

## 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

黄智, 马光友, 何琳燕, 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重点实验室, 南京 210095

**摘要:** 【目的】为了明确钾矿物分解细菌 *Bacillus globisporus* Q12 和 *Rhizobium* sp. Q32 最合适的产酸和胞外多糖条件, 并进一步阐明供试菌株对钾长石的溶解效应及其机制。【方法】分别向培养基中加入 0-1.2 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 选择菌株最适的产酸及合成胞外多糖条件, 研究菌株对钾长石的溶解效果, 并采用扫描电镜 (SEM) 观察钾长石表面形态及菌体分布特征。【结果】0.6、0 和 0.3 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分别能使菌株 Q12、Q32 和混合菌株 (Q12 + Q32) 产生较多的有机酸、胞外多糖以及有机酸和胞外多糖的复合物。菌株 Q12、Q32 及其混合菌株均能够显著地溶解钾长石, 并释放出矿质元素, 其中混合菌株的溶解效果要优于单一菌株; SEM 分析表明, 混合菌株对钾长石的溶蚀作用最强。【结论】 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的含量能够影响供试菌株 Q12 和 Q32 的生长代谢及其对钾长石的风化作用, 混合菌株可以通过产生的有机酸和胞外多糖的联合作用加速对钾长石的风化。

**关键词:** 钾矿物分解细菌, 硫酸铵, 有机酸, 胞外多糖, 矿物-微生物相互作用

**中图分类号:** Q935    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2012) 02-0206-08

矿物风化不仅在土壤矿物元素循环及土壤养分供给中有重要的意义<sup>[1-4]</sup>, 对于研究全球气候变化也有着深远的影响<sup>[2,5]</sup>。微生物对矿物的风化是自然界普遍存在的地球化学现象, 其风化机制主要是通过微生物新陈代谢分泌的有机酸、胞外多糖、金属-络合物配体及其复合物等化学物质来腐蚀矿物<sup>[6-9]</sup>, 并日渐成为环境矿物学的研究热点之一。

近年来, 有关有机酸和胞外多糖对含钾硅酸盐矿物风化方面的研究已有较多的报道。众所周知, 有机酸对矿物的风化主要是通过电离  $\text{H}^+$  和酸根离子来影响矿物的风化<sup>[10]</sup>, 而细菌分泌的胞外多糖则能够促进细菌在生长的过程中形成细菌-矿物复合体, 从而促使细菌与矿物颗粒进一步接触, 最终导致

矿物中矿质元素的释放<sup>[11]</sup>。另外, 胞外多糖还能够吸附细菌分泌的代谢产物, 使大量的  $\text{H}^+$  和酸根集中在细菌-矿物复合体中, 导致该复合体微域发生变化<sup>[12]</sup>, 进而加速矿物的溶解。

细菌的代谢产物易受到外部因素的影响, 其中培养基就是一个重要的方面。培养基中碳源、氮源等条件能够影响细菌的生长代谢和特性, 而氮源中  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  则是一种经常用到且简单的氮源。本研究选取两株钾矿物分解细菌, 其中菌株 Q12 能够产生有机酸, 而菌株 Q32 能够产生胞外多糖, 通过调节培养基中  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的含量来调控菌株 Q12 和 Q32 及其混合菌株合成有机酸和胞外多糖的能力, 进而提高菌株对钾长石的风化能力。目前, 有关

基金项目: 国家自然科学基金 (41071173)

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

作者简介: 黄智 (1983-) 男, 江苏淮安人, 博士, 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

收稿日期: 2011-10-08; 修回日期: 2011-12-21

细菌通过产生有机酸或胞外多糖来风化钾长石的研究已有报道,但是通过调控培养液中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的量来优化混合菌株产生有机酸和胞外多糖的能力,进一步提高其对钾长石的风化效应的研究至今未见报道。这不仅能进一步阐明供试菌株对钾长石的溶解效应及其机制,为研究微生物-矿物相互作用提供新的思路和实验材料,还能够为研究微生物肥料菌种资源提供新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株:**供试菌株为实验室保存菌株。菌株 Q12 和 Q32 分别被鉴定为 *Bacillus globisporus* (登录号: EU685811) 和 *Rhizobium* sp. (登录号: EU685808)。

**1.1.2 供试矿物:**供试硅酸盐矿物:采自福建邵武的钾长石,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 pH 4.0 的盐酸溶液中浸泡过夜,最后再用去离子水清洗后烘干。

**1.1.3 培养基:**M0 培养基:蔗糖 10.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, NaCl 0.1 g, 酵母膏 0.5 g,  $\text{CaCO}_3$  0.5 g, 1.0 g, 钾长石粉 0.2 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2, 121°C, 25 min 灭菌。M1-M4 培养基是在 M0 培养基的基础上每升分别加入 0.3 g、0.6 g、0.9 g 和 1.2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.2, 121°C, 25 min 灭菌。

**1.1.4 培养基优化:**将菌株 Q12 和 Q32 活化后分别接种至 100 mL 有氮培养基<sup>[13]</sup>中, 30°C、150 r/min 摇床培养约 20 h, 6000 × g 离心收集菌体。用无菌水分别洗涤菌体 3 次,再用无菌水将细胞密度调节至 OD 1.0 左右(700 nm),其细胞数量分别为  $2.23 \times 10^8$  cfu/mL 和  $1.34 \times 10^8$  cfu/mL。将菌株 Q12、Q32 及其混合菌株的菌悬液接入 50 mL M0-M4 培养基中,每个处理 3 个重复。菌株 Q12 和 Q32 的接种量分别为 0.2 mL,混合菌株处理中菌株 Q12 和 Q32 接种量分别为 0.1 mL。将摇瓶置于摇床中振荡培养 7 d(150 r/min, 28°C)。培养结束后,采用 pH 计(PHS-3CT)测定培养液中 pH;酸碱滴定法测定总酸度;稀释平板法测定培养液中细胞数量;比色法测定铵态氮( $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ )<sup>[14]</sup>,硫酸-萘酚法<sup>[15]</sup>测定粗多糖。

### 1.2 供试菌株对钾长石的溶解效应

根据上述结果选取适合的培养基研究菌株对钾长石的溶解作用。将用无菌水洗涤过的菌液接入对应的 100 mL 液体培养基中,接种量均为 1 mL,其中接复合菌的处理中菌株 Q12 和 Q32 各为 0.5 mL,对照接等量灭活菌液(CK)。将摇瓶置于 28°C, 150 r/min 摇床中进行振荡培养 50 d,培养期间每隔 10 d 取 20 mL 培养液测定 pH、总酸度、细菌数量(平板计数法)、铵态氮、粗多糖及其中矿质元素的含量(用等离子发射光谱法测定,ICP-OES,Optimal 2100 DV,Perkin Elmer),同时补充等量新鲜培养基。第 50 d 时,用滤纸过滤的方式回收摇瓶中的钾长石粉末,于 40°C 烘箱中烘干,采用扫描电镜(日立 S-3000 型)对矿物表面进行观察。

## 2 结果和分析

### 2.1 培养基的优化

**2.1.1  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  对 pH 及总酸度的影响:**由图 1-A 可知,菌株在不同  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  含量的培养基中培养后,培养液 pH 发生了明显的变化。培养基中不加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  时培养液的 pH 接近中性,加入不同量的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  后 pH 值均有显著降低;菌株 Q12、Q32 及 Q12 + Q32 混合菌株分别在含有 0.6、0.9、0.6 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的培养基中 pH 最低,分别为 4.28、4.04 和 3.92。但除菌株 Q32 在 0.3 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的培养基中 pH 相对较高外,其它处理间无明显差异。由图 1-B 可知,菌株 Q12、Q32 及混合菌株总酸度在培养基中  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的含量在 0-0.3 g/L 之间时的变化较大,随着  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  含量的进一步增加,培养液中总酸度变化不显著。这可能与培养液中产酸细菌 Q12 细胞的数量变化不明显有关(图 2)。

**2.1.2 培养液中细胞数量的变化:**图 2 表明,菌株 Q12 和 Q32 及其混合菌株在所有供试  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  含量下均能够生长,但其生长势存在差异。在不加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的培养基中,菌株 Q12 的细胞数量约为  $10^7$  cfu/mL,而菌株 Q32 的细胞数量显著高于菌株 Q12;混菌处理中,菌株 Q12 和 Q32 的细胞数量与它们单独培养时无显著的差别。培养液中加入 0.3 g/L 的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  时,能够显著增加培养液中细胞的数量,其中菌株 Q12 细胞的数量达到了

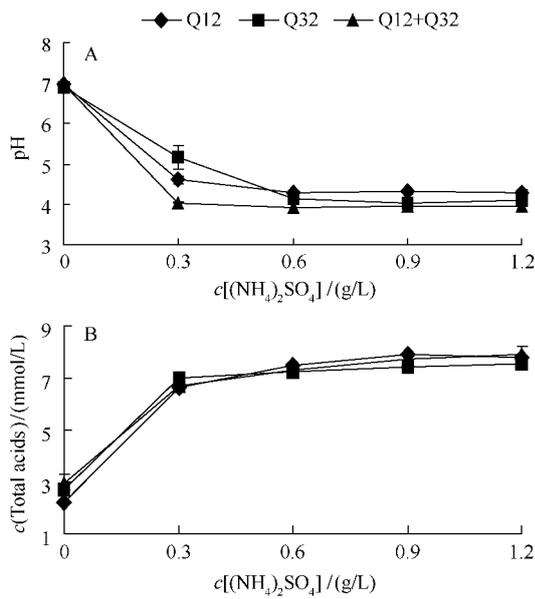


图1 pH及总酸度的变化

Fig.1 Changes of pH values (a) and total acids (b) in the culture solution.

$10^8$  cfu/mL, 菌株 Q32 的细胞数量达到  $10^9$  cfu/mL; 混菌处理能够显著增加菌株 Q12 的数量, 而菌株 Q32 的数量却小幅的降低。但是, 随着培养基中  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  含量的进一步增加, 单独培养菌株 Q12 和 Q32 的培养液中细胞数量却没有显著的增加。同样, 混菌处理能够显著增加菌株 Q12 的细胞数量, 而菌株 Q32 的细胞数量与单独培养时略有差异。由此可知, 混菌培养中菌株 Q12 和 Q32 能够良好共存, 并能够促进菌株 Q12 的生长。无论是单菌培养还是混菌培养, 培养液中菌株 Q32 的细胞数量要远高于菌株 Q12 的细胞数量, 其数量比为 10 到 13:1。

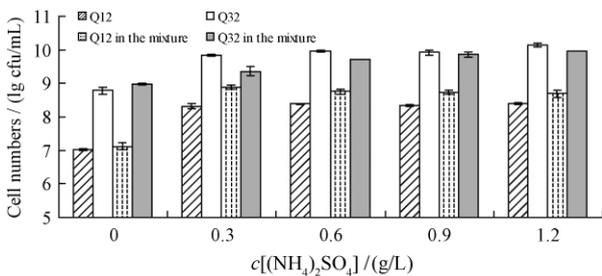


图2 培养液中细胞数量的变化

Fig.2 Changes of cell numbers in the culture solutions.

**2.1.3  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  对菌株产胞外多糖的影响:** 由图 3 可见, 菌株在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  含量不同的培养基中

胞外多糖的产量发生了较大的变化。菌株 Q12 基本不产生胞外多糖, 而菌株 Q32 和混合菌株均在含  $0.3 \text{ g/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的培养基中产生的胞外多糖最多, 其胞外多糖含量分别为  $2.04$  和  $1.47 \text{ g/L}$ 。

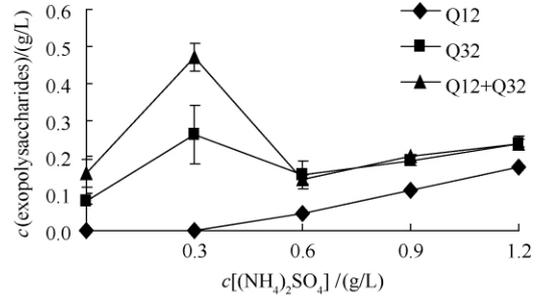


图3 培养液中粗多糖含量的变化

Fig.3 Contents of exopolysaccharides produced by the strains in culture solutions.

**2.1.4 培养液中  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  含量的变化:** 培养基中的 N 素对菌株的生长和代谢有重要的影响。因此, 通过测定培养 7 d 后的培养液中  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  的含量来评估菌株对 N 素的利用情况。由图 4 可见, 培养 7 d 时  $0.6 \text{ g/L}$  的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  能够满足菌株 Q12 正常的生长代谢的需求; 而菌株 Q32 和混合菌株的处理中没有加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  时也能正常生长, 这可能与培养基组分中的酵母膏含有一定量的 N 有关。

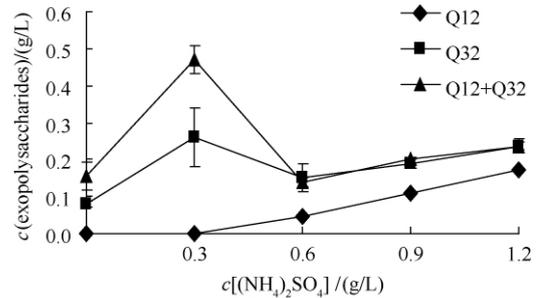


图4 培养 7 d 后培养液中  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  含量的变化

Fig.4 Changes of  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  in liquid after 7 days with different strains.

综上所述, 含  $0.6 \text{ g/L}$  的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  就能够满足菌株 Q12 生长的需求, 且培养液 pH 能够达到最低, 总酸度也维持在较高的水平; 只要在培养基中加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 菌株 Q32 的培养液中 pH 就会降低, 总酸度也会相应的升高, 而不加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  菌株 Q32 也能够良好的生长, 胞外多糖的产量维持在一个较高的水平。因此, 培养菌株 Q32 时培养基中无需加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 混合菌株在加入  $0.3 \text{ g/L}$  的

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 时培养液的 pH 能达到较低的水平,总酸度较高,且胞外多糖的产量也达到最大值。因此,分别选择 M2、M0 和 M1 培养基来研究供试菌株 Q12、Q32 和混合菌株对钾长石的溶解效应。

2.2 菌株对钾长石的溶解效应

2.2.1 培养液 pH 和细胞数量的变化:由图 5-A 可见,菌株 Q12 与钾长石相互作用到第 10 天时培养液的 pH 值由初始的 6.44 降为 4.03,10 天后略有上升,但基本维持在 pH 4.5 左右;菌株 Q32 在 50 天的培养时间内,其培养液 pH 变化不明显,维持在 pH 7 左右;混合菌株接种后,pH 逐渐下降。第 20 天时,培养液中 pH 低于菌株 Q12,在第 40 天时达到最低 (pH 4.1),从图 5-B 可以看出培养液中细胞数量随着培养时间的延长发生了较大的变化。初始接入摇瓶中菌株 Q12 的细胞数量为 10<sup>5</sup> cfu/mL,随着培养时间的延长,细菌数量逐渐上升,在第 50 天时达到 10<sup>8</sup> cfu/mL;菌株 Q32 的初始数量为 10<sup>7</sup> cfu/mL,接种 10 d 后数量为 10<sup>8</sup> cfu/mL,随着培养时间的延长,其数量有所下降,但基本稳定在 10<sup>8</sup> cfu/mL;混合菌株处理中总细胞数的变化趋势与单一培养菌株 Q32 时相似,但细胞数量却显著高于菌株 Q32。

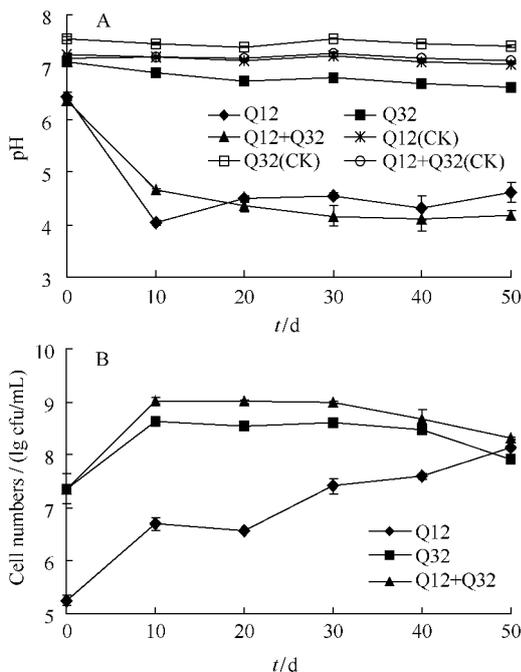


图 5 培养液 pH 及细菌数量的变化  
Fig. 5 Changes of pH and cell numbers in the culture solutions.

2.2.2 培养液中总酸度和胞外多糖的变化:从图 6-

A 可知,菌株 Q12 培养液中总酸度逐渐升高,在第 10 天时达到最大,为 8.62 mmol/L,之后有所下降,第 40 天时最低,为 5.70 mmol/L;混合菌株培养液中总酸度在第 30 天达到最大,为 7.09 mmol/L,30 d 后与菌株 Q12 无显著差异;而菌株 Q32 培养液中总酸度较小,其最大值出现在第 50 天,为 3.81 mmol/L。由图 6-B 可知,菌株 Q12 不产胞外多糖,菌株 Q32 及混合菌株能够产生胞外多糖。菌株 Q32 和混合菌株胞外多糖产量均在培养到 40 d 时达到最大值,分别为 2.23 g/L 和 2.62 g/L。

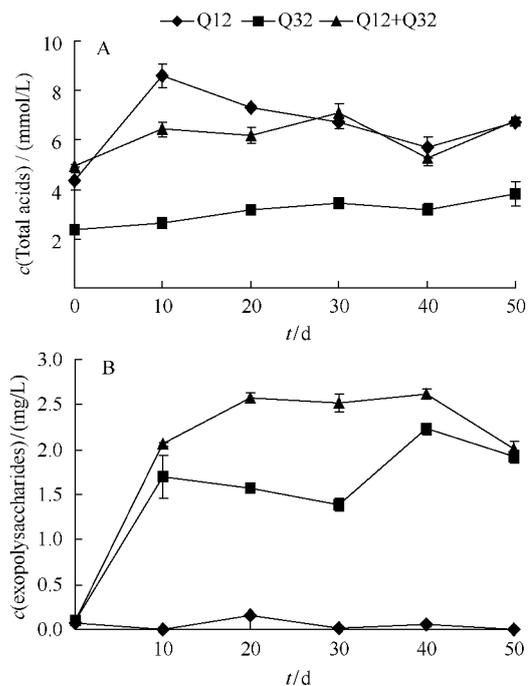


图 6 培养液总酸度和粗多糖的变化  
Fig. 6 Total acids and exopolysaccharides in the culture solutions.

2.2.3 培养液中元素含量的变化:Si、Al、K 是长石矿物的主要元素,培养液中元素含量的变化可以在一定程度上反映钾长石的溶解状况,同时我们还分析了钾长石中的微量元素 Fe。由图 7 可知,菌株 Q12、Q32 及混合菌株能够促进钾长石中 Si、Al、Fe 的释出,释出量显著高于对照。从图 7-A 可知,菌株 Q12 和 Q32 培养液中 Si 含量分别第 20 天和第 30 天达到“小高峰”,分别为 2.95 mg/L 和 2.77 mg/L,在第 50 d 达到最大值,分别为 3.39 mg/L 和 3.21 mg/L。混合菌株培养液中, Si 含量在第 10 天达到“小高峰”,为 2.96 mg/L,经过第 20 天的下降后又逐渐上升,并在第 50 天达到最大值 3.31 mg/L。

第50天时,3个处理对钾长石中的Si释放无显著差异。由图7-B可知,第10天时菌株Q12对钾长石中Al的释出量要显著高于菌株Q32和混合菌株,并经过“波浪式”的变化后,在第50天达到最大值,为0.72 mg/L;而菌株Q32和混合菌株对Al的最大释出量均出现在第30天,分别为0.51 mg/L和0.74 mg/L。第50天时,菌株Q12和混合菌株对Al的释出量无显著差异,但均显著高于菌株Q32。由图7-C可知,经过细菌作用后,钾长石中的微量元素Fe均能够释出,不同菌株对Fe的释出效率存在差异。菌株Q12除第20天外,对钾长石中Fe的释出量均显著高于菌株Q32,其最大值分别出现在第50

天(1.27 mg/L)和第30天(0.78 mg/L)。而混合菌株能够显著地促进钾长石中Fe的释放,并在第30天时达到最大释放量,为2.59 mg/L,第30天后逐渐下降。由图7-D可知,培养液中的K的变化无明显规律,这可能是由于K是微生物生长必需的元素,溶出的K被微生物细胞吸收所致。而对照组K出现了先下降后上升的趋势,可能的原因:虽然灭活处理中没有活菌存在,但是死细胞还存在于培养液中,这些死细胞一般带有负电荷,容易吸附培养液中的 $K^+$ 等阳离子,使 $K^+$ 浓度下降。然而,随着培养时间的延长,死菌体逐渐裂解,细胞吸附的以及细胞内的 $K^+$ 释放出来,使培养液 $K^+$ 浓度增加。

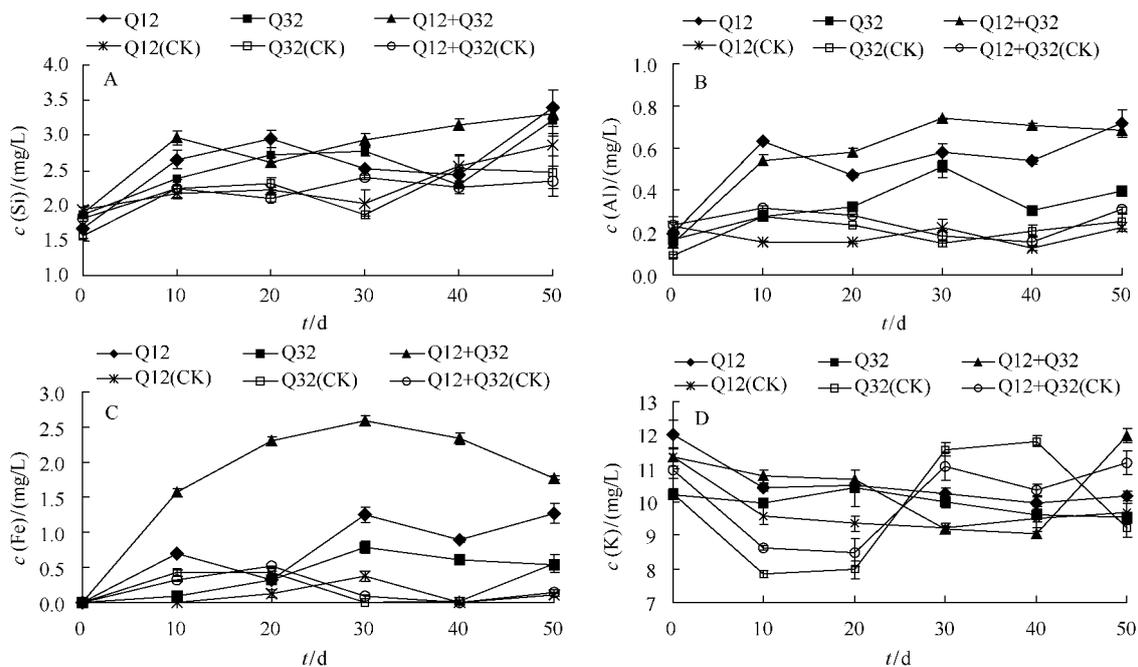


图7 培养液中Si、Al、Fe和K含量的变化

Fig. 7 Concentrations of Si, Al, Fe and K in the culture solutions.

**2.2.4 钾长石表面形态的观察:**根据培养液中元素含量的变化可以推测摇瓶中的钾长石发生了不同程度的溶解,为了更好地、直观地观察钾长石表面发生的变化,选用扫描电子显微镜观察了钾长石表面形态的变化。由图8可知,未经细菌作用的钾长石(图8-A)表面较平整、有许多孔洞和一些小颗粒物质,钾长石边缘不规则,棱角分明。由图8-B可知,菌株Q12与钾长石作用50 d后,钾长石表面依然有许多细菌存在,表面变得粗糙,边缘变得平滑,棱角

模糊;菌株Q32与钾长石作用50 d后(图8-C),钾长石表面变得模糊,这可能是由于菌株Q32代谢产生了大量的胞外多糖,这些胞外多糖包裹在钾长石颗粒的表面。此外,可以观察到有一些针状物存在,推测可能是形成的次生矿物。接混合菌株处理50 d后(图8-D),钾长石颗粒表面被严重的腐蚀,出现较大的蚀坑,并且钾长石表面的薄层有脱落的趋势。由此可知,菌株Q12、Q32以及混合菌株均能够溶蚀钾长石,其中混合菌株对钾长石的破坏最强。

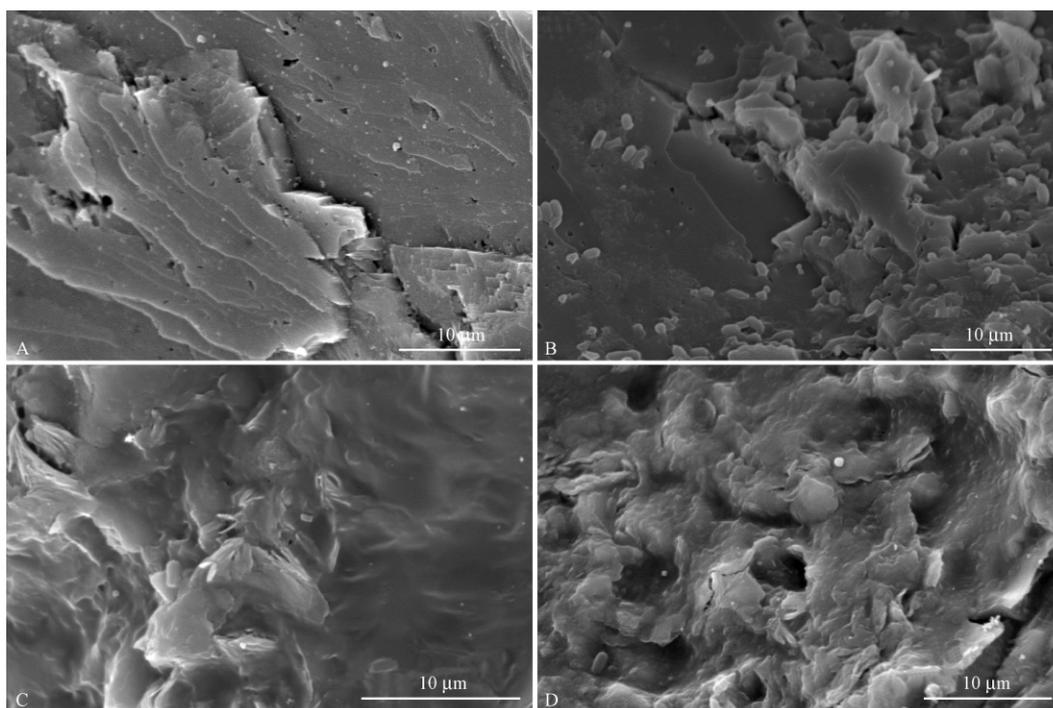


图8 钾长石颗粒的扫描电镜图片

Fig. 8 SEM analysis of the K-feldspar grains. A: K-feldspar with no treatment; B-D were the photos of K-feldspar treated with strains Q12, Q32 and their mixture (Q12 + Q32) for 50 days, respectively.

### 3 讨论

本研究通过调节培养基中的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  含量来调控菌株产酸和合成胞外多糖的能力,从而加速菌株对钾长石的风化效能。培养基中的 N 素营养对微生物的生长与代谢产生重要的影响。Roos 等<sup>[16]</sup> 研究发现 *Penicillium cyclopium* 每吸收和利用 1 mol 的  $\text{NH}_4^+$  就能够释放出等量的  $\text{H}^+$ ,从而导致培养液中酸度的降低;培养液中酸度降低的另外一个原因可能是微生物呼吸释放出的  $\text{CO}_2$  与水反应后形成了  $\text{H}^+$ <sup>[17]</sup>。本研究发现在 0.3 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的处理中培养液酸度较大,增加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的量酸度变化却不明显,这可能与培养液中产酸细菌 (Q12) 细胞数量变化不明显有关。Desmond 等<sup>[18]</sup> 研究发现,培养基中  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  作为 *Aureobasidium pullulans* 唯一 N 源,当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的量设置为 0.05 - 0.50 g/L 时,培养液的 pH 从 4.19 降到 1.50,当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的量大于 0.3 g/L 时, pH 降幅变化就不显著;同时,培养液中多糖的含量也受到  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的影响,胞外多糖的产量呈倒“V”型。本研究发现在培养基中加入 0.3 g/L 的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  虽然能够促使菌株 Q12

及混合菌株产生较多的酸类物质,但尚不能满足菌株 Q12 生长的需要,因此培养菌株 Q12 时  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的加入量为 0.6 g/L。菌株 Q32 及混合菌株培养液中胞外多糖的产量随着  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  含量的增加也呈现倒“V”型,其最大值均出现在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的加入量为 0.3 g/L 与文献报道一致<sup>[18]</sup>。

微生物与矿物的相互作用已有很多报道,微生物作用后矿物可以释放出很多矿物元素,如 Si、Fe、Mg、Ca 等供细菌或植物生长。Sheng 等<sup>[19]</sup> 的研究表明,菌株 Q12 能够通过产生葡萄糖酸等有机酸对钾长石、黑云母和白云母进行溶解,释放出矿物中 K、Si 等元素。而菌株 Q32 能够产生大量的胞外多糖,从而能够对钾长石矿物进行溶解。这两株细菌及其混合培养物为我们研究细菌-矿物的相互作用提供了良好的试验材料。菌株 Q12 在培养第 10 天时,产生的酸最大,之后有所降低。有机酸可能是菌株 Q12 溶蚀矿物的主要机制之一。从图 7 可以看出,有机酸对钾长石的溶解效果要优于胞外多糖对钾长石的溶解效果。有报道显示<sup>[20]</sup>,草酸的浓度 < 3 mmol/L 时,其对正长石和钠长石几乎没有影响,当草酸浓度 > 3 mmol/L 时,能够显著促进正长石和钠长石的溶解。也有研究表明,在相同 pH 值的溶

液中,有机酸对矿物的溶解是无机酸的 3-5 倍<sup>[21]</sup>。这可能是由于有机酸电离的  $H^+$  能够与矿物中的阳离子( $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ ) 等发生交换作用,同时有机酸的酸根离子也能够矿物中的金属离子形成配合物,从而促进矿物的溶解。菌株 Q32 能够分泌较多的胞外多糖,将矿物颗粒包裹住(图 8-c),多糖中的羟基、羧基等官能团能够络合矿物中的 Si、Al 等元素,提高多糖对钾长石的溶解能力。然而,在不添加  $(NH_4)_2SO_4$  的培养基中,细菌生长的较慢,菌体细胞也较少<sup>[21]</sup>,因而对矿物的风化作用较弱。混合菌株对 Al、Fe 元素的溶出效果较明显,这可能主要是由于胞外多糖包裹住矿物颗粒,有助于细菌在矿物表面的定殖,并形成生物膜,使大量  $H^+$  和酸根离子集中在细菌-矿物复合体中,从而使局部酸的浓度增加,最终导致钾长石的溶解<sup>[11-12]</sup>。除了有机酸和胞外多糖对矿物的溶蚀作用外,摇瓶中矿物的溶解还可能存在一些其它的机理,这需要进一步的研究。

菌株对矿物溶解的同时,可能会在溶液中或矿物表面形成一些粒径较小的次生矿物。培养液中矿物质元素含量的“波浪式”变化也可能与其中矿物的反复溶解或沉淀有关。X 射线衍射和电子探针等技术广泛应用于矿物的物相分析中,是一种快速、有效的方法,因此可以借助该技术研究矿物在溶解过程的物相变化。在细菌的作用下,培养液中元素的变化与矿物物相变化之间的关系值得进一步研究。

## 参考文献

- [1] Miot J, Benzerara K, Morin G, Kappler A, Bernard S, Obst M, Férard C, Skouri-Panet F, Guigner J-M, Posth N, Galvez M, Brown GE, Guyot F. Iron biomineralization by anaerobic neutrophilic iron-oxidizing bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2009, 73: 696-711.
- [2] 李莎,李福春,程良娟. 生物风化作用研究进展. 矿产与地质(*Mineral Resources and Geology*) 2006, 20(6): 577-582.
- [3] 周跃飞,陆现彩,王汝成,陆建军. 长石微生物风化作用的研究现状与展望. 地球科学进展(*Advances in Earth Science*) 2008, 23(1):17-23.
- [4] 赵飞,黄智,何琳燕,王鹏,盛下放. 不同风化程度钾长石表面矿物分解细菌的筛选及遗传多样性. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*) 2010, 50(5):647-653.
- [5] Caldeira K. Forest, Climate, and silicate rock weathering. *Journal of Geochemical Exploration*, 2006, 88: 419-422.
- [6] 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: 87-98.
- [7] 盛下放,黄为一. 硅酸盐细菌 NBT 菌株释钾条件的研究. 中国农业科学(*Scientia Agricultura Sinica*) 2002, 35(6):673-677.
- [8] Khraisheh MAM, Al-Ghouti MA, Allen SJ, Ahmad MN. Effect of OH and silanol groups in the removal of dyes from aqueous solution using diatomite. *Water Research*, 2005, 39: 922-932.
- [9] Duckworth OW, Bargar JR, Sposito G. Coupled biogeochemical cycling of iron and manganese as mediated by microbial siderophores. *Biometals*, 2009, 22: 605-613.
- [10] Brantley SL, Stiltings LL. Feldspar dissolution at 25°C and low pH. *American Journal of Science*, 1996, 296: 101-127.
- [11] Barker WW, Welch SA, Chu S. Experimental observations of the effects of bacteria on alumina silicate weathering. *American Mineralogist*, 1998, 83: 1551-1563.
- [12] Welch SA, Barker WW, Banfield JF. Microbial extracellular polysaccharide sand plagioclase dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1999, 63: 1405-1419.
- [13] 王静,盛下放,曹建芳,张树奎,张垠,何琳燕. 南京小龙山钾矿区植物根际可培养细菌的遗传多样性分析. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*) 2009, 49(7): 867-873.
- [14] 弓晓峰,张静,张振辉,周云. 纳氏试剂比色法测定土壤铵态氮的研究. 环境科学与技术(*Environmental Science and Technology*) 2006, 29(1):43-44.
- [15] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术. 北京:科学出版社 2002:171-173.
- [16] Roos W, Luckner M. Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. *Journal of General Microbiology*, 1984, 130: 1007-1014.
- [17] 林启美,王华,赵小蓉,赵紫鹃. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探. 微生物学通报(*Microbiology*) , 2001, 28(2):26-30.
- [18] Desmond PFA, Robert JS. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990, 32(6): 637-644.

- [19] Sheng XF, Zhao F, He LY, Qiu G, Chen L. Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus globisporus* Q12 from the surfaces of weathered feldspar. *Canadian Journal of Microbiology*, 2008, 54: 1064-1068.
- [20] 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 Cosmochimica Acta*, 1999, 63: 2043-2059.
- [21] Banfield JF, Barker WW, Welch SA, Taunton A. Biological impact on mineral dissolution: Application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 3404-3411.
- [22] 杜叶, 周雪莹, 连宾. 胶质芽孢杆菌的胞外分泌物与细菌的解钾作用. *地学前缘 (Earth Science Frontiers)*, 2008, 15(6): 107-111.

## Effects of ammonium sulfate on the metabolism and K-feldspar weathering of two potassium-bearing mineral-solubilizing bacteria

Zhi Huang, Guangyou Ma, Linyan He, Xiafang Sheng\*

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

**Abstract:** [Objective] To determine the best conditions for *Bacillus globisporus* Q12 and *Rhizobium* sp. Q32 to produce organic acids and extracellular polysaccharides, respectively, and further elucidate the weathering mechanism of the two potassium-bearing mineral-solubilizing bacteria. [Methods] Different contents (0 – 1.2 g/L) of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  were added to media to analyze the ability of the strains to produce organic acids and extracellular polysaccharides, and assess the ability of Q12, Q32 and their mixture to dissolve potassium feldspar. Scanning electron microscope (SEM) was also used to observe the distribution of the bacterial cells on the surfaces of the feldspar and the mineral weathering. [Results] Results show that *Bacillus globisporus* Q12 produced more organic acids, when the contents of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  were 0.6 g/L; *Rhizobium* sp. Q32 produced more extracellular polysaccharides, when there was no  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in the media; and the mixture of two strains produced more organic acids and extracellular polysaccharides, when the contents of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  were 0.3 g/L. Mineral dissolution experiment showed that *Bacillus globisporus* Q12, *Rhizobium* sp. Q32 and the mixture (Q12 + Q32) significantly dissolved the feldspar and released the elements from the mineral, of which the mixture of Q12 and Q32 had the best weathering ability than strain Q12 or Q32; SEM also indicated that the mixture of Q12 and Q32 had more ability to weather feldspar than each tested strain. [Conclusion] The contents of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in the media could affect the growth and metabolites of the strains Q12 and Q32 and the mineral bioweathering, the mixture of strains Q12 and Q32 had the more potential of feldspar weathering through the combined action of organic acids and extracellular polysaccharides produced by strains Q12 and Q32.

**Keywords:** potassium-bearing mineral-solubilizing bacteria, ammonium sulfate, organic acid, extracellular polysaccharide, interaction between mineral and microorganism

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41071173)

\* Corresponding author. Tel: +86-25-84395125; E-mail: xfsheng604@sohu.com

Received: 8 October 2011/Revised: 21 December 2011