

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^①

谢庆东, 何琳燕, 王 琪, 盛下放*

(农业部农业环境微生物实验室, 南京农业大学生命科学院, 南京 210095)

摘要: 从风化的钾质粗面岩表面分离筛选到 1 株高效风化钾长石的芽孢杆菌 E31 菌株, 通过菌株的生理生化特征并结合菌株 16S rDNA 序列分析, E31 菌株被鉴定为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。同时对 E31 菌株溶解钾长石的效应与机制以及生物学特性进行了研究。结果表明, E31 菌株能风化钾长石并释放出其中的元素, 28℃ 振荡培养不同时间, 接菌处理发酵液中可溶性 K、Fe、Ca、Al 含量分别比对照提高了 19.6%~25.6%、1~12.5 倍、10.4%~47.2% 和 1.2~4.5 倍。在钾长石存在条件下接菌处理发酵液 pH 为 3.62~3.80, 发酵液中葡萄糖酸含量达 61~1794 mg/L, 发酵液细胞数量达 $(8.7\sim 16.1)\times 10^6$ cfu/ml, 表明菌株可以通过代谢产生的有机酸来加速对钾长石的分解作用。另外, E31 菌株能够合成生长素和铁载体, E31 菌株对温度、pH 和盐浓度具有较强的耐受性。

关键词: 钾质粗面岩; 钾长石; 苏云金芽孢杆菌; 矿物风化; 葡萄糖酸; 生物学特性

中图分类号: Q93; S1 文献标识码: A

微生物-矿物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^[1]。细菌可以通过产生的有机酸、胞外多聚物以及铁载体等不同的机制加速土壤矿物的溶解, 对于岩石风化、土壤形成以及土壤肥力的维持有重要的作用, 同时在长时间尺度上对土壤环境和大气 CO₂ 产生重要的影响^[2-6]。芽孢杆菌(*Bacillus* spp.) 是一类革兰氏染色阳性、能够产生抗逆性芽孢、好氧或兼性厌氧, 且分布广泛的一类细菌种群^[7]。芽孢杆菌的芽孢对高温、干燥、强电离辐射、紫外线、各种有害物质都有很强的抗性, 良好的抗逆性使得它在各种恶劣的环境下可以正常地生长繁殖^[8]。芽孢杆菌在矿物的生物风化和元素的释放等方面的研究已受到人们的重视。Song 等^[9]发现 *Bacillus subtilis* 能够显著增强矿物风化的速率; Basak 和 Biswas^[10]的研究表明, 冻样芽孢杆菌能够风化云母并能够活化淋溶土中的 K 元素; 黄智等^[11]在摇瓶条件下研究了 *Bacillus altitudinis* 溶解钾长石的效应, 发现菌株能明显降低发酵液的 pH 并释放矿物中的 Fe、Si、Al、K 等元素。虽然芽孢杆菌分解矿物及其机制的研究已有报道, 但从风化的钾质粗面岩表面分离筛选高效风化钾长石的芽孢杆菌并研究其对钾长

石的溶解效能与机制等至今未见报道。本研究采用选择性培养基, 从钾质粗面岩表面分离筛选到一株高效分解钾长石的苏云金芽孢杆菌, 并探明该菌株溶解钾长石的效能、机制及其生物学特性, 丰富矿物风化芽孢杆菌资源库, 同时为研发高效微生物肥料、提高土壤矿质营养提供理论依据和菌种资源。

1 材料与方法

1.1 钾长石和培养基

钾长石(购自烟台市华威矿业有限公司)元素组成: SiO₂ 63.6%, K₂O 13.5%, Al₂O₃ 18.4%, Fe₂O₃ 1.7%, MgO 0.1%, CaO 0.04%。矿物样品处理参照文献^[12]。矿物样品研磨、过 100~300 目筛, 去离子水超声波清洗、盐酸溶液浸泡、去离子水超声清洗若干次, 烘干备用。

BHm 培养基: 150 mg MgSO₄·7H₂O, 80 mg NaH₂PO₄, 90 mg Na₂HPO₄, 65 mg (NH₄)₂SO₄, 20 mg CaCl₂, 2 g 葡萄糖, 1 L 蒸馏水, 调节 pH 至 7.0; LB 培养基: 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母粉, 10 g 氯化钠, 1 L 蒸馏水, 调节 pH 至 7.0; 有氮改良培养基: 10 g 蔗糖, 2 g K₂HPO₄, 1 g (NH₄)₂SO₄, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.1 g NaCl, 1 L 蒸馏水, 调节 pH 至 7.0。

基金项目: 国家自然科学基金项目(41473075)资助。

* 通讯作者(xfsheng@njau.edu.cn)

作者简介: 谢庆东(1990—), 男, 山西晋城人, 硕士研究生, 主要从事硅酸盐矿物-细菌相互作用研究。E-mail: 2013116076@njau.edu.cn

1.2 芽孢杆菌分离、纯化与筛选

采用 LB 培养基按文献[12]分离。已风化钾质粗面岩样品采自南京小龙山钾矿区(118°45'E, 31°47'N)。岩石样品 10 g 加入 90 ml 无菌水中,充分振荡(10 min)以制备成菌悬液,菌悬液置于 80 水浴锅中水浴 15 min 以杀死非芽孢杆菌,采用稀释涂布的方法分离岩石样品中的芽孢杆菌,平板在 30 培养 3 天后挑取单菌落并进行菌种划线纯化。

采用贫营养的 BHm 培养基,以发酵液中有效 Al 含量的增加作为钾长石溶解的标志。100 ml 塑料三角瓶中分装 BHm 培养基 30 ml,加入 0.15 g 钾长石粉,调节培养基 pH 为 7.0,115 灭菌 30 min,将供试菌株分别接种于 2 ml LB 培养基中培养 12 ~ 16 h,离心(8 000 r/min, 5 min)收集菌体后,用无菌水洗涤 2 次后重悬于无菌水中,调整其 OD₆₀₀ 为 0.8 左右(10⁸ cfu/ml),接种于每一只塑料瓶中,对照接等量灭活菌液,28 振荡(150 r/min)培养 7 天后分析发酵液中有效 Al 含量,以筛选高效分解钾长石的芽孢杆菌菌株。发酵液中有效 Al 含量的测定:将发酵液 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液用电感耦合等离子发射光谱仪(ICP-OES)测定溶液中 Al 的含量。

1.3 高效菌株对钾长石的溶解作用

高效菌株对钾长石的溶解试验同 1.2。摇瓶培养时间分别为 0、1、2、3、5、7 和 15 d,在不同培养时间取样分析发酵液 pH,细胞数量,有机酸以及其中有效态 Fe、Al、K、Ca 等元素的含量。发酵液 pH 采用 pH 计测定,细胞数量采用平板计数,发酵液高速离心(10 000 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机酸,测定条件:色谱柱:C18 Agilent ZorbaxSB-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;发酵液有效态 Fe、Al、K、Ca 等元素的含量采用 ICP-OES 测定。

1.4 高效矿物风化芽孢杆菌形态、生理生化特性与鉴定

按常规方法对菌株形态和生理生化特性进行分析。将菌株接种于灭菌的 2 ml LB 液体培养基,30℃、180 r/min 振荡培养 12 h。取 1.5 ml 纯培养物 6 000 g 离心 5 min,细菌基因组总 DNA 的提取采用 CTAB 法^[13]。菌株 16S rDNA 扩增采用细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'),扩增片段长度为 1.5 kb。反应体系为 25 μl,包括 12.5 μl 2×Taq

Master Mix, 0.5 μl 浓度为 10 μmol/L 的引物,1 μl DNA 模板,10.5 μl ddH₂O;PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 45 s,56℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1.5 min,30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用经 EB 染色的 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。将获得的序列用 BLAST 软件与 GenBank 中已知的 16S rRNA 基因序列进行比对分析,鉴定菌株。

1.5 菌株产吲哚乙酸(IAA)和铁载体能力测定

菌株产 IAA 能力测定采用王璐等^[14]方法。将供试菌株接入有氮培养基中振荡培养,发酵液离心,取上清液,加正磷酸和 Sackowski's 显色剂,混匀,黑暗下显色,测定 530 nm 波长处吸光值。以 IAA 标准液作标准曲线,计算发酵液中 IAA 的浓度^[15]。

菌株产铁载体能力测定参照王璐等^[14]方法。将供试菌株接入有氮液体培养基,振荡培养,发酵液离心,取上清液加入 CAS 检测液,混匀,以去离子水作对照,测定 630 nm 波长处的吸光值;取未接菌的 LB 液体培养基与 CAS 检测液混匀,同法测定为参比值^[16-17]。

1.6 温度、初始 pH 和盐浓度对芽孢杆菌生长的影响

温度、初始 pH 和盐浓度对芽孢杆菌生长的影响采用王璐等^[14]方法进行分析。将供试菌株点接于 LB 固体平板,分别在 4℃、15℃、30℃、45℃和 55℃的温度下培养 72 h,观察其能否生长及生长情况;用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 将 LB 培养基的 pH 调节至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0。将活化的供试菌株分别点接于上述不同 pH 的培养基中,28℃ 培养 72 h,观察其能否生长及生长情况;按质量百分比浓度分别配制 NaCl 浓度为 0.1%、0.5%、1.0%、5.0%、10%、20% 和 30% 的 LB 培养基,将供试菌株分别点接于上述培养基上,30℃ 培养 72 h,观察其能否生长。

1.7 数据处理

所有试验数据均采用 Microsoft Office Excel 2007 处理,采用 SPSS 19.0 对数据进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 芽孢杆菌的分离筛选

细菌广泛分布在岩石(矿物)表面和土壤中^[12, 18]。采用热处理和添加钾长石的贫营养培养基(BHm 培养基)筛选到 18 株能够从钾长石中释放 Al 的芽孢杆菌,其中菌株 E31 风化钾长石的能力最强,接菌处理发酵液中的有效 Al(0.53 mg/L)含量比对照(0.09 mg/L)

增加了 4.9 倍,因此,以下试验均以菌株 E31 为供试菌株。另外,供试钾质粗面岩表面可培养细菌数量达 2.86×10^6 cfu/g,芽孢杆菌数量达 3.24×10^5 cfu/g,芽孢杆菌数量占总细菌数量的 11.3%。

2.2 E31 菌株对钾长石的溶解作用及其机制

研究表明,细菌可以通过产生的有机酸、铁载体、多糖以及氧化还原作用加速矿物的风化并释放其中的元素^[5, 9, 12, 19]。由图 1 可以看出,芽孢杆菌 E31 菌株具有显著的溶解钾长石的能力。接菌处理的发酵液中有效 K、Ca、Fe、Al 的含量分别比对照增加了 19.6%~25.6%、10.4%~47.2%、1~12.5 倍和 1.2~4.5 倍(图 1)。随着培养时间的延长,菌株 E31 溶解钾长石的能力增强,而对照处理发酵液中的 K、Ca、Fe、Al 含量没有显著变化。菌株 E31 在含钾长石的贫营养培养基中能够正常生长,培养 1 d 后发酵液中活细胞数量由初始的 1.4×10^6 cfu/ml 增

加到 1.5×10^7 cfu/ml,培养时间在 1~7 d 内发酵液中活细胞数量没有显著变化,培养 7 d 后发酵液中的活细胞数量显著下降(图 2A)。另外,菌株 E31 在风化钾长石的过程中可以通过产酸来降低发酵液中的 pH,培养 1 d 后,接菌处理的发酵液 pH 为 3.66~3.80,而对照处理发酵液中的 pH 在培养过程中没有显著变化(图 2B)。菌株 E31 在含钾长石的贫营养培养基中能够大量合成葡萄糖酸,培养 1 d 后发酵液中葡萄糖酸含量最高(1 794 mg/L),随着培养时间的延长,发酵液中葡萄糖酸含量快速下降,培养后期发酵液中葡萄糖酸含量为 61~66 mg/L(图 3)。由此可见,菌株 E31 能够在贫营养条件下通过细胞生长和代谢活动来降低发酵液中的 pH,并通过发酵液的酸化作用和合成的葡萄糖酸的络合作用来溶解钾长石并释放出其中的元素,增加发酵液中可溶性 K、Ca、Fe、Al 含量^[5, 12]。

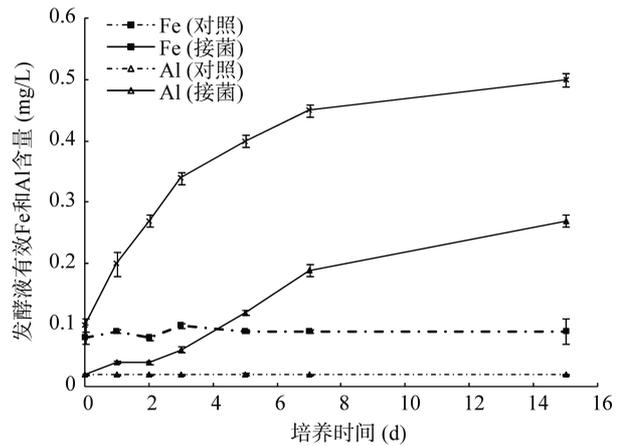
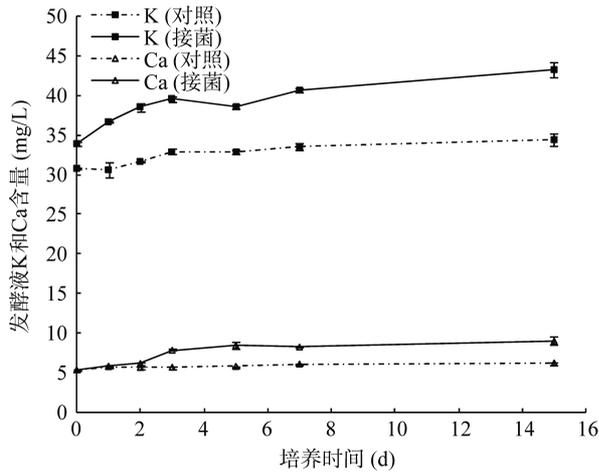


图 1 E31 菌株对 K、Ca、Fe 和 Al 的溶解作用

Fig. 1 K, Ca, Fe, and Al releases from feldspar in presence of strain E31

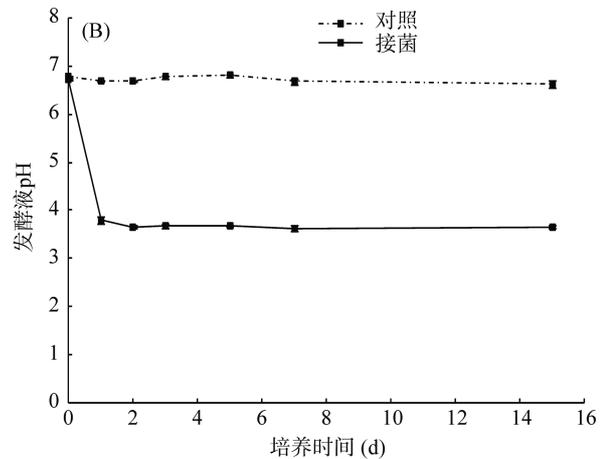
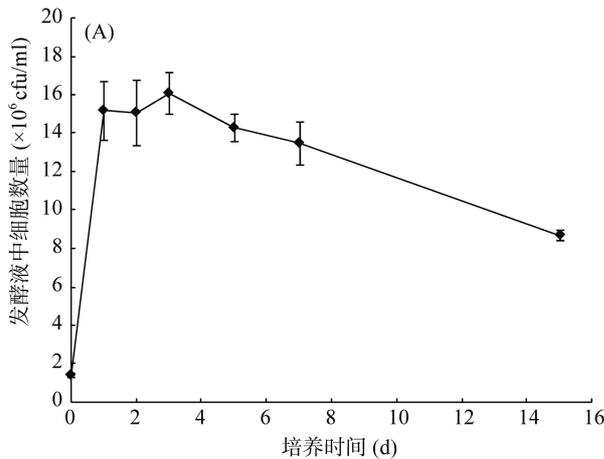


图 2 发酵液细胞数量(A)和 pH (B)的变化

Fig. 2 Change of cell numbers and pH in culture medium in presence of strain E31

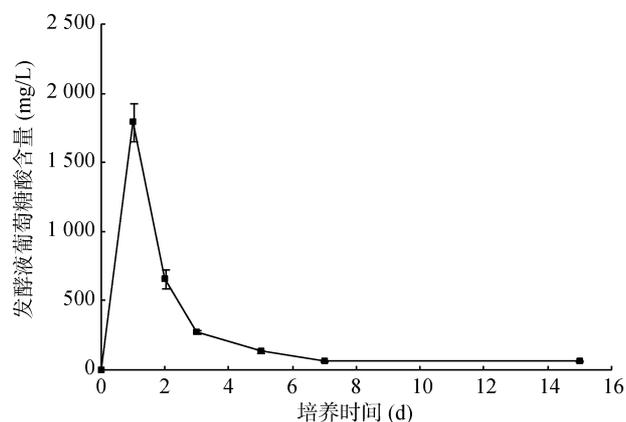


图 3 芽孢杆菌 E31 菌株合成的葡萄糖酸

Fig. 3 Production of gluconic acid by strain E31 during feldspar weathering process

2.3 菌株 E31 的鉴定

菌株 E31 的鉴定主要依据 16S rRNA 序列并结合菌株基本特征进行。菌株 E31 的基本特征：革兰氏阳性、好氧、杆状、菌体大小为(1.5 ~ 2.0) $\mu\text{m} \times$ (3.0 ~ 3.5) μm ，能产生芽孢。在 LB 培养基上菌落为白色、圆形、边缘不规则、厚实且较湿润、易挑取。将 E31 菌株 16S rRNA 序列在数据库中进行相似性比对，采用 MEGA 5.0 软件经邻接法(Neighbor-joining)构建系统发育树(图 4)。由系统发育树可以看出，菌株 E31 与 *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792^T (ACNF01000156) 的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%。因此，E31 菌株被鉴定为 *Bacillus thuringiensis*。

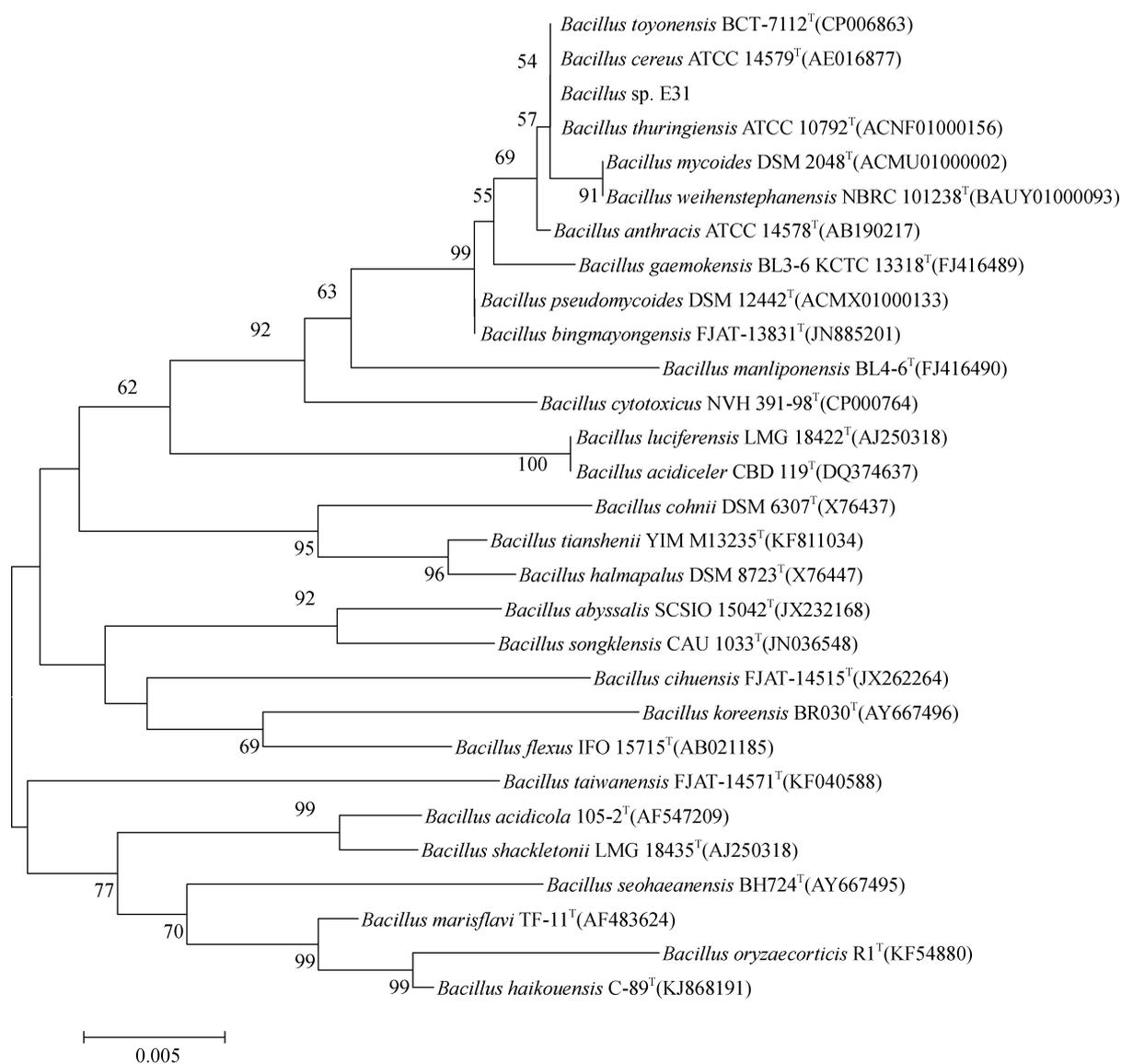


图 4 基于 16S rDNA 序列系统发育树(邻接法)

Fig. 4 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences

2.4 苏云金芽孢杆菌 E31 菌株产生长素和铁载体能力

菌株 E31 具有产 IAA 的能力,产量为 30.8 mg/L。铁载体是一类特异性螯合剂,是微生物在限铁条件下(即铁离子浓度较低时)产生并分泌的一种低分子量(<1 000 Da)、能够螯合 Fe(III) 离子的化合物。本试验采用 CAS 通用检测法检测供试菌株产铁载体的能力^[16-17]。根据 A/Ar 比值(即菌株测定值/对照值)对细菌铁载体产量进行半定量比较, A/Ar 比值越小菌株产铁载体能力越强^[15-16]。菌株 E31 的 A/Ar 比值为 0.45(在 0.4~0.6 范围内),产铁载体能力中等。

2.5 苏云金芽孢杆菌 E31 菌株对环境的适应能力

苏云金芽孢杆菌 E31 菌株对不同的温度、pH 和盐浓度等表现出一定的耐受性。菌株 E31 为中温菌,在 15~37℃ 下能较好生长,最适生长温度为 30℃ 左右;菌株 E31 生长的 pH 范围是 3~10,最适生长 pH 7.0;菌株 E31 在 0.5%~20% 的 NaCl 中良好生长,最适生长盐浓度为 1.0% NaCl,值得注意的是,菌株 E31 耐高渗能力较强,在 20% NaCl 中能够正常生长。

3 结论

1) 从风化的钾质粗面岩表面分离筛选到一株高效风化钾长石的苏云金芽孢杆菌 E31 菌株。

2) 研究表明,苏云金芽孢杆菌 E31 菌株能够显著促进钾长石的溶解并释放出其中的 Fe、K、Al、Ca 等元素,E31 菌株主要通过培养基的酸化和合成的葡萄糖酸加速钾长石的风化。

3) E31 菌株能够合成植物促生物质生长素和铁载体,同时对温度、酸碱有一定的耐受性,尤其具有较强的耐高渗能力。

参考文献:

- [1] Ehrlich H L. Geomicrobiology: Its significance for geology[J]. Earth-Science Reviews, 1998, 45: 45-60
- [2] Schulz S, Brankatschk R, Dümig A, et al. The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation[J]. Biogeosciences, 2013, 10: 3983-3996
- [3] Ahmed E, Holmström S J M. Microbe-mineral interactions: The impact of surface attachment on mineral weathering and element selectivity by microorganisms[J]. Chemical Geology, 2015, 403: 13-23
- [4] Shirokova L S, Bénézeth P, Pokrovsky O S, et al. Effect of the heterotrophic bacterium *Pseudomonas reactans* on olivine dissolution kinetics and implications for CO₂ storage in basalts[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2012, 80: 30-50
- [5] 连宾. 矿物-微生物相互作用研究进展:地质微生物专栏文章评述[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2014, 33(6): 759-763
- [6] 张亮, 袁玲, 黄建国. 共生固氮菌对土壤钾的活化作用[J]. 土壤学报, 2015, 52(2): 399-405
- [7] 杨苏声. 细菌分类学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997
- [8] Nicholson W L, Munakata N, Horneck G, et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64: 548-572
- [9] Song W, Ogawa N, Oguchi C T, et al. Effect of *Bacillus subtilis* on granite weathering: A laboratory experiment[J]. Catena, 2007, 70: 275-281
- [10] Basak B B, Biswas D R. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols[J]. Plant and Soil, 2009, 317: 235-255
- [11] 黄智, 何琳燕, 盛下放, 等. 矿物分解细菌 *Bacillus* sp. L11 对钾长石的风化作用[J]. 微生物学报, 2013, 53(11): 1172-1178
- [12] Sheng X F, Zhao F, He L Y, et al. Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus globisporus* Q12 from the surfaces of weathered feldspar[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2008, 54: 1064-1068
- [13] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acid Research, 1980, 8: 4321-4326
- [14] 王璐, 何琳燕, 盛下放. 耐铜苏丹草根内产 ACC 脱氨酶细菌的分离筛选及其生物学特性研究[J]. 土壤, 2016, 48(1): 95-101
- [15] Gordon S A, Weber R P. Colorimetric estimation of indole acetic acid[J]. Plant Physiology, 1951, 26: 192-195
- [16] Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytic Biochemistry, 1987, 160: 47-56
- [17] Manjanatha M G, Loynachan T E, Atherly A G. Tn5 mutagenesis of Chinese *Rhizobium fredii* for siderophore overproduction[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1992, 24: 151-155
- [18] Wang R R, Wang Q, He L Y, et al. Isolation and the interaction between a mineral-weathering *Rhizobium tropici* Q34 and silicate minerals[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31: 747-753
- [19] Balland C, Poszwa A, Leyval, C, et al. Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2010, 74: 5478-5493

Isolation and Identification of a Feldspar-dissolving *Bacillus* Strain and Its Biological Characteristics

XIE Qingdong, HE Linyan, WANG Qi, SHENG Xiafang*

(Key Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: One mineral-weathering *Bacillus* strain was isolated from the surface of weathered potash trachyte and was identified as *Bacillus thuringiensis* based on the physiological and biochemical traits and 16S rDNA sequence analysis. The dissolution of feldspar by strain E31 and the mechanism involved as well as the biological characteristics were characterized. The results showed that strain E31 could weather feldspar and release elements from the mineral. The concentrations of K, Fe, Ca, and Al were increased by 19.6%–25.6%, 1–12.5 times, 10.4%–47.2% and 1.2–4.5 times in the presence of strain E31 compared with the controls respectively during the mineral weathering process. pH value, gluconic acid content, and cell numbers in the culture medium were 3.62–3.80, 61–1 794 mg/L, and $(8.7–16.1) \times 10^6$ cfu/ml, respectively, in the presence of strain E31, suggesting that strain E31 could promote the mineral weathering by increasing the production of organic acids in the culture medium. Furthermore, E31 strain has the ability to produce IAA and siderophores in culture medium and also has the characteristics of acid or alkali and salt tolerance and temperature resistance.

Key words: Potash trachyte; Feldspar; *Bacillus thuringiensis*; Mineral weathering; Gluconic acid; Biological characteristics