

# 粘粒矿物对细菌吸附的测定方法<sup>\*</sup>

蒋代华<sup>1,3</sup> 黄巧云<sup>2†</sup> 蔡 鹏<sup>2</sup> 荣兴民<sup>2</sup> 陈雯莉<sup>1</sup>

(1 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室,武汉 430070)

(2 华中农业大学农业部亚热带农业资源与环境重点实验室,武汉 430070)

(3 广西大学农学院,南宁 530005)

**摘 要** 本文目的是建立粘粒矿物对细菌吸附测定的方法。采用密度梯度分离介质 - Nycodenz,通过测定蛋白质与菌量的相关性,探讨了分离液的分离悬浮效果,摸索了适宜菌量、矿物量,以及吸附时间等条件。结果表明:采用测定细菌细胞的蛋白质含量来表征矿物表面细菌的吸附量是可行的;浓度为 60% (w/v)、密度  $1.31 \text{ g ml}^{-1}$  的 Nycodenz 密度梯度分离液可有效地分离矿物—细菌体系中被矿物吸附的细菌与游离的细菌;在此基础上,建立了粘土矿物表面吸附细菌的测定方法。

**关键词** 高岭石;芽孢杆菌;吸附量;Nycodenz;方法  
**中图分类号** S154.3 **文献标识码** A

微生物与矿物的相互作用是地球上广泛发生的一种地质作用<sup>[1]</sup>,至少已有 30 亿年的历史<sup>[2]</sup>。微生物过程在地球环境中元素的循环、矿物的形成和风化等方面起着非常重要的作用<sup>[3]</sup>;而微生物的分布、活性、多样性、基因的表达与转化等又都受到矿物过程的深刻影响<sup>[4~7]</sup>。

土壤是微生物的良好生存环境。一般而言,细菌是土壤中数量最多的一类微生物,约占 70%~90%,由于其个体小、代谢强、繁殖快,又与土壤颗粒表面广泛而密切接触,是土壤中最活跃的微生物<sup>[8]</sup>。土壤中的粘土矿物颗粒细小,有较强的表面活性,能与土壤中的微生物发生吸附固定作用,深刻影响着微生物在土壤中的生存和运移<sup>[9]</sup>,决定着土壤中的微生物的活性。研究土壤粘土矿物对微生物的吸附与固定及其两者的相互作用,对于认识土壤的形成演化、揭示污染物转化和降解规律、评价微生物对污染土壤的修复效率以及土壤质量和健康风险预测等具有重要的意义<sup>[10,11]</sup>。此外,在医学医药领域中有关细菌与粘土矿物相互作用的认识,可以探明粘土矿物抗菌治病的机制,促进粘土矿物药用价值的应用与开发<sup>[12,13]</sup>。利用细菌提取有用金属的生物冶金技术可大大提高矿物冶炼的效率<sup>[14,15]</sup>。

有关矿物对细菌吸附的研究,以往多集中于原生矿物体系,颗粒粒径一般在 50~200  $\mu\text{m}$  以上<sup>[16~20]</sup>,少有涉及到粒径小于 2  $\mu\text{m}$  的粘粒。主要是由于粘粒的颗粒大小与细菌细胞相近,分离游离态的细菌细胞与吸附固定态细胞的困难是限制粘土矿物与细菌相互作用研究的主要障碍。本研究引入在细胞及生物大分子分离中的等密度梯度分离法,采用挪威 AXIS-SHIELD Bc AS 公司生产的密度梯度分离试剂 - Nycodenz 尝试解决这一难题,试图在粘土矿物对细菌的吸附研究方法上作一些探索,为矿物与细菌相互作用的研究提供新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试细菌菌株

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*),为本实验室保存的菌株。

### 1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨。分别称取牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g 和 NaCl 5 g 于 100 ml 双蒸水中,加热溶解,加水至 950 ml,用 10% 的 NaOH 调 pH 至 7.0,定容至 1 000 ml,分装后于 121 高压灭菌 30 min。

<sup>\*</sup> 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目

<sup>†</sup> 通讯作者, E-mail: qyhuang@mail.hzau.edu.cn

作者简介:蒋代华(1962~),男,副教授,现主要从事土壤环境微生物方面的研究。E-mail: jdh-003@163.com

收稿日期:2006-03-17;收到修改稿日期:2006-07-21

### 1.3 供试矿物

称取高岭石试剂(化学纯、上海五四化学试剂公司)200 g于2 000 ml烧杯中,加100~150 ml去离子水,搅拌混匀。加10~15 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>后不断搅拌以去除有机质(重复此步骤直至无明显气泡产生)。除净有机质后的高岭石悬液用0.5 mol L<sup>-1</sup>的NaOH或HCl调节pH至11,加去离子水至400 ml,超声波分散30 min,并不断搅拌。分散后的悬液过320目筛,沉降法分离小于2 μm的胶体。悬液用0.5 mol L<sup>-1</sup>的CaCl<sub>2</sub>絮凝,再用去离子水和95%的酒精洗至无Cl<sup>-</sup>,50~60℃下烘干,过100目筛,保存备用。

### 1.4 Nycodenz 试剂

挪威AXIS-SHIELD P6C AS公司生产。Nycodenz是一种含碘酰胺苯类有机化合物(分子式:C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>I<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>,分子量:821.14。标准命名(IUPAC):N,N-双(2,3-二羟基丙基)-5-[N-(2,3-二羟基丙基)乙酰胺基]-2,4,6-三碘-1,3-N-苯二甲酰胺)。60%(w/v)的Nycodenz密度梯度分离液(以下简称分离液)配制:将8 g 99.8%Nycodenz固体粉末溶于10 ml无菌双蒸水中即可。后续矿物吸菌后的分离实验皆用此浓度溶液。

### 1.5 菌液制备

用接种环挑取一环4℃保藏的菌株于盛有5 ml牛肉膏蛋白胨液体培养基的PA瓶中,28℃下、200 r min<sup>-1</sup>摇动7 h。吸取活化的菌液2 ml于盛有200 ml培养基的500 ml三角瓶中,同样条件下培养14 h,7 000 r min<sup>-1</sup>离心5 min,菌体经双蒸水清洗3遍,悬于pH 7.0的0.02 mol L<sup>-1</sup>Tris-HCl缓冲液中备用。经稀释平板计数检测菌数为10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>。根据测定的该菌的生长曲线可知其生长处于稳定期。实验所有用菌都严格控制在这一生长期。

### 1.6 细菌细胞蛋白质含量的测定及方法选择

细菌细胞裂解:分别吸取3、6、9、12、15、20 ml菌液于50 ml平底带盖塑料管中,加缓冲液至23 ml。加入2 ml 6.25 mol L<sup>-1</sup>NaOH使体系NaOH最终浓度达到0.5 mol L<sup>-1</sup>。在100℃水浴中保持30 min。冷却后过滤,滤液中蛋白质含量按以下两种方法测定。

考马斯亮兰法<sup>[21]</sup>:吸取1 ml含10~100 μg ml<sup>-1</sup>的蛋白质滤液于玻璃管中,加入5 ml考马斯亮兰显色剂,摇匀,室温下放置2 min,用DU 800紫外-可见分光光度计测定595 nm的吸光值。

Folin酚试剂法<sup>[21]</sup>:吸取0.5 ml含20~500 μg ml<sup>-1</sup>的蛋白质滤液于玻璃管中,加入福林试剂甲5 ml,摇匀,室温下放置10 min,加入福林试剂乙0.5

ml,立即混匀,室温下静置15 min,于DU800紫外-可见分光光度计测定500 nm的吸光值。

对12%(v/v)的60%(w/v)Nycodenz溶液、88%(v/v)0.02 mol L<sup>-1</sup>Tris-HCl溶液、12%(v/v)的60%(w/v)Nycodenz加88%(v/v)0.02 mol L<sup>-1</sup>Tris-HCl混合溶液以及水(对照),分别用考马斯亮兰法和Folin-酚试剂法测定它们的光密度值。

### 1.7 分离液悬浮细菌细胞实验

分别吸取1、3、6、9、12、15、20 ml的菌液于50 ml塑料离心管中,加pH 7.0的0.02 mol L<sup>-1</sup>Tris-HCl缓冲液至20 ml。充分混匀,吸取分离液3 ml于离心管底部使之分层。4℃、4 000 r min<sup>-1</sup>离心15 min,上清液倒入50 ml平底塑料管中。按1.6法进行细菌细胞裂解、考马斯亮兰法测定蛋白质含量。

### 1.8 矿物悬液分离实验

分别称取高岭石样品20、50、100 mg于50 ml离心管中,加入20 ml 0.02 mol L<sup>-1</sup>Tris-HCl缓冲液,充分分散后,加3 ml分离液于离心管的底部,4℃、4 000 r min<sup>-1</sup>离心15 min。弃去上清液,沉淀有矿物的离心管于105℃烘至恒重,计算沉淀的矿物重量。同时,分别称取相同重量的系列高岭石样品于50 ml离心管中,直接放于105℃烘至恒重,计算沉淀的矿物重量。

### 1.9 适宜矿物用量、细菌菌量及吸附时间的确定实验

分别称取0、15、25、30、35、40、50、60 mg高岭石于50 ml离心管中,加入0.02 mol L<sup>-1</sup>Tris-HCl缓冲液5 ml,充分分散后,再加菌悬液15 ml,总体积为20 ml。25℃、200 r min<sup>-1</sup>摇动60 min。加分离液3 ml,4℃、4 000 r min<sup>-1</sup>离心15 min。上清液倒入50 ml平底塑料管中。按1.6法进行细菌细胞裂解、考马斯亮兰法测定蛋白质含量。用加入菌量的蛋白质量减去上清液的蛋白质量表示矿物对细菌的吸附量。

称取高岭石35 mg于50 ml离心管中,分别加入0、3、6、9、12、15、20 ml菌液。加0.02 mol L<sup>-1</sup>Tris-HCl缓冲液至20 ml。后同上进行振荡、离心分离及蛋白质含量的测定。

分别称取35 mg矿物,加Tris-HCl缓冲液5 ml,充分分散后再加菌液15 ml,总体积20 ml。25℃、200 r min<sup>-1</sup>下,分别振荡15、30、45、60、120和240 min后,同上进行离心分离及蛋白质含量测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌量与蛋白质含量的关系

目前,细菌数量的检测有平板计数法、显微镜直

接计数法、同位素标记计数法、荧光闪烁计数等方法,其中平板计数法最为常用。这些方法测定时结果误差较大,难以用于精确定量表征细菌的数量。为此,本实验采用测定细菌细胞的蛋白质含量的方法来表征细菌的量。以土壤中常见的苏云金芽孢杆菌作为供试菌,测定其系列菌量的蛋白质含量。菌量从  $3 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$  个细胞的范围内,相应的蛋白质含量为  $790 \sim 3570 \mu\text{g}$  之间。由图 1 可见,不同菌量芽孢杆菌与测定的蛋白质含量之间呈极显著的正相关性 ( $R^2 = 0.9919, n = 6, p < 0.001$ )。因此,在目前细菌计数尚无精确的定量方法的情况下,用细菌细胞蛋白质含量来表征体系中细菌的数量是可行的。

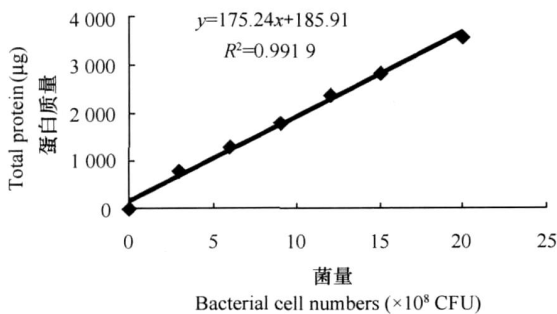


图 1 芽孢杆菌菌量与蛋白质含量的关系

Fig. 1 Correlation between total protein and count of *B. thuringiensis*

## 2.2 分离液和缓冲液对蛋白质测定的影响

为了解分离液及缓冲液是否会对蛋白质测定产生影响。本实验比较了 12% (v/v) 的 60% (w/v) Nycodenz 溶液、88% (v/v) 的  $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  Tris-HCl 溶液、12% (v/v) 的 60% (w/v) Nycodenz 加 88% (v/v) 的  $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  Tris-HCl 混合溶液(后续实验中测定蛋白质时的实际浓度)及水溶液用考马斯亮兰法和 Folin-酚试剂法测定的光密度值。测定结果为:考马斯亮兰法测定的水、缓冲液、分离液、分离液 + 缓冲液的光密度值均为 0。说明各体系对考马斯亮兰法测定蛋白质均不产生干扰。而 Folin-酚试剂法测定的水、缓冲液、分离液、分离液 + 缓冲液各体系的光密度值分别为 0、0、0.204 和 0.202。表明分离液对 Folin-酚试剂法测定蛋白质有较大干扰,而 Tris-HCl 缓冲液无干扰。故本实验选择考马斯亮兰法测定细菌细胞的蛋白质含量。

## 2.3 分离液悬浮细菌细胞的效果

在矿物与细菌相互作用后的体系中,如何分离吸附在矿物表面的细菌与未被吸附的细菌是本研究最为关注的问题。考虑到粘土矿物的密度一般为  $2.6 \sim 2.7 \text{ g ml}^{-1}$ ,细菌细胞的密度为  $1.02 \sim 1.12 \text{ g ml}^{-1}$ ,本

实验采用等密度梯度离心法解决这一关键问题。等密度梯度离心法的原理是密度分离介质在离心力的作用下形成密度梯度分布,被分离的粒子随密度大小的不同依次沉降。最后,样品中不同密度的粒子就停留在相应的密度位置上而得到分离。这一方法的特点是,分离只与样品粒子的密度有关,而与粒子的大小、形状等参数无关<sup>[22]</sup>。浓度为 60% (w/v)、密度为  $1.31 \text{ g cm}^{-3}$  的 Nycodenz 水溶液常用于分离各种生物大分子、细胞器及细胞<sup>[23]</sup>,也用作土壤 DNA 提取的分离介质<sup>[24]</sup>。

为了弄清 Nycodenz 分离液悬浮细菌细胞的实际效果,进行了分离液悬浮不同数量芽孢杆菌细胞的实验。经测定不同浓度的细菌细胞蛋白质含量的结果(表 1)表明:当菌液量为 1 ml 时,用分离液离心悬浮测定的细菌细胞蛋白质量为  $180.1 \mu\text{g}$ ;不用分离液而直接测定的细菌细胞蛋白质量为  $169.2 \mu\text{g}$ ;当菌液量增加至 9 ml 时,两种方式测定的蛋白质含量分别为  $1850 \mu\text{g}$  和  $1835 \mu\text{g}$ ;菌液量达 20 ml 时,分别为  $3531 \mu\text{g}$  和  $3495 \mu\text{g}$ 。对比两种方式的蛋白质测定值,可以说明 Nycodenz 分离液完全能够将不同数量的细菌细胞悬浮起来。表 1 数据统计显示,分离液离心悬浮和未用分离液悬浮的菌量与蛋白质含量之间都具有极显著的正相关 ( $R_{\text{悬浮}}^2 = 0.9919, R_{\text{未悬浮}}^2 = 0.9911, n = 7, p < 0.001$ )。可见,等密度分离介质—Nycodenz 对不同浓度的细菌细胞有很好的悬浮效果。

同时,为探明供试的矿物颗粒能否穿越密度梯度分离液,进行了纯矿物的分离液离心实验。不同重量的高岭石样品经分离液离心沉淀后烘干称重,与对照的矿物烘干重的结果列入表 2。由表 2 可见,矿物称量为 20 mg 时,分离液处理的矿物烘干重与未经分离液处理的矿物烘干重分别为 19.3 和 19.2 mg。矿物量增加为 100 mg 时,测定值分别为 95.5 和 95.3 mg。可见,三个重量不一的高岭石颗粒经分离液离心沉淀烘干重与未经分离液离心分离而直接烘干重没有差别,说明矿物颗粒在分离液离心体系中能顺利穿过分离液层而沉淀于离心管管底,表明分离液不能阻止颗粒微小但密度大于它的矿物粒子的沉淀。

综合以上结果可以看出,Nycodenz 分离液是一种较理想的密度梯度介质,它可以完全悬浮不同浓度菌液中的细菌细胞而允许微小的矿物颗粒沉淀,可达到有效分离矿物与细菌共存体系中两种组分的目的。

## 2.4 适宜矿物用量的确定

在进行粘土矿物吸附细菌实验时,如果体系中矿物浓度过高,矿物颗粒之间可能会相互聚集而产生絮凝作用,干扰矿物对细菌的正常吸附。

如果矿物浓度过低,加入体系中的细菌菌量较少,吸附平衡后细菌细胞的蛋白质含量又难以检测。因此,选择合适的矿物用量是实验首要解决的问题之一。

表 1 分离液离心悬浮菌液的效果

Table 1 Suspending effect of bacteria by Nycodenz solution

菌量 <i>B. thuringiensis</i> cell numbers ( $\times 10^8$ CFU)	分离液悬浮蛋白质质量 Total protein of bacteria treated with Nycodenz ( $\mu\text{g}$ )	未用分离液悬浮蛋白质质量 Total protein of bacteria without Nycodenz treatment ( $\mu\text{g}$ )
1	180.1 $\pm$ 3.7	169.2 $\pm$ 3.9
3	630.9 $\pm$ 4.6	595.4 $\pm$ 4.8
6	1 200 $\pm$ 8	1 165 $\pm$ 8
9	1 850 $\pm$ 11	1 835 $\pm$ 11
12	2 280 $\pm$ 12	2 320 $\pm$ 13
15	2 660 $\pm$ 15	2 773 $\pm$ 14
20	3 531 $\pm$ 18	3 495 $\pm$ 18

表 2 分离液分离矿物的效果

Table 2 Effects of separation of clay mineral by Nycodenz solution

称取矿物重量 Air dry weight of kaolinite (mg)	未经分离液处理的矿物烘干重 Dry weight of kaolinite without Nycodenz (mg)	分离液处理后沉淀于离心管 管底的矿物烘干重 Dry weight of kaolinite with Nycodenz (mg)
20	19.2 $\pm$ 0.4	19.3 $\pm$ 0.4
50	47.8 $\pm$ 0.3	48.0 $\pm$ 0.3
100	95.3 $\pm$ 0.2	95.5 $\pm$ 0.2

研究设计了在固定菌量体系中系列浓度高岭石对细菌的吸附实验。图 2 表明,体系中的菌量为  $1.5 \times 10^9$  个细胞时,随着矿物浓度的增加细菌的吸附量也逐渐增加;矿物量为 15 mg 时细菌吸附量为  $38.34 \mu\text{g mg}^{-1}$ ;当矿物量增加到 35 mg 以上时吸附

达到饱和,此时的细菌吸附量为  $68.51 \mu\text{g mg}^{-1}$ 。继续增加矿物量达 40 ~ 60 mg,则细菌吸附量稳定在  $68.99 \sim 69.03 \mu\text{g mg}^{-1}$ 。可见,在本实验条件下,矿物用量应选择 35 ~ 50 mg ( $1.75 \sim 2.50 \text{ mg ml}^{-1}$ ) 范围为佳。

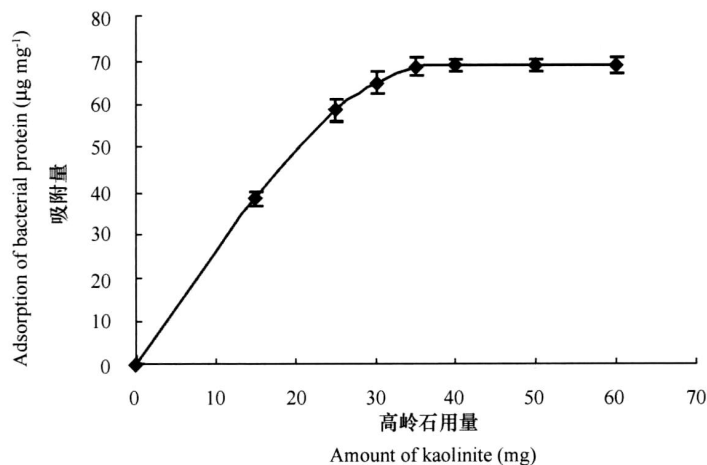


图 2 不同浓度高岭石对芽孢杆菌的吸附曲线

Fig. 2 Adsorption of *B. thuringiensis* by kaolinite at different concentrations

## 2.5 合适菌量的确定

确定合适的菌量是粘土矿物吸附细菌实验的又一重要环节。体系中的细菌数量既要保证细菌细胞之间不能相互胶结和聚合,又能满足蛋白质含量的检测要求。为此,进行了系列菌量的吸附实验。

图3显示,在恒定高岭石浓度的条件下,在低菌量( $< 1.5 \times 10^9$ 个细胞,即 $< 7.5 \times 10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ )体系中,细菌吸附量随菌量的增加而增加。高菌量( $> 1.5 \times 10^9$ 个细胞,即 $> 7.5 \times 10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ )时,吸附量随菌量的增加而降低。菌量在 $1.5 \times 10^9$ 个细胞( $7.5 \times 10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ )时吸附量达到最大值( $74.99 \mu\text{g mg}^{-1}$ )。由此可知,在粘土矿物与细菌作用的复杂体系中要研究二者的相互作用特点如矿物对细菌的吸附量等时选择适宜的菌量至关重要。根据以上结果,在本实验及类似的条件下,粘土矿物吸附细菌实验适宜的菌量以 $(12 \sim 15) \times 10^8$ 个细胞,即 $(6 \sim 7.5) \times 10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ 为佳。

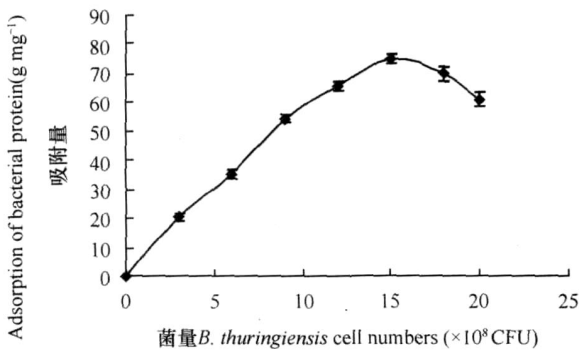


图3 高岭石对不同浓度芽孢杆菌的吸附曲线

Fig. 3 *B. thuringiensis* adsorption curve by kaolinite

## 2.6 吸附时间的确定

为了确定矿物吸附细菌实验的最佳时间,在矿物用量 35 mg 和芽孢杆菌菌量  $1.5 \times 10^9$  个细胞,总体积控制在 20 ml 的条件下,设计了 15、30、45、60、120 和 240 min 等系列时间的吸附实验。由图4可见,高岭石对芽孢杆菌的吸附量由 15 min 时的  $37.77 \mu\text{g mg}^{-1}$  快速上升到 45 min 时的  $70.36 \mu\text{g mg}^{-1}$ ; 60 min 后,吸附量达  $72.57 \mu\text{g mg}^{-1}$ ,之后随着时间的继续延长吸附量稳定在  $72.63 \sim 72.70 \mu\text{g mg}^{-1}$ 。240 min 时的吸附量仍为  $72.70 \mu\text{g mg}^{-1}$ 。说明,本实验条件下,高岭石表面吸附芽孢杆菌在 60 min 后进入了饱和状态,达到最大吸附量。这与一般的化学平衡吸附实验中固相表面吸附离子及分子达到平衡的时间 1 h 左右基本一致。因此,研究粘土矿物表面吸附细菌细胞的平衡时间应选择 1

h 以上为宜。

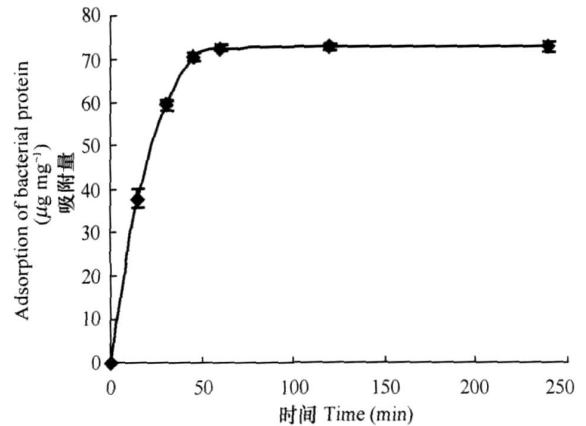


图4 不同时间高岭石对芽孢杆菌的吸附曲线

Fig. 4 Adsorption of *B. thuringiensis* by kaolinite vs time

## 3 结论

本研究通过定量测定细菌细胞的蛋白质含量及其相关性分析,探讨了等密度梯度分离法对矿物和细菌细胞悬液分离悬浮效果,摸索了在矿物吸附细菌体系中适宜的矿物用量和细菌菌量以及吸附达到平衡的最佳时间。综合以上结果与分析可以得出:

细菌数量与细菌细胞蛋白质含量有极显著的正相关性,细菌细胞蛋白质含量可以精确的定量测定,用蛋白质含量来表征矿物对细菌的吸附量是可行的。Nycodenz 密度梯度分离液是理想的分离介质,它可以有效地分离吸附平衡后的共存体系中游离细菌细胞与吸附态的细菌细胞,首次尝试了长期以来困扰粘土矿物吸附细菌后的体系中矿物与细菌分离的难题。在进行粘土矿物对细菌的吸附研究时,体系中细菌的数量以控制在  $(6 \sim 7.5) \times 10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  细胞为佳,  $1.75 \sim 2.50 \text{ mg ml}^{-1}$  为适宜的矿物浓度范围,经 60 min 左右吸附平衡后,即用 3 ~ 5 ml 浓度为 60% (w/v) 的 Nycodenz 试剂分离游离态与吸附态的细菌细胞,矿物对细菌的吸附量用考马斯亮兰法测定的细菌细胞的蛋白质含量表示。

粘土矿物对细菌吸附的测定方法,可以为矿物与微生物的相互作用的定量及深入研究提供方法。

## 参考文献

- [1] Ehrlich H.L. How microbe influence mineral growth and dissolution. *Chemical Geology*, 1996, 132: 1 ~ 3
- [2] Lower K.S., Tadanier C.J., Hochella M.F. Dynamics of the mineral-mi-

- crobe interface: Use of biological force microscopy in biogeochemistry and geomicrobiology. *Geomicrobiology Journal*, 2001, 18: 63 ~ 76
- [ 3 ] Liu B R, Jia G M, Chen J, *et al.* A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere*, 2006, 16(1): 18 ~ 24
- [ 4 ] Arredondo R, Garcia A, Jerez C A. Partial removal of lipopolysaccharide from *hiobacillus ferrooxidans* affects its adhesion to solids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60: 2 846 ~ 2 851
- [ 5 ] Trevors J T, Elsas J D. Quantification of gene transfer in soil and the rhizosphere. In: Hurst C J. ed. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington, USA: Am. Soc. Microbio., 1997. 500 ~ 508
- [ 6 ] Hölben W E. Isolation and purification of bacterial community DNA from environmental samples. In: Hurst C J. ed. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington, USA: Am. Soc. Microbio., 1997. 431 ~ 436
- [ 7 ] Kennedy A C, Gewin V L. Soil microbial diversity: Present and future considerations. *Soil Sci.*, 1997, 162: 607 ~ 617
- [ 8 ] 陈文新, 胡正嘉. 土壤和环境微生物学. 北京: 北京农业大学出版社, 1996. 23 ~ 24. Chen W X, Hu Z J. *Soil and Environment Microbiology* (In Chinese). Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1996. 23 ~ 24
- [ 9 ] 李桂花, 李保国. 大肠杆菌在饱和砂质壤土中非平衡运移的 CDE 数学模型模拟. *土壤学报*, 2006, 43(2): 197 ~ 202. Li G H, Li B G. Non-equilibrium transport of *E. coli* saturated sandy loam and its simulation with CDE model (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(2): 197 ~ 202
- [ 10 ] 孙玉焕, 骆永明. 污泥中病原物的环境与健康风险及其削减途径. *土壤*, 2005, 37(5): 474 ~ 481. Sun Y H, Luo Y M. Environmental and health risks of pathogens in sewage sludge and their abating approaches (In Chinese). *Soils*, 2005, 37(5): 474 ~ 481
- [ 11 ] 赵炳梓, 张佳宝. 病毒在土壤中的迁移行为. *土壤*, 2006, 43(2): 306 ~ 313. Zhao B Z, Zhang J B. Transport of viruses in the soil: An overview (In Chinese). *Soils*, 2006, 43(2): 306 ~ 313
- [ 12 ] 汤庆国, 沈上越, 梁金生, 等. 粘土矿物的药理作用及其医药应用. *硅酸盐学报*, 2005, 33(8): 1 036 ~ 1 040. Tang Q G, Shen S Y, Liang J S, *et al.* Pharmacological effects and pharmaceutical application of clay minerals (In Chinese). *Journal of the Chinese Ceramic Society*, 2005, 33(8): 1 036 ~ 1 040
- [ 13 ] 胡秀荣, 吕光烈, 陈林深, 等. 天然蒙脱石与细菌相互作用机理的研究. *药学报*, 2002, 37(9): 718 ~ 720. Hu X R, Lu G L, Chen L S, *et al.* Study on the mechanism of the interaction between montmorillonite and bacterium (In Chinese). *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2002, 37(9): 718 ~ 720
- [ 14 ] 谢先德, 张刚生. 微生物-矿物相互作用之环境意义的研究. *岩石矿物学杂志*, 2001, 20(4): 382 ~ 386. Xie X D, Zhang G S. Study on environmental significance of microorganism-mineral interaction (In Chinese). *Acta Petrologica et Mineralogica*, 2001, 20(4): 382 ~ 386
- [ 15 ] 张在海, 胡岳华, 邱冠周, 等. 从细菌学角度探讨硫化矿物的细菌浸出. *矿冶工程*, 2000, 6(2): 15 ~ 18. Zhang Z H, Hu Y H, Qiu G Z, *et al.* Discuss on the bacterial leaching of sulfide ores from point of view of bacteriology (In Chinese). *Mining and Metallurgical Engineering*, 2000, 6(2): 15 ~ 18
- [ 16 ] Zheng X P, Peggy J A, Smith R W. Adhesion of two bacteria onto dolomite and apatite: Their effect on dolomite depression in anionic flotation. *Int. J. Miner. Process*, 2001, 62: 159 ~ 172
- [ 17 ] Namita D, Natarajan K A, Somasundaran P. Mechanisms of adhesion of *Paenibacillus polymyxa* onto hematite, corundum and quartz. *Int. J. Miner. Process*, 2001, 62: 27 ~ 39
- [ 18 ] Nathan Y, Fein J B, Daughney C J. Experimental study of the pH, ionic strength, and reversibility behavior of bacteria. mineral adsorption. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, 64(4): 609 ~ 617
- [ 19 ] Shashikala A R, Raichur A M. Role of interfacial phenomena in determining adsorption of *Bacillus polymyxa* onto hematite and quartz. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 24: 11 ~ 20
- [ 20 ] Schilling K M, Carson R G, Bosko C A. A microassay for bacterial adherence to hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1994, 3: 31 ~ 38
- [ 21 ] 何忠效. 生物化学实验指导书. 北京: 化工工业出版社, 2003. 7 ~ 8. He Z X. ed. *Biochemistry Experiment* (In Chinese). Beijing: Chemical Industry Press, 2003. 7 ~ 8
- [ 22 ] 张丰德, 王秀玲. 现代生物学技术(第二版). 天津: 南开大学出版社, 2001. 136 ~ 145. Zhang F D, Wang X L. eds. *Modern Biochemistry Technology* (In Chinese). 2nd Ed. Tianjing: Nankai University Press, 2001. 136 ~ 145
- [ 23 ] Aakra A M, Hesselsoe L, Bakken R. Surface attachment - oxidizing bacteria in soil. *Microbial Ecology*, 2000, 39: 222 ~ 235
- [ 24 ] Anders P J, Ikeana B S, Klemedtsson A K. Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, 21: 59 ~ 68

## A METHOD FOR DETERMINATION OF BACTERIA ADSORPTION BY CLAY MINERALS

Jiang Daihua<sup>1,3</sup> Huang Qiaoyun<sup>2†</sup> Cai Peng<sup>2</sup> Rong Xingmin<sup>2</sup> Chen Wenli<sup>1</sup>

(1 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(2 Key Laboratory of Subtropical Agricultural Resources and Environment, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(3 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China)

**Abstract** Interactions between bacteria and clay minerals are ubiquitous in soil and sediments. Previous studies on bioadsorption of bacteria focused mainly on large particles like quartz sands. Few methods for investigation of bacteria on clayey soil

components are available. This study aims to establish a method for determination of adsorption of bacteria on clay minerals. Kaolinite and *B. thuringiensis* were used as the test bacterial strain and clay mineral. Nycodenz—density gradient solution was used to separate free bacterial cells from those adsorbed. Correlation between total protein and count of bacteria was analyzed. Suspending and separating effects of Nycodenz solution on bacteria and minerals were tested. Appropriate ranges of bacterial number and clay mineral, and equilibrium time were determined. Results show significant correlation between total bacterial protein and count of bacteria ( $R^2 = 0.9919$ ). Total protein of bacteria could be used to represent the amount of bacteria adsorbed on minerals. Data reveal that Nycodenz solution, 60% (w/v) in concentration and  $1.31 \text{ g ml}^{-1}$  in density, is an efficient density gradient medium to separate free bacteria from those adsorbed on clay minerals. No interferences were observed of the 12% (v/v) Nycodenz solution on protein measurement by the Bradford method. Maximum adsorption of bacteria on kaolinite occurred 60 min after getting in contact and then leveled off. The method could be extended to the study on interactions of minerals and microorganisms.

**Key words** Kaolinite; *B. thuringiensis*; Adsorption; Nycodenz; Method