



两株溶磷真菌的筛选、鉴定及溶磷效果的评价

杨顺^{1,2}, 杨婷¹, 林斌^{1,2}, 刘杏忠^{1*}, 向梅春^{1*}

¹中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:【目的】从作物根围土壤中筛选高效溶磷菌株。【方法】结合溶磷圈筛选法和钼锑抗比色法评价菌株的溶磷能力; 利用菌株的形态学特性、培养性状和微管蛋白 β -tubulin 基因序列分析方法进行菌株的鉴定; 采用气相色谱-质谱法(GC-MS)对溶磷菌的产酸物质进行分析; 并用平板亲和性实验测定菌株间的兼容性。【结果】筛选得到 2 株高效溶磷菌株 P1-1、P2-2; 经鉴定, 菌株 P1-1 为黑曲霉(*Aspergillus niger*), P2-2 为塔宾曲霉(*A. tubingensis*)。2 株溶磷菌株的产酸物质相同, 均为草酸、葡萄糖酸、乳酸和甘油酸。这 2 株溶磷菌与杀线虫功能菌株淡紫拟青霉(*Purpureocillium lilacinum*)、橄榄色链霉菌(*Streptomyces olivaceus*)和苍白杆菌(*Ochrobactrum pseudogrignonense*)兼容性好。2 菌株分别在 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 、羟基磷灰石为磷源的无机磷固体培养基中 25 °C 培养 5 d, 测定溶磷圈的直径(D)与菌落直径(d), 通过计算其比值 D/d 的大小对比, 以及在 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 、羟基磷灰石为磷源的液体培养基中培养 5 d, 测定发酵液中有效磷含量进行比较后判定, 这 2 株溶磷菌溶解磷的能力强且效果相当。【结论】获得了 2 株高效的溶磷真菌。它们能活化多种难溶性磷源, 同时伴随挥发性酸性物质的产生; 2 个菌株与 1 组杀根结线虫微生物菌群兼容性均良好。

关键词: 溶磷真菌, 曲霉属, 筛选, 复合微生物菌剂

磷对植物的生长发育有着不可替代的作用, 是植物必需的矿质营养元素之一^[1]。磷不仅参与许多重要的生命代谢活动, 而且还是很多器官的组成成分, 磷对作物碳水化合物的运输、合成和分解起着重要作用^[2]。土壤中磷元素的丰缺度对作物

的产量和品质影响非常明显。由于大部分磷与土壤中的 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 结合形成难溶磷酸盐, 导致土壤中 95% 以上的难溶性磷源不能被植物吸收利用^[3]。

土壤中存在着大量溶磷微生物, 它们能够将难溶

基金项目: 北京市科技计划(D151100003915002); 中国科学院科技服务网络计划(STS 计划)(KFJ-SW-ST5-143-5)

*通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807512; E-mail: 刘杏忠, liuxz@im.ac.cn; 向梅春, xiangmc@im.ac.cn

收稿日期: 2017-03-15; 修回日期: 2017-04-28; 网络出版日期: 2017-05-25

性磷酸盐转化为植物可吸收利用的有效磷,具有这种能力的微生物称为溶磷微生物(phosphate-solubilizing microorganisms)^[4]。溶磷微生物主要分为溶磷真菌和细菌,研究显示,溶磷细菌的数量是溶磷真菌的2-50倍^[5]。然而,溶磷细菌常在传代过程中溶磷活性降低或失去活性,溶磷真菌的活性和溶磷能力均高于溶磷细菌^[6]。溶磷真菌类菌株主要属于曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、根霉属(*Rhizopus*)、小菌核菌(*Sclerotium*)和镰刀菌(*Fusarium*)^[7]。其中,在众多溶磷微生物中,曲霉属菌株的溶解活性最高^[8]。国外已对该属溶磷菌做了大量的调查研究^[9]。国内也有大量关于溶磷真菌曲霉属的报道。赵小蓉等^[10]研究不同C、N源和C/N比对微生物溶磷的影响,结果发现,曲霉2TCiF2和4TCiF6在以NO₃⁻为氮源的培养基中表现出强的解磷活力。李露莉等^[11]发现黑曲霉对于提高低品位的磷矿石具有重要作用。梁艳琼^[12]、张丽珍^[13]等分别从热带作物根际和盐碱地柠条根围土壤中分离出溶磷曲霉。龚明波等^[14]从土壤中筛选出1株能促进玉米生长的构巢曲霉。吕靖等^[15]的研究表明黑曲霉发酵液对石灰性土壤中小麦幼苗具有促生作用。

筛选高效溶磷菌株是开发微生物菌肥不可或缺的重要环节。本研究在溶磷菌株的筛选基础上,利用溶磷圈法和钼锑抗比色法对得到的高效溶磷菌进行定性和定量测定,从而综合评价其溶磷效果。通过气相色谱-质谱法(GC-MS)对溶磷菌产酸物质的分析,初步探讨溶磷菌的溶磷机理。单一菌种向多种功能菌的组合应用是提高微生物肥料效果的有效途径,而菌株间的兼容性测定是各功能菌组合的前提条件。本研究结果与一组杀线虫功能菌株兼容性好,为微生物肥料的研发提供了很好的菌种资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 作物土壤来源:土壤于2015年10月采自北京市昌平区大豆、生菜、玉米和苹果大田,共采集土壤12份。土样采回后置于冷库保存,用于溶磷真菌的筛选。

1.1.2 培养基:(1)难溶无机磷培养基^[16]:葡萄糖10g, MgSO₄·7H₂O 0.3g, 磷源5g, (NH₄)₂SO₄ 0.5g, NaCl 0.2g, KCl 0.2g, MnSO₄ 0.03g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, 琼脂20g, 酵母膏0.5g, 水1L, pH值7.0±0.2, 121℃灭菌30min备用。(2)PDA培养基(美国BD公司)用于真菌的培养。(3)PDA、高氏1号(广东环凯微生物科技有限公司)和LA(美国BD公司)混合培养基用于菌株的兼容性测定。(4)查氏酵母膏琼脂培养基(CYA)用于菌种的鉴定:K₂HPO₄ 1g, 查氏浓缩液10mL, 酵母抽提粉5g, 蔗糖30g, 琼脂15g, 水1L。查氏浓缩液配方:NaNO₃ 30g, KCl 5g, MgSO₄·7H₂O 5g, FeSO₄·7H₂O 0.1g, ZnSO₄·7H₂O 0.1g, CuSO₄·5H₂O 0.05g, 无菌水100mL。

1.1.3 供试磷源:难溶磷酸盐为:磷酸三钙Ca₃(PO₄)₂(上海百舜生物科技有限公司), 羟基磷灰石(上海百舜生物科技有限公司), 磷酸锌Zn₃(PO₄)₂(北京普益华科技有限公司)。

1.1.4 供试菌株:淡紫拟青霉YES-2(CGMCC No. 2012)、橄榄色链霉菌HDZ-9-47(CGMCC No. 2878)和苍白杆菌NC1(CGMCC No. 12154)为本实验室前期筛选的杀线虫功能菌株^[17]。

1.1.5 主要试剂:PCR Mix购自天根生化科技(北京)有限公司;引物βt-2a和βt-2b由上海生工生物技术有限公司合成。

钼锑贮存溶液:量取153mL浓硫酸(分析纯),

密度 1.84 g/mL), 缓缓加入到 400 mL 蒸馏水中, 不断搅拌, 冷却。另称取经磨细的钼酸铵 10 g 溶于温度约 60 °C 的 300 mL 水中, 冷却。然后将硫酸溶液缓缓倒入钼酸铵溶液中。再加入 0.5% 酒石酸锶钾溶液 100 mL, 冷却后, 加水稀释至 1000 mL, 摇匀, 贮于棕色试剂瓶中。钼锶抗显色剂: 称取 1.50 g 抗坏血酸溶于 100 mL 钼锶贮存溶液中, 此溶液有效期不长, 宜随配随用。

5 mg/L 磷标准溶液: 将 0.4394 g 在 50 °C 烘干的磷酸二氢钾溶于 100 mL 水, 加 5 mL 浓硫酸防腐, 用水定容到 1 L, 浓度为 100 mg/L 磷溶液, 此溶液可以长期保存。吸取上述溶液 10 mL 于 200 mL 容量瓶中, 加水至标度, 浓度为 5 mg/L 磷标准溶液, 此溶液不宜久存。

1.1.6 主要的仪器: 电热恒温培养箱 DNP-9082 (上海精密实验设备有限公司); 摇床 HZO-F160 (太仓市强乐实验设备有限公司); PCR 仪 ABI Veriti96 (美国); 分光光度仪 Bio-Rad SmartSpec3000 (美国); 光学显微镜 Nikon eclipse 80i (日本); 气相色谱质谱联用仪 GCMS-QP2010 Ultra (岛津公司)。

1.2 溶磷菌株的筛选与菌株间的亲和测定

1.2.1 基于稀释土壤法对菌株进行初筛: 制作 (10^{-2} – 10^{-4}) 的土壤悬液, 将土壤悬液涂布于以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为磷源的无机磷培养基(含 100 mg/L 链霉素和氯霉素)上, 25 °C 培养。分离产生溶磷圈的菌株至 PDA 培养基上, 纯化, 15% 甘油–80 °C 保存。

1.2.2 溶磷菌株与功能菌株的亲和性检验: 将 PDA、高氏 1 号和 LA 培养基按等比例混合灭菌后倒入 15 cm 培养皿中, 待培养基凝固后将菌株 HDZ-9-47 和 NC1 菌体以“井”字形划线方式接种到培养基, 30 °C 培养 2 d。然后用打孔器从培养 5 d 的 P1-1、P2-2、YES-2 菌落边缘打取 0.6 cm 的菌饼, 分别

接入距 HDZ-9-47 和 NC1 菌体 0.5 cm 的位置。于 25 °C 下倒置培养 5 d 后观察菌株间的生物兼容性。

1.3 溶磷菌株的鉴定

1.3.1 菌株形态学观察: 菌种经标准培养条件培养后, 挑取菌体制做显微形态观察切片, 于普通光学显微镜下观察, 记录菌种的显微形态: 包括分生孢子头、顶囊、产孢结构、分生孢子等特征, 参照中国真菌志(第五卷)曲霉属及其相关有性型进行描述^[18]。

1.3.2 基于菌株微管蛋白 β -tubulin 基因序列的系统发育学分析: 用热裂解法提取真菌 DNA^[19]。并用引物 β t2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) 和 β t2b (ACCCTCAGTG TAGTGACC CTTGGC) 扩增真菌微管蛋白 β -tubulin 基因。PCR 扩增产物由北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。利用 BLAST 程序将 β -tubulin 序列与数据库中的所有序列进行比对, 选取同源性较高与相近种的序列, 并利用 MEGA 5.0 进行系统发育树构建。

1.4 基于平板法的菌株溶磷效果测定

将溶磷菌株制作成菌悬液, 取 200 μ L 菌悬液于 6 cm 培养皿中, 每个培养皿倒入 5 颗玻璃珠均匀涂板。25 °C 培养 1 d 后用 6 mm 的打孔器打成菌饼, 将菌饼接入含 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 、羟基磷灰石的无机磷平板上, 25 °C 培养 5 d 后测定溶磷圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)大小, 以此来初步确定菌株的溶磷能力。

1.5 基于钼锶抗比色法的菌株溶磷效果进一步测定及 GC-MS 对产酸物质的分析

1.5.1 磷标准曲线的绘制: 将 50 mg/L 的磷标液稀释为 5 mg/L, 分别吸取 5 mg/L 的磷标液 0、2、4、6、8、10 mL 至 50 mL 容量瓶中, 加入蒸馏水

至体积为 30 mL, 然后加入 2 滴 2,4-二硝基酚指示剂, 逐滴加入 4 mol/L 的 NaOH 溶液至容量瓶中液体呈微黄色, 再逐滴加入 1 mol/L 的 H_2SO_4 至黄色刚刚消去, 接着加入 5 mL 钼锑抗显色剂, 并用蒸馏水定容至刻度。在常温下显色 2 h, 然后与上述样品的显色液同在分光光度计上测定吸光度值, 波长设定为 700 nm。以磷浓度为横坐标, 以吸光度值为纵坐标, 绘制磷标准曲线。

1.5.2 钼锑抗比色法测定发酵液中有效磷的含量: 在 500 mL 三角瓶中装入 50 mL 已灭菌的无机磷培养基, 难溶磷酸盐浓度为 5 g/L, 分别接种 200 μ L 菌悬液, 25 $^{\circ}C$ 、200 r/min 摇床培养 5 d。将发酵液摇匀, 取 20 mL 到离心管中, 8000 r/min 离心 10 min; 吸取 5 mL 上清液到 50 mL 的容量瓶中, 加入蒸馏水至体积为 30 mL, 加入 2 滴 2,4-二硝基酚指示剂, 再加入 1 滴 1 mol/L 的 H_2SO_4 至溶液黄色刚好退去, 接着加入 5 mL 的钼锑抗试剂, 定容至刻度, 在常温下显色 2 h。然后与上述样品的显色液同在分光光度计上测定吸光度值, 波长设定为 700 nm。根据标准曲线计算出对应的有效磷含量。

1.5.3 溶磷菌 P1-1、P2-2 发酵液 pH 值的变化: 在 500 mL 三角瓶中装入 50 mL 已灭菌的无机磷培养基, 难溶磷酸盐浓度为 5 g/L, 分别接种 200 μ L 菌悬液于 25 $^{\circ}C$ 、200 r/min 摇床培养, 每隔 24 h 取 5 mL 发酵液测定 pH 值。

1.5.4 气相色谱-质谱法(GC-MS)对发酵液中产酸物质的测定: (1) 样品的制备: 在 500 mL 三角瓶中装入 50 mL 已灭菌的无机磷培养基, 分别接种 200 μ L 菌悬液, 25 $^{\circ}C$ 、200 r/min 摇床培养 5 d。将发酵液摇匀, 取 20 mL 到离心管中, 8000 r/min 离心 10 min; 吸取上清液 100 μ L, 加入 400 μ L 冷甲醇, 剧烈漩涡 1 min, 14000 r/min、4 $^{\circ}C$ 离心 15 min; 取 400 μ L 上清液冻干, 封口, 4 $^{\circ}C$ 保存

备用。(2) 衍生化反应与进样测定: 将冻干样品加入 100 μ L 20 mg/mL 甲氧胺溶液(溶于吡啶中), 剧烈漩涡 1 min, 室温超声 10 min, 37 $^{\circ}C$ 水浴 1.5 h; 加入 80 μ L MSTFA, 剧烈漩涡 1 min, 37 $^{\circ}C$ 水浴 1 h, 14000 r/min、4 $^{\circ}C$ 离心 15 min; 取 2 μ L 上清进样。进样测定方法参照文献[20]。

2 结果和分析

2.1 溶磷菌的分离筛选与菌株间的亲和测定

2.1.1 溶磷菌的分离筛选: 从北京市昌平区大豆根围土壤(E116 $^{\circ}$ 07.909'; N40 $^{\circ}$ 11.303')中分离到 6 株具有溶磷特性的菌株。其中, P1-1、P2-2 菌株产生的溶磷圈较大, 且经传代培养试验后活性和溶磷效果稳定, 繁殖能力强。本研究选择这 2 菌株进行深入研究。

2.1.2 功能菌株间亲和性: 功能复合微生物菌群 HDZ-9-47、NC1、YES-2 和实验菌株 P1-1、P2-2 在混合培养基上共培养 5 d 后的菌落形态如图 1

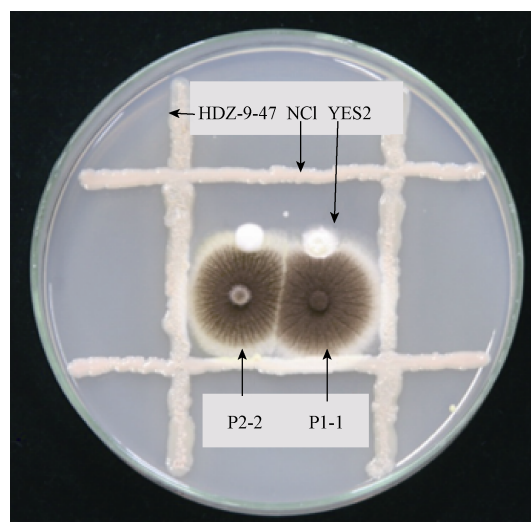


图 1. 溶磷菌株与杀线虫功能菌株间共培养 5 d 的菌落形态

Figure 1. The colonial morphology of the phosphate-solubilizing fungi with three biocontrol agents co-cultured for 5 days on plate.

所示。P1-1、P2-2 菌株生长良好，且与各菌株间无拮抗现象，表明 P1-1、P2-2 菌株与功能菌株间均具有良好的生物兼容性，可以用作功能微生物菌群的研究。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌株形态学观察：菌株在 CYA 培养基上培养 5 d 后，P1-1 菌株的菌落直径为 4.7 cm；菌落颜色从黄色变为黄褐色，反面褐色；菌落质地中心凸起，有放射状沟纹；渗出液少量；顶囊为球形，直径为 50–80 μm ；分生孢子球形，直径 3.0–4.5 μm 。P2-2 菌株的菌落直径为 2.8 cm；菌落颜色为褐色，反面为淡黄褐色；菌落质地有放射状沟纹；渗出液少量；顶囊为球形，直径为 50–80 μm ；分生孢子球形，直径 2.8–4.5 μm 。

2.2.2 菌株微管蛋白 β -tubulin 序列分析：利用 β -tubulin 特异性引物对菌株进行 PCR 扩增得到 520 bp 的目的扩增产物。用 BLAST 程序对菌株 P1-1、P2-2 的 β -tubulin 序列与数据库中的所用序列进行核苷酸同源性比对，根据序列相似性构建系统发育树。菌株 P1-1、P2-2 均为曲霉属真菌，其中，P1-1 菌株与黑曲霉(*Aspergillus niger*)形成同

一支，P2-2 菌株与塔宾曲霉(*Aspergillus tabingensis*)形成相同分支(图 2)。结合形态学特征，菌株 P1-1 鉴定为黑曲霉，P2-2 为塔宾曲霉。

2.3 溶磷菌在不同磷源平板上的效果

P1-1、P2-2 菌株在磷酸钙、磷酸锌、羟基磷灰石为磷源的无机磷培养基上于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d 后，产生明显的溶磷圈(图 3)。结果初步显示 P1-1、P2-2 菌株能溶解不同形式的无机磷源。

同时统计 P1-1 菌株在相应培养基上的溶磷圈的直径(D)与菌落直径(d)的比值 D/d 的大小分别为 1.59、2.89、1.23；P2-2 菌株在对应的培养基上 D/d 值为 1.76、3.17、1.29。结果表明 P1-1、P2-2 菌株对磷酸锌的溶解程度比溶解磷酸钙和磷灰石的能力强(表 1)。

2.4 溶磷菌在不同磷源发酵液中的效果测定

2.4.1 标准曲线的建立：将 5 mg/L 的磷标液稀释为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L，然后在分光光度计上测定吸光度值，波长设定为 700 nm。以磷浓度为横坐标，以吸光度值为纵坐标作图，得到 $y=0.3371x-0.0071$ ($R=0.9955$) 的磷标准曲线。

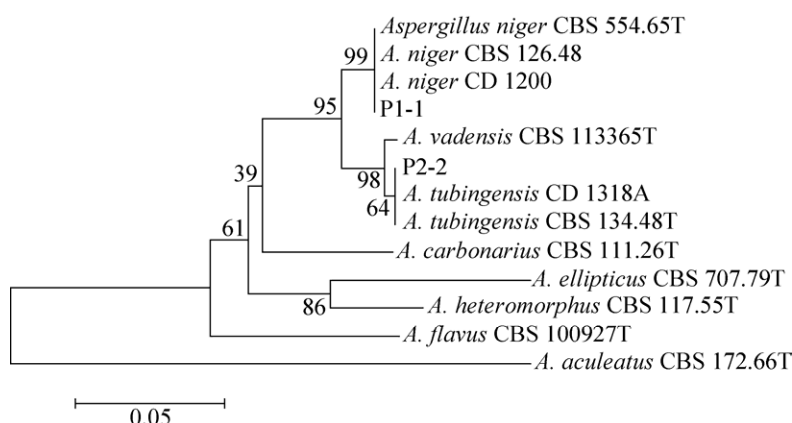


图 2. 菌株 P1-1、P2-2 基于 β -tubulin 序列同源性构建的系统进化树

Figure 2. Phylogenetic tree of strain P1-1, P2-2 and reference *Aspergillus* species. Evolutionary distances were calculated by MEGA5; Bootstrap = 1000. Bar. 0.05 substitution per nucleotide.

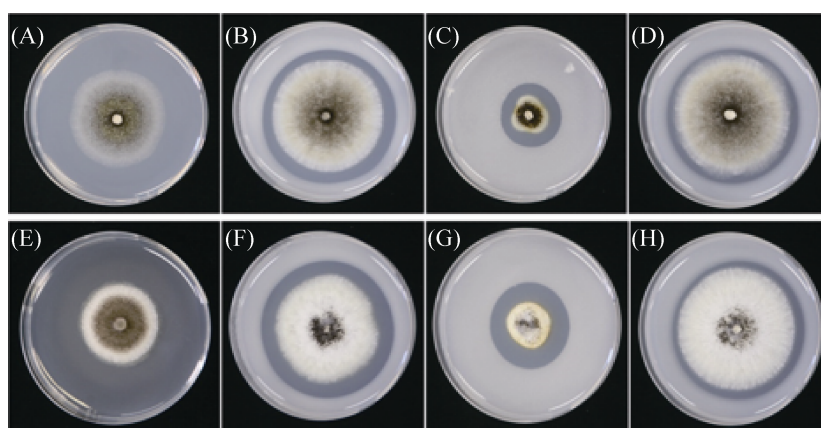


图 3. 溶磷菌在不同磷源的固体培养基上产生的溶磷圈

Figure 3. Halo of phosphate-solubilization microorganism on different solid media. A: CK; B–D: P1-1 in the media containing $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (B), $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ (C) and Phosphorite (D). E: CK; F–H: P2-2 in the media containing $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (F), $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ (G) and Phosphorite (H).

表 1. P1-1、P2-2 菌株在不同无机磷培养基中产生溶磷圈的直径与菌落直径的比值

Table 1. Diameter ratio of phosphate dissolving circle and colony circle on the media with different phosphorus source (5 d)

Strains	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$			$\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$			Phosphorite		
	D	d	D/d	D	d	D/d	D	d	D/d
P1-1	5.9	3.7	1.59	2.6	0.9	2.89	6.4	5.2	1.23
P2-2	5.8	3.3	1.76	3.8	1.2	3.17	6.6	5.1	1.29

D: diameter of phosphate-dissolving zone (cm); d: colony growth diameter (cm).

2.4.2 发酵液溶磷效果测定: 以不接菌为对照, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 、羟基磷灰石培养基的有效磷含量分别是 3.98、0.95、4.80 mg/L; P1-1 菌株在 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 、羟基磷灰石为磷源的液体培养基中培养 5 d 后, 发酵液中可溶性磷含量分别增加到 83.36、64.08、90.18 mg/L, 是不接菌溶液的 20.94、67.47、18.79 倍; 接种 P2-2 后各发酵液中有效磷含量分别是 79.50、62.30、86.92 mg/L, 是不接菌溶液的 19.97、65.58、18.11 倍(表 2)。

表 2. 溶磷菌对 3 种难溶磷酸盐的溶解能力

Table 2. Solubilization ability of P1-1, P2-2 strains to three insoluble phosphates in liquid medium (5 d) (mg/L)

Strains	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$	Phosphorite
No fungi	3.98	0.95	4.80
P1-1	83.36	64.08	90.18
P2-2	79.50	62.30	86.92

结果显示, 接菌后摇培 5 d, 溶液中的可溶性磷含量增加了 18–90 倍, 说明溶磷菌株对无机磷的溶解能力极强。

2.4.3 溶磷真菌发酵液中 pH 值的变化情况: 溶磷菌株 P1-1、P2-2 在无机磷液体培养基中培养, 随着培养时间的延长, pH 逐渐下降; 经过培养 60 h 后, pH 基本趋于平衡(图 4)。

2.4.4 气相色谱-质谱(GC-MS)测定结果: 溶磷菌株 P1-1、P2-2 的 GC-MS 总离子流色谱图所示, 培养 5 d 后 2 株溶磷菌产生的挥发性酸性物质相似(图 5)。经 NIST 谱库检索鉴定出 2 株溶磷菌产生的酸性物质为草酸、葡萄糖酸、乳酸和甘油酸。

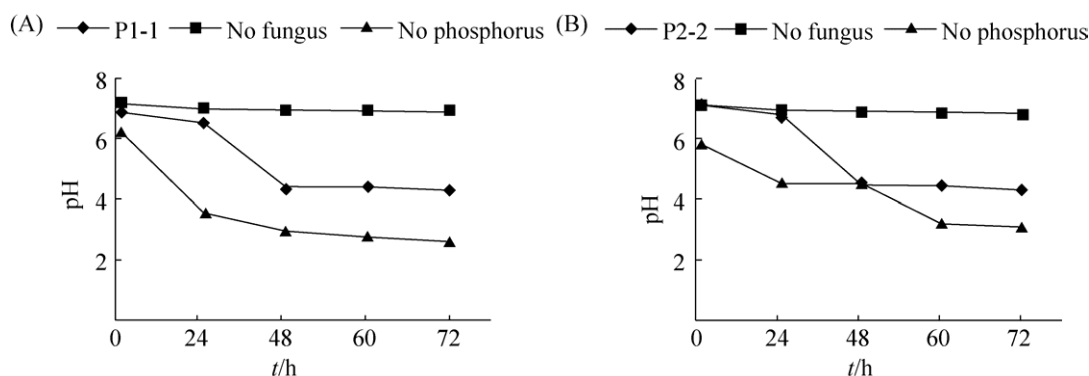


图 4. 溶磷菌在无机磷培养基中 pH 值的变化

Figure 4. pH variation in culture medium during solubilizing period. A: P1-1; B: P2-2.

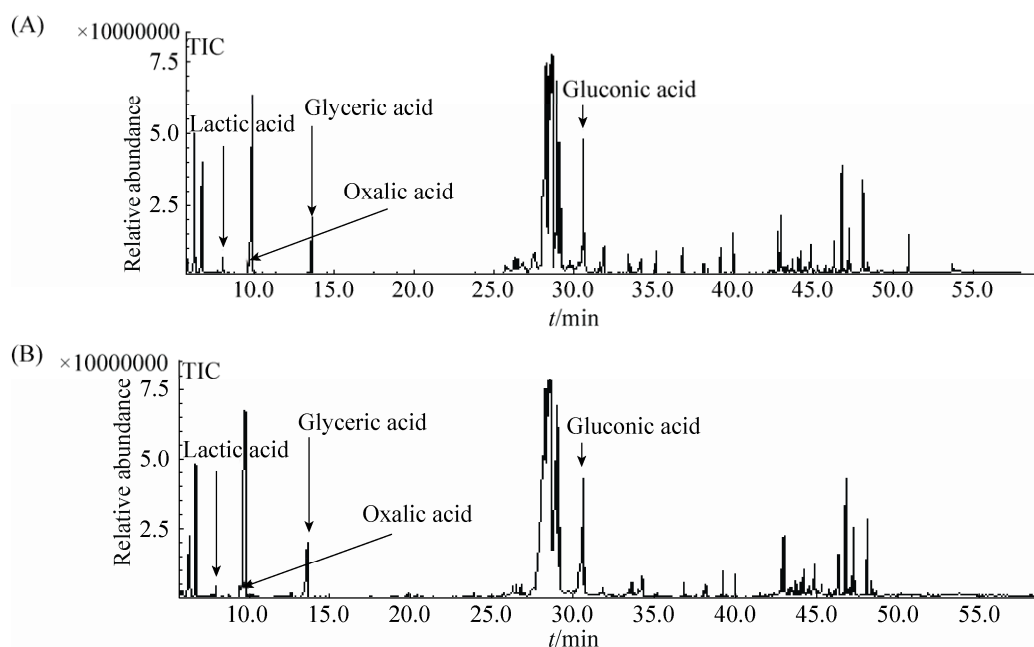


图 5. 溶磷菌株 P1-1、P2-2 发酵液中有有机酸 GC-MS 定性分析图

Figure 5. GC-MS detection of organic acids in phosphate-solubilizing strains metabolite. A: P1-1; B: P2-2.

3 讨论和结论

土壤存在着大量的能够溶解难溶性磷源的微生物，主要包括溶磷真菌、溶磷细菌和少数几种溶磷放线菌^[21]。其中，溶磷真菌主要分布在曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)。研究表明，溶磷曲霉属真菌溶磷效果好且对植物具有明

显的促生长作用^[22]。本研究从大豆根际土壤中获得了 2 株溶磷曲霉。其中一株 P1-1 为常见溶磷黑曲霉(*A. niger*)，另一株为国内首次报道具有溶磷特性的塔宾曲霉(*A. tubingensis*)。

微生物的溶磷能力一般有 3 种测定方法，一是将溶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^[7]。范丙全等筛选的2株草酸青霉菌 P8 和 Pn1 在难溶无机磷培养基 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 上培养 5 d 分别能够产生 4.9 cm 和 4.5 cm 的透明圈,而国际上研究和应用较多的拜莱青霉菌(ATCC20851)只能产生 2.4 cm 的透明圈^[23]。本研究通过平板溶磷圈法初筛发现,P1-1、P2-2 菌株在无机磷培养基 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 上可产生 5.9、5.8 cm 的透明圈,溶磷效果非常显著。同时,用钼锑抗染色法对溶磷菌株的溶磷效果进行定量测定,溶液中的可溶性磷含量与对照相比增加了 18–90 倍,结果同样说明 2 株溶磷菌的溶磷能力非常强。经 2 种方法测定的溶磷结果较为一致,对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 、羟基磷灰石均具有较强的溶解效果;其中,无论是 P1-1 菌株还是 P2-2 菌株均表现为对 $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 具有更强的溶解能力。

微生物的解磷机制一般认为是由于微生物分泌出有机酸,这些酸既能够降低 pH 值,又可与铁、铝、钙、镁等离子结合,从而使难溶性磷酸盐溶解。尽管有研究发现培养介质 pH 值的下降,并不是微生物解磷的必要条件^[24],但越来越多的研究发现溶磷量与培养液中的 pH 值存在着一定的负相关性^[7,23]。从本研究结果也能看出,随着溶磷量的增加,pH 值逐渐降低,推测溶磷菌的溶解能力与溶磷菌的产酸能力相关。据报道,能够溶磷的微生物产生的有机酸多种多样,主要包括草酸、乳酸、苹果酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、氨基乙酸、丁二酸、葡萄糖酸、乙酸、延胡索酸、富马酸、丙酸和葡萄糖酸等^[25]。通过气相色谱-质谱法对溶磷菌 P1-1、P2-2 的产酸种类进行了鉴定,结果发现 2 株溶磷菌的产酸物质相同,都为草酸、葡萄糖酸、乳酸和甘油酸。2 株溶磷菌产酸物质相

同的结果可能是由于它们的亲缘关系较近的原因(图 2)。

溶磷微生物拥有溶解难溶磷的能力,被公认为安全、环保、经济、高效的活化土壤难溶磷的生物措施,具有重要的开发应用价值,是微生物肥料研究的好材料。研究表明,人工合成的功能型微生物菌群在控制土壤病害^[26]、抵御环境有害生物入侵^[27]和增加作物生物量^[28]等方面发挥着重要的作用。而合成微生物菌群功能的发挥首先取决于其群落内部物种间是否具备良好的生物兼容性。本研究筛选的溶磷菌株 P1-1、P2-2 与一组杀根结线虫微生物菌群兼容性好,是构建功能复合微生物肥料的理想材料。

参 考 文 献

- [1] Holford ICR. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Soil Research*, 1997, 35(2): 227–239.
- [2] Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 1999, 17(4/5): 319–339.
- [3] Yang H, Fan BQ, Gong MB, Li QX. Isolation and identification of a novel phosphate-dissolving strain P21. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(1): 51–56. (in Chinese)
杨慧, 范丙全, 龚明波, 李全霞. 一株新的溶磷草生欧文氏菌的分离、鉴定及其溶磷效果的初步研究. *微生物学报*, 2008, 48(1): 51–56.
- [4] Kucey RMN, Janzen HH, Leggett ME. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in Agronomy*, 1989, 42: 199–228.
- [5] Banik S, Dey BK. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant and Soil*, 1982, 69(3): 353–364.
- [6] Kucey RMN. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 1983, 63(4): 671–678.
- [7] Zhao XR, Lin QM. A review of phosphate-dissolving microorganisms. *Soils and Fertilizers*, 2001, (3): 7–11. (in Chinese)
赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展. *土壤肥料*, 2001,

- (3): 7–11.
- [8] Narsian V, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(4): 559–565.
- [9] Whitelaw MA. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 1999, 69: 99–151.
- [10] Zhao XR, Lin QM, Li BG. Effect of C, N sources and C/N ratio on the solubilization of rock phosphate by some microorganisms. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2002, 8(2): 197–204. (in Chinese)
赵小蓉, 林启美, 李保国. C、N 源及 C/N 比对微生物溶磷的影响. *植物营养与肥料学报*, 2002, 8(2): 197–204.
- [11] Li LL, Qiu SY, Wang YJ, He GX. Research on the transforming capacity of low grade phosphate tailings with *Aspergillus niger*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(20): 335–338. (in Chinese)
李露莉, 邱树毅, 王义娟, 何贵香. 一株黑曲霉转化低品位磷尾矿能力的研究. *中国农学通报*, 2010, 26(20): 335–338.
- [12] Liang YQ, Lei ZM, He CP, Zheng XL, Yu SH, Zheng FC. Phosphate-solubilizing mechanism of PSFM and preliminary study on solubilization capacity of insoluble phosphates. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, 32(6): 1116–1121. (in Chinese)
梁艳琼, 雷照鸣, 贺春萍, 郑肖兰, 余树华, 郑服丛. 一株溶磷真菌的分离鉴定及其溶能力的初步研究. *热带作物学报*, 2011, 32(6): 1116–1121.
- [13] Zhang LZ, Fan JJ, Niu W, Li T, Wu RH, Jin YJ, Lu R. Isolation of phosphate solubilizing fungus (*Aspergillus niger*) from *Caragana* rhizosphere and its potential for phosphate solubilization. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(24): 7571–7578. (in Chinese)
张丽珍, 樊晶晶, 牛伟, 李涛, 吴荣海, 金益杰, 鹿茸. 盐碱地柠条根围土中黑曲霉的分离鉴定及解磷能力测定. *生态学报*, 2011, 31(24): 7571–7578.
- [14] Gong MB, Fan BQ, Jin ZG, Wei GC, Wang HY. Screening and application of phosphate-dissolving microorganism suitable for corn production. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(12): 1619–1625. (in Chinese)
龚明波, 范丙全, 金振国, 魏国才, 王洪媛. 适应玉米生产的溶磷真菌筛选及其应用. *微生物学报*, 2010, 50(12): 1619–1625.
- [15] Lü J, Tian XH, Yan H, Cao CL. Effect of *Aspergillus niger* fermentation liquid on the growth of wheat seedlings in calcareous soil. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2015, 43(5): 100–106. (in Chinese)
吕靖, 田霄鸿, 闫辉, 曹翠玲. 黑曲霉发酵液对石灰性土壤中小麦幼苗生长的影响. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2015, 43(5): 100–106.
- [16] Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorus in soils in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*, 1948, 17: 362–370.
- [17] Ji Y, Wu YP, Wang Y, Wang XQ, Liu XZ, Liu JB, Xiang MC. Study on the efficiency of functional multi-microbial agent against root-knot nematode *Meloidogyne* spp. on cucumber. *Chinese Journal of Biological Control*, 2016, 32(4): 493–502. (in Chinese)
冀宇, 武云鹏, 王胤, 王晓青, 刘杏忠, 刘建斌, 向梅春. 功能型复合微生物菌剂防治黄瓜根结线虫的研究. *中国生物防治学报*, 2016, 32(4): 493–502.
- [18] 齐祖同. 中国真菌志(第五卷): 曲霉属及其相关有性型. 北京: 科学出版社, 1997.
- [19] Zhang YJ, Zhang S, Liu XZ, Wen HA, Wang M. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51(1): 114–118.
- [20] Zhou Y, Song RX, Zhang ZS, Lu X, Zeng ZD, Hu CX, Liu XY, Li YL, Hou JG, Sun YH, Xu CL, Xu GW. The development of plasma pseudotargeted GC-MS metabolic profiling and its application in bladder cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(24): 6741–6749.
- [21] Khan MS, Zaidi A, Wani PA. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture — a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2007, 27(1): 29–43.
- [22] Khan MS, Zaidi A, Musarrat J. Phosphate solubilizing microorganisms: principles and application of microphos technology. Switzerland: Springer, 2014: 2328–2332.
- [23] Fan BQ, Jin JY, Ge C. Isolation of *Penicillium oxalicum* and its effect on solubilization of insoluble phosphate under different conditions. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(5): 525–530. (in Chinese)
范丙全, 金继运, 葛诚. 溶磷草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究. *中国农业科学*, 2002, 35(5): 525–530.
- [24] Kucey RMN. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. *Canadian Journal of Soil Science*, 1988, 68(2): 261–270.
- [25] Goldstein AH. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal*

- of Alternative Agriculture*, 1986, 1(2): 51–57.
- [26] Wei Z, Yang TJ, Friman VP, Xu YC, Shen QR, Jousset A. Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health. *Nature Communications*, 2015, 6: 8413.
- [27] van Elsas JD, Chiurazzi M, Mallon CA, Elhottová D, Křišťůfek V, Salles JF. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(4): 1159–1164.
- [28] Srinivasan K, Mathivanan N. Biological control of sunflower necrosis virus disease with powder and liquid formulations of plant growth promoting microbial consortia under field conditions. *Biological Control*, 2009, 51(3): 395–402.

Isolation and evaluation of two phosphate-dissolving fungi

Shun Yang^{1,2}, Ting Yang¹, Bin Lin^{1,2}, Xingzhong Liu^{1*}, Meichun Xiang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] To isolate phosphate-solubilizing strains from crop rhizosphere soil for functional composite microbial community and bio-fertilizer production. **[Methods]** The phosphate-solubilizing capacity was evaluated by the halo zone of dissolving phosphate and molybdenum antimony colorimetric. Phosphate-solubilizing fungi were identified based on their morphological and cultural characteristics and β -tubulin sequence analysis. Acid producing substances of phosphate solubilizing fungus were analyzed by GC-MS and the biological compatibility of microbial strains was tested by medium method. **[Results]** Two phosphate-solubilizing fungi were screened from soybean rhizosphere soil, P1-1, P2-2, which were identified as *Aspergillus niger* and *A. tubingensis*. The volatile acids (oxalic acid, gluconic acid, lactic acid and glycerol acid) were detected in both fungi. They were compatible with a group of nematocidal microorganisms (*Purpureocillium lilacinum* + *Streptomyces olivaceus* + *Ochrobactrum pseudogrignonense*). The D/d (diameter of the halo zone/diameter of the colony) value of P1-1 and P2-2 was detected after culturing on three media with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ and phosphorite at 25°C for 5 days, and the available phosphorus contents were detected after 5 days culturing in liquid medium containing $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ and phosphorite. The results indicated that the two phosphate-dissolving fungi had similar capability in dissolving phosphorus. **[Conclusion]** Two high-efficient phosphate solubilize fungi were obtained, and they could activate a variety of insoluble phosphorus sources accompanied by the production of volatile acidic substances. The two strains showed good biological compatibility with a group of nematocidal microorganisms.

Keywords: phosphate-solubilizing fungi, *Aspergillus*, screening, multi-microbial agent

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Beijing Municipal Science and Technology Project (D151100003915002) and by the Science and Technology Service Network Initiative (KFJ-SW-STS-143-5)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807512; E-mail: Xingzhong Liu, liuxz@im.ac.cn, Meichun Xiang, xiangmc@im.ac.cn

Received: 15 March 2017; Revised: 28 April 2017; Published online: 25 May 2017