

固氮肺炎克氏杆菌的产酸和解磷能力*

周 枫 马素凤 蒋有绎 张美庆
(北京市农林科学院土壤肥料研究所, 北京)

摘 要

本文报道了549、258属于肺炎克氏杆菌的这一类联合固氮细菌具有产酸解磷的能力。549在培养过程中能产生多种有机酸成分,使无机磷的有效性提高。它还能利用卵磷脂这种有机磷作为自己的磷源,在其培养过程中产酸量有一定限度,达到一定酸度时,培养环境中的酸基本上就不再增加,维持在一个相对稳定的水平。549、258产酸解磷的结果能够改善植物的磷素营养,从非豆科植物根际联合固氮的研究角度考虑,可以认为产酸的联合固氮细菌具有固氮和解磷的双重性。

关键词 肺炎克氏杆菌 产酸 解磷

针对土壤中磷固定化的严重情况,不少学者为解决磷的有效化进行了多方面的研究,其中利用微生物的解磷作用以提高磷的利用率是一种有效的方法。国内外文献都曾报道过从土壤、植物根系、种子表面和水体等各种生态环境中分离出多种解磷微生物,其中包括细菌、放线菌、霉菌和酵母等。它们有的能产酸,有的能分泌胞外酶以促使土壤中难溶性磷的有效化¹⁾。有些文献报道了施用磷细菌肥料对植物生长有良好的促进作用。Cepreeba H·B. 在加磷酸钙和磷灰石的黑钙土和灰色森林土上进行玉米盆栽试验,接种荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*),能使玉米增产10—14%²⁾。另有报道用假单胞菌属(*Pseudomonas*)的细菌可以刺激棉花种子的发芽,把它和圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)混合施用能增加作物产量。此外,还有些文献介绍用解磷巨大芽孢杆菌(*Bacillus megatherium phosphaticum*)³⁾,黑曲霉(*Aspergillus niger*)等微生物作解磷试验,认为在一定程度上是有效的。关于固氮细菌是否直接有解磷的作用,国内外都还未见报道。肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)具有固氮酶,能够固氮。近年来从一些植物的根际分离到的肺炎克氏杆菌,已经成为一种重要类型的联合固氮细菌,但也未曾有过解磷研究的报道。我们的研究发现固氮肺炎克氏杆菌的两个菌株有产酸解磷的能力,并且对植物的磷素营养有一定的影响。

* 中国科学院科学基金资助的课题。本院中心实验室冯国洲、赵建秋两位同志负责有机酸的测试,在此表示感谢。马素凤是河北农业大学土化系85届毕业生。

材料和方法

一、供试菌种

549(*K. pneumoniae*)，本所分离得到^[4]；258(*K. pneumoniae*)，引自科学院微生物所；磷细菌(*Bac. megatherium* P.)引自中国农科院土壤肥料研究所。

二、培养基

培养549、258用Döbereiner无氮培养基^[5]，碳源改用蔗糖；培养磷细菌用磷细菌合成培养基^[6]。

三、磷的测定

用Olsen法测速效磷：用硫酸—过氧化氢消化，钼锑抗法测全磷。

四、一次产酸和连续产酸量的测定

在38毫升血清瓶内注入10毫升液体的Döbereiner无氮培养基，15磅、30分钟高压灭菌。菌种预先活化，然后制成单细胞菌悬液，吸0.1毫升菌液进行接种，28℃保温培养。

1. 一次产酸量的测定：每隔4小时取出2瓶，在无菌室内加2滴1%酚酞指示剂，用标准氢氧化钠滴定，计算产酸量，同时测pH和菌数，一直测定到培养了68个小时为止。

2. 连续产酸量的测定：培养4小时后取出小瓶滴定，测产酸量，然后将小瓶放回恒温箱继续培养，过4小时再取出滴定，如此反复滴定，直至80个小时为止，同时每4小时另用一瓶，测pH和菌数。用接等量死菌的小瓶作对照，以消除初始的H⁺量和培养基的缓冲容量。

五、549菌株产酸的种类

将培养24小时的549菌液经超速离心(3万转/分，30分钟)得到上清液，作为测试样品，注入HP1090型高速液相色谱仪，测其有机酸的组分从样品出峰的保留时间与标准酸出峰保留时间相比较，分析细菌培养液中所含的有机酸种类。

六、549对有机磷的利用

用液体磷细菌合成培养基，其中磷源分别换成磷酸三钙和卵磷脂，然后接入549，28℃振荡培养48小时后，用72型分光光度计波长550 μm测定光密度值，比较549在不同磷源培养基中的生长情况。

七、解磷效果的测定

称15克干净河砂放进38毫升血清瓶中，加入重量为0.5%的磷酸三钙，混匀、灭菌，再加3毫升低氮低磷营养液(每升蒸馏水中含0.5克牛肉膏和0.5克蛋白胨)。然后分别接种549、258和磷细菌，28℃保温培养。20天后将瓶中砂子用20:1的0.5M NaHCO₃浸提，测浸提液中的速效磷含量。

八、生物鉴定

称300克干净河砂放进塑料杯中，加入重量为0.1%的磷酸三钙，混匀；大麦种子用85%酒精表面消毒后进行播种。分别接种549、258和磷细菌，每种菌接种量为2毫升菌液，再加10毫升低氮低磷营养液。出苗后每杯留苗5株，适时滴加营养液，调节杯内的湿度，30天后将植株取出洗净称鲜重。烘干后称干重，并测定全磷含量。

结果与讨论

一、产酸量与细菌的生长

图1中曲线1和曲线2表示549一次培养条件下的产酸量和细菌总数, 反映出549在正常培养时(培养时间长短有所不同)酸的积累和菌数消长的变化情况。曲线3和曲线4表示549在连续滴定、培养条件下的产酸量和菌数变化。从图1中的曲线1可以看出细菌在培养4小时后就使环境中的酸度达到一定的值, 即使延长培养时间, 产酸量也始终在 $0.03-0.05 \text{ meH}^+$ 的范围内变动, pH值也只是在4-5之间变动。说明549在繁殖代谢过程中很快就能分泌出大量的酸, 使环境中 H^+ 的浓度达到 0.03 me 以上的数量, 以后就很少或不再产酸, 培

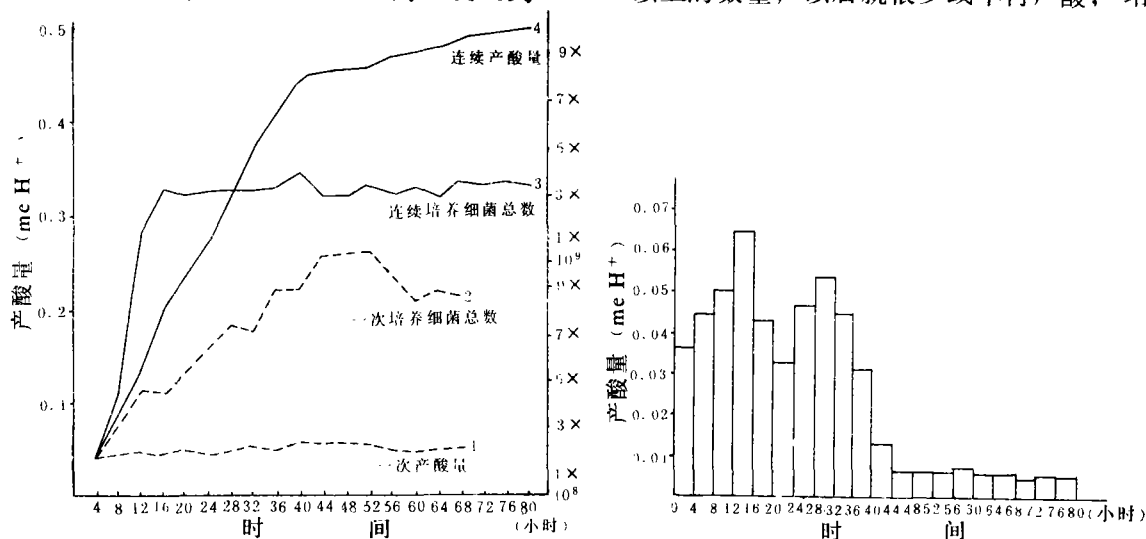


图1 549在不同培养方式下的产酸量和细菌总数 图2 549在连续培养方式下的每4小时单位产酸量

培养基中的酸度始终保持在一个酸性的平稳状态。由于培养基是限量的, 培养环境又是封闭的, 酸的积累势必会抑制细菌的繁殖。所以从曲线2可以看出在这种情况下, 细菌的生长速度比较缓慢。接种后52小时, 菌数才达到最大值, 而且每毫升菌液的菌数仅为 1.28×10^9 。而在连续培养情况下, 由于及时中和了细菌所产生的酸, 培养基的酸度经常处于中性状态, 对细菌的增殖创造了一个有利的环境。所以从图1中曲线3可以看出细菌的生长几乎没有迟缓期, 很快就进入对数生长期, 仅16个小时菌数就达到最大值, 时间比前者提前了36小时, 而且菌数为每毫升 3.16×10^9 , 比前者增加2.5倍。从曲线1和曲线4比较两种培养方式的产酸量。16小时的产酸量前者(滴定1次)为 0.0437 meH^+ ; 后者(滴定4次的累计数)为 0.1965 meH^+ , 两者相差4.5倍。

图2为连续培养时细菌每4小时的单位产酸量。把图2和图1中的曲线3和4联系起来看, 可以发现中和酸的情况下, 培养的前16个小时细菌生长最快, 4小时单位产酸量也急剧增加, 到16小时达到高峰, 以后菌数不再增加, 但一直保持最高水平, 而4小时单位产酸量仍很高, 直到40小时后才下降。对于培养40小时后菌数保持高水平而产酸量减少的原因, 我们认为可能是培养中、后期, 培养基的养分已经不多, 加上每4小时滴定一次, 培养基酸度经常处于变化状态, 对细菌的生活带来一定的影响, 所以菌体基本不再增殖, 也很少再产酸, 处于一个维持生存的状态。

二、解磷

Sperber (1958) 在研究微生物分解磷矿粉的强度时发现解磷强度与微生物产生的酸有密切关系。一般说来, 培养基的酸度愈高, 解磷愈多。但也有文献报道认为有的微生物在培养时, 基质酸度不高, 却有相当数量的磷被释放出来^[1]。因此微生物的解磷能力, 不仅取决于它所产生的酸的数量, 还取决于酸的种类。图 3 表示 549 培养液用高压液相色谱仪测出的峰图, 经与标准酸对照分析, 初步认为 549 产酸的主要种类有 α -酮戊二酸、顺乌头酸、柠檬

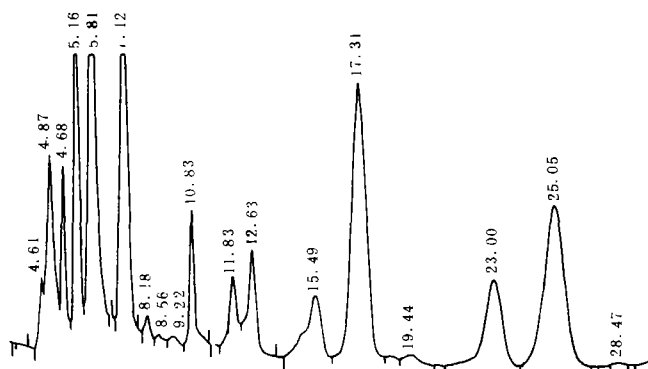


图 3 549 培养液中有有机酸用高压液相色谱分析的图谱

酸、草酸、乳酸乙酸、琥珀酸等有机酸。此外我们还测定了以上几种不同的有机酸 (50 毫升 0.01N 的) 对 0.05 克 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶磷能力 (见表 1)。

表 1 不同有机酸对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解能力

0.01N / 50ml	草 酸	延胡索酸	苹果酸	琥珀酸	柠檬酸	羟基乙酸	丙酮酸	乳 酸	盐 酸
P_2O_5 ppm	11.0	14.0	10.3	9.7	9.9	11.5	7.8	15.3	14.5

从表 1 可以看出不同有机酸对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶磷能力不同, 但都有作用。无疑 549 产生的酸对难溶性磷的转化起了积极的作用。

表 2 比较了不同菌株的解磷能力, 从结果可以看出 549、258 和磷细菌这三种菌都能使培养介质中的难溶性 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 转化为可溶性磷释放出来, 549、258 这两株肺炎克氏杆菌

表 2 不同菌株的固氮和解磷效果

	549	258	磷细菌	对 照
Nase nmol 乙烯 / 瓶 hr	0.70	0.27	—	—
速效磷 (P_5O_2 ppm)	9.20 S=0.71	9.18 S=1.95	7.84 S=0.87	6.55 S=0.07
接菌 - CK	2.65 *	2.63 *	1.29	

注: $F=4.219$, $F_{0.05}=3.86$, 差异显著; 5% L. S. D.=2.107

的解磷能力明显高于磷细菌。后者解磷效果不显著的原因可能是其不能固氮,在低氮低磷的培养条件下生长不良,影响其解磷能力。

549不仅对无机磷有分解释放的效果,对有机磷的分解释放同样表现出积极的效果。从表3看出在以卵磷脂为磷源的培养液中,549和磷细菌都能生长,而且生长的繁茂程度明显大于磷酸三钙为磷源的培养液。因此它们解磷的途径可能是多种的,不仅有酸解,还有酶解。

表3 不同磷源的利用情况

项 目	磷 酸 三 钙		卵 磷 脂	
	固体培养	液体培养(E)	固体培养	液体培养(E)
549	++	0.021	++++	1.16
磷细菌	+	0.005	++++	1.09

注: +: 生长; ++: 菌落较多; ++++: 菌落长得满,而且厚; (E): 消光值

三、生物鉴定

表4列出了大麦幼苗试验结果,从表中数据可以看出:用这3个菌接种大麦,无论接活菌或死菌,对植株干重的增加都有作用。但只有接活菌与不接菌的对照相比,统计分析结果才达到差异显著标准。植株含磷率只有接549的比对照高。全盆含磷量接活菌的3个处理都

表4 不同菌株接种大麦幼苗的效果其

项 目		549		258		磷细菌		对 照
		活菌	死菌	活菌	死菌	活菌	死菌	(不接菌)
植株干重	克/盆	0.574	0.552	0.610	0.537	0.592	0.539	0.427
	S	0.147	0.021	0.017	0.032	0.044	0.057	0.021
	—死菌	0.022		0.073		0.053		
	—对照	0.147 *		0.183		0.165 *		5 % LSD = 0.067
植株含磷率	%	0.402	0.306	0.289	0.310	0.297	0.296	0.337
	S	0.073	0.064	0.045	0.015	0.024	0.024	0.026
	—死菌	0.096		—0.021		0.001		
	—对照	0.065		—0.048		—0.04		5 % LSD = 0.097
全盆含磷量	克/盆	0.230	0.168	0.175	0.165	0.176	0.161	0.1435
	S	0.037	0.031	0.022	0.011	0.015	0.019	
	—死菌	0.062 *		0.10		0.015		
	—对照	0.087 *		0.031		0.033		5 % LSD = 0.050

注: S 是标准差

比对照有不同程度的增加,但只有接549的效果最好,差异达到显著标准。故可以初步认定,

549在改善植物磷素营养方面有一定作用。其效果甚至高于解磷大芽孢杆菌。

结 论

一、549、258属于肺炎克氏杆菌的这一类联合固氮菌具有产酸和解磷的能力。

二、549在培养过程中能产生多种有机酸成分,使难溶性磷的有效性提高,此外549还能转化有机磷。

三、549在培养过程中,产酸量是有一定限度的,当达到一定酸度时,环境中的酸量就会维持在一个相对稳定的水平。

四、549、258产酸解磷的结果能够改善植物的磷素营养,从非豆科植物根际联合固氮的研究角度来考虑,可以认为产酸的联合固氮细菌具有固氮和解磷的双重性。

参 考 文 献

1. 黄德明: 解磷微生物及其在农业中的应用《农业科技资料》(北京市农科院资料室) 1979(4), 20-25
2. 张美庆等: 磷细菌肥料《微生物学通报》6(3), 1979, 1-4
3. 蒋有绎等: 玉米根际联合共生固氮体系的研究《微生物学报》23(4), 1983, 380-383
4. Döbereiner, J., J. M. Day In Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation 1976, 518-538
5. 中国科学院林业土壤研究所编: 《土壤微生物分析方法手册》, 科学出版社, 1960, 36-37

STUDIES ON ACID PRODUCTION AND PHOSPHATE RELEASE BY *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Zhou Feng, Ma Sufeng, Jiang Youyi, Zhang Meiqing
(Institute of Soil and Fertilizer Research, Beijing Municipal
Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing)

ABSTRACT

Two strains 549 258, which belong to *Klebsiella pneumoniae* have the ability of producing acids and releasing phosphate. In culture process, 549 can produce many kinds of organic acids and improve the effectiveness of mineral phosphate. 549 can also use organic phosphate as nutrient.

The amount of produced acids in culture medium is limited to a certain level. 549, 258 can increase the phosphate supply for crops, so some nitrogen-fixing bacteria that can also produce acids have double characters: fixing nitrogen and releasing phosphate.

Key words: Producing acid; Releasing phosphate; *Klebsiella pneumoniae*