

叶劲松,吴 克,俞志敏. 1 株无机磷细菌筛选及溶磷能力的测定[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):333-335.

# 1 株无机磷细菌筛选及溶磷能力的测定

叶劲松,吴 克,俞志敏

(合肥学院生物与环境工程系/中德合作环境技术转化中心/合肥环境工程研究院,安徽合肥 230601)

**摘要:**以  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  为唯一磷源,从云南土壤样品中筛选到 1 株无机磷溶解能力较强的细菌。形态特征为乳黄色,短杆、产荚膜、革兰氏阴性。溶磷试验结果表明:经固体平板培养,溶磷圈培养 5 d 时达到 10.7 mm,溶磷圈和菌落直径比达到 1.6;经 7 d 液体摇床培养,分别以磷酸钙和磷矿粉为唯一磷源的培养液中有有效磷总量最高达 161.32、18.12 mg/L,相应的溶磷率为 16.14%、2.49%。此菌溶磷活性较高且稳定,在微生物肥料等研制中有较大应用潜力。

**关键词:**无机磷;细菌;筛选;溶磷

**中图分类号:** Q945;S154.34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0333-03

磷是植物生长所必需的大量元素之一<sup>[1]</sup>。为了提高作物产量,大量磷肥被施入到土壤;但是施入土壤的磷肥 95% 以上被土壤中的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Al}^{3+}$  等固定成为不能被植物吸收的无效态磷,磷肥的当季利用率一般只有 5%~25%<sup>[2-3]</sup>,而且过量施入的磷肥有一部分流入湖泊造成了水体富营养化<sup>[4-6]</sup>。一方面磷肥不能充分利用导致浪费惊人,另一方面我国磷矿资源不足,目前国土资源部已将我国磷矿列为 2010 年后不能满足国民经济发展需求的矿产之一<sup>[7]</sup>。要解决这一难题,唯有让原本沉积在土壤中的大量难溶的无效态磷素释放返回土壤溶液中,能够担当此任务的只有溶磷微生物(phosphate-solubilizing microorganisms, PSMs),溶磷微生物能将难溶性磷酸盐转化为植物可吸收利用的形态<sup>[8]</sup>。向土壤中接种溶磷菌,能够显著改善作物的磷素营养,提高作物的产量<sup>[9]</sup>。因此,开展溶磷微生物的筛选,深挖土壤内部磷资源潜力,可大大减少磷肥施入量,减少污染,有利于农业的高效可持续发展<sup>[10]</sup>,具有重要的理论意义和现实意义,目前已成为农业土壤肥料科学研究的热点<sup>[11-13]</sup>。本试验筛得 1 株无机磷酸盐溶解细菌,并对其溶磷能力进行了初步研究,以期为将来植物根际促生菌和微生物肥料等的研制提供基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种来源 云南山区土壤。

1.1.2 培养基 初筛培养基:葡萄糖 10.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g、NaCl 0.3 g、 $\text{MgSO}_4$  0.3 g、KCl 0.3 g、 $\text{FeSO}_4$  0.03 g、 $\text{MnSO}_4$  0.03 g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5.0 g、琼脂 20.0 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 值 7.0~7.5。药品均为分析纯。115℃ 下灭菌 30 min。

液态发酵培养基:有 2 种磷源,分别为  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (分析纯,国药集团)和磷矿粉(安徽肥东磷肥厂,过 100 目筛,  $\text{P}_2\text{O}_5$

含量为 33.4%),其余同初筛培养基(不加琼脂)。

### 1.2 方法

1.2.1 稀释平板分离纯化培养 土壤样品中加入无菌水制作菌悬液,按照平板分离方法<sup>[14]</sup>接种到以  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  为唯一磷源的初筛培养基上,40℃ 培养 7 d,观察菌落周围有无溶磷透明圈。有则挑取有透明圈的菌落,进一步划线分离至纯培养。

1.2.2 形态特征 记录平板菌落形态特征和镜检特征。

1.2.3 溶磷能力的测定 (1)平板溶磷圈法:将斜面菌种用 0.8% 的生理盐水洗脱,并且于 40℃ 活化 48 h 后,再把溶磷细菌稀释涂布于平板上,40℃ 培养 5 d,每天定时测量溶磷圈直径与菌落直径,计算两者比值,初步定性该菌溶磷能力大小。(2)液态摇瓶有效磷法:取 1 mL 溶磷细菌菌悬液(约  $10^8$  个/mL),分别接入到含  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  和磷矿粉的 100 mL 液态发酵培养基中,40℃ 160 r/min 下连续培养 7 d。定时将发酵液经 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定有效磷的含量。再取沉淀经石英砂研磨、洗涤和离心后,再次测定上清液有效磷含量,以此作为菌体内的磷<sup>[15]</sup>。同时以灭活菌株作对照。每个处理做 3 次重复。

细菌溶解的总磷量 = 上清液中磷的含量 + 菌体磷含量。

有效磷溶出率计算方法<sup>[16]</sup>:有效磷溶出率 = 细菌溶解的总磷量/培养液中总磷含量  $\times 100\%$ 。

培养液中的总磷含量分别以加入的  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  或以磷矿粉中的磷量计算;菌体磷含量以 mg/L 表示。

1.2.4 测定方法 有效磷测定方法:钼锑抗比色法<sup>[17]</sup>。

1.2.5 数据分析 数据采用 OriginPro 8 进行绘图,用 SPSS 18 进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 无机磷溶解菌初筛结果

以无机  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  为唯一磷源的初筛平板上有 5 株溶磷菌。有 1 株溶磷菌从初筛平板上往新平板划线时不再生长,还有 3 株细菌在后来的划线过程中不再出现溶磷圈,确如文献报道的那样,很多溶磷菌活性易丢失<sup>[18-19]</sup>。只有 1 株溶磷细菌经过数 10 次传代划线后仍然有明显溶磷圈,具有良好的溶磷稳定性。

收稿日期:2013-02-25

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:11010402088);合肥学院科学研究发展基金(编号:09KY01ZR)。

作者简介:叶劲松(1973—),男,安徽合肥人,硕士,实验师,研究方向为环境微生物等。E-mail:hardpine6@163.com。

2.2 溶磷菌落形态特征

2.2.1 平板菌落特征 如图 1 所示,在菌落周围有明显溶磷圈;乳黄色,圆形,稍凸起,半透明,光滑湿润。

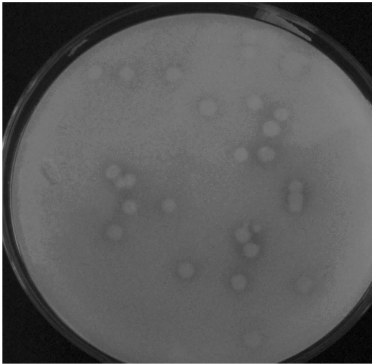


图1 解磷细菌溶磷圈

2.2.2 镜检 可见为短杆细菌,革兰氏染色阴性;湿墨汁染色后可见明显荚膜(图 2)。镜检下,该细菌胞外有 1 层厚厚的荚膜。目前对于溶磷细菌具有荚膜的报道很少见。一般说来,荚膜是某些细菌在细胞壁外包围的 1 层黏液性物质,一般由糖和多肽组成<sup>[20]</sup>。荚膜对溶磷有何影响,对于溶液中的磷酸根是否有吸持作用等,还有待进一步研究<sup>[21]</sup>。

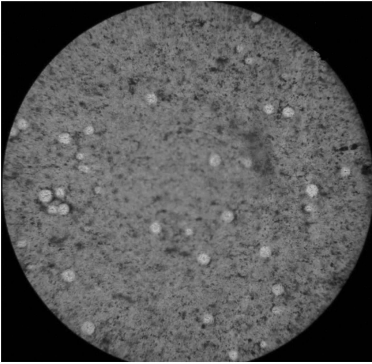


图2 解磷细菌荚膜染色

2.3 溶磷能力

2.3.1 无机磷酸钙溶解能力的定性测定 透明圈法可初步定性判断该菌有无溶磷能力,一定程度指示溶磷能力大小。斜面活化后的菌株经稀释涂平板,40 ℃ 培养,测得溶磷圈直径(*D*)和菌落直径(*d*),计算两者之间的比值(表 1)。

表 1 溶磷圈直径比

时间 (d)	溶磷圈直径 <i>D</i> (mm)	菌落直径 <i>d</i> (mm)	<i>D/d</i>
1	2.4	2.1	1.1
3	6.4	4.3	1.5
5	10.7	6.5	1.6

由表 1 可见,溶磷圈直径、菌落直径以及直径比 *D/d*,在前 3 d 均快速增大,说明前 3 d 在平板上生长及溶磷速度较快。培养 5 d 时溶磷圈直径与菌落直径比为 1.6,不算太大,但是不能就此断定该菌株溶磷能力较弱,因为菌株在不同培养条件下对磷酸钙的溶解能力存在较大差异<sup>[16]</sup>,需要用液体摇床培养对其溶磷能力进行定量测定<sup>[22]</sup>。

2.3.2 无机磷酸盐溶解能力的定量测定 固体平板溶磷圈

法测出的溶磷能力与液态摇床发酵法测出的溶磷能力之间不成正比关系<sup>[22-23]</sup>。分析纯  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  和天然磷矿粉的化学结构差异太大,本研究特对照考察了该溶磷细菌对这 2 种无机磷源的溶解能力。如图 3 所示,以磷酸钙为磷源的上清液中,有效磷和菌体中磷在前 4 d 快速上升,之后上升明显变缓,有走平趋势,上清液中有有效磷最高达到 135.46 mg/L,菌体中磷最高达到 25.86 mg/L。如图 4 所示,以磷矿粉为磷源时,上清液和菌体中的磷始终处于较快的上升趋势,培养 7 d 时,上清液中的有效磷上升到 16.18 mg/L,菌体磷上升到 1.94 mg/L。

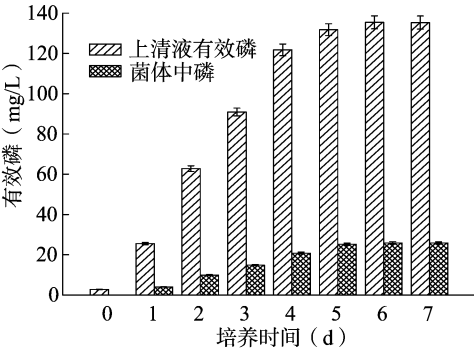


图3 以磷酸钙为磷源的发酵液中溶磷量

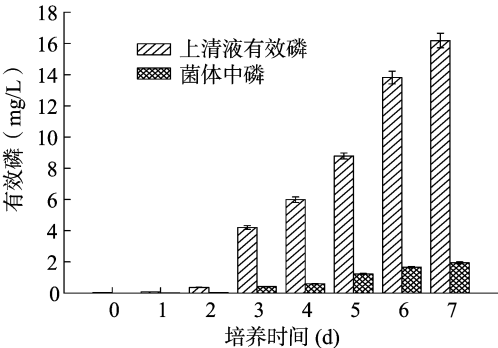


图4 以磷矿粉为磷源的发酵液中溶磷量

培养 7 d 时,2 种磷源的菌体中磷分别达到了上清液中有有效磷量的 17.39% 和 11.99%,这部分菌体细胞中的磷最终要以有效磷形式回归到土壤被植物吸收利用。如果在液体摇床测定溶磷菌溶磷能力时,忽略这部分磷,将低估溶磷菌的溶磷能力<sup>[24]</sup>。细菌的总溶磷量应该是上清液磷和菌体中磷之和。以磷酸钙为磷源的总溶磷量最高为 161.32 mg/L,以磷矿粉为磷源的溶磷量最高为 18.12 mg/L。该菌对于肥东磷矿粉的溶磷量明显高于杨慧等报道的草生欧文氏菌 3.35 mg/L 的结果<sup>[25]</sup>。

该溶磷菌在以磷酸钙为磷源时,有效磷先升后趋缓,很可能是由于到了发酵后期,除磷酸钙因过量添加尚有剩余外培养基中其他营养成分几乎耗尽,导致该溶磷菌生长受限所致。而以磷矿粉为磷源的有效磷始终处于上升,说明磷是限制性生长因子,溶出的这部分磷和其他大量的营养成分仍可满足其生长需要,溶磷菌溶磷能力还没有受到明显抑制。

2.3.3 有效磷的溶出率 以总溶磷量计算的溶磷率的变化趋势,与各自的上清液中有有效磷变化趋势一致。以磷酸钙为磷源时,磷的溶出率在前 4 d 呈现快速上升,之后升势趋缓,最高达到 16.14% (图 5),略低于 Paul 等报道的芽孢杆菌溶

磷率 19%<sup>[26]</sup>。以磷矿粉为磷源时,有效磷溶出率一直上升,培养 7 d 升到 2.49% (图 6)。该溶磷细菌对磷矿粉的磷溶出率和大多数文献报道的结果<sup>[27-28]</sup>相接近。

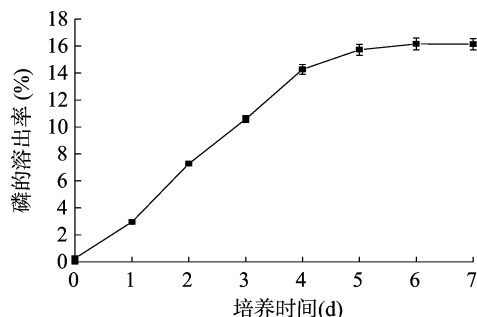


图5 磷酸钙中有效磷的溶出率

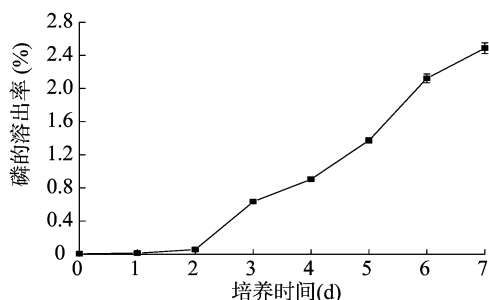


图6 磷矿粉中有效磷的溶出率

由于磷矿粉具有复杂的结构和化学组成<sup>[27]</sup>,磷矿粉中有效磷比磷酸钙难以溶解出来,但从已有 7 d 的溶磷趋势看,溶磷率还有上升潜力。

### 3 讨论

通过以  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  为唯一磷源培养基进行培养,筛得 1 株产荚膜的无机磷酸盐溶解细菌,为乳黄色,短杆状,革兰氏阴;溶磷圈试验表明,培养 5 d 时溶磷圈直径达 10.6 mm,溶磷圈直径与菌落直径之比达到 1.6;定量测定解磷能力结果显示,经 7 d 液体摇床培养后,分别以磷酸钙和磷矿粉为唯一磷源的发酵液中有有效磷最大可达 161.32 mg/L 和 18.12 mg/L,相应的有效磷溶出率分别为 16.14% 和 2.49%;在测定溶磷菌溶磷能力时,不能忽略菌体内那部分磷,否则将低估溶磷菌的溶磷能力。

本研究已用平板溶磷圈和液体摇床测定了该细菌的溶磷能力,以后还可用地培方法来测定其溶磷能力<sup>[29]</sup>,今后还将开展 16S rRNA 基因序列方面的菌种鉴定以及溶磷机理方面的研究,还可通过驯化和诱变等方法来进一步提高其溶磷能力。该菌溶磷能力稳定,历经 5 年的斜面保种和反复划线,仍具有良好活性,可为农业用溶磷微生物基因库的构建提供优良材料。

### 参考文献:

- [1] 贝盛临,张欣. 灵武长枣根际溶磷菌的分离研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(4):311-313.
- [2] 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.
- [3] 卢金珍,任俊,熊汉国. 解磷突变株 E652 的发酵条件研究[J]. 湖北农业科学,2011,50(7):1353-1355.

- [4] Parry R. Agricultural phosphorus and water quality: A U S environmental protection agency perspective [J]. Journal of Environment Quality,1998,27(2):258-261.
- [5] 聂素梅,徐晓锋,苗艳芳. 蔬菜地磷淋失调控途径的研究[J]. 江苏农业科学,2011(1):179-180.
- [6] 樊磊,叶小梅,何加骏,等. 解磷微生物对土壤磷素作用的研究进展[J]. 江苏农业科学,2008(5):261-263.
- [7] 熊金涛,毛小云,张俊涛,等. 不同温度下促释材料活化磷矿粉效果的研究[J]. 腐植酸,2009(1):29-33.
- [8] Tao G, Tian S, Cai M, et al. Phosphate-solubilizing and -mineralizing abilities of bacteria isolated from soils [J]. Pedosphere,2008,18(4):49-58.
- [9] 卢金珍,许宁,熊汉国. 高效解磷突变株的选育[J]. 湖北农业科学,2010,49(2):327-329.
- [10] 贝盛临,任贤,雷茜,等. 宁夏枸杞根际固氮解磷菌的分离研究[J]. 广东农业科学,2010(5):176-177.
- [11] 康贻军,程洁,梅丽娟,等. 植物根际促生菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学报,2010,50(7):853-861.
- [12] 赵勤瑞,常婷婷,王春芳,等. 有效微生物技术在农业上的应用与展望[J]. 江苏农业科学,2012,40(8):6-8.
- [13] 齐向英,陈宗礼,薛皓,等. 木枣根际促生微生物分离与初步研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(10):157-159.
- [14] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 3版. 北京:高等教育出版社,1999:70-74.
- [15] 向文良,冯玮,郭建华,等. 一株解磷中度嗜盐菌的分离鉴定及解磷特性分析[J]. 微生物学通报,2009,36(3):320-327.
- [16] 杜春梅,金术超,王蔚,等. 无机磷分解菌 BL-11 的鉴定及其解磷能力研究[J]. 微生物学通报,2007,34(2):283-286.
- [17] 鲁如坤. 土壤农业化学分析[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,1999:132-133.
- [18] 林启美,赵小蓉,孙炎鑫,等. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布[J]. 土壤与环境,2000,9(1):34-37.
- [19] 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.
- [20] 周群英,王士芬. 环境工程微生物学[M]. 3版. 北京:高等教育出版社,2008:46-47.
- [21] 易艳梅,黄为一. 产多糖溶磷细菌对难溶性 Ca-P 的活化特性[J]. 南京农业大学学报,2008,31(2):49-54.
- [22] Nautiyal C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms [J]. Federation of European Microbiological Societies,1999,170(1):265-270.
- [23] 齐文娟,龙瑞军,周万海,等. 溶磷菌在 5 种不同培养基中溶解磷矿粉的性能比较[J]. 草原与草坪,2007(5):37-41.
- [24] 赵小蓉,林启美,孙炎鑫,等. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物学通报,2001,28(1):1-4.
- [25] 杨慧,范丙全,龚明波,等. 一株新的溶磷草生欧文氏菌的分离、鉴定及其溶磷效果的初步研究[J]. 微生物学报,2008,48(1):51-56.
- [26] Paul N B, Sundara-Rao W V B. Phosphate dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes [J]. Plant and Soil, 1971,35:127-132.
- [27] 杨翠红,邱慧珍,李亚娟. 溶磷细菌对不同性质磷矿粉的溶磷效果研究[J]. 土壤通报,2007,38(6):1240-1242.
- [28] 林启美,赵海英,赵小蓉. 溶磷微生物对不同磷矿粉的溶解能力[J]. 中国农业科学,2002,35(10):1232-1235.
- [29] 冯瑞章,姚拓,周万海,等. 溶磷菌对燕麦生物量及植株氮、磷含量的影响[J]. 水土保持学报,2009,23(2):188-192.