胶质芽孢杆菌对土壤矿物的分解作用及机理研究①

刘五星[1] 徐旭士[2] 杨启银[2] 吴向华[2]

(1 中国科学院南京土壤研究所 南京 210008; 2 南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘 要 应用胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)作分解土壤矿物试验。从土壤矿物经该菌处理前后的表面光滑程度、表面积以及上清液中 K、Si 离子浓度的变化等方面证明了胶质芽孢杆菌能够分解土壤矿物，并把其中的 K、Si 从矿物晶格中释放出来。同时还表明胶质芽孢杆菌 NS01 分解矿物与其生长过程中产生的荚膜多糖与小分子有机酸的复合作用有关。

关键词 胶质芽孢杆菌；土壤矿物；分解机理

中图分类号 Q939.9

钾(K)是作物所必须的三大营养元素之一，近年来随着种植业结构的调整，农作物产量和复种指数的不断提高，土壤中耗 K 量不断增加，缺 K 地区不断扩大。土壤 K 素已成为我国农业持续高产的限制因素之一，特别缺 K 地区每公顷年缺 K 量达 30.0～153.0 千克[1]。我国 K 矿资源严重缺乏，每年花大量外汇进口 K 肥仍难以满足农业生产对 K 肥的需求。有研究表明胶质芽孢杆菌能够分解土壤中的硅酸盐矿物[2]，释放被矿物晶格包裹着的 K 离子和 SiO_2。而且，土壤矿物 K 一般占土壤全 K 的 90 %～98 %[3]，实验也证明胶质芽孢杆菌对棉花[4]等植物有明显的增产效果。因此开发以胶质芽孢杆菌为主要成份的生物 K 肥具有很大的应用前景。然而由于对胶质芽孢杆菌分解土壤矿物的机理一直未有明确的结论，严重限制了该生物肥料的生产和推广。本文用多种方法从不同方面研究了胶质芽孢杆菌对土壤矿物的分解作用，并通过对其代谢产物多糖和有机酸的分析及其与解 K 强度之间的关系，对土壤矿物的分解机理作了初步探讨，结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 胶质芽孢杆菌 (*Bacillus Mucilaginosus*) NS01 由本实验室筛选保存。

1.1.2 土壤矿物 取耕层土加 200 ml/L HCl (土:HCl = 1:10) 煮沸 30 min，蒸馏水洗至无 Cl^-，烘干，磨碎过 100 目筛[5]。

1.1.3 培养基 斜面及平板测定培养基为胶质芽孢杆菌琼脂培养基[6]。解 K 培养基 I：蔗糖，10.0 g；Na_2HPO_4，1.0 g；$(NH_4)_2SO_4$，0.5 g；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$，1.0 g；$CaCO_3$，1.0 g；、酵母膏，0.2 g；$FeCl_3$，微量；土壤矿物，10.0 g；蒸馏水，1 L。解 K 培养基 II：蔗糖，10.0 g；Na_2HPO_4，1.0 g；$(NH_4)_2SO_4$，0.5 g；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$，1.0 g；酵母膏，0.2 g；$FeCl_3$，微量；土壤矿物，10.0 g；蒸馏水，1 L。

1.2 方法

1.2.1 摇瓶培养 在 250 ml 三角瓶中分别加入 50 ml 解 K 培养基，121℃，20 min 高压灭菌。接入 1 ml 种子液，对照接入同体积的灭活种子。28℃在震荡器上 180 r/min 培养 5d。

1.2.2 发酵液处理 取培养 5 d 的培养液 20 ml，加 40 mg/L 的 H_2O_2，121℃，处理 20 min，6000 r/min 离心 20 min，测上清液中 K^+、SiO_2 的含量。残渣用蒸馏水洗净，110℃烘干 1h，扫描电镜观察。

1.2.3 测定方法 原子吸收分光光度计 GBC 932AA 测定 K^+含量；硅钼蓝比色法测 SiO_2[7]；乌氏粘度计测发酵液粘度；pH 计测发酵液 pH 值；平板菌落计数测活菌数；实验结果均为 3 次测定的平均值。

1.2.4 有机酸分析 将发酵液用微孔滤膜过滤后采用 Water PICO.TAG 氨基酸分析系统测定发酵液中的有机酸含量。

1.2.5 菌株荚膜多糖红外光谱分析 采用丙酮法[8]提取荚膜多糖；用 Nicolet 公司 FT-TR Nexu670

①基金项目：江苏省教育厅产业化发展项目(2002SWXTSJ3002)。

型红外光谱仪扫描得出荚膜多糖的红外光谱(扫描范围：4000～400 cm^{-1}，扫描次数：32次，分辨率：4 cm^{-1})。另将提纯的多糖配成80 g/L的水溶液，并在其中分别加入200 mg/ml的SiO_2。扫描得出该溶液的红外光谱，以不加SiO_2的多糖溶液作对照，并得出两者的差示谱。

2 结果

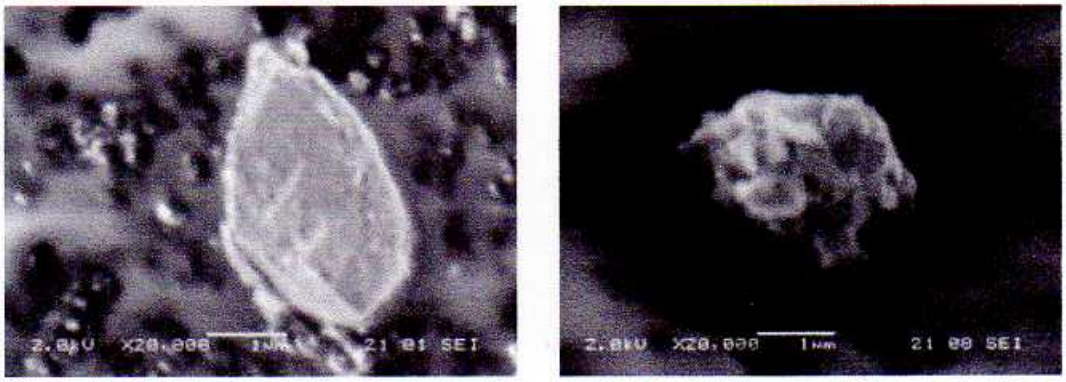
2.1 胶质芽孢杆菌对土壤矿物的分解作用

由表1可知胶质芽孢杆菌在两种不同的培养基中均能够分解土壤矿物，释放出其中的K^+和SiO_2，使溶液中的K^+、SiO_2浓度增加。另外从对照组和接菌组的扫描电镜照片(图1)可以看出对照组土壤矿物表面比较光滑，而接菌组土壤矿物表面凹凸不平。从接种组上清液中K^+的增加以及处理与对照矿物的电镜照片可以得出这样的结论：在胶质芽孢杆菌的作用下，土壤矿物的结构被破坏，因而藏在其晶格间的K^+、SiO_2被释放出来。另外，可以看出经过5d培养后，解K培养基Ⅰ中接种组的菌量比培养基Ⅱ中的要少，pH两者相近，但解K培养基Ⅰ接种组的粘度比培养基Ⅱ的大得多，其分解土壤矿物的能力也比培养基Ⅱ的强。这说明胶质芽孢杆菌分解土壤矿物能力与粘度有关，与pH及菌量相关性不大。

表1 胶质芽孢杆菌对土壤矿物的分解作用

Table 1 Effect of *B.mucilaginous* on dissolving soil minerals

	SiO_2(mg/L)		增加	K^+(mg/L)		增加	pH	粘度	菌量
	对照	处理	(%)	对照	处理	(%)		(m^2/s^2)	(10^8cfu/ml)
解K培养基Ⅰ	225.28	285.86	26.89	12.22	13.40	9.66	5.96	57.54	1.85
解K培养基Ⅱ	198.6	216.46	8.99	11.67	11.97	2.57	5.73	5.96	3.75



a: 对照 b: 处理

图1 胶质芽孢杆菌处理的土壤矿物

Fig. 1 Soil minerals treated with *B.mucilaginosus*

2.2 发酵过程中产生的有机酸

经试验比较确定，高相液相色谱（HPLC）分析发酵液中有机酸组分的最佳条件：流动相为0.01 mol/L的$(NH_4)_2HPO_4$，pH 2.3，流速：0.8 ml/min，紫外检测波长210 nm。在该试验条件下有机酸的HPLC色谱图见图2。从图2可以看出菌体在发酵过程中可以产生草酸、柠檬酸、乳酸等有机酸。其含量分别为76.67、188.00、124.23 mg/L。另外在有机酸的保留区段还有个峰，只是由于标样有限而不能一一确定。这说明胶质芽孢杆菌在菌体繁殖过程中能产生多种有机酸。

2.3 发酵液对草酸及K^+、SiO_2的络合作用

在解K培养基Ⅰ的发酵液中分别加入SiO_2、K^+、草酸，使外加的SiO_2浓度分别为200 mg/ml、500 mg/ml、K^+浓度分别为100 mg/ml、300 mg/ml：草酸浓度分别为200 mg/ml、500 mg/ml。振荡混匀20 min，静置24 h，6000 r/min离心20 min，测上清液中SiO_2、K^+及草酸的含量。从表2、3、4可以看出发酵液对草酸及SiO_2有强烈的吸附作用，而对K^+几乎无吸附。

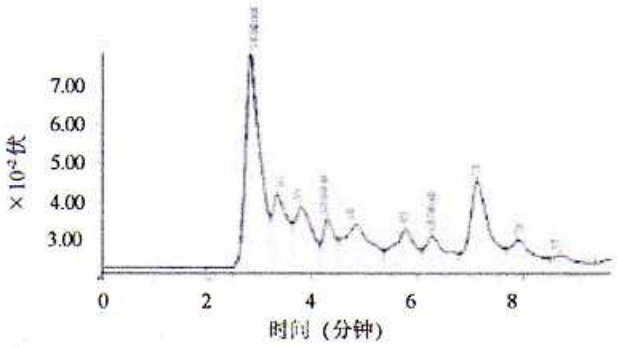


图 2　胶质芽孢杆菌生成的有机酸的高相液相色谱图

Fig. 2　Hyper-liquid chromatogram of the organic acid generated by *B.mucilaginosus*

表 2　细菌培养液对 K^+ 的吸附作用

Table 2　Adsorption of K^+ by bacterial medium

外加 K^+ 量 (mg/mL)	吸附 K^+ 量 (mg/mL)	吸附率 (%)
100	1.5	1.5
300	3.7	1.2

表 3　细菌多糖对 SiO_2 的吸附

Table 3　Adsorption of SiO_2 by bacterial polysaccharides

外加 SiO_2 量 (mg/ml)	吸附 SiO_2 量 (mg/ml)	吸附率 (%)
200	129.95	64.98
500	313.37	62.67

表 4　细菌培养液对草酸的吸附作用

Table 4　Adsorption of oxalic acid by bacteria medium

外加草酸量 (mg/mL)	吸附草酸量 (mg/mL)	吸附率 (%)
200	188.23	94.41
500	483.58	96.72

2.4　荚膜多糖的结构及其与 SiO_2 的络合作用

红外光谱（图 3）中波数 1593.63 cm^{-1} 的吸收是羧酸的 C = O 特征峰，3395.61 cm^{-1} 的吸收是羧酸或糖的 OH 的特征峰。这说明该多糖含有羧基。图 4 是多糖的水溶液的红外光谱，图 5 是多糖溶液中加入 SiO_2 的红外光谱。对图 4，图 5 比较并经示差谱（图 6）分析，可以看出图 5 在 1075.96 cm^{-1}

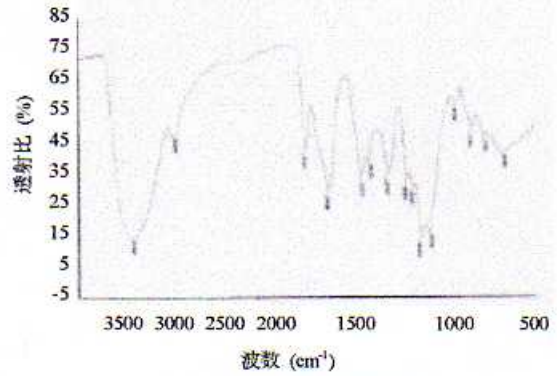


图 3　荚膜多糖的红外光谱

Fig. 3　IR spectrum of capsular polysaccharide

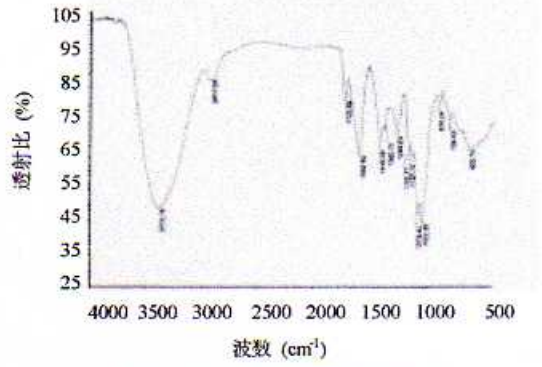


图 4　荚膜多糖溶液的红外光谱

Fig. 4　IR spectrum of capsular polysaccharide solution

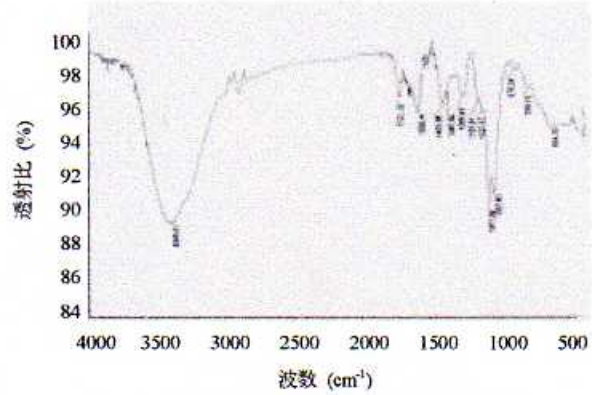


图 5　荚膜多糖吸附 SiO_2 后的红外光谱

Fig. 5　IR spectrum of capsular polysaccharide with absorbed SiO_2

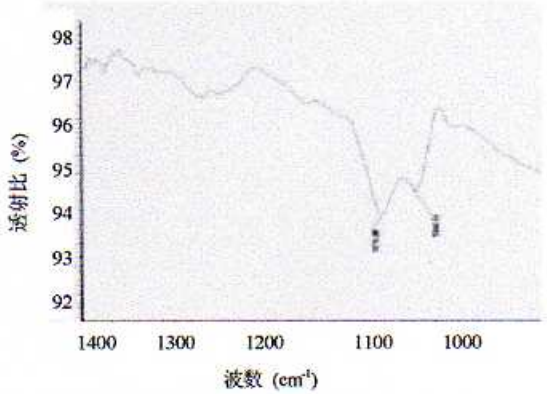


图 6　加 SiO_2 后的荚膜多糖与对照的红外光谱的示差谱

Fig. 6　Difference between capsular polysaccharide and CK in IR spectrum

及1044.95 cm的吸收比图4要强烈。从两图的比较可以看出多糖能够与之形成络合物吸附SiO_2。

3 讨 论

目前关于胶质芽孢杆菌对硅酸盐矿物的分解并释放出其中K素的机理有多种假说。Avakyan[9]和Rozanova[10]认为硅酸盐细菌分解硅酸盐矿物是由于硅酸盐细菌在生长过程中，产生的胞外多糖或有机酸是导致硅酸盐细菌解K的原因。连宾[2]指出细菌矿物复合体的形成是细菌行使解K作用的关键所在。也有学者认为其和矿物接触并产生特殊的酶从而破坏矿石的结晶结构。从本实验结果可以看出其分解K的能力与发酵液的粘度成正相关，而与pH值及菌量相关性不大，从这一点可以推测出该菌对土壤矿物的分解能力可能与细菌产生的荚膜多糖有密切的关系。因此我们对荚膜多糖进行提纯，经红外光谱分析看出其结构中含有可以与SiO_2形成的羧基。另外通过对发酵液进行HPLC分析，发现其中含有大量的低分子量的有机酸，其中有一些含有多羧基基团。而发酵液对有机酸、SiO_2、K^+的络合实验表明：发酵液能够强烈吸附SiO_2及有机酸，而对K^+几乎没有吸附。通过对含SiO_2的多糖溶液的红外光谱及两者的示差谱分析结果表明，夹膜多糖能够与SiO_2形成络合物。

从以上实验结果，对胶质芽孢杆菌分解矿物的机理可以初步认为：①细菌发酵过程中产生荚膜多糖和小分子有机酸；②细菌与荚膜多糖能够与土壤矿物形成复合体；③复合体中的荚膜多糖强烈地络合有机酸，形成一个高浓度的有机酸区，在有机酸的作用下土壤矿物发生分解；④大量SiO_2与夹膜多糖发生络合，从而降低游离的SiO_2浓度，打破矿物溶解与结晶过程中暂时的动态平衡，促进矿物降解，从而释放出被矿物晶格包围的SiO_2、K^+等离子。

参考文献

1 毛知耘主编. 肥料学. 北京: 中国农业出版社, 1997, 173
2 连宾. 硅酸盐细菌的解钾作用研究. 贵阳: 贵州科技出版社, 1998, 106
3 北京农业大学主编. 农业化学总论. 北京: 农业出版社, 1991, 152～153
4 盛下放, 黄为一, 殷永娴. 硅酸盐细菌的解钾作用及对棉花的增产效果. 土壤, 2001, 33 (3): 163～165
5 中国科学院南京土壤研究所微生物室编. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985
6 中国微生物菌种保藏委员会农业微生物中心. 中国农业菌种目录. 北京: 中国农业科技出版, 1991, 101
7 国家环保局编. 水和废水监测分析方法. 中国环境科学出版社, 1989, 340～343
8 杨钟琪. S型肺炎链球菌多糖的物理化学和免疫化学特性. 国外医学(生物制品分册), 1982, (6): 261
9 Avakyan ZA. Silicon compounds in solution bacteria quartz degradation. Mikrobiologia, 1984, 54(2): 301～307
10 Rozanova EP. Leaching of glass sand during microbiological oxidation of oil. Mikrobiologia,1986, 55(5): 787～791

MECHANISMS OF *BACILLUS MUCILAGINOSUS* DECOMPOSING SOIL MINERALS

LIU Wu-xing[1] XU Xu-shi[2] YANG Qi-yin[2] WU Xiang-hua[2]

(1 *Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing* 210008;
2 *College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing* 210097)

Abstract The role and mechanisms of *Bacillus mucilaginosus* in extracting K^+ and SiO_2 from silicate soil were studied. It was found that *B. mucilaginosus* can dissolve soil minerals and release K^+ and SiO_2 from crystal lattices of the minerals. At the same time the results also showed that there is a correlation between the capability of the bacterium of dissolving minerals and its capsular polysaccharides and the complexing action of small molecular organic acids.

Key words *Bacillus mucilaginosus*, Soil mineral, Mechanism