

# 一株嗜酸氧化亚铁硫杆菌的鉴定及浸矿性能

卢涛<sup>1</sup>, 魏德洲<sup>1</sup>, 张瑞洋<sup>1</sup>, 卓建英<sup>2</sup>

(1. 东北大学资源与土木工程学院, 辽宁沈阳 110819; 2. 辽宁省冶金地质勘查局四〇三队, 辽宁鞍山 114018)

**摘 要:** 从西藏甲玛某多金属矿的酸性矿坑水中分离获得一株浸矿细菌(命名为XZ)。该菌为革兰氏阴性菌,短杆状,菌体长约1~1.5 μm,直径约0.5 μm,两端钝圆,能够氧化Fe<sup>2+</sup>和单质硫,最适生长pH为2.0,最适生长温度为30℃,经过对其生长特性进行研究及16S rRNA基因测序鉴定其为一株嗜酸氧化亚铁硫杆菌。利用XZ菌对西藏某低品位铜矿角闪岩矿进行了摇瓶浸出试验研究,结果表明,在接种量体积分数为10%,矿浆质量分数为10%,矿石粒度为-45 μm占100%,培养温度30℃,振荡强度160 r/min的浸出条件下,经过15 d, Cu<sup>2+</sup>的浸出率达72.15%。

**关 键 词:** 嗜酸氧化亚铁硫杆菌;菌种鉴定;16S rRNA;生物浸出;低品位铜矿

**中图分类号:** TD 925.5; Q 939 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-3026(2016)01-0089-05

## Identification and Bioleaching Capacity of an *Acidithiobacillus Ferrooxidans*

LU Tao<sup>1</sup>, WEI De-zhou<sup>1</sup>, ZHANG Rui-yang<sup>1</sup>, ZHUO Jian-ying<sup>2</sup>

(1. School of Resources & Civil Engineering, Northeastern University, Shenyang 110819, China; 2. Team 403 in Liaoning Provincial Bureau of Metallurgical & Geological Prospecting, Anshan 114018, China. Corresponding author: LU Tao, E-mail: lt\_heaven008@163.com)

**Abstract:** A bioleaching bacterium was isolated from an acidic mine drainage of Jiama polymetallic mine in Tibet and was named as XZ. The strain XZ, with round ends, is gram-negative and short-rod shaped in 1~1.5 μm × 0.5 μm. Ferrous iron and elemental sulfur could be oxidized by strain XZ. The optimum growth pH is 2.0 and the optimum growth temperature is 30℃. It was identified as *Acidithiobacillus ferrooxidans* by means of growth characteristic research and 16S rRNA sequencing. The strain XZ was used to leach a poor copper hornstone ore took from Tibet. Shaking flask leaching tests were carried out with inoculation size of 10% (volume fraction), pulp mass fraction of 10%, ore particle size of -45 μm accounting for 100%, leaching temperature of 30℃ and shaking intensity of 160 r/min. The results show that leaching rate of copper can reach 72.15% after 15 days.

**Key words:** *Acidithiobacillus ferrooxidans*; strain identification; 16S rRNA; bioleaching; poor copper ore

微生物浸出技术是一种利用微生物自身的生命活动直接从矿石中提取有价金属元素的方法。由于该过程具有流程短、操作简单、反应过程温和、环境友好的优点及浸出速度慢、浸出周期长的缺点,与传统选冶方法相比,特别适合于贫矿、废矿、表外矿及难采、难选、难冶矿石的综合利用<sup>[1]</sup>。

菌种本身是微生物浸出技术的核心,高效浸矿菌种的选育是该技术应用的关键。嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*,简称At.f菌),是一种嗜酸、化能自养、专性好氧的革兰氏阴性菌,其作为微生物浸出技术应用的主要菌种之一,一直以来都是各国科研工作者研究的重点<sup>[2-3]</sup>。不同来源的At.f菌,其浸矿能力存在明

收稿日期: 2014-11-10

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(N120601005);“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAB01B03)。

作者简介: 卢涛(1986-),男,山东淄博人,东北大学博士研究生;魏德洲(1956-),男,河南南阳人,东北大学教授,博士生导师。

显的差异,因此,研究不同地域、不同环境下的 *At. f* 菌的生物多样性和生态演替规律,对于高效浸矿菌种的选育具有重要意义<sup>[4]</sup>。

本文从西藏甲玛某多金属矿的矿坑水中分离提取了一株细菌,对其菌落和菌体的形貌特征及其生理特性进行了系统的研究,通过 16 S rRNA 基因测序鉴定其为一株 *At. f* 菌。运用分离得到的 *At. f* 菌对西藏某低品位铜矿角岩矿进行了摇瓶浸出试验研究,考察其对该铜矿的浸出性能。

## 1 试验材料和方法

### 1.1 菌种分离

菌种是从西藏甲玛某多金属矿的酸性矿坑水(pH=3.5)中分离获得,命名为 XZ 菌。分离过程为:取 5 mL 水样接种到 100 mL 9 K 液体培养基中,在 30 ℃ 条件下振荡培养至颜色变为红棕色,重复该接种和培养过程 5 次。取最后一轮的菌液,采用梯度稀释法在 9 K 固体培养基中涂布,然后置于 30 ℃ 生化培养箱中静置培养<sup>[2,5]</sup>。

### 1.2 培养基

液体培养基:选用 9 K 培养基,其配方为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.0 g/L, KCl 0.1 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  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,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  44.2 g/L<sup>[2]</sup>。其中,亚铁溶液采用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤除菌,基础盐溶液采用 121 ℃ 高温灭菌,冷却后混合,并用灭菌的 5 mol/L 硫酸溶液调节 pH=2.0。

固体培养基:其配制方法是在 9 K 液体培养基的基础上添加 1.5% 的琼脂糖作为凝固剂, pH=2.0<sup>[6]</sup>。琼脂糖在酸性条件下高温加热易水解,故需单独灭菌后再进行混合配制。

### 1.3 形态观察

离心收集培养至生长对数期的菌体,采用革兰氏染色方法对菌种进行染色处理,然后在生物显微镜( $\times 1000$ ,油镜)下观察菌种形态。另外,将收集到的菌体经过固定—脱水—置换—临界点干燥—离子溅射喷金等一系列特殊方法制样后,在扫描电镜下观察菌种的微观形貌。

### 1.4 16 S rRNA 扩增、测序及分析

将纯化后培养的菌液放入离心机中,2500 r/min 转速下离心 10 min 以除去菌液中的沉淀杂质,然后进行菌体收集、基因组 DNA 的提取、16 S rRNA 扩增、基因测序及分析<sup>[7-8]</sup>。该项工作内容委托中国科学院沈阳应用生态研究所完成。

### 1.5 亚铁氧化活性研究

对亚铁的氧化能力是菌种活性的重要表现。在 250 mL 锥形瓶中加入 9 K 液体培养基 90 mL,接种对数期菌液 10 mL,在 30 ℃ 恒温振荡器中培养,振荡强度为 160 r/min。培养过程中定期取样,采用重铬酸钾滴定法测量培养液中  $\text{Fe}^{2+}$  的浓度,具体方法为:取 1 mL 菌液,加入 10 mL 硫磷混酸( $V(\text{H}_2\text{SO}_4):V(\text{H}_3\text{PO}_4):V(\text{H}_2\text{O})=15:15:70$ ),以 2 g/L 二苯胺磺酸钠为指示剂,用 1.7559 g/L 重铬酸钾标准溶液进行滴定。

$\text{Fe}^{2+}$  氧化率根据式(1)计算得到,其中,  $c_0$  和  $c$  分别为  $\text{Fe}^{2+}$  初始浓度和实时测量浓度。以培养时间为横轴,以  $\text{Fe}^{2+}$  氧化率为纵轴作图,即为细菌的亚铁氧化率曲线图。

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 氧化率} = \frac{c_0 - c}{c_0} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.6 硫氧化活性研究

菌种硫氧化活性测定采用的培养基是在无铁 9 K 培养基中加入 0.5 g/L 硫磺(CP),接种和培养条件与亚铁氧化活性测定试验相同。定期测定菌液的 pH 值来表征该菌种的硫氧化活性。

### 1.7 浸矿试验

试验用矿样为西藏甲玛地区某铜矿角岩矿,铜品位较低,仅为 0.12%。矿石中的金属矿物主要为黄铁矿、辉铜矿、斑铜矿以及少量的黄铜矿和毒砂;脉石矿物主要为石英、钠长石等。矿石中的铜矿物含量较低,呈微粒嵌布,颗粒尺寸约为 0.01 ~ 0.001 mm,呈分散状充填于脉石矿物中。

矿石经破碎、研磨后使得粒级控制在 -45  $\mu\text{m}$  占 100%,用于摇瓶浸出试验。试验条件为:250 mL 锥形瓶中加入 9 K 培养基 90 mL,接种对数期菌液 10 mL,矿浆质量分数为 10%,振荡强度为 160 r/min,培养温度为 30 ℃。

试验过程中定期取样,采用 ICP-MS 电感耦合等离子体质谱仪测定  $\text{Cu}^{2+}$  的浓度,采用赛多利斯 PB-10 酸度计测量浸出环境的 pH 值。蒸发水用去离子水补充。

## 2 试验结果与讨论

### 2.1 菌种形态观察

XZ 菌接种到 9 K 液体培养基中,随着培养时间的延长,培养液的颜色依次经历了“浅绿—浅黄—橙黄—橙红—深红—红棕”的变化过程,这是由于细菌在生命活动中不断将  $\text{Fe}^{2+}$  氧化为  $\text{Fe}^{3+}$ ,以获得生命所需的能量。继续培养时会逐渐

有大量黄色沉淀生成,沉淀经 XRD 鉴定为黄铵铁矾和黄钾铁矾的混合物,是溶液中高浓度的  $\text{Fe}^{3+}$  在酸性条件下水解生成的产物.

XZ 菌在 9 K 固体培养基上生长十分缓慢. 在  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  生化培养箱中培养 20 d 后,XZ 菌在固体培养基上生长形成了小而凸的圆形单菌落,直径  $1\sim1.5\text{ mm}$ ,具有不规则的边缘,呈棕黄色(见图 1).

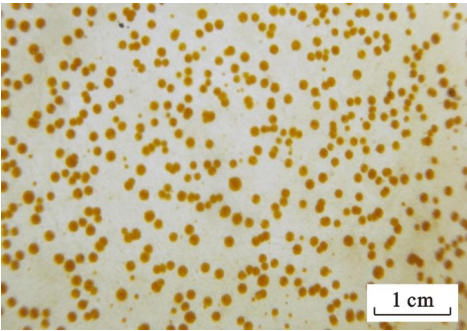


图 1 XZ 菌的菌落形态  
Fig. 1 The colonial morphology of strain XZ

XZ 菌的菌体经革兰氏染色后呈红色,表明该菌属于革兰氏阴性菌;菌体形态单一,呈短杆状,长短略有差别,单生、对生均有(见图 2). 从 XZ 菌的 SEM 照片(图 3)中可以看出菌体长度约为  $1\sim1.5\text{ }\mu\text{m}$ ,直径约  $0.5\text{ }\mu\text{m}$ ,两端钝圆.

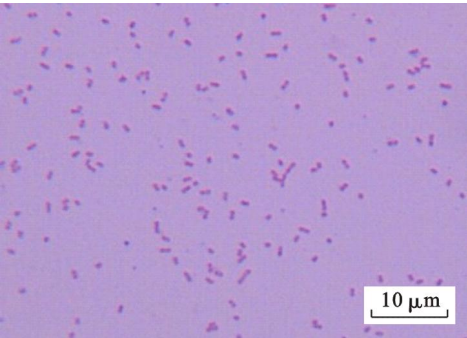


图 2 XZ 菌生物显微镜下形态  
Fig. 2 Morphology of strain XZ under biomicroscope

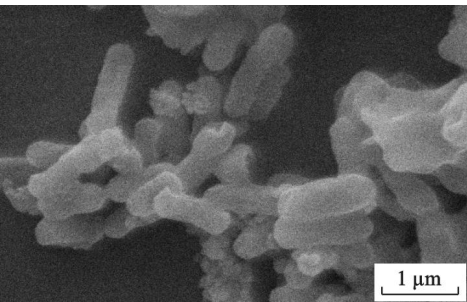


图 3 XZ 菌的 SEM 照片  
Fig. 3 The SEM picture of strain XZ

2.2 菌种生长的理化特性研究

通过对 XZ 菌生长的理化性质研究发现,该菌的最适宜生长温度为  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,最适宜生长 pH 值为 2.0,能够以  $\text{Fe}^{2+}$ ,黄铁矿( $\text{FeS}_2$ ), $\text{S}^0$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  作为能源物质生长,在单纯的葡萄糖培养基中无法生长. XZ 菌生长的具体理化性质见表 1.

表 1 XZ 菌生长的理化特征  
Table 1 Physiological and biochemical feature of strain XZ

序号	理化特征	表现
1	革兰氏染色	G -
2	运动性	+
3	氧化 $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{FeS}_2$	+
4	氧化 $\text{S}^0$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	+
5	异养生长(葡萄糖)	-
6	严格好氧	+
7	最适生长温度/ $^{\circ}\text{C}$	30
8	最适生长 pH 值	2.0

2.3 16 S rRNA 序列分析及系统发育树

从培养收集到的 XZ 菌体中提取基因组,采用 PCR 技术扩增出 16 S rRNA,然后进行克隆和测序,将 XZ 菌的 16 S rRNA 序列与 GenBank 中已知序列进行比对,结果表明,其与嗜酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)的多个 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 菌株的序列相似性均达到 99% 以上(见图 4). 鉴定结果表明,XZ 菌是一株生活在西藏高寒地区的 *At. f* 菌株. 该菌株的分离为研究 *At. f* 菌物种和地域分布的多样性提供了新的资料,对浸矿细菌的遗传分类学研究具有一定的意义.

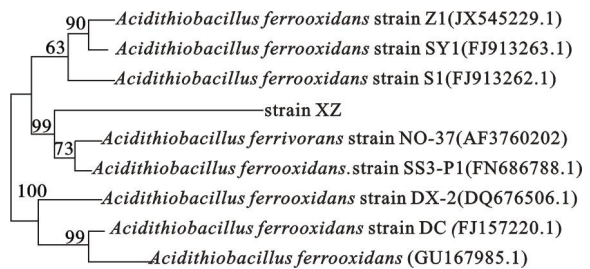
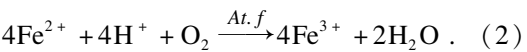


图 4 XZ 菌的 16S rRNA 序列系统发育树  
Fig. 4 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA sequence of strain XZ

2.4 亚铁氧化活性研究

*At. f* 菌能够以  $\text{Fe}^{2+}$  为能源物质,在生长过程中通过将  $\text{Fe}^{2+}$  氧化成  $\text{Fe}^{3+}$  来获得生长所需的能量<sup>[9]</sup>,其氧化机理如式(2)所示.





从图 5 中可以看出,从酸性矿坑水中提取的未经活化的细菌对  $\text{Fe}^{2+}$  的氧化活性较差,培养过程中完全氧化 9 K 液体培养基中的  $\text{Fe}^{2+}$  需要 100 h. 而分离纯化后,经过连续五代的活化培养后,只需 50 h 即可将培养基中的  $\text{Fe}^{2+}$  完全氧化,氧化活性得到显著的提高. 从图 5 中还可以看出,培养前期,细菌生长存在一定的停滞期,随着培养时间的增长,细菌逐渐适应了环境而加快增殖的速度,使得培养液中的菌体浓度指数级迅速增大,从而使  $\text{Fe}^{2+}$  的氧化率也随之呈指数级增长.

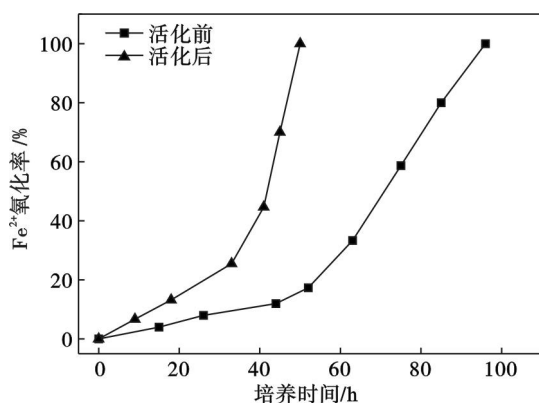
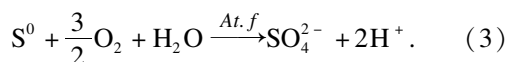


图 5 XZ 菌的亚铁氧化率曲线

Fig. 5 Ferrous ion oxidation rate curves of strain XZ

## 2.5 硫氧化活性研究

*At. f* 菌能够以单质硫为能源物质,在生长过程中通过将单质硫氧化成硫酸来获得生长所需的能量,并使得培养基的 pH 值不断降低<sup>[9]</sup>,其氧化机理如式(3)所示.



从图 6 中看出, XZ 菌氧化单质硫的过程比氧化亚铁时间长很多,且活化培养能够明显提高 XZ 菌的硫氧化活性. 原始菌在接种后的 0~3 d

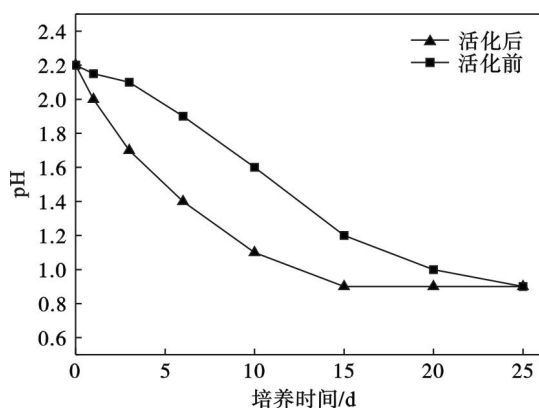


图 6 XZ 菌的硫氧化过程中 pH 变化曲线

Fig. 6 Variation of pH value in sulfur oxidation process of strain XZ

对单质硫的氧化速度缓慢,细菌处于生长延滞期;在 3~20 d 时,细菌逐渐适应环境,开始迅速生长,氧化速率快速提高,溶液 pH 值快速下降到 1.0;20 d 后随着单质硫的逐渐氧化完全, pH 值逐渐恒定. 活化后的 XZ 菌在接种后几乎没有延滞期,单质硫迅速被氧化,溶液 pH 值在 15 d 时迅速下降到 1.0,表现出较强的硫氧化活性.

## 2.6 浸矿试验

从图 7 中可以看出,摇瓶浸矿体系下,在浸出初始阶段,  $\text{Cu}^{2+}$  的浸出速度较快,这是由于矿样经破碎研磨后,大量含铜矿物的晶格暴露在固体颗粒外表面,与细菌接触充分,有利于  $\text{Cu}^{2+}$  的氧化浸出;随着浸出过程的进行,暴露的铜矿物晶格减少,加之  $\text{Fe}^{3+}$  水解产生的铁矾沉淀的罩盖作用影响,使得细菌与矿物的氧化作用不能顺利进行,  $\text{Cu}^{2+}$  的浸出速率逐渐降低<sup>[10]</sup>. 浸出 15 d 时,  $\text{Cu}^{2+}$  的浸出率可达 72.15%,表明分离得到的 XZ 菌对该低品位铜矿具有较强的浸出作用.

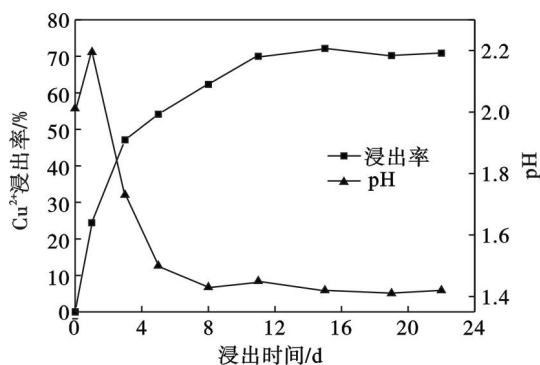


图 7  $\text{Cu}^{2+}$  的浸出率及 pH 变化曲线

Fig. 7 Variation curves of copper ion leaching rate and pH value

从图 7 中还可以看出,在浸出初始阶段,随着矿样的加入,浸液的 pH 值有所升高,这是矿样中含有一定量的氧化矿物消耗酸所致. 随着时间的延长,浸矿细菌不断增殖,对矿石中的黄铁矿、辉铜矿、斑铜矿和黄铜矿等硫化矿物的生物氧化作用逐渐增强,细菌的氧化作用和  $\text{Fe}^{3+}$  的水解作用产酸,导致浸出体系中的 pH 值不断降低.

## 3 结 论

1) 从西藏甲玛某多金属矿的酸性矿坑水中分离得到一株细菌 XZ,为革兰氏阴性菌,短杆状,菌体长约 1~1.5  $\mu\text{m}$ ,直径约 0.5  $\mu\text{m}$ ,根据其形貌特征、理化特性及 16S rRNA 测序鉴定其为一株嗜酸氧化亚铁硫杆菌.

2) 对 XZ 菌进行了亚铁和单质硫的氧化活

性测试,结果表明,该菌在接种到 9 K 液体培养基中,接种量(体积分数)为 10%,经过 50 h 即可将  $\text{Fe}^{2+}$  氧化完全,具有较强的亚铁氧化活性;相比而言,XZ 菌对单质硫的氧化要慢得多,但依然表现出较强的硫氧化活性。

3) 利用获得的 XZ 菌对西藏某低品位铜矿角闪岩矿进行了摇瓶浸出试验。在接种量(体积分数)为 10%,矿浆质量分数为 10%,矿石粒度为  $-45\text{ }\mu\text{m}$  占 100%,培养温度  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,振荡强度 160 r/min 的条件下,浸出 15 d,  $\text{Cu}^{2+}$  浸出率达 72.15%,表明 XZ 菌对该矿具有较强的浸出能力。

#### 参考文献:

- [1] Brierley J A, Brierley C L. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy [J]. *Hydrometallurgy*, 2001, 59: 233 – 239.
- [2] 魏德洲,朱一民,李晓安. 生物技术在矿物加工中的应用 [M]. 北京:冶金工业出版社,2008:56 – 57.  
(Wei De-zhou, Zhu Yi-min, Li Xiao-an. Application of biotechnology in minerals engineering [M]. Beijing: Metallurgical Industry Press, 2008: 56 – 57.)
- [3] Yang S R, Xie J Y, Qiu G Z, et al. Research and application of bioleaching and biooxidation technologies in China [J]. *Minerals Engineering*, 2002, 15: 361 – 363.
- [4] Kelly D P, Wood A P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 511 – 516.
- [5] Olson G J, Brierley J A, Brierley C L. Bioleaching review part B. progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2003, 63: 249 – 257.
- [6] 张在海,邱冠周,胡岳华,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 – 23.  
(Zhang Zai-hai, Qiu Guan-zhou, Hu Yue-hua, et al. The investigation of the colony isolation of *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. *Multipurpose Utilization of Mineral Resources*, 2001(1): 19 – 23.)
- [7] Peng H, Yang Y, Li X, et al. Sturcture analysis of 16S rRNA sequences of strains from *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 39(2): 178 – 182.
- [8] 杨宇,万民熙,彭宏,等. 一株黄铜矿专属浸出细菌的分离与鉴定 [J]. 中南大学学报(自然科学版), 2007, 38(4): 639 – 645.  
(Yang Yu, Wan Min-xi, Peng Hong, et al. Isolation and characterization of bacterium for chalcopyrite bioleaching [J]. *Journal of Central South University (Natural Science)*, 2007, 38(4): 639 – 645.)
- [9] Rawlings D E. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates [J]. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4: 13.
- [10] Xia J L, Peng A A, He H, et al. A new strain *Acidithiobacillus albertensis* BY – 05 for bioleaching of metal sulfides ores [J]. *Transactions of Nonferrous Metal Society of China*, 2007, 17(1): 168 – 175.

(上接第 83 页)

#### 参考文献:

- [1] Lemieux M J. Moving cone optimizing algorithm [C]// Computer Methods for the 80's in the Mineral Industry. New York, 1979: 329 – 345.
- [2] Lerchs H, Grossmann I. Optimum design of open-pit mines [J]. *Canadian Institute of Mining, Metallurgy and Petroleum Bulletin*, 1965, 58(1): 17 – 24.
- [3] Meyer M. Applying linear programmings to the design of ultimate pit limits [J]. *Management Science*, 1969, 16(2): 121 – 135.
- [4] Jalali S E, Ataee-Pour M, Shahriar K. Pit limits optimization using a stochastic process [J]. *Canadian Institute of Mining Magazine*, 2006, 1(6): 90 – 94.
- [5] 黄勇,胡庆雄,赵兴宽. 多种因素变化的露天矿境界优化 [J]. 金属矿山, 2011(12): 35 – 38.  
(Huang Yong, Hu Qing-xiong, Zhao Xing-kuan. Open pit optimization with various changeable factors [J]. *Metal Mine*, 2011(12): 35 – 38.)
- [6] Latorre E, Golosinski T S. Definition of economic limits taking into consideration time value of money [J]. *CIM Journal*, 2011, 2(3): 162 – 170.
- [7] 汪朝,赵勇,贾明涛,等. 正交试验在露天矿境界优化参数选取中的应用 [J]. 中国钼业, 2011, 35(4): 22 – 25.  
(Wang Zhao, Zhao Yong, Jia Ming-tao, et al. Application for parameter selection of pit optimization in orthogonal experiments [J]. *China Molybdenum Industry*, 2011, 35(4): 22 – 25.)
- [8] Frimpong S, Asa E, Szymanski J. Intelligent modeling: advances in open pit mine design and optimization research [J]. *International Journal of Surface Mining, Reclamation and Environment*, 2002, 16(2): 134 – 143.
- [9] 杨彪,罗周全,陆广,等. 基于经济时间序列预测的露天矿开采境界动态优化 [J]. 煤炭学报, 2011, 36(1): 29 – 33.  
(Yang Biao, Luo Zhou-quan, Lu Guang, et al. Open pit mining limit dynamic optimization based on economic time series forecasting [J]. *Journal of China Coal Society*, 2011, 36(1): 29 – 33.)
- [10] Akbari A D, Osanloo M, Shirazi M A. Ultimate pit limit determination through minimizing risk costs associated with price uncertainty [J]. *Gospodarka Surowcami Mineralnymi Mineral Resources Management*, 2008, 24(4): 157 – 170.