

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.03.042

## · 专论与综述 ·

## 极端嗜酸硫杆菌高密度培养的研究进展\*

康鑫 刘荣辉 周文博 唐诗哲 周洪波<sup>△</sup>

(中南大学资源加工与生物工程学院 湖南长沙 410083)

**摘要:** 极端嗜酸硫杆菌属微生物在生物冶金、生物脱硫以及固体废弃物的处置中扮演重要作用,但该类微生物在培养过程中细胞浓度很低,限制了该类微生物的广泛应用。高密度培养是提高微生物生产效率的有效手段。高密度培养技术在嗜酸微生物中的应用能够显著减少微生物培养的生成成本,缩短生产周期,极端嗜酸硫杆菌微生物菌剂的输出速率。本文从菌种选育、培养条件、培养方式综述了极端嗜酸硫杆菌高密度培养的研究现状。

**关键词:** 极端嗜酸硫杆菌, 高密度培养, 菌种选育, 培养条件, 培养策略

**中图分类号:** Q-33; Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)03-596-05

## Research Progress of High Density Culture of Acidithiobacillus\*

KANG Xin, LIU Rong-hui, ZHOU Wen-bo, TANG Shi-zhe, ZHOU Hong-bo<sup>△</sup>

(School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan, 410083, China)

**ABSTRACT:** Acidithiobacillus microorganisms play important roles in bioleaching, biological desulfurization and solid waste disposal. However, the concentration of cells was very low during culturing, which limited the application of these microorganisms. High density culture is an effective means to improve microbial production. The application of high density culture technology in acidophilic microorganisms would significantly reduce the cost of culture, shorten the time of production and accelerate the output rate of Acidithiobacillus microbial agents. This paper reviewed the research process from strains breeding, medium conditions, culture strategies.

**Key words:** Acidithiobacillus; High density culture; Strains breeding; Medium conditions; Culture strategies

**Chinese Library Classification(CLC):** Q-33; Q939.9 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2021)03-596-05

## 前言

生物冶金技术是细菌作用与湿法冶金技术相结合的新工艺,主要利用嗜酸微生物与矿物之间的相互作用而促进矿物溶解,有针对性地某种矿物从矿石中提取出来的一种冶金技术<sup>[1]</sup>。该技术具有成本低,易操控,环境友好等特点,已经广泛应用于低品位矿中有价金属的提取和低品位金矿的预氧化。近年来,该技术在电子废弃物、电镀污泥以及含重金属固体废弃物中有价资源的回收展现了巨大的潜力。研究表明,在生物冶金的过程中浸矿微生物的菌体数量是影响整个过程的关键因素,浸矿微生物的菌体浓度直接决定了反应进行的速率<sup>[1]</sup>。提高菌体的浓度尤为重要。浸矿微生物是一类生长在强酸、高重金属离子浓度和寡营养的特殊环境中的特殊微生物,已报道的大多数浸矿微生物主要通过氧化亚铁或者还原硫获得能源,以 CO<sub>2</sub> 为唯一碳源,其生长繁殖速度非常缓慢。如何提高细菌浓度一直都是生物冶金行业的研究重点之一<sup>[2]</sup>。

高密度培养技术是指在液体培养环境中,尽可能多的积累细菌浓度的培养状态。高密度培养能够实现微生物的高密度和高生产率,是获得最高的效益的关键技术<sup>[3]</sup>。目前该技术在嗜酸微生物的研究也取得了一定的进展,但主要集中于嗜酸氧化亚铁硫杆菌和氧化硫硫杆菌的研究,本文就几种典型极端嗜酸硫杆菌属微生物的高密度培养研究方法和现状进行综述。

## 1 高密度培养

高密度培养技术(HCDC, high cell density culture)的核心在于通过优化培养条件,改变培养策略,改进反应器等方式,给菌体的生长提供更加合适的生长条件和营养物质,使菌体的密度比普通培养得到显著提高,从而在同样甚至更低的生产成本下得到更多的细胞体或者更多的特定目的产物。从广义上来说,凡是细胞的密度较高,甚至于能够接近其理论培养值的培养,都可以称之为高密度培养<sup>[4]</sup>。

高密度培养技术的主要目的就是提高细胞密度,而细胞生

\* 基金项目:中国大洋矿产资源开发协会"十三五"专项(DY135-B2-15);国家自然科学基金项目(31870115);

国家重点研发计划资助项目(2017YFD0801304)

作者简介:康鑫(1992-),男,硕士研究生,主要研究方向:浸矿微生物, E-mail: a8782184@126.com

△ 通讯作者:周洪波(1969-),男,教授,博士生导师,主要研究方向:生物冶金和微生物发酵, E-mail: zhouhb@csu.edu.cn

(收稿日期:2019-12-27 接受日期:2020-02-23)

长过程中的各个因素包括营养物质、代谢产物、温度、溶氧、pH 等各个因素,都会影响高密度培养。通过高密度培养技术,可以获得更多的细胞体或者更多的特定目的产物,从而达到降低生产成本,缩短生产周期,减少设备投资,提高生产效率的目的。一般来说,高密度培养的上限值大概在 150-200 (DCW/L),其下限值大概在 20-30 (DCW/L)。密度培养的上下限值因不同的菌种乃至不同的菌株之间存在着非常大的差异<sup>[5]</sup>。例如浸矿微生物都生长在非常极端的环境中,较常见的大肠杆菌、酵母等工业发酵菌种,其细胞浓度仅有前者 1/10-1/100,所以其上下限也就远小于一般理论值了。

## 2 极端嗜酸硫杆菌

浸矿微生物是生物浸出的主导者,根据其浸出机理和其产物的不同,大致上可以分为三类:第一类是可以氧化利用二价铁和还原硫的自养或兼性自养微生物,第二类是利用有机物产生有机酸的异养微生物,第三类微生物可以产生氰化物<sup>[67]</sup>。三类微生物中研究最多的是第一类微生物,其中又以嗜酸氧化亚铁硫杆菌的应用最为广泛。2000年, Kelly DP 和 Wood Ap 将嗜酸氧化硫硫杆菌、嗜酸氧化亚铁硫杆菌和喜温嗜酸硫杆菌共通划分至新属 - 嗜酸硫杆菌属(Acidithiobacillus)中<sup>[8]</sup>。迄今为止,嗜酸硫杆菌属共有 6 个种,分别是 *Acidithiobacillus ferrivorans*、*Acidithiobacillus caldus*、*Acidithiobacillus albertensis*、*Acidithiobacillus ferridurans*、*Acidithiobacillus ferrooxidans* 和 *Acidithiobacillus thiooxidans*<sup>[69]</sup>。这些微生物通过氧化亚铁、单质硫和含硫化合物获取能量,是一类短杆状的化能自养菌,具有专性好氧、嗜酸、革兰氏染色阴性的特点,是生物冶金中应用最广泛的一类微生物。

## 3 高密度培养的优化策略

### 3.1 菌种优化策略

微生物在不同生长环境经过长期驯化所形成的不同菌株,其生理生化特性、浸出能力甚至代谢途径都会出现明显的差别<sup>[10]</sup>,菌株在自己最适应的生长环境下才能达到最高的细胞浓度。为获得更适应特定浸出体系,具有更高的细胞浓度和生长活性的菌株,需要对菌种进行改良和驯化。

诱变育种常用于获得高耐性和高浸出活性的嗜酸硫杆菌菌株,没有专门针对高密度培养的诱变研究,但可以从培养过程中的生长活性等指标侧面的反映出微生物的生物量。剡倩等<sup>[11]</sup>使用 X 射线诱变处理嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*,简称 *At.f*),使细菌提前进入对数期,其活性增加了 11%。袁檬等<sup>[12]</sup>使用紫外诱变对 *At.f*,培养出能够更适应冬季低温条件的菌株。此外,通过微生物驯化,能够使菌株在特定条件下的耐性和生理活性显著提高,从而实现特定条件下的高密度培养。Elaine Govender 等<sup>[13]</sup>使用小型的柱反应器模拟堆浸反应,发现嗜酸性氧化亚铁硫杆菌在黄铁矿预培养过程中加入铜离子进行驯化,可以使加入反应器中的生物量得到显著提高。甄世杰等<sup>[14]</sup>通过高  $Mg^{2+}$  浓度培养基的多级驯化培养,使 *At.f* 的最低  $Mg^{2+}$  致死量由 15 g/L 增加到 20 g/L,使 *At.f* 在高浓度  $Mg^{2+}$  生长环境中的生长得到了极大的提高。由此可见,通过驯化、诱变等策略提高微生物的活性是提高该类微生物性能的有

效方式。

### 3.2 培养基优化策略

嗜酸硫杆菌属微生物都属于化能自养细菌,所需碳源来自于环境中的  $CO_2$ ,培养基一方面供应充足的  $Fe^{2+}$  和还原、单质硫供细菌氧化获得生长所需能源,另一方面提供充足的无机 N、P、K 等元素供给细菌完成生长繁殖和其它代谢过程<sup>[15]</sup>。这些营养物质必须充足以支撑细胞的高密度生长,但浓度过高又会抑制细菌生长,所以培养基需要有恰当的比例和浓度。

培养基氮源用于构成细胞中的蛋白质、核酸以及其它含氮有机物,是微生物生长和产物合成的基础。肖磊等<sup>[16]</sup>对不同氮源进行了研究,发现在硫酸铵、硝酸铵和尿素中,使用硫酸铵培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌时其生长的停滞期明显短于另外两种氮源。吕早生等<sup>[17]</sup>使用  $KNO_3$ 、 $(NH_4)_2CO_3$ 、 $(NH_4)H_2PO_4$  替代普通 9K 培养基中的  $(NH_4)H_2PO_4$ ,发现 *At.f* 菌在这几种氮源下都可以生长,但是其生长的速率都远小于使用  $(NH_4)H_2PO_4$  作为氮源时。谌书等<sup>[18]</sup>发现使用 1 g/L 的  $(NH_4)H_2PO_4$  代替培养基中的  $(NH_4)H_2PO_4$ ,培养 *At.f* 用于浸出废旧印刷电路板中的铜,其浸出效果更好。

培养基的其它无机盐物质,一部分属于能源物质,含可氧化的铁和硫元素,另一部分用于合成有机物或者参与酶的反应中。能源物质太少不足以支撑高浓度的细胞生长造成细胞浓度较低,但过多会导致细胞生长对数期显著延长并且细胞浓度也会明显下降。普遍发现使用现有的标准培养基如 9K 培养基或者稍微提高一点能源物质含量,能够得到最多的细胞密度,同时生成的结晶沉淀量也比较少<sup>[16]</sup>。吴学玲等<sup>[20]</sup>发现阴离子物质对 *At.f* 具有一定的抑制作用,结果表明常见的阴离子对 *At.f* 菌的抑制影响程度为  $NO_3^- > Cl^- > SO_4^{2-}$ 。郭勤等<sup>[21]</sup>发现当培养基中  $Cl^-$  浓度小于 1 g/L 时, *At.f* 菌的亚铁氧化活性没有任何影响;  $Cl^-$  浓度在 1-2 g/L 时, *At.f* 菌的亚铁氧化活性有所降低,但通过长时间的适应和驯化,也可以获得较高的活性;当  $Cl^-$  浓度大于 3 g/L 时, *At.f* 菌的生长受到严重抑制。 $SO_4^{2-}$  对菌体的影响程度小,因此在构建培养体系时,应当使用硫酸调节体系 pH。

使用标准培养基培养硫杆菌属虽然能够使培养基的组分和状态得到稳定的控制,非常适合用于实验培养,但是其成本高昂,并且可能由于缺乏某些特定的微量元素物质,使得标准培养基的能效一直不高。张旭等<sup>[22]</sup>发现使用 10 g/L 的黄铁矿代替普通 9K 培养基中的  $FeSO_4$ ,在接种量 15%,初始 pH2.0 的条件下培养 *At.f* 144 h 后,其菌浓度高达  $6.4 \times 10^8$  个/mL,并且经过测算,发现培养过程中单位质量的黄铁矿提供的能量大约是单位质量  $FeSO_4$  提供能量的 34.7 倍,这意味着使用黄铁矿代替  $FeSO_4$  能够非常高效的进行 *At.f* 培养。因此,进一步研究天然矿物在高密度培养中的作用能够提高该类微生物的浓度。

### 3.3 培养条件优化策略

**3.3.1 温度** 温度能极大程度的影响微生物的生长。一方面温度能够影响微生物细胞内酶的活性、蛋白质的性质和细胞膜的流动性,另一方面温度也能够影响培养体系中各物质的物化性质和传质能力,这些因素直接或者间接的影响了细胞的生长和代谢产物的合成。一般来说,在一定范围内温度升高时,细胞内各种酶的催化效率会升高,这时细胞内的化学反应速率加快,细胞的代谢水平和生长速度提高<sup>[23]</sup>;继续升高温度,细胞内的

酶、核酸和其它蛋白质发生某些不可逆的损伤,导致细胞失活<sup>[24]</sup>。

为了获得更高的细胞浓度,我们一般选择微生物的最适生长温度进行细胞的培养。最适生长温度不是菌种的特征性常数,它不是一个特定的值,通常是一个范围区间,它随着培养基的成分组成、培养条件、目的产物等因素的不同而发生改变,不同的菌其最适生长温度的差距可能会很大<sup>[4]</sup>。因此,在选择培养温度时,要根据实际的培养环境和条件,以及当前培养的实际用途,进行实验调整,获取当前最佳培养温度。目前为止,关于改善这类微生物培养温度的策略还没有研究报道,需要进一步培育不同温度适应的菌株,以尽可能达到特定环境下的高密度培养<sup>[25,26]</sup>。

**3.3.2 pH** pH 是影响硫杆菌高密度培养的重要因素之一,在培养过程中由于能源物质的氧化利用、代谢产物的积累以及其他伴生产物的产生、沉降等因素会导致培养体系 pH 的变化,这会影响到体系中物质的电离状态以及细胞组分的结构和性质,从而最终影响细胞的生长繁殖<sup>[27]</sup>。

嗜酸微生物最独特的特征是对胞外酸性环境的需求,维持胞内外几个数量级 pH 梯度差(胞内 pH 6.5 左右)是该类微生物赖以生存的基础。pH 一方面影响着菌体本身的生长活性,另一方面也影响培养基中二次矿物的形成。王清良等<sup>[28]</sup>研究了 pH 对 *At.f* 氧化  $Fe^{2+}$  的影响,该菌最适合的 pH 在 2.0-2.5 之间;当 pH 过低时, $Fe^{2+}$  很难被氧化;但当 pH 过高时会大量生成黄钾铁矾沉淀影响菌体的生长。Li 等<sup>[51]</sup>表明添加柠檬酸可以有效避免铁矾的生成,在 pH1.8 时增加了 53% 的细胞浓度。除此之外,也有研究表明添加外源氨基酸提高了 *At.f* 在低 pH 环境下的生长率<sup>[52]</sup>。可见,pH 对嗜酸微生物密度的影响是复杂的,在特定培养条件下优化其生长 pH 值时必要的。

**3.3.3 溶氧** 嗜酸硫杆菌属于专性的好氧菌,随着菌体的不断生长繁殖,所需的溶解氧会不断提高,供氧不足会使培养基中的溶解氧下降,抑制菌体生长和产物合成。40% 左右的溶解氧是最适合 *At.f* 高密度培养的,过高或者过低都不利于菌体的生长<sup>[31,33]</sup>。

常用的增氧方式有摇床震荡、搅拌桨搅动和曝气增氧<sup>[34]</sup>。摇床和搅拌桨借助外力使培养基在容器内流动,增加培养基和空气的接触从而增加溶氧,这两种方式转速和溶氧都成正相关关系,但转速都不易过高,过高的转速可能由于剪切力过大损伤细胞或者不利于代谢产物沉降等因素导致细菌浓度反而降低<sup>[32,35]</sup>。曝气增氧较前两种方式更为温和,通过曝气设备直接将含氧空气通入培养基中,空气在培养基中呈现细密的小气泡,增大了气液交换的面积,其增氧能力更好,耗能较前两种也更少。曝气量和培养基溶氧也是正相关关系,过高的曝气量也会对菌体产生一些影响,但影响不算大<sup>[36]</sup>。增加溶氧的措施一方面提高了空气中的溶解氧,另一方面也提高了培养基的传质速率,使菌液得到充分的扰动,保证容器中各部分物质和菌体的均一<sup>[37]</sup>。可见,维持足够的溶解氧能够提高菌浓。

### 3.4 培养方式优化策略

硫杆菌属属于化能自养菌,通过优化培养基和培养条件的方式对细胞浓度的提升不像异养菌那么显著,通过改变培养方式能够弥补这一不足,在相同培养的时间内尽可能多的得到高浓度的菌液。

**3.4.1 连续培养** 实验室常用分批培养技术进行硫杆菌属的培养,确定好最佳培养条件后,按照最佳接种量将菌种接入培养基中培养至能源物质基本消耗完毕。分批培养只能控制反应的初始条件,由于代谢产物的积累和营养物质的缺乏,细胞浓度一般较低,并且培养时间间隔很长,很难在短时间内获取大量的细胞和产物。

为解决分批培养产能规模小的问题,持续获取高浓度的硫杆菌培养物,使硫杆菌能够用于工程实施上,现在多使用气升式反应器对硫杆菌进行连续培养。连续培养是让菌体在反应器中完成活化后,控制反应器的溶氧、温度等因素的稳定,开始往反应器匀速的流加新鲜的培养基,反应器中同时有等量的培养液流出,反应器内培养液的总体积保持不变,随培养的进行反应器内的菌液状态逐步保持稳定,能够连续不断产生培养好的菌液,保持长时间的运转。连续培养过程中,新鲜的培养基不断流入反应器,带走了产物、代谢废物和部分菌体,同时源源不断的补充着营养物质,因此培养基可以不需要太高浓度的营养物质,这样就在保证充足的营养物质的前提下一定程度上解决了底物和产物的抑制问题,使菌体浓度得到提升。蒋亚飞等<sup>[29]</sup>对比了分批培养和连续培养两种工艺下浸铀硫酸高铁菌液的培养,最终发现连续培养下  $Fe^{2+}$  的氧化速率和日菌液产出率分别是分批式培养的 1.7 和 1.4 倍。王清良等<sup>[30]</sup>使用固定化反应器连续培养 *Acidithiobacillus ferrivorans*,当通气量在 20 L/h,吸附尾液温度在 17-19℃,加液流量在 500L/h 时,可以使反应器的连续  $Fe^{2+}$  氧化速率达到 0.85 g/(L·h)。现阶段连续反应器大多停留在控制温度、曝气量的相对稳定不变,不断加入新鲜的培养基的程度,实际上对 pH、溶氧等参数都没有进行严格的控制,随着培养的不断进行,各项参数可能都会产生比较大的变化。优化和完善反应器是实现高密度培养的一个很好的方向,让硫杆菌属的培养能够像普通发酵一样精准的控制各项参数,使培养过程中的次生矿物沉淀尽可能的少产生或者不产生,尽可能的延长硫杆菌在反应器内的对数生长期时长,使反应器能够长时间高效率的不断运转下去。

**3.4.2 固定化培养** 在反应器进行连续培养的过程中,随着培养基的不断加入和菌液的流出,大量的菌体从反应器中被带走,当液体的流量较大时,反应器中的菌体很容易被逐步洗脱出去,这限制了反应器的流量大小,也使反应器内菌体的浓度、反应速率受到了限制。通过固定化培养技术,能够使大量的菌体停留在反应器当中,极大的增加了反应器内的细胞浓度和反应效率。

固定化技术是指通过一定的物理和化学方法,使细胞或者酶能够固定在一定的区域内,同时能够保持它们本身的活性和反应能力,使其能够反复利用的方法<sup>[38]</sup>。嗜酸硫杆菌属由于其嗜酸、专性自养的特性,其培养基具有高盐浓度、高酸浓度的特征,所以许多细胞固定化技术都不适用于嗜酸硫杆菌属的固定化培养。常用的固定化培养嗜酸硫杆菌属的方法为吸附固定法和包埋固定法<sup>[6]</sup>。吸附固定是使用固定化载体通过物理或者化学的方法将细胞固定在载体表面,包埋固定是通过不溶于水的凝胶或者半透膜将细胞固定在其中。苏峰<sup>[38]</sup>通过吸附固定法,采用新型固定化载体吸附固定 *At.f* 在通气量 125 L/h,稀释率 0.43 h<sup>-1</sup> 的条件下,细胞的  $Fe^{2+}$  氧化速率高达 3.205 g/(L·h)。王

清良<sup>[39]</sup>使用活性炭作为载体固定 *At.f* 构建了固定床反应器,在模拟矿山铀矿石溶浸的 pH 和 Fe 浓度条件下,最终 Fe<sup>2+</sup> 的氧化速率达到 1.2 g/(L·h)。杨晓娟等<sup>[40]</sup>使用聚乙烯醇-海藻酸钠复合材料作为载体, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 作为交联剂,对 *At.f* 菌进行了包埋固定,在稀释率为 0.4 h<sup>-1</sup> 的条件下运行 96 h 后 Fe<sup>2+</sup> 的氧化速率高达 3.75 g/(L·h)。

两种固定化培养方法都可以用于嗜酸硫杆菌属的固定化培养,吸附固定法较包埋固定法成本更低,操作更简单,并且由于培养过程中黄钾铁矾等次生产物的形成,吸附固定载体较包埋固定载体更容易清理,能够重复利用。所以吸附固定法作为固定化培养方式是可行的。

**3.4.3 外加电位培养** 微生物在生长过程中一直伴随着电流和电势的变化,我们可以通过电化学中燃料电池的氧化还原理论来模拟和解释生物在生长过程中的变化和特性,称之为生物电化学研究。生物电化学的作用在细胞膜的结构、功能和机制,以及细胞内外的信息传递上都有体现。人们发现在微生物的培养过程中外加一定的电流或者电压后,微生物会出现某些特性定位以及向电生长的现象<sup>[41]</sup>。

在 *At.f* 菌的研究过程中,发现在培养时添加一定的电场可以优化 *At.f* 菌细胞膜的选择通透性,这加速了菌体的生长代谢。同时通过外加电场,我们可以借助氧化还原作用将 Fe<sup>3+</sup> 转化为 Fe<sup>2+</sup>,这能够在培养过程中提高能源物质的供应,并且减少 Fe<sup>3+</sup> 对菌体抑制,从而改善 *At.f* 菌的代谢<sup>[42]</sup>。Yunker 和 Rodovich<sup>[43]</sup>通过外加电位还原培养液中 Fe<sup>3+</sup>,为菌体培养提供源源不断的 Fe<sup>2+</sup>,最终发现 Fe<sup>2+</sup> 的利用率提高了 8 倍,同时细菌的生长速度大幅提高。Blake 和 Howard 等人<sup>[43]</sup>使用 45L 的电化学培养槽连续培养 *At.f*,使 *At.f* 的细菌浓度有自然培养条件下的 6 × 10<sup>7</sup> 个/mL 大幅提高到了 1.5 × 10<sup>9</sup> 个/mL。外加电位培养和共培养能够实现 Fe<sup>2+</sup> 到 Fe<sup>3+</sup> 的物质循环,既能极大的提高细胞浓度,又可以减少 Fe<sup>2+</sup> 的消耗,是实现高密度培养的好方法。

**3.4.5 共培养** 研究发现 *At.f* 和 *Acidiphilium acidophilum* (氧化硫嗜酸菌,简称 *Aph.a*) 具有非常良好协同关系<sup>[44-46]</sup>。*Aph.a* 是一种兼性异养的革兰氏阴性杆菌,其生长 pH1.5-6.0,生长温度 10-35℃,和 *At.f* 菌的生长环境非常吻合。*Aph.a* 在厌氧的条件下可以将 Fe<sup>3+</sup> 还原为 Fe<sup>2+</sup>,而 *At.f* 则氧化利用 Fe<sup>2+</sup> 产生 Fe<sup>3+</sup>,这意味着在一定的条件下将 *At.f* 和 *Aph.a* 进行共培养,可以实现 Fe<sup>2+</sup> 到 Fe<sup>3+</sup> 的物质循环,极大的提高 Fe<sup>2+</sup> 的利用率。*Aph.a* 作为兼性异养微生物,可以利用 *At.f* 在生长过程中产生的有机代谢产物进行生长,这可以减少有机物质对 *At.f* 的抑制作用。*At.f* 则可以利用环境中的硫化物,这可以减轻硫化物对 *Aph.a* 的抑制作用。刘宏伟等<sup>[47]</sup>发现,使用 *At.f* 和 *Aph.a* 建立共培养体系进行培养时,*At.f* 菌较纯培养时能够更快的进入对数期,并且对数期能够延长 2 天以上,共培养体系中 *At.f* 菌的菌浓也达到纯培养体系的 5 倍以上。

## 4 小结与展望

同酵母、芽孢杆菌等发酵用的生产工程菌不同,单纯进行极端嗜酸硫杆菌高密度培养的研究很少。这意味着嗜酸硫杆菌

属的高密度培养既有不小的难度,又有很大的提升空间。很多时候我们不以单纯的细胞浓度来表征嗜酸硫杆菌属培养的优劣,一方面是我们培养嗜酸硫杆菌的主要目的是能够快速氧化利用 Fe<sup>2+</sup> 等关键物质,获得源源不断培养液用于浸出而不仅仅是菌体本身,另一方面在固定化反应器中细胞数目的确定难度很大并且准确性也得不到保证。嗜酸硫杆菌属作为自养菌,其正常的培养浓度比大肠杆菌、芽孢杆菌少了至少 1-2 个以上的数量级,嗜酸硫杆菌细胞浓度低很可能是由基因本身所以决定的。如密度感应等都对微生物的培养产生巨大影响<sup>[48-52]</sup>。因此,只有深入揭示该类微生物的生长机制才能够显著提高该类生物的培养密度。

## 参考文献(References)

- [1] 殷志勇,成海芳,张文彬. 生物技术在湿法冶金领域的应用现状及研究趋势[J].湿法冶金, 2006, (03): 113-116
- [2] 冯守帅,杨海麟,高凯,等. 极端嗜酸硫杆菌高效筛选、高密度发酵及保藏方法的研究[J].微生物学通报, 2014, 41(12): 2565-2573
- [3] 左肖肖,陆利霞,李壹,等. 微生物高密度培养策略[J].生物加工过程, 2016, 14(03): 81-86
- [4] 刘元东,袁乐,余润兰. 微生物高密度培养的研究概况[J].有色金属科学与工程, 2015, 6(04): 76-80
- [5] 刘子宇,李平兰,郑海涛,等. 微生物高密度培养的研究进展[J].中国乳业, 2005, (12): 47-51
- [6] 康鑫. 固定床反应器中嗜酸铁氧化微生物的 Fe<sup>2+</sup> 氧化研究[D]. 中南大学, 2016
- [7] 周洪波,毛峰,王玉光. 嗜酸微生物与生物冶金技术[J].矿物岩石地球化学通报, 2015, 34(02): 269-276
- [8] Hedrich S, Johnson DB. *Acidithiobacillus ferridurans* sp nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic gammaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(11): 4018-4025
- [9] Hallberg KB, González-Toril E, Johnson DB. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles*, 2010, 14(1): 9-19
- [10] Kelly DP, Wood AP. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov and *Thermithiobacillus* gen. nov. . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(2): 511-516
- [11] 荆倩,张苗苗,郭晓鹏,等. X 射线诱变选育嗜酸氧化亚铁硫杆菌及其对难处理金矿浸出的研究[J].辐射研究与辐射工艺学报, 2016, 34(05): 42-48
- [12] 袁檬,翁沁玉,卢进登. 嗜酸性氧化亚铁硫杆菌低温诱变试验研究[J].湖北大学学报(自然科学版), 2016, 38(06): 557-560+571
- [13] Elaine Govender, Christopher G. Bryan, Susan T.L. Harrison. Effect of physico-chemical and operating conditions on the growth and activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in a simulated heap bioleaching environment. *Minerals Engineering*, 2015, 75: 14
- [14] 甄世杰,覃文庆,张雁生,等. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌的耐 Mg<sup>2+</sup> 驯化试验研究[J].湿法冶金, 2008, (03): 139-141
- [15] 邓明强,白静,白建峰,等. 影响嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长及生物浸出效率的研究进展[J].湿法冶金, 2016, 35(03): 171-175

- [16] 肖雷,姚菁华,陶秀祥,等. 氧化亚铁硫杆菌培养条件的优化[J]. 选煤技术, 2008, (06): 12-14+2
- [17] 吕早生,袁向利,李凌凌. 一株嗜酸氧化亚铁硫杆菌的筛选及生长条件研究[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(11): 51-54
- [18] 谌书,杨远坤,廖广丹,等. 氨源对氧化亚铁硫杆菌浸提废旧印刷线路板覆层铜的影响研究[J]. 地球与环境, 2013, 41(04): 353-357
- [19] 刘金艳. 氧化亚铁硫杆菌优化培养及其煤炭生物脱硫的界面作用研究[D]. 中国矿业大学, 2010
- [20] 吴学玲,蒋莹,邱冠周,等. *Acidithiobacillus ferrooxidans* 菌株的分离及阴离子对其亚铁氧化活性的影响[J]. 中国有色金属学报, 2008, (02): 349-355
- [21] 郭勤,韩文艳,李江,等. 氯离子对氧化亚铁硫杆菌和氧化亚铁钩端螺菌活性的影响[J]. 有色金属(冶炼部分), 2015, (01): 42-45+53
- [22] 张旭,冯雅丽,王雅静. 黄铁矿高效培养嗜酸氧化亚铁硫杆菌及过程分析[J]. 矿冶工程, 2018, 38(01): 88-91
- [23] Mason L, Rice M. The adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* for the treatment of nickel-iron sulphide concentrates[J]. *Minerals Engineering*, 2002, 15(11): 795-808
- [24] 周吉奎. 三类生物冶金微生物菌种的选育及其与矿物作用研究[D]. 中南大学, 2004
- [25] 李小静,江宝塔·穆哈德斯,杨兰,等. 喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 在不同温度下基因组的可塑性[J]. 微生物学报, 2017, 57(07): 1083-1094
- [26] 陈鹏. 耐冷嗜酸硫杆菌快速氧化地浸采铀吸附尾液中 Fe<sup>~</sup>(2+) 工艺与应用研究[D]. 南华大学, 2018
- [27] 刘晶. pH 对嗜酸氧化亚铁硫杆菌分泌胞外多聚物及其吸附性能的影响[D]. 中南大学, 2013
- [28] 王清良,刘选明. pH 值与温度对氧化亚铁硫杆菌氧化 Fe<sup>~</sup>(2+) 影响的研究[J]. 矿冶工程, 2004, (02): 36-38
- [29] 蒋亚飞,孙占学,王学刚,等. 批次培养及连续培养制备硫酸高铁浸铀菌液的对比研究[J]. 有色金属(冶炼部分), 2016, (07): 34-37
- [30] 王清良,陈鹏,胡鄂明,等. 耐冷嗜酸硫杆菌快速氧化地浸采铀吸附尾液中 Fe<sup>~</sup>(2+)[J]. 化工进展, 2018, 37(10): 3995-4005
- [31] 罗林,康瑞娟,马晓楠,等. 氧化亚铁硫杆菌在气升式反应器中培养条件对其生长特性的影响[J]. 过程工程学报, 2001, (04): 365-368
- [32] 刘奋武,高诗颖,卜玉山,等. 培养转速与镁离子对生物合成次生铁矿物的影响研究[J]. 环境科学学报, 2014, 34(06): 1429-1435
- [33] 邓蓉,张小云,张梦雪,等. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌培养及其影响因素[J]. 湘潭大学自然科学学报, 2014, 36(04): 67-71
- [34] Carcamo M, Saa P, Torres J, et al. Effective Dissolved Oxygen Control Strategy for High-Cell-Density Cultures [J]. *IEEE Latin America Transactions*, 2014, 12(3): 389-394
- [35] Matsui T, Shinzato N, Yokota H, et al. High cell density cultivation of recombinant *E.coli* with a pressurized culture [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(4): 920-924
- [36] 王玉建. 固定化氧化亚铁硫杆菌生物 - 化学两级反应器系统处理硫化氢[D]. 兰州大学, 2010
- [37] 许治国. 废旧线路板金属富集体生物浸出反应器体系研究 [D]. 华南理工大学, 2014
- [38] 苏峰. 利用固定化生物 - 化学反应器脱除硫化氢 [D]. 兰州大学, 2012
- [39] 王清良. 细菌溶浸采铀工艺理论基础及应用研究 [D]. 中南大学, 2015
- [40] 杨晓娟,王玉建,李红玉,等. 固定化氧化亚铁硫杆菌培养条件对黄铁矿沉淀的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2007, (01): 64-68
- [41] 马志章,蒋承波. 电场对生物细胞的作用及其实际应用[J]. 细胞生物学杂志, 1996, (03): 111-115
- [42] Yunker S, Radovich J. Enhancement of growth and ferrous iron oxidation rates of *T. Ferrooxidans* by electrochemical reduction of ferric iron[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2010, 28(12): 1867-1875
- [43] Blake R C, Howard G T, Mcginness S. Enhanced yields of iron-oxidizing bacteria by in situ electrochemical reduction of soluble iron in the growth medium [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1994, 60(8): 2704
- [44] Gurung A G, Chakraborty R C. The role of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in alleviating the inhibito [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(9): 1040
- [45] Hao J, Murphy R, Lim E, et al. Effects of phospholipid on pyrite oxidation in the presence of autotrophic and heterotrophic bacteria[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2009, 73(14): 0-4123
- [46] Marchand E A, Silverstein J. The Role of Enhanced Heterotrophic Bacterial Growth on Iron Oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2003, 20(3): 231-244
- [47] 刘宏伟. *Acidithiobacillus ferrooxidans* 与 *Acidiphilium acidophilum* 共培养体系的协同作用及其生物浸出研究[D]. 中南大学, 2013
- [48] 周雯,刘岚. 密度感应系统 -- 细菌信号分子研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(6): 431-436
- [49] 徐远东. 氧化硫硫杆菌密度感应系统研究[D]. 兰州大学, 2017
- [50] 南文滨. 氧化亚铁硫杆菌密度感应系统功能研究 [D]. 兰州大学, 2011
- [51] Li X, Mercado R, Kernan T, et al. Addition of citrate to *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures enables precipitate-free growth at elevated pH and reduces ferric inhibition[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(10): 1940-1948
- [52] Jorge Valdés, Pedroso I, Quatrini R, et al. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 597-620