

文章编号: 1000-5692(2002)04-0342-04

# 1 株磷细菌基本培养条件的研究

梁锦锋<sup>1</sup>, 陈欣<sup>2</sup>, 唐建军<sup>2</sup>

(1. 浙江林学院 生命科学学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310029)

**摘要:** 以磷细菌菌株巨大芽孢杆菌为对象, 采用液体培养研究了各种理化因素对其生长的影响。结果表明: ①适宜的 pH 值为 5.5~9.5, 最适 pH 范围为 8.5~9.0。②在 100 mL 三角瓶中, 其最适装量为 15~20 mL; 在装量大于 25 mL 时, 菌体生长明显受抑制。③菌体最大生长量时的温度为 30℃左右。④作为菌体生长的碳源, 葡萄糖最佳, 半乳糖和甘露糖次之; 单糖对于菌体生长的促进优于二糖, 多糖最差。⑤ $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  可以明显提高磷细菌在液体培养基中的初始生长量,  $Fe^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  等离子特别是  $Fe^{2+}$  却对菌体的初始生长量有明显抑制作用。 $K^+$ ,  $Zn^{2+}$  对于菌体初始生长影响不明显。图 4 表 3 参 14

**关键词:** 磷细菌; 生长条件; 磷

中图分类号: Q935; S718.83

文献标识码: A

土壤缺磷、磷矿资源衰竭和水体磷素非点源污染是生态学和资源学领域要力图解决的重要问题。为此人们采用了许多方法提高磷肥的利用效率<sup>[1~4]</sup>, 其中利用植物根际与磷循环相关的生物学系统来调节植物根际磷的有效性是最重要的途径之一<sup>[5~11]</sup>。这个生物学系统包括植物本身对土壤难溶态磷的吸收与利用以及土壤中某些微生物参与的难溶态磷的释放与利用。其中, 对磷细菌参与难溶态磷的利用加快磷素小循环的研究目前多局限在菌种分离选育和作用效果的比较, 而对于影响磷细菌生长和解磷的主要因素, 磷细菌施入土壤后的活动和消长动态, 解磷作用发挥的条件、作用本质及其与其他土壤微生物种群的相互关系等基础性研究进展相当缓慢。本文通过对影响磷细菌生长的一些因素进行研究, 旨在为提高磷细菌应用的高效性和稳定性等做些前期研究, 并为研究磷细菌解磷机理打下基础。

## 1 材料与方方法

### 1.1 磷细菌菌种

巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, 由中国科学院北京微生物研究所提供。

### 1.2 卵磷脂的制备和总磷的测定

参见《农业微生物学技术》<sup>[12]</sup>。

### 1.3 培养基

菌种保存培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基, 起始 pH 7.2~7.4 (pH 5.5~9.0, 精密试纸测定)。鉴别培养基: 鸡蛋黄细菌培养基<sup>[12]</sup>。生长培养基基本配方: Glucose 为 20.0 g,  $(NH_4)_2SO_4$  为 1.0 g, yeast extract 为 1.5 g,  $H_2O$  为 1 000 mL, 卵磷脂少量, pH 7.5。

收稿日期: 2002-04-29; 修回日期: 2002-07-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870149)

作者简介: 梁锦锋(1976-), 男, 浙江临海人, 硕士, 从事微生物生理生化研究。

## 1.4 菌体量测定

利用比浊法 (440 nm) 测定。

## 1.5 试验设计

4 因素 3 水平正交实验表采用  $L_9(3^4)$ 。4 因素分别为碳源、氮源、pH 和培养时间。碳源的 3 水平设为  $15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。氮源的 3 水平为  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。pH 值 3 水平为 7.5, 8.0, 8.5。培养时间 3 水平为 48 h, 72 h, 120 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 磷细菌解磷能力的平板表现

在鸡蛋黄鉴定培养基中, 磷细菌的解磷表现如图 1 所示。

### 2.2 pH 值对磷细菌生长的影响

从图 2 可以看出, 磷细菌的 pH 耐受极限分别为 4.1~4.4 和 10.5~11.0, 其最适 pH 范围为 8.5~9.0。在 pH 5.5~10.0 范围内, pH 值对磷细菌生长影响不显著。由此可知, 磷细菌对于环境的酸碱度具有较强的自适应能力 and 较广的 pH 适应范围。测定菌体培养物的终点 pH 值与初始 pH 值比较, 未见明显变化。这可能除了菌株本身原因外, 合适的碳氮比也是一个非常重要的因素。碳氮比高的培养基经培养后 pH 值常会明显下降, 而碳氮比低的培养基经培养后其 pH 则会明显上升<sup>[13]</sup>。

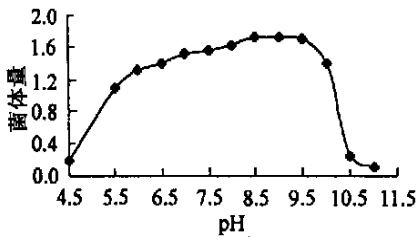


图 2 pH 值对磷细菌生长的影响

Figure 2 The influence of the pH on the growth of PSB in liquid medium



图 1 平板培养条件下解磷细菌解磷能力示意图  
Figure 1 Sketch diagram of phosphate solubilizing ability of PSB in plat

### 2.3 通气量对磷细菌生长的影响

资料表明, 巨大芽孢杆菌属于好氧菌<sup>[14]</sup>。改变三角瓶中解磷培养基的装量, 进行供氧状况对菌体生长量影响的实验, 确定其合适的通气条件并进一步确认其与供氧的关系。图 3 表明, 在 100 mL 三角瓶中, 小于 25 mL 装量的条件下, 通气量对磷细菌的生长影响不大, 而在大于 25 mL 时, 菌体生长明显受抑制。三角瓶的最适装量范围为 12~20 mL。磷细菌表现出了严格的好氧特征。但在 10 mL 装量时, 菌体的生长也受到一定的影响, 其可能原因是分子氧的毒害作用。过多的氧气供应容易导致大量超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^-$ ) 的产生, 机体内的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶不能及时地还原超氧阴离子自由基, 其结果导致细胞内各种重要生物高分子和膜的破坏, 使种群生长量受到抑制。

### 2.4 温度对菌体生长量的影响

由图 4 可得, 培养 2 d 后, 磷细菌菌体生长量最高时的温度为  $30^\circ\text{C}$  左右。超过  $35^\circ\text{C}$  时, 菌体最大生长量表现出明显下降的趋势。

### 2.5 不同碳源对菌体生长的影响

以正交实验所得的  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度用量, 来测定分析各种糖对磷细菌菌体生长量的影响。结果如表 1 所示。

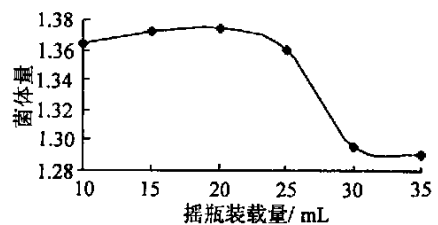


图 3 通气量对磷细菌生长的影响

Figure 3 Influence of aeration on the growth of PSB in liquid medium

表1表明,作为菌体生长的碳源,葡萄糖最佳,半乳糖、甘露糖次之。这说明单糖对于菌体生长的促进优于二糖,多糖最差,其主要原因可能与糖类结构的复杂程度有关。对于结构越复杂的碳源,菌体利用它就需要种类更多的酶参与,从而需要更多的物质供应,物耗效率低,其过程也更长,表现在菌体生长上因细胞代谢更为复杂,而生长较为缓慢。

2.6 氮源对磷细菌生长的影响

利用硝态氮 (KNO<sub>3</sub>) 和氨态氮 [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 作为不同的氮源,观察不同形态氮对磷细菌生长的影响,利用统计分析软件 SPSS 中的单因素方差分析进行差异显著性检验,结果发现氮源形态对于磷细菌的生长不存在明显差别。

2.7 影响磷细菌生长的主因素分析

4 因素 3 水平正交试验实验数据采用极差法来处理。其结果如表 2 所示,磷细菌的合适培养条件为: 1 000 mL 培养基中葡萄糖和硫酸铵的加量分别为 20 g, 1.0 g, 培养基的 pH 为 8.0, 培养时间为 120 h。极差值为第二因素最大,第一和第四因素次之,第三因素最小。这说明氮源的变化是影响磷细菌生长的主要因素,碳源对解磷细菌生长的影响次之, pH 的影响最小。

表 2 正交试验测定解磷细菌最适生长条件 [L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>)]

Table 2 Orthogonal test for the optimal conditions of PSB in liquid medium [L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>)]

试验号/因素	碳源/g	氮源/g	pH	时间/h	生长量 (OD <sub>440</sub> )
K <sub>1</sub>	3.760	3.700	3.809	3.938	Σ x = 12.273 n = 9 x <sub>i</sub> = 1.334
K <sub>2</sub>	4.445	4.443	4.235	3.942	
K <sub>3</sub>	4.068	4.130	4.229	4.393	
K <sub>1</sub> '	1.253	1.233	1.270	1.313	
K <sub>2</sub> '	*1.482	*1.481	*1.412	1.314	
K <sub>3</sub> '	1.356	1.377	1.410	*1.464	
R	0.229	0.248	0.142	0.151	

说明: K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub> 分别为 3 种处理水平的总值, K<sub>1</sub>', K<sub>2</sub>', K<sub>3</sub>' 为平均值; R 是极差。表中有 \* 表示在几个处理当中所得的最大平均值

2.8 金属离子对磷细菌生长的影响

在前期实验中发现,金属离子影响磷细菌的生长主要是延长它的迟滞期和降低菌体的初始生长量。例如,金属 Fe<sup>3+</sup> 会明显延长磷细菌的迟滞期。因此,我们在装有 20 mL 生长培养基的摇瓶中分别添加一定量 (按 1.0 g·L<sup>-1</sup> 质量浓度加量) 不同种类的金属离子,培养 1 d 后取样测定菌体生长量,分析金属离子对于磷细菌初始生长的影响。由表 3 可以看出,

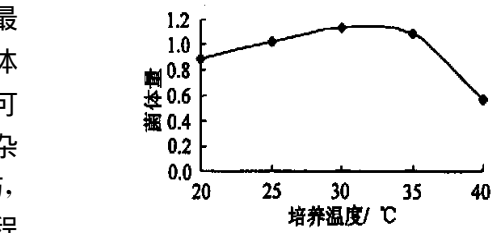


图 4 培养温度对磷细菌最大生长量的影响

Figure 4 Influence of temperature on the growth of PSB in liquid medium

表 1 不同碳源对磷细菌生长的影响 (培养 2 d)

Table 1 Effect of various carbon sources on the cell growth of PSB (incubated for 2 d)

碳源	菌体量	碳源	菌体量
葡萄糖	1.458	岩藻糖	0.697
乳糖	0.838	甘露糖	1.103
半乳糖	1.243	山梨糖	1.105
麦芽糖	0.786	阿拉伯糖	0.862
蔗糖	0.897	木糖	0.924
可溶性淀粉	0.554		

表 3 金属化合物对磷细菌生长量的影响

Table 3 Effect of metal compounds on the cell growth of PSB

金属化合物	菌体生长量 (OD <sub>440</sub> )	金属化合物	菌体生长量 (OD <sub>440</sub> )
未加	0.277	NaHCO <sub>3</sub>	0.353
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.156	CH <sub>3</sub> COONa	0.336
NaCl	0.245	AlPO <sub>4</sub>	0.134
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.466	MnSO <sub>4</sub>	0.470
MgCl <sub>2</sub>	0.439	FeSO <sub>4</sub>	0.078
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.286	ZnCl <sub>2</sub>	0.337
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.245	CaCO <sub>3</sub>	0.578
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.335		

$Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  可以明显地提高磷细菌在液体培养基中的初始培养量,  $Fe^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  等离子特别是  $Fe^{2+}$  却对菌体的初始生长量有明显的抑制作用。  $K^+$ ,  $Zn^{2+}$  对于菌体初始生长影响不明显。

### 3 结论

磷细菌菌株对于碳源种类、氮源加量尤其是  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  等离子具有较敏感的反应。其可能原因是这些金属离子影响了培养基中磷的有效态并进而影响磷细菌生长过程中磷素营养的供应, 或者在涉及有机磷分解代谢过程中相关酶如碱性磷酸酶等的活性调节中存在上述金属离子的效应作用。在 pH、温度和需氧量等参数上, 磷细菌具有较广的适应范围, 表明它可能存在较好的应用潜力。由于使微生物肥料发挥作用的先决条件是其携带的功能菌株接入土壤后能在土体尤其是作物根际生长繁殖并形成优势菌群, 因此, 在磷细菌肥的应用研究中, 有必要对于土壤成分特别是各种金属离子含量进行分析, 并考虑利用微载体技术保持磷细菌外环境的相对稳定性进而保证磷细菌的使用效果。

### 参考文献:

- [1] Walbridge M R. Phosphorus availability in acid organic soil of the lower north Carolina coastal plain [J]. *Ecol*, 1991, 72: 2 083-2 100.
- [2] Stevenson F J. *Cycle of Soil Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micro-nutrients* [M]. New York: Wiley Inc, 1986. 41-60.
- [3] Richy J E. *The Phosphorus Cycle in the Major Biochemical-cycles and Their Interaction* [M]. New York: Wiley, Inc, 1983.
- [4] 鲁如坤, 史陶钧. 土壤磷素在利用过程中的消耗与积累[J]. 土壤通报, 1980, 7(5): 5-8.
- [5] 王庆仁, 李继云, 李振声. 高效利用土壤磷素的植物营养学研究[J]. 生态学报, 1999, 19(3): 417-421.
- [6] 刘建中, 李振声, 李继云. 利用植物自身潜力提高土壤磷的生物有效性[J]. 生态农业研究, 1994, 2(1): 16-23.
- [7] 李继云, 刘秀娣, 周伟, 等. 有效利用土壤营养元素的作物育种新技术研究[J]. 中国科学(B辑), 1995, 25(1): 41-48.
- [8] 陈欣, 姜曙千, 张克中, 等. 红壤坡地磷素流失规律及其影响因素[J]. 土壤侵蚀与水土保持学报, 1999, 5(3): 38-41; 130-131.
- [9] 张宝贵, 李贵桐. 土壤生物在土壤磷有效化中的应用[J]. 土壤学报, 1998, 35(1): 104-109.
- [10] Zou Xiaoming. 植物与磷的生物地球化学循环[A]. 张福锁: 土壤与植物研究新动态[C]. 北京: 中国农业出版社, 1995, 171-184.
- [11] Cosgrove D J. Microbial transformations in the phosphorus cycle[J]. *Adv Microb Ecol*, 1977, 1: 95-134.
- [12] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 磷细菌的分离与纯化[A]. 李阜棣: 农业微生物学实验技术[C]. 北京: 中国农业出版社, 1995, 90-91.
- [13] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993, 199.
- [14] 邓元修, 吴元喜, 兰清道. 菌种初步鉴定[A]. 邓元修: 生物技术实验[C]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1993, 13-19.

## Culture condition of phosphate-solubilizing bacteria

### *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*

LIANG Jin-feng<sup>1</sup>, CHEN Xin<sup>2</sup>, TANG Jian-jun<sup>2</sup>

(1. Faculty of Life Science, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Faculty of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China)

**Abstract:** Influence of different physical and chemical factors on the growth of phosphate-solubilizing bacteria (PSB) were investigated. The results showed that ①PSB was able to thrive and grow very well when its volume in a 100 mL flask was 20 mL, which was considered as optimal. ②The bacteria grew well in slightly alkaline conditions and the optimal pH was 8.5~9.0. ③The temperature for the largest number of cell after two days' incubation was 30 °C. ④Glucose was the best source of carbon; the most suitable Nitrogen and Carbon concentrations were 8 g °L<sup>-1</sup> and 0.21 g °L<sup>-1</sup> respectively. ⑤Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> could improve the quantity of the initial growth of this bacteria. But Fe<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup> especially Fe<sup>2+</sup> inhibit the bacteria's initial growth.

**Key words:** phosphate-solubilizing bacteria; culture condition; phosphorus