

·环境矿物学·

梭菌 SN-1 菌株参与下形成的碳酸盐矿物组合及其主要矿物成分的动态变化

王金平¹, 李福春¹, 郭文文¹, 汪君², 刘铭艳², 王果²

(1. 南京农业大学 资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095; 2. 中国核工业集团 216 大队, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 在 Mg/Ca 比值为 6 的 Lagoa Vermelha 改良培养基中, 对分离自青海湖湖底沉积物的梭菌 (*Clostridium* sp.) 进行了为期 100 d 的碳酸盐矿物培养实验, 同时还完成了一组无菌对照实验。利用 X 射线衍射仪 (XRD) 和扫描电子显微镜 (SEM) 分别对矿物成分和形态进行了测定和观察。实验结果表明: 细菌培养实验的沉淀物数量始终多于无菌对照实验, 在梭菌 SN-1 菌株作用下形成的碳酸盐矿物组合的变化趋势是方解石 → 方解石 + 单水碳钙石 → 单水碳钙石 + 方解石 → 单水碳钙石, 而无菌对照实验产物中矿物的演化方向是单水碳钙石 + 方解石 → 方解石 + 单水碳钙石。在综合分析 SEM 和 XRD 观测结果的基础上, 推测哑铃状矿物可能是高镁方解石, 而球状矿物可能是单水碳钙石。

关键词: 梭菌; 方解石; 单水碳钙石; 哑铃状; 动态变化

中图分类号: P578.6; P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2012)04-0627-06

The temporal changes of carbonate mineral assemblages formed by *Clostridium* sp. SN-1 strain and their main mineral composition

WANG Jin-ping¹, LI Fu-chun¹, GUO Wen-wen¹, WANG Jun², LIU Ming-yan² and WANG Guo²

(1. College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. No. 216 Geological Party, China National Nuclear Corporation, Urumqi 830011, China)

Abstract: Culture experiments of carbonate mineral using Lagoa Vermelha improved medium with 6:1 molar ratio of Mg/Ca within 100 days were conducted under the mediation of *Clostridium* sp. (SN-1 strain) isolated from sediments in the Qinghai Lake. At the same time, aseptic experiments were carried out as the control. Mineral species and morphologies were determined by X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM), respectively. The results showed that: ① The quantities of sediments in bacterial culture experiments were always more than those in the control ones. ② The change trend of carbonate mineral assemblages formed in *Clostridium* sp. SN-1 strain culture was calcite → calcite and monohydrocalcite → monohydrocalcite and calcite → monohydrocalcite, while in the control experiments the change trend was monohydrocalcite and calcite → calcite and monohydrocalcite; ③ Based on comprehensive analysis of SEM and XRD, the authors considered that dumbbell-shaped minerals might be high-magnesium calcite, while spherical minerals might be monohydrocalcite.

Key words: *Clostridium* sp.; calcite; monohydrocalcite; dumbbell; temporal change

收稿日期: 2012-03-20; 修订日期: 2012-06-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41172308, 40930738); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 王金平(1984-), 女, 汉, 硕士研究生, 生态学专业, E-mail: wangjp9082@163.com; 通讯作者: 李福春, E-mail: fchli@

njau.edu.cn.

微生物诱导/控制矿物形成的历史可以追溯到遥远的地质年代,如前寒武纪形成的大规模叠层石、富铁建造等都可能与微生物作用有关(Altermann *et al.*, 2006)。基于微生物对成岩作用影响的广泛性, Burne 和 Moore 提出了微生物岩(microbialite)的概念,用来描述由底栖微生物的生理活动而形成的生物沉积岩,主要是微生物碳酸盐岩,包括叠层石、凝块石、树形石等(Burne and Moore, 1987)。近年来,对于碳酸盐微生物矿化问题的研究出现了新的趋势,即由单一研究天然样品转向天然样品和实验室模拟的全方位研究,研究目的主要是希望在白云石成因、地外生命的探寻等重大科学问题上寻求突破。

在微生物促进碳酸盐矿物的形成实验研究方面,已经有多种矿物组合被报道。碳酸钙体系的矿物组合有方解石(Martinez *et al.*, 2010)、方解石+文石(Buczynski *et al.*, 1991)、方解石+球霏石、方解石+非晶态碳酸钙(Hou *et al.*, 2011)、单水碳钙石(Rivadeneira *et al.*, 1998)等;碳酸钙-镁体系的矿物组合有白云石+含镁方解石(Roberts *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2005; Warthmann *et al.*, 2005)、白云石+水菱镁矿(Sánchez-Román *et al.*, 2009)、白云石+含镁方解石+水菱镁矿+碳酸钙镁石(Sánchez-Román *et al.*, 2011)、含镁方解石(李福春等, 2011)、方解石+单水碳钙石(马恒等, 2009; 苏宁等, 2010; 郭文文等, 2012)等。

一些实验结果证明,许多微生物具有促进碳酸盐矿物形成的能力(Boquet *et al.*, 1973; Sanchez-Moral *et al.*, 2003; 李福春等, 2011),某些硫酸盐还原细菌甚至可以诱导形成白云石(Warthmann *et al.*, 2005)。但对于微生物作用下碳酸盐矿物形成的过程目前却知之甚少。最近几年,作者所在课题组在CaCO₃-MgCO₃体系的实验过程中发现,细菌参与下形成的碳酸盐矿物主要是镁含量不同的方解石和单水碳钙石,它们具有多种形态,如棒状、哑铃状、花菜状、球状等(马恒等, 2009; 苏宁等, 2010; 李福春等, 2011; 郭文文等, 2012)。研究者还认为这些形态之间具有递进式的演化关系,可能的演化方向是棒状→哑铃状→光球状→刺球状(马恒等, 2009)。上述研究结果大体勾勒出了微生物作用下碳酸盐矿物形态演化的方向,尽管还存在许多不甚清楚或不太确定之处。但到目前为止,对矿物组合及其矿物成分的演化过程还未详细探讨。一般认为,单水碳钙石在热力学上是亚稳定态物质,在纯化

学体系中较少存在。然而,在作者所在课题组完成的微生物实验产物中经常出现单水碳钙石,目前尚不清楚该矿物相的形成是否具有规律性。本文利用从青海湖湖底沉积物中分离的一株梭菌(SN-1)进行了一系列培养实验,试图揭示在细菌参与下形成的碳酸盐矿物组合及其主要矿物成分的动态变化规律。

1 材料和方法

1.1 培养基成分

实验所用培养基为经过改良的Lagoa Vermelha(巴西一泻湖的名称,简称LV)培养基。1 L液体培养基中含有KH₂PO₄ 0.019 g, MgSO₄·7 H₂O 2.46 g, MgCl₂·6 H₂O 14.21 g, CaCl₂·2 H₂O 1.91 g, KCl 0.5 g, NH₄Cl 0.25 g, 酵母浸提膏 0.15 g, 乳酸钠溶液(50%~60%) 6 mL, Na₂S·9 H₂O 0.5 g, NaHCO₃ 7.45 g, Na₂CO₃ 1 g, FeCl₂·4 H₂O (1.8 g/L) 1 mL, 生物素(10.0 mg/100.0 mL) 0.5 mL。培养基的配制过程见文献(苏宁等, 2010)。

1.2 菌株特征

SN-1菌株(NCBI上的登录号为JF504704)分离自青海湖湖底沉积物,其基本特征为:菌体为杆状,长1.2~2.4 μm,直径0.5~0.8 μm,厌氧生长,在LV固体培养基上形成白色隆起菌落;菌落表面光滑,边缘整齐,革兰氏染色呈阳性,可见鞭毛。16S rRNA基因测序结果显示,菌株SN-1属于梭菌属(*Clostridium* sp.) (李福春等, 2011)。

1.3 培养实验方法

利用血细胞计数板法对母液中菌数进行测定。向一系列已加入100 mL液体培养基的小注射瓶中加入一定量的母液,使细菌初始浓度达到2×10⁶ cfu/mL。然后,将小注射瓶充满氮气,用石蜡封口,在30℃条件下静置培养。除离心和充氮气外,其他实验操作均在无菌操作台上进行,时间最长的实验为100 d。在前15 d,每培养1 d结束1个实验;在第15~50 d,每培养5 d结束1个实验;在第60~100 d,每培养10 d结束1个实验,并对继续培养的样品充氮气,以排除微生物所产生的代谢气体并使其保持相对厌氧的环境。充氮气后用石蜡将针孔及其整个瓶盖封住。实验结束后,用离心法将固相和液相产物分离,测定固相产物质量。设若干无菌实验作为对照,对照实验与细菌实验不同之处在于不接菌

种,不充氮气。

1.4 观察和测定方法

利用 XRD 测定矿物成分。制样方法:将收集到的固相产物用蒸馏水清洗 3 次,自然风干后将其研磨至 200 目以下,制成混浊液后均匀地涂在载玻片上,待自然风干后测定。测定条件为:铜靶,管压 35 kV,管流 20 mA,步长 0.02° ,积分时间 $0.2^\circ/\text{min}$,扫描范围 $10^\circ\sim 60^\circ$ 。

利用 SEM 观察矿物微观形态并用 EDS 对其化学成分进行测定。制样方法:将收集到的固相产物用蒸馏水清洗 3 次,自然风干,取适量固相产物固定在样品台上,上机前喷上约 8 nm 厚金膜即可进行观察。观察和测定条件为:工作电压 20 kV,电子束流 60 mA。

2 实验结果与讨论

2.1 细菌浓度及其导致的 pH 值变化

培养基中细菌的初始浓度为 0.2×10^7 cfu/mL。培养至第 7 d 时,细菌浓度达到最大值 4.55×10^7 cfu/mL,此后逐渐降低。到第 100 d 实验结束时为 0.16×10^7 cfu/mL,与初始浓度接近。在细菌的对数生长期,培养基的 pH 值变化于 7.27~7.46 之间。对数生长期结束后,pH 值呈现逐渐升高的趋势,在第 90 d 时达到最高(7.68)(图 1)。在实验初期(0~15 d)培养基的 pH 值由以下几个过程共同控制:①细菌分泌低分子量有机酸;②细菌还原 SO_4^{2-} 消耗 H^+ ;③细菌新陈代谢产生的 CO_2 和 NH_3 反应会发生如下反应 $2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$;

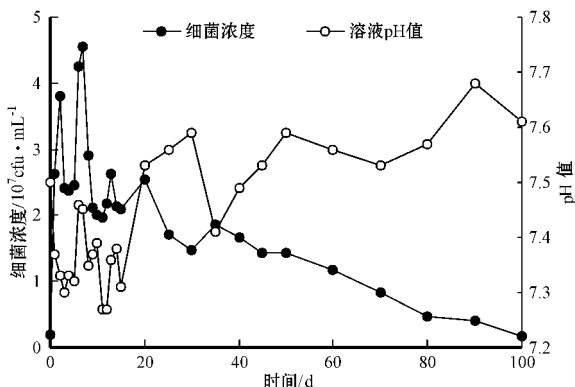


图 1 培养液中细菌浓度和 pH 值的动态变化

Fig. 1 Temporal change of bacteria concentration and pH value in culture medium

④有机质中的氨基酸被分解,产生 NH_4^+ 。第 1 个过程使 pH 值降低,后 3 个过程均导致 pH 值升高。在总体上后 3 个过程可能占优势,因此 pH 值随细菌浓度的升降而表现出一定的波动。第 15 d 以后,细菌浓度逐渐降低,大量死亡的细菌自溶导致 pH 值呈现逐渐升高的趋势。

2.2 沉淀物的数量特征

对每个时期所形成的固相产物进行了定量分析。从图 2 可以看出,细菌培养实验与无菌对照实验中沉淀物的数量具有相同的变化趋势,均出现 3 个台阶,说明沉淀过程具有阶段性。二者的区别在于:无菌对照实验的沉淀物在数量上一直少于细菌实验,细菌培养实验在第 60 d 左右达到平衡,而对照实验在第 35 d 时就已达到平衡。该结果说明 SN-1 菌株的存在有利于沉淀的形成。

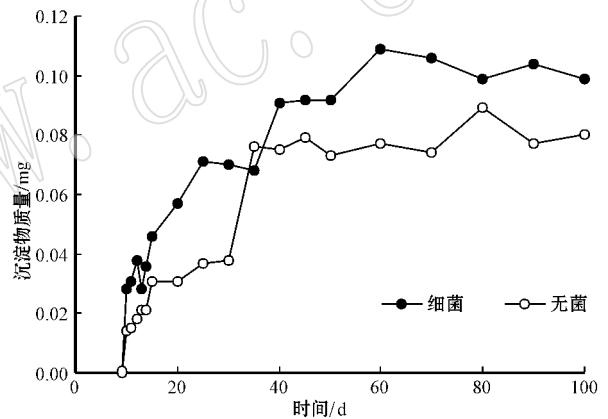


图 2 沉淀物质量的动态变化

Fig. 2 Temporal change of quality of precipitates

2.3 矿物组合特征

通常,体系中最终出现的矿物并不是从溶液中直接形成的,而是通过一系列过渡性矿物的逐渐转变来实现(Berner and Holdren, 1979),很可能是经过含水的非晶质相阶段再逐渐脱水 and 重结晶,因为非晶态固相有较低的界面自由能和较快的成核速率(Konhauser *et al.*, 1999)。对于无机化学体系中的碳酸钙系列矿物来说,通常存在如下的转变过程:非晶态碳酸钙→单水碳钙石→球霏石→文石→方解石(戴永定等,1994)。但通过对各个时期固相产物的 XRD 结果进行分析表明,细菌培养实验的沉淀物由方解石和单水碳钙石两种矿物组成(图 3),其中第 10~35 d 以方解石为主,第 40~100 d 则以单水碳钙石为主,其中第 60 d 例外,以方解石为主,即总体的

相转变方向是：方解石→单水碳钙石。作者推测，可能是梭菌及其新陈代谢产物在成矿过程中起到了至关重要的作用，它们不仅促进了含镁方解石的快速形成，而且使单水方解石成为稳定的矿物相。无菌对照实验也以方解石和单水碳钙石为主（图 4），但两者形成的先后次序截然相反：先形成以单水碳钙石为主而方解石为次的组合，而后方解石的相对含量逐渐增大。这总体上符合无机化学体系中碳酸钙系列矿物相的转变方向。值得一提的是，本文并没有获得体系中存在球霏石和文石的信息，可能是由于这两个相存在的时间短于本文实验的时间间隔之故。

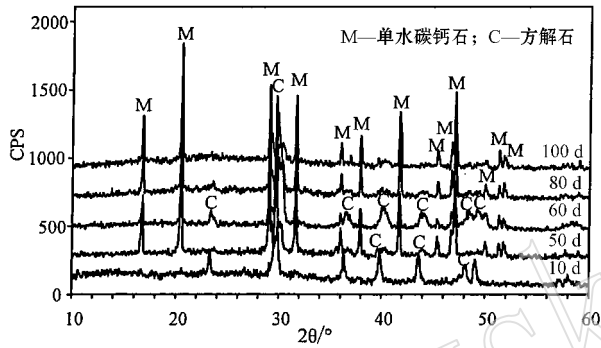


图 3 细菌培养实验中形成的沉淀物的 XRD 图谱

Fig. 3 X-ray diffractographs of precipitated products obtained from culture with SN-1 strain

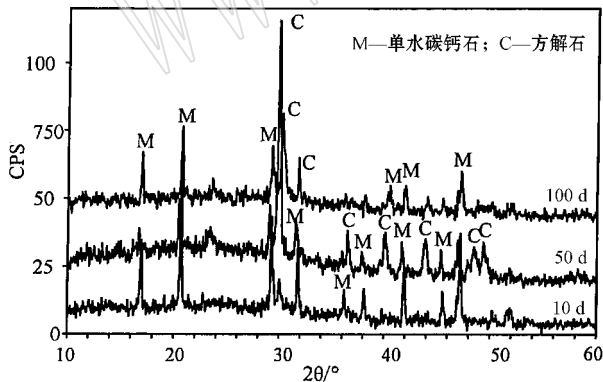


图 4 对照实验中形成的沉淀物的 XRD 图谱

Fig. 4 X-ray diffractographs of precipitated products obtained from aseptic experiments

通常认为，单水碳钙石是不稳定相。无论是化学体系还是生物体系的实验，均极少有形成单水碳钙石的报道，仅见于文献 (Rivadeneira *et al.*, 1998; Van Lith *et al.*, 2003) 中，目前尚无定量估算单水碳钙石在矿物组合中所占比例的方法。为了大致定量描述单水碳钙石和方解石含量的动态变化，暂时用

方解石(104)晶面衍射峰和单水碳钙石(012)晶面衍射峰的面积比值来表示二者的比例。应该指出的是，方解石的衍射峰往往是由镁含量不同的一系列方解石衍射峰构成的组合峰，因此，其(104)晶面衍射峰面积实际上是几个衍射峰面积之和。

计算结果表明，细菌培养实验产物中方解石含量随着培养时间的延长而逐渐减少，单水碳钙石含量逐渐增加，而无菌对照实验则正好相反（图 5）。单水碳钙石能够稳定地存在可能与细菌分泌的有机物有关。微生物分泌的有机物质（多糖、有机酸等）随着矿物的形成而被包裹于矿物之中。这些有机物质有可能提高了不稳定碳酸盐矿物相（例如单水碳钙石）的稳定性 (Rodriguez Navarro *et al.*, 2007)。

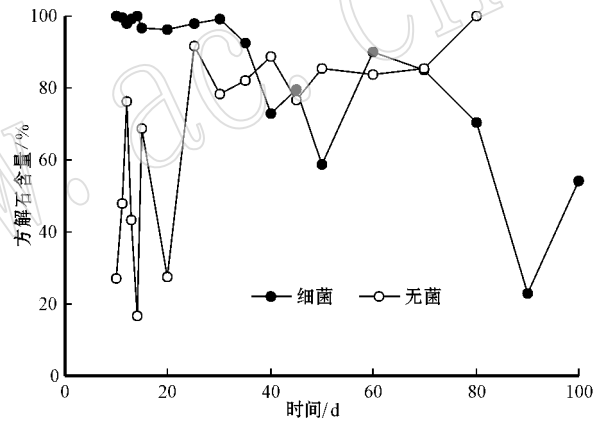


图 5 结晶态物质中方解石的含量

Fig. 5 Percentages of calcite in crystalline products

2.4 形态特征

在第 10~25 d，矿物主要以哑铃状为主（如图 6a），还有一些花菜状矿物和球状矿物。这里所说的花菜状矿物实际上是表面不很圆滑的球状矿物。花菜状和球状矿物聚集在一起构成葡萄状集合体。从第 25 d 开始直至第 100 d，除以上形态外，还出现了由菱面体构成的矿物集合体。一些球状矿物的表面棱角突出（我们暂称之为刺球）而不再是比较光滑的圆球（如图 6b）。总体上来看，随着培养时间的加长，哑铃状矿物减少，刺球状和菱面体状矿物增多。这种趋势与我们以前报道的结果（李福春等，2011）类似。

2.5 矿物种类与形态的关系

对矿物形态的观察结果表明，第 10 d 时哑铃状矿物占优势。哑铃状矿物随着培养时间的延长而逐渐减少，球状矿物增多。同时，XRD 结果表明，第 10

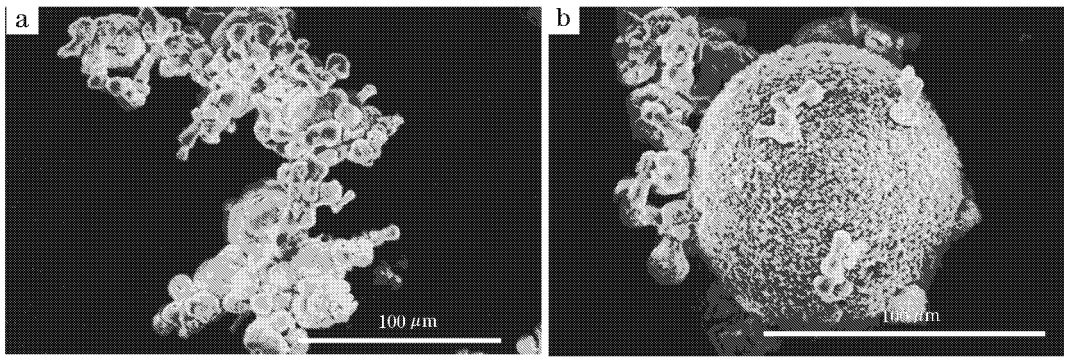


图 6 哑铃状和球状碳酸盐矿物的 SEM 照片

Fig. 6 SEM photographs of carbonate minerals with various morphologies

a—哑铃状(20 d); b—刺球状(25 d)
a—dumbbell(20 d); b—spherulite(25 d)

~35 d 的产物中以方解石为主,第 40 d 以后以单水碳钙石为主。此外,第 60 d 的实验产物中与总体趋势不协调地出现了较多的哑铃状矿物,而矿物成分也表现出与总体趋势不一致——以方解石为主。看来,这可能不是巧合,而是有可能暗示着哑铃状矿物是方解石,球状矿物是单水碳钙石。

3 结论

通过以上分析和讨论,认为梭菌 SN-1 菌株对碳酸盐矿物的形成过程及其矿物组合有一定的控制作用:

(1) 细菌培养实验的沉淀物数量始终多于无菌对照实验。

(2) 在梭菌 SN-1 菌株作用下形成的碳酸盐矿物组合的变化趋势是方解石→方解石+单水碳钙石→单水碳钙石+方解石→单水碳钙石,而无菌对照实验产物中矿物的演化方向是单水碳钙石+方解石→方解石+单水碳钙石→方解石。

(3) 在综合分析 SEM 和 XRD 观测结果的基础上推测,哑铃状矿物可能是高镁方解石,而球状矿物可能是单水碳钙石。

References

Altermann W, Kazmierczak J and Oren A. 2006. Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history[J]. *Geobiology*, 4: 147~166.
Berner R A and Holdren G R. 1979. Mechanism of feldspar weathering: Some observational evidence[J]. *Geology*, 5: 369~372.

Boquet E, Boronat A and Ramos-Cormenzana A. 1973. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon[J]. *Nature*, 246(5434): 527~529.
Buczynski C and Chafetz H S. 1991. Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy[J]. *Sedimentary Research*, 61(2): 226~233.
Burne R V and Moore L S. 1987. Microbialites: organose-sedimentary deposits of benthic microbial communities[J]. *Palaios*, 2: 241~254.
Dai Yongding. 1994. *Biom mineralogy*[M]. Petroleum Industry Press, 19~21(in Chinese with English abstract).
Dai Yongding, Liu Tiebing and Shen Jiyang. 1994. Bio-ore formation and biomineralization[J]. *Acta Palaeontologica Sinica*, 33(5): 575~594(in Chinese with English abstract).
Guo Wenwen, Ma Heng, Li Fuchun, et al. 2012. Clostridium sp. MH18 strain induces the formation of carbonate minerals[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 52(2): 221~227(in Chinese with English abstract).
Hou W G, Lian B and Zhang X Q. 2011. CO₂ mineralization induced by fungal nitrate assimilation[J]. *Bioresource Technology*, 102: 1562~1566.
Konhauser K O and Urrutia M M. 1999. Bacterial clay authigenesis: implications for river chemistry[J]. *Chemical Geology*, 161: 399~414.
Li Fuchun, Ma Heng, Su Ning, et al. 2011. Clostridium sp. controlled morphology of Mg-bearing calcite and its implication for possible mechanism[J]. *Geological Journal of China Universities*, 17(1): 13~20(in Chinese with English abstract).
Ma Heng, Li Fuchun, Su Ning, et al. 2009. Morphological evolution during the formation of carbonate spherulite *Citrobacter freundii* culture[J]. *Geological Journal of China Universities*, 15(3): 429~436(in Chinese with English abstract).
Martinez R E, Gardes E, Pokrovsky O S, et al. 2010. Do photosynthetic bacteria have a protective mechanism against carbonate precipi-

- tation at their surfaces[J]. *Ecological Engineering* , 36 : 118~136.
- Rivadeneira M A , Delgado G , Ramos-Cormenzana A , *et al.* 1998. Biomineralisation of carbonates by *Halomonas eurihalina* in solid and liquid media with different salinities : Crystal formation sequenced[J]. *Research in Microbiology* , 149 : 277~287.
- Rivadeneira M A , Delgado G , Ramos-Cormenzana A , *et al.* 1998. Biomineralization of carbonates by *Halomonas eurihalina* in solid and liquid media with different salinities : crystal formation sequenced[J]. *Res. Microbial.* , 149(4) : 277~287.
- Roberts J A , Bennett P C , Gonzalez L A , *et al.* 2004. Microbial precipitation of dolomite in methanogenic groundwater[J]. *Geology* , 32 : 277~280.
- Rodriguez-Navarro C , Jimenez-Lopez C , Rodriguez-Navarro A , *et al.* 2007. Bacterially mediated mineralization of vaterite[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta* , 71(5) : 1197~1213.
- Sánchez-Moral S , Cañaveras J C , Laiz L , *et al.* 2003. Biomediated precipitation of calcium carbonate metastable phases in hypogean environments : a short review[J]. *Geomicrobiol. J.* , 20 : 491~500.
- Sánchez-Román M , McKenzie J A , Luca Rebello Wagener A , *et al.* 2009. Presence of sulfate does not inhibit low-temperature dolomite precipitation[J]. *Earth and Planetary Science Letters* , 285 : 131~139.
- Sánchez-Román M , Romanek C S , Fernández-Remolar D C , *et al.* 2011. Aerobic biomineralization of Mg-rich carbonates : Implications for natural environments[J]. *Chemical Geology* , 281(3~4) : 143~150.
- Su Ning , Li Fuchun , Ma Heng , *et al.* 2010. Effects of Mg/Ca ratios on the species and morphologies of microbial carbonate mineral[J]. *Acta Mineralogica Sinica* , 30(1) : 83~89(in Chinese with English abstract).
- Van Lith Y , Warthmann R , Vasconcelos C , *et al.* 2003. Sulphate-reducing bacteria induce low-temperature dolomite and high Mg-calcite formation[J]. *Geobiology* , 1(1) : 71~79.
- Warthmann R , Vasconcelos C , Sass H , *et al.* 2005. *Desulfovibrio brasiliensis* sp. nov. , a moderate halophilic sulfate-reducing bacterium from Lagoa Vermelha (Brazil) mediating dolomite formation[J]. *Extremophiles* , 9(3) : 255~261.
- Wright D T and Wacey D. 2005. Precipitation of dolomite using sulphate-reducing bacteria from the Coorong Region , South Australia : Significance and implications[J]. *Sedimentology* , 52(5) : 987~1008.

附中文参考文献

- 戴永定, 刘铁兵, 沈继英. 1994. 生物成矿作用与生物矿化作用[J]. *古生物学报* , 33(5) : 575~594.
- 戴永定. 1994. 生物矿物学[M]. 北京 : 石油工业出版社, 19~21.
- 李福春, 马恒, 苏宁, 等. 2011. 梭菌对含镁方解石形态的控制及其可能机理[J]. *高校地质学报* , 17(1) : 13~20.
- 苏宁, 李福春, 马恒, 等. 2010. Mg/Ca 比对微生物成因的碳酸盐矿物种类和形态的影响[J]. *矿物学报* , 30(1) : 83~89.
- 郭文文, 马恒, 李福春, 等. 2012. 梭菌 MH18 菌株诱导碳酸盐矿物的形成[J]. *微生物学报* , 52(2) : 221~227.
- 马恒, 李福春, 苏宁, 等. 2009. *Citrobacter freundii* 作用下球状碳酸盐矿物的形态演化过程研究[J]. *高校地质学报* , 15(3) : 429~436.