

适应铀矿石的耐极低 pH 值 氧化亚铁硫杆菌的诱变育种

刘亚洁¹, 李江², 陈功新¹, 刘艳¹

(1. 东华理工学院土木与环境工程系, 江西 抚州 344000;

2. 江西抚州师专生物系, 江西 抚州 344000)

摘要 从我国最大的集采—选—冶为一体的“721矿”铀矿石中分离富集出具强适应性的氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans* T.f.)其最适 pH 值为 2.0。利用紫外线诱变法处理,经定向筛选获得一株可在 pH1.2 条件下快速生长,甚至可在 pH0.9、0.6 的条件下生长的突变株,经过多代培养其氧化活性稳定,可直接用于铀矿石的生物浸出。

关键词 氧化亚铁硫杆菌; 最适 pH 值; 紫外诱变; 定向筛选

中图分类号 :TF803.21; Q933.13 **文献标识码** :A **文章编号** :1000-653X(2005)02-0021-06

随着我国核工业的快速发展,所开采的铀矿资源其品位已越来越低,因此低品位铀资源的回收利用技术尤其是生物浸出技术展现了广阔的应用前景。但目前我国在该领域的研究只停留于实验室研究和小规模半工业试验阶段,尚不能应用于工业化生产,同时铀矿的生物浸出也落后于金、铜等其他矿产。氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)是一种生物浸矿的优势菌种,其在低 pH 值条件下对铀矿石的适应性、二价铁的氧化活性及稳定性是铀矿石生物浸出的关键因素。目前我国缺乏在低 pH 值条件下具有强而稳定氧化活性的浸矿菌是制约其工业化应用的主要原因之一。在铀矿细菌浸出体系中,氧化亚铁硫杆菌的主要作用是通过间接氧化作用将铀矿石中的黄铁矿(FeS_2)或黄铜矿(CuFeS_2)等硫化矿物中的低价铁和硫氧化成高价铁和高价硫,在溶液中形成一种强氧化态的强酸环境,使难溶的四价铀氧化成六价铀而溶解出来^[1~2];或直接作用于四氧化

二铀等形式的低价铀,将其氧化成三氧化铀等易溶的高价铀形式。同时氧化亚铁硫杆菌具有较强的趋向性,可主动吸附在硫化矿物的矿石表面,对矿石产生生物化学和生物物理侵蚀作用,从而加快目标金属的浸出。在整个作用过程中,体系的 pH 值是影响硫化矿物溶解速率的关键因素。氧化亚铁硫杆菌的最适 pH 一般在 2.0~2.5^[3]。在矿石浸出中,由于黄钾铁矾类物质的产生,会将矿石颗粒包裹而使浸出过程减缓并停止^[4]。我们对多种试验矿石进行 X 衍射分析,也表明在 $\text{pH} > 1.6$ 的细菌浸出系统中总铁浓度为 5~8g/L 时便有黄钾铁矾类物质产生。可见,生物浸出过程中使用在低 pH 值条件下具有强而稳定氧化活性的浸矿菌是提高浸出效率的关键。国外细菌浸出工艺无论是大规模生产还是实验室研究, pH 一般在 1.2~1.3 之间^[2,5];而国内细菌浸出 pH 值均在 2.0 左右^[6~7],龙中儿等报道了一株最适 pH 值为 1.7~2.0 氧化亚铁硫杆菌驯化菌^[8],目前尚

未见 pH 值 1.2 条件下有较高活性的氧化亚铁硫杆菌菌株报道。笔者通过矿石培养基筛选、驯化及紫外线诱变,获得了一株在 pH 值 1.2 条件下具强氧化活性的氧化亚铁硫杆菌突变株,该菌在目标铀矿石中具有很好的适应性,有望在低品位铀矿石、尾矿及常规水冶渣等铀资源回收中发挥作用。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

铀矿石:取自“721 铀矿”沙州、山南和邹家山三个矿区的铀品位为 0.2%~0.5% 的混合铀矿石。矿石主要成份 S^{2-} 0.77%, S^{6+} 0.066%, U^{6+} 0.058%, U^{4+} 0.366%, F^{-} 1.08%。

出发菌 C-03:以加富矿石培养基自“721 铀矿”邹家山铀矿井+30m 中段引水渠水分离筛选驯化、纯化而得。

基本培养基:9K 培养基(A 液: $(NH_4)_2SO_4$ 3g; KCl 0.1g; K_2HPO_4 0.5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g; $Ca(NO_3)_2$ 0.01g; H_2O 700mL。B 液: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 25g 浓 H_2SO_4 1mL。用时两液分别灭菌后混合),根据需要以浓硫酸调节 pH 值。

矿石培养基:将粒度为 0.1~5.0mm 的铀矿石按固液比 1:5~7 酸化至 pH1.5, 0.1MPa 下高压蒸汽(LS-B50L 型高压蒸汽灭菌锅)灭菌 20min,备用。

定向筛选培养基:矿石培养基加 10% 9K 培养基,二价铁浓度 5g/L, pH1.2。

1.2 实验方法

1.2.1 适应铀矿石的出发菌株富集分离

自“721 铀矿”邹家山矿区+30m 中段引水渠中按无菌法采集水样(pH 值=5.6, Eh 值=475.6mV, 水温 21℃),立即带回实验室按 20% 的接种量以无菌 9K 培养基和无菌矿石培养基按 8:2 比例混合接种(固体含量为 5%),在初始 pH 值为 2.0,温度为 30℃、转速为 140r/min 条件下振荡培养。待二价铁

接近氧化完全时,以 20% 接种量、矿石培养基和 9K 培养基各占 50%(固体含量为 10%)进行矿石适应性驯化培养,继代三至四次(每代均增加矿石培养基 10%,固体含量 20%,且每次继代使用原固液培养体系中的矿石接种),使富集菌种密度达到 10^7 个/mL 以上,且 100% 氧化二价铁所需时间在 30h 以内。

1.2.2 适应铀矿石的出发菌株纯化

将上述所获得的菌液充分振荡(15~20min) 2000r/min 下离心 4min,取上清液以 pH 值为 2.0 的酸性无菌水按 10 倍稀释法依次进行稀释,至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释度。分别进行琼脂固体平板涂布接种,30℃ 人工气候箱中培养。待菌落长出,挑取单一、界限明显的圆形、中间突起呈铁锈红色的小型菌落接种入无菌 9K 培养基中复壮,连续继代两到三代,100% 氧化二价铁所需时间在 30h 以内。保存备用,经镜检和生理生化检验为氧化亚铁硫杆菌,命名为 C-03。

1.2.3 出发菌株的选择

将保存的氧化亚铁硫杆菌菌株 C-03 在 pH 值 2.0、起始二价铁浓度 5.0g/L 条件下的矿石培养基中复壮两代,平均铁氧化速率为 0.25g/L·h。将处于对数期的 C-03 作为出发菌株。该菌株具有较强的目标矿石适应性,且氧化活性强,但其最适 pH 值为 2.0。因此需进行紫外线诱变,其目的是在维持高氧化活性的前提下,使其最适 pH 值降为 1.2。

1.2.4 紫外照射条件

紫外灯 30W, $\Phi 9cm$ 无菌培养皿 5 个,每皿盛出发菌液 10mL,距紫外灯 15~20cm 均匀照射 15~25min。照射前紫外灯提前打开,预热 30min。

1.2.5 诱变后接种及定向筛选

按 20% 接种量接种入筛选培养基,初始 pH 值为 1.2。不同照射时间者各接种 10 瓶平行样(G1 代)。所使用锥形瓶、培养基、七

水硫酸亚铁等器皿、试剂均应灭菌,整个操作过程在无菌操作台(LSW - CJ - 2FD 型医用型净化工作台)中迅速进行。接种完毕后立即置于 30℃ 振荡培养箱(BS - IE 型振荡培养箱)并在 140r/min 下避光培养。培养过程中 pH 值始终维持在 1.2 左右。

待 G1 代中二价铁氧化近完全时,分别取三组照射时间中发育最快者各接种 5 瓶继代培养(G2 代);同法至 G3 代,最终获得氧化活性稳定的诱变菌株

1.2.6 致死率测定方法

将照射前后菌液分别制成活体染色水浸片,利用 Evolution LC Camera Kit Image-Pro Express 软件(美国)在 Olympus BX - 51 显微镜油镜下活体计数。

致死率 = (1 - 照射后活菌数 / 照射前活菌数) × 100%

1.2.7 诱变菌氧化活性测定

出发菌与诱变菌株均以 80mL 矿石培养基、二价铁刚好氧化完全时的种子菌液、20% 接种量接种入 250mL 锥形瓶,30℃、140r/min、pH 值分别为 2.0 和 1.2 的条件下对照培养并定时观测铁浓度、pH 值的变化情况。

1.2.8 诱变菌耐受极低 pH 值的试验

在其他条件完全相同,pH 值分别为 0.6、0.9、1.0、1.1、1.2 条件下接种诱变菌,30℃、140r/min 振荡培养观察并测定各参数。

1.2.9 参数测定

铁的测定使用 EDTA 容量法(甲基紫和磺基水杨酸为指示剂,过硫酸氨为氧化剂); pH 值、Eh 值使用 pH - 320S 型 Mettler-Delta 酸度计测定。

2 实验结果及讨论

2.1 紫外照射诱变时间的确定

本次研究中,诱变前出发菌的细菌总数一定(5.9×10^8 个 / mL),固定所选紫外灯功率及照射距离,因此诱变条件的确定即是照

射时间的确定。

2.1.1 紫外照射时间的选择

处于对数期的氧化亚铁硫杆菌液体培养液中三价铁含量较高,三价铁对紫外线具有强的吸收峰值。一般情况下,诱变前均将菌液进行离心,用无菌水制备菌悬液后再进行紫外照射,照射时间一般在 5min 以内。我们经过反复试验发现,对总铁浓度为 5g/L 的出发菌液(三价铁浓度 4 ~ 5g/L),直接紫外照射 15min、20min 和 25min,其致死率与对无铁菌悬液照射 1min、2min 和 3min 致死率相近。因此选择 15min、20min 和 25min 三组照射时间对出发菌进行直接照射。表 1 为所选择的不同照射时间和致死率之间对应关系。可见照射 25min 致死率最高,为 65.9%,照射 15min 致死率较低,为 42.5%。

表 1 紫外线照射时间与致死率的关系

紫外照射时间/min	15	20	25
致死率/%	42.5	58.7	65.9

以前诱变育种中,常采用高致死率(90% ~ 99.9%)来达到纯的高突变菌株。由于高致死率下所获得的菌株负突变率高,在随后的培养中易退化,生理活性不稳定。因此目前多采用致死率在 30% ~ 80% 之间,获得较高的正突变菌株^[9]。在照射强度一定时,致死率与照射时间成正相关。由表 1 可见,本次所采用的三组照射时间致死率在 30% ~ 80% 之间,符合上述观点的要求。

2.1.2 紫外照射最佳时间的确定

定向筛选三代的结果见图 1。可知照射时间 25min 经过三代的定向筛选后,氧化 5g/L 二价铁的时间为 2.5d;照射 20min 和 15min 定向筛选后,氧化 5g/L 二价铁的时间分别为 5d 和 7.5d。结果表明,照射时间 25min 所得诱变菌氧化活性分别是照射 15min 和 20min 的 2 倍和 3 倍。所以以照射 25min 为本次试验的最佳照射时间。在该照射时间下最终获得的突变株命名为 UTf12。

图 1 表明,诱变 G1 代氧化二价铁时间相当长,且以照射时间 25min 所经历时间最长。对于同一出发菌的紫外照射而言,G1 代培养液中突变体的数量决定于致死率和突变率。高致死率意味着高突变率,但存活率低。由于突变率以指数级提高,而存活率则是按算术级提高。因此,图 1 所示的 G1 代中,照射 25min 组中,单位体积存活的突变体数量稍多,但单位体积存活菌数相对较少。所以氧化二价铁的速度慢于其他两者,完全氧化二价铁所需时间为 25d。但到了 G2、G3 代后,三组照射条件下初始培养液中活细菌密度相当,但单位体积突变体数量以 25min 者多,故其氧化活性明显提高,且随筛选代数的增加,突变体的纯度相对增加,氧化活性也越来越强。

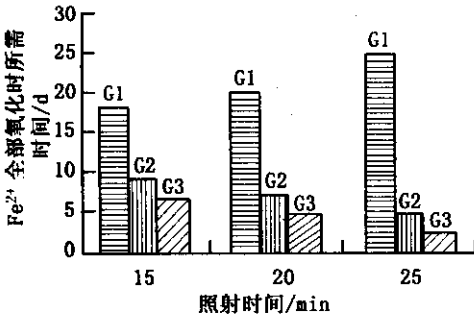


图 1 不同照射时间下诱变菌株生长时间比较

2.2 UTh12 的氧化活性及稳定性

2.2.1 UTh12 与 C-03 的氧化活性比较

在其他条件完全相同,pH 值分别为 2.0 和 1.2 时,进行 C-03 和 UTh12 两菌株氧化活性比较,三价铁浓度随时间变化情况见图 2。结果表明,UTh12 与 C-03 在初始 pH 值分别为 1.2 和 2.0 条件下,二价铁氧化活性接近。

2.2.2 UTh12 的稳定性

菌种性状的稳定性是工业生产应用的前提。为了检验该 UTh12 的稳定性,我们在与定向筛选完全相同的条件下继续继代培养至

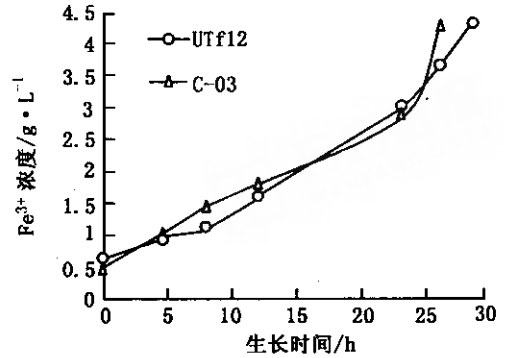


图 2 UTh12(G6 代)和 C-03 三价铁浓度随时间变化比较

第八代(G8),发现其氧化二价铁速率基本保持不变或有所增加。以接种代数为横坐标,以二价铁氧化速率($\text{g/L} \cdot \text{h}$)为纵坐标作图,结果如图 3。可见,UTh12 的氧化活性随继代次数的增加而提高,G3 代后基本稳定且略有增高,直到 G8 代均保持较高的氧化活性。经过紫外线照射及 pH 值 1.2 定向筛选,所获得的 UTh12 二价铁氧化活性几乎与 C-03 相当。这是因为在紫外照射及定向筛选过程中,已筛选出既保留有原出发菌对矿石的适应性和强氧化活性,又产生了适应极低 pH 值的正突变体。这一突变株在经过八代的继代培养,并未出现退化现象,反而活性稳中有升,说明所获得的突变株性状稳定,而且菌株

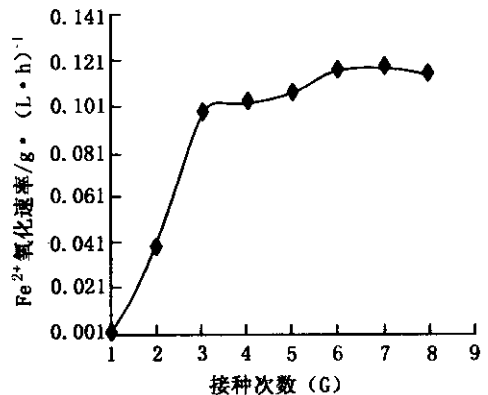


图 3 UTh12 二价铁氧化速率随接种次数的变化

较纯。

2.3 UTf12 耐受极低 pH 值试验

生物浸出体系中,由于有氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*, T. t)等强产酸菌协同作用,体系 pH 值将会不断降低,最低可达 $\text{pH} < 1.0$ 以下。在这样的环境中,氧化亚铁硫杆菌耐低酸度能力的强弱将对金属最大浸出率有着重要的影响。作为对比,在进行突变株耐受极低 pH 值试验的同时,我们也进行了 C-03(最适 $\text{pH} = 2.0 \sim 2.5$)耐受低 pH 值试验,发现 C-03 在 pH 值小于 1.5 的体系中生长极其缓慢,在小于 1.0 的体系中几乎不生长。

图 4 为 UTf12 在不同极低 pH 值条件下培养,其三价铁浓度随时间变化情况。试验表明,该 UTf12 在 $\text{pH} = 1.2$ 时氧化活性最强, pH 为 1.1、1.0 和 0.9 时均具相对较高的氧化活性,在 $\text{pH} = 0.6$ 的酸度条件下经历了相当长时间(220h)后二价铁也接近氧化完全。可见这是一株具有极强嗜酸性的菌株。

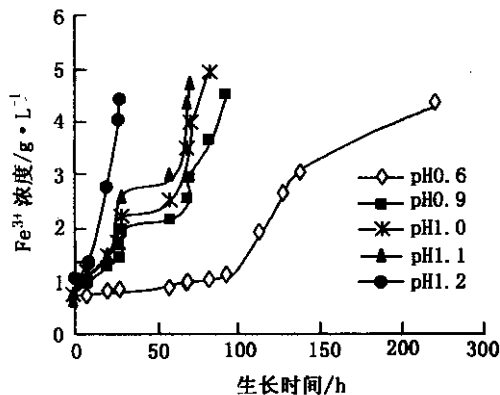


图 4 极低 pH 值对 UTf12 二价铁氧化能力的影响

耐受极低 pH 值试验表明,该突变株具有极强的嗜酸性,而原出发菌却不具备,可能是诱变过程中产生了耐强酸的正突变性状,具体机理尚不清楚,有待进一步的分子生物学研究。万方数据

3 结 论

从目标矿样品中富集分离、筛选和纯化出矿石适应性强的原出发菌 C-03,其最适 pH 值为 2.0。原出发菌 C-03 经紫外线处理并定向筛选后,获得了极低 pH 值适应能力的突变株 UTf12,该菌株具有以下特征:

(1) 在 $\text{pH} = 1.2$ 的矿石培养基中具有较强的二价铁氧化活性;

(2) 经 8 代矿石培养基液体继代培养,性状稳定;

(3) 能在 pH 为 0.9、0.6 条件下生长,具极强的嗜酸性。

但 UTf12 强嗜酸机理及其在铀矿生物浸出中的应用尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王恩德. 环境资源中的微生物技术[M]. 北京: 冶金出版社, 1997.
- [2] J. A. Fowler, P. R. Homes, F. K. Crundwell. Mechanism of Pyrite Dissolution in the Presence of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Applied and environmental Microbiology, 1999, 65(7).
- [3] 林建群, 彭基斌, 颜望明. 氧化亚铁硫杆菌基因转移系统研究进展[J]. 环境生物学报, 2001, 7(2): 193 ~ 196.
- [4] 李宏照, 刘晓荣, 邱冠周, 等. 驯化氧化亚铁硫杆菌浸出废铜矿中铜的研究[J]. 矿冶工程, 2001, 21(1): 40 ~ 42.
- [5] Matthew O. Schrenk, Katrina J. Edwards, Robert M. Goodman et al. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for Generation of Acid Mine Drainage[J]. Science, 279(5356): 1519 ~ 1523.
- [6] 李秀艳, 周建民, 魏德洲, 等. 金属硫化物矿物生物浸出过程中 Fe^{3+} 的作用[J]. 东北大学学报(自然科学版), 2001, 22(3): 291 ~ 294.
- [7] 陈泉军, 方兆珩. 硫杆菌浸出低品位镍铜硫化矿[J]. 过程工程学报, 2001(1): 49 ~ 53.
- [8] 龙中儿, 黄运红, 蔡昭铃, 等. 低 pH 的氧化亚铁硫杆菌选育及氧化硫酸亚铁初步研究[J]. 过程工程学报, 2002, 2(5): 415 ~ 419.

某高镁磷尾矿矿石工艺特性研究*

谭志斗^{1 2}, 谭小红², 胡远芳², 张允湘¹

(1. 四川大学化工学院, 四川 成都 610065;

2. 湖北民族学院化学与环境工程学院, 湖北 恩施 445000)

摘要 对某磷矿尾矿的物相和化学组成、反应特性及发泡性能进行了研究。结果表明:该尾矿的主要物相为 $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$, MgO 含量为 19.0%、 P_2O_5 含量为 5.94%。尾矿的反应活性较好, 抗阻缓性较差, 发泡比较严重。加入消泡剂 BMS-1 后, 发泡明显减弱。

关键词 高镁磷尾矿; 反应特性; 发泡性能

中图分类号: TQ126 文献标识码: A 文章编号: 1000-653X(2005)02-0026-05

世界上的磷矿资源经过几十年的开采, 逐渐趋于贫化, 高品位磷矿明显减少。我国磷矿储量居世界第四位, 但 80% 是中、低品位磷矿^[1], 为了满足湿法磷酸对原料矿石的

质量要求, 通过各种选矿技术的运用, 每年将产生大量的磷尾矿。如果能对磷尾矿进行综合利用, 不仅可以减少资源浪费, 还能避免尾矿堆积占用土地及对环境的污染。由于磷矿

[9] 黄秀犁. 微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社,

1998.

Mutation Breeding of *Thiobacillus ferrooxidans* Tolerable the Extremely Low pH Value and Adaptable Uranium Ores

LIU Ya-jie¹, LI Jiang², CHEN Gong-xin¹, LIU Yan¹

(1. East China Institute of Technology, Fuzhou, Jiangxi, China;

2. Fuzhou Teacher's College, Fuzhou, Jiangxi, China)

Abstract :An original *Thiobacillus ferrooxidans* strain isolated and enriched from "the 721 Uranium Mine" which is the biggest uranium mine in China has high activity of oxidizing ferrous and optimum pH value 2.0. When it is treated by ultraviolet irradiation, a mutant strain was obtained after a series of directional screening. This mutant strain can grow fast under the condition of pH1.2 and also can grow under the condition of pH 0.9 and 0.6. Meanwhile it is stable after 8 times inoculating culturing. It can be directly used for uranium bioleaching.

Key words :*Thiobacillus ferrooxidans*; Optimum pH value; Ultraviolet irradiation; Directional screening

* 湖北民族学院 2000 级化学工程与工艺专业学生徐亮、李莎莎、刘莉参与了实验研究工作。

收稿日期 2004-06-08

作者简介: 谭志斗 (1970 -), 男, 副教授, 四川大学化工学院访问学者。