

尚晓静, 侯 瑞, 徐芳玲, 等. 2 株蓝莓溶磷内生真菌的筛选、鉴定及溶磷效果评价[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(20): 246–252.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.20.037

## 2 株蓝莓溶磷内生真菌的筛选、鉴定及溶磷效果评价

尚晓静<sup>1,2</sup>, 侯 瑞<sup>1</sup>, 徐芳玲<sup>1</sup>, 潘秋梅<sup>1</sup>, 张富美<sup>1</sup>

(1. 贵州大学林学院, 贵州贵阳 550025; 2. 黔东南州林业科学研究所, 贵州凯里 556000)

**摘要:**从蓝莓植株内生真菌中筛选出具有溶磷、耐盐功能的菌株, 为研究和评价其溶磷效果, 采用固体溶磷圈法, 根据是否产生溶磷圈来筛选蓝莓溶磷内生真菌, 选取具有溶磷圈的真菌进行经典形态学和内源转录间隔区 (ITS) 序列分析和鉴定; 采用液体培养法测定发酵液的有效磷含量及 pH 值; 采用超高效液相色谱仪测定有机酸的种类及其含量, 分析菌株的溶磷机制; 采用固体培养法, 设置不同 NaCl 浓度梯度用于分析蓝莓溶磷内生真菌的耐盐性。经形态学和分子生物学鉴定, 菌株 G14 为烟管菌 (*Bjerkandera adusta*)、菌株 FG54 为阿达青霉 (*Penicillium adametzii*)。菌株 FG54 于 5 d 后有效磷含量最高, 达到 587.315  $\mu\text{g/mL}$ , 菌株 G14 于 5 d 后有效磷含量最高, 达到 523.730  $\mu\text{g/mL}$ 。通过对 2 株菌株有机酸的测定, 发现该菌株的溶磷能力主要通过自身分泌的丙二酸、甲基丙二酸和柠檬酸等有机酸降低菌株发酵液的 pH 值, 从而达到溶解磷的效果。同时, 菌株 FG54 能较好的适应不同含量氯化钠浓度, 在较高浓度的氯化钠培养基中也能生长。在氯化钠低浓度情况下, 菌株 G14 生长速度较快, FG54 生长较慢。通过筛选得到了 2 株溶磷性和耐盐性较好的真菌, 它们在不同盐环境中差异显著, 具有良好的应用前景。

**关键词:**溶磷真菌; 蓝莓; 筛选; 鉴定; 溶磷效果

**中图分类号:**S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)20-0246-07

蓝莓 (*Vaccinium* spp.) 是多年生灌木类果树, 为杜鹃花科越橘属, 根毛少、根浅。适宜生存在土质疏松, 土壤微酸的环境中<sup>[1]</sup>。我国于 20 世纪末在贵州省黔东南苗族侗族自治州麻江县开始大规模引种、种植蓝莓, 因环境适宜, 贵州蓝莓产业发展迅速<sup>[2]</sup>。磷在植物的生长发育过程中扮演着非常重要的角色, 为植物生长必需的矿质营养元素<sup>[3-4]</sup>。土壤中磷的主要形态可以分为有机态和无机态 2 种。目前已发现的有机态磷主要包括代谢磷酸盐、磷酸化蛋白、磷脂、核酸和肌醇磷酸盐等<sup>[5]</sup>。

在土壤里, 溶磷菌能把不利于植物吸收利用的磷转化为易于其吸收利用的形态<sup>[6]</sup>。溶磷真菌类菌株种类较少, 主要有小菌核属 (*Sclerotium*)、青霉属 (*Penicillium*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、根霉属 (*Rhizopus*)、曲霉属 (*Aspergillus*)。这 5 类菌株中, 曲霉属菌株的溶解活性效果最好<sup>[7]</sup>。目前, 国外已对曲霉属一类的溶磷菌做了广泛深度的探索<sup>[8]</sup>。李

露莉等在研究黑曲霉的试验中发现其具有改良一些品位不好的磷矿石的作用<sup>[9]</sup>。梁艳琼等从热带作物根际以及盐碱地柠条根围土壤中分离出具有溶磷作用的曲霉<sup>[10-11]</sup>。张建峰等通过筛选得到了 1 株绳状青霉 (*Penicillium funiculosum*), 其溶磷能力较好, 能将直径为 9 cm 的无机磷固体培养基在 96 h 后完全溶解<sup>[12]</sup>。范延辉等筛选出 1 株耐盐溶磷的真菌 PSF2, 该菌株在 NaCl 浓度为 0.45% 的土壤中培养 20 d 后, 土壤中有效磷含量提高了 20.9%<sup>[13]</sup>。

目前, 已经筛选出大量的溶磷微生物, 但其中具有耐盐性的不多, 不一定适合在盐渍化土壤中生存。因此, 寻找并发现既能溶磷又耐盐的真菌, 将其应用于盐碱地农业产业和土壤环境改良是很有必要的。本试验通过常规固体筛选和钼锑抗比色法等方法, 初步筛选出具有溶磷特性的蓝莓溶磷内生真菌, 鉴定溶磷内生真菌, 分析菌株耐盐性并研究其溶磷特性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 本试验于 2019 年在贵州大学林学院森林保护学实验室研究, 供试菌株为贵州大学林学院森林保护学实验室从蓝莓根、叶、果实分离得到的内生真菌菌株 (G14、FG54)。

收稿日期: 2021-10-27

基金项目: 贵州省科技计划 [编号: 黔科合支撑 (2017) 2567、黔科合平台人才 (2018) 5781]; 国家自然科学基金 (编号: 31801688)。

作者简介: 尚晓静 (1997—), 女, 贵州岑巩人, 硕士, 从事微生物资源与利用研究。E-mail: shangxiaojingcg@163.com。

通信作者: 侯 瑞, 博士, 副教授, 从事微生物资源与利用研究。E-mail: jiaoyouhourui123@163.com。

1.1.2 供试培养基 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:200 g 马铃薯,20 g 葡萄糖,20 g 琼脂,1 000 mL 水,自然 pH 值。马铃薯葡萄糖(PDB)培养基:PDA 培养基中去掉琼脂。无机磷(PKO)培养基:3.0 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,10.0 g 蔗糖,0.5 g NaCl,0.2 g KCl,0.1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,0.1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,0.004 g  $\text{MnSO}_4$ ,0.5 g 酵母膏,0.004 g  $\text{FeSO}_4$ ,1 000 mL 蒸馏水,15.0 g 琼脂,pH 值为 7.0。蒙金娜有机磷培养基:10g 葡萄糖,0.5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,0.3 g NaCl,0.3 g KCl,0.2 g 卵磷脂,0.3 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,0.03 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,0.03 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,5 g  $\text{CaCO}_3$ ,0.4 g 酵母膏,20 g 琼脂,1 000 mL 蒸馏水,pH 值为 7.0。耐盐性培养基:PDA 培养基基础上加上不同含量 NaCl。水-琼脂(WA)培养基:20 g 琼脂,1 000 mL 水,pH 自然。以上培养基均经过 121 ℃、30 min 高温灭菌处理。

1.1.3 主要试剂 2,4-二硝基酚指示剂:0.25 g 二硝基酚定容至 100 mL 蒸馏水中。标准磷溶液:放置  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  在 45 ℃ 环境干燥 6 h 后称取 0.439 4 g,移至 400 mL 蒸馏水中充分溶解,加入 5 mL 浓硫酸,用蒸馏水稀释至 1 L,摇匀。钼锑抗贮存液:配制质量浓度为 0.5% 的酒石酸锑钾( $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2$ )的溶液。另取 10 g 钼酸铵( $\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$ )于 450 mL 蒸馏水中混匀,慢慢添加 153 mL 浓硫酸并搅动。最后,在钼酸铵溶液中添加 100 mL 浓度为 0.5% 的酒石酸锑钾溶液,蒸馏水定容至 1 L 并混匀,储藏于深棕色瓶子里。钼锑抗显色剂:临用前于 100 mL 钼锑抗贮存液中加入 1.5 g 左旋维生素 C。5 mg/L 磷溶液:临用前取 10 mL 上述 100 mg/L 标准磷溶液置于量筒中,用蒸馏水定容至 200 mL。

## 1.2 试验方法

1.2.1 蓝莓内生真菌的分离与纯化 无菌条件下,将取到的新鲜的蓝莓植株的根、叶、果等 3 个部位分别用无菌水缓慢冲洗 3 次,去除表面杂质,用体积分数为 75% 的乙醇消毒 2~3 s,用无菌水润洗 3 遍后用体积分数为 3%  $\text{NaClO}$  浸泡 3 min,再用无菌水润洗 5~8 次。已消毒后的根、叶、果等 3 个部位分别在 PDA 培养基上滚动并取出作为对照。截取边长为 0.5 cm 的根、叶、果小块接种在 PDA 培养基上于 28 ℃ 下培养。根、叶、果周围有菌丝长出时,分别挑取菌丝转移至未接菌的 PDA 培养基上进一步纯化,以每个平板上只含有同一个特征的单一菌落作为试验结束的标志。

1.2.2 蓝莓溶磷内生真菌筛选 将已活化的内生真菌(菌柄直径  $d=0.6$  cm)分别接种在蒙金娜有机磷培养基和 PKO 培养基上,于 28 ℃ 培养 72 h 后,根据是否存在透明溶磷圈来判定菌株是否具备溶磷能力;同时测定菌株的溶磷圈直径  $D$  值与  $d$  值并计算比值,把具有可溶磷的菌株初步筛选出来。

1.2.3 蓝莓溶磷内生真菌形态学鉴定 无菌条件下,用 6.0 mm 打孔器依次取菌株 G14、FG54 置于 PDA 培养基中,观察菌落 2、4、6 d 后的生长变化及菌落特征,对菌株进行简单的形态学鉴定。挑取培养皿新鲜菌丝置于放有载玻片的培养皿上,培养 3~4 d 时,在边缘菌丝上盖上盖玻片,通过荧光显微镜观察菌丝的形态结构特征并拍照。

1.2.4 蓝莓溶磷内生真菌 DNA 分子生物学鉴定 无菌环境下分别取菌株 G14、FG54 菌饼放入 PDB 中,于 28 ℃、160 r/min 摇床培养 36 h,利用真菌提取试剂盒进行提取菌株总 DNA,用 ITS1 和 ITS4 扩增 18S rDNA 的 ITS 区域,提取获得的聚合酶链式反应(PCR)扩增产物委托重庆擎科兴业生物技术有限公司进行测序。获得的 DNA 序列在 GenBank 数据库用基于局部比对算法的搜索工具(BLAST)进行序列比较分析,利用 MEGA 7.0 软件的 Clustalw 程序进行多序列比对并构建菌株系统发育树。

1.2.5 蓝莓溶磷内生真菌的溶磷效果测定 以 PKO 培养基不加琼脂作为液体培养基,每个锥形瓶各添加 150 mL,无菌条件下,取 5 块直径 8.0 mm 的菌饼分别放入呈有发酵液的锥形瓶中,移至摇床,于 28 ℃、150 r/min 转速下培养 7 d,培养后每天取样测定发酵液中有有效磷含量,同时测定 pH 值。

发酵液有效磷含量的测定:取 5 mL 上清液,12 000 r/min 离心 5 min 后,取 3 mL 上清液作为待测液置于 50 mL 锥形瓶中。

磷标准液的配制:将 100 mg/L 的磷标准溶液稀释至 5 mg/L,分别取 0、2、4、6、8、10 mL 的 5 mg/L 的磷标液至 50 mL 锥形瓶中,添加蒸馏水至 30 mL。

上述溶液均加 2 滴 2,4-二硝基酚指示剂,再逐滴加入 4 mol/L NaOH 溶液至锥形瓶内液体变为微黄色;然后添加 1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液至黄色褪去,分别添加 5 mL 钼锑抗显色剂,快速摇匀后,加蒸馏水至 50 mL 标线位置,2 h 后用分光光度计测定 700 nm 处吸光度值。以未接菌的 PKO 液体发酵液为参比液,设定其吸收值为 0,分别测定不同标准液和发酵液的显色值,绘制磷标准曲线,并在磷标准

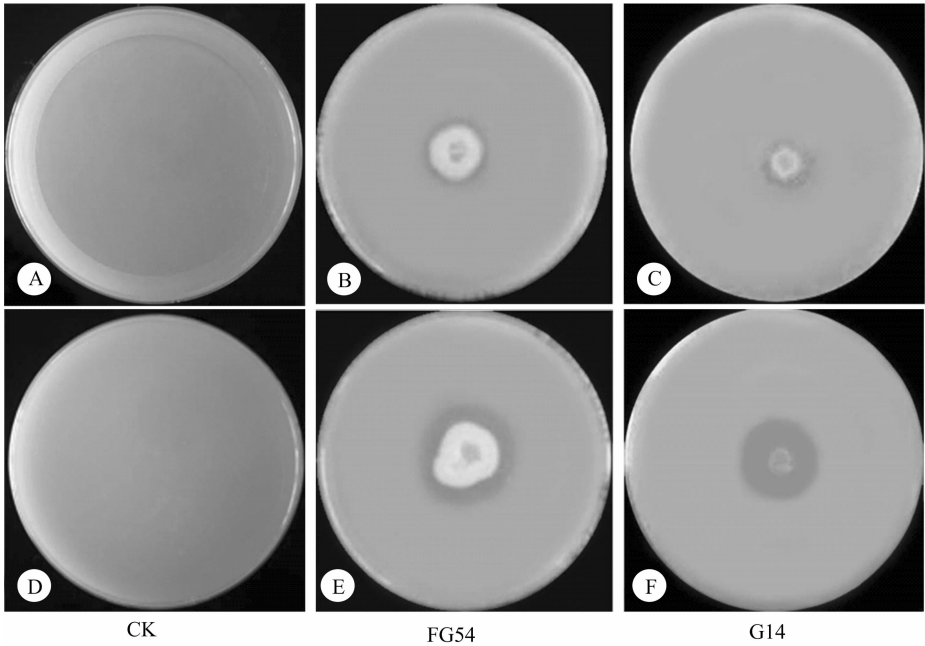
曲线上计算发酵液的磷浓度。计算公式为

有效磷含量(μg/mL) = (ρ × V × T<sub>s</sub>)/V<sub>0</sub>。

式中:ρ 表示有效磷的质量浓度,μg/mL;V 表示定容体积,mL,此处为 50 mL;T<sub>s</sub> 为分取倍数,此处为 17 倍;V<sub>0</sub> 表示加入发酵液的体积,mL,此处为 3 mL。

1.2.6 蓝莓溶磷菌分泌有机酸的种类及含量测定

分别取 3 片已活化的 G14 和 FG54 菌柄(*d* = 5 cm)至 PKO 液体培养基中,置于 120 r/min、25 ℃ 摇床培养 7 d 后,于离心机离心后取上清液,用 1290 Infinity 型超高效液相色谱仪(上海硅仪生化科技有限公司)测定有机酸的种类及含量。液相色谱条件:色谱柱为 C<sub>18</sub>(粒径 1.8 μm,内径 × 长度 2.1 mm × 100 mm);流动相 A 为超纯水(含 0.1% 的甲酸);流动相 B 为乙腈(含 0.1% 的甲酸);仪器柱温为 40 ℃;流速为 0.40 mL/min;进样体积为 2 μL。



A~C—PKO无机磷培养基; D~F—蒙金娜有机磷培养基  
图1 菌株 G14 和 FG54 于 PKO 和蒙金娜的溶磷效果

2.1.2 G14、FG54 菌株在不同溶磷培养基中的溶磷圈比较 经反复筛选得到的溶磷圈直径(*D*)与菌落直径(*d*)的值(表 1),其中 2 个培养基中 G14 的 *D/d* 最大。蒙金娜培养基中 G14 的 *D/d* 为 1.7, FG54 为 1.1。PKO 培养基中, G14 的 *D/d* 最大,为 1.7, FG54 的 *D/d* 为 1.6。2 株菌株于蒙金娜和 PKO 培养基中生长速度与溶磷圈大小各不相同,推测 2 株菌株对同一培养基的溶磷性与溶磷机制不同。

2.2 蓝莓溶磷内生真菌的鉴定

2.2.1 蓝莓溶磷内生真菌的PDA形态学观察 由

1.2.6 蓝莓溶磷内生真菌的耐盐性分析 采用 PDA 作为基本培养基,在培养基中分别加入含量为 0%、2.5%、5.0%、7.5%、10%、12.5% 的 NaCl。无菌条件下,取直径为 6.0 mm 的菌株菌饼接种在不同 NaCl 含量的培养基上,于 28 ℃ 培养 5 d,每天观察并记录菌丝在不同 NaCl 含量的 PDA 平板上的蔓延情况分析菌株耐盐性。

2 结果与分析

2.1 蓝莓溶磷内生真菌的筛选与鉴定

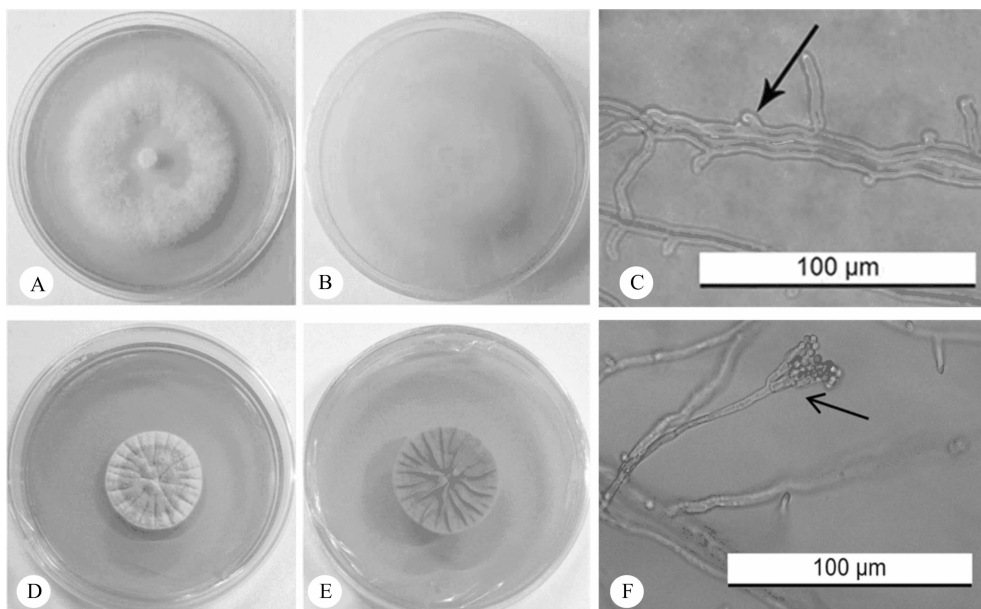
2.1.1 蓝莓溶磷内生真菌的筛选 以 PKO 固体培养基作为基础培养基,接菌 2 d 后观察透明圈情况,再结合溶磷圈筛选法进一步筛选出具有溶磷特性的菌株。G14 和 FG54 溶磷效果见图 1,初步显示 G14、FG54 菌株均能溶解有机磷和无机磷。

表 1 溶磷菌株溶磷圈直径( <i>D</i> )与菌落直径( <i>d</i> )				
培养基	菌株	<i>D</i> (cm)	<i>d</i> (cm)	<i>D/d</i>
PKO 培养基	FG54	3.0	1.8	1.6
	G14	1.7	1.0	1.7
蒙金娜培养基	FG54	1.9	1.7	1.1
	G14	2.2	1.3	1.7

图 2 可知,菌株 G14 于 28 ℃ 下暗培养,其生长速度较快,6 d 后可铺满培养皿平面(直径 90 mm)。菌

落边缘整齐,纹理松散;菌丝生长均匀,表面呈白色棉絮状。菌落边缘在显微镜下呈分枝状生长,具有锁状联合。菌株 FG54 于 28 ℃ 恒温培养箱暗培养 6 d 后形成半径为 4.0 ~ 4.5 cm 的菌落,FG54 生长

较缓慢,每天均匀生长,菌落正面整体为圆形,中央为浅青色环绕,边缘为白色细菌丝,菌落背面为浅黄色,呈褶皱状生长。菌株 FG54 菌落边缘显微形态特征,显微镜下该菌株菌丝顶端产孢结构呈扫帚状。



A—G14 菌株正面; B—G14 菌株背面; C—G14 菌株显微结构, 箭头所指为菌丝顶端产孢结构;

D—FG54 菌株正面; E—FG54 菌株背面; F—FG54 菌株显微结构, 箭头所指为锁状联合

图2 菌株菌落形态及菌落边缘显微形态特征

### 2.2.2 蓝莓溶磷内生真菌的 DNA 分子生物学鉴定

将菌株 G14、FG54 进一步测序。菌株 G14 总 DNA 经过 ITS1 和 ITS4 引物扩增,PCR 产物送至重庆擎科兴业生物技术有限公司测序得到相关序列。获取测序结果后登录 GenBank, 得到登录号 MT601950。将菌株 G14 序列进行 BLAST 比对结果

表明菌株 G14 与 *Bjerkandera adusta* KJ668570.1 的亲缘关系达到 100%, 菌株构建系统发育树见图 3。同时, 获取菌株 FG54 测序结果后登录 GenBank, 得到登录号 MT601884。FG54 与 *Penicillium adametzii* KF313079.1 的亲缘关系为 100%, 将其构建系统发育树见图 4。

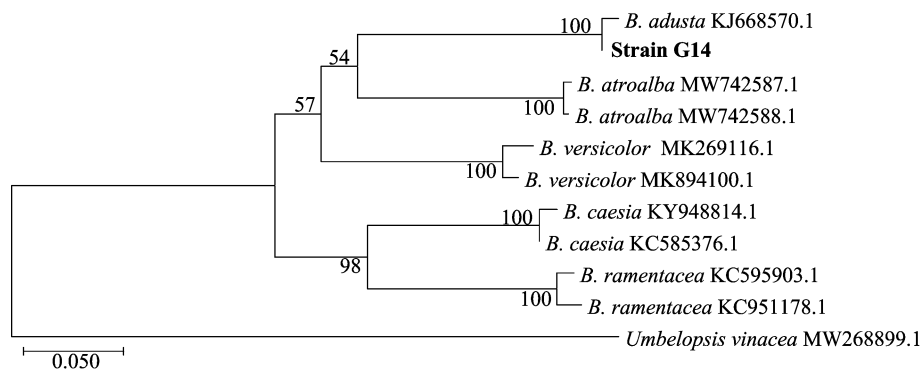


图3 基于 ITS 序列的烟管菌(*B. adusta*) 系统发育树

### 2.3 蓝莓溶磷内生真菌的溶磷效果测定

2.3.1 蓝莓溶磷内生真菌有效磷含量变化 以 PKO 为参比液, 在 Excel 中输入磷标线数据, 计算得磷标线公式为  $y = 0.374 3x + 0.017 9$ ,  $r^2 = 0.992$ 。通过公式算得的有效磷含量 ( $\mu\text{g/mL}$ )。由图 5 可

知, FG54 有效磷含量总体表现为先降后升再降的趋势, 2 ~ 5 d 的有效磷含量逐渐上升, 5 d 达到最大值 587.315  $\mu\text{g/mL}$ , 7 d 降到 404.465  $\mu\text{g/mL}$ 。G14 的有效磷含量表现为先降再升再降的趋势, G14 从 1 d 的 331.628  $\mu\text{g/mL}$  下降到 2 d 的 187.131  $\mu\text{g/mL}$ ,

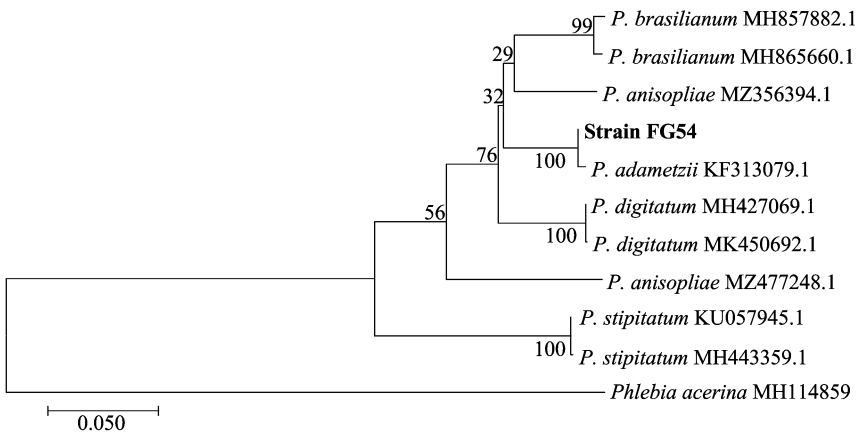


图4 基于 ITS 序列的青霉(*P. adametzii*)系统发育树

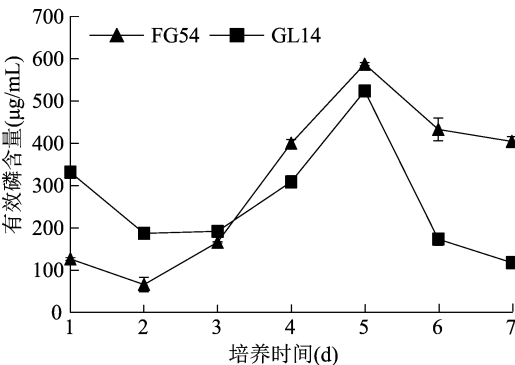


图5 不同菌株 7 d 有效磷含量变化

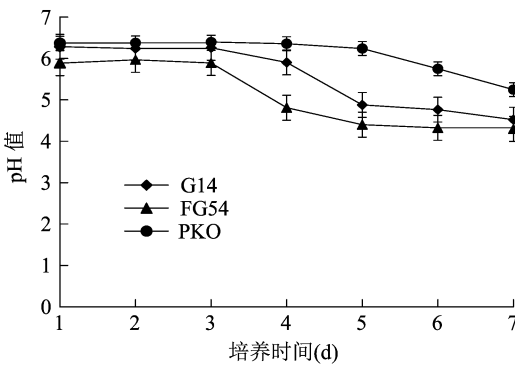


图6 溶磷菌在无机磷培养基中 pH 值的变化

然后一直上升,在 5 d 达到最大,最大值为 523.730  $\mu\text{g/mL}$ ,过后逐渐呈现下降的趋势,到 7 d 降至 117.742  $\mu\text{g/mL}$ 。菌株 G14、FG54 有效磷含量均在 1~2 d 呈现下降趋势,3~5 d 有效磷含量值都在逐步上升,总体都在 5 d 达到最大有效磷含量,并在 5 d 后逐步下降,G14 的 1 d 的值比 7 d 的值高,而 FG54 的 7 d 值比 1 d 高。

2.3.2 蓝莓溶磷内生真菌发酵液中 pH 值的变化

由图 6 可知,PKO 液体的 7 d 时 pH 值大于 G14、FG54。PKO 的 pH 值在前 3 d 呈现逐步上升趋势,3 d 达到最大值 6.40,4 d 逐步下降,7 d 降至 5.25。G14 在 2 d pH 值下降,3 d 又回升到最大值,4 d 逐渐下降,5 d 下降速度最快,7 d 下降至 4.52。FG54 pH 值在 2 d 达到最大,为 5.97,之后逐步下降。2 个菌株的 pH 值均低于 PKO 值,且所有的发酵液在 5 d 下降的速度最快。乔欢等研究得出 pH 值与磷的溶解量呈负相关关系,随着磷溶解量的增加,pH 值随之降低<sup>[14]</sup>。本研究结果与之相符,通过监测 2 株溶磷内生真菌在 5 d 时有效磷含量值达到峰值。

2.4 蓝莓溶磷菌分泌有机酸的种类及含量测定

对 2 株菌株的有机酸种类及含量进行测定,得

出 2 株蓝莓溶磷菌分泌的有机酸种类及其相对含量,根据数据库物质中 2 株菌共同分泌有机酸种类进行筛选,匹配到的有机酸共 3 种(表 2)。有机酸种类依据相对含量大小排列分别为丙二酸、甲基丙二酸和柠檬酸。

表 2 蓝莓溶磷菌代谢产物的种类及其相对含量

化合物	峰面积( $\text{mV} \cdot \text{min}$ )		保留时间 (min)	质荷比 ( $m/z$ )
	FG54	G14		
丙二酸	138 634.22	138 480.42	4.71	104
甲基丙二酸	16 098.47	9 185.82	1.28	118
柠檬酸	1 315.13	796.85	5.70	192

2.5 蓝莓溶磷内生真菌的耐盐性分析

通过 5 d 观察记录到的 G14、FG54 在不同 NaCl 含量下的菌丝平均直径(mm)情况见表 3。由于菌丝前 2 天生长速度缓慢,故不记录菌丝直径,未生长用“—”表示。由表 3 可知,总体上 FG54 能适应不同含量的 NaCl 浓度,G14 的最高耐盐浓度是 2.50%,FG54 相较 G14 来说耐盐适应范围更广一些。FG54 在 NaCl 含量为 2.50% 的时候生长效果最好,在 0% 和 5% 时效果次之,12.5% 最差。在 3 d 时 12.5% NaCl 含量下,FG54 生长速度较缓慢,其

直径仅增加 1 mm 左右。同样取菌株 G14 直径 6 mm 的菌块置于相同培养基,在 NaCl 含量为 0% 和 2.5% 下,3 d 时菌丝直径能生长到 FG54 的 1~3

倍数,但当 NaCl 含量大于 2.5% 时,G14 皆不生长。综上所述,2 类菌丝的耐盐程度较低,经观察低 NaCl 含量下,G14 的 5 d 后的生长速度远超于 FG54。

表 3 不同 NaCl 含量下的菌丝直径情况

菌株	时间(d)	不同 NaCl 含量菌落生长直径(mm)					
		0.00%	2.50%	5.00%	7.50%	10.00%	12.50%
FG54	3	13.3±0.94	16.3±0.47	12.0±0.82	11.7±1.25	8.0±0.00	6.7±0.47
	4	19.0±0.82	22.7±0.47	17.0±0.82	15.3±0.94	12.3±0.47	9.0±0.82
	5	22.0±0.82	25.3±0.94	22.0±0.82	18.3±0.47	12.3±1.25	11.3±0.94
G14	3	56.7±1.25	24.3±0.47	—	—	—	—
	4	70.7±2.36	32.3±1.70	—	—	—	—
	5	90.0±0.00	41.7±3.40	—	—	—	—

### 3 讨论与结论

微生物肥料能够有效改良土壤的肥力与结构,使作物更高效地利用土壤里的化肥,增强作物的抗逆性,提高作物的产量,且对环境污染较小,故溶磷微生物在农林业生产上十分重要<sup>[15]</sup>。溶磷菌的溶磷机制较为复杂,溶磷菌在培养的过程中可分泌多种有机酸,有机酸可以溶解磷化物<sup>[16]</sup>。而不同溶磷菌所分泌的有机酸类型可能存在区别,且培养条件不同所产生的有机酸种类也可能不同<sup>[17-18]</sup>。通过对 2 株菌株的有机酸种类及含量的分析,丙二酸、甲基丙二酸和柠檬酸为本试验研究的 2 株溶磷菌的主要有机酸代谢产物。本试验把菌株 FG54 和 G14 接种到蒙金娜有机磷培养基和 PKO 无机磷培养基上,发现 2 株菌株均能产生溶磷圈,说明 2 株菌株均具有溶磷功能<sup>[19]</sup>。菌株 FG54 是阿达青霉,培养 5 d 其有效磷含量为 587.315 μg/mL,溶磷效果较同为青霉属的嗜松青霉 JP-NJ4 溶磷效果低,嗜松青霉 JP-NJ4 在磷酸钙溶液中溶磷量为 1 390 mg/L<sup>[14]</sup>。溶磷菌的溶磷机制是溶磷菌产生的质子降低了培养基的 pH 值,从而使磷酸盐溶解<sup>[20]</sup>。据现有报道,诸多植物根际分布的微生物类群能产生植物激素,促进植物根部细胞的生长,增加植物对营养元素的吸收能力<sup>[21]</sup>。Illmer 等从不同植株中筛选到高校溶磷菌株后,又对菌株的溶磷能力、培养特性等做了深入的研究,发现不同菌株其溶磷能力不同<sup>[22-25]</sup>。在 pH 值与溶磷能力的关联性研究中,本试验结果与冯宏等研究结果不同的是,其研究的菌株培养液的 pH 值与溶磷能力并无显著关联性<sup>[26]</sup>,而本试验研究 2 个菌株在培养时随酵液中的 pH 值的降低,有效磷含量随之升高,因此推测本试验的 2

株菌株能起到溶磷作用的主要原因是其质子产生时的酸解作用<sup>[22]</sup>。本试验中有效磷含量总体表现为先下降后上升的趋势,FG54 菌株 5 d 有效磷含量最高,而 G14 稍微低一些,可能是各个菌株在同一种溶液中的溶解能力、溶解机理存在差异。菌株的耐盐性也是菌株在生产应用上的关键因素。杨榕等发现其研究的长枝木霉随着盐胁迫浓度的提高,菌株的生长速度和溶磷性均有所降低,因此在实际农业应用过程中需判断土壤的盐浓度含量,盐浓度含量过高时会抑制部分菌的生长<sup>[27]</sup>。

本试验结果表明,菌株 FG54 和 G14 的生长都受 NaCl 含量的影响,菌株 FG54 在 NaCl 含量为 2.50% 的时候生长效果最好,而当 NaCl 浓度达到 12.50% 时生长效果变差。菌株 G14 只能在 NaCl 含量为 0% 和 2.50% 的条件下生长,在大于 2.50% 的条件下皆不生长。向文良等分离出的嗜盐溶磷菌 QW1011,在 NaCl 浓度为 10% 下生长状态最好,且对 NaCl 最高耐受浓度可达 15%<sup>[28]</sup>,与之相比,本试验筛选的 2 株菌株的耐盐性较低。综合耐盐性分析,本试验分离出的菌株 FG54 对土壤的耐盐性较高,对当今的土壤出现的各种状况可以起到一定的改良作用。而菌株 G14 耐盐性相对较差,适合在 NaCl 浓度较低的土壤上应用。本试验为进一步研究溶磷内生真菌在土壤中的应用提供理论基础,为盐碱地农业产业和土壤环境改良上提供应用依据。

#### 参考文献:

- [1] 孙运杰,马海林,刘方春,等. 植物根际促生菌对蓝莓根际土壤养分与微生物数量的影响[J]. 山东农业科学,2014,46(1):66-69.
- [2] 周丕东. 丹寨蓝莓小镇建设现状及发展对策[J]. 农技服务,2019,36(11):96-97,99.
- [3] Holford I C R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by

- plants[J]. Australian Journal of Soil Research,1997,35(2):227 – 240.
- [4] Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion[J]. Biotechnology Advances,1999,17(4/5):319 – 339.
- [5] 江红梅. 真菌溶磷相关基因的克隆与功能验证[D]. 北京:中国农业科学院,2018.
- [6] 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.
- [7] Narsian V, Patel H H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer[J]. Soil Biology and Biochemistry,2000,32(4):559 – 565.
- [8] Whitelaw M A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate – solubilizing fungi[J]. Advances in Agronomy,1999,69:99 – 151.
- [9] 李露莉, 邱树毅, 王义娟, 等. 一株黑曲霉转化低品位磷尾矿能力的研究[J]. 中国农学通报,2010,26(20):335 – 338.
- [10] 梁琼艳, 雷照鸣, 贺春萍, 等. 一株溶磷真菌的分离鉴定及其溶磷能力的初步研究[J]. 热带作物学报,2011,32(6):1116 – 1121.
- [11] 张丽珍, 樊晶晶, 牛 伟, 等. 盐碱地柠条根围土中黑曲霉的分离鉴定及解磷能力测定[J]. 生态学报,2011,31(24):7571 – 7578.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 乔 欢, 吴小芹, 王 早. 一株嗜枯青霉 JP – NJ4 的解磷特性[J]. 微生物学通报,2014,41(9):1741 – 1748.
- [15] Lugo M A, Reinhart K O, Menoyo E, et al. Plant functional traits and phylogenetic relatedness explain variation in associations with root fungal endophytes in an extreme arid environment[J]. Mycorrhiza,2015,25(2):85 – 95.
- [16] 詹寿发, 樊有赋, 甘金莲, 等. 1 株山药内生真菌的鉴定及解钾活性[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):320 – 323.
- [17] 孙合美, 王春红, 卢冬雪, 等. 土壤溶磷微生物及其对植物促生作用研究进展[J]. 河南农业科学,2016,45(5):1 – 6.
- [18] Chen Y P, Rekha P D, Arun A B, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities[J]. Applied Soil Ecology,2006,34(1):33 – 41.
- [19] 杜春梅, 金术超, 王 葳, 等. 无机磷分解菌 BL – 11 的鉴定及其解磷能力研究[J]. 微生物学通报,2007,34(2):283 – 286.
- [20] Hameeda B, Reddy Y H K, Rupela O P, et al. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna[J]. Current Microbiology, 2006, 53: 298 – 302.
- [21] 王 欢, 王敬敬, 徐 松, 等. 有机磷降解菌的筛选及其促生特性[J]. 微生物学报,2017,57(5):667 – 680.
- [22] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms[J]. Soil Biology and Biochemistry,1995,27(3):257 – 263.
- [23] Sokolski S, Dalpé Y, Piché Y. Phosphate transporter genes as reliable gene markers for the identification and discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *Glomus*[J]. Applied and Environmental Microbiology,2011,77(5):1888 – 1891.
- [24] 李凤霞, 梁锦绣, 周 涛. 宁夏产枸杞根际溶磷菌分离及溶磷能力分析[J]. 植物资源与环境学报,2006,15(2):29 – 32.
- [25] 冯瑞章, 姚 拓, 周万海, 等. 溶磷菌和固氮菌溶磷矿粉时的互作效应[J]. 生态学报,2006,26(8):2764 – 2769.
- [26] 冯 宏, 李永涛, 张志红, 等. 类芦根际溶磷真菌的筛选、鉴定及其溶磷能力分析[J]. 微生物学通报,2010,37(5):677 – 681.
- [27] 杨 榕, 王敬敬, 徐 松, 等. 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.
- [28] 向文良, 冯 玮, 郭建华, 等. 一株解磷中度嗜盐菌的分离鉴定及解磷特性分析[J]. 微生物学通报,2009,36(3):320 – 327.
- (上接第 216 页)
- 510 – 521.
- [20] Yang W Y, Wang H, Dong J X, et al. Cloning, expression, purification, and characterization of a novel single – chain variable fragment antibody against the 2 – nitrobenzaldehyde derivative of a furaldone metabolite in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification,2012,84(1):140 – 146.
- [21] 何 婷. 黄曲霉毒素纳米抗体研制及其免疫分析技术研究[D]. 北京:中国农业科学院,2016.
- [22] Wang X X, He Q H, Xu Y, et al. Anti – idiotypic VHH phage display – mediated immuno – PCR for ultrasensitive determination of mycotoxin zearalenone in cereals[J]. Talanta,2016,147:410 – 415.
- [23] 杨武英, 王 弘, 洪艳平, 等. 呋喃它酮代谢物单链抗体制备和酶联免疫分析方法[J]. 食品科学,2020,41(24):251 – 258.
- [24] 杨武英, 董洁娴, 沈玉栋, 等. 虾肉中呋喃它酮代谢物化学发光酶免疫分析方法的建立[J]. 分析化学,2012,40(12):1816 – 1821.
- [25] 伍伟健, 董洁娴, 饶美芳, 等. 抗孔雀石绿单链抗体 – 碱性磷酸酶融合表达和活性鉴定[J]. 食品科学,2016,37(17):121 – 126.
- [26] Xu Z L, Dong J X, Wang H, et al. Production and characterization of a single – chain variable fragment linked alkaline phosphatase fusion protein for detection of O, O – diethyl organophosphorus pesticides in a one – step enzyme – linked immunosorbent assay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2012,60(20):5076 – 5083.
- [27] 陈薪竹, 王玉波, 王 丹, 等. 抗呋喃唑酮代谢物单链抗体基因构建及蛋白结构分析和活性鉴定[J]. 食品科学,2021,42(24):67 – 73.
- [28] 陈冬年, 刘 展, 武韶华, 等. 超声波辅助法提取小龙虾甲壳素[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):236 – 238.
- [29] Haque M A, Imam H, Hana H K, et al. Maintenance and optimization of culture/fermentation media to achieve maximum bioactive metabolites from marine *Streptomyces* sp. and their cytotoxic effects[J]. Indian Journal of Geo – Marine Sciences,2017,46(1):170 – 175.
- [30] 刘佳璐, 郑 维, 范若辰, 等. 金黄色葡萄球菌 SaeP 蛋白表达条件的优化[J]. 中国乳品工业,2020,48(1):14 – 17,22.
- [31] 孟 婷, 郑志明, 王永娟, 等. 抗四环素单链抗体基因表达及免疫学活性检测[J]. 畜牧与兽医,2018,50(7):57 – 59.