微生物学报 Acta Microbiologica Sinica 53 (11):1172 - 1178; 4 November 2013 ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

矿物分解细菌 Bacillus sp. L11 对钾长石的风化作用

黄智¹,何琳燕¹,盛下放^{1*},贺子义²

¹南京农业大学生命科学学院,农业部农业环境微生物重点实验室,南京 210095

²南京农业大学生命科学实验中心,南京 210095

摘要:【目的】明确从南京钾矿区土壤中分离到的一株矿物分解细菌的分类地位,阐明其对钾长石矿物的风 化效应及机制,为深入研究微生物-矿物相互作用提供参考依据。【方法】通过 16S rRNA 基因序列分析及其 系统发育分析对菌株 L11 进行鉴定。采用摇瓶试验评估菌株 L11 对钾长石的风化能力,利用 SEM/EDS 观 察钾长石矿物的形貌变化,使用 X-射线衍射技术对小于 2 μm 矿物进行了鉴定。【结果】菌株 L11 的 16S rRNA 基因序列与 *Bacillusaltitudinis* 的相似性最高,为 99.9%,初步鉴定其为 *Bacillus* sp. L11。摇瓶试验表 明,菌株 L11 能够通过产生有机酸风化钾长石矿物,释放出 Si、Al 和 Fe 等元素。通过 SEM 发现第 30 d 的钾 长石表明形貌发生了较大变化,表面有许多细菌存在,并形成了一些球形物质,EDS 分析表明其 Fe 的含量较 高。XRD 结果表明,钾长石经菌株 L11 作用后可能形成了新矿物——菱铁矿。【结论】菌株 *Bacillus* sp. L11 能够加速钾长石的风化,改变其形貌,并能诱导新矿物的形成。

关键词:矿物分解细菌,芽孢杆菌,钾长石,有机酸

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0001-6209 (2013)11-1172-07

矿物风化是在地表及其附近发生的最重要的地 球化学现象之一,是形成土壤的前提^[1]。微生物是 矿物风化的重要参与者,其通过改变微环境 pH 和 氧化还原电位来加速矿物溶蚀^[2-3]。研究微生物对 矿物的风化在深入理解土壤发生过程、土壤养分供 给、全球气候调节以及重要建筑和文物的保护等方 面具有重要的意义。目前,微生物对矿物的风化已 成为环境矿物学的研究热点之一。

微生物对营养的需求可能是其风化矿物的主要 驱动力^[4]。微生物可以通过产生有机酸、胞外多聚 物、铁载体等方式来溶蚀矿物,进而释放出 K、Si、Fe 和 Mg 等矿质元素^[5-7]。研究表明,微生物在风化 原生矿物的同时,还能够促进新矿物的形成,甚至产 生一定的环境效应。如细菌 Shewanella oneidensis[®] 利用 Fe(III) 作为电子受体,在厌氧条件下培养 14 d,使部分蒙脱石转变为伊利石,而这个转变通常要 在 300 - 350℃、100 MPa 下经历 4 - 5 个月才能发 生。然而,微生物风化原生矿物后形成新矿物的种 类及演化序列仍需深入研究^[9]。

本文以 Bacillus sp. L11 为试验材料,在摇瓶条 件下研究了供试菌株对钾长石矿物风化的影响,初 步分析了其风化机制。同时使用扫描电子显微镜/ 能谱仪(SEM/EDS)等观察了矿物表面形貌的变化, 并利用 X 射线衍射仪测定了小于 2 μm 粒径固相产 物的衍射峰,获得了菌株 L11 风化钾长石的一些有 价值的信息。这些结果将为深入了解微生物-矿物

基金项目:国家自然科学基金项目(41071173,41201251);南京农业大学青年科技创新项目(KJ2012024)

^{*} 通信作者。Tel: +86-25-84395125; E-mail: xfsheng@ njau.edu.cn

作者简介:黄智(1983-),男,讲师,从事微生物生态与矿物微生物相互作用的研究。E-mail:zhuang@njau.edu.cn

相互作用机制提供重要的科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:采用传统的稀释平板法分离采自 南京市江宁区龙山钾矿区的土壤样品,获得了一株 长势较好的细菌,将其命名为L11。

1.1.2 供试矿物:供试硅酸盐矿物:采自福建省邵 武市的钾长石,经研磨后选取 100 - 300 目之间的颗 粒,超声波(100 Hz)清洗 30 min,然后在 pH4.0 的 盐酸溶液中浸泡过夜,最后再用去离子水清洗后烘 干,备用。供试钾长石的近似分子式如下所示: [Na_{0.017}K_{0.811}Ca_{0.003}](Mg_{0.008}Al_{1.013}Si_{2.981}O₈)。

1.1.3 限钾培养基: 蔗糖 10.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, Na₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄•7H₂O 0.5 g, NaCl 0.1 g, 酵母膏 0.1 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2, 121℃, 25 min 灭菌,用于摇瓶试验。蔗糖无机盐培养基: 蔗糖 10.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, K₂HPO₄ 2.0 g, MgSO₄•7H₂O 0.5 g, NaCl 0.1 g, 酵母膏 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2, 121℃, 25 min 灭菌,用于摇瓶种子培养 和细菌计数(固体培养基)。

1.2 供试菌株对钾长石的溶解效应

选取 250 mL 塑料锥形瓶,每瓶分别加入缺钾培养基 100 mL 和钾长石粉 0.5 g,121℃ 灭菌 30 min。

用无菌水洗涤种子液3次,然后将种子液浓度调节 到 *OD*₇₀₀为1.0左右,每瓶中接入种子液1mL(细胞 数量约2.7×10⁸ cfu/mL),对照接等量灭活菌液,每 组3个重复。将塑料瓶置于150 r/min、28℃振荡培 养 30 d,分别在第0、2、5,10、20、30 d 取样分析。

使用稀释涂布法测定各培养液中细菌数量;采用 pH 计(PHS-3CT)测定培养液 pH,采用酸碱滴定 法测定培养液的总酸度;使用等离子发射光谱(ICP-OES,Optimal 2100 DV,Perkin Elmer)分析矿质元素 的溶出情况;矿物样品扫描电镜观察/能谱分析 (SEM/EDS)及X射线衍射参照李福春等^[10]的方法。

2 结果和分析

2.1 菌株鉴定

使用细菌通用引物 27f(5´-AGAGTTTGATC CTGGCTCAG-3´)/1492r(5´-TACGGCTACCTTGTTAC GACTT-3´)扩增菌株 16S rRNA 基因序列,经测序后 获得了 1440 bp 序列,其 GenBank 登录号为 HQ222333。采用 BLAST(http://www.ncbi.nlm.nih. gov)将菌株 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中序列 进行比对,并选择代表性的模式种构建系统发育树 (图 1)。菌株 L11 与 Bacillus altitudinis 的相似性最 高,为 99.9%。根据菌株 L11 的 16S rRNA 基因同



图 1. 菌株 L11 的系统发育学分析

Figure 1. Neighbour-joining phylogenetic tree, constructed based on a comparative analysis of 16S rRNA gene sequences, showing the relationships between strain L11 and related bacteria. Numbers at nodes are bootstrap values based on 1000 resamplings. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. 源性并结合其系统发育树,可将菌株 L11 鉴定为 Bacillus sp. L11。菌株 L11 的基本特征:革兰氏阳 性,好氧,杆状,菌体大小为(1.0 - 2.0 μ m)× (3.0 - 3.5) μ m,能产生芽孢。在营养琼脂培养基 (Nutrient Agar)上菌落为白色,边缘不规则,隆起。 菌株能够在 4 - 37℃和 pH 4 - 9 的培养基中生长, 对氨苄青霉素(50 mg/L)和利福平(50 mg/L)不敏 感。

2.2 菌株风化钾长石的效应

2.2.1 细菌数量的变化:菌株 L11 在培养的前 10 d 生长良好,细胞密度出现先升高再降低的趋势,在第 2 d 时细胞数量最大,为 4.58 × 10^s cfu/mL(表 1)。 第 20 天和第 30 天时,使用稀释平板法未检测到活 细胞,但钾长石表面仍然可以看见有细菌存在(图 4-B,4-C)。这可能是由于菌株在培养的过程中丧失 了繁殖能力或失去活性所致。

表1. 培养液中细菌数量的变化(×10⁶ cfu/mL)

Table 1. The growth of strain L11using dilution plating method $(\times 10^6 \, \text{cfu}\,/\text{mL})$

Strain	0 d	2 d	5 d	10 d	20 d	30 d
L11	2.7 ± 0.1	458 ± 2.1	38.5 \pm 5.0	35.9 ± 3.7	ND	ND
ND · ND · Not Detected						

2.2.2 培养液 pH 和总酸度的变化: pH 可以反映 菌株的代谢情况。在培养的过程中,接灭活菌的培 养液中 pH 变化不明显,基本维持在 pH 6.8 左右 (图 2-A)。接菌处理 pH 变化较大,在 0-2 d 迅速 下降,并达到最低,为 pH 3.1。在 2-30 d pH 变化 不显著。由图 2-B 可以看出,灭活菌培养液总酸度 变化不明显,其浓度均小于 3 mmol/L。接菌株 L11 处理的培养液中总酸度在 0-2 d 迅速增加,但在第 5 d 才出现较高值,为 13.4 mmol/L。在 10-30 d, 总酸度继续增加,在第 30 d 出现最大值,为 15.7 mmol/L。有研究表明^[11],酸度的增加可能是促进 培养液中钾长石溶解的重要机制之一。

2.2.3 培养液中元素含量的变化:Si和 Al 是钾长石矿物的结构元素,也是其主要元素。由图 3 可知,菌株 L11 能够显著地促进钾长石的溶蚀,释放出 Si和 Al,其含量随着培养时间的延长逐渐增加,均在第 30 d 达到最大值,分别为 3.08 mg/L 和 1.75 mg/L。Fe 是钾长石矿物中的少量元素,有时会被称为杂质元素。接菌处理也能显著地促进钾长石中 Fe的释放,但培养液中 Fe 含量呈现出"上升-下降-再



图 2. 培养液中 pH 和总酸度的变化 Figure 2. pH (A) and total acids (B) in the culture solutions.

上升-再下降"的过程,这可能是由于菌株 L11 作用 后,培养液中矿物发生了"溶解-沉淀"的过程^[12]。 K 也是钾长石矿物中主要元素,由图 3-D 可知,除第 5 d 外接菌处理和灭活菌处理的培养液中 K 含量无 明显区别。由于 K 是微生物细胞生长所需的大量 元素,极易被细胞吸收。同时,由于自身所带电荷的 差异,细菌菌体会吸附一些 K 离子在其细胞周围。 因此,培养液中 K 离子含量的变化并不能如实地反 映矿物的溶蚀情况。

2.2.4 矿物 SEM/EDS 分析:根据培养液中 Si、Al 和 Fe 的变化,可知菌株 L11 能够加速钾长石的风 化。为了更加直观地观察矿物的风化效果,选用了 扫描电子显微镜来观察菌株 L11 与矿物相互作用第 30 d 时矿物的形貌变化。图4-A 是灭活菌处理的矿 物样品,钾长石表面较光滑,无菌,有一些孔洞。由 图 4-B 可以看出,第 30 d 时钾长石矿物表面有许多 菌体的存在,这些菌体还形成了生物膜,矿物表面形 貌发生了较大的变化。由图 4-C 可知,矿物表面形 成了大量的球形物质,其直径为 1 – 10 μm,这可能 是细菌及其产物作用钾长石矿物后形成的物质。采 用 EDS 分析了细菌菌体和球形物质的元素组成(图 4-C 中 1 和 2 两个点),结果表明,钾长石矿物表面 细菌的主要元素组成是 C 和 O(图 4-D),而新形成 的球形物质的元素组成较复杂,见图 4-E。球形物



图 3. 培养液中 Si、Al、Fe 和 K 含量的变化 Figure 3. Concentrations of Si (A), Al (B), Fe (C) and K (D) in the culture solutions.

质元素组成与钾长石的元素组成相比差异较大,Al 和 Si 含量明显降低,而 C 和 Fe 含量则显著增加。 这可能是细菌菌体及其胞外产物聚合而成,同时又

吸附了培养液中各种元素以及较小的矿物碎片所致,Fe元素的增加是否是形成了一些含 Fe 的化合物还需要进一步的验证。



图 4. 钾长石矿物表面 SEM/EDS 分析(30 d)

Figure 4. SEM and EDS photographs of K-feldspar after interaction with strain L11. A: K-feldspar with no treatment; B and C were the photes of K-feldspar treated with strain L11 for do days; D and E were EDS images and elements of triangles "1" and "2" in figure 4(C), respectively.

30 d 钾长石样品中小于 2 µm 的矿物组分,其 XRD

分析结果如图 5 所示。接菌处理与接灭活菌处理相 比,在 d = 2.78 处出现了一个明显的衍射峰,此峰是 菱铁矿(主要成分为 FeCO₃)的特征衍射峰,所以初 步鉴定其为菱铁矿。推测是菌株 L11 在代谢时产生 的 CO₂ 与培养液中溶出的或细胞附近的 Fe²⁺ 形成 了沉淀。SEM/EDS 的分析也同样表明了含 Fe 物质 的形成。第 30 d 时,接菌处理的培养液中 Fe 含量 有明显的下降,这也从侧面证明了培养液中有含 Fe 物质的生成。



图 5. 细菌培养物中小于 2 μm 粒径组分的 XRD 图谱 Figure 5. X-ray diffraction patterns of < 2 μm size fraction obtained from product of inoculated cultures (A) and control treatment (B) over

3 讨论

a 30-day period.

矿物风化对于土壤矿物元素循环及土壤养分供 给有着十分重要的意义。芽孢杆菌广泛分布于自然 环境中,也是经常被报道的具有风化矿物能力的菌 株。试验表明^[13],菌株 Bacillus sp. L11 不产生铁载 体,也不产生胞外聚合物,其产生的有机酸可能是风 化钾长石的主要机制。在相同 pH 的条件下,有机 酸风化矿物的能力是无机酸的 3-5 倍^[14]。菌株 L11 培养2d 后产生的有机酸就大于了12 mmol/L, 其浓度足以促进钾长石风化^[11],进而释放出矿质元 素。Sheng 等^[15] 的研究表明 Bacillus globisporus Q12 通过产生大量的葡萄糖酸促进钾长石、金云母和黑 云母的风化。Štyriaková 等^[16] 也证实了 Bacillus cereus ISHP-1 通过分泌有机酸电离的 H⁺和有机配 体风化金云母矿物。仇刚等^[17]和 Song 等^[18]分别 研究了 Bacillus coagulans 和 Bacillus subtilis 对硅酸 盐矿物的溶蚀,也认为有机酸是菌株风化含钾矿物 的主要机制。然而,菌株 L11 在风化钾长石过程中 产生的有机酸种类及每种有机酸对钾长石的风化作 用仍需进一步研究。

微生物除了能够风化矿物外,还能够诱导新矿物的形成。微生物具有较大的比表面积和丰富的表面电荷^[19],既可以从周围环境中吸附和富集金属离子,又可以利用独特的细胞壁结构作为矿物结晶的成核位置^[20-21]。菌株 L11 在风化钾长石的过程中形成了菱铁矿,这可能是由细菌菌体或其胞外产物吸附金属离子后逐步形成的。据估算,全球碳酸盐矿物中含有的 C 至少是大气中 C 含量的 40000倍^[23],因此,菱铁矿等碳酸盐矿物的形成对于深入理解矿物风化在全球气候调节中的作用有重要意义。除了试验的第 30 d,第 10 d 时培养液中 Fe 也有明显的下降,是否形成了一些新矿物也需要深入研究。

XRD 是鉴定矿物物相的有效手段之一,但由于 试验中所回收的小于 2 μm 的矿物样品的量太少, 其衍射图中只出现了菱铁矿的主峰,没有出现其它 的衍射峰。所以,可以通过扩大培养或根据李福春 等^[9]的建议来获得更多的新矿物,以便于更加精确 地鉴定新形成的矿物。

参考文献

- [1] Barker WW, Welch SA, Chu S. Experimental observations of the effects of bacteria on alumina silicate weathering. *American Mineralogist*, 1998, 83: 1551-1563.
- [2] Burford EP, Fomina M, Gadd GM. Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Mineralogical Magazine*, 2003, 67 (6): 1127– 1155.
- [3] Liu D, Lian B, Dong H. Isolation of Paenibacillus sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. Geomicrobiology Journal, 2012, 29 (5): 413-421.
- [4] Hutchens E. Microbial selectivity on mineral surfaces: possible implications for weathering processes. *Fungal Biology Review*, 2009, 23: 115-121.
- [5] Wongfun N, Furrer G, Plotze M, Brandl H. Cyanidepromoted mineral weathering in a glacier forwfield. *Goldschmidt Conference Abstracts*, 2009, A1451.
- [6] Baker MG, Lalonde SV, Konhauser KO, Foght JM. Role of extracellular polymeric substance in the surface chemical reactivity of *Hymenobacter aerophilus*, a psychrotolerant bacterium. *Applied and Environmental*

Microbiology, 2010, 76 (1): 102-109.

- [7] He L, Zhang Y, Sheng X, Huang Z. Isolation of a siderophore-producting bacterial strain and mica-bacterial interactions. *Geological Journal of China Universities*, 2012, 18(1):117-424. (in Chinese)
 何琳燕,张垠,盛下放,黄智. 一株产铁载体细菌的筛 选及其与云母的相互作用. 高校地质学报,2012,18 (1):117-424.
- [8] Kim J, Dong H, Seabaugh J. Role of microbes in the smectite-to-illite reaction. Science, 2004, 303: 830-832.
- [9] 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.
- [10] Li FC, Cheng LJ, Li S, Teng F, Li XL. Weathering of biotite by Burkholderia sp.: Preliminary study on secondary minerals. Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry, 2011, 30(3): 292-298. (in Chinese) 李福春,程良娟,李莎,腾飞,李学林. 伯克霍尔德菌作 用下黑云母的风化作用——对次生矿物的初步分析. 矿物岩石地球化学通报,2011,30(3): 292-298.
- [11] Blake RE, Walter LM. Kinetics of feldspar and quartz dissolution at 70 - 80°C and near-neutral pH: Effects of organic acids and NaCl. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1999, 63: 2043-2059.
- [12] Huang Z, Ma G, He L, Sheng X. Effects of ammonium sulfate on the metabolism and K-feldspar weathering of two potassium-bearing mineral-solubilizing bacteria. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52 (2): 206-213. (in Chinese)

黄智,马光友,何琳燕,盛下放.硫酸铵对两株钾矿物 分解细菌生长代谢和风化钾长石的影响.微生物学 报,2012,52(2):206-213.

[13] 黄智.不同土壤母质黄棕壤剖面细菌的生物多样性及 其对钾矿物风化作用的研究.南京农业大学博士学位 论文,2010.

- [14] Banfield JF, Barker WW, Welch SA, Taunton A. Biological impact on mineral dissolution: Application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizophere. Proceedings of the NationalAcademy of Sciences of the United States of America, 1999, 96: 3404-3411.
- [15] Sheng XF, ZhaoF, He LY, Qiu G, Chen L. Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus* globisporus Q12 from the surface of weathered feldspar. *Canada Journal of Microbiology*, 2008, 54: 1064-1068.
- [16] Štyriaková I, Bhatti TM, Bigham JM, Štyriak I, Antti Vuorinen A, Tuovinen OH. Weathering of phlogopite by Bacillus cereus and Acidithiobacillis ferrooxidans. Canada Journal of Microbiology, 2004, 50: 213-219.
- [17] Qiu G, He LY, Chen L, Zhao F, Huang Z, Sheng XF. Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus* from surfaces of weathered feldspar. *Soils*, 2009, 41(4): 676-679. (in Chinese) 仇刚,何琳燕,陈亮,赵飞,黄智,盛下放. 一株分解硅 酸盐矿物芽孢杆菌的筛选及其生物学特性研究. 土 壤,2009,41(4):676-679.
- [18] Song W, Ogawa N, Oguchi CT, Hatta T, Matsukura Y. Effect of *Bacillus subtilis* on granite weathering: A laboratory experiment. *Catena*, 2007, 70: 275-281.
- [19] Banfield JF, Zhang H. Nanoparticles in the environment. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2001, 44: 1– 58.
- [20] Schultze-Lam S, Fortin D, Davis BS. Mineralization of bacterial surfaces. *Chemical Geology*, 1996, 132: 171-182.
- [21] Labrenz M, Gilbert B, Welch SA. Formation of sphalerite (ZnS) deposites in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria. *Science*, 2000, 290: 1744–1747.
- [22] Kashefi K, Lovley DR. Reduction of Fe(III), Mn(IV), and toxic metals at 100°C by Pyrobaculum islandicum. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66: 1050-1056.
- [23] Oelkers EH, Gislason SR, Matter J. Mineral carbonation of CO₂. *Elements*, 2008, 4: 333–337.

Weathering of potash feldsparby *Bacillus* sp. L11

Zhi Huang¹, Linyan He¹, Xiafang Sheng^{1*}, Ziyi He²

¹ College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiology, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China

²Laboratory Center of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: [**Objective**] To determine the taxonomic position of mineral-weathering bacterium L11 isolated from soil of potassium mine tailing of Nanjing and to elucidate the weathering mechanism of the strain, which will offer the basis for the interaction between microorganism and mineral. [**Methods**] 16S rRNA gene was sequenced and neighbor-joining phylogenetic tree was constructed to identify strain L11. The ability of strain L11 to weather potash feldspar was evaluated by shaking culture. Scanning electron microscope and Energy-dispersive spectrometry were used to observe the mineral weathering and to analyze the elements of mineral surface, respectively. Mineral ($<2 \mu$ m in diameter) was determined by X-ray diffraction. [**Results**] Phylogenetic analysis of strain L11 based on 16S rRNA gene sequence was closest to *Bacillus altitudinis* (99.9%). Mineral dissolution experiments showed that strain L11 dissolved potash feldspar and significantly released more Si, Al and Fe elements by producing more organic acids. Many bacteria and some spherical minerals were observed on the surfaces of the feldspar and the energy-dispersive spectrometry analysis showed that the new minerals contained more Fe. After 30 days, siderite might be the newly-formed mineral identified by X-ray diffraction in the mineral weathering process. [**Conclusion**] Strain *Bacillus* sp. L11 could accelerate weathering of potash feldspar, changemineral surface morphologyand induce the formation of new mineral complex. **Keywords**: mineral-weathering bacterium, *Bacillus*, potash feldspar, organic acid

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41071173, 41201251) and by the Foundation for Innovation of Nanjing Agricultural University (KJ2012024)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-25-84395125; E-mail: xfsheng@ njau.edu.cn

Received: 8 April 2013/Revised:21 May 2013