

嗜酸热硫球菌 (S-5) 对硫化物的氧化

李雅芹 钟慧芳 陈秀珠 蔡文六

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从中国一热泉区分离到一种新的嗜热菌——嗜酸热硫球菌 (*Sulfosphaerellus thermoacidophilum*) S-5 能直接氧化元素硫 (S^0) 和黄铁矿 (FeS_2) 等硫化物, 氧化元素硫的温度范围是 55—80°C, 最适 70°C; pH 范围是 1.0—5.5, 最适 2.5。在最适条件下, 含元素硫 1%, 静置 10 天, 细菌氧化元素硫溶液中的硫酸根 (SO_4^{2-}) 使浓度从 1.10 g/L 增加到 6.56 g/L, pH 从 2.35 降到 1.00。还发现嗜酸热硫球菌与中温的氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) T-9 以同样方式氧化黄铁矿, 但是前者的氧化能力比后者的更强, 而且温度范围也更广。当使用 -200 目黄铁矿矿粉、矿浆浓度 10%、振荡氧化 20 天时, 在接入嗜热菌的溶液中, 可溶性铁浓度从 1.79 g/L 增加到 16.40 g/L, pH 从 2.23 降到 0.85, 而接入中温菌的溶液中可溶性铁浓度从 1.23 g/L 只增加到 7.37 g/L, pH 从 2.23 只降到 1.20。

关键词 嗜酸热硫球菌; 硫化物; 元素硫; 黄铁矿

七十年代以来, 人们分离了一种极端嗜热嗜酸微生物, 并且着重研究了在高温条件下对金属硫化物的氧化作用, 试图从矿石中提取金属以发展生物湿法冶金技术。这些微生物需要酵母汁或简单有机物维持生长^[1-6]。

本文报道一种专性化能自养嗜酸嗜热菌——嗜酸热硫球菌 (*Sulfosphaerellus thermoacidophilum*) S-5^[7] 对元素硫 (S^0) 和黄铁矿 (FeS_2) 的氧化, 并与氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) T-9^[8] 氧化黄铁矿的能力进行了比较。

材料和方 法

(一) 菌株和培养基

实验中使用的嗜酸热菌是从中国某一热泉分离到的专性化能自养嗜酸嗜热细菌, 定名为嗜酸热硫球菌 (*Sulfosphaerellus thermoacidophilum*) S-5, 在改良的 Allen 培养基上^[9]培养, 其成分如下 (g/L): (NH_4)₂SO₄ 1.30, KH₂PO₄ 0.28, MgSO₄·7H₂O 0.25, CaCl₂·2H₂O 0.07, 硫粉 10; 微量元素溶液 1.0 ml [其组成为 (g/L): FeCl₂·

6H₂O 0.02, MnCl₂·4H₂O 1.80, Na₂B₄O₇·10H₂O 4.50, ZnSO₄ 0.22, CuCl₂ 0.05, Na₂MoO₄·2H₂O 0.03, CoSO₄ 0.01]; 水 1000 ml, 用 1:1 H₂SO₄ 调 pH 2.5。

在对比实验中所使用的氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) T-9^[8] 是从中国某酸性矿水中分离到的, 并培养在 Leathen 培养基中^[10]。

两种培养基均用高压法灭菌, 其中改良的 Allen 培养基中硫粉用间歇法灭菌, Leathen 培养基中的亚铁 ($FeSO_4$) 用过滤法灭菌 (G-5 细菌过滤器), 用于原种培养。

(二) 基质

所用元素硫 (S^0) 为硫磺粉 (升华硫), 黄铁矿 (FeS_2) 来自中国桃江, 磨碎到 -200 目。详细化学分析资料如表 1 所示。黄铁矿样品用间歇法灭菌。

(三) 步骤

在元素硫氧化实验中, 取 0.4 ml S-5 培养物接种到含 40 ml 改良 Allen 培养基的 100 ml 三角瓶中, 然后在恒温培养箱中静置培养。

本文于 1986 年 4 月 11 日收到。

表 1 黄铁矿样品的化学分析

Table 1 Chemical analysis of pyrite sample

元素 Elements	%	化合物 Compounds	%
S	41.92	SiO ₂	10.85
Fe	37.90	MgO	0.18
Zn	0.333	CaO	0.10
Cu	0.199		
Pb	0.098		
As	0.008		
Sb	0.001		

在黄铁矿氧化实验中,将 10 g 矿粉加到含 90 ml 无硫的改良 Allen 培养基或含无 Fe²⁺(FeSO₄) 的 Leathen 培养基的 250 ml 三角瓶中,用 10 ml S-5 或 T-9 细胞悬液接种,然后分别培养在 65℃ 往复水浴摇床 (120 r/min) 和 30℃ 旋转式摇床上 (120 r/min)。在 30—80℃ 静置恒温培养箱中进行温度效果试验。

培养过程中,用无菌蒸馏水补充三角瓶内蒸发的水份。

(四) 分析方法

用汤姆氏血球计数板直接计数或用比浊法 (450nm, 3cm 比色杯) 测定氧化反应混合物中的细菌浓度。用 EDTA 滴定法测定硫酸根 (SO₄²⁻) 浓度,用重铬酸钾容量法测定可溶性铁 (Fe²⁺ 和 Fe³⁺), 用 ZD-2 型 pH 计测定 pH 值。

结果和讨论

(一) 嗜酸热硫球菌 (S-5) 对元素硫的氧化

1. 温度和 pH 条件: 如图 1 所示, 当初始 pH 为 2.5 的反应混合物在 50—85℃ 培养时, 反应混合物中细胞悬液浓度的变化表明, 细菌氧化元素硫的温度范围在 55—80℃, 最佳温度为 70℃。

将不同初始 pH 的反应混合物 (pH 1.0—6.0) 置于 70℃ 静置条件下氧化, 则细胞悬液浓度的变化说明氧化元素硫的 pH 范围在 1.0—5.0, 最佳 pH 为 2.5 (图 2)。

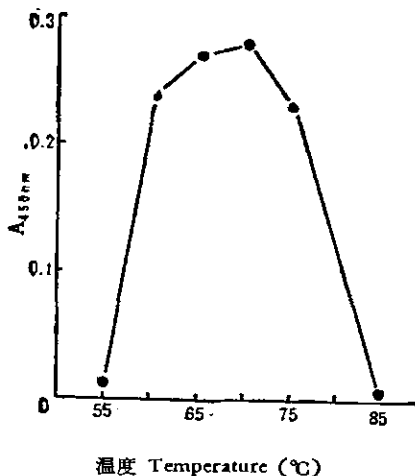


图 1 温度对嗜酸热硫球菌 (S-5) 氧化元素硫的影响
Fig. 1 Effect of different temperature on elemental sulfur oxidation by *Sulfothermobacterium thermoacidophilum* (S-5)

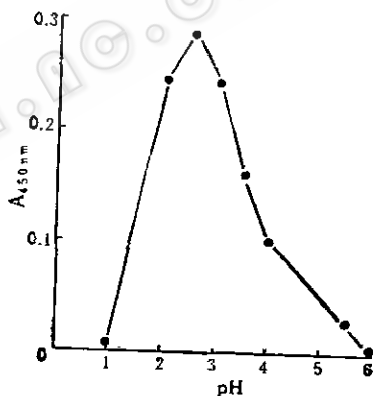


图 2 pH 对嗜酸热硫球菌 (S-5) 氧化元素硫的影响
Fig. 2 Effect of different pH values on elemental sulfur oxidation by *Sulfothermobacterium thermoacidophilum* (S-5)

2. 嗜酸热硫球菌对元素硫的氧化: 在最佳温度和 pH 条件下, S-5 对元素硫的氧化如图 3 所示。6 天后细菌生长进入对数期。第 10 天时, 培养液中细胞浓度达 10⁹ 个/ml, pH 从 2.23 降到 1.00, SO₄²⁻ 浓度从 1.10 mg/ml 增加到 6.56 mg/ml。10 天后, 细菌生长到稳定期, pH 值和 SO₄²⁻ 浓度基本上无变化。与此同时, 在未接种的对照中 pH 值和 SO₄²⁻ 浓度无变化。

以上结果表明元素硫被细菌氧化生成

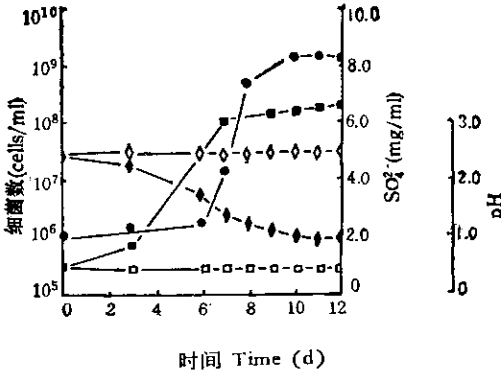
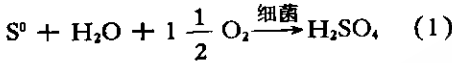


图3 嗜酸热硫球菌 (S-5) 对元素硫的氧化
Fig. 3 Elemental sulfur oxidation by *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* (S-5)

- (●) 细菌数 Bacterial counts
- (■) SO₄²⁻, 接菌 With bacteria
- (□) SO₄²⁻, 未接菌 Sterile control
- (◆) pH, 接菌 With bacteria
- (◇) pH, 未接菌 Sterile control

硫酸。



(二) 嗜酸热菌 (S-5) 与中温菌 (T-9) 对黄铁矿氧化的比较

1. 温度对细菌氧化黄铁矿的影响: 将接种 S-5 及 T-9 细胞悬液的混合物分别在 30—80℃ 静置培养。培养物中可溶性铁的浓度表明, 在 30℃ 和 40℃ 时 S-5 几乎不能氧化黄铁矿(图 4-a, b)。50℃ 时黄铁矿才开始氧化, 培养物中可溶性铁浓度随着温度的升高而增加(图 4-c, d, e 和 f)。而 T-9 只是在 30℃ 时才对黄铁矿有氧化作用(图 4a)。显然, 菌株 S-5 比 T-9 氧化黄铁矿的温度范围要广得多, 这对于嗜酸热硫球菌在高温条件下的应用研究具有重要意义。

2. 两种细菌对黄铁矿的氧化: 接种 S-5 和 T-9 的黄铁矿混合物分别在 65℃ 和 30℃ 振荡培养。结果表明, 两种细菌都能直接氧化黄铁矿(图 5, 6)。混合物中所释放出的可溶性铁和硫酸取决于细菌的生

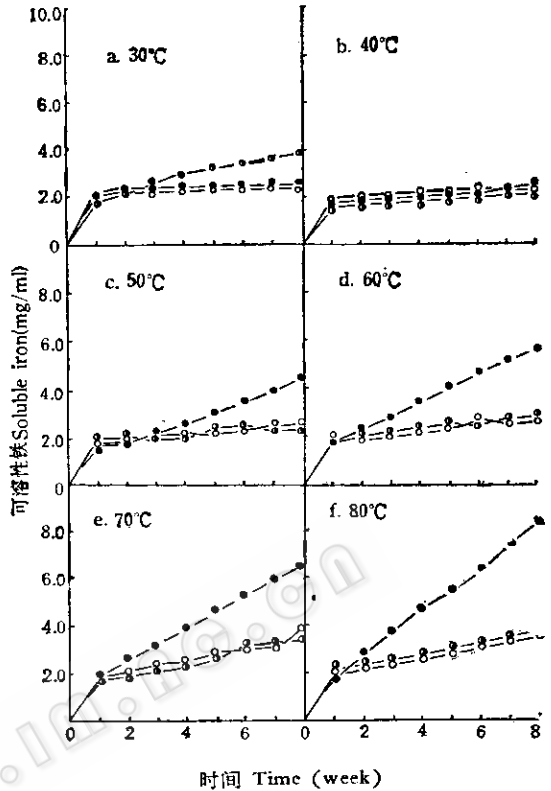


图4 嗜酸热硫球菌 (S-5) 和氧化亚铁硫杆菌 (T-9) 在不同温度下对黄铁矿的氧化

Fig. 4 *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* (S-5) and *Thiobacillus ferrooxidans* (T-9) oxidized pyrite at different temperature

- (●) S-5
- (○) T-9
- (○) 未接菌 Sterile control

长。菌株 S-5 氧化黄铁矿时, 第 10 天细菌生长开始进入对数期, 第 20 天时, 培养物中细胞浓度增加到 8.6×10^6 个/ml, pH 从 2.23 降到 0.85, 可溶性铁浓度从 1.79 mg/ml 增加到 16.64 mg/ml。20 天后, 细菌生长速度及可溶性铁释放速度都很慢, 第 30 天时, 可溶性铁浓度仅为 17.95 mg/ml, pH 仍为 0.85。当菌株 T-9 氧化黄铁矿时, 第 5 天细菌生长开始进入对数期。第 10 天时, 细胞浓度增加到 2.5×10^7 个/ml, pH 值从 2.23 降到 1.20, 可溶性铁浓度从 1.23 mg/ml 增加到 7.37 mg/ml。20 天后, 这些

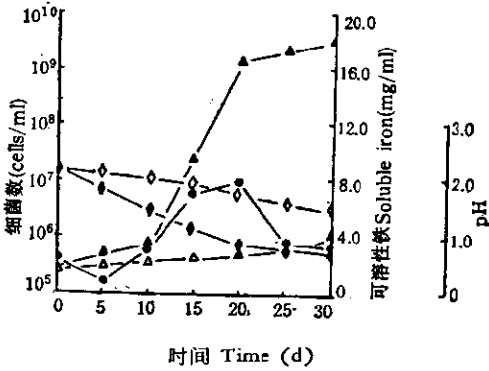


图5 嗜酸热硫球菌(S-5)对黄铁矿的氧化

Fig. 5 Pyrite oxidation by *Sulfothermobacterium thermoacidophilum* (S-5)

- (●) 细菌数 Bacterial counts
- (▲) 可溶性铁,接菌 Soluble iron, with bacteria
- (△) 可溶性铁,未接菌 Soluble iron, sterile control
- (◆) pH, 接菌 With bacteria
- (◇) pH, 未接菌 Sterile control

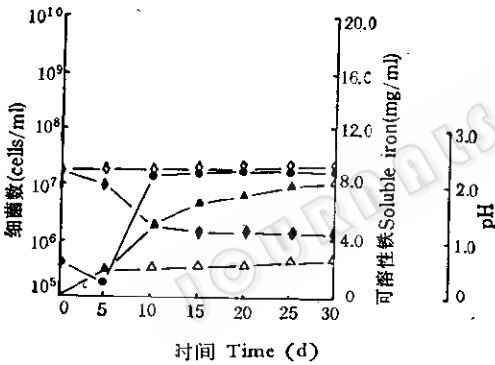


图6 氧化亚铁硫杆菌(T-9)对黄铁矿的氧化

Fig. 6 Pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* (T-9)

- (●) 细菌数 Bacterial counts
- (▲) 可溶性铁,接菌 Soluble iron, with bacteria
- (△) 可溶性铁,未接菌 Soluble iron, sterile control
- (◆) pH, 接菌 With bacteria
- (◇) pH, 未接菌 Sterile control

变化都受到限制,第30天时,可溶性铁浓度仅为8.13 mg/ml, pH 仍是1.20。由这些变化可以清楚地看到,接有菌株 S-5 的培养液中可溶性铁增加的量是接有菌株 T-9 培养液的2.4倍,说明嗜酸热硫球菌比中温菌对黄铁矿有更强的氧化能力。同时还发现,溶液的pH值降到某一极限

值时(例如0.85和1.20),细菌繁殖受到抑制,这一现象支持了细菌氧化黄铁矿时有一极限pH值的观点[4,10-11]

3. 细菌氧化黄铁矿时,溶液中 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 浓度的变化: 图7和8表明了菌株 S-5 和 T-9 分别在 65°C和 30°C 振荡氧化

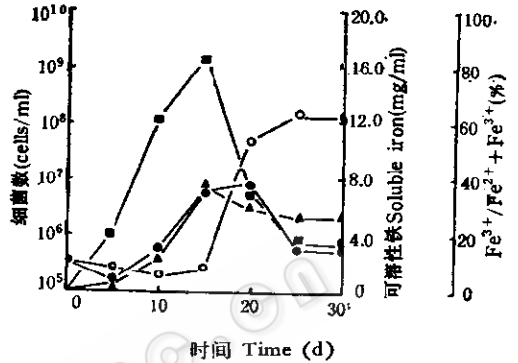


图7 嗜酸热硫球菌(S-5)氧化黄铁矿时溶液中成分的变化

Fig. 7 Change of components in the solution of pyrite oxidation by *Sulfothermobacterium thermoacidophilum* (S-5)

- (●) 细菌数 Bacteria counts
- (○) Fe²⁺
- (▲) Fe³⁺
- (■) Fe³⁺/(Fe²⁺ + Fe³⁺)

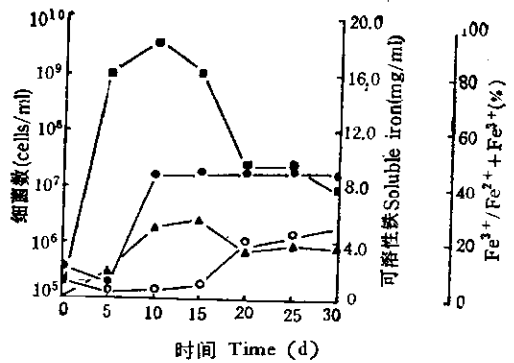
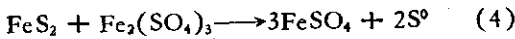
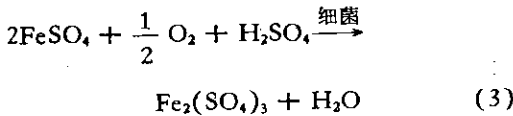
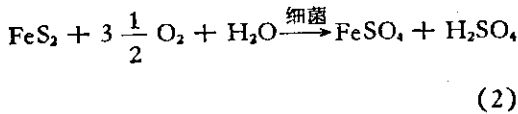


图8 氧化亚铁硫杆菌(T-9)氧化黄铁矿溶液中成分的变化

Fig. 8 Change of components in the solution of pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* (T-9)

- (●) 细菌数 Bacteria counts
- (○) Fe²⁺
- (▲) Fe³⁺
- (■) Fe³⁺/(Fe²⁺ + Fe³⁺)

黄铁矿时, 溶液中可溶性铁 (Fe^{2+} 和 Fe^{3+}) 浓度的变化, 发现其变化趋势相同。在停滞期 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 浓度都很低, 在对数期则迅速增加。对数期后, Fe^{2+} 浓度增加, 而 Fe^{3+} 浓度减少。这种变化进一步证实了细菌在黄铁矿氧化中起了直接作用。黄铁矿生物氧化过程中的一些反应可以用下面反应式表示。



反应式 (2) 和 (3) 阐明了导致总铁增加的直接氧化反应。由于硫酸高铁的存在, 势必氧化黄铁矿, 这就是导致高铁 (Fe^{3+}) 减少的一种非生物氧化反应。当细菌繁殖缓慢时, Fe^{3+} 不可能迅速增加, 则 Fe^{2+} 氧化率 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$) 一定要降低。这些变化过程对于两种细菌都是一致的。

如上所述, 嗜酸热硫球菌 (S-5) 和氧化亚铁硫杆菌 (T-9) 都能直接氧化黄铁矿产生硫酸和可溶性铁, 而且以同样过程

将溶液中 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} 。然而, 嗜酸热硫球菌 (S-5) 比中温菌 (T-9) 具有更强的氧化能力。前者的 pH 值比后者降低的多, 而且前者比后者氧化黄铁矿的温度范围更广。这一研究结果为嗜酸热硫球菌在工业上的应用提供了依据。

参 考 文 献

- [1] Brierley, C. L. et al.: *Science*, **179**: 488—490, 1973.
- [2] Brierley, C. L.: *Dev. Ind. Microbiol.*, **18**: 273—284, 1976.
- [3] Le Rowx, N. W. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **100**: 197—202, 1977.
- [4] Brierley, J. A. et al.: Conference Bacterial Leaching (ed. by G. Rossi et al.) Verlag Chemie, New York, p. 55—56, 1977.
- [5] Chakraborti, N. et al.: *Hydrometallurgy*, **5**: 337—354, 1980.
- [6] Marsh, R. M. et al.: Recent Progress in Biohydrometallurgy (ed. by G. Rossi et al.), Cagliari, Italy, p. 71—81, 1983.
- [7] 钟慧芳等: 微生物学报, **22**: 1—7, 1982.
- [8] 钟慧芳等: 微生物学报, **11**: 493—499, 1965.
- [9] Allen, M. B.: *Arch. Microbiol.*, **32**: 270—277, 1958.
- [10] Leathen, W. W. et al.: *J. Bacteriol.*, **72**: 700, 1956.
- [11] Atkins, A. S.: Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena, Academic Press, New York, p. 253—274, 1978.

OXIDATION OF SULFIDES BY *SULFOSPHAERELLUS THERMOACIDOPHILUM* (S-5)

Li Yaqin Zhong Huifang Chen Xiuzhu Cai Wenliu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A strain of chemoautotrophic and thermoacidophilic bacteria, *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* (S-5), isolated from hot spring area in China can oxidize both elemental sulfur (S^0) and pyrite (FeS_2) directly. It was found that the temperature range for S^0 oxidation by the strain (S-5) was 55—88°C and the optimum was 70°C; the pH range was 1.0—5.5 and the optimum was 2.5. It has been also observed that the pH dropped from 2.35 to 1.00 and the concentration of SO_4^{2-} increased from 1.10 mg/ml to 6.56 mg/ml when the culture contained 1% S^0 and cultivated statically under the optimal conditions for 10 days.

S. thermoacidophilum (S-5) oxidized pyrite in some manner similar to *T. ferrooxidans* (T-9), but more active than the latter. Strain

(S-5) also present a wide temperature range than that of strain (T-9). When 10% pulp density and -200 mesh powder of pyrite were used, the concentration of soluble iron released from pyrite by *S. thermoacidophilum* increased from 1.79 mg/ml to 16.40 mg/ml and the pH decreased from 2.23 to 0.85 at 65°C after shaking 20 days. In the experiment corresponding to *T. ferrooxidans*, the concentration of soluble iron only increased from 1.23 mg/ml to 7.37 mg/ml and the pH decreased from 2.23 to 1.20 at 30°C.

Key words

Sulfosphaerellus thermoacidophilum; Sulfide; Elemental sulfur; Pyrite