

黑曲霉溶磷菌株Asp.32—4的筛选及性能

张梦昌 梁羽坚 张晓东 高继才

(吉林农业大学土化系)

摘 要

从吉林省葡萄根际土壤中分离筛选出了溶磷菌株Asp.32—4, 在液体培养条件下, 当培养基中含2%葡萄糖, 5%的麦麸及1%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时溶磷能力较强, 加入1%的磷矿粉, 培养12天, 磷的转化率为85.4%, 随磷矿粉含量增加, 溶磷能力逐渐降低。

黑曲霉溶磷菌的产酸力与培养基的组成有关。合成1号(CP¹)培养基有利于柠檬酸的产生; 合成2号(CP²)培养基有利于产生草酸; 在同一培养基内, 柠檬酸和草酸的含量成明显的负相关。

据国内外资料报导, 黑曲霉对难溶性磷酸盐有较强的转化能力, 并能将较复杂的有机质(如植素等)中的磷进行转化⁽¹⁾⁽²⁾。国内某些单位已进行了这方面的研究工作, 目前所分离出的溶磷黑曲霉菌株主要有M31、黑曲霉7465、Fo28、AN2—7等, 利用上述菌种研制成生物磷肥, 在田间肥效试验中均取得了一定的增产效果⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾。

为了筛选出能适应我省土壤气候条件, 而又具有较高溶磷能力的新菌种, 我们进行了黑曲霉溶磷菌株的分离筛选及其溶磷性能的测定。

一、黑曲霉溶磷菌株的分离筛选

(一) 样品采集

从吉林省前郭县、长岭县、长春市郊区和吉林农大实验农场、果园等地共采集土样六十余个, 供分离菌种用。

(二) 菌种分离

采用酸性马铃薯琼脂培养基(20%的马铃薯汁1000ml, 琼脂23~25克, 用醋酸调pH至4.5~5.0, 用稀释平板涂抹法进行平板分离。28~30℃培养5~7天, 待长出菌落后, 将黑曲霉孢子转入米曲汁琼脂斜面培养基。

(三) 菌种筛选

1、初筛: 采用麦麸葡萄糖液体培养基(麦麸5%, 葡萄糖2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, 磷矿粉* 1%, 蒸馏水1000ml, pH6.0), 用500ml三角瓶, 每瓶装培养液100ml,

* 采用墨西哥磷矿粉, 预先用2%的柠檬酸浸提除去速效磷, 处理后的矿粉含全磷21%。

接菌后30℃静置培养8~10天,用25型酸度计测定pH值,用721型分光光度计,钼黄比色法测定水溶磷含量,选取产水溶较高的菌株,进行复筛。

2、复筛:经过初筛选出的黑曲霉溶磷菌株再用上法多次反复进行测定,最后选出了溶磷较强的菌株ASP.32-4(从长春市郊区新立城果园葡萄根际土壤中分离)。

二、黑曲霉溶磷菌株溶磷能力的测定

(一) ASP.32-4 溶磷规律

1、磷矿粉含量为1%时的溶磷强度

利用麦麸葡萄糖液体培养基加1%的磷矿粉,每隔两天测定一次培养液的pH及速效磷含量,结果如表1、图1。

表1 ASP.32-4不同培养时间的溶磷强度

培养天数	0	2	4	6	8	10	12	14	16
pH	5.6	3.6	3.95	3.26	2.80	2.95	2.70	2.64	3.10
磷的转化率(%)	3.5	14.3	46.03	47.4	66.6	74.3	75	81	85.2

(表内数据为三次重复平均值)

从图1看出:在磷矿粉含量为1%时,磷的转化率随时间的延长而增加,曲线呈半抛物线状态而上升。培养在32℃条件下,16天磷的转化率可达85.2%。

2、不同磷矿粉含量对ASP.32-4溶磷能力的影响

在上述麦麸葡萄糖培养基中分别加入1%、2%、3%的磷矿粉,30℃恒温静置培养14天,测定培养液中水溶磷含量,结果如表2。

表2结果表明:磷矿粉含量越高,pH值越高,磷的转化率越低。

3、ASP.32-4在不同培养条件下的溶磷能力用四种不同培养基,加1%的磷矿粉,

表3 ASP.32-4在不同营养条件下的溶磷能力

培养基	配方	pH	水溶磷 (P ₂ O ₅) %	磷的转化率 (%)	增加比
5%麦麸 2%葡萄糖	1% (NH ₄) ₂ SO ₄ 1%磷矿粉	2.95	16	69	163
3%麦麸、2%葡萄糖	“	3.80	14	56.5	131
20%土豆汁100ml、2%葡萄糖	“	3.85	12.3	46	108
2%葡萄糖	“	2.90	8.9	42.4	100

注 1、pH为培养10天后所测数值。2、数据为三次重复平均值。

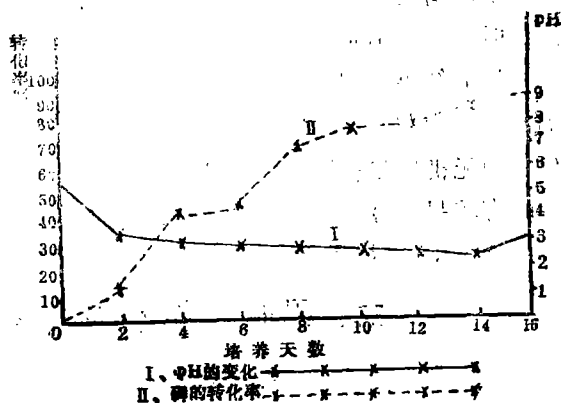


图1 ASP.32-4的溶磷曲线

表2 不同磷矿粉含量对ASP.32-4溶磷能力的影响

磷矿粉含量(%)	1	2	3
pH	3.35	3.45	3.60
磷的转化率(%)	77.1	58.8	39.6

30℃恒温静止培养10天后测定水溶磷含量，结果如表3。

试验结果表明：在不同营养条件下ASP.32—4的溶磷能力不同。以2%葡萄糖为基础添加麦麸优于20%土豆汁；而5%麦麸又优于3%麦麸。以2%葡萄糖磷的转化率为100，其它详见表3。

(二) Asp.32—4 溶浸液与几种酸溶磷能力的比较

为了验证ASP.32—4 溶浸菌液的溶磷能力，我们将该溶液与常用的几种有机酸（草酸、柠檬酸）和无机酸（硫酸、硝酸和盐酸）的溶磷强度进行了比较。几种酸的浓度均采用0.1N，磷矿粉含量为1%，溶浸时间为60小时，结果如表4。

试验结果表明：ASP.32—4 培养液的溶磷能力与0.1N硫酸接近，均高于其他几种无机酸和有机酸。同时试验还证明草酸有较强的溶磷能力，等当量的草酸其PH为1.60，其溶磷能力与硝酸、盐酸等无机酸近似⁽⁷⁾。

表4 Asp.32—4 与几种酸溶磷能力的比较

溶浸液	类别	酸浓度(N)	pH	速效磷含量(P ₂ O ₅ %)	转化率(%)
Asp.32—4 溶浸液	—	—	2.80	21.38	74.47
硫酸	酸	0.1	1.30	20.33	74.76
硝酸	酸	0.1	1.25	18.90	69.23
盐酸	酸	0.1	1.27	19.38	71.23
草酸	酸	0.1	1.60	18.83	69.22
柠檬酸	酸	0.1	2.25	6.88	25.13

注：数据为三次重复平均值。

三、黑曲霉溶磷菌株 Asp.32—4 产酸力的分析

据文献报导⁽²⁾⁽⁸⁾，土壤中难溶性无机磷酸盐溶解，其主要途径之一是靠微生物产生的有机酸。一般说来，微生物产酸力越高其溶磷能力越强。为此我们对黑曲霉溶磷菌株ASP.32—4进行了产酸力的分析测定。

(一) 色谱纸快速测定法

1、供试菌种：① M31，② Fo28，③ Asp.32—4，④ Asp.48—5。

2、测定方法：于内径为9Cm的培养皿内倒入2%的灭菌贫乏琼脂培养基（2%琼脂水），凝固后，在表面上再灌注10ml CP¹（或CP²）培养基⁽⁹⁾（配方见后）。冷凝后，在表面上放上灭菌圆形色谱滤纸（可用φ9Cm的普通滤纸代替），接种一小块（直径约0.5Cm）带琼脂的溶磷黑曲霉菌苔（预先在含1.5%NaCl的麦芽汁琼脂上培养4昼夜）。置32℃温箱中培养2天，取下滤纸，于室温下用吹风机吹干，然后用溴酚兰喷雾显色（0.75克溴酚兰溶于100ml 95%的酒精中，用时将原液稀释20倍）。按菌落周围有机酸显色范围判断该菌株的产酸力，以酸显色直径与该菌株菌落直径之差表示产酸力。测定结果如表5。

表5 不同黑曲霉溶磷菌株产酸力的比较

显色直径(cm)	酸环直径与菌落直径之差	
	CP ¹ 培养基	CP ² 培养基
Asp.32—4	6.20	1.60
Asp.48—5	5.40	1.50
Fo28	5.10	1.30
M31	3.90	1.00

注：数据为四次重复平均值。

从表5 结果看出：两种不同培养基（CP¹及CP²），不同溶磷菌株，其产酸力各不相同。其中以ASP.32—4产酸力最高，M31最低，其产酸力的顺序为ASP.32—4 > Asp.48—5 > Fo28 > M31。

(二) 总酸度滴定法

(1) 培养基

① CP¹培养基

蔗糖 30克 NH₄Cl 3.5克 KH₂PO₄ 0.5克 MgSO₄·7H₂O 0.5克
ZnSO₄·7H₂O 0.05克 FeSO₄·7H₂O 0.025克 蒸馏水 1000ml pH6.6

② CP²培养基

蔗糖 30克 NaNO₃ 5.6克 K₂HPO₄ 1.0克 MgSO₄·7H₂O 0.5克
ZnSO₄·7H₂O 0.05克 FeSO₄·7H₂O 0.025克 蒸馏水 1000ml pH7.6—7.7

③ HCP培养基

麦麸 50克 葡萄糖 20克 (NH₄)₂SO₄ 10克 蒸馏水 1000ml pH7.

(2) 方法:

用500ml三角瓶, 每瓶装一种培养基100ml, 灭菌后接种Asp.32-4孢子一环, 为便于校正以不接菌作对照, 每处理5次重复。置32℃温箱中培养, 每隔一定时间用雷磁25型酸度计测pH值, 用0.1N NaOH滴定总酸度(用酚酞指示剂)。

结果如表6、图2。

从表6、图2结果看出:

① 三种培养基的pH变化规律不同:

CP¹培养基曲线下降较快, 1~3天为最快, 3~6天缓慢; CP²培养基pH下降缓慢, pH值为中性和微碱性, 5天以后略有回升; HCP培养基曲线下降速率介于二者之间。

② 三种培养基产生的总酸度差别较

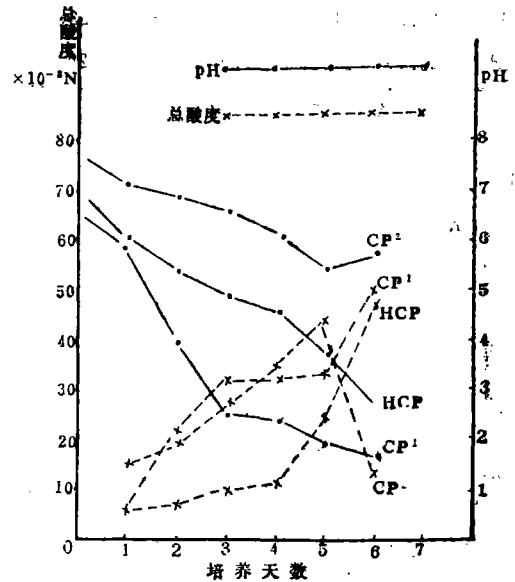


图2 Asp.32-4在不同培养基中的产酸曲线

表6 不同培养基上Asp.32-4的产酸力

培养基	时间 总酸度 起始 pH	1 天		2 天		3 天		4 天		5 天		6 天	
		pH	N	pH	N	pH	N	pH	N	pH	N	pH	N
CP ¹	6.60	5.87	5.84	3.96	20.09	2.49	31.46	2.43	32.36	1.87	33.56	1.70	49.32
CP ²	7.70	7.05	14.83	6.90	19.02	6.57	26.97	6.17	31.76	5.43	43.99	6.75	12.37
HCP	7.00	6.00	5.72	5.41	6.73	4.91	9.71	4.80	10.07	3.71	23.95	2.60	48.77

注: 表内当量(N)值各×10⁻³

大, CP¹培养基曲线上升速度较快, 总酸度值最高; CP²培养基5天后总酸度达最高点, 5天以后很快下降; HCP培养基曲线1~4天产酸较少上升平缓, 4天后上升较快。

(三) Asp.32-4产生草酸和柠檬酸的能力及其相关性

据文献资料报导^[10], 溶磷黑曲霉代谢过程中产生多种有机酸, 但以草酸和柠檬酸为

主。

测定方法与测定总酸度的方法相同。测柠檬酸含量用五溴丙酮比色法；测草酸含量用草酸钙沉淀、高锰酸钾滴定法，结果如表7及图3、4。

表7 不同培养基中草酸及柠檬酸的含量

类别 时间(天)	草酸 (mg/100ml)						柠檬酸 (mg/100ml)					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
CP ¹	11.99	12.50	13.20	6.25	9.99	12.30	3.00	51.00	96.00	68.50	49.30	30.00
CP ²	14.99	11.00	10.00	10.99	23.99	67.98	0.80	10.30	16.00	6.50	3.00	1.00
HCP	26.99	19.10	11.99	8.73	20.99	54.99	1.90	4.00	7.50	13.50	10.00	5.00

注：数据为四次重复平均值

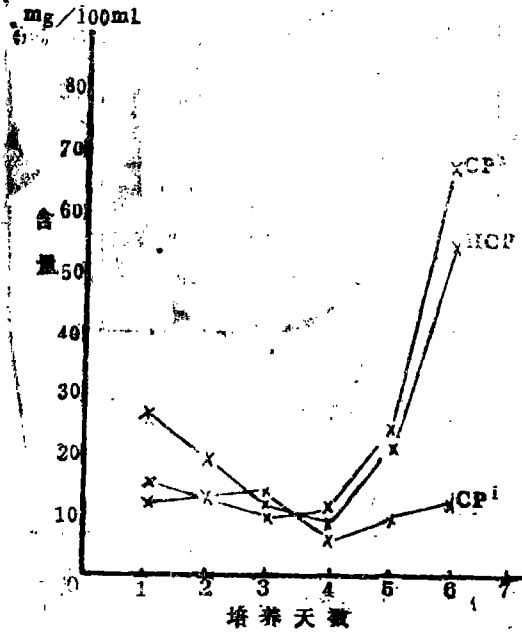


图3 草酸含量曲线

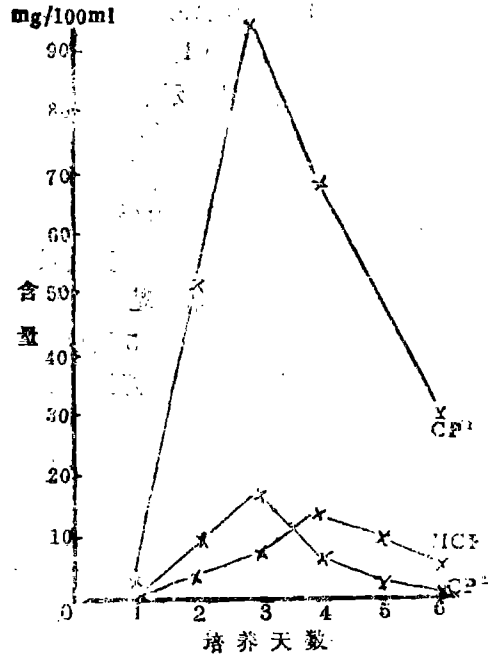


图4 柠檬酸含量曲线

从表7、及图3、4可以看出，Asp.32-4产酸种类与培养基组成有关。CP¹培养基有利于产生柠檬酸，32℃培养3天柠檬酸含量可达96mg/100ml，而CP²培养基为16mg/100ml，HCP培养基为7.5mg/100mg。CP²培养基有利于产生草酸，32℃培养6天草酸含量可达67.98mg/100ml，HCP培养基为54.99mg/100ml，CP¹培养基为12.30mg/100ml。此实验结果与И.Д.Касаткина^[9]报道相符。

再由图5、6、7看出，柠檬酸和草酸的含量成明显的负相关，与黑曲霉有机酸代谢规律相符合。微生物在好气条件下糖代谢过程中产生草酰乙酸，它既是柠檬酸的前体，又

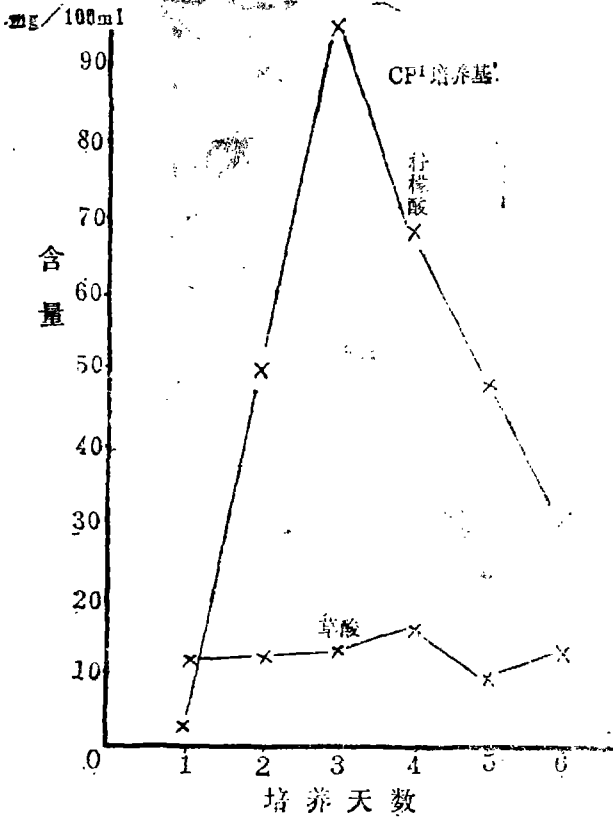


图 5 在 CP¹ 培养基中草酸和柠檬酸含量的相对曲线

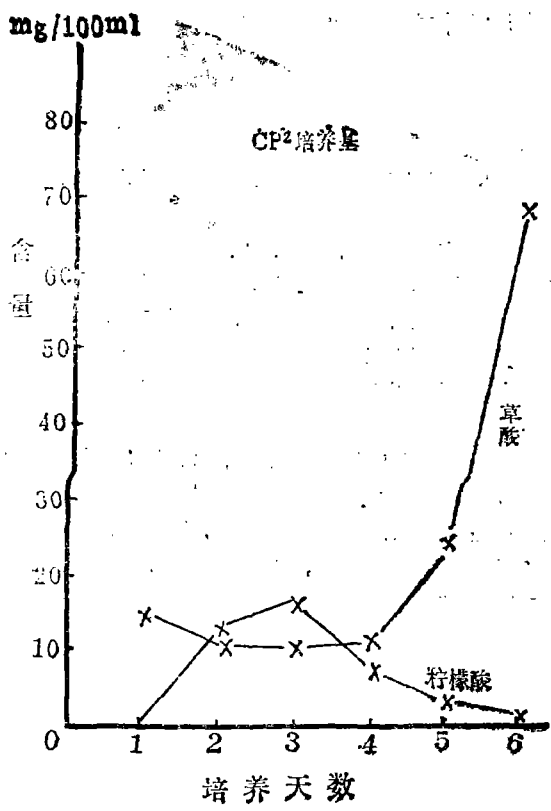


图 6 在 CP² 培养基中草酸和柠檬酸含量的相对曲线

可分解成草酸⁽¹¹⁾。因此在一定条件下：如培养基组成、pH值及温度的影响等，草酸和柠檬酸的累积成明显的负相关。

结 语

(一) 从吉林省不同地区植物根际中分离了黑曲霉100余株，从中筛选出 Asp. 32-4 有较强的溶磷能力。当培养液中磷矿粉含量为 1% 时，静止培养12天磷的转化率为85.4%。

(二) Asp. 32-4 的溶磷能力与培养基的组成有关。在含 2% 葡萄糖的培养基中加 5% 的麦麸及 1% 的 $(NH_4)_2SO_4$ ，溶磷效果最好。溶磷能力随磷矿粉含量的增加而降低。

(三) Asp. 32-4 溶磷菌株有较高的产酸力，其产酸强度（总酸度）、产酸种类与培养基的组成有关。CP¹培养基有利于产生柠檬酸，CP²培养基有利于产生草酸。在同一培养基内柠檬酸和草酸的含量成明显的负相关。

(四) Asp. 32-4 培养液的溶磷能力与 0.1N 的硫酸相近似，而高于 0.1N 的盐酸和硝酸，但溶浸菌液的 pH 均高于 0.1N 的无机酸，因而黑曲霉溶磷菌株的溶磷机理，除了酸溶以外，可能还有络合、螯合或沉淀等方面的作用，尚需进一步分析研究。

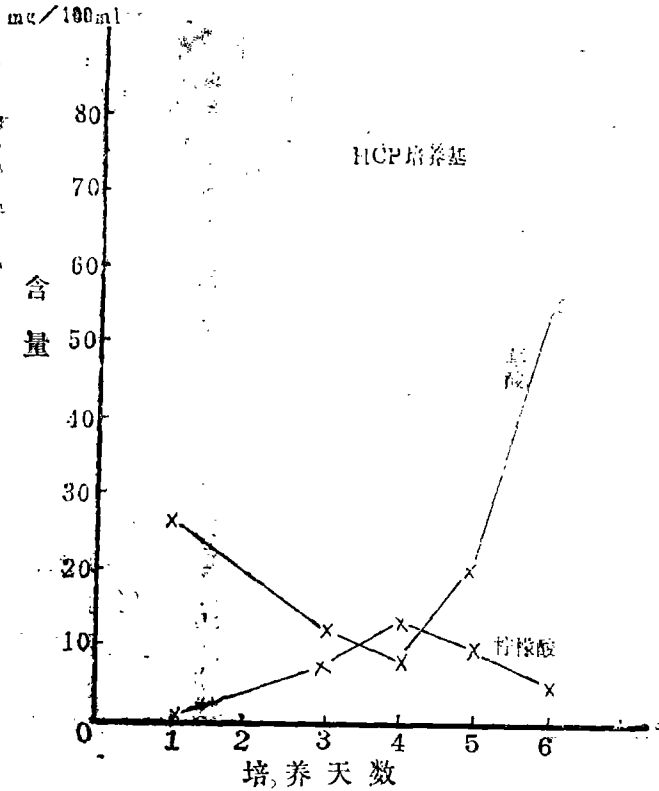


图7 在HCP培养基中草酸和柠檬酸含量的相对曲线

参 考 文 献

- (1) 中国科学院南京土壤所情报室：土壤中溶磷微生物的国外研究概况，土壤农化参考资料，1975年4月，P.1—6。
- (2) 黄德明：解磷微生物及其在农业中的应用，北京农业科技，1979. 4。
- (3) 河北省植保土肥所：黑曲霉分解磷矿粉能力的试验，植保土肥资料，1974年3月 P.1—5。
- (4) 河北省植保土肥所：黑曲霉分解磷矿粉大田应用试验，植保土肥资料，1975年5月，P.2—5。
- (5) 吉林农大土化系微生物教研室：草炭生物磷肥及其肥效试验总结（未发表）。
- (6) 吉林省微生物解磷协作组：微生物解磷试验的初步成果及今后意见，腐植酸类肥料科技资料选编，1977年12月。
- (7) 腐磷科研协作组：次腐酸及有机酸的解磷作用，腐植酸解磷资料汇编，1976年12月 P.9—13。
- (8) 徐文玉：土壤中的磷化物及其转化，1979，（未发表）。
- (9) И. Д. Касагкина И Пр., Икробнология, ХХХ Вып. 3, Стр 511, 1965.
- (10) 张淑风等：溶磷微生物的研究，№Fo28胞外溶磷机理的研究，1980，P1—2（未发表）。
- (11) 汤树德等：高效溶磷霉菌（AN2—7菌株）筛选、溶磷机制及其条件的研究。中国土壤学会土壤微生物专业会议学术交流论文，1980. 10。