

大肠杆菌的直流电场刺激过程

孙西同 马洁* 孙晓彦 刘镔

(首都师范大学化学系 北京 100048)

摘要: 以钛网电极和铂网电极对培养瓶中大肠杆菌生长过程进行加电刺激, 研究其在直流电场作用下的生长情况, 并结合循环伏安扫描、恒电流、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及测定菌体 ATP 酶活力等技术对大肠杆菌的直流电场刺激过程进行研究。结果表明, 在 0–0.2275 mA/cm² 范围内, 随着电流密度的增加, 直流电场对大肠杆菌生长量的增长促进作用逐渐增加, 而 0.0455 mA/cm² 的电场则是获得最大活菌量的最适电流密度; 通过对析氢活性不同的铂网电极与钛网电极通加相同电流密度的电场, 发现铂电极培养体系菌体生长优于钛电极培养体系菌体的生长。经验证发现引起这种变化的原因主要是水的阴极电解产物吸附氢和氢气比例的不同引起的; 同时发现在 0.091 mA/cm² 电流密度下, 直流电场能有效提高 ATP 酶的活力, 在 8 h 时通电菌样酶活为不通电菌样酶活的 3.2 倍; 通过对 0.0455 mA/cm² 直流电场刺激后的菌体蛋白进行 SDS-PAGE 分析发现加电菌体在分子量 25 kD 与 35 kD 左右多肽表达量明显高于不加电菌体的多肽表达量, 而在分子量为 66.2 kD 左右时多肽表达量低于不加电菌体多肽表达量。

关键词: 大肠杆菌, 直流电场, 吸附氢, 氢气, ATP 酶

Electrolytic Stimulation of *Escherichia coli* by a Direct Current

SUN Xi-Tong MA Jie* SUN Xiao-Yan LIU Bin

(Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: Growth behavior of *Escherichia coli* (*E. coli*) under the exposure to direct current (DC) was studied in this paper, with electrolytic stimulation on the culture flask of *E. coli* using gauze titanium and platinum electrodes. The electric field-activated mechanism was also investigated by cyclic voltammetry technique, constant direct current technique, SDS-PAGE as well as enzyme activity assay of ATPase. The results show that direct current can promote the growth of *E. coli* under the current density of 0.2275 mA/cm², and the growth speed is gradually accelerated with increasing current density, but 0.0455 mA/cm² is the optimal current density to obtain the maximum viable cells. When the same current density electric field is applied to Pt electrodes and Ti electrodes, the Pt electrode culture system is superior to Ti electrode culture system. The cathode electrolysis products of water are the primary factor for the difference, which include adsorbed hydrogen and H₂. It is also found that the 0.091 mA/cm² direct current can promote ATPase activity effectively, with 3.2 times at most after 8 hours. Bacterial

proteins about 25 kD and 35 kD are expressed higher while proteins of 66.2 kD are expressed lower after (under) electrolytic stimulation of 0.0455 mA/cm² direct current.

Keywords: *Escherichia coli*, Direct current, Adsorbed hydrogen, Hydrogen, ATPase

微生物细胞的电解刺激(Electrolytic stimulation)技术是电化学与生物工程交叉领域的一个重要研究课题。目前这一技术已在酵母发酵体系^[1]、生物脱氮体系^[2-4]、污水处理和土壤修复^[5-7]等领域中得到初步应用。在直流电解反应条件下, 酵母菌的酒精产量及生物脱氮速率均得到明显提高。在污水处理和土壤修复的生物反应体系中, 施加电场可以提高污染物的降解速率。但此方面的研究目前仍以现象观察为主, 对其作用机理尚无统一认识。She^[8-9]以细菌 *Enterobacter dissolvens* 为研究对象, 考察了外加电场下 *E. dissolvens* 菌在酶的活性、生长、底物代谢等诸方面所受影响, 认为水电解产生的有氧条件的还原性环境是细胞生长加快的原因。此外, 已有报道表明直流电亦可对微生物细胞施加负面影响^[10-13], 甚至有杀菌的作用。因此为了进一步解释微生物的电场生物效应, 有必要将此方法拓展至更为广泛的微生物菌株类别, 并对细胞生长、酶的活性及蛋白表达等方面可能出现的变化进行综合考察。

大肠杆菌作为外源基因表达的宿主, 具有遗传背景清楚, 技术操作简单, 培养条件简单, 大规模发酵经济等优点, 倍受遗传工程专家的重视^[14-15]。目前大肠杆菌是应用最广泛、最成功的表达体系, 常做高效表达的首选体系。因此研究大肠杆菌电刺激作用具有很强的实际应用价值。本文以大肠杆菌为实验菌株, 综合考察了施加直流电场时该菌生长、酶活及蛋白表达诸方面可能受到的影响, 并结合电学方法对直流电场的作用机理进行推测。其结果有助于丰富直流电刺激技术原理的认识, 并拓展其应用范围。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

VMP3 多通道电化学工作站(法国 Bio-Logic 公司); 可调式直流电源(金坛儒林电子仪器厂), 721B 型分光光度计(上海第三分析仪器厂), MODEL-868 型奥立龙(Thermo Orion)酸度计(美国 ORION), SHA-BA 水浴恒温振荡器(金坛荣华仪器制造有限公

司), VC130 型超声波破碎仪(美国 SONICS 公司), 3K15 型高速冷冻离心机(Sigma 公司), CS501-SP 型超级恒温水浴锅(重庆四达实验仪器有限公司)。钛网电极(表观面积为 3 cm × 3 cm, 通过测定电容值估算实际面积约为 220 cm²), 铂网电极(表观面积为 3 cm × 3 cm, 实际面积约为 52 cm²)。考马斯亮蓝蛋白测试盒(南京建成生物工程研究所), 超微量 ATP 酶测试盒(同上), 酵母浸粉(北京双旋微生物培养基制品厂), 胰蛋白胨(同上), 细菌蛋白抽提试剂(北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.2 实验菌种及培养基

实验所用大肠杆菌由北京市疾病预防控制中心自行筛选所得。实验用培养基为 LB 液体培养基, 每升水中含胰蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 5 g, 氯化钠 10 g, pH 7.0。

1.3 实验装置与培养条件

直流电解实验在三口玻璃电解瓶中进行, 加电阴阳两极均为钛网电极或铂网电极(间距 2 cm)。首先将大肠杆菌接种于装有 200 mL LB 液体培养基的锥形瓶中培养, 取对数期细菌培养液 5 mL 接种于装有 300 mL LB 液体培养基的电解瓶中加电处理 20 h, 摇床培养(温度 30°C, 转速 130 r/min), 以不加电培养作为空白对照。

1.4 实验方法

1.4.1 大肠杆菌生长曲线的测定: 采用比浊法、稀释涂布平板法和培养基中菌体蛋白质含量检测法来表征细菌浓度。比浊法为测定菌样在 660 nm 波长下的吸光度值(OD_{660})。稀释涂布平板法为吸取少量培养菌液作系列倍数稀释, 各涂 200 μ L 菌液于 LB 固体培养基上, 37°C 恒温培养 15 h 后计数。蛋白含量的检测法为考马斯亮蓝法, 操作方法为取 3 mL 样品于 5000 r/min 的转速下离心 20 min 后弃去上清液, 收集菌体; 然后洗涤数次重悬于生理盐水中; 再经超声波破碎, 最后用考马斯亮蓝蛋白测试盒测定。蛋白含量定义为每升菌液中蛋白的质量:

$$C = A \cdot C_s / A_s \quad (1)$$

式中, C 为测定样品的蛋白含量(g/L), A 为测定管的吸光度值, A_s 为标准管的吸光度值, C_s 为标准

管蛋白含量(g/L)。培养过程中每隔 2 h 取样测定菌液的吸光度值和蛋白含量来绘制生长曲线。

1.4.2 培养基 pH 曲线测定: 培养过程中每隔 2 h 取样测定菌液的 pH 绘制 pH 曲线, 以此表征直流电场对培养基酸碱性质的影响。

1.4.3 ATP 酶活性测定: ATP 酶活性用 ATP 试剂盒测定, 其活性单位定义为: 每毫克蛋白中, ATP 酶 1 h 分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为 1 个 ATP 酶活力单位, 单位为 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。

$$A_{\text{ATP}} = 6(A - A_C) \cdot C_P \cdot n / A_S \cdot C \quad (2)$$

式中, A_{ATP} 为测定样品的 ATP 活力, A 为测定管的吸光度值, A_C 为对照管的吸光度值, A_S 为标准管的吸光度值, C_P 为标准管的磷含量, n 为反应体系中的样本稀释倍数, C 为测定样品的蛋白含量。

1.4.4 电解产物对大肠杆菌生长作用分析: 采用析氢反应活性不同的钛网电极和铂网电极作为工作电极, 通加相同电流密度(0.0455 mA/cm^2) 的电场, 并结合电化学方法考察电解产物对大肠杆菌生长的影响。电化学曲线的测定是以钛盘电极(实际面积约为 0.927 cm^2) 或者铂盘电极(实际面积约为 0.418 cm^2) 为工作电极, 铂网电极为对电极, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极(以下电位均相对于该电位)构成的三电极体系, 采用 VMP3 多通道电化学工作站对灭菌后的新鲜培养基进行循环伏安和恒电流实验, 以此来考察培养基的电化学特性。

1.4.5 直流电场对大肠杆菌的蛋白诱导作用: 取加电培养 24 h 的菌液, 首先 5000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用 Tris-HCl (0.01 mol/L, pH 7.4) 缓冲液离心洗涤数次后加入细菌蛋白抽提试剂充分涡旋 1 min, 然后 15000 r/min 离心 5 min, 取上清液, Bradford 法蛋白定量, 最后进行 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 由北京蛋白质组研究中心生物质谱实验室代做。

2 结果与讨论

2.1 不同电流密度的直流电场对大肠杆菌生长状况与培养基 pH 值的影响

为了比较不同电流密度对大肠杆菌生长的影响, 选取生物亲和性较好的钛网电极为研究电极, 分别以 0.0455、0.1365 和 0.2275 mA/cm^2 为实验电流密度, 以不通电菌样作为空白进行考察。结果如图 1A 所示, 通电菌样相对于不通电菌样在 0-4 h 即处于细胞生长的延迟期和对数生长期的

前期没有显著变化, 从 5 h 以后通电菌样的 OD 值迅速增大, 且电流密度越大, 菌体的 OD 值越大, 即菌体的生长总量越大。18 h 时通电菌样生长总量与不通电菌样生长总量相比差距最大, 吸光度值差别分别为 0.318、0.561 和 0.789。由此可见, 在 0-0.2275 mA/cm^2 范围内, 随着电流密度的增加, 直流电场对大肠杆菌生长量的增长促进作用逐渐增加。

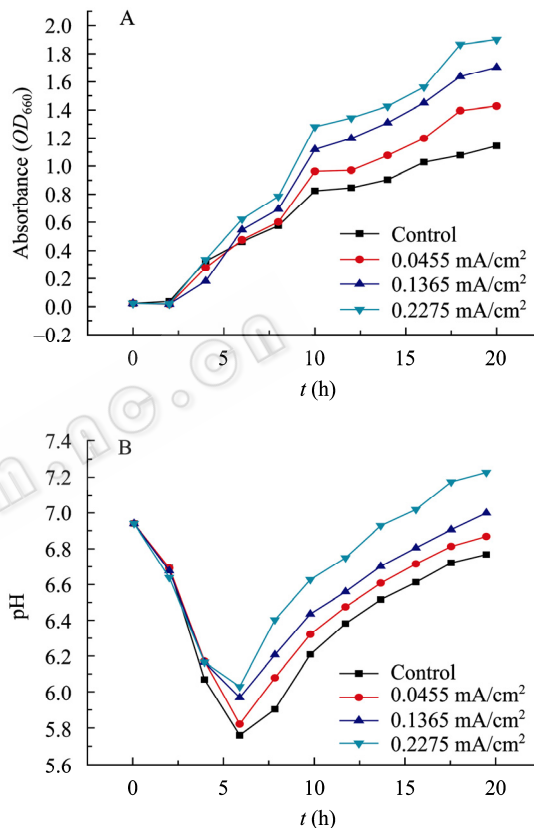


图 1 不同电流密度直流电场对大肠杆菌生长与培养基 pH 的影响

Fig. 1 Cell growth of *E. coli* and pH of medium with different current density electric field and without electric field
Note: A: Cell growth curve; B: pH of medium curve.

由于吸光度法测定的生长曲线只能表征细菌生长量, 却不能表征菌液中的活菌量, 因此为了进一步阐明不同电流密度下的直流电场对大肠杆菌活菌量的影响, 我们取培养 20 h 后的菌液, 用吸光度法和稀释涂布平板法分别来测定大肠杆菌的生长量和活菌量, 加电电流密度分别为 0、0.0455、0.1365、0.2275 和 0.455 mA/cm^2 。实验结果如表 1 所示, 在 0-0.2275 mA/cm^2 范围内, 随着电流密度的增加, 菌液吸光度值逐渐增加, 而菌液中的

活菌量则是先增加后减小, 在 0.0455 mA/cm^2 时的活菌量最大为 $4.40 \times 10^8/\text{mL}$ 。当施加电流密度为 0.455 mA/cm^2 时, 菌液吸光度值和活菌量基本为 0, 说明 0.455 mA/cm^2 的直流电场对大肠杆菌有直接的杀灭作用, 菌体在此电流密度下无法生长, 这与已有文献^[10-13]介绍的当对菌体施加过大的电流密度时, 电场对菌体有杀灭作用的结论一致。综上所述, 在 $0-0.2275 \text{ mA/cm}^2$ 范围内, 随着电流密度的增加, 直流电场对大肠杆菌生长量的增长促进作用逐渐增加, 而 0.0455 mA/cm^2 的电场则是获得最大活菌量的最适电流密度, 同时可知随着电流密度的增加, 菌体的生长量虽然增加, 但电场对细菌的杀灭作用也逐渐增加。

表 1 不同碳源对酶活和生物量的影响
Table 1 Effect of different carbon sources on enzyme activity and cell weight of yeast

电流密度 Current density (mA/cm^2)	生长量 Absorbance (OD_{660})	活菌量 Living cell concentration ($/\text{mL}$)
0	1.140	2.25×10^8
0.0455	1.430	4.40×10^8
0.1365	1.700	2.65×10^8
0.2275	1.910	8.30×10^7
0.4550	0.024	0

为了考察培养过程中培养物的变化, 测定了培养物在不同时间的 pH 值。结果如图 1B 所示, 通电菌样与不通电菌样的 pH 值都呈现出先下降(0-6 h)后不断上升(6-20 h)的趋势, 下降过程中, 电流密度越大, 菌体培养物的 pH 值降低的越小, 上升过程中, 电流密度越大, 菌体培养物的 pH 值越大; 且通电与不通电菌样相比差距较小, 分别维持在 0.1、0.2 和 0.4 左右。pH 值先下降的原因是菌体优先利用存在于培养物中的少量糖类物质, 此时代谢以糖代谢途径为主, 在此过程中产生的酸性代谢产物使培养物的 pH 值下降。当培养基中的糖类物质消耗完时, 菌体开始利用培养物中含量较高的氨基酸, 进行氮的代谢, 此时产生的碱性物质使培养物的 pH 值不断升高^[16]。随着电流密度的增加, 菌体的生长代谢速度加快, 提前进入氮的代谢过程, 从而导致 4-6 h pH 值下降逐渐变慢, 而 6-20 h pH 值随着电流密度的增加而增加。因通电与不通电培养物的 pH 值差距较小, 可以排除由于直流电场导致培养物 pH 值

变化而影响菌体生长的假设和排除由于 pH 值变化而导致酶的活性的变化。

2.2 电解产物对大肠杆菌的生长作用

我们利用析氢活性不同的铂网电极和钛网电极对大肠杆菌加电培养时发现, 通加 0.0455 mA/cm^2 相同电流密度的直流电场时, 铂电极培养体系菌体的生长明显优于钛电极(如图 2 所示)。直流电刺激过程中细胞所受的影响主要来自电流刺激和电解产物两方面, She^[8-9]利用盐桥屏蔽电解产物对细菌 *Enterobacter dissolvens* 进行加电培养时发现, 单纯的离子电流对菌体的生长没有明显促进作用, 水的电解产物是菌体生长加快的主要因素。因此我们认为导致铂电极培养体系与钛电极培养体系菌体生长不同的原因可能是水的电解产物的产量比例不同引起的。

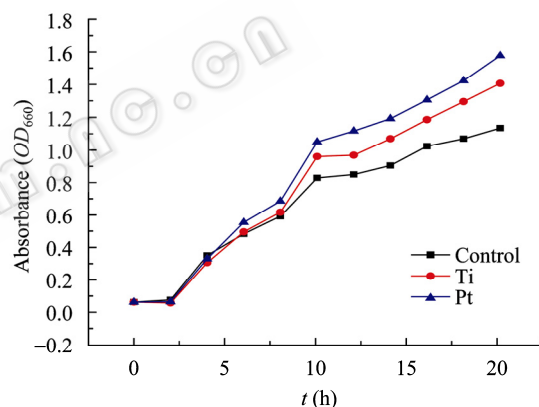


图 2 铂网电极与钛网电极通加相同电流密度大肠杆菌生长曲线

Fig. 2 Cell growth of *E. coli* by using different electrode with 0.0455 mA/cm^2 current density

为了探究培养基的电解产物, 用循环伏安技术考察了 LB 培养基的电化学性质。实验以钛盘电极及铂盘电极为研究电极, 大面积铂网电极为对电极, 饱和甘汞电极为参比电极组成的三电极体系, 采用 VMP3 多通道电化学工作站对灭菌的新鲜培养基进行循环伏安扫描。图 3A 为 LB 培养基在钛电极上的反应特性, 扫描范围为 $2-2 \text{ V}$, 扫速 100 mV/s 。体系主要存在 3 个反应, 反应 1 为析氧反应($2\text{H}_2\text{O} = \text{O}_2\uparrow + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$); 反应 2 我们认为是水分子得电子形成吸附氢的反应($\text{H}_2\text{O} + \text{M} + \text{e}^- = \text{MH} + \text{OH}^-$), 反应 3 为析氢反应($2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- = \text{H}_2\uparrow + 2\text{OH}^-$)。LB 培养基在铂电极上的反应特性如图 3B

所示, 扫描范围 2—1.5 V, 扫速 100 mV/s。体系主要存在 4 个电极反应, 分别为析氧反应(反应 1)、氧气的还原反应(反应 2, 培养基通氮气除氧后此峰消失)、氢吸附反应(反应 3)及析氢反应(反应 4)。通过比较培养基在铂电极与钛电极上水的电解反应发现, 析氧反应均发生在 1.5 V 左右, 没有明显区别, 二者的主要区别为铂电极上的析氢发生在 1.0 V 左右, 而钛电极上的析氢反应发生在 1.6 V 左右。

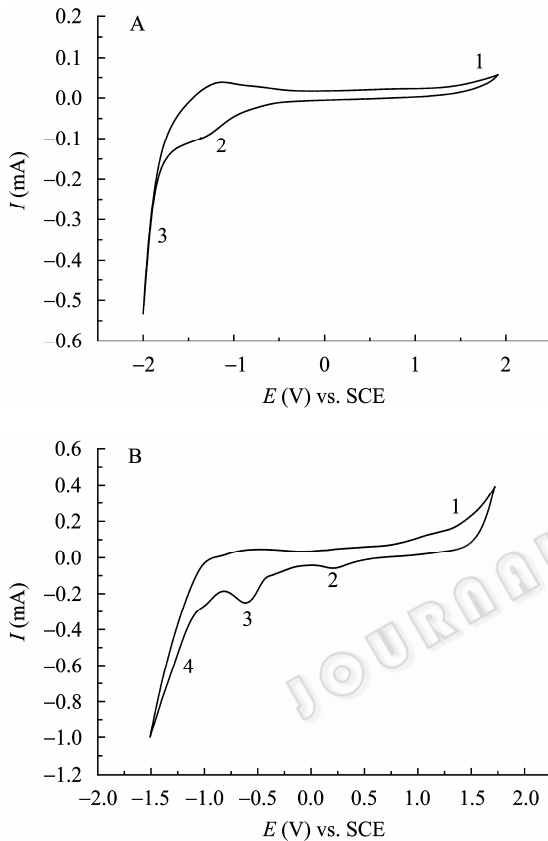


图 3 钛电极, 铂电极在 LB 培养基中的循环伏安曲线
Fig. 3 Cyclic voltammograms of the Ti electrode (A) and Pt electrode (B) in the precultivated cell culture

为了研究钛电极与铂电极在 0.0455 mA/cm^2 电流密度下的反应, 我们接着考察了两者在 LB 培养基的恒电流特性。如图 4 所示, 钛电极与铂电极分别在电位为 1.56 V 和 1.12 V 处出现平台, 对应于图 3A 与图 3B 可知, 钛电极在 0.0455 mA/cm^2 电流密度下刚刚开始发生析氢反应, 主要为氢吸附反应, 而铂电极在此电流密度下主要发生析氢反应。此结论与析氢反应的火山图^[17] (各电极析氢反应交换电流密度 i_0 对其吸附自由能 ΔG_{ads}^0 作图) 机理一致, 铂处于“火山顶”, ΔG_{ads} 适中既有利于 MH 的形成, 又利

于吸附氢的解脱, 所以析氢容易。钛处于“火山腰”, ΔG_{ads} 较大有利于 MH 的形成, 但不利于解脱, 所以析氢困难。在相同电流密度即相同电荷量反应下, 钛电极较铂电极的吸附氢产量高, 氢气产量低。而正是这种阴极电解产物产量的不同导致了铂电极培养体系与钛电极培养体系菌体生长的差别。

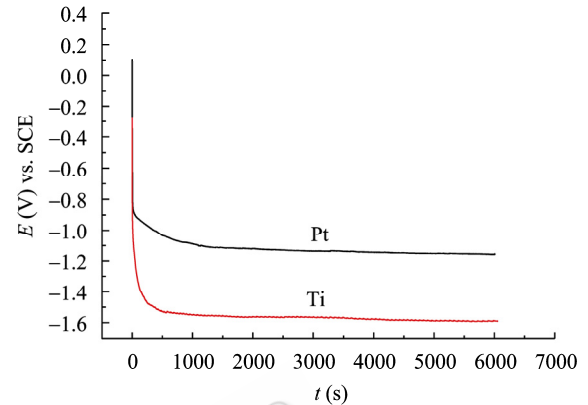


图 4 钛电极, 铂电极在 0.0455 mA/cm^2 电流密度下的恒电流曲线

Fig. 4 Constant current curve of the Pt and Y-Ti electrode in the precultivated cell culture with the same current density (0.0455 mA/cm^2)

由于吸附氢只存在电极表面, 供微生物的利用率低, 而产生的氢气则可以通过扩散和对流作用传递到溶液内部, 供微生物的利用率高, 所以铂电极培养体系在相同电流密度 0.0455 mA/cm^2 的培养条件下菌体生长优于钛电极。康博^[7]等利用 Ti/PbO₂ 氧化物涂层电极为阳极, 对氨基二甲基苯胺的生物膜电极为阴极组成的生物膜电极反应器降解对氨基二甲基苯胺的研究时发现在相同降解时间内, 采用生物膜电极反应器对对氨基二甲基苯胺的降解率远大于单纯生物法的降解率。这主要是因为生物膜电极在通入低压直流电后, 阴极表面的细菌以电解氢气和水中的有机物为电子供体, 在生长代谢过程中使有机物被逐渐降解。因为生物膜电极的制备是将微生物固定在电极表面, 吸附氢起着重要作用, 所以一般选择钛电极这种析氢活性低的电极以及需要通加微电流, 这与本文摇瓶培养中氢气作用显著的结论相辅相成。由此可见, 对摇瓶培养细菌体系, 吸附氢和氢气对大肠杆菌的生长都有利, 而氢气的利用率高, 进而推测电解氢气是菌体快速生长的主要因素。此结论与 She^[8-9]指出的水电解产生的有氧条件的还原性环境是细胞生长加快的原因有所差异,

主要是因为培养条件和菌种不同引起的。

2.3 直流电场对 ATP 酶活性的影响

ATP 酶主要存在于大肠杆菌的细胞膜上, 是生物膜上的一种蛋白酶, 它在物质运送、能量转换以及信息传递方面具有重要的作用。为了考察电解氢气对大肠杆菌生理生化特性的影响, 测定了通电与不通电培养条件下菌体胞内 ATP 酶活性的变化, 通电电流密度为 0.091 mA/cm^2 。其结果如图 5 所示, 通电与不通电大肠杆菌的 ATP 酶活性都随着时间的增长出现先升高后降低的趋势, 两者分别在 8 h 和 12 h 时达到最大值。此点恰与通电与不通电大肠杆菌分别在 8 h 和 10 h 后生长速度加快相一致, 可见 ATP 酶的活性与菌体的生长直接相关。而且通电与不通电大肠杆菌相比, 通电大肠杆菌的 ATP 酶活性明显升高。在 8 h 时, 通电菌的酶活约为不通电菌酶活的 3.2 倍, 两者差距最大。由此可见, 在 0.091 mA/cm^2 的电流密度下, 直流电场能强烈地促进菌体 ATP 酶的活力, 而酶活的升高同时又促进了细胞更好更快的生长, 其具体作用机理有待研究。

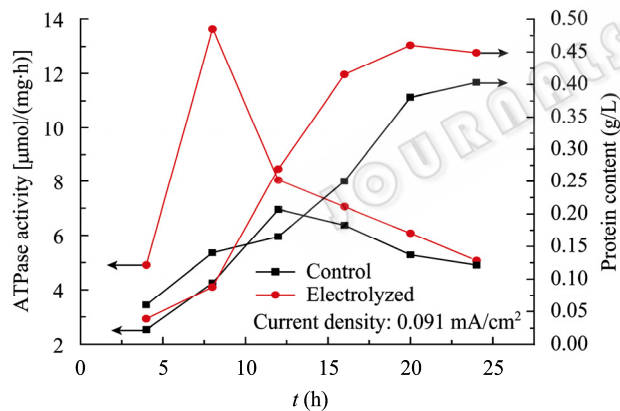


图 5 加电与不加电 ATP 酶活性曲线及对应的蛋白含量曲线

Fig. 5 ATPase activity and protein content of *E. coli* with electric field and without electric field

2.4 直流电场对大肠杆菌蛋白表达的影响

为了考察大肠杆菌在电场作用下的蛋白表达变化, 我们以不加电菌体蛋白为空白对照, 对加电菌体蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 加电电流密度为 0.0455 mA/cm^2 。首先将蛋白提取液与等体积的 $2 \times \text{SDS}$ 凝胶加样缓冲液混合后 100°C 煮沸 5 min, 15000 r/min 离心 5 min, 取 $5 \mu\text{L}$ 进行蛋白电泳 (13%), 银染。实验结果如图 6 所示, 通过比较加电与不加

电菌体蛋白的电泳图谱发现如下差异: 加电菌体在分子量为 25 kD 与 35 kD 左右多肽表达量明显高于不加电菌体的多肽表达量, 而在分子量为 66.2 kD 左右多肽表达量低于不加电菌体多肽表达量。多肽表达量的差异说明电场对菌体蛋白表达有明显的影 响, 这种影响可能是菌体吸收了电解氢气造成的, 具体的影响机理需进一步研究。

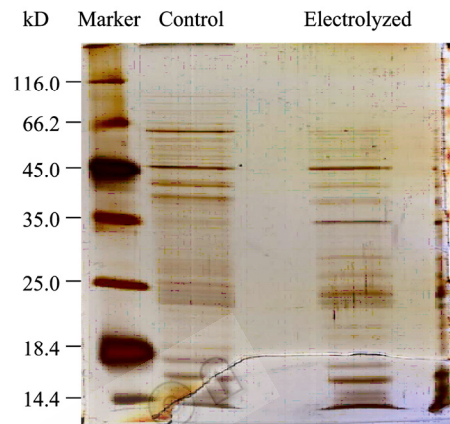


图 6 加电与不加电菌体蛋白质的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of *E. coli* with electric field and without electric field

3 结束语

综上所述, 直流电对微生物的酶活、生长、底物代谢及蛋白表达等诸方面均会产生影响, 使得这一技术不仅可以在酵母发酵体系、生物脱氮体系、污水处理和土壤修复等领域中得到应用, 而且在微生物菌种诱变方面具有很大的应用潜力。随着微生物电解刺激技术的不断发展, 相信这一技术会拓展更广泛的应用范围。





参考文献

- [1] Nakanishi K, Tokuda H, Soga T, *et al.* Effect of electric current on growth and alcohol production by Yeast cells. *J Ferment Bioeng*, 1998, **85**(2): 250-253.
- [2] Hayes AM, Flora JR, Khan J. Electrolytic stimulation of denitrification in sand columns. *Water Res*, 1998, **32**(9): 2830-2834.
- [3] Beschkov V, Velizarov S, Agathos SN, *et al.* Bacterial denitrification of waste water stimulated by constant electric field. *Biochem Eng J*, 2004, **17**(2): 141-145.
- [4] 曹宏斌, 李鑫钢, 孙津生, 等. 直流电对硝化细菌活性的影响. *环境科学学报*, 2001, **21**(4): 420-425.
- [5] Watanabe T, Motoyama H, Kuroda M. Denitrification and

- neutralization treatment by direct feeding of an acidic wastewater containing copper ion and high-strength nitrate to a bioelectrochemical reactor process. *Water Res*, 2001, **35**(17): 4102-4110.
- [6] Watanabe T, Jin HW, Cho KJ, *et al.* Application of a bio-electrochemical reactor process to direct treatment of metal pickling wastewater containing heavy metals and high strength nitrate. *Water Sci Technol*, 2004, **50**(8): 111-118.
- [7] 康博, 黄卫民, 张应玖, 等. 生物膜电极反应器降解对氨基二甲苯胺的研究. *高等学校化学学报*, 2007, **28**(3): 556-558.
- [8] She P, Song B, Van Loosdrecht M, *et al.* Electrolytic stimulation of bacteria *Enterobacter dissolvans* by a direct current. *Biochem Eng J*, 2006(28): 23-29.
- [9] 余鹏, 宋波, 邢新会, 等. 细菌 *Enterobacter dissolvans* 的直流电解刺激过程. *过程工程学报*, 2006, **6**(1): 71-76.
- [10] 张鹰, 曾新安, 温其标, 等. 高电压技术, 强脉冲电场对细胞膜通透性及其 DNA 的影响. *高电压技术*, 2007, **33**(2): 90-93.
- [11] Stewart PS, Wattanakaroon W, Goodrum L, *et al.* Electronic generation of oxygen partially explains electrical enhancement of tobramycin efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, **43**(2): 292-296.
- [12] Blenkinsopp SA, Khoury AE, Costerton JW. Electrical enhancement of biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(11): 3770-3773.
- [13] Wellman N, Fortun SM, Melcod BR. Bacterial biofilms and the bioelectric effect. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, **40**(9): 2012-2014.
- [14] 李民, 陈常庆. 重组大肠杆菌高密度发酵研究进展. *生物工程进展*, 2000, **20**(2): 26-31.
- [15] 张惟材, 朱厚础. 重组大肠杆菌的发酵与代谢工程. *微生物学报*, 1999, **26**(4): 289-293.
- [16] 周德庆. 微生物教程. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2004: 125-127.
- [17] 江琳才. 电合成. 北京: 高等教育出版社, 1993: 27-29.

征订启事

2011 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: 010-64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量