

# 氧化亚铁硫杆菌的分离鉴定及培养条件优化

庄贺 沈俊剑 黎俊 谢鸿观 雷泞菲\*

(成都理工大学 矿产资源化学四川省高校重点实验室 四川 成都 610059)

**摘要:** 【目的】获得可用于浸矿的菌株, 对其培养条件进行优化。【方法】从成都热电厂采集土样中分离得到一株菌株, 分析该菌株的形态学特征、培养特征及 16S rDNA 序列, 确定菌株的分类地位。利用 Design-Expert 软件中的 Box-Behnken 法设计实验, 通过响应面分析对初始 pH 值、温度、接种量和装液量 4 个因素进行优化, 确定其最适培养条件。

【结果】获得菌株 Z1, 该菌为革兰氏阴性菌, 短杆状, 经 16S rDNA 鉴定为嗜酸性氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*, 简称 *At. f.*)。确定菌株最适培养条件为: pH 1.8、温度 30 °C、接种量 14%、装液量 250 mL 摇瓶装 60 mL 培养液。在此条件下, Z1 的亚铁氧化率可达 99.7%。【结论】Z1 菌株适合于生物浸矿的应用。

**关键词:** 氧化亚铁硫杆菌, 16S rDNA 鉴定, 系统发育树, 培养条件, 响应面分析

## Isolation and identification of *Thiobacillus ferrooxidans* and optimization of its culture condition

ZHUANG He SHEN Jun-Jian LI Jun XIE Hong-Guan LEI Ning-Fei\*

(The Key Laboratory of Chemical Mineral Resources of Sichuan Province, Chengdu University of Technology, Chengdu, Sichuan 610059, China)

**Abstract:** [Objective] A strain with the ability of bioleaching was isolated. Its culture condition was optimized. [Methods] The strain was isolated from the soil collected from thermoelectric plant in Chengdu, whose taxonomic status was identified based on analysis of mor-

基金项目: 四川省教育厅青年基金项目(No. 11ZB040); 矿产资源化学四川省高校重点实验室开放基金项目(No. Kzh201104); 四川省十二五攻关项目(No. 2011NZ0098-12-07)

\*通讯作者: Tel: 86-28-84073135; 邮箱: leiningfei@gmail.com

收稿日期: 2012-10-11; 接受日期: 2012-12-18

phology characteristics, culture characteristics and 16S rDNA sequence. The optimization experiment was designed with Box-Behnken method in the software Design-Expert, in which the four factors of culture condition that initial pH, temperature, inoculum amount and liquid volume were investigated. Then the results were analyzed with the response surface analysis (RSA) and the optimal culture condition was determined. **[Results]** The isolated strain was Gram-negative and short-rod, which was named as Z1 and identified as *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain by analysis of its 16S rDNA sequence. The optimal culture condition of the strain was determined, which was initial pH 1.8, optimum temperature 30 °C, inoculum volume 14% and liquid volume 60 mL medium in a 250 mL flask. Under the optimum condition, the oxidation rate of ferrousion reached at 99.7%. **[Conclusion]** The strain Z1 was appreciated for bioleaching.

**Keywords:** *Thiobacillus ferrooxidans* (*T. f.*), 16S rDNA, Phylogenetic tree, Culture condition, Response surface analysis (RSA)

1947年, Colmer 和 Hinkle 从矿山酸性废水中分离出一株极端嗜酸杆菌命名为氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*, 简称 *T. f.*), 并证明该菌能促进煤中黄铁矿的氧化和溶解, 这被认为是微生物冶金研究的开端<sup>[1]</sup>。*T. f.*属于革兰氏阴性菌, 具有专性好氧、嗜酸、化能自养等特点, 该菌通过氧化亚铁离子为三价铁离子或氧化还原态硫化物为硫酸根而获得生长和生命活动的能量<sup>[2]</sup>, 在生物脱硫、生物冶金、生物处理污泥中的重金属和有色金属回收等领域都具有一定的应用价值<sup>[3-7]</sup>。

随着生物技术的快速发展, 微生物的鉴定手段被大大丰富, 尤其是分子生物学技术的发展, 使微生物的分类和鉴定结果更为快捷、准确<sup>[8]</sup>。Peng H. 从不同的矿井水中分离出4株不同的氧化亚铁硫杆菌, 应用16S rDNA序列分析法进行了分类和鉴定<sup>[9]</sup>。李广悦<sup>[10]</sup>、梅健<sup>[11]</sup>、蔡培<sup>[12]</sup>和李茹<sup>[13]</sup>等用单因素或正交实验对氧化亚铁硫杆菌的培养条件进行了研究。响应面分析法是分析响应变量 $\eta$ 与一组输入变量 $(\zeta_1, \zeta_2, \zeta_3, \dots, \zeta_k)$ 之间的函数关系 $[\eta=f(\zeta_1, \zeta_2, \zeta_3, \dots, \zeta_k)]$ , 也是一种实验条件寻优的方法, 适合于解决非线性数据处理的相关问

题。与以往的单因素或正交实验相比, 其优点在于不仅能确定单因素对菌株活性的影响, 而且能分析各个因素间交互作用的大小, 同时通过回归模型可以分析出影响菌株活性的主要因素。

本文以从四川成都热电厂附近土样中分离得到的一株嗜酸性氧化亚铁硫杆菌为研究对象, 对该菌株进行了形态、培养特性及16S rDNA序列分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

从成都热电厂采集土样, 用于菌种分离。

### 1.2 培养基

9K液体培养基<sup>[14]</sup>: A液:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g, KCl 0.10 g,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, 蒸馏水 600 mL, pH 2.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。B液:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  44.7 g, 蒸馏水 400 mL, 用6 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  调节pH为2.0, 过滤除菌。接种前将A液和B液混合。

9K固体培养基<sup>[15]</sup>: A液:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g, KCl 0.10 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01 g, 溶于1 L蒸馏水中, 用6 mol/L

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>调 pH 至 2.8, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。B 液: 将 24 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 溶于 180 mL 蒸馏水中, 过滤除菌。C 液: 将 15.0 g 琼脂溶于 400 mL 蒸馏水中, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。从 A 液中取出 420 mL 与 B 液及 C 液混合。

### 1.3 菌株的富集和分离<sup>[16]</sup>

称取 5 g 土样, 加入 10 mL 蒸馏水中, 充分搅拌, 静置几分钟, 取上清液接入 100 mL 9K 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 10 d, 至菌液呈红棕色。取 0.2 mL 菌液均匀涂布在 9K 固体培养基平板上, 30 °C 培养 11 d, 挑单菌落接种到 100 mL 9K 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 10 d。如此交替进行 3 次, 直到在显微镜上观察到一株菌体形态单一的纯培养菌株, 命名为 Z1。

### 1.4 形态学鉴定

用光学显微镜观察细菌形态及革兰氏染色情况。

### 1.5 16S rDNA 序列分析及系统发育树的构建

**1.5.1 基因组 DNA 的提取:** 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 Z1 的基因组 DNA。

**1.5.2 PCR 扩增:** 细菌 16S rDNA 基因的 PCR 扩增。正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3'; 反向引物 1492R: 5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3'<sup>[18]</sup>。反应体系: 反应总体积 50 μL, 包括 10×Taq Buffer 5 μL, dNTPs (2.5 μmol/L) 4 μL, 基因组 DNA 2 μL, 上、下游引物(20 μmol/L)各 1 μL, rTaq 酶(2.5 U) 0.5 μL, 加无菌水至 50 μL。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min<sup>[17]</sup>。

**1.5.3 16S rDNA 测序、分析及构建系统发育树:** 使用胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化, 送北京梓熙生物科技有限公司测序。将菌株 Z1 的 16S rDNA 序列用 BLASTn 进行同源性比对, 将该菌株序列与比对结果中同源性较高的序列应

用 ClustalX 1.81 进行全序列比对。利用 MEGA 5.0 软件分析其碱基组成, 以 Kimura-2 参数计算遗传距离, 采用 N-J 邻接法构建系统发育树, 在分支上标记 1 000 次重复获得的自展检验 Bootstrap 值。

### 1.6 菌株培养条件的优化<sup>[18]</sup>

对初始 pH 值、温度、接种量和装液量 4 个因素进行优化, 分别记为变量 A、B、C 和 D, 每个因素取 3 个水平; 以 Fe<sup>2+</sup>氧化率作为响应值, 记为 R; 利用 Design-Expert 软件中的 Box-Behnken 设计实验方案, 将菌株 Z1 在不同的培养条件下、150 r/min 振荡培养 25 h, 测定培养液的 Fe<sup>2+</sup>氧化率。

### 1.7 Fe<sup>2+</sup>氧化率的测定

Fe<sup>2+</sup>浓度的测定采用重铬酸钾法<sup>[19]</sup>。

氧化亚铁硫杆菌的氧化活性用 Fe<sup>2+</sup>氧化率来表征, Fe<sup>2+</sup>氧化率越高, 表明其将 Fe<sup>2+</sup>氧化为 Fe<sup>3+</sup>的能力越强, 其活性也越高。

$$\text{Fe}^{2+}\text{氧化率} = \frac{[\text{Fe}^{2+}]_{\text{空白}} - [\text{Fe}^{2+}]}{[\text{Fe}^{2+}]_{\text{空白}}} \times 100\%$$

式中: [Fe<sup>2+</sup>]为培养液中 Fe<sup>2+</sup>浓度; [Fe<sup>2+</sup>]<sub>空白</sub>为空白对照中 Fe<sup>2+</sup>浓度, 即不接菌 9K 培养基中的 Fe<sup>2+</sup>浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株形态和培养特征

菌体呈短杆状, 革兰氏阴性(图 1)。在 9K 液

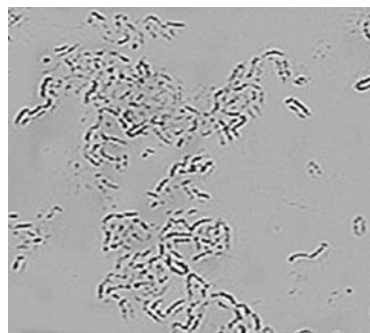


图 1 Z1 菌株革兰氏染色形态

Fig. 1 Morphology of Z1 strain by gram stain

体培养基中培养, 培养液先由浅绿色变成淡黄色, 最后变成红棕色, 并且产生沉淀。在 9K 固体培养基培养 11 d, 菌落为黄褐色且边缘光滑(图 2)。

## 2.2 16S rDNA 序列分析及系统发育树的构建

该菌株 16S rDNA 长度为 1 416 bp, GenBank

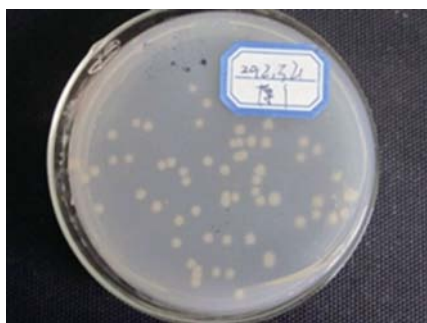


图 2 9K 培养基上的菌落形态

Fig. 2 The colony feature on the 9K medium

登录号为 JX545229。用 BLAST 进行序列同源性比对, 结果显示菌株 Z1 与 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 的同源性高达 99%。将该菌株序列与比对结果中同源性较高的序列应用 ClustalX 1.81 进行全序列比对, 利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树(图 3), 菌株 Z1 与嗜酸性氧化亚铁硫杆菌属在系统发育树上处于同一分支, 结合其生物学特性, 可以确定菌株 Z1 为嗜酸性氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)。

## 2.3 菌株培养条件的优化

本实验对初始 pH 值、温度、接种量和装液量进行优化, 分别将这 4 个变量记为变量 A、B、C、D, 各因素水平的取值见表 1, 以  $\text{Fe}^{2+}$  氧化率作为响应值, 记为  $R$ 。实验方案及结果见表 2。

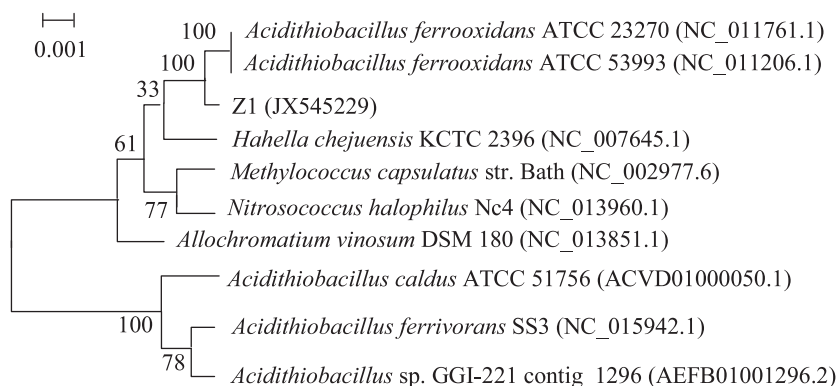


图 3 以菌株 Z1 16S rDNA 序列为基础的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain Z1

注: 分支点上的数字表示的是该分支的置信度; 刻度表示的是遗传距离; 括号中的序号是菌株的 GenBank 登录号。

Note: The digital representation on the branch point is degree of confidence. The scale indicates is genetic distance. The serial number in parentheses is the GenBank accession numbers of the strain.

表 1 因素的水平取值  
Table 1 The value of the factors

	因素 Factors	水平 Level		
		-1	0	1
A	pH	1.5	2.0	2.5
B	Temperature (°C)	26	30	34
C	Inoculum size (%)	5	10	15
D	Culture volume (mL)	50	70	90

表 2 实验方案和结果  
Table 2 The plan and the results of the experiments

No.	A	B	C	D	R	No.	A	B	C	D	R
1	-1	-1	0	0	28.61	15	0	1	-1	0	46.27
2	-1	1	0	0	88.93	16	0	1	1	0	67.31
3	1	-1	0	0	37.46	17	-1	0	-1	0	15.67
4	1	1	0	0	57.68	18	-1	0	1	0	97.26
5	0	0	-1	-1	45.37	19	1	0	-1	0	38.59
6	0	0	-1	1	46.42	20	1	0	1	0	91.71
7	0	0	1	-1	95.22	21	0	-1	0	-1	61.73
8	0	0	1	1	96.11	22	0	-1	0	1	62.14
9	-1	0	0	-1	83.96	23	0	1	0	-1	50.17
10	1	0	0	1	86.42	24	0	1	0	1	51.06
11	1	0	0	-1	80.10	25	0	0	0	0	82.01
12	1	0	0	1	74.18	26	0	0	0	0	81.77
13	0	-1	-1	0	30.46	27	0	0	0	0	81.77
14	0	-1	1	0	65.81						

通过 Design-Expert 软件对数据进行分析, 得回归方程:  $R=81.85-0.98 \times A+6.26 \times B+24.22 \times C+0.063 \times D-10.03 \times A \times B-7.12 \times A \times C+13.58 \times A \times D-3.58 \times B \times C+0.14 \times B \times D-0.040 \times C \times D-10.17 \times A^2-20.24 \times B^2-9.15 \times C^2-3.64 \times D^2$ 。

由回归方程可以看出一次方和平方项中 C 和  $B^2$  对响应值的影响最为显著, 而交互项中  $A \times D$  对响应值也有较大的影响, 但相对于 C 和  $B^2$  要小很多。因此, 可以说本实验 4 个因素之间的关系是二次关系, 并非是简单的线型关系, 而且各个因素之间的交互作用相对来说比较小, 在以后的实验中可以不考虑各个因素间的交互作用。

根据回归方程可由 Design-Expert 软件作出响应面立体图(图 4-9)。由 Design-Expert 响应面优化图可看出: 培养温度和接种量对亚铁氧化率有显著影响, pH 和装液量对其也有一定影响但不显著。

由 Design-Expert 软件分析可知, 该回归模型

R 的最大估计值为 98.39, 此时各个因素的值为初始 pH 1.8、温度 30 °C、接种量 14%、装液量 60 mL。模型预测值和实验验证值基本一致, 所以确定该条件为最优培养条件。

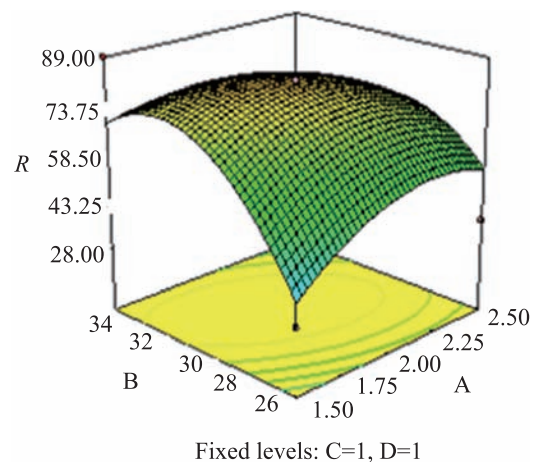


图 4 pH 和温度影响亚铁氧化率的响应面立体图  
Fig. 4 The response surface picture of the effect of pH and temperature on the oxidation rate of ferrous

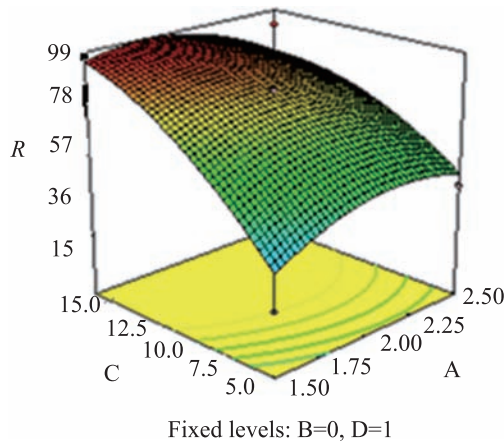


图5 接种量和 pH 影响亚铁氧化率响应面立体图  
**Fig. 5 The response surface picture of the effect of pH and inoculum volume on the oxidation rate of ferrous**

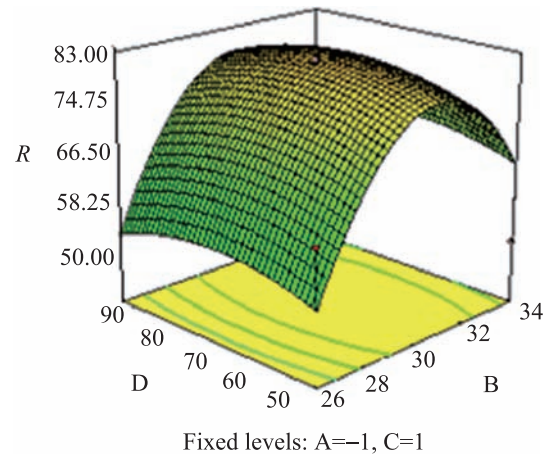


图8 装液量和温度影响亚铁氧化率响应面立体图  
**Fig. 8 The response surface picture of the effect of temperature and culture volume on the oxidation rate of ferrous**

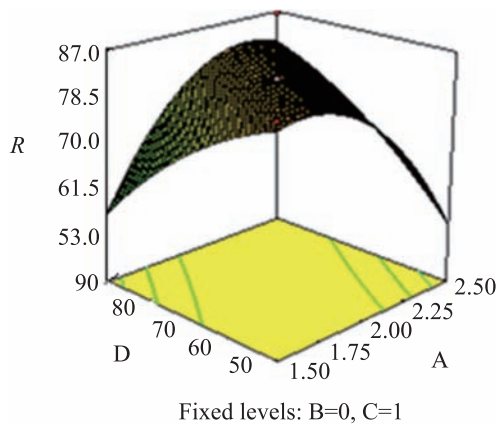


图6 装液量和 pH 影响亚铁氧化率响应面立体图  
**Fig. 6 The response surface picture of the effect of pH and culture volume on the oxidation rate of ferrous**

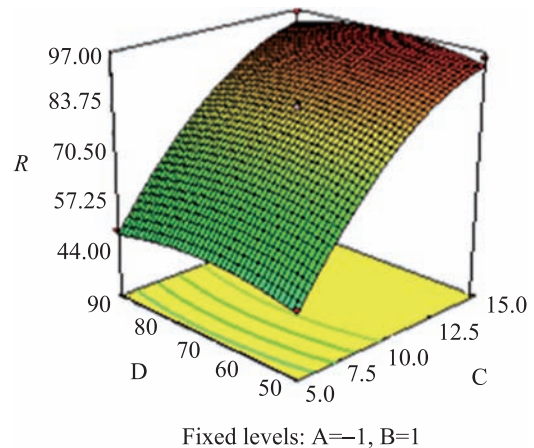


图9 装液和接种量影响亚铁氧化率响应面立体图  
**Fig. 9 The response surface picture of the effect of culture volume and inoculum size on the oxidation rate of ferrous**

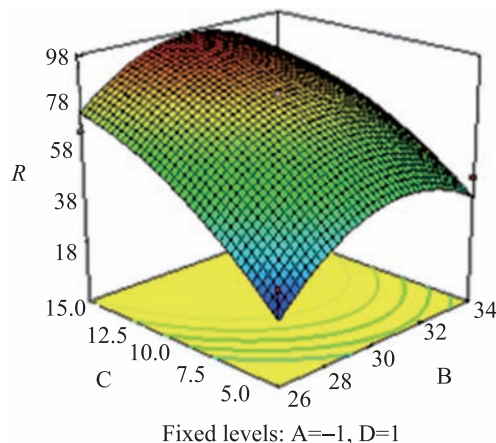


图7 接种量和温度影响亚铁氧化率响应面立体图  
**Fig. 7 The response surface picture of the effect of temperature and inoculum size on the oxidation rate of ferrous**

### 3 结论

(1) 从四川成都热电厂采集土样中分离得到一株细菌 Z1, 该菌为革兰氏阴性菌, 短杆状, 经 16S rDNA 鉴定为嗜酸性氧化亚铁硫杆菌。

(2) 本文采用响应面分析法对菌株的培养条件进行了优化, 确定其最佳的培养条件为: 初始 pH 值为 1.8、温度为 30 °C、接种量为 14%、装液量为 60 mL。在此最佳条件下, 当培养到 24 h

时, 菌株 Z1 的亚铁氧化率就可达 99.7%。

(3) 该研究结果说明 Z1 菌株适合于生物浸矿的应用, 且其在生物脱硫、生物冶金、有色金属回收等领域都具有较好的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Colmer AR, Hinkle ME. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report[J]. Science, 1947, 106(2751): 253-256.
- [2] 武华平, 袁斌, 白书立. 氧化亚铁硫杆菌及其在环境工程中的应用[J]. 广东工业大学学报, 2005, 22(4): 18-21, 25.
- [3] 邓恩建, 杨朝晖, 曾光明, 等. 氧化亚铁硫杆菌的研究概况[J]. 黄金科学技术, 2005, 13(5): 8-12.
- [4] 黄海炼, 黄明清, 刘伟芳, 等. 生物冶金中浸矿微生物的研究现状[J]. 湿法冶金, 2011, 30(3): 184-189.
- [5] 宣群, 肖文彦, 张玲琪, 等. 降解低浓度二氧化硫废气的菌株分离及其固定化研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2003, 25(2): 157-160.
- [6] 邓恩建, 杨朝晖, 曾光明, 等. 氧化亚铁硫杆菌培养条件的筛选及脱硫效果研究[J]. 环境科学与技术, 2005, 28(6): 1-3, 109.
- [7] 毕银丽, 胡瑜, 苏高华, 等. 氧化亚铁硫杆菌筛选及对矿区煤矸石脱硫影响[J]. 辽宁工程技术大学学报, 2007, 26(6): 929-932.
- [8] 武名麟, 阮仁满, 翟永功, 等. 紫金山铜矿浸矿微生物中一株硫杆菌的分子生物学鉴定[J]. 有色金属, 2007, 59(3): 43-48.
- [9] 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.
- [10] 李广悦, 刘玉龙, 王永东, 等. 一株氧化亚铁硫杆菌菌株的筛选及其生长特性的研究[J]. 南华大学学报: 自然科学版, 2007, 60(1): 7-9, 13.
- [11] 梅健, 陶秀祥, 刘金艳. 脱硫菌培养条件及脱硫研究[J]. 金属矿山, 2007, 37(11): 106-110.
- [12] 蔡培, 陶秀祥, 朱红威, 等. 氧化亚铁硫杆菌氧化 Fe(2+) 的动力学研究[J]. 选煤技术, 2008(5): 4-8, 77.
- [13] 李茹, 张书平, 崔心水, 等. 氧化亚铁硫杆菌生长特性的研究[J]. 西安工程大学学报, 2008, 22(6): 733-736.
- [14] Zhang JH, Xu Z, Ni YQ, et al. Bioleaching of arsenic from medicinal realgar by pure and mixed cultures[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(9): 1265-1271.
- [15] 刘文全, 任一兵, 王宇, 等. 1株氧化亚铁硫杆菌的分子鉴定及生物学特性研究[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(1): 70-73.
- [16] 苑璞. 氧化亚铁硫杆菌的分离鉴定及其在烟气脱硫中的应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2010.
- [17] Xia JL, Peng AA, He H, et al. A new strain *Acidithiobacillus albertensis* BY-05 for bioleaching of metal sulfides ores[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2007, 17(1): 168-175.
- [18] 苑璞, 苑琳, 邵静, 等. 氧化亚铁硫杆菌的分离及其培养条件优化[J]. 生物技术, 2010, 20(2): 47-50.
- [19] 姜涛, 金勇士, 李骞, 等. 氧化亚铁硫杆菌浸出铁矿石脱磷技术[J]. 中国有色金属学报, 2007, 17(10): 1718-1722.