

## 几株高效溶磷菌株对不同磷源溶磷活力的比较

吕学斌<sup>1</sup>, 孙亚凯<sup>1</sup>, 张毅民<sup>1,2\*</sup>

(1. 绿色合成与转化教育部重点实验室, 天津大学化工学院, 天津 300072; 2. 石河子大学化学化工学院, 石河子 832003)

**摘要:** 在液体培养条件下, 研究了 4 株溶磷菌株(Bmp5、Bmp6、Bmp7 和 Fmp9)对不同磷源溶解能力的差异并与荧光假单胞菌 *As1.867* 和巨大芽孢杆菌 *As1.223* 进行了比较, 探讨了菌株组合培养对溶磷活力的影响。结果表明, 4 株菌株对磷酸钙、磷酸铝、磷酸氢钙溶解能力明显高于磷酸铁和卵磷脂。以磷酸钙为磷源时, Fmp9 的溶磷量比 *As1.867* 和 *As1.223* 分别高出约 92% 和 48%; 而以磷酸铝为磷源时, *As1.223* 的溶磷量明显高于其他菌株; 在磷酸氢钙为磷源的条件下, Bmp6 为优势菌株, 溶磷量高达 785.51 mg/L。对比研究发现, Bmp5、Bmp6、Bmp7 及 Fmp9 的优势磷源分别为卵磷脂、磷酸氢钙、磷酸铝和磷酸钙。组合培养表明, Bmp5+ Fmp9 和 Bmp6+ Fmp9 较单株菌的溶磷量有所增加, 为较好的组合。试验得到的溶磷微生物配方已经应用于生物复合肥料的研究, 并进行了盆栽实验, 得到了较好的效果。该研究可为土壤生物肥料工业的微生物学研究提供借鉴。

**关键词:** 溶磷微生物; 溶磷量; 菌株组合; 磷源

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2007)5-0195-03

吕学斌, 孙亚凯, 张毅民. 几株高效溶磷菌株对不同磷源溶磷活力的比较[J]. 农业工程学报, 2007, 23(5): 195-197.

Lü Xuebin, Sun Yakai, Zhang Yimin. Comparative research on the influences of several high efficient phosphate-solubilizing strains on phosphate solubilizing activity[J]. Transactions of the CSAE, 2007, 23(5): 195-197. (in Chinese with English abstract)

### 0 引言

磷是植物生长发育所需的重要元素。土壤中平均含磷量约为 0.12%, 但其在土壤溶液中的浓度一般仅有 0.005~1.0 mg/kg, 总磷量充足而水溶态磷不足, 难以供植物直接吸收利用。因此, 长期以来, 研究者一直致力于在土壤中引入溶磷微生物的研究以促使植物从吸附态和矿物态的磷源中吸收磷元素<sup>[1]</sup>。目前已投入工业应用并取得较好田间试验效果的溶磷微生物主要有巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 等<sup>[2-4]</sup>。事实上, 土壤中的含磷化合物以无机态和有机态两种形式存在。无机态磷一般占土壤磷含量的 50% 以上, 主要形式为钙磷酸盐、铁和铝的磷酸盐以及闭蓄态磷; 有机态磷约占土壤磷含量的 20%~50%, 主要包括植素、核酸、磷脂、磷蛋白、代谢磷酸盐等。研究表明, 不同溶磷微生物对难溶磷的种类有一定的选择性, 对不同种类磷源的溶解能力也不相同<sup>[6]</sup>。Reddy 等<sup>[5]</sup>研究了曲霉菌对不同磷矿石的溶解作用, 发现不同曲霉菌喜好不同的磷源作为它们的生长物质。Whitelaw 等<sup>[7]</sup>研究发现青霉菌 (*Penicillium radicum*) 对  $\text{CaHPO}_4$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Al-P}$  的溶解效果较高, 而对  $\text{Fe-P}$  的溶解效果很差。赵小蓉等<sup>[8]</sup>人研究发现无论真菌还是细菌对  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的溶解能力都较强, 对  $\text{Fe-P}$  的溶解活性都很低, 并且有些菌株 (如欧文氏菌 *Erwinia 4TCRi22*) 完全不能溶解  $\text{Fe-P}$ 。本文对自

行筛选的 4 株溶磷菌株和 2 株对照菌株进行了溶磷效果的对比研究, 结果发现 4 株供试菌株具有较高的溶磷活力, 并且不同菌株有着不同的磷源偏好, 溶磷效果差异很大。为了适应土壤中难溶磷素形态的多样化, 构建高效溶磷微生物混合菌群, 对 4 株菌进行混合发酵培养以考察菌株组合培养条件下溶磷活力的变化, 为设计合理的功能菌群和进一步的工业化应用提供依据。本试验得到的溶磷微生物配方已经应用于生物复合肥料的研究, 并进行了盆栽试验, 得到了较好的效果<sup>[9]</sup>。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

##### 1) 菌株

供试菌株 Bmp5、Bmp6、Bmp7 和 Fmp9 为本实验室从土壤中筛选出经试验初步确定为活力较高的溶磷微生物, 对照菌株荧光假单胞菌 *As1.867* 和巨大芽孢杆菌 *As1.223* 由中国科学院微生物保藏中心提供。

##### 2) 磷源物质

有机磷源为卵磷脂, 通过 1:1  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$  消煮钼锑抗比色法<sup>[9]</sup>测定含磷量为 2.23%。无机磷源为磷酸钙 ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )、磷酸铝 ( $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、磷酸铁 ( $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、磷酸氢钙 ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 均为市售分析纯试剂。

##### 3) 培养基

Bmp5、Bmp6、Bmp7、*As1.223* 和 *As1.867* 用肉汤蛋白胨培养基保存活化, Fmp9 用马丁氏培养基保存活化。液体发酵培养基为 Pikovskaya 无机磷液体培养基<sup>[10]</sup>。

#### 1.2 方法

##### 1) 菌株形态观察

纯化菌株接种于相应的平板培养基上, 30℃ 培养 48 h 后观察菌落生长情况及菌落特征。在相应培养基上, 环境温度为 30℃ 下, 培养 24 h 后的 Bmp5、Bmp6、Bmp7 和培养 48 h 后的 Fmp9 染

收稿日期: 2006-08-21 修订日期: 2006-11-16

基金项目: 山西科委项目资助(030024)

作者简介: 吕学斌(1980-), 河北衡水人, 博士研究生, 主要从事绿色化学与环境化学工艺研究。天津 天津大学化工学院, 300072。

Email: lxb3779@126.com

\*通讯作者: 张毅民(1961-), 山西河津人, 副教授, 博士, 主要从事绿色化学与环境化学工艺研究。天津 天津大学化工学院, 300072。

Email: zhangym001@263.net

色制片,在显微镜下对菌体形态进行观察。

## 2) 菌株溶磷活力比较

配制 Pikovskaya 无机磷培养基,并将其中的磷源物质分别用磷酸钙(10 g/L)、磷酸铁(12.088 g/L)、磷酸铝(8.406 g/L)、磷酸氢钙(11.096 g/L)、卵磷脂替代。其中当磷源采用卵磷脂时,加入量为 0.5 g/L,另加入  $\text{CaCO}_3$  5 g/L。按每瓶 4% 的接种量分别将被测菌株接入上述 5 种不同的磷源的培养基中,并分别以不接种菌株的培养基作空白对照,然后于 30℃,160 r/min 条件下摇床培养 5 d。将发酵液在 4000 r/min 下离心 30 min,取上清液稀释适当倍数,利用 U-3010 紫外可见分光光度计在 886 nm 处通过钼锑抗比色法<sup>[11]</sup>测定吸光光度值并计算溶磷量和溶磷率。溶磷量为以空白对照作为参比溶液,计算得到的 1 L 上清液中可溶性磷的量,单位为  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;溶磷率为 100 g 难溶磷所溶解出来的水溶性磷量(g),以%表示。

## 3) 菌株组合培养活力研究

将组合 Bmp5+ Bmp7、Bmp5+ Fmp9、Bmp6+ Bmp7、Bmp6+ Fmp9、Bmp7+ Fmp9 和 Bmp5+ Bmp6+ Fmp9 接种于 Pikovskaya 无机磷液体培养基(其中磷酸钙为 6 g/L),并以空白为对照,于 30℃,160 r/min 条件下摇床培养 7 d,按上述方法测定发酵液的溶磷量。

# 2 结果和讨论

## 2.1 菌株形态观察

Bmp5 在肉汤蛋白胨培养基上生长速度快,48 h 后观察到菌落呈乳白色,具有蜡质光泽,显微镜下观察到细胞杆状,产生芽孢;Bmp6 在肉汤蛋白胨培养基上生长缓慢,菌落圆形,边缘整齐,表面光滑,呈黄褐色,显微镜下观察到细胞球状,无芽孢;Bmp7 在肉汤蛋白胨培养基上菌落呈乳白色,黏稠状,显微镜下观察到细胞呈球形,无芽孢;Fmp9 在马丁氏培养基上菌落呈青灰色,边缘为多枝形,显微镜下观察到菌丝生长良好,分枝繁茂,分生孢子呈椭圆形。

## 2.2 单株菌活力

采用不同的磷源物质,将浓度为  $10^9$  cfu/mL 的菌悬液,按 4% 的接种量,于 30℃,160 r/min 条件下摇床培养 5 d,测定溶磷量,结果见图 1。由图 1 可以看出以磷酸钙为磷源时,Fmp9 的溶磷量比 As1.867 和 As1.223 分别高出约 92% 和 48%;而以磷酸铝为磷源时,As1.223 的溶磷量明显高于其它菌株;在以磷酸氢钙为磷源的情况下,Bmp6 为优势菌株,溶磷量高达 785.51  $\text{mg/L}$ ,比 As1.867 高出约 35%,为 As1.223 的 3.34 倍。以磷酸铁为磷源时,供试菌株和参照菌株的溶磷活力都比较低,溶磷率只有 2% 左右。当卵磷脂为磷源物质时,Bmp5 的溶磷量高于两株参照菌株。由于卵磷脂中磷元素的含量相对较低,菌株的溶磷量相对几种无机磷源要小的多,但是仍然具有一定的溶磷活力,如 Bmp5、As1.223 的溶磷率可分别达到 8.86%、8.08%。结果表明供试的 4 株菌株中 Bmp5、Bmp6、Bmp7 及 Fmp9 的优势磷源分别为卵磷脂、磷酸氢钙、磷酸铝和磷酸钙。

以上结果表明不同微生物菌株对相同的磷源溶解效果差异很大,同一菌株对不同磷源的溶解效果也不一致。钟传青等<sup>[12,13]</sup>研究了一株磷细菌 P17 对不同产地磷矿粉的溶解能力,又深入

比较了细菌、霉菌、酵母菌对不同难溶磷酸盐和磷矿粉等的溶解效果发现不同微生物对不同磷源的亲和溶解能力不同,这可能是由微生物复杂的溶磷机制、磷源化学成分和结构差异等多种因素引起的。Illmer 报道了<sup>[14]</sup>4 株菌对 Al-P、Ca-Ps、磷灰石等的溶解效果差异后认为,这种差别是由微生物不同的溶解机制造成的,并且普遍认为  $\text{AlPO}_4$  是通过形成络合物的酸解作用溶解的。在试验中还发现有有机磷细菌 As1.223 不但对有机磷源卵磷脂有降解能力,而且对磷酸铝、磷酸钙、磷酸氢钙等无机磷的分解能力也较强,这与陈廷伟<sup>[4]</sup>等的研究结论相一致。

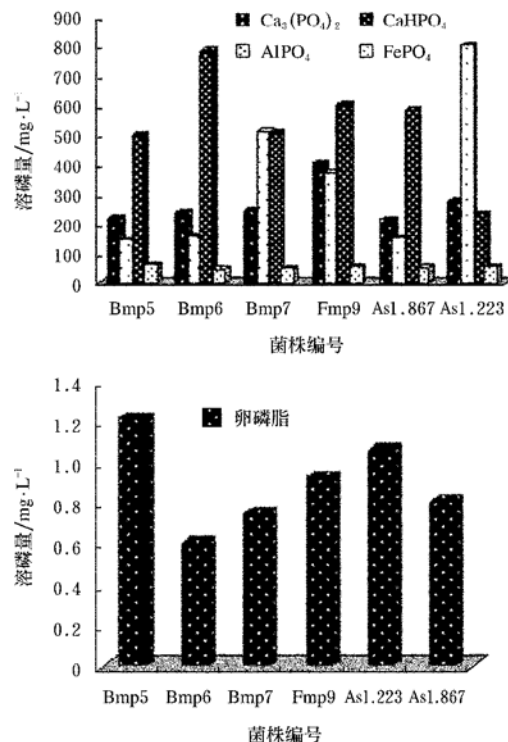
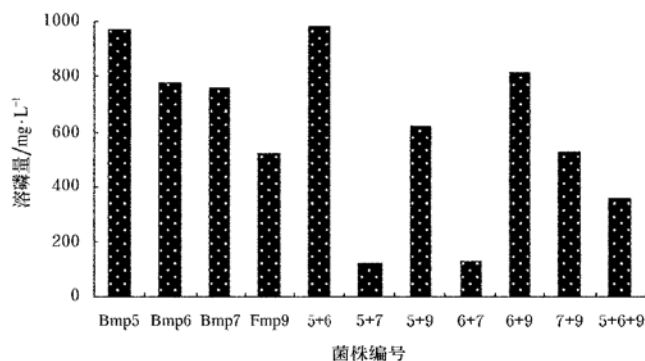


图 1 不同磷源条件下各菌株的溶磷量比较

Fig. 1 Comparison of phosphate solubilization capacity of the strains in different phosphate sources

## 2.3 复合菌株活力

为了构建高效溶磷微生物混合菌群,对 Bmp5、Bmp6、Bmp7、Fmp9 作了混合发酵试验,结果见图 2。由图 2 可以看出,



注:图中 5+6 表示 Bmp5+ Bmp6 组合,其余类推

图 2 单个菌株和复合菌株溶磷量比较

Fig. 2 Comparison of phosphate solubilization capacity between the single strain and co-culture strains

当 Bmp5 或 Fmp9 与 Bmp6 共同培养时, 溶磷活力有一定程度的提高, 可以作为的较好的组合利用; 相反, Bmp5 和 Bmp7 以及 Bmp6 和 Bmp7 组合培养时出现了溶磷量的急剧下降的情况, 因此, Bmp5 和 Bmp7, Bmp6 和 Bmp7 之间可能存在着竞争或拮抗作用, 在实际应用中要避免 Bmp7 和 Bmp5、Bmp6 复合; 当 Bmp5 + Bmp6 + Fmp9 三株菌的复合发酵时, 溶磷量比三株菌单独培养都有所下降。从以上结果可看出在构建微生物混合菌群时, 菌与菌之间的相互作用不可忽视。但由于菌株间的相互作用比较复杂, 溶磷活力的影响因素复杂, 对其机理难以把握, 目前的研究报道也较少, 还有待于进一步深入研究。

### 3 结 论

4 株供试菌具有与对照菌株相当的溶磷能力, 对于某些磷源物质, 活力甚至超过对照菌株。以磷酸钙为磷源, Fmp9 的溶磷量比 As1.867 和 As1.223 分别高出约 92% 和 48%; 以磷酸氢钙为磷源物质, Bmp6 溶磷量比 As1.867 高出约 35%, 为 As1.223 的 3.43 倍。通过比较得出 Bmp5、Bmp6、Bmp7 及 Fmp9 的优势磷源分别为卵磷脂、磷酸氢钙、磷酸铝和磷酸钙。

菌株组合培养研究发现 Bmp5、Bmp6、Bmp7 对 Fmp9 溶磷效果有不同程度的促进作用, 而 Bmp5 和 Bmp7、Bmp6 和 Bmp7 之间可能存在的竞争或拮抗作用, 使菌株溶磷活力急剧下降, 在实际应用中要尽力避免这两种组合。本试验得到的溶磷微生物配方已经应用于生物复合肥料的研究, 并进行了盆栽试验, 得到了较好的效果。

#### [参 考 文 献]

- [1] Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion [J]. *Biotechnology Advances*, 1999, 17: 319– 339.
- [2] 李 华, 王光华, 谷守玉, 等. 磷细菌突变株生理特性的研究[J]. *高校化学工程学报*, 1999, 113(3): 240– 244.
- [3] Sahu S, Natarajan N, Hari K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields[J]. *Field Crops Research*, 2002, 77: 43– 49.
- [4] 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.
- [5] Reddy M S, Kumar S, Babita K, et al. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 84: 187– 189.
- [6] 邵春花, 张 强, 卢朝东, 等. 选用解磷菌剂改善缺磷土壤磷素的有效性[J]. *农业工程学报*, 2005, 21(5): 56– 59.
- [7] Whitelaw M A, Harden T J, Helyar K R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum* [J]. *Soil Biol Biochem*, 1999, 31: 655– 665.
- [8] 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.
- [9] 张毅民, 胡 静, 吕学斌, 等. 一种新型生物有机复混肥的肥效研究[J]. *化工进展*, 2005, 24(10): 1176– 1180.
- [10] 鲍士旦. *土壤农化分析* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 76– 78.
- [11] 林启美, 王 华, 赵小蓉, 等. 一些细菌和真菌的解磷能力及机理初探[J]. *微生物学报*, 2001, 28(2): 26– 29.
- [12] 钟传青, 黄为一. 磷细菌 P17 对不同来源磷矿粉的溶磷作用及机制[J]. *土壤学报*, 2004, 41(6): 931– 936.
- [13] 钟传青, 黄为一. 不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化[J]. *土壤学报*, 2005, 42(2): 286– 294.
- [14] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms [J]. *Soil Biol Biochem*, 1995, 27(3): 257– 263.

## Comparative research on the influences of several high efficient phosphate-solubilizing strains on phosphate solubilizing activity

Lü Xuebin<sup>1</sup>, Sun Yakai<sup>1</sup>, Zhang Yimin<sup>1, 2\*</sup>

(1. Key Laboratory for Green Chemical Technology of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

**Abstract:** Under hydroponic conditions, the phosphate solubilizing capacity of the four tested strains (Bmp5, Bmp6, Bmp7 and Fmp9) in dissolving five different poorly soluble phosphates were studied with two strains (*Pseudomonas fluorescens* As1.867 and *Bacillus megatherium* As1.223) as control. A co-culture experiment with these four strains, compared to the single cultivation, was conducted in order to reveal their mutual influences on the phosphate solubilizing activity. The results indicated that these single strains exhibited higher solubilizing abilities in  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  than in  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and lecithin. As an example, when using  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  as the sole phosphate source, the amount of the phosphate solubilizing capacity of Fmp9 was 92% and 48% higher than those of the references As1.867 and As1.223, respectively. As1.223 showed the maximum solubilization in  $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . In all four tested strains, Bmp6 was the dominant strain in solubilizing  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , and its phosphate solubilization capacity could be as high as 785.51 mg/L. The best phosphate sources for Bmp5, Bmp6, Bmp7 and Fmp9 were lecithin,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Furthermore, the study of the hydroponic co-culture of the four strains showed that the combinations of Bmp5+ Fmp9 and Bmp6+ Fmp9 were the preferable combinations in terms of phosphate solubilizing activities. The phosphate solubilizing microorganisms in this experiment have been used to the biological compound fertilizer and the pot experiment showed a satisfactory result. This research can provide references for biological compound fertilizer.

**Key words:** phosphate-solubilizing microorganisms; phosphate solubilizing capacity; co-culture; phosphate sources