

球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)和嗜冷芽孢八叠球菌(*Sporosarcina psychrophila*)介导形成白云石晶体

宋泉颖¹ 徐俊^{2,3} 张宇^{2,3*}

(1. 上海交通大学 生命科学与技术学院 上海 200240)

(2. 海洋工程国家重点实验室 上海 200240)

(3. 上海交通大学 海洋研究院 上海 200240)

摘要：【目的】白云石(Dolomite)是一种含有钙镁的碳酸盐矿物[CaMg(CO₃)₂]，广泛存在于陆地和海洋等环境并常与油气埋藏共存。尽管白云石(或岩)的发现已经有三百多年的历史，但是对白云石的成因仍然没有定论，地质学上称之为“白云石之谜”。20世纪90年代 Vasconcelos C. 提出了“微生物白云石模型”，为白云石成因的研究带来了新的思路。但是这一模型并不完善，白云石的形成与所介导的微生物生理状态以及环境参数之间的关系不明确。另外，所有报道的实验都是在地表压强条件下进行，无法表征自然界中白云石所处的高压环境。本研究中引入压力这一环境参数，结合菌株本身生理特性参数，综合考察多重因子对微生物介导形成白云岩的影响。【方法】利用球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)和嗜冷芽孢八叠球菌(*Sporosarcina psychrophila*)两株具有尿素水解活性的细菌作为生物材料，在不同的温度(15 °C 和 30 °C)压强(常压和 20 MPa)氧气浓度(常压好氧条件和常压微氧条件)不同的尿素水解活性下进行生物矿化实验。通过 SEM(扫描电子显微镜)和 EDS(X 射线能谱分析)相结合的方法观察沉淀物形貌和矿物成分构成。通过 XRD(X 射线衍射分析)定性测定碳酸盐矿物沉淀物的种类。【结果】球形赖氨酸芽孢杆菌和嗜冷芽孢八叠球菌在实验中所设计的所有矿化条件下都能够介导形成碳酸盐矿物沉淀。XRD 和 SEM 检测均证实球形赖氨酸芽孢杆菌在 30 °C 的 20 MPa 微氧条件下能够介导形成不规则菱面型和椭球型白云石。高压条件更有助于白云石的形成。除了白云石晶体，实验中还观察到有其他矿物(如方解石，碳氢镁石，钙镁碳酸石等)。【结论】实验证实球形赖氨酸芽孢杆菌和嗜冷芽孢八叠球菌具有矿化能力，特别是球形赖氨酸芽孢杆菌具有介导形成白云石的能力。微生物介导形成的碳酸盐矿物组分受到微生物的代谢活性以及温度、压力等生物矿化实验条件控制。这一研究结果帮助完善“微生物白云石模型”，为解释白云石的深部成因提供数据支持。

关键词：球形赖氨酸芽孢杆菌，嗜冷芽孢八叠球菌，尿素水解酶活性，高压，菱面型白云石

基金项目：国家自然科学基金项目(No. 41102211)；上海交通大学新进青年教师启动计划项目(No. AF0800005)

*通讯作者：Tel：86-21-34207208；Fax：86-21-34207205；✉：zhang.yusjtu@sjtu.edu.cn

收稿日期：2014-01-08；接受日期：2014-02-21；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2014-03-04

Dolomite precipitation mediated by *Lysinibacillus sphaericus* and *Sporosarcina psychrophila*

SONG Quan-Ying¹ XU Jun^{2,3} ZHANG Yu^{2,3*}

(1. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. State Key Laboratory of Ocean Engineering, Shanghai 200240, China)

(3. Institute of Oceanology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] Dolomite [$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$], a carbonate mineral composed of calcium and magnesium carbonate is widely distributed both in terrestrial as well as in marine environments including petroleum reservoirs. It has been more than three centuries since dolomite was discovered for the first time. However the origin of dolomite remains unclear, which was referred to as “dolomite problem”. In 1990’s Vasconcelos C. from Swiss Institute of Technology proposed a model for “microbial dolomite formation”, which provided a new perspective on the origin of dolomite. However, this model is not yet optimized to fully clarify the relationship between dolomite formation, bacterial physiology and environmental parameters. The available published data on the dolomite formation mediated by microorganisms were performed at ambient temperature and pressure, which is different from the natural niche of dolomitization. In this study, we introduced hydrostatic pressure as an additional environmental parameter in combination with the physiological status of bacteria in order to investigate the dolomite formation under multiple conditions. [Methods] Two strains, *Lysinibacillus sphaericus* and *Sporosarcina psychrophila*, which express urea hydrolysis activity, were used as biomass to mediate dolomite precipitation under different environmental conditions like temperature (15 °C and 30 °C), pressures (ambient and 20 MPa) and oxygen concentrations (aerobic and micro-aerobic). To determinate the morphology and component of carbonate precipitation, SEM (scanning electron microscope) combined with EDS (Energy Dispersive X-ray Spectrometry) analysis was performed. To determinate the mineralogy of carbonate precipitation, XRD (X-ray diffraction) analysis was performed. [Results] Both *L. sphaericus* and *S. psychrophila* were able to induce carbonate precipitation under all of the given experimental conditions. Both SEM and XRD results confirmed the irregular rhombohedral and spherical dolomite formation mediated by *L. sphaericus* at 30 °C under 20 MPa pressure and micro-aerobic condition. In addition to dolomite, other minerals (e.g. calcite, nesquehonite, huntite) were also detected to be present in precipitation. [Conclusion] This study has demonstrated that both *L. sphaericus* and *S. psychrophila* are able to mediate carbonate precipitation. Especially *L. sphaericus* is proven to induce dolomite formation under certain conditions. Dolomite formation is significantly influenced by urea hydrolysis activity, temperature and pressure. Our results provide evidence to explain the origin of dolomite from deep sphere and help to optimize the model of “microbial dolomite formation”.

Keywords: *Lysinibacillus sphaericus*, *Sporosarcina psychrophila*, Urea hydrolysis activity, High hydrostatic pressure, Rhombohedral dolomite precipitation

白云石是一种钙镁碳酸盐矿物,其标准晶体结构呈菱面型,其标准组分书写形式为 $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ^[1]。自然条件下白云石存在于多种环境中,包括海床、矿脉、湖泊和蒸发盆地^[2]。据相关数据统计,全世界50%的碳酸盐岩储层是白云岩,80%以上北美油气碳酸盐岩储存在白云岩中^[3]。可以说研究白云石的成因对油气勘探和开发具有战

略学意义。虽然白云岩分布如此之广泛,但是在现代沉淀环境中几乎找不到原生的白云石及白云岩踪迹^[4]。原生、厚层白云岩在前寒武纪分布最广^[5]。现代海水中碳酸根离子和钙镁离子的活度远超过固相白云石活度的理论值,理论上来说应该有白云石及白云岩形成,但在近代全球范围内近地表环境中并没有找到大规模的白云岩,这说明白云石的形

成是一个动力学问题,它之所以不能形成是因为动力学壁垒无法突破^[6]。对白云石的形成条件和机制一直没有明确解析,地质学界几百年间都存在着“白云石之谜”之说。白云石生成机制一个突破性进展是 Vasconcelos C.在厌氧条件下利用硫酸盐还原菌沉淀出了微米级的白云石晶体,并被公众所接受,由此提出了一种新的白云岩形成模型“微生物白云石模型”^[7]。此后,陆续有报道多种微生物的代谢能够介导白云石的形成,如硫酸盐还原菌、产甲烷菌、厌氧嗜甲烷古菌、中度嗜盐菌^[8-26]。微生物的一些特性,包括:生成胞外多聚物带负电荷有利于吸收钙镁离子、微生物代谢产生碳酸根离子、微生物代谢产生碱度等,有利于打破动力学壁垒,促进白云石原生结晶形成。一旦原生结晶形成,初生动力学壁垒已经被打破,钙镁离子进一步附着在上面,有利于白云石晶体进一步扩大^[17]。然而,微生物介导形成白云石模型中有一个难点尚未解决,即目前在实验室条件下得到白云石晶体都是微米级的球型、纺锤体型或者哑铃型,尚未有菱面型的白云石晶体,这与在环境样品中观察到的现象不一致^[8-26]。另外,目前的报道都是对菌株进行常压培养,与自然环境中深部来源的白云石形成条件有所区别。因此,“微生物白云石模型”还有待于进一步完善。白云石之谜尚未解开。

在本研究中利用球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*, *L. sphaericus*)和嗜冷芽孢八叠球菌(*Sporosarcina psychrophila*, *S. psychrophila*)两种具有尿素水解活性能够介导碳酸盐矿物形成的细菌作为生物材料,引入高压这一环境参数模拟白云石形成时所处的深部环境,检测多重环境因子对于微生物介导形成碳酸盐矿物,特别是白云石的影响,为完善“微生物白云石模型”提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 生物材料

球形赖氨酸芽孢杆菌(*L. sphaericus*)购买于中国海洋微生物菌种保藏管理中心;嗜冷芽孢八叠球

菌(*S. psychrophila*)购买于中国普通微生物保藏管理中心。球形赖氨酸芽孢杆菌和嗜冷芽孢八叠球菌是一类好氧,嗜中低温,产芽孢的细菌,同类菌株被报道过有尿素水解酶活性^[9,27]。球形赖氨酸芽孢杆菌和嗜冷芽孢八叠球菌也曾被报道过可以在4–32 °C 条件下迅速沉淀方解石^[9,28]。

1.2 菌种培养

培养球形赖氨酸芽孢杆菌(*L. sphaericus*)时采用2216 E培养基(Yeast extract 1 g/L, Tryptone 5 g/L, Beef extract 1 g/L, NaCl 26 g/L, MgCl₂·6H₂O 5 g/L, CaCl₂·2H₂O 1.4 g/L, Na₂SO₄ 4 g/L, NH₄Cl 0.3 g/L, KH₂PO₄ 0.1 g/L, KCl 0.5 g/L, Trace element mixture 1 mL/L, Vitamin mixture 1 mL/L, Thiamin solution 1 mL/L, Vitamin B₁₂ solution 1 mL/L, pH 7.4–7.6)。培养嗜冷芽孢八叠球菌(*S. psychrophila*)时采用营养肉汤培养基(Tryptone 10 g/L, Beef extract 3 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.0)。两株菌均在30 °C 常压好氧条件下以220 r/min的转速培养2 d后作为生物材料用于后续的生物矿化实验。

1.3 生物矿化实验

在菌生长2 d之后,加入20 g/L的尿素和54 mmol/L的氯化钙以及421 mmol/L的氯化镁[n(Mg/Ca)≈8/1],满足白云石生成所必需的高镁钙比。为了观察氧气和液压对生物矿化实验影响,矿化环境设置为常压好氧条件,常压微氧条件和20 MPa 液压微氧环境。为了观察温度对生物矿化影响,矿化环境设置为15 °C和30 °C。常压好氧条件是在200 mL的菌液加入钙镁离子之后转入500 mL三角瓶中置于相应温度培养箱中静置培养。常压微氧条件是取50 mL的菌液加入50 mL注射器中,人工除去注射器中的气泡,仅保留菌液中溶解的氧气,置于相应温度培养箱中静置培养。20 MPa 液压微氧环境是将50 mL菌液加入50 mL注射器中,除去注射器中的气泡,将注射器转移到高压生物反应器中,利用高压泵加压至20 MPa,最后置于相应温度培养箱中静置培养。在矿化实验完成之后,样品利用冷冻干燥机过夜干燥,在4 °C条件下保存。

1.4 沉淀物形态及元素组成检测

生物矿化实验后的样本在扫描电子显微镜(SEM)下观测,并用X射线能谱仪(EDS)检测化学组分。把导电胶粘贴在样品台,取出少量沉淀物(约0.5 g)涂在导电胶上,将导电胶置于离子溅射仪镀金120 s。然后将镀金好的样品放在扫描电子显微镜(Sirion 200SEM, FEI 公司, USA)观测。显微镜观测同时对选定区域样品的化学组分用EDS能谱仪(INCA OXFORD, England)检测^[29-30]。

1.5 沉淀物矿物组分检测

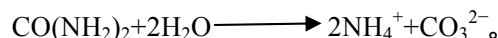
首先将沉淀物样品用玛瑙研钵磨成粉,然后用100 μm的分样筛得到最终粉末,将粉末与10%的ZnO混合用X射线衍射仪(XRD, D8 ADVANCE, BRUKER-AXS 公司, German)在40 kV和40 mA的条件下利用Cu-Kα射线以4 s的速度在10°-90°的角度范围内扫描^[31]。图谱用Jade 5.0软件进行定量分析。最低检测极限为1%。可检测的矿物成分包括:白云石[CaMg(CO₃)₂]、方解石(CaCO₃)、泻利盐(MgSO₄·7H₂O)和碳酸钙镁石[Mg₃Ca(CO₃)₄]。

1.6 尿素水解酶活性检测

尿素水解酶活性以单位时间内氨氮(NH₃-N)变化含量计算,为了定性确定两株菌是否有尿素水解酶活性,本研究设计了一个通过氨氮含量变化值推测尿素水解酶活性大小的方法。步骤如下:首先配置新鲜海水培养基(MgCl₂·6H₂O 5 g/L, CaCl₂·2H₂O 1.4 g/L, Na₂SO₄ 4 g/L, NH₄Cl 0.3 g/L, KH₂PO₄ 0.1 g/L, KCl 0.5 g/L, Trace element mixture 1 mL/L, Vitamin mixture 1 mL/L, Thiamin solution 1 mL/L, Vitamin B12 solution 1 mL/L, 尿素 20 g/L, pH 7.0)。这一培养基与2216E相比缺乏营养物,有利于维持细胞活性但避免细胞量的显著变化。此外,培养基化学组分确定,实验中所检测到的氨氮变化基本来源于尿素水解活性。将相应的菌在适应的环境下生长至稳定期,将稳定期菌液以不同的接种比例加入海水培养基来模拟处于不同生长阶段的菌。根据尿素水解酶反应可以看出,培养基中氨氮的变化速率能够指示尿素水解的活性。氨氮含量(NH₃-N)是

利用哈希公司DR 5000紫外分光分光光计和量程为0-50 mg/L的氨氮含量测量试剂盒测定的。

尿素水解反应:



2 结果与分析

2.1 球形赖氨酸芽孢杆菌(*L. sphaericus*)和嗜冷芽孢八叠球菌(*S. psychrophila*)的生长曲线和菌株的尿素水解活性

为了观察这两株菌在生长过程中pH值和OD值是否发生明显变化,且pH值处于持续上升的状态,将两株菌以1%接种之后在30℃常压好氧条件下培养,72 h之内观察OD值和pH值变化。如图1所示,球形赖氨酸芽孢杆菌和嗜冷芽孢八叠球菌这两株菌以1%接种之后72 h之内OD值和pH值上升,该变化曲线显示两株菌在接种后12 h均进入到生长对数期,并且在生长期阶段pH值都持续上升。这两株菌在接种后48 h均进入稳定期,而且OD值均大于2.5, pH值均大于8.5。这些生理特性指示:(1)帮助快速获得足够的生物量用于生物成矿实验;(2)这两株菌在生长中产生碱度,长期处于碱性环境中,有可能具有介导碳酸盐矿物形成的潜力。

尿素水解酶活性可以水解尿素,在短时间内产生大量碳酸根离子和碱度,因而有助于产生碳酸盐沉淀物。结果表明*L. sphaericus*和*S. psychrophila*均具有明显的尿素水解活性,并且就单位变量来看*L. sphaericus*相比*S. psychrophila*其尿素水解酶活性更强(图2)。

2.2 *L. sphaericus*和*S. psychrophila*介导形成的碳酸盐矿物的组成鉴定

如表1所示,XRD结果显示在30℃常压好氧以及30℃高压微氧条件下*L. sphaericus*都能够介导形成白云石。*S. psychrophila*介导的矿化实验中没有超过XRD检测极限(1%)的白云石生成。除了白云石以外,同时也生成了方解石、一水合方解石、钙镁碳酸石、泻利盐和碳氢镁石等矿物晶体。但是由于检测手段的局限性,还有大量的沉淀组分无法确定。

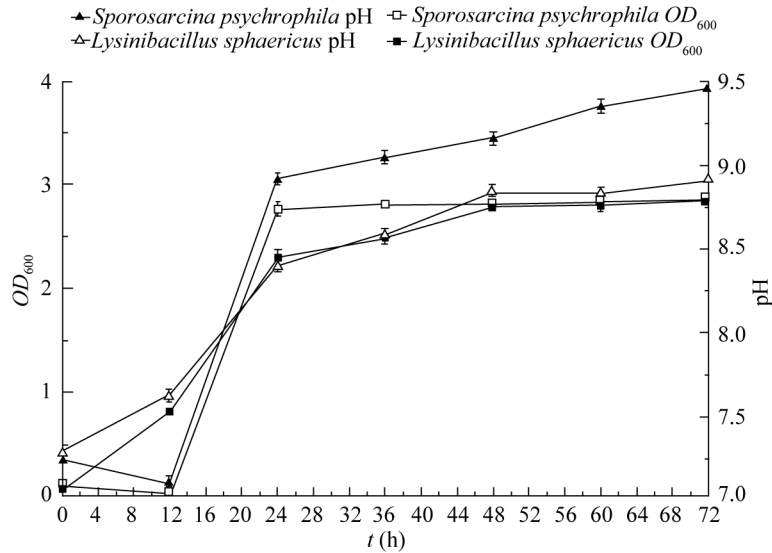


图 1 *L. sphaericus* 和 *S. psychrophila* 生长曲线和 pH 变化曲线
Figure 1 Growth and pH curve of *L. sphaericus* and *S. psychrophila*

注：在 30 °C 常压条件下培养，1%接种量。
Note: Incubation at ambient condition and 30 °C with 1% inoculation amount.

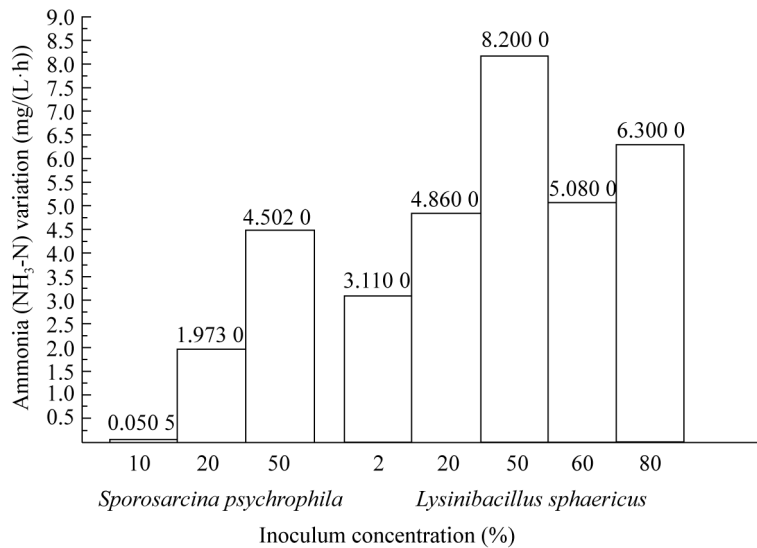


图 2 不同接种量的 *L. sphaericus* 和 *S. psychrophila* 尿素水解酶活性(氨氮含量变化值/h)柱状图
Figure 2 Bar graph of urea hydrolysis activity of *L. sphaericus* and *S. psychrophila* (calculated by ammonia change per hour) inoculated at different ratios

注：不同接种量的两株菌对应不同生理状态。*L. sphaericus*：接种量为 2%时，OD=1.312，pH 8.2；接种量为 20%时，OD=1.387，pH 8.27；接种量为 50%时，OD=1.416，pH 8.45；接种量为 60%时，OD=1.605，pH 8.5；接种量为 80%时，OD=1.875，pH 8.55；*S. psychrophila*：接种量为 10%时，OD=1.167，pH 8.45，接种量为 20%时，OD=1.939，pH 9.05；接种量为 50%时，OD=2.401，pH 9.25。
Note: The two strains with different incubation amounts corresponds to different physiological statuses. *L. sphaericus*: For 2%, OD=1.312, pH 8.2; For 20%, OD=1.387, pH 8.27; For 50%, OD=1.416, pH 8.45; For 60%, OD=1.605, pH 8.5; For 80%, OD=1.875, pH 8.55. *S. psychrophila*: For 10%, OD=1.167, pH 8.45; For 20%, OD=1.939, pH 9.05; For 50%, OD=2.401, pH 9.25.

表 1 球形赖氨酸芽孢杆菌以及嗜冷芽孢八叠球菌在多种条件下矿化所形成的碳酸盐沉淀物 XRD 定性结果
Table 1 The XRD result of carbonate precipitation with *L. sphaericus* and *S. psychrophila*

成岩环境 Incubation condition	菌株 Strain	碳氢镁石 Nesquehonite	钙镁碳酸石 Huntite	一水合方解石 Monhydrocalciteo	方解石 Cacite	白云石 Dolomite	泻利盐 Espomite
15 °C ambient pressure Aerobic (with urea)	<i>L. sphaericus</i>	+	+	—	+	—	—
15 °C ambient pressure Micro-aerobic (with urea)	<i>L. sphaericus</i>	+	+	—	—	—	—
15 °C high hydraulic pressure 20 MPa (with urea)	<i>L. sphaericus</i>	+	+	—	—	—	—
30 °C ambient pressure Aerobic (with urea)	<i>L. sphaericus</i>	+	—	+	+	+	—
30 °C ambient pressure Micro-aerobic (with urea)	<i>L. sphaericus</i>	—	+	—	+	—	—
30 °C high hydraulic pressure 20 MPa (with urea)	<i>L. sphaericus</i>	+	—	—	—	+	—
15 °C ambient pressure Aerobic (with urea)	<i>S. psychrophila</i>	+	—	—	—	—	+
15 °C ambient pressure Micro-aerobic (with urea)	<i>S. psychrophila</i>	—	—	—	—	—	+
15 °C high hydraulic pressure 20 MPa (with urea)	<i>S. psychrophila</i>	+	—	—	—	—	+
30 °C ambient pressure Aerobic (with urea)	<i>S. psychrophila</i>	+	—	—	—	—	+
30 °C ambient pressure Micro-aerobic (with urea)	<i>S. psychrophila</i>	—	—	—	—	—	+
30 °C high hydraulic pressure 20 MPa (with urea)	<i>S. psychrophila</i>	+	—	—	—	—	+
30 °C ambient pressure Aerobic (without urea)	<i>L. sphaericus</i>	+	—	—	+	—	—
30 °C high hydraulic pressure 20 MPa (without urea)	<i>L. sphaericus</i>	+	—	—	—	—	—

注：碳氢镁石：MgCO₃·5H₂O；钙镁碳酸石：Mg₃Ca(CO₃)₄；一水合方解石：CaCO₃·H₂O；方解石：CaCO₃；白云石：CaMg(CO₃)₂；泻利盐：MgSO₄·7H₂O。+：所得到的沉淀物中检测出有该种矿物的存在；—：所得到的沉淀物中没有检测出该种矿物的存在，检测极限为 1%。
Note: Nesquehonite: MgCO₃·5H₂O; Huntite: Mg₃Ca(CO₃)₄; Monohydrocalcite: CaCO₃·H₂O; Calcite: CaCO₃; Dolomite: CaMg(CO₃)₂; Espomite: MgSO₄·7H₂O. +: The presence of the mineral crystal in the incubation condition; -: The absence of the mineral crystal in the incubation condition, the detection limit is 1%.

2.3 *L. sphaericus* 介导形成的典型碳酸盐矿物的形态鉴定
利用 SEM 结合 EDS 对微生物介导形成的碳酸盐矿物沉淀的形态和组分进一步进行检测。*L. sphaericus* 在 30 °C 高压微氧条件下介导形成的沉淀物中发现不规则菱面型(图 3A)和椭球型(图 3B)碳酸盐矿物晶体，且钙镁离子比例相当，具有白云石特征。结合 XRD 结果，证实在该条件下 *L. sphaericus* 介导形成白云石能力。此外，同样条件下的沉淀中也发现大量其他形态和组成的富含钙镁的碳酸盐矿物(图 3C)。

2.4 微生物及其代谢活性对其介导形成碳酸盐矿物的影响
为了验证微生物及其尿素水解的代谢活性对于矿化过程的作用，设计对照试验：在 30 °C 常压好氧和 30 °C 高压微氧两种条件下不接种，或者接种球形赖氨酸芽孢杆菌但是不加尿素，进行生物矿化实验。在没有微生物接种条件下 4 d 内并无沉淀物形成，而在有微生物接种但不加入尿素的情况下有少量沉淀形成，所形成沉淀物 XRD 结果(表 1)显示在相同的环境条件下并没有白云石。而与之相对应的 SEM 实验显示沉淀物表明有大量细菌附着(图 4)。除此之

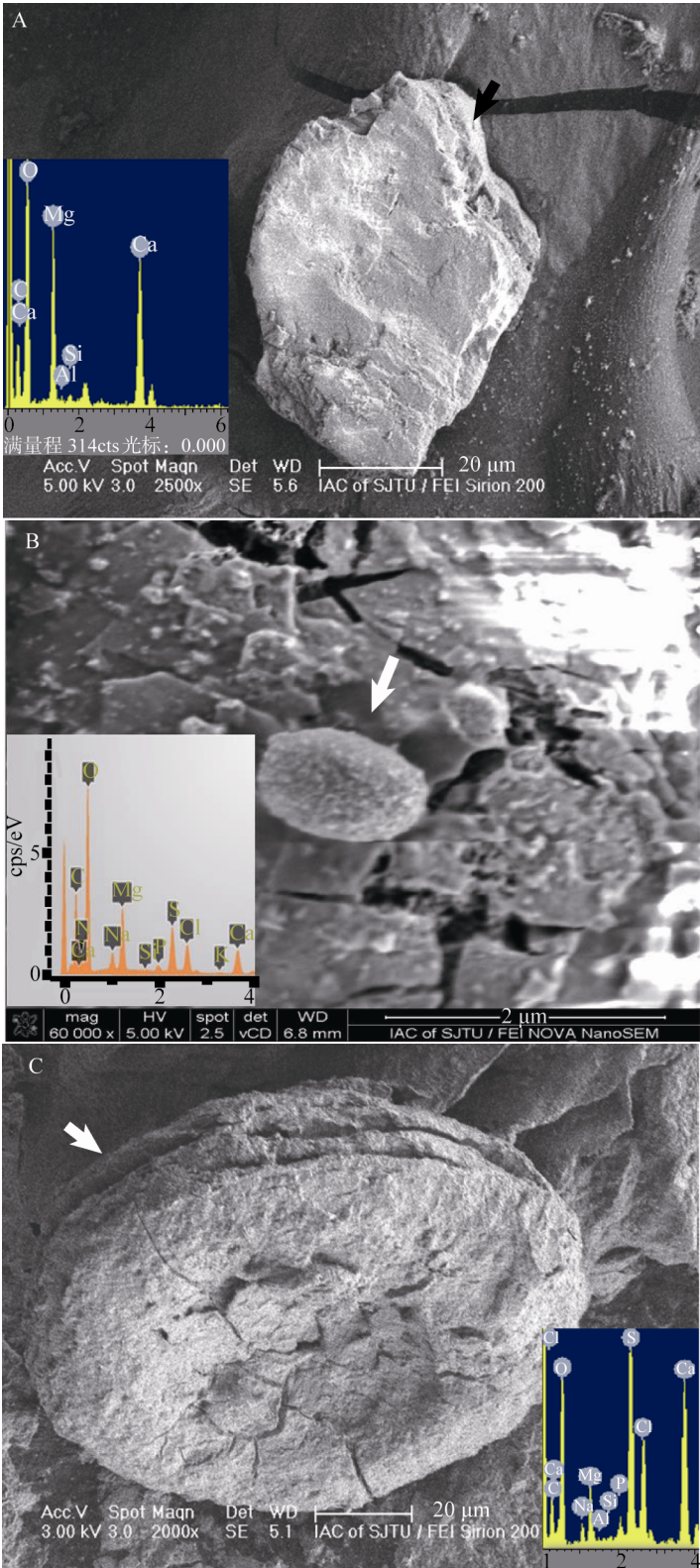


图 3 球形赖氨酸芽孢杆菌加入尿素后在 30 °C 和 20 MPa 条件下所得到的碳酸盐矿物质沉淀物的 SEM-EDS 图
Figure 3 The SEM-EDS analysis of the carbonate precipitation mediated by *L. sphaericus* under the condition of 30 °C and 20 MPa in presence of urea

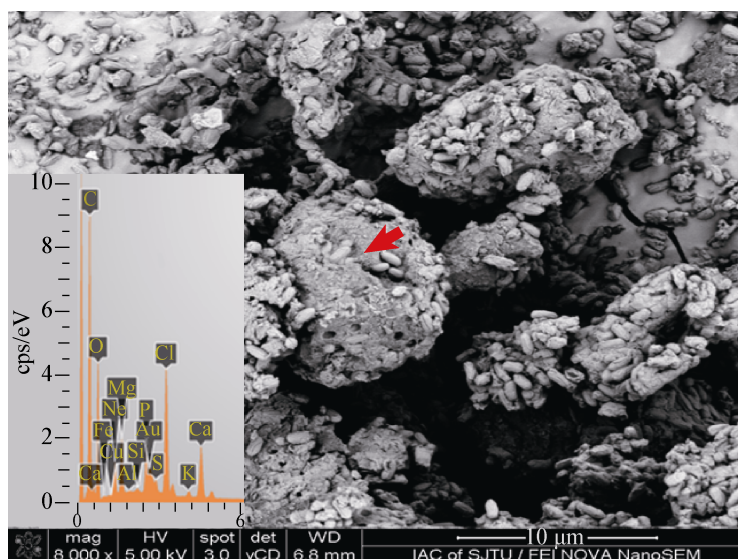


图4 赖氨酸球形芽孢杆菌(*L. sphaericus*)在不加尿素 30 °C 20 MPa 高液压条件下静置矿化 4 d 之后
Figure 4 The precipitation mediated by *L. sphaericus* after four days in the absence of urea under anaerobic conditions at 20 MPa

外,通过 EDS 所显示的峰图,发现在所采的区域虽然钙元素和镁元素的含量接近相等,但是碳元素所对应的峰远高于氧元素所对应的峰,这说明该区域内有大量有机碳存在,证实有细菌的附着。根据 SEM 图所示菌体为长约 1 μm 的短杆形,与接种的球形赖氨酸芽孢杆菌的特性吻合。相比加入尿素的矿化实验,钙元素和镁元素峰高相对较低,说明在不表达尿素水解活性时菌体周围富集钙镁离子的能力下降。缺乏尿素时细菌不能快速创造高碱度高碳酸根离子的微环境吸引钙镁离子聚集。

3 讨论

在本研究中用于生物矿化实验的生物材料并非分离自白云石的天然产地,也同样具有介导白云石晶体形成的能力。之所以选择球形赖氨酸芽孢杆菌(*L. sphaericus*)和嗜冷芽孢八叠球菌(*S. psychrophila*)这两株菌有三方面原因:(1)菌株生长环境偏碱性,且生长过程中产生碱度致使培养 pH 值不断升高,这一碱性环境有利于碳酸盐矿物的形成;(2)菌株具有尿素水解酶活性,其代谢产物之一为碳酸根离子,因此微生物的代谢活动有利于碳酸盐矿物

的形成;(3)该菌株生长代时短,代谢活性强,便于培养和生物矿化实验。实验结果表明球形赖氨酸芽孢杆菌和嗜冷芽孢八叠球菌都具有介导碳酸盐矿物快速形成的能力,特别是球形赖氨酸芽孢杆菌能够介导白云石的形成。目前已报道可以促进白云石沉淀的微生物多分离自海洋、盐湖等白云岩天然产地。而采用的芽孢杆菌广泛存在于包括土壤等多种天然环境,这与已经报道的菌有一定区别。这说明具有介导形成白云石能力的微生物分布广泛,在适合的条件下多种代谢途径都具有打破动力学壁垒刺激矿化的潜力。这一介导机制总结为:球形赖氨酸芽孢杆菌利用尿素分解出碳酸根离子和胺根离子,在菌体周围形成一个高碱度高钙镁高碳酸根离子的微环境,促使钙镁离子的聚集。同时,菌体本身又作为凝结核,为碳酸盐矿物的形成提供支持。从而打破动力学壁垒,有利于白云石沉淀形成(图 5)。

在海床、矿脉、湖泊和蒸发盆地等多天然白云石的环境中缺乏尿素,尿素水解活性也不是这些环境中主要的生物转化过程,但是在本实验所设置的条件下,尿素水解活性在球形赖氨酸芽孢杆菌(*L. sphaericus*)介导白云石沉淀物形成过程中具有

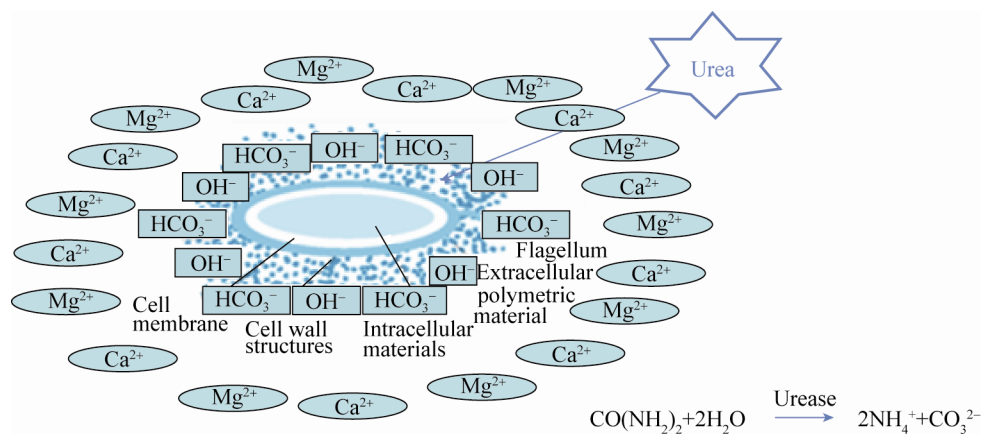


图 5 推测的赖氨酸芽孢杆菌介导白云石模型

Figure 5 The proposed model on dolomite formation induced by *L. sphaericus*

不可替代的作用。在添加尿素的矿化实验中,由于球形赖氨酸芽孢杆菌具有很强的尿素水解活性,在菌体周围迅速形成了高碱度和高碳酸根浓度的微环境,进而吸引钙镁离子的快速聚集,最终菌体被碳酸盐沉淀物包埋。相反,在不添加尿素的条件下,细菌代谢产生碱度和碳酸根的速度和浓度都大幅度下降,不足以造成碳酸盐矿物的快速生成和包埋。同时,由于矿化实验是在静置条件下进行,更容易产生菌体附着在矿物表面的现象。这一结果证明微生物的代谢活性比微生物代谢反应种类本身对于矿化过程的影响更大。

在环境参数设计中我们首次引入了压力这一环境因子,表现出白云石天然存在环境(如冷泉等)中的高压特性。通过比较常压和高压条件下的生物矿化实验,发现不同压力条件下介导形成的碳酸盐矿物的种类有明显区别。部分实验结果显示高压微氧条件下所形成的白云石含量更高。此外,从矿化时间来看,在高压条件下4 d已经有白云石的形成,与之前已报道的矿化时间相比缩短了1~2周^[10-23]。从矿物形态来看,球形赖氨酸芽孢杆菌在30℃高压微氧条件下所形成的白云石沉淀物类似于菱面型,与之前所报道的在实验室形成的球型、哑铃型或者纺锤体型白云石沉淀物形态不同,但与自然环境中发现的白云石晶体相似。推测有以下几个原

因:(1)白云石所需要的碳酸根离子主要是尿素水解产生,在高压微氧条件下,二氧化碳气体在溶液中溶解度更高,这也意味着更多碳酸根离子用于形成白云石;(2)液压本身对打破白云石形成的动力学壁垒有一定积极作用;(3)压力对微生物本身的生理和代谢产生影响,从而影响矿化。以上证明,压力在微生物矿化的培养及生物矿化过程中都是一个关键环境参数,而其影响也必然体现在机制和模型中。

除了环境因子以外,菌种以及微生物的生理状态都会直接影响碳酸盐矿物形成的种类和含量。之前的矿化研究多着眼于环境因子(温度、盐度、钙镁离子浓度等)对碳酸盐矿物种类的影响,但对微生物本身的生理状态有所忽视。我们的研究发现,即使是同一种属但来源于不同产地的菌株也会因为生理特性和细胞结构上的细微差别,导致所介导形成的碳酸盐矿物种类有很大区别(Unpublished data)。虽然本次所选用的两种芽孢杆菌在生理特性和细胞结构上有许多相似之处,但是所产生的碳酸盐沉淀物在组成成分上有很大区别,并且球形赖氨酸芽孢杆菌相比较嗜冷芽孢八叠球菌而言更容易介导白云石晶体形成。归其原因可能是因为以下几个方面:(1)球形赖氨酸芽孢杆菌有更高的尿素水解酶活性,而尿素水解酶活性对白云石的生物介导

沉淀有关键影响;(2)嗜冷芽孢八叠球菌在各种条件下能够介导形成泻利盐($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)形成,而据之前报道硫酸盐对生物成因的白云石形成可能有抑制作用^[23]。

4 结论

该研究主要研究两株具有尿素水解酶的球形赖氨酸芽孢杆菌(*L. sphaericus*)和嗜冷芽孢八叠球菌(*S. psychrophila*)在不同环境条件下介导形成碳酸盐矿物的能力。实验数据表明球形赖氨酸芽孢杆菌在低温高压微氧条件下通过尿素水解活性能够介导形成类似于菱面形白云石晶体,与之前所报道的球型、哑铃型或者纺锤体型不同。球形赖氨酸芽孢杆菌的尿素水解反应在白云石分布的天然环境中鲜见,但在本研究的实验条件下却是打破白云石形成的动力学壁垒的关键因素。这说明微生物代谢产生的碳酸根和碱度的速率和数量是决定生物矿化能力的根本因素,而并非微生物的种类或者微生物代谢反应的种类。与此同时,本研究证实了高压和高的微生物代谢活性都有助于微生物介导白云石的形成,因此,在完善微生物介导形成白云石的模型中必须要考虑这两个因素。综上所述,本研究结果可用于完善“微生物白云石模型”,为地质微生物学家在探寻微生物与白云石形成的研究提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] McKenzie JA, Vasconcelos C. Dolomite Mountains and the origin of the dolomite rock of which they mainly consist: historical developments and new perspectives[J]. *Sedimentology*, 2009, 56(1): 205-219.
- [2] Warren J. Dolomite: occurrence, evolution and economically important associations[J]. *Earth-Science Reviews*, 2000, 52(1): 1-81.
- [3] Zengler D, Dunham J, Ethington RL. Concepts and models of dolomitization[M]. *Turkey: Special Publication-Society of Economic Paleontologists and Mineralogists* 28, 1980: 87-110.
- [4] Lippmann F. *Sedimentary carbonate minerals*[M]. New York: Springer Verlag, 1973: 228.
- [5] 王勇. “白云岩问题”与“前寒武纪之谜”研究进展[J]. *地球科学进展*, 2006, 21(8): 857-862.
- [6] 李波, 颜佳新, 刘喜婷, 等. 白云岩有机成因模式: 机制,

进展与意义[J]. *古地理学报*, 2010, 12(6): 699-710.

- [7] Bontognali TR, Vasconcelos C, Warthmann RJ, et al. Microbes produce nanobacteria-like structures, avoiding cell entombment[J]. *Geology*, 2008, 36(8): 663-666.
- [8] Buczynski C, Chafetz HS. Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy[J]. *Journal of Sedimentary Research*, 1991, 61(2): 226-233.
- [9] Cacchio P, Ercole C, Cappuccio G, et al. Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2003, 20(2): 85-98.
- [10] Deng S, Dong H, Lv G, et al. Microbial dolomite precipitation using sulfate reducing and halophilic bacteria: Results from Qinghai Lake, Tibetan Plateau, NW China[J]. *Chemical Geology*, 2010, 278(3): 151-159.
- [11] Sánchez-Román M, Vasconcelos C, Schmid T, et al. Aerobic microbial dolomite at the nanometer scale: Implications for the geologic record[J]. *Geology*, 2008, 36(11): 879-882.
- [12] Van Lith Y, Warthmann R, Vasconcelos C, et al. Sulphate-reducing bacteria induce low-temperature Ca-dolomite and high Mg-calcite formation[J]. *Geobiology*, 2003, 1(1): 71-79.
- [13] Kenward P, Goldstein R, Gonzalez L, et al. Precipitation of low-temperature dolomite from an anaerobic microbial consortium: the role of methanogenic Archaea[J]. *Geobiology*, 2009, 7(5): 556-565.
- [14] Moore TS, Murray R, Kurtz A, et al. Anaerobic methane oxidation and the formation of dolomite[J]. *Earth and planetary science letters*, 2004, 229(1): 141-154.
- [15] Roberts JA, Bennett PC, González LA, et al. Microbial precipitation of dolomite in methanogenic groundwater[J]. *Geology*, 2004, 32(4): 277-280.
- [16] Sánchez-Román M, McKenzie JA, De Luca Rebello Wagener A, et al. Presence of sulfate does not inhibit low-temperature dolomite precipitation[J]. *Earth and Planetary Science Letters*, 2009, 285(1): 131-139.
- [17] Sánchez-Román M, Vasconcelos C, Warthmann R, et al. Microbial dolomite precipitation under aerobic conditions: results from Brejo do Espinho Lagoon (Brazil) and culture experiments[J]. *Perspectives in Carbonate Geology: A Tribute to the Career of Robert Nathan Ginsburg*, 2009(41): 167-178.
- [18] Van Lith Y, Warthmann R, Vasconcelos C, et al. Microbial fossilization in carbonate sediments: a result of the bacterial surface involvement in dolomite precipitation[J]. *Sedimentology*, 2003, 50(2): 237-245.
- [19] Vasconcelos C, McKenzie JA. Microbial mediation of modern dolomite precipitation and diagenesis under anoxic conditions (Lagoa Vermelha, Rio de Janeiro, Brazil)[J]. *Journal of Sedimentary Research*, 1997, 67(3): 378-390.
- [20] Vasconcelos C, McKenzie JA, Bernasconi S, et al. Microbial mediation as a possible mechanism for natural dolomite formation at low temperatures[J]. *Nature*, 1995, 377(6546): 220-222.
- [21] Warthmann R, Van Lith Y, Vasconcelos C, et al. Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture

- experiments[J]. *Geology*, 2000, 28(12): 1091-1094.
- [22] Warthmann R, Vasconcelos C, Sass H, et al. *Desulfovibrio brasiliensis* sp. nov., a moderate halophilic sulfate-reducing bacterium from Lagoa Vermelha (Brazil) mediating dolomite formation[J]. *Extremophiles*, 2005, 9(3): 255-261.
- [23] Wright DT. The role of sulphate-reducing bacteria and cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, South Australia[J]. *Sedimentary Geology*, 1999, 126(1): 147-157.
- [24] 由雪莲, 孙枢, 朱井泉, 等. 微生物白云岩模式研究进展[J]. *地学前缘*, 2011, 18(4): 52-64.
- [25] Rivadeneyra M, Delgado R, Delgado G, et al. Precipitation of carbonates by *Bacillus* sp. isolated from saline soils[J]. *Geomicrobiology Journal*, 1993, 11(3/4): 175-184.
- [26] Rivadeneyra MA, Párraga J, Delgado R, et al. Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48(1): 39-46.
- [27] De Muynck W, Verbeken K, De Belie N, et al. Influence of temperature on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(3): 1335-1347.
- [28] Hammes F, Boon N, De Villiers J, et al. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4901-4909.
- [29] 李剑平. 扫描电子显微镜对样品的要求及样品的制备[J]. *分析测试技术与仪器*, 2007, 13(1): 74-77.
- [30] 洪涛. 生物医学超微结构与电子显微镜技术[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 1-18.
- [31] 刘粤惠, 刘平安. X 射线衍射分析原理与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 72-77.

~~~~~

## 科技信息摘录

### 人体微生物也是“制药厂”

生活在人体内的细菌包含了为一系列类药性分子指定遗传密码的基因, 包括一种由阴道细菌制造的新抗生素。研究人员将该发现报道于《细胞》杂志上。

这种名为 Lactocillin 的药物暗示微生物学领域还有尚未开发的广阔医疗前景。并未参与新研究的加拿大魁北克省拉瓦尔大学医院中心(CHUL)微生物学家 Marc Ouellette 说: “该实验展示了就制造抗菌分子而言, 微生物有巨大的多样化潜力。”

研究已经证实, 微生物的构成, 即生活在人体内的细菌, 对健康会产生巨大影响, 但科学家尚不清楚这些微生物的工作机理。

美国加州大学旧金山分校微生物学家 Michael Fischbach 领导的团队旨在填补这项空白。研究人员构建了一个机器学习算法, 让一个计算机程序识别那些能制造微小分子的基因。随后, 他们要求该程序在人体微生物中寻找相似基因。搜索结果显示, 人体内有上千个能制造药物的基因。其中一些和临床试验中被检测的药物类似, 例如一种被称作 Thiopeptides 的抗生素。

Fischbach 的团队提纯出了其中一种药物: 由阴道细菌生产的 Thiopeptides。研究人员发现, 这种药物和其他 Thiopeptides 一样, 能杀死相同类型的细菌, 例如金黄色酿脓葡萄球菌(能导致皮肤感染)。

克雷格·文特尔研究所微生物基因学家 Derrick Fouts 表示, 找到特定的分子并研究其作用将帮助研究者了解微生物和人体的相互作用方式。

Fouts 说: “新研究让我们感受到生物信息学的巨大威力: 不仅能从大数据中识别出特定的基因, 还能将这些基因联系起来, 从而解开与人类共生的细菌是如何维持人体健康的谜团。”

其他研究者表示, 该研究还为如何利用微生物开发新药提供了线索。科学家一直在争论, 生活在人体内的微生物是否是一个丰富的药物来源。很多制药公司正在试图借用这一理念。

——摘自《科学网》2014-09-22

<http://news.sciencenet.cn/htmlpaper/201492211255051934551.shtml>