

研究报告

嗜中高温嗜酸古菌 *Ferroplasma thermophilum* 的培养条件优化

周洪波^{1,2}, 彭娟花², 张瑞永², 陈晨², 张汝兵², 顾帼华^{1,2}, 邱冠周^{1,2}

1 生物冶金教育部重点实验室, 长沙 410083

2 中南大学资源加工与生物工程学院, 长沙 410083

摘要: 在中高温和较低 pH 条件下, *Ferroplasma* spp. 是进行硫化矿生物浸出的重要微生物。*Ferroplasma* spp. 为古菌, 无细胞壁, 对矿浆浓度、搅拌剪切力以及溶液中的重金属离子等敏感, 很难得到高密度的纯培养, 给大规模的工业应用带来了一定难度。研究了 *F. thermophilum* 摇瓶培养时的最佳生长条件, 单因素考察结果表明最适培条件为: 温度 50°C, 初始 pH 0.5, 250 mL 的摇瓶装液量为 50 mL, 无机氮源(NH₄)₂SO₄。通过正交试验确定了 FeSO₄·7H₂O、酵母粉和蛋白胨最适组合为 FeSO₄·7H₂O 40 g/L, 酵母粉 0.3 g/L, 蛋白胨 0.2 g/L。优化培养后, *F. thermophilum* 浓度达到了 6.3×10⁷ 个/mL, 40 g/L 的 FeSO₄·7H₂O 在 72 h 内全部氧化完全。该结果可为该类古菌的扩大培养以及工业应用提供参考。

关键词: 生物浸矿, *Ferroplasma*, 古菌, 培养, 优化

Optimization of Culture Condition of a Moderately Thermophilic Acidophilic *Ferroplasma thermophilum*

Hongbo Zhou^{1,2}, Juanhua Peng², Ruiyong Zhang², Chen Chen², Rubing Zhang², Guohua Gu^{1,2}, and Guanzhou Qiu^{1,2}

1 Key Laboratory of Biometallurgy, Ministry of Education, Changsha 410083, China

2 School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China

Abstract: The extreme microorganisms *Ferroplasma* spp., play an important role in bioleaching of sulphide ores at low pH value and temperatures around 50°C. Without cell wall, *Ferroplasma* spp. is sensitive to pulp density, shearing force and heavy metal ions. Thus it is difficult to obtain their high cell density cultures, which limits the large-scale industrial application. In this paper, the optimum culture conditions of *Ferroplasma thermophilum* were studied by shaking culture. The results showed that the optimum culture conditions are as follows: 50°C, initial pH 0.5, 50 mL working volume in 250 mL shaking-flask, inorganic nitrogen source (NH₄)₂SO₄. The optimum combination of FeSO₄·7H₂O, yeast extract and peptone was determined by orthogonal experiments, including FeSO₄·7H₂O 40 g/L, yeast extract 0.3 g/L, peptone 0.2 g/L. Under the optimum culture conditions, the cell density was up to 6.3×10⁷ cell/mL, and the oxidation of 40 g/L ferrous sulfate heptahydrate was finished in less than 72 hours. The results might

Received: January 15, 2008; **Accepted:** March 12, 2008

Supported by: the National Basic Research Program of China (No. 2004CB619204), the National Nature Science Foundation of China (No. 40646029), the Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-06-0691), and the China Ocean Mineral Resources Research and Development Association (No. DYXM-115-02-2-07).

Corresponding author: Hongbo Zhou. Tel: +86-731-8877216; Fax: +86-731-8710804; E-mail: zhouhb@mail.csu.edu.cn

国家重点基础研究项目(973)(No. 2004CB619204), 国家自然科学基金(No. 40646029), 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NECT-06-0691)和大洋协会课题(No. DYXM-115-02-2-07)资助。

provide information for scale-up of archaeon culture as well as its industrial application.

Keywords: bioleaching, archaeon, *Ferroplasma* spp., culture, optimization

原来一直认为常温菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 是生物冶金环境中分布最广、作用最大的微生物^[1,2], 近来的研究发现中等嗜热细菌包括 *Leptospirillum* spp.、*Acidithiobacillus caldus*、*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 等^[3-6], 也是浸矿环境中广泛存在的微生物。Demergasso 和 Golyshina 等研究发现在较低 pH 条件下, *Ferroplasma* spp. 在硫化矿的生物浸出系统中占据重要地位, 具有重要的应用前景^[7-11]。*Ferroplasma* spp. 是中度嗜热古菌, 无细胞壁, 呈球形, 无鞭毛, 不能运动, 只能利用亚铁, 不能氧化硫。它具有特殊的细胞膜结构, 有较低的质子渗透性, 能够耐受较高的温度、较低的 pH 及较高的重金属离子浓度。据文献报道, 已分离并鉴定 *Ferroplasma* spp. 的菌种有三种, *F. acidiphilum*^[12]、*F. acidarmanus*^[13]和 *F. cupricumulans*^[14], 本实验室成功分离出第四种, 命名为 *F. thermophilum*(另文发表)。

由于人们对于古菌生长特性了解很少, 分离和纯化培养古菌所需的温度、pH、盐度、碳源、底物离子种类和强度等条件都在摸索之中^[15]。因为没有细胞壁, *Ferroplasma* spp. 对矿浆浓度、搅拌剪切力以及溶液中的重金属离子等较为敏感, 很难得到高密度的纯培养, 给大规模的工业应用带来了一定的难度。本实验研究了 *F. thermophilum* 摇瓶培养的最佳生长条件, 以期为该类古菌的扩大培养以及工业应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

菌种: *F. thermophilum* 由本实验室从反应器分离获得, 是一株中等嗜热嗜酸古菌, 经鉴定为 *Ferroplasma* spp. 的一个新种, 命名为 *F. thermophilum*。

培养基: 培养基参照 Dopson 报道改良^[16], 命名为 Fer 培养基, 由基本盐、30 g/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 0.2 g/L 的酵母粉组成。

基本盐组成: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, KCl 0.1 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, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 11.0 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg/L,

Na_2SO_4 0.5 mg/L, H_3BO_3 2.0 mg/L, MnSO_4 2.0 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.6 mg/L。培养基用 30% H_2SO_4 调整培养基的 pH 为 1.0。121°C 灭菌 30 min。 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 过滤除菌后加入到已灭菌的培养基中。

实验中所用的试剂均为分析纯。

主要仪器: ZHWY-2102 型双层大容量全温摇床, PHS-25 型酸度计, CX-31 型 OLYMPUS 生物显微镜。

1.2 实验条件

实验在 ZHWY-2102 型双层大容量全温摇床中进行。除特殊说明外, 培养条件均为: 50°C, 初始 pH 1.0, 250 mL 的摇瓶装液量 100 mL, 摇床转速 170 r/min, 接种后初始菌浓度 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个/mL。

1.3 分析方法

1.3.1 菌浓度的测定

每个样品培养 72 h 后, 用血球计数板计数, 每个样品做 3 次平行试验。

1.3.2 pH 值的测定

采用 PHS-25 型酸度计测定。

1.3.3 Fe^{2+} 浓度的滴定

每 12 h 取待测样品 1 mL, 按照参考文献[17]方法测定 Fe^{2+} 浓度。每个样品做 3 次平行试验。

Fe^{2+} 的氧化率按下式计算:

$$E = (C_0 - C_t) / C_0 \times 100 \%$$

式中: C_0 为 Fe^{2+} 的初始浓度(g/L), C_t 为 t 时 Fe^{2+} 的浓度(g/L), E 为 Fe^{2+} 的氧化率(%)。

2 结果和讨论

2.1 不同培养温度对 *F. thermophilum* 生长影响

F. thermophilum 接种到 Fer 液体培养基中, 分别置于 30°C、40°C、45°C、50°C、55°C 和 60°C 培养。由图 1 可见, 30°C 时, *F. thermophilum* 几乎不氧化 Fe^{2+} , 菌基本不生长; 增加培养温度, Fe^{2+} 氧化速度和菌浓度增加, 50°C 时, Fe^{2+} 氧化速度最快, 达 0.004 g/L/h, 菌浓度达最大值, 为 4.21×10^7 个/mL, 约为 30°C 培养时的菌浓度的 2.3 倍。高于 50°C, Fe^{2+} 的氧化速率和菌浓度明显呈下降趋势。由此可知, *F. thermophilum* 的最适温度为 50°C, 与 *F. cupricumulans*^[14] 的最适温度相近。

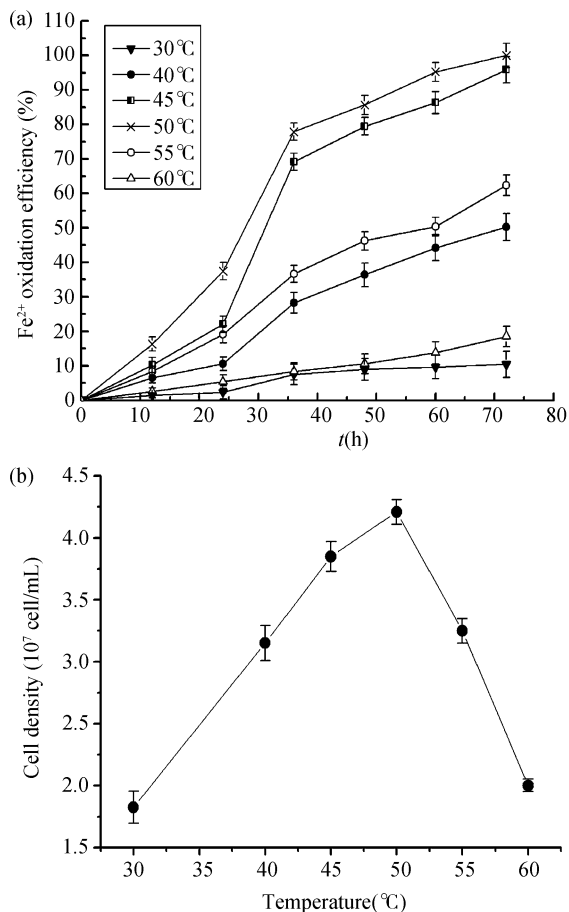


图1 不同培养温度对 *F. thermophilum* 氧化亚铁(a)及生长(b)的影响

Fig. 1 Effects of temperatures on ferrous oxidation (a) and the growth (b) of *F. thermophilum*

由于古菌细胞膜上有四醚成分, 四醚能形成大小和双分子层相同的单分子层, 避免了双层膜在高温下易变性分开的情况^[18], 因此 *F. thermophilum* 有较大范围的适宜生长温度(30°C~60°C), 适合温度变化较大的生物堆浸工艺。

2.2 初始 pH 对 *F. thermophilum* 生长的影响

用稀硫酸将 Fer 液体培养基调至不同 pH 值, 分别为 0.2、0.5、1.0、1.5 和 5.0 培养, 结果见图 2。在本实验中该菌亚铁氧化和生长的最适 pH 为 0.5, 当经过 72 h 达到稳定期时, 其菌浓度也最高, 为 4.5×10^7 个/mL, pH 大于 0.5, 菌浓度呈下降趋势。Jennifer L 等^[19]推测该菌的高度耐酸性也与其细胞膜中四乙醚单分子层有关。

由于 *F. thermophilum* 能耐受较低的 pH 值, 对温度也有较大的适应范围, 因此在较低 pH 条件下进行生物浸出的重要物种资源, 有很广阔的工业应用前景。

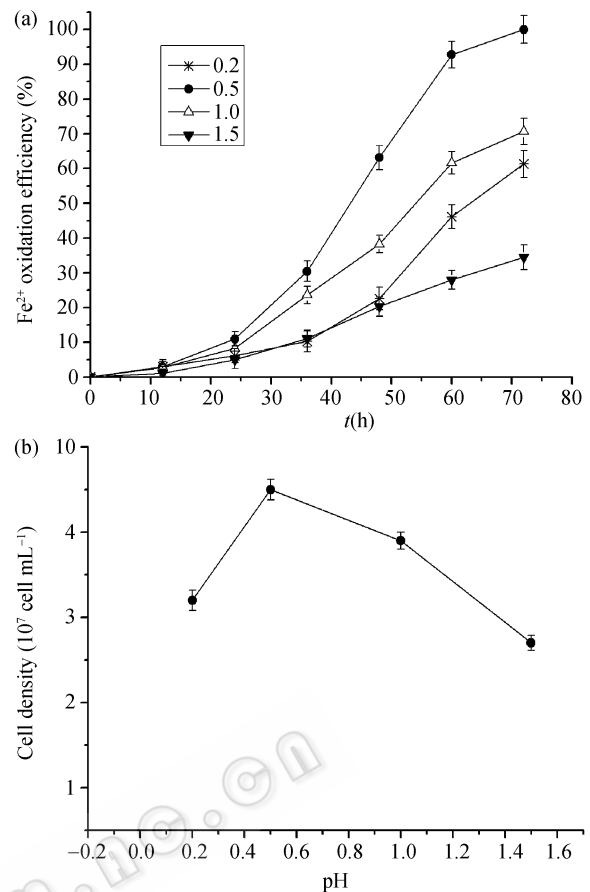


图2 不同初始 pH 对 *F. thermophilum* 氧化亚铁(a)及生长(b)的影响

Fig. 2 Effects of initial pH on ferrous oxidation (a) and the growth (b) of *F. thermophilum*

2.3 不同装液量对 *F. thermophilum* 生长的影响

250 mL 的摇瓶中, 装液量分别为 50、100 和 150 mL, 调 pH 0.5, 培养温度为 50°C, 培养 72 h 菌体浓度分别为 4.478×10^7 、 3.2×10^7 、 2.5×10^7 个/mL, Fe²⁺氧化率分别为 100%、56.23%、40.23%。当摇瓶装液量为 50 mL 时, 菌浓度最高, Fe²⁺氧化速度最快。溶氧量的不足常常是限制好氧微生物生长的一个重要因素。摇床转速相同条件下, 摇瓶装液量越少, 溶氧浓度越高, 有利于好氧菌 *F. thermophilum* 生长。

2.4 不同无机氮源对 *F. thermophilum* 生长的影响

在加入相同量酵母粉的前提下, 分析了不同的无机氮源对 *F. thermophilum* 氧化亚铁及生长的影响。加入相同质量氮源的前提下, 将 Fer 培养基中的 (NH₄)₂SO₄ 用的其它形式的无机氮源替换, 即 3 g/L (NH₄)₂SO₄, 1.8172 g/L NH₄NO₃, 3 g/L (NH₄)₂HPO₄ 和 3.8591 g/L NaNO₃, 培养条件均为: 50°C, 初始 pH 为

0.5, 250 mL 的摇瓶装液量为 50 mL。结果如图 4 所示, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 比其它三种形式的无机氮源对菌体氧化亚铁和生长的效果更好, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 稍差, NH_4NO_3 次之, NaNO_3 最差。

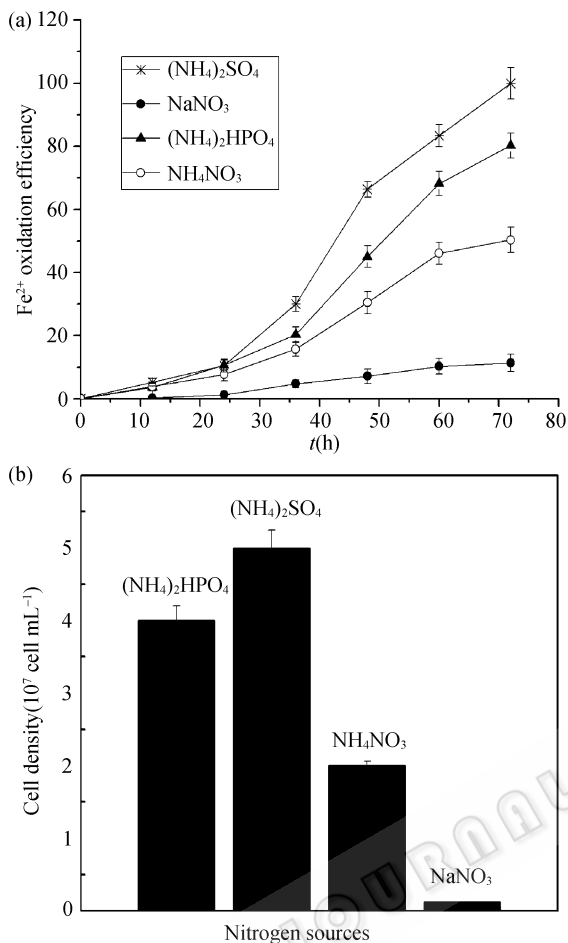


图 3 不同的无机氮源对 *F. thermophilum* 氧化亚铁(a)及生长(b)的影响

Fig. 3 Effect of inorganic nitrogen sources on ferrous oxidation (a) and the growth (b) of *F. thermophilum*

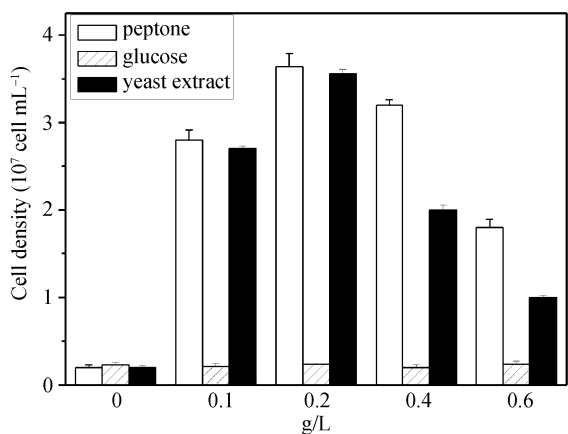


图 4 不同的有机物对 *F. thermophilum* 生长影响

Fig. 4 Effects of different organic substance on the growth of *F. thermophilum*

2.5 不同有机物对 *F. thermophilum* 生长影响

研究了在培养基中加入不同浓度蛋白胨、葡萄糖和酵母粉对 *F. thermophilum* 生长的影响。从图 5 可以看出, 当不加有机物时, *F. thermophilum* 几乎不能生长; 葡萄糖不能促进生长, 而蛋白胨和酵母粉却能在 0.1~0.6 g/L 时有明显促进作用, 尤其当酵母粉浓度为 0.1~0.2 g/L 或当蛋白胨浓度为 0.2~0.4 g/L 左右时促进作用最为明显, 这说明蛋白胨或酵母粉中可能含有某种 *F. thermophilum* 的生长所必需的成分, 国外文献有类似报道^[12]。

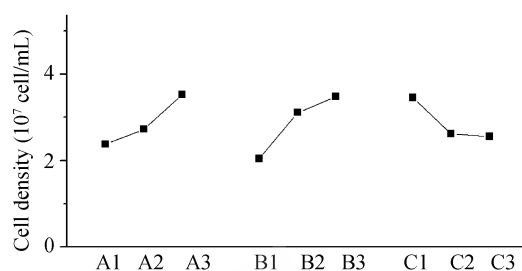


图 5 正交试验结果分析

Fig. 5 Analysis of the orthogonal experiment results

A: ferrous sulfate heptahydrate, g/L; B: yeast extract, g/L; C: peptone, g/L

2.6 培养条件正交实验优化

通过上述单因素实验得出, 最佳的温度、pH、250 mL 摇瓶装液量分别为 50°C, pH 0.5, 50 mL, 基本培养基中无机氮源以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为最佳, 酵母粉浓度为 0.1~0.2 g/L 或当蛋白胨浓度为 0.2~0.4 g/L 左右时显著促进生长。为进一步优化培养条件, 考察了 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、酵母粉和蛋白胨最佳用量。

实验采用三因素三水平的正交实验, 见表 1。对实验数据进行了极差分析和方差分析, 结果如表 1、图 5 和表 2。从表 1 的极差结果分析得知, 酵母粉对 *F. thermophilum* 生长影响最大, 其次为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和蛋白胨。极差分析得, 主次因素为 $\text{RB} > \text{RA} > \text{RC}$, 最优组合 $\text{A}_3\text{B}_3\text{C}_1$, 即 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 g/L, 酵母粉 0.3 g/L, 蛋白胨 0.2 g/L。由图 6 可知: 当 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度从 20 g/L 增加到 40 g/L 时, 菌体浓度依次增加, 因此继续适度提高 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度可进一步提高 *F. thermophilum* 的浓度。从图 6 的结果可知, 当酵母粉的浓度从 0.1 g/L 增加到 0.3 g/L, 菌浓度依次升高, 似乎增加酵母粉用量能继续增加菌体浓度, 而从图 5 的结果来看, 当酵母粉的加入量达到 0.4 g/L 时, 菌浓度反而降低了, 因此酵母粉最适宜的加入量为 0.3 g/L; 同样可以分析得出蛋白胨的最适加入量为 0.2 g/L。

表 1 正交试验结果
Table 1 Orthogonal experiment results

Experiment No.	Factor			Target
	A(Ferrous sulfate heptahydrate)/(g/L)	B(yeast extract)/(g/L)	C(peptone)/(g/L)	Cell density/(10 ⁷ cell/mL)
1	20	0.1	0.2	2.016
2	20	0.2	0.3	2.457
3	20	0.3	0.4	2.657
4	30	0.1	0.3	1.633
5	30	0.2	0.4	2.533
6	30	0.3	0.2	4.00
7	40	0.1	0.4	2.467
8	40	0.2	0.2	4.34
9	40	0.3	0.3	3.77
Result analysis				
	7.13	6.116	10.356	
	8.166	9.33	7.86	
	10.577	10.427	7.657	
K1	2.377	2.039	3.452	
K2	2.722	3.11	2.62	
K3	3.526	3.476	2.552	
R	1.149	1.437	0.9	

由表 2 得知, 当取显著性水平 $\alpha=0.05$, 查表得 $F_{0.05}(2, 2)=19$, 而 FA、FB 和 FC 均大于 19, 故三因素均有显著性影响, 其中酵母粉浓度对 *F. thermophilum* 的影响最为显著, 因此试验过程中要严格控制加入量。

2.7 优化培养条件下 *F. thermophilum* 的氧化 Fe²⁺ 及生长曲线

F. thermophilum 在 1.3 设定的培养条件下, 由图 1 可知, 菌浓度仅约为 4.0×10^7 个/mL, 需 72 h 才氧化完 30 g/L 的 FeSO₄ · 7H₂O。 *F. thermophilum* 在最适的条件(即: 培养温度 50°C, 初始 pH 为 0.5, 250 mL 的摇瓶装液量为 100 mL, 无机氮源为 (NH₄)₂SO₄, FeSO₄ · 7H₂O 40 g/L, 酵母粉 0.3 g/L, 蛋白胨 0.2 g/L) 培养时, 结果如图 6。 *F. thermophilum* 24 h 后进入

表 2 正交试验结果的方差分析

Table 2 Variance analysis of orthogonal experiment

Variance	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F value
Factor A	2.08542	2	1.04271	34.1639
Factor B	3.34656	2	1.67328	54.82425
Factor C	1.50594	2	0.75297	24.670716
Random error	0.0610416	2		
Summation	6.99897	8		

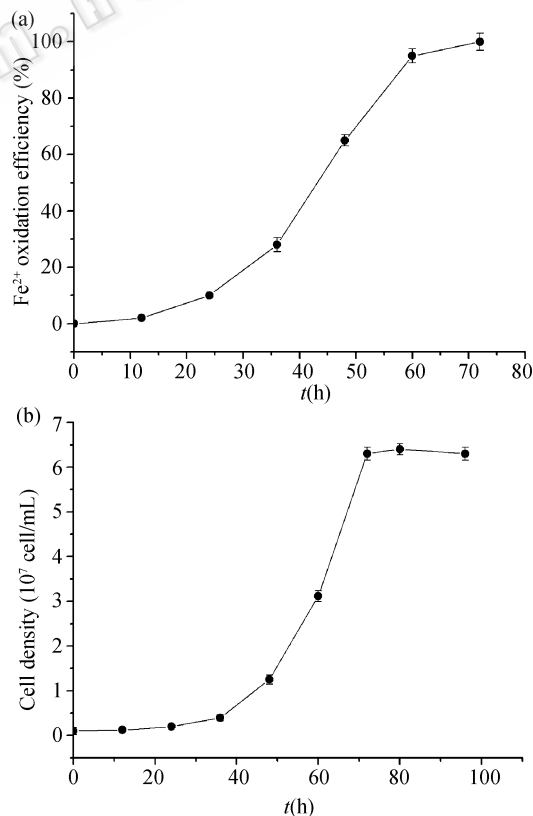


图 6 *F. thermophilum* 的氧化亚铁(a)及生长(b)的影响
Fig. 6 Ferrous iron oxidation curve (a) and growth curve (b) of *F. thermophilum*

对数期,最大生长速率为 0.104 h^{-1} ,平均代时为 6.56 h,约 72 h 进入了稳定期。优化培养后的菌浓度达 6.3×10^7 个/mL,增加了约 50%, Fe^{2+} 氧化速率也大大提高,40 g/L 的 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在 60 h 就已经被氧化了 90%,72 h 内全部氧化完全。

3 结论

(1)单因素实验结果表明:摇瓶培养中,*F. thermophilum* 最适温度为 50°C ,最佳初始 pH 值 0.5,250 mL 摇瓶中最适装液量 50 mL,最适无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,适宜添加的有机物为酵母粉和蛋白胨。

(2)正交试验结果表明: $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、酵母粉和蛋白胨的加入量对 *F. thermophilum* 均有显著影响,其中酵母粉浓度的影响最为显著。三者组合最适的加入量为: $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 g/L,酵母粉 0.3 g/L,蛋白胨 0.2 g/L。

REFERENCES

- [1] Temple KL, Colmer AR. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 1951, **62**(5): 605–611.
- [2] Rawlings DE. Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology*, 2002, **56**: 65–91.
- [3] Wulf-durand DP, Bryant LJ, Sly LI. PCR-mediated detection of acidophilic, bioleaching-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(7): 2944–2948.
- [4] Vasquez M, Espejo RT. Chemolithotrophic bacteria in copper ores leached at high sulfuric acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(1): 332–334.
- [5] Olson GJ, Brierley JA, Brierley CL. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial progresses by the minerals industries. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **63**(3): 249–257.
- [6] Wu CB, Zeng WM, Zhou HB. Bioleaching of chalcopyrite by mixed culture of moderately thermophilic microorganisms. *Journal of Central South University of Technology*, 2007, **14**(4): 474–478.
- [7] Okibe N, Gericke M, Hallberg KB. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(4): 1936–1943.
- [8] Golyshina OV, Timmis KN. *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environment Microbiology*, 2005, **7**(9): 1277–1288.
- [9] Hawkes RB, Franzmann PD. *Ferroplasma cupricumulans* sp.nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaeon isolated from an industrial-scale chalcocite heap. *Extremophiles*, 2006, **10**(6): 525–530.
- [10] Okibe N, Gericke M, Hallberg KB, Johnson B. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolate from a pilot plant stirred-tank bioleaching operations. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(4): 1936–1943.
- [11] Demergasso CS, Gelleguillos PA. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy*, 2005, **80**(4): 241–253.
- [12] Golyshina OV, Pivovarova TA, Karavaiko GI. *Ferroplasma acidiphilum* gen.nov., sp.nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**(3): 997–1006.
- [13] Dopson M, Austin CB, Hind A. Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp.nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(4): 2079–2088.
- [14] Hawkes HB, Franzmann PD, Plumb JJ. Moderate thermophiles including “*Ferroplasma cupricumulans*” sp. nov., dominate an industrial-scale chalcocite heap bioleaching operation. *Hydrometallurgy*, 2006, **83**(1-4): 229–236.
- [15] Li SG, Pi YD, Zhang CL. The study of archaea: a review and perspectives. *Journal of University of Science and Technology*, 2007, **37**(8): 830–838.
李曙光, 皮昀丹, Zhang CL. 古菌研究及其展望. 中国科学技术大学学报, 2007, **37**(8): 830–838.
- [16] Silverman MP, Lundgren DG. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*: I. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology*, 1959, **77**(5): 642–647.
- [17] Lü SX, Zhang CR, Jie NQ. The Experiments of Fundamental Chemistry. Beijing: Science Press, 2000.
吕苏祥, 张春荣, 揭念芹. 基础化学实验. 北京: 科学出版社, 2000.
- [18] Ma T, Liu RL. Advance in tolerance to heat of heat. *Thermophiles*, 2002, **29**(2): 86–88.
- [19] Macalady JL, Vestling MM, Kaspar CW. Tetraether-linked membrane monolayers in *Ferroplasma* spp: a key to survival in acid. *Extremophiles*, 2004, **8**(5): 411–419.
- [20] Sandstom A, Mattsson E. Bacterial ferrous iron oxidation of acid mine drainage as pre-treatment for subsequent metal recovery. *International Journal of Mineral Processing*, 2001, **62**(1-4): 309–320.