

黄铁矿高效培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌及过程分析^①

张旭¹, 冯雅丽², 王雅静¹

(1.河北地质大学 宝石与材料工艺学院,河北 石家庄 050031; 2.北京科技大学 土木与资源工程学院,北京 100083)

摘要:以黄铁矿为能量来源对嗜酸氧化亚铁硫杆菌的高效培养进行了研究,并针对培养过程中黄铁矿的能量利用进行了分析。研究表明,在黄铁矿浓度 10 g/L、接菌浓度 15%和 pH=2.0 的条件下培养 144 h 后,嗜酸氧化亚铁硫杆菌细菌浓度达到 6.4×10^8 个/mL。在培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌过程中单位质量黄铁矿提供的能量约为培养基中单位质量 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 提供能量的 34.7 倍,通过黄铁矿可以实现对嗜酸氧化亚铁硫杆菌的高效培养。

关键词:生物浸出; 细菌; 嗜酸氧化亚铁硫杆菌; 培养; 黄铁矿; 能量源

中图分类号: TF18

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.0253-6099.2018.01.020

文章编号: 0253-6099(2018)01-0088-04

Efficient Cultivation of Acidithiobacillus Ferrooxidans with Pyrite and Its Process Analysis

ZHANG Xu¹, FENG Ya-li², WANG Ya-jing¹

(1.School of Gemology and Materials Technology, Hebei GEO University, Shijiazhuang 050031, Hebei, China; 2.School of Civil and Resource Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: An efficient cultivation of acidithiobacillus ferrooxidans with pyrite as an energy source was studied and the utilization of pyrite energy during the cultivation was analyzed. It is found that acidithiobacillus ferrooxidans bacteria concentration was up to 6.4×10^8 cell/mL after 144 h cultivation with pyrite concentration at 10 g/L, initial bacteria concentration at 15% and pH of 2.0. The energy provided by per unit mass pyrite during the cultivation of acidithiobacillus ferrooxidans was about 34.7 times that by per unit mass $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. It is concluded that acidithiobacillus ferrooxidans can be efficiently cultivated with pyrite.

Key words: bioleaching; bacterial; acidithiobacillus ferrooxidans; cultivation; pyrite; energy source

嗜酸氧化亚铁硫杆菌是一种广泛分布于土壤、空气或水体等自然环境中的化能异养型细菌,在含硫的煤矿或金属硫化物(尤其是黄铜矿)矿坑中的微酸性水体中能够大量存活,因此采取嗜酸氧化亚铁硫杆菌的最佳地点多为含有黄铜矿、铀矿、含硫煤矿和含金硫化矿物的矿坑废水中^[1-5]。由于嗜酸氧化亚铁硫杆菌可以广泛应用于生物冶金工程,因此嗜酸氧化亚铁硫杆菌的培养及培养环境一直都是嗜酸氧化亚铁硫杆菌利用研究的热点^[5-7]。

嗜酸氧化亚铁硫杆菌以自然环境中的二氧化碳作为碳源,利用亚铁、单质硫和硫化物作为能量来源,并在其传递电子的过程(元素的价态转变)中获得能量,同时从水溶液中吸收氮、磷等无机营养成分完成生物繁殖及代谢过程^[8-10]。通过 9K 培养基进行培养,培

养溶液中嗜酸氧化亚铁硫杆菌的数量最高约为 8×10^8 个/mL^[11]。本文利用黄铁矿+无铁 9K 培养基对嗜酸氧化亚铁硫杆菌的培养和溶液中菌种数量生长规律进行研究。

1 实 验

1.1 菌 种

实验用菌种——嗜酸氧化亚铁硫杆菌为实验室保藏。培养基采用无铁 9K 培养基($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g/L, KCl 0.1 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g/L),培养温度控制为 30 ± 1 °C,通过改变黄铁矿用量、嗜酸氧化亚铁硫杆菌接种量和调整溶液初始 pH 值对其培养过程进行研究。黄铁矿-74 μm 粒级占 95%,化学成分和 XRD 图分别见表 1 和图 1。

① 收稿日期: 2017-06-04

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(FRT-TP-09-002B); 中国大洋矿产资源研究开发计划项目(DY125-25-T-08); 河北地质大学校内项目(BQ2017019)

作者简介: 张旭(1982-),男,河北衡水人,讲师,博士,主要从事矿物综合利用及微生物金属提取等研究工作。

表 1 黄铁矿化学成分分析结果(质量分数)/%

Fe	S	SiO ₂	Al ₂ O ₃	CaO
43.18	49.23	3.11	1.92	1.43

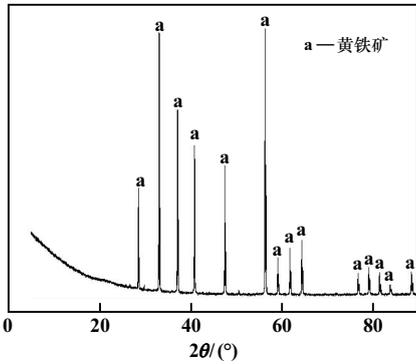


图 1 黄铁矿 X 射线衍射图

1.2 实验仪器与实验方法

采用黄铁矿对嗜酸氧化亚铁硫杆菌进行高效培养,其中黄铁矿为细菌的能量来源物质,其培养过程受黄铁矿用量、接菌浓度和培养液初始 pH 值的影响。同时分析培养过程中溶液中 TFe 浓度、pH 值、细菌数量的变化及相互关系,为嗜酸氧化亚铁硫杆菌高效培养提供必要实验参数。

主要仪器包括光学显微镜(YS2 型 Nikon China)、722 型光栅分光光度计、pHS-29A 型酸度计和 SZX-B 型恒温水浴振荡摇床。采用邻菲罗琳分光光度法测定溶液中 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 浓度;采用血球计数板在显微镜下直接计算细菌数量;采用 pHS-29A 型酸度计测定 pH 值。

2 实验结果与讨论

2.1 黄铁矿用量对培养过程的影响

实验中控制细菌的接菌浓度为 15%、pH=2.0。黄铁矿用量对利用黄铁矿培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长的影响见图 2~3。

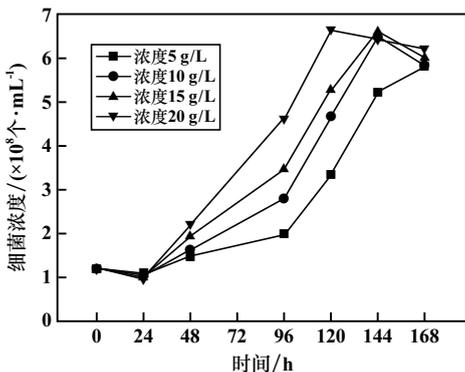


图 2 黄铁矿用量对培养过程中细菌浓度的影响

期,加入黄铁矿后细菌浓度稍微有些下降,说明培养初期是嗜酸氧化亚铁硫杆菌吸附适应的过程;随着培养时间延长,溶液中嗜酸氧化亚铁硫杆菌浓度由最初的 1.2×10^8 个/mL 逐渐上升为 5×10^8 个/mL 以上,同时不同的黄铁矿加入量使得嗜酸氧化亚铁硫杆菌培养结果存在一定差异;在细菌培养后期,溶液中细菌浓度达到最高值后,延长培养时间会使细菌浓度稍微下降,无机盐养分减少和溶液 pH 值降低是出现这一现象的主要原因。在黄铁矿用量为 10 g/L 时,培养 144 h 后细菌浓度可以达到 6.2×10^8 个/mL。对比黄铁矿用量和细菌生长曲线,采用黄铁矿用量为 10 g/L 对嗜酸氧化亚铁硫杆菌进行培养较为合适。

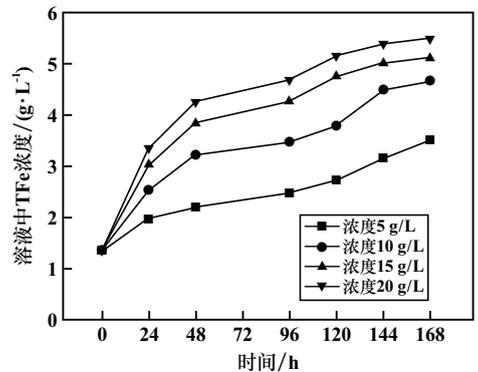


图 3 黄铁矿用量对培养过程中 TFe 浓度的影响

由图 3 可见,嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长过程中,溶液中 Fe 浓度随时间延长逐步上升。溶液中铁离子浓度呈现初期快速提高、之后浸出速率下降,后期浸出速率再次加快、再下降的阶梯式浸出规律,且该规律随黄铁矿用量增加越趋明显。

2.2 接菌浓度对培养过程的影响

控制黄铁矿用量 10 g/L,溶液初始 pH=2.0,接菌浓度对利用黄铁矿培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长过程的影响见图 4,不同接菌浓度条件下黄铁矿培养细菌生长过程中 TFe 浓度变化见图 5。

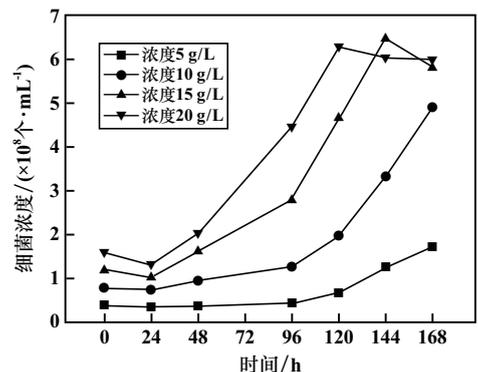


图 4 接菌浓度对培养过程中细菌浓度的影响

由图 2 可以看出,在嗜酸氧化亚铁硫杆菌培养初

由图 4 可以看出,随着接菌浓度增加,大量细菌吸

附在黄铁矿表面,这为后期嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长提供了必要基础。接菌浓度较低时,虽然溶液中嗜酸氧化亚铁硫杆菌活度较大,但是在黄铁矿表面吸附较少,限制了嗜酸氧化亚铁硫杆菌的生长。同时在培养初期,接菌浓度增加与溶液中细菌浓度减少的现象对这一规律进行了证实。

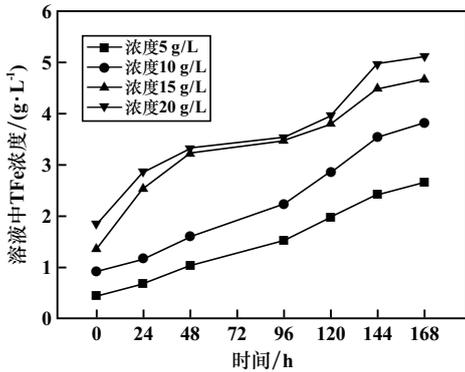


图5 接菌浓度对培养过程中 TFe 浓度的影响

由图5可知,在接菌浓度变化过程中,溶液中 TFe 浓度呈阶梯状变化,且随着接菌浓度增大其阶梯状趋势越明显。对比接菌浓度为 15% 和 20% 条件下的实验结果,发现 TFe 浓度差别不大,表明培养过程中接菌浓度达到一定值后,黄铁矿作为培养基中能量提供作用的效能逐步减小。

2.3 pH 值对培养过程的影响

控制嗜酸氧化亚铁硫杆菌接菌浓度为 15%, 溶液中黄铁矿浓度 10 g/L, pH 值对黄铁矿培养氧化亚铁硫杆菌的影响见图 6。pH 值对黄铁矿培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌过程中 TFe 浓度的影响见图 7。

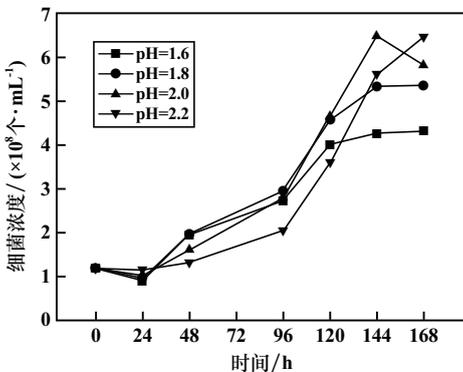


图6 pH 值对培养过程中细菌浓度的影响

由图6可知,pH 值对黄铁矿培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长具有较明显的影响,初始 pH 值越小时溶液中(按培养 144 h 计算)细菌浓度越低。在初始 pH 值一定的情况下,细菌生长和黄铁矿氧化分解使得溶液 pH 值进一步减小;另外,对培养过程中 pH 值监测,发现经过 168 h 细菌培养后(初始 pH=1.6),溶液终点

pH 值约为 1.28。嗜酸氧化亚铁硫杆菌适宜生长的 pH 值一般为 1.6~2.3,在初始 pH 值为 2.0 或 2.2 时,经过 168 h 细菌培养后 pH 值约为 1.58 和 1.62,因此采用初始 pH 值为 2.0 或 2.2 对嗜酸氧化亚铁硫杆菌进行培养较为合适。

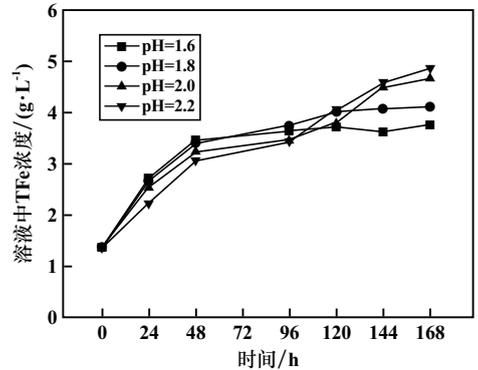


图7 pH 值对培养过程中 TFe 浓度的影响

由图7可以看出,初始 pH 值较小时,后期溶液中 TFe 浓度变化趋于平缓,说明培养后期细菌的生长受到抑制。

3 细菌培养过程分析

嗜酸氧化亚铁硫杆菌是一种化能无机自养型细菌,通过硫化矿氧化过程中的电子传递获取能量,进而繁殖生长^[12]。在细菌培养过程中,Fe(II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 失去电子氧化为 Fe(III),该过程中发生的电子传递过程为细菌提供了能量。在黄铁矿培养细菌生长的过程中,黄铁矿被氧化成含铁硫酸盐的同时伴随着电子传递,细菌从该电子传递过程中获取生长所必须的能量。根据该过程中能够提供的电子传递数量可以确定 Fe(II) 或黄铁矿提供能量的高低。假定 Q 为提供电子数目,在 9K 培养基单位质量 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 提供电子数目为:

$$Q = \frac{1}{M_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}} = \frac{1}{278.01} = 3.6 \times 10^{-3} (\text{mol/g})$$

式中 $M_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$ 为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔质量。

单位质量黄铁矿培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长过程中提供电子数目为:

$$Q = \frac{15}{M_{\text{FeS}_2}} = \frac{15}{119.967} = 0.125 (\text{mol/g})$$

式中 M_{FeS_2} 为 FeS_2 的摩尔质量,其中以 FeS_2 中 Fe 元素氧化为 Fe^{3+} 和 S 元素氧化为 SO_4^{2-} 为标准。

对比 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和黄铁矿提供电子数目可以看出,单位质量黄铁矿培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长过程中提供的电子数约为 9K 培养基中单位质量

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 提供电子数的 34.7 倍。在培养过程中,少量黄铁矿氧化即可提供大量电子以供嗜酸氧化亚铁硫杆菌利用。另外黄铁矿成本很低,可以有效降低嗜酸氧化亚铁硫杆菌培养成本。因此利用黄铁矿可以实现对嗜酸氧化亚铁硫杆菌的低成本高效培养。

通过细菌浓度与黄铁矿的氧化浸出程度或 9K 培养基中 $\text{Fe}(\text{II})$ 转化率的比值,可以表征细菌能量提供物质的利用率:

$$K = \frac{C_\theta - C_0}{C_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ 或 } \text{FeS}_2} \times \beta}$$

式中 K 为培养过程中细菌利用率; C_θ 为培养过程中细菌浓度; C_0 为接菌浓度; $C_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ 或 } \text{FeS}_2}$ 为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 或 FeS_2 在溶液中的浓度; β 为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 或 FeS_2 在溶液中的氧化率。

嗜酸氧化亚铁硫杆菌培养过程中能量利用率如图 8 所示。

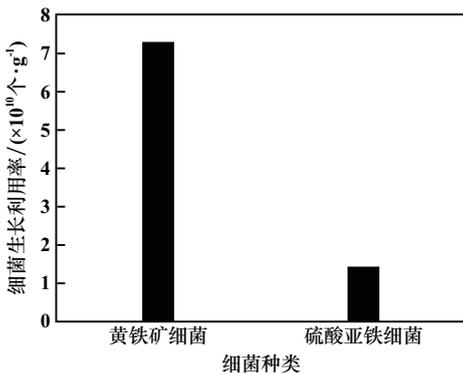


图 8 嗜酸氧化亚铁硫杆菌培养过程中能量利用率分析

由图 8 可知,以黄铁矿为能量来源时,细菌的生长利用率为 7.28×10^{10} 个/g,而以硫酸亚铁为能量来源时细菌生长利用率仅为 1.43×10^{10} 个/g,可以看出以黄铁矿为能量来源对嗜酸氧化亚铁硫杆菌进行培养是传统的以硫酸亚铁培养细菌时能量利用效率的 5 倍左右,因此以黄铁矿为能量来源可以实现嗜酸氧化亚铁硫杆菌的高效生长培养。

4 结 论

1) 利用黄铁矿培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌的过程表明,黄铁矿加入量不同,其培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌过程存在一定差异;随着接菌浓度增加,大量细菌在黄铁矿表面吸附,有利于嗜酸氧化亚铁硫杆菌的生长;黄铁矿氧化分解使得溶液的 pH 值进一步下降,在初始 pH 值较小的情况下,后期溶液 pH 值持续下降,使得细菌的生长受到抑制。

2) 在培养过程中,黄铁矿中的铁离子快速溶出的同时,细菌浓度逐步上升,而溶液中以铁离子为媒介在

黄铁矿和嗜酸氧化亚铁硫杆菌之间循环进行电子传递,使得细菌快速生长。在适宜的黄铁矿用量、细菌接种浓度和 pH 值下,嗜酸氧化亚铁硫杆菌可以有效利用黄铁矿提供的能量实现细菌生长,细菌生长的同时铁离子浓度阶梯式上升。

3) 在黄铁矿用量 10 g/L、接菌浓度 15%、pH=2.0 的培养条件下,144 h 培养后溶液中细菌浓度能够达到 6.4×10^8 个/mL。通过对比能量提供者提供的电子数目可以看出,单位质量黄铁矿为嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长提供的能量约为 9K 培养基中单位质量 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 提供能量的 34.7 倍。

4) 利用黄铁矿对嗜酸氧化亚铁硫杆菌进行培养是传统方法(利用硫酸亚铁培养细菌)利用效率的 5 倍左右。

参考文献:

- [1] 张在海,胡岳华,邱冠周,等.从细菌学角度探讨硫化矿物的细菌浸出[J].矿冶工程,2000,20(2):15-18.
- [2] 方芳,钟宏,江放明,等.黄铁矿对铜黄铁矿生物浸出的影响[J].中国有色金属学报,2013,23(10):2970-2976.
- [3] 董颖博,林海,莫晓兰,等.不同能源物质对 At.f 菌浸出低品位铜尾矿的影响[J].中南大学学报(自然科学版),2011,42(5):1181-1187.
- [4] 柳建设,王兆慧,耿梅梅,等.微生物浸出中微生物-矿物多相界面作用的研究进展[J].矿冶工程,2006,26(1):40-44.
- [5] Merwe J A V D, Deane S M, Rawlings D E. The chromosomal arsenic resistance genes of *Sulfolobus solfataricus* [J]. *Hydrometallurgy*, 2010,104(3):477-482.
- [6] 王清良,胡鄂明,余润兰,等.细菌低温驯化及其浸出砂岩型铀矿试验研究[J].矿冶工程,2011,31(6):6-8.
- [7] Zhang J H, Xu Z, Ni Y Q, et al. Bioleaching of arsenic from medicinal realgar by pure and mixed cultures[J]. *Process Biochemistry*, 2007,42(9):1265-1271.
- [8] Li R C B, Sasaki K, Ohmura N. Does aporusticyanin mediate the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite[J]. *Hydrometallurgy*, 2001,59(2-3):357-372.
- [9] Rojas-Chapana J A, Tributsch H. Biochemistry of sulfur extraction in bio-corrosion of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. *Hydrometallurgy*, 2001,59(2):291-300.
- [10] 管昊,尹华群,刘杰,等.高浓度镍环境中不同培养条件对浸矿微生物群落的影响[J].中南大学学报(自然科学版),2009,40(3):543-549.
- [11] 沈艳杰,龚文琪,雷绍民,等.氧化亚铁硫杆菌的形态及对 Fe^{2+} 的氧化研究[J].生物技术,2005,15(2):64-66.
- [12] Gómez J, Cantero D. Modelling of Ferrous Sulphate Oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* in Discontinuous Culture: Influence of Temperature, pH and Agitation Rate[J]. *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 1998,86(98):79-83.

引用本文:张旭,冯雅丽,王雅静.黄铁矿高效培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌及过程分析[J].矿冶工程,2018,38(1):88-91.