

Ferrobacillus sulfooxidans 氧化亚铁 离子活力的影响因素*

鍾慧芳 裘荣庆

(中国科学院微生物研究所, 北京)

化能自养型亚铁氧化细菌的研究,最早开始于1947年 Colmer 和 Hinkle^[1] 从酸性矿水中分离出一种亚铁氧化细菌 *Thiobacillus ferrooxidans*; 1949年 Leathen 和 Madisem^[2] 从相似矿区分离出一种 *Ferrobacillus ferrooxidans*; 1960年 Kinsel^[3] 分离出一种 *F. sulfooxidans*。三种亚铁氧化细菌的形态特征极其相似,都能以氧化亚铁离子作为主要能量来源,而差异只在硫化物的利用上不同。然而在1953年 Leathen 等人^[4]发现从硫化矿床中流出的红色酸性矿水,主要含有硫酸高铁和硫酸,系由 *T. ferrooxidans* 氧化矿水中的亚铁离子至高铁离子, *T. thiooxidans*^[5] 氧化元素硫成硫酸,导致高酸度矿水形成的原因,构成了加速硫化矿床破坏的硫酸高铁有效溶剂,因此1958年 Kennecontt 铜山公司^[6]应用 *T. ferrooxidans* 提供硫酸高铁和硫酸溶剂溶浸低品位铜矿石的方法,成功地回收了铜,并指出带有这种细菌的硫酸高铁和硫酸溶液,不但能够用于浸矿,而且能够循环再生。同时还指出这个方法亦能够有效地溶浸其它种金属硫化物,随着浸矿溶液的循环渗滤,溶解于浸矿液中的各种有用金属离子亦得到浓缩,从而达到回收的浓度,大大地降低生产成本,提高了这个方法的经济价值,所以细菌参与硫酸高铁的湿法冶金,无疑在国民经济建设上有着重要的意义。

任何一个国家开采有色金属矿床,必然由富矿走上贫矿开采的日程,用现有的机械开采和选冶的方法处理贫矿已成为巨大困难时,需要建立一种从低品位矿石回收各种金属的更有效的方法,因此微生物的生物化学反应的应用,无疑地是解决这个问题的一种可能的途径。我们按照这个目的,进行 *F. sulfooxidans* 氧化亚铁离子最适条件以及对重金属离子耐力的试验。

材料与方 法

试验菌株 为宋鸿迁等^[7]从安徽省铜官山酸性矿水中分离的 *Ferrobacillus sulfooxidans*。

培养基 采用了 Leathen^[8] 的无机亚铁培养基,其成分: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.15克; K_2HPO_4 0.05克; KCl 0.05克; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5克; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01克; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 130克;蒸馏水 1000毫升;用10%硫酸溶液调节培养基 pH 2.0。将灭菌的培养基 20毫升盛于100毫升锥形瓶中,或者是100毫升盛于500毫升锥形瓶中,接种4—5天菌龄1%菌量的培养物,置于28℃培养,定时测定培养液里亚

* 技术助理: 王兴同志。

本文承蒙王大珍先生指导和审阅,特此致以衷心谢忱。

本文1965年2月27日收到。

铁的变化量。

测定磷酸盐对 *F. sulfooxidans* 氧化亚铁和固定二氧化碳的影响 采用瓦勃呼吸计方法^[9]。将制备的无高铁沉淀的纯净细胞^[7]，用 pH 2.2 的 KCl-HCl 缓冲溶液制成悬浮液，测定时，将洗涤细胞悬浮液和磷酸盐加入瓦勃反应瓶的主室中，亚铁溶液加至侧臂，中心小杯加入 30% KOH 溶液 0.2 毫升，吸收去空气中的 CO₂。作 CO₂ 固定试验时，则不加入 KOH 溶液，空气中的 CO₂ 含量未测定。

***F. sulfooxidans* 对重金属离子的忍耐力试验** 将 CuSO₄·5H₂O, ZnSO₄·7H₂O, NiSO₄·7H₂O, MnSO₄·7H₂O, CoCl₂·6H₂O 和 Al₂(SO₄)₃·18H₂O 等盐，各配制成一定浓度的金属离子溶液，通过无菌的 Seite 漏器，取所需要的离子浓度一定量溶液，加入灭菌的亚铁培养基里，接种量（4—5 天菌龄）1%，28℃ 下静置培养，当细菌生长后，培养液中的亚铁被完全氧化时，立刻将培养物分别移种入有同一种重金属离子浓度和高一级浓度的新鲜培养基中，如果能在高一级金属离子浓度培养液里生长，则在下一大的培养基里再提高金属离子的浓度。如此反复进行，可以获得对高浓度重金属离子具有适应能力的新菌株。

测定方法 用标定过的重铬酸钾溶液和二苯磷酸钠作指示剂的容量滴定法，定期测定培养液中亚铁离子的变化，计算出亚铁氧化成高铁的量；用雷磁 25 型酸度计测定培养液的 pH 值；用汤姆氏血球计数器，直接在显微镜上计算细胞数量，以检查细菌的生长速度；微量凯氏定氮法测定细胞氮量。

结果和讨论

亚铁氧化细菌参与硫酸高铁湿法冶金的主要作用，在于它能够将浸矿溶液中的硫酸亚铁快速地再生硫酸高铁循环浸矿，要求细菌在浸矿过程中具有不衰退的氧化活力，因此，找出细菌最适宜的生长条件是必要的。

（一）通气对 *Ferrobacillus sulfooxidans* 氧化亚铁速度的影响

将接种的培养瓶分成两组，一组试验静置于 28℃ 培养，另一组试验置于 26—28℃ 旋

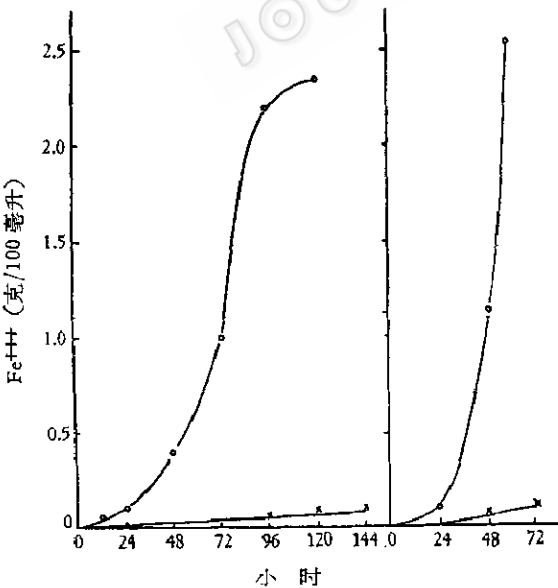


图1 静置培养对 *F. sulfooxidans* 氧化 Fe⁺⁺ 速度的影响。

—○—○—接种；—×—×—不接种（对照）。

转摇床（150 转/分）上培养，对照试验均不接种，结果见图 1 和图 2。静置培养瓶 144 小时将 2.5 克 Fe⁺⁺ 氧化完全，而摇床培养只需 72 小时，较静置培养的氧化活力提高一倍，说明该菌氧化亚铁离子至高铁离子的能力很强。

在上述静置培养的同时，测定了细菌氧化亚铁速度与生长的关系。试验结果表示于表 1，细胞的生长随着亚铁被氧化完而停止，培养至第三天第四天，细菌氧化亚铁的速度呈直线上升（见图 1），细胞的繁殖力也最强，约氧化 22 毫克 Fe⁺⁺，则每毫升达 375×10^8 个细胞，说明随着细胞的大量繁殖，亚铁得到快速氧化。

（二）温度的影响

将接种的培养物分别置于 5—55℃ 不同温度的地方静置培养，试验结果见图 3，

表 1 *F. sulfooxidans* 氧化亚铁速度与生长的关系

静置培养时间 (小时)	0	24	48	72	96	120	144
细菌氧化 Fe^{++} 至 Fe^{+++} 的量 (Fe^{+++} 毫克/毫升)	0	0.42	1.01	5.08	21.08	22.84	22.76
细胞繁殖量 (细胞/毫升)	180×10^4	120×10^6	132×10^6	215×10^7	180×10^9	375×10^8	590×10^8

最适温度 25—28℃, 15℃ 以下和 35℃ 以上, 氧化活力急剧减弱, 5℃ 和 40℃ 已成为细菌生长的最低和最高的临界温度, 低温时, 细菌氧化亚铁速度极为缓慢, 在 5℃ 培养 75 天才将培养液的 2.5 克 Fe^{++} 氧化完全, 45℃ 以上培养液的亚铁产生浓缩沉淀现象。因此, 应用细菌溶浸矿石, 如果考虑 *F. sulfooxidans* 在整个浸矿过程中的加速作用, 必须控制浸矿溶液的温度为 25—28℃, 超过 40℃ 以上, 则不是细菌作用。

(三) pH 的关系

亚铁氧化细菌产于硫化铜矿区的酸性水中, 具有高度的耐酸能力, 但是适宜的酸度对它快速氧化亚铁至高铁, 具有实际的冶金生产意义, 因此, 用浓硫酸调节亚铁培养基至不同的酸度 (pH 1—4.5 之间), 试验结果见图 4, 最适 pH 1.6—3.0, 只需 7 天时间把约 2.5 克 Fe^{++} 氧化完全, pH 4.0 和 pH 1.4 是该菌生长的最高和最低临界 pH 范围, 细菌氧化活力比较弱, 但是, 即使在 pH 1.5—1.4 的培养液里, 能够分别于 10 天和 14 天氧化完全, 显示出具有一定的氧化能力, 说明该菌具有一定的嗜酸的特性, 特别应当指出, 在 pH 1.7—1.6 的培养液里, 当亚铁离子全部氧化至高铁离子时, 高铁离子呈可溶性状态, 而 pH 1.8—3.0 的培养液里, 则有大量的铁沉淀物出现。因此, 如果进行细菌的硫酸高铁溶液溶浸硫化矿物时, 加入硫酸调节浸矿溶液的酸度, 以 pH 1.6—2.0 为宜。

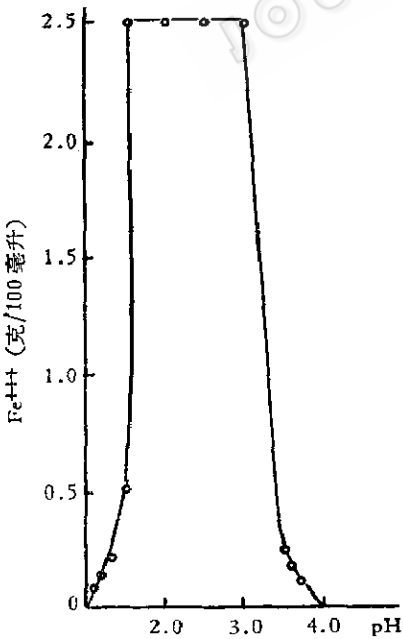


图 4 pH 对 *F. sulfooxidans* 氧化亚铁速度的影响 (静置培养 7 天)。

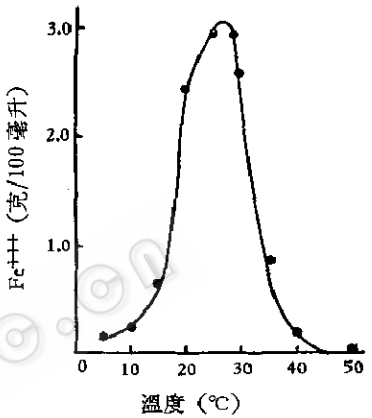


图 3 温度对 *F. sulfooxidans* 氧化亚铁速度的影响 (培养 7 天)。

(四) 磷酸盐对 *Ferrobacillus sulfooxidans* 氧化亚铁速度和对固定二氧化碳的影响

Razzell 和 Trussell^[10] 曾进行过磷酸盐对细菌溶浸黄铜矿的铜的试验, 指出高浓度的磷酸盐 (未报导磷酸盐浓度) 要不是抑制铜的浸出, 就是与铁离子生成不溶性磷酸盐沉淀物。因此, 细菌浸矿时, 加入适量低浓度的磷酸盐, 既可以作细菌的营养, 又可以促进细菌氧化浸矿液中硫酸亚铁成硫酸高铁, 加速浸矿速度。我们首先在一定的菌量下, 试测了不同浓度的磷酸对亚铁

氧化速度的影响。试验结果见图 5, 加入磷酸盐比较不加的显著的提高细菌消耗氧的速度, 最适浓度以 7.25×10^{-7} 克分子 K_2HPO_4 (这个浓度等于 Leathen^[8] 亚铁培养基每升

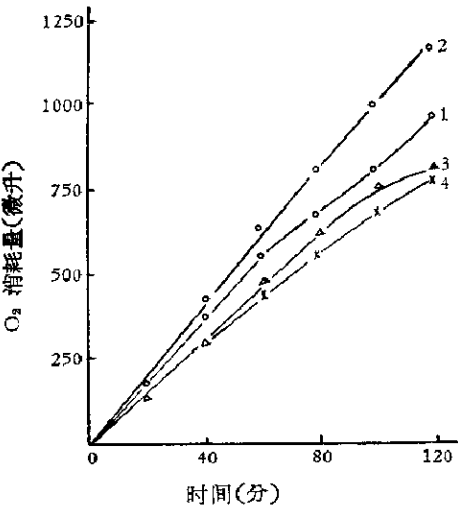


图 5 磷酸盐浓度对 *F. sulfooxidans* 在亚铁上呼吸的影响。

反应瓶加入细胞悬浮液(总氮量 = 0.125 毫克)各瓶加入 K_2HPO_4 浓度为: 瓶 1, 7.25×10^{-6} 克分子; 瓶 2, 7.25×10^{-7} 克分子; 瓶 3, 7.25×10^{-8} 克分子; 瓶 4, 不加。各瓶侧臂加入 450 微克分子 Fe^{++} 溶液。最终 pH 2.0。中心小杯加入 30% KOH 0.2 毫升和小卷滤纸, 总容量 2.7 毫升, 温度 28℃。

0.05 克 K_2HPO_4), 而高于或低于 (7.25×10^{-6} 或 7.25×10^{-8} 克分子 K_2HPO_4) 这个浓度, 都不能得到细菌对氧的最大消耗量。

在这个试验的基础上, 测定磷酸盐对细菌固定二氧化碳的影响, 以磷酸盐浓度为零及最适磷酸盐浓度 7.25×10^{-7} 克分子, 使细菌氧化 225 微克分子亚铁离子测定其固定 CO_2 的作用, 固定的 CO_2 量是按照 Umbreit^[9] 的检压技术测定生物固定 CO_2 的方法计算的, 固定 CO_2 的能量效率是按照下面的公式计算, 计算前应将固定的 CO_2 量, 按阿佛加德定律, 在标准状态下, 每克分子气体为 22.4 升体积换算成微克分子量, 然后代入公式计算。根据式中氧化 1 克原子亚铁离子释放能量 11.3 卡, 固定 1 克分子 CO_2 需要能量按 113 卡来计算。

能量效率% = $\frac{\text{固定 } CO_2 \text{ 原子} \times 113 \text{ (卡)}}{\text{氧化 } Fe^{++} \text{ 原子} \times 11.3 \text{ (卡)}} \times 100$

结果见表 2, 指出细菌氧化亚铁离子至高铁离子过程固定 CO_2 , 当亚铁被利用完时 (取反应瓶溶液测

表 2 磷酸盐对 *F. sulfooxidans* 氧化 225 微克分子 Fe^{++} 固定 CO_2 的作用

试 验	加入 7.25×10^{-7} 克分子 K_2HPO_4			不加 K_2HPO_4		
	固定 CO_2 量		能量效率 (%)	固定 CO_2 量		能量效率 (%)
	微 升	微克分子		微 升	微克分子	
1	210.00	9.30	41.70	138.38	6.10	27.10
2	177.48	7.90	34.70	100.00	4.40	19.95

定, 已无 Fe^{++} 存在), CO_2 的同化作用亦随之停止, CO_2 的固定量并无增加。加入磷酸盐的试验比较不加磷酸盐的试验, 固定的 CO_2 量显增多, 于 1.5 小时内分别固定 CO_2 量为 210 微升, 177.48 微升和 138.38 微升, 100 微升。而固定 CO_2 所需的能量效率分别为 41.7%, 34.7% 和 27.1%, 19.5%。由此说明磷酸盐促进 CO_2 的固定作用, 从而加速了细菌的生长速度。而且表 1 已经指出, 细菌随着氧化亚铁速度的加快而大量的繁殖, 所以磷酸盐不论在促进细胞对亚铁氧化速度方面, 以及促进细胞的生长速度方面, 都有比较显著的作用。

(五) 重金属离子浓度对细菌氧化亚铁能力的影响

在硫酸高铁湿法冶金过程中, 为了保持细菌氧化硫酸亚铁成硫酸高铁的最高活力, 除了需要了解该菌的一般生理特性之外, 由于循环渗滤浸矿液中有相当高浓度的各种金属

离子, 而亚铁氧化细菌是否能够抵抗这些重金属离子的毒害性, 成为一个不可忽视的问题, 有关这方面的问题, Kennecott 铜山公司^[6] 曾经报导过, *T. ferrooxidans* 在较高浓度的铜溶液里可以长时间生长, 繁殖力也很强, 但是在 0.015% 锌溶液里不生长, 因此他们将该菌放在一种更高浓度的金属离子培养液里, 连续繁殖驯化, 获得了一种新的菌株, 对金属离子的抵抗力增高到 1.2% Cu, 1.7% Zn, 0.6% Al, 0.49% Ca, 0.24% Mn 和 0.16% Mo 等浓度。几种金属离子浓度是根据铜官山某矿石的化学元素组成成分确定的, 如表 3。

表 3 铜官山某矿石物质组成成分

成 分	Fe	Cu	Mn	Zn	Ni	Co	Al
(%)	>5	0.1—1	0.1—1	0.01±	0.001—0.01	0.01±	1—10

试验要求细菌对重金属离子的忍耐力, 必须等于或者超过矿物中金属离子的浓度。

(1) *F. sulfooxidans* 对亚铁离子的忍耐力 试验结果列于表 4, 细菌原有的忍耐亚铁离子浓度为 5% Fe^{++} , 在 5.5—6% Fe^{++} 浓度的培养液里, 没有发现氧化现象, 却有亚铁盐的浓缩现象(由于培养液的蒸发所致)。

表 4 *F. sulfooxidans* 对 Fe^{++} 的忍耐力

培养液 Fe^{++} 浓度 (克/100毫升)	0.96	1.4	1.8	2.2	2.7	3.5	3.9	5.2
细菌氧化完 Fe^{++} 所需时间(天)	4	4	4	6	6	8	10	14

(2) *F. sulfooxidans* 对六种重金属离子的忍耐力 试验结果于表 5, 原菌株在 0.1% Cu^{++} , Co^{++} 和 Al^{+++} , 1% Mn^{++} , Zn^{++} 和 Ni^{++} 等单一离子浓度的亚铁培养液里将约 2.1 克 Fe^{++} 氧化完全。说明细菌原有的忍耐重金属离子浓度很高。但是表 6 的试验结

表 5 *F. sulfooxidans* 对重金属离子的原有忍耐力

培养基里金属离子的浓度 (克/100毫升)		培养基里原始的 Fe^{++} 浓度 (克/100毫升)	细菌氧化 Fe^{++} 至 Fe^{+++} 量 (克/100毫升)	
			2 天	6 天
Cu^{++}	0.1	2.145	0.110	2.145
Mn^{++}	1.0	2.130	0.045	2.130
Zn^{++}	1.0	2.136	0.315	2.136
Co^{++}	0.1	2.100	0.180	2.100
Ni^{++}	1.0	2.160	0.180	2.160
Al^{+++}	0.1	2.070	0.275	2.070
Cu^{++}	0.1	2.160	0.110	2.160
Mn^{++}	1.0			
Zn^{++}	1.0			
Co^{++}	0.1			
Ni^{++}	1.0			
Al^{+++}	0.1			
Fe^{++}		2.145	0.135	2.145

果指出,提高各个金属离子的浓度后,则氧化活力减弱,经过几次培养,才能恢复它的氧化活力,其中对 Mn^{++} , Zn^{++} 和 Al^{+++} 等离子适应最快,对 Cu^{++} 和 Co^{++} 比较难于适应,都需要十多天才能适应,在含有 2% Cu^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} 和 Ni^{++} , 1.5% Co^{++} 和 1% Al^{+++} 等浓度混合物的亚铁培养液里,细菌氧化亚铁极其缓慢。

从以上试验结果可以看出, *F. sulfooxidans* 具有抵抗高浓度重金属离子的能力,远超过表 3 所列的矿石物质组成成分的含量,如果进一步提高它们对重金属离子浓度的忍耐力,还是有可能的。因此, *F. sulfooxidans* 可以适用于硫酸高铁湿法冶金中浸矿溶液的再生。

从以上几个试验结果来看,该菌适用于硫酸高铁浸矿过程再生硫酸高铁浸矿溶液,其主要成本也只包括维持可溶性硫酸高铁所需要的硫酸,即调节至适宜的 pH 1.6—2.0,加入每毫升 2.9×10^{-7} 克分子 K_2HPO_4 , 和足够细菌消耗的空气中的二氧化碳,就能保持该菌较快的氧化速度。

表 6 *F. sulfooxidans* 对高浓度重金属离子的忍耐力

培养基里重金属离子的浓度 (克/100 毫升)		培养基里原始的 Fe^{++} 浓度 (克/100 毫升)	细菌氧化 Fe^{++} 至 Fe^{+++} 量 (克/100毫升)	
			天	Fe^{+++}
Co^{++}	0.5	2.050	13	1.135
	1.0	2.010	15	1.450
	1.5	2.160	18	1.450
Mn^{++}	1.5	1.650	7	1.640
	2.0	2.070	15	1.770
Zn^{++}	1.5	2.550	7	2.550
	2.0	2.640	7	2.640
Ni^{++}	1.5	1.800	15	1.430
	2.0	1.790	10	1.790
Cu^{++}	0.5	2.100	13	2.000
	1.0	2.070	13	1.770
	1.5	2.062	17	1.950
	2.0	2.020	15	1.425
Al^{+++}	0.5	2.085	7	2.080
	1.0	2.055	7	2.055

摘 要

(一) 控制 *Ferrobacillus sulfooxidans* 培养液的最适 pH 1.6—3.0, 最适温度 25—28℃ 和充入足量氧和 CO_2 , 该菌可以具有较高的氧化亚铁的活力。

(二) 7.25×10^{-7} 克分子磷酸盐可以促进 *F. sulfooxidans* 氧化亚铁和固定 CO_2 的作用。

(三) 所研究的这株菌,通过对重金属离子浓度的连续适应性培养,可提高对金属的耐力,忍耐金属离子的浓度 2% Cu^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} 和 Ni^{++} , 1.5% Co^{++} 和 1% Al^{+++} 。

参 考 文 献

- [1] Colmer, A. R. and Hinkle, M. E.: *Science*, **106**:253—256, 1947.
- [2] Leathen, W. W. and Madisem, K. M.: *Abstracts of Papers Soc. Amer. Bacteriol.*, **64**, 1949.
- [3] Kinsel, N. A.: *J. Bacteriol.*, **80**:628—632, 1960.
- [4] Leathen, W. W., Braley, S. A. and McIntyre, L. D.: *App. Microbiol.*, **1**:65—68, 1953.
- [5] Waksman, S. A.: *Soil Science*, **13**:329—336, 1922.
- [6] Kennecott Copper Corp.: *J. Eng. & Min.*, **159**:89—91, 1958.
- [7] 宋鸿迁、钟慧芳、孙健男: 中国微生物学会 1963 年学术会议论文集, 12—13 页, 1963.
- [8] Leathen, W. W.: *Science*, **114**:280, 1951.
- [9] Umbreit, W. W.: 检压技术, 姚佩等译, 科学出版社, 1961.
- [10] Razzell, W. E. and Trusell, P. C.: *J. Bacteriol.*, **85**:595—603, 1963.

EFFECT OF CERTAIN FACTORS ON THE OXIDATION OF FERROUS ION BY *FERROBACILLUS SULFOOXIDANS*

CHUNG HUEI-FANG AND CHYOU RINE-QUING

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking*)

1. When the culture fluid was incubated at 25—28°C with its pH well adjusted at between 1.6 to 3.0 and in the presence of enough O₂ and CO₂, *F. sulfooxidans* possessed comparatively high activity of oxidizing ferrous ions.

2. Phosphate at a concentration of 7.25×10^{-7} moles has been observed to be stimulatory both to the oxidation of ferrous ion and the fixation of CO₂ by *F. sulfooxidans*.

3. The strain under investigation through successive subculturing in increasing concentrations of heavy metal ions has increased its tolerance up to 2% Cu⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺ and Ni⁺⁺, 1.55% Co⁺⁺ and 1% Al⁺⁺⁺.