



低 Mg/Ca 条件下丛毛单胞菌 HJ-1 菌株诱导文石的形成

李磊, 李福春*, 刘璐, 张宠宏, 吕杰杰

南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095

摘要:【目的】为了探讨细菌对碳酸盐矿物种类和形态的影响。【方法】本文利用丛毛单胞菌 HJ-1 菌株进行了持续 50 d 的培养实验。在实验过程中, 对细菌数量、沉淀物重量、培养液中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 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观察, 并利用 X-射线衍射仪对矿物成分进行测定。【结果】丛毛单胞菌 HJ-1 菌株具有显著的诱导碳酸盐矿物沉淀的能力, 碳酸盐矿物的重量随着培养时间的延长而逐渐增加。X-射线衍射结果表明, 形成的碳酸盐沉淀主要由文石和高镁方解石组成, 其中文石的最高含量达 86%。上述矿物在形态上复杂多样, 主要有杆状、柱状、哑铃形、球状和板状以及不规则状和鳞片状集合体。【结论】通常, 在 $\text{Mg}/\text{Ca} \leq 2$ 并且有微生物参与的条件极少形成文石。本文在 Mg/Ca 为 2, 不含碳酸根离子的培养基中培养 HJ-1 菌株的过程中发现了文石。作者认为, 低 Mg/Ca 条件下文石的形成主要与 HJ-1 菌株分泌较多的胞外多糖有关。

关键词: 丛毛单胞菌, 文石, 高镁方解石, 胞外多糖, 生物矿化

目前已发现有 80 余种生物成因的矿物(生物矿物), 其中碳酸钙矿物的分布最为广泛^[1]。碳酸钙矿物是浅海沉积物和大陆表生环境中最常见的矿物系列之一。自然界中最常见的生物成因碳酸钙矿物是方解石和文石^[2]。此外, 生物成因的球霏石也陆续被发现^[3-4]。方解石为热力学稳定相, 是碳酸钙最常见的矿物相。文石为热力学亚稳定相, 而球霏石为不稳定相, 受动力学因素控制。在一定条件下, 文石和球霏石会迅速向方解石转变^[5]。

自然界中的方解石或多或少都含镁。方解石中镁的含量一般以 MgCO_3 的摩尔百分比计, 通常以 4% (摩尔比) 为界将方解石分为低镁方解石(LMC)和高镁方解石(HMC)^[6]。LMC 为热力学稳定相, 而 HMC 与文石一样为亚稳定相。HMC 和文石在成岩过程中极易转变为 LMC。因此, 古老地层中的钙镁碳酸盐矿物主要以 LMC、白云石和菱镁矿等形式产出^[7]。在现代浅海沉积物中, 碳酸盐矿物以文石为主、以 HMC 为次^[7-8], 而在湖泊和河流

基金项目: 国家自然科学基金(41673083, 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, SKLLQG1511); 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

收稿日期: 2016-07-28; 修回日期: 2016-09-28; 网络出版日期: 2016-12-06

的现代碳酸盐沉积物中,最主要的碳酸盐矿物却是 LMC^[7]。这些有趣的现象吸引了许多科研工作者不断地探索方解石、文石等矿物在水溶液中沉淀和相变的机理。对碳酸钙矿物在水溶液中的溶解和沉淀等化学行为的研究,可为了解海洋 CO₂ 体系、海相和陆相碳酸钙的成因等提供有用的信息^[9]。在显生宙,碳酸盐岩约占沉积岩总量的 20%左右^[10]。现已认识到,世界上 60%左右的油气储量与碳酸盐岩储层有关^[10]。因此,研究碳酸盐矿物的形成和转变过程对于理解碳酸盐成岩作用、油气形成和储存机制以及全球碳循环也具有十分重要的意义。

微生物是地球表层系统中最为活跃的成员之一,在该系统中几乎无处不在。因此,碳酸钙矿物在自然条件下的溶解和沉淀过程在一定程度上都受到微生物及其分泌物的影响。研究表明,微生物能够通过自身的新陈代谢活动影响细胞周围微环境的 pH 值并为矿物的形成提供成核模板^[11]。近年来,微生物参与的碳酸盐矿化过程的研究日益增多。Guo 等^[11]在培养一株胶质芽孢杆菌的过程中发现沉淀物中存在 HMC 和少量的文石。费正彬等^[12]根据实验结果推测,耐辐射奇球菌细胞表面的氨基具有抑制方解石晶体生长的作用而促进了文石的形成。以上实例说明,微生物和二价金属阳离子均有可能对碳酸盐矿物的种类产生显著的影响。

从目前的研究现状来看,微生物对碳酸盐矿物种类的调控机制还远未阐述清楚。但从前人的研究报告中可见,微生物分泌的胞外多糖(EPS)有可能影响碳酸盐矿物的沉淀过程:在电子显微镜下观察到大量的纳米级球状晶体生成于 EPS 之中^[13];EPS 含量越高越有利于方解石和球霏石的形成^[14];碳酸盐沉淀速率与 EPS 含量呈显著的正相关关系^[2]。

对海洋碳酸盐矿物沉淀过程的研究结果表明,Mg/Ca (摩尔比)是影响碳酸盐矿物种类的主要因素之一^[15-16]。当 Mg/Ca<2 时,形成 LMC 相;当 Mg/Ca≥2 时,形成由 HMC 和文石构成的混合物^[15]。可见,在无微生物参与的情况下,决定矿物组合的重要 Mg/Ca 节点位于 2 附近。为了探讨细菌对碳酸盐矿物相的影响,本文选择在 Mg/Ca 为 2 的条件下,在不含碳酸根离子的培养基中对分泌 EPS 较多的丛毛单胞菌 HJ-1 菌株进行培养实验,并试图探究细菌对碳酸盐矿物种类的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 培养基

实验所用培养基(M2 培养基)主要成分:9.0 g 单水乙酸钙,21.4 g 四水乙酸镁,10.0 g 胰蛋白胨和 1.0 L 去离子水。培养基的 Mg/Ca 摩尔比值为 2。利用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液和盐酸将上述培养基的 pH 值调至 8.0,在 121 °C 条件下灭菌 20 min。在液体培养基中加入 2%的琼脂即得到固体培养基。

1.2 菌株的分离、筛选和鉴定

在无菌条件下,将少许取自南京农业大学牌楼实验田的土壤(黄棕壤)加入无菌水中制成菌悬液,稀释并取 0.1 mL 涂布于平板上,然后将平板倒置于 30 °C 培养箱中进行恒温培养。3 d 后,挑取平板上形态不同的菌落并分别进行划线,经多次划线纯化后得到若干菌株并分别编号。其中,HJ-1 菌株的培养液最为粘稠,作者估计其分泌的 EPS 可能最多,因而被选为实验用菌株。HJ-1 菌株在固体培养基上形成透明隆起的菌落,表面光滑,边缘整齐,革兰氏染色阴性反应。细菌细胞呈杆状,直径约 0.5–1.0 μm,长度约 1.5–2.0 μm,

未见芽孢和鞭毛(图 1)。根据 16S rRNA 基因序列构建的 HJ-1 菌株的系统发育树(图 2)及相似性分析结果表明, HJ-1 菌株与 *Curvibacter lanceolatus* (AB 681931)相似度为 99.6%。可以认为, HJ-1 菌株为丛毛单胞菌属(*Curvibacter*)的 *lanceolatus* 种。为慎重起见, 本文暂称之为丛毛单胞菌属

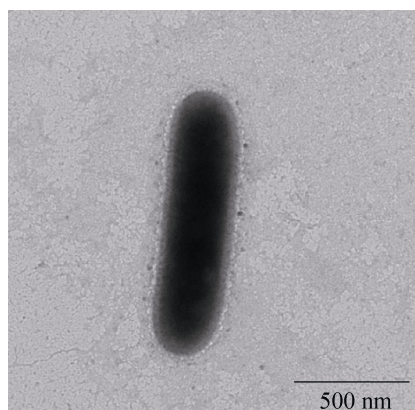


图 1. HJ-1 菌株细胞的 TEM 照片
Figure 1. TEM image of the strain HJ-1.

(*Curvibacter* sp.)。我们为菌株在 NCBI 上申请的登录号为 KX 815269。

1.3 实验方法

挑取单菌落接种于 M2 液体培养基中, 在 30 °C 条件下在摇床内以 180 r/min 转数培养 24 h, 获得种子液。在装有 90 mL 液体培养基的若干三角瓶中分别加入 10 mL 的种子液制成培养液(初始的细菌数量约 3.4×10^7 CFU/mL)。将上述三角瓶置于恒温培养箱中, 在 30 °C 条件下静置培养。每隔一定时间(在第 6 天之前为 1 d, 之后间隔逐渐增大, 分别为 2、3、5、7 d)结束一个实验, 直至第 50 天。每个实验设有 3 个重复。实验结束后用手充分摇动三角瓶(以尽量克服菌膜对所测细菌数量的影响), 然后用离心法将培养液与固相分开, 并分别进行相关指标的测定。以无菌水代替种子液作为对照实验(CK)。

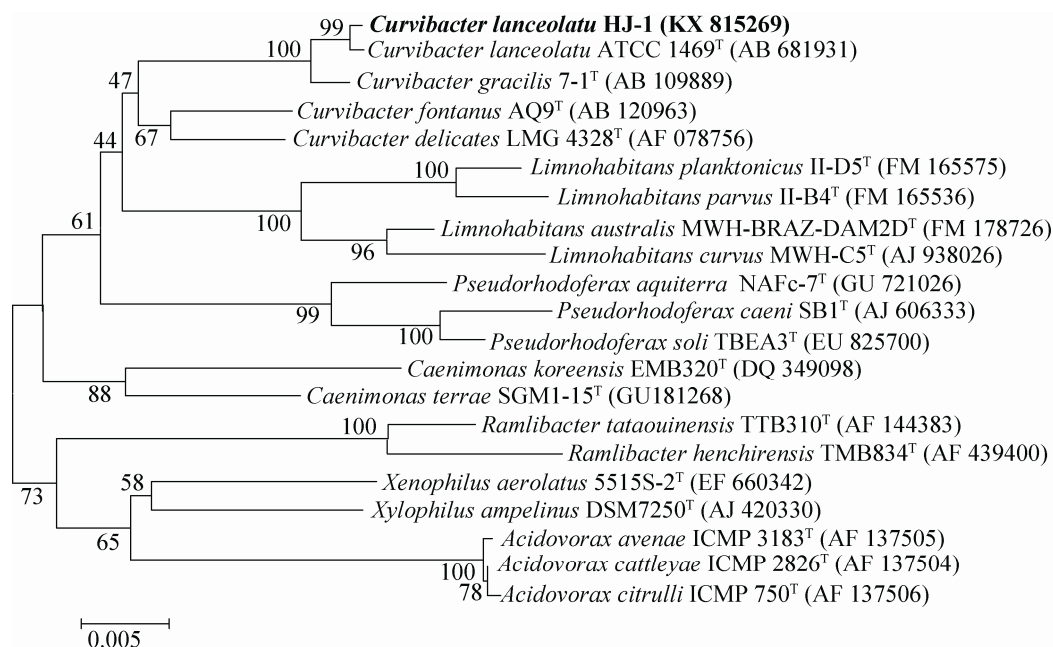


图 2. 基于 16S rRNA 基因序列构建的 HJ-1 菌株与相关菌株的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of strain HJ-1 based on 16S rRNA gene sequence comparison with related genera. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.5% sequence divergence.

1.4 测定方法

采用稀释平板法测定了细菌数量。具体方法为：将培养液摇匀后分成 4 份，分别稀释为原浓度的 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} ；分别取稀释后的菌液 0.1 mL，涂布于 M2 固体培养基上，并将其倒置于 30 °C 的恒温培养箱中进行培养；培养 2 d 后记录平板上的细菌菌落，并换算成细菌数量。使用万分之一电子天平称量沉淀物的质量。使用 pH-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。利用醇析的方法提取 EPS^[17]，以硫酸-萘酮混合液为溶剂、利用 UV-1100 型分光光度计在 625 nm 波长处测定吸光度并计算 EPS 含量^[18]。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之后加磷钨酸(PTA)负染 10 s，待样品自然晾干后上机观察。矿物形态的观察在 S-3000N 型扫描电子显微镜(SEM)上完成。制样方法：将固相产物用蒸馏水清洗 3 次，用纯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 D_{max}-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 α ，管压 30 kV，管流 20 mA，扫描速度 2°/min，步长 0.02°，测定范围 10°–60°。

2 结果和分析

2.1 细菌数量的变化

HJ-1 菌株在培养实验过程中生长良好，其细菌数量总体上呈现先升高后降低的趋势，第 2 天达到最大值，此时的细菌数量约为 2.82×10^8 CFU/mL。

此后，随着培养时间的延长，细菌数量逐渐降低，第 23 天以后趋于稳定(图 3)。

2.2 培养液 pH 值和电导率的动态变化

在培养实验过程中，培养液 pH 值变化于 7.23–9.11 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 4-A)。培养液的电导率(EC)在第 10 天之前以较小的幅度波动(无明显规律)，在第 10–28 天以较快的速率降低，此后缓慢降低直至第 50 天(实验结束)(图 4-B)。CK 实验的 pH 值和电导率均未发生明显的变化。

2.3 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度及 Mg/Ca 的动态变化

培养液中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度均随着时间的延长而不断降低。第 10 天之前， Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度降低较快，第 10 天以后降低较慢。CK 的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度则基本上没有变化(图 5-A)。培养液的 Mg/Ca 在第 8 天之前有较小的升降波动，之后逐渐升高的趋势十分明显。第 33 天达到最大值(2.41)，远大于初始 Mg/Ca (图 5-B)。

2.4 胞外多糖含量的动态变化

在实验过程中，HJ-1 菌株分泌的 EPS 逐渐增多，第 23 天以后不再增多。培养液中 EPS 含量在第 4 天时达到最大值(2544.73 mg/L)(图 6)。

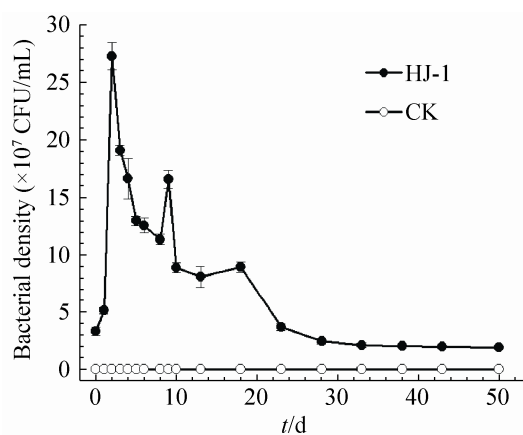


图 3. 细菌数量的动态变化

Figure 3. Temporal change of the bacterial density.

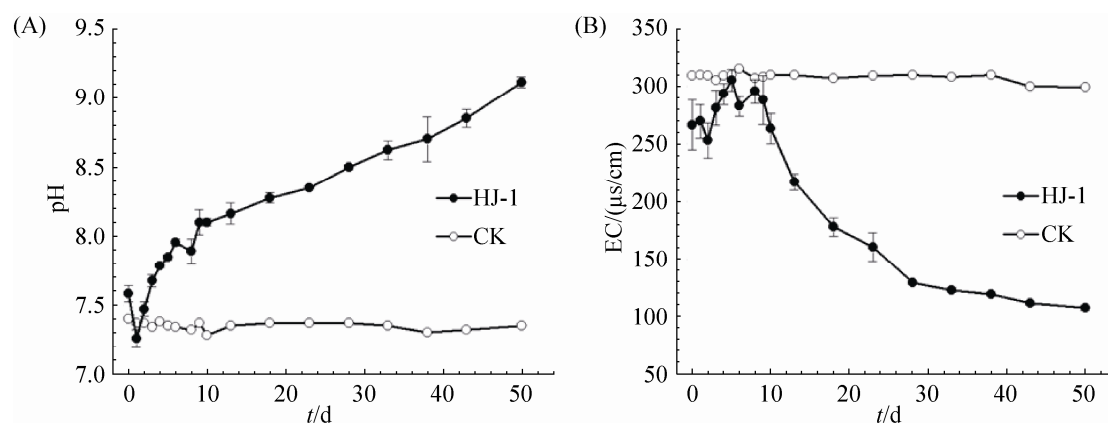


图 4. 培养液 pH 值(A)和电导率(B)的动态变化

Figure 4. Temporal changes of the pH value (A) and electronic conductivity (B) in the medium.

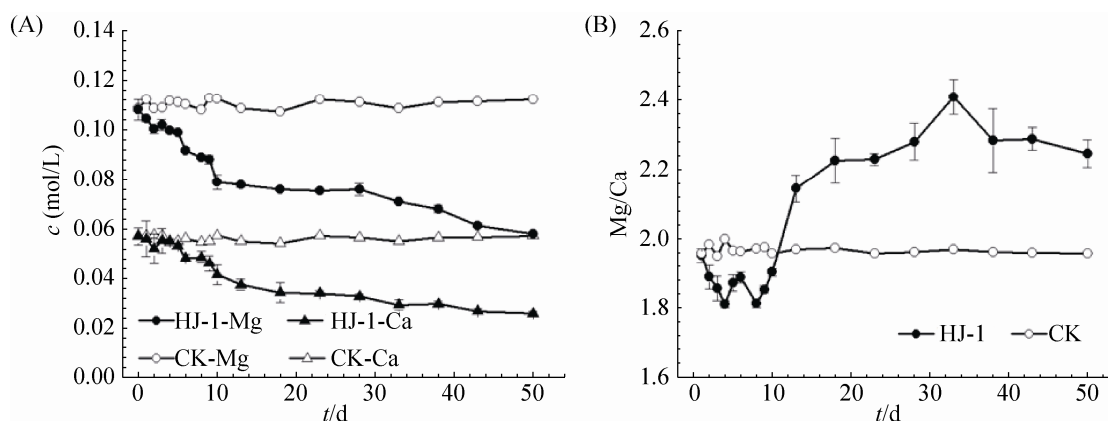


图 5. 培养液中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度及 Mg/Ca 的动态变化

Figure 5. Temporal changes of the Ca^{2+} , Mg^{2+} concentration (A) and the Mg/Ca ratio (B) in the medium.

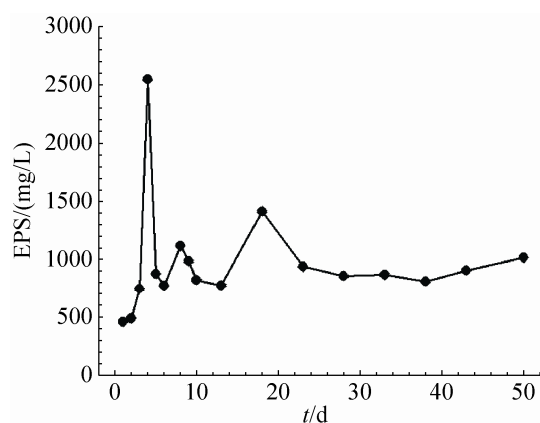


图 6. 培养液中胞外多糖含量的动态变化

Figure 6. Temporal change of the EPS content in the medium.

2.5 沉淀物总量及其中碳酸盐重量的动态变化

在 HJ-1 菌株作用下, 沉淀物的重量随着培养时间的延长而逐渐增加, 第 3 天之后的增加尤为明显。为了解沉淀物中碳酸盐所占的比例, 作者利用浓度为 30% 的双氧水对沉淀物进行了处理(至不冒泡为止)。自然风干后测定反应残余物重量。反应残余物的重量可以大体上代表碳酸盐的重量, 而与双氧水反应过程中被消耗的部分可以大体上代表死亡的细菌细胞以及细菌分泌物的沉淀部分。从图 7 可见, 第 6 天之前碳酸盐沉淀微乎其微。从第 6 天开始, 碳酸盐沉淀随着培养时间的

延长而逐渐增多。从图 7 还可以看出, 有机物质沉淀量仅在 13–56 mg 的微小范围内波动(平均 35 mg)。总体上来看, 中-晚阶段的有机物质沉淀量低于早阶段。其原因可能有三: (1) 有机物质组成可能随着培养时间的延长变得越来越复杂, 这使双氧水的氧化降解效果降低, 导致出现了有机物质减少的“假象”; (2) 在中-晚阶段, 矿物沉淀的速率较快, 它们可能包裹了较多的有机物质; (3) 在中-晚阶段, 细菌细胞及其分泌物发生降解。在 CK 实验中未收集到沉淀物。上述结果充分地说明, HJ-1 菌株具有促进碳酸盐矿物形成的能力。

2.6 矿物种类

XRD 测定结果表明, 第 8 天之前的沉淀物未显示出明显的衍射峰, 从第 8 天开始直至实验结束(第 50 天), 沉淀物的 XRD 图谱中均出现了 d 值分别为 0.302、0.209、0.186 nm 的衍射峰, 这说明 HJ-1 菌株诱导形成了方解石。此外, 上述 XRD 图谱中还存在文石的 3 个最强衍射峰, 其 d 值分别为 0.339、0.326、0.187 nm (图 8)。可见, 在本实验的中-晚阶段, 沉淀的碳酸盐矿物均以方解石和文石为主。

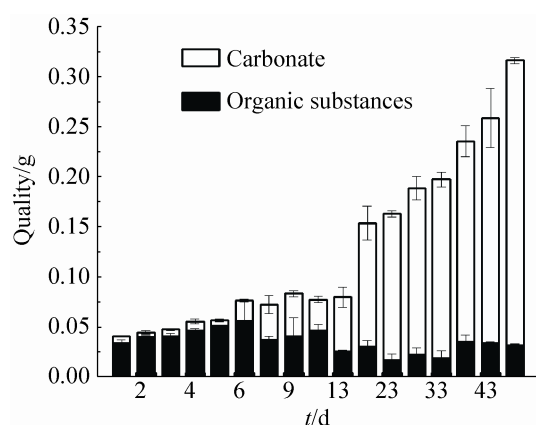


图 7. 碳酸盐和有机物质质量的柱状图

Figure 7. Histograms of the quality of carbonate and organic substances.

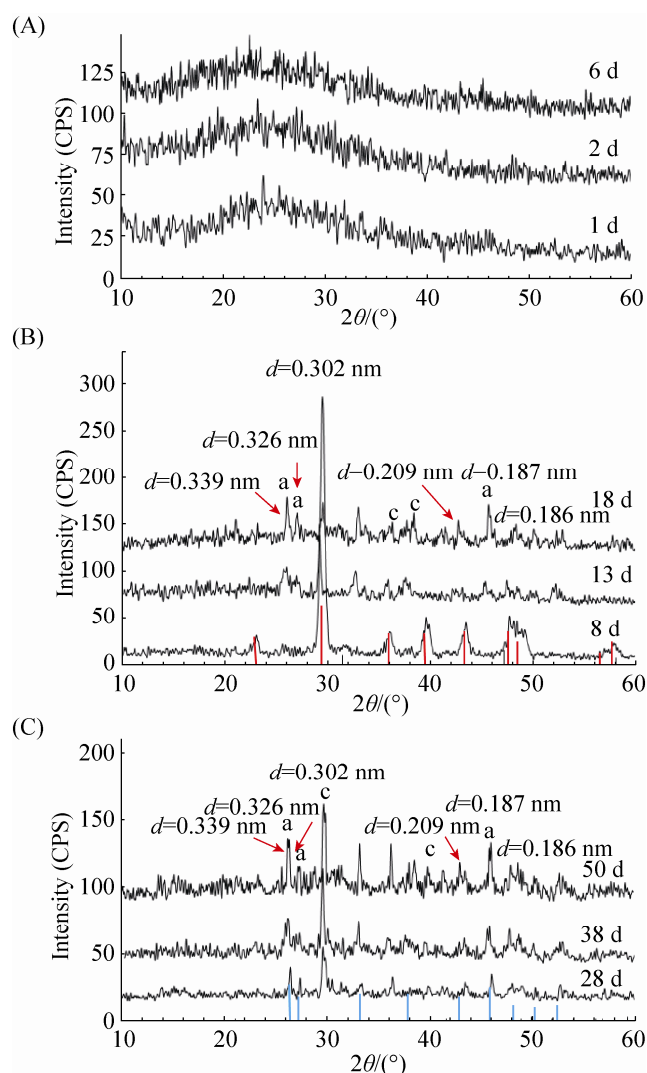


图 8. 代表性实验中沉淀物的 XRD 图谱

Figure 8. X-ray diffraction patterns of the precipitates in the representative runs. A: 1 d, 2 d, 6 d; B: 8 d, 13 d, 18 d; C: 28 d, 38 d, 50 d. a: aragonite; c: calcite; standard diagram of calcite (PDF number is 05-0586) and aragonite (PDF number is 41-1475) are shown by red and blue vertical lines, respectively.

2.7 矿物形态

从图 9 和表 1 可以看出, 在 HJ-1 菌株作用下形成的矿物形态丰富多样。其中, 鳞片状和不规则状是最主要的集合体形态(图 9-A, B)。在第 8 天, 矿物以鳞片状和长柱状集合体为主(图 9-A)。在之后的实验中相继出现了哑铃形(图 9-C)、杆状(图 9-D)、球状(图 9-E)以及长板状(图 9-F)矿物。

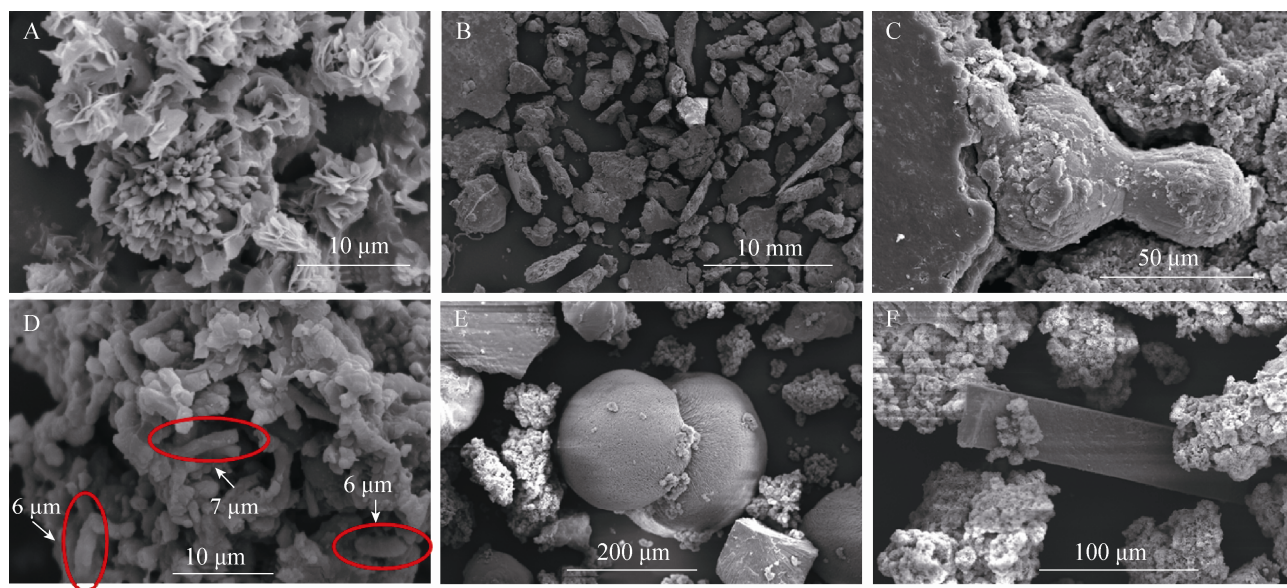


图 9. 碳酸盐矿物的扫描电子显微镜照片

Figure 9. Scanning electron microscope images of carbonate minerals. A: 8 d, flake and columnar aggregates; B: 13 d, irregular; C: 13 d, dumbbell-shaped; D: 18 d, rod-shaped; E: 38 d, spherical and irregular; F: 38 d, tabular and flake aggregates.

3 讨论

本研究利用丛毛单胞菌 HJ-1 菌株在 Mg/Ca 为 2 的条件下进行了碳酸盐矿化实验。结果表明,在实验的初始阶段(第 8 天以前),沉淀物的 XRD 图谱中未见明显的衍射峰,即未形成结晶质矿物(但有可能形成少量的非晶态碳酸钙),在中-晚阶段形成了文石和方解石沉淀,二者始终并存于实验产物中。

3.1 形成文石+高镁方解石组合的原因

从本文 2.3 可知,自第 8 天开始一直到实验结束,沉淀物均由文石和方解石组成。当 CaCO_3 样品中只含有文石和方解石两种矿物相时,文石相所占比例可用公式(1)计算。

$$y = [3.157 I_a / (3.157 I_a + I_c)] \times 100\%^{[19]} \quad \text{公式(1)}$$

式中, y 代表文石的质量百分比(%); I_a 代表

文石(221)晶面衍射峰的强度; I_c 代表方解石(104)晶面衍射峰的强度。计算结果列于表 1。从表 1 可以看出,碳酸盐沉淀中文石所占比例随着培养时间延长而逐渐升高,第 18 天时达到最大值,此后逐渐降低。对于方解石系列的矿物,可根据公式(2)计算其中 MgCO_3 的百分含量。

$$\text{MgCO}_3(\text{mol}\%) = 100 - 3333.3d + 911.99^{[20]} \quad \text{公式(2)}$$

其中, d 代表方解石(104)晶面衍射峰的 d 值(单位为 nm)。计算结果表明,方解石中 MgCO_3 含量在 8.78–18.28 mol% 范围内波动(表 1),即这些方解石均属于 HMC 亚种。

在微生物参与下形成文石的报道很少,仅见几例在 Mg/Ca 较高的条件下形成 HMC+文石组合的报道(表 2)。到目前为止,未见在微生物参与、 $\text{Mg/Ca} \leq 2$ 的条件下形成文石的报道。本研究中,在 Mg/Ca 为 2 的条件下形成了 HMC+文石组合。

表 1. 碳酸盐沉淀的组成、形态及方解石中镁的含量

Table 1. Mineral species and morphologies of the carbonate precipitates, and the percent of MgCO₃ in calcite

t/d	Aragonite/%	Calcite/%	d/nm	MgCO ₃ /(mol%)	Morphology	Ratio relationship between the main morphologies
1-6	—	—	—	—	—	—
8	2	98	0.2981	18.28	flake rod-shaped	+++ +++
9	15	85	0.2997	13.03	—	—
10	46	54	0.2998	12.52	—	—
13	54	46	0.3009	9.08	irregular spherical dumbbell-shaped	+++ ++ +
18	86	14	0.3009	9.03	irregular rod-shaped spherical	+++ +++ ++
23	77	23	0.3012	7.87	—	—
28	55	45	0.3011	8.37	—	—
33	40	60	0.3009	8.95	—	—
38	34	66	0.3006	10.03	irregular flake spherical tabular	+++ +++ +++ +
43	31	69	0.3003	11.04	—	—
50	30	70	0.3004	10.52	—	—

+++; larger; ++; moderate; +; less; —; no observation results.

表 2. 几种微生物培养基中 EPS 含量与所形成的碳酸盐矿物组合

Table 2. The EPS contents and the assembled of carbonate mineral formed in several media with bacteria

Strain number	Bacterial species	Mg/Ca/(mol)	EPS/(mg/L)	Mineral	Reference
SN-1	Sulfate-reducing bacteria	2.0	—	HMC	Su et al., 2010 ^[31]
GW-2	<i>Lysinibacillus</i>	2.0	9–20	HMC+HC	Xu et al., 2014 ^[32]
MF-2	<i>Arthrobacter</i>	1.5	20–155	HMC+LMC	Zhang et al., 2016 ^[33]
HJ-1	<i>Curvibacter</i>	2.0	459–2545	HMC+Aragonite	The study
GW-M	<i>Clostridium</i>	6.0	—	HMC+Aragonite	Guo et al., 2013 ^[11]
MF-2	<i>Arthrobacter</i>	6.0	20–40	HMC+Aragonite	Zhang et al., 2016 ^[33]

—; indicates no calculation results.

我们推测，在 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-CO}_3^{2-}$ 体系中形成的碳酸盐矿物种类既与溶液的 Mg/Ca 有关，也与微生物种属有关。

在近溶解-沉淀平衡处，温度、CO₂ 分压 (PCO₂)、pH 值和化学成分的微小变化均有可能影响碳酸盐的饱和度及其沉淀^[8]。在本研究中，温度

是不变量。微生物在生长代谢过程中会产生 CO_2 ，并且其产生的量会随着微生物生长周期的变化而发生一定的变化。同时，部分 CO_2 会溶解于水最终形成碳酸根乃至碳酸盐矿物。这 2 个因素使 $P\text{CO}_2$ 的变化显得更加复杂。为了重点讨论 Mg^{2+} 对矿物种类的影响，在本研究中我们暂时忽略 $P\text{CO}_2$ 变化的影响。因此，此处主要讨论 pH 值和化学成分对矿物种类的影响。

(1) pH 值的影响。在实验初期(第 8 天之前)形成的沉淀物的 XRD 图谱中未见明显的衍射峰，即未形成结晶质矿物(但有可能形成少量的非晶态碳酸钙)。第 8 天时，形成了文石和 HMC。值得注意的是，此时溶液的 pH 值为 7.89，接近现代海水的 pH 值(8.1 ± 0.1)^[8]。在第 8–50 天时间段内，pH 值介于 7.89–9.11 之间，可能该 pH 条件有利于文石和 HMC 的形成。特别值得一提的是，第 13–28 天时(pH 为 8.2–8.5)，形成了类似于现代浅海沉积物中以文石为主、以 HMC 为次的组合。这有可能暗示，8.2–8.5 是最有利于文石沉淀的 pH 条件。

(2) Mg^{2+} 的影响。研究表明， Mg/Ca 决定了碳酸盐矿物的种类(包括 LMC、HMC 和文石)^[16]。在海洋环境中，碳酸盐矿物类型与海水化学成分存在关联：在富镁的海水中($\text{Mg}/\text{Ca} > 2$)，矿物以文石和 HMC 为主，在贫镁的海水中($\text{Mg}/\text{Ca} < 2$)，则有利 LMC 的形成^[15]。例如在现代海水环境中($\text{Mg}/\text{Ca} = 5.2$)形成的文石约占 57%，HMC 约占 43%^[21]。陈友明等的化学实验结果表明， $\text{Mg}/\text{Ca} < 5$ 为镁方解石稳定区， Mg/Ca 介于 5–20 之间为镁方解石和文石的混合区，当 Mg/Ca 介于 20–30 之间时仅有极少量的文石沉淀，当 $\text{Mg}/\text{Ca} > 30$ 时，不形成任何碳酸盐矿物^[7]。后来，Davis 等^[22]在较小的 Mg/Ca 范围内进行了更细致的实验研究。结果表明，当 $\text{Mg}/\text{Ca} < 1$

时，形成稳定的 LMC 相；当 Mg/Ca 为 1–2 时，形成亚稳定的 HMC 相；当 Mg/Ca 为 2.0–5.3 时，形成 HMC 相和文石相构成的混合物；当 $\text{Mg}/\text{Ca} > 5.3$ 时，形成单一的文石相。

总之， Mg^{2+} 显著影响碳酸盐物相的观点早已得到国内外科学家的广泛认可，并被用于生产实践。在生产文石晶须的过程中发现，无论采用何种方法，只要体系中不含 Mg^{2+} ，沉淀的矿物均主要为方解石。当体系中加入 Mg^{2+} 时，则可以形成文石。 Mg^{2+} 浓度越高，沉淀物中文石的相对含量越高^[23–25]。因此， Mg^{2+} 被认为是 CaCO_3 晶型的重要调节剂^[22]。一般认为， Mg^{2+} 进入方解石晶格并改变其新生长面的热力学性质进而抑制方解石的生长^[22]。

在本研究的实验过程中，碳酸盐矿物的沉淀导致溶液的 Mg/Ca 在较小的范围(1.8–2.4)内波动(图 5-B)。在第 8–13 天之间，培养液的 $\text{Mg}/\text{Ca} < 2$ 。若是在纯化学体系中，在该 Mg/Ca 条件下只形成 HMC 而不会形成文石。在第 13 天以后，培养液的 Mg/Ca 达到 2 以上。在该阶段形成文石符合碳酸盐矿物在化学体系中结晶的基本规律。由此可以看出，HJ-1 菌株的存在降低了文石沉淀需要的 Mg/Ca 条件，这可能与细菌或其分泌的有机物质有关。

(3) 有机物质的影响。研究表明，许多有机分子可以抑制亚稳定相或不稳定相向方解石的转化。但是，不同有机分子所促进生长和稳定的相不同。实验结果表明，黄原胶和韦兰胶(属于胞外多糖)以及卵磷脂^[5]的存在延迟了球霏石向方解石的转变^[26]；乙二醇^[27]、蛋白质^[28]、聚丙烯酸^[29]、 β -环糊精^[30]等有机物质的存在均有利于文石的形成。

从表 2 可以看出，同样是在 $\text{Mg}/\text{Ca} \leq 2$ 的条件

下,不同细菌作用下形成的矿物种类有明显的区别。在硫酸盐还原细菌、赖氨酸芽孢杆菌和节杆菌作用下分别形成 HMC^[31]、碳钙镁石+HMC^[32]和 HMC+LMC (未发表)。在本研究中,丛毛单胞菌 HJ-1 菌株作用下形成了 HMC+文石组合。我们注意到,丛毛单胞菌培养液中 EPS 含量比上述几种细菌培养液中 EPS 含量大 1 个数量级(表 2)。一个很有趣的现象是,HJ-1 菌株培养液中 EPS 含量的变化趋势与碳酸盐矿物中文石含量的变化趋势基本上一致,并且二者含量均在第 18 天时达到最高值(图 10)。我们有理由认为,分泌较多的 EPS 可能是丛毛单胞菌诱导形成文石的主要原因。微生物分泌的 EPS 中含有羧基、羟基和氨基等官能团^[14]。这些官能团能够吸引 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等阳离子并通过阳离子键桥吸引碳酸根离子,最终创造出局部的碳酸盐过饱和环境。

化学成因的文石是热力学上亚稳定的矿物,在低温(0 °C 和 25 °C)的流体作用下向方解石转化

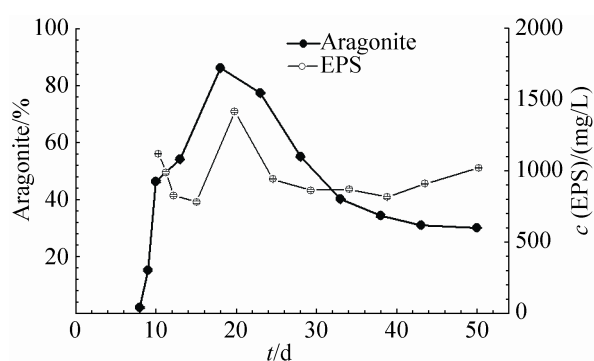


图 10. 碳酸盐沉淀物中文石和培养液中 EPS 含量的动态变化

Figure 10. Temporal changes of aragonite percent in the carbonate precipitate and the EPS content in the medium with bacteria.

的速度较快,老化 10 min 就转化为稳定的方解石相^[9]。然而,本研究中形成的文石在 50 d 时间内仍保持稳定。这可能与有机物质有关。Mann 认为,在生物参与的矿化作用过程中形成的亚稳相碳酸钙可以稳定地长时间地存在,这是由于生物体中的有机物质对生物矿物的形成、转化及稳定均有重要的调控作用^[33]。在本研究中,HJ-1 菌株在培养实验过程中分泌了较多的 EPS。这些 EPS 势必会部分地被包裹进入生长中的文石晶体,并对其稳定性产生影响。EPS 影响碳酸盐矿物种类和稳定性的问题还有待于进一步探索。

3.2 矿物形态多样的原因

本研究中形成的矿物形态丰富多样,包括了杆状、哑铃形、球状、长板状、柱状、鳞片状以及不规则状集合体等。在化学体系中,形成的方解石一般为菱面体形,文石则具有针状。因此,本实验产物中出现的形态多样性可能体现了细菌的影响力。不规则状矿物可能是以 EPS 为模板而形成的^[11]。利用从 2 种芽孢杆菌培养液中提取出的 EPS 进行的矿化实验表明,生成的沉淀物被 EPS 胶结在一起,形成不规则状矿物集合体^[34]。杆状、哑铃形以及球状矿物均可能与细菌细胞作为成核模板有关。以杆状细菌的细胞为成核模板,最初形成杆状矿物。研究表明,细菌菌体的两端比中间带有更多的负电基团^[11,35],这使菌体的两端容易聚集更多的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,从而吸引 CO_3^{2-} 向两端移动并与阳离子结合,因而杆状矿物经过哑铃形阶段逐渐发展为球状矿物^[11]。一般来说,哑铃的两端大致相等^[11]。有趣的是,在本研究产物中大部分哑铃的两端大小不等。其原因尚不清楚。

4 结论

目前,尚无关于丛毛单胞菌属细菌促进碳酸盐矿物形成的研究报道。本研究通过培养实验获得了以下几点认识。

(1) 在丛毛单胞菌 HJ-1 菌株的培养过程中,碳酸盐矿物重量随着培养时间的延长而增多,而对照实验中则未生成碳酸盐沉淀。这清楚地表明,HJ-1 菌株对碳酸盐矿物的形成具有显著的促进作用。

(2) 在 Mg/Ca 为 2 的条件下,形成了文石+高镁方解石组合,其中文石含量最高达 86%。碳酸盐矿物的形态复杂多样,主要是杆状、哑铃状、球状、长板状、柱状、鳞片状以及不规则状。

(3) 我们推测,丛毛单胞菌 HJ-1 菌株控制矿物种类和形态的途径主要是:① 通过显著提高溶液的 pH 值,增大碳酸盐的过饱和度;② 通过分泌较多的 EPS,为矿物结晶提供有效的成核模板。

参考文献

- [1] Qin S, Lu AH, Wang CQ. The minerals in the human body. *Earth Science Frontiers*, 2008, 15(6): 32–39. (in Chinese)
秦善, 鲁安怀, 王长秋. 人体中的矿物. *地质前缘*, 2008, 15(6): 32–39.
- [2] Xu QL, Zhang CH, Li FC, Ma F, Guo WW, Li XL, Li L, Liu L. *Arthrobacter* sp. strain MF-2 induces high-Mg calcite formation: Mechanism and implications for carbon fixation. *Geomicrobiology Journal*, 2016, Online, DOI: 10.1080/01490451.2016.1155002.
- [3] Palchik NA, Moroz TN. Polymorph modifications of calcium carbonate in gallstones. *Journal of Crystal Growth*, 2005, 283(3/4): 450–456.
- [4] Zhou L, Jin ZD, Li FC. Mineralogy of the otoliths of naked carp *Gymnocypris przewalskii* (Kessler) from lake Qinghai and its Sr/Ca potential implications for migratory pattern. *Science China Earth Sciences*, 2012, 55(6): 983–990.
- [5] Ni J, Zhou GT, Qu XF. Effect of phosphatidylcholine and glycylglycine on polymorph and surface microstructure of calcium carbonate. *Geological Journal of China Universities*, 2007, 13(4): 644–650. (in Chinese)
倪杰, 周根陶, 曲晓飞. 卵磷脂与双甘氨酸对碳酸钙变体和表面微结构的影响. *高校地质学报*, 2007, 13(4): 644–650.
- [6] Li F, Wu SQ, Liu K. Identification of ooid primary mineralogy: A clue for understanding the variation in paleo-oceanic chemistry. *Acta Sedimentologica Sinica*, 2015, 33(3): 500–511. (in Chinese)
李飞, 武思琴, 刘柯. 鲕粒原生矿物识别及对海水化学成分变化的指示意义. *沉积学报*, 2015, 33(3): 500–511.
- [7] Chen YN, Wang XL, Sha QA, Zhang NX. Experimental studies on the system $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-HCO}_3^-\text{-H}_2\text{O}$ at room temperature and pressure. *Scientia Geologica Sinica*, 1979, 14(1): 22–36. (in Chinese)
陈友明, 王秀兰, 沙庆安, 张乃嫻. 室温常压下 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-HCO}_3^-\text{-H}_2\text{O}$ 体系的试验研究. *地质科学*, 1979, 14(1): 22–36.
- [8] Tao XW, Pu XQ, Wang HQ, Yuan Z, Zhou B. Research on dissolution kinetics of calcite and aragonite in seawater with very low saturation state and near saturation. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 33(3): 63–73. (in Chinese)
陶小晚, 蒲晓强, 王海强, 袁智, 周波. 极低饱和度和近饱和状态下海水中方解石和文石溶解动力学研究. *海洋学报*, 2011, 33(3): 63–73.
- [9] Zhou GT, Zheng YF. Chemical synthesis of CaCO_3 minerals and mineralogical mechanism of polymorphic transformation at low temperatures. *Scientia Geologica Sinica*, 2000, 35(3): 325–335. (in Chinese)
周根陶, 郑永飞. 碳酸钙矿物低温化学合成及其同质多象转变矿物学机理研究. *地质科学*, 2000, 35(3): 325–335.
- [10] Körtzinger A, Mintrop L, Wallace DWR, Johnson KM, Neill C, Tilbrook B, Towler P, Inoue HY, Ishii M, Shaffer G, Saavedra RFT, Ohtaki E, Yamashita E, Poisson A, Brunet C, Schauer B, Goyet C, Eiseheid G. The international at-sea intercomparison of $f\text{CO}_2$ systems during the R/V Meteor Cruise 36/1 in the North Atlantic Ocean. *Marine Chemistry*, 2000, 72(2/4): 171–192.
- [11] Guo WW, Ma H, Li FC, Jin ZD, Li J, Ma F, Wang C. *Citrobacter* sp. strain GW-M mediates the coexistence of carbonate minerals with various morphologies. *Geomicrobiology Journal*, 2013, 30(8): 749–757.
- [12] Fei ZB, Liu MX, Huang T, He H, Zheng T, Huang MD. Effect of the surface amino modification of *Deinococcus radiodurans* on self-assembly of calcium strontium. *Journal of Synthetic Crystals*, 2016, 45(1): 259–266. (in Chinese)
费正彬, 刘明学, 黄婷, 何辉, 郑天, 黄茂迪. *Deinococcus radiodurans* 表面氨基修饰对钙锶生物矿化自组装的影响. *人工晶体学报*, 2016, 45(1): 259–266.
- [13] Aloisi G, Gloter A, Krüger M, Wallmann K, Guyot F, Zuddas P. Nucleation of calcium carbonate on bacterial nanoglobules. *Geology*, 2006, 34(12): 1017–1020.
- [14] Braissant O, Cailleau G, Dupraz C, Verrecchia EP. Bacterially

- induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: The role of exopolysaccharides and amino acids. *Journal of Sedimentary Research*, 2003, 73(3): 485–490.
- [15] Sandberg PA. New interpretations of Great Salt Lake ooids and of ancient non-skeletal carbonate mineralogy. *Sedimentology*, 1975, 22(4): 497–537.
- [16] Hardie LA. Secular variation in seawater chemistry: An explanation for the coupled secular variation in the mineralogies of marine limestones and potash evaporites over the past 600 m. y.. *Geology*, 1996, 24(3): 279–283.
- [17] Omoike A, Chorover J. Spectroscopic study of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*: Aqueous chemistry and adsorption effects. *Biomacromolecules*, 2004, 5(4): 1219–1230.
- [18] Adav SS, Lee DJ. Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 154(1/3): 1120–1126.
- [19] Kontoyannis CG, Vagenas NV. Calcium carbonate phase analysis using XRD and FT-Raman spectroscopy. *Analyst*, 2000, 125(2): 251–255.
- [20] Lumsden DN. Discrepancy between thin-section and X-ray estimates of dolomite in limestone. *Journal of Sedimentary Research*, 1979, 49(2): 429–435.
- [21] Ries JB, Anderson MA, Hill RT. Seawater Mg/Ca controls polymorph mineralogy of microbial CaCO_3 : A potential proxy for calcite-aragonite seas in precambrian time. *Geobiology*, 2008, 6(2): 106–119.
- [22] Davis KJ, Dove PM, De Yoreo JJ. The role of Mg^{2+} as an impurity in calcite growth. *Science*, 2000, 290(5494): 1134–1137.
- [23] Chen HX, Song YC. Preparation of aragonite style calcium carbonate whiskers. *Journal of Materials Science and Engineering*, 2004, 22(2): 197–200. (in Chinese)
陈华雄, 宋永才. 文石型碳酸钙晶须的制备研究. 材料科学与工程学报, 2004, 22(2): 197–200.
- [24] Liu ZF, Yan MF, Zhang LH, Li HH. Study on the effect of magnesium ion on the crystal form of calcium carbonate. *Technology of Water Treatment*, 2011, 37(10): 60–62. (in Chinese)
刘振法, 闫美芳, 张利辉, 李海花. 镁离子对碳酸钙晶型影响研究. 水处理技术, 2011, 37(10): 60–62.
- [25] Zhao LN, Wang XY, Kong ZG, Wang ZC. Biomimetic synthesis of dendrite-shaped aragonite calcium carbonate particles and its application in PVC. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2010, 31(12): 2329–2333. (in Chinese)
赵丽娜, 王秀艳, 孔治国, 王子忱. 枝状文石型碳酸钙的仿生合成及在 PVC 中的应用. 高等学校化学学报, 2010, 31(12): 2329–2333.
- [26] Yin XS, Zhang H, Yang WZ, Tang YM, Wang JT. Investigation of CaCO_3 crystallization induced by extracellular polysaccharide. *Journal of Synthetic Crystals*, 2010, 39(6): 1529–1534. (in Chinese)
尹晓爽, 张慧, 杨文忠, 唐永明, 王锦堂. 胞外多糖调控碳酸钙结晶的研究. 人工晶体学报, 2010, 39(6): 1529–1534.
- [27] Flaten EM, Seiersten M, Andreassen JP. Polymorphism and morphology of calcium carbonate precipitated in mixed solvents of ethylene glycol and water. *Journal of Crystal Growth*, 2009, 311(13): 3533–3538.
- [28] Shen QM, Huang ZQ, Zhang GS. Biomimetic synthesis of aragonite crystals with spherical superstructure at ambient condition. *Journal of Materials Science and Engineering*, 2012, 30(3): 453–457. (in Chinese)
申巧敏, 黄增琼, 张刚生. 常温常压下文石球形超结构的仿生合成. 材料科学与工程学报, 2012, 30(3): 453–457.
- [29] Chen YP, Yan Y, Hu ZH. Preparation of aragonite whisker and the effect of sulfur-containing compounds on CaCO_3 whisker. *Journal of Synthetic Crystals*, 2015, 44(5): 1347–1353. (in Chinese)
陈艳萍, 严云, 胡志华. 碳酸钙晶须的制备及含硫化物对碳酸钙晶须影响的研究. 人工晶体学报, 2015, 44(5): 1347–1353.
- [30] Zhang XY, Liao ZJ, Yang L, Hu ZG, Jiang K, Guo YM. Interaction between β -cyclodextrin and crystallization of calcium carbonate. *Acta Chimica Sinica*, 2003, 61(1): 69–73. (in Chinese)
张秀英, 廖照江, 杨林, 胡志国, 蒋凯, 郭玉明. β -环糊精与碳酸钙结晶的相互作用. 化学学报, 2003, 61(1): 69–73.
- [31] Su N, Li FC, Ma H, Li XL. Effects of Mg/Ca ratios on the species and morphologies of microbial carbonate minerals. *Acta Mineralogica Sinica*, 2010, 30(1): 83–89. (in Chinese)
苏宁, 李福春, 马恒, 李学林. Mg/Ca 比对微生物成因的碳酸盐矿物种类和形态的影响. 矿物学报, 2010, 30(1): 83–89.
- [32] Xu QL, Li FC, Zhang CH, Li XL. Formation of huntite by *Lysinibacillus* sp. GW-2 strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(5): 607–615. (in Chinese)
徐青龙, 李福春, 张宏, 李学林. 赖氨酸芽孢杆菌 GW-2 菌株作用下碳钙镁石的形成. 微生物学报, 2015, 55(5): 607–615.
- [33] Eppel M. Buchbesprechung: Biomineralization principles and concepts in bioinorganic materials chemistry. Von Stephen Mann. *Angewandte Chemie*, 2003, 115(4): 395.
- [34] 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(1): 42–50.
- [35] 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.

***Curvibacter* sp. strain HJ-1 induced the formation of aragonite under the condition of low Mg/Ca ratio**

Lei Li, Fuchun Li^{*}, Lu Liu, Chonghong Zhang, Jiejie Lü

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

Abstract: [Objective] To study the effects of bacteria on the species and morphology of carbonate minerals. [Methods] We conducted a series of cultural experiments in the medium with initial Mg/Ca ratio of 2 but without carbonate ion using *Curvibacter* sp. strain HJ-1 for 50 days. During the cultivation, bacterial density, precipitate quantities, 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] Strain HJ-1 could induce the precipitation of carbonate minerals, the quality of carbonate gradually increased with the incubation time. XRD patterns showed that the mineral precipitates consisted of high-Mg calcite and aragonite. The percentage of aragonite in the precipitates was up to 86%. The morphology of carbonate minerals was multiform, including rod-shaped, dumbbell-shaped, spherical, tabular, as well as irregular and flake. [Conclusions] The formation of aragonite under the condition of low Mg/Ca ratio has a close correlation with extracellular polysaccharide secreted by *Curvibacter* sp. strain HJ-1.

Keywords: *Curvibacter* sp., Aragonite, High-Mg calcite, Extracellular polysaccharide, Biomineralization

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41673083, 41172308), by the Open Project of the State Key Laboratory of Loess and Quaternary Geology (SKLLQG1309, SKLLQG1511) 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: 28 July 2016; Revised: 28 September 2016; Published online: 6 December 2016