

氧化亚铁硫杆菌分离复壮及固定化的研究

邸进申 赵新巧 耿冰

(河北工业大学化工学院生物工程系 天津 300130)

摘要 :用稀释涂布平板法从已退化的氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)菌液中分离出氧化活性较高、生命力强的氧化亚铁硫杆菌 T1。以 H-2 软性填料作为氧化亚铁硫杆菌的固定化载体,构建了固定床生物反应器。考察了固定床生物反应器氧化 Fe^{2+} 的情况: Fe^{2+} 最大氧化速率达 $7.67\text{g}(\text{L}\cdot\text{h})$ 。并对固定床生物反应器运行过程中在载体表面形成的沉淀物进行了研究,通过 X 衍射证明此沉淀物为黄钾铁矾 $[\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6]$ 。

关键词 :氧化亚铁硫杆菌,固定化,载体,固定床生物反应器

中图分类号 :Q939.145 ;O613.51 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2003)04-0487-05

氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*, *T. f.*)属原核生物界、化能营养原核生物门、细菌纲、硫化细菌科和硫杆菌属,是典型的化能自养菌。好氧嗜酸,革兰氏阴性。该菌从亚铁离子或硫化物的化学反应中获得能量,以空气中的 CO_2 为碳源,并吸收氮、磷等无机营养,合成菌体细胞^[1]。但由于这类细菌生长缓慢,代谢周期长,从而为其工业应用带来障碍。一方面,应保持和筛选生长速度快的菌种、防止菌种退化等;另一方面,*T. f.* 菌生长于物质表面的自然倾向使其成为细胞固定化的理想微生物,因此采用固定化氧化亚铁硫杆菌来增大细胞密度,使反应加速,实现连续化操作,从而提高生产能力。因此选择合适的固定化填料成为工业生产中的一个重要环节。Norio 等^[2]曾用角叉藻聚糖、交联树脂等对氧化亚铁硫杆菌进行了固定化,但固定化稳定时间不能达到产业化的要求。为此,我们首先对氧化亚铁硫杆菌进行了分离复壮,分离出具有更高的氧化活性和生命力的 T1 菌。以 H-2 软性填料为载体,利用吸附法,对氧化亚铁硫杆菌进行了固定化,用电镜扫描观测了菌种的固定化情况,并构建了固定床生化反应器,对固定化氧化亚铁硫杆菌氧化硫酸亚铁的一般特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*, *T. f.*)由中国科学院微生物研究所提供。

1.2 培养基

9K 液体培养基 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g, KCl 0.1g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01g, 蒸馏水定容至 1000mL, pH 2.0, 121℃ 灭菌 15min。加入经过滤除菌的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

基金项目 河北工业大学“211 工程”资助项目

作者简介:邸进申(1939-),男,河北深泽人,教授,从事生物反应工程研究。Tel :86-22-26564393 ;Fax :86-22-26564287 ;E-mail :zxqiao929@eyou.com

收稿日期 :2002-10-21, 修回日期 :2002-12-09

溶液(质量浓度为 30%, pH 2.0) 10 mL。9K 琼脂固体培养基为 A 和 B 的混合物。A 液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5g, KCl 0.1g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01g, 琼脂 15g, 蒸馏水定容至 600 mL, pH 2.0, 100 kPa 灭菌 15 min。B 液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 160g, 蒸馏水定容至 400 mL, pH 2.0, 过滤除菌。将 A 和 B 液混合倒平板。

1.3 仪器设备

分批培养时采用回转式恒温调速摇瓶柜(HYG-II 型, 上海欣蕊自动化设备有限公司); 生化培养箱(LRH-250A 型, 广东省医疗器械厂); 固定化细胞培养时采用自制的固定床生物反应器(高径比为 10:1, 有效体积为 2L, 材质为有机玻璃, 带有水浴夹套以保持反应器温度恒定), 加入固定化载体后, 床层空隙率为 72%。X 射线衍射仪 Xpert MPD 型(荷兰 Philips 公司); 扫描电子显微镜 PHILIPS FEICO 型。

1.4 分析方法

用重铬酸钾容量法测定铁^[3]; 血球计数板法对细菌计数^[4]; 采用扫描电子显微镜观测载体内部结构^[5]; 采用 X 射线衍射测定复合铁盐沉淀物的组成^[6]。

1.5 分离复壮方法

首先进行富积培养。吸取 10 mL 原始菌液, 放入盛 100 mL 9K 液体培养基的锥形瓶中, 在 30°C 150 r/min 条件下培养, 直至锥形瓶中的溶液颜色变成棕色, 此过程一般需要 3 d。然后采用稀释涂布平板法分离纯化。取上述培养好的菌液 1 mL, 用 pH 2.0 的稀 H_2SO_4 溶液稀释, 每次稀释 10 倍, 依次制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 浓度的稀释液。然后将 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度的稀释液各 0.2 mL 分别接种到 3 个盛有 9K 琼脂固体培养基的培养皿中, 涂布均匀, 倒置培养直至固体培养基表面出现棕色圆点状小菌落, 此过程需 7 d。选外观均匀的菌落挑取菌株接种至盛有 10 mL 9K 液体培养基的小锥形瓶中, 30°C 150 r/min 条件下培养, 直至锥形瓶中的溶液颜色变成棕色。如此重复在液体培养基中扩大培养和在平板上反复涂布分离, 最终选出代谢旺盛, 生命力强的菌株 T1。

1.6 固定化细胞制备方法

本研究采用的固定化载体为 H-2 软性填料——软聚氨酯泡沫塑料, 空隙率 90% 以上, 长和宽为 6 mm、高为 2 mm 的长方体, 采用吸附法制备固定化细胞。

1.7 细胞的固定化过程

T. f 菌在 H-2 软性填料上的固定化分两个步骤进行。首先取 2500 片生物支持粒子均分放到 10 个 500 mL 锥形瓶中, 每个锥形瓶加入 200 mL 的培养基, Fe^{2+} 浓度为 8.66 g/L, 接种量为 10% (V/V), 在摇瓶柜中进行分批培养。培养条件 30°C, pH 2.0, 150 r/min。定时测定培养液中 Fe^{2+} 浓度, 当培养基中亚铁离子消耗超过 90% 时, 转移载体至新鲜培养基中。如此反复培养 3~4 次, 直到 H-2 软性填料呈现红褐色, 表明 *T. f* 菌已吸附在载体上。然后将吸附有氧化亚铁硫杆菌的 2500 片生物支持粒子放入到固定床生物反应器中, 加入新鲜培养基进行培养, 温度 30°C, pH 2.0~2.2, 通气量 330 L/h, 定时测定反应器中 Fe^{2+} 的浓度, 当 Fe^{2+} 被消耗 90% 时, 更换新鲜培养基, 如此反复 4~5 次, 待 Fe^{2+} 氧化速率不随时间而变化时, 表明生物催化剂活化后使固定化细胞进入稳定期, 接着进行连续培养, 在稀释率为 0.6 h^{-1} 条件下, pH 为 2.0~2.2, 温度为 30°C, 通气量为 330 L/h 时, 此时 Fe^{2+} 平均氧化速率为 $7.2 \text{ g}(\text{L} \cdot \text{h})$, 表明固定化 *T. f* 菌在生物反应器中的操作已进入稳定。

2 结果和讨论

2.1 分离复壮后的特性比较

经分离复壮后,测定分离前后菌株的生长情况和氧化活性,与分离前的混合菌液相比,分离后的 T1 菌株生长延迟期缩短近 5 h,生长情况明显优于后者。由此可知分离后菌株较分离前的氧化活性大大提高,在对数期和稳定期尤为明显。

2.2 游离细胞与固定化细胞 Fe^{2+} 氧化速率的比较

图 1 显示,在分批培养中,游离细胞的最大 Fe^{2+} 氧化速率为 $0.685\text{g}(\text{L}\cdot\text{h})$,固定化细胞最大 Fe^{2+} 的氧化速率上升到 $7.2\text{g}(\text{L}\cdot\text{h})$,固定化细胞比游离细胞的 Fe^{2+} 氧化速率大大提高的原因是由于细胞固定化后,增加了活细胞的密度。

2.3 固定床生物反应器中 Fe^{2+} 氧化与菌膜形成的相关性

间歇培养时,定时取样观察 Fe^{2+} 的氧化与菌膜形成的相关性(图 2)。在培养 1~4d

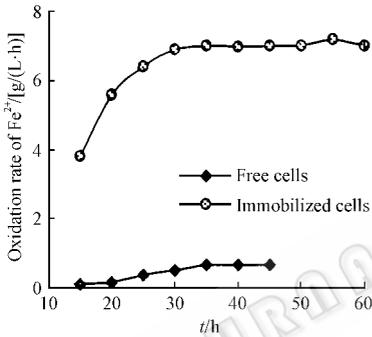


图 1 固定化细胞与游离细胞 Fe^{2+} 氧化速率的比较

Fig.1 The Fe^{2+} oxidation rate comparison between immobilized and free cells

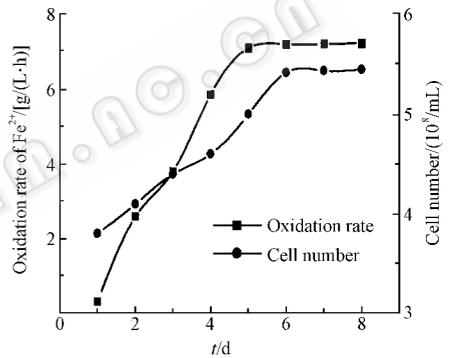


图 2 生物膜形成与 Fe^{2+} 氧化速率的相关性

Fig.2 The relation between bio-film and the oxidation rate of Fe^{2+}

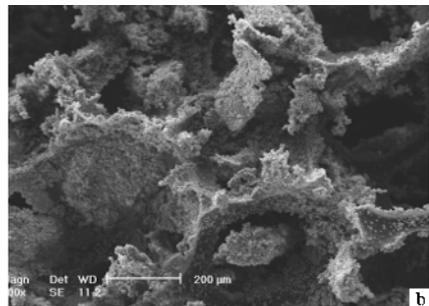
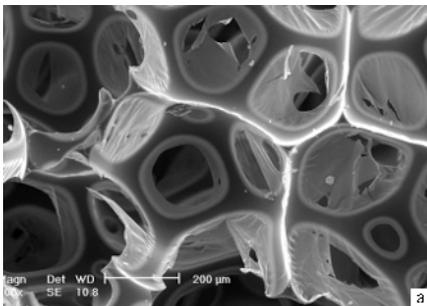


图 3 载体的扫描电镜照片

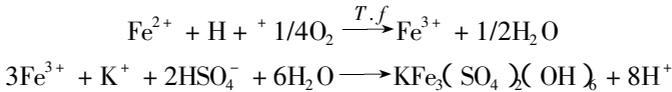
Fig.3 Scanning electron micrograph of H-2 carriers
a. Fresh H-2 carriers ; b. H-2 carriers immobilized *T. f.*

中,当 Fe^{2+} 的氧化速率在 $0.1 \sim 7.0 \text{g}(\text{L} \cdot \text{h})$ 时,培养液中的菌数和 Fe^{2+} 氧化速率增长之间有明显的相关性,表明 Fe^{2+} 氧化是靠培养液和菌膜中的菌体共同完成的。随着培养时间延长,当 Fe^{2+} 氧化速率达到 $7.0 \text{g}(\text{L} \cdot \text{h})$ 以上时, Fe^{2+} 氧化速率和液体中菌数已无相关性, Fe^{2+} 的氧化主要由反应器中固定化细胞完成,这说明在反应器中细胞固定化已完成,反应器进入稳定期。本实验采用电镜扫描观测菌膜生长情况,图 3-a 是电镜扫描观测到的未固定细胞 H-2 载体结构图,图 3-b 为 *T. f* 菌在 H-2 载体孔隙表面上吸附后的情况。

2.4 反应过程中复合铁盐沉淀物的形成及其对生物反应的影响

2.4.1 复合铁盐沉淀物的形成机理

由于氧化亚铁硫杆菌生长过程中将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} , Fe^{3+} 发生一系列的水解反应,最终在载体表面形成沉淀物,对其进行 X 衍射,结果表明此沉淀物为黄钾铁矾 [$\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$] 其形成过程机理可由下列方程式表示:



复合铁盐沉淀物的形成与 pH 值、离子浓度及培养基组成有关。

2.4.2 复合铁盐沉淀物对生物反应的影响

图 3-b 显示,在载体表面形成了由细菌和黄钾铁矾沉淀物的积聚物。通常载体表面的粗糙度对固定化有很大影响,载体表面的沉淀物提高了载体的粗糙度,有利于固定化过程^[7];另外,*T. f* 菌对黄钾铁矾沉淀物的亲和力也在固定化过程中起到一定的作用^[5]。但是载体表面沉淀物可能限制固定化细胞的浓度,因它们占据了载体部分表面,阻塞载体微孔及床层的流通过道,势必影响底物与代谢产物的传递,导致菌生长所需的 O_2 、 CO_2 和 Fe^{2+} 等营养物质的不足,降低反应速率。故应调节培养基 pH 值和离子浓度,控制黄钾铁矾的生成量,使固定化细胞反应达到最佳效果。

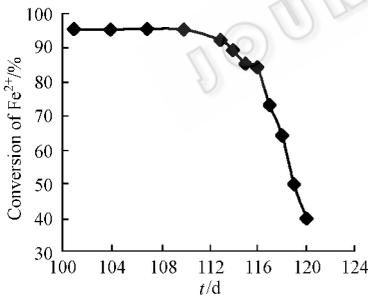


图 4 生物催化剂失效与时间的相关性

Fig. 4 Relativity between biocatalyst lose efficacy and time

2.5 固定化细胞的稳定性

在装有固定化细胞的固定床生物反应器中,于 30°C , 加入 pH 2.0~2.2 的 9K 培养基,通气量为 330L/h ,稀释率为 0.6h^{-1} 的情况下,连续运转了 110 d,定时测定反应器出口液中亚铁离子的浓度,结果显示反应器中固定化细胞的稳定性良好,其间,沉淀物也在不断生成,但由于少量的沉淀物有利于 *T. f* 的吸附,因此这一时期生物反应器性能较为稳定。但随着时间的增长,反应器稳定运行 110 d 后,器壁上附着有黄色的沉淀物,并逐渐有所增多,沉淀物的积累造成填料结块,影响营养物质的传递,使细胞生长与代谢受到抑制,造成 Fe^{2+} 转化率降低(图 4)。本文采用 pH 1.0 的硫酸清洗载体,使沉淀溶解,可除去此沉淀物,载体恢复原性能,解决了细胞固定化载体结块的难题,对细胞的生长没有影响。

3 结论

经稀释涂布平板法分离出的氧化亚铁硫杆菌 T1 比分离前具有更高的氧化活性和生命力,达到了复壮目的。

采用 H-2 软性填料作为固定氧化亚铁硫杆菌的载体, 操作简便易行, 利用制备的固定化细胞构建了固定床生物反应器, 进行了连续反应。此固定床生物反应器在通气量为 330L/h, pH 值为 2.0 ~ 2.2, 稀释率为 0.6 h^{-1} 的条件下, Fe^{2+} 的最大氧化速率可达到 $7.67 \text{ g} / (\text{L} \cdot \text{h})$, 该固定床生物反应器连续运行 110 d, 生物催化剂的稳定性良好, Fe^{2+} 的转化率可保持在 95% 左右, 取得了较为满意的结果。

对固定化过程中载体表面形成的沉淀物用 X 衍射测定, 此沉淀物为黄钾铁矾 $[\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6]$, 并初步探讨了其对生物反应的影响。

参 考 文 献

- [1] 袁 欣, 袁楚雄, 钟康年, 等. 非金属矿物的微生物加工技术的研究. 中国非金属矿工业导刊, 2000, 3 : 12 ~ 14.
- [2] Norio W, Kumihiro E, Kenichi M, et al. Immobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* using various polymers as matrix. *J Gen Appl Microbiol*, 1994, 40 : 349 ~ 358.
- [3] 王名德. 分析化学实验. 北京: 高等教育出版社, 1986. 97 ~ 99.
- [4] 范秀容, 李广武, 沈 萍. 微生物学实验. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1989. 133 ~ 138.
- [5] Nemati M, Webb C. Effect of ferrous iron concentration on the catalytic activity of immobilized cells of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 46 : 250 ~ 255.
- [6] 邱冠周, 柳建设, 王淀佐, 等. 氧化亚铁硫杆菌生长过程铁的行为. 中南工业大学学报, 1998, 29(3) : 226 ~ 228.
- [7] Gómez J M, Cantero D, Webb C. Immobilisation of *Thiobacillus ferrooxidans* cells on nickel alloy fibre for ferrous sulfate oxidation. *Appl Microbiol biotechnol*, 2000, 54 : 335 ~ 340.

Study on the Rejuvenating by Isolation and the Immobilization of *Thiobacillus Ferrooxidans*

Di Jinshen* Zhao Xinqiao Geng Bing

(School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

Abstract : A strain of *Thiobacillus ferrooxidation* T1 with stronger oxidation ability and more exuberant vitality was isolated from the liquid with regressive *Thiobacillus ferrooxidans* by method of dilution butteron on plate. A fixed-bed bioreactor was constructed by immobilized cells of *Thiobacillus ferrooxidans* with H-2 carriers. In the state of bioreactor operation a maximum Fe^{2+} oxidation rate of $7.67 [\text{Fe}^{2+}] \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ was attained. We studied the precipitates formed on the surface of the carriers during the operation of the bioreactor. By X-ray diffraction analyses we proved the precipitates were jarosite.

Key words : *Thiobacillus ferrooxidans*, Immobilization, Carriers, Fixed-bed bioreactor

Foundation item : The Project Granted by Project 211 of Hebei University of Technology

* Corresponding author. Tel 86-22-26564393, Fax 86-22-26564287, E-mail zqxiao929@eyou.com

Received date : 10-21-2002