

类芦根际溶磷真菌的筛选、鉴定及其 溶磷能力分析

冯宏¹ 李永涛¹ 张志红¹ 韦翔华² 郭彦彪^{1*}

(1. 华南农业大学资源环境学院 广东 广州 510642)

(2. 广西大学农学院 广西 南宁 530005)

摘要: 为揭示类芦(*Neyraudia reynaudiana*)等水土保持植物的耐低磷机制, 开发溶磷菌种质资源, 提高赤红壤磷素利用率, 从类芦根际土壤中筛选到一株溶磷能力较强的真菌 FP1, 经形态学和 ITS 序列分析, 鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。3 种难溶性磷酸盐液体培养基接种菌株 FP1 后, 其 pH 值和溶磷量的动态变化显示, 培养液的 pH 值均呈显著下降趋势。溶磷量与培养时间有关, 除磷酸三钙外, 菌株 FP1 对其他难溶性磷酸盐的溶磷趋势均为先上升再下降并趋于稳定。菌株 FP1 对不同磷源的最大溶磷率顺序为: 磷酸铝(92.02%) > 磷酸三钙(41.62%) > 3 种磷酸盐的混合物(35.86%) > 磷酸铁(19.20%)。FP1 对磷酸铝和磷酸铁都具有较强的溶磷能力, 表明抗逆性强的水土保持植物类芦根际土壤蕴藏着高效的溶磷微生物资源。

关键词: 溶磷真菌, 水土保持植物, 耐低磷, 赤红壤

Screening, Identification, and Capability Assessment of a Phosphorus Solubilizing Fungus in Rhizosphere of Burma Reed

FENG Hong¹ LI Yong-Tao¹ ZHANG Zhi-Hong¹ WEI Xiang-Hua²
GUO Yan-Biao^{1*}

(1. College of Resources and Environment, South China Agriculture University, Guangzhou,
Guangdong 510642, China)

(2. Agricultural College, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China)

Abstract: To reveal mechanism of soil and water conservation plant such as Burma Reed (*Neyraudia reynaudiana*) tolerant of low phosphorus, explore germplasm of solubilizing phosphorus and improve use efficiency of phosphorus in latosolic red soil, a solubilizing phosphate fungus FP1 was isolated from rhizosphere soil of Burma reed and identified as *Aspergillus niger* according to morphological characteristics and ITS rDNA sequences. The dynamic variation of solubilizing phosphate capability and pH of in the liquid medium with three kinds of inorganic phosphate indicated that the pH of the liquid medium decreased sig-

nificantly after inoculated FP1 and the solubilizing phosphate capability was related with culturing time. Except for $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, solubilizing phosphate capability of FP1 rose first, then fell, and became stable in the end. The maximum phosphate solubilizing efficiencies were ordered as follows: AlPO_4 (92.02%) > $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (41.62%) > mixture of these three insoluble phosphates (35.86%) > $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (19.20%). The fungus FP1 was high efficient on solubilizing AlPO_4 and $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. It is indicated that microorganisms with high efficient solubilizing phosphorus exists in soil and water conservation plant rhizosphere.

Keywords: Solubilizing phosphorus fungus, Soil and water conservation plant, Tolerance to low phosphate, Latosolic red soil

土壤中 95% 磷为生物无效形式, 导致我国 74% 的耕地土壤缺磷。通过施肥进入土壤的磷会与 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 结合形成难溶性磷酸盐, 使磷肥的作物当季利用率只有 5%–25%^[1]。利用微生物提高土壤中难溶性磷的生物有效性和磷肥利用率, 对于作物增产和环境保护具有重要意义。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^[2–4]。研究表明, 真菌的溶磷能力普遍比细菌要高得多^[5], 但其数量和种类远少于溶磷细菌。因此, 不断挖掘高效溶磷真菌种质资源是当前迫切需要解决的科学问题。

迄今为止发现的溶磷菌主要集中在农作物和土壤中^[6–7], 少量报道源自牧草和林地等生态系统^[8–10], 类芦 (*Neyraudia reynaudiana*) 是一种耐贫瘠能力极强的水土保持植物^[11], 能够在水土流失严重、高铁铝导致低磷有效性的南方丘陵坡地红壤中正常生长, 表明类芦可能具有土壤溶磷特性和潜力, 但这方面的研究未见报道。本研究通过对类芦等植物根际溶磷菌的分离筛选, 并对筛选到的高效溶磷菌株进行鉴定和溶磷强度的动态测定, 为深入揭示类芦等水土保持植物的耐低磷机制, 开发植物根际溶磷真菌资源, 提高坡地红壤等侵蚀劣地磷素的利用率提供支持。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

2008 年 11 月 2 日采自华南农业大学校园内类芦、象草 (*Pennisetum purpureum* Schumach) 和大黍 (*Panicum maximum* Jacq.) 的根际土壤。土壤类型为花岗岩发育的赤红壤。

1.2 培养基

难溶无机磷培养基: 葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, 磷源 5.0 g, 加蒸馏水至 1000 mL, pH 7.0–7.5。磷源: 供试难溶磷酸盐分别为磷酸三钙 [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]、磷酸铝 (AlPO_4)、磷酸铁 ($\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 及三者重量比例为 1:1:1 的混合物 (简称 Fe-Al-Ca-P) 5.0 g。液体培养时不加琼脂, 培养温度 28°C。该培养基用于溶磷菌株筛选及溶磷能力测定。

PDA 培养基: 土豆 200 g, 蔗糖 10 g, 琼脂 18 g, 水 1000 mL。该培养基用于斜面保存菌株。

1.3 溶磷菌的筛选

称取 10 g 根际土壤于 90 mL 加有少许玻璃珠的无菌水中, 置于恒温摇床以 120 r/min 振荡 30 min 之后稀释, 取 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释度的土壤悬液涂布于相应的难溶无机磷固体平板培养基上, 置于 28°C 培养箱培养 10 d, 选择具有透明圈的菌落进行分离纯化, 转接斜面保存, 备用。

1.4 溶磷菌株的鉴定

1.4.1 菌株的形态观察: 采用载玻片培养法进行真菌培养, 通过电子显微镜观察分生孢子形状以及着生方式等, 依据齐祖同著《中国真菌志. 第 5 卷. 曲霉属及其相关有性型》^[12] 进行菌株初步鉴定。

1.4.2 菌株的分子生物学鉴定: 按照 SK1201-UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂 (上海生工) 方法提取 DNA 基因组。用 ITS1: 5'-TCCGT AGGTGAACCTGCGG-3' 与 ITS4: 5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3' 为引物对基因组进行 PCR 反应^[13], 扩增 rDNA ITS 区段。50 μL PCR 反应体系: 适量模板 DNA, 10 \times PCR buffer 5.0 μL , *Taq* DNA 聚合酶 2.5 U, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ITS1, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ITS4, 0.2 mmol/L dNTPs。PCR 扩增程序为: 95°C 5min; 95°C 35 s, 55°C 35 s, 72°C 40 s, 35 个循环; 72°C 8 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测。基因测序由上海生工生物工程公司完成, 获得测序结果后,

用 BLAST 搜索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)对基因序列的同源性进行分析。

1.5 菌株溶磷能力的测定

1.5.1 菌悬液制备: 将 PDA 培养基上培养 48 h 的菌刮入无菌水中, 于漩涡混合器中混合 30 s, 制备成菌悬液, 菌数约为 1×10^9 CFU/mL。

1.5.2 菌株溶磷能力测定: 在 250 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 5.0 g/L, 分别接种 1 mL 菌悬液, 设不接菌对照, 每个处理重复 3 次, 在 28°C、120 r/min 恒温摇床上振荡培养 8 d。每隔 24 h 用 pH 计测定 1 次培养液 pH 值, 同时取 1–2 mL 培养液在 10000 r/min 转速下离心 5 min, 取上清液用钼锑抗比色法测定有效磷含量, 减去对照值后即为其溶磷量, 以 P_2O_5 mg/L 计。

2 结果与分析

2.1 分离筛选

经筛选, 从供试植物根际土壤样品中分离到 10 株溶磷菌, 全部为真菌。可能是由于自然条件下, 南方赤红壤呈酸性反应, 真菌成为类芦等植物根际溶磷菌的优势类群。其中 1 株菌的菌落直径较大, 生长状况良好, 使磷酸铁和磷酸铝为磷源的培养基出现明显的透明圈。在磷酸铁固体平板上第 4 天开始出现透明圈, 菌落 + 透明圈直径为 2.20 cm, 菌落直径为 1.83 cm。将它指定为菌株 FP1, 并作为进一步研究的供试菌株。

2.2 菌株鉴定

菌株 FP1 在查氏琼脂培养基上培养 9 d 的生长情况和菌株分生孢子头经乳酸棉兰酚染色后的显微照见图 1, 菌落在查氏琼脂上生长迅速, 25°C 培养

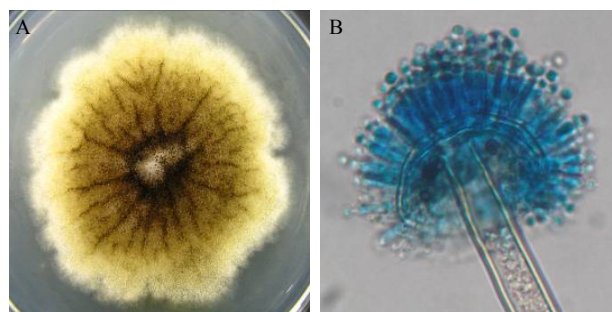


图 1 菌株 FP1 在查氏琼脂培养基上(9 d)的菌落形态(A)和分生孢子头形态特征(B)($\times 400$)

Fig. 1 The colony on czapek's medium (9 d, A) and conidial head (B) of FP1 ($\times 400$)

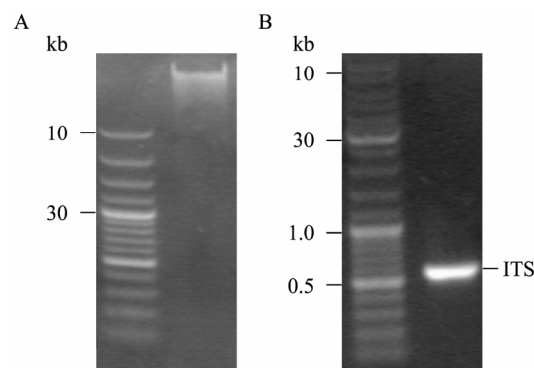


图 2 菌株 FP1 细胞总 DNA 电泳图(A)及 PCR 产物电泳图(B)

Fig. 2 Electrophoresis of total DNA (A) and PCR product of ITS rDNA of FP1 (B)

9 d 直径为 60 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 μ m–80 μ m, 产孢结构双层, 表面全面可育, 分生孢子球形, 直径 3.0 μ m–4.8 μ m, 壁稍粗糙。

菌株 FP1 细胞总 DNA 及 PCR 产物电泳图见图 2。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 599 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 FP1 与黑曲霉的同源性为 100%, 支持了形态鉴定的结果。该序列已经递交 GenBank, 登录号为 GU216310。

2.3 菌株 FP1 对难溶性磷酸盐的溶解能力

2.3.1 菌株对培养液 pH 值的影响: 菌株 FP1 在不同磷源的液体培养基中培养 8 d, 其液体培养基的 pH 值变化过程见图 3。从图中可以看出, 以难溶性磷酸盐作为唯一磷源的培养基在配制完成后, 经过 1×10^5 Pa、20 min 的高压蒸汽灭菌后, 培养基的 pH 值发生变化, 其原因可能是由于培养基中磷酸盐在高温条件下的部分溶解或各化学成分发生反应。接菌后 Fe-P 和 Al-P 的培养液呈酸性, 而 Ca-P 和 Fe-Al-Ca-P 的培养液呈碱性, pH 值大小顺序为: Fe-P < Al-P < Fe-Al-Ca-P < Ca-P。随着培养时间的延续, 4 种磷源液体培养基 pH 值变化明显呈现两种趋势, 一是以 Fe-P 和 Al-P 为磷源的培养基其 pH 值在培养初期 1–4 d 内下降速度较快, 4 d 后逐渐趋于平稳; 二是 Ca-P 培养基和 Fe-P、Al-P 和 Ca-P 三者混合物培养基在培养前 2 d, pH 值缓慢降低, 2 d 后 pH 值快速降低, 然后又逐渐趋于稳定。分析两种变

化趋势,发现呈现第2种变化趋势的培养基均有Ca-P,这可能是由于在培养初期,培养液中Ca-P的存在对pH值变化有缓冲作用,但随着培养时间的延长,这种缓冲作用逐渐消失所致。

无论接菌前培养液呈酸性还是碱性,1-8 d培养期间,各处理培养基pH值总的变化趋势一致,均为持续下降,除Ca-P培养液下降到2.34外,其他培养液的pH值都下降到2.00以下,表明菌株FP1在偏酸或偏碱的环境中均可生长,而且可能是该菌株不断向周围环境分泌酸性物质,致使培养液pH值不断下降。

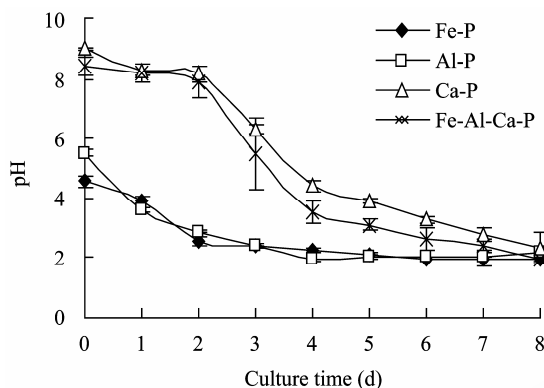


图3 菌株FP1在不同磷源培养液pH的动态变化
Fig. 3 Dynamic variation of pH during culture period

2.3.2 菌株FP1对难溶磷酸盐的溶磷能力: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^[5,14-15],而康贻军等^[16]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。培养期间菌株FP1对不同磷源的溶磷量动态变化见图4。从图中可以看出,菌株FP1对不同磷酸盐的溶解量在8 d培养过程中表现出不同的变化过程。在培养初期,FP1对各类型磷的溶磷量均随着培养时间的延长而增加,培养后期除Ca-P外,其他类型磷的溶解量均出现降低后趋于平稳的趋势,这一变化趋势与康贻军等^[16]的研究结果一致。从图中可以看出,在3 d内,菌株FP1对Al-P的溶磷量随着培养时间的延长而增加,从第2天开始,培养液已变澄清,FP1形成菌丝球(图5),5 d以后趋于稳定;在前7 d内,Fe-P的溶磷量随时间逐渐增加,之后趋于稳定,培养液也逐渐变澄清,颜色呈微黄色,可能与溶磷的同时伴随着 Fe^{3+} 的释放有关(图6);Ca-P在培养期间溶磷量一直在增加;南方的铁铝土中,难溶性磷酸盐总是

铁磷、铝磷和钙磷共存,从菌株FP1对3种难溶性磷酸盐混合物的溶磷量动态变化看,在前6 d内一直增加,6 d后显著下降并趋于稳定。菌株FP1对不同难溶性磷酸盐的溶磷量的动态变化较为复杂,如结合菌株在不同生长时期培养液的pH、有机酸的浓度和种类、有机磷与无机磷含量等的动态变化来探索溶磷机理,则有望在揭示微生物的溶磷机理方面取得新进展。

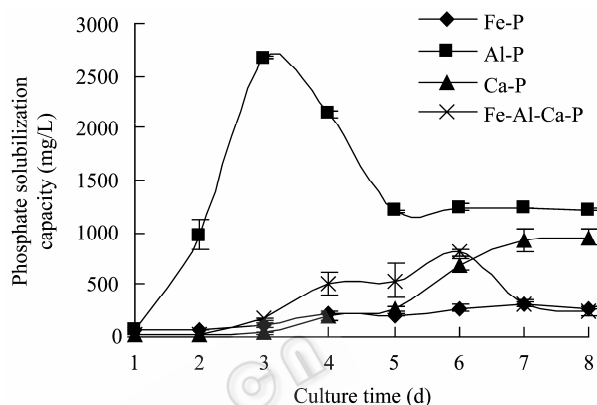


图4 菌株FP1在不同磷源培养液溶磷量的动态变化
Fig. 4 Dynamic variation of phosphate solubilization capacity during culture period



图5 Al-P培养液接种菌株FP1 2 d后的情况
Fig. 5 Liquid medium with Al-P after cultured FP1 for 2 days

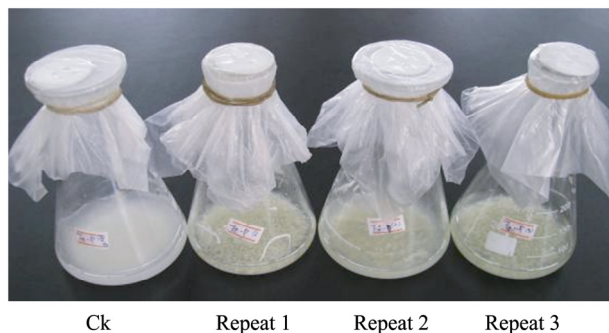


图6 Fe-P培养液接种菌株FP1 8 d后的情况
Fig. 6 Liquid medium with Fe-P after cultured FP1 for 8 days

有研究表明, 微生物的溶磷量与 pH 之间不存在显著的相关性^[5], 而有的研究结果则相反^[16-17]。从本研究结果看, 无论是哪种磷源, 菌株 FP1 的溶磷量与培养液的 pH 值均无显著相关性。康贻军等^[16]在对两株高效解磷真菌的解磷能力研究时, 每 12 h 测定溶磷量, 溶磷量分别在 4、5 d 溶磷量达最高值。本研究中菌株 FP1 对 Fe-P、Al-P、Ca-P 和 Fe-Al-Ca-P 的溶磷量最大值分别出现在培养的 7、3、8 和 6 d, 可见如果选用培养 7 d 以后的数据, 菌株对难溶性磷酸盐的最大溶磷能力将难以知晓。依最大溶磷量计算出的溶磷率顺序为: 磷酸铝(AlPO_4) 92.02% > 磷酸三钙 $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ 41.62% > 3 种磷酸盐的混合物 (35.86%) > 磷酸铁 ($\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 19.20%。与前人的研究结果相比^[15-17], 菌株 FP1 对磷酸铝和磷酸铁具有较好的溶磷效果, 有待进一步研究其接种到南方酸性赤红壤中的溶磷能力。

3 结论

(1) 从类芦根际土壤中筛选到 1 株溶磷能力较强的真菌 FP1, 经形态学和 ITS 序列分析, 鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

(2) 不论是何种难溶性磷酸盐磷源, 培养期间, 液体培养基的 pH 值均呈下降趋势, 培养第 8 天磷酸三钙培养液 pH 值下降到 2.34, 其他培养液均下降到 2.00 以下。

(3) 溶磷量与培养时间有关, 除磷酸三钙外, 菌株 FP1 对其他难溶性磷酸盐的溶磷趋势均为先上升再下降并趋于稳定。菌株 FP1 对不同磷源的最大溶磷率大小顺序为: 磷酸铝(AlPO_4) 92.02% > 磷酸三钙 $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ 41.62% > 3 种磷酸盐的混合物 35.86% > 磷酸铁($\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 19.20%。菌株 FP1 对磷酸铝和磷酸铁都具有较强的溶磷能力, 具有进一步开发利用的潜力。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Wang GH, Zhou DR, Yang Q, et al. Solubilization of rock phosphate in liquid culture by fungal isolates from rhizosphere soil. *Pedosphere*, 2005, 15(4): 532-538.
- [4] Gothwal RK, Nigam, VK, Mohanl, MK, et al. Phosphate solubilization by rhizospheric bacterial isolates from economically important desert plants. *Indian Journal of Microbiology*, 2006, 46(4): 355-361.
- [5] 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.
- [6] 蔡磊, 李文鹏, 张克勤. 高效解磷菌株的分离、筛选及其对小麦苗期生长的促进作用研究. 土壤通报, 2002, 33(1): 44-46.
- [7] 郝晶, 洪坚平, 刘冰, 等. 不同解磷菌群对豌豆生长和产量影响的研究. 作物杂志, 2006(1): 73-76.
- [8] Souchie EL, Abboud ACD. Phosphate solubilization by microorganisms from the rhizosphere of Pigeonpea genotypes grown in different soil classes. *Semina-Ciencias Agrarias*, 2007, 28(1): 11-18.
- [9] 陈俊, 陆俊银, 康丽华, 等. 红树林溶磷菌的初步鉴定、溶磷能力测定及其优化培养. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1183-1188.
- [10] 朱颖, 姚拓, 李玉娥, 等. 红三叶根际溶磷菌分离及其溶磷机制初探. 草地学报, 2006, 17(2): 259-263.
- [11] 林夏馨. 类芦生长和抗逆特性的分析探讨. 亚热带水土保持, 2006, 18(1): 48-51.
- [12] 齐祖同. 中国真菌志. 第 5 卷. 曲霉属及其相关有性型. 北京: 科学出版社, 1997.
- [13] Jin SL, Kwan SK, Hack SJ. Phylogenetic analysis of Xylariabased on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 2000(187): 89-93.
- [14] 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.
- [15] 黄伟, 黄欠如, 胡锋, 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.
- [16] 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.
- [17] 江丽华, 刘兆辉, 石璟, 等. 真菌 F2 的解磷能力及其生长动态研究. 中国农学通报, 2009, 25(1): 42-46.