

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(5):580-585; 4 May 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一株新的溶磷棘孢青霉菌 Z32 的分离、鉴定及其土壤定殖与溶磷特性

龚明波, 范丙全*, 王洪媛

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】从植物根部土壤中分离到一株高效溶磷真菌 Z32, 进行了分类学鉴定和土壤定殖与溶磷特性的初步研究。为溶磷微生物的应用提供新的菌株。【方法】通过形态特征、培养特征和 ITS rDNA 序列分析方法进行菌株鉴定。通过菌株 Z32 在土豆液体培养基培养过程中培养液 pH 的变化确定溶磷菌株的溶磷能力。利用菌株土培试验, 进行菌株的土壤定殖和土壤中不同形态无机磷转化试验。【结果】菌株 Z32 鉴定为棘孢青霉菌 (*Penicillium aculeatum*)。菌株 Z32 能在 4 d 内完全溶解固体培养基中的磷酸三钙, 18 h 内将土豆液体培养基的 pH 值从 7.0 降低到 1.5 左右。菌株 Z32 在 20℃ 时的定殖效果最好, 21 d 时, 菌数达到起始的 9.83 倍, 而且能够保持到 49 d 不消亡。在 20℃ 时, 添加菌株 Z32 的土培实验在 21 d 时, 土壤中 $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 AlPO_4 和 FePO_4 等难溶无机磷向可溶性的 CaHPO_4 转化, CaHPO_4 含量增加了 58.83%。49 d 时, 土壤中的 $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 AlPO_4 和 FePO_4 被转化后, 没有随着微生物的减少而完全被固定。【结论】筛选到一株新的溶磷菌株 Z32 在土壤中很好定殖, 能够转化土壤中多种形态的难溶无机磷为可溶性的 CaHPO_4 , 显著增加土壤中 CaHPO_4 的含量。同时阻滞了 $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 AlPO_4 和 FePO_4 等难溶无机磷的固定。

关键词: 溶磷菌; 棘孢青霉; 定殖; 无机磷分级

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0580-06

磷是植物的必需三大营养元素之一, 虽然自然界中存在大量的磷, 但土壤磷大多以植物难以利用的无机态和有机态存在, 占土壤总磷的 95%。因此, 目前大多数土壤都是缺有效磷的, 尤其是我国有 74% 的耕地缺磷。单纯的大量施用磷肥并不能完全解决土壤缺磷的状况, 有研究表明当季使用的磷肥利用率一般不超过 20%^[1], 很大一部分或被土壤固定, 或随着雨水冲洗而进入河流, 造成了严重的水环境污染。提高磷肥的利用率, 高效施肥是目前国内外科学家的研究热点, 而溶磷微生物在提高磷肥利

用率方面发挥的重要作用尤为引人注目。研究证明溶磷菌在转化土壤难溶磷、提高磷肥利用率和促进作物生长方面都具有显著的作用^[2]。目前国内外有关青霉菌的溶磷报道很多, 主要集中在草酸青霉菌和拜来青霉菌^[3-6], 国内外文献检索显示, 还未见有关于棘孢青霉菌 (*Penicillium aculeatum*) 的溶磷报道。本文拟从土壤中筛选具有高效溶磷能力的菌株, 并对其在土壤中定殖能力和转化土壤磷素的能力进行研究, 以期为提高磷肥的利用率提供优质的菌种资源和理论依据。

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2008-13)

* 通信作者。Tel: +86-10-82108689; E-mail: bqfan@caas.ac.cn

作者简介: 龚明波 (1979-), 男, 湖北人, 助研, 在职博士研究生, 主要从事微生物资源与利用研究。E-mail: gongcmb@caas.ac.cn

收稿日期: 2009-10-30; 修回日期: 2010-02-08

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品来源:采自北京、河北、东北等地的作物根际土壤样品 200 个。土培实验土壤采自中国农科院实验基地,为非石灰性潮土,pH 值 6.8,0-20 cm 土壤有机质含量为 6.20 g/kg,全氮 0.35 g/kg,全磷 0.41 g/kg,土壤有效磷 20.94 mg/kg,土壤速效钾 28.65 mg/kg,土壤阳离子交换量为 10.72 cmol/kg 土。

1.1.2 培养基:用于溶磷菌株分离的难溶无机磷培养基、PDA 斜面培养基、PDB 液体培养基、CA 培养基和 CYA 培养基均参照文献[7]配制。

1.1.3 主要试剂和仪器:主要试剂:真菌总 DNA 提取试剂盒购至杭州博日科技有限公司,Taq 酶和 dNTP 购至天根生化科技(北京)有限公司,引物为 ITS1 和 ITS2^[11] 在上海生工生物技术有限公司合成,其它试剂均为国产分析纯。主要仪器:离心机为 PCR 仪为 GeneAmp PCR system 9700,高速冷冻离心机为 Heraeus 的 Sorvall Biofuge stratos,光学显微镜为 OLYMPUS BH-2,外分光光度仪为天美科技有限公司的 UV-7501。

1.2 溶磷菌的分离筛选

稀释土壤 $10^2 - 10^4$ 倍,制成土壤悬液,将其涂布到难溶无机磷培养基上,28℃ 倒置培养 5 d,选择溶磷圈较大的菌株,转接新鲜的 PDA 固体培养基,纯化后,接入 PDA 斜面保藏。

1.3 溶磷菌的鉴定

1.3.1 菌落形态特征观察和培养特征:参照文献[8]和中国真菌志(第三十五卷)-青霉属及其相关有性型属^[9]。

1.3.2 ITS rDNA 鉴定:将筛选菌株的孢子接入 PDB 液体培养基中,28℃ 摇床培养 24 h,过滤获得菌丝,提取真菌基因组总 DNA^[10],用引物为 ITS1 和 ITS2 扩增 18S rDNA 和 5.8S rDNA 之间的序列^[11],PCR 扩增产物送上海生工生物技术有限公司测序后,将获得的 DNA 序列,输入 GenBank,用 Blast 程序与数据库中的所有序列进行比较分析。并利用 MEGA4.1 进行系统发育树的构建。

1.4 溶磷菌培养过程中溶液 pH 的变化

将每瓶 50 mL 的 PDB 培养液用稀 HCl 或稀 NaOH 调节 pH 值,使其分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,加入溶磷菌株,每瓶 10^6 cfu,28℃ 摇床培养 18 h,用 EUTECH pH510 测定仪测定培养液的 pH。

1.5 不同温度对溶磷菌在土壤中定殖的影响

试验土壤取自北京昌平农科院试验站,每盆装土壤 500 g,设置 3 个温度:15、20、30℃,加入溶磷菌悬液,含量为 10^6 cfu/g,保持土壤湿度 30% - 50%,每个处理重复 3 次。每隔 7 d 取样一次,即分别在第 7、14、21、28、35、42 和 49 天取样。按上述溶磷菌的分离筛选方法,利用难溶磷无机盐培养基平板计数法测定土壤中溶磷菌的数量,平板上长出有溶磷透明圈的真菌数在 30 - 100 个的为有效计数结果。

1.6 溶磷菌对土壤中难溶无机磷的转化

土壤处理同 1.5 的方法。不同形态的磷含量按照顾益初^[12-13]确立的方法分别测定,将土壤中磷分为 ($\text{Ca}_2\text{-P}$)、($\text{Ca}_9\text{-P}$)、(Al-P)、(Fe-P)、(O-P)、($\text{Ca}_{10}\text{-P}$) 六级。

2 结果和分析

2.1 溶磷菌的分离筛选

从植物根际土壤样品中共分离到 210 株溶磷菌,其中真菌 Z32 在无机磷培养基上生长良好,4 d 能够将 9 cm 培养皿内的无机磷全部溶解,具有较强的溶磷能力,因此选择菌株 Z32 作为本实验供试菌株。

2.2 溶磷菌的鉴定

2.2.1 形态特征:菌株 Z32 28℃ 在 PDA 上恒温培养 2 d 后肉眼可看到清晰的菌丝体,孢子培养 7 d 菌落直径为 45 mm,菌丝为青绿色,反面略带黄红色,菌落外缘绒状,中部棉絮状,无霉味。在显微镜下观察,菌丝成束,帚枝双轮对称型,从气生菌丝上伸出;孢子梗壁光滑,直径 2.4 μm - 3.6 μm ;小梗披针形,5.8 μm - 8.2 μm ,顶端尖细,形成 2 μm - 3 μm 的喙状物;分生孢子球形,3 μm - 3.5 μm ,具有小棘。

2.2.2 培养特征:菌落在 CA 培养基上 25℃ 培养 12 d,直径 22 cm - 28 cm,近于平坦,质地绒状,分生孢子结构较少,分生孢子面黄绿色至绿色,菌丝体橘黄色,反面紫红色。菌落在 CYA 上 25℃ 培养 7 d,分生孢子结构较多,质地绒状,分生孢子面黄绿色至绿色,菌丝体淡黄色,反面紫红色。菌落在 CYA 培养基上 5℃ 培养 7 d 不生长,37℃ 生长较慢。

2.2.2 ITS rDNA 序列分析:利用 ITS rDNA 特异引物对菌株进行 PCR 扩增得到 524 bp 的目的 DNA 片段,将序列提交到 GenBank 上,获得 GenBank 登陆号为 GU384213,利用 Blast 软件与 GenBank 的序列进行同源性比较,结果显示菌株 Z32 的 ITS rDNA 序列与青霉属的棘孢青霉菌和嗜松青霉菌同源性 >99%。

利用 MEGA4.1 的 Neighbor-Joining 软件进行系统发育树的构建,结果如图 1,遗传距离显示菌株

Z32 与青霉遗传距离最近, 与棘孢青霉菌同源性高达 99.8%。

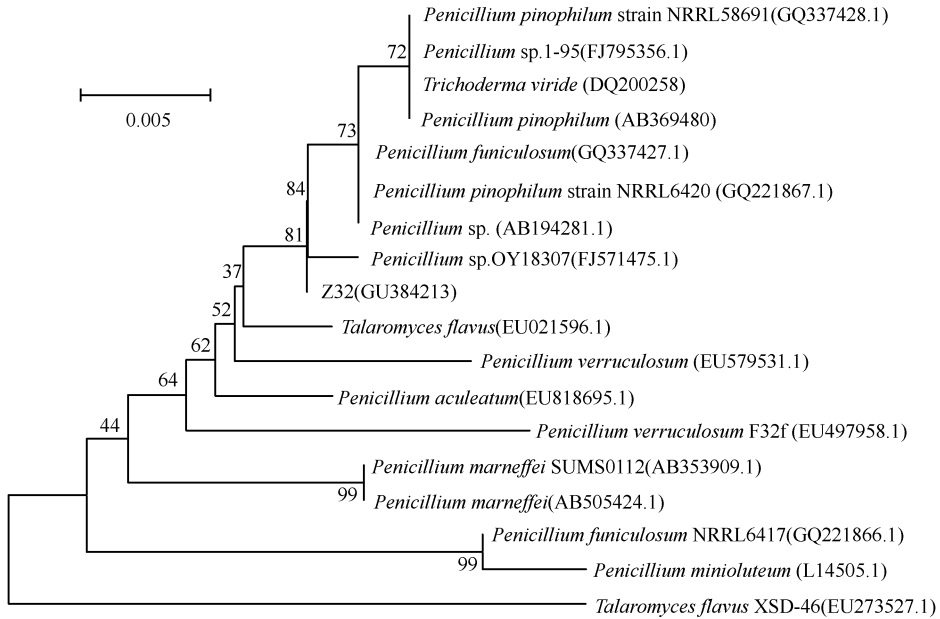


图 1 菌株 Z32 的基于 ITS rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of Strain Z32 and reference *Penicillium* species. Evolutionary distances showed in the figure were calculated by MEGA4.1; Bootstrap = 1000. Bar, 0.005 substitution per nucleotide. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

根据形态特征、培养特征结合 ITS 序列分析结果, 参照文献[8]和中国真菌志(第三十五卷)-青霉属及其相关有性型属^[9], 确定菌株 Z32 为棘孢青霉 (*Penicillium aculeatum*)。

2.3 溶磷菌培养过程中溶液 pH 的变化

将菌株 Z32 接种到不同的初始 pH 条件下对溶液中。结果表明菌株 Z32 在 pH 值 4.0 - 9.0 的范围内都能很好的生长, 在摇瓶培养 18 h 后, 菌株产生的代谢物能将溶液的 pH 值从 9.0 降到 5.0 以下, 在初始 pH 值小于 7.0 的条件下, 菌株 Z32 能够显著降低溶液的 pH 值到 1.5 以下(图 2), 初始 pH 在 4 - 7 之间, 溶磷菌 Z32 培养过程中对溶液的 pH 没有显著影响。

2.4 不同温度对菌株 Z32 在土壤中定殖的影响

将菌株 Z32 接种到土壤中, 在 15℃、20℃、30℃

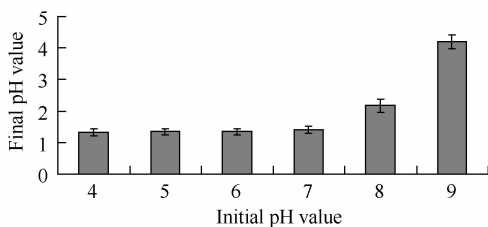


图 2 菌株 Z32 培养 18 h 后溶液的 pH 值

Fig.2 The final pH values of of mediums after culture for 18 hours of the strain Z32.

三种不同的温度环境下培养, 结果表明菌株 Z32 在土壤中都有很好的定殖能力(图 3), 到第 21 天时, 菌群数量达到最大, 之后开始逐渐下降, 其中 20℃ 条件下, 菌株 Z32 的生长速度最快, 21 d 后超过初始数量 10 倍, 15℃ 和 30℃ 条件下, 菌株 Z32 的生长速度没有明显的差异, 最大数量能够达到起始数量的 5 倍。在 30℃ 条件下, 菌株在土壤中的消亡速度最快, 到第 49 天时, 菌株基本全部消亡。而在 15℃ 下, 菌株达到最大数量后能够在 15 d 内保持稳定。

2.5 菌株 Z32 对土壤中难溶无机磷的转化

将菌株 Z32 接种到土壤中, 在 15℃、20℃、30℃ 三种不同的温度环境下培养, 结果显示在土壤中接种菌株 Z32 后, 土壤中不同形态无机磷 $\text{Ca}_2\text{-P}$ 、 $\text{Ca}_8\text{-P}$

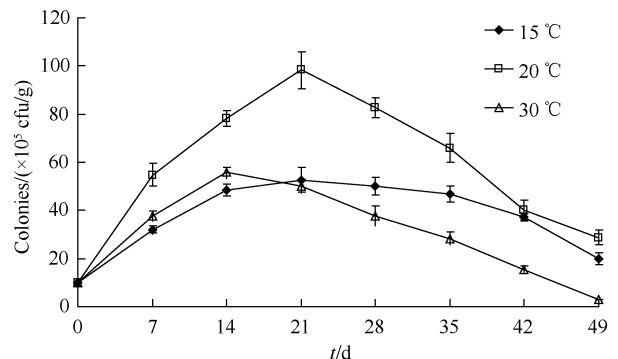


图 3 菌株 Z32 在土壤中的定殖情况

Fig.3 The Colonization condition of strains Z32 in soil.

P、Al-P、Fe-P、Ca₁₀-P 的含量都发生了显著变化 (表 1, 2, 3)。Ca₈-P、Al-P、Fe-P、Ca₁₀-P 都有部分转化为 Ca₂-P。其中 Ca₂-P 的含量随着菌株生长正相关变化, 在前 21 d, 其含量显著升高。不同的温度, 对各

种形态的无机磷的影响有显著差异, 在 20℃ 条件下, 转化为 Ca₂-P 的量最大, 且保持时间最长, 而在 15℃ 和 30℃ 条件下, 随着菌株 Z32 的死亡, 其 Ca₂-P 也相应向 Ca₈-P、Al-P、Fe-P、Ca₁₀-P 转化。

表 1 在 15℃ 条件下接种菌株 Z32 后, 不同时间土壤中难溶无机磷的含量

Table 1 The contents of inorganic phosphorus in soil with strain Z32 in different time at 15℃

t/d	Inorganic-P fraction/(μg/g)						Total
	Ca ₂ -P	Ca ₈ -P	Al-P	Fe-P	O-P	Ca ₁₀ -P	
0	20.94 d	116.93 a	32.96 a	42.15 ab	7.50 bc	470.81 a	691.29
7	23.67 c	114.59 bc	31.53 b	41.83 bc	7.61 abc	471.14 a	690.37
14	26.98 b	112.58 cd	31.11 bc	41.25 cd	7.83 a	470.69 a	690.44
21	30.47 a	111.39 d	29.77 e	40.26 f	7.49 bc	469.89 a	689.27
28	30.22 a	111.64 d	30.15 de	40.55 ef	7.38 c	470.25 a	690.19
35	27.35 b	113.45 c	30.68 cd	41.09 de	7.55 abc	470.36 a	690.48
42	23.19 c	115.67 ab	31.02 bc	42.56 a	7.69 ab	470.66 a	690.79
Signif(P =)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	

在 15℃ 条件下接种菌株 Z32 后, Ca₂-P 含量先增加后减小, 到第 21 天时, 含量达到最大, 比 CK 增加了 45.15%, 每克土的 Ca₈-P、Al-P、Fe-P、Ca₁₀-P 分别向 Ca₂-P 转化了 5.54 μg, 3.19 μg, 0.89 μg 和 0.92 μg, O-P 没有变化。Ca₈-P 从 0 d 到 21d, 含量降低 5.54 μg/g 土, 降低 4.74%, 21 d 后, Ca₈-P 含

量又逐渐升高, 在 42 d 时 Ca₈-P 被转化 1.26 μg/g 土为其它形态。Al-P 在 21 d 时, 降低了 3.21, 降低 9.74%, 但在 21 d 后, 其他形态的磷又向 Al-P 转化。Fe-P 向 Ca₂-P 转化后, 但 28 d 后, 含量显著升高。Ca₁₀-P 有少量向其它形态磷转化。

表 2 在 20℃ 条件下接种菌株 Z32 后, 不同时间土壤中难溶无机磷的含量

Table 2 The contents of inorganic phosphorus in soil with strain Z32 in different time at 20℃

t/d	Inorganic-P fraction/(μg/g)						Total
	Ca ₂ -P	Ca ₈ -P	Al-P	Fe-P	O-P	Ca ₁₀ -P	
0	20.94 f	116.93 a	32.96 a	42.15 a	7.50 a	470.81 a	691.29
7	25.47 e	114.01 b	30.89 bc	41.93 a	7.42 a	470.36 a	690.08
14	30.58 cd	111.21 c	30.25 cd	41.28 b	7.46 a	469.23 a	690.01
21	33.26 a	110.55 c	29.52 d	40.59 c	7.41 a	468.84 a	690.17
28	32.31 b	110.36 c	30.89 bc	41.13 b	7.52 a	468.31 a	690.52
35	31.09 bc	111.24 c	31.21 bc	41.09 bc	7.48 a	469.02 a	691.13
42	29.43 d	111.50 c	31.76 b	41.16 b	7.51 a	469.44 b	690.80
Signif(P =)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	

在 20℃ 条件下接种菌株 Z32 后, Ca₂-P 含量先增加后减小, 到第 21 天时, 含量达到最大, 比 CK 增加了 58.83%, 其中每克土中 Ca₈-P、Al-P、Fe-P、Ca₁₀-P 分别向 Ca₂-P 转化了 6.38 μg, 3.44 μg, 1.56 μg 和 1.97 μg, O-P 没有变化。Ca₈-P 从初始到第 14

天, 含量降低 5.72 μg/g 土, 降低 4.89%, 14 d 后, Ca₈-P 含量基本达到稳定。Al-P 到 21 d 时, 降低了 3.42 μg/g 土, 降低 10.38%, 但在 21 d 后, 其他形态的磷又向 Al-P 转化。Fe-P 向 Ca₂-P 转化后, 其含量稳定。Ca₁₀-P 有少量转化为其它形态磷。

表 3 在 30℃ 条件下接种菌株 Z32 后, 不同时间土壤中难溶无机磷的含量

Table 3 The contents of inorganic phosphorus in soil with strain Z32 in different time at 30℃

t/d	Inorganic-P fraction/(μg/g)						Total
	Ca ₂ -P	Ca ₈ -P	Al-P	Fe-P	O-P	Ca ₁₀ -P	
0	20.94 e	116.93 a	32.96 a	42.15 a	7.50 b	470.81 a	691.29
7	24.52 c	114.63 b	31.61 b	42.03 ab	7.52 b	470.22 a	690.53
14	28.33 a	112.09 c	31.29 bc	41.59 bc	7.46 b	469.87 a	690.63
21	29.18 a	111.64 c	30.81 c	41.29 c	7.51 b	469.73 a	690.16
28	26.42 b	113.79 b	31.26 bc	41.43 c	7.55 a	470.25 a	690.70
35	24.89 c	114.60 b	31.88 b	41.50 c	7.55 a	470.19 a	690.61
42	22.11 d	115.96 a	31.72 b	42.03 ab	7.59 a	470.81 a	690.22
Signif(P =)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	

在 30℃ 条件下接种菌株 Z32 后, Ca₂-P 含量同

样先增加后减小, 到第 21 天时, 含量达到最大, 比

CK增加了39.35%,每克土中的 $\text{Ca}_8\text{-P}$ 向 $\text{Ca}_2\text{-P}$ 转化了 $5.39\ \mu\text{g}$,但之后,又被迅速固定,而 Al-P 、 Fe-P 被转化后,含量较稳定。 O-P 和 $\text{Ca}_{10}\text{-P}$ 受到影响较小,基本没有显著的变化。

3 讨论

目前,国内外研究的具有较强溶磷能力的菌株主要为草酸青霉菌和拜莱青霉菌。范丙全等筛选的两株草酸青霉菌P8和Pn1在难溶无机磷培养基上培养5 d分别能够产生49.2 cm和45.5 cm的透明圈,而国际上研究和应用较多的拜莱青霉菌(ATCC20851)只能够产生24.0 cm的透明圈^[14]。本实验筛选的棘孢青霉菌Z32在难溶磷无机盐培养基上培养4 d能将90 cm培养皿内难溶磷完全溶解,主要因为棘孢青霉菌在难溶磷无机盐培养基上生长速度较快,接种5 mm的菌块培养4 d菌丝直径能够达到55 cm左右,从而表现溶磷圈直径更大。

溶磷微生物的溶磷机理大致5种:有机酸、氢质子($\text{NH}_4\text{-N}$ 供应)、磷酸酶(蛋白质)、螯合作用、氧化还原^[15]。而产生有机酸是一种主要的方式^[16-18],有机酸能与铁、铝、钙等离子螯合,从而使难溶磷转化为有效磷^[19]。本实验筛选获得的棘孢青霉菌的分泌物具有很强的酸化能力,能够在18 h内将PDB的pH值降到1.5左右,而培养液酸碱度的变化与溶磷能力之间具有显著相关性,酸化能力越强,其溶解难溶无机磷的能力越强。

菌株在土壤中的定殖能力直接决定了其溶磷效果,本实验所筛选到的棘孢青霉菌在 15°C – 30°C 都能很好的定殖,其中 20°C 定殖最好,在 30°C 时,菌株在第49天时基本消亡,这与真菌的生长特性一致。

青霉菌在土壤中转化难溶无机磷具有很好的效果,Salih接种溶磷青霉菌*Penicillium* sp.于土壤中,不但显著增加了土壤中的有效磷含量^[20],同时能防止磷肥向难溶磷的转化^[21]。不同溶磷菌株对难溶磷种类有较强的选择性^[22-23],而本实验获得的棘孢青霉菌Z32具有广谱性,在土壤中能够溶解多种难溶无机磷。在 20°C 时,难溶无机磷向有效磷的转化最多,部分 $\text{Ca}_8\text{-P}$ 、 Al-P 、 Fe-p 和 $\text{Ca}_{10}\text{-P}$ 形态的无机磷随着微生物的生长被转化,这与棘孢青霉在 20°C 时具有高的定殖能力相一致;其中 $\text{Ca}_8\text{-P}$ 向 $\text{Ca}_2\text{-P}$ 转化后, $\text{Ca}_8\text{-P}$ 含量随着微生物的消亡在土壤中很稳定。在15和 30°C 时, $\text{Ca}_8\text{-P}$ 、 Al-P 被转化后,没有随着微生物的消亡完全被固定,而 Fe-p 和 $\text{Ca}_{10}\text{-P}$ 随着微生物的消亡又完全被固定。菌株Z32对土壤中

多种形态的难溶无机磷都具有一定的转化能力,对提高土壤中有效磷含量有显著效果。

参考文献

- [1] 黄伟,黄欠如,胡锋. 红壤溶磷菌的筛选及溶磷能力的比较. 生态与农村环境学报(*Journal of Ecology and Rural Environment*), 2006,22(3):37-40.
- [2] Vessey JK, Heisnger KG. Effect of *Penicillium bilaii* inoculation and phosphorus fertilisation on root and shoot parameters of field-grown pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 2001,81(3):361-366.
- [3] Gulden RH, Vessey JK. *Penicillium bilaii* inoculation increases root hair production in field pea. *Canadian journal of plant science*, 2000,80(4):801-804.
- [4] Reyes I, Berber L, Antoun H. Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *penicillium rugulosum*. *Microbiology Ecology*, 2002,44:39-48.
- [5] Morales A, Alvear M, Valenzuela E, Rubio R, Borie F. Effect of inoculation with *Penicillium albidum*, a phosphate-solubilizing fungus, on the growth of *Trifolium pratense* cropped in a volcanic soil. *Journal of Basic Microbiology*, 2007,47(3):275-280.
- [6] Wakelin SA, Gupta VV, Harvey PR, Ryder MH. The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern Australia. *Canadian Journal of Microbiology*, 2007,53(1):106-115.
- [7] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究方法. 第一版. 北京:科学出版社,1985:44-51.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册. 第一版. 上海:上海科学技术出版社,1979:501-512.
- [9] 孔华忠. 中国真菌志(第三十五卷)-青霉属及其相关性型属. 第一版. 北京:科学出版社,2007:197-199.
- [10] 吴志红,汪天虹,黄卫,等. 简便易行的丝状真菌染色体DNA提取法. 菌物系统(*Mycosystema*), 2001,20(4):575-577.
- [11] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [12] 顾益初,蒋柏藩. 石灰性土壤磷分级的测定方法. 土壤(*soil*), 1990,(2):101-103.
- [13] 顾益初,蒋柏藩. 石灰性土壤无机磷分级体系的研究. 中国农业科学(*Chinese Agricultura Sinica*), 1989,22(3):58-66.

- [14] 范丙全, 金继运, 葛诚. 溶解草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究. 中国农业科学 (*Chinese Agricultural Science*), 2002, 35(5): 525-530.
- [15] Altomare C, Norvell WA, Bjorkman T. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(7): 2926-2933.
- [16] Sperber JI. Solution of mineral phosphate by soil bacteria. *Nature*, 1957, 180: 994-995.
- [17] Rashid M, Khalil S, Ayub N. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2004, 7(2): 187-196.
- [18] Kim KY, Jordan D, McDonald GA. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology-and-Fertility-of-Soils*, 1997, 26(2): 79-87.
- [19] 冯月红, 姚拓, 龙瑞军. 土壤解磷菌研究进展. 草原与草坪 (*Grassland and Turf*), 2003, (1): 3-7.
- [20] Salih HM, Yahya AL, Abdul-Rahem AM. Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. *Plant and Soil*, 1989, 120(2): 181-185.
- [21] 范丙全, 金继运, 葛诚. ^{32}P 示踪法研究溶磷真菌对磷肥转化固定和有效性的影响. 应用生态学报 (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 2004, 15(11): 2142-2146.
- [22] 杨慧, 范丙全, 龚明波等. 一株新的溶磷草生欧文氏菌的分离、鉴定及其溶磷效果的初步研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008(1): 51-56.
- [23] 钟传青, 黄为一. 磷细菌 P17 对不同来源磷矿粉的溶磷作用及机制. 土壤学报 (*Acta Pedologica Sinica*), 2004, 41(6): 931-937.

Isolation and identification of a novel phosphate-dissolving strain *Penicillium aculeatum* Z32 and its colonization and phosphate-dissolving characteristics in soil

Mingbo Gong, Binqun Fan*, Hongyuan Wang

(Chinese Academy of Agricultural Sciences Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Beijing 100081, China)

Abstract: [Objective] To obtain new strains that can dissolving phosphate, we screened and identified a new strain Z32 capable of phosphate dissolving from soil samples. We studied the colonization and phosphate-dissolving characteristics of Z32 in soil. [Methods] Morphological, growth on various media, and ITS rDNA sequences homology analysis were performed to identify the strain Z32. We conducted a soil experiment in pot to investigate the colonization and the capability of the different forms of inorganic phosphorus transformation of the strain Z32. [Results] The strain Z32 was identified as *Penicillium aculeatum*. Z32 dissolved all $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in solid culture for 4 days and decreased the pH from 7.0 to 1.5 in potato liquid culture for 18 hours. Z32 presented high colonization ability in soil and the optimum colonization temperature was 20°C. The number of Z32 increased 9.83 times in 21 days and kept alive in 49 days at the optimum temperature. Z32 promoted the transformation of insoluble phosphate like $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, AlPO_4 and FePO_4 to soluble CaHPO_4 and the CaHPO_4 content increased by 58.83% in soil compared to CK at the 21st d at 20°C. [Conclusion] A new strain Z32 with high performance of phosphate dissolving had colonized well in soil. Z32 showed high phosphate-dissolving ability for different kinds of inorganic phosphorus in soil. At the same time, Z32 inhibited the transformation of CaHPO_4 to insoluble phosphate.

Keywords: phosphate-dissolving microorganism; *Penicillium aculeatum*; colonization; inorganic-P fraction

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (2008-13)

* Corresponding author. Tel: +86-10-82108689; E-mail: bqfan@caas.ac.cn

Received: 30 October 2009/Revised: 8 February 2010