

甘肃省河西高钙土溶磷菌筛选及其溶磷能力初步研究

李娟¹, 王文丽¹, 卢秉林¹, 郭天文²

(1. 甘肃省农科院土壤肥料与节水农业研究所, 甘肃 兰州 730070;

2. 甘肃省农科院旱地农业研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 采用无机磷固体培养基从甘肃省河西高钙土中分离出具有解磷能力的菌株 16 株, 测定了各初选菌株溶磷能力。16 株溶磷菌株的 D/d 值(溶磷圈直径 D 与菌落直径 d 的比值)范围在 1.24~5.4 之间, 有效溶磷量在 7.6~356.2 mg/l 之间, 均具有一定溶磷作用。其中, P3-16、P3-28 菌株在液体培养条件下的有效溶磷量均显著高于其他菌株, 解磷率达 7.22%、6.67%, 为进一步研制适合高钙土土壤环境的磷细菌肥料提供优质菌种。

关键词: 解磷菌; 高钙土; 解磷能力

中图分类号: S144.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2008)02-0007-04

磷是植物生长发育不可缺少的大量营养元素之一, 是植物的重要组成成分。世界上绝大部分农业土壤缺磷(总磷不缺, 活性磷缺)^[1], 就我国而言, 74%的耕地土壤缺磷, 土壤中 95%以上的磷为无效磷^[2,3]。施入的磷肥当季利用率为 5%~25%, 大部分磷与土壤中的 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 结合形成难溶性磷酸盐^[2], 不能被植物利用。

甘肃省的河西地区灌溉耕地面积达 130.24 万 hm^2 ^[4], 土壤类型属灌漠土, 土壤中钙的含量较高, 而速效磷含量极低, 钙的含量极大地影响着磷的有效性, 随着碳酸钙含量的增加, 磷的有效性降低^[5]。甘肃省金昌市土壤中钙的含量高达 14 500~18 850 $\mu\text{g/mL}$ ^[6], 是甘肃中部土壤钙含量的 5~10 倍。在该土壤上施用大量磷肥(如 450 $\text{kg P}_2\text{O}_5/\text{hm}^2$)也无明显增产效果, 而栽培作物却表现出明显的缺磷症状。这可能是土壤中钙对磷酸盐的吸附固定造成的。大量的研究结果证明, 土壤存在着大量的解磷微生物(Phosphate-solubilizing microorganisms, PSM)^[1], 能够依靠自身的代谢产物或其他生物协同溶解土壤中的难溶无机磷, 将植物难以吸收利用的磷转化为可吸收利用的形态, 这种微生物对土壤磷的转化和有效性影响很大。本研究从高钙土分离了 16 株溶磷细菌, 并对 16 株细菌的溶磷能力做了一个初步的研究, 为进一步研制磷细菌肥料的提供优良的菌种。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 2005 年 6 月分别采集张掖小麦、金昌小井子大麦、油葵、武威白云村小麦、玉米、民勤西瓜的根际土壤。

1.1.2 培养基 用于测定无机磷细菌溶磷能力的液体培养基(PKO)^[7]: 葡萄糖 10 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, 磷酸钙 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.5。

溶磷菌分离所用的固体培养基除了加入 15 g 琼脂粉以外其余同上。

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母浸体物 5 g, NaCl 10 g, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 溶磷菌的分离与纯化 溶磷菌的分离采用常规的 10 倍稀释法稀释样品, 分别吸取浓度为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的稀释液 0.1 mL 均匀涂抹在无菌的 PKO 平板上, 在 28℃ 培养 7 d, 选择具有透明圈的菌落进行分离纯化。

1.2.2 溶磷菌株初选 观察溶磷圈: 将 PKO 无机磷培养基制作成平板, 解磷菌制备成菌液, 用接种针 在无菌条件下每板点植三个点, 于 28℃ 下培养 7~10 d, 观察有无溶磷圈生成, 测定溶磷圈直径(D)、

收稿日期: 2007-06-26; 修改日期: 2007-10-10

基金项目: 甘肃省科技攻关项目“甘肃省主要农作物根际有益微生物的筛选与应用”; 甘肃省自然科学基金项目“河西高钙土高效解磷菌的筛选及其在土壤中溶磷效应的研究”

作者简介: 李娟(1971—), 女, 甘肃省永登人, 助理研究员, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: lijuanh@126.com。

菌落直径(d),根据能否产生溶磷圈判断菌株有无溶磷能力,根据(D/d)值大小来初步确定菌株的溶磷能力^[8]。

1.2.3 摇瓶复选 ①取活化后的供试菌株斜面试管在无菌条件下,用接种环沾取 2 环转接到装有 50 mL 无菌液体培养基(一级发酵培养基)的三角瓶中,29℃恒温振荡(190 r/min)2~3 d,镜检菌株的纯度及用 LB 平板测定发酵液得到活菌浓度。②二级发酵。将 PKO 液体培养基分装在 100 mL 的三角瓶中,每瓶 50 mL,121℃灭菌 30 min 后,每瓶接种培养好的一级发酵液 2 mL,另留不接种者作对照,试验重复 3 次,在 28℃(190 r/min)恒温振荡培养 7 d 后。离心(4800 r/min)15 min,取适量上清液,测其磷含量、pH 值。上清液含磷量用钼锑抗比色法^[9]测定,pH 值用 PHS-25 酸度计测定。

解磷率计算方法:解磷率=(发酵液磷含量-对照溶液磷含量)×溶液体积(0.05 L)/加入磷酸钙量(250 μg)×100%

2 结果与分析

2.1 不同高钙土壤中溶磷菌的分离与筛选

根据 PKO 平板上有无溶磷圈,筛选出 16 株溶磷菌,其中武威玉米根际分离出 4 株,小麦根际分离出 2 株,金昌大麦根际分离出 3 株,油葵根际分离出 3 株,民勤西瓜根际分离出 2 株,张掖小麦根际分离出 2 株。

2.2 溶磷菌在固体培养基上的溶磷效果

溶磷圈直径(D)与菌落生长直径(d)的比值

(以几次测定结果的最大值为准)是表征溶磷菌的相对溶磷能力的一个指标^[10]。对分离纯化得到的 16 个细菌菌株,用溶磷圈法对其溶磷能力进行测定(见表 1),16 株细菌菌株中,溶磷效果极好的(D/d 值 ≥ 4)有 1 株,溶磷效果好的($2\leq D/d<4$)有 4 株,占细菌菌株总数的 25.0%;溶磷效果较好的($1.5\leq D/d<2$)有 6 株,占 37.5%;溶磷效果较差的($D/d<1.5$)有 5 株,占 31.25%。对 $D/d\geq 2$ 的 5 个菌株,将作为重点菌株,在以后的实验中,研究它们的溶磷能力、溶磷机理以及生理生化特性和促生特性;对 $1.5<D/d<2$ 的 6 个菌株,作为发展潜力较大的菌株保存。

2.3 液体培养基中解磷细菌溶解无机磷效果

将 16 株解磷细菌分别单独接种到液体培养基中培养 6 d 后,测定其上清液有效性磷含量。表 2 结果表明,16 株解磷细菌,对磷酸钙都有一定的溶解作用。各解磷菌株之间溶解磷酸钙的能力不同,其有效磷含量在 87.02~429.82 mg/L 范围之间,与不接菌对照相比,增量在 7.6~356.24 mg/L 之间,增幅达 18.27%~484.15%,其中增幅大于 200%的菌株有 11 株,培养液中磷含量最高的为 P3-16,其培养液中的浓度为 429.82 mg/L,比对照增加 484.15%,它的解磷率达 7.12%;其次菌株 P3-28 的培养液的磷含量为 413.28 mg/L,比对照增加 461.67%,解磷率达 6.79%。实验表明在进行供试的 16 株解磷菌中,菌株 P3-16、菌株 P3-28 对磷酸钙的解磷效果最好。

表 1 几种细菌的 D/d 值
Table 1 D/d value of bacterium in different days

菌株编号 Strain No.	第四天 The fourth day	第六天 The sixth day	第八天 The eighth day	D/d 最大值 The largest D/d value
P3-1	1.74	1.74	1.61	1.74
P3-11	1.77	1.80	1.54	1.80
P3-12	2.00	1.88	1.63	2.00
P3-13	1.32	1.75	2.01	2.01
P3-14	1.04	1.45	1.48	1.48
P3-15	2.56	1.88	2.38	2.56
P3-16	1.73	2.10	1.88	2.10
P3-17	1.22	1.24	1.17	1.24
P3-18	1.66	1.54	1.76	1.76
P3-19	0	0.00	1.33	1.33
P3-21	1.29	2.18	2.19	2.19
P3-22	0	4.53	5.40	5.40
P3-23	1.38	1.25	1.44	1.44
P3-26	1.46	1.27	1.19	1.46
P3-27	1.28	1.47	1.87	1.87
P3-28	1.73	2.25	2.20	2.25

在磷含量增幅大于 200%、小于 400% 的 11 个菌中,其中的 10 个菌株,溶磷效果较好,其磷含量在 224.64~273.31 mg/L 之间,解磷率在 3.02%~3.99%。结果表明,P3-16、P3-28 解磷效果好,可以考虑作为研制微生物肥料的重点菌种,其余 13 株还需进一步筛选才能用来制作生物肥料。

2.4 细菌培养液中磷含量与 pH 的关系

从表 2 可以看出,各菌株培养 6 d 以后,相对于对照培养液的 pH 值,培养液 pH 值均降低,其 pH 值在 3.81~5.61 之间,培养液中有效磷增加幅度大于 200% 的 13 株菌株的 pH 值则集中于 3.81~5.53 之间。说明这些细菌在培养过程中,能够分泌一些酸

性物质,导致 pH 值下降。许多研究者也发现:培养基质酸度的提高,是微生物溶磷的重要表征之一。这说明溶磷微生物在其代谢过程产生了大量的致酸物质,如质子和有机酸,质子能够与磷矿粉中的离子发生交换反应,有机酸能够与钙、镁、铁等发生沉淀、络合甚至螯合反应,从而使磷矿粉溶解,磷酸根释放出来^[11]。综合分析 15 株溶磷菌培养 6 d 后其有效磷增量与培养液 pH 值之间的关系时发现,两者之间存在一定的相关性: $Y_{\text{溶磷量}} = -147.4X_{\text{pH}} + 983.73(r^2 = 0.5469)$,但是相关性不显著。说明溶磷量与培养液的 pH 之间无明显的相关性。

表 2 不同菌株对磷酸钙的解磷率及 pH 的影响

Table 2 Effects of different strain on P soluble rate of calcium phosphate and pH

菌株编号 Strain No.	溶液中磷含量 P content in nutrient solution (mg/l)	比 CK 增加 Higher than CK (%)	解磷率 Phosphorus-dissolving rate (%)	发酵液 pH pH of nutrient solution
P3-1	261.63 ^{bc}	255.57	3.76	5.34
P3-11	273.31 ^b	271.45	3.99	5.25
P3-12	233.40 ^{def}	217.21	3.20	5.08
P3-13	240.70 ^{cde}	227.13	3.34	4.99
P3-14	224.64 ^{ef}	205.30	3.02	4.77
P3-15	87.02 ^h	18.27	0.27	5.77
P3-16	429.82 ^a	484.15	7.12	4.35
P3-17	238.76 ^{cde}	224.49	3.30	5.16
P3-18	252.38 ^{bcd}	243.00	3.58	4.83
P3-19	122.45 ^g	66.42	0.98	5.36
P3-21	124.49 ^g	69.19	1.02	4.86
P3-22	236.81 ^{de}	221.84	3.26	5.53
P3-23	210.53 ^f	186.12	2.74	5.31
P3-26	256.28 ^{bcd}	248.30	3.65	5.28
P3-27	264.55 ^b	259.54	3.82	5.38
P3-28	413.28 ^a	461.67	6.79	3.81
CK	73.58 ^h	—	—	5.63

3 结 论

本研究中采用了两种方法对分离的 16 株溶磷菌的溶磷能力进行了测定,16 株溶磷菌对磷酸钙均有一定的溶解作用,在固体培养剂上它们的溶磷圈直径与菌落直径比值在 1.24~5.4 之间,在液体培养解磷能力试验中,16 株解磷细菌中各解磷菌株之间溶解磷酸钙的能力不同,其有效磷含量在 87.02~429.82 mg/l 范围之间,与不接菌对照相比,增量在 7.6~356.24 mg/l 之间,增幅达 18.27%~484.15%,其中,菌株 P3-16、菌株 P3-28 对磷酸钙的解磷效果好,其培养液中的浓度分别为 429.82、

413.28 mg/l,比对照分别增加 484.15%、461.67%,它的解磷率达 7.12%、6.79%,可以作为微生物肥料研制的重点菌种。本试验中采用两种方法测定溶磷菌株溶解无机磷的能力,两种方法测定的结果不完全相同。有些菌株在平板上溶磷圈很大,但在液体培养时溶解无机磷的能力却不强,反之亦然。许多研究表明,绝大多数的溶磷微生物在固体培养基上不显现溶磷圈。通过在固体培养基观察溶磷圈的这种方法来判断溶磷菌的解磷能力,有一定的局限性;液体培养可能是更为合理的方法。

在液体培养基中接种 16 种溶磷菌,经过 6 d 后,液体培养液的 pH 均下降,表明溶磷菌在生长过

程中产生酸性物质。林启美等研究发现解磷菌能够分泌甲酸、乙酸、丙酸、乳酸、反丁烯二酸、琥珀酸、苹果酸、丙二酸等,这些酸一方面使培养液的 pH 下降^[12],但解磷数量与分泌的有机酸总量之间相关性很低。本试验中也证明溶磷量与 pH 之间没有显著的相关性,这与林启美等的研究结果相一致。

参 考 文 献:

[1] 赵小蓉,林启美.微生物解磷的研究进展[J].土壤肥料,2001,(3):7—11.
[2] 吴 平,印莉萍,张立平.植物营养分子生理学[M].北京:科学技术出版社,2001.103—104.
[3] 邵宗臣,赵美芝.土壤中积累态磷活化动力学的研究 I. 有机质的影响[J].土壤学报,2002,39(3):318—325.
[4] 甘肃省土壤普查办公室.甘肃土壤[M].北京:农业出版社,489.

[5] 华东师范大学生物系植物生理教研组.磷肥的施用.植物营养原理[M].南京:江苏科学技术出版社,299.
[6] 加拿大钾磷研究所北京办事处.土壤养分状况系统研究法[M].北京:中国农业科技出版社,1992.
[7] 许光辉.土壤微生物分析方法手册[M].北京:农业出版社,246—248.
[8] 田 宏,李凤霞,张德罡,等.草坪草溶磷菌筛选及溶磷能力的初步研究[J].草业科学,2005,22(10):92—96.
[9] 南京农业大学.土壤农化分析[M].北京:农业出版社,1981.71—74.
[10] 范丙全,金继运,葛 诚,等.溶磷草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究[J].中国农业科学,2002,35(5):525—530.
[11] 冯瑞章,冯月红,姚 拓,等.春小麦和苜蓿根际溶磷菌筛选及其溶磷能力测定[J].甘肃农业大学学报,2005,10(5):604—608.
[12] 林启美,王 华,赵小蓉,等.一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探[J].微生物学通报,2001,28(1):26—30.

Selection and measurement of phosphate-solubilizing micro-organisms and their phosphate-dissolving ability in high calcium soil of Hexi corridor in Gansu province

LI Juan¹, WANG Wen-li¹, LU Bing-lin¹, GUO Tian-wen²

(1. Institute of Soil and Fertilizer and Water-Saving Agriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China; 2. Institute of

Dryland Agriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Sixteen phosphate-solubilizing micro-organisms were separated from high calcium soil in Hexi corridor in Gansu Province by abio-phosphor solid culture medium, and their ability of dissolving phosphorus was measured. The ratio of D/d (ratio of diameter of phosphorus-dissolving circle to diameter of bacteria community) varied from 1.24 to 5.4, and available quantity of dissolving phosphorus changed from 7.6 mg/L to 356.24 mg/L, which showed those phosphate-solubilizing micro-organisms had ability of dissolving phosphors. In condition of liquid cultivate, P3-16 and P3-28 had higher available quantity of dissolving phosphors than other phosphate-solubilizing micro-organisms, and the ratio of dissolving phosphorus reached 7.22% and 6.67% respectively. High quality strains would be offered to further study fertilizer with P bacteria using in high Ca soil.

Key words: phosphate-solubilizing micro-organisms; high calcium soil; ability to dissolve phosphorus