

# 低分子量有机配体对黏粒矿物吸附苏云金芽孢杆菌的影响\*

吴华勇 蒋代华 蔡鹏 荣兴民 黄巧云<sup>†</sup>

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 农业部亚热带农业资源与环境重点开放实验室, 武汉 430070)

## EFFECTS OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT ORGANIC LIGANDS ON ADSORPTION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* BY CLAY MINERALS

Wu Huayong Jiang Daihua Cai Peng Rong Xingmin Huang Qiaoyun<sup>†</sup>

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

关键词 苏云金芽孢杆菌; 黏粒矿物; 吸附; 有机配体

中图分类号 S154 文献标识码 A

土壤是微生物的理想栖息地, 土壤微生物群落组成复杂, 数量巨大。1g 土壤中可能栖息着上百亿个微生物, 其中细菌可达  $10^{10}$  个<sup>[1]</sup>。约 80%~90% 的土壤微生物寄居于土壤固相表面, 如粘土矿物、金属氧化物或有机质表面<sup>[2]</sup>。细菌与矿物间的相互作用在土壤污染物转化与降解、团聚体形成<sup>[3]</sup>、矿物风化<sup>[4-6]</sup>及病原菌运移<sup>[7-8]</sup>等诸多过程起着关键作用。

已有研究表明, 细菌在矿物表面的初始吸附受细菌种类、矿物类型及溶液化学性质的影响。Yee 等<sup>[9]</sup>发现枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 在刚玉表面较石英表面有更强的吸附亲和力, 且在刚玉表面的吸附量随 pH (4 ~ 11) 或离子强度 ( $0.1 \sim 100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 的升高而降低。Ams 等<sup>[10]</sup>报道铁氧化物包被显著促进枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和门多萨假单胞菌 (*Pseudomonas mendocina*) 在石英表面的吸附, 且在 pH 4 ~ 9 间, 随 pH 值的升高, 吸附量下降。枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 较门多萨假单胞菌 (*P. mendocina*) 在铁氧化物包被的石英表面有更高的吸附量。新近的研究发现恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 优先吸附于针铁矿上, 其次是高岭石和蒙脱石, 细菌吸附量随 pH (3 ~ 10) 升高或离子强度 ( $50 \sim 0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 的降低而降低<sup>[11-13]</sup>。

土壤溶液作为土壤颗粒与细菌发生相互作用的介质, 其中存在多种低分子量有机配体。这些有机配体来源于植物根系和微生物的分泌作用及土壤有机质降解等生物化学过程<sup>[14]</sup>。低分子量有

\*国家自然科学基金项目 (40825002) 资助

<sup>†</sup>通讯作者, E-mail: [qyhuang@mail.hzau.edu.cn](mailto:qyhuang@mail.hzau.edu.cn)

作者简介: 吴华勇 (1986—), 男, 河南周口人, 博士研究生, 研究方向为土壤生物化学。E-mail: [wuhuayong@webmail.hzau.edu.cn](mailto:wuhuayong@webmail.hzau.edu.cn)。吴华勇和蒋代华对本研究工作的贡献相同。

收稿日期: 2010-10-10; 收到修改稿日期: 11-05-08

机配体在土壤溶液中的浓度范围很广，最低可小于  $1 \mu\text{molL}^{-1}$ ，最高可达  $6.7 \text{ mmolL}^{-1}$ ，且在根际土壤中的浓度，一般都高于土壤本体溶液<sup>[14]</sup>。低分子量有机配体被土壤颗粒吸附后，可导致土壤颗粒表面电荷和电动性质的变化<sup>[15-16]</sup>。Xu 等<sup>[15]</sup>报道在  $2.5 \text{ mmolL}^{-1}$  柠檬酸盐存在条件下，可变电荷土壤（Rhodic ferrasol）的负电荷增加了 18.1%，正电荷降低了 62.4%。当柠檬酸盐的浓度从 0 升至  $0.15 \text{ mmolL}^{-1}$  时，这种土壤的电动电位从  $-3 \text{ mV}$  降到  $-24 \text{ mV}$ <sup>[16]</sup>。这些有机配体与土壤颗粒的相互作用，已经对土壤胶体和矿物表面吸附生物大分子产生显著的影响，如酸性磷酸酶<sup>[17]</sup>、DNA<sup>[18]</sup> 等。因此，有机配体也可能对矿物表面吸附细菌产生深刻影响。然而，到目前为止，还很少有关于有机配体影响细菌在矿物表面吸附的定量研究。土壤溶液中，醋酸盐、草酸盐、酒石酸盐及柠檬酸盐是主要的低分子量有机配体，分别代表脂肪族的一元、二元和三元羧酸盐。苏云金芽孢杆菌是土壤中普遍存在的革兰氏阳性菌。因此，本研究旨在定量分析上述 4 种低分子量有机配体对高岭石、蒙脱石及针铁矿表面吸附苏云金芽孢杆菌的影响特征，为阐明土壤环境中细菌与矿物间的相互作用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 矿物制备

高岭石和蒙脱石为化学纯试剂，分别购自上海五四化学试剂公司和河南信阳蒙脱石公司。将矿物悬于去离子水中，搅匀后用  $0.01 \text{ molL}^{-1}$  NaOH 调节悬液 pH 至 10，超声波分散 30min。分散后的悬液过 320 目筛（0.048 mm），沉降法分离小于  $2 \mu\text{m}$  的胶体。矿物胶体悬液用  $0.5 \text{ molL}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  絮凝，再用去离子水和 95% 的酒精洗至无  $\text{Cl}^{-1}$ ， $60^\circ\text{C}$  下烘干。针铁矿按 Atkinson 等<sup>[19]</sup>的方法合成，并用 X-射线衍射仪鉴定。研磨 3 种矿物过 100 目筛（0.15 mm），保存备用。高岭石、蒙脱石及针铁矿的电荷零点采用酸碱滴定法测定，大小分别为 3.6、2.5 及 8.3。

### 1.2 细菌培养

供试苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）由农业微生物学国家重点实验室保存。保存的菌种经活化后转入牛肉膏蛋白胨液体培养基中，在  $28^\circ\text{C}$  恒温摇床中培养 14h 至稳定期。菌液在  $7000 \text{ rmin}^{-1}$  转速下离心分离，再用去离子水洗涤 3 次，并重悬于 pH7.0 的  $10 \text{ mmolL}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液中备用。菌悬液浓度用稀释平板计数法检测，并调配为  $2 \times 10^8 \text{ CFUml}^{-1}$  用于后续实验。细菌的电荷零点采用酸碱滴定法测定，大小为 2.7。

### 1.3 供试低分子量有机配体

配体为醋酸钠、草酸钠、酒石酸钠及柠檬酸钠，均为分析纯。

### 1.4 细菌-矿物吸附

在 50ml 离心管中，分别加入 35mg 矿物、5ml 配体溶液和  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液、15ml 菌悬液，体系终体积为 20ml，有机配体终浓度范围为  $0 \sim 80 \text{ mmolL}^{-1}$ 。混合物在  $25^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ rmin}^{-1}$  下振荡 1h。预实验显示反应平衡时间小于 1h。按蒋代华等<sup>[20]</sup>的方法分离测定游离态细菌，加 3ml

质量百分浓度为 60% 的 Nycodenz 分离液于离心管底部，在  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $4000\text{rmin}^{-1}$  的条件下水平离心 15min。上清液倒入 50ml 平底塑料管中，加 Tris-HCl 缓冲液至 23ml，加 2ml  $6.25\text{molL}^{-1}$  NaOH，使体系的 NaOH 终浓度为  $0.5\text{molL}^{-1}$ 。在  $100^{\circ}\text{C}$  水浴下消解 30min，冷却后过滤，按考马斯亮蓝法测定滤液中的细菌蛋白含量。吸取 1ml 滤液于玻璃管中，加入 5ml 考马斯亮兰染色液，摇匀，室温下放置 2min 后，用 DU 800 紫外-可见分光光度计测定 595nm 的吸光值。因苏云金芽孢杆菌的数量与细菌蛋白质含量有极显著正相关性，因此用细菌细胞蛋白质含量来表征细菌数量<sup>[20]</sup>。细菌在矿物表面的吸附量等于初始加入的菌量与游离态菌量的差值。

## 1.5 数据处理

图表中数据以平均值±标准差表示。统计分析使用 SAS 8.01，实验数据的差异显著性水平采用 Fisher 的最小显著差检验， $p < 0.05$  时认为差异显著。为探讨不同种类配体的影响差异，按下式计算了 4 种配体对矿物表面吸附细菌的抑制效率：

配体的抑制效率 =  $1 - (\text{有配体时细菌的吸附量} / \text{无配体时细菌的吸附量})$ 。

## 2 结果

### 2.1 配体浓度对苏云金芽孢杆菌吸附的影响

由图 1 可知，当草酸盐、酒石酸盐及柠檬酸盐浓度分别从 0 增至 5、20 及  $40\text{mmolL}^{-1}$  时，苏云金芽孢杆菌在高岭石表面的吸附量一直显著下降 ( $p < 0.05$ )，当配体浓度高于上述各浓度时，苏云金芽孢杆菌的吸附量轻微下降或趋于稳定。而醋酸盐浓度在  $0 \sim 80\text{mmolL}^{-1}$  范围内时，苏云金芽孢杆菌的吸附量一直轻微下降。

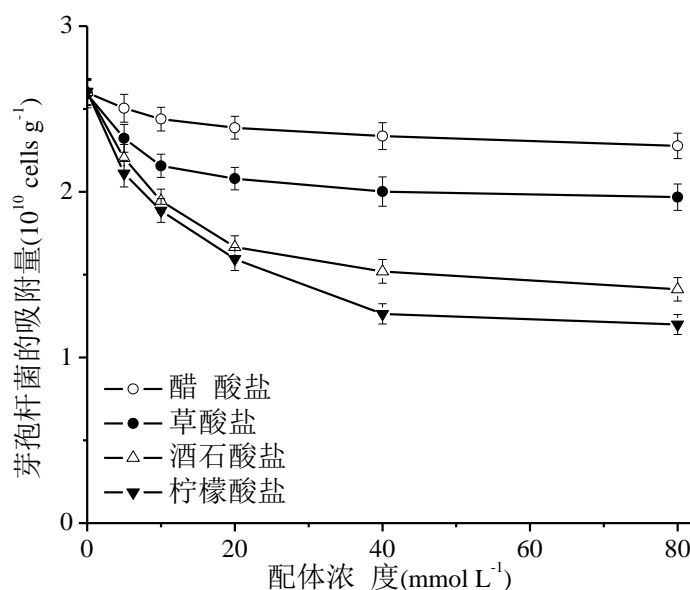


图 1 配体对苏云金芽孢杆菌在高岭石上吸附的影响

如图 2 所示，配体浓度在  $0 \sim 80\text{mmolL}^{-1}$  范围内时，醋酸盐和草酸盐均轻微抑制苏云金芽孢杆菌在蒙脱石表面的吸附量，而酒石酸盐和柠檬酸盐则显著抑制苏云金芽孢杆菌的吸附量 ( $p <$

0.05)。

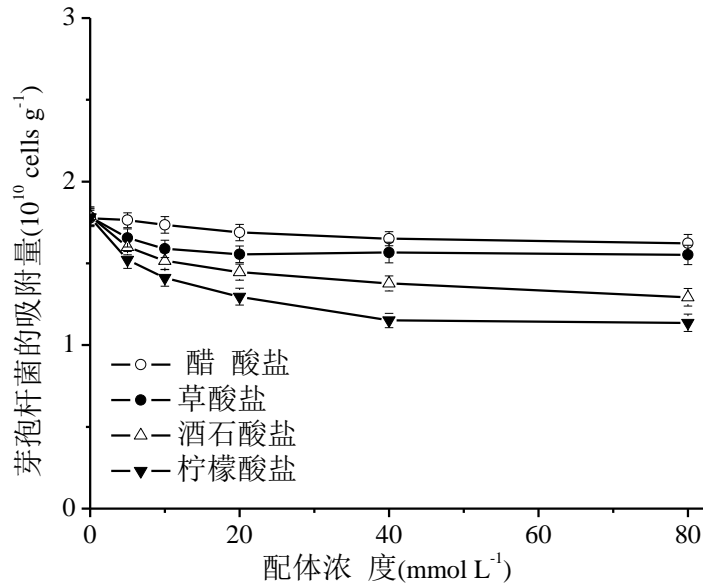


图2 配体对苏云金芽孢杆菌在蒙脱石上吸附的影响

由图3可知,在草酸盐和柠檬酸盐体系中,苏云金芽孢杆菌在针铁矿表面的吸附量呈先显著下降(0~40mmolL<sup>-1</sup>)( $p < 0.05$ ),后逐渐稳定(40~80mmolL<sup>-1</sup>)的趋势。当酒石酸盐浓度在0~20mmolL<sup>-1</sup>范围内时,苏云金芽孢杆菌在针铁矿表面的吸附量显著下降( $p < 0.05$ ),当酒石酸盐浓度在20~80mmolL<sup>-1</sup>范围内时,苏云金芽孢杆菌的吸附量轻微下降。醋酸盐浓度在0~5mmolL<sup>-1</sup>范围内时,苏云金芽孢杆菌在针铁矿表面的吸附量显著下降( $p < 0.05$ ),当醋酸盐浓度大于5mmolL<sup>-1</sup>时,吸附量则轻微下降。

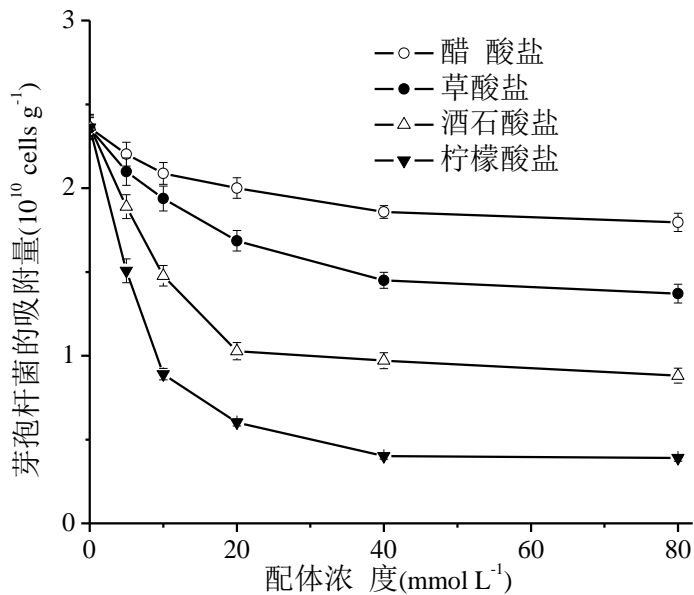


图3 配体对苏云金芽孢杆菌在针铁矿上吸附的影响

## 2.2 配体类型对苏云金芽孢杆菌吸附的影响

如表 1 所示, 醋酸盐、草酸盐、酒石酸盐及柠檬酸盐对针铁矿表面吸附苏云金芽孢杆菌的抑制效率范围依次为 7%~24%, 11%~42%, 20%~63%, 36%~84%。这 4 种有机配体对蒙脱石表面吸附苏云金芽孢杆菌的最大抑制效率仅为 36%, 对高岭石表面吸附苏云金芽孢杆菌的最大抑制效率可达 54%。

表 1 配体对细菌在 3 种矿物表面吸附的抑制效率

Table 1 Efficiency of ligands inhibiting bacterial adsorption on three minerals

配体 Ligands	配体浓度 Ligand concentrations (mmol L <sup>-1</sup> )	抑制效率 Inhibitive efficiency (%)		
		高岭石 Kaolinite	蒙脱石 Montmorillonite	针铁矿 Goethite
醋酸盐 Acetate	5	4	1	7
	10	6	2	12
	20	8	5	15
	40	10	7	21
	80	12	9	24
草酸盐 Oxalate	5	10	7	11
	10	17	11	18
	20	20	13	29
	40	23	12	39
	80	24	13	42
酒石酸盐 Tartrate	5	15	11	20
	10	25	15	38
	20	36	19	57
	40	42	23	59
	80	46	28	63
柠檬酸盐 Citrate	5	19	15	36
	10	28	21	62
	20	39	27	75
	40	51	35	83
	80	54	36	84

## 3 讨论

研究表明, 供试的 4 种低分子量有机配体对针铁矿表面粘附革兰氏阳性细菌细胞的抑制效率最高, 其次为高岭石和蒙脱石。供试矿物中, 针铁矿表面活性羟基量最多, 高岭石基面和边缘羟基量大于蒙脱石<sup>[21]</sup>。可见配体对矿物粘附细菌的影响主要决定于矿物表面羟基的数量。任何影响矿物表面羟基量的因素都有可能改变细菌在矿物表面的吸附量。已有研究证实, 细菌细胞表面的脂多糖、胞外聚合物和蛋白质含有大量羧基、磷酸二酯基、氨基及羟基等功能团<sup>[22]</sup>, 这些功

能团可与矿物表面的羟基或结合水形成化学键<sup>[12-13, 23-24]</sup>。例如, 恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 细胞可借助氢键而吸附于高岭石、蒙脱石及针铁矿表面<sup>[12-13]</sup>; 希瓦氏菌 (*Shewanella oneidensis*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 及枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 细胞表面磷酸和羧酸基团可与赤铁矿表面形成 P-OFe 和 COOH 化学键<sup>[24]</sup>; 有机配体如草酸盐、柠檬酸盐等可通过羧基和羟基功能团与矿物形成内圈或外圈复合物<sup>[25-27]</sup>。因此, 供试有机配体的基团与细菌表面功能团的竞争极有可能抑制细菌与矿物表面间的键合作用。如果有机配体优先络合于矿物表面后, 矿物表面负电荷量增加, 细菌与矿物间的静电排斥作用增强。本研究中, 因苏云金芽孢杆菌细胞、高岭石、蒙脱石及针铁矿的电荷零点分别为 2.7、3.6、2.5 及 8.3, 所以在 pH7.0 的条件下, 前三者固相表面均带负电荷, 而后者固相表面则带正电荷。供试的几种有机配体络合在矿物表面后, 针铁矿表面正电荷量降低, 高岭石和蒙脱石表面负电荷量增加。已有研究报道草酸盐和柠檬酸盐等吸附于土壤颗粒或铝氧化物表面后, 可显著增加土壤组分表面的负电荷<sup>[15-16, 28]</sup>。因此, 苏云金芽孢杆菌与高岭石和蒙脱石间的静电排斥作用增强, 而与针铁矿间的静电吸引显著减弱, 其结果是有机配体抑制了细菌与矿物间静电力介导<sup>[11]</sup>的吸附作用。

本研究结果表明, 柠檬酸盐对 3 种矿物表面吸附细菌细胞的抑制能力最强, 其次为酒石酸盐、草酸盐及醋酸盐。由有机配体的分子结构特征可知, 柠檬酸含有 3 个羧基和 1 个羟基, 酒石酸有 2 个羧基和 2 个羟基, 而草酸仅有 2 个羧基, 醋酸为一元羧酸。4 种有机配体的相对分子质量大小顺序为: 柠檬酸 (192.4) > 酒石酸 (150.1) > 草酸 (90.0) > 醋酸 (60.1)<sup>[14]</sup>。不难发现, 有机配体抑制细菌吸附的能力与配体分子结构的复杂程度(羧基和羟基数)和分子质量大小一致, 含更多功能团的配体可能在矿物表面占据更多的结合位点, 分子量大的配体在矿物表面有更高的覆盖度, 对细菌吸附可能产生更大的空间位阻效应。

从上述讨论可知, 有机配体对黏粒矿物表面粘附革兰氏阳性细菌有显著的抑制能力, 且矿物表面的羟基密度和配体的分子结构特征决定着配体的抑制能力。对革兰氏阴性细菌而言, 有机配体的影响特征又是怎样呢? 最近的研究显示, 在 pH7.0 的 10mmolL<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲体系中, 有机配体对黏粒矿物表面粘附恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 也有显著的抑制能力<sup>[29]</sup>。笔者对比有机配体对两种细菌的抑制效率后, 发现有机配体对黏粒矿物表面粘附革兰氏阴性细菌有更高的抑制能力。因此, 可认为有机配体抑制矿物表面粘附革兰氏阳性和阴性细菌的能力不同, 但影响机制并没有明显的区别。

## 4 结 论

低分子量有机配体对针铁矿粘附苏云金芽孢杆菌有最高的抑制能力, 其次为高岭石和蒙脱石。配体对矿物表面结合苏云金芽孢杆菌的抑制能力大小为: 柠檬酸盐 > 酒石酸盐 > 草酸盐 > 醋酸盐。配体竞争细菌结合位点, 配体在矿物表面结合后增加矿物表面负电荷可能是抑制苏云金芽孢杆菌粘附的主要原因。配体抑制能大小可能还决定于配体相对分子质量大小和功能团多少。本

研究结果定量阐述了土壤中低分子量有机配体对细菌在矿物表面吸附的深刻影响,为深入揭示自然环境中矿物与细菌间交互作用的机理奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5: 240—245
- [2] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, et al. Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci*, 2003, 54 : 655—670
- [3] Huang P M, Wang M K, Chiu C Y. Soil mineral-organic matter-microbe interaction: Impacts on biogeochemical processes and biodiversity in soils. *Pedobiologia*, 2005, 49: 609—635
- [4] Kim J, Dong H, Seabaugh J, et al. Role of microbes in the smectite-to-illite reaction. *Science*, 2004, 303: 830—832
- [5] Liu B R, Jia GM, Chen J, et al. A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere*, 2006, 16: 18—24
- [6] 盛下放, 冯阳. 不同条件下硅酸盐细菌对含钾矿物分解作用的研究. *土壤*, 2005, 37: 572—574
- [7] Morrow J B, Stratton R, Yang H H, et al. Macro- and nanoscale observations of adhesive behavior for several *E. coli* strains (O157:H7 and environmental isolates) on mineral surfaces. *Environ Sci Technol*, 2005, 39: 6395—6404
- [8] 赵炳梓, 张佳宝. 病毒在土壤中的迁移行为. *土壤学报*, 2006, 43: 306—313
- [9] Yee N, Fein J B, Daughney C J. Experimental study of the pH, ionic strength, and reversibility behavior of bacteria-mineral adsorption. *Geochim Cosmochim Acta*, 2000, 64: 609—617
- [10] Ams D A, Fein J B, Dong H, et al. Experimental measurements of the adsorption of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas mendocina* onto Fe-oxyhydroxide-coated and uncoated quartz grains. *Geomicrobiol J*, 2004, 21: 511—519
- [11] Jiang D, Huang Q, Cai P, et al. Adsorption of *Pseudomonas putida* on clay minerals and iron oxide. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2007, 54: 217—221
- [12] Rong X, Huang Q, He X, et al. Interaction of *Pseudomonas putida* with kaolinite and montmorillonite: A combination study by equilibrium adsorption, ITC, SEM and FTIR. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2008, 64: 49—55
- [13] Rong X, Chen W, Huang Q, et al. *Pseudomonas putida* adhesion to goethite: Studied by equilibrium adsorption, SEM, FTIR and ITC. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2010, 80: 79—85
- [14] Strobel B W. Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution-A review. *Geoderma*, 2001, 99: 169—198
- [15] Xu R, Zhao A, Ji G. Effect of low-molecular-weight organic anions on surface charge of variable charge soils. *J Colloid Interface Sci*, 2003, 264: 322—326
- [16] Xu R, Li C, Ji G. Effect of low-molecular-weight organic anions on electrokinetic properties of variable charge soils. *J Colloid Interface Sci*, 2004, 277: 243—247
- [17] Huang Q, Zhao Z, Chen W. Effects of several low-molecular weight organic acids and phosphate on the adsorption of acid phosphatase by soil colloids and minerals. *Chemosphere*, 2003, 52: 571—579
- [18] Cai P, Huang Q, Zhu J, et al. Effects of low-molecular-weight organic ligands and phosphate on DNA adsorption by soil colloids and minerals. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2007, 54: 53—59
- [19] Atkinson R J, Posner A M, Quirk J P. Adsorption of potential determining ions at the ferric oxide aqueous electrolyte interface. *J Phys Chem*, 1967, 71: 550—558
- [20] 蒋代华, 黄巧云, 蔡鹏, 等. 黏粒矿物对细菌吸附的测定方法. *土壤学报*, 2007, 44: 656—662

- [21] 李学垣. 土壤化学. 北京: 高等教育出版社, 2001: 55—99
- [22] Cox J S, Smith D S, Warren L A, et al. Characterizing heterogeneous bacterial surface functional groups using discrete affinity spectra for proton binding. *Environ Sci Technol*, 1999, 33: 4514—4521
- [23] Jucker B A, Harms H, Hug S, et al. Adsorption of bacterial surface polysaccharides on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 1997, 9: 331—343
- [24] Parikh S J, Chorover J. ATR-FTIR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide. *Langmuir*, 2006, 22: 8492—8500
- [25] Filius J D, Hiemstra T, van Riemsdijk W H. Adsorption of small weak organic acids on goethite: Modeling of mechanisms. *J Colloid Interface Sci*, 1997, 195: 368—380
- [26] Geelhoed J S, Hiemstra T, van Riemsdijk W H. Competitive interaction between phosphate and citrate on goethite. *Environ Sci Technol*, 1998, 32: 2119—2123
- [27] Evanko C R, Dzombak D A. Influence of structural features on sorption of NOM-analogue organic acids to goethite. *Environ Sci Technol*, 1998, 32: 2846—2855
- [28] Wijnja H, Schulthess C P. Interaction of carbonate and organic anions with sulfate and selenate adsorption on an aluminum oxide. *Soil Sci Soc Am J*, 2000, 64: 898—908
- [29] Wu H, Jiang D, Cai P, et al. Effects of low-molecular-weight organic ligands and phosphate on adsorption of *Pseudomonas putida* by clay minerals and iron oxide. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2011, 82: 147—151