2019 年 3 月 March 2019

DOI: 10.19476/j.ysxb.1004.0609.2019.03.21

Leptospirillum ferriphilum 耐砷能力的 驯化及驯化机制



郑兴福¹, 聂珍媛¹, 夏金兰¹, 刘李柱¹, 杨洪英²

(1. 中南大学 资源加工与生物工程学院,教育部生物冶金重点实验室,长沙 410083;2. 东北大学 冶金学院,沈阳 110819)

摘 要:为了获得耐砷能力较高的中度嗜热嗜酸浸矿菌 Leptospirillum ferriphilum,采用连续转接驯化法进行耐砷 驯化,并对菌株的驯化机制进行研究。结果表明: 驯化后 Leptospririllum ferriphilum 菌的 As(III)和 As(V)耐受浓 度分别提高到 7.0 g/L 和 11.0g/L; As(V)驯化菌株对砷黄铁矿的浸出作用明显比 As(III)驯化菌株强; 砷驯化菌细 胞官能团发生明显变化,多糖和蛋白质含量明显增多,细胞表面负电荷明显降低,以适应高砷的环境。同步辐射 原位 C-K 边 XANES 谱图表明,驯化菌糖类和蛋白质的分布位置发生了变化; DFT 理论计算表明,驯化菌更容易 吸附到矿物表面上。

关键词: 砷; 砷黄铁矿; 黄铁矿; 驯化 文章编号: 1004-0609(2019)-03-0617-11

中图分类号: TF18

文献标志码: A

在含砷金矿的冶炼工艺中,常用浸矿微生物预氧 化含砷金矿,其中浸矿菌通过自身代谢作用,浸出含 砷金矿中的砷、铁与硫,从而分离出金矿。在氧化预 处理过程中,释放的砷在溶液中累积;当溶液中的可 溶性砷累积到一定浓度时,浸矿菌的生长及浸出活性 受到抑制,预氧化处理效率降低;为了保持浸矿菌活 性,工艺中必须每隔一定时间更换或稀释高砷浓度的 溶液,这大大增加劳动强度与生产成本^[1]。在工业生 产中,浸矿菌预处理含砷金矿时,砷含量大多控制在 2%~6%(质量分数)之间^[2];自然界中的原矿或次生矿, 含砷量超过 6%。提高浸矿菌抗砷能力,是有效氧化 预处理这类含砷金矿的前提,因此,对所得的浸矿菌 进行砷的驯化,提高浸矿菌对砷的耐受能力在工业生 产中具有极其重要的意义。

已有研究者将 Acidithiobacillus ferrooxidans 的耐 砷能力提高至 6 g/L^[3],将 Acidithiobacillus caldus 的耐 砷能力提高至 3.38 g/L^[4],将 Leptospirillum ferriphilum (L. ferriphilum)的耐砷能力驯化至 4.88 g/L^[5];吴俊子 等^[6]通过对中度嗜热混合菌的驯化,成功培养出耐受 矿浆质量浓度为 200 g/L、砷质量浓度 8 g/L 的高耐砷 混合菌。有研究指出砷驯化菌与原始菌相比,蛋白质 的表达量和表达类型均存在差异^[7];溶液中亚砷酸盐 或砷酸盐浓度的不同,会诱导微生物细胞内的砷抗性

蛋白种类和表达量出现差异^[8]。富瑶等^[9]指出,As(III) 胁迫时胞外多糖含量增长超过 34.14%,As(V)胁迫时 胞外多糖含量增长超过 28.84%。目前所得到的驯化菌 耐砷能力还不足以应对生物浸出过程的高浓度砷环 境,其耐砷驯化机制也还需要进一步的探讨。本实验 通过逐渐加大砷浓度驯化获得菌株,期望得到耐砷性 强的菌株,并阐释菌株对高砷环境的适应机制,为后 期开展含砷金矿矿物的预处理及高浓度砷污染环境的 治理提供依据。

L. ferriphilum 为中度嗜热嗜酸的好氧革兰氏阴性 菌, 是一种代表性的浸矿微生物。本文作者以 L. ferriphilum 菌为研究对象,以黄铁矿作为能源底物, 采用连续转接驯化法^[3]进行耐砷驯化,在不同浓度的 As(III)和 As(V)条件下进行耐砷驯化,以期获得耐砷 能力较高的驯化菌株,并进一步对菌株的驯化耐砷机 制进行探讨。

1 实验

1.1 菌种及培养基

L. ferriphilum 菌来源于中南大学生物冶金重点实 验室。摇瓶培养条件如下: pH 2.0, 温度 45 ℃,转速

收稿日期: 2018-01-24; 修订日期: 2018-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51774342, U1608254)

通信作者: 聂珍媛, 高级工程师; 电话: 0731-88830544; E-mail: zynie@csu.edu.cn,jlxia@csu.edu.cn

170 r/min。采用 MSN 培养基, 配方如下: (NH₄)₂SO₄ 3.0 g/L, Na₂SO₄ 1.41 g/L, KCl 0.1 g/L, K₂HPO₄ 0.05 g/L, MgSO₄·7H₂O 5.0 g/L, Ca(NO₃)₂ 0.1 g/L, FeCl₃·6H₂O 1.1×10⁻³ g/L, CuSO₄ 5.0×10⁻⁵ g/L, HBO₃ 2.0×10⁻⁴ g/L, MnSO₄·H₂O 8.0×10⁻⁵ g/L, CoCl·H₂O 6.0×10⁻⁵ g/L, ZnSO₄·7H₂O 9.0×10⁻⁵ g/L, 使用硫酸调 节 pH 2.0。

1.2 菌株的耐砷性驯化

本实验中 As(III)溶液用亚砷酸钠配制,As(V)溶 液用五氧化二砷(As₂O₅)配制。

1.2.1 砷的胁迫实验

对 L. ferriphilum 菌设置 As(III)胁迫浓度梯度: 0 g/L, 1.0 g/L, 2.0 g/L, 3.0 g/L, 4.0 g/L, 5.0 g/L; 设 置 As(V)浓度梯度: 0 g/L, 2.0 g/L, 4.0 g/L, 6.0 g/L, 8.0 g/L, 9.0 g/L; 初始接种量均为 8×10⁷ mL⁻¹, 每隔 12 h 取样一次,使用显微镜观察细菌浓度变化情况, 确定砷对菌的胁迫浓度。

1.2.2 菌株的驯化

菌株以黄铁矿为能源,按 8×10⁷ cell/mL 的接种 量接种到含 As(III)或 As(V)的培养基中进行驯化,当 细菌生长繁殖至稳定期时,砷浓度按照 As(III) 1 g/L, As(V) 2 g/L 的浓度梯度递增进行下一轮的驯化。

1.2.3 砷黄铁矿的浸出实验

将驯化菌与原始菌接种到含有砷黄铁矿的培养基体系中,接种量为4×10⁷ mL⁻¹,测定相关浸矿参数。

在驯化过程中,分别以细菌计数板、PHS-3C型 pH 计和 PHS-25 型数显酸度计(以 Ag/AgCl 为参比电 极)测定菌株在生长过程悬浮液中细菌的浓度、pH 和 氧化还原电位的变化^[10];以磺基水杨酸法^[10]和电感耦 合等离子体发射光谱仪(ICP-OES)分别测定溶液中铁 离子和砷离子的浓度变化;以扫描电镜(SEM,美国 FEI 公司)表征驯化前后细菌对矿物的作用。

1.3 驯化机制

驯化完成后,选取细胞组分差距最大的驯化菌和 原始菌进行更进一步的驯化机制分析。

1.3.1 糖类与蛋白质的测量

以红外吸收光谱^[11] (Nicolet Nexus 670, USA)、荧 光显微镜(德国莱卡公司 DM2500)、BCA 蛋白质检测 试剂盒和硫酸法测量驯化前后菌株糖类和蛋白质的变 化^[12]。

1.3.2 驯化前后 L. ferriphilum 菌表面性质的探究

以动电位观察菌株驯化前后细胞表面电位的变化;以同步辐射 C-K 边 X 射线吸收近边结构光谱(上

海同步辐射装置)分析菌株驯化前后细胞表面蛋白质多糖的分布变化^[13]。

1.3.3 DFT 计算探究驯化菌在矿物表面的吸附

已有的研究表明,微生物接近并吸附于矿物表面 后,更有利于矿物-微生物界面相互作用的发生^[14]。因 此,微生物对矿物表面的吸附是生物浸出的关键环节。 通过 DFT 模拟计算,探究了驯化菌吸附矿物表面能力 的变化。

计算中以黄铁矿为底物,经收敛性测试后,选取 截断能 *E*_{cut}=340 eV,K 点为2×2×1,采用超软赝势 描述离子实与价电子之间的相互作用,采用 GGA-PBE 理论方法^[15]。将黄铁矿优化后进行切面,得(100)面, 设置 15 Å 的真空层,固定底部原子层,驰豫表面后, 建立2×2×1 超晶胞结构;对于吸附基团,计算时采 用 Gamma 点^[16];能量收敛标准为2.0×10⁻⁵ eV/atom, 原子位移收敛标准为0.2 pm,原子间作用力收敛标准 为0.8 eV/nm,晶体内应力收敛标准为0.2 GPa;自洽 迭代收敛精度为2.0×10⁻⁶ eV/atom。所有计算均采用 自旋极化方法。

2 结果与讨论

2.1 胁迫实验和驯化实验结果

L. ferriphilum 菌在不同浓度梯度的 As(III)和 As(V) 下的生长情况如图 1(a)和(b)所示。从图中可以看到, 未经驯化的 L. ferriphilum 菌明显受到 2.0 g/L As(III)和 4.0 g/L As(V)的抑制作用。可以看出, L. ferriphilum 菌 的耐砷能力并不高,若是不经驯化,难以满足浸出高 砷金矿的要求。所以,对 L. ferriphilum 菌进行驯化是 十分必要的。

经驯化实验后,得到能在 7.0 g/L As(III)浓度和 11.0 g/L As(V)浓度条件下生存的 *L. ferriphilum* 菌,所 得菌株的耐砷性能均超出了驯化前的菌株,较前人的 工作也有所提高^[4-6],生长曲线如图 1(c)所示。从生长 曲线可以看出,未经驯化的 *L. ferriphilum* 菌在 7.0 g/L As(III) 和 11.0 g/L As(V)浓度下基本不能存活; 驯化 后 *L. ferriphilum* 菌在 7.0 g/L As(V)浓度下基本不能存活; 驯化 后 *L. ferriphilum* 菌在 7.0 g/L As(III)条件下,生长至稳 定期时,其细胞浓度约为 2×10⁸ mL⁻¹,而在 11.0 g/L As(V)条件下生长至稳定期的细胞浓度可达到约 3×10⁸ mL⁻¹,这表明驯化后 *L. ferriphilum* 菌的耐砷能 力大大提高;而驯化菌在 8.0 g/L As(III)和 12.0 g/L As(V)条件下,生长受到了严重的抑制,表明 *L. ferriphilum* 菌的耐受能力已经达到了极限。图中驯 化菌的细胞浓度在前期有所下降,这可能是驯化菌选

择性吸附到矿物表面上^[17],导致溶液中细胞数量 下降。



图 1 在不同浓度 As(III)和 As(V)胁迫下 L. ferriphilum 菌的 生长曲线及驯化前后 L. ferriphilum 菌的生长曲线

Fig. 1 Evolution of cell concentration of *L. ferriphilum* under stress of As (III) (a) and As (V) (b) with different concentrations and growth curves (c) of *L. ferriphilum* before and after acclimation

As(III)和 As(V)驯化菌浸出砷黄铁矿实验效果 对比

2.2.1 浸出行为的表征

砷黄铁矿浸出过程浸出液中的细胞浓度、pH、 ORP,铁离子和砷离子浓度变化情况分别如图 2(a)~(e) 所示。由图 2 可知,As(III)驯化的 L. ferriphilum 菌浸 出液细胞浓度较小,可能是因为As(III)驯化菌吸附到 矿物表面上,导致溶液中的细胞浓度较小;pH先增高 后降低,氧化还原电位迅速增高,这是由于细菌的生 化过程引起的^[18],电位在后期下降,这可能是由于溶 液pH 的变化^[19]以及 Fe(III)的沉淀等引起的;铁离子 和砷离子浓度都是先升高后趋于平稳,数值大小反映 了细菌浸出能力的强弱,可以看到,驯化菌对应的数 值都大于原始菌的。综合对比图中的数据可以发现, 驯化菌的浸出效率总体上高于原始菌的,说明驯化菌 更容易适应含砷的环境,驯化达到了预期的目的。浸 矿率从大到小的顺序依次为五价砷驯化的菌株、三价 砷驯化的菌株、未驯化的菌株。

2.2.2 矿物形貌观察

为更好地对比驯化菌和原始菌浸出砷黄铁矿的能力,根据浸出液测得的数据分析,选取 7.0 g/L As(III) 驯化后的 *L. ferriphilum* 菌与原始菌浸出砷黄铁矿过程中的矿渣进行扫描电镜观察,选取无菌体系作为空白对照,其结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出,36 h 之后,驯化菌对砷黄铁矿 的腐蚀速度更快,腐蚀程度更大,这说明驯化菌在砷 黄铁矿体系中的适应性较原始菌的强,对砷的抵抗力 更强,更容易吸附在含砷的矿物上,能更快地浸出砷 黄铁矿。

2.3 红外吸收光谱检测

图 4 所示为各砷浓度梯度驯化后菌的红外光谱 图。与文献对比可知^[20-23],在 2921 cm⁻¹ 和 2853 cm⁻¹ 处是亚甲基的振动峰, 1650 cm⁻¹ 处是酰胺化合物 C==O的特征峰,1560 cm⁻¹处为酰胺键的特征峰,1452 cm⁻¹处是苯环骨架的振动峰。由图 4(a)可知,上述位 置的峰都随着砷浓度的增加而由尖峰变为钝峰,且峰 的强度逐渐减弱,这说明驯化后 L. ferriphilum 菌的亚 甲基减少,别化过程中 C=O 键在减少,苯环骨架的 量也有所减少,这可能是细菌某些糖类或蛋白质表达 量减少所致; 1402 cm⁻¹处的峰是糖类 C—H 的振动峰, 850 cm^{-1} 处的峰是糖类基团的吸收峰, 660 cm^{-1} 处的 峰是脂肪胺基团的振动峰,这些位置的峰随着砷浓度 的增加,由钝峰变为尖峰,强度增大,证明细胞的某 些蛋白质、糖类和脂肪胺大量增加; 驯化后 L. ferriphilum 菌 480 cm⁻¹ 处 C-C 长链的变形振动峰 相对较强,也表明经砷驯化后菌株某些多糖或脂质表 达量增多。

由图 4(a)和(b)可知,从总体上看,随着砷浓度的 增加,驯化后浸矿菌的蛋白质,脂质和多糖表达量增 加。相对于原始菌,7.0 g/LAs(III)驯化的 L. ferriphilum





图2 As(III)和As(V)驯化前后的L. ferriphilum 菌浸出 砷黄铁矿过程中浸出液细胞浓度、pH、氧化还原电位, Fe³⁺与总铁以及砷离子变化曲线

Fig. 2 Evolution of cell concentration, pH, redox potential, Fe^{3+} , total iron and arsenic ions during bioleaching of arsenopyrite by origin and As(III)/As(V) acclimated *L. ferriphilum*.



((b1)–(b4)) and stile control ((c1), (c2))

生存。

621

为 As(III)的毒性较 As(V)的毒性要强^[24],使菌株的性质变化更大,因此,实验时选取 7.0 g/L As(III)驯化的 *L. ferriphilum* 菌进行驯化机制的研究,能取得更好的结果。

7 g/L As(III)驯化后 L. ferriphilum 菌糖类和蛋白 质的含量变化

2.4.1 糖和蛋白质含量的测量

使用 BCA 法和原位荧光染色法测量驯化菌与原 始菌糖类和蛋白质的含量,以去 EPS 的原生质体为对 照,实验结果如图 5~6 所示。从图 5 可以看出:较原 始菌,驯化菌的糖类和蛋白质的含量都有较大的增加。 这与红外光谱(图 6)结果一致,也与现有的研究结果相 一致^[9],表明细菌糖类和蛋白质表达量的增多有利于 细菌提高对砷的耐受能力。

2.4.2 7 g/L As(III)驯化前后 L. ferriphilum 菌表面性质 的探究

驯化菌表面的电荷量、糖蛋白分布和砷离子的价 态变化如图 7 所示。

图 7(a)所示为驯化菌与原始菌的动电位变化情况。随着 pH 增加,菌株表面的负电荷增多,这是因为细胞表面的羟基发生去质子化,表面正电荷减少,负电荷增加,电位下降^[25]。等电点的变化能反应官能团如羟基、羧基和氨基的变化,这些官能团决定着细胞表面的电荷^[26]。驯化菌等电点较原始菌等电点低,在 pH 1.5 附近,这可能是由驯化菌表面带羧基的糖类表达量增多引起的^[27],这说明驯化菌表面成分发生了改变;驯化菌电位下降较慢,表明驯化菌表面所带的负电荷较少,更接近中性,这能减弱细胞表面与砷离子间的离子作用力,可能更有利于菌在砷环境下的

图 7(b)所示为驯化菌和原始菌以及它们分别除去 EPS 后碳的 K 边 XANES 谱图, 查阅资料得知, 特征 峰 A(288.3 eV)来源于羧基或者氨基 1s 电子到 p*轨道 的共振吸收峰^[28],特征峰 B(292 eV 附近)主要来源于 σ*cc 结构^[29]。XANES 谱图峰面积的大小与细菌表面 糖和蛋白的含量存在正相关关系。由于 C 元素 K 边的 能量较低^[30],穿透能力弱,未去除 EPS 的驯化菌和原 始菌 K 边 XANES 主要反应的是胞外 EPS 中有机组成 的信息,而去除了EPS的驯化菌和原始菌K边XANES 主要为周质空间的有机组成信息。从图中可知,完整 驯化菌的 A 峰强度较原始菌的强,说明驯化菌 EPS 上糖类和蛋白质的含量增多;完整未驯化菌较去除 EPS 的未驯化菌的 A 峰稍强, B 峰强度相近, 表明驯 化前菌株糖类和蛋白质在EPS和周质空间中分布较为 均匀; 驯化菌去除 EPS 前后的 A 峰显著增强, 说明 L. ferriphilum 菌经驯化后, 糖类和蛋白质的分布由均 匀分布在 EPS 和周质空间中变为集中分布在 EPS 上, 说明 EPS 上糖类和蛋白质的增多,是该细菌抵抗砷的 毒害的重要途径。

图 7(c)所示为 7 g/L As(III)驯化后 L. ferriphilum 菌 砷 L 边 XANES 谱图,对比 L 边 XANES 谱图可以确 定元素的价态^[31]。对比图中曲线可以看到,驯化菌表 面的砷主要是以 As(III)的形式存在,这说明驯化菌的 解毒机制可能以甲基外排途径为主^[32],也可能是因为 细菌未能及时将吸附在表面的 As(III)转化为 As(V),导致 As(III)积累在细胞表面。

2.5 DFT 计算探究驯化菌在矿物表面的吸附

利用 Materials Studio 软件中 CASTEP 模块的第一性原理对黄铁矿晶胞进行优化后,得到的晶格常数为 0.5428 nm,与实验值 0.5417 nm 很接近^[16],只有约



图 4 As(III)和 As(V)分别驯化的 L. ferriphilum 菌的红外吸收光谱

Fig. 4 FTIR spectra of *L. ferriphilum* acclimated by As(III) (a) and As(V) (b)



图 5 As(III)驯化前后的 L. ferriphilum 菌多糖和蛋白质含量图

Fig. 5 Polysaccharide content of *L. ferriphilum* before and after acclimation by As(III) (a) and protein content of *L. ferriphilum* before and after domestication by As(III) (b)



图 6 不同处理条件下糖蛋白的荧光梁色图

Fig. 6 Fluorescence staining of glycoprotein by different treatments: (a) *L. ferriphilum*; (b) *L. ferriphilum* without EPS; (c) AS(III)-acclimated *L. ferriphilum*; (d) As(III)-acclimated *L. ferriphilum* without EPS

0.2%的误差,表明计算结果与实际情况是相符合的。 由前面的实验得知驯化菌的糖类和蛋白质含量增 多,随之增多的是细胞表面的羟基(一OH),以丝氨酸 中的羟基为例,利用 CASTEP 模块的第一性原理进行 羟基在黄铁矿(100)面上的吸附计算,探究羟基对菌株 吸附矿物能力的影响,优化后羟基对表面 Fe 或 S 的 吸附方式如图 8 所示。

2.5.1 吸附能的计算

根据公式 $E_{ad} = E_{surface+R-OH} - E_{surface} - E_{R-OH}$ 对图 7(a), (b)中两种吸附方式的吸附能进行计算,得到 R—OH 在 Fe 上吸附时的 E_{ad} 为-3.63 eV, R—OH 在 S 上吸附 时的 E_{ad} 为-3.57 eV,说明吸附过程在能量上是有利 的,即细菌表面—OH 容易在黄铁矿表面吸附,并在 铁原子上的吸附更容易。 2.5.2 布居分析和分波态密度图(PDOS)分析

表1给出了吸附后的部分布居分析结果。其中键 长较小,进一步说明羟基能与黄铁矿(100)面上的铁和 硫原子成键;现有研究表明,布居值越大,形成共价 键的可能性就越大^[33],而表1中布居值偏向0,说明 R—OH在Fe和S上的两种吸附方式(见图8)均偏向于 离子键成键作用。

本实验中进一步对羟基吸附(100)面后的分波态



图 7 As(III)驯化前后 *L. ferriphilum* 菌动电位, As(III)驯化 前后 *L. ferriphilum* 菌碳的 K 边 XANES 谱图以及驯化菌砷 L 边的 XANES 谱图

Fig. 7 Zeta-potential of *L. ferriphilum* before and after acclimation by As(III) (a), C-K-edge XANES of *L. ferriphilum* before and after acclimation by As(III) (b) and As-L-edge XANES of *L. ferriphilum* acclimated by As(III) (c)

密度图(PDOS)进行分析,结果如图 9 所示。其中, *E*_F 代表费米面能级。从图 9 可以看到,吸附后,O 2p 轨 道与 S 2p 轨道在-10~0 eV 处交叠,而 0~5 eV 处的峰 较弱,说明 O—S 间存在成键作用;同时,O 2p 轨道 与 Fe 3d 轨道在-8~0 eV 处交叠,0~5 eV 处的峰较弱,

表1 部分布居分析结果

 Table 1
 Parts of Mulliken population analysis

Bond	Length/nm	Population
O—Fe	0.2405	0.18
O—S	0.2836	0.12



图 8 R—OH 吸附在 Fe 和 S 上的方式

Fig. 8 Adsorbing stratus of R—OH on Fe (a) and S (b)



图 9 R—OH 吸附 S 和 Fe 后的 PDOS 谱 Fig. 9 PDOS patterns of R—OH adsorbing S (a) and (b)

说明存在 O—Fe 成键作用^[34]。这些结果表明羟基以化 学吸附的形式吸附在黄铁矿(100)面上,这与布居分析 的结果相一致。

综上 DFT 的计算结果,可知羟基通过与黄铁矿之 间的成键作用,以化学吸附的方式吸附在矿物的表面 上,吸附能力强。因此,驯化菌表面羟基的增多,糖 类和蛋白质含量的增多,有利于菌吸附到矿物表面上, 这与己有文献的结论相一致^[35]。菌株更好地选择性吸 附到矿物上,有利于菌更快地获取生长所需能量^[36], 从而适应高砷的环境,这可能也是微生物抗砷的机制 之一。

3 结论

1) 经过驯化,得到了 As(III)和 As(V)耐受浓度分 别为 7.0 g/L 和 11.0 g/L 的 *L. ferriphilum* 菌,并且驯化 菌有良好的砷黄铁矿浸出能力。

2) 通过实验数据可知, 驯化菌的糖类和蛋白质表 达类型发生了改变,不利于细胞生存的糖类和蛋白质 表达量减少,有利于细胞生存的糖类和蛋白质表达量 增多,总体上糖类和蛋白质的表达量增多。

3) 动电位表明驯化菌表面的负电荷量减少,通过 对碳的K边分析得知驯化菌表面糖类和蛋白质的分布 位置发生了变化,从均匀分布转变为主要集中在 EPS 上,这有利于菌株在高砷环境下生存;通过砷的L边 分析得知 As 在驯化菌表面主要以三价砷存在,由此 推测出细菌耐砷机制可能是以甲基外排途径为主,但 这个推测还需要进一步的实验进行验证。

4) DFT 计算结果表明, 驯化菌细胞表面糖类和蛋 白质中羟基的增多, 有利于菌以化学吸附的方式吸附 到矿物上, 从而更容易获取能量, 从而适应高砷环境。

致谢:本论文的 DFT 计算工作在吕梁国家超级计 算中心天河 2 号机组以及中南大学和南京大学高性能 计算中心完成。

REFERENCES

 杨 硕. 氧化硫硫杆菌耐砷菌株与非耐砷菌株的生理生 化特性比较[C]//中国环境科学学会学术年会论文集(第八 卷). 北京: 中国环境科学出版社, 2013: 7106-7118.
 YANG Suo. Comparison of physiological and biochemical characteristics between arsenic-tolerant strains and non-arsenic-tolerant strains of *Thiobacillus ferro-* *oxidans*[C]//Proceedings of the Chinese Society for Environmental Sciences (Volume 8th). Beijing: China Environmental Press, 2013: 7106–7118.

- [2] 杨洪英,范 金,崔日成,巩恩普. 难处理高砷金矿的细 菌氧化-提金研究[J]. 贵金属, 2009, 30(3): 1-3.
 YANG Hong-ying, FAN Jin, CUI Ri-cheng, GONG En-pu.
 Study on bacterial oxidation-extraction gold of refractory gold ore[J]. Precious Metals, 2009, 30(3): 1-3.
- [3] 方 芳, 钟 宏, 江放明, 许凯扬. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌
 的耐砷驯化与浸矿能力[J]. 中南大学学报(自然科学版),
 2013(10): 3977-3983.

FANG Fang, ZHONG Hong, JIANG Fang-ming, XU Kai-yang. Domestication for arsenic-tolerant ability and bioleaching of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Journal of Central South University (Science and Technology), 2013(10): 3977–3983.

- [4] ZHAO Qing, LIU Xiang-mei, ZHAN Yang, LIN Jian-qun, YAN Wang-ming. Construction of an engineered *Acidithiobacillus caldus* with high-efficiency arsenic resistance[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(5): 675–679.
- [5] JIANG Hui-dan, LIANG Yi-li, YIN Hua-qun, XIAO Yun-hua, GUO Xue, XU Ying, HU Qi, LIU Hong-wei, LIU Xue-duan. Effects of arsenite resistance on the growth and functional gene expression of *Leptospirillum ferriphilum* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in pure culture and coculture[J]. Biomed Research International, 2015(18): 1–13.
- [6] 吴俊子,曾伟民,王玉光,仉丽娟,万利利,周洪波. 搅拌 槽反应器中中度嗜热浸矿菌预处理含砷金矿[J]. 过程工 程学报, 2013, 13(3): 494-499.
 WU Jun-zi, ZENG Wei-min, WANG Yu-guang, LI Li-juan, ZHOU Hong-bo. Pretreatment of arsenic-bearing gold ores in stirred tank reactor by medium thermophilic bioleaching bacteria[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2013, 13(3): 494-499.
 [7] 罗金学. 喜温硫杆菌蛋白质组学研究技术建立及抗砷机
- [7] 岁显子, 普溫凱利 菌蛋白质蛋子研究设术建立及抗砷和 制初步探讨[D]. 济南: 山东大学, 2008. LUO Jing-xue. Construct of proteomic technology for *Acidithiobacillus caldus* research and study on arsenic resistant mechanlsm[D]. Jinan: Shandong University, 2008.
- [8] 冷非凡.氧化亚铁硫杆菌和氧化硫硫杆菌对无机砷化合物抗性的比较研究[D]. 兰州:兰州大学,2010.
 LENG Fei-fan. Comparative study on the resistance of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* to inorganic arsenic compounds[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2010.
- [9] 富 瑶. 砷胁迫下浸矿细菌胞外聚合层(EPS)中多糖抗砷

第29卷第3期

625

行为的研究[D]. 沈阳: 东北大学, 2011.

FU Yao. Study on anti-arsenic behavior of polysaccharide in extracellular polymeric layer (EPS) of leaching bacteria under arsenic stress[D]. Shenyang: Northeastern University, 2011.

- [10] LIU Hong-chang, XIA Jin-lan, NIE Zhen-yuan. Relatedness of Cu and Fe speciation to chalcopyrite bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Hydrometallurgy, 2015, 156: 40-46.
- [11] ZARNOWIEC P, LECHOWICZ L, CZERWONKA G, KACA W. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) as a tool for the identification and differentiation of *pathogenic* bacteria[J]. Current Medicinal Chemistry, 2015, 22(14): 1710.
- [12] NIE Zhen-yuan, LIU Hong-chang, XIA Jing-Lan, YANG Yi, ZHEN Xiang-Jun, ZHENG Li-juan, QIU Guan-zhou. Evidence of cell surface iron speciation of acidophilic iron-oxidizing microorganisms in indirect bioleaching process[J]. Biometals, 2016, 29(1): 25–37.
- [13] LIU Li-zhu, PAN Xuan, XIA Xu, ZHOU Yu-hang, NIE Zhen-yuan, XIA Jin-lan. In situ characterization of surface organic composition changes of thermoacidophilic archaea *Acidianus manzaensis* YN-25 in response to energy substrate[J]. Solid State Phenomena, 2017, 262: 417–420.
- [14] LIU Jian-she, WANG Zhao-hui, GEN Mei-mei, QIU Guan-zhou. Progress in the study of polyphase interfacial interactions between microorganism and mineral in bio-hydrometallurgy[J]. Mining & Metallurgical Engineering, 2006.
- [15] 李 帅,赵志曼, 部 峰, 杜晨曦, 刘子瑜. 羧基与钙离 子吸附机理的密度泛函的仿真研究[J]. 计算机与应用化 学, 2015, 32(8): 951-954.
 LI Shuai, ZHAO Zhi-man, GAO Feng, DU Chen-xi, LIU Zi-yu. Simulation study on the adsorption mechanism of carboxyl and calcium ions by density functional analysis[J].
 Computer and Applied Chemistry, 2015, 32(8): 951-954.
- [16] 李玉琼,陈建华,蓝丽红,郭 进. 氧分子在黄铁矿和方铅矿表面的吸附[J]. 中国有色金属学报, 2012, 22(4): 1184-1194.
 LI Yu-qiong, CHEN Jian-hua, LAN Li-hong, GUO Jin. Adsorption of O₂ on pyrite and galena surfaces[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2012, 22(4): 1184-1194.
- [17] 王 蕾, 夏金兰, 朱泓睿, 刘红昌, 聂珍媛, 刘李柱. 微生物-矿物相互作用及界面显微分析研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(3): 716-725.
 WANG Lei, XIA Jin-lan, ZHU Hong-rui, LIU Hong-chang,

NIE Zhen-yuan, LIU Li-zhu. Progress on research of microbe-mineral interaction and interfacial microanalysis[J]. Microbiology, 2017, 44(3): 716–725.

- [18] 战金帅. 湖南省典型高砷金矿的细菌氧化及提金试验研究[D]. 沈阳: 东北大学, 2005.
 ZHAN Jin-shuai. Study on the bacterium oxidations test of the type high arsenic gold concentration from Hunan and the extracted gold[D]. Shenyang: Northeastern University, 2005.
- [19] DENG Sha, GU Guo-hua, HE Guo-shuai, LI Li-juan. Catalytic effect of pyrite on the leaching of arsenopyrite in sulfuric acid and acid culture medium[J]. Electrochimica Acta, 2018, 263: 8–16.
- [20] 周维芝,申博玲,刘升波,陈 波,张玉忠. 南极海冰细 菌胞外多糖的助凝作用及红外光谱分析[J]. 光谱学与光 谱分析, 2009, 29(9): 2405-2408.
 ZHOU Wei-zhi, SHEN Bo-ling, LIU Shen-bo, CHRN Bo, ZHANG Yu-zhong. Effect of extracellular polysaccharide of Antarctic sea ice bacteria on coagulation and FTIR analysis[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(9): 2405-2408.
- [21] 赵花荣, 王晓燕, 陈冠华, 温树敏. 利用傅里叶变换红外 光谱法鉴定小麦品种[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(11): 1338-1341.

ZHAO Hua-rong, WANG Xiao-yan, CHEN Guan-hua, WEN Shu-ming. Identification of wheat varieties by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2004, 24(11): 1338–1341.

- [22] 郭振楚, 韩永生, 封惠侠. 三种多糖的光谱鉴定、化学改 性及活性[J]. 光谱学与光谱分析, 1999, 19(1): 25-27.
 GUO Zhen-chu, HAN Yong-sheng, FENG Hui-xia. Spectral identification, chemical modification and activity of three polysaccharides[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 1999, 19(1): 25-27.
- [23] 周 群,孙素琴,杜德国,梁曦云,杨显荣. 芦丁热稳定性的红外光谱法实时原位跟踪[J].光谱学与光谱分析,2000,20(2):195-198.
 ZHOU Qun, SUN Su-qing, DU De-guo, LIANG Xi-yun, YANG Xian-rong. The thermal stability of rutin in situ tracking by infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2000, 20(2):195-198.
- [24] 蔡 林, 王革娇. 抗砷性微生物及其抗砷分子机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1253-1259.
 CAI Lin, WANG Ge-jiao. Advance on studies of arsenic-resistant microorganisms and molecular mechanisms[J]. Microbiology, 2009, 36(8): 1253-1259.
- [25] 王 永,徐仁扣,王火焰,姜 军.砷酸根在可变电荷土 壤颗粒表面的配位吸附[J].环境化学,2009,28(2):

163-167.

WANG Yong, XUN Ren-kou, WANG Huo-yan, JIANG Jun. The coordination adsorption of arsenic on the surface of variable charge soil particles[J]. Environmental Chemistry, 2009, 28(2): 163–167.

- [26] XIA Le-xian, LIU Xin-xing, ZENG Jian, CHU Yin, GAO Jian, LIU Jian-she, QIU Guan-zhou. Mechanism of enhanced bioleaching efficiency of *Acidithiobacillus ferrooxidans* after adaptation with chalcopyrite[J]. Hydrometallurgy, 2008, 92(3): 95–101.
- [27] 许晓芳,林 海,董颖博,周闪闪. Mg²⁺对 At.f菌氧化活性的影响[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2016, 44(6): 41-46.

XU Xiao-fang, LIN Hai, DONG Ying-bo, ZHOU Shan-shan. Effect of Mg^{2+} on the oxidative activity of *At.f* bacteria[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2016, 44(6): 41–46.

- [28] KEILUWEIT M, BOUGOURE J J, ZEGLIN L H, MYROLD D D, WEBER P K, PETT-RIDGE J, KLEBER M, NICO P S. Nano-scale investigation of the association of microbial nitrogen residues with iron (hydr)oxides in a forest soil O-horizon[J]. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 2012, 95(11): 213–226.
- [29] ENDO O, NAKAMURA M, AMEMIYA K. Separation of C K-NEXAFS spectra for layer-by-layer analysis of carbon-based thin films: An n-alkane monolayer adsorbed on a monolayer graphene substrate grown on a Pt(111) surface[J]. Journal of Electron Spectroscopy & Related Phenomena, 2013, 189(15): 27–31.
- [30] 陈 亮. 同步辐射软 X 射线辐射效应研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2011.

CHEN Liang. Study on soft X-ray radiation effect of

synchrotron radiation[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2011.

- [31] LIANG Chang-Li, XIA Jin-lan, YANG Yi, NIE Zhen-yuan, ZHAO Xiao-juan, ZHENG Lei, MA Chen-yan, ZHAO Yi-dong. Characterization of the thermo-reduction process of chalcopyrite at 65 °C by cyclic voltammetry and XANES spectroscopy[J]. Hydrometallurgy, 2011, 107(1/2): 13–21.
- [32] 李 兵. 嗜铁钩端螺旋菌在砷胁迫条件下的蛋白质组学研究[D]. 济南:山东大学, 2010.
 LI Bing. The proteomics study of *Leptosplrlllum ferriphllum* under arsenic stress[D]. Ji'nan: Shandong University, 2010.
- [33] ZHAO Cui-hua, CHEN Jian-hua, LI Yu-qiong, HUANG De-wei, LI Wei-zhou. DFT study of interactions between calcium hydroxyl ions and pyrite, marcasite, pyrrhotite surfaces[J]. Applied Surface Science, 2015, 355: 577–581.
- [34] LI Kui, ZHAO Yao-lin, ZHANG Peng, HE Chao-hui, DENG Jia, DING Shu-jiang, SHI Wei-qun. Combined DFT and XPS investigation of iodine anions adsorption on the sulfur terminated (001) chalcopyrite surface[J]. Applied Surface Science, 2016, 390: 412–421.
- [35] 贾春云,李培军,魏德洲,张海荣,刘 宛. 微生物在矿物表面吸附的研究进展[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 607-613.

JIA Chun-yun, LI Pei-jun, WEI De-zhou, ZHANG Hai-rong, LIU Wan. Research advances on adsorption of bacteria to mineral surface[J]. Microbiology, 2010, 37(4): 607–613.

[36] 张东晨,王 涛,侯志翔,周倩倩. 矿物表面性质生物调 节机理的研究[J]. 洁净煤技术,2013,19(1):5-9.
ZHANG Dong-chen, WANG Tao, HOU Zhi-xiang, ZHOU Qian-qian. Mechanism of microorganism regulating mineral surface properties[J]. Clean Coal Technology, 2013, 19(1): 5-9.

Domestication of *Leptospirillum ferriphilum* arsenic-tolerant ability and mechanism of domestication

ZHENG Xing-fu¹, NIE Zhen-yuan¹, XIA Jin-lan¹, LIU Li-zhu¹, YANG Hong-ying²

(1. Key Laboratory of Biometallurgy of Ministry of Education of China,

School of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China;

2. School of Metallurgy, Northeastern Univwrsity, Shenyang 110819, China)

Abstract: In order to obtain high arsenic-tolerant ability of *Leptospirillum ferriphilum*, continuous transfer domestication was adopted, and the acclimation mechanism was studied. The results show that, after domestication, the tolerant abilities to As(III) and As(V) of *L. ferriphilum* increase to 7.0 g/L and 11.0 g/L, respectively. The leaching effect of the bacteria acclimated by As(V) is significantly higher than that by As(III) in the leaching of arsenopyrite. After being acclimated, the contents of polysaccharide and protein of cells significantly increase, while the negative charge on the surface of cells significantly decreases, so as to adapt to the high arsenic environment. The in-situ C-K-edge XANES results show a change in the distribution of polysaccharide and protein. The DFT calculation shows that the adapted bacterial cells are easier to be adsorbed on the mineral surface.

Key words: arsenic; arsenopyrite; pyrite; domestication

Foundation item: Projects(51774342, U1608254) supported by the National Natural Science Foundation of China Received date: 2018-01-24; Accepted date: 2018-04-20

Corresponding author: NIE Zhen-yuan; Tel: +86-731-88830544; E-mails: zynie@csu.edu.cn.jlxia@csu.edu.cn

(编辑 龙怀中)