

# 宁夏产枸杞根际溶磷菌分离及溶磷能力分析

李凤霞, 梁锦绣, 周涛

(宁夏农林科学院农业资源与环境研究所, 宁夏银川 750002)

**摘要:** 采用常用的 PKO(无机培养基)和蒙金娜有机培养基,从宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)根际分离具有溶磷能力的菌株,并利用溶磷圈法测定溶磷菌株的溶磷能力。从宁夏枸杞根际共分离出 88 株具有溶磷能力的菌株,其中溶解无机磷能力较强的菌株 4 株,其溶磷圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)从高至低依次是 NQ2、NQ4、NQ3、NQ1, D/d 值为 3.02~1.85; 菌株 NQ2、NQ1、NQ3 和 NQ4 对无机磷的溶磷强度分别为 91.2、82.5、75.5 和 74.8  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。所分离的 4 株具有较强无机磷溶解能力的菌株在微生物肥料的开发方面有潜在应用价值。

**关键词:** 枸杞;根际;溶磷菌;溶磷能力

**中图分类号:** S154.39 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2006)02-0029-04

**Isolation and analysis on ability of phosphate dissolving bacteria in rhizosphere of *Lycium barbarum* in Ningxia** LI Feng-xia, LIANG Jin-xiu, ZHOU Tao (Resource and Environment Institute of Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(2): 29-32

**Abstract:** By using PKO inorganic and Mengjinna organic culture media, inorganic and organic phosphate dissolving bacteria have been isolated from rhizosphere of *Lycium barbarum* L. in Ningxia. The results indicate that 88 strains show dissolving organic and inorganic phosphate abilities. Four strains (NQ1, NQ2, NQ3, NQ4) show strong ability of dissolving inorganic phosphate with a ratio of dissolving phosphate zone diameter to culture community zone diameter (D/d) ranged from 1.85 to 3.02, and with an order of its' D/d value from high to low is NQ2, NQ4, NQ3, NQ1 respectively. The dissolving inorganic phosphate quantities of NQ2, NQ1, NQ3 and NQ4 are 91.2, 82.5, 75.5 and 74.8  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  respectively. It is concluded that the four strains have a great practical value in microorganism fertilizer developing.

**Key words:** *Lycium barbarum* L.; rhizosphere; phosphate dissolving bacteria; phosphate dissolving ability

磷是植物生命活动所必须的大量营养元素之一。宁夏地区土壤普遍缺磷,土壤中有 95% 以上的磷元素不能被植物直接利用,化学磷肥虽然是增加土壤有效磷含量的重要手段,但是施入的磷肥常与土壤中的  $\text{Ca}^{2+}$  (石灰性土壤)、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Al}^{3+}$  相结合而丧失其有效性<sup>[1]</sup>,在一般情况下,磷肥的利用率仅为 5%~25%。因此,难溶性的无机磷向可溶性磷的转化和有机磷的生物矿化对植物的磷素营养十分重要。大量的研究证明,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,具有这种能力的微生物称为解磷菌或溶磷菌(Phosphate dissolving bacterium);对其中能够矿化有机磷化合物的称之为有机磷微生物;能够将植物难以吸收的无机磷酸盐转化为可直接吸收利用

形态的微生物,称之为无机磷微生物<sup>[2-4]</sup>。利用多种农作物进行的研究结果表明,溶磷菌不但可分解不能被植物直接吸收的磷,而且还分泌生长调节物质、促进根系生长、增强植物抗病能力<sup>[5]</sup>。如果将溶磷微生物制作成生物肥料,以提高土壤中磷的利用效率,在生产实践中具有极其重要的意义<sup>[4]</sup>。为此,作者对宁夏产枸杞根际土壤溶磷微生物资源进行分离和研究,为宁夏枸杞的生长及产量的提高、专用生物菌肥的研制提供理论依据,对枸杞的绿色

收稿日期: 2005-09-05

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ0531)

作者简介: 李凤霞(1977-),女,宁夏固原人,硕士,助理研究员,研究方向为农业资源与土壤微生物。

食品建设乃至枸杞产业的可持续发展也具有一定的理论及应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 自然概况

采样地为宁夏银川市园林试验场。地理座标为东经 105°49', 北纬 38°08'; 海拔 1 100 m。年平均气温 8.5℃, 无霜期约 158 d, 年降水量 200 mm, 年日照时数 2 800 ~ 3 000 h。土壤为灌淤土、灰钙土、风沙土等, pH 8.15, 全盐含量 0.06%。

### 1.2 材料

1.2.1 培养基 实验采用 LB 培养基、蒙金娜有机培养基和 PKO (Pikovskaia's medium) 无机培养基进行<sup>[5]</sup>。蒙金娜有机培养基含 Glucose 10 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g、NaCl 0.3 g、KCl 0.3 g、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.03 g、MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.03 g、Lecithin (卵磷脂) 0.2 g、Yeast extract paste 0.4 g、Agar 20 g, 蒸馏水补足至 1 000 mL, pH 7.0 ~ pH 7.5; PKO 无机培养基含 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 3.0 g、Sucrose 10 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g、NaCl 0.1 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g、KCl 0.3 g、FeSO<sub>4</sub> 0.002 g、MnSO<sub>4</sub> 0.004 g、Yeast extract paste 0.5 g、Agar 15 g, 蒸馏水补足至 1 000 mL, pH 6.8 ~ pH 7.2。

1.2.2 土壤样品采集 利用 5 点取样法于 2005 年春季 (5 月 20 日) 和夏季 (7 月 20 日) 采取 0 ~ 25 cm 内 6 年生枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 根际 (根系和土壤) 样品, 各点样品按照常规方法混合后装入无菌保鲜袋中, 作好标记, 封口<sup>[6]</sup>。放入冰桶中带回实验室进行溶磷菌的分离和测试。

### 1.3 方法

1.3.1 溶磷菌的分离 将根区分为较远 (1 cm) 的土壤 (NSR)、根表土壤 (RS)、根系表面 (RP) 等 3 部分, 利用 LB、PKO (无机培养基) 和蒙金娜有机培养基进行分离与纯化。称取混合土样 10 g, 置于已灭菌的研钵内, 加入少量无菌水, 研磨后放入装有 90 mL 已灭菌的 0.85% NaCl 溶液的 250 mL 三角瓶中, 振荡 10 min, 制成土壤悬浮液。用 1 mL 微量加样器从中吸取 1 mL 土壤悬液注入盛有 9 mL 0.85% 无菌 NaCl 溶液的试管中, 充分混匀, 再从此试管中吸取 1 mL, 注入另一盛有 9 mL 0.85% 无菌 NaCl 溶液的试管中, 以此类推, 制成土壤含量 (g) 与 NaCl

溶液 (mL) 比例依次为 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 3 种稀释度的土壤溶液。涂布, 并作好标记<sup>[6,7]</sup>。

1.3.2 溶磷菌的形态特征观察 观察培养于 PKO 无机和蒙金娜有机平板培养基上的各菌株在 28℃ ~ 30℃ 条件下生长 24 ~ 48h 后的菌落颜色、大小、形状和生长速度等。

1.3.3 溶磷性能的定性分析 采用溶磷圈法对溶磷菌的溶磷性能进行定性测试。将分离获得的纯菌株分别点接种于蒙金娜有机培养基和 PKO 无机培养基上, 置于 30℃ 培养箱中培养 10 d, 观察有无溶磷圈, 并根据溶磷圈直径 (D) 与菌落直径 (d) 比值的大小初步确定解磷能力<sup>[8]</sup>。将有溶磷作用的分离物接种于斜面培养基上保存备用。

1.3.4 溶磷强度测定 将在上述步骤中获得的有溶磷作用的透明圈菌株制备成悬浮液, 取 1 mL 菌株的悬浮液接种于 50 mL PKO 无机和蒙金娜有机液体培养基中 (对照则接种无活菌液), 每一菌株设 5 次重复, 置于轨道摇床上培养 10 d 之后在 4℃ 下离心 12 min, 取上清液用钼酸铵比色法测定有效磷的含量<sup>[9,10]</sup>。

1.3.5 数据分析方法 实验数据采用 DPS 软件进行分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 枸杞根际溶磷菌分布

利用 LB、PKO 和蒙金娜培养基从产自宁夏银川的 6 年生枸杞植株根际分离到 88 个菌株, 其中溶解无机磷和有机磷的溶磷菌数见表 1。

表 1 枸杞根际具有溶磷能力菌株的数量分布  
Table 1 Quantity distribution of phosphate dissolving bacterium in rhizosphere of *Lycium barbarum* L.

分离时间 Separate time	分离 菌株数 Number of bacterium	溶解无机磷菌株数 Number of dissolving inorganic phosphate bacterium	溶解有机磷菌株数 Number of dissolving organic phosphate bacterium
2005-05-05	52	25	18
2005-07-20	36	11	12

由表 1 可以看出, 分离自 6 年生枸杞根际、具有溶磷能力的 88 个菌株中, 来自春季的菌株占总菌株的 59.1%, 夏季采样分离菌株占 40.9%。在春季分离的菌株中, 具有溶解无机磷能力的菌株占总菌株数的 28.4%, 具有溶解有机磷能力的菌株占总菌株

数的20.4%。夏季采样分离的菌株中具有溶解无机磷能力的菌株和能溶解有机磷的菌株数量相近,均占总菌株数的13%左右,但是夏季分离的溶磷菌株数量少于春季分离的溶磷菌株。

## 2.2 枸杞根际溶磷菌菌落特征

通过观察菌落的特征可以发现,大多数分离出的菌落呈灰白色或乳白色、圆形、形状较小、边缘整齐、半透明、无光泽、无色素、突起,少数为中凹的隆起或隆起。绝大多数菌落生长速度较快,在12 h后即可观察到生长;另有部分生长速度中等,24 h后可观察到生长。另外,枸杞根际溶磷菌株的分布以根表土壤最多,根系表面次之,远根土壤最少,这与林启美等人的研究结果一致<sup>[7]</sup>。

## 2.3 枸杞根际溶磷菌的溶磷特性

溶磷圈直径(D)、菌落生长直径(d)及其比值(D/d)是表征溶磷菌相对溶磷能力的指标,可初步确定菌株的溶磷效果<sup>[11,12]</sup>。宁夏枸杞根际具有较强的溶解无机磷能力的4个菌株(NQ1、NQ2、NQ3、NQ4)在10 d内的D/d值变化趋势见图1。

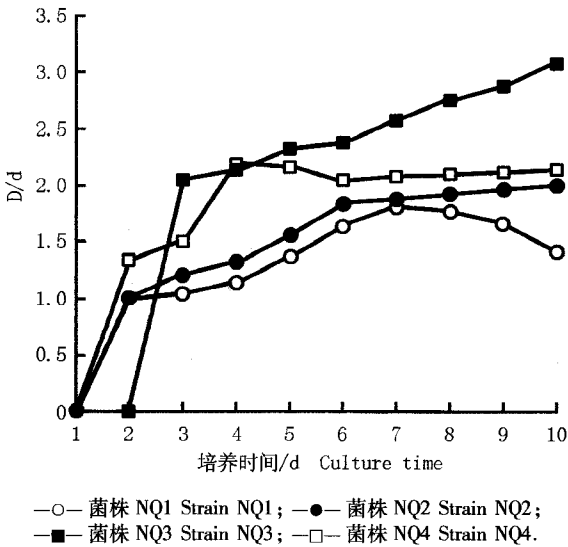


图1 在PKO培养基上枸杞根际溶磷菌溶磷圈直径(D)和菌落直径(d)的比值(D/d)与培养时间的关系

Fig. 1 Relationship between ratio (D/d) of dissolving phosphate zone diameter (D) to culture community diameter (d) of phosphate dissolving bacterium from rhizosphere of *Lycium barbarum* L. and culture time on PKO medium

测定发现,供试的4株菌株在平板培养基上都能够形成透明圈,其中菌株NQ3和NQ4在24 h后就有溶磷圈出现,菌株NQ1和NQ2在48 h后才有溶磷圈出现。4株菌株中,菌株NQ2的溶磷能力最

好,D/d值达到3.02;菌株NQ3次之,D/d值达到2.16,且都是随培养时间的增加D/d值不断增大。随培养时间的延长,NQ2的透明圈持续增大;NQ3的D/d值在1~6 d增加比较显著,6~10 d增加缓慢;菌株NQ1在第7天D/d值达到最高,之后随培养时间的延长不断下降;菌株NQ4在第4天D/d值达最高,且随培养时间的延长,D/d的变化不明显。各菌株在培养基上D/d值的变化与菌株代谢物质的种类、代谢快慢程度等有关<sup>[13,14]</sup>。另外,分离得到的各菌株对无机磷的利用效率高于对有机磷的利用效率。

## 2.4 枸杞根际溶磷菌的溶磷强度

分离自枸杞根际的4株菌株(NQ1、NQ2、NQ3和NQ4)在不同的培养基上的溶磷强度差异较大(表2),与对照相比差异均达到极显著水平( $P < 0.01$ )。在同一培养基上的溶磷强度也有差异,在PKO无机培养基上溶磷强度从高到低依次为NQ2、NQ1、NQ3、NQ4,其中NQ2、NQ1与NQ3之间差异显著,NQ4与NQ3之间差异不显著;在蒙金娜有机培养基上溶磷强度从高到低依次为NQ1、NQ2、NQ3、NQ4,除NQ2与NQ3之间差异不显著外,其他菌株之间差异都达到极显著水平。

表2 枸杞根际溶磷菌在液体培养基中的溶磷量<sup>1)</sup>

Table 2 Phosphate dissolution quantity by phosphate dissolving bacterium isolated from rhizosphere of *Lycium barbarum* L. in liquid medium<sup>1)</sup>

菌株 Strain	溶磷量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Phosphate dissolution quantity	
	PKO 无机培养基 PKO inorganic medium	蒙金娜有机培养基 Mengjinna organic medium
NQ1	82.5bB	31.4aA
NQ2	91.2 aA	23.7 bB
NQ3	75.5 cC	22.6 bB
NQ4	74.8 cC	16.9 cC
CK	0.0 dD	0.0 dD

<sup>1)</sup> 同列不同的大写和小写字母分别表示在 $P=0.01$ 和 $P=0.05$ 水平上的差异显著性。The different capital and small letters in same column indicate the significant difference at  $P=0.01$  and  $P=0.05$  levels respectively.

## 3 讨 论

从枸杞根际分离得到的溶磷菌株的溶磷强度为 $74.8 \sim 91.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,溶磷圈直径与菌落直径比值为 $1.85 \sim 3.02$ ,略低于前人的研究结果<sup>[10,15]</sup>,可能与选用的培养基种类和所用的植物根际材料不同等因素有关<sup>[16]</sup>。菌株在培养基上能够形成良好的

溶磷圈,说明这些菌株可以分泌一些酸性物质,并向培养基中扩散,使菌落周围的磷酸盐[Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>和卵磷脂]溶解,即这些菌株具有溶磷性<sup>[17,18]</sup>。有学者认为,溶磷菌的种类和数量及溶磷量受土壤物理结构、有机质含量、土壤类型、土壤肥力、耕作方式和措施等因素有关<sup>[19,20]</sup>。Sperber、Kucey 和林启美等发现,在菌株纯化过程中有近 50% 的溶磷菌失去了溶磷能力<sup>[14,21]</sup>。笔者在研究过程中也发现,随着转皿次数的增加,菌株的溶磷圈直径减小,这一现象也证实了前人的研究结果。

枸杞是宁夏最大规模栽培的药食两用中草药品种,其独特的耐旱和抗盐碱性也成为生态环境治理过程中沙化和盐碱化土壤改良的先锋植物。从枸杞根际分离到具有较高溶磷能力的溶磷菌,将为今后枸杞溶磷菌的研究以及溶磷微生物菌肥的研制提供科学的依据。

#### 参考文献:

- [1] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料, 2001, 5(3): 7-11.
- [2] 杨珏, 阮晓红. 土壤磷素循环及其对土壤磷流失的影响[J]. 土壤与环境, 2001, 10(3): 256-258.
- [3] 唐勇, 陆玲, 杨启银, 等. 解磷微生物及其应用的研究进展[J]. 天津农业科学, 2001, 7(2): 1-4.
- [4] Fauzia Y H. 生物肥料在农业可持续发展中的应用前景[J]. 草原与草坪, 2003(2): 10-13, 18.
- [5] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [6] 林启美, 赵小蓉. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 1-4.
- [7] 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.
- [8] 陈廷伟. 微生物对不溶性无机磷化合物的分解能力及其接种效果[J]. 微生物, 1995, 2(5): 210-215.
- [9] Kobus J. The distribution of microorganisms mobilizing phosphorus in different soils [J]. Acta Microbiology of Polish, 1962, 11: 255-264.
- [10] 姚拓. 高寒地区燕麦联合固氮菌研究[J]. 草业学报, 2004, 13(6): 85-90.
- [11] Louw H A, Webley D M. A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds[J]. Appl Bacteriol, 1959, 22: 227-233.
- [12] 蔡磊, 李文鹏, 张克勤. 高效解磷菌株的分离、筛选及其对小麦苗期生长的促进作用研究[J]. 土壤通报, 2002, 33(1): 44-46.
- [13] Abd-alla M H. Use of organic phosphorus by rhizobium leguminous biovar vicarious phosphatases[J]. Biol Fertil Soil, 1994, 18: 216-218.
- [14] Sperber J I. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids [J]. Australia Journal of Agricultural Research, 1958, 9: 782-789.
- [15] 李凤霞, 张德罡, 姚拓. 燕麦根际促生菌特性研究[J]. 草业学报, 2005, 14(1): 58-62.
- [16] 李凤霞, 张德罡, 姚拓. 高寒地区燕麦根际高效 PGPR 菌培养条件研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 39(3): 316-320.
- [17] 林启美, 赵小蓉, 孙焱鑫, 等. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布[J]. 土壤与环境, 2000, 9(1): 34-37.
- [18] 尹瑞龄. 我国旱地土壤的溶磷微生物[J]. 土壤, 1988, 20(5): 243-246.
- [19] 范丙全, 金继运, 葛诚. 溶解草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(5): 525-530.
- [20] Kucey R M N, Janzen H H, Leggett M E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus [J]. Adv Agron, 1989, 42: 199-228.
- [21] 林启美, 赵海英, 赵小蓉. 4 株溶磷细菌和真菌溶解磷矿粉的特性[J]. 微生物学通报, 2002, 29(6): 24-28.