

胶质芽孢杆菌胞外多糖 在肥料矿物分解转化中的作用

周雪莹¹, 李 辉¹, 连 宾²

1. 南京市微生物工程技术研究中心 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室 南京师范大学 生命科学学院,
南京 210046; 2. 中国科学院 地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002

摘 要: 本文探讨了胶质芽孢杆菌胞外多糖在细菌分解转化矿物过程中的作用。将事先提取的胞外粗多糖按一定浓度梯度与矿粉混合, 24 h 后再次提取多糖称重, 证实多糖与矿粉颗粒之间的吸附现象。计算结果表明, 矿粉对多糖的吸附随多糖量的增加而呈较明显的增长, 之后增幅逐渐趋于平缓。在无氮培养基中添加不同种类矿粉培养细菌, 然后分别提取粗多糖和较纯多糖, 发现矿物种类对胶质芽孢杆菌多糖的分泌有显著影响。添加含有细菌所需矿质养料的矿粉在培养液中, 胞外多糖含量相对增高, 说明细菌分泌胞外多糖受到矿物化学组成的影响, 即细菌胞外多糖的产生与它们对矿物养料的需求和矿物的风化过程有密切联系。

关 键 词: 胶质芽孢杆菌; 胞外多糖; 矿物风化

中图分类号: P593 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-2802(2010)01-0063-04

Effect of Exo-Polysaccharides Produced by *Bacillus Mucilaginosus* During the Process of Fertilizer Mineral Degradation and Transformation

ZHOU Xue-ying¹, LI Hui¹, LIAN Bin²

1. Nanjing Engineering and Technology Research Center for Microbiology; Jiangsu Key Lab for Biodiversity and Biotechnology. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China

Abstract: In this paper, we studied the function of capsular polysaccharides secreted by *Bacillus mucilaginosus* in the process of mineral decomposition. Crude capsular polysaccharides were extracted and then different concentrations of polysaccharide were mixed with mineral powder. After 24 hours, polysaccharides were extracted again and weighed. The results indicated that polysaccharides can be sorbed on the mineral, and that the sorption amount increased rapidly at first and gently in late with increasing of polysaccharide concentration. We also found that mineral powder properties had effects on polysaccharide secretion of *Bacillus mucilaginosus*, polysaccharide secretion enhanced when nutritive mineral powders were added. It may be implied that secretion of polysaccharides, chemical constitution of mineral, and weathering of mineral are closely connected.

Key words: *Bacillus mucilaginosus*; polysaccharides; mineral weathering

土壤中矿质元素的含量在很大程度上受岩石风化的影响, 许多研究结果证实了微生物在岩石的风化过程中扮演非常重要的角色^[1,2]。胶质芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*) 是目前广泛用于微生物与

矿物相互作用研究的模式菌种, 该菌细胞外有肥厚荚膜, 能够分解硅酸盐矿物和磷灰石等并释放出 K、Si、P 等元素, 直接供其自身或植物生长利用, 同时还具生物固氮功能^[3~6]。以此菌剂为主要活性成分

收稿日期: 2009-11-18, 12-14 改回

基金项目: 国家高技术研究发展项目(2008AA06Z108); 国家自然科学基金资助项目(40773069)

第一作者简介: 周雪莹(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 资源及环境微生物的研究。

通讯作者: 连宾, 研究员。E-mail: bin2368@vip.163.com.

的生物钾肥已有应用^[6~8]。胶质芽孢杆菌在代谢过程中可分泌大量的多糖等物质,这些胞外多糖不仅对细菌有一定的保护作用,还能协同其他代谢物共同破坏矿物的晶体结构,帮助细菌与矿物相互接触形成细菌-矿物复合体,从而形成相对封闭的微环境,加速矿物的风化进程^[9~10]。胶质芽孢杆菌胞外多糖的应用还涉及用作微生物絮凝剂处理污水等多个方面^[11,12]。研究微生物胞外多糖在矿物分解转化过程中的作用,对进一步探讨地球上广泛存在的微生物与矿物之间的相互作用,以及岩石、矿物的生物风化机制具有重要意义^[13]。本文主要研究胶质芽孢杆菌胞外多糖在细菌分解矿物过程中所起的作用。

1 实验部分

1.1 菌种及培养基

胶质芽孢杆菌 KO1 菌株保藏于南京师范大学生命科学院微生物实验室。实验选用的无氮培养基的组成为:蔗糖 5.0 g,Na₂HPO₄·12H₂O 5.014 g,MgSO₄·7H₂O 0.2561 g,CaCO₃ 0.1 g,FeCl₃·6H₂O 0.005 g,pH 7.0~7.2,蒸馏水 1.0 L。实验所用钾矿粉(采自河南泌阳县,K₂O 含量约为 8%)、磷矿粉(采自贵州福泉磷矿,P₂O₅ 含量约为 40%)和碳酸钙(AP,上海奉贤奉城试剂厂)均磨碎并过 200 目筛。

1.2 菌种培养及其胞外粗多糖提取

两只 1000 mL 锥形瓶分别加入 500 mL 无氮培养基,115℃ 灭菌 30 min,冷却后将胶质芽孢杆菌悬浮液按 5%接种量接入瓶中,30℃,130 r/min 摇床培养 7 d。将培养 7 d 后的无氮培养液在 80℃的水浴锅中浓缩,体积减少至原体积的一半时,8000 r/min 离心 20 min,取上清液,沉淀物加入适量蒸馏水后,重复以上步骤,离心取上清液,合并 2 次上清液后继续浓缩,直至约 100 mL 左右;此时提取的液体相当粘稠,加入 300 mL 95%乙醇,6000 r/min 离心 20 min,再分别用 95%乙醇、无水乙醇和乙醚洗涤沉淀,离心后得多糖粗品,冻干,称重备用^[14]。

1.3 细菌胞外粗多糖对矿粉的吸附

有机物多糖因具阴性基团,故与矿物颗粒之间的吸附现象十分普遍^[12]。以钾矿粉为例定量说明。取 5 只 250 mL 锥形瓶,各装 100 mL 蒸馏水和 1 g 钾矿粉,121℃ 灭菌 30 min,冷却后依次加入 0.1、0.3、0.6、1.0 和 1.5 g 经紫外线灭菌 30 min 的粗多糖(以上操作在超净工作台中进行,以避免杂菌污染),30℃,130 r/min 摇床 24 h。8000 r/min 离心 5 min,取上清液,分别冻干称重,重复 3 次取平均值。

计算粗多糖的损耗,即矿粉对其的吸附量。

1.4 胶质芽孢杆菌胞外多糖的分泌与矿物分解

3 只 250 mL 锥形瓶各装 100 mL 无氮培养基,分别加入 1 g 钾矿粉、磷矿粉和碳酸钙。121℃ 灭菌 30 min,冷却后将胶质芽孢杆菌悬浮液按 5%接种量接入瓶中,30℃,130 r/min 摇床培养 7 d。同时另做灭活菌处理作为对照。分别提取粗多糖,冻干称重。将获得的粗多糖加蒸馏水溶解,用 Sevag 试剂[氯仿(4):异戊醇(1)]进行脱蛋白处理,然后用去离子水透析约 24 h,得较纯多糖,冻干,称重。将瓶底沉淀取样处理后,SEM 观察,比较对照组矿粉和菌体作用 7 d 后的矿粉。

2 结果与讨论

2.1 胶质芽孢杆菌胞外粗多糖对矿粉的吸附情况

冻干称重得出上清液中剩余粗多糖重量,取三个重复的平均值,计算损耗量(表 1),矿物和粗多糖之间的吸附规律见图 1。

表 1 矿粉存在时粗多糖的损耗情况

Table 1 The consumption of crude polysaccharides with the presence of mineral powder g

初始多糖	0.1	0.3	0.6	1.0	1.5
剩余多糖称重	0.0782	0.221	0.4735	0.8358	1.3097
损耗量	0.0218	0.079	0.1265	0.1642	0.1903

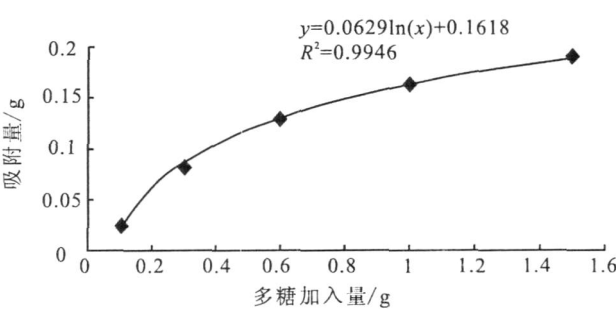


图 1 矿粉对粗多糖的吸附情况

Fig.1 Adsorption of crude polysaccharides on mineral powder

实验表明,粗多糖与矿粉间确实存在相互吸附。当增加粗多糖量时,矿粉对糖的吸附量也随之增加,增幅起初较大,但是随着粗多糖量的进一步增多,其增幅逐渐趋于平缓。胶质芽孢杆菌胞外多糖对矿粉的吸附有助于菌体粘附于矿物颗粒,并将菌体和矿物颗粒包裹起来形成较为稳定的细菌-矿物复合体,这拉近了细菌与矿物的距离,有利于细菌分解转化矿物。细菌分泌胞外多糖,既可能通过拉近菌体与矿物距离,协同酸性小分子物质破坏矿物晶格结

构等方式,起到帮助细菌分解矿物的作用,也有利于细菌接触固体颗粒并发生机械破坏作用。

2.2 胶质芽孢杆菌胞外多糖的分泌与矿物分解

将培养至 7 d 的发酵液分别进行粗多糖提取和除蛋白等处理,结果见表 2。

表 2 不同矿物存在条件下胞外多糖的分泌情况

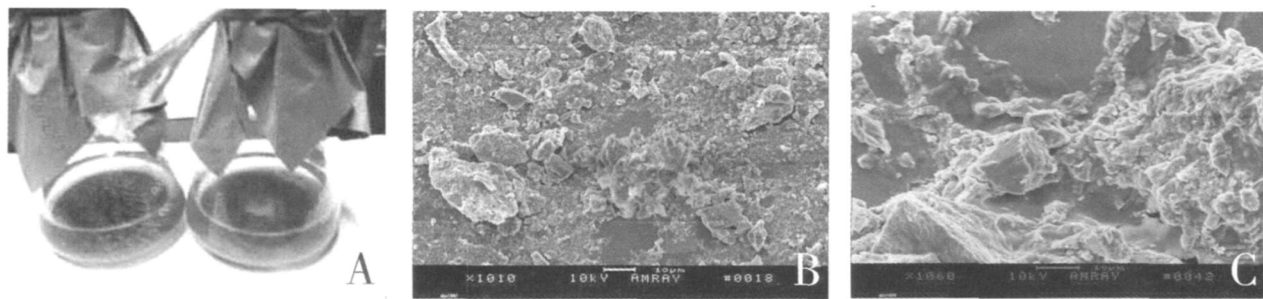
Table 2 The amount of exopolysaccharides secreted by bacterial in the presence of different kind of minerals g

	粗多糖	较纯多糖	蛋白
钾矿粉组	0.0943	0.0659	0.0284
磷矿粉组	0.1382	0.1014	0.0368
碳酸钙组	0.0541	0.0458	0.0083

实验提取的粗多糖主要成分为多糖和一些与多糖相结合的蛋白质;实验表明,不论从粗多糖、较纯多糖还是从蛋白质分泌量来看,都是磷矿粉组 > 钾矿粉组 > 碳酸钙组。磷矿粉的化学组成主要是磷酸

钙,含钾岩石主要含 Si、Al 和 K 等的铝硅酸盐矿物,其中 P、Si 及 K 均为胶质芽孢杆菌所需矿物养料,在一定程度上可能会刺激细菌对矿物的分解并利用其中的矿物元素^[15]。因此磷矿粉组和钾矿粉组中,细菌分泌的糖类物质显著多于加碳酸钙组。铝硅酸盐矿物相对较难以被细菌风化,而 P 在细胞膜组成、细菌遗传物质合成等方面均有重要作用,细菌在生长过程中对 P 的需求更甚,所以磷矿粉组中细菌分泌的糖类物质相对最多;表明胶质芽孢杆菌分泌胞外多糖与细菌分解矿物的过程密切相关,且很可能受到细菌细胞内蛋白质表达调控机制的影响^[16]。调控的关键因子可能与矿粉中所含的细菌所需矿物营养物质(如 K、P 和 Si 等)有关。

取样观察接入灭活菌体组的磷矿粉和活菌作用后的磷矿粉,结果如图 2 所示。



A. 接入灭活菌(左)及接入活菌(右)培养基中的磷矿粉;B. SEM 观察未经细菌作用的磷矿石;C. SEM 观察细菌作用后的磷矿石

A. Phosphorite powder with degermed inoculator (left) and inoculator (right) in medium; B. SEM photograph of powder without bacteria action; C. SEM photograph of powder with bacteria action

图 2 培养基中的磷矿石颗粒

Fig. 2 Phosphorite ore particles in cultural medium

由图 2A 可见,接入灭活菌组(左侧)的矿粉未发生明显变化,散布于瓶底,而接入活菌组(右侧)的矿粉呈明显聚集状态,粘附在瓶底不易倒出。电镜观察可见,未经细菌作用的矿粉颗粒清楚、分散,棱角明显。细菌作用后的矿粉几乎完全被覆盖,颗粒呈聚集状态,界限模糊,无明显棱角,表面粘滑,出现形状不规则的小颗粒;这是胶质芽孢杆菌在生长中产生大量多糖等粘性物质,连同菌体覆盖于矿粉上,与之形成细菌-矿物复合体^[14]。这不仅帮助菌体附着于矿粉表面,还形成了相对封闭的微环境,使菌体分泌物直接接触矿物,更加有效地发挥风化作用。ICP 测定表明,经胶质芽孢杆菌作用含磷钾矿粉后的矿质元素含量,细菌作用 42 d 后,可溶性 K、Ca 和 P 的含量比最初分别增加了 40 %、91 %和 42 %^[17],这是由于细菌对矿粉的风

化作用所致。

推测细菌风化石矿物的作用方式如图 3 所示。

胶质芽孢杆菌在生长过程分泌多糖和其他代谢产物,通过胞外多糖黏附于矿物表面,并逐渐在界面形成生物膜^[13,18]。同时,多糖与细菌分泌的其他有机物质共同作用,协同促进矿物的分解和转化,使矿物离子不断释放到周围环境中。

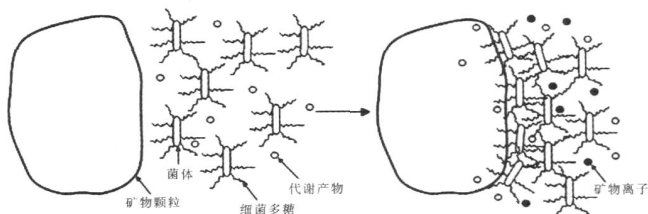


图 3 胶质芽孢杆菌与矿粉之间的相互作用

Fig. 3 The interaction between the bacterial and mineral powder

3 结 论

胶质芽孢杆菌培养过程中产生的胞外多糖,在有矿物存在的条件下可加强菌体与矿物颗粒之间的吸附,帮助菌体附着在矿物颗粒表面,拉近菌体与矿物之间的距离,为细菌分解转化矿物提供较为稳定的微环境。胶质芽孢杆菌胞外多糖的分泌与矿物种类有关,当培养环境中存在不同矿物时,细菌胞外分泌物的量亦发生显著变化。当添加的矿物中含有较多细菌所需矿质养料时,胞外多糖的分泌量显著多于其他实验组。这说明细菌分泌多糖并非只是为附着于固体颗粒而发生的应激反应,还起到帮助细菌分解转化矿物的作用。这可能与细菌的代谢调控机制密切相关。矿粉的存在诱导细菌产生新的蛋白乃至多糖,进而更有效地分解转化矿物,获取菌体所需养料。

参考文献 (References) :

- [1] 谢先德, 张刚生. 微生物 - 矿物相互作用之环境意义的研究[J]. 岩石矿物学杂志, 2001, 20 (4) :382 - 386.
Xie Xiande, Zhang Gangsheng. Environmental significance of the interaction between minerals and microbes[J]. Acta Petrologica et Mineralogica, 2001, 20 (4) :382 - 386. (in Chinese with English abstract)
- [2] 连宾, 陈骏, 傅平秋, 刘丛强, 陈烨. 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.
Lian Bin, Chen Jun, Fu Pingqiu, Liu Congqiang, Chen Ye. Weathering of silicate minerals by microorganisms in culture experiments[J]. Geological Journal of China Universities, 2005, 11(2) :181 - 186. (in Chinese with English abstract)
- [3] 姜成林, 徐丽华. 微生物资源开发利用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001:1271.
Jiang Chenglin, Xu Lihua. Microbes resources exploitation [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2001:1271. (in Chinese)
- [4] 连宾. 硅酸盐细菌 GY92 对伊利石的释钾作用[J]. 矿物学报, 1998, 18(2) :234 - 237.
Lian Bin. A study on how silicate bacteria GY92 dissolves potassium form illite [J]. Acta Mineralogica Sinica, 1998, 18 (2) :234 - 237. (in Chinese with English abstract)
- [5] Singh S, Kapoor K K. Effects of inoculation of phosphate-solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions[J]. Mycorrhiza, 1998, 7:249 - 253.
- [6] 李元芳. 硅酸盐细菌肥料的特性和应用[J]. 土壤肥料, 1994, (2) :48 - 49.
Li Yuanfang. Characteristics and application of silicate bacteria fertilizer[J]. Soils and Fertilizers. 1994, (2) :48 - 49. (in Chinese)
- [7] 盛下放, 黄为一. 硅酸盐细菌 NBT 菌株释钾条件的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(6) :673 - 677.
Sheng Xiafang, Huang Wei. Study on the condition of potassium release by strain NBT of silicate bacteria[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2002, 35 (6) :673 - 677. (in Chinese with English abstract)
- [8] 葛诚. 微生物肥料生产应用基础[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000, 81 - 84.
Ge Cheng. Microbial fertilizer production and application of basic[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000, 81 - 84. (in Chinese)
- [9] Friedrich N P, Platonova G I, Karavaiko E, Stichel F, Gombitza. Chemical and micro-biological solubilization of silicates[J]. Acta Biotechnologica, 1991, 11(3) :187 - 196.
- [10] 连宾, 傅平秋, 莫德明, 刘丛强. 硅酸盐细菌解钾机理的综合效应[J]. 矿物学报, 2002, 22(3) :179 - 183.
Lian Bin, Fu Pingqiu, Mo Deming, Liu Congqiang. A comprehensive review of the mechanism of potassium releasing by silicate bacteria[J]. Acta Mineralogica Sinica, 2002, 22(3) :179 - 183. (in Chinese with English abstract)
- [11] Lian B, Chen Y, Yuan S, Zhu L J, Liu C Q. Study on flocculability of metal ions by *Bacillus mucilaginosus* GY03 strain[J]. Chinese J. Geochem, 2004, 23 (4) :380 - 386.
- [12] Lian B, Chen Y, Zhao J, Henry T H, Zhu L J, Yuan S. Microbial flocculation by silicate bacterium *Bacillus mucilaginosus*: Applications and mechanisms[J]. Bioresource Technol., 2008, 99(11) :4825 - 4831.
- [13] Gorbushina A A. Life on the rocks[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(7) :1613 - 1631.
- [14] 连宾. 硅酸盐细菌的解钾作用研究[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1998, 106.
Lian Bin. Study on the potassium releasing from minerals by silicate bacteria[M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press, 1998, 106. (in Chinese)
- [15] 谌书. 硅酸盐细菌对磷矿石风化作用机理的探讨[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(33) :14733 - 14736.
Chen Shu. Discussion on the weathering mechanism of Silicate bacteria on phosphorite [J]. J. Anhui Agricul. Sci., 2008, 36(33) :14733 - 14736. (in Chinese with English abstract)
- [16] Chen S, Lian B, Liu C Q. Effect of *Bacillus mucilaginosus* on weathering of phosphorite and a preliminary analysis of bacterial proteins[J]. Chinese J. Geochemistry, 2008, 27 (2) :209 - 216.
- [17] 谌书, 连宾, 刘丛强. 一株胶质芽孢杆菌对磷矿石风化作用的实验研究[J]. 矿物学报, 2008, 28(1) :77 - 83.
Chen Shu, Lian Bin, Liu Congqiang. The role of a strain of *Bacillus mucilaginosus* on weathering of phosphorite rock under experimental conditions[J]. Acta Mineralogica Sinica, 2008, 28(1) :77 - 83. (in Chinese with English abstract)
- [18] Gadd G M. Geomycology: Biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation [J]. Mycological Research, 2007, 111 (1) :3 - 49.