

文章编号:1673-9981(2007)03-0182-05

广东梅州浸矿细菌的选育及对金属硫化矿的浸出*

何 环, 夏金兰, 彭安安, 邱冠周

(中南大学生物冶金教育部重点实验室, 资源加工与生物工程学院, 湖南 长沙 410083)

摘 要: 从中国南方典型矿区——广东梅州玉水生物提铜示范基地酸性矿水中分离得到一株金属硫化矿浸出微生物 YS-1。对菌株 YS-1 的形态、生理生化特征、16S rDNA 种系序列以及对黄铁矿和铁闪锌矿的浸出等进行了研究。结果表明: 细菌长 $1.0 \sim 2.5 \mu\text{m}$, 直径 $0.4 \sim 0.6 \mu\text{m}$, 能运动, 革兰氏染色显阴性。最适宜生长的 pH 和温度分别为 2.0 和 30°C , 能利用亚铁盐、单质硫和硫代硫酸钠, 不能利用有机能源, 与嗜酸氧化亚铁硫杆菌的 16S rDNA 种系序列同源性达到 98%, 对铁闪锌矿和黄铁矿的浸出率分别为 14.38% 和 3.8%。

关键词: 浸矿细菌选育; 金属硫化矿; 生物浸出

中图分类号: TF18; Q939.97

文献标识码: A

浸矿菌种的定向选育对提高硫化矿的实际浸出效率, 具有重要意义。菌种定向选育的成功与出发菌株的性能有直接关系, 而出发菌株的性能与其来源密切相关。本实验的目的是从典型的硫化矿矿区筛选出浸矿菌, 为定向选育提供基础菌株。为此, 我们从中国南方典型矿区——广东梅州玉水生物提铜示范基地取回酸性矿水水样, 从中筛选得到一株金属硫化矿浸出微生物 YS-1。经生理生化性质研究及 16S rDNA 序列同源性分析, 发现该菌株为嗜酸氧化亚铁硫杆菌, 它能较好地浸出黄铁矿和铁闪锌矿。

1 材料及方法

1.1 酸性矿坑水

水样取自广东梅州玉水生物提铜示范基地地下深矿坑中的酸性矿水, 原始水样 pH 为 $2.5 \sim 5.0$ 。

1.2 培养基及矿样

富集培养基 (g/L): 将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3.0), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0.01), KCl (0.1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5) 和 K_2HPO_4 (0.5) 溶于 1000 mL 蒸馏水中, 用 45 g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 或 10 g 单质硫作为基础能源, 用 1 mol H_2SO_4 调节 pH=2.0。

固体培养基 (g/L): 由 A、B 和 C 组成。A 是将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3.0), KCl (0.1), K_2HPO_4 (0.1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5) 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0.01) 溶于 200 mL 蒸馏水所形成的溶液; B 是将琼脂粉 (15) 溶于 700 mL 蒸馏水所形成的溶液; C 是将 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (22.2) 溶于 100 mL 蒸馏水所形成的溶液。A 和 B 分别在 121°C 和 0.1 MPa 下灭菌 20 min, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 超滤膜将 C 中的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 过滤除菌。将 A 和 B 灭菌冷却后混合, 再加入 C, 混合后的培养基用 1 mol H_2SO_4 调节 pH=2.5。

试验中所用的黄铁矿和铁闪锌矿是由中南大学资源加工与生物工程学院矿物加工工程系提供的, 矿物基本成分列于表 1。

表 1 金属硫化矿基本组成
Table 1 The composition of metal sulfides

| 矿样 | 元素含量 w/% | | |
|------|----------|------|-------|
| | Fe | Zn | S |
| 黄铁矿 | 44.79 | 0 | 47.74 |
| 铁闪锌矿 | 16.99 | 47.4 | 30.85 |

收稿日期: 2007-04-28

* 基金项目: 国家创新群体基金资助项目 (50621063); 国家重大基础研究项目 “973” (2004CB619204)

作者简介: 何环 (1981-), 男, 湖南人, 博士研究生。

1.3 菌种分离

将10 mL原始水样放入液体培养基中富集培养,富集三代后,用平板连续分离3次,得到单菌株,命名为YS-1.具体操作方法参照文献[1].

1.4 菌株YS-1形态及显微结构的观察

在光学显微镜(Olympus CX-31)下观察细菌的形态和运动情况,经革兰氏染色后再观察其染色情况.细菌样品经处理后用扫描电镜(JEOL JSM-6360 LV)观察细菌的亚显微结构.

1.5 菌株YS-1生理生化性质的研究

1.5.1 菌株YS-1的生长情况

将预先培养好的细菌分别接种于亚铁和元素硫的培养基中(接种终浓度为 1.0×10^6 个/mL),在25~60℃或30℃及pH 1.0~5.0的条件下摇床培养,2天后每隔4~8 h取样,用血小板计数法测定细菌的数量.

1.5.2 菌株YS-1对能源的利用情况

在100 mL基本盐培养基中分别加入1 g除菌的单质硫或4.31 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和1 g单质硫的混合物、硫代硫酸钠、葡萄糖、酵母粉、蛋白胨、黄铁矿和铁闪锌矿,分别配成含硫或亚铁和硫、硫代硫酸钠、不同碳源、不同矿样的特别基质.然后,按1.5.1方法接种,在30℃条件下分别培养5天后,观察细菌的生长情况.

1.6 菌株YS-1的16S rDNA扩增、序列测定和系统发育分析

用液体培养基将细菌培养3天后,依次用普通滤纸过滤及4000 r/min离心处理5 min,以除去培养液中的铁矾类沉淀,然后再进行10 000 r/min离心处理10 min,收集细菌.用pH 2.0硫酸清洗菌泥3次后转至1.5 mL EP管中,再用500 μL TE (pH 8.0)重新悬浮细菌,平衡pH,提取细菌基因组,扩增16S rDNA,转导克隆,构建系统发育树.具体操作方法参照文献[1].

1.7 菌株YS-1的浸矿实验

用黄铁矿和铁闪锌矿进行浸矿实验,矿样粒度为-0.074 mm,矿浆浓度为5%,在100 mL液体培养基中加入5 g矿粉,细菌接种后浓度为 1.0×10^7 个/mL,浸出10天后,用原子吸收法测量浸出液中金属离子的含量,计算金属离子的浸出率.

2 结果与讨论

2.1 菌株YS-1的形态特征及生理生化性质

将细菌在固体平板上培养7天后开始出现白色凸起菌落,菌落直径为0.2~1 mm,其表面光滑,边缘完整,如图1(a)所示.将细菌培养10天左右,部分白色菌落开始变黄,菌落周围培养基也逐渐呈黄色,培养到第14天时,平板上的菌落全部变成黄色,表面粗糙,菌落周围变得不规则,菌落中心呈黄褐色,如图1(b)所示.通过显微镜进一步观察,发现分离纯化的细菌为短杆状,能运动,革兰氏染色显阴性.

扫描电镜分析(图1(c)和(d))表明,细菌长 $1.0 \sim 2.5 \mu\text{m}$,直径 $0.4 \sim 0.6 \mu\text{m}$,在硫培养基中的细菌明显比在亚铁培养基中的长,并且存在明显的细菌链生现象.这可能是由在不同的培养基中细菌胞外多聚物成分的差异性所致.T. Gehrke等人^[2-3]研究表明,A. ferrooxidans在亚铁盐培养基中生长时,其胞外物质含有较多的糖及糖醛酸,细菌主要通过静电作用接触晶体表面;在硫培养基中生长的细菌,其胞外物质含糖类物质较少,含饱和酸较多.傅建华等人^[4]用电镜细胞化学方法证实了A. ferrooxidans胞外多聚物的存在,科学、直观地再现了胞外多聚物中的脂类、多糖、外膜蛋白等生物大分子以及铁离子,间接地证明了胞外多聚物在吸附和形成细菌生物膜的过程中所起的关键作用.

图2为菌株YS-1在亚铁培养基和硫培养基中的典型生长曲线.由图2可知,培养早期细菌在亚铁培养基中的增长速度明显比在硫培养基中的快,但100 h后,在硫培养基中的细菌浓度明显高于在亚铁培养基中的细菌浓度,细菌浓度达到 10^8 个/mL.细菌在利用元素硫时,需要经过一段时间诱导自身表达或合成分泌性疏水胞外物质,以利于与元素硫接触,因而在开始阶段细菌的浓度较低.但一旦接触好后,硫氧化比亚铁氧化可提供更多的能量,所以培养后期细菌的浓度较高.

图3为初始pH对菌株YS-1生长和氧化的影响曲线.由图3(a)可以看出,初始pH对细菌的生长有较大影响,适合细菌生长的pH=2.0.当pH<2.0时,细菌的生长受到抑制,空白对照中亚铁离子的氧化率相当低(图3(b)),表明pH<2.0时,溶液中的亚铁离子较难被空气中的氧气氧化.在pH为

2.0~2.5 时,培养基中的亚铁离子几乎都是细菌氧化作用的结果(图 3(b)).当培养基的 $\text{pH} > 3.0$ 时,空白对比中的亚铁离子很容易被氧化,而该条件下

的细菌浓度并不高.这证明在 $\text{pH} > 3.0$ 条件下,培养基中的亚铁离子几乎都是空气中的氧气氧化所致.

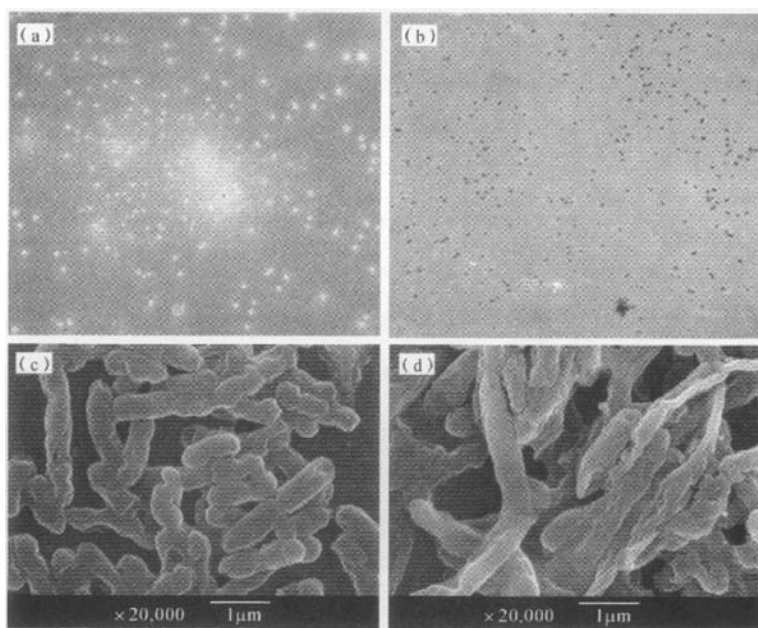


图 1 菌株 YS-1 在固体培养基上培养 1 周(a)和 2 周(b)后的菌落形态及在含亚铁(c)和硫(d)培养基中细胞的亚显微结构

Fig. 1 The colonies of strain YS-1 on the solid agar after cultivated for 1 week (a) and 2 weeks (b), and the cellular structure of strain YS-1 cultured with ferrous sulfate (c) and elemental sulfur (d), respectively

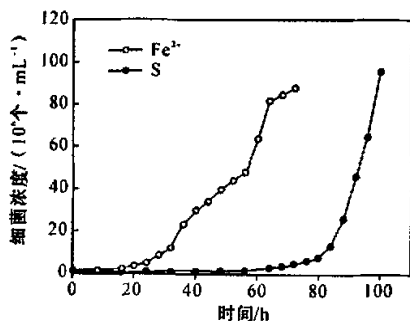


图 2 菌株 YS-1 在亚铁和硫培养基中的生长曲线

Fig. 2 The growth curves of strain YS-1 in the culture media with Fe^{2+} and S, respectively

将菌株分别接种到含亚铁、硫或化合物培养基及不同的碳源中,发现该菌株能够利用亚铁、单质硫、硫代硫酸钠和还原型硫化物进行生长,而不能利

用葡萄糖、酵母粉和蛋白胨等有机碳源.在亚铁盐中添加质量分数 1% 葡萄糖和未添加葡萄糖,三天后发现添加葡萄糖的细菌菌数明显低于未添加葡萄糖的菌数,这说明 1% 葡萄糖对细菌氧化 Fe^{2+} 有抑制作用.

图 4 为温度对菌株 YS-1 生长影响的曲线图.从图 4 可以看出,菌株 YS-1 在 $25 \sim 40^\circ\text{C}$ 均能生长,最适宜生长的温度为 30°C .当温度超过 40°C 时,菌体会大量死亡.

2.2 菌株 YS-1 的 16S rDNA 序列分析和系统发育树的构建

用于序列对比的细菌均为本实验室从全国各地取回的水样中筛选出来的.由图 5 系统发育树分析(小括号中的代号为 GeneBank 登录号)可知,菌株 YS-1 的 16S rDNA 序列与 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的相似性超过 98%.

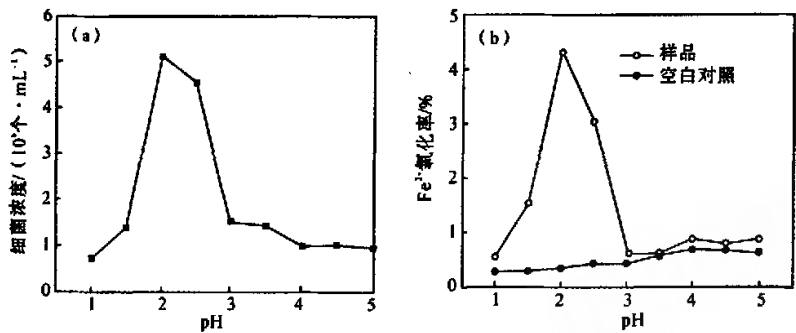


图3 初始 pH 对菌株 YS-1 生长和氧化的影响

Fig. 3 The Effects of initial pH values on the growth and ferrous ions oxidation of strain YS-1

2.3 浸矿实验

菌株 YS-1 对黄铁矿和铁闪锌矿的浸出实验结果列于表 2。由表 2 可知,菌株 YS-1 对铁闪锌矿的浸出效果较好,对黄铁矿的浸出效果不是很明显。

表 2 菌株 YS-1 对黄铁矿和铁闪锌矿的浸出率

Table 2 Metal ions leaching rate of pyrite and spalerite by strain YS-1

| 矿样 | 浸出率/% | 空白浸出率/% |
|---------|-------|---------|
| 黄铁矿(铁) | 3.8 | 1 |
| 铁闪锌矿(锌) | 14.38 | 1.83 |

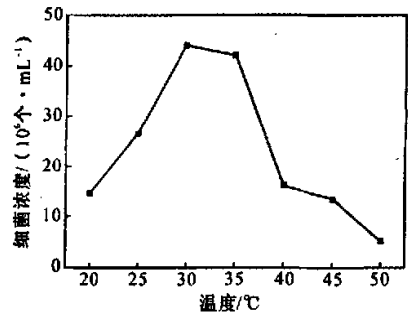


图4 温度对菌株 YS-1 生长的影响

Fig. 4 The effect of temperature on the growth of the strain YS-1

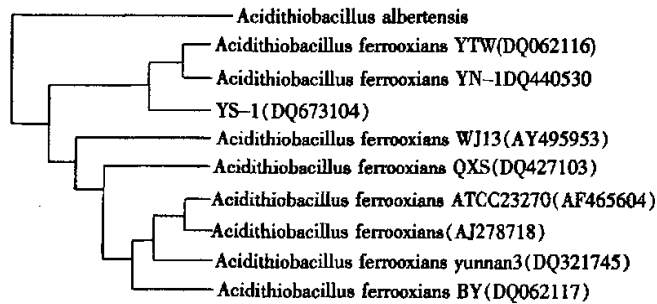


图5 菌株 YS-1 的 16S rDNA 系统发育分析

Fig. 5 The 16S rDNA phylogenetic analysis of strain YS-1

嗜酸氧化亚铁硫杆菌与硫化矿之间相互作用机理的研究较为深入,目前比较认同的主要有两种机理^[5-6]:不溶于酸的硫化矿主要通过硫代硫酸盐途径,如黄铁矿和辉钼矿等,溶于酸的硫化矿主要通过聚硫化物途径。不溶于酸的金属硫化矿主要是通过

溶液中的 Fe³⁺ 对金属硫化矿氧化,在产生硫代硫酸根离子后,金属离子与硫之间的化学键断裂。溶于酸的金属硫化矿在浸出过程中受到溶液中铁离子和质子的攻击,这些金属硫化矿的金属与硫之间的化学键在质子的攻击下发生断裂而生成硫化氢,进而通

过聚硫化氢生成单质硫。矿物成分分析表明,黄铁矿和铁闪锌矿均含有亚铁和硫,且黄铁矿中亚铁和硫的含量都高于铁闪锌矿中的含量,但是该菌株却对铁闪锌矿的作用效果更好,这可能与矿物的表面结构有关,尽管细菌与矿物的作用位点至今还不是很清楚。T. Gehrke 等人^[3]提出了细菌可能会优先作用于晶格表面不完整的部分。石绍渊等人^[7]用扫描电镜观察浸渣颗粒表面,发现经过细菌处理后,矿物颗粒表面一些部位形成明显的腐蚀坑。因为试验中选用的铁闪锌矿含有较多的铁,而黄铁矿中的成分比较单一,因此铁闪锌矿的表面晶格比黄铁矿容易破坏。同时,铁闪锌矿中金属原子与元素硫之间的化学键受到质子和三价铁离子的攻击很容易断裂,所以这可能是细菌对铁闪锌矿的浸出效果比黄铁矿好的原因。

3 结 论

从广东梅州生物提铜示范基地酸性矿水中分离纯化得到的一株细菌为嗜酸氧化亚铁硫杆菌,它能利用亚铁、单质硫和硫代硫酸钠作为能源物质,不能利用葡萄糖等有机能源,同时,葡萄糖对细菌利用亚铁有阻碍作用。该菌最适宜生长的温度为 30℃,pH 为 2.0~2.5,对铁闪锌矿和黄铁矿的浸出率分别为 14.38% 和 3.8%。

参考文献:

- [1] XIA Jin-lan, PENG An-an, HE Huan, et al. A new strain acidithiobacillus albertensis BY-05 for bioleaching of metal sulfides ores[J]. Trans Nonferrous Metal Soc China, 2007, 17(1): 168-175.
- [2] GEHRKE T, TELEGDI J, THIERRY D, et al. Importance of extracellular polymeric substances from thiobacillus ferrooxidans for bioleaching[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 2743-2747.
- [3] GEHRKE T, HALLMANN R, KINZLER K, et al. The EPS of acidithiobacillus ferrooxidans—a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology[J]. Water Sci Technol, 2001, 43: 159-167.
- [4] 傅建华,邱冠周,胡岳华. 氧化亚铁硫杆菌胞外多聚物在生物浸出中的作用[J]. 激光生物学报, 2004, 13(1): 62-66.
- [5] ROHWERDER T, GEHRKE T, KINZLER K, et al. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 63: 239-248.
- [6] FOWLER T A, HOLMES P R. Mechanism of pyrite dissolution in the presence of thiobacillus ferrooxidans[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(6): 2987-2993.
- [7] SHI Shao-yuan, FANG Zhao-heng. Bioleaching of malachite flotation concentrate by acidithiobacillus ferrooxidans[J]. Trans Nonferrous Metal Soc China, 2004, 14(3): 569-575.

Breeding of a strain YS-1 from Meizhou, Guangdong provance and its bioleaching trials for metal sulfides ores

HE Huan, XIA Jin-lan, PENG An-an, QIU Guan-zhou

(Key Laboratory of Biometallurgy of Ministry of Education, School of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: A strain named YS-1 was isolated from the acidic water of Meizhou Yushui copper mine of Guangdong province. The morphology, physiological and biochemical characteristics, 16S rDNA phylogenetic sequence, as well as leaching pyrite and sphalerite of this strain were studied. The results showed that strain YS-1 was Gram negative and rob-shaped in $(1.0-2.5) \times (0.4-0.6) \mu\text{m}$, and mobile, and the optimum pH and temperature for its growth were 2.0, and 30℃, respectively, it was able to grow in the liquid medium with Fe^{2+} , S^0 or thiosulfate, but failed to make use of organic energy source, it had 98% of alignments similarity with *Acidithiobacillus ferrooxidans*, and the leaching rate for sphalerite and pyrite by this strain were 14.4% and 3.8%, respectively.

Key words: breeding of leaching bacteria; metal sulfides ores; bioleaching