



Pseudomonas azotoformans F77 和 *Pseudomonas paracarnis* P1 风化黑云母的效应及机制比较

王远丽^{1,2}, 董文², 何琳燕², 盛下放^{2*}

1 安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000

2 南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095

王远丽, 董文, 何琳燕, 盛下放. *Pseudomonas azotoformans* F77 和 *Pseudomonas paracarnis* P1 风化黑云母的效应及机制比较[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1127-1141.

WANG Yuanli, DONG Wen, HE Linyan, SHENG Xiafang. Distinct biotite weathering effects and mechanisms of *Pseudomonas azotoformans* F77 and *Pseudomonas paracarnis* P1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1127-1141.

摘要: 【目的】比较高效矿物风化固氮假单胞菌(*Pseudomonas azotoformans*) F77 及其亲缘关系较近的假单胞菌(*Pseudomonas paracarnis*) P1 风化黑云母的效应和机制。【方法】通过检测两株菌在不同时间点的发酵液中细胞数量、pH 值、葡萄糖剩余量、葡萄糖酸浓度和可溶性 Fe、Al 释放量, 比较它们对黑云母的风化效果与生理机制。采用 RNA-seq 技术研究这两株菌风化黑云母过程中出现差异的分子机制。【结果】在持续 5 d 的风化试验中, 菌株 F77 发酵液中的细胞数量和 pH 值低于菌株 P1, 葡萄糖酸浓度是菌株 P1 的 27.3–53.9 倍, Fe 和 Al 元素的释放量是菌株 P1 的 3.3–23.3 倍。比较转录组数据表明, 菌株 F77 特有的基因数量(2 872)和差异基因数量(1 832)均多于菌株 P1 (分别为 1 903 和 1 258)。菌株 F77 在胞内物质跨膜转运与碳代谢、细胞运动、趋化与信号诱导等途径中基因数量也高于菌株 P1。此外, 菌株 F77 的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶基因差异表达倍数、葡萄糖酸合成基因数量和差异表达倍数也明显高于菌株 P1。【结论】菌株 F77 风化黑云母以及合成葡萄糖酸的能力显著高于菌株 P1。菌株 F77 通过产生葡萄糖酸来促进黑云母的风化。添加黑云母显著促进了菌株 F77 胞内与矿物风化相关基因的表达, 如物质跨膜转运、细胞运动与趋化、信号诱导、碳代谢及能量代谢等途径基因。此外, 葡萄糖酸合成途径基因、超氧化物歧化酶基因以及过氧化氢酶基因在矿物风化中可能发挥重要作用。

关键词: 矿物风化; 转录组; 矿物-微生物相互作用; 分子机制; 假单胞菌

资助项目: 安徽省自然科学基金(2308085QD123); 安徽省高等学校自然科学研究项目(2022AH050984); 国家自然科学基金(42077288)

This work was supported by the Anhui Provincial Natural Science Foundation (2308085QD123), the Anhui Provincial Natural Science Research in Universities (2022AH050984), and the National Natural Science Foundation of China (42077288).

*Corresponding author. E-mail: xfsheng@njau.edu.cn

Received: 2023-10-09; Accepted: 2024-01-16; Published online: 2024-01-23

Distinct biotite weathering effects and mechanisms of *Pseudomonas azotoformans* F77 and *Pseudomonas paracarnis* P1

WANG Yuanli^{1,2}, DONG Wen², HE Linyan², SHENG Xiafang^{2*}

1 College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China

2 College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To compare the biotite weathering activities and mechanisms between *Pseudomonas azotoformans* F77 and *Pseudomonas paracarnis* P1. [Methods] During the mineral weathering process, the dissolved Fe and Al concentrations, cell number, pH, gluconic acid concentration, and residual glucose concentration in the culture medium were determined to reveal the biotite weathering effects and mechanisms of strains F77 and P1. Furthermore, RNA-seq was employed to explore the molecular mechanism for the difference in the biotite weathering effect between the two strains. [Results] During the 5 days of mineral weathering, strain F77 increased Fe and Al concentrations by 3.3–23.3 folds and gluconic acid concentration by 27.3–53.9 folds compared with strain P1. Meanwhile, strain F77 showed decreased cell number and medium pH compared with strain P1. The data of comparative transcriptomics showed that strain F77 had more specific genes (2 872) and differentially expressed genes (1 832) than strain P1 (1 903 and 1 258 genes, respectively). Additionally, strain F77 carried more genes involved in the membrane transport, carbohydrate metabolism, cell motility, chemotaxis, and signal transduction than strain P1. Furthermore, strain F77 had higher fold changes in the expression levels of superoxide dismutase and catalase genes as well as higher number and fold changes of the genes involved in gluconic acid synthesis than strain P1. [Conclusion] Strain F77 surpassed strain P1 in weathering the biotite and producing gluconic acid. Strain F77 promoted the biotite weathering by producing gluconic acid. The addition of biotite significantly up-regulated the expression of genes involved in the transmembrane transport, cell movement and chemotaxis, signal induction, and carbon and energy metabolisms in mineral weathering. Furthermore, the genes involved in gluconic acid synthesis and encoding superoxide dismutase and catalase may play a role in the mineral weathering by strain F77.

Keywords: mineral weathering; transcriptome; mineral-microbial interaction; molecular mechanism; *Pseudomonas*

矿物与微生物之间的相互作用能够促进岩石风化及土壤的形成，微生物的活性可以增强元素在土壤中的流动性，从而加速地质元素的地球化学循环^[1-5]。土壤微生物可以通过产生胞外多糖和有机酸腐蚀岩石，形成原始土壤，在

此基础上通过进一步风化，提高原始土壤肥力、改变土壤性能^[1,4]。硅酸盐矿物风化是广泛存在的地球化学过程，在长期的地质演化过程中，微生物参与的硅酸盐矿物风化在一定程度上影响大气 CO₂ 的迁移和转化，硅酸盐矿物与微生物

物相互作用所引起的元素循环和碳汇效应,对缓解全球气候变化和解决可持续发展等重大科学问题具有重要意义^[2-3]。此外,微生物对硅酸盐矿物的风化在缓解土壤营养元素缺乏、改善土壤状态、提高农作物产量、缓解可溶性钾短缺、修复建筑材料、铝土矿的脱硅除铁、减少尾矿污染以及生物浸矿等方面都有利用价值^[6-12]。

细菌风化硅酸盐矿物的生理学和生物化学机制研究已有不少报道,包括酸解作用、氧化还原作用和螯合作用等^[1,3]。近年来,有关微生物风化矿物的分子机制研究也有报道,如采用 RNA-seq 技术及基因组分析表明,含钾硅酸盐矿物能够诱导假单胞菌 NLX-4 胞内有机酸及氨基酸合成等途径的基因差异表达^[9]。Uroz 等借助转录组和蛋白质组学分析进一步证明了细菌的趋化、运动、铁载体以及 GMC 氧化还原酶系在矿物风化中的重要作用^[13]。Wang 等通过转录组和基因组揭示了细菌的耐酸性和胞内中心碳代谢参与风化黑云母^[14],采用基因敲除与回补等分子手段发现细菌鞭毛和菌毛能够通过运动和吸附作用加速黑云母的风化^[15-16];I 型聚酮合酶基因的缺失改变了真菌 *Knufia petricola* A95 对橄榄石的吸附作用^[17];漆酶基因过表达菌株能够通过腐蚀和点蚀溶解石英^[18];黑曲霉的多铜氧化酶 McoA 能够促进硅酸盐矿物中钾元素的释放^[19];由氧化还原酶类所驱动的氧化还原过程是硅酸盐矿物生物风化的重要手段^[20]。然而,有关微生物风化矿物的分子机制仍有许多问题没有得到解决,如不同微生物风化效应差异巨大的潜在分子机制是什么?在矿物风化过程中,细菌胞内有哪些途径调控了酸解、吸附等机制?各途径之间的相互调节机制如何?有关细菌与矿物相互作用机制需要在分子水平进行深入研究。

黑云母是普遍存在于土壤中的成土硅酸盐矿物。假单胞菌(*Pseudomonas*)是一种广泛分布

于多种环境中且具有生防特性及矿物风化能力的细菌^[9,14,21-23]。对细菌风化黑云母的效应与机制进行研究,有助于解析土壤的形成与演化以及元素循环等问题,同时可为全球气候变化等研究提供线索。*Pseudomonas azotoformans* F77 是具有高效矿物风化能力的细菌^[14,16],本研究以菌株 F77 以及与其亲缘关系较近的 *Pseudomonas paracarnis* P1 为材料,通过摇瓶试验比较了这两株菌的黑云母风化效应以及生长代谢差异,进一步通过比较转录组揭示了两株假单胞菌矿物风化差异的潜在分子机制。细菌风化硅酸盐矿物分子机制的进一步解析不仅有助于细菌-矿物相互作用分子机制的深入认识,丰富硅酸盐矿物生物风化细菌资源库和基因库,还将为功能菌株的改造提供理论依据、为高效矿物风化细菌在微生物肥料研制、土壤生态修复、生物冶金和文物保护等产业中的应用提供菌种资源和技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株和矿物

1.1.1 菌株及培养基

Pseudomonas azotoformans F77 (GenBank 登录号为 CP019856)由本实验室保藏和筛选,*Pseudomonas paracarnis* P1 (GenBank 登录号为 OR945531)购自中国典型培养物保藏中心(原始名为 *Pseudomonas azotoformans* 6-2R,保藏号为 CCTCCAB2013577,经 16S rRNA 基因鉴定,重新命名为 *Pseudomonas paracarnis* P1)。

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,NaCl 10.0,调节 pH 为 7.0,用于菌株培养。BHm 培养基(Bushnell-Hass medium) (g/L): MgSO₄·7H₂O 0.15, NaH₂PO₄ 0.08, Na₂HPO₄ 0.09, (NH₄)₂SO₄ 0.065, CaCl₂ 0.02, 葡萄糖 2.0, 调节 pH 为 7.0,用于矿物风化试验。

1.1.2 供试黑云母

选取实验室保藏的 100–200 目硅酸盐矿物黑云母(元素组成: SiO₂ 39.99%, Al₂O₃ 18.98%, K₂O 9.12%, Fe₂O₃ 14.75%, Na₂O 0.28%, MgO 13.69%, CaO 0.07%)为供试矿物, 经 pH 4.0 的 HCl 浸泡过夜, 超声清洗至 pH 为中性, 烘干备用。

1.2 矿物风化试验

矿物风化试验主要参考 Wang 等^[16]方法。准备经 5%的 HNO₃ 浸泡且清洗后的组培瓶, 称取 0.15 g 黑云母于 30 mL BHm 培养基中, 115 °C 灭菌 30 min。将活化后的菌株接种在 LB 培养基中, 28 °C、180 r/min 培养过夜后, 6 000 r/min 离心 10 min, 收集的菌体经生理盐水洗涤后重悬, 接种于 BHm 培养基中(接种量为 2%), 28 °C、150 r/min 培养 5 d, 定点取样测定发酵液中细胞数量和 pH 值。吸取 5 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 2 mL 加入等量 10% HNO₃, 采用电感耦合等离子体发射光谱仪(inductively coupled plasma optical emission spectrometer, ICP-OES)测定发酵液 Fe 和 Al 浓度, 以不接菌处理为阴性对照。

1.3 发酵液中细胞数量测定

发酵液中的活细胞数量采用稀释涂布的方法进行计数^[14,16]。矿物风化试验到第 0、1、3、5 天后, 取发酵液 1 mL 进行梯度稀释, 涂布于固体 LB 培养基上, 28 °C 培养过夜后进行活菌计数。

1.4 发酵液中还原性糖及有机酸测定

还原性糖的检测及 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)溶液的配制见参考文献[24]。取培养到第 0、1、3、5 天的发酵液, 经 12 000 r/min 离心 5 min 后, 取上清液加入 2 倍体积的 DNS 溶液, 沸水浴 2 min 后迅速冷却, 测定 540 nm 处吸光度值。

有机酸的测定采用 Chen 等^[24]方法。取培养

到特定时间的发酵液 2 mL, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液采用 0.22 μm 过滤器过滤后备用。采用高效液相色谱(Hitachi 公司)以及 Agilent 公司的 C18 柱(4.6 mm×250 m, 5 μm), 在波长 214 nm 下测定发酵液中的有机酸浓度, 流动相为含有 1% 甲醇的 20 mmol/L K₂HPO₄, 流速为 0.5 mL/min。

1.5 细菌总 RNA 的提取及质量检测

假单胞菌 F77 和 P1 分别接种在含 0.15 g 黑云母的 BHm 培养基中, 28 °C、150 r/min 振荡培养 4 h 和 10 h, 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 按照细菌 RNA 提取试剂盒(Omega Bio-Tek 公司)说明书提取菌株 F77 和 P1 的总 RNA。提取完成的 RNA 采用 NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific 公司)分光光度计检测其浓度, 样品送至广州基迪奥生物科技有限公司进行测定。

1.6 RNA-seq 的测序及生物信息学分析

采用 Illumina HiSeqTM 2500 (Illumina 公司)对 RNA 文库进行测序。通过核糖体数据库比对样品中的 high quality clean reads, 删除比对上核糖体的 reads, 剩余数据进行后续试验。转录本经组装合并后进行差异表达分析(除特殊说明外, 差异倍数≥2 视为差异基因)、基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析以及菌株的特有基因分析(各序列经 BLAST 比对, $E < 10^{-5}$ 的基因对被认为是物种间同源基因)等生物信息学数据分析。

2 结果与分析

2.1 两株假单胞菌对黑云母的风化效应及生长代谢特性

2.1.1 菌株对黑云母的风化效应

两株假单胞菌对黑云母的风化效应通过发

酵液中元素 Fe、Al 的浓度变化进行表征。菌株 F77 发酵液中 Fe、Al 元素释放量最高分别为不接菌对照组的 37.7 倍和 35.5 倍, 表明其具有高效风化矿物的能力, 而菌株 P1 的矿物风化能力较差(Fe、Al 元素释放量最高仅为对照的 4.2 倍和 7.2 倍), 这两株菌的元素释放效应差异较大(图 1)。

接种菌株 F77 的发酵液中 Fe、Al 元素逐渐增多, 最大值出现在第 5 天, 分别为 37.1 $\mu\text{mol/L}$ 和 38.9 $\mu\text{mol/L}$ 。菌株 P1 发酵液中可溶性 Fe 元素逐渐下降, 推测可能是由于菌株 P1 的大量生长(图 2A)需要消耗 Fe, 因此利用了部分 Fe 元素。在整个培养过程中(1–5 d), 菌株 F77 的 Fe、Al 元素释放均显著高于菌株 P1, 第 1、3、5 天的 Fe、Al 含量分别为菌株 P1 的 4.3 倍和 3.3 倍、14.9 倍和 3.8 倍以及 23.3 倍和 5.8 倍(图 1)。

2.1.2 生长代谢特性

在 5 d 的矿物风化试验中, 菌株 F77 和 P1 的细胞数量均在第 1 天达到峰值, 随后逐渐下降, 菌株 F77 发酵液中细胞数量低于菌株 P1 (图 2A)。两株菌发酵液的 pH 值均在第 1 天降低(菌株

F77 降至 3.2, 菌株 P1 降至 5.5), 在随后的培养中, 菌株 F77 的 pH 值始终显著低于菌株 P1 (图 2B)。两株菌发酵液中葡萄糖剩余量也逐渐降低(图 2C), 菌株 F77 的葡萄糖剩余量显著高于菌株 P1 (1–5 d), 在第 5 天仍有 440.9 mg/L 葡萄糖, 为菌株 P1 的 24.4 倍, 表明菌株 F77 只能缓慢地利用葡萄糖进行生长代谢。菌株 F77 和 P1 均只产生葡萄糖酸这一种有机酸(图 2D), 菌株 F77 的发酵液中葡萄糖酸浓度为 7.2–9.1 mmol/L, 是菌株 P1 的 27.3–53.9 倍。菌株 F77 能够利用葡萄糖产生大量的葡萄糖酸用于风化黑云母, 仅利用少量葡萄糖用于细胞生长。菌株 P1 在整个风化过程中几乎不产生能够促进矿物风化的葡萄糖酸(0.17–0.26 mmol/L), 其消耗的葡萄糖主要用于细胞的生长。

2.2 两株假单胞菌在短时间内对黑云母的风化效应

菌株 F77 和 P1 发酵液中可溶性 Fe、Al 元素在 1 d 即出现显著性差异(图 1)。菌株 P1 发酵液中 Fe 元素随发酵时间逐渐减少, 表明可能有部分 Fe 被其生长所利用。因此, 为研究菌株

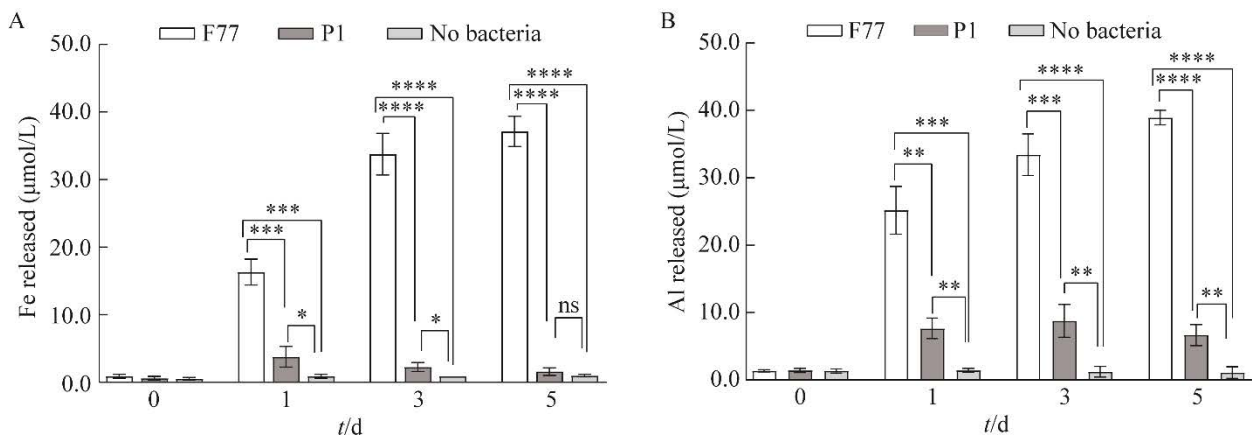


图 1 菌株 F77 和 P1 发酵液中可溶性元素 Fe (A) 和 Al (B) 的浓度变化

Figure 1 Dissolved Fe (A) and Al (B) concentrations in the presence of strains F77 and P1. Each test was repeated three times in parallel, and the data represent the mean \pm standard deviation (SD). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: No significant difference.

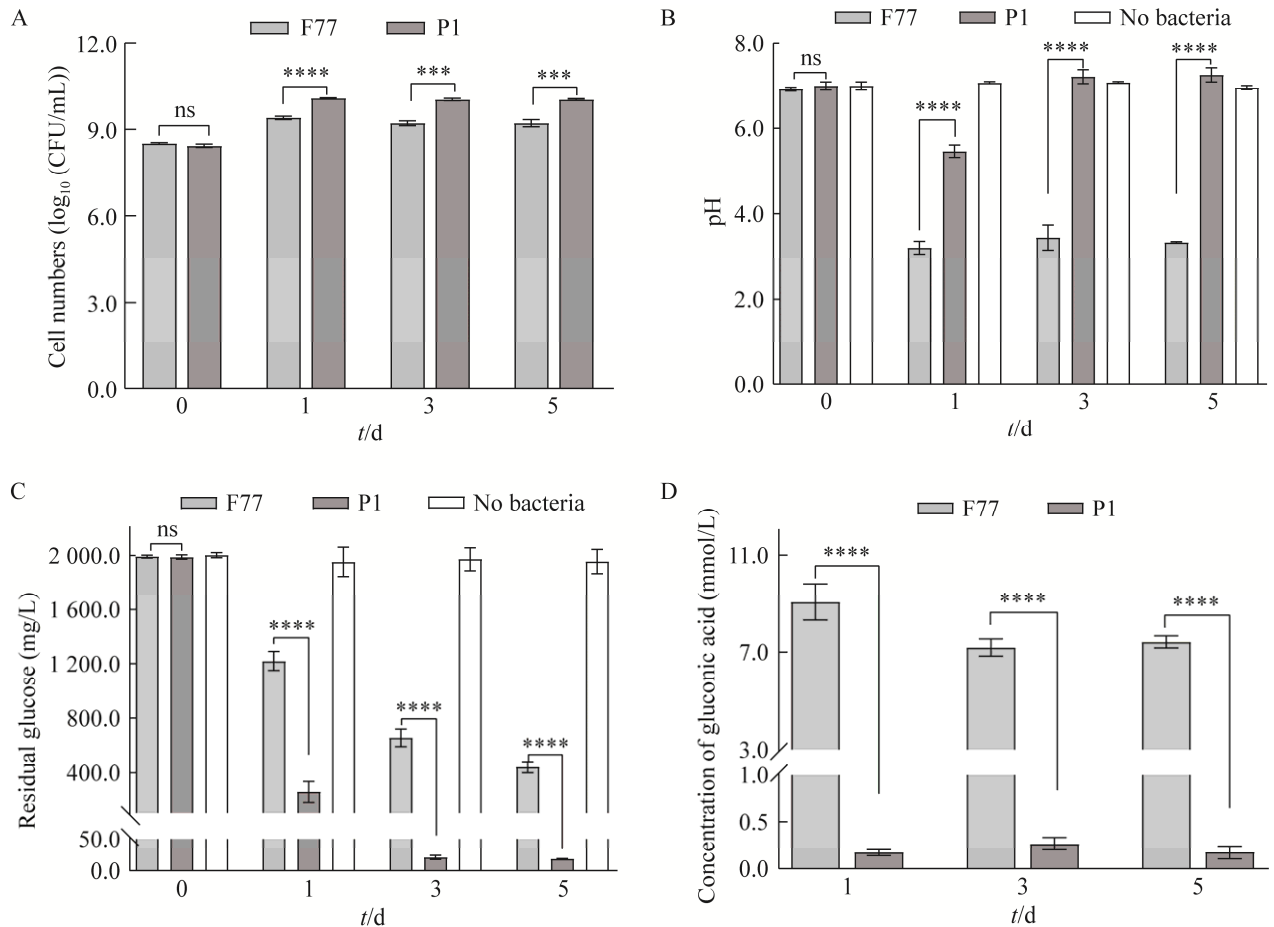


图2 菌株 F77 和 P1 发酵液中细胞数量(A)、pH 值(B)、剩余葡萄糖浓度(C)与葡萄糖酸(D)

Figure 2 The cell number (A), pH values (B), concentration of residual glucose (C) and gluconic acid (D) in culture medium in the presence of strains F77 and P1. Each test was repeated three times in parallel, and the data represent the mean±standard deviation (SD). ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: No significant difference.

P1 在 1 d 内矿物风化特性, 同时比较两株菌在短时间内的矿物风化差异, 进一步研究了菌株 F77 和 P1 在 20 h 内的黑云母风化效应。

菌株 F77 和 P1 的生长代谢以及元素释放效应在 20 h 内呈现不同变化(图 3)。在发酵液 pH 方面, 两株菌在 0–5 h 内的 pH 缓慢降低且无显著差异(pH 约为 5.7), 在 5 h 后菌株 F77 发酵液中 pH 显著低于菌株 P1。对于菌株 F77, 在 5–6 h 的 pH 陡然降低, 6–12 h 缓慢降低, 随后维持在 3.2 左右, 而菌株 P1 的 pH 最终维持在 5.2

左右。两株菌的细胞数量在 0–6 h 时无显著差异, 假单胞菌 F77 的细胞数量在 7–11 h 时显著高于菌株 P1, 12–20 h 时显著低于菌株 P1, 结合菌株 F77 发酵液中 pH 值的变化(图 3A), 其细胞数量在 12 h 后低于菌株 P1 的原因可能是发酵液过酸影响了细菌的生长。

在矿物风化效应方面, 菌株 F77 和 P1 在培养 5 h 后即能够风化黑云母, 但两株菌的矿物风化效应差异较大(图 3C)。两株菌在 0–5 h 内 Fe 元素释放量无差异, 随后菌株 F77 的 Fe 元

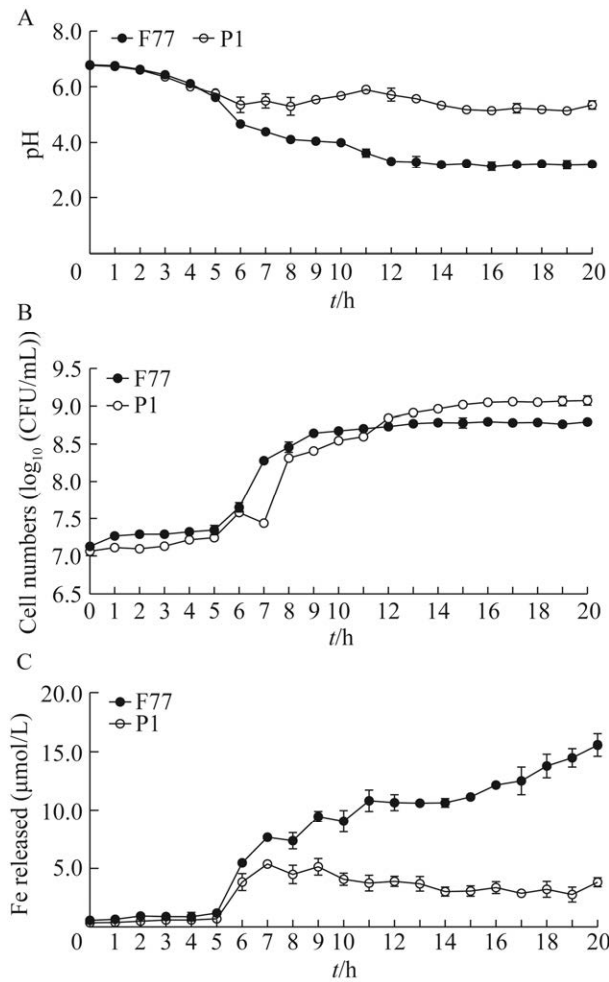


图3 菌株 F77 和 P1 发酵液中 pH 值(A)、细胞数量(B)和可溶性元素 Fe (C)的变化

Figure 3 The change of pH (A), cell number (B) and soluble elements Fe (C) of strain F77 and P1 were cultured in the medium during 20 hours of incubation. Each test was repeated three times in parallel, and the data represent the mean±standard deviation (SD).

素含量显著高于菌株 P1, 最大为菌株 P1 的 5.2 倍。在 5–6 h 时, 随着 pH 值的陡然降低, 菌株 F77 和 P1 的 Fe 元素释放速率也突然增强, 分别为 $11.9 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ 和 $8.7 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$, 但菌株 P1 的元素最大释放速率仅为菌株 F77 的 73.12%。在 9 h 之后, 菌株 P1 发酵液中 Fe 元素含量逐渐减少, 而菌株 F77 的 Fe 含量始终增

加, 在 20 h 时浓度达到 $15.6 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。

通过对菌株 F77 和 P1 在短时间内的黑云母风化试验比较发现, 两株菌发酵液中 pH 在 5–6 h 出现陡然降低, Fe 元素释放量也在相同时间突然增加。在随后的培养过程中, 菌株 F77 发酵液中 pH 显著低于菌株 P1, 而 Fe 元素释放量显著高于菌株 P1, 表明两株菌发酵液中 Fe 元素变化与培养基的酸化程度相关。菌株 F77 能够通过不断酸化培养基来增强其风化黑云母的效果, 菌株 P1 酸化培养基的能力较差, 因此其风化黑云母能力也相对较弱。

2.3 菌株 F77 和 P1 的比较转录组分析

2.3.1 细菌总 RNA 提取和质量检测

采用邻位相连法构建菌株 F77 和 P1 的系统发育树, 发现两株菌位于同一分支[附图 1, 所有附图和附表数据已提交到国家微生物科学数据中心(NMDC, <http://nmnc.cn>), 编号为 NMDCX0000250]。尽管菌株 F77 和 P1 相似度很高, 但两者风化黑云母的效应却相差极大(图 1–图 3), 因此, 进一步通过比较转录组研究两株菌风化黑云母差异的分子机制。基于图 3 结果, 将菌株 F77 和 P1 接种在添加黑云母的 BHm 培养基中培养 4 h 和 10 h, 收集菌体提取 RNA。经检测, 提取的 RNA 均达到了建库要求(附表 1), 且各 reads 与基因组比对率在 94% 以上(附表 2)。

2.3.2 菌株 P1 的从头装配和功能注释

采用 Short-read 装配程序对假单胞菌 P1 的基因组进行从头装配, 具体方法见参考文献 [25–26]。通过多个数据库[Nr (non-redundant protein)、COG (cluster of orthologous groups)、KEGG 和 Swiss-Prot]对菌株 P1 的基因进行注释, 菌株 F77 的全基因组测序由上海凌恩生物科技有限公司完成。两株菌的基因装配及注释结果如附表 3 所示, 菌株 F77 和 P1 分别注释到 5 943 个和 4 548 个基因。

2.3.3 两株假单胞菌在风化黑云母过程中的基因表达差异

基于比较转录组数据分析,菌株 F77 与 P1 的共有基因家族数及共有基因数分别为 2 866 个和 6 028 个,菌株 F77 特有基因家族数及特有基因数分别为 2 500 个和 2 872 个,菌株 P1 特有基因家族数及特有基因数分别为 1 895 个和 1 903 个(附图 2)。进一步比较假单胞菌 F77 和 P1 中特有基因的 KEGG 通路,发现菌株 F77 中参与物质跨膜转运(ABC 转运蛋白、细菌分泌

系统)、碳代谢(脂多糖生物合成)、能量代谢(柠檬酸循环)和细胞运动(鞭毛装配)等代谢通路中的特有基因数量多于假单胞菌 P1 (图 4A)。这两株假单胞菌风化黑云母的主要差异机制为葡萄糖酸的酸解作用(图 2D),经比较发现,两菌株中胞内参与碳代谢的特有基因数量也出现差异,菌株 F77 的磷酸戊糖途径、柠檬酸循环以及果糖、甘露糖、氨基糖和核苷酸糖代谢途径中特有基因数量高于低效菌株 P1 (图 4B)。假单胞菌 F77 的以上途径可能为其高效风化黑云母

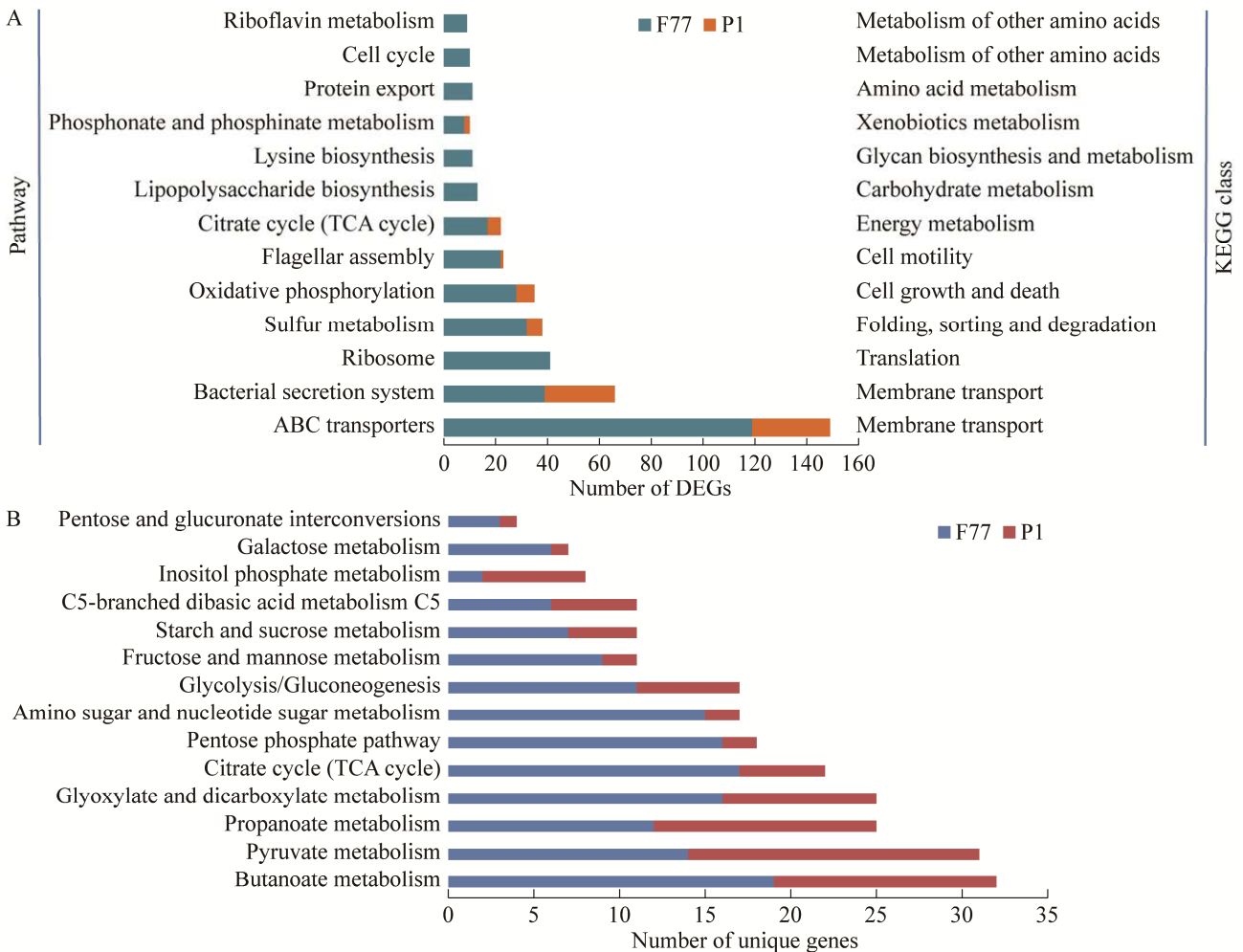


图 4 菌株 F77 和 P1 特有基因中的差异表达基因 KEGG 通路(A)和碳代谢途径相关的基因数量(B)

Figure 4 The number of differentially expressed genes (DEGs) in all of unique genes involved in KEGG pathway for strain F77 and P1 (A), the number of unique genes related to carbohydrate metabolism pathway in strain F77 and P1 (B).

提供能量和中间代谢物, 途径中的基因差异可能是两株菌矿物风化能力出现差异的原因。

2.3.4 两株假单胞菌在不同时间点风化黑云母的基因表达差异

菌株 F77 和 P1 在发酵 0–5 h 时, 发酵液中 pH 值及 Fe 元素释放无显著差异, 5 h 后出现显著差异(图 3)。因此, 为深入研究这两株假单胞菌风化黑云母过程中的遗传差异, 比较了两株菌在 10 h 和 4 h 的基因表达差异, 图 5 显示菌株 F77 和 P1 风化黑云母 10 h 的基因上下调数量(与 4 h 相比)。菌株 F77 差异基因数量高于菌株 P1, 其中菌株 F77 的上调基因数量高于下调基因数量, 添加黑云母可能诱导了菌株 F77 基因表达, 使其产生更多代谢物用于风化矿物。

通过分析两株假单胞菌的 KEGG 通路发现, 高效矿物风化细菌 F77 中参与能量代谢、运动、碳代谢和信号诱导等通路中的差异基因数量多于低效矿物风化细菌 P1 (图 6), 尤其在信号诱导和能量代谢通路中, 在菌株 P1 中有部分途径没有出现差异基因, 表明能量代谢、运动、碳代谢和信号诱导通路可能在菌株 F77 风化

黑云母中具有重要作用。黑云母可能会刺激菌株 F77 的趋化以及信号诱导能力, 使其朝着有利的方向运动。同时, 在运动及风化矿物过程中需要更多的能量和含碳化合物的参与, 因此在能量和碳代谢通路中差异基因也多于菌株 P1。

菌株 F77 与 P1 风化黑云母的生理机制差异为葡萄糖酸产生量的差异(图 2D)。因此, 基于两株菌的基因组以及比较转录组数据, 分析了这两株菌的葡萄糖酸合成与代谢相关基因以及基因表达差异(表 1)。通过菌株 F77 与 P1 的基因组数据发现, 菌株 F77 具有完整的葡萄糖酸合成和代谢途径基因, 而菌株 P1 基因组中只有 3 个与葡萄糖酸合成相关的辅酶(葡萄糖脱氢酶依赖性辅酶)基因 *pqqB*、*pqqE* 和 *pqqF* 以及葡萄糖脱氢酶基因 *gcd* (将葡萄糖催化为葡萄糖酸), 缺乏葡萄糖酸转运蛋白以及葡萄糖酸-2-脱氢酶(将葡萄糖酸催化为 2 酮葡萄糖酸)。通过比较转录组进一步发现, 菌株 F77 中葡萄糖脱氢酶、葡萄糖酸-2-脱氢酶、PQQ 系列辅酶以及葡萄糖酸转运酶和通透酶均出现上调表达(除基因 *pqqF*), 而菌株 P1 中除辅酶基因 *pqqB* 外, 其他基因均无差异表达或未检测到, 表明葡萄糖酸合成相关基因是菌株 F77 风化矿物的重要基因, 同时也是两株假单胞菌风化差异的关键基因。值得关注的是, 在菌株 F77 的 FoxO 信号途径中有 5 个基因出现显著差异(图 6), 酶功能分别为超氧化物歧化酶和过氧化氢酶, 这两种酶能够减少超氧化物和过氧化氢对细胞的损害。通过比较以上两种酶在两株菌中的差异表达情况, 发现菌株 F77 中基因差异表达倍数高于 P1 (除基因 *katE*) (表 1), 表明超氧化物歧化酶和过氧化氢酶可能在菌株 F77 风化矿物过程中加强了其防御机制, 对于 F77 菌株, 其高效矿物风化能力可能与这两种酶的高效表达有关。

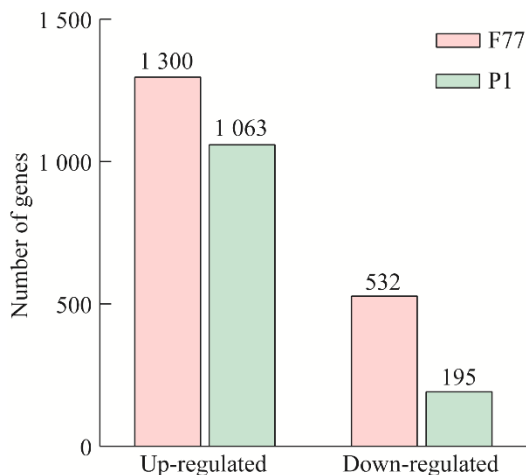


图 5 菌株 F77 和 P1 胞内差异表达基因的数量
Figure 5 The number of DEGs of strain F77 and P1 cultured at 10 h compared with 4 h.

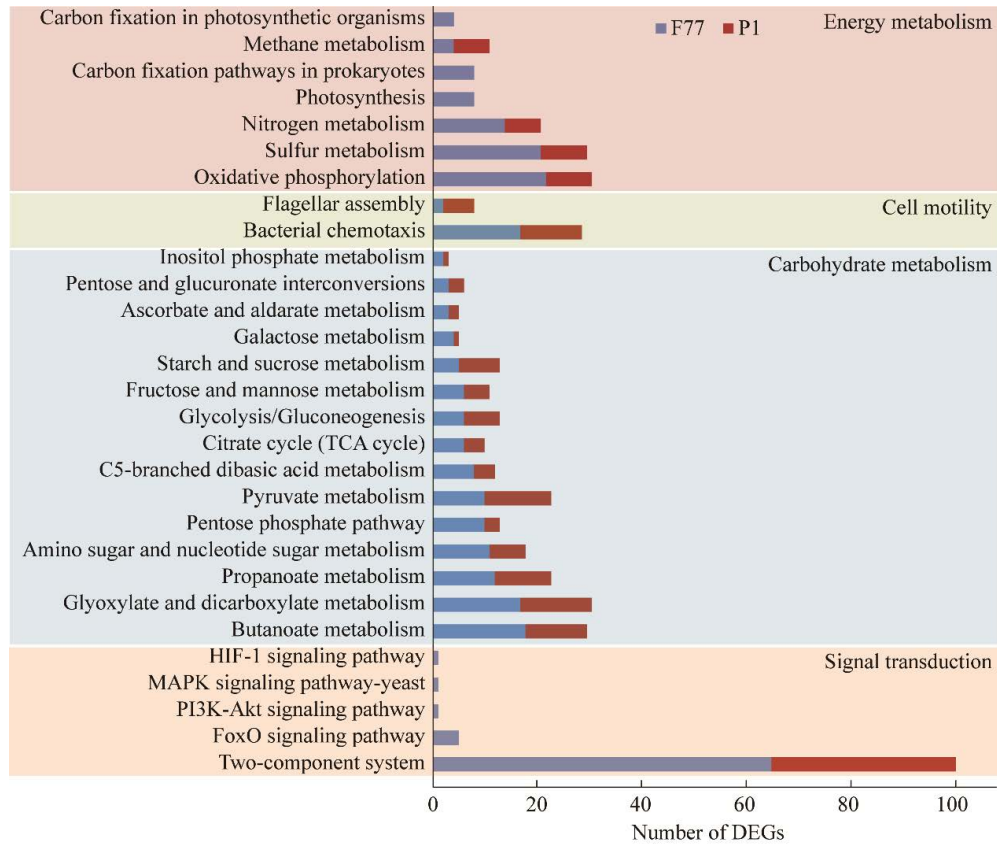


图 6 菌株 F77 和 P1 的 KEGG 通路中与矿物风化相关的差异基因数量

Figure 6 Enriched pathways and DEGs of strain F77 and P1 cultured at 10 h compared with 4 h.

表 1 菌株 F77 和 P1 中与葡萄糖酸代谢、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶相关基因表达差异

Table 1 Genes fold change related to gluconic acid metabolism, superoxide dismutase and catalase in strain F77 and P1

Gene	Function or description of product	Fold change	
		F77	P1
<i>gcd</i>	Glucose dehydrogenase	3.82***	1.20*
<i>gad</i>	Gluconate 2-dehydrogenase	2.38***	–
<i>pqqF</i>	Pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein	1.32***	1.40**
<i>pqqB</i>	Pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein	3.19***	1.94***
<i>pqqC</i>	Pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein	2.65***	–
<i>pqqD</i>	Coenzyme PQQ synthesis protein	2.66***	–
<i>pqqE</i>	Pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein	2.84***	–1.44**
<i>pqqE</i>	Pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein	1.58***	–
<i>gntP</i>	Gluconate transporter	1.67***	–
<i>dsdX</i>	Gluconate permease	1.67***	–
<i>katE</i>	Catalase	–2.42***	–5.17***
<i>cat</i>	Catalase	2.21***	1.69*
<i>cat</i>	Catalase	3.38***	2.17***
<i>cat/echA8</i>	Catalase	29.92***	3.34***
<i>sod</i>	Superoxide dismutase	3.50***	ns

Differentially expressed genes, fold change \geq 1.5; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; –: No gene; ns: No significant difference.

3 讨论

前期研究表明, 菌株 F77 风化黑云母 5 d 后元素释放量基本达到平衡, 表明其对黑云母的风化主要集中在培养前期^[16]。本研究分别从细胞生长代谢活动、矿物风化效应及风化模式等角度考察了短期内(5 d)高效矿物风化假单胞菌 F77 和低效矿物风化假单胞菌 P1 对黑云母的风化, 重点解析了两株假单胞菌风化黑云母差异的分子机制。详细了解假单胞菌的矿物风化行为及分子机制, 有助于更好地理解不同假单胞菌在土壤环境下硅酸盐风化、元素循环和土壤形成中的作用, 更加有利于阐明不同假单胞菌具有不同矿物风化效应的潜在机制。结果表明, 两株假单胞菌具有不同的矿物风化行为及分子机制。菌株 F77 具有高效风化黑云母的能力, 而菌株 P1 的风化能力较差, 两株菌在风化过程中的生长代谢活动差异较大(图 1-图 3)。有机酸在矿物风化过程中起到促进作用^[1,16,24,27], 前期研究表明, *P. azotoformans* F77 产生的葡萄糖酸能够明显促进黑云母的风化^[14]。在 5 d 的矿物风化试验中, 低效矿物风化细菌 P1 发酵液中葡萄糖酸浓度显著低于菌株 F77 (图 2D), 菌株 F77 可能通过分泌大量葡萄糖酸用以促进黑云母风化, 菌株 P1 产生的葡萄糖酸却主要被用于自身生长。此外, 相比菌株 P1, 菌株 F77 酸化培养基的能力更强, 能够提供大量质子用于风化矿物(图 2B 和图 3A)。

P. azotoformans F77 和 *P. paracarnis* P1 虽相似度较高(附图 1), 但黑云母风化效应及生长代谢却相差极大, 需要在基因及代谢调控水平进行解析。前期研究发现, 黑云母能够诱导菌株 F77 胞内涉及能量代谢、信号诱导、物质跨膜转运、细胞运动和碳代谢等途径的基因显著差异表达^[14]。在本研究中, 有黑云母存在下,

高效矿物风化细菌 F77 与低效矿物风化细菌 P1 的以上途径也出现明显不同, 在运动、信号诱导、物质跨膜转运和碳代谢等通路中, 菌株 F77 的特有基因数量多于菌株 P1 (图 4)。进一步分析了两株菌在风化黑云母 10 h (与 4 h 相比)的差异基因变化, 同样发现在菌株 P1 中有关细胞运动、信号诱导、物质跨膜转运和碳代谢等相关通路中的差异基因数量低于菌株 F77 (图 6)。

微生物的趋化与运动有助于其趋利避害。假单胞菌 F77 在细胞趋化方面的差异表达基因数量高于 P1 菌株(图 6), 胞内有关鞭毛装配的特有基因数量同样高于 P1 菌株(图 4A), 而微生物的趋化与细胞群集性和表面运动有关^[28], Wang 等证实细菌鞭毛和菌毛能够促进黑云母风化^[14-16]。微生物的能量代谢为细胞生长繁殖提供能量, 有利于细菌适应贫营养环境^[29-30]; 物质跨膜转运能够为细菌胞内胞外各物质的交换与运输提供机会^[31-32]。在信号诱导通路中, 与 4 h 相比, 菌株 F77 在 10 h 有 5 种途径的基因出现差异表达(差异表达基因数: two-component system 66 个、FoxO signaling pathway 5 个、PI3K-Akt signaling pathway 1 个、MAPK signaling pathway-yeast 1 个、HIF-1 signaling pathway 1 个), 而菌株 P1 中只在 two-component system 中有 36 个差异基因(图 6)。信号诱导可为细菌特定功能发挥以及趋利避害提供信号, 同时为细胞正常生长代谢提供多种酶用以抵抗外界不利环境的影响^[33]。因此, 低效矿物风化菌株 P1 在物质跨膜转运、能量代谢、信号诱导以及运动等通路中的差异基因数量低于高效菌株 F77, 可能是这两株菌矿物风化能力出现差异的重要原因。

含金属矿物会通过释放金属离子和氧化还原反应等产生活性氧, 活性氧的产生取决于矿物的理化性质和环境条件(如溶液 pH 和 O₂ 等)^[34-35]。环境中过多的活性氧能够使微生物群

落中的某些种群发生突变, 由活性氧诱导的基因突变可能会增加微生物的功能多样性, 由矿物诱导的活性氧可能代表了驱动微生物进化的重要选择压力^[35]。在假单胞菌 F77 和 P1 的进化过程中, 具有产酸能力的矿物风化细菌 F77 可能会产生更多的活性氧加速进化突变, 使其向高效风化矿物的方向进化。然而, 过多的活性氧会对微生物的 DNA 和 RNA 产生损害, 从而影响其生长代谢, 为此微生物会产生一系列的防御酶用于清除胞内过多的活性氧, 如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)以及过氧化氢酶(catalase, CAT); SOD 可以将活性氧催化为 O₂ 和 H₂O₂ 以减少胞内氧化损伤来保护细胞; CAT 可促使 H₂O₂ 分解为 O₂ 和 H₂O, 清除胞内的 H₂O₂ 以避免细胞损害, 这两种酶均是生物防御体系的关键酶^[36]。在菌株 F77 的转录组结果中发现, 超氧化物歧化酶以及过氧化氢酶基因出现显著差异表达, 差异倍数高于菌株 P1 (除基因 *katE*) (表 1)。在矿物风化 10 h 时(图 3), 菌株 F77 发酵液中过酸的环境以及金属元素的释放可能会导致更多活性氧的产生, 因此, 菌株 F77 会通过表达更多的超氧化物歧化酶以及过氧化氢酶来消除活性氧的毒害作用。

碳代谢是细胞能量和中间代谢产物生成的基础。前期研究表明, 黑云母能够诱导固氮假单胞菌 F77 的碳代谢基因的表达, 碳代谢在其风化黑云母过程中占有十分重要的作用^[14]。本研究发现, 在风化黑云母过程中, 与低效矿物风化细菌 P1 相比, 高效矿物风化细菌 F77 的细胞数量较低, 但葡萄糖酸产生量较高(图 2)。因此, 对菌株 F77 和 P1 胞内参与碳代谢的特有基因进行分析。结果表明, 与菌株 P1 相比, 菌株 F77 胞内涉及柠檬酸循环、磷酸戊糖途径, 以及氨基糖、核苷酸糖、果糖和甘露糖代谢等通路中

特有基因数量较多(图 4B), 这些途径可能为菌株 F77 高效风化矿物提供能量和中间代谢物。此外, 比较了两株菌在风化 10 h 的差异基因变化, 发现在菌株 F77 中, 与碳代谢途径相关的差异基因多于菌株 P1 (图 6), 进一步证实碳代谢在菌株风化矿物中的重要作用, 与前期研究结果相符合^[14]。研究表明, 葡萄糖酸是菌株 F77 风化黑云母的重要机制之一^[14,16]。通过比较菌株 F77 和 P1 合成葡萄糖酸的相关基因的表达(表 1), 进一步表明葡萄糖酸合成途径相关基因的差异可能是这两株菌株风化能力出现差异的最根本原因。

对两株亲缘关系较近、风化黑云母能力显著差异的假单胞菌 F77 和 P1 进行比较分析, 进一步证实能量代谢、信号诱导、运动、碳代谢以及葡萄糖酸合成等在高效矿物风化细菌 F77 风化矿物过程中具有重要作用。菌株 F77 和 P1 在趋化、运动、能量代谢、物质跨膜转运及信号诱导途径的基因差异可能是它们风化矿物能力出现差异的原因。其中, 葡萄糖酸合成基因的差异可能是根本原因, 超氧化物歧化酶基因以及过氧化氢酶基因差异可能是另一重要原因。假单胞菌是环境中常见的有较强矿物风化能力的细菌种群^[9,14,22,37], 有关其风化黑云母的机制可能包括酸解和吸附等^[14,16]。此外, 假单胞菌胞内参与能量代谢、信号诱导、物质跨膜转运、碳代谢和耐酸等途径的基因在其风化黑云母过程中也占有重要作用^[14,16,38], 本研究中发现超氧化物歧化酶和过氧化氢酶可能也参与风化黑云母, 未来有关细菌风化矿物的机制可从以上方面展开研究。对微生物风化矿物的途径探索, 有助于解析细菌胞内多种代谢途径如何进行相互协调以促进细菌风化矿物, 同时阐明微生物风化矿物的潜在分子机制。

4 结论

以两株亲缘关系较近的 *P. azotoformans* F77 和 *P. paracarnis* P1 为研究对象, 比较研究了两株菌的代谢活动、风化黑云母效应及机制, 发现黑云母对菌株 F77 的影响主要体现在促进葡萄糖酸的产生, 对菌株 P1 主要为促进细胞生长。菌株 F77 风化黑云母能力显著高于菌株 P1, 其原因可能是菌株 F77 产生的葡萄糖酸能够通过螯合作用将矿物中的金属元素析出, 同时葡萄糖酸中的 H^+ 又为矿物风化提供大量质子, 从而加速黑云母风化。

菌株 F77 可以通过合成葡萄糖酸促进黑云母风化, 通过比较转录组发现菌株 F77 中葡萄糖酸合成相关基因的数量以及差异表达倍数高于菌株 P1。菌株 F77 在风化黑云母过程中胞内参与细胞运动与趋化、物质跨膜转运、碳代谢、能量代谢及信号诱导等途径中的基因显著差异表达, 以上途径可能在其风化矿物过程中起到重要作用。此外, 由矿物诱导的活性氧可能是驱动微生物矿物风化能力进化的重要选择压力, 菌株 F77 在超氧化物歧化酶以及过氧化氢酶基因上的显著差异表达可能是其具有高效矿物风化能力的另一重要原因, 未来将从这一角度进行深入研究。本研究为矿物微生物相互作用分子机制提供了理论基础, 为细菌风化矿物的研究提供了新的线索。

参考文献

- [1] UROZ S, CALVARUSO C, TURPAULT MP, FREY-KLETT P. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(8): 378-387.
- [2] FANG Q, LU AH, HONG HL, KUZYAKOV Y, ALGEO TJ, ZHAO LL, OLSHANSKY Y, MORAVEC B, BARRIENTES DM, CHOROVER J. Mineral weathering is linked to microbial priming in the critical zone[J]. Nature Communications, 2023, 14: 345.
- [3] DENG K, YANG SY, GUO YL. A global temperature control of silicate weathering intensity[J]. Nature Communications, 2022, 13: 1781.
- [4] DONG H, LU A. Mineral-microbe interactions and implications for remediation[J]. Elements, 2012, 8(2): 95-100.
- [5] HILLEY GE, PORDER S. A framework for predicting global silicate weathering and CO_2 drawdown rates over geologic time-scales[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(44): 16855-16859.
- [6] MEENA VS, MAURYA BR, VERMA JP. Does a rhizospheric microorganism enhance K^+ availability in agricultural soils?[J]. Microbiological Research, 2014, 169(5/6): 337-347.
- [7] ZHAO JM, WU WJ, ZHANG X, ZHU ML, TAN WS. Characteristics of bio-desilication and bio-flotation of *Paenibacillus mucilaginosus* BM-4 on aluminosilicate minerals[J]. International Journal of Mineral Processing, 2017, 168: 40-47.
- [8] WANG Q, SHENG XF, HE LY, SHAN Y. Improving bio-desilication of a high silica bauxite by two highly effective silica-solubilizing bacteria[J]. Minerals Engineering, 2018, 128: 179-186.
- [9] WU YW, KAMESHWAR AKS, ZHANG B, CHEN FF, QIN WS, MENG MJ, ZHANG JC. Genome and transcriptome analysis of rock-dissolving *Pseudomonas* sp. NLX-4 strain[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2022, 9(1): 63.
- [10] WANG WY, SUN JJ, DONG CL, LIAN B. Biotite weathering by *Aspergillus niger* and its potential utilisation[J]. Journal of Soils and Sediments, 2016, 16(7): 1901-1910.
- [11] YI Q, WU SL, LIU YJ, CHAN TS, LU YR, SAHA N, SOUTHAM G, HUANG LB. Mineral weathering of iron ore tailings primed by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and elemental sulfur under contrasting pH conditions[J]. Science of the Total Environment, 2023, 856: 159078.
- [12] UROZ S, PICARD L, TURPAULT MP. Recent progress in understanding the ecology and molecular genetics of soil mineral weathering bacteria[J]. Trends in Microbiology, 2022, 30(9): 882-897.
- [13] UROZ S, PICARD L, TURPAULT MP, AUER L, ARMENGAUD J, OGER P. Dual transcriptomics and proteomics analyses of the early stage of interaction between *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) and

- mineral[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(9): 3838-3862.
- [14] WANG YL, DONG W, XIANG KX, WANG Q, HE LY, SHENG XF. A combination of genomics, transcriptomics, and genetics provides insights into the mineral weathering phenotype of *Pseudomonas azotoformans* F77[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(24): e0155221.
- [15] WANG YL, LI L, SUN Y, HE LY, SHENG XF. Impact of the *fliF* gene on biotite weathering of *Rhizobium pusense* S41[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2020, 37(4): 308-314.
- [16] WANG YL, SUN LJ, XIAN CM, KOU FL, ZHU Y, HE LY, SHENG XF. Interactions between biotite and the mineral-weathering bacterium *Pseudomonas azotoformans* F77[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(7): e02568-19.
- [17] GERRITS R, POKHAREL R, BREITENBACH R, RADNIK J, FELDMANN I, SCHUESSLER JA, von BLANCKENBURG F, GORBUSHINA AA, SCHOTT J. How the rock-inhabiting fungus *K. petricola* A95 enhances olivine dissolution through attachment[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2020, 282: 76-97.
- [18] KIRTZEL J, UEBERSCHAAR N, DECKERT-GAUDIG T, KRAUSE K, DECKERT V, GADD GM, KOTHE E. Organic acids, siderophores, enzymes and mechanical pressure for black slate bioweathering with the basidiomycete *Schizophyllum commune*[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(4): 1535-1546.
- [19] WANG WY, SUN QB, LIAN B. Redox of fungal multicopper oxidase: a potential driving factor for the silicate mineral weathering[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2018, 35(10): 879-886.
- [20] LIU HL, LIU XR, LI XF, FU ZY, LIAN B. The molecular regulatory mechanisms of the bacteria involved in serpentine weathering coupled with carbonation[J]. *Chemical Geology*, 2021, 565: 120069.
- [21] MA Y, RAJKUMAR M, MORENO A, ZHANG C, FREITAS H. Serpentine endophytic bacterium *Pseudomonas azotoformans* ASS1 accelerates phytoremediation of soil metals under drought stress[J]. *Chemosphere*, 2017, 185: 75-85.
- [22] HEIDARI NONAKARAN S, PAZHOUHANDEH M, KEYVANI A, ABDOLLAHIPOUR FZ, SHIRZAD A. Isolation and identification of *Pseudomonas azotoformans* for induced calcite precipitation[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 31(12): 1993-2001.
- [23] ANSARI FA, JABEEN M, AHMAD I. *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2021, 18(12): 3855-3870.
- [24] CHEN W, LUO L, HE LY, WANG Q, SHENG XF. Distinct mineral weathering behaviors of the novel mineral-weathering strains *Rhizobium yantingense* H66 and *Rhizobium etli* CFN42[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(14): 4090-4099.
- [25] GRABHERR MG, HAAS BJ, YASSOUR M, LEVIN JZ, THOMPSON DA, AMIT I, ADICONIS X, FAN L, RAYCHOWDHURY R, ZENG QD, CHEN ZH, MAUCELLI E, HACOEN N, GNIRKE A, RHIND N, Di PALMA F, BIRREN BW, NUSBAUM C, LINDBLAD-TOH K, FRIEDMAN N, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29: 644-652.
- [26] BI L, GUAN CJ, YANG GE, YANG F, YAN HY, LI QS. High-throughput transcriptome sequencing analysis provides preliminary insights into the biotransformation mechanism of *Rhodospseudomonas palustris* treated with alpha-rhamnnetin-3-rhamnoside[J]. *Microbiological Research*, 2016, 185: 1-12.
- [27] RIBEIRO IDA, VOLPIANO CG, VARGAS LK, GRANADA CE, LISBOA BB, PASSAGLIA LMP. Use of mineral weathering bacteria to enhance nutrient availability in crops: a review[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 590774.
- [28] HARSHEY RM, KAWAGISHI I, MADDOCK J, KENNEY LJ. Function, diversity, and evolution of signal transduction in prokaryotes[J]. *Developmental Cell*, 2003, 4(4): 459-465.
- [29] 丁阿强, 李朝洋, 李薇薇, 卢培利. 厌氧甲烷氧化微生物物质代谢与能量代谢研究进展[J]. *微生物学报*, 2022, 62(5): 1669-1687.
DING AQ, LI CY, LI WW, LU PL. Advances in catabolism and energy metabolism of anaerobic methane-oxidizing microorganisms[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1669-1687 (in Chinese).
- [30] 赵芮, 李登辉, 李学恭, 张维佳, 赵苑, 吴龙飞. 微小杆菌属(*Exiguobacterium*)细菌的能量代谢途径分析[J]. *微生物学报*, 2023, 63(6): 2078-2093.
ZHAO R, LI DH, LI XG, ZHANG WJ, ZHAO Y, WU LF. Energy metabolism pathways in *Exiguobacterium*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(6): 2078-2093 (in Chinese).

- [31] OKADA U, MURAKAMI S. Structural and functional characteristics of the tripartite ABC transporter[J]. *Microbiology*, 2022, 168(11): 10.1099/mic.0.001257.
- [32] 徐志弘, 周爱萍, 姚玉峰. 结核分枝杆菌 ABC 转运蛋白与物质的跨膜转运[J]. *微生物学报*, 2014, 54(6): 608-615.
XU ZH, ZHOU AP, YAO YF. ATP-binding cassette transporters and transmembrane transport in *Mycobacterium tuberculosis*-a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(6): 608-615 (in Chinese).
- [33] MATILLA MA, MONTEAGUDO-CASCALES E, KRELL T. Advances in the identification of signals and novel sensing mechanisms for signal transduction systems[J]. *Environmental Microbiology*, 2023, 25(1): 79-86.
- [34] SCHOONEN MAA, COHN CA, ROEMER E, LAFFERS R, SIMON SR, O'RIORDAN T. Mineral-induced formation of reactive oxygen species[J]. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 2006, 64(1): 179-221.
- [35] DONG HL, HUANG LQ, ZHAO LD, ZENG Q, LIU XL, SHENG YZ, SHI L, WU G, JIANG HC, LI FR, ZHANG L, GUO DY, LI GY, HOU WG, CHEN HY. A critical review of mineral-microbe interaction and co-evolution: mechanisms and applications[J]. *National Science Review*, 2022, 9(10): nwac128.
- [36] WEYDERT CJ, CULLEN JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue[J]. *Nature Protocols*, 2010, 5: 51-66.
- [37] HUANG J, SHENG XF, XI J, HE LY, HUANG Z, WANG Q, ZHANG ZD. Depth-related changes in community structure of culturable mineral weathering bacteria and in weathering patterns caused by them along two contrasting soil profiles[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(1): 29-42.
- [38] WANG YL, DONG W, CHU LF, ZHAO H, HE LY, SHENG XF. A combination of proteomics, genetics, and physiology provides insights into the acid-tolerance phenotype of *Pseudomonas pergaminensis* F77[J]. *Microbiological Research*, 2024, 278: 127545.