doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.004

## 不同底物培养的细胞吸附固体基质和有机溶剂的差异\*

沈 振<sup>1,2</sup> 孙文娟<sup>1,2</sup> 夏乐先<sup>1,2△</sup>

(1 生物冶金教育部重点实验室 湖南 长沙 410083;2 中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

摘要 目的:对细菌吸附有机溶剂法进行一定的修改,探索水相溶液 pH 和电解质浓度对测定细胞疏水性的影响,以及不同底物培养的细胞疏水性的差异性。探索细胞和固体间的静电作用和疏水作用对细菌早期吸附的影响。方法:以9K 液体培养基为水相溶液,测定不同 pH 值和电解质浓度下细胞转移到有机相的吸附率。测定不同底物培养的细胞的 Zeta 电位以及在石英砂和黄铜矿 表面的吸附率。结果:水相溶液 pH 值的变化并没有引起细胞转移到有机溶液的吸附率的显著变化,而在实验所用的电解质浓度 梯度范围内,随着浓度的增加,细胞转移到有机溶剂的吸附率也随之增加,但是以单质硫为底物培养的细胞的吸附率始终大于以 Fe<sup>2+</sup>和黄铜矿为底物培养的细胞带负电。在溶液 pH 2.0 的条件下,石英砂和黄铜矿带负电,单质硫培养的细胞带正电,而以 Fe<sup>2+</sup>和黄铜矿为底物培养的细胞带负电。结论:细胞表面疏水性不会受到溶液 pH 值变化的扰动,但是却会随着电解液浓度的增加而增加, 以单质硫为底物培养的细胞的疏水性大于以 Fe<sup>2+</sup>和黄铜矿为底物培养的细胞的疏水性大于以 Fe<sup>2+</sup>和黄铜矿为底物培养的细胞、不同的细胞表面均含有大量的作为电子供体和电 子受体的官能团。不同底物培养的细胞在石英砂和黄铜矿表面的早期吸附受到静电作用和疏水作用力的共同影响。

关键词:疏水性;吸附率;电解质;有机溶剂

中图分类号:Q932 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)07-1216-05

# The Difference in the Adhesion of Cells Grown with Different Substrate to Solid Substrates and Organic Solution\*

SHEN Zhen<sup>1,2</sup>, SUN Wen-juan<sup>1,2</sup>, XIA Le-xian<sup>1,2</sup>

(1 Key Laboratory of Biohydrometallurgy of Ministry of Education, Changsha, Hunan, 410083, China;

2 School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan, 410083, China)

**ABSTRACT Objective:** The method of microbial adhesion to solvents was accomplished by a small modification to describe the effect of solution pH value and electrolyte concentration on cellular hydrophobicity. The difference in cellular hydrophobicity of three strains grown with different substrate was investigated. The effect of electrostatic interaction and hydrophobicity on bacterial adhesion was investigated. **Method:** According to classical principle of microbial adhesion to solvents, the adhered rate of cells to solvents was calculated by direct counting. The change in adhered rate to organic solvents was investigated as a function with solution pH value and electrolyte concentration on the basis of 9K liquid medium as aqueous phase. **Results:** There is no significant difference in adhered rate of cells to organic solvents as a function with solution pH value. But the adhered rate increased as the electrolyte concentration increased in certain range. And the adhered rate to organic solvents of cells grown with elemental sulfur is bigger than that of cells grown with Fe<sup>2+</sup> and chalcopyrite. In pH 2.0 solution, the surface charge of quartz and chalcopyrite and cells grown with Fe<sup>2+</sup> and chalcopyrite was negative, and the charge of cells grown with elemental sulfur was positive. **Conclusion:** The cellular hydrophobicity was not prominently impacted by the change of solution pH value, but increased as the electrolyte concentration increased. Elemental sulfur-grown cells exhibited a higher hydrophobicity than Fe<sup>2+</sup>-grown and chalcopyrite-grown cells. A great of functional groups of electron donor and electron acceptor existed on the cellular surface of any cells. The adhered behavior of cells grown with different substrate to quartz and chalcopyrite was determined by electrostatic interaction and hydrophobicity between cells and solid adsorption substrates.

Key words: Hydrophobicity; Adhered rate; Electrolyte; Organic solvent

Chinese Library Classification(CLC): Q932 Document code: A Article ID: 1673-6273(2014)07-1216-05

## 前言

微生物吸附到固体表面是医学上引起假肢移植后感染的

主要原因<sup>11</sup>,是造成食物腐败的关键因素<sup>21</sup>,也是生物冶金过程 中直接作用机制的理论基础,是生物膜形成的前提条件<sup>134</sup>。吸 附过程受到微生物细胞和固体表面性质的影响,细胞-固体间

△ 通讯作者:夏乐先(1973-),男,博士,副教授,主要研究方向:生物冶金、选矿、微生物分子生态学研究, 电话:0731-88836943, E-mail:xialex888@163.com

<sup>\*</sup>基金项目:中国博士后特别资助(2012T50710)

<sup>(</sup>收稿日期:2013-07-19 接受日期:2013-08-12)

相互作用包括范德华力、静电作用、疏水作用力和路易斯酸碱 作用等<sup>[56]</sup>。因此,深入探究细胞和固体表面的性质对于控制和 强化细菌的吸附过程有着至关重要的作用。而当前针对细胞表 面性质的研究主要集中在带电性和亲疏水性,许多研究表明, 细菌细胞在固体表面的早期吸附行为主要是由细胞 - 固体间 的静电作用和疏水作用决定的。

判断静电作用大小的方法往往通过测量细胞和固体基质 的 Zeta 电位获取的,而亲疏水性大小的判定主要是通过测定 细胞的接触角和微生物吸附到有机溶剂(Microbial adhesion to solvents, MATS)的方法<sup>[7]</sup>。接触角需要十分精确的测量但往往 难以控制,而 MATS 因为操作简单且能够很好的描述细胞的 亲疏水性大小和酸碱基团被广泛应用。Rosenberg 等人<sup>[80]</sup>研究 石油降解菌时,发现不同菌株细胞吸附到聚苯乙烯的数量不 同,提出了一种简单快速的测定细胞表面疏水性的方法 -MATH(Microbial adhesion to hydrorbons)。Van Loosdrecht 等 人<sup>[10]</sup>比较了接触角和 MATH,由两者获得的细胞疏水性大小一 致。Bellon-Fontaine 等人<sup>[11]</sup>在 MATH 的理论基础上,提出了 MATS,该方法将有机溶剂划分为极性的酸性溶剂(电子受体) 和非极性碱性溶剂(电子供体),根据细胞与两者的亲和能力判 断细胞的带电基团差异。

MATS的结果容易受到水相电解质浓度和 pH 的影响<sup>[12]</sup>, Natarajan 和 Das<sup>[13]</sup>以磷酸钾溶液为水相,发现在一定浓度范围 下,随着电解质浓度的增加,由水相转移到十六烷有机相中的 吸附率也增加。MATS常常选用硝酸钾和磷酸钾作为水相电解 质<sup>[14]</sup>,但是生物冶金领域常用的培养基是 9K 液体培养基目前 还欠缺关于浸矿细菌在 9K 培养基中的疏水性的报道。本文以 三种浸矿细菌为目的菌株,用修改后的 MATS 方法测定不同 生长底物培养的三株菌细胞的疏水性和电子基团的差异性。测 定细胞、石英砂和黄铜矿的 Zeta 电位来判断细胞 - 固体间的静 电作用大小,由此探究静电作用和疏水作用与细胞早期吸附固 体表面的关系。由此补充和扩展了对浸矿微生物吸附行为特别 是早期吸附的认识,为研究后期吸附中生物膜的形成过程提供 更多可靠的早期吸附的数据

## 1 材料与方法

## 1.1 矿样

石英砂和黄铜矿精矿用玛瑙研钵研磨至小于 0.074 mm。 黄铜矿经 XRD 物相分析得主要成分质量分数是 ZnS 29.7%, CuFeS<sub>2</sub>61.7%, PbS 3.9%, PbSO<sub>4</sub>4.63% 和 PbCuAsS<sub>3</sub>1.1%。石英 砂为分析纯。

### 1.2 菌株与培养条件

本研究所用菌株是来自中南大学生物冶金教育部重点实 验室的嗜酸氧化亚铁硫杆菌 A. ferrooxidans<sup>T</sup>,嗜酸氧化硫硫杆 菌 A. thiooxidans<sup>A</sup> 和氧化亚铁钩端螺旋菌 L. ferriphilum<sup>Y</sup>。9K 培养基<sup>[15]</sup>为基础培养基,其组成为:3g·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.1g·L<sup>-1</sup> KCl,0.5g·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.5g·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,0.01g·L<sup>-1</sup> Cl (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,此时 9K 的浓度设置为 1× x M。分别以 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (44.7g·L<sup>-1</sup>),单质硫(10g·L<sup>-1</sup>)和黄铜矿(10g·L<sup>-1</sup>)为生长底物 培养 A. ferrooxidans ATCC23270,以单质硫(10g·L<sup>-1</sup>)为生长底 物 A. thiooxidans<sup>A</sup>,培养温度为 30°C,初始 pH 2.0。以 FeSO<sub>4</sub>· 7H<sub>2</sub>O(44.7 g·L<sup>-1</sup>)为生长底物培养 L. ferriphilum<sup>v</sup>,培养温度为 40 ℃,初始 pH 1.6。当细菌生长处于对数期时,将培养液用滤纸 过滤,除去黄钾铁矾、硫粉和矿渣,过滤液 10000 rpm 高速离心 15 min,收集菌泥用灭过菌的 9K 培养基清洗三次,置于 4℃ 保 藏,待用。

#### 1.3 细菌吸附石英砂和黄铜矿

取 250 mL 锥形瓶,加入 100 mL pH2.0 的 9K 培养基,121 <sup>°</sup> 灭菌 20 min,冷却待用。将不同底物培养的三种细菌接种到 以上培养基中,细胞的初始浓度约为 1× 10<sup>8</sup> cells·L<sup>-1</sup>。为了确保 初始菌浓的准确性,待接种后混匀培养液,然后取溶液 1 mL, 计算确定细胞浓度 C<sub>0</sub>。取石英砂和黄铜矿各 1 g,作为吸附底 物,分别加入到已接种细胞的培养液中,迅速置于 30 °C 的恒温 培养相中,170 rpm 培养。待细菌细胞与吸附剂接触 120 min 后,取培养液 1 mL,低速短暂离心,取上清液,用血球计数板计 算得溶液中的细胞浓度 Ct。吸附的细胞浓度是 C<sub>x</sub>=C<sub>0</sub>·C<sub>1</sub>,吸附 率计算公式是:C<sub>x</sub>= $\frac{C_x}{C_0}$ × 100%= $\frac{C_0Ct}{C_0}$ × 100%。不同条件下的 实验均做三组平行。

#### 1.4 Zeta 电位测定

不同生长底物培养的细胞以及石英砂和黄铜矿的 Zeta 电 位是借助 Nano-2s MPT-2 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定 的。先后测定 2.0,3.0,4.0,5.0,7.0 和 8.0 七个梯度下的 Zeta 电 位,细菌浓度为 2× 10<sup>8</sup> cells·mL<sup>-1</sup>,用稀硫酸和 NaOH 溶液调节 溶液 pH。

### 1.5 MATS 测定

本课题以正十六烷,氯仿和乙酸乙酯作为有机溶剂用于 MATS 测定,通过预实验我们发现震荡后水相在 400 nm 处的 吸光值没有减小,反而增大了。水相和有机相不能完全分离,大 量的有机小液珠游离在水相中,导致吸光值不降反增。因此我 们放弃分光光度法,而选择接对水相中的细菌浓度进行直接计 数,步骤<sup>19</sup>如下:(1)用灭菌的9K培养基将收集的不同能源培 养细菌稀释约至 2× 10<sup>®</sup>cells·mL<sup>-1</sup>,血球计数板直接计数作为初 始浓度 C<sub>0</sub>;(2)取 1.2 mL 稀释好的菌悬液加入到 1.5 mL 的 EP 管中,然后加入一种有机溶剂 0.2 mL,置于 30 ℃ 培养箱中处理 10 min;(3) 将混合体系在漩涡震荡器下震荡 120 s, 静置 20 min;(4)待水相与有机相分离,取水相,在光学显微镜下用血球 计数板直接计数作为吸附后水相中的细菌浓度 Ct,那么在有机 溶液中的吸附率 Cx%=(Co-Ct)× 100%。不同条件下的吸附均 进行三组平行试验。MATS 在不同 pH 和不同浓度的 9K 培养 基为水相的条件下进行,用稀硫酸和 NaOH 溶液调节 pH 梯度 为1.0,2.0,3.0,4.0 和 5.0,此时 9K 培养基的浓度是 1× x M。 9K 培养基的浓度梯度为 0.5× x,1× x,5× x 和 10× x M, 此时 9K 培养基的 pH 是 2.0。

## 2 结果

#### 2.1 细菌吸附石英砂和黄铜矿

由表1可知,不同底物培养的细胞在黄铜矿表面的吸附率 大于在石英砂表面的吸附率,以黄铜矿为底物培养的 A. ferrooxidans<sup>T</sup>在黄铜矿表面的吸附率明显大于以 Fe<sup>2+</sup>和单质硫为底 物培养的 A. ferrooxidans<sup>T</sup>。

## 表 1 不同生长底物培养的细胞在石英砂和黄铜矿表面的吸附率

Table 1	Adhered rate of cells	grown with different substrate to	quartz and chalcopyrite
		A.c	

Strains	Adhered rate to quartz and chalcopyrite, %			
Suams	Quartz	Chalcopyrite		
$Fe^{2+}-A.$ ferrooxidans <sup>T</sup>	24.60± 4.90	51.72± 7.26		
$S^0$ -A. ferrooxidans <sup>T</sup>	32.37± 1.67	56.40± 5.62		
Chalcopyrite-A. ferrooxidans <sup>™</sup>	31.76± 6.73	75.07± 3.68		
$S^0$ -A. thiooxidans <sup>A</sup>	34.56± 8.48	60.23± 15.82		
$\mathrm{Fe}^{2+}$ -L. ferriphilum <sup>Y</sup>	18.37± 3.25	67.65± 4.45		





Fig.1 Changes in Zeta potential of cells grown with different substrate as a function with pH





表 2 不同生长底物培养的细胞在不同溶液 pH 条件下由水相转移到正十六烷的吸附率 Table 2 Adhered rate of cells grown with different substrate to hexadecane at various solution pH.

Ctoring.	Adhered to hexadecane, %				
Strains	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
$Fe^{2+}-A$ . ferrooxidans <sup>T</sup>	6.32± 1.55	5.15± 1.65	5.43± 2.01	4.77± 1.26	3.31± 0.58
$S^0$ -A. ferrooxidans <sup>T</sup>	8.37± 1.98	10.6± 1.85	13.5± 1.69	11.4 <b>±</b> 2.53	10.9± 2.17
chalcopyrite-A. $ferrooxidans^{T}$	5.94± 2.06	5.15± 2.92	7.61± 2.84	6.83± 1.62	4.31± 1.16
$S^0$ -A. thiooxidans <sup>A</sup>	35.2± 8.43	33.9± 7.07	30.5± 4.61	31.3± 5.04	31.6± 4.65
Fe <sup>2+</sup> -L. ferriphilum <sup>Y</sup>	6.12± 2.27	7.07± 3.50	4.87± 0.59	6.58± 2.01	4.94± 1.82

表 3 不同生长底物培养的细胞在不同浓度电解质条件下由水相转移到正十六烷的吸附率

Table 3	Adhered rate of cells	grown with differer	t substrate to he	exadecane at various	electrolyte concentration
		8-0			

Ctarin -	Adhered to hexadecane, %				
Strains	0.5× x M	1× x M	2× x M	5× x M	10× x M
$Fe^{2+}-A$ . ferrooxidans <sup>T</sup>	4.97± 1.34	5.15± 1.65	7.22± 1.95	10.6± 2.87	15.4± 3.27
$S^0$ -A. ferrooxidans <sup>T</sup>	9.85± 2.03	10.6± 1.85	10.8± 2.37	15.2± 2.69	27.8± 5.58
chalcopyrite-A. ferrooxidans <sup><math>T</math></sup>	5.04± 1.73	5.15± 2.92	7.54± 2.28	11.7± 3.02	14.8± 2.96
$S^0$ -A. thiooxidans <sup>A</sup>	29.8± 4.55	33.9± 7.07	35.7± 6.91	50.4± 8.35	70.2± 10.8
Fe <sup>2+</sup> -L. ferriphilum <sup>Y</sup>	6.31± 2.74	7.07± 3.50	6.65± 2.81	11.2± 3.36	16.4± 4.17

### 2.2 Zeta 电位

图 1 显示在 pH 2.0-8.0 的范围内,细胞的 Zeta 电位随着 pH 的升高而不断降低,以 Fe<sup>2+</sup>和黄铜矿为底物培养的细胞在 溶液 pH 2.0-8.0 的范围内没有等电点,均小于 0 mv。而已单质

硫为生长底物的 A. ferrooxidans<sup>T</sup> 和 A. thiooxidans<sup>A</sup> 的等电点 分别是 pH 2.3 和 2.6,在 pH 2.0 的溶液中带正电。由图 2 可知, 石英砂的 Zeta 电位在 pH 2.0-8.0 的范围内随着 pH 的升高而 降低,没有等电点,而黄铜矿的 Zeta 电位在 pH 2.0-4.0 的范围

Table 4 Adhered rate of cens grown with different substrate to enforcionin and ethyr acetate				
Straina	Adherec	l rate,%		
Suains	Chloroform	Ethyl acetate		
Fe <sup>2+</sup> - A. ferrooxidans <sup>T</sup>	44.72± 11.90	68.91± 2.41		
$S^0$ -A. ferrooxidans <sup>T</sup>	22.95± 2.33	29.90± 2.13		
Chalcopyrite-A. ferrooxidans <sup><math>T</math></sup>	9.18± 1.55	11.29± 5.71		
$S^0$ -A. thiooxidans <sup>A</sup>	36.76± 4.37	75.62± 2.34		
Fe <sup>2+</sup> - <i>L. ferriphilum</i> <sup>Y</sup>	59.15± 12.57	52.16± 14.70		

表 4 不同生长底物培养的细胞由水相转移到氯仿和乙酸乙酯的吸附率

Table 4 Adhered rate of cells grown with different substrate to chloroform and ethyl acetate

内均接近于 0 mv, 然后随着 pH 的升高不断降低。溶液的 pH 为 2.0 时,黄铜矿的 Zeta 电位约为 -2.5 mv,而石英砂的 Zeta 电位约为 -10 mv。

#### 2.3 电解质 pH 对 MATS 测定细胞疏水性的影响

正十六烷是疏水性的有机溶剂,细胞表面疏水性基团越 多,细胞疏水性越强,由水相进入正十六烷有机相的数量越多, 吸附率越大。由表2可知,细胞由水相转移到正十六烷有机相 的吸附率并没有因为水相溶液pH的变化而发生显著变化,其 大小在一定的范围内波动。表2显示,以单质硫为底物培养的 *A. thiooxidans*<sup>4</sup> 菌细胞由水相转移到正十六烷有机相中的吸附 率最高,其次是以单质硫为底物培养的*A. ferrooxidans<sup>T</sup>* 菌,以 Fe<sup>2+</sup>和黄铜矿为底物培养的细胞转移到正十六烷有机相中的 吸附率最低。

#### 2.4 电解质浓度对 MATS 测定细胞疏水性的影响

表3展示了以不同浓度的9K培养基为水相,细胞由水相转移到正十六烷有机相的吸附率。由表3可知,在实验所用的5个浓度梯度范围内,不同底物培养的五种细胞转移到正十六烷中的吸附率随着9K溶液电解质浓度的增加而增加。在任意电解质浓度下,单质硫培养的A. thiooxidans<sup>4</sup>菌和A. ferrooxidans<sup>r</sup>菌细胞由水相进入正十六烷有机相的吸附率都大于Fe<sup>2+</sup>和黄铜矿养的细胞,而且吸附率的增加量的也最大。

#### 2.5 细胞吸附氯仿和乙酸乙酯

从表 4 可知,不同生长底物培养的 A. ferrooxidans<sup>r</sup>, A. thiooxidans<sup>A</sup> 和 L. ferriphilum<sup>v</sup> 菌细胞由水相转移到有机相的 吸附率有明显的差异,以 Fe<sup>2+</sup> 为生长底物培养的细胞转移到氯 仿和乙酸乙酯的吸附率明显大于以单质硫和黄铜矿为底物培养的细胞。A. ferrooxidans<sup>T</sup> 和 A.thiooxidans<sup>A</sup> 菌细胞转移到乙 酸乙酯的吸附率大于转移到氯仿的。

## 3 讨论

细胞疏水性是由其表面的-CH,-CH2,CH3等官能团决定的,而这些官能团并不会因为溶液 pH 的变化而发生质子化或 去质子化,而是保持数量和结构的稳定性,从而保证细胞疏水 性的稳定性<sup>16</sup>。Djeribi等人<sup>12</sup>借助 MATS 发现 Acinetobacterbaumannii 菌细胞在不同 pH 的溶液中均是亲水性的。细胞由水 相转移到正十六烷有机相的吸附率大小表示细胞疏水性大小。 吸附率越大说明细胞表面的疏水性官能团越多,细胞疏水性越 大,与正十六烷有机相的亲和力就越强。同样是以单质硫为底 物培养的细胞,A. thiooxidans<sup>4</sup>菌的疏水性大于 A. ferrooxidans<sup>7</sup> 菌,它们都大于以Fe<sup>2+</sup>和黄铜矿为底物培养的细胞。这一结果 与以磷酸钾作为电解质溶液得到的结论相一致。细胞表面疏水 性与其生长底物的性质密切相关,以固体作为生长底物培养的 细胞的疏水性大于以可溶性离子作为生长底物培养的细胞,生 长底物的疏水性越强,细胞的疏水性就越强<sup>[13,17]</sup>。

不同生长底物培养的三种浸矿细菌细胞表面疏水性与9K 培养基的电解质浓度大小密切相关,电解液浓度越大,细胞疏 水性越强。因为蛋白质是既含有疏水性官能团也含有亲水性官 能团的生物大分子,电解液浓度增加会引起蛋白质上亲水性官 能团脱水,暴露出更多的疏水性官能团,从而是细胞疏水性增 强<sup>[18]</sup>。以单质硫为底物培养的细胞表面因亲水性官能团结合水 分子而掩盖的疏水性官能团的数量比以 Fe<sup>2+</sup>和黄铜矿为底物 培养的细胞多。

不同生长底物培养的三种浸矿细菌细胞与氯仿和乙酸乙 酯间的亲和力大小表现出很大差异。以 $Fe^{2+}$ 为生长底物培养的 细胞与氯仿和乙酸乙酯的亲和力最大,其次是以单质硫为底物 培养的细胞,以黄铜矿为底物培养的细胞最小。氯仿是酸性的 电子供体,乙酸乙酯是碱性的电子受体,这说明不同条件下的 菌株细胞表面的生物大分子均含有作为电子供体和电子受体 的官能团。A. ferrooxidans<sup>T</sup>菌细胞和 A.thiooxidans<sup>4</sup> 菌细胞转 移到乙酸乙酯中的吸附率大于转移到氯仿中的,说明这两种细 菌细胞表面作为电子供体的官能团的数量比作为电子受体的 官能团多。而 L. ferriphilum<sup>Y</sup>菌则相反,其细胞表面的电子受体 官能团多于电子供体官能团。这些官能团可能是 COO-, PO4<sup>3</sup>, HSO3 和 NH4<sup>+</sup>等,它们主要存在于蛋白质的氨基酸中,在生物 浸出硫化矿的过程中可以作为电子传递的枢纽,对细菌细胞识 别和结合吸附位点有至关重要的作用<sup>[4]</sup>。

Zeta 电位的结果说明在溶液 pH 2.0 的条件下,以 Fe<sup>2+</sup>和 黄铜矿为生长底物培养的细胞与两种固体吸附剂间是静电斥 力,而以单质硫为生长底物培养的细胞与两种固体吸附剂间是 静电引力,细胞与石英砂间的静电作用大小是与黄铜矿间的 4 倍。以 Fe<sup>2+</sup>和黄铜矿为生长底物培养的细胞疏水性较弱,此时 细胞与石英砂间较大的静电斥力导致细胞在石英砂表面的吸 附率相对较小。而单质硫为生长底物培养的细胞疏水性较强, 细胞与黄铜矿间的疏水作用力比与石英砂间的强,这种较强的 疏水作用在很大程度上掩盖了静电引力,从而使细胞在黄铜矿 表面的吸附率更高。有报道显示石英砂的接触角是 30-45□,硫 化矿的接触角是 65-85□,这说明黄铜矿表面的疏水性的基团 比石英砂的多<sup>[1920]</sup>。另外,因为黄铜矿可以作为细胞生长的底 物,而石英砂不是生长底物,细胞对黄铜矿表现出更强化学倾向性,细胞表面的化学基团与黄铜矿表面复杂的化学键间有更 多的吸附结合位点,这可能也是导致黄铜矿表面吸附率较大的 原因<sup>[21]</sup>。

采用修改后的 MATS 方法测定不同生长底物培养的三种 浸矿细菌的细胞疏水性是可行的,显微镜直接计数计算吸附率 可以较好的避免有机溶液小液滴悬浮在水相中对分光光度法 测量吸光值的影响。MATS 测定细胞疏水性的大小不会受到水 相溶液 pH 的影响,但是却随着电解质溶度的增加而增大。以 单质硫为底物培养的细胞疏水性大于以 Fe<sup>2+</sup>和黄铜矿为底物 培养的细胞,当细胞疏水性较强时,静电作用被掩盖,当疏水作 用较弱时,静电斥力其主要作用,从而引起不同条件下的细胞 在黄铜矿表面的吸附率大于在石英砂表面。以上研究成果表明 MATS 方法得到了优化,同时进一步认识了浸矿细菌在固体表 面的早期吸附行为的特点。在此基础上,开展浸矿细菌后期吸 附的研究,借助原子力显微镜,从胞外多聚物和化学键键合的 角度,探索早期吸附与后期吸附的关联性。对细胞 - 固体间各 种作用力进行精确定量化,构建更为合理的吸附模型有助于明 确细菌在矿物表面的吸附机理。

#### 参考文献(References)

游永剛, 唐辉, 徐永清. 不同骨移植材料骨诱导活性的研究现状[J].
现代生物医学进展, 2008, 8(7): 1338-1340

You Yong-gang, Tang Hui, Xu Yong-qing. The actuality of studies on the osteoinductive activities of different bone graft materials[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(7): 1338-1340

- [2] Nychas G-JE, Skandamis PN, Tassou CC, et al. Meat spoilage during distribution[J]. Meat Science, 2008, 78(1): 77-89
- [3] Florian B, Noël N, Thyssen C, et al. Some quantitative data on bacterial attachment to pyrite[J]. Minerals Engineering, 2011, 24(11): 1132-1138
- [4] Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, et al. Bioleaching review part A[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2003, 63(3): 239-248
- [5] Bayoudh S, Othmane A, Mora L, et al. Assessing bacterial adhesion using DLVO and XDLVO theories and the jet impingement technique
  [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009, 73(1): 1-9
- [6] Afzal Ghauri M, Okibe N, Barrie Johnson D. Attachment of acidophil ic bacteria to solid surfaces: The significance of species and strain variations[J]. Hydrometallurgy, 2007, 85(2): 72-80
- [7] Hamadi F, Latrache H. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor-electron acceptor (acid-base) properties of bacterial surface[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 65(1): 134-139
- [8] Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity

[J]. FEMS Microbiology Letters, 1980, 9(1): 29-33

- [9] Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty five years of doing MATH[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 262(2):129-134
- [10] Van Loosdrecht M, Lyklema J, Norde W, et al. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion [J]. Applied and environmental microbiology, 1987, 53(8): 1893-1897
- [11] Bellon-Fontaine MN, Rault J, Van Oss C. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1996, 7(1): 47-53
- [12] Djeribi R, Boucherit Z, Bouchloukh W, et al. A study of pH effects on the bacterial surface physicochemical properties of Acinetobacter baumannii [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 102(2): 540-545
- [13] Natarajan K, Das A. Surface chemical studies on 'Acidithiobacillus' group of bacteria wi th reference to mineral flocculation [J]. International Journal of Mineral Processing, 2003, 72(1): 189-198
- [14] Mauclaire L, Brombacher E, Bü nger J, et al. Factors controlling bacterial attachment and biofilm formation on medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 76(1): 104-111
- [15] He Huan, Zhang Cheng-gui, Xia Jin-lan, et al. Investigation of elemental sulfur speciation transformation mediated by Acidithiobacillus ferrooxidans[J]. Current microbiology, 2009, 58(4): 300-307
- [16] He Huan, Hong Fen-fen, Tao Xiu-xiang, et al. Biodesulfurization of coal with Acidithiobacillus caldus and analysis of the interfacial interaction between cells and pyrite [J]. Fuel Processing Technology, 2012, 101(9): 73-77
- [17] Sharma P, Das A, Hanumantha Rao K, at al. Surface characterization of Acidithiobacillus ferrooxidans cells grown under different conditions[J]. Hydrometallurgy, 2003, 71(1): 285-292
- [18] Schneider N, Lange G, Hindle S, et al. A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein-ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function[J]. Journal of computer-aided molecular design, 2013, 27(1): 1-15
- [19] Harnett EM, Alderman J, Wood T. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007, 55(1): 90-97
- [20] Ye X, Gredelj S, Skinner W, et al. Evidence for surface cleaning of sulphide minerals by attritioning in stirred mills[J]. Minerals Engineering, 2010, 23(11): 937-944
- [21] Delgado M, Toledo H, Jerez C. Molecular characterization of a chemotactic receptor from Leptospirillum ferrooxidans[J]. Process Metallurgy, 1999, 9: 69-78

· 1220 ·