【生物工程 / Bioengineering】

混凝土自修复菌 *Bacillus sp.* 芽孢生产和萌发条件的优化

罗 顺¹, 刘 冰², 张金龙¹, 李秋伟¹, 邓 旭¹

1) 深圳大学生命与海洋科学学院, 广东深圳 518055; 2) 深圳信息职业技术学院交通与环境学院, 广东深圳 518172

摘 要: 对一株混凝土自修复菌 *Bacillus sp.* B8 芽孢生产条件进行优化, 研究芽孢萌发的影响因素. 芽孢生产的单因素实验表明, 最适接种量为 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$; 最适碳源和氮源分别为淀粉和酵母粉, 相应的最适质量浓度分别为 0.5 g/L 和 2 g/L; 一定质量浓度的 Mg^{2+} (0.24 g/L) 和 Mn^{2+} (4.8 mg/L) 有利于芽孢生成. 在单因素实验的基础上利用正交实验对各影响因子进行了优化, 结果表明, 接种量和酵母粉浓度是影响芽孢产量的显著因子, 在接种量、淀粉、酵母粉、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度分别为 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 、5、5、0.48 和 $4.8 \times 10^{-3} \text{ g/L}$ 时, 芽孢产量达到 $1.54 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, 比优化前提高 150 倍. 此外, 芽孢萌发实验表明, 芽孢萌发时间约为 4 h; 最适萌发剂为肌苷, 最适质量浓度为 2 g/L, 最适 pH 值为 10; 金属离子 Na^+ 能促进芽孢萌发, 但 Ca^{2+} 对芽孢的萌发有严重的抑制作用. 在实验中首次发现一定质量浓度的 Na^+ 能消除 Ca^{2+} 的抑制作用, 最适质量浓度为 24 g/L.

关键词: 微生物学; 自修复; 枯草芽孢菌属; 芽孢生成; 萌发; 矿化

中图分类号: Q819; Q939.99

文献标志码: A

doi: 10.3724/SP.J.1249.2020.01025

Optimization of sporulation and germination of self-healing bacterium *Bacillus sp.* for concrete crack

LUO Shun¹, LIU Bing², ZHANG Jinlong¹, LI Qiuwei¹, and DENG Xu¹

1) College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518055, Guangdong Province, P. R. China

2) School of Traffic and Environment, Shenzhen Institute of Information Technology, Shenzhen 518172, Guangdong Province, P. R. China

Abstract: The single factor experimental results of spore production of a self-healing bacterial strain, *Bacillus sp.* B8, show that the optimal inoculation volume is $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. The suitable carbon and nitrogen source are starch and yeast extract and the corresponding optimal concentrations being 0.5 g/L and 2 g/L, respectively. The presence of Mg^{2+} (0.24 g/L) and Mn^{2+} (4.8 mg/L) is beneficial for spore formation. Furthermore, based on the above results, orthogonal experiment is carried out to optimize the influential factors. The result shows that the inoculation volume and yeast extract concentration are the significant factors affecting spore yield. Under the optimized condition in which the concentrations of inoculation cells, starch, yeast extract, Mg^{2+} and Mn^{2+} are $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 5, 5, 0.48 and $4.8 \times 10^{-3} \text{ g/L}$, respectively, the final spore concentration reaches up to $1.54 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, showing more than 150 times enhancement. On the other hand, the results of spore germination indicate that spores need about 4 h to complete germination process. The most suitable germinant is inosine, and the optimal concentration is 2 g/L.

Received: 2019-05-20; **Accepted:** 2019-09-19

Foundation: National Natural Science Foundation of China (51578339); Project of Department of Education of Guangdong Province (2017GKTSX064)

Corresponding author: Professor DENG Xu. E-mail: dengxu@szu.edu.cn

Citation: LUO Shun, LIU Bing, ZHANG Jinlong, et al. Optimization of sporulation and germination of self-healing bacterium *Bacillus sp.* for concrete crack [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2020, 37(1): 25-32. (in Chinese)

The suitable pH is 10. Na^+ could promote the germination of spores, whereas Ca^{2+} shows a severe inhibition on the germination of spores. However, we find, for the first time, that the presence of Na^+ at a certain concentration (the optimal concentration is 24 g/L) can alleviate the inhibition of Ca^{2+} on spore germination to a large extent.

Key words: microbiology; self-healing; *Bacillus*; sporulation; germination; mineralization

混凝土是被广泛应用的建筑材料,服役过程中由于自然环境和外界压力的影响,表面和内部容易出现裂缝,破坏建筑结构,缩短建筑物的使用年限. 1973 年,BOQUET 等^[1]研究发现,众多土壤微生物具有成矿能力,受此启发,GOLLAPUDI 等^[2]利用细菌诱导碳酸钙的方式对建筑材料渗漏现象进行控制,开启了混凝土的微生物自修复研究. 在混凝土出现裂缝时,微生物通过呼吸代谢产生 CO_2 ,在碱性条件下形成 CO_3^{2-} ,与环境中的 Ca^{2+} 反应生成 CaCO_3 沉积在裂缝表面,从而填补裂缝^[3].

混凝土内部是高压、缺氧、缺水的胁迫环境,水化过程中 pH 值甚至高达 13,对微生物的生长极为不利. BUNDUR 等^[4]将巴氏芽孢八叠球菌 (*Sporosarcina pasteurii*) 的营养细胞混入混凝土中,7 d 后细菌存活率为 0.1%,若同时混入营养物质,细菌存活率也仅为 3%. 为了提高细菌的存活率,研究者开始尝试将细菌以芽孢的形式预埋入混凝土中. 相比于营养细胞,芽孢的抗逆能力强,尤其是能抵抗水泥水化过程中的强碱性环境和剪切力,有利于在混凝土中存活. 当混凝土开裂时,外界氧气和水分进入,促使芽孢萌发成营养细胞,修复裂缝. 目前用于混凝土裂缝自修复的细菌基本上都属于芽孢菌属,如科氏芽孢杆菌 (*Bacillus cohnii*)、巴氏芽孢八叠球菌 (*S. pasteurii*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[5] 和球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 等. NAIN 等^[5]研究发现,经过 28 d 的修复,巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 使混凝土试块抗压强度提高 22.5%,枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 使混凝土试块抗拉强度提高 25.3%. LORS 等^[6]研究了嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus pseudofirmus*) 对混凝土裂缝的修复效果,通过提供外源乳酸钙能使裂缝宽度减小 155 ~ 179 μm . 由此可见,利用微生物修复混凝土裂缝具有很好的应用前景.

要实现混凝土裂缝的微生物自修复,首先需要将足够数量的芽孢预置入混凝土;当裂缝出现时,芽孢还要萌发生长成营养细胞后才能诱导碳酸钙的形成. 芽孢的生产和萌发受多种环境因素如温度、pH 值、金属离子以及营养条件的影响,目前这方面的研究主要集中在食品、医药等领域,对于应用

于混凝土自修复的矿化微生物鲜有涉及. 本研究拟系统考察影响混凝土自修复细菌芽孢产量及萌发的主要因素,从而探明提高芽孢产率和萌发效率的优化途径,为实现混凝土裂缝的微生物自修复提供实验参考.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

一株嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus sp.*, 命名为 B8, 由深圳市福田区红树林沉积土筛选获得.

1.1.2 培养基

1) 菌种活化培养基(1 L). 其中,牛肉膏 3 g; 蛋白胨 10 g; 碳酸钠 9.54 g; 碳酸氢钠 0.84 g.

2) 芽孢发酵培养基(1 L). 其中,氯化钾 0.476 g; 磷酸二氢钾 0.02 g; 氯化钙 0.17 g; 六水合氯化镁 0.2 g; 一水合硫酸锰 0.01 g; 硝酸铵 0.3 g; 酵母粉 1 g; 60% L-乳酸钠 1.87 g (单独灭菌); 碳酸钠 5.3 g 或碳酸氢钠 4.2 g (单独灭菌).

3) 芽孢萌发培养基(1 L). 其中,肌苷 2.682 g; 氯化钠 11.688 g; 3-(环己氨基)-1-丙磺酸 22.132 g.

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化培养

从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出菌种,用接种环刮取菌苔接入到 50 mL 培养基中,置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下振荡培养 18 h,备用.

1.2.2 芽孢发酵培养

将活化菌悬液稀释,按体积分数 1% 接种到 50 mL 芽孢发酵培养基中,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下振荡培养 48 h,检测芽孢产量.

1.2.3 芽孢浓度检测

芽孢产量用芽孢浓度表征,具体过程为:取 2 μL 待检芽孢悬浮液滴加在细菌计数板中心计数区,随机选取 n 个小格采用“计上不计下,计左不计右”的原则记录芽孢数量,计算芽孢浓度,为

$$S = \frac{2N}{n} \times 10^7$$

其中, S 为芽孢浓度; N 为芽孢总数; n 为格子数。

1.2.4 芽孢发酵的单因素优化

1) 接种量. 将活化后的菌悬液稀释成 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 和 $2 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ 4 个浓度, 按 1% 的体积比接种到对应的锥形瓶 (250 mL) 中, 每瓶装 50 mL 芽孢发酵培养基, 接种后的芽孢初始浓度分别为 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 和 $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。

2) 碳源. 选取葡萄糖、D-果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖和淀粉 6 种糖类和甲酸钠、乙酸钠、草酸钠、海藻酸钠、D-葡萄糖酸钠和 L-乳酸钠 6 种有机酸盐作为碳源, 质量浓度为 1 g/L, 进行碳源种类筛选; 获得优势碳源后, 设置质量浓度为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 g/L 进行碳源浓度优化。

3) 氮源. 选取硝酸钠、硝酸铵、尿素、牛肉膏、蛋白胨和酵母粉作为氮源, 质量浓度为 1 g/L, 进行氮源种类筛选; 获得优势氮源后, 设置质量浓度为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 g/L 进行氮源浓度优化。

4) 金属离子. Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 分别来源于六水合氯化镁和一水合硫酸锰, 其中, Mg^{2+} 质量浓度为 0.06、0.12、0.24、0.36 和 0.48 g/L, Mn^{2+} 质量浓度为 1.6、3.2、4.8、6.4 和 8.0 mg/L。

1.2.5 正交实验

在单因素实验的基础上, 以芽孢浓度为考察指标, 通过正交实验对接种量、淀粉、酵母粉、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的用量进行优化, 每个因素选取 3 个水平, 如表 1。

表 1 B8 芽孢发酵培养基正交实验设计
Table 1 Orthogonal design of B8 sporulation medium

组别	因 素	水 平		
		1	2	3
A	菌液浓度/ mL^{-1}	1×10^5	1×10^6	1×10^7
B	ρ (淀粉) / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.5	2.0	5.0
C	ρ (酵母粉) / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.5	2.0	5.0
D	ρ (Mn^{2+}) / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.06	0.24	0.48
E	ρ (Mn^{2+}) / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.6	4.8	8.0

1.2.6 制备芽孢悬浮液

利用优化后的培养基生产芽孢, 在 4°C 、7 000 r/min 的条件下离心 10 min, 去掉上清液, 用无菌水洗涤再离心, 重复 10 次。用灭菌的去离子水配置芽孢悬浮液, 浓度为 $4 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, 保存在 4°C 冰箱中, 备用。

1.2.7 芽孢萌发检测

在 490 nm 波长下, 随着芽孢萌发率增加, 光密度值逐渐下降。实验中, 利用光密度值的变化, 判断芽孢萌发状态, 并在相差显微镜下利用细菌计数板检测未萌发芽孢数, 计算芽孢萌发率。具体过程如下: 将芽孢悬浮液 (浓度 $4 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$) 置于 60°C 水浴 10 min, 取 200 μL 至 10 mL 离心管中, 再取 1.8 mL 芽孢萌发培养基至离心管中, 摇匀后取 200 μL 至 96 孔板中, 用多功能酶标仪每隔 30 min 测量 1 次 $D(490)$; 将装有芽孢的离心管置于 30°C 、150 r/min 的条件下震荡培养, 待萌发稳定后检测未萌发芽孢数 (参照 1.2.3), 计算芽孢萌发率, 为

$$G = 1 - \frac{S}{S_0} \times 100\%$$

其中, G 为芽孢萌发率; S 为未萌发芽孢浓度; S_0 为初始芽孢浓度。

1.2.8 芽孢萌发条件优化

1) 萌发剂. 分别选取 L-丙氨酸、L-组氨酸、L-苏氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-甘氨酸、L-谷氨酸、L-天冬酰胺和肌苷为萌发剂, 质量浓度均为 3 g/L, 进行萌发剂种类筛选。获得优势萌发剂后, 设置浓度为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 和 5.00 g/L 进行萌发剂浓度优化。

2) pH 值. 将芽孢萌发体系的初始 pH 值分别调节为 7、8、9、10、11、12 和 13, 待萌发稳定后计算芽孢萌发率。

3) 金属离子. 芽孢的萌发也需要金属离子的参与, 菌株筛选自金属离子种类多、含量高的滨海湿地, 因此, 以海水中金属离子的含量为依据, 探究了 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 5 种主要金属离子对芽孢萌发的影响。在芽孢萌发体系中分别加入 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} , 质量浓度分别为 10.500、0.400、0.030、0.600 和 0.011 g/L。其中, 系列 1 只加金属离子, 不加萌发剂, 系列 2 同时添加金属离子和萌发剂, 随后探究对芽孢萌发具有影响作用的金属离子的浓度效应。待芽孢萌发稳定后, 计算萌发率。

以上所有实验均重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 芽孢生产条件优化

2.1.1 接种量

接种量不同, 芽孢产量有明显差异。如图 1,

接种量为 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 时, 培养 48 h 后芽孢浓度为 $2.37 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$, 而且随着培养时间增加, 芽孢浓度基本保持稳定. 接种量为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 和 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 时, 最终芽孢浓度都在 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 以下; 接种量为 $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 时, 48 h 芽孢浓度超过 $3.5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$, 但进一步延长培养时间, 部分芽孢萌发生长成营养细胞, 芽孢浓度反而下降. 接种量是芽孢产量的影响因素之一, 严涛等^[7]研究表明, 接种量为 4% 时, 凝结芽孢杆菌 BC01 (*Bacillus coagulans*) 产孢率可达 65.1%, 但继续增大接种量则产孢率急剧下降. 这可能是因为接种量过大导致营养细胞生长过快, 环境中有害代谢产物积累过多所致.

图 1 接种量对芽孢产量的影响

Fig. 1 Effect of inoculation amount on sporulation

2.1.2 碳源

如图 2 显示了不同碳源对芽孢产量的影响. 其中, CK 为对照组. 由图 2 可见, 以淀粉为碳源产芽孢效果最好. 随着淀粉质量浓度的增加, 芽孢浓度呈先增后降趋势. 淀粉质量浓度为 0.5 g/L 时, 芽孢浓度最高, 为 $3.76 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$. 由此可见, 高浓度的淀粉不利于芽孢生成. 左肖肖等^[8]研究也表明, 可溶性淀粉是枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 芽孢生产的最适碳源, 添加量为 0.5% (质量分数) 时, 芽孢浓度为 $6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 之后再增加淀粉含量, 芽孢产量反而下降, 与本研究一致. 这可能是因为加入高浓度淀粉为细菌营养细胞的生长繁殖提供了充足的碳源, 营养胁迫的限制减小, 导致芽孢萌发, 从而芽孢产量下降. 此外, 淀粉实惠易得, 因此本实验选取淀粉作为 B8 芽孢生产的碳源.

2.1.3 氮源

本研究实验结果表明, 以酵母粉为氮源芽孢产

图 2 不同碳源和淀粉浓度对芽孢产量的影响

Fig. 2 Effects of carbon sources and starch concentration on sporulation

率高于其他种类氮源, 且随着酵母粉质量浓度的增加, 芽孢浓度呈先增后降趋势 (图 3). 酵母粉浓度为 2 g/L 时, 芽孢浓度最大, 为 $4.34 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$. 在芽孢生产工艺中, 酵母粉是一种常见的氮源, 如在侧孢芽孢杆菌 C5 (*B. laterosporus* C5) 生产过程中, 以酵母膏为氮源效果最佳^[9]. 冯鑫等^[10]研究表明, 以酵母浸粉为氮源, 使酸土脂环酸芽孢杆菌芽孢产量提高了 12.81 倍. 左肖肖^[8]等对枯草芽孢杆菌的研究发现, 加入酵母膏的浓度为 0.2% (质量分数) 时, 芽孢量为 $6.1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 浓度增加到 1.2% 时, 芽孢量下降到 $1.7 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. 由此可见, 低浓度酵母粉有利于芽孢生产.

图 3 不同氮源和酵母粉浓度对芽孢产量的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen sources and yeast extract concentration on sporulation

2.1.4 金属离子

Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 是影响芽孢生产的主要金属离子, 随着离子浓度的增加, 芽孢浓度呈先增后降的趋势 (图 4). Mg^{2+} 质量浓度为 0.24 g/L 时, 芽孢浓度最

大,为 $2.94 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$; Mn^{2+} 质量浓度为 4.8 mg/L 时,芽孢浓度最大,为 $1.88 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$. 可见, Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的浓度过低或过高都不利于芽孢形成. Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 是细菌生长和芽孢生成所需的微量元素, Mg^{2+} 能激活多种代谢酶,影响 Na^+ 和 Ca^{2+} 等离子的转运, Mn^{2+} 则是 L-阿拉伯糖异构酶和超氧化物歧化酶等关键酶的辅助因子. 然而,在芽孢生产过程中,不同菌种所需 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的含量存在差异. 董佩佩等^[11] 对一株凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*) 产芽孢培养基进行优化发现,所需 MgSO_4 的最优质量浓度为 0.49 g/L . 吴迎奔等^[9] 对侧孢芽孢杆菌 C5 研究发现,添加 0.2 g/L 的 MnSO_4 有助于芽孢形成. 冯鑫^[10] 等的结果表明,在酸土脂环酸芽孢杆菌 (*A. acidoterrestris*) 芽孢生产过程中, MgSO_4 质量浓度低于 0.34 g/L 时,芽孢数和芽孢形成率皆随 MgSO_4 质量浓度增加而增加,高于 0.34 g/L 时,芽孢数略有下降;加入 $0.24 \sim 0.48 \text{ g/L}$ MnSO_4 能促进芽孢生成,而质量浓度高于 0.48 g/L 时,对芽孢生成有抑制作用,结果与本研究一致.

图4 金属离子对芽孢产量的影响

Fig. 4 Effects of metal ions on sporulation

2.1.5 正交实验优化

基于单因素实验,通过正交实验对接种量、淀粉、酵母粉、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的用量进行优化. 结果表明,各因素对 B8 芽孢产量的影响大小为:酵母粉 > 接种量 > Mn^{2+} > 淀粉 > Mg^{2+} , 所得优化组合为: $\text{A}_3\text{B}_3\text{C}_3\text{D}_3\text{E}_2$, 即接种量为 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 淀粉质量浓度为 5 g/L , 酵母质量浓度为 5 g/L , Mg^{2+} 质量浓度为 0.48 g/L , Mn^{2+} 质量浓度为 4.8 mg/L , 在此优化组合下,所得芽孢浓度为 $1.54 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, 高于正交实验各个组合. 方差分析结果表明,接种量对芽孢产量有显著影响 ($P < 0.05$),酵

母粉质量浓度对芽孢产量有极显著影响 ($P < 0.01$),其他组分对芽孢产量的影响无统计学意义 ($P > 0.05$). 因此,在芽孢生产过程中,要严格控制接种量和酵母粉的使用量.

2.2 芽孢萌发

2.2.1 萌发时间

如图5所示,随着萌发时间的增加, $D(490)$ 逐渐下降,芽孢萌发率逐渐增加,在4 h时萌发趋于稳定,芽孢萌发率超过85%. 通常芽孢萌发所需的时间较短,且不同菌种的芽孢之间存在差异. SHARMA 等^[12] 研究发现,科氏芽孢杆菌 (*B. cohnii*) 芽孢在3 h时,萌发率可达98%,而嗜碱芽孢杆菌 (*B. pseudofirmus*) 芽孢在20 h时才开始萌发,经过10 h才萌发完全. 本实验所用的 B8 芽孢萌发比较迅速,3 ~ 4 h 就能萌发完全. 芽孢萌发时间与不同菌种芽孢内膜所含的营养萌发受体量有关,萌发受体量多,芽孢萌发就快,萌发受体量少,芽孢萌发所需时间长,甚至能使芽孢进入深休眠状态^[13]. 此外,芽孢萌发速率与所用萌发剂、无机盐、环境 pH 值和热处理等有关.

图5 芽孢萌发率和 $D(490)$ 随萌发时间的变化Fig. 5 Time course of spore germination and $D(490)$

2.2.2 萌发剂

芽孢萌发的萌发剂大多为氨基酸类,本研究对9种萌发剂进行了考察,发现肌苷和 L-丙氨酸能较好地促使芽孢萌发,其他几种氨基酸促萌发效果较差(图6). 对肌苷质量浓度作进一步考察发现,在 $0 \sim 0.1 \text{ g/L}$ 随着质量浓度的增加,芽孢萌发率迅速升高;在 $0.1 \sim 2.0 \text{ g/L}$,芽孢萌发率增加变缓;肌苷浓度高于 2.0 g/L 时,芽孢萌发率几乎不再增加. 可见,适宜的肌苷质量浓度为 2.0 g/L . 不同菌种的芽孢所需萌发剂的种类和用量存在差异. 如科氏芽孢杆菌 DSM6307 (*B. cohnii* DSM6307) 芽孢的最适

萌发剂为肌苷, 最适浓度为 15 mmol/L, 浓度过高反而抑制芽孢萌发^[14]. GOUNINA-ALLOUANE 等^[15]发现, 利用 1 ~ 100 mmol/L 的 L-丙氨酸或 0.01 ~ 10.00 mmol/L 的肌苷能促使蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 迅速萌发. 除了糖类、氨基酸和嘌呤核苷等营养萌发因子, 非营养萌发因子以及高压、热处理等物理因素也能诱导芽孢萌发.

图 6 不同萌发剂和肌苷浓度对芽孢萌发的影响
Fig. 6 Effects of different germinators and inosine concentration on spore germination

2.2.3 pH 值

环境条件是影响芽孢高效萌发的因素之一, 如图 7, 随着 pH 值的增加, 芽孢萌发率呈先增后降的趋势. pH 值为 10 时, 芽孢萌发率最高, 为 86.25%; pH 值为 9 和 11 时, 萌发率分别为 74.38% 和 65.63%, 相对较高; pH 值低于 8 或高于 12 时, 芽孢萌发率急剧下降. 因此, 芽孢萌发适宜的 pH 值范围为 9 ~ 11. 不同菌种的生长环境不同, 导致其芽孢萌发所需的 pH 值也存在差异. VERCAMMEN 等^[16]研究发现, 在 800 MPa 的高压下、pH 值为 4 的缓冲液能促使凝结芽孢杆菌 LMG6326 (*B. coagulans* LMG6326) 芽孢萌发. SETLOW 等^[17]研究表明, pH 值为 7.3 ~ 7.5 时, 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 芽孢开始萌发. 本实验所研究的菌株 B8 筛选于碱性环境, 因此在碱性条件下更有利于该菌株芽孢的萌发.

2.2.4 金属离子

图 8 显示了不同金属离子对芽孢萌发的影响. 由图 8 可见, 不加肌苷的系列中, 芽孢几乎不萌发, 可见芽孢萌发必须要有萌发剂的参与. 但除肌苷外, 一些金属离子也会对萌发过程产生影响. 在加入肌苷的系列中, Na⁺ 的存在使芽孢萌发率高达 75.42%; 加入 K⁺、Mg²⁺ 和 Mn²⁺ 芽孢萌发率分别

图 7 pH 值对芽孢萌发的影响
Fig. 7 Effect of pH on spore germination

为 30%、34.67% 和 32%, 与对照组的 32.67% 相近; 而加入 Ca²⁺ 芽孢萌发率仅为 6%, 芽孢几乎不萌发. 可见 Na⁺ 能促进芽孢萌发, 但 Ca²⁺ 严重抑制芽孢萌发, 而 K⁺、Mg²⁺ 和 Mn²⁺ 对芽孢萌发无明显影响. 进一步考察肌苷存在时不同 Na 质量浓度对芽孢萌发的促进作用. 如图 8, 随着 Na⁺ 质量浓度的增加, 芽孢萌发率呈先增后减的趋势. Na⁺ 质量浓度在 0 ~ 3 g/L 时, 芽孢萌发率迅速升高; 在 3 ~ 24 g/L 时, 芽孢萌发率缓慢下降; 当质量浓度高于 24 g/L 时, 芽孢萌发率迅速下降. 其中, Na⁺ 质量浓度为 3 g/L 时, 芽孢萌发率最大, 为 89.17%; 质量浓度为 0.6 g/L 和 24.0 g/L 时, 也具有较高的萌发率, 分别为 77.29% 和 73.75%. 由此可见, B8 芽孢对 Na⁺ 质量浓度的耐受范围较宽, 在 0.6 ~ 24.0 g/L 皆能保持较高的萌发率.

图 8 不同金属离子对芽孢萌发的影响
Fig. 8 Effects of different metal ions on spore germination

在混凝土内部环境中, Ca²⁺ 的含量较高 (如普通水泥中, CaO 的质量分数高达 50% ~ 55%), 这将对芽孢萌发造成严重抑制. 芽孢如果不能萌发并

生长为营养细胞,就无法诱导碳酸钙的生成,从而大幅降低微生物自修复的效率,因此,必须采取措施解除 Ca^{2+} 对芽孢萌发的抑制作用. 由图 8 可知, Na^+ 对芽孢萌发具有明显的促进作用,因此本研究利用 Na^+ 的促进作用来抵消 Ca^{2+} 的抑制作用. 如图 9, 在含有 0.6 g/L 的 Ca^{2+} 体系中加入 10.6 g/L 的 Na^+ , 芽孢萌发率从对照组的 6.00% 左右上升到 30.67%, 而加入 K^+ 、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的芽孢萌发率分别为 5.33%、4.00% 和 6.67%, 与对照相近, 对芽孢萌发无促进作用. 由此可见, Na^+ 确实能在一定程度上解除 Ca^{2+} 对芽孢萌发的抑制. 从文献调研的情况来看, 这是首次证实 Na^+ 具有消除 Ca^{2+} 对芽孢萌发抑制的作用.

图9 含 Ca^{2+} 体系中, 共存金属离子对芽孢萌发的影响

Fig. 9 Effects of co-existing metal ions on spore germination in the presence of Ca^{2+}

在确定 Na^+ 能有效解除抑制后, 进一步考察了不同质量浓度 Na^+ 的抑制解除效果. 如图 9, 在含有 0.6 g/L 的 Ca^{2+} 体系中, 随着 Na^+ 质量浓度增加, 芽孢萌发率呈先增后减的趋势. 当 Na^+ 质量浓度为 24.0 g/L 时, 芽孢萌发率最高达到 82.71%, 基本恢复到无 Ca^{2+} 抑制的水平, 表明在此质量浓度时, Ca^{2+} 对芽孢萌发的抑制作用被完全解除.

芽孢萌发过程通常伴随有 H^+ 和 K^+ 等一价阳离子从芽孢内核释放, 这可能与芽孢内膜上的离子转运蛋白有关. SOUTHWORTH 等^[18] 研究发现, 在蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*) 芽孢中存在一种 Na^+ 和 K^+ 的反向转运蛋白 GerN, 外界 Na^+ 内流促使 H^+ 、 K^+ 释放, 促进芽孢萌发, 在其他种属的细菌芽孢中也可能存在类似的离子转运蛋白. SHARMA 等^[12] 研究表明, 嗜碱芽孢杆菌 (*B. pseudofirmus*) 芽孢萌发需要 Na^+ 存在, 在萌发体系中加入 0.10 mol/L NaCl, 芽孢萌发率高达 99%, 加入 0.05 mol/L

NaCl, 芽孢萌发率为 82%, 不添加 NaCl, 芽孢不萌发. 本实验中, Na^+ 能促进 B8 芽孢的萌发, 也可能是芽孢内膜上存在相关离子转运蛋白, 通过 Na^+ 内流促使内核中其他阳离子外排, 伴随着内核吸水, 促进萌发.

在芽孢形成过程中, 内核生成 2,6-吡啶二羧酸 (pyridine-2,6-dicarboxylic acid, PDA), 会吸收 Ca^{2+} , 以 1:1 结合生成螯合物 Ca^{2+} -PDA, 而芽孢萌发伴随着 Ca^{2+} -PDA 的释放, 当外界存在 Ca^{2+} 时, 会抑制 Ca^{2+} -PDA 的释放, 进而抑制萌发^[13]. 本实验表明, 当环境中存在 Na^+ 时, 相关离子转运通道可能被开启, 使内核中 H^+ 和 K^+ 等离子释放的同时可能也导致了 Ca^{2+} -PDA 释放, 引起内核吸水, 从而解除 Ca^{2+} 的抑制作用, 最终促使芽孢萌发.

结 语

在 B8 芽孢生产过程中, 接种量和酵母粉含量对芽孢产量有显著影响, 优化后各组分: 接种量 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 、淀粉 5 g/L、酵母粉 5 g/L、 Mg^{2+} 0.48 g/L 和 Mn^{2+} 4.8 mg/L, 所得芽孢浓度为 $1.54 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, 产量大幅度提高. 碱性环境能保证 B8 芽孢高效萌发, 肌苷能刺激芽孢快速萌发, Na^+ 促进芽孢萌发, Ca^{2+} 抑制萌发; 高质量浓度 Na^+ 能缓解 Ca^{2+} 的抑制作用, 促进芽孢萌发.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51578339); 广东省高等学校科技创新资助项目 (2017GKTSCX064)

作者简介: 罗 顺 (1995—), 男, 深圳大学硕士研究生. 研究方向: 混凝土的微生物自修复. E-mail: luoshun2017@email.szu.edu.cn

引 文: 罗 顺, 刘 冰, 张金龙, 等. 混凝土自修复菌 *Bacillus* sp. 芽孢生产和萌发条件的优化[J]. 深圳大学学报理工版, 2020, 37(1): 25-32.

参考文献 / References:

- [1] BOQUET E, BORONAT A, RAMOS A. Production of calcite (*calcium carbonate*) crystals by soil bacteria is a general phenomenon [J]. Nature, 1973, 246 (5434): 527-529.
- [2] GOLLAPUDI U K, KNUTSON C L, BANG S S, et al. A new method for controlling leaching through permeable channels [J]. Chemosphere, 1995, 30(4): 695-705.
- [3] WANG J, ERSAN Y C, BOON N, et al. Application of microorganisms in concrete: a promising sustainable strategy to improve concrete durability [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(7): 2993-

- 3007.
- [4] BUNDUR Z B, AMIRI A, ERSAN Y C, et al. Impact of air entraining admixtures on biogenic calcium carbonate precipitation and bacterial viability [J]. *Cement and Concrete Research*, 2017, 98: 44-49.
- [5] NAIN N, SURABHI R, YATHISH N V, et al. Enhancement in strength parameters of concrete by application of *Bacillus* bacteria [J]. *Construction and Building Materials*, 2019, 202: 904-908.
- [6] LORS C, DUCASSE-LAPEYRUSSE J, GAGNÉ R, et al. Microbiologically induced calcium carbonate precipitation to repair microcracks remaining after autogenous healing of mortars [J]. *Construction and Building Materials*, 2017, 141: 461-469.
- [7] 严涛, 朱建国, 姜甜, 等. 一株凝结芽孢杆菌的分离筛选及产孢条件优化[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(2): 238-249.
YAN Tao, ZHU Jianguo, JIANG Tian, et al. Isolation and optimization on spore-forming conditions of *Bacillus coagulans* [J]. *Microbiology China*, 2018, 45(2): 238-249. (in Chinese)
- [8] 左肖肖, 陆利霞, 李壹, 等. 驱油枯草芽孢杆菌产芽孢条件优化[J]. *科学技术与工程*, 2017, 17(16): 28-34.
ZUO Xiaoxiao, LU Lixia, LI Yi, et al. The Formation and germination of the spores of *Bacillus subtilis* [J]. *Science Technology and Engineering*, 2017, 17(16): 28-34. (in Chinese)
- [9] 吴迎奔, 陈薇, 贺月林, 等. 侧孢芽孢杆菌 C5 发酵条件及培养基的优化[J]. *湖南农业科学*, 2016(9): 4-6.
WU Yingben, CHEN Wei, HE Yuelin, et al. Optimizing fermentation condition for *Bacillus laterosporus* C5 [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2016(9): 4-6. (in Chinese)
- [10] 冯鑫, 何承云, 徐茜茜, 等. 培养基成分对酸土脂环酸芽孢杆菌生长及芽孢形成的影响[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(19): 84-89.
FENG Xin, HE Chengyun, XU Qianqian, et al. Effect of medium component on growth and spore formation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(19): 84-89. (in Chinese)
- [11] 董佩佩, 汪祥燕, 刘元香, 等. 一株凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 发酵培养基的优化[J]. *中国酿造*, 2018, 37(4): 28-32.
- DONG Peipei, WANG Xiangyan, LIU Yuanxiang, et al. Optimization of fermentation medium of *Bacillus coagulans* [J]. *China Brewing*, 2018, 37(4): 28-32. (in Chinese)
- [12] SHARMA T K, ALAZHARI M, HEATH A, et al. Alkaliphilic *Bacillus* species show potential application in concrete crack repair by virtue of rapid spore production and germination then extracellular calcite formation [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 122(5): 1233-1244.
- [13] 王一晓, 张海红, 章中. 理化因素诱导芽孢萌发研究进展[J]. *农业科学研究*, 2016, 37(1): 58-64.
WANG Yixiao, ZHANG Haihong, ZHANG Zhong. Research progress on spore germination induced by physical and chemical factors [J]. *Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 37(1): 58-64. (in Chinese)
- [14] 程文凤, 彭慧, 刘冰, 等. 混凝土修复功能菌 *Bacillus cohnii* DSM6307 芽孢萌发条件探究[J]. *科技通报*, 2016, 32(5): 219-223.
CHENG Wenfeng, PENG Hui, LIU Bing, et al. Study on the condition of spore germination of concrete self-healing bacterium *Bacillus cohnii* DSM6307 [J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2016, 32(5): 219-223. (in Chinese)
- [15] GOUNINA-ALLOUANE R, BROUSSOLLE V, CARLIN F. Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and l-alanine on *Bacillus cereus* spore germination [J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(1): 202-206.
- [16] VERCAMMEN A, VIVIJS B, LURQUIN I, et al. Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 152(3): 162-167.
- [17] SETLOW B, SETLOW P. Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores [J]. *Biochemistry*, 1980, 77(5): 2474-2476.
- [18] SOUTHWORTH T W, GUFFANTI A A, MOIR A, et al. GerN, an endospore germination protein of *Bacillus cereus*, is a $\text{Na}^+/\text{H}^+-\text{K}^+$ antiporter [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(20): 5896-5903.

【中文责编: 坪梓; 英文责编: 艾琳】