

阴离子对嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长和硫氧化活性的影响

张成桂, 张倩, 王晶, 张瑞永, 何环, 夏金兰, 邱冠周

(中南大学 资源加工与生物工程学院 生物冶金教育部重点实验室, 长沙 410083)

摘要:以嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*, ATCC23270)为对象, 研究 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 和 PO_4^{3-} 对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 生长和硫氧化活性的影响。结果表明: 不同阴离子对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 硫氧化表观活性的影响效应不同, 其影响由大到小的顺序依次为 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} ; 在高浓度 PO_4^{3-} 的胁迫(300 mmol/L)下, 细菌所表达蛋白质的总数量减少, 但同时表达一些特异性蛋白质, 这说明细菌可通过抑制一些在正常条件下表达的蛋白质, 同时表达一些新的蛋白质来应对无机离子的胁迫效应。

关键词: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌; 阴离子; 胁迫效应

中图分类号: TF18 文献标识码: A

Effect of anions on growth and sulfur oxidation activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans*

ZHANG Cheng-gui, ZHANG Qian, WANG Jing, ZHANG Rui-yong, HE Huan, XIA Jin-lan, QIU Guan-zhou

(Key Laboratory of Biometallurgy, Ministry of Education, School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: The effects of NO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- and PO_4^{3-} on the growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and sulfur oxidation activity were investigated. The results show that the anions have different effects on the sulfur oxidation activity, and the inhibition effect sequence from great to little is Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} . The total proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown under PO_4^{3-} threatening condition (300 mmol/L) are down-regulated, but specific proteins are observed, when compared with normal condition. These specific proteins may take part in the response to the stress effect of anions.

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; anion; stress effect

硫化矿分解时产生大量的元素硫和其它含硫化合物, 它们经嗜酸硫氧化细菌(包括 *Acidithiobacillus ferrooxidans*)氧化为终产物硫酸。这个过程十分复杂, 受各种因素, 包括物理、化学和生物因素的影响。*Acidithiobacillus ferrooxidans* 是以氧化亚铁离子、元素硫或还原态硫化物获得能量而生长的嗜酸硫氧化细菌之一, 是重要的生物浸出功能菌^[1-2]。*Acidithiobacillus ferrooxidans* 生存在极端酸性环境下, 属自养革兰氏阴性细菌, 最适生长温度为 30 左右。在一定的温度、大气压、营养离子和实验菌种等条件下,

Acidithiobacillus ferrooxidans 对硫的生物氧化过程受环境中各种阳离子和阴离子的影响^[3-5]。已有的研究表明, *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的硫氧化活性也能被金属离子抑制, 相对于 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 在亚铁氧化过程中的金属离子相互竞争性抑制来说, 其机理可能更为复杂, 二价金属离子如 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 在高浓度时相对于同浓度 K^+ 和 Na^+ 来说, 抑制硫氧化的效果更为显著^[4]。TAKEUCHI 和 SUZUKI^[5] 研究发现, 在不同 pH 的酸性条件下, 嗜酸氧化硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)的硫氧化活性不同。

在研究阳离子对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 生长活性的影响时,往往忽略阴离子的影响。因此,有必要了解环境中的各种阴离子对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的生长和硫氧化表观活性影响的一般性规律。

本文作者以嗜酸硫氧化细菌中的模式菌株 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 为研究对象,以细菌生长过程中的生长曲线、溶液 pH 值变化等一些实时参数来反映环境中的 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 和 PO_4^{3-} 等典型的阴离子浓度逐渐增加时对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 硫氧化表观活性影响的一般性规律,为获得浸矿细菌的最优生长和硫氧化活性条件提供依据。

1 实验

1.1 菌株、培养基和培养条件

Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 23270 来源于美国模式菌种收集中心,使用 9K 培养基进行液体培养,对菌种进行活化和传代,在含 5.0 g/L 元素硫的 9K 培养基中,营养成分分别为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L; KCl , 0.1 g/L; K_2HPO_4 , 0.5 g/L 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.01 g/L。培养液初始 pH 值用 5 mol/L 的 H_2SO_4 调整至 2.5。

加入不同浓度梯度的各种阴离子(NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 和 PO_4^{3-})钾盐,设置重复 3 组,细菌用 250 mL 锥形瓶于 30 °C 摇床中以 180 r/min 振荡培养。

1.2 细菌在不同浓度阴离子溶液中生长行为的观察

用 Olympus 生物显微镜(CX-31)通过血球计数板直接计数的方法测定细菌的浓度来比较分析 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 在不同浓度阴离子溶液中生长呈现的生长曲线。溶液 pH 值的变化用上海雷磁 pHS-3C pH 计测量,间接推测细菌的硫氧化活性。

1.3 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 细胞总蛋白质的提取及双向电泳展示

将对数生长期细菌收集后分成两份,一份转入 300 mmol/L 的磷酸盐环境中静置 72 h,一份作为对照。将收集的细菌样品放入预冷的玻璃匀浆管中,加入 5 倍体积的预冷样品裂解液,套入预冷的匀浆头后,以 2 400 r/min 的速度将细菌裂解约 15 min,然后室温放置 2 h,于 4 °C 下 16 000 r/min 离心 40 min 后,收集上清液部分冷冻干燥,即为细菌可提取的可溶性总蛋白

质。样品经第一向固相 pH 梯度等电聚焦和第二向 SDS-PAGE 电泳后进行考马斯亮蓝 G-250 染料染色。利用 Uniscan scanner (清华紫光)扫描仪和 2-D Imagemaster 7.2 专业分析软件(GE)对着色凝胶图像进行分析,得到凝胶图谱。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度 NO_3^- 对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 生长和硫氧化的影响

在本实验中,低浓度 NO_3^- (10 mmol/L)能延缓细菌的生长速度,高于 50 mmol/L 的 NO_3^- 对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的生长和硫氧化活性有强烈的抑制作用,其结果如图 1 所示。有报道 1 mmol/L 的 NO_3^- 就能完全抑制 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 对亚铁的氧化, NO_3^- 在超过 94 mmol/L 时能导致细菌死亡;在单质硫

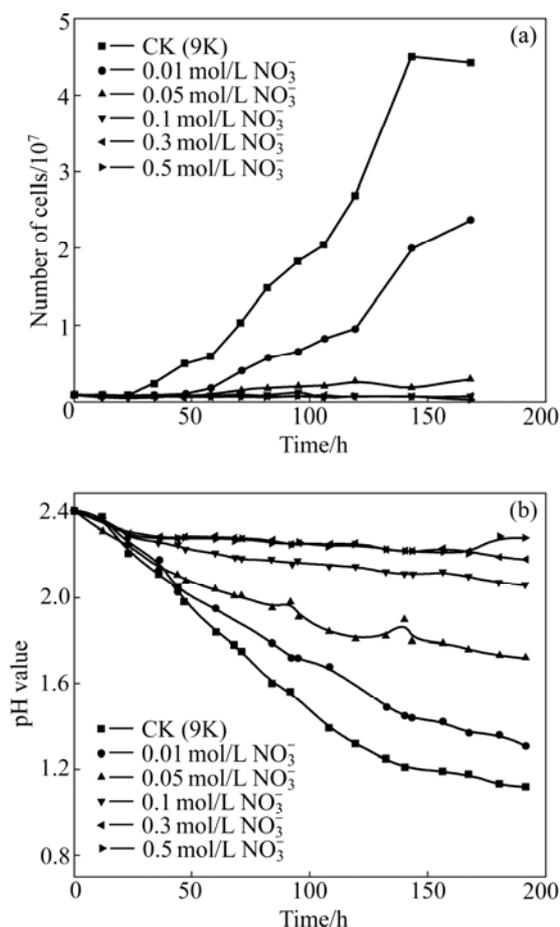


图 1 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 在含不同浓度 NO_3^- 的 9K+S 培养基中的生长曲线及 pH 值变化曲线

Fig.1 Growth curves of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and change curves of pH values during cultivation in 9 K medium with different concentrations of NO_3^-

中传代生长的 *Acidithiobacillus ferrooxidans* SM-4 能承受 100 mmol/L 的硝酸根离子^[6-7], 这些结果和本实验结果相差较大, 可能是不同菌株对 NO₃⁻的耐受程度不同。也有研究报道, 在不同的 pH 环境中, 同一 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 菌株能耐受的 NO₃⁻浓度也不同^[7]。但总的趋势是较低浓度的 NO₃⁻能抑制细菌的生长, 甚至使细菌逐渐死亡。

2.2 不同浓度 Cl⁻对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 生长和硫氧化的影响

Acidithiobacillus ferrooxidans 在含不同浓度 Cl⁻的 9K+S 培养基中的生长曲线及 pH 值变化曲线如图 2 所示。由图 2 可知, 浓度为 10 mmol/L 的 Cl⁻能显著延缓细菌的生长, 硫氧化活性相对正常生长情况显著降低; 当 Cl⁻浓度为 50 mmol/L 时, 细菌在数量和细菌生活环境 pH 值都不再发生变化, 表明相对较低浓

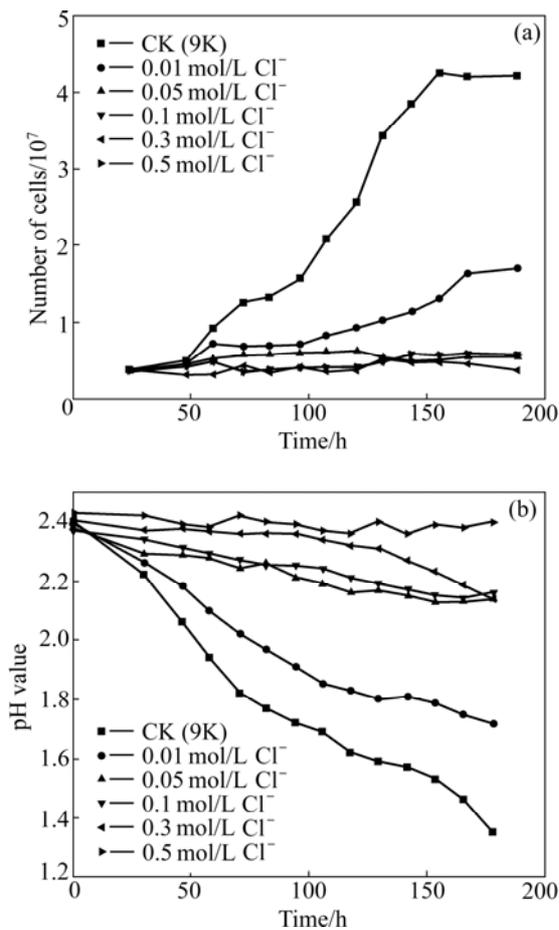


图 2 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 在含不同浓度 Cl⁻的 9K+S 培养基中的生长曲线以及 pH 值变化曲线

Fig.2 Growth curves of *Acidithiobacillus ferrooxidans* (a) and change curves of pH values (b) during cultivation in 9K medium with different concentrations of Cl⁻

度的 Cl⁻能成为 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 生长和硫氧化的抑制剂。研究表明, Cl⁻对细菌的毒害主要是对铁依赖性的细胞色素 c 有强烈的抑制作用, 阻碍电子通过铁依赖性的细胞色素 c 的传递^[7]。

2.3 不同浓度 SO₄²⁻对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 生长和硫氧化的影响

SO₄²⁻是嗜酸氧化亚铁硫杆菌的代谢产物之一, 相对 Cl⁻和 NO₃⁻来说, 细菌能够承受较高浓度的 SO₄²⁻, (见图 3)。由图 3 可知, SO₄²⁻浓度在 100 mmol/L 时, 对细菌的生长起到延缓效应; 在 SO₄²⁻浓度大于 300 mmol/L 时, 完全抑制细菌的生长。通常在酸性矿水或含硫温泉中都含有较高浓度的 SO₄²⁻, 初始研究认为 SO₄²⁻介导细菌对亚铁离子的氧化利用^[6, 8]。FRYI 等^[9]研究报道, 在依赖氧气的电子传递链中, SO₄²⁻负责从铁硫簇到铜蓝蛋白中的铜原子的电子转运, 在铁、铜蓝蛋白氧化还原酶的体外酶活性试验中发现, 铜蓝蛋

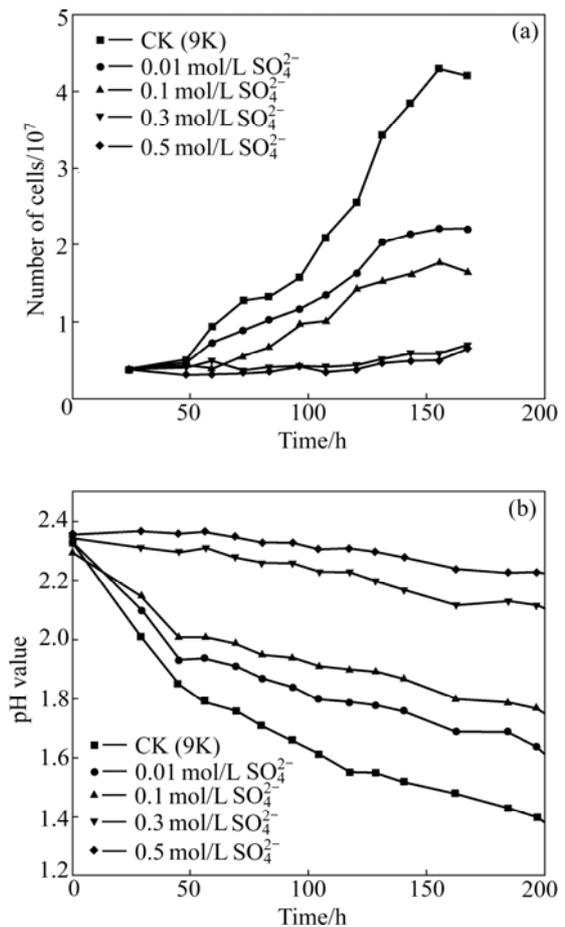


图 3 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 在含不同浓度 SO₄²⁻的 9K+S 培养基中的生长曲线以及 pH 值变化曲线

Fig.3 Growth curves of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and change curves of pH values during cultivation in 9K medium with different concentrations of SO₄²⁻

白只有在硫酸根离子存在时才能被亚铁离子还原。

2.4 不同浓度 PO_4^{3-} 对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 生长和硫氧化的影响

PO_4^{3-} 对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的生长和硫氧化活性的影响结果如图 4 所示。由图 4 可知, 50 和 100 mmol/L 的 PO_4^{3-} 都能促进细菌的生长, 提高细胞分裂速度, 细菌生长平稳期的细菌浓度显著大于正常生长情况下的细菌浓度。相对于 Cl^- 和 NO_3^- 来说, 高浓度(大于 300 mmol/L)的磷酸盐抑制细菌的生长。磷是细菌体内核酸、磷脂和 ATP 的重要组成成分, 是细胞的结构物质, 参与高能化合物如 ATP 和 ADP 的形成, 在能量积累和转换过程中发挥作用, 能够活化体内蛋白质, 调控细菌体的整个代谢过程, 在体内信号转导和生理代谢等方面扮演十分重要的角色。在细菌生活在磷酸盐饥饿的情况下时, 细菌易形成纺锤体

状阻碍细菌分裂。研究发现, *Acidithiobacillus ferrooxidans* 在磷酸盐饥饿状况下, 体内至少有 25 种蛋白质的表达水平发生变化, 这说明在 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 体内可能存在有磷酸盐饥饿的预警应对系统^[10-11]。

从典型阴离子(NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 和 PO_4^{3-})对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 硫氧化表观活性影响实验结果可知, 不同阴离子在各个不同浓度情况下, 对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 硫氧化表观活性影响效应不同, 其影响由大到小的顺序依次为: Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} 。50 mmol/L 的 NO_3^- 和 Cl^- 能完全抑制细菌的生长, 100 mmol/L 的 SO_4^{2-} 延缓细菌的生长, 100 mmol/L 的 PO_4^{3-} 能促进细菌的生长, 但 300 mmol/L 的 PO_4^{3-} 延缓细菌的生长。环境中高浓度阴离子延缓和抑制细菌生长的原因可能是源于环境中高浓度阴离子对细菌细胞渗透压的改变。当外界渗透压改变时, 微生物胞内的水活度及各种组分的浓度会发生相应的变化, 细胞体积也会缩小或膨胀, 导致胞内各种生理代谢活度紊乱, 从而引起细菌生长活性降低或逐渐死亡^[10]。细菌自身也在长期进化过程中形成了适应渗透压变化的机制, 这种机制需要细菌在胁迫环境中进行适当的生理反应来保证调节和代谢功能的正常进行^[11]。

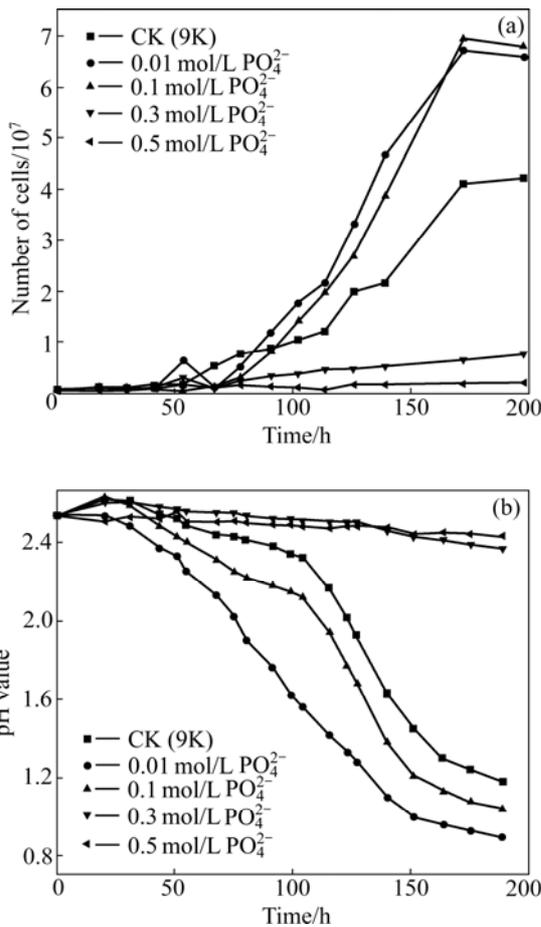


图 4 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 在含不同浓度 PO_4^{3-} 的 9K+S 培养基中的生长曲线以及 pH 值变化曲线

Fig.4 Growth curves of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and change curves of pH values during cultivation in 9K medium with different concentrations of PO_4^{3-}

2.5 PO_4^{3-} 胁迫环境对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 总蛋白表达的影响

本实验中选取以 PO_4^{3-} 为代表来了解阴离子胁迫环境对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的总蛋白表达的影响, 其结果如图 4 所示。由图 4 可知, 300 mmol/L 的 PO_4^{3-} 延缓 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的生长(将该环境中存在 6 d 的细菌接种到新鲜培养基中, 细菌能恢复生长繁殖), 推测细菌在这种胁迫的环境中, 尽可能减小生理代谢活动, 并转变为细胞本底的代谢活动。比较处于胁迫和正常生长的 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的蛋白质表达差异, 有助于直接了解细菌对环境胁迫的适应变化及发现与硫氧化相关的硫氧化酶系。图 5 所示为 PO_4^{3-} 胁迫环境 72 h 后和正常培养 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的总蛋白表达差异展示。

已有的研究报道, 在磷饥饿的环境下生长的细菌体内有独特的适应应对体系, 表现在细菌体内一些特异性的蛋白质表达明显增加, 多种基因开始表达或增强表达, 包括高亲和力和磷转运子、有机酸的分泌等相关基因^[12-14]。目前, 利用基因转录谱的差异来研究微生物对环境胁迫的应答反应是十分有效的研究手段^[11, 15-16]。但从细菌应答反应到细菌维持本底的代谢

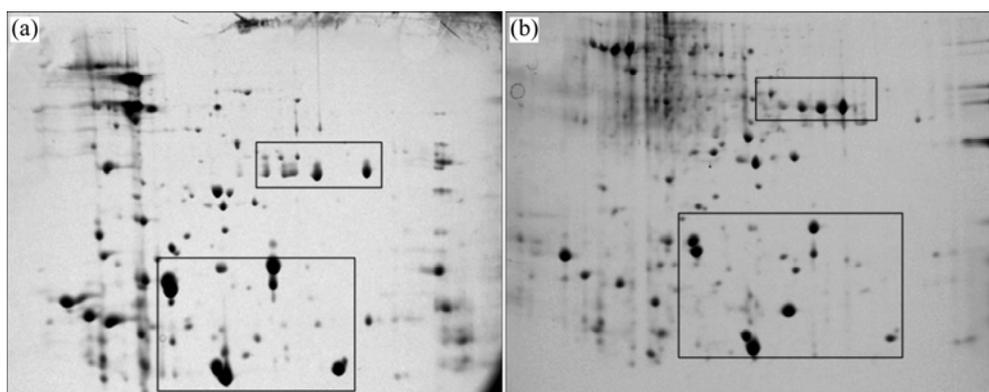


图 5 PO_4^{3-} 胁迫环境下和正常培养 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的总蛋白表达差异谱展示

Fig.5 Electrophoresis patterns of total protein of *Acidithiobacillus ferrooxidans* under PO_4^{3-} threatening condition (a) and normal condition (b)

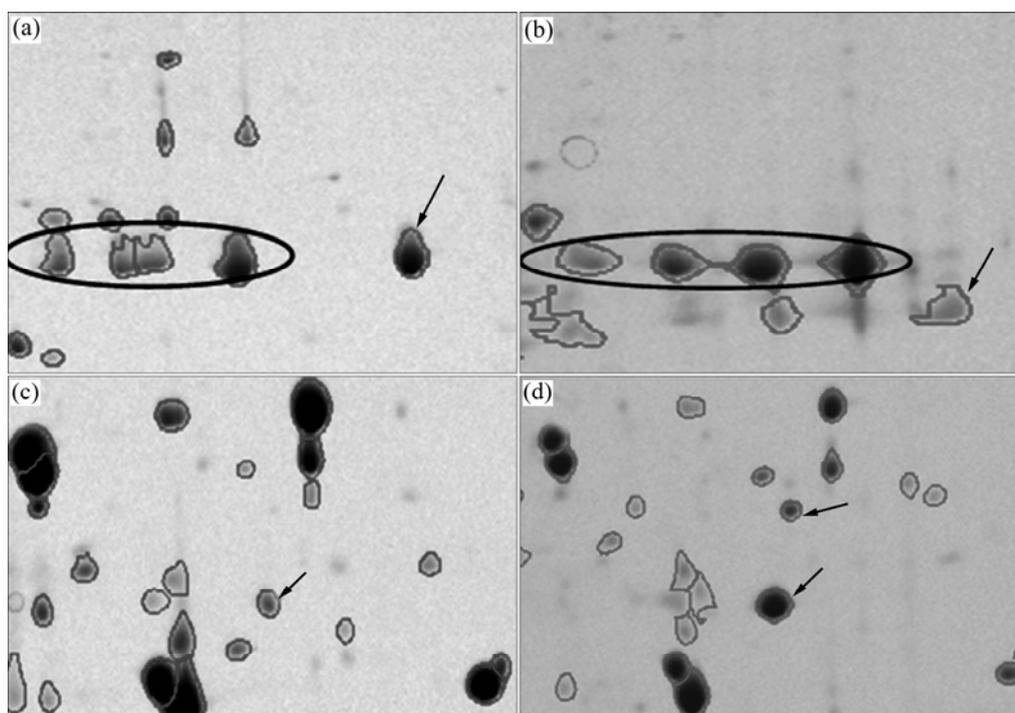


图 6 PO_4^{3-} 胁迫环境下和正常培养 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 总蛋白中表达差异斑点

Fig.6 Differential expressed total protein spots of *Acidithiobacillus ferrooxidans* under PO_4^{3-} threatening condition ((a), (c)) and normal condition ((b), (d))

活动, 最终体现为蛋白质效应, 即细菌体内一些蛋白质的表达受到抑制或/和应急蛋白质产生^[17-18]。在本实验中, 如图 5 和 6 所示, PO_4^{3-} 胁迫环境和正常培养 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的总蛋白表达电泳展示结果表明, 正常生长的细菌体内蛋白质表达数量相对较多(见图 6(b)), 相对在高磷胁迫下的蛋白展示中相对缺失的蛋白质斑点, 推测这些蛋白质可能是正常生长情况下主要参与生理生化反应的酶(包括硫化系

统中的一些关键酶系)。相对于正常生长的细菌蛋白质展示谱, 在高磷胁迫后的特异性蛋白质, 可能与参与细菌对无机离子的反应, 参与细胞的渗透调节, 以及应对环境胁迫有关。以 PO_4^{3-} 为代表的阴离子对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 生长和硫化表现活性影响, 以及 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 对 PO_4^{3-} 胁迫环境和正常培养下的差异斑点的具体功能的解析, 将有助于更好地了解浸矿细菌的特性, 为细菌的最佳生

长条件提供依据。

3 结论

1) 不同的阴离子对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 硫氧化表面活性影响效应不同, 其影响顺序由大到小依次为 Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} 。

2) 高浓度的阴离子抑制 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的生长, 100 mmol/L 的 SO_4^{2-} 和 300 mmol/L 的 PO_4^{3-} 延缓细菌的生长, 50 mmol/L 的 NO_3^- 和 Cl^- 能完全抑制细菌的生长。

3) 高浓度 PO_4^{3-} 胁迫下, 细菌表达蛋白的总数量相对减少, 但同时表达一些特异性蛋白。

REFERENCES

- [1] RAMÍREZ P, GUILIANI N, VALENZUELA L, BEARD S, JEREZ C A. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds or metal sulfides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4491–4498.
- [2] ROHWERDER T, GEHRKE T, KINZLER K, SAND W. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 63(3): 239–248.
- [3] FANG D, ZHOU L X. Effect of sludge dissolved organic matter on oxidation of ferrous iron and sulfur by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. Water, Air & Soil Pollution, 2006, 171(1): 81–94.
- [4] SUZUKI I, LEE D, MACKAY B, HARA H, OH J K. Effect of various ions, pH, and osmotic pressure on oxidation of elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(11): 5163–5168.
- [5] TAKEUCHI T, SUZUKI I. Cell hydrophobicity and sulfur adhesion of *Thiobacillus thiooxidans*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(5): 2058–2061.
- [6] LAZAROFF N. The specificity of the anionic requirements for iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Journal of General Microbiology, 1977, 101: 85–91.
- [7] LESIA H, HECTOR M L, ISAMU S. Selective inhibition of the oxidation of ferrous iron or sulfur in *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 1031–1037.
- [8] LAZAROFF N. Sulfate requirement for iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Journal of Bacteriology, 1963, 85(1): 78–83.
- [9] FRYI V, LAZAROFF N, PACKER L. Sulfate-dependent iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*: characterization of a new EPR detectable electron transport component on the reducing side of rusticyanin[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986, 246(2): 650–654.
- [10] CSOKAL N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress[J]. Microbial Research, 1989, 53(1): 121–147.
- [11] ASPEDON A, PALMER K, WHITELEY M. Microarray analysis of the osmotic stress response in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(7): 2721–2725.
- [12] HE Z, ZHONG H, HU Y, XIAO S, LIU J, XU J, LI G. Analysis of differential-expressed proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown under phosphate starvation[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 38(5): 545–549.
- [13] SEEGER M, JEREZ C A. Phosphate limitation affects global gene expression in *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Geomicrobiology Journal, 1992, 10(3/4): 227–237.
- [14] WASAKI J, SHINANO T, ONISHI K, YONETANI R, SASAKI T. Transcriptomic analysis indicates putative metabolic changes caused by manipulation of phosphorus availability in rice leaves[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(9): 2049–2059.
- [15] FIROVED A M, WOOD S R, ORNATOWSKI W, DERETIC V, TIMMINS G S. Microarray analysis and functional characterization of the nitrosative stress response in nonmucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(12): 4046–4050.
- [16] CHEUNG K J, BADARINARAYANA V, SELINGER D W, JANSE D, CHURCH G M. A microarray-based antibiotic screen identifies a regulatory role for super coiling in the osmotic stress response of *Escherichia coli*[J]. Genome Research, 2003, 13(2): 206–215.
- [17] RIEDEL K, LEHNER A. Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics [J]. Microbiology, 2007, 7(8): 1217–1231.
- [18] PETERSOHN A, BRIGULLA M, HAAS S, HOHEISEL J D, VÖLKER U, HECKER M. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(19): 5617–5631.

(编辑 龙怀中)