第 42 卷 第 2 期
2005 年 3 月

土 壤 学 报
ACTA PEDOLOGICA SINICA

Vol. 42, No. 2
Mar., 2005

不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化*

钟传青 黄为一

(农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京农业大学生命科学学院微生物学系, 南京 210095)

摘 要 比较了不同种类的微生物菌株对不同种类难溶性磷酸盐及磷矿粉的溶解能力。结果发现, 细菌、酵母、霉菌在解磷方面均有一定作用, 发挥着不同优势。磷酸钙、磷酸铝、磷酸铁等难溶性磷酸盐容易被酵母菌、霉菌溶解, 而磷矿粉容易被巨大芽孢杆菌溶解, 显示不同微生物与不同磷源的亲和溶解能力不同。不同种类磷酸盐或磷矿粉对微生物磷酸酶活力的影响不同, 贫磷条件可以促进酸性和碱性磷酸酶活性的增加。

关键词 解磷微生物; 酸性磷酸酶; 碱性磷酸酶; 有效磷

中图分类号 Q93, S14 文献标识码 A

磷对植物生长发育和成熟发挥着重要作用, 但是土壤中大部分有机磷和无机磷处于植物不能直接吸收、利用的形态[1]。使用磷肥后由于土壤的固定化作用, 大部分磷与土壤中 Ca^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}、Al^{3+} 结合, 形成难溶性磷酸盐[2], 因此提高磷肥利用率一直是颇受关注的问题。解磷微生物产生的植酸酶、核酸酶和磷酸酶等加速了植酸、核酸、磷脂等含磷有机化合物的分解, 促进了磷素释放, 可以提高植物磷素营养; 解磷微生物分泌的有机酸与 Ca-P、Fe-P 和 Al-P 等进行螯合[3], 使难溶磷转化成为有效磷。很多因素影响土壤磷的利用效率, 微生物对土壤磷的转化和有效性影响很大[2]。

Sundara 和 Sinha[4] 曾研究过芽孢杆菌和埃希氏菌对磷酸三钙的溶解能力; Paul 和 Sundara[5] 测定几株芽孢杆菌溶解磷酸三钙的效率高达 19%, 其中解磷能力最强的是巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*); Molla 和 Chowdhury[6] 的研究表明, 不同菌株分解磷酸三钙的能力有很大差异。林启美等[3] 发现以磷矿粉作为唯一磷源培养解磷细菌, 培养 5 d 后可溶性磷含量最高可达 11.73 μg ml^{-1}, 解磷能力较强菌株为假单胞菌属和欧文氏菌属。Kucey 等[7] 报道真菌解磷能力一般是细菌的 10 倍, 而大部分真菌解磷能力均超过能力最好的细菌, 最高可达 12.8 mg L^{-1}。自然界存在的磷酸盐种类多种多样, 至今文献中尚未见不同微生物对不同磷源活化、产酸和磷酸酶变化的系统比较。本文试图通过细菌、霉菌、酵母对不同难溶磷酸盐和磷矿粉等的溶解效果及其可能存在的溶磷途径研究, 阐明不同种类的解磷微生物溶磷能力及其对不同来源磷的活化作用, 从而为磷形态多样化的土壤提供活化能力较全面的微生物群体, 克服单一菌株不能适应磷形态多样化土壤的不足, 为生物磷肥的合理施用提供应用理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 巨大芽孢杆菌 P17 菌株; 短杆菌 P10 菌株; 青霉菌 F4 菌株; 酵母菌 Y3 菌株; 均系本实验室分离。

1.1. 培养基 (1) 种子培养基: 葡萄糖 10 g, 硫酸铵 0.5 g, 氯化钠 0.3 g, 氯化钾 0.3 g, 七水合硫酸亚铁 0.03 g, 四水合硫酸锰 0.03 g, 磷酸二氢钾 2 g, 蒸馏水定容至 1 000 ml, pH7.0~7.5。(2) 发酵培养基: 葡萄糖 10 g, 硫酸铵 0.5 g, 氯化钠 0.3 g, 氯化钾 0.3 g, 七水合硫酸亚铁 0.03 g, 四水合硫酸锰 0.03 g, 难溶性磷酸盐 (如磷酸钙、植酸钙、磷酸铝、磷酸

* 上海市科技兴农重点攻关项目(农科攻字 98 第 05-2 号) 资助

- 通讯作者

作者简介: 钟传青(1977~), 女, 博士研究生, 主要从事土壤微生物方面研究。E-mail: zhongchq@163.com

收稿日期: 2004-03-15; 收到修改稿日期: 2004-07-05

铁) 或磷矿粉等 5.0 g 或者可溶性磷酸盐如磷酸二氢钾、磷酸二氢铵等 2.0 g, 蒸馏水定容至 1 000 ml, pH7.0~ 7.5。

1.　方法

1. .1　发酵液中有效磷的测定　　将活化好的 P17、P10、F4、Y3 菌株 28℃培养 48 h, 菌体浓度达 10^8cfu ml^{-1}后备用。设接菌、接灭活菌、接培养基(对照) 3 个处理, 每个处理 3 个重复。按 10% 接种量分别将上述种子液接种在发酵培养基中, 28℃培养 7 d。121℃灭活 40 min 后加 6% H_2O_2 2 滴于三角瓶中, 60℃水浴 48 h 以使微生物量磷释放出来。发酵液用无磷滤纸过滤至澄清, 定容至 55 ml, 用钼锑抗比色法测滤液有效磷含量[8]。

1. .　发酵液 pH 值和磷酸酶活性测定　　按 1.2.1中方法将菌种分别接种于各发酵培养基中, 取培养 48 h 的发酵液, 用上海雷磁 pHS-3C 型号 pH 计检测发酵液 pH 值; 考虑到该酶为胞外酶, 8 000 r min^{-1}离心 5min 后取上清液按文献[9] 检测磷酸酶活性。以单位磷源该菌株每小时产生的酶作用于底物所释放出产物的微摩尔数作为酶活力单位, 记为 μmol $g^{-1}h^{-1}$。

结果与分析

.1　解磷微生物对各种难溶磷酸盐和磷矿粉的溶解效果

.1.1　解磷微生物对磷酸钙溶解能力比较　　从表 1 可以看出, 青霉菌 F4 菌株对 $Ca_3(PO_4)_2$ 溶解效果最好, 其次为酵母菌 Y3 菌株。其原因可能是接种量相同时, 真菌由于生物量大, 产生的利于解磷的代谢产物多, pH 下降快, 从而使 $Ca_3(PO_4)_2$ 中更多的有效磷溶解出来。有机酸能够螯合金属离子 Ca^{2+}, 使难溶磷释放出来。菌液经灭活后, 仍有部分有机酸能够发挥溶磷作用, 解磷微生物产生的有机酸不同, 不同有机酸对不同金属离子螯合能力不同[10], 使难溶磷酸盐的溶解效果不同。检测有效磷时, 用 H_2O_2 破坏菌体, 使部分微生物量磷释放出来, 细菌、真菌生物量不同导致微生物量磷的差别, 也可能使其灭活菌液处理滤液的有效磷不同。

表 **1**　各菌株对磷酸钙溶解能力比较

Table 1　Comparisons in capacity of solubilizing $Ca_3(PO_4)_2$ between different P-solubilizing microbes

菌株编号 Microbial symbols	滤液有效磷含量 Available P content of filtrate (mg L^{-1})		
	接菌 Inoculation with microbes	接灭活菌液 Inoculation with inactivated microbes	对照 CK
巨大芽孢杆菌 P17 菌株 Strain *Bacillus megaterium* P17	109.4	76.72	26.09
短杆菌 P10 菌株 Strain *Brevibacterium* P10	42.82	33.66	
青霉菌 F4 菌株 Strain *Penicillium* F4	190.0	130.8	
红酵母 Y3 菌株 Strain *Rhodotorula* Y3	156.4	134.7	

.1.　解磷微生物对植酸钙溶解能力比较　　青霉菌 F4 菌株和巨大芽孢杆菌 P17 菌株能够很好地溶解植酸钙中的磷, P17 菌株、F4 菌株接菌处理的发酵液有效磷含量分别是对照的 6.47 倍和 7.51 倍, 而P10 菌株与 Y3 菌株溶解植酸钙能力相当, 结果见表 2。植酸钙中难溶磷主要是有机磷。有机磷的分解需要酶的参与, 可以认为各菌株能够产生分解植酸钙的酶, 使发酵液有效磷增加。

表 各菌株对植酸钙溶解能力比较

Table Comparisons in capacity of solubilizing calcium phytate between different P-solubilizing microbes

菌株编号 Microbial symbols	滤液中有效磷含量 Available P content of filtrate (mg L^{-1})		
	接菌 Inoculation with microbes	接灭活菌液 Inoculation with inactivated microbes	对照 CK
巨大芽孢杆菌 P17 菌株 Strain *Bacillus megaterium* P17	129.8	41.61	20.05
短杆菌 P10 菌株 Strain *Brevibacterium* P10	87.40	67.11	
青霉菌 F4 菌株 Strain *Penicillium* F4	150.6	59.90	
红酵母 Y3 菌株 Strain *Rhodotorula* Y3	77.40	67.10	

.1.3 解磷微生物对磷酸铝溶解能力比较 由表3可知,短杆菌P10菌株对$AlPO_4$溶解能力最强,接菌处理发酵液有效磷含量是对照的6.68倍,其次为青霉菌F4菌株。而巨大芽孢杆菌P17菌株对$AlPO_4$溶解能力最弱。接P17、P10、F4、Y3灭活菌液的发酵液中有效磷含量比对照仍要高出许多,说明各菌株灭活菌液中仍存在利于难溶磷溶解的因素。P17菌株能够产生难挥发性有机酸[11],灭活菌液中可能仍存在一定量难挥发性有机酸,有机酸能螯合金属离子,从而使磷释放出来[12]。

表3 各菌株对 **$AlPO_4$** 溶解能力比较

Table 3 Comparisons in capacity of solubilizing $AlPO_4$ between different P-solubilizing microbes

菌株编号 Microbial symbols	滤液中有效磷含量 Available P content of filtrate (mg L^{-1})		
	接菌 Inoculation with microbes	接灭活菌液 Inoculation with inactivated microbes	对照 CK
巨大芽孢杆菌 P17 菌株 Strain *Bacillus megaterium* 17	182.5	138.4	
短杆菌 P10 菌株 Strain *Brevibacterium* P10	498.7	241.8	
青霉菌 F4 菌株 Strain *Penicillium* F4	490.6	86.21	74.67
红酵母 Y3 菌株 Strain *Rhodotorula* Y3	429.4	149.4	

.1.4 解磷微生物对磷酸铁溶解能力比较 酵母菌Y3菌株接菌处理发酵液有效磷含量高达430.4 mg L^{-1},而其他对照仅为8.94 mg L^{-1},说明Y3菌株溶解$FePO_4$效果最好,结果见表4。而巨大芽孢杆菌P17菌株、短杆菌P10菌株、青霉菌F4菌株接菌处理发酵液有效磷含量差别不大。有的微生物能够产生有机酸以螯合金属离子,使难溶磷溶解出来,不同有机酸对金属离子螯合能力不同[12]。因此不同菌株产生的有机酸种类直接影响菌株的溶磷效果,可能Y3菌株分泌的有机酸螯合Fe^{3+}的能力强,从而使其溶解$FePO_4$的效果增强。

表 4　各菌株对 $FePO_4$ 溶解能力比较

Table 4　Comparisons in capacity of solubilizing $FePO_4$ between different P-solubilizing microbes

菌株编号 Microbial symbols	滤液中有效磷含量 Available P content of filtrate (mg L^{-1})		
	接菌 Inoculation with microbes	接灭活菌液 Inoculation with inactivated microbes	对照 CK
巨大芽孢杆菌 P17 菌株 Strain *Bacillus megaterium* P17	192. 6	66. 04	8. 94
短杆菌 P10 菌株 Strain *Brevibacterium* P10	182. 3	138. 4	
青霉菌 F4 菌株 Strain *Penicillium* F4	159. 5	47. 98	
红酵母 Y3 菌株 Strain *Rhodotorula* Y3	430. 4	241. 8	

. 1. 5　解磷微生物对黄麦岭磷矿粉溶解能力比较　　黄麦岭磷矿属于变质型磷矿[13], 直接施用于田间效果迟缓。摇瓶条件下经过 P17 菌株长达 70 d 的溶解, 全磷的 81. 02% 被溶解下来[11]。巨大芽孢杆菌 P17 菌株、青霉菌 F4 菌株对黄麦岭磷矿粉的溶解效果较好, 接种巨大芽孢杆菌 P17 菌株后培养 7 d, 接菌处理的发酵液有效磷含量高达 291. 5 mg L^{-1}, 而 F4 菌株接菌处理发酵液有效磷含量为208. 9 mg L^{-1}, 见表 5。细菌溶磷能力超过了真菌, 说明细菌对某些磷矿粉的溶解能力并不低于真菌。与 P17 菌株、F4 菌株、P10 菌株相比, 酵母菌 Y3 菌株溶解黄麦岭磷矿粉的效果最差, 接菌处理发酵液有效磷含量仅为 82. 72 mg L^{-1}, 接灭活菌处理的发酵液有效磷含量仅为 26. 63 mg L^{-1}。磷细菌 P17 菌株、P10 菌株、青霉菌 F4 菌株的孢子较小, 能够在磷矿粉凹凸不平的表面富集、生长, 可能利于溶解磷矿粉中的磷。

表 5　各菌株对黄麦岭磷矿粉溶解能力比较

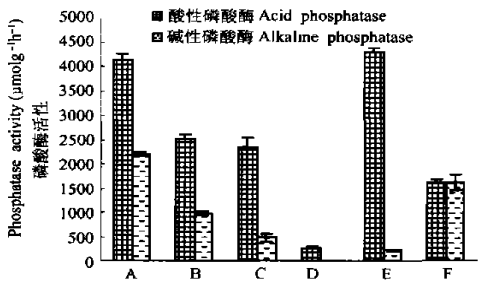
Table 5　Comparisons in capacity of solubilizing Huangmailing phosphate rock powder between different P-solubilizing microbes

菌株编号 Microbial symbols	滤液中有效磷含量 Available P content of filtrate (mg L^{-1})		
	接菌 Inoculation with microbes	接灭活菌液 Inoculation with inactivated microbes	对照 CK
巨大芽孢杆菌 P17 菌株 Strain *Bacillus megaterium* P17	291. 5	49. 00	23. 81
短杆菌 P10 菌株 Strain *Brevibacterium* P10	153. 9	86. 63	
青霉菌 F4 菌株 Strain *Penicillium* F4	208. 9	103. 3	
红酵母 Y3 菌株 Strain *Rhodotorula* Y3	82. 72	26. 63	

注: 表 1~ 表 5 中所有数据均经 DPS 的 Duncan' s 新复极差测验, 其中表 1~ 表 4 各处理间在 1% 水平上有显著性差异; 表 5 接菌处理与接培养基对照在 1% 水平上均有显著性差异; Y3 菌株的接灭活菌处理与接培养基对照间在 1% 水平上没有显著性差异, 其他菌株的接灭活菌处理与接培养基对照在 1% 水平上均有显著性差异 Note: All the data in the tables were subjected to Duncan' s range test of the DPS system. Differences were significant at 1% level between the treatments in Tables 1~ 4. Differences between the microbes inoculation treatments and CK were significant at 1% level. There was no significant differences between the inactivated Y3 inoculation treatment and CK. Differences were significant at 1% level between the treatments of inactivated P17, P10, F4 inoculation and CK

. 同种解磷微生物对不同难溶性磷酸盐和磷矿粉溶磷方式

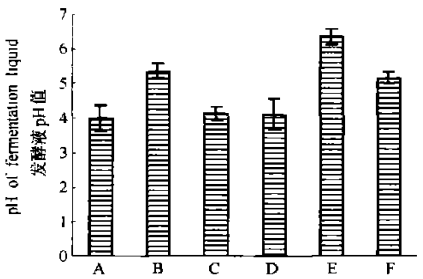
. .1 不同磷源条件下 P17 菌株磷酸酶活性和发酵终止 pH 值 图 1 表明, 以不同磷酸盐为磷源时 P17 菌株产生的酸性磷酸酶活性除以黄麦岭磷矿粉为磷源外普遍高于碱性磷酸酶活性。以植酸钙为磷源时酸性磷酸酶活性最高; 而培养基中没有有机磷源、只有难溶性无机磷源时酸性磷酸酶仍有活性, 可能培养基中存在其他底物如微生物菌体的核酸、细胞膜上的磷脂等, 也可能与菌体生长量有关。以植酸钙为磷源时 P17 菌株长势最好, 从而促进了酸性磷酸酶的分泌。而碱性磷酸酶在培养基中没有添加磷源(只有种子液带入少量磷源) 活性最高, 其次为黄麦岭磷矿粉。图 2 表明, P17 菌株在以 KH_2PO_4、$NH_4H_2PO_4$ 为磷源, 培养基中没有添加另外磷源时产酸能力比较高, 有可能是微生物分泌的磷酸化酶等催化葡萄糖与可溶性磷酸盐中的 PO_4^{3-} 结合生成葡萄糖- 1- 磷酸、葡萄糖- 6- 磷酸等, 使发酵液 pH 下降。



A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

图 1 不同磷源条件下 P17 菌株磷酸酶活性比较

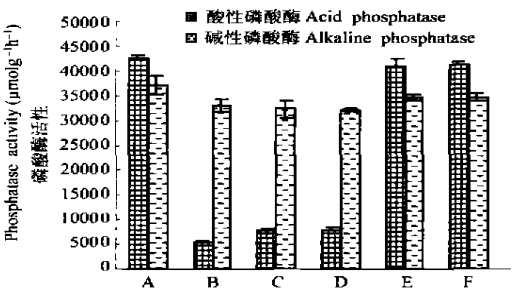
Fig. 1 Comparison in phosphatase activity of P17 between media different in phosphorus source



A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

图 2 不同磷源条件下 P17 发酵终止 pH 比较

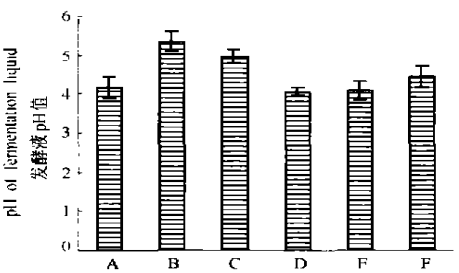
Fig. 2 Comparison in fermentation terminal pH of P17 between media different in phosphorus source



A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

图 3 不同磷源条件下 P10 菌株磷酸酶活性比较

Fig. 3 Comparison in phosphatase activity of P10 between media different in phosphorus source



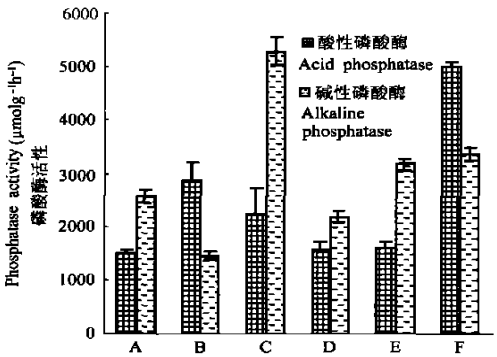
A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

图 4 不同磷源条件下 P10 菌株发酵终止 pH 比较

Fig. 4 Comparison in fermentation terminal pH of P10 between media different in phosphorus source

. .　不同磷源条件下短杆菌 P10 菌株磷酸酶活性和发酵终止 pH 值　短杆菌 P10 菌株在溶解黄麦岭磷矿粉、植酸钙以及培养基中没有添加磷源时酸性磷酸酶活性较高; 培养基中含有 $Ca_3(PO_4)_2$、KH_2PO_4、$NH_4H_2PO_4$ 等时酸性磷酸酶活性较低; 碱性磷酸酶活性在不同磷源之间基本上没有差异, 如图 3 所示。磷源种类对碱性磷酸酶活性影响不大。P10 菌株产生的酸性、碱性磷酸酶活性很高, 其解磷功能可能主要通过磷酸酶实现。图 4 表明, P10 菌株发酵终止 pH 曲线比较平稳, P10 菌株在含不同磷源发酵液中 pH 变化不大。

. .**3**　不同磷源条件下青霉菌 F4 菌株磷酸酶活性和发酵终止 pH 值　F4 菌株在以黄麦岭磷矿粉为磷源时, 酸性磷酸酶活性高达 5 006 $\mu mol\ g^{-1}\ h^{-1}$; 而以 KH_2PO_4 为磷源时, 碱性磷酸酶活性高达 5 284 $\mu mol\ g^{-1}\ h^{-1}$。青霉菌 F4 菌株以可溶性或难溶性磷酸盐为磷源时, 均能产生活性较高的磷酸酶。F4 菌株属于青霉菌, 产酸能力比较强。由图 5、图 6 可以看出, F4 菌株产酸、产酶能力有高有低, 其解磷方式可能是二者的结合。

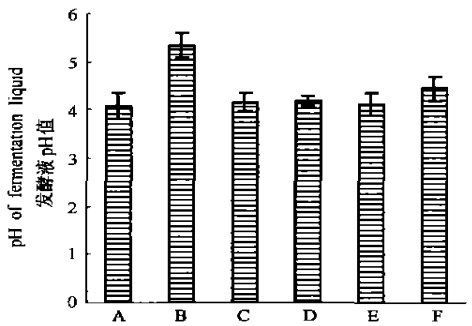


A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

图 5　不同磷源条件下 F4 菌株磷酸酶活性比较

Fig. 5　Comparison in phosphatase activity of F4 between media different in phosphorus source



A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

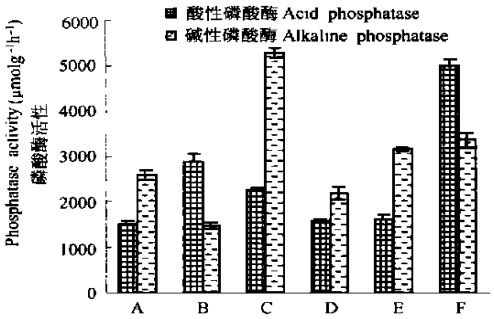
图 6　不同磷源条件下 F4 菌株发酵终止 pH 比较

Fig. 6　Comparison in fermentation terminal pH of F4 between media different in phosphorus source

. .**4**　不同磷源条件下酵母菌 Y3 菌株磷酸酶活性和发酵终止 pH 值　从图 7 可以看出, 在培养基中没有添加磷源(只有种子液带入少量磷源) 或以 KH_2PO_4 为磷源时检测不出碱性磷酸酶活性。在发酵液中不添加磷酸盐时酸性磷酸酶活性较高, 达 7 500 $\mu mol\ g^{-1}\ h^{-1}$, 而以黄麦岭磷矿粉为磷源时碱性磷酸酶活性达 8 868 $\mu mol\ g^{-1}\ h^{-1}$, 说明贫磷条件利于 Y3 菌株磷酸酶基因的表达。Y3 菌株产酸能力很强, 见图 8。培养基中含不同磷源时产酸能力不同。培养基中没有添加磷源、只有种子液带入少量磷源以及以 KH_2PO_4、$NH_4H_2PO_4$ 为磷源时产酸能力强, 其他几种磷源条件下产酸能力差。

综合图 1~ 图 8 可以看出, 以同种磷酸盐为磷源时, 不同菌株产生的磷酸酶活性不同。培养基以植酸钙和黄麦岭磷矿粉为磷源时各菌株产生的磷酸酶活性普遍比较高。其中 P10 菌株产生酶活性在不同种类磷源条件下均较高, 磷酸酶在其溶磷过程中可能起主要作用。

从 pH 变化来看, 发酵液 pH 都有一定程度的下降, 各菌株在培养过程中产酸。各菌株以 KH_2PO_4、$NH_4H_2PO_4$ 为磷源时均有较强的产酸能力。这些酸一方面使培养基 pH 下降; 另一方面, 微生物产生的有机酸还与 Ca^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}、Al^{3+} 等多种离子以多种形式结合, 使难溶性含磷物质中的磷释放出来[3,14]。产酶或产酸在解磷微生物溶解各种难溶性磷酸盐时都起一定作用[14], 环境中磷的存在形式对何种溶磷方式起主导作用有重要影响。

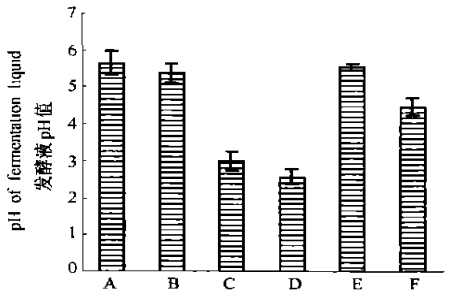


A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

图 7 不同磷源条件下 Y3 菌株磷酸酶活性比较

Fig. 7 Comparison in phosphatase activity of Y3 between media different in phosphorus source



A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

A. 没有磷源 No phosphorus; B. $Ca_3(PO_4)_2$; C. KH_2PO_4;
D. $NH_4H_2PO_4$; E. 植酸钙 Calcium phytate;
F. 黄麦岭磷矿粉 Huangmailing phosphate rock powder

图 8 不同磷源条件下 Y3 菌株发酵终止 pH 比较

Fig. 8 Comparison in fermentation terminal pH of Y3 between media different in phosphorus source

3 讨 论

解磷微生物溶解磷矿粉和难溶性磷酸盐是一个长期的动态变化过程, 微生物不断地生长、繁殖, 并分泌有机酸和磷酸酶, 使难溶磷不断地释放出来。巨大芽孢杆菌 P17 菌株的磷酸酶动态变化趋势表明 P17 菌株在 48 h 左右活性最高, 因此本试验取 48 h 发酵液进行磷酸酶活性与 pH 的研究; P17 菌株在生长至 7 d 时培养液中营养成分已难以满足菌体需要, 并开始形成芽孢, 因此培养至 7 d 时检测其有效磷相对稳定的释放量。其他菌株为了便于对照, 也在同一时间进行有效磷、磷酸酶及 pH 的检测。测定发酵液中有效磷含量时, 发酵液灭活利于菌体自溶, 用 H_2O_2 破坏菌体, 过滤后发酵液已澄清, 再定容以减少发酵过程中因蒸发引起的误差即可准确检测有效磷。解磷微生物在生长、繁殖过程中能够通过酸、酶等溶解、吸收难溶磷[15~17]。巨大芽孢杆菌 P17 菌株、短杆菌 P10 菌株、酵母菌 Y3 菌株、青霉菌 F4 菌株在培养基中没有添加磷源(只有种子液带入少许磷源)或以难溶性无机磷酸盐作唯一磷源时仍能产生较高活性的酸性磷酸酶和碱性磷酸酶, 这些酸性磷酸酶和碱性磷酸酶能够将不断死亡的微生物菌体中的有机磷转化为无机磷。这部分无机磷被微生物吸收后又可以参加微生物的新陈代谢过程。研究中发现, P10 菌株产生的酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性很高, 可作为将来生物磷肥的重要组成部分, 也可作为饲料添加剂以增加动物饲料中的有效磷素营养。在试验中比较磷酸酶活性时设可溶性磷酸盐处理可以研究可溶性磷源对磷酸酶活性的影响。在培养基中添加 KH_2PO_4 等可溶性磷源时, 细菌、酵母、霉菌产生的酸性磷酸酶活性较低; 而以难溶性磷酸盐为磷源时磷酸酶活性较高, 说明贫磷条件促进了酸性磷酸酶活性的增加。

从试验结果来看, $Ca_3(PO_4)_2$、$FePO_4$、$AlPO_4$ 等难溶性磷酸盐容易被酵母、霉菌溶解, 而磷矿粉容易被芽孢杆菌溶解, 各种溶磷微生物对不同化学结构含磷物质的亲和溶解能力不同。本研究所选的四株解磷微生物具有一定代表性, 分别属于产芽孢杆菌、非芽孢杆菌、酵母和霉菌。由此可见, 霉菌并不是对所有形态难溶磷的溶解能力都高于细菌, 酵母、产芽孢细菌等在溶磷方面也发挥着重要作用。有的文献报道真菌溶磷能力高于细菌[18], 这种说法亦存在一定片面性。从本研究来看, 各种微生物对不同难溶磷酸盐有不同溶解效果。真菌生长、繁殖需要的碳源、能源较高, 生长周期长, 但在溶解难溶磷酸盐时发挥着生物量大、代谢产物多的优势; 磷细菌 P17 菌株溶解磷矿粉的能力强, 且代时短。因此生物磷肥应该考虑由细菌和真菌混合菌群组成。若把在溶解难溶性磷酸盐和磷矿粉方面能相得益彰的不同种类解磷

微生物混合菌群作为生物磷肥, 将会为农业做出更大贡献。

参 考 文 献

[1] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展. 土壤肥料, 2001, (3): 7~ 11. Zhao X R, Lin Q M. Review of P-solubilization by microbes (In Chinese). Soil Fertilizer, 2001, (3): 7~ 11

[2] 张宝贵, 李贵桐. 土壤生物在土壤磷有效化中的作用. 土壤学报, 1998, 35(1): 104~ 111. Zhang B G, Li G T. Effects of soil organisms on enhancement of plant availability of soil phosphorus (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 1998, 35(1): 104~ 111

[3] 林启美, 赵小蓉, 孙炎鑫, 等. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布. 土壤与环境, 2000, 9(1): 34~ 37. Lin Q M, Zhao X R, Sun Y X, *et al*. Community characters of soil phosphobacteria in four ecosystems (In Chinese). Soil and Environment, 2000, 9(1): 34~ 37

[4] Sundara R, Sinha M K. Phosphate dissolving microorgamisms in the rhizosphere and soil. India J. Agric. Sci., 1963, 33(4): 272~ 278

[5] Paul N B, Sundara R. Phosphate dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated hegumes. Plant and Soil, 1971, 35: 127~ 132

[6] Molla, Chowdhury A. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. Plant and Soil, 1984, 78: 393~ 399

[7] Kucey, Janzenand H H, Legett M E. Microbial lymediated increases in plant-available phosphorus. Adv. Agron., 1989, 42: 199~ 228

[8] 南京农业大学主编. 土壤农化分析(第二版). 北京: 农业出版社, 1996. 69. Nanjing Agricultural University. Soil Agricultural Chemistry Analysis. 2nd Ed. (In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1996. 69

[9] 佩奇 A L, 米勒 R H, 等著. 闵九康, 郝心仁, 严慧峻, 等译. 土壤分析法. 北京: 中国农业科技出版社, 1991. 592~ 599. Peiqi A L, Mile R H, *et al*. eds. Min J K, Hao X R, Yan H J, *et al*. trans. Soil Analysis Methods (In Chinese). Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 1991. 592~ 599

[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. 微生物学报, 2002, 42(2): 236~ 241. Zhao X R, Lin Q M, Li B G. Solubilization of 4 insoluble phosphates by Psolubilizing microorganisms (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica, 2002, 42(2): 236~ 241

[11] 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. 土壤学报, 2004, 41(6): 931~ 937. Zhong C Q, Huang W Y. Effects and mechanism of P-solubilizing *Baaillus* P17 strain on phosphorus solubilization of different phosphate rocks (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(6): 931~ 937

[12] 陆文龙, 王敬国, 曹一平, 等. 低分子量有机酸对土壤磷释放动力学的影响. 土壤学报, 1998, 35(4): 493~ 500. Lu W L, Wang J G, Cao Y P, *et al*. Kinetics of phosphorus release from soils, as affected by organic acids with low-molecular-weight (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 1998, 35(4): 493~ 500

[13] 李庆逵, 蒋柏藩, 鲁如坤编著. 中国磷矿的农业利用. 南京: 江苏科学技术出版社, 1992. 35. Li Q K, Jiang B F, Lu R K. eds. Phosphate Rock for Agriculture Use in China (In Chinese). Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 1992. 35

[14] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. Soil Biol. Biochem., 1995, 27(3): 257~ 263

[15] Hilda R, Reynaldo F. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 1999, 17: 319~ 339

[16] Feng K, Lu H M, Sheng H J, *et al*. Effect of organic ligands on biological availability of inorganic phosphorus in soils. Pedosphere, 2004, 14(1): 85~ 92

[17] Song Y C, Li X L, Christie P. Uptake of organic phosphorus by Arbuscular Mycorrhizal red clover. Pedosphere, 2002, 12(2): 103~ 110

[18] Ghani A, Rajan S, Lee A. Enhancement of phosphate rocks solubility through biological processes. Soil Biol. Biochem., 1994, 26: 127~ 136

COMPARISON IN P-SOLUBILIZING EFFECTS BETWEEN DIFFERENT P-SOLUBILIZING MICROBES AND VARIATION OF ACTIVITIES OF THEIR PHOSPHATASES

Zhong Chuanqing Huang Weiyi*

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture; Microbiology Department, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Different P-solubilizing microbes can live in media containing different phosphorous sources. The author compared four strains, namely P17, Y3, F4, and P10, in phosphorus-dissolving mechanism and phosphorus-solubilizing ability. Results show that bacteria, fungus, and yeast play important roles in phosphorus-solubilization. Such artificial phosphates as aluminum phosphate, iron phosphate, calcium phosphates can be dissolved by yeast and mildew easily. Strain Phosphobacteria P17 *(Bacillus megaterium)* could dissolve phosphorus from phosphate rock powder from Huangmailing of Hubei Province easily; while yeast Y3 could improve solubility of calcium phosphate the most significantly among the four strains examined. They demonstrated different predominance in solubilizing phosphorus. The results also show that different strains of P-dissolving microbes can accelerate solubilization of phosphorus to a varying extent, which reveals that different chemical bonds have different effects on solubilization of phsphates and phosphate rock powder varied in solubility. Acids, acid phosphatase, and alkaline phosphatase have synergic effects on phosphate dissolution. Phosphatase could utilize substrates containing such organic phosphates as calcium phosphate, and Strain phospobacteria P10 produced the highest phosphatase activity among the four strains. Activities of acid phosphatase and alkaline phosphatase vary with P-solubilizing microbes. When growing in medium containing $NH_4H_2PO_4$, and KH_2PO_4 as phosphorus sources, activities of acid phosphatase and alkaline phosphatase with Strain phosphobacteria P17, Strain phosphobacteria P10, Strain yeast Y3, and mildew F4 were low. Activities of acid phosphatase and alkaline phosphatase were high in medium containing such hard-to-dissolve phosphates as calcium phosphate, aluminium phosphate, iron phosphate. The results show that in conditions short of phosphorus, acid, acid phosphatase and alkaline phosphatase help phosphorus-solubilizing microorganisms dissolve phosphorus more easily.

Key words P-solubilizing microorganism; Acid phosphatase; Alkaline phosphatase; Available phosphorous