



生物启发的细菌表面人造矿物壳：通过仿生矿化保护活细胞

郑莹玲¹, 刘瑜¹, 谢鑫¹, 石美玲¹, 谢雯¹, 曾飒², 曾晓雪², 孟涛^{1*}

1 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031

2 广州栋方生物科技股份有限公司, 广东 广州 510800

郑莹玲, 刘瑜, 谢鑫, 石美玲, 谢雯, 曾飒, 曾晓雪, 孟涛. 生物启发的细菌表面人造矿物壳: 通过仿生矿化保护活细胞[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 2133-2143.

ZHENG Yingling, LIU Yu, XIE Xin, SHI Meiling, XIE Wen, ZENG Sa, ZENG Xiaoxue, MENG Tao. Bio-inspired artificial shells protect living bacterial cells via biomimetic mineralization[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 2133-2143.

摘要:【目的】生物启发的细菌表面仿生矿化人造矿物壳被用于保护活细胞。【方法】将细菌限制在坚固而完整的矿物壳中, 有限的物理空间和物质交换使其暂时进行休眠, 降低长期保存期间的活力损失以及提高在各种极端环境中的生存能力, 并且能够通过酸去除矿物壳而重新激活细菌。【结果】相较于未仿生矿化的细菌(EcN), 矿化细菌(EcN@CaCO₃)在 32 d 的储存实验中活力最高提升 262 倍; 在 pH 2.5 的强酸环境中存活率提高 837 倍; 在 pH 12.0 的强碱环境中存活率提高 171 倍; 在 80 °C 的高温条件下存活率提高 59.1 倍; 甚至在抗生素溶液中, EcN@CaCO₃ 中细菌的存活率是 EcN 的 729.7 倍。【结论】本研究利用仿生矿化提高了细菌的保存稳定性, 使其能在酸刺激下去除涂层恢复活性, 也能在极端环境下保留细菌的活力, 为微生物在环境生态、食品制造和生物医药等领域的应用提供研究基础。

关键词: 细菌; 生物启发; 仿生矿化; 休眠与激活; 耐受性

资助项目: 国家自然科学基金(22378336, 22204130); 四川省科技计划(2020YFG0092, 2021YFN0129); 中央高校基本科研业务费专项资金(2682021ZTPY031, 2682021CX087)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22378336, 22204130), the Science and Technology Program of Sichuan Province (2020YFG0092, 2021YFN0129), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2682021ZTPY031, 2682021CX087).

*Corresponding author. E-mail: taomeng@swjtu.edu.cn

Received: 2023-07-24; Accepted: 2023-10-17; Published online: 2023-10-20

Bio-inspired artificial shells protect living bacterial cells *via* biomimetic mineralization

ZHENG Yingling¹, LIU Yu¹, XIE Xin¹, SHI Meiling¹, XIE Wen¹, ZENG Sa², ZENG Xiaoxue², MENG Tao^{1*}

1 School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, Sichuan, China

2 Guangzhou Ridgepole Biological Technology Co., Ltd., Guangzhou 510800, Guangdong, China

Abstract: [Objective] Bio-inspired artificial mineral shells are used to protect living bacterial cells. [Methods] Bacterial cells were encapsulated in firm and intact mineral shells, where the limited physical space and substance exchange induced the dormancy of living bacteria to decrease the viability loss during long-term preservation and even in extreme environments. Moreover, acids can erode the shells to reactivate the bacteria. [Results] Compared with the un-mineralization treatment (EcN), the mineralization treatment (EcN@CaCO₃) increased the bacterial viability by a maximum of 262 folds in a 32-day storage experiment and the survival rate by 837, 171, 59.1, and 729.7 folds at pH 2.5, pH 12.0, 80 °C, and in the presence of an antibiotic, respectively. [Conclusion] We employed biomimetic mineralization to improve the stability of bacterial cells in storage, which can provide a research basis for the application of microorganisms in environmental engineering, food production, and biomedical engineering.

Keywords: bacteria; bioinspired; biomimetic mineralization; dormancy and activation; tolerance

微生物在环境生态、食品制造和生物医药等领域发挥着重要的作用,然而微生物面临着在恶劣环境下的生存困境^[1-6]。例如严苛的制备条件、长时间的货架储存和给药后宿主的胃肠道微环境,均会导致益生菌的活力下降^[7-8]。在自然界中,无论是基本的还是高度复杂的生物体,都具有精密控制系统结构和材料功能的能力,如为了适应环境的变化产生生物矿化硬组织,包括牙齿和骨骼等^[9-11]。其中,生物矿化外壳因为具有特殊的结构和保护生物体免受外界环境侵害的能力,受到了研究者的广泛关注^[12-14]。具体来说,许多微生物外表面三维细胞膜结构为生物外壳的矿化提供了良好的模板,通过对矿物离子的局部富集并发生相应的反应,由此产生薄矿物层^[15-16]。例如,鸡蛋的矿物外壳、硅藻华丽图案的硅外壳,以及蓝藻外表面覆盖的石膏和

碳酸钙^[17-18]。然而,自然界中大多数生物都不能自主制造生物保护外壳。

受自然启发,通过模拟生物矿化,研究人员已开发出多种仿生矿化方法用于人工制造微生物的生物保护外壳^[19-21]。例如,通过基因工程将调控生物矿化的外源基因递送到宿主细胞并稳定表达,赋予细胞自主的生物矿化能力^[22]。有学者调控酵母细胞实现仿生硅化外壳表面和磷酸钙包裹^[14,23]。已经探索使用了基于微生物表面性质,例如,静电相互作用、氢键和共价键的层层自组装,海藻酸-壳聚糖的交替组装,肠溶性材料的细菌表面修饰等用于疾病的治疗^[24-26]。尽管上述方法具备诸多优点,包括可以基因调控和通过不同材料的修饰赋予细胞不同的功能,但高难度的制备过程、不可预测的基因突变、重复的离心-洗脱过程,以及阳离子聚电解质潜在的毒

副作用限制了进一步的研究和应用^[27-28]。因此, 需要开发新的微生物仿生矿化策略定制生物保护外壳。

本研究报道了一种简单和高效的细菌表面人造矿物壳策略, 使其能够在极端环境中生存。通过外源性脲酶仿生矿化细菌, 制备出由碳酸钙矿物壳包裹的细菌(图 1)。首先, 利用细菌表面物理性质对金属阳离子(Ca²⁺)和脲酶局部富集, 接着脲酶原位催化尿素生成碳酸根离子, 与螯合在细菌表面的 Ca²⁺发生矿化反应, 从而在细菌外表面制备出人造矿物壳。由此产生的矿化细菌(EcN@CaCO₃)表现出矿化外壳限制了细菌的物质交换和自我繁殖, 细菌暂时处于休眠状态, 提高了保存期间的稳定性, 并且可以在酸刺激下去除外壳, 重新恢复活力; 对于外界环境表现出耐受性, 包括强酸、强碱、高温和抗生素, 这主要归因于生物矿化外壳隔绝了外界环境对细菌的损害。

1 材料与方 法

1.1 试剂及仪器

大肠杆菌 Nissle 1917 (EcN), 实验室保藏;

脲酶, Sigma-Aldrich 公司; 氯化钙(CaCl₂)、尿素、卡那霉素, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 盐酸(HCl)、氢氧化钠(NaOH)、LB 培养基, 海博生物技术有限公司; 戊二醛、无水乙醇、琼脂粉, 成都市科隆化学品有限公司; 用水均为实验室自制水。

电子天平, 上海菁海仪器有限公司; 磁力搅拌器, IKA 仪器设备有限公司; 冷冻离心机, Thermo 公司; 扫描电子显微镜, JEOL 公司; 全波长酶标仪, 上海闪谱生物技术有限公司; 真空冷冻干燥机, 新芝生物科技股份有限公司; X 射线衍射仪(XRD), Rigaku 公司; 超净工作台, 苏州博莱净化设备有限公司; 恒温培养摇床, 上海一恒科学仪器有限公司; 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, Malvern Zetasizer 公司; 手提式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂。

1.2 大肠杆菌 Nissle 1917 活化和单克隆细菌的制备

大肠杆菌 Nissle 1917 (EcN)是一种常见的益生菌, 在本研究中被选为模型菌。首先, 取出冻存于-80 °C 冰箱的 EcN (20%甘油保存)并复苏, 放置于超净工作台备用。在超净工作台无菌

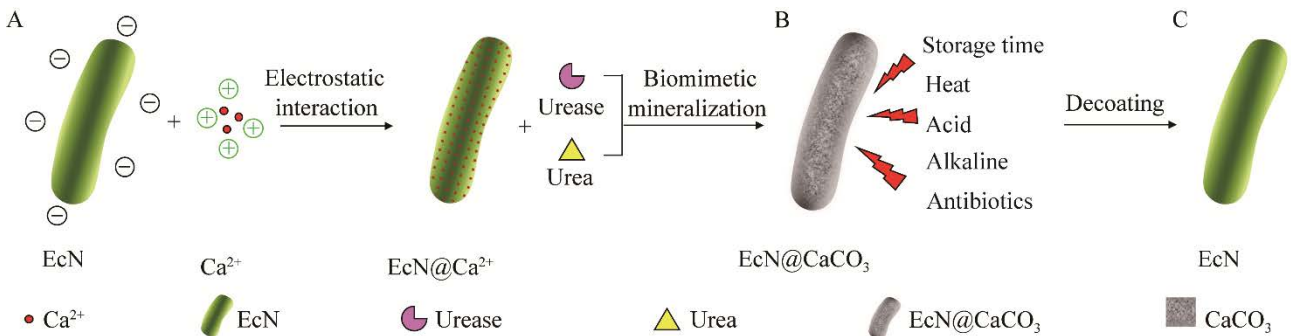


图 1 EcN@CaCO₃ 的制备

Figure 1 Preparation of EcN@CaCO₃. A: Preparation of bacteria with artificial mineral shell on the surface. B: Bacteria temporarily rendered dormant and enhanced resistance against external attacks when enclosed within the mineral shell. C: Reactivation of bacteria upon removal of the mineral shell.

环境中,用接种环浸润菌液后在 LB 固体培养基上按照平板划线法接种细菌。将固体培养基倒置放于恒温培养箱,37 °C 培养 24 h。选取培养基上的单个菌落,用接种环挑取单菌落后接种于 30 mL 灭菌的液体 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 培养,得到单克隆细菌。

1.3 仿生矿化细菌(EcN@CaCO₃)的制备

吸取在 37 °C、200 r/min 条件下培养 12 h 的 EcN 单克隆细菌 5 mL,6 000 r/min 离心 5 min 分离培养物,用去离子水洗涤 2 次。将细菌重新悬浮在 20 mL 的 CaCl₂ (12 mmol/L) 溶液中,并涡旋 5 min。向该溶液中加入 20 mg 脲酶,并进一步摇动 5 min。接着,加入 30 mL 尿素(12 mmol/L)溶液,200 r/min 磁力搅拌 1 h,使脲酶和尿素充分反应。最后,6 000 r/min 离心 5 min 收集沉淀,并用去离子水洗涤,得到仿生矿化细菌(EcN@CaCO₃)。

1.4 EcN@CaCO₃ 的表征

为了观察确定细菌的形态,进行了扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察。首先,将 EcN 和 EcN@CaCO₃ 沉淀物离心(6 000 r/min、5 min),用去离子水洗涤 3 次,并立即用 2.5%戊二醛溶液在 4 °C 条件下固定 3 h,固定后的细菌用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗 3 次,每次 10 min。接着,在 30%、50%、70%、90%和 100%的乙醇中梯度脱水,每次 15 min。然后,将完成脱水的细菌冷冻干燥。最后将样品喷金进行扫描电子显微镜观察。

为了定性 EcN 表面矿化涂层物质,对 EcN@CaCO₃ 样品进行了 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)分析。称取 100 mg 干燥 EcN@CaCO₃ 进行 XRD 分析,扫描角度 10°–80°,扫描速度 2°/min。

粒径和 Zeta 电位分析:为了表征细菌在仿生矿化前后的粒径和表面电位变化,进行了纳米粒度

及 Zeta 电位分析。取微量的 EcN 和 EcN@CaCO₃ 分别加入到去离子水中,充分分散后,于粒径和 Zeta 电位分析仪样品池中,进行粒径和 Zeta 电位分析。

1.5 EcN@CaCO₃ 生长曲线的测定

为了验证仿生矿化后细菌的生长情况,测定了 EcN@CaCO₃ 生长曲线。首先,将 EcN@CaCO₃ 悬液稀释到 200 μL 新鲜 LB 培养基中,使其 OD₆₀₀ 值达到 0.05,然后在 37 °C 下 200 r/min 摇晃培养。在 96 孔板中,每隔 1 h 测定 OD₆₀₀ 值,8 h 后加入 0.001 mol/L 盐酸溶液 10 μL,去除 EcN@CaCO₃ 表面矿化涂层,并继续测定 OD₆₀₀ 值。为了量化细菌的生长,分别于 0、3、6、9、12、15、18 h 吸取少量菌液,按照稀释涂布平板法涂布在固体 LB 培养基上,培养 24 h 后对菌落进行计数。

1.6 EcN@CaCO₃ 的长期储存稳定性

为了验证仿生矿化涂层对 EcN 储存稳定性的影响,取适量的 EcN 和 EcN@CaCO₃ 分别悬浮于去离子水中,放置在 4 °C 和 25 °C 条件下长期保存,每隔 8 d 通过稀释涂布平板法计数活细胞数量,连续测定 32 d。

1.7 EcN@CaCO₃ 对恶劣环境的耐受性

为了验证仿生矿化外壳对恶劣环境的耐受性,分别将等量的 EcN 和 EcN@CaCO₃ 重新悬浮到强酸溶液(pH 2.5)、强碱溶液(pH 12.0)、高温(50–80 °C、10 min)、卡那霉素溶液(50 μg/mL)。在预定的间隔时间,分别是 0.5 h、0.5 h、10 min、1 h,吸取 100 μL 样品,用无菌水洗涤,用稀释涂布平板法铺设在固体 LB 培养基上,37 °C 孵育 24 h 后记录菌落数。

2 结果与分析

2.1 EcN@CaCO₃ 的表征

2.1.1 EcN@CaCO₃ 的形貌

利用扫描电子显微镜(SEM)比较了 EcN 和 EcN@CaCO₃ 的微观形貌差异。SEM 图表明(图 2),

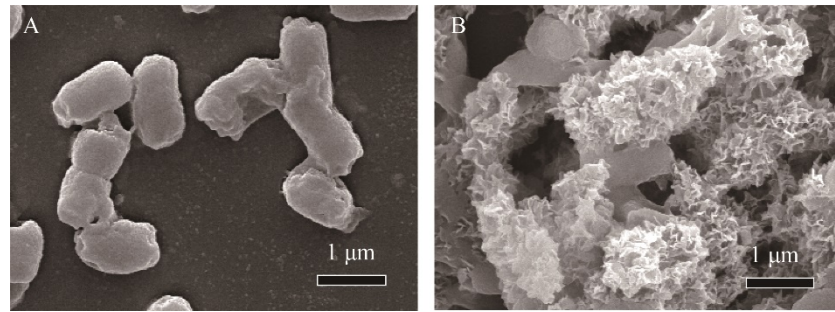


图 2 EcN (A)和 EcN@CaCO₃ (B)的 SEM 图

Figure 2 SEM images of EcN (A) and EcN@CaCO₃ (B).

EcN@CaCO₃ 的表面显示出清晰的褶皱样仿生矿化外壳, 与未仿生矿化的 EcN 光滑表面形成鲜明的对比。研究结果证明, 成功地在 EcN 仿生矿化出人造矿物壳。

2.1.2 EcN@CaCO₃的粒径和 Zeta 电位

通过动态光散射(dynamic light scattering, DLS)评价了 EcN 仿生矿化前后粒径和表面电荷的变化。结果如图 3A 所示, EcN 表面仿生矿化出矿物壳(EcN@CaCO₃)后, 粒径由(1 795±41) nm 增长至(2 192±194) nm, 大约有 400 nm 的粒径变

化, 尺寸的增加表明矿化壳增加了 EcN 的整体大小; Zeta 表面电位(图 3B)由(-38.4±1.3) mV 增加至(-11.3±0.17) mV, 大约有 27 mV 的电位变化, 表面电荷的变化表明矿物壳增加了 EcN 的 Zeta 电位。

2.1.3 X 射线衍射(XRD)分析

为了定性分析 EcN@CaCO₃ 表面矿物壳的成分, 通过 X 射线衍射对样品进行了分析。结果如图 4 所示, 谱图 2θ 在 23.1°、29.3°、31.4°、36.0°、39.4°和 43.2°等位置附近出现强的特征衍射峰, 对照标准卡 PDF#47-1743 可知, 矿物外壳为方解石型 CaCO₃。

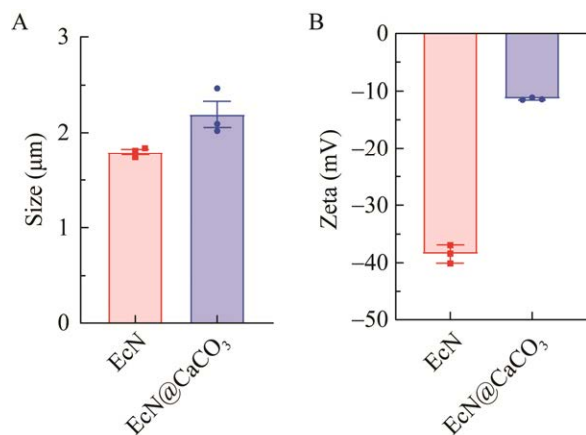


图 3 EcN@CaCO₃ (A)的粒径和 Zeta 电位(B)分析

Figure 3 Particle size distribution (A) and Zeta potential (B) of EcN@CaCO₃. Data are presented as the mean±SEM (n=3).

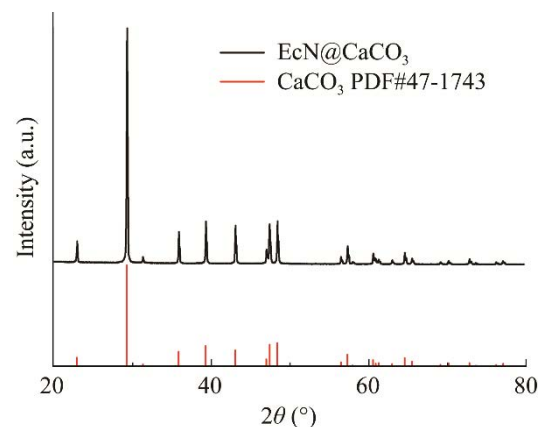


图 4 EcN@CaCO₃的 X 射线衍射分析

Figure 4 X-ray diffraction analysis of EcN@CaCO₃.

以上结果均证明 EcN 被成功仿生矿化出方解石型 CaCO_3 矿物壳。

2.2 EcN@CaCO₃ 的生长曲线

本研究认为将 EcN 限制在坚固和完整的矿物壳中使细菌暂时休眠,并在一定的条件下去除矿物壳后可以重新激活。为了验证这一假设,在 LB 培养基中监测了 EcN@CaCO₃ 的生长情况。如图 5A 所示,在细菌表面有矿物壳包覆时, EcN@CaCO₃ 几乎被完全抑制,即使培养时间延长至 8 h, OD_{600} 也几乎没有增长。有效的失活可以简单地归因于坚固和完整的矿物壳带来有限的物理空间和物质交换使细菌的繁殖受限。在培养液中加入适量的盐酸去除矿物壳后,培养液 pH 值为 7.21,处于 EcN 的最适生长 pH 值, EcN@CaCO₃ 被重新激活,并在之后的 10 h 内迅速增殖。然后,通过平板计数再次验证,取培养 0、3 和 6 h 的菌液平板计数发现,无菌落生长,表明细菌被暂时抑制;通过酸刺激去除涂层后,取培养 9、12、15 和 18 h 的菌液计数发现,有大量菌落的生长,并随着时间的增加活菌数也快速增加(图 5B),表明细菌被重新激活。

2.3 EcN@CaCO₃ 的长期储存稳定性

细菌被限制在矿物壳内暂时进入休眠状态,

有助于提高其在储存期间的稳定性。为了验证人造矿物壳对细菌在长时间储存期间的活力保护,通过平板计数法在规定时间内监测活细菌数。如图 6A、6B 所示,在低温(4 °C)条件下经过长达 32 d 的储存后, EcN@CaCO₃ 的活细菌数依旧有 $8.52 \log_{10}$ (CFU/mL),活菌率高达 63.4%,而 EcN 活菌数为 $6.77 \log_{10}$ (CFU/mL),活菌率仅为 1.3%,提升了约 48 倍。在常温(25 °C)条件下(图 6C、6D),人造矿物壳仍然可以极大提升细菌的储存稳定性,相较于 EcN 经过 32 d 储存后仅剩余 0.2%的活菌, EcN@CaCO₃ 的活菌率高达 58.3%,提升了 262 倍。

2.4 EcN@CaCO₃ 对恶劣环境的耐受性

2.4.1 pH 2.5 的强酸环境

首先,本研究评价了 EcN 和 EcN@CaCO₃ 在 pH 2.5 的酸性条件下溶液 pH 值随时间的变化情况,如图 7A 所示, EcN 一直处于 pH 2.5 的酸性环境;而 EcN@CaCO₃ 在酸性条件下随着时间的增加, pH 值维持在 7.0 左右,处于中性环境。接着,评价了 EcN 和 EcN@CaCO₃ 在 pH 2.5 的酸性条件下的存活率。如图 7B、7C 所示, EcN 在酸性条件下随着时间的增加活细胞数量急剧减少,当时间增长至 2 h,活细胞数量下降了 $3.47 \log_{10}$ (CFU/mL),活菌率仅为 0.03%;而

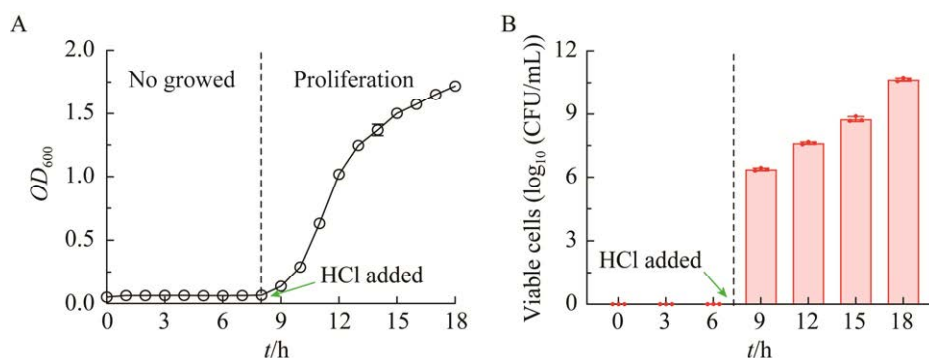


图 5 EcN@CaCO₃ 去除矿化壳前后的生长情况

Figure 5 The growth before and after removal of the mineralized shell of EcN@CaCO₃. Growth curves (A) and the plate counts (B) at specified time points of EcN@CaCO₃. Data are presented as the mean±SEM (n=3).

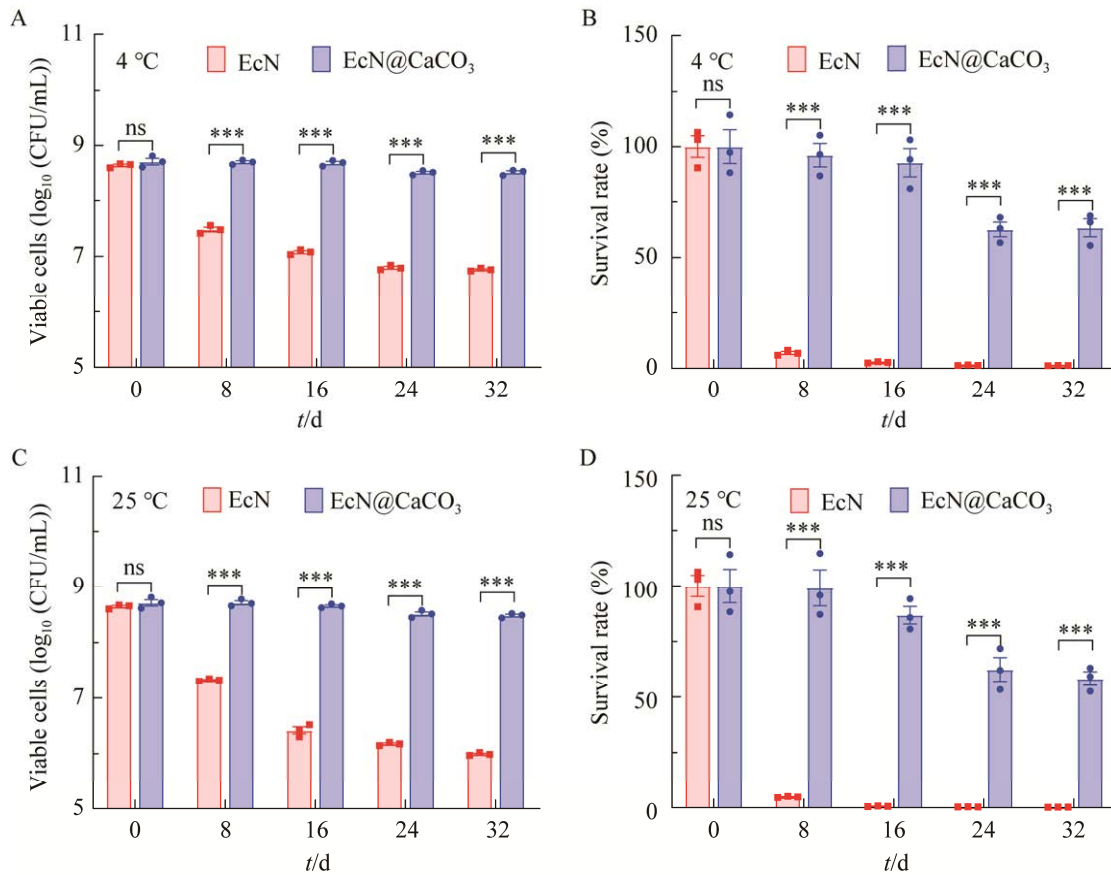


图 6 EcN 和 EcN@CaCO₃ 的长时间储存情况

Figure 6 Long-term storage of EcN and EcN@CaCO₃. Viability counts (A) and survival rates (B) of EcN and EcN@CaCO₃ during long-term storage at 4 °C; Viability counts (C) and survival rates (D) of EcN and EcN@CaCO₃ during long-term storage at 25 °C. Data are presented as the mean±SEM (*n*=3). Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. ***: *P*<0.001; ns: *P*>0.05.

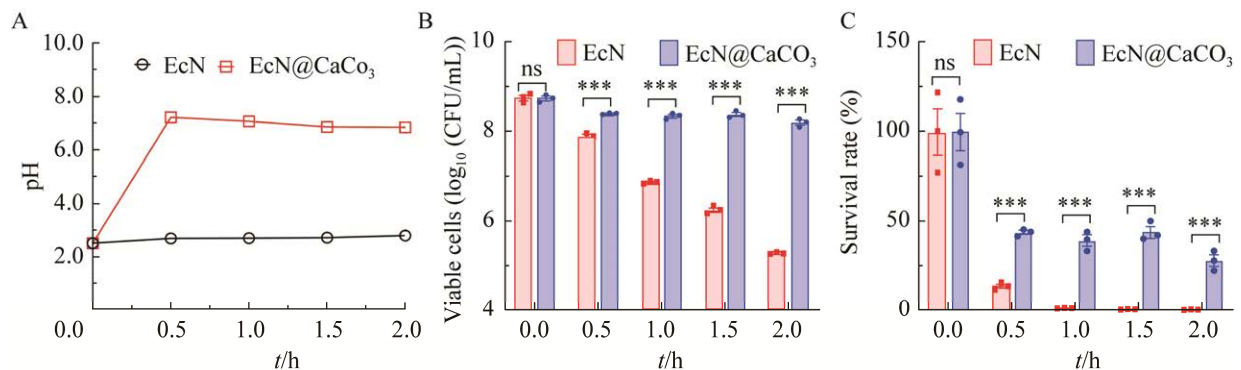


图 7 EcN@CaCO₃ 对强酸环境的耐受情况

Figure 7 The tolerance of EcN@CaCO₃ in strong acidic environment. The evolution of solution pH over time of EcN and EcN@CaCO₃ under acidic conditions with pH 2.5 (A), and viability counts (B) and survival rates (C) of EcN and EcN@CaCO₃ under acidic conditions with pH 2.5. Data are presented as the mean±SEM (*n*=3). Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. ***: *P*<0.001; ns: *P*>0.05.

EcN@CaCO₃表现出对酸性环境极高的耐受性,就算时间延长至 2 h,活细胞数量仅有 0.54 log₁₀ (CFU/mL) 的下降,活菌率为 28.1%,相较于未仿生矿化的 EcN 活菌数提高了 837 倍。上述结果可以归因于矿化外壳是一种优秀的抗酸剂^[29-30],在酸性环境中能够有效发挥中和 pH 的作用,使微环境 pH 升高,从而减少 H⁺对细菌的损害。

2.4.2 pH 12.0 的强碱环境

本研究评价了 EcN 和 EcN@CaCO₃ 在 pH 12 的碱性条件下的存活率。如图 8 所示, EcN 在强碱环境中活细胞数量快速降低, 0.5 h 游离 EcN 活细菌数量已经下降了 1.08 log₁₀ (CFU/mL), 活菌率降至 8.18%, 随着时间增长至 1 h, 游离 EcN 活菌数量为 5.89 log₁₀ (CFU/mL), 活菌率仅剩 0.11%; 相较于游离 EcN 在碱性环境中的快速失活, EcN@CaCO₃ 表现出更高的稳定性, 0.5 h 活菌数量几乎不变[下降 0.041 log₁₀ (CFU/mL)], 而在碱性环境中 1 h, 活菌数仍有 8.12 log₁₀ (CFU/mL), 提高了 171 倍。上述结果归因于矿化壳在一定程度上保持了细菌外形, 阻止了生物活性物质由于形变带来的损伤^[22], 极大提升了细菌在碱性环境中的存活率。

2.4.3 高温

本研究评估了 EcN 和 EcN@CaCO₃ 在不同高

温条件下处理 10 min 后的细菌存活率。如图 9A 所示, EcN 和 EcN@CaCO₃ 在 50、60、70 °C 和 80 °C 环境中的活菌数分别是 7.72 log₁₀ (CFU/mL) 和 8.18 log₁₀ (CFU/mL)、6.47 log₁₀ (CFU/mL) 和 7.56 log₁₀ (CFU/mL)、3.88 log₁₀ (CFU/mL) 和 5.19 log₁₀ (CFU/mL)、3.37 log₁₀ (CFU/mL) 和 5.17 log₁₀ (CFU/mL), 活菌率(图 9B)分别是 9.46% 和 27.2%、0.53%和 6.51%、0.001 3%和 0.028%、0.000 43%和 0.025%; 虽然 EcN 和 EcN@CaCO₃ 在高温环境中均有明显的活细菌下降, 但细菌表面矿化壳涂敷仍然有助于提高存活率, 在 50、60、70 和 80 °C 环境中分别提高了 2.9、12.3、20.7 和 59.1 倍。

2.4.4 抗生素

本研究评价了仿生矿化矿物壳在抗生素环境中对细菌的保护作用。如图 10 所示, EcN 在 50 μg/mL 的卡拉霉素溶液中仅 1 h 活菌数量就减少了 3.9 log₁₀ (CFU/mL), 死亡细菌占比超 99.98%, 在 2 h 内活菌仅保留了 0.024%; 而有矿化壳保护的 EcN@CaCO₃ 在 1 h 内活菌数量仅下降了 1.25 log₁₀ (CFU/mL), 活菌保留率为 5.64%, 是 EcN 的 455 倍; EcN@CaCO₃ 甚至在经过 2 h 抗生素处理后, 活菌率仍然有 1.8%, 是 EcN 的 729.7 倍。

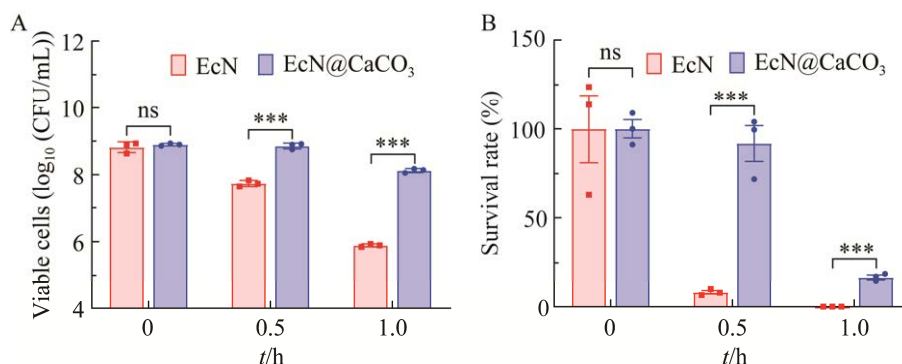


图 8 EcN@CaCO₃ 对强碱环境的耐受情况

Figure 8 The tolerance of EcN@CaCO₃ in strong alkaline environment. Viability counts (A) and survival rates (B) of EcN and EcN@CaCO₃ under alkaline conditions with pH 12. Data are presented as the mean±SEM (n=3). Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. ***: *P*<0.001; ns: *P*>0.05.

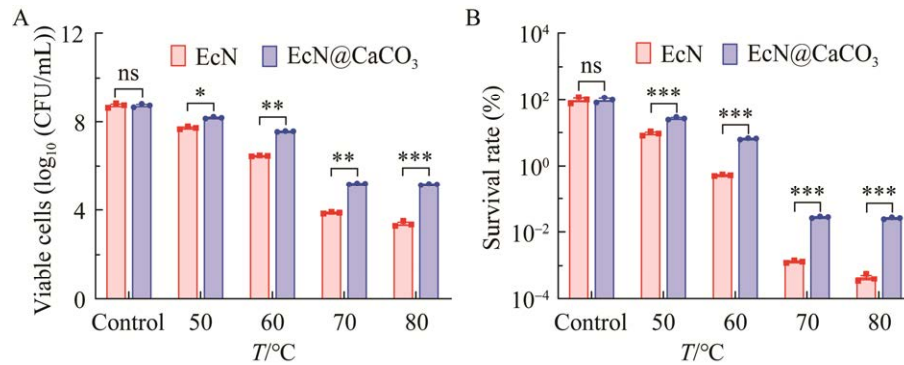


图 9 EcN@CaCO₃对高温环境的耐受情况

Figure 9 The tolerance of EcN@CaCO₃ in high temperature environments. Viability counts (A) and survival rates (B) of EcN and EcN@CaCO₃ after treatment at different temperatures for 10 minutes. Data are presented as the mean±SEM ($n=3$). Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: $P>0.05$.

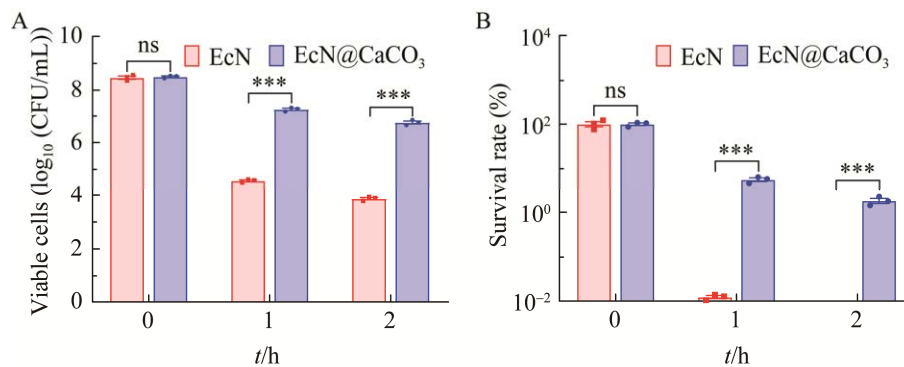


图 10 EcN@CaCO₃对抗生素环境的耐受情况

Figure 10 The tolerance of EcN@CaCO₃ in the presence of antibiotic environment. Viability counts (A) and survival rates (B) of EcN and EcN@CaCO₃ in the presence of antibiotic environment. Data are presented as the mean±SEM ($n=3$). Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. ***: $P<0.001$; ns: $P>0.05$.

综上所述,细菌表面仿生矿化出的矿物质外壳能够极大地提高细菌在恶劣环境中的生存能力,不论是在强酸、强碱、高温,甚至是在抗生素环境中。

3 结论

本研究通过生物启发的仿生矿化成功地在细菌表面涂敷人造碳酸钙矿物壳,用于保护活细胞。细菌被限制在坚固而完整的矿物壳中,有限的空间和物质交换使细菌暂时失活,并能够在酸刺

激下去除涂层重新恢复活性。本研究考察了EcN@CaCO₃在4 °C和25 °C下储存32 d后的存活率,相较于未仿生矿化的EcN,活力提高了48倍和262倍。人造矿物壳还可以作为保护细菌免受外界侵害的物理屏障,甚至可以在各种极端环境下保留细菌的活力:相较于游离EcN, EcN@CaCO₃在强酸环境中的活力最高提升837倍,在强碱环境中提升超171倍,在高温条件下最多提升59.1倍,甚至在抗生素溶液中都能展现出超高的活力,活力提升达到了729.7倍。在未

来的研究中, 仿生矿化人造矿物壳可以为细菌在环境工程、食品制造和生物医药领域的应用提供新的思路和见解。

参考文献

- [1] BARDGETT RD, van der PUTTEN WH. Belowground biodiversity and ecosystem functioning[J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 505-511.
- [2] BÄUMLER AJ, SPERANDIO V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 85-93.
- [3] CARDINALE BJ, DUFFY JE, GONZALEZ A, HOOPER DU, PERRINGS C, VENAIL P, NARWANI A, MACE GM, TILMAN D, WARDLE DA, KINZIG AP, DAILY GC, LOREAU M, GRACE JB, LARIGAUDERIE A, SRIVASTAVA DS, NAEEM S. Biodiversity loss and its impact on humanity[J]. *Nature*, 2012, 486(7401): 59-67.
- [4] HOOPER LV, LITTMAN DR, MACPHERSON AJ. Interactions between the microbiota and the immune system[J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1268-1273.
- [5] 段云峰, 蔡峰, 律娜, 朱宝利. 益生菌促进胃肠道健康的机制及应用[J]. *微生物学报*, 2022, 62(3): 836-847. DUAN YF, CAI F, LYU NA, ZHU BL. The mechanism and application of probiotics in promoting gastrointestinal health[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 836-847 (in Chinese).
- [6] 刘真真, 彭楠. 益生菌的应用现状和发展前景[J]. *微生物学报*, 2023, 63(5): 1863-1887. LIU ZZ, PENG N. Current application status and development prospect of probiotics[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(5): 1863-1887 (in Chinese).
- [7] COOK MT, TZORTZIS G, CHARALAMPOPOULOS D, KHUTORYANSKIY VV. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery[J]. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2012, 162(1): 56-67.
- [8] YOUN W, KO EH, KIM MH, PARK M, HONG D, SEISENBAEVA GA, KESSLER VG, CHOI IS. Cytoprotective encapsulation of individual jurkat T cells within durable TiO₂ shells for T-cell therapy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(36): 10702-10706.
- [9] NAIK RR, STONE MO. Integrating biomimetics[J]. *Materials Today*, 2005, 8(9): 18-26.
- [10] PALMER LC, NEWCOMB CJ, KALTZ SR, SPOERKE ED, STUPP SI. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(11): 4754-4783.
- [11] SARIKAYA M. Biomimetics: materials fabrication through biology[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(25): 14183-14185.
- [12] DU P, LIU RH, SUN SQ, DONG H, ZHAO RB, TANG RK, DAI JW, YIN H, LUO JX, LIU ZX, GUO HC. Biomimetic mineralization improves the thermostability of foot-and-mouth disease virus-like particles and the protective immune response induced[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(47): 22748-22761.
- [13] NIE ZH, ZHANG YQ, TANG RK, WANG XY. Biomimetic mineralization: an emerging organism engineering strategy for biomedical applications[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2022, 232: 111815.
- [14] WANG B, LIU P, JIANG WG, PAN HH, XU XR, TANG RK. Yeast cells with an artificial mineral shell: protection and modification of living cells by biomimetic mineralization[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2008, 47(19): 3560-3564.
- [15] KIM BJ, CHO H, PARK JH, MANO JF, CHOI IS. Strategic advances in formation of cell-in-shell structures: from syntheses to applications[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(14): e1706063.
- [16] ZHAO YQ, TANG RK. Improvement of organisms by biomimetic mineralization: a material incorporation strategy for biological modification[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 120: 57-80.
- [17] ARIAS JL, FERNÁNDEZ MS. Polysaccharides and proteoglycans in calcium carbonate-based biomineralization[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(11): 4475-4482.
- [18] HILDEBRAND M. Diatoms, biomineralization processes, and genomics[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(11): 4855-4874.
- [19] CHONG LSH, ZHANG JY, BHAT KS, YONG D, SONG J. Bioinspired cell-in-shell systems in biomedical engineering and beyond: comparative overview and prospects[J]. *Biomaterials*, 2021, 266: 120473.
- [20] FAKHRULLIN RF, ZAMALEEVA AI, MOROZOV MV, TAZETDINOVA DI, ALIMOVA FK, HILMUTDINOV AK, ZHDANOV RI, KAHRAMAN M, CULHA M. Living fungi cells encapsulated in

- polyelectrolyte shells doped with metal nanoparticles[J]. *Langmuir*, 2009, 25(8): 4628-4634.
- [21] LEE H, KIM N, BIN RHEEM H, KIM BJ, PARK JH, CHOI IS. A decade of advances in single-cell nanocoating for mammalian cells[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, 10(13): e2100347.
- [22] WANG GC, CAO RY, CHEN R, MO LJ, HAN JF, WANG XY, XU XR, JIANG T, DENG YQ, LYU K, ZHU SY, QIN ED, TANG RK, QIN CF. Rational design of thermostable vaccines by engineered peptide-induced virus self-biomineralization under physiological conditions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(19): 7619-7624.
- [23] YANG SH, LEE KB, KONG B, KIM JH, KIM HS, CHOI IS. Biomimetic encapsulation of individual cells with silica[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2009, 48(48): 9160-9163.
- [24] 高楚琪, 赵梓墨, 黄羽彤, 李萱韬, 陈峰. 益生菌-水凝胶递送系统的研究进展及应用潜力[J]. *微生物学报*, 2022, 62(3): 806-823.
- GAO CQ, ZHAO ZM, HUANG YT, LI XT, CHEN F. Research progress and potential application in oral cavity of hydrogel-based probiotic delivery systems[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 806-823 (in Chinese).
- [25] ANSELMO AC, McHUGH KJ, WEBSTER J, LANGER R, JAKLENEC A. Layer-by-layer encapsulation of probiotics for delivery to the microbiome[J]. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla)*, 2016, 28(43): 9486-9490.
- [26] LIU J, LI W, WANG YX, DING YY, LEE A, HU QY. Biomaterials coating for on-demand bacteria delivery: selective release, adhesion, and detachment[J]. *Nano Today*, 2021, 41: 101291.
- [27] EDGINGTON MP, ALPHEY LS. Modeling the mutation and reversal of engineered underdominance gene drives[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2019, 479: 14-21.
- [28] FENG PP, CAO ZP, WANG XY, LI JJ, LIU JY. On-demand bacterial reactivation by restraining within a triggerable nanocoating[J]. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla)*, 2020, 32(34): e2002406.
- [29] RODRIGUEZ-STANLEY S, AHMED T, ZUBAIDI S, RILEY S, AKBARALI HI, MELLOW MH, MINER PB. Calcium carbonate antacids alter esophageal motility in heartburn sufferers[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2004, 49: 1862-1867.
- [30] RALIYA R, SOM A, SHETTY N, REED N, ACHILEFU S, BISWAS P. Nano-antacids enhance pH neutralization beyond their bulk counterparts: Synthesis and characterization[J]. *RSC Advances*, 2016, 6: 54331-54335.