

# 不同 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 含量及菌种保存温度下 SL01 菌株的解磷及生长能力\*

李剑峰<sup>1,2</sup> 师尚礼<sup>\*\*1,2</sup> 张淑卿<sup>1,2</sup>

(1. 甘肃农业大学草业学院 兰州 730070;

2. 草业生态系统教育部重点实验室 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心 兰州 730070)

**摘要** 试验比较了不同保存温度和培养基  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  含量下解磷根瘤菌 SL01 的生长和解磷能力。结果表明: 固体培养条件下, 增大  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  添加量能促进菌落生长,  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  处理菌落直径( $d$ )为  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  处理的 116.9%、127.7%、130.1% 和 132.7%。 $0 \sim 8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  含量范围内, 菌株的解磷能力无显著差异, 故更适于以溶磷圈直径  $D$  与菌落直径  $d$  的比值  $D/d$  来衡量菌株在固态环境如土壤中的解磷能力; 其菌液最适宜于  $15^\circ\text{C}$  下保存,  $4^\circ\text{C}$  次之。不同保存温度下菌种的解磷能力为  $-18^\circ\text{C} > -10^\circ\text{C} > 4^\circ\text{C} > 15^\circ\text{C} > 28^\circ\text{C} > 35^\circ\text{C}$ ; 不同保存温度下 SL01 菌株的菌落直径为  $4^\circ\text{C} > 15^\circ\text{C} > -18^\circ\text{C} > 28^\circ\text{C} > -10^\circ\text{C} > 35^\circ\text{C}$ ; 菌液在不同温度下保存 60 d 后的活菌含量为  $15^\circ\text{C} > 4^\circ\text{C} > 28^\circ\text{C} > -10^\circ\text{C} > 35^\circ\text{C} > -18^\circ\text{C}$ 。

**关键词** 解磷根瘤菌 解磷能力 生长能力 保存温度 菌落直径

中图分类号: S154.4; S812; S41 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2010)01-0094-04

## Growth and phosphate-dissolving ability of strain SL01 under different storage temperatures and calcium phosphate levels

LI Jian-Feng<sup>1,2</sup>, SHI Shang-Li<sup>1,2</sup>, ZHANG Shu-Qing<sup>1,2</sup>

(1. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education & Sino-US Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

**Abstract** The growth rate and phosphate-dissolving ability of phosphate-dissolving rhizobium SL01 in different calcium phosphate [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] content of substrate and storage temperatures were determined. Based on solid culture, the results indicate enhanced colony growth with increasing levels of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Colony diameter of treatment with  $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  is respectively 16.9%, 27.7%, 30.1% and 32.7% higher than that of  $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  treatments. At  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  range of  $0 \sim 8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , the phosphate-dissolving ability of the strain is not obviously different. It is therefore more suitable to use  $D/d$  (phosphate-dissolving ring diameter to colony diameter) ratio in measuring phosphate-dissolving ability of strains in solid surrounding such as soil. Bacteria liquid is best preserved under  $15^\circ\text{C}$ , followed by  $4^\circ\text{C}$ . Phosphate-dissolving ability of SL01 under different storage temperatures is  $-18^\circ\text{C} > -10^\circ\text{C} > 4^\circ\text{C} > 15^\circ\text{C} > 28^\circ\text{C} > 35^\circ\text{C}$ . The order of SL01 colony diameter under different storage temperatures is  $4^\circ\text{C} > 15^\circ\text{C} > -18^\circ\text{C} > 28^\circ\text{C} > -10^\circ\text{C} > 35^\circ\text{C}$ . Order of viable bacteria amount of strain preserved for 60 d under different temperatures is  $15^\circ\text{C} > 4^\circ\text{C} > 28^\circ\text{C} > -10^\circ\text{C} > 35^\circ\text{C} > -18^\circ\text{C}$ .

**Key words** Phosphate dissolving rhizobium, Phosphate-dissolving ability, Growth ability, Storage temperature, Colony diameter  
(Received Jan. 30, 2009; accepted April 13, 2009)

磷是植物生长发育不可或缺的重要元素, 我国大部分区域土壤平均含磷量约  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 但其在土壤溶液中的浓度一般仅有  $0.005 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 难以供植物直接吸收利用<sup>[1]</sup>, 而施入土壤的化学磷肥

利用率很低, 通常只有  $5\% \sim 25\%$ <sup>[2]</sup>。为此人们采用多种方法以提高自然界磷素的利用效率<sup>[3]</sup>, 利用微生物调节土壤难溶性无机磷向可溶性磷的转化<sup>[4]</sup>、增加土壤中的微生物量磷<sup>[5]</sup>是其中最重要的途径。目

\* 国家科技支撑计划项目(2007BAD52B06、2006BAD04A04、2006BAD01A19)和农业部行业专项(nyhyzx07-022)资助

\*\* 通讯作者: 师尚礼(1964~), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事牧草种质资源方面的研究。E-mail: shishl@gsau.edu.cn

李剑峰(1979~), 男, 博士研究生, 主要从事牧草种质资源和微生物育种及制剂方面的研究。E-mail: ljfsmart@qq.com

收稿日期: 2009-01-30 接受日期: 2009-04-13

前,对微生物参与难溶态磷素利用的研究多局限在芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)<sup>[6]</sup>和真菌、放线菌等方面,而对涉及解磷菌菌种保存温度和解磷能力关系间的研究尚鲜有报道。祁娟等<sup>[7]</sup>在苜蓿种子中分离得到 1 株可溶无机磷并能分泌生长素的根瘤菌 SL01,其溶解无机磷的能力较强,有很大的利用价值和开发潜力,但解磷根瘤菌同其他微生物一样具有基因变异性,随着菌种保存条件的变化,菌株性能有所变异,生长和溶解无机磷的能力降低<sup>[8]</sup>。本研究比较分析了固体培养基磷酸钙添加量、继代周期和保存温度对 SL01 菌株生长和溶解磷酸钙能力的影响,为解磷根瘤菌菌种保存和菌剂研制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株为解磷苜蓿根瘤菌 SL01,由甘肃农业大学草业生态系统重点试验室提供。PKO 无机磷培养基组分为葡萄糖 10 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g, NaCl 0.2 g, KCl 0.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03 g,  $\text{MnSO}_4$  0.03 g,  $\text{FeSO}_4$  0.003 g, 酵母膏 0.5 g, 琼脂 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH=7.0,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  过筛并单独灭菌后与培养基混合<sup>[9]</sup>。YMA 培养基<sup>[10]</sup>组分为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g, 酵母粉 1.0 g, 甘露醇 10.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, NaCl 0.1 g, pH=6.8~7.2, 蒸馏水 1 000 mL, 固体培养基加琼脂 15 g。

### 1.2 不同 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 含量下 SL01 菌株的生长能力和解磷能力

以 PKO 培养基为基础,设  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  以及  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  添加量,以及 1 个  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  并添加溴麝香草酚蓝指示剂(观察菌株的产酸状况)处理。将 4 下 YMA 斜面保存的菌种活化 2 h 后转接到各处理固体平板上,每处理设 3 个重复,培养 14 d 后测量菌落直径  $d$  和解磷透明圈直径  $D$ ,以  $D/d$  值衡量解磷能力的强弱<sup>[11]</sup>。

### 1.3 不同继代转接周期下 SL01 菌株的生长及解磷能力

将 4 下保存的 SL01 菌种活化 2 h 后接 1 环于 YMA 液体培养基中,  $28 \text{ } 120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养至菌液  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  吸光度值为 0.5 时开始进行处理:将菌液分别置于 28、18、4 和 -18 培养,每隔 5 d、15 d 和 30 d 以 2% 的接种量转接入新的 YMA 液体培养基,再次培养至菌液吸光度值为 0.5 时将菌液重新置于各处理温度下保存。累计处理 60 d 时将各处理菌株以接种针点接至 PKO 无机磷培养基,培养 4 d 后记录菌落直径  $d$  及解磷透明圈直径  $D$ ,每处理 4 个重复。

### 1.4 SL01 液体菌剂在不同温度下保存 60 d 后的活菌含量和菌株的生长及解磷能力

将活化的 SL01 菌株于 YMA 液体培养基上接种 1 环,  $28 \text{ } 140 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养 20 h,将菌液  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  吸光度值用 YMA 液体培养基调为 0.5 后分别置于 35、28、15、4、-10、-18 下静置保存,60 d 后以无菌水稀释  $1 \times 10^3$  倍,取 0.2 mL 均匀涂抹在 YMA 固体培养基上,用平板计数法测定各处理活菌含量。每处理 3 个重复,以 4 保存的处理为对照。再将平板计数得到的单菌落用接种针在 PKO 无机磷培养基上点接,培养 10 d 后记录菌落直径  $d$  和解磷透明圈直径  $D$ ,每处理 4 个重复。

### 1.5 数据分析

使用 DPS 数据分析软件和 EXCEL 软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 磷酸钙含量对菌株生长及解磷能力的影响

由表 1 可知,SL01 在不同  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  含量的 PKO 培养基上培养 14 d 后,各处理的 SL01 菌落直径与  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  含量呈显著正相关( $R^2 = 0.81$ ),回归方程为  $y = 0.2197x + 4.9709$ 。 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  处理下菌落平均直径( $d$ )最大,达到 6.9 mm,分别为  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  处理的 116.9%、127.7%、130.1% 和 132.7%,差异达显著水平( $P < 0.05$ ); $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  并添加溴麝香草酚蓝指示剂的处理菌落直径最小,平均直径 4.7 mm,仅为  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  处理的 68.1% 和 79.7%,差异显著( $P < 0.05$ ),而其他处理间差异不显著,说明高  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  含量对菌落生长有促进作用。解磷透明圈和菌落直径的比值  $D/d$  在  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  并添加指示剂处理下达 2.21,分别为  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  处理的 151.4% 和 134.8%,显著高于其他所有处理( $P < 0.05$ )。其他处理间差异均不显著,说明培养基  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  含量对菌株的解磷能力无明显影响。添

表 1 不同  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  含量对菌株生长及解磷能力的影响

Tab. 1 Influence of calcium phosphate content on the ability of phosphate-dissolving and growth of isolate SL01 in solid medium

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 含量 Calcium phosphate content ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	菌落直径 $d$ Colony diameter (mm)	解磷透明圈直径 $D$ Phosphate-dissolving ring diameter (mm)	$D/d$
8	6.9±0.36a	10.1±0.16	1.46±0.13b
5	5.9±0.65ab	9.7±0.82	1.64±0.09b
3	5.4±0.25bc	8.9±0.37	1.65±0.04b
1	5.3±0.76bc	8.8±0.58	1.66±0.08b
0.5	5.2±0.75bc	8.9±0.71	1.72±0.04b
3+指示剂 Indicator	4.7±0.34c	10.4±0.21	2.21±0.09a

同列不同字母表示各处理之间差异显著( $P < 0.05$ , LSD 法),下同。Different letters in one column mean significant difference at  $P < 0.05$  level by LSD. The same below.

加溴麝香草酚蓝指示剂的培养基上, 菌落生长受到抑制, 而  $D/d$  却显著高出其他各处理 28.5%~51.4%。

## 2.2 继代周期在不同保存温度下对菌株生长和解磷能力的影响

由表 2 可知, 在液体 YMA 培养基上, 28 ℃、18 ℃、4 ℃ 保存温度下各转接周期处理间的菌落直径  $d$  和解磷透明圈与菌落直径的比值  $D/d$  差异不显著, 而在 -18 ℃ 保存温度下 15 d·次<sup>-1</sup> 和 30 d·次<sup>-1</sup> 处理菌落直径最大, 达到 4.31 mm 和 3.92 mm, 分别为 5 d·次<sup>-1</sup> 的 135.1% 和 122.8%; 而  $D/d$  达到 1.67 和 1.73, 分别为 5 d·次<sup>-1</sup> 的 103.1% 和 106.8%, 差异均达显著水平 ( $P<0.05$ )。说明 -18 ℃ 低温保存时, 减少继代次数对于维持菌株的解磷能力和生长能力有促进作用。就保存温度而言, 不同转接周期处理都呈现随保存温度降低, 保存菌株的菌落直径和  $D/d$  逐渐增大的趋势, 转接周期为 5 d、15 d 和 30 d 的处理在 -18 ℃ 下菌落直径分别为 28 ℃ 处理的 127.6%、175.9% 和 151.9%,  $D/d$  为 28 ℃ 处理的 112.5%、121.1% 和 131.1%, 差异显著 ( $P<0.05$ ), 说明降低保存温度对维持菌株的解磷能力和生长能力有积极作用。

## 2.3 不同保存温度对液体菌剂中活菌量、菌株生长和解磷能力的影响

本研究测定了 6 个不同温度下 YMA 液体菌剂

保存 60 d 后的活菌含量、菌株生长及解磷能力, 结果表明, 活菌含量随保存温度的降低而呈单峰曲线变化 (表 3)。保存 60 d 后, 15 ℃ 下活菌含量最高, 达  $6.70 \times 10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>, 分别为 28 ℃、35 ℃、-10 ℃ 和 -18 ℃ 处理的  $1.21 \times 10^2$ 、 $1.60 \times 10^4$ 、 $1.47 \times 10^4$  和  $3.96 \times 10^4$  倍; 4 ℃ 处理的活菌含量次之, 但也达到  $2.98 \times 10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>, 显著高于除 15 ℃ 的所有处理 ( $P<0.05$ ); -18 ℃ 处理活菌个数最低, 仅为  $1.69 \times 10^4$  cfu·mL<sup>-1</sup>, 但与 35 ℃ 和 -10 ℃ 处理差异不显著, 说明就活菌含量而言, 4~15 ℃ 是液体菌剂保存的最佳温度。35 ℃ 下菌株在保存过程中繁殖过快, 菌种退化并大量死亡, -10 ℃ 处理由于缓慢结冰产生冰晶体积较大, 对菌株造成严重伤害, 导致菌株生长活性降低和大量菌体死亡。菌落直径随保存温度降低的变化趋势和活菌含量一致, 15 ℃ 和 4 ℃ 处理菌株产生的菌落直径最大, 分别为 6.03 mm 和 6.47 mm, 显著高于其他处理 ( $P<0.05$ ), 而 -10 ℃ 和 35 ℃ 处理菌株产生的菌落直径最小, 仅分别为 4 ℃ 处理的 69.86% 和 68.01%。菌种的解磷能力与保存温度间呈明显负相关,  $D/d$  呈随温度降低逐渐增大的趋势, 回归方程为  $y = -1.3917x + 21.325$ , 相关系数  $R^2 = 0.969$ 。-18 ℃ 处理  $D/d$  高达 1.95, 显著高于 35~4 ℃ 各处理 10.16%~57.25% ( $P<0.05$ ), 表明低温保存有利于保持菌株的解磷活性。

表 2 转接周期及保存温度对菌株生长及解磷能力的影响

Tab. 2 Influence of subculture cycle under different storage temperature on the ability of phosphate-dissolving and growth of isolate SL01 in liquid medium

转接周期 Subculture cycle (d·cycle <sup>-1</sup> )	保存温度 Storage temperature (℃)	菌落直径 ( $d$ ) Colony diameter (mm)	溶磷圈直径 ( $D$ ) Phosphate-dissolving ring diameter (mm)	$D/d$
5	28	2.50±0.37c	3.52±0.21	1.44±0.12b
	18	2.73±0.09bc	3.81±0.15	1.41±0.17b
	4	2.42±0.17c	3.63±0.08	1.51±0.04ab
	-18	3.19±0.15b	5.16±0.32	1.62±0.13a
15	28	2.45±0.22c	3.35±0.19	1.38±0.21b
	18	2.63±0.15bc	3.76±0.37	1.43±0.16b
	4	2.67±0.24bc	4.06±0.13	1.54±0.09ab
	-18	4.31±0.27a	7.21±0.33	1.67±0.05a
30	28	2.58±0.51c	3.39±0.53	1.32±0.11bc
	18	2.60±0.65bc	3.61±0.37	1.39±0.09bc
	4	2.85±0.31bc	4.51±0.49	1.60±0.12ab
	-18	3.92±0.55a	6.74±0.73	1.73±0.10a

表 3 保存温度对液体菌剂中活菌含量、菌株生长及解磷能力的影响

Tab. 3 Influence of storage temperature on the viable bacteria number and ability of phosphate-dissolving and growth of isolate SL01 in liquid medium

保存温度 Storage temperature (℃)	活菌含量 Viable bacteria number (cfu·mL <sup>-1</sup> )	菌落直径 ( $d$ ) Colony diameter (mm)	溶磷圈直径 ( $D$ ) Phosphate-dissolving ring diameter (mm)	$D/d$
35	$(4.18 \pm 0.23) \times 10^4$ d	4.40±0.26c	5.50±0.29	1.24±0.18d
28	$(5.55 \pm 0.57) \times 10^6$ c	4.65±0.15bc	6.86±0.35	1.47±0.05c
15	$(6.70 \pm 0.36) \times 10^8$ a	6.03±0.21a	9.43±0.11	1.56±0.06c
4	$(2.98 \pm 0.25) \times 10^8$ b	6.47±0.32a	11.43±0.40	1.77±0.03b
-10	$(4.57 \pm 0.58) \times 10^4$ d	4.52±0.46c	8.30±0.44	1.86±0.04ab
-18	$(1.69 \pm 0.28) \times 10^4$ d	4.69±0.12bc	9.01±0.41	1.95±0.04a

### 3 结论和讨论

#### 3.1 无机磷含量对菌株生长和解磷能力的影响

本研究结果表明, 环境中的  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  能促进菌落生长, 与 Lukito<sup>[12]</sup>和来璐等<sup>[13]</sup>的研究结果一致, 即土壤微生物量随无机磷盐含量( $0\sim 8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内)的增高而明显提高。溴麝香草酚蓝酸碱指示剂对 PKO 培养基上的菌落生长有抑制作用, 但能明显促进其解磷能力。添加了指示剂的培养基上菌落变为橙红色, 说明菌落通过分泌酸性物质使得周围的 pH 值降低, 从而溶解难溶性磷酸盐, 这与赵小蓉等的研究结果一致<sup>[14]</sup>。菌落解磷透明圈与菌落直径的比值  $D/d$  与  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  含量间无显著相关, 说明  $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的添加量并未达到菌落解磷的极限, 在  $0\sim 8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  含量范围内, 菌株分解无机磷的作用在空间上仅限于菌落周围一定的区域, 而区域范围与无机磷含量并不相关。由于植物生长中, 根系寄生和根际游离的根瘤菌所能达到的土壤范围有限, 因此衡量根瘤菌的解磷能力更应该比较菌落在土壤中可分解无机磷的空间范围。故以  $D/d$  值作为促生菌株解磷能力的衡量标准, 对于生产更具有实际指导意义。

#### 3.2 保存温度和转接周期对液体菌剂 SL01 菌株活菌数量及其生长和解磷能力的影响

本研究中, SL01 活菌含量与保存温度间呈典型的单峰曲线相关,  $15^\circ\text{C}$  保存 60 d 的菌株菌落生长速度最快, 菌落直径最大。 $15\sim 4^\circ\text{C}$  下保存 60 d 的菌株菌落直径显著高于其他处理, 是最适的菌种保存温度。保存于  $35^\circ\text{C}$  的菌种活力较差, 这可能是由于菌株在高温下生活力下降所致。低于  $4^\circ\text{C}$ , 则使液体菌剂中的菌种长期处于逆境胁迫状态, 液体菌剂在  $0\sim 10^\circ\text{C}$  下缓慢结冰, 会产生较大的冰晶破坏菌体的膜结构, 导致解冻后菌株的生活力大幅下降, 菌落直径仅为  $4^\circ\text{C}$  处理的 69.86%。 $-18^\circ\text{C}$  低温下菌剂迅速冻结, 形成的冰晶较小, 对菌体膜结构的损伤较轻, 生活力较高, 菌种的菌落直径比  $-10^\circ\text{C}$  处理高 3.76%, 也可能是低温诱导菌株产生了更强的代谢活性, 常温下产生更多的有机酸所致。温度高于  $-18^\circ\text{C}$  时, 继代周期的长短与保存菌株的生长及解磷特性能力并不密切, 而低于  $-18^\circ\text{C}$  保存时,  $15\text{ d}\cdot\text{次}^{-1}$  的转接周期对菌株的解磷和生长能力均有促进, 这一现象可能与低温下菌株的代谢和繁殖有关。

保存 60 d 的 YMA 液体根瘤菌剂中的活菌含量随保存温度的降低呈单峰曲线变化,  $15\sim 4^\circ\text{C}$  处理的活菌数最高, 达  $6.70\sim 2.98\times 10^8\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 可作为以获得大量活菌为目标的最佳保存温度。普通解磷菌<sup>[15]</sup>和根瘤菌<sup>[16]</sup>的最适生长温度为  $35^\circ\text{C}$  和  $30^\circ\text{C}$  左右, 该温度下液体菌剂中的菌株迅速繁殖, 导致营养的

快速消耗和次生代谢物的积累, 最终表现为活菌数急剧降低, 生活力和解磷能力明显下降, 本研究结果与此结论一致, 故菌种应尽量避免高温保存; 菌株的解磷能力随菌种保存温度的增高而减弱, 呈典型的负相关( $R^2=0.969$ ),  $-18^\circ\text{C}$  保存的菌种  $D/d$  值达 1.95, 显著高于  $35\sim 4^\circ\text{C}$  各处理 10.16%~57.25% ( $P<0.05$ ), 说明低温保存能提高菌株的解磷能力, 高温保存则导致该能力退化。

综上所述, 菌种的生长和解磷活性取决于两个方面, 一是解磷底物的刺激, 二是菌种的退化程度。难溶性磷作为解磷底物, 对于解磷菌株的生长有促进作用, 其具体机理尚不明确, 需进一步研究。菌种的退化程度与菌种保存的温度和营养条件密切相关, 高温和能产生缓慢结冰的低温均会导致菌种的退化。这一结论对于根瘤菌和解磷菌株的保存和应用具有指导意义。SL01 菌株对低温和高温的耐受性好, 经多次传代后解磷能力稳定, 生长迅速, 可用于解磷根瘤菌剂的研制, 具有很大开发潜力。

### 参考文献

- [1] 吕学斌, 孙亚凯, 张毅民. 几株高效溶磷菌株对不同磷源溶磷活力的比较[J]. 农业工程学报, 2007, 23(5): 195-197
- [2] 陆文静, 何振立, 许建平, 等. 石灰性土壤难溶态磷的微生物转化和利用[J]. 植物营养与肥料学报, 1999, 5(4): 377-383
- [3] Walbridge M R. Phosphorus availability in acid organic soil of the lower North Carolina coastal plain[J]. Ecology, 1991, 72: 2083-2100
- [4] 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
- [5] Brookes P C, Poelson D S, Jenkinson D S. Phosphorus in the soil microbial biomass[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1984, 16: 169-175
- [6] 陈廷伟. 解磷巨大芽孢杆菌分类名称、形态特征及解磷性能述评[J]. 土壤肥料, 2005(1): 7-9
- [7] 祁娟, 师尚礼. 不同品种紫花苜蓿种子内生根瘤菌溶磷和分泌生长素能力[J]. 草原与草坪, 2006(5): 18-20
- [8] 杨慧. 溶磷高效菌株筛选鉴定及其溶磷作用研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007: 41-42
- [9] 姚拓. 促进植物生长菌的研究进展[J]. 草原与草坪, 2002(4): 3-5
- [10] 姚拓, 王刚, 陈本建, 等. 盐碱地小麦根际联合固氮菌数量分布研究[J]. 土壤通报, 2004(4): 479-482
- [11] 师尚礼, 曹致中, 刘建荣. 苜蓿根瘤菌溶磷和分泌植物生长素能力研究[J]. 草业学报, 2007(2): 105-111
- [12] Lukito H P, Kouno K, Ando T. Phosphorus requirement of microbial biomass in a regosol and an andosol[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30: 865-872
- [13] 来璐, 赵小蓉, 李贵桐. 土壤微生物量磷及碳磷比对加入无机磷的响应[J]. 中国农业科学, 2006, 39(10): 2036-2041
- [14] 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
- [15] 张毅民. 高效溶磷菌株 Bmp5 筛选及活力和培养条件的研究[J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(3): 61-65
- [16] 常玮, 王伟, 屈新兰. 苜蓿根瘤菌菌剂的研究[J]. 新疆农业科学, 2004, 41(2): 103-104