

氧化亚铁硫杆菌在气升式反应器中 培养条件对其生长特性的影响

罗 林, 康瑞娟, 马晓楠, 蔡昭铃

(中国科学院化工冶金研究所生物工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘 要: 构建了一种用于菌体培养-矿物浸取的气升式反应器. 分别采用 Leathen 和 9K 培养基研究了不同条件下氧化亚铁硫杆菌在气升式反应器中的生长、 Fe^{2+} 氧化速率、溶氧随培养时间的变化及其相互关系. 通过测定溶氧和 Fe^{2+} 氧化速率可了解培养条件对微生物生长特性的影响.

关键词: 氧化亚铁硫杆菌; 气升式反应器; 生长; Fe^{2+} 氧化; 溶氧

中图分类号: TF18; Q939.99 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2001)04-0365-04

1 前 言

金属矿物的生物浸出(Bioleaching)因具有投资少、成本低、金属回收率高及无环境污染等特点受到普遍关注^[1], 在近 40 年得到迅速发展. 生物浸出过程中微生物的生长往往是速率控制步骤. 因此, 研究微生物的生长及氧化特性可以为生物浸出速率分析提供实验依据.

氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*, T.f)是生物冶金过程中应用最广泛的浸矿菌种^[1], 该菌形态呈杆状, 尺寸(0.3~0.5) μm \times (1.0~2.0) μm , 是一种化能自养专性好氧嗜酸性革兰氏阴性菌, 有鞭毛, 可运动, 广泛存在于金属硫化矿山和煤矿的酸性矿坑水中. 氧化亚铁硫杆菌以氧化二价铁、元素硫、硫化矿等来获得生命过程所需的能量^[2,3].

氧化亚铁硫杆菌被广泛应用于浸出各种金属硫化矿, 其生长与溶液中的溶氧变化、 Fe^{2+} 氧化有对应关系, 可通过测定溶氧和 Fe^{2+} 氧化速率的变化来了解其生长及氧化活性. 气升式反应器具有结构简单、操作稳定、易放大及良好的混合、传质、传热和较低的剪切力等有利于微生物生长和矿物浸出的环境条件. 本实验在气升式反应器中进行, 以期生物冶金过程浸取反应器提供依据.

2 材料与方 法

氧化亚铁硫杆菌由中科院微生物所提供; 培养基为 Leathen 和 9K 培养基^[4,5], 其组成见表 1.

表 1 培养基的组成

Table 1 Medium composition (g/L)

Medium	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	K_2HPO_4	KCl	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fe^{2+}	pH
Leathen	0.15	0.05	0.05	0.50	0.01	6.00	2.0~2.5
9K	3.00	0.50	0.10	0.50	0.01	4, 6, 10	2.5~2.8

气升式反应器: 罐体直径 120 mm, 高 1000 mm, 提升管直径 72 mm, 高 650 mm, 总体积 8 L, 工作体积 6 L, 提升管下方设有孔径 80 μm 的圆形气体分布器, 空气从底部经气体分布器进入反应器, 沿提升管上升至顶部排出. 由于气体的通入使提升管内流体视密度降低, 提升管内外流体存在较大密度差, 导致液体在反应器中循环流动而得以充分混合. 反应器设有溶氧 (YSI Model 51B

收稿日期: 2001-02-15, 修回日期: 2001-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 59834150)

作者简介: 罗林(1972-), 男, 江西省南昌市人, 硕士研究生, 生化工程专业.

oxygen meter, Yellow Springs instrument Co.Inc)、pH、温度测试装置,可在线检测相应参数。

培养基培养:分别采用 Leathen 和 9K 培养基,于气升式反应器中在 30°C 恒温下分别按 180, 360 和 540 L/h 通气量进行通气培养,接种后隔一定时间取样,测 Fe^{2+} 、总 Fe 及氧化亚铁硫杆菌浓度。

分析方法:溶液中的 Fe^{2+} 和总 Fe 用改进的邻二杂氮菲分光光度法测定^[8]; Fe^{3+} 由总 Fe 减去 Fe^{2+} 得到;细菌浓度用显微镜直接计数法测定;溶氧和 pH 由反应器上的溶氧仪和 pH 计在线测定。

3 结果与讨论

3.1 氧化亚铁硫杆菌的生长与 Fe^{2+} 氧化速率、pH、溶氧变化的关系

采用 Leathen 培养基,培养过程中氧化亚铁硫杆菌菌体生长、 Fe^{2+} 氧化速率、溶氧及 pH 随培养时间的变化如图 1 所示。由图可见,在接种后约 10 h,细菌生长处于延滞期(相同条件下摇瓶培养为 20 h),随后细菌很快进入对数生长期,细菌数急剧增加,40 h 后进入稳定期,此时细菌数达到 19.5×10^8 个/ml。由图可知,氧化亚铁硫杆菌生长具有一般微生物的特征。从溶氧和 Fe^{2+} 氧化速率的变化可以看出,在延滞期,氧化亚铁硫杆菌生长缓慢,氧消耗低,溶氧下降缓慢, Fe^{2+} 氧化速率也缓慢;当进入对数生长期,溶氧快速下降, Fe^{2+} 氧化速率加快;进入稳定期后,溶氧也趋于稳定, Fe^{2+} 氧化速率变慢,并趋于稳定,与氧化亚铁硫杆菌生长是对应的。因此,可通过溶氧和 Fe^{2+} 氧化速率的变化了解氧化亚铁硫杆菌的生长情况和氧化特性。另外,由图 1(a)可知,在培养过程中,开始时溶液的 pH 有所上升,然后略呈下降趋势,最终趋于稳定,均处于细菌生长的适宜范围,培养过程不需另加调节。在 9K 培养基中也有相同的变化趋势,呈现相似的变化规律。

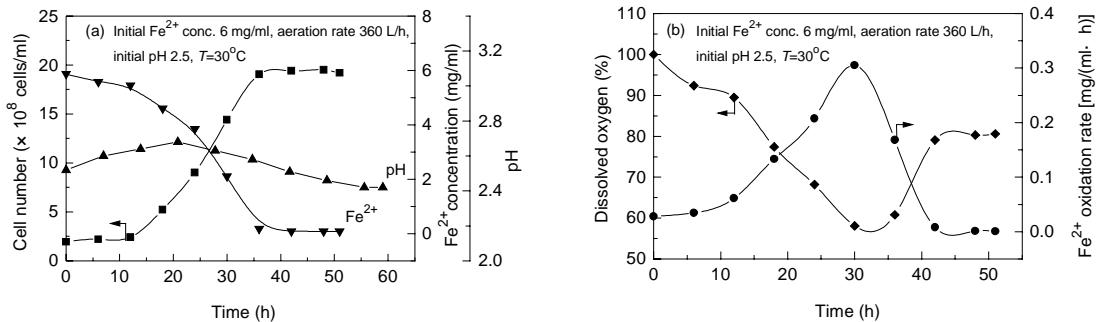


图 1 Leathen 培养基中氧化亚铁硫杆菌生长与 Fe^{2+} 氧化速率、溶氧、pH、 Fe^{2+} 浓度的关系

Fig.1 Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* and the change of Fe^{2+} oxidation rate, dissolved oxygen, pH and Fe^{2+} concentration in Leathen medium

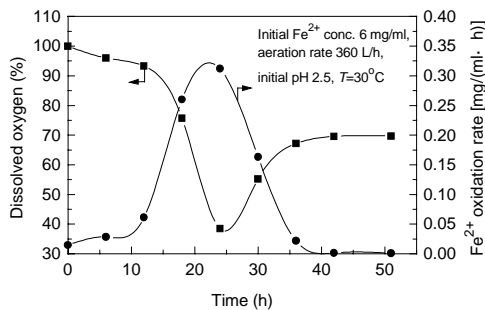


图 2 9K 培养基中溶氧和 Fe^{2+} 氧化速率的变化
Fig.2 The change of dissolved oxygen and Fe^{2+} oxidation rate in 9K medium

3.2 培养基对氧化亚铁硫杆菌生长特性的影响

比较图 2 和图 1(b)可知,9K 和 Leathen 培养基在起始 Fe^{2+} 浓度、pH 和通气量相同的条件下,都在 10 h 左右进入对数生长期,延滞期基本相同,但进入对数生长期后,9K 培养基中 Fe^{2+} 氧化速率明显比 Leathen 培养基快,在 25 h 左右 Fe^{2+} 的氧化速率达 0.3 mg/(ml·h),而 Leathen 培养基中达到相同的最大氧化速率则需 30 h。这是由于 9K 培养基中氮源浓度较高,有利于微生物的生长。因此,在培养过程中,维持较高的氮源或适时补加氮质对

氧化亚铁硫杆菌的生长是有利的. 溶氧变化也有类似的结果, 延滞期内两种培养基中的溶氧下降均较缓慢, 进入对数期后, 9K 培养基中的溶氧下降明显比 Leathen 培养基中快, 这是由于 9K 培养基氮源浓度高, 菌体生长快, 对氧的消耗也相应增加, 这与 Fe^{2+} 氧化速率变化是一致的. 由此表明, 相同起始 Fe^{2+} 浓度的 9K 培养基比 Leathen 培养基更有利于菌体生长和 Fe^{2+} 的氧化.

3.3 起始 Fe^{2+} 浓度对氧化亚铁硫杆菌生长特性的影响

图 3 是不同起始 Fe^{2+} 浓度下 9K 培养基在通气量为 360 L/h、初始 pH 2.5、温度 30°C 时, Fe^{2+} 氧化速率和溶氧随培养时间的变化. 从图可见, 起始 Fe^{2+} 浓度为 6 mg/ml 时经历约 10 h 的延滞期后, Fe^{2+} 氧化速率明显加速, 至 25 h 左右达到 0.3 mg/(ml·h) 的最大值, 然后由于 Fe^{2+} 和其它营养成分的消耗, Fe^{2+} 氧化速率开始下降, 至 40 h 左右进入稳定期. 在起始 Fe^{2+} 浓度为 10 mg/ml 时, 经过 18 h 的延滞期后, Fe^{2+} 氧化速率加快, 至 39 h 达到 0.45 mg/(ml·h) 的最大值, 然后开始下降. 起始 Fe^{2+} 浓度为 4 mg/ml 时, 经过 6 h 左右的延滞期, 进入对数生长期, 至 18 h Fe^{2+} 氧化速率达到 0.22 mg/(ml·h) 的最大值, 在 40 h 左右进入稳定期. 以上结果表明, 起始 Fe^{2+} 浓度低, 菌体生长的延滞期相对较短, 但进入对数生长期后 Fe^{2+} 氧化速率低; 起始 Fe^{2+} 浓度高, 延滞期相对较长, 这是因为 Fe^{2+} 作为细菌生长的底物, 浓度过高对细菌生长有一定的抑制, 细菌需要更长的适应期. 初始 Fe^{2+} 浓度低, 虽然延滞期相对较短, 但进入对数期后, 由于受底物限制, 菌体生长和氧化速率明显偏低. 从图中溶氧的变化也可看出相同的变化规律. 因此, 适当提高培养基中的起始 Fe^{2+} 浓度有利于微生物的培养. 当然起始 Fe^{2+} 浓度不能过大, 以 10 mg/ml 较适宜, 根据摇瓶实验结果, 当 Fe^{2+} 浓度为 16 mg/ml 时, 延滞期达 30 h 左右, 并易在后期形成过多的黄钾铁矾盐, 影响细菌的生长.

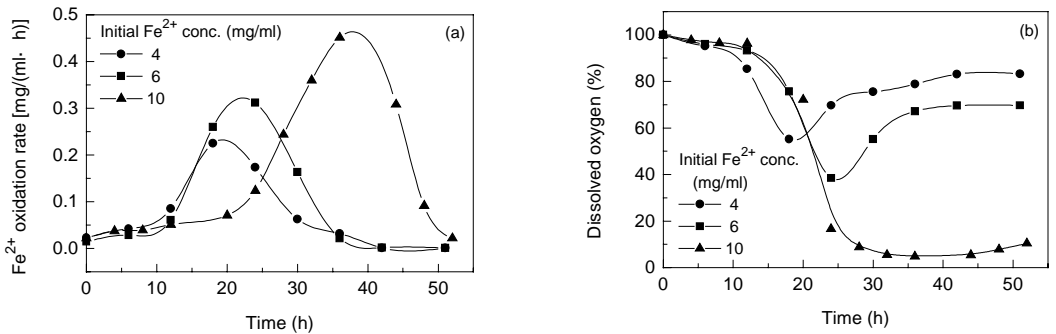


图 3 起始 Fe^{2+} 浓度对 Fe^{2+} 氧化速率和溶氧的影响
Fig.3 The effect of initial Fe^{2+} concentration on Fe^{2+} oxidation rate and dissolved oxygen

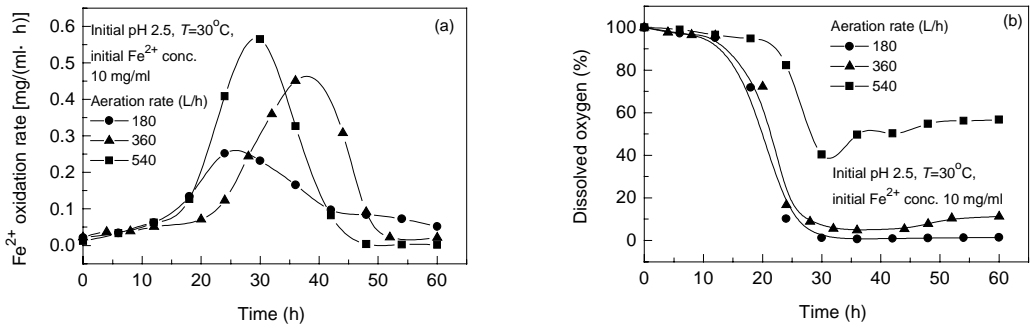


图 4 通气量对氧化亚铁硫杆菌 Fe^{2+} 氧化速率和溶氧的影响
Fig.4 The effect of aeration rate on dissolved oxygen and Fe^{2+} oxidation rate

3.4 通气量对氧化亚铁硫杆菌生长特性的影响

图4为通气量对氧化亚铁硫杆菌 Fe^{2+} 氧化速率和溶氧的影响。从图可以看出,在起始 Fe^{2+} 浓度为10 mg/ml的9K培养基中,通气量为180 L/h时,细菌生长最快时溶氧降至1%以下, Fe^{2+} 最大氧化速率仅0.25 mg/(ml·h),表明菌体生长受溶氧的限制。气量增大至360 L/h,溶氧降至5%左右, Fe^{2+} 最大氧化速率为0.45 mg/(ml·h)。当加大通气量至540 L/h,溶氧仅降至40%左右, Fe^{2+} 的最大氧化速率达0.6 mg/(ml·h),有显著提高。因此,在氧化亚铁硫杆菌培养中,采用较高的通气量,以维持适当的溶氧水平是必要的。

4 结论

(1) 氧化亚铁硫杆菌的生长与培养过程中溶氧变化、 Fe^{2+} 氧化有对应关系,可通过测定溶氧和 Fe^{2+} 氧化速率了解微生物的生长状况。

(2) 氧化亚铁硫杆菌培养过程中,溶液pH变化不大,均维持在细菌生长的适宜范围,不需另外调节。

(3) 在本实验条件下,9K培养基中 Fe^{2+} 氧化速率达到最大值的时间比Leathen培养基中缩短5 h,表明含氮源较高的9K培养基比Leathen培养基更有利于菌体生长。

(4) 培养基中的初始 Fe^{2+} 浓度较高,相应的 Fe^{2+} 氧化速率高,但延滞期较长,考虑这两方面因素,初始 Fe^{2+} 浓度为10 mg/ml较适宜。

(5) 通气量对菌体生长和氧化速率有显著影响,提高通气量,维持培养过程溶氧水平在40%左右,较为适合细菌生长。

参考文献:

- [1] Tuovien O H, Niemela S I, Gyllenberg H G. Effect of Mineral Nutrients and Organic Substances on the Development of *Thiobacillus Ferrooxidans* [J]. Biotechnol. Bioeng., 1971, 13: 517-527.
- [2] Wieckowski A B, Slowik G P, Gasiorek J A, et al. EPR Study and Structural Aspects of Ferredoxins Obtained from *Thiobacillus Ferrooxidans* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52: 96-98.
- [3] Tuovinen O H, Kelly D P. Biology of *Thiobacillus Ferrooxidans* in Relation to the Microbiological Leaching of Sulfide Ores [J]. Z. Allg. Mikrobiol., 1972, 12: 311-314.
- [4] Leathen W W, McIntyre L D, Braley S A. A Medium for the Study of Bacterial Oxidation of Ferrous Iron [J]. Science, 1951, 144: 280-281.
- [5] Sliverman M P, Lundgren D G. Studies on the Chemoautotrophic Iron Bacterium *Thiobacillus Ferrooxidans* — I. An Improved Medium and a Harvesting Procedure for Searching High Cell Yields [J]. J. Bacteriol., 1959, 77: 642-647.
- [6] Leandro Herrera, Pauline Ruiz, Juan C A, et al. A New Spectrophotometric Method for the Determination of Ferrous Iron in the Presence of Ferric Iron [J]. J. Chem. Technol. Biotechnol., 1989, 44: 171-181.

Effect of Cultivation Conditions on the Growth of *Thiobacillus Ferrooxidans* and Ferrous Iron Oxidation in an Airlift Reactor

LUO Lin, KANG Rui-juan, MA Xiao-nan, CAI Zhao-ling

(State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Chem. Metall., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Based on the growth characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* in bioleaching systems, an airlift reactor was constructed to cultivate the bacteria. Leathen medium and 9K medium under different conditions were used to study the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*, Fe^{2+} oxidation rate, dissolved oxygen and their relationship in the airlift reactor. The influence of cultivation conditions on the growth of the bacteria was investigated by monitoring dissolved oxygen and Fe^{2+} oxidation rate.

Key words: *Thiobacillus ferrooxidans*; airlift reactor; growth; Fe^{2+} oxidation; dissolved oxygen