

一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探*

林启美 王 华 赵小蓉 赵紫鹃

(中国农业大学资源环境学院土壤和水科学系 北京 100094)

摘要:4株细菌和8株真菌培养6d后,发现培养液中有机酸含量大幅度增加,pH大幅度地下降,磷的含量大幅度增加,真菌比细菌表现出更强的溶解磷矿粉的能力。不同的微生物分泌有机酸的数量和种类差别很大,真菌分泌的有机酸种类比细菌要多。但是,培养液中有机酸总量与解磷量之间并不存在显著的相关性。

关键词:细菌,真菌,解磷能力

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0026-05

CAPACITY OF SOME BACTERIA AND FUNGI IN DISSOLVING PHOSPHATE ROCK

LIN Qi-Mei WANG Hua ZHAO Xiao-Rong ZHAO Zi-Juang

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

* 国家重点基础研究发展规划项目(No. G1999011803)

收稿日期:2000-01-25,修回日期:2000-04-6

Abstract: Four bacterial and 8 fungal isolates were incubated in media for 6 days. It was found that organic acid content in the media increased largely, but pH decreased sharply. Phosphorus content in the media enhanced dramatically as well. The fungal isolates showed stronger ability to dissolve phosphate rock than the bacterial ones. These isolates excreted not only quite distinct volume of organic acids but diverse organic acid chemicals. The fungi produced more kinds of organic acids than the bacteria. However, there was no significant relationship between the total quantity of organic acids and P content in the media.

Key words: Bacteria, Fungi, Dissolving phosphate rock

土壤中存在大量的微生物,能够将难溶性的磷酸盐,如磷矿粉中的磷转化为水溶性形态。从而供植物吸收利用^[1]。不同种类的微生物,不仅解磷能力有巨大的差异,而且解磷的机理也可能不一样。林启美等^[2]发现具有解磷能力的细菌,在培养期间,培养介质的酸度一般都降低;不具有解磷能力的微生物,其培养介质的 pH 不仅不降低,反而升高,但是,培养介质的 pH 与解磷数量之间并不存在显著的相关性。有人认为^[3]微生物的解磷能力可能与微生物分泌有机酸类物质有关,也可能存在多个解磷机理^[4]。本文对 4 株细菌和 8 株真菌的解磷能力及其机理,做一个初步的探索。

1 材料与方法

1.1 菌株

从玉米根际和非根际土壤中分离得到的具有解磷能力的微生物,根据在固体培养基上透明圈的大小,选取透明圈比较大的细菌 4 株,编号 Bm1、Bm2、Bm5、Bm9,真菌 8 株,编号 Fm1 至 Fm8。

1.2 培养基

1.2.1 蒙金娜无机磷培养基: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, 磷矿粉(<200 目) 10g, 蒸馏水 1000mL, pH7.0~7.5。

1.2.2 真菌用无机磷培养基:葡萄糖 2g, 蔗糖 2g, NH_4Cl 1.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, KCl 0.3g, NaCl 0.2g, 磷矿粉 10g, 土壤浸出液 12.5mL, 蒸馏水 1000mL, pH7.0。

1.2.3 保存培养基:牛肉膏蛋白胨培养基(细菌)和 PDA 培养基(真菌)。

1.3 培养液中磷含量的测定

将供试菌体在保存培养基上制成悬液(28°C 培养 3d),取 1mL 分别接种到 50mL 蒙金娜无机磷培养基和真菌无机磷培养基中,28°C 摇床培养 6d(160r/min)。将菌液离心(10000r/min, 30min),用钼锑抗比色法^[5]测定上清液中磷的含量。将培养液离心(3000 r/min, 30min),使磷矿粉沉淀,上清液用 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 消煮后,同上测定消煮液的磷含量。

1.4 培养液中有机酸组成及其含量的测定

取 1.3 的 10000r/min 离心上清液,经适当稀释后,用 HPLC(岛津-LC-10A)测定有机酸的组成和含量。色谱条件:分析柱 RP-ODS-C18;检测波长 214nm;流动相 0.25mmol/L pH 2.10 磷酸二氢钾缓冲液;流速 0.7mL/min;柱温 27°C。培养液的酸度用 pH 计测定。

2 结果

2.1 细菌的解磷能力及机理

表1的结果表明,4株细菌都具有一定的溶解磷矿粉的能力,培养6d后,培养液的磷含量最高达43.34mg/L,比不接种的对照增加了10多倍。将培养液消煮后,磷的含量有所增加,不接种的对照,磷含量也增加,可能是由于离心的上清液有少量磷矿粉。培养液的pH都大幅度下降,从pH7.39降低到4左右。

表1 细菌培养液的磷含量(mg/L)与pH的关系

菌株	培养液磷含量	培养液全磷含量	pH
Bm1	26.92	30.54	3.89
Bm2	43.34	46.73	3.59
Bm5	35.74	39.21	3.41
Bm9	31.14	36.42	4.24
CK	3.28	5.28	7.39

表2 细菌培养液有机酸的组成及其含量(mg/L)

菌株编号	苹果酸	丙酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	总计
Bm1	10.56	16.06	0	0	0	27.16
Bm2	70.76	0	25.86	11.16	0	107.78
Bm5	198.32	8.83	67.52	17.93	46.38	338.98
Bm9	38.77	15.14	33.07	0	50.92	137.9
CK	15.77	0	0	0	27.85	43.62

从表2可以看出,3个菌株(Bm2、Bm5、Bm9)的培养液中,不仅有有机酸的含量增加,而且种类也增多。培养液中有有机酸的浓度最高可达338.98mg/L,但Bm1菌株的培养液有机酸比不接种的对照反而减少了近一半,只有27.16mg/L。培养基中只有苹果酸和柠檬酸,而发酵液中还发现有丙酸、乳酸、乙酸,尤其是Bm5菌株,不仅有机酸含量高,而且5种有机酸都存在,特别是乳酸和苹果酸增加最多。菌株Bm1利用了培养基中柠檬酸和少量的苹果酸,释放出丙酸。可见,不同的细菌不仅分泌的有机酸总量上差异很大,而且种类也不一样。

2.2 真菌的解磷能力及机理

真菌表现出比细菌强得多的解磷活力(表3)。培养6d后,培养液的磷含量大幅度增加,最高为145.36mg/L,最低的也有37.41mg/L。培养液消煮后,磷的含量增加幅度更大,最高的达到320.54mg/L,比不消煮增加了近一倍。除了菌株Fm1的培养液,酸度比不接种略有下降外,其余菌株的培养液pH都降到4左右。

表3 真菌培养液磷含量(mg/L)与pH的关系

菌株	培养液磷含量	培养液全磷含量	pH
Fm1	37.41	52.38	6.30
Fm2	71.23	83.19	4.39
Fm3	90.54	129.98	3.41
Fm4	64.21	68.64	4.26
Fm5	145.36	320.54	3.04
Fm6	74.48	100.74	3.63
Fm7	81.23	113.62	4.28
Fm8	59.64	65.22	3.82
CK	0.53	6.06	7.28

表4的结果表明:在培养期间,真菌也大量分泌有机酸,培养液中有机酸含量最高达到302.27mg/L,并且发现培养液中有机酸的种类也发生了变化。培养基中共有6种有机酸,接种真菌培养6d后,酒石酸、反丁烯二酸和顺丁烯二酸几乎被真菌利用掉,而草酸、乳酸、乙酸和柠檬酸则大幅度增加,但是不同的菌株存在很大的差异。

表4 真菌培养液有机酸的组成及其含量(mg/L)

菌株	草酸	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸	顺丁烯二酸	柠檬酸	丁二酸	反丁烯二酸	总计
Fm1	18.23	62.89	0	0	41.99	0	0	28.49	0	151.60
Fm2	0	0	5.05	0	0	0.06	30.97	0	0	36.08
Fm3	128.70	0	0	14.16	0	0.07	20.65	19.88	0	183.46
Fm4	0	0	0	0	96.26	0.14	23.58	0	0	119.98
Fm5	39.16	0	28.59	18.61	111.20	0.11	104.60	0	0	302.27
Fm6	29.58	0	12.17	0	0	0.24	25.89	0	0	67.88
Fm7	42.03	0	34.58	161.50	0	0.47	37.76	0	0.08	276.42
Fm8	138.30	0	8.06	28.45	10.46	0.17	0	0	0	185.43
不接种	10.50	9.23	12.54	0	0	0.80	15.42	0	0.05	48.54

3 讨论

解磷菌一般首先根据其溶解磷矿粉等难溶性磷酸盐来确定,然后用摇瓶培养或其它的培养方法,定量地测定其解磷能力。本研究结果表明:被解磷菌溶解的磷中很大一部分用于组建微生物的细胞,如果将这一部分磷排除在外,会低估解磷菌的解磷活力,有时候甚至导致错误的结论^[6]。所以,在定量测定解磷菌的解磷数量时,必须将离心的上清液消煮。

微生物之所以具有溶解难溶性磷酸盐的能力,可能与培养液的酸度下降有关。Paul^[7]发现培养液的pH与解磷量之间存在显著的相关性,但本研究发现无论是细菌,还是真菌,其解磷数量与pH之间没有显著的相关性,其他人也发现了类似的结果^[3]。酸度降低的原因有多种,包括微生物呼吸释放出的CO₂与水反应后形成H⁺,也可能是微生物在同化NH₄⁺时,释放出H⁺,所以培养基中NH₄⁺的存在非常必要,但也不是所有微生物解磷的充分条件^[8]。

大多数研究者认为微生物的解磷作用,主要取决于其分泌有机酸的能力。业已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,另一方面还与Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Al³⁺等离子以多种形式结合,使难溶性磷酸盐中的磷释放出来^[8]。本研究发现4株细菌的解磷数量与分泌的有机酸总量之间相关性很低,尽管真菌的解磷量与有机酸量的相关性有所改善,但也没有达到显著水平(相关系数最高的为0.64, $p < 0.05$)。本研究还发现不同的微生物,不仅分泌有机酸的数量差异很大,有机酸的种类也有很大的不同,由于不同的有机酸与Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Al³⁺等离子的结合能力不一样,可能是影响解磷数量的关键因素。这方面还需要做进一步细致的研究。也许还存在其它的解磷机理,微生物在不同的生长时期,其解磷机理可能发生转变,关于微生物的解磷机理还有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 尹瑞玲. 土壤, 1988, 20(5): 243~246.
- [2] 林启美, 赵小菁, 孙森鑫, 等. 土壤与环境, 2000, 9(1): 34~37.
- [3] Asea P E A, Kucey R M, Stewart J W B. Soil Biol Biochem, 1988, 20(4): 459~464.

- [4] Illmer P, Schinner F. *Soil Biol Biochem*, 1995, 27(3):257~263.
- [5] 南京农业大学主编, 土壤农化分析, 北京: 农业出版社, 1981, 71~74.
- [6] 赵小蓉, 林启美, 孙焱鑫, 等. *微生物学通报*, 2001, 28(1):1~5.
- [7] Paul N B, Sundara Rao W V B. *Plant and Soil*, 1971, 35:127~132.
- [8] Illmer P, Schinner F, *Soil Biol Biochem*, 1995, 27(3):257~263.
- [9] Surange S, *Current Science*, 1985, 54:1134~1135.