

文章编号:1003-8701(2012)05-0038-04

巨大芽孢杆菌 JD-2 的解磷效果及对土壤有效磷化的研究

张维娜, 孙梅, 陈秋红, 施大林, 匡群*

(江苏省苏微微生物研究有限公司, 江苏 无锡 214063)

摘要: 考察巨大芽孢杆菌 JD-2 对有机磷、无机磷的降解效果, 比较巨大芽孢杆菌 JD-2、乳酸芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌对土壤有效磷化的作用差异。研究不同浓度的巨大芽孢杆菌 JD-2 对土壤有效磷化的作用效果。结果表明: 巨大芽孢杆菌 JD-2 具有很强的降解有机磷、无机磷的能力, 有效磷含量分别为对照组的 25 倍、22 倍。巨大芽孢杆菌 JD-2 在土壤中的解磷效果最好, 土壤有效磷含量由 19.0 mg/kg 增至 34.5 mg/kg。不同浓度的巨大芽孢杆菌 JD-2 在土壤中均具解磷效果, 接入土壤起始浓度 10^6 CFU/g 最适宜。

关键词: 巨大芽孢杆菌, 解磷, 土壤

中图分类号: Q939.96

文献标识码: A

Studies on the Effect of *Bacillus megaterium* JD-2 in Dissolving P and Soil Available Phosphorus

ZHANG Wei-na, SUN Mei, CHEN Qiu-hong, SHI Da-lin, KUANG Qun*

(Jiangsu Suwei Microbiology Research Co., Ltd. Wuxi 214063, China)

Abstract: To research on degradation effect of organic phosphorus and inorganic phosphorus of *Bacillus megaterium* JD-2, the differences of soil available phosphorus among *Bacillus megaterium* JD-2, Lactic acid bacillus, *Bacillus subtilis* was compared. Effect of different concentration of *Bacillus megaterium* JD-2 on soil available phosphorus was studied. The results indicated that *Bacillus megaterium* JD-2 had a strong degradation ability of organic phosphorus and inorganic phosphorus. The available phosphorus content was 25 times and 22 times as much as the control group. *Bacillus megaterium* JD-2 had the best degradation phosphorus ability and soil available phosphorus content increased from 19.0 mg/kg to 34.5 mg/kg. In the soil, different concentration of *Bacillus megaterium* JD-2 had the effect on dissolving phosphorus, but the best initial concentration was 10^6 CFU/g in the soil.

Keywords: *Bacillus megaterium*; Dissolving P; Soil

磷是植物必需的营养元素之一, 土壤中蕴藏着丰富的含磷钾矿物, 只是它们主要以稳定的铝硅酸盐和磷灰石状态存在^[1], 我国有 74% 的耕地土壤缺磷, 土壤中 95% 以上的磷为无效磷, 植物很难利用^[2], 土壤中能被植物吸收利用的有效态无机磷很低, 一般只占全磷量的 2%~3%。大量的

研究结果证明, 土壤中存在大量的微生物, 能够将植物难以吸收利用的磷转化为可吸收利用的形态, 这些微生物称为解磷菌^[3], 利用微生物的解磷功能, 可释放土壤中固定态无效磷。这样不仅能够增加作物磷素吸收量, 提高作物产量, 还能大大提高磷肥利用率, 减少农业面源污染。因此, 在农业生产中使用解磷菌是实现农业可持续发展的重要途径。

本试验以巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) JD-2 为研究对象, 主要研究这株菌对难溶性无机磷、有机磷的解磷能力, 同时考察它在土壤中的解

收稿日期: 2012-04-25

基金项目: 科技部农业科技成果转化资金项目(2012GB2C100162)

作者简介: 张维娜(1985-), 女, 研究实习生, 研究方向: 应用微生物。

通讯作者: 匡群, 男, 高级工程师, E-mail: KuangQun@live.cn

磷效果,为以后深入研究其解磷机理以及制备生物制剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

巨大芽孢杆菌 JD-2 由江苏省苏微微生物研究有限公司生化工程研究室分离、鉴定并保存。枯草芽孢杆菌、乳酸芽孢杆菌由江苏省苏微微生物研究有限公司生化工程研究室保存。

1.1.2 实验土壤

采集草坪土壤,所取土壤为土壤表层(0~20 cm)。

1.1.3 试剂

葡萄糖、硫酸铵、氯化钠、氯化钾、卵磷脂、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCO_3 ,以上试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.4 仪器

DR2800 分光光度计、GJ-202 洁净工作台,无锡市新达净化成套设备厂;123MB-1 型光学显微镜,Nikon;Delta320pH 计,梅特勒-托利多;YX280A* 手提式不锈钢蒸汽消毒器,上海三申医疗器械有限公司;HYG-1a 迴转式恒温调速摇瓶柜,上海欣蕊自动化设备有限公司;SPX-250B 生化培养箱,上海琅玕实验设备有限公司。

1.1.5 摇瓶培养基

无机磷培养基:葡萄糖 10 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g、NaCl 0.3 g、KCl 0.3 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g、蒸馏水 1 L,pH7.0。

有机磷培养基:以 2 g 卵磷脂代替 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$,另外再加 CaCO_3 5 g,其它同无机磷培养基^[4]。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

1.2.1.1 种子培养

无菌开启菌株 JD-2 的冻干保藏菌种,画线接种于营养肉汤琼脂试管斜面,30℃ 培养 24~48 h,然后画线转接于营养肉汤琼脂茄子瓶斜面,30℃ 培养 24~48 h。镜检,当 90%以上菌体形成芽孢时,即为成熟。

1.2.1.2 巨大芽孢杆菌对有机磷、无机磷的解磷效果测定

将成熟的种子用无菌水从斜面上刮洗下来,放入内装无菌玻璃珠的灭菌三角瓶,振荡,制成均匀的菌悬液,以 2%(v/v) 的接种量分别接入无机

磷、有机磷培养基中,对照接入灭活菌液,每组 3 个平行,摇瓶装量为 25 mL/250 mL(即 10%的装量),接种后,30℃,200 r/min 振荡培养 5 d。

1.2.1.3 芽孢杆菌对土壤解磷效果的测定

分别用无菌竹签将成熟的巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、乳酸芽孢杆菌刮入内装无菌水及玻璃珠的灭菌三角瓶中,振荡,制成均匀的菌悬液。

吸取菌悬液 5 mL 于装有 30 g 土壤的三角瓶中,接种后起始浓度均为 1.0×10^7 CFU/g,每个菌种做 3 个平行,加入 5 mL 蒸馏水的土壤作为空白对照。用纱布包扎瓶口,将三角瓶置于 30℃ 培养箱中,每隔 5 d 取样测土壤中的有效磷含量。

1.2.1.4 不同巨大芽孢杆菌浓度对土壤解磷效果的测定

用无菌竹签将成熟的巨大芽孢杆菌 JD-2 刮入内装无菌水及玻璃珠的灭菌三角瓶中,振荡摇匀,依次稀释菌悬液。

吸取菌悬液 5 mL 于装有 30 g 土壤的三角瓶中,接种后起始浓度分别为 1.0×10^7 CFU/g、 1.0×10^6 CFU/g、 1.0×10^5 CFU/g,每个浓度做 3 个平行。用纱布包扎瓶口,将三角瓶置于 30℃ 培养箱中,每隔 7 d 取样测土壤中的有效磷含量。土壤样品中有效磷含量为 16.5 mg/kg。

1.2.2 测定方法

有机磷、无机磷的测定:将巨大芽孢杆菌 JD-2 接种到液体有机磷、无机磷培养基中,对照接入灭活菌液,于 30℃ 下 200 r/min 振荡培养 5 d,离心,上清液使用钼锑抗比色法测定其培养基中有效磷含量^[5-6]。

土壤有效磷的测定:采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法。

1.2.3 数据分析

试验数据采用 EXCEL 进行处理,SPSS17.0 软件进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 巨大芽孢杆菌对有机磷的降解效果

从图 1 中可以看出,巨大芽孢杆菌 JD-2 具有较强的分解有机磷卵磷脂的能力,在整个培养过程中,1~3 d 培养基内有效磷含量上升较快,在第 4 d 时,巨大芽孢杆菌对卵磷脂中磷的释放达到最大值,有效磷的含量为 1.9 mg/L,是对照组含量的约 25 倍,培养后期有效磷含量趋于平稳。对照组培养基接入的是灭活菌液,在整个试验过程中有效磷的含量基本维持在 0.075 mg/L。

2.2 巨大芽孢杆菌对无机磷的降解效果

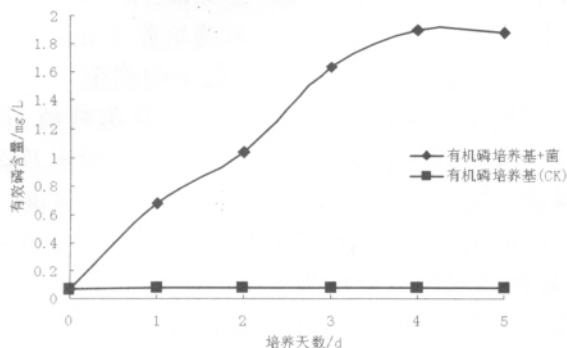


图1 巨大芽孢杆菌 JD-2 对有机磷的降解效果

从图2中可以看出,巨大芽孢杆菌 JD-2 具有很强的分解难溶性无机磷 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的能力,在整个培养过程中,第1 d 分解速度最快,培养基内有效磷含量由 2.85 mg/L 升至 42.6 mg/L,之后解磷速度放缓,至第4 d 培养基内有效磷含量达到最大值 63.0 mg/L,是对照组有效磷含量的约 22 倍,培养后期有效磷含量趋于稳定。对照组在整个试验过程中有效磷含量基本维持在 2.9 mg/L。

2.3 芽孢杆菌对土壤的有效磷化效果

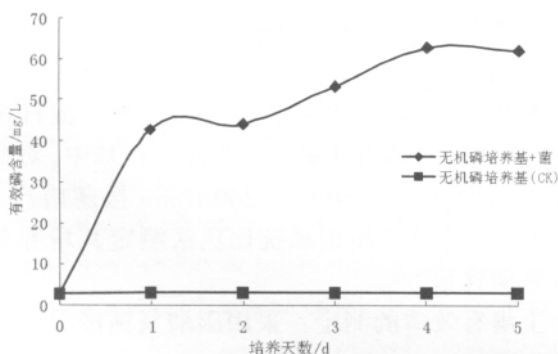


图2 巨大芽孢杆菌 JD-2 对无机磷的降解效果

2.3.1 不同芽孢杆菌对土壤有效磷化的作用效果

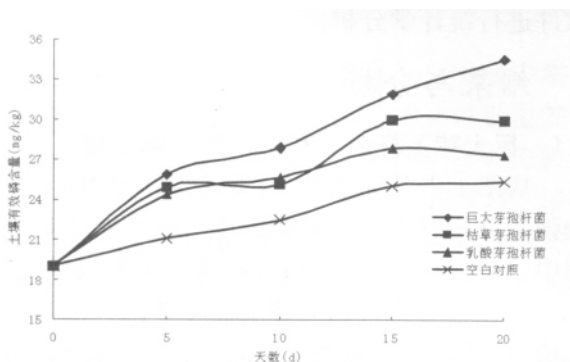


图3 不同芽孢杆菌对土壤有效磷化的作用效果

由图3可知,与空白对照相比,芽孢杆菌均具

有较好的解磷效果,其中巨大芽孢杆菌 JD-2 在土壤中的解磷效果最强,经过 20 d 的培养,土壤中的有效磷含量由 19.0 mg/kg 上升至 34.5 mg/kg,解磷效果十分明显。接种枯草芽孢杆菌和乳酸芽孢杆菌的土壤的有效磷含量也分别达到了 29.89 mg/kg 和 27.41 mg/kg。空白对照土壤的有效磷含量也有一定的增加,是因为在土壤的微生物系统中也含有一定的解磷菌在发挥作用。

2.3.2 不同浓度的巨大芽孢杆菌对土壤有效磷化的影响

表1 不同浓度的巨大芽孢杆菌 JD-2 对土壤有效磷化的影响 mg/kg

巨大芽孢杆菌接入土壤后的起始浓度(CFU/g)	第7 d 土壤中有效磷含量	第14 d 土壤中有效磷含量	第21 d 土壤中有效磷含量	第28 d 土壤中有效磷含量
1×10^7	21.95±1.45a	32.04±0.72b	36.71±0.26c	37.40±1.35c
1×10^6	17.97±0.95b	29.91±0.28b	35.67±1.01c	35.40±0.29c
1×10^5	16.01±0.44b	25.15±1.55c	27.26±0.87d	27.99±1.18d

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

从表1中可以看出,不同浓度的巨大芽孢杆菌在土壤中均具有解磷效果。从试验第7 d 结果可看出,巨大芽孢杆菌浓度越高,解磷速度越快, 10^7 数量级接种量的土壤中有有效磷含量明显高于 10^6 、 10^5 数量级接种量($P < 0.05$),但3个数量级接种量的土壤中有有效磷含量均未大幅增加,说明巨大芽孢杆菌在土壤中发挥解磷作用存在一定的缓滞期。至试验第14 d,3个数量级接种量的土壤中解磷速度均明显加快,其中 10^6 数量级速度增加最快, 10^6 、 10^7 数量级接种量的土壤中有有效磷含量差异已不明显($P > 0.05$),但显著高于 10^5 数量级接种量($P < 0.05$)。试验后期,3个数量级接种量在土壤中的解磷速度均放缓,有效磷含量趋于稳定。因此, 10^6 、 10^7 数量级接种量的巨大芽孢杆菌在土壤中均具有较好的解磷效果,从应用价值方面考虑,接入土壤起始浓度 10^6 CFU/g 最适宜。

3 结论

目前,在农业生产中多施用高水溶性磷肥满足植物对磷的需求^[7],但是磷肥施入土壤后易形成难溶性的磷酸盐并迅速被土壤矿物吸附固定或为微生物固持,其当季利用率仅为 10%~25%^[8]。研究发现,微生物对土壤中磷的转化起关键作用。向土壤中施用解磷细菌,不仅能够增加作物磷素吸收量,提高作物产量,还能大大提高磷肥利用率,减少农业面源污染。

本试验巨大芽孢杆菌 JD-2 具有较强的降解

有机磷、无机磷的能力,是因为巨大芽孢杆菌在生长过程中能够产生具有分解有机磷、无机磷的酶、有机酸,即“酶解作用”、“酸解作用”^[9]。在试验后期,接种巨大芽孢杆菌 JD-2 的有机磷、无机磷培养基中有效磷含量分别为对照组的 25 倍、22 倍。通过不同芽孢杆菌对土壤解磷效果比较结果显示,巨大芽孢杆菌 JD-2 解磷效果最好,土壤有效磷含量由 19.0 mg/kg 增至 34.5 mg/kg,接种枯草芽孢杆菌和乳酸芽孢杆菌的土壤的有效磷含量也分别达到了 29.89 mg/kg 和 27.41 mg/kg,说明芽孢杆菌均具有不同程度的解磷能力。通过考察不同浓度的巨大芽孢杆菌 JD-2 对土壤有效磷化的影响,结果显示,经过 28 d 的培养,不同浓度的巨大芽孢杆菌 JD-2 在土壤中均具有一定的解磷效果。在试验初期巨大芽孢杆菌浓度越高,解磷速度越快,至第 28 d, 10^6 、 10^7 数量级接种量的土壤中有效磷含量差异不明显($P>0.05$),但显著高于 10^5 数量级接种量($P<0.05$)。因此,从应用价值方面考虑,接入土壤起始浓度 10^6 CFU/g 最适宜。

后续工作我们将进一步研究巨大芽孢杆菌

JD-2 的解磷机理以及与其他功能微生物之间的关系,为研制多功能的高效复合菌剂奠定基础。

参考文献:

- [1] 陈廷伟,陈华葵. 钾细菌的形态生理及其对磷钾矿物的分解能力[J]. 微生物, 1960(2): 104-112.
- [2] 张云翼,邹碧云. 土壤解磷细菌的研究进展[J]. 现代农业科技, 2008(15): 182-184.
- [3] 李福后,王伟霞,潘建梅. 有机磷分解细菌的选育及其发酵条件的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2007(6): 74-77.
- [4] 郑传进,黄林,龚明. 巨大芽孢杆菌解磷能力的研究[J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(2): 190-192.
- [5] 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, 40(5): 594-597.
- [6] 张祥胜. 钼锑抗比色法测定磷细菌发酵液中有有效磷含量测定值的影响因素分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 4822-4823.
- [7] 梁锦锋,于红卫,叶国平,等. 有机磷化物对磷细菌生长和解磷的影响[J]. 江西农业学报, 2007, 19(8): 89-90.
- [8] 张宝贵,李贵桐. 土壤生物在土壤磷有效化中的作用[J]. 土壤学报, 1998, 35(1): 104-111.
- [9] 山东农学院农药厂. 磷细菌肥 [M]. 北京: 农业出版社, 1979: 23.

(上接第 2 页)更好地发掘耐密型品种的增产潜力。

本研究是在天津地区夏播条件下进行的,以玉米子粒的高产为目标确定耐密型玉米品种在天津地区夏播的最适种植密度 4 850 株/667 m²。而对比前人研究结果韦如东以正大 619 玉米为材料进行密度种植研究,结果为密度 3 500 株/667 m² 时各农艺性状的表现最佳^[8]。郝兰春等人对鲁单 981 玉米进行密度研究,当密度为 4 333~5 000 株/667 m² 时可达最高产量^[9]。可见郑单 958 耐密性很强。运用玉米三值变化研究玉米产量要素对玉米产量的贡献,可以确定在增加种植密度的条件下对产量要素的主攻方向,本试验结果认为,提高产量应在适宜的种植密度范围内主攻穗粒数和百粒重来实现高产。

通过三值及产价研究中种植密度与收获穗数比较可看出,两者差异主要是无效穗数的增加。这些无效穗主要由空秆、小青株、病害等原因造成的。表 4 中最大重值产价与最高产量相对应,表明

增加粒重对提高产量有很重要的作用。

参考文献:

- [1] 赵保献,梁晓伟,雷晓兵,等. 耐密型玉米育种相关问题的思考[J]. 中国农学通报, 2009, 25(14): 108-112.
- [2] 路海东,薛吉全,马国胜. 夏玉米不同群体的受光态势和光合特性研究[J]. 玉米科学, 2008, 16(4): 100-104.
- [3] 王鹏文,戴俊英,赵桂坤,等. 玉米种植密度对产量和品质的影响[J]. 玉米科学, 1996(4): 43-46.
- [4] 李明,穆青,肖万欣. 种植密度对郑单 958 干物质生产和农艺性状的影响[J]. 辽宁农业学报, 2010(4): 44-46.
- [5] 赵久然,孙世贤. 对超级玉米育种目标及技术路线的再思考[J]. 玉米科学, 2007, 15(1): 21-23.
- [6] 王春虎,欧行奇,王昊. 玉米郑单 958 等高产品种的生理生态机理研究[J]. 种子, 2009, 28(8): 41-44.
- [7] 王鹏文,刘鹏飞. 种植密度对玉米三值变化的影响[J]. 杂粮作物, 1998, 18(3): 1-4.
- [8] 韦如东. 玉米种植密度试验 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13(16): 126.
- [9] 郝兰春,谭秀山,毕建华,等. 玉米产量与种植密度的相关性研究[J]. 河北农业科学, 2009, 13(5): 9-10.