

## 磁分离仪分离磁性细菌的新方法

刘新星, 郭宁, 杨英杰, 梁万洁, 张剑

中南大学资源加工与生物工程学院, 长沙 410083

**摘要:** 磁性细菌胞内可以产生磁性颗粒, 因此具有趋磁性, 基于这种特性, 利用磁分离的原理, 本研究开发了一种磁性细菌分离仪, 提供了一种分离磁性细菌的新方法。以氧化亚铁硫杆菌为例, 使用磁性细菌分离仪进行分离, 可以得到强磁菌和弱磁菌。利用透射电镜观察, 强磁菌胞内磁性颗粒明显多于弱磁菌; 半固体平板磁泳实验也表明强磁菌趋磁性明显强于弱磁菌。各项实验结果表明磁性细菌分离仪可以有效地分离磁性细菌, 这是一种分离磁性细菌的新方法, 将促进磁性细菌分离培养的研究。

**关键词:** 磁性细菌, 细菌磁分离, 磁性细菌分离仪

## Separation of magnetic bacteria by using a magnetic separator

Xinxing Liu, Ning Guo, Yingjie Yang, Wanjie Liang, and Jian Zhang

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

**Abstract:** A magnetic separator was used to separate magnetic bacteria based on their magnetotactic characteristics. *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a bacterium that could synthesize intra-cellular nanometer magnetic particles, was investigated as an example. Strong magnetic and weak magnetic cells were separated and collected. On average, the number of the magnetic particles present in the strong magnetic cells is more than that of the weak magnetic cells. Moreover, semisolid-plate magnetophoresis showed that the magnetotaxis of strong magnetic cells was stronger than the weak magnetic cells. These results suggest that the magnetic separator can be used to isolate the magnetic bacteria, which will facilitate the research of magnetic bacteria.

**Keywords:** magnetic bacteria, magnetic separation of bacteria, magnetic separator

氧化亚铁硫杆菌是生物冶金<sup>[1]</sup>中的重要细菌之一, 能以亚铁、硫元素以及低价硫化物作为能源, 为好氧菌, 培养条件简单。本课题组在研究磁黄铁矿选育浸矿细菌的过程中发现氧化亚铁硫杆菌胞内能够生成磁性颗粒<sup>[2]</sup>, 因此在磁场作用下有微弱的趋磁性, 并且破碎细胞后提取到了能够响应磁场的

磁性颗粒。经反复研究发现, 氧化亚铁硫杆菌体内的磁性颗粒数量不多, 且没有成链排布, 因此其趋磁性比较弱。本研究把所有胞内含有天然生成的磁性颗粒, 可以在磁场作用下产生趋磁性泳动的一类细菌统称为磁性细菌。使用液体<sup>[2]</sup>和固体平板磁泳<sup>[3]</sup>的方法分离磁性细菌时, 时间长, 处理量小, 分离

**Received:** September 7, 2009; **Accepted:** November 16, 2009

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2004CB619201), National Natural Science Foundation of China (No. 50774102).

**Corresponding author:** Yingjie Yang. Tel: +86-731-6635099; E-mail: yjyangcsu@126.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2004CB619201), 国家自然科学基金 (No. 50774102) 资助。

效果受到限制。为此, 本研究开发了一种新的磁性细菌分离仪, 采用磁分离的方法分选磁性细菌。以氧化亚铁硫杆菌为样品进行磁分离后, 显微镜观察、透射电镜观察和半固体平板磁泳结果都说明这是一种有效的磁性细菌分离方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌种

氧化亚铁硫杆菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans*, 从云南东川某酸性矿坑水中分离得到, 现保存于中南大学生物冶金教育部重点实验室。

将菌种培养至对数期, 10 000 r/min 离心收集菌体, 用 pH 2.0 硫酸反复悬浮、离心, 除去铁矾, 滴在载玻片上, 用磁铁在不同方向对其施加磁场镜检, 有的细胞会缓慢游向磁铁 S 极, 有的细胞只是随磁铁来回振动, 还有细胞对磁场没有反应。由此判断该菌种可以由磁分离的方法来分离。

#### 1.1.2 培养基

9K 液体培养基<sup>[6]</sup> (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.00, KCl 0.10,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.50,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.50,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  44.7, pH 2.0。

ISP 半固体培养基由 3 部分组成, A 液:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  33.4 g/L, 用无菌微孔滤膜过滤; B 液 (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4.00, KCl 0.20,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.00,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.02; C 液: 琼脂 3 g/L, pH 3.0。

#### 1.1.3 仪器与设备

自行开发的磁性细菌分离仪, Galen III 型显微镜, HZQ-C 空气浴振荡器, PHS-3C 酸度计, HT201 高斯计, TDL-5A 离心机, HL-4 恒流泵, VP50 真空泵。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 设备组成

磁性细菌分离仪的磁分离系统由电磁铁部分、分离通道和恒流泵组成。

电磁铁部分 (工程纯铁极头) 的线圈通以直流电流 (0~3 A 电流), 从而产生磁场。磁性颗粒为偶极粒子, 在匀强磁场中受力为零, 故必须采用非匀强磁场才能分离。本强磁分离仪分离空间由一对相

对但不平行的磁极面组成, 如图 1 所示。双曲线形状的磁极面产生的磁场是梯度分布的, 因此对于处在其中的磁性颗粒产生磁力作用。这个空间中磁性颗粒除了受垂直方向的重力和浮力外, 最主要的力是平行方向上的磁力和粘滞阻力。磁力的方向 ( $F_m$ ) 指向磁力线密集的一边, 当磁力足够大时, 就可以使通过的磁性颗粒偏移, 达到磁分离的目的。

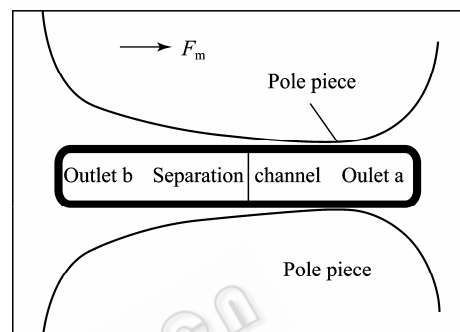


图 1 磁极头截面示意图

Fig. 1 The sketch map of magnetic pole.

分离通道是磁分离系统的主要部分, 由塑料管制成, 置于电磁铁两极形成的分离空间之内。有一个入口和两个出口, 入口连接着恒流泵。通过的磁性颗粒在磁场的作用下, 向一侧偏移。分离通道设计成为细长管道, 通过磁场的管道长度与管道宽度之比  $L/W \gg 1$ , 有利于提高分离效率。

恒流泵可以控制载有磁性颗粒的悬液流量, 本实验采用的流量为 372 mL/h。

#### 1.2.2 细胞悬液样品制备

所用菌株采自云南东川某酸性矿坑水中, 使用 9K 培养基多次富集。细胞培养至对数期, 通过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜抽滤, 用 pH 2.0 的稀硫酸冲洗滤膜表面, 得到细胞悬液。将得到的细胞悬液用 10 000 r/min 离心收集菌体, 再用 pH 2.0 的稀硫酸悬浮, 反复离心、悬浮, 直至收集到的细胞不含铁矾沉淀为止。进行分离实验的时候, 用 pH 2.0 稀硫酸把菌体稀释成不同浓度的细胞悬液。

#### 1.2.3 细胞磁分离

在实验之前, 整个通道使用 75% 乙醇消毒, 再使用蒸馏水冲洗干净, 最后使用 pH 2.0  $\text{H}_2\text{SO}_4$  润洗。然后泵入样品悬液, 打开电磁铁电源, 待流体稳定

之后,分别收集两个出口流出的液体即可。含有磁性颗粒的菌体在磁场作用下发生偏移,从而导致从两个出口流出的菌悬液的浓度会发生变化,在显微镜下分别用计数板计数,每个样品重复计数3次,取平均值。

#### 1.2.4 趋磁性观察<sup>[3]</sup>

取培养好的细菌在半固体平板中央接种,于30℃生化培养箱中正置培养,在由永久磁铁产生的人工磁场中生长,人工磁场方向平行于地磁场方向,培养数天后观察菌斑生长情况。以不加人工磁场仅在地磁场下培养作为空白对照。

#### 1.2.5 透射电镜观察

将分离后得到的两种菌悬液离心收集菌体,用磷酸缓冲液(PBS, pH 6.7)清洗,经过适当稀释后做超薄切片,置于透射电镜(JEM1230,电压80 kV)下观察菌体内磁性颗粒数量的变化。

## 2 结果

### 2.1 设备磁场的分布

为了直观表示磁极磁场的分布,首先使用磁场模拟软件FEMM4.2 (<http://femm.foster-miller.net>)模拟这种磁极(切面)产生的磁场二维平面分布,如图2所示。从磁场的模拟图中可以清楚地看出出口 a

处和出口 b 处两点之间磁场的梯度分布。出口 a 处磁场线比出口 b 处密集,磁性颗粒受力方向与磁场梯度方向相同,所以应该可以从出口 a 处收集得到含磁性颗粒相对多的细菌,称为强磁菌,从出口 b 处收集得到含磁性颗粒相对少的细菌,称为弱磁菌。

使用高斯计测量磁分离仪的磁场实际分布情况,分离空间的磁场符合软件模拟的分布。当线圈的电流为3 A时,出口 a 处的磁场强度可达1460 mT,出口 b 处的磁场强度为1000 mT,水平方向的磁场梯度为18.4 T/m。本磁分离仪可以产生的磁场要远强于普通静磁块的磁场。强的高梯度磁场对于分离趋磁性很弱的磁性细菌是非常有利的。

### 2.2 细胞的磁分离

对照实验 M1 是将细胞悬液在不加磁场的情况下通过分离通道。实验 M2、M3 和 M4 则加了分离磁场(电磁铁通以3 A 电流)。实验 M2 是将细胞悬液进行初次磁分离,在出口 a 和 b 处分别收集到强磁菌和弱磁菌;实验 M3 是将得到的强磁菌进行再次磁分离;实验 M4 是将得到的弱磁菌进行再次磁分离。所有实验中细胞悬液的流量都控制为372 mL/h(恒流泵电压为1.2 V)。使用统计学分析软件SPSS13.0对磁分离后细胞悬液的浓度变化进行均值比较和方差分析,结果见表1。

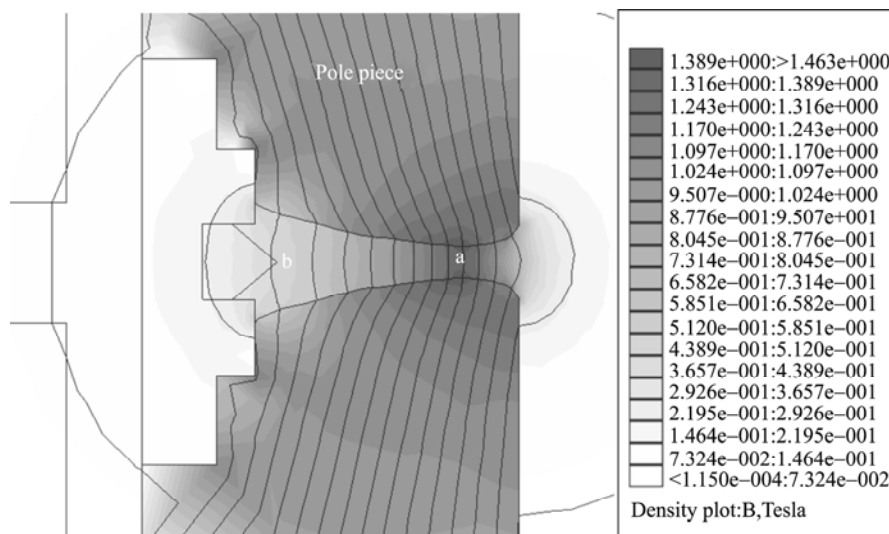


图2 磁分离仪磁极磁场分布图

Fig. 2 Two-dimensional simulation of the magnetic field generated by the poles. a: location of outlet a; b: location of outlet b.

表 1 磁分离细胞悬液浓度变化及方差分析结果 ( $n=3$ )  
Table 1 Result of the magnetic separation and the variance analysis ( $n=3$ )

Experiments No.	Outlet a ( $\times 10^7$ cells/mL)	Outlet b ( $\times 10^7$ cells/mL)
M1 *	2.70 $\pm$ 0.025	2.67 $\pm$ 0.029
M2**	2.90 $\pm$ 0.062	2.33 $\pm$ 0.080
M3**	3.25 $\pm$ 0.038	2.53 $\pm$ 0.025
M4 *	2.30 $\pm$ 0.085	2.31 $\pm$ 0.026

Compared between outlet a and outlet b: \* $P>0.05$ ; \*\* $P<0.05$ .

由结果可以看出, 不加磁场的实验 M1 中,  $P>0.05$ , 两个出口得到的细胞悬液浓度没有显著差异。施加了外磁场之后, 实验 M2 中,  $P<0.05$ , 分离结果有显著差异, 且出口 a 得到的细胞悬液浓度明显大于出口 b 处得到的细胞悬液, 这说明含有磁性颗粒的细胞在磁场作用下发生了偏移。为了进一步证明这一点, 把得到的强磁菌液和弱磁菌液分别进行第 2 次磁分离。结果, 强磁菌液的分离效果与第 1 次分离结果类似 (M3),  $P<0.05$ , 分离结果有显著差异; 而弱磁菌液分离后细胞浓度没有发生明显变化 (M4),  $P>0.05$ , 分离结果没有显著差异, 这是因为经过第 1 次分离后, 其中含有磁性颗粒的细胞以及细胞中的磁性颗粒数都减少了, 这一点也可由透射电镜结果所验证。

### 2.3 透射电镜观察

10 000 r/min 下高速离心, 分别收集强磁菌液和弱磁菌液菌体, 用磷酸缓冲液 (pH 6.7) 清洗, 经过适当稀释后制作超薄切片, 使用透射电镜观察, 结果见图 3。图中黑色电子致密体是磁性颗粒, 在本课题组前期的工作中, 使用能谱分析显示, 该磁性颗粒主要由 Fe 和 O 两种元素组成<sup>[3]</sup>。

从图中可以看出, 经磁分离仪分离后, 强磁菌和弱磁菌磁性颗粒含量有一定差别。在电镜下选取轮廓完整的细胞, 统计胞内与细胞背景区别明显、且直径在 20~90 nm 范围内的黑色电子致密体数量, 结果见表 2。统计每个含有磁性颗粒的细胞内的磁性颗粒数量, 进行频数分析, 结果见图 4。

从统计结果可以看出, 强磁菌胞内磁性颗粒数量明显多于弱磁菌。强磁菌平均每个细胞含有 4 颗磁性颗粒, 84.21% 的细胞含有磁性颗粒, 多数

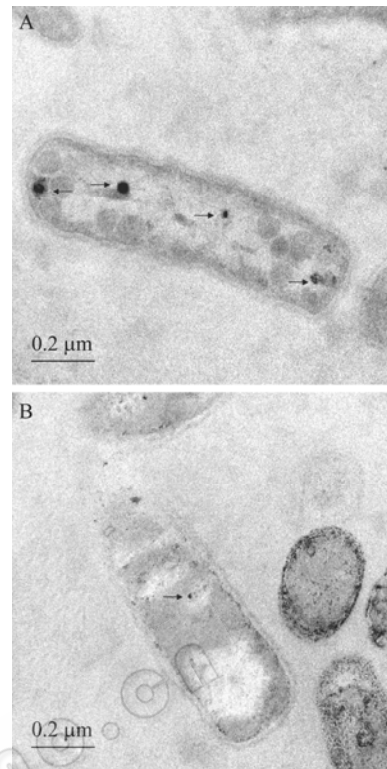


图 3 强磁菌和弱磁菌的透射电镜照片 (A: 强磁菌, 在出口 a 处收集; B: 弱磁菌, 在出口 b 处收集)

Fig. 3 Transmission electron micrograph of thin sectioned cells. (A) Strong magnetic cells collected at outlet a. (B) Weak magnetic cells collected at outlet b.

表 2 氧化亚铁硫杆菌胞内磁性颗粒数量统计结果  
Table 2 Statistical results of magnetic particles in the *A. f* cells

	Outlet a (Strong magnetic cells)	Outlet b (Weak magnetic cells)
Sample numbers	38	38
Magnetic particles numbers	145	65
Average numbers /cell	4	2
Magnetic cells numbers	32	25
Percent of magnetic cells	84.21%	65.79%

细胞含有 2~5 颗, 最多可达 18 颗; 弱磁菌平均每个细胞含有 2 颗磁性颗粒, 65.79% 的细胞含有磁性颗粒, 多数细胞只含有 1 颗, 最多只有 9 颗。经磁分离仪分离后, 含磁性颗粒的细胞的比例发生了明显变化, 这说明磁分离仪可以分离出含磁性颗粒多的细胞。

## 2.4 趋磁性观察

半固体平板磁泳结果如图 5 所示。从图中可以看出, 强磁菌在强外磁场的作用下, 明显向磁铁一侧运动, 相比之下, 在相同的外磁场中, 弱磁菌的趋磁运动没有强磁菌明显。而不加外磁场的情况下, 细菌仅在地磁场作用下没有明显的趋磁运动。这是因为氧化亚铁硫杆菌中磁性颗粒数量较少, 且分散在菌体内部, 没有成链排列, 地磁场对它的作用不能抵消菌体本身的热运动。但是当胞内磁性颗粒数

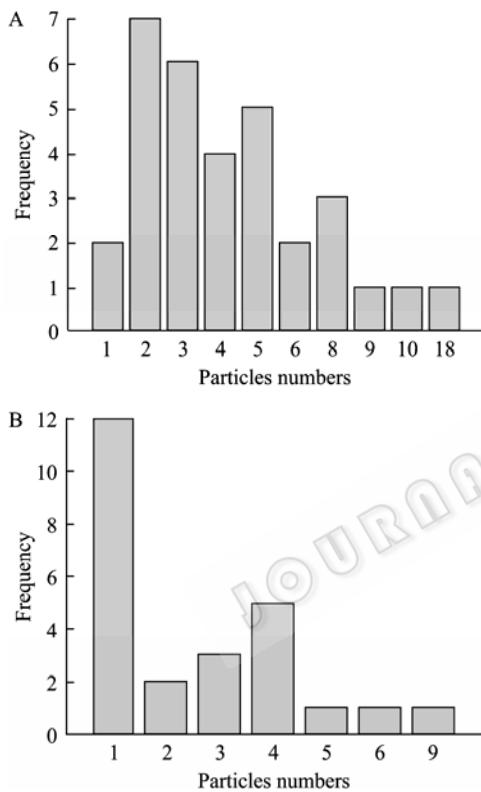


图 4 每个含有磁性颗粒的细胞内的磁性颗粒数量频数分析图

Fig. 4 Frequencies statistics of magnetic particles numbers in the cells containing the magnetic particles. (A) Strong magnetic cells. (B) Weak magnetic cells.

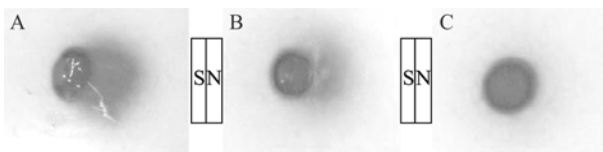


图 5 半固体平板磁泳照片

Fig. 5 Photograph of semisolid-plate magnetophoresis. (A) Strong magnetic cells in the artificial magnetic field. (B) Weak magnetic cells in the artificial magnetic field. (C) Cells in the geomagnetic magnetic field.

量足够多时, 当外加磁场达到一定强度后, 氧化亚铁硫杆菌仍然会产生趋磁运动。半固体平板磁泳的结果也同样说明采用磁分离仪分离强趋磁性的细菌是可行的。

## 3 讨论

纳米级磁性颗粒在生物技术、信息存储<sup>[5]</sup>、传感技术<sup>[6]</sup>、医疗卫生<sup>[7]</sup>、废水处理<sup>[8]</sup>和环境磁学<sup>[9]</sup>等方面都有广泛的应用前景。因此, 磁性细菌的相关研究有着非常重要的理论和实际价值。迄今为止, 人们在很多物种中发现了由生物矿化作用产生的铁磁性物质, 主要都是磁铁矿颗粒。氧化亚铁硫杆菌胞内生成的磁性颗粒同样是生物矿化作用<sup>[10-11]</sup>的结果, 本实验室在研究中发现嗜铁钩端螺旋菌胞内也可能生成相似的磁性颗粒, 类似的生物矿化作用很可能存在于多种浸矿细菌中, 将是未来研究的重点方向之一。但是类似的磁性细菌趋磁性都非常微弱, 其分离成为制约研究的瓶颈, 急需开发有效的分离方法。

目前, 生物物质的磁分离方法有很多种, 如简单磁泳分离<sup>[6]</sup>、微芯片磁泳分离<sup>[12]</sup>和磁性分流薄层分级<sup>[13]</sup>等。但是对于类似氧化亚铁硫杆菌这样弱趋磁性的细菌, 上述磁分离方法都不甚理想。针对氧化亚铁硫杆菌, 本课题组在前期工作中采用了液体磁泳和固体平板磁泳方法, 取得了比较好的效果。但是这两种磁泳方法仍然不能满足实际培养的需要。液体磁泳和固体平板磁泳使用的都是静磁块, 静磁块的磁场强度有限, 且磁场分布没有经过特殊设计, 不能最大效率地分离弱趋磁性的氧化亚铁硫杆菌, 因此, 磁泳所需的时间很长, 而且每次分离后都需要活化扩培, 不能连续培养。为了分离包括弱趋磁性细菌在内的各种磁性细菌, 本实验利用磁选的原理, 开发设计了一台强磁分离仪。利用特殊形状的磁极头, 产生最利于磁分离的梯度分布的磁场, 且可达到的磁场强度也远强于普通静磁块。同时, 本强磁分离仪也可用于从大量细胞悬液中提取磁性颗粒的下游过程中, 有效地减少所需处理的细胞悬液量。

通过实验,可以得到以下结论: 1) 经过特殊设计的磁极头可以产生利于磁分离的梯度分布强磁场。2) 本强磁分离仪可以有效地分离磁性细菌: 经过强磁分离仪分离得到的强磁菌平均每个细胞含有 4 颗磁性颗粒, 84.21% 的细胞含有磁性颗粒, 多数细胞含有 2~5 颗, 最多可达 18 颗, 而弱磁菌平均每个细胞含有 2 颗磁性颗粒, 65.79% 的细胞含有磁性颗粒, 多数细胞只含有 1 颗, 最多只有 9 颗; 在人工磁场中, 强磁菌的趋磁性明显强于弱磁菌, 而在地磁场中没有明显的趋向运动。

## REFERENCES

- [1] Leathen WW, Kinsel NA, Braley SA. *Ferrobacillus ferrooxidans*: a chemosynthetic autotrophic bacterium. *Bacterial*, 1956, **72**: 700-704.
- [2] Liu XX, Xie JP, Liu WB, *et al.* Research on isolating bacteria by using magnetophoresis. *China Biotechnol*, 2006, **26**(4): 70-74.  
刘新星, 谢建平, 刘文斌, 等. 磁泳分离细菌新方法的研究. 中国生物工程杂志, 2006, **26**(4): 70-74.
- [3] Liu XX, Liu WB, Yan Y, *et al.* Isolation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by using solid-plate magnetophoresis. *China Biotechnol*, 2008, **28**(3): 79-83.  
刘新星, 刘文斌, 闫颖, 等. 固体平板磁泳分离细菌新方法. 中国生物工程杂志, 2008, **28**(3): 79-83.
- [4] Amaro AM, Chamorro D, Seeger M, *et al.* Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein-synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 910-915.
- [5] Bahaj AS, James PAB. Characterization of magnetotactic bacteria using image processing techniques. *IEEE Trans Magn*, 1993, **29**(6): 3358-3360.
- [6] Matsunaga T, Kamiya S. Use of magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria for enzyme mobilization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, **26**: 328-332.
- [7] Matsunaga T, Higashi Y, Tsujimura N. Drug delivery by magnetoliposomes containing bacterial magnetic particles. *Cellular Eng*, 1997, **2**: 7-11.
- [8] Bahaj AS, Croudace IW, James PAB, *et al.* Continuous radionuclide recovery from wastewater using magnetotactic bacteria. *J Magnet Magnet Mater*, 1998, **184**: 241-244.
- [9] Vali H, Li YL, Zhang CL, *et al.* Formation of tabular single domain magnetite induced by *Geobacter metallireducens* GS-15. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 16121-16126.
- [10] Frankel RB, Bazylinski DA. Biologically Induced mineralization by bacteria. *Rev Mineral Geochem*, 2003, **54**: 95-114.
- [11] Bazylinski DA, Frankel RB. Biologically controlled mineralization in prokaryotes. *Rev Mineral Geochem*, 2003, **54**: 217-247.
- [12] Pamme N, Eijkel J, Manz A. On-chip free-flow magnetophoresis: separation and detection of mixtures of magnetic particles in continuous flow. *J Magnet Magnet Mater*, 2006, **307**: 237-244.
- [13] Zhang Y, Emerson DR, Reese JM. General theory for flow optimization of split-flow thin fractionation. *J Chromatogr*, 2003, **1010**: 87-94.