

基于微生物光电效应的典型硫酸盐还原菌定向富集方法

Targeted enrichment of typical sulphate-reducing bacteria based on microbial photoelectric effect

何乐乐¹, 朱霖翱², 杨朝晖¹, 徐锐^{2,*}

¹环境科学与工程学院, 湖南大学, 长沙, 湖南

²冶金与环境学院, 中南大学, 长沙, 湖南

*通讯作者邮箱: xurui7@csu.edu.cn

摘要

酸性矿井水(AMD)具有极强的酸性, 含有高浓度的硫酸盐和重金属。硫酸还原菌(SRB)是处理酸性矿井水的一种环保、有效的方法。但实际处理体系中低丰度 SRB 的富集往往依赖碳源投入、定向富集效率低。本文介绍了一种简单快速富集典型硫酸盐还原菌的方法, 基于微生物光电效应, 结合改进的培养基与持续光照刺激, 仅需 10 天即可在原位快速定向富集 SRB 高达 200 倍, 并将酸性矿山废水中硫酸盐的去除率提高近 60%。具体包括: 在培养基中加入光敏剂配合光照刺激快速富集, 利用电化学工作站优化光生电流最佳效率条件, 结合组学手段对微生物群落进行鉴定分析。本文通过利用微生物光电效应定向富集硫酸盐还原菌, 为 AMD 的处理提供了新的思路。

关键词: 微生物光电效应, 酸性矿山废水, 硫酸盐还原菌, 高通量测序

基本原理

SRB 是一类兼性厌氧原核生物的总称，是 AMD 生物处理的关键微生物，可以利用有机物(电子供体)将 AMD 中的硫酸盐(电子受体)还原为硫化氢，同时释放碱度[1]。AMD 中的金属离子进一步与 S^{2-} 形成溶解度很低的金属硫化物沉淀，从而达到降低 AMD 危害的作用[2]。SRB 的富集往往需要投入较多碳源作为电子供体，而微生物光电效应也显示了光电子作为微生物外源电子进行生长代谢的可能[3,4]。因此本方法基于微生物光电效应，利用典型光敏剂的光激发电子可以被 SRB 捕获并用于自身的代谢活动和硫酸盐还原原理，实现了典型硫酸盐还原菌定向富集，并有效提高了 AMD 中硫酸盐的还原与去除。

材料与试剂

1. 环境样本（本实验为某矿区土壤为例）
2. 光敏剂（以蒽醌-2-磺酸钠为例）
3. DNA 提取试剂盒（MP Biomedicals, USA）

仪器设备

1. 氙灯（CEL-HXF300, 中教金源，中国）
2. 电化学工作站（CHI760E, 辰华，中国上海）
3. Qubit 3.0 荧光计（ThermoFisher Scientific, USA）

实验步骤

一、土壤样品的采集

由于酸性矿山废水中含有大量变价金属，受污染农田中耐受微生物丰度较高，因此于长期受酸性矿山废水影响的农田采集次表层土壤用于本研究。这些土壤样品在室温下干燥，用 2 mm 筛网筛过，并在 -20 °C 保存以供进一步分析。

二、SRB 的富集

将采集的酸性矿区土壤接种到 120 mL 可密封的厌氧瓶中，接种量为 5 g，加入 100 mL 培养液和光敏剂，并加入过滤灭菌的 5% 硫酸亚铁铵作为硫化氢指示剂。混匀后往培养瓶中通入氙气 15 min 以排除氧气干扰，将培养瓶放在装有 AM1.5 滤光片的 300 W 氙灯下光照培养；当培养瓶中溶液变黑并观察到有小气泡产出时，表明 SRB 初步富集完成。改进培养液主要成分为：柠檬酸钠：5 g/L，乳酸钠：3.5 g/L，酵母提取物：1 g/L， $MgSO_4$ ：2 g/L， $CaSO_4$ ：2 g/L， NH_4Cl ：1 g/L， K_2HPO_4 ：0.5 g/L，并加入 1 mM 蒽醌-2-磺酸盐（AQS）作为光敏剂[5]。

三、光电化学表征

使用 CHI760E 电化学工作站，在 0.1 M pH=7 的磷酸缓冲盐水(PBS)中构建三电极系统，其中氧化铟锡(ITO)玻璃为工作电极，铂板为工作电极，饱和甘汞电极(SEC)为参比电极。记录 $i-t$ 曲线，施加电位为 0.3 V vs

SCE[6]。采用装有 AM1.5 滤光片的 300 W 氙灯作为光源。在缓冲液中加入不同浓度（0.5 mM、1 mM、2 mM）的光敏剂，探究不同光敏剂浓度对光生电流大小的影响。改变氙灯辐照位置，探究不同光照强度（1200 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、800 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、400 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ）对光生电流大小的影响。

四、辐照对硫酸盐光电还原作用的批次实验

将富集得到的菌液按一定比例接种于四组不同条件的 120 mL 培养瓶中。分别为对照组；灭菌组：接种后将培养瓶进行高温灭菌；黑暗组：将接种后的培养瓶用锡纸包裹并放在暗处培养；无光敏剂组：不添加光敏剂。详细实验设计见表 1。接种完毕后往上述四组培养瓶通入氩气 15 min，之后除黑暗组外其余三组放在装有 AM1.5 滤光片的 300 W 氙灯下培养，使用光密度计将氙灯调节到最适光照强度，明暗循环(每个周期 12 小时)模拟白天和黑夜。使用 1mL 注射器每两天对批次实验中培养液进行取样，过滤稀释后用离子色谱法[7]对硫酸盐浓度进行检测，每个组别 3 次重复。

表 1 各组批次实验条件

组别	接种液(mL)	光照强度 ($\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)	光敏剂(mM)	SO_4^{2-} (mg/L)	平行
对照组	10	1200	1	1200	3
无菌组	10 (灭菌)	1200	1	1200	3
黑暗组	10	避光	1	1200	3
无光敏剂组	10	1200	/	1200	3

五、微生物群落分析

1. 提取 DNA
 - (1) 在批次培养过程中定期打开一个培养瓶，静置沉淀一段时间后倒掉部分上清液，将剩余泥水混合物小心转移至 50 mL 离心管后离心 15 min ($7,500\times g$)；
 - (2) 倒掉上清液，仅保留湿土用于 DNA 的提取；
 - (3) 使用 DNA 提取试剂盒提取样品的基因组 DNA；
 - (4) 利用 Qubit 测定所提取的 DNA 浓度，将符合要求的样品进行扩增子测序。
2. 16S rRNA 基因扩增子测序

为分析批处理 SRB 微生物组成的变化，利用条形码 338F/806R 引物靶向细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区进行微生物群落分析[8]。纯化的 PCR 产物在 Personal Bio 公司的 Illumina Miseq PE300 平台上进行高通量测序。16S rRNA 基因序列数据采用 QIIME2 流程处理。使用 DADA2 算法对过滤后的读取进行降噪以生成扩增子序列变体(ASV)。利用 SILVA 数据库 v13.8 对获得的 ASV 序列进行分类。基于 MicrobiomeAnalyst 分析平台对 ASV 分析群落组成和多样性。

结果与分析

1. 光电化学表征

使用 CHI760E 电化学工作站构建三电极系统对光敏剂的光敏性进行表征。结果如图 2 所示。在打开氙灯时，系统中产生了明显的光电流，在光敏剂的浓度为 1 mM 时产生的光生电流最大，电流从 0.8 μA 提升到 2.5 μA ，并且在后续照射的过程中逐渐增大。0.5 mM 光敏剂和 2 mM 光敏剂产生的光生电流分别为 1.5 μA 和 2.0 μA 。光照强度也会显著影响光电流的强度，结果如图 3 所示。光照强度越大，产生的光电流越大，当光照强度为 1200 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时产生的峰值电流最高。

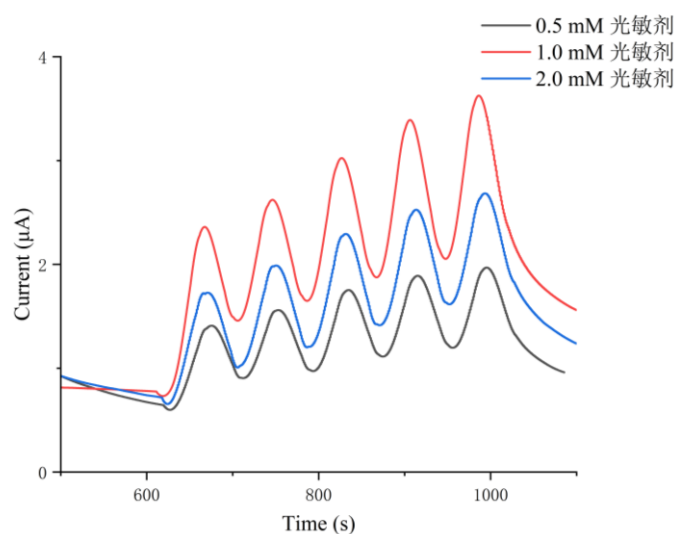


图 1. 不同光敏剂浓度光生电流大小示意图

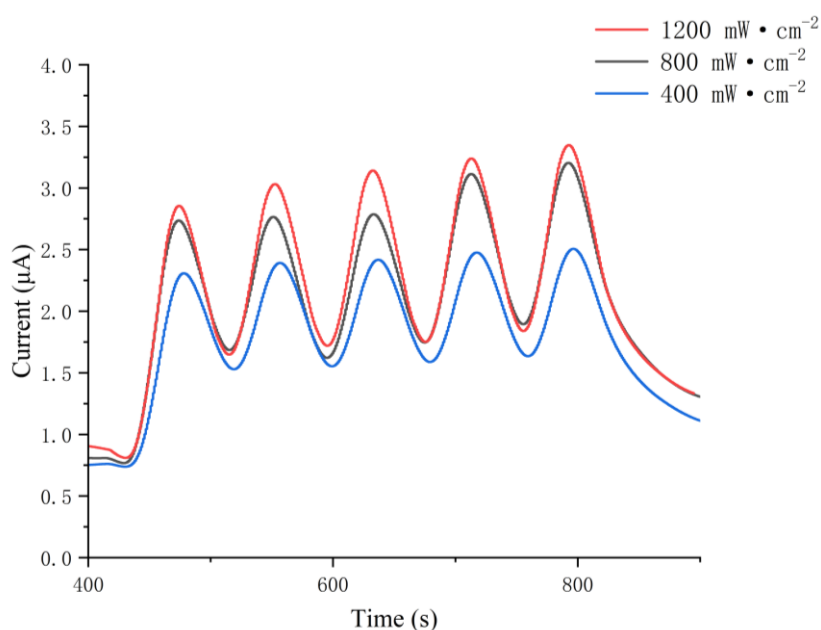


图 2. 不同光照强度光生电流大小示意图

2. 批次实验结果

在光照条件下光敏剂会产生光生电子，进而被 SRB 所利用进行硫酸盐还原。每两天对批次实验中培养液进行采样，并用离子色谱法对硫酸盐浓度进行检测，可以得到图 3。可以看出，随着培养时间的延长，SRB 利用体系中唯一电子受体硫酸根进行呼吸，使得硫酸盐含量不断下降。在对照组中实现了硫酸盐的高效去除，在 30 天的连续监测中达到了 40% 的硫酸盐去除率，比黑暗组中增强了近 60%。在灭菌组中硫酸盐的含量则没有明显的变化。对照组的硫酸盐还原速率明显高于黑暗组和无光敏剂组，说明光照和光敏剂缺一不可。

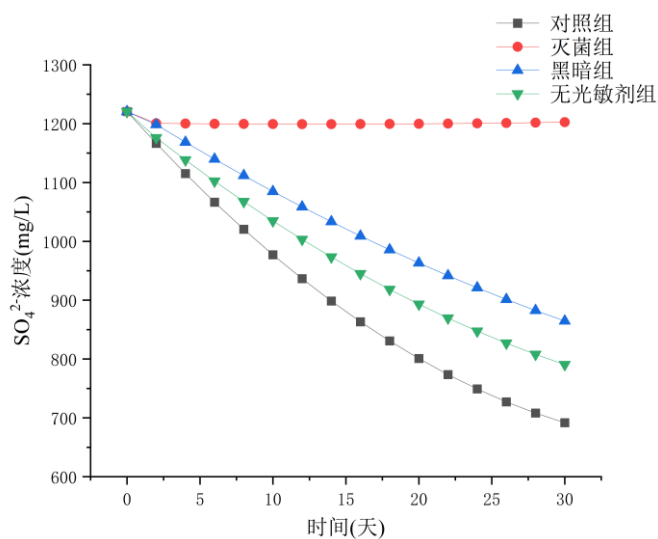


图 3. 不同处理硫酸盐含量变化情况示意图

3. 高通量测序

将培养 10 天的样品进行 16S rRNA 高通量测序可得图 4。我们可以发现在改进的培养基和光照条件下，作为典型 SRB 的 *Desulfosporosinus* 的相对丰度在对照组中达到了 5%，分别是黑暗组（0.02%）、无光敏剂组（0.7%）的 200 倍、7 倍以上，说明本方法可有效的定向富集典型 SRB。

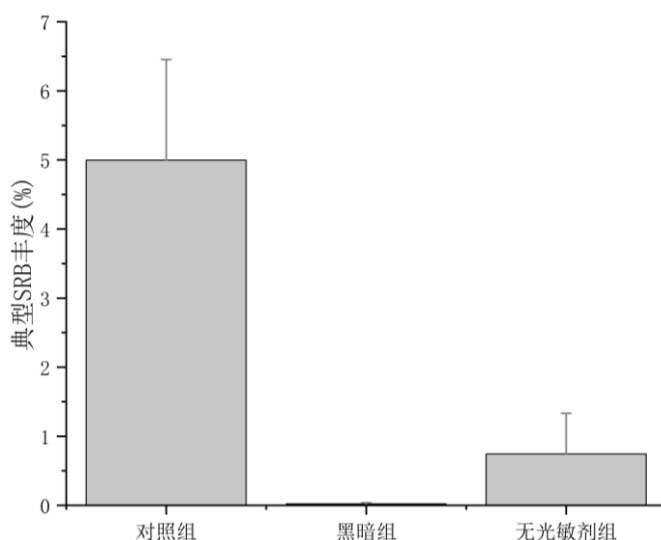


图 4. 不同处理下典型 SRB 的相对丰度大小

结论

本文通过将微生物光电效应引入到典型硫酸盐还原菌的富集方法之中，验证了溶解性有机质光敏剂的光敏性，并且探究了不同实验方案对产生光生电流大小的影响，为酸性矿山废水的处理提供了一种新的思路，即利用光照强化典型 SRB 的富集，以促进硫酸盐的还原，达到减少碳源投入和处理速率提升的双重作用。读者可以根据自身实验的需要，通过引入光照和光敏剂的条件对目标微生物进行富集培养，并结合微生物

引用格式：何乐乐，朱霖翔，杨朝晖，徐锐. (2024). 基于微生物光电效应的典型硫酸盐还原菌定向富集方法. *Bio-101* e2405484. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405484.

How to cite: He, L. L., Zhu, L. O., Yang, Z. H. and Xu, R. (2024). Targeted enrichment of typical sulphate-reducing bacteria based on microbial photoelectric effect. *Bio-101* e2405484. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405484. (in Chinese)

组学技术，验证实验目标菌群的成功富集。

致谢

感谢湖南省自然科学基金杰出青年项目(2024JJ2072)和国家自然科学基金面上基金项目(42377033)对本工作的大力支持。

参考文献

1. Sato, Y., Hamai, T., Hori, T., Aoyagi, T., Inaba, T., Kobayashi, M., Habe, H. and Sakata, T. (2019). Desulfosporosinus spp. were the most predominant sulfate-reducing bacteria in pilot- and laboratory-scale passive bioreactors for acid mine drainage treatment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 103(18): 7783–7793. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10063-2>
2. Zhang, Z., Zhang, C., Yang, Y., Zhang, Z., Tang, Y., Su, P. and Lin, Z. (2022). A review of sulfate-reducing bacteria: Metabolism, influencing factors and application in wastewater treatment. *J Cleaner Prod.* 376: 134109. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134109>
3. Magowo, W. E., Sheridan, C. and Rumbold, K. (2020). Global Co-occurrence of Acid Mine Drainage and Organic Rich Industrial and Domestic Effluent: Biological sulfate reduction as a co-treatment-option. *J Water Process Eng.* 38: 101650. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101650>
4. Huang, S., Chen, M., Diao, Y., Feng, Q., Zeng, R. J. and Zhou, S. (2022). Dissolved Organic Matter Acting as a Microbial Photosensitizer Drives Photoelectrotrophic Denitrification. *Environ Sci Technol.* 56(7): 4632–4641. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07556>
5. Chen, M., Cai, Q., Chen, X., Huang, S., Feng, Q., Majima, T., Zeng, R. J. and Zhou, S. (2022). Anthraquinone-2-Sulfonate as a Microbial Photosensitizer and Capacitor Drives Solar-to-N₂O Production with a Quantum Efficiency of Almost Unity. *Environ Sci Technol.* 56(8): 5161–5169. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08710>
6. Huang, S., Chen, K., Chen, X., Liao, H., Zeng, R. J., Zhou, S. and Chen, M. (2023). Sunlight Significantly Enhances Soil Denitrification via an Interfacial Biophotoelectrochemical Pathway. *Environmental Science & Technology* 57(20): 7733–7742. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c00236>
7. Nielsen, G., Coudert, L., Janin, A., Blais, J. F. and Mercier, G. (2019). Influence of Organic Carbon Sources on Metal Removal from Mine Impacted Water Using Sulfate-Reducing Bacteria Bioreactors in Cold Climates. *Mine Water Environ.* 38(1): 104–118. <https://doi.org/10.1007/s10230-018-00580-3>
8. Xu, R., Li, B., Xiao, E., Young, L. Y., Sun, X., Kong, T., Dong, Y., Wang, Q., Yang, Z., Chen, L., et al. (2020). Uncovering microbial responses to sharp geochemical gradients in a terrace contaminated by acid mine drainage. *Environ Pollut.* 261: 114226. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114226>