一株红壤花生根际溶磷真菌的分离、鉴定及溶磷能力的研究*

刘文干[1,2]　曹　慧[1]　樊建波[2]　何园球[2†]

(1 南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室,南京　210095)

(2 中国科学院南京土壤研究所,南京　210008)

摘　要　为提高磷素利用率,从花生根际土壤样品中筛选到一株溶磷能力强的菌株 B1-A,结合菌落形态特征和 ITS rDNA 序列分析将其鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。菌株 B1-A 的不同接种量(1%,3%,5%)在两种难溶性磷酸盐($FePO_4$,$AlPO_4$)培养液的溶磷量和 pH 随时间动态变化表明溶磷量均与 pH 呈显著负相关,B1-A 的溶磷量与接种量、培养时间、磷矿粉浓度有关,实验结果表明菌株 B1-A 在接种量为 3%~5%、培养时间 168 h、云南磷矿粉浓度为 3 g L^{-1}、江西磷矿粉浓度为 5 g L^{-1}时溶磷效果较好。菌株 B1-A 对磷酸三钙、磷酸铝、磷酸铁、磷矿粉有较强的溶解能力,最高溶磷量分别为 418.7、942.3、242.2、177.4 mg L^{-1},有望为开发高效红壤微生物磷肥提供种质资源。

关键词　溶磷真菌;溶磷量;接种量;红壤

中图分类号　S154.39　　**文献标识码**　A

磷是植物生长必须的三大营养元素之一,是植物细胞分裂和各器官组织的分化发育及产量和品质形成不可缺少的元素[1]。植物缺磷时,各类作物分蘖将减少或延迟,抽穗推迟,开花晚,成熟迟,穗粒数减少,籽粒不饱满,玉米果穗秃顶,油菜脱荚,甘薯、马铃薯块变小等[2]。作物所利用的磷主要来源于土壤[3]。红壤是我国南方土壤的主要类型,占全国土地面积的 22.7%,是我国经济作物和粮食生产的重要基地,红壤由于其特殊的成土过程,土壤中黏粒和氧化铁、铝含量均较高,加之大量磷肥长期不合理施用以及土壤"酸"、"瘦"、"板"、"结"的自然特点使土壤磷素水平及有效性较低,制约着该地区作物产量的提高。

土壤磷素循环是以微生物活动为中心的,微生物的活动对土壤磷的转化和有效性影响很大。溶磷微生物(Phosphate-solubilizing microorganisms, PSM)[4]能使土壤中难溶性或不溶性的磷转化成易于被植物吸收利用的磷,从而提高土壤供磷水平、增加作物吸磷量、提高作物产量[5],同时还能促进农作物对植物根系锌、铜等其他营养元素的吸收,增强植物抗病能力,并减少环境污染[6]。

溶磷菌的分布表现出强烈的根际效应,即根际土壤的数量较土体要多[7],近年来,从植物根际土壤中筛选具有活化土壤难溶无机磷能力的高效溶磷菌成为提高土壤磷有效性的研究热点[8-10]。溶磷菌广泛存在于土壤中,Kucey[11]报道真菌的溶磷能力一般是细菌的 10 倍,许多细菌在进一步的纯化中失去解磷能力,而真菌则始终保持其磷活力。

红壤由于其特殊的理化性质可能会导致非土著溶磷菌定殖能力差、生存力与竞争力较弱、溶磷能力退化快、菌种淘汰率高等劣势,因此,筛选土著溶磷菌就显得极具意义。花生是我国南方红壤地区最主要的经济和油料作物之一,本研究以红壤旱地长期定位施肥试验为依托,通过对花生根际溶磷真菌的分离、鉴定和溶磷能力的动态测定,为提高红壤磷素利用率、丰富溶磷菌菌种资源提供生物学支撑。

1　材料与方法

1.1　供试材料

1.1.1　小区概况　　本实验选择中国科学院红壤

* 国家科技支撑项目(2009BADC6B04,2009BADC6B003-3)和国家自然科学基金项目(40871125、30971869)资助

† 通讯作者, E-mail:yqhe@issas.ac.cn

作者简介:刘文干(1987—),男,硕士研究生,主要从事微生物分子生态学研究。E-mail:ganwenliu@163.com

收稿日期:2011-06-03;收到修改稿日期:2011-08-18

生态实验站的长期试验土壤(该试验始于 1988 年)进行研究,小区设计参照文献[12]。

1.1.2 供试土壤　第四纪红色黏土发育的旱地红壤,2010 年 8 月收获花生时采样,每个小区采用五点采样法采集花生根际土壤,充分混合后分成三份:一份 4℃保存,一份 -20℃保存,一份土样风干后过 2 mm 筛备用。

1.1.3 培养基　(1)分离培养基(改良后的 PVK[13]);(2)筛选培养基(NBRIP[14]);(3)真菌培养基(PDA 培养基)。

1.1.4 供试磷源　难溶磷酸盐为磷酸三钙($Ca_3(PO_4)_2$)、磷酸铝($AlPO_4$),购于天津科密欧试剂公司;磷酸铁($FePO_4$)购于 SIGMA 试剂公司。云南昆阳磷矿粉(Kunyang Yunnan RPP)、江西吴村磷矿粉(Wucun Jiangxi RPP),所有磷矿石粉碎过 100 目筛。用 2% 的柠檬酸浸提,钒钼黄法测定磷矿粉有效磷含量;用硝酸浸提(1∶1),钒钼黄法测定磷矿粉全磷含量,结果云南昆阳和江西吴村磷矿粉全磷和有效磷分别为 3.46、0.29 g kg^{-1} 和 0.51、0.18 g kg^{-1}。

1.2 溶磷真菌的分离筛选

1.2.1 平板初筛　称取 1.0 g 土样溶于 99 ml 无菌水中,用 10 倍稀释法分别配制 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}的土壤悬液,分别涂布至分离培养基上,28℃培养4 d,观察出现溶磷圈的菌落,测定溶磷圈直径(D),菌落直径(d),根据能否产生溶磷圈与 D/d 值大小来初步确定菌株的溶磷能力。将 D/d≥1.5 的菌株利用平板划线法分离纯化后,4℃下保存于 LB 斜面培养基,-70℃保存菌种于甘油管中。

1.2.2 溶磷菌菌落形态特征观察　用接种环取上述分离到的已纯化的菌落分离物,用平板划线法将其分别接种于分离培养基中,置于 28 ~ 30℃培养箱中培养 4 d,观察并记录菌落形状、大小、边缘结构、光泽度、透明度和颜色等菌落形态特征。

1.2.3 摇瓶复筛　250 ml 三角瓶中装入 NBRIP 液体培养基 100 ml,121℃高压灭菌 21 min,备用。将在 PDA 培养基中摇瓶生长过夜的真菌孢子制成孢子悬液,取孢子悬液 2 ml 接种于灭菌的 NBRIP 液体培养基中,以不接菌为对照,每个处理 4 次重复,摇床培养(28℃,180 r min^{-1})7 d,测定有效磷含量和 pH。

1.3 菌株溶磷效果的测定

1.3.1 孢子悬液的制备　将 PDA 培养基上培养 48 h 的真菌孢子刮入无菌水中,于涡旋仪中混合 30 s,制成孢子悬液 (1×10^9 CFU ml^{-1})。

1.3.2 菌株对两种难溶性磷酸盐溶解能力测定　三角瓶中装入 100 ml 已灭菌的 NBRIP 液体培养基和难溶磷酸盐(磷酸铁和磷酸铝浓度为 5 g L^{-1}),分别接种 1 ml、3 ml、5 ml 孢子悬夜,28℃、180 r min^{-1}摇床培养,分别于 1、3、5、7、9 d 取发酵液5 ml。将上述发酵液于 12 000 r min^{-1}、4℃离心 10 min,取上清液测定有效磷含量和 pH。设不接菌为对照,每个处理重复 3 次。

1.3.3 菌株对两种磷矿粉溶解能力的测定　取 2 ml 孢子悬液接入 100 ml 筛选培养基中,磷源选用磷矿粉,加入量分别为 3 g L^{-1} 和 5 g L^{-1},在 28℃、180 r min^{-1}摇床条件下培养 7 d,测定培养液中有效磷含量。设不接菌和接菌 2 个处理,每个处理重复 3 次。

1.3.4 测定方法　用 pHS - 29 A 型酸度计测定发酵液的 pH。将发酵液 12 000 r min^{-1}、4℃离心 10 min,取上清液稀释适当倍数,利用 UV3010 紫外可见分光光度计在 700 nm 处通过钼锑抗比色法测定光密度并计算有效磷含量,溶磷量为扣除不接种对照的值。数据采用 DPS 9.50 和 SPSS16.0 统计软件进行分析。

1.4 溶磷菌株的鉴定

1.4.1 菌株的形态观察　参照文献[15],依据菌落、菌体形态和产孢特征。

1.4.2 菌株的分子生物学鉴定　刮取少量培养 24 h 的菌丝体,转至液氮中研磨,DNA 的抽提采用改良的 CTAB 法[16]。ITS 区域扩增选择真核生物 ITS 通用引物 ITS1∶5′-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3′和 ITS4∶5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′。50 μlPCR 反应体系:灭菌双蒸水 30.4 μl,10 × *Taq* 聚合酶反应缓冲 5 μl,Mg^{2+} (25 mmol L^{-1})5 μl,d NTP(2.5 mmol L^{-1} each)5 μl,Its1(25 pmol μl^{-1}) 1 μl, Its4 (25 pmol μl^{-1}) 1μl, 总 DNA (约 20 ng μl^{-1})2 μl,*Taq* DNA 聚合酶 (5 U μl^{-1})0.6 μl,扩增 ITS rDNA 区段。PCR 扩增程序为:95℃ 5 min; 95℃ 35 s,55℃ 35 s,72℃ 40 s,35 个循环; 72℃ 8 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测,PCR 产物经试剂盒纯化后送至上海生工生物技术有限公司测序后,将获得的 DNA 序列,输入 GenBank,用 Blast 程序与数据库中的所有序列进行比较分析,利用 MEGA4.1 的 Neighbor-Joining 软件进行系统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 不同利用方式红壤溶磷菌的初筛

经过筛选,共得到 4 株具有明显溶磷圈(D/d≥1.5)的真菌,4 株真菌全部来源于长期有机肥无机肥配施试验地,其中施低量 NPK(CK)处理 3 株,记为 B1-A、B1-B、B1-C;绿肥处理 1 株,记为 B4-A,说明有机肥试验地中溶磷真菌数量可能较无机肥试验地多,各菌株的菌落特征及 D/d 比值见表 1。

表 1 溶磷菌株的菌落特征和 D/d 值

Table 1 Colonial characteristics and D/d value of the phosphorus solubilizing bacteria (PSB)

菌株 Strains	菌落特征 Colonial characteristics	D/d
B1-A	辐射状,直径 22 ~ 30 mm,边缘丝状,菌丝紧密,黑色,中部凸起	2.3
B1-B	棉絮状,直径 15 ~ 18 mm,边缘丝状,菌丝疏松,中间绿色边缘白色,凸起	2.2
B1-C	棉絮状,直径 16 ~ 18 mm,边缘丝状,菌丝疏松,中间绿色边缘白色,凸起	2.5
B4-A	辐射状,直径 24 ~ 27 mm,边缘丝状,菌丝紧密,黑色,中部凸起	1.8

由表 1 可知,4 株溶磷真菌溶磷能力差异不大,在 $Ca_3(PO_4)_2$ 平板上培养 4 d 时菌株的 D/d 值在 1.8 ~ 2.5 之间,比值较大。

2.2 溶磷真菌的复筛

液体培养法是测定溶磷效果的定量方法之一,在培养基上观察得到溶菌圈,只是表征了菌体的解磷特性,其解磷能力大小还需要通过定量测定加以说明。将分离的 4 株真菌在 NBRIP 液体培养基中进行液体发酵试验,摇瓶培养 7 d 后测得发酵液中有效磷含量见表 2。

由表 2 可知,4 株溶磷真菌溶磷量在 330.1 ~ 418.7 mg L^{-1} 之间,均显著高于对照。菌株 B1-A 与 B4-A 溶磷量无显著差异,与 B1-B、B1-C 溶磷量差异达极显著水平。B1-A 溶磷量最高 418.7 mg L^{-1},与 Molla 等[17]报道的基本一致。B1-B、B1-C 菌株溶磷量分别为 330.1、338.3 mg L^{-1},差异不显著,因此本实验中选择 B1-A 作进一步研究。

表 2 液体摇瓶培养条件下第 7 天溶解 $Ca_3(PO_4)_2$ 的效果($Ca_3(PO_4)_2$ 5 g L^{-1})

Table 2 Dissolution rate of $Ca_3(PO_4)_2$ in the culture on D7

菌株 Strains	溶磷量 P dissolution rate (mg L^{-1})	最终 pH Final pH	pH 降幅 pH drop-out value
CK	28.10c	6.80 a	0.20
B1-A	418.7 a	1.68 c	5.12
B1-B	330.1 b	4.12 b	2.68
B1-C	338.3 b	3.95 b	2.85
B4-A	388.3 a	1.68 c	5.12

注:表中字母不同表示在 0.05 水平差异显著,下同 Note: Difference in letter following the table shows significant difference at 0.05 level. The same below

摇瓶培养 7 d 后 4 株溶磷真菌培养液的 pH 均有不同程度的下降,B1-A 和 B4-A 最终 pH 均为 1.68,pH 下降了 5.12,B1-B 和 B1-C 也有不同程度的下降。比较 4 株溶磷菌培养液 pH 下降幅度与其溶磷量之间的关系时发现:培养液的 pH 降幅大,有效磷含量高;pH 降幅小,有效磷含量低。

2.3 菌株 B1-A 的鉴定

菌株 B1-A 在查氏琼脂培养基上培养 4 d 后分生孢子头经乳酸棉兰酚染色后的显微照见图 1,直径为 30 mm,中心稍凸起,有规则的辐射状沟纹,质地丝绒状,表面呈暗褐黑色,有少量渗出液,具有轻微霉味,菌落反面呈黄色。顶囊球形,直径 50 ~ 80 μm,产孢结构双层,分生孢子球形,直径 3.2 ~ 4.5 μm,壁稍粗糙。

利用 ITS1 和 ITS4 为引物对菌株 FP1 的 ITS 区进行 PCR 扩增和正反向测序,得到的序列长度为 594 bp。通过 BLAST 将该序列与 GenBank 数据库中序列进行比对,结果表明菌株 B1-A 与黑曲霉 *Aspergillus niger* (FJ629341.1)、*Aspergillus niger* (FJ878650.1)、*Aspergillus niger* (HQ014692.1)、*Aspergillus niger* strain JC-A3 (HQ285563.1)的同源性均大于 99%,支持了形态鉴定的结果,将其鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。利用 MEGA4.1 的 Neighbor-Joining 软件进行系统发育树的构建,结果如图 2。

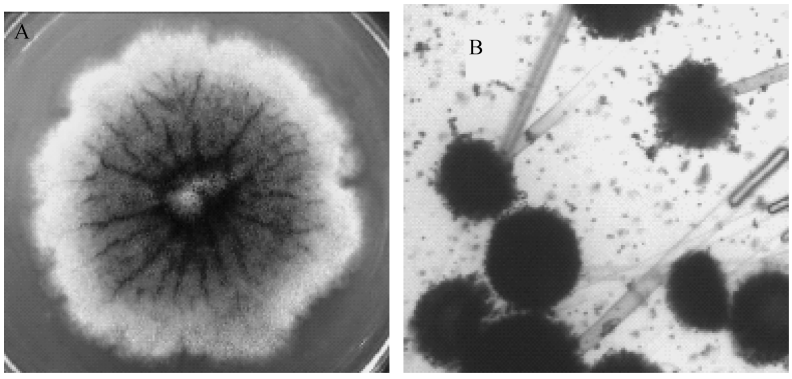


图 1　菌株 B1-A 在 PDA 培养基上(4 d)的菌落形态(A)和分生孢子头形态特征(B)(×400)

Fig. 1　Morphologies of the colony (A) and conidial heads (B) (×400) of B1-A on PDA medium for 4 days

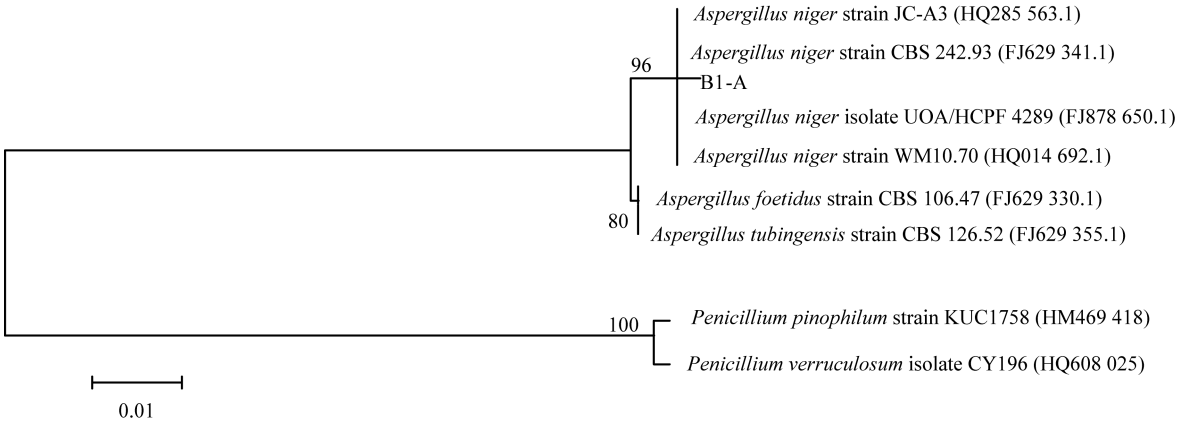


图 2　菌株 B1-A 的基于 ITS rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of StrainB1-A and reference *Aspergillus* species

2.4　溶磷菌 B1-A 对 4 种不同形态难溶磷酸盐溶磷动态分析

经筛选菌株 B1-A 无论在固体还是在 $Ca_3(PO_4)_2$ 溶液中均具有较强的溶磷能力，为进一步验证 B1-A 的溶磷能力，分析测定不同接种量(1%、3%、5%)对同一浓度(5 g L^{-1})磷酸铝、磷酸铁的动态溶磷特性以及相同接种量(2%)对不同浓度(3 g L^{-1}、5 g L^{-1})的两种磷矿粉的溶磷效果。

2.4.1　B1-A 对磷酸铝、磷酸铁的动态溶磷特性

多数学者在研究溶磷菌的溶磷效果时，将溶磷菌接种在液体培养基中，振荡培养 7～10 d，培养结束后 1 次测定溶磷量[18-20]。而康贻军等[21]建议对不同培养时期的溶磷量进行测定，才能更准确地说明溶磷菌的溶磷能力。本实验中菌株 B1-A 在接种 24 h 后开始测定菌液中有效磷含量及 pH，以后每隔 48 h 各测定一次，结果见表 3 和表 4。

由表 3 和表 4 可知，菌株 B1-A 的接种量不同，最大溶磷量也不同。菌株 B1-A 在接种量分别为 1%、3%、5% 的 $FePO_4$ 培养液中摇瓶培养216 h 后最高溶磷量分别为 237.9、242.2、207.0 mg L^{-1}；在 $AlPO_4$ 溶液中最高溶磷量分别为 883.9、910.4、962.3 mg L^{-1}。在 $AlPO_4$ 和 $FePO_4$ 培养液，接种量为 1% 和 3% 时，最高溶磷量无显著性差异，在接种量为 5% 的 $FePO_4$ 培养液中的最高溶磷量显著降低，而在接种量 5% 的 $AlPO_4$ 培养液中最高溶磷量显著增加，说明溶磷菌的最高溶磷量受到菌种的接种量的影响，选择合适的接种量对于研究溶磷菌的最高溶磷量具有重要意义。

菌株 B1-A 对不同磷酸盐的溶磷特性有较大差异，在 $FePO_4$ 培养液中最高溶磷量在 207.0～242.2 mg L^{-1} 之间，当接种量分别为 1%、3%、5% 时，溶磷量均在 168 h 后趋于稳定。在 $AlPO_4$ 培养液中最高溶磷量在 883.9～962.3 mg L^{-1} 之间，

表 3 $FePO_4$培养液中溶磷量和 pH 随时间的变化

Table 3 P dissolution rate and pH in $FePO_4$ culture medium during solubilizing period

时间 Time(h)	接种量 Inoculation rate					
	1%		3%		5%	
	溶磷量 P dissolution rate (mg L^{-1})	pH	溶磷量 P dissolution rate (mg L^{-1})	pH	溶磷量 P dissolution rate (mg L^{-1})	pH
24	18.11 ± 0.53	2.30	17.65 ± 0.95	2.22	21.15 ± 1.58	2.26
72	33.85 ± 1.40	2.20	43.28 ± 5.51	2.12	59.09 ± 13.46	2.11
120	98.21 ± 14.86	1.98	110.4 ± 8.0	1.94	124.9 ± 27.0	1.92
168	223.0 ± 21.5	1.92	216.3 ± 17.3	1.89	185.9 ± 22.3	1.95
216	237.9 ± 15.0	1.80	242.2 ± 16.6	1.78	207.0 ± 3.6	1.86

表 4 $AlPO_4$培养液中有效磷含量和 pH 随时间的变化

Table 4 Variation available phosphate content and pH in $AlPO_4$ solution with the time

时间 Time(h)	接种量 Inoculation rate					
	1%		3%		5%	
	溶磷量 P dissolution rate(mg L^{-1})	pH	溶磷量 P dissolution rate (mg L^{-1})	pH	溶磷量 P dissolution rate (mg L^{-1})	pH
24	35.32 ± 3.27	3.04	138.3 ± 10.0	2.84	179.8 ± 10.6	2.80
72	579.1 ± 19.4	2.53	803.6 ± 11.7	2.38	855.3 ± 13.0	2.32
120	851.7 ± 39.9	2.30	870.7 ± 20.1	2.06	849.9 ± 8.3	2.12
168	871.1 ± 42.0	2.10	910.4 ± 34.0	1.85	962.3 ± 29.4	2.07
216	883.9 ± 21.5	1.85	851.9 ± 19.5	1.76	961.4 ± 22.6	2.05

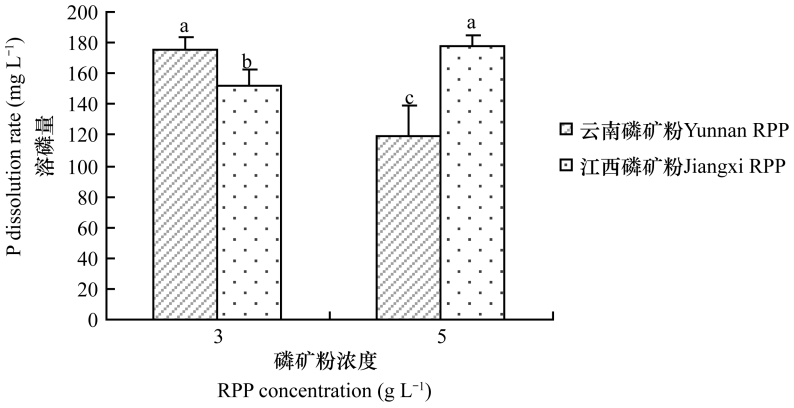
当接种量为 1% 时,溶磷量在 120 h 后趋于稳定,当接种量为 3% 和 5% 时,溶磷量均在 72 h 后趋于稳定,表明 B1-A 的溶磷量除了与接种量有关还与培养时间有关。相对于 $FePO_4$,菌株 B1-A 易于迅速高效溶解 $AlPO_4$。在 $FePO_4$培养液中,接种量为 5% 时的最高溶磷量反而较接种量为 1% 和 3% 的最高溶磷量低,可能是由于溶磷菌在不同的磷酸盐溶液中有不同的溶磷动力学机制。

有研究发现溶磷菌的溶磷量与培养液的 pH 存在一定的相关性[22-23],但也有研究证明两者间不存在显著或必然相关性[18,24-25]。比较表 3 和表 4 中溶磷量和 pH 随时间的变化可知,B1-A 的不同接种量在 $FePO_4$和 $AlPO_4$溶液中溶磷量均先升高后稳定,pH 先下降后稳定。经计算可知:不同接种量下,在 $FePO_4$溶液中溶磷量与 pH 的相关性系数分别为 −0.937、−0.955、−0.927,在 $AlPO_4$溶液中的相关性系数分别为 −0.934、−0.881、−0.968 ($p < 0.01$),表明溶磷菌 B1-A 的溶磷量与 pH 呈极显著负相关,与赵晓蓉[26]和 Asea[27]等研究结果一致。虽然目前关于微生物的溶磷机理说法不一,但是本次实验中 B1-A 的溶磷量与 pH 显著相关,无论是代谢过程中产生质子还是有机酸,均导致培养液的 pH 降低从而导致难溶性磷酸盐中的磷酸根被释放出来。

观察菌株 B1-A 在 $FePO_4$和 $AlPO_4$溶液中 pH 变化可知, pH 在 24 h 内由 7.0 迅速下降至 3.0 左右,之后 pH 变化趋于平缓,说明该菌的产酸能力很强,在短时间内使培养液 pH 迅速下降,并能良好生长,可能在酸性红壤中具有较强的定殖能力。

2.4.2 B1-A 对不同浓度的两种磷矿粉的溶磷特性 为进一步确定 B1-A 的溶磷能力,将 B1-A 接种至不同浓度的两种磷矿粉中培养 7 d,结果见图 3。

图 3 结果表明,菌株 B1-A 对不同浓度两种磷矿粉均有显著的溶磷效果,有效磷含量按云南(3 g L^{-1}、5 g L^{-1})和江西(3 g L^{-1}、5 g L^{-1})分别为 175.6、119.4 和 151.7、177.4 mg L^{-1},林启美等[28]以磷矿粉为唯一的磷源培养溶磷菌发现大多数真菌的溶磷量在 59.64 ~ 145.4 mg L^{-1}。本实验菌株 B1-A 对



注：图不同上标字母表示在0.05水平上差异显著 Note: Different superscript letters in the figure indicate significant difference at 0.05 levels

图 3　不同磷矿粉浓度对培养液中溶磷量的影响

Fig. 3　Effect of RPP concentration on phosphate dissolution rate in the solution

两种磷矿粉的溶磷量在 119.4 ~ 177.4 mg L^{-1}，最大溶磷量为 177.4 mg L^{-1}，具有较强溶解磷矿粉的能力。

有研究表明溶磷菌对不同类型的磷矿粉溶磷效果不同[29]，也有研究表明微生物的溶磷量与磷矿粉的浓度有关，林启美等[30]研究表明磷矿粉浓度越高，溶磷量越低；Narsian 和 Patel[25]也发现真菌 *Aspergillus aculeatus* 的溶磷量随着磷矿粉加入量的增加而降低，溶磷活性最高时的磷矿粉用量为 P_2O_5 0.5 g L^{-1}。合理确定磷矿粉的浓度对研究其溶磷能力有重要意义，本次实验中，菌株 B1-A 在 5 g L^{-1} 的江西磷矿粉中较 3 g L^{-1} 的溶磷量要高；在 5 g L^{-1} 的云南磷矿粉中较 3 g L^{-1} 的溶磷量低，说明溶磷菌的溶磷量受磷矿粉浓度的影响，确定磷矿粉的用量对研究溶磷菌的溶磷量有重要意义。

B1-A 对 4 种难溶性磷酸盐（$Ca_3(PO_4)_2$、$AlPO_4$、$FePO_4$、磷矿粉）的最高溶磷量分别为 418.7、962.3、242.2、177.4 mg L^{-1}，溶磷能力为 $AlPO_4$ > $Ca_3(PO_4)_2$ > $FePO_4$ > 磷矿粉，与冯宏等[31]研究结果基本一致。黄伟等[20]从江西红壤中筛选到一株溶磷菌 CY 06，其对 $AlPO_4$、$FePO_4$ 有效磷含量分别为 336.6 mg L^{-1} 和 107.6 mg L^{-1}。而本实验菌株 B1-A 对 $AlPO_4$ 和 $FePO_4$ 的最高溶磷量均显著高于 CY 06，可望能开发成为微生物肥料应用于红壤地区，且对丰富微生物种质资源有重要意义和价值。

3　结　论

1）在以 $Ca_3(PO_4)_2$ 为唯一磷源的分离培养基上根据溶磷菌株的 D/d 筛选到 4 株溶磷能力较强的菌株，溶磷量在 330.1 ~ 418.7 mg L^{-1}，明显高于对照，其中 B1-A 溶磷量最高为 418.7 mg L^{-1}，经形态学和 ITS 序列分析，鉴定为黑曲霉（*Aspergillus niger*）。

2）比较 4 株溶磷菌在 NBRIP 培养液中 pH 下降幅度与其溶磷量之间的关系时发现：培养液的 pH 降幅大，溶磷量高；pH 降幅小，溶磷量低。

3）B1-A 的高溶磷量与接种量和培养时间有关，并非接种量越大溶磷量越高，在 $AlPO_4$ 培养液中溶磷量在接种后 72 h 趋于稳定；在 $FePO_4$ 培养液中溶磷量在接种后 168 h 趋于稳定，不同接种量的 B1-A 在 $FePO_4$ 和 $AlPO_4$ 培养液中溶磷量均与 pH 呈显著负相关。

4）B1-A 对两种磷矿粉的溶磷量在 119.4 ~ 177.4 mg L^{-1}，具有较强的溶解磷矿粉能力。对不同浓度的磷矿粉溶解效果不同，云南磷矿粉浓度为 3 g L^{-1}、江西磷矿粉浓度为 5 g L^{-1} 时溶磷效果较好。B1-A 对 4 种难溶性磷酸盐溶磷能力排序为 $AlPO_4$ > $Ca_3(PO_4)_2$ > $FePO_4$ > 磷矿粉，对 $AlPO_4$ 和 $FePO_4$ 有较好的溶磷效果，有望为开发微生物肥料应用于红壤地区提供优质种质资源。

参 考 文 献

[1]　郑春荣，陈怀满，周东美，等．土壤中积累态磷的化学耗竭．应用生态学报，2002，13（5）：559—563. Zheng C R, Chen H M, Zhou D M, et al. Chemical depletion of cumulative phosphorus in soils (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(5): 559—563

[2]　徐俊兵．扬州市土壤有机质和速效磷钾的分布研究．土壤，

2004,36(1): 99—103. Xu J B. Distribution of soil organic matter, available phosphorus and available potassium in soils of Yangzhou (In Chinese). Soils, 2004, 36(1): 99—103

[3] Gerretsen F C. The influence of microorganisms on the phosphate intake by plant. Plant and Soils, 1948, 1: 51—81

[4] AL-Niemi T S, Summers M L, Elkins J G, et al. Regulation of the phosphate stress response in rhizobium meliloti by PhoB. Appl Environ Microbial, 1997, 63: 4 978—4 981

[5] Whitel M A, Harden T J, Helyar K R. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31(5): 655—665

[6] Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva I. Simultaneous P solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: Potentials and future trends. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(2): 137—144

[7] 赵小蓉,林启美. 微生物解磷的研究进展. 土壤肥料,2001,5(3): 7—11. Zhao X R, Lin Q M. A review of phosphate dissolving microorganisms (In Chinese). Soils and Fertilizers, 2001, 5(3): 7—11

[8] 冯瑞章,冯月红,姚拓,等. 春小麦和苜蓿根际溶磷菌筛选及其溶磷能力测定. 甘肃农业大学学报,2005,40(5): 604—608. Feng R Z, Feng Y H, Yao T, et al. The screening of phosphobacteria and solubilizing phosphate ability in the rhizosphere of alfalfa and wheat (In Chinese). Journal of Gansu Agricultural University, 2005, 40(5): 604—608

[9] Wang G H, Zhou D R, Yang Q, et al. Solubilization of rock phosphate in liquid culture by fungal isolates from rhizosphere soil (In Chinese). Pedosphere, 2005, 15(4): 532—538

[10] Gothwal R K, Nigam V K, Mohanl M K, et al. Phosphate solubilization by rhizospheric bacterial isolates from economically important desert plants. Indian Journal of Microbiology, 2006, 46(4): 355—361

[11] Kucey R M N. Phosphate soluilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. Canadian Journal of Soil Science, 1983, 63(1): 671—678

[12] 杨芳,何园球,李成亮. 不同施肥条件下红壤旱地磷素形态及有效性分析. 土壤学报,2006,43(5):794—799. Yang F, He Y Q, Li C L. Effect of fertilization on phosphorus forms and its availability in upload red soil (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(5): 794—799

[13] Gupta R, Singal R, Shankar A, et al. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. Journal of General and Applied Microbiology, 1994, 40(3): 255—260

[14] Nautiyal C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170(1): 265—270

[15] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社,1979: 501—512. Wei J C. Fungus identification manual (In Chinese). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 501—512

[16] 闵晓芳,邓伯勋,陈丽锋,等. 柑橘采后致病青霉的鉴定. 果树学报,2007,24(5): 653—656. Min X F, Deng B X, Chen L F, et al. Molecular identification of *Penicillium* species causing post-harvest diseases of citrus fruits (In Chinese). Journal of Fruit Science, 2007, 24(5): 653—656

[17] Molla M A Z, Chowdhury A A, Islam A, et al. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. Plant and Soils, 1984, 78(3): 393—399

[18] 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. 微生物学报,2002,42(2): 236—241. Zhao X R, Lin Q M, Li B G. The solubilization of four insoluble phosphates by some microorganisms (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica, 2002, 42(2): 236—241

[19] 杨慧,范丙全,龚明波,等. 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. Yang H, Fan B Q, Gong M B, et al. Isolation and identification of a novel phosphate-dissolving strain P 21 (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(1): 51—56

[20] 黄伟,吴洪生,李辉信,等. 红壤溶磷菌的筛选及溶磷能力的比较. 生态与农村环境学报,2006,22(3): 37—40. Huang W, Wu H S, Li H X, et al. Screening and comparing of phosphorus solubilizing bacteria in red soil (In Chinese). Journal of Ecology and Rural Environment, 2006, 22(3): 37—40

[21] 康贻军,胡健,单君,等. 两株解磷真菌的解磷能力及其解磷机理的初步研究. 微生物学通报,2006,33(5): 22—27. Kang Y J, Hu J, Shan J, et al. Solubilization capacity of insoluble phosphates and its mechanism by two phosphate solubilizing fungi (PSF) (In Chinese). Microbiology, 2006, 33(5): 22—27

[22] Gyaneshwar P, Naresh K G, Parekh L J. Effect of buffering on the phosphate solubilizing ability of microorganisms. World J Microbiol Biotechnol, 1998, 14(5): 669—673

[23] Nahas E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms. World J Microbiol Biotechnol, 1996, 12(6): 567—572

[24] 王光华,周克琴,赵英. 黑土区高效溶磷真菌筛选及其溶解磷矿粉效果的研究. 中国农业生态学报,2004,12(3): 144—145. Wang G H, Zhou K Q, Zhao Y. Choose of phosphate-solubilizing fungal strains with high efficiency in black soil (In Chinese). Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2004, 12(3): 144—145

[25] Narsian V, Patel H H. Aspergillus aculeatus as a rock phosphate solubilizer. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(4): 559—565

[26] 赵小蓉,林启美,李保国. 微生物溶解磷矿粉能力与 pH 及分泌有机酸的关系. 微生物学杂志,2003,23(3): 5—7. Zhao X R, Lin Q M, Li B G. The relationship between rock phosphate solubilization and pH and organic acid production of microorganisms (In Chinese). Journal of Microbiology, 2003, 23(3): 5—7

[27] Asea P E A, Kucey R M N, Stewart J W B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. Soil Biology and Biochemistry, 1988, 20(4): 459—464

[28] 林启美,王华,赵小蓉,等. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探・微生物学通报,2001,28(2): 26—30. Lin Q M, Wang H, Zhao X R, et al. Capacity of some bacteria and fungi in dissolving phosphate rock (In Chinese). Microbiology, 2001, 28(2): 26—30

[29] 钟传青,黄为一. 磷细菌 P17 对不同来源磷矿粉的溶磷作用及机制. 土壤学报,2004,41(6):931—937. Zhong C Q,Huang W Y. Effects and mechanism of P-sollubilizing *Bacillus* P17 strain on phosphorus sollubilization of different phosphate rocks (In Chinese). Acta Pedologica Sinica,2004,41(6):931—937

[30] 林启美,赵海英,赵小蓉. 4 株溶磷细菌和真菌溶解磷矿粉的特性,微生物学通报,2002,29(6):24—28. Lin Q M,Zhao H Y,Zhao X R. The characteristics of solubilizing rock phosphate by four isolates of bacteria and fungi (In Chinese). Microbiology,2002,29(6):24—28

ISOLATION,IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PHOSPHATE-SOLUBILIZING STRAIN OF FUNGI IN RHIZOSPHERE OF PEANUTS GROWING IN RED SOIL

Liu Wengan[1,2]　Cao Hui[1]　Fan Jianbo[2]　He Yuanqiu[2†]

(1 *Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment*,*Ministry of Agriculture*,*Microbiology Department*,*College of Life Sciences*,*Nanjing Agricultural University*,*Nanjing* 210095,*China*)

(2 *Institute of Soil Science*,*Chinese Academy of Sciences*,*Nanjing* 210008,*China*)

Abstract To improve use efficiency of phosphorus in farming,a phosphate-solubilizing strain of fungi (PSF) labeled as B1-A was isolated from the rhizosphere of peanuts growing in red soil and identified as *Aspergillus niger* according to its colonial morphological characteristics and ITS rDNA sequence analysis. In the culture prepared out of two hard-to-dissolve phosphates ($FePO_4$ and $AlPO_4$),B1-A was added at a rate of 1%,3% and 5% separately. It was found that the P dissolution rate in and pH of the culture varied with the time,that a significant negative correlation existed between the rate and the pH,and that the former was also related to B1-A inoculation rate,incubation time and the concentration of rock phosphate powder (RPP) in the solution as well. Results show that B1-A demonstrated its highest capability when the solution was 3 g L^{-1} in Yunnan and 5 g L^{-1} in Jiangxi RPP concentration,inoculated with 3%~5% of B1-A,and incubated for 168 hours. B1-A was quite good at dissolving tricalium phosphate,aluminium phosphate,ferric phosphate and RPP,and might dissolve as much as 418.7,942.3,242.2 and 177.4 mg L^{-1},respectively. So B1-A is a promise microbial resource for development of high efficiency biological phosphorus fertilizer for use in latosolic red soil.

Key words Phosphate-solubilizing bacteria;P dissolution rate;Inoculation rate;Red soil