

文章编号: 1004 - 0609(2005) 12 - 2009 - 07

氧化亚铁硫杆菌驯化菌株的铜离子运输特性^①

姚 静, 徐文静, 李红玉
(兰州大学 生命科学学院, 兰州 730000)

摘 要: 以氧化亚铁硫杆菌野生菌(wide T. f)和驯化菌(adapted T. f)为供试菌株, 通过比较野生菌与驯化菌对 Cu^{2+} 的吸收与运输特性, 研究了氧化亚铁硫杆菌驯化菌株的抗铜机理。结果表明: Cu^{2+} 对野生菌 Fe^{2+} 的氧化活性影响较大, 当 Cu^{2+} 浓度高于 10 g/L 时, 细菌 Fe^{2+} 氧化活性逐渐降低直至完全抑制; 而经驯化培养的 T. f 菌, 对重金属铜则具有较高的抗性, 其 Fe^{2+} 氧化活性也较高, Fe^{2+} 氧化速率加快; 在不同 Cu^{2+} 浓度下, 驯化菌细胞中的 Cu^{2+} 含量总低于野生菌的, 经驯化培养的氧化亚铁硫杆菌与野生菌相比, 具有更高的促进体内 Cu^{2+} 排出的能力, 该排出系统与 ATPase 的活性有关。

关键词: 氧化亚铁硫杆菌; 铜离子; 运输特性; 氧化活性

中图分类号: Q 939.99

文献标识码: A

Transportation characterization of copper ion in adapted *Thiobacillus ferrooxidans*

YAO Jing, XU Wen-jing, LI Hong-yu
(School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Copper-resistance mechanisms of the adapted *Thiobacillus ferrooxidans* were studied in this thesis by comparing the uptake and transport characterization with Cu^{2+} in the wide T. f and the adapted T. f. The results show that wide T. f is largely affected by Cu^{2+} when the content of Cu^{2+} is bigger than 10 g/L, the active oxidation of Fe^{2+} reduces gradually till completely restraining. The adapted T. f is quite resistant to the heavy metal copper, exhibiting in the active oxidation of Fe^{2+} and its speeding oxidation rate. Further, the accumulation of Cu^{2+} in the cell of the adapted T. f is always lower than the wide T. f. Compared with the wide T. f, the adapted T. f possesses higher power in exporting Cu^{2+} and the efflux system is related to the activity of ATPase.

Key words: *Thiobacillus ferrooxidans*; Cu^{2+} ion; transportation characterization; oxidation activity

铜是许多微生物生长代谢必需的微量元素, 是超氧化物歧化酶(SOD)、细胞色素 C 等物质的有效成分, 具有多种生物学功能。然而, 当环境中的 Cu^{2+} 含量超过一定浓度时, 就会对微生物产生毒害, 甚至杀死菌体^[1]。氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)是一种化能自养菌, 为目前生物浸提硫化矿中研究最多、最具经济价值的浸矿微生物^[2]。细菌浸出低品位铜矿石的大量研究及实践表明, Cu^{2+} 在溶液中的积累对细菌的生长具有较明显

的抑制作用^[3]。通过驯化, 氧化亚铁硫杆菌对多种重金属均具有良好的抗性作用^[4, 5], 在一定的浓度范围内, 可通过逐步增加金属离子的浓度诱导细菌产生金属抗性。Das 通过对氧化亚铁硫杆菌驯化菌在黄铜矿及闪锌矿生物浸提的研究表明, 驯化菌对两种矿物均具有很高的生物溶解能力^[6]。因此, 深入了解氧化亚铁硫杆菌对重金属铜的抗性及其作用机理对提高氧化亚铁硫杆菌对重金属铜的抗性和获

① 基金项目: 甘肃省科技攻关基金资助项目(2GS035-A52-008-01); 兰州市科技攻关资助项目(03-02-24)

收稿日期: 2004-10-10; 修订日期: 2005-10-08

作者简介: 姚 静(1973-), 女, 硕士研究生

通讯作者: 李红玉, 博士, 教授; 电话: 13519640428, 传真: 0931-8912561; E-mail: lihy@lzu.edu.cn

得高效的金属提取率就显得尤为重要。

原核微生物主要通过增加细胞内重金属的排放来控制胞内金属离子的浓度^[7]。近年来的研究表明,高浓度 Cu^{2+} 可影响氧化亚铁硫杆菌细胞表面化学结构、蛋白质合成及体内多磷酸盐代谢的变化,但其具体的作用机制不详^[4, 8, 9]。许多研究表明,大多数微生物对有毒阳离子、阴离子的抗性系统主要为质粒上的基因编码^[7]。但是,Chisholm 等^[10]和 Ahmod 等^[11]对氧化亚铁硫杆菌驯化菌质粒的研究结果表明,带有驯化菌株质粒的 *E. coli* 并未表现出对铜的抗性,说明氧化亚铁硫杆菌抗铜基因可能与质粒无关。随后,Novo 等^[8]的研究表明,在 Cu^{2+} 胁迫下,驯化菌 4 种胞质蛋白和 7 种膜蛋白的合成量均发生了明显变化,部分胞质蛋白、膜蛋白发生了磷酸化反应^[8]。这可能与 Chater 等提出膜蛋白可通过蛋白质磷酸化将外界信号传递至胞质蛋白的假说有关^[12-14]。另有研究表明,微生物可通过分解体内无机多聚磷酸盐 (polyP) 水解产生正磷酸盐 (Pi) 结合重金属,并分泌到胞外以降低胞内金属离子的浓度。2003 年,Alvarez 等^[9]对无机多聚磷酸盐 (polyP) 在氧化亚铁硫杆菌中含量的变化进行了研究。结果表明,该菌中含有由氧和硫组成的电子致密颗粒很有可能就是 polyP,并发现在磷酸盐 (Pi) 缺乏的细胞中,无机多聚磷酸盐外切酶 (PPX) 的含量明显增加,而细胞内 polyP 的含量呈持续下降趋势,推测这可能与 PPX 含量的增加有关。综上所述,高浓度铜离子可影响氧化亚铁硫杆菌细胞表面化学结构、蛋白质合成和多磷酸盐代谢的变化,然而上述研究仅仅是一些现象的观察,有关于该菌到底采取何种机制来抵抗高浓度铜离子的毒害作用,是否和其它原核微生物抗重金属离子的机制一样,以建立阳离子、阴离子外流系统为主,通过增加细胞内重金属的排放来控制胞内金属离子的浓度目前尚不清楚。本文作者通过观察 Cu^{2+} 对氧化亚铁硫杆菌氧化活性的影响及该菌对 Cu^{2+} 的吸收与运输作用,研究了氧化亚铁硫杆菌的抗铜机理。

1 实验

1.1 材料

氧化亚铁硫杆菌野生菌 (wide T. f) 采自西北某铜矿酸性矿坑水,经本实验室分离纯化获得。驯化菌 (adapted T. f) 经本实验室胁迫驯化所得,可拮抗浓度为 40 g/L 的 Cu^{2+} 。培养基为 9 K 液体^[15]。

矿样采自甘肃白银铜矿,依据矿样采集原则,在综合考虑了影响矿样取样方法、样品数量和样品制备过程等后,按预定方案,依据现场矿堆的实际形状采集废弃矿约 2 t,经粗磨、中磨后混合均匀,按照缩分取样原则,取部分代表性好的样本经细磨后进行物相及成分分析,矿样物相及成分分析如表 1 所列。可见矿样为硫化铜矿,其主要铜矿物为黄铜矿。

表 1 矿样物相及成分分析

Table 1 Analysis of mineral components and attribution (mass fraction, %)

Total Cu	Free CuO	Bonded CuO	Secondary CuS	Primary CuS
0.320	0.002	0.020	0.020 6	0.277

1.2 菌株的驯化

Adapted T. f 的驯化过程为:在装有一定体积 9 K 培养基的三角瓶中加入较低浓度的 Cu^{2+} (以 CuSO_4 形式加入),然后接入要驯化的氧化亚铁硫杆菌进行恒温培养。开始细菌不适应,要较长时间才能生长,待细菌适应并能正常生长后,将它再转移到含有更高 Cu^{2+} 浓度的培养基中继续培养,并依此类推,每转移一次,都提高 Cu^{2+} 浓度,但是两次转接之间的梯度不能过大,否则达不到好的效果。如此进行下去,就可获得对 Cu^{2+} 具有较强耐性的菌株。

1.3 Cu^{2+} 对氧化亚铁硫杆菌 Fe^{2+} 氧化活性的影响

取新配制的 9 K 培养基于 100 mL 锥形瓶中,其 Cu^{2+} 浓度分别为 0、10、20、30、40 g/L, pH 值为 1.8,按 10% 接种量分别接种实验用细菌 (野生菌和驯化菌),于 30 °C 振荡培养,采用硫酸高铈法测 Fe^{2+} 氧化率^[16]。

1.4 摇瓶实验

称取 2.5 g 粒径不大于 50 μm 的铜矿粉,于灭菌后的 100 mL 锥形瓶中,加入灭菌后的 9 K 无铁液体培养基 50 mL,用硫酸调 pH 至 2.0,待 pH 稳定后,接种体积分数为 10% 的 T. f 菌,无菌对照中加入 40 mg/L 的氨苄青霉素,以消除实验过程中可能导致的污染,彻底保证无菌。称取质量后,在 30 °C、振荡速度为 120 r/min 时摇瓶浸出 25 d。实验过程中采用 1:1 的硫酸调节 pH 值,用蒸馏水补充所蒸发的水分。定时取样用原子吸收仪测定分析溶液中的铜离子浓度。

1.5 氧化亚铁硫杆菌对 Cu^{2+} 的吸收^[17]

取对数后期野生菌和驯化菌菌液, 离心收集菌体, 清洗后分别悬浮于 Cu^{2+} 浓度为 10、20、30、40、50 g/L 的 9 K 液体中(要求细胞浓度为 3~ 4 g/L protein, 于 30 ℃ 恒温振荡培养。每隔 10 min, 取一次样, 2 h 完成反应。离心收集菌体, 并采用原子吸收法测细胞中的 Cu^{2+} 浓度^[18]。

1.6 氧化亚铁硫杆菌细胞膜囊对 Cu^{2+} 运输的影响^[19]

取对数后期野生菌和驯化菌菌液, 离心收集菌体, 清洗后悬浮于 CT 缓冲液(100 mmol/L Tris-Cl, 150 mmol/L KCl, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgSO_4 , pH = 6.5) 中, 破碎细胞, 离心 2 h (4×10^4 r/min, 10 ℃) 收集细胞膜囊。将膜沉淀悬浮于同样缓冲液中, 采用同样的方法清洗, 离心收集悬浮于 CT 缓冲液中(含 5 g/L Cu^{2+}), 并使最终蛋白浓度达到 3~ 4 g/L。将细胞悬液于 37 ℃ 恒温振荡培养 30 min 预处理后, 加入 0.5 mmol/L 的 ATP, 启动运输。每隔 10 min, 取一次样, 40 min 完成反应, 采用原子吸收法测处理液中 Cu^{2+} 浓度。

蛋白质标准曲线制作及测定按照 Bradford 的考马斯亮蓝 G250 法^[20]。

数据采用平均数 ± 标准差, 每组平行 3 个样品, 应用 origin 软件进行分析。

2 结果和分析

2.1 浸矿菌株的驯化培养

细菌依赖一定的环境而生存, 改变一种细菌已适应的环境, 会给细菌的生长带来不利影响, 过分改变环境因素, 就会造成细菌死亡。与其它生物细胞相比, 细菌对外界环境的变化具有较强的适应能力, 即可通过驯化培养方式使细菌逐步适应严酷的外界环境。

对细菌浸出低品位铜矿石的大量研究及实践表明, Cu^{2+} 在溶液中的积累对细菌的生长具有较明显的抑制作用。因此, 在生物浸提中, 提高氧化亚铁硫杆菌对重金属铜的抗性和获得高效金属提取率就显得尤为重要。本研究采用驯化培养的方法, 对氧化亚铁硫杆菌进行 Cu^{2+} 驯化。通过比较该菌在不同 Cu^{2+} 浓度下 Fe^{2+} 氧化能力的变化, 观察了氧化亚铁硫杆菌在驯化前后对 Cu^{2+} 的抗性。

表 2 所列为不同浓度 Cu^{2+} 时氧化亚铁硫杆菌对 Fe^{2+} 氧化能力的变化。由表 2 可以看出, 当

Cu^{2+} 浓度超过 10 g/L 时, 氧化亚铁硫杆菌(驯化前)对 Fe^{2+} 氧化能力逐渐受到抑制; 当 Cu^{2+} 浓度为 20 g/L 时, 该菌氧化培养基中全部 Fe^{2+} 氧化所需时间长达 264 h; 当 Cu^{2+} 浓度为 30~ 40 g/L 时, 培养基中的 Fe^{2+} 浓度几乎无任何变化。与驯化前相比, 驯化后氧化亚铁硫杆菌在高浓度 Cu^{2+} 时(Cu^{2+} 浓度为 30~ 40 g/L), 其氧化能力明显提高, 氧化培养基中全部 Fe^{2+} 的氧化所需时间分别为 40 和 48 h。表明该菌经驯化培养后, 对重金属铜的抗性有显著提高, 在 Cu^{2+} 浓度为 40 g/L 时, 可表现出较高的氧化活性。由此可以说明, 经本研究驯化培养的驯化菌(可拮抗 Cu^{2+} 浓度为 40 g/L)可作为浸矿菌进行浸矿实验。

表 2 不同 Cu^{2+} 浓度时
氧化亚铁硫杆菌 Fe^{2+} 氧化能力的变化

Table 2 Changes of ferrous iron
oxidation ability by T. f under
different Cu^{2+} contents

Cu^{2+} concentration/ (g · L ⁻¹)	Time of Fe^{2+} oxidated/ h	
	By wide T. f	By adapted T. f
0	28	28
10	43	30
20	264	36
30 ¹⁾		40
40 ¹⁾		48

1) — Fe^{2+} keep no change.

2.2 Cu^{2+} 对氧化亚铁硫杆菌氧化活性的影响

通过测定不同 Cu^{2+} 浓度时野生菌和驯化菌氧化培养基中全部 Fe^{2+} 氧化所需时间, 观察了 Cu^{2+} 对氧化亚铁硫杆菌氧化活性的影响, 并研究该菌对重金属铜的抗性, 结果如图 1 和 2 所示。由图 1 和 2 可看出, 野生菌在不含 Cu^{2+} 培养基中, 其完全氧

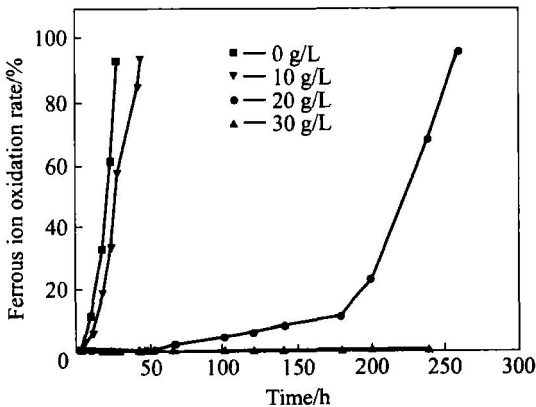


图 1 Cu^{2+} 浓度对野生菌 Fe^{2+} 氧化活性的影响
Fig. 1 Effect of Cu^{2+} concentration on
ferrous ion oxidation by wide T. f

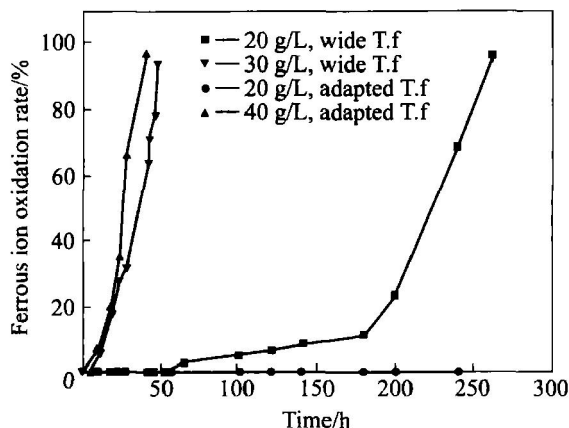


图 2 Cu^{2+} 浓度对野生菌和驯化菌 Fe^{2+} 氧化活性的影响

Fig. 2 Effect of Cu^{2+} concentration on ferrous ion oxidation by wide T.f and adapted T.f

化培养基中的 Fe^{2+} 所需时间(t_{ox})为 28 h, 在 Cu^{2+} 浓度为 10 g/L 的培养基中, t_{ox} 为 44 h。与不含铜的培养基相比, 在 Cu^{2+} 浓度为 20 g/L 的培养基中, 该菌的 Fe^{2+} 氧化活性明显降低, 停滞期延长, 细菌经过 180 h 后, 才进入快速氧化阶段, t_{ox} 增加到 264 h; 而在 Cu^{2+} 浓度为 30 和 40 g/L 的培养基中, 培养基中的 Fe^{2+} 浓度几乎没有任何变化。这一结果表明, Cu^{2+} 浓度对野生菌 Fe^{2+} 的氧化活性影响较大, 当 Cu^{2+} 浓度高于 10 g/L 时, 细菌 Fe^{2+} 氧化活性逐渐降低直至完全抑制。与野生菌相比, 驯化菌在 Cu^{2+} 浓度为 20 和 40 g/L 培养基中, 其 Fe^{2+} 氧化活性明显提高, 完全氧化培养基中的 Fe^{2+} 所需时间分别为 33 和 48 h。说明氧化亚铁硫杆菌经驯化培养后, 可诱导产生良好的抗铜特性。

野生菌和驯化菌的浸出时间对浸出率的影响如图 3 所示。由图 3 可看出, 在无菌酸体系中, 矿石的氧化率要比加菌时低得多, 浸出 25 d 后, 其浸出率只有 4.53%, 远远低于有菌体系对硫化铜矿的浸出; 驯化后的菌株对矿石的浸出率达到了 23.438% 比野生菌株对铜矿的浸出率的 17.888% 升高了许多。其生长特性也得到很大的提高, 主要表现为两个方面: 1) 延滞期大大缩短, 菌株很快就能适应环境; 2) Fe^{2+} 的氧化速率也有很大的提高。说明氧化亚铁硫杆菌经驯化培养后, 可诱导产生良好的抗铜特性, 浸矿菌株的驯化对细菌对硫化铜矿的浸出是至关重要的。

2.3 氧化亚铁硫杆菌对 Cu^{2+} 的吸收

为了研究氧化亚铁硫杆菌对重金属铜的抗性机制, 采用原子吸收法测定不同 Cu^{2+} 浓度下 Cu^{2+} 在氧化亚铁硫杆菌(野生菌和驯化菌)细胞中的累积量, 观察了氧化亚铁硫杆菌对 Cu^{2+} 的吸收, 结果如图 4 和 5 所示。

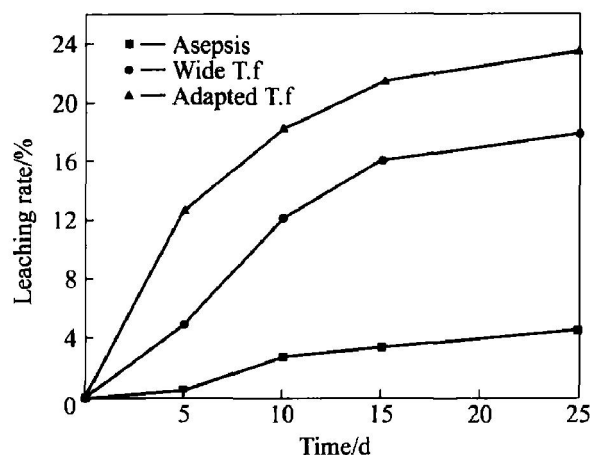


图 3 野生菌和驯化菌的浸出时间对浸出率的影响

Fig. 3 Effect of leaching time of wide T.f and adapted T.f on leaching rate

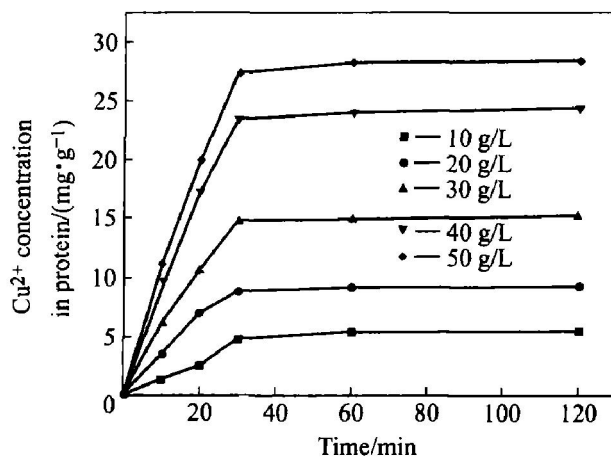
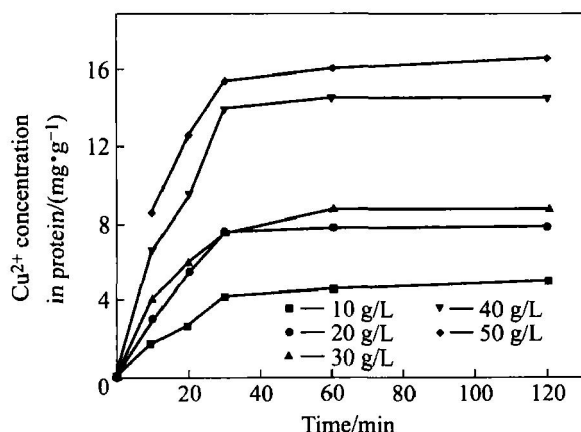
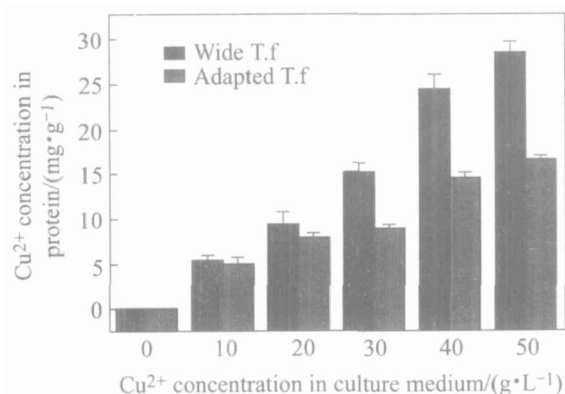


图 4 不同 Cu^{2+} 浓度时野生菌对 Cu^{2+} 的吸收

Fig. 4 Cu^{2+} uptake by wide T.f at different Cu^{2+} concentrations

从图 4 和 5 可知, 在最初的 30 min 内, 随着反应的进行, 无论是野生菌还是驯化菌, 其对 Cu^{2+} 的吸收都迅速增加; 30 min 后, 反应逐渐趋于平衡, 细胞中 Cu^{2+} 含量不再呈显著增加, 120 min 反应结束。

比较 Cu^{2+} 在野生菌和驯化菌细胞中的含量(见图 6)可以明显地看出, 当反应液中的 Cu^{2+} 含量低于 20 g/L 时, 驯化菌细胞中的 Cu^{2+} 含量呈缓慢上升趋势, 与野生菌相比, 驯化菌细胞中 Cu^{2+} 含量始

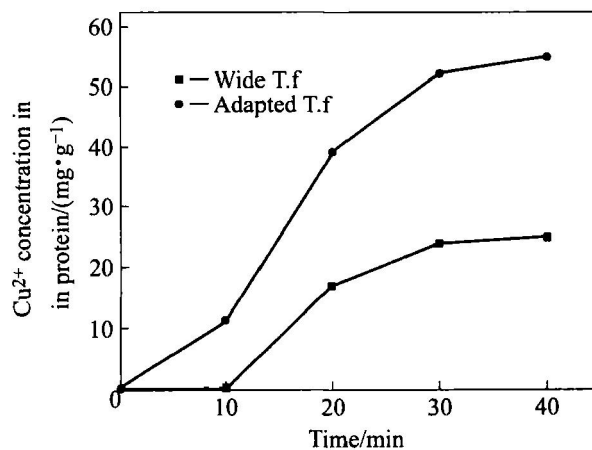
图 5 不同 Cu^{2+} 浓度时驯化菌对 Cu^{2+} 的吸收Fig. 5 Cu^{2+} uptake by adapted T. f at different Cu^{2+} concentrations图 6 不同 Cu^{2+} 浓度时野生菌和驯化菌对 Cu^{2+} 吸收的比较Fig. 6 Comparison of Cu^{2+} uptake by wide T. f and adapted T. f at different Cu^{2+} concentrations

终低于野生菌,但是差别不是很明显;当反应液中的 Cu^{2+} 达到 20 g/L 时,野生菌细胞中的 Cu^{2+} 含量大约驯化菌细胞中的 1.191 倍;但当反应液中的 Cu^{2+} 含量高于 20 g/L 时,野生菌对 Cu^{2+} 的吸收能力远远大于驯化菌;野生菌细胞中的 Cu^{2+} 含量明显的高于驯化菌,当反应液中的 Cu^{2+} 达到 50 g/L 时,野生菌细胞中的 Cu^{2+} 浓度达 27.45 mg/g 时,含量大约是驯化菌细胞中的 1.715 倍,表明此时驯化菌有可能或者通过减少对 Cu^{2+} 的摄入或者通过增加对 Cu^{2+} 的排放,来调节胞内重金属铜的浓度。

2.4 氧化亚铁硫杆菌细胞外翻膜囊对 Cu^{2+} 的运输

为进一步研究氧化亚铁硫杆菌对重金属铜的抗性机制,本研究仍采用原子吸收法,通过测定反应

液中 Cu^{2+} 浓度的变化来观察氧化亚铁硫杆菌细胞膜囊对 Cu^{2+} 的运输情况,以确定氧化亚铁硫杆菌对 Cu^{2+} 抗性机制。自然形成的细胞膜囊是研究物质运输的良好介质,只有外翻形成的膜囊(其上附有 ATPase)才会对反应液中加入的 ATP 产生反应^[19, 21~23]。因此,本研究所细胞膜囊对 Cu^{2+} 的运输,均为细胞外翻膜囊对 Cu^{2+} 的运输。图 7 所示为在 ATP 刺激下,细胞外翻膜囊对 Cu^{2+} 的运输。

图 7 细胞膜囊对 Cu^{2+} 的运输Fig. 7 Cu^{2+} transportation by native inside-out membrane vesicles of wide T. f and adapted T. f

实验结果表明,在相同初始条件下,加入 0.5 mmol/L ATP 启动反应 40 min 后,驯化菌外翻膜囊对 Cu^{2+} 的运输浓度为 54.91 mg/g,远远高于野生菌外翻膜囊对 Cu^{2+} 的运输(25.24 mg/g)。表明经驯化培养后的细菌与野生菌相比,具有更高的促进体内 Cu^{2+} 的排出能力,驯化菌大约是野生菌的 2.176 倍。为了说明驯化菌对 Cu^{2+} 的运输是一种依赖于 ATP 提供能量的主动运输过程,因而在相同条件下,在驯化菌外翻膜囊对 Cu^{2+} 的运输反应体系中分别加入 0.5 mmol/L ATP、1 mmol/L 钒酸钠(ATPase 抑制剂)及不加 ATP,观察驯化菌外翻膜囊的 Cu^{2+} 运输,结果如图 8 所示。

由此可以看出,ATP 的加入与否会极大影响驯化菌外翻膜囊对 Cu^{2+} 的运输。在反应过程中,不加 ATP 的反应对 Cu^{2+} 的运输一直处于较低水平,反应 40 min 后,其对 Cu^{2+} 的运输最低,只为 10.771 mg/g,表明驯化菌对 Cu^{2+} 的排出需要 ATP 提供能量。同样,在反应体系中加入 1 mmol/L 钒酸钠,也使驯化菌外翻膜囊对 Cu^{2+} 的运输受到影响,反应结束后,其对 Cu^{2+} 运输略高于不加 ATP

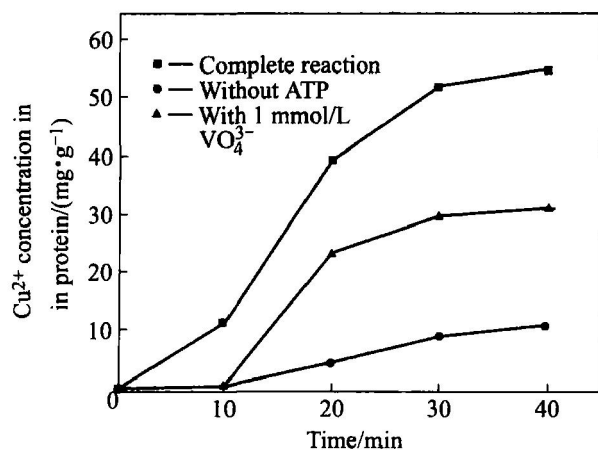


图 8 驯化菌细胞膜囊对 Cu^{2+} 的运输

Fig. 8 Cu^{2+} transportation by adapted *T. f* native inside-out membrane vesicles

的反应, 这可能是由于驯化菌对 Cu^{2+} 的排出系统除了依赖 ATPase 的主动运输外, 还存在另外的非特异性运输, 或者是由于膜囊吸附了一部分 Cu^{2+} 所致。

3 讨论

3.1 Cu^{2+} 对氧化亚铁硫杆菌 Fe^{2+} 氧化活性的影响

本研究观察了 Cu^{2+} 对氧化亚铁硫杆菌(野生菌及驯化菌) Fe^{2+} 氧化活性的影响, 结果显示, Cu^{2+} 对野生菌 Fe^{2+} 氧化活性影响较大, 随着培养基中 Cu^{2+} 浓度的增加, Cu^{2+} 对细胞造成的毒害也越来越严重。与野生菌相比, 在高 Cu^{2+} 培养基中(浓度为 40 g/L), 驯化菌则表现出较高的氧化活性, 其 Fe^{2+} 氧化速率最高可达 334 mg/(L·h)。表明氧化亚铁硫杆菌经驯化培养后, 可诱导产生良好的抗铜特性, 经本研究驯化培养后, 该驯化菌可拮抗的 Cu^{2+} 浓度为 40 g/L。这些结果和前人的研究结果基本一致^[5-6], 即通过驯化后, 氧化亚铁硫杆菌对多种重金属均可获得良好的抗性作用。

3.2 氧化亚铁硫杆菌对 Cu^{2+} 的吸收

本研究通过观察氧化亚铁硫杆菌对 Cu^{2+} 的吸收, 发现反应 30 min 后, 氧化亚铁硫杆菌对 Cu^{2+} 的吸收逐渐趋于平衡, 细胞中 Cu^{2+} 含量不再呈显著增加。比较 Cu^{2+} 在野生菌和驯化菌细胞中的含量可以明显看出, 与野生菌相比, Cu^{2+} 在驯化菌细胞中的含量呈缓慢上升趋势且总是低于野生菌细胞中 Cu^{2+} 含量, 这与 Agnes 等^[17] 在研究氧化亚铁硫

杆菌野生菌与驯化菌对 Cu^{2+} 的吸收实验所得结果基本一致。同时在本研究中, 可明显观察到当反应液中 Cu^{2+} 含量高于 20 g/L (该浓度下野生菌氧化活性明显降低), 野生菌细胞中的 Cu^{2+} 含量则明显的高于驯化菌, 并随着反应液中 Cu^{2+} 含量的增加, 增高的趋势也越来越明显, 表明此时驯化菌有可能通过减少对 Cu^{2+} 的摄入以及增加对 Cu^{2+} 的排放, 来调节胞内重金属铜的浓度。

3.3 氧化亚铁硫杆菌对 Cu^{2+} 的排出

为进一步确定氧化亚铁硫杆菌对 Cu^{2+} 抗性机制究竟是增加细胞内 Cu^{2+} 的排出还是大量减少 Cu^{2+} 的摄入, 实验中观察了外翻膜囊对 Cu^{2+} 的运输。结果表明, 在 ATP 的作用下, 反应 40 min 后, 驯化菌外翻膜囊对 Cu^{2+} 的运输为 54.91 mg/g, 驯化菌外翻膜囊对 Cu^{2+} 的运输远远高于野生菌。由此说明, 经驯化培养后的细菌与野生菌相比, 具有更高的促进体内 Cu^{2+} 排出的能力, 驯化菌大约为野生菌的 2.176 倍, 该排出能力需 ATP 提供能量, 是一种主动运输过程。对照驯化菌和野生菌对铜离子的吸收: 当反应液中 Cu^{2+} 达到 50 g/L 时, 野生菌细胞内的 Cu^{2+} 浓度 27.45 mg/g, 而驯化菌细胞内 Cu^{2+} 浓度 16.58 mg/g。可明显看出, 氧化亚铁硫杆菌为了维持细胞内的铜离子浓度, 采用的主要方式是增加细胞内 Cu^{2+} 的排出, 从而也就说明氧化亚铁硫杆菌对 Cu^{2+} 抗性机制主要是增加细胞内 Cu^{2+} 的排出而非大量减少 Cu^{2+} 的摄入。

4 结论

1) 在一定的浓度范围内, 逐步增加铜离子的浓度, 可诱导氧化亚铁硫杆菌对铜离子产生抗性, 驯化菌株与野生菌株相比, 表现出良好的抗铜能力。

2) 驯化菌对付高浓度铜离子胁迫的手段有两类: 1) 通过减少对铜离子的吸收来抵抗高浓度铜离子胁迫; 2) 通过增加细胞内 Cu^{2+} 的排出来抵抗高浓度铜离子胁迫。

3) 驯化菌通过增加细胞内 Cu^{2+} 的排出来抵抗高浓度铜离子胁迫的能力要远远高于其通过减少对铜离子的吸收来抵抗高浓度铜离子胁迫的能力。

4) 在高浓度 Cu^{2+} 诱导下, 驯化菌株通过建立依赖 ATPase 的阳离子外流系统来增加细胞内铜的排放从而控制胞内铜离子的浓度。

REFERENCES

- [1] 叶锦韶, 尹 华, 彭 辉. 微生物抗重金属毒性研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2002, 3(4): 1-4.
YE Jirshao, YIN Hua, PENG Hui. Advance on study of the resistance to heavy metal by microorganisms[J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2002, 3(4): 1-4.
- [2] 孙业志, 吴爱祥, 黎剑华. 微生物在铜矿溶浸开采中的应用[J]. 金属矿山, 2001(1): 3-6.
SUN Yezhi, WU Aixiang, LI Jianhua. The application of microbe in the solution mining of copper ore[J]. Metallic Mine, 2001(1): 3-6.
- [3] 李洪枚, 柯家骏. Cu^{2+} 对氧化亚铁硫杆菌(*T. f*) 生长活性的影响[J]. 黄金, 2000, 21(6): 27-29.
LI Hongmei, KE Jiajun. Effect of Cu^{2+} on the growth and activity of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Gold, 2000, 21(6): 27-29.
- [4] Das A, Modak J M, Natarajan K A. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73: 215-222.
- [5] Tuovinen O H, Niemela S I, Gyllenberg H G. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1971, 37(4): 489-496.
- [6] Das A, Modak J M, Natarajan K A. Studies on multi-metal ion tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. Minerals Engineering, 1997, 10: 743-749.
- [7] 林稚兰, 田哲贤. 微生物对重金属的抗性及其解毒机理[J]. 微生物学通报, 1998, 25(1): 36-39.
LIN Zhilan, TIAN Zhexian. The resistance and detoxification mechanism to heavy metal by microorganisms[J]. The Journal of Microbiology, 1998, 25(1): 36-39.
- [8] Novo M T, Da Sila A C, Moreto R, et al. *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2000, 77(2): 187-195.
- [9] Alvarez S A, Jerez C A. Inorganic polyphosphates in *Acidithiobacillus ferrooxidans*: Possible role in heavy metals tolerance[J]. Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology, 2003, 103: 100-101.
- [10] Chisholm L A, Leduc L G, Ferroni G D. Metal resistance and plasmid DNA in *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73: 245-254.
- [11] Ahmad Z, Ghauri M A, Anwar M A, et al. Transformation of plasmids of *Acidithiobacillus ferrooxidans* encoding ampicillin resistance to *Escherichia coli* strain DH5- α for detecting copper tolerance genes on such plasmids[J]. Resource and Environmental Biotechnology, 2002, 3: 185-191.
- [12] Kennelly P J, Potts M. Fancy meeting you here! A fresh look at "prokaryotic" protein phosphorylation [J]. J Bacteriol, 1996, 178: 4759-4764.
- [13] Swanson R V, Alex L A, Simon M I. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology[J]. Trends Biochem Sci, 1994, 19: 485-490.
- [14] Chatter K, Downie A, Drobak B, et al. Alarms and directions: the biochemistry of development [J]. Trends Genet, 1995, 11: 79-82.
- [15] 魏以和, 王 军. 矿物生物技术的微生物学基本方法[J]. 国外金属矿选矿, 1996(1): 14-27.
WEI Yirhe, WANG Jun. The basic methods of microbiology for mineral biotechnology[J]. Metallic Ore Dressing Abroad, 1996(1): 14-27.
- [16] 柴华丽, 马 林. 定量分析化学实验教程[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1993.
CHAI Huaili, MA Lin. The Course of Quantitative Chemical Analytical Experiments[M]. Shanghai: Fudan University Press, 1993.
- [17] Boyer A, Magnin J P, Ozil P. Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass[J]. Biotechnology, 1998, 120(2): 187-190.
- [18] Kazy S K, Pinaki S R, Asthana R K, et al. Copper uptake and its compartmentalization in *Pseudomonas aeruginosa* strains: Chemical nature of cellular metal [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1999, 15: 599-605.
- [19] Solioz M, Odermatt A. Copper and silver transport by cop B-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(16): 9217-9221.
- [20] Brandford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-255.
- [21] Lee S W, Glickmann E, Cooksey D A. Chromosomal locus for cadmium resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a MerR family response regulator[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 1437-1444.
- [22] Axelsen K B, Palmgren M G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily[J]. J Mol Evol, 1998, 46: 84-101.
- [23] Gaballa A, Helann J D. *Bacillus subtilis* CPx-type ATPases: characterization of Cd, Zn, Co and Cu efflux system[J]. Biometals, 2003, 16: 497-505.

(编辑 李艳红)