

Functional Diversity of Phosphate-Solubilizing Microbes

Takashi OSONO*, Yuta KADO

(Received November 5, 2020)

This review summarizes the functional diversity of phosphate-solubilizing microbes (i.e. bacteria and fungi associated with the solubilization of phosphorus compounds) in soil. Dynamics of major compounds of inorganic and organic phosphorus in soil are briefly documented, and importance of soil microbes as a pool and in the transformation of phosphorus is introduced. Microbes are functionally diverse in terms of their ability to solubilize inorganic and organic phosphorus, with previous studies identifying 50 genera of Ascomycota, Basidiomycota, and Mucoromycota as phosphate-solubilizing fungi. Recent studies on the metabarcoding of phosphate-solubilizing bacteria possessing genes encoding phosphatases that hydrolyze organic phosphorus compounds are reviewed, and future research directions regarding phosphatase-producing fungi are discussed.

Key words : bacteria, fungi, inorganic phosphorus, organic phosphorus, phosphatase

キーワード : 細菌, 真菌, ホスファターゼ, 無機リン, 有機リン

リン溶解菌の機能的多様性

大園 享司, 門 祐太

1. はじめに

リン (phosphorus, P) は生命活動に必須の元素であり, 生態系のなかを有機物あるいは無機物として循環している. 微生物は, 土壌における有機リンと無機リンの循環速度を高める能力を有しており, 陸域生態系のリン循環において不可欠の役割を担う. リン溶解菌 (phosphate-solubilizing microbes, PSM) は細菌類と真菌類に属し, 土壌中に存在する不溶性の無機リンや有機リンを可溶化し, オルトリン酸を生成する微生物の総称である. PSM は生態学のみならず農業分野でも重要であるため, その多様性と機能に関する研究が数多く行われてきた. 例えば, Rodriguez and Fraga¹⁾は, リン溶解細菌 (phosphate-solubilizing

bacteria, PSB) による無機リンおよび有機リンの可溶化と, 植物生長の促進効果, および可溶化に関わる遺伝子についての知見をまとめた. Whitelaw²⁾は, リン溶解真菌 (phosphate-solubilizing fungi, PSF) による無機リンの可溶化と, 植物生長の促進効果に関する研究成果を集約した. 武田³⁾は, 土壌リンの存在形態と生物循環について総説記事にまとめた. さらに, Jones and Oburger⁴⁾は, PSM が利用するリン化合物, リンの可溶化メカニズム, および農業における PSM の管理に関する知見を網羅的にまとめている.

本稿では, PSM の機能的な多様性についての基礎的な知見をまとめるとともに, 分子系統学的手法を用いた最近の研究成果を紹介する. ここでは機能的

*Department of Environmental Systems Science, Doshisha University, Kyotanabe, Kyoto 610-0394
Telephone: +81-774-65-6688, E-mail: tosono@mail.doshisha.ac.jp

多様性を「種の機能形質、すなわち種の有する環境との相互作用に影響する形質の多様性」と定義する。土壌中のリン動態と微生物のはたらきについての概要を紹介したのち、無機リンと有機リンの可溶化に関わる微生物の機能的多様性に関する研究例を紹介する。最後に、有機リンの無機化に関わる酵素ホスファターゼをコードする機能遺伝子を対象とした最近の多様性研究について紹介する。

2. 土壌におけるリンの動態

植物は、オルトリン酸態リン ($\text{PO}_4\text{-P}$, 以下では単にオルトリン酸とよぶ) をリン源として根から吸収し、利用する (Fig. 1)。オルトリン酸はオルトリン酸イオン (orthophosphoric ion, PO_4^{3-}) として存在し、土壌水中で pH に応じてリン酸水素イオン (HPO_4^{2-}) やリン酸二水素イオン (H_2PO_4^-) の形になる。ただし、土壌におけるこれらの利用可能なリン酸の濃度は 0.01~1 mg/L 以下と一般に低い。土壌中にはオルトリン酸以外にもさまざまな有機リン・無機リンの化合物が存在しているが (Fig. 1), そのほとんどが難溶性である。これらの難溶性のリン化合物は、オルトリン酸に変換されてはじめて、植物が利用可能となる。

土壌水に含まれるオルトリン酸の利用可能性に影響する要因として、無機的平衡による溶解—沈殿 (dissolution-precipitation), 溶液中のリンと固体表面との相互作用による吸着—脱着 (sorption-desorption), 生物的なリンの無機態—有機態変換である無機化—不動化 (mineralization-immobilization) の 3 つのプロセスが挙げられる⁴⁾。農地土壌にリン肥料を施用してもその一部しか植物に吸収されないが、その理由はこれら 3 つのプロセスにより施肥されたリンの大部分が難溶化するためである⁵⁾。PSM はこれら 3 つのプロセスのすべてに深く関わっており、難溶性のリンを可溶化することで土壌中のオルトリン酸の利用可能性を増加させるはたらきを担う (Fig. 1)。

3. 土壌中の無機リン・有機リン化合物

無機リンが表層土壌の全リンに占める割合は 35~70% である⁴⁾。リン酸カルシウム (calcium-phosphate, Ca-P) は未風化および適度に風化された土壌で、pH

が中性からアルカリ性の条件において主要な無機リンである。一方、より風化の進んだ土壌や酸性土壌では、リン酸鉄 (Fe-phosphate, Fe-P) やリン酸アルミニウム (Al-phosphate, Al-P), 鉄やアルミニウムの酸化物 (oxide) および水酸化物 (hydroxide) にオルトリン酸が結合ないし吸蔵された化合物が主となる。Ca-P は酸性条件下で可溶性が増すため、PSM による局所的な酸性化は Ca-P を可溶化させ、オルトリン酸の放出を促す。一方、酸性土壌では、鉄やアルミニウムの酸化物および水酸化物がリンの利用可能性に大きく影響する。無機リンの利用可能性は、pH により主に決定されるリンを含む鉱物の溶解特性と、吸着—脱着による溶解平衡反応、の 2 つのプロセスに依存する。

有機リンは表層土壌に含まれる全リンの 30~65% を占めるが、有機質の土壌では 90% 以上に達する⁴⁾。主要な化合物は、イノシトールリン酸 (inositol phosphates), リン脂質 (phospholipid), 核酸 (nucleic acid) などである。なかでもイノシトールリン酸は、全有機リンの 80% 以上を占める主要な化合物である。イノシトールリン酸には、イノシトールモノリン酸 (inositol monophosphate) からイノシトールヘキサキスリン酸 (inositol hexakisphosphate) まで、リン酸モノエステルがさまざまにつながった立体異性体が存在する。これらの化合物は酸性度が高く、しばしば重合体となるか、あるいはタンパク質や脂質と難溶性の複合体を形成する。イノシトールリン酸の安定性はリン酸基の数と関連しており、高次のエステルほど難分解性で量的に多い。土壌中でもっとも一般的な立体異性体は、ミオイノシトールヘキサキスリン酸 (myo-inositol hexakisphosphate) で、フィチン酸 (phytic acid) とよばれる。ホスファターゼなどの脱リン酸化酵素により、オルトリン酸と水酸基をもつ化合物に加水分解されるプロセスを無機化とよび、逆に、無機リンが微生物細胞に取り込まれて有機リンに変換されるプロセスを不動化とよぶ。

4. 土壌微生物とリン動態

土壌微生物は土壌におけるリンのプールとして、

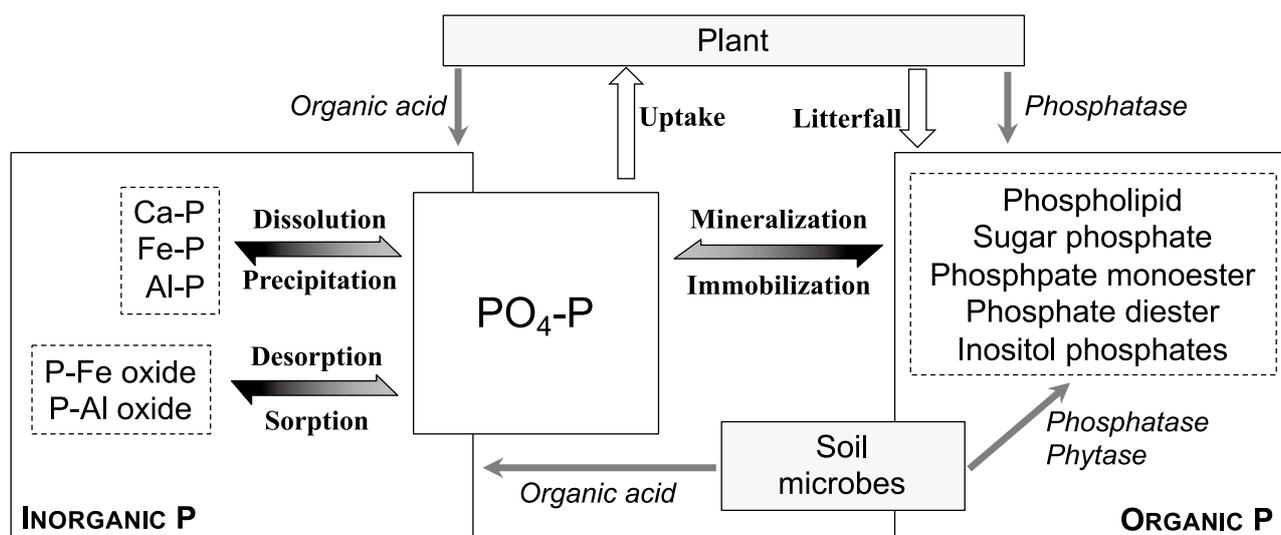


Fig. 1. Schematic dynamics of phosphorus in soil. Drawn from Jones and Oburger⁴⁾. The availability of PO₄-P depends on such processes as dissolution-precipitation, sorption-desorption, and mineralization-immobilization. Plants and soil microbes produce organic acids and phosphatase/phytase to increase the availability of PO₄-P. Plants uptake PO₄-P from soil as a sole source of phosphorus and supply organic forms of phosphorus as litterfall to soil.

またリン化合物の変換を担う生物として重要な役割を担っている (Fig. 1).

微生物細胞は土壌リンの主要なプールであり、微生物細胞に含まれるリンは土壌微生物リン (soil microbial phosphorus, SMP) とよばれる (Fig. 1). SMP が土壌リン全体に占める割合は 0.4~7.5% に達し、その 60~80% 程度がオルトリン酸やリン酸モノエステルなど比較的高い利用可能性の高いリンからなる^{6,7)}. これらのリン化合物は、微生物細胞が枯死すると放出されるが、微生物細胞は寿命が一般に短い。このため、SMP は土壌の有機リンのなかで、ターンオーバーが速く、かつ利用可能性の比較的高いリン画分の 1 つとなっている。

PSM はリン化合物の変換に直接的に関わっている。プロトン (H⁺) や水酸化物イオン (OH⁻)、二酸化炭素、有機酸アニオンなどの生成による pH の変化や、菌体外多糖 (エキソポリサッカライド)、シデロフォア、ホスファターゼ (phosphatase) などの生成を通じて、オルトリン酸の可給性をコントロールしている^{2,4)}. これらのうちホスファターゼは、リン酸エステル結合の加水分解を触媒することでオルトリン酸を生成する酵素の総称である⁸⁾. ホスファターゼは、リン酸モノエステルを基質とする酸性ホスホモノエステ

ラーゼ (acid phosphomonoesterases) とアルカリホスホモノエステラーゼ (alkaline phosphomonoesterases)、リン酸ジエステルを基質とするホスホジエステラーゼ (phosphodiesterases)、イノシトールリン酸 (フィチン酸) を基質とするフィターゼ (phytases) に大きく区分される (Fig. 1). 土壌環境中に存在する微生物群集全体としてのホスファターゼ活性はくりかえし調べられてきた⁹⁾. その一方で、個々の PSM のホスファターゼ活性については、以下で述べるように、分離培養が可能ないくつかの種について調べられているものの情報は限定的である。土壌中で自由生活を営む微生物のほか、根圏微生物や菌根菌もリン可溶化を促進することが知られている^{10,11)}.

5. 無機リンの可溶化に関わる微生物

無機リンの可溶化に関わる PSM は一般に、Ca-P を添加した培地における透明帯 (clear zone) の形成を基準にスクリーニングされる^{12,13)}. この方法による PSM のスクリーニングは主に北半球の温帯域で行われてきたが、南半球¹⁴⁾や熱帯¹⁵⁾、極域¹⁶⁾などでも報告がある。PSB としては *Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属が代表的で、PSF としては *Aspergillus* 属や *Penicillium*

属をはじめとする 30 属が報告されている (Table 1). 野外基物からの PSM のスクリーニングは、希釈平板法による分離との組み合わせで行われることが多い。希釈平板法で分離されやすいこれらの属が PSM として頻繁に記録される理由の 1 つとして、分離法によるバイアスが考えられる。

得られた PSM の分離株を用いて、リン可溶能を調べるための種々の実験が行われている。培養条件におけるリン可溶能は細菌よりも真菌のほうが一般に高い傾向が認められる。pH や温度といった環境要因や、乾燥や塩分などのストレス条件が、無機リンの可溶能に影響を及ぼす^{20, 22, 30}。近年の農地におけるリン飽和に絡めて、高リン環境下での PSM による無機リンの可溶能を調べた研究がある³¹。Al-P や Fe-P の可溶能^{23, 31}や、Ca-P を用いてスクリーニングされた PSM のホスファターゼ活性¹⁵)についても検討されている。そして実際に、PSM の土壌への添加や接種が、コムギやトウモロコシの成長を促進し、植物のリン吸収やリン含有率を増加させることが確かめられている^{32, 33}。PSM による無機リン可溶化のメカニズムとして、有機酸アニオンの生成による溶解^{13, 20, 23})や、有機酸を用いた脱着などが考えられる²⁸。

6. 有機リンの可溶化に関わる微生物

有機リンの溶解菌として、リン酸エステルの加水分解活性を有するホスファターゼ産生菌がスクリーニングされている。ホスホモノエステラーゼ活性を有する PSM の報告が多いが、フィチン酸カルシウム (Ca-phytate) を添加した培地を使ってフィターゼ活性を持つ菌類のスクリーニングも行われている。ホスファターゼ活性やフィターゼ活性を有する PSF として、*Aspergillus* 属、*Penicillium* 属、*Trichoderma* 属などの子囊菌類や、担子菌類、ケカビ類の 30 属が知られている (Table 1)。ホスホモノエステラーゼ活性は高頻度で認められており、例えばヨーロッパのフユナラ (*Quercus petraea*) 林の土壌から得られた真菌 29 株のうち 28 株で²⁴、ドイツトウヒ (*Picea abies*) の落葉から得られた真菌 16 株のすべてで²⁶、それぞれホスホモノエステラーゼ活性が検出されている。真菌のホスファターゼ活性には、pH や基質となるリ

Table 1. Fungal genera that exhibited the solubilization of phosphorus under pure culture conditions. Numbers indicate references.

Genus	Solubilization of Ca-P	Phosphatase and/or phytase activity
Ascomycota		
<i>Acremonium</i>		24
<i>Alternaria</i>	2	24
<i>Aspergillus</i>	2,15,16,17	15,17,18,19,21,27
<i>Beltraniella</i>	2	
<i>Cephalosporium</i>	2	
<i>Ceuthospora</i>		26
<i>Chalara</i>		26
<i>Cistella</i>		26
<i>Cladosporium</i>		24
<i>Clonostachys</i>	14	14
<i>Curvularia</i>	2	
<i>Cylindrocarpon</i>	2	26
<i>Cylindrocladium</i>	2	24
<i>Emmericella</i>		19
<i>Eupenicillium</i>	2	
<i>Fusarium</i>	2	
<i>Geomyces</i>		24
<i>Gliomastix</i>	2	
<i>Hormonema</i>		26
<i>Humicola</i>	2	
<i>Hypocrea</i>		24
<i>Masoniella</i>	2	
<i>Myrothecium</i>	2	24
<i>Ochrocladosporium</i>		24
<i>Paecilomyces</i>	2	
<i>Papulaspora</i>	2	
<i>Penicillium</i>	2,14,20,23	14,19,21,24,29
<i>Phacidomyces</i>		26
<i>Phoma</i>	2	
<i>Pseudeurotium</i>		21
<i>Robillarda</i>	2	
<i>Sclerotium</i>	2	
<i>Scopulariopsis</i>	2	
<i>Sirococcus</i>		26
<i>Spagazzinia</i>	2	
<i>Syncephalastrum</i>	2	
<i>Talaromyces</i>	23	29
<i>Trichoderma</i>	2	21,26
<i>Tysanophora</i>		26
<i>Verticillium</i>	2	
Basidiomycota		
<i>Fomitopsis</i>		26
<i>Hypholoma</i>		25
<i>Marasmius</i>		26
<i>Mycena</i>		26
<i>Peniophora</i>		26
<i>Phanerochaete</i>		25
Mucoromycota		
<i>Absidia</i>	22	22
<i>Mortierella</i>	28	
<i>Mucor</i>	2	
<i>Umbelopsis</i>	2	

ン化合物の違いが影響する²⁹。また、非滅菌土壌のマイクロゾムを用いた実験により、菌糸間相互作用がホスホモノエステラーゼ活性を促進することが確かめられた²⁵。酵素ラベル蛍光法 (enzyme-labelled fluorescence, ELF) を用いた研究では、外生菌根菌の

Table 2. Number of fungal genomes that annotate phosphatase genes registered in JGI MycoCosm (accessed October 1, 2020). Percentages to the total number of species in parentheses. No genomes annotated 4-phytase (EC 3.1.3.26) and 5-phytase (EC 3.1.3.72).

Taxonomic group	Total	Alkaline phosphatase		Acid phosphatase		Phosphodiesterase		3-phytase	
		EC 3.1.3.1	()	EC 3.1.3.2	()	EC 3.1.4.1	()	EC 3.1.3.8	()
Basidiomycota	510	351	(69)	503	(99)	191	(37)	326	(64)
Ascomycota	1006	961	(96)	1005	(100)	342	(34)	643	(64)
Mucoromycota	95	94	(99)	94	(99)	20	(21)	0	(0)
Zoopagomycota	22	22	(100)	22	(100)	7	(32)	0	(0)
Blastocladiomycota	4	4	(100)	4	(100)	1	(25)	1	(25)
Chytridiomycota	31	28	(90)	29	(94)	8	(26)	4	(13)
Microsporidia	9	1	(11)	8	(89)	7	(78)	0	(0)
Cryptomycota	2	2	(100)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>Kingdom Fungi</i>	<i>1679</i>	<i>1463</i>	<i>(87)</i>	<i>1665</i>	<i>(99)</i>	<i>576</i>	<i>(34)</i>	<i>974</i>	<i>(58)</i>

Table 3. The presence of phosphatase genes in six genomes of five fungal species in Basidiomycota that have genes encoding ligninases. 3-phytase, 4-phytase, and 5-phytase are not annotated in these genomes. 1, present; 0, absent.

Fungus (ID)	Ligninase			Phosphatase		
	Manganese peroxidase	Lignin peroxidase	Versatile peroxidase	Alkaline phosphatase	Acid phosphatase	Phosphodiesterase
	EC 1.11.1.13	EC 1.11.1.14	EC 1.11.1.16	EC 3.1.3.1	EC 3.1.3.2	EC 3.1.4.1
<i>Bjerkandera adusta</i> (v1.0)	1	1	1	0	1	1
<i>Ganoderma</i> sp. (10597 SS1 v1.0)	1	0	1	0	1	1
<i>Phlebia brevispora</i> (HHB-7030 SS6 v1.0)	1	1	0	0	1	1
<i>Phlebiopsis gigantea</i> (v1.0)	1	1	0	0	1	1
<i>Pleurotus ostreatus</i> (PC15 v2.0)	1	0	1	1	1	1
<i>Pleurotus ostreatus</i> (PC9 v1.0)	1	0	1	1	1	1

外部菌系においてもホスファターゼ活性が確認されている³⁴⁾。

フィターゼはさまざまな種類の酵素の総称であり、真菌、細菌、植物が産生する³⁵⁾。フィターゼに関する研究は、これまで産業利用の面から行われてきた。その一例が、家畜飼料に関連した分野である。フィチンはリン貯蔵物質として種子に含まれているが、種子を飼料として摂食する動物にとって、フィチンは比較的使用しにくいリン化合物である。このため、飼料にリン酸を添加する必要があるためコストがかかる上に、糞として大量に排出されたフィチンが環境汚染を引き起こすなどの問題があった。このような背景から、*Aspergillus niger* のフィターゼ遺伝子 (*phyA2*) をトウモロコシで発現させる試みなどが行われている³⁶⁾。

7. ホスファターゼ遺伝子を対象とした多様性解析

環境中に存在する微生物のホスファターゼ遺伝子

を対象とした多様性解析に関心が集まっている³⁷⁾。

これまで主に、細菌のアルカリホスファターゼ (ALP) 遺伝子 (*phoD*) を対象として、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法^{38,39)}や、超並列シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスによる解析が進められてきた^{40,41)}。Matsuoka et al.⁴¹⁾は、堆肥化した水草を添加した土壌において、細菌の *phoD* 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンスを行った。塩基配列の相同性に基づいて 415 の操作的分類群 (operational taxonomic unit, OTU) を検出し、水草の添加区で無添加の対照区に比べて OTU 数が増加することを報告した。これらの研究では、Sakurai et al.³⁸⁾が開発した PCR プライマーが用いられているが、より広範な分類群の細菌の *phoD* 遺伝子が検出可能なプライマーが考案された⁴²⁾。そのプライマーを用いて、有機リンの無機化に関わる *phoD* 遺伝子群集について詳細な解析が行われている⁴³⁾。環境中の酸性ホスファターゼ遺伝子を対象に、配列を網羅的に取得するこ

とで遺伝子の多様性や系統の解析も行われ始めている^{44,45)}。

真菌のホスファターゼとフィターゼをコードする遺伝子は、はじめ酵母を材料にして調べられてきたが^{46,47)}、現在では真菌の幅広い分類群を対象にゲノム解析が進められており、それに伴いリン循環に関わる機能遺伝子についての情報も蓄積しつつある。米国 Joint Genome Institute (JGI) のゲノムデータベースにある真菌データベース MycoCosm に登録されている、全ゲノムが解読された真菌 1679 種を対象に、アルカリホスファターゼ (EC 3.1.3.1)、酸性ホスファターゼ (EC 3.1.3.2)、ホスホジエステラーゼ (EC 3.1.4.1) と、および 3 種類のフィターゼ、すなわち 3-フィターゼ (EC 3.1.3.8)、4-フィターゼ (EC 3.1.3.26)、5-フィターゼ (EC 3.1.3.72) をコードする遺伝子を EC 番号により検索した (Table 2)。アルカリホスファターゼ遺伝子は 1463 種 (87%) で含まれていたが、担子菌類と微胞子虫で種数の割合が低かった。酸性ホスファターゼ遺伝子はクリプト菌門を除くほぼ全ての種 (1665 種, 99%) に含まれていた。ホスホジエステラーゼ遺伝子は 576 種 (34%) でアノテーションされており、微胞子虫で比較的高い割合 (78%) で含まれていたが、それ以外の分類群ではクリプト菌門を除いて 21~37% であった。3-フィターゼ遺伝子は 974 種 (58%) でアノテーションされており、特にディカリア (担子菌類, 子囊菌類) で割合が高かった (いずれも 64%)。4-フィターゼと 5-フィターゼの遺伝子は、今回のデータベース検索ではヒットしなかった。

土壌中の真菌群集メタゲノムを対象としたホスファターゼ遺伝子、フィターゼ遺伝子の多様性研究は、著者らの知る限りこれまでに行われていない。今後は、真菌の持つホスファターゼ遺伝子の DNA を特異的に PCR 増幅できるプライマーの設計と、PSF を対象としたホスファターゼ遺伝子の進化や多様性に関する研究が必要である。また、真菌は植物リターのリグニン分解において中心的な役割を果たしているが⁴⁸⁾、リター分解プロセスにおいてリグニン分解とリン放出との関連も指摘されている⁴⁹⁾。前出の MycoCosm において、リグニン分解酵素であるマン

ガンペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.13)、リグニンペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.14)、およびバーサタイルペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.16) のいずれかの遺伝子を有する 5 種 (いずれもハラタケ綱の担子菌類) のリグニン分解菌の 6 ゲノムにおいても、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、ホスホジエステラーゼホスファターゼの全て、あるいはいずれかの遺伝子が含まれていた (Table 3)。リグニン分解活性は多様な分類群の菌類に認められていることから⁵⁰⁾、リグニン分解菌によるリン可溶活性の評価も今後の課題といえる。

日本大学薬学部の広瀬大博士、兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科の松岡俊将博士、酪農学園大学環境共生学類の保原達博士には、本稿に対して有益なコメントをいただいた。本研究は、大学共同利用機関法人 人間文化研究機構 総合地球環境学研究所・個別連携プロジェクト「栄養循環プロジェクト」、北極域研究推進プロジェクト (ArCS)、JSPS 科研費 (18K05731, 18H03413) の助成を受けた。ここに記して感謝の意を表する。

参考文献

- 1) H. Rodríguez and R. Fraga, "Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion", *Biotechnol. Adv.*, **17**, 319-339 (1999).
- 2) M.A. Whitelaw, "Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi". *Adv. Agron.*, **69**, 99-151 (2000).
- 3) 武田容枝, "土壌リンの存在形態と生物循環. 土と微生物", **64**, 25-32 (2010) .
- 4) D.L. Jones and E. Oburger, Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms, in: E. Bünemann, A. Oberson and E. Frossard (ed.), *Phosphorus in Action, Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*, (Springer, Heidelberg, 2011), pp. 169-198.
- 5) D. Menezes-Blackburn, C. Giles, T. Darch, T.S. George, M. Blackwell, M. Stutter, C. Shand, D. Lumsdon, P. Cooper, R. Wendler, L. Brown, D.S. Almeida, C. Wearing, H. Zhang and P.M. Haygarth, "Opportunities for Mobilizing Recalcitrant Phosphorus from Agricultural Soils: a Review", *Plant Soil*, **427**, 5-16 (2018).
- 6) E.K. Bünemann, R.J. Smernik, A.L. Doolette, P. Marschner, R. Stonor, S.A. Wakelin and A.M. McNeill, "Forms of

- Phosphorus in Bacteria and Fungi Isolated from Two Australian Soils”, *Soil Biol. Biochem.*, **40**, 1908-1915 (2008).
- 7) A.L. Doolette, R.J. Smernik, Soil Organic Phosphorus Speciation Using Spectroscopic Techniques, in E. Bünemann, A. Oberson and E. Frossard (ed.), *Phosphorus in Action, Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*, (Springer, Heidelberg, 2011), pp. 3-36.
 - 8) P. Nannipieri, L. Giagnoni, L. Landi and G. Renella, Role of Phosphatase Enzymes in Soil, in E. Bünemann, A. Oberson and E. Frossard (ed.), *Phosphorus in Action, Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*, (Springer, Heidelberg, 2011), pp. 215-243.
 - 9) R.L. Sinsabaugh, C.L. Lauber, M.N. Weintraub, B. Ahmed, S.D. Allison, C. Crenshaw, A.R. Contosta, D. Cusack, S. Frey, M.E. Gallo, T.B. Gartner, S.E. Hobbie, K. Holland, B.L. Keeler, J.S. Powers, M. Stursova, C. Takacs-Vesbach, M.P. Waldrop, M.D. Wallenstein, D.R. Zak and L.H. Zeglin, “Stoichiometry of Soil Enzyme Activity at Global Scale”, *Ecol. Lett.*, **11**, 1252-1264 (2008).
 - 10) T.S. George, A.M. Fransson, J.P. Hammond and P.J. White, Phosphorus Nutrition: Rhizosphere Processes, Plant Response and Adaptations, in E. Bünemann, A. Oberson and E. Frossard (ed.), *Phosphorus in Action, Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*, (Springer, Heidelberg, 2011), pp. 245-271.
 - 11) J. Jansa, R. Finlay, H. Wallander, F.A. Smith and S.E. Smith, Role of Mycorrhizal Symbioses in Phosphorus Cycling, in E. Bünemann, A. Oberson and E. Frossard (ed.), *Phosphorus in Action, Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*, (Springer, Heidelberg, 2011), pp. 137-168.
 - 12) R.M.N. Kucey, “Phosphate-Solubilizing Bacteria and Fungi in Various Cultivated and Virgin Alberta Soils”, *Can. J. Soil Sci.*, **63**, 671-678 (1983).
 - 13) P. Illmer and F. Schinner, “Solubilization of Inorganic Phosphates by Microorganisms Isolated from Forest Soils”, *Soil Biol. Biochem.*, **24**, 389-395 (1992).
 - 14) A. Morales, M. Alvear, E. Valenzuela, C.E. Castillo and F. Borie, “Screening, Evaluation and Selection of Phosphate-Solubilizing Fungi as Potential Biofertiliser”, *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **11**, 89-103 (2011).
 - 15) C. Nopparat, M. Jatupornpipat and A. Rittiboon, “Isolation of Phosphate Solubilizing Fungi in Soil from Kanchanaburi, Thailand”, *KMITL Sci. Tech. J.*, **7**, 137-146 (2007).
 - 16) S.M. Singh, L.S. Yadav, S.K. Singh, P. Singh, P.N. Singh and R. Ravindra, “Phosphate Solubilizing Ability of Two Arctic *Aspergillus Niger* Strains”, *Polar Res.*, **30**, 1-7 (2011).
 - 17) S. Gargova, Z. Roshkova and G. Vancheva, “Screening of Fungi for Phytase Production”, *Biotechnol. Tech.*, **11**, 221-224 (1997).
 - 18) J.C. Tarafdar, R.S. Yadav and S.C. Meena, “Comparative Efficiency of Acid Phosphatase Originated from Plant and Fungal Sources”, *J. Plant. Nutr. Soil Sci.*, **164**, 279-282 (2001).
 - 19) R.S. Yadav and J.C. Tarafdar, “Phytase and Phosphatase Producing Fungi in Arid and Semi-Arid Soils and Their Efficiency in Hydrolyzing Different Organic P Compounds”, *Soil Biol. Biochem.*, **35**, 745-751 (2003).
 - 20) M. Takeda and J.D. Knight, “Enhanced Solubilization of Rock Phosphate by *Penicillium Billaiae* in pH-Buffered Solution Culture”, *Can. J. Microbiol.*, **52**, 1121-1129 (2006).
 - 21) G.K. Aseri, N. Jain and J.C. Tarafdar, “Hydrolysis of Organic Phosphate Forms by Phosphatases and Phytase Producing Fungi of Arid and Semi-Arid Soils of India”, *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, **5**, 564-570 (2009).
 - 22) V. Nenwani, P. Doshi, T. Saha and Rajkumar S, “Isolation and Characterization of a Fungal Isolate for Phosphate Solubilization and Plant Growth Promoting Activity”, *J. Yeast Fungal Res.*, **1**, 9-14 (2010).
 - 23) J.M. Scervino, M.P. Mesa, I.D. Mónica, M. Recchi, N.S. Moreno and A. Godeas, “Soil Fungal Isolates Produce Different Organic Acid Patterns Involved in Phosphate Salts Solubilization”, *Biol. Fertil. Soils*, **46**, 755-763 (2010).
 - 24) P. Baldrian, J. Voriskova, P. Dobiasova, V. Merhautova, L. Lisa and V. Valaskova, “Production of Extracellular Enzymes and Degradation of Biopolymers by Saprotrophic Microfungi from the Upper Layers of Forest Soil”, *Plant Soil*, **338**, 111-125 (2011).
 - 25) J. Snajdr, P. Dobiasova, T. Vetrovsky, V. Calaskova, A. Alawi, L. Boddy and P. Baldrian, “Saprotrophic Basidiomycete Mycelia and Their Interspecific Interactions Affect the Spatial Distribution of Extracellular Enzymes in Soil”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **78**, 80-90 (2011).
 - 26) L. Zifcakova, P. Dobiasova, Z. Kolarova, O. Koukol, and P. Baldrian, “Enzyme Activities of Fungi Associated with *Picea Abies* Needles”, *Fungal Ecol.*, **4**, 427-436 (2011).
 - 27) I. Gontia-Mishra, D. Deshmukh, N. Tripathi, K. Bardiya-Bhurat, K. Tantai and S. Tiwari, “Isolation, Morphology and Molecular Characterization of Phytate-Hydrolysing Fungi by 18S rDNA Sequence Analysis”, *Braz. J. Microbiol.*, **44**, 317-323 (2013).
 - 28) N.W. Osorio and M. Habte, “Phosphate Desorption from the Surface of Soil Mineral Particles by a Phosphate-Solubilizing Fungus”, *Biol. Fertil. Soils*, **49**, 481-486 (2013).

- 29) I.F.D. Mónica, M.S. Godoy, A.M. Godeas and J.M. Scervino, "Fungal Extracellular Phosphatases: Their Role in P Cycling Under Different pH and P Sources Availability", *J. Appl. Microbiol.*, **124**, 155-165 (2018).
- 30) N. Vassilev, B. Eichler-Löbermann and M. Vassileva, "Stress-Tolerant P-Solubilizing Microorganisms", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **95**, 851-859 (2012).
- 31) S. De Bolle, M.T. Gebremikael, V. Maervoet and S. de Neve, "Performance of Phosphate-Solubilizing Bacteria in Soil Under High Phosphorus Conditions", *Biol. Fertil. Soils*, **49**, 705-714 (2013).
- 32) P.M. Patil, V.B. Kuligod, N.S. Hebsur, C.R. Patil and G.N. Kulkarni, "Effect of Phosphate Solubilizing Fungi and Phosphorus Levels on Growth, Yield and Nutrient Content in Maize (*Zea Mays*)", *Karnataka J. Agric. Sci.*, **25**, 58-62 (2012).
- 33) A. Sharma, U.S. Rawat and B.K. Yadav, "Influence of Phosphorus Levels and Phosphorus Solubilizing Fungi on Yield and Nutrient Uptake by Wheat Under Sub-Humid Region of Rajasthan", India. *ISRN Agron.*, **2012**, 1-9 (2012).
- 34) I.M. Van Aarle, Assessment of Phosphatase Activity Associated with Mycorrhizal Fungi by Epi-Fluorescent Microscopy, in A. Varma and A.C. Kharkwal, (ed.) *Symbiotic Fungi*. (Springer, Heidelberg, 2009), pp. 89-99.
- 35) E.J. Mullaney and A.H.J. Ullah, "The Term Phytase Comprises Several Different Classes of Enzymes", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 179-184 (2003).
- 36) R. Chen, G. Xue, P. Chen, B. Yao, W. Yang, Q. Ma, Y. Fan, Z. Zhao, M.C. Tarczynski and J. Shi, "Transgenic Maize Plants Expressing a Fungal Phytase Gene", *Transgenic Res.*, **17**, 633-643 (2008).
- 37) T.S. George, C.D. Giles, D. Menezes-Blackburn, L.M. Condrón, A.C. Gama-Rodrigues, D. Jaisi, F. Lang, A.L. Neal, M.I. Stutter, D.S. Almeida, R. Bol, K.G. Cabugao, L. Celi, J.B. Cotner, G. Feng, D.S. Goll, M. Hallama, J. Krueger, C. Plassard, A. Rosling, T. Darch, T. Fraser, R. Giesler, A.E. Richardson, F. Tamburini, C.A. Shand, D.G. Lumsdon, H. Zhang, M.S.A. Blackwell, C. Wearing, M.M. Mezeli, Å. R. Almås, Y. Audette, I. Bertrand, E. Beyhaut, G. Boitt, N. Bradshaw, C.A. Brearley, T.W. Bruulsema, P. Ciais, V. Cozzolino, P.C. Duran, M.L. Mora, A.B. de Menezes, R.J. Dodd, K. Dunfield, C. Engl, J.J. Frazão, G. Garland, J.L. González Jiménez, J. Graca, S.J. Granger, A.F. Harrison, C. Heuck, E.Q. Hou, P.J. Johnes, K. Kaiser, H.A. Kjær, E. Klumpp, A.L. Lamb, K.A. Macintosh, E.B. Mackay, J. McGrath, C. McIntyre, T. McLaren, E. Mészáros, A. Missong, M. Mooshammer, C.P. Negrón, L.A. Nelson, V. Pfahler, P. Poblete-Grant, M. Randall, A. Seguel, K. Seth, A.C. Smith, M.M. Smits, J.A. Sobarzo, M. Spohn, K. Tawarayama, M. Tibbett, P. Voroney, H. Wallander, L. Wang, J. Wasaki and P.M. Haygarth, "Organic Phosphorus in the Terrestrial Environment: A Perspective on the State of the Art and Future Priorities", *Plant Soil*, **427**, 191-208 (2018).
- 38) M. Sakurai, J. Wasaki, Y. Tomizawa, T. Shinano and M. Osaki, "Analysis of Bacterial Communities on Alkaline Phosphatase Genes in Soil Supplied with Organic Matter.", *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54**, 62-71 (2008).
- 39) S. Chhabra, D. Brazil, J. Morrissey, J. Burke, F. O'Gara, and D.N. owling, "Fertilization Management Affects the Alkaline Phosphatase Bacterial Community in Barley Rhizosphere Soil", *Biol. Fertil. Soils*, **49**, 31-39 (2013).
- 40) H. Tan, M. Barret, M.J. Mooij, O. Rice, J.P. Morrissey, A. Dobson, B. Griffiths and F. O'Gara, "Long-Term Phosphorus Fertilization Increased the Diversity of the Total Bacterial Community and the phoD Phosphorus Mineraliser Group in Pasture Soils", *Biol. Fertil. Soils*, **49**, 661-672 (2013).
- 41) S. Matsuoka, S. Fujinaga, Y. Kobayashi, S. Hobara and T. Osono, "Bacterial 16S rDNA and Alkaline Phosphatase Gene Diversity in Soil Applied with Composted Aquatic Plants", *Limnology*, **21**, 357-364 (2020).
- 42) S.A. Ragot, M.A. Kertesz, E. Frossard and E.K. Bünemann, "phoD Alkaline Phosphatase Gene Diversity in Soil", *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 7281-7289 (2015).
- 43) S.A. Ragot, O. Huguenin-Elie, M.A. Kertesz, E. Frossard and E.K. Bünemann, "Total and Active Microbial Communities and phoD as Affected by Phosphate Depletion and pH in Soil", *Plant Soil*, **408**, 15-30 (2016).
- 44) J.R. Gaiero, E. Bent, T.D. Fraser, L.M. Condrón and K.E. Dunfield, "Validating Novel Oligonucleotide Primers Targeting Three Classes of Bacterial Non-Specific Acid Phosphatase Genes in Grassland Soils", *Plant Soil*, **427**, 39-51 (2018).
- 45) A.L. Neal, M. Blackwell, E. Akkari, C. Guyomar, I. Clark and P.R. Hirsch, "Phylogenetic Distribution, Biogeography and the Effects of Land Management upon bacterial Non-Specific Acid Phosphatase Gene diversity and Abundance", *Plant Soil*, **427**, 175-189 (2018).
- 46) Y. Oshima, N. Ogawa and S. Harashima, "Regulation of Phosphatase Synthesis in *Saccharomyces Cerevisiae* - a Review", *Gene*, **179**, 171-177 (1996).
- 47) Y. Oshima, "The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genes Genet. Syst.*, **72**, 323-334 (1997).
- 48) T. Osono, "Ecology of Ligninolytic Fungi Associated with Leaf Litter Decomposition", *Ecol. Res.*, **22**, 955-974 (2007).

- 49) T. Osono and H. Takeda, "Accumulation and Release of Nitrogen and Phosphorus in Relation to Lignin Decomposition in Leaf Litter of 14 Tree Species in a Cool Temperate Forest", *Ecol. Res.*, **19**, 593-602 (2004).
- 50) T. Osono, "Functional Diversity of Ligninolytic Fungi Associated with Leaf Litter Decomposition", *Ecol. Res.*, **35**, 30-43 (2020).