



## 一株岩石放线菌对碳酸钙形貌的影响

褚玥<sup>1</sup>, 曹成亮<sup>2</sup>, 连宾<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 南京师范大学生命科学学院, 江苏省功能微生物与功能基因组学重点实验室, 江苏省微生物工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

<sup>2</sup> 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, 贵州 贵阳 550001

**摘要:** 【目的】微生物诱导成矿是近年来地质微生物学领域研究中的热点之一。采用一株分离自喀斯特地区的岩生放线菌DHS C013<sup>T</sup>菌株, 研究该菌株及其代谢产物在由NaHCO<sub>3</sub>、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O组成的成矿体系中对CaCO<sub>3</sub>生成及形貌的影响。【方法】将在葡萄糖麦芽酵母提取物(MGYP)培养液中培养的放线菌上清液、菌丝球、发酵液以及无菌的MGYP培养液和超纯水分别加入成矿体系, SEM观察不同处理成矿体系中的底部沉淀物。【结果】在超纯水成矿体系中只形成标准菱面体方解石, 而在添加放线菌及其代谢产物甚至含有机质的培养液则可形成形态各异的CaCO<sub>3</sub>晶体, 如球形、哑铃以及表面具有鳞片状的柱形。这些特殊形态的CaCO<sub>3</sub>晶体的形成, 可能是在放线菌的菌丝球和菌丝片段以及胞外分泌物上成核和逐渐生长的结果。【结论】放线菌菌丝体及代谢产物对调控和影响CaCO<sub>3</sub>的晶体形貌有重要作用。研究结果对进一步认识放线菌及其代谢产物诱导生物成矿提供了新的证据。

**关键词:** 岩生放线菌, 成矿体系, CaCO<sub>3</sub>

在岩石表面、缝隙以及岩石上的细土中住着多种类型的微生物, 如: 蓝细菌、放线菌、地衣、有芽孢和无芽孢的杆菌、分枝杆菌以及多种真菌等<sup>[1-2]</sup>。它们能适应诸如周期性干旱、缺乏有机质、太阳辐射、冻结以及剧烈温差等严酷的外界环境, 烈日、风霜、雨水以及微生物本身对岩石的风化, 使得微生物能够从中吸取矿质养分, 这些岩石微生物的生长和繁殖改变了周围环境的

理化因子, 并导致风化出部分Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>等进而产生生物成矿作用。

生物成矿作用在自然界中广泛发生。在南太平洋新喀里多尼亚岛中, 海面温度的升高刺激了海水中微生物碳酸盐沉积的形成, 这种现象可被用来分析当地的环境和气候的变化<sup>[3]</sup>。在陆地环境中, 微生物诱导的碳酸盐沉淀作用同样明显, Boquet等<sup>[4]</sup>研究发现, 土壤细菌诱导方解石沉淀是

基金项目: 国家自然科学基金(41373078); 国家重大科学研究计划(2013CB956702); 江苏高校优势学科建设工程(PAPD)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-25-85891050; E-mail: bin2368@vip.163.com

收稿日期: 2015-09-28; 修回日期: 2015-12-09; 网络出版日期: 2015-12-21

一种普遍现象,在合适的培养条件下大部分细菌都能诱导方解石晶体的形成。微生物碳酸盐沉积在地质演化历史中长期存在,科学家通过碳同位素测定结果推测 3800 MaBP(距今3800个百万年前)的地层中就有微生物生长,并伴有固定形态的含碳酸盐的微生物化石发育<sup>[5-6]</sup>。

实验条件下微生物诱导碳酸盐合成已有较多的报道,在细菌中研究较多的是芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)。Lian等<sup>[7]</sup>通过研究1株巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的菌体及其发酵液在液体成矿体系中对生物诱导成矿的影响,认为细菌及其胞外分泌物对碳酸盐结晶过程及形貌有重要影响;而成亮等<sup>[8]</sup>在研究芽孢杆菌的菌体、分泌物以及不同浓度的细菌液对碳酸钙晶体形成与形貌的影响试验中,发现细菌液浓度越高,对碳酸钙晶体形貌的影响越显著,但菌体本身对晶体形貌似乎没有实质影响;Li等<sup>[9]</sup>在探讨产碳酸酐酶(CA)的芽孢杆菌诱导方解石沉淀的实验中,得出CA作为一种“催化剂”,能够促进方解石的沉淀,这与Xiao等<sup>[10-11]</sup>的研究结果一致;Dhami等<sup>[12]</sup>从石灰质土壤分离出5种细菌,分别探讨了脲酶(UA)、CA、胞外分泌物(EPS)等对生物诱导成矿的影响,认为EPS可以作为微生物成矿位点,而UA和CA能够促进碳酸钙的沉淀;韩金鑫等<sup>[13]</sup>则用实验证实恶臭假单胞菌(*Pseudomonas Putida*)能够诱导碳酸钙晶体的沉淀,但过高的Ca<sup>2+</sup>似乎不利于碳酸钙晶体的生成;Rautaray等<sup>[14]</sup>采用在液体培养基中发酵培养的真菌和放线菌菌丝球,分别诱导出不同形貌的碳酸钙(CaCO<sub>3</sub>)及碳酸钡(BaCO<sub>3</sub>)晶体,他将这一结果归因于微生物分泌蛋白质的不同。

细菌在诱导形成生物矿物的种类和形貌方面各有特色。如:Warthmann等<sup>[15]</sup>选用硫酸盐还原菌在缺氧的条件下诱导形成了花菜状和哑铃型的白云石;李福春等<sup>[16]</sup>选用梭菌(*Clostridium* sp.)诱导了哑铃形、花菜状、球形等多种特殊形态的含镁方解石;而Lian等<sup>[7]</sup>在成矿体系中发现了具有中

空核心,且表面具有三维交叉结构的球霏石。这些结果显示生物成矿过程十分复杂,不仅受到微生物生长环境(如温度、pH等)的影响,更与菌体自身的特性和代谢产物密切相关。参与生物诱导成矿的生物种类繁多,包括细菌、真菌、植物<sup>[17]</sup>和动物<sup>[18]</sup>。由于土壤和水体中碳酸盐的沉积和生物诱导合成是地球碳汇的重要组成部分,能够将大气CO<sub>2</sub>转化为碳酸盐矿物固定下来,减少大气CO<sub>2</sub>浓度和延缓温室效应,因而具有重要研究价值。

此外,生物诱导的矿物因其复杂的形态和优越的性能,为研究新型生物材料设计提供了独特灵感,将生物矿物应用于保护和修复腐烂的构造材料并已初见成效<sup>[19]</sup>。Li等<sup>[20]</sup>采用细菌成矿作用来去除土壤中常见的几种可溶性重金属离子,经过48 h反应,实验菌株对重金属离子Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>和Co<sup>2+</sup>等固定率可达88%–99%。废水中的重金属污染也可以通过微生物诱导成矿来去除,Yao等<sup>[21]</sup>通过胶质芽孢杆菌产生的微生物絮凝剂(MBF),将废水中的Fe<sup>3+</sup>和Pb<sup>2+</sup>等离子与CO<sub>2</sub>结合形成碳酸盐而固定于MBF表面。

放线菌为具丝状结构的特殊细菌,对环境抗性强,分布广泛,也是喀斯特地区岩石中常见微生物类群<sup>[22]</sup>。对放线菌的研究目前更多集中在其多样性<sup>[23]</sup>、抗生素筛选<sup>[24]</sup>和功能基因<sup>[25]</sup>等方面,但有关放线菌诱导成矿研究则极少报道。放线菌也像其它细菌那样能够影响碳酸钙晶体的形貌吗?放线菌菌丝及其代谢产物在诱导碳酸钙沉淀方面有何不同?探讨这些问题显然可以为放线菌的生物学特性和生态学功能增添新的知识,并拓展放线菌的研究范畴。为此,我们以1株从喀斯特地区石灰岩上分离出的优势岩石放线菌作为实验菌株<sup>[26]</sup>,利用Lian等<sup>[7]</sup>采用的成矿系统,分别研究放线菌菌丝球、发酵液、培养上清液等对CaCO<sub>3</sub>的诱导形成及形貌的影响,并初步探究其形成原因,为进一步研究放线菌与岩石的相互作用提供新的资料。

# 1 材料和方法

## 1.1 实验菌株

从中国科学院普定喀斯特生态系统观测研究站采集石灰岩,带回室内后,在室温中干燥后磨成粉末,用无菌水制成悬浮液,稀释10倍后,用改进的ATCC-172培养基分离培养,28 °C培养21 d后,获得1株先前没有报导且数量占优势的放线菌DHS C013<sup>T</sup>。有关该菌株的形态及培养特征、化学分类特征、DNA的G+C含量以及16S rRNA测序结果见Cao等的文章<sup>[26]</sup>,确定该菌为伦茨菌属的1个新种,即*Lentzea guizhouensis* sp. nov.,以此新种作为本研究的实验菌株。

## 1.2 菌株培养

将活化后的菌种接入到MGYP液体培养基<sup>[14]</sup>(麦芽提取物3 g/L、葡萄糖10 g/L、酵母提取物3 g/L、蛋白胨5 g/L、pH 7.0),培养条件为28 °C、130 r/min,4 d。

放线菌培养4 d后,用离心机(Allegra X-30多功能台式高速离心机,美国贝克曼库尔特)10000 r/min离心10 min分别收集100 mL培养基培养的放线菌菌丝球和上清液,用成矿体系(见2.3)液体清洗放线菌菌丝球,重复3次。

用此方法获得的放线菌培养液、上清液、菌丝球与MGYP液体培养基以及超纯水用于后续不同组分处理实验。

## 1.3 成矿体系构建与实验安排

参照Lian<sup>[7]</sup>的方法制备成矿体系液体,NaHCO<sub>3</sub>、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O,均为分析纯,实验用水均为超纯水。

采用Lian<sup>[7]</sup>和周雪莹等<sup>[27]</sup>的方法和诱导成矿实验装置(图1),研究放线菌菌丝球和不同培养液组分对诱导碳酸钙晶体形成及形貌的影响。

干燥器底部放置已加入10 g NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>粉末的50 mL烧杯,将直径为9 cm的已灭菌的玻璃培养

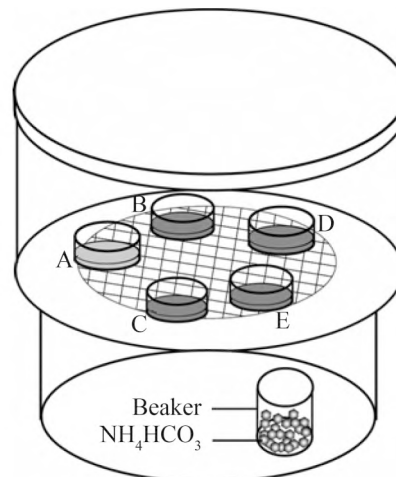


图1. 实验所用成矿装置

Figure 1. Metallogenetic system of the experimental setup. A: control group; B, C, D, E: experimental group.

皿置于干燥器分隔板的上方,在培养皿中倒入50 mL灭菌的成矿体系液体,并在培养皿底部放入洁净的已灭菌盖玻片,共设置如下5个处理。

处理A:在50 mL成矿体系溶液中加入3 mL超纯水,此为空白对照。处理B:同处理A,但将超纯水换成灭菌的MGYP培养液。处理C:同处理A,但将超纯水换成收集的放线菌培养液的上清液。处理D:在50 mL成矿体系溶液中加入培养4 d的放线菌菌丝球。处理E:在50 mL成矿体系溶液中加入培养4 d的放线菌发酵液。对成矿体系的pH值进行监测,前12 h每4 h取1次样,此后1 d取样1次。

实验于第8天结束,用镊子取出培养皿底部的盖玻片,烘干后,借助SEM(S-3400N可变压力扫描电子显微镜,日本日立)观察碳酸钙晶体形貌,光学显微镜(AXIO imager. A1德国蔡司正立式金相显微镜)观察菌丝球形貌。

## 2 结果和分析

### 2.1 实验菌株的描述

该菌为需氧革兰氏阳性菌,在ISP2、ISP3、ISP4、ISP5、切比克溶液琼脂培养基、营养琼脂

培养基和马铃薯琼脂培养基上均能形成微黄色的基内菌丝和白色的气生菌丝，在除了营养琼脂以外的培养基上，菌丝分散成直链孢子(图2)。该菌能利用多种氮源和碳源，对外界环境有很强的抗性，能适应严酷的岩石环境，能够在10–37 °C、pH值为6–11，盐浓度5%的条件下存活，是石灰岩中的常见放线菌<sup>[26]</sup>。本文后续试验将用该岩生放线菌开展微生物诱导成矿的研究。

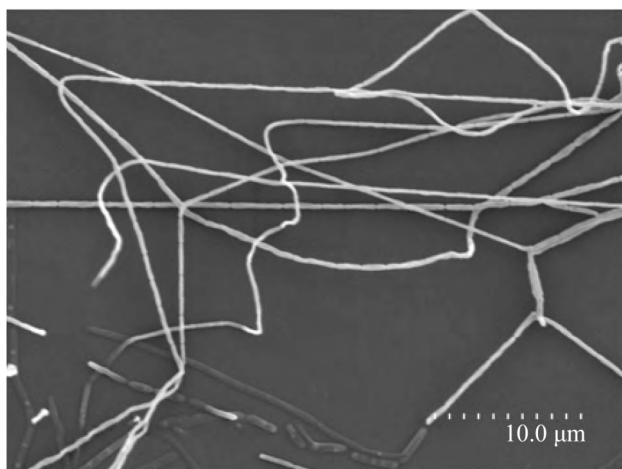


图2. 菌株DHS C013<sup>T</sup>的扫描电镜图

Figure 2. Scanning electron micrograph of strain DHS C013<sup>T</sup>.

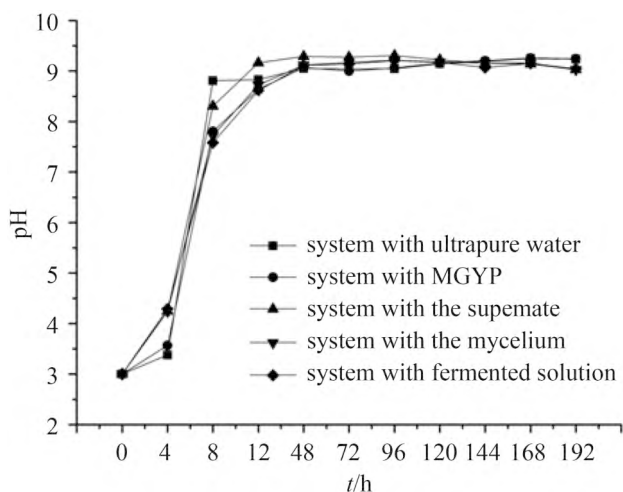


图3. 成矿体系pH值变化图

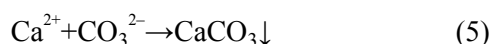
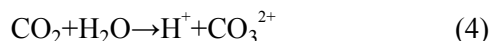
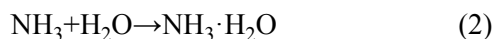
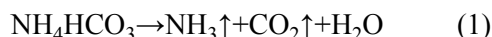
Figure 3. The chart of pH change in metallogenetic system.

actamicro@im.ac.cn

## 2.2 不同处理碳酸盐矿物的形成和形貌

成矿系统装置中的 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 在自然条件下会分解生成 $\text{CO}_2$ 、 $\text{NH}_3$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ 。 $\text{CO}_2$ 溶于水生成 $\text{HCO}_3^-$ 离子，而 $\text{NH}_3$ 溶于水则生成 $\text{NH}_4^+$ 和 $\text{OH}^-$ 离子，导致成矿体系中pH值升高(图3)。5个体系的pH值变化趋势基本一致，都在前12 h内上升速度较快；此后pH值保持基本不变，最终在9.2左右。

成矿体系溶液pH值的升高会导致反应式(1–5)，最后生成 $\text{CaCO}_3$ 。



由于在5个处理中分别加入了不同组分(放线菌发酵液、上清液、菌丝球，MGYP液体培养基以及超纯水)，致使生成的碳酸盐形貌有显著差异(图4)。

图4-A、B是超纯水处理下生成的碳酸钙晶体，这个体系中并无生物因素参与，纯属化学反应所得，形成的碳酸盐晶体呈菱面体，表面光滑，边角完整，形貌规则，是十分典型的方解石形貌。

图4-C、D是加入了MGYP培养基的成矿体系，形成的碳酸钙总体上类似一个柱形的结构，表面有鳞片状的片层结构，并向上突起(如图4-Da)，晶体两端参差不齐，呈现分层的片状结构，片层之间含有缝隙。这说明MGYP培养基中的糖、蛋白质等成分影响了碳酸钙晶体的形貌。

图4-E为含有上清液的成矿体系，生成的碳酸钙为多个碳酸钙晶体嵌合构成多面体结构，中间夹杂着的不规则的碳酸钙晶体，表面粗糙且具有向上突起的片状结构，这一点与图4-D类似。

图4-F、G中的成矿体系中加入了菌丝球，得到的碳酸钙晶体在形貌上与图4-A–E的晶体有

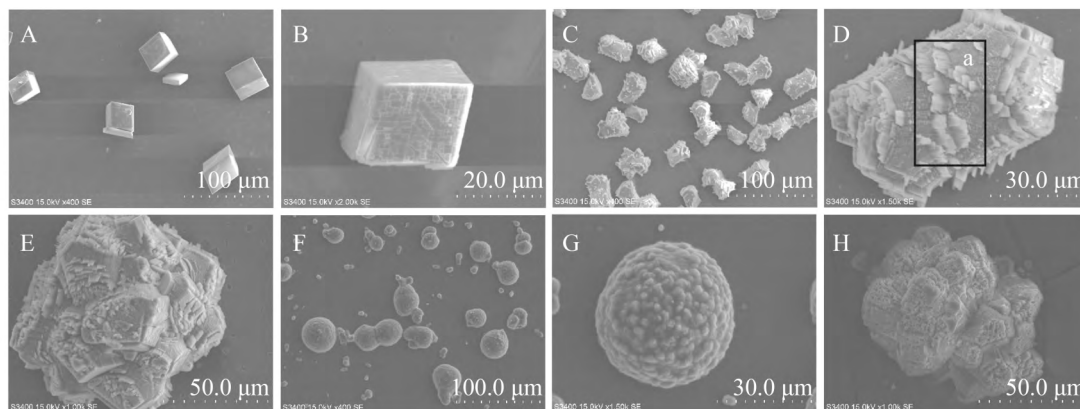


图 4. 成矿体系中沉淀的CaCO<sub>3</sub>晶体扫描电镜图

Figure 4. Scanning electron micrograph of CaCO<sub>3</sub> crystals in metallogenic system. A, B: crystals formed in metallogenic system with ultrapure water; C, D: crystals formed in metallogenic system with MGYP liquid medium; E: crystals formed in metallogenic system with the supernate; F, G: crystals formed in metallogenic system with the mycelium; H: crystals formed in metallogenic system with the fermented solution.

明显不同, 总体上呈现球形、哑铃形, 放大后(图4-G), 还可看到一个大小不一, 凹凸不平的小颗粒。为进一步理解球形、哑铃形的形成机理, 将放入成矿体系中的1个菌丝球置于光学显微镜下观察(图5), 发现菌丝球表面辐射状散开很多小“绒毛”, 其中有黑色颗粒物。为确定这些颗粒的成分, 我们用移液枪吸取少量的稀盐酸滴于小颗粒上, 在显微镜下, 可以看到有气泡冒出。根据化学式:  $\text{CaCO}_3 + 2\text{HCl} = \text{CaCl}_2 + \text{CO}_2\uparrow + \text{H}_2\text{O}$ , 我们确定这些颗粒物质为碳酸钙晶体。(图5方框内所示)。

图4-H的体系中加入发酵液(既有菌丝球又有发酵上清液), 发现碳酸钙晶体为花菜状, 表面疏松有孔, 局部有棱角, 但总体上仍然呈现球形, 与图4-E和F相似。

### 2.3 不同碳酸钙晶体形貌的成因分析

在成矿体系中加入超纯水, 生成的碳酸盐是标准的方解石形貌。但当成矿体系中加入有机的成分, 产生的碳酸盐形貌就会发生很大变化, 如图4-C-H中出现诸如球形、哑铃形和花菜形等多种形貌的碳酸钙颗粒。

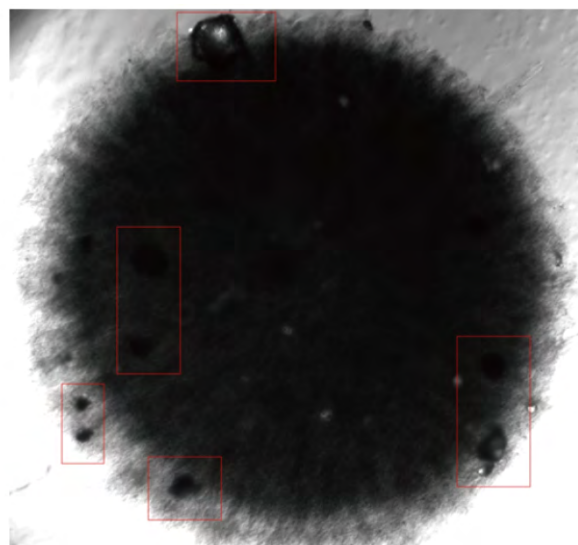


图 5. 成矿体系中放线菌菌丝球光学显微镜图(50×)

Figure 5. Optical microscope micrograph of actinomycetes mycelium in metallogenic solution (50×).

MGYP培养基营养丰富, 含有酵母提取物、麦芽提取物、葡萄糖、蛋白胨等有机物, 这些有机物会将极性基团暴露在表面, 其中带负电的极性基团可与Ca<sup>2+</sup>结合, 形成由多个分子凝集而成的同性大分子团。这样形成的(有机质-Ca<sup>2+</sup>)<sub>y</sub><sup>x</sup>基元模板使得界面异相成核成为优势。以Ca<sup>2+</sup>作为键桥, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>和Ca<sup>2+</sup>结合并以相等的概率向大分子

团基元模板上沉积,形成了多个独立的生长位点<sup>[8]</sup>。在晶体生长之初,成核晶粒小,表面能大,从而促使晶粒之间相互聚合形成团聚体,其中的每一个单晶粒子按照各自的结晶习性(通常以生长速率快的晶面互相联结的方式)进行生长,但由于晶体生长会受到多方面的限制,如不同生长单元的各晶面周期性电荷层的阻碍以及成矿体系中有有机质相互团聚所形成的微空间等限制了晶体的正常发育,使其在成矿体系中最终形成了图4-C、D所示的总体上为柱形,表面和两端有突起的片层结构<sup>[28]</sup>。

同样,通过离心获得的放线菌发酵液的上清液,含糖类、蛋白质以及放线菌代谢产生的有机质以及胞外多糖等粘性物质。这些有机大分子、胞外分泌物的有机质表面均可以作为成核位点<sup>[29]</sup>,有机质及其空间结构与 $\text{Ca}^{2+}$ 的相互作用形成了与前述类似的多面体结构。与处理2不同之处,胞外分泌物中的多糖等粘性物质会将最初形成的小颗粒物黏附在一起,粘附后的小颗粒物依照自己的生长规律,沿各个方向独立生长,从而形成了图4-E所示的碳酸钙晶体相互嵌合的多面体结构。

在加入菌丝球的成矿体系中,我们能看到以球形和哑铃型为主的晶型,这些晶型可能是以较小的菌丝球表面或菌丝片段作为成核位点形成的。菌丝球表面所带有的负电基团可以吸引 $\text{Ca}^{2+}$ ,后者再通过“阳离子桥”的作用吸引 $\text{CO}_3^{2-}$ 。这样,菌丝球表面逐渐被矿化颗粒所包裹,而菌体最终死亡和被分解,这些被矿化的死亡菌体可以成为异相成核的理想场所。按照Ostwald熟化理论,分散的纳米粒子不断被吸附在表面能较低、体积较大的颗粒表面。这些纳米粒子因表面能很高而溶解并作为较大粒子的“营养”进而促进后者生长。纳米粒子不断向矿化的菌体表面输送“营养”,最终可能形成球状晶体颗粒<sup>[16]</sup>。另外,放线菌菌丝球表面并不光滑,覆盖着“绒毛”状结构(图5)。

溶液中 $\text{Ca}^{2+}$ 与“绒毛”表面的负电基团相互吸引,进而使 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{CO}_3^{2-}$ 结合并形成负离子配位多面体,作为晶体生长基元继续生长并在菌丝球表面沉积。由于整个菌丝球表面的负电基团并不均等,所以在表面会形成不等的颗粒状(图4-G)。在成矿体系中还有放线菌的菌丝片段,菌丝两端的负电基团比菌丝中间更加丰富,这使 $\text{Ca}^{2+}$ 在细胞两端聚集的速率高于中间,溶液中的 $\text{CO}_3^{2-}$ 受到在菌丝两端聚集起来的 $\text{Ca}^{2+}$ 的吸引也移向两端并与之结合,导致菌丝两端晶体生长速率高于菌丝中间生长,故而出现哑铃形或球状的卵晶,此情形与已报导的杆状细菌作为成矿模板相似<sup>[16]</sup>。而两端生长速度较快的哑铃状晶体会向哑铃状中部的凹陷处延伸生长,进而演变为类似于两个球形晶体的聚合<sup>[30]</sup>。

处理5是加入放线菌发酵液,不仅含有培养液中的糖类、蛋白质等有机物、放线菌代谢产物及其胞外多糖等粘性物质,也含有菌丝球、菌丝等细胞结构。观察处理5成矿体系中的碳酸钙晶体很像是图4-E与图4-F、G的综合,这里碳酸钙晶体为嵌合体,表面疏松有孔。在这个体系中,胞外多糖等的黏附作用会将体系中的各个组分不同程度黏附在一起形成复合物,复合物表面负电荷能够吸引溶液中的 $\text{Ca}^{2+}$ ,作为成核位点沉淀碳酸钙晶体。复合物表面的分子间的微环境会限制晶体的正常发育,使晶体只能沿着特定的形状生长,最终形成了表面疏松的类似于花菜状的团聚体。

### 3 小结

放线菌的生物成矿作用与以往报道的其它细菌和真菌的成矿作用有显著差异。放线菌的菌丝体、菌丝球及其代谢产物均对碳酸钙晶体的形成和形貌改变有重要影响。菌丝体、菌丝球表面带有负电荷基团,能够作为成核位点,吸附二价阳离子 $\text{Ca}^{2+}$ ,并形成阳离子桥,吸附 $\text{CO}_3^{2-}$ ,进而形

成CaCO<sub>3</sub>, 并逐渐发育成有鳞片状的柱形, 球形、哑铃型等特殊形貌。此外, 放线菌代谢产物中的多糖、蛋白质等生物大分子, 在离子电荷转变中起重要作用, 也能捕获Ca<sup>2+</sup>成为核位点, 在控制碳酸钙结晶过程中起修饰作用, 能够诱导形成鳞片状的片层结构。本文研究结果为进一步研究岩石放线菌与碳酸盐岩的相互作用提供新的资料。

## 参考文献

- [1] Lian B. Microbial roles in the genesis of soil from carbonate rock weathering. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 2010, 29(1): 52–56. (in Chinese)  
连宾. 碳酸盐岩风化成土过程中的微生物作用. *矿物岩石地球化学通报*, 2010, 29(1): 52–56.
- [2] Lian B, Chen Y, Zhu LJ, Yang RD. Progress in the study of the weathering of carbonate rock by microbes. *Earth Science Frontiers*, 2008, 15(6): 90–99. (in Chinese)  
连宾, 陈焯, 朱立军, 杨瑞东. 微生物对碳酸盐岩的风化作用. *地学前缘*, 2008, 15(6): 90–99.
- [3] Wang Y, Shen JW, Yang HQ, Wang X, Liu MM. Microbial carbonates and its research significance. *Advances in Earth Science*, 2011, 26(10): 1038–1049. (in Chinese)  
王月, 沈建伟, 杨红强, 王旭, 刘苗苗. 微生物碳酸盐沉积及其研究意义. *地球科学进展*, 2011, 26(10): 1038–1049.
- [4] Boquet E, Boronat A, Ramos-Cormenzana A. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature*, 1973, 246(5434): 527–529.
- [5] Lowe DR. Stromatolites 3,400-myr old from the archeon of western australia. *Nature*, 1980, 284(5755): 441–443.
- [6] Schidlowski M. A 3,800-million-year isotopic record of life from carbon in sedimentary rocks. *Nature*, 1988, 333(6171): 313–318.
- [7] 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.
- [8] Cheng L, Qian CX, Wang RX, Wang JY. Study on the mechanism of calcium carbonate formation induced by carbonate-mineralization microbe. *Acta Chimica Sinica*, 2007, 65(19): 2133–2138. (in Chinese)  
成亮, 钱春香, 王瑞兴, 王剑云. 碳酸岩矿化菌诱导碳酸钙晶体形成机理研究. *化学学报*, 2007, 65(19): 2133–2138.
- [9] Li W, Liu LP, Zhou PP, Cao L, Yu LJ, Jiang SY. Calcite precipitation induced by bacteria and bacterially produced carbonic anhydrase. *Current Science*, 2011, 100(4): 502–508.
- [10] Xiao LL, Lian B. Heterologously expressed carbonic anhydrase from *Bacillus mucilaginosus* promoting CaCO<sub>3</sub> formation by capturing atmospheric CO<sub>2</sub>. *Carbonates and Evaporites*, 2015, doi: 10.1007/s13146-015-0239-4.
- [11] Xiao LL, Lian B, Hao JC, Liu CQ, Wang SJ. Effect of carbonic anhydrase on silicate weathering and carbonate formation at present day CO<sub>2</sub> concentrations compared to primordial values. *Scientific Reports*, 2015, 5: 7733.
- [12] Dhama NK, Reddy MS, Mukherjee A. Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 23(5): 707–714.
- [13] Han JX, Lian B, Tang Y, Liu SR, Gong GH. Induced mineralization of calcium carbonate by *Pseudomonas putida*. *Journal of Nanjing University (Natural Science)*, 2013, 49(6): 681–688. (in Chinese)  
韩金鑫, 连宾, 唐源, 刘世荣, 龚国洪. 恶臭假单胞菌对碳酸钙的诱导矿化作用. *南京大学学报(自然科学版)*, 2013, 49(6): 681–688.
- [14] Rautaray D, Ahmad A, Sastry M. Biological synthesis of metal carbonate minerals using fungi and actinomycetes. *Journal of Materials Chemistry*, 2004, 14(14): 2333–2340.
- [15] 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.
- [16] Li FC, Ma H, Su N, Wang JP, Liu MY, Wang J, Teng F. *Clostridium* sp. controlled morphology of mg-bearing calcite and its implication for possible mechanism. *Geological Journal of China Universities*, 2011, 17(1): 13–20. (in Chinese)  
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*, 2011, 17(1): 13–20.
- [17] Goreau TF. Calcium carbonate deposition by coralline algae and corals in relation to their roles as reef-builders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1963, 109: 127–167.

- [18] Pedrozo HA, Schwartz Z, Dean DD, Harrison JL, Campbell JW, Wiederhold ML, Boyan BD. Evidence for the involvement of carbonic anhydrase and urease in calcium carbonate formation in the gravity-sensing organ of *Aplysia californica*. *Calcified Tissue International*, 1997, 61(3): 247–255.
- [19] Meldrum FC, Cölfen H. Controlling mineral morphologies and structures in biological and synthetic systems. *Chemical Reviews*, 2008, 108(11): 4332–4432.
- [20] Li M, Cheng XH, Guo HX. Heavy metal removal by biomining of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 76: 81–85.
- [21] Yao MJ, Lian B, Dong HL, Hao JC, Liu CQ. Iron and lead ion adsorption by microbial flocculants in synthetic wastewater and their related carbonate formation. *Journal of Environmental Sciences*, 2013, 25(12): 2422–2428.
- [22] Tang Y, Lian B, Dong HL, Liu DF, Hou WG. Endolithic bacterial communities in dolomite and limestone rocks from the nanjiang canyon in guizhou Karst area (China). *Geomicrobiology Journal*, 2012, 29(3): 213–225.
- [23] Song ZQ, Zhi XY, Li WJ, Jiang HC, Zhang CL, Dong HL. *Actinobacterial* diversity in hot springs in tengchong (China), kamchatka (Russia), and nevada (USA). *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26(4): 256–263.
- [24] Tiwari K, Gupta RK. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2012, 32(2): 108–132.
- [25] Li J, Xiang SH, Yang XS, Yang KQ. Evaluation of the activities of two promoters in *Streptomyces* by reporter gene method. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(11): 1454–1458. (in Chinese)
- 李佳, 向四海, 杨秀山, 杨克迁. 报告基因法比较两种放线菌启动子的活性. *微生物学报*, 2009, 49(11): 1454–1458.
- [26] Cao CL, Zhou XQ, Qin S, Tao FX, Jiang JH, Lian B. *Lentzea guizhouensis* sp. nov., a novel lithophilous actinobacterium isolated from limestone from the Karst area, Guizhou, China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 108(6): 1365–1372.
- [27] Zhou XY, Du Y, Lian B. Effect of different culture conditions on carbonic anhydrase from *Bacillus mucilaginosus* inducing calcium carbonate crystal formation. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(7): 955–961. (in Chinese)
- 周雪莹, 杜叶, 连宾. 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. *微生物学报*, 2010, 50(7): 955–961.
- [28] Gao YJ, Yan PK, Wang YL, Tian HS, Xue GL, Lu ZQ. Study on the synthesis and growth mechanism of the radial nesquehonite crystal. *Journal of Synthetic Crystals*, 2014, 43(4): 886–892. (in Chinese)
- 高玉娟, 闫平科, 王宇林, 田海山, 薛国梁, 卢智强. 放射状三水碳酸镁晶体合成及生长机理研究. *人工晶体学报*, 2014, 43(4): 886–892.
- [29] Buczynski C, Chafetz HS. Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate: examples from laboratory experiments and recent sediments//Rezak R, Lavoie DL. *Carbonate Microfabrics*. New York: Springer, 1993: 105–116.
- [30] Zhang Q, Chen M, Sun XY, Pan YS. Preparation of  $\text{CaCO}_3$  under the presence of sodium citrate. *Journal of Synthetic Crystals*, 2012, 41(2): 539–543. (in Chinese)
- 张群, 陈敏, 孙新园, 潘玉锁. 柠檬酸钠作用下碳酸钙的制备. *人工晶体学报*, 2012, 41(2): 539–543.



# Effect on calcium carbonate morphology by a strain of rock actinomycete

Yue Chu<sup>1</sup>, Chengliang Cao<sup>2</sup>, Bin Lian<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Jiangsu Key Laboratory of Microbes and Functional Genomics, Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Microbiology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

**Abstract:** [Objective] Microbes-induced mineralization is one of the hottest issues in the field of geomicrobiology. Strain DHS C013<sup>T</sup> isolated from the surfaces of rocks in the Karst region was used to investigate microbial influence on the formation of carbonate and its morphology in the metallogenic system consisting NaHCO<sub>3</sub> and Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O. [Methods] Strain DHS C013<sup>T</sup> was inoculated into malt extract-glucose-yeast extract peptone (MGYP) liquid medium. After cultivation we put the fermented solution, supernatant, hypha pellets, sterile MGYP liquid medium and ultrapure water into the metallogenic system separately. Scanning electronic microscope was applied to observe the crystals at the bottom of the petri dishes. [Results] In the metallogenic system with ultrapure water, only standard calcite of rhombohedron was found. However, special morphology of CaCO<sub>3</sub>, such as dumbbell-like, spherulite and scaly cylindrical shapes, were found in the metallogenic system with actinomycetes, hyphae fragment and their cell metabolism products. These calcium carbonates of special morphology might be resulted from their nucleation on smaller hypha pellets, hyphae fragment or extracellular secretion. [Conclusion] Actinomycetes can induce the formation of CaCO<sub>3</sub>, and the mycelium and metabolites have important effects on regulating and influencing CaCO<sub>3</sub> morphology. Our data provide new evidence for further understanding of the biological mineralization mediated by actinomycete and its metabolic products.

**Keywords:** actinomycete, metallogenic system, CaCO<sub>3</sub>

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41373078), by the National Key Basic Research Program of China (2013CB956702) and by the Priority Academy Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-85891050; E-mail: bin2368@vip.163.com

Received: 28 September 2015; Revised: 9 December 2015; Published online: 21 December 2015