

异亮氨酸对嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外多聚物的影响

白郁山,刘 政,张 丹,龚权君,刘 丹,刘晓梅

(辽宁工程技术大学 理学院,辽宁 阜新 123000)

摘要:为提高生物冶金效率,研究了添加异亮氨酸对嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外多聚物组分、嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长和吸附能力的影响。结果表明:与对照相比,添加异亮氨酸的嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长周期明显缩短, Fe^{2+} 的耗尽时间缩短,培养后期 Fe^{2+} 剩余量明显降低。最高菌密度提高17%,环境pH降低20.45%,胞外多聚物中蛋白质组分提高16.84%,多糖组分提高5.05%。培养时间为72 h时,添加异亮氨酸的嗜酸氧化亚铁硫杆菌菌液EPS吸附量为 $54.520\ 8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,比对照提高了44.05%。整个生长周期中,异亮氨酸对菌液中游离EPS含量影响不大。

关键词:嗜酸氧化亚铁硫杆菌;生物预氧化;胞外多聚物;异亮氨酸

中图分类号:TF18

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)01-0118-03

生物冶金技术具有低成本、低污染和高适应性等特点,是当今世界冶金矿业发展的必然趋势,对微生物浸出机理的不断探索势在必行。氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)(简称*T. f.*)的研究始于20世纪50年代初,后更名为嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)(简称*At. f.*)^[1],该菌是生物冶金常用菌种。

细菌胞外多聚物(Extracellular polymeric substance, EPS)是指附着在细菌表面或围绕在细菌周围,水道、孔隙穿通其间,形成蘑菇状膜结构,用于自我保护和相互粘附的天然有机物^[2]。*At. f.*的EPS主要由多糖类、脂类、蛋白质和铁离子构成,其中蛋白质主要包含5~6种多肽,分子量低于60 000,具有增强菌体吸附作用、加快氧化还原反应速度及保护*At. f.*生长等重要作用。

由于生物氧化浸出工艺生产周期长,浸出速率低,限制了其扩大应用。而浸矿微生物营养学的研究可能有效解决生物冶金效率低的问题^[3]。现阶段国内的研究较少从微生物生长所需营养条件角度进行。微生物中的很多活性物质化学本质往往是蛋白质,作为蛋白质的前体物质,氨基酸消耗量极为巨大。因此,氨基酸的供应情况决定菌类特定物质的表达及活性表现。张文超等研究了添加6种氨基酸对目标蛋白的影响,结果表明,除胱氨酸对目标蛋白的表达影响不明显外,其它5种氨基酸对菌体生长和目标蛋白表达都有一定促进作用,且氨基酸添加量在一定范围内与菌体生长情况呈正相关^[4]。

该试验从微生物营养学的角度出发,研究直接添加异亮氨酸对氧化亚铁硫杆菌的生长及活性的影响,以期缩短浸矿时间,降低研究成本和生产耗能。同时探究该种氨基酸对EPS主要组分含

量的影响,以探究该种氨基酸改善其生物活性的实质作用,对生物浸矿的进一步工业化应用起到促进作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌种为嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)(简称*At. f.*);供试矿石为难浸含硫矿石。菌种及矿石均购于中国科学院工程研究院;供试氨基酸为异亮氨酸。

试验仪器及设备为PHS-3C型pH计(上海雷磁仪器厂)、XSZ-4G型光学显微镜(上海精密科学仪器有限公司)、THZ-92型气浴恒温振荡器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)及UV-752型紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)。所用试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养基配制 9K培养基^[1],其主要成分为: $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44.3 g、KCl 0.1 g、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g,蒸馏水1 000 mL。用于培养氧化亚铁硫杆菌。

浸矿培养基的配制:氧化亚铁硫杆菌所使用的浸矿培养基为不添加 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的9K培养基,矿石添加量为2%。

1.2.2 测定项目及方法 亚铁离子测定采用邻菲罗啉分光光度计法^[5];pH测定采用PHS-3C型精密酸度计;菌体浓度测定采用血球计数板法^[6]。EPS提取采用NaOH法^[7];蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法^[8],多糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[9]。

2 结果与分析

2.1 异亮氨酸对*At. f.*菌液浓度的影响

从图1可以看出,添加异亮氨酸后,*At. f.*生长各阶段均较对照在时间上有所提前,调整周期比对照组调整周期缩短了10 h,对数周期缩短了5 h,稳定期提前了约15 h。表明异亮氨酸能够明

收稿日期:2013-08-31

第一作者简介:白郁山(1975-),男,辽宁省辽阳市人,硕士,讲师,从事微生物冶金研究。E-mail:903551042@qq.com。

显缩短 *At. f.* 的生长各阶段所需时间,促进氧化亚铁硫杆菌的生长。

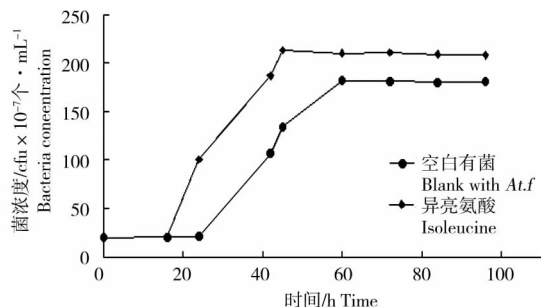


图1 异亮氨酸对 *At. f.* 浓度的影响
Fig. 1 Effect of isoleucine on the *At. f.* bacteria concentration

添加异亮氨酸后, *At. f.* 菌在对数生长期阶段的生长曲线斜率显著增加,表明异亮氨酸对于 *At. f.* 在对数生长期的生长速率有促进作用;对照样菌种浓度在 60 h 时达到最大值,为 1.82×10^9 个。异亮氨酸添加样的菌种浓度在 45 h 时达到最大值,为 2.13×10^9 个,菌种浓度比对照样提升了 17%,说明添加氨基酸能够增加菌种数量。

2.2 异亮氨酸对亚铁离子剩余量的影响

从图 2 可以看出,培养初期培养液中的 Fe^{2+} 含量变化不明显,此时 *At. f.* 菌处于调整期, Fe^{2+} 消耗较少;进入对数期 *At. f.* 菌对 Fe^{2+} 消耗增加,培养液中的 Fe^{2+} 含量开始明显减少。添加异亮氨酸, *At. f.* 菌调整期明显缩短,且培养相同时间培养液中 Fe^{2+} 含量明显少于对照组。说明添加异亮氨酸可以提升 Fe^{2+} 的氧化速率,缩短氧化进程,进而缩短预氧化进程。

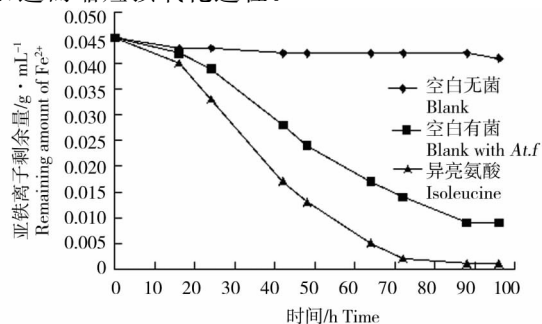


图2 异亮氨酸对 Fe^{2+} 剩余量影响
Fig. 2 Effect of isoleucine on the remaining amount of Fe^{2+}

2.3 异亮氨酸对环境 pH 的影响

从图 3 可以看出, 0~16 h 为 *At. f.* 菌种生长的停滞期, pH 均无明显变化, 在 16~48 h, *At. f.* 菌种进入对数生长期后, 此阶段是 *At. f.* 菌种大量生成新生原生质以满足自身的新陈代谢所需的酶等, 因此消耗大量的 H^+ , 使环境的 pH 迅速升高, 同时环境中的 Fe^{2+} 被菌氧化为 Fe^{3+} , Fe^{3+} 又发生连续的水解反应, 进而产生大量的 H^+ , 而在此阶段 Fe^{2+} 的氧化速率也逐渐升高, 因而出现 pH 达到最大点后回落的现象。

添加异亮氨酸的培养基 pH 上升曲线比未添加的对照组平缓, 对照组的最高 pH 达到 2.28,

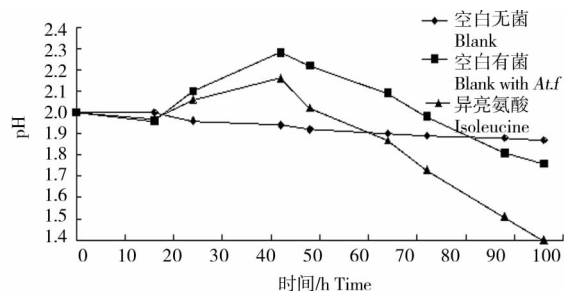


图3 异亮氨酸对 pH 的影响
Fig. 3 Effect of isoleucine on pH

而添加异亮氨酸的培养基最高 pH 仅为 2.16, 比对照样低了 5.26%, 表明添加异亮氨酸的 *At. f.* 菌培养基的 pH 较早地出现了下降的趋势, 其消耗 H^+ 的速率较快, 并且与 Fe^{3+} 的水解速率达到平衡, 说明添加异亮氨酸能够有效缩短菌种生长周期。48 h 后, 两组 pH 均明显下降, 此阶段中, Fe^{2+} 氧化速率达到最大值, pH 持续下降, 而后 Fe^{2+} 氧化速率开始逐渐下降。未添加氨基酸的对照组在 95 h 的 pH 为 1.76, 而添加异亮氨酸的 *At. f.* 菌培养基 pH 为 1.40, 比对照组低了 20.45%, 其较对照组 pH 的下降速率要快, 而且更早达到 pH 最低点, 反映出添加氨基酸能够增加菌种氧化 Fe^{2+} 的速率。

2.4 异亮氨酸对 EPS 中多糖含量的影响

从图 4 可以看出, 在整个培养过程中, EPS 中的多糖含量变化不大, 呈现出的波动性较小, 说明添加异亮氨酸对 EPS 中多糖含量并没有明显影响。培养至后期, 添加异亮氨酸的 *At. f.* 菌培养基多糖含量较对照增加 5.05%。

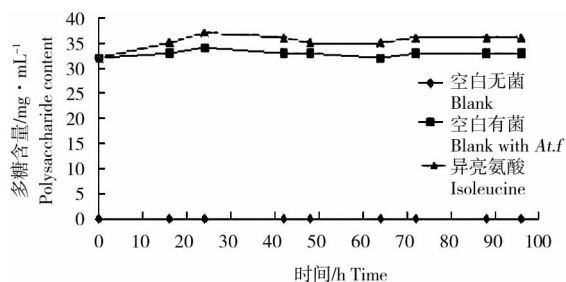


图4 异亮氨酸对 EPS 多糖含量的影响
Fig. 4 Effect of isoleucine on EPS polysaccharide content

2.5 异亮氨酸对 *At. f.* 菌 EPS 蛋白质含量的影响

从图 5 可以看出, 整个培养过程中 EPS 蛋白质含量呈上升趋势, 而添加异亮氨酸可明显提高 EPS 中蛋白质含量。培养至 16 h 时, 添加异亮氨酸的培养基中 EPS 蛋白质含量比对照样提高 8.45%, 培养至结束时, 添加异亮氨酸的 *At. f.* 培养基的 EPS 蛋白质含量比对照提高 16.84%。说明添加异亮氨酸能够促进 EPS 中蛋白质的表达, 分析原因可能由于氨基酸添加到培养基中后可被细菌直接吸收利用, 作为蛋白质合成的单体物质来源, 从而省略了由无机二氧化碳逐步合成氨基

酸的漫长全合成过程,使其更容易合成蛋白质类产物。

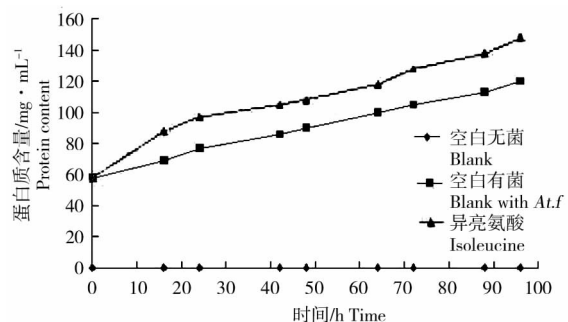


图5 异亮氨酸对EPS蛋白质含量的影响
Fig. 5 Effect of isoleucine on EPS protein content

2.6 异亮氨酸对 *At. f* EPS 吸附量与游离量的影响

从图6可以看出,金矿石表面EPS的吸附量随着培养时间的延长而增加;游离量在培养前、中期变化不大,在培养后期略有增加。

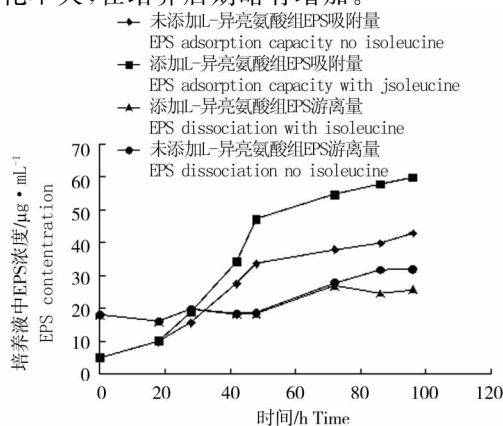


图6 异亮氨酸对EPS吸附量与游离量的影响
Fig. 6 Effect of isoleucine on adsorption capacity and dissociation of EPS

在培养前期(0~28 h)添加异亮氨酸对EPS吸附量影响不大。在培养的中后期,添加异亮氨酸的 *At. f* 菌液EPS的吸附量明显高于对照,培养至48 h时,添加异亮氨酸的 *At. f* 菌EPS吸附量为 $47.0726 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,较对照提高了40.42%;培养至72 h时,添加异亮氨酸的 *At. f* 菌EPS吸附量为 $54.5208 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,较对照提高了44.05%。整个生长周期中,菌液中的EPS游离量变化不大。

3 结论

异亮氨酸对 *At. f* 生长有促进作用。添加异亮氨酸后, *At. f* 的生长周期较对照缩短了13 h,生长周期的各个阶段分别不同程度地缩短或提前。胞外多聚物中蛋白质组分提高幅度较大,多糖组分变化较小。

培养液中与矿石结合的EPS量大幅增加,但游离EPS量相差不大,说明异亮氨酸对EPS与金矿石粉的结合有促进作用。

参考文献:

- [1] 罗志雄,张广积,方兆珩.采用中温菌和常温菌浸出含砷金精矿[J].中国有色金属报,2007,8(17):1342-1347.
- [2] 李茹,张书平,崔心水,等.氧化亚铁硫杆菌生长特性的研究[J].西安工程大学学报,2008,22(6):94-102.
- [3] 张知见,张春风.氧化亚铁硫杆菌的培养及氧化性能测定[J].内蒙古石油化工,2008,10(2):35-41.
- [4] 李廷梁.俄罗斯难浸金矿的生物冶金技术[J].贵金属,1998,19(1):54-56.
- [5] 煤矿酸性水中铁离子的测定方法.中华人民共和国煤炭行业标准[S].1995,647-648.
- [6] 姚英杰.氧化亚铁硫杆菌分解难处理金矿的研究[D].成都:四川大学,2005:5.
- [7] 马军军,周迟骏.胞外多聚物对污泥的调理[J].化工进展,2010,29(7):1369-1372.
- [8] 王孝平,邢树礼.考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J].天津化工,2009,23(9):40-42.
- [9] 富瑶,杨洪英,范有静,等.浸矿细菌胞外聚合层中多糖含量的测定[J].中南大学学报,2010,10(5):1686-1690.

Effect of Isoleucine on Extracellular Polymeric Substance of *Acidithiobacillus ferrooxidans*

BAI Yu-shan, LIU Zheng, ZHANG Dan, GONG Quan-jun, LIU Dan, LIU Xiao-mei
(College of Science, Liaoning Technical University, Fuxin, Liaoning 123000)

Abstract: In order to improve the efficiency of biological metallurgy, the effect of isoleucine added to the liquid medium on extracellular polymeric component of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, growth and adsorption capacity were studied. The results showed that compared with CK, growth cycle of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with isoleucine and consumption time of Fe^{2+} were shortened, the highest cell density increased by 17%, pH of medium decreased by 20.45%, protein content of extracellular polymeric increased by 16.84%, polysaccharide content increased by 5.05%. The adsorption amount of EPS added isoleucine was $54.5208 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for 72 h, increased by 44.05% than CK. During the whole growth cycle, isoleucine had little effect on dissociation of EPS.

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; biological pre-oxidation; extracellular polymeric substances; isoleucine