

镁离子浓度对氧化亚铁硫杆菌生长动力学的影响

刘欣伟¹, 冯雅丽¹, 李浩然², 蔡震雷¹, 杨志超¹

(1. 北京科技大学 土木与环境工程学院, 北京 100083;

2. 中国科学院 过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190)

摘要: 在氧化亚铁硫杆菌(*T.f*)培养过程中其他营养物质足量的情况下, 通过考察不同初始 Mg^{2+} 浓度对氧化亚铁硫杆菌(*T.f*)生长活性的影响, 得到在不同 Mg^{2+} 浓度下细菌的生长曲线。结果表明: *T.f* 对 Mg^{2+} 具有一定的耐受能力; 当培养基中 $\rho(Mg^{2+}) \leq 10$ g/L 时, Mg^{2+} 对细菌生长活性影响很小; 其 $\rho(Mg^{2+})$ 为 15 g/L 时, Mg^{2+} 开始产生延迟效应, 抑制细菌生长; $\rho(Mg^{2+})$ 为 20 g/L 时, 细菌生长完全受到抑制。同时利用基于存在非竞争性抑制的 Monod 方程, 建立了 *T.f* 在高 Mg^{2+} 浓度下的生长动力学方程模型, 确定在不同条件下细菌生长动力学参数, 包括最大比生长速率 μ_{max} 、Monod 常数 K_m 及镁离子抑制常数 K_I 。利用 correl 系数工具分析细菌比生长速率的实验值和模拟值之间的相关系数为 0.973, 表明该动力学方程能较好地描述 Mg^{2+} 浓度对氧化亚铁硫杆菌生长的影响。

关键词: 氧化亚铁硫杆菌; 生长动力学; 非竞争性抑制; 比生长速率

中图分类号: Q935

文献标志码: A

Effect of magnesium ion concentration on growth kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans*

LIU Xin-wei¹, FENG Ya-li¹, LI Hao-ran², CAI Zhen-lei¹, YANG Zhi-chao¹

(1. School of Civil and Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China;

2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: When the other nutrients were sufficient in the culture of *Thiobacillus ferrooxidans*, the impact of the different initial Mg^{2+} concentration on the activity of the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* was studied, and the bacterial growth curves were obtained at different magnesium ion concentrations. The results of the experiment show that *Thiobacillus ferrooxidans* is tolerant to Mg^{2+} some extent. No bad effect on the growth and activity of *Thiobacillus ferrooxidans* by Mg^{2+} is brought when cultured in 9K medium containing $\rho(Mg^{2+}) \leq 10$ g/L. The growth and activity of *Thiobacillus ferrooxidans* are obviously influenced by Mg^{2+} when $\rho(Mg^{2+})$ is 15 g/L. When the concentration of Mg^{2+} is around 20 g/L, the growth and activity of *Thiobacillus ferrooxidans* are completely inhibited. Simultaneously the kinetic model for the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* at high magnesium ion concentrations is deduced on the basis of the non-competitive inhibition of the Monod equation. The values of kinetic parameters (i.e. maximum growth rate μ_{max} , Monod constant K_m and magnesium ion inhibition constant K_I) under different initial experiment conditions are determined. The correlation coefficient between the simulated and experiment specific growth rates is 0.973, which shows that the kinetics equation can well describe the effect of magnesium ion concentration on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*.

Key words: *Thiobacillus ferrooxidans*; growth kinetics; non-competitive inhibition; specific growth rate

随着高品位镍矿资源的减少,低品位镍矿资源目前进入开发回收阶段^[1]。从低品位矿中回收镍是我国保证镍资源供应的基础保证^[2-3]。我国金川公司(JNMC)拥有约400 Mt低品位硫化镍矿,平均镍品位为0.60%,是典型的高镁型低品位硫化镍矿。由于高昂的成本和日趋严格的环保要求,采用处理富矿的生产工艺处理这些贫矿是不可行的。本文作者针对金川高镁型低品位硫化镍矿的氧化亚铁硫杆菌(*T. f*)浸出工艺进行研究,由于该矿的主要脉石矿物为含镁高的蛇纹石及绿泥石,在细菌浸出过程中部分 Mg^{2+} 进入溶液中。 Mg^{2+} 对于细菌生长是必需的,但是当 Mg^{2+} 超过细菌生长耐受范围时,过高的渗透压会导致细菌死亡。 Mg^{2+} 对*T. f*生长活性的影响,国内外已有文献报道^[4-6],但从动力学^[7-10]方面考察 Mg^{2+} 浓度对*T. f*生长动力学的影响尚未见文献报道。

在此,本文作者旨在通过监测高 Mg^{2+} 浓度培养条件下的*T. f*菌生长过程,利用存在非竞争性抑制的Monod模型^[11],得到高镁浓度培养条件下的*T. f*菌生长动力学方程,以期对利用*T. f*浸出高镁型低品位硫化镍矿的生产实践起到一定的指导作用。

1 实验

1.1 培养条件

实验用菌种氧化亚铁硫杆菌(*T. f*),实验室保藏。在高镁离子浓度下经驯化后,用于实验。

培养基为9K培养基, Mg^{2+} 采用 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (化学纯)配置,培养温度为30~32℃,培养时间为120 h,接种浓度为 1×10^7 /mL,接种量为10%,显微镜记数。

培养方式如下:在250 mL锥形瓶中装入按上述条件配置的100 mL培养液,置于SZX-B型恒温水浴振荡摇床内,用DZS-707型多参数分析仪测定溶液氧化还原电位(φ),定期补加蒸馏水弥补损耗的水分。

1.2 不同 Mg^{2+} 浓度下氧化亚铁硫杆菌生长曲线的测定

测定细菌的生长曲线对掌握高镁离子浓度下细菌生长规律很重要。实验将转代培养后的细菌分别接入初始 $\rho(Mg^{2+})=0.004 \sim 20$ g/L、初始pH=1.8的培养基中,菌种浓度为 1×10^7 /mL,接种量为10%。定期测定培养基中的细菌数、亚铁离子浓度 $\rho(Fe^{2+})$ 及三价铁离子浓度 $\rho(Fe^{3+})$ 。

1.3 主要仪器及分析方法

主要仪器如下:722型光栅分光光度计;pHS-29A

型酸度计;DZS-707型多参数分析仪;SZX-B型恒温水浴振荡摇床;XS-18电子显微镜。

分析方法如下: Fe^{2+} 和总铁分析采用邻菲罗啉分光光度法测定, Fe^{3+} 的量由总铁和 Fe^{2+} 的量之差确定;细菌活体数采用血球计数法测定;溶液的氧化还原电位用DZS-707型多参数分析仪测定。

1.4 生长动力学模型

综合氧化亚铁硫杆菌的生长动力学模型,本文作者选择一种存在非竞争性抑制的Monod方程^[11]。该方程表达形式简单,有利于工业应用,其公式如下:

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{1 + \frac{\rho_1}{K_I}} \frac{\rho(Fe^{2+})}{K_M + \rho(Fe^{2+})} \quad (1)$$

设: $\mu'_{\max} = \frac{\mu_{\max}}{1 + \rho_1 / K_I}$, 故式(1)可写为

$$\mu = \frac{\mu'_{\max} \rho(Fe^{2+})}{K_M + \rho(Fe^{2+})} \quad (2)$$

式中: $\rho(Fe^{2+})$ 为不同时间溶液中 Fe^{2+} 浓度; μ 为比生长速率; μ_{\max} 为最大比生长速率; K_M 为Monod饱和常数; ρ_1 为培养基中 Mg^{2+} 浓度; K_I 为 Mg^{2+} 的抑制常数。

2 实验结果与讨论

2.1 氧化亚铁硫杆菌生长过程中代谢变化

通过改变培养基中 Mg^{2+} 浓度(0.004~9 g/L(基础培养基),5,10,15和20 g/L),对*T. f*菌生长过程的代谢变化进行研究,得到细胞浓度,亚铁浓度 $\rho(Fe^{2+})$ 及三价铁浓度 $\rho(Fe^{3+})$ 随时间的变化曲线如图1所示。

研究表明,适当增加培养基中 Mg^{2+} 含量有利于细菌生长;当 $\rho(Mg^{2+}) \leq 10$ g/L时, Mg^{2+} 对细菌生长活性影响很小,不影响细菌的生长繁殖;但当溶液中 Mg^{2+} 浓度升至15 g/L时,开始产生延迟效应,抑制细菌生长;当溶液中 Mg^{2+} 浓度升至20 g/L时,细菌的生长繁殖完全停止,菌体开始死亡。 $MgSO_4$ 是细菌培养基的主要成分,它对细菌细胞的结构如核糖体、细胞膜等的稳定性起重要作用。但随着 Mg^{2+} 质量浓度的升高,体系的渗透压增大,会影响细菌正常的生理功能。细菌调节体内 Mg^{2+} 浓度的能力是有限的,因此, Mg^{2+} 浓度过高会造成细菌生长停滞甚至死亡。在已有文献所得*T. f*菌的生长动力学方程中,普遍认同金属离子对*T. f*菌生长的非竞争性抑制^[12-13],在本实验中以此为基础建立动力学方程。

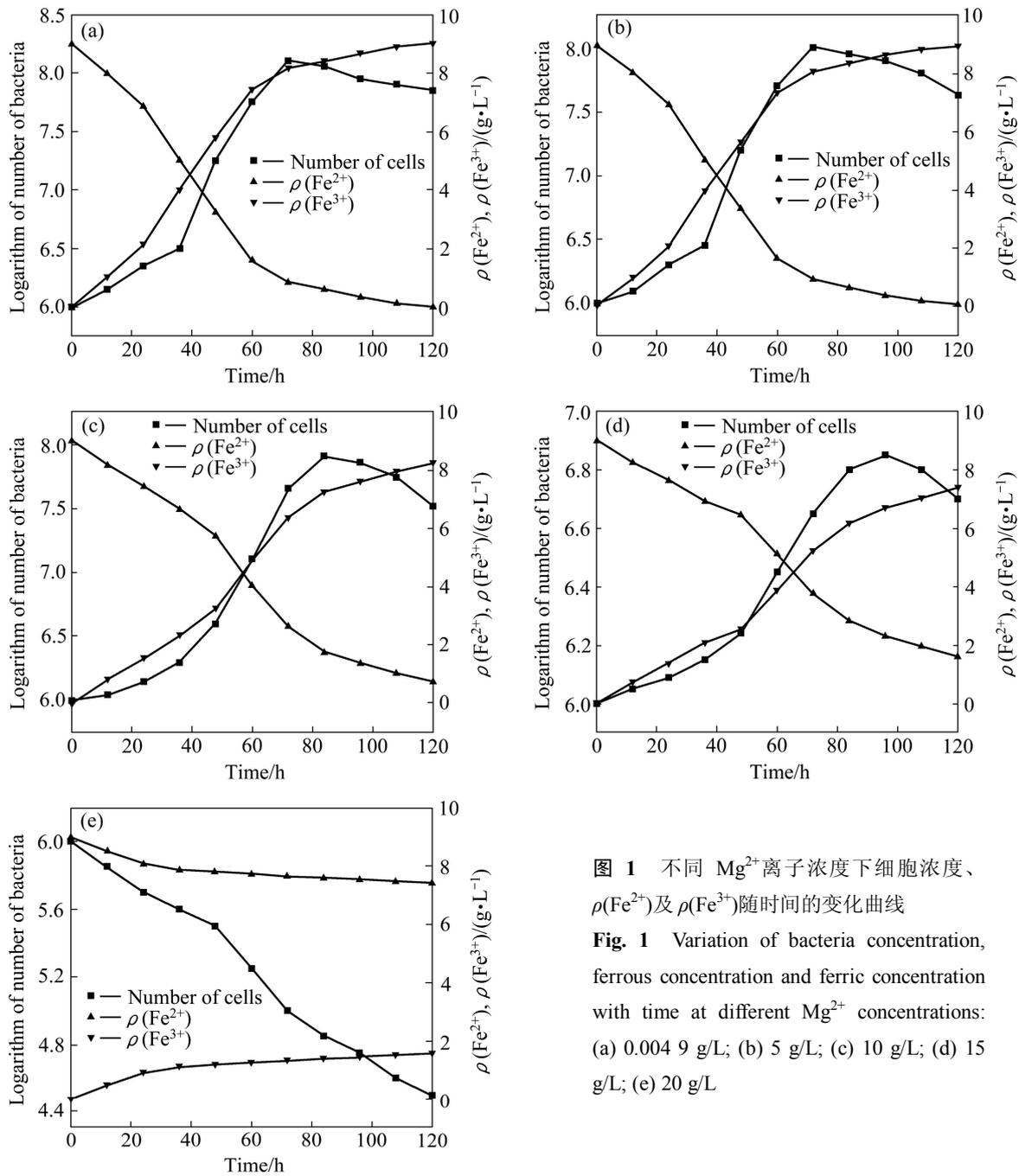
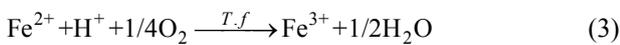


图 1 不同 Mg^{2+} 离子浓度下细胞浓度、 $\rho(Fe^{2+})$ 及 $\rho(Fe^{3+})$ 随时间的变化曲线
 Fig. 1 Variation of bacteria concentration, ferrous concentration and ferric concentration with time at different Mg^{2+} concentrations: (a) 0.004 9 g/L; (b) 5 g/L; (c) 10 g/L; (d) 15 g/L; (e) 20 g/L

2.2 不同 Mg^{2+} 浓度对溶液氧化还原电位(φ)的影响

试验在 Mg^{2+} 浓度为 0.004 9~20 g/L 范围内考察了溶液氧化还原电位 φ 的变化情况, 结果如图 2 所示。

细菌生长过程中, 溶液中主要发生的反应如下:



根据能斯特方程和反应式中各物质的热力学数据, 计算溶液中的氧化还原电位如式(4)

$$\varphi = 0.767 + 0.059 \lg(\rho(Fe^{3+}) / \rho(Fe^{2+})) \quad (4)$$

式(4)表明随着 $T.f$ 菌将溶液中的 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} , Fe^{3+} 浓度增加, $\rho(Fe^{3+})/\rho(Fe^{2+})$ 比值增加, 导致溶液氧化还原电位 φ 上升。由图 2 可知, 当 $\rho(Mg^{2+}) \leq 10$ g/L 时, 溶液中最大氧化还原电位 φ 基本不变, 为 610 mV, 表明细菌活性受 Mg^{2+} 影响很小, 菌体生长旺盛; 当 Mg^{2+} 浓度从 10 g/L 增加到 20 g/L 时, 溶液中最大氧化还原电位 φ 由 610 mV 降低至 392 mV, 这也可由图 1 结果得到解释, 随着 Mg^{2+} 浓度增加, 抑制了 $T.f$ 菌的生长, 导致对铁的氧化能力降低, 溶液中 $\rho(Fe^{3+})/\rho(Fe^{2+})$ 比值随 Mg^{2+} 浓度的增加而降低, 根据式(4)进行计算,

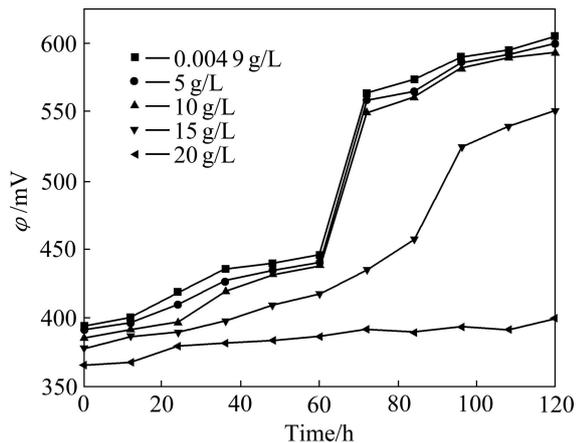


图2 Mg^{2+} 浓度对培养液氧化还原电位的影响

Fig. 2 Impact of Mg^{2+} concentration on culture solution redox potential

ϕ 值减小, 实验结果与此相符。

2.3 *T. f*菌生长动力学参数的确定

为确定不同 Mg^{2+} 浓度下细菌生长的最大比生长速率 μ_{max} 、Monod 饱和常数 K_M 、 Mg^{2+} 抑制常数 K_I 的值, 参考 GABRIEL^[14]和 LIU^[15]求解动力学方程的方法进行了相关参数的求解。

细菌比生长速率 μ 利用两点法^[16]求解, 其满足如下方程:

$$\mu = \left(\frac{dX}{dt} \right)_i \frac{1}{X}, \quad \left(\frac{dX}{dt} \right)_i = \frac{1}{2} \left(\frac{X_i - X_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} + \frac{X_{i+1} - X_i}{t_{i+1} - t_i} \right) \quad (5)$$

式中: X 为溶液中细胞的数目; t 为时间。

实验采用等间隔取点分析, 综合式(5)可简化为

$$\mu = \left(\frac{dX}{dt} \right)_i \frac{1}{X} = \frac{X_{i+1} - X_{i-1}}{2tX_i} \quad (6)$$

动力学模型(2)可变形为

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_M}{\mu'_{max}} \frac{1}{\rho(Fe^{2+})} + \frac{1}{\mu'_{max}} \quad (7)$$

不同 Mg^{2+} 浓度下 *T. f*菌比生长速率和动力学参数的求解曲线如图3所示。

通过 $1/\mu - 1/\rho(Fe^{2+})$ 作图, 曲线 y 截距为 $1/\mu'_{max}$, x 截距为 $-1/K_M$, 从而求得 μ'_{max} 、 K_M 。从曲线求解所得动力学模型(2)中细菌生长的动力学参数值见表1。

在 *T. f*菌最常用的 9K 培养基中, $MgSO_4$ 是不可缺少的主要成分之一, 一般含 Mg^{2+} 0.005 g/L 左右,

因此可认为 $\mu_{max} = \mu'_{max} = 0.192 \text{ h}^{-1}$ 。

由于 $\mu'_{max} = \frac{\mu_{max}}{1 + \rho_I / K_I}$, 因此计算可得动力学模型

(1)的各动力学参数如表2。

表1 细菌生长动力学参数值

Table 1 Kinetic parameters for growth of bacterium

$\rho(Mg^{2+})/(g \cdot L^{-1})$	μ'_{max}/h^{-1}	$K_M/(g \cdot L^{-1})$
0.004 9 (Basic medium)	0.192	1.152
5	0.190	1.152
10	0.170	1.152
15	0.138	1.153

表2 氧化亚铁硫杆菌生长动力学参数

Table 2 Kinetic parameters for growth of *Thiobacillus ferrooxidans*

$\rho(Mg^{2+})/(g \cdot L^{-1})$	μ_{max}/h^{-1}	$K_M/(g \cdot L^{-1})$	$K_I/(g \cdot L^{-1})$
0.004 9 (Basic medium)	0.192	1.152	—
5	0.190	1.152	500
10	0.170	1.152	52.08
15	0.138	1.153	38.36

图3中各曲线的相关性较好, R^2 都大于0.97, 证明所得动力学参数较好地符合了实验结果。由表2可知, K_M 值基本不变, 这与抑制剂对酶催化反应速率的非竞争性抑制中 K_M 值保持恒定的结论相符^[11]。而 K_I 和 μ_{max} 均有不同程度的变化, 这一结果与实验选择的高 Mg^{2+} 浓度条件有关。 K_I 值的大小表示细菌对 Mg^{2+} 的吸收亲和力的大小, 随着 Mg^{2+} 浓度的增加, 细菌对 Mg^{2+} 的亲和力增大, 导致 Mg^{2+} 的非竞争性抑制作用也相应增加, K_I 值减小。 μ_{max} 表示 *T. f*菌的最大比生长速率, 随着 Mg^{2+} 浓度的增加, Mg^{2+} 逐渐与酶活性中心以外的基团结合, 故 Mg^{2+} 与底物 Fe^{2+} 两者没有竞争作用, 但是由于 Mg^{2+} 的结合可导致酶活性中心的结构发生改变(见图4), 消弱了底物 Fe^{2+} 和酶活性中心的结合, 导致最大反应速率 μ_{max} 的减小。

Mg^{2+} 浓度越高, 形成不能转化为产物的EI或IES越多, K_I 值越小, μ_{max} 降低的程度也越显著, 非竞争性抑制的反应机理可用式(8)表示。由于 μ_{max} 降低, 酶的反应速率也相应减小。非竞争性抑制作用的强弱取决于抑制物的绝对浓度, 因而不能用增大底物浓度的办法来消除此种抑制作用。

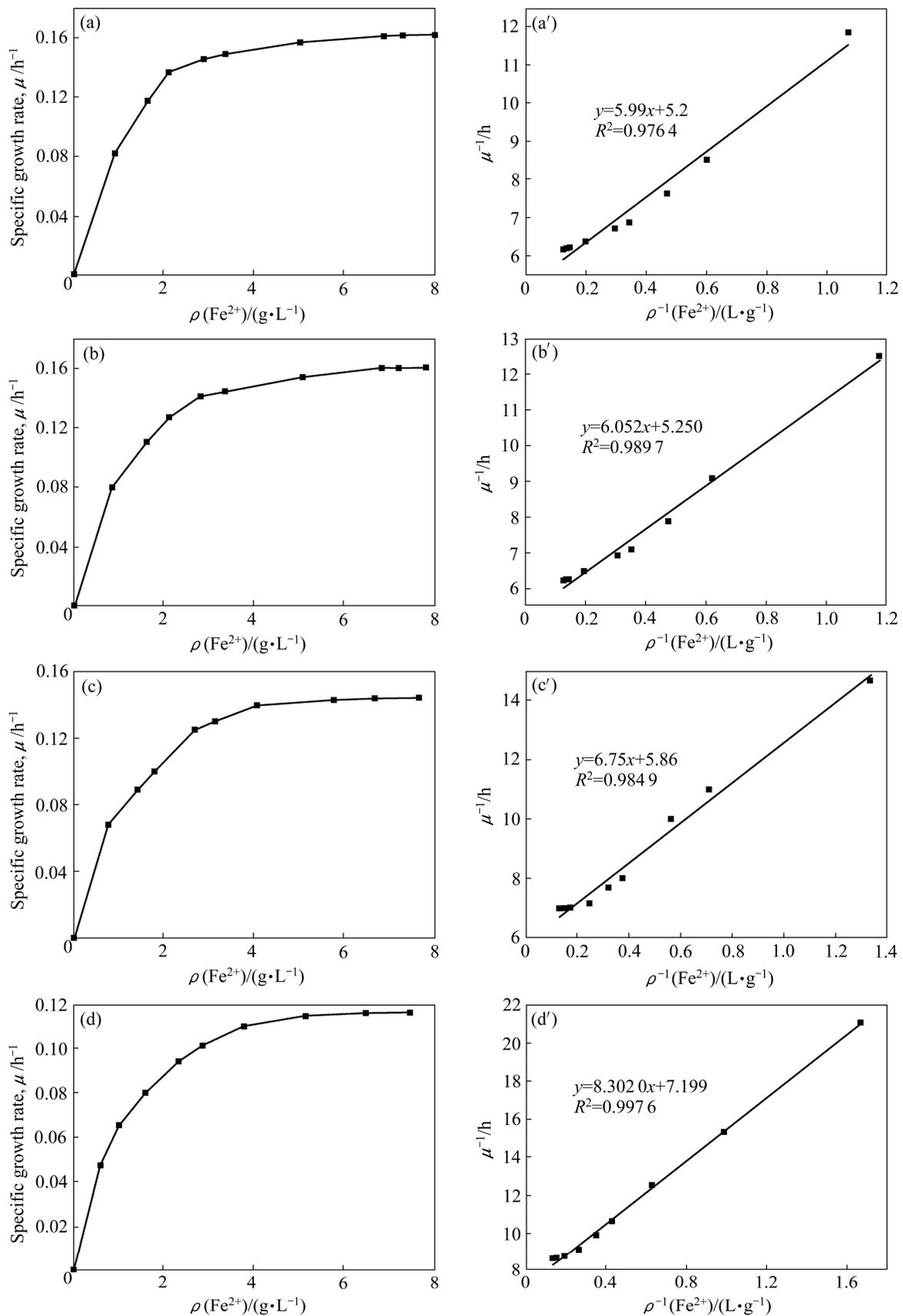


图3 不同Mg²⁺浓度下*T. f.*菌的比生长速率和动力学求解曲线

Fig. 3 Specific growth rate of *T. f.* ((a), (b), (c), (d)) and dynamic processing curves ((a'), (b'), (c'), (d')) at different Mg²⁺ concentrations: (a), (a') 0.004 9 g/L (basic medium); (b), (b') 5 g/L; (c), (c') 10 g/L; (d), (d') 15 g/L

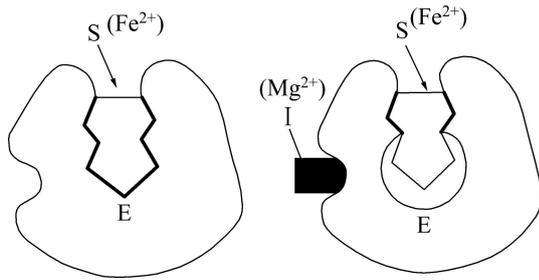
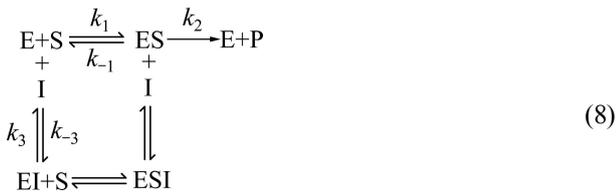


图4 非竞争性抑制示意图
Fig.4 Schematic diagram of non-competitive inhibition



为了描述镁离子浓度对氧化亚铁硫杆菌生长动力学的影响，在动力学模型中引入初始镁离子浓度项 ρ_0 和初始饱和常数 K_{I0} ，动力学方程(1)可变形为

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{1 + K_{I0}\rho_0 + \frac{\rho_I}{K_I} K_M + \rho(Fe^{2+})} \quad (9)$$

根据上述实验数据，通过对 μ_{max} 与 K_I 的试差，得到氧化亚铁硫杆菌在 Mg^{2+} 浓度为 0~15 g/L 范围内的生长动力学方程，如式(10)所示：

$$\mu = \frac{0.194}{1 + 1381.11 \times 4.73 \times 10^{-6} + \frac{\rho_I}{K_I} 1.152 + \rho(Fe^{2+})} \quad (10)$$

利用 correl 系数工具分析理论值与实验室的相关系数为 0.973，见图 5。该值表明以上动力学方程能较

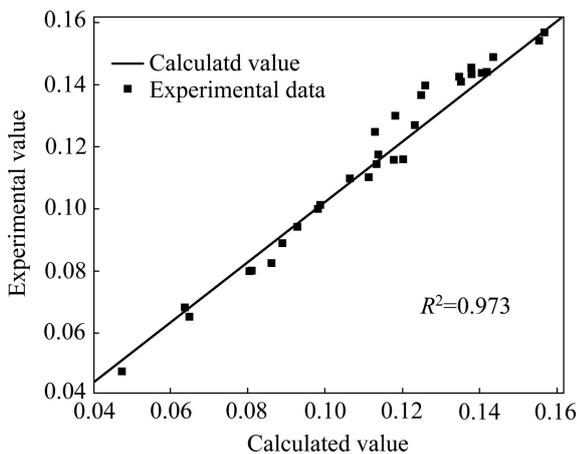


图5 比生长速率实验室与模拟值的比较
Fig.5 Comparison of laboratory and simulated values about specific growth rate

好地描述镁离子浓度对氧化亚铁硫杆菌生长的影响。

3 结论

1) 考察了在不同 Mg^{2+} 浓度下，氧化亚铁硫杆菌的细菌浓度、 $\rho(Fe^{2+})$ 、 $\rho(Fe^{3+})$ 和溶液氧化还原电位 φ 随时间的变化，结果表明氧化亚铁硫杆菌(*T.f*)对 Mg^{2+} 具有一定的耐受能力；当培养基中 $\rho(Mg^{2+}) \leq 10$ g/L 时， Mg^{2+} 对细菌的生长活性影响很小； $\rho(Mg^{2+})$ 为 15 g/L 时，开始产生延迟效应，抑制细菌生长； $\rho(Mg^{2+})$ 为 20 g/L 时，细菌生长完全受到抑制，并且随着 Mg^{2+} 浓度的增加，溶液氧化还原电位 φ 逐渐减小。

2) 利用基于存在非竞争性抑制的 Monod 方程，建立了 *T.f* 菌在高镁浓度下的生长动力学方程模型，得到了 4 个 Mg^{2+} 浓度下细菌生长的动力学参数值，结果表明，随着 Mg^{2+} 浓度的增加，非竞争性抑制作用增加，消弱了底物 Fe^{2+} 与酶活性中心的结合， K_I 和 μ_{max} 逐渐减小，这也说明在一定 Mg^{2+} 浓度下，氧化亚铁硫杆菌才能正常生长。

3) 对实验数据进行数学推导，得出该菌种在 Mg^{2+} 浓度为 0~15 g/L 范围内的生长动力学方程：

$$\mu = \frac{0.194}{1 + 1381.11 \times 4.73 \times 10^{-6} + \frac{\rho_I}{K_I} 1.152 + \rho(Fe^{2+})}$$

利用该方程得到的比生长速率理论值与实验值的相关系数为 0.973，表明该方程能较好地描述 Mg^{2+} 浓度对氧化亚铁硫杆菌生长情况的影响。

REFERENCES

[1] ZHEN Shi-jie, QIN Wen-qing, YAN Zhong-qiang, ZHANG Yan-sheng, WANG Jun, REN Liu-yi. Bioleaching of low grade nickel sulfide mineral in column reactor[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18: 1480-1484.

[2] 孙彦峰. 氧化亚铁硫杆菌浸出金川低品位镍黄铁矿的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007: 15-18.

SUN Yan-feng. Study on bioleaching of low-grade nicopyrite in Jinchuan by *Thiobacillus ferrooxidans*[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2007: 15-18.

[3] 甄世杰. 金川高镁型低品位硫化镍矿生物浸出的应用基础与技术研究[D]. 长沙: 中南大学, 2010: 6-12.

ZHEN Shi-jie. Application basis and technology research on the bioleaching of Jinchuan low grade nickel-bearing sulfide ore containing high magnesium[D]. Changsha: Central South University, 2010: 6-12.

- [4] LI Hong-mei, KE Jia-jun. Influence of Cu^{2+} and Mg^{2+} on the growth and activity of Ni^{2+} adapted *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Minerals Engineering, 2001, 14(1): 113–116.
- [5] 李洪梅, 柯家骏. Mg^{2+} 对氧化亚铁硫杆菌生长活性的影响[J]. 中国有色金属学报, 2000, 10(4): 577–578.
- LI Hong-mei, KE Jia-jun. Effect of Mg^{2+} on growth and activity of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2000, 10(4): 577–578.
- [6] LI Hong-mei, KE Jia-jun. Influence of Ni^{2+} and Mg^{2+} on the growth and activity of Cu^{2+} adapted *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Hydrometallurgy, 2001, 61: 151–156.
- [7] DE JAGER D, SHELDON M S, EDWARDS W. Modelling growth kinetics of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in a pressurized membrane gradostat reactor (MGR)[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 45: 449–456.
- [8] SHELDON M S, MOHAMMED K, NTWAMPE S. An investigation of biphasic growth kinetics for *Phanerochaete chrysosporium* (BKMF-1767) immobilised in membrane gradostat reactor using flow cells[J]. Enzyme and Microbial Technology 2008, 42: 353–361.
- [9] LI Yi, LI Jing, WANG Chao, WANG Pei-fang. Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(17): 6740–6744.
- [10] SGOUNTZOS I N, PAVLOU S, PARASKEVA C A, PAYTAKES A C. Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* in sand beds during biodegradation of phenol[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 30: 164–173.
- [11] 李再资, 黄肖容, 谢逢春. 生物化学工程基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 119–123.
- LI Zai-zi, HUANG Xiao-rong, XIE Feng-chun. Biochemical engineering fundamentals[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 119–123.
- [12] NURMI P, ÖZKAYA B, KAKSONEN A H, TUOVINEN OH, PUHAKKA J A. Inhibition kinetics of iron oxidation by *Leptospirillum ferriphilum* in the presence of ferric, nickel and zinc ions[J]. Hydrometallurgy, 2009, 97: 137–145.
- [13] CABRERA G, GÓMEZ J M, CANTERO D. Kinetic study of ferrous sulphate oxidation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metal ions[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36: 301–306.
- [14] GABRIEL M. Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5–7.0[J]. Hydrometallurgy, 2003, 71: 149–158.
- [15] LIU Jian-she, ZHANG Yan-hua, LI Bang-mei, XIE Xue-hui. The study kinetic for growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Journal of Microbiology, 2006, 26(2): 9–13.
- [16] 李庆扬, 王能超, 易大义. 数值分析[M]. 北京: 清华大学出版社, 2001: 119.
- LI Qing-yang, WANG Neng-chao, YI Da-yi. Numerical analysis[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2008: 119.

(编辑 龙怀中)