

燕麦根际有机磷细菌的分离及其有关生理特性的研究

郑红丽, 周晓荣, 樊明寿*

(内蒙古农业大学农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要: 从内蒙古四子王旗燕麦根际土壤分离获得 5 株具有解磷能力的细菌, 从中筛选出 2 个解磷能力相对较强的菌株, 对其形态学特征进行了观察, 并比较了不同碳源、盐浓度、pH 等环境条件对其生长的影响。结果表明, 2 个菌株特别是 YM-2 具有较强的耐盐性; 适宜生长的介质 pH 为中性偏碱性; 葡萄糖是最好的碳源。随着有机磷细菌的生长繁殖, 介质 pH 会逐渐降低, 泌酸以及耐盐等特性对改善种植于盐渍化土壤的燕麦磷营养极为有利, 因此从燕麦根际得到的 2 株有机磷细菌(YM-2, YM-4)值得进一步研究并开发利用。

关键词: 有机磷细菌; 分离; 形态特征; 环境因素
中图分类号: S144.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2007)05-0001-06

作为植物的重要组成成分, 磷是植物生长发育与新陈代谢必不可少的大量元素。尽管土壤中的总磷含量并不低, 但在绝大部分农田土壤中可被植物吸收利用的活性磷却普遍缺乏, 我国农田约 2/3 严重缺磷^[1]。除了土壤中的难溶性矿质磷酸盐不能被植物直接利用以外, 土壤中还存在着许多作物难以直接利用的卵磷脂、核酸、植素等有机态磷。磷素中约 1/3~1/2 是有机磷, 东北地区黑土中的有机磷甚至占总磷的 60% 以上^[2]。尽管不同地区、不同施肥水平和栽培条件下, 土壤有机磷含量存在差异, 不可能用 60% 或 1/2 全面而准确反映各种土壤的有机磷含量, 但有机磷毫无疑问是土壤磷库的重要组成部分。据统计, 从 1949 年到 1992 年间, 我国累计施入农田的磷肥有 7 880.9 万 t(P₂O₅), 其中大约有 6 000 万 t(P₂O₅) 积累在土壤中没有被利用^[2]。因此, 如何将土壤中这种潜在的磷充分利用起来是土壤与植物营养学科的一个具有重要实践价值的研究课题。研究表明, 土壤中存在很多具有解磷能力的微生物, 如芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 等^[3], 而且这些细菌中有一些能够通过其生理活动将土壤含磷有机化合物分解并将磷释放出来以满足作物需要^[3~6]。由此可见, 研究这些微生物转化有机磷的规律并对其开发利用显得十分必要。早在 1958 年 Sperber 就发现土壤中大部分解磷微生物都

存在于植物根际^[7]。Kabznelson 等在 1962 年进一步发现玉米、红三叶草、亚麻、小麦、黄桦树苗根际解磷细菌明显高于非根际土壤^[8]。之后, 世界许多国家的研究人员纷纷开始研究植物根际的各种解磷细菌的群落生态、解磷能力并尝试接种应用^[4, 8~15]。Asea 等许多研究小组均发现接种磷细菌对作物生长的促进效果^[16, 17]。Chabot 等发现在中等肥力和低肥力的土壤上接种 *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* R1, 玉米和莴苣吸收磷量分别增加了 8% 和 6%^[15]。在石灰质土壤上接种 *P. bilaji*, 小麦植株干物重增加了 16%, 吸收磷量增加了 14%, 磷矿粉存在时, *P. bilaji* 增加磷吸收量 11%^[16]。在我国, 赵小蓉等对不同生态环境中解磷细菌的分布, 特别是玉米、小麦根际土壤分解有机磷的细菌种类进行了调查研究, 结果表明冬小麦根际土壤分解有机磷的细菌时共发现四个属, 主要是假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 非根际土壤只发现两个属, 大部分是芽胞杆菌属; 玉米根际土壤发现有 7 个有机磷细菌菌属, 主要是假单胞菌属和黄杆菌属, 而非根际土壤只有 4 个有机磷细菌菌属^[5, 18, 19]。郜春花等用自行分离筛选的 B2 和 B67 解磷细菌制成解磷菌剂, 进行小麦、玉米、甘蓝、青菜等作物的盆栽和大田对比试验, 发现解磷菌剂增产效果显著, 而且有提高土壤速效磷含量、培肥土壤的作用^[20]。虽然接种应用受土壤其他微生物、pH、温度、湿度等众多环境因素的影响, 在应用方面目前还存在许多技术上的问题,

收稿日期: 2007-01-31
基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(200208020302, 200607010302)
作者简介: 郑红丽(1966—), 女, 内蒙古土默特左旗人, 副教授, 在职博士, 主要从事农业微生物的教学和科研。
* 通讯作者: 樊明寿, E-mail: fmswh@yahoo.com.cn

但解磷细菌的潜在作用已被充分认识。燕麦是我国西北以及华北地区的重要粮食作物,由于其营养价值正引起人们的高度关注,种植面积近年来逐渐增加,但燕麦根际是否存在有机磷细菌目前还未见任何报道。本课题组从内蒙古四子王旗地区燕麦根际土壤进行了有机磷细菌的分离,并对其形态特征和生理特性进行观察研究,以期为进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 取 样

用于有机磷细菌分离的燕麦根际土壤采自于内蒙古四子王旗的燕麦田,2005 年于燕麦旺盛生长的 6 月下旬,随机选取 3 块燕麦田,土壤平均 pH 7.8,有机质含量为 1.48%,全氮量为 0.082%,速效磷为 42 mg/kg,速效钾为 101 mg/kg。将燕麦根系挖出(30 cm),抖落根系土壤并将其收集,带回实验室分析。

1.2 方 法

1.2.1 培养基的制备 基础培养基组成为:2.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g K_2HPO_4 , 1 000 ml 蒸馏水。

蒙金娜卵磷脂培养基组成为:10 g 葡萄糖, 0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.3 g NaCl , 0.3 g KCl , 0.3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5.0 g CaCO_3 , 卵磷脂, 琼脂 15~18 g, 水 1 000 ml, pH 7.0~7.5。其中,卵磷脂的制备方法为:在无菌室内,用酒精消毒棉球擦净鸡蛋外壳。用注射器从鸡蛋中抽取蛋黄置于灭菌的空三角瓶中,加入等量的生理盐水充分摇匀,制成蛋黄液(不要混有蛋清)。用无菌吸管吸取 3 ml 蛋黄液加入已融化的培养基中(培养基温度不宜过高,约在 45℃ 左右加入蛋黄液较适宜),充分混匀后倒平板。

保存培养基(形态学特征观察、pH 值的测定、耐盐性测定都用此种培养基)为牛肉膏蛋白胨培养基^[21]。

1.2.2 有机磷细菌的分离纯化 分别称取燕麦根际土壤 10 g 放入盛有 90 ml 无菌水的三角瓶中,置于摇床摇 30 min,用移液枪吸取 1 ml 的土壤悬浮液于盛有 9 ml 无菌水的试管中,充分振荡,再从该试管中吸取 1 ml 土壤悬浮液于下一支试管中,混匀,依次类推,稀释成不同梯度(10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6})。在蒙金娜卵磷脂基上涂平板,每个梯度重复 3 次,待长出菌落并经纯化后转接于牛肉膏

蛋白胨斜面培养基上保存备用。

1.2.3 有机磷细菌的筛选 将分离获得的菌株分别制成菌悬液涂于蒙金娜卵磷脂培养基的平板上,在 28℃ 条件下培养 5 d,据菌落周围透明圈的大小筛选出解磷能力相对较强的菌株用于进一步的研究。

1.2.4 有机磷细菌的形态学特征观察 在牛肉膏蛋白胨培养基上接菌,在 28℃ 条件下培养 24 h,简单染色法染色后,在油镜下观察菌体形态并借助测微尺测量菌体大小,同时进行革兰氏染色反应观察;培养 48 h 染色后进行芽孢、荚膜的观察。

1.2.5 不同 pH 值条件下菌株生长情况的观察 取牛肉膏蛋白胨培养液,分装于 50 ml 的小瓶中,每瓶装 30 ml,调节 pH 值分别为 5、6、7、8、9,每个 pH 值设 3 个重复。灭菌后,在每个小瓶中分别接入 3 ml 的菌悬液,并且每一个 pH 值都设置 1 个对照(接种等量的死菌),在 28℃ 条件下培养 36 h,用 752 型紫外分光光度计测量透光率。

1.2.6 耐盐性的测定 将牛肉膏蛋白胨培养液中 NaCl 的浓度分别设为 1%、5%、10%,分装于 50 ml 小三角瓶中,每瓶装 30 ml,每个盐浓度设 3 个重复,灭菌后,分别接入 3 ml 的菌悬液,并且设置不同盐浓度的对照(接种等量的死菌)。在 28℃ 条件下培养 36 h,用 752 型紫外分光光度计测量透光率。

1.2.7 碳源利用情况的比较 在 350 ml 基础培养基中,分别用葡萄糖、蔗糖、乳糖、淀粉作为 C 源,糖浓度为 1%,制成 4 种培养液,分装于 100 ml 的三角瓶中,每瓶 50 ml,灭菌后,接入 3 ml 供试菌株的菌悬液,并且每种培养基都设置 1 个对照(接种等量的死菌)。在 28℃ 条件下培养,每隔 12 h 用 752 型紫外分光光度计测定 1 次透光率,每隔 24 h 用 pH S-25 型 pH 计测定 1 次 pH 值。

2 结果与分析

2.1 有机磷细菌的分离纯化及筛选

经初步分离,从内蒙古四子王旗燕麦根际土壤获得 5 个具有分解有机磷能力的菌株,分别命名为 YM-1、YM-2、YM-3、YM-4 和 YM-5。对分离出的菌株,进行进一步筛选培养,根据蒙金娜卵磷脂培养基菌落周围透明圈与菌落直径比的大小筛选出解磷能力相对较强的菌株 YM-2 和 YM-4 (图 1)。

2.2 有机磷细菌的形态学特征

两个菌株的形态学特征如图 2 所示,进一步的特征描述列入表 1。

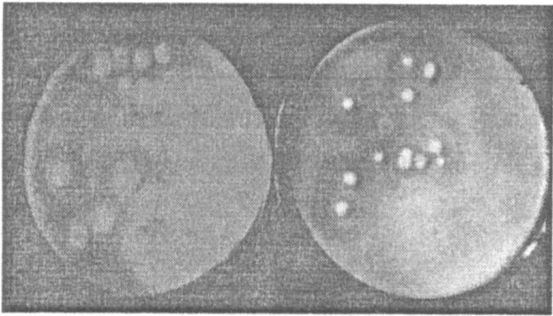


图 1 菌株的菌落特征比较(左图为 YM-2、右图为 YM-4,培养时间 5d)

Fig.1 Colonies of strain YM-2(left) and YM-4(right) after 5 days of culture

2.3 pH 值对菌株生长的影响

用分光光度计测得的细菌培养液透光率可较准

确地反映培养液细菌浓度或生长繁殖速度的变化,即透光率越大说明细菌浓度越低或繁殖速度越慢。将 YM-2、YM-4 接种于不同 pH 的牛肉膏蛋白胨培养液,经过一段时间的培养后,测定透光率变化。图 3 表明 pH 值在 5 到 6 的范围内,菌株 YM-4 培养液的透光率没有显著变化,均保持在 95%以上与对照没有显著差异。当 pH=7 时,透光率开始显著降低,当 pH 值继续升高到 8 时,菌株培养液的透光率降到最低,pH 值大于 8 时,透光率又开始上升,当 pH=9 时,基本接近对照的 100%。YM-2 菌株的表现与 YM-4 相似,在介质 pH=5 时生长很微弱,随着介质 pH 的增高,透光率降低,pH=7~8 时,透光率降到最低,之后,透光率又随 pH 的增加而增加。说明两个菌株在中性偏碱性条件下生长较好,

表 1 有机磷细菌菌株的形态学特征

Table 1 Morphological characters of 2 strains of organic P decomposing bacteria

菌株号 No. strain	形态 Bacterium shape	菌体大小 Bacterium size (μm)	革兰氏反应 Gram reaction	芽孢 Spore	荚膜 Capsule	运动性 Movement	菌落特征 Colony character
YM-2	杆状 Rod-shaped	0.5~1.0× 1.5~4.8	G ⁺	在中部产生芽孢且较大,菌体两端稍尖。	无 None	无 None	生长初期菌落乳白色,表面光滑平坦,后期菌落表面有多层轮纹。
YM-4	杆状 Rod-shaped	0.8~1.1× 1.8~5.0	G ⁺	在中部产生芽孢,菌体两端平截。	无 None	无 None	初期菌落表面光滑凸起,后期产生粘稠物质,并且从四周开始褶皱。

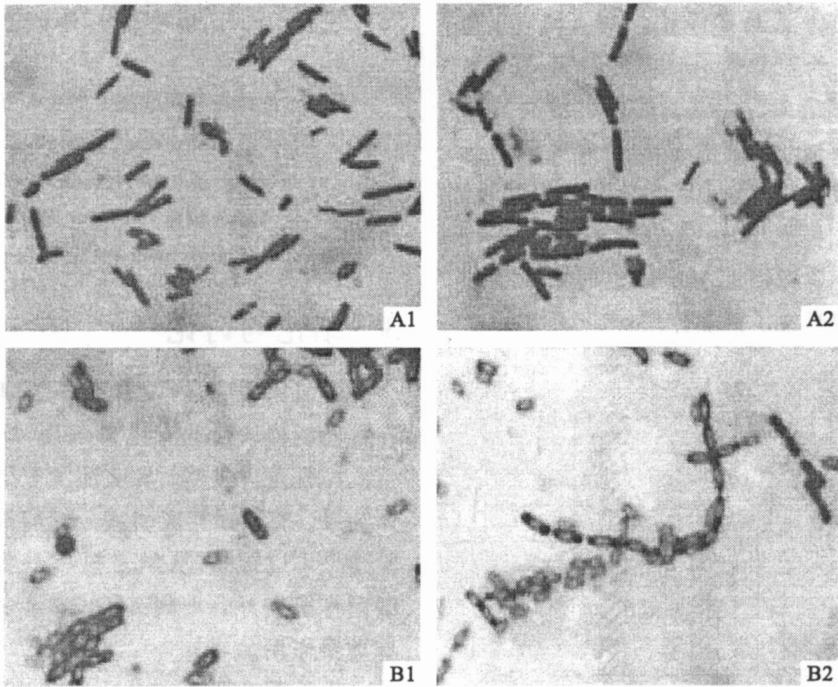


图 2 菌株的菌体形态及其芽孢(培养时间为 48h,照片放大倍数 100×10)

Fig.2 Shapes of the bacteria and their spores after 48 hours of culture

A1,YM-2 的菌体;A2,YM-4 的菌体;B1,YM-2 芽孢;B2,YM-4 的芽孢

A1, strain YM-2; A2, YM-4; B1, spore for YM-2; B2, spore for YM-4. Amplification ratio, 100×10

而在酸性或强碱性条件下,其生长均基本停止,但在 pH=6~9 范围内,YM-2 菌株的生长量远大于菌株 YM-4。随着培养时间的延长,两个菌株的培养介质 pH 均逐渐下降。如,YM-2 经过 96 h 培养,介质 pH 值降低近 1 个单位。这与林启美等(2000)的研究结果是一致的^[5]。

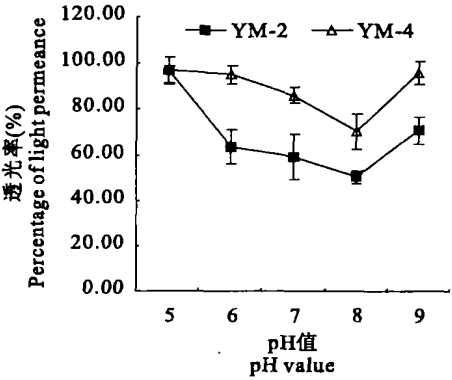


图 3 培养基 pH 值对菌株透光率的影响

Fig.3 Affect of medium pH on bacteria growth expressed as percentage of light permeation of bacterial liquor

2.4 菌株耐盐性的测定

图 4 表明,在 1% 的盐浓度条件下,透光率很低,说明菌液浓度较大,即 1% 的盐浓度没有抑制 YM-2 的生长,随着 NaCl 浓度的增加,透光率逐渐增加即生长量逐渐减少,在 10% 的盐溶液中,透光率接近 100%,表明生长基本停止。而 YM-4 在 1% 的盐溶液中其生长就受到了较大的限制,在 5% 的盐浓度下,其菌液透光率与 1% 的情形没有显著差别,但明显高于 YM-2 菌液在该盐浓度下的透光率。说明 YM-2 比 YM-4 具有较高的耐盐性。在 10% 的盐浓度条件下,YM-4 生长量与 YM-2 没有显著差异,透光率均接近 100%,这是由于盐浓度太高,对两菌株均产生了抑制作用。

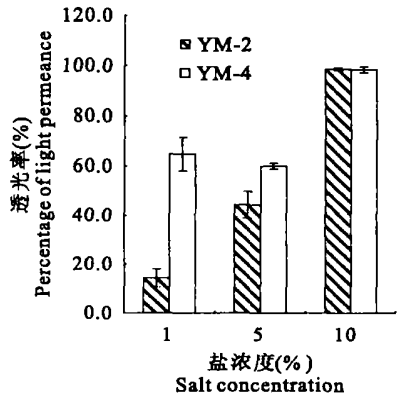


图 4 盐浓度对菌株透光率的影响

Fig.4 Affect of salt concentration on bacteria growth expressed as percentage of light permeation of bacterial liquor

2.5 不同碳源对菌株生长的影响

从图 5 可知,YM-2 与 YM-4 均在以葡萄糖为碳源的培养基中生长最好。另外,YM-4 也能较好地利用蔗糖。2 个菌株对乳糖和淀粉的利用能力均较差。不论何种碳源,随培养时间延长,介质 pH 均降低(图 6)。

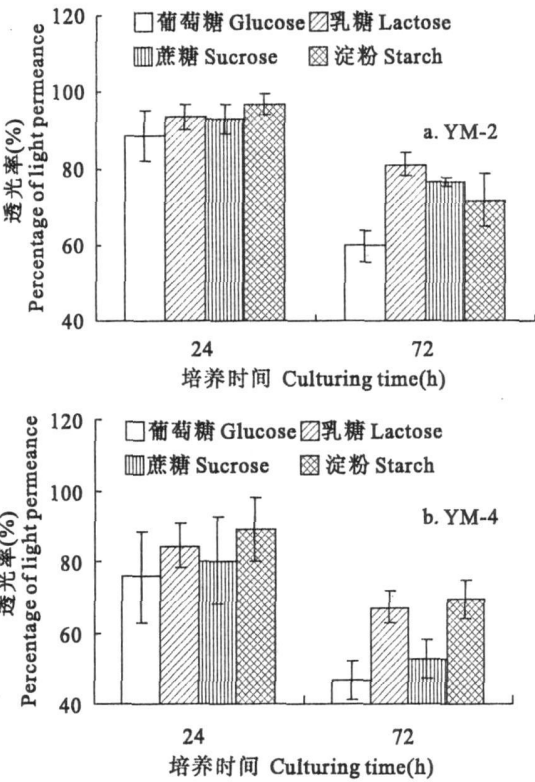


图 5 菌株在不同碳源上的生长情况(透光率 T)

Fig.5 Affect of carbon resources on bacteria growth expressed as percentage of light permeation of bacterial liquor

注:上图为 YM-2,下图为 YM-4。

Note:The up is for strain YM-2, the down for YM-4.

3 结论与讨论

本研究表明,内蒙古四子王旗地区燕麦根际存在解磷能力较强的有机磷细菌,均为杆状无荚膜革兰氏阳性菌。虽然,目前还没有得到接菌试验的具体结果,但根据其实验室分解卵磷脂能力较强的试验结果可以推断,从燕麦根际土壤分离得到的解磷细菌可能在分解土壤有机磷改善植株磷营养方面起着重要作用。

由于两个菌株在中性到偏碱性环境中生长好于酸性条件,所以其可能为北方石灰性土壤所特有,当然这需要对菌种进行进一步的鉴定。另外,2 株有机磷细菌均具有一定耐盐能力(特别是 YM-2)。这些特性可能对改善燕麦的磷营养有利,因为燕麦

具有一定的耐盐碱性,因此常被种植于轻度盐渍化土壤,在这样的土壤中,无机磷多呈难溶性状态,难以被植物利用,如果有机磷细菌可以大量生长繁殖,

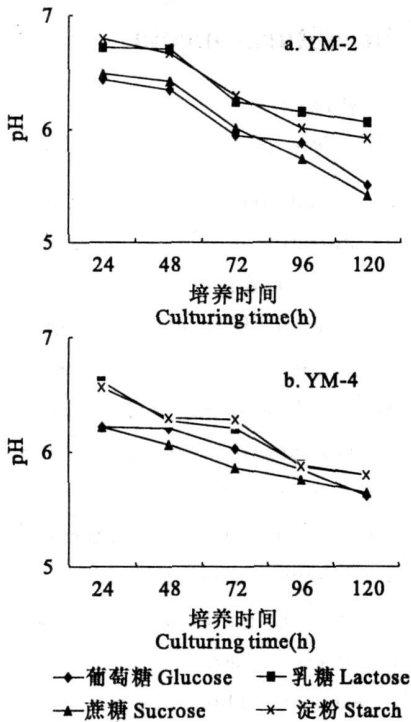


图 6 不同 C 源供应对菌株生长介质 pH 的影响
Fig. 6 Affect of carbon resources on pH of bacteria media

必然会分解土壤中存在的有机磷从而为植物提供有效磷素。大量研究证明,土壤 pH 降低有利于石灰性土壤难溶性磷的溶解,Hedley (1982)的试验表明,pH 降低 2.4 个单位,土壤中可溶性磷的浓度增加 10 倍^[22]。本研究发现,两个菌株的生长均使介质 pH 逐渐下降,因此,植物根际这些有机磷细菌的大量繁殖,不仅有利于土壤中有有机磷的分解,而且有利于难溶性无机磷的溶解。这对改善燕麦的磷素营养极为有利。解磷菌株的分离以及生理特性的研究,其最终目的是开发利用。不同碳源的培养结果表明,2 株有机磷细菌均对葡萄糖的利用最佳。这一结果也为菌株大规模扩繁利用提供了重要信息。

参考文献:

[1] 李继云,刘秀娣,周伟,等.有效利用土壤养分元素的作物育种新技术研究[J].中国科学(B辑),1995,25(1):41-48.
[2] 鲁如坤,刘鸿翔,闻中大,等.我国典型地区农业生态系统养分循环和平衡研究 III.农田养分平衡的评价方法[J].土壤通报,1996,27(5):197-199.
[3] 唐勇,陆玲,杨启银,等.解磷微生物及其应用的研究进展

[J].天津农业科学,2001,7(1):1-5.
[4] Molla M A Z, Chowdhury M A. Microbial mineralization of organic phosphate in soil[J]. Plant and Soil, 1984, 78(1): 393-399.
[5] 林启美,赵小蓉.四种不同生态环境中解磷细菌的数量及种群分布[J].土壤与环境,2000,9(1):34-37.
[6] 赵晓蓉,林启美.微生物解磷的研究进展[J].土壤肥料,2001(3):7-11.
[7] Sperber J I. The incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere and soil[J]. Aust J Agric Res, 1958, (9): 778-781.
[8] Kabznilson H, Peterson E, Rouatt J W. Phosphate-dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants[J]. Canadian Journal of Botanic, 1962, 40(9): 1181-1186.
[9] Sundara Racand W B, Sinha M K. Phosphate dissolving microorganisms in the rhizosphere and soil[J]. India J Agric sci, 1963, 33(4): 272-278.
[10] Paul N B, Sundara Rao W B. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes[J]. Plant and Soil, 1971, 35: (3): 127-132.
[11] Kucey R M N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin alberta soils[J]. Canadian Journal of Soil Science, 1983, 63: 671-678.
[12] Elliott J M, Mathre D E, Sands D C. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat [J]. Appl Enoron Microbiol, 1987, 53(2): 2793-2799.
[13] Mundryk Z J. Decomposition of organic and solubilization of inorganic phosphorus compounds by bacteria isolated from a marine sandy beach[J]. Marine Biology, 2004, 145: 1227-1234.
[14] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils [J]. Soil Biology & Biochemistry, 1992, 24(2): 389-395.
[15] Chabot R, Antoun H, Cescas M P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* [J]. Plant and Soil, 1996, 184: 311-321.
[16] Asea P E A, Kucey R M, Stewart J W B. Inorganic phosphate solubilization by two penicillium species in solution culture and soil[J]. Soil Biol Biochemical, 1988, 20(4): 459-464.
[17] Raj J, Bagyaraj D J, Manjunath A. Influence of soil inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhiza and a phosphate dissolving bacterium on plant growth and ³²P-uptake [J]. Soil Biol Biochem, 1981, 13: 105-108.
[18] 赵小蓉,林启美,孙焱鑫,等.玉米根际与非根际解磷细菌的分布特点[J].生态学杂志,2001,20(6):62-64.
[19] 赵小蓉,林启美,孙焱鑫,等.小麦根际与非根际解磷细菌的分布[J].华北农学报,2001,16(1):111-115.
[20] 郜春花,王岗,董云中,等.解磷菌剂盆栽及大田施用效果[J].山西农业科学,2003,31(3):40-43.
[21] 周德庆.微生物实验教程[M].北京:高等教育出版社,2006.
[22] 樊明寿,张福锁.植物磷吸收效率的生理基础[J].生命科学,2001,13(3):129-131.

Isolation of organic-phosphorus-dissolving bacteria in rhizosphere of oat (*Avena nuda* L.) and their growth in cultural media

ZHENG Hong-li, ZHOU Xiao-rong, FAN Ming-shou^{*}

(College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010019, China)

Abstract: Organic phosphorus is an important P source in soil, but it is not able to be used by plant directly. Therefore, decomposing of organic phosphorus in soil is essential to its utilization by plants. Enhancing the decomposing of organic phosphorus in soil is of great significance in agriculture, and it has become a hot research topic in plant nutrition. Oat is an important crop in Inner Mongolia, phosphorus bioavailability is often a limiting factor for oat production. The main purpose of this research is to investigate if there is any bacteria in the rhizosphere of oat, which can dissolve the organic phosphorus. The results showed that five strains of organic-phosphorus-dissolving bacteria were isolated from rhizospheres of oat in Siziwang Inner Mongolia. Two of them with higher capacity of dissolving organic phosphorus were selected for further study on their morphology and growth. Both YM⁻⁴ and YM⁻² are bacilli without capsule and positive in gram reaction, after 4~5 days of culture, they all produced spores. Two strains, especially strain YM⁻² proved tolerant to salt in the experiment and grow well in media with 1% NaCl. The data on effects of different pH on the bacteria growth showed that neutral or alkaline culture media is preferred by the bacteria, acid media is not good for their growth. Along with the growth of both strains of bacteria, the media pH gradually decreases. This implies that growth and propagation of these two strains of bacteria in the soil can not only dissolve organic phosphorus, but probably also enhance the solubility of inorganic phosphates in alkine soil and therefore benefit P absorption by oat, which are usually planted in alkine soil. This suggests the strains of bacteria isolated from rhizosphere of oat may have great potential for use in practice. In this research, sorts of carbon resources were also compared in cultural media, the result showed that glucose is better than starch, sucrose, and lactose for the bacteria growth. This is important for selecting C resource when conducting propagation of the bacteria, and it also provides important information for utilization of these strains.

Keywords: organic-phosphorus-dissolving bacteria; isolation; morphology; environmental factors