

不同方法提取嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外聚合物的比较分析

顾卫华, 白建峰, 卢亮, 张洁娜, 王景伟

(上海第二工业大学 a. 电子废弃物研究中心; b. 上海电子废弃物资源化协同创新中心, 上海 201209)

摘要: 从嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, A.f 菌) 中提取胞外聚合物 (Extracellular Polymeric Substances, EPS) 的方法有很多, 但不同方法提取的 EPS 成分及含量都有较大区别。通过对比 NaOH 法、EDTA 法、超声法、离心法提取 A.f 菌 EPS 的研究, 分析高效提取 A.f 菌 EPS 方法的同时, 得到 EPS 成分及含量在不同提取方法下的变化情况。实验结果表明, 对于未驯化和驯化处理的实验组, 超声法提取的 EPS 最多, 分别达到 $37.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $55.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 同时其对细菌自身的破坏最小, 测得的核酸占比分别为 8.7%、8.1%。4 种提取方法在 A.f 菌驯化前后, 提取的 EPS 中多糖与蛋白质的比例范围分别为 2.71~3.49 和 3.24~5.58。该实验结果可为模拟 EPS 来探索 EPS 对 A.f 菌浸出电子废弃物中金属的影响提供参考。

关键词: 电子废弃物; 嗜酸氧化亚铁硫杆菌; 胞外聚合物; 提取

中图分类号: Q89

文献标志码: A

0 引言

EPS(Extracellular Polymeric Substances, 胞外聚合物)指的是细菌或真菌在一定条件下分泌于细胞外的一些高分子有机物, 主要包括蛋白质、多糖、核酸^[1-2]。A.f 菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, 嗜酸氧化亚铁硫杆菌)是一种化能自养菌, 专性好氧, 革兰氏阴性, 最佳生长 pH 值为 1.5~3.5, 最佳生长温度为 25~35 °C^[3]。作为一种典型的浸矿细菌, A.f 菌会根据生长环境的变化分泌一些 EPS 来保护自身更好的繁殖。目前, 细菌 EPS 的提取方法主要有物理法(离心法、加热法、超声法)、化学法(EDTA 法、NaOH 法、阳离子交换树脂提取法), 提取对象主要是好氧/厌氧污泥、生物膜等常见物质^[4-6]。关于 A.f 菌 EPS 的研究主要集中于 EPS 介导的 A.f 菌浸矿机制上。王利等^[7]研究了在添加 Fe^{3+} 及 A.f 菌与否、A.f 菌失活与否、EPS 脱离菌活体细胞与否等 6 组组合条件下, 紫金山铜矿样浸矿过程中氧化还原电位变化的规律, 结果表明, EPS 对金属硫化物的生物浸矿过程离不开分泌它的活体细胞。Yu 等^[8]研究了 A.f 菌浸出黄铜矿中氧化还原电位、黄钾铁

矾和 EPS 的关系和影响, 结果表明, 细菌氧化的铁离子容易吸附在黄铜矿表面的 EPS 表层, 而有黄钾铁矾的 EPS 层是弱离子扩散壁垒, 会阻碍生物进一步浸出黄铜矿中的金属。为了深入探究 A.f 菌浸出电子废弃物中金属的作用机理, 鉴于金属在矿物和电子废弃物中的不同存在形态^[9], 有必要先对 A.f 菌 EPS 进行高效提取, 对比分析 A.f 菌驯化前后, 其 EPS 成分组成及变化情况, 为下一步揭示 A.f 菌浸出电子废弃物中金属的机理做准备。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用菌种筛选自江西德兴某铜矿酸性废水中, 所用 9K 培养基成分包括: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g, K_2HPO_4 0.5 g, MgSO_4 0.5 g, KCl 0.1 g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 42 g, 去离子水 1 L。培养液经 H_2SO_4 调节初始 pH 值为 2.0, 所得菌种经 16S RNA 鉴定为 A.f 菌^[10]。驯化用覆铜板购自上海某线路板厂。实验过程中使用的其他试剂主要有 EDTA、氢氧化钠、蒽酮、葡萄糖、无水碳酸钠、酒石酸钠、碳

收稿日期: 2016-11-23

通信作者: 白建峰(1978-), 男, 江苏泰兴人, 教授, 博士, 主要研究方向为电子废弃物资源化、环境微生物技术、污染土壤修复。E-mail: jfbai@sspu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(21307080), 上海第二工业大学重点学科建设项目(XXKZD1602), 上海第二工业大学校基金项目(EGD16XQD09)资助

酸氢钠、硫酸铜、牛血清白蛋白、二苯胺、冰醋酸、脱氧-D-核糖、2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸。

1.2 方法

1.2.1 EPS 提取法

分别用离心法、超声法、EDTA法、氢氧化钠法4种方法对驯化前后的A.f菌EPS进行提取。每种提取方法的优劣以胞外聚合物提取后细胞的破壁程度来表征,即溶液中测得的核酸量越大,细胞破裂的程度就越大,其对应的提取方法越差^[11]。

1.2.2 EPS 成分分析法

本实验针对每种提取方法得到的EPS进行了成分分析。采用Bicinchoninic Acid (BCA)法测定EPS中蛋白质的含量^[12],蒽酮法测定EPS中多糖的含量^[13],二苯胺法测定EPS中核酸(DNA)的含量^[14]。实验过程中得到的数据采用Excel及Origin8.0软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 EPS 提取效率

前期的研究表明,A.f菌在9K培养基中生长4~5天后可达到稳定期^[15]。实验过程中设置对照组,以覆铜板作为驯化因子对其中一组菌种做驯化处理,另一组不做处理。待A.f菌正常生长至第5天时,分别用不同方法提取其EPS,结果如图1所示。当A.f菌不做驯化处理时,用超声法提取的EPS含量最高,达到 $37.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,用NaOH法提取的EPS含量最少,只有 $24.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,两者差了 $12.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;而当A.f菌经过驯化处理后,相应地,超声法提取的EPS含量变为 $55.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,NaOH法提取的EPS含量则为 $39.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。从2种条件下提取的EPS含量来看,不论A.f菌驯化与否,用超声法都能提取最多的EPS含量,而NaOH法提取的EPS含量最少。此外,驯化后,A.f菌EPS的提取量得到了不同程度的增加。有研究表明,微生物EPS的分泌可以降低外界环境对该微生物正常生长的影响,并且外界环境越恶劣,其分泌的EPS就越多^[16]。Jiao等^[17]研究表明,在细菌浸出矿物时,细菌EPS除了含有蛋白质、多糖、核酸等大分子有机物外,还含有无机金属离子。在本实验中,向培养液中加入覆铜板作为驯化因子,因培养液中 Cu^{2+} 含量的不断增加,一方面,A.f菌需要不断地产生EPS来

抵抗外界环境的影响,另一方面,增加的 Cu^{2+} 含量也会被EPS所吸附,最终导致产生的EPS含量高于未驯化的A.f菌。这一现象可以被前人的研究结果很好的解释。

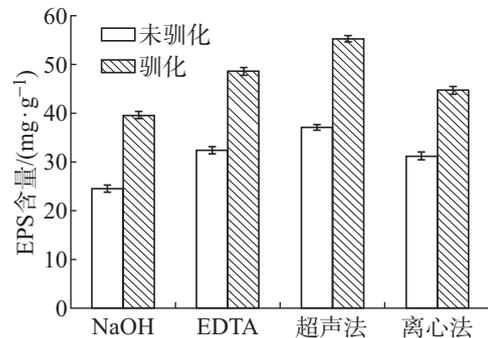


图1 不同方法提取A.f菌EPS含量对比

Fig. 1 Comparison of EPS contents in different extraction methods

2.2 EPS 提取效果

不同提取方法会导致提取的EPS成分及含量有所差别。由于溶液中DNA的含量只能来源于已破裂的细胞,因此,测溶液中DNA的含量可以反映出每种提取方法对细胞本身的破坏程度。Liao等^[18]研究认为,溶液中DNA在EPS中的比例在2%~15%内属正常。因而DNA在EPS中的比例常常被用来判断每种提取EPS方法的优劣。本实验对于溶液中核酸含量的测定结果如图2所示。在A.f菌未驯化组中,NaOH法提取的EPS中核酸含量高达17.3%,这已超出其正常范围,超声法提取的EPS中核酸含量则为8.7%;而在A.f菌驯化组内,NaOH法提取的EPS中核酸含量为14.1%,较驯化前有了一定程度的下降,超声法提取的EPS中核酸含量则变为8.1%。从图中可以看出,A.f菌驯化组内,不同方法提取的EPS中核酸含量普遍低于A.f菌未驯化组。可能的原因为A.f菌驯化后,其对 Cu^{2+} 的抗性增强,A.f菌细胞自身不容易破裂,导致溶液中核酸含量普遍低于A.f菌未驯化组。4种提取方法中,除了NaOH法在提取过程中对A.f菌自身伤害较大外,其余3种方法提取的A.f菌EPS中含有的核酸含量基本都在10%左右。结合已得到的结论,即超声法对于A.f菌EPS的提取效率最高,在本次对比实验中,超声法在提取A.f菌EPS的过程中,在提取出较多EPS的同时,对A.f菌自身伤害最小。因此,后续在提取A.f菌EPS时,可以选择超声波法高效温和的提取。

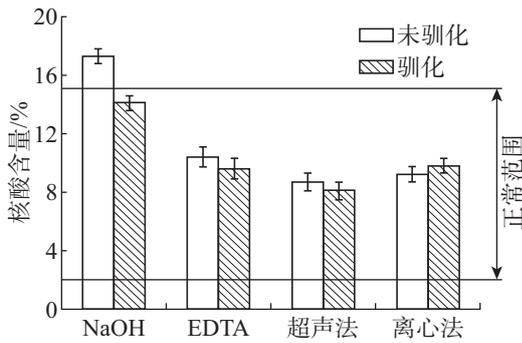
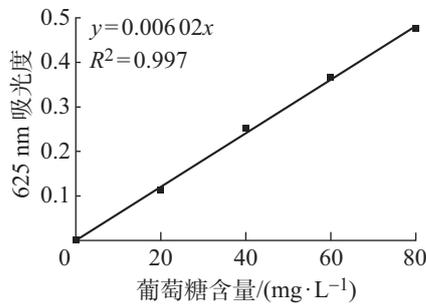


图 2 不同方法提取 A.f 菌 EPS 中核酸含量对比

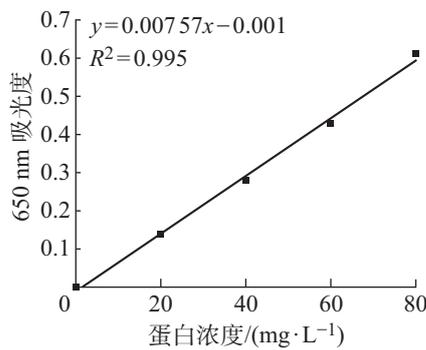
Fig. 2 Comparison of nucleic acid contents in different extraction methods

2.3 EPS 成分分析

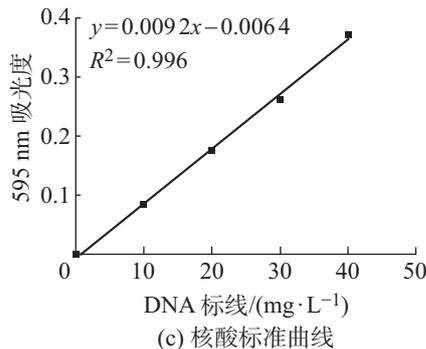
分别采用蒽酮法、BCA 法、二苯胺法测定 A.f 菌 EPS 中多糖、蛋白质、核酸的浓度。相应标准物质在不同波长条件下吸光度的线性关系如图 3 所示。



(a) 葡萄糖标准曲线



(b) 蛋白质标准曲线



(c) 核酸标准曲线

图 3 相应标准物质在不同波长条件下的吸光度曲线

Fig. 3 The absorbancy curves of standard substances under different wavelengths

由图 3(a) 可见, 葡萄糖含量与 625 nm 波长下的吸光度线性关系可近似拟合合成:

$$y = 0.00602x \quad (1)$$

式中, 相关系数 $R^2 = 0.997 > 0.99$, 说明该标准曲线拟合程度较好^[19], 可以用作本次实验 A.f 菌 EPS 中多糖含量的测定。

图 3(b) 表示的是不同蛋白质含量在 650 nm 波长下吸光度的标准曲线, 可由下列方程表示:

$$y = 0.00757x - 0.011 \quad (2)$$

相关系数 $R^2 = 0.995 > 0.99$, 说明该拟合方程适合本次实验 A.f 菌 EPS 中蛋白质含量的测定。

图 3(c) 表示的是不同核酸含量在 595 nm 波长下吸光度的标准曲线, 线性方程如下:

$$y = 0.0092x - 0.0064 \quad (3)$$

相关系数 $R^2 = 0.996 > 0.99$, 表明该线性方程可以用于本实验 A.f 菌 EPS 中核酸含量的测定。

依据图 3 中各标准曲线的方程, 将实验过程中测得的 A.f 菌 EPS 样品中各有机物的吸光度分别代入其中, 得到蛋白质、多糖、核酸在 A.f 菌 EPS 中的含量, 结果如图 4 所示。

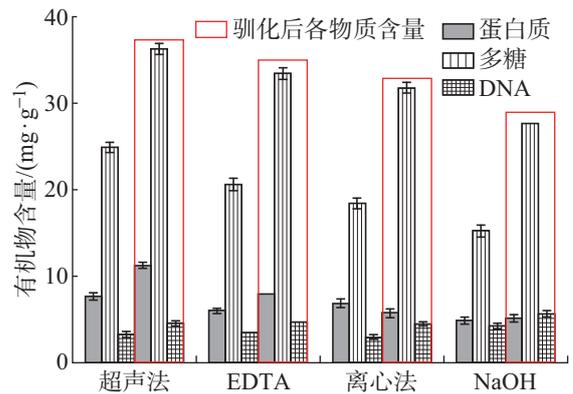


图 4 不同方法提取 A.f 菌 EPS 中各有机物含量对比

Fig. 4 Comparison of organic substance contents in different extraction methods

由图 4 可见, 不论 A.f 菌驯化与否, 其 EPS 中多糖的含量最高, 其次是蛋白质, 核酸含量在 A.f 菌 EPS 中最低。对于 4 种不同的提取方法, 超声法提取的多糖含量高于其余 3 种方法。经计算, 在未驯化的 A.f 菌中, 超声法、EDTA 法、离心法、NaOH 法提取的 EPS 中多糖与蛋白质含量比例分别为 3.26, 3.49, 2.71, 3.17, 其多糖与蛋白质的比例范围在 2.71~3.49 之间。而在驯化的 A.f 菌中, 对应的多糖与蛋白质含

量比例分别为 3.24, 4.23, 5.58, 5.41, 其多糖与蛋白质的比例范围则在 3.24~5.58 之间。这说明 A.f 菌驯化与否对其 EPS 中多糖、蛋白质的含量会产生较大影响, 特别是对驯化后的 A.f 菌 EPS, 其多糖与蛋白质的比例普遍高于未驯化处理组。产生这一现象可能的原因为驯化后 A.f 菌为了耐受更高 Cu^{2+} 浓度, 产生了更多的 EPS 来抵御高浓度 Cu^{2+} 对 A.f 菌自身生长的影响。此外, 多糖在 EPS 保护细菌自身生长过程中可能起到非常重要的作用。Gehrke 等^[20]的研究表明, A.f 菌 EPS 中多糖的组成为: 甘露糖、木糖、葡萄糖、鼠李糖、海藻糖等糖类。结合本实验的研究结果, 可以通过模拟 A.f 菌 EPS 的形式来探索 EPS 对 A.f 菌浸出电子废弃物中金属的影响, 排除了在浸出过程中, A.f 菌自身对 EPS 产生的干扰。

3 结 语

不论 A.f 菌驯化与否, NaOH 法、EDTA 法、超声法、离心法 4 种方法中, 提取 EPS 效率最高的为超声法, 驯化前后分别能提取到 $37.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $55.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的 EPS。在提取过程中, 超声法对 A.f 菌自身的伤害最小, 驯化前后, 培养液中检测到的核酸占比分别为 8.7%、8.1%。4 种提取方法在 A.f 菌驯化前后, 提取的 EPS 中多糖与蛋白质的比例范围分别为 2.71~3.49 和 3.24~5.58。依据前人的研究结果, 结合本实验得到的相关数据, 可通过模拟 A.f 菌 EPS 来探索 EPS 对 A.f 菌浸出电子废弃物中金属的影响。

参考文献:

- [1] LASPIDOU C S, RITTMANN B E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass [J]. *Water Resource*, 2002, 36(11): 2711-2720.
- [2] SHENG G P, YU H Q, LI X Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological waste water treatment systems: A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 882-894.
- [3] 白建峰, 顾卫华, 张承龙, 等. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌研究及在电子废弃物中应用进展 [J]. *安全与环境学报*, 2014(4): 181-185.
- [4] 严杰能, 许燕滨, 段晓军, 等. 胞外聚合物的提取与特性分析研究进展 [J]. *科技导报*, 2009, 27(20): 106-110.
- [5] 罗曦, 雷中方, 张振亚, 等. 好氧/厌氧污泥胞外聚合物 (EPS) 的提取方法研究 [J]. *环境科学学报*, 2005, 25(12): 1624-1629.
- [6] 曹勇. 生物膜及活性污泥胞外聚合物的提取及其对重金属离子的吸附研究 [D]. 安徽: 安徽大学, 2013.
- [7] 王利, 温健康. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外聚合物浸矿作用研究 [J]. *金属矿山*, 2011, 40(7): 86-89.
- [8] LAN Y R, ZHONG D L, MIAO L, et al. Relationship and effect of redox potential, jarosites and extracellular polymeric substances in bioleaching chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2011, 21(7): 1634-1640.
- [9] VEIT, HUGO M, MOURA B, et al. Electronic waste recycling techniques [M]. Berlin, Germany: Springer, 2015: 87-127.
- [10] WANG J W, BAI J F, XU J Q, et al. Bioleaching of metals from printed wire boards by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* and their mixture [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 172(2/3): 728-734.
- [11] 葛利云, 王红武, 马鲁铭, 等. 好氧活性污泥胞外聚合物的影响因素研究 [J]. *环境科学与技术*, 2007, 30(2): 8-9.
- [12] WEI X, FANG L C, CAI P, et al. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria [J]. *Environmental pollution*, 2011, 159(5): 1369-1374.
- [13] ADAV S S, LEE D J, TAY J H. Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule [J]. *Water Research*, 2008, 42(6/7): 1644-1650.
- [14] ADAV S S, LEE D J, LAI J Y. Effects of aeration intensity on formation of phenol-fed aerobic granules and extracellular polymeric substances [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(1): 175-182.
- [15] GU W H, BAI J F, DAI J, et al. Characterization of extreme acidophile bacteria (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) bioleaching copper from flexible PCB by ICP-AES [J]. *Journal of Spectroscopy*, 2014(33): 1-8.
- [16] BO F, RIKKE P, KRISTIAN K, et al. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin [J]. *Water Research*, 1996, 30(8): 1749-1758.
- [17] JIAO Y, CODY G D, HARDINGA K, et al. Characterization of extracellular polymeric substances from acidophilic microbial biofilms [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(9): 2916-2922.
- [18] LIAO B Q, ALLEN D G, DROPPA I G, et al. Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability [J]. *Water Research*, 2001, 35(2): 339-350.
- [19] 蒋磊欣, 李军, 马挺, 等. 好氧污泥颗粒化中胞外聚合物 (EPS) 的动态变化 [J]. *环境科学学报*, 2014, 34(5): 1192-1198.
- [20] GEHRKE T, TELEGDI J, THIERRY D, et al. Importance

of extracellular polymeric substances from *thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching [J]. Applied and Environmental

Microbiology, 1998, 64(7): 2743-2747.

Comparison on Different Methods Extracting Extracellular Polymeric Substances from *Acidithiobacillus ferrooxidans*

GU Weihua, BAI Jianfeng, LU Liang, ZHANG Jiena, WANG Jingwei

(a. WEEE Research Centre; b. Shanghai Collaborative Innovation Centre for WEEE Recycling, Shanghai Polytechnic University, Shanghai 201209, China)

Abstract: Many methods can extract extracellular polymeric substances (EPS) from *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*), and the components and contents are different when treated with different methods. The variation of EPS components and contents was obtained, and the high efficiency of extracting EPS from *A. ferrooxidans* was also analyzed through comparing the methods of NaOH, EDTA, ultrasound and centrifugation in extracting EPS from *A. ferrooxidans*. The experimental results indicated that ultrasound method could extract the highest EPS content, and there were $37.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $55.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ EPS in the unacclimated and domesticated *A. ferrooxidans* groups, respectively. Accordingly, the nucleic acid proportion was 8.7% and 8.1% respectively, which illustrated that ultrasound method was more friendly to *A. ferrooxidans* itself. The proportional regions of polysaccharide and protein were 2.71–3.49 and 3.24–5.58 in EPS which had already extracted by four extraction methods among the unacclimated and domesticated *A. ferrooxidans* groups. These results can provided a reference for exploring the effect of simulated EPS in *A. ferrooxidans* bioleaching metals from electronic waste.

Keywords: electronic waste; *Acidithiobacillus ferrooxidans*; extracellular polymeric substances; extraction

简 讯

上海第二工业大学荣获广东省科学技术奖特等奖

近日, 上海第二工业大学参与的“东莞横沥镇模具产业协同创新体系的建设与实践”项目, 获得了 2016 广东省科学技术奖唯一的特等奖。早在 2012 年, 在上海教委科技发展中心的组织下, 上海第二工业大学、上海交通大学、东华大学 3 所高校共同参与了横沥模具产业协同创新中心的建设。期间, 借助横沥模具专业镇的优势, 充分发挥了上海高校的科技和人才优势, 促进了产业科技创新, 加快推进了产学研的紧密结合, 取得了可喜的成效。张展、何亚飞等参与的横沥协同创新中心建设, 得到了国家工信部和广东省的高度认可, 被定义为“横沥模式”并向全国推广。