

高效中等嗜热菌自然界选育方法探索研究

姚国成, 阮仁满, 温建康, 宋永胜

(北京有色金属研究总院, 北京 100088)

摘要 通过采样、富集、分离纯化、菌种鉴定等系列措施,建立了从自然界选育高效浸矿菌的有效方法。在研究的过程中,确定了样品采集原则、培养基选择的基本方法,以及对菌种分离及鉴定的初步手段。通过探索性试验,选育分离出一株中等嗜热菌 CLJ 菌,并对其进行了初步鉴定,为从自然界选育高效中等嗜热菌奠定了一定的基础。

关键词 中等嗜热菌;选育;高效浸矿菌

中图分类号:TF111.31 文献标识码:A 文章编号:1000-6532(2004)02-0018-06

目前,国内应用于工业生产的生物浸矿菌种大都以自然选育驯化的嗜中温菌和诱变的嗜中温菌为主,包括氧化亚铁硫杆菌、氧化硫杆菌、氧化亚铁螺旋菌等,耐受最佳温度范围为 $25 \sim 40^{\circ}\text{C}$ ^[1~2]。国外生物冶金技术的发展已较成熟,应用于工业生产的生物浸矿菌种不仅有嗜中温菌,还包括中等嗜热菌和极端嗜热菌。中等嗜热菌耐受最佳温度范围为 $45 \sim 55^{\circ}\text{C}$ ^[3~4],与嗜中温菌相比,中等嗜热菌具有以下优点:(1)能耐受更高温度,比嗜中温菌具有动力学优势,加快过程的反

应速度,提高浸出速率,缩短浸出周期;(2)耐受更强的剪切力,适用于生物搅拌浸出;(3)工程中应用可使装备简化,比如减少工业反应器的冷却系统;(4)中等嗜热菌为兼性自养菌,这样为强化浸出手段提供更多的选择途径。因此,如何从自然界选育高效中等嗜热菌变得至关重要。本文基于此入手,研究选育高效中等嗜热菌的方法。

1 样品采集

1.1 目的菌选育流程

Preparation of Ultra-fine and High-purity CaCO_3 by a Recycling Process

CHEN Ji-ming

(Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan, China)

Abstract A new technology for preparing ultra-fine and high-purity CaCO_3 by recycling process of limestone and ammonium chloride was researched. The products obtained can satisfy various requirements of the electro-ceramic industry. The effect of purification run, recycling process of ammonium chloride and carbonizing conditions on physico-chemical properties of products was emphatically examined.

Key words High-purity calcium carbonate; Ultrafine; Ammonium chloride; Recycling

收稿日期 2003-05-29

作者简介:姚国成(1975-)男,工程师,从事高效中等嗜热菌选育工作。

本探索研究选育流程如图 1 所示。

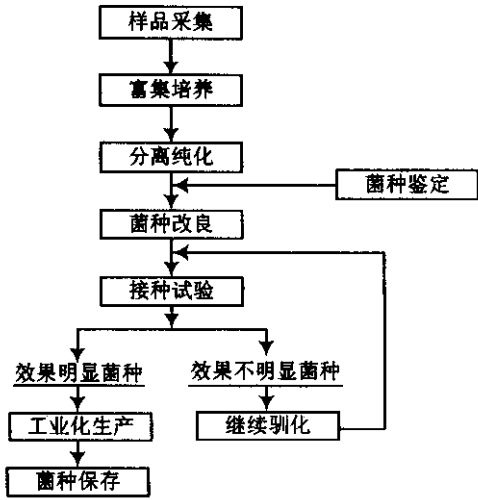


图 1 菌种选育流程

1.2 样品采集原则

从自然选育目的菌 , 首先要进行样品采集 , 采集样品需要遵循以下几个基本原则 :

- (1) 样品必须具代表性 , 采样器具尽可能保持相对无菌 ;
- (2) 采好的样品必须完整标上采集日期、地点以及采样点的地理、生态参数 ;
- (3) 采样应考虑季节性和时间性因素 ;
- (4) 采好的样应及时处理 , 不能及时处埋时应于 4℃ 以下保藏 , 但时间不宜过长。

一般采样方法分为土样采集法、植物体采集法、水样采集法 , 本次试验采用土样采集法。中等嗜热菌喜生长在酸性矿坑水、浸出堆场、温泉、热泉中 , 试验选用某煤矿废矿堆周边长期沉积的酸性水。此煤矿属高硫煤矿 , 含硫 3.2% , 含硫矿物主要为黄铁矿。取样时间为 12 月 , 气温平均 8℃ , 所取废堆堆内温度 25℃ , 所取水样 pH 值为 5.12。

2 富集培养

2.1 培养基选择

选择培养基的根本目的是为了更加容易地分离出目的菌 , 因此在菌液富集过程中应

选择性配制培养基 , 通过控制培养条件来控制细菌的生长。在培养过程中应考虑以下生态学参数 : 温度、适宜 pH 值、适宜浓度。本次试验选择的培养基有液体无机 3k 培养基、液体有机 3k 培养基、液体自氧 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 培养基、液体异氧 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 培养基、硫磺粉培养基、黄铁矿培养基。

2.2 菌种初筛

菌种的初筛有两种方法 (1) 用简单的定性反应进行初筛 (2) 在最初分离阶段就给予特殊的培养基或培养条件 , 进而让目的菌株得以繁殖 , 尽可能地把只成为目的菌的菌株或只将其最适宜菌株的一株纯化分离。在工业应用菌株的选育方面经常采用第二种方法。初筛的目的就是要用最简单和最快捷的方法来对大量的待筛菌进行测试。因此 , 为提高工作效率 , 建立有效的初筛模型是最为重要的一个环节。本试验采用 96 孔液体培养板进行菌种初筛试验^[5]。

将制好的水样转接至多孔液体培养板 (12 × 8 孔) , 在不同培养基和不同稀释度培养后观察菌落生长状态 , 初步了解在何种培养基下菌落能够生长。然后转接到相应的培养基在空气浴恒温振荡器进行放大培养。试验条件 : 培养 7d , 培养温度 50 ~ 52℃ , 接种量 20% , 静置于恒温生化培养箱。结果见表 1。

由表 1 可知 , 在以亚铁为底物的培养基里此菌落能够生长 , 添加酵母提取物以后 , 生长状况明显良好。在以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为底物的培养基里不管是异养还是自养条件 , 基本不生长。在以硫为底物的培养基里生长情况良好 , 培养 7d 测定 pH 值从 4 降到 2.2 , 从侧面也可知道硫已经部分氧化成硫酸。在空白对照中 , 水样的条件基本没变 , 说明菌落在这种条件下可以存活。

2.3 菌种富集

将在上述底物能生长的菌落挑出 , 分别转接到有机 3k 培养基、黄铁矿培养基 (加 0.02% 酵母提取物) 和硫磺粉培养基进行富

表 1 多孔液体培养板培养结果

培养基 稀释度	无机 3k 培养基 pH = 2		有机 3k 培养基 +0.02% 酵母 pH = 2		自养 Na ₂ S ₂ O ₃ 培养基 pH = 2.5		异养 Na ₂ S ₂ O ₃ +0.02% 葡萄糖 培养基 pH = 2.5		S 培养基 10g/L pH = 4		空白对照 pH = 2
10 ⁻¹	±	±	+	+	-	-	-	-	+	+	±
10 ⁻²	±	±	+	+	-	-	-	-	+	+	±
10 ⁻³	±	±	+	+	-	-	-	-	+	+	±
10 ⁻⁴	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	±
10 ⁻⁵	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
10 ⁻⁶	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
10 ⁻⁷	-	-	±	±	-	-	-	-	+	+	-

注 每一组培养基进行两组平行试验 ;± 表示有菌落生长但异常缓慢 ; - 表示无菌落生长 ; + 表示有菌落生长且良好。

表 2 富集培养试验现象和结果

项 目	有机 3k 培养基	FeS ₂ 1% + 酵母 0.02%	S 培养基 10g/L
初始 pH 值	1.82	2.35	3.90
接种量/%	20	20	20
培养时间/h	48	120	68
细菌数	2 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸
试验现象	溶液成深棕红色	溶液呈现粘膜	S 颗粒部分溶解
Fe 氧化率/%	100		
最终 pH 值		1.60	1.39

集培养。培养在 200mL 三角瓶内 ,放入恒温空气振荡器中进行。转速 150r/min ,温度 50℃ pH 按以上试验调节 ,接种量 20%。试验结果见表 2。

从实验现象和结果可以看出 :选育出的菌种有将 Fe²⁺ 氧化成 Fe³⁺ 的能力 ,从黄铁矿培养基中 pH 值的降低也可知此菌种具有氧化黄铁矿的能力。

3 分离及鉴定

3.1 菌种分离

分离的目的是将混杂菌群个体各个分开 ,形成纯培养物。分离是菌种选育的关键步骤。一般有以下三种分离方法 :

- (1) 试管倾倒培养皿分离法 ;
- (2) 固体培养基平板划线分离法 ;
- (3) 液体培养基稀释分离法。

在分离的最初阶段一般不给予严密的培

养条件 ,尽可能分离到多的纯菌种。在这种情况下 ,菌种分离阶段选用广泛的分离培养基^[5]。

本试验采用固体培养基平板划线分离法 ,在自制的平板上进行。用琼脂粉做固化剂 ,混合富集培养过程中生长良好的培养基一起倒成平板。用接种针挑取富集培养液在平板上做连续划线 ,划线完毕 ,盖上平板 ,倒置放在恒温生化培养箱静止培养 ,培养温度控制在 50℃。以上过程都在严格灭菌和无菌条件下操作。分离的菌种命名为 CLJ 菌。结果见表 3。

从试验结果可知在固体培养基中生长很缓慢 ,效果不理想。可能存在如下原因 :

- 1. 中高温菌培养温度较高 ,固体培养基水分蒸发 ,造成培养基干裂。而这种浸矿菌为异氧菌 ,在有液体存在的情况下能更好地利用氧 ;

表 3 固体培养基平板划线分离法菌种分离结果

项 目	有机 3k 培养基 + 1.2% 琼脂粉	FeS ₂ 1% + 酵母 0.02% + 1.2% 琼脂粉	S 培养基 10g/L + 1.2% 琼脂粉
初始 pH 值	1.82	2.35	3.90
培养时间/d	14	14	14
试验现象及 试验结果	固化培养基干裂,有少量菌落 生长,呈园盘状,发出金属光泽	固体培养基干裂,有菌落生长, 园盘状和不规则状,金属光泽	固体培养基干裂,几乎 无菌落生长

2. 平板培养在恒温生化培养箱空气状态下进行,中高温菌固碳能力比较弱,没有足够的可利用 CO₂,不利于细菌的生长;

3. 固体培养基中添加的琼脂粉为固化剂,也可能影响细菌的生长。

3.2 菌种鉴定

菌种鉴定工作是微生物的基础工作,一般分为以下三个步骤 (1)获得该微生物的纯种培养物(pure culture) (2)测定一系列必要的鉴定指标 (3)根据权威性的鉴定手册(如伯杰氏细菌鉴定手册)进行菌种鉴定。

不同微生物往往有自己不同的鉴定指标,如形态特征指标,生理特征指标,生理、生化、遗传指标等。通常把鉴定微生物的技术分为四个不同水平 (1)细胞的形态和习性水平,就是用经典的研究方法,观察细胞的形态特征、运动性、酶反应、营养要求和生长条件等 (2)细胞组分水平,包括细胞组成成分,脂类,醌类,光合色素等的分析,一般要采用红外光谱、气相色谱和质谱分析等新技术; (3)蛋白质水平,包括氨基酸序列分析、凝胶电泳和血清反应等若干现代技术 (4)基因或 DNA 水平,包括核酸分子杂交(DNA 与 DNA 或 DNA 与 RNA),G + Cmol% 值的测定,遗传信息的转化和转导,16SrRNA(核糖体 RNA)寡核苷酸组分分析,以及 DNA 或 RNA 的核苷酸序列分析等^[6]。

鉴定可知 :CLJ 菌为革兰氏阳性菌,无机化能营养菌,细胞呈杆状,细胞尺寸 0.4 ~ 2 × 3 ~ 6.8 μm 之间,能在铁、硫、硫化矿不同底物上生长。专性好氧,嗜酸,中等嗜热,最

适宜生长温度 50℃,在 60℃ 能存活。以 Fe²⁺、硫化矿为能源自养生长,以酵母提取物为能源异养生长,以铁和酵母提取物为能源混合营养生长,有酵母提取物存在时,可氧化元素硫。以无机底物为能源自养生长时,细胞的良好生长需要足够的 CO₂,在有机物存在的混合营养条件下该菌更易生长。在细胞生长过程中有球形孢子生成,细胞不具运动性。透射电镜观察 FeS₂1% + 酵母 0.02% 为培养基的细菌如图 2 所示。

根据伯杰氏细菌鉴定手册中对 Sulfobacillus 属的描述 :Sulfobacillus 菌属存在于富含铁、硫、硫化矿的酸热环境中,属革兰氏阳性、无机化能营养菌,细胞呈杆状、棒状,最适宜生长温度为 52℃。对比选育出 CLJ 菌鉴定可知其为 Sulfobacillus 中等嗜热菌属,典型种为 Sulfobacillus thermosulfidooxidans,在金属硫化矿生物浸出过程中起重要作用^[7~10]。

4 结 论

1. 通过采样、富集、分离纯化等系列措施,建立了从自然界选育高效浸矿菌的有效方法。从国内外文献和我国生物冶金技术发展前景看,开展中等嗜热菌选育及浸矿性能研究工作对我国矿业的可持续发展具有重要的意义。

2. 从选取酸性矿坑水的取样点而言,应选取含硫高或黄铁矿存在的矿山酸性矿坑水,对于开采多年的老矿而言,微生物在生存、繁殖、进化的过程中,经过选择已经适应其生长环境,更有可能从中分离选育出适合

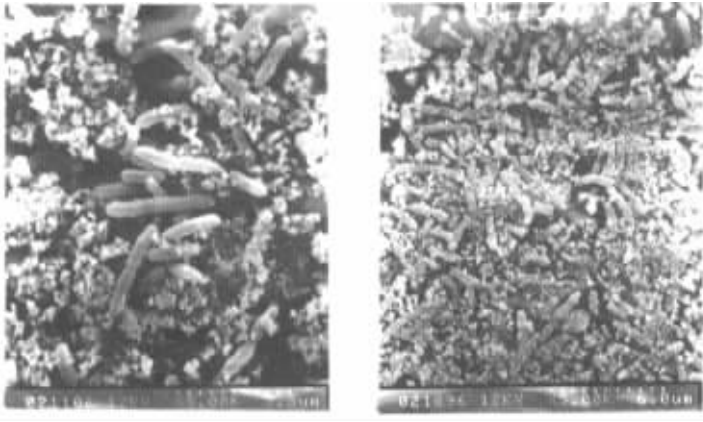


图2 CLJ 菌透射电镜图

于生物浸矿的菌种。

3. 选育出一株中等嗜热菌,命名为 CLJ 菌,鉴定为 *Sulfobacillus* 属,革兰氏阳性、无机化能营养菌,细胞呈杆状,以 Fe^{2+} 、 S^0 和硫化矿为能源自养生长;以酵母提取物为能源异样生长;以 Fe^{2+} 和酵母为能源混合营养生长。

4. 对 CLJ 菌的鉴定,有待于更加细化,并且对中等嗜热菌的特征菌株在以后菌种的分离过程中应着重研究。因为即使同属一种菌属,但不同的菌种氧化黄铁矿以及其他矿石的能力也是不同的。

参考文献:

- [1] Lasse Ahonen, Ollih. Tuobinen, Bacterial Oxidation of Sulfide Mineral in Column Leaching Experiments at Suboptimal Temperatures, Applied and Environment Microbiology, 1992, 600 ~ 606.
- [2] 孙雪南, 阮仁满, 温建康. 生物冶金技术中的浸矿微生物选育研究进展 [C]. 铜镍湿法冶金技术交流会及应用推广会议论文集, 2001, 205 ~ 210.
- [3] Brierley, J. A. & Brierley, C. L. Microbial mining using thermophilic microorganisms, In Thermophilic General, Molecular and Applied Microbiology, Edited by T. D. Brock. New York; Wiley, (1986) 279 ~ 305.

ology, Edited by T. D. Brock. New York; Wiley, (1986) 279 ~ 305.

- [4] Norris, P. R. Acidophile bacteria and their activity in mineral sulfide oxidation. In Microbial Mineral Recovery (1990) 3 ~ 27.
- [5] 姜成林, 徐丽华. 微生物资源开发利用 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001, 54 ~ 60.
- [6] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1991, 169 ~ 201.
- [7] Good fellow, M., M., Mordarski and S. T. Williams (eds), The Biology of the Actinomycetes, Academic Press, London, 1983.
- [8] Paul R. Norris, Darren A. Clark, Jonathan P. Owen and Sara Waterhouse, Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral - sulphide-oxidizing bacteria, Microbiology, 1996, 142, 775 ~ 783.
- [9] Darren A. Clark and Paul R. Norris, Acidimicrobium ferrooxidans gen. nov. sp. nov. mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species, Microbiology, 1996, 142, 785 ~ 790.
- [10] Karaca jko GI, Bulygina ES, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a new lineage of bacterial evolution [J], FEBS letters, 1990, 26(1), 8 ~ 10.

Exploratory Research on Isolation of High-efficiency Moderate Thermophilic Bacteria from Nature

YAO Guo-cheng, RUAN Ren-man, WEN Jian-kang, SONG Yong-sheng

General Research Institute of Non-ferrous Metals, Beijing, China)

膨润土的活化改性与在橡胶中的应用

张军¹, 赵丽颖², 蒋引珊²

(1. 吉林大学汽车材料教育部重点实验室, 吉林 长春 130025;

2. 吉林大学材料科学与工程学院, 吉林 长春 130026)

摘要 采用热处理与机械力化学改性相结合的方法活化膨润土,可制备橡胶补强填料。热处理能有效驱除矿物的挥发份和结合水,活化结构,保证并提高干法机械力化学表面改性效果,使改性剂用量在1%以下就能获得理想指标。采用此种方法制得的膨润土替代半补强炭黑量达30%,橡胶制品各项物理性能符合国家标准 GB3778-94;100%替代高耐磨炉黑,橡胶力学性能满足 GB318-98 技术要求。

关键词 热处理;机械力化学改性;膨润土;橡胶填料

中图分类号 :TD927 **文献标识码** :A **文章编号** :1000-653X(2004)02-0023-05

1 引言

矿物填料的改性是非金属矿物重要的深加工技术之一,它涉及材料化学、矿物学、化工等多学科领域。改性矿物填料应用于橡胶工业的研究和应用有着重要的经济和技术意义,近些年填料矿物种类和用量持续稳定增长。膨润土由于强吸水性,做矿物填料的研究工作相对较少。已有的研究主要采用湿法对其进行表面处理,在橡胶中的填充量限定在一定水平^[1]。也有部分学者采用干法改

性,但均匀程度有待提高^[2]。而机械力化学改性制备矿物填料则是一种更经济适用的方法^[3~4]。针对膨润土中主要矿物蒙脱石的结构和强吸水特性,采用热活化与机械力化学表面改性制备膨润土矿物补强填料,将有效改善膨润土矿物填料的性能,免去提纯处理造成的成本提高和资源浪费,为综合利用开辟新的途径。

2 实验部分

2.1 原料

Abstract :Application and isolation of moderate thermophilic bacteria become a research hotspot during recent years. In this paper we discuss the fundamental of sample collection ,analyze the culture medium selection and establish the effective method of isolating moderate thermophilic bacteria from nature. The moderate thermophilic bacteria isolated from nature named CLJ bacteria. During the test we deeply express the characteristic of physiological ecology ,and test ability of bio-leaching. After the study we establish a effective method of isolating moderater thermophilic bacteria from nature.

Key words :Moderate thermophilic bacteria ; Isolation ; High-efficiency bacteria for leaching ore

收稿日期 2003-04-18 改回日期 2003-06-25

基金项目 :吉林省科学技术发展基金项目(990332)

作者简介 :张军(1958 -) ,女 ,工程师 ,主要从事材料测试分析及研究工作。