

Fe²⁺对嗜铁钩端螺旋菌 *L. ferriphilum* 生长活性的影响

高 健^{1,2}, 康 健^{1,2}, 吴学玲¹, 徐 竞¹, 李邦梅¹, 邱冠周¹

(1. 中南大学 资源加工与生物工程学院, 长沙 410083;

2. 湖南科技大学 生命科学学院, 湘潭 410201)

摘 要: 以分离于江西某铜矿的嗜铁钩端螺旋菌(*L. ferriphilum* YSK)菌株为研究对象, 报道不同 Fe²⁺浓度对 *L. ferriphilum* 生长活性的影响。结果表明, YSK 菌株生长最适宜的 Fe²⁺浓度约为 0.1 mol/L。当初始 Fe²⁺浓度为 0.4 mol/L 时, 进入对数生长期前很明显需要一个较长的延迟期, 表明该 Fe²⁺浓度对细胞的生长产生较强的抑制作用; 当初始 Fe²⁺浓度为 0.6 mol/L 时, YSK 菌株的生长完全受到抑制。尽管高浓度的 Fe²⁺抑制细胞的生长, 但受到抑制而不生长繁殖的 YSK 细胞仍然具有氧化 Fe²⁺的能力。

关键词: *L. ferriphilum* YSK 菌株; Fe²⁺; 生长活性

中图分类号: TF 18

文献标识码: A

Effect of Fe²⁺ on growth activity of *L. ferriphilum*

GAO Jian^{1,2}, KANG Jian^{1,2}, WU Xue-ling¹, XU Jing¹, LI Bang-mei¹, QIU Guan-zhou¹

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China;

2. School of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 410201, China)

Abstract: The effect of different ferrous iron concentrations on the growth activity of *L. ferriphilum* was reported with *L. ferriphilum* YSK being developed objective of this research. The results show that YSK optimally grows at 0.1 mol/L of ferrous iron. In the culture initially containing 0.4 mol/L of ferrous iron, a long period of lag is observed, which is followed by exponential phase of microbial growth. However, in the culture initially containing 0.6 mol/L of ferrous iron, no evidence of bacterial growth is observed. Although ferrous iron is concentrations of 0.4 mol/L can prohibit the growth of cells completely, the non-growing population of *L. ferriphilum* YSK strain is able to oxidize ferrous iron.

Key words: *L. ferriphilum* YSK strain; ferrous iron; growth activity

嗜酸微生物, 如嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, A.f)^[1]、嗜酸氧化硫硫杆菌 (*Acidithiobacillus thiooxidans*, A.t) 和氧化亚铁钩端螺旋菌 (*Leptospirillum ferrooxidans*, L.f) 在低品位硫化矿物的生物浸出过程中扮演了极为重要的角色。在生物浸出过程中, Fe²⁺的生物氧化被证明是一个重要的环节^[2]。然而, 无论是原生硫化矿物, 还是次生硫化矿物都含有不同浓度的 Fe²⁺, 生物浸出过程中, 因

Fe²⁺氧化产生过多的高价铁离子往往会影响细菌的浸出效果^[3], 因此, 了解不同浓度的 Fe²⁺对浸矿细菌生长活性的影响情况与其在生物冶金过程中的应用有着极其重要的意义。以前, 对浸矿细菌的 Fe²⁺氧化和金属抗性研究的报道, 主要集中在 A.f^[4-9]、布氏酸菌 (*Acidianus brierleyi*, A.b)^[2, 10]、*Sulfolobus acidocaldarius*^[11] 和 A.t^[12-14] 等菌。目前, 已报道的钩端螺旋菌属 (Genus *Leptospirillum*) 包括氧化亚铁钩端、

基金项目: 国家创新群体资助项目(50621063); 国家重点基础研究发展计划资助项目(2004CB619201)

收稿日期: 2007-04-17; 修订日期: 2007-10-22

通讯作者: 邱冠周, 教授; 电话: 0731-8879212; E-mail: qgzfbw@163.com

螺旋菌(*L. ferrooxidans*)、嗜热氧化亚铁钩端螺旋菌(*L. thermoferrooxidans*)、嗜铁钩端螺旋菌(*L. ferriphilum*)^[15]和固氮氧化亚铁钩端螺旋菌(*L. ferrodiazotrophum*)^[16]4个种,除了早些年有过对*L. ferrooxidans*菌的 Fe^{2+} 氧化与金属抗性能力的几例报道外^[17-19],对该属其它3个种在不同浓度的 Fe^{2+} 下的生长情况,国内外还未见相关报道。

在本研究中,以分离于江西某铜矿的*L. ferriphilum* YSK菌株为研究对象,报道了不同浓度的 Fe^{2+} 对嗜铁钩端螺旋菌生长活性的影响,以期为其在生物冶金工业中的应用提供参考。

1 实验

1.1 菌种和培养基

菌种为*L. ferriphilum* YSK菌株,由本研究室分离与保藏,其16S rRNA gene基因库登录序列号为DQ343299。

YSK菌株的培养采用液体9K培养基,其成分包括: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.00 g/L; KCl 0.10 g/L; K_2HPO_4 0.50 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g/L; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44.2 g/L。培养基的pH用5 mol/L的 H_2SO_4 调节到1.6。培养温度40℃、转速为180 r/min。所有试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

离心收集培养3 d后的细菌细胞,用2%的稀硫酸洗涤几次以去掉三价铁离子,然后用液体9K培养基将细菌浓度调节为 1.0×10^8 个/mL左右,接种量为10%(体积分数)。实验过程中, Fe^{2+} 采用重铬酸钾滴定法测定,即通过测定培养基中 Fe^{2+} 的浓度变化来反应细菌的氧化能力。定时测定 Fe^{2+} 的浓度和补充因蒸发损失的水分。整个实验重复3次。

2 结果与讨论

作为惟一的能源, Fe^{2+} 浓度必然与YSK菌株的生长繁殖密切相关,因此,在YSK菌株的最适生长条件^[20],即pH=1.6、温度为40℃、摇床转速为180 r/min和培养时间为100 h的情况下,考察了不同浓度的 Fe^{2+} 对YSK菌株生长活性的影响。

在初始 Fe^{2+} 浓度为0.05~0.1 mol/L范围内,YSK生长的趋势基本相似,即大约在培养40 h时,随着YSK生物量的迅速增加,伴随着 Fe^{2+} 浓度的急剧下降,这表明YSK的生长与 Fe^{2+} 氧化速度正处于倍增时期。随着 Fe^{2+} 完全被氧化,YSK生长开始处于稳定时期。尽管初始 Fe^{2+} 浓度分别为0.05 mol/L和0.1 mol/L时,YSK达到对数生长期的时间很接近,但在0.1 mol/L的情况下,YSK菌株的浓度可达 2.4×10^8 个细胞/mL,而在0.05 mol/L时,其浓度要低得多,最高约 1.65×10^8 个细胞/mL(见图1)。当 Fe^{2+} 浓度 ≥ 0.2 mol/L时,一方面,YSK达到对数生长期的时间比前面两种情况要长得多,另一方面,YSK菌株可达到的最高细胞浓度也要低得多(见图2),由此可见,在上述最适温度、最适pH、相同摇床转速和接种量的情况下,YSK菌株生长繁殖的最适宜 Fe^{2+} 浓度约为0.1 mol/L。

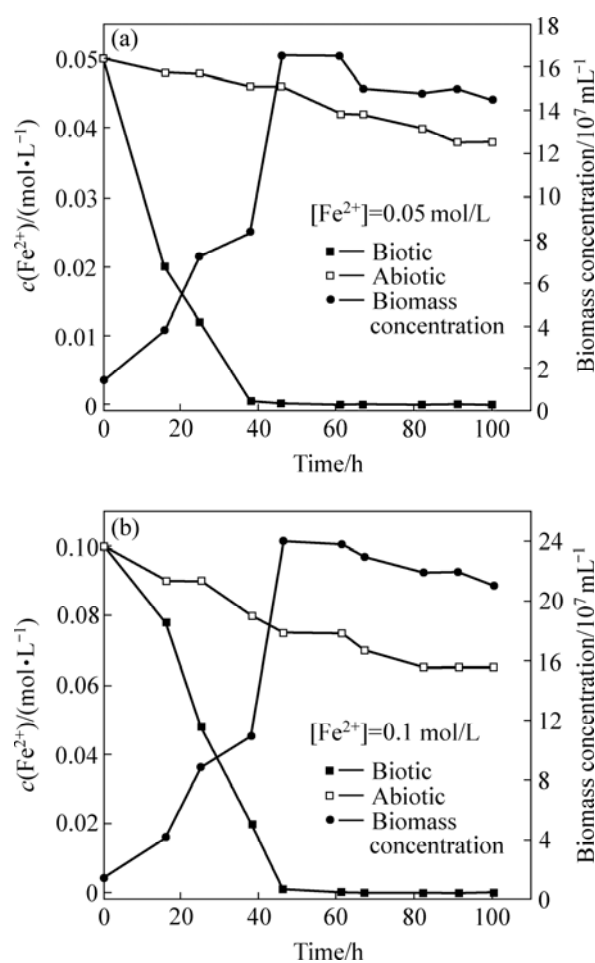


图1 初始浓度为0.05 mol/L和0.1 mol/L的 Fe^{2+} 对YSK菌株生长活性的影响

Fig.1 Influences of ferrous iron at initial concentrations of 0.05 mol/L and 0.1 mol/L on growth activity of YSK strain

当初始 Fe^{2+} 浓度分别为 0.2 mol/L 和 0.3 mol/L 时, 虽然达到对数生长期的时间明显要长, 但其最高细胞浓度相差不大, 分别为 2.2×10^8 和 1.8×10^8 个细胞/mL, 表明这个范围的 Fe^{2+} 浓度可能仅仅影响细胞的对数生长时间(见图 2)。

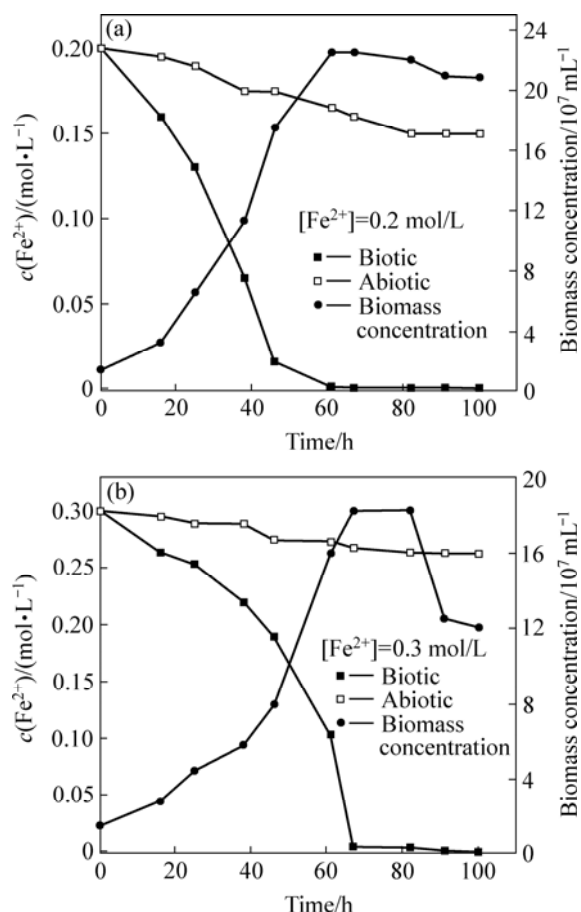


图 2 初始浓度为 0.2 mol/L 和 0.3 mol/L 的 Fe^{2+} 对 YSK 菌株生长活性的影响

Fig.2 Influences of ferrous iron at initial concentrations of 0.2 mol/L and 0.3 mol/L on growth activity of YSK strain

当初始 Fe^{2+} 浓度为 0.4 mol/L 时, 进入对数生长期前很明显需要一个较长的延迟期, 表明该 Fe^{2+} 浓度对细胞的生长产生较强的抑制作用, 而且细胞的最高浓度只有 0.81×10^8 个细胞/mL。尽管如此, 仍然可以观察到细胞的加倍生长与 Fe^{2+} 氧化(见图 3)。

当初始 Fe^{2+} 浓度为 0.6 mol/L 时, 尽管 Fe^{2+} 浓度缓慢而又连续地下降, 但并没有观察到细胞地生长, 而且, 在整个实验过程中, 细胞基本上维持在一个相对稳定的浓度。从图 3 可以看出, 有菌和无菌状态下 Fe^{2+} 氧化程度明显不同, 前者高于后者。换句话说, 尽管高浓度的 Fe^{2+} 抑制细胞的生长, 但受到抑制而不生长繁殖的 YSK 细胞仍然具有氧化 Fe^{2+} 的能力。

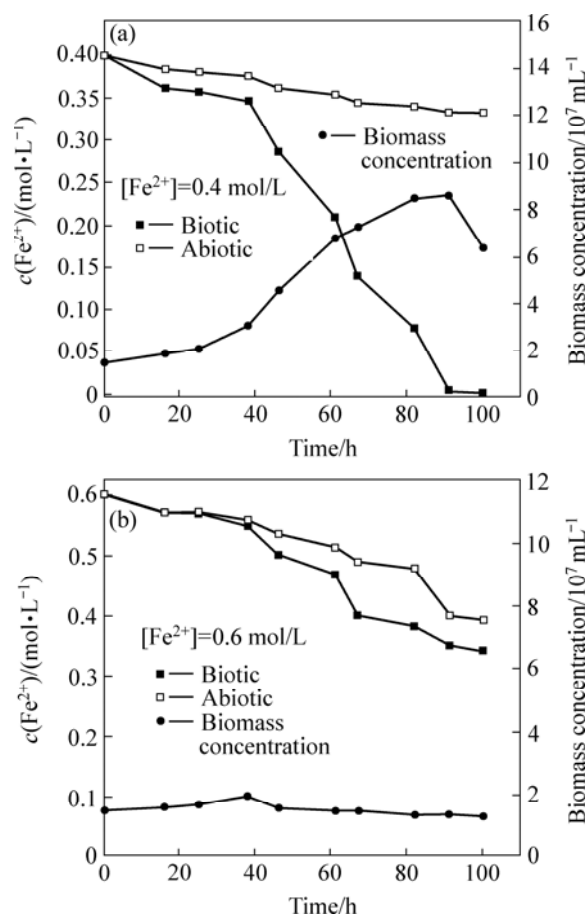


图 3 初始浓度为 0.4 mol/L 和 0.6 mol/L 的 Fe^{2+} 对 YSK 菌株生长活性的影响

Fig.3 Influences of ferrous iron at initial concentrations of 0.4 mol/L and 0.6 mol/L on growth activity of YSK strain

3 结论

Fe^{2+} 的生物氧化结果表明, *L. ferriphilum* YSK 菌株生长最适宜的 Fe^{2+} 浓度约为 0.1 mol/L。当初始 Fe^{2+} 浓度为 0.4 mol/L 时, 进入对数生长期前很明显需要一个较长的延迟期, 表明该 Fe^{2+} 浓度对细胞的生长产生较强的抑制作用。当初始 Fe^{2+} 浓度为 0.6 mol/L 时, YSK 菌的生长完全受到抑制。尽管高浓度的 Fe^{2+} 抑制细胞的生长, 但受到抑制而不生长繁殖的 YSK 细胞仍然具有氧化 Fe^{2+} 的能力。

REFERENCES

- [1] KELLY D P, WOOD A P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen.

- nov[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 511–516.
- [2] NEMATI M, HARRISON S T L. A comparative study on thermophilic and mesophilic biooxidation of ferrous iron[J]. Minerals Engineering, 2000, 13(1): 19–24.
- [3] MERUANE G, VARGAS T. Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5–7.0[J]. Hydrometallurgy, 2003, 71: 149–158.
- [4] LEDUC L G, FERRONI G D. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 14: 103–120.
- [5] LEDUC L G, FERRONI G D, TREVORS J T. Resistance to heavy metals in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997, 13: 453–455.
- [6] DAS A, MODAK J M, NATARAJAN K A. Studies on multi-metal ion tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Minerals Engineering, 1997, 10: 743–749.
- [7] NOVO M T, DA SILVA A C, MORETO R, CABRAL P C, COSTACURTA A, GARCIA O Jr, OTTOBONI L M. *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2000, 77: 187–195.
- [8] KIM S D, BAE J E, PARK H S, CHA D K. Bioleaching of cadmium and nickel from synthetic sediments by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Environmental Geochemistry and Health, 2005, 27(3): 229–235.
- [9] 李洪枚, 柯家骏. Mg^{2+} 对氧化亚铁硫杆菌生长活性的影响[J]. 中国有色金属学报, 2000, 10(4): 576–578.
- LI Hong-mei, KE Jia-jun. Effect of Mg^{2+} on growth and activity of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2000, 10(4): 576–578.
- [10] KONISHI Y, TOSHIDO S, ASAI S. Bioleaching of pyrite by acidophilic thermophile *Acidianus brierleyi*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1995, 48: 592–600.
- [11] VITAYA V B, LOIZUMI J, TODA K A. Kinetic assessment of substantial oxidation by *Sulfolobus acidocaldarius* in pyrite dissolution[J]. Journal of Fermentation Bioengineering, 1994, 77(5): 528–534.
- [12] LOMBARDI A T, GARCIA O, MOZETO A A. Bioleaching of metals from anaerobic sewage sludge: Effects of total solids, leaching microorganisms, and energy source[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2001, 36: 793–806.
- [13] CHEN B Y, LIU H L, CHEN Y W, CHENG Y C. Dose-response assessment of metal toxicity upon Indigenous *Thiobacillus thiooxidans* BC1[J]. Process Biochemistry, 2004, 39: 735–745.
- [14] BARREIRA P R, VILLAR L D, GARCIA O Jr. Tolerance to copper and zinc of *Acidithiobacillus thiooxidans* isolated from sewage sludge[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21: 89–91.
- [15] CORAM N J, RAWLINGS D E. Molecular relationship between two groups of *Leptospirillum* and the finding that the world and the *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 °C[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 838–845.
- [16] TYSON G W, IAN LO, BAKER B J, ALLEN E E, HUGENHOLTZ P, BANFIELD J F. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferroplasma* sp. nov. from an acidophilic microbial community[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(10): 6319–6324.
- [17] NORRIS P R, PARROT L, MARSH R M. Moderately thermophilic mineral-oxidizing bacteria[J]. Biotech Bioeng Syn, 1986, 16: 253–262.
- [18] SAND W, GEHRKE T, HALLMANN R. In-Situ bioleaching of metal sulfides: the importance of *Leptospirillum ferrooxidans*[C]// Torma A E, Wey J E, Lakshmanan V I. Biohydrometallurgical Technologies, Vol. 1: Bioleaching Processes. Warrendale, Pennsylvania: TMS, 1993: 15–27.
- [19] 李宏煦, 苍大强, 董清海, 王淀佐. 浸矿菌 *Leptospirillum ferrooxidans* 氧化 Fe^{2+} 的电极动力学[J]. 中国有色金属学报, 2006, 16(9): 1634–1640.
- LI Hong-xu, CANG Da-qiang, DONG Qing-hai, WANG Dian-zuo. Electrochemical growth kinetics of *Leptospirillum ferrooxidans* through oxidation of Fe^{2+} [J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2006, 16(9): 1634–1640.
- [20] GAO J, ZHANG C G, WU X L, WANG H H, QIU G Z. Isolation and identification of a strain of *Leptospirillum ferriphilum* from an acid mine adrainage site[J]. Annals of Microbiology, 2007, 57(2): 171–176.

(编辑 陈爱华)