



过表达 *Na, K-ATPase* 基因增强了黑曲霉对硅灰石的风化能力

孙晶晶[#], 余诚峰[#], 付紫玉, 连宾^{*}

南京师范大学生命科学学院, 江苏省功能微生物与功能基因组学重点实验室, 江苏省微生物工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要:【目的】探究和证实黑曲霉钠钾 ATP 酶(NKA)在硅灰石风化过程中的作用。【方法】以野生型黑曲霉(WT)为原始菌株构建黑曲霉 *Na, K-ATPase $\alpha 1$* 基因(*NKA $\alpha 1$*)高表达菌株 oeNKA。通过测定不同时间点(0 d、2 d、4 d、6 d) oeNKA 和 WT 生物量、培养液 pH 值和矿物风化释放的 Ca^{2+} 浓度, 并用 X-ray diffraction (XRD)对风化后的矿物残渣进行检测, 比较 oeNKA 和 WT 菌株对硅灰石这种硅酸盐矿物的风化效果。【结果】oeNKA 菌株的 *NKA $\alpha 1$* 基因相对表达量和酶活分别为 WT 菌株的 103 倍和 1.76 倍。在持续 6 d 的培养过程中, oeNKA 与 WT 的菌丝体生物量变化趋势相同, 在培养第 2 天时 WT 显著高于 oeNKA, 随时间差异逐渐缩小并在第 6 天达到最低; 培养液 pH 值变化趋势相同, 分别下降至 3.64 和 3.87; oeNKA 风化硅灰石时所释放 Ca^{2+} 浓度($1011.36 \pm 47.78 \mu\text{g/g}$)约为 WT ($248.30 \pm 25.21 \mu\text{g/g}$)的 4 倍; XRD 检测图谱显示菌株 oeNKA 对硅灰石风化作用更明显。【结论】*NKA $\alpha 1$* 过表达菌株 oeNKA 对硅灰石的风化能力显著高于 WT 菌株, 且黑曲霉的 *NKA* 与硅灰石的风化有密切关联。

关键词: 黑曲霉, *Na, K-ATPase*, 硅灰石, 风化

硅酸盐矿物(如长石、云母和辉石)是构成地壳和地幔的主要矿物, 是土壤矿物的重要组成部分^[1]。硅酸盐矿物风化包括物理风化作用、化学风化作用以及生物风化作用, 通常表现为多种因子的综合效应^[2-4]。硅酸盐矿物的风化会伴随碱性离子的溶出, 以及大气 CO_2 的固定^[1,5-6]。因此, 硅酸盐矿物风化作用对大气 CO_2 浓度乃至地表环境

有重要影响^[7-8]。微生物能适应地球表面的多种环境, 对地表矿物的风化广泛发生^[9-10], 地表岩石和矿物的微生物风化作用在促进土壤形成和演化、提高农作物产量、环境废弃物利用以及生物冶金等都有重要利用价值^[11]。然而, 硅酸盐矿物的风化作用进程缓慢, 如何加速矿物风化是迫切需要研究解决的科学问题。目前, 微生物风化硅酸盐矿物

基金项目: 江苏省高校自然科学研究重大项目(16KJA180003); 国家自然科学基金(41772360, 41173091)

*通信作者。Tel/Fax: +86-25-85891050; E-mail: bin2368@vip.163.com

[#]并列第一作者。

收稿日期: 2018-08-02; 修回日期: 2018-10-29; 网络出版日期: 2018-11-29

的研究已有诸多报道^[12-15], 但绝大部分都处在细胞水平上, 例如微生物通过分泌酸性物质、多糖和有机螯合物等促进矿物溶解释放矿质离子, 真菌还能通过其菌丝体的穿插和包裹作用破坏矿物晶体结构等。但是, 很多问题并不能得到很好地解释, 例如, 有哪些基因参与了微生物的生长代谢活动, 通过何种途径参与到矿物风化的过程中。这些问题需要在基因表达与代谢调控水平上来展开研究解决。目前已有学者开始关注矿物风化过程中微生物基因表达与代谢调控, 尝试从分子水平解析微生物与矿物相互作用的过程和机理, 从而能利用基因操作方法提高微生物对矿物的风化效率。例如, 微生物的碳酸酐酶参与对碳酸盐矿物和硅酸盐矿物的风化^[16-18]; 黑曲霉在风化含钾硅酸盐矿物的过程中漆酶和半胱氨酸酶等相应基因的表达会提高^[19-20]; 风化含钾矿物过程中, 烟曲霉的金属离子结合蛋白(如锌指类蛋白和钙调磷酸酶结合蛋白等)基因表达提高^[21], 且漆酶的高表达, 直接或间接提高了黑曲霉对矿物的风化作用。然而, 涉及微生物风化矿物的分子调控机制研究仍有待进一步深入。

Wang 等^[2]通过 RT-qPCR 发现黑曲霉在风化含钾硅酸盐矿物过程中 *NKA α1* 基因表达量显著上调, 是正常培养环境下(含 K^+ 条件下)的 447.6 倍。钠钾 ATP 酶(NKA), 即钠钾泵, 存在于真核细胞膜脂质双分子层中, 具有离子通道载体和生物酶特性, 将 ATP 释放的能量转化为跨膜电势, 逆浓度将 2 个 K^+ 泵入和 3 个 Na^+ 泵出细胞, 调节细胞膜内外离子浓度差和细胞渗透压, 维持细胞的体积和外形。该酶主要由 α 和 β 亚基形成异源二聚体。其中, α 亚基主要参与 ATP 催化反应, 释放能量促进钠和钾的运输, β 亚基发挥调节作用, 它从内质网运输至质膜, 稳定 α 亚基蛋白质构型,

调节其活性^[22-25]。黑曲霉已被证实对多种硅酸盐矿物都有显著的风化效果^[18, 26-28], 但黑曲霉 *NKA* 对硅酸盐矿物风化的机理研究尚未见报道。

硅灰石是含钙硅酸盐矿物, 自然界产出的硅灰石一般为针状, 呈纤维状或放射状集合体。其热稳定性及尺寸稳定性良好, 耐化学腐蚀, 且纯度高, 硬度适中, 在中性水中的溶解度极低^[29]。因此硅灰石较为适合代表硅酸盐矿物应用于黑曲霉风化研究。

本文通过构建黑曲霉 *NKA α1* 基因过表达菌株, 用其风化硅灰石, 并与野生型菌株作比较, 分析论证黑曲霉 *NKA α1* 基因是否能增强对硅酸盐矿物的风化作用, 进一步丰富和完善硅酸盐矿物微生物风化理论, 从而为农业生产和工业实践提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 菌种及矿物材料

1.1.1 菌种及培养基: 黑曲霉菌株, 从中国普通微生物菌种保藏管理中心购买, 保藏号 3.3928。培养黑曲霉产孢采用 YAG 培养基(1 L): Glucose 20 g, Yeast extract 5 g, Trace elements 1 mL, (固体添加 Agar powder 20 g), 加超纯水充分溶解至 1 L。培养大肠杆菌采用 LB 培养基(1 L): Tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g, 加 1 L 超纯水充分溶解, 调整 pH 值至 7.0。筛选含重组质粒的黑曲霉采用 SMM 培养基(1 L): Glucose 10 g, 20×Nitrate salts 50 mL, Trace elements 1 mL, Sorbitol 218.6 g, Yeast extract 1 g (固体添加 Agar powder 16 g), 加 1 L 超纯水充分溶解, pH 值调至 6.5。风化所用液体培养基采用查氏培养基(1 L)^[30], 即: Sucrose 30 g, $NaNO_3$ 3 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,

FeSO₄·7H₂O 0.01 g, KCl 0.5 g, K₂HPO₄·H₂O 1 g。添加 50 mmol/L 的 Maltose 诱导基因过表达, 加 1 L 超纯水充分溶解后调整 pH 值为 6.5。

1.1.2 供试矿物: 硅灰石样品由中国科学院地球化学研究所提供, 其化学式为 Ca₃Si₃O₉, 呈白色, XRD 分析该矿物试样, 主要为硅灰石。X-ray fluorescence (XRF)分析其化学组成: SiO₂ 50.71%, CaO 47.61%, MgO 1.20%, TFe₂O₃ 0.36%, P₂O₅ 0.05%, SrO 0.04%, MnO 0.02%, ZnO 0.01%。硅灰石矿粉试样研磨过 100–200 目筛, 用超纯水和无水乙醇清洗去除矿物表面吸附的杂质, 烘干备用。

1.2 黑曲霉 *NKA α1* 基因过表达菌的构建、筛选和鉴定

1.2.1 *NKA α1* 基因过表达载体构建: 过表达载体为丝状真菌常用表达载体 pAN7-1, 其中含有氨苄青霉素抗性基因和潮霉素抗性基因, 分别用作大肠杆菌和黑曲霉转化菌株的筛选标记。采用葡萄糖淀粉酶基因(*glaA*)启动子, 为诱导型强启动子, 在有麦芽糖为碳源的培养条件下过量表达^[31]。具体操作如下: (1) 构建含 *glaA* 启动子的载体: 以黑曲霉基因组为模板, *PglaA*-F, *PglaA*-R 为引物 (表 1), PCR 获得 *glaA* 基因上游 2000 bp 启动子序

列, 然后通过酶切位点 *Xba* I 和 *Hind* III 将 *glaA* 片段克隆至线性化的 pAN7-1 质粒, 获得含 *glaA* 片段的线性质粒。(2) 构建含目的基因的重组质粒: 用柱式真菌 Total RNA 抽提纯化试剂盒 (Vazyme, China) 抽提该菌在查氏培养基液中的菌丝总 RNA, OD 值检测合格后, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性和降解情况, 再用 HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒 (Vazyme, China) 进行反转录获得黑曲霉的 cDNA。根据 GenBank (NCBI) 黑曲霉 *NKA α1* 基因 cDNA 为模板, 设计引物 *NKA*-F、*NKA*-R (表 1), 以黑曲霉 cDNA 为模板, PCR 扩增 *NKA α1* 亚基基因。最后利用同源重组酶 (ClonExpress[™] II, Vazyme, China) 连接 *NKA α1* 亚基基因片段与线性质粒形成重组质粒 *PglaA*-*NKA*。构建好的载体转入大肠杆菌, 在含有氨苄青霉素的 LB 培养基上生长。挑选正常生长的转化子进行菌落 PCR 和测序验证, 将基因正确连接且没有突变的载体保存作后续实验。

1.2.2 转化和筛选: 制备野生型黑曲霉原生质体, 参照 PEG-原生质体转化法^[32] 将 *PglaA*-*NKA* 重组质粒转入原生质体, 并在含 100 μg/mL 潮霉素的 SMM 固体培养基上筛选出正常生长的转化子。

表 1. 本实验所用引物序列

Table 1. The sequences of primers used in this study

| Name | Sequence (5'→3') |
|------------------|--|
| <i>NKA</i> -F | ACACCTCAGCACCCAAGCTTATGGACGCGAAGTCAGGCG |
| <i>NKA</i> -R | CGACGGCCAGTGCCAAGCTTCTACCAAGCAAACCTATCCAACAC |
| <i>PglaA</i> -F | CCCAAGCTTGGGTGCTGAG'GTGTAATGATGCTGG |
| <i>PglaA</i> -R | TGGGTGCTGAGGTGTAATGATGCTATGTATCCCTTTCAATTCGG |
| <i>QNKA</i> -F | CGATTCCACGGATGACAACACTAC |
| <i>QNKA</i> -R | CAGTCCTTCTTGGGTTCGC |
| <i>QGAPDH</i> -F | ACAAGGACTGGCGTGGTG |
| <i>QGAPDH</i> -R | ACCGTTCAGGTCGGAGGAG |

1.2.3 过表达转化子与 WT 的生理特征比较: (1) 检测高表达转化子和 WT 菌株的 *NKA α1* 基因表达量: 分别接等量(10^8 个/mL)高表达 *NKA α1* 基因转化子和 WT 菌株孢子悬液到含麦芽糖查氏培养基中, 28 °C、150 r/min 摇床培养 2 d, 收集菌丝体, 去除水分后迅速投入液氮冻存, 提 RNA 并反转录为 cDNA, 以 *GAPDH* 为内参基因(引物见表 1), 利用 RT-qPCR 检测其基因表达量, 以 WT 菌株的该基因表达量为 1, 比较各过表达转化子相对 WT 的基因表达量的增加情况。(2) 检测高表达转化子和 WT 菌株的 NKA 酶活: 同时称取 0.1 g 新鲜干菌丝到匀浆管, 加入 0.9 mL PBS 缓冲液(浓度为 10 mmol/L, pH 值 7.4), 用细胞破碎仪破碎, 4 °C、10000 r/min 离心 20 min, 收集 0.5 mL 上清液, 利用 NKA 酶联免疫试剂盒(Mbbiology, China)测定 NKA 酶活水平。取 *NKA α1* 基因表达量和酶活性均相对较高的菌株, PCR 和测序验证基因序列的正确转入, 将此转化子记作 oeNKA, 作后续风化实验。(3) 菌落表型对比: 分别接等量 oeNKA 和 WT 的孢子悬液至固体平板, 28 °C 培养 2 d, 观察菌落表型, 以确定 *NKA α1* 基因的高表达对菌落表型的影响。

1.3 黑曲霉与硅灰石风化

1.3.1 培养条件: 取 oeNKA 和 WT 菌种分别在 YAG 固体平板上划线扩培, 28 °C 培养 3 d, 用无菌去离子水使孢子悬浮, 12000 r/min 离心 1 min 弃上清。以上方法清洗孢子 3 遍。计数调整两种孢子悬液浓度使其达到一致: 血球计数板计数 3 次, 调整孢子悬液浓度为 1×10^8 个/mL; 平板计数法对两种孢子悬液计数。在 250 mL 的三角瓶中添加含 1 g 硅灰石矿物的液体查氏培养基 100 mL, 115 °C 灭菌 20 min。分别接入 1 mL oeNKA 和 WT

孢子悬液, 对照不接菌。实验组和对照组分别作 3 个平行。28 °C 150 r/min 摇床培养, 在培养 0、2、4、6 d 分别取样作后续检测分析。

1.3.2 培养液中黑曲霉与硅灰石相互作用及分析: (1) pH 值的测定: 利用 pH 计测定培养不同时间培养液的 pH 值。(2) 生物量测定: 用布氏漏斗抽滤, 收集菌丝体 70 °C 烘干至恒重, 称重, 质量记为 A_1 , 用 HNO_3 和 H_2O_2 消解菌丝, 8000 r/min 离心 10 min 收集余下矿物, 利用烘箱 70 °C 烘干至恒重, 称重保存, 其质量记为 A_2 , 菌丝体干重 $A=A_1-A_2$ 。(3) 上清液和菌丝内不同离子浓度的测定: 培养液 8000 r/min 离心 20 min, 收集上清液; 收集菌丝球, 利用烘箱 70 °C 烘干至恒重, 充分研磨, 利用 100 mL 1 mol/L EDTA- CH_3COONH_4 溶液超声振荡 30 min, 8000 r/min 离心 20 min, 取上清^[33]。利用火焰原子吸收仪(AA-6300C, Shimadzu)检测上清液和菌丝球内的 Ca^{2+} 浓度, 分别记为 B_1 和 B_2 , 培养体系中 Ca^{2+} 浓度 $B=B_1+B_2$ 。(4) 原矿和 风化后矿物的 XRD (BTX-526, Olympus, America)分析: 用超纯水清洗硅灰石矿物残渣 3 次, 去除矿物表面可溶性杂质, 65 °C 烘干, 过 100 目筛后用于 XRD 分析。

2 结果和讨论

2.1 黑曲霉 *NKA α1* 基因过表达菌株的特征

高表达转化子的 *NKA α1* 基因相对表达量和酶活检测结果如图 1 所示, 筛选所得 8 个转化子中 *NKA α1* 基因表达量与酶活和 WT 相比均有不同程度的提高。其中, NKA2、NKA6、NKA8 转化子中 *NKA α1* 基因表达量分别为 WT 菌株的 71、103、131 倍(图 1-A)。NKA2、NKA6、NKA8 转化子中的 NKA 酶活分别是 WT 菌株的 1.36、1.76、

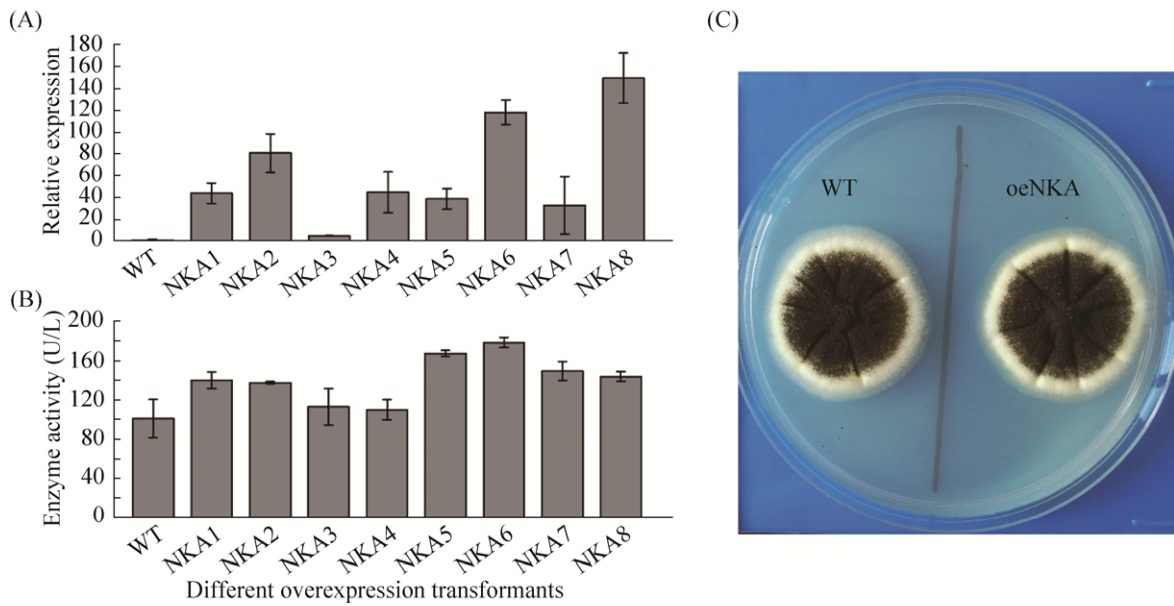


图 1. *NKA α1* 基因过表达转化子的特征

Figure 1. Overexpression transformants characters of *NKA α1*. A: Relative expression of *NKA α1*; B: Enzyme activity; C: Colonial morphology. Data represent the mean±standard deviation (SD) of three independent experiments.

1.42 倍,其中 NKA6 过表达转化株 *NKA* 酶活性均高于 WT 和其他过表达转化子的酶活(图 1-B),因此选取 NKA6 转化子作后续风化实验,记作 oeNKA。oeNKA 和 WT 在固体平板上的菌落形态相似(图 1-C),说明 *NKA α1* 基因高表达不影响菌落形态。

2.2 硅灰石风化过程中黑曲霉生物量的变化

如图 2 所示,黑曲霉在风化硅灰石 6 d 过程中,生物量不断增高,在 0–4 d 菌丝生长迅速,4–6 d 逐渐变缓到最后保持不变或略有下降。两个菌株 WT 和 oeNKA 风化硅灰石时的生物量在不同时期有一定差异。测得 oeNKA 和 WT 在 2 d 的菌丝体质量分别为(0.38±0.02) g 和(0.87±0.01) g, oeNKA 的菌丝体生物质量显著低于 WT,说明此时 oeNKA 的菌丝体对硅灰石的生物风化作用小于 WT。随着时间推移两组的菌丝体生物量差异逐渐缩小,风化

6 d 后, oeNKA 的菌丝体生物量(1.79±0.10) g 与 WT (1.83±0.08) g 相比差异值达到最低。因此,在风化硅灰石的过程中,*NKA α1* 基因的高表达对

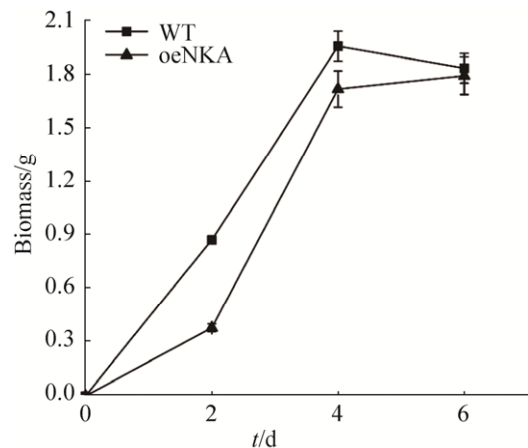


图 2. 硅灰石风化过程中生物量变化

Figure 2. Biomass changes during wollastonite weathering process. Data represent the mean±standard deviation (SD) of three independent experiments.

黑曲霉菌丝体在含硅灰石的查氏培养基中的生长有一定的抑制作用, 并且作用强度随着时间推移慢慢减小。*NKA a1* 基因的高表达在代谢调控方面对菌丝生物量影响的研究有待进一步深入。

2.3 硅灰石风化过程中培养液的 pH 值

oeNKA 与 WT 菌株风化硅灰石在不同时间的培养液 pH 值变化情况如图 3 所示。含硅灰石的培养液在高温灭菌过后的 pH 值为 7.81。可能是因为前期的高温灭菌导致硅灰石少量溶解释放碱性离子, 造成 pH 值上升。由图 3 可知, 黑曲霉在含硅灰石矿物的查氏培养基内生长, 两组 pH 值的变化趋势相同, pH 值在 0–2 d 迅速降低, 且 WT 降低趋势较 oeNKA 更显著, 2 d 时 oeNKA 培养液 pH 值高于 WT 培养液, 可能此时 oeNKA 菌丝体生物量较低, 释放的酸性物质质量较少所致; 2–4 d, WT 变化趋于平稳, oeNKA 降低幅度变缓; 4–6 d, oeNKA 和 WT 的 pH 值变化量分别为 0.25 和 0.02, 差异值较低, 体系逐渐稳定, 说明 *NKA a1* 基因的

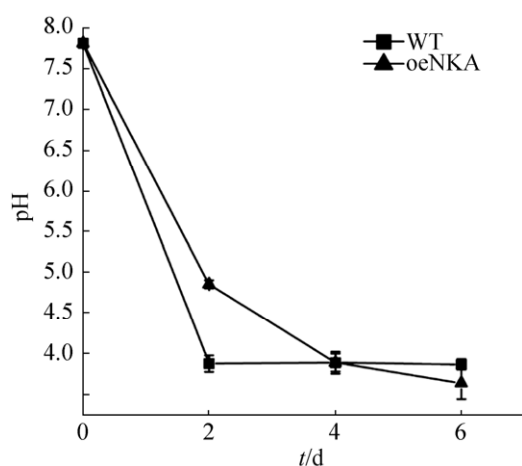


图 3. 硅灰石风化过程中培养液的 pH 值变化

Figure 3. pH changes in culture medium during wollastonite weathering process. Data represent the mean±standard deviation (SD) of three independent experiments.

高表达对黑曲霉的产酸情况影响不大。oeNKA 和 WT 在前期生长过程中分泌大量酸性物质如草酸、柠檬酸、琥珀酸等, 降低培养环境 pH 值^[34]。

2.4 硅灰石风化过程中培养体系中的 Ca²⁺浓度

如图 4 所示, oeNKA 和 WT 在含硅灰石的查氏培养基中生长 6 d, 随时间推移风化所释放的 Ca²⁺浓度有不同程度提高(图 4), 而 pH 值迅速降低是造成生物风化释放大量矿质离子的重要因素。oeNKA 菌株风化硅灰石释放的 Ca²⁺浓度普遍高于 WT 菌株, 且随着试验的进行, 浓度差异越来越明显。第 2 天测得 oeNKA 和 WT 风化硅灰石释放 Ca²⁺总浓度分别为 404.28±57.10 μg/g 和 379.96±13.45 μg/g, 没有显著差异。结合图 2 可发现, 2 d 时 oeNKA 的菌丝体生物量显著低于 WT, 说明 oeNKA 对硅灰石的生物风化作用更明显。第 4 天和第 6 天 oeNKA 风化硅灰石释放的 Ca²⁺浓度均显著高于 WT, 到第 6 天时 oeNKA 风化硅灰石释放的 Ca²⁺总浓度是 1011.36±47.78 μg/g, 约为 WT (248.30±25.21 μg/g)

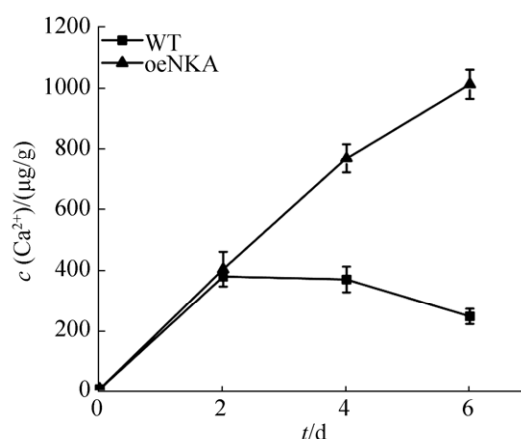


图 4. 硅灰石风化过程中体系中 Ca²⁺浓度变化

Figure 4. Changes of Ca²⁺ concentration during wollastonite weathering process. Data represent the mean±standard deviation (SD) of three independent experiments.

的 4.07 倍。oeNKA 在生物量相同或更低, pH 值相同的情况下, 风化硅灰石释放更多的 Ca^{2+} 。这说明 *NKA α1* 基因的高表达显著提高了对硅灰石的风化能力, 并且不是通过物理风化增强和产酸量增加的方式提高的。*NKA α1* 基因的高表达可能直接导致风化能力的提高, 或者间接影响其他的某种代谢通路, 造成黑曲霉对硅灰石的更强的风化作用。

在风化硅灰石的过程中, 随着培养时间推移, WT 培养体系中 Ca^{2+} 浓度逐渐下降。可能是由于培养体系中 Ca^{2+} 沉淀形成少量的次生矿物结晶, 而 oeNKA 培养体系中 Ca^{2+} 浓度依然不断上升, 这可能是 Ca^{2+} 释放速率大于次生矿物的形成速率。黑曲霉作用含钙矿物形成次生矿物草酸钙的研究已有报道^[35]。因此, 基因工程菌诱导成矿的研究有待进一步深入。

2.5 XRD 检测硅灰石风化后成分

用 XRD 分析原始矿物 (original) 及经过 oeNKA 和 WT 风化 6 d 后的矿物残渣成分后, 发现原矿中主要成分为硅灰石 (PCPDF 号 75-1396), 纯度高且衍射峰强度大 (图 5)。经 oeNKA 和 WT 风化后的矿物仍为硅灰石, 矿物组成没有明显变化, 但风化后硅灰石残渣的主要衍射峰的强度相对 original 均降低, 峰强度大小为 original > WT > oeNKA, 其中, oeNKA 组的衍射峰中部分峰冠几乎消失, 说明 oeNKA 和 WT 对硅灰石均有一定的风化作用, 且 oeNKA 相较于 WT 更强。

硅灰石经 WT 和 oeNKA 风化后几乎没有新的峰出现, 可能是由于黑曲霉与矿物相互作用产生的新矿物比例较低, 或者为无定型矿物, 不能被 XRD 检测到, 并且黑曲霉在查氏培养基生长过程中产生酸性物质 (图 3), 新产生的矿物被溶液中 H^+ 攻击而大量消耗又转化为矿质离子。

在风化过程中, *NKA α1* 基因的高表达虽然在

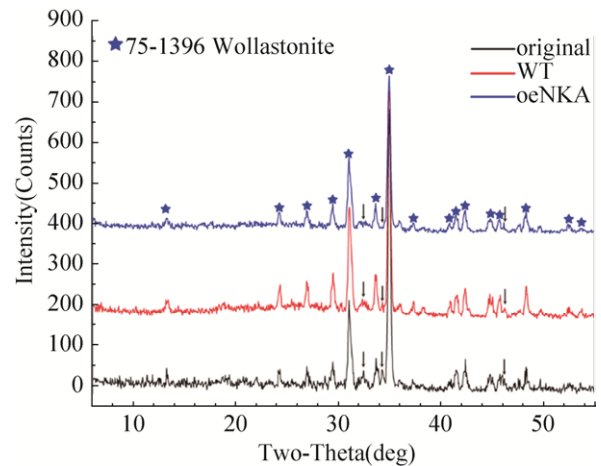


图 5. 风化后硅灰石残渣和原矿的 XRD 检测图谱
Figure 5. The detection and analysis of wollastonite and residue after weathering by XRD. The arrow express that the peak intensity has obviously decreased or disappeared in the figure.

一定程度上提高了黑曲霉风化硅灰石的效果, 释放更多矿质离子 (图 4, 5), 但相对于 WT, 整体风化效果没有得到很大提高。这也与连宾等^[3-4]指出微生物风化硅酸盐矿物有多种因素综合作用相符合, 单独提高一个生物酶基因对整个风化机制的影响可能较小, 导致风化效果没有显著提高。因此, 探索发现微生物风化新途径, 以及研究多种途径在硅酸盐矿物风化中的相互协调作用十分必要。

3 结论

本研究构建了黑曲霉 *NKA α1* 基因高表达菌株 oeNKA, 其 *NKA α1* 基因表达量和酶活相较于 WT 均有显著提高。在相同的培养条件下, oeNKA 与 WT 的菌丝体生物量和 pH 值变化趋势相同。其中 2 d 的 oeNKA 的菌丝体生物量显著小于 WT, 可能导致 oeNKA 产酸量减少, pH 值相对较高。在 2-6 d 菌丝体生物量差异逐渐缩小, 培养体系中 pH 值也趋于稳定。比较 oeNKA 和 WT 风化硅灰

石的作用效果, oeNKA 风化硅灰石相比 WT 均释放出更多的矿质离子。XRD 图谱显示硅灰石经过 oeNKA 和 WT 风化后其矿物成分不变, 但衍射峰强度下降, 其中 oeNKA 对硅灰石的风化能力更强。本文研究结果为进一步研究真菌与硅酸盐矿物的相互作用分子机理提供了新的资料。

参 考 文 献

- [1] Gadikota G, Fricker K, Jang SH, Park AHA. Carbonation of silicate minerals and industrial wastes and their potential use as sustainable construction materials. *ACS Symposium Series*, 2015, 1194: 295–322.
- [2] Wang WY, Lian B, Pan L. An RNA-sequencing study of the genes and metabolic pathways involved in *Aspergillus niger* weathering of potassium feldspar. *Geomicrobiology Journal*, 2015, 32(8): 689–700.
- [3] Lian B, Wang B, Pan M, Liu CQ, Teng HH. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2008, 72(1): 87–98.
- [4] Lian B, Fu PQ, Mo DM, Liu CQ. A comprehensive review of the mechanism of potassium releasing by silicate bacteria. *Acta Mineralogica Sinica*, 2002, 22(2): 179–183. (in Chinese)
连宾, 傅平秋, 莫德明, 刘丛强. 硅酸盐细菌解钾作用机理的综合效应. *矿物学报*, 2002, 22(2): 179–183.
- [5] Manning DAC, Renforth P. Passive sequestration of atmospheric CO₂ through coupled plant-mineral reactions in urban soils. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(1): 135–141.
- [6] Montserrat F, Renforth P, Hartmann J, Leermakers M, Knops P, Meysman FJR. Olivine dissolution in seawater: implications for CO₂ sequestration through enhanced weathering in coastal environments. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(7): 3960–3972.
- [7] Medaris LG, Driese SG, Stinchcomb GE, Fournelle JH, Lee S, Xu HF, Dipietro L, Gopon P, Stewart EK. Anatomy of a sub-cambrian paleosol in Wisconsin: Mass fluxes of chemical weathering and climatic conditions in North America during formation of the Cambrian great unconformity. *Journal of Geology*, 2018, 126(3): 261–283.
- [8] Hayes SM, Webb SM, Bargar JR, O'Day PA, Maier RM, Chorover J. Geochemical weathering increases lead bioaccessibility in semi-arid mine tailings. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(11): 5834–5841.
- [9] Gorbushina AA. Life on the rocks. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(7): 1613–1631.
- [10] Santelli CM, Bach W, Edwards KJ. Microorganisms and the weathering of ocean crust at the seafloor. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2006, 70(18): A556.
- [11] Wang WY, Sun JJ, Dong CL, Lian B. Biotite weathering by *Aspergillus niger* and its potential utilisation. *Journal of Soils and Sediments*, 2016, 16(7): 1901–1910.
- [12] Wu T, Chen J, Lian B. Advance in studies on the function of microbes to the weathering of silicate minerals. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 2007, 26(3): 263–268, 275. (in Chinese)
吴涛, 陈骏, 连宾. 微生物对硅酸盐矿物风化作用研究进展. *矿物岩石地球化学通报*, 2007, 26(3): 263–268, 275.
- [13] Lian B, Xiao LL, Sun QB. Ecological effects of the microbial weathering of silicate minerals. *Acta Geologica Sinica (English Edition)*, 2017, 91(S1): 150–152.
- [14] Li FC, Li S, Yang YZ, Cheng LJ. Advances in the study of weathering products of primary silicate minerals, exemplified by mica and feldspar. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 2006, 25(5): 440–448. (in Chinese)
李福春, 李莎, 杨用钊, 程良娟. 原生硅酸盐矿物风化产物的研究进展——以云母和长石为例. *岩石矿物学杂志*, 2006, 25(5): 440–448.
- [15] Bennett PC, Rogers JR, Choi WJ, Hiebert FK. Silicates, silicate weathering, and microbial ecology. *Geomicrobiology Journal*, 2001, 18(1): 3–19.
- [16] Xiao LL, Lian B, Hao JC, Liu CQ, Wang SJ. Effect of carbonic anhydrase on silicate weathering and carbonate formation at present day CO₂ concentrations compared to primordial values. *Scientific Reports*, 2015, 5: 7733.
- [17] Xiao LL, Lian B, Dong CL, Liu FH. The selective expression of carbonic anhydrase genes of *Aspergillus nidulans* in response to changes in mineral nutrition and CO₂ concentration. *Microbiologyopen*, 2016, 5(1): 60–69.
- [18] Hu J, Lian B, Yu JP, Hu X. Formation of *Aspergillus niger*-mineral aggregation and characterization of polysaccharide from aggregation. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(6): 756–763. (in Chinese)
胡婕, 连宾, 郁建平, 胡星. 黑曲霉-矿物聚集体的形成及其

- 分泌的多糖特性. *微生物学报*, 2011, 51(6): 756–763.
- [19] Wang WY, Sun QB, Lian B. Redox of fungal multicopper oxidase: A potential driving factor for the silicate mineral weathering. *Geomicrobiology Journal*, 2018, 35(10): 879–886.
- [20] Sun LL, Xiao LL, Xiao B, Wang WY, Pan C, Wang SJ, Lian B. Differences in the gene expressive quantities of carbonic anhydrase and cysteine synthase in the weathering of potassium-bearing minerals by *Aspergillus niger*. *Science China Earth Sciences*, 2013, 43(11): 1828–1833.
- 孙蕾蕾, 肖雷雷, 肖波, 王伟英, 潘辰, 王世杰, 连宾. 黑曲霉风化含钾矿石过程中碳酸酐酶和半胱氨酸合成酶基因表达量的差异. *中国科学: 地球科学*, 2013, 43(11): 1828–1833.
- [21] Xiao B, Lian B, Sun LL, Shao WL. Gene transcription response to weathering of K-bearing minerals by *Aspergillus fumigatus*. *Chemical Geology*, 2012, 306–307: 1–9.
- [22] Mao H, Ferguson TS, Cibulsky SM, Holmqvist M, Ding CM, Fei H, Levitan IB. MONaKA, a novel modulator of the plasma membrane Na,K-ATPase. *Journal of Neuroscience*, 2005, 25(35): 7934–7943.
- [23] Xie ZJ, Cai T. Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Molecular Interventions*, 2003, 3(3): 157–168.
- [24] Jørgensen PL. Mechanism of the Na⁺, K⁺ pump protein structure and conformations of the pure (Na⁺+K⁺)-ATPase. *Biophysica et Biophysica Acta*, 1982, 694(1): 27–68.
- [25] Lingrel JB, Williams MT, Vorhees CV, Moseley AE. Na,K-ATPase and the role of α isoforms in behavior. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2007, 39(5/6): 385–389.
- [26] Wucherpfennig T, Lakowitz A, Driouch H, Krull R, Wittmann C. Customization of *Aspergillus niger* morphology through addition of talc micro particles. *Journal of Visualized Experiments*, 2012, (61): 4023.
- [27] Tan Y, Dong FQ, Dai QW. Study on leaching of cobalt and nickel from tail-serpentine by *Aspergillus niger*. *Journal of Mineralogy and Petrology*, 2009, 29(3): 115–119. (in Chinese)
- 谭媛, 董发勤, 代群威. 黑曲霉菌浸出蛇纹石尾矿中钴和镍的实验研究. *矿物岩石*, 2009, 29(3): 115–119.
- [28] Chen S, Liu CQ, Lian B. Effect of a strain of *Aspergillus niger* on weathering of phosphorite. *Acta Mineralogica Sinica*, 2009, 29(1): 103–108. (in Chinese)
- 谌书, 刘丛强, 连宾. 一株黑曲霉对磷矿石的风化作用. *矿物学报*, 2009, 29(1): 103–108.
- [29] Xu WC. Study on several plastics of reinforcing modification by inorganic filler wollastonite. *Journal of East China Geological Institute*, 1994, 17(1): 46–50. (in Chinese)
- 徐伟昌. 无机填料硅灰石对几种塑料的增强改性研究. *华东地质学院学报*, 1994, 17(1): 46–50.
- [30] Ma F, Zhang S, Shan D. Optimization of the medium composition for culturing of mycelia pellet of *Aspergillus niger* Y3. *China Environmental Science*, 2008, 28(11): 989–993. (in Chinese)
- 马放, 张斯, 山丹. 黑曲霉 Y3 菌丝球培养基成分优化. *中国环境科学*, 2008, 28(11): 989–993.
- [31] Ganzlin M, Rinas U. In-depth analysis of the *Aspergillus niger* glucoamylase (*glaA*) promoter performance using high-throughput screening and controlled bioreactor cultivation techniques. *Journal of Biotechnology*, 2008, 135(3): 266–271.
- [32] Osmani SA, May GS, Morris NR. Regulation of the mRNA levels of *nimA*, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Biology*, 1987, 104(6): 1495–1504.
- [33] Zhang YG, Xiao M, Dong YH, Jiang Y. Determination of soil exchangeable base cations by using atomic absorption spectrophotometer and extraction with ammonium acetate. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2012, 32(8): 2242–2245. (in Chinese)
- 张玉革, 肖敏, 董怡华, 姜勇. 乙酸铵浸提原子吸收光谱法同时测定土壤交换性盐基离子组成. *光谱学与光谱分析*, 2012, 32(8): 2242–2245.
- [34] Huang XJ, Diao NN, Zhang JG. Review on the formation of *Aspergillus niger* pellets and its application. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(11): 171–176. (in Chinese)
- 黄勋娟, 刁宁宁, 张建国. 黑曲霉菌丝球的形成及应用研究综述. *食品与发酵工业*, 2014, 40(11): 171–176.
- [35] Chen S, Zheng HY. The role of microorganism in the weathering of phosphorite rock: A case study of *Aspergillus niger* strain. *Ecology and Environment*, 2007, 16(3): 1007–1013. (in Chinese)
- 谌书, 郑厚义. 磷矿石的微生物风化作用——以一株黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 为例. *生态环境学报*, 2007, 16(3): 1007–1013.

Overexpression of *Na, K-ATPase* gene enhanced the weathering ability of *Aspergillus niger* to wollastonite

Jingjing Sun[#], Chengfeng Yu[#], Ziyu Fu, Bin Lian^{*}

Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Microbiology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To investigate and confirm the role of Na, K-ATPase (NKA) of *Aspergillus niger* in the weathering process of wollastonite, a silicate mineral. [Methods] Wild type *Aspergillus niger* was used as the original strain to construct high *Na, K-ATPase a1* (*NKA a1*) gene-expressing strain oeNKA. We determined the biomass of oeNKA and the wild strain, pH of the culture medium and Ca²⁺ concentration released from wollastonite at different cultivation time (0, 2, 4 and 6 d). Besides, we also analyzed the mineralogy of the wollastonite residue by X-ray diffraction (XRD) to compare the weathering effect of oeNKA and the wild strain on wollastonite. [Results] The relative expression of *NKA a1* and enzyme activity of oeNKA strain was 103 and 1.76 times higher than those of the wild strain, respectively. The biomass and pH of oeNKA had the same variation tendency as the wild strain during the 6-day cultivation. The biomass difference between the wild strain and oeNKA decreased significantly on the 2nd day, and then was gradually narrowed down over time and reached the lowest on the 6th day. Furthermore, the concentration of Ca²⁺ (1011.36±47.78 µg/g) released from wollastonite was about 4 times as that from the wild strain (248.30±25.21 µg/g). Moreover, the XRD pattern also showed that oeNKA exhibited intense effect on wollastonite weathering. [Conclusion] The weathering ability of oeNKA to wollastonite was significantly higher than that of the wild strain, and *Na, K-ATPase* in *Aspergillus niger* was actively involved in wollastonite weathering.

Keywords: *Aspergillus niger*, *Na, K-ATPase*, wollastonite, weathering

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Project of Natural Science Research in Colleges and Universities in Jiangsu Province (16KJA180003) and by the National Natural Science Foundation of China (41772360, 41173091)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-85891050; E-mail: bin2368@vip.163.com

[#]These authors contributed equally to this work.

Received: 2 August 2018; Revised: 29 October 2018; Published online: 29 November 2019

连宾, 理学博士, 南京师范大学生命科学学院教授/博士生导师。现任中国矿物岩石地球化学学会第九届理事会理事, 地表与生物地球化学专业委员会副主任; 成因矿物学找矿矿物学专业委员会委员; 中国微生物学会地质微生物学专业委员会委员; 江苏省生物技术协会常务理事及环境生物技术专业委员会副主任; 《矿物学报》、《矿物岩石地球化学通报》、《地球与环境》以及《广西植物》等期刊编委。曾获国务院政府特殊津贴和入选中国科学院“百人计划”。主要从事地质微生物及环境生物地球化学研究, 主持过国家高技术研究发展项目 863 课题和国家自然科学基金面上项目等课题, 以第一或通讯作者在国际学术期刊发表 SCI 论文 80 篇, 授权发明专利 8 项。

