

嗜酸异养菌对自养菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 金属离子抗性和生物浸出的影响

刘宏伟^{1,2} 戴艳霞^{1,2} 黄伟¹ 尹华群^{1,2} 梁伊丽^{1,2} 申丽^{1,2} 刘学端^{1,2*}

(1. 中南大学 资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

(2. 教育部生物冶金重点实验室 湖南 长沙 410083)

摘要: 【目的】了解嗜酸异养菌在诸如酸性矿坑水(AMD)和生物浸出体系等极端酸性环境中对浸矿微生物产生的影响。【方法】研究由嗜酸异养菌 *Acidiphilium acidophilum* 和自养菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 经长期驯化后形成的共培养体系分别在 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Mg^{2+} 胁迫下的稳定性; 并将此共培养体系应用于黄铁矿和低品位黄铜矿的生物浸出实验。【结果】在上述 4 种金属离子分别存在的条件下, 异养菌 *Aph. acidophilum* 均能促进 *At. ferrooxidans* 对亚铁的氧化, 提高其对能源利用的效率。共培养体系中的异养菌 *Aph. acidophilum* 使 *At. ferrooxidans* 对 Cu^{2+} 的最大耐受浓度(MTC)由 2.0 g/L 提高到 5.0 g/L, 而且共培养的细胞数量与 2.0 g/L Cu^{2+} 条件下生长的 *At. ferrooxidans* 纯培养相似。另外, 共培养中的 *At. ferrooxidans* 对 Mg^{2+} 的 MTC 也由 12.0 g/L 提高到 17.0 g/L。生物浸出实验中嗜酸异养菌 *Aph. acidophilum* 促进了 *At. ferrooxidans* 对黄铁矿样品的浸出, 浸出率较其纯培养提高了 22.7%; 但在含铁量较低的低品位黄铜矿浸出体系中共培养和 *At. ferrooxidans* 纯培养的浸出率均低于 33%。在加入 2.0 g/L Fe^{2+} 的低品位黄铜矿浸出体系中, 共培养和 *At. ferrooxidans* 纯培养的浸出率均得到提高, 分别达到 52.22% 和 41.27%。【结论】以上结果表明, *Aph. acidophilum* 与 *At. ferrooxidans* 共培养在一定的环境胁迫下仍能保持其稳定性并完成各自的生态功能, 并且嗜酸异养菌 *Aph. acidophilum* 适合在含铁量较高的浸出体系中与铁氧化细菌共同作用来提高生物浸出的效率。

关键词: 生物浸出, 金属抗性, 共培养, *Acidiphilium acidophilum*, 嗜酸氧化亚铁硫杆菌

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2010CB630901); 国家自然科学基金项目(No. 31070104)

*通讯作者: Tel: 86-731-88830546; 信箱: xueduanliu@yahoo.com

收稿日期: 2011-12-23; 接受日期: 2012-02-27

Influence of acidophilic heterotrophic bacteria on metal resistance and bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*

LIU Hong-Wei^{1,2} DAI Yan-Xia^{1,2} HUANG Wei¹ YIN Hua-Qun^{1,2}
LIANG Yi-Li^{1,2} SHEN Li^{1,2} LIU Xue-Duan^{1,2*}

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)

(2. Key Laboratory of Biometallurgy of the Ministry of Education, Changsha, Hunan 410083, China)

Abstract: [Objective] To investigate the influence of acidophilic heterotrophic bacteria on *Acidithiobacillus ferrooxidans* in extremely acidic environment such as acid mine drainage (AMD) and bioleaching system. **[Methods]** A co-culture consists of *Aph. acidophilum* and *At. ferrooxidans* was separately exposed to four metal ions (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} and Mg^{2+}) to test its stability. This co-culture was also applied to bioleaching of pyrite and low grade chalcopyrite. **[Results]** In the metal resistance experiment, heterotrophic bacteria *Aph. acidophilum* facilitated the ferrous iron oxidation by *At. ferrooxidans* and improved its efficiency of energy utilization. The maximum tolerant concentration (MTC) of *At. ferrooxidans* to Cu^{2+} was improved from 2.0 g/L to 5.0 g/L by *Aph. acidophilum*, and the cell density of co-culture in 5.0 g/L Cu^{2+} was almost the same with purely cultured *At. ferrooxidans* in 2.0 g/L Cu^{2+} . In addition, the MTC of co-cultured *At. ferrooxidans* to Mg^{2+} was also improved from 12.0 g/L to 17.0 g/L by *Aph. acidophilum*. In bioleaching experiment, the pyrite bioleaching efficiency of co-culture increased by 22.70% as compared with that of purely cultured *At. ferrooxidans*. While in the low grade chalcopyrite bioleaching system with few iron, the bioleaching efficiency of both *At. ferrooxidans* and its co-culture with *Aph. acidophilum* were lower than 33%. In the low grade chalcopyrite bioleaching system with pre-added 2 g/L Fe^{2+} , the bioleaching efficiency of *At. ferrooxidans* and its co-culture with *Aph. acidophilum* were raised to 41.27% and 52.22%, respectively. **[Conclusion]** Results in this study demonstrated that *At. ferrooxidans* and *Aph. acidophilum* in co-culture could maintain their physiological stability and sustain their ecological function under environmental stress. The bioleaching results suggested that acidophilic heterotrophic bacteria *Aph. acidophilum* should be applied to the bioleaching system with high iron concentration, in which it could collaborate with iron oxidation bacteria to improve the bioleaching efficiency.

Keywords: Bioleaching, Metal resistance, Co-culture, *Acidiphilium acidophilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

我国金属矿产资源多为中小型矿,且矿石品位低,难于采选。由于传统的浸出工艺不仅对资源的利用率低,而且对环境造成严重的污染。生物冶金技术以其低成本和低污染等特有

的优势,在我国得到快速发展和应用^[1]。*Acidithiobacillus ferrooxidans* 和 *Acidiphilium acidophilum* 是生物浸出体系和酸性矿坑水 (AMD)等酸性环境中常见的两种微生物,其中

At. ferrooxidans 是目前生物浸出相关研究中研究较多的微生物物种之一^[2], *At. ferrooxidans* 以氧化亚铁和(或)还原型硫化物获得能源并固定 CO₂ 作为碳源营化能自养生长。*Aph. acidophilum* 则是以有机物作为能源的异养嗜酸微生物, 其典型菌株 *Aph. acidophilum* ATCC 27807 最初也是由 Harrison 从所谓的 *At. ferrooxidans*“纯培养”中分离得到的^[3]。以往大量研究表明, 这两种微生物在铁氧化与还原、碳源利用及相互解除生长和代谢抑制作用等方面存在明显的协同关系^[4-9]: *At. ferrooxidans* 能氧化 Fe²⁺, 而 *Aph. acidophilum* 在厌氧条件下对 Fe³⁺有还原能力; *At. ferrooxidans* 是自养菌, 而 *Aph. acidophilum* 则可利用 *At. ferrooxidans* 自养代谢产物作为碳源和能源进行异养生长并解除葡萄糖对 *At. ferrooxidans* 生长的抑制作用; 在生物浸出体系中, *Aph. acidophilum* 能通过生长代谢分解矿物表面的有机物以提高 *At. ferrooxidans* 对矿物的浸出效率, 而 *At. ferrooxidans* 则可以减轻硫化物对 *Acidiphilium* 属微生物的抑制作用。

在生物浸出过程中, *At. ferrooxidans* 和 *Aph. acidophilum* 等嗜酸微生物常常处于高浓度的金属离子(其中还包括一些重金属离子)环境中, 为了适应这种环境胁迫, 这些微生物通过协同作用, 表现出对一些特定的金属离子产生比纯培养更高的抗性^[10], 从而有利于其生长和浸矿效率的提高^[11]。Cabrera 等^[10]曾研究过 *At. ferrooxidans* 纯培养及其与 *Acidiphilium organovorum* 和 *Acidocella facilis* 两种微生物混合培养时, 5 种重金属离子(Cr³⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺)对其生长和 Fe²⁺氧化能力的影响。研究结果表明异养菌的加入使 *At. ferrooxidans* 对 Cd²⁺和 Zn²⁺的耐受浓度提高, 对 Cu²⁺和 Ni²⁺的耐受浓度降低。另外, 在使用混合菌浸矿时值得注意的一点是如果混合菌中包括异养菌, 加入大量有机物作为异养菌能源

后反而会降低浸出效率。Marchand 等通过实验^[12]证实利用葡萄糖生长的 *Aph. acidophilum* 会抑制 *At. ferrooxidans* 对黄铁矿的氧化, 进而影响到浸出效率。这主要是由于异养菌的大量生长及其代谢产生的有机物不仅抑制 *At. ferrooxidans* 的生长, 而且这些代谢产物将与浸出体系中的铁离子结合, 使其不能对黄铁矿进行有效的氧化。

与以往所有简单混合两种或多种浸矿微生物不同, 本研究旨在利用已驯化且不需加入有机物即可生长的、由异养菌 *Aph. acidophilum* 与自养菌 *At. ferrooxidans* 组成的共培养物作为简单的两物种群落, 模拟自然环境和生物浸出体系中自养菌和异养菌相互作用后对一些金属离子的抗性较 *At. ferrooxidans* 纯培养是否有所改变, 检验其在环境胁迫下的稳定性, 并以此共培养物作为生物浸出实验的菌种, 检验其对黄铁矿和黄铜矿的浸出能力, 为深入了解嗜酸异养微生物在诸如酸性矿坑水(AMD)和生物浸出体系等极端酸性环境中的生态功能提供研究基础, 并为多菌种生物浸出时是否加入, 以及加入何种嗜酸异养微生物提供参考。

1 材料与方 法

1.1 菌种和培养基

本实验中所用菌株 *At. ferrooxidans* ATCC 23270 和 *Aph. acidophilum* ATCC 27807 均购自美国模式菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 共培养物已由本实验室先期完成驯化, 其具体过程已另文发表^[13]。

At. ferrooxidans、*Aph. acidophilum* 及它们的共培养物用 9K 基本盐培养基并添加一定量的能源物质(硫酸亚铁或葡萄糖)进行传代培养并用于实验。9K 基本盐培养基(g/L): KCl 0.1, (NH₄)₂SO₄ 3.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.05, Ca(NO₃)₂·4H₂O 0.01。用稀硫酸调 pH 至 2.0,

1×10^5 Pa 灭菌 15 min 备用。在已灭菌的 9K 基本盐培养基加入 44.7 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 待其完全溶解后用孔径为 0.22 μm 的无菌针头式过滤器 (MILLEX[®] GP, Millipore) 除菌用于 *At. ferrooxidans* 及其与 *Aph. acidophilum* 共培养物的培养。采用与上述相同的过滤除菌方法在 9K 基本盐培养基中加入 1% (W/V) 葡萄糖用于 *Aph. acidophilum* 纯培养物的培养。

1.2 主要仪器

恒温培养振荡器 Sukun NSKY-2102, 上海苏坤; 光学显微镜 Olympus CX21, Tokyo Japan; pH 酸度计雷磁 PHSJ-4A, 上海雷磁; 原子吸收光谱仪 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer) Agilent 7500 series, U.S.

1.3 培养条件及微生物数量检测

本研究中所有的实验均使用恒温培养振荡器在温度为 30 °C、转速为 200 r/min 的条件下培养微生物和进行微生物浸出实验, 并使用血球计数板和光学显微镜对微生物进行镜检和计数。

1.4 金属离子抗性实验

Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Mg^{2+} 是 4 种在生物浸出环境中较为常见的金属离子^[14]。为了比较 *At. ferrooxidans* 纯培养及其与 *Aph. acidophilum* 的共培养对这些金属离子的抗性和在此环境下的稳定性, 于装有 50 mL 9K- FeSO_4 培养基的 150 mL 三角瓶中分别添加不同浓度的 4 种金属离子 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Mg^{2+} , 并接种 *At. ferrooxidans* 纯培养及其与 *Aph. acidophilum* 的共培养物来进行检测。这 4 种金属离子分别以 CdSO_4 、 CuSO_4 、 NiSO_4 和 MgSO_4 的形式添加, 以减少其它阴离子对实验可能造成的影响^[15]。其浓度梯度(单位: g/L)分别为: Cd^{2+} : 4、8 和 12; Cu^{2+} : 2、5 和 8; Ni^{2+} : 10、20 和 30; Mg^{2+} : 12、17 和 22; 每种金属离子的每个浓度分别设置 3 个平行, 包括不加入金属离子的阳性对照和不接种的阴性对照。*At. ferrooxidans* 纯培养及其与 *Aph. acidophilum* 的共培

养物的接种量为 5% (V/V), 接种后 *At. ferrooxidans* 纯培养细胞终浓度为 $(8.60 \pm 0.13) \times 10^6$, *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 共培养细胞终浓度为 $(7.50 \pm 0.69) \times 10^6$ 。

1.5 微生物浸出实验

实验中所用黄铁矿取自广东云浮, 经 X 射线荧光光谱分析 (XRF) 定量后发现其铁含量为 23.44%。实验中所用黄铜矿取自江西德兴, 经 XRF 定量后发现其铜含量为 0.44%, 其铁含量为 3.25%。在装有 200 mL 9K 基本盐培养基的 500 mL 三角瓶中加入 200 目的黄铁矿或低品位黄铜矿 2.0 g 用于微生物浸出实验。另外, 作为低品位黄铜矿浸出的对照实验, 在此培养体系基础上再加入 9.97 g FeSO_4 , 使起始 Fe^{2+} 浓度达到 2.0 g/L, 然后与低品位黄铜矿浸出实验一样, 完成各项检测。每个实验设 3 个平行, *At. ferrooxidans* 纯培养及其与 *Aph. acidophilum* 的共培养物接种量均为 5% (V/V)。

1.6 分析测试

实验中 Fe^{2+} 浓度均采用重铬酸钾滴定法测定^[16], pH 值使用 pH 酸度计测量。微生物浸出实验溶液中各元素的浓度使用原子吸收光谱仪 (ICP-MS) 测定。

2 结果

2.1 抗性实验

为了便于比较 *At. ferrooxidans* 纯培养及其与 *Aph. acidophilum* 共培养分别对 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Mg^{2+} 4 种金属离子的抗性, 采用以下 3 个参数来进行评价: MTC (Maximum tolerant concentration), 细菌对特定金属的最大耐受浓度; T85, 氧化 85% Fe^{2+} 所需时间, 用以体现细菌在对能源的利用速度; BP (Bacterial production), 每毫克亚铁被氧化后所产生的细胞数量, 用以衡量细菌对能源的利用效率。具体结果见表 1。

表1 *At. ferrooxidans* 纯培养(*A. f*)及其与 *Aph. acidophilum* 共培养对4种金属离子的MTC、T85和BP值
Table 1 MTC, T85 and BP for pure culture of *At. ferrooxidans* (*A. f*) and its co-culture with *Aph. acidophilum* in the presence of four metal ions

Ion	MTC (g/L)		T85 (h)		BP ($\times 10^3$ cell/mg $\text{Fe}^{2+}_{\text{oxid}}$)	
	<i>A. f</i>	Co-culture	<i>A. f</i>	Co-culture	<i>A. f</i>	Co-culture
Cd^{2+}	4 \pm 0.15	4 \pm 0.20	134 \pm 2.84	129 \pm 1.83	10.0 \pm 0.51	10.6 \pm 1.35
Cu^{2+}	2 \pm 0.17	5 \pm 0.17	67 \pm 1.74	109 \pm 2.75	10.8 \pm 0.92	10.5 \pm 0.92
Ni^{2+}	30 \pm 0.81	30 \pm 0.60	75 \pm 1.94	83 \pm 1.94	10.8 \pm 0.81	13.5 \pm 0.82
Mg^{2+}	12 \pm 0.65	17 \pm 0.77	69 \pm 0.13	117 \pm 1.90	10.3 \pm 0.59	5.36 \pm 0.39
Control	—	—	32 \pm 2.10	28 \pm 1.47	18.2 \pm 0.80	26.0 \pm 1.07

由表1可知, *Aph. acidophilum* 的存在使 *At. ferrooxidans* 对 Cu^{2+} 和 Mg^{2+} 的耐受浓度提高, 虽然在较 *At. ferrooxidans* 纯培养高的 Cu^{2+} 浓度条件下共培养的延滞期明显变长, 但共培养中的 *At. ferrooxidans* 对能源的利用效率并未受影响。与之相对的是共培养虽然也能耐受更高浓度的 Mg^{2+} , 但在此浓度下共培养中 *At. ferrooxidans* 的生长活性受到了一些影响。共培养中的 *At. ferrooxidans* 耐受另外两种金属离子 Cd^{2+} 和 Ni^{2+} 的能力没有受到异养菌 *Aph. acidophilum* 的影响, 且其生长活性有明显提高。从表1可以看到, 无论是否加入 Cd^{2+} 和 Ni^{2+} , 共培养的 T85 值较 *At. ferrooxidans* 纯培养低, BP 值则较高; 并且当共培养中的 Cu^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度分别为 2.0 g/L 与 12.0 g/L (与 *At. ferrooxidans* 纯培养 MTC 值相同) 时, 其 T85 值分别为 58 \pm 1.74 h 和 46 \pm 3.13 h, 均较 *At. ferrooxidans* 纯培养低; 其 BP 值分别为 (12.8 \pm 1.33) $\times 10^3$ cell/mg $\text{Fe}^{2+}_{\text{oxid}}$ 和 (13.2 \pm 0.45) $\times 10^3$ cell/mg $\text{Fe}^{2+}_{\text{oxid}}$, 均较 *At. ferrooxidans* 纯培养高。由此可见, 嗜酸异养菌 *Aph. acidophilum* 的存在不仅提高了 *At. ferrooxidans* 对一些金属离子的耐受能力, 还使其与 *At. ferrooxidans* 共培养的生长活性在这些金属离子存在的条件下仍能保持高于 *At. ferrooxidans* 纯培养的水平。

另外, 无论是 *At. ferrooxidans* 纯培养还是其与 *Aph. acidophilum* 的共培养, 在实验过程中的

pH 值变化均与 Fe^{2+} 氧化曲线一致, 由 2.50 下降到 1.70 左右。实验结束后, 存在生长和 Fe^{2+} 氧化现象的共培养物均接种至 9K-葡萄糖培养基中, 经 3 d 培养后长出大量 *Aph. acidophilum*, 说明抗性实验中的共培养有异养菌生长。

2.2 黄铁矿浸出实验

黄铁矿生物浸出实验的 Fe 浸出结果及其 pH 变化情况见图 1。经 30 d 的浸出后共培养的浸

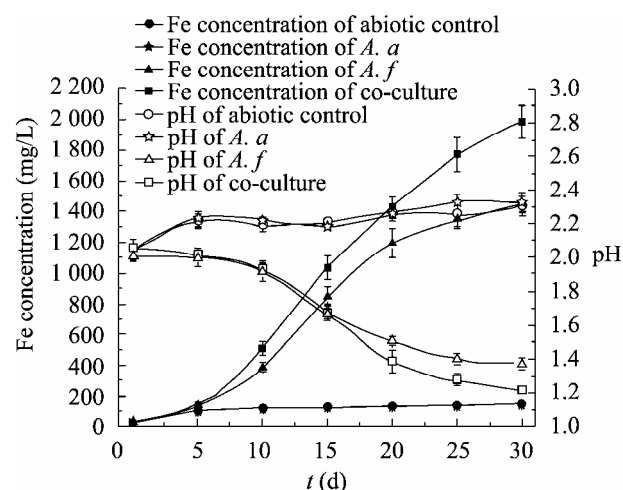


图1 黄铁矿浸出与 pH 变化曲线

Fig. 1 Bioleaching of pyrite and its pH profiles

注: 图中“*A. f*”表示 *At. ferrooxidans*; “*A. a*”表示 *Aph. acidophilum*; “co-culture”表示 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 的共培养。以下图中所有与之相同的注释均与此处同义。

Note: “*A. f*” in figure denotes *At. ferrooxidans*; “*A. a*” denotes *Aph. acidophilum*; “co-culture” denotes the co-culture of *At. ferrooxidans* and *Aph. acidophilum*. All denotations as above have the same mean in the following figures.

出效率[66.11 mg/(L·d)]明显高于 *At. ferrooxidans* 纯培养[48.37 mg/(L·d)], 其浸出率分别为 84.60% 和 61.90%, 说明嗜酸异养菌 *Aph. acidophilum* 促进了 *At. ferrooxidans* 对黄铁矿样品的浸出。由于浸矿微生物的生长(图 2)使 Fe^{2+} 不断被氧化, 共培养和 *At. ferrooxidans* 纯培养的浸出体系酸度均明显增加(图 1), 并且在整个浸出过程中没有检测到 Fe^{2+} , 说明矿物中的 Fe 一旦成为 Fe^{2+} 离子状态即被迅速氧化。

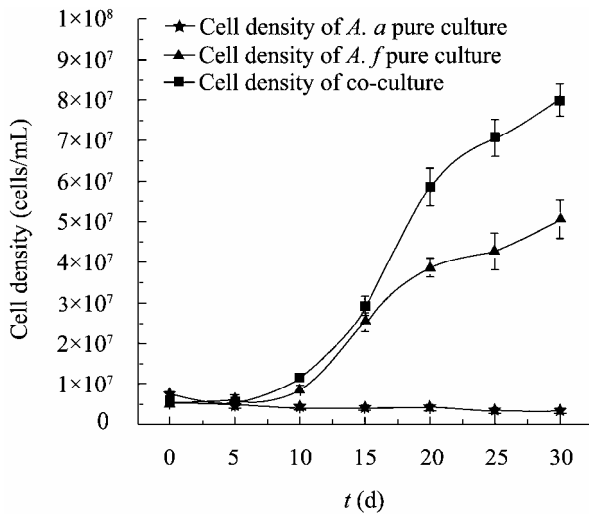


图 2 黄铁矿浸出的微生物生长曲线

Fig. 2 Bacterial growth profiles in pyrite bioleaching

2.3 黄铜矿浸出实验

黄铜矿生物浸出实验的 Cu 浸出结果及其 pH 变化情况见图 3。从图 3 可见, 经 30 d 的浸出后共培养和 *At. ferrooxidans* 纯培养的浸出效率均较低, 分别为 4.71 mg/(L·d) 和 4.00 mg/(L·d), 且总浸出率均低于 33% (共培养和 *At. ferrooxidans* 纯培养的浸出率分别为 32.48% 和 27.54%)。与黄铁矿浸出结果不同的是, 嗜酸异养菌 *Aph. acidophilum* 的存在对本次实验中的低品位黄铜矿样品浸出的影响不明显, 共培养的浸出率较 *At. ferrooxidans* 纯培养仅提高了 4.94%。随着 Cu^{2+} 的不断浸出, pH 值也不断下降, 说明浸矿微生物的生

长(图 4)促进了 S 和 Fe^{2+} 的氧化, 使整个浸出体系酸度增加。在这两种低品位黄铜矿浸出体系中没有检测到 Fe^{2+} , 而且 Fe^{2+} 浓度差异不大, 含量均小于 160 mg/L。说明矿物中 Fe 的含量较低, 且一旦成为 Fe^{2+} 离子状态即被迅速氧化。

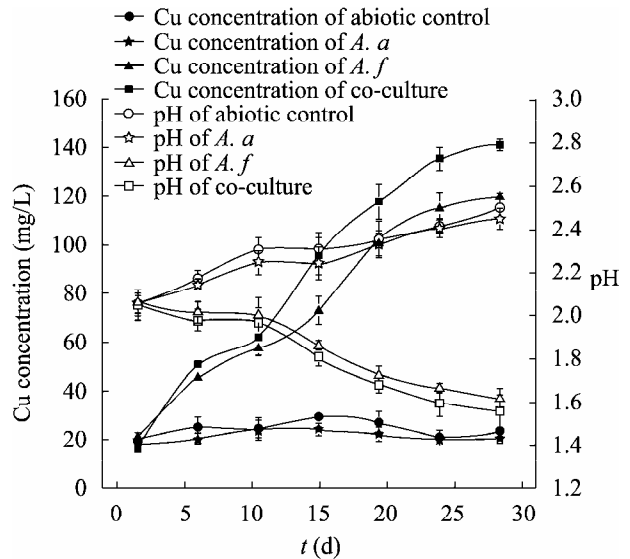


图 3 黄铜矿浸出与 pH 变化曲线

Fig. 3 Bioleaching of chalcopyrite and its pH profiles

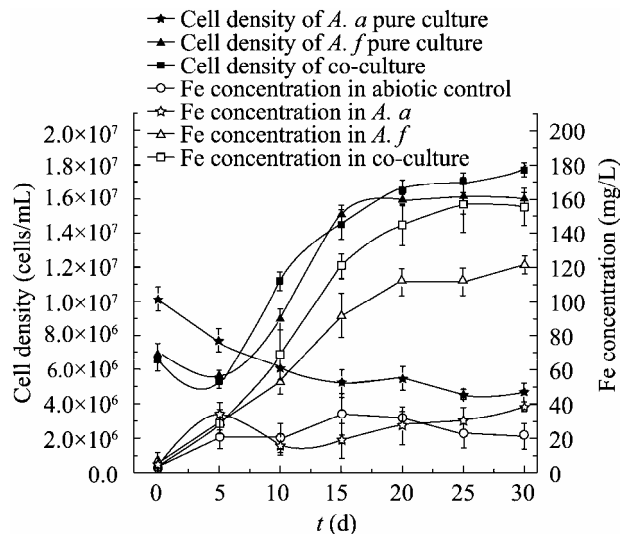


图 4 黄铜矿浸出微生物生长曲线与 Fe 变化曲线

Fig. 4 Bacterial growth profiles and Fe concentrations in chalcopyrite bioleaching

在加入 2.0 g/L Fe^{2+} 的黄铜矿生物浸出体系中, 共培养和 *At. ferrooxidans* 纯培养的浸出效率均得到提高(图 5), 分别达到 7.56 mg/(L·d) 和 5.98 mg/(L·d); 而且共培养在此相对较高 Fe 含量的浸出体系中较 *At. ferrooxidans* 纯培养更有优势, 其浸出率高出 *At. ferrooxidans* 纯培养 10.95% (共培养和 *At. ferrooxidans* 纯培养的浸出率分别为 52.22% 和 41.27%)。与此结果相一致的是浸矿微生物的生长及其 pH 值的变化(图 6)。另外, 在使用共培养和 *At. ferrooxidans* 纯培养的浸出体系中加入的 Fe^{2+} 均被迅速氧化成 Fe^{3+} (氧化过程均在 2 d 之内结束, Fe^{2+} 滴定结果未给出), 图 5 中所示的铁离子均为 Fe^{3+} 。与之相对应的, 对只接种了 *Aph. acidophilum* 和未接种微生物的实验对照来说, 由于它们缺少对 Fe^{2+} 的氧化, 图 5 中所示的铁离子均为 Fe^{2+} 。

3 讨论

本研究通过金属抗性实验证实由自养菌 *At. ferrooxidans* 与嗜酸异养菌 *Aph. acidophilum* 组成

的共培养体系在一定环境胁迫条件下仍能保持稳定, 并且对 Cu^{2+} 和 Mg^{2+} 的抗性还有所提高, 这与 Cabrera 等的研究结果^[10] 存在一定差异。不同物种微生物的混合、不同混合培养基以及驯化过程的有无是产生这些差异的原因。考虑到 Cabrera 等的研究中^[10] 混合培养与 *At. ferrooxidans* 纯培养所用培养基成分有所不同, 其研究中出现的抗性差异有可能是培养基成分不同造成的(有机物的存在对 *At. ferrooxidans* 的生长和 Fe^{2+} 氧化活性有抑制作用^[12]), 所以本研究中的抗性实验均使用 9K-硫酸亚铁培养基并接种经过驯化的共培养物以尽量接近自然状态的条件来进行比较, 提高了结果的可靠性。

根据以往大量研究结果(表 2)表明, Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对 *At. ferrooxidans* 生长和活性的影响要大于 Mg^{2+} 和 Ni^{2+} , 本研究的结果也证实了这点。并且, 本研究还发现嗜酸异养菌 *Aph. acidophilum* 的存在不仅提高了 *At. ferrooxidans* 对 Cu^{2+} 的抗性(表 1), 还使其能保持较高的生长活性(图 7)。这很可能是由于 *At. ferrooxidans* 纯培养和 *Aph. Acidophilum*

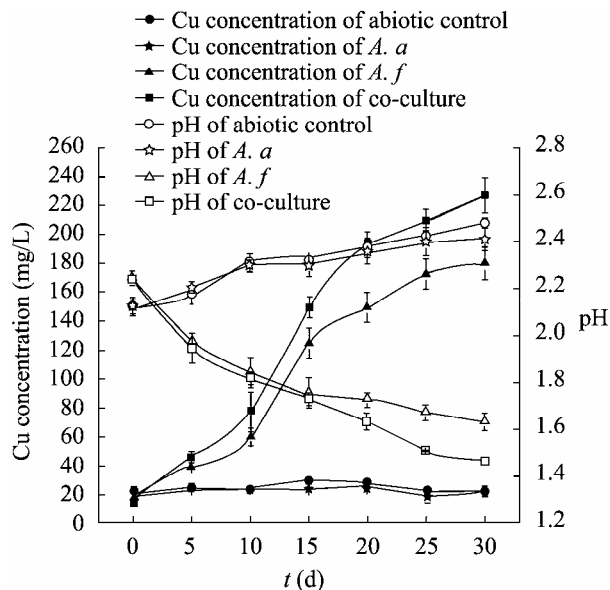


图 5 预加 2 g/L Fe^{2+} 的黄铜矿浸出与 pH 变化曲线
Fig. 5 Bioremediation of chalcopyrite and its pH profiles with pre-added 2 g/L Fe^{2+}

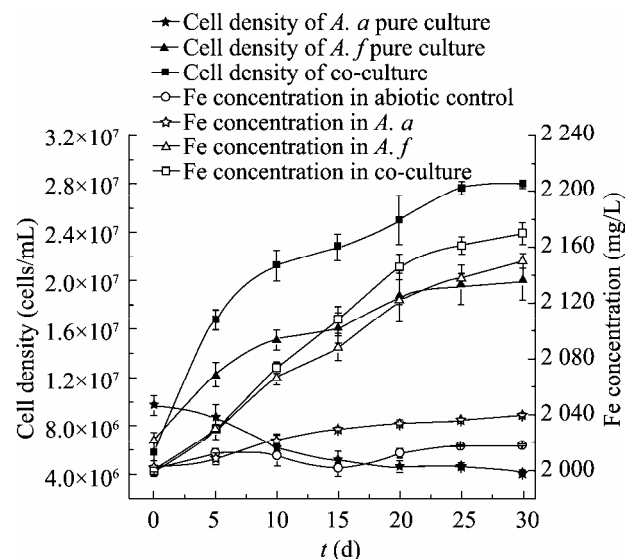


图 6 预加 2 g/L Fe^{2+} 的黄铜矿浸出微生物生长曲线与 Fe 变化曲线
Fig. 6 Bacterial growth profiles and Fe concentrations in chalcopyrite bioremediation with pre-added 2 g/L Fe^{2+}

纯培养对 Cu^{2+} 抗性均较高(表 2), 在共培养条件下它们通过协同作用确保了在高浓度 Cu^{2+} 条件下对能源的利用速度和利用效率均保持在较高水平。以往对 *At. ferrooxidans* 抗铜机理进行的大量研究^[11,25-27]均建立在其纯培养基础上, 至于在多物种存在的自然条件下 *At. ferrooxidans* 主要采用何种机制减轻 Cu^{2+} 对其的抑制作用仍无定论。本实验通过比较 *At. ferrooxidans* 纯培养及其与 *Aph. acidophilum* 共培养物对 Cu^{2+} 抗性的差异, 为研究自然环境中 *At. ferrooxidans* 的主要抗铜机理提供了一个思路和一定的研究基础。

微生物浸出实验结果表明, 在含铁量较高的黄铁矿和低品位黄铜矿浸出体系中 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 的共培养物具有明显的浸出优势, 其微生物数量和浸出率均较 *At. ferrooxidans* 纯培养高。这一方面是由于异养菌 *Aph. acidophilum* 的生长减轻了 *At. ferrooxidans* 代谢产物(丙酮酸^[28], 乙醇酸^[29]等)对 *At. ferrooxidans* 自

身的抑制作用, 提高了浸出体系中的微生物数量; 另一方面是由于异养菌 *Aph. acidophilum* 的存在使黄钾铁矾结构发生改变, 难以在矿物表面沉积^[30], 从而有利于 *At. ferrooxidans* 对黄铁矿的浸出。然而, 在含铁量较低的低品位黄铜矿浸出

表 2 以往 *At. ferrooxidans* 和 *Acidiphilium* 属微生物对 4 种金属离子 MTC 的研究结果

Table 2 Literature MTC values for pure cultures of *At. ferrooxidans* and *Acidiphilium* strains in the presence of 4 metal ions

Bacteria	Metal ion	MTC (g/L)
<i>At. ferrooxidans</i>	Cu^{2+}	0.6–10 ^[17] , 19 ^[18] , 16 ^[19] , 10 ^[10,20]
	Cd^{2+}	10 ^[10] , 5.6 ^[21]
	Ni^{2+}	30 ^[10] , 0.6–9.4 ^[17] , 6.3 ^[22]
	Mg^{2+}	15.5 ^[23]
<i>Acidiphilium</i>	Cu^{2+}	0.6–9.4 ^[24]
	Cd^{2+}	<0.02–112.4 ^[24]
	Ni^{2+}	1.2–23.5 ^[24]
	Mg^{2+}	Not available

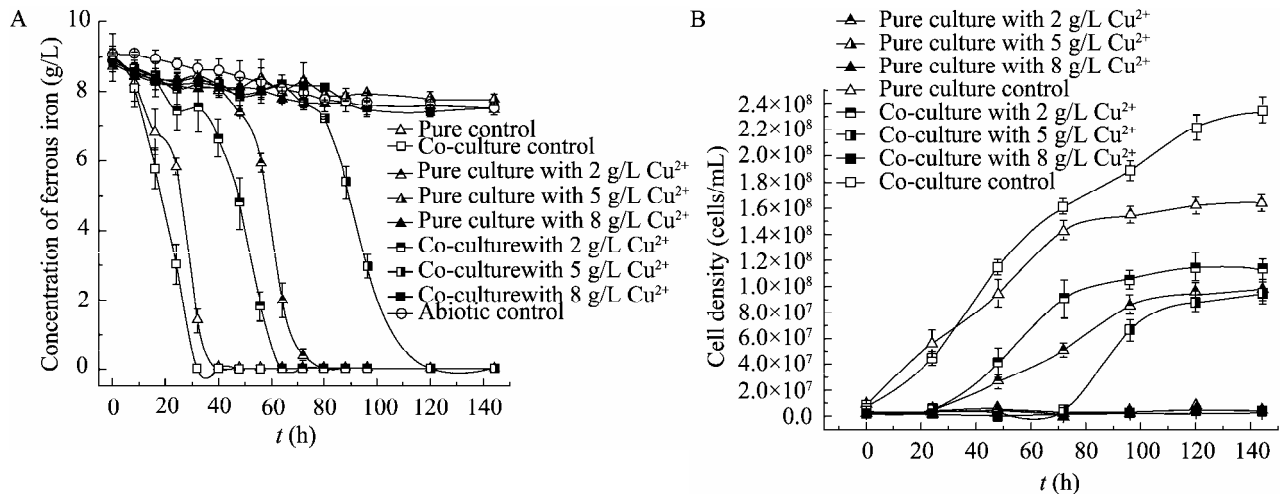


图 7 不同浓度铜离子条件下 *At. ferrooxidans* 纯培养及其与 *Aph. acidophilum* 共培养亚铁氧化曲线(A)及生长曲线(B)

Fig. 7 Profiles of ferrous iron oxidation (A) and growth curves (B) of *At. ferrooxidans* and its co-culture with *Aph. acidophilum* in the present of several concentrations of copper ion

注: 图中“Pure culture”表示 *At. ferrooxidans* 纯培养; “Co-culture”表示 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 共培养。

Note: “Pure culture” in figure denotes the pure culture of *At. ferrooxidans*; “co-culture” denotes the co-culture of *At. ferrooxidans* and *Aph. acidophilum*.

体系中 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 的共培养物并未体现出浸出优势,而且无论 *At. ferrooxidans* 纯培养还是其与 *Aph. acidophilum* 的共培养对此黄铜矿样品的浸出率都不高。这也从另一个角度说明了 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 的共培养在含铁量较高的浸出体系中能发挥更大的作用,并且与以往研究中在浸出体系中加入少量 Fe^{2+} 有助于浸出的结果^[31-32]一致。

4 结论

本研究利用经过长期培养后驯化出的不需加入有机物即可生长的 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 共培养进行金属抗性检测,发现嗜酸异养菌 *Aph. acidophilum* 通过与自养菌 *At. ferrooxidans* 的协同作用提高了 *At. ferrooxidans* 对 Cu^{2+} 和 Mg^{2+} 的抗性,并且使其在高浓度 Cu^{2+} 存在的条件下,仍能保持与低浓度 Cu^{2+} 中生长的 *At. ferrooxidans* 纯培养相似的生长活性和亚铁氧化能力。由此可见 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 共培养在一定的环境胁迫下仍能保持其稳定性并完成各自的生态功能。应用此共培养体系对黄铁矿和低品位黄铜矿进行生物浸出实验的结果表明,在含铁量较高的黄铁矿和低品位黄铜矿浸出体系中,*At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 共培养物较 *At. ferrooxidans* 纯培养具有明显的浸出优势,异养菌 *Aph. acidophilum* 不仅促进了 *At. ferrooxidans* 的生长,还提高了其对黄铁矿和低品位黄铜矿浸出的效率。在含铁量较低的低品位黄铜矿浸出体系中,*At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 的共培养并未体现出浸出优势,其对铜的浸出率与 *At. ferrooxidans* 纯培养相似,均较低。由生物浸出实验结果可知,嗜酸异养菌 *Aph. acidophilum* 适合加入到含铁量较高的浸出体系中,与铁氧化细菌共同作用以提高生物浸出的效率。

参考文献

- [1] 殷志勇,成海芳,张文彬. 生物技术在湿法冶金领域的应用现状及研究趋势[J]. 湿法冶金, 2006, 25(3): 113-116.
- [2] 田克立,林建群,张长铠,等. 氧化亚铁硫杆菌铁氧化系统分子生物学研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29 (1): 85-88.
- [3] Harrison AP Jr. Genomic and physiological comparisons between heterotrophic Thiobacilli and *Acidiphilium cryptum*, *Thiobacillus versutus* sp. nov., and *Thiobacillus acidophilus* nom. rev.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1983, 33(2): 211-217.
- [4] Harrison AP Jr. The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat[J]. Annual Review of Microbiology, 1984, 38(1): 265-292.
- [5] Baker BJ, Banfield JF. Microbial communities in acid mine drainage[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44(2): 139-152.
- [6] Johnson DB, Bridge TAM. Reduction of ferric iron by acidophilic heterotrophic bacteria: evidence for constitutive and inducible enzyme systems in *Acidiphilium* spp.[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(2): 315-321.
- [7] Marchand EA, Silverstein J. The role of enhanced heterotrophic bacterial growth on iron oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Geomicrobiology Journal, 2003, 20(3): 231-244.
- [8] Hao J, Murphy R, Lim E, et al. Effects of phospholipid on pyrite oxidation in the presence of autotrophic and heterotrophic bacteria[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2009, 73(14): 4111-4123.
- [9] Gurung A, Chakraborty R. The role of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in alleviating the inhibitory effect of thiosulfate on the growth of acidophilic *Acidiphilium* species isolated from acid mine drainage samples from Garubathan, India[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(9): 1040-1048.
- [10] Cabrera G, Gómez JM, Cantero D. Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(8): 2683-2687.
- [11] Orell A, Navarro CA, Arancibia R, et al. Life in

- blue: copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 839–848.
- [12] Marchand EA, Silverstein J. Influence of heterotrophic microbial growth on biological oxidation of pyrite[J]. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36(24): 5483–5490.
- [13] Liu HW, Yin HQ, Dai YX, et al. The co-culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidiphilium acidophilum* enhances the growth, iron oxidation, and CO₂ fixation[J]. *Archives of Microbiology*, 2011, 193(12): 857–866.
- [14] Zhen SJ, Yan ZQ, Zhang YS, et al. Column bioleaching of a low grade nickel-bearing sulfide ore containing high magnesium as olivine, chlorite and antigorite[J]. *Hydrometallurgy*, 2009, 96(4): 337–341.
- [15] 张成桂, 张倩, 王晶, 等. 阴离子对嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长和硫氧化活性的影响[J]. *中国有色金属学报*, 2009, 19(12): 2237–2242.
- [16] Peng H, Yang Y, Li X, et al. Structure analysis of 16S rDNA sequences from strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 39(2): 178–182.
- [17] Leduc LG, Ferroni GD, Trevors JT. Resistance to heavy metals in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, 13(4): 453–455.
- [18] Boyer A, Magnin JP, Ozil P. Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass[J]. *Biotechnology Letters*, 1998, 20(2): 187–190.
- [19] Garcia O, da Silva LL. Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals[J]. *Biotechnology Letters*, 1991, 13(8): 567–570.
- [20] Das A, Modak JM, Natarajan KA. Studies on multi-metal ion tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *Minerals Engineering*, 1997, 10(7): 743–749.
- [21] Baillet F, Magnin JP, Cheruy A, et al. Cadmium tolerance and uptake by a *Thiobacillus ferrooxidans* biomass[J]. *Environmental Technology*, 1997, 18(6): 631–637.
- [22] Dopson M, Baker-Austin C, Koppineedi PR, et al. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms[J]. *Microbiology*, 2003, 149(8): 1959–1970.
- [23] 李洪枚, 柯家骏. Mg²⁺对氧化亚铁硫杆菌生长活性的影响[J]. *中国有色金属学报*, 2000, 10(4): 576–578.
- [24] Mahapatra NR, Banerjee PC. Extreme tolerance to cadmium and high resistance to copper, nickel and zinc in different *Acidiphilium* strains[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 23(6): 393–397.
- [25] Felicio AP, Garcia O Jr, Bertolini MC, et al. The effects of copper ions on the synthesis of periplasmic and membrane proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* as analyzed by SDS-PAGE and 2D-PAGE[J]. *Hydrometallurgy*, 2003, 71(1/2): 165–171.
- [26] Navarro CA, Orellana LH, Mauriaca C, et al. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(19): 6102–6109.
- [27] Luo YJ, Liu YD, Zhang CG, et al. Insights into two high homogenous genes involved in copper homeostasis in *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Current Microbiology*, 2008, 57(4): 274–280.
- [28] Schnaitman C, Lundgren DG. Organic compounds in the spent medium of *Ferrobacillus ferrooxidans*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1965, 11(1): 23–27.
- [29] Ñancucheo I, Johnson DB. Production of glycolic acid by chemolithotrophic iron- and sulfur-oxidizing bacteria and its role in delineating and sustaining acidophilic sulfide mineral-oxidizing consortia[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(2): 461–467.
- [30] 刘艳阳, 陈志伟, 姜成英, 等. 一株嗜酸化能异养菌 *Acidiphilium sp.* 的分离鉴定及其对 Fe(III)代谢的研究[J]. *微生物学报*, 2007, 47(2): 350–354.
- [31] Falco L, Pogliani C, Curutchet G, et al. A comparison of bioleaching of covellite using pure cultures of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* or a mixed culture of *Leptospirillum ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. *Hydrometallurgy*, 2003, 71(1/2): 31–36.
- [32] Qiu MQ, Xiong SY, Zhang WM, et al. A comparison of bioleaching of chalcopyrite using pure culture or a mixed culture[J]. *Minerals Engineering*, 2005, 18(9): 987–990.