



## 光电子和光生空穴对粪产碱杆菌代谢产物的影响

孟繁斌, 董发勤\*, 刘明学, 王萍萍

西南科技大学生命科学与工程学院, 四川省固体废物处理与资源化教育部重点实验室, 西南科技大学环境与资源学院, 四川 绵阳 621010

**摘要:**【目的】探讨光催化下纳米 TiN 对粪产碱杆菌代谢情况的影响。【方法】我们通过分别添加空穴捕获剂及电子捕获剂, 使用三维荧光光谱分析比较光生空穴和光电子对粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*) 生长代谢的不同作用。【结果】光照条件下, 空穴捕获剂组明显生成了较多的类腐殖质类物质, 且比其他实验组有更强的 NADH 的荧光峰出现, 峰强度是其他实验组的 4 到 5 倍。黑暗条件下, 各实验组之间的代谢产物无明显变化。光照条件下的电子捕获剂组比黑暗条件下有更强的类蛋白质类荧光峰。【结论】本文首次报道光电子会促进粪产碱杆菌产生腐殖质类物质, 且会产生更多的能量。光生空穴会促进粪产碱杆菌产生蛋白质类物质。

**关键词:** 纳米 TiN, 光电子, 光生空穴, 粪产碱杆菌, 三维荧光

地球上所有生命活动的能量来源都是太阳, 地球生命直接或者间接依靠太阳光能生存繁衍<sup>[1]</sup>。长期以来人们一直认为微生物以利用太阳能与化学物质(包括有机物和无机物)储存的能量为主, 因此将地球上微生物分为光能营养和化能营养这两种基本能量营养模式<sup>[2]</sup>。然而鲁安怀等的研究表明, 在天然半导体矿物的介导作用下, 光照可促进非光合微生物(化能自养微生物与化能异养微生物)的生长代谢<sup>[3]</sup>, 研究结果揭示了一种长期存在并且正在发生的微生物能量利用途径, 即天然

半导体矿物参与的非光合微生物利用太阳光能途径。Mulkidjanian 等研究证实, 地表热泉中富含的天然金属硫化物矿物如闪锌矿和硫锰矿等, 能够形成保护鞘, 保护了原始细胞不受到阳光中紫外光光子的损害<sup>[4]</sup>。正是由于天然半导体矿物光催化作用在保护早期生命细胞的同时又能为早期生命提供生存繁衍所必需的能量, 天然半导体矿物光催化可能在地球早期生命起源与演化中起着重要的作用。半导体有允许电子占据的能级区域称为允许带, 其最外层称为价带, 之后是能量高于价

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973 项目”)(2014CB846003); 国家自然科学基金(41572035)

\*通信作者。E-mail: fqdong@swust.edu.cn

收稿日期: 2017-10-31; 修回日期: 2018-01-19; 网络出版日期: 2018-02-05

带的导带；允许带之间不能被电子占据的能级区域为禁带。当半导体受到能量大于禁带宽度的光照时，能带之间就会发生电子跃迁，产生的电子就被称为光电子，而电子跃迁后留下的电子空穴就被称为光生空穴<sup>[5]</sup>。余萍等<sup>[6]</sup>用电化学方法模拟半导体光电子，研究了光电子对粪产碱杆菌的代谢影响，结果表明光电子能促进粪产碱杆菌在固体表面的附着生长并增强其反硝化能力。国外学者 Sakimoto 等<sup>[7]</sup>的研究表明 CdS 在光照下可以促进非光合二氧化碳还原菌 *Moorella thermoacetica* 将一氧化碳固定为乙酸的代谢反应，而乙酸可以为该菌提供能量。向沙等<sup>[8]</sup>用含有半导体材料 TiN 的寡营养培养基从某铀尾矿区的土壤中筛选出了粪产碱杆菌，并表明在 TiN 影响下粪产碱杆菌代谢产物蛋白和腐殖酸增多。但文中并未证明该影响是光电子的作用还是光生空穴的影响。研究非光合微生物如何通过半导体的相互作用来促进自身生长有助于对地球元素循环的了解，并对研究早期地球还原性环境下生命如何产生有重要意义。同时，研究半导体对微生物代谢产物的影响，对两者之间互作和生物的演变有重要意义。而粪产碱杆菌作为已经证明的可以利用光电子的微生物之一，对此类研究有重要意义，且粪产碱杆菌有较强的抗逆性，因此本研究选择粪产碱杆菌作为模式菌株。纳米 TiN 作为一种半导体材料国内外研究较多，且性能和天然的半导体矿物相比并无太大差异，亦有天然半导体矿物促进微生物生长的报道<sup>[5]</sup>，因此纳米 TiN 对粪产碱杆菌的代谢产物影响具有普适性。本研究通过添加不同捕获剂来分别屏蔽光电子、光生空穴，从而更全面地观察探讨纳米 TiN 对粪产碱杆菌代谢产物的影响，以期探究半导体对微生物生长代谢的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种来源

本文应用的粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)属于非发酵性革兰氏阴性杆菌中的产碱杆菌科(Alcaligenaceae)，产碱杆菌属(*Alcaligenes*)。来源于西南科技大学科技园环境微生物实验室。

### 1.2 培养基及培养方法

活化培养基为 LB 培养基(每升胰蛋白胨 10 g，酵母浸粉 5 g，NaCl 10 g，使用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0)。高压蒸汽 121 °C 灭菌 20 min。实验培养基为 1/100 营养的培养基并加入浓度为 5 mg/L 的 TiN，用超声振荡器使 TiN 均匀分布在培养基中。从保存菌种的固体培养基上挑取一环菌体，接入活化培养基，在 30 °C 下，120 r/min 振荡培养，进行活化。活化 1 d 后，接种到实验培养基中，培养条件同活化条件。实验使用石英锥形瓶，每瓶 100 mL 实验培养基，接种 1 mL 活化后的菌液。实验设置空白对照、空穴捕获剂(乙酸钠)、电子捕获剂(溴酸钾) 3 个对照组，并在钠灯照射或黑暗下进行培养，每组设置 3 个平行。空穴捕获剂及电子捕获剂的浓度为 10 mg/L。

### 1.3 主要仪器和试剂

主要试剂：酵母浸粉、胰蛋白胨、氯化钠(NaCl)、乙酸钠(CH<sub>3</sub>COONa)(空穴捕获剂)、溴酸钾(KBrO<sub>3</sub>)(电子捕获剂)、氢氧化钠(NaOH)、琼脂粉、氮化钛(TiN)(阿拉丁公司)等分析纯试剂。

主要仪器：钠灯，超声振荡器、日立 F-7000 荧光分光光度计(Hitachi, JPN)、欧诺 HNY-100B 恒温培养振荡器、紫外分光光度计(上海谱元仪器有限公司)、台式数显 pH 计(Bante PHS-3CW)、分析天平(BSA124S, USA)等。

## 1.4 生长曲线变化

使用紫外可见分光光度计在 600 nm 测量 0、4、8、12、18、24、30、36、48、72 h 时的  $OD$  值来表征菌体生长变化,取 3 个平行的平均数绘制生长曲线。

## 1.5 代谢产物变化分析

取 5 mL 菌液于灭菌后的离心管中,在超声下振荡破碎。使用日立 F-7000 荧光分光光度计进行三维荧光测试来表征不同条件下代谢产物的变化。测试条件为激发波长 200–500 nm,步长 3 nm;发射波长 200–600 nm,步长 4 nm。光电倍增管 400 V,激发狭缝、发射狭缝均为 5 nm。扫描速度 12000 nm/min,扫描的积分时间为 0.002 s。并通过扣除空白水样校正拉曼散射。将瑞利散射及其附近( $\pm 20$  nm)区域置零来去除瑞利散射对荧光的影响<sup>[9]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同条件对粪产碱杆菌生长曲线的影响

如图 1 所示,光照条件下,空穴捕获剂组比其他实验组生长状况更好,30 h 后的  $OD$  值下降,应是受到了营养条件的限制,粪产碱杆菌的生长进入衰亡期。黑暗条件下,电子捕获剂组、空穴捕获剂组和空白对照组的生长状况无明显区别。

### 2.2 光照条件下不同捕获剂对粪产碱杆菌代谢产物的影响

图 2、图 3 中激发/发射波长( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ )为 235–240/340–355 nm 及 280–285/320–352 nm 的荧光峰代表的是类蛋白质类<sup>[10]</sup>, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  为 260–280/380–460 nm 的荧光峰代表的是类腐殖质类<sup>[11]</sup>, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  为 320–360/420–460 nm 的荧光峰为 NADH<sup>[12]</sup>。由图 2 可见,

类蛋白质和类腐殖质的最大激发波长为 280 nm, NADH 的最大激发波长为 345 nm。光照条件下,加入空穴捕获剂的实验组,蛋白质明显多于空白组,且相较于其他两组出现了较为明显的腐殖质的峰,NADH 的含量也更多。而电子捕获剂组和空白对照组相比,蛋白质含量增加,但腐殖酸和 NADH 的含量无明显变化。

### 2.3 黑暗条件下不同添加剂对粪产碱杆菌代谢产物的影响

在黑暗条件下,3 个实验组之间的代谢产物无明显变化,空穴捕获剂组和电子捕获剂组的蛋白质含量和 NADH 略多于空白对照组(图 3)。

### 2.4 不同条件下类蛋白质、类腐殖质及 NADH 的变化

图 4 是类蛋白质、类腐殖质及 NADH 在不同条件下的荧光光谱。从图 4 中可以看出,光照条

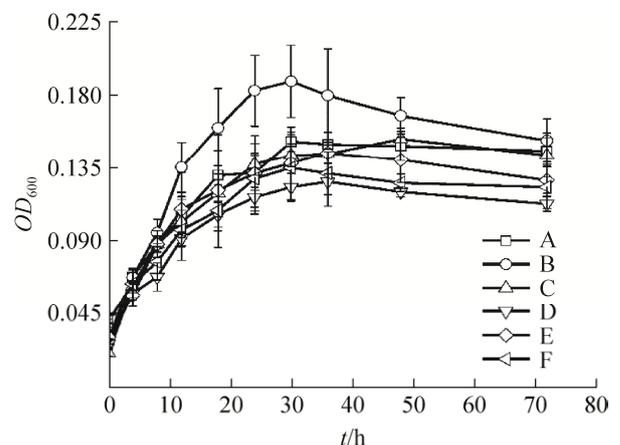


图 1. 不同条件下粪产碱杆菌的生长曲线

Figure 1. The growth curve of *Alcaligenes faecalis* in different conditions. A: control group under the light; B: hole scavenger group under the light; C: electron capturer group under the light; D: control group under the dark; E: hole scavenger group under the dark; F: electron capturer group under the dark.

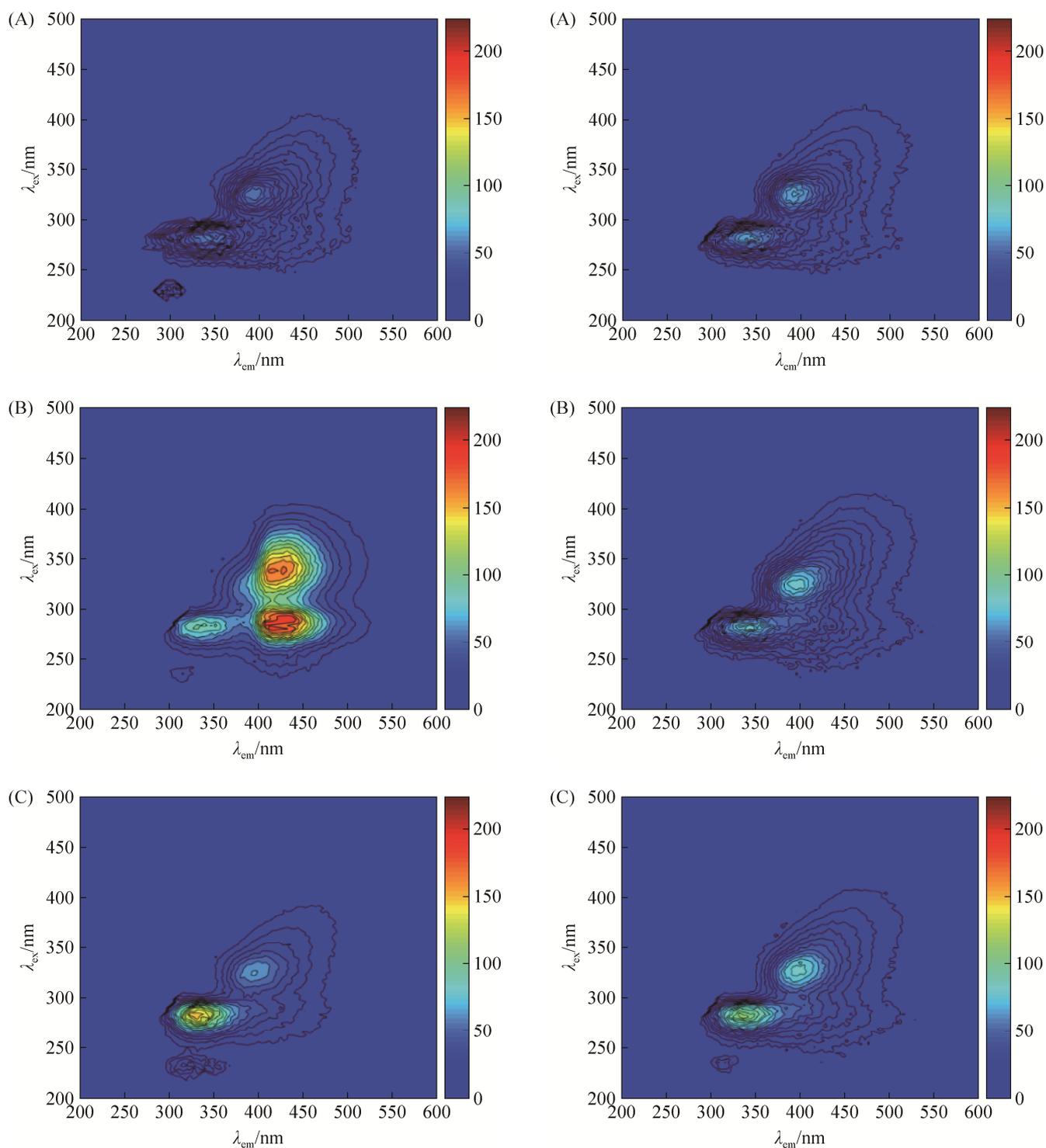


图 2. 光照条件下空白对照组(A)、空穴捕获剂组(B)、电子捕获剂组(C)代谢产物变化

Figure 2. The change of metabolites of control group (A), hole scavenger group (B) and electron capturer group (C) under the light.

图 3. 黑暗条件下空白对照组(A)、空穴捕获剂组(B)、电子捕获剂组(C)代谢产物变化

Figure 3. The change of metabolites of control group (A), hole scavenger group (B) and electron capturer group (C) under the dark.

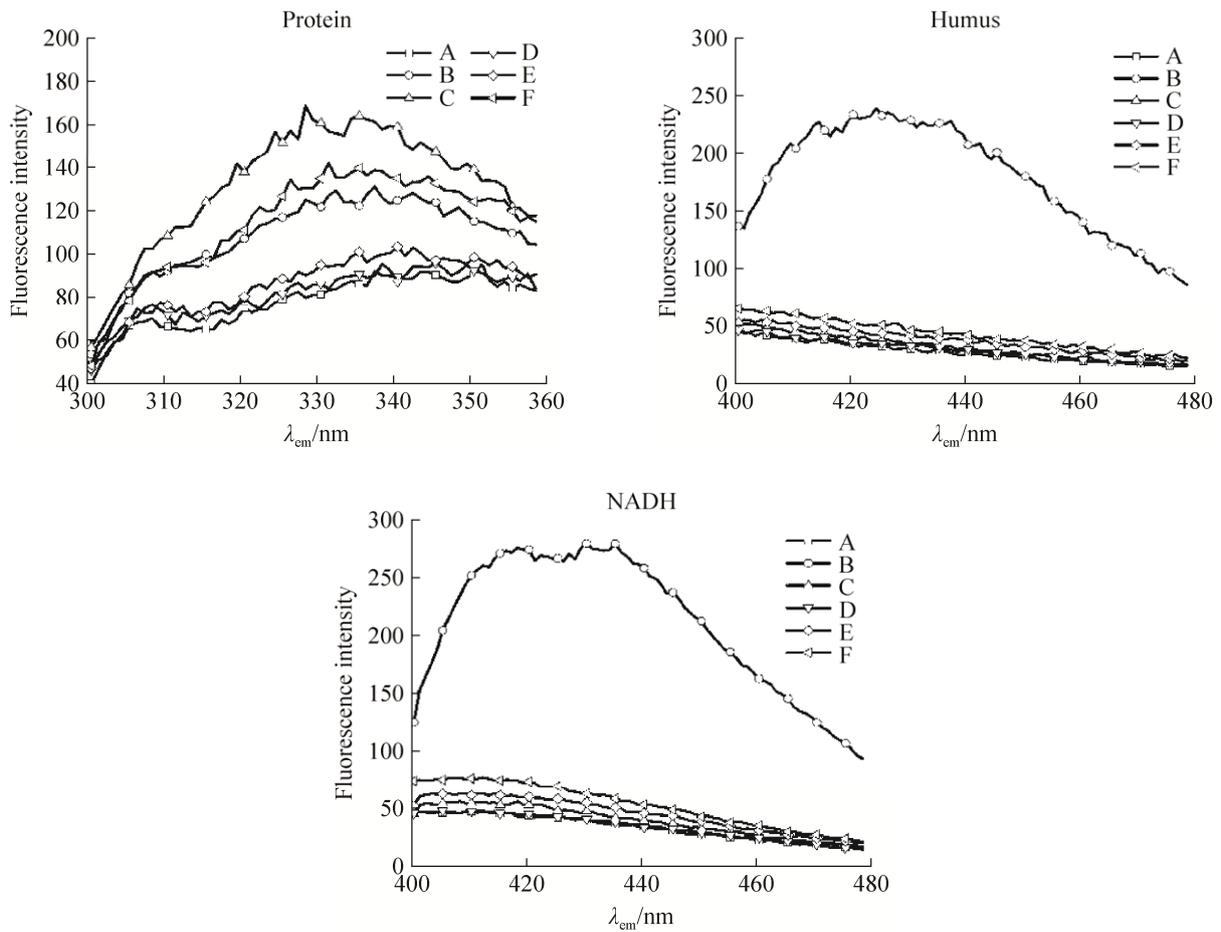


图 4. 不同条件下类蛋白质、类腐殖质及 NADH 的变化

Figure 4. The change of proteinoid, humic-like and NADH in different conditions. A: control group under the light; B: hole scavenger group under the light; C: electron capturer group under the light; D: control group under the dark; E: hole scavenger group under the dark; F: electron capturer group under the dark.

件下的电子捕获剂组比其他实验组有更强的类蛋白荧光峰,这说明在排除了电子捕获剂的影响后,光生空穴刺激了粪产碱杆菌蛋白质的生成。而光照条件下的空穴捕获剂组比其他实验组有更强的类腐殖质荧光峰和 NADH 荧光峰,且是其他实验组的 4 到 5 倍之多,这说明光电子明显促进了粪产碱杆菌产生类腐殖质物质,且使得粪产碱杆菌产生了更多的能量,即光电子进入了粪产碱杆菌的三羧酸循环中,也可以说是粪产碱杆菌利用了光电子的能量。

### 3 讨论

深入了解半导体和微生物的协同作用,对研究矿物形成与变化和生命的起源与进化有重要意义。因此本研究利用三维荧光法初步分析了光电子及光生空穴对粪产碱杆菌代谢产物的影响。结果显示光电子会促进粪产碱杆菌产生腐殖质类物质,且会产生更多的能量,光生空穴会促进粪产碱杆菌表明蛋白的生成。腐殖质在溶液体系下可以作为电子穿梭体,是介导胞外电子传递的重要

途径之一<sup>[13]</sup>。鲁安怀等<sup>[3]</sup>的研究表明,非光合微生物可以利用光催化半导体矿物产生的能量来生长。同时,向沙等<sup>[8]</sup>的研究表明,在 TiN 影响下粪产碱杆菌代谢产物蛋白和腐殖酸增多。

本研究在此基础上进行实验。结果表明光照条件下,添加空穴捕获剂组的类腐殖质类荧光峰强度是其他实验组的 4 到 5 倍,且有更明显的 NADH 荧光峰;黑暗条件下,空穴捕获剂组和其他两组之间的类腐殖质类荧光峰无明显变化。有研究表明,腐殖质类物质可以作为电子穿梭体参与微生物的物质能量代谢<sup>[14]</sup>,而微生物在获取能量或生殖时会分泌大量的蛋白质以及腐殖质<sup>[15]</sup>,这就使得微生物可以更好地获得和传递光电子的能量;同时,电子可以转移到 NAD<sup>+</sup>上生成 NADH<sup>[16]</sup>进入电子呼吸链参与能量代谢, Matsuda 等<sup>[17]</sup>的研究结果表明微生物在接受胞外电子时编码 NADH 脱氢酶基因会上调,使能量代谢作用加强。这些报道都与本研究的结果相符,即粪产碱杆菌在光电子的刺激下分泌更多的腐殖质来加强电子传递,从而生成了更多的 NADH。

光照条件和黑暗条件下的空穴捕获剂组和电子捕获剂组的类蛋白质类荧光较空白对照组都有加强,应与空穴捕获剂及电子捕获剂加入溶液中有更多的离子有关,潘帧婕等<sup>[18]</sup>的研究表明随着钠离子浓度的增加,细胞钠离子通道蛋白 1.7(Nav)的表达也随之加强。通过本研究的结果可以推测微生物生成了更多的转运类蛋白(如钠钾泵),但影响并不明显。而对比光照条件和黑暗条件下的空穴捕获剂组和电子捕获剂组,可发现光照条件下类蛋白质类荧光峰强度是黑暗条件下的 0.5–1.7 倍左右,变化较为明显,可以看出光生空穴会促进微生物蛋白质的产生,应与微生物的抗逆性有关:

光生空穴具有氧化性,会对微生物产生胁迫。蛋白质含量的增加是生物对环境胁迫的一种生理生化反应<sup>[19]</sup>,在本研究中,粪产碱杆菌在光生空穴及光生空穴氧化生成的氧自由基的胁迫下,生成还原性蛋白(如金属硫蛋白、谷氧还蛋白、黄素血红蛋白、硫氧还蛋白和谷胱甘肽等)和过氧化物酶体(如触酶 A、触酶 T 等)来清除氧化产物以及保护细胞本身<sup>[20]</sup>。

本文的研究结果显示,在光电子和光生空穴不同的作用下,微生物会有不同的应激反应。这一结果进一步证实了光电子会促进微生物生长,半导体和微生物体系复杂,在自然环境下半导体与光电子如何协同作用目前仍不清楚。

## 参 考 文 献

- [1] Lu AH, Wang X, Li Y, Ding HR, Wang CQ, Zeng CP, Hao RX, Yang XX. Mineral photoelectrons and their implications for the origin and early evolution of life on Earth. *Science China Earth Sciences*, 2014, 57(5): 1117–1123. (in Chinese)  
鲁安怀, 王鑫, 李艳, 丁竑瑞, 王长秋, 曾翠平, 郝瑞霞, 杨晓雪. 矿物光电子与地球早期生命起源及演化初探. *中国科学: 地球科学*, 2014, 44(6): 1117–1123.
- [2] Lu AH, Li Y, Wang X, Ding HR, Zeng CP, Hao RX, Wang CQ. The utilization of solar energy by non-phototrophic microorganisms through semiconducting minerals. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 190–202. (in Chinese)  
鲁安怀, 李艳, 王鑫, 丁竑瑞, 曾翠平, 郝瑞霞, 王长秋. 半导体矿物介导非光合微生物利用光电子新途径. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 190–202.
- [3] Lu AH, Li Y, Jin S, Wang X, Wu XL, Zeng CP, Li Y, Ding HR, Hao RX, Lv M, Wang CQ, Tang YQ, Dong HL. Growth of non-phototrophic microorganisms using solar energy through mineral photocatalysis. *Nature Communications*, 2012, 3: 768.
- [4] Mulkidjanian AY, Bychkov AY, Dibrova DV, Galperin MY, Koonin EV. Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(14):

- E821–E830.
- [5] Lu AH, Li Y, Wang X, Ding HR, Liu Y, Wang CQ. The photoelectron generation from semiconducting minerals and its effects in critical zone. *Earth Science Frontiers*, 2014, 21(3): 256–264. (in Chinese)  
鲁安怀, 李艳, 王鑫, 丁竑瑞, 刘熠, 王长秋. 关键带中天然半导体矿物光电子的产生与作用. *地学前缘*, 2014, 21(3): 256–264.
- [6] 余萍, 李艳, 鲁安怀. 半导体矿物光电子调控粪产碱杆菌代谢研究//中国矿物岩石地球化学学会第 14 届学术年会论文摘要专辑. 南京: 中国矿物岩石地球化学学会, 2013.
- [7] Sakimoto KK, Wong AB, Yang PD. Self-photosensitization of nonphotosynthetic bacteria for solar-to-chemical production. *Science*, 2016, 351(6268): 74–77.
- [8] Xiang S, Liu MX, Zhang GG, Luo L, Wei HF, Dong FQ. Screening of photoelectron-response microbes as well as their growth and metabolism. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(4): 205–213. (in Chinese)  
向沙, 刘明学, 张格格, 罗浪, 魏红福, 董发勤. 光电子响应微生物的筛选鉴定及生长代谢特征研究. *生物技术通报*, 2017, 33(4): 205–213.
- [9] Xiao X, Zhang YJ, Wang ZG, Jin D, Yin GF, Zhao NJ, Liu WQ. Experimental studies on three-dimensional fluorescence spectral of mineral oil in ethanol. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, 30(6): 1549–1554. (in Chinese)  
肖雪, 张玉钧, 王志刚, 金丹, 殷高方, 赵南京, 刘文清. 矿物油-乙醇溶液三维荧光光谱的实验研究. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(6): 1549–1554.
- [10] 郭玉婷. 高硅钙质超细矿物颗粒与人体常见菌壁膜结构分子的作用研究. 西南科技大学硕士学位论文, 2016.
- [11] Hao RX, Cao KX, Deng YW. The variation trend of three-dimensional characteristic fluorescence of dissolved organic matter in the wastewater treatment process. *Journal of Instrumental Analysis*, 2007, 26(6): 789–792, 796. (in Chinese)  
郝瑞霞, 曹可心, 邓亦文. 城市污水处理过程中有机污染物三维荧光特性的变化规律. *分析测试学报*, 2007, 26(6): 789–792, 796.
- [12] Liu L. Three-dimensional fluorescence spectra of microbial metabolites. *Chemical Engineering & Equipment*, 2010, (2): 144–146, 137. (in Chinese)  
刘璐. 微生物代谢产物的三维荧光光谱分析. *化学工程与装备*, 2010, (2): 144–146, 137.
- [13] Ma JL, Ma C, Tang J, Zhou SG, Zhuang L. Mechanisms and applications of electron shuttle-mediated extracellular electron transfer. *Progress in Chemistry*, 2015, 27(12): 1833–1840. (in Chinese)  
马金莲, 马晨, 汤佳, 周顺桂, 庄莉. 电子穿梭体介导的微生物胞外电子传递: 机制及应用. *化学进展*, 2015, 27(12): 1833–1840.
- [14] Klüpfel L, Piepenbrock A, Kappler A, Sander M. Humic substances as fully regenerable electron acceptors in recurrently anoxic environments. *Nature Geoscience*, 2014, 7(3): 195–200.
- [15] Pal A, Paul AK. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 2008, 48(1): 49–64.
- [16] Olgun A. Converting NADH to NAD<sup>+</sup> by nicotinamide nucleotide transhydrogenase as a novel strategy against mitochondrial pathologies during aging. *Biogerontology*, 2009, 10(4): 531–534.
- [17] Matsuda S, Liu H, Kato S, Hashimoto K, Nakanishi S. Negative faradaic resistance in extracellular electron transfer by anode-respiring *Geobacter sulfurreducens* cells. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(23): 10163–10169.
- [18] Pan ZJ, Cao J, Li M, Ren XH, Wang JN, Shao JP, Zang WD. Effects of sodium glutamate on sodium channel protein 1.7 subunit expression in PC12 cells. *Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences)*, 2013, 48(5): 591–594. (in Chinese)  
潘帧婕, 曹靖, 李鸣, 任秀花, 王剑南, 邵金平, 臧卫东. 谷氨酸钠对 PC12 细胞钠离子通道蛋白 1.7 表达的影响. *郑州大学学报(医学版)*, 2013, 48(5): 591–594.
- [19] 王焕校. 污染生态学. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2012.
- [20] Yu LQ, Jiang LH. Cellular responds under oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemistry of Life*, 2010, 30(1): 46–49. (in Chinese)  
于立权, 蒋伶活. 氧化胁迫环境下的酵母细胞应答调控. *生命的化学*, 2010, 30(1): 46–49.

# Effects of photoelectron and photogenerated hole on the metabolites of *Alcaligenes faecalis*

Fanbin Meng, Faqin Dong\*, Mingxue Liu, Pingping Wang

School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Key Laboratory of Waste Solid Treatment and Resource Recycle of Ministry of Education, School of Environment and Resource, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan Province, China

**Abstract:** [Objective] To explore the effect of photoelectron and photogenerated hole on the metabolites of *Alcaligenes faecalis*. [Methods] We compared different effect of photoelectron and photogenerated hole on metabolism of *Alcaligenes faecalis* through the Three-dimensional fluorescence spectroscopy by adding the hole scavenger and electron capturer. [Results] Under light, the hole scavenger group obviously produced 4 to 5 times higher humus-like substances and intensity of NADH fluorescence peaks than the electron capturer group, while the Three-dimensional fluorescence spectra did not show visible change among the experimental sets under dark. In contrast, the electron capturer group under light shows stronger fluorescence peak than under dark. [Conclusion] This is the first report that the photoelectron will promote the *Alcaligenes faecalis* to produce humus substances and more energy. The photogenerated hole will promote the *Alcaligenes faecalis* to produce protein.

**Keywords:** nano-TiN, photoelectron, photogenerated hole, *Alcaligenes faecalis*, 3D-fluorescence

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Basic Research Program of China (2014CB846003) and by the National Natural Science Foundation of China (41572035)

\*Corresponding author. E-mail: fqdong@swust.edu.cn

Received: 31 October 2017; Revised: 19 January 2018; Published online: 5 February 2018

**董发勤**, 男, 54岁, 西南科技大学教授, 博士生导师, “百千万人才工程”国家级人选。从事环境矿物学、生态环境材料、矿物环境工程相关的研究。在国内外重要学术期刊发表有关纤维矿物的表面性质、超细矿物特性、环境安全评估、生物活性应用等方面的文章 100 余篇。目前主要从事矿物微生物界面作用研究。近年来系统研究了光电子、价电子、微生物源电子在调控重金属离子电子转移行为、结晶矿化过程及其微观机制, 揭示了多场耦合下重金属离子、放射性元素、大气超细矿物与微生物表面的界膜作用机理, 提出了矿物颗粒界面/微生物膜体系毒性模型和风险评价方法。

