

一株分解硅酸盐矿物芽孢杆菌的筛选及其生物学特性研究^①

仇刚, 何琳燕, 陈亮, 赵飞, 黄智, 盛下放*

(农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

Isolation and Characterization of Silicate Mineral-Solubilizing Bacillus from Surfaces of Weathered Feldspar

QIU Gang, HE Lin-yan, CHEN Liang, ZHAO Fei, HUANG Zhi, SHENG Xia-fang

(MOA Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, College of Life Science,

Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

摘要: 从风化的钾长石矿物表面分离筛选到一株高效分解硅酸盐矿物的细菌菌株Q14, 通过菌株的生理生化特征并结合菌株 16S rDNA序列分析, 菌株Q14 被鉴定为凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)。同时对菌株Q14 分解硅酸盐矿物 (钾长石和黑云母) 的效应及其机制、生物学特性等进行了研究。结果表明, 菌株Q14 能高效分解钾长石和黑云母, 28℃ 振荡培养 4 天, 接活菌处理的溶液中有效硅含量比接死菌对照处理增加了 114% ~ 210%。在液体培养中, 菌株Q14 能够在含钾长石和黑云母的低钾培养基中良好生长和代谢, 钾长石和黑云母的溶解可能与菌株产生的有机酸有关, 在黑云母的溶解中葡萄糖酸可能起了重要作用, 而在钾长石的溶解中, 葡萄糖酸和乙酸可能起了重要作用。菌株Q14 对酸碱有一定的耐受性, 对高浓度盐和温度有一定的抗性。

关键词: 凝结芽孢杆菌; 硅酸盐矿物; 释硅; 有机酸; 生物学特性

中图分类号: Q93; S1

钾长石和云母是土壤中矿质营养的重要来源^[1]。人们已在多种植物中观察到硅 (Si) 素营养在促进植物生长发育、提高作物产量, 提高植物对病虫害的抗性等方面的重要作用^[2-3]。地壳中的 Si 大部分为非有效态, 不能被植物直接吸收利用, 必须经过长期的风化作用转变为有效 Si 才能被植物吸收利用。微生物-矿物的相互作用是地球上广泛发生的一种地质作用, 微生物作用下硅酸盐矿物的风化作用是表生环境中普遍存在的地球化学过程^[3]。研究表明, 细菌可以通过产生的低分子量有机酸、高分子量胞外多聚物以及铁载体等破坏矿物的晶格结构, 释放出其中的钾 (K) 和 Si 等元素^[4-6]。微生物可以通过不同的机制影响土壤矿物的溶解, 在元素循环和土壤肥力等方面发挥着十分重要的作用^[3,7]。虽然细菌分解硅酸盐矿物及其机制的

研究已有不少报道^[8-9], 但从已风化的钾长石矿物表面分离筛选高效分解硅酸盐矿物的芽孢杆菌并研究其生物学特性、分解矿物机制等研究至今未见报道, 本研究采用高效选择性培养基, 从不同风化程度的钾长石样品中分离高效矿物分解细菌, 并阐明菌株分解硅酸盐矿物机制, 以期为提高土壤 Si 素营养提供理论依据和实验材料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株分离用的已风化钾长石样品采自南京某钾长石矿区。矿物分解试验采用未风化钾长石和黑云母 (购自河北云源矿物厂), 矿物元素组成: 钾长石: SiO₂ 635.6 g/kg, K₂O 135.4 g/kg, Al₂O₃ 183.5 g/kg,

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400006) 资助。

* 通讯作者 (xfsheng604@sohu.com)

作者简介: 仇刚 (1982—), 男, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要从事矿物微生物相互作用机制研究。E-mail: qiuq2005116052@163.com

Fe₂O₃ 17.6 g/kg, MgO 1.0 g/kg, CaO 0.4 g/kg; 黑云母: SiO₂ 399.9 g/kg, K₂O 91.2 g/kg, Al₂O₃ 189.8 g/kg, Fe₂O₃ 147.5 g/kg, MgO 136.9 g/kg, CaO 0.7 g/kg。样品 X-射线衍射分析测定表明,供试钾长石主要成分为正长石及很少量的伊利石、石英;黑云母主要成分为云母类物质。样品经粉碎、研磨和过筛,收集 100~200 目颗粒,用去离子水超声清洗后,在 1.0 mol/L 的盐酸溶液中浸泡 24 h,再用去离子水超声清洗若干次,直至溶液澄清并且 pH 达到 7.0,然后烘干备用。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株分离与纯化 采用低 K 选择性培养基按文献[10-11]分离。

1.2.2 菌株筛选 以钾长石为唯一 K 源,按照 Welch 和 Ullman^[12]以发酵液中有效 Si 含量的增加作为硅酸盐矿物溶解的标志。250 ml 三角瓶中分装低 K 选择性培养基 50 ml,加入 1.0 g 钾长石粉,用酸或碱调节,使培养基中 pH 为 7.5,121℃灭菌 30 min,接入菌悬液(6.8×10⁸ CFU/ml) 2.5 ml,对照处理接等量灭活菌液,28℃振荡(150 r/min)培养 7 天后分析培养液中有效 Si 含量,以筛选高效分解钾长石的细菌菌株。

1.2.3 高效菌株对硅酸盐矿物的溶解作用 根据以上试验结果,选取一株高效分解钾长石的细菌菌株(Q14)进行细菌分解硅酸盐矿物的动态试验。250 ml 三角瓶中分别加入低 K 液体培养基 50 ml 和钾长石、黑云母各 0.3 g,121℃灭菌 30 min,接入菌悬液 2.5 ml,对照处理接等量灭活菌液,28℃振荡培养不同时间后取样分析。每处理设 3 个重复。

1.2.4 菌株形态、生理生化特性及鉴定 按常规方法对菌株形态和生理生化特性进行分析;提取菌株的基因组 DNA 作为模板,进行 16S rDNA 基因扩增。扩增引物为:正向引物:5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3',反向引物:5'-TACGGCTACCTTGT-TACGA CTT-3'。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小(1.5 kb 左右)后,将其TA 克隆后进行测序(由上海基天生物技术有限公司进行测序)。测序结果通过在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),与 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行相似性比较。

1.2.5 其他生物学特性 分别配制含有不同浓度 NaCl、酸碱(pH 4~11)的硅酸盐细菌培养基,用供试细菌点样,培养 3 天后观察菌落的生长情况,测定菌株耐盐性、耐酸碱性。用供试菌株在硅酸盐细菌培养基平板上点样,在不同温度(4~55℃)下培养 3 天后,观察菌株的生长情况。

1.2.6 测定方法 培养液中活菌数量采用平板计数法计数,pH值采用pH计测定,有效 Si 含量采用硅钼蓝比色法测定;发酵液高速离心(10000 r/min, 15 min),0.25 μm滤膜过滤,滤液用高效液相色谱法测定发酵液中有有机酸,测定条件:色谱柱:C₁₈ Agilent Zorbax SB-AQ (4.6 mm×250 mm),流速 0.6 ml/min,进样量 20 μl,流动相:0.02 mol/L KH₂PO₄ (pH 2.4) 和 1% 色谱甲醇,检测波长 214 nm。数据用 SPSS10.0 软件进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选

细菌广泛地分布在土壤和风化矿物的表面^[13]。以钾长石为唯一 K 源的选择性培养基分离到 26 株细菌,其中有明显溶解钾长石矿物的菌株有 19 株,高效钾矿物分解细菌占分离菌株的 73%,其中菌株 Q14 分解矿物的能力最强,接菌处理发酵液中的有效 Si (SiO₂ 9.31 mg/L) 含量比不接菌对照处理 (SiO₂ 5.62 mg/L) 增加了 66%,因此,以下试验均以菌株 Q14 为供试菌株。另外,不同风化程度的钾长石(根据扫描电镜观察的钾长石矿物表面形貌确定,未风化矿物表面光滑,已风化矿物表面粗糙不平)矿物表面可培养细菌的数量不同,高度风化的矿物表面可培养细菌的数量(1.8×10⁶~9.1×10⁶ CFU/g)是未风化矿物表面可培养细菌数量(3.0×10³ CFU/g)的 600~3000 倍。

2.2 菌株的鉴定

Q14 菌株细胞杆状,长 3.5~5 μm,宽 0.6~0.8 μm,端生芽孢,革兰氏染色阳性。菌株在硅酸盐细菌培养基上的菌落边缘整齐、凸起、圆形、白色。菌株能够很好地利用葡萄糖和淀粉,不能利用甘露醇、阿拉伯糖、麦芽糖为碳源;菌株还具有明胶水解、淀粉水解等特征,接触酶、过氧化氢酶为阳性,不产吲哚,M.R、V.P、柠檬酸盐、DNA 酶试验均为阴性,根据以上菌株形态和生理生化特征并结合 16S rDNA 序列分析,菌株 Q14 被鉴定为凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)。

2.3 菌株对酸碱、盐浓度和温度的耐受性

菌株 Q14 耐受的 pH 值范围为 4.0~11.0,最适生长 pH 值为 6.0~7.5,能耐受 5% NaCl 浓度;菌株能在 15~28℃下良好生长,菌株能在 45℃的温度下生长。

2.4 菌株对钾长石和黑云母的溶解作用

由图 1 可以看出,供试菌株 Q14 具有明显的溶解硅酸盐矿物的能力。接活菌处理的发酵液中有有效性

Si 的含量分别比接灭活菌对照处理增加了 43% ~ 138% (钾长石) 和 79% ~ 210% (黑云母)。随着培养时间的延长, 菌株 Q14 溶解矿物的能力增强, 培养 5 天后, 溶液中有效 Si 的含量逐渐减少, 可能是菌体吸附作用的影响 (图 1)。另外, 菌株 Q14 溶解黑云母的能力比溶解钾长石的能力强。培养 4 天, 菌株 Q14 通过代谢活动从钾长石和黑云母中释放的有效 Si 分别比对照处理增加了 114% 和 210% (图 1)。由表 1 可以看出, 菌株 Q14 在含钾长石和黑云母的培养基中能够良好生长, 溶液中的 pH 值由初始的 6.85 (钾长石) 和 6.91 (黑云母) 分别降到 4.93 (钾长石) 和 5.76 (黑云母), 而接灭活菌对照处理的培养液中的 pH 值没有明显变化; 随着培养时间的延长, 培养液中的细胞数量不断增加, 培养 5 天, 发酵液中的细胞数量达最大, 分别达 2.8×10^9 CFU/ml (钾长石) 和 3.6×10^9 CFU/ml (黑云母)。菌株 Q14 在含钾长石和黑云母的培养基中能够合成葡萄糖酸、乙酸和柠檬

酸。在含钾长石的培养基中, 菌株 Q14 合成的葡萄糖酸、乙酸和柠檬酸分别为 1006、601.5 和 11.5 mg/L, 在含黑云母的培养基中, 菌株 Q14 合成的葡萄糖酸、乙酸和柠檬酸分别为 1000、75.8 和 29.0 mg/L。

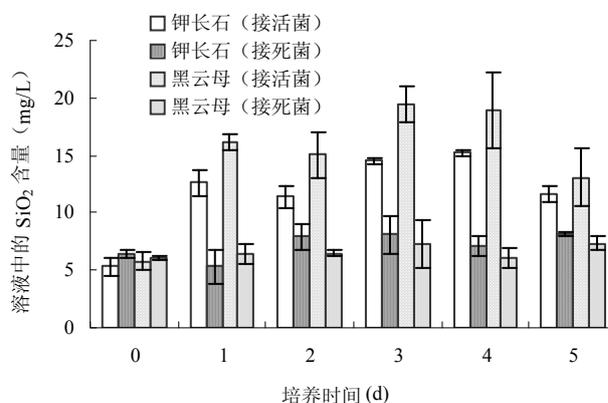


图 1 菌株 Q14 对硅酸盐矿物的溶解作用

表 1 钾长石和黑云母对菌株 Q14 细胞生长和代谢活性的影响

培养时间 (天)	细胞数量 (\log_{10} CFU/ml)		Ph			
	钾长石	黑云母	钾长石		黑云母	
			接菌	对照	接菌	对照
0	6.30 ± 0.7	6.30 ± 0.6	6.85 ± 0.04	6.80 ± 0.01	6.91 ± 0.06	6.78 ± 0.12
1	6.30 ± 0.8	6.00 ± 1.0	6.50 ± 0.05	6.65 ± 0.10	6.41 ± 0.02	6.71 ± 0.04
2	6.69 ± 1.5	6.90 ± 1.3	6.55 ± 0.03	6.67 ± 0.08	6.36 ± 0.19	6.85 ± 0.03
3	8.59 ± 1.2	8.82 ± 0.9	6.36 ± 0.03	6.74 ± 0.11	6.06 ± 0.04	6.70 ± 0.18
4	8.91 ± 1.3	8.99 ± 1.0	5.37 ± 0.04	6.67 ± 0.15	5.70 ± 0.09	6.73 ± 0.05
5	9.45 ± 0.9	9.55 ± 0.8	4.93 ± 0.04	6.69 ± 0.11	5.76 ± 0.05	6.73 ± 0.17

研究表明, 细菌可以加速硅酸盐矿物的风化从而促进矿物中 Si 的释放^[5-6,14]。我们的试验也表明, 凝结芽孢杆菌 Q14 菌株可以显著提高溶液中有效 Si 的浓度。矿物结构和化学组成会影响微生物对矿物的溶解^[12]。溶液中有效性 Si 含量的测定表明, 黑云母比钾长石更容易被菌株 Q14 分解。黑云母中的 Fe、Mg 和 Ca 等含量明显高于钾长石中的相应含量, 这些金属离子可以被菌株 Q14 合成的有机酸络合^[9,15-16]。因此, 黑云母中高含量的 Fe、Mg 和 Ca 可能加速了矿物中 Si 的释放。

有机酸可以通过降低溶液 pH 或与矿物表面的离子形成复合物来影响矿物的风化速率^[16]。土壤中的微生物能够通过分泌的有机酸络合硅酸盐矿物中的 Si 离子, 提高溶液中有效 Si 浓度^[17]。微生物参与的矿物中 Si 的溶解作用可能包括质子的交换作用和有机

酸的络合反应两个过程。葡萄糖酸可能在 Si 从黑云母中的释放中发挥着重要作用, 而葡萄糖酸和乙酸可能负责钾长石中 Si 的溶解。因此, 不同矿物的结构和化学组成可以影响凝结芽孢杆菌 Q14 菌株的生长和代谢, 从而显著提高了硅酸盐矿物中 Si 的释放活性。凝结芽孢杆菌 Q14 菌株有较强的酸碱耐受性以及高浓度盐和温度的抗性。因此, 硅酸盐矿物-微生物的相互作用及其机制的研究对于阐明硅酸盐矿物的风化速率、风化机理以及土壤中 Si 素营养的活化作用有重要的意义。

3 结论

(1) 从风化的钾长石矿物表面分离筛选到一株高效溶解钾长石和黑云母的细菌菌株 Q14, 经形态、生理生化特性分析并结合 16S rDNA 序列分析, 菌株

Q14 被鉴定为凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)。菌株 Q14 对酸碱、盐浓度和温度有较强的耐受性。

(2) 菌株 Q14 能够通过代谢活动溶解硅酸盐矿物(钾长石和黑云母)并释放出其中的 Si, 接菌处理溶液中有效 Si 含量的增加可能与菌株 Q14 代谢产生的葡萄糖酸和乙酸有关, 菌株 Q14 与硅酸盐矿物相互作用及其机制等值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Chardon ES, Livens FR, Vaughan DJ. Reactions of feldspar surfaces with aqueous solutions. *Earth-Sci. Rev.*, 2006, 78: 1-26
- [2] Ma JF. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 2004, 50: 11-18
- [3] Calvaruso C, Turpault MP, Frey-Klett P. Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: A budgeting analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72: 1258-1266
- [4] Buss HL, Lüttge A, Brantley SL. Etch pit formation on iron silicate surfaces during siderophore-promoted dissolution. *Chem. Geol.*, 2007, 240: 326-342
- [5] Sheng XF, He LY. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Can. J. Microbiol.*, 2006, 52: 66-72
- [6] Song W, Ogawa N, Oguchi CT, Hatta T, Matsukura Y. Effect of *Bacillus subtilis* on granite weathering: A laboratory experiment. *Catena*, 2007, 70: 275-281
- [7] Ehrlich HG. How microbes influence mineral growth and dissolution? *Chem. Geol.*, 1996, 132: 5-9
- [8] Vandevivere P, Welch SA, Ullman WJ, Kirchman DL. Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. *Microb. Ecol.*, 1994, 27: 241-251
- [9] 盛下放, 黄为一. 硅酸盐细菌 NBT 菌株解钾机理初探. *土壤学报*, 2002, 39(6): 863-871
- [10] 中国科学院南京土壤研究所微生物实验室编著. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985: 51-57
- [11] 何琳燕, 盛下放, 陆光祥, 黄为一. 不同土壤中硅酸盐细菌生理生化特征及其解钾活性的研究. *土壤*, 2004, 36(4): 434-437
- [12] Welch SA, Ullman WJ. The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5 °C and 35 °C. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1999, 63: 3247-3259
- [13] Hirsch P, Eckhardt FEW, Palmer Jr RJ. Methods for the study of rock-inhabiting microorganisms—A mini review. *J. Microbiol. Meth.*, 1995, 23: 143-167
- [14] 连宾, 陈骏, 傅平秋, 刘丛强, 陈焯. 微生物影响硅酸盐矿物风化作用的模拟实试验. *高校地质学报*, 2005, 11(2): 181-186
- [15] Ullman WJ, Kirchman DL, Welch SA, Vandevivere P. Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chem. Geol.*, 1996, 132: 11-17
- [16] Drever JI, Stillings LL. The role of organic acids in mineral weathering. *Colloid Surface A*, 1997, 120: 167-181
- [17] Bennett PC, Choi WJ, Rogera JR. Microbial destruction of feldspars. *Mineral Mag.*, 1998, 62A: 149-150