

## 溶磷菌对 4 种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究\*

赵小蓉 林启美 李保国

( 中国农业大学土壤和水科学系 北京 100094 )

摘 要:以 4 种难溶性磷酸盐为培养基,发现供试菌株溶解这些磷酸盐的特性差异很大,真菌溶磷能力普遍比细菌要高得多。以  $\text{NO}_3^-$  为氮源时的溶磷量通常高于以  $\text{NH}_4^+$  为氮源时的溶磷量,只有 2TCiF2 对氟磷灰石及 4TCiF6 对磷酸铝的溶解能力以  $\text{NH}_4^+$  为氮源时较高。大多数菌株较易溶解 Ca-P( 氟磷灰石和磷矿粉),其次为 Al-P(  $\text{AlPO}_4$  ),而溶解 Fe-P(  $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ) 的能力都比较弱,只有曲霉 2TCiF2 具有较强的溶解 Fe-P 能力,尤其是当供给  $\text{NO}_3^-$  时,溶解 Fe-P 的活性比供给  $\text{NH}_4^+$  时大幅度提高。欧文氏菌 4TCRi22 和肠杆菌 1TCRi15 能大量地溶解氟磷灰石,而两株杆杆菌对磷矿粉的溶解能力最强。供试菌株的溶磷作用可能是由于分泌的有机酸与金属离子络合或螯合作用所致,欧文氏菌和肠杆菌溶解难溶性磷过程中,非有机酸物质可能在起主要作用。

关键词:溶磷菌,难溶性磷酸盐,溶磷量

中图分类号:Q939.96 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)02-0236-06

土壤中的磷酸盐有多种形态,不同的土壤差异很大,如我国南方大部分土壤中的磷酸盐主要是铁磷酸盐,包括粉红磷铁矿(  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  )、蓝铁矿(  $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  )及闭蓄态磷酸盐等;北方石灰性土壤主要是钙镁磷酸盐,主要包括磷酸二钙、磷酸八钙、磷酸十钙( 羟基磷灰石,氟磷灰石)等,铝磷酸盐在一些土壤中也占相当大的比例<sup>[1]</sup>。土壤中这些磷酸盐大部分都是水不溶性的,对植物有效性很低。而施入土壤的大部分磷肥很快与土壤中的铁、铝、钙、镁等结合,形成难溶性的磷酸盐,致使磷肥的利用率较低,当季作物的利用率一般都低于 25%<sup>[2]</sup>。

土壤中存在许多微生物,能将难溶性磷酸盐转化为植物可吸收利用的形态<sup>[3]</sup>,这些微生物称为溶磷菌。不同菌株不仅溶磷能力存在很大的差异,而且对不同的磷酸盐溶解能力也不一样<sup>[4,5]</sup>。将这些微生物接种于土壤中,有些能够在土壤中繁殖并发挥作用,提高土壤有效磷含量,增加作物吸收磷量,提高作物产量<sup>[6,7]</sup>。但也有不少相反的报道,接种溶磷菌对土壤有效磷含量没有显著的影响<sup>[4]</sup>,不能明显地改善作物磷素营养<sup>[8]</sup>,即使能够提高作物生物量也是由于其它的原因,而非溶磷作用所致<sup>[9]</sup>。本研究将利用从玉米根际和非根际土壤中分离出的溶磷真菌和细菌,研究它们对土壤中几种主要磷酸盐的溶解能力,以期利用溶磷菌提高土壤磷利用效率提供一些依据。

\* 国家重点基础研究发展规划项目( G1999011803 )

作者简介 赵小蓉( 1970 - )女,现为中国农业大学讲师,博士,主要从事土壤微生物生态学方面的研究。

收稿日期 2001-04-12, 修回日期 2001-09-10

# 1 材料和方法

## 1.1 菌株

供试菌株是本实验室从夏玉米(唐抗 5 号)根际和非根际土壤中分离出来的,细菌有肠杆菌(*Enterobacter* sp.)1TCRi15、欧文氏菌(*Erwinia* sp.)4TCRi22、节杆菌(*Arthrobacter* spp.)1TCRi7 和 1TCRi14;真菌有青霉(*Penicillium* spp.)1TCRiF5 和 2TCRiF4、曲霉(*Aspergillus* spp.)2TCiF2 和 4TCiF6。

## 1.2 培养基

**1.2.1 无机磷培养基:**葡萄糖 10g, NaCl 0.3g, KCl 0.3g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.03g,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0.03g,  $(NH_4)_2SO_4$  0.5g, 磷酸盐(含磷 1000mg), 加蒸馏水至 1000mL, 调节 pH7.0~7.5。其中对两株溶磷能力较强的菌株测定其在  $KNO_3$  (0.76g/L)培养基中的溶磷能力。

所用的磷酸盐包括:  $FePO_4 \cdot 4H_2O$  (Fe-P, 含磷 13.3%),  $AlPO_4$  (Al-P, 含磷 24.9%), 购于 Aldrich 公司, 氟磷灰石  $Ca_{10}(PO_4)_6 \cdot F_2$  (FAP, 含磷 18.0%) 由南京土壤研究所提供, 磷矿粉 (RP, 含磷 10.3%), 产于湖北宜昌。上述磷酸盐按每升培养基中加入相同含量的磷(1000mg)计算其加入量。

**1.2.2 牛肉膏蛋白胨培养基, PDA 培养基。**

## 1.3 菌液制备

将牛肉膏蛋白胨上培养 24h 的细菌和 PDA 上培养 7d 的真菌分别刮入无菌水中, 于漩涡混合器中混合 30s, 制备成菌悬液和孢子悬液, 菌数约为  $10^8$  cfu/mL。

## 1.4 培养

150mL 三角瓶中装入 50mL 灭菌培养基, 然后分别加入已灭菌的磷酸盐(160℃~170℃ 2h), 接种 1mL 菌悬液或孢子悬液, 28℃ 下培养(160r/min)7d 后, 在 4℃ 下离心(9 000g)20min, 测定上清液中含磷量。同时做不接种对照 4 次重复。

## 1.5 测定项目及方法

上清液含磷量用钼锑抗比色法测定<sup>[10]</sup>, 溶磷量为不接种与接种培养液含磷量的差值, 用 mg/L 表示。上清液的酸度用 pH 计( PHS-29A )测定。真菌质量用滤纸过滤培养液, 再用蒸馏水洗涤 5 次, 80℃ 烘 8h 后称重, 用 mg/mL 表示。

所有数据用 STATISTICA 软件进行分析。

# 2 结果

## 2.1 真菌对不同难溶性磷酸盐的溶解能力

从表 1 可知, 供试菌株均能在 4 种磷酸盐培养基上生长, 但在 Al-P 和 RP 上生长得更好, 菌体质量是 Fe-P 和 FAP 上的 2 倍多。但溶磷量并不与其菌体生长量一致。曲霉 2TCiF2 的溶磷活性最高, 而且对 4 种形态的磷酸盐均能溶解, 其中溶解 Al-P 的能力最强, 溶磷量高达 310.28mg/L, 其次为 FAP > RP > Fe-P。曲霉 4TCiF6 菌株的溶磷能力明显低于菌株 2TCiF2, 溶解 RP 的能力最强, 溶磷量达到 210.46mg/L。两株青霉的溶磷能力比两株

曲霉低得多,对 Fe-P 的溶解能力很差,而溶解 FAP 的能力比较强,但菌体生长量很小。

大部分培养液的 pH 都降低到 3 以下,但青霉 1TCriF5 和 2TCriF4 在 FAP 和 RP 培养液中的酸度没有发生显著的变化,与不接种对照的酸度(表 4)相当。

当供给  $\text{NO}_3^-$  时,两株溶磷能力较强的曲霉生长量和溶磷量发生了明显的改变。总的来看,菌体生长量比在  $\text{NH}_4^+$  为氮源的培养基上明显增大,其中 FAP 培养基上的生长量增加了 1 倍多(表 2),只有在 Fe-P 培养基上生长量下降,其中菌株 2TCiF2 的生长量减少到  $\text{NH}_4^+$  培养基中的 1/2。2TCiF2 溶解 Fe-P 和 RP 的能力增强了 50% 左右,而溶解 FAP 的能力降低了约 30%。培养介质的 pH 也相应提高了近 2 个单位,由 2.89 上升到 4.71。4TCiF6 菌株溶解 Fe-P 的能力增加了 6 倍多,但溶解 Al-P 的能力降低了约 1/2,培养液的 pH 都升高了约 3 个单位。

表 1 4 株真菌对不同难溶性磷酸盐的溶解能力( $\text{NH}_4^+$  为氮源)

Table 1 Solubilization of different insoluble phosphates by four fungal isolates (in ammonium medium)

Phosphates	Isolates	pH	Phosphate solubilization capacity/(mg/L)	Fungal mass/(mg/mL)
Fe-P	<i>Asp.</i> 2TCiF2	2.21 ± 0.07	129.47 ± 26.41	1.12 ± 0.08
	<i>Asp.</i> 4TCiF6	2.50 ± 0.03	11.26 ± 5.72	1.70 ± 0.18
	<i>Pen.</i> 1TCriF5	2.37 ± 0.14	1.52 ± 0.59	1.15 ± 0.26
	<i>Pen.</i> 2TCriF4	2.30 ± 0.03	-7.17 ± 0.19	1.54 ± 0.40
Al-P	<i>Asp.</i> 2TCiF2	2.24 ± 0.06	310.28 ± 73.45	2.00 ± 0.18
	<i>Asp.</i> 4TCiF6	2.76 ± 0.10	107.73 ± 26.77	2.42 ± 0.18
	<i>Pen.</i> 1TCriF5	2.59 ± 0.04	12.86 ± 4.49	2.17 ± 0.53
	<i>Pen.</i> 2TCriF4	2.50 ± 0.05	8.67 ± 1.45	3.04 ± 0.53
FAP	<i>Asp.</i> 2TCiF2	2.89 ± 0.06	255.42 ± 19.15	1.04 ± 0.09
	<i>Asp.</i> 4TCiF6	4.13 ± 0.56	56.98 ± 7.27	1.01 ± 0.50
	<i>Pen.</i> 1TCriF5	6.45 ± 0.39	69.70 ± 4.27	0.19 ± 0.07
	<i>Pen.</i> 2TCriF4	2.89 ± 0.01	60.17 ± 2.07	0.73 ± 0.21
RP	<i>Asp.</i> 2TCiF2	4.23 ± 0.33	240.39 ± 31.32	2.15 ± 0.25
	<i>Asp.</i> 4TCiF6	4.54 ± 0.42	210.46 ± 4.28	2.29 ± 0.24
	<i>Pen.</i> 1TCriF5	5.42 ± 0.14	14.35 ± 1.38	2.16 ± 0.54
	<i>Pen.</i> 2TCriF4	7.40 ± 0.26	2.65 ± 1.13	3.17 ± 0.28
LSI( $P < 0.05$ )		0.34	32.49	0.42

表 2 两株曲霉对不同难溶性磷酸盐的溶解能力( $\text{NO}_3^-$  为氮源)

Table 2 Solubilization of different insoluble phosphates by two *Aspergillus* isolates (in nitrate medium)

Phosphates	Strains	pH	Phosphate solubilization capacity/(mg/L)	Fungal mass/(mg/mL)
Fe-P	<i>Asp.</i> 2TCiF2	2.72 ± 0.15	212.66 ± 42.07	0.67 ± 0.06
	<i>Asp.</i> 4TCiF6	5.41 ± 0.11	81.46 ± 12.19	1.01 ± 0.13
Al-P	<i>Asp.</i> 2TCiF2	2.37 ± 0.13	327.46 ± 37.33	1.53 ± 0.20
	<i>Asp.</i> 4TCiF6	5.77 ± 0.42	48.18 ± 6.80	2.68 ± 0.09
FAP	<i>Asp.</i> 2TCiF2	4.71 ± 0.19	176.05 ± 6.83	2.40 ± 0.24
	<i>Asp.</i> 4TCiF6	4.45 ± 0.56	53.95 ± 4.68	2.73 ± 0.24
RP	<i>Asp.</i> 2TCiF2	5.23 ± 0.55	345.83 ± 32.61	2.82 ± 0.37
	<i>Asp.</i> 4TCiF6	4.43 ± 0.22	235.12 ± 19.33	2.52 ± 0.18

LSI( $P < 0.05$ )

0.49

35.92

0.31

## 2.2 细菌对不同难溶性磷酸盐的溶解作用

表 3 表明,供试菌株对 Fe-P 的溶解活性都较低,尤其是欧文氏菌 4TCRi22 完全不能溶解 Fe-P 和 Al-P,但可强烈地溶解 FAP,溶磷量为 41.16mg/L。肠杆菌 1TCRi15 也能够大量地溶解 FAP,其溶磷量高达 42.00mg/L,对 Fe-P、Al-P 及 RP 也有一定的溶解能力。两株节杆菌对 RP 的溶解能力最强,溶磷量最高为 11.47mg/L,也能够溶解一定量的 FAP 和 Al-P。

几乎所有培养介质的 pH 都降低到 4 以下,但在 RP 为磷源时,肠杆菌和欧文氏菌培养液的 pH 比不接种的对照(表 4)升高了近一个单位。

表 3 4 株细菌对不同难溶性磷酸盐的溶解能力( $\text{NH}_4^+$  为氮源)

Table 3 Solubilization of insoluble phosphates by four bacteria isolates (in ammonium medium)

Phosphates	Isolates	pH	Phosphate solubilization capacity/(mg/L)
Fe-P	<i>Arth.</i> 1TCRi7	3.41 ± 0.02	0.08 ± 0.18
	<i>Arth.</i> 1TCRi14	3.49 ± 0.06	1.05 ± 1.69
	<i>Ent.</i> 1TCRi15	3.53 ± 0.08	2.05 ± 0.70
	<i>Erw.</i> 4TCRi22	3.53 ± 0.03	-0.43 ± 0.88
Al-P	<i>Arth.</i> 1TCRi7	3.96 ± 0.05	2.21 ± 0.29
	<i>Arth.</i> 1TCRi14	3.99 ± 0.04	3.22 ± 1.38
	<i>Ent.</i> 1TCRi15	3.58 ± 0.02	7.30 ± 0.57
	<i>Erw.</i> 4TCRi22	3.44 ± 0.02	-1.17 ± 0.59
FAP	<i>Arth.</i> 1TCRi7	4.07 ± 0.02	6.30 ± 1.49
	<i>Arth.</i> 1TCRi14	4.08 ± 0.01	5.51 ± 0.44
	<i>Ent.</i> 1TCRi15	3.43 ± 0.06	42.00 ± 1.99
	<i>Erw.</i> 4TCRi22	3.06 ± 0.04	41.16 ± 0.45
RP	<i>Arth.</i> 1TCRi7	3.88 ± 0.03	11.47 ± 0.22
	<i>Arth.</i> 1TCRi14	4.06 ± 0.01	9.07 ± 0.14
	<i>Ent.</i> 1TCRi15	7.91 ± 0.02	6.57 ± 0.58
	<i>Erw.</i> 4TCRi22	8.56 ± 0.08	1.79 ± 0.35
LSI( $P < 0.05$ )		0.06	1.33

表 4 不接种对照培养液的酸度和含磷量

Table 4 The pH and phosphorus concentration in the non-inoculated culture medium

	$\text{NH}_4^+$ ( Fungi )				$\text{NO}_3^-$ ( Fungi )				$\text{NH}_4^+$ ( Bacteria )			
	Fe-P	Al-P	FAP	RP	Fe-P	Al-P	FAP	RP	Fe-P	Al-P	FAP	RP
pH	3.46	5.25	6.62	7.29	3.44	5.16	6.25	7.08	3.39	5.49	7.25	7.47
( Phosphorus )( mg/L )	10.70	2.34	0.57	0.80	7.27	1.66	0.51	0.97	10.04	2.82	0.10	0.33

### 2.3 微生物的溶磷量与 pH 值的关系

从图 1 可以看出,微生物的溶磷量与 pH 之间不存在显著的相关性,相同的 pH,无论是不同菌株溶解同一种磷酸盐的数量,还是同一菌株溶解不同磷酸盐的数量差异都很大,说明这些菌株的溶磷作用可能不取决于培养液中质子的数量。

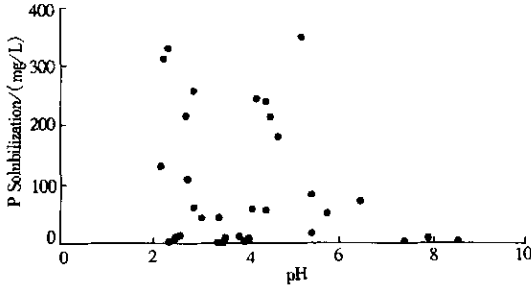


图 1 培养介质 pH 与溶磷量的关系

Fig. 1 The relationship between the medium pH and rock phosphate solubilization by microorganisms

### 3 讨论

微生物的溶磷能力首先取决于微生物本身的特征,如分泌质子、有机酸和其它物质的数量和种类,其次与难溶性磷酸盐的结构和组成成分有关。本研究发现,供试真菌的溶磷量是细菌的几倍,甚至上百倍(表 1、表 3),其他一些研究者也得到类似的结果<sup>[11]</sup>。这可能与其在生长繁殖过程中产生质子、有机酸等物质的数量和种类有关,真菌不仅分泌的有机酸总量比细菌大,而且有机酸种类更多<sup>[12]</sup>;也可能是由于菌丝与磷酸盐的接触面比细菌更大,或易于主动接触磷酸盐颗粒。

一些研究发现,许多溶磷菌的溶磷量与培养液的 pH 存在一定的相关性<sup>[13]</sup>,但本研究发现二者之间不存在显著的相关性,其他许多研究者也得到类似的结果<sup>[6]</sup>,溶磷作用主要是由于有机酸对铁、铝、钙、镁等金属离子的络合或螯合作用。由于不同的有机酸与金属离子的结合能力差异很大,所以,微生物分泌有机酸的种类比绝对数量对溶解难溶性磷酸盐影响更大。

由于不同形态的磷酸盐,其结构和成分差异很大,导致微生物对其溶解能力的差异。Banik 和 Dey<sup>[4]</sup>发现几株细菌和真菌对不同磷酸盐的溶解能力为  $\text{Ca}(\text{PO}_4)_3 > \text{AlPO}_4 > \text{FePO}_4$ 。Whitelaw 等<sup>[8]</sup>的研究结果也证实, *Penicillium radicum* 对 Ca-P 的溶解能力大于 Al-P 和 Fe-P。由于大多数溶磷菌主要通过分泌质子和有机酸使磷酸盐溶解, Ca-P 较易溶解可能是由于质子和有机酸络合双重作用的结果,而 Al-P 和 Fe-P 的溶解可能只通过络合和螯合作用。本研究发现,培养基的组成强烈地影响这些磷酸盐在水中的溶解量(表 4),但是溶磷菌对其溶解并不与它们在水中的溶解量有关,主要取决于溶磷菌所分泌的代谢产物。

溶磷菌分泌的非有机酸物质,可能在溶解难溶性磷过程中也发挥一定作用,有时甚至起主要作用。本研究发现供试菌株中的一株欧文氏菌、一株肠杆菌和—株青霉(表 1 和表 3)在以磷矿粉为磷源时,培养液的酸度不仅不提高,反而降低,说明溶磷作用是由于这些菌株分泌其它非致酸物质,这些物质能够与磷矿粉中的钙、镁、铁等结合,从而释放出磷。

菌体也吸收利用所溶解出来的磷,导致净溶磷量为负值(表 1,表 3)。赵小蓉等<sup>[14]</sup>也发现某些微生物细胞能够以多聚磷酸盐的形态贮藏磷,用氯仿进行熏蒸处理时,这部分磷会从细胞中释放出来。但 Illmer 和 Schinner<sup>[11]</sup>认为所溶解出来的磷成为微生物量磷所占的比例很小,还不到 1%。总之,微生物的溶磷机理比较复杂,不同的菌株有不同的溶磷机制,同一菌株可能有多个溶磷机制。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 沈仁芳 蒋柏藩. 土壤学报, 1992, 29( 1 ) : 80 ~ 85.
- [ 2 ] 沈善敏 殷秀岩 张 璐. 应用生态学报, 1992, 3( 2 ) : 138 ~ 143.
- [ 3 ] Richardson A E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In Pankhurst C E, Doube B E, Gupta V V S R, et al. Eds. Soil Biota Management in Sustainable Farming Systems. CSIRO : Melbourne, 1994. 50 ~ 62.
- [ 4 ] Banik S, Dey B K. *Plant and Soil*, 1982, 69 : 353 ~ 364.
- [ 5 ] Whitelaw M A, Harden T J, Helyar K R. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999, 31 : 655 ~ 665.
- [ 6 ] Illmer P, Schinner F. *Soil Biology & Biochemistry*, 1992, 24( 4 ) : 389 ~ 395.
- [ 7 ] Whitelaw M A, Harden T J, Bender G L. *Australian Journal of Soil Research*, 1997, 35 : 291 ~ 300.
- [ 8 ] De Freitas J R, Banerjee M R, Germida J. *J Biol Fertil Soils*, 1997, 24 : 358 ~ 264.
- [ 9 ] Laheurte F, Berthelin J. *Plant and Soil*, 1988, 105 : 11 ~ 17.
- [ 10 ] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京 : 中国农业科技出版社, 2000. 166 ~ 185.
- [ 11 ] Illmer P, Schinner F. *Soil Biology & Biochemistry*, 1995, 27( 3 ) : 257 ~ 263.
- [ 12 ] 林启美 王 华 赵小蓉, 等. 微生物学通报, 2001, 28( 2 ) : 26 ~ 30.
- [ 13 ] 林启美 赵小蓉 孙焱鑫, 等. 土壤与环境, 2000, 9( 1 ) : 34 ~ 37.
- [ 14 ] 赵小蓉 林启美 孙焱鑫, 等. 微生物学通报, 2001, 28( 1 ) : 1 ~ 4.

## The Solubilization of Four Insoluble Phosphates by Some Microorganisms\*

Zhao Xiaorong Lin Qimei Li Baoguo

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

**Abstract** : Four insoluble phosphates of ferric phosphate ( Fe-P ), aluminum phosphate ( Al-P ), fluorapatite ( FAP ) and rock phosphate ( RP ) were used as a sole phosphorus resource for some phosphate-solubilizing microorganisms. It was found that there was significant difference in solubilizing these phosphates by the tested isolates. The fungi normally were more powerful than the bacteria in dissolving the phosphates. The microorganisms generally solubilized more phosphate when supplied with  $\text{NO}_3^-$  than with  $\text{NH}_4^+$ . However, the isolates of 2TCiF2 and 4TCiF6 had much higher capacity to solubilize FAP and Al-P respectively in  $\text{NH}_4^+$  medium. Most of the isolates solubilized readily FAP and RP, and then Al-P. Ferric phosphate was the least soluble to these isolates. Only isolate 2TCiF2 showed strong ability to solubilize Fe-P. In particular, two *Aspergillus* sp. had much higher capacity of dissolving Fe-P when supplied with  $\text{NO}_3^-$ . The isolates of *Erwinia* sp. 4TCRi22 and *Enterobacter* sp. 1TCRi15 had higher capacity of solubilizing FAP. But two *Arthrobacter* sp. showed the highest activity in RP medium. It is supposed that complexation of organic acids with metals may be the main reason for these isolates to solubilize the phosphates. However, other chelant substances may be much more important for *Enterobacter* sp. and *Erwinia* sp. to release phosphorus from the phosphates.

**Key words** : Phosphate-solubilizing microorganisms, Insoluble phosphates, Phosphate solubilization capacity