



# 葡萄糖酸促进氧化亚铁硫杆菌磁小体合成的发酵动力学

邢思雨<sup>1</sup>, 英高飞<sup>1</sup>, 李薪同<sup>1</sup>, 张爽<sup>1</sup>, 刘涛<sup>1,2</sup>, 赵丹<sup>1,2</sup>, 王伟东<sup>1,2</sup>, 周宁一<sup>3</sup>, 晏磊<sup>1,2\*</sup>

- 1 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院 黑龙江省寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室, 黑龙江 大庆 163319
- 2 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院 农业农村部东北平原农业绿色低碳重点实验室, 黑龙江 大庆 163319
- 3 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

邢思雨, 英高飞, 李薪同, 张爽, 刘涛, 赵丹, 王伟东, 周宁一, 晏磊. 葡萄糖酸促进氧化亚铁硫杆菌磁小体合成的发酵动力学[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2260-2276.

XING Siyu, YING Gaofei, LI Xintong, ZHANG Shuang, LIU Tao, ZHAO Dan, WANG Weidong, ZHOU Ningyi, YAN Lei. Fermentation kinetics of *Acidithiobacillus ferrooxidans* for magnetosome synthesis improved by gluconic acid addition[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2260-2276.

**摘要:**【目的】明确不同种类有机物对氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*) BYM 磁小体形成的促进作用,为安全有效提升细菌磁小体产量提供新思路。【方法】以 *A. ferrooxidans* BYM 为目的菌株,采用单因素试验分析 10 种有机物对 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化的影响,通过 4 L 发酵体系进一步筛选促进磁小体合成的有机物;通过分批发酵实验基于经典发酵动力学模型(Logistic、Luedeking-Piret、底物消耗动力学方程)分别构建 *A. ferrooxidans* BYM 菌体生长、磁小体合成以及亚铁消耗动力学模型。【结果】筛选得到 10 mmol/L 葡萄糖酸能使磁小体产量最高达到  $2.00 \times 10^{-3}$  g/L,葡萄糖酸使 *A. ferrooxidans* BYM 细胞呈椭圆形,表面光滑;在葡萄糖酸作用下,*A. ferrooxidans* BYM 的发酵符合 Logistic、Luedeking-Piret、底物消耗动力学方程。【结论】添加 10 mmol/L 葡萄糖酸能够使 *A. ferrooxidans* BYM 磁小体产量提升 8 倍,葡萄糖酸通过改变细胞形

资助项目: 黑龙江省重点研发计划指导类项目(GZ20220051); 黑龙江八一农垦大学自然科学人才支持计划(ZRCPY202320); 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2023-Y68)

This work was supported by the Heilongjiang Provincial Key Research and Development Program Guidance Project (GZ20220051), the Natural Science Talents of Heilongjiang Bayi Agricultural University (ZRCPY202320), and the Heilongjiang Bayi Agricultural University Postgraduate Innovation Research Project (YJSCX2023-Y68).

\*Corresponding author. E-mail: hekouyanlei@gmail.com

Received: 2023-08-10; Accepted: 2024-03-26; Published online: 2024-03-28

态和表面结构促进磁小体合成, 菌体生长、产物生成以及底物消耗动力学模型可以阐明 *A. ferrooxidans* BYM 在葡萄糖酸存在下的分批发酵过程。

关键词: 氧化亚铁硫杆菌; 磁小体; 葡萄糖酸; 发酵动力学; 亚铁氧化

## Fermentation kinetics of *Acidithiobacillus ferrooxidans* for magnetosome synthesis improved by gluconic acid addition

XING Siyu<sup>1</sup>, YING Gaofei<sup>1</sup>, LI Xintong<sup>1</sup>, ZHANG Shuang<sup>1</sup>, LIU Tao<sup>1,2</sup>, ZHAO Dan<sup>1,2</sup>, WANG Weidong<sup>1,2</sup>, ZHOU Ningyi<sup>3</sup>, YAN Lei<sup>1,2\*</sup>

1 Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Environmental Microbiology and Recycling of Argo-waste in Cold Region, College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

2 Key Laboratory of Low-carbon Green Agriculture in Northeastern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

3 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** [Objective] To clarify the promotion effects of different organic compounds on the formation of magnetosomes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM, so as to provide a new idea for safely and effectively improving the magnetosome yield. [Methods] Single-factor experiments were conducted to measure the effects of ten organic compounds on the ferrous oxidation of *A. ferrooxidans* BYM, and the organic compounds promoting the synthesis of magnetosomes were further screened by a 4 L fermentation system. The classical kinetic models (Logistic, Luedeking-Piret, and substrate consumption kinetic equations) were employed to build the kinetic models for the growth, magnetosome synthesis, and ferrous consumption of *A. ferrooxidans* BYM by batch fermentation experiments. [Results] The maximum magnetosome yield ( $2.00 \times 10^{-3}$  g/L) was achieved with the addition of 10 mmol/L gluconic acid, in the presence of which the bacterial cells were oval and had a smooth surface. With the addition of gluconic acid, the fermentation kinetics of *A. ferrooxidans* BYM was in accordance with Logistic, Luedeking-Piret, and substrate consumption kinetic equations. [Conclusion] The addition of 10 mmol/L gluconic acid increases the magnetosome yield of *A. ferrooxidans* BYM by eight times. Gluconic acid changes the cell morphology and surface of *A. ferrooxidans* BYM. The kinetics models of cell growth, product formation, and substrate consumption can illustrate the batch fermentation of *A. ferrooxidans* BYM in the presence of gluconic acid.

**Keywords:** *Acidithiobacillus ferrooxidans*; magnetosome; gluconic acid; fermentation kinetics; ferrous oxidation

磁小体是一种理想的生物纳米磁性材料,主要成分是  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  或  $\text{Fe}_3\text{S}_4$ , 具有粒径均一、超顺磁性、纯度高、无细胞毒性等特点,在靶向载药、生物定位、污水处理和磁热疗等方面具有广泛应用<sup>[1-3]</sup>。研究表明,生物控制矿化作用下产生的磁小体具有双层膜结构<sup>[4]</sup>。目前报道用于磁小体合成的微生物主要是 3 种模式趋磁细菌,包括格利菲斯瓦尔德镇磁螺菌(*Magnetospirillum gryphiswaldense*) MSR-1<sup>[5]</sup>、向磁磁螺菌(*Magnetospirillum magnetotacticum*) MS-1<sup>[6]</sup>、*Magnetospirillum magneticum* AMB-1<sup>[7]</sup>。然而,这些趋磁细菌生长条件苛刻,对氧浓度要求极为严格,导致细菌培养和磁小体提取过程复杂,难以进行大规模生产。氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 是一种化能自养革兰氏阴性细菌,最初发现于 1947 年<sup>[8]</sup>,广泛分布于酸性矿水、铁硫矿床以及土壤中<sup>[9]</sup>,属于产磁小体的非趋磁细菌,能以亚铁、硫元素以及还原型硫化物作为能源<sup>[10]</sup>。虽然已有研究通过单因素和响应面实验对 *A. ferrooxidans* 产磁小体的发酵条件进行了优化,产率有了显著提高,可达 0.012 mg/(L·h),但相较于趋磁细菌的磁小体产率 0.036–0.154 mg/(L·h),*A. ferrooxidans* 的磁小体产率还有很大的差距<sup>[11]</sup>。因此,筛选获得易于培养的磁小体产生菌,并通过优化发酵条件提高磁小体产量,对于促进磁小体商业化应用具有重要意义。

*A. ferrooxidans* 作为典型的化能自养菌,对多种有机物敏感<sup>[12]</sup>。人们在试验中多采用有机酸、螯合剂以及表面活性剂作为促进剂<sup>[13]</sup>。研究表明,*A. ferrooxidans* 在一定程度上能够吸收特定有机物转化为细胞的生长物质,但其同化能力有限,主要体现在乙酸可以作为一种有机促进剂,其结合细胞碳的能力大于氨基酸和糖类物质<sup>[14]</sup>,其他常用的有机酸还包括草酸、苹果酸以及柠檬酸等<sup>[15]</sup>。螯合剂可以与金属离子产生

配位作用,从而提高菌体对金属的摄入量,主要包括葡萄糖酸、乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、酒石酸和罗丹明 B 等<sup>[16]</sup>。表面活性剂可以降低浸出液的表面张力,改变疏水性和渗透性,主要包括吐温-20、吐温-80、聚乙二醇辛基苯基醚(p-iso-octyl phenoxy polyethoxyethanol, TritonX-100)和聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)等<sup>[13]</sup>。因此,在分批发酵中,加入有机物对菌体的次生代谢及菌体产量具有促进作用,从而提高磁小体产量。

发酵调控是实现磁小体规模化生产的前提,发酵动力学是一门能够监控发酵过程中各种因素随发酵时间变化的科学。通过发酵动力学的研究和发酵模型的建立,能够进一步了解发酵过程中菌体生长与产物形成的机制,以及环境因素对这些机制的影响,实现发酵过程的有效控制,从而达到提高发酵产物指标的目的<sup>[17-19]</sup>。微生物发酵动力学模型包括:菌体生长动力学模型、产物生成动力学模型和底物消耗动力学模型<sup>[20-22]</sup>。通过这些动力学模型探究 *A. ferrooxidans* BYM 在整个发酵阶段的菌体生长、磁小体生成和亚铁消耗情况,可为细菌磁小体的规模化发酵提供理论和实践依据。另外,对于细菌合成磁小体发酵动力学研究,有助于实现发酵过程的优化。发酵规模的扩大对于产物生成具有关键作用,有利于产磁小体细菌的工厂化发酵及补料发酵培养。目前,对于 *A. ferrooxidans* BYM 发酵动力学的探究主要集中在次生矿物的合成中,对其合成磁小体的发酵动力学的探究尚未深入报道<sup>[23]</sup>。

因此,本研究以 *A. ferrooxidans* BYM 为研究对象,旨在探究有机酸、表面活性剂和螯合剂等外源有机物添加对菌体生长和磁小体合成的影响;解析 *A. ferrooxidans* BYM 在添加最佳促进剂体系中的发酵动力学特征,阐明促进剂作用

下 *A. ferrooxidans* BYM 的菌体生长、磁小体合成及亚铁氧化的动态规律, 为 *A. ferrooxidans* BYM 磁小体产量提升提供一种新思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌种和培养基

*A. ferrooxidans* BYM 是本课题组于甘肃白银铜矿样品中分离获得, 保藏于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC), 保藏编号为 CCTCC M2018630。

改良的 9K 液体培养基由溶液 A (0.7 L) 和溶液 B (0.3 L) 组成, 溶液 A (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.2, KCl 0.1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01; 溶液 B (g/L):  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  40.0。使用时, 将溶液 A 于 121 °C 灭菌 15 min, 溶液 B 用稀  $\text{H}_2\text{SO}_4$  调 pH 至 2.0, 经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌加入到 A 液中。

### 1.2 主要试剂和仪器

七水硫酸亚铁、酒石酸、L-抗坏血酸、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)和乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA-2Na), 天津市大茂化学试剂厂; 柠檬酸, 天津博迪化工股份有限公司; 苹果酸, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 甘氨酸、TritonX-100, 北京兰杰柯科技有限公司; 葡萄糖酸, 国药集团化学试剂有限公司; 吐温-80, 辽宁泉瑞试剂有限公司。

振荡培养箱, 上海旻泉仪器有限公司; 台式高速冷冻离心机, 湖南可成仪器设备有限公司; 扫描电子显微镜、透射电子显微镜, 株式会社日立制作所; 傅里叶变换红外光谱仪, 赛默飞世尔科技公司。

### 1.3 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 的培养和菌体收集

将 *A. ferrooxidans* BYM 按照体积分数 10%

的接种量接种于改良的 9K 液体培养基中, 30 °C、120 r/min 条件下振荡培养, 当培养基中  $\text{Fe}^{2+}$  氧化达 90% 时, 细菌达到了对数生长期, 菌液颜色呈红棕色<sup>[24]</sup>。收集菌液, 经 4 °C、2 000 r/min 离心 5 min 去除培养基中的铁矾沉淀, 上清经 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min 获得菌体沉淀, 用 pH 2.0 的稀  $\text{H}_2\text{SO}_4$  洗涤, 重复此步骤至菌体中无铁矾沉淀。将收集得到的菌体暂存备用<sup>[25]</sup>。

### 1.4 不同有机物对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 生长的影响

备用菌体用 pH 2.0 的稀  $\text{H}_2\text{SO}_4$  重悬后, 取 100  $\mu\text{L}$  分别接种于不同有机物不同浓度的 20 mL 改良的 9K 液体培养基中, 30 °C、120 r/min 条件下振荡培养(表 1)。每种有机物浓度变量进行 3 次重复试验。培养至对数期利用重铬酸钾法滴定, 记录滴定体积并计算亚铁氧化速率, 见公式(1)。

亚铁氧化速率(mol/h) =  $0.01 \times 6 \times (\text{初始时间重铬酸钾体积} - \text{到达对数期重铬酸钾体积}) / \text{到达对数期时间}$  (1)

根据不同有机物对 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化速率的影响, 选择亚铁氧化速率最高的葡萄糖酸、L-抗坏血酸以及苹果酸进行扩大体系(4 L)培养, 以不添加有机物组作为对照。培养条件: 液体培养基 pH 2.0, 接种量 10% (体积分数), 温度 30 °C, 通气量 0.7 L/min。当培养基中  $\text{Fe}^{2+}$  氧化率达到 90% 时, 取样测试分析亚铁氧化速率, 并收集菌体。

菌体收集采用三联薄膜过滤器进行抽滤, 选择规格 50 mm、孔径 0.22  $\mu\text{m}$  的混纤微孔滤膜, 菌体吸附在滤膜上。用 pH 2.0 的稀  $\text{H}_2\text{SO}_4$  将滤膜上的菌体冲洗收集至烧杯中。菌体悬浮液 4 °C、2 000 r/min 离心 5 min, 弃沉淀, 取上清液再次离心, 弃上清。将无铁矾沉淀的菌体转移至离心管中, 称量菌体湿重。

表 1 不同有机物及其添加浓度

Table 1 Different organic compounds and their added concentrations

Organic compounds	Concentration groups				
	1	2	3	4	5
Citric acid (mmol/L)	0.0	5.0	30.0	60.0	120.0
Tartaric acid (mmol/L)	0.0	5.0	20.0	40.0	50.0
L-ascorbic acid (mmol/L)	0.0	2.0	6.0	8.0	10.0
Malic acid (mmol/L)	0.0	5.0	10.0	20.0	30.0
Glycine (mmol/L)	0.0	5.0	10.0	20.0	30.0
Gluconic acid (mmol/L)	0.0	5.0	20.0	30.0	40.0
Tween 80 (mmol/L)	0.0	0.1	0.5	4.0	8.0
TritonX-100 (mmol/L)	0.0	5.0	10.0	30.0	40.0
SDS (mmol/L)	0.0	1.0	5.0	10.0	20.0
EDTA-2Na (mmol/L)	0.0	2.0	4.0	6.0	10.0

### 1.5 不同有机物对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 磁小体合成的影响

采用超声破碎的方式,将上述收集得到的各试验组的菌体进行磁小体提取。将大约 0.5 g 湿菌体悬浮于 20 mL Tris-HCl 缓冲液中,其中包括 DNA 酶 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , RNA 酶 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{MgCl}_2$  5 mmol/L, 1% (质量体积分数)溶菌酶,苯甲基磺酰氟化物 0.1 mmol/L, 37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。然后在冰浴条件下, 382.5 W 功率下超声间歇处理 1 h (运行 3 s, 间歇 5 s)。将超声后的细胞悬液转入平底烧杯中,置于磁铁 S 极上静置 1 h。用 10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(pH 7.4)缓冲液反复吹洗聚集在烧杯底部的磁小体颗粒以去除静电吸附的杂质。将收集得到的磁小体称重,加入生理盐水于 4  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用<sup>[25]</sup>。

### 1.6 葡萄糖酸对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 生长与磁小体合成的影响

以 10% (体积分数)的接种量,将菌种接种至含有 10 mmol/L 葡萄糖酸的 4 L 改良的 9K 液体培养基中进行培养。按照 1.3 所述的方法收集对数期的菌体,称量湿重,以探究葡萄糖酸对 *A. ferrooxidans* BYM 生长的影响。随后将收集得到的菌体按照 1.5 所述的方法进行磁小体提取,并称重,以探究葡萄糖酸对 *A. ferrooxidans* BYM 磁小体合成的影响。

相同发酵条件下收集的菌体分为两部分,分别用于探究葡萄糖酸对细菌的表型特征和磁小体数量的影响。取部分菌体用 2.5% (体积分数)戊二醛固定 12 h,经 pH 7.4 0.1 mmol/L 的 PBS 漂洗后重悬,菌体悬液 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min,重复 4 次后,用体积分数为 30%、50%、70%、90%和 100%的乙醇分别进行处理,再 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min,随后将样品置于无水乙醇中,采用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)分析菌体表面形态,采用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察分析磁小体数量。另外一部分菌体冻干后进行傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)测试,分析菌体表面官能团特征。

### 1.7 葡萄糖酸存在下 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 发酵动力学研究

根据已报道的关于 *A. ferrooxidans* 微生物生长、底物消耗以及产物生成动力学模型<sup>[26-27]</sup>,选择合适的动力学方程拟合 *A. ferrooxidans* BYM 菌体生长、亚铁消耗以及磁小体生成情况。将待测发酵液按照 24、36、42、48、54、60、66、72 h 进行 4 L 体系培养。于选定时间结束发酵进行重铬酸钾滴定,测定培养基中残留  $\text{Fe}^{2+}$  的量。另外,收集菌体称重,并利用超声破碎、磁吸附

方法收集磁小体,称取磁小体重量并计算每升发酵液产磁小体的量。上述每个变量进行5组平行试验。

Logistic 方程描述菌体生长动力学,见公式(2)。

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (2)$$

式中,  $X$  表示菌体浓度(g/L),  $X_m$  表示最大细胞浓度(g/L),  $\mu_m$  表示最大比生长速率( $s^{-1}$ ),  $t$  表示发酵时间(h)。

Luedeking-Priet 方程描述产物形成同菌体生长的相关性,见公式(3)。

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (3)$$

式中,  $X$  表示菌体浓度(g/L),  $P$  表示磁小体产量(g/L),  $t$  表示发酵时间(h),  $\alpha$  和  $\beta$  表示系数。

亚铁消耗用动力学模型表述,见公式(4)。

$$-\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \times \frac{dS}{dt} + \frac{1}{Y_{P/S}} \times \frac{dP}{dt} + mX \quad (4)$$

式中,  $S$  表示亚铁浓度(g/L),  $Y_{X/S}$  表示用于菌体生长的得率常数,  $Y_{P/S}$  表示用于产物积累的得率常数,  $m$  表示维持系数,  $X$  表示细胞浓度(g/L)。

## 1.8 数据统计分析

利用 Origin 2018 版软件 (OriginLab Corporation) 进行统计分析; OMNIC 8.0 (赛默飞世尔科技公司) 对 FTIR 试验数据进行处理; 1stOpt 5.0 软件 (北京七维高科科技有限公司) 进行动力学分析。利用 IBM SPSS Statistics 25.0 (国际商业机器公司) 对 *A. ferrooxidans* BYM 不同有机物处理组的亚铁氧化速率进行统计学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同有机物对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 生长的影响

本研究通过改变培养基中添加有机物的浓度,探究不同有机物的不同浓度对 *A.*

*ferrooxidans* BYM 生长的影响。

#### 2.1.1 亚铁氧化速率的比较

在探究不同有机物的不同浓度对 *A. ferrooxidans* BYM 生长的影响试验中, L-抗坏血酸、苹果酸以及葡萄糖酸的添加可促进 *A. ferrooxidans* BYM 的亚铁氧化。如图 1 所示,随着 L-抗坏血酸(图 1A)和苹果酸(图 1B)浓度的增加, *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化速率总体呈现逐渐降低的趋势, 2 mmol/L L-抗坏血酸添加组与 5 mmol/L 苹果酸添加组的亚铁氧化速率显著高于未添加有机物组,表明 2 mmol/L L-抗坏血酸与 5 mmol/L 苹果酸对 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化速率具有促进作用。随着葡萄糖酸(图 1C)浓度的增加,其亚铁氧化速率呈现先上升后下降的趋势。5 mmol/L 和 20 mmol/L 葡萄糖酸添加组的亚铁氧化速率均显著高于未添加有机物组,表明 5 mmol/L 和 20 mmol/L 葡萄糖酸对 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化速率具有促进作用。其中, 2、8、10 mmol/L 的 L-抗坏血酸添加组相较于未添加有机物组存在极显著差异( $P < 0.01$ ), 5、10、20、30 mmol/L 的苹果酸添加组相较于未添加有机物组存在极显著差异( $P < 0.01$ ), 5、20、30、40 mmol/L 的葡萄糖酸添加组相较于未添加有机物组存在极显著差异( $P < 0.01$ )。

如图 2 所示,添加不同浓度柠檬酸、酒石酸、TritonX-100、吐温-80 和 SDS,随着有机物浓度的增加, *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化速率均整体呈现下降趋势。柠檬酸添加组(图 2A)、酒石酸添加组(图 2B)、TritonX-100 添加组(图 2C)和 SDS 添加组(图 2E)相较于未添加有机物组均存在极显著差异( $P < 0.01$ )。0.5、4、8 mmol/L 吐温-80 添加组(图 2D)相较于未添加有机物组均存在极显著差异( $P < 0.01$ )。说明柠檬酸、酒石酸、TritonX-100、吐温-80 和 SDS 的存在均会影响 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化速率,抑制菌体的生长。

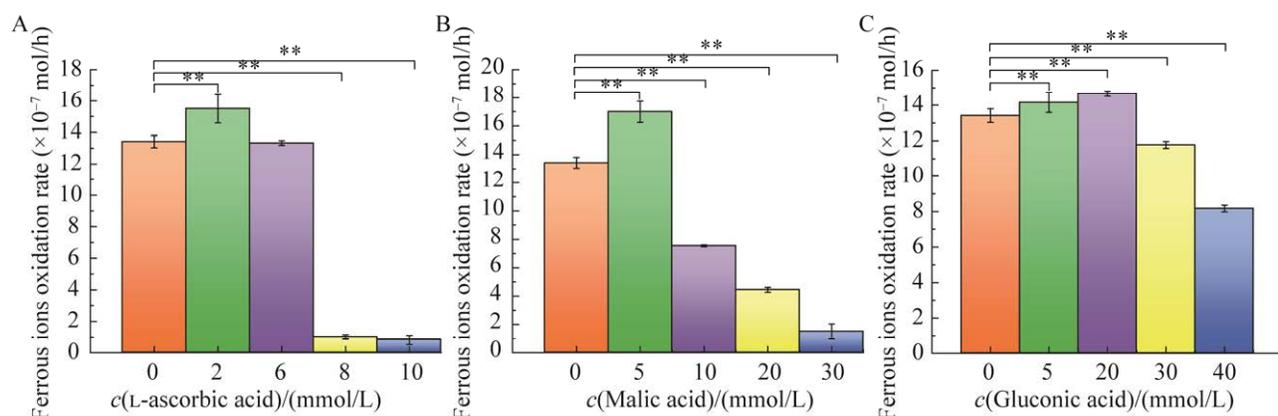


图 1 不同浓度不同小分子有机酸对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 亚铁氧化速率影响 A: L-抗坏血酸. B: 苹果酸. C: 葡萄糖酸. \*\*表示  $P < 0.01$

Figure 1 Effect of different concentrations of different small molecular organic acids on the ferrous oxidation rate of *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM. A: L-ascorbic acid. B: Malic acid. C: Gluconic acid. \*\* represents significant differences of  $P < 0.01$ .

如图 2 所示, 根据甘氨酸和 EDTA-2Na 试验可知, 随着甘氨酸浓度的增加, 其亚铁氧化速率呈现先上升后下降的趋势(图 2F)。增加 EDTA-2Na 浓度, 其亚铁氧化速率呈现先降低然后趋于平稳的趋势(图 2G)。甘氨酸添加组与 EDTA-2Na 添加组相较于未添加有机物组均存在极显著差异( $P < 0.01$ )。由此可说明, 上述有机物的添加均会抑制 *A. ferrooxidans* BYM 的亚铁氧化能力。

综上所述, L-抗坏血酸浓度为 2 mmol/L、苹果酸浓度为 5 mmol/L、葡萄糖酸为 5 mmol/L 和 20 mmol/L 时均会促进 *A. ferrooxidans* BYM 的亚铁氧化速率, 分别可达到  $1.55 \times 10^{-6}$ 、 $1.70 \times 10^{-6}$ 、 $1.42 \times 10^{-6}$  和  $1.47 \times 10^{-6}$  mol/h。然而, 其他有机物的添加均对 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化产生抑制作用。因此, 选择 L-抗坏血酸、苹果酸和葡萄糖酸进行下一步试验。

为进一步筛选磁小体合成最优促进剂, 选用 L-抗坏血酸(0、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L)、苹果酸(0、0.5、1.0、3.0、5.0 mmol/L)和葡萄糖酸(0、5、10、15、20 mmol/L)进行试验, 以 *A.*

*ferrooxidans* BYM 达到对数期的亚铁氧化速率、菌体湿重和磁小体产量作为筛选标准(图 3)。

如图 3 所示, 1.0 mmol/L L-抗坏血酸对 *A. ferrooxidans* BYM 菌体生长的促进作用最显著(图 3A), 其亚铁氧化速率可达  $2.17 \times 10^{-6}$  mol/h。1.0 mmol/L 的苹果酸对 *A. ferrooxidans* BYM 菌体生长的促进作用最明显, 其亚铁氧化速率高于 L-抗坏血酸, 可达  $2.40 \times 10^{-6}$  mol/h(图 3B)。葡萄糖酸浓度为 20 mmol/L 时, 对 *A. ferrooxidans* BYM 菌体生长的促进作用最明显, 其亚铁氧化速率最高, 可达  $2.42 \times 10^{-6}$  mol/h(图 3C)。0.5、1.0、1.5 mmol/L L-抗坏血酸添加组相较于未添加有机物组均存在极显著差异( $P < 0.01$ ), 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 苹果酸添加组相较于未添加有机物组均存在极显著差异( $P < 0.01$ ), 10、15、20 mmol/L 葡萄糖酸添加组相较于未添加有机物组均存在极显著差异( $P < 0.01$ )。

### 2.1.2 菌体生长的比较

如图 4 所示, L-抗坏血酸以 1.5 mmol/L 添加时, 其菌体浓度高于未添加组, 可达 0.160 g/L(图 4A), 相较于未添加组存在极显著差异( $P < 0.01$ )。

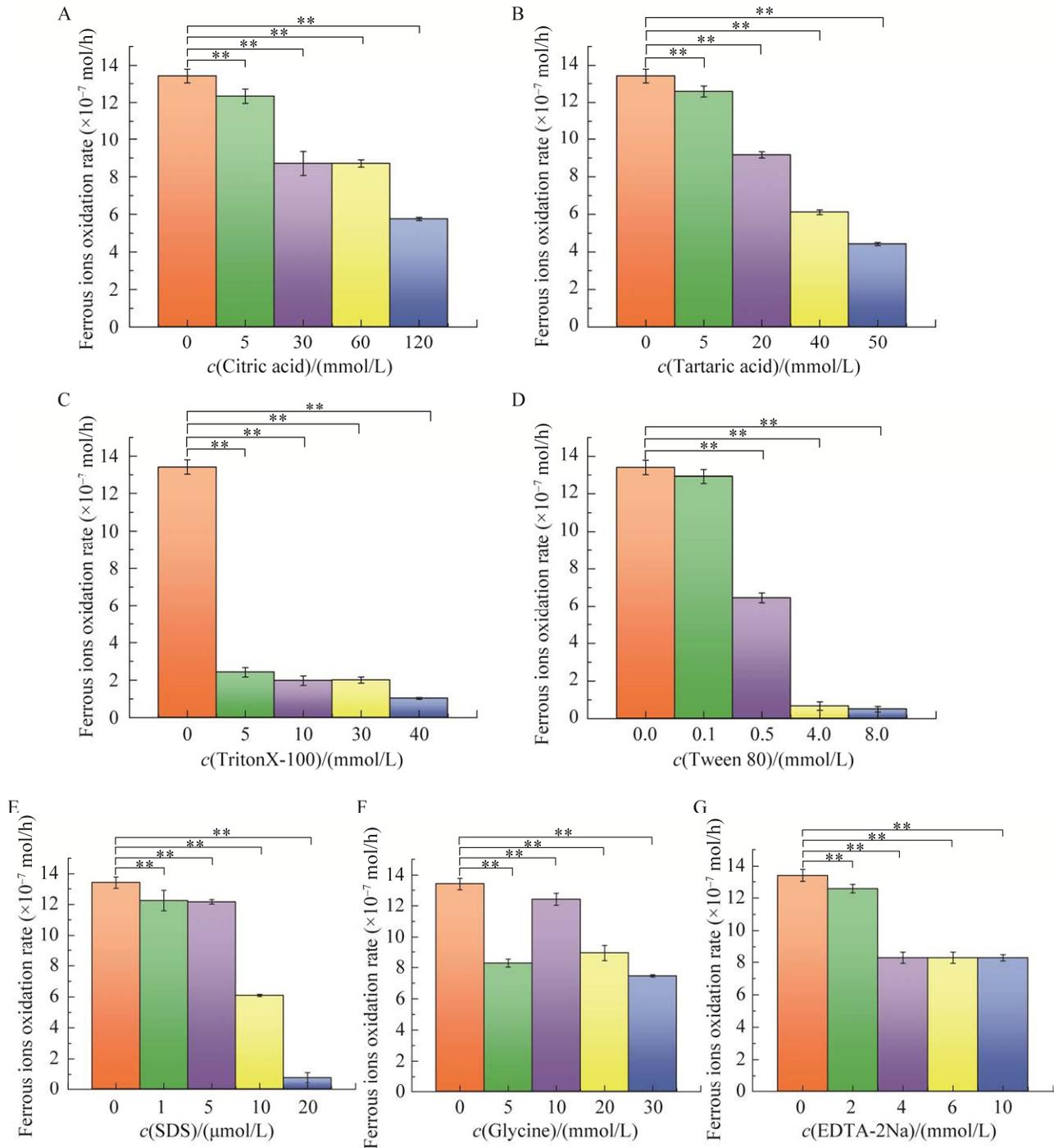


图 2 不同浓度不同有机物对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 亚铁氧化速率影响 A: 柠檬酸. B: 酒石酸. C: TritonX-100. D: 吐温-80. E: SDS. F: 甘氨酸. G: EDTA-2Na. \*\*表示  $P < 0.01$

Figure 2 Effect of different concentrations of different organic substance on the ferrous oxidation rate of *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM. A: Citric acid. B: Tartaric acid. C: TritonX-100. D: Tween 80. E: SDS. F: Glycine. G: EDTA-2Na. \*\* represents significant differences of  $P < 0.01$ .

其中, 0.5 mmol/L L-抗坏血酸试验组菌体湿重较低, 相较于未添加组存在极显著差异 ( $P<0.01$ )。苹果酸浓度在 1 mmol/L 时, 其菌体浓度略高于未添加有机物组, 此时菌体浓度最高, 可达 0.145 g/L (图 4B)。其中, 3 mmol/L 和 5 mmol/L 苹果酸试验组相较于未添加有机物组

存在极显著差异 ( $P<0.01$ )。当葡萄糖酸添加量为 15 mmol/L, 其菌体浓度最高, 可达 0.188 g/L (图 4C)。其中, 添加 10 mmol/L 葡萄糖酸试验组相较于未添加有机物组存在显著差异 ( $P<0.05$ ), 添加 15 mmol/L 和 20 mmol/L 葡萄糖酸试验组相较于未添加有机物组存在极显著差异 ( $P<0.01$ )。

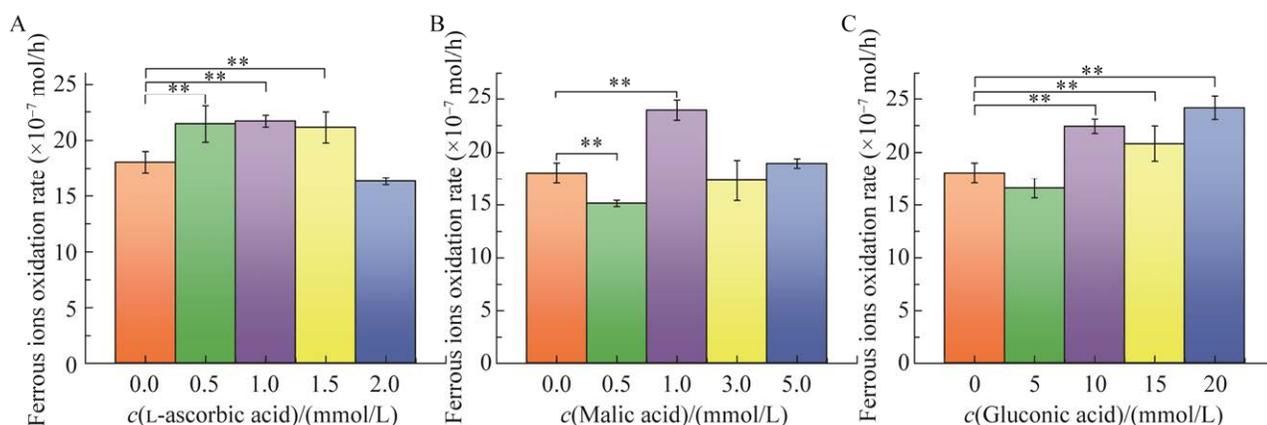


图 3 不同有机酸对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 亚铁氧化速率影响 A: L-抗坏血酸. B: 苹果酸. C: 葡萄糖酸. \*\*表示  $P<0.01$

Figure 3 Effect of different organic acids on the ferrous oxidation rate of *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM. A: L-ascorbic acid. B: Malic acid. C: Gluconic acid. \*\* represents significant differences of  $P<0.01$ .

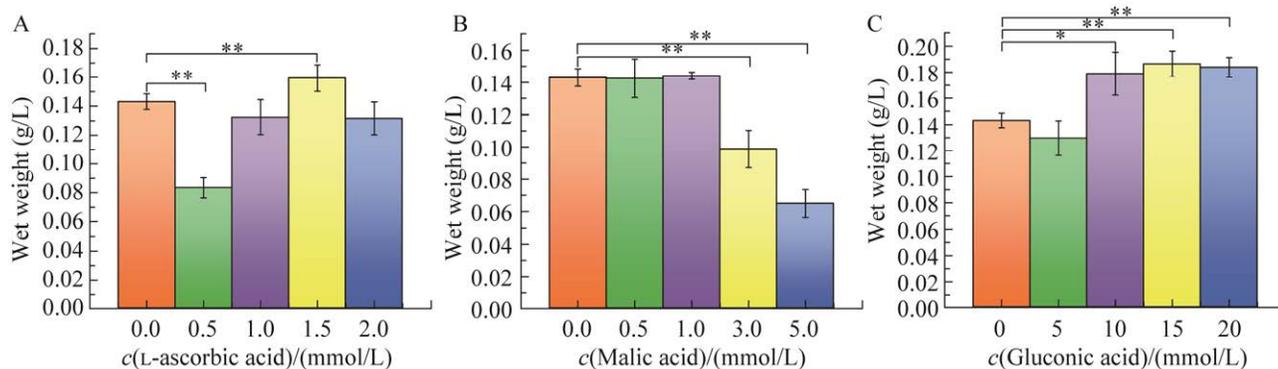


图 4 不同浓度有机物对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 菌体浓度的影响 A: L-抗坏血酸. B: 苹果酸. C: 葡萄糖酸. \*\*表示  $P<0.01$ , \*表示  $P<0.05$

Figure 4 Effect of different concentrations of organic matter on concentration of *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM. A: L-ascorbic acid. B: Malic acid. C: Gluconic acid. \*\* represents significant differences of  $P<0.01$ , \* represents significant differences of  $P<0.05$ .

## 2.2 不同有机物对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 磁小体合成的影响

如图 5 所示, 磁小体提取试验表明, 1.0、1.5、2.0 mmol/L L-抗坏血酸添加组磁小体产量均高于未添加有机物组。1.5 mmol/L L-抗坏血酸添加组磁小体产量最高, 为  $9.83 \times 10^{-4}$  g/L (图 5A)。1.0、1.5、2.0 mmol/L L-抗坏血酸添加组相较于未添加有机物组均存在极显著差异 ( $P < 0.01$ )。1.0 mmol/L 苹果酸添加组磁小体产量最高为  $7.58 \times 10^{-4}$  g/L (图 5B)。0.5、1.0、3.0 mmol/L 苹果酸添加组相较于未添加有机物组均存在极显著差异 ( $P < 0.01$ )。10 mmol/L 葡萄糖酸添加组磁小体产量最高, 为  $2.00 \times 10^{-3}$  g/L (图 5C)。5、10、15 mmol/L 葡萄糖酸添加组磁小体产量与未添加有机物组相比均存在极显著差异 ( $P < 0.01$ )。同时, 所有苹果酸以及葡萄糖酸添加组的磁小体产量均高于未添加组。

## 2.3 葡萄糖酸对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 生长及磁小体合成的促进作用

根据上述试验结果选择 10 mmol/L 的葡萄

糖酸进行 *A. ferrooxidans* BYM 发酵培养, 以不添加有机物的 *A. ferrooxidans* BYM 作为对照组。葡萄糖酸作用前后菌体表观形态以及表面基团化结果如图 6 所示。SEM 结果表明, 添加葡萄糖酸组细菌呈椭圆形, 表面光滑 (图 6A)。而对照组表面有褶皱, 呈杆状 (图 6B)。TEM 结果表明, 添加葡萄糖酸组细菌胞内磁小体分散排列 (图 6C), 数量明显高于未添加葡萄糖酸组 (图 6D)。

采用 FTIR 仪对添加 10 mmol/L 葡萄糖酸 *A. ferrooxidans* BYM 进行测试, 如图 7 所示。以处于对数期的 *A. ferrooxidans* BYM 作为对照。

添加 10 mmol/L 葡萄糖酸组在 3 402.02、2 926.84、1 652.82、1 536.74、1 236.29、1 079.29 和 614.31  $\text{cm}^{-1}$  处出现峰值。未添加有机物组在 3 414.28、2 926.87、2 362.35、1 651.55、1 538.74、1 453.26、1 236.65、1 080.13 和 612.30  $\text{cm}^{-1}$  处出现峰值 (图 7)。通过与 NIST 数据库比较可知, 经过葡萄糖酸处理后相较于未添加葡萄糖酸组在 2 362  $\text{cm}^{-1}$  处少了一个峰, 推测可能是  $\text{C}_{10}\text{H}^-$ 。

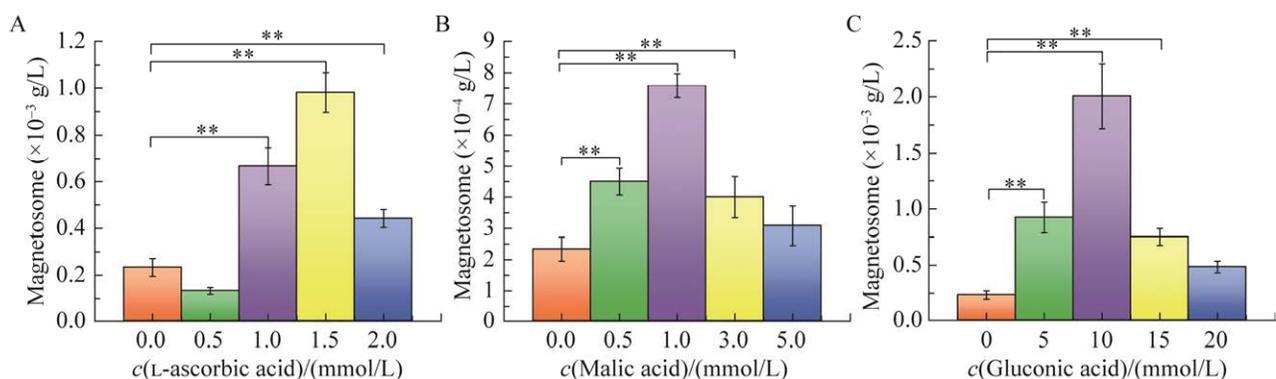
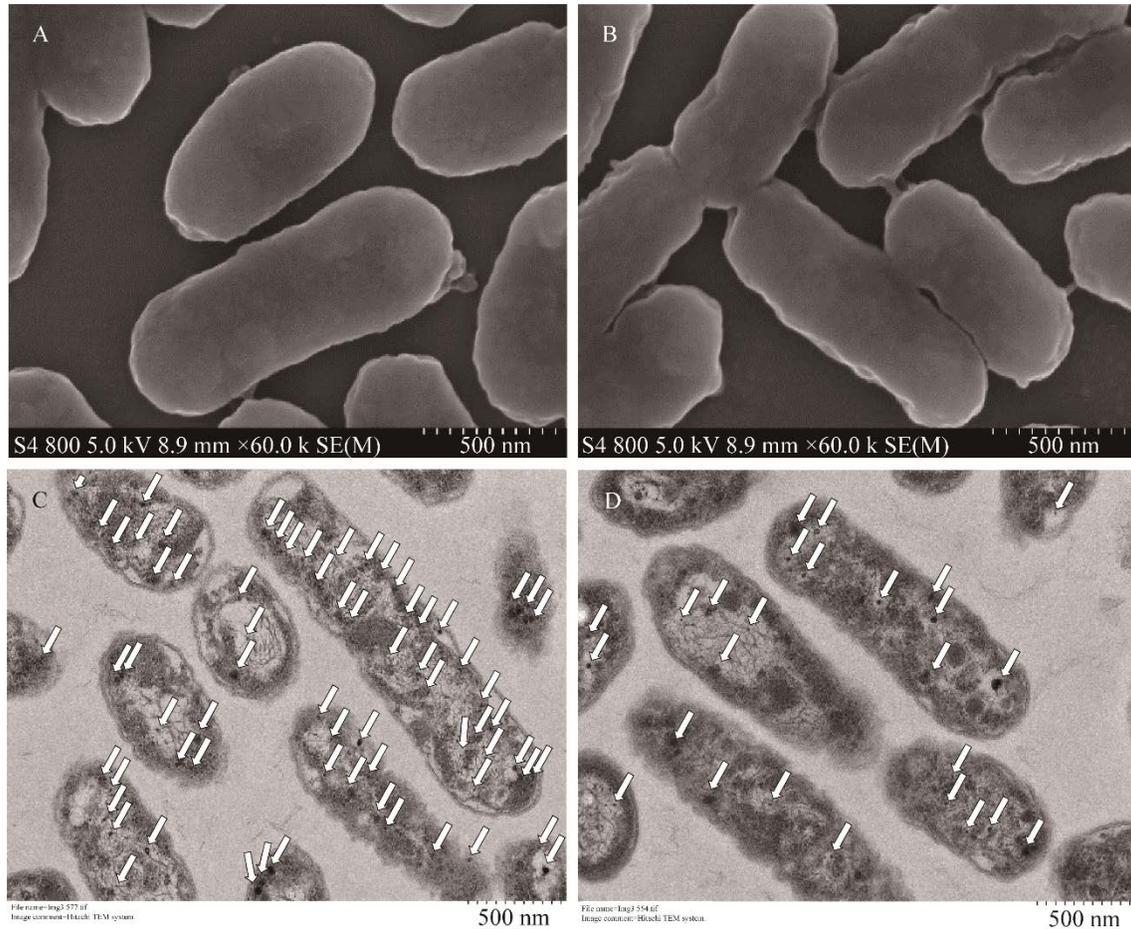


图 5 不同浓度有机物对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 磁小体合成的影响 A: L-抗坏血酸. B: 苹果酸. C: 葡萄糖酸. \*\*表示  $P < 0.01$

Figure 5 Effect of different concentrations of organic matter on the synthesis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM magnetosomes. A: L-ascorbic acid. B: Malic acid. C: Gluconic acid. \*\* represents significant differences of  $P < 0.01$ .



**图 6** *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 的扫描电镜图及透射电镜图 A: 500 nm 标尺下的葡萄糖酸处理组扫描电镜图. B: 500 nm 标尺下的对照组扫描电镜图. C: 500 nm 标尺下的葡萄糖酸处理组透射电镜图. D: 500 nm 标尺下的对照组透射电镜图. 箭头指向磁小体黑色颗粒

**Figure 6** The SEM and TEM of *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM. A: Gluconic acid-treated group at 500 nm scale. B: Control group at 500 nm scale and the TEM. C: Gluconic acid-treated group at 500 nm scale. D: Control group at 500 nm scale of *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM. The arrow pointed to the black magnetosome particles.

为探究 *A. ferrooxidans* BYM 发酵过程中菌体变化、磁小体生成以及亚铁消耗情况, 选用菌体生长动力学模型建立最常用的是 Logistic 模型和 Monod 方程。Logistic 模型是一个非常典型的 S 型曲线方程, 常被用来描述菌体浓度与营养物质之间的非线性关系。因此 *A. ferrooxidans* BYM 菌体生长动力学模型选用 Logistic 方程进行拟合。利用 1stOpt 软件对试验数据进行非线性拟合, 可得动力学参数为  $X_0=0.010\ 5$ ,  $X_m=0.165\ 2$ ,

$\mu_m=0.084\ 3$ 。代入公式(2), 整理可得 *A. ferrooxidans* BYM 菌体生长随时间变化的动力学方程, 见公式(5)。

$$X = \frac{0.010\ 5e^{0.084\ 3t}}{1 - 0.063\ 6 \times (1 - e^{0.084\ 3t})} \quad (5)$$

式中,  $X$  代表生物量(g/L),  $t$  代表发酵时间(h)。

由公式(5)所述动力学方程可知, 随着发酵时间的延长, 菌体湿重逐渐增加, 将拟合得到的参数代入方程, 得到  $R^2$  为 0.99, 拟合结果良好, 说明该模型能够很好地描述 *A. ferrooxidans* BYM 菌体生长过程。

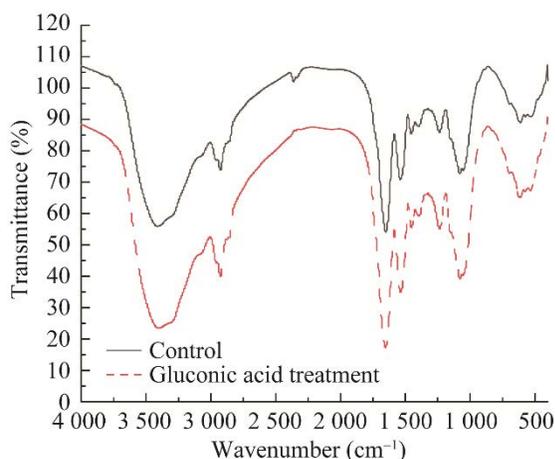


图 7 葡萄糖酸处理前后 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM 的傅里叶变换红外光谱图

Figure 7 FTIR of *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM with and without gluconic acid treatment.

*A. ferrooxidans* BYM 磁小体生成动力学为磁小体生物合成过程, 选用 Luedeking-Priet 方程构建动力学模型, 此方程能够准确描述出产物形成同菌体生长的相关性。利用 1stOpt 软件对不同发酵时间磁小体浓度进行非线性拟合, 得到动力学参数为  $P_0=0.0001$ ,  $\alpha=0.0009$ ,  $\beta=0.0002$ , 代入公式(3), 整理可得 *A. ferrooxidans* BYM 磁小体合成随时间变化的动力学方程, 见公式(6)。

$$P = 0.0001 + \frac{0.00000945e^{0.0843t}}{1 - 0.0636 \times (1 - e^{0.0843t})} + 0.0004 \times \ln[1 - 0.1246 \times (1 - e^{0.0843t})] \quad (6)$$

式中,  $P$  代表磁小体生成量(g/L),  $t$  代表发酵时间(h)。

由公式(6)所述的动力学方程可知, 随着发酵时间的延长, 磁小体的产量逐渐增加, 将拟合得到的参数代入方程, 得到  $R^2$  为 0.98, 拟合结果良好, 说明该模型能够很好地描述 *A. ferrooxidans* BYM 磁小体生成过程。

*A. ferrooxidans* BYM 是以铁或硫为底物进行电子传递的微生物, 并且仅在亚铁存在的情况下, *A. ferrooxidans* BYM 才能合成磁小体。因此,

本研究将  $\text{FeSO}_4$  作为关键底物进行动力学分析。利用 1stOpt 软件对不同发酵时间的亚铁浓度进行非线性拟合, 得到 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁消耗动力学参数为  $S_0=-0.9953$ ,  $a=0.0290$ ,  $b=0.0003$ , 代入公式(4), 整理可得 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化随时间变化的动力学方程, 见公式(7)。

$$S = -0.9953 - \left[ \frac{0.0003e^{0.0843t}}{1 - 0.0636 \times (1 - e^{0.0843t})} - 1 \right] - 0.000019 \times \ln[1 - 0.0636 \times (1 - e^{0.0843t})] \quad (7)$$

式中,  $S$  代表亚铁浓度(g/L),  $t$  代表发酵时间(h)。

由公式(7)所述的动力学方程可知, 随着发酵时间逐渐接近 72 h, 亚铁含量趋近于 0,  $R^2$  为 0.98, 拟合结果良好, 说明该模型能够很好地描述 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁利用过程。

### 3 讨论

*A. ferrooxidans* BYM 在好氧条件下能够以培养基中的  $\text{FeSO}_4$  为底物进行磁小体合成。随着研究的不断深入, 发现这类细菌在一定程度上能够吸收特定有机物转化为细胞的生长物质, 但是其同化能力有限<sup>[14]</sup>。研究发现, *A. ferrooxidans* BYM 生长和磁小体合成受到培养基组分和培养条件的影响<sup>[28]</sup>。由于不同有机物可以调节亚铁转运, 改变细胞膜通透性, 从而达到促进 *A. ferrooxidans* BYM 生长的目的。因此, 本研究以 *A. ferrooxidans* BYM 为目的菌株, 分别添加 10 种不同浓度有机物, 根据亚铁氧化速率判断不同浓度有机物对 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化的效果, 为进一步探究 *A. ferrooxidans* BYM 磁小体的发酵奠定基础。

研究表明, 不同浓度的柠檬酸可能影响 *A. ferrooxidans* 磁小体相关基因 *mpsA*、*feoB*、*tonB* 及 *mpsA* 的表达, 推测其原因可能是由于柠檬酸能够螯合  $\text{Fe}^{3+}$ , 促进 *A. ferrooxidans* 对  $\text{Fe}^{3+}$  的转

运<sup>[29]</sup>。对 *A. ferrooxidans* R2 进行低分子量有机酸耐受试验, 结果表明 *A. ferrooxidans* R2 可以耐受 40 mmol/L 的柠檬酸<sup>[30]</sup>。因此, 本研究选择柠檬酸探究其对 *A. ferrooxidans* BYM 菌体生长的影响。酒石酸作为常见的金属螯合剂常用于重金属吸附, 能够较好地吸附被污染土壤中的镍、铜、锌、镉和铅<sup>[31]</sup>。0.5 mmol/L 抗坏血酸能够完全抑制 *A. ferrooxidans* NCIM 5370 中的过氧化氢酶活性<sup>[32]</sup>。其还原作用能够减少  $\text{Fe}^{3+}$  的积累, 加速铁的循环。因此推测, 试验中添加 L-抗坏血酸能够通过还原作用消耗 *A. ferrooxidans* BYM 代谢产生的  $\text{Fe}^{3+}$ , 同时减少活性氧和自由基对 *A. ferrooxidans* BYM 的损伤。苹果酸作为一种小分子量有机酸常用于金属生物浸出<sup>[33]</sup>。因此, 本研究添加苹果酸, 判断其对 *A. ferrooxidans* BYM 菌体生长的影响。在培养基中添加 L-甘氨酸能够促进 *A. ferrooxidans* CK 浸出胶磷矿的效率, 通过试验结果可知, L-甘氨酸的存在能够显著增强细菌在矿物表面的吸附作用<sup>[34]</sup>。葡萄糖酸作为铁螯合剂能够在一定程度上促进 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 生长<sup>[35]</sup>。因此, 本研究通过添加葡萄糖酸验证其对亚铁氧化的作用。10 mmol/L 的吐温-80 能够促进 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 生长以及  $\text{S}^0$  和  $\text{CuFeS}_2$  的代谢, 其能够改变 *A. ferrooxidans* 细胞表面多聚物<sup>[36]</sup>。Jafari 等报道, 10 mmol/L SDS 会影响 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 生长, 引起细胞膜损伤和矿物表面亲水性变化, 抑制 *A. ferrooxidans* 亚铁氧化, 降低铜浸出率<sup>[37]</sup>。由于 SDS 对 *A. ferrooxidans* 的强抑制作用, 即使将 SDS 浓度降低至 0.001 mmol/L, 其仍能够抑制 *A. ferrooxidans* BYM 生长。在摇瓶试验中, 通过添加 30 mmol/L TritonX-100 在 *A. ferrooxidans* XZ11 浸取黄铜矿的体系中, 培养 24 d, 结果表明铜的生物浸出率相较于未添加有机物组提升了 42.21%<sup>[38]</sup>。

0.04 mmol/L EDTA 处理 *A. ferrooxidans* 1 h 后, 能够去除表面脂多糖, 对细胞形态和活性均未产生影响<sup>[39]</sup>。

结果表明(图 4), 有机酸中 L-抗坏血酸和苹果酸对 *A. ferrooxidans* BYM 生长具有促进作用。抗坏血酸作为微量元素可以参与生物体的代谢过程, 作为小分子抗氧化剂可以中和细胞代谢产生的活性氧和自由基对机体造成的损伤<sup>[40]</sup>。抗坏血酸作为辅酶因子为羟化酶和单加氧酶等 15 种哺乳动物内酶提供电子, 参与了肉碱、胶原蛋白和神经递质合成等过程<sup>[41]</sup>。因此, 可推测试验中添加 L-抗坏血酸能够通过还原作用消耗 *A. ferrooxidans* BYM 代谢产生的  $\text{Fe}^{3+}$ 。柠檬酸的添加不能促进 *A. ferrooxidans* BYM 生长。苹果酸作为三羧酸循环中的一环, 其在某种程度上促进了菌体的代谢, 从而对亚铁氧化产生了促进作用。本研究通过添加 0–30 mmol/L 苹果酸, 明确了 5 mmol/L 的苹果酸能够促进 *A. ferrooxidans* BYM 生长。葡萄糖酸能够螯合培养基中的铁离子, 从而促进 *A. ferrooxidans* BYM 的亚铁氧化速率。吐温-80、TritonX-100 以及 SDS 对 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化均起到了抑制作用, 这可能是由于以上 3 种表面活性剂改变了 *A. ferrooxidans* BYM 细胞表面张力, 抑制了 *A. ferrooxidans* BYM 生长, 从而导致亚铁氧化速率降低。本研究选择 EDTA-2Na 的原因是其相较于 EDTA 在酸性条件下更容易溶解, 因此选择 EDTA-2Na 作为外源有机物进行试验。结果分析表明, EDTA-2Na 不能促进 *A. ferrooxidans* BYM 亚铁氧化, 并且随着 EDTA-2Na 浓度升高, 可能会螯合培养基中的铁离子, 抑制 *A. ferrooxidans* BYM 生长。

向 *M. magneticum* AMB-1 培养体系中添加 EDTA、罗丹明 B、抗坏血酸、赤藓红、邻氨基苯甲酸、柠檬酸、3-(N-吗啉)丙磺酸、3-(环己

胺)-1-丙磺酸、钙黄素、葡聚糖、阿仑膦酸、奈立膦酸和烟酰胺等铁螯合剂可以促进菌株生长并提高磁小体产量;我们前期的研究也发现,葡萄糖酸可以有效促进 *A. ferrooxidans* 的生长并促进菌体合成磁小体<sup>[42]</sup>。一些有机物可以使细菌的表面变得更为光滑,并使菌体表面的官能团变化<sup>[43]</sup>。这与本研究 SEM 及 FTIR 获得的经葡萄糖酸处理后 *A. ferrooxidans* BYM 表面变得光滑(图 6A、6B)、表面官能团发生变化的结果一致(图 7)。对于趋磁的磁小体合成细菌 *M. magneticum* AMB-1 而言,有机物可以通过增加磁小体链的长度来提高其单个细胞的磁小体数量<sup>[42]</sup>,尽管非趋磁性的 *A. ferrooxidans* BYM 不存在磁小体链,但葡萄糖酸作用后菌体内的磁小体数量仍然增加,原因可能是葡萄糖酸促进了菌体对铁的吸收,具体机制仍需要进一步研究。

微生物发酵动力学能够探究 *A. ferrooxidans* BYM 在整个发酵过程中的菌体变化、磁小体生成和亚铁消耗情况,此过程为磁小体的规模化发酵提供理论和实践依据。发酵动力学作为描述发酵过程微生物生长、产物生成和底物消耗的学科,能够在发酵过程中通过模型建立实现发酵的动态监控,以达到高效生产。目前,发酵动力学主要分为菌体生长动力学、产物生成动力学和底物消耗动力学。Logistic 方程作为经典菌体生长动力学模型,广泛用于微生物的发酵研究,Logistic 方程描述了三孢布拉霉发酵生产番茄红素过程中菌体生长情况,并很好地描述了菌体生长的动态情况<sup>[44]</sup>。Logistic 方程对于嗜酸乳杆菌的菌体发酵进行描述,并对其在 48 h 内菌体生长进行分析<sup>[21]</sup>。对拉曼 HLY0902 进行摇瓶发酵动力学研究,利用 Logistic 方程建立了菌体生长动力学模型<sup>[20]</sup>。产物生成动力学是描述产物生成与菌体生长之间的关系的科学,通过对产物生成动力学的探究,可以明确单一发酵和复合发酵

的不同机制。底物消耗动力学一般与细胞生长、产物生成和维持底物消耗的能量 3 种因素相关。通过描述发酵动力学,能够对菌体生长、目标产物生成、底物消耗过程等阶段进行明确调控,这对于分批发酵和连续发酵生产具有关键性意义。

本文以 *A. ferrooxidans* BYM 为目的菌株,探究在 10 mmol/L 葡萄糖酸下 4 L 发酵体系代谢变化。通过分批培养测定 *A. ferrooxidans* BYM 的生物量、磁小体生成量和亚铁氧化速率,明确 *A. ferrooxidans* BYM 在各个阶段的变化情况。基于经典 Logistic 方程、Luedeking-Priet 方程以及发酵动力学模型成功构建了 *A. ferrooxidans* BYM 菌体生长、磁小体合成及亚铁消耗动力学模型,其拟合度  $R^2$  分别为 0.99、0.98 及 0.98,数值均大于 0.90,说明模型能够很好地反映 *A. ferrooxidans* BYM 发酵动力学。通过非线性拟合的方法拟合得到的 3 个方程与实际值接近,误差较小,能够很好地反映 *A. ferrooxidans* BYM 在各个阶段发酵变化。3 个发酵模型的建立为今后的发酵条件控制和磁小体规模化发酵提供了一定的理论参考价值。

## 4 结论

本研究以 *A. ferrooxidans* BYM 为研究对象,通过单因素试验探究 10 种外源添加有机物对其生长的影响,根据试验结果筛选得到对磁小体合成促进效果最明显的一种有机物。在最优促进剂下对 *A. ferrooxidans* BYM 在发酵过程中的菌体生长、磁小体合成以及亚铁消耗动力学进行研究。通过以上探究过程,本研究得出以下结论:

(1) 通过亚铁氧化速率的测定,筛选出 L-抗坏血酸、苹果酸以及葡萄糖酸对 *A. ferrooxidans* BYM 生长具有显著的促进作用,并确定了合适的浓度范围。

(2) 通过 4 L 体系发酵试验,对 3 种有机

物进行浓度优化。获得最优促进剂葡萄糖酸，以 10 mmol/L 添加时，磁小体产量可达  $2.00 \times 10^{-3}$  g/L。

(3) 通过不同时间梯度的分批发酵试验，本研究建立了 *A. ferrooxidans* BYM 的菌体生长、磁小体生成和亚铁消耗动力学模型。

研究结果表明在葡萄糖酸的作用下能够对 *A. ferrooxidans* BYM 发酵过程进行调控，改善磁小体发酵过程，为后续大体系通过微生物发酵产磁小体提供理论及实践依据。

## 参考文献

- [1] JACOB JJ, SUTHINDHIRAN K. Magnetotactic bacteria and magnetosomes-scope and challenges[J]. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications*, 2016, 68: 919-928.
- [2] WANG XJ, LI Y, ZHAO J, YAO H, CHU SQ, SONG ZM, HE ZX, ZHANG W. Magnetotactic bacteria: characteristics and environmental applications[J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2020, 14(4): 56.
- [3] YAN L, ZHANG S, CHEN P, LIU HT, YIN HH, LI HY. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application[J]. *Microbiological Research*, 2012, 167(9): 507-519.
- [4] GREENING C, LITHGOW T. Formation and function of bacterial organelles[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18: 677-689.
- [5] WANG Q, WANG X, ZHANG WJ, LI XY, ZHOU Y, LI D, WANG YJ, TIAN JS, JIANG W, ZHANG ZD, PENG YL, WANG L, LI Y, LI JL. Physiological characteristics of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 that control cell growth under high-iron and low-oxygen conditions[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 2800.
- [6] BERTANI LE, WEKO J, PHILLIPS KV, GRAY RF, KIRSCHVINK JL. Physical and genetic characterization of the genome of *Magnetospirillum magnetotacticum*, strain MS-1[J]. *Gene*, 2001, 264(2): 257-263.
- [7] LI KF, CHEN CF, CHEN CY, WANG YZ, WEI Z, PAN WD, SONG T. Magnetosomes extracted from *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1 showed enhanced peroxidase-like activity under visible-light irradiation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 72: 72-78.
- [8] COLMER AR, HINKLE ME. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report[J]. *Science*, 1947, 106(2751): 253-256.
- [9] 刘文斌. 氧化亚铁硫杆菌中磁小体形成研究[D]. 长沙: 中南大学硕士学位论文, 2007.  
LIU WB. Microbiological formation of magnetosomes in *Acidithiobacillus ferrooxidans*[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University, 2007 (in Chinese).
- [10] ZHAN Y, YANG MR, ZHANG S, ZHAO D, DUAN JG, WANG WD, YAN L. Iron and sulfur oxidation pathways of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(4): 60.
- [11] 范欣欣. 氧化亚铁硫杆菌发酵条件优化及其磁小体与阿霉素的偶联表征[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2019.  
FAN XX. Optimization of fermentation conditions of *Thiobacillus ferrooxidans* and its coupling characterization of magnetosomes with adriamycin[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [12] 李洋. 小分子有机酸对氧化亚铁硫杆菌的抑制作用及其机理的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2010.  
LI Y. Mechanisms involved in Imwoas-caused inhibition on ferrous iron oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [13] 全丽丽. 促进剂对桦褐孔菌液体深层发酵多糖产生和活性的影响[D]. 杭州: 浙江理工大学硕士学位论文, 2015.  
QUAN LL. Simultaneously stimulated production and antioxidant activity of expolysaccharides and endopolysaccharides of *Inonotus obliquus* in submerged fermentation[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Sci-Tech University, 2015 (in Chinese).
- [14] 王玮. 几种有机物对嗜酸氧化亚铁硫杆菌 ATCC 23270 生长的影响及其 *cbb* 基因差异表达研究[D]. 长沙: 中南大学硕士学位论文, 2008.  
WANG W. Affects of several organic matters on growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 and study of its *cbb* gene expression difference[D].

- Changsha: Master's Thesis of Central South University, 2008 (in Chinese).
- [15] 任婉侠, 李培军, 范淑秀, 何娜. 低分子量有机酸对氧化亚铁硫杆菌影响[J]. 环境工程学报, 2008, 2(9): 1269-1273.
- REN WX, LI PJ, FAN SX, HE N. Effects of low molecular weight organic acids on *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2008, 2(9): 1269-1273 (in Chinese).
- [16] ALPHANDÉRY E, AMOR M, GUYOT F, CHEBBI I. The effect of iron-chelating agents on *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1: stimulated growth and magnetosome production and improved magnetosome heating properties[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(3): 663-670.
- [17] 王世宽, 冉燃, 侯华, 许艳丽, 潘明. 减压处理下泡菜发酵动力学初探[J]. 食品工业科技, 2009, 30(7): 134-135, 139.
- WANG SK, RAN R, HOU H, XU YL, PAN M. Primary study on kinetics model of pickle under decompression[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(7): 134-135, 139 (in Chinese).
- [18] 陈丽. 多拷贝毕赤酵母重组菌表达 PIP 生理特性和动力学研究[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2011.
- CHEN L. Physiological characterization and kinetics of porcine insulin precursor production in multi-copy *Pichia pastoris*[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2011 (in Chinese).
- [19] 陈建堂. 超声场中棉阿舒囊霉菌(*Ashbya gossypii*)生长和核黄素产生机制研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2022.
- CHEN JT. Study on the growth and riboflavin production mechanism of *Ashbya gossypii* in ultrasonic field[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2022 (in Chinese).
- [20] 刘杨洋.  $\gamma$ -亚麻酸产生菌拉曼被孢霉培养基优化及发酵动力学分析[D]. 长春: 长春工业大学硕士学位论文, 2019.
- LIU YY. Culture medium optimization and fermentation kinetics analysis of  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mortierella ramanniana*[D]. Changchun: Master's Thesis of Changchun University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [21] 后立琼. 苗族酸汤中乳酸菌的分离鉴定及发酵动力学模型研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2012.
- HOU LQ. Isolation and identification of lactic acid bacteria in fermented soup of Miao and its fermentation kinetics[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [22] 韦晓菊. 合成用青霉素酰化酶的发酵与酶法合成头孢克洛[D]. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文, 2014.
- WEI XJ. The fermentation process of penicillin acylase and preparation of catalytic by enzymatic method[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University of Forestry and Technology, 2014 (in Chinese).
- [23] ORTIZ-CASTILLO J, MIRAZIMI M, MOHAMMADI M, DY E, LIU WY. The role of microorganisms in the formation, dissolution, and transformation of secondary minerals in mine rock and drainage: a review[J]. Minerals, 2021, 11(12): 1349.
- [24] YAN L, YIN HH, ZHANG S, LENG FF, NAN WB, LI HY. Biosorption of inorganic and organic arsenic from aqueous solution by *Acidithiobacillus ferrooxidans* BY-3[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 178(1/2/3): 209-217.
- [25] ZHAO D, YANG JN, ZHANG GJ, LU D, ZHANG S, WANG WD, YAN L. Potential and whole-genome sequence-based mechanism of elongated-prismatic magnetite magnetosome formation in *Acidithiobacillus ferrooxidans* BYM[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(7): 121.
- [26] 叶茂友, 严苹方, 孙水裕, 韩大建, 庄圣炜, 郑莉, 黄绍松. 铜离子浓度对嗜酸性氧化亚铁硫杆菌生长特性和生长动力学的影响[J]. 中国有色金属学报, 2016, 26(10): 2238-2245.
- YE MY, YAN PF, SUN SY, HAN DJ, ZHUANG SW, ZHENG L, HUANG SS. Effect of copper ion concentration on growth activity and kinetics of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2016, 26(10): 2238-2245 (in Chinese).
- [27] 柳建设, 张艳华. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长动力学方程的应用[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(2): 5-8.
- LIU JS, ZHANG YH. The application of kinetic equation for growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2006, 6(2): 5-8 (in Chinese).
- [28] YANG JN, ZHANG S, ZHANG Y, ZHAO D, LIU T, SUN XD, YAN L. Phenomic and transcriptomic analyses reveal the sequential synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in *Acidithiobacillus ferrooxidans*

- BYM[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(6): e0172923.
- [29] 余兰, 岳潇轩. 柠檬酸对 *A. ferrooxidans* 磁小体产生及转铁相关基因的影响[J]. *生物技术世界*, 2012, 10(5): 1-2.
- YU L, YUE XX. Effect of citric acid on the production of magnetosomes and iron-transforming related genes in *A. ferrooxidans*[J]. *Biotechnology World*, 2012, 10(5): 1-2 (in Chinese).
- [30] REN WX, LI PJ, ZHENG L, FAN SX, VERHOZINA VA. Effects of dissolved low molecular weight organic acids on oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 162(1): 17-22.
- [31] WUANA RA, OKIEIMEN FE, IMBORVUNGU JA. Removal of heavy metals from a contaminated soil using organic chelating acids[J]. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 2010, 7(3): 485-496.
- [32] JADHAV U, GAWADE T, BHAPKAR S, BHARDE A. Exploration of intrinsic peroxidase-like activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans* spent medium and its application for glutathione detection[J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(5): 2615-2623.
- [33] CHAKANKAR M, SU CH, HOCHENG H. Leaching of metals from end-of-life solar cells[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(29): 29524-29531.
- [34] LI LL, LV ZS, YUAN XL. Effect of L-glycine on bioleaching of collophanite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 85: 156-165.
- [35] LI XZ, MERCADO R, KERNAN T, WEST AC, BANTA S. Addition of citrate to *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures enables precipitate-free growth at elevated pH and reduces ferric inhibition[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(10): 1940-1948.
- [36] PENG AA, LIU HC, NIE ZY, XIA JL. Effect of surfactant Tween-80 on sulfur oxidation and expression of sulfur metabolism relevant genes of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2012, 22(12): 3147-3155.
- [37] JAFARI M, SHAFARIE SZ, ABDOLLAHI H, GHARABAGHI M, CHEHREH CHELGANI S. Study of the effects of conventional reagents for sulfide flotation on bio-oxidation activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Chemical Engineering Communications*, 2019, 206(3): 365-377.
- [38] ZHANG RY, SUN CB, KOU J, ZHAO HY, WEI DZ, XING Y. Enhancing the leaching of chalcopyrite using *Acidithiobacillus ferrooxidans* under the induction of surfactant TritonX-100[J]. *Minerals*, 2018, 9(1): 11.
- [39] CHANDRAPRABHA MN, NATARAJAN KA. Role of outer membrane exopolymers of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in adsorption of cells onto pyrite and chalcopyrite[J]. *International Journal of Mineral Processing*, 2013, 123: 152-157.
- [40] CARR AC, FREI B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 69(6): 1086-1107.
- [41] 赵光夫. L-抗坏血酸影响牛源 A 型多杀性巴氏杆菌感染的研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2019.
- ZHAO GF. Study on the effect of L-ascorbic acid on the bovine serotype a *Pasteurella multocida* infection[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2019 (in Chinese).
- [42] HE SJ, YANG JN, FAN XX, LU D, ZHANG S, YAN L. Magnetosome yield characteristics modeling of acidithiobacillus ferrooxidans in airlift bioreactor using response surface methodology[J]. *Journal of Biomaterials Applications*, 2023, 37(7): 1325-1338.
- [43] WU Y, LIANG S, ZHANG M, WANG ZH, WANG ZY, REN X. The effect of chlorogenic acid on *Bacillus subtilis* based on metabolomics[J]. *Molecules*, 2020, 25(18): 4038.
- [44] 张阳. 三孢布拉霉大量产孢条件及发酵动力学研究[D]. 武汉: 华中科技大学硕士学位论文, 2013.
- ZHANG Y. Study on conditions of mass sporulation and fermentation kinetics of *Blakeslea trispora*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong University of Science and Technology, 2013 (in Chinese).