

解磷菌分离及其对内蒙古布龙图低品位磷矿利用研究

田晓娟¹⁾ 杜德平¹⁾ 王艳¹⁾ 吴永慧²⁾ 彭立斌²⁾

1) 中国地质科学院地质力学研究所, 北京 100081; 2) 北京大学分子与化学工程学院, 北京 100871

摘要 从内蒙古布龙图磷矿区表层土壤中取样, 分离得到了几个解磷菌株, 测定了每个菌株的解磷能力。分离的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) A20, AC2013 和 AC2015, 对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和磷矿石粉中磷的分解率为 21% ~ 25%, 它们对磷的分解具有协同效应。用 A20 和 AC2013 的菌液制成的生物复合磷肥施于马铃薯, 增产 23.08%, 微生物法将成为利用北方低品位磷矿的有效途径之一。

关键词 解磷菌, 低品位磷矿, 马铃薯, 生物复合磷肥

Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria and Its Utilization to Low Grade Phosphorous Rocks from Bulongtu Area, Inner Mongolia

TIAN Xiaojuan¹⁾ DU Deping¹⁾ WANG Yan¹⁾ WU Yonghui²⁾ PENG Li'e²⁾

1) Institute of Geomechanics, Chinese Academy of Geological Sciences, Beijing 100081; 2) College of Chemistry and Molecular engineering, Peking University, Beijing 100871

Abstract Strains of phosphate solubilizing bacteria were isolated from soil samples of various soil classes collected in the Bulongtu phosphorus ore district of Inner Mongolia. Phosphate solubilization of each strain was estimated. The phosphate solubilization rates of strains A20, AC2013 and AC2015 (*Bacillus* sp.) for $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and phosphorus rock are 21% ~ 25%. They have the synergistic effect on phosphate solubilization. The application of the compound bio-fertilizer composed of phosphate made from strains A20, AC2013 and powder of low grade phosphorus rocks to potato can increase the potato output by 23.08% on average. It is thus shown that this technique is one of the effective methods in which low grade phosphorus rocks are utilized through the treatment of phosphate by microorganisms.

Key words phosphate solubilizing bacteria, phosphorous rocks, potato, compound bio-fertilizer of phosphate

我国磷矿资源较丰富, 主要分布在云南、贵州、湖北、四川、湖南五省, 占全国总储量 74.5%。虽然北方缺磷, 富矿、易选矿少。但是, 却蕴藏着丰富的低品位磷矿资源待以开发与利用。

内蒙古布龙图磷矿 P_2O_5 的储量在亿吨以上, 平均品位 8.7%, 曾进行过选矿综合利用的研究, 但因成本高而不能实际应用(刘宁, 1994)。解磷微生物能有效分解土壤及磷矿中的磷为可溶性的磷。单独的解磷菌或它和根际联合固氮菌组合制成生物肥,

能提高作物对磷的吸收能力, 增加作物的产量, 成本低(肖和艾等, 1994; 魏以和, 1995; 边武英等, 2000), 是一种利用中低品位磷矿的有效方法。

解磷菌是一类能分解有机物和无机物中的磷为可溶性磷的微生物的总称, 包括不同的菌种, 在不同地区的土壤存在着不同的微生物种群, 分离到的解磷菌的特性各有差异。我们从内蒙古布龙图磷矿区表层土壤中取样, 分离筛选到包括芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、格兰氏阴性菌(*Gram negative*)和真菌属

本文由国家自然科学基金项目(编号:40504011)资助。

责任编辑:刘志强; 收稿日期:2005-12-07; 改回日期:2007-01-22。

第一作者简介:田晓娟, 女, 1954年生, 副研究员, 主要从事岩石矿化学分析研究; 通讯地址:100081, 北京市海淀区民族大学南路11号; 电话:010-68412315; E-mail: xjtianlx@126.com。

(*Aspergillus* sp. (曲霉)),研究了它们的解磷能力。将其中的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)和磷矿粉制成了生物复合磷肥,施于当地马铃薯的试验田,获得了增产23.08%的显著效果。

1 材料和方法

在土壤和植物根际有大量的解磷微生物(Raghu,1966),其中许多都具有分解难溶性磷矿粉的能力(Goldstein,1986),微生物解磷机制是利用其在代谢过程中产生的质子和有机酸与磷矿粉作用的结果。

微生物的解磷能力一般有三种测定方法:一是将解磷菌株在含有难溶性磷酸盐的固体培养基上培养,测定菌落周围产生的透明圈的大小;二是进行液体培养,测定培养液中可溶性磷的含量;三是进行土壤培养,测定其有效磷的含量(赵小蓉等,2001)。

1.1 材料

土壤样品取自内蒙古布龙图磷矿区表层土壤;磷矿样998-2,取自内蒙古布龙图胶质磷矿。组成如下: P_2O_5 20.0%, $Ca \geq 10\%$, Fe 5%~10%, Si 5%, Al 1.0%, Mn 0.1%~0.5%, Mg 0.05%~0.10%。

1.2 培养基

1.0 g $Ca_3(PO_4)_2$ 透明圈法培养基的配方:10.0 g 蔗糖,0.5 g NH_4NO_3 ,0.3 g KCl ,0.3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.03 g $MnSO_4 \cdot 6H_2O$,0.3 g $FeSO_4 \cdot H_2O$,1000 ml 蒸馏水,20 g 琼脂,pH:7.2~7.5。

5.0 g $Ca_3(PO_4)_2$ 的分离培养基(梁绍芬等,1996)配方:10.0 g 蔗糖,0.2 g NH_4NO_3 ,0.2 g KCl ,0.1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,1.0 mg $MnSO_4 \cdot 6H_2O$,1.0 mg $FeSO_4 \cdot H_2O$,0.1 g 酵母膏,1000 ml 蒸馏水,20 g 琼脂(三角瓶培养不用),pH:7.2~7.5。

用以上同样的分离培养基,将粉碎至80目的磷矿粉代替以上 $Ca_3(PO_4)_2$,测定解磷菌对磷矿石的分解率。

1.3 菌种的分离

取土壤样品5.0 g于装有玻璃珠并灭菌的250 ml三角瓶中,加无菌水50 ml,在90 r/min 的摇床上摇20 min 制成菌悬液。取0.2 ml 的菌悬液于装有20 ml 分离培养基并灭菌的250 ml 三角瓶中,30℃摇床4 d 进行富集培养。用接种环取培养液在平板培养基上划线后,30℃培养2~3 d。待平板上

的菌落可分辨时,用接种针挑取单菌落接于试管斜面上30℃培养。

1.4 菌种的筛选

先通过透明圈法将有解磷能力的菌筛选出来,再通过三角瓶摇床培养法,分析菌对 $Ca_3(PO_4)_2$ 和磷矿粉的分解率,筛选出对磷矿石粉高效分解的菌株。

(1)透明圈法(Viveganandan,2000):

将试管斜面上的菌用无菌水配成菌液,将菌液在平板上点成直径0.5~1.0 cm 的菌斑,30℃培养4 d 后,分别测量菌落的直径d 和透明圈的直径D。

(2) $Ca_3(PO_4)_2$ 和磷矿粉分解率的测定:

将菌种一支接种于装有50 ml 筛选培养基并灭菌的三角瓶中,30℃培养7 d 后,取1 ml 在3000 r/min 的速度离心分离30 min,取0.2 ml 用磷钼钒分光光度法测定磷的分解率。

1.5 生物复合磷肥

生物复合磷肥按如下比例配制(重量比):解磷菌液(2.4×10^9 /ml):风化煤粉(灭菌):磷矿粉: NK 化肥=25: 30: 35: 15。对照(CK)的组成除用水代替解磷菌液外,其它组成相同。

2 结果与讨论

2.1 解磷菌的分离结果

从第一批样中分离到了70多个菌株,通过透明圈法,初步鉴定具有解磷能力的菌列于表1。

表1 解磷菌的透明圈(第一批)
Table 1 Transparent turn of phosphate solubilizing bacteria (first group)

菌株	A5	A9	B5	B15	B17	B6A
d/mm	4	3	4	4	5	4
D/mm	5	17	17	18	20	18
D/d	1.3	5.7	4.3	4.5	4	4.5

表中的d和D为4个重复的平均值。一般来说,D/d 值愈大,解磷能力愈高。对表1中的菌进行格兰氏染色和芽包染色,其中仅A5和A9为芽孢杆菌,其它都为格兰氏阴性杆菌。由于芽孢杆菌能适应于恶劣的生长环境,内蒙古少雨干旱,筛选芽孢杆菌作为主要的解磷菌可能更合适。如此,在第二批样品的分离目标,重点为解磷芽孢杆菌。分离时先将分离样品在75~80℃的水浴上加热10 min,然后

表 2 解磷菌的透明圈(第二批)

Table 2 The bacteria's transparent turn of solution apatite(second group)

菌株	A20	AC2012	AC2013	AC2015	AC2024
d/mm	8	8	10	7	8
D/mm	22	20	21	19	21
D/d	2.75	2.5	2.1	2.71	2.63

表 3 不同菌株对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的分解率

Table 3 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ decomposition rates of different bacteria stubs

菌种	A5	A9	B5	B15	B6A	A20
pH	5.5	6.0	6.2	5.8	5.8	5.7
分解率/%	9.5	6.7	2.1	4.9	5.8	9.1
菌种	AC203	AC2013	AC2015	AC2021	AC2022	CK
pH	4.0~4.5	3.5~4.0	3.5	3.5~4.5	4.0~4.5	7.5
分解率/%	8.86	21.27	21.54	23.83	10.37	0.125

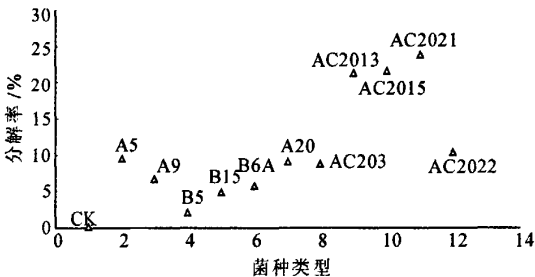


图 1 不同菌株对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的分解率

Fig. 1 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ decomposition rates of different bacteria stubs

再进行平板分离和透明圈法操作,得到几株解磷芽孢杆菌(表 2)。

此外还发现几株真菌,D/d 值为 5.8,高于表 1 和表 2 中各菌的 D/d 值。

2.2 解磷菌对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 分解率的测定

D/d 值仅说明所分离到的菌有解磷能力,还需要通过它们对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和磷矿粉分解率的测定来证实和优选,以获得具有实际应用价值的菌株。三角瓶发酵培养 7 d 不同菌株对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的分解率列于表 3。

从图 1 看出,芽孢杆菌对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的分解率,都高于格兰氏阴性菌 B5、B17、B6A 对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的分解率,AC2021、AC2013、AC2015 和 AC2022 发酵液的 pH 较低,为 pH 3.5~4.5,它们对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的分解率较高,分别为 23.83%、21.27% 和

表 4 解磷菌对磷矿石的分解率

Table 4 Phosphorous ore decomposition rates of phosphate solubilizing bacteria

菌种	A20	A9	B15	AC2013	AC2015
pH	3.0~4.4	3.0~4.0	4.0~4.5	3.5~4.0	3.5~4.5
分解率/%	5.87	7.84	5.82	8.47	8.03
菌种	AC2021	A20 + B15	A20 + AC2013	A20 + AC2021	
pH	3.5~4.5	3.5~4.5	3.5~4.0	3.5~4.0	
分解率/%	8.94	17.59	25.34	22.09	
菌种	A20 + A9	B15 + AC2013	B15 + AC2021	CK	
pH	3.5~4.5	4.0~4.5	4.0~4.5	7.2	
分解率/%	17.43	11.76	11.59	0.103	

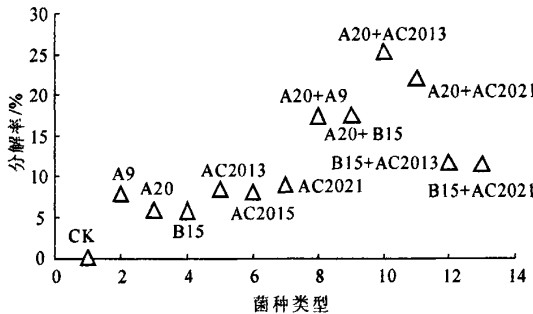


图 2 解磷菌对磷矿石的分解率

Fig. 2 Phosphorous ore decomposition rates of phosphate solubilizing bacteria

21.54%。

2.3 解磷菌对磷矿粉分解率的测定

大部分磷矿石中的磷是以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 化合物的形态存在,除此外还含有许多其它的元素。为进一步了解所分离到的解磷菌对磷矿石的分解能力,从内蒙古布龙图磷矿采集矿样 998-2,粉碎至 -80 目进行解磷菌分解率的测定,结果见表 4。

从图 2 看出两个菌的组合对磷矿石的分解率比单个菌的分解率要高得多,最好的组合是 A20 + AC2013 和 A20 + AC2021,它们都是芽孢杆菌。对磷矿石的分解率分别为 25.34% 和 22.09%,比没有组合时高一倍以上,说明组合菌对磷矿石的分解有协同效应。发酵液的酸度 pH 3.5~4.5,表明,所筛选出来的菌株为产酸菌株。这些有机酸不但能够降低溶液中的 pH,而且同土壤中铁、铝、钙、镁等离子结合,溶解了难溶性磷酸盐。产酸很可能是解磷作用的机理之一。

理论上在一定的量比范围内,磷矿粉用量越大,

反应越容易,磷的浸出就越多。培养时间不同,磷的浸出率也不同,随培养时间的推移,磷的浸出率逐渐升高,但培养 15 d 后磷的浸出率不再明显升高,似乎磷的浸出达到了饱和,并维持在一个相对平稳的水平。说明这些菌种的解磷活性主要表现在前 15 d 培养期间,在以后的培养期间,可能由于碳源物质耗竭,菌体不再生长繁殖(池汝安等,2005)。

工作中我们对分离的几株真菌也进行了同样的测定,发现真菌对磷矿石的分解率高达 70% ~ 91%,发酵液的酸度 pH 2.5 ~ 3.0,解磷效果比芽孢杆菌高出 3 ~ 4 倍。

赵小蓉等(2001)的实验也表明,以磷矿粉作为唯一的磷源培养解磷菌,发现真菌的解磷能力比细菌强。据 Kucey(1989)报道真菌的解磷能力一般是细菌的 10 倍,许多细菌在进一步纯化中失去解磷能力,而真菌则始终保持其解磷能力(Nahas, 1990)。关于这一方面的研究待另文阐述。

2.4 田间肥效试验

为了检验解磷菌的实际应用效果,挑选了表 4 中的最好组合 A20 + AC2013,用 5 L 的发酵罐分别对菌 A20 和 AC2013 进行了发酵培养试验,用平板法检测发酵液的有效活菌数在 $2.0 \times 10^9/\text{ml}$ 以上,两种菌液等体积混合制成生物复合磷肥,由内蒙古达茂旗科委选定当地的主要农作物马铃薯于 2001 年 5 月至 9 月在达茂旗百灵庙地区进行了田间小区肥效试验,试验结果列于表 5。

表 5 中,处理 A 生物复合磷肥;处理 B 为除未加菌液外,其它成份和 A 完全相同;CK 为磷矿粉和风化煤粉,每小区面积 = $10 \text{ m} \times 2.2 \text{ m} = 22 \text{ m}^2$,施肥 5 kg。

经方差分析,处理间的 $F = 38.31 > F_{0.01} = 18.0$,增产 23.08%,达极显著性效果。

3 小结

微生物肥料的研究及开发对提高土壤养分利用率,改善土壤环境以及调控土壤肥力等必将产生巨大的作用。综上结果可以得出如下结论:从内蒙古布龙图磷矿区表层土壤中取样,分离筛选到的解磷芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) A20、AC2013 和 AC2015,对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和磷矿石粉中的磷有很强的分解能力。它们对磷的分解具有协同效应,用 A20 和 AC2013 的菌液制成的生物复合磷肥施于马铃薯,增产

23.08%,达极显著性效果,微生物法有可能成为利用北方低品位磷矿的有效途径之一。今后应该加强的研究工作(冯月红等,2003):

(1)解磷微生物的生态学特征;

(2)解磷微生物与作物根系生长发育及吸收功能之间的关系;

表 5 各处理马铃薯的产量及其比较 /kg

Table 5 Comparison of the yields of various processed potatoes /kg

处理	重复 I	II	III	小区平均	折亩产	与对照比 (增产)	增减 /%
A	35.9	37.9	36.7	36.8	1394.6	261.5	23.08
B	30.9	34.8	32.6	32.8	1243.0	151.4	12.1
CK	29.8	30.8	29.2	29.9	1133.1		

(3)解磷微生物与其他功能微生物的相互作用;

(4)微生物解磷的分子生物学机理。

参考文献

- 边武英,何振立,黄昌永. 2000. 高效解磷菌对矿物专性吸附磷的转化及生物有效性的影响. 浙江大学学报(农业与生命科学), 26(4):461~464.
- 池汝安,肖春桥,高洪,等. 2005. 细菌和真菌分解低品位磷矿. 过程工程学报,5(6): 636~639.
- 冯月红,姚拓,龙瑞军. 2003. 土壤解磷菌研究进展. 草原与草坪, 25(1):3~7.
- 刘宁. 1994. 内蒙古布龙图低品位磷矿的利用途径研究. 矿产综合利用, (4):1~4.
- 梁绍芬,姜瑞波. 1996. 细菌解磷作用的初步研究. 葛诚主编. 微生物肥料的生产应用及其发展. 中国农业科技出版社,61~65.
- 魏以和,钟康年,肖太阳. 1995. 磷资源利用新途径的探索—磷矿的微生物处理. 武汉化工学院学报, 17(3):36~40.
- 肖和艾,龚惠群,谭云峰. 1994. 江南丘陵红壤解磷菌株的筛选试验初报. 北京:农业现代化研究, 15(6):368~371.
- 赵小蓉,林启美,等. 2001a. 细菌解磷能力测定方法的研究. 微生物学通报, 28(1):1~4.
- 赵小蓉,林启美. 2001b. 微生物解磷的研究进展. 土壤肥料,2001(3):7~11.

References

- Bian Wuying, He Zhenli, Huang Changyong. 2000. 1) Increasing transformation and bioavailability of specifically sorbed P by P efficient microorganisms (PEM). Journal of Zhejiang Agricultural University (Agric. & Life Sci.), 26 (4) : 461~464 (in Chinese with English abstract).
- Chi Ru'an, Xiao Chunqiao, Gao Hong, et al. 2005. Biodecomposition of

- low-grade rock phosphate with some bacteria and fungi. The Chinese Journal of Process Engineering, 5 (6): 636 ~ 639 (in Chinese with English abstract).
- Feng Yuehong, Yao Tuo, Long Ruijun. 2003. 3) Research progress of phosphate-dissolving microorganisms in plant rhizosphere. Grassland and Turf, (25)1: 3 ~ 7 (in Chinese with English abstract).
- Goldstein A H. 1986. Bacterial Solubilization of Mineral Phosphates: Historical Perspective and Future Prospects. Am. J. Altern. Agri., (1): 51 ~ 57.
- Kucey R M N, Janzenand H H, Legett M E. 1989. Microbially Mediated Increases in Plant-available Phosphorus. Adv. Agron., (42): 199 ~ 228.
- Liang Shaofen, Jiang Ruibo. 1996. the germs solve the first step research of the phosphorus function. Ge Cheng copy chief. the production application and its development of the microorganism fertilizer. Beijing: PublishingHouse of Chinese AgricultureTechnology, 61 ~ 65 (in Chinese).
- Liu Ning. 1994. exploitation that low personal status apatite ore of diagram of Inner Mongolia cloth dragon the go by way of the research. Multipurpose Utilization of Mineral Resources, 15 (4): 1 ~ 4 (in Chinese with English abstract).
- Nahas E, Banzatto D A, Assis L C. 1990. Fluorapatite Solubilization by *Aspergillus Niger* in Vinase Medium. Soil Biol. Biochem., (22): 1097 ~ 1101.
- Raghu K, Macrac I C. 1996. Occurrence of Phosphate-Dissolving Microorganisms in the Rhizosphere of Rice Plants and in Sumerget Soils. J. Appl. Bacteriol., (29): 582 ~ 586.
- Viveganandan G, Jauhari K S. 2000. Growth and survival of phosphate-solubilizing bacteria in calcium alginate. Microbiological Research, 155 (3): 205 ~ 207.
- Wei Yihe, Zhong Kangnian, Xiao Taiyang. 1995. Exploration for utilizing low/Middle grade phosphorous resources--treatment of phosphate by microorganisms. Journal of Wuhan Institute of Chemical Technology, 17 (3): 36 ~ 40 (in Chinese with English abstract).
- Xiao He'ai, Gong Huiquen, Tan Yunfeng. 1994. the Jiang south the red soil of mound the decompose apatite bacteria the stub to choose to experiment the early report. Research of Agricultural Modernization, 15 (6): 368 ~ 371 (in Chinese with English abstract).
- Zhao Xiaorong, Lin Qimei, et al. 2001a. The methods for quantifying capacity of bacteria in dissolving P compounds. Microbiology, 28 (1): 1 ~ 4 (in Chinese with English abstract).
- Zhao Xiaorong, Lin Qimei. 2001b. A review of phosphate dissolving microorganisms. Soils and Fertilizers, (3): 7 ~ 11 (in Chinese with English abstract).

《微地震台震网天然地震层析技术在狮子沟深层构造解析中应用》主要进展

在自然条件恶劣、人工地震勘探长期未能突破的柴达木盆地狮子沟地区,首次应用微地震台阵网天然地震层析成像技术探测油田深部构造试验获得成功。该课题建立了中等尺度微地震台阵网深部构造探测的技术方法体系;自主研发了数据处理软件,实现了高效的地震事件选取和震相高质量标注;首次提出利用波速标定层位的原则和方法,获得了深部速度结构三维展布图像和主要储层等波速构造图,填补了该区深部构造信息的空白。依据成果部署的狮36风险井喜见油气显示。该项目是财政部油气项目,由中国地质科学院地质力学所王小凤研究员课题组负责。