微生物学通报 Microbiology China tongbao@im.ac.cn



一株胞内合成纳米磁性颗粒菌株的筛选及鉴定

田郭顺 历娜 赵敏^{*} (东北林业大学 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:【目的】从聊城东昌湖湖水中分离纯化出一株可合成纳米磁性颗粒的菌株,将其命名为 TZ-1。【方法】对该菌株进行形态学研究、分子生物学鉴定,将 TZ-1 菌株合成的纳米磁性颗粒 进行提取纯化,并对菌体和纳米磁性颗粒进行透射电镜(Transmission electron microscope, TEM) 观察、扫描电镜(Scanning electron microscope, SEM)元素分析,对纳米磁性颗粒进行 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD)分析。【结果】经鉴定 TZ-1 属于伯克霍尔德氏菌属(Burkholderia sp.)。透 射电镜下菌体为杆状,易聚集,有明显的单生鞭毛,有荚膜,在 TEM 下观察菌体内部有两种电 子致密颗粒,较小颗粒分布在菌体细胞膜附近,近似多边形,大小约为 60 nm,较大颗粒分布在 菌体内部,大小约为 180 nm,表面有膜包裹。扫描电镜(SEM)下细胞为杆状,大小与 TEM 下测 量结果一致。SEM 下对磁性颗粒进行元素分析,主要为 Fe、P、O。根据 TEM、SEM、XRD 结 果推测菌体可合成纳米磁性颗粒。【结论】分离纯化出的菌株 TZ-1 可合成纳米磁性颗粒,磁性颗 粒 X 射线衍射结果分析知 TZ-1 合成的纳米磁性颗粒为单斜晶体,主要成分为 Fe₃(PO₄)₂·8H₂O 和 Fe₃O₄。

关键词:磁敏感细菌,筛选,鉴定,纳米磁性颗粒,透射电镜(TEM),扫描电镜(SEM),X射线 衍射(XRD)

Isolation and characterization a bacterium strain can synthesized magnetic nano-particles

TIAN Guo-Shun LI Na ZHAO Min*

(Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

Abstract: [Objective] Isolation of a bacterium strain named TZ-1 synthesized magnetic nano-particles from Dongchang Lake in Liaocheng City. **[Methods]** Proceed the morphological study and 16S rRNA gene identify to the strain TZ-1, extract and depurate the magnetic nano-particles form TZ-1 culture. Observe and analyze TZ-1 cells and the magnetic nano-particles through transmission electron microscope (TEM), scanning electron microscope (SEM) and X-ray diffraction (XRD). **[Results]** Concluded that TZ-1 belongs to *Burkholderia* sp.. The cells of TZ-1 is rod under the TEM, possess flagellum and capsule easy to gather. The approximate polygon in like electron dense granules arounded biomembrane in the cells include two types in size for 60 nm approximate located at the cytomembrane and 180 nm approximate located inner the middle of cells. The cells are rod under SEM,

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 31170553);国家林业局 948 项目

^{*}通讯作者: 🖂: 82191513@163.com

收稿日期: 2015-03-11; 接受日期: 2015-05-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-02

and the sizes are the same as the TEM. EDAX spectrum for the magnetic nano-particles on SEM shows that the main elements are Fe, P, O. According to the result of TEM, SEM and XRD that TZ-1 can compose magnetic nano-particles. **[Conclusion]** The bacterial strain TZ-1 we isolated synthesized magnetic nano-particles, XRD shows the ingredient of the magnetic nano-particles are $Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ and Fe_3O_4 , and the crystal structure of the magnetic nano-particles is monoclinic crystal.

Keywords: Magnetic sensitive bacteria, Selection, Identification, Magnetic nano-particles, Transmission electron microscope (TEM), Scanning electron microscope (SEM), X-ray diffraction (XRD)

纳米材料由于其具有独特的尺寸、形貌、光电 性质、化学性质及力学性质而被广泛研究[1],其中 纳米磁性材料具有的独特性质而广受科学家的青 睐^[2-3]。传统化学方法合成纳米磁性材料成本高、产 率低,限制了这一领域的发展和应用研究^[3]。自1975 年科学家首次发现趋磁细菌以来,科学家们有意识 地利用微生物进行纳米磁性材料的生物合成和应 用研究^[3-7]。细菌合成的纳米磁性颗粒具有尺寸分布 窄、稳定性高、生物相容性好、产率高和成本低等 优点[6-10],在纳米生物技术、医药和催化等领域具 有广泛的应用潜力[11-14]。同时细菌可以在室温和近 中性 pH 的温和条件下合成无机纳米粒子, 是一种 清洁、无毒和无污染的绿色合成方法^[6-8]。迄今为止 科学家们用不同的方法从不同的环境中分离近 30株(包括纯化的、未纯化的及不能培养的)趋磁细 菌,这些趋磁细菌模式菌株多数属于 Proteobacteria 的 Alpha-亚纲^[4-6]。此外,研究者分离出的 Actinobacter sp.^[9], Desulfovibrio magenticus RS-1^[10] 等菌株也可以合成纳米磁性颗粒。本文报告从山东 省聊城东昌湖水样分离纯化一株高产纳米磁性颗 粒的菌株,并对其进行形态学和分子生物学鉴定, 提取该菌株合成的纳米磁性颗粒并对其进行表征 分析。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验所用水样为聊城东昌湖南岸泥水交界处 水样。

1.2 培养基^[5]

KH₂PO₄ 0.68 g, NaAc 0.05 g, NaNO₃ 0.12 g, 丁二酸 0.74 g, 巯基乙酸钠 0.05 g, 刃天青 2 mg, Wolfe's 维生素混合液 10 mL, Wolfe's 矿物质混合 液 5 mL, 0.1 mol/L 柠檬酸铁溶液 5.0 mL, 蒸馏水 1 L, 用 10 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 6.7, 半固体 培养基另加 0.5%的琼脂, 固体培养基另加 2%的 琼脂。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种分离纯化:将样品与培养基按照 1:1 的 比例混合置于密封的棕色广口瓶中,在广口瓶外壁 的中部放置一块 40 mm×25 mm×5 mm 规格的 N48 稀土钕铁硼强力磁铁,将广口瓶放置于 28 °C 恒温 培养箱中,避光静置培养30d。无菌条件下取出 1 mL 磁铁处培养物,将其梯度稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶和10⁻⁷7个浓度,分别取 100 µL 与冷却到 40 ℃ 的 30 mL 半固体分离培养基 均匀混合,倒平板,将平板置于厌氧箱里维持氧分 压在 0.5%, 28 ℃ 避光培养。每天观察,将长出的 单菌落接种到固体培养基,放置于厌氧箱里维持氧 分压在 0.5%, 28 ℃ 避光培养, 多次分离纯化得到 纯培养。将得到的纯培养物接种到装瓶量为75%液 体生长培养基的厌氧瓶中,密封,28°C、140 r/min 培养。将培养物分别在4000 r/min条件下离心,经 3 次灭菌去离子水清洗,取相同 OD600 条件下的相 同量菌悬浮物进行细胞破碎,将合成磁性颗粒最多 的菌种 TZ-1 作为研究对象并保存菌种。

1.3.2 纳米磁性颗粒的提取纯化:将培养7d的培养物4000r/min离心,弃上清,无菌水清洗菌体,4000r/min离心,清洗3次。将清洗之后的培养物用适量无菌水悬浮,用超声波细胞破碎仪破壁,设置参数为:功率80%,破碎15s,间隔5s,破碎60个循环。磁铁吸附纳米磁性粒子,弃掉上清液,

破碎 10-15 次。

1.3.3 纳米磁性颗粒 XRD: 日本理学 D/Max-2500 X 射线衍射仪,扫描电压为 50 kV,扫描电流为 100 mA,辐射源为 Cu 靶, λ=0.154 056 nm,扫描 速度 0.06°/s,扫描范围为 5-60°。

1.3.4 纳米磁性颗粒磁滞回线测定:室温下使用 Lake shore 磁滞回线测量系统测定纳米磁性颗粒的 磁滞回线曲线。

1.3.5 菌种鉴定: EasyPure Genomic DNA Kit 提取 菌种总 DNA, PCR 扩增 16S rRNA 基因序列。50 μL PCR 反应体系: 10×PCR buffer 5 µL、10 mmol/L dNTPs 1 µL、10 µmol/L 引物 27F 和 10 µmol/L 引物 1492R各1 µL、5 U/mL Taq 酶 0.5 µL、DNA 模板 1 μL, 去离子水 40.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个 循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。pMD18-T Vector 连接 PCR 产物,连接体系为:1 µL T 载体,4 µL PCR 产物,5µL Solution I,室温放置16h。热激转化到 大肠杆菌 TOP10 感受态中,将转化后的感受态菌液 于 37 °C、200 r/min 摇床培养 1 h, 取 50 μL 培养物 涂布到氨苄终浓度为50 mg/L的LB固体培养基上, 37 ℃ 培养 12 h, 挑取单菌落接种于 LB 液体培养基 37°C、200 r/min 摇床培养6h,使用 pMD18-T Vector 特定引物 M13F(47)、M13R(48)进行菌体 PCR 检测。 将转导成功的培养物 50%甘油 1:1 比例混匀保存, 送由华大基因公司测序,用 NCBI、Biology Workbench 和 MEGA 等软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 富集培养物特征

富集培养7d后,表面和底部均生长出棕色菌; 第2周后,培养物变黑色;第3周后,培养基变为 无色,菌膜为棕色,磁铁处有明显菌体;继续培养 一周后磁铁附近菌体增多,证明了采用超强力磁铁 可以提高富集的回收率,得到了较多可以合成磁性 颗粒的细胞,以便于下步实验中更好地筛选出菌 种。取出磁铁附近培养物,滴加到载玻片上制成临 时装片,在盖玻片一边放置 N48 稀土钕铁硼强力磁铁,在油镜下面观察发现有菌体可以沿磁力线向磁铁 S 极游动。

2.2 菌种分离纯化

在半固体培养基平板上,3d后可以看到菌液稀释度为10⁻⁶的平板上有明显单菌落,在培养基内部和表面均有单菌落分布,多数为白色。培养到7d时,菌落变成黄绿色、棕色或黑色,经6次划线培养后得到纯培养。经液体培养后,对不同单菌落的液体培养物进行菌体收集,破碎菌体,其中TZ-1菌株在相同 *OD*600、菌液量的条件下合成的磁性颗粒最多,且该菌株较其他菌株生长较快。

实验研究发现 TZ-1 菌株合成磁性颗粒的最主 要因素是氧分压。培养基中含有氧指示剂刃天青, 培养1d后培养物颜色变浅,第3天时变为无色。 培养3d之内的培养物无法提取出磁性颗粒。对照 试验使用摇瓶好氧培养,其培养物中也无法提取磁 性颗粒。由此推测,TZ-1在低氧分压条件下才能合 成磁性颗粒。文献[5-6,8]报道,趋磁细菌在氧分压 超过1%条件下不能合成磁小体,与本实验得出的 结论类似。氧分压影响趋磁细菌合成磁小体的机制 尚没有定论,目前较一致的观点是,氧作为呼吸链 的终端电子受体,产生能量供磁小体的合成^[12-14]。

2.3 菌株 TZ-1 的形态特征及磁性颗粒的表征分析
2.3.1 菌落形态: 直径约为 3-5 mm, 呈圆形, 边缘不规则, 菌落湿润呈黄绿色, 半透明(图 1)。

2.3.2 菌体 TEM 结果:如图 2-4 所示,菌体为杆 状,有鞭毛,有荚膜,菌体分散,菌体长约为 2-4 μm, 宽约为 0.5-1.5 μm。菌体内部有两种电子致密颗粒, 较小颗粒分布在菌体细胞膜附近,近似多边形,大 小约为 60 nm,较大颗粒分布在菌体内部,大小约 为 180 nm。TZ-1 在不加柠檬酸铁的生长培养基中 培养后,TEM 下观察到菌体内部和细胞膜边缘均没 有电子致密颗粒结构,菌体无趋磁性,且无法提取 出纳米磁性颗粒。

2.3.3 菌体及纳米磁性颗粒 SEM 结果:如图 5 所



图 1 菌落形态 Figure 1 Colonial morphology of TZ-1



图 2 TZ-1 菌体 TEM 照片 Figure 2 TEM of TZ-1

示,菌体为杆状,菌体长约为 2-4 μm,宽约为 0.5-1.5 μm,与 TEM 测量结果一致。纳米磁性颗粒 EDAX 分析主要成分为 Fe、O、P,其中金元素来 源于样品处理时的喷金,其他各元素都来源于培养 基成分中被菌体利用的部分(图 6,表 1)。

2.3.4 纳米磁性颗粒 XRD 结果分析:如图 7 所示,
2*θ*=13.2°时出现主峰,TZ-1 所合成的磁性颗粒为单斜晶系结构。对应的各晶面间距 *d* 值与Fe₃(PO₄)₂·8H₂O 标准衍射卡 PDF75-1186 比对,与Fe₃(PO₄)₂·8H₂O 特征峰 11.2 (110)、13.2 (020)、18.1 (200)、19.6 (001)、23.1 (201)、27.8 (131)、30.2 (311)、32.9 (221)、38.4 (401)基本一致。对应各晶面间距*d* 值与 Fe₃O₄标准衍射卡 PDF19-0629 比对,与Fe₃O₄



图 3 不含柠檬酸铁培养基中 TZ-1 菌体 TEM 照片 Figure 3 TEM of TZ-1 in the medium without ferric citrate



图 4 菌落形态图磁性颗粒 TEM 照片 Figure 4 TEM of magnetic nano-particles



图 5 菌体 SEM 照片 Figure 5 SEM of TZ-1

http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn



图 6 纳米磁性颗粒扫描电镜的 EDAX 分析 Figure 6 EDAX spectrum for the magnetic nano-particles on SEM

表 1 纳米磁性颗粒扫描电镜的 EDAX 分析 Table 1 EDAX spectrum for the magnetic nano-particle on scanning electron micrograph		
元素	质量比	原子数比
Element	Wt (%)	At (%)
О	33.75	60.61
Р	13.09	12.12
Fe	63.16	27.27

特征峰 18.3 (111)、30.1 (220)、35.4 (311)、37.0 (222)、 43.0 (400)、54.1 (116)、70.1 (620)基本一致。

2.3.5 磁滞回线分析:如图 8 所示,TZ-1 合成的纳 米磁性颗粒具有较高的矫顽力 $H_c=239$ A/m,磁饱和 强度为 0.51 Am²/kg, $M_r/M_s=0.48$ 接近自由聚集的单 磁畴颗粒的理论值 0.5,磁性较弱,主要原因是 Fe₃(PO₄)₂·8H₂O 为非磁性物质,TZ-1 合成的纳米磁 性颗粒为硬磁性材料。

2.3.6 菌株 16S rRNA 基因分子鉴定:测序得到 一条 1 556 bp 的序列,将序列提交到 NCBI 数据库, 获得序列登录号 1B3EEPNA014, BLAST 比对结果 为洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*),属于 Proteobacteria 的 β-亚纲,命名为 *Burkholderia*



图 7 Fe₃(PO₄)₂·8H₂O (A)和 Fe₃O₄ (B)对应 XRD 衍射峰 图谱

Figure 7 Diffraction peak for XRD of $Fe_3(PO_4)_2{\cdot}8H_2O$ (A) and Fe_3O_4 (B)



图 8 纳米磁性粒子的磁滞回线

Figure 8 Room temperature hysteresis loop of the magnetic nano-particles

http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn



图 9 菌株 Burkholderia cepacia TZ-1 的 16S rRNA 基因系统进化树

Figure 9 Phylogenetic tree of strain *Burkholderia cepacia* TZ-1 and related species based on 16S rRNA gene sequences 注: 线段0.02表示序列差异的分支长度; 发育树节点的数值表示Brootstrap值; 括号内的数值为GenBank数据库中的登录号. Note: Bar=2% nucleotide divergence. Number at notes present bootstrap percentages (based on 1 000 sampling). Those in parentheses are the GenBank accession number.

cepacia TZ-1 (图 9)。使用 MEGA 软件做出进化树, Burkholderia cepacia TZ-1 菌株与趋磁细菌模式菌 株 MSR 亲缘关系较远。这是首次发现伯克霍尔德 菌属(Burkholderia sp.)菌株可以合成纳米磁性颗粒。

3 结论

从聊城东昌湖湖水中分离纯化出一株高产磁 性颗粒的菌株 Burkholderia cepacia TZ-1。本课题组 首次发现伯克霍尔德氏菌(Burkholderia sp.)中有合 成纳米磁性颗粒的菌株。与趋磁细菌模式菌株相比 较,菌株更易培养,且生长速度快,相同条件下合 成磁性颗粒更多,但是也有不足之处,TZ-1合成的 磁性颗粒含有较多的 Fe₃(PO₄)₂·8H₂O 成分,磁性相 对较弱,长时间放置容易聚集成大颗粒,进行性质 及应用方面的研究前需要重新通过超声法将其 分散。

本实验的创新之处是根据 Burkholderia cepacia TZ-1 菌株的特性,采用厌氧摇瓶培养的方式。伯克 霍尔德氏菌属(Burkholderia sp.)中菌株均为好氧菌, TZ-1 在有氧条件下可以快速生长,但是氧分压超过 1%时 TZ-1 不能合成磁性颗粒。由此将菌种接种于 氧分压为 5%的微好氧条件,密封,28 ℃、140 r/min 摇床培养,该培养方式下菌体在对数期消耗密封环 境中的 O₂,菌体大量繁殖,根据培养物颜色变化(刃 天青的指示作用)判断菌体生长情况,培养约 36 h, 培养物变为无色状态,培养约 7 d 菌体可合成出大 量磁性颗粒。

平板上菌落直径约为 3-5 mm,呈圆形,边缘 不规则,菌落湿润呈黄绿色,半透明。在 TEM 和 SEM 下观察,菌体为杆菌,长约为 2-4 μm,宽约 为 0.5-1.5 μm,易聚集,有明显的单生鞭毛,有荚 膜,胞内有电子致密颗粒。4 000 r/min 离心培养物 方法收集菌体,使用无菌水清洗菌体,细胞破碎方 法收集到磁性颗粒。SEM 下 EDAX 分析元素分析 纳米磁性颗粒主要成分为 Fe、P、O。磁性颗粒 XRD 结果表明,纳米磁性颗粒具有单斜晶系结构, 其主要成分为 Fe₃(PO₄)₂·8H₂O 和 Fe₃O₄。由于 Fe₃(PO₄)₂·8H₂O 为非磁性物质,*Burkholderia cepacia* TZ-1 合成的纳米磁性颗粒的磁性较弱,矫顽力 *H*_c=239 A/m,磁饱和强度为 0.51 Am²/kg, *M*_f/*M*_s=0.48。

参考文献

- Kim BY, Kodama PK, Moeller RE. Bacterial magnetite produced in water column dominates lake sediment mineral magnetism: Lake Ely, USA[J]. Geophysical Journal International, 2005, 163(1): 26-37
- [2] Zhu SD, Xu ZQ, Bai ZQ. Esearch of the nano-materialsat homeand abroad II — the applctions and preparation of the nano-material[J]. Heat Treatment Technology and Equipment, 2010, 8(4): 31-40 (in Chinese) 朱世东,徐自强,白真权. 纳米材料国内外研究进展 II — 纳 米材料的应用与制备方法[J]. 热处理技术与装备, 2010, 8(4):

31-40

- [3] Liu X, Xie J, Liu W, et al. Research on isolating bacteriaby using magnetophoresis[J]. Journal of Chinese Biotechnology, 2006, 26(4): 70-74
- [4] Zhang XY, Wang JF, Wu WJ. Nacreous layer of shell biomineralization and its inspiration for biomimetic materials[J]. Journal of Inorganic Materials, 2006, 3(2): 257-265 (in Chinese) 张学鸯, 王建方, 吴文健. 贝壳珍珠层生物矿化及其对仿生 材料的启示[J]. 无机材料学报, 2006, 3(2): 257-265
- [5] Jogler C, Lin W, Meyerdierks A. Toward cloning of the magnetotactia metagenome:identification of magnetosome island gene clusters in uncultivated magnetotactic bacteria from different aquatic sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(12): 3972-3979
- [6] Simmons SL, Sievert SM, Frankel RB, et al. Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 623-639
- [7] Bazylinski DA, Garratt-Reed AJ, Abedi A, et al. Copper association with iron sulfide magnetosomes in a magnetotactic bacterium[J]. Archives of Microbiology, 1993, 160(1): 35-42
- [8] Bazylinski D, Frankel R. Magnetosome formation in prokaryotes[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(3): 217-230
- [9] Lee J, Lee D. Preparation of a magnetically switchable

bioelectro catalytic system employing cross-linked enzyme aggregates in magnetic mesocellular carbon foam[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2005, 44(45): 7427-7432

- [10] Sakaguchi T, Burgess JG, Matsunaga T. Magnetite formation by a sulphate-reducing bacterium[J]. Nature, 1993, 365(6441): 47-49
- [11] Kobayashi A, Taguchi T. Biological control of magnetite crystal formation in the magnetotactic bacteria: hints concerning the possible evidence from ALH84001 for life on Mars[J]. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 2002, 66(15A): A408-A408
- [12] Lins U, McCarteney MR, Farina M. Crystal habits and magnetic microstructures of magnetosomes in coccoid magnetotactic bacteria[J]. Anais Da Academia Brasileira De Ciencias, 2006, 78(3): 463-474
- [13] Frankel RB, Bazylinski DA. Magnetosomes and magneto-aerotaxis[J]. Contribution to Microbiology, 2009, 16(16): 182-193
- [14] Jiang W, Tian JS, Li Y. Characteristics of magnetotactic bacteria and biosynthesis conditions of nano-magnetosomes[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2007, 9(3): 24-31 (in Chinese) 姜伟,田杰生,李颖. 趋磁细菌的特点及其纳米磁小体的合 成条件[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(3): 24-31

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

 ϕ

专论与综述是本刊重要栏目之一,主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展,其 内容要求新颖丰富,观点明确,论述恰当,应包含作者自己的工作内容和见解。因此,作者在动笔之前必 须明确选题,一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各 个方面,在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势,即掌握其内在的精髓,深入到专题研 究的本质,论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望,提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另 外,作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法,辅以注释,客观而有少量评述,使读者对该专题的 过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是:(1)我刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介,并指出自己的工作(已发 表的文章)在综述中的体现,同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2)在专论与综述中引用的文献应该主要 是近5年国内外正式发表的研究论文,引用文献数量不限。