

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (3) :282 - 291; 4 March 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140377

土生空团菌对白云母的风化作用及解钾特性

彭云湘, 宋淼, Israel Pedruzzi, 李平*, 于建国

华东理工大学, 化学工程联合国家重点实验室, 上海 200237

摘要:【目的】为了提高森林土壤含钾硅酸盐矿物利用率和改善树木钾素营养, 探讨外生菌根真菌对白云母矿物的解钾及风化效应。【方法】通过 5 种外生菌根真菌在贫钾条件下与白云母的相互作用, 考察了 3 种常用培养基对菌株解钾能力的影响; 采用解钾效果最高的土生空团菌在 Modified Melin-Norkrans (MMN) 培养基条件下, 进一步研究了 21d 浸出过程中主要矿质元素的释放量、生物量、剩余葡萄糖量、产生的小分子有机酸种类及含量、菌丝-矿物微环境的改变, 利用扫描电子显微镜观测白云母被风化的痕迹。【结果】培养基对不同外生菌根真菌解钾能力的影响各异, 其中土生空团菌在 MMN 培养基条件下解钾能力最强, 其解钾量与生物量、剩余葡萄糖量、pH 值显著相关。土生空团菌能够分泌有助于菌丝-矿物粘附的胞外多糖以形成菌丝-矿物微环境, 并富集有机酸, 促进微环境内钾的释放; 菌丝不仅能够粘附在白云母表面产生刻蚀作用, 还能破坏矿物深入其内部。【结论】外生菌根真菌具有促进白云母风化并释放钾素的能力, 这种能力可能与菌丝、有机酸、多糖的协同作用有关。

关键词: 外生菌根真菌, 含钾硅酸盐矿物, 白云母, 解钾, 风化, 土生空团菌

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 03-0282-10

微生物与矿物的相互作用影响着矿物的风化, 这对岩石圈的演化及陆地生态系统的建立意义重大^[1]。Philip C. Bennett 提出, 微生物对矿物风化的促进作用是为了从矿物中获得生长和发育所需的营养或能量^[2], 它是具有一定的选择性的^[3]。硅酸盐矿物是构成地壳的主要矿物, 其风化不仅与土壤中矿质营养元素的供给密切相关^[4], 还可以消耗大气二氧化碳、调节气候^[5]。钾作为地壳组成的重要元素, 既是植物的重要组成物质, 还是酶的活化剂, 在植物的生长和代谢过程中起到了至关重要的作用。然而土壤中能被植物利用的有效钾较少, 再加上水土流失严重、土壤肥力日益降低, 缺钾严重制约着植

物的生长。目前已有许多关于微生物对含钾硅酸盐矿物的风化研究^[6-9]。

外生菌根真菌既可独立的生存于土壤中, 又可与众多木本植物共生形成外生菌根^[10]。外生菌根可扩大植物根系的吸收范围和与土壤接触的面积, 改善宿主营养条件^[11-13], 促进其生长, 使其能够在贫瘠、低营养的环境中生存。与一些曲霉属真菌^[14-15]类似, 外生菌根真菌可以通过酸性代谢产物的腐蚀溶解、络合分子的螯合作用风化含钾硅酸盐矿物^[16], 但这种效果具有特异性^[17], Calvaruso Christophe^[18] 和 P. A. W. van Hees^[19] 发现共生实验中双色蜡蘑 (*Laccaria bicolor*) 和斑粘盖牛肝菌

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21376085); 中国博士后科学基金 (2012M510809)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-21-64250981; E-mail: liping_2007@ecust.edu.cn

作者简介: 彭云湘 (1990-), 女, 湖南岳阳, 硕士研究生, 研究方向为生物与化学工程。E-mail: pyxecust@126.com

收稿日期: 2014-07-28; **修回日期:** 2014-11-05

(*Suillus variegatus*) 可以增强植物对生长基质的利用程度,但不能促进矿物元素的释放。此外,菌丝与矿物直接接触可加速接触点碱性阳离子和氢离子间的交换,从而达到溶解矿物的目的^[20]。关于外生菌根真菌在含钾硅酸盐矿物风化过程中起到的作用、菌丝与矿物物理接触的意义至今仍存在分歧^[21-23]。

研究外生菌根真菌为了获得自身以及宿主新陈代谢所需钾素营养而与含钾硅酸盐矿物相互作用并造成风化现象的过程,对提高非水溶性钾资源利用率和保护森林生态系统具有十分重大的意义。白云母是常见的硅酸盐矿物,在云母族中分布最广,也是土壤中主要的含钾矿物(7% - 11%)。为了排除土壤中固有矿质元素和植物的干扰,本文在加入白云母的贫钾培养基中对外生菌根真菌进行纯培养,考察其对白云母矿物的风化作用及解钾特征,以期能为外生菌根真菌与硅酸盐矿物相互作用提供一些研究线索和实验数据,为研究微生物菌剂提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:实验选取 5 种自然界中广泛存在,并被证明具有一定促进矿物风化能力的外生菌根真菌作为供试菌株。它们分别是土生空团菌^[24] (*Cenococcum geophilum*, cfcc 86380), 采自内蒙古包头乌素图国家森林公园;卷边网褶菌^[25] (*Paxillus involutus*, cfcc 85743), 采自辽宁丹东同兴镇针叶林地上;双色蜡蘑^[11] (*Laccaria bicolor*, cfcc 84366), 采自甘肃舟曲林业局沙滩林场;彩色豆马勃^[24] (*Pisolithus tinctorius*, cfcc 7551), 采自广东广州桉树林;绒粘盖牛肝菌^[16] (*Suillus tomentosus*, cfcc 87556), 采自陕西镇安木王国家森林公园针阔叶混交林。菌株均购自中国林业微生物保藏管理中心(China Forestry Culture Collection Center, CFCC)。

1.1.2 矿物:实验所用含钾硅酸盐矿物为河北灵寿白云母。白云母粉经筛分取粒径为 200 - 325 目间颗粒。经 X 射线荧光光谱分析(XRF),其主要化学组成为: SiO₂ (49.48%)、Al₂O₃ (34.45%)、K₂O (8.60%)、Fe₂O₃ (4.63%)、MgO (1.24%)、Na₂O (0.62%)。参照国标(NY/T 889 - 2004 土壤速效钾和缓效钾的测定)测试得到 5g 白云母粉的速效钾

量和缓效钾量分别为 1.09 mg 和 5.51 mg。白云母片(13 mm × 18 mm)经透明胶带粘贴、撕拉数次,剥落外层以露出新鲜平整的表面待用。

1.1.3 培养基:实验选用 3 种外生菌根真菌的良好培养基 PD(马铃薯浸出粉 6g/L,葡萄糖 20g/L)、MMN^[26](去除牛肉蛋白胨,以 3 g/L 麦芽提取物替代新鲜麦芽汁)和 Pachlewski^[24]。将其中的 KH₂PO₄ 用 NaH₂PO₄ 替代使其成为贫钾培养基,VB₁ 改为 0.1 mg/L,初始 pH 约 5.5。制作平板固体培养基时补加 20 g/L 琼脂。

1.1.4 主要试剂和仪器:马铃薯浸出粉和麦芽提取物分别购自上海金穗生物科技有限公司和南京都莱生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。隔水式恒温培养箱,GHP-9080,上海一恒科学仪器有限公司。恒温摇床,ZHWY-2102C,上海智城分析仪器制造有限公司。X 射线荧光光谱分析仪(XRF),ARL ADVANT' XP,Thermo Scientific。电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP),SPECTRO ARCOS,AMETEK。高效液相色谱(HPLC),UltiMate 3000,Dionex。扫描电子显微镜(SEM),Quanta 250,FEI。pH 计,SevenMulti,METTLER TOLEDO。紫外可见分光光度计,UV-2550,SHIMADZU。

1.2 琼脂菌种的制备

取供试菌株接种在含 1 g/L 白云母矿粉的 PD 平板固体培养基(彩色豆马勃采用 MMN 平板固体培养基)中,于 25℃ 暗培养 10 - 20 d 备用。

1.3 培养基的筛选

于盛有 5 g 白云母矿粉的 250 mL 锥形瓶内分别加入 100 mL PD、MMN 和 Pachlewski 培养基,灭菌后分别接种直径约 6 mm 琼脂供试菌种 1 个,25℃、180 r/min 震荡培养。每个处理 2 个重复,以不接种者为空白对照组(CK)。21 d 后将发酵液离心、过滤,滤渣加入盛有 100 mL 1 mol/L NH₄Ac 的锥形瓶中,超声 8min 后置于摇床中震荡 30 min,再次离心、过滤。2 次过滤所获滤液分别取样,4293 × g 离心 10 min 后取上清液用 1% HNO₃ 稀释 10 倍,采用 ICP 分别测定钾浓度,其和乘以稀释倍数为解钾量。

1.4 外生菌根真菌解钾效应

取实验 1.3 中解钾能力最强的外生菌根真菌在其最适宜培养基条件下与 5g 白云母矿粉 25℃、180 r/min 摇床震荡培养 0 - 21 d。

每 3 d 从摇床中取出 2 个锥形瓶对其发酵液进

行如 1.3 所述处理,采用 ICP 测定溶液中 K、Al、Si 元素含量。并另取首次过滤滤液,4293 × g 离心 10 min 后取上清液用超纯水稀释 10 倍,用 0.45 μm PTFE 针式过滤器过滤,使用 HPLC 测试(测试条件:柱温 80℃,流动相 6 mmol/L H₂SO₄,流速 0.6 mL/min,色谱柱 IC Sep Coregal64H 分析柱),二极管阵列检测器检测代谢的小分子有机酸量,示差检测器检测发酵液中剩余葡萄糖量。用 pH 计测试发酵液 pH 值。80℃ 烘干称重法测定生物量。

外环境与微环境:于第 15 天和第 21 天从摇床中分别另取出 2 个锥形瓶,取其上清液测试外环境中钾浓度、小分子有机酸量和多糖量;然后滤纸过滤至长时间无滤液滴出,收集滤渣 1308 × g 低速离心,取其上清液测试菌丝-矿物微环境的钾浓度、小分子有机酸量和多糖量。多糖量采用蒽酮-硫酸法^[27]测定。

1.5 外生菌根真菌与白云母相互作用观察

为了更好的观察外生菌根真菌与白云母间的相互作用,选取表面平整的白云母片为研究对象。将灭菌后的白云母片置于无菌适宜平板培养基上,接种实验 1.3 中解钾能力最强的菌株,25℃ 静置培养 30 d。取被菌丝铺满的白云母片剪成两半,一半直接喷金后使用 SEM 观察表面形貌,另一半经 300℃ 煅烧 2h^[28]并用去离子水冲洗掉表面灰分,80℃ 烘干后观察。

1.6 数据处理

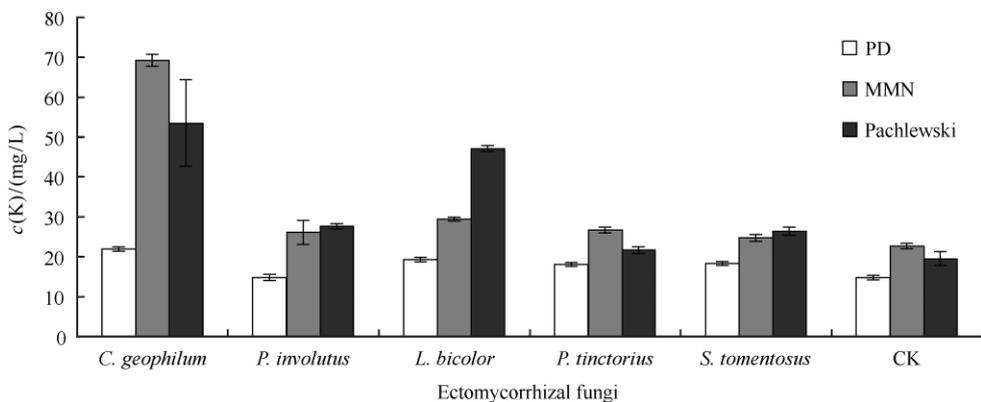


图 1. 培养基对 5 种外生菌根真菌解钾能力的影响

Figure 1. Effect of culture mediums on K-releasing ability of five ectomycorrhizal fungi.

2.2 外生菌根真菌对白云母的解钾效应

2.2.1 K、Al、Si 释放量的变化:如图 2 所示,白云母粉在土生空团菌的作用下,K 的释放量随时间的变化呈现先上升后下降的趋势,在第 15 天左右出现

极大值,此时发酵液内速效钾量为 8.01 mg,超过原矿粉速效钾和缓效钾的总和 6.60 mg。Al、Si 的释放量远小于 K。原矿粉中 Al/Si、K/Si 质量比分别为 0.79 和 0.31,而 3-21 d 的培养时间内发酵液中

2 结果

2.1 培养基对外生菌根真菌解钾能力的影响

如图 1 所示,5 种外生菌根菌都具有一定的解钾能力,且在不同的培养基下存在差异。土生空团菌在 MMN 培养基中解钾能力最强,较对照组总解钾量提高了 205.02%;而在 PD 中最弱,仅提高 47.83%。培养基对土生空团菌解钾过程的适宜程度次序为:MMN > Pachlewski > PD。而对于卷边网褶菌、双色蜡蘑、彩色豆马勃和绒粘盖牛肝菌,该次序依次为:Pachlewski > MMN > PD、Pachlewski > MMN = PD、PD > MMN > Pachlewski、MMN > PD > Pachlewski。外生菌根真菌在不同培养条件下,生长状况和代谢状况均不同,进而会对其解钾过程产生不同的影响,这应该是外生菌根真菌解钾能力在不同培养基中具有差异性的主要原因。以 PD、MMN 和 Pachlewski 为培养基,土生空团菌在 5 个外生菌根真菌中解钾能力均最强,解钾量分别达到 21.85、69.21 和 53.52 mg/L。本文之后将以土生空团菌在 MMN 中的解钾情况为基础,进一步研究外生菌根真菌对白云母的风化作用及解钾特性。

溶出的 Al/Si、K/Si 质量比平均值分别为 0.72 和 4.03。这说明土生空团菌对白云母的风化作用,对 Al、Si 而言在一定程度上是接近计量化学的,而对 K 而言是非计量化学的。土生空团菌能在较短时间内将白云母中缓效钾转化为速效钾,造成了钾的优先溶出;Al、Si 的计量化学溶出源于白云母晶格结构的破坏。缓效钾的迅速消耗、菌丝对矿物晶格的破坏将加快白云母的风化进程。

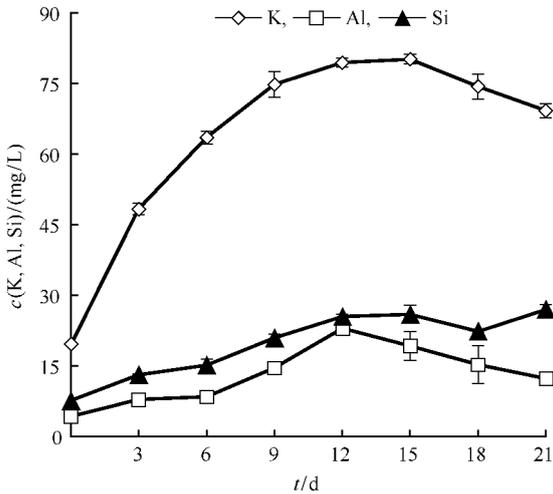


图 2. 土生空团菌浸取白云母时 K、Al、Si 释放量随浸取时间的变化

Figure 2. Release of K, Al, Si from muscovite by *C. geophilum* during 21-day leaching.

2.2.2 生物量和剩余葡萄糖量的变化:在培养过程中,随着微生物的新陈代谢,如图 3,菌丝干重在 0-12 d 稳步增加至 0.25 g,后期略微有所下降。葡萄糖是本实验中土生空团菌生长的主要碳源,因此可用发酵液中的剩余葡萄糖量表征碳源的消耗情况。

在 0-12 d 内,葡萄糖的消耗基本呈线性趋势,以约 1.17 g/d 的速度逐步被微生物利用。以此推算,葡萄糖约在第 13 天被消耗殆尽,故在第 15 天及以后无法被检出。

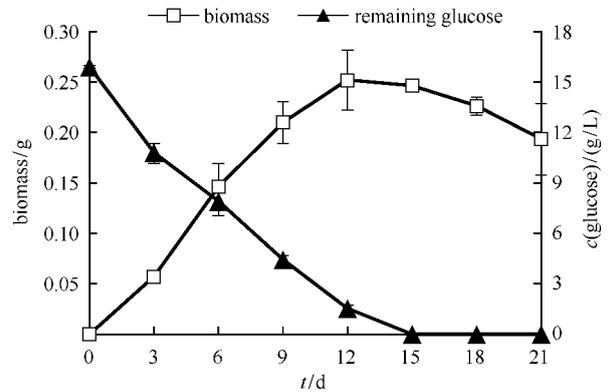


图 3. 土生空团菌浸取白云母时发酵液中生物量和剩余葡萄糖量随时间变化曲线

Figure 3. Biomass and remaining glucose in culture medium during 21-day leaching of muscovite by *C. geophilum*.

2.2.3 发酵液 pH 值和小分子有机酸量的变化:该株土生空团菌主要产生的小分子有机酸为柠檬酸、乙酸、乳酸和少量的草酸。如表 1 所示,在 0-9 d 内,有机酸在发酵液中累积量较少,而在 9-15 d 内迅速增加,总量最高达到 464.68mg/L,并又在后期迅速减少,第 21 天时总量降低至 11.34 mg/L。土生空团菌的生长需大量碳源,而培养基中碳源量不充沛,可能是导致初期柠檬酸以及培养 15 d 后各类有机酸被快速消耗的主要原因。发酵液 pH 从初期的 6.05 下降至 4.48 后缓慢回升至 4.99。影响 pH 的原因有很多,如细胞分泌 H⁺ 平衡电荷、呼吸作用、有机酸类物质的水解、磷酸盐的缓冲作用等。

表 1. 土生空团菌浸取白云母过程中 pH 值与有机酸的代谢情况

Table 1. pH values and organic acid amounts in culture medium during 21-day leaching of muscovite by *C. geophilum*

Incubation time/d	pH	c(Organic acid) / (mg/L)				
		Oxalic acid	Citric acid	Acetic acid	Lactic acid	Total
0	6.05	0.00	188.39	0.00	0.00	188.39
3	4.96	0.15	0.00	22.21	28.74	51.10
6	4.91	0.40	0.00	45.88	53.20	99.48
9	4.73	0.59	36.23	33.86	13.99	84.67
12	4.52	0.83	83.14	125.35	11.98	221.30
15	4.48	0.35	55.74	357.02	51.57	464.68
18	4.95	0.22	34.07	213.00	37.80	285.08
21	4.99	0.05	11.29	0.00	0.00	11.34

2.2.4 外环境与微环境:如表 2 所示,培养 15 d 左右时,外环境中多糖含量为 1086.49 mg/L,大于未被 HPLC 检测到的糖类(来源于麦芽提取物)的初始值(921.73 mg/L),说明土生空团菌具有分泌胞外多糖的能力。培养 21 d 后,外环境培养基中多糖量锐减,但微环境内多糖量是外环境的 1.95 倍。大量小分子有机酸也在菌丝-矿物微环境富集,以乙酸

和乳酸的富集程度最强,柠檬酸较弱,第 15 天时微环境有机酸浓度是外环境的 14.15 倍。如图 4 所示,培养 15 d 和 21 d 后,外环境中 K 含量分别为 19.58 mg/L 和 8.32 mg/L,而在微环境中分别为 60.65 mg/L 和 85.53 mg/L,表明 K 得到持续释放和富集。然而 Al、Si 在这两种环境下的差别并不太大。

表 2. 土生空团菌浸取白云母 15 d 与 21 d 后外环境与微环境下多糖和有机酸浓度的比较

Table 2. Comparison of polysaccharide concentrations and organic acid concentrations between in external environment and in micro-environment after 15-day and 21-day leaching of muscovite by *C. geophilum*

Incubation time/d	Environment	c (Polysaccharide) / (mg/L)	c (Organic acid) / (mg/L)				
			Oxalic acid	Citric acid	Acetic acid	Lactic acid	Total
15	External environment	1086.49	0.34	36.69	11.93	0.00	48.95
	Micro-environment	1259.01	0.41	85.66	544.61	62.16	692.84
21	External environment	207.95	0.00	11.09	0.00	0.00	11.09
	Micro-environment	405.90	0.37	11.35	14.28	1.99	27.99

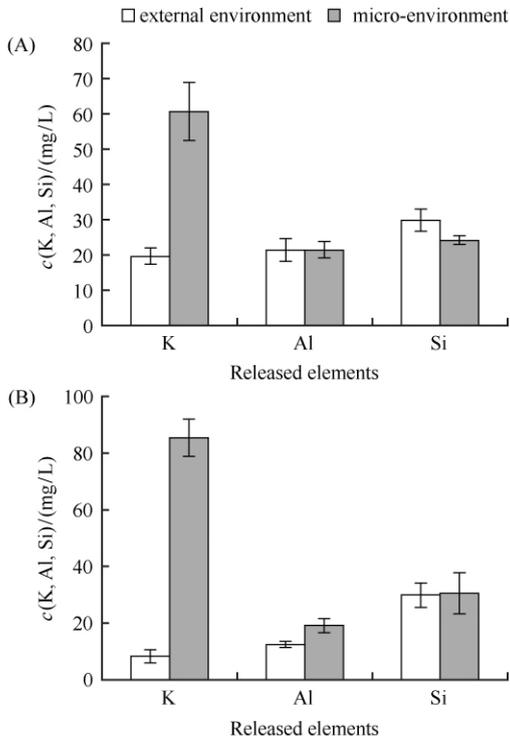


图 4. 土生空团菌浸取白云母 15 d (A) 与 21 d (B) 后外环境与微环境下 K、Al、Si 浓度的比较

Figure 4. Comparison of K, Al, Si concentrations between in external environment and in micro-environment after 15-day (A) and 21-day (B) leaching of muscovite by *C. geophilum*.

2.2.5 释钾量与各因素间相关性分析:碳源消耗量、生物量、pH 值、小分子有机酸量是微生物新陈代

谢情况最直观的体现,均会直接或间接的影响微生物对矿物的风化。其中有机酸通常被认为是外生菌根真菌风化矿石的关键^[29-30]。本实验中不同培养时间下释钾量与剩余葡萄糖量、生物量、pH 值显著相关,其相关系数分别为: $r = -0.926^{**}$, $r = 0.971^{**}$, $r = -0.930^{**}$, $N = 8$ 。释钾量与生物量间极显著的相关关系可能预示着菌丝对浸出过程的重要影响。

表 3. 释钾量与各因素间相关性分析

Table 3. Correlation between K release amount and other experimental factors

Experimental factor	Pearson correlation	Sig. (2-tailed)	N
Remaining glucose	-0.926**	0.001	8
Biomass	0.971**	0.000	8
pH value	-0.930**	0.001	8
Organic acid	0.284	0.496	8

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

2.3 外生菌根真菌与白云母间的相互作用

在实验室平板固相培养条件下,土生空团菌约 2 d 才出现菌落;2-10 d 有较快的生长速度,菌落直径可达 5-7 cm,白云母片边缘有致密的菌丝附着,但表面菌丝较少;后期(10-30 d)生长较慢,但菌丝会逐步覆盖云母片。白云母片原矿经 SEM 观

察如图 5-A 所示, 具有光滑平整的表面, 而与土生空团菌相互作用后, 如图 5-B 表面附着有大量纵横交错的菌丝。在更高放大倍数下仔细观察, 发现如图 5-C 所示, 有菌丝会从层间深入矿物内部, 造成矿物表面凸起并出现裂纹。煅烧并冲洗掉白云母片表面附着的菌丝后, 我们可以观察到云母片表面出现了

如图 5-D 中的“沟壑”, 这些细长的“沟壑”较完整的保留了菌丝原有的形态, 横在“沟壑”中将其分成多段的物质有可能是菌丝中的隔膜。“沟壑”的产生是菌丝风化矿物的最直接证明, 产生机制可能是菌丝的机械破坏、有机酸的腐蚀或螯合、离子交换等的协同作用。

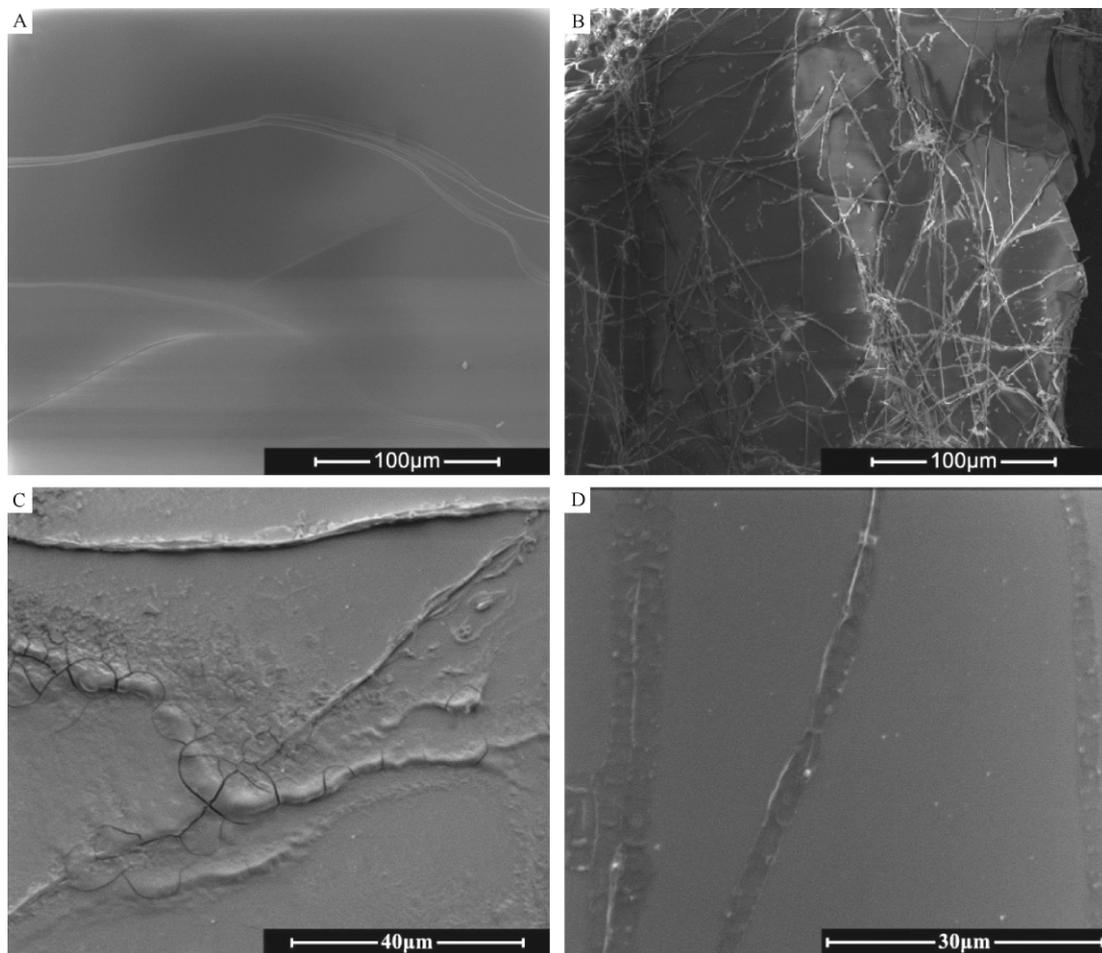


图 5. 土生空团菌浸取白云母片前后表面 SEM 扫描电镜图

Figure 5. SEM photographs of muscovite sheet surface before and after leaching by *C. geophilum*. A: photo of original muscovite (1000 \times); B and C: photos of muscovite after leaching by *C. geophilum* (1000 \times for B, 3000 \times for C); D: photos of calcined muscovite after leaching by *C. geophilum* (5000 \times).

3 讨论

5 株外生菌根真菌在不同的培养基条件下与白云母相互作用 21 d 后, 发酵液中速效钾含量均高于空白对照 (图 1); 其中土生空团菌浸出的速效钾量高于原矿粉中速效钾和缓效钾量的总和, 并能够使

矿物表面产生腐蚀坑, 说明外生菌根真菌具有风化白云母释放钾素的能力; 培养基类型对外生菌根真菌解钾能力具有显著影响, 直接制约着微生物新陈代谢, 如生物量、有机酸或胞外多糖的分泌等, 进而影响着微生物风化矿物的过程^[31]。

胞外多糖的产生有助于菌丝对矿物的粘附以及菌丝-矿物微环境的形成。连宾等^[32]提出硅酸盐细

菌与含钾硅酸盐矿物相互作用时产生大量胞外多糖,其粘结作用会促使细菌-矿物复合体的形成,该复合体对一些无机离子和酸根离子有较好的吸附作用,从而改变其微区环境,并对释钾过程的进行起到积极的影响。外生菌根真菌菌丝-矿物微环境发生了与细菌-矿物复合体微环境类似的变化。本研究观察到外生菌根真菌分泌胞外多糖,暗示胞外多糖与菌丝一起,在白云母表面形成了微环境。因此,到第 21 天时即使微生物进入到衰减期,培养基中有机酸总量锐减,但是微环境中仍有较高浓度的有机酸,在多糖、菌丝等的协同作用下仍能有效促进白云母溶解,使微环境中钾浓度上升(表 2)。菌丝-矿物微环境对钾有较强的持续选择性吸附富集能力,这在自然环境下对储备植物所需矿质营养和一定程度上避免铝胁迫具有重要意义。

菌丝-矿物微环境的形成可能是自然条件下矿物风化的一种重要的促进因素。有研究表明,微生物对矿物的风化直接或间接与微生物有机酸代谢有关^[29]。有机酸能降低环境的酸度,在矿物表面产生质子化作用,并且螯合 Al^{3+} 、 Si^{4+} 等多价态阳离子,降低它们的饱和程度^[22]。本实验结果发现,90% 以上钾的溶出发生在培养前期(0-9 d),而此时小分子有机酸积累不多;培养中期(9-15 d)有机酸大量累积,解钾量却缓慢增加并趋于稳定;培养后期(15-21 d),有机酸量锐减,解钾量有所下降(表 1,图 2)。这一方面可归因于培养前期释放的钾主要为易溶出的缓效钾,培养中期释放的主要是难溶出的结构钾,而培养后期浸矿环境受间歇体系制约逐渐恶化。事实上,Minjie Yao 等^[33]在利用胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)浸出蛇纹石时,发酵液中 Mg^{2+} 在第 10-20 d 过程中也有所下降。Fabiene Paris^[25]发现卷边网褶菌可以引起 Mg^{2+} 和 Al^{3+} 与层间 K^+ 的交换,导致金云母矿物晶格结构发生不可逆性破坏;然而彩色豆马勃只能引起 Mg^{2+} 与层间 K^+ 的交换,使晶格结构产生可逆性变化。笔者推测,土生空团菌对白云母晶格的作用是可逆的,当满足某种条件时(如有机酸被微生物降解,被螯合的阳离子重新游离出来),有可能打破原有的离子平衡和溶解平衡,而使反应向逆方向进行,释放的钾可能部分会重新回到矿物中,从而导致培养基溶液中

K 浓度下降。然而,微环境中 K 浓度在持续增加(图 4),多糖和有机酸在外环境和微环境间也存在较大的浓度差,可以认为菌丝-矿物微环境能够有效的富集有机酸,加强了有机酸与多糖、菌丝等的协同风化作用,并吸附释放的钾,使其在发酵液中产生了浓度梯度。

菌丝本身以及菌丝与矿物的物理接触可能对微生物风化过程同样起着举足轻重的作用。这也能解释生物量与释钾量之间显著的相关关系(表 3)。缺钾能促进有机酸的分泌^[24];贫磷条件下,与富磷矿物相互作用能刺激外生菌根真菌生物量的增加,而在富磷条件下,矿物的影响较小^[34];Garcia Kevin 等^[35]发现,与宿主共生的粘花菇(*Hebeloma cylindrosporum*)在缺钾环境下,仅在根系附近及深入土壤的外延菌丝内合成钾转运体 *HcTrk1* 蛋白,而在富钾条件下所有菌丝均能合成。浸矿过程中,菌丝的基因可能会朝有利于微生物风化的方向选择性表达。SEM 观察结果表明,土生空团菌菌丝不仅可以附着于白云母表面,还能破坏矿物进入其间隙中(图 5)。菌丝-矿物物理接触可以促进微生物直接从矿物中吸收营养物质并且加快矿物表面与有机酸的相互作用^[36]。土生空团菌通过凭借多糖等粘性物质加强菌丝与矿物间的接触,从而可能在矿物表面形成了生物膜,膜内构成菌丝-矿物微环境,加强了土生空团菌对白云母的风化及钾素的释放。

间歇体系在探讨微生物释放矿质营养、风化矿物过程存在一些弊端,如营养条件和生存条件日益恶化、有机酸大量积累时间短暂、矿质营养得不到及时的消耗等,采用不同的外生菌根真菌菌种和矿物研究,这些弊端造成的影响或许会有差异,这可能是导致研究者们关于外生菌根真菌风化矿物的情况意见不一的原因之一。

外生菌根真菌不仅可以附着于含钾硅酸盐矿物上,还能破坏矿物进入其间隙中,达到根系达不到的范围或微小孔隙,进行生物风化反应,释放钾素或其他矿质营养元素,提高宿主植物的生存能力。研究外生菌根真菌风化含钾硅酸盐矿物释放钾素的规律与机理对于筛选优良菌株、改善树木钾素营养、维持森林系统养分平衡具有重大意义。

参考文献

- [1] Ehrlich HL. Geomicrobiology. 3rd eds. New York: Marcel Dekker, 1996.
- [2] Bennett PC, Rogers JR, Choi WJ, Hiebert FK. Silicates, silicate weathering, and microbial ecology. *Geomicrobiology Journal*, 2001, 18 (1) : 3-19.
- [3] Bennett PC, Hiebert FK, Choi WJ. Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. *Chemical Geology*, 1996, 132 (1-4) : 45-53.
- [4] Huntington TG, Hooper RP, Johnson CE, Aulenbach BT, Cappellato R. Calcium depletion in a southeastern United States forest ecosystem. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64 (5) : 1845-1858.
- [5] Raymo ME, Ruddiman WF. Tectonic forcing of late Cenozoic climate. *Nature*, 1992, 359: 117-122.
- [6] Hu J, Lian B, Yu J, Hu X. Formation of *Aspergillus niger*-mineral aggregation and characterization of polysaccharide. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (6) : 756-765. (in Chinese)
胡婕, 连宾, 郁建平, 胡星. 黑曲霉-矿物聚集体的形成及其分泌的多糖特性. 微生物学报, 2011, 51 (6) : 756-765.
- [7] Sun D, Yin J, Chen Y, Cao F. Effect of crystal structures of potassium-bearing minerals on *Aspergillus niger* growth metabolism and potassium and silicon release. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47 (3) : 503-513. (in Chinese)
孙德四, 尹健美, 陈晔, 曹飞. 钾矿物晶体结构对黑曲霉新陈代谢及钾与硅的溶出影响. 中国农业科学, 2014, 47 (3) : 503-513.
- [8] Yuan L, Huang JG, Li XL, Christie P. Biological mobilization of potassium from clay minerals by ectomycorrhizal fungi and eucalypt seedling roots. *Plant and Soil*, 2004, 262 (1) : 351-361.
- [9] Zhao F, Huang Z, He L, Wang P, Sheng X. Isolation and genetic diversity of mineral-solubilizing bacteria of different weathered potassium-feldspars. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (5) : 647-653. (in Chinese)
赵飞, 黄智, 何琳燕, 王鹏, 盛下放. 不同风化程度钾长石表面矿物分解细菌的筛选及遗传多样性. 微生物学报, 2010, 50 (5) : 647-653.
- [10] Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal Symbioses. 2nd eds. London: Academic press, 1997.
- [11] Huang JG, Lapeyrie F. Ability of ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N to increase the growth of Douglas Fir seedlings and their phosphorus and potassium uptake. *Pedosphere*, 1996, 6 (3) : 217-224.
- [12] Koele N, Turpault M-P, Hildebrand EE, Uroz S, Frey-Klett P. Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral weathering: budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41 (9) : 1935-1942.
- [13] Wallander H, Wickman T. Biotite and microcline as potassium sources in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza*, 1999, 9 (1) : 25-32.
- [14] Hu J, Yu J, Lian B. Capability and mechanism of potassium releasing from potassium-bearing minerals by *Aspergillus niger*. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 2011, 30 (3) : 277-285. (in Chinese)
胡婕, 郁建平, 连宾. 黑曲霉对含钾矿物的解钾作用与机理分析. 矿物岩石地球化学通报, 2011, 30 (3) : 277-285.
- [15] Lian B, Wang B, Pan M, Liu CQ, Teng HH. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2008, 72 (1) : 87-98.
- [16] Balogh-Brunstad Z, Kent Keller C, Thomas Dickinson J, Stevens F, Li CY, Bormann BT. Biotite weathering and nutrient uptake by ectomycorrhizal fungus, *Suillus tomentosus*, in liquid-culture experiments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2008, 72 (11) : 2601-2618.
- [17] Van Schöll L, Smits MM, Hoffland E. Ectomycorrhizal weathering of the soil minerals muscovite and hornblende. *New Phytologist*, 2006, 171 (4) : 805-814.
- [18] Christophe C, Marie-Pierre T, Stéphane U, Elisabeth L, Antoine K, Pascale F-K. *Laccaria bicolor* S238N improves Scots pine mineral nutrition by increasing root nutrient uptake from soil minerals but does not increase mineral weathering. *Plant and Soil*, 2010, 328 (1-2) : 145-154.
- [19] van Hees PAW, Rosling A, Lundström US, Finlay RD. The biogeochemical impact of ectomycorrhizal conifers on major soil elements (Al, Fe, K and Si). *Geoderma*, 2006, 136 (1) : 364-377.

- [20] Jenny H. *The Soil Resource: Origin and Behavior*. New York: Springer-Verlag, 1980.
- [21] Hoffland E, Kuyper TW, Wallander H, Plassard C, Gorbushina AA, Haselwandter K, Holmström S, Landeweert R, Lundström US, Rosling A, Sen R, Smits MM, van Hees PAW, van Breemen N. The role of fungi in weathering. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2004, 2 (5) : 258-264.
- [22] Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, van Breemen N. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution*, 2001, 16 (5) : 248-254.
- [23] Wallander H, Hagerberg D. Do ectomycorrhizal fungi have a significant role in weathering of minerals in forest soil? *Symbiosis*, 2004, 37 (1-3) : 249-257.
- [24] 袁玲. 外生菌根吸收和活化利用土壤矿物钾的研究. 中国农业大学博士学位论文, 2003.
- [25] Paris F, Bonnaud P, Ranger J, Lapeyrie F. *In vitro* weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi. 1. Effect of K^+ and Mg^{2+} deficiency on phyllosilicate evolution. *Plant and Soil*, 1995, 177 (2) : 191-201.
- [26] Bi G, Guo X, Zang M. Influence of temperature on colony growth of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Forest Research*, 1989, 2 (3) : 247-252. (in Chinese)
毕国昌, 郭秀珍, 臧穆. 在纯培养条件下温度对外生菌根真菌生长的影响. 林业科学研究, 1989, 2 (3) : 247-252.
- [27] Wei Z, Kierans M, Gadd GM. A model sheet mineral system to study fungal bioweathering of mica. *Geomicrobiology Journal*, 2012, 29: 323-331.
- [28] Scott TA, Melvin EH. Determination of dextran with anthrone. *Analytical Chemistry*, 1953, 25 (11) : 1656-1661.
- [29] Rosling A. Trees, Mycorrhiza and minerals -field relevance of *in vitro* experiments. *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26 (6) : 389-401.
- [30] Zhang L, Wang M, Zhang W, Huang J, Yuan L. Mobilization of potassium from soil by ectomycorrhizal fungi. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54 (7) : 786-792. (in Chinese)
张亮, 王明霞, 张薇, 黄建国, 袁玲. 外生菌根真菌对土壤钾的活化作用. 微生物学报, 2014, 54 (7) : 786-792.
- [31] Huang Z, Ma G, He L, Sheng X. Effects of ammonium sulfate on the metabolism and K-feldspar weathering of two potassium-bearing mineral-solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (2) : 206-213. (in Chinese)
黄智, 马光友, 何琳燕, 盛下放. 硫酸铵对两株钾矿物分解细菌新陈代谢和风化钾长石的影响. 微生物学报, 2012, 52 (2) : 206-213.
- [32] Lian B, Fu P, Mo D, Liu C. A comprehensive review of the mechanism of potassium releasing by silicate bacteria. *Acta Mineralogica Sinica*, 2002, 22 (2) : 179-183. (in Chinese)
连宾, 傅平秋, 莫德明, 刘从强. 硅酸盐细菌解钾作用机理的综合效应. 矿物学报, 2002, 22 (2) : 179-183.
- [33] Yao MJ, Lian B, Teng HH, Tian YC, Yang XQ. Serpentine dissolution in the presence of bacteria *Bacillus mucilaginosus*. *Geomicrobiology Journal*, 2012, 30 (1) : 72-80.
- [34] Wallander H, Thelin G. The stimulating effect of apatite on ectomycorrhizal growth diminishes after PK fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40 (10) : 2517-2522.
- [35] Garcia K, Delteil A, Conejero G, Becquer A, Plassard C, Sentenac H, Zimmermann S. Potassium nutrition of ectomycorrhizal *Pinus pinaster*: overexpression of the *Hebeloma cylindrosporum* HcTrk1 transporter affects the translocation of both K^+ and phosphorus in the host plant. *New Phytologist*, 2014, 201 (3) : 951-960.
- [36] Adeleke RA, Cloete TE, Bertrand A, Khasa DP. Mobilisation of potassium and phosphorus from iron ore by ectomycorrhizal fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26 (10) : 1901-1913.

K-release and weathering of muscovite by *Cenococcum geophilum*

Yunxiang Peng, Miao Song, Israel Pedruzzi, Ping Li^{*}, Jianguo Yu

State Key Laboratory of Chemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: [Objective] To use efficiently the insoluble K-bearing minerals in forest soil as nutrients for plant growth, we studied the weathering mechanism of muscovite by ectomycorrhizal fungi. [Methods] *Cenococcum geophilum*, *Paxillus involutus*, *Laccaria bicolor*, *Pisolithus tinctorius*, and *Suillus tomentosus* were used to dissolve muscovite in three culture mediums. Furthermore, K release from muscovite, biomass, remaining glucose, pH value and organic acids were measured during the 21-day incubation of *C. geophilum* in Modified Melin-Norkrans (MMN) culture medium. We also compared K release amounts, organic acids and polysaccharides in external environment with those in micro-environment after 15-day and 21-day bioleaching. The weathering phenomenon on muscovite surface was observed by Scanning Electron Microscope (SEM). [Results] Among five ectomycorrhizal fungi, *C. geophilum* showed the best K-releasing ability in MMN culture medium. Fungal biomass, remaining glucose and pH value had significantly effects on K release. With the aid of exopolysaccharides, the hypha adhered to the mineral surface forming the micro-environment. In the micro-environment, organic acids were concentrated to promote K-release from muscovite, and obvious weathering marks on muscovite surface were found by SEM image. [Conclusion] Ectomycorrhizal fungi could weather muscovite to provide K-solubilizing microbial resource for plant growth, and the synergism action of hyphae, organic acids and polysaccharides would accelerate K mobilization.

Keywords: ectomycorrhizal fungi, K-bearing silicate mineral, muscovite, K-release, weathering, *Cenococcum geophilum*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21376085) and by the China Postdoctoral Science Foundation (2012M510809)

^{*} Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-64250981; E-mail: liping_2007@ecust.edu.cn

Received: 28 July 2014 / Revised: 5 November 2014