

## 两株解磷真菌的解磷能力及其解磷机理的初步研究\*

康贻军<sup>1,2</sup> 胡健<sup>1\*\*</sup> 单君<sup>1</sup> 何芳<sup>1</sup> 朴哲<sup>1</sup> 殷士学<sup>1</sup>

(江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室 盐城 224002)<sup>1</sup>

(扬州大学环境科学与工程学院 扬州 225009)<sup>2</sup>

**摘要:** 从不同处理的水稻土壤中分离筛选出两株高效解磷真菌 HP2、P5, 研究了不同碳源条件对溶磷效果的影响, 以及解磷菌株在不同的碳源培养条件下, 溶磷量与培养介质 pH 值之间的相关性。结果表明, HP2 菌株解磷能力在不同的测定时间内均高于 P5 菌株; 不同碳源培养基的溶磷量顺序为蔗糖 > 葡萄糖 > 纤维素, 且彼此差异显著; 测定时间内, 菌株的溶磷量与介质 pH 值之间存在极显著相关性 ( $P < 0.01$ )。

**关键词:** 解磷菌, 溶磷量, 机理

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0022-06

### Solubilization Capacity of Insoluble Phosphates and it's Mechanism by Two Phosphate Solubilizing Fungi (PSF)\*

KANG Yi-Jun<sup>1,2</sup> HU Jian<sup>1\*\*</sup> SHAN Jun<sup>1</sup> HE Fang<sup>1</sup> PIAO Zhe<sup>1</sup> YIN Shi-Xue<sup>1</sup>

(Bioresources and Environmental Protection, Yancheng 224002)<sup>1</sup>

(Environment Science and Engineering College of Yangzhou University, Yangzhou 225009)

**Abstract:** Two phosphate solubilizing fungi (PSF) strains named HP2、P5 were isolated from different paddy soils, we studied the effects of different carbon sources on the solubilization of rock phosphate and the relationship between phosphate solubilization capacity and the pH of culture mediums supplied with different carbon sources. The results showed that, Strain HP2 had the better capacity to solubilize rock phosphate than P5 in different testing time; The rock phosphate solubilized by two PSF supplied with different carbon sources was sucrose > glucose > cellulose, and the relationship among each other was salience; in testing time, the correlation between phosphate solubilization capacity by two PSF and the pH of culture mediums supplied with different carbon sources was significant salience ( $P < 0.01$ ).

**Key words:** Phosphate solubilizing fungi, Phosphate solubilization capacity, Mechanism

磷素是植物生长不可缺少的营养元素之一, 在生产实践中, 为了提高作物产量, 每年都要向土壤中施入大量可溶性磷肥, 然而许多研究表明, 磷酸盐在土壤中常以磷酸三钙为主, 这类磷酸盐溶解性差, 难于被植物所吸收, 作物对磷肥的当季的利用率一般只有 5% ~ 10%, 加上作物的后效, 也不超过 25%<sup>[1]</sup>, 长期施用磷肥导致大多数农田土壤潜在的磷库含量很大, 而提供作物生长发育的磷流却很少, 土壤缺磷是“遗传学缺磷”而非“土壤学缺磷”<sup>[4]</sup>。因此如何解决这个矛盾, 控制滥用肥料带来的环境污染, 分离筛选出高效具有解磷作用的微生物菌株并设法制成微肥, 成了近些年的微

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30470060, 40471072)

\*\* 通讯作者 E-mail: huj@yzu.edu.cn

收稿日期: 2005-11-14, 修回日期: 2006-01-28

生物学界的研究热点之一。

本文从不同处理的水稻土壤中筛选出两株具有高效解磷能力的真菌，测试其解磷能力，摸索解磷的最佳条件，探究其作用机理，并在前人研究的基础上，将解磷菌解磷特性的研究方法做了改进。

## 1 材料与方法

### 1.1 土样

采自扬州大学农学院网室盆栽水稻土壤，土壤系江苏省扬州市水稻土，母质为湖相沉积物。基本理化性状为全氮 1.0 g/kg、有机质 17.3 g/kg、速效磷 8.57 mg/kg、全磷 0.50 g/kg、CaCO<sub>3</sub> 7.5 g/kg。采集样品深度为 0 cm ~ 20 cm，各取得含重金属 Cr (VI) 10 mg/kg 土壤和正常土壤若干。

### 1.2 分离培养基

解磷菌分离培养基（简记为 P1 培养基）配方<sup>[2]</sup>：葡萄糖 10.0 g，NaCl 0.3 g，KCl 0.3 g，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g，MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.3 g，MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.03 g，FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.03 g，Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5.0 g，琼脂 18 g，定容至 1,000 mL，pH 值 7.0 ~ 7.2。

### 1.3 解磷菌的分离

称取风干水稻土样 10 g 于 100 mL 无菌水中，充分振荡混匀、静置，取上清液作 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 稀释，各吸取 0.2 mL 均匀涂布于平板培养基上，每个浓度重复 3 皿，30℃ 条件下培养 48 h 后，取出观察各平板长成的菌落，菌落周围出现透明圈的则表明该菌落中存在具有解磷能力的菌体。再将此菌落中的所有可能的菌体转接并继续培养观察，通过如此反复分离筛选，最终根据产生透明圈的大小确定具有较高解磷能力的真菌作进一步研究。

### 1.4 菌株鉴定方法

通过光学电子显微镜进行形态观察，并结合环境扫描电镜观察其繁殖器官形态，初步进行菌株鉴定。

### 1.5 仪器及设备

往复恒温摇床，722 光栅分光光度计，pHS-3C 数字酸度计。

### 1.6 测定方法

用接种环从 HP2、P5 菌株各取得孢子若干到 30 mL 无菌水中，旋涡混匀仪上充分振荡 30 s 使孢子分散均匀，用微量取样器分别吸取 1 mL 孢子液至 50 mL 三角瓶内，将三角瓶放置于 30℃、100 r/min 的往复恒温摇床中培养，分别于各测定时间随机取两种菌株的培养液各 3 瓶，过滤，测定滤液中溶解磷的含量以及 pH 值，溶磷量的测定采用钼锑抗比色法<sup>[3]</sup>。另任取 3 只三角瓶不进行培养作为 0 h 对照，测定其滤液的溶磷量及 pH 值。真菌生物量的测定方法是在配制解磷液体培养基时，将不可溶磷酸盐装入透析袋进行培养，测定时将培养液用滤纸过滤后，用蒸馏水反复洗涤，80℃ 烘 8 h 后称重，以 mg/mL 为计算单位。

## 2 结果与分析

### 2.1 两株解磷真菌的基本特征

从含重金属 Cr (VI) 10 mg/kg 处理的水稻土壤中分离获得的菌株 HP2 (图 1A)，

经初步鉴定为圆孢毛霉 (*Mucor globosus* Fischer); 从正常水稻土壤中获得的菌株 P5 (图 1-B), 初步鉴定为青霉属 (*Penicillium* spp.)。

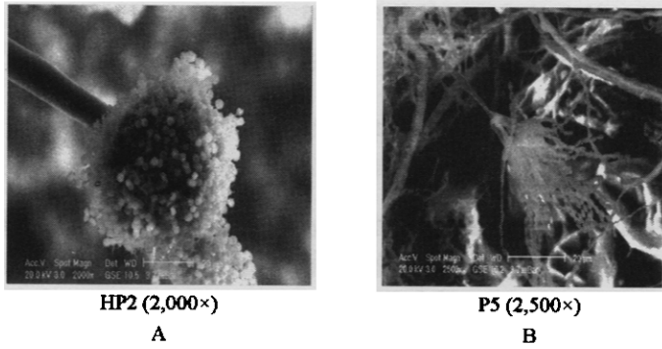


图 1 两株解磷菌的扫描电镜图

### 2.2 解磷菌在不同培养时期解磷能力的动态变化

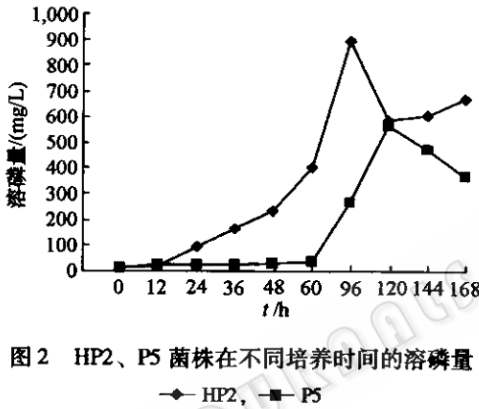


图 2 HP2、P5 菌株在不同培养时间的溶磷量

◆ HP2, ■ P5

解磷菌在不同培养时期解磷能力如图 2 所示, 在不同的测定时间, HP2 菌株培养液溶磷量均高于 P5 菌株。两株解磷菌的溶磷趋势均是先增加再下降并趋于稳定的。HP2 在 0 ~ 60 h 溶磷量是逐步提高, 96 h 时溶磷量达最高值, 为 897.354 mg/mL; 而 P5 菌株的解磷能力在 0 ~ 60 h 内几乎没有表现出来, 60 h 后溶磷量出现跃增, 120 h 达最高值 565.487 mg/mL, 此后出现逐渐下降现象。

### 2.3 解磷菌在不同培养时期溶磷量与培养介质 pH 值的关系

有关解磷菌与培养介质 pH 的关系, 前人的研究有不同的结论。王光华等<sup>[4]</sup>人研究表明, 溶磷量与培养介质 pH 值之间的相关性因不同的菌株差别很大, 而赵小蓉<sup>[2]</sup>和 Narsian 等<sup>[5]</sup>却研究得出解磷菌的溶磷量与介质 pH 值之间没有显著的相关性。对于解磷菌的溶磷量与介质 pH 值的相关性研究, 前人少有考虑解磷菌不同生长时期的 pH 及解磷量的动态变化, 所以可能出现不同的研究结论。就本试验的研究结果看, 如表 1 所示, 除 P5 菌株在以纤维素作为碳源的培养条件下溶磷量与培养介质 pH 值之间无显著相关性外, 其余各处理在不同测定时间溶磷量与培养介质 pH 间存在显著甚至极显著的相关性。

再将测定时间内所有培养介质 pH 值与其相对应的溶磷量作成图 3, 由图得出溶磷量与介质 pH 值之间的相关系数为 -0.8632\*\* ( $P < 0.01$ ), 达极显著水平, 说明在合适的培养条件下, 解磷菌的溶磷量与培养介质 pH 值之间存在良好的相关性, 由此可以认为, 本实验中的两株解磷菌的解磷能力极有可能是由于菌株在生长过程中增加了培养介质中酸性物质, 从而降低了 pH 值, 增加了难溶性磷酸盐的溶解量。

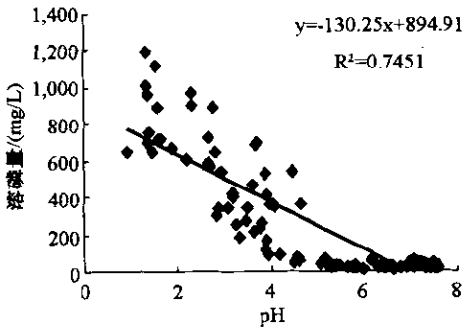


图3 培养基 pH 值与溶磷量之间的相关性

注:  $r_{0.05} = 0.632$ ,  $r_{0.01} = 0.765$

### 2.4 解磷菌的解磷能力与生物量的关系

在测定时间内,对 HP2 菌株生物量与相应溶磷量、介质 pH 值作相关性分析可知,生物量与溶磷量和介质 pH 值的相关系数分别达 0.8948<sup>\*\*</sup>和-0.9324<sup>\*\*</sup> ( $r_{0.05} = 0.632$ ,  $r_{0.01} = 0.765$ );对 P5 菌株,生物量与溶磷量和介质 pH 值的相关系数分别达 0.9665<sup>\*\*</sup>和-0.8923<sup>\*\*</sup> ( $r_{0.05} = 0.632$ ,  $r_{0.01} = 0.765$ )。两株真菌的生物量和溶磷量、pH 值之间有着良好的相关性,这说明生物量的累积会增加真菌向培养介质分泌酸性物质或质子的数量,由此也可以进一步证实解磷菌的解磷能力是由于产酸原因造成。

### 2.5 解磷菌混合培养条件下的解磷效果

定期同步测定两菌株混合培养液及各自独立培养液的溶磷量,并进行相关分析(图4)。结果表明,不同培养时期,两菌株独立培养时溶磷量的均值与混合培养的溶磷量关系密切[即:混合培养的总溶磷量 = (HP2 溶磷量 + P5 溶磷量) / 2],相关系数达 0.9810<sup>\*\*</sup> ( $P < 0.01$ ),说明混合培养并未使菌株的解磷能力出现累积甚至跃增现象,相反,混合培养时,两菌株会相互抑制,其原因有可能是因为两菌株在生长过程中会彼此竞争生长源所致。

通过相关性分析,计算出复合菌解磷时,培养基 pH 与溶磷量之间的相关系数为-0.7605<sup>\*</sup> ( $P < 0.05$ ),达显著水平。说明混合培养解磷效果与菌体生长过程中培养基 pH 下降密切相关。

表1 真菌在不同培养时间溶磷量与培养基 pH 值的相关性分析

碳源	相关系数 (r)	
	HP2	P5
葡萄糖	-0.9078 <sup>**</sup>	-0.9081 <sup>**</sup>
果糖	-0.9497 <sup>**</sup>	-0.8676 <sup>**</sup>
麦芽糖	-0.8431 <sup>**</sup>	-0.9025 <sup>**</sup>
纤维素	-0.7423 <sup>*</sup>	-0.3559
淀粉	-0.9971 <sup>**</sup>	-0.9983 <sup>**</sup>
蔗糖	-0.8589 <sup>**</sup>	-0.9211 <sup>**</sup>

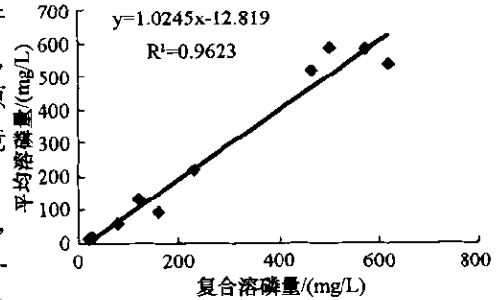


图4 复合溶磷量与两菌株平均溶磷量的相关性

### 2.6 不同碳源对真菌解磷能力的影响

2.6.1 不同碳源对真菌解磷能力的影响:前人<sup>[2,4]</sup>研究解磷菌解磷能力时,一般是将接种的培养液培养 6~8 d 后进行溶解磷的测定。本文通过不同培养时间培养液溶解磷的测定,一方面可以了解解磷菌解磷能力随时间变化的动态变化,也可以了解各菌株在不同时间的溶磷量与培养基 pH 值之间的相关性。

本文比较了葡萄糖(单糖)、蔗糖(二糖)、纤维素(多糖)等多种碳源对两株真菌解磷能力的影响。如图 5、6 所示,不同碳源条件对两株解磷菌的解磷效果存在着较大的差别。对于以蔗糖和葡萄糖作为碳源的培养条件而言,溶磷量随时间的变化趋势

几乎一致，而菌株在以淀粉、纤维素作为碳源的培养基中几乎不生长，因而几乎没有解磷效果。由图明显得知，3种碳源培养基的溶磷效果顺序为蔗糖 > 葡萄糖 > 纤维素，经多重比较，三者之间达到显著差异。

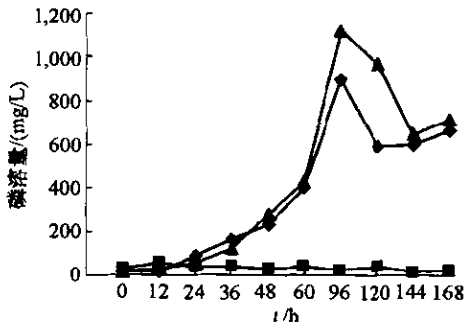


图5 不同碳源对 HP2 解磷能力的影响

◆ 葡萄糖, -■- 纤维素, -▲- 蔗糖

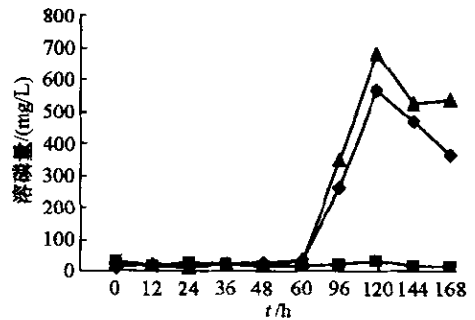


图6 不同碳源对 P5 解磷能力的影响

◆ 葡萄糖, -■- 纤维素, -▲- 蔗糖

**2.6.2 真菌在不同碳源条件下溶磷量净增加量的比较:** 在培养的不同时段，两株解磷菌的溶磷能力是不同的，效率最高时期一般都出现在 48 ~ 96 h (表 2)，因而测定菌株培养 7 d 左右的总溶磷量，其结果并不可靠。所以笔者建议对不同培养时期的溶磷量进行测定，这样才能更准确地说明解磷菌的解磷能力。

表2 真菌在不同培养时间段的净溶磷量

碳源种类	0 ~ 48 h		48 ~ 96 h		96 ~ 144 h	
	HP2	P5	HP2	P5	HP2	P5
葡萄糖	218.188	14.974	665.872	236.524	-294.891	205.659
果糖	182.740	-3.973	749.297	331.561	-312.646	-1.681
麦芽糖	166.544	-5.806	346.840	346.840	-7.240	-0.234
纤维素	-20.780	-20.780	8.862	8.862	-0.352	0.003
淀粉	14.057	-3.973	7.334	4.278	-0.240	-0.046
蔗糖	258.526	-0.611	834.861	330.644	-0.289	-0.021

### 3 讨论

#### 3.1 供试真菌解磷机制

前人的研究表明，解磷菌解磷的机制是多样性的<sup>[1,2,4,6]</sup>。其中解磷菌通过产生有机酸来溶解难溶磷是最常见的一种机制。本文通过对两株解磷菌解磷能力的研究发现，在不同的培养时间，其解磷能力是不同的，而且溶磷量均与培养液 pH 呈显著或极显著负相关，这与曾广勤等<sup>[7]</sup>的研究结果是一致的。同时溶磷量与培养液菌体的生物量存在极显著的正相关性。这一结论说明，供试的两个菌株解磷能力的高低，与菌株生长过程中酸性物质的产生能力有密切关系。而解磷能力与生物量存在正相关性这一结论则可以进一步解释为：培养过程中，供试菌株的生物量决定了培养基有机酸的产生能力，进而决定培养基 pH 值的大小，最终决定了难溶性磷酸盐的溶解量。

#### 3.2 碳源对供试真菌解磷能力的影响

有关不同碳源对解磷菌解磷作用的影响，前人研究表明，碳源影响解磷菌的解磷能力因解磷菌的种类不同而不同。

本文研究了不同类型的碳源对所筛选的菌株溶磷能力的影响,获得了与前人相似的结果:以单糖(葡萄糖、果糖)和二糖(麦芽糖、蔗糖)作为碳源时,供试菌的解磷能力比较强,并且,不同单糖和二糖为碳源,其解磷效果也有差别。以多糖(淀粉、纤维素)作为碳源时,溶磷量很小甚至不产生溶磷效应。纤维素为碳源时,各培养时期溶磷量均很低,而以淀粉为碳源时,培养液在144 h之后溶磷量才开始略有增加(图表格)。

可以认为,碳源对供试解磷菌解磷能力的影响,主要起因于解磷菌对各种碳源利用能力及其降解产酸量和产酸种类的差异。从不同碳源条件下供试解磷菌的培养液生物量的大小可以明显看出,以纤维素和淀粉作为碳源时,供试菌比其它碳源条件下生长要缓慢得多。不同碳源条件下菌体的生长速度的不同导致生物量积累的不同,进而影响代谢产物——有机酸的积累,影响培养液溶解磷的产生。

解磷菌的研究目前主要还是处于实验室阶段,将实验室筛选出的高效解磷菌株施入土壤中实际的解磷效果,有待进一步探讨。

### 参考文献

- [1] 王光华,周克琴,金剑,等. 生态学杂志, 2003, 23 (2): 32~36.
- [2] 赵小蓉,林启美,李保国. 微生物学报, 2002, 42 (2): 236~241.
- [3] 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.
- [4] 王庆仁,李继云,李振声. 植物营养与肥料学报, 1998, 4 (2): 107~116.
- [5] Narsian V, Patel H H. Soil Biol Biochem, 2000, 32: 559~565.
- [6] Kucey R M N. Can J Soil Sci, 1988, 68: 261~270.
- [7] 曾广勤,张爱民,张志红,等. 微生物学通报, 2000, 27 (5): 346~348.