

# 耐低pH的氧化亚铁硫杆菌选育 及其氧化硫酸亚铁的初步研究

龙中儿<sup>1,2</sup>, 黄运红<sup>2</sup>, 蔡昭铃<sup>1</sup>, 丛威<sup>1</sup>, 欧阳藩<sup>1</sup>

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080;

2. 江西师范大学化学与生物科学学院, 江西 南昌 330027)

**摘要:** 低 pH 条件下高效氧化硫酸亚铁的氧化亚铁硫杆菌的选育是两步法生物浸出工艺应用的前提条件。本文经定向培育和连续培养筛选得到 pH 为 1.7~2.0 条件下氧化硫酸亚铁的氧化亚铁硫杆菌驯化菌, 其氧化硫酸亚铁的最适 pH 值由原来的 2.0~3.0 下降到 1.7~2.0, 在初始 pH 为 1.7 条件下培养 48 h 后, 9K 培养基中  $Fe^{2+}$  氧化率从 13.1% 提高到 85%。动力学研究表明, 该菌在 250 ml 摇瓶中装量 100 ml、接种量 10%、起始 pH=1.7、温度 31°C、转速 120 r/min 的优化条件下培养 52 h 后, 9K 培养基中  $Fe^{2+}$  氧化率在 98% 以上, 对数期的细菌比生长速率为  $0.0635 h^{-1}$ , 与出发菌株相近。该菌有望用于两步法生物浸出矿物的新工艺。

**关键词:** 氧化亚铁硫杆菌; 选育; 低 pH 值; 硫酸亚铁; 生物氧化

**中图分类号:** Q933; TQ929      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1009-606X(2002)05-0415-06

## 1 前言

传统的生物浸出工艺是细菌对  $Fe^{2+}$  的氧化和矿物的浸出同步进行, 由于细菌受到高矿浆浓度和重金属离子等逆境的抑制, 其氧化速率缓慢, 矿物浸出效率很低<sup>[1-3]</sup>。在深入研究生物浸出过程机理的基础上, 许多研究者<sup>[4-7]</sup>认为生物浸出以间接作用机理为主, 即生物浸出过程中细菌的作用是将体系中的  $Fe^{2+}$  氧化成  $Fe^{3+}$ , 以提供源源不断的氧化剂, 于是有人<sup>[8]</sup>提出两步法应用氧化亚铁硫杆菌的构想, 即将氧化亚铁硫杆菌参与的矿物浸出过程分为氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的生物反应过程和硫酸铁参与的化学反应过程, 分别控制其反应的最佳条件可大大提高矿物的浸出效率。

细胞固定化技术的应用<sup>[9-12]</sup>可以显著提高氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的效率, 因而在两步法生物浸出工艺中呈现良好的应用前景。但由于氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的产物在目前常用菌株的生长条件下(pH>2.0)易形成不溶性复合物, 使得两步法生物浸出工艺难以实现<sup>[13-15]</sup>, 因而选育在更低 pH 值条件下高效氧化硫酸亚铁的氧化亚铁硫杆菌菌种具有重要意义。本文经定向培育和连续培养得到氧化硫酸亚铁的最适 pH 值在 1.7~2.0 的氧化亚铁硫杆菌, 并对其氧化硫酸亚铁的特性进行了初步研究, 以期开发两步法生物浸出新工艺提供实验依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 出发菌株

氧化亚铁硫杆菌 TF5(又名云株一号), 由中国科学院微生物研究所提供。

收稿日期: 2002-01-16, 修回日期: 2002-04-19

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(编号: 59834150)

作者简介: 龙中儿(1970-), 男, 江西省崇仁县人, 博士, 讲师, 生化工程专业。

## 2.2 培养基

采用 9K 培养基(g/L)<sup>[16]</sup>:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{KCl}$  0.1,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  44, pH 值用浓硫酸调节.

## 2.3 菌株的定向培育

将活化后的氧化亚铁硫杆菌 TF5 培养液 5 ml 接种到装有 95 ml pH=1.7 的 9K 培养基的三角摇瓶中, 于转速 120 r/min 及温度 31°C 条件下振荡培养 96 h 后, 取 5 ml 转接于另一装有同样培养基的三角摇瓶中, 并在同样条件下培养, 如此重复 8 次.

## 2.4 连续培养分离

连续培养装置如图 1 所示. 置于恒温水浴锅内的培养瓶上连有一进料管和压缩空气进管, 在装液量为 300 ml 的位置有一溢流口, 以保证培养瓶内的培养物体积恒定. 储备瓶上设有一培养基入口(没有培养基流过时关闭), 其内的新鲜培养基通过一带空气过滤器的空气管和外界相通(底端浸入培养基液面以下, 使蠕动泵进口压力保持稳定).

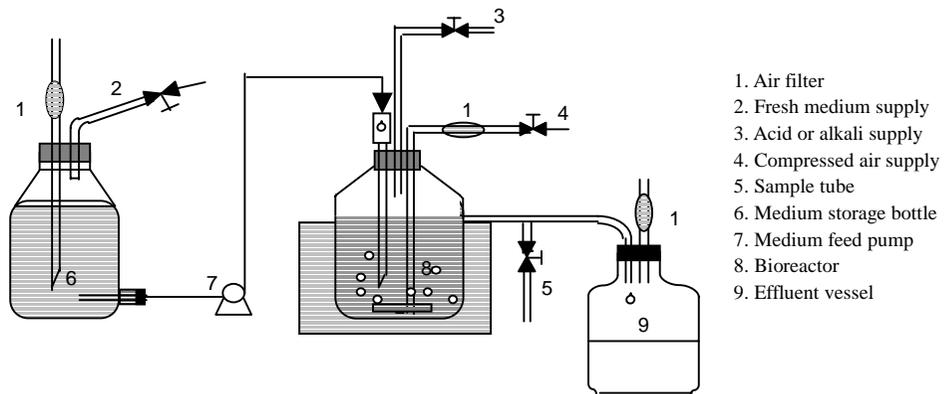


图 1 连续培养装置简图

Fig.1 Schematic diagram of the experimental apparatus

实验时, 培养瓶内先装入适量 pH=1.7 的 9K 培养基, 接入经定向培育获得的菌种后作批式培养, 一段时间后, 将盛在储备瓶内 pH=1.5 的 9K 培养基通过蠕动泵以一定速度输送到培养瓶内, 以进行连续培养, 同时, 以浓硫酸调节培养瓶内 pH 值, 使出口液 pH 值稳定在  $1.7 \pm 0.1$ .

## 2.5 氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的工艺

将处于稳定状态的连续培养瓶中氧化亚铁硫杆菌培养液接种到 250 ml 的三角摇瓶中振荡培养, 培养条件根据实验需要确定.

## 2.6 分析方法

$\text{Fe}^{2+}$  浓度参照 Herrera 等<sup>[13]</sup> 的比色法测定, pH 值用 pHS-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂)测定.

# 3 结果与讨论

## 3.1 耐低 pH 菌种的定向培育

出发菌株氧化亚铁硫杆菌 TF5 的最适生长 pH 值为 2.0~3.0. 当第 1 次接种到 pH 为 1.7 的 9K 培养基中培养时, 由于酸的抑制作用, 细菌的生长及  $\text{Fe}^{2+}$  的氧化速率较低, 96 h 后仅有 40% 的  $\text{Fe}^{2+}$  被氧化; 第 2, 3 次移种时  $\text{Fe}^{2+}$  氧化率更低, 随后随着移种次数的增多,  $\text{Fe}^{2+}$  氧化速率逐渐升高, 到第 8 次移种时, 培养 96 h 后  $\text{Fe}^{2+}$  的氧化率达到 71%. 每次移种后  $\text{Fe}^{2+}$  的氧化率变化如图 2 所示.

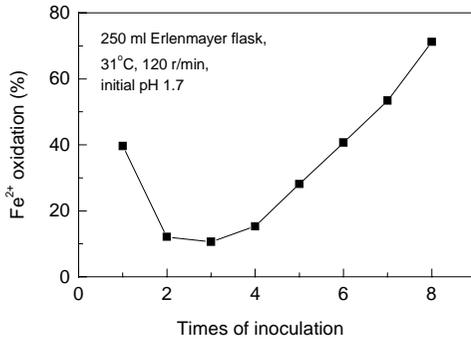


图2 移种次数对氧化亚铁硫杆菌氧化 Fe<sup>2+</sup>的影响  
Fig.2 Effect of the times of inoculation on the biooxidation of ferrous iron by *Thiobacillus ferrooxidans*

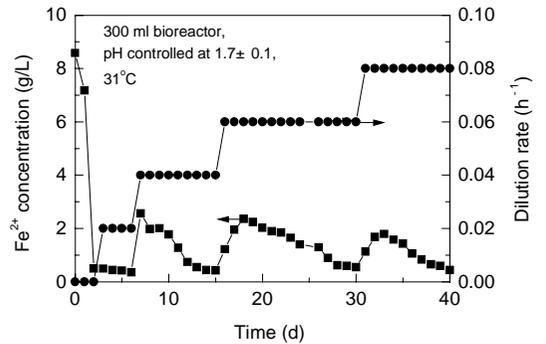


图3 连续培养中 Fe<sup>2+</sup>浓度和稀释率随时间的变化  
Fig.3 Changes of ferrous iron concentration and dilution rate during continuous culture

### 3.2 连续培养法筛选

经过定向培育后得到的氧化亚铁硫杆菌是一个最适生长 pH 各不相同的菌株混合体系, 其中耐低 pH 的菌体已占有一定比例, 通过连续培养可筛选到最适生长 pH 较低的菌株。

在连续培养条件下, 因比生长速率小于稀释率的细胞会逐渐被洗光, 而比生长速率大于稀释率的细胞可得到富集, 从而实现了对细胞的选择性分离。在连续培养的初期, 由于输入的新鲜培养基 pH 值较低(1.5), 为防止细胞被洗, 因而控制的稀释率也较低(0.02 h<sup>-1</sup>)。随后逐渐增大稀释率, 部分细胞被洗, 培养物中 Fe<sup>2+</sup>浓度会升高, 但随后又因为比生长速率大的细胞得到富集而导致培养物中 Fe<sup>2+</sup>浓度逐渐降低。当稀释率达到 0.08 h<sup>-1</sup>且趋于稳定时, 所得的氧化亚铁硫杆菌即为目标菌株, 即驯化菌。培养过程中稀释率和培养物中 Fe<sup>2+</sup>浓度随时间的变化关系如图 3 所示。

### 3.3 氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的最适起始 pH 值

将驯化氧化亚铁硫杆菌和 TF5 活化后分别接入初始 pH 各不相同的 9K 培养基中, 于 120 r/min 和 31°C 条件下培养 48 h 后检测培养物中的 Fe<sup>2+</sup>浓度, 并计算 Fe<sup>2+</sup>的氧化率。结果表明, 氧化亚铁硫杆菌 TF5 氧化硫酸亚铁的最适初始 pH 值为 2.0~3.0, 而驯化氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的最适初始 pH 值为 1.7~2.0。在初始 pH 为 1.5 和 1.7 时, 用驯化氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁, Fe<sup>2+</sup>氧化率分别为 61.3%和 85%, 而出发菌株分别为 10.8%和 13.1%。初始 pH 对氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的影响如图 4 所示。由图可知, 氧化亚铁硫杆菌 TF5 经定向培育和连续培养筛选后得到的氧化亚铁硫杆菌可在低 pH(1.7)条件下高效地氧化硫酸亚铁, 由此可以减轻氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的产物 Fe<sup>3+</sup>形成不溶性复合物的倾向, 从而在两步法生物浸出工艺中有良好的应用前景。

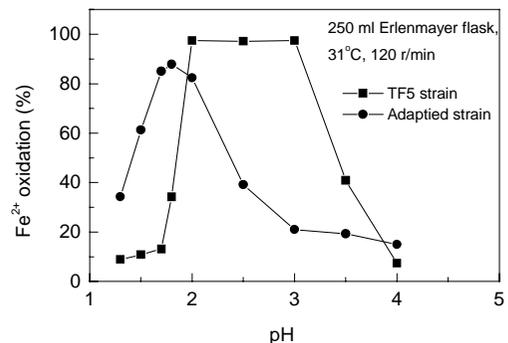


图4 培养基起始 pH 对氧化亚铁硫杆菌氧化铁的影响  
Fig.4 Effect of initial pH on the biooxidation of ferrous iron by *Thiobacillus ferrooxidans*

### 3.4 驯化氧化亚铁硫杆菌对硫酸亚铁的氧化

#### 3.4.1 驯化氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的工艺条件

培养基是影响生物代谢的主要因素. 9K 培养基中含有 6 种营养成分, 通过正交实验考察了各营养成分对驯化氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的影响. 结果表明, 各营养成分的浓度在实验比较的浓度范围内对驯化氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁皆无显著性影响, 说明驯化氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的营养要求与出发菌株相似, 常规的 9K 培养基即可满足驯化氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的要求, 同时, 驯化氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的最适温度为 31°C 左右, 也与出发菌株相近; 以处于稳定状态的连续培养瓶中氧化亚铁硫杆菌培养液(细菌浓度  $10^8$  个/ml)作为种子接种到装有新鲜培养基的 250 ml 三角瓶中振荡培养(总装液量 100 ml)时, 接种量以 10%( $\phi$ )为宜.

#### 3.4.2 驯化氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的动力学

驯化氧化亚铁硫杆菌在本研究所优化的实验条件下(250 ml 三角摇瓶中装料 100 ml, 接种量 10%, 起始 pH=1.7, 转速 120 r/min, 31°C)培养 52 h, 9K 培养基中的铁氧化率在 98%以上, 其动力学过程如图 5 所示.

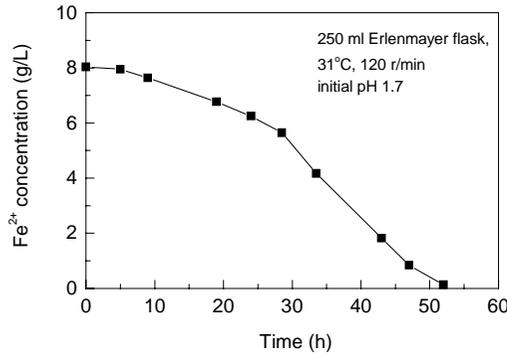


图 5 氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的动力学过程  
Fig.5 Course of biooxidation of ferrous iron by adapted *Thiobacillus ferrooxidans*

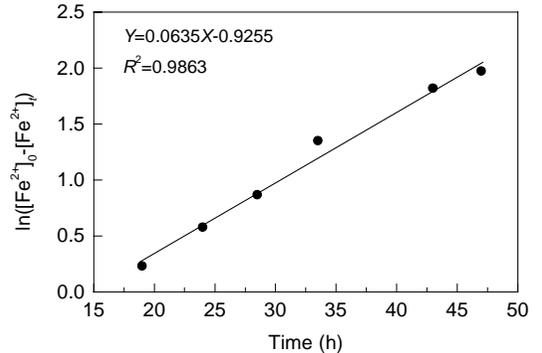


图 6 批次培养中  $\ln([Fe^{2+}]_0 - [Fe^{2+}]_t)$  随时间的变化  
Fig.6 The change of  $\ln([Fe^{2+}]_0 - [Fe^{2+}]_t)$  with respect to culture time

在微生物分批培养的对数生长阶段, 培养基的成份虽然发生变化, 但细菌的生长速度维持恒定. 如以细胞数量的增加表示生长速度, 有:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X, \quad (1)$$

$t=t_0$  时,  $X=X_0$ . 在对数生长期内, 上式积分得:

$$X = X_0 e^{\mu(t-t_0)}. \quad (2)$$

假设细菌对  $Fe^{2+}$  的得率系数  $Y_{X/S}$  为一常数, 同时细菌处于延迟期所氧化的铁忽略不计, 于是:

$$X = Y_{X/S} ([Fe^{2+}]_0 - [Fe^{2+}]_t), \quad (3)$$

将式(3)代入式(2), 两边取对数得:

$$\ln([Fe^{2+}]_0 - [Fe^{2+}]_t) = \ln(X_0/Y_{X/S}) + \mu(t-t_0).$$

将对数生长阶段的  $\ln([\text{Fe}^{2+}]_0 - [\text{Fe}^{2+}]_t)$  对培养时间  $t$  作图, 得一直线(如图 6), 该直线斜率, 即细菌的比生长速率  $\mu = 0.0635 \text{ h}^{-1}$ , 与出发菌株在最适培养条件下的比生长速率  $0.0659 \text{ h}^{-1}$  相近, 表明在最适 pH 范围内, 驯化氧化亚铁硫杆菌的比生长速率不低于出发菌株, 这对产业化应用十分有利。

## 4 结论

(1) 从最适生长 pH 为 2.0~3.0 的氧化亚铁硫杆菌 TF5 出发, 经定向培育(驯化)和连续培养分离获得在低 pH (<2.0) 条件下高效氧化硫酸亚铁的驯化菌。该菌在初始 pH=1.7 条件下培养 48 h 后, 培养基中  $\text{Fe}^{2+}$  氧化率为 85%, 是出发菌株的 6.5 倍, 实现了低 pH 条件下  $\text{Fe}^{2+}$  的高效氧化而降低了其氧化产物  $\text{Fe}^{3+}$  形成不溶性复合物的倾向。

(2) 除起始 pH 外, 驯化氧化亚铁硫杆菌氧化  $\text{Fe}^{2+}$  的最优条件和出发菌株 TF5 相近, 它们的比生长速率也相近, 有利于产业化应用。

符号表:

$[\text{Fe}^{2+}]_0$	培养基初始 $\text{Fe}^{2+}$ 浓度 (g/L)	$[\text{Fe}^{2+}]_t$	$t$ 时刻培养基 $\text{Fe}^{2+}$ 浓度 (g/L)	$t$	培养时间 (h)
$X$	细菌浓度 (个/ml)	$Y_{X/S}$	细菌对 $\text{Fe}^{2+}$ 的得率系数 (个/g)	$\mu$	细菌的比生长速率 ( $\text{h}^{-1}$ )
下标		0	初始	$t$	培养时间

参考文献:

- [1] 王恩德. 环境资源中的微生物学技术 [M]. 北京: 冶金工业出版社, 1997. 100-131.
- [2] Nemati M, Harrison S T L, Hansford G S, et al. Biological Oxidation of Ferrous Sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: A Review on the Kinetic Aspects [J]. Biochemical Engineering Journal, 1998, 1: 171-190.
- [3] Smith R W, Misra M. Recent Developments in the Bioprocessing of Minerals [J]. Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review, 1993, 12: 37-60.
- [4] Fowler T A, Crundwell F K. Leaching of Zinc Sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: Experiments with a Controlled Redox Potential Indicate No Direct Bacterial Mechanism [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3570-3575.
- [5] Boon M, Luyben K C A M, Heijnen J J. The Use of On-line Off-gas Analyses and Stoichiometry in the Bio-oxidation Kinetics of Sulphate Minerals [J]. Hydrometallurgy, 1998, 48: 1-26.
- [6] Boon M, Heijnen J J. Chemical Oxidation Kinetics of Pyrite in Bioreaching Processes [J]. Hydrometallurgy, 1998, 48: 27-41.
- [7] Fowler T A, Holmes P R, Crundwell F K. Mechanism of Pyrite Dissolution in the Presence of *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(7): 2987-2993.
- [8] Iglesias N. 含金难处理矿石处理方法的评述和生物工艺技术的最新进展 [J]. 黄宗良译. 湿法冶金, 1994, 3: 33-38.
- [9] Gomez J M, Cantero D, Webb C. Immobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* Cells on Nickel Alloy Fibre for Ferrous Sulphate Oxidation [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000, 54: 335-340.
- [10] Kawabe Y, Suto K, Inoue C, et al. Enhancement of the Specific Growth Rate of *Thiobacillus ferrooxidans* by Diatomaceous Earth [J]. Journal of Bioscience and Engineering, 1999, 88(4): 374-379.
- [11] Armentra H, Webb C. Ferrous Sulphate Oxidation Using *Thiobacillus ferrooxidans* Cells Immobilized in Polyurethane Foam Support Particles [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1992, 36: 690-700.
- [12] Grishin S I, Tuovinen O H. Fast Kinetics of  $\text{Fe}^{2+}$  Oxidation in Packed-bed Reactors [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54: 3092-3100.
- [13] Lazaroff N, Sigal W, Wasserman A. Iron Oxidation and Precipitation of Ferric Hydroxysulfates by Resting *Thiobacillus ferrooxidans* Cells [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1982, 43: 924-938.
- [14] Grishin S I, Bigham J M, Tuovinen O H. Characterization of Jarosite Formed upon Bacterial Oxidation of Ferrous Sulphate in a Packed-bed Reactor [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54: 3101-3106.
- [15] Grishin S I, Tuovinen O H. Scanning Electron Microscopic Examination of *Thiobacillus ferrooxidans* on Different Support Matrix Materials in Packed and Fluidized Bed Reactors [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989, 31: 505-511.
- [16] Silverman M P, Lundgren D G. Studies on the Chemotrophic Iron Bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* — I. An Improved

- Medium and a Harvesting Procedure for Securing High Cellular Yields [J]. *J. Bacteriol.*, 1959, 77: 642–647.
- [17] Herra L, Ruiz P, Aguillon J C, et al. A New Spectrophotometric Method for the Determination of Ferrous Iron in the Presence of Ferric Iron [J]. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1989, 44: 171–181.

## Adaption of *Thiobacillus ferrooxidans* Tolerating Low pH and Biooxidation of Ferrous Sulphate

LONG Zhong-er<sup>1,2</sup>, HUANG Yun-hong<sup>2</sup>, CAI Zhao-ling<sup>1</sup>, CONG Wei<sup>1</sup>, OUYANG Fan<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Inst. Proc. Eng., CAS, Beijing 100080, China;

2. College of Chemistry and Biological Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330027, China)

**Abstract:** *Thiobacillus ferrooxidans* oxidating ferrous sulphate effectively at low pH (pH<2.0) is prerequisite to the industrial application of two-step bioleaching. In this work, the strain was adapted by sequential adaptive culture and isolation via continuous culture. Compared with the original *Thiobacillus ferrooxidans* TF5, its optimum pH for oxidating ferrous iron was changed from 2.0~3.0 to 1.7~2.0, and the ratio of oxidized ferrous iron was improved from 13.1% to 85% at pH=1.7. Kinetic research showed that, under the optimized cultural condition of initial pH=1.7, culture temperature near 31°C, 98% of ferrous iron contained in 9K medium was oxidized after cultivation for 52 h in a 250 ml Erlenmeyer flask incubated on a rotary shaker at 120 r/min, and the growth rate of *Thiobacillus ferrooxidans* cells was 0.0635 h<sup>-1</sup>, which is similar to the original type. It was showed that the adapted *Thiobacillus ferrooxidans* is potentially useful in the industrial application of two-step bioleaching.

**Key words:** *Thiobacillus ferrooxidans*; adaption; low pH; ferrous sulphate; biooxidation