

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (5) :607 -615; 4 May 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140360

赖氨酸芽孢杆菌 GW-2 菌株作用下碳钙镁石的形成

徐青龙, 李福春*, 张宠宏, 李学林

南京农业大学资环与环境科学学院, 江苏 南京 210095

摘要:【目的】微生物诱导碳酸盐矿物沉淀机理的研究有可能为 CO₂ 的矿物捕获提供科学依据。【方法】本研究在 Mg/Ca 为 2 的 B4 培养基中对赖氨酸芽孢杆菌 GW-2 菌株进行了为期 50 天的培养实验, 同时完成了一组无菌对照实验。在实验过程中, 对沉淀物重量、培养液的 pH 值、电导率及其中细菌数量、Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 浓度等进行了动态监测。利用扫描电子显微镜对矿物形态进行了跟踪观察, 利用 X-射线衍射仪对矿物成分进行了测定。【结果】(1) 在对 GW-2 菌株进行培养的过程中发现, 沉淀物的质量随着培养时间的延长而逐渐增加, 而在无菌对照实验中未收集到沉淀物; (2) 各时间段平均沉淀速率与细菌数量之间 ($r = 0.67, P < 0.05$)、沉淀物质量与培养液 pH 值之间 ($r = 0.79, P < 0.05$) 均具有显著的正相关关系; (3) 沉淀物质量与电导率、Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 浓度均呈极显著的负相关关系 (r 分别为 0.89、0.93 和 0.98, $P < 0.001$); (4) 在赖氨酸芽孢杆菌作用下, 3 种碳酸盐矿物按如下顺序先后形成: 非晶态碳酸钙→碳钙镁石→高镁方解石。【结论】(1) 赖氨酸芽孢杆菌 GW-2 菌株具有诱导碳酸盐矿物形成的能力; (2) 细菌数量是控制碳酸盐矿物沉淀的直接因素, 而较高的 pH 值是碳酸盐沉淀的必要条件; (3) 电导率以及 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 浓度的明显降低可以间接地指示碳酸盐矿物沉淀的发生; (4) 碳钙镁石可能主要是非晶态碳酸钙经过老化作用而形成, 碳钙镁石可能经脱镁作用转变为高镁方解石。

关键词: 赖氨酸芽孢杆菌, 碳钙镁石, 高镁方解石, 矿物捕获

中图分类号: Q938 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 05-0607-09

在解决温室气体所导致的环境问题时可供选择的途径主要有两条: 一是减排, 二是固定 (包括植物固定和地质封存)。相对而言, 地质封存更有现实意义。将 CO₂ 封存于地下的方式有物理封存 (以气态或超临界流体状态或溶解于水) 和化学捕获 (或称矿物捕获)。物理封存后 CO₂ 还有可能通过盖层

逃逸并造成环境事件^[1]。矿物捕获的实质是将大气 CO₂ 转化为方解石、白云石、菱镁矿以及菱铁矿等稳定碳酸盐矿物、进而达到长期固定的目的。矿物捕获被认为是潜在的减少 CO₂ 排放的中-长期尺度的技术, 挪威、英国、奥地利、韩国等多个国家已经启动了各自的碳捕获和封存 (CCS) 工程^[2]。但不

基金项目: 国家自然科学基金 (41172308); 中国科学院黄土与第四纪地质国家重点实验室开放课题 (SKLLQG1309); 中国科学院知识创新工程重大项目 (KZZD-EW-04-02)

* 通信作者。Tel: +86-25-84395014; E-mail: fchli@njau.edu.cn

作者简介: 徐青龙 (1989 -), 男, 贵州金沙人, 硕士研究生, 主要从事生物矿化方面的研究。E-mail: xql2012103025@163.com

收稿日期: 2014-07-13; **修回日期:** 2014-09-01

容忽视的问题是, CO_2 水化为 HCO_3^- 的过程相当缓慢^[3], 这使矿物捕获的效果大打折扣。联合国政府间气候变化专门委员会 (IPCC) 的专门报告指出, 自然的矿物捕获可能需要千年甚至更长的时间^[4]。微生物有可能利用自身特点加速这一进程, 特别是一些能够分泌碳酸酐酶的细菌可大大加快 CO_2 水化作用^[18]。近年来地下深处活跃微生物群落的发现使该项研究的意义得到进一步强化^[5-6]。

实验结果表明, 几乎所有微生物在适宜的条件下都具有诱导碳酸盐矿物形成的能力^[7]。此处所谓的适宜条件包括存在碳酸根离子。在已有的关于微生物促进碳酸盐矿物形成的报道中, 所有的实验均是在培养基中存在碳酸根离子的条件下进行的^[7-10]。研究还表明, 在有微生物存在的 Mg^{2+} - Ca^{2+} - CO_3^{2-} 体系中, 最常出现的矿物是含镁/高镁方解石, 与其同时或单独出现的还有文石、球文石、非晶态碳酸钙 (ACC) 和单水碳钙石^[11-13]。此外, 当以硫酸盐还原细菌^[14] 和产甲烷细菌^[8] 等微生物为实验材料时还有可能出现白云石。

碳钙镁石 [$\text{CaMg}_3(\text{CO}_3)_4$] 是 1953 年才被发现和描述的一种碳酸盐矿物^[15]。在地质记录中, 碳钙镁石主要存在于石灰岩和白云岩中^[15]。在近代和现代的野外样品中, 碳钙镁石主要发现于湖泊沉积物^[15-17] 和洞穴沉积物^[18] 中。在细菌培养实验产物中, 目前仅见 1 例出现碳钙镁石的报道: 在嗜盐细菌参与下, 在高 Mg/Ca 值 (>5) 的溶液中形成了白云石 + 碳钙镁石 + 方解石 + 水碳镁石的矿物组合^[9]。总之, 无论是模拟实验产物还是天然样品中, 碳钙镁石均不多见。这是因为其稳定性较差, 易转变为较为稳定的矿物相。

本文利用不含碳酸根离子的 B4 培养基对赖氨酸芽孢杆菌 (GW-2) 菌株进行了持续 50 d 的培养实验。作者在实验产物中检测到碳酸盐矿物, 尤其是其中出现了比较罕见的碳钙镁石。本文主要报道这一实验结果, 希望该研究结果能为进一步探讨微生物作用下碳酸盐矿物形成的机理提供科学线索。

1 材料和方法

1.1 培养基成分

细菌的富集、纯化均在 B4 培养基中进行。1 L 的液体培养基中含有 2.5 g 乙酸钙、4 g 酵母膏和

6.1 g 乙酸镁。利用 1 mol/L 的 NaOH 将上述培养基的 pH 值调至 8.0 (灭菌后 pH 降至 7.50 左右)。在液体培养基中加入 2% 的琼脂即得到固体培养基。固体培养基用于富集和纯化细菌, 液体培养基用于培养实验。

1.2 供试菌株特征

本文实验所用 GW-2 菌株——赖氨酸芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus* sp.) 为作者所在实验室保存菌种^[2]。GW-2 菌株的基本特征为: 在固体培养基上形成透明、隆起的菌落, 菌落直径约 1 mm, 表面光滑, 边缘整齐。菌体呈短杆状, 有中生芽孢, 大小约 $(0.4 - 0.7) \mu\text{m} \times (0.7 - 1.1) \mu\text{m}$ (图 1)。革兰氏染色呈阳性。

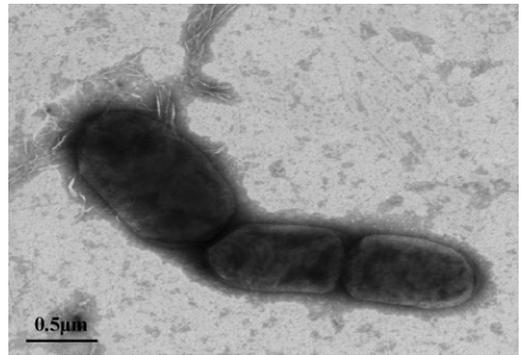


图 1. GW-2 菌株的 TEM 照片 (平板培养 48 h)

Figure 1. TEM image of strain GW-2.

1.3 培养实验方法

在装有 90 mL 液体培养基的若干三角瓶中分别加入 10 mL 的接种液制成培养液。经测定, 1 mL 培养液中含有大约 2.47×10^6 CFU 的细菌细胞。将上述三角瓶置于恒温培养箱中, 在 30°C 条件下进行静置培养。每隔一定时间结束一个实验, 直至第 50 天。实验结束后用离心法将液相和固相分离, 分别进行相关指标的测定。在细菌培养实验的同时, 本文完成了一组无菌对照实验。

1.4 主要的观察和测定方法

采用稀释平板法对细菌进行计数。使用万分之一电子天平称量沉淀物的质量。使用 pHS-3C 型 pH 计和 DDB-303A 电导率仪分别测定培养液的 pH 值和电导率。利用 Thermo-6000 电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES) 测定培养液中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度。利用 H-7650 型透射电子显微镜 (TEM) 观察菌体形态。制样方法: 将平板上的单菌落悬浮于双蒸水中, 将悬浮液滴于铜网上, 然后加磷钨酸 (PTA) 负

染 10 s, 待样品自然晾干后上机观察。利用扫描电子显微镜 (SEM) 对矿物的形态进行观察。制样方法: 将固相产物用蒸馏水清洗 3 次, 用 100% 酒精浸泡后滴加于样品台上, 自然风干后喷上约 8 nm 厚的金膜。利用理学 Dmax-B 型 X-射线衍射仪 (XRD) 测定固相产物的矿物成分。制样方法为: 用滴管将沉淀物涂在载玻片上, 自然风干。测定条件: Cu 靶, $K\alpha$, 管压 35 kV, 管流 20 mA, $2^\circ/\text{min}$, 步长 0.02° , 测定范围 $10 - 60^\circ$ 。

2 结果和讨论

2.1 细菌数量的变化

GW-2 菌株在整个培养实验过程中生长良好, 其菌体数量总体上呈现先升高后降低的趋势, 最大值出现在培养实验开始后的第 2 天 (图 2), 此时的菌体数量约为 2.57×10^7 CFU/mL。此后, 随着培养时间的延长, 菌体数量逐渐降低。

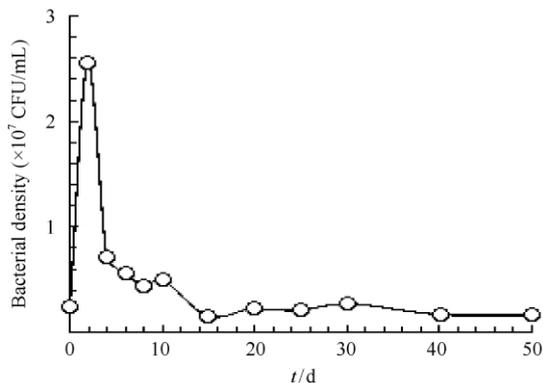


图 2. 细菌数量的动态变化

Figure 2. Temporal change of the bacterial density.

2.2 培养液 pH 值和电导率的变化

在培养实验过程中, 培养液 pH 值变化于 7.16 - 8.81 之间。总体趋势是: 在初始阶段呈现小幅度降低, 之后逐渐升高 (图 3-A)。培养液的电导率总体上呈降低趋势。其中, 第 15 天之前其变化幅度较小, 第 15 - 20 天快速降低, 第 20 天以后缓慢降低直至第 50 天实验结束 (图 3-B)。与之形成鲜明对照的是, 无菌实验的 pH 值和电导率基本上未变化。

2.3 培养液中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度的变化

培养液中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度大体上与电导率同步变化。第 15 天之前呈现出缓慢降低的趋势, 第 15 天以后快速降低, 直至实验结束。无菌

对照实验的溶液中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度则基本稳定 (图 4)。

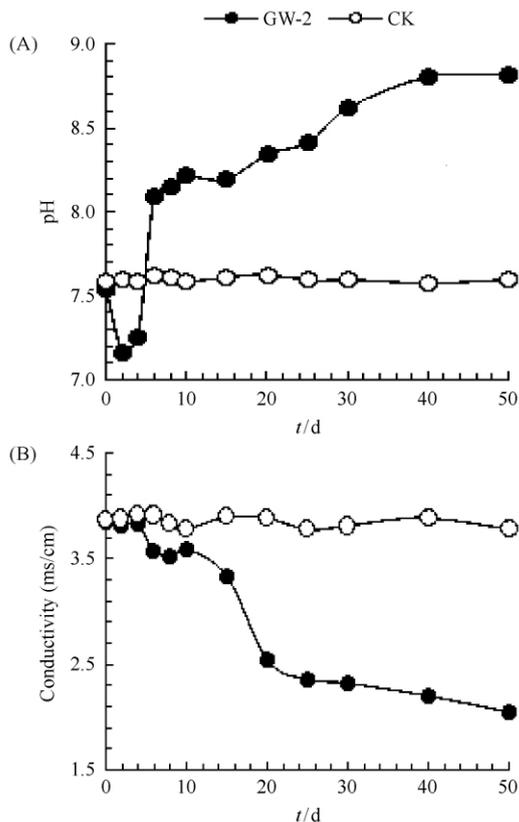


图 3. 培养液 pH 值 (A) 和电导率 (B) 的动态变化

Figure 3. Temporal changes of the pH value (A) and the electrical conductivity (B) in the medium.

2.4 碳酸盐矿物的种类和形态

随着培养时间的延长, 沉淀物的质量逐渐增加, 尤其是第 30 天之后增加比较明显 (图 5)。SEM 观察结果表明, 在 GW-2 菌株作用下形成的碳钙镁石以球状为主, 高镁方解石以板状为主 (图 6)。XRD 结果表明, 第 15 天之前的沉淀物未显示出明显的衍射峰, 仅在大约 $15 - 35^\circ (2\theta)$ 之间出现一个宽峰 (图 7-A)。作者推测, 第 15 天之前形成的沉淀物可能以 ACC 为主。第 20、25 和 30 天, 沉淀物的 d 值均在 0.282 nm 左右, 说明 GW-2 菌株诱导形成了碳钙镁石。当培养实验进行至第 40 天和 50 天时, 实验产物中不再出现碳钙镁石, 取而代之的是方解石 (图 7-B), 其 d 值在 0.301 nm 左右。利用 Bischoff (1985) 提出的经验公式: $\text{MgCO}_3 (\text{mol}\%) = [-363.96d + 1104.05]^{[19]}$, 其中 d 代表钙-镁碳酸盐矿物 (104) 晶面衍射峰的 d 值 (单位为 \AA)。计算结果

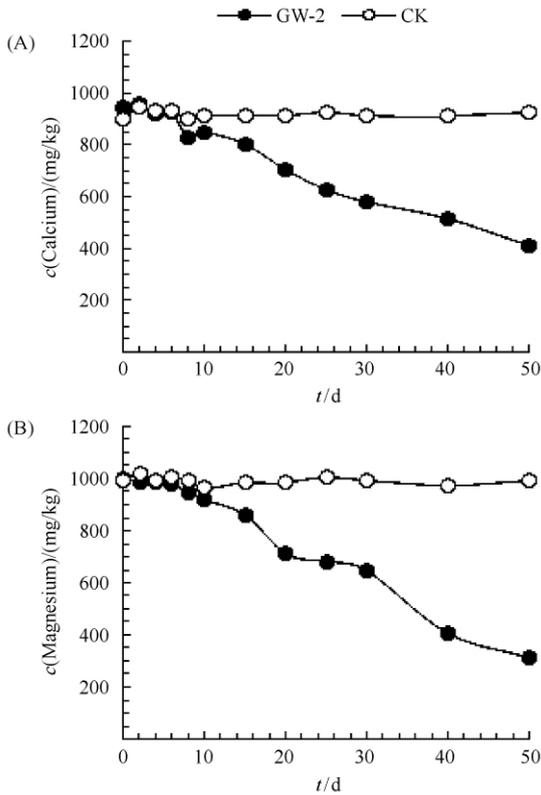


图 4. 培养液中 Ca^{2+} 浓度和 Mg^{2+} 浓度的动态变化
Figure 4. Temporal changes of calcium (A) and magnesium (B) concentration in the medium.

表明,方解石中含有大约 10 (mol) % 的 MgCO_3 , 为高镁方解石亚种; 碳钙镁石中 MgCO_3 的含量在 80 (mol) % 左右 (表 1), 属于比较典型的碳钙镁石 (标准化学式为 $\text{CaMg}_3(\text{CO}_3)_4$, 即 MgCO_3 的摩尔百分含量为 75%)。

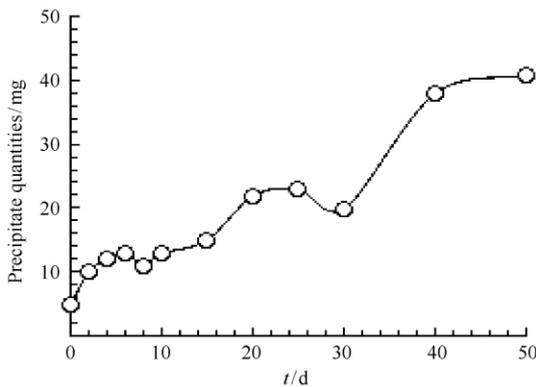


图 5. 沉淀物质量的动态变化
Figure 5. Temporal change of the precipitate quantity in the medium.

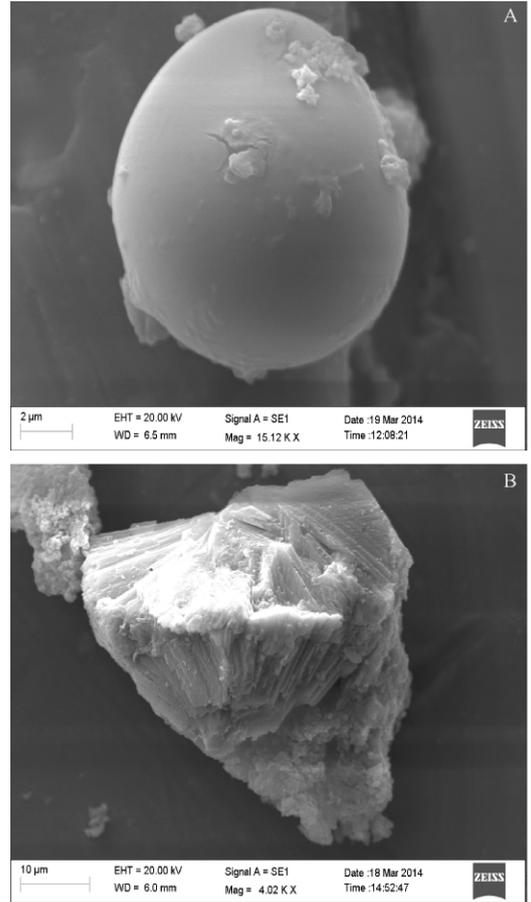


图 6. 碳酸盐矿物的扫描电子显微镜照片

Figure 6. Scanning electron microscope images of carbonate minerals. A: 30d, spherical mineral; B: 50 d, platy mineral.

表 1. 碳酸盐矿物中 MgCO_3 的含量

Table 1. The contents of MgCO_3 in carbonate minerals

t/d	Mineral	MgCO_3 (mol%)
1-15	ACC	-
20	Huntite	79.39
25	Huntite	79.58
30	Huntite	78.85
40	High-Mg calcite	9.44
50	High-Mg calcite	10.17

“-” indicates lack of datum.

3 讨论和结论

3.1 碳酸盐矿物沉淀的控制因素分析

上述实验结果表明,在 GW-2 菌株作用下形成了碳酸盐矿物,而在无菌对照实验中则未收集到沉淀物。这充分地说明,赖氨酸芽孢杆菌 GW-2 菌株

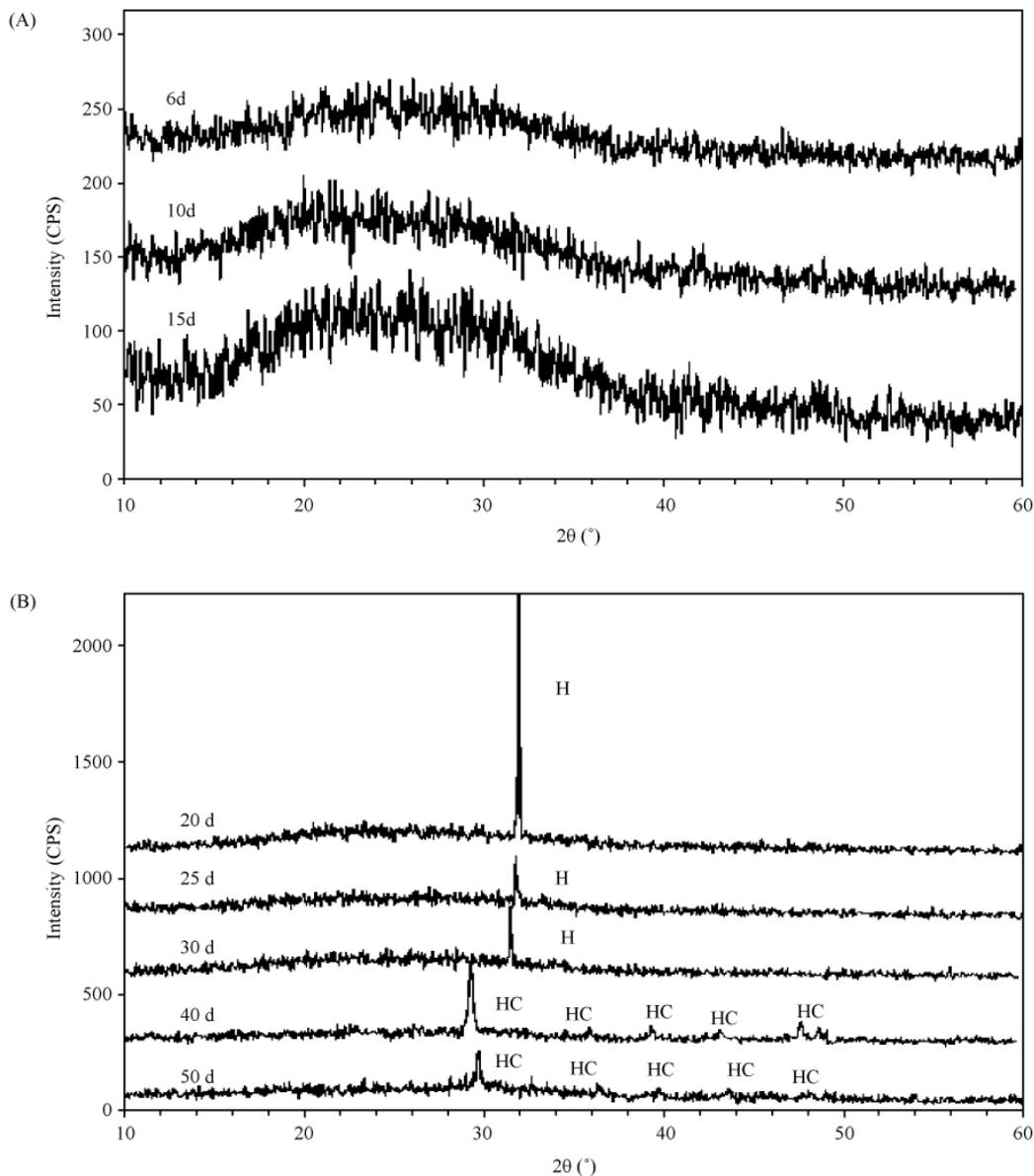


图 7. 沉淀物的 XRD 图谱

Figure 7. X-ray diffraction patterns of precipitates. A: 6 d, 10 d, 15 d; B: 20 d, 25 d, 30 d, 40 d, 50 d; H: Huntite; HC: High-Mg calcite

具有诱导碳酸盐矿物形成的能力。为了揭示碳酸盐矿物沉淀的控制因素,我们对一些测定指标之间的相关性进行了分析。首先,各时间段平均沉淀速率与细菌数量呈显著的正相关关系(相关系数 $r = 0.67$, $P < 0.05$, 图 8);其次,沉淀物质量与培养液 pH 值具有显著的正相关关系($r = 0.79$, $P < 0.05$, 图 9-A);再次,沉淀物质量与电导率、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度均呈极显著的负相关关系, r 分别为 0.89、0.93 和 0.98 ($P < 0.001$, 图 9-B, 图 9-C, 图 9-D),这说明:电导率、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度的明显降低可以间接地指示

碳酸盐矿物沉淀的发生。

沉淀物质量与培养液 pH 值以及各时间段平均沉淀速率与细菌数量之间均呈正相关关系可能暗示了,细菌数量可能是控制碳酸盐沉淀的主要因素,而 pH 值直接影响碳酸盐沉淀的过程:pH 值越高,对碳酸盐矿物沉淀越有利。从图 3-A 可以看出,在初始阶段,培养液 pH 值呈现小幅度降低,之后逐渐升高。主要有两种机制可以导致 pH 值降低:(1) 细菌新陈代谢分泌低分子量有机酸;(2) CO_2 溶于水以及后来生成 CaCO_3 沉淀的系列反应: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$

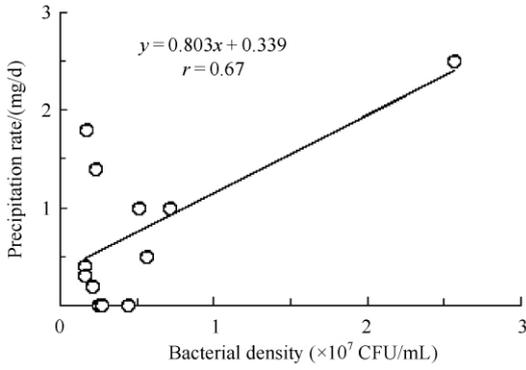


图 8. 细菌数量与各时间段平均沉淀速率的相关性

Figure 8. The correlation between bacterial density and average precipitation rate.

$\text{H}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$; $\text{H}_2\text{CO}_{3(\text{aq})} \rightarrow \text{HCO}_3^-(\text{aq}) + \text{H}^+$; $\text{HCO}_3^-(\text{aq}) \rightarrow \text{CO}_3^{2-}(\text{aq}) + \text{H}^+$; $\text{CO}_3^{2-}(\text{aq}) + \text{Ca}^{2+}(\text{aq}) \rightarrow \text{CaCO}_{3(\text{s})}$ 。在第二种机制中,涉及到 CO_2 的来源问题。其来源可能包括细菌呼吸作用产生的 CO_2 和来自于空气的 CO_2 。本文的研究结果暂时不能对其具体来源进行判断。以下两种机制可能会导致 pH 值升高:(1) 死亡的细菌自溶;(2) 细菌消耗有机氮源并产生氨气,氨气溶于水释放出 OH^- [11]。在实验过程中,上述 4 种机制可能同时存在,但前两种机制在初始阶段可能占主

导地位,而中晚阶段则以后两种机制为主导,导致 pH 值逐渐升高,这为碳酸盐沉淀提供了必要的物理化学条件。

3.2 碳钙镁石的形成及其成因分析

实验结果表明,在 GW-2 菌株的作用下,在不同阶段的实验产物中分别出现了 ACC、碳钙镁石和高镁方解石。其中,ACC 为不稳定相,碳钙镁石为亚稳定相,高镁方解石是在类似体系中常见的、比较稳定的矿物相。研究表明,无论是天然样品还是模拟实验产物中,碳钙镁石总是与其他钙和镁的碳酸盐矿物共存,例如高镁方解石、白云石、水菱镁矿和菱镁矿等。研究者根据湖泊沉积物中各种矿物的空间关系推测,随着 Mg/Ca 值的增加,矿物沉淀的顺序可能是:高镁方解石→白云石→碳钙镁石→水菱镁矿 [17, 20]。到目前为止,对于在一定的 Mg/Ca 值条件下各种矿物形成的先后顺序问题还极少涉及。本文的 XRD 结果清楚地表明,下列 3 种矿物在 Mg/Ca 值为 2 的条件下按一定顺序沉淀:ACC→碳钙镁石→高镁方解石。

3.2.1 ACC 的形成: 增大/维持碳酸根浓度是碳酸盐沉淀的前提条件。在通常的物理化学条件下, CO_2 水化为 HCO_3^- 的过程 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ +$

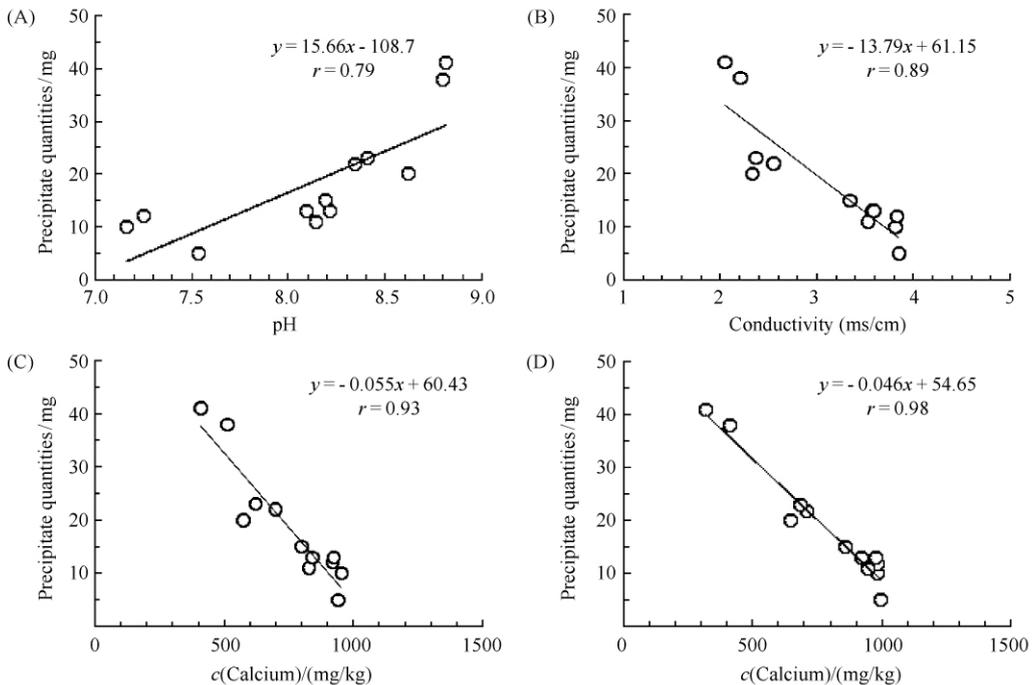


图 9. 沉淀物质量与 pH 值 (A)、电导率 (B)、 Ca^{2+} 浓度 (C) 和 Mg^{2+} 浓度 (D) 的相关性

Figure 9. The correlations between precipitate quantities and the pH value (A), the electrical conductivity (B), calcium concentration (C) and magnesium concentration (D).

HCO_3^- 是 CO_2 转变为 CO_3^{2-} 的限速步骤, 该过程相当缓慢 ($\approx 1.3 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[3, 21]。但微生物有可能利用自身特点加速这一进程, 特别是一些能够分泌碳酸酐酶的细菌可大大加快 CO_2 水化作用 (约提高 10^7 倍, 达到 $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$)^[3, 22]。在通常的地质环境中, ACC 在热力学上属于不稳定的相, 一般会很快地转变为亚稳态或稳定态矿物。因而 ACC 被认为是碳酸盐矿物的前驱相^[23]。但近年来的研究发现, 有机质或 Mg^{2+} 的存在可以增强 ACC 的稳定性^[23]。这可以用来解释本文实验 (含 Mg^{2+} 的微生物体系) 中存在 ACC 的原因。

3.2.2 碳钙镁石的形成: 研究表明, 碳钙镁石既可以从富镁溶液中直接沉淀, 也可以通过富镁的水溶液与先期形成的前驱物反应而形成^[24]。尽管本文中碳钙镁石的形成途径很难确定, 但我们认为, 碳钙镁石主要是通过 ACC 与含镁的培养液反应而形成: (1) ACC 通常为球形, 而本文实验中观察到的碳钙镁石也以球形为主, 这可能是它继承了 ACC 的形态; (2) 碳钙镁石形成时期 (第 20 - 30 天) 未见 ACC 存在的迹象。

3.2.3 高镁方解石的形成: 结晶作用和老化作用都可能是本文实验中高镁方解石形成的有效途径。碳钙镁石含有的开放结构有利于镁的脱水和水化^[25]。因而, 碳钙镁石具备通过镁的水化 (而进入溶液) 转变为高镁方解石的结构条件。另外, 碳钙镁石的沉淀导致溶液中 Mg/Ca 比降低, 这有利于在实验的晚阶段形成方解石。因为在 Mg/Ca 值较高时, Mg^{2+} 吸附在方解石雏晶表面而在动力学和热力学上限制其进一步生长^[25-26]。但是, 如果高镁方解石是直接由溶液中结晶形成的, 那么实验产物中应该同时存在碳钙镁石和高镁方解石。据此我们推测, 高镁方解石很可能是碳钙镁石发生结构转变而形成的。

研究表明, 碳钙镁石通常形成于白云石沉淀之前^[25]。因此, Lippmann (1973) 认为碳钙镁石可以作为白云石的前驱相。本文中出现的有一种有意思的现象是, 实验产物中出现了富镁的碳钙镁石和富钙的高镁方解石, 却未发现在化学成分上介于二者之间的白云石。这有可能暗示着, 在本文实验条件下, 白云石的稳定性不及碳钙镁石。换言之, 碳钙镁石不大可能是白云石的前驱相。这些信息对于解决“白云石问题”具有一定的参考价值。

3.3 结论

根据上述的实验结果和讨论, 可以得到以下几点初步结论或认识。

(1) 赖氨酸芽孢杆菌 GW-2 菌株可以在不含碳酸根的培养基中诱导形成碳酸盐矿物。细菌可能通过分泌的碳酸酐酶加速 CO_2 的水化作用进而促进碳酸盐矿物的沉淀。这一结果有利于深化研究 CO_2 的矿物捕获机理及其在实践中的推广应用。

(2) 各时间段平均沉淀速率与细菌数量之间、沉淀物质量与培养液 pH 值之间均具有显著的正相关关系 (r 分别为 0.67 和 0.79, $P < 0.05$)。这说明, 细菌数量可能是控制碳酸盐沉淀的主要因素, 而 pH 值直接地影响碳酸盐沉淀的过程。细菌在新陈代谢过程中利用有机氮源并最终生成 NH_4^+ 和死亡细菌的自溶可能是导致培养液 pH 值升高和碳酸盐矿物沉淀的直接原因。

(3) 沉淀物质量与电导率、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度均呈极显著的负相关关系 (r 分别为 0.89、0.93 和 0.98, $P < 0.001$) 说明, 电导率、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度的明显降低可以间接地指示碳酸盐矿物沉淀的发生。

(4) 在赖氨酸芽孢杆菌作用下, 在 Mg/Ca 比较低 (2) 的 B4 培养基中先后形成 ACC、碳钙镁石和高镁方解石。碳钙镁石主要是通过 ACC 与含镁的溶液反应而形成, 高镁方解石则很可能是碳钙镁石中镁离子发生水化而形成的。碳钙镁石经过脱镁作用直接形成高镁方解石而未经过白云石阶段。这说明, 碳钙镁石可能不是白云石的前驱相。

参考文献

- [1] Ebigho A, Class H, Helmig R. CO_2 leakage through an abandoned well: Problem-oriented benchmarks. *Computational Geosciences*, 2007, 11 (2): 103-115.
- [2] Carroll AG, Przeslawski R, Radke LC, Black JR, Picard K, Moreau JW, Haese RR, Nichol S. Environmental considerations for subseabed geological storage of CO_2 : A review. *Continental Shelf Research*, 2014, 33: 117-123.
- [3] Li W, Chen WS, Zhou PP, Zhu SL, Yu LJ. Influence of initial calcium ion concentration on the precipitation and crystal morphology of calcium carbonate induced by bacterial carbonic anhydrase. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 218: 65-72.
- [4] IPCC. Special report on carbon dioxide capture and storage. 2005.

- [5] Dong HL, Yu BS, Lv G. Recent developments in Geomicrobiology. *Geological Review*, 2009, 55 (4) : 561–563. (in Chinese)
董海良, 于炳松, 吕国. 地质微生物学中几项最新研究进展. *地质论评*, 2009, 55 (4) : 561–563.
- [6] Millo C, Dupraz S, Ader M, Guyot F, Thaler, Foy E, Menez B. Carbon isotope fractionation during calcium carbonate precipitation induced by ureolytic bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2012, 98 : 107–124.
- [7] Boquet E, Boronat A, Ramos-Cormenzana A. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature*, 1973, 246 : 527–529.
- [8] Roberts JA, Bennett PC, Gonzalez LA, Macpherson, GL, Milliken, KL. Microbial precipitation of dolomite in methanogenic groundwater. *Geology*, 2004, 32 : 277 – 280.
- [9] Sánchez-Román M, Romanek CS, Fernández-Remolar DC, Sánchez-Navas A, McKenzie JA, Pibernat RA, Vasconcelos C. Aerobic biomineralization of Mg-rich carbonates: Implications for natural environments. *Chemical Geology*, 2011, 281 : 143–150.
- [10] Wright DT, Wacey D. Precipitation of dolomite using sulphate reducing bacteria from the Coorong Region, South Australia: Significance and implications. *Sedimentology*, 2005, 52 : 987–1008.
- [11] Li FC and Guo WW. Three kinds of aerobic bacteria induced mineralization of calcium carbonate. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 2013, 49 (6) : 665–672. (in Chinese)
李福春, 郭文文. 三种好氧细菌诱导碳酸钙矿物的形成. *南京大学学报(自然科学版)*, 2013, 49 (6) : 665–672.
- [12] Buczynski C, Chafetz HS. Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy. *Journal of Sedimentary Research*, 1991, 61 (2) : 226–233.
- [13] Guo WW, Ma H, Li FC, Jin ZD, L J, Ma F, Wang C. *Citrobacter* sp. strain GW-M mediates the coexistence of carbonate minerals with various morphologies. *Geomicrobiology Journal*, 2013, 30 : 749–757.
- [14] Van Lith Y, Warthmann R, Vasconcelos C, Mckenzie JA. Sulphate-reducing bacteria induce low-temperature Ca-dolomite and high Mg-calcite formation. *Geobiology*, 2003, 1 (1) : 71–79.
- [15] Akbulut A, Kadir S. Huntite deposits in the neogene lacustrine sediments of the Cameli basin, Denizli, SW Turkey. *Carbonates and Evaporates*, 2003, 18 (1) : 1–9.
- [16] Alcicek, Huelya. Late Miocene nonmarine sedimentation and formation of magnesites in the Acigol Basin, southwestern Anatolia, Turkey. *Sedimentary Geology*, 2009, 219 (1–4) : 115–135.
- [17] Müller G, Irion G, Förstner U. Formation and diagenesis of inorganic Ca-Mg carbonates in the lacustrine environment. *Naturwissenschaften*, 1972, 59 (4) : 158–164.
- [18] Jones, Brian. Speleothems in a wave-cut notch, Cayman Brac, British West Indies: The integrated product of subaerial precipitation, dissolution, and microbes. *Sedimentary Geology*, 2010, 232 (1–2) : 15–34.
- [19] Bischoff WD. Magnesian calcites: Physical and chemical properties and stabilities in aqueous solution of synthetic and biogenic phases. *Evanston: Northwestern University*, 1985.
- [20] Casas J, Martín de Vidales, JL, Durán JJ, López Martínez J, Barea J. Mineralogía de depósitos tipo moonmilk en la Cueva de Nerja (Málaga, España) . *Geogaceta*, 2001, 29 : 29–32.
- [21] Kim IG, Jo BH, Kang DG. Biomineralization-based conversion of carbon dioxide to calcium carbonate using recombinant carbonic anhydrase. *Chemosphere*, 2012, 87 : 1091–1096.
- [22] Mirjafari P, Asghari K, Mahinpey N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO₂ sequestration purposes. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2007, 46 : 921–926.
- [23] Ni J, Zhou GT. Formation and stabilization of amorphous calcium carbonate modified by phosphatidylcholine. *Earth Science Frontiers*, 2008, 15 (6) : 84–85. (in Chinese)
倪杰, 周根陶. 生物膜脂参与的非晶碳酸钙形成和稳定. *地学前沿*, 2008, 15 (6) : 84–85.
- [24] Dollase, Reeder. Crystal-structure refinement of Huntite, CaMg₃(CO₃)₄, with X-ray-powder data. *American Mineralogist*, 1986, 71 (1–2) : 163–166.
- [25] Lippmann F. *Sedimentary Carbonate Minerals*. Berlin: Springer Verlag, 1973.
- [26] Raz S, Weiner S, Addadi L. Formation of high-magnesian calcites via an amorphous precursor phase: Possible biological implications. *Advanced Materials*, 2000, 12 : 38–49.

Formation of huntite by *Lysinibacillus* sp. GW-2 strain

Qinglong Xu, Fuchun Li^{*}, Chonghong Zhang, Xuelin Li

College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We studied the formation of carbonate minerals induced by microorganism to explore the possibility of mineral capture. [Methods] Culture experiments of carbonate precipitation were done using B4 medium with 6:1 molar ratio of Mg/Ca for 50 days. The same medium without inoculation was used as the control. During the cultivation, bacterial density, precipitate quantities, pH and conductivity of the medium, calcium and magnesium concentration were determined. The morphologies of precipitated carbonates were observed using scanning electron microscopy, and mineral species of carbonate were determined by X-ray diffraction. [Results] The main results were: (1) In the inoculation process of the *Lysinibacillus* sp. (GW-2 strain), we found that precipitate quantities were gradually increased with time, while precipitate was not collected in the aseptic experiments; (2) There were significant positive correlations between bacterial density and average precipitation rate ($r = 0.67$, $P < 0.05$), precipitate quantities and pH value ($r = 0.79$, $P < 0.05$); (3) Precipitate quantities negatively correlated with conductivity, Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration with correlation coefficients r of 0.89, 0.93, 0.98 ($P < 0.001$), respectively; (4) The three carbonate minerals by *Lysinibacillus* sp. formed according to following trend: amorphous calcium carbonate \rightarrow Huntite \rightarrow High-Mg calcite. [Conclusions] The main conclusions were: (1) *Lysinibacillus* sp. (GW-2 strain) might induce the formation of carbonate minerals precipitation; (2) The bacterial density directly affected the precipitation of carbonate minerals, whereas pH value indirectly controlled the precipitation of carbonate minerals; (3) Decreased of conductivity, calcium and magnesium concentration of the medium could indirectly indicate the occurrence of carbonate precipitate; (4) Huntite might be formed through ageing of amorphous calcium carbonate, whereas high-Mg calcite might be formed through demagnesium of the huntite.

Keywords: *Lysinibacillus* sp., huntite, high-Mg calcite, mineral capture

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41172308) and by the Open Project of the State Key Laboratory of Loess and Quaternary Geology (SKLLQG1309) and by the Knowledge Innovation Project of The Chinese Academy of Sciences (KZZD-EW-04-02)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-25-84395014; E-mail: fchli@njau.edu.cn

Received: 13 July 2014 / Revised: 1 September 2014