

詹寿发,樊有斌,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.

1 株山药内生真菌的鉴定及解钾活性

詹寿发,樊有斌,甘金莲,彭 琴,孙德四,陈 晔

(九江学院生命科学学院,江西九江 332000)

摘要:以钾长石为唯一钾源,从山药内生真菌中筛选得到 1 株具有解钾活性的菌株(SYF-011),通过形态学和 18S rDNA ITS 序列分析,鉴定 SYF-011 菌株为曲霉属棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)。该菌株菌丝能有效吸附钾长石颗粒并形成菌丝-矿物聚集体,对矿物产生明显的侵蚀作用,电镜下可见大量侵入矿物颗粒内部的菌丝。结果显示,该菌株能将钾矿物中不溶性钾转化为可溶性钾,具有较好的解钾活性。

关键词:内生真菌;棘孢曲霉;解钾活性

中图分类号: Q949.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-9399(2013)10-0320-04

钾是植物生长不可缺少的重要矿质元素。土壤中矿物钾储量丰富,但主要以稳定的铝硅酸盐状态存在,不能被作物直接吸收利用。我国可溶性钾肥资源严重紧缺,钾肥供需矛盾日趋突出^[1]。利用微生物转化土壤矿物钾受到了广泛关注,研究较多的是硅酸盐细菌的解钾作用^[2-5]。近年来的研究表明,在矿物和岩石风化过程中起作用的微生物种类繁多,除细菌外还有真菌。人们已经从不同矿物表层、土壤、植物内生菌中选育出部分对含钾矿物具有降解作用的真菌菌株,如 *Paxillus involutus*、*Suillus variegatus*、*Pisolithus tinctorius*、*Piloderma* sp.、*Aspergillus fumigatus*、*Aspergillus niger* 等^[6-11]。但植物内生真菌解钾活性的研究至今鲜见报道。笔者在前期工作基础上,从山药内生真菌中筛选得到 1 株具有解钾活性的菌株,对该菌株进行了鉴定,并对其解钾作用进行了初步研究,以期解钾真菌资源的研究与利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 试验材料 供试菌种:由九江学院生命科学学院实验室从山药组织中分离获得,编号 SYF-011。钾长石:由九江学院鄱阳湖生态经济研究中心矿物研究室提供,粉碎至 100 目备用。培养基:PDA 培养基,去离子水配制。

1.1.2 主要仪器设备 恒温培养箱(GZ-250-S);振荡培养箱(COS-2112B);电子分析天平(BSA124S);摄影显微镜(JZ95MS60);扫描电镜(EJM-2010)等。

1.2 试验方法

1.2.1 SYF-011 菌株的鉴定

1.2.1.1 形态学鉴定 将从山药组织中分离纯化得到的 SYF-011 菌株接种于 PDA 平板培养基上,28 ℃ 条件下培养,

观察菌落的特征。挑选纯化的 SYF-011 菌株的菌丝(含孢子梗),制成装片,显微镜观察菌丝形态、产孢结构和孢子的形态特征,进一步用扫描电镜观察分生孢子的形态,查阅真菌分类手册,对菌株进行初步鉴定^[12]。

1.2.1.2 分子鉴定 提取 SYF-011 菌株基因组 DNA,选用通用引物 ITS1、ITS4 扩增 SYF-011 菌株 18S rDNA ITS 片段,PCR 产物送上海生工生物工程公司测序,通过 Blast 程序在 GenBank 数据库中进行同源性比对,确定 SYF-011 菌株分类地位^[13]。

1.2.2 SYF-011 菌株在含钾长石培养基上生长情况观察

1.2.2.1 菌种种子液制备 在 100 mL PDA 培养液中接入 1 环纯化 SYF-011 菌种,28 ℃ 120 r/min 振荡培养 1 d,制成菌种种子液。

1.2.2.2 SYF-011 菌株在含钾长石培养基上生长情况观察

在不含钾的 PDA 平板培养基上撒入 1 g 灭菌后的钾长石矿粉,将 2 mL 菌种种子液涂布在平板表面,28 ℃ 条件下培养,以不添加钾长石矿粉为对照,定期观察平板上菌落的生长情况;同时在 100 mL PDA 培养液中加入 1 g 钾长石矿粉,灭菌后接种 10 mL 菌株种子液,于 28 ℃ 120 r/min 振荡培养,以不添加钾长石矿粉为对照,定期观察培养瓶中菌丝生长情况。

1.2.2.3 SYF-011 菌株生物量的测定 按“1.2.2.2”节的方法进行液体培养,每隔 24 h 取 3 个培养瓶中的菌丝球与培养液混合物,先用分液漏斗分离菌丝球和培养液,用去离子水冲洗 2 次,将所得菌丝球抽滤除去水分,置 50 ℃ 烘箱中干燥,电子分析天平分别称重,取平均值计算生物量。以不加钾长石矿粉培养作对照,每组设 21 个培养瓶,共测定 7 次。

1.2.3 SYF-011 菌株对钾长石矿粉作用观察 在不同时期用吸管从“1.2.2.2”节试验组培养瓶下部取 1 滴培养液置于扫描电镜样品支撑铜网上,自然晾干后电镜观察 SYF-011 菌丝对钾长石矿粉颗粒的作用(电镜观察及图像拍摄由九江学院电镜室完成)。

1.2.4 发酵液中可溶性钾含量的测定 按“1.2.2.2”节的方法进行液体培养,在 100 mL PDA 培养液中加入 1 g 钾长石矿粉,灭菌后接入 10 mL SYF-011 菌种种子液,28 ℃ 120 r/min 振荡培养,20 d 后将培养液过滤,用去离子水定容至 100 mL,取 5 mL 培养液用四苯硼酸钾重量法^[14]测定培养

收稿日期:2013-06-13

基金项目:国家自然科学基金(编号:51264014);江西省自然科学基金(编号:20114BAB204022)。

作者简介:詹寿发(1964—),男,江西九江人,硕士,副教授,主要从事真菌资源与利用研究工作。E-mail:zhan9630@126.com。

通信作者:陈 晔,硕士,教授,主要从事真菌研究工作。E-mail:chenyejtc@126.com。

液中可溶性钾的含量,以加入 10 mL 灭活的菌株种子液(与培养基一起灭菌)作对照,每组设 6 个重复。按下式计算试验组培养液中可溶性钾的含量(高出对照组),以 K_2O (mg/mL) 为单位:

$$\text{可溶性钾含量 (mg/mL)} = \frac{(m_2 - m_1) \times 0.1314}{5/100} \times$$

1 000/100。

式中: m_1 为试验所得沉淀的质量(g); m_2 为对照所得沉淀的质量(g); 0.1314 为四苯硼酸钾转换为氧化钾的转换系数。

1.3 数据处理与分析

采用 SPSS 13.0 软件对试验数据进行统计分析, Excel 2003 工作表制作图表。

2 结果与分析

2.1 SYF-011 菌株的鉴定

2.1.1 SYF-011 菌株形态学鉴定 SYF-011 菌株菌落特征、分生孢子梗、分生孢子形态观察见图 1。

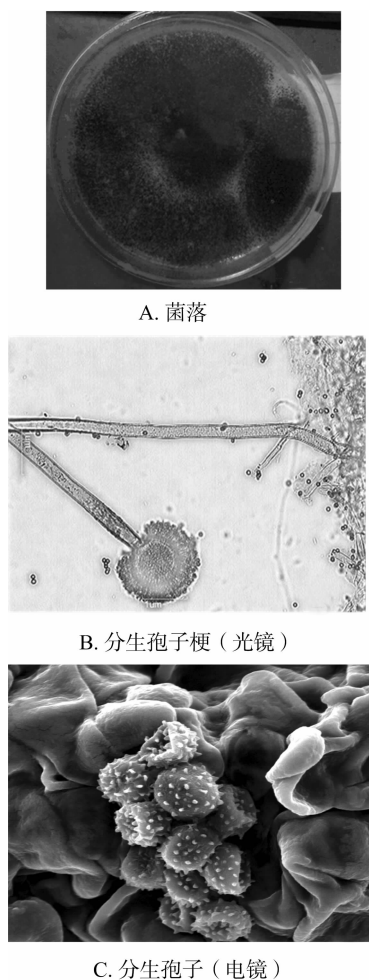


图1 SYF-011菌株形态特征观察

由图 1 可见,该菌株菌丝发达,分生孢子梗顶囊大球形,小梗双层,孢子黑褐色。扫描电镜观察,分生孢子为球形,表面粗糙有棘刺,符合曲霉属棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)的形态特征。

2.1.2 SYF-011 菌株分子生物学鉴定 SYF-011 菌株 18S rDNA ITS 序列测定结果显示,该序列含 574 bp。通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行同源性比较,该菌株 ITS 序列与曲霉属(*Aspergillus*)的 *Aspergillus aculeatus* A3S1-40 菌株(登录号:JX501394.1) ITS 序列同源性达到 100%。确定该菌株属于曲霉属棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)。

2.2 SYF-011 菌株在含钾长石培养基上生长情况观察

2.2.1 SYF-011 菌株在含钾长石培养基上生长情况 由图 2 可见,SYF-011 菌株在含钾长石矿粉的平板培养基上长势明显好于对照组,产孢速度快,孢子量大,而对照组产孢稀少。在液体培养条件下,试验组培养瓶中菌丝生物量多,且形成了大量菌丝球,对照组菌丝生物量明显低于试验组(图 3)。说明该菌株在含钾长石矿粉的培养基中生长情况明显好于不含钾长石矿粉的培养基。显微观察显示,试验组菌丝球中包裹许多棕褐色的矿粉颗粒,说明该菌株菌丝能有效吸附钾长石矿粉颗粒,形成真菌-矿物聚集体,从不溶性的含钾矿物中获得生长所需的钾素(图 4)。

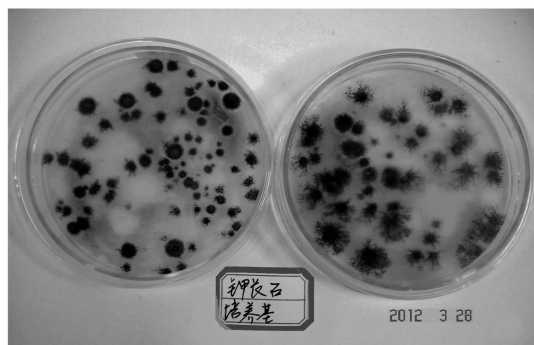
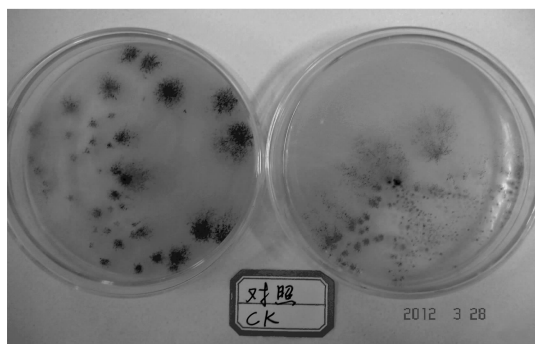
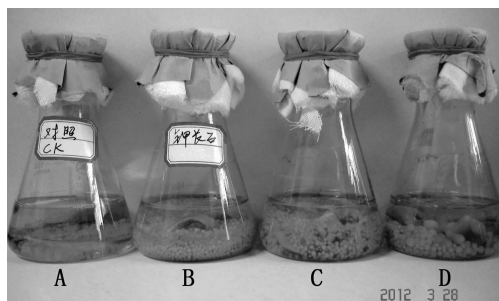
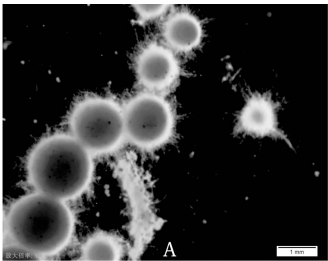


图2 不同平板培养基上生长的菌落

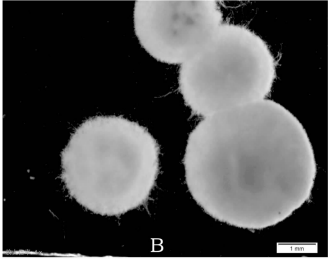


A—未添加钾长石矿粉培养(对照);
B、C、D—添加钾长石矿粉培养

图3 不同液体培养基上菌丝生长情况



A. 包裹钾长石颗粒的菌丝球(1.6×)

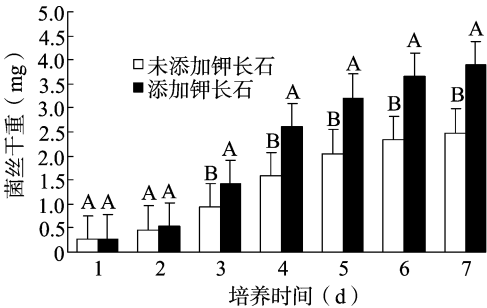


B. 未包裹钾长石颗粒菌丝球(对照)(2.6×)

图4 菌丝球显微观察结果

2.2.2 SYF-011 菌株在含钾长石培养基上生长量的测定

SYF-011 菌株在不同培养基上生物量变化情况见图 5。从图 5 可以看出,培养初期,添加钾长石矿粉的培养瓶中菌丝的生长速度与对照非常接近;随着培养时间的延长,添加钾长石矿粉的培养瓶中菌丝生物量迅速上升;培养 5 d 后,生物量的增加速度明显变缓。对照组菌丝生长趋势虽然与试验组相似,但总生物量明显低于试验组,在培养 3 d 后,两者的差异达到极显著水平 ($P < 0.01$),进一步看出培养液中添加钾长



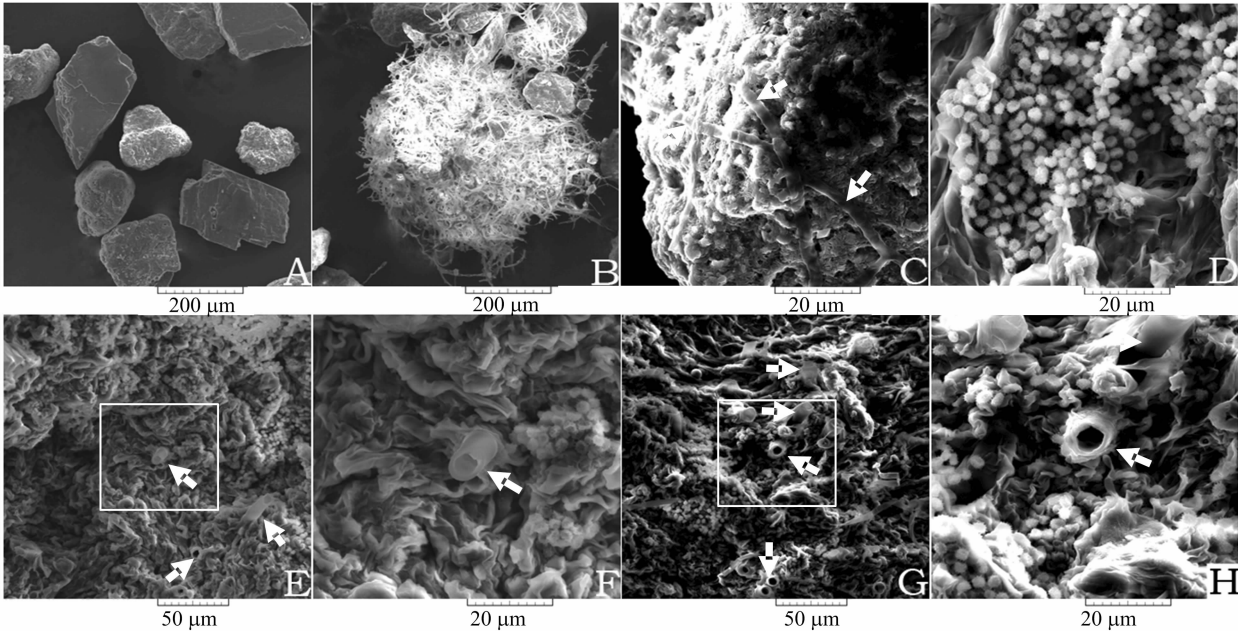
不同字母表示相同时间不同处理间差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)

图5 SYF-011 菌株培养 7 d 生物量变化

石对 SYF-011 菌株的生长具有较大的促进作用。

2.3 SYF-011 菌株对钾长石矿粉作用观察

经 SYF-011 菌丝作用后的矿物扫描电镜观察结果见图 6。由图 6 可以看出,SYF-011 菌株的分生孢子和菌丝能有效吸附钾长石矿物,并逐渐包裹矿粉颗粒,形成真菌-矿物聚集体(图 6-B、C、D)。受 SYF-011 菌丝作用后,矿粉颗粒在大小与形状上与未被菌丝作用的矿物(图 6-A)相比呈现出明显的变化,原始矿样棱角分明,表面平整光滑,而经过 SYF-011 作用后的矿样,矿粉颗粒边缘棱角逐渐消失,由原来的不规则多角形变为不规则椭圆形,表面凹凸不平,显示出菌体对矿物的溶蚀作用。电镜下可见伸入矿物颗粒内部的菌丝(图 6-E、F、G、H),显示 SYF-011 菌丝可通过某种方式伸入矿物内部,有可能通过机械作用使矿粉颗粒破碎,从而加速矿物的风化。



A—未经作用的矿物颗粒(对照);B—菌丝包裹矿物颗粒形成的菌丝-矿物聚集体;C—吸附在矿物颗粒表面的菌丝(→所示);D—吸附在矿物颗粒表面的分生孢子;E、F、G、H—经真菌作用后的矿物颗粒表面(→表示伸入矿物内部的菌丝)

图6 SYF-011 菌株对钾长石的作用

2.4 培养液中可溶性钾含量的测定

采用四苯硼钾重量法,测定培养 30 d 后培养液中可溶

性钾的含量,以加入 10 mL 灭活的 SYF-011 菌种种子液为对照,测定结果见表 1。从表 1 可以看出,接种 SYF-011 活

表 1 SYF-011 菌株培养液中可溶性钾含量的测定

处理	沉淀质量(g)						培养液中可溶性钾 净增量(mg/mL)
	1	2	3	4	5	6	平均值
试验组(W_1)	0.345 2	0.351 4	0.343 1	0.344 8	0.345 7	0.350 6	0.346 8a
对照组(W_2)	0.339 2	0.344 3	0.341 4	0.342 0	0.338 6	0.342 3	0.341 3b

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

菌株的培养瓶中可溶性钾的含量明显高于对照,证明 SYF-011 菌株能将钾长石中的不溶性钾溶出。经测定,通过 SYF-011 菌株解钾作用产生的可溶性钾素除被菌体本身生长利用外,培养液中可溶性钾(K_2O)的剩余量仍高达 0.143 4 mg/mL,显示 SYF-011 菌株对钾长石中不溶性钾具有较好的浸出效果。

3 结论与讨论

利用微生物转化矿物获得植物生长所需的矿质元素的研究倍受人们关注。利用微生物转化矿物不仅能满足微生物本身的生长需要,同时也能为植物的生长提供所需的矿质元素。植物根际真菌和内生真菌具有丰富的多样性,从植物根际真菌和内生真菌中筛选出具有解钾、溶磷活性的菌株,将其应用于农林业生产,对解决土壤缺磷、缺钾问题具有重要的价值。本试验从山药内生真菌中获得 1 株对钾长石具有解钾活性的菌株,经形态学和分子生物学方法鉴定,该菌株属于曲霉属棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)。显微镜及电镜观察显示,该菌株对钾长石具有较好的亲和性,其菌丝体及分生孢子能有效吸附并与钾长石矿物形成真菌-矿物聚集体。化学测定结果表明该菌株能将钾长石中不溶性钾溶出,表现出较好的解钾活性。

目前微生物对矿物风化作用的机理尚未形成定论,有研究表明,微生物促进矿物的风化机制主要是通过微生物新陈代谢产物和分泌的化学物质腐蚀岩石,这些化学物质可能是无机酸,也可能是各种有机酸及其他有机化合物^[15]。胡婕等通过测定黑曲霉(*Aspergillus niger*)对含钾矿粉的解钾量、黑曲霉作用含钾矿粉后的代谢产物(多糖、蛋白质、小分子分泌物)以及微环境中的 pH 值等,比较静置培养和振荡培养条件下黑曲霉对含钾矿粉的作用效果,并分析振荡培养下黑曲霉对含钾矿粉的风化作用机理,结果表明黑曲霉与矿物形成的真菌-矿物聚集体、黑曲霉菌丝生长及其形成的代谢产物、酸性微环境在含钾矿粉转化过程中发挥重要作用^[11]。也有研究认为,真菌除了可以分泌各种代谢物(有机酸、铁载体等)对矿物产生酸解和络解作用外,还可以通过菌丝体的机械作用破坏矿物结构。连宾等认为,微生物对矿物表面的风化作用首先发生在其表面最脆弱的部位,并逐渐向纵深推进^[16]。Jongmans 等报道,某些“食岩真菌”(rock-eating fungi)的菌丝能够以顶端伸长的方式钻进矿物颗粒内部,通过机械作用使矿物破碎,从而加速矿物的风化与解体^[17]。本研究观察到大量侵入矿物内部的 SYF-011 真菌菌丝,为上述学者的观点提供了有力支持。微生物转化矿物的过程和影响因素多而复杂,目前学界倾向于微生物转化矿物是多种因素综合作用的结果,其确切机理还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1]周俊,朱江. 钾资源的地球化学背景及其开发利用[J]. 矿产综合利用,1999(4):36.
- [2]吴凡,刘训理,张楠,等. 桑树根际硅酸盐细菌的分离鉴定及解钾能力测定[J]. 蚕业科学,2010,36(2):323-329.
- [3]Zhou X Y, Li H, Lian B. Effect of exo-polysaccharides produced by *Bacillus uclaginosis* during the process of fertilizer mineral degradation and transformation[J]. Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry, 2010, 29(1):63-66.
- [4]Du Y, Zhou X Y, Lian B. The extracellular secretion of *Bacillus mucilaginosus* and its capability of releasing potassium from potassium bearing minerals[J]. Earth Science Frontiers, 2008, 15(6):107-111.
- [5]赵飞,盛下放,黄智,等. 山东地区钾矿物分解细菌的分离及生物学特性[J]. 生物多样性,2008,16(6):593-600.
- [6]Wallandor H, Tonie W. Biotite and micorcline as Potassium sources in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedling[J]. Mycorrhiza, 1999, 9(1):25-32.
- [7]Yuan L, Huang J G, Li X L, et al. Biological mobilization of potassium from clay minerals by ectomycorrhizal fungi and eucalypt seedling Roots[J]. Plant and Soil, 2004, 262(1-2):351-361.
- [8]Glowa K R, Arocena J M, Massicotte H B. Extraction of potassium and/or magnesium from selected soil minerals by *Piloderma*[J]. Geomicrobiology Journal, 2003, 20(2):99-112.
- [9]Brehma U, Gorbushina A, Mottershead D. The role of microorganisms and biofilms in the breakdown and dissolution of quartz and glass[J]. Palaeoecology, 2005, 219(1-2):117-129.
- [10]Lian B, Wang B, Pan M, et al. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 2008, 72(1):87-98.
- [11]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[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2011, 30(3):277-285.
- [12]魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科技出版社, 1979.
- [13]汪涯,颜日明,曾庆桂,等. 一株产石杉碱甲的蛇舌石杉内生真菌的分离和鉴定[J]. 菌物学报, 2011, 30(2):255-262.
- [14]赵春杰. 用四苯硼酸钾重量法测定化肥中钾含量[J]. 中国质量技术监督, 2008(4):64-65.
- [15]Baker W W, Welch S A, Chu S, et al. Experiment observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering[J]. American Mineralogist, 1998, 83:1551-1563.
- [16]连宾,陈骏,傅秋萍,等. 微生物影响硅酸盐矿物风化作用的模拟试验[J]. 高校地质学报, 2005, 11(2):181-186.
- [17]Jongmans A G, van Breemen N, Finlay R D, et al. Rocking-eating fungi[J]. Nature, 1997, 389:682-683.