



细菌解磷能力测定方法的研究*

赵小蓉 林启美

(中国农业大学土壤和水科学系 北京 100094)

孙焱鑫 姚 军 张有山

(北京市农林科学院植物营养与资源研究所 北京 100081)

摘要:选择分解有机磷能力较强的3株细菌和溶解磷矿粉较强的4株细菌,砂培4周后,用不同的方法测定水浸提液中磷的含量。发现不同的细菌解磷能力差异很大,细菌在分解磷化合物的同时,一部分磷被细菌同化,一部分以无机磷酸盐状态贮藏在细菌细胞内。直接测定浸提液中无机磷酸盐的含量,将大大低估细菌的解磷能力,必须将浸提液消毒,才能比较正确地反映细菌分解磷的能力。

关键词:解磷细菌,熏蒸,消毒

中图分类号:Q939.9 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-01-04

THE METHODS FOR QUANTIFYING CAPACITY OF BACTERIA IN DISSOLVING P COMPOUNDS

Zhao Xiao-Rong Lin Qi-Mei

(Department of Soil & Water Science, China Agricultural University, Beijing 100094)

Sun Yan-Xin Yao Jun Zhang You-Shan

(Institute of Plant Nutrition & Resource, Beijing Academy of Agricultural & Forest Science, Beijing 100081)

Abstract: Three bacteria of decomposing lecithin and 4 bacteria of dissolving aptite were incubated for 4 weeks with sand media respectively. Phosphorus in the sand was extracted with distilled water and measured by different methods. It was found that the bacteria have a quite different ability to release P from the materials. Part of the P released became organic phosphorus compounds in microbial tissue. However, a large amount of the P was reserved in microbial cells in a form of phosphates. The direct measurement of P in the extract by molybdenum blue method would underestimate the capacity of the bacteria to release P from the materials. The correct approach was that the sand was fumigated with chloroform and then digested with acid before the measurement by molybdenum blue method.

Key words: Phosphobacteria, Fumigation, Digestion

土壤中存在大量能将对作物无效的磷化合物转化为对作物有效形态的微生物,测定这些微生物解磷能力的方法有两种,一是采用土培或砂培,二是进行液体培养,但如何将微生物分解的磷浸

* 北京市自然科学基金重点资助项目(No. 6971003)

收稿日期:1999-09-15,修回日期:2000-02-18

提出来并测定,目前有多种方法。尹瑞玲^[1]将培养液过滤,直接测定滤液中的磷含量;梁绍芬等^[2]、Paul等^[3]和Kucey^[4]等都采用离心的方法,除去微生物细胞,测定离心后上清液中磷的含量;也有人将菌株接种于30mL培养液中培养21d后,再加入0.1mol/L HCl振荡过滤后测定,认为能被0.1mol/L HCl提取出的磷是微生物分解出来的磷^[5]。所有这些方法都不包括微生物生物量磷。

微生物在生长繁殖时,不仅分解难溶性的磷化合物,而且还同化一部分分解出来的磷,所以微生物生物量磷也应是微生物分解的磷的一部分。本研究采用熏蒸、消煮等方法,测定砂培过程中微生物分解出来的磷,以期找到准确的测定微生物分解磷能力的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:所有菌株都是本实验室从土壤和作物根际分离得到的,分解有机磷化合物的细菌菌株编号为2FOP1、2VOP6、2MOP22,分解无机磷酸盐细菌菌株编号为2VCP1、2MCP2、2VCP3、2MCP4。

1.1.2 培养基:无机磷培养基:葡萄糖10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, NaCl 0.3g, KCl 0.3g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, 酵母膏0.4g, 蒸馏水1000mL, pH7.0~7.5;有机磷培养基:同上,但其中补加卵磷脂0.2g, CaCO_3 5g。

1.1.3 细砂:细砂过2mm筛,用水洗3次以除去附着的土壤,再用1%的稀盐酸浸泡24h后,用蒸馏水洗至中性,烘干备用。称取细砂50g于50mL三角瓶中,无机磷细菌需加入磷矿粉0.5g, $1.05 \times 10^5 \text{ Pa}$ 灭菌30min,共3次。

1.2 方法

1.2.1 砂培试验:将2mL菌液接入灭菌的细砂中,分别加入8mL有机磷或无机磷培养基,无机磷培养基中补加葡萄糖1g和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.08g, 28℃培养4周。

1.2.2 熏蒸处理:取3份上述培养物进行熏蒸处理^[6],3份不熏蒸,处理后加入50mL蒸馏水振荡(185r/min)30min,再离心(4000r/min)15min,取上清液用钼锑抗比色法测定磷含量。

1.2.3 消煮:取上述浸提液5mL,加浓 H_2SO_4 8mL,消煮至棕黑色,加30% H_2O_2 数滴,继续消煮至清亮。消煮液定容后,用钼锑抗比色法测定消煮液中磷的含量。

所有分析都做4次重复。

2 结果与讨论

2.1 熏蒸和消煮对测定细菌分解卵磷脂的影响

从表1可以看出,当直接用水浸提培养4周的砂土,并用钼锑抗比色法测定浸提液中的磷,除了接种2FOP1的处理,浸提液中磷的含量比不接种的对照增加了13%,其余两个处理都比对照要低,尤其是接种2VOP6的处理,浸提液中磷含量比对照降低了一半。熏蒸处理对测定结果没有明显地影响。

钼锑抗比色法只能测定无机磷酸盐,有机磷化合物不能与钼酸铵形成兰色物质。熏蒸处理破坏了微生物的细胞结构,使细胞中的磷释放出来,但由于微生物细胞中的磷主要是有机磷化合物,熏蒸处理并不能将有机磷化合物转化为无机磷酸盐,所以熏蒸处理与否并不明显影响测定结果。但2MOP22菌株,可能细胞中含有一定量的无机磷酸盐,熏蒸处理导致这部分磷释放出来,使浸提液磷含量增加了20%。

如果将浸提液消煮后再测定,由于消煮过程将浸提液中所有的有机磷化合物都转化为无机磷酸盐,不仅未接种微生物的对照处理浸提液中磷含量大幅度增加,而且所有接种微生物处理的浸提液中磷含量都大幅度提高(表2)。由于对照水浸提液中的磷主要是容易分解的有机磷化合物,在培养期间这部分磷可能被微生物全部分解掉,所以在计算微生物分解卵磷脂能力时,用不消煮没有接种微生物的处理作为对照。3株细菌都表现出很强的分解卵磷脂的能力,尤其是2VOP6菌株,浸提液中磷含量提高了236%,而不消煮时其测定值比对照还低一半。这是因为菌体利用大量所分解的磷,将其转化为有机形态,无法用钼锑抗测定出来,所以测定结果显示该菌株不表现出分解卵磷脂的能力。但是,接种2FOP1的处理,熏蒸后消煮的测定值小于不熏蒸消煮时的测定值,可能是由于熏蒸时破坏了微生物细胞,比起完整的细胞,细胞碎片可能黏附在砂粒上,从而比较难以浸提。

表1 熏蒸对测定有机磷细菌分解卵磷脂的影响(mg P/kg 砂)

菌株编号*	不熏蒸		熏蒸	
	磷含量	磷增加量	磷含量	磷增加量
CK	1.32	0	1.36	0
2FOP1	1.50	0.18	1.48	0.12
2VOP6	0.65	-0.67	0.50	-0.86
2MOP22	1.19	-0.13	1.43	0.07

LSD_{0.05} = 0.124

* 2FOP1芽孢杆菌属,2VOP6产碱菌属,2MOP22假单胞菌属

表2 消煮对测定有机磷细菌分解卵磷脂能力的影响(mg P/kg)

菌株编号*	不熏蒸		熏蒸	
	磷含量	磷增加量*	磷含量	磷增加量*
CK	3.18*	0	3.45*	0
2FOP1	3.35	2.03	2.59	1.23
2VOP6	4.43	3.11	3.91	2.55
2MOP22	2.29	0.97	2.61	1.25

LSD_{0.05} = 0.267

* 用表1中不接种的CK做为对照

综上所述,在测定微生物分解有机磷化合物能力时,浸提液必须进行消煮处理,否则将低估微生物的解磷能力,甚至得出错误的结论。

2.2 熏蒸和消煮对测定细菌分解磷矿粉能力的影响

从表3可知,直接测定浸提液中的磷,接种2株假单胞细菌(2VCP1和2VCP3)的处理,不进行熏蒸处理的浸提液中磷的含量比对照增加了3倍以上,而接种2株欧文氏细菌(2MCP2和2MCP4)的处理,浸提液中磷的含量比对照略高。如果浸提前进行氯仿熏蒸处理,除了接种2VCP1的处理,浸提液中磷的含量略有降低外,其余各处理都比不熏蒸高2倍多。这说明这些分解无机磷的细菌,细胞中存在大量的无机磷酸盐,氯仿熏蒸时由于破坏了细胞的结构,使这部分磷释放出来,这与分解卵磷脂的细菌完全不一样,可能与培养基中水溶性磷酸盐的浓度有关。介质中高浓度的磷酸盐,可能导致细菌细胞对磷的奢侈吸收,并以磷酸盐的形态保存在细胞中。

将浸提液消煮后再测定,结果见表4。不接种的对照,可能是由于浸提液中含有少量细小的磷矿粉颗粒,消煮时转化为可溶性的磷酸盐,从而使消煮液的测定值比不消煮的要高。所有接种细菌的处理,不熏蒸的浸提液消煮后,磷的含量提高了1.5~4倍,而熏蒸的浸提液消煮后,接种2VCP3和2MCP4的处理,磷含量增加的幅度比较小,而接种2VCP1和2MCP2的两个处理,磷含量分别增加了4倍和2倍。这说明4个菌株都具有溶解磷矿粉的能力,以2VCP1最强,其中2VCP1和2MCP2同化大量从磷矿粉中溶解下来的磷,而2VCP3和2MCP4则将溶解的磷以无机磷酸盐的形式贮藏于细胞内,只有很少一部分被同化,转变为微生物体内有机磷化合物。

微生物的解磷机制一般认为与微生物分泌有机酸有关,Illmer & Schinner^[7]发现:伴随着呼吸或NH₄⁺的同化,发生质子的释放是解磷的另一种机制。Asea等^[8]也认为产酸不是磷释放到培养

表3 熏蒸对测定无机磷细菌分解
磷矿粉的能力影响(mg P/kg 砂)

菌株编号*	不熏蒸		熏蒸	
	磷含量	磷增加量	磷含量	磷增加量
CK	0.95	0	1.00	0
2VCP1	4.73	3.79	4.48	3.48
2VCP3	3.95	3.00	7.25	6.25
2MCP2	1.05	0.11	3.27	2.27
2MCP4	1.26	0.31	2.43	1.43

LSD_{0.05}=0.284

表4 消毒对测定无机磷细菌分解
磷矿粉能力的影响(mg P/kg 砂)

菌株编号	不熏蒸		熏蒸	
	磷含量	磷增加量	磷含量	磷增加量
CK	1.48	0.00	1.77	0.00
2VCP1	12.96	11.48	19.45	17.68
2VCP3	6.24	4.76	8.15	6.38
2MCP2	4.10	2.62	6.62	4.85
2MCP4	3.97	2.49	2.81	1.04

LSD_{0.05}=0.467

* 2VCP1、2VCP3 假单胞菌属, 2MCP2、2MCP4 欧文氏菌属

基质中的唯一原因,磷浓度最终的增加可能是由于细胞裂解。在整个培养过程中,培养基质第一次磷含量的增加可能是由于微生物产酸,然后微生物细胞可能改变它们的代谢机制,释放有机代谢物于基质中,如乳酸、琥珀酸、NH₄⁺等,可能形成有机磷化合物而降低溶液中的磷含量。由于基质组成的变化,可能迫使微生物再次利用这些化合物作为能源或营养源,这可能导致第二次磷的释放。在整个过程中几乎影响pH变化几次,产生不同的有机磷化合物,直至由于缺乏营养而死亡。由于本研究没有进行细菌解磷的动态观察,还无法证实这些现象。但是,本研究发现有些细菌在生长繁殖过程中,利用大量所溶解的磷,将其转化为有机磷;另一些细菌则发生对分解出来的无机磷酸盐的奢侈吸收,在细胞内贮藏大量的无机磷酸盐。Beever & Burns^[9]的研究结果也证实了这一点,他们发现真菌细胞中贮藏数量可观的磷。所以,不能因为直接浸提液中磷含量低于不接种的对照,就推断此菌株没有解磷能力,必须考虑到微生物在生长繁殖过程中,对所分解的磷的吸收和同化利用。

参 考 文 献

- [1] 尹瑞玲. 土壤, 1988, 20(5): 243~246.
- [2] 梁绍芬, 姜瑞波, 葛 诚主编. 微生物肥料的生产和发展及存在的问题. 北京: 中国农业科技出版社, 1996, 61~65.
- [3] Paul N B, Sundara Rao W V B. Plant and Soil, 1971, 35: 127~132.
- [4] Kucey R M N. Can. J. Soil Sci., 1983, 63: 671~678.
- [5] 许光辉编. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986, 246~248.
- [6] 林启美. 生态学杂志, 1999, 18(2): 63~66.
- [7] Illmer P, Schinner F. Soil Biol. & Biochem., 1995, 27(3): 257~263.
- [8] Asea P E A, Kucey R M N, Stewart J W B. Soil Biol. & Biochem. 1988, 20: 459~464.
- [9] Beever R E, Burns D J W. Advances in Botanical Research, 1980, 8: 127~219.