

DOI:10.11937/bfyy.201709035

土壤中解磷细菌的分离筛选

郑喜清, 邸娜, 李旭红, 黄越, 李鑫淳

(河套学院 农学系, 内蒙古 巴彦淖尔 015000)

摘要:为筛选出高效的解磷微生物,提高磷的有效利用,采集向日葵、小麦、豆科等不同种植区单株的根际土壤,采用平板溶菌圈法从土壤中进行分离筛选,初步筛选出3株解磷菌JLX-1、JLX-2、JLX-3,研究不同条件对其解磷能力的影响。结果表明:菌株JLX-3的解磷能力较高,溶磷圈直径和菌落直径比值D/d为2.09。菌株JLX-3在碳源为葡萄糖、氮源为硫酸铵时,溶磷量分别为5.572、5.520 mg·g⁻¹,在氯化钠浓度为0.3 g·L⁻¹、pH 7时解磷效果较好。根据形态特征和生理生化特征,初步将菌株JLX-3鉴定为芽孢杆菌。

关键词:解磷细菌;分离;溶磷能力

中图分类号:S 154.38⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)09-0164-05

磷是农业生产的重要物质保证,是植物生长发育中最主要的营养元素之一^[1],是植物体内核酸、磷脂、磷酸甘等重要化合物的组成部分;同时是植物细胞膜的组成成分,细胞膜是植物的保护组织。磷积极参与植物体内生理生化过程和各种代谢^[2]。可见磷在植物生长过程中发挥着重要作用。

我国土壤中的磷含量很高,但能被植物吸收利用的却很少,大多数的磷元素被土壤中离子所吸附^[3],影响作物吸收磷元素的因素有土壤pH、通气状况、温度、质地及土壤离子,土壤离子中的Fe²⁺、Ca²⁺、Al³⁺、Fe³⁺等与磷元素结合形成很难被植物吸收利用的难溶性磷酸盐,这个过程称为磷的固定^[4-5]。可溶性磷都被土壤中的离子吸附固定形成难溶性的磷,这就大大的降低了磷元素在土壤中的有效性,从而使植物表现出缺磷的症状,致使植物减产。土壤中能被植物吸收利用的有效态磷仅占全磷量的2%~3%^[1]。为了满足作物对土壤磷素的需求,提高作物产量,农民大量施用化学磷肥,但施入的磷肥本季节利用效率仅为5%~25%,这种通过施加磷肥来提高土壤的有效磷含量,成本高、有效转化率低、浪费严重、化学磷肥的过度使用会对土壤和水

体环境造成严重的污染^[6]。

解磷微生物可以直接提高土壤中的有效磷含量,解磷菌主要作用是将土壤中无效磷转化成有效磷,利用土壤中微生物特有的功能来提高有效磷含量,要比传统方法有更大优势^[6]。解磷微生物的存在能够增加土壤有效磷含量,促进农作物对其它营养元素的吸收。解磷微生物参与植物新陈代谢,可促进植物对根系周围微量元素的吸收,促进植物根系营养的吸收,进而提高作物抗病能力;解磷微生物能够改善土壤生态环境,提高土壤肥力^[7]。

解磷菌的分离筛选及鉴定成为了微生物学研究的重点。为此,该研究从土壤中分离筛选具高效解磷作用的菌株,对其进行初步的鉴定,进一步研究不同的条件对其解磷能力的影响,为高效解磷微生物的应用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

在临河区曙光乡采集向日葵、小麦、豆科等不同种植区单株的根际土壤为供试材料,编号封存于封口袋中,带回实验室备用。解磷细菌的分离采用无机磷培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 解磷细菌分离筛选 解磷细菌分离筛选采用席琳乔等^[8]的方法。选择有较大清晰溶磷圈的菌株,接种到无机磷固体培养基上进行划线培养,连续培养5代,以获得较稳定的纯培养,4℃斜面保藏备

第一作者简介:郑喜清(1979-),女,内蒙古兴安盟人,硕士,讲师,现主要从事植物病害综合防控技术等研究工作。E-mail:413703219@qq.com.

基金项目:河套学院自然科学基金资助项目(HTXYZY13005)。

收稿日期:2016-12-23

用。测量溶磷圈和菌落的直径,溶磷圈直径(D)与菌落直径(d)的比值是表示溶磷菌的相对溶磷能力的一个指标^[9]。

1.2.2 解磷细菌的鉴定 解磷细菌形态观察:将解磷细菌经稀释后,接种于无机磷培养基上,于 30 ℃ 恒温培养 5 d,长出单菌落后,观察记录菌落形状^[10]。同时对菌体进行革兰氏染色,在显微镜下观察菌体形态。解磷细菌生理生化特性测定:参考《常见细菌系统鉴定手册》^[11]和《伯杰细菌鉴定手册》^[12]的方法对菌株进行了淀粉水解、过氧化氢酶试验、M.R(甲基红)试验、V.P(乙酰基甲醇)试验等生理生化试验。

1.3 项目测定

1.3.1 标准曲线绘制 依次吸取 5 mg · L⁻¹ 磷标准溶液 0.2、4、6、8、10 mL 于 50 mL 容量瓶中,加水至 15~20 mL,加 1 滴 2,4-二硝基苯酚指示剂,用稀碱溶液和稀酸(硫酸)调节 pH 至溶液呈微黄色。用移液管加 5 mL 钼锑抗显色剂,定容,摇匀。30 min 后,测定 OD₇₀₀。此时各管中磷浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg · L⁻¹。以磷浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制磷标准曲线^[13]。

1.3.2 不同条件解磷细菌解磷能力的测定 1)碳源试验:配制无机磷液体培养基,培养基中其它成分和浓度不变,只改变碳源,碳源分别选用葡萄糖、蔗糖、乳糖和可溶性淀粉,将 1 mL 的菌悬液接入无机磷液体培养基中,3 次重复,空白样品不接菌;在恒温振荡培养箱中,摇床以 150 r · min⁻¹、30 ℃ 培养 4 d。然后取 5 mL 菌液 4 000 r · min⁻¹ 离心 20 min,取上清液,用钼锑抗比色法测定发酵液的 OD₇₀₀^[14]。2)氮源试验:方法同上,培养基中其它成分和浓度不变,

只改变氮源,氮源分别选用硫酸铵、氯化铵和尿素,用钼锑抗比色法测定发酵液的 OD₇₀₀^[14]。3)盐浓度试验:配制无机磷液体培养基,培养基其它成分和浓度不变,只改变氯化钠的加入量不同,氯化钠的加入量分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g · L⁻¹,用钼锑抗比色法测定发酵液的 OD₇₀₀^[14]。4)pH 试验:采用无机磷液体培养基,灭菌前用酸度计将 pH 调至 4、5、6、7、8、9,接种后,用钼锑抗比色法测定培养液的 OD₇₀₀^[14]。

2 结果与分析

2.1 解磷细菌的分离筛选

通过平板法筛选出 3 株解磷细菌,分别为 JLX-1、JLX-2、JLX-3。由表 1 可知,菌株 JLX-1 的溶磷圈直径(D)与菌落直径(d)的比值 D/d 为 1.47,菌株 JLX-2 的 D/d 为 1.57,菌株 JLX-3 的 D/d 为 2.09,可见 JLX-3 溶磷菌的相对溶磷能力较强。

表 1 解磷菌溶磷圈和菌落直径比值

菌株 Strains	溶磷圈直径 D Dissolving phosphate diameter/cm	菌落直径 d Colony diameter/cm	D/d
JLX-1	1.03	0.70	1.47
JLX-2	1.12	0.71	1.57
JLX-3	1.06	0.51	2.09

2.2 解磷菌的形态特征

由图 1 可知,菌株 JLX-1 菌落乳白色,椭圆形,中央隆起,边缘整齐,表面光滑、湿润,不透明,粘稠;菌株 JLX-2 菌落圆形,边缘整齐,外缘扁平中央突起似煎鸡蛋状,质地不均匀,不透明;菌株 JLX-3 菌落淡黄色,近似圆形,边缘整齐,表面平坦,干燥,不透明。3 个菌株细胞形态均为杆状,革兰氏阴性(图 2)。

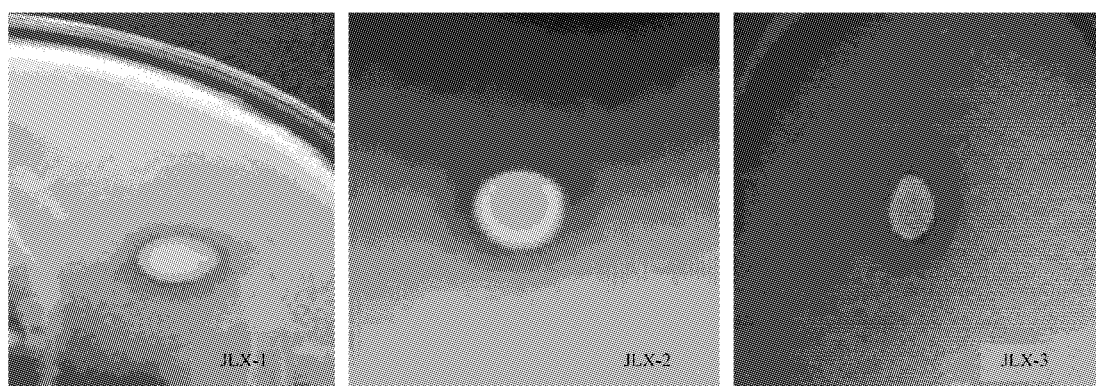


图 1 解磷细菌的菌落形态

Fig. 1 The colony of phosphate-solubilizing bacteria

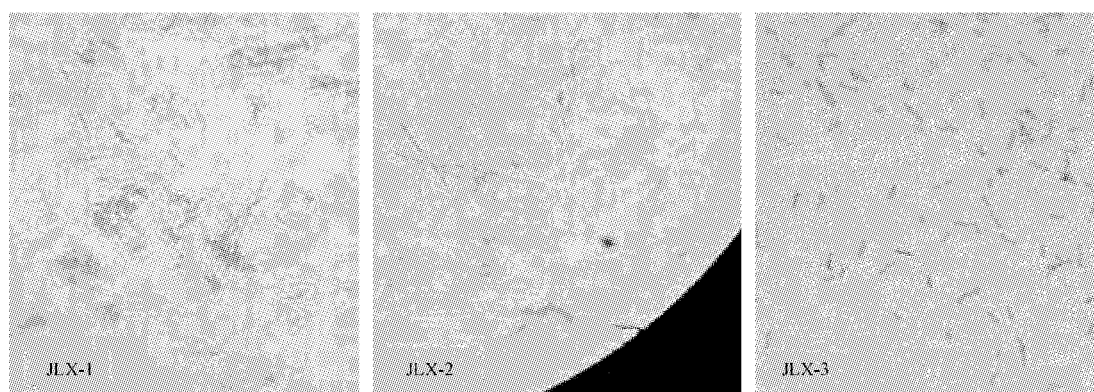


图2 解磷细菌的菌体形态(1 000×)

Fig.2 Thalli shape of phosphate-solubilizing bacteria(1 000×)

2.3 菌株JG3的生理生化特性

对菌株JG3进行了甲基红、过氧化氢、淀粉水解、V-P(乙酰基甲醇)反应测定,由表2可知,革兰氏染色为阴性,V.P反应和甲基红试验为阴性,淀粉水解和过氧化氢试验为阳性。

表2 菌株JG3理化特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of JLX-3

测定项目 Item	菌株JG3 Strain
革兰氏染色 Gram stain reaction	—
V.P反应 V-p test	—
过氧化氢试验 H ₂ O ₂ Test	+
淀粉水解试验 Starch hydrolysis	+
甲基红试验 Methyl red test	—

注: +表示阳性反应;—表示阴性反应。

Note: + means positive reaction;— means negative reaction.

2.4 解磷能力测定

2.4.1 磷标准曲线的绘制 由图3可知,磷的标准曲线为 $y=0.516x+0.0003$, $R^2=0.9997$ 。根据该标准方程及菌体发酵液的OD计算出解磷菌的解磷能力。

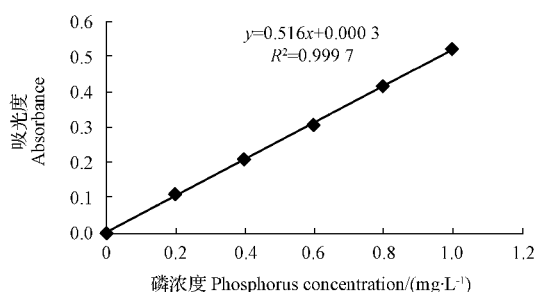


图3 磷的标准曲线

Fig.3 Standard curve of phosphorus

2.4.2 不同条件解磷细菌解磷能力的测定 1)碳源试验:通过测定不同碳源对解磷细菌JLX-3生长的影响,发现不同的碳源对解磷菌JG3的溶磷能力

有一定的影响。由图4可知,不同碳源对菌株JG3解磷能力由大到小为:葡萄糖>蔗糖>可溶性淀粉>乳糖。碳源为葡萄糖时溶磷能力最强,溶磷量达 $5.572\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;蔗糖次之,溶磷量为 $2.860\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;乳糖最差,仅有 $0.048\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。由此看出,供试碳源中,葡萄糖为最适碳源。2)氮源试验:通过测定不同氮源对菌株JLX-3生长的影响,由图5可知,尿素的溶磷量为 $4.100\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,氯化铵的溶磷量为 $2.150\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,硫酸铵的溶磷量为 $5.520\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。可见,硫酸铵为氮源时溶磷能力较强。3)盐浓度试验:通过测定不同浓度的氯化钠对菌株JG3生长的影响,由图6可知,氯化钠浓度在 $0.1\sim 0.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,解磷菌JG3生长均较好,其中在浓度为 $0.3\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,解磷菌JG3生长最好,溶磷能力最强达 $1.22\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。4) pH试验:由图7可知,菌株在pH为5时,其解磷能力较差,pH在6~9范围内,生长均较好,当pH为7时,生长最好,也表现出较强的溶磷能力。

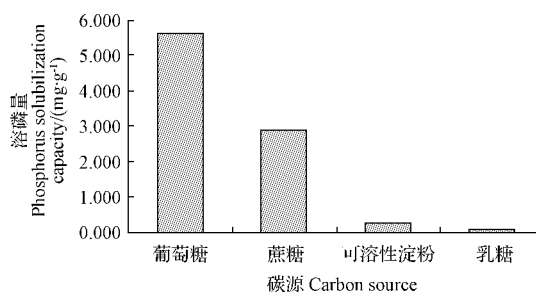


图4 菌株JLX-3在不同碳源下的溶磷量

Fig.4 Phosphate solubilization capacity of strain JLX-3 under different carbon sources

3 结论与讨论

我国磷细菌的研究开始于20世纪50年代,

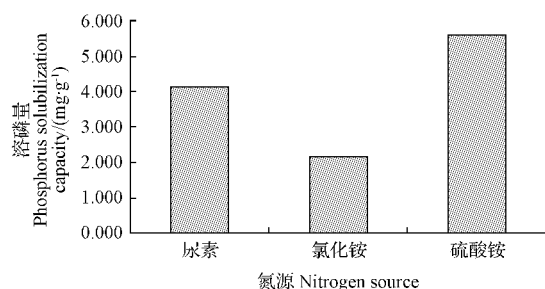


图5 菌株 JLX-3 在不同氮源下的溶磷量

Fig. 5 Phosphate solubilization capacity of strain JLX-3 under different nitrogen sources

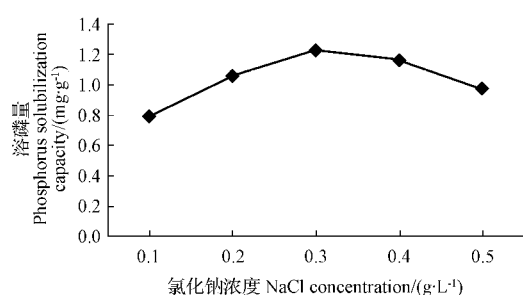


图6 菌株 JLX-3 在不同盐浓度下的溶磷量

Fig. 6 Phosphate solubilization capacity of strain JLX-3 under NaCl concentration

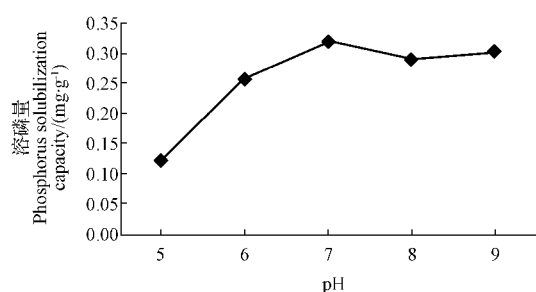


图7 菌株 JLX-3 在不同 pH 下的溶磷量

Fig. 7 Phosphate solubilization capacity of strain JLX-3 under pH

1950年,东北农业科学研究所从东北灰化土和黑土中分离出可以分解有机磷的巨大芽孢杆菌;中国科学院林业土壤研究所在1950年从东北黑土中分离出假单胞菌^[15]。2005年,陈廷伟^[16]从华北石灰性土壤中分离得到一种产酸性无芽孢杆菌,此菌具有很强的溶解磷酸三钙能力,称其为矿质磷细菌。2009年,王义等^[17]发现解磷微生物在不同土壤中的数量存在很大的差异,存在着很明显的根际效应,植物根际土壤中解磷微生物的数量明显远高于土壤其它区域的数量。

该研究从曙光乡大田不同作物的根际土壤中分离筛选到3株具有解磷效果的菌株JG1、JG2、JG3。其中菌株JG3溶磷圈最大,说明其具有较强的溶磷能力。结合解磷菌JG3的形态特征和生理生化特征,对照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰细菌鉴定手册》将菌株JG3初步鉴定为芽孢杆菌。

一些菌株在无机磷固体培养基的生长过程中可产生酸,将培养基中的磷酸钙溶解产生溶磷圈,通过分析溶磷圈的大小可对微生物的溶磷能力进行初步估测^[18]。王继雯等^[19]从2种不同根系土壤分离到10株解磷菌,根据溶磷圈直径(D)和菌落直径(d)比值大小筛选到6株有较大溶磷圈的菌株,其中,DK-4 D/d值为3.33, XL-2 D/d值为2.00, PD-2 D/d值为1.91, PC-2 D/d值为1.70。该研究筛选到的3株解磷菌,菌株JG1的D/d为1.47、菌株JG2的D/d为1.57、菌株JG3的D/d为2.09,菌株JG3的D/d比值与王继雯等^[19]研究结果一致,具有较大的溶磷圈,即具有较强的溶磷能力。

解磷能力的大小主要是由菌株的特性所决定的,在不同的条件下,菌株的解磷能力有很大的差异^[20]。同一株磷细菌在不同的碳氮源时表现的解磷能力也不一致^[21]。尹瑞玲^[22]测定了从土壤中分离出的265株细菌溶解磷矿粉的能力,平均为2~30 mg·g⁻¹。该试验研究菌株JG3在碳源为葡萄糖时溶磷能力最大,为5.572 mg·g⁻¹;氮源为硫酸铵时溶磷能力最大,为5.520 mg·g⁻¹;盐浓度为0.3 g·L⁻¹、pH为7的条件下较适合发挥其解磷作用,说明不同的菌株都有自身最适合的培养条件。

解磷菌的分离筛选及鉴定成为微生物学研究的重点。筛选出高效的解磷微生物,提高磷的有效利用,降低农林业的生产成本,保护环境和资源,具有良好的发展前景。

参考文献

- [1] 向万胜,黄敏,李学垣,等. 土壤磷素的化学组分及其植物有效性[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(6): 663-670.
- [2] 毕江涛,孙权,李素剑,等. 解磷微生物研究进展[J]. 农业科学研究, 2009, 30(4): 58-64.
- [3] 赵小蓉,林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料, 2001, 5(3): 7-11.
- [4] 王光华,赵英,周德,等. 解磷菌的研究现状与展望[J]. 生态环境, 2003, 12(1): 96-101.
- [5] 李蓉,周德明,吴毅,等. 杉木根际溶磷菌筛选及其部分特性的初步研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(4): 95-99.
- [6] 孙剑秋,王鹏,张建,等. 优良解磷菌株诱变选育与解磷培养基优化[J]. 核农学报, 2010, 24(1): 41-45.
- [7] 韩梅,温志丹,肖亦农,等. 解磷细菌的筛选及对植物病原真菌

- 的拮抗作用[J]. 沈阳农业大学学报, 2009, 10(5): 594-597.
- [8] 席琳卉, 王静芳, 马金萍, 等. 棉花根际解磷菌的解磷能力和分泌有机酸的初步测定[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 70-74.
- [9] 贺梦醒, 高毅, 胡正雪, 等. 解磷菌株 B25 的筛选、鉴定及其解磷能力[J]. 应用生态学报, 2012, 23(1): 235-239.
- [10] 张帆, 张瑾, 张锐, 等. 土壤芽孢杆菌的筛选与抑菌能力研究[J]. 江苏农业科学, 2010(4): 345-348.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常用细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 399-417.
- [12] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [13] 魏丽红. 土壤全磷测定中样品分解与比色方法的比较研究[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2009, 11(2): 1-3.
- [14] 张敏敏, 李玉玺, 张丽艳, 等. 一株高效解磷菌的分离及理化特性研究[J]. 实验科学与技术, 2014, 12(4): 10-12, 34.
- [15] 张淑云. 土壤解磷微生物研究进展[J]. 内蒙古林业科技, 2015, 41(1): 39-41, 52.
- [16] 陈廷伟. 解磷巨大芽孢杆菌分类名称、形态特征及解磷性能述评[J]. 土壤肥料, 2005(1): 7-9.
- [17] 王义, 贺春萍, 郑肖兰, 等. 土壤解磷微生物研究进展[J]. 安徽农业通报, 2009, 15(9): 60-64.
- [18] 万璐, 康丽华, 廖宝文, 等. 红树林根际解磷菌分离、培养及解磷能力的研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17(1): 89-94.
- [19] 王继雯, 甄静, 谢宝恩, 等. 有机磷降解菌的分离筛选及初步鉴定[J]. 河南科学, 2011, 29(1): 31-34.
- [20] 李丽丽, 郎敬, 杨洪一, 等. 大豆根际解磷菌的鉴定[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 363-365.
- [21] 赵小蓉, 林启美, 李保国, 等. C、N 源及 C/N 比对微生物溶磷的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(2): 197-204.
- [22] 尹瑞玲. 我国旱地土壤的溶磷微生物[J]. 土壤, 1988, 20(5): 243-246.

Isolation and Screening of Phosphorus Solubilizing Bacterial Strains in Soil

ZHENG Xiqing, DI Na, LI Xuhong, HUANG Yue, LI Xinchun

(Agriculture Department, Hetao College, Bayannaoer, Inner Mongolia 015000)

Abstract: The experiment was conducted to study the phosphorus bacterial strains from the rhizosphere soil of the single sunflower, wheat and leguminosae planting areas by plate P-solubilizing circle method. Three phosphate-solubilizing bacterial strains including JLX-1, JLX-2 and JLX-3 were obtained from all kinds of crops soil to investigate the effects of different and JLX-3 were obtained from all kinds of crops soil to investigate the effects of different conditions on P-solubilizing capacity. The results showed that the JLX-3 strains showed strong ability of dissolving phosphate with a ratio of dissolving phosphate zone diameter to culture community zone diameter (D/d) 2.09. When the carbon source was glucose, nitrogen source was $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, the phosphate-solubilizing capacity were $5.572 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and $5.520 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. The JLX-3 displayed a better phosphate solubilizing capability when NaCl concentration was $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and pH was 7. The based on the morphological physiological and biochemical properties JLX-3 was identified as *Bacillus*.

Keywords: phosphate-solubilizing bacteria; isolation; phosphate solubilization capability

巧贮藏防苹果烂果

知识窗

生理病害贮藏期生理病的发生与果实采收期有密切关系,适时采收是防止该类病害发生的重要措施之一。苹果苦痘病是缺钙造成的,在果实采收后可用 2%~4%氯化钙溶液浸果,入贮果实前期温度不应过高,以避免该病的大量发生;苹果虎皮病是因果实成熟度不够而早采引起的,可在果实采收后,用 500~1 000 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 卵磷脂液浸果,并尽快低温条件贮存;果肉褐变是因低温、缺氧和二氧化碳中毒造成,防止果肉褐变要抓好适期入贮,同时掌握贮存温度及调节好氧气(2%~4%)和二氧化碳(3%~5%)浓度。

真菌病害包括轮纹病、炭疽病、青霉病和霉心病等,因这几种病害在果实生长发育也大量发生,故除在生长期加强防治外,在果实入库前要严格选果,防止病虫果入库。防治轮纹病和炭疽病,采前喷 50%多菌灵或 50%甲基托布津 800 倍液。贮藏前用 500~1 000 倍 50%多菌灵或 800 倍 50%甲基托布津药液浸泡果实,也可用仲丁胺药或多功能保鲜纸包果。同时,贮藏期要适当降低贮藏室温度,若用气调,应适当提高二氧化碳浓度,降低氧的浓度。防治青霉病:①入贮前 2 周对贮藏场所用硫磺熏蒸,每 10 m^3 用硫磺 100~200 g,也可用 50%福尔马林 500 倍液喷洒消毒,每 10 m^3 用 0.5 kg 药液。②入贮前用 500~1 000 倍甲基托布津或多菌灵浸果。③贮藏温度应保持 1~2 $^{\circ}\text{C}$,并经常清除病果。防止苹果霉心病,应在贮藏期保持 5 $^{\circ}\text{C}$ 以下。

(来源:中国水果网)