

梁 净, 张晓波, 赵 艳, 等. 草地早熟禾根际磷细菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 314–317.

草地早熟禾根际磷细菌的分离与鉴定

梁 净, 张晓波, 赵 艳, 许沛冬

(海南大学农学院, 海南海口 570228)

摘要: 利用选择性培养基从草地早熟禾 (*Poa pratensis*) 根际土壤中筛选到 8 株有机磷细菌和 7 株无机磷细菌, 根据其形态学和生理生化等特性进行了鉴定。结果表明, 有机磷细菌菌株 PO1、PO3、PO4、PO5 鉴定为 *Bacillus cereus* (蜡状芽孢杆菌), 菌株 PO2、PO6 和 PO7 鉴定为 *Bacillus megaterium* (巨大芽孢杆菌), 菌株 PO8 为 *Bacillus badius* (栗褐芽孢杆菌), 而本试验筛选到的无机磷细菌菌株均为 *Pseudomonas* sp. (荧光假单胞菌)。

关键词: 草地早熟禾; 磷细菌; 分离; 鉴定

中图分类号: S688.406 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)02–0314–03

磷是植物生长发育必需的重要营养元素, 但我国目前土壤缺磷面积较大, 增加土壤磷素的主要途径依然是靠草地生产中施用的磷肥。由于施入可溶性的磷肥会使农田大部分迅速转变为作物难以吸收的无效磷, 最终导致作物对磷肥的当季利用率很低^[1–2]。对于我国而言, 提取固定土壤中释放的无效磷, 对提高土壤可利用磷素含量、减少磷肥使用具有重要的意义^[2]。磷细菌是可将土壤中有机磷和难溶性无机磷转化为可溶性无机磷的细菌, 可分为解磷菌(有机磷细菌)和溶磷菌(无机磷细菌)两大类^[3–5]。研究证明, 土壤中存在大量微生物, 能将植物难以吸收利用的磷转化为可吸收利用的形态^[6], 对于将无效磷转变为有效磷有着至关重要的作用。

草地早熟禾 (*Poa pratensis*) 是常用的冷季型草坪草, 其绿期长、适应性强、分布广, 抗霜冻及耐寒能力强, 对于北方城市草坪美化、绿化有重要意义。肥料的合理施用对其生长及发挥生态效益具有重要作用, 其中磷肥对草坪草的重要作用主要表现在抗性方面^[7–9]。我国目前磷矿资源贫乏, 生产能力低, 使用的磷肥主要依靠外国进口, 因此, 研发生物磷肥, 既可提高作物产量, 又可保护土壤资源, 对于农业生产可持续发展有着重要意义。根据生态学原理, 特定种类的有益菌株, 从原习居地取样筛选, 不仅能满足植物的专一性, 且能获得较高成功率。本研究利用选择培养基, 从草地早熟禾根际土壤样品中对磷细菌进行分离、纯化、鉴定, 对于有效利用磷细菌菌株及调控植物根系微生物系统有重要意义, 可为研制专用生物磷肥提供必要实践及理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土样基本特征 草地早熟禾根际磷细菌土样取自山西农业大学校园内年限为 3 年的健康草地早熟禾根际土壤, 其 pH 值为 8.24, 有机质含量为 8.59 g/kg, 全钾为

3.18 g/kg, 全磷为 0.21 g/kg, 全氮为 0.17 g/kg, 速效钾为 90.67 mg/kg, 速效磷为 60.37 mg/kg。

1.1.2 培养基 蒙金娜有机培养基^[10–11]: 葡萄糖 10.0 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, KCl 0.3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, NaCl 0.3 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.03 g, MnSO₄ · 4H₂O 0.03 g, 卵磷脂 0.2 g, CaCO₃ 1.0 g, 酵母粉 0.5 g, 琼脂 20 g, 总体积 1 000 mL (蒸馏水补足), pH 值 7.0, 121 ℃ 灭菌 20 min。

Pikovaskaia's (PKO) 无机培养基^[10–11]: 葡萄糖 10.0 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.036 g, Ca₃(PO₄)₂ 2.0 g, 琼脂 20 g, MnSO₄ · 4H₂O 0.03 g, 总体积 1 000 mL (蒸馏水补足), pH 值 7.0, 121 ℃ 灭菌 20 min。

Luria – Bertani (LB) 培养基^[12]: 蛋白胨 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, NaCl 8.0 g, 琼脂 20 g, 总体积 1 000 mL (蒸馏水补足), pH 值 7.0, 121 ℃ 灭菌 20 min。

土壤矿物: 去除有机残体的土壤, 取土样 3 g, 加入 20% HCl 30 mL, 煮沸 30 min, 过滤, 用蒸馏水淋洗至无氯离子反应。

1.2 方法

1.2.1 根际土壤的采集 采样区为山西农业大学校园内健康的草地早熟禾草坪, 取草坪区域良好处作为标准样地 (3 m × 3 m), 在每个标准样地内按“S”形随机选择 5 株草地早熟禾植株, 先除去其表层的枯草及落叶, 随后将整个植株带根系慢慢挖出, 轻轻抖落根系上的大块土壤, 收集附于植株根系表面约 2 mm 左右的土壤, 分别将采集到的根际土样装入经过高压消毒的无菌纸袋, 并在袋上注明采集日期以及土样号, 带回实验室立即进行试验。

1.2.2 磷细菌分离 称取各根际土壤样品 1 g, 在无菌条件下操作, 分别取 9 mL 无菌水和 8 粒无菌玻璃珠装入 250 mL 的三角瓶中, 置于恒温振荡机上 25 ℃、170 r/min 振荡 20 min, 得到 10⁻¹ 稀释度的土壤悬液。用无菌吸管分别吸取 10⁻¹ 稀释度的土壤悬液 1 mL 并注入装有 9 mL 无菌水的三角瓶中作 10⁻² 稀释度的土壤悬液, 随后再用无菌吸管吸取 10⁻² 稀释度的土壤悬液 1 mL 并注入装有 9 mL 无菌水的试管中作 10⁻³ 稀释度的土壤悬液, 依此类推, 分别得到 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释度的各土样悬液。用移液管吸取上述稀释度为 10⁻⁴、

收稿日期: 2013–10–22

基金项目: 海南省自然科学基金 (编号: 312060)。

作者简介: 梁 净 (1991—), 男, 瑶族, 主要从事草坪管理相关研究。

E-mail: airstreet00@163.com。

通信作者: 张晓波, 博士, 副教授。E-mail: angiaoo@126.com。

10⁻⁵、10⁻⁶ 的各土壤悬液,每个稀释度设 3 个重复。稀释平板法,有机磷细菌菌株于 28 ℃ 下培养 24 h,无机磷细菌菌株在 28 ℃ 下培养 2~4 d,分别观察其菌落形态。由于有机磷细菌能分解卵黄中的有机磷产生磷酸,无机磷细菌能分解磷酸钙盐产生有机酸或无机酸,使难溶性的磷酸钙盐转化为可溶性磷酸盐,所以在其菌落的周围可形成一个透明圈。挑选周围产生透明圈的单菌落,接入牛肉膏蛋白胨斜面培养基培养,在 LB 平板上 2 次活化再接入牛肉膏蛋白胨斜面保存。

1.2.3 磷细菌的形态及生理生化特性鉴定 (1) 革兰氏染色:取用 24 h 菌龄的纯培养物制片染色后通过镜检观察其染色结果。(2) 芽孢染色:采用淀粉铵盐培养基^[13]培养 3 d,用芽孢染色法^[13]观察其形状及着生位置。(3) 鞭毛染色:取连续传代培养 2 次的菌种,接种至新鲜配制的琼脂斜面上(有冷凝水),30 ℃ 培养 24 h,观察硝酸银染色的结果。(4) 菌体大小测定:简单染色后用数码显微镜观测菌体长及宽。(5) 液体培养特征:将供试菌株接种在硅酸盐细菌液体培养基中,置于 30 ℃ 恒温下培养 6 d,观察是否形成菌环、菌膜、浑浊或沉淀特征。(6) 菌落特征:用接种环接菌,对制成的平板进行划线,置于 30 ℃ 恒温下培养 5~6 d,观察并且描述其菌落大小、颜色、形状、是否黏稠、是否透明。(7) 过氧化氢酶试验:将供试菌株活化后(培养 18~24 h),有机磷细菌菌株接种于蒙金娜有机培养基斜面上,无机磷细菌菌株接种于 PKO 无机培养基斜面上,分别置于 30 ℃ 下培养,7 d 后,在丰满的菌苔上滴加 3% H₂O₂ 1 mL,立即检查其结果,5 min 内如出现气泡则为阳性反应,记录为“+”,否则为“-”。(8) 其他生化性

状:甲基乙酞甲醇试验(V.P 试验)、酯素水解、淀粉水解、吲哚试验、卵磷脂酶、硝酸盐还原试验等均按常用方法^[14]进行。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离

用接种环取上述分离到的各类菌株的纯培养物,再以平板划线法将其分别接种于平板培养基上,置于 28 ℃ 的培养箱中培养 24~48 h。视菌落生长情况,在蒙金娜有机培养基挑出 8 株有机磷细菌菌落,分别编号为 PO1 至 PO8。在 PKO 培养基挑出 7 株无机磷细菌菌落,分别编号为 PM1 至 PM7。然后对挑出的菌株进一步分离纯化后,对菌株的形态和生理生化特征进行鉴定。

2.2 菌株的培养特征

将分离纯化得到的 8 株有机磷菌株和 7 株无机磷菌株,分别接种在分离培养基平板上 30 ℃ 条件下培养 48 h,发现有机磷菌株(表 1)在蒙金娜有机培养基上菌落形状不一,主要呈现乳白色或浅黄色,像半粒玻璃珠平贴于平板上;菌落凸起呈圆形或不规则,边缘完整或锯齿状,表面光滑,湿润有光泽,黏稠,富有弹性。无机磷菌株(表 2)在 PKO 培养基上形状为圆形,呈现色泽不一,边缘完整或锯齿状,表面光滑,湿润有光泽,黏稠,富有弹性。在液体培养条件下,分离的菌株能在培养液底部形成透明度不一的雾状沉淀,沉淀胶结成团,不易摇散,培养液浑浊度不一。

表 1 草地早熟禾根际有机磷细菌在蒙金娜有机培养基上的菌落形态

菌株号	形状	隆起度	透明度	边缘	颜色	表面状况	生长速度
PO1	不规则	凸起	不透明	锯齿状	浅黄色	较湿润	较慢
PO2	圆形	凸起	不透明	完整	白色	湿润	较慢
PO3	不规则	凸起	不透明	完整	乳白	很湿润	较快
PO4	不规则	平坦	不透明	波浪状	浅黄色	很湿润	较慢
PO5	不规则	凸起	稍透明	完整	乳白	较湿润	较快
PO6	圆形	平坦	不透明	波浪状	乳白	较湿润	较快
PO7	圆形	平坦	不透明	完整	白色	湿润	较慢
PO8	圆形	凸起	不透明	锯齿状	灰白色	很湿润	较快

表 2 草地早熟禾根际无机磷细菌在 PKO 培养基上的菌落形态

菌株号	形状	隆起度	透明度	边缘	颜色	表面状况	生长速度
PM1	圆形	凸起	不透明	锯齿状	乳白	很湿润	较快
PM2	圆形	平坦	不透明	锯齿状	灰白色	很湿润	较慢
PM3	圆形	凸起	透明	完整	乳白	很湿润	较快
PM4	圆形	平坦	不透明	完整	浅黄色	很湿润	较慢
PM5	圆形	凸起	稍透明	完整	乳白	较干燥	较快
PM6	圆形	平坦	透明	齿状	无色	较干燥	较快
PM7	圆形	平坦	透明	完整	无色	很湿润	较慢

2.3 菌株的形态

对 8 株有机磷菌株进行革兰氏染色、荚膜染色及芽孢染色,发现 8 株菌株革兰氏染色均为阳性,菌体呈杆状,大小约为 2.2~4.0 μm×1.1~1.4 μm,鞭毛周生,在淀粉铵盐培养基中易形成芽孢,无囊泡。对 7 株无机磷培养基进行革兰氏染色、芽孢染色及荚膜染色,发现 7 株菌株革兰氏染色均为阴性,菌体呈杆状,大小约为 1.5~3.0 μm×0.5~0.7 μm,

PM1、PM4、PM5、PM7 的鞭毛周生,其余菌株的鞭毛为极生,在淀粉铵盐培养基中不产生芽孢,无囊泡。这与文献[15~16]中有关磷细菌的特征一致。

2.4 菌株的生理生化特征

参考磷细菌特征,对 8 株有机磷细菌菌株的主要生理生化指标进行测定(表 3)。由表 3 可知,有机磷细菌供试菌株均能在葡萄糖为碳源的培养基上生长;此外还具有淀粉、酯素

水解等特征,过氧化氢酶试验为阳性反应,不产生吡嗪。由表 4 可知,7 株无机磷细菌供试菌株均能在葡萄糖为碳源的培养

基上生长;此外还具有淀粉、果胶水解等特征,过氧化氢酶试验为阳性反应,不产生色素,不产生吡嗪。

表 3 草地早熟禾根际有机磷细菌菌株的生理生化反应特性

反应特性	菌株号							
	PO1	PO2	PO3	PO4	PO5	PO6	PO7	PO8
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+	+	+
V.P 反应	+	-	+	+	+	+	-	-
产酸:葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖	-	+	-	-	-	+	+	-
木糖	-	+	-	-	-	+	+	-
甘露糖	-	+	-	-	-	+	+	-
水解:酪素	+	+	+	+	+	+	+	+
明胶	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉	+	+	+	+	+	+	+	-
利用柠檬酸盐	+	+	+	+	+	+	+	-
卵磷脂酶	+	-	+	+	+	-	-	-
吡嗪反应	-	-	-	-	-	-	-	-
厌氧生长	+	-	+	+	+	-	-	+
pH 值 5.7 肉汤生长	+	+	+	+	+	+	+	+

注: + :阳性反应; - :阴性反应。

表 4 草地早熟禾根际无机磷细菌菌株的生理生化反应特性

反应特性	菌株号						
	PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	PM6	PM7
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶	+	-	+	-	+	+	-
葡萄糖氧化发酵	-	-	-	-	-	-	-
水解:明胶	+	-	+	+	-	+	+
淀粉	-	-	-	-	-	-	-
果胶	-	-	-	-	-	-	-
吡嗪反应	-	-	-	-	-	-	-
硝酸盐还原	+	-	-	+	-	-	-
产生色素	-	-	-	-	-	-	-
厌氧生长	-	-	-	-	-	-	-
pH 值 5.7 肉汤生长	-	-	-	-	-	-	-

注: + :阳性反应; - :阴性反应。

2.5 磷细菌的鉴定

根据以上形态学特性和生理生化特征,将草地早熟禾根际有机磷细菌鉴定为 *Bacillus* sp. (杆菌属),其后均按 *Bacillus* sp. 的分类方法继续进行鉴定,将供试菌株的鉴定结果与 *Bacillus* sp. 属的相关种群进行比较后,将菌株 PO1、PO3、PO4、PO5 鉴定为 *Bacillus cereus*(蜡状芽孢杆菌),菌株 PO2、PO6 和 PO7 鉴定为 *Bacillus megaterium*(巨大芽孢杆菌),菌株 PO8 鉴定为 *Bacillus badius*(栗褐芽孢杆菌)。而本试验筛选到的无机磷细菌菌株均为 *Pseudomonas* sp. (荧光假单胞菌)。

3 结论

目前微生物肥料的应用与开发尚有许多不足,但此方面的研究对启动土壤磷库资源、减少化肥的投入及环保等诸多方面具有深远的意义。本研究通过对 8 株有机磷菌株和 7 株无机磷菌株的细胞形态及生理生化特征的初步考察,对照《常见细菌系统鉴定手册》^[14]及有关文献报道^[17-19],可以确定 8 株有机磷细菌中的 PO1、PO3、PO4、PO5 为 *Bacillus cereus* (蜡状芽孢杆菌),PO₂、PO6 和 PO7 为 *Bacillus megaterium*(巨

大芽孢杆菌),PO8 为 *Bacillus badius*(栗褐芽孢杆菌),而 7 株无机磷菌株均为 *Pseudomonas* sp. (荧光假单胞菌)。分析结果表明有机磷细菌菌株为芽孢杆菌属,无机磷细菌为假单胞菌属。通过此次研究可知山西农业大学校园内草地早熟禾根系常见的磷细菌种类,为将来更好地挖掘草地早熟禾微生物的解磷潜能,对开发高效微生物肥料,提高土壤中有效磷的含量、减少化学肥料的使用、改善土壤环境方面具有积极作用,对探索草地早熟禾根际土壤的潜在肥力、发展草地早熟禾土壤地可持续农业具有一定的理论与实际作用。关于各磷细菌菌株的解磷机制和在土壤中的活动规律有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Babana A H, Antoun H. Biological system for improving the availability of Tilemsi phosphate rock for wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in Mali [J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2005, 72: 147 - 157.

[2] 朱培森, 杨兴明, 徐阳春, 等. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 107 - 112.

罗友进,王 武,余 端,等. 土壤压实对土壤生化循环和生态效应的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):317-319.

土壤压实对土壤生化循环和生态效应的影响

罗友进,王 武,余 端,胡佳羽,程玥晴,陈 霞,谢永红

(重庆市农业科学院,重庆 401329)

摘要:土壤压实改变了土壤的物理属性,从而对土壤化学属性、生物性状等产生影响。对国内外关于土壤压实对土壤物质生化循环、生态效应研究进行了回顾,重点阐述了土壤压实对土壤碳氮循环的影响,并对下一步的研究方向进行了展望。

关键词:土壤压实;生化循环;生态效应

中图分类号: S154.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0317-03

土壤是一个复杂多层次的开放性体系,它在各种因素的共同作用下,处于不断变化之中。土壤压实是指土壤颗粒重新排列达到更紧密结合、降低孔隙度、增加密度的过程。土壤压实会引起土壤物理属性的改变,进一步对土壤化学属性、土壤生物性状以及植物生长产生影响。只有在极少数情况下,轻微的土壤压实会对土壤性质、生产性能产生正面影响^[1],绝大多数都是负面影响。在耕作土壤中,机械压实主要集中于土壤表层,随着农业机械化的发展,耕作机械的牵引力、载重逐渐增加,压实作用也随之增加,从而对心土层土壤产生影响。心土层压实后难以恢复^[2]。土壤机械压实问题若得不到解决,土壤环境将遭到严重破坏,农田生产力严重下降,从而对农业可持续发展产生影响。土壤机械压实对农业的主要危害表现为土壤密度增加、通气孔隙减少、水渗透能力降低,从而对土壤生化属性、生物多样性产生影响,进而导致作物生

长受阻、产量降低、土壤环境遭到破坏^[3]。近年来,不少学者对土壤机械压实的诱因、特征、危害以及消除或避免措施进行了大量研究^[3-5]。本研究对国内外有关机械压实对土壤生化属性、生态环境的影响研究进行了归纳,旨在为我国土壤机械压实研究提供参考。

1 土壤物理属性

在农机重力、剪切力的作用下,土壤大孔隙、充气孔隙逐渐减少,团聚体相互靠近,甚至发生变形,土壤密度明显增加。经耕作机械压实后,黏性土壤密度从 1.1 ~ 1.3 g/cm³ 增至 1.5 ~ 1.7 g/cm³,沙性土壤密度可以增至 2.2 g/cm³^[6]。土壤压实造成土壤表面局部土壤密度明显增加,大孔隙减少,持水能力、水分渗透率明显降低,导致水土流失加剧。目前,土壤压实已成为农田土壤水土流失加剧的主要因素之一。Singh 等研究表明,随着土壤密度的增加,水分渗漏率由 12.35 cm/h 降为 3.46 cm/h,导致土壤水分减少^[7]。土壤压实后,充气孔隙明显减少,气体扩散率下降,进而影响土壤溶液流动。土壤严重压实后,土壤通气大孔隙降为 3% 以下,团聚体相互靠近并发生摩擦,稳定性明显降低,土壤环境质量下降。Nadian

收稿日期:2013-06-04

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2013BAJ10B07-04B)。

作者简介:罗友进(1984—),男,浙江玉环人,博士,助理研究员,主要从事土地利用与生态变化研究。E-mail: luoyoujin1984@163.com。

[3]王 鹏,孙剑秋,臧 威,等. 磷细菌研究进展[J]. 河南农业科学,2008(9):5-9.

[4]陈廷伟. 解磷巨大芽胞杆菌分类名称、形态特征及解磷性能述评[J]. 土壤肥料,2005(1):7-9,38.

[5]王英健. 解磷细菌的分离纯化鉴定与生物学特性研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(32):13932-13933.

[6]Richardson A E. Soil microorganism and phosphorus availability [M]//Pankhurst C E, Double B E, Gupta V V S R, et al. Soil biota management in sustainable farming system. CSIRO: Melbourne, 1994:50-62.

[7]王俭珍,韩建国,周 禾,等. 品种及施肥对草地早熟禾种子产量要素和产量的影响[J]. 草业科学,2006,23(7):90-95.

[8]张瑞麟,赵 清,范 敏,等. 我国草地早熟禾的研究进展[J]. 草业科学,2005,22(7):67-70.

[9]赵小强,马晖玲,林 栋,等. 草地早熟禾新格莱德胚性愈伤组织原生质体培养及植株再生的研究[J]. 草业学报,2010,19(2):55-60.

[10]Hafeez F Y, Malik K A. Manual on biofertilizer technology [M]. NIBGE, Pakistan, 2000.

[11]韩玉竹,赵建军,曾 兵,等. 多花黑麦草根际解磷菌的分离及解磷能力测定[J]. 草地学报,2011,19(5):766-770.

[12]林启美,赵小蓉,孙焱鑫,等. 四种不同生态环境土壤中溶磷细菌的数量及种群分布[J]. 土壤与环境,2000,9(1):34-37.

[13]沈萍等. 微生物学实验 [M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,1999:2-6.

[14]东秀珠,蔡妙英等. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京:科学出版社,2001.

[15]徐晓东,李莉芳. 无机磷细菌的分离、筛选和鉴定[J]. 环境科学导刊,2008,27(4):1-3.

[16]李晓芹,马利青,王戈平,等. 磷细菌的分离培养与筛选[J]. 青海畜牧兽医杂志,2010,40(5):7-8.

[17]姚晓惠,刘秀花,梁 峰. 土壤中磷细菌的筛选和鉴定[J]. 河南农业科学,2002(7):28-31.

[18]郝 晶,洪坚平,谢英荷,等. 石灰性土壤磷细菌的分离、筛选及解磷效果[J]. 山西农业科学,2005,33(4):56-59.

[19]郑世仲,江胜滔,黄燕翔,等. 土壤中有机磷解磷细菌的分离筛选及鉴定[J]. 安徽农学通报,2009,15(15):24-26.