

不同培养条件对胶质芽孢杆菌诱导碳酸钙晶体形成的影响

周雪莹¹, 杜叶¹, 连宾^{2*}

(¹南京市微生物工程技术研究中心, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 南京师范大学生命科学院, 南京 210046)

(²中国科学院地球化学研究所, 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002)

摘要:【目的】研究不同培养条件对胶质芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*) 菌体形态、数量和分泌的碳酸酐酶 (CA 酶) 活性的影响, 以及不同方式培养的菌体与碳酸钙晶体的生长及其形貌、数量之间的联系。【方法】分别采用无氮和有氮培养基培养胶质芽孢杆菌, 进行菌体形态、数量及 CA 酶活性的比较, 收集不同培养方式的菌体加入碳酸钙结晶体系中以研究细菌与碳酸钙晶体形成的联系。【结果】在无氮培养条件下, 胶质芽孢杆菌数量少、荚膜肥厚, 细菌培养液 CA 酶活力较低; 有氮培养条件下, 菌体数量多、荚膜单薄, 细菌培养液 CA 酶活力较高。在碳酸钙结晶体系中加入无氮培养的菌体, 生成的碳酸钙晶体表面光滑, 体积较大但数量较小, 加入有氮条件下培养的菌体形成的碳酸钙晶体表面粗糙, 数量大但体积较小。【结论】不同培养条件能够引起胶质芽孢杆菌菌体数量、荚膜多糖及 CA 酶活的明显差异, 进而对碳酸钙晶体的生成和形貌产生影响。

关键词: 胶质芽孢杆菌; 碳酸酐酶; 碳酸钙; 晶体生长

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0955-07

自然界中微生物与矿物间的相互作用广泛存在。微生物生长繁殖及代谢活动不仅可以风化矿物, 还起到富集、转化和迁移矿物元素的作用。碳酸钙是岩石、建筑混凝土、动物甲壳和牙齿等的重要组成部分, 也是生物矿化的重要产物之一, 它还是材料学、矿物学、生物学和医学领域长期以来较受关注的研究对象^[1]。生物矿化材料有着独特的形成方式和结构, 揭示其形成过程和作用机理, 无疑可为材料的人工合成提供新的研究思路 and 手段。近年来, 生物矿化研究已逐渐进入到仿生模拟阶段, 通过添加生物提取物质或人工合成物质, 控制合成出特殊晶型的碳酸钙晶体^[2]。国外一些研究机构还开始尝试利用微生物的矿化作用在混凝土表面进行覆膜防护^[3-5]。已有研究发现, 微生物可以有效修复历史

文物及建筑物的风化表层并形成防护层从而保护历史建筑遗产^[6], 利用细菌诱导成矿对重要历史建筑物裂缝进行填充修复, 因其具有破坏性小和环境友好等特点有着广泛的应用前景^[7]。此外, 细菌诱导矿化在重金属污染治理、砂土工程性能改良等方面也已引起研究者的广泛关注^[8-9]。

胶质芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*), 通常称硅酸盐细菌, 是一株分离自土壤的具有溶磷解钾作用的革兰氏阴性菌, 能够生物固氮, 胞外有肥厚的荚膜, 可形成菌胶团, 在生长过程中可分泌大量胞外多糖和蛋白质^[10-11]。目前已在微生物肥料中广泛使用, 在重金属污水处理等方面也有应用潜力^[12-14]。已有研究证实, 多糖、蛋白质等有机质能够在很大程度上控制和影响碳酸钙晶体的形成过程, 如成核、晶

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973 项目”(2006CB403200); 国家自然科学基金项目(40773069)

* 通信作者: Tel: +86-851-5895148. E-mail: bin2368@vip.163.com

作者简介: 周雪莹 (1985-), 女, 安徽人, 主要从事环境微生物的研究。E-mail: zhouxueying1985@163.com

收稿日期: 2009-12-09; 修回日期: 2010-04-14

体取向和生长习性等^[15-16]。胶质芽孢杆菌能够分泌碳酸酐酶(CA),而CA具有加速 CO_2 水合生成 HCO_3^- 的特性^[17-18],因而在自然条件下该菌有可能对碳酸钙的沉积施加影响,但目前尚未见有胶质芽孢杆菌及其胞外分泌物在碳酸钙晶体形成和生长过程中作用的研究报道。开展这项工作对拓展胶质芽孢杆菌的研究范围,进一步了解细菌诱导矿化的作用过程和机理以及探讨自然界碳酸钙形成的微生物成因机制具有一定的意义。本文研究了不同培养条件对胶质芽孢杆菌诱导碳酸钙晶体生成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及培养基:胶质芽孢杆菌来自本实验室保藏,生长培养基分别为无氮培养基^[11](Sucrose 5.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.014, MgSO_4 0.2561, CaCO_3 0.1, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005, pH7.0)和有氮培养基(Sucrose 10.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.507, MgSO_4 0.5122, CaCO_3 1.0, KCl 0.1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, Yeast extract 0.2, pH7.0)(单位均为g/L)。

1.1.2 主要试剂和仪器:配制无氮和有氮培养基所用试剂均为分析纯(Yeast extract为生化试剂,购自广东汕头市西陇化工厂),购自上海国药集团;结晶反应体系用的 NaHCO_3 (分析纯)和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)购自上海统亚化工科技发展有限公司;酶活性测定所用试剂pNPA、二乙基丙二酸、对硝基苯酚(均为分析纯)购自广州伟伯化工有限公司(进口分装);刚果红(生物染料级)购自天津市化学试剂研究所。紫外分光光度计(WFZ UV-2802S),由尤尼柯(上海)仪器有限公司制造;光学显微镜(Olympus-CH)产自南京同立实验仪器有限公司;扫描电子显微镜(SEM, KYKY1000B)由中国科学院科学仪器厂制造。

1.2 无氮和有氮培养条件下细菌CA酶活、菌体形态和计数

在250 mL锥形瓶中分别加入100 mL无氮和有氮液体培养基,115℃灭菌30 min,挑取已在无氮固体培养基上培养7 d的菌体放入50 mL无菌水中制成约 1×10^5 菌/mL的菌悬液,分别将菌悬液按5%接种量接入无氮和有氮液体培养基,对照组接入等量灭活菌悬液,30℃,130 r/min摇床培养7 d。

酶活测定方法:参照Pocker Y和Stone JT的方法^[19]略有改进。称量0.0018 g乙酸对硝基苯酯

pNPA,先用0.5 mL无水酒精溶解,另将0.0156 g二乙基丙二酸用10 mL磷酸缓冲液溶解,两者混合后作为工作液。分别吸取1 mL培养液,稀释5倍,吸取1 mL稀释液与1 mL工作液混合,35℃反应30 min,迅速置于冰浴中冷却。400 nm处测定吸光度,对照标准曲线求出生成对硝基苯酚的量,计算比较胶质芽孢杆菌在两种不同培养液中的CA酶活性。

标准曲线的绘制:分别吸取1 mmol/L对硝基苯酚(称量0.0139 g对硝基苯酚溶于100 mL 0.2 mol/L pH 6.8的磷酸缓冲液中)标准溶液1.5、1.35、1.2、1.05、0.9、0.75、0.6、0.45、0.3、0.15和0 mL,分别加水至15 mL,在波长400 nm处测定吸光度,绘制标准曲线,并得出直线方程。

细菌形态和计数:分别取以上活菌培养液1 mL,稀释10倍,然后取0.01 mL稀释菌液与等量刚果红染液混合,均匀涂布于载玻片,自然晾干后光学显微镜观察^[20];采用平板菌落计数法计算两种培养液中的菌体数量。

1.3 胶质芽孢杆菌对碳酸钙晶体形成的影响

参考Lian等的研究^[21],采用碳酸钙晶体形成试验装置如图1所示。

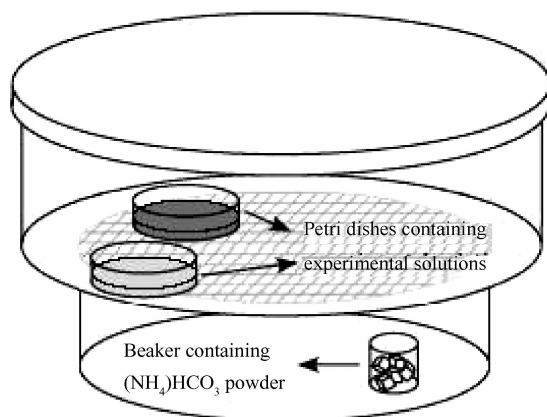


图1 结晶反应装置

Fig. 1 Schematics of the experimental setup.

取两只50 mL烧杯,各加入10 g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 粉末,置于干燥器底部。分别配制 2×10^{-2} mol/L的 NaHCO_3 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液待用。

为证实胶质芽孢杆菌能够促进晶体的生成,并让不加菌的对照组几乎不结晶(降低反应体系中 NaHCO_3 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的浓度),由此设置体系1和体系2。此外,采用体系3和4来比较两种培养基条件下菌体对碳酸钙结晶形态的影响。各反应

体系设置如下:

体系 1:取 NaHCO_3 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液各 0.04 mL,加入到 15 mL 无菌水中,再倒入皿底有盖玻片的洁净培养皿,然后加入 2 mL 无菌水。此为空白对照组。

体系 2:按照体系 1 配制 NaHCO_3 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的混合溶液,取 2 mL 来自无氮培养基的菌悬液(见 1.2)加入培养皿中。此为实验组。

体系 3:取事先配制好的 NaHCO_3 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液各 1.25 mL 混合,加入到 10 mL 无菌水中,倒入皿底有盖玻片的洁净器皿,加入 2 mL 来自无氮培养基的菌悬液。

体系 4:操作同体系 3,只是加入 2 mL 来自有氮培养基的菌悬液(见 1.2)。

用稀 HCl 将以上各体系溶液酸化至 $\text{pH} = 3$,加无菌水至终体积 25 mL。加盖,置干燥器中间的隔板上。所有反应需在层流通风橱内进行,以避免落入空气中的颗粒。

每隔 12 h 取样显微镜观察直至晶体不再发生变化。在 100 倍光学显微镜下对视野中的晶体进行计数,同一样品随机取 3 个视野计算平均值,比较各体系生成碳酸钙晶体的数量;并通过 SEM 观察各组生成的晶体形貌。

2 结果和分析

2.1 两种培养条件下的细菌 CA 活性测定、菌体形态和计数

CA 能够改变环境中的 CO_2 和 HCO_3^- 浓度,促进碳酸盐岩的溶解,从而影响碳酸钙的结晶和生物矿化过程^[18,22],所以在研究胶质芽孢杆菌对碳酸钙晶体形成的影响之前,有必要先对其 CA 活性进行测定。

以 p-Nitrophenol 浓度为横坐标,吸光度为纵坐标作标准曲线,得直线方程($R^2 > 0.99$, $y = 9.3482x + 0.0304$)。测定并根据方程换算出培养液中的碳酸酐酶活力,结果见表 1。

表 1 反应生成对硝基苯酚的量与 CA 酶活

Table 1 The quantity of p-nitrophenol after reaction and CA enzyme activity

Sample	A_{400}	p-nitrophenol/($\mu\text{mol/L}$)	Enzyme activity/U
N-free medium (inactivated strain)	0	0	0
N-free medium (viable strain)	0.155	0.20	0.0067
N-contained medium (inactivated strain)	0	0	0
N-contained medium (viable strain)	0.571	0.87	0.029

表 1 结果表明,该菌在两种培养条件下均可产生 CA,但在有氮培养液中产生的 CA 活性更高。

对两种细菌培养液刚果红染色和菌落计数结果表明,无氮条件下培养的细菌数量相对较少

(6.05×10^5 cfu/mL),细菌培养液更为粘稠,细菌胞外具有肥厚的荚膜;在有氮培养基中生长的菌体数量明显较高(2.29×10^7 cfu/mL),荚膜单薄(图 2)。

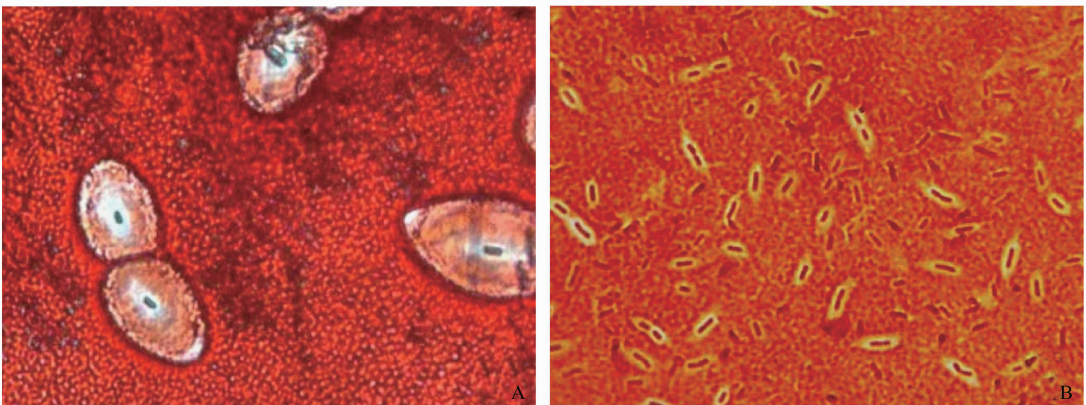


图 2 不同培养条件下的胶质芽孢杆菌(400 ×)

Fig. 2 *B. mucilaginosus* in different medium(400 ×). A: in N-free medium; B: in the medium contained N.

尽管胶质芽孢杆菌可以生物固氮,但在缺乏氮源的情况下细菌增殖速度较慢;添加氮源,使培养液中 C/N 下降,不利于细菌肥厚荚膜的形,但培养液相对不粘稠,通气性较好,有利于细菌生长。有氮培养基中胶质芽孢杆菌的菌体数量大大多于在无氮培养条件下的菌体数量(高出 1-2 个数量级),致使 CA 活性提高;此外,充分的氮素也是细菌蛋白质

与酶合成的物质基础。

2.2 胶质芽孢杆菌菌体对碳酸钙晶体形成的促进作用

从体系 1 和 2 中取样,观察发现晶体生长至 72 h 后形成的碳酸钙晶体形态和数量基本稳定。两个体系中形成的碳酸钙晶体见图 3。

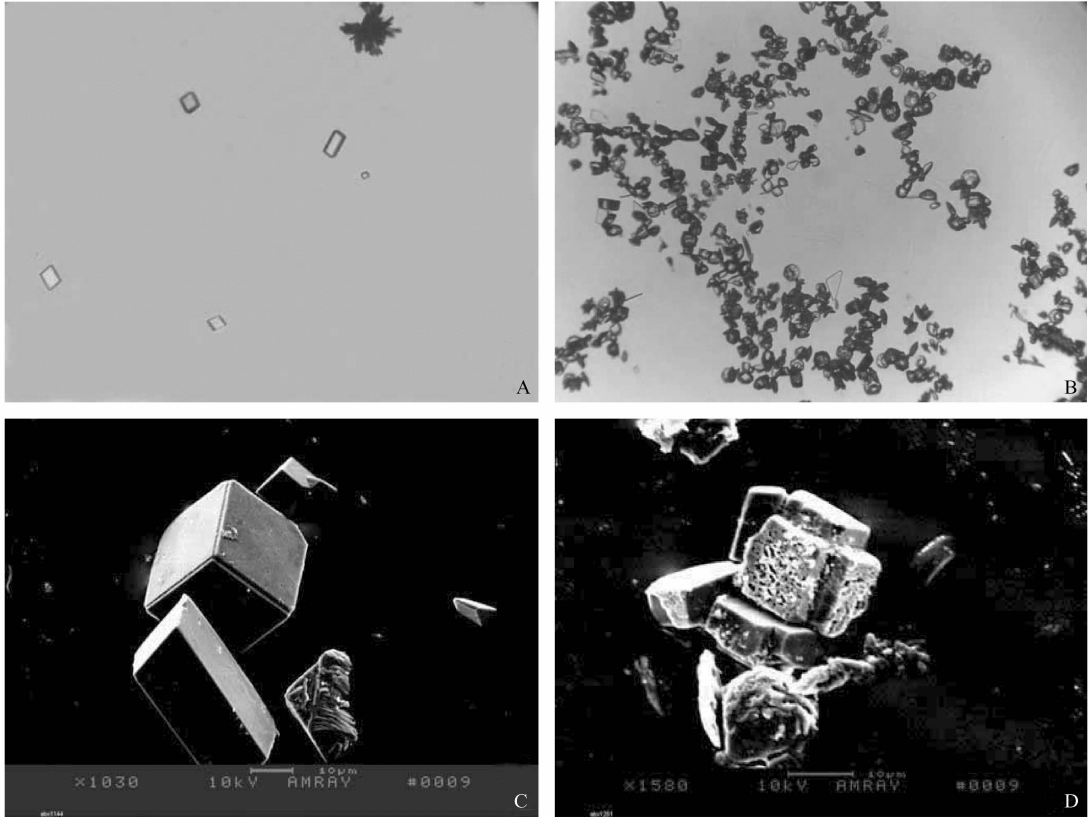


图 3 不同结晶反应体系生成的碳酸钙晶体

Fig.3 The calcium carbonate crystals in different group. A: crystals in system1 observed by OM, 400 × ; B: crystals in system2 observed by OM,400 × ; C: crystals in system1 observed by SEM; D: crystals in system2 observed by SEM.

实验组(体系 2)形成的晶体在数量和形态(见图 3-B 和 D)上与体系 1 中的对照组(见图 3-A 和 C)有显著不同。对照组形成的晶体数量稀少,光学显微镜 100 倍视野中平均仅有 19 个碳酸钙颗粒,多为大小约 20 μm 的六面体方解石,表面光滑平整;而实验组受到加入菌体的影响,生成的碳酸钙晶体数量远大于对照组(相同视野下可观察到 289 个颗粒),大小约 15 μm ,形状不规则且多呈聚集状态,表面多孔隙。究其原因可能是菌体及有机质的存在有助于钙离子的富集,对方解石晶体成核与生长过程产生了影响。此外,细菌生长分泌的 CA 酶由于具有加速 CO_2 水合生成 HCO_3^- 的特性,影响溶液中

HCO_3^- 的浓度和碳酸钙的溶解性,因而会与其他有机质共同影响碳酸钙晶体的形成和最终生成的形貌。

2.3 两种培养条件下生长的菌体对碳酸钙结晶的影响

在体系 3 和 4 中分别加入来自无氮和有氮两种培养条件下的菌悬液,导致最终生成的碳酸钙晶体形态、大小和数量皆不相同,结果见图 4。

观察发现:体系 3(图 4-A 和 C)中形成的碳酸钙晶体较大,平均长度约 130 μm ,分布稀疏(光镜 100 倍视野中仅有 7 个),晶体表面平滑;体系 4(图 4-B 和 D)中形成的碳酸钙晶体较小,长约 50 μm ,

分布较密集(相同视野中 119 个),表面有明显嵴状突起。这是由于无氮培养条件下的菌体密度低,胞外有肥厚荚膜和大量多糖,荚膜多糖具有较强的吸附阳离子的能力,促进了晶核形成和晶体的生长、聚集,使晶体变大^[14,21];而有氮条件下培养的菌体数量

较多,荚膜小,胞外多糖较少,不仅对钙离子的吸附能力较弱,较密集的菌体还在一定程度上阻碍了晶体的聚集和生长,并在碳酸钙晶体表面形成突起。此外,相对较高的 CA 活性会造成部分碳酸钙的溶解,致使菌体较密集的反应液中碳酸钙晶体相对较小。

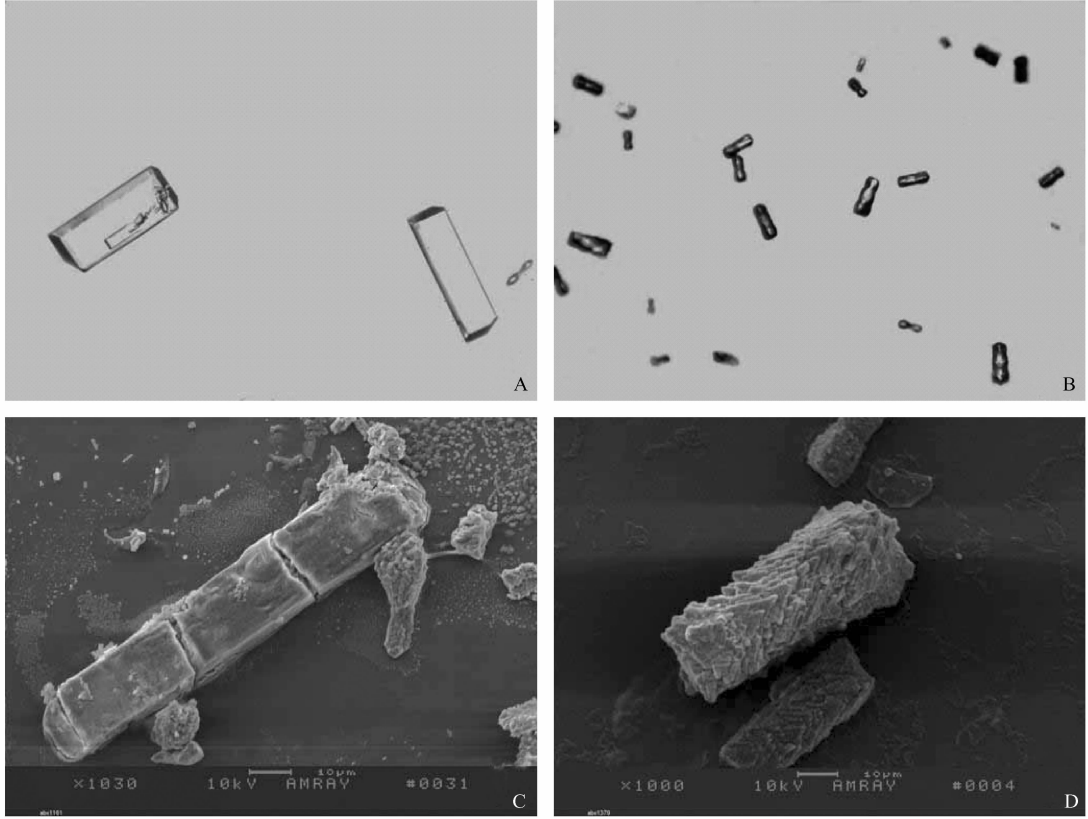


图 4 无氮和有氮培养的菌体存在条件下的碳酸钙结晶

Fig. 4 The calcium carbonate crystals in groups with bacteria which grown in different medium added in. A: crystals in system 3 observed by OM, 400 ×; B: crystals in system 4 observed by OM, 400 ×; C: crystals in system 3 observed by SEM; D: crystals in system 4 observed by SEM.

3 讨论

生物矿化是一个受到生物新陈代谢影响调控的缓慢过程,在有大量细菌存在的环境中形成的碳酸钙晶体之所以不同于纯水溶液中形成的规则的六面体方解石,是因为晶体的成核和生长过程受到了菌体、胞外多糖和 CA 的影响,导致最终晶体的大小和形状发生变化。

胶质芽孢杆菌在两种培养条件下菌体形态和数量的差异以及培养液中 CA 酶活的差异,有助于解释该菌及其分泌物在碳酸钙晶体形成过程中所起的作用。无氮培养条件下胶质芽孢杆菌具有荚膜大、菌体数量少和培养液 CA 活性低的特点,而有氮培养条件则促进细菌增殖、提高蛋白质的合成量和酶

活性。在结晶反应体系中,菌体的存在,可促进碳酸钙晶核形成,其原因不仅与菌体本身及其荚膜对钙离子的吸附有关,细菌分泌的胞外多糖和蛋白质可能对晶体生长的取向和大小也有一定影响。菌体产生的 CA 能影响反应液中 CO_2 水合反应以及 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 的浓度,进而影响碳酸钙晶体的生长。总之,培养条件的差异,导致胶质芽孢杆菌菌体数量、胞外多糖及 CA 酶活的差别,并最终影响碳酸钙晶体的生成与形貌。

参考文献

- [1] 冯庆玲, 侯文涛. 碳酸钙生物矿化的体外研究进展. 清华大学学报(自然科学版) (*Journal of Tsinghua University (Science and Technology)*), 2006, 46(12): 2019-2023.

- [2] Falini G. Crystallization of calcium carbonates in biologically inspired collagenous matrices. *International Journal of Inorganic Materials*, 2000, 2 : 455-461.
- [3] de Muynck W, Cox K, de Belie N, Verstraete W. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials*, 2008, 22(5) : 875-885.
- [4] Carlos RN, Manuel RG, Koutar BC, Maria Teresa GM. Conservation of ornamental stone by myxococcus xanthus-induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(4) : 2182-2193.
- [5] Dick J, de Windt W, de Graef B, Saveyn H, Van der Meeren P, de Belie N, Verstraete W. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation*, 2006, 17(4) : 357-367.
- [6] Fernandes P. Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73 : 291-296.
- [7] 李沛豪, 屈文俊. 细菌诱导矿化保护历史建筑遗产的机理及效果. 硅酸盐学报 (*Journal of The Chinese Ceramic Society*), 2009, 37(4) : 497-505.
- [8] Mitchell AC, Ferris FG. The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater : Temperature and kinetic dependence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2005, 69(17) : 4199-4210.
- [9] Dejong JT, Fritzes MB, Nüsslein K. Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2006, 132(11) : 1381-1392.
- [10] 姜成林, 徐丽华. 微生物资源开发利用. 北京: 中国轻工业出版社, 2001 : 1271.
- [11] 连宾. 硅酸盐细菌的解钾作用研究. 贵阳: 贵州科技出版社, 1998, 106.
- [12] 葛诚. 微生物肥料生产应用基础. 北京: 中国农业科技出版社, 2000:81-84.
- [13] Deng SB, Bai RB, Hu XM, Luo Q. Characteristics of a biofloculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 60(5) : 588-593.
- [14] Lian B, Chen Y, Zhao J, Teng HH, Zhu LJ, Yuan S. Microbial Flocculation by Silicate Bacterium *Bacillus mucilaginosus*: applications and mechanisms. *Bioresource Technology*. 2008, 99(11) : 4825-4831.
- [15] Gottfried K, Gabriele G. Mechanisms of Biomineralization in the Formation of Calcified Shells. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1998, 27(9) : 1145-1156.
- [16] Stephen M, Douglas DA, Jon MD, Trevor D, Brigid RH, Fiona CM, Nicholas JR. Crystallization at Inorganic-organic Interfaces : Biominerals and Biomimetic Synthesis. *Science*, 1993, 261 : 1286-1292.
- [17] Nathalie F, M. Lorraine C, Alain CP. Biocatalytic capture of CO₂ with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 2009, 60(4) : 163-170.
- [18] 刘再华. 碳酸酐酶对碳酸盐岩溶解的催化作用及其在大气 CO₂ 沉降中的意义. 地球学报 (*Acta Geoscientia Sinica*), 2001, 22(5) : 477-480.
- [19] Pocker Y, Stone JT. The Catalytic Versatility of erythrocyte carbonic anhydrase III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-Nitrophenyl acetate. *Biochemistry*, 1967, 6(3) : 668-678.
- [20] 凌云, 肖智杰, 连宾. 胶质芽孢杆菌荚膜染色方法的比较与改进. 南京师大学报(自然科学版) (*Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*), 2007, 30(4) : 84-88.
- [21] Lian B, Hu QN, Chen J, Ji JF, Teng HH. Carbonate biomineralization induced by soil bacterium *Bacillus megaterium*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2006, 70(22) : 5522-5535.
- [22] 李为, 余龙江, 袁道先等. 不同岩溶生态系统土壤及其细菌碳酸酐酶的活性分析. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2004, 24(3) : 438-443.

Effect of different culture conditions on carbonic anhydrase from *Bacillus mucilaginosus* inducing calcium carbonate crystal formation

Xueying Zhou¹, Ye Du¹, Bin Lian^{2*}

(¹ Nanjing Engineering and Technology Research Center for Microbiology; Jiangsu Key Lab for Biodiversity and Biotechnology. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(² State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Abstract: [**Objective**] Effect of various culture conditions on the morphology, amount and carbonic anhydrase (CA) activity of *Bacillus mucilaginosus* were examined, as well as the effect on calcium carbonate crystal forming, shape and amount. [**Methods**] The strain was inoculated in N-free or N-containing medium, and the bacterial morphology, number and CA activity were compared under different culture conditions. By collecting different cultures and adding them to the system of calcium carbonate crystallization we studied the relationship between the bacteria and the formation of calcium carbonate crystals. [**Results**] A small number of cell, capsular hypertrophy, lower CA activity in bacterial culture were obtained under N-free culture condition. In contrast, more biomass quantity, thin capsule, and high CA activity were got in the nitrogen-containing culture. In the calcium carbonate crystal system, adding N-free culture of bacteria produced a smooth surface of calcium carbonate crystals, larger volume but small density, the addition N-containing culture of bacteria formed rough surface, bigger density but smaller volume of calcium carbonate crystals. [**Conclusion**] Different culture conditions can cause significant differences in bacterial amounts, capsular thickness and CA activity, and then influence the crystal growth and form of calcium carbonate.

Keywords: *Bacillus mucilaginosus*; carbonic anhydrase; calcium carbonate; crystal growth.

(本文责编: 张晓丽)