

# 溶磷草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究

范丙全,金继运,葛 诚

(中国农业科学院土壤肥料研究所,北京 100081)

摘要:采集石灰性土壤样品进行了溶磷微生物的筛选,获得了具有溶磷作用的草酸青霉菌菌株 P8 和 Pn1。不同培养条件下测定了它们的溶磷能力,并与拜莱青霉菌 ATCC20851 和解磷巨大芽孢杆菌 ATCC14581 进行了比较。在固体培养基上草酸青霉菌 P8、Pn1 表现较强的溶解  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaHPO}_4$ 、 $\text{FePO}_4$  和骨粉的能力;在液体培养条件下,能有效的溶解摩洛哥磷矿粉,氮源对其溶磷效果有显著影响,硝态氮高于铵态氮;接种 P8 能够显著增加灭菌和不灭菌土壤的有效磷含量,灭菌土壤增加的有效磷略高于不灭菌土壤。氮源影响草酸青霉菌产生有机酸的种类,使用铵态氮时主要分泌苹果酸、乙酸、丙酸、柠檬酸、琥珀酸,而硝态氮条件下几乎不再产生这些有机酸。这表明,氮源形态影响了它的代谢方向,而且它的溶磷机理不只一种,其机理尚不清楚,有待研究。

关键词:草酸青霉菌;溶磷作用;有机酸;氮源

## Isolation of *Penicillium oxalicum* and Its Effect on Solubilization of Insoluble Phosphate under Different Conditions

FAN Bing-quan, JIN Ji-yun, GE Cheng

(Soil and Fertilizer Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Two *Penicillium oxalicum* strains P8 and Pn1 were isolated in Calcareous soils and their effects on solubilization of insoluble phosphate were tested under different conditions. In plate assay, P8 and Pn1 strains showed higher solubilizing capacity to  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$  and bone meal. In broth assay, P8 and Pn1 consistently demonstrated marked solubilizing efficiency of Morocco rock phosphate (MRP) compared to ATCC20851. Both  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{NH}_4^+$ -N enhanced the release amount of P in MRP, but  $\text{NO}_3^-$ -N form is better than  $\text{NH}_4^+$ -N form. P8 strain could mobilize insoluble phosphate from soil, soil available P was increased significantly in both sterile and non-sterile soils. The increment of available P in sterile soil was higher than that in non-sterile soil. Nitrogen sources influenced acid metabolism of P8 and Pn1, strain P8 secreted malic acid, acetic acid, citric acid and propionic acid at the presence of  $\text{NH}_4^+$ -N, but P8 produced none of the above organic acids with  $\text{NO}_3^-$ -N supply, Pn1 showed the same trends. These indicated that there are more than one kind of mechanisms of P solubilization of *Penicillium oxalicum* P8.

Key words: *Penicillium oxalicum*; Phosphate solubilization; Organic acids; Nitrogen sources

溶磷微生物能够依靠自身的代谢产物或与其它生物协同溶解土壤中的难溶无机磷,从而在磷素的转化中起着非常重要的作用。磷素是植物生长必需的仅次于氮的大量元素,因土壤的固定作用其有效性很低<sup>[1,2]</sup>,因此溶磷微生物的研究一直受到科学家的重视,期望以接种剂的途径提高土壤难溶磷的

有效性和磷肥的利用效率<sup>[3-5]</sup>。由于不同种类的溶磷菌或不同菌株之间的溶磷能力和接种效果差异悬殊,所以高效溶磷菌株的筛选显得尤为重要。一些研究显示,真菌的溶磷能力大于细菌<sup>[6,7]</sup>,但在微生物肥料生产中溶磷细菌所占比例高于真菌,更值得注意的是一些 20 世纪 40~50 年代的老菌株还没

收稿日期:2001-05-25

作者简介:范丙全(1956-),男,河北武强人,副研究员,博士,主要从事植物营养和土壤微生物研究。Tel: 010-68918683; Fax: 010-68918638;

E-mail: Bqfan@caas.ac.cn

有被替代,依然作为生产菌株倍受重视<sup>[8-10]</sup>。说明在微生物肥料生产中溶磷稳定的高效菌株还比较少,这为优良菌株的选育工作提出了迫切任务。

溶磷青霉菌的筛选工作有一些报道,其中拜莱青霉菌(*Penicillium bilaii*)已进入商业化生产<sup>[11]</sup>。然而,草酸青霉菌的选育及其溶磷作用在国内外尚无报道。本文进行了溶磷真菌的筛选,并对得到的草酸青霉菌在不同条件下的溶磷效果进行了研究,以期溶磷微生物肥料的生产提供优良菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 溶磷微生物的筛选

**1.1.1 土壤来源** 样品取自不同生境下的褐土与潮土。采样点为土壤有效磷低、多年未施肥料、土壤瘠薄的农田或非耕地,筛选重点放在不施磷肥田块和闲荒地的土壤样品。田间采取的新鲜土壤样品放入塑料袋中,封口,置于4℃冰箱保存,不能及时放入冰箱的样品则先风干,粉碎过2mm的土筛。

**1.1.2 筛选方法** 分离溶磷真菌培养基:PDYA + 10% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 10% CaCl<sub>2</sub> + 0.02% 链霉素 + 0.007% 孟加拉红<sup>[12]</sup>;筛选溶磷真菌采用改良的Pikovskaya培养基(g/L):(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, NaCl 0.2, KCl 0.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03, MnSO<sub>4</sub> 0.03, FeSO<sub>4</sub> 0.003, 酵母粉 0.5, 葡萄糖 10.0, 磷酸三钙 5.0, 琼脂 20.0。

风干土使用前在室内培养,恢复土壤微生物活性。称取30.0g风干土样放入灭菌的50ml塑料离心管中,管的底部穿孔并加灭菌棉以利于透气,加灭菌水至80%的相对含水量,室温培养2周。称取1.0g新鲜或培养后的土样,用0.8%NaCl的灭菌水系列稀释为10<sup>-4</sup>。

用移液器吸取10<sup>-4</sup>浓度的土壤溶液100μl放于琼脂培养基上,涂布均匀,每个样品重复3次,30℃培养5d。逐日观测出现溶磷圈的菌落,将溶磷圈较大的菌株分离、转接保存,供进一步筛选。

### 1.2 草酸青霉菌溶磷效果

**1.2.1 实验菌株** 目的菌株为草酸青霉菌P8、Pn1与未知菌名的A6,对照菌株为拜莱青霉菌*P. bilaii*(ATCC20851)和解磷巨大芽孢杆菌(ATCC14581)。

### 1.2.2 实验设计

(1) 固体培养基溶磷实验。采用改良的Pikovskaya培养基,磷源为骨粉(bone meal, P 14.6%)、磷酸氢钙(CaHPO<sub>4</sub>)、磷酸三钙(Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)、磷酸八钙

(Ca<sub>8</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>·5H<sub>2</sub>O, P 18.93%)、摩洛哥磷矿石(MPR, P 13.9%)、磷酸铁(FePO<sub>4</sub>)、磷酸铝(AlPO<sub>4</sub>)、氟磷灰石(Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>F)。分别吸取P8、Pn1、ATCC20851、ATCC14581悬浮菌液20μl接种于培养皿的中心,4次重复,30℃培养。第5天测量溶磷圈与菌落的直径,同时测定溶磷量。

(2) 液体培养基溶磷实验。培养基同实验1,无琼脂,磷源为摩洛哥磷矿粉(80μm)。吸取50ml液体培养基转入150ml三角瓶中,加入200mg摩洛哥磷矿粉,121℃灭菌30min,分别从P8、Pn1、ATCC20851菌落取3环(φ1.5mm)接入瓶中,对照不接菌,25℃摇床培养10d,重复3次。第5天离心取上清液,更换新鲜培养基,第10天结束培养,离心取上清。两次培养的上清液用于有效磷和有机的测定。

(3) 土壤溶磷实验。实验土壤为石灰性褐土,质地重壤,速效磷(P)为9.5μg/g。实验使用P8和A6菌株,加上对照,共3个处理,重复3次。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 磷的分析方法** ①在固体培养基的溶磷圈内用灭菌的打孔器(φ1.5mm)取培养基一片放入180ml塑料瓶,加1mol/L盐酸20ml,旋紧螺盖,往复振荡30min(150r/min),过滤,钼蓝比色法测有效磷;②液体培养基上清液中的有效磷用钼蓝比色法测定;③土壤有效磷采用Olsen法。

### 1.3.2 有机酸的测定 高效液相色谱法。

### 1.4 数据统计分析

采用SAS统计软件对数据进行分析(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 溶磷真菌的筛选

**2.1.1 筛选** 土壤样品在新沉淀难溶磷培养基上进行了溶磷微生物的分离。待琼脂培养基上长出明显的菌落,根据溶磷圈直径的大小初步分离出溶磷真菌20株。然后,在磷酸三钙为唯一磷源的选择性培养基上,比较了这些溶磷菌株的溶磷能力,最后获得3株溶磷能力较强的真菌,暂将它们定名为P8、Pn1和A6。

**2.1.2 分类鉴定** 将菌株P8和Pn1送中国科学院微生物研究所进行了鉴定,鉴定结果:P8、Pn1为草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum* Currie & Thom)。经文献检索,还没有草酸青霉菌的溶磷研究报道。菌株A6未进行鉴定,从菌落形态与孢子

颜色看,属于泡盛曲霉。

**2.1.3 草酸青霉菌的形态** 菌落在 CYA 上 25 ℃ 生长 7d,直径 45 ~ 47 mm,线状,产生大量的分生孢子结构,微黄暗棕色,近于水松绿( Yew Green, R. Pl. X X X I ),无渗液,反面淡黄色。

麦芽汁琼脂上 25 ℃ 生长 7d,菌落直径 35 ~ 37 mm,分生孢子结构较多,中部带粉红色,近于洋葱皮粉红色( Onion-Skin Pink, R. Pl. X X V ),边缘暗绿色,近于林肯绿( Lincoln Green, R. Pl. X L I ),反面紫黄褐色。

在 CYA 上 5 ℃ 7d,少数萌发;在 CYA 上 37 ℃ 生长 7d,生长茂盛。

分生孢子梗发生于基质,180 ~ 300 μm × 3.0 ~ 4.0 μm,壁平滑;梗基每轮通常 2 ~ 4 个,通常 13 ~ 20 μm × 3.0 ~ 4.0 μm,彼此近于平行;梗基每轮通常 5 ~ 6 个,瓶状或近于圆柱状,通常 9.0 ~ 13 μm × 2.5 ~ 3.2 μm;分生孢子椭圆型,通常 4.8 ~ 6.0 μm × 2.8

~ 3.5 μm,壁平滑。帚状枝,通常双轮生,偶有单轮生。分生孢子链,通常呈较紧密的圆柱状。

## 2.2 溶磷菌的溶磷能力

**2.2.1 溶磷菌在固体培养基上溶磷效果** 溶磷圈、菌落生长直径及其比值是表征溶磷菌的相对溶磷能力的一个指标,根据表 1 中溶磷圈和菌落直径计算出溶磷效率,溶磷效率未列入表中。在骨粉、Fe-PO<sub>4</sub>、CaHPO<sub>4</sub>、Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、磷酸八钙为磷源的培养基上,青霉菌 P8 和 Pn1 培养 5d 时菌落周围出现透明的溶磷圈,而对照菌株 ATCC20851 和巨大芽孢杆菌 ATCC14581 分别在磷酸三钙和骨粉培养基上出现溶磷圈,而且都比 P8 和 Pn1 同样磷源培养基的溶磷圈小。菌株 P8 和 Pn1 在 MRP、AlPO<sub>4</sub>、氟磷灰石的培养基上未见溶磷圈,尤其在 AlPO<sub>4</sub> 和氟磷灰石上菌落生长极为缓慢,而在摩洛哥磷矿粉上生长正常(表 1)。

表 1 溶磷菌在不同磷源固体培养基上菌落和溶磷圈直径<sup>1)</sup>

Table 1 Colony and halo of P-solubilizing strains in insoluble phosphates medium( mm)

磷源 P sources	菌株 Strains							
	P8		Pn1		ATCC20851		ATCC14581	
	溶磷圈 Halo	菌落 Colony	溶磷圈 Halo	菌落 Colony	溶磷圈 Halo	菌落 Colony	溶磷圈 Halo	菌落 Colony
Bone meal	50.5a	45.5a	48.5b	41.2ab	-	22.5a	15.0	12.5a
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	49.2ab	39.0bc	45.5ab	42.5a	24.0	22.7a	-	10.2cd
Ca <sub>8</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub>	44.7bc	36.7c	44.2b	39.0bc	-	22.0ab	-	10.2cd
CaHPO <sub>4</sub>	44.5bc	37.2c	46.2ab	41.5ab	-	21.5ab	-	11.5b
FePO <sub>4</sub>	41.2c	38.5d	40.5c	37.5c	-	21.7ab	-	10.2cd
MRP	-	43.5ab	-	38.7bc	-	20.2bc	-	10.0d
AlPO <sub>4</sub>	-	25.2d	-	29.2d	-	21.5ab	-	11.0bc
Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> F	-	27.7d	-	29.0d	-	18.5c	-	10.0cd
显著性 Signif P.								
磷源 P sources	0.01		0.01		0.01		0.01	

<sup>1)</sup> - 表示无溶磷圈,同一列不同字母表示差异显著 Stand for no dissolving halo. The value with a column followed by different letter are significantly different at 95 % probability

菌株 P8 和 Pn1 在不同难溶磷培养基上的溶磷圈、菌落直径和溶磷效率比较接近。P8 的溶磷圈以骨粉最大, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 略小, FePO<sub>4</sub> 最小;菌落直径以骨粉培养基的最大, MRP 次之, AlPO<sub>4</sub> 最小;溶磷效率以 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 最高(127.0), 其次是 Ca<sub>8</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(122.2), FePO<sub>4</sub> 最低(107.2)。菌株 Pn1 的溶磷圈以骨粉最大, CaHPO<sub>4</sub> 第 2, FePO<sub>4</sub> 最小;菌落直径以 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 最大, CaHPO<sub>4</sub> 次之, 氟磷灰石最小;溶磷效率在骨粉上最高(117.9), Ca<sub>8</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> 略低(113.6), Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 最低(107.1)。

不难看出,青霉菌 P8 和 Pn1 具有溶解多种难溶磷的作用,但不能溶解 AlPO<sub>4</sub> 和氟磷灰石,

ATCC20851 和 ATCC14581 溶解难磷源的种类很少。P8 和 Pn1 的菌落在 MRP 培养基上生长良好,表现了它们对摩洛哥磷矿粉的利用能力,从未出现明显溶磷圈现象分析,可能是其本身含有部分水溶磷的缘故。

培养 5d 的固体培养基中有效磷测定结果显示(表 2),青霉菌 P8 对 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 溶解量最大,达到 6.02 mg P/20 ml 培养基,其次是 Ca<sub>8</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> (4.704 mg P/20 ml), 分别占加入总磷量的 30.14 % 和 24.85 %;骨粉和 CaHPO<sub>4</sub> 释放有效磷的数量接近,为 4.19 和 4.41 mg P,占加入总磷量的 31.25 % 和 24.45 %;FePO<sub>4</sub> 溶解出的有效磷较少(3.48 mg),

占总磷量的 21.02%。菌株 Pnl 的溶磷效果与 P8 接近,对骨粉、 $\text{CaHPO}_4$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$  和  $\text{FePO}_4$  的溶解量分别为 4.56、3.58、5.12、4.61 和 3.36 mg P,占加入磷量的 29.11%、26.51%、25.62%、

24.36%和 20.28%。两株对照溶磷能力远远低于青霉菌 P8 和 Pnl,拜莱青霉菌 ATCC20851 对  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的溶解量占加入量的 7.28%,巨大芽孢杆菌 ATCC14581 溶解骨粉仅为加入磷量的 2.76%。

表 2 固体培养基接种溶磷菌 5d 的溶磷量

Table 2 Soluble P content in petri-dishes after 5 days incubation (mg/20 ml)

磷源 P sources	菌株 Strains							
	P8		Pnl		ATCC20851		ATCC14581	
	溶磷量 SPC	% of total P	溶磷量 SPC	% of total P	溶磷量 SPC	% of total P	溶磷量 SPC	% of total P
Bone meal	4.19	31.25	4.56	29.11	-	-	0.37	2.76
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	6.02	30.14	5.12	25.62	1.46	7.28	-	-
$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	4.70	24.85	4.61	24.36	-	-	-	-
$\text{CaHPO}_4$	4.41	24.45	3.58	26.51	-	-	-	-
$\text{FePO}_4$	3.48	21.02	3.36	20.28	-	-	-	-
MPR	-	-	-	-	-	-	-	-
$\text{AlPO}_4$	-	-	-	-	-	-	-	-
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	-	-	-	-	-	-	-	-
显著性 Signif. P								
磷源 P sources	0.01		0.01		0.01		0.01	

1) - 表示未测定溶解磷 Stand for no test of soluble P; SPC 表示溶磷量 SPC stand for content of soluble P

2.2.2 液体培养基中溶磷菌的溶磷效果 液体培养条件下测定了 P8、Pnl 和 ATCC20851 等 3 株溶磷真菌的溶磷能力,结果表明(表 3),各菌株都有明显的溶磷效果,菌株间差异显著,青霉菌 P8、Pnl 经过 10d 的培养 50 ml 培养基中的水溶磷(P)分别为 9.71 和 6.82 mg,显著高于对照菌 P20851 (5.95 mg

P)。氮源形态对溶磷菌株的溶磷效果有显著影响,硝态氮供应时青霉菌 P8 和 Pnl 的溶磷量高于铵态氮,分别将磷矿粉中 47.5%和 28.77%的磷素溶解出来,而铵态氮为氮源时溶磷量仅有 36.07%和 25.34%。无论是使用硝态氮还是铵态氮,青霉菌 P8 都具有较高的溶磷能力。

表 3 液体培养条件下不同溶磷菌 10d 转化磷矿粉为水溶磷的数量

Table 3 Content of soluble P released from rock phosphate by fungi in liquid culture (mg/50 ml/10 d)

菌株 Strains	$\text{NH}_4^+$		$\text{NO}_3^-$	
	溶磷量 P dissolved	占加入量 % % of applied	溶磷量 P dissolved	占加入量 % % of applied
P8	9.710 a	36.07	12.786 a	47.50
Pnl	6.820 b	25.34	7.745 b	28.77
ATCC20851	5.952 c	22.11		
CK	0.145 d	0.54		
显著性 Signif. P.				
菌株间 Strains			0.01	
氮源间 N sources			0.05	
菌株*氮源 Strain*N			ns	

这与已有的研究结果不同,大多数研究表明铵态氮是溶磷微生物的必需氮源,对铵态氮有依赖性,甚至依靠吸收  $\text{NH}_4^+$ -N 分泌出  $\text{H}^+$  质子溶磷<sup>[13-16]</sup>;有些溶磷微生物供应铵态氮溶磷效果显著,而供应硝态氮时不溶磷<sup>[17]</sup>,也有研究指出,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为最好氮源,所有溶磷菌株都不能利用  $\text{NaNO}_3$ <sup>[18]</sup>。目前能够利用  $\text{NO}_3^-$ -N 且具有较强溶磷能力的微生物的研究报道甚少,本实验所筛选的青霉菌利用

硝态氮溶磷的机理尚不清楚,有待进一步研究。

2.2.3 溶磷菌溶解土壤磷的效果 溶磷菌株溶磷能力的强弱,最终以溶解土壤磷的效果为重要依据。实验表明,在土壤环境中,菌株 P8 和 A6 具有较显著的溶磷作用(表 4)。

无论灭菌土还是非灭菌土,接种 P8 和 A6 处理土壤的有效磷都比对照显著增加。土壤灭菌对 P8 和 A6 溶磷效果有明显影响,灭菌土壤有效磷增加

较多,而非灭菌土壤增加较少。但是,就土壤有效磷含量而言,不灭菌土壤高于灭菌土壤,这主要归因于土著微生物也参与了溶磷过程。培养时间对 P8 和 A6 溶解土壤磷的影响不大,培养 10d 和 20d 的土壤有效磷无显著差异。在灭菌土壤中,青霉菌 P8 处

理土壤的有效磷高于 A6,培养 10d 土壤有效磷分别达到 14.25 和 12.40 $\mu\text{g P/g}$  土壤,而继续增加培养时间,有效磷变化甚小。不灭菌土壤未表现对溶磷真菌 P8 和 A6 的溶磷作用的不良影响,并且随培养时间延长而有效磷呈现增加趋势。

表 4 接种青霉菌对土壤磷的溶解效果

Table 4 The effect of P-dissolving strains on solubilization of insoluble P in soils ( $\mu\text{g/g}$ )

菌株 Strains	灭菌土壤 Sterilized soil		非灭菌土壤 Non-sterilized soil	
	10d	20d	10d	20d
CK	9.62 b	9.05 b	11.95 b	10.95 b
A6	12.40 a	12.96 a	13.44 a	14.50 a
P8	14.25 a	13.28 a	13.09 a	14.27 a
显著性 Signif. P				
菌株间 Strains	0.01			
培养时间 Incubation time	ns			
土壤处理间 Soils	0.01			

### 2.3 不同氮源对溶磷菌有机酸代谢的影响

用高效液相色谱分析了菌株 P8、Pn1、A6 液体培养基中有机酸的种类与浓度,限于条件,仅分析了 5 种有机酸(表 5)。结果显示,不同菌株分泌的有机酸的种类与数量差异较大,而且受氮源的显著影响。氮源为铵态氮时,菌株 P8 主要分泌苹果酸、乙酸、丙酸以及少量柠檬酸;菌株 Pn1 分泌苹果酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸;A6 以分泌乙酸和丙酸为主,未见苹果酸。当培养基中氮源为硝态氮时,有机酸的种类发生了根本变化,而且有机酸的总量远远低于相同菌株铵态氮的处理,菌株 P8 的培养基中检测不到以上 5 种有机酸,Pn1 只产少量苹果酸。可能是  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  作氮源改变了溶磷菌的代谢方向,致使分

泌的有机酸的种类不在检测范围之内。在  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  条件下,总有机酸分泌量如下顺序  $\text{P8} > \text{A6} > \text{Pn1}$ , 分别为 171.8、101.7 和 31.5  $\text{mg}/100 \text{ml}$ ;而  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  条件下 Pn1 有机酸分泌量为 14.8  $\text{mg}/100 \text{ml}$ ,P8 为 0。

氮源变化引起溶磷菌有机酸代谢差异的报道较少。对溶磷青霉菌 *P. bilaii* 的有机酸代谢的研究发现,分泌草酸还是柠檬酸严格受氮源和碳源的控制<sup>[9]</sup>。一些研究比较了不同氮源对溶磷菌株溶磷能力的影响,认为铵态氮是最好氮源,溶磷菌不能利用硝态氮<sup>[17,18]</sup>,这是否因氮的形态不同造成了有机酸的差异,没有予以阐明。本试验草酸青霉菌分泌有机酸受氮源影响的机理值得进一步探讨。

表 5 磷矿石溶解过程中有机酸的分泌种类与浓度

Table 5 Organic acids in broth during decomposition of rock phosphate ( $\text{mg}/100 \text{ml}$ )

菌株 Strain	氮源 N	苹果酸 Malic acid	乙酸 Acetic acid	柠檬酸 Citric acid	琥珀酸 Succinic acid	丙酸 Propionic acid	总酸 Total acids
P8	$\text{NH}_4^+$	56.6	69.3	3.9	-	42	171.8
P8	$\text{NO}_3^-$	0	0	0	0	0	0
Pn1	$\text{NH}_4^+$	12.1	6.5	3.9	9	-	31.5
Pn1	$\text{NO}_3^-$	14.8	0	0	0	0	14.8
A6	$\text{NH}_4^+$	-	56.3	3.9	2.5	39	101.7

## 3 结论

3.1 在以磷酸三钙为唯一磷源的选择性培养基上,根据溶磷菌株的溶磷能力,最后筛选出 3 株溶磷能

力较强的真菌。经过分类鉴定,两株(P8 和 Pn1)确定为草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum* Currie & Thom),另外一株(A6)尚待鉴定。文献检索显示,还没有草酸青霉菌的溶磷研究报道。

**3.2** 在固体培养基、液体培养基和土壤中分别测定了草酸青霉菌 P8 和 Pn1 的溶磷能力,它们表现出较强的溶解骨粉、 $\text{FePO}_4$ 、 $\text{CaHPO}_4$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、磷酸八钙、摩洛哥磷矿粉和土壤难溶磷的能力。溶磷能力显著高于对照菌株 ATCC20851 (*P. bilaii*) 和巨大芽孢杆菌 ATCC14581。初步研究显示,本菌株溶磷种类多、效率高、适应能力强,表现了良好的应用潜力。

**3.3** 草酸青霉菌 P8 和 Pn1 供应铵态氮和硝态氮都表现了较高的溶磷效果。溶磷能力受氮源的影响,硝态氮做氮源时青霉菌溶磷效果高于铵态氮,这与以往的研究报道不同。有机酸的分泌同样受氮源的影响,铵态氮为氮源时有机酸的种类多、浓度高,而硝态氮为氮源时则检测不到与铵态氮条件下同类有机酸的产生,可能氮源的不同影响了有机酸的代谢方向,并且它的溶磷机理不只一种。

**3.4** 草酸青霉菌 P8 存在两种可能溶磷机理,预示了有机酸不是溶磷微生物唯一的溶磷机理,这或许是它长期以来适应环境条件而形成的生理机制。可以将具有能够利用多种形态氮源、不依赖  $\text{NH}_4^+$  态氮而溶磷这一特性作为今后筛选高效溶磷菌株的一种遵循的标准。

## References

- [ 1 ] Ford M C. The nature of phosphate fixation in soils. *J. Amer. Soc. Agron.* 1933, 25:133 - 144.
- [ 2 ] Nagelschmidt G, et al. Formation of aptite from superphosphate in the soil. *Nature*, 1994, 154: 428 - 429.
- [ 3 ] Pikovskaya R I. Mobilisation of phosphates in soil in connection with the vital activities of some microbial species. *Mikrobiologiya, U. S. S. R.* 1948, 17: 362 - 370.
- [ 4 ] Yadav K, et al. Phosphorus solubilization by microbial isolate from a Calcifluent. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 1991, 39(1): 89 - 93.
- [ 5 ] Narsian V, et al. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 2000, 32:559 - 565.
- [ 6 ] Arora D I, et al. Periodic microbial solubilization of  $^{32}\text{P}$  labelled hydroxyapatite. *Indian J. Exp. Biol.* 1978, 18(3): 193 - 194.
- [ 7 ] Bopaiah, B M. Occurrence of phosphate solubilizing microorganisms in the root region of arecanut palms. *J. Plantation Crops*, 1985, 13(1): 60 - 62.
- [ 8 ] Tomar S S, et al. Availability of phosphorus to urdbean as influenced by phosphate solubilizing bacteria and phosphorus levels. *Indian J. Pulses Res.* 1994, 7(1): 28 - 32.
- [ 9 ] Ge C. Manufacture, Application and Development of Microbial Fertilizers Proceedings of '95 National Microbial Fertilizers Symposium. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 1996. (in Chinese)  
葛 诚 主编. 微生物肥料的生产应用及其发展 - '95 全国微生物肥料专业会议论文集. 北京:中国农业科技出版社, 1996.
- [ 10 ] Kamble B M, et al. Effect of phosphate a biophos culture inoculation on nutrients concentration, quality of groundnut and yield of subsequent wheat crop. *J. Maharashtra Agric. Univ.* 1996, 2(3): 324 - 327.
- [ 11 ] Gleddie S C, et al. A summary of wheat response to Provide<sup>TM</sup> (*Penicillium bilaii*) in Western Canada. In Proc. Alberta Soil Science Workshop, Lethbridge, Alberta. 1991: 306 - 313.
- [ 12 ] Kucey R M N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can. J. Soil Sci.* 1983, 63: 671 - 678.
- [ 13 ] Roos W, et al. Relationship between proton extrusion and pluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. *J. Gen. Microbiol.* 1984, 130: 1007 - 1014.
- [ 14 ] Asea P E A, et al. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soils. *Soil Biol. Biochem.* 1988, 20(4): 459 - 464.
- [ 15 ] Halder A K, et al. Role of  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_3^-$  on release of soluble phosphorus from hydroxyapatite by *Rhizobia* and *Bradryrhizobium*. *J. Basic Microbiol.* 1992, 32(5): 325 - 330.
- [ 16 ] Illmer P, et al. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 1995, 27: 3, 257 - 263.
- [ 17 ] Wenzel C L, et al. Phosphate-solubilizing bacteria associated with proteoid roots of seedlings of waratah [ *Telopea speciosissima* ( Sm. ) R.Br. ]. *New Phytologist*, 1994, 128(3): 487 - 496.
- [ 18 ] Vora M S, et al. Impact of addition of different carbon and nitrogen sources on solubilization of rock phosphate by phosphate-solubilizing microorganisms. *Indian J. Agric. Sci.* 1997, 68(6): 292 - 294.
- [ 19 ] Cunningham J E, et al. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58(5): 1451 - 1458.