

硅酸盐矿物分解细菌 *Bacillus globisporus* Q12 与云母矿物相互作用的研究

黄 智, 何琳燕, 黄 静, 王 琪, 盛下放

南京农业大学 生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095

摘要: 土壤矿物与微生物相互作用对土壤中一系列生态过程产生重要影响。本文通过对培养液进行 K、Si、Fe、Al 等元素分析, 测定了菌株生长与代谢产物, 结合扫描电镜和透射电镜的观察, 研究了钾矿物表生硅酸盐矿物分解细菌 *Bacillus globisporus* Q12 菌株与云母矿物(黑云母和白云母)的相互作用规律。结果表明, 不同的云母矿物对 *B. globisporus* Q12 菌株的生长与代谢有不同影响; 与白云母相比, 黑云母更适合 *B. globisporus* Q12 菌株的生长与酸性代谢产物(如有机酸等)的合成; 供试菌株能促进黑云母和白云母矿物中 K、Si、Fe、Al 等元素的释放。扫描电镜、透射电镜观察与能谱分析发现, *B. globisporus* Q12 菌株能在云母矿物表面定殖, 加速云母矿物的风化; 菌体自身也能吸附培养液中离子和矿物碎片而形成新的矿物。

关键词: *Bacillus globisporus*; 云母; 相互作用; 有机酸; 矿物风化

中图分类号:P593 文献标识码:A 文章编号:1007-2802(2011)03-0286-06

Interaction between Silicate-Dissolving *Bacillus globisporus* Q12 and Mica Minerals

HUANG Zhi, HE Lin-yan, HUANG Jing, WANG Qi, SHENG Xia-fang

Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, College of Life Science,
Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China

Abstract: The interactions between soil minerals and microorganisms are important ecological processes in soils. The interactions between the silicate-dissolving *Bacillus globisporus* Q12 isolated from weathered potassium-bearing minerals and micas (such as biotite and muscovite) were investigated through determinations of K、Si、Fe、Al, cell growth and metabolism, and through analyses of transmission electron microscope (TEM) and scanning electron microscope (SEM). The results showed that different mica minerals have different effects on the cell growth and acid metabolism (such as organic acids) of *Bacillus globisporus* Q12, and that the strain showed better growth and metabolism on the biotite than on the muscovite. It was found that inoculation with the strain increased releasing of K、Si、Fe、Al from the micas minerals. SEM-EDX analyses showed that the strain Q12 could colonize the surfaces of the micas and accelerate the weathering of biotite and muscovite. The strain Q12 could also absorb cations and small grains, and such to form new minerals around the cells.

Key words: *Bacillus globisporus* Q12; micas; interactions; organic acids; mineral weathering

地质微生物学是地质科学与微生物学紧密结合的一门新兴学科, 是研究微生物生命过程与地球表层地质环境相互关系的科学。微生物广泛分布于各种地质环境中, 并影响地球化学环境和地球化学过程。土壤矿物与微生物相互作用是地球表层系统中

重要的生态过程, 对土壤中一系列生态过程会产生深远影响, 如成岩、成矿、物质转化、物质循环, 以及气候变化等方面起重要作用^[1~4], 并以酸解、碱解、络合等多种方式加速矿物风化过程, 促进土壤演化, 为植物提供 P、K、Si 等营养元素^[5]。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^[6],是当前地质微生物学研究的重要方向之一。

云母矿物是常见的硅酸盐矿物。硅酸盐矿物分解细菌是能够分解硅酸盐矿物,并释放出K、Si等元素的细菌^[7]。这一研究受到国内外学者的广泛关注。它主要通过有机酸^[8~11]、胞外聚合物^[12~15]及其综合因素等方式来溶解矿物。微生物在风化矿物的同时,还能诱导形成新的矿物^[12,16~19]。本文以分离自含钾矿物表面的硅酸盐矿物分解细菌*Bacillus globisporus* Q12为试验菌株,研究供试云母矿物对菌株生长和代谢的影响,菌株对云母矿物中K、Si、Fe、Al元素释放、矿物表面溶蚀及次生矿物形成的影响及其机制,以期为深入理解矿物-微生物相互作用机制等提供科学依据。

1 实验部分

1.1 菌种及培养基

硅酸盐矿物分解细菌*B. globisporus* Q12(EU685811)菌株由本研究组分离保存。实验选用的缺(限)钾培养基的组成为:蔗糖10.0 g,Na₂HPO₄1.5 g,(NH₄)₂SO₄0.5 g,MgSO₄0.5 g,NaCl0.1 g,酵母膏0.1 g,去离子水1000 mL,pH7.2;蔗糖无机盐培养基:蔗糖10.0 g,(NH₄)₂SO₄1.0 g,K₂HPO₄2.0 g,MgSO₄·7H₂O0.5 g,NaCl0.1 g,酵母膏0.5 g,CaCO₃0.5 g,琼脂20 g,蒸馏水1000 mL,pH7.2。试验用黑云母和白云母购自河北灵寿县华源云母厂,研磨后选取100~300目的云母,水洗备用,其化学组成见表1。

表1 黑云母和白云母的元素组成

Table 1 The elements compositions of biotite and muscovite minerals

样 品	SiO ₂	Al ₂ O ₃	TFe ₂ O ₃	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅	MnO	CaO	烧失量	合 计
黑云母	39.99	18.98	14.75	13.69	0.28	9.12	0.1	0.24	0.09	1.36	99.75
白云母	51.04	28.63	5.09	0.72	0.58	9.28	0.17	0.09	0.06	3.6	99.88

1.2 试验设计

选取250 mL三角瓶,每瓶分别加入缺钾培养基100 mL和云母粉0.5 g,121℃灭菌30 min。接入用无菌去离子水洗涤过的菌液2.5 mL,对照接等量灭活菌液,每组重复3次,28℃、150 rpm振荡培养35 d。分别在第0、1、3、7、14、21、28、35天取样分析。

1.3 pH 及总酸度的测定

采用pH计(PHS-3CT)测定发酵液pH值;采用酸碱滴定法测定发酵液的总酸度。用移液管精确量取离心后的发酵液10 mL于250 mL三角瓶中,加少量水稀释,加入0.5%酚酞指示剂,用标定好的浓度为0.025 mol/L的NaOH滴定,滴定终点时溶液由无色变为红色,记录读数。

1.4 发酵液中细菌数量

取1 mL发酵液于100 mL无菌水中,充分震荡将细胞分散均匀,用9 mL无菌水进行一系列的稀释,制成不同稀释度的溶液。涂布于蔗糖无机盐固体培养基上,2 d后计算平板中菌落的数量。

1.5 发酵液中元素含量测定

取发酵液5 mL,4000 r/min离心10 min,取上清液,加入一滴浓硝酸,采用等离子体发射光谱仪(ICP-OES,Optimal 2100 DV,Perkin Elmer)测定发酵液中K、Si、Fe、Al等元素的含量。

1.6 矿物和菌体的电镜观察

扫描电镜(SEM)观察及能谱(EDX)分析:摇瓶

振荡后迅速用滤纸过滤,收集矿物(滤渣),于40℃烘干。将样品固定于电镜样品台上,喷金,采用日本S-3000N型扫描电镜进行观察,工作电压20 kV。

透射电镜(TEM)观察菌体形态:取第35 d培养液充分摇匀,然后沉降1 min,使颗粒较大的矿物充分沉降;取上部液体5 mL,4000 rpm离心10 min,去除上清液,加入去离子水,按照上述步骤摇匀、离心、去上清液,加入2.5%的戊二醛溶液,悬浮沉淀,得菌悬液。用镊子夹住小铜网,浸入菌悬液中,用吸水纸擦去周围液体,然后将小铜网反扣在磷钨酸溶液中染色20 s,取出在台灯下干燥,电镜(日本H-7650)观察。

2 结果与讨论

2.1 pH 值及总酸度的变化

pH值是培养液性质的重要指标之一。由图1A可知,接灭活菌处理的培养液pH值相对稳定,保持在7左右。接入菌株Q12后,培养液的pH值逐渐下降,无论是以黑云母还是白云母作为唯一钾源在振荡培养第14天时培养液的pH值均达到最低,pH值分别为4.40(黑云母)和4.87(白云母)。由图1B可知,随着培养时间的延长,培养液总酸度在接入菌株Q12后逐渐增加,以黑云母和白云母作为唯一钾源的培养液的总酸度分别在培养14 d和21 d时达到最大,总酸度分别为6.08(黑云母)和

5.88 mmol/L(白云母)。菌株 Q12 在黑云母存在的条件下能够合成较多的有机酸,培养液 pH 值也

较低(图 1)。

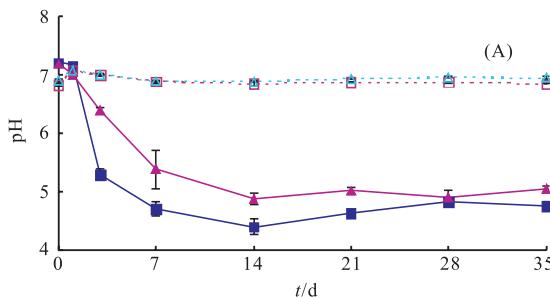


图 1 培养液 pH 值(A)及总酸度(B)的变化

Fig. 1 Changes of pH value(A) and total acids(B) in the culture solution

2.2 细胞数量的变化

由图 2 可知,接入菌株 Q12 后,初始培养液中细胞数量为 16.7×10^6 cfu/mL,在第 1 天时培养液中的细胞数量迅速下降,而在第 3 天时培养液中的细胞数量有显著上升并达到最大值,在以黑云母和白云母为唯一钾源的培养液中的细胞数量分别达到 26.3×10^6 和 17.6×10^6 cfu/mL。第 3 天后含黑云母和白云母的摇瓶中细胞数量均开始下降,并在第 21 天后稳定在 5×10^6 cfu/mL 左右。

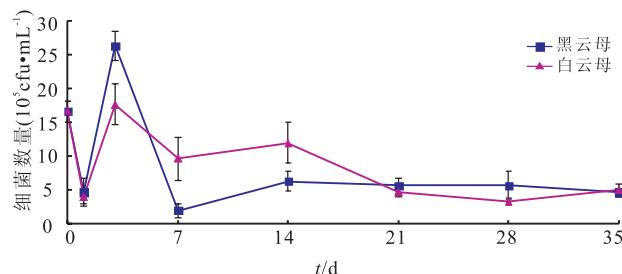


图 2 培养液中细胞数量的变化

Fig. 2 Change of Cell numbers in the culture solution

2.3 元素含量的变化

菌株 Q12 能够促进黑云母和白云母的溶解,释放出各种元素。Si、Al、K 和 Fe 是黑云母和白云母中的主要组成元素,Si 和 Al 是云母矿物的结构元素。由图 3 可知,以黑云母为唯一钾源的培养液中 Si 和 Al 含量在 0~7 d 时逐渐增加,在第 7 天时达到一个小高峰,第 14 天时略有下降,之后逐渐上升,并在第 28 天时达到最大(分别为 4.75 和 0.91 mg/L),第 35 天时又显著下降。而以白云母为唯一钾源的培养液中 Si 和 Al 含量的变化与以黑云母为唯一钾源的培养液中 Si 和 Al 含量的变化有相同趋势,但是出现小高峰的时间有所变化(均在第 14 天出现小高峰)。灭活菌处理的培养液中 Si 和 Al 含量的变化不明显。由图 3-C 可见,菌株 Q12 与黑云

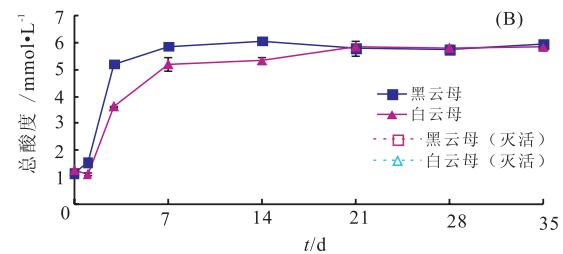


图 1 培养液 pH 值(A)及总酸度(B)的变化

母和白云母作用后,第 3 天培养液中 K 含量均较低;第 3 天后培养液中 K 含量有所上升,并在第 28~35 天时上升的速率最大。结合第 3 天细胞数量的变化可知,这是由于细胞的大量生长消耗了溶液中的 K;细菌的生长也导致了云母矿物中 K 的释放。由图 3-D 可见,所有处理的培养液中在 0~7 d 均没有检测到 Fe。菌株 Q12 从黑云母中释放出的 Fe 在第 28 天达到最大(0.91 mg/L),第 35 天时培养液中的 Fe 含量有显著下降;而菌株 Q12 从白云母中释放出的 Fe 在第 35 天达最大(0.31 mg/L)。在试验期间,培养液中云母矿物的结构元素 Si 和 Al 出现了“上升一下降一再上升一再下降”的过程,这可能是由于供试云母矿物接入菌株 Q12 后出现了“溶解—沉淀—再溶解—再沉淀”的过程。研究表明^[20],菌株 Q12 在含钾矿物的培养基中能够产生大量的有机酸。研究表明^[21],在相同 pH 条件下,有机酸对矿物的风化能力是无机酸风化能力的 3~5 倍。当草酸浓度大于 3 mmol/L 时,能显著促进正长石和钠长石的溶解^[10]。菌株 Q12 在代谢过程中能够产生有机酸,这些有机酸可能通过其电离的 H⁺和酸根离子来影响云母矿物的溶解。为了能够更好地了解摇瓶中矿物物相的变化,可以分时段提取摇瓶中的次生矿物进行 X 射线衍射分析。

2.4 云母矿物表面形貌观察

由培养液中矿物元素的变化可以推测摇瓶中矿物物相发生了变化,尤其发生在 28~35 天。因此,本研究结合 SEM 和 EDX 对第 28 天和第 35 天的云母矿物表面形貌进行了分析。由图 4A 可见,黑云母表面光滑、平整,无明显的凹凸;接菌 Q12 后第 28 天时(图 4B),黑云母表面有大量菌体的存在;同时在菌体附近出现了许多圆形的物质。由图 4C 可见,黑云母表面菌体数量开始减少,而其表面的圆形物质却增多了,并聚集在一起。由图 4D 可见,菌

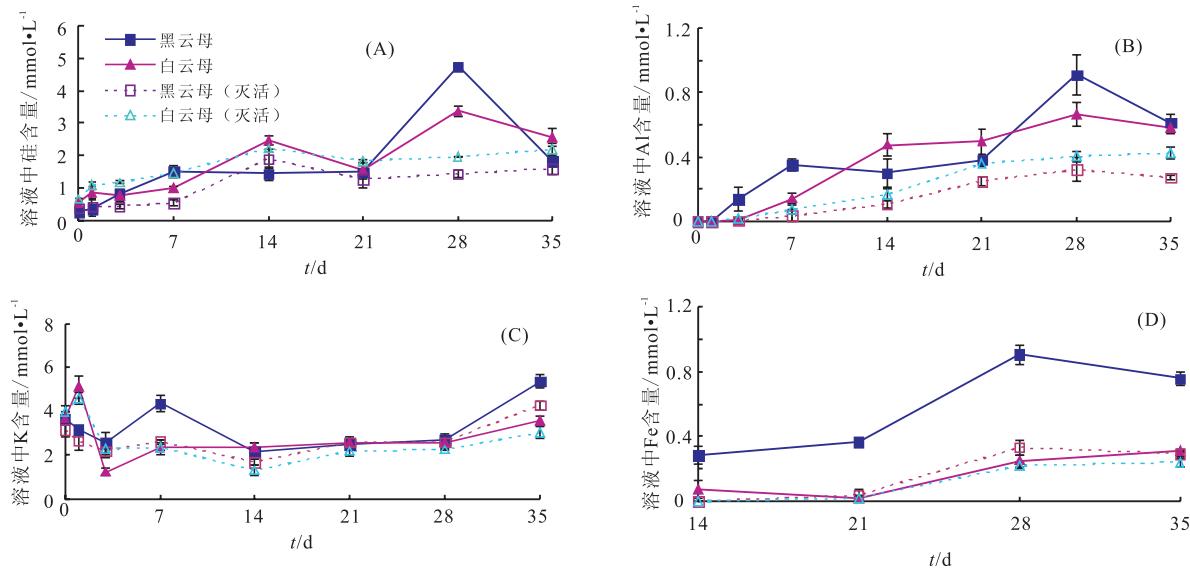
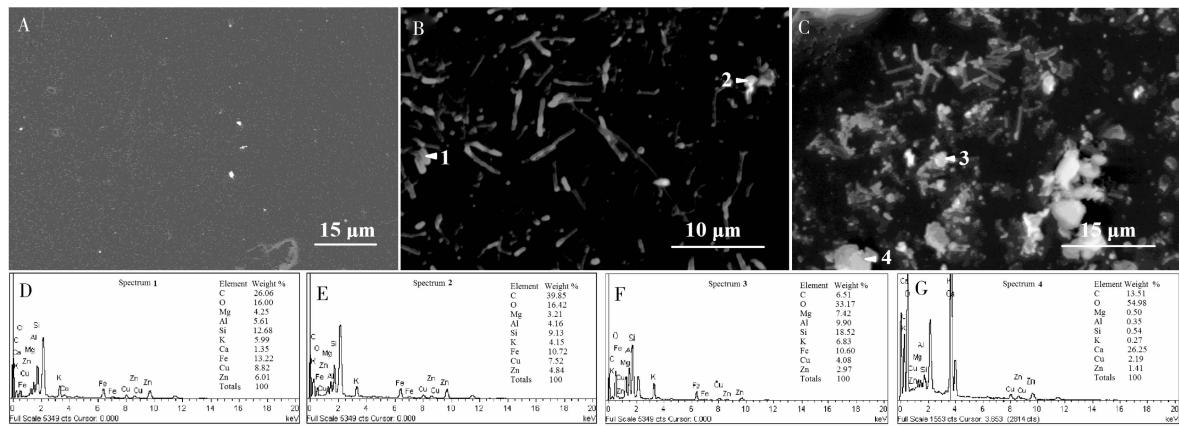


图 3 培养液中 Si(A)、Al(B)、K(C) 和 Fe(D) 含量的变化

Fig. 3 Concentrations of Si (A), Al (B), K (C) and Fe (D) in the culture solutions

体表面吸附了许多元素,这可能是由于菌体带有负电荷,吸附了培养液中大量的阳离子。由图 4E 和 F 可知,黑云母表面圆形物质可能是富含 Fe 并含有

多种元素的次生矿物。由图 4G 可知,在第 35 天时,黑云母表面除了形成含有 Fe 的物质,还能够形成含 Ca 的化合物,根据其主要元素组成推测是方解石。



A、B 和 C 图分别是菌株 Q12 与黑云母作用 0、28 和 35 d 时的照片;D、E、F 和 G 分别对应图 4(B 和 C)1-4 号点的能谱分析

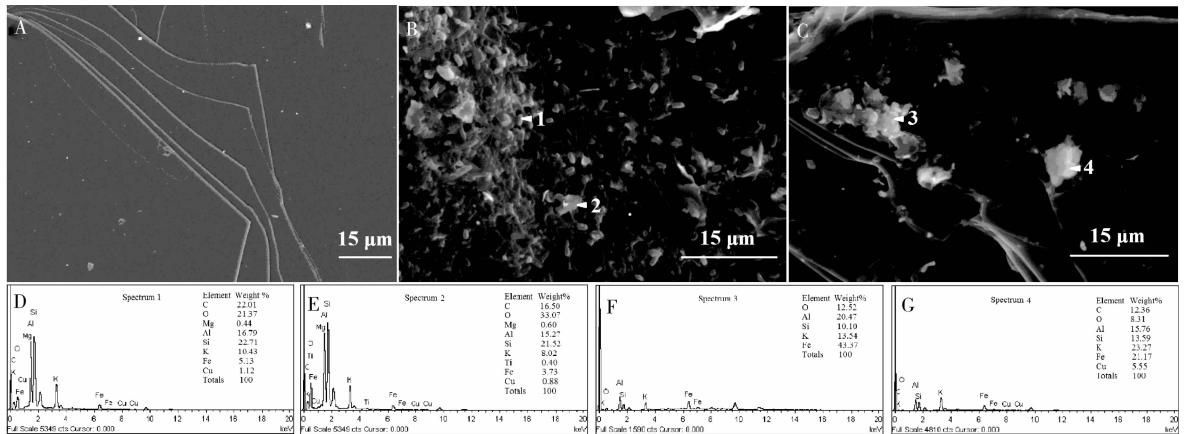
A, B and C were the photos of biotite treated by strain Q12 for 0, 28 and 35 days, respectively; D, E, F and G were corresponding to spectrum 1-4

图 4 菌株 Q12 对黑云母风化的 SEM 及 EDX 分析
Fig. 4 SEM and EDX photos of biotite treated by the strain Q12

由图 5A 可见,白云母表面光滑、平整,无明显凹凸,云母片层结构明显。菌株 Q12 与白云母相互作用 28 d 时(图 5B),白云母表面凹凸不平,白云母表面有许多菌体存在,在菌体周围出现了许多不规则的物质;菌株 Q12 与白云母相互作用 35 d 时,除了观察到白云母被严重腐蚀外,还发现其表面有许多圆形或椭圆形的物质并聚集在一起(图 5C)。能谱分析表明,菌株 Q12 与白云母相互作用 28 d 时,白云母表面虽然发生了严重的溶解,但是并无明显的次生矿物的变化(图 5D 和 5E);而第 35 天时,白

云母表面形成的聚集物是富含 Fe 的物质,能谱点 3 和 4 的 Fe 含量分别为 43.37% 和 21.17%,推测是 Fe 的化合物。

根据培养液中 Si、Al 和 Fe 含量的变化及 SEM 对黑云母和白云母表面形貌的观察,表明菌株 Q12 能够促进云母矿物的溶解,释放出云母矿物的结构元素,并能够形成一些次生矿物。由图 4 和图 5 可知,分布在云母矿物表面的菌体表面存在大量的矿物结构元素,推测菌体能吸附各种离子和矿物碎片,并有可能形成新的次生矿物。



A、B 和 C 图分别是菌株 Q12 与白云母作用 0、28 和 35 d 时的照片;D、E、F 和 G 分别对应图 4(B 和 C)1-4 号点的能谱分析

A, B and C were the photos of muscovite treated by strain Q12 for 0, 28 and 35 days, respectively; D, E, F and G were corresponding to spectrum 1-4

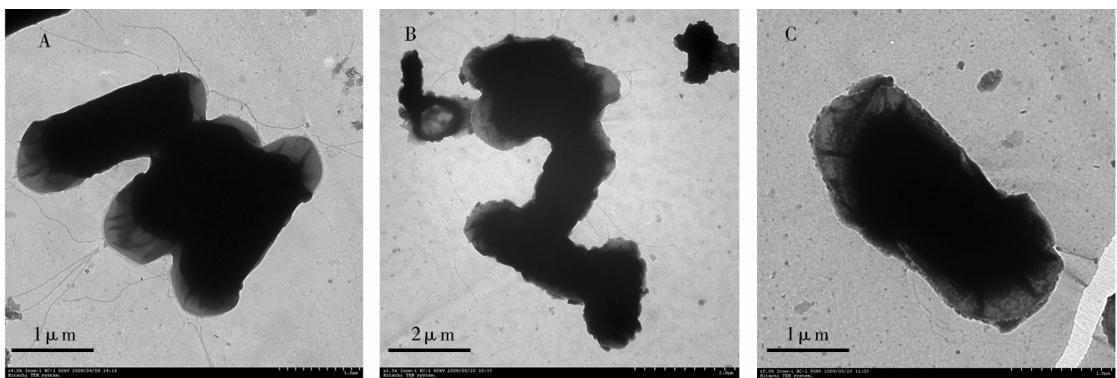
图 5 菌株 Q12 对白云母风化的 SEM 及 EDX 分析

Fig. 5 SEM and EDX photos of muscovite treated by the strain Q12

2.5 菌株 Q12 形态的透射电镜观察

为了验证上述设想,用 TEM 研究了培养液中悬浮的菌体的形态。由图 6A 可见,菌体表面光滑、规则,有端生鞭毛。菌株 Q12 与黑云母和白云母相互作用 35 d 时,菌体表面均吸附了许多物质,表面粗糙,鞭毛掉落,菌体发生矿质化(图 6B 和图 6C)。研究表明,微生物具有较大的比表面积和丰富的电

荷^[22],能够从周围环境中吸附和富集金属离子,又可以利用其细胞壁作为矿物成核结晶的模板^[23]。本研究发现菌株 Q12 能够吸附培养液中的离子和纳米矿物,形成菌体-矿物复合体,当细胞最终死亡时,菌体的形态保持良好,菌体便形成了新形成的矿物的核心,与文献报道一致^[24]。



A 是菌株 Q12 在蔗糖无机盐液体培养基中培养 7 d 时的形态;B 和 C 分别是菌株 Q12 与黑云母和白云母相互作用 35 d 时的形态

A, morphology of strain Q12 growth in sucrose mineral-salt medium for 7 days; B and C, morphology of strain Q12 interaction with biotite and muscovite for 35 days, respectively

图 6 菌株 Q12 的形态

Fig. 6 Morphology of the strain Q12

3 结 论

云母矿物的结构与元素组成对细菌的生长和代谢以及细菌对矿物的风化效应产生重要的影响。在黑云母和白云母存在的条件下,菌株 Q12 在生长代谢的过程中能够产生酸性代谢产物来溶解黑云母和白云母,释放云母中的矿质元素,培养液中主要矿质

元素出现了“上升—下降—再上升—再下降”的过程,可能与摇瓶中矿物的物相变化相一致,即矿物经历了“溶解—沉淀—再溶解—再沉淀”的过程;另外,菌株 Q12 自身也能够吸附培养液中的离子和矿物碎片,形成新的矿物。为了进一步了解细菌-矿物的相互作用,有必要对不同培养时间培养液中小于 2 μm 和小于 1 μm 的矿物进行 X 射线衍射分析以深

人了解矿物微生物相互作用过程中矿物物相的变化规律及其作用机制。

参考文献 (References) :

- [1] 张胜,张翠云,张云,李政红,张明. 地质微生物地球化学作用的意义与展望[J]. 地质通报,2005,24(11—12):1027—1031.
Zhang Sheng, Zhang Cuiyue, Zhang Yue, Li Zhenghong, Zhang Ming. Geomicrobial geochemical processes: Significance and prospects [J]. Geological Bulletin of China, 2005, 24 (11—12):1027—1031. (in Chinese with English abstract)
- [2] Banfield J F, Barker W W, Welch S A. Biological impact on mineral dissolution: Application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America,1999,96:3404—3411.
- [3] Kevin H, Joselito M A, Jan B. The influence of aspect on the biological weathering of granites: observations from the Kunlun Mountains, China [J]. Geomorphology, 2005, 67: 171—188.
- [4] Kim J, Dong H, Seabaugh J. Role of microbes in the smectite-to-illite reaction [J]. Science, 2004, 303:830—832.
- [5] Buss H L, Liittge A, Brantley S L. Etch pit formation on iron silicate surfaces during siderophore-promoted dissolution [J]. Chemical Geology, 2007, 240:326—342.
- [6] Ehrlich H L. How microbe influence mineral growth and dissolution[J]. Chemical Geology, 1996, 132:1—3.
- [7] 赵飞,盛下放,黄智,何琳燕. 山东地区钾矿物分解细菌的分离及生物学特性[J]. 生物多样性,2008,16(6):593—600.
Zhao Fei, Sheng Xiafang, Huang Zhi, He Linyan. Isolation of mineral potassium-solubilizing bacterial strains from agricultural soils in Shandong Province [J]. Biodiversity Science, 2008, 16 (6):593—600. (in Chinese with English abstract)
- [8] Brantley S L, Stiltzings L L. Feldspar dissolution at 25°C and low pH[J]. America Journal of Science, 1996, 296:101—127.
- [9] Furrer G, Stumm W. The coordination chemistry of weathering; I. Dissolution kinetics of d-Al₂O₃ and BeO [J]. Geochim. Cosmochim. Acta, 1986, 50:1847—1860.
- [10] Blake R E, Walter L M. Kinetics of feldspar and quartz dissolution at 70—80°C and near-neutral pH: Effects of organic acids and NaCl [J]. Geochim. Cosmochim. Acta, 1999, 63: 2043—2059.
- [11] Drever J I. The effect of land plants on weathering rates of mineral dissolution by atomic force microscopy (AFM)[J]. Geochim. Cosmochim. Acta, 1994, 58:2325—2332.
- [12] Fortin D, Farris F G, Beveridge T J. Surface mediated mineral development by bacteria[A]. Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals[M]. Washington D. C. : Mineralogical Society of America,1997:161—180.
- [13] Barker W W, Welch S A, Chu S. Experimental observations of the effects of bacteria on alumina silicate weathering[J]. A-merican Mineralogist, 1998, 83:1551—1563.
- [14] Welch S A, Barker W W, Banfield J F. Microbial extracellular polysaccharide sand plagioclase dissolution [J]. Geochim. Cosmochim. Acta, 1999, 63:1405—1419.
- [15] Kim J, Dong H, Seabaugh J, Seabaugh J, Newell S W, Zberl D D. Role of microbes in the smectite-to-illite reaction[J]. Science, 2004, 303:830—832.
- [16] 连宾,陈骏,傅平秋,刘从强,陈烨. 微生物影响硅酸矿物风化作用的模拟试验[J]. 高校地质学报,2005,11(2):181—186.
Lian Bin, Chen Jun, Fu Pingqiu, Liu Congqiang, Chen Ye. Weathering of silicate minerals by microorganisms in culture experiments[J]. Geological Journal of China Universities, 2005, 11 (2):181—186. (in Chinese with English abstract)
- [17] Lian B, Wang B, Pan M, Liu C, Teng H H. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. Geochim. Cosmochim. Acta, 2008, 72:87—98.
- [18] 贺秋芳,李为,朱敏,余黑龙江,朱晓燕,袁道先. 细菌在洞穴含铁沉积物形成过程中的作用[J]. 矿物岩石地球化学通报,2007, 26(2):197—202.
He Qiufang, Li Wei, Zhu Min, Yu Longjiang, Zhu Xiaoyan, Yuan Daoxian. Bacterium effects in the forming process of ferric speleothem, a simulation experiment [J]. Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry, 2007, 26 (2):197—202. (in Chinese with English abstract)
- [19] 马恒,李福春,苏宁,李学林. *Citrobacter freundii* 作用下球状碳酸盐矿物的演化过程研究[J]. 高校地质学报,2009,15(3): 429—436.
Ma Heng, Li Fuchun, Su Ning, Li Xuelin. Morphological evolution during the formation of carbonate spherulite in *Citrobacter freundii* culture[J]. Geological Journal of China Universities, 2009, 15, (3): 429—436. (in Chinese with English abstract)
- [20] Sheng X F, Zhao F, He L Y, Qiu G, Chen L. Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus globisporus* Q12 from the surfaces of weathered feldspar[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2008, 54:1064—1068.
- [21] Banfield J F, Barker W W, Welch S A, Taunton A. Biological impact on mineral dissolution: Application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1999,96:3404—3411.
- [22] Banfield J F, Zhang H. Nanoparticles in the environment[J]. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2001, 44:1—58.
- [23] Kashefi K, Lovley D R. Reduction of Fe (III), Mn (IV), and toxic metals at 100°C by *Pyrobaculum islandicum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66:1050—1056.
- [24] Ehrlich H L. Geomicrobiology: its significance for geology [J]. Earth Science Reviews, 1998, 45:45—60.