

青藏高原溶磷菌菌株的分离筛选

王亚艺, 李松龄, 蔡晓剑, 郝玉兰

(青海省农林科学院, 青海 西宁 810016)

摘要:对青海省主要耕作区农田土壤进行了溶磷菌的分离和筛选, 得到具有明显溶磷圈的溶磷菌 48 株。通过对溶磷圈大小测定, 筛选出 5-1、5-2、12-7 等 12 株菌, 溶磷圈直径(D)与菌落直径(d)比值(D/d)均 ≥ 1.5 。结果表明:通过摇瓶复筛, 获得 3 株溶磷菌, 可使培养液磷含量升高, 均超过 180 $\mu\text{g/mL}$, 而 pH 平均降低 1 个单位。因此, 最终确定 5-2、5-3 和 12-7 株菌为适合青海农作区推广的高效溶磷菌。

关键词:青藏高原; 溶磷菌; 溶磷圈; 溶磷能力

中图分类号:S 144.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)15-0161-03

磷是植物生长必需的营养元素之一, 它既是植物体内许多重要有机化合物的组分, 同时又以多种方式参与植物体内各种代谢过程, 在人类赖以生存的土壤-植物-动物生态系统中起着不可替代的作用^[1]。但磷是不可再生资源, 据统计, 世界磷矿资源最多只能维持 400 a。我国有 74% 的耕地土壤缺磷, 土壤中 95% 以上的磷为无效磷, 植物很难利用^[2]。青海省主要耕作土壤为石灰性土壤, 游离碳酸钙含量高, 大部分磷形成难溶性的磷酸钙盐, 速效磷含量平均在 5~10 mg/kg, 土壤严重缺磷。农业生产中为保证作物正常生长而大量施用化肥, 但磷肥施入土壤后易被固定, 利用率不高, 青海省磷肥利用率在 5%~20%, 土壤累积磷严重, 造成大量磷素资源的浪费, 产投比较低^[3]。为此, 如何开发和有效利用被土壤固定的磷, 提高磷肥利用率, 减少化肥用量, 节约农民成本是青海省农业生产中急需解决的问题。

目前, 国内外对解磷细菌的研究较多^[4-8], 在磷细菌分离和分类、解磷能力和解磷机理、对植物生长促进作用等方面开展了大量工作, 但在青海省关于解磷细菌的报道较少。而由于该地区气候具有低温、干旱、日照时间长、辐射强、日温差大、雨热同季等特征, 农田土壤微生物也随环境的不同有其固有的特点。该试验拟从几种主要作物的根际土壤中筛选高效溶磷菌, 研究其溶磷特性, 为提高青海省农业区土壤磷素的利用率、改良盐碱地以及微生物肥料的开发奠定基础, 提供理论依据。

第一作者简介:王亚艺(1983-), 女, 硕士, 助理研究员, 现主要从事农业微生物及肥料研究工作。E-mail: 578833756@qq.com.

基金项目:青海省农林科学院院创新基金资助项目(2011-NKY-04)。

收稿日期:2012-05-23

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤 采自青海省主要农耕区海东区和海南区小麦、洋芋、油菜、蚕豆、辣椒、葱等 16 种作物的根际土壤, 采样深度 10~20 cm, 置 4℃冰箱中保存、备用。

1.1.2 培养基 溶磷菌分离采用改良的 PKO 培养基^[9], 牛肉膏蛋白胨培养基用于继代培养。所有培养基均在 121℃灭菌 25 min 备用。改良的 PKO 培养基: 葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 10 g, 0.4% 溴酚蓝 (pH 6.7) 6 mL, 琼脂 18~20 g, 蒸馏水 1 000 mL, 调节 pH 7.0~7.5。牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

1.2 试验方法

1.2.1 初筛(溶磷圈试验) 分离与纯化 将所采集的土壤样品用研钵研细, 称取 10 g, 加入 90 mL 无菌水中, 再加入玻璃珠, 振荡 30 min, 按 10 倍稀释法配制样品。用移液器吸取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} g/mL 稀释浓度 4 个样品各 0.1 mL, 分别涂布于 PKO 培养基的平板上。28℃恒温箱倒置培养 7 d, 记录具有透明溶磷圈的菌落, 测量溶磷圈直径(D)、菌落直径(d), 根据是否产生溶磷圈以及 D/d 值大小来初步确定菌株的溶磷能力。将 D/d ≥ 1.5 的菌株利用平板划线法分离纯化后, 再用接种针挑取有明显透明圈的菌落, 进一步通过划线法纯化, 直至得到纯菌株后, 转到牛肉膏蛋白胨斜面培养基上, 保存于 4℃冰箱中。

1.2.2 复筛(钼锑抗比色法) 在 300 mL 三角瓶中装入培养基 100 mL PKO 无机磷液体培养基, 高压灭菌 30 min(121℃, 101 kPa), 备用。然后将溶磷圈法初筛得

到的菌株接种到牛肉膏蛋白胨斜面培养基上,于 28℃ 培养 24 h,挑取细菌接入到无菌水中,制成含菌量为 10^7 个/mL 的菌悬液,取 1 mL 菌悬液,分别对应接种至 PKO 无机磷液体培养基,以培养基中加入 1 mL 无菌水作为对照,每个处理 3 次重复,摇床培养(28℃、150 r/min) 5 d。然后在 4℃ 条件下,对培养液进行离心(4 000 r/min) 15 min,吸取上清液,用钼锑抗比色法测定可溶性磷含量。用酸度计测定上清液的 pH。

1.2.3 土培试验 取青海省农林科学院土壤肥料研究所试验地灰钙土耕层土壤,风干过 2 mm 筛,分装到培养皿中,每个培养皿装 100 g 土壤,将复筛菌株培养液吸取 10 mL,用针管均匀地滴入到土壤中,保持土壤的湿润,重复 3 次,同时做对照试验,将所有土壤放入光照培养箱,按照昼夜交替 12 h 设置,保持室温培养 30 d,每隔 10 d 取 1 次土样,共取 4 次。所有土样自然条件下风干研磨,均匀过 1 mm 筛,测定速效磷含量。

2 结果与分析

从青海主要农作区土壤中分离出具有解无机磷能力的菌株 48 株,将分离得到的菌株进一步初筛和复筛。

2.1 初筛

2.1.1 溶磷菌溶磷能力的平板表现 经过筛选有 5-1、5-2、5-3 等 12 株菌株具有明显的溶磷能力(表 1)。在 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养基上,各个菌株的 D 值均大于 10 mm,其中,5-1 和 4-2 的 D 值最大,达到 20 mm,D/d 值在 1.80 以上,5-1 的 D/d 值最大,为 2.50。将这些菌株接种到卵磷脂固体培养基中测定溶磷圈,结果可知,仅 5-1、4-1、8-8 和 12-7 菌株产生溶磷圈。其中,4-1 的 D/d 值最大,而 12-7 的 D/d 值最小。但溶磷圈仅能定性反映溶磷能力,要定量反应溶磷能力,必须做液体发酵和土壤培养,测定培养液中可溶性磷的含量和土壤中有效磷含量。

表 1 溶磷细菌的初筛结果

Table 1 Preliminary screening result of PSBs isolated by serial dilution plating method

菌株 Strain	5-1	5-2	5-3	4-1	4-2	8-1	8-2	8-3	8-6	8-8	11-1	12-7
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养基												
D/mm	20	17	16	15	20	16	15	14	13	16	18	15
d/mm	8	9	8	9	11	10	8	9	8	10	12	10
D/d	2.50	1.89	2.00	1.67	1.82	1.60	1.88	1.56	1.63	1.60	1.50	1.50
卵磷脂培养基												
D/mm	15			18						16		21
d/mm	10			10						10		16
D/d	1.50			1.80						1.60		1.31

2.1.2 菌株在液体培养基上的计数 将筛选出的 12 株菌株挑取 2 环接种于 100 mL 细菌培养基中,28℃ 在摇床上培养 5 d,取出后用稀释平板法计数。大部分菌株经摇床培养后,其数量 $>10^8$,但菌株 12-7 在培养 10 d 后才长出菌落,且其数量仅达 10^7 。由此可以看出,有些菌

株虽然单个菌落生长较好,溶磷圈较大,但群体在液体培养基中生长状况不佳,原因可能是该菌种的繁殖能力较差,生长速度较慢或是环境不适宜。

2.2 复筛

2.2.1 溶磷菌溶磷能力的测定 通过观察菌落特征,筛选相同特征的菌株,最终确定了 6 株菌株进行液体培养,测定发酵液中速效磷和 pH。由表 2 可知,以磷酸钙为唯一磷源的解无机磷细菌培养基中接种溶磷菌株,接种处理培养液的速效磷达到 18~265 $\mu\text{g/mL}$,不同菌株溶磷能力差异较大。从溶磷能力角度来看,5-3、5-2 和 12-7 菌株溶磷能力较强,培养液中磷含量均超过 180 $\mu\text{g/mL}$,其次是 11-1、8-6 和 4-1 菌株的溶磷能力相对较弱;从 pH 分析,由于青海省农作区耕地土壤主要为石灰性土壤,pH 均在 8 以上,明显偏碱性,故降低 pH 能有效提高养分利用率和作物产量。该试验结果显示,除 4-1 菌株的培养液 pH 大于对照外,其它 5 株均符合要求。综合分析可知,5-3、5-2 和 12-7 菌株溶磷能力强,且可降低土壤 pH 值,符合筛选要求。

表 2 菌液中速效磷含量和 pH 值

Table 2 Content of available P in bacterial solution and pH test

	$\mu\text{g/mL}$						
菌株 Strains	8-6	5-3	11-1	12-7	5-2	4-1	CK
培养液磷含量 P content in solution	18	265	79	186	264	29	—
pH	6.0	6.0	6.0	5.9	5.5	7.3	6.9
与 CK 比较 Comparing to control	-0.9	-0.9	-0.9	-1.0	-1.4	0.4	—

2.2.2 溶磷能力与 pH、D/d 值的关系 微生物溶磷机理非常复杂,有些微生物溶磷主要是质子起作用,有些主要是有机酸起作用,而有些菌株则 2 种机制都存在,还有些菌株由于生长过程中产生其它的螯合物质,从而导致磷矿粉的溶解。许多研究发现,溶磷量与培养介质的 pH 之间缺乏相关性。赵小蓉等^[10]报道,细菌的溶磷量与 pH 间存在二种情况,一是提高培养液的酸度,当培养液的 pH 降低到 4.5 以下时,溶磷量大幅度增加;二是不提高培养液的酸度,其溶磷活性仍非常高。该研究表明(图 1),溶磷量与 pH 间并无相关性,说明溶磷菌的溶磷机理比较复杂,除了酸解作用,还存在其它溶磷过程。结果还显示,溶磷菌的溶磷能力随 pH 的升高呈先降低后升高的趋势,这与郝晶等^[11]研究结果相反,其原因有待进一步探究。溶磷菌溶磷能力与溶磷圈/菌落直径(D/d)之间的关系表明(图 2),溶磷菌的溶磷量与 D/d 的相关性较差,说明在筛选溶磷菌过程中仅凭 D/d 的大小不足以判定某个菌株的溶磷能力,必须与培养液中溶磷量相结合进行综合判断。

3 结论与讨论

该试验筛选到 3 株溶磷效果较好的溶磷菌,在以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为唯一磷源时,各个菌株的 D 值均大于 10 mm,

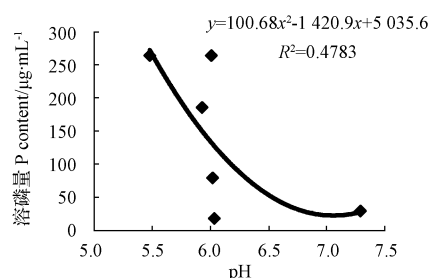


图1 细菌溶磷量与培养介质 pH 的关系

Fig. 1 The relationship between the dissolved phosphate by the bacteria and the culture pH

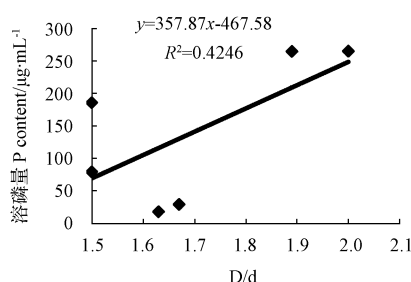


图2 细菌溶磷量与 D/d 的关系

Fig. 2 Relationship between the dissolved phosphate by the bacteria and D/d

D/d 值均 ≥ 1.5 ,但菌株的 D/d 值和溶磷量之间并不呈典型相关关系。通过研究发现,D 和 D/d 值并不能准确反映菌株的溶磷能力。因此,在菌株的初步筛选过程中,将 D 和 D/d 值作为菌株溶磷能力的初步筛选的定性判断标准有待进一步研究^[12-15]。

摇瓶复筛测各个菌株的培养液磷含量可知,在菌落数为 10^7 时,3 株菌的溶磷量均超过 $180 \mu\text{g/mL}$,溶磷能力较强。在以往对溶磷菌溶解无机磷的机制主要认为是产生柠檬酸、草酸、苹果酸等,但该试验摇瓶复筛的结果是培养液的 pH 值与溶磷量之间没有典型的负相关关系,说明不同菌株对同一难溶性磷源的溶磷机制不同,

在分泌酸的同时,可能还存在其它溶解过程。

综合分析各个菌株的 D/d 值、溶磷量以及培养液的 pH 可得,筛选出的 5-2、5-3 和 12-7 为适合青海农作区推广的高效溶磷菌。

参考文献

- [1] 吴平,印莉萍,张立萍. 植物营养分子生理学[M]. 北京:科学技术出版社,2001.
- [2] 鲁如坤. 土壤-植物营养学原理和施肥[M]. 北京:化学工业出版社,1998:152-157.
- [3] 陈占全,李月梅,孙小凤,等. 青海省耕地质量现状分析及平衡施肥建议[J]. 青海农林科技,2008(2):32-36.
- [4] 赵小蓉,林启美. 小麦根际与非根际解磷细菌的分布[J]. 华北农学报,2001,16(1):111-115.
- [5] 林启美,赵海英,赵小蓉. 4 株溶磷细菌和溶磷真菌解磷矿粉的特性[J]. 微生物学报,2002,29(6):24-28.
- [6] 郝春花,王岗,董云中,等. 解磷菌剂盆栽及大田施用效果[J]. 山西农业科学,2003,31(3):25-28.
- [7] 蔡磊,李文鹏,张克勤. 高效解磷菌株的分离、筛选及其对小麦苗期生长的促进作用研究[J]. 土壤通报,2002(33):44-46.
- [8] 曾广勤,刘荣昌. 磷细菌剂在小麦上应用研究[J]. 河北省科学院学报,1997(3):25-28.
- [9] Gupta R, Singal R, Shankar A, et al. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1994(40):255-260.
- [10] 赵小蓉,林启美,李保国. 溶磷菌对 4 种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究[J]. 微生物学报,2002,42(2):236-241.
- [11] 郝晶,洪圣平,刘冰,等. 石灰性土壤中高效解磷细菌菌株的分离、筛选及组合[J]. 应用与环境生物学报,2006,12(3):404-408.
- [12] 王岳坤,于飞,唐朝荣. 海南生态区植物根际解磷细菌的筛选及分子鉴定[J]. 微生物学报,2009,49(1):64-71.
- [13] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1992(24):389-395.
- [14] 赵小蓉,林启美,孙焱鑫,等. 玉米根际与非根际解磷细菌的分布特点[J]. 生态学杂志,2001,20(6):62-64.
- [15] Rosas S B, Andrés J A, Rovera M, et al. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006,38:3502-3505.

Isolation and Screening of Phosphorus Solubilizing Bacterial Strains in Tibetan Plateau

WANG Ya-yi, LI Song-ling, CAI Xiao-jian, HAO Yu-lan

(Qinghai Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: By isolation and screening of phosphorus-solubilizing bacteria in cultivated farmland soil in Qinghai Province, 48 strains were obtained which had obviously dissolved phosphorus ring. By determination of the ring size, there were 12 strains such as 5-1, 5-2 and 12-7 with a ratio of dissolving phosphate zone diameter to culture community zone diameter (D/d) greater than or equal to 1.5. The results showed that three strains were isolated through broth screening increasing the content of available P in bacterial solution more than $180 \mu\text{g/mL}$ in average and pH down an average of one unit. Therefore, 5-2, 5-3 and 12-7 were determined as the final high dissolved phosphorus bacteria suitable for Qinghai agricultural district.

Key words: Tibetan plateau; P-solubilizing bacteria; dissolved phosphorus ring; ability of P-solubilizing