

研究报告

一株钠长石分解菌的筛选及其生长特性

刘雪^{1,2}, 温全宝^{1,2}, 张雷^{1,2}, 杨志超^{1,2}, 郭建英^{1,2}, 刘生玉^{*1,2,3}

1 太原理工大学矿业工程学院, 山西 太原 030024

2 山西浙大新材料与化工研究院, 山西 太原 030032

3 太原理工大学原位改性采矿教育部重点实验室, 山西 太原 030024

刘雪, 温全宝, 张雷, 杨志超, 郭建英, 刘生玉. 一株钠长石分解菌的筛选及其生长特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1801-1814.

LIU Xue, WEN Quanbao, ZHANG Lei, YANG Zhichao, GUO Jianying, LIU Shengyu. Screening and growth characteristics of an albite-decomposing strain[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1801-1814.

摘要:【背景】钠长石中钠元素的存在给矿物加工利用带来严重的问题。【目的】获得一株对钠长石具有显著分解效果的菌株, 以脱除钠长石中钠元素。【方法】以钠长石为唯一钠源, 从内蒙古盐湖土壤中筛选分解能力强且性能稳定的菌株, 通过形态学观察、生理生化特性以及 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定, 构建其系统发育树, 绘制生长曲线并探究培养条件对菌株生长的影响。【结果】筛选到一株钠长石分解菌, 经鉴定为约翰逊不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*), 3–11 h 为对数生长期, 最佳培养条件: 初始 pH 9.0, 培养温度 25 °C, 盐浓度 2%, 摇床转速 150 r/min, 接菌量 5%, 装液量 100 mL/250 mL、牛肉膏为唯一碳源, 蛋白胨为唯一氮源。【结论】首次报道约翰逊不动杆菌具有高效分解钠长石的性能, 为生物脱钠提供菌株来源。

关键词: 钠长石; 筛选; 约翰逊不动杆菌; 生长特性; 生物脱钠

资助项目: 国家自然科学基金(22178245); 山西浙大新材料与化工研究院研发项目(2022SX-TD009); 山西省基础研究计划(202203021211165)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22178245), the Shanxi-Zheda Institute of Advanced Materials and Chemical Engineering (2022SX-TD009), and the Fundamental Research Program of Shanxi Province (202203021211165).

*Corresponding author. E-mail: liusyutyut@126.com

Received: 2022-08-02; Accepted: 2022-10-10; Published online: 2022-12-06

Screening and growth characteristics of an albite-decomposing strain

LIU Xue^{1,2}, WEN Quanbao^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2}, YANG Zhichao^{1,2}, GUO Jianying^{1,2},
LIU Shengyu^{*1,2,3}

1 College of Mining Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China

2 Shanxi-Zheda Institute of Advanced Materials and Chemical Engineering, Taiyuan 030032, Shanxi, China

3 Key Laboratory of *In-situ* Property-improving Mining of Ministry of Education, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China

Abstract: [Background] The sodium in albite poses a challenge to mineral processing and utilization. [Objective] To screen an efficient albite-decomposing strain and to remove the sodium in albite. [Methods] With albite as the sole sodium source, a stable strain with strong decomposition ability was screened from the soil of salt lake in Inner Mongolia. Then, it was identified based on morphological observation, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA gene sequencing. The phylogenetic tree was constructed and the growth curve was plotted. Moreover, the influence of culture conditions of the growth of the strain was investigated. [Results] An efficient albite-decomposing strain was screened out and identified as *Acinetobacter johnsonii*, with the logarithmic phase of the 3rd–11th hours. The optimal culture conditions are as follows: initial pH 9.0, temperature of 25 °C, 2% salt, shaker speed at 150 r/min, inoculum of 5%, liquid volume of 100 mL/250 mL, beef extract as the sole carbon source, and peptone as the sole nitrogen source. [Conclusion] It is reported for the first time that *A. johnsonii* has the ability to decompose albite, which provides a strain for biological removal of sodium.

Keywords: albite; screening; *Acinetobacter johnsonii*; growth characteristics; biological removal of sodium

钠长石作为一种常见的铝硅酸盐矿物，是诸多金属或非金属矿中常见的脉石矿物，其存在加大了矿物开采和加工利用的难度^[1-2]。此外，钠长石还是煤中灰分的主要来源之一，对煤的发热量、挥发分和燃烧过程都产生重要影响^[3]。将钠长石与目的矿物或非矿物实现有效分离并脱除有害元素钠对提升矿物品质和实现煤炭清洁高效利用具有重要应用价值和潜力。常见的脱钠方法有物理法、化学法及物理化学法，这些常规方法均会在一定程度上造成高污染、高能耗等问题。因此，从能耗、生产成本

和对环境的危害角度出发，寻找一种低成本且环境友好型的脱钠方法显得尤为迫切。

微生物浸矿是一种具有良好选择性、经济性和绿色无污染的分选方法，已被广泛应用于矿物提质、有价值元素回收和有害金属的脱除^[4-5]。赵江曼等^[6]筛选出一株胶质类芽孢杆菌 BM-4，其对层状铝硅酸盐矿物有较好的溶蚀脱硅效果，浮选后矿物的 Al/Si 由 3.05 提高至 8.60。Song 等^[7]筛选出一株细菌 HY-7，将其应用于脱除金红石精矿中的硅酸盐矿物以降低硅含量，结果表明经细菌处理后 TiO₂ 的品位由 78.21% 提升到

91.80%, 浸出 7 d 后 TiO_2 回收率达到了 95.24%。毛欣欣等^[8]利用筛选出的伯克霍尔德氏菌从钾长石与黑云母中浸出了硅、钾和钙元素。还有研究报道了烟曲霉、黑曲霉等真菌均可通过溶蚀作用或机械作用破坏铝硅酸盐矿物的结构^[9]。国内外大多文献研究利用微生物处理钾长石、石英等硅酸盐矿物^[10-12], 而对与其晶体结构相似钠长石的研究未见报道, 因此, 筛选具有高效分解钠长石的菌株将为生物脱钠提供新思路 and 菌株来源。

本文以钠长石为研究对象, 采用浸出液中钠离子浓度来评价浸出效果, 从内蒙古凉城县岱海周边土壤中筛选出一株可分解钠长石的菌株, 分析其形态特征和生理生化特性, 结合分子生物学结果对菌株进行鉴定, 探究生长条件对菌株的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

以五点取样法从内蒙古乌兰察布市凉城县 NaCl 型盐湖——岱海附近采集土壤样品, 该水域属于内陆微咸水湖, 岱海覆水中的阴离子以 Cl^- 为主, 阳离子则以 Na^+ 为主, 属氯化物类钠组 I 型水, 采样点位于北纬 $40^\circ 29' 27''$ – $40^\circ 37' 06''$ 和东经 $112^\circ 33' 31''$ – $112^\circ 46' 40''$, 距湖水 1.5–2.0 m、距地表 10–15 cm 处。由图 1 土壤样品 X 射线衍射图谱可知其矿物组成主要是石英、钠长石和钙长石。

1.1.2 矿样

钠长石购买于浩宇石头工艺品商行, 其化学多元素分析结果如表 1 所示。钠长石纯度较高, 满足实验对纯矿物的要求, 为使目的菌株在含钠长石的培养基中具有良好适应性, 选择粒级为 200–400 目的钠长石作为细菌处理对象。

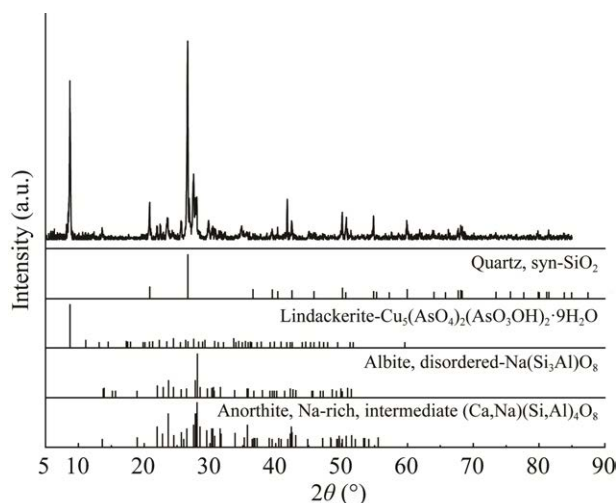


图 1 土壤样品 X 射线衍射图谱

Figure 1 X-ray diffraction pattern of soil samples.

表 1 钠长石化学多元素分析

Table 1 Albite chemical multielement

成分 Element	含量 Content (%)
Si	31.44
Al	9.74
Na	8.59
Ca	0.73
K	0.10
Others	49.40

1.1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨固体培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0–20.0; 种子液培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0; 初筛培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, 琼脂 15.0–20.0, 钠长石 1.0; 复筛培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, 钠长石 1.0。以上培养基 pH 值均为 7.4–7.6。

1.1.4 主要试剂和仪器

牛肉膏、蛋白胨, 北京博奥星生物技术有限公司; 氯化钠、琼脂, 天津市北辰方正试剂厂; 细菌 DNA 提取试剂盒, 上海玉博生物科技有限公司; PCR 聚合酶, TOYOBO 公司。恒温磁力搅拌器, 常州国华电器有限公司; 紫外分

光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司; 立式高压蒸汽灭菌锅, 上海三申医疗器械有限公司; 智能光照培养箱, 宁波江南仪器厂; 测序仪和 PCR 仪, Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离与纯化

称取 10 g 土壤样品置于烧杯中, 加入 90 mL 无菌水在磁力搅拌器上搅拌至菌体与土壤充分分离, 静置 30 min, 吸取上清液, 采用 10 倍稀释法(10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6}) 在固体培养基上涂布并倒置于 30 °C 恒温箱中培养 48–72 h, 同一稀释度设置 3 组平行试验^[13]。根据平板上菌落形态和颜色差异挑取不同菌落进行划线培养, 重复上述操作, 直到显微镜下观察到的菌落形态和颜色不再发生改变。挑取纯化后的菌落, 接种于种子液培养基中并在温度为 30 °C、转速为 150 r/min 的恒温摇床富集培养 48–72 h, 保存于 4 °C 冰箱内供筛选使用。

1.2.2 菌株筛选

取富集菌液分别以 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释梯度接种于初筛培养基并置于 30 °C 恒温箱培养 48–72 h, 同一稀释度设置 3 组平行实验。挑取生长良好的菌落进行划线培养, 将初筛得到的菌株在复筛培养基中复筛并驯化。

1.2.3 钠离子浸出实验

称取 1 g 钠长石置于 250 mL 锥形瓶中, 加入 100 mL 无钠液体培养基, 实验组接 5 mL 菌液, 对照组接等量灭活菌液, 每组设 3 次重复试验, 30 °C、150 r/min 培养 7 d 后测定菌液中钠离子浓度^[14–15]。

1.2.4 菌株鉴定

1) 形态特征观察

观察平板上菌落形态、颜色、大小和表面特性等, 挑取少量菌落进行革兰氏、鞭毛、荚膜和芽孢染色并置于显微镜下观察菌体形态

特征^[16–17]。

2) 生理生化特性

分别进行硫化氢、明胶液化、过氧化氢酶、淀粉水解、甲基红、V-P、柠檬酸盐和糖发酵实验, 确定菌株生理生化特性, 具体实验操作方法参照《常见细菌系统鉴定手册》^[18]。

3) 16S rRNA 基因扩增及测序

采用细菌 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA, 利用 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACCTT-3') 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: DNA 模板(200 ng/50 μ L) 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 1.5 μ L, KOD One™ PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 10 s, 55 °C 8 s, 35 次循环; 68 °C 2 s。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 利用 Sanger 法对扩增产物测序, 结果采用 DNAMAN 软件进行拼接处理, 将所得序列在 NCBI 数据库中的 BLAST 比对系统中进行分析, 并在 MEGA 11.0 软件中构建其系统发育树。

1.2.5 生长特性实验

1) 温度

在牛肉膏蛋白胨液体培养基中接入 5 mL 对数期(培养 12 h)纯菌液, 分别置于温度为 10、15、20、25、30、35、40 °C 以及转速均为 150 r/min 的恒温摇床上培养 12 h, 测定菌液吸光度(OD_{600} 值)。

2) 初始 pH

用 0.1 mol/L 的氢氧化钾溶液和盐酸溶液调节液体培养基初始 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 接入 5 mL 对数期(培养 12 h)纯菌液, 置于温度为 25 °C、转速为 150 r/min 的恒温摇床上培养 12 h, 测定菌液 OD_{600} 值。

3) 盐浓度

在牛肉膏蛋白胨液体培养基中分别加入

0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、7%、9%、10%、15%浓度的 NaCl, 置于温度为 25 °C、转速为 150 r/min 的恒温摇床上培养 12 h, 测定菌液 OD_{600} 值。

4) 摇床转速

取 5 mL 对数期(培养 12 h)纯菌液接入灭菌的牛肉膏蛋白胨液体培养基, 调节摇床转速分别为 100、125、150、175、200、225 r/min, 置于温度为 25 °C 的恒温摇床培养 12 h, 测定菌液的 OD_{600} 值。

5) 接菌量

分别取 1%、2.5%、5%、7.5%、10%、12.5%、15%对数期(培养 12 h)纯菌液接入灭菌的牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 置于温度为 30 °C、转速为 150 r/min 的恒温摇床培养 12 h, 测定菌液的 OD_{600} 值。

6) 装液量

在 250 mL 锥形瓶中分别加入 50、75、100、125、150、200 mL 灭菌的牛肉膏蛋白胨液体培养基, 接入菌液并置于温度为 30 °C、转速为 150 r/min 的恒温摇床培养 12 h, 测定菌液的 OD_{600} 值。

7) 碳源

分别以甘露醇、葡萄糖、蔗糖、柠檬酸、糊精、牛肉膏作为唯一碳源, 接入对数期(培养 12 h)纯菌液并置于温度为 30 °C、转速为 150 r/min 的恒温摇床培养 12 h, 测定菌液的 OD_{600} 值。

8) 氮源

分别以硝酸钠、硝酸铵、氯化铵、硫酸铵、磷酸氢二铵、蛋白胨、酵母膏作为唯一氮源, 接入对数期(培养 12 h)纯菌液并置于温度为 30 °C、转速为 150 r/min 的恒温摇床培养 12 h, 测定菌液的 OD_{600} 值。

1.2.6 生长曲线测定

量取 100 mL 液体培养基加入 250 mL 锥形

瓶中, 调节培养基初始 pH 值为 9.0, 在 121 °C 灭菌 20 min, 冷却后接菌 5 mL 置于转速为 150 r/min、温度为 25 °C 的恒温摇床上进行培养, 测定不同时间菌液 OD_{600} 值。

1.2.7 菌株对钠长石的影响

在菌株的最佳生长条件下进行浸矿实验, 测定浸矿发酵液中的钠离子含量并对比分析菌株作用前后钠长石的分解情况。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与筛选

通过在牛肉膏蛋白胨固体培养基上多次分离纯化, 共获得 30 株形态、颜色、大小及表面特性存在差异的菌株, 将这 30 株菌接种在含有钠长石的固体培养基上培养后, 筛选出 9 株能稳定生长的菌株, 对这 9 株菌进行钠离子浸出实验并测定液体培养基中钠离子含量, 结果如表 2 所示。JC-1、JT-2、BF-2、JW-2、JC-2 和 LW-3 这 6 株菌所在菌液环境中钠离子含量均在 100 mg/L 以上, 表明 6 株菌对钠长石的浸出效果较好。其中, 菌株 JC-1 发酵液中钠离子含量为 214.13 mg/L, 对该菌进行灭活处理用于浸出钠长石, 测定发酵液中钠离子含量为 24.32 mg/L, 发现与原来(214.13 mg/L)相比菌液中钠离子含

表 2 菌液中钠离子含量

Table 2 Sodium ion content in bacterial fluid

菌株 Strains	钠离子浓度 Sodium ion concentration (mg/L)
JC-1	214.13
JT-2	163.28
BF-2	134.76
JW-2	134.87
JX-1	60.98
JC-2	147.00
LW-3	110.34
LX-4	99.97
JX-2	89.74

量降低了 189.81 mg/L, 进一步证明菌株 JC-1 对钠长石的分解效果较好。因此, 选择菌株 JC-1 作为优势菌种并优化其生长条件。

2.2 菌株鉴定结果

2.2.1 形态特征

菌株 JC-1 在牛肉膏蛋白胨固体培养基上的菌落形态和在显微镜下菌体特征, 如图 2、表 3 所示。菌株 JC-1 在固体培养基上的菌落呈乳白色, 圆形, 边缘整齐, 表面湿润且光滑。在电子显微镜下染色观察到菌体长度为 1.0–1.5 μm , 宽度为 0.8–1.0 μm , 为短圆杆状, 无芽孢和鞭毛, 有荚膜, 经革兰氏染色后镜检呈红色, 证明其为革兰氏阴性菌。

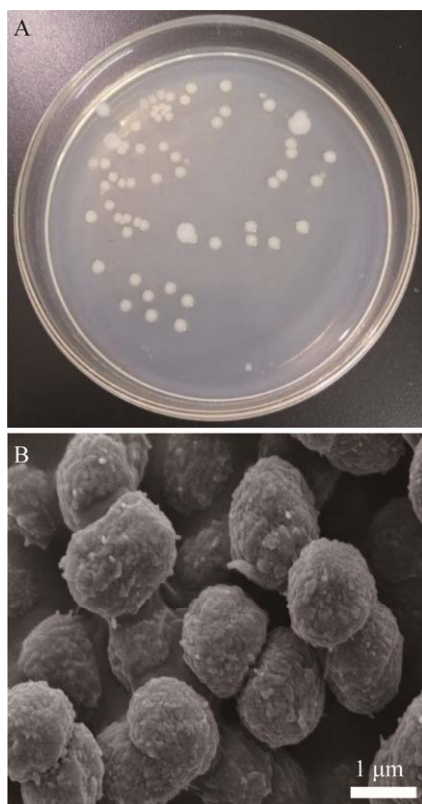


图 2 菌株 JC-1 的形态特征 A: 菌落形态. B: 生物扫描电镜

Figure 2 Morphological characteristics of strain JC-1. A: Colony morphology. B: Biological scanning electron microscope.

2.2.2 生理生化特性

根据《常见细菌系统鉴定手册》^[18]操作开展生理生化试验, 具体试验结果见表 4。菌株 JC-1 产淀粉酶、过氧化氢酶、有机酸, 不产硫化氢, 可使明胶液化, 可利用柠檬酸盐作为碳源, 不能利用葡萄糖和蔗糖发酵产酸, 不能利用葡萄糖产非酸性或中性末端产物。

表 3 菌株 JC-1 的形态特征

Table 3 Morphology and characteristics of strain JC-1

项目 Project	结果 Result
形状 Shape	圆形 Circular
颜色 Color	乳白 Milky white
透明度 Transparency	不透明 Opacification
边缘 Edge	整齐 Orderliness
表面状态 Surface state	湿润且光滑 Moist and smooth
形态 Morphology	短圆杆状 The short round rods
长度 Length (μm)	1.0–1.5
宽度 Width (μm)	0.8–1.0
革兰氏染色	G ⁻
Gram staining	
芽孢 Spore	–
荚膜 Capsule	+
鞭毛 Flagellum	–

+: 有; –: 无

+: Yes; –: No.

表 4 菌株 JC-1 生理生化实验结果

Table 4 Results of physiological and biochemical experiments of strain JC-1

测试项目 Item tested	测试结果 Result tested
硫化氢 Hydrogen sulfide	–
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
过氧化氢酶 Catalase	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
甲基红 Methyl red	+
Voges-Prokauer	–
柠檬酸盐 Citrate	+
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	–
蔗糖发酵 Sucrose fermentation	–

+: 阳性; –: 阴性

+: Positive; –: Negative.

2.2.3 16S rRNA 基因序列分析

利用 16S rRNA 通用引物扩增测序, 得到产物的基因片段约为 1 500 bp, 在国家微生物科学数据中心获得菌株的核酸序列登录号为 N000110I, 对测序结果比对分析并在 MEGA 11.0 软件中采用邻接法构建系统发育树, 如图 3 所示。菌株 JC-1 与 *Acinetobacter johnsonii* ATCC 17909 的相似性最高, 其相似度高达 99.93%, 结合形态特征和生理生化特性进一步说明菌株 JC-1 为约翰逊不动杆菌(*A. johnsonii*)。

2.3 生长特性实验

2.3.1 温度的影响

温度通过影响菌株的新陈代谢作用进而影响菌株的生长。测定不同温度下菌株 JC-1 的 OD_{600} 值, 绘制温度与 OD_{600} 值的关系曲线, 如图 4 所示。 OD_{600} 值随着温度的升高呈现先增大后减小的趋势, 10–15 °C 时 OD_{600} 值较小, 低温环境下菌株酶活性较低导致新陈代谢水平较

缓, 菌株数量较少; 15–25 °C 时随着温度的增加 OD_{600} 值逐渐增大且递增趋势较快, 在 25 °C 时 OD_{600} 值达到最大, 此时菌株生长速度最快且生长状态最佳; 25–40 °C 时随着温度的升高, OD_{600} 值逐渐减小并趋于不变, 在该温度范围内菌株由于环境温度过高致使新陈代谢作用减弱, 进而导致菌株生长缓慢。因此, 选择 25 °C 作为培养菌株 JC-1 的最适温度。

2.3.2 初始 pH 的影响

pH 会改变蛋白质、核酸等生物大分子所带电荷来影响生物活性。在培养温度为 25 °C 的条件下探究初始 pH 对菌株 JC-1 生长的影响, 如图 5 所示。pH 3.0–5.0 时 OD_{600} 值并未呈现出明显的变化, 该 pH 环境不适合菌株生长; pH 5.0–9.0 时 OD_{600} 值迅速递增, 在 pH 9.0 的菌液环境中 OD_{600} 值最大, 随着 pH 值继续递增, OD_{600} 值略有降低。因此, 选择 pH 9.0 作为菌株 JC-1 生长的最适 pH。

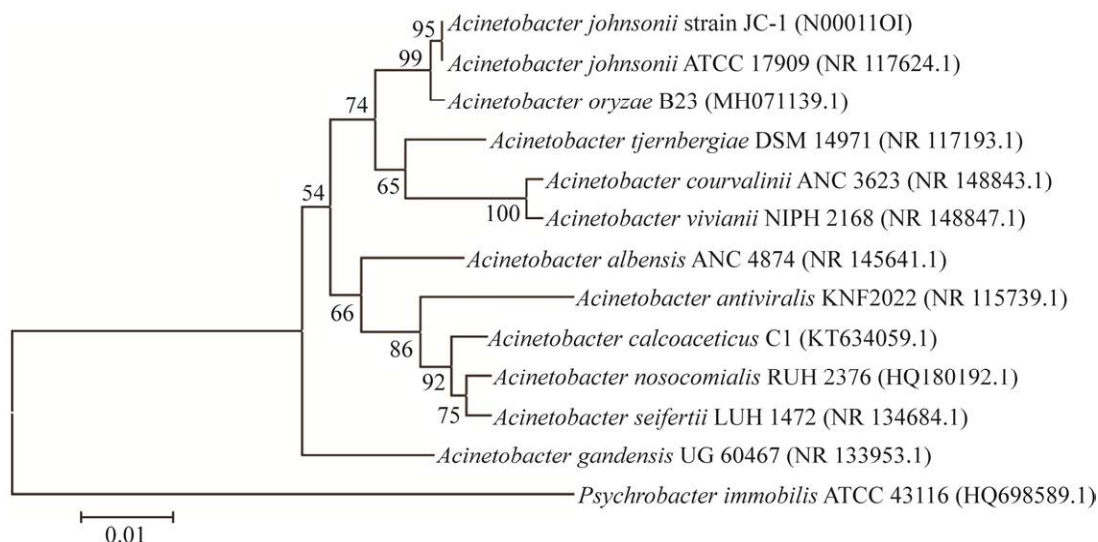


图 3 菌株 JC-1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中的序号为 GenBank 的登录号; 分支点上的数值为 bootstrap 值; 标尺 0.01 代表 1% 的核酸差异

Figure 3 The phylogenetic tree of strain JC-1 based on 16S rRNA gene sequence. The serial number in parentheses is the accession number of GenBank; The values at the branch nodes are bootstrap values; The scale of 0.01 represents 1% difference in nucleic acids.

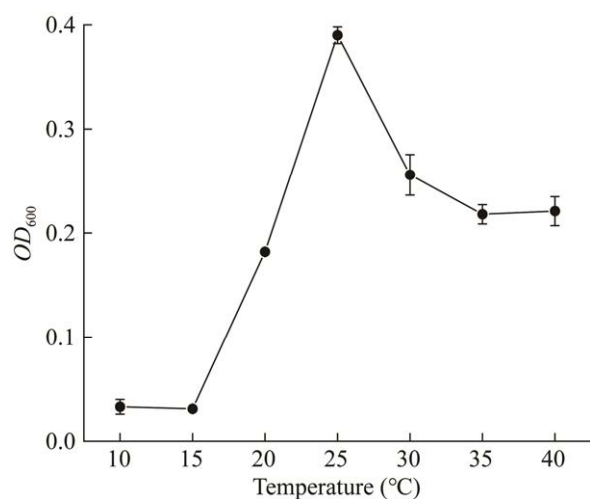


图4 温度对菌株 JC-1 生长的影响

Figure 4 Effect of temperature on the growth of strain JC-1.

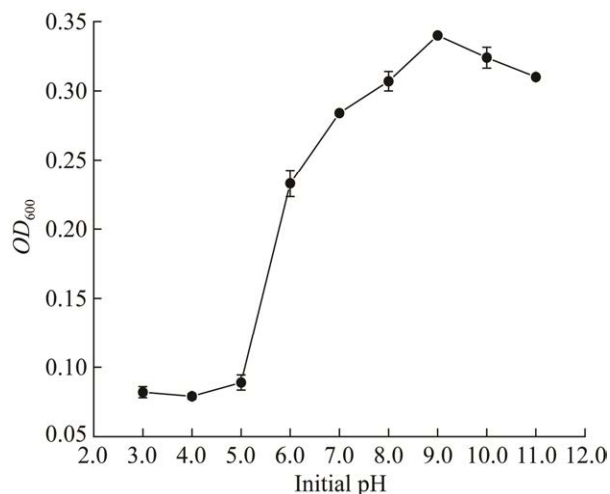


图5 初始 pH 对菌株 JC-1 生长的影响

Figure 5 Effect of initial pH on the growth of strain JC-1.

2.3.3 耐盐性

细胞渗透压对菌株的生长有重要影响。在培养温度为 25 °C 和初始 pH 9.0 的条件下探究盐浓度对菌株 JC-1 生长的影响, 如图 6 所示。 OD_{600} 值随着盐浓度的增大呈现先增大后减小的趋势, 当盐浓度为 2% 时 OD_{600} 最大, 此时细胞内外渗透压达到相对平衡的状态, 菌株 JC-1

生长速度最快。因此, 选择 2% 盐浓度作为菌株 JC-1 生长的最佳盐浓度。

2.3.4 摇床转速的影响

摇床转速会影响液体培养基中氧气含量及流通速度。在培养温度为 25 °C、初始 pH 9.0 以及盐浓度为 2% 的条件下探究摇床转速对菌株 JC-1 生长的影响, 如图 7 所示。当转速为 100 r/min

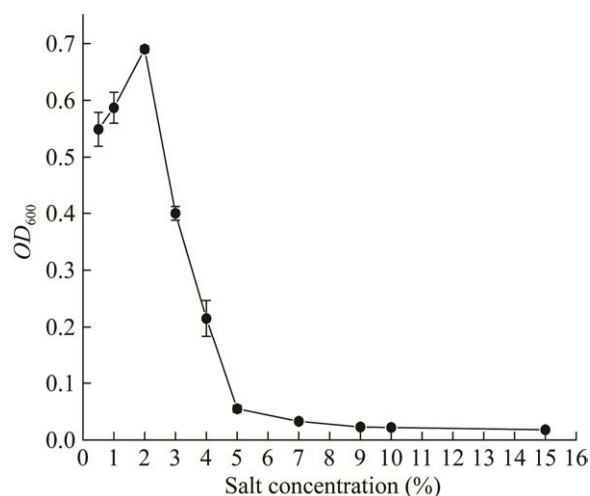


图6 盐浓度对菌株 JC-1 生长的影响

Figure 6 Effect of salt concentration on the growth of strain JC-1.

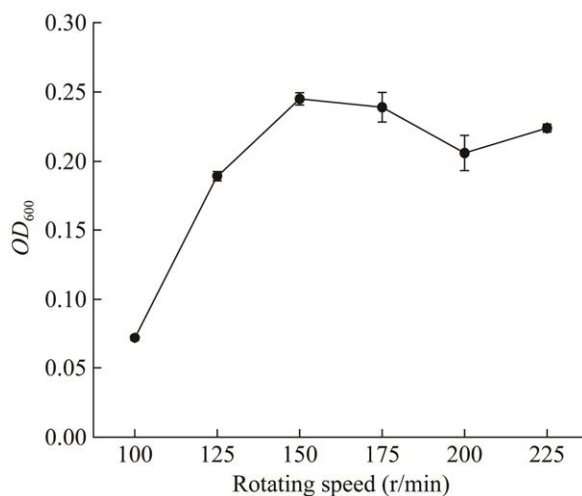


图7 摇床转速对菌株 JC-1 生长的影响

Figure 7 Effect of rotating speed of shaker on the growth of strain JC-1.

时 OD_{600} 值较小, 此时培养基中氧气含量不足, 菌株生长较为缓慢; 当转速在 125–225 r/min 时 OD_{600} 值较大, 此时培养基中氧气含量增加, 菌株对营养物质的摄入较快, 其生长状态较佳; 在摇床转速为 150 r/min 时 OD_{600} 值最大, 此时瓶中营养物质与菌株 JC-1 充分接触且培养基中氧气含量充足, 菌株达到最佳生长状态。因此, 选择摇床转速为 150 r/min 作为最佳的转速。

2.3.5 接菌量的影响

培养基中接入的菌量会决定营养物质的消耗速度。在培养温度 25 °C、初始 pH 9.0、盐浓度为 2% 以及摇床转速 150 r/min 的条件下探究接菌量对菌株 JC-1 生长的影响, 如图 8 所示。当接菌量小于 5% 时, OD_{600} 值随着接菌量的增加而增加, 培养基中细菌浓度逐步增长; 当接菌量为 5% 时 OD_{600} 值最大, 培养基中营养物质恰好能供应菌株 JC-1 生长, 此时细菌浓度最大; 当接菌量大于 5% 时, 由于培养基中营养物质消耗速度过快 OD_{600} 值减小, 菌株生长受到抑制且部分菌株衰亡。因此, 选择接菌量为 5% 作为最佳的接种量。

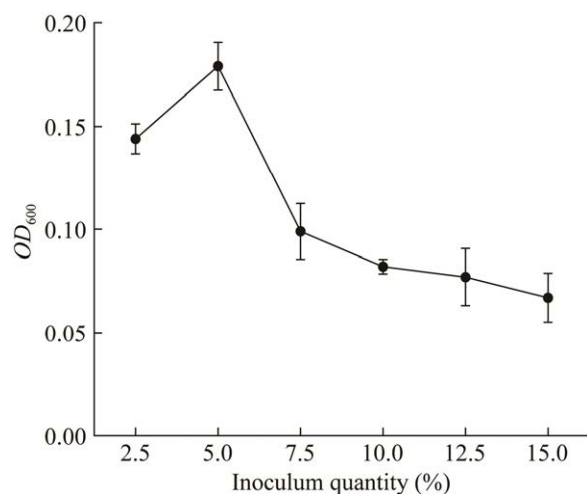


图 8 接菌量对菌株 JC-1 生长的影响

Figure 8 Effect of inoculum quantity on the growth of strain JC-1.

2.3.6 装液量的影响

装液量能够影响液体培养基中氧气的溶解量, 从而对菌株的生长产生影响。在培养温度为 25 °C、初始 pH 值为 9.0、盐浓度为 2%、摇床转速为 150 r/min 以及接菌量为 5% 的条件下探究装液量对菌株 JC-1 生长的影响, 如图 9 所示。装液量为 50 mL 时 OD_{600} 值接近于 0, 菌株 JC-1 几乎不能生长; 装液量为 100 mL/250 mL 时 OD_{600} 值最大, 此时菌株 JC-1 在摇床的扰动作用下与液体培养基充分接触并进行营养交换; 装液量在 125–200 mL 时 OD_{600} 值逐渐减小, 此时在摇床的转动下会使锥形瓶内液体上升导致瓶内空间不足, 影响液体培养基中氧气的溶解量, 菌株数量减少。因此, 选择装液量为 100 mL/250 mL 作为最佳的装液量。

2.3.7 碳源的影响

碳源是微生物生长必需的营养来源, 菌株通过一系列的生理生化反应将外界的有机质转化为可供自身生长的营养物质。在培养温度为 25 °C、初始 pH 值为 9.0、盐浓度为 2%、摇床转速为 150 r/min、接菌量为 5% 以及装液量为

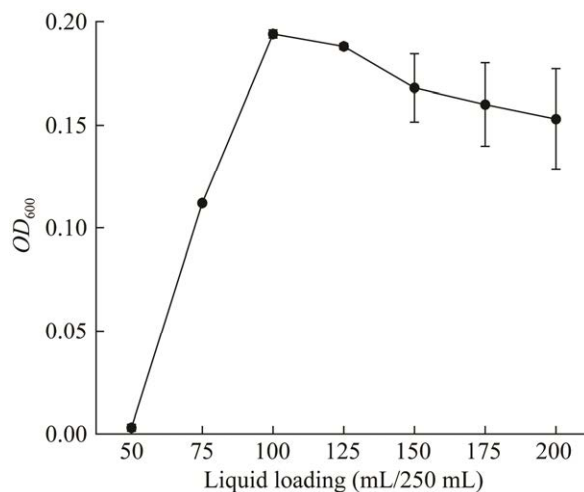


图 9 装液量对菌株 JC-1 生长的影响

Figure 9 Effect of liquid loading on the growth of strain JC-1.

100 mL/250 mL 的条件下,分别以各种类型的碳源作为液体培养基中的唯一碳源并测定 OD_{600} 值,如图 10 所示。以甘露醇和葡萄糖(单糖)、蔗糖和糊精(二糖)为碳源时 OD_{600} 值均较低,而以柠檬酸(有机酸)和牛肉膏为碳源培养菌株时的 OD_{600} 值相对较高,其中以牛肉膏为碳源时的 OD_{600} 值最大。因此,选择牛肉膏作为菌株 JC-1 生长的碳源。

2.3.8 氮源的影响

氮源是微生物生长的必要元素。微生物从外界获取氮源,将其转化为营养物质供给自身生长。在培养温度为 25 °C、初始 pH 值为 9.0、盐浓度为 2%、摇床转速为 150 r/min、接菌量为 5%、装液量为 100 mL/250 mL 以及牛肉膏作唯一碳源条件下,分别以各种类型的氮源作为液体培养基中的唯一氮源并测定 OD_{600} 值的大小,如图 11 所示。以氯化铵、硝酸钠和硫酸铵为氮源时 OD_{600} 值均趋于 0,菌株几乎不能生长,同时氯化铵和硫酸铵均为强酸弱碱盐,其水溶液呈酸性,菌株在该环境下难以生长;以硝酸铵和磷酸氢二胺为氮源时 OD_{600} 值相对较小,说

明菌株很难利用这两类无机氮源;以蛋白胨和酵母膏为氮源时 OD_{600} 值相对较大,以蛋白胨为氮源时 OD_{600} 值最大,表明菌株对蛋白胨的利用效果最好。因此,选择蛋白胨作为菌株 JC-1 生长的氮源。

2.4 生长曲线

在菌株的最适生长条件下测定不同培养时间下菌液 OD_{600} 值来探究细菌的生长情况,绘制菌株 JC-1 的生长曲线,如图 12 所示。菌株

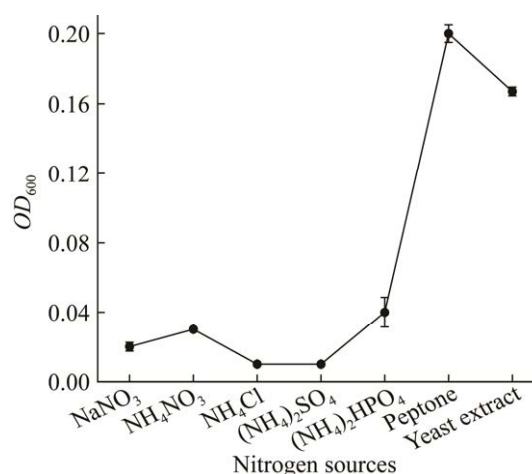


图 11 氮源对菌株 JC-1 生长的影响

Figure 11 Effect of nitrogen sources on the growth of strain JC-1.

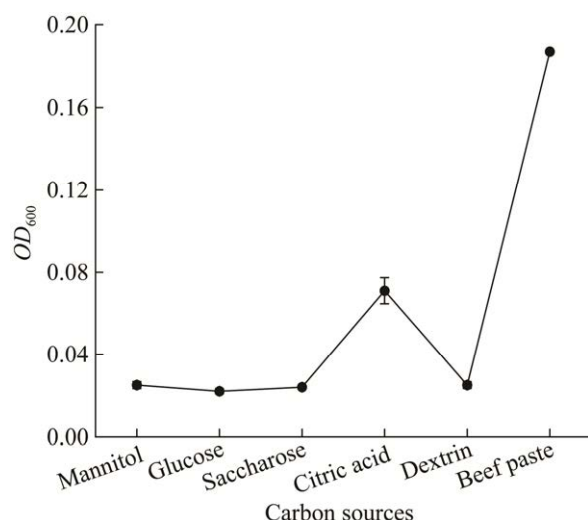


图 10 碳源对菌株 JC-1 生长的影响

Figure 10 Effect of carbon sources on the growth of strain JC-1.

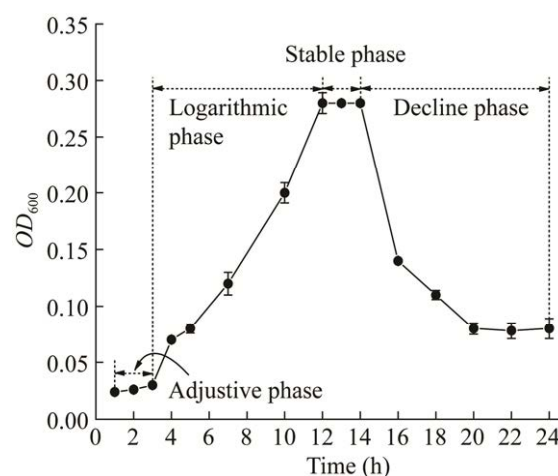


图 12 菌株 JC-1 的生长曲线

Figure 12 The growth curve of strain JC-1.

JC-1 生长经历了调整期(1–3 h)、对数期(3–11 h)、稳定期(11–14 h)以及衰亡期(14–24 h)这 4 个时期, 菌株在对数期生长速率最大, 菌液中细菌数量最多。

2.5 菌株对钠长石的影响

在菌株 JC-1 的最佳培养条件下进行钠离子浸出实验, 测定浸矿发酵液中钠离子浓度为 228.77 mg/L, 相比条件优化前钠离子浓度增加了 14.64 mg/L, 说明最佳生长条件下菌株 JC-1 浸矿效果更为显著。同时对菌株作用前后钠长石矿粉进行 X 射线衍射分析, 如图 13 所示。由图 13A 可知, 在 25°–30°之间对应的钠长石晶面最为显著, 对比图 13B 可知, 菌株 JC-1 作用后钠长石在该区间的特征峰强度明显降低。此外, 在 20°–25°和 40°–45°之间钠长石特征峰强度均降低, 表明钠长石矿粉晶体结构遭到破坏, 菌株 JC-1 对钠长石具有分解作用。

3 讨论与结论

目前对于钾长石分解菌筛选的报道屡见不鲜, 然而对钠长石分解菌的筛选研究还未见报

道。钾长石分解菌大多为硅酸盐细菌。例如芽孢杆菌属、根瘤菌属、假单胞菌属等。吴红艳等^[19]从番茄土壤中筛选到一株能分解钾长石的胶质类芽孢杆菌 K02, 发酵液中可溶性钾含量为 41.84 mg/L。Panda 等^[20]从印度盐场分离得到一株土壤不动杆菌, 该菌浸矿发酵液中可溶性钾可达 68 mg/L。此外, 钾长石分解菌还包括烟曲霉、黑曲霉等真菌。孙德四等^[21]研究了黑曲霉对不同晶体结构钾矿物的分解情况。薛永萍等^[11]从钾长石矿区土壤中筛选到一株能够分解钾长石的新菌 JX-14, 溶液中可溶性钾离子质量浓度可达 26.12 mg/L, 浸出率为 9.36%。本研究从盐湖土壤中分离筛选到一株对钠长石具有显著分解效果的约翰逊不动杆菌 JC-1, 该菌浸矿发酵液中钠离子浓度高达 214.13 mg/L, 说明该钠长石分解菌相比钾长石分解菌其分解效果更为显著, 但钾长石分解菌种类多且研究成熟, 关于钠长石分解菌的研究还需要进一步深入。本研究发现该钠长石分解菌无鞭毛和芽孢, 为短圆杆状的革兰氏阴性菌, 其菌体特征与奉鉴金等^[22]、黄萃等^[23]、马丹等^[24]的报道相吻合。

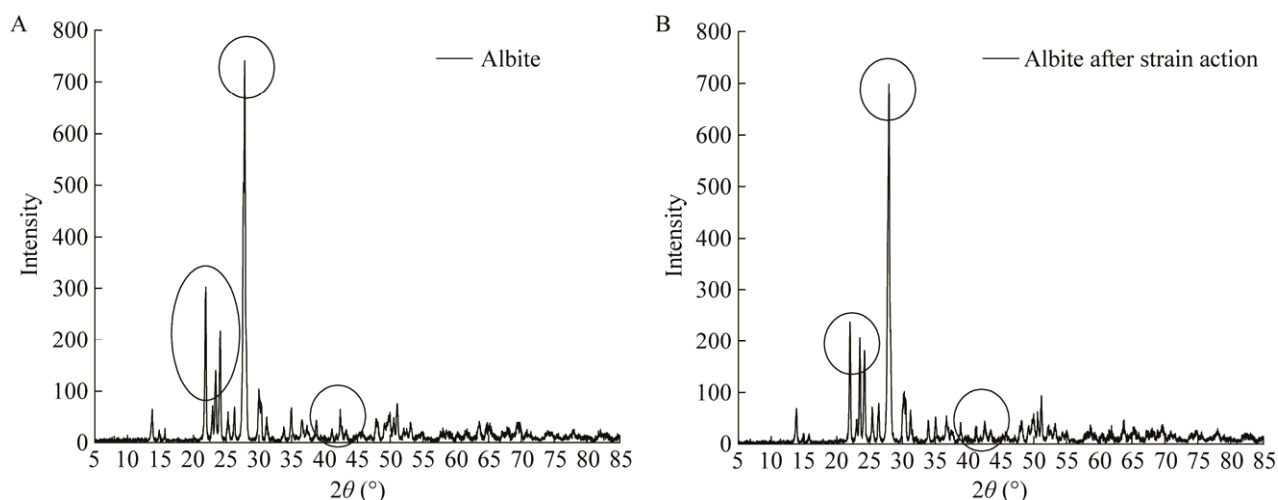


图 13 X 射线衍射图谱 A: 钠长石. B: 菌株作用后的钠长石
Figure 13 X-ray diffraction pattern of albite. A: Albite. B: Albite after strain action.

约翰逊不动杆菌有较强的生存能力,可广泛存在于高磷高盐的水域环境中,可以聚磷和解磷还具有一定的耐药性^[25]。谢祥聪^[26]从池塘水体中筛选到可高效聚磷的约翰逊不动杆菌 AJ-3,发现其对合成污水的去磷率达到 90.93%。本研究筛选到可以分解钠长石的约翰逊不动杆菌拓宽了其应用领域。

微生物生长会受到诸多因素的影响,本论文对菌株 JC-1 的生长特性进行了研究。温度和 pH 会影响蛋白质、核酸等生物大分子的结构和功能,进而影响菌株的正常生长^[27-28],菌株 JC-1 的最适培养温度为 25 °C,最适 pH 值为 9.0,其在弱酸和碱性环境下都有较好的生长状况,表明该菌对环境的适应性较强,这与苏丹^[29]报道的培养温度一致,与马丹等^[24]报道的培养温度和 pH 略有偏差。盐浓度和接菌量会对微生物的正常生长产生影响,在低渗环境下,菌体会因吸水而膨胀甚至破裂;在高渗环境下,菌体细胞内水分会渗出,从而出现质壁分离现象;只有在菌体与环境渗透压相对平衡时,微生物才可正常生长^[27]。接菌量过少,菌株 JC-1 生长调整期变长,需要更多时间才能达到对数生长期;接菌量过多,在生长初期菌株繁殖速度会加快,但相应地培养基中营养物质消耗速度也会加快,菌株 JC-1 生长受到抑制。摇床转速和装液量都会影响液体培养基中氧气的溶解量^[30]。当摇床转速和装液量合适时,培养基中氧气溶解量充足且菌株与营养物质充分接触,菌株 JC-1 达到最佳生长状态。碳源和氮源都是微生物生长必需的营养来源,碳源不仅为生物细胞内的大分子合成提供碳素骨架,还为细胞的新陈代谢提供能量^[31],氮源则是微生物合成氨基酸、蛋白质、核酸及含氮代谢物的物质^[32]。

综上所述,本研究从内蒙古乌兰察布市凉城县岱海土壤中分离筛选出了一株分解钠长石

优势菌株 JC-1,观察其形态学特征发现该菌无芽孢和鞭毛,存在荚膜,染色后在显微镜下观察该菌为革兰氏阴性菌。生理生化试验结果显示该菌产淀粉酶、过氧化氢酶、有机酸,不产硫化氢,可使明胶液化,可利用柠檬酸盐作为碳源,不能利用葡萄糖和蔗糖发酵产酸,不能利用葡萄糖产非酸性或中性末端产物。分析其 16S rRNA 基因序列可知菌株 JC-1 为约翰逊不动杆菌,通过绘制生长曲线可知该菌的对数生长期为 3-11 h 并对其生长条件进行优化,确定最佳生长条件为:温度 25 °C,初始 pH 9.0,2% 盐浓度,摇床转速 150 r/min,接菌量 5%,装液量 100 mL/250 mL,牛肉膏作唯一碳源,蛋白胨作唯一氮源。

REFERENCES

- [1] XU LH, PENG TF, TIAN J, LU ZY, HU YH, SUN W. Anisotropic surface physicochemical properties of spodumene and albite crystals: implications for flotation separation[J]. *Applied Surface Science*, 2017, 426: 1005-1022.
- [2] JIANG CH, LI KJ, ZHANG JL, QIN QH, LIU ZJ, WANG L, SUN MM, WANG ZM. The effect of CaO(MgO) on the structure and properties of aluminosilicate system by molecular dynamics simulation[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2018, 268: 762-769.
- [3] 张宁, 许云, 宁树正, 赵彦. 准噶尔煤田阜康矿区小黄山煤矿煤的矿物学特征[J]. *煤炭科学技术*, 2021, 49(6): 242-250.
ZHANG N, XU Y, NING SZ, ZHAO Y. Mineralogical characteristics in No. 6 coal seam from Xiaohuangshan Coal Mine of Fukang Mining Area, Junggar Coal Field[J]. *Coal Science and Technology*, 2021, 49(6): 242-250 (in Chinese).
- [4] LI GY, SUN J, LI FY, WANG YD, LI Q. Macroparticle-enhanced bioleaching of uranium using *Aspergillus niger*[J]. *Minerals Engineering*, 2022, 180: 107493.
- [5] SRICHANDAN H, MOHAPATRA RK, PARHI PK, MISHRA S. Bioleaching approach for extraction of metal values from secondary solid wastes: a critical review[J]. *Hydrometallurgy*, 2019, 189: 105122.

- [6] 赵江曼, 朱明龙, 张旭, 谭文松. 硅酸盐细菌的筛选、鉴定和对铝硅酸盐矿物的作用研究[J]. 高校化学工程学报, 2014, 28(5): 1036-1043.
ZHAO JM, ZHU ML, ZHANG X, TAN WS. The screening and identification of silicate bacteria and its interaction with aluminosilicate minerals[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2014, 28(5): 1036-1043 (in Chinese).
- [7] SONG XY, QIU GZ, WANG HD, XIE JP, XU J, WANG J. Bio-desilication of rutile concentrate and analysis of community structure in bio-desilication reactor[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2015, 25(7): 2398-2406.
- [8] 毛欣欣, 何琳燕, 王琪, 盛下放. 具矿物风化效应伯克霍尔德氏菌的筛选与生物学特性研究[J]. 土壤, 2017, 49(1): 77-82.
MAO XX, HE LY, WANG Q, SHENG XF. Isolation of mineral-weathering *Burkholderia* strains and their biological characteristics[J]. Soils, 2017, 49(1): 77-82 (in Chinese).
- [9] 王秀林, 孙德四, 曹飞. 硅酸盐细菌代谢产物对不同结构硅酸盐矿物风化作用的影响[J]. 非金属矿, 2013, 36(1): 1-4.
WANG XL, SUN DS, CAO F. The influence of silicate bacterial metabolites on weathering of silicate minerals with different crystal structures[J]. Non-Metallic Mines, 2013, 36(1): 1-4 (in Chinese).
- [10] PRAJAPATI KB, MODI HA. Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria from ceramic industry soil[J]. CIBTech Journal of Microbiology, 2012, 1(2/3): 8-14.
- [11] 薛永萍, 肖春桥, 张琰图, 池汝安. 钾长石矿物的微生物法解钾过程[J]. 天津工业大学学报, 2021, 40(3): 61-67, 76.
XUE YP, XIAO CQ, ZHANG YT, CHI RA. Process of K-feldspar dissolved by microbiology[J]. Journal of Tiangong University, 2021, 40(3): 61-67, 76 (in Chinese).
- [12] 杨毅然, 曾强, 刘莎, 马燕. 微生物对尾矿中钾、硅元素释放性能研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(4): 1546-1550.
YANG YR, ZENG Q, LIU S, MA Y. Effects of microorganism on silicon release and potassium release in tailings of minerals[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(4): 1546-1550 (in Chinese).
- [13] 唐白露, 谭朵朵, 黎梦姣, 李婧妮, 周芷洁, 王梓涵, 陈中元, 夏虎, 何海伦. 淡水湖渔场沉积物中产胶原蛋白酶菌株的筛选及发酵优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2715-2729.
TANG BL, TAN DD, LI MJ, LI JN, ZHOU ZJ, WANG ZH, CHEN ZY, XIA H, HE HL. Screening of a collagenase-producing strain from the sediments in fishing grounds of freshwater lakes and optimization of the fermentation conditions[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2715-2729 (in Chinese).
- [14] 张鑫. 脱砷微生物的筛选和从难处理金矿除砷的研究[D]. 赣州: 江西理工大学硕士学位论文, 2021.
ZHANG X. Screening of microorganisms for arsenic removal and study on arsenic removal from refractory gold ores[D]. Ganzhou: Master's Thesis of Jiangxi University of Science and Technology, 2021 (in Chinese).
- [15] 王小国, 梁红艳. 冶金废渣中浸矿菌种的筛选及其生长特性分析[J]. 中国金属通报, 2019(2): 141-142.
WANG XG, LIANG HY. Screening of leaching bacteria from metallurgical waste residue and analysis of their growth characteristics[J]. China Metal Bulletin, 2019(2): 141-142 (in Chinese).
- [16] 孙燕. 微生物学实验指导[M]. 西安: 陕西师范大学出版总社, 2015.
SUN Y. Laboratory Manual for Microbiology[M]. Xi'an: Shaanxi Normal University General Publishing House, 2015 (in Chinese).
- [17] 胡双喜, 曹福祥, 许岗, 李萌. 一株耐高温黄原胶降解菌的筛选及功能鉴定[J]. 中国资源综合利用, 2021, 39(4): 1-6.
HU SX, CAO FX, XU G, LI M. Screening and functional identification of a thermostable xanthan gum degradation strain[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2021, 39(4): 1-6 (in Chinese).
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [19] 吴红艳, 于淼, 冯健, 王智学, 冯敏. 土壤中解钾菌 K02 的筛选、鉴定及培养条件优化[J]. 微生物学杂志, 2020, 40(4): 60-65.
WU HY, YU M, FENG J, WANG ZX, FENG M. Screening, identification and culture condition optimization of potassium-soluble bacteria K02 in soil[J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(4): 60-65 (in Chinese).
- [20] PANDA B, RAHMAN H, PANDA J. Phosphate solubilizing bacteria from the acidic soils of Eastern Himalayan region and their antagonistic effect on fungal pathogens[J]. Rhizosphere, 2016, 2: 62-71.

- [21] 孙德四, 尹健美, 陈晔, 曹飞. 钾矿物晶体结构对黑曲霉生长代谢及钾与硅的溶出影响[J]. 中国农业科学, 2014, 47(3): 503-513.
SUN DS, YIN JM, CHEN Y, CAO F. Effect of crystal structures of potassium-bearing minerals on *Aspergillus niger* growth metabolism and potassium and silicon release[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(3): 503-513 (in Chinese).
- [22] 奉鉴金, 张玉龙, 左之才, 才冬杰, 崔耀成, 甘佳, 方东辉. 一株牛源约翰逊不动杆菌的分离鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(1): 1-5, 11.
FENG JJ, ZHANG YL, ZUO ZC, CAI DJ, CUI YC, GAN J, FANG DH. Isolation and identification of a bovine *Acinetobacter johnsonii* strain[J]. Journal of Pathogen Biology, 2021, 16(1): 1-5, 11 (in Chinese).
- [23] 黄萃, 伍思华, 李钰, 黄海玲, 邬向东. 圈养白额雁约翰逊不动杆菌分离鉴定与药敏分析[J]. 野生动物学报, 2020, 41(4): 1094-1098.
HUANG C, WU SH, LI Y, HUANG HL, WU XD. Isolation, identification and drug sensitivity analysis of *Acinetobacter johnsonii* from *Anser albifrons* in zoo[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2020, 41(4): 1094-1098 (in Chinese).
- [24] 马丹, 王永刚, 陈吉祥, 杨智, 孙尚琛, 李文新. 一株高效菲降解不动杆菌的筛选、鉴定及性能研究[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(6): 15-23.
MA D, WANG YG, CHEN JX, YANG Z, SUN SC, LI WX. Isolation, identification and performances of a high-efficient phenanthrene-degrading strain of *Acinetobacter* sp.[J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(6): 15-23 (in Chinese).
- [25] 田秋丰, 张红, 尹琚伊, 史同瑞, 张军, 刘秋瑾, 王岩, 秦平伟, 王欢, 白长胜, 陈楠楠, 朱庆贺, 苗艳. 一株奶牛源约翰逊不动杆菌的分离鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(1): 324-328.
TIAN QF, ZHANG H, YIN JY, SHI TR, ZHANG J, LIU QJ, WANG Y, QIN PW, WANG H, BAI CS, CHEN NN, ZHU QH, MIAO Y. Isolation and identification of a strain *Acinetobacter johnsonii* from dairy cow[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2022, 53(1): 324-328 (in Chinese).
- [26] 谢祥聪. 高效聚磷菌的筛选、鉴定及 AJ-3、MK-6 菌株污水除磷条件优化[D]. 金华: 浙江师范大学硕士学位论文, 2015.
XIE XC. Screening and identifying PAOs, optimizing wastewater phosphorus removal conditions of strain AJ-3 and MK-6[D]. Jinhua: Master's Thesis of Zhejiang Normal University, 2015 (in Chinese).
- [27] 于源华. 生物工程与技术专业基础实验教程[M]. 北京: 北京理工大学出版社, 2016.
YU YH. Basic Experiment Course of Biology and Technology Specialty[M]. Beijing: Beijing Institute of Technology Press, 2016 (in Chinese).
- [28] 郝明辉, 于鲁冀, 李廷梅, 刘攀龙. 一株异养硝化菌的筛选及生长特性研究[J]. 生物技术通报, 2016, 32(4): 168-174.
HAO MH, YU LJ, LI TM, LIU PL. Screening and growth characteristics of a heterotrophic nitrification bacterium[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(4): 168-174 (in Chinese).
- [29] 苏丹. 约翰氏不动杆菌 DBP-3 低温生长特性及冷休克蛋白表达研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2016.
SU D. Study of the growth characteristics under low temperature and expression of cold shock protein of *Acinetobacter johnsonii* strain DBP-3[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2016 (in Chinese).
- [30] 滕青. 低品位菱镁矿石细菌预处理反浮选脱硅及综合利用研究[D]. 北京: 北京科技大学博士学位论文, 2018.
TENG Q. Study on reverse flotation desilication of bacterial pretreatment and comprehensive utilization for low-grade magnesite ore[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of University of Science and Technology Beijing, 2018 (in Chinese).
- [31] 杨锦, 沈宏. 海藻酸裂解酶高产菌株 *Microbulbifer* sp. SH-1 的分离、鉴定及其产酶条件优化[J]. 微生物学报, 2020, 60(4): 679-694.
YANG J, SHEN H. Isolation, identification and culture optimization of an alginate lyase-producing strain *Microbulbifer* sp. SH-1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(4): 679-694 (in Chinese).
- [32] 王屈祎, 钟倩, 闫如玉, 马醒佳, 王会, 刘思瑜, 吴凌天. 淀粉酶产生菌的筛选、鉴定及其发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 173-188.
WANG QY, ZHONG Q, YAN RY, MA XJ, WANG H, LIU SY, WU LT. Screening and identification of amylase-producing strain and optimization of the fermentation conditions[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 173-188 (in Chinese).