

细菌在土壤上吸附的研究

——以一株假单胞菌(*Pseudomonas Sp.*)为例

范成新

(中国科学院南京地理与湖泊研究所)

摘 要

本文以7种土壤作为吸附剂,用从土壤中分离并被 ^{32}P 放射性标记的纯假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)作为吸附质,研究细菌在土壤上的等温吸附。在所选择的实验条件下($\text{pH}=7$ 温度为 30°C),发现细菌在土壤上的吸附属于线性等温吸附: $N_s = K_n N_w$,并且还发现吸附常数 K_n 的大小与土壤中有机质含量呈正相关($r=0.992$)。

固体对气体的吸附规律研究较有成果,并有理论上的归纳,而固体在液体中的吸附较复杂,研究的尚不够。土壤是一类特殊的固体物质,对于研究它对某些有机化学物质、金属离子吸附方面,已见有不少报道。然而,对于体态微小的生物体在土壤上吸附的研究,这方面却进行的比较少。细菌是这类微小生物体的典型代表,它们的尺寸约为 $0.5-2.0\mu\text{m}$ 大小,接近于化学溶液中的胶体粒子和有机高分子,因此有人将细菌在溶液中的状态称为是“活”的胶体,并且设想它们吸附在颗粒物固体表面也是通过分子吸附那样进行的^[1]。为了探讨固体对细菌吸附的这一研究领域,人们借用各种固体吸附剂,选用不同表面来进行研究。MacRae和Evans^[2]以平皿计数法对细菌在磁铁石上的吸附进行了研究。结果发现,菌含量在 10^7 细胞/毫升或更少时,吸附符合Freundlich等温形式。Myerson和Kline^[3]为了研究 *Thiobacillus*(硫杆菌属)细菌在矿石上的吸附,他们以含有12.90%煤灰的细煤和多孔玻璃粒作为矿石模型,研究后认为,吸附是不可逆的二级动力学吸附。

土壤与一般的固体物质不同,它有极其复杂的性质,它们没有确定的物质组成,也没有规整的表面,在溶液中,它们的粒度可以达到非常之小,不仅比细菌尺寸小,甚至远小于胶体颗粒($0.2\mu\text{m}$)。因此由于土壤的组成和结构的复杂性,使得人们对它的研究较难进行。1984年,Ogram等人^[4]用一株 *Flavobacterium*(黄杆菌属)菌在4种不同土壤上进行了细菌吸附实验,认为吸附可用线性关系表达,即:

$$N_s = K_n N_w$$

式中: N_s : 单位土壤上细菌的吸附量(细胞/克); N_w : 溶液中细菌的平衡浓度(细胞/毫升);
 K_n : 细菌在土壤上的等温吸附常数(毫升/克)

另外还发现,在有机碳含量为零的蒙脱石上,细菌的吸附常数 K_n 为零。为何出现这些结果,Ogram等人未能给予充分说明。

土壤固相主要由粘土矿物、氧化物和腐殖质这三大组成部分组成,三者有着不同的化学结构和表面性质。在该研究中,这三部分对细菌吸附可能都有着贡献,但究竟哪部分影响更为重要却是值得研究的问题。阳离子交换量和有机质含量是土壤的两个主要性质,并且易于定量处理,因此本文在Ogram等人的研究基础上,着重研究土壤性质对细菌吸附影响,并将性质与土壤相近、有机质含量高于土壤的沉积物也一并进行研究,旨在得到细菌吸附与在不同量

值范围内的土壤有机质含量的关系。

为了使实验提高精度，我们采用了生物放射性技术作为细菌吸附的基本手段。一般认为细菌的分子结构简式为 $C_{60}H_{87}O_{23}N_{12}P$ ，其中磷占总重量的2.3%，因此它是细菌的必须营养元素。 ^{32}P 是磷的放射性同位素，最大能量为1.718MeV，半衰期为14.3天，适合实验室生物研究。当在缺磷或有少许磷的菌体培养液中加了 ^{32}P 后，菌体在摄入其它营养物质同时，将放射性磷也一同摄入体内，使菌体获得标记。

一、材料与方 法

(一)实验材料

1. 主要仪器

PIX-Ⅱ型生化恒温培养箱， $\pm 0.1^{\circ}C$ ；THZ-82型恒温振荡器， $\pm 1.0^{\circ}C$ ；LG20-2,4型离心机，最大离心加速度11000g，10000rpm；钟罩形盖革计数管及FH408自动定标器；高压蒸气灭菌锅；721型分光光度计。

2. 土壤

在选好的采集点上，随机采取距地表约10cm处土样(沉积物为距沉积物表层20cm)，挑去杂物，风干后过60目(250 μ m)筛，高压蒸气灭菌(15磅/寸，2小时)，干燥待用。其有关化学性质见表1。

3. 细菌

在南京江浦县实验农场采集点上取少量土壤，放入以2,4-D农药为唯一碳源的培养液中进行恒温30 $^{\circ}C$ 振荡驯化，然后分离纯化获得一株纯菌。据初步鉴定，该菌为一假单胞菌(*Pseudomonassp*)，其主要性质为：菌体外形为杆状、极生鞭毛；革兰氏染色阴性；氧化酶试验阳性；接触酶试验阳性；葡萄糖氧化发酵呈氧化产酸。该菌可从2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)为唯一碳源，在生长对数期，代时约为14.4小时。

(二)实验方法

1. 含 ^{32}P 菌体的培养和收集

为了适应菌体生长的特殊需要，我们选用的培养基组成和含量分别为：2,4-D钠盐1.0g/L； ^{32}P -磷酸钠(溶液)适量； K_2HPO_4 0.096g/L； KH_2PO_4 0.024g/L； NH_4NO_3 1.0g/L； $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g/L； $Ca(NO_3)_2$ 0.04g/L； $Fe_2(SO_4)_3$ 0.04g/L；NaCl3.0g/L，pH=7，在配好、灭菌的上述培养基中，加入少量已处于对数生长后期的纯菌体，30 $^{\circ}C$ 恒温振荡富集。当达该菌的对数期后期时，将菌液小心分装入离心管中，离心机离心(9000rpm)20分钟后，用pH7的磷酸缓冲液分散菌块，混匀器上混匀洗涤，再次离心如此重复数次，直至上清液的脉冲计数与普通缓冲液的脉冲计数相近为止。

2. 细菌吸附的振荡时间选择

取15-18只具塞试管，分成5-6组，每组3只。第一组不加土壤作为空白，其余组每组中有2只加1.000g土，剩下1只作对照，所有试管均加入相同体积的缓冲液(pH7)和放射性菌

表 1 供试土壤的基本性质

采集地点	pH	阳离子 代换量 Cmol/kg	有机质 含 量 (gkg ⁻¹)
南京北阴阳营	6.85	15.0	5.75
北京清华园	7.11	15.8	10.4
江浦县实验农场	6.86	22.5	20.6
常州龚家村	7.41	19.5	21.3
南京中山陵	6.80	8.06	25.6
南京玄武湖东南湖心	7.73	—	50.3
南京玄武湖西北湖心	8.01	13.0	70.0

液。30℃、140rpm 下间隔一定时间取出一组，并垂直放置于 30℃ 恒温箱中，待澄清 4-10 小时后用注射器抽取上清液 0.5ml 于计数盘中，红外灯下烘干后，依次放入钟罩形盖革计数器内，用自动定标器记录 ^{32}P 在一定时间内的放射脉冲次数，平行 2-3 份，扣除本底值后取平均，即获得以每毫升脉冲记数表示的 N_w ，和以每克土壤上脉冲记数表示的 N_s 。

将 7 种土壤(沉积物)所做的吸附量 N_s 与时间关系曲线比较后看出，南京北阴阳营采集的土壤吸附达平衡最快(5 分钟)，最慢的是南京玄武湖西北湖心的沉积物，约需 40 分钟达平衡，其它五种吸附剂所需的平衡时间在 8-30 分钟之间，图 1 列出 3 种典型吸附剂其 K_n 与振荡时间的关系曲线。其达等温吸附平衡时间作为下面吸附实验的参考。

3. 细菌吸附实验

先将收集到的放射性菌液小心调整到 3 分钟内每毫升有 16000 以上的脉冲计数。取 18 只小试管，3 只一组分成 6 组，每组中 2 只加 1.000 克土壤，另 1 只不加，做空白对照。然后加不同体积的放射性菌悬液于不同组，使各组的放射性强度上呈现差别。塞紧试管盖，横放入振荡器内，恒温 30℃、140rpm 下，根据情况连续振荡 20—60 分钟后，一并取出。其后操作与上面实验的步骤相同。

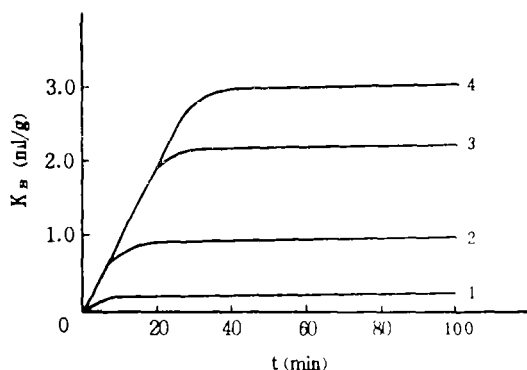


图1 细菌吸附与振荡时间关系曲线(30°)

1—南京北阴阳营土壤； 2—江浦县实验农场土；
3—南京玄武湖东南湖心沉积物；
4—南京玄武湖西北湖心沉积物

二、结果与讨论

(一)菌体在土壤上的吸附类型

表 2 是细菌在几种土壤和沉积物上于 30℃ pH = 7 的条件下所得到的吸附数据。当将它们的吸附量 N_s 与平衡浓度 N_w 分别按线性回归分析后，发现有显著相关($r = 0.984 - 0.998$)。图 2 为它们的吸附等温线，可见菌体在该实验条件下可用线性关系($N_s = K_n N_w$) 定量描述，即与 Ogram 等人^[4]所做的土壤吸附表达式相一致。

对于等温吸附，常见有二种形式。一种是 Langmuir 等温吸附，一种是 Freundlich 等温吸附。前者是应用单分子层吸附理论推导而得到的吸附式，理论中运用较多；后者为从实验中得到的经验公式，即 $Q = KC^1/n$ ，该式在实际中运用较广。式中 k 和 n 都是在一定范围内表示吸附过程的经验系数， Q 为吸附量， C 为吸附质的平衡浓度。该公式的应用范围限于中等浓度情况，对于低浓度和高浓度可能产生较大误差。在低浓度区，浓度对吸附量 Q 影响最大，二者几乎呈直线比例关系。本文实验中，由于较高浓度的 ^{32}P 细菌富集有困难，可能未达到细菌吸附过程的中浓度区(约在 $10^7 \text{ cells. ml}^{-1}$ 数量级)，使 $Q = KC^1/n$ 中的 $n \approx 1$ ，等温线呈线性关系。图 2 中的曲线应看成 Freundlich 吸附等温式的特殊形式。

(二)吸附常数 K_n 与土壤有机质含量的关系

阳离子代换量(CEC)和有机质含量是土壤的两个主要参数，在研究土壤物质吸附中，人们已发现它们有着较重要的影响。我们将本文中所得到的吸附常数 K_n 与 CEC 和有机质含量比

表 2

细菌在土壤上的吸附数据(30°C)

土样 代号	土壤采集点	阳离子 代换量 Cmol/kg	有机质 含量 gkg ⁻¹	菌 含量	实 验 数 据 组						K _B ml/g	相关 系数 r
					1	2	3	4	5	9		
1	南京北 阴阳营	15.0	5.75	Nw	5270	10274	16584	21214	27338	32794	0.183	0.984
				Ns	870	1550	2670	3120	4350	6160		
2	北京清华园	15.8	10.4	Nw	4904	7404	11948	14972	18078	—	0.253	0.997
				Ns	1640	2160	3560	4090	4952	—		
3	江浦县实 验农场	22.5	20.6	Nw	1427	2686	4092	5135	6098	7700	0.908	0.998
				Ns	1216	2165	3743	4651	5526	6768		
4	常州龚家村	19.5	21.3	Nw	1941	4092	6056	7378	9338	11844	1.067	0.985
				Ns	2121	4288	7088	6528	10272	12736		
5	南京中山陵	8.06	25.6	Nw	2308	4480	7354	9192	12108	14620	1.352	0.992
				Ns	2460	5480	7560	12290	15140	19100		
9	南京玄武湖 东南湖心	—	50.3	Nw	1945	3556	4947	8841	10364	—	2.276	0.998
				Ns	4996	8640	11028	21108	23700	—		
7	南京玄武湖 西北湖心	13.0	70.0	Nw	1678	5338	6328	9472	11044	—	3.089	0.990
				Ns	5600	21068	22328	29744	36000	—		

较时发现：土壤有机质含量与细菌线性吸附常数 K_B 呈正相关，见图3。线性回归的相关系数 $r = 0.992 > (r_{0.01, 5} = 0.874)$ ，表明二者相关水平极为显著；相反CEC与 K_B 则无对应关系。该结果说明，土壤有机质含量高，吸附常数 K_B 就大，吸附的菌体就可能多；含量低， K_B 就小，吸附的菌体就可能少。当有机质含量为零时， K_B 应为零，对菌体不产生吸附^[4]。

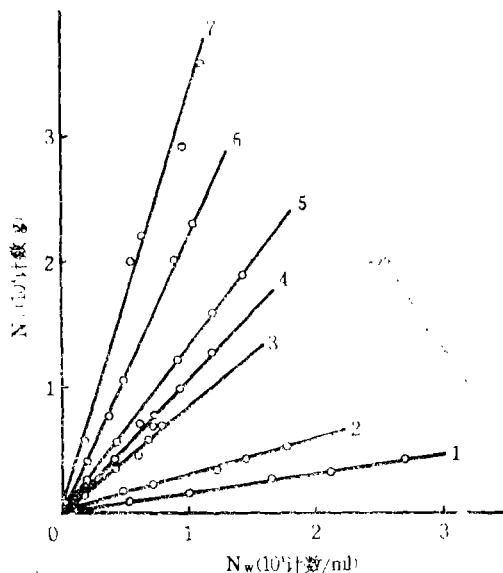
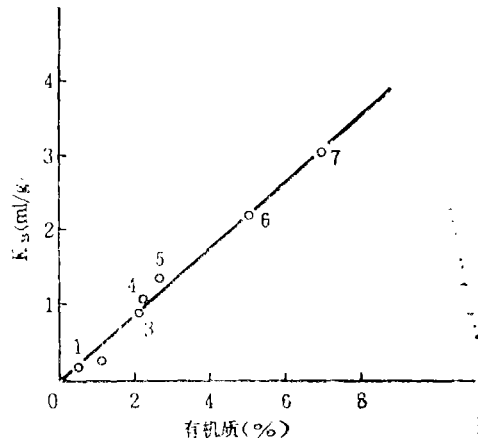


图2 土壤的吸附等温线

土壤采集点：1—南京北阴阳营；2—北京清华园，3—江浦县实验农场；4—常州龚家村；5—南京中山陵；6—南京玄武湖东南湖心；7—南京玄武湖西北湖心；

图3 土壤有机质含量与细菌线性吸附常数 K_B 的关系曲线(土壤代号见图2)

土壤粒子的表面大致可分为硅氧烷型、水合氧化物型和有机物表面型等三种类型。但是实际碰到的土壤极少见到属于单独一种类型，而是三种类型混合类，它们交错混杂相互影响地交织在一起^[5]。通常其中的有机

物表面型所占的比例较少,约1—40%。它为何能在细菌吸附中成为主要因素,需从物理、化学和生物的微观角度来加以分析。

首先,表面吸附是一种物理吸附,这种作用的发生是颗粒或胶体具有巨大的比表面和表面能所致。目前已知的硅氧烷型比表面积和水合氧化物型比表面积都不大,如较大的水化埃洛石约为430平方米/克,氧化铁(Fe_2O_3)约为170平方米/克,而腐殖质的比表面大部分在350—900平方米/克之间。如此巨大的比表面使得腐殖质(胡敏素、富里酸、胡敏酸等)表面有着明显的蜂窝状特征^[5],聚积着巨大的表面吸附能,为物质吸附提供有利的条件。

第二,微生物细胞表面的特性在土壤吸附中也起着重要作用。细菌的表面层为一列同心圆层。主要表面层包括:(1)离子层;(2)荚膜和微荚膜;(3)吸附粘液和树胶;胶合和细胞结集层;(4)细胞壁和外套的组分;(5)细胞质膜。细菌表面的最外层是离子层,它具有表面各组分中电荷物质提供的静电荷。带电性质可以由电泳法来测定,可能带正电也可能带负电,与介质有关。表面层的其它物质则主要是有机化合物组成。如细胞壁的主要成份肽聚糖,是由N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰胞壁酸以及由4-5个氨基酸组成的短肽,聚合而成的多层网状大分子有机化合物。土壤中的有机质也是由一系列有机化合物组成的。其中腐殖物质占有较大的比例(85%左右),分子量最大的为胡敏酸,约100,000,属于有机大分子。富里酸、胡敏素和吉马多美朗酸等分子量都在几百以上。它们的表面有许多基团,如羧基($-\text{COOH}$)、羟基($-\text{OH}$)、苯醌基($=\text{O}$)、醛基($-\text{CHO}$)、氨基($-\text{NH}_2$)和甲氧基($-\text{OCH}_3$)等活性基团,因此有着大量的负电荷,其阳离子代换量约在200—500Cmol/kg。细菌表面的有机大分子与腐殖质中的有机分子因同属有机结构,故本质上具有一定的亲和性,使它们彼此有接近对方的倾向。另一方面,分子的表面电荷性质不一定使它们难以接近。若果菌体外表带有正电荷,那将促进它们相互吸附,并可能成为一种选择性吸附。

此外,细菌不仅只作为一普通微粒看待,还应注意它首先是活的生物体。土壤中绝大多数细菌都不具备有叶绿素,不能象绿色植物那样进行光合作用,而需要靠土壤中的有机质来生活。一些腐殖质作为微生物活动的产物,一般较不易为微生物分解,但仍然有不少腐殖质可被其代谢。如碳水化合物、脂肪、蛋白质、单宁质和木质素等。即使有些大分子物质主体不易被分解,但其上的支链或官能团却能被降解。如本文实验中所用的菌可去羧基($-\text{COOH}$),而一般认为羧基占土壤腐殖质官能团的50%。因此,出于生物体本身的生长、繁殖需要,将迫使它们接近或接触或吸附含有机质的表面,成为一种可能弱又可能强的选择性吸附。

由上面讨论可以看出,细菌在土壤上的吸附可能会受到物理、化学和生物三方面的因素影响。某方占据主要,吸附就可能呈现出某种形式。MacRae和 Evans^[2]采用磁铁作为吸附剂,因磁石有比较简单的物理性质和比较规整的表面,使细菌的表面物理吸附占据主要,所得结果符合Freundlich等温吸附式。本文采用了土壤作为吸附剂,使物理、化学和生物因素都对吸附产生影响,得到一线性等温吸附关系。因此吸附剂性质可能是该研究体系的决定性因素。由于土壤性质复杂,许多地方还不清楚。但是随着土壤学发展,加深对土壤性质、特别是土壤有机质和胶体粒子的研究,可能会推动该研究领域的不断深入。

三、小 结

细菌在土壤上的吸附可以用一简单的线性吸附等温式 $N_s = K_n N_w$ 来表示,它可看成低浓度下Freundlich等温吸附式 $Q = KC^1/n$ 的线性部分($n \approx 1$)。吸附常数 K_n 与土壤的阳离子代

换量没有明显关系,而与有机质含量有着极显著的正相关($r=0.992$),该结果验证了Ogram等人用有机质含量为零的蒙脱石所做的细菌吸附 K_d 为零的结果。

由本文可看出,细菌作为一种吸附质,在溶液中和土壤表面上都可表现出一般微粒的物理和化学特性。但另一方面,细菌又是一种活体,为了生存,它必须表现其生物特性。土壤中有机的存在,可能使它生物特性得到显示。一方面它受土壤的表面电性和化学物质作用,另外它本身还需要有机物质作为自己的骨架和营养物。土壤中的有机质在细菌的吸附过程中起了重要的作用,其原因是:(1)有机质中的部分物质因有巨大的比表面而使表面呈蜂窝状,积聚较高的表面能;(2)腐殖质表面的众多活性基团可能在细菌吸附中起到促进作用,菌体表面的有机大分子与有机质分子间固有的亲和性则促使双方表面接近;(3)部分有机质是细菌可资利用的物质,因此有可能吸引菌体接近表面。有机质在细菌吸附中的实际作用,有待人们作进一步深入研究。

考 参 文 献

- [1] Marshall, K.C., Adv. Colloid Interface Sci. 25:59-86, 1986.
- [2] MacRae, I.C., Evans, S.K., Water Res., 17:271-277, 1983.
- [3] Myerson, A.S., Kline, P., Biotechnol. Bioeng. 25:1669-1676, 1983.
- [4] Ogram, A.V., Jessup, R.E., Ou, L.T., Rao, P.S.C., Appl. Environ. Microbiol. 49:582-587, 1985.
- [5] 于天仁主编,土壤化学原理,155—156页,科学出版社,1987.

研究通讯

热带亚热带土壤氧化还原状况的特征*

丁昌璞 保学明 潘淑贞 吴又光

(中国科学院南京土壤研究所)

本工作应用电化学方法在田间原位测定了热带砖红壤和砖红壤性黄壤以及亚热带赤红壤、红壤和黄壤的氧化还原电位(E_h)、还原性物质、亚铁和二价硫的数量,试图以大量野外原位测定结果作基础,概括氧化还原状况的特征,并讨论它与物质转化和土壤发生的关系。测定结果表明:

一、土壤的氧化还原状况存在明显的空间分异,主要表现在:1.地形部位不同,土壤的氧化还原状况有别。例如丘陵顶部自然林下土壤、中部农用旱地和底部水稻土表层的 E_h 分别为510, 640和180毫伏、还原性物质浓度分别相当于 $1.30 \cdot 10^{-5}$, $0.12 \cdot 10^{-5}$ 和 $1.88 \cdot 10^{-5}$ mol/L亚锰。2.土壤的氧化还原状况随植物群落的垂直演替而异。例如广东鼎湖山高 处季 风常绿阔叶林下土壤表层的 E_h 值<中部针阔叶混交林下土壤<下部马尾松林下土壤,还原性物质浓度的顺序则相反。3.土壤的氧化还原状况随地带性及土壤利用而异。例如自然林下砖红壤、砖红壤性黄壤、赤红壤红壤和黄壤表层的 E_h 为400-540毫伏、还原性物质浓度为

(下转第45页)

*本工作得到国家自然科学基金和国际科学基金(IFS)资助。