

有机碳源对氧化亚铁硫杆菌生长的影响^{*}

张再利, 沈 镭, 贾晓珊
(中山大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 氧化亚铁硫杆菌为化能自养菌, 嗜酸, 通常生长于无机环境中。为了扩大其在有机环境中的应用, 选择乙酸、丙酸和正丁酸三种低分子有机酸及葡萄糖作为氧化亚铁硫杆菌生长的有机环境, 研究其在不同浓度不同有机物下的生长活性。实验结果显示: 氧化亚铁硫杆菌在 100 mg/L 低浓度的乙酸和 400 mg/L 葡萄糖浓度范围内均能很好的生长, 而在余下的几种有机物中生长则受到抑制。表明氧化亚铁硫杆菌并不是对所有的有机物都敏感, 通过筛选和驯化能得到在有机环境中生长良好的菌株。

关键词: 氧化亚铁硫杆菌; 驯化; 有机酸; 葡萄糖

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 06-0121-04

氧化亚铁硫杆菌^[1] (*Thiobacillus ferrooxidans* 简称 *T. f*) 是一种化能自养菌, 且专性好氧、嗜酸、呈革兰氏阴性, 形状呈圆端短柄状, 宽 0.3 ~ 0.5 μm , 长 1.0 ~ 2.0 μm , 端生鞭毛。*T. f* 菌以氧化二价铁、元素硫及还原态硫的化合物来获得生长过程所需的能量, 并固定空气中的 CO_2 获得生物合成所需要的碳源。*T. f* 菌是一种常见的工业菌种, 它已成为工业生物浸出各种金属的主要菌种之一^[2]。

此外, *T. f* 菌嗜酸产酸的特性使其在环保领域中具有广泛的应用前景。目前在煤炭脱硫, 工业废气、石油废气的处理, 含重金属污泥的处理等领域中利用 *T. f* 菌作为生化处理的微生物菌种的研究表明, *T. f* 菌具有良好的处理能力。但是 *T. f* 菌为化能自养菌, 对有机物, 尤其是低分子有机物非常敏感这一特性则阻碍了其在实际工程中的推广应用。因此, 通过筛选、驯化、诱变等手段找到适应有机环境的 *T. f* 菌是本研究的重点。

1 实验内容与方法

1.1 菌种来源及培养

研究所用 *T. f* 菌株的初始来源是广东云浮硫铁矿矿坑的酸性废水。具体的富集、分离培养过程如下: 富集培养在 9K 液体培养基中进行, 取 10 mL 矿坑废水和 30 mL 的 9K 培养基于三角瓶中, 调 pH 为 2.5 置于 30℃, 120 r/min 恒温摇床中培养, 三天后, 取其上清液 10 mL 于 100 mL 的 9K 液体

培养基中再培养。重复上述培养过程三到四次, 然后进行分离培养。将约 0.2 mL 的培养液涂布到含固体培养基的培养皿中, 放入 30℃ 的生化培养箱中培养。7 d 左右, 固体培养基上长出白色细小的 *T. f* 菌落, 后因亚铁的氧化, 菌落的颜色逐渐变成红褐色, 如图 1 所示。用接种针挑取纯的菌落接种到含 10 mL 液体培养基的试管中, 在与上述相同的条件下培养。重复数次后, 获得纯的 *T. f* 菌株, 图 2 为放大 15 万倍的 *T. f* 菌电镜扫描照片。

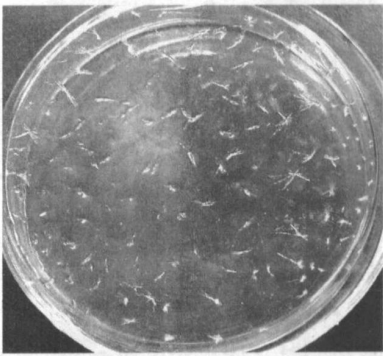


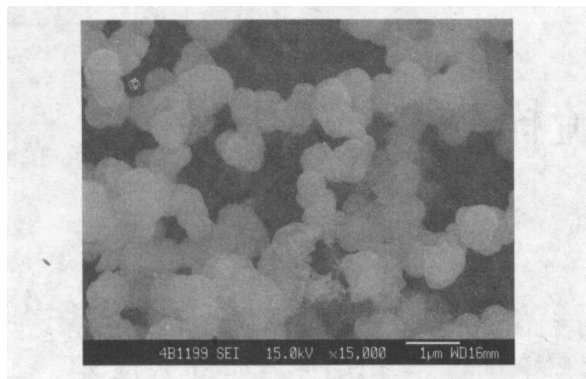
图 1 固体培养基中 *T. f* 菌菌落
Fig 1 Colony of *T. f* on 9K solid medium

1.2 培养基

9K 液体培养基^[3]的组成: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, KCl 0.1 g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44.2 g/L, pH 2.5。

固体培养基^[4]的组成: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/L, KCl

^{*} 收稿日期: 2005-11-17
基金项目: 国家“985工程”基金资助项目 (32000-3253282); 中山大学“百人计划”重点资助项目
作者简介: 张再利 (1976年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 贾晓珊; E-mail: eesjxs@mail.sysu.edu.cn
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

图 2 9K 液体培养基中 *T. f.* 菌扫描照片Fig. 2 Scanning electron microscope analysis of *T. f.* in 9K liquid medium

0.1 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $Ca(NO_3)_2$ 0.01 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 22.4 g/L

1.3 实验内容

实验分两阶段进行: 第一阶段, 选取乙酸、丙酸、正丁酸三种低分子有机酸及葡萄糖为 *T. f.* 菌生长的有机环境, 同时进行空白实验。三种酸和葡萄糖的起始浓度分为 100 和 200 mg/L 两种。各培养液的接种量为 5%, 在 30℃, 120 r/min 恒温摇床中培养。此阶段持续时间两周, 每 12 h 监测一次培养基中的 Fe^{2+} 、pH、DO。进入第 2 阶段之前, 先进行驯化工作。第一阶段中正丁酸环境下的 *T. f.* 菌完全被抑制, 不能进行后续实验而停止驯化工作。因此, 驯化实验只选择乙酸和丙酸两种有机酸和葡萄糖为研究对象。驯化起始浓度均为 100 mg/L, 菌液采用第一阶段各自在 100 mg/L 浓度培养下的菌液。重复驯化 3 次。在进行第一次驯化实验时, 丙酸环境下的 *T. f.* 菌被完全抑制, 同样不能进入第二阶段。因此, 第二阶段最终只进行了乙酸和葡萄糖环境下的实验。乙酸的初始浓度取 100、200、300 三种, 葡萄糖的初始浓度取 200、300、400 mg/L 三种。其它同第一阶段。

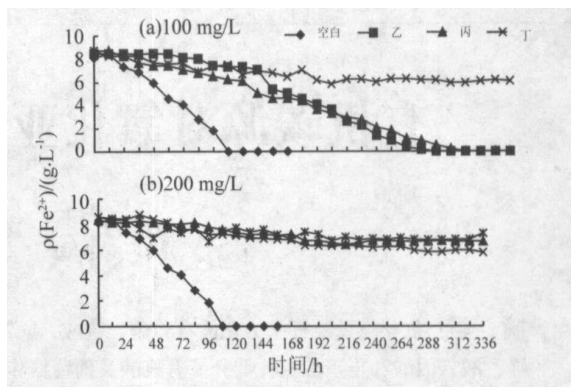
1.4 分析方法及仪器

Fe^{2+} : 重铬酸钾法^[5]; pH: MO 130 型便携式 pH 计; DO: MO 128 便携式溶解氧仪; 葡萄糖: 蒽酮分光光度法; 乙酸、丙酸、丁酸: GC-14C 型气相色谱仪; 微生物形态观察: JSM-6330F 型扫描电子显微镜。

2 实验结果与讨论

2.1 有机酸对 *T. f.* 菌生长的影响

图 3a 和图 3b 为在乙酸、丙酸和丁酸均分别为 100、200 mg/L 浓度下, *T. f.* 菌利用 Fe^{2+} 的情况。以 Fe^{2+} 浓度的减少快慢反映 *T. f.* 菌的活性, 即

图 3 有机酸对 *T. f.* 菌生长的影响Fig. 3 Effects of organic acid on the growth of *T. f.*

Fe^{2+} 浓度的减少快说明 *T. f.* 菌的活性强, 反之 Fe^{2+} 浓度的减少慢说明 *T. f.* 菌的活性弱^[6]。从两图中看到, 未加有机酸的空白样经过 24 h 左右的迟缓期后, 进入对数增长期, 此间 Fe^{2+} 被迅速利用, 表明 *T. f.* 菌快速生长。与空白样相比, 未经驯化的 *T. f.* 菌在丁酸的两种浓度下及乙酸和丙酸的 200 mg/L 浓度下均被抑制, 两周的时间里 Fe^{2+} 浓度几乎未发生变化, 始终维持在初始浓度附近。而在乙酸 100 mg/L 浓度和丙酸 100 mg/L 浓度下 *T. f.* 菌并未被完全抑制。 *T. f.* 菌对 100 mg/L 浓度乙酸的适应性强于 100 mg/L 浓度的丙酸。它同样经过 24 h 的适应期进入对数增长期, 只是在对数增长期内, 消耗 Fe^{2+} 的速度不如空白样中的消耗速度快。在 100 mg/L 浓度丙酸中, *T. f.* 菌经过的迟缓期长于空白和 100 mg/L 浓度乙酸中的迟缓期。经过 60 h 的时间适应环境的变化。进入对数增长期, 而在对数增长期中它消耗 Fe^{2+} 的速度则快于 100 mg/L 浓度乙酸中 *T. f.* 菌消耗 Fe^{2+} 的速度。表明在各自对数增长期中, 100 mg/L 丙酸下的 *T. f.* 菌的生长快于在 100 mg/L 乙酸中的生长。

第一阶段的实验结果表明 *T. f.* 菌在乙酸 100 mg/L、丙酸 100 mg/L 浓度下能适应并生长, 而在乙酸 200 mg/L、丙酸 200 mg/L、丁酸 100 mg/L 和丁酸 200 mg/L 浓度下均不能生长。

2.2 葡萄糖对 *T. f.* 菌生长的影响

同时进行了 *T. f.* 菌在葡萄糖 100 mg/L 和 200 mg/L 浓度下生长的实验。结果如图 4。图 4 表明两种葡萄糖浓度对 *T. f.* 菌的生长都未产生影响, 利用 Fe^{2+} 的能力基本与在空白中的相当。除此, 也未发现葡萄糖对 *T. f.* 菌的生长有明显的促进作用。总之, *T. f.* 菌在葡萄糖的两种浓度中具有良好的适应性。

2.3 驯化后乙酸对 *T. f.* 菌生长的影响

经过三次重复驯化工作, 实验进入第二阶段

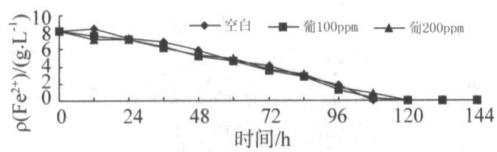


图 4 葡萄糖对 *T. f* 菌生长的影响

Fig. 4 Effects of glucose on the grow th of *T. f*

此阶段研究 *T. f* 菌在 3 种乙酸的初始浓度，即 100、200、300 mg/L 浓度下的生长。实验结果如图 5 所示。空白样中的生长规律基本与未驯化时一致。与空白样相比，经过驯化后的 *T. f* 菌在乙酸 200 和 300 mg/L 两种浓度下仍不能适应，而是受到抑制失去生长活性。在初始浓度为 100 mg/L 浓度中，*T. f* 菌的适应时间在 36 h 左右，之后进入对数增长期。在对数增长期中利用 Fe^{2+} 的能力仍不及空白样中的利用能力。但它的生长活性已被大大提高。200、300 mg/L 浓度的乙酸仍对 *T. f* 菌产生抑制，可能驯化的时间不够长，需加强驯化。在 100 mg/L 乙酸浓度的实验中，*T. f* 菌能很好的生长，说明 *T. f* 菌能适应低浓度的乙酸环境。

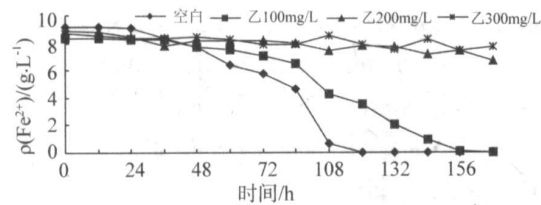


图 5 乙酸对 *T. f* 菌生长的影响

Fig 5 Effects of acetic acid on the grow th of *T. f*

2.4 驯化后葡萄糖对 *T. f* 菌生长的影响

在葡萄糖对驯化后的 *T. f* 菌生长的影响实验中，根据未驯化阶段的经验，初始浓度定为 200 mg/L、300 mg/L 和 400 mg/L，浓度相应增大。实验结果如图 6 所示。经过驯化的 *T. f* 菌能在三种葡萄糖浓度中生长，与空白样中的 *T. f* 菌相比，其生长能力与空白样的相当。且三种浓度之间的生长能力没有明显差异。表明在 400 mg/L 浓度范围内，*T. f* 菌均能很好的生长。

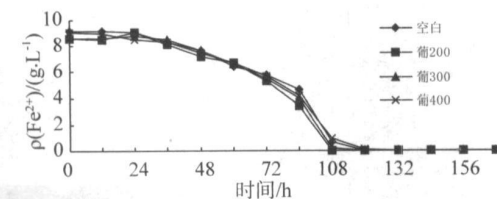


图 6 葡萄糖对 *T. f* 菌生长的影响

Fig 6 Effects of glucose on the grow th of *T. f* by domestication

2.5 驯化前后乙酸对 *T. f* 菌生长影响的对比

经过乙酸驯化和未经乙酸驯化的 *T. f* 菌的生长状况对比如图 7 所示。经驯化后 *T. f* 菌在对数增长期内利用 Fe^{2+} 的能力大大高于未经驯化的 *T. f* 菌。这表明驯化工作是有意义的。经过驯化，*T. f* 菌具有更好的生长活性，能很好地适应乙酸生长。

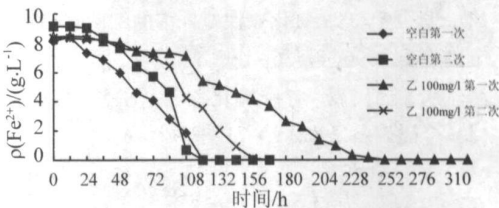


图 7 两个阶段乙酸对 *T. f* 菌生长影响的对比

Fig 7 Different effects of acetic acid on the grow th of *T. f* by non-domestication and domestication

2.6 驯化前后葡萄糖对 *T. f* 菌生长影响的对比

经过葡萄糖驯化和未经葡萄糖驯化的 *T. f* 菌的生长状况对比如图 8 所示。根据对数增长期中 Fe^{2+} 浓度变化斜率的大小，经过驯化的 *T. f* 菌相比未经驯化的 *T. f* 菌，生长能力有一定的提高，但是这种提高很微小。可能是在一定浓度范围内葡萄糖对 *T. f* 菌的影响很小，从而驯化与未驯化均不产生较大的变化。

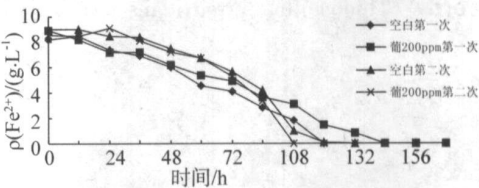


图 8 两个阶段葡萄糖对 *T. f* 菌生长影响的对比

Fig. 8 Different effects of glucose on the grow th of *T. f* by non-domestication and domestication

3 结 论

- (1) 实验用 *T. f* 菌株在初始乙酸 200 mg/L、丙酸 200 mg/L、丁酸 100 mg/L、丁酸 200 mg/L 浓度中均受到抑制失去活性而不能生长。
- (2) 实验用 *T. f* 菌株在第一次的丙酸 100 mg/L 浓度下能生长，而在第二次重复实验中则受到抑制，原因可能是在重复实验过程中生成了某种中间产物，而这种中间产物抑制 *T. f* 菌的生长。
- (3) 实验用 *T. f* 菌株能在乙酸 100 mg/L 的浓度下生长良好，经过驯化后的 *T. f* 菌生长能力更强。
- (4) 实验用 *T. f* 菌株在实验设计的最高葡萄糖浓度 400 mg/L 下能很好生长，葡萄糖不影响 *T. f* 菌的生长。

菌的生长。

(5) *T.f*菌并不是对所有有机物敏感, 而是有选择性的。是可以通过筛选和驯化找到适合有机环境生长的 *T.f*菌株。

参考文献:

[1] 胡岳华, 康自珍. 氧化亚铁硫杆菌的细菌学描述[J]. 湿法冶金, 1996(4): 36 – 40

[2] 温建康, 阮仁满. 含砷硫化铜精矿的细菌浸出研究[J]. 金属矿山, 2002(9): 21 – 24

[3] 袁欣, 袁楚雄. 非金属矿物的微生物加工技术研究(I) [J]. 中国非金属矿工业导刊, 2000(3): 12 – 14

[4] 张在海, 邱冠周, 等. 氧化亚铁硫杆菌的菌落分离研究[J]. 矿产综合利用, 2001(1): 19 – 22

[5] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[J]. 2版. 北京: 中国环境科学出版社, 1996

[6] 周顺桂, 王世梅, 余素萍, 等. 污泥中氧化亚铁硫杆菌的分离及其应用效果[J]. 环境科学, 2003 24(3): 56 – 60

E ffects ofO rgan ic Carbon Resource on the Grow th ofTh iobacillus Ferrooxidans

ZHANG Zai li SHEN Lei JIAXiao shan

(School of Environmental Science and Engineering Sun Yat sen University, Guangzhou 510275 China)

Abstract Thiobacillus ferrooxidans (*T.f*) is a chemoautotrophic species that can obtain energy for growth from the oxidation of a variety of inorganic sulphur compounds and ferrous ion. In short, *T.f* usually grows in inorganic environment. Domesticating *T.f* to grow better in organic environment, this study selected acetic acid, propionic acid, butyric acid and glucose as the organic carbon resource of *T.f* and observed its growth in several concentration of organic compounds. The results show that *T.f* can grow greatly in 100 mg /l acetic acid and 400 mg /l glucose, however, is inhibited in propionic acid and butyric acid. The study indicates that *T.f* can grow selectively in kinds of organic environments and grow better in organic environment by domestication and cultivation.

Key words Thiobacillus ferrooxidans (*T.f*); domestication; organic acid; glucose