

磷细菌肥



农业出版社

S144.9

磷 细 菌 肥

山东农学院农药厂编

农 业 出 版 社

磷 细 菌 肥

山东农学院农药厂编

农业出版社出版 新华书店北京发行所发行

农业出版社印刷厂印刷

787×1092 毫米 32 开本 2.5 印张 60 千字

1979 年 4 月第 1 版 1979 年 4 月北京第 1 次印刷

印数 1—23,000 册

统一书号 16144·1865 定价 0.22 元

前 言

近年来，随着氮肥化学工业的迅速发展，农田氮肥使用量日益增加。但是，如果植物缺乏磷素营养，氮肥的作用就不能充分发挥。特别是在土壤缺磷的地区，这一矛盾尤为突出。因此，当前农业生产上迫切需要广辟磷肥来源，增施磷肥。一方面要增产化学磷肥，另一方面要发掘自然界的磷肥资源。土壤中存在大量植物不能利用的无效磷，转化这些无效磷为有效磷，是开辟自然磷源的重要途径，而土壤微生物，特别是溶磷微生物在这方面起着主导作用。因此，近年来国内外对溶磷微生物的研究和应用很重视，并有了较大的发展。

我院自一九七一年起开展了对磷细菌的研究工作。通过田间肥效试验，初步证实磷细菌肥在山东省土壤气候条件下，在各种主要作物上有一定增产效果。此后，又开展了以无机磷细菌为重点的菌种筛选工作。近两年来，我院配合中国科学院南京土壤研究所，对磷细菌的作用机制进行了初步探讨。

当前，在我国生产和应用磷细菌肥的已有二十个省市，尤其是华北几省，每年使用面积达数千万亩，对提高农作物单位面积产量，促进农业生产起了一定的作用。

为了适应进一步发展磷菌肥的生产、应用和科学实验活动的需要，我们编写了这本小册子，供从事这方面工作的农村四级科技网人员、基层干部和知识青年参考。由于我们水平有限，对磷细菌的研究工作做得不多，对群众经验总结学习也不够，书中必然存有不少缺点和错误，恳切希望广大读者批评指正。

编 者 一九七八年七月

目 录

一、植物的磷素营养和溶磷微生物.....	1
(一) 磷对植物的作用	1
(二) 磷在土壤中的存在形态及其转化	2
(三) 微生物在磷的转化中的作用	3
(四) 溶磷微生物研究的发展概况	6
二、磷细菌的分离筛选	9
(一) 菌源标本的采集	10
(二) 菌株的分离和初筛	10
(三) 有效菌株的复筛	12
三、几种磷细菌简介.....	14
(一) “大芽孢”磷细菌	14
(二) “83—2”磷细菌	15
(三) “T—39”磷细菌	18
四、关于磷细菌的作用机制	21
(一) 磷细菌的溶磷作用	22
(二) 磷细菌的刺激作用	24
(三) 磷细菌对土壤中磷的转化及植物吸收磷的影响	29
五、磷细菌肥的生产.....	34
(一) 菌种	34
(二) 种子菌	36

(三) 摇瓶培养 (1—2级液体培养)	36
(四) 液体扩大培养 (3—4 级液体培养或发酵罐液体通 气培养)	37
(五) 固体扩大培养 (1—3 级固体培养或固体发酵培养)	39
(六) 后处理	41
(七) 成品检验	43
(八) 磷细菌肥的贮存	44
六、磷细菌肥的施用和增产效果	45
(一) 一般施用方法	45
(二) 磷细菌肥施用的条件	46
(三) 磷细菌肥与其他菌肥、化肥及农药的混合施用	47
(四) 磷细菌肥的增产效果	48
(五) 磷细菌肥对作物产量品质构成因素的影响	54
七、磷细菌肥生产检验操作技术	58
(一) 磷细菌细胞形态的检验	58
(二) 磷细菌培养液及成品中含菌量的测定	62
附录	70
(一) 培养基	70
(二) 染色液	74
(三) 消毒剂	75

一、植物的磷素营养和溶磷微生物

（一）磷对植物的作用

磷是植物生长不可缺少的重要元素。在植物体内，磷主要存在于核酸、磷脂和植素等成分中。核酸是细胞核的主要成分，磷脂是原生质的重要成分，缺少磷就要影响细胞的分裂和植物的生长发育，特别影响植物的分生组织。植素是植酸和钙、镁结合而形成的盐类，大量贮存于种子中，种子发芽时，其中贮存的磷逐渐转移到新生细胞中，对植物的发芽、生根影响很大。如果土壤不能为植物继续提供磷素营养，细胞的形成和根的生长就会受到限制，因此磷素营养在植物苗期特别重要。磷还能促进植物体内糖类化合物的运输和淀粉的转化，对油脂代谢也有很大关系。

增施磷肥可以促进植物根系生长，次生根增多，提高植物的吸收能力，增强植物的耐寒、耐旱和耐盐能力。对禾谷类作物，能增加分蘖数、有效穗数、粒数和千粒重。对移栽作物，能促使提早生根返青，提高成活率，并有防止倒伏的作用。对油料作物，能提高含油量。对多种果实，能增进品味，提高耐贮运性。磷能促进植物的代谢作用和生长发育，缩短生育期，提早成熟。

(二) 磷在土壤中的存在形态及其转化

土壤中的磷主要来自土壤母质、生物遗体和施用的肥料。土壤含磷总量一般为 0.05—0.20%。华北石灰性土壤的含磷量为 0.12—0.16%，江苏省徐州、淮阴地区土壤的含磷量为 0.10—0.20%。此数看来虽小，若换算成一亩农田 0—20 厘米耕层土壤中的含磷量，就有几百斤之多。亩产粮食 400—500 斤，仅需磷 5—6 斤，但往往仍感磷的不足，其原因在于土壤中的磷是以多种形态存在，但并不能完全为植物所吸收利用。植物吸收利用的主要是可溶性的含磷化合物，而这部分有效磷只占全磷量的 1% 左右。具体来说，一亩地耕层土壤中的有效磷含量为 1—7.5 斤，多数是 2—4 斤，其余绝大部分的磷则以多种形态固定在土壤中，不能为植物吸收利用。

磷在土壤中存在的形态，基本上可以分为无机磷化合物和有机磷化合物两大类。无机磷化合物约占全磷的 40—75%，除少量可溶性磷酸盐外，一部分是由磷酸与钙、铁、铝、氟等结合而形成的不溶性磷酸盐，如磷酸钙、铁铝磷酸盐等；一部分与粘土矿物相结合；而在多种土壤中，特别是在耕层下部的磷，则往往以粉状磷灰石的形态存在。这些形态的无机磷化合物都很难为植物利用，一般微生物也难以分解。有机磷化合物存在于土壤有机质中，约占全磷的 25—60%，其来源主要是植物残体（含磷量为干物质的 0.1—0.5%），部分来自动物排泄物（有机肥料），还有微生物的残体（如真菌含磷量为干物质的 0.5—1%，细菌为 1.5—2.5%）。有机磷化合物的主要形态是核酸、磷脂和植素。虽然在灭菌的培养液

中核酸和植素可作为植物的磷源，但在土壤中却往往与土壤成分相互作用而降低了溶解度，例如与钙、铁、铝等作用生成难溶的含磷化合物；在酸性条件下，还可为粘土矿物所固定；在某些情况下，核酸、核蛋白也可为斑脱土所固定，等等。因此土壤中的有机磷化合物基本上是不能被植物直接利用的形态。

但是，磷和其他物质一样，在自然界存在的各种形态并不是固定不变的，而是不断地互相转化。无效磷可以转化为有效磷，有效磷也可以转化为无效磷，而每一转化过程又各有其一定的条件和制约因素。磷在土壤中的移动性较小，其转化循环与碳、氮、硫等元素相比，局限性较大，主要转化过程有：①植物根系分泌物和微生物的溶解作用或其他作用释出 H_2PO_4^- ；②植物、微生物、动物合成有机磷化合物；③微生物分解动植物残体中的有机磷化合物；④土壤成分对无机磷或有机磷化合物的固定。对植物来说，是磷的有效化和固定化两个方面在交替进行。即使是施入土壤中的磷肥，也有相当大的部分通过不同转化过程而被固定，其实际利用率很低，通常只有 15—25%。因此，为了改善植物的磷素营养，除了施用磷肥外，通过各种途径促进土壤中的无效磷转化为有效磷，就具有十分重要的意义。

（三）微生物在磷的转化中的作用

微生物在自然界参与磷的生物循环，作用是多方面的，既有使有效磷固定化的合成作用，也有使无效磷有效化的解磷作用。微生物的特点是个体微小，繁殖快，存活时间短，

生命活动旺盛。它们对物质的转化，总的来说，分解作用强度大于合成作用。因此，微生物是推动土壤中磷的有效化的重要因素。

微生物分解含磷化合物的作用，基本上可分为有机磷化合物的分解和无机磷化合物的分解两个方面。前者主要是微生物产生的各种酶参与的结果，如核酸或磷脂只有在相应酶的作用下才能分解。有机磷化合物在土壤这个复合体中变化十分复杂，往往形成一些极难分解的产物。如植素在酸性土壤中易与铁铝结合而形成很难溶解的化合物；有机磷化合物在泥炭、腐殖质中，可与某些有机质形成络合物，等等。这些复杂的物质只有在微生物相应酶的作用下才能分解。如芽孢杆菌对植素的水解是根际有效磷的一个重要来源；植素是在细菌产生的植酸酶的作用下水解的。研究荧光假单孢菌和解磷巨大芽孢杆菌分解卵磷脂和核酸的结果表明，磷酸酶是上述有机磷化合物分解的主要因素。此外，这两种细菌对腐植酸的分解能力也与它们分泌的多酚氧化酶的强度有关。

微生物促进磷的有效化的另一重要方面，是对土壤中无机磷化合物的溶解作用。这主要是它们在生命活动中产酸的作用结果。微生物产生的酸，一类是无机酸，如在呼吸作用中产生的 HCO_3^- ，化能自养细菌产生的 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 等，对这一类酸的作用现已比较明确。另一类是有机酸，也是微生物代谢过程中的产物。微生物产生的有机酸种类很多，大都有溶磷作用。对这一类物质的研究，已日渐引起重视。现在已知植物根际微生物对许多不溶性磷酸盐有溶解作用，并已从植物根际分出多种溶磷细菌。这些细菌可以产生甲酸、乙

酸、丙酸、乳酸、乙醇酸、草酰酸、琥珀酸， α -羟基酸等有机酸，都有溶解磷酸三钙的特性。其中以 α -羟基酸的反应活性最强。微生物产生的有机酸中还有葡萄糖酸，对难溶性磷酸盐也有溶解作用。这种酸及一些羟基酸，可与钙、铁等离子构成络合物，从而提高了磷酸盐的溶解度，络合物的稳定性越大，磷酸盐的溶解度越高。已知形成葡萄糖酸的细菌多系假单胞菌属（*Pseudomonas*）的种。这种酸往往在细菌转化糖时形成，对多种矿物有溶解作用，甚至可以溶解难溶的天然磷灰石。另据对巨大芽孢杆菌等细菌研究的结果，这些细菌产生的有机酸类主要是乳酸和柠檬酸；在土壤中，它们产生葡萄糖酸的量则大于乳酸或乙醇酸。可以认为，微生物在代谢过程中通过呼吸作用（有氧呼吸或无氧呼吸）分解糖类碳源，可以产生多种有机酸。这些有机酸在土壤中对无机磷化合物的溶解起着重要作用。

在微生物参与的磷的转化中，与上述有效化过程相对立而存在着有效磷的固定化过程。微生物需要吸收一定量的可溶性磷，合成菌体物质，因而将可溶性磷转化为有机磷化合物。微生物吸收的可溶性磷有的是原来存在于土壤中的，有的是由施肥而加入土壤的，有的是微生物分解有机磷化合物或无机磷化合物的产物。这些可溶性磷经微生物吸收后合成微生物体的有机磷化合物而暂时被固定。只有在微生物个体死亡后，才以有机磷形式参与生物循环而分解释放出来。

总之，土壤中的磷在很多情况下是无效态的。因此，利用微生物的作用促进土壤中磷的有效化过程，提高植物的磷素营养和作物产量，就成为土壤微生物学的一项重要任务。

从五十年代以来,“溶磷微生物”(使含磷化合物有效化的微生物)就成为土壤微生物学的重要研究对象。

(四) 溶磷微生物研究的发展概况

早在十九世纪,有的土壤学家就曾指出土壤微生物对磷的转化作用。二十世纪初,在欧洲相继有人研究了土壤中微生物转化磷的过程。一九〇八年,萨开特(Sacket)开始以平板法研究溶磷微生物。一九一六至一九二二年,李普曼(Lipman)和瓦克斯曼(Waksman)曾以硫杆菌进行磷灰石的转化试验。到三十年代,苏联列宁格勒农业微生物研究所曾经较深入地研究了土壤中磷与微生物的关系,从磷的生物循环研究了土壤中磷的状况。与此同时,各国的土壤微生物学者对土壤中磷与微生物的关系也进行了许多研究。一九三五年,明基娜(Менкина)从黑钙土、泥炭及灰化土中分离出几株有芽孢杆菌和无芽孢杆菌,通过对分解有机磷化合物(卵磷脂、核酸)能力的比较,选出了解磷巨大芽孢杆菌(*Bac. megatherium* var. *phosphaticum*)和解磷珊瑚红赛氏杆菌(*Serratia carollera* var. *phosphaticum*),推动了以人工培制磷细菌剂接种农作物的试验研究,是应用磷细菌肥的开端。五十年代中期,在苏联对磷细菌剂和其他菌剂进行了较广泛的试验和应用。五十年代末至六十年代初,磷细菌逐渐受到世界范围的重视。英、美、法及东欧各国在磷细菌的分离筛选、溶磷机制、增产效果等方面,都进行了一些研究工作。

六十年代以前的研究,着重在明基娜分离的巨大芽孢杆

菌的基础上进行试验。六十年代以后，各国关于溶磷微生物的研究逐渐发展，研究对象除巨大芽孢杆菌外，还有另外一些芽孢杆菌的种，如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、矮小芽孢杆菌 (*Bac. pumilis*)、多粘芽孢杆菌 (*Bac. polymyxa*)、短小芽孢杆菌 (*Bac. brevis*)、环状芽孢杆菌 (*Bac. circulans*)、胶冻芽孢杆菌 (*Bac. mucilaginosus*)，即硅酸盐细菌；也有其他属的细菌，如埃希氏杆菌属 (*Escherichia*)、假单孢菌属 (*Pseudomonas*)、色杆菌属 (*Chromobacter*)、橙色杆菌属 (*Flavobacterium*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)，等等；此外也有人发现某些球菌、酵母菌、真菌、放线菌等具有溶磷作用。从六十年代迄今，研究较多的是假单孢菌属的细菌，如萤光假单孢菌 (*Ps. fluorescens*)、放射假单孢菌 (*Ps. radiobacter*)、草生假单孢菌 (*Ps. herbicola*)、纤细假单孢菌 (*Ps. gracilis*) 等。近来，西班牙研究者从园土中分离出一株假单孢菌，除有溶磷作用外还能固氮，定名为 *Ps. azotocolligans*。对溶磷菌根也有人进行了一些研究。

在我国，解放后不久，随着农业微生物工作的开展，也开始了溶磷微生物的应用和研究。最初引进了苏联的解磷巨大芽孢杆菌。一九五四年，东北农业科学研究所曾筛选出一株巨大芽孢杆菌的变种，与引进的有机磷细菌基本相似而略有差异。其后这两株菌种即在我国各地推广应用，群众称之为“大芽孢”磷细菌。一九五四年，中国科学院林业土壤研究所曾分离筛选出四株有机磷细菌，均为假单孢菌属。一九五五年，华北农业科学研究所自小麦根际土壤中分离出一株产酸的无芽孢杆菌，对磷酸三钙和磷矿粉有较高的分解能

力。一九五八年，湖南省农业科学研究所也曾分离出一株产酸较强能分解磷矿粉的格氏阴性小杆菌。

在无产阶级文化大革命中，三大革命运动蓬勃开展，科学实验为生产服务的运动掀起了新的高潮。农业微生物的应用和研究逐渐形成了规模宏大的群众运动，全国不少地区和单位进行了溶磷微生物特别是磷细菌的分离筛选，肥效试验以及大田推广等工作。一九七〇年至今，除原有的“大芽孢”有机磷细菌外，新的菌种主要有：无机磷细菌“83—2”（山东农学院）、无机磷细菌“712”（山东省农业科学院）、解磷黑曲霉“31”（华中农学院）、无机磷细菌“T—39”（中国科学院南京土壤研究所）、氧化硫杆菌（山东大学生物系、山东泰安地区农业科学研究所）、黑曲霉F—082（西北水土保持生物土壤研究所）等，其中以“大芽孢”、“83—2”、“T—39”三个菌种在当地和其他地区推广应用较广。近年来，有关单位正在调查总结群众经验的基础上，对溶磷微生物的解磷机制、生产工艺技术、有效使用方法等进行深入的探讨和研究。

二、磷细菌的分离筛选

利用微生物的作用促进土壤中磷的有效化，是改善植物的磷素营养解决磷肥不足的重要途径，其具体任务就是利用一定方法从自然界复杂的微生物群中分离筛选有效的高性能的菌种，通过生产试验确定其增产效果后，用人工方法大量培制成微生物肥料，施用于农田以提高作物的产量和质量。到目前为止，国际国内对溶磷微生物的筛选，以溶磷细菌（简称磷细菌）方面的工作做的较多，而在磷细菌的筛选上又以无机磷细菌为主。

由于对溶磷微生物的作用机制和解磷动态了解尚少，当前在分离筛选溶磷微生物的方法上还有很大的局限性。从现有方法来看，主要依据是微生物分解或转化植物难以利用的含磷化合物的能力，或促进植物吸收磷素营养的能力。其基本方法是：在缺磷的合成基础培养基中，加入控制磷源。如分离有机磷细菌时，通常以卵磷脂为控制磷源；分离无机磷细菌时，通常用磷酸三钙或磷矿粉为控制磷源。使用上述加有控制磷源的培养基，从一定的菌源标本中分离初筛出具有一定溶磷能力的菌株，再经过多次复筛选出效能较高的菌株。由于所用控制磷源的种类有限，因此筛选的磷细菌种类就受到很大的限制。对分离筛选磷细菌的方法尚有待探讨和

改进，这也是微生物科研的一项具体任务。

下面仅就目前使用的分离筛选无机磷细菌的一般方法加以介绍。

(一) 菌源标本的采集

菌源标本包括土壤、堆肥、湖泥、植物根系等可能含有大量磷细菌的物质，通常以根际土壤和根系为主。分离无机磷细菌时，可重点由缺磷的土壤如红壤、红粘土、天然磷矿或磷矿粉堆等处采集标本。为使磷细菌对不同土类有比较广泛的代表性和适应性，可从不同地点多采几种土样。如山东农学院在一九七一至一九七三年分离筛选磷细菌时，从山东省各地以及江苏、福建、河北、云南等省采集了土样 596 个，共分离初筛了无机磷细菌 373 株。

采集土壤标本时，采土深度以 5—15 厘米为宜。土样分装塑料袋，保持新鲜，防止干燥。但也不要存放过久以免生霉，采后最好及早处理，尽快进行菌株的分离。

(二) 菌株的分离和初筛

1. 分离方法：按常规操作琼脂平板涂抹法进行分离。以土壤标本为例，称取土样 10 克，用无菌生理盐水定倍稀释（虽然不计菌数，但定倍稀释可以掌握合理浓度，使平板上出现的菌落密度比较适宜），稀释倍数根据土壤含菌情况酌定，一般可稀释 10^6 — 10^8 倍。选取两级适当倍数的稀释液，各吸取 0.1—0.2 毫升，滴于已凝好的控制磷源培养基平板上。每一稀释度重复三次。将各平板上的稀释液分别用

玻璃刮棒展开抹匀，然后先在低温下正放4小时，使平板表面的水分吸收，防止菌落蔓延，影响分离；4小时后，再倒转置于28—30℃恒温下培养。

如菌源标本是植物根系，先用自来水将根部土壤冲净，剪取嫩根，用无菌水冲洗3—5次，剪成2—3厘米长的小段，平铺于培养基平板上，在28—30℃恒温下增殖培养后，再进行单株分离。

分离用的缺磷合成基础培养基（明基娜培养基）的成分如下：

葡萄糖	10克
硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5克
硫酸镁 $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.3克
氯化钠 (NaCl)	0.3克
氯化钾 (KCl)	0.3克
硫酸亚铁 (FeSO_4)	0.03克
硫酸锰 (MnSO_4)	0.03克
碳酸钙 (CaCO_3)	5克
琼脂	20克
蒸馏水	1,000毫升

（琼脂应先用流动自来水浸洗2—3小时，再用蒸馏水冲洗两次，沥干后使用）

分离无机磷细菌时，常用的控制磷源有两种：一是磷酸三钙（化学纯），按0.5%加入基础培养基；一种是磷矿粉（如摩洛哥磷矿粉，含 P_2O_5 31%，无水溶磷，细度100目，加入量为1%）。培养基配好后，分装150毫升锥形烧瓶，每瓶100毫升，120℃/30分钟灭菌。

2. 溶磷菌株的选择：培养24—36小时后，开始挑选菌