

# HM0332 和 HM48-3 菌株纯培养条件下解磷强度研究

曾广勤 张爱民 张志红 张春莉 郝正然

(河北省科学院微生物研究所 保定 071051)

**摘要:** 室内研究结果说明, 解磷细菌 HM0332 和 HM48-3 菌株以磷矿粉为磷源, 在纯培养条件下产生有机酸, 分解转化磷矿粉, 有效磷转化率即解磷强度分别为 8.28% 和 7.26%。

**关键词:** 解磷细菌, 纯培养, 磷矿粉, 解磷强度

**中图分类号:** Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0346-03

## STUDY ON THE PHOSPHATE-DISSOLVING ABILITY OF HM0332 AND HM48-3 UNDER PURE CULTURE CONDITION

ZENG Guang-Qin ZHANG Ai-Min ZHANG Zhi-Hong ZHANG Chun-Li HAO Zheng-Ran

(Microbiology Institute of Hebei Academy of Sciences, Baoding 071051)

**Abstract:** Organic acid can be produced by HM0332 and HM48-3 strains under pure culture condition, which ground phosphate rock is used as phosphate source. Ground phosphate rock can be transformed and the rate of phosphate-transforming (phosphate-dissolving ability) is 9.28% and 7.26% separately.

**Key words:** Phosphate-dissolving bacteria, Pure culture, Ground phosphate rock, Phosphate-dissolving ability.

利用微生物解磷弥补土壤磷素营养不足是国内外非常关注的研究课题。早在二十世纪 30 年代原苏联学者 A.P.Mehkuha 从土壤中分离筛选出解磷巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megatherium* var. *phosphoticum*), 分解有机磷<sup>[1]</sup>。后来, 我国有关科研部门也开始了应用研究, 分离出有解磷能力的芽孢或无芽孢细菌、真菌、放线菌和酵母菌, 同时引进巨大芽孢杆菌, 并用土法制成磷细菌剂, 应用到玉米上取得了一定的增产效果<sup>[2]</sup>。但解磷细菌纯培养条件下的解磷强度国内未见报道。国际上印度 S.Banik 曾报道两株细菌以磷酸三钙为磷源, 水溶性磷转化率为 0.32% 和 0.30%<sup>[3]</sup>, 但未透露培养时间。我课题组从保定磷肥厂堆放磷矿粉场地的磷灰土和无极县沙地杂草根际土中分离到两株分解转化无机磷能力较强的细菌, 菌株编号 HM0332 和

HM48-3。经河北省卫生防疫站毒理检验, 结果实属无毒。以此菌株作多种作物的接种剂进行盆栽、小区和大田对比试验示范, 增产效果显著且稳定。本文报道两株细菌在以磷矿粉为磷源纯培养条件下的解磷强度。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** HM0332、HM48-3 本课题组分离筛选。

**1.1.2 培养基:** “磷细菌肥料国家标准”规定的培养基为基础培养基 (BA)<sup>[4]</sup>。

**1.1.3 磷矿粉:** 保定市磷肥厂提供, 细度 80 目, 全磷含量 13.1707%。

**1.1.4 仪器:** P270 无级变速旋转式摇床, 日立 SCR20BA 型高速离心机, 721 型分光光度计, S-3 型酸度计。

## 1.2 方法

**1.2.1 菌种培养:** 250mL 三角瓶装 100mL BA 液体培养基,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌后接一支斜面菌种,  $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 、190r/min 摇床培养 24h, 镜检无杂菌备用。

**1.2.2 产酸量测定:** 250mL 三角瓶分装 100mL 不加  $\text{CaCO}_3$  BA 液体培养基灭菌后接种, 接种量 10%, 对照加灭活种子液,  $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 、190r/min 摇床培养 64h。从 16h 开始定时取样, 测定含菌量、pH 和总酸量。含菌量测定用稀释平板法<sup>[6]</sup>、pH 用 pH 计测定, 酸的定性分析采用纸层析法<sup>[5]</sup>, 总酸量用酸碱中和滴定法。

**1.2.3 固体解磷能力测定:** 培养 24h 的 HM0332 和 HM48-3 液体菌种适当稀释后分别涂在装有 15mL 固体 BA 培养基的平板上, 恒温培养, 观测解磷透明圈大小。

**1.2.4 液体解磷强度测定:** 不加  $\text{CaCO}_3$  和磷源的 BA 液体培养基 100mL, 分装在 250mL 三角瓶中,  $1 \times 10^5$  Pa, 30min 灭菌。接种前精确加 1g 灭菌磷矿粉。接种量 10%, 摇床培养。定时取样, 9500r/min 离心, 上清液测水溶性磷含量; 沉淀物用稀盐酸加热处理后, 定性滤纸过滤, 滤液测缓释磷, 滤渣用全磷法测难溶磷。

**1.2.5 磷的测定方法:** 磷钼兰比色法<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 总酸量

纯培养条件下 HM0332 和 HM48-3 菌株有机酸总量随培养时间延长和含菌量增加而增加, 如图 1、图 2。接种 HM0332 的初始酸量为 1.968 mmol/L, 培养到 64h 总酸量达 9.417 mmol/L, 增加了 7.449 mmol/L; 接种 HM48-3 菌株培养到 64h 总酸量达 2.062 mmol/L, 比初始 2.187 mmol/L 增加了 9.875 mmol/L; 对照总酸量为 0.350 mmol/L。HM0332 菌株和 HM48-3 菌株产酸量分别是对照的 21.3 和 28.2 倍。

### 2.2 酸的定性试验

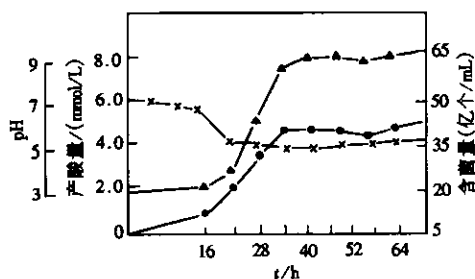


图1 HM0332菌株产酸曲线

—▲— 总酸量, —●— 含菌量, —×— pH

培养 64h 的 HM0332 和 HM48-3 菌株培养液 9500r/min 离心 20min, 上清液经纸层析法分析, 初步认定两菌株培养液中均有苹果酸、丙二

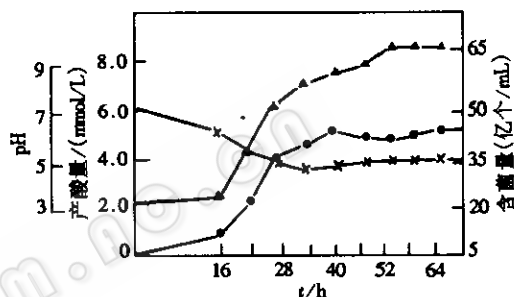


图2 HM48-3菌株产酸曲线

—▲— 总酸量, —●— 含菌量, —×— pH

酸、乳酸、琥珀酸和草酸等, 但从迁移图大小看出各酸的含量不一样, 具体各酸量待进一步研究。

### 2.3 解磷强度

**2.3.1 固体解磷透明圈:** HM0332 和 HM48-3 菌株接种在 BA 固体平板培养基上,  $30^\circ\text{C}$  培养 36h 长出典型的单菌落, 120h 看出明显的透明圈, 经测量解磷圈的透明度和边缘的清晰度随培养时间延长越来越高。

HM0332 菌株的菌落和透明圈平均直径分别为 1.0~1.2mm 和 3.0~4.0mm, 透明圈与菌落直径之比为 3.0~3.3; HM48-3 菌株的菌落和透明圈直径在 1.5~2.5mm 和 4.5~7.0 之间, 透明圈与菌落直径之比为 2.8~3.0。

**2.3.2 液体解磷强度:** 经几次试验 HM0332 和 HM48-3 菌株的解磷高峰期在 36~48h, 故取振荡培养 36h 菌液测定液体解磷强度, 结果见表 3。水溶性磷转化率 HM0332 为 0.49%, HM48-3 为 0.47%, 比印度 S. Banik 报道的 0.32% 和

0.30% 提高 50% 以上, 是对照的 3.3 和 3.2 倍。接菌处理的缓释磷, 比对照提高 8.24% 和 7.19%, 经方差分析均达极显著标准。水溶磷与缓释磷之和为总有效磷, 处理值减去对照, 增加部分即为磷细菌的解磷效果, 增加值占磷矿粉

全磷含量的百分比视为磷细菌的解磷强度。HM0332 和 HM48-3 菌株的解磷强度分别为 8.28% 和 7.26%。

从表 1 数据看, 残渣中全磷含量, 接菌处理比分别对照减少 57.4% 和 52.3%。有效磷增加

表1 液体解磷强度测定结果

磷的类型	处理	磷 含 量				CK+-		解磷强度
		I	II	III		mg/g	%	%
水溶性磷 (mg/100mL)	CK	0.2765	0.2670	0.3100	0.2845	—	—	—
	HM0332	1.0738	0.6425	1.0810	0.9324	0.6479	227.73	0.49
	HM48-3	1.0967	0.5583	1.0638	0.9060	0.6218	218.56	0.47
缓释磷 (mg/g)	CK	123.10	125.57	123.00	123.89	—	—	—
	HM0332	134.60	135.20	132.50	134.10	10.21	8.24	7.79
	HM48-3	132.00	133.80	132.60	132.80	8.9	7.19	6.79
难溶磷 (mg/g)	CK	6.90	6.98	7.37	7.083	—	—	—
	HM0332	2.20	2.26	2.04	2.16	-4.916	-69.4	
	HM48-3	2.65	2.16	2.32	2.478	-4.605	-65.9	

注: ①缓释磷经方差分析,  $F=55.856 > F_{0.01}=10.92$ 。②表中数据为3次重复的平均值

量与全磷减少量虽不一致, 但趋势吻合。

### 3 讨论

(1) HM0332、HM48-3 两菌株在纯培养条件下, 以磷矿粉为磷源的解磷强度分别为 8.28% 和 7.26%。(2) HM0332、HM48-3 两菌株将磷矿粉转化为有效磷主要因其生长繁殖过程中产生有机酸和酶类, 解磷强度与总酸量成正比, 酸的种类及其含量又是影响解磷强度的直接因素。(3) HM0332 和 HM48-3 菌株纯培养条件下, 产生苹果酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸和草酸等有机酸。在试验期内, 总酸量随含菌量增加而增多, 对数期增加最快, 平衡期总酸量维持动态平衡。36~48h 为产酸高峰期, pH 降到 4.5 左右。

致谢: 王来福, 杨则璠, 任春玲在本研究中作了一定工作, 特致谢。

### 参 考 文 献

- [1] 周 风, 马素凤, 蒋有绎等. 华北农学报, 1987, 2(4): 75~80.
- [2] 张美庆, 丁亦林. 微生物学报, 1979, 6(3): 1~4.
- [3] Datta M, Bank S, Gupta R K. *plants and soil*, 1982, 69: 353~364.
- [4] 中华人民共和国农业部《微生物肥料》行业标准. NY 227-94. 北京: 中国标准出版社, 1994.
- [5] 南京农业大学编. 土壤农化分析. 北京: 农业出版社, 1986, 72~74.
- [6] 范秀云, 沈 萍. 微生物学实验. 北京: 人民教育出版社, 1983, 30~32.