

梭菌 MH18 菌株诱导碳酸盐矿物的形成

郭文文, 马恒, 李福春*, 王金平, 苏宁

南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095

摘要: 【目的】研究细菌作用下碳酸盐矿物的形成过程有助于了解微生物成矿的机理。【方法】在 Lagoa Vermelha 培养基中 (Mg/Ca 为 6:1) 对一株分离自土壤样品的梭菌 MH18 菌株进行了为期 35 天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-射线衍射技术对沉淀物的矿物成分进行了测定, 利用光学显微镜和扫描电子显微镜对沉淀物的形态进行了系统的观察。【结果】MH18 菌株在 Lagoa Vermelha 培养基中诱导形成了以高镁方解石为主的碳酸盐矿物; 这些矿物起初具有哑铃状的外形, 后来发展为球状; 无菌对照实验中出现少量沉淀物, 但 X-射线衍射技术图谱显示它们是非晶态物质。【结论】MH18 菌株具有促进碳酸盐矿物结晶的功能; 碳酸盐矿物的特殊形态 (哑铃状和球状) 可能与细菌形态存在着某种成因上的联系。

关键词: 梭菌, 碳酸盐矿物, 高镁方解石, 球状, 哑铃状

中图分类号: P572.3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 02-0221-07

生物矿化是多学科交叉的研究领域, 它涉及到生物学、化学、结晶学、材料学、矿物学以及医学等多门学科^[1]。生物矿化作用的产物——生物矿物在自然界广泛分布^[2]。由于生物矿化的多学科性以及普遍存在性, 这一研究逐渐受到多个学科研究人员的重视并成为当前研究的热点之一。

碳酸盐岩是沉积岩的重要组成部分, 它的成因可以揭示地质环境的演变以及生物地球化学循环特点。微生物成因碳酸盐矿物的形成很可能是全球碳循环的重要过程之一^[3]。微生物促进碳酸盐矿物形成的功能有可能被用来对纪念碑等观赏性石质材料的风化表面进行环境友好的修复^[4-5]。此外, 探究特殊形态碳酸盐矿物的成因还可能为寻找地外生命提供重要线索^[6], 等等。可见, 微生物作用下碳酸盐矿物的形成过程具有重要的研究意义。

已有研究表明, 球状矿物广泛地存在于土壤和沉积环境中^[5, 7-10]。已有研究者对有机物质影响下球状碳酸盐矿物的形成过程进行了观察和描述, 并推测了其形态演化的过程^[11]。越来越多的研究表明, 微生物对球状碳酸盐矿物的形成具有重要作用^[2, 12]。微生物表面及其分泌的胞外多糖富含酸性基团并且具有吸附和富集阳离子的能力, 因而可以成为矿物成核的理想位点^[13-15]。微生物可以通过各种代谢方式来提高微环境乃至周围环境的酸度、碱度并改变其它化学条件, 从而使碳酸盐达到局部过饱和并最终促使矿物成核和生长^[13-15]。

本文利用从土壤中分离出的一株梭菌 (MH18) 进行了一系列的成矿培养实验, 分别对固相和液相产物进行了跟踪观察和测定, 探讨了 MH18 菌株对碳酸盐矿物形态和种类的影响。研究结果有可能为

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41172308, 40930738)

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

作者简介: 郭文文 (1983-) 女, 山东烟台人, 博士研究生, 主要从事地质微生物学和土壤地球化学研究。E-mail: wwaxmt@163.com

收稿日期: 2011-09-20; 修回日期: 2011-12-08

微生物作用下球状碳酸盐矿物的形成机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 培养基的配制

筛选菌种以及成矿实验所用的培养基均为经过改良的 LV (巴西泻湖 Lagoa Vermelha 的简称) 培养基, 具体配制过程如下: (1) 将 KH_2PO_4 0.019 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2.46 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 14.21 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1.91 g, KCl 0.5 g, NH_4Cl 0.25 g, 酵母浸膏 0.15 g, 50% -60% 的乳酸钠溶液 6 mL 配成溶液并在 121°C 下灭菌 20 min, 冷却; (2) 将含有 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaHCO_3 7.45 g, Na_2CO_3 1 g 的无菌溶液加入溶液(1)中, 定容至 1 L; (3) 在上述的 1L 溶液中加入 1 mL 的 $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (1.8 g/L) 和 0.5 mL 生物素 (10.0 mg/100.0 mL); (4) 用 1 mol/L 的 HCl 将上述混合溶液的 pH 调至 7.5。

用以上方法制成的液体培养基 Mg/Ca (摩尔) 约为 6:1, 盐度约 0.6%。在液体培养基中加入 2% 的琼脂可制成固体培养基。液体培养基用于富集菌种和成矿实验, 而固体培养基用于分离和纯化菌种。

1.2 菌种的获取

将来自南京下马坊农田土表以下 7-10 cm 的土壤 (pH 为 7.4) 2 g 捻碎后加入装有 200 mL 已灭菌培养基的 250 mL 盐水瓶中, 盖盖后充 N_2 , 并于 30°C 恒温静置培养, 进行菌种的富集。采用倒扣平板法将富集 3 次后得到的培养物进行分离纯化, 最后获得一株菌, 命名为 MH18。

1.3 实验设计

用培养基将 MH18 菌株制成种子液, 以 2×10^4 CFU/mL 的初始浓度分别接种于装有 100 mL 培养基的若干小盐水瓶中, 充 N_2 并于 30°C 条件下恒温静置培养。初始 pH 值设定为 7.5, 分别培养至 5、10、15、20、25、30 和 35 d 时结束实验。同时设置无菌实验作为对照 (进行至第 165 d)。培养实验结束后用离心法将固相和液相分离, 分别对固相和液相进行相关指标的测定。

1.4 观察和测定方法

利用透射电子显微镜 (TEM) 对菌体进行观察。制样方法: 将平板培养物负染 16 秒后粘于铜网, 用于观察菌体形态, 样品自然风干。用结晶紫染色法

制备样品并用光学显微镜 (OM) 观察培养实验早中期的固相产物形态。制样方法: 加 1 滴沉淀物和菌液的混合物于载玻片上, 涂开后加热固定; 再加 1 滴 1% 的结晶紫染色液, 涂开使之覆盖于样品上, 1 min 后用水冲洗干净; 待样品自然风干后, 盖上盖玻片。利用扫描电子显微镜 (SEM) 观察培养实验中晚期矿物的形态。制样方法: 将离心收集到的沉淀物用蒸馏水清洗 3 次后, 用 100% 酒精浸泡并滴加于样品台上, 于 40°C 条件下烘干后喷上约 8 nm 厚的金膜。利用 XRD 对沉淀物的矿物成分进行测定。制样方法: 将离心收集到的沉淀物用蒸馏水清洗 3 次并涂于载玻片上, 自然风干。利用显微镜直接计数法计算培养液中的细菌浓度。利用 pH 计测定液相的 pH 值。利用液相色谱仪 (HPLC) 测定了液相产物中低分子量有机酸的种类和含量。

2 结果和分析

2.1 菌种鉴定结果

通过对 MH18 的 16S rRNA 基因序列进行分析并构建系统发生树 (图 1) 可以看出, MH18 与本课题组从青海湖沉积物中分离的另一株细菌 (SN-1) 亲缘关系最近, 16S rRNA 序列相似度达到 99.1%。根据 16S rRNA 基因序列判断, SN-1 属于梭菌属, 有可能是梭菌属中的新种^[2]。与 MH18 关系较近的其他 3 个梭菌属成员分别是: *Clostridium thermopalmarium* X72869, *Clostridium haemolyticum* ATCC9650 (AB037910) 和 *Clostridium novyi* L37594, 它们与 MH18 的 16S rRNA 序列相似度分别为 97.1%、96.6% 和 96.5%。可见, MH18 与相邻的 3 株菌的基因序列相似度并不是很高。从以上分析可以看出, MH18 可能与 SN-1 同属于梭菌属的一个新种, 暂用 *Clostridium* sp. 表示。我们为该菌株在 NCBI 上申请的登录号为 JF504706。

MH18 菌株的基本特征为: 革兰氏阳性, 兼性厌氧, 菌身呈杆状, 其大小范围为: $(0.5 - 1 \mu\text{m}) \times (1 - 2 \mu\text{m})$, 个别长了芽孢的菌体长些, 可达 $3.6 \mu\text{m}$ (图 2)。

2.2 培养液中细菌浓度、pH 值以及草酸浓度的变化

MH18 在整个培养实验过程中生长良好, 其浓度整体上呈现先升高后降低的趋势, 最高浓度出现

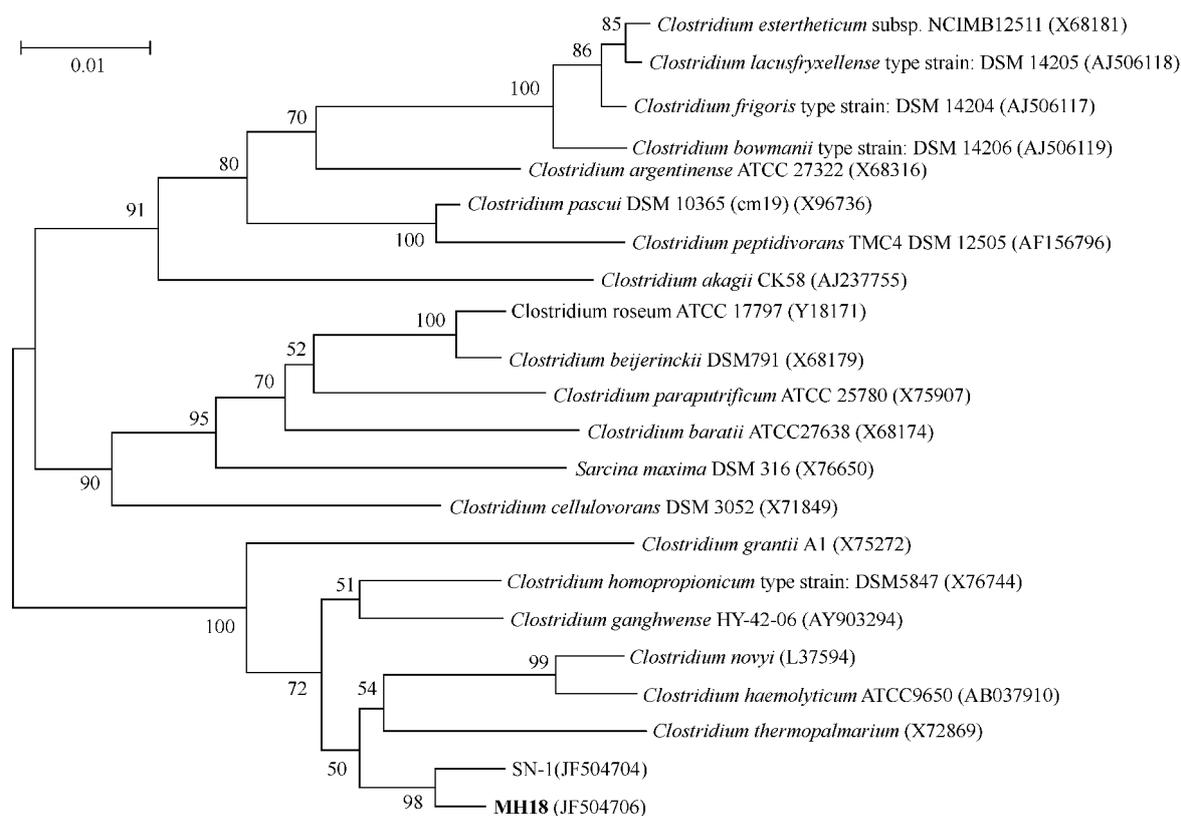


图 1 MH18 的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of MH18. bar, 0.01 (evolutionary distance). Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationships between MH18 and related species. Accession numbers are shown in parentheses. The number at each branch point represents the bootstrap percentages. Bar, 1% substitutions per nucleotide position.

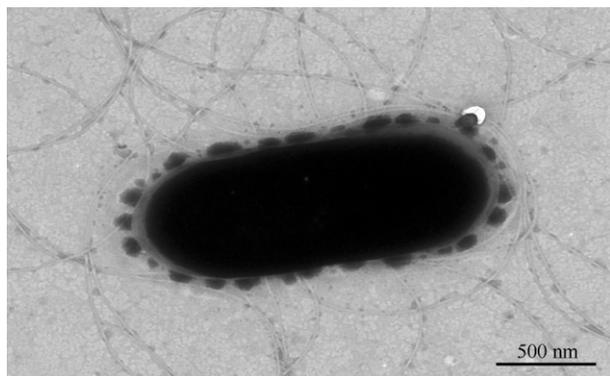


图 2 平板培养第 5 天时 MH18 的 TEM 图 (6000 ×)

Fig. 2 TEM image of MH18 (*Clostridium* sp.) growing on the plate at the fifth day.

在培养的第 5 天 (图 3), 此时的浓度值为 2.23×10^7 CFU/mL。由此可判断, MH18 在培养的第 5 天左右达到对数生长期, 此时菌体活性最强。随着培养时间的延长, 细菌活性逐渐减弱。

在培养过程中, pH 值总体上呈现先降低后升高

的趋势 (图 3)。培养初始 pH 值为 7.5, 到第 5 天时降到 7.08, 随着培养时间的延长, pH 值又呈现出逐渐升高的趋势。到培养实验结束时 (即 35 d 时), pH 值接近初始 pH 值的水平。综合分析细菌浓度和 pH 值两条曲线可以看出, MH18 在第 5 天时达到对数生长期, 而此时的 pH 值为最低, 作者认为这是因为对数生长期梭菌大量生长的同时释放较多的有机酸所致。利用 HPLC 对低分子量有机酸的测定结果 (图略) 表明, 菌株 MH18 生长过程中分泌的有机酸以草酸为主。图 4 为培养液中草酸浓度与培养时间的关系曲线, 可以看出第 5 天时有大量的草酸生成, 这与此时 pH 值大幅度下降相吻合。此外, 细菌呼吸作用释放的 CO_2 溶解在培养液中也可能导致 pH 值下降。培养至第 5 天以后, pH 值升高的原因是多方面的, 最可能的原因包括: (1) 梭菌的脱氨基作用产生氨气并溶于水; (2) 随着培养时间的延长, 部分细菌细胞发生自溶也可能导致 pH 值升高, 因为细菌本身显碱性。

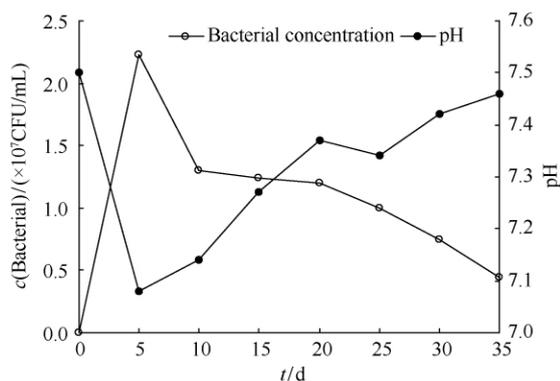


图3 培养液中细菌浓度和 pH 值的动态变化曲线
Fig. 3 Dynamic changes of bacteria density and pH in culture medium.

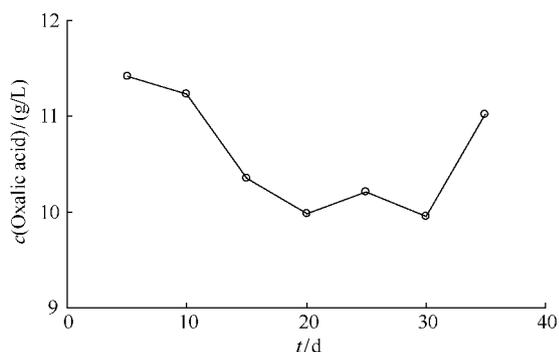


图4 培养液中草酸浓度的动态变化曲线
Fig. 4 Dynamic changes of Oxalic acid concentration in culture medium.

2.3 XRD 测定结果

在培养实验进行至第 25 日之前,沉淀物极少,无法进行 XRD 的测定。第 35 天时,小盐水瓶底部的沉淀物较多,足够用于各项观察和测定。第 35 天样品的 XRD 图谱(图 5-A)说明,沉淀物的主要矿物成分为方解石。

在 Mg-Ca 系列的碳酸盐矿物体系中,可根据以下经验公式计算其中 $MgCO_3$ 的百分含量,即 $MgCO_3$ (%) = $[100 - 3333.3d + 911.99]^{[16]}$,其中 d 代表 (104) 晶面衍射峰的 d 值(单位为 nm)。一般认为,在 Mg-Ca 系列的碳酸盐矿物中, $MgCO_3$ (%) > 4% 时为含镁方解石^[17],在 7% - 35% 时为高镁方解石,在 35% - 52% 时则为钙白云石或白云石^[18-19]。根据以上经验公式的计算结果表明,第 35 d 样品中 $MgCO_3$ 含量约为 17.3%,即主要矿物为高镁方解石亚种。图 5 中竖线为标准方解石(在 PDF 库中的编号为 47-1743)衍射峰的位置。 Mg^{2+} 替代 Ca^{2+} 后使得 d 值减小、 2θ 角度增大,因此高镁方解石的特征衍射峰位置相对于标准方解石来说整体向右移动。

无菌对照实验中一直无沉淀物生成,直到 165 d 时才收集到少量的沉淀物。这些沉淀物的 XRD 图谱显示(如图 5-B)其信噪比远小于 3,即对照实验中的沉淀物为非晶态物质(碳酸钙)。

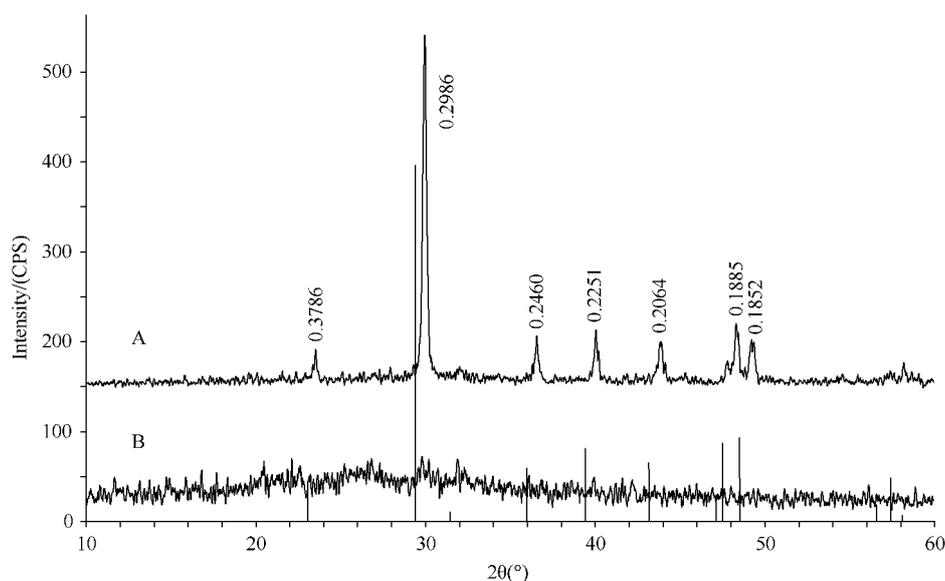


图5 沉淀物的 XRD 图谱

Fig. 5 X-ray diffraction patterns of precipitate at the 35th day (A) and of control treatment at the 165th day (B) (unit of d -values is nm).

2.4 OM 和 SEM 观察结果

图 6 为各种形态碳酸盐矿物的显微照片, 它们清楚地展现了碳酸盐矿物生长过程中的主要形态。图 6-A 为 OM 下观察到的哑铃形和球形矿物 (第 25 天) 图 6-B 和 6-C 均为第 35 天时碳酸盐矿物形态的照片。可以看出, 在同一时期哑铃状和球状矿物共存, 这是因为培养基中存在着不同世代的梭菌。新生的梭菌菌体可以作为新的成核模板, 因此在同

一时期的培养实验产物中可以见到处于不同发展阶段的矿物形态。从图 6-C 可以看出, 在球体表面存在一些小孔洞, 它们可能是矿物表面的菌体或被包裹的多糖、有机酸等溶解而成的。

图 6-D 为无菌对照实验进行到第 165 天时收集到的沉淀物。这些沉淀物量少且没有规则的形态, 这更进一步说明了梭菌在特殊形态碳酸盐矿物形成中的重要作用。

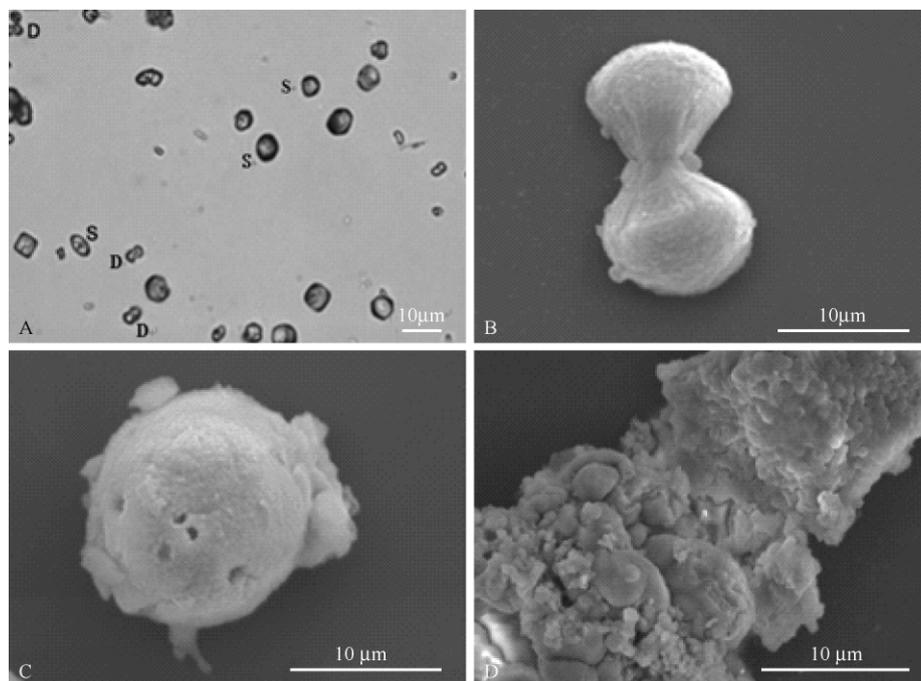


图 6 各种形态的碳酸盐矿物照片

Fig. 6 Photographs of carbonate mineral with various morphologies. A: 25 d (D is dumbbell-like and S is sphere) (1000 ×); B: 35 d (500 ×); C: 35 d (4000 ×); D: 65 d control treatment (2000 ×).

3 讨论

本研究发现, 实验产物中常见数量众多的纳米级颗粒 (图 7), EDS 分析表明其为碳酸钙, 这说明碳酸盐矿物的形成是从纳米级颗粒开始的。大量的研究表明, 溶液中的纳米晶体在具有弱电子吸收能力的物质 (如多糖、有机酸) 包裹下可以逐渐聚集形成矿物晶体, 这些电子吸收较弱的物质也会被整合进入矿物集合体^[20]。这就是纳米级晶体以多糖、有机酸为模板逐渐聚集成矿物集合体的过程。我们认为, 哑铃状矿物的形成也有可能是因为: 细菌两端的带负电基团比菌体中间丰富, 易聚集更多的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} , Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 离子作为“阳离子桥”吸引

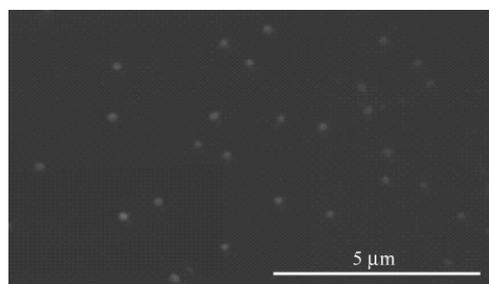


图 7 纳米级颗粒 SEM 图像 (10000 ×)

Fig. 7 SEM image of nanometer-grade grain.

CO_3^{2-} , 其结果是两端的纳米晶体成核速度相对较快、中间相对较慢, 导致细菌两端的矿物晶体 (实际上是矿物集合体) 生长较快^[21]。在本课题组的一系列实验中均发现, 梭菌诱导下形成的碳酸盐矿物具

有多种形态,例如透镜状、杆状、哑铃状、球状等,而无菌对照实验中所形成的碳酸盐沉淀呈不规则状,这进一步说明了细菌在成矿过程中的重要作用。从矿物种类来看,梭菌诱导下形成的矿物以高镁方解石为主,而无菌对照实验形成的沉淀物为非晶态物质(含镁碳酸钙)。以往利用 SRB 进行的实验研究认为,pH 值升高是导致矿物沉淀的最主要原因之一^[21]。在这些研究中,随着培养时间的延长,pH 高于初始 pH 值^[21]。在本研究中,pH 值先降低后升高,但仅升高到与初始值相当的水平,在这种情况下仍可产生少量矿物沉淀。可见,在 pH 值不是很高的条件下,有些细菌仍可以促进碳酸盐矿物结晶。

微生物参与碳酸盐矿物的形成过程是比较普遍的现象。早在 1973 年 Boquet 等^[22]就在 B-4 固体培养基上利用 210 种微生物成功合成了方解石。在这一研究基础上他们提出:在适当的条件下,绝大部分细菌都有形成碳酸盐矿物的能力。本文作者所在课题组曾利用柠檬酸杆菌^[12]和梭菌 SN-4^[2]在 LV 培养基中成功合成了具有一定形态的碳酸盐矿物,这些研究可能进一步佐证了 Boquet 等的推测。

参考文献

- [1] 欧阳健明. 生物矿物及其矿化过程. *化学进展* (*Progress in Chemistry*), 2005, 17(4): 749-756.
- [2] 李福春, 马恒, 苏宁, 王金平, 刘铭艳, 汪君, 滕飞. 梭菌对含镁方解石形态的控制及其可能机理. *高校地质学报* (*Geological Journal of China Universities*), 2011, 17(1): 13-20.
- [3] Dupraz C, Visscher PT. Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(9): 429-438.
- [4] Rodriguez-Navarro C, Rodríguez-Gallego M, Chekroun KB, Gonzalez-Muñoz MT. Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 2182-2193.
- [5] Wright DT, Oren A. Nonphotosynthetic bacteria and the formation of carbonates and evaporites through time. *Geomicrobiology Journal*, 2005, 22: 27-53.
- [6] Ercole C, Cacchio P, Botta AL, Centi V, Lepidi A. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate: the role of exopolysaccharides and capsular polysaccharides. *Microscopy and Microanalysis*, 2007, 13: 42-50.
- [7] Verrecchia EP, Frey P, Verrecchia KE, Dumont JL. Spherulites in calcrete laminar crusts: Biogenic CaCO₃ precipitation as a major contributor to crust formation. *Journal of Sedimentary Research*, 1995, 65(4a): 690-700.
- [8] Kazmierczak J, Kempe S. Modern terrestrial analogues for the carbonate globules in Martian meteorite ALH84001. *Naturwissenschaften*, 2003, 90(4): 167-172.
- [9] López-García P, Kazmierczak J, Benzerara K, Kempe S, Guyot F, Moreira D. Bacterial diversity and carbonate precipitation in the giant microbialites from the highly alkaline Lake Van, Turkey. *Extremophiles*, 2005, 9(4): 263-274.
- [10] Mastandrea A, Perri E, Russo F, Spadafora A, Tucker M. Microbial primary dolomite from a Norian carbonate platform: northern Calabria, southern Italy. *Sedimentology*, 2006, 53: 465-480.
- [11] Canti MG. The Micromorphological Identification of Faecal Spherulites from Archaeological and Modern Materials. *Journal of Archaeological Science*, 1998, 25(5): 435-444.
- [12] 马恒, 李福春, 苏宁, 李学林. *Citrobacter freundii* 作用下球状碳酸盐矿物的形态演化过程研究. *高校地质学报* (*Geological Journal of China Universities*), 2009, 15(3): 429-436.
- [13] Castanier S, Métayer-Levrel G, Perthuisot JP. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis: the microbiogeologist point of view. *Sedimentary geology*, 1999, 126(1-4): 9-23.
- [14] Frankel RB, Bazylinski DA. Biologically induced mineralization by bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 2003, 54: 95-114.
- [15] 李一良, 王汝成, 周根陶, 张传伦. 微生物成矿. *高校地质学报* (*Geological Journal of China Universities*), 2005, 11(2): 167-180.
- [16] Lumsden DN. Discrepancy between thin-section and X-ray estimates of dolomite in limestones. *Journal of Sedimentary Petrology*, 1979, 49: 429-436.
- [17] 戴永定, 沈继英. 生物系统中的矿物. *动物学杂志* (*Chinese Journal of Zoology*), 1995, 30(4): 58-61.
- [18] Vasconcelos C, Mckenzie JA. Microbial mediation of modern dolomite precipitation and diagenesis under anoxic conditions (Lagoa Vermelha, Rio de Janeiro, Brazil). *Journal of Sedimentary Research*, 1997, 67: 378-390.

- [19] 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: 71-79.
- [20] Rodriguez-Navarro C , Jimenez-Lopez C , Rodriguez-Navarro A , Gonzalez-Muñoz MT , Rodriguez-Gallego M. Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* ,2007 ,71 (5) ,1197-1213.
- [21] Warthmann R , Van Lith Y , Vasconcelos C , McKenzie JA , Karpoff AM. Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiments. *Geology* , 2000 ,28 (12) : 1091-1094.
- [22] Boquet E , Boronat A and Ramos-Cormenzana A. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* ,1973 ,246 (5434) : 527-529.

Clostridium sp. MH18 strain induces the formation of carbonate minerals

Wenwen Guo , Heng Ma , Fuchun Li* , Jinping Wang , Ning Su

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

Abstract: [Objective] We studied the formation of carbonate minerals by bacteria to understand the mechanism of microbial mineralization. [Methods] Cultures of carbonate precipitation using Lagoa Vermelha medium with 6:1 molar ratio of Mg/Ca within 35 days were made under the mediation of *Clostridium* sp. (MH18 strain) isolated from soil. At the same time , aseptic experiments without the inoculation were done as the control. Mineral species were determined by X-ray diffraction , and the morphologies of precipitated carbonates were observed using optical microscopy and scanning electron microscopy. [Results] In the LV medium , MH18 strain mediated the formation of carbonate mineral , in which high-magnesium calcite was dominant. In the initial stage , the minerals had shapes with dumbbell-like morphology , and finally transformed to spheres. Only a small amount of precipitation appeared in the control , but X-ray diffraction patterns showed that these precipitations were amorphous substance. [Conclusions] MH18 strain could induce crystallization of carbonate.

Keywords: *Clostridium* sp. , carbonate mineral , high-magnesian calcite , dumbbell-like morphology , spherical morphology

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of China (41172308 and 40930738)

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

Received: 20 September 2011/Revised: 8 December 2011