

一株高效解钾脱硅真菌的筛选、鉴定及培养条件优化^①

张红芳, 何 刚, 吴绿英, 孙德四, 陈 晔*

(九江学院药学与生命科学学院, 江西九江 332000)

摘 要: 为挖掘植物内生真菌功能活性菌株资源, 从钾矿区优势蕨类植物——乌蕨(*Stenoloma chusanum*)中筛选得到一株高效解钾脱硅菌株 WJ007。通过形态学特征观察、rDNA ITS 序列分析以及系统发育关系比较等研究, 确定该菌株为小刺青霉 *Penicillium spinulosum*。通过单因素试验与正交试验对 WJ007 菌株解钾、脱硅培养条件进行优化, 结果显示: WJ007 菌株脱硅最优培养条件为葡萄糖作碳源、酵母膏作氮源、碳氮比 60 : 1、初始 pH 6, 在该条件下培养液中可溶性硅含量为 8.74 mg/L; WJ007 菌株解钾最优培养条件为葡萄糖作碳源、蛋白胨作氮源、碳氮比 60 : 1、初始 pH 7, 在该条件下培养液中可溶性钾含量为 154.44 mg/L。通过对 WJ007 菌株解钾脱硅发酵条件的优化, 可为植物内生真菌资源开发利用提供依据。

关键词: 内生真菌; 解钾; 脱硅; 筛选; 鉴定; 培养条件

中图分类号: S154.39 **文献标识码:** A

含钾矿物中的钾、硅元素是植物生长发育过程中不可或缺的大量营养元素, 在植物生理代谢过程中起着非常重要的作用。我国能被植物直接吸收利用的可溶性钾资源十分匮乏, 但含钾岩石以及土壤中的含钾矿物颗粒十分丰富, 这些含钾矿物绝大多数是以难溶性含钾硅铝酸盐存在, 不能被植物直接吸收利用, 如何从这些富含钾、硅的难溶性硅酸盐矿物中溶出可溶性的钾、硅元素供植物吸收利用, 是永恒的科学问题^[1-2]。目前针对不溶性钾矿资源制取钾肥的方法大体分为高温法和湿法, 这些方法存在耗能大、严重污染环境等问题, 而利用微生物法制取钾肥, 生产成本低, 无污染, 耗能低, 有利于实现大规模的工业化生产^[3]。

国内外学者在高效解钾脱硅菌株筛选、活力测定、作用机制和优良菌株的选育等方面进行了广泛研究, 但这些钾细菌在浸取钾矿过程中仍然存在菌株不稳定、解钾脱硅效应不理想等问题^[4-7], 因此筛选出具有解钾脱硅作用高效稳定的优质菌株及进行条件优化仍是该领域的研究热点问题。

植物内生真菌作为一类特殊的微生物资源, 与宿主植物形成互惠共生关系, 可从植物中获得足够的碳源、氮源, 且受到植物组织的良好保护, 在帮助植物分解土壤矿物、摄取营养、抗病及促进植物生长等方

面发挥重要作用^[8-10]。国内外学者既开展了从土壤、植物根际、钾矿区等生境中的解钾菌株分离纯化的研究, 也开展了有关解钾效应、解钾机理等方面的研究, 已取得了丰硕成果, 但有关从植物体内筛选解钾真菌的研究至今鲜见报道。因此, 本试验以分离自钾矿区优势蕨类植物——乌蕨(*Stenoloma chusanum*)内生真菌的菌株为研究对象, 通过平板活性测定试验分离筛选出高效解钾脱硅活性菌株, 并对其进行鉴定, 同时进行培养条件优化, 这不仅可增加解钾脱硅菌株资源, 而且可为进一步研究植物-微生物共生体在植物矿质营养与逆境生理中的作用机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试菌株为从龙南钾矿区 (114°23' ~ 114°59' E, 24°29' ~ 25°1' N) 优势植物——乌蕨组织中分离得到的内生真菌, 共 89 株, 由九江学院真菌研究室提供。

1.1.2 供试矿样 钾长石样品, 由九江学院鄱阳湖生态经济研究中心矿物研究室提供。矿样主要化学组成质量分数为 K₂O 11.09%, Al₂O₃ 19.25%, SiO₂ 66.57%。矿样粉碎至 100 目备用。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360064; 51264014)和江西省自然科学基金项目(20171BAB204007)资助。

* 通讯作者(chenyejjtc@126.com)

作者简介: 张红芳(1971—), 女, 江西九江人, 硕士, 讲师, 主要从事真菌资源开发利用研究。E-mail: 939044612@qq.com

1.1.3 供试培养基 固体或液体 PDA 培养基、解钾脱硅培养基^[11-12]。

1.2 方法

1.2.1 解钾脱硅内生真菌菌株筛选及测定 1) 菌株初筛。将乌蕨内生真菌菌株在 PDA 培养基平板上进行活化培养,活化后的菌株挑取菌块($\Phi=0.5$ cm)接种至解钾脱硅固体培养基上,28℃培养 4~5 d,观察菌落形态大小、生长速度,进行解钾脱硅菌株初步筛选。

2) 菌株复筛。将初选得到的菌株($\Phi=0.5$ cm)接种至 50 ml/150 ml 解钾脱硅液体培养基中,置于恒温摇床 28℃、150 r/min 发酵培养 15 d,以灭活菌株作对照,每菌株 3 个重复^[13]。发酵液采用过氧化氢灰化法^[14]处理,取发酵处理液,用 Optima 8000 型电感耦合等离子体发射光谱仪(Perkin-Elmer 公司)分别测定可溶性钾和硅的含量^[15-16],然后计算出可溶性钾(或硅)的净增加量(mg/L): $A=(b_1-b_0)$,式中: A 为可溶性钾(或硅)净增加量(mg/L); b_1 为接菌样品中可溶性钾(或硅)含量(mg/L); b_0 为接灭活菌样品中可溶性钾(或硅)含量(mg/L)。

3) 菌株生物量测定。按“菌株复筛”中的方法进行液体培养,于 0、1、3、6、9、12、15 d 对培养液过滤得到的菌体进行干燥,称重测定菌株生物量(mg/L),同时以灭活菌株作对照,每菌株 3 个重复。

4) 菌株对钾长石矿粉的作用。用体视显微镜、扫描电镜 SEM (TESCAN 公司生产,型号为 VEGA-LSU)、能谱仪(EDS)与 X 射线衍射仪 XRD(日本 Rigaku 生产,D/Max-2500 型)观察真菌菌株侵蚀前后矿样的表面微观形态及矿物结构变化^[16]。

1.2.2 高效解钾、脱硅菌株鉴定 1) 形态学鉴定。依据相关文献^[17-18],根据菌落形态、产孢方式、孢子形态特征和产孢结构对菌株进行形态学鉴定。

2) 分子生物学鉴定。基因组 DNA 提取:参考 Barnett 和 Hunter^[19]及 Guo 等人^[20]的方法,利用反复冻融、SDS-CTAB 法提取基因组 DNA。②内生真菌 DNA 的 PCR 扩增^[21]:利用真菌通用引物 Primer 1 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 正向)和 Primer 4 (ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATRGATATGC-3' 反向)对内生真菌 DNA 的 ITS1、ITS2 和 5.8S rRNA 区间进行扩增。扩增体系(50 μ l):Primer 1 和 Primer 4 各 0.75 μ l, DNA Buffer 2.5 μ l, dNTPS 各 2 μ l, Taq E 0.4 μ l, DNA 模板 1 μ l (视情况进行不同梯度稀释,以便达到最好的效果), ddH₂O 17.6 μ l。PCR 反应程序:94℃预变性 2 min, 94℃变性 1 min, 55℃引物退火 45 s, 72℃延伸 45 s, 循环 30 次, 72℃ 终末

延伸 10 min。PCR 产物采用纯化试剂盒(QiaQuick PCR purification Kit; Qiagen)进行纯化,琼脂糖凝胶电泳进行检测(上海生物工程有限公司测序完成)。③系统进化树构建:将测序结果提交 NCBI 数据库比对分析,选取相似性较高的典型菌株的序列,利用 MEGA5.0 软件构建 N-J 系统进化树,其 BootsVap(Bootstrap)值设为 1 000 次重复。

1.2.3 菌株 WJ007 培养条件的优化 选用解钾脱硅培养基作为基础培养基,用葡萄糖、麦芽糖、果糖、乳糖、蔗糖分别代替培养基中的碳源;用酵母膏、硫酸铵、硝酸铵、牛肉膏、蛋白胨分别代替培养基中的氮源;用 5 1、10 1、20 1、40 1、60 1、80 1 为不同碳氮比;以 3、4、5、6、7、8 为不同初始 pH 进行单因素优化试验^[21]。置恒温摇床 28℃、150 r/min 发酵培养 15 d,每个处理设 3 个重复。在以上试验的基础上,按正交试验 $L_9(3^4)$ 4 因素 3 水平对菌株摇瓶培养条件进行优化,每组设 3 个重复。

1.3 数据分析

采用 Origin7.5 软件、MEGA5.0 软件进行数据统计分析。

2 结果与讨论

2.1 解钾脱硅内生真菌菌株筛选

根据在解钾脱硅培养基平板上菌落形态大、生长速度快的特点,从乌蕨 89 株内生真菌菌株中初步筛选出 8 株具有解钾、脱硅能力的菌株(菌株编号分别为 WJ005、WJ006、WJ007、WJ010、WJ012、WJ064、WJ067、WJ074)。对初筛的 8 株真菌进行解钾、脱硅试验,测定其解钾、脱硅效应。结果显示:接种 8 株内生真菌的发酵培养液中可溶性钾净增加量在 32.4~64.23 mg/L,可溶性硅的净增加量在 0.364~1.86 mg/L,其中接种 WJ007 菌株的可溶性钾、硅净增加量最高,分别为 64.23、1.86 mg/L(图 1A、B)。因此选择 WJ007 菌株作为研究对象,进行后续研究。

2.2 菌株生物量的测定

初筛的 8 株菌株在解钾脱硅液体培养基中的生物量变化情况如图 2 所示。从图 2 中可以看出,在培养初期 8 株菌株在解钾脱硅液体培养基中菌丝的生长非常接近,随着培养时间的延长,菌丝生物量迅速上升,培养 12 d 后,生物量的增加幅度较小。与对照相比,显示 8 株菌株均能在含钾长石培养基中生长,其中,菌株 WJ007 生长速度最快,生物量最高。

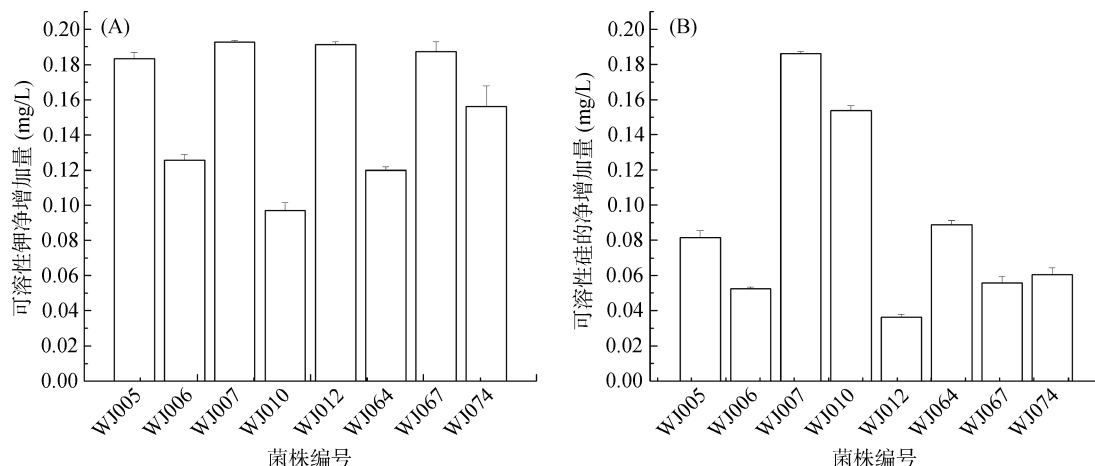


图 1 不同菌株对钾长石作用能力的筛选(A: 解钾能力; B: 脱硅能力)

Fig. 1 Potassium-solubilization capacity (A) and desilication capacity (B) of different strains on potassium feldspar

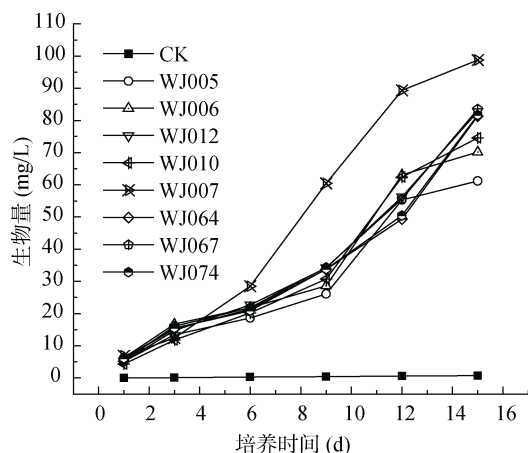
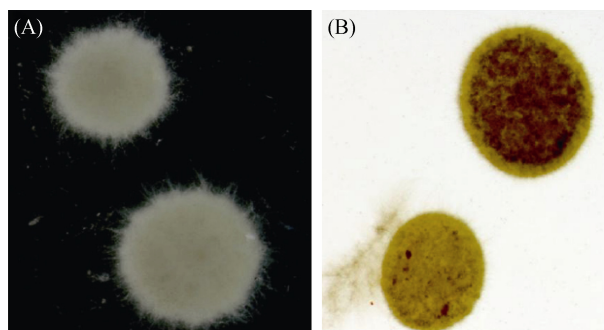


图 2 不同菌株在含钾长石培养基中的菌株生物量变化曲线
Fig. 2 Biomass curves of different strains in potassium-bearing feldspar medium

2.3 WJ007 菌株对钾矿粉的作用

液体培养 15 d 后, 通过体视显微镜观察(图 3), 菌株 WJ007 作用钾长石前, 菌丝球表面内壁均呈乳白色, 而作用钾长石后菌丝球中包裹许多深褐色的矿粉颗粒, 表现出对钾长石具有较好的亲和性。扫描电镜观察显示(图 4), 菌株 WJ007 作用钾长石前钾长石矿样的棱角清晰, 表面圆滑, 晶体结构完整; 作用钾长石后 WJ007 菌株菌丝能有效吸附和缠绕钾长石矿粉颗粒, 形成矿物-真菌聚合体, 钾长石表层被深度侵蚀, 且其晶体结构基本被破坏。对 WJ007 菌株作用后的钾长石表面进行 EDS 能谱分析(图 5), 从图 5 中可以看出, 钾长石表面 K^+ 和 Si^{4+} 含量明显高于菌株 WJ007 作用钾长石前, 进一步说明矿物晶体结构基本被破坏后, K^+ 和 Si^{4+} 等阳离子被释放出来。这是因为矿物与菌丝形成的菌丝球微环境为菌丝及其

代谢产物分化钾矿物提供了更为便利的空间, 微环境中的大量代谢产物通过质子交换与络合作用将矿物表面和晶体中的 K^+ 和 Si^{4+} 等阳离子释放出来^[17,22]。



(A: WJ007 菌株作用钾长石前; B: WJ007 菌株作用钾长石后)

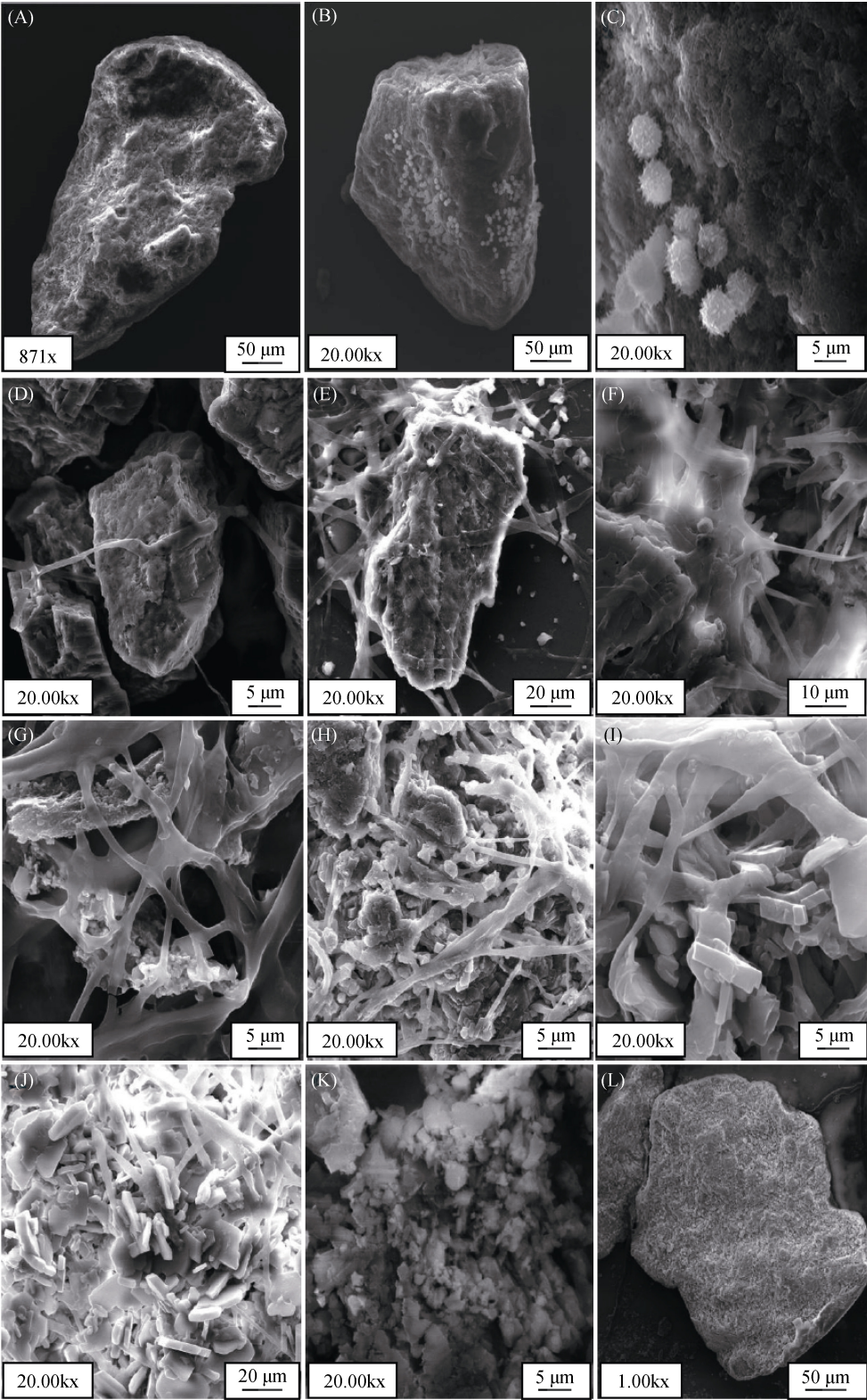
图 3 WJ007 菌株对钾长石作用的体视显微镜照片

Fig. 3 Stereomicroscope images of interaction of WJ007 strain on potassium feldspar

2.4 高效解钾脱硅菌株鉴定

根据 WJ007 菌株的培养性状和形态特征, 参照孔华忠^[23]的描述, 可初步确定该菌株属于青霉属 *Penicillium* 类曲霉亚属 *Subgenus Aspergilloides* 的小刺青霉 *Penicillium spinulosum* Thom(图 6)。

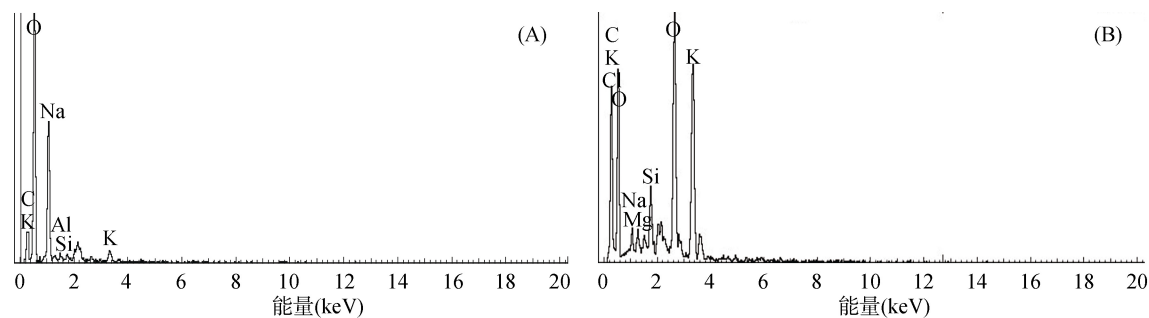
用真菌通用引物 ITS1/ITS4 对 WJ007 菌株 rDNA 的 ITS 区进行 PCR 扩增, 所获 PCR 产物经测序得到 590 bp 的碱基序列。通过 GenBank(NCBI) Megablast 搜索核酸数据库(blastn)进行比对和同源性分析。WJ007 菌株 ITS 序列的比对结果显示该序列与小刺青霉 *P. spinulosum* 的 ITS 序列同源性为 100%, 结合形态学特征, 支持 WJ007 菌株为小刺青霉 *P. spinulosum*。为了更为直观地显示 WJ007 菌株与青霉属类曲霉亚属其他种的亲缘关系, 采用最大似然法将本研究测定所得的序列与来自 GenBank 的部分



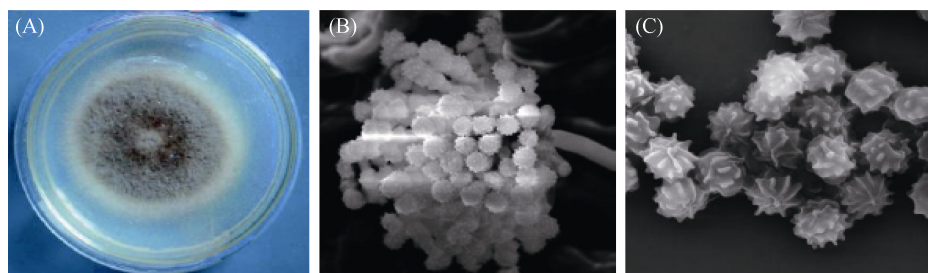
(A：WJ007 菌株作用前的钾长石；B、C：WJ007 菌株孢子吸附在钾长石上；D、E：WJ007 菌株菌丝吸附在钾长石上；F、G：发酵培养第 9 天 WJ007 菌株对钾长石的作用；H：发酵培养第 12 天 WJ007 菌株对钾长石的作用；I、J：发酵培养第 15 天后 WJ007 菌株对钾长石的作用；K：WJ007 菌株作用后的矿样；L：发酵培养第 15 天接种灭活菌株矿样)

图 4 WJ007 菌株对钾长石作用的扫描电镜照片

Fig. 4 SEM images of interaction of WJ007 strain on potassium feldspar



(A：WJ007 菌株作用前钾长石；B：WJ007 菌株作用后钾长石)
图 5 WJ007 菌株作用后钾长石表面 EDS 能谱
Fig. 5 Energy dispersive spectrum of potassium feldspar under WJ007 strain

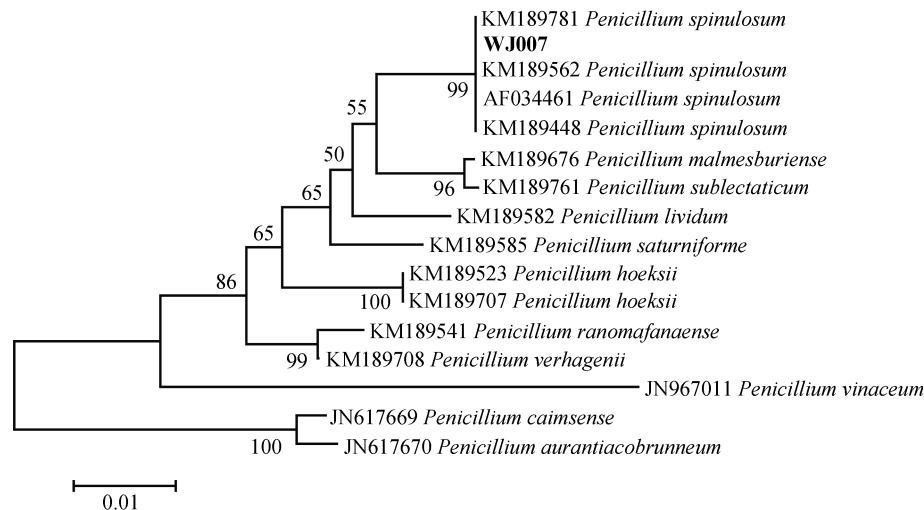


(A：菌落；B：扫描电镜下的产孢结构；C：扫描电镜下的孢子)

图 6 WJ007 菌株形态特征

Fig. 6 Morphological characters of WJ007 strain

青霉属类曲霉亚属序列进行分析并构建系统发育树 (图 7)。系统发育关系表明，WJ007 菌株同来自 GenBank 的小刺青霉 *P. spinulosum*(序列登录号：KM189781、KM189526、KM189448 和 AF034461) 聚为一支，得到了 99% 靴带值的支持，进一步证实了菌株 WJ007 为小刺青霉 *P. spinulosum*。



(本试验所获菌株序列以粗体标识，靴带值 50% 的数值标注于分支上)

图 7 基于 ITS 序列借助最大似然法构建的青霉属系统发育树

Fig. 7 Molecular phylogenetic tree of *Penicillium* inferred from ITS sequences using maximum likelihood method

2.5 WJ007 菌株解钾脱硅培养条件的优化

2.5.1 单因素试验 选择碳源、氮源、碳氮比、初始 pH 4 个因素，每个因素设定合适的水平数，对菌株 WJ007 进行培养条件单因素优化，所得结果见图

8。由图 8 可知，菌株 WJ007 最优的解钾单因素培养条件为：果糖为碳源，硝酸铵为氮源，碳氮比为 60 1，pH 为 6；最优的脱硅单因素培养条件为：葡萄糖为碳源，蛋白胨为氮源，碳氮比为 60 1，pH 为 6。

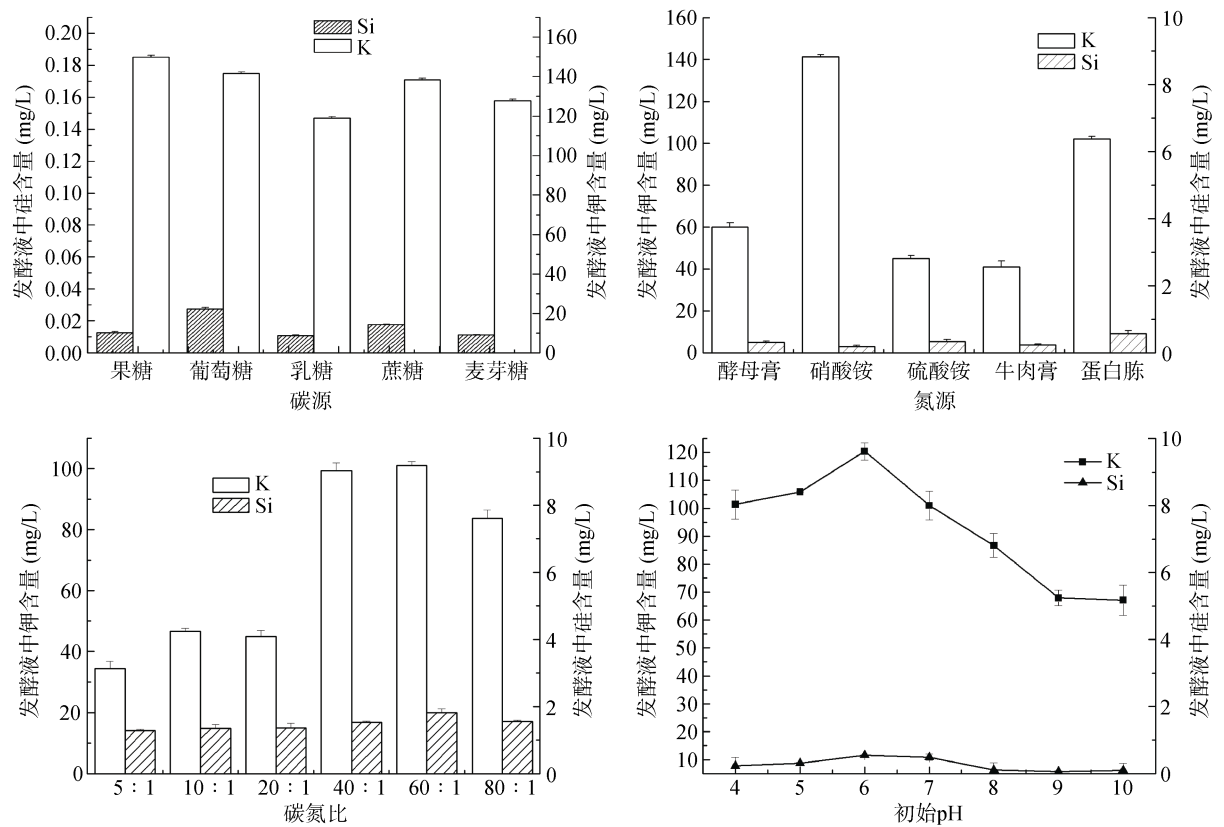


图 8 不同培养条件对 WJ007 菌株解钾、脱硅作用的影响
Fig. 8 Effects of different culture conditions on potassium-solubilization and desilication of WJ007 strain

2.5.2 正交试验 在单因素基础上，选择合适的因素和水平(表 1)，按 $L_9(3^4)$ 正交试验对 WJ007 菌株解钾、脱硅培养条件进行优化，每组设置 3 个重复。由极差分析可知，各因素对 WJ007 菌株解钾影响的主次顺序为：碳源>初始 pH>碳氮比>氮源，从 T_{K1} 、 T_{K2} 、 T_{K3} 值可知， $A_2B_3C_2D_3$ 组合(碳源为葡萄糖，氮源为蛋白胨，碳氮比为 60 : 1 及初始 pH 为 7)为 WJ007 菌株解钾能力的最优培养条件，发酵液中可溶性钾含量最高，为 154.44 mg/L；各因素对 WJ007 菌株脱硅影响的主次顺序为：碳氮比>碳源>初始 pH>氮源，从 T_{Si1} 、 T_{Si2} 、 T_{Si3} 值可知， $A_2B_1C_2D_2$ 组合，即：碳源为葡萄糖，氮源为酵母膏，碳氮比为 60 : 1 及初始 pH 为 6，为 WJ007 菌株脱硅能力的最优培养

条件(表 2)，发酵液中可溶性硅含量最高，为 9.74 mg/L。正交试验结果与单因素试验结果存在差异(表 3)，说明培养条件各因素之间存在交互作用，正交试验结果更具说服力。

表 1 正交试验水平与因素表(L_3^4)			
Table 1 Level and factor of orthogonal test(L_3^4)			
因素	水平 1	水平 2	水平 3
A：碳源	果糖	葡萄糖	蔗糖
B：氮源	酵母膏	硝酸铵	蛋白胨
C：碳氮比	40 : 1	60 : 1	80 : 1
D：pH	5	6	7

表 2 WJ007 菌株解钾、脱硅正交试验结果						
Table 2 Orthogonal experimental results of potassium-solubilization and desilication of WJ007 strains						
试验号	A	B	C	D	硅含量(mg/L)	钾含量(mg/L)
1	1	1	1	1	6.71	53.80
2	1	2	2	2	7.03	67.63
3	1	3	3	3	5.93	76.10
4	2	1	2	3	8.66	100.00
5	2	2	3	1	5.97	79.95

续表

试验号	A	B	C	D	硅含量(mg/L)	钾含量(mg/L)
6	2	3	1	2	8.37	85.10
7	3	1	3	2	7.54	50.63
8	3	2	1	3	7.64	69.45
9	3	3	2	1	7.30	60.50
T _{Si1} (T _{K1})	19.67(197.53)	22.91(204.43)	22.72(208.35)	19.98(194.25)	T=65.18	T=643.16
T _{Si2} (T _{K2})	23.00(265.05)	20.64(217.03)	22.99(228.13)	22.94(203.36)		
T _{Si3} (T _{K3})	22.48(180.58)	21.60(221.70)	19.44(206.68)	22.23(245.55)		
t _{Si1} (t _{K1})	6.56(65.84)	7.64(68.14)	7.57(69.45)	6.66(64.75)		
t _{Si2} (t _{K2})	7.67(88.35)	6.88(72.34)	7.66(76.04)	7.65(67.79)		
t _{Si3} (t _{K3})	7.49(60.19)	7.2(73.90)	6.48(68.89)	7.41(81.85)		
R	3.33(84.47)	2.27(17.27)	3.55(21.45)	2.96(51.30)		
主次顺序	Si : C>A>D>B		K : A>D>C>B			
优化组合	Si : A ₂ B ₁ C ₂ D ₂		K : A ₂ B ₃ C ₂ D ₃			

注：A、B、C、D 分别代表碳源、氮源、碳氮比、pH；T₁、T₂、T₃及 T 分别代表 1、2、3 水平的和及总和；t₁、t₂、t₃及 R 分别代表 1、2、3 水平的和的均值及极差。

表 3 方差分析
Table 3 Variance analysis

变异来源	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	P
碳源	60.313 7(0.001 3)	2	30.156 8(0.000 6)	252.899 4(1004.317 7)	0.003 9(0.001 0)
氮源	120.692 4(0.005 8)	2	60.346 2(0.002 9)	506.071 2(4545.036 5)	0.002 0(0.000 2)
碳氮比	91.920 8(5.114 6)	2	45.960 4(2.557 3)	385.430 2(616.988 0)	0.002 6(0.001 6)
pH	5.785 8(0.006 9)	2	2.892 9(0.003 4)	697.965 0(5363.349 0)	0.001 4(0.000 2)
实验误差	0.238 5(0.008 3)	2	0.119 2(0.004 1)		
总变异	273.165 4(12.029 5)				

注：括号外数据为 WJ007 菌株解钾的方差分析；括号内数据为 WJ007 菌株脱硅的方差分析。

2.5.3 验证实验 根据正交试验优化结果，对 WJ007 菌株脱硅最佳培养组合，即 A₂B₁C₂D₂，进行 3 组验证实验，结果显示，发酵液中硅的含量分别为 8.37、8.74、9.11 mg/L，平均含量为 8.74 mg/L；对 WJ007 菌株解钾最佳培养组合，即 A₂B₃C₂D₃，进行 3 组验证实验，结果显示：发酵液中钾的含量分别为 154.56、152.49、151.28 mg/L，平均含量为 154.44 mg/L。结果表明，在上述培养条件下，WJ007 菌株脱硅、解钾活性相对稳定，从而达到优化的目的。

3 结论

本研究利用从龙南钾矿区乌蕨中分离培养获得的内生真菌进行解钾脱硅的菌株筛选，共筛选出 8 株具有解钾脱硅功能的菌株，其中，WJ007 为一株高效解钾脱硅的菌株。通过对其形态特征以及 rDNA-ITS 序列的测定和分析，鉴定其为青霉属 *Penicillium* 的小刺青霉 *Penicillium spinulosum*，结合单因素和正交试验得出 WJ007 菌株最佳发酵条件组

合：碳源为葡萄糖、氮源为蛋白胨、碳氮比为 60 1、初始 pH 为 7 的培养条件下，发酵液中可溶性钾含量最高，为 154.44 mg/L；碳源为葡萄糖、氮源为酵母膏、碳氮比为 60 1、初始 pH 为 6 的培养条件下，发酵液中可溶性硅含量最高，为 8.74 mg/L。通过对 WJ007 菌株培养条件优化的研究，进一步说明植物内生真菌具有很广泛的开发应用前景。

参考文献：

[1] 徐晓燕, 马毅杰. 土壤矿物钾的释放及其在植物营养中的意义[J]. 土壤通报, 2001, 32(4): 172-178

[2] 潘大伟, 梁成华, 杜立宇. 土壤含钾矿物的释钾研究进展[J]. 土壤通报, 2005, 36(2): 253-258

[3] 易浪波, 彭清忠, 何齐庄, 等. 高效钾长石分解菌株的筛选、鉴定及解钾活性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(9): 773-776, 785

[4] 盛下放, 黄为一, 殷永娴. 硅酸盐菌剂的应用效果及其解钾作用的初步研究[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(1): 43-46

[5] 胡敏, 任涛, 廖世鹏, 等. 不同含钾物料对土壤钾素含

- 量动态变化影响[J]. 土壤, 2016, 48(1): 48–52
- [6] Badr M A, Shafei A M, Sharaf El-Deen S H. The dissolution of K and P-bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth[J]. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2006, 2(1): 5–11
- [7] 李佳, 张爱民, 王伟, 等. 几株硅酸盐细菌菌株的分离及解钾、解硅活性[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(21): 5147–5152
- [8] 姜道宏. 植物内生真菌及其展望[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31 (5): 742–749
- [9] 钱旭, 甘会云, 杜勇涛, 等. 龙南钾矿区常见蕨类植物可培养内生真菌的多样性[J]. 广西植物, 2016, 36(3): 342–348
- [10] 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
- [11] 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
- [12] 李振东, 陈秀蓉, 杨成德, 等. 乳白香青内生解磷菌的筛选鉴定及解磷特性研究[J]. 草业学报, 2013, 22(6): 158–158
- [13] 谢庆东, 何琳燕, 王琪, 等. 一株高效溶解钾长石芽孢杆菌的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 土壤, 2017, 49(2): 302–307
- [14] 张洋洋, 鲁剑巍, 王笋, 等. 不同提取方法测定的土壤钾的有效性比较研究[J]. 土壤学报, 2014, 51(3): 600–608
- [15] 李新新, 高新新, 陈星, 等. 一株高效解钾菌的筛选、鉴定及发酵条件的优化[J]. 土壤学报, 2014, 51(2): 381–388
- [16] 赖阳巍. 电感耦合等离子体质谱法测定土壤中的总碘[J]. 土壤, 2018, 50(1): 73–78
- [17] 孙德四, 尹健美, 陈晔, 等. 钾矿物晶体结构对黑曲霉生长代谢及钾与硅的溶出影响[J]. 中国农业科学, 2014, 47(3): 503–513
- [18] Keith S, Gareth M J, Walter G, et al. The genera of hyphomycetes[M]. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011: 1–997
- [19] Barnett H L, Hunter B B. Illustrated genera of imperfect fungi (4 Ed.)[M]. St Paul, Minnesota: APS Press, 1998: 1–218
- [20] GUO Ling-dong, Hyde K D, Liew E C Y. Detection and identification of endophyte fungi with in frond tissues of *Livlstonia chinensis* based on rDNA sequence[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 20: 1–13
- [21] 李敏, 厚华艳. 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)液体培养条件优化[J]. 中国调味品, 2011, 36(4): 48–50
- [22] 詹寿发, 卢丹妮, 毛花英, 等. 2 株溶磷、解钾与产 IAA 的内生真菌菌株的筛选、鉴定及促生作用研究[J]. 中国土壤与肥料, 2017(3): 142–151
- [23] 孔华忠. 中国真菌志(第 35 卷): 青霉属[M]. 北京: 科学出版社, 2007

Screening, Identification and Cultivated Condition Optimization of High Efficiency Potassium Solubilization and Desilication Fungus Strain

ZHANG Hongfang, HE Gang, WU Lvyang, SUN Desi, CHEN Ye*

(School of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000, China)

Abstract: In order to excavate the functional endophyte fungi resources, a fungus strain, named WJ007 with high-efficiency potassium solubilization and desilication was screened from *Stenoloma chusanum*, it was identified as *Penicillium spinulosum* based on morphological characteristics, rDNA ITS sequence and phylogenetic relationships analyses. Its optimal culture conditions obtained by single factor and orthogonal experiments for desiliconization were glucose as carbon source, yeast extract as nitrogen source, carbon and nitrogen ratio of 60 : 1, initial pH 6, and culture soluble silicon content in liquid is 8.74 mg/L under these conditions; while its optimal culture conditions for potassium solubilization were glucose as carbon source, protein peptone as nitrogen source, carbon and nitrogen ratio of 60 : 1, initial pH 7, and soluble potassium contents in culture solution is 154.44 mg/L under these conditions. It is significant for the development and utilization of plant endophytic fungi to optimize fermentation conditions of potassium solubilization and desiliconization for WJ007.

Key words: Endophytic fungi; Potassium-solubilization; Desilication; Isolation; Identification; Fermentation condition