

## 极端嗜酸硫杆菌高效筛选、高密度发酵及保藏方法的研究

冯守帅 杨海麟 高凯 陈金才 计云鹤 王武\*

(江南大学生物工程学院 教育部工业微生物技术重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:**【目的】针对嗜酸硫杆菌极端特殊的生化特性, 分别建立双层平板培养高效筛选方法和补料分批高密度发酵策略, 并优选最佳保藏方法, 以强化对该类菌种资源的利用和储备效率。

【方法】分别采用以异养型微生物 *Sacchromyces ellipsoideu* 和 *Rhodotorula* sp. 为底层培养物的双层平板培养嗜酸硫杆菌, 并结合透射电子显微镜技术(TEM)考察细胞形态差异。结合硫化矿培养基设计及单质硫补料培养策略, 延长 *Acidithiobacillus thiooxidans* 对数期, 提高比生长速率。分析不同保藏方法对嗜酸硫杆菌细胞存活率的影响。【结果】采用异养微生物——*Rhodotorula* sp. 作为底层培养物的双层平板培养法在缩减 1/3 检出周期的同时将 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 和 *Acidithiobacillus thiooxidans* 的检出率提高了 3 倍左右。TEM 结果表明双层培养中细胞形态更为规则。采用基于 Starkey-硫化矿培养基的补料分批发酵策略提高了 *Acidithiobacillus thiooxidans* 平均比生长速率, 硫对生物量转化率和生产强度分别比分批培养提高 31.1% 和 187.9%。4 °C 低温保藏方式更适于嗜酸硫杆菌的保藏, 有效保藏期 1–3 月。【结论】*Rhodotorula* sp. 为辅助培养物的双层平板培养法可有效提高嗜酸硫杆菌的筛选效率。设计的 Starkey-硫化矿培养基结合补料分批培养策略可实现 *Acidithiobacillus thiooxidans* 高密度培养。简单高效的 4 °C 低温保藏方式更适合于嗜酸硫杆菌的中短期保藏。

**关键词:** 嗜酸硫杆菌属, 双层培养, 补料分批策略, 菌种保藏

## The study on efficient screening, high-density fermentation and preservation methods for extremely *Acidithiobacillus* sp.

FENG Shou-Shuai YANG Hai-Lin GAO Kai CHEN Jin-Cai JI Yun-He WANG Wu\*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] Considering of the extremely special biochemical characteristics of *Acidithiobacillus* sp., the efficient double-layers screening, fed-batch high-density fermentation strategy and preservation method was respectively established and optimized for enhancing the utilization and reservation efficiency of these microbial resources. [Methods] The heterotrophic microorganisms such as *Sacchromyces ellipsoideu* and *Rhodotorula* sp. was employed as bottomed culture when the transmission electronic technology (TEM) was employed for observing the

基金项目: 江苏省创新计划项目(No. CXZZ11\_0481); 江南大学博士研究生科学研究基金项目(No. JUDCF11013)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85918119; ✉: bioprocessor@aliyun.com

收稿日期: 2014-03-10; 接受日期: 2014-04-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-14

morphological differences. Based on the designed sulfide medium and elemental sulfur fed-batch strategy, the logarithmic phase of *Acidithiobacillus thiooxidans* was extended when the specific growth rate was improved. The effects of different preserved methods on cell survival rates were also investigated. [Results] Using heterotrophic microorganisms—*Rhodotorula* sp. as the underlying culture in the double-layers culture, the screening cycle was reduced by 1/3, while the plating efficiencies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* were improved by about 3 times. More regular cell morphology was shown by TEM in the double-layers culture. The average specific growth rate of *Acidithiobacillus thiooxidans* was improved via fed-batch fermentation strategy in the Starkey-sulfide medium. The biomass conversion rate of sulfur and productivity were improved by 31.1% and 187.9% respectively, compared to the batch fermentation. The simple and efficient 4 °C cryopreservation perseveration was more suitable for preserving *Acidithiobacillus* sp. with the validity period about 1–3 months. [Conclusion] The screening efficiency of *Acidithiobacillus* sp. could be effectively improved by the double-layers culture with the auxiliary culture-*Rhodotorula* sp.. High-density fermentation of *Acidithiobacillus thiooxidans* was achieved via fed-batch fermentation strategy in the Starkey-sulfide medium. Simple and efficient 4 °C cryopreservation preservation was more suitable for preserving *Acidithiobacillus* sp. in the short-term.

**Keywords:** *Acidithiobacillus*, Double-layers culture, Fed-batch strategy, Culture preservation

随着全球易处理精矿储量的减少及金属需求量的日益增加,如何有效提炼低品位的贫尾矿已经变成了世界性难题。具有经济、环保并可有效提炼低品位矿物等优点的生物浸出工艺被认为是解决以上问题的绿色冶金技术<sup>[1-2]</sup>。在生物浸出过程中,浸矿微生物可以直接或通过浸出液与矿物进行各种生物化学反应,是整个体系的生命体和主导者,也是影响整个体系的主要因素<sup>[3]</sup>。然而由于其生存环境的极端特殊性,如强酸、高金属离子浓度且营养缺乏等,造就了浸出微生物独特的生化特性<sup>[3]</sup>。该类微生物多隶属化能自养型,通过亚铁或还原态硫氧化过程获取维持生命所需能量。以CO<sub>2</sub>为唯一碳源,生长速率偏低。采用传统的单层平板筛选菌种,平板培养过程中透气性较差,使得目标菌种难以获得足够碳源维持生长,导致平板培养周期偏长(约2周)且检出率极低<sup>[4-6]</sup>。这给高效浸矿菌种筛选及专属微生物菌种库的完善工作带来很大困难。

同时,无论是在科学研究还是工业化生产,生物浸出过程均需要大量微生物菌液。然而由于该类菌种比生长速率低,能源物质的生物量得率较低(尤其是硫利用率)且易受到底物或产物抑制,导致常规分批培养周期较长及菌体浓度生产强度较低,难以满足实际科研和生产需求<sup>[6-8]</sup>。此外,在获取

优良性状的菌种后,高效的菌种保藏工作也是非常重要的。尤其嗜酸硫杆菌具有特殊的生化特性,如该类菌种对最适生长pH极低,且对有机物胁迫非常敏感<sup>[9-11]</sup>。这也使得传统常规的保藏方法的效果并不理想,因此有必要针对该类菌种优选一种快捷高效的保藏方法。

本研究分别以生物浸出过程应用最为广泛的典型浸矿微生物——氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)和氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)为模式菌种,分别从提高该类微生物的筛选效率、高生物量培养模式确定以及保藏方法优选3个方面展开来解决上述难题。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 氧化亚铁硫杆菌(*A. ferrooxidans* CUMT-1)由中国矿业大学冷云伟赠送,筛选于兖州煤矿区酸性矿坑废水。氧化硫硫杆菌(*A. thiooxidans* ZJJN)筛选于福建紫金矿业有限公司2000万t级生物堆浸浸出液<sup>[12]</sup>。红酵母*Rhodotorula* sp. W1保存于本实验室,葡萄酒用活性干酵母购于安琪酵母股份有限公司。本研究所使用菌种的主要生理特性如表1所示。

表 1 菌种的主要生理特性  
Table 1 The main characteristics of strains

菌种 Strains	营养类型 Nutrition type	能源底物 Energy substrate	培养基 Medium	最适温度, pH Optimal temperature, pH
<i>A. ferrooxidans</i> CUMT-1	Chemolithoautotrophy	Fe <sup>2+</sup> /S <sup>0</sup>	9K	30–35 °C, pH 1.8–2.5
<i>A. thiooxidans</i> ZJJN	Chemolithoautotrophy	S <sup>0</sup>	Starkey	28–32 °C, pH 0–2.0
<i>S. ellipsoideus</i>	Chemoheterotrophy	Organic substance	YPD	30–37 °C, pH 3.0–5.5
<i>Rhodotorula</i> sp. W1	Chemoheterotrophy	Organic substance	YPD	30–37 °C, pH 3.0–5.5

**1.1.2 培养基:** (1) 9K 培养基(g/L)<sup>[12-13]</sup>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0, KCl 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.01, H<sub>2</sub>O 700 mL; 能源底物 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 44.3, H<sub>2</sub>O 300 mL。 (2) Starkey 培养基(g/L)<sup>[12]</sup>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.018, H<sub>2</sub>O 1 000 mL; 能源底物升华硫 10.0。 (3) YPD 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 10。

**1.1.3 硫化矿石:** 贫黄铜矿矿石采集于安徽铜陵冬瓜山铜矿, 金属矿物主要成分为黄铜矿、磁黄铁矿、黄铁矿和磁铁矿, 属于碱质偏高的钙碱性矿石。其中主要元素成分如表 2 所示。Zn、Mn、Ni、Pb、As、Ag、Au、Co、Cd 与 Hg 含量均低于检测限(<0.05%)。

## 1.2 双层平板法培养实验

取 0.5 g 葡萄酒用活性干酵母加入含有 5% 葡萄糖的去离子水, 37 °C 水浴 0.5 h。涂布于 YPD 固体平板, 30 °C 培养 24 h。同时将活化后的 *Rhodotorula* sp. W1 涂布于 YPD 固体平板, 在 30 °C 培养 24 h。并以这两类平板作为底层培养物, 分别将冷却的 9K 或 Starkey 固体培养基加热融化后冷却至约

50–60 °C, 迅速覆盖于底层培养物上面。进而将 *A. ferrooxidans* CUMT-1 和 *A. thiooxidans* ZJJN 菌液系列稀释后分别涂布于上层培养基, 30 °C 培养。同时设定相应单层平板培养作为对照, 观察菌落形成并定期进行菌落计数。

## 1.3 高密度发酵模式优选实验

(1) 分批培养: *A. thiooxidans* ZJJN 活化后接种至 100 mL 的 Starkey-S 培养基, 初始条件为 pH 1.8, 5% 接种量。培养条件为 30 °C、170 r/min 振荡培养, 定期检测 pH、硫酸根离子和菌体浓度。

(2) 基于 Starkey 培养基补料分批培养: 接种及培养条件同分批培养。当还原态硫低于 5 g/L 时补加升华 2 g/L 硫单质, 多次补料后菌体浓度出现下降时结束补料。

(3) 基于 Stakey-硫化矿补料分批培养: 向 Starkey 培养基中额外添加 0.2% 的硫化矿, 其他条件同基于 Starkey 培养基补料分批培养。

## 1.4 菌种保藏实验

连续培养保藏: *A. ferrooxidans* CUMT-1 培养于 9K 培养基, 每隔 3 d 进行转接; *A. thiooxidans* ZJJN 培养于 Starkey 培养基, 每隔 5 d 进行转接。固体平板保藏: 将长出菌落的 9K 和 Starkey 固体培养基放置于 4 °C 保存, 每隔 2 个月进行转接及平板保藏。4 °C 低温保藏: 将培养至对数期的菌种直接保藏于 4 °C, 每隔 3 个月进行重新培养保藏。冷冻-甘油保藏: 取对数菌液, 加入灭菌甘油控制终浓度 15%, 于 -20 °C 冷冻保藏。冷冻干燥保藏: 采用脱脂牛奶将平板上的菌落冲洗下来并迅速抽真空, 于 -20 °C 冷冻保藏。初始细胞浓度定义为 100%, 定期取保藏样品涂平板测定其活菌存

表 2 硫化矿主要元素含量

Table 2 The main element content of sulfide ore

参数 Parameter	含量和描述 Content and description
S (%)	12.80±0.10
Fe (%)	32.50±0.50
Cu (%)	1.01±0.02
Ca (%)	3.70±0.20
Mg (%)	3.73±0.20
Al (%)	1.40±0.12
Particle diameter (μm)	<48

活率。

本研究中所有实验均设计 3 个平行,图表中数据为 3 个测量值的平均值,误差线代表标准偏差。

## 1.5 检测方法

**1.5.1 透射电子显微镜分析<sup>[12]</sup>:**用 2.5% (体积比)的戊二醛将收集的细胞样品固定 0.5 h 后离心(6 000×g, 5 min)收集菌体,与 1.25% (质量体积比)水质琼脂混合。将凝固后的琼脂制成 1 mm 左右切片,并在含有 2.5% (体积比)戊二醛的磷酸缓冲液中继续固定 0.5 h。采用磷酸缓冲液洗涤 3 次后,将切片固定于 1% (质量体积比)四氧化锇的磷酸缓冲液中 1 h,再用超纯水漂洗切片于 1% (质量体积比)铈酰乙酸溶液中固定 1 h。采用乙醇和氧化丙烯进行梯度脱水后,将琼脂切片植入环氧树脂,经铈酰乙酸染色后待用。

**1.5.2 还原态硫浓度测定:**采用铬酸钡分光光度法<sup>[14]</sup>。取适度稀释后样液 10 mL 加入试管,分别加入 0.2 mL 的盐酸溶液(2.5 mol/L),煮沸 5 min。加入 0.5 mL 铬酸钡悬浊液(0.1 mol/L),继续煮沸 5 min。逐滴滴入(1+1)氨水至呈柠檬黄色,再补加 2 滴。适当冷却后采用慢速定性滤纸过滤,收集滤液于 10 mL 比色管内。若滤液浑浊,应继续重复过滤直至滤液透明。用蒸馏水洗涤试管及滤纸 3 次,收集滤液于比色管中,用蒸馏水稀释至标线。在 420 nm 波长处测定吸光值,根据标准曲线计算  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度。还原态硫浓度=初始添加浓度- $\text{SO}_4^{2-}$  浓度/3。

**1.5.3 菌体浓度测定:**采用核酸测定法<sup>[15]</sup>。取 1.0 mL 的培养基或浸出样液离心(367×g, 3 min)除去底层固体颗粒。取 0.5 mL 适度系列稀释后稀释液加入离心管,并加入 0.5 mL 三氯乙酸(5%),80 °C 水浴 25 min 后冰浴冷却,以 5% 的三氯乙酸作为空白对照在 260 nm 下测定其吸光值。最后根据显微镜计数与吸光值之间建立的标准曲线计算菌体浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 建立快捷高效的浸矿微生物筛选方法

#### 2.1.1 双层培养改善平板检出效率: Tuovinen 等<sup>[16]</sup>

研究发现  $\text{CO}_2$  通气量过低时会抑制 *A. ferrooxidans* 对亚铁的氧化过程。而采用以异养微生物作为底层辅助物的双层平板培养法中,下层异养微生物的代谢产物  $\text{CO}_2$  可为上层浸矿微生物提供碳源,促进细胞生长。此外,还可以消耗掉上层培养基中琼脂在高压蒸汽灭菌过程中产生的少量可溶性寡糖和单糖,减少其对目标菌的抑制作用,从而提高平板检出率。本研究采用两种常见异养微生物葡萄酒用活性干酵母和 *Rhodotorula* sp. W1 作为底层辅助培养物,以 *A. ferrooxidans* CUMT-1 与 *A. thiooxidans* ZJJN 为模式菌株,其平板检出时间及效率如图 1 所示。结果表明,单层培养基在第 10-11 天才开始出现菌落,最大菌落数仅为  $3.2 \times 10^6$  cells/mL (*A. ferrooxidans* CUMT-1) 和  $2.1 \times 10^6$  cells/mL (*A. thiooxidans* ZJJN);而在双层培养基中第 6-7 天便开始长出菌落,在筛选周期缩短近 1/3 的同时,最大检出菌落数也明显提升。采用葡萄酒用活性干酵母作为底层辅助物的双层培养,*A. ferrooxidans* 和 *A. thiooxidans* 的检出菌落数分别为单层培养的 2.1 和 2.2 倍;以 *Rhodotorula* sp. 为底层辅助物的双层培养检出菌落数则分别为单层培养的 3.1 倍和 4.1 倍。Fournier 等<sup>[17]</sup>曾发现与异养微生物之间混养的过程中会有相互促进生长的协同效应,这与实验结果也是吻合的。

**2.1.2 不同培养方法对细胞形态的影响:**采用 TEM 技术观察两种不同培养方法下 *A. ferrooxidans* 和 *A. thiooxidans* 细胞形态差异,结果如图 2 所示。无论是 *A. ferrooxidans* 还是 *A. thiooxidans*,采用双层平板培养中细胞形态更为规则,且表面较光滑,而在传统单层培养基中细胞形态规则性差,表面粗糙且表面或有荚膜形成,或荚膜厚度较厚。这意味着单层培养方法对该类菌种存在一定环境胁迫,迫使细胞调节荚膜的合成来抵御这种不利外界条件。这也从另一个角度证实了双层培养方式的筛选效率更高。因此,采用 *Rhodotorula* sp. W1 为底层辅助物的双层培养有望应用于筛选有类似生化特性的其他浸矿微生物。

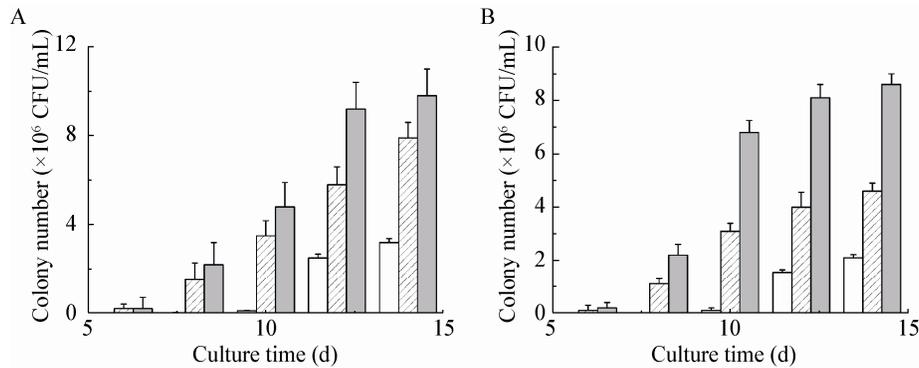


图 1 不同培养方法 *A. ferrooxidans* 和 *A. thiooxidans* 的菌落检出

Figure 1 The colony forming unit (CFU) of *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* by different plating methods

注 : A : *A. ferrooxidans* ; B : *A. thiooxidans*. □ : 单层平板培养 ; ▨ : 双层培养-葡萄酒用活性干酵母 ; ■ : 双层培养-*Rhodotorula* sp. W1.

Note : A : *A. ferrooxidans* ; B : *A. thiooxidans*. □ : Single-layer culture ; ▨ : Double-layers culture-*Saccharomyces ellipsoideu* ; ■ : Double-layers culture-*Rhodotorula* sp. W1.

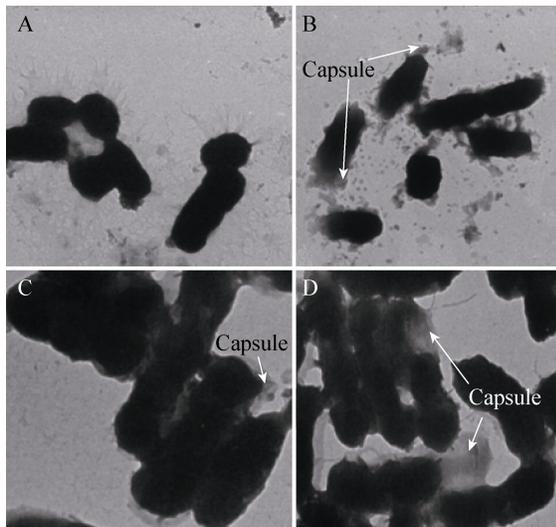


图 2 双层(*Rhodotorula* sp.)和传统单层培养法中细胞透射电镜图

Figure 2 Transmission electron microscopes of *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* by double-layers (*Rhodotorula* sp.) and traditional single-layer plating methods

注 : A : 双层平板的 *A. ferrooxidans* (bar , 1 μm ; 25.5×k) ; B : 传统单层平板的 *A. ferrooxidans* (bar , 1 μm ; 25.5×k) ; C : 双层平板的 *A. thiooxidans* (bar , 1 μm ; 42.5×k) ; D : 传统单层平板的 *A. thiooxidans* (bar , 1 μm ; 42.5×k).

Note : A : *A. ferrooxidans* of double-layers plate (bar , 1 μm ; 25.5×k); B : *A. ferrooxidans* of traditional single-layer plate (bar , 1 μm ; 25.5×k); C : *A. thiooxidans* of double-layers plate (bar , 1 μm ; 42.5×k); D : *A. thiooxidans* of traditional single-layer plate (bar , 1 μm ; 42.5×k).

## 2.2 建立 *A. thiooxidans* ZJJN-3 高密度发酵模式

2.2.1 基于 Starkey 培养基分批培养: 作为专性硫氧化菌种, *A. thiooxidans* 可有效利用在生物浸出过程产生的还原态硫, 从而减弱元素硫膜钝化层的抑制作用提升浸出率, 在加速硫代谢方面扮演了重要角色<sup>[18-19]</sup>。然而在纯培养过程中菌种硫氧化速率较慢, 使得细胞得率较低, 生物量过低, 难以满足实际需要<sup>[19]</sup>。基于 Starkey-S<sup>0</sup> 培养基分批培养结果如图 3 所示。接种后的菌种经过 20 h 左右的适应

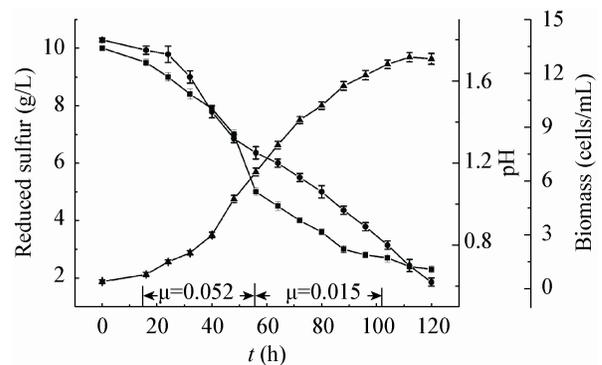


图 3 基于 Starkey 培养基分批培养过程 pH、生物量和还原态硫的变化

Figure 3 The changes of pH, biomass and reduced sulfur in batch culture based on Starkey medium

注 : ● : pH ; ▲ : 生物量 ; ■ : 还原态硫.

Note : ● : pH ; ▲ : Biomass ; ■ : Reduced sulfur.

期,开始步入快速生长阶段,在 16–56 h 阶段的平均比生长速率达  $0.052\text{ h}^{-1}$ , 菌体浓度呈指数升高。但在 56–104 h 阶段,随着还原态硫被逐渐消耗,细胞增长速率出现明显下滑,平均比生长速率仅为  $0.015\text{ h}^{-1}$ 。经过 120 h 培养,菌体浓度仅为  $1.28\times 10^8\text{ cells/mL}$ 。相比于 *A. ferrooxidans* 通常仅为 30–70 h 的培养周期即可达到菌体浓度约  $3\times 10^8\text{--}6\times 10^8\text{ cells/mL}$  差距明显<sup>[20]</sup>。鉴于 56–104 h 阶段由于能源底物的减少导致的比生长速率的下滑,可考虑采用补料策略来进行改善。

**2.2.2 基于 Starkey 培养基补料培养:**补料培养策略通过保证合适的关键底物浓度,同时减少其过高浓度抑制来实现高强度发酵过程。本研究首先采用基于 Starkey 培养基补料单质硫的方式来遏制 56–104 h 阶段菌种生长速率的大幅下降。当还原态硫下降至  $5\text{ g/L}$  时开始补加升华硫,保持其浓度不低于  $4.5\text{ g/L}$ 。保证在培养过程中能源物质还原态硫既不会产生较高底物抑制也不会成为限制性因素,维持菌体持续稳定生长,结果如图 4 所示。整个培养过程可分为分批培养(0–56 h)和补料培养(56–120 h)两个阶段。相比于分批培养,在 16–56 h 阶段,补料培养中还原态硫的浓度维持在更为合适的浓度,约  $4.5\text{--}9.5\text{ g/L}$ 。平均比生长速率达到  $0.031\text{ h}^{-1}$ ,为分批培养的两倍。基于 Starkey 培养基进行补料培养过程中 pH 呈持续下降趋势,与分批培养时 pH 变化规律基本一致。但补料过程中下降趋势持续时间更长。补料培养过程维持了更长的细胞生长对数期,最终菌体浓度可达  $2.87\times 10^8\text{ cells/mL}$ ,也远高于单纯采用分批培养的  $1.28\times 10^8\text{ cells/mL}$ 。

**2.2.3 基于 Starkey-硫化矿培养基补料分批培养:**常规发酵过程中复合培养基通常比合成培养基的培养效果更好,这为本研究采用 Starkey-硫化矿复合培养基高效培养 *A. thiooxidans* 提供了启发。硫化矿中碳酸类矿物质成分在酸解过程会释放  $\text{CO}_2$ ,部分溶解于培养基中可作为 *A. thiooxidans* 碳源。同时,矿物中硫成分的溶解也会生成还原态硫,可作

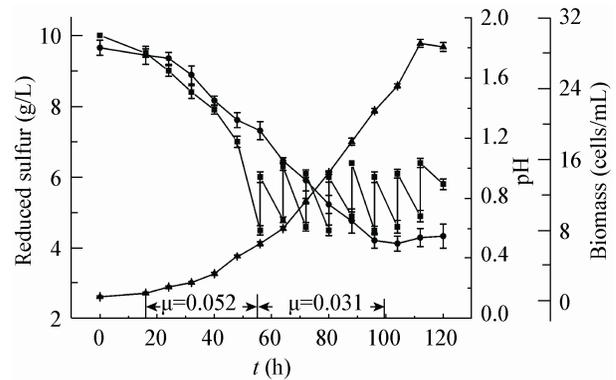


图 4 基于 Starkey 培养基补料培养过程 pH、生物量和还原态硫的变化

Figure 4 The changes of pH, biomass and reduced sulfur in fed-batch culture based on Starkey medium

注: ●: pH; ▲: 生物量; ■: 还原态硫。

Note: ●: pH; ▲: Biomass; ■: Reduced sulfur.

为菌体生长的能源底物。此外,基于 Starkey 设计的硫化矿培养基也可使菌种得到持续矿物驯化,便于后续浸出实验。以上因素促发设计硫化矿复合培养基来进行高密度培养 *A. thiooxidans*。考虑到较高浓度会导致延滞期延长,采用 0.2%的硫化矿浓度加入 Starkey 培养基制作硫化矿培养基。图 5 中结果表明,在基于硫化矿培养基补料培养过程中 pH 也维持在更适于菌体生长的范围。补料策略仍采用当还原态硫下降至  $5.0\text{ g/L}$  时开始补加升华硫,保持其浓度不低于  $4.5\text{ g/L}$ 。基于 Starkey-硫化矿培养基过程中的分批培养对数期阶段(0–56 h)的平均比生长速率为  $0.056\text{ h}^{-1}$ ,也略高于分批培养和基于 Starkey 培养基的补料培养。同时,补料培养阶段(56–104 h)的平均比生长速率达  $0.030\text{ h}^{-1}$ ,与基于 Starkey 培养基的补料培养持平,均为单纯分批培养的两倍。培养至 112 h,菌种的死亡速率开始高于其生长速率,逐渐出现菌体浓度的下降,这时候的一些其他参数如 pH、氧化还原电位、有机代谢废物及有限的生存空间等成为限制细胞生长的因素<sup>[19]</sup>。该策略中最终菌体浓度为 3 个培养过程中最高,可达  $3.69\times 10^8\text{ cells/mL}$ 。

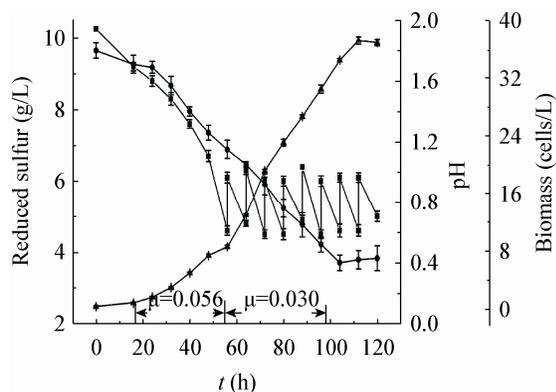


图 5 基于硫化矿培养基补料培养过程 pH、生物量和还原态硫的变化

Figure 5 The changes of pH, biomass and reduced sulfur in fed-batch culture based on sulfide medium

注: ●: pH; ▲: 生物量; ■: 还原态硫。

Note: ●: pH; ▲: Biomass; ■: Reduced sulfur.

不同培养方式生长参数比较: 3 种不同培养方式下主要参数比较如表 3 所示。补料分批培养可在保持较高的比生长速率基础上, 大幅提高菌体转化率与生产强度。相比于分批培养, 基于 Starkey 培养基补料培养的转化率和生产强度分别提高 8.0% 和 123.3%。基于硫化矿培养基补料培养的转化率和生产强度分别提高 31.1% 和 187.9%。因此, 采用补料培养策略可实现 *A. thiooxidans* 更高效的培养。与此同时, 相比于 Starkey 培养基, 基于硫化矿培养基补料的转化率和生产强度分别提高 22.6% 和 28.9%, 成为最高效的培养模式, 这也为类似生化特性的浸出微生物的高密度培养提供了参考。

### 2.3 快捷高效保藏嗜酸硫杆菌方法优选

无论是实验室研究还是工业化生产, 高效的菌种保藏都极其重要。获得具有优良性状的菌株之后, 因为保藏不当而产生菌种退化, 将会造成很大的经济和精力损失<sup>[21]</sup>。嗜酸硫杆菌长期生存的环境恶劣, 营养贫瘠, 造就了该类微生物独特的生理特性, 如可耐受极低的 pH 且对有机物非常敏感, 其最佳保藏方法也有别于传统常规保藏<sup>[22-23]</sup>。本研究以 *A. ferrooxidans* 和 *A. thiooxidans* 为模式菌株, 分别研究了 5 种保藏方法对其细胞存活率的影响。结果表明, 随着保藏时间延长, 细胞存活率逐渐降低。保藏效果顺序依次为连续培养>冷冻干燥法>4 °C 低温保藏>斜面保藏效果>甘油悬浮低温冷冻法(图 6)。甘油悬浮低温冷冻法效果最差的原因是甘油类有机物对该类化能自养型微生物细胞有一定的毒害胁迫作用。连续培养操作繁琐、费时费力, 且过多传代次数易导致优良菌种退化, 因此也不是最佳选择。冷冻干燥法对设备要求较高且费用较高, 更适用于长期菌种保藏。4 °C 低温保藏穿凿了一种低营养及溶氧的贫瘠环境, 而且操作简单、保藏存活率高, 非常适用于中短期(1-3 月)保藏。杨宇等<sup>[11]</sup>研究发现营养缺乏、无氧、低盐浓度的环境有利于 *A. ferrooxidans* 的保藏, 而甘油作为保护剂的保藏方法效果较差, 这与本研究结果也是一致的。冷冻干燥的保藏方法更适合于该类菌种的长期保藏。

表 3 三种培养方式下主要参数比较

Table 3 The comparison of key parameters between the three culture methods

培养方法 Culture method	培养时间 Culture time (h)	硫消耗量 Consumed sulfur (g/L)	均比生长速率 Average of $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	终了菌浓度 Final Biomass (cells/mL)	转化率 Converted rate (cells/g S <sup>0</sup> )	生产强度 Productivity (cells/(mL·h))
Batch culture	120	7.8	0.032	12.8 E7	1.64 E10	1.07 E6
Fed-batch-Starkey	120	16.2	0.040	28.7 E7	1.77 E10	2.39 E6
Fed-batch-Sulfide	120	17.2	0.040	36.9 E7	2.15 E10	3.08 E6

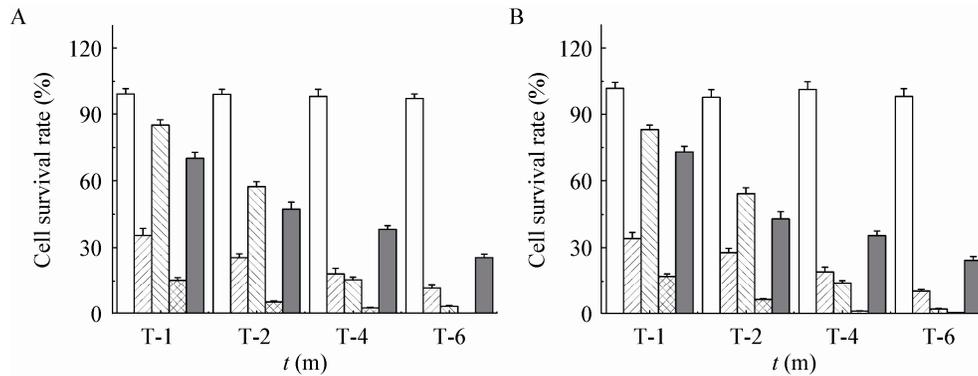


图 6 不同保藏方法对细胞存活率的影响

Figure 6 The effects of different preservation methods on cell survival rates

注: A: *A. ferrooxidans*; B: *A. thiooxidans*. □: 连续培养; ▨: 平板保藏; ▩: 低温保藏; ▤: 甘油悬浮冷冻保藏; ■: 冷冻干燥保藏。

Note: A: *A. ferrooxidans*; B: *A. thiooxidans*. □: Continuous culture; ▨: Plating preservation; ▩: 4 °C cryopreservation preservation; ▤: Glycerol suspended-freezing preservation; ■: Freezing-drying preservation.

### 3 结论

(1) 建立了以 *Rhodotorula* sp. 为底层培养物的浸矿微生物专属双层培养筛选方法。相比于传统单层平板培养, 可将周期缩短 1/3, 同时平板检出效率提高 3 倍左右。TEM 结果表明, 双层筛选培养基中细胞形态更为规则且细胞表面较光滑, 也证实了双层培养方法更适于嗜酸硫杆菌的平板检出。

(2) 采用硫单质补料分批策略有效提高了 *A. thiooxidans* ZJJN-3 纯培养的转化率和生产强度。基于 Starkey 设计的硫化矿培养基的补料分批发酵可延长对数生长期, 且保持对数期后半段比生长速率约为分批培养的两倍, 硫对生物量转化率和生产强度分别比分批培养提高 31.1% 和 187.9%, 实现了该类化能自养型极端微生物的高密度发酵。

(3) 4 °C 低温培养液保藏保持了无氧、较低的 pH 及营养贫乏的条件, 操作简单且保藏存活率高, 非常适于该类极端浸矿微生物的中短期(1-3 月)保藏。

### 参考文献

[1] Rawlings DE. 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: 13-27.

[2] 刘宏伟, 戴艳霞, 黄伟, 等. 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[J]. 微生物学通报, 2012, 39(8): 1069-1078.

[3] 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.

[4] Feng SS, Xin Y, Yang HL, et al. A novel and efficient assay for identification and quantification of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in bioleaching samples[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39(8): 1161-1168.

[5] Johnson DB, McGinness S. A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic, iron-oxidizing, acidophilic bacteria[J]. Journal of Microbiology Methods, 1991, 13(2): 113-122.

[6] 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.

[7] 庄贺, 沈俊剑, 黎俊, 等. 氧化亚铁硫杆菌的分离鉴定及培养条件优化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1131-1137.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

- [11] 杨宇, 张燕飞, 黄菊芳, 等. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌的保藏方法[J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2006, 37(3): 472-475.
- [12] Feng SS, Yang HL, Xin Y, et al. Isolation of an extremely acidophilic and highly efficient strain *Acidithiobacillus* sp. for chalcopyrite bioleaching[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39(11): 1625-1635.
- [13] Johnson DB. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria[J]. Journal of Microbiology Methods, 1995, 23(2): 205-218.
- [14] 中华人民共和国环境保护部科技标准司. 水质硫酸盐的测定铬酸钡分光光度法(试行)[S]. 中华人民共和国环境保护行业标准, 2007, HJ/T: 342-2007.
- [15] 魏培莲, 岑沛霖, 盛春琦. 3种固态发酵生物量测定方法的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 60-64.
- [16] Tuovinen OH, Kelly DP. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers, and comparison with CO<sub>2</sub>-fixation and iron oxidation as measures of growth[J]. Archives of Microbiology, 1973, 88: 285-298.
- [17] Fournier D, Lemieux R, Couillard D. Essential interactions between *Thiobacillus ferrooxidans* and heterotrophic microorganisms during a wastewater sludge bioleaching process[J]. Environmental Pollution, 1998, 101: 303-309.
- [18] 周立祥, 周顺桂. 氧化硫硫杆菌及制革污泥中铬的生物脱除方法: 中国, CN1375553A[P]. 2003-01-08.
- [19] Fang D, Zhou LX. Effect of sludge dissolved organic matter on oxidation of ferrous iron and sulfur by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. Water Air and Soil Pollution, 2006, 171(1/4): 81-94.
- [20] 汪智姝, 陈晓, 李万全. 高铁浓度下氧化亚铁硫杆菌的生长动力学[J]. 化工进展, 2007, 26(10): 1475-1480.
- [21] 中国科学院微生物研究所菌种保藏手册编写组. 菌种保藏手册[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [22] Morgan CA, Herman N, White PA, et al. Preservation of micro-organisms by drying; a review[J]. Journal of Microbiology Methods, 2006, 66: 183-193.
- [23] Zeng WM, Zhou HB, Wan MX, et al. Preservation of *Acidithiobacillus caldus*: A moderately thermophilic bacterium and the effect on subsequent bioleaching of chalcopyrite[J]. Hydrometallurgy, 2009, 96(4): 333-336.



## 编辑部公告

### 《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。