

嗜酸性氧化亚铁硫杆菌代谢产物的常压化学电离质谱分析

梁钜超¹ 屈颖¹ 于苗苗² 徐玲玲² 刘亚洁² 孙占学² 陈焕文^{* 1}¹ (东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点实验室, 南昌 330013)² (东华理工大学省部共建核资源与环境国家重点实验室培育基地, 南昌 330013)

摘 要 本研究以 721 矿和 745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌为研究对象, 采用常压化学电离质谱直接分析其代谢产物, 分别考察了顶空采样 (Headspace sampling)、界面采样 (Interface sampling) 和中性解吸采样 (Neutral desorption sampling) 3 种进样方式对电离效果的影响。在优化条件下, 常压化学电离质谱对微生物纯菌种和混合菌种的代谢产物均具有良好的分析能力, 可根据获得的代谢产物指纹谱图结合主成分分析 (PCA) 方法和聚类分析 (CA) 方法区分 2 个放射性强弱不同区域共 4 类嗜酸性微生物样品, 并对主要胺类、酯类等代谢成分进行串联质谱鉴定, 为耐辐射微生物的相关研究提供了一种可借鉴的分析方法。

关键词 嗜酸性氧化亚铁硫杆菌; 常压化学电离; 代谢产物; 质谱分析

1 引 言

嗜酸性微生物是指可在极端酸性环境 ($\text{pH} < 3.5$) 中生长良好的微生物, 多分布在酸性矿水、酸性热泉、火山湖、地热泉等极端酸性环境中, 含硫化物矿物环境中亦有较多分布^[1~3]。大部分已知的嗜酸性微生物分离自上述酸性环境, 并被用于生物湿法冶金, 如氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, At. f)、氧化硫硫杆菌 (*Acidithiobacillus thiooxidans*, At. t) 等, 既是典型的嗜酸菌, 也是典型的化能自养型微生物。这类微生物能氧化某种特定的无机物, 并利用所产生的化学能还原二氧化碳和生成有机碳化合物^[4~6], At. f 能将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} , 获得能量而生长, 而 Fe^{3+} 又是冶金工艺中良好的氧化剂, At. t 可以低价硫或单质硫为能源并生成硫酸, 运用于冶金工艺中可以降低酸耗, 大大节约生产成本^[7~9]。同时, 由于贫矿、尾矿、品外矿的增加, 微生物浸矿工艺已成为许多地区首选的浸矿技术。因此, 通过微生物代谢产物研究生物冶金中目标矿体环境中嗜酸性微生物特异性, 对目标菌种的筛选及构建生物浸出体系中优势冶金菌群具有很重要的指导作用^[10]。

基于代谢产物对微生物种类进行识别鉴定具有快速无损的优势, 开发微生物代谢产物快速检测的方法, 已成为了热门的研究课题。目前, 微生物代谢产物的分析方法很多, 传统方法的包括化学传感、光谱学、“电子鼻”、离子迁移谱等^[11]。由于质谱技术具有较高的化学特异性, 得到越来越广泛的应用, 但传统的质谱方法常与气相色谱或液相色谱联用, 样品预处理较复杂, 耗时较长。直接质谱分析技术能够在无需样品预处理的情况下对复杂基体样品中痕量待测物进行快速分析, 因此得到了极大的关注和广泛的应用^[12]。Liang 等^[13]利用常压化学电离, 无需任何预处理, 对临床上 5 种常见的致病菌进行指纹谱图分析, 并得到其挥发性代谢产物生物标志物作为快速识别的信号。Yang 等^[14]利用表面解吸常压化学电离 (SDAPCI) 质谱法, 在无需样品预处理的情况下, 直接测定了奶粉中三聚氰胺, 实现了奶粉中三聚氰胺的半定量和批量检测。常压化学电离质谱法作为一种常用的直接质谱分析技术, 通过高电压的针尖电晕放电, 使空气中某些中性分子电离, 产生 H_3O^+ , N_2^+ , O_2^+ 和 O^+ 等离子, 这些离子与待测物分子发生离子-分子反应, 使待测物分子离子化, 反应过程包括由质子转移和电荷交换产生正离子, 质子脱离和电子捕获产生负离子等^[15]。该方法对易挥发半极性的小分子化合物具有较高的灵敏度, 特别适宜在环境监测和生物表征中发挥作用。本实验以 721 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌及 745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌为研究对象, 比较了顶空、界面、中性解吸 3 种进样方式的特点, 分析了嗜酸性微生物代谢成分, 并

2016-07-12 收稿; 2016-09-02 接受

本文系国家自然科学基金项目 (No. 81460327), 长江学者和创新团队发展计划项目 (No. IRT13054), 江西省科技支撑计划项目 (Nos. 20152ACB21013, 20152ACG70014) 资助

* E-mail: chw8868@gmail.com

结合主成分分析 (PCA) 和聚类分析 (CA) 对不同矿区的嗜酸性微生物进行快速区分。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

常压化学电离源为本实验室搭建^[13]; LTQ-XL 线性离子阱质谱仪并配有 Xcalibur 数据处理系统 (美国 Thermo Scientific 公司)。

微生物样品: 721 矿嗜酸性混合菌种分离自 721 矿生物堆浸出液; 721 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种由 721 矿嗜酸性混合菌种进一步纯化得到; 745 矿嗜酸性混合菌种富集分离自 745 矿生物堆浸矿渣; 745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种由 745 矿嗜酸性混合菌种进一步纯化得到。

9k 培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g/L; KCl 0.1 g/L; K_2HPO_4 0.5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 g/L; 二次蒸馏水 1000 mL。菌种选育和样品培育在东华理工大学铀矿生物溶浸工艺实验室提供的帮助下完成。

2.2 微生物培育

所有微生物样品活化之后以 20% 接种至 9k 培养基, 在 35℃ 条件下 120 r/min 摇床培养 24 h 后取样进行质谱分析。

2.3 常压化学电离实验参数

常压化学电离质谱装置图如图 1 所示。实验室环境为恒温恒湿条件, 温度 25℃, 湿度 45%。为使样品分子最大限度地与初级带电离子进行碰撞并发生反应, 参考实验室气体检测实验优化条件为: 放电针与进样口角度 $\alpha = 30^\circ$, 样品通道口与质谱口水平距离为 $l = 6$ mm。设置检测模式为正离子模式, 质量范围为 100 ~ 400 Da, 放电针电压为 4 kV, 离子传输管温度为 150℃, 样品载气 (氮气, 纯度为 99.99%), 压力为 0.1 MPa, 其他条件为系统自动优化。

3 结果与讨论

3.1 常压化学电离 3 种采样方式对电离效率影响

为了考察采样方法对细菌代谢产物检测结果的影响, 分别采用了顶空采样、界面采样和中性解吸采样等 3 种方式进行代谢产物的检测 (图 1)。3 种方法均利用 N_2 将培养体系中的物质萃取出来进入质谱进行检测, 区别之处在于培养瓶中 N_2 进气口与液面间的距离不同。比较 3 种不同的进样方式的检测结果, 以 745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌为例得出其指纹图谱如图 2 所示, 检测出主要成分质荷比 m/z 119, 139, 223, 295 等区别不大, 尤其是顶空采样与界面采样, 但是中性解吸采样谱图 c 与前两种采样方式谱图相比, 所得谱图信号略有增加, 可能是由于随着 N_2 进样口与液面间距离不断缩短, 气体从培养基中萃取的物质也越多, 采取中性解吸采样检测到的可能不仅仅是挥发性代谢产物, 培养基和培养液中一些非挥发性的代谢产物也有可能被检测到, 所以得到了较多复杂的质谱信号。

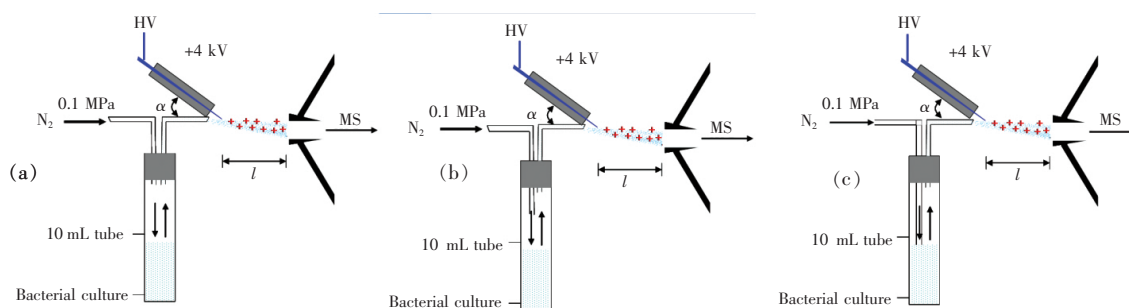


图 1 常压化学电离检测微生物代谢产物的实验装置图: (a) 顶空采样; (b) 界面采样; (c) 中性解吸采样

Fig. 1 Schematic diagram of ambient corona discharge ionization mass spectrometry for microbial metabolites analysis in bacteria culture: (a) headspace sampling; (b) interface sampling; (c) neutral desorption sampling

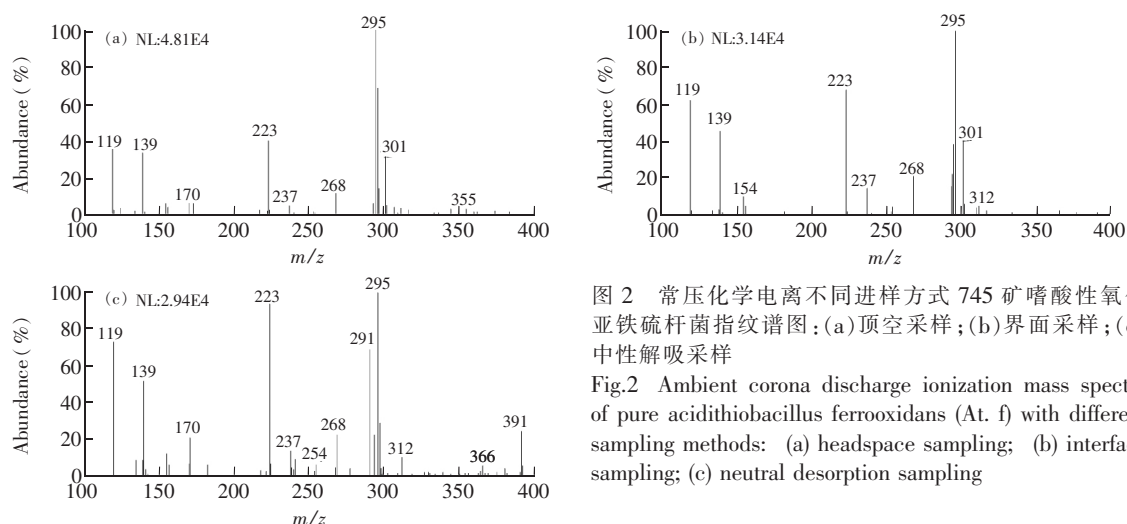


图 2 常压化学电离不同进样方式 745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌指纹谱图：(a) 顶空采样；(b) 界面采样；(c) 中性解吸采样

Fig.2 Ambient corona discharge ionization mass spectra of pure acidithiobacillus ferrooxidans (At. f) with different sampling methods: (a) headspace sampling; (b) interface sampling; (c) neutral desorption sampling

3.2 嗜酸性微生物代谢产物指纹谱图分析

分别对 721 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种、721 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌混合菌种、745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种和 745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌混合菌种代谢产物进行质谱分析，得到指纹谱图如图 3 所示。比较 4 种样品指纹谱图可知 4 种微生物都存在明显的 m/z 119, 139, 223, 295 等离子峰，说明 4 种微生物样品都会产生一些相同的代谢产物，且相对强度较为一致。

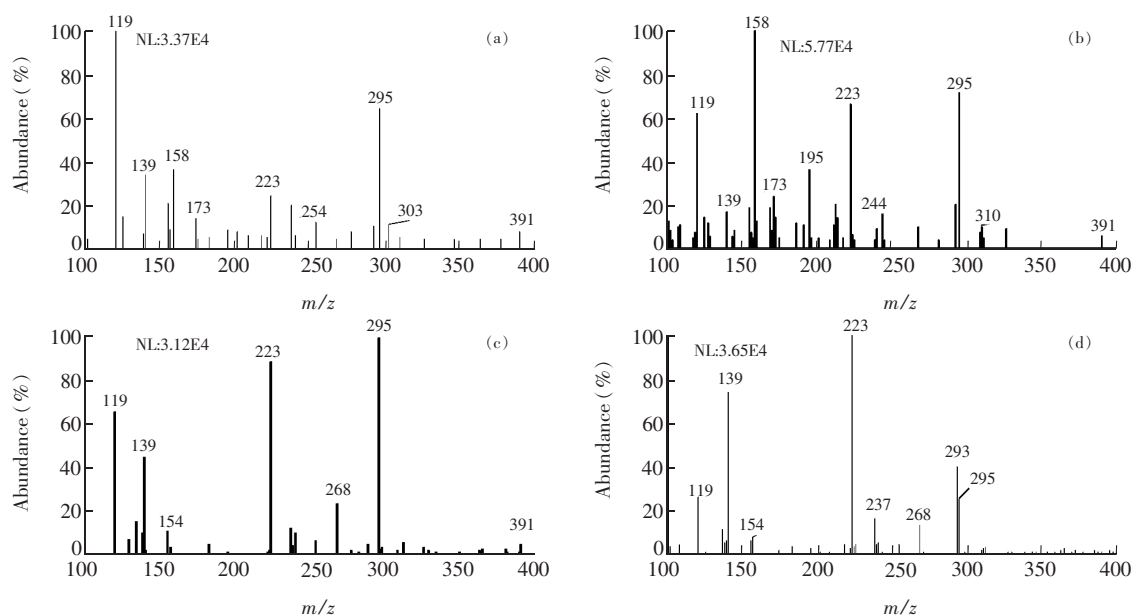


图 3 微生物代谢产物常压化学电离中性解吸采样指纹谱图：(a) 721 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种；(b) 721 矿嗜酸性混合菌种；(c) 745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种；(d) 745 矿嗜酸性混合菌种

Fig.3 Neutral desorption sampling ambient corona discharge ionization mass spectra for bacterial metabolites fingerprinting: (a) pure At. f from 721 Mine; (b) impure At. f from 721 Mine; (c) pure At. f from 745 Mine; (d) impure At. f from 745 m Mine

对比 721 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种和混合菌种，混合菌种中在质荷比 m/z 158, 195, 223, 295 等处质谱信号强度较 721 矿嗜酸性混合菌种均有不同程度的升高，且在 m/z 100 ~ 300 之间出现了一些强度较小的离子峰，如 m/z 244 等，而 721 纯菌种则相对干净。同样的现象在 745 矿纯菌种和混合菌种也存在。可能的原因是由于混合菌种中含有微生物种类较多而产生的化学成分比较复杂，导致在此质荷比区间差异明显。而相比于 745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种，721 矿纯菌种的 m/z 119, 173 信号强度更大，另外，721 矿纯菌种还出现 m/z 158, 295, 391 质谱信号峰，未见 m/z 301 的质谱信号。

峰。为了快速识别鉴定嗜酸性微生物的种类,选择 721 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种中丰度较高的一些物质如 m/z 119 等离子进行串联质谱鉴定。

图 4 为通过碰撞诱导解离实验 (CID) 得到的串联质谱图。 m/z 119 离子的二级质谱图如图 4a 所示,产生主要碎片离子 m/z 91,为母体离子丢失中性碎片 C_2H_4 形成的,可能与酯类物质丢失碎片规律一致,推测 m/z 119 为一酯类物质,通过文献和标准品串联质谱进一步确认了 m/z 119 为质子化的乳酸乙酯 $[CH_3CH(OH)COOCH_2CH_3 + H]^+$ 。 m/z 151 的二级质谱图如图 4b 所示,产生主要碎片离子 m/z 133,掉落碎片 18,同时产生 m/z 105 离子碎片,由此推测其为质子化苯甲酸乙酯,与参考文献对比进一步确认该化合物^[16]。 m/z 135 的二级质谱图和三级质谱图如图 4c 所示,产生主要碎片离子为 m/z 107,因此推测 m/z 135 为酰胺物质,然后通过标准品的三级质谱图和文献对比进一步确认了 m/z 135 为离子化的乙酰苯胺 $[CH_3CONHC_6H_5]^+$ 。 m/z 136 的二级谱图和三级谱图如图 4d 所示,与 m/z 135 的串联谱图类似,由乙酰苯胺质子化之后得到 $[CH_3CONHC_6H_5 + H]^+$ 。

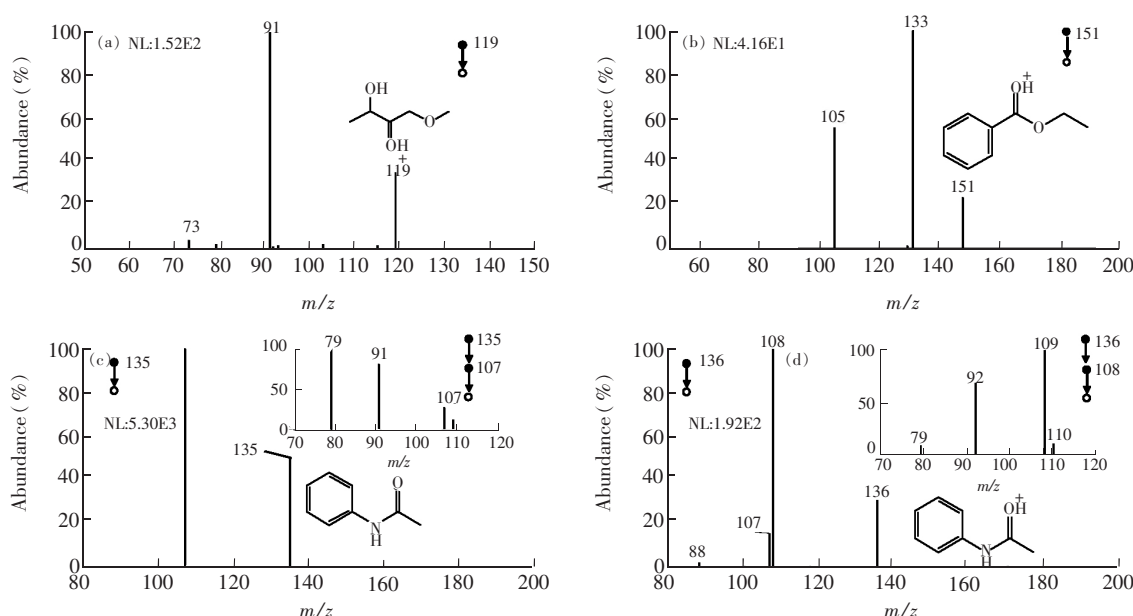


图 4 常压化学电离串联质谱图:(a) m/z 119;(b) m/z 151;(c) m/z 135;(d) m/z 136

Fig. 4 Ambient corona discharge ionization tandem mass spectra:(a) m/z 119;(b) m/z 151;(c) m/z 135;(d) m/z 136

3.3 常压化学电离质谱主成分分析 (PCA)

主成分分析 (PCA) 在复杂样品的分析检测中已得到广泛地应用^[17~20]。为了更直观地揭示嗜酸性微生物之间的差异和进一步论证实验结果的正确性,本研究通过 Matlab 软件将采集的大量质荷比在 m/z 100~400 范围内的一级质谱数据进行规一化处理,利用“Princomp”函数对每一类样品数据进行 PCA 分析,自动得到各个主成分的得分图及相应的载荷图。

对 721 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种和混合菌种指纹谱图进行 PCA 分析 (图 5a),结果表明,两类生物样品可以得到很好的区分。由 3 个主成分载荷分布图 (图 5b) 可见, m/z 135, 136, 158, 223, 295, 296 等对区分两种样品的贡献较大,说明这些物质在两种样品中的含量存在有较大差异。同样,对 745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种和混合菌种指纹谱图进行 PCA 分析,得到主成分分析图和载荷图如图 5c 和 5d 所示。从图 5c 可见, PC1, PC2 和 PC3 对方差贡献率分别为 51.5%, 29.8% 和 7.1%, 三者之和达到 88.4%, 因而这 3 个主成分包含了被分析样品的绝大部分信息,同时两种样品能够被明显区分开。

3.4 常压化学电离质谱聚类分析 (CA)

聚类分析是一种静态数据分析的统计学方法,目前已广泛应用于模式识别和图像分析等领域。实

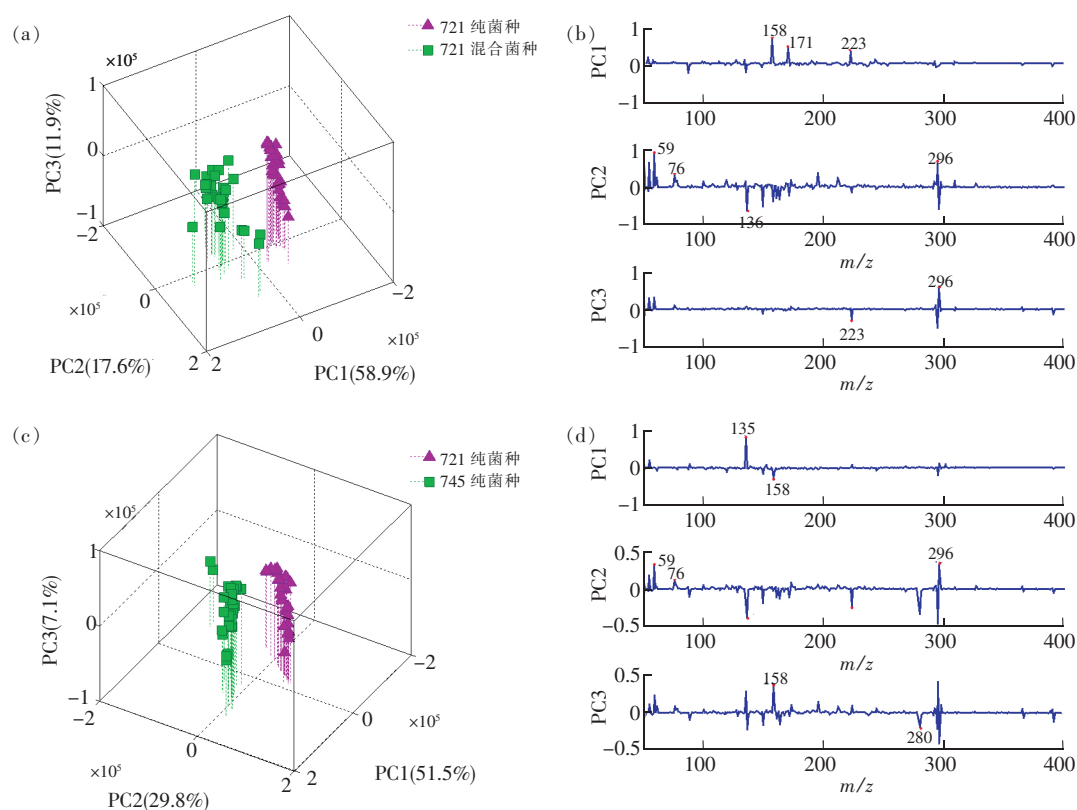


图 5 嗜酸性微生物样品的质谱数据 PCA 分析结果：(a) 721 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种与混合菌种 PCA 三维得分图；(b) 721 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种与混合菌种 3 个主成分上的 PCA 载荷图；(c) 721 矿和 745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种 PCA 三维得分图；(d) 721 矿和 745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种 3 个主成分上的 PCA 载荷图

Fig. 5 Mass spectrometric data of bacteria sample for principal component analysis (PCA) : (a) 721 Mine pure and impure At. f mass spectrometric data PCA score plot ; (b) 721 Mine pure and impure At. f mass spectrometric data PCA loading plot ; (c) 721 Mine pure and 745 Mine pure At. f mass spectrometric data PCA score plot ; (d) 721 Mine pure and 745 Mine pure At. f mass spectrometric data PCA loading plot

将正离子模式检测下的嗜酸性微生物的质谱数据 (已进行 PCA 分析) 导入 Matlab 软件的聚类分析程序中进行分析, 结果如图 6 所示。嗜酸性微生物样本为 120 个, 其中 721 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种、721 矿嗜酸性混合菌种、745 矿嗜酸性氧化亚铁硫杆菌纯菌种、745 矿嗜酸性混合菌种各 30 个。

分析结果表明, 721 矿纯菌种与 745 矿纯菌种样本具有一定的相似度, 说明在不同矿区中同一纯菌种代谢非常接近, 而 721 矿混合菌种代谢产物中包含了部分纯菌种代谢产物, 表明混合菌种中包含有嗜酸性氧化亚铁硫杆菌。721 矿混合菌种与 745 矿混合菌种差异较大, 说明不同矿区的混合菌种代谢具有较大的差异。从图 6 可见, A, B, C, D 分别自聚成一类, 反应不同嗜酸性微生物样品被区分开, 这与 PCA 的分析结果相印证。

4 结论

本研究采用常压化学电离技术, 在无需样品预处理的情况下, 直接快速分析不同矿区嗜酸性氧化亚铁硫杆菌代谢产物, 从而高通量地实现对微生物的快速识别鉴定。尤其是对于化能自养型微生物的快速识别能够实现对目标菌种的筛选及构建生物浸矿体系具有重要的指导作用, 有望在生物冶金中得到很好地应用。同时, 本方法具有操作简单、灵敏度高、重现性好、分析速度快等特点, 为微生物的快速识别和鉴定提供了一种可靠的途径。

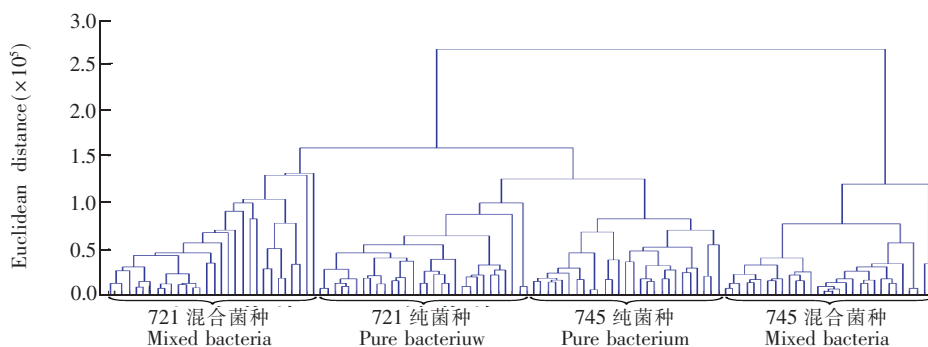


图6 嗜酸性微生物样品的质谱数据聚类分析结果

Fig.6 Cluster analysis of ambient corona discharge ionization mass spectra of bacterial samples

References

- XU Wei-Yun, LIU Ya-Jie, XU Ling-Ling, SUN Li-Min. *J. ECUT. Nat. Sci.*, **2009**, 32 (2): 147-151
徐蔚云, 刘亚洁, 徐玲玲, 孙丽敏. 东华理工大学学报: 自然科学版, **2009**, 32 (2): 147-151
- SHEN Jun-Jian. *Study on Screening and Culturing of Biometallurgical Microorganisms and Their Leaching Process in Low grade Tellurium Ore. Chengdu Univ. Technol.*, **2013**
沈俊剑. 低品位碲矿浸矿微生物选育及其浸出工艺研究. 成都理工大学, **2013**
- ZHOU Hong-Bo, MAO Feng, WANG Yu-Guang. *Bull. Mineral. , Petrol. Geochem.*, **2015**, 34 (2): 269-276
周洪波, 毛峰, 王玉光. 矿物岩石地球化学通报, **2015**, 34 (2): 269-276
- Kelly D, Wood A. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, **2000**, 50 (2): 511-516
- Colmer A, Hinkle M. *Science*, **1947**, 106 (2751): 253-256
- Temple K, Colmer A. *J. Bacteriol.*, **1951**, 62 (5): 605-611
- QIU Guan-Zhou. *Biohydrometallurgy*. Central South University Press, **2011**
邱冠周. 生物湿法冶金. 中南大学出版社, **2011**
- Acevedo F. *Electron. J. Biotechn.*, **2002**, 5 (2): 196-199
- Bosecker K. *Fems Microbiol. Rev.*, **1997**, 20 (3): 591-604
- YANG Xian-Wan, SHEN Qing-Feng, GUO Yu-Xia. *Microbial Hydrometallurgy*, Metallurgical Industry Press, **2003**
杨显万, 沈庆峰, 郭玉霞. 微生物湿法冶金. 冶金工业出版社, **2003**
- LIANG Hua-Zheng, ZHANG Xie, RAO Jun, CHEN Huan-Wen. *J. Chin. Biotechnol.*, **2008**, 28 (1): 124-133
梁华正, 张燮, 饶军, 陈焕文. 中国生物工程杂志, **2008**, 28 (1): 124-133
- Chingin K, Liang J, Chen H. *Rsc. Adv.*, **2014**, 4 (11): 5768-5781
- Liang J, Hang Y, Chingin K, Hu L, Chen H. *Rsc. Adv.*, **2014**, 4 (48): 25326-25329
- YANG Shui-Ping, HU Bin, LI Jian-Qian, HAN Jing, ZHANG Xie, CHEN Huan-Wen, LIU Qing, LIU Qing-Jun, ZHENG Jian. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2009**, 37 (5): 691-694
杨水平, 胡斌, 李建强, 韩京, 张燮, 陈焕文, 刘清, 刘清珺, 郑健. 分析化学, **2009**, 37 (5): 691-694
- CHEN Huan-Wen, LAI Jin-Hu, ZHOU Yu-Feng, HUAN Yan-Fu, LI Jian-Qian, ZHANG Xie, WANG Zhi-Chang, LUO Ming-Biao. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2007**, 35 (8): 1233-1240
陈焕文, 赖劲虎, 周瑜芬, 邹延富, 李建强, 张燮, 王志畅, 罗明标. 分析化学, **2007**, 35 (8): 1233-1240
- JIANG Guo-Fang, LE Zhang-Gao, XIE Zong-Bo. *Chinese J. Spectr. Lab.*, **2004**, 21 (4): 782-784
姜国芳, 乐长高, 谢宗波. 光谱实验室, **2004**, 21 (4): 782-784
- WEI Yi-Ping, YAN Fei-Yan, JIA Bin, DING Jian-Hua, PENG Jin-Hua, CHEN Huan-Wen, XUN Jian-Jun. *Chinese J. Exp. Surg.*, **2011**, 28 (3): 422-424
魏益平, 鄢飞燕, 贾滨, 丁健桦, 彭金华, 陈焕文, 徐建军. 中华实验外科杂志, **2011**, 28 (3): 422-424

- 18 WANG Jiang , LI Qian , GU Hai-Wei , GUO Xiao-Tun , YANG Shui-Ping , WANG Zhi-Hao. *Chem. J. Chinese Universities* , **2015** , 1 (6) : 1067–1073
王 姜 , 李 倩 , 顾海巍 , 郭晓墩 , 杨水平 , 王志豪. 高等学校化学学报 , **2015** , 1 (6) : 1067–1073
- 19 LUO Li-Ping , WANG Jiang , ZHANG Wen-Jun , DAI Xi-Mo , FANG Xiao-Wei , ZHANG Qian , LIU Ya-Li , CHEN Huan-Wen. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2013** , 41 (7) : 1050–1056
罗丽萍 , 王 姜 , 章文军 , 戴喜未 , 方小伟 , 张 茜 , 刘亚丽 , 陈焕文. 分析化学 , **2013** , 41 (7) : 1050–1056
- 20 ZHU Zhi-Qiang , YAN Jian-Ping , WANG Yu , CHEN Shun-Zong , CHEN Huan-Wen. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2013** , 41 (6) : 905–910
朱志强 , 闫建平 , 汪 雨 , 陈瞬宗 , 陈焕文. 分析化学 , **2013** , 41 (6) : 905–910

Rapid Analysis of Acidithiobacillus Ferrooxidans Metabolites by Ambient Corona Discharge Ionization Mass Spectrometry

LIANG Ju-Chao¹ , QU Yin¹ , YU Miao-Miao² , XU Ling-Ling² , LIU Ya-Jie² , SUN Zhan-Xue² , CHEN Huan-Wen^{* 1}

¹ (East China University of Technology , Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation , Nanchang 330013 , China)

² (East China University of Technology , State Key Laboratory Breeding Base of Nuclear Resources and Environment , Nanchang 330013 , China)

Abstract A method for rapid determination of acidithiobacillus ferrooxidans (At. f) metabolites by ambient corona discharge ionization mass spectrometry was established. Three injection modes were applied to study the effects such as headspace sampling , interface sampling and neutral desorption sampling. Under the optimized experimental conditions , the metabolites , such as small molecule esters and amines were detected by ambient corona discharge ionization mass spectrometry and confirmed using tandem mass spectrometry (MS/MS). Further principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) of the mass spectrometric results allowed a confident discrimination of different bacterial samples. Ambient corona discharge ionization mass spectrometry has the advantages of no sample pretreatment , convenient operation , high sensitivity and high analytical speed , which will be an attractive method to rapidly identification of microorganisms.

Keywords Acidithiobacillus ferrooxidans ; Ambient corona discharge ionization ; Metabolites ; Mass spectrometry

(Received 12 July 2016 ; accepted 2 September 2016)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81460327) , Program for Changjiang Scholars and Innovation Research Team in Universities (PCSIRT) (No. IRT13054) , Science and technology support program of Jiangxi Province (Nos. 20152ACB21013 , 20152ACG70014).