

# 毛竹根际新黑曲霉的解磷特性及促生作用

吴高洋<sup>1</sup>, 陈伏生<sup>1</sup>, 万松泽<sup>1,2</sup>, 刘仁<sup>1</sup>, 杨豆<sup>2</sup>, 胡添翼<sup>2</sup>, 张扬<sup>1,2\*</sup>

(1. 江西农业大学 江西特色林木资源培育与利用 2011 协同创新中心, 江西 南昌 330045;

2. 江西省竹子种质资源与利用重点实验室, 江西 南昌 330045)

**摘要:** [目的] 探究毛竹根际微生物新黑曲霉 (*Aspergillus niger*) JXBR16 对土壤难溶性磷酸盐的溶磷作用及对毛竹的促生效果。 [方法] 采用液体发酵培养法研究该菌株对  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{CaHPO}_4$ 、 $\text{FePO}_4$ 、 $\text{AlPO}_4$  和植酸钙等 5 种难溶性磷酸盐的溶解能力及碳源、氮源、pH、装液量和盐离子等因素对其解磷能力的影响; 并采用温室盆栽法评价该菌株对毛竹实生幼苗的促生作用。 [结果] 表明, 新黑曲霉对 5 种难溶性磷酸盐均具有较好的溶解能力, 其中对  $\text{FePO}_4$ 、 $\text{CaHPO}_4$  的溶解能力最佳, 解磷量分别达  $3\ 208.31$  和  $3\ 027.09\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 在碳源为蔗糖或葡萄糖、氮源为硫酸铵、初始 pH 值 3.5、装液量 2/5、温度  $25\ ^\circ\text{C}$  和盐离子浓度为  $0 \sim 1.0\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  条件下新黑曲霉的解磷能力最佳。施用该菌株 180 d 后毛竹根际土壤有效磷和矿质氮分别提高 37% 和 41%, 植株根、茎和叶磷含量分别提高了 95%、102% 和 43%; 毛竹地径、苗高和生物量分别比对照显著提高了 44%、47% 和 50%。 [结论] 新黑曲霉能够有效增强南方红壤区毛竹林土壤磷的供给, 促进植株养分吸收利用, 并提高毛竹的生长, 具有应用于竹林生物菌肥研制和开发的巨大潜力。

**关键词:** 新黑曲霉; 毛竹; 溶磷; 促生作用; 根际土壤

**中图分类号:** S714.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2019)04-0144-08

磷是植物生长必需的大量元素, 在植物光合作用、根系延伸及能量传递等方面起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。大多数磷以磷酸钙、磷酸铝及磷酸铁等难溶性磷酸盐形式存在于自然界土壤中, 只有少数  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  和  $\text{HPO}_4^{2-}$  等可溶性磷能被植物吸收利用<sup>[3]</sup>。磷缺乏是限制植物生产力提高的主要因素之一, 大量的磷肥施入土壤中满足了植物的生长需求, 却引起了如水体污染等诸多环境问题<sup>[4]</sup>。另外, 磷肥主要是从磷矿石中提取, 而磷矿石的储量有限<sup>[5]</sup>, 开采矿石和磷肥生产是一种高成本和不可持续的过程。使用一种替代或可再生能源提高磷的循环利用, 减少对磷矿石和磷肥的依赖是目前急需解决的问题<sup>[4]</sup>。

土壤微生物能通过促进植物根系生长和磷的矿化等方式来提高其对养分的利用<sup>[6]</sup>, 其中溶磷微生物能通过有机磷矿化和无机磷的增溶从土壤难溶性磷酸盐中水解出可溶性磷<sup>[7-8]</sup>。如 Zhang 发现 2 株

溶磷真菌对  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{FePO}_4$ 、 $\text{AlPO}_4$  和植酸钙均具有较好的溶解作用<sup>[9]</sup>; 在田间或温室盆栽试验条件下, 石灰性土壤中施用巴西青霉菌 (*Penicillium bilaii*) 能显著促进小麦、大豆及豌豆等农作物的生长及磷的获取<sup>[4, 10]</sup>。Wang 发现溶磷真菌 CS-1 能分泌草酸、酒石酸和柠檬酸, 对磷酸钙具有较好的溶解能力, 且能显著促进小麦生物量的累积<sup>[11]</sup>。此外, 部分溶磷微生物还具有分泌嗜铁素、吲哚乙酸 (IAA) 和解钾等多种功能进而促进植物生长<sup>[3]</sup>。李云玲筛选出一株溶磷细菌 CHW10B 具有产嗜铁素和 IAA 的能力, 且能促进南方红豆杉生长及生物量提高<sup>[12]</sup>。张扬从毛竹根际土壤中筛选出 2 株溶磷细菌兼具解钾, 分泌 IAA 及抑制病原菌等功能, 对毛竹有较好的促生作用<sup>[13]</sup>。因此, 通过筛选和应用溶磷微生物改善土壤磷素供应或许是解决我国缺磷区养分供应不足的有效途径<sup>[14]</sup>。

毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carrière) J. Houz.)

收稿日期: 2019-01-25 修回日期: 2019-03-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31730014 & 31660190 & 41867007); 江西省 5511 优势科技创新团队人才计划项目(20165BCB19006); 大学生创新计划项目(2017110410045)。

\* 通讯作者: 张 扬, 主要研究方向: 土壤微生物。E-mail: zhangyang0558@163.com

是我国分布最广,面积最大的竹种<sup>[15]</sup>,主要分布于亚热带地区,占全国竹林面积70%左右,面积已达443万 $\text{hm}^2$ <sup>[16]</sup>。毛竹是典型的克隆植物,具有生长迅速及更新周期短等特点,是南方山区林农收入的重要来源,也是我国重要的经济林树种<sup>[17]</sup>。由于长期的不合理经营方式导致毛竹林地养分流失,地力衰退,生产力不稳定,土壤磷素缺乏导致竹材、竹笋产量逐年呈下降趋势,严重威胁着竹林的持续经营利用<sup>[18]</sup>。研究表明,磷素已成为限制毛竹林资源质量及生产力提升的主要因子之一<sup>[9,19]</sup>。目前关于毛竹林地溶磷真菌的研究少有报道。利用溶磷真菌提高竹林磷素利用率,对于改善毛竹林地土壤养分,提高竹林生产力,促进竹农增收具有重要的现实意义,也是一种低成本、环保和可持续的生物技术策略。本课题组前期从毛竹根际土壤中分离到1株解磷真菌新黑曲霉(*Aspergillus neoniger*)<sup>[9]</sup>,但关于该菌株解磷等相关功能尚未系统研究,对毛竹是否具有促生作用也尚不明确,限制了开发和利用。本研究探讨该新黑曲霉(JXBR16)的解磷特性和解磷条件,并通过盆栽试验研究其对毛竹实生苗的促生作用,揭示该菌株的溶磷效果及其促生机理,以期为该菌株作为生物肥料应用时发挥最佳溶磷功效提供参考,为改善土壤磷素营养和维持毛竹林可持续经营发展提供理论依据和实践指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株、植物及培养基

新黑曲霉(JXBR16),前期从毛竹根际土壤中筛选得到,保存于江西农业大学林学院森林保护实验室;毛竹实生苗(苗龄90 d),栽培于江西农业大学温室。基质土壤采自江西农业大学校园竹林,全氮含量 $0.47 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,有机质含量 $6.88 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,全磷含量 $0.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。土壤、蛭石与砂子按照2:1:1比例混合均匀后备用;解磷能力测定(NBRIP)培养基配方如下:葡萄糖10 g,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5 g,  $\text{MgCl}_2$  5 g,  $\text{KCl}$  0.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 g,蒸馏水1 000 mL, pH 7.0,马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基等培养基配方见参考文献[20]。

### 1.2 菌株 JXBR16 对不同磷源的溶解能力

按照1%的接种比例,将种子液分别接入以  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{FePO}_4$ 、 $\text{CaHPO}_4$ 、 $\text{AlPO}_4$  和植酸钙(*Calcium phytate*)作为唯一不溶性磷源的NBRIP培养基,5种磷源中磷素的含量均为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;以不接菌处

理作为对照。 $25^\circ\text{C}$ ,  $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下震荡培养7 d,发酵液离心10 min( $4^\circ\text{C}$ ,  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),取上清液,采用钼锑抗比色法测定发酵液中可溶性磷含量<sup>[20]</sup>。

### 1.3 碳氮源对菌株 JXBR16 解磷能力的影响

保持NBRIP培养基中  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  为磷源,其他成分不变,将蔗糖、果糖、可溶性淀粉、麦芽糖和葡萄糖分别按 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的比例加入到NBRIP液体培养基中作为唯一碳源;保持NBRIP培养基  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  为磷源,其他成分不变,将  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KNO}_3$ 、牛肉膏、酵母粉、蛋白胨分别按 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的比例加入到NBRIP液体培养基中作为唯一氮源。以1%接种量向装有50 mL培养基的100 mL三角瓶中接入JXBR16种子液。各处理均设3个重复,以不接菌处理作为对照。 $25^\circ\text{C}$ 、 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下震荡培养7 d,发酵液离心10 min( $4^\circ\text{C}$ ,  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),测定发酵液中可溶性磷含量,方法同1.2。

### 1.4 环境因子对菌株 JXBR16 解磷能力的影响

在100 mL三角瓶中分别装入20、40、50、60和80 mL的NBRIP培养基,使得装液量与三角瓶体积比分别为1/5、2/5、1/2、3/5和4/5;初始pH分别调到1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5,培养基中  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  为磷源,其他成分保持不变;设置20、25、30、35、 $40^\circ\text{C}$  5个不同温度下进行震荡培养,培养基中  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  为磷源,其他成分保持不变;向NBRIP培养基中分别按质量百分比浓度0%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0%和9.0%加入NaCl,保持培养基中  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  为磷源,其他成分不变,均按1%接种量分别接入JXBR04种子液进行震荡培养。各处理设3个重复和1个空白对照, $25^\circ\text{C}$ 、 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下震荡培养7 d后,发酵液离心10 min( $4^\circ\text{C}$ ,  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),测定发酵液中可溶性磷含量。方法同1.2。

### 1.5 菌株 JXBR16 对毛竹促生作用

将菌株JXBR16活化后,接种PDA培养基平板上,置于培养箱中 $25^\circ\text{C}$ 条件下培养7 d,产孢后加入无菌生理盐水,用毛笔刷轻轻洗落孢子,获得含分生孢子和少量菌丝的悬浮液,取上层孢子悬浮液进行孢子计数,将所得孢子悬浮液调成为孢子浓度为 $1.0 \times 10^7$  个孢子 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 悬浮液制成液体菌剂。

菌剂处理为对照(CK)和施用溶磷菌JXBR16。采用灌根的方式分别施用于毛竹根际土壤里,以等量无菌生理盐水为对照,菌剂施用量为10 mL·

株<sup>-1</sup>。采用完全随机设计,各处理20株。在栽培180 d时测定毛竹地径、苗高,用抖落法采集其根际新鲜土壤<sup>[21]</sup>,用于测定土壤有效磷和矿质氮等养分。将毛竹植株体洗净,在105℃下杀青30 min,80℃烘干至恒质量,测定其生物量,将毛竹分为根系、茎干和叶片3个不同器官组织,经球磨仪粉碎后过0.5 mm筛,分别测定其磷含量。土壤和植物组织的养分测定方法见参考文献[20]。

## 1.6 数据处理

运用Microsoft Excel 2013整理数据,利用Origin 8.5和SPSS 18.0软件做统计分析,采用单因素多重比较对解磷特性试验数据进行分析,促生效应试验数据采用配对*T*检验分析( $P < 0.05$ )。图表中数据为平均值±标准误。

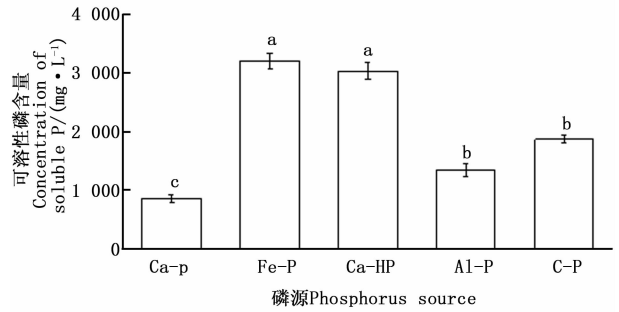
## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 JXBR16 对不同磷源解磷能力

菌株 JXBR16 对  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{CaHPO}_4$ 、 $\text{FePO}_4$ 、 $\text{AlPO}_4$  和植酸钙等5种难溶性矿质盐均具有较好的溶解能力且差异显著(图1)。该菌株对  $\text{FePO}_4$ 、 $\text{CaHPO}_4$  的溶解能力最强,解磷量分别为3 208.31和3 027.09  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;对植酸钙和  $\text{AlPO}_4$  的解磷能力其次,解磷量分别为1 862.73和1 342.43  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;对  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的溶解作用最低,解磷量也达至850.84  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.2 碳氮源对菌株 JXBR16 解磷能力的影响

不同碳源对菌株 JXBR16 溶解磷酸钙能力的影响差异显著(图2A)。以蔗糖和葡萄糖分别为唯一



Ca-P: 磷酸钙 ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ); Fe-P: 磷酸铁 ( $\text{FePO}_4$ ); Ca-HP: 磷酸氢钙 ( $\text{CaHPO}_4$ ); Al-P: 磷酸铝 ( $\text{AlPO}_4$ ); C-P: 植酸钙 (Calcium phytate)

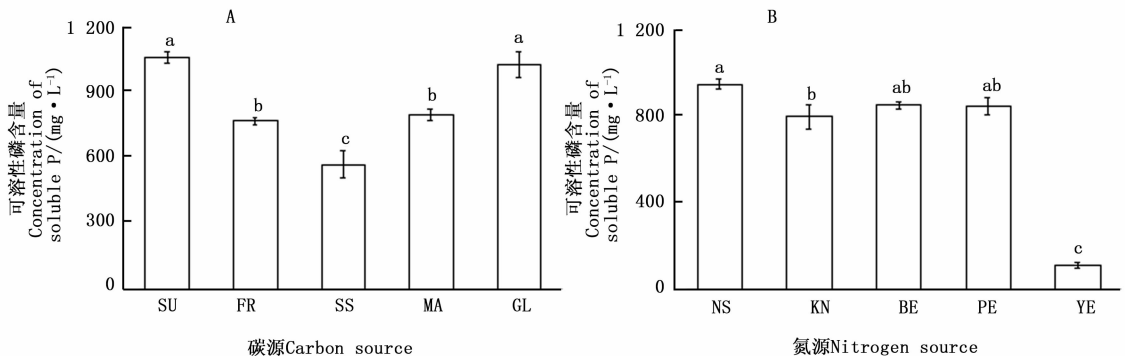
注:不同字母代表不同处理之间显著差异( $P < 0.05$ )。下同。

Note: The different letter indicated significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ). The same is below.

图1 不同磷源下菌株 JXBR16 培养液可溶性磷含量

Fig.1 Soluble phosphorus content in culture liquid of strain JXBR16 cultivated under different phosphorus sources

碳源时,菌株 JXBR16 对磷酸钙的溶解能力达至最强,解磷量分别为1 054.4  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和1 021.47  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;以麦芽糖、果糖和可溶性淀粉为碳源时,该菌株的解磷量显著降低,尤其是以可溶性淀粉为碳源时,解磷量最小,为567.75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在不同氮源条件下菌株 JXBR16 对磷酸钙的解磷能力差异显著(图2B),以硫酸铵为唯一氮源时,菌株 JXBR16 的解磷能力最强,解磷量为943.58  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;其次是以牛肉膏和蛋白胨为氮源时,该菌株的解磷的能力分别为847.64  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和844.27  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;而以酵母粉为氮源时解磷能力降至最低,为109.74  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



SU:蔗糖(sucrose);FR:果糖(fructose);SS:可溶性淀粉(soluble starch);MA:麦芽糖(maltose);GL:葡萄糖(glucose);NS:硫酸铵( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ );KN:硝酸钾( $\text{KNO}_3$ );BE:牛肉膏(beef extract);PE:蛋白胨(peptone);YE:酵母粉(yeast)

图2 不同碳(A)氮(B)源条件下菌株 JXBR16 培养液中可溶性磷含量

Fig.2 Soluble phosphorus concentrations in culture liquid of strain JXBR16 cultivated in different carbon (A) and nitrogen sources (B)

### 2.3 环境条件对菌株 JXBR16 解磷能力的影响

菌株 JXBR16 在不同环境条件下其解磷能力差异显著(图3)。该菌株在装液量为 2/5 时对磷酸钙具有较好的溶解能力,解磷量  $1\ 053.18\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,显著高于其他装液量解磷量(图3A)。菌株的解磷能力受初始 pH 值的显著影响;当初始 pH 值为 3.5 时,该菌株具有最大的解磷能力,解磷量为  $749.98\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,其次为初始 pH 值 4.5、1.5 和 6.5 时,而初始 pH 值 5.5 和 2.5 时最低(图3B)。温度在 25

℃和 30℃时该菌株对磷酸钙的溶解量显著高于其它温度处理的溶解量,解磷能力分别为  $758.33$  和  $716.67\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,其次为温度 35℃和 20℃时,而温度为 40℃时解磷能力最低(图3C)。随着 NaCl 浓度的增加,该菌株解磷能力总体呈现下降的趋势,在 NaCl 浓度为  $0.0\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.0\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,解磷能力分别为  $1\ 035.2$ 、 $984.13$  和  $920.72\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,显著高于其余处理(图3D)。

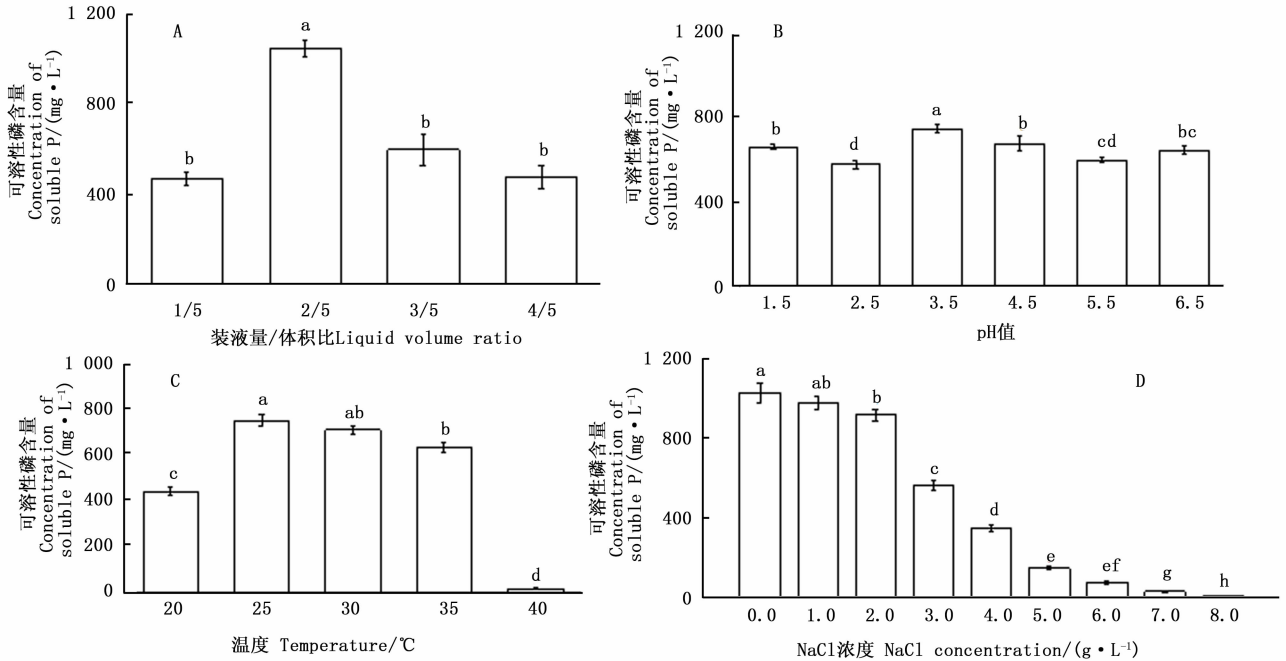


图3 不同装液量(A)、pH值(B)、温度(C)和NaCl浓度(D)条件下菌株JXBR16培养液可溶性磷含量

Fig.3 Soluble phosphorus concentrations in culture liquid of strain JXBR16 cultivated under different liquid volume in flask (A), pH (B), temperature (C) and NaCl levels (D)

### 2.4 菌株 JXBR16 对毛竹的促生作用

与对照相比,施用菌剂 JXBR16 能显著促进毛竹实生苗的生长(图4)。苗高、地径及总生物量分别比对照提高了 47.27%、44.44% 和 50.40%,地上和地下生物量分别比对照提高了 56.05% 和 39.2%,总生物量比对照提高了 50.4%(表1)。

同时,发现施用菌剂 JXBR16 后,毛竹根际土壤有效磷、铵态氮及矿质氮都显著提高,有效磷、铵态氮和矿质氮含量分别比对照提高了 36.68%、84.26%、41.07%;此外,植株体磷含量也显著提高,毛竹叶片、茎干和根系磷含量分别比对照提高了 43.28%、102.17% 和 95.35%(表2)。

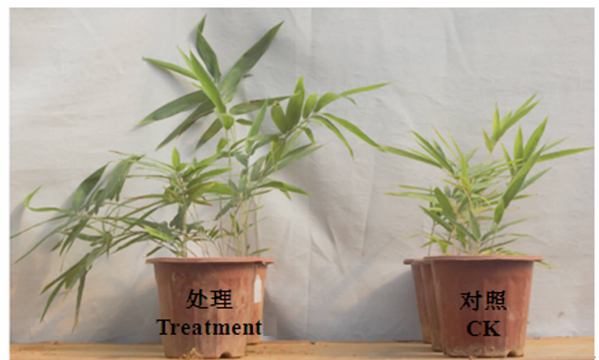


图4 施用解磷真菌 JXBR16 对毛竹促生效果的盆栽试验(180 d)

Fig.4 Inoculated with phosphate-solubilizing fungi JXBR16 for moso bamboo growth promotion in pot experiment (180 d)

表1 施用菌剂 JXBR16 对毛竹实生苗生长的影响

Table 1 The effect of adding strain JXBR16 on the growth of moso bamboo seedling

处理 Treatment	苗高 Seedling height/cm	地径 Ground diameter/cm	地上生物量 Aboveground biomass/g	地下生物量 Underground biomass/g	总生物量 Total biomass/g
施用菌剂 Adding strain	35.27 ± 1.21a	2.21 ± 0.26a	3.87 ± 0.16a	1.74 ± 0.09a	5.61 ± 0.14a
对照 CK	23.95 ± 0.73b	1.53 ± 0.17b	2.48 ± 0.14b	1.25 ± 0.06b	3.73 ± 0.22b

表2 施用菌剂 JXBR16 对毛竹实生苗养分吸收和根际土壤养分的影响

Table 2 Effect of inoculation with strain JXBR16 on nutrient uptake of moso bamboo seedlings and rhizosphere soil nutrient

观测指标 Variables	对照 CK	施用菌剂 Adding strain	T 检验 T-test
叶片磷含量 Leaf P/(g · kg <sup>-1</sup> )	2.01 ± 0.12	2.88 ± 0.21	P < 0.05
茎磷含量 Stem P/(g · kg <sup>-1</sup> )	0.92 ± 0.05	1.86 ± 0.27	P < 0.05
根系磷含量 Root P/(g · kg <sup>-1</sup> )	0.86 ± 0.06	1.68 ± 0.07	P < 0.05
有效磷 Available P/(mg · kg <sup>-1</sup> )	2.29 ± 0.25	3.13 ± 0.11	P < 0.05
铵态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/(mg · kg <sup>-1</sup> )	1.08 ± 0.09	1.99 ± 0.15	P < 0.05
硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/(mg · kg <sup>-1</sup> )	2.11 ± 0.02	2.51 ± 0.04	P > 0.05
矿质氮 Mineral N/(mg · kg <sup>-1</sup> )	3.19 ± 0.05	4.50 ± 0.18	P < 0.05

### 3 讨论

植物根际中存在着大量微生物,其中解磷微生物是植物最重要的促生微生物之一,其种类和数量很多,迄今报道约有 13 种细菌和 5 种真菌<sup>[22]</sup>。解磷微生物对难溶性磷源的溶解能力除了受遗传特性影响外,还受到培养条件、营养物质等因子制约<sup>[23]</sup>。如解磷放线菌 PSPSA1 在碳氮源分别为乳糖和蛋白胨时,其解磷量可达至 202.6 mg · L<sup>-1</sup>,纤维素和尿素为碳氮源其解磷能力最低<sup>[24]</sup>;而解磷细菌 CHW10B 在碳氮源分别为葡萄糖和硫酸铵时,其解磷能力最大,以淀粉和蛋白胨为碳氮源时基本没有解磷能力<sup>[12]</sup>。本研究中的新黑曲霉 JXBR16 以蔗糖和葡萄糖为碳源,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为氮源时解磷能力最强。这也与相关报道相一致,即当氮源为 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 时,菌株的解磷能力要高于其它氮源<sup>[25]</sup>。通过该菌株对不同磷源的溶解发现其解磷量与发酵液 pH 值也存在显著的负相关,推测菌株 JXBR16 通过 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的同化作用分泌质子,使培养基介质的 pH 值降低,从而提高对难溶性磷酸盐的溶解能力<sup>[26]</sup>。这是否会加剧土壤酸化而带来负面效应值得关注。此外以果糖、麦芽糖、可溶性淀粉和葡萄糖分别作为碳源和以 KNO<sub>3</sub>、牛肉膏和蛋白胨作为氮源时其解磷能力也较好,这为今后该菌株的开发及应用提供了广泛的碳氮源。pH 值、温度、溶氧量及盐碱度等外部的环境条件也是影响解磷微生物溶磷功能的重要因素<sup>[25]</sup>。如 Illmer 等发现溶氧量对

解磷细菌 *Pseudomonas* sp. 的解磷能力有着较显著的影响<sup>[27]</sup>。本试验发现菌株 JXBR16 能够在较低的 pH 值、装液量、温度和盐离子浓度变化范围内仍能发挥较强的解磷作用。毛竹主要分布我国南方酸性土壤区域,土壤 pH 值介于 3.7 ~ 5.2,温度、酸度和氧气浓度均具有较大变化<sup>[9]</sup>,解磷菌株 JXBR16 能在不同环境因子下发挥较好的解磷能力,这为菌株 JXBR16 对今后应用于毛竹林地中发挥解磷功效,改善土壤肥力奠定优势。

研究表明,解磷微生物的解磷能力强弱与土壤类型密切相关,并且解磷微生物对土壤中不同类型磷源的溶解能力也是不同的<sup>[23]</sup>。如解磷真菌黑曲霉 *Aspergillus niger* An2 对 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 和 AlPO<sub>4</sub> 的溶解能力为 1 722 和 2 356 mg · L<sup>-1</sup>,而对 FePO<sub>4</sub> 和 Rock phosphates 的溶解能力仅为 215 和 179 mg · L<sup>-1</sup><sup>[28]</sup>。本试验中选取的 5 种难溶性磷酸盐中 Fe-PO<sub>4</sub>、AlPO<sub>4</sub> 和植酸钙相比磷酸钙盐具有更复杂的晶体结构<sup>[23]</sup>,试验结果显示新黑曲霉 JXBR16 对这 5 种难溶性磷源具有不同的溶解能力,说明该菌株的解磷能力受磷源的结构组成影响。此外植酸钙作为植酸磷的组成部分在土壤中广泛存在,是土壤中有有机磷的重要存在形式<sup>[29]</sup>。试验结果显示菌株 JXBR16 除了对磷酸钙盐、磷酸铁盐和磷酸铝盐等无机磷源具有较强的溶解能力,还对植酸钙具有较好的溶解能力,说明该菌株在有机磷的矿化中也能发挥着重要作用。本试验结果表明该菌株能适用不同的土壤类型,包括石灰性土壤和红壤等不同土壤类型。

这也为今后该菌株应用于不同类型土壤中促进有效磷的释放提供技术支撑。然而菌株 JXBR16 对这 5 种难溶性磷酸盐的解磷机制还未弄清楚,前人研究证实有机酸的分泌是解磷真菌解磷的机制之一<sup>[24, 28]</sup>,有机酸的含量和种类对其与  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  等金属离子结合能力及对阴离子抑制磷酸根吸附阳离子具有较显著影响<sup>[23, 30]</sup>。如 Cunningham 认为解磷真菌 *Penicillium bilaii* 分泌的草酸是溶解磷酸钙的主要机制<sup>[31]</sup>。关于本试验中菌株 JXBR16 分泌有机酸的种类和数量还有待于进一步研究,以期为该菌株的解磷机理提供有力佐证。

以往研究显示施用解磷菌株后植株体对磷素的吸收量与植物生长并不总是具有相关性<sup>[4, 10]</sup>。如 Mónica 等人从阿根廷北方酸性土壤中筛选几株解磷能力较强的细菌,通过盆栽试验发现其促进了磷素吸收然而对大豆并无明显的促生长作用<sup>[32]</sup>,而 Li 等发现解磷细菌能提高核桃对土壤磷素的吸收和促进植株体生长<sup>[33]</sup>。本研究中施用解磷真菌 JXBR16 能显著提高毛竹对土壤磷的吸收利用,显著提高毛竹苗高、地径及生物量,促进毛竹实生苗的生长,实验的结果也显示了解磷菌株能通过提高植物对土壤磷素的吸收进而促进植物生长<sup>[4]</sup>。此外,解磷微生物促进植物生长也取决于不同土壤类型中磷素的含量<sup>[4, 31]</sup>。如 Zhu 等人发现解磷真菌 *Penicillium aculeatum* 促进植物的生长要依赖于土壤中磷源的含量,当土壤中有效磷含量较低时,解磷微生物才发挥其解磷功能,促进植物生长,而土壤磷源充足时解磷微生物并不能促进植物的生长<sup>[34]</sup>,Efthymiou 等人也证实了这一现象,并猜测这是由于解磷微生物与植物根系之间有着特定的相互作用<sup>[4]</sup>。本试验所用基质为典型的竹林红壤土,有效磷含量较低,试验结果显示施用菌剂 JXBR16 能显著提高毛竹土壤有效磷和植株体内磷含量,且能显著促进毛竹生长,这也与前人研究得出的结论相一致。本试验发现施用菌剂 JXBR16 能显著提高土壤有效磷和铵态氮含量,而磷在植物细胞分裂和增大起着重要作用,而铵态氮被植物吸收后用于合成蛋白质<sup>[35-36]</sup>,推测解磷真菌新黑曲霉 JXBR16 通过提高土壤有效磷和铵态氮含量促进毛竹的生长和生物量累积,而相关的影响机制还有待于后续研究。本试验结果对于应用微生物改善毛竹林地土壤磷素营养及开发微生物肥料具有重要的参考价值和指导意义。

## 参考文献:

- [1] Bhat S A, Singh J, Vig A P. Earthworms as organic waste managers and biofertilizer producers[J]. Waste and Biomass Valorization, 2018, 9(7): 1073 - 1086
- [2] Ram H, Malik S S, Dhaliwal S S, et al. Growth and productivity of wheat affected by phosphorus-solubilizing fungi and phosphorus levels[J]. Plant Soil and Environment, 2015, 61(3): 122 - 126.
- [3] Biswas J K, Banerjee A, Rai M, et al. Potential application of selected metal resistant phosphate solubilizing bacteria isolated from the gut of earthworm (*Metaphire posthuma*) in plant growth promotion [J]. Geodma, 2018, 330: 117 - 124.
- [4] Efthymiou A, Grønlund M, Müller-Stöver D S, et al. Augmentation of the phosphorus fertilizer value of biochar by inoculation of wheat with selected *Penicillium* strains[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 116: 139 - 147.
- [5] Cordell D, Drangert J O, White S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought [J]. Global Environmental Change, 2009, 19(2): 292 - 305.
- [6] Richardson J, Stead D E, Coutts R H A. Incidence of the *cblA* major subunit pilin gene amongst *Burkholderia* species[J]. Fems Microbiology Letters, 2001, 196(1): 61 - 66.
- [7] Koch M, Kruse J, Eichler-Löbermann B, et al. Phosphorus stocks and speciation in soil profiles of a long-term fertilizer experiment: Evidence from sequential fractionation, P K-edge XANES, and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy [J]. Geofisica Internacional, 2018, 316: 115 - 126.
- [8] Sharma S B, Sayyed R Z, Trivedi M H, et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils[J]. Springerplus, 2013, 2(1): 587.
- [9] Zhang Y, Chen F S, Wu X Q, et al. Isolation and characterization of two phosphate-solubilizing fungi from rhizosphere soil of moso bamboo and their functional capacities when exposed to different phosphorus sources and pH environments[J]. Plos One, 2018, 13(7): e199625.
- [10] Gómez-Muñoz B, Pittroff S M, Neergaard A D, et al. *Penicillium bilaii* effects on maize growth and P uptake from soil and localized sewage sludge in a rhizobox experiment[J]. Biology and Fertility of Soils, 2017, 53(1): 1 - 13.
- [11] Wang X, Wang C, Sui J, et al. Isolation and characterization of phosphofungi, and screening of their plant growth-promoting activities[J]. Amb Express, 2018, 8(1): 63.
- [12] 李云玲, 侯沁文, 刘瑞祥, 等. 草木樨中华根瘤菌 CHW10B 溶磷特性及其对南方红豆杉的促生作用[J]. 林业科学研究. 2017, 30(5): 751 - 758.
- [13] 张 扬, 郭春兰, 陈伏生, 等. 毛竹根际 2 株溶磷解钾促生细菌的筛选鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2018, 40(4): 759 - 768.
- [14] Liu Z, Li Y C, Zhang S, et al. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils[J]. Applied Soil Ecology, 2015, 96: 217 - 224.
- [15] 范少辉, 刘广路, 苏文会, 等. 竹林培育研究进展[J]. 林业科

- 学研究, 2018, 31(1): 137–144.
- [16] 姚钧能, 俞卫良, 张君波, 等. 氮沉降和经营强度对毛竹林凋落叶生态化学计量特征的影响[J]. 应用生态学报, 2018, 29(2): 467–473.
- [17] Song X, Zhou G, Jiang H, *et al.* Carbon sequestration by Chinese bamboo forests and their ecological benefits: assessment of potential, problems, and future challenges[J]. *Environmental Reviews*, 2011, 19(1): 418–428.
- [18] 曹永慧, 萧江华, 陈双林, 等. 竹阔混交林阔叶树下土壤养分对毛竹生长的影响[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(6): 43–47.
- [19] 郭晓敏. 毛竹林平衡施肥与营养管理[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- [20] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [21] 刘 煜, 胡小飞, 陈伏生, 等. 马尾松和苦槠林根际土壤矿化和根系分解 CO<sub>2</sub> 释放的温度敏感性[J]. 应用生态学报, 2013, 24(6): 1501–1508.
- [22] 李小冬, 王小利, 陈 锡, 等. 转录组解析白三叶根际溶磷菌株 RW8 的解磷机制[J]. 草业学报, 2017, 26(8): 168–179.
- [23] Mendes G D O, Freitas A L M D, Pereira O L, *et al.* Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources[J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(1): 239–249.
- [24] 薛 冬, 黄向东, 杨瑞先, 等. 牡丹根际溶磷放线菌的筛选及其溶磷特性[J]. 应用生态学报, 2018, 29(5): 1645–1652.
- [25] 曾庆伟, 温心怡, 吴小芹. 1 株 *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2 的解磷特性及解磷条件研究[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(1): 11–16.
- [26] Ahuja A, Ghosh S B, D'Souza S F. Isolation of a starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(17): 3408–3411.
- [27] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, 24(4): 389–395.
- [28] Li X, Luo L, Yang J, *et al.* Mechanisms for solubilization of various insoluble phosphates and activation of immobilized phosphates in different soils by an efficient and salinity-tolerant *Aspergillus niger* strain An2 [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(5): 2755.
- [29] Turner B, Paphazy M, Haygarth P, *et al.* Inositol phosphates in the environment[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 2002, 357(1420): 449–469.
- [30] Rinu K, Malviya M K, Sati P, *et al.* Response of cold-tolerant *Aspergillus* spp. to solubilization of Fe and Al phosphate in presence of different nutritional sources[J]. *Isrn Soil Science*, 2013, (4): 135–143.
- [31] Cunningham J E, Kuaick C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(5): 1451–1458.
- [32] Richardson A E, Simpson R J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(3): 989–996.
- [33] Liu F P, Liu H Q, Zhou H L, *et al.* Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(6): 927–937.
- [34] Zhu J, Li M, Whelan M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 612: 522–537.
- [35] Bhattacharyya P N, Jha D K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1327–1350.
- [36] Orhan F. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(3): 621–627.

# Phosphate Solubilizing Characteristics and Growth Promoting Effect of *Aspergillus neoniger* on *Phyllostachys edulis* Seedling

WU Gao-yang<sup>1</sup>, CHENG Fu-sheng<sup>1</sup>, WAN Song-ze<sup>1,2</sup>, LIU Ren<sup>1</sup>, YANG Dou<sup>2</sup>, HU Tian-yi<sup>2</sup>, ZHANG Yang<sup>1,2</sup>

(1. Collaborative Innovation Center of Jiangxi Typical Trees Cultivation and Utilization, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China; 2. Jiangxi Provincial Key Laboratory for Bamboo Germplasm Resources and Utilization, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, 330045, Jiangxi, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] The aim of this study is to investigate the phosphate-solubilizing characteristics and growth promoting effect of *Aspergillus neoniger* (JXBR16) from rhizosphere soil of *Phyllostachys edulis*. [ **Method** ] The phosphate-solubilizing ability of strain JXBR16 on five different types of mineral phosphate, including  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$  and calcium phytate, were compared and the effects of carbon sources, nitrogen sources, initial pH, liquid filling volume, temperature and salt ions on phosphate solubilizing ability of strain JXBR16 were studied using the liquid fermentation experiment. Also, the effects of strain JXBR16 on nutrient acquirement and growth of *Ph. edulis* were evaluated using pot experiment. [ **Result** ] The strain JXBR16 showed the greatest ability to solubilize  $\text{FePO}_4$  and  $\text{CaHPO}_4$  with 3 208.31 and 3 027.09  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. The strain JXBR16 displayed the highest phosphate-dissolving capacity when the initial pH reached 3.5, the volume of liquid was 2/5, the temperature was 25°C, the NaCl concentration was 0.0 ~ 1.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , sugar and yeast powder were used as carbon and nitrogen sources, respectively. Meanwhile, compared with control, the rhizosphere soil available phosphorus, mineral nitrogen, root, stem, and leaf phosphorus contents increased by 37%, 41%, 95%, 102% and 43%, respectively in *Ph. edulis* seedling inoculated with strain JXBR16 for 180-days. In addition, the ground diameter, seedling height and biomass accumulation were higher by 44.44%, 47.27% and 50.40%, respectively in strain JXBR16 treatment than control. [ **Conclusion** ] *A. neoniger* can effectively enhance soil phosphorus supply, promote nutrient uptake and utilization, and improve the growth of *Ph. edulis* in red soil region. It has great potential to be used in development of biological fertilizer for bamboo forests in southern China.

**Keywords:** *Aspergillus neoniger*; *Phyllostachys edulis*; phosphate-solubilization; growth-promoting effect; rhizosphere soil.

(责任编辑:崔 贝)