

茛三酮比色法测定矿物表面吸附 浸矿细菌蛋白质含量

周吉奎¹, 钮因健², 邱冠周¹, 覃文庆¹

- (1. 中南大学 资源加工与生物工程学院, 湖南 长沙, 410083;
2. 中国有色金属工业技术开发交流中心, 北京, 100814)

摘要: 为了研究浸矿细菌在矿物表面的吸附量与金属浸出率的关系, 必须测定矿物表面吸附的细菌数量. 在 100 °C 的水浴中, 用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液消化矿物表面的细菌时间为 25 min, 然后用 0.5 mol/L 的 HCl 溶液中和至 pH=7.0. 在 2 mL 中和液中加入 1 mL 茛三酮显色液, 在 100 °C 的水浴中加热 20 min, 冷却 6 min 后, 在波长为 562 nm 时测定反应产物的吸光值 A. 吸光值 A 对应溶液中的蛋白质含量, 进而对应着矿物表面吸附细菌的数量.

关键词: 茛三酮; 比色法; 蛋白质; 细菌; 吸附

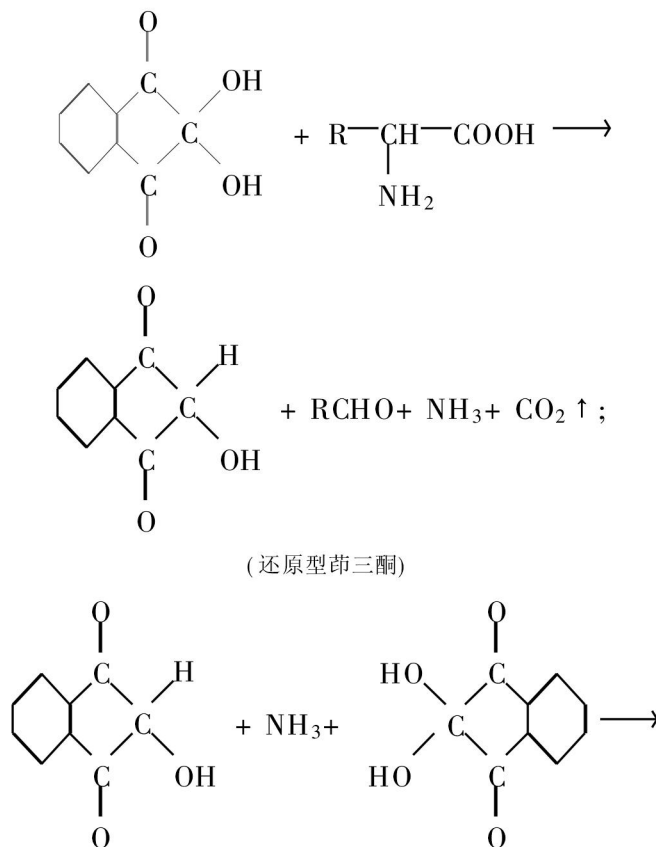
中图分类号: Q331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9792(2003)02-0128-04

在硫化矿氧化成可溶性硫酸盐的过程中, 细菌的催化有直接作用和间接作用 2 种方式. 直接作用是细菌吸附于矿物表面直接催化其氧化反应. 而间接作用是细菌通过氧化矿物中的亚铁和硫, 形成硫化矿氧化所必需的氧化剂 $Fe_2(SO_4)_3$ 和溶剂 H_2SO_4 . 硫化矿生物浸出时, 直接作用和间接作用中以何者为主, 主要取决于矿石组成和浸出条件. 例如, 在常温下, 生物浸出含铁低的辉铜矿主要依靠细菌的直接催化作用, 而闪锌矿浸出时细菌直接浸出作用不显著, 靠 Fe^{3+} 的间接氧化^[1,2]. 在硫化矿细菌浸出过程中, 一部分细菌紧密地附在矿物表面. 为了研究细菌吸附对矿石中金属溶出的影响, 必须对矿石表面吸附的细菌数量进行测定. 研究表明, 细菌与矿石之间的结合比较紧密, 用洗涤剂、超声波以及高速离心等方法都难以使吸附的细菌全部洗脱, 因此, 对吸附细菌直接计数不准确. 使用扫描电镜、荧光显微镜、荧光抗体、ELISA 等方法对吸附细菌计数, 在具体操作中有一定的难度^[3,4]. 为此, 作者使用茛三酮比色法测定细菌裂解液中蛋白质的总量. 蛋白质总量的多少可反映吸附细菌数量的多少.

1 实验原理

蛋白质、多肽和各种氨基酸能与茛三酮发生反应. 除无 α 氨基的脯氨酸和羟脯氨酸呈黄色外, 其他

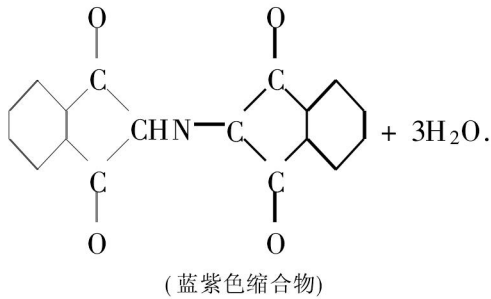
氨基酸呈紫红色, 最终为蓝色化合物. 该化合物颜色的深浅与它的含量成正比. 这种蓝色化合物在 562 nm 处有一最大吸收峰. 因此, 测定该化合物在 562 nm 处的吸光值 A 就可计算溶液中氨基酸、蛋白质的含量. 反应式如下^[5]:



收稿日期: 2002-11-04

基金项目: 全国优秀博士论文专项基金资助项目(200047)

作者简介: 周吉奎(1969-), 男, 湖南隆回人, 中南大学博士研究生, 从事资源生物提取研究.



该反应灵敏度达 1: 1 500 000 (pH 值为 5~ 7), 已用于氨基酸定量测定。

2 材料与方 法

2.1 菌种和培养基

氧化亚铁硫杆菌 T-1 菌株从广东大宝山矿区浸矿水中分离获得, 经过 6 个月驯化培养, 已适于在闪锌矿矿浆中生长。将达到对数期的细菌培养物用孔径为 0.22 μm 的细菌滤膜过滤, 得含杂质的菌体, 再用 pH= 2.0 的硫酸溶液冲洗 3 次, 洗去细菌表面的铁沉淀物, 得到去铁细菌, 悬浮于无铁培养基中, 供实验使用。

培养基为 pH= 2.0 的 9K 培养基^[1]。

2.2 茚三酮显色剂的配制

取 0.5 g 茚三酮和 0.3 g 果糖, 用蒸馏水溶解并定容至 100 mL, 贮存于棕色瓶中, 低温保存。

2.3 细菌裂解液的制备

在 250 mL 的三角烧瓶中加入 10 g 闪锌矿精矿, 然后加入 95 mL pH= 2.0 的 9K 培养液以及 5 mL 氧化亚铁硫杆菌, 细菌浓度为 1×10^8 个/mL, 置于温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中, 以转速为 200 r/min 振荡培养 20 d 后, 用普通定性滤纸过滤, 收集固体物, 再将固体物用 pH= 2.0 的硫酸溶液 20 mL 洗涤后过滤, 以去除残留在矿物表面的非吸附细菌。将表面吸附有细菌的固体矿物装入 1 个 50 mL 的已灭菌的烧杯, 加入 20 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液, 混合均匀, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热消化 10, 15, 20, 25, 30 min, 分别取 2 mL 上清液, 冷却后用 0.5 mol/L 的 HCl 溶液中和至 pH= 7.0, 即制得细菌裂解液。

2.4 测定方法与步骤

2.4.1 最佳裂解时间

每次移入制备的细菌裂解液 2 mL 到灭菌的试管, 加入 1 mL 茚三酮显色剂, 混匀, 试管口用封口膜扎紧, 防止水分散失。将试管放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中加热 20 min, 然后移入自来水中冷却 20 min。冷却后移

入厚度为 1 cm 的石英比色杯中, 使用 UV-1100 紫外分光光度计测定波长为 562 nm 时的吸光值 A , 找到 A 值最大时的最佳裂解时间。

2.4.2 反应产物的最佳测量波长

将上述制备的显色反应液在 UV-1100 紫外分光光度计上波长范围为 400~ 600 nm 的吸光值进行扫描测定, 确定反应产物特征吸收峰的位置, 确定最佳测量波长。

2.4.3 不同 pH 值对反应产物吸光值的影响

取 6 支灭菌试管, 分别移入 pH= 7.0 的细菌裂解液 2 mL, 用 0.5 mol/L 的 HCl 与 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液配成 pH 值为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0。然后对不同 pH 值的细菌裂解液按上述方法处理, 在波长为 562 nm 时测定不同 pH 值时反应物的吸光值, 并进行比较。

2.4.4 不同加热时间对反应产物吸光值的影响

取 5 支灭菌试管, 分别移入 pH= 7.0 的细菌裂解液 2 mL, 再在每支管中加入 1 mL 茚三酮显色液, 混合均匀。然后分别加热 10, 15, 20, 25, 30 min。在自来水中冷却 15 min, 于波长为 562 nm 时分别测定 5 支试管中反应物的吸光值, 进行比较。

2.4.5 不同冷却时间对反应产物吸光值的影响

将于 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 20 min 的显色反应液在自来水中分别冷却 4, 6, 8, 10, 12, 14 min, 在波长为 562 nm 时测定不同冷却时间的反应物吸光值, 并进行比较。

2.4.6 浸矿细菌蛋白质含量标准曲线的制定

取 8 支 50 mL 的灭菌离心管, 用灭菌移液管分别移入细菌浓度为 1×10^9 个/mL 的去铁浸矿细菌溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mL, 前 7 管用灭菌水补至 8 mL。在转速为 10 000 r/min 时离心 10 min。倒掉上清液, 保留沉淀的细菌体。将收集的菌体用 2 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液消化, 消化液用上述方法处理后测定吸光值, 制定菌体浓度与总吸光值 (即 $A \times V$, 其中 V 为总反应液体积) 关系标准曲线。

3 结果与分析

3.1 高温裂解矿物表面吸附细菌的时间

表面吸附有细菌的矿物浸在 20 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液中, 置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中加热消化不同时间, 取样与显色剂反应, 反应产物的吸光值变

化情况如图 1 所示. 可见, 在消化时间低于 20 min 时, 细菌裂解液显色反应产物的吸光值比裂解 20 min 时的低, 说明吸附在矿物表面的细菌裂解还不充分; 当裂解时间大于 20 min 时, 细菌裂解液显色反应产物的吸光值不会大于裂解 20 min 时显色反应产物的值, 说明当裂解时间达到 20 min 时, 吸附在矿物表面的细菌被完全裂解.

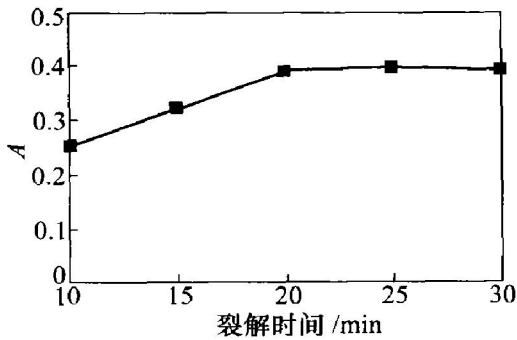


图 1 高温裂解时间对显色反应产物吸光值 A 的影响

3.2 最佳测量波长的选择

将冷却后的反应产物移入宽度为 1 cm 的石英比色杯中, 在 UV-1100 紫外分光光度计上 400~ 600 nm 的波长范围内扫描, 结果如图 2 所示. 据图 2 可以确定在波长 562 nm 处有一个明显的特征吸收峰, 与文献[5]中的结果一致. 在实验中可取波长 562 nm 进行反应产物的最佳测量波长.

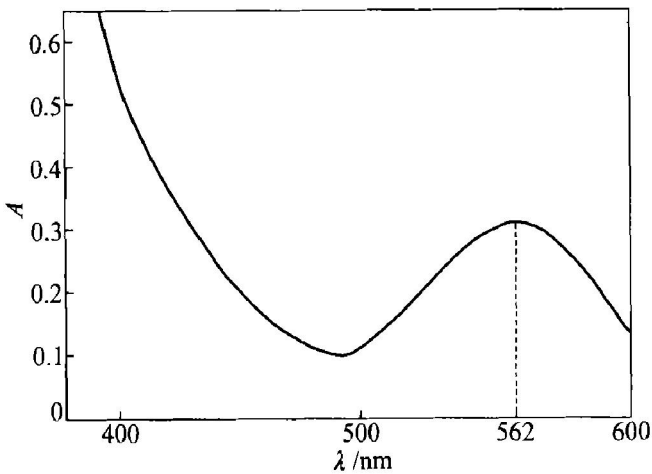


图 2 反应产物在波长 λ 范围为 400~ 600 nm 时的扫描图谱

3.3 不同 pH 值对吸光值的影响

不同 pH 值的细菌裂解溶液与显色剂反应后, 在波长为 562 nm 处测定反应物的吸光值, 结果如图 3 所示. 可见, 在 pH 值不同时反应物的吸光值不同, 在 pH= 7.0 时, 反应产物的吸光值最大; 酸性越强或碱性越强时, 反应产物的吸光值越小. 其原因可能是在酸性或碱性条件下, 裂解液中的蛋白质、多肽或氨基酸与茚三酮的反应速度慢, 或者是形成的反应产物

在酸性与碱性条件下不稳定.

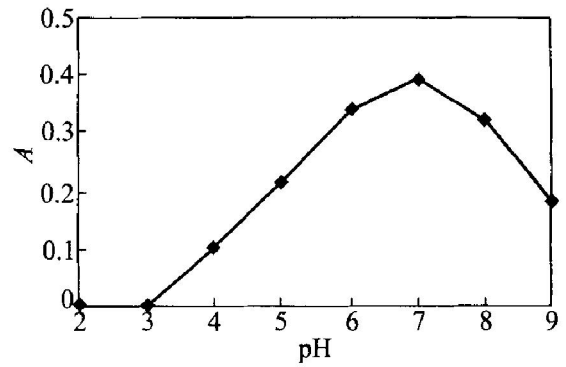


图 3 pH 值对显色反应产物吸光值 A 的影响

3.4 不同加热时间对反应物吸光值的影响

对在沸水浴中分别加热 10, 15, 20, 25, 30 min 的反应产物在自来水中冷却 15 min. 在波长为 562 nm 处测定反应产物的吸光值, 结果如图 4 所示. 可见, 加热 20 min 的反应产物吸光值达到最大值. 说明在沸水浴中加热 20 min 可使蛋白质与茚三酮充分发生反应. 可以把 20 min 设置为显色反应的加热时间.

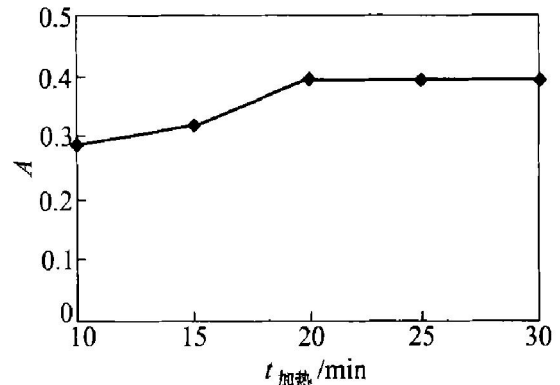


图 4 加热时间 t_{加热} 对显色反应产物吸光值 A 的影响

3.5 不同冷却时间对反应物吸光值的影响

加热 25 min 后, 反应产物在自来水中分别冷却 4, 6, 8, 10, 12, 14 min. 在波长为 562 nm 时测定 5 支试管中反应物的吸光值, 结果如图 5 所示. 可见, 冷却 6 min 以后, 反应产物的吸光值达到最大值后基本不变. 说明可以把 6 min 设置为反应产物的冷却时间, 同时也说明此产物在短时间内能保持稳定.

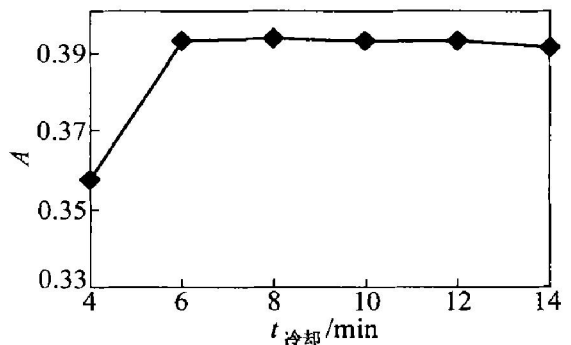


图 5 冷却时间 t_{冷却} 对显色反应产物吸光值 A 的影响

3.6 浸矿细菌蛋白质含量标准曲线的制备

浓度为 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 个/mL 的去铁浸矿细菌用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液在 100 °C 的水浴锅中加热消化 25 min. 制备的细菌裂解液与茚三酮显色剂反应后, 在波长为 562 nm 时测定不同细菌浓度所形成的产物吸光值, 制备标准曲线, 见图 6. 可见, 在本研究设置的细菌浓度范围内, 细菌裂解液显色反应产物的吸光值与细菌的浓度成正比, 被裂解的细菌数量越多, 裂解液的吸光值越大.

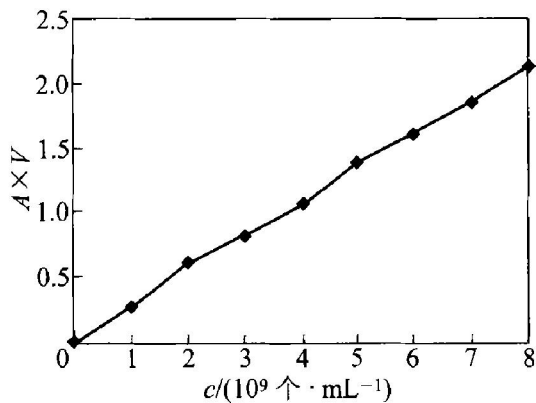


图 6 细菌浓度 c 与细菌裂解液总吸光值 ($A \times V$) 关系标准曲线

4 结 论

a. 纯蛋白质在波长为 280 nm 处有特征吸收峰, 由于矿物表面吸附的浸矿细菌裂解液中存在有 DNA, RNA 以及各种多糖等细菌结构物质, 还有多种金属离子、非金属离子以及矿物细微颗粒, 所以, 在细菌裂解液的扫描图谱中, 蛋白质在波长为 280 nm 处的特征吸收峰不明显. 将细菌裂解液与茚三酮反应后, 形成了在波长为 562 nm 处有特征吸收

峰的反应产物. 该反应可用于定量测定蛋白质含量.

b. 应在 100 °C 的水浴锅中加热 25 min, 这样才能用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液完全消化吸附在矿物表面的细菌.

c. 当细菌裂解液的 pH=7.0 时, 显色反应产物的吸光值最大. 在 pH < 5.0 或 pH > 8.0 的情况下, 反应产物的吸光值大大降低, 说明该显色反应要在 pH 值呈中性的条件下进行.

d. 测定条件为: 在 100 °C 的水浴锅中用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液裂解矿物表面吸附的细菌 25 min, 再用 0.5 mol/L 的 HCl 溶液中和过滤的裂解液至 pH=7.0. 取一定体积的裂解液, 其中加入体积为总体积的 1/2 的茚三酮显色液, 混合均匀, 在 100 °C 的水浴锅中加热 20 min 后, 在自来水中冷却 6 min, 测定反应产物在波长为 562 nm 处的吸光值. 裂解液吸光值的变化, 在一定程度上可以反映矿物表面吸附细菌数量的变化.

参考文献:

- [1] 童 雄. 微生物浸矿的理论与实践[M]. 北京: 冶金工业出版社, 1997.
- [2] 德瓦西亚 P. 细菌生长条件与细菌吸附在氧化亚铁硫杆菌生物浸出黄铜矿中的作用[J]. 陈 谦, 译. 国外金属矿选矿, 1999, 36(2): 28-30.
- [3] Escobar B, Jedlicki E, Wiertz J, *et al.* A method for evaluating the proportion of free and attached bacteria in bioleaching of chalcopyrite with thiobacillus ferrooxidans [J]. Hydrometallurgy, 1996, 40(1-2): 1-10.
- [4] Karan G, Natarjan K A, Modak J M. Estimation of mineral-attached biomass of Thiobacillus ferrooxidans by protein assay-some problems and remedies[J]. Hydrometallurgy, 1996, 42(2): 169-175.
- [5] 李建武, 萧能赓, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理与方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.

Protein content of mineral-adhered bacterium by ninhydrin colorimetric method

ZHOU Ji-kui¹, NIU Yi-r-jian², QIU Guan-zhou¹, QIN Wen-qing¹

(1. College of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China;
2. Technology Development and Exchange Center of Nonferrous Metallurgical Industry, Beijing 100814, China)

Abstract: Biomass of bacterium on mineral surfaces is measured to study the relation between growth of adhered bacterium and metal dissolution. The mineral samples containing adhered bacterium are digested in 0.5 mol/L NaOH in a boiling water bath for 25 min. The digested soup then filtered and the filtrate is neutralised to pH=7 using 0.5 mol/L HCl. Then 1 mL of reagent ninhydrin is added to 2 mL of protein extracted solution and mixed thoroughly. The mixed solution is heated in a boiling water bath for 20 min, then the boiled solution is cooled for 6 min. After development of the color, the absorbance is measured at 562 nm using a UV-1100 for the protein content, which provides a measure of the attached cell mass.

Key words: ninhydrin; colorimetric; protein; bacterium; attachment