doi:10.3969/j.issn.1007-7545.2022.08.012

电场作用对氧化亚铁硫杆菌培养的影响

刘泓伟[1],王学刚[1,2],龙杰[1],高瑛瑛[1],万子聪[1],刘超[1,2]

(1.东华理工大学 水资源与环境工程学院,南昌 330013;
2.东华理工大学核资源与环境国家重点实验室,南昌 330013)

摘要:采用单室生物电反应器研究了直流电对氧化亚铁硫杆菌生长的影响。外加电流为10 mA条件下,氧化亚铁硫杆菌的亚铁氧化速率提高了33.15%。研究表明,适当的电流刺激可以使细菌细胞活性和生长速率更加稳定。电场作用下细菌细胞形态分析结果表明,适当的电流刺激能使细胞产生更高的跨膜电位,改变细胞膜的通透性,将更多的Fe^{2+}泵入内膜,促进氧化亚铁硫杆菌的生长和繁殖。

关键词:电场;生物电反应器;氧化亚铁硫杆菌

中图分类号:X703 **文献标志码**:A **文章编号**:1007-7545(2022)08-0076-06

Effect of Electric Field on Culture of *Acidithiobacillus Ferrooxidans*

LIU Hong-wei[1], WANG Xue-gang[1,2], LONG Jie[1], GAO Ying-ying[1], WAN Zi-cong[1], LIU Chao[1,2]

(1. School of Water Resources and Environmental Engineering, East China University of Technology, Nanchang 330013, China;
2. State Key Laboratory of Nuclear Resources and Environment, East China University of Technology, Nanchang 330013, China)

Abstract: The single-chamber bioelectric reactor was used to study effect of direct current on growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*). The experimental results show that when current intensity is 10 mA, the ferrous oxidation rate of *A. ferrooxidans* rises by 33.15%, and appropriate current stimulation can maintain the activity and growth rate of bacterial cells more stable. The results of morphological analysis of bacterial cells under the action of electric field shows that appropriate current stimulation can make cells generate higher transmembrane potential, change the permeability of cell membrane, pump more Fe^{2+} into the inner membrane, and promote *A. ferrooxidans* growth and reproduction.

Key words: electric field; bioelectric reactor; *A. ferrooxidans*

嗜酸性氧化亚铁硫杆菌(*A. ferrooxidans*)是生物冶金工业中最有价值的菌株之一[1],但其在生物堆浸工业应用中存在矿堆内细菌活性不强、生长繁殖速率低等不足,从而大大影响了生物浸出反应速率。近年来,在利用生物电反应器(Bioelectric Reactor,BER)强化细菌细胞活性和生长繁殖速度方面,国内外学者开展了相关研究[2-6]。NAKASONO等[7]研究了双室BER中控制电位电势强化*A. ferrooxidans*的生长,结果表明,电极电化学反应产生的Fe^{2+}或者将浸出体系中的Fe^{3+}还

收稿日期:2022-04-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(52064001);江西省自然科学基金资助项目(20202BABL203022)

作者简介:刘泓伟(1998-),男,硕士研究生;**通信作者**:王学刚(1979-),男,博士,教授

原为 Fe^{2+} 为 *A. ferrooxidans* 生长提供了能源物质,从而增加细菌的生物量。LI 等[8]研究了单室 BER 中电流对 *A. ferrooxidans* 生长特性的影响,发现在 30 mA 的电流条件下,84 h 内细菌细胞浓度能达到 1.39×10^9 cell/mL,较未加电流的常规培养的细菌密度提高了 10 倍。

在上述研究的基础上,本文进一步探讨电流条件对提高 *A. ferrooxidans* 活性和 Fe^{2+} 氧化率的影响规律,分析电场作用下 *A. ferrooxidans* 细胞形态变化和强化机理,为电场强化 *A. ferrooxidans* 培养提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

试验菌种来自南方某铀矿山富集分离、选育获得的 *A. ferrooxidan*,细菌培养 9K 培养基成分如下。A 液:3.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$、0.1 g/L KCl、0.5 g/L K_2HPO_4、0.01 g/L $Ca(NO_3)_2$;B 液:5 g/L $FeSO_4\cdot7H_2O$。A 液进行 121 ℃、20 min 高压灭菌,B 液采用 0.22 μm 滤膜过滤灭菌。

1.2 试验方法

试验在 6 个相同的 BER 反应装置(长 10 cm、宽 5 cm、高 20 cm)中进行,有效容积为 1 000 mL,每个反应装置中间放置 1 个曝气器,两端插入两个石墨电极(130 mm×95 mm×2 mm),电极连接直流电源,如图 1 所示。采用水浴加热控制温度为恒温 30 ℃,R_0 中加入 50 mL 菌液和 450 mL 9K 培养液,

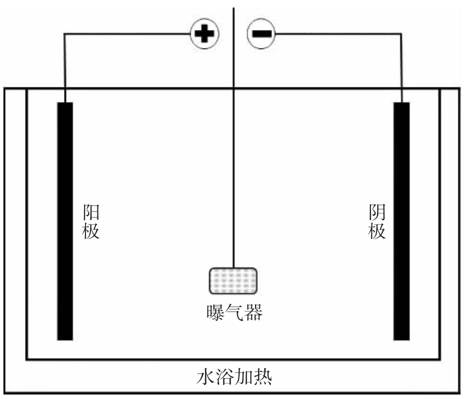

图 1 试验装置图

Fig. 1 Experimental setup

采用未加电流常规方式培养;R_5、R_{10}、R_{20}、R_{30}、R_{50} 中各加入 50 mL 菌液和 450 mL 9K 培养液,分别通入 5、10、20、30、50 mA 的恒定电流进行培养。试验均在通风橱中进行(每次试验前都需对通风橱进行酒精灭菌处理)。

1.3 分析方法

pH、*Eh* 分别采用 pH 计(ST3100)、*Eh* 计(ST3100)进行测量,Fe^{2+}、Fe^{2+}浓度采用 EDTA 络合滴定法测定,细菌数量采用极限稀释法(MPN)测定,细胞形态采用透射电子显微镜(TEM)(HT7700)分析。

2 结果与讨论

2.1 电流对细菌培养 *Eh* 和 Fe^{2+} 氧化率的影响

从图 2 可以看出,在外加电流为 10 mA 条件下,培养时间 30 h 时 *A. ferrooxidans* 的 Fe^{2+} 氧化率达 97.36%,而常规培养(未加电流)的 *A. ferrooxidans* 的 Fe^{2+} 氧化率为 64.00%。常规培养 42 h 时细菌 Fe^{2+} 氧化率达到 90%,较 10 mA 电流条件培养时间延迟了 12 h,主要原因是,在 10 mA电流作用下阳极反应产生氧气,促进了 *A. ferrooxidans* 的生长,同时阴极反应将培养基中的 Fe^{3+} 转换为 Fe^{2+} 给细菌的生长提供了更多的能源物质[9],反应式如式(1)~(2)所示。

$$\text{阳极}:2H_2O\rightarrow O_2+4H^++4e \quad (1)$$

$$\text{阴极}:Fe^{3+}+e\rightarrow Fe^{2+} \quad (2)$$

当电流为 30 mA 时,细菌生长速率有明显的下降;在电流达到 50 mA 时,细菌基本不生长,其主要原因是,电场强度过大时,会增加细菌表面疏水力及表面电荷,水解过程生成 ·OH 和 H_2O_2 等中间产物,抑制细菌的生长繁殖[10-11]。

通过电刺激驯化微生物提升微生物代谢活性、改善微生物群落结构在污水处理领域被广泛应用[12]。*A. ferrooxidans* 经过 5 代驯化培养,在 20 mA电流条件下的细菌活性和 Fe^{2+} 氧化率优于常规培养(而在第一代时低于常规培养),表明通过电场驯化培养,细菌对电极反应副作用的耐受力得到提升;而在 10 mA 电流条件下一直保持较高的细菌活性和 Fe^{2+} 氧化率,说明适当的电流刺激能够使细菌细胞活性和生长速率更加的稳定[13]。

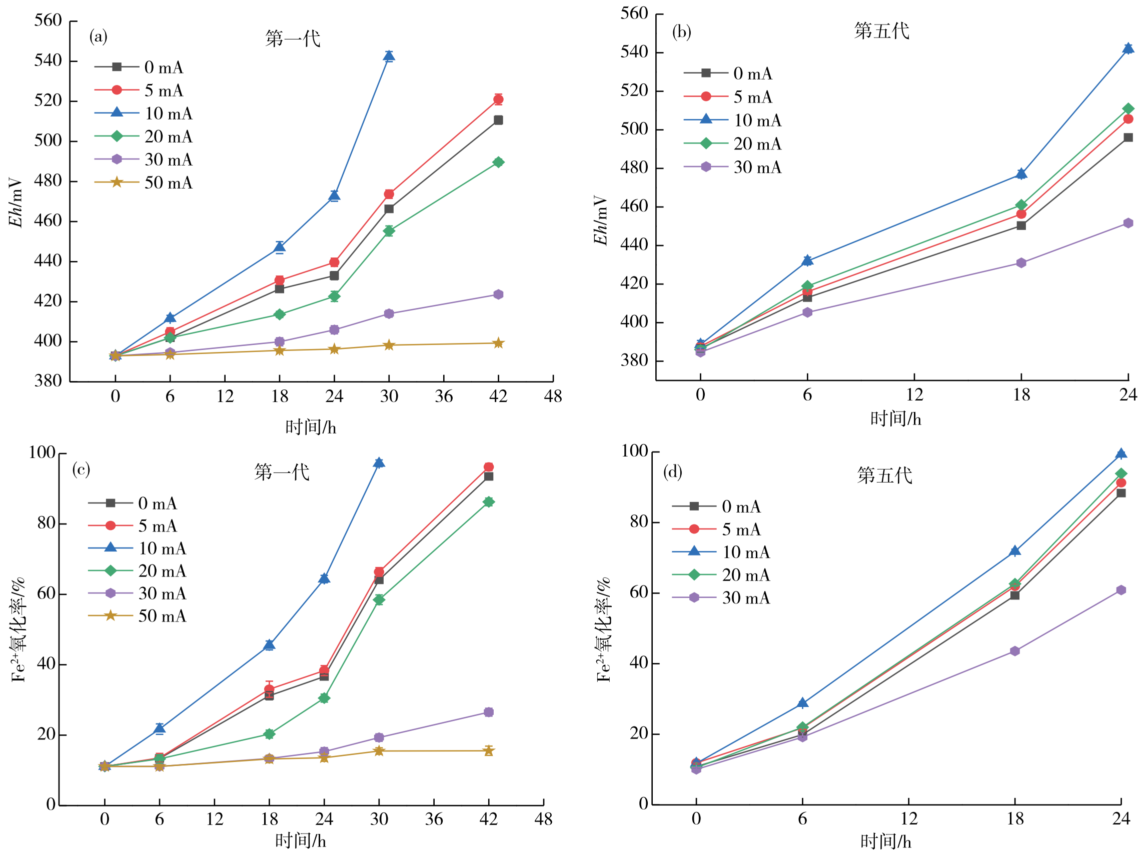

图 2　电流对细菌培养 *Eh* 和 Fe^{2+} 氧化率的影响

Fig. 2　Effects of electric current on *Eh* and oxidation rate of Fe^{2+} in bacterial culture

2.2　电流对细菌培养 pH 的影响

溶液 pH 是反应细菌生长情况的一个重要参数，它通过改变细菌细胞中的蛋白质、核酸等所带的电荷，影响其生物活性；还可以通过改变细胞膜电荷来改变微生物细胞吸收营养物质能力，从而影响生物的生长速率[14]。不同电流对细菌培养 pH 的影响如图 3 所示。从图 3 可以看出，在相同的初始 pH 条件下，10 mA 电流条件下的细菌培养的 pH 增长最快，表明在此培养条件下 *A. ferrooxidans* 的生长和 Fe^{2+} 氧化速率最快，其主要原因是，在 *A. ferrooxidans* 在培养过程中的主要反应应为 Fe^{2+} 的氧化，同时消耗培养体系中的 H^+ 浓度，导致溶液 pH 增高，反应方程如式(3)所示。

$$4Fe^{2+}+4H^{+}+O_2 \xrightarrow{A.\ ferrooxidans} 4Fe^{3+}+2H_2O \tag{3}$$

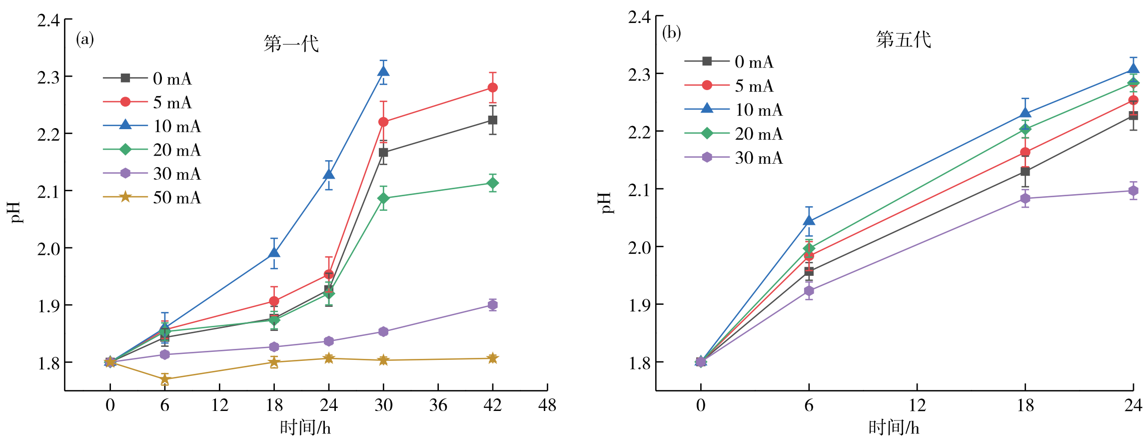

图 3　电流对细菌培养 pH 的影响

Fig. 3 Effects of electric current on pH value of bacterial culture

2.3　电场作用下初始 pH 对细菌培养的影响

电流为 10 mA 的条件下，初始 pH 对细菌培养的 *Eh* 和 Fe^{2+} 氧化率的影响如图 4 所示。从图 4 可以看出，在外加 10 mA 的电流条件下，初始 pH 在 1.8～2.0 时，*A. ferrooxidans* 的 Fe^{2+} 氧化率和溶液 *Eh* 均达到最高，表明在电流 10 mA、初始 pH 为 1.8～2.0 的条件下，适宜 *A. ferrooxidans* 的生长繁殖。过高或过低均不利于细菌的生长繁殖[15-16]。

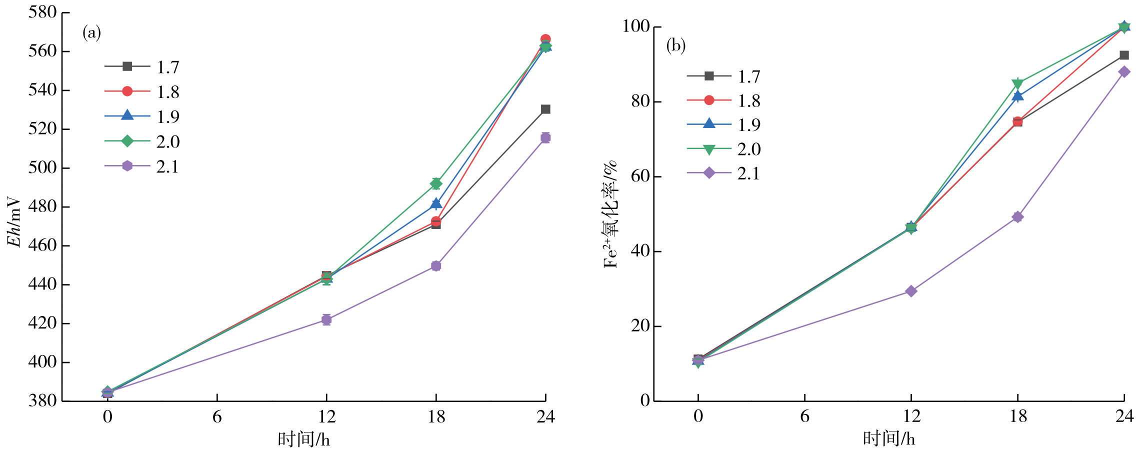

图 4　初始 pH 对电场作用下细菌培养的影响

Fig. 4　Effects of initial pH value on bacterial culture under electric field

2.4　电场作用下细菌形态变化和机理分析

常规培养和外加电场条件下 *A. ferrooxidans* 的 TEM 照片如图 5 所示。从图 5 可以看出，外加电场条件与常规细菌培养相比，在 10 mA 电流下 *A. ferrooxidans* 细胞膜更厚、更透明，表明细菌对额外电压有响应。细胞形态(细胞膜通透性)的变化导致细胞膜表面电荷分布、运动发生变化，使 Fe^{2+} 进入内膜的时间更快，被氧化的速度更快，从而提高了细菌细胞的生长速率。采用 MPN(Most Probable Number)方法测得常规和加 10 mA 电流 24 h 后的细菌细胞浓度分别为 2.4×10^{8}、2.4×10^{9} cells/mL，证实了 10 mA的电流能增强 *A. ferrooxidans* 的细菌活性和生长速率。

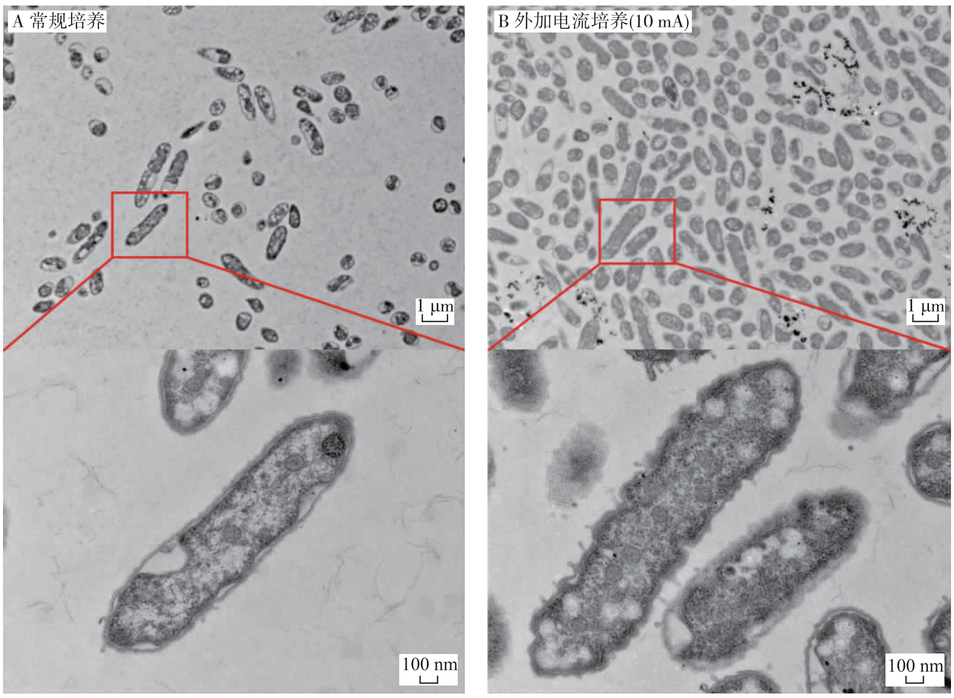

图 5　常规培养和外加电流条件下 *A. ferrooxidans* 的 TEM 照片

Fig. 5　TEM images of *A. ferrooxidans* under conventional culture and applied electric field

A. ferrooxidans 在两个磷脂双层膜(外膜和更薄的细胞质膜)之间夹有一层 1～2 nm 厚的肽聚糖层,构成 *A. ferrooxidans* 的细胞壁[17]。细菌细胞表面带电是因为基团的存在:如羧基(—COOH)、氨基(—NH_2)和羟基(—OH)的存在,这些都是来自细胞壁的成分(脂多糖、脂蛋白和细菌表面蛋白)[18-19],*A. ferrooxidans* 在膜内外维持约 80 mV 的静息电位,形成势垒,离子出入膜必须穿过这层势垒[20]。当 10 mA 电场作用于细胞时,会产生更高的跨膜电位,改变细胞膜的通透,更容易将 Fe^{2+} 泵入内膜。而 Fe^{2+} 不仅能作为 *A. ferrooxidans* 的能源物质,还能够促进 *A. ferrooxidans* 胞外电子传递过程[21]。

3 结论

1) 在单室 BER 中 10 mA 电流对 *A. ferrooxidans* 有明显的强化效果,电流过大会抑制细菌的增长,当电流达到 50 mA 时细菌细胞停止生长。单室 BER 构造简单,对细菌的强化效果明显,有利于其实际应用。

2)电场作用可以提高细菌细胞的跨膜电位,改变细胞膜的通透性,增大其细胞壁的厚度,使细胞能够吸收更多的 Fe^{2+},加快电子传递过程,从而增强 *A. ferrooxidans* 活性和生长繁殖。

参考文献

[1] 徐玲玲,杨洪英,周义朋,等.浸铀微生物及其应用[J].有色金属(冶炼部分),2020(4):93-101.
XU L L, YANG H Y, ZHOU Y P, et al. Uranium-leaching microorganisms and their applications [J]. Nonferrous Metals(Extractive Metallurgy),2020(4):93-101.

[2] DOMINGUEZ-BENETTON X, VARIA J C, POZO G, et al. Metal recovery by microbial electro-metallurgy[J]. Progress in Materials Science, 2018, 94:435-461.

[3] THRASH J C, VAN TRUMP J I, WEBER K A, et al. Electrochemical stimulation of microbial perchlorate reduction[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(5):1740-1746.

[4] NANCHARAIAH Y V, MOHAN S V, LENS P N L. Biological and bioelectrochemical recovery of critical and scarce metals[J]. Trends in Biotechnology, 2016, 34(2):137-155.

[5] WU P, ZHANG L J, LIN C B, et al. Extracting heavy metals from electroplating sludge by acid and bioelectrical leaching using *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. Hydrometallurgy, 2020, 191:105225. DOI:10.1016/j.hydromet.2019.105225.

[6] WEI X C, LIU D F, HUANG W L, et al. Simultaneously enhanced Cu bioleaching from E-wastes and recovered Cu ions by direct current electric field in a bioelectrical reactor [J]. Bioresource Technology, 2019, 298: 122566. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122566.

[7] NAKASONO S, MATSUMOTO N, SAIKI H. Electrochemical cultivation of *Thiobacillus ferrooxidans* by potential control [J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1997, 43(1):61-66.

[8] LI X, LIU Y G, ZENG G M, et al. Direct current stimulation of *Thiobacillus ferrooxidans* bacterial metabolism in a bioelectrical reactor without cation-specific membrane[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(15):6035-6038.

[9] 宋波,佘鹏,刘铮.微生物电解刺激技术及其在生物化工和环境生物技术中的应用[J].化工进展,2006,25(1):39-42.
SONG B, SHE P, LIU Z. Electrolytic stimulation of microbial cells and its application to biochemical engineering and environmental biotechnology [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2006, 25(1):39-42.

[10] NATARAJAN K A. Bioleaching of sulphides under applied potentials[J]. Hydrometallurgy, 1992, 29(1/2/3):161-172.

[11] 佘鹏,宋波,邢新会,等.细菌 *Enterobacter dissolvens* 的直流电解刺激过程[J].过程工程学报,2006,6(1):71-76.
SHE P, SONG B, XING X H, et al. Electrolytic stimulation of *Enterobacter dissolvens* cultivated in glucose medium[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2006, 6(1):71-76.

[12] 成文虎.电刺激驯化好氧污泥强化处理含苯酚废水研究[D].乌鲁木齐:新疆大学,2021.
CHEN W H. Electrical stimulation on aerobic sludge acclimation for treatment of phenol-containing wastewater[D]. Urumqi:Xinjiang University, 2021.

[13] 宋波.细菌 *Enterobacter dissolvens* 的电解刺激连续培养过程研究[J].工业微生物,2009,39(6):30-33.
SONG B. Electrolytic stimulating continuous culture of *Enterobacter dissolvens* [J]. Industrial Microbiology, 2009, 39(6):30-33.

[14] 温建康,姚国成,陈勃伟,等.溶液 pH 值对浸矿微生物活性及浸出速率的影响研究[J].稀有金属,2009,33(1):80-83.

WEN J K,YAO G C,CHEN B W,et al. Effect of pH on activities of mineral-bioleaching microorganisms and bioleaching rate[J]. Chinese Journal of Rare Metals, 2009,33(1):80-83.

[15] KUMAR R N, NAGENDRAN R. Influence of initial pH on bioleaching of heavy metals from contaminated soil employing indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. Chemosphere,2007,66(9):1775-1781.

[16] 马鹏程,杨洪英,王路平,等. pH 对黄铜矿细菌浸铜的影响[J]. 有色金属(冶炼部分),2015(3):1-4.
MA P C,YANG H Y,WANG L P,et al. Effect of pH value on bioleaching of chalcopyrite[J]. Nonferrous Metals(Extractive Metallurgy),2015(3):1-4.

[17] WANG J,TAO L,ZHAO H B,et al. Cooperative effect of chalcopyrite and bornite interactions during bioleaching by mixed moderately thermophilic culture[J]. Minerals Engineering,2016,95:116-123.

[18] LI H X, QIU G Z, HU Y H, et al. Electrochemical behavior of chalcopyrite in presence of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China,2006,16(5):1240-1245.

[19] QUATRINI R, APPIA-AYME C, DENIS Y, et al. Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme *Acidophile Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 394. DOI: 10. 1186/1471-2164-10-394.

[20] THRASH J C,COATES J D. Review:Direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism[J]. Environmental Science & Technology,2008,42(11):3921-3931.

[21] 梁方圆,吴冉冉,曹昌丽,等. 氧化亚铁硫杆菌的胞外电子传递研究[J]. 高等学校化学学报,2014,35(2):372-376.
LIANG F Y, WU R R, CAO C L, et al. Research on extracellular electron transfer of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2014,35(2):372-376.