

巴氏芽孢杆菌诱导矿化作用及其脲酶活性的研究与进展

张纾羽 邓鑫林 郭怡楠 李横江 (通讯作者)

武昌首义学院, 湖北武汉, 430060;

摘要: 本文对微生物诱导碳酸钙沉淀 (Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation, MICP) 技术进行了系统综述, 阐述了 MICP 技术的基本原理及其在国内外的研究进展。针对 MICP 技术中广泛使用的巴氏芽孢杆菌 (*Sporosarcina pasteurii*), 深入探讨了其活化、传代与保藏方法, 并进一步剖析了脲酶的分子结构与功能特性。同时, 论述了温度、pH 值、抑制剂以及底物浓度等因素对脲酶活性的影响机制, 并介绍了基于电导率法测定脲酶活性的具体方法。研究旨在通过深入理解脲酶表达调控机制, 进一步提升 MICP 技术的效率与稳定性, 从而推动该技术在岩土工程、环境修复等领域的广泛应用与发展。

关键词: 微生物矿化; 巴氏芽孢杆菌; 脲酶; 电导法; 培养基

DOI: 10.69979/3041-0673.25.10.041

在我国大力发展双碳产业的背景下, 当今的工程建设领域, 可持续、绿色的技术发展需求日益迫切, 微生物学科和岩土工程学科等一些相关学科交叉研究在不断发展, 微生物诱导矿化 (MICP) 技术作为一种新型的加固技术被广泛应用于工程中岩土体的加固。它通过微生物代谢活动促进碳酸钙沉淀生成, 提升土壤强度和稳定性, 巴氏芽孢杆菌分泌的脲酶能催化尿素水解, 生成氨和二氧化碳, 进而促进碳酸钙的形成。未来, 进一步深入研究巴氏芽孢杆菌脲酶的结构与功能, 提升脲酶活性, 将有助于开发更为高效和稳定的生物矿化技术。

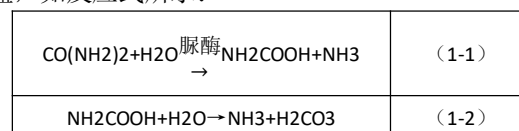
1 微生物诱导碳酸钙沉淀 (MICP) 机理

1973 年 Boquet 等^[1]首次发现微生物诱导碳酸钙沉淀 (Microbially Induced Calcite Precipitation, MICP) 是土壤细菌中普遍存在的现象, MICP 指的是由于微生物的存在和生化活动, 从过饱和溶液中形成碳酸钙沉淀的过程。

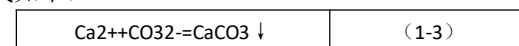
核心机理在于其代谢活动产生的碳酸根离子 (CO_3^{2-}) 与环境中的钙离子 (Ca^{2+}) 的生物矿化过程。反应机制主要包括: 尿素分解、光合作用、硫酸盐还原、厌氧硫化物氧化作用及胞外聚合物合成等多途径。工程实践中, 以尿素分解菌分泌脲酶水解尿素的途径最为普遍, 该反应通过调节碳酸根离子浓度有效驱动碳酸钙晶体成核与生长。

微生物诱导矿化的主要过程之一是尿素水解。以巴氏芽孢杆菌为例, 该菌种因其极高的脲酶活性而被广泛应用于矿化研究中。脲酶能够催化尿素水解生成氨和碳

酸盐, 如反应式所示:



生成的氨溶于水形成氢氧化铵 (NH_4OH), 提高环境 PH, 使得碳酸盐离子 (CO_3^{2-}) 浓度增加。与此同时, 巴氏芽孢杆菌的细胞壁带有负电荷, 能够吸附环境中的钙离子 (Ca^{2+}), 当钙离子与高浓度的碳酸根离子相遇时, 便会以细胞为晶核形成碳酸钙 (CaCO_3) 沉淀, 反应式如下:



2 国内外研究现状

在农业领域, 巴氏芽孢杆菌可被用作生物肥料, 以增强植物的抗病能力和促进生长。例如, 王靖^[2]等人在小麦生长过程中, 使用巴氏芽孢杆菌的微生物修复技术提高了土壤中脲酶的活性, 降低了土壤细菌群落多样性, 增加了群落均匀度, 土壤分解细菌相对丰度增加, 促进了小麦的生长。

通过 MICP 生成碳酸钙沉淀的土体改良加固技术, 可以起到胶结土体的作用, 在岩土领域, 马琰榕^[3]等人的试验表明, 利用巴氏芽孢杆菌的 MICP 技术可以作为一种新型的黄土加固方法, 该方法可以替代传统的注入水泥砂浆加固黄土的方法, 有效地减少了水泥和石灰的使用量, 从而降低能源消耗和对环境造成的污染, 达到了节能减排的效果。

建筑行业的快速发展致使建筑原材料大量消耗, 资

源枯竭问题日益凸显,作为一种新兴技术, MICP 为建筑行业提供环境友好型方案,突破了传统水泥存在的运维成本高昂与生态负面效应双重困境,为建筑行业的可持续发展开辟了新路径,早在 1993 年,研究者们便利用生物矿化这一特点对古建筑进行了修复^[4]。近年来,我国学者也利用 MICP 技术对国内多个三合土古建筑进行了修复,对于 5mm 的裂纹修复后剪切强度恢复率可达 88.54%^[5]。

3 巴氏芽孢杆菌的概述

巴氏芽孢杆菌 (*Sporosarcina pasteurii*) 属于好氧嗜碱型微生物,其最适生长温度为 30° C^[6]。菌落呈灰白色,中等大小,表面光滑湿润,不透明,稍皱褶,平坦,边缘不整齐,菌落革兰氏染色呈紫色,为革兰氏阳性菌。

3.1 菌种的活化

菌种通常以冻干粉的形式保存,便于长期储存和运输,用 75%乙醇消毒冻干粉安瓿瓶,无菌条件下打开,注入适量液体培养基溶解。用无菌移液枪吸取菌液,接种至斜面培养基,根据菌种特性,于合适条件下培养至活化成功。

特别说明,由于尿素溶液在高温下受热易分解,故需单独配制尿素溶液,通过滤膜过滤除菌后加入液体培养基。

3.2 菌种的传代与保藏

取活化成功的试管斜面,挑取单菌落接种于液体培养基,置于 30 °C、180r/min 恒温摇床中培养 24h,取活化后的菌液,梯度稀释后涂平板,放入 30 °C 培养箱培养 24h,培养后获得的单菌落平板可用于后期传代培养,一般培养至二代,方可用于实验。

保藏主要介绍甘油管保藏,流程大致为将菌液与甘油按一定比例混合,充分混匀后分装到无菌甘油管中,然后置于低温环境(如-20°C)保存。其中应注意:甘油要使用分析纯级别并进行灭菌处理;菌液浓度要适中,一般为对数生长期的菌液;混合要充分,避免局部甘油浓度不均;分装时尽量避免产生气泡。

4 脲酶的概述

4.1 脲酶的结构与功能

脲酶的分子通常由多个亚基组成,每个亚基含有一

个活性位点,能够与尿素分子结合并催化其水解。脲酶的活性位点通常包含 Ni (II) 离子,这些镍离子在脲酶的催化过程中起到关键作用。不同来源的脲酶蛋白质、核酸结构或许不同,但都有相同的功能:水解尿素。

微生物诱导大多数脲酶基因都含有结构基因 UreA、UreB、UreC 和辅助基因 UreD、UreE、UreF、UreG 等 7 个或 7 个以上的基因^[7], UreA、UreB、UreC 分别编码脲酶的 3 个亚基 (α 、 β 、 γ) 并构成 $\alpha\beta\gamma$ 单聚体,三个单聚体在形成复合三聚体结构。UreD、UreE、UreF、UreG 则编码了水解尿素所必须的蛋白质^[8]。

脲酶的主要功能在于催化尿素水解,生成氨和碳酸盐,生成的氨溶于水后形成氢氧化铵 (NH_4OH),从而提高环境 PH,使得碳酸盐离子 (CO_3^{2-}) 浓度增加。这一过程在微生物矿化中尤为重要,因为高浓度的碳酸根离子能够与钙离子 (Ca^{2+}) 结合,形成碳酸钙 (CaCO_3) 沉淀,进而引发矿化反应。

4.2 脲酶活性的影响因素

4.2.1 温度

脲酶作为含镍寡聚酶,存在最适温度范围(通常 30-50°C),在此范围内酶分子柔性适宜,活性中心与底物尿素结合效率高,催化速率最快。巴氏芽孢杆菌产生的脲酶在 60°C 以上活性显著下降,其热稳定性与微生物代谢产物的保护机制相关。温度变化通过调控微生物生长状态,间接影响脲酶表达量与催化效能,进而影响微生物诱导碳酸钙沉积 (MICP) 等应用体系的效率。

4.2.2 pH 值

pH 通过调控脲酶分子活性中心镍离子的配位环境及构象稳定性影响其催化效率。碱性条件 (pH 8-9) 可维持酶构象稳定,促进尿素水解生成碳酸根与钙离子结合沉淀;酸性或中性环境则导致镍离子配位结构改变,降低酶活性。

4.2.3 抑制剂

一些化学物质,如重金属离子、巯基试剂等,可以通过调控脲酶活性中心构象及催化机制影响其功能。脲酶活性中心由两个镍离子与天冬氨酸、组氨酸等残基配位构成。镍离子通过亲核攻击尿素羰基促进水解反应,而其他金属离子(如 Co^{2+} 、 Zn^{2+}) 可竞争性取代镍离子导致酶活性下降。

4.2.4 底物浓度

底物(尿素)浓度对脲酶的活性也有影响。在一定

浓度范围内,随着底物浓度的增加,脲酶的催化反应速率增加。但当底物浓度达到一定值时,脲酶的活性位点可能饱和,此时再增加底物浓度,催化反应速率不再增加。

4.3 电导法测酶活

细菌的脲酶活性和水解尿素所产生的离子数量成正比,试验室中常用电导率法测量脲酶活性。脲酶活性与溶液的导电能力有关。这里主要介绍由 Whiffin 等^[9]人提出的,基于电导率测定脲酶活性的方法。该方法基于巴氏芽孢杆菌代谢活动产生的脲酶催化作用,将尿素分解为可导电的 NH_4^+ 和 CO_3^{2-} 。在扩大培养的过程中,菌液浓度升高,脲酶活性显著提升,溶液中离子浓度持续增加,导电性逐渐提升。实验结果表明,尿素分解速率与溶液电导率正相关,该特性可作为重要检测指标,用于评估脲酶活性及细菌平均代谢水平。

$A = E/t \cdot 11.11 \cdot n$	(3-3)
-------------------------------	-------

A—脲酶活性(mmol/L/min);E—电导率值(ms/cm);
t—时间(min);n—稀释倍数。

5 思考与展望

微生物诱导矿化(MICP)中,巴氏芽孢杆菌展现出巨大应用潜力,但仍存在诸多待解问题。从作用机理看,虽已明晰其分泌脲酶催化尿素水解诱导碳酸钙沉淀过程,但对脲酶结构与功能关系的理解尚浅,深入探究二者关联,有望精准调控矿化效率。

在应用层面,于建筑行业,可进一步挖掘其修复裂缝、增强耐久性的潜力;环境保护领域,可探索其在重金属固化、污水净化等方面新应用。未来,跨学科融合研究是趋势,结合材料科学、环境科学等,有望拓展 MICP 技术边界。同时,借助基因工程技术改造巴氏芽孢杆菌,或能提升脲酶活性与稳定性,推动生物矿化技术迈向高效、稳定新高度。

参考文献

- [1]李婧. 微生物诱导碳酸钙矿化(MICP)固土过程的调控及机理研究[D]. 内蒙古工业大学, 2024. DOI:10.27225/d.cnki.gnmgu.2024.000118.
- [2]王靖. 巴氏芽孢杆菌对黄河滩区镉污染土壤修复及冬小麦镉富集影响[D]. 河南大学, 2024. DOI:10.27114/d.cnki.ghnau.2024.001167.

- [3]马琰榕. MICP 技术加固黄土力学特性及其机理试验研究[D]. 太原理工大学, 2020. DOI:10.27352/d.cnki.gylgu.2020.001228.
- [4]Orlial, Geneviève, Castanier S, Le Metayer, Gaëlle, et al. The biomineralization: a new process to protect calcareous stone; applied to historic monuments[C]//1993.
- [5]Liu S, Yu J, Peng X, et al. Preliminary study on repairing tabia cracks by using microbially induced carbonate precipitation[J]. Construction and Building Materials, 2020, 243(118611):1-12. DOI:10.1016/j.conbuildmat.2020.118611.
- [6]陈永贵,江昭明,付俊,等. 巴氏芽孢杆菌固化污染土的培养优化与矿化机制[J]. 同济大学学报(自然科学版), 2025, 53(04):635-643.
- [7]裴迪,刘志明,胡碧茹等. 巴氏芽孢杆菌矿化作用机理及应用研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2020, 47(06):467-482.
- [8]Karplus P A, Pearson M A, Hausinger R P. 70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned?[J]. Accounts of Chemical Research, 1997, 30(8):330-337. DOI:10.1021/ar960022j.
- [9]Whiffin V S. Microbial CaCO_3 precipitation for the production of biocement[J]. [2025-04-25].

作者简介:张纾羽(2004-),女,汉族,四川广元人,本科在读。

作者简介:邓鑫林(2003-),女,汉族,湖北黄冈人,本科在读。

作者简介:郭怡楠(1990-),女,汉族,河南许昌人,本科,实验师,研究方向:化学实验室安全及其废弃物管理、岩土微生物及重金属处理。

作者简介:*李横江(1981-),女,汉族,湖北武汉人,硕士,副教授,研究方向:微生物应用,相关实践教学研究和探索。

基金项目:2023年度湖北省教育厅科研计划项目“岩土微生物的筛选与优化及在改善土体结构中的应用研武昌首义学院”(项目编号:B2023366),湖北省省级大学生创新创业训练计划“非离子表面活性剂提升巴氏芽孢杆菌脲酶活性的研究”(项目编号:S202412309013)成果。