

钙长石浸矿细菌的筛选优化及浸矿效果研究*

刘立翔^{1,2}, 常承兵^{1,2}, 刘生玉^{1,2,3}, 郭建英^{1,2}, 温全宝^{1,2}

(1. 太原理工大学 矿业工程学院, 山西 太原 030024;

2. 山西浙大新材料与化工研究院, 山西 太原 030032;

3. 太原理工大学 原位改性采矿教育部重点实验室, 山西 太原 030024)

摘要:为促进钙长石中Ca、Mg元素的浸出,从山西省吕梁市方山县架梁山的土壤中筛选出一株对钙长石具有较好适应性的菌株hzt-1',经鉴定为紫金牛叶杆菌 *Phyllobacterium myrsinacearum*,探究该菌株在察氏培养基中的最适生长条件及钙长石的最佳浸矿条件。菌株hzt-1'的最佳生长条件:pH=6,装液量80 mL,接种量7%,最佳碳源为葡萄糖(20 g/L),最适氮源为NaNO₃(1 g/L)。菌株hzt-1'的最佳浸矿条件:pH=6,接种量3%,矿浆质量浓度20 g/L,装液量100 mL,在该条件下,钙长石中Ca²⁺、Mg²⁺的浸出率分别为50.38%和39.91%。该菌株通过质子交换、络合作用等促进钙长石的溶解,加速了Ca²⁺、Mg²⁺的浸出,提高了钙长石等矿物资源的利用率,为硅酸盐矿物高效浸矿提供了新型菌株。

关键词:钙长石;生物浸出;菌株筛选;生长条件;浸矿条件;浸出率

中图分类号:TD989

文献标识码:A

文章编号:1005-2763(2025)10-0267-12

Study on Screening Optimization and Leaching Effect of Anorthite Leaching Bacteria

LIU Lixiang^{1,2}, CHANG Chengbing^{1,2}, LIU Shengyu^{1,2,3}, GUO Jianying^{1,2}, WEN Quanbao^{1,2}

(1.College of Mining Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan, Shanxi 030024, China;

2.Shanxi-Zheda Institute of Advanced Materials and Chemical Engineering, Taiyuan, Shanxi 030024, China;

3.Key Laboratory of In-Situ Property-Improving Mining of Ministry of Education,
Taiyuan University of Technology, Taiyuan, Shanxi 030024, China)

Abstract:In order to promote the leaching of Ca and Mg elements in anorthite, a strain hzt-1' with good adaptability to anorthite was screened from the soil of Jialiangshan, Fangshan County, Lvliang City, Shanxi Province. It was identified as *Phyllobacterium myrsinacearum*. The optimum growth conditions of the strain and the optimum leaching conditions of anorthite in Czapek Medium were investigated. The optimum growth conditions of strain hzt-1' are as follows: pH of 6, liquid volume of 80 mL, inoculation volume of 7%, glucose as the best carbon source (20 g/L), and NaNO₃ as the best nitrogen source (1 g/L). The optimum leaching conditions of strain hzt-1' are as follows: pH of 6, inoculation volume of 3%, pulp mass concentration of 20 g/L, and liquid volume of 100 mL. Under these conditions, the leaching rates of Ca²⁺ and Mg²⁺ in anorthite are 50.3% and 39.91%, respectively. The strain promotes the dissolution of anorthite through proton exchange and complexation, accelerates the leaching of Ca²⁺ and Mg²⁺, and thus improves the utilization rate of anorthite and other mineral resources. This study can provide a new strain for efficient leaching of silicate minerals.

Key words:Anorthite, Bioleaching, Strain screening, Growth condition, Leaching condition, Leaching rate

0 引言

全球气候变暖主要是由人类活动产生的温室气体(如CO₂等)引起的,减少CO₂在大气中的排放

成为目前亟待解决的问题^[1-2]。CO₂封存技术可以实现大规模碳减排和碳封存,其中CO₂矿物封存因其具有储量大、稳定性好以及绿色环保的特点被认为是最具应用前景的封存技术之一^[3-4]。

* 收稿日期:2024-10-30

基金项目:山西省基础研究计划项目(202203021211165);山西浙大新材料与化工研究院研发项目(2022SX-TD009);山西省研究生科研创新项目(2024KY159)

作者简介:刘立翔(2000—),男,辽宁营口人,硕士研究生,主要从事生物浸矿研究。E-mail:2465366067@qq.com

通信作者:刘生玉(1969—),男,山西临县人,博士,教授,博士生导师,主要从事界面分选理论及应用、低值与废弃资源加工利用、矿物散料表层固化抑尘技术研发及应用等研究。E-mail:liusytyut@126.com

SEIFRITZ^[5]指出 CO₂ 矿物封存本质是人为加速自然界中钙镁硅酸盐风化的过程,CO₂ 与矿物中的钙、镁等元素反应生成稳定的碳酸盐产物(CaCO₃ 或 MgCO₃)。硅酸盐矿物风化主要经历 3 个阶段:CO₂ 溶解、钙镁离子的浸出以及碳酸盐沉淀的生成^[6],其中钙镁离子的浸出是整个反应的决速步骤^[7]。为实现 CO₂ 的高效封存,通过对矿石的预处理促进矿物中钙镁离子的浸出至关重要,传统的酸碱、盐类浸出存在操作困难、高能耗、高污染^[8]等缺点。相比较而言,微生物浸出能耗低、污染小,具有广阔的发展前景。

大量研究表明,微生物通过直接作用(溶蚀作用和机械破坏作用)以及间接作用(有机酸、胞外聚合物、生物膜等的作用)显著提高硅酸盐矿物中 Ca、Mg、Al、K、Si 等元素的浸出^[9-12]。赵江曼等^[13]对胶质类芽孢杆菌作用于硅酸盐矿物的脱硅能力进行了探究,结果表明,相对于无菌对照组,胶质类芽孢杆菌对绿泥石、高岭土、一水硬铝石中硅的浸出率分别提高了 194.47%、20.03%、150.82%。张红芳等^[14]从龙南钾矿区乌蕨中分离培养出一株内生真菌——小刺青霉菌(*Penicillium spinulosum*),其在最优培养条件下发酵液中可溶性 K、Si 含量可达 154.44 mg/L、8.74 mg/L。钙长石作为自然界中主要的含钙矿物之一,具有良好的矿物活性和固碳潜力^[15]。马炯政等^[16]利用真菌 *Ramichloridium apiculatum* 对钙长石中 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的浸出进行研究,发现该菌株通过质子交换及有机配体的络合作用促进钙长石中元素的释放,在菌株最适宜生长条件下,相较于无菌条件,可将钙长石中 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的浸出率提高 10.04 倍和 10.11 倍。目前,国内针对细菌浸出钙长石中元素的研究较少,且存在浸矿时间长、浸矿效果差等缺点,因此,筛选一株高效浸出钙长石中 Ca、Mg 元素的细菌尤为重要。

本研究从山西省吕梁市方山县架梁山的土壤中分离、筛选出一株能有效浸出钙长石中 Ca、Mg 元素的细菌,通过形态特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定,通过单因素试验探究

细菌的最适生长条件和浸矿条件,并考察钙长石中 Ca、Mg 元素的释放规律。利用 X 射线衍射(XRD)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)、扫描电子显微镜-能量色散 X 射线光谱(SEM-EDS)分析浸出前后钙长石的物相组成、官能团以及表面形貌变化,分析细菌对钙长石的作用机理。通过本试验,不仅可以为钙长石等硅酸盐矿物的生物浸出提供新的微生物资源和技术路径,还有助于推动生物浸矿技术在矿业环保中的应用,对促进矿业的可持续发展具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

菌株来源样品的采集时间为 2023 年 6 月下旬,第一个采样点来自山西省吕梁市交城县水峪贯镇,分别取辉绿岩、白云灰岩的植被土壤和苔藓土壤 50 g,保存于无菌密封袋中。第二个采样点为吕梁市方山县架梁山,取玄武岩周围的苔藓土壤 50 g,密封保存。所取样品均保藏在实验室冰箱中(4 ℃),48 h 内完成样品的处理,并进行富集培养。辉绿岩苔藓和植被土壤中分离出的菌株分别编号为 htt、hzt,白云灰岩苔藓和植被中分离出的菌株分别编号为 btt、bzt,玄武岩苔藓土壤中分离出的菌株编号为 xtt。

1.2 矿样

钙长石样品采购于石家庄雨馨建筑材料有限公司,钙长石的化学组成见表 1。经筛分后选择粒级为 200~400 目的钙长石粉用于后续试验。

表 1 钙长石的化学组成

SiO ₂	Al ₂ O ₃	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	Fe ₂ O ₃	其他
46.808	33.617	10.785	5.913	0.779	0.739	0.639	0.720

1.3 培养基

试验所用培养基的组分见表 2,均使用察氏培养基。其中各组分含量为蔗糖 30.0 g,NaNO₃ 3.0 g,MgSO₄ 0.5 g,KCl 0.5 g,K₂HPO₄ 1.0 g,FeSO₄·7H₂O 0.01 g,琼脂 15.0~20.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 为 7.40~7.60。

表 2 试验所用培养基的组分

Table 2 Components of the culture medium used in the test

培养基名称	蔗糖	NaNO ₃	MgSO ₄	KCl	K ₂ HPO ₄	FeSO ₄ ·7H ₂ O	琼脂	钙长石
富集培养基	+	+	+	+	+	+	-	-
初筛培养基	+	+	+	+	+	+	+	-
复筛培养基	+	+	+	+	+	+	+	+
种子液培养基	+	+	+	+	+	+	-	-
浸矿培养基	+	+	-	+	+	-	-	+

注:“+”表示培养基中有该组分,“-”则表示无该组分。

1.4 主要试剂和仪器

试验试剂:蔗糖(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);琼脂粉(天津市北辰区方正化学试剂厂); NaNO_3 、 MgSO_4 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (分析纯,天津市凯通化学试剂有限公司); K_2HPO_4 和 KCl (分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司)。

试验仪器:立式高压蒸汽灭菌锅、GXZ 型智能光照培养箱、恒温培养振荡器。

1.5 菌株筛选

1.5.1 菌株富集

取 5 g 土壤溶于 50 mL 无菌水中,在磁力搅拌器上搅拌至菌体与土壤充分分离,静置 30 min,取 3 mL 上清液接种于富集培养基培养,并观察现象。

1.5.2 菌株初筛

将菌液稀释涂布于初筛培养基上(稀释度为 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}),并置于 30 °C 恒温箱培养 48~72 h,同一稀释度设置 3 组平行试验。根据菌落形态和颜色等差异挑选不同菌落进行平板划线,重复上述操作,直至观察到显微镜下菌落形态和颜色不再改变,分别接种于富集培养基中培养 48 h^[17]。

1.5.3 菌株复筛

将纯化后的菌液稀释涂布于复筛培养基上(稀释度为 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}),并置于 30 °C 恒温振荡培养箱培养 48~72 h,同一稀释度设置 3 组平行试验,观察其生长情况,并将长势较好的菌落进行划线培养,最终接入富集培养基中富集培养。

1.5.4 钙长石浸矿试验

取 5 mL 复筛后的富集菌液接入钙长石浓度为 20 g/L、无 Mg 和 Fe 的液体察氏培养基(蔗糖 30.0 g, NaNO_3 3.0 g, KCl 0.5 g, K_2HPO_4 1.0 g, 钙长石 20.0 g, 去离子水 1 000 mL, pH 为 7.40~7.60)中,置于 30 °C、转速 150 r/min 的摇床中培养 10 d;对照组接入等量无菌培养基,每组设置 3 次重复试验,记录发酵液 pH 以及钙镁离子总浓度。采用 EDTA 滴定法测定溶液中钙镁离子总浓度^[18],每个样品滴定均设置 3 组平行试验,取平均值。

1.6 菌株鉴定

1.6.1 形态特征观察

观察平板上菌落的形状、颜色、边缘、透明度、表面形态,以及显微镜下染色处理后的菌体的形状、直

径,还有芽孢、鞭毛、荚膜等形态特征。

1.6.2 生理生化特性

对试验所用菌株分别进行甲基红 M.R.、V.P.测定,以及淀粉水解、明胶液化、硫化氢、柠檬酸盐、过氧化氢酶等试验,以测定细菌生理生化特征^[19]。

1.6.3 16S rRNA 基因扩增及测序

(1) 配制细菌裂解液:1 μL 0.2 mol/L NaOH, 2.5 μL 1% 十二烷基硫酸钠(SDS)。

(2) 基因组 DNA 提取:取 5 μL 细菌裂解液于 1.5 mL 离心管中,在离心管内加入一定量的待测菌体沉淀。混匀(注意避免出现大量气泡)反应 5 min,加 200 μL 双蒸水(dd H_2O)终止反应(混匀)。

(3) 基因组聚合酶链式反应(PCR)扩增:利用引物序列 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3)扩增样品 DNA。PCR 反应体系:dd H_2O 10 μL , 27F 0.5 μL , 1492R 0.5 μL , Taq DNA 聚合酶 12.5 μL , DNA 1.5 μL , 配制好之后混匀。PCR 反应条件:预变性(94 °C, 3 min),变性(94 °C, 45),退火(58 °C, 45),延伸(72 °C, 2 min),变性、退火和延伸循环 30 次,再延伸(72 °C, 10 min),保存(4 °C)。

(4) 凝胶电泳:利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物,条件:电压 120 V,电流 120 mA,时间 20 min。

(5) 基因测序:采用桑格测存法(Sanger 法)对 PCR 产物进行测序,测序结果采用 DNAMAN 软件进行拼接处理。

1.7 标准曲线绘制

(1) 紫外分光光度计测定菌液在 600 nm 波长下的光密度值(OD_{600} 值):在平板上挑选试验所用菌株接种于富集培养基中,并置于恒温振荡培养箱中培养 4 h、8 h、12 h、24 h 和 48 h,取适量菌液,设置离心机转速 5 500 r/min,离心 10 min,紫外分光光度计调至 600 nm 波长,测定其 OD_{600} 值。

(2) 平板菌落计数:每个时间点测定 OD_{600} 值后,在超净台内将各时间段的初始菌液稀释至不同倍数(10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}),取 25 μL 涂布于固体察氏培养基上,培养 48~72 h 后进行菌落计数,细菌浓度计算公式为:细菌浓度(CFU/mL) = (菌落数 \times 稀释度)/0.025 mL。

(3) 标准曲线的绘制:以 OD_{600} 值为横坐标,细菌浓度为纵坐标,绘制细菌浓度与 OD_{600} 值的标准曲线。

1.8 细菌生长条件优化

1.8.1 装液量

取培养 48 h 的纯菌液分别接入 60 mL、80 mL、100 mL、120 mL 的种子液培养基中培养,60 h 后测定其 OD_{600} 值,每组设置 3 次平行试验。

1.8.2 碳源

取培养 48 h 的纯菌液接入 100 mL 优化后的种子液培养基中培养,设置唯一碳源分别为蔗糖、葡萄糖、甘露醇、麦芽糖,60 h 后测定其 OD_{600} 值,每组设置 3 次平行试验。

1.8.3 氮源

取培养 48 h 的纯菌液接入 100 mL 优化后的种子液培养基中培养,设置唯一氮源分别为 $NaNO_3$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4NO_3 、 NH_4Cl ,60 h 后测定其 OD_{600} 值,每组设置 3 次平行试验。

1.8.4 接种量

取培养 48 h 的纯菌液接入 100 mL 优化后的种子液培养基中培养,设置接种的体积分数分别为 3%、5%、7%、9% 和 11%,60 h 后测定其 OD_{600} 值,每组设置 3 次平行试验。

1.8.5 初始 pH

取培养 48 h 的纯菌液接入 100 mL 优化后的种子液培养基中培养,设置初始 pH 分别为 2, 4, 6, 7, 8, 10 和 12,60 h 后测定其 OD_{600} 值,每组设置 3 次平行试验。

1.9 生长曲线测定

将菌株在最佳碳源、最适氮源、初始 pH、接种量、装液量条件下,置于 30 °C、150 r/min 的恒温振荡培养箱中培养 108 h,测定菌液 OD_{600} 值随时间的变化,每组设置 3 次平行试验。

1.10 浸矿条件优化

取培养 48 h 的纯菌液接入钙长石浓度为 20 g/L 无 Mg 和 Fe 的液体察氏培养基(葡萄糖 20.0 g, $NaNO_3$ 1.0 g, KCl 0.5 g, K_2HPO_4 1.0 g, 钙长石 20.0 g, 去离子水 1 000 mL, pH 6.0)中,置于 30 °C、转速 150 r/min 的摇床中培养 30 d,并调整浸矿条件。(1)矿浆浓度:设置钙长石浓度分别为 5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L 和 25 g/L;(2)接种量:设置

接种对数期纯菌液的体积分数分别为 1%、3%、5%、7% 和 9%;(3)装液量:设置培养基体积分别为 60 mL、80 mL、100 mL 和 120 mL;(4)初始 pH:设置培养基初始 pH 分别为 5, 6, 7, 8 和 9。测定浸矿过程中发酵液的 pH 以及钙、镁离子总浓度,每组设置 3 次平行试验。

1.11 细菌浸矿试验

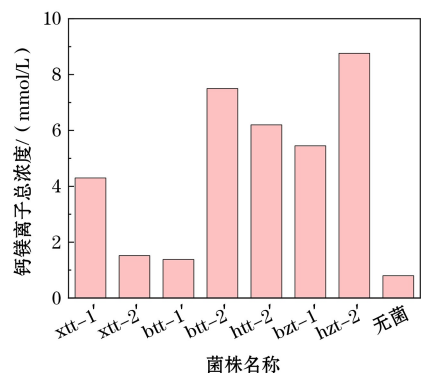
将菌株在最适矿浆浓度、接种量、装液量、初始 pH 条件下,置于 30 °C、150 r/min 的恒温振荡培养箱中培养 30 d,作为接苗组,设置对照组为接入等量的灭活细菌,测定浸矿过程中发酵液的 pH 以及钙、镁离子总浓度,每组设置 3 次平行试验。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与筛选

将土壤中的细菌经过 3 次分离纯化,最终得到 7 株颜色、形态、大小有明显差异的细菌:xtt-1'、xtt-2'、btt-1'、btt-2'、htt-1'、bzt-1'、hzt-1',将纯化后的菌落接种于富集培养基中,并在温度为 30 °C、转速为 150 r/min 的恒温振荡培养箱培养 48~72 h,保存于 4 °C 冰箱,供后续试验使用。

将 7 株细菌稀释至不同倍数(10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}),并接种于钙长石浓度为 20 g/L 的固体培养基中培养 72 h,选取对钙长石有较好适应性的菌株。将所选菌株分别接入相同条件下的液体察氏培养基中培养 10 d,相较于无菌条件,发酵液中钙镁离子总浓度和 pH 变化情况如图 1 所示。由图 1 可知,菌株 btt-2'、htt-1'、bzt-1'、hzt-1' 对钙长石的溶解有较好的效果,其中菌株 hzt-1' 对钙长石浸出效果最佳,钙镁离子总浓度达到 8.76 mmol/L。因此,选用 hzt-1' 作为后续试验所用菌株。



(a) 发酵液中钙镁离子总浓度

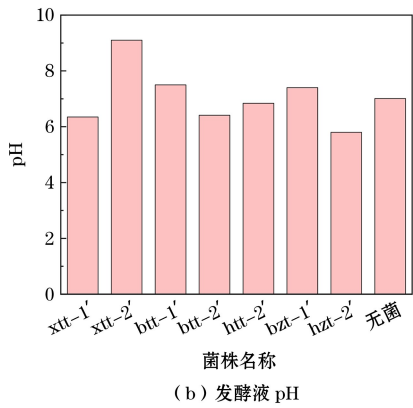


图 1 细菌浸矿 10 d 效果

Fig.1 Effect of bacterial leaching for 10 days

2.2 菌株鉴定结果

2.2.1 形态学特征

菌株 hzt-1' 在固体培养基上的菌落形态特征以及显微镜下的菌体形态特征见表 3 和表 4, 其菌落呈圆形、灰白色、边缘整齐、不透明、表面形态湿润且光滑, 菌体呈杆状, 存在芽孢、荚膜以及鞭毛, 为革兰氏阴性菌^[19]。

表 3 细菌菌株的形态特征

Table 3 Morphological characteristics of bacterial strains

菌株名称	颜色	形状/大小	边缘	表面状态
xtt-1'	白色	圆形(大)	整齐	润湿且光滑
xtt-2'	白色偏黄	圆形(大)	不规则	润湿且光滑
btt-1'	乳白色	圆形(大)	整齐	润湿且光滑
btt-2'	白色	圆形(大)	不规则	润湿且光滑
htt-1'	白色	圆形(小)	整齐	润湿且光滑
bzt-1'	乳白色	圆形(大)	不整齐	润湿且光滑
hzt-1'	灰白色	圆形(大)	整齐	润湿且光滑

表 4 菌株 hzt-1' 的形态特征

Table 4 Morphological characteristics of strain hzt-1'

菌株 hzt-1'	项目	结果
菌落	形状	圆形
	颜色	灰白色
	边缘	整齐
	透明度	不透明
	表面形态	湿润且光滑
菌体	形状	杆状
	直径	1.0 μm
	革兰氏染色	有
	芽孢染色	有
	鞭毛染色	有
	荚膜染色	有

2.2.2 生理生化特征

菌株 hzt-1' 的生理生化特征见表 5。该菌株在代谢过程中可分解含硫有机物产生 H₂S, 也可产生淀粉水解酶和过氧化氢酶, 属于好氧菌^[19], 能够利用柠檬酸盐作为碳源。同时该菌株不能分解葡萄糖产生丙酮酸, 不能使明胶液化, 代谢过程中不产生色氨酸酶。

表 5 菌株 hzt-1' 的生理生化特征

Table 5 Physiological and biochemical characteristics of strain hzt-1'

甲基红 (M.R.)	V.P. 测定	淀粉水解	明胶液化	硫化氢	柠檬酸盐	过氧化氢酶
-	-	+	-	+	+	+

注: “+”表示菌株具备对应特征, “-”表示不具备对应特征。

2.2.3 16S rRNA 基因扩增及测序

菌株 hzt-1' 经 16S rRNA 基因扩增和测序, 将所得的序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对后使用 MEGA 11.0 软件的 neighbor-joining 方法构建系统发育树(见图 2)。通过 16S rRNA 基因序列对比分析, 菌株 hzt-1' 与紫金牛叶杆菌 *Phyllobacterium myrsinacearum* 的序列相似度高达 99.78%, 结合菌株形态特征和生理生化特性, 从系统发育树来看, 二者聚于同一分支, 且该分支的白展值为 100, 表明二者亲缘关系最近, 聚类可靠性较高, 进一步确定菌株 hzt-1' 为紫金牛叶杆菌。

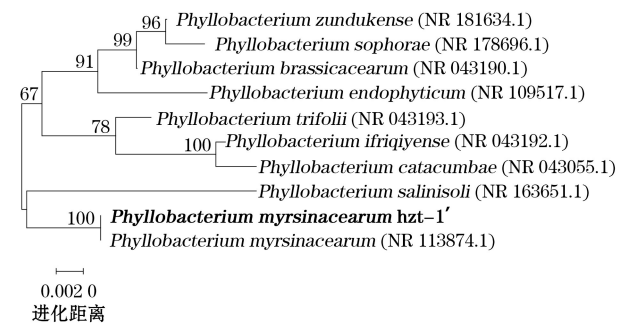


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 hzt-1' 的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of strain hzt-1' was constructed based on 16S rRNA gene sequence

2.3 标准曲线分析

菌株 hzt-1' 浓度与 OD₆₀₀ 值的标准曲线如图 3 所示。标准曲线为 $y = 7.502x - 0.059$, $R^2 = 0.996$, 表明 OD₆₀₀ 值与浓度有很强的正相关性, 可用于后续细菌浓度的测定^[20]。

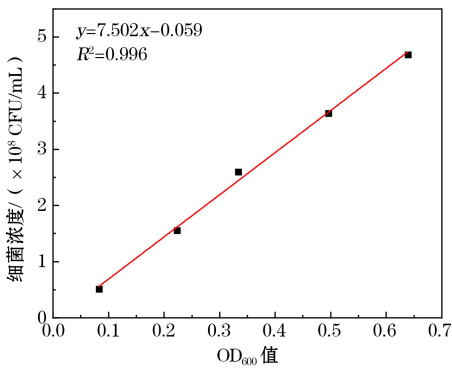


图3 菌株 hzt-1' 浓度标准曲线

Fig.3 Standard curve of strain hzt-1' concentration

2.4 影响因素及生长曲线分析

2.4.1 装液量的影响

装液量直接影响锥形瓶中的溶氧浓度。在温度 30 ℃、转速 150 r/min、pH=7.5 的条件下,探究不同装液量对菌株 hzt-1' 生长的影响,如图 4 所示。在装液量为 80~120 mL 的区间内,细菌浓度呈下降趋势,这是由于 hzt-1' 为好氧菌,装液量较少时,细菌细胞有更多的机会接触空气,溶氧程度相对较高,有利于细菌的生长和繁殖,随着装液量的增加,锥形瓶中的空气量相对减少,溶氧浓度逐渐降低^[21],从而限制细菌的生长。装液量为 60 mL 时,细菌细胞受到的由摇床转动产生的机械创伤力增大,导致部分细菌细胞损伤,甚至死亡,进而影响细菌浓度。最终选取 80 mL 作为菌株 hzt-1' 的最佳装液量。

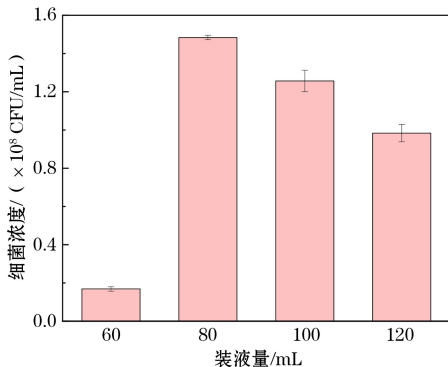


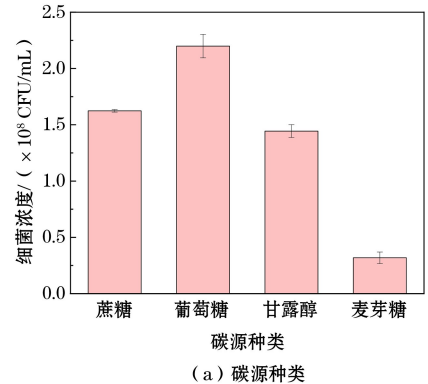
图4 装液量对菌株 hzt-1' 生长的影响

Fig.4 Effect of liquid volume on the growth of strain hzt-1'

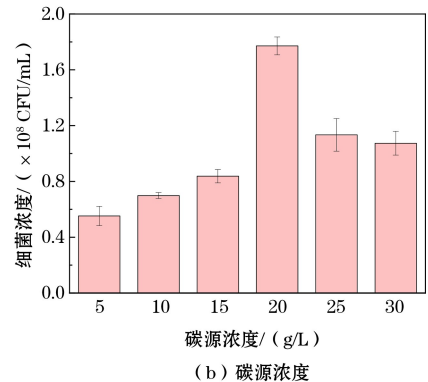
2.4.2 碳源的影响

细菌在生长过程中,需要吸收、利用碳源来构建其细胞结构和组成成分。碳源作为细胞基本元素的来源之一,参与细胞壁的合成、细胞膜的构建以及细胞内各种生物分子的形成,如蛋白质、核酸、多糖等。

这些生物分子是细菌进行生命活动的基础^[22]。本试验分别选取蔗糖、葡萄糖、甘露醇、麦芽糖作为唯一碳源,在 30 ℃、转速 150 r/min、装液量 80 mL、pH=7.5 的条件下,探究碳源种类及浓度对菌株 hzt-1' 生长的影响,如图 5 所示。由图 5 可知,以葡萄糖为唯一碳源时,菌株 hzt-1' 的细菌浓度最高,说明该菌株能迅速吸收单糖并转化为能量,促进自身快速生长,但对二糖、有机醇等吸收较慢,因此选用葡萄糖作为菌株 hzt-1' 所用培养基的最佳碳源^[23]。在碳源浓度为 5~20 g/L 时,细菌浓度随碳源浓度的升高而增大,但过高的浓度可能会形成高渗透压,导致细胞脱水,从而抑制菌株 hzt-1' 生长。因此选取葡萄糖 20 g/L 作为菌株 hzt-1' 的最佳碳源浓度。



(a) 碳源种类



(b) 碳源浓度

图5 碳源对菌株 hzt-1' 生长的影响

Fig.5 Effects of carbon sources on the growth of strain hzt-1'

2.4.3 氮源的影响

氮源是细菌合成蛋白质和核酸等生物大分子的关键元素,对于细菌的生长和繁殖至关重要。细菌通过吸收并利用氮源,可以合成所需的氨基酸、核苷酸等,进而构建细胞结构并进行生命活动^[24]。在温度 30 ℃、转速 150 r/min、装液量 80 mL、葡萄糖 20 g/L、pH=7.5 的条件下,探究不同氮源种类及浓度

对菌株 hzt-1' 生长的影响,如图 6 所示。其中,菌株 hzt-1' 对 NaNO_3 的利用效果最好,对其余氮源利用效果较差,选取 NaNO_3 作为菌株 hzt-1' 生长的最适氮源。在 NaNO_3 浓度分别为 1 g/L、2 g/L、3 g/L

和 4 g/L 时,培养液中的细菌浓度随着氮源浓度的增大而减小,说明过高的氮源浓度会抑制细菌生长。因此,选取 NaNO_3 1 g/L 作为菌株 hzt-1' 的最适氮源浓度。

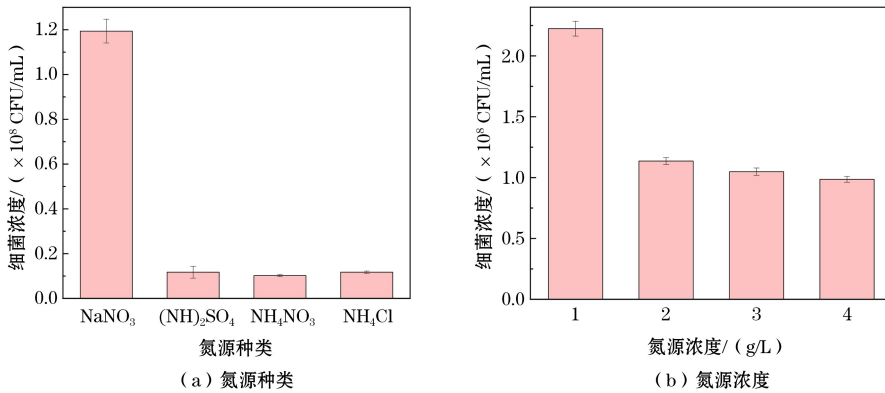


图 6 氮源对菌株 hzt-1' 生长的影响

Fig.6 Effects of nitrogen sources on the growth of strain hzt-1'

2.4.4 接种量的影响

细菌的接种量影响其自身生长和繁殖速度,在温度 30 °C、转速 150 r/min、装液量 80 mL、葡萄糖 20 g/L、 NaNO_3 1 g/L、pH=7.5 的条件下,探究不同接种量对菌株 hzt-1' 生长的影响,如图 7 所示。由图 7 可知,随着接种量的增加,细菌生长繁殖速度加快,主要是由于较高的初始细菌浓度能够更快地占据培养环境,利用有限的营养和生长空间。但随着接种量的进一步加大,细菌浓度呈下降趋势,这是由于过大的接种量导致细菌过度拥挤,从而抑制其生长,甚至导致死亡^[25],过高的浓度会增加细菌对营养和氧气的竞争,同时产生过多的代谢废物,影响培养环境的稳定性,导致培养液黏度增加,造成溶氧不足,从而影响产物的合成。因此,选取 7% 作为菌株 hzt-1' 的最佳接种量。

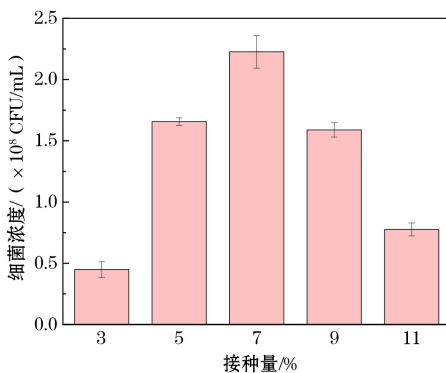


图 7 接种量对菌株 hzt-1' 生长的影响

Fig.7 Effect of inoculation amount on the growth of strain hzt-1'

2.4.5 初始 pH 的影响

培养基初始 pH 主要影响细菌生长代谢中酶的活性、细胞膜的通透性、营养物质的溶解性和电离性以及代谢产物的质量和比例^[26]。在温度 30 °C、转速 150 r/min、装液量 80 mL、葡萄糖 20 g/L、 NaNO_3 1 g/L、接种量 7% 的条件下,探究不同初始 pH 对菌株 hzt-1' 生长的影响,如图 8 所示。由图 8 可知,在初始 pH 为 6~8 时,菌株 hzt-1' 生长最佳,pH 过大或过小均会抑制细菌的生长。因此,选取 pH=6 作为菌株 hzt-1' 的最佳初始 pH。

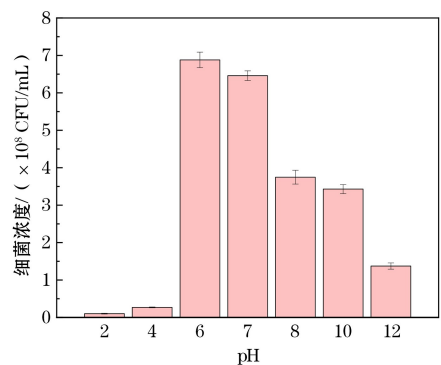


图 8 初始 pH 对菌株 hzt-1' 生长的影响

Fig.8 Effect of initial pH on the growth of strain hzt-1'

2.4.6 生长曲线

菌株 hzt-1' 优化后的最佳生长条件为:pH=6,装液量 80 mL,接种量 7%,最佳碳源为葡萄糖(20 g/L),最适氮源为 NaNO_3 (1 g/L)。在最佳的生长条件下,通过测定不同时间的细菌浓度以探究细菌的生长情况,菌株 hzt-1' 的生长曲线如图 9 所示。细菌生长曲线反映了其在液体培养基中生长繁殖的

基本规律,0~10 h为该菌株的调整期,细菌生长较为缓慢,10~60 h为对数生长期,细菌呈快速生长趋势,60~108 h为稳定期,培养基中细菌浓度基本不变。

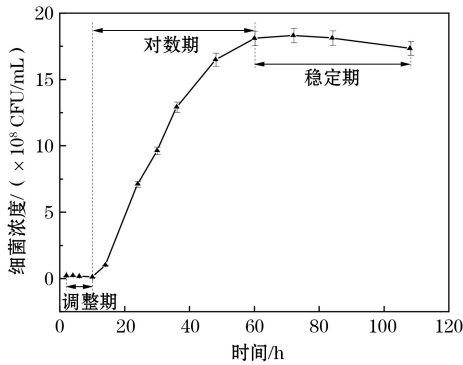


图9 菌株 hzt-1' 生长曲线

Fig.9 Growth curve of strain hzt-1'

2.5 菌株 hzt-1' 浸矿条件优化

对菌株 hzt-1' 的浸矿条件进行优化,结果如图 10 所示。装液量对菌株 hzt-1' 浸矿效果的影响如图 10(a)所示。由图 10(a)可知,过少的装液量会因搅

拌过度从而对细菌造成机械损伤,过高的装液量会导致矿物颗粒无法与细菌充分接触,影响浸出效果,确定最佳装液量为 100 mL^[27]。初始 pH 对菌株 hzt-1' 浸矿效果的影响如图 10(b)所示。由图 10(b)可知,适宜的 pH 会提高生物膜的通透性,加快离子交换速率,提高浸出效果,因此选取 pH=6 作为最佳浸矿 pH。接种量对菌株 hzt-1' 浸矿效果的影响如图 10(c)所示。由图 10(c)可知,随着接种量的增大,可能会导致发酵液黏性逐渐增大,溶氧量降低,从而影响细菌活性,使浸出效果降低,因此选取 3% 作为菌株 hzt-1' 浸矿的最佳接种量。矿浆浓度对菌株 hzt-1' 浸矿效果的影响如图 10(d)所示。由图 10(d)可知,发酵液中钙镁离子总浓度随矿浆浓度的增大呈上升趋势,但通过比较发酵液中的离子浸出率,可以看出钙长石体积分数为 20 g/L 时,浸出率最高,这是由于矿浆中固体物含量过高会对细菌生长产生不利影响,从而降低浸出率,因此选取 20 g/L 作为最佳矿浆浓度。最终确定的最佳浸矿条件为:初始 pH=6,接种量 3%,矿浆浓度 20 g/L,装液量 100 mL。

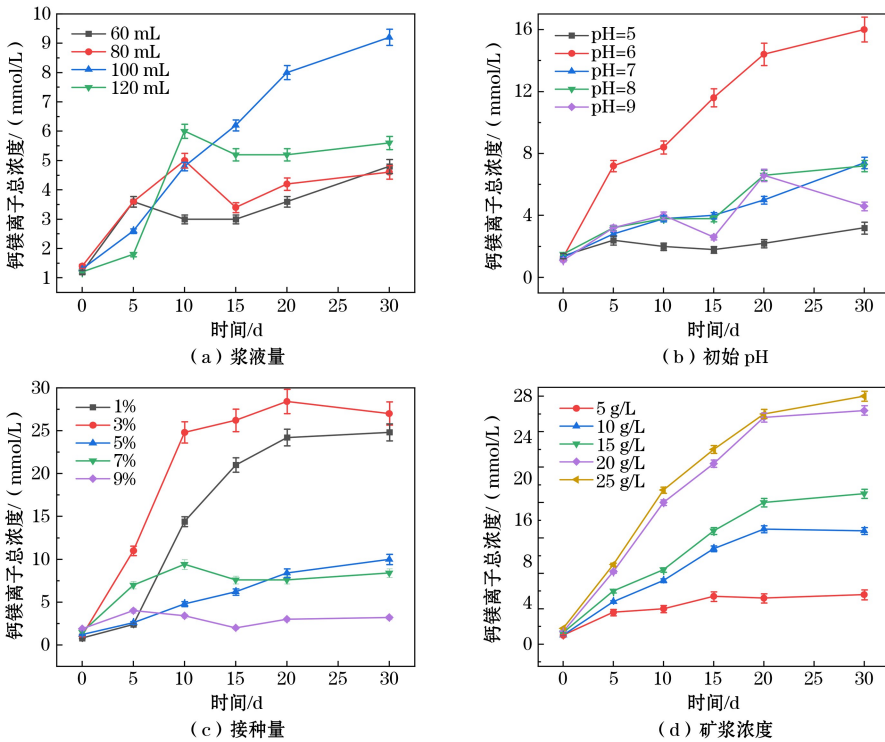


图 10 菌株 hzt-1' 浸矿条件优化

Fig.10 Optimization results of leaching conditions of strain hzt-1'

2.6 菌株 hzt-1' 浸矿试验

2.6.1 发酵液中 Ca²⁺、Mg²⁺ 浓度及 pH 随时间变化规律

在最佳浸矿条件下,探究发酵液中 Ca²⁺、Mg²⁺

浓度及 pH 随时间的变化规律,如图 11 所示。接菌组 pH 在 0~4 d 内迅速下降,这是由于细菌生长代谢产生了大量的有机酸,使发酵液体系 pH 降低,同时有机酸能促进钙长石中离子溶出,使得发酵液中的

Ca²⁺、Mg²⁺浓度迅速上升。4 d后 pH 趋于平缓,这是由于前期发酵液中的营养物质被大量消耗,剩余营养物质无法满足细菌生长,所以通过分解钙长石以获得生长所需元素,维持自身生长代谢,进而加快钙长石的分解,在此过程中,细菌生长速率下降,从而使得产生的有机酸速率也有所下降,Ca²⁺、Mg²⁺浸出率分

别达到 50.38%和 39.91%。而对照组中灭活细菌无法进行生长代谢,无法产生有机酸等代谢产物,导致对照组发酵液 pH 和 Ca²⁺、Mg²⁺浓度无明显变化。相对于无菌条件,经菌株 hzt-1'处理后的钙长石中 Ca²⁺、Mg²⁺浸出率分别提高了 12.14 倍和 19.19 倍,证明菌株 hzt-1'对钙长石中 Ca、Mg 元素有较好的浸出效果。

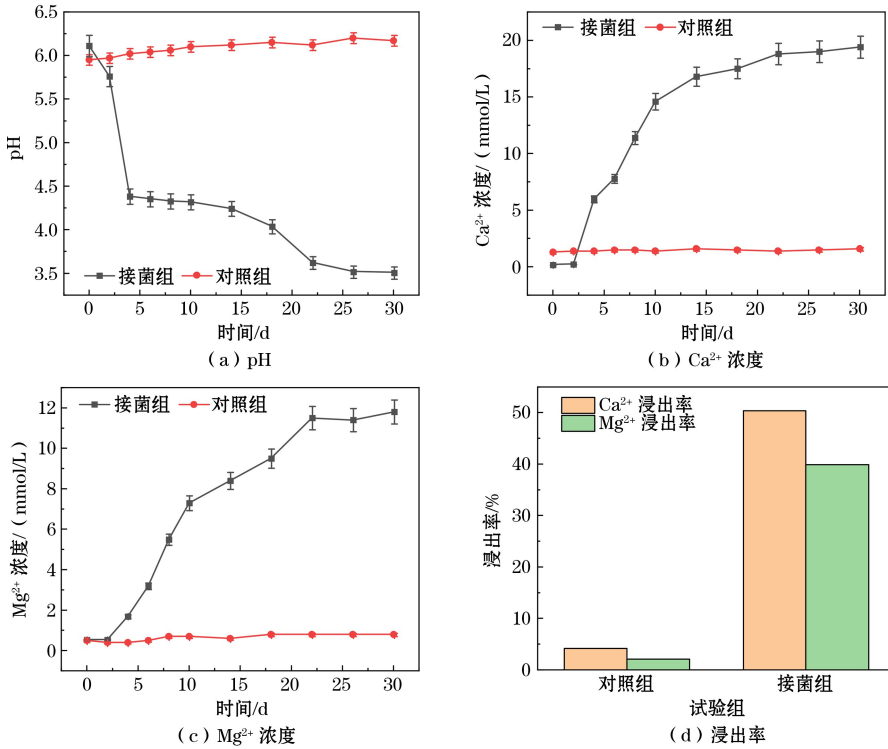


图 11 菌株 hzt-1'浸矿试验
Fig.11 Leaching test of strain hzt-1'

2.6.2 XRD 分析

在最佳浸矿条件下,菌株 hzt-1'浸矿前后的钙长石 XRD 图谱如图 12 所示。

由图 12 可知,经菌株 hzt-1'浸矿 30 d 后的钙长石特征峰明显减弱,SiO₂ 特征峰明显增强,证明在浸矿过程中产生了次生矿物 SiO₂,而灭活细菌处理的钙长石特征峰无明显变化,表明菌株 hzt-1'会对钙长石晶体结构造成破坏,对钙长石有分解作用。

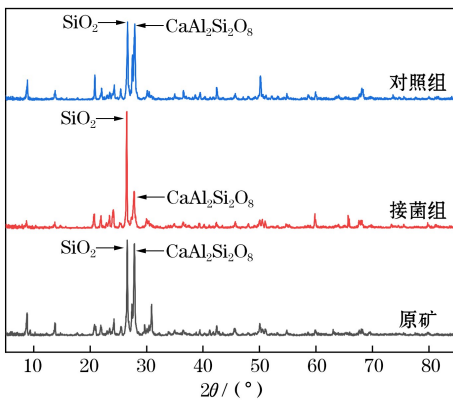


图 12 菌株 hzt-1'浸矿前后的钙长石 XRD 图谱
Fig.12 XRD patterns of anorthite before and after leaching by strain hzt-1'

2.6.3 FTIR 分析

在最佳浸矿条件下,菌株 hzt-1'浸矿前后的钙长石 FTIR 图谱如图 13 所示。由图 13 可知,经菌株 hzt-1'浸矿 30 d 后,浸矿残渣在波数为 1 137 cm⁻¹和 1 091 cm⁻¹处的 Si—O 伸缩振动峰,1 035 cm⁻¹和 1 021 cm⁻¹处的 Si(Al)—O 伸缩振动峰,777 cm⁻¹和 725 cm⁻¹处的 Si—Si 伸缩振动峰,648 cm⁻¹处的 Si—Al(Si)伸缩振动峰,606 cm⁻¹和 590 cm⁻¹处的 O—Si(Al)—O 弯曲振动峰以及 530 cm⁻¹处的 O—Si—O 弯曲振动与 Ca—O 伸缩振动耦合吸收峰均有不同程度的降低^[28],灭活细菌处理后的浸矿残

渣变化不明显,表明菌株 hzt-1'能破坏钙长石晶体结构中的化学键,从而导致钙长石的溶解。

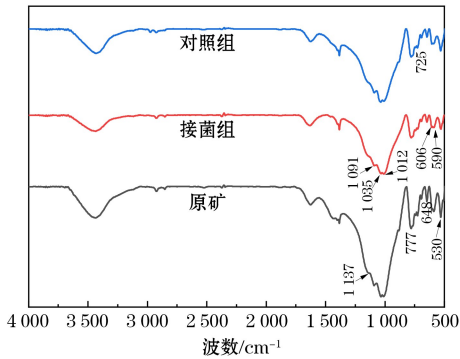


图 13 菌株 hzt-1'浸矿前后的钙长石 FTIR 图谱
Fig.13 FTIR spectra of anorthite before and after leaching by strain hzt-1'

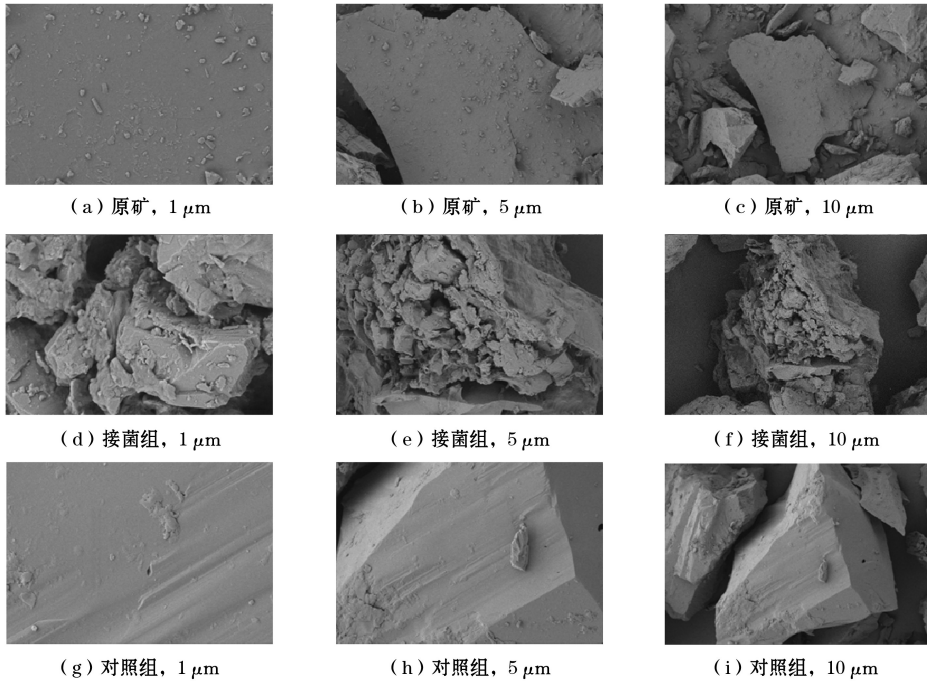


图 14 菌株 hzt-1'浸矿前后的钙长石表面形貌

Fig.14 Surface morphology of anorthite before and after leaching by strain hzt-1'

表 6 菌株 hzt-1'浸矿前后的钙长石表面元素组成

Table 6 Surface element composition of anorthite before and after leaching by strain hzt-1'

试验组	Ca	Mg	Al	Si	Fe
原矿	18.41	1.60	32.45	35.73	11.80
接菌组	0.09	0.73	22.18	76.44	0.57
对照组	4.96	2.60	21.03	70.63	0.79

2.7 浸矿机理分析

菌株 hzt-1'主要通过质子交换和络合作用促进钙长石溶解。菌株在生长代谢过程中产生有机酸、

2.6.4 SEM-EDS 分析

在最佳浸矿条件下,菌株 hzt-1'浸矿前后的钙长石表面形貌如图 14 所示,钙长石表面元素组成见表 6。经细菌接触后的钙长石表面出现明显孔隙以及裂痕,这是由细菌直接接触促进了钙长石的分解所导致的,且钙长石表面 Ca、Mg、Al 原子含量由 18.41%、1.60%、32.45%减少至 0.09%、0.73%、22.18%,Si 原子含量由 35.73%提升至 76.44%,而对对照组 Ca、Mg 原子含量下降不明显,且观察到矿物表面略有溶蚀痕迹,证明培养基对钙长石的溶解有一定的效果。经过菌株 hzt-1'处理后的钙长石中的 Ca、Mg 元素极大部分以离子形式浸出至发酵液中,显著加快了钙长石的溶解,Ca、Mg 元素的溶出在这一过程需经过 O—Si(Al)—O 的破坏,这与 XRD、FTIR 分析结果一致。

胞外多糖等代谢产物,加快了其对钙长石的酸解作用及络合作用,当该菌株与钙长石直接接触时,其表面结构和电性特征会附在矿物表面,对钙长石结构造成破坏,提高 Ca、Mg 等元素的释放速率,同时 Ca、Mg、Al、Si 等易与有机酸的羟基和羧基形成络合物,进而加速钙长石溶解。

3 结论

本试验从土壤中分离、纯化和筛选出一株能够有效浸出钙长石中 Ca、Mg 元素的优势菌株 hzt-1',经鉴

定为紫金牛叶杆菌 *Phyllobacterium myrsinacearum*, 探究了该菌株的生长特性及其对钙长石浸矿行为的影响,得出的主要结论如下。

(1) 菌株 hzt-1' 的最佳生长条件:葡萄糖 20 g/L (最佳碳源), NaNO_3 1 g/L (最适氮源), 初始 pH=6, 装液量 80 mL, 接种量 7%。

(2) 菌株 hzt-1' 的最佳浸矿条件:初始 pH=6, 接种量 3%, 矿浆浓度 20 g/L, 装液量 100 mL, 在该条件下, 钙长石中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的浸出率分别为 50.38%、39.91%。

(3) 菌株 hzt-1' 代谢产生的有机酸通过质子交换和络合作用促进了钙长石中 Ca、Mg 元素的浸出, 破坏钙长石的晶体结构。同时由于元素浸出行为差异, 钙长石表面形成次生矿物 SiO_2 。

参考文献 (References):

- [1] 邹才能, 陈艳鹏, 熊波, 等. 碳中和目标下中国新能源使命 [J]. 中国科学院院刊, 2023, 38(1): 48-58.
ZOU Caineng, CHEN Yanpeng, XIONG Bo, et al. Mission of new energy under carbon neutrality goal in China [J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2023, 38(1): 48-58.
- [2] 余建辉, 肖若兰, 马仁锋, 等. 国际贸易“碳中和”研究热点领域及其动向 [J]. 自然资源学报, 2022, 37(5): 1303-1320.
YU Jianhui, XIAO Ruolan, MA Renfeng, et al. Research hotspots and trends of carbon neutrality in international trade [J]. Journal of Natural Resources, 2022, 37(5): 1303-1320.
- [3] 马铭婧, 郝凤明, 凌江华, 等. 二氧化碳矿物封存技术研究进展 [J]. 生态学杂志, 2019, 38(12): 3854-3863.
MA Mingjing, XI Fengming, LING Jianghua, et al. Research progress on mineral carbonation of carbon dioxide [J]. Chinese Journal of Ecology, 2019, 38(12): 3854-3863.
- [4] 王国强, 李婷, 陈隽璐, 等. 中国西北地区超基性岩封存 CO_2 潜力研究 [J]. 西北地质, 2023, 56(1): 186-193.
WANG Guoqiang, LI Ting, CHEN Junlu, et al. Assessment of carbon dioxide sequestration potential of ultramafic rocks in northwest China [J]. Northwestern Geology, 2023, 56(1): 186-193.
- [5] SEIFRITZ W. CO_2 disposal by means of silicates [J]. Nature, 1990, 345(6275): 486.
- [6] 张亮, 温荣华, 耿松鹤, 等. CO_2 在玄武岩中矿物封存研究进展及关键问题 [J]. 高校化学工程学报, 2022, 36(4): 473-480.
ZHANG Liang, WEN Ronghua, GENG Songhe, et al. Mineral trapping of CO_2 in basalt rock: progress and key issues [J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2022, 36(4): 473-480.
- [7] 张兵兵, 王慧敏, 曾尚红, 等. 二氧化碳矿物封存技术现状及展望 [J]. 化工进展, 2021, 31(9): 2075-2083.
ZHANG Bingbing, WANG Huimin, ZENG Shanghong, et al. Current status and outlook of carbon dioxide mineral carbonation technologies [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2021, 31(9): 2075-2083.
- [8] 刘红霞, 廖传华, 朱跃钊. 二氧化碳矿物封存的研究进展 [J]. 中国陶瓷, 2010, 46(7): 9-14.
LIU Hongxia, LIAO Chuanhua, ZHU Yuezhao. Progress of carbon dioxide sequestration by mineral carbonation [J]. China Ceramics, 2010, 46(7): 9-14.
- [9] 王维富, 代群威, 沈瑞, 等. 土壤常驻霉菌对石灰岩的风化侵蚀作用研究: 以黑曲霉菌为例 [J]. 矿物学报, 2024, 44(4): 589-597.
WANG Weifu, DAI Qunwei, SHEN Rui, et al. Weathering and erosion of limestone by soil indigenous moulds: a case study of aspergillus niger [J]. Acta Mineralogica Sinica, 2024, 44(4): 589-597.
- [10] GERRITS R, POKHAREL R, BREITENBACH R, et al. How the rock-inhabiting fungus *K. petricola* A95 enhances olivine dissolution through attachment [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2020, 282: 76-97.
- [11] 陈未, 高岩, 何琳燕, 等. 细菌 *Ensifer adhaerens* M78 产胞外多糖对矿物风化的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2023, 29(5): 1226-1233.
CHEN Wei, GAO Yan, HE Linyan, et al. Effects of extracellular polysaccharide produced by *Ensifer adhaerens* M78 on mineral weathering [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2023, 29(5): 1226-1233.
- [12] 王远丽. 高效矿物风化细菌 *Pseudomonas azotoformans* F77 风化黑云母分子机制研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
WANG Yuanli. The molecule mechanisms of biotite-weathering mediated by a highly effective mineral weathering bacterium *Pseudomonas azotoformans* F77 [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020.
- [13] 赵江曼, 朱明龙, 张旭, 等. 硅酸盐细菌的筛选、鉴定和对铝硅酸盐矿物的作用研究 [J]. 高校化学工程学报, 2014, 28(5): 1036-1043.
ZHAO Jiangman, ZHU Minglong, ZHANG Xu, et al. The screening and identification of silicate bacteria and its interaction with aluminosilicate minerals [J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2014, 28(5): 1036-1043.
- [14] 张红芳, 何刚, 吴绿英, 等. 一株高效解钾脱硅真菌的筛选、鉴定及培养条件优化 [J]. 土壤, 2018, 50(5): 934-941.
ZHANG Hongfang, HE Gang, WU Lvyang, et al. Screening, identification and cultivated condition optimization of high efficiency potassium solubilization and desilication fungus strain [J]. Soils, 2018, 50(5): 934-941.
- [15] 常承兵, 刘生玉, 张雷, 等. 钙硅酸盐矿物湿法碳酸化封存二氧化碳实验研究 [J]. 无机盐工业, 2023, 55(9): 57-65.
CHANG Chengbing, LIU Shengyu, ZHANG Lei, et al. Experimental study on carbon dioxide sequestration by wet carbonation of calcium silicate minerals [J]. Inorganic Chemicals Industry, 2023, 55(9): 57-65.
- [16] 马炯政, 郭建英, 刘生玉, 等. *Ramichloridium apiculatum* 生长特性及其对钙长石中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浸出的研究 [J]. 过程工程学报, 2024, 24(8): 982-992.

- MA Jiongzheng, GUO Jianying, LIU Shengyu, et al. Growth characteristics of *Ramichloridium apiculatum* and its effect on Ca^{2+} and Mg^{2+} leaching from anorthite[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2024, 24(8): 982-992.
- [17] 赵咏梅. 微生物实验教程[M]. 西安: 陕西师范大学出版社, 2018.
- ZHAO Yongmei. Microbiology experiment tutorial[M]. Xi'an: Shanxi Normal University General Publishing House, 2018.
- [18] 吴丹, 胡莹露. EDTA 滴定法测水总硬度实验方法[J]. 实验室研究与探索, 2021, 40(6): 59-63+123.
- WU Dan, HU Yinglu. Experimental method of measuring the total hardness of water by EDTA titration[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2021, 40(6): 59-63+123.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- DONG Xiuzhu, CAI Miaoying. Handbook of systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [20] 马培培, 苏梦茹, 李鑫鑫, 等. 大肠埃希菌细菌计数分光光度计法的建立及应用[J]. 动物医学进展, 2020, 41(5): 29-33.
- MA Peipei, SU Mengru, LI Xinxin, et al. Establishment and application of escherichia coli counting method based on spectrophotometer[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(5): 29-33.
- [21] 田曼丽, 王杰. 微生物生长特性的试验研究[J]. 科学技术创新, 2021(8): 81-82.
- TIAN Manli, WANG Jie. Experimental study on microbial growth characteristics [J]. Scientific and Technological Innovation, 2021(8): 81-82.
- [22] 朱洪波, 彭永臻, 马斌, 等. 光源、氮源和碳源对紫色非硫细菌生长特性的影响[J]. 中国环境科学, 2019, 39(1): 290-297.
- ZHU Hongbo, PENG Yongzhen, MA Bin, et al. Effects of light, nitrogen and carbon on the growth characteristics of purple non-sulfur bacteria[J]. China Environmental Science, 2019, 39(1): 290-297.
- [23] 黄俊杰, 陆雅海. 土壤拟杆菌与梭菌分解多糖类有机物质的研究进展与展望[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1147-1157.
- HUANG Junjie, LU Yahai. Decomposition of soil polymeric organic matter by bacteroidetes and clostridia: progress and perspectives [J]. Microbiology China, 2022, 49 (3): 1147-1157.
- [24] 卢培利, 杨涵, 丁阿强, 等. 碳源与氮源限制下细菌代谢调节研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 946-962.
- LU Peili, YANG Han, DING Aqiang, et al. Metabolic regulation of bacteria with limited carbon and nitrogen sources [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63 (3): 946-962.
- [25] 董丽红, 陈甜妹, 曾荣, 等. 米糠固态发酵工艺优化及其酚类物质和抗氧化活性的影响[J]. 中国食品学报, 2024, 24(9): 333-343.
- DONG Lihong, CHEN Tianmei, ZENG Rong, et al. Optimization of solid-state fermentation technology and effect on phenolic profiles and antioxidant activities of rice bran[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(9): 333-343.
- [26] PANG Y R, ZHAO Y K, LI S L, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce limonene from waste cooking oil[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 241.
- [27] 孙德四, 万谦, 赵薪萍. 硅酸盐细菌 JXF 菌株浸矿脱硅条件研究[J]. 矿业研究与开发, 2008(3): 34-37.
- SUN Desi, WAN Qian, ZHAO Xinpeng. Study on the conditions of desilication for ore leaching with silicate strain JXF[J]. Mining Research and Development, 2008(3): 34-37.
- [28] 翁诗甫, 徐怡庄. 傅里叶变换红外光谱分析[M]. 第3版. 北京: 化学工业出版社, 2016.
- WENG Shifu, XU Yizhuang. Fourier transform infrared spectroscopy [M]. 3rd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2016.