

谭海霞,李丽艳,王连龙,等.耐盐溶磷菌 YJC19 的鉴定及不同培养条件对其溶磷效果的影响[J].江苏农业科学,2022,50(9):235-239.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.09.037

耐盐溶磷菌 YJC19 的鉴定及不同培养条件对其溶磷效果的影响

谭海霞¹,李丽艳^{2,3},王连龙¹,彭红丽¹,杜迎辉^{2,3},孙杉杉^{2,3}

(1.河北环境工程学院,河北秦皇岛 066000;2.领先生物农业股份有限公司,河北秦皇岛 066000;

3.河北省农业生物技术技术创新中心,河北秦皇岛 066000)

摘要:对前期从盐碱土壤中筛选到的 1 株溶磷菌株 YJC19 进行分子生物学鉴定,探讨分析菌株的耐盐特性及不同培养条件对其溶磷能力的影响,以期为其在盐碱地改良中的应用提供理论参考,为进一步开发耐盐溶磷微生物菌肥提供种质资源。通过形态观察和系统发育树分析对溶磷菌株进行鉴定,通过不同盐浓度 PDA 培养基对菌株生长影响判断其耐盐特性,采用钼锑抗比色法测定菌株 YJC19 在不同磷源[Ca₃(PO₄)₂、AlPO₄、FePO₄]、盐浓度(0、2.5%、5.5%、7.5%)、初始 pH 值(5.5、6.5、7.5、8.5)液体培养条件下的溶磷量。结果表明,菌株 YJC19 鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*),可耐受盐浓度高达 15.0%,在盐浓度为 0~7.5% 培养基中生长良好。菌株 YJC19 具有较强的溶磷能力,对磷酸钙的溶解能力远大于磷酸铝和磷酸铁,溶磷量为 1 741.59 mg/L;随着盐浓度的提高,菌株 YJC19 溶磷能力降低,2.5% 盐浓度处理组的溶磷量与无盐对照组差异不显著。菌株 YJC19 在 pH 值 5.5~8.5 范围内均可正常生长,初始 pH 值为 6.5 时其溶磷量最高。不同环境条件的无机磷液体培养中,溶磷量与 pH 值均呈显著负相关,初步判断菌株 YJC19 溶磷机制为酸溶磷。菌株 YJC19 是 1 株耐盐碱性较强的高效溶磷真菌,为其应用于盐碱土改良提供了保证,可为北方盐碱土壤修复改良提供优质种质资源,具有良好的开发与应用潜力。

关键词:黑曲霉;耐盐溶磷菌;溶磷能力;培养条件;相关性分析

中图分类号:X171.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)09-0235-05

在农业生产中,磷肥施入土壤,约有 80% 的磷被土壤中铝、铁、钙等阳离子吸附固定,导致土壤中有效磷含量较低,磷已成为影响植物产量的养分限制因素之一^[1]。化肥过量施用不利于农业可持续发展,研究表明,溶磷微生物可以活化土壤中的不溶性磷,进而促进植物生长,利用微生物提高土壤中磷的利用率已成为目前研究的热点^[2-3]。目前已报道的多数溶磷菌都不耐盐碱,在高盐碱环境中溶磷能力有限,不适合在盐碱地施用。盐碱地的改良修复是亟需解决的问题,利用微生物改良盐碱土壤既节本增效,又可促进农业生态环境健康发展。本试验从河北滨海盐生植物根际土壤中筛选

获得了 1 株高效溶磷耐盐真菌,对其耐盐能力及在不同培养环境溶磷特性进行初步分析,以期丰富盐碱地改良菌种资源库,为在盐碱地实际应用中提高盐渍土不溶性磷的利用效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

试验于 2021 年 3—5 月在河北省农业生态安全重点实验室完成。试验菌株:解磷真菌 YJC19(由领先生物农业股份有限公司微生物实验室从曹妃甸盐地碱蓬根际土壤中筛选分离得到)。

1.2 培养基

含盐 PDA 培养基:以马铃薯葡萄糖琼脂培养基^[4]为基础,分别添加 0、2.5%、5.5%、7.5%、10.0%、15.0% NaCl。

含盐无机磷液体培养基:在解磷液体培养基^[5]的基础上添加 2.5%、5.5%、7.5% NaCl。

1.3 溶磷菌的鉴定

1.3.1 形态学观察 参照文献^[6-7],对溶磷菌株 YJC19 的菌落和分生孢子进行观察及鉴定。

收稿日期:2021-08-10

基金项目:河北省重点研发计划(编号:1927302D);河北省农业生态安全重点实验室开放基金(编号:2020SYSJJ04);秦皇岛科学技术研究与发展计划(编号:202005A036)。

作者简介:谭海霞(1979—),女,黑龙江五常人,硕士,副教授,主要从事生态修复研究。E-mail:tanhaixia2001@126.com。

通信作者:李丽艳,农艺师,主要从事微生物肥料研发应用研究。E-mail:li.liyan@leadst.cn。

1.3.2 菌株分子鉴定 参考文献[8]对溶磷菌株 YJC19 进行基因组 DNA 提取并构建系统发育树。将测序得到的内源转录间隔区(ITS)序列在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中使用 BLAST 比对后,使用 MEGA 6.0 软件 Clus - tral W 进行聚类分析,以 Neighbour - Joining 法构建分子系统发育树,结合形态鉴定,确定各菌株的亲缘关系及分类地位。

1.4 溶磷菌株 YJC19 耐盐能力探究

参考文献[9]测定菌株 YJC19 的耐盐能力,用接种环挑取菌株 YJC19 的菌丝 1 环于含盐 PDA 固体培养基中,30 ℃ 培养 7 d,观察菌株生长情况。

1.5 不同培养条件对菌株 YJC19 溶磷能力的影响

分别改变原有无机磷培养基中磷源[Ca₃(PO₄)₂、AlPO₄、FePO₄]、盐浓度(2.5%、5.5%、7.5%)、初始 pH 值(5.5、6.5、7.5、8.5)等,在 100 mL 无机磷液体培养基中接种 10⁸ CFU/mL 菌株 YJC19 孢子悬液 1 mL,28 ℃、180 r/min 恒温振荡培养 5 d^[10],每隔 24 h 取 2 mL 发酵液,测定上清液中有效磷的含量和 pH 值,以不接菌种处理为对照。

1.6 数据分析

采用 Excel 2010、SPSS 25、Origin 8.0 和 MEGA 6.0 软件进行数据统计与分析。

2 结果与分析

2.1 溶磷菌株 YJC19 分类学鉴定

2.1.1 形态学特征 菌株 YJC19 的菌落颜色先呈黄白后变黑。分生孢子梗长度不同,分生孢子头呈

放射状,黑褐色,分生孢子呈褐色,球形。将纯化的菌株 YJC19 接种到无机磷固体培养基中,观察菌株的溶磷效果,如图 1 所示,培养 5 d 后,菌株 YJC19 周围的 Ca₃(PO₄)₂ 已经明显被溶解并形成了透明的溶磷圈。

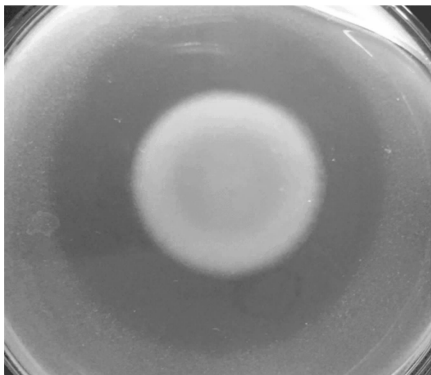


图1 菌株 YJC19 的溶磷特征

2.1.2 菌株分子鉴定 利用 ITS 通用引物 ITS1 和 ITS4 有效扩增出 603 bp 的片段。测序结果在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 上进行比较。利用 BLAST 软件构建系统发育树,利用 Neighbour - Joining 方法构建系统发育树。从图 2 可以看出,菌株 YJC19 与已报道的黑曲霉(*Aspergillus niger*)在分类生态学中亲缘关系最密切,同源性较高。结合形态分析鉴定菌株 YJC19 为黑曲霉(*A. niger*) YJC19。

2.2 溶磷菌株 YJC19 的耐盐能力

培养 7 d 后,与对照组(无盐培养基)相比,盐含量为 15.0% 的培养基中,菌株 YJC19 有被抑制的趋

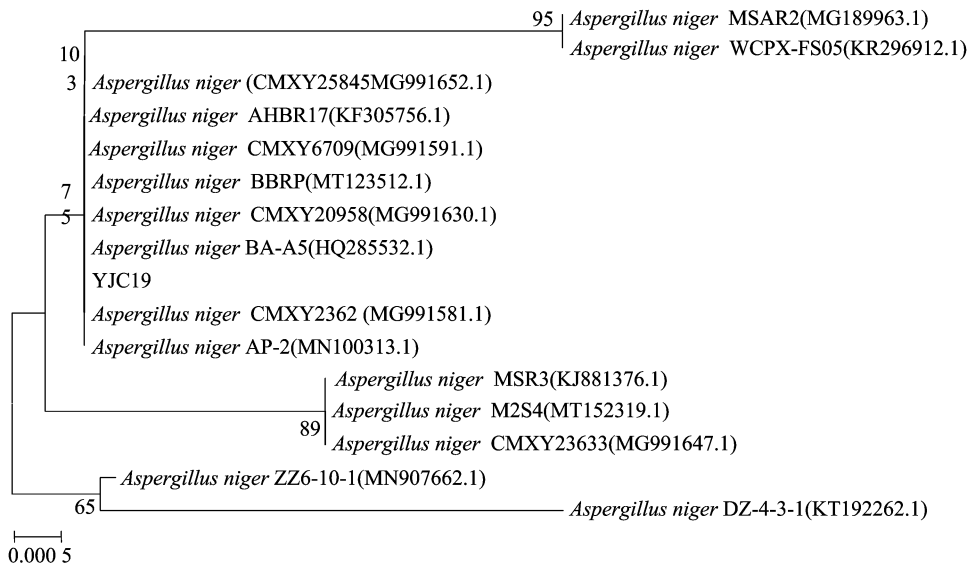


图2 基于 ITS 基因序列相似性构建的菌株 YJC19 的系统发育树

势,长势较弱;盐含量为 10.0% 时,菌株可生长。可见,菌株 YJC19 可耐受高达 15.0% 的 NaCl (表 1)。目前研究的耐盐解磷菌主要为江红梅等筛选得到的草酸青霉 M2,最高可耐受 7% 的盐浓度^[4];范延辉等筛选的草酸青霉 PSF2 最高可耐受盐浓度阈值为 12.5%^[11];而本研究中菌株 YJC19 可耐受高达 15.0% 的盐浓度。菌株 YJC19 生长能力随盐胁迫的增加而降低,其原因可能是高盐浓度下细胞内 Na^+ 浓度较低,以此来免受毒害^[12],大量的能量用来调整自身的代谢途径以及适应环境,用于生长繁殖的能量相对减少,所以自身生长受到影响。

表 1 不同盐浓度下菌株生长状况

| 氯化钠浓度 (%) | YJC19 生长状况 |
|-----------|------------|
| 0 | +++ |
| 2.5 | +++ |
| 5.5 | ++ |
| 7.5 | ++ |
| 10.0 | + |
| 15.0 | w |

注:+++ 说明菌株长势快;++ 说明菌株生长较慢;+ 说明菌株可生长;w 说明菌株生长较弱。

2.3 不同培养条件对其溶磷效果的影响

2.3.1 不同磷源对菌株 YJC19 溶磷能力的影响

由图 3 可知,菌株 YJC19 对 3 种磷酸盐的溶解能力总体表现为 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{FePO}_4 > \text{AlPO}_4$ 。培养 144 h,3 种磷化合物培养液中有有效磷含量均呈先升后降再趋于稳定的趋势。以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为磷源时,培养液中有有效磷含量在 48~72 h 内快速增加,96 h 时达到峰值(1 741.59 mg/L),此后平缓减少,同一培养时间内它的有效磷含量显著高于其他 2 种磷源。磷源为 AlPO_4 时,在 72 h 时有效磷含量最高(403.33 mg/L);磷源为 FePO_4 时,在 96 h 时有效磷含量最高(693.75 mg/L)。

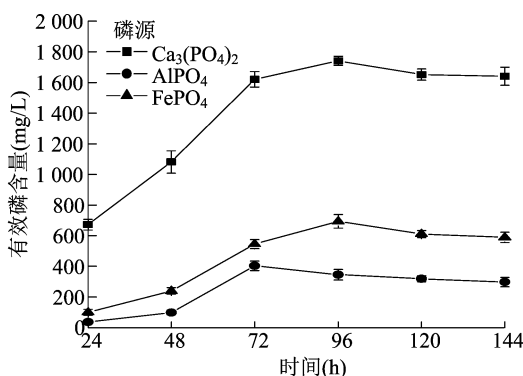


图 3 不同磷源对菌株 YJC19 溶磷能力的影响

2.3.2 不同 NaCl 浓度对菌株 YJC19 溶磷能力的影响 在不同盐浓度的无机磷液体培养基中,菌株 YJC19 对磷酸三钙的溶解能力存在显著差异($P < 0.05$),总体表现为随着盐浓度的提高,菌株 YJC19 的溶磷能力降低。盐浓度为 2.5% 时,菌株 YJC19 溶磷能力仅次于对照组;盐浓度为 7.5% 时,溶磷能力最差。144 h 培养期间,菌株 YJC19 对磷酸钙的溶磷量变化如图 4 所示,不同盐浓度对菌株 YJC19 溶磷能力的影响基本表现一致,溶磷量达到峰值的培养时间不同,盐浓度为 2.5% 和 5.0% 时溶磷量随培养时间的延长逐渐提高而后下降。盐浓度为 2.5% 时,前 120 h 溶磷量逐渐增加,120 h 时达到峰值(1 719.48 mg/L);盐浓度为 5.0% 时,96 h 溶磷量达到峰值(790.83 mg/L);盐浓度为 7.5% 时,溶磷量变化曲线呈“S”形,72 h 时溶磷量达到峰值(497.08 mg/L),随后溶磷量略有降低再升高后趋于平稳趋势。

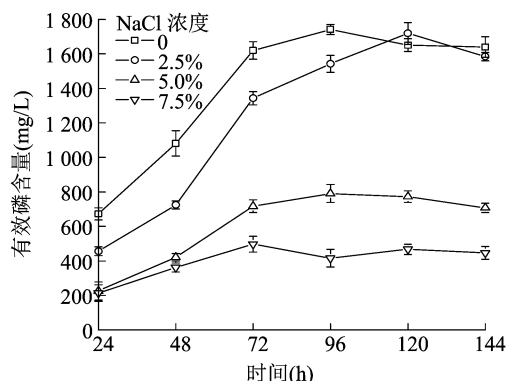


图 4 不同盐浓度对菌株 YJC19 溶磷能力的影响

2.3.3 不同初始 pH 值对菌株 YJC19 溶磷能力的影响 如图 5 显示,菌株 YJC19 在 pH 值 5.5~8.5 范围内均可正常生长,但溶磷特性不同,处理组间差异极显著($P < 0.01$)。各处理组溶磷量出现峰值的时间不同,溶磷量峰值排序为 6.5 > 7.5 > 5.5 > 8.5。初始 pH 值为 6.5 时,溶磷量峰值达到 1 741.71 mg/L,分别比 pH 值为 5.5、7.5、8.5 处理组增加 29.45%、9.38%、46.26%,表明培养菌株 YJC19 的培养基最适初始 pH 值为 6.5。

2.4 菌株 YJC19 溶磷能力与 pH 值的关系

将菌株 YJC19 接种到不同环境条件的无机磷液体培养基中,总体来看,培养液的 pH 值在培养 144 h 内均逐渐降低,在 48~72 h 迅速降低,均在 120 h 后逐渐平缓(图 6)。不同磷源 [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 AlPO_4 、 FePO_4] 培养液在 144 h 内溶液 pH 值从 7.0 分别下降到 2.33、3.96、3.02;不同盐浓度(2.5%、

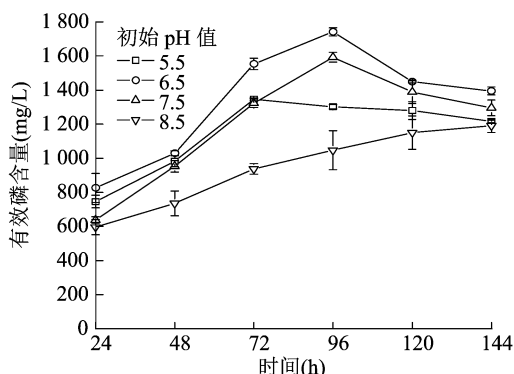
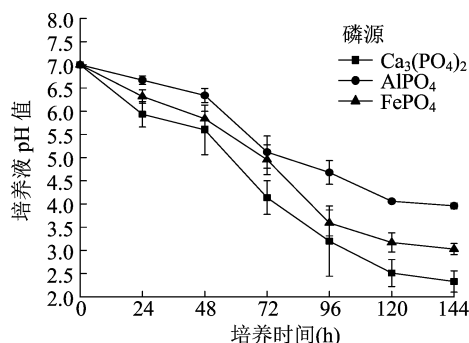
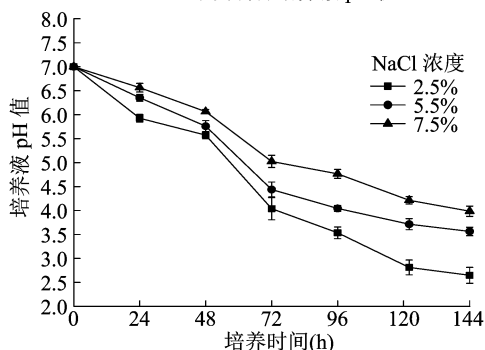


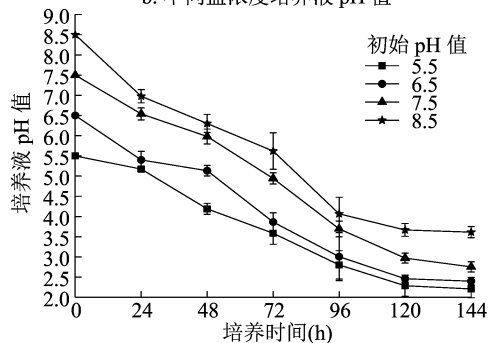
图5 不同初始 pH 值对菌株 YJC19 溶磷能力的影响



a. 不同磷源培养液 pH 值



b. 不同盐浓度培养液 pH 值



c. 不同初始 pH 值培养液

图6 无机磷液体培养基的 pH 值动态变化

5.5%、7.5%) 培养液在 144 h 内溶液 pH 值从 7.0 分别下降到 2.65、3.56、3.98; 不同初始 pH 值(5.5、6.5、7.5、8.5) 培养液在 144 h 内溶液 pH 值分别下降到 2.21、2.48、2.75、3.61。培养液 pH 值变化范围在 2.0~8.5 之间, 在此范围内菌株均能正常生

长, 这表明菌株 YJC19 具有广泛的酸碱适应性。

对溶磷量与 pH 值数据进行 Pearson 相关性分析, 不同环境的无机磷液体培养液中溶磷量与 pH 值两者均呈负相关(图 7)。菌株 YJC19 在难溶磷源 $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2, \text{AlPO}_4, \text{FePO}_4]$ 培养液中的溶磷量与 pH 值的相关系数分别为 -0.886 ($P < 0.05$)、 -0.815 ($P < 0.05$)、 -0.903 ($P < 0.05$); 不同盐浓度(2.5%、5.5%、7.5%) 培养液中的溶磷量与 pH 值的相关系数分别为 -0.976 ($P < 0.01$)、 -0.952 ($P < 0.01$)、 -0.829 ($P < 0.05$); 不同初始 pH 值(5.5、6.5、7.5、8.5) 培养液中的溶磷量与 pH 值的相关系数分别为 -0.894 ($P < 0.05$)、 -0.812 ($P < 0.05$)、 -0.818 ($P < 0.05$)、 -0.978 ($P < 0.01$)。这可能是因为 YJC19 菌体适应环境后, 不断产生释放酸性代谢产物, 随着溶磷量的增加, 培养液 pH 值下降, 这表明将菌株 YJC19 作为微生物菌剂应用于盐碱土中, 不仅能增加盐碱土中可溶磷的含量, 也可以改善盐碱土的酸碱环境。

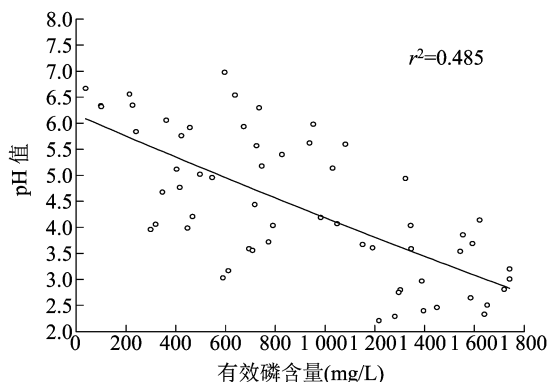


图7 菌株 YJC19 溶磷能力与培养液 pH 值的关系

3 结论与讨论

研究表明, 溶磷真菌比溶磷细菌具有更高的溶磷能力^[13], 从高盐环境中筛选分离得到的溶磷真菌主要局限于青霉属 (*Penicillium*)^[14]、曲霉属 (*Aspergillus*)^[15-16] 等。本研究所用的菌株是 1 株从盐地碱蓬根际土中分离得到的溶磷真菌, 鉴定为黑曲霉 (*A. niger*), 命名为 YJC19。

研究表明, 随着外界环境或营养物质的变化, 溶磷菌的生长代谢会发生变化, 导致菌株溶磷能力有明显差异^[14,17]。在不同环境下菌株 YJC19 均具有溶磷能力, 但溶磷效果有显著差异, 它对磷酸钙 (1 741.59 mg/L) 的溶解能力显著高于磷酸铁 (693.75 mg/L) 和磷酸铝 (403.33 mg/L), 这与相关

文献研究结论^[18-20]一致。但与刘文干等的结论^[21]不一致,其从红壤中筛选的黑曲霉菌株 B1-A 对磷酸盐溶磷能力排序为 $\text{AlPO}_4 > \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{FePO}_4$, 这可能是由于北方盐碱土壤中难溶磷的主要形态为磷酸钙,强酸性红壤中以磷酸铝铁形态存在,微生物对土壤环境表现出高度的生理响应特性,进而不同菌株的溶磷机制不同,因此筛选土著溶磷菌具有重要意义。经过对菌株 YJC19 在不同 NaCl 浓度下的耐盐性和溶磷能力分析得知,菌株 YJC19 在 0~7.5% NaCl 浓度范围内生长良好,溶磷量随着 NaCl 浓度的增加而减少。2.5% 盐浓度处理组与无盐对照组无显著性差异,说明该菌有较强的耐盐性,为其在盐碱化土壤中的生长定殖提供了基本保障,提高盐碱地磷素利用率潜力巨大,但盐碱化程度高的土壤中该菌的溶磷能力降低。

pH 值会影响微生物的生长和代谢。微生物溶磷的方式多种多样,一般认为有机酸分泌是微生物溶解磷的主要途径^[1]。王呈玉等研究发现,黑曲霉菌株 An510 的溶磷能力可能来自于有机酸的产生,发酵液中有机的含量和种类随培养时间和培养基质的不同而变化^[8]。刘晓芳等研究发现,黑曲霉菌株 ML4 发酵液中含有多种有机酸^[22]。本试验中菌株 YJC19 在初始 pH 值为 5.5~8.5 的培养液中均可正常生长,培养液中可溶磷含量基本表现为先升后降再趋于稳定的趋势,pH 值在培养 7 d 内呈下降趋势,不同环境的无机磷液体培养中溶磷量与 pH 值均呈显著负相关,因此推测菌株 YJC19 的溶磷能力主要源自其分泌的有机酸物质,也可能与菌株代谢有关,其溶磷机制需进一步深入研究。

盐碱地改良是急需解决的问题,微生物改良盐碱地是一种环保、经济、高效的生物措施。本研究中的溶磷黑曲霉菌株 YJC19 兼具较强的耐盐性和溶磷能力,最高溶磷量可达 1 741.59 mg/L,为其应用于盐碱土壤改良提供了保证,具有良好的开发与应用潜力。

参考文献:

- [1] 秦利均,杨永柱,杨星勇. 土壤溶磷微生物溶磷、解磷机制研究进展[J]. 生命科学研究,2019,23(1):59-64,86.
- [2] 李静,张金羽,张琪,等. 玉米根际无机磷溶解菌的筛选与促

- 生特性[J]. 应用与环境生物学报,2019,25(2):378-384.
- [3] 薛英龙,李春越,王苻蓉,等. 丛枝菌根真菌促进植物摄取土壤磷的作用机制[J]. 水土保持学报,2019,33(6):10-20.
- [4] 江红梅,殷中伟,史发超,等. 一株耐盐溶磷真菌的筛选、鉴定及其生物肥料的应用效果[J]. 植物营养与肥料学报,2018,24(3):728-742.
- [5] 李豆豆,尚双华,韩巍,等. 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.
- [6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:129-135.
- [7] 齐祖同. 中国真菌志:曲霉属及其相关有性型[M]. 北京:科学出版社,1997:100-102.
- [8] 王呈玉,关旭雯,陈美骅,等. 溶磷黑曲霉 An510 筛选鉴定及其溶磷机理[J]. 吉林农业大学学报,2020,42(6):662-668.
- [9] 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.
- [10] 王虹. 解磷真菌在盐碱胁迫下的解磷能力及促生作用研究[D]. 长春:吉林农业大学,2020.
- [11] 范延辉,王君,李学平. 耐盐溶磷菌 PSB7 的鉴定及其溶磷效果研究[J]. 河南农业科学,2016,45(7):56-60.
- [12] 刘晓丹,刘金亮,魏毅,等. 一株极端耐盐曲霉的分离、鉴定及生物学特性分析[J]. 吉林大学学报(理学版),2011,49(3):548-553.
- [13] 杨顺,杨婷,林斌,等. 两株溶磷真菌的筛选、鉴定及溶磷效果的评价[J]. 微生物学报,2018,58(2):264-273.
- [14] 范延辉,王君,刘雪红,等. 一株耐盐解磷真菌的筛选、鉴定及其发酵优化[J]. 土壤通报,2015,46(2):362-367.
- [15] 郑晓梅,丁旭扬,黄婷,等. 一株产酸黑曲霉的分离鉴定及其在盐碱土改良中的应用[J]. 山东农业科学,2019,51(4):69-73,78.
- [16] 江红梅,殷中伟,史发超,等. 一株耐盐日本曲霉的筛选及其溶磷促生作用[J]. 微生物学报,2018,58(5):862-881.
- [17] 刘小玉,付登强,贾效成,等. 不同培养条件对油茶根际解磷菌 6-Y-09 溶磷效果的影响[J]. 现代农业科技,2016(3):44-45,47.
- [18] 何迪,耿雨平,郭佳,等. 草酸青霉菌 HB1 溶磷能力及作用机制[J]. 农业工程学报,2020,36(2):255-265.
- [19] 张建峰,苗天瑶,张嘉旭,等. 1 株溶磷真菌的分离鉴定及溶磷特性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2017,45(12):121-128.
- [20] 孙冉,张素,吴臣林,等. 黑曲霉解磷能力的影响因素及培养条件优化[J]. 应用生态学报,2020,31(6):1963-1970.
- [21] 刘文干,曹慧,樊建波,等. 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[J]. 土壤学报,2012,49(5):988-995.
- [22] 刘晓芳,黄晓东,张芳. 一株溶磷黑曲霉的溶磷特性及溶磷机制初探[J]. 河南农业科学,2005,34(6):60-62,65.