

生物(细菌)对微量金属元素吸收固定作用的模拟实验及其机理探讨^①

王璞君^① 孙利炜^② 常平^① 王东坡^①

(^①长春地质学院, ^②长春市儿童医院)

摘要 需氧或兼性厌氧细菌对 Fe、Cu、Zn、Mo 四种金属元素的吸收固定作用实验结果表明,细菌对金属元素有明显的富集作用。其富集途径主要是通过生物化学沉淀,其次为菌体吸收。在含有金属元素和细菌的溶液中,影响金属元素沉积富集的因素依次为:生物化学沉淀>>菌体吸收>元素种类影响>细菌种类影响。

关键词 生物作用 元素富集机理 模拟实验

1 实验方法

细菌在生长繁殖过程中,必须从外界环境中取得各种营养物质,如水分、含碳和/或氮的化合物,某种气体和生长因子及无机盐类等。其中微量元素对大多数细菌的生长繁殖都起着重要作用;本文选用福氏志贺氏菌和沙门氏菌作为实验菌种。

1.1 菌种

福氏志贺氏菌:为革兰氏阳性杆菌,长约 2~3 μm ,宽 0.5~0.7 μm ;无芽胞、无荚膜、无鞭毛;是需氧或兼性厌氧细菌;最适宜的生长温度为 25~40 $^{\circ}\text{C}$,最适宜的 pH 值为 6.4~7.8;在液体培养基中呈均匀混状生长,不形成菌膜,亦不产生沉淀。

沙门氏菌:为革兰氏阴性杆菌;长约 1~3 μm ,宽 0.4~0.9 μm ;无芽胞、无荚膜,周身鞭毛,能运动,无菌毛。为需氧或兼性厌氧细菌;最适宜的生长温度为 25~40 $^{\circ}\text{C}$,最适宜的 pH 值为 6.5~8;在液体培养基中呈均匀混状生长。

1.2 试剂

细菌培养用胰蛋白胨(bacto-tryptone);细菌培养用酵母提取物(bacto-yeast extract);优级纯氯化钠;超纯去离子水;细菌培养用琼脂(bacto-agar)。

1.3 仪器和器皿

90 mm 培养皿;15 ml 离心管;20 ml 培养管;20~60 $^{\circ}\text{C}$ 精密自动控温电热恒温培养箱;多功能台式恒温振荡器;净化台。所有器皿均用超纯去离子-蒸馏水冲洗干净后,用高压灭菌器于 15 lbf/in²(磅力/英寸²,1.034 $\times 10^5$ Pa)条件下高压灭菌 20~30 min。微量元素分析

^① 本文为国家自然科学基金资助项目(49172107号)的子课题

第一作者简介 王璞君 男 36岁 副教授 博士 化学与沉积学专业 已发表“油页岩中生物及有机质对金属元素富集机理研究”等论文

收稿日期 1994-12-26

用 JARRELL—ASH800 系列 Mark— I 型电感耦合氩等离子体发射光谱仪, 计算机操纵, 高盐雾化器, 蠕动泵送样。

1.4 操作方法

(1) 培养基的制备^[1]

① LB 液体培养基: 配制 500 ml 培养基。在盛有 450 ml 超纯去离子—蒸馏水的烧杯中加入细菌培养用胰化蛋白胨 5 g, 细菌培养用酵母提取物 2.5 g, 氯化钠 5 g; 轻轻摇动烧杯至溶质完全溶解; 加入去离子水至 500 ml, 用 5 molL⁻¹ 的 NaOH 调节 pH 值至 7.0; 取 100 ml, 测溶液中 Fe、Zn、Cu、Mo 的含量; 然后再取 180 ml LB 培养基加入 20 ml 含 Fe、Cu、Mo、Zn 离子的标准溶液。将 200 ml 的培养基溶液一起放在高压灭菌器内, 于 15 lbf/in² 高压下蒸气灭菌 20~30 min。

② LB 固体培养基: 首先按以上配方配制 LB 液体培养基, 然后加入细菌培养用琼脂 15 gL⁻¹, 水浴中加热至溶质完全溶解, 用高压灭菌器于 15 lbf/in² 条件下蒸气灭菌 20~30 min。从高压灭菌器中取出培养基, 待其温度降至 50℃ 时铺平板。90 mm 直径的培养皿约 30~50 ml 培养基。

③ M9 培养基: 制备 1000 ml 培养基。在 650 ml 无菌高纯去离子水(冷却至 50℃ 或 50℃ 以下) 中加入 5×M9 盐溶液 200 ml、小牛血清 100 ml, 然后用无菌去离子水稀释至 1000 ml。

5×M9 盐溶液的制备: 在去离子水中加入下列盐类, 终体积为 1000 ml:

Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	64g;	KH ₂ PO ₄	15g
NaCl	2.5g;	NH ₄ Cl	5.0g

将上述盐溶液分成 200 ml 一份, 在 15 lbf/in² 高压下蒸气灭菌 15 min。

(2) 细菌的复苏

将 -70℃ 冻存的菌种室温下融化, 然后在超净台内用接种环沾取少许菌种, 以分段划线法将菌种涂布于事先制备好的 LB 固体培养基的培养皿上, 37℃ 恒温箱中培养过夜。

(3) 细菌的扩增

在超净台内, 从培养过夜的福氏志贺氏细菌和沙门氏细菌的培养皿上, 挑取生长良好的单菌分别落于装有 10 ml LB 培养基和含有 Fe、Zn、Cu、Mo 等微量元素的 LB 培养基混合液的试管中。每种菌、每种培养基为 6 管。试管加盖, 放入已 37℃ 恒温的摇床中, 以 100 转/min 摇动装有菌种的培养基试管。

(4) 收集菌体

分别于摇菌后 6 h、10 h 和 16 h 取扩增繁殖的菌液; 于 2000~4000 转/min 离心 5 min, 分离收集菌体。然后定量分离沉淀、菌体和上清液, HNO₃ 酸化后定容, 待测。

2 实验结果

按上述方法对福氏志贺氏细菌和沙门氏细菌对 Fe、Cu、Zn、Mo 等金属离子的吸收固定作用进行了试验。实验中选用两种菌体(福氏志贺氏细菌和沙门氏细菌)、两种培养基(LB 液体培养基和 M9 液体培养基)、四种细菌培养时间(0 h、6 h、10 h 和 16 h)、两种金属元素浓度(2~5 μg/ml 和 5~10 μg/ml)。

实验结果列于图 1 和表 1 中。

表 1 金属元素在菌体中的最大含量(以占总量的百分比表示)

元素	福氏志贺氏细菌	沙门氏细菌	原始金属浓度($\mu\text{g/ml}$)	培养基类型
Fe	1.8~14.3	1.8~4.5	2~5	LB
Cu	1.1~4.0	1.4~3	2~5	LB
Zn	31~76	10~20	5~7	LB
Mo	0.2~3.2	0.6~1.3	2~6	LB
Fe	2~4.2	4~5.1	2~6	M9
Cu	3~3.4	2.3~3.1	2~6	M9
Zn	11~13	19~61	5~12	M9
Mo	1.3~2.2	0.5~1.2	2~6	M9

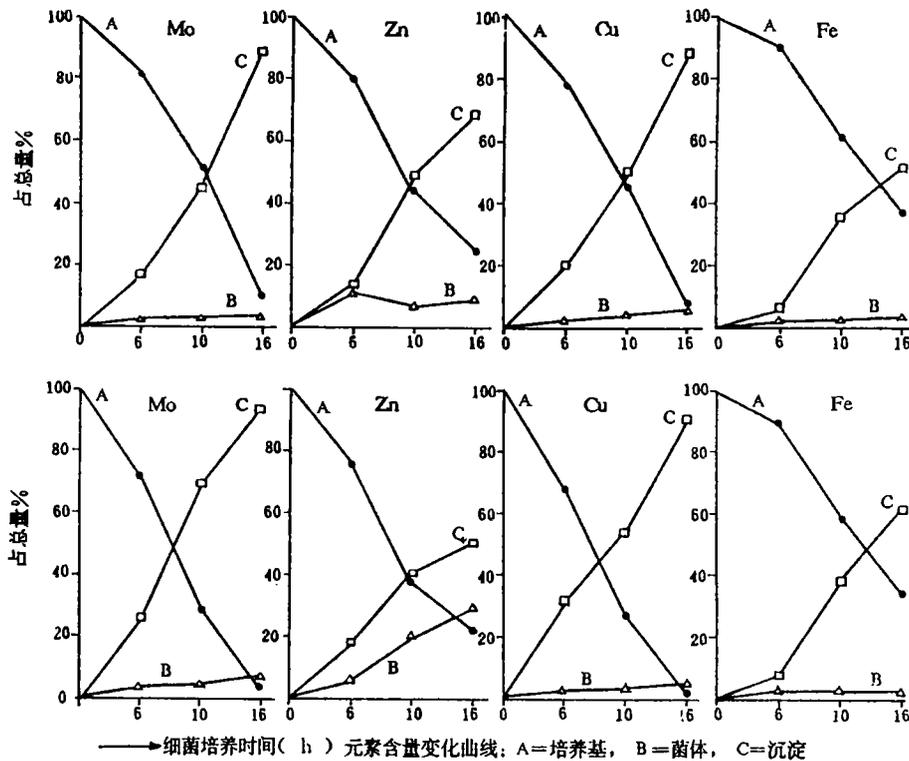


图 1 细菌对 Fe、Cu、Zn、Mo 等金属的吸收固定作用实验结果

(上图为福氏志贺氏细菌; 下图为沙门氏细菌)

从中可得出主要规律如下:

- ①液体培养基内金属元素的含量随时间明显降低;
- ②菌体内微量金属元素含量随时间有一定程度增加;
- ③沉淀内微量金属元素的含量随时间明显增加;
- ④细菌生命活动引起微量金属元素发生化学-生物化学沉积的量, 大于菌体自身吸收

的微量金属元素的量。

3 细菌吸收固定微量金属元素的机理探讨

生物对金属元素的富集机理是生物成矿模拟实验的主要研究目的之一。藻类可吸收富集 Zn^{2+} 形成矿源层,同时也为硫酸盐还原细菌提供能源并产生 H_2S ,导致 ZnS 沉淀^[2]。有机质分解形成的腐殖酸,对铅锌等金属元素具有很强的络合能力以及吸附能力和阳离子交换能力^[3],从而导致金属元素富集。铁磁性矿物,如磁铁矿(Fe_3O_4)、磁黄铁矿($Fe_{1-0.1}S$)和复硫铁矿(Fe_3S_4)等,可在细菌的细胞内沉积富集,并沿地磁场方向呈定向排列^{[4][5]}。

从本项实验结果可得出以下有关细菌对金属元素吸收固定作用机理的基本结论:

(1)细菌使金属元素发生富集的方式主要有两种:细菌体本身的吸收和细菌的生命活动改变了介质的物化条件致使金属元素沉积富集。

(2)在本项实验中,金属元素的主要富集方式是生物化学沉淀,即,细菌的生命活动导致金属元素沉积富集,而菌体本身的吸收居次要地位。

(3)不同种类的金属元素沉积固定方式有所不同。 Zn 较 Fe 、 Cu 、 Mo 等元素更趋于在菌体中富集(表 1)。

(4)细菌种类对金属元素在菌体—沉淀—溶液中的分配关系有一定影响。

(5)在各影响因素中,对金属元素沉积富集作用影响由大到小的顺序依次为:生物化学沉淀 \gg 菌体吸收 \geq 元素种类影响 \geq 细菌种类影响。

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南·第二版·金冬雁等译·北京:科学出版社, 1992. 908~919
- 2 刘志礼,黄玉路. 蓝藻对锌的富集及在锌矿形成中的作用的初步研究. 见:叶连俊主编. 生物成矿作用研究. 北京:海洋出版社,1993. 183~186
- 3 卢家烂,傅家谟,刘金钊,邓长平. 有机质在层控铅锌矿床形成中的作用——I,腐殖酸与铅锌的相互作用. 见:叶连俊主编. 生物成矿作用研究. 北京:海洋出版社,1993. 187~197
- 4 Farina M, Esquivel D M S, de Barros H G P L. Magnetic iron-sulphur crystals form a magnetotactic microorganism. *Nature*, 1990, 343: 256~258
- 5 Mann S, Sparks H S, Frankel R B, et al. Biomineralization of ferrimagnetic greigite(Fe_3S_4) and iron pyrite(FeS_2) in a magnetotactic bacterium. *Nature*, 1990, 343: 258~261