

4株溶磷细菌和真菌溶解磷矿粉的特性*

林启美 赵海英** 赵小蓉

(中国农业大学土壤和水科学系 北京 100094)

摘要: 溶磷微生物广泛地分布在土壤、根际等生态环境中,了解这些微生物溶解难溶性磷酸盐如磷矿粉的特性,对于开发利用这些微生物,提高磷素利用效率具有重要作用。研究发现:真菌比细菌溶解磷矿粉的能力要强得多,培养基中的铁、镁、锰、钠等成分可以提高真菌的溶磷量,但降低了细菌的溶磷量。培养基中磷矿粉用量越高,溶磷量越低;碳源物质浓度高于3%将显著地降低溶磷量。微生物能够破坏磷矿粉的结构,使其中的磷在以后的培养过程中更加容易释放出来。可见利用微生物活化磷矿粉中的磷,具有良好前景。

关键词: 微生物, 磷矿粉, 溶磷量

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2002) 06-0024-05

THE CHARACTERISTICS OF SOLUBILIZING ROCK PHOSPHATE BY FOUR ISOLATES OF BACTERIA AND FUNGI

LIN Qi-Mei ZHAO Hai-Ying ZHAO Xiao-Rong

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

Abstract: Phosphate-dissolving microorganisms are widely distributed in soil, rhizosphere and other ecological environment. Understanding the characteristics of these microorganisms in solubilizing phosphates is helpful to apply them in improving P use efficiency. The obtained results indicated that the fungi had much higher capacity to dissolve the rock than the bacteria. Existence of Fe, Al, Mg and Na in the culture media reduced the rock solubilization by the bacteria, but increased the solubilization of the fungi. The higher content of the rock in the media, the lower capacity of the rock phosphate solubilization was found. The capacity was also significantly reduced if the concentration of C material in the media was higher than 3%. It was also found that the microorganisms destroyed the rock structure. The P was more easily released from the rock at further incubation. In conclusion, there is some potential to utilize the microorganisms to activate the rock phosphate.

Key words: Microorganisms, Rock phosphate, P solubilization capacity

我国磷矿资源相当丰富,但80%以上是中低品位磷矿,并且难以分选、加工成高浓度磷肥。直接施用仅在酸性土壤和某些作物上表现出良好的效果,而且与矿物的特性密切相关。开发利用这些磷矿资源,对我国农业发展具有重要的意义。

土壤和作物根际存在大量能够溶解磷矿粉的微生物^[1,2],这些微生物统称为溶磷菌,包括细菌、真菌和放线菌。向土壤接种这些溶磷菌,能够显著地增强土壤供磷能力,增加作物吸收磷量,提高作物生物量和产量^[3,4]。本文就一些菌株溶解磷矿粉的特性进行探讨,为通过生物途径开发利用磷矿粉提供依据。

* 国家重点基础研究规划项目 (No. G1999011803)

** 现在山西省农业厅工作

收稿日期: 2001-09-05, 修回日期: 2001-10-22

1 材料与方法

1.1 菌株和磷矿粉

供试菌株是本实验室从土壤中分离出来的, 细菌2株: 节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) 1TCri7, 假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 2VCP1, 真菌为两株曲霉 (*Aspergillus* sp.) 2TCiF2 和 4TCiF6。

磷矿粉来自贵州开阳和云南昆阳, 粉碎过筛 ($< 0.018\text{mm}$), 2% 柠檬酸浸提的有效磷 (P_2O_5) 分别为 4.91% 和 5.06%, 1:1 硝酸测定的全磷 (P_2O_5) 分别为 35.16% 和 30.57%^[5]。

1.2 培养基成分对微生物溶解磷矿粉的影响

细菌培养基 A: 葡萄糖 10g, 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, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, 开阳磷矿粉 10g, 水定容至 1,000mL, pH7.0。

细菌培养基 B: 葡萄糖 10g, KCl 0.3g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, 开阳磷矿粉 10g, 水定容至 1,000 mL, pH7.0。

真菌培养基 C: 蔗糖 10g, 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, KNO_3 0.76g, 开阳磷矿粉 10g, 水定容至 1,000mL, pH7.0。

真菌培养基 D: 蔗糖 10g, KCl 0.3g, KNO_3 0.76g, 开阳磷矿粉 10g, 水定容至 1,000mL, pH7.0。

将牛肉膏蛋白胨上生长的细菌和在 PDA 培养基上生长的真菌, 刮下制成菌体或孢子悬浮液, 取 1mL (约 10^8 个/mL) 分别接种到 50mL 的培养基 A、B、C、D 中, 在 28℃ 下培养 7d 后 (130r/min), 高速离心 ($9,000g$) 20min, 用钒钼黄比色法测定上清液的磷含量, 同时做不接种的对照。

1.3 连续培养对微生物溶解磷矿粉的影响

分别向 1.2 中筛选出来的 50mL 培养基中加入云南昆阳磷矿粉 0.5g、2.5g、5.0g 和 25.0g, 灭菌后接种供试菌株, 培养 7d, 在 3,000r/min 下离心 10min, 真菌则首先用超声波细胞破碎机处理 3 次, 每次 1min (400W) 后再离心。再向沉降物中加入去离子水 10mL, 搅拌混合同上离心, 如此重复 4 次, 上清液全部无损地转移到 100mL 容量瓶中, 再离心 ($9,000g$, 20min), 用钒钼黄法测定再次离心所得的上清液磷量。

将沉降物无损地转移到三角瓶中, 再加入 50mL 培养基, 接种后同上培养 7d 后, 再离心, 再培养, 如此进行 3 次, 同上测定上清液的含磷量。由于不接种的对照溶磷量比较小, 所以此试验没有做不接种的对照。

1.4 碳源物质浓度对溶解磷矿粉的影响

将碳源物质浓度调节到 1%、2%、3% 和 5%, 磷矿粉用量为 1%, 其它成分同 1.2, 同上接种溶磷菌后进行培养, 测定上清液的含磷量。

溶磷量为经过微生物处理后 1g 磷矿粉所释放出来的磷量, 溶磷率为经过微生物处理后 100g 磷矿粉中的磷所释放出来的磷量。所有测定都做 3 次重复。

2 结果与讨论

2.1 培养基中无机盐对微生物溶解磷矿粉的影响

表1 无机盐对微生物溶解磷矿粉的影响

菌株	培养基	培养液含磷量 (P_2O_5 mg/L)	溶磷率 (%)	pH
1TCR7	A	52.20 ± 18.95	1.49	3.68
	B	81.12 ± 4.29	2.31	3.95
2VCP1	A	44.44 ± 11.35	1.26	3.95
	B	83.24 ± 0.71	2.37	3.98
2TCIF2	C	238.32 ± 20.55	6.78	3.76
	D	197.55 ± 69.88	5.62	3.53
4TCIF6	C	216.37 ± 12.44	6.15	4.07
	D	184.23 ± 20.00	5.24	3.79
CK	A	13.88 ± 0.81	0.40	6.97
CK	B	12.70 ± 0.71	0.36	7.42
CK	C	13.33 ± 1.36	0.38	7.61
CK	D	10.98 ± 1.36	0.31	7.72

菌株的溶磷率增加了 55.03%，2VCP1 的溶磷率增加了 88.09%。这一方面说明供试菌株对这些无机营养需要量很少，磷矿粉中的含量能够满足其需要；另外一个原因可能是由于培养基中没有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 等离子，减少了与磷酸根反应形成难溶性化合物，避免了微生物所释放出来的磷被再固定。

与细菌相反，两株曲霉的溶磷活性在这些无机盐不存在时，其溶磷活力下降，2TCIF2 菌株的溶磷率降低了 17.10%，4TCIF6 菌株也降低 14.80%。这可能说明真菌对这些无机营养需要量比较大，磷矿粉中的这些成分不能满足供试真菌生长繁殖的需要。

所有接种培养液的酸度都明显降低，不接菌的培养液的酸度在 6.97 ~ 7.72，接种处理培养液的酸度下降到 4 左右。许多研究者也发现：培养介质酸度的提高，是微生物溶磷的重要表征之一^[7,8]。这说明溶磷微生物在其代谢过程产生了大量的致酸物质，如质子和有机酸，质子能够与磷矿粉中的离子发生交换反应，有机酸能够与钙、镁、铁等发生沉淀、络合甚至螯合反应，从而使磷矿粉溶解，磷酸根释放出来。

根据本试验的结果，为了提高工作效率，在以后的研究中，去掉培养基中铁、锰、镁、钠等无机盐成分，细菌培养基为：葡萄糖 10.0g，KCl 0.3g， $(NH_4)_2SO_4$ 0.05g，水定容至 1,000mL，pH7.0。真菌培养基为：蔗糖 10.0 g，KCl 0.03g， KNO_3 0.76g，水定容至 1,000mL，pH7.0。

2.2 多次培养对微生物溶解磷矿粉的影响

从表 2 的结果来看，连续培养 3 次，曲霉 2TCIF2 的总溶磷率最高达 52.32%，而假单胞菌 2VCP1 最高只有 4.94%。无论是细菌还是真菌，其溶磷量和溶磷率都随着磷矿粉加入量的增加而减少，当磷矿粉加入量为 50% 时，培养 3 次共 21d，2VCP1 菌株总溶磷量只有 0.03mg P_2O_5 /g 磷矿粉，总溶磷率只有 0.01%；2TCIF2 菌株则分别为 3.11mg P_2O_5 /g 磷矿粉和 1.01%。

理论上在一定浓度范围内，基质越多反应越容易，产物形成得就越多。本试验的结果表明：磷矿粉用量为 1% 时，已经达到甚至超过了最合适的磷矿粉用量，再增加磷

微生物正常的生长繁殖，不仅需要充足的碳源物质，而且还需要氮、磷、钾、钙、镁、铁等无机盐成分，有些微生物还需要特殊的生长因子。从表 1 可以看出，供试真菌的溶磷能力比细菌要强得多，这与其他许多研究者所得的结果一致^[6]。去掉培养基中铁、锰、镁、钠无机盐，两株细菌溶解磷矿粉的活力显著提高，其中 1TCR7

矿粉的用量, 溶磷量就减少, 甚至完全不表现出任何溶磷活力。张永奎等⁹也发现培养基中磷矿粉超过一定浓度时, 溶磷菌的溶磷活性将大幅度降低, 主要是由于氟对微生物的毒害作用, 与我们所得的结果基本一致。

表2 多次培养对微生物溶解磷矿粉的影响

菌株	磷矿粉 用量 (%)	溶磷量 (mg/g)			合计	总溶磷率 (%)
		7d	14d	21d		
2VCP1	1%	3.95 ± 0.30	4.16 ± 0.11	6.93 ± 0.01	15.04	4.94
	5%	0.80 ± 0.07	0.90 ± 0.07	1.03 ± 0.03	2.73	3.54
	10%	0.50 ± 0.03	0.45 ± 0.10	0.45 ± 0.08	1.40	0.46
	50%	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.002	0.03	0.01
2TCiF2	1%	48.39 ± 0.73	50.28 ± 6.37	60.56 ± 6.90	159.23	52.32
	5%	17.27 ± 0.55	24.66 ± 1.58	19.49 ± 0.72	61.42	20.34
	10%	7.70 ± 1.48	16.02 ± 3.30	13.28 ± 0.70	37.00	12.10
	50%	0.38 ± 0.01	0.96 ± 0.27	1.76 ± 0.22	3.11	1.01

多数研究者认为: 微生物之所以能够溶解磷矿粉等难溶性磷酸盐, 一是由于在其代谢过程中产生的质子与磷矿粉中的铁、铝、钙、镁等离子交换作用¹⁰, 二是由于有机酸类物质与这些离子结合, 或发生沉淀反应, 或发生络合反应, 或发生螯合反应, 从而使磷酸根释放出来⁴。如果反应在磷矿粉颗粒的表面进行, 将不会破坏整个磷矿粉中矿物的结构; 但如果反应深入到磷矿粉内部, 则可能会破坏其结构。那么, 进行连续多次培养时, 微生物溶解磷矿粉的数量将会逐渐增加。总的来看, 第2次和第3次培养时的溶磷率显著比第1次要高 ($P < 0.05$), 真菌比细菌表现得更加明显, 特别是磷矿粉加入量比较大时, 连续多次培养效应更加明显。如细菌 2VCP1 菌株在磷矿粉加入量为 1% 时, 第1次溶磷量只有 3.95 mg P_2O_5 /g 磷矿粉, 第2次增加到 4.16 mg P_2O_5 /g 磷矿粉, 第3次增加到 6.93 mg P_2O_5 /g 磷矿粉。真菌 2TCiF2 菌株则分别从 48.39 mg P_2O_5 /g 磷矿粉, 增加到 50.28 mg P_2O_5 /g 磷矿粉和 60.56 mg P_2O_5 /g 磷矿粉。当磷矿粉用量为 50% 时, 真菌第1次溶磷量只有 0.38 mg P_2O_5 /g 磷矿粉, 第2次为 0.96 mg P_2O_5 /g 磷矿粉, 提高了 153%, 第3次为 1.76 mg P_2O_5 /g 磷矿粉, 比第2次培养提高了 83%。可见, 经过微生物处理, 磷矿粉的结构发生了变化, 磷更加容易被溶磷菌释放出来。

2.3 碳源物质浓度对微生物溶解磷矿粉的影响

表3的结果表明: 随着碳源物质浓度提高, 溶磷量降低。当碳源物质浓度由 1% 提高到 5% 时, 2VCP1 的溶磷量降低了约 11%, 2TCiF2 降低了 36%。溶磷菌的溶磷作用是由于在其代谢过程中产生的质子和有机酸与磷矿粉作用的结果^{4,10}, 那么, 在一定范围内, 增加培养基中碳源物质浓度, 将有利于微生物的生长繁殖, 也将增加质子和有机酸的生产量, 从而提高其溶磷量。本试验结果表明: 碳源物质浓度高于 3% 时, 溶磷量显著降低, 当培养基的碳源物质浓度为 2% 时, 从理论上讲, 微生物的溶磷量应该比 1% 碳源物质浓度

表3 碳源物质浓度对微生物溶解磷矿粉的影响

菌株	碳源物质加入量	溶磷量 (mg/g)	溶磷率 (%)
2VCP1	1%	5.42	1.77
	2%	5.02	1.64
	3%	4.56	1.49
	5%	4.82	1.58
2TCiF2	1%	63.11	20.64
	2%	63.11	20.64
	3%	55.74	18.23
	5%	40.12	13.13

LS_{0.05} (2VCP1) = 1.46, LS_{0.05} (2TCiF2) = 8.89

时要高,但是,本试验并没有发现这种现象,这可能是由于反馈调节作用的缘故。在溶磷菌生长繁殖过程中产生大量的质子和有机酸,使培养基的酸度升高,一般pH 3左右,如此低的pH将反过来抑制溶磷菌的代谢活动。在此条件下,即使增加碳源物质供给,也不能使微生物继续生长繁殖,也就不会提高其溶磷量,过高的碳源物质浓度会提高培养液的渗透势,过高的渗透势将破坏微生物细胞的结构。所以,应该选择合适的碳源物质浓度。

3 结论

培养基中的铁、镁、锰、钠等无机盐成分的存在,提高了供试真菌溶解磷矿粉的活力,但大幅度地降低了供试细菌溶解磷矿粉的能力。微生物能够破坏磷矿粉的结构,再次培养时,磷矿粉中的磷更加容易释放出来。增加培养基中磷矿粉浓度,溶磷量将显著降低。提高培养基中碳源物质浓度,不仅不能增加溶磷量,反而减少溶磷量。

参考文献

- [1] 林启美,赵小蓉,孙焱鑫,等.土壤与环境,2000,9(1):34~37.
- [2] 赵小蓉,林启美,孙焱鑫,等.华北农学报,2001,16(1):111~115.
- [3] Kucey R M N. Can J Soil Sci, 1987, 68: 261~270.
- [4] 杨秋忠,张芝贤,陈立夫,等.中国农业化学会志,1998,36(2):201~210.
- [5] 鲁如坤主编.土壤农业化学分析方法.北京:中国农业科技出版社,1999.
- [6] 林启美,王华,赵小蓉,等.微生物学通报,2001,28(2):26~29.
- [7] 赵小蓉,林启美,孙焱鑫,等.微生物学通报,2001,28(1):1~5.
- [8] Whitelaw M A, Harden T J, Helyar K R. Soil Biol. Biochem. 1999, 31: 655~665.
- [9] 张永奎,王安,陈茂春,等.矿产综合利用,2000,6:32~34.
- [10] Roos W, Luckner M. J Gen Microbiol, 1984, 130: 1007~1014.