

多功能解磷真菌的筛选与解磷活性评价

杨腊英¹, 郭立佳¹, 周游¹, 汪军¹, 梁昌聪¹, 徐云龙², 黄俊生^{1*}

1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海南海口 571101; 2. 海南大学植物保护学院, 海南海口 570228

摘要: 磷是植物生长发育过程中不可或缺的元素, 但在田间大多以无效的结合态磷存在, 土壤中的微生物能将无效态的磷转化为游离态的有效磷, 充分提高磷的利用率。本研究采用平板溶磷圈法从玉米根围土壤中分离纯化出 1 株解磷真菌 XZY3PSF, 对该菌株进行种类鉴定, 分析该菌株在 1~25 d 内溶解 2.5~20.0 g/L 磷酸三钙的活性、 $10\sim 10^5$ 个/mL 孢子浓度下对磷酸三钙的解磷能力, 及其在 0~35 d 内对 2.5、5.0 g/L 植酸钙的矿化能力, 评价其与解淀粉芽孢杆菌及香蕉枯萎病原菌间的相互作用。研究表明: 基于形态特征结合 *ITS* 与 β -*tubulin* 基因序列, 菌株 XZY3PSF 鉴定为 *Talaromyces purpureogenus*; 解磷菌在不同浓度的磷酸三钙下溶解出的有效磷含量均在 500~570 mg/L 之间, 培养基中的有效磷含量随着培养时间的延长而下降, 第 13 天后高浓度磷酸三钙培养液中的有效磷含量降低幅度减弱, 在第 25 天时 15.0、20.0 g/L 磷酸三钙培养基中的有效磷含量极显著高于其他浓度; 随着培养基中孢子浓度的增加, 培养液中有有效磷含量高峰值出现的时间越快, 且其降低幅度随着孢子浓度的增加而扩大; 在供试时间段内, 随着培养时间的延长, 菌株 XZY3PSF 对植酸钙的矿化能力越强; 解磷菌 XZY3PSF、芽孢杆菌菌株 X5 均对香蕉枯萎病原菌株 B2 具有拮抗作用, 且解磷菌 XZY3PSF 与芽孢杆菌 X5 之间亦相互拮抗。研究结果可为研发解磷菌与拮抗菌的复合微生物菌肥奠定基础, 同时, 解磷菌 XZY3PSF 对植酸钙的矿化作用为后续研究其是否具降解有机磷类农药提供理论基础。

关键词: 解磷真菌; 产紫篮状菌; 磷酸三钙; 植酸钙; 拮抗作用

中图分类号: S154.3 文献标识码: A

Screening of a Multifunctional Phosphate-solubilizing Fungus and Evaluation of the Phosphate-solubilizing Activity

YANG Laying¹, GUO Lijia¹, ZHOU You¹, WANG Jun¹, LIANG Changcong¹, XU Yunlong², HUANG Junsheng^{1*}

1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Integrated Pest Management of Tropical Crops, Ministry of Agriculture & Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou, Hainan, 571101, China; 2. School of Plant Protection, Hainan University, Haikou Hainan, 570228, China

Abstract: Phosphorus is an indispensable element in the process of plant growth and development, but it is mostly in the form of ineffective bound phosphorus in the field. The microorganisms in soil can convert the ineffective phosphorus into free effective phosphorus, and fully improve the utilization rate of phosphorus. In this study, a phosphate-solubilizing fungus XZY3PSF was isolated and purified from the corn rhizosphere soil using the phosphorus-solubilized halo method, and the strain was identified. The activity of the strain to dissolve 2.5–20.0 g/L tricalcium phosphate and the phosphate solubilization ability of $10\sim 10^5$ spores/mL to tricalcium phosphate in 1–25 d were analyzed. The mineralization ability of 2.5 g/L and 5.0 g/L calcium phytate was evaluated, and the interaction between it and *Bacillus amyloliquefaciens* and the pathogen of banana *Fusarium* wilt disease was evaluated. Based on the morphological characteristics combined with *ITS* and β -*tubulin* gene sequences, the strain XZY3PSF was identified as

收稿日期 2022-08-22; 修回日期 2022-10-15

基金项目 国家重点研发计划项目(No. 2020YFD10006000); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(No. 1630042022010); 海南省农业农村厅 2022 年农业种质资源保护项目(琼农计财〔2022〕29 号)。

作者简介 杨腊英(1981—), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物资源研究与利用。*通信作者(Corresponding author): 黄俊生(HUANG Junsheng), E-mail: h888111@163.com。

Talaromyces purpureogenus. The highest content of available phosphorus dissolved by phosphate-solubilizing strain under different concentrations of tricalcium phosphate was between 500 and 570 mg/L. The content of available phosphorus in the medium decreased with the prolongation of culture time. The decreasing range of the available phosphorus content in the tricalcium phosphate medium was weakened. On the 25th day, the available phosphorus content in the 15.0 and 20.0 g/L tricalcium phosphate medium was significantly higher than that of the other concentrations. With the increase of the spore concentration in the medium, higher peak value of the available phosphorus content in the culture medium appeared, and its decreasing range expanded with the increase of the spore concentration. During the test period, with the extension of culture time, the mineralization ability of XZY3PSF to calcium phytate was stronger. XZY3PSF and *Bacillus* X5 had antagonistic effects on the pathogen of banan *Fusarium* wilt, but the phosphate solubilizing fungus and *Bacillus* spp. also antagonized each other. The research results would lay a foundation for the development of microbial fertilizers composed of phosphorus-solubilizing fungi and antagonistic bacteria. At the same time, the mineralization of XZY3PSF on calcium phytate would provide a basic theoretical basis for subsequent studies on whether it can degrade organophosphorus pesticides.

Keywords: phosphate-solubilizing fungus; *Talaromyces purpureogenus*; tricalcium phosphate; calcium phytate; antagonism

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.08.016

磷是作物生长发育所必需的三大营养元素之一, 在植物的细胞分裂、能量转移、信号传导、核酸合成以及光合作用等过程中发挥着重要作用, 也是农业生产中最重要的养分限制因子。磷以磷肥的形式添加到土壤中, 据统计, 在我国, 磷肥在土壤中的当季利用率一般只有 10%~25%^[1], 植物未利用的部分均转化成不溶的固定形式。在酸性土壤中, 土壤中难溶性无机磷多被固定为磷酸铁、磷酸铝类化合物, 在中性及石灰性土壤中则多被固定为磷酸三钙类化合物。因此, 如何开发和利用被土壤固定的磷素, 提高土壤中磷的有效利用率, 减少化学磷肥的施用是我国可持续农业中必需解决的问题之一。调节土壤酸碱度、施用有机肥、土壤淹水处理、合理施用磷肥和利用解磷微生物活化土壤难溶性磷均为提高土壤磷素有效性的途径^[2], 其中, 利用解磷微生物来提高土壤磷素有效性不仅符合当下“化肥使用量零增长”的需求, 而且可以减少因磷肥的过量施用所造成的农业环境污染。

微生物对磷矿粉等难溶性磷肥的增溶作用及其在农业中的应用正成为国内外研究人员广泛关注的研究热点。很多土壤微生物包括细菌、真菌和放线菌均可参与土壤难溶性磷的溶解、转化和迁移过程, 通过酸化、螯合和交换反应, 将土壤中被固定的不溶性磷酸盐变成可溶形式^[3-5], 以利于植物的吸收, 进而增加作物产量^[6-7]。目前对解磷细菌的溶磷特性和机制已开展了大量研究, 但解磷真菌的相关研究仍然较少, 已报道的主要为曲霉属 (*Aspergillus*)、青霉属 (*Penicillium*)^[6-18]、

木霉属 (*Trichoderma*)^[19-20]、篮状菌属 (*Talaromyces*)^[19, 21]、枝孢属 (*Cladosporium*)^[22]、拟青霉属 (*Paecilomyces*)^[23-24]等, 其他类群较少报道。解磷真菌与细菌相比, 其产生有机酸的能力更强, 部分种属的溶磷效率明显高于细菌^[8], 且在传代培养过程中溶磷活性的稳定性也显著优于细菌^[10]。因此, 寻找更多有溶磷功能的真菌类群, 可为增强土壤或肥料中磷的可利用性提供更多的菌种资源。

笔者团队通过近 10 a 的研究, 已研发出一系列用于防控香蕉枯萎病、根结线虫等土传病害的生物菌肥产品, 为扩宽生物菌肥菌株的功效, 将拮抗生防菌与提高肥效利用率的菌株相结合研发不同系列的微生物菌肥, 既可提高作物抵御病虫害入侵的能力, 又能提高磷的利用率, 进而改善农产品品质。本研究采用无机磷筛选培养基, 从农田黑土中筛选出高效解磷菌株, 定性分析该菌株的解磷能力与芽孢杆菌的相互作用, 为后续利用该菌株进行新菌肥的研发与田间应用奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤 土壤样品采自西藏自治区墨脱县背崩乡 (29°14'36"N, 95°10'9"E), 土壤类型为黑土, 采样点为玉米根周土壤。

1.1.2 供试菌株 解磷对照菌株 LGJPJ、拮抗芽孢杆菌菌株 X5、香蕉枯萎病病原菌菌株 B2 均由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所微生物资源研究与利用研究组分离鉴定并保存。

1.1.3 供试培养基 (1) 简化版无机磷固体培养基: 葡萄糖 10.0 g, 硫酸铵 2.0 g, 磷酸三钙 5.0 g, 琼脂 20.0 g, 水 1000 mL, pH 7.00~7.50。

(2) 简化版蒙金娜固体培养基: 葡萄糖 10.0 g, 硫酸铵 2.0 g, 植酸钙 2.0 g, 琼脂 20.0 g, 水 1000 mL, pH 7.00~7.50。

(3) 简化版无机磷(有机磷)液体培养基: 葡萄糖 10.0 g, 硫酸铵 2.0 g, 磷酸三钙 5.0 g (植酸钙 2.0 g), 胰蛋白胍 0.5 g, 去离子水 1000 mL, pH 7.00~7.50。

(4) 保存用 PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1000 mL, 自然 pH。

(5) LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胍 10.0 g, 氯化钠 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g。

所有培养基均在 121 °C 条件下高压灭菌 20 min。

1.1.4 供试溶液 (1) 钼酸盐溶液: 13.00 g 钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 溶于 100 mL 蒸馏水, 0.35 g 酒石酸锑钾 $(\text{KSbC}_4\text{H}_4\text{O}_7\cdot \text{H}_2\text{O})$ 溶于 100 mL 蒸馏水。在不断搅拌的情况下把钼酸铵溶液徐徐加入到 300 mL 50%硫酸溶液中, 然后加入酒石酸锑钾溶液混匀, 于棕色瓶 4 °C 保存。

(2) 10%抗坏血酸溶液: 10 g 抗坏血酸溶于 100 mL 的蒸馏水中, 于棕色瓶 4 °C 保存。

(3) 150 mmol/L 对硝基苯磷酸二钠 (pNPP) 溶液: 称取 2.784 g pNPP 溶于 50 mL 蒸馏水中。

1.2 方法

1.2.1 孢子接种液制备 挑取菌株的菌丝, 放于 PDA 平板中, 28 °C 恒温培养至长出孢子, 用无菌水冲洗孢子并经无菌 3 层擦镜纸过滤后, 即制备成真菌的孢子悬液, 经镜检孢子数约为 7×10^6 个/mL。

1.2.2 有效磷含量测定 吸取各处理的培养液 2 mL 于 10 000 r/min 离心 10 min, 参考陈玮^[25]的钼锑抗比色法, 测定上清液中的有效磷含量(使用光程 10 mm 的比色皿, 波长采用 700 nm), 以不接菌作为空白对照。以波长 700 nm 处吸光度值 (OD_{700}) 为纵坐标 (y), 溶磷量 (x) 为横坐标绘制磷标准曲线, 得到钼锑抗磷标准曲线线性回归方程为: $y=0.5031x+0.0112$, 相关系数 $R^2=0.9976$, 通过磷标准曲线回归方程计算溶液中的有效磷含量, 以确定菌株的解磷能力。溶磷率计算公式为: 溶磷率=(接菌有效磷含量-对照有效磷含量)/加入无机磷源的量 $\times 100\%$ 。

1.2.3 解磷菌的筛选 (1) 解磷菌的初筛。称取

10 g 土壤样品置于 90 mL 无菌水中, 28 °C 摇床震荡 30 min 制成土壤悬液, 土壤悬液梯度稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 后分别用玻璃棒涂布于无机磷固体培养基上, 吹干后用封口膜封口并倒置于生化培养箱中 28 °C 培养。通过观察平板上所长真菌菌落周围是否产生透明圈来初步筛选解磷菌, 挑取具有较明显透明圈的真菌菌落转接至 PDA 平板上进行纯化培养, 并作为解磷真菌复筛的初筛菌株。

(2) 解磷菌的复筛。150 mL 三角瓶中装入无机磷液体培养基 50 mL, 接入制备的孢子悬液 200 μL , 于 28 °C 180 r/min 震荡培养 5 d。解磷对照菌株 LGJPJ、芽孢杆菌 X5 从 LB 平板接种单菌落于 LB 液体培养基中, 摇培 16 h 后, 分别接种 200 μL 菌液至无机磷液体培养基中, 于 37 °C、180 r/min 摇床上培养 5 d, 吸取各摇培液 2 mL 离心后取上清液, 根据有效磷含量测定方法, 对比各菌株培养液中有有效磷浓度的大小, 筛选出高效解磷菌。

(3) 解磷菌对有机磷的矿化能力。挑取解磷菌株菌饼置于简化版蒙金娜固体培养基上, 通过观察平板上所长真菌菌落周围是否产生透明圈, 分别测定解磷菌菌落直径 (d) 和溶磷圈直径 (D), 计算可溶性指数 (D/d), 分析菌株对有机磷的矿化能力。同时向培养基平板上滴加 2 mL 150 mmol/L pNPP, 覆盖溶磷圈, 4 h 后观察显色结果, 如有黄色产生则说明解磷菌分泌磷酸酶。

1.2.4 解磷菌的鉴定 (1) 真菌 DNA 的提取。将经单孢纯化菌株在 PDA 培养基中活化, 再按照 SDS 法^[26]提取真菌 DNA, 于 -20 °C 保存。

(2) ITS 基因序列扩增。用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3')、ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系: 模板 1 μL , 10 mmol/L 引物各 1 μL , Takara Mix 12.5 μL , 用 ddH₂O 补至 25 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 然后 94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 50 s、72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 °C 再延伸 7 min。PCR 扩增产物置于 4 °C 保存。

(3) β -tubulin 基因序列扩增。用真菌通用引物 Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3')、Bt2b (5'-ACCCTCAGTGAGTGACCCTTGGC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系: 模板 1 μL , 10 mmol/L 引物各 1 μL , Takara Mix 12.5 μL , 用 ddH₂O 补至 25 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 然后 94 °C 变性 30 s、58 °C

退火 50 s、72 °C 延伸 1 min，共 35 个循环，最后 72 °C 再延伸 7 min。PCR 扩增产物置于 4 °C 保存。

用 1% 琼脂糖凝胶电泳对产物进行检测，PCR 产物经纯化后送生工生物工程（上海）股份有限公司测序，获得的序列经 GenBank 中的 Blast 程序与数据库中的所有序列进行比较分析，利用 DNASTar 软件构建系统发育树。

1.2.5 解磷真菌的解磷能力分析 (1) 解磷菌株对不同浓度磷酸三钙的解磷能力。50 mL 不含磷酸三钙的无机磷液体培养基置于 150 mL 三角瓶中，分别加入 0.125、0.250、0.400、0.500、0.600、0.750、1.000 g 磷酸三钙，制成终浓度分别为 2.5、5.0、8.0、10.0、12.0、15.0、20.0 g/L 的无机磷液体培养基，分别加入 200 μ L 制备的孢子悬液，180 r/min、28 °C 摇床培养 11 d 后，室温静置培养，分别在第 1、3、5、7、9、11、13、17、25 天吸取培养液 2 mL，测定有效磷含量及培养液 pH，每处理 3 次重复。菌株解磷能力为接菌培养液有效磷浓度减去不接菌培养液有效磷浓度，取 3 次重复的平均值 (mg/L)。

(2) 解磷菌株不同孢子浓度悬液的解磷能力。50 mL 无机磷液体培养基置于 150 mL 三角瓶中，将制备的孢子悬液分别按照 0.2、2、20、200 μ L，2 mL 接入无机磷液体培养基中，使孢子终浓度分别为 28、280、 2.8×10^3 、 2.8×10^4 、 2.8×10^5 个/mL。28 °C 摇床 180 r/min 培养 11 d 后，室温静置培养，分别在第 1、3、5、7、9、11、13、17、25 天吸取培养液 2 mL，测定有效磷含量，每处理 3 次重复。

(3) 解磷菌株对不同浓度植酸钙的矿化能力。在含 50 mL (植酸钙终浓度分别为 2.0、5.0 g/L) 的简化版蒙金娜液体培养基的 150 mL 三角瓶中，分别加入孢子悬液 200 μ L，孢子终浓度均为 2.8×10^4 个/mL，180 r/min 28 °C 摇床培养 11 d 后，室温静置培养，分别在第 1、3、5、7、9、11、13、15、17、25、35 天吸取培养液 2 mL，测定有效磷含量，每处理 3 次重复。

1.2.6 解磷真菌与芽孢杆菌、香蕉枯萎病菌之间的相互拮抗作用 采用平板对峙法测定解磷真菌 XZY3PSF 与芽孢杆菌 X5、香蕉枯萎病菌 B2 之间的相互拮抗作用。香蕉枯萎病菌 B2 用 PDA 平板按照孢子悬浮液制备法获得病原真菌的孢子悬液，参考汪军等^[27]的拮抗活性检测方法，按照等边三角形分别接种直径为 0.5 cm 的香蕉枯萎病菌 B2、解磷真菌 XZY3PSF 菌饼及芽孢杆菌 X5

菌液 10 μ L，28 °C 培养 3~4 d，观察相互之间的拮抗情况。

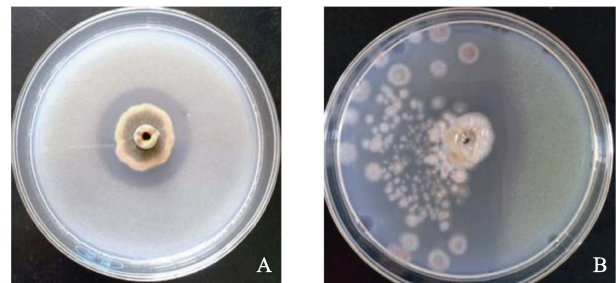
1.3 数据处理

采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件对数据进行分析处理，数值进行对数转换后采用 LSD 法进行多重比较，采用 Pearson's 法进行相关性分析，利用 Excel 2010 软件制作图表。

2 结果与分析

2.1 解磷菌的筛选

在无机磷固体培养基平板上，解磷菌株周围能形成一圈透明圈 (图 1A)，根据透明圈直径大小可以初步判断解磷菌株解磷能力的强弱。通过对初筛的解磷菌株进行解磷能力测定，结果表明，5 d 后该菌株的解磷能力达到 502.1 mg/L，分别高于对照菌株 LGJPJ (68.9 mg/L)、拮抗芽孢杆菌菌株 X5 (53.3 mg/L) 7.3 倍、9.4 倍。解磷菌株培养第 5 天在蒙金娜固体培养基平板上的可溶性指数达 1.6，滴加 pNPP 后观察到有黄色产生 (图 1B)，说明解磷菌株可分泌磷酸酶。将该菌株命名为 XZY3PSF，并进一步对其进行分子鉴定和解磷特性研究。



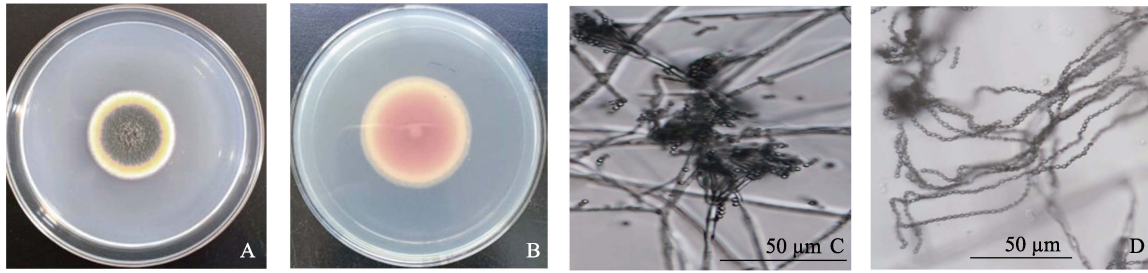
A: 第 5 天溶磷情况; B: 第 7 天产磷酸酶情况。
A: Phosphorus dissolution at the 5th day; B: Phosphatase production at the 7th day.

图 1 解磷菌株在蒙金娜固体培养基上的溶磷和产磷酸酶活性

Fig. 1 Phosphorus solubilization and phosphatase production activity of phosphate solubilizing bacteria strain on Montkina solid medium

2.2 菌株 XZY3PSF 的鉴定

菌株 XZY3PSF 在 PDA 培养基上的初生菌丝为白色透明，3 d 后开始产生绿色孢子，聚集在中央，周围菌丝为白色，平板背面显示为橘红色，培养至 15 d 后菌丝几乎长满整个平板，孢子灰绿色 (图 2A)，平板背面深红色 (图 2B)。产孢结构 3 分支且轮生 (图 2C)，孢子椭圆形，3.16~3.69 μ m，孢子呈长链状 (图 2D)。



A: 菌落正面; B: 平板背面; C: 产孢结构; D: 孢子长链。
 A: Picture is the front; B: Picture is the back of the PDA culture plate; C: Picture is the spore-forming structure;
 D: Picture is the spore long chain.

图 2 菌株 XZY3PSF 在 PDA 上的菌落与孢子形态

Fig. 2 Colony and spore morphology of strain XZY3PSF on PDA plate

选择均有 *ITS* 与 β -*tubulin* 基因序列的同一菌株, 并将其序列进行拼接, 采用邻位法构建系统发育树, 发现菌株 XZY3PSF 的 *ITS* 与 β -*tubulin* 基因拼接序列与归属于 *T. purpureogenus* 的

CBS184.27 等 9 株菌株在同一分支, 且相似度达到 99.8%(图 3)。根据形态观察和 *ITS* 与 β -*tubulin* 基因序列对比结果, 鉴定 XZY3PSF 为篮状菌属 (*Talaromyces*) 产紫篮状菌 (*T. purpureogenus*)。

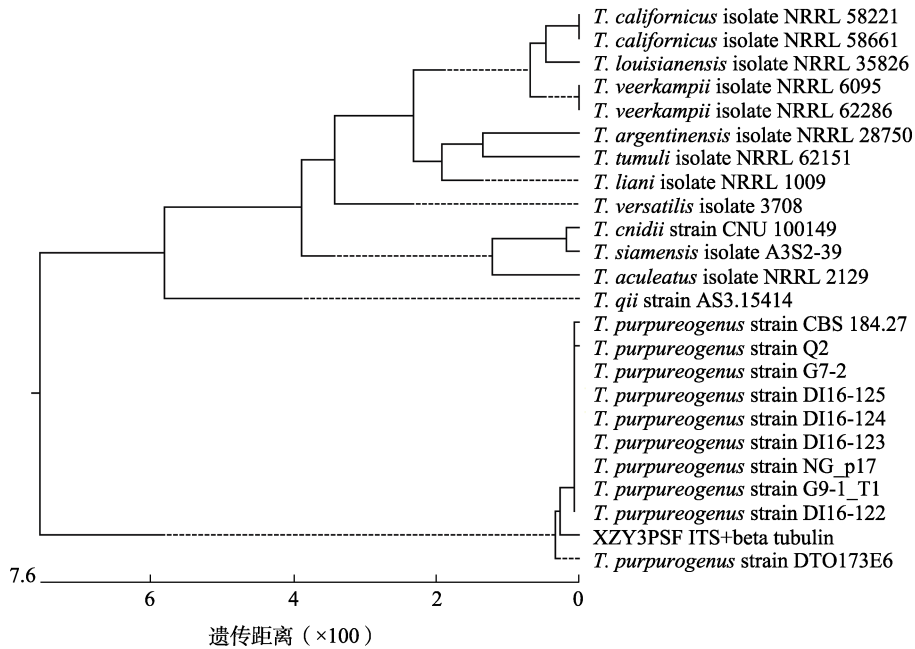


图 3 基于 *ITS*、 β -*tubulin* 基因序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree established with *ITS*, β -*tubulin* genes sequence

2.3 菌株 XZY3PSF 对磷酸三钙、植酸钙的解磷能力

2.3.1 菌株 XZY3PSF 对不同浓度磷酸三钙的解磷能力 从图 4 可知, 随着磷酸三钙浓度的升高, 培养液中的最高有效磷含量无显著变化, 5 g/L 磷酸三钙的培养液中的有效磷含量相对较高, 而 2.5 g/L 磷酸三钙的溶磷率最高, 溶磷率随磷酸三钙浓度的增加而降低。随着培养时间的延长, 从第 9 天开始, 有效磷含量开始下降, 在第 13 天后有效磷含量随磷酸三钙浓度的增大而增大, 且在

第 25 天时, 浓度为 15、20 g/L 磷酸三钙的有效磷含量极显著高于其他浓度 (表 1)。

2.3.2 菌株 XZY3PSF 不同孢子浓度对磷酸三钙的解磷能力 从图 5 可知, 随着解磷菌株孢子浓度的增加, 有效磷含量最高值出现的时间逐渐缩短, 分别出现在第 11、9、9、7、7 天; 随着培养时间的延长, 孢子浓度为 28 个/mL 的有效磷含量下降趋势较缓, 而其余浓度在第 25 天与最高峰值呈极显著差异, 尤以浓度为 2.8×10^4 个/mL 的有效磷含量下降趋势最为陡峭, 在第 17 天有效磷含量仅

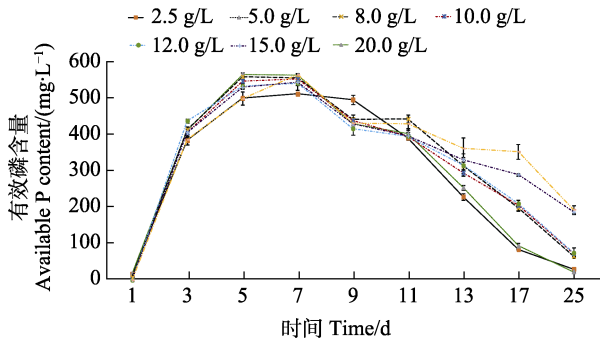


图 4 菌株 XZY3PSF 对不同浓度磷酸三钙的解磷效果

Fig. 4 Phosphorus solubilization effect of strain XZY3PSF on different concentrations of tricalcium phosphate

表 1 XZY3PSF 菌株在不同浓度磷酸三钙中的有效磷含量

Tab. 1 Available P content of strain XZY3PSF in different tricalcium phosphate concentrations

浓度 Concentration/(g·L ⁻¹)	有效磷含量 Available P content/(mg·L ⁻¹)	
	7 d	25 d
2.5	513.9±3.3 ^{cB}	31.8±2.4 ^{dD}
5.0	566.0±5.6 ^{aA}	24.9±1.6 ^{cC}
8.0	558.9±2.2 ^{abA}	67.5±1.5 ^{bB}
10.0	555.0±12.3 ^{abA}	74.9±2.8 ^{bB}
12.0	543.9±5.6 ^{bA}	76.4±14.5 ^{bB}
15.0	546.3±22.3 ^{bA}	189.1±5.5 ^{aA}
20.0	566.8±3.2 ^{aA}	195.8±11.4 ^{aA}

注：同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)；同列不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$); Different capital letters in the same column indicate extremely significant difference ($P < 0.01$).

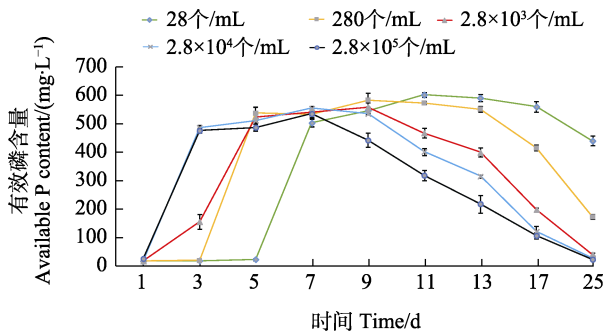


图 5 菌株 XZY3PSF 不同孢子浓度对磷酸三钙的解磷效果

Fig. 5 Effect of strain XZY3PSF with different spore concentrations on phosphorus decomposition of tricalcium phosphate

为 93.9 mg/L, 在第 25 天有效磷含量仅为 10.3 mg/L, 与第 7 天分别相差 5.6 倍、50.8 倍。

2.3.3 菌株 XZY3PSF 对不同浓度植酸钙的解磷能力 从图 6 可知, 在测试时间段内, 2 种植酸

钙浓度的有效磷含量均随培养时间的延长而增加, 其中浓度为 5.0 g/L 的有效磷含量在第 25 天达到最高峰; 同时随着植酸钙浓度的升高, 有效磷含量亦增加, 在不同时间均呈极显著差异。

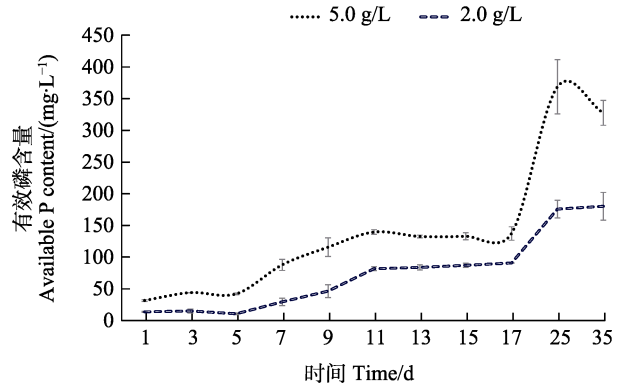
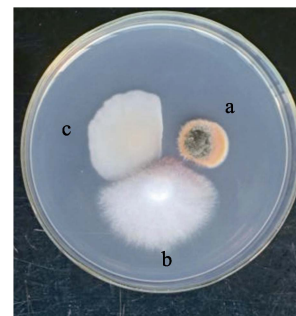


图 6 菌株 XZY3PSF 对不同浓度植酸钙的解磷效果

Fig. 6 Phosphorus dissolving effect of XZY3PSF strain on different concentrations of calcium phytate

2.4 菌株 XZY3PSF 与芽孢杆菌 X5、香蕉枯萎病菌 B2 之间的相互作用

采用对峙培养法综合评价解磷菌株 XZY3PSF 与已用于研发生物菌肥产品的芽孢杆菌 X5 对香蕉枯萎病菌 B2 的生长抑制情况, 及解磷菌株 XZY3PSF 与芽孢杆菌 X5 之间的相互作用, 研究发现解磷菌 XZY3PSF 可抑制香蕉枯萎病菌 B2 的生长, 同时与芽孢杆菌 X5 之间存在一定的相互拮抗作用 (图 7)。



a: XZY3PSF; b: B2; c: X5.

图 7 菌株 XZY3PSF 与芽孢杆菌 X5、香蕉枯萎病菌 B2 之间的相互作用

Fig. 7 Interaction between strain XZY3PSF and *Bacillus* .sp X5, banana *Fusarium* wilt pathogen B2

3 讨论

本研究中筛选的解磷菌株 XZY3PSF 与对照菌株 LGJPJ、芽孢杆菌 X5 相比, 其溶磷效率在 7 倍以上, 这与 WHITELAW 等^[8]的研究结果相似,

且解磷菌株 XZY3PSF 经传 10 代后, 其仍具有较好的溶磷活性。经鉴定, 菌株 XZY3PSF 鉴定为产紫篮状菌 (*T. purpleogenus*), 篮状菌属 (*Talaromyces*) 是一种正被开发利用的生防菌类群, 已报道从开裂的人参种皮中分离得到黄色篮状菌 (*T. flavus*), 该菌能产生几丁质酶, 从而抑制核盘菌、黄萎病菌、立枯病菌的细胞壁形成, 还能抑制稻瘟病菌、链格孢菌、尖镰孢菌的孢子萌发和菌丝伸长^[28]。田叶韩等^[29]发现产紫篮状菌 Q2 菌株对多种土传病害有明显的防治作用, 赵洋等^[30]发现 Q2 菌株可通过产生细胞壁降解酶破坏尖镰孢菌菌丝形态, 起到抑制病原菌生长的作用。据笔者所查文献, 目前尚无产紫篮状菌在解磷方面的研究报道。通过“三三”拮抗实验发现菌株 XZY3PSF 亦对香蕉枯萎病菌具有较好的抑菌作用, 该菌株既有高效解磷效果又具较好拮抗作用, 为后续生物菌肥的研发提供优良微生物菌种。

通过研究 0~25 d 解磷菌株 XZY3PSF 对磷酸三钙的解磷情况, 发现随着培养时间的延长, 不同孢子浓度或同一孢子浓度不同磷酸三钙浓度的有效磷含量均下降, 尤其到 13 d 静置培养后下降速度更快, 这可能是由于菌株生长消耗所致。NARSIAN 等^[9]研究发现, 较高浓度的磷对溶磷活性无影响, 但是由于菌株的持续生长, 使菌株生长过程中会以利用培养基中有效磷的形式导致有效磷浓度下降。李豆豆等^[18]等发现草酸青霉菌 PSF1 在 1~6 d 对磷酸三钙的解磷量呈上升趋势, 在第 6 天解磷量达到最高后略有下降, 可能是由于此时培养液中菌体较多对磷的消耗较大导致。这一发现与 NARSIAN 等^[9]、李豆豆等^[18]的报道一致, 且本研究结果基于更长时限, 结论更客观、可靠。

本研究发现解磷菌株 XZY3PSF 对有机磷类的植酸钙具有持续的矿化作用, 随着培养时间的延长, 0~25 d 有效磷含量呈逐渐上升趋势, 在第 35 天时略有下降或趋于平缓, 且该菌株对有机磷类磷源的矿化或分解效率强于已报道的巨大芽孢杆菌等细菌。杨晓燕等^[31]研究发现巨大芽孢杆菌能够有效降解有机磷和无机磷, 对卵磷脂中的磷分解后有效磷含量达到最高值为 1.67 mg/L, 本研究中菌株 XZY3PSF 对植酸钙矿化后有效磷含量高达 368.6 mg/L, 对大豆卵磷脂中的磷降解率最高达 94.5 mg/L (数据另行分析处理)。

利用解磷菌来制备土壤改良剂、生物肥料等,

不仅能提高土壤有效磷的利用率、增加农作物的产量, 还能有效减少磷素的流失^[32]。目前, 部分从土壤中分离的解磷菌已投入实际应用, 且效果显著。如洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*) 作为生物肥料可以显著提高番茄、马铃薯、洋葱等作物的产量^[33]; 巴西青霉菌 (*Penicillium bilaii*) 对小麦等谷物类作物的促生作用明显, 能有效减少化学磷肥的施用^[7]; 以固氮菌株和溶磷真菌产紫篮状菌混合发酵所制复合型菌肥对辣椒苗的促生效果最佳^[34]。分离的解磷菌株 XZY3PSF 对有机磷和无机磷的降解具有高活性, 且对香蕉枯萎病菌具有较好的拮抗活性, 研究结果为研发具拮抗功能又可提高土壤中磷利用率的复合生物菌肥奠定基础。

参考文献

- [1] 鲁如坤. 我国的磷矿资源和磷肥生产消费 II. 磷肥消费和需求[J]. 土壤, 2004, 36(2): 113-116.
LU R K. Phosphorus resources and phosphate fertilizer production and consumption of China II. Phosphate fertilizer consumption and predicted demand[J]. Soils, 2004, 36(2): 113-116. (in Chinese)
- [2] 黄昌勇, 徐建明. 土壤学(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
HUANG C Y, XU J M. Pedology (3rd ed)[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010. (in Chinese)
- [3] ASEA P E A, KUCEY R M N, STEWART J W B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1988, 20: 459-464.
- [4] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料, 2001(3): 7-11.
ZHAO X R, LIN Q M. Research progress of phosphate solubilizing microorganisms[J]. Soil and Fertilizer Sciences, 2001(3): 7-11. (in Chinese)
- [5] 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[J]. 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[J]. Journal of Microbiology, 2003, 23(3): 5-7. (in Chinese)
- [6] COUTINHO F P, FELIX W P, YANO-MELO A M. Solubilization of phosphates *in vitro* by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp.[J]. Ecological Engineering, 2012, 42: 85-89.
- [7] RAM H, MALIK S S, DHALIWAS S S, KUMAR B, SINGH Y. Growth and productivity of wheat affected by

- phosphorus-solubilizing fungi and phosphorus levels[J]. *Plant Soil & Environment*, 2015, 61(3): 122-126.
- [8] WHITE LAW M A, HARDEN T J, BENDER G L. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov.[J]. *Australian Journal of Soil Research*, 1997, 35(2): 291-300.
- [9] NARSIAN V, PATEL H H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 559-565.
- [10] MALIHA R, SAMINA K, NAJMA A, SADIA A, FAROOQ L. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions[J]. *Pakistan Journal of Biological Science*, 2004, 7(2): 187-196.
- [11] SRIVIDYA S, SOUMYA S, POOJA K. Influence of environmental factors and salinity on phosphate solubilization by a newly isolated *Aspergillus niger* F7 from agricultural soil[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(9): 1864-1870.
- [12] GUPTA N, SABAT J, PARIDA R, KERKATTA D. Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines[J]. *Acta Botanica Croatica*, 2007, 66(2): 197-204.
- [13] GUPTA N, DAS S, BASAK U C. TCP and rock phosphate solubilization by mangrove fungi grown under different pH and temperature in liquid culture[J]. *Journal of Agricultural Technology*, 2010, 6(3): 421-428.
- [14] JAIN R, SAXENA J, SHARMA V. Solubilization of inorganic phosphates by *Aspergillus awamori* S19 isolated from rhizosphere soil of a semi-arid region[J]. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(2): 725-735.
- [15] XIAO C Q, ZHANG H X, FANG Y J, CHI R. Evaluation for rock phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Aspergillus niger* WHAK1[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169: 123-133.
- [16] LI Z, BAI T S, DAI L T, WANG F W, TAO J J, MENG S T, HU Y X, WANG S M, HU S J. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25313.
- [17] 李学平, 谢文军, 范延辉. 盐碱地塔宾曲霉菌的解磷能力及其对小麦生长的影响[J]. *水土保持通报*, 2017, 37(1): 93-96.
- LI X P, XIE W J, FAN Y H. Phosphate-solubilizing ability of *Aspergillus tubingensis* and its effects on growth of wheat seedling stage[J]. *Bulletin of Soil and Water Conservation*, 2017, 37(1): 93-96. (in Chinese)
- [18] 李豆豆, 尚双华, 韩巍, 房娜娜, 依艳丽. 一株高效解磷真菌新菌株的筛选鉴定及解磷特性[J]. *应用生态学报*, 2019, 30(7): 2384-2392.
- LI D D, SHANG S H, HAN W, FANG N N, YI Y L. Screening, identification, and phosphate solubilizing characteristics of a new efficient phosphate solubilizing fungus[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(7): 2384-2392. (in Chinese)
- [19] 杨榕, 王敬敬, 徐松, 赵维, 刘海燕, 李晴晴, 黄志勇. 溶磷真菌的筛选及耐盐特性分析[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(10): 2142-2151.
- YANG R, WANG J J, XU S, ZHAO W, LIU H Y, LI Q Q, HUANG Z Y. Screening, identification and salt-tolerant characteristics of phosphate-solubilizing fungi[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(10): 2142-2151. (in Chinese)
- [20] TANDON A, FATIMA T, ANSHU, SHUKLA D, TRIPATHI P, SRIVASTAVA S, SINGHAL P C. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions[J]. *Journal of King Saud University-Science*, 2020, 32(1): 791-798.
- [21] KANSE O S, WHITE LAW-WECKERT M, KADAM T A, BHOSALE H J. Phosphate solubilization by stress-tolerant soil fungus *Talaromyces funiculosus* SLS8 isolated from the Neem rhizosphere[J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(1): 85-93.
- [22] 曹冠华, 张雪, 马诗婷, 王希付, 俞捷, 顾雯, 赵荣华, 贺森. 阳春砂仁根内生真菌解磷功能评价及分类学鉴定[J]. *中草药*, 2020, 51(5): 1316-1323.
- CAO G H, ZHANG X, MA S T, WANG X F, YU J, GU W, ZHAO R H, HE S. Phosphate-solubilizing function evaluation and taxonomic identification of endophytic fungi separated from roots of *Amomum villosum*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(5): 1316-1323. (in Chinese)
- [23] ERKFELDT S. Slow and steady phosphate solubilization by a psychrotolerant strain of *Paecilomyces hepiali* (MTCC 9621)[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2011, 27(5): 1055-1062.
- [24] HERNANDEZ-LEAL T I, CARRION G, HEREDIA G. *In vitro* phosphate solubilization by a strain of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson[J]. *Agrociencia*, 2011, 45(8): 881-892.
- [25] 陈玮. 钼锑抗比色法测定水中总磷的改进[J]. *山西化工*, 2003(1): 18-19, 36.
- CHEN W. Improvement of determining total phosphorus by colorimetry[J]. *Shanxi Chemical Industry*, 2003(1): 18-19, 36. (in Chinese)
- [26] 杨腊英, 黄华平, 唐复润, 胡美娇, 张世清, 黄俊生. 香蕉炭疽菌 rDNA ITS 区的分子鉴定与检测[J]. *植物病理学报*, 2006(3): 219-225.

- YANG L Y, HUANG H P, TANG F R, HU M J, ZHANG S Q, HUANG J S. Rapid molecular identification and detection of *Colletotrichum musae* with species-specific primers based on the internal transcribed spacer (ITS) region[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2006(3): 219-225. (in Chinese)
- [27] 汪军, 黄俊生, 梁昌聪, 周游, 刘磊, 杨腊英, 郭立佳. 一种非无菌条件下测定生防细菌代谢产物拮抗活性的方法: CN107937479A[P]. 2018-04-20.
- WANG J, HUANG J S, LIANG C C, ZHOU Y, LIU L, YANG L Y, GUO L J. A method for determining the antagonistic activity of biocontrol bacterial metabolites under non-sterile conditions: CN107937479A[P]. 2018-04-20. (in Chinese)
- [28] LI Z B, LIU L W, LU X C, JI J F, CHEN J. Analysis of the *Talaromyces flavus* exometabolome reveals the complex responses of the fungus to minerals[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2021, 298(1): 70-86.
- [29] 田叶韩, 彭海莹, 王德浩, 李晓芳, 何邦令, 高克祥. 产紫篮状菌的生防潜力及其对土壤微生物群落的调控[J]. *应用生态学报*, 2020, 31(10): 3255-3266.
- TIAN Y H, PENG H Y, WANG D H, LI X F, HE B L, GAO K X. Biocontrol potential of *Talaromyces purpureogenus* and its regulation on soil microbial community[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020, 31(10): 3255-3266. (in Chinese)
- [30] 赵洋, 田叶韩, 高克祥, 付学松. 转录组分析产紫篮状菌 Q2 菌株抑制尖镰孢菌生长的潜在机制[J]. *山东农业科学*, 2021, 53(8): 94-101.
- ZHAO Y, TIAN Y H, GAO K X, FU X S. Transcriptome analysis of potential inhibitory mechanisms of *Talaromyces purpureogenus* strain Q2 against *Fusarium oxysporum*[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2021, 53(8): 94-101. (in Chinese)
- [31] 杨晓燕, 叶伟伟, 魏善强, 张龙, 黄俊. 一株巨大芽孢杆菌发酵培养基的优化及解磷效果研究[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(15): 105-112.
- YANG X Y, YE W W, WEI S Q, ZHANG L, HUANG J. *Bacillus megaterium*: fermentation medium optimization and phosphate solubilization effect[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(15): 105-112.
- [32] KLAIC R, PLOTTEGHE R F, RIBEI R O C, ZANGIROL-AMIA T C, FARINAS C S. A novel combined mechanical-biological approach to improve rock phosphate solubilization[J]. *International Journal of Mineral Processing*, 2017, 161: 50-58.
- [33] CABALLERO-MELLADO J, ONOFRE-LEMUS J, SANTOS P E L, MARTINEZ-AGUILAR L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5308-5319.
- [34] 李凌凌, 陆雅琳, 汪汉正, 周予西, 左振宇, 杨忠华. 一株固氮菌的筛选、鉴定及混菌发酵制备复合型菌糠菌肥的研究[J]. *武汉科技大学学报*, 2021, 44(1): 34-42.
- LI L L, LU Y L, WANG H Z, ZHOU Y X, ZUO Z Y, YANG Z H. Isolation, identification of a nitrogen-fixing bacterium and preparation of complex bio-fertilizer with spent mushroom substrate by mix fermenting[J]. *Journal of Wuhan University of Science and Technology*, 2021, 44(1): 34-42. (in Chinese)