

## 不同氨基酸对 *At.f* 菌生长情况的影响

刘 政<sup>1</sup>, 杨绍斌<sup>1</sup>, 徐金军<sup>2</sup>, 张 莉<sup>3</sup>

(1. 辽宁工程技术大学 理学院, 辽宁 阜新 123000; 2. 兰州大学 药学院, 甘肃 兰州 730000;  
3. 阜新市粮油工贸总公司, 辽宁 阜新 123002)

**摘要:**通过在不同 pH 条件下培养 *At.f* 菌, 并监测其生长情况, 以确定 *At.f* 菌生长的最适 pH, 再向所确定的最适 pH 的 9K 培养基中添加不同氨基酸, 研究不同氨基酸对 *At.f* 菌生长情况的影响。结果表明: pH 为 2.0 的培养基中菌种的生长情况最好; 另外丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、酪氨酸、甘氨酸、半胱氨酸对  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率较高, 而丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸作用结果则相反。从而得出结论: *At.f* 菌生长的最适 pH 为 2.0; 非极性氨基酸、成环氨基酸对 *At.f* 菌生长有促进作用, 丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸对 *At.f* 菌生长有抑制作用。

**关键词:**氧化亚铁硫杆菌; 氨基酸;  $\text{Fe}^{2+}$  利用率; pH; 生长情况

**中图分类号:** Q939.98

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-2767(2011)02-0016-04

氧化亚铁硫杆菌作为浸矿的主要菌种, 最初应用于低品味铜矿、铀矿的生产, 后来发展应用于金、锌、钴等多种金属的浸出。随着氧化亚铁硫杆菌在冶金生产中应用的日益广泛, 人们注意到它在环境保护方面及一些科研领域同样有着良好的应用前景, 其研究越来越受到广泛重视<sup>[1-2]</sup>。然而目前, 我国对于生物浸矿的研究大部分还处于实验室和半工业试验水平, 未能实现规模化应用。限制其应用的一个很重要的原因就是微生物浸矿时间过长, 短则数十天, 长则 1 a。这其中有微生物自身的原因, 即传代周期长, 生长速度缓慢。另外一个原因就是受环境条件的影响严重, 即温度、pH、营养物质等。因此如何提高浸矿微生物生长周期, 从而提高浸矿效率已成为生物提金技术的一个重要领域<sup>[1-3]</sup>。有报道研究了在培养基中加入无机碳源、氮源等对 *At.f* 菌生长的影响; 为了扩大其在有机环境中的应用, 选择乙酸、丙酸和正丁酸 3 种低分子有机酸及葡萄糖作为氧化亚铁硫杆菌的有机环境, 研究其在不同浓度不同有机物下的生长活性<sup>[3-5]</sup>等。然而至今为止, 在培养基中加入氨基酸营养对 *At.f* 菌生长情况的影响的相关研究较少报道。该试验针对在 9K 培养基中加入不同种氨基酸后 *At.f* 的活性变化进行了研究, 从而确定何种氨基酸对 *At.f* 菌生长具有促进作用, 何种具有抑制作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 试验菌种 供试菌种为中科院过程工程研究院提供的经活化后的氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)。其培养条件均为 35℃, 培养 pH 分别为 1.3、1.5 和 2.0。

1.1.2 培养基 氧化亚铁硫杆菌所使用的培养基为 9K 液体培养基<sup>[5]</sup>, 其主要成分为: KCl 0.10 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.00 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.50 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.50 g、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  44.20 g、蒸馏水 1 L。

1.1.3 试剂 主要试剂有氯化钾、硫酸铵、磷酸氢二钾、硫酸镁、硝酸钙、硫酸亚铁、浓硫酸、浓磷酸、氢氧化钠、重铬酸钾、二苯胺磺酸钠。

20 种基本氨基酸有: L- $\alpha$ -丙氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-脯氨酸、L-苯丙氨酸、L-色氨酸、L-甘氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-半胱氨酸、L-天冬酰胺、L-谷氨酰胺、L-酪氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-赖氨酸、L-精氨酸、L-组氨酸。

1.1.4 仪器和设备 试验用的仪器和设备包括精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)、电子天平(上海精密科学仪器有限公司)、显微镜(北京格拉威尔科技有限责任公司)、气浴恒温振荡器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)和磁力搅拌器(金坛市荣华仪器制造有限公司)。

#### 1.2 方法

1.2.1 摇床培养 将已经接种的 9 个锥形瓶固

收稿日期: 2010-12-09

基金项目: 辽宁省教育厅 2008 年高等学校科研资助计划项目(2008298)

第一作者简介: 刘政(1977-), 男, 吉林省敦化市人, 硕士, 讲师, 从事活性肽制备和微生物冶金研究。E-mail: liuzheng-workbag@163.com。

定于气浴恒温振荡器中,在  $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下摇床培养。

1.2.2 20 种氨基酸添加预试验 为大致确定添加 20 种氨基酸后, *At. f* 菌对  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率和 pH 变化速率,以便能够确定隔几个小时测定 1 次菌种对  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率和 pH 变化。共做 22 个添加样,每个样本均添加 150 mL 已配制好的 9K 液体培养基,标号 1~22。其中 1~21 号均接种 5 mL *At. f* 菌,22 号加入 5 mL 蒸馏水。前 20 号再分别加入 3.5 mL 配制好的对应氨基酸,使每个培养基氨基酸浓度达到  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,21 号为不加氨基酸加菌,22 号为不加氨基酸不加菌。添加完氨基酸后,所有样本 pH 均用 1:1 硫酸调整为 2.0,在  $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下摇床培养。每隔 2 h 测定 1 次  $\text{Fe}^{2+}$  利用率(重铬酸钾滴定法测定)及 pH 变化情况(pH 计直接测量)。从而确定 20 种氨基酸添加试验的最佳测量时间间隔。由于到培养后期,培养基中  $\text{Fe}^{2+}$  含量越来越低,为了使滴定时更准确,重铬酸钾的滴定浓度稀释为  $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2.3 20 种氨基酸添加试验 与预试验处理相同,但不同的是,每隔 4 h 测定 1 次  $\text{Fe}^{2+}$  利用率( $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 重铬酸钾滴定法测定)及 pH 变化情况(pH 计直接测量)。直到大部分氨基酸添加样中的  $\text{Fe}^{2+}$  几乎全部被利用,即 1 滴重铬酸钾即可使指示剂变色。

1.2.4 试验各指标测定方法 采用重铬酸钾滴定法测定  $\text{Fe}^{2+}$  利用率<sup>[5]</sup>。用精密 pH 计测量培养基 pH 变化。

2 结果与分析

2.1 20 种氨基酸添加预试验  $\text{Fe}^{2+}$  利用率变化

为了大致确定添加 20 种氨基酸后的  $\text{Fe}^{2+}$  利用率的变化,从而确定正式试验中氨基酸的添加量和最佳测量时间间隔。此阶段试验测量了 0~8 h 的重铬酸钾消耗量(重铬酸钾浓度为  $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),共测量 5 次,得到不同时间段下  $\text{Fe}^{2+}$  利用率,处理后的具体数据见表 1。

由表 1 得知:在 0~8 h 下,前 21 号样本对  $\text{Fe}^{2+}$  利用率均略有上升,但上升幅度很小且很接近。22 号(空白不加菌)由于未加 *At. f* 菌,  $\text{Fe}^{2+}$  利用率几乎没有变化。故根据 22 个样本中  $\text{Fe}^{2+}$  利用率的整体变化趋势,确定在 20 种氨基酸添加试验中  $\text{Fe}^{2+}$  利用率每隔 4 h 测定 1 次,且氨基酸的添加量较为合适。

表 1 0~8 h 下  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率 %

编号	氨基酸	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
1	丙氨酸	0	3.05	3.63	4.96	9.16
2	缬氨酸	0	2.98	7.08	8.38	10.80
3	亮氨酸	0	1.52	6.07	5.69	6.45
4	异亮氨酸	0	2.32	6.78	7.72	8.30
5	甲硫氨酸	0	0.58	4.42	4.61	6.15
6	脯氨酸	0	2.92	4.68	6.63	8.58
7	苯丙氨酸	0	2.12	4.05	4.82	8.09
8	色氨酸	0	1.35	7.13	8.86	9.63
9	甘氨酸	0	4.58	6.48	6.48	9.16
10	丝氨酸	0	2.33	3.50	5.63	10.49
11	苏氨酸	0	1.56	3.56	5.17	10.55
12	半胱氨酸	0	2.35	7.45	8.82	8.89
13	天冬酰胺	0	1.37	5.27	6.45	7.62
14	谷氨酰胺	0	1.19	3.90	5.26	8.58
15	酪氨酸	0	0.20	0.20	1.37	4.89
16	天冬氨酸	0	2.34	4.89	5.27	6.84
17	谷氨酸	0	3.84	3.26	6.14	8.83
18	赖氨酸	0	5.93	9.07	11.29	11.29
19	精氨酸	0	2.50	6.55	7.90	7.51
20	组氨酸	0	1.06	7.21	8.73	10.63
21	空白加菌	0	1.34	7.10	8.06	8.25
22	空白不加菌	0	0.19	-0.39	1.36	0.96

2.2 20 种氨基酸添加预试验 pH 变化

预试验中 pH 变化的测定,测量时间段是 0~8 h,共测量 5 次。测得的不同时间段下培养基中 pH 变化的具体数据见表 2。

表 2 0~8 h 下培养基中 pH 的变化 %

编号	氨基酸	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
1	丙氨酸	2.00	1.93	1.91	1.91	1.87
2	缬氨酸	2.00	2.02	2.00	1.98	1.93
3	亮氨酸	2.00	2.01	2.00	1.99	1.94
4	异亮氨酸	2.00	1.91	1.90	1.89	1.83
5	甲硫氨酸	2.00	1.90	1.90	1.90	1.89
6	脯氨酸	2.00	1.93	1.90	1.90	1.90
7	苯丙氨酸	2.00	1.94	1.92	1.90	1.88
8	色氨酸	2.00	1.94	1.92	1.91	1.90
9	甘氨酸	2.00	1.96	1.95	1.95	1.87
10	丝氨酸	2.00	1.97	1.92	1.93	1.90
11	苏氨酸	2.00	1.95	1.92	1.93	1.90
12	半胱氨酸	2.00	2.04	2.01	2.01	1.99
13	天冬酰胺	2.00	1.93	1.89	1.90	1.87
14	谷氨酰胺	2.00	1.93	1.89	1.89	1.88
15	酪氨酸	2.00	2.05	2.01	2.01	1.98
16	天冬氨酸	2.00	2.10	2.02	2.02	1.97
17	谷氨酸	2.00	1.98	1.93	1.92	1.88
18	赖氨酸	2.00	1.97	1.95	1.93	1.87
19	精氨酸	2.00	1.92	1.90	1.88	1.85
20	组氨酸	2.00	1.96	1.95	1.95	1.87
21	空白加菌	2.00	2.04	2.00	2.01	2.00
22	空白不加菌	2.00	1.91	1.89	1.90	1.81

由表 2 可知:在 0~8 h 下,有一部分样本 pH 呈先略有上升后下降的趋势,还有一部分样本 pH 一直呈略有下降的趋势,但总体 pH 均是只有微小变化。可以判断,在添加氨基酸后的前 8 h 培养基中 pH 几乎没有变化。因此,可以确定 20 种氨基酸添加试验的 pH 可以每隔 4 h 测定 1 次,且氨基酸的添加量较为合适。

### 2.3 20 种氨基酸添加试验 $\text{Fe}^{2+}$ 利用率变化

根据预试验所确定的  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率的最佳测量时间间隔为 4 h,故本阶段试验测量了 0~76 h 下 5 mmol·L<sup>-1</sup>重铬酸钾的使用量,共测量了 9 次。

为了更直观的表现 At.f 菌的生长情况,又对数据进行了进一步处理,得到 0~76 h 中  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率变化情况(见表 3)。

表 3 0~76 h 下  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率变化

%

编号	氨基酸	0 h	5 h	10 h	24 h	30 h	48 h	54 h	72 h	76 h
1	丙氨酸	0	0.95	1.89	3.79	7.58	14.39	47.92	99.05	99.05
2	缬氨酸	0	0.38	1.32	2.82	7.16	31.26	47.92	99.06	99.06
3	亮氨酸	0	2.25	2.62	4.31	8.24	26.97	40.82	99.06	99.06
4	异亮氨酸	0	0.56	1.50	2.06	9.57	31.70	44.85	99.06	99.06
5	甲硫氨酸	0	1.10	1.28	5.48	7.50	25.60	40.40	93.60	99.09
6	脯氨酸	0	1.66	3.33	3.68	6.62	27.62	38.12	99.08	99.08
7	苯丙氨酸	0	0.19	1.50	3.36	4.10	24.25	30.78	87.87	99.07
8	色氨酸	0	1.29	1.66	3.51	6.84	26.43	35.86	78.56	98.34
9	甘氨酸	0	0.58	0.96	1.92	6.14	23.61	35.51	82.73	99.04
10	丝氨酸	0	0.18	0.55	1.64	7.65	23.68	25.68	44.18	54.28
11	苏氨酸	0	0.37	0.55	2.21	7.73	23.57	34.07	76.24	94.66
12	半胱氨酸	0	0.92	1.83	5.31	6.78	13.19	33.70	81.36	99.08
13	天冬酰胺	0	1.29	3.14	3.88	8.50	13.31	28.10	58.41	67.65
14	谷氨酰胺	0	1.11	2.95	3.14	5.54	13.47	25.46	33.21	48.52
15	酪氨酸	0	1.50	2.06	3.38	4.50	19.14	32.08	83.11	99.06
16	天冬氨酸	0	0.19	1.50	4.31	6.93	17.79	39.51	90.45	98.31
17	谷氨酸	0	0.38	1.33	2.09	6.45	23.15	36.81	83.87	97.15
18	赖氨酸	0	0.74	2.03	5.35	7.38	29.15	35.98	88.00	97.97
19	精氨酸	0	0.37	0.74	3.72	8.01	25.51	35.2	81.75	97.02
20	组氨酸	0	1.30	2.98	3.54	5.40	15.46	21.23	41.34	45.44
21	空白加菌	0	0.57	0.76	2.08	2.27	21.40	27.27	45.64	76.52
22	空白不加菌	0	1.44	-0.18	-1.08	-0.90	0	-1.26	-1.08	-0.18

根据上述所得试验数据可知:20 种氨基酸添加样试验中,在 30 h 之前,1~21 号样本中  $\text{Fe}^{2+}$  利用率只有少量上升,30 h 后大部分氨基酸添加样的  $\text{Fe}^{2+}$  利用率均有大幅度上升。而 22 号(空白不加菌)的  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率几乎没有变化。

在添加氨基酸的 20 个样本中,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸等非极性氨基酸的  $\text{Fe}^{2+}$  利用率上升的最快,除甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸外,在 72 h 后 1 滴重铬酸钾即可使指示剂变色,即  $\text{Fe}^{2+}$  利用率达到 99% 以上。在 76 h 后,除色氨酸外的非极性氨基酸,其它样本  $\text{Fe}^{2+}$  利用率均达到 99% 以上。另外,分子量较小的甘氨酸、含有巯基的半胱氨酸和分子中含有苯环的酪氨酸的  $\text{Fe}^{2+}$  利用率也均上升较快,在 76 h 后 1 滴重铬酸钾即可使指示剂变色,可以说几乎培养基中所有的  $\text{Fe}^{2+}$  均转化为  $\text{Fe}^{3+}$ 。由如图 1 看出,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸和酪氨酸对 At.f 菌的生长有明显的促进作用。

除此之外,与 21 号样本(空白加菌)相比,在 72 h 时,色氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸对  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率也有较明显的上升,利用率均在 75% 以上。在 76 h 后,培养基中的绝大部分  $\text{Fe}^{2+}$  均已经转化为  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率在 95% 以上。所以,这些氨基酸对 At.f 菌的生长也

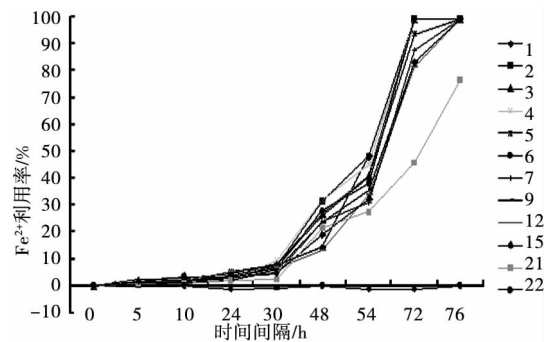


图 1 有明显促进作用的氨基酸

有较好的促进作用(见图 2)。

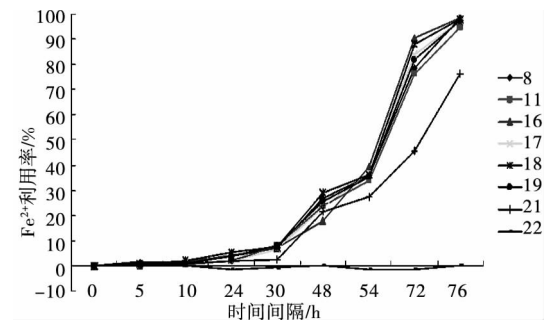


图 2 有较好促进作用的氨基酸

然而,丝氨酸、谷氨酰胺、组氨酸,在 72 h 后对  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率开始均小于 21 号(空白加菌)的 45.64%,76 h 时  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率明显低于空白样

的 76.52%。总之,添加这几种氨基酸的培养基中  $\text{Fe}^{2+}$  的氧化率比不添加氨基酸要低,因此判断这些氨基酸对 *At. f* 菌的生长有抑制作用。 $\text{Fe}^{2+}$  利用率的具体情况见图 3。

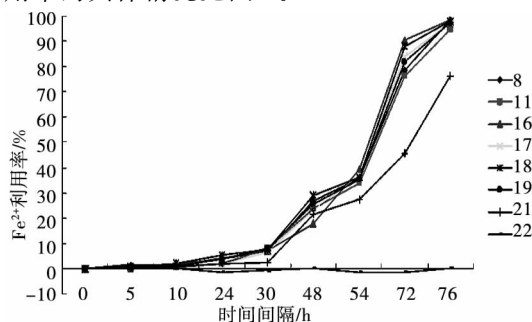


图 3 有抑制作用的氨基酸

综上所述,在 9K 液体培养基中添加氨基酸后,大部分 *At. f* 菌对  $\text{Fe}^{2+}$  的利用率有所增加,即对菌种生长有促进作用;其中添加非极性氨基酸的 *At. f* 菌对  $\text{Fe}^{2+}$  利用率普遍较高,对 *At. f* 菌的生长具有非常明显的促进作用;甘氨酸、半胱氨酸、酪氨酸对 *At. f* 菌的生长也有较好的促进作用;而丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸对 *At. f* 菌的生长则呈抑制作用。

### 3 结论与讨论

与空白样比较,72 h 后大部分非极性氨基酸添加样中  $\text{Fe}^{2+}$  氧化率达到 90% 以上,76 h 时达到 99%,*At. f* 菌生长活性比空白样平均要高 23% 左右。所以,非极性氨基酸:丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸,对 *At. f* 菌生长有很强的促进作用。

成环氨基酸:脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸

酸,培养基中  $\text{Fe}^{2+}$  浓度和 48 h 后 pH 的下降趋势均较空白样快,并且在 76 h 后  $\text{Fe}^{2+}$  的氧化率几乎达到 99%。*At. f* 菌对  $\text{Fe}^{2+}$  的氧化率比空白样平均要高 20% 左右,生长情况明显好于空白样。所以,成环氨基酸对 *At. f* 菌生长也有较强的促进作用。

在 76 h 时,添加甘氨酸、半胱氨酸的培养基中  $\text{Fe}^{2+}$  利用率明显高于空白样的 76.52%,大约高出 20% 左右,此时培养基中  $\text{Fe}^{2+}$  几乎全部氧化为  $\text{Fe}^{3+}$ 。因此,分子量较小的甘氨酸,含有巯基的半胱氨酸对 *At. f* 菌的生长也有促进作用。

在 76 h 后,丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸添加样中  $\text{Fe}^{2+}$  利用率的平均值在 54% 左右,明显低于空白样的 76.52%,其生长情况没有不添加氨基酸好。因此判断,这 4 种氨基酸对 *At. f* 菌生长有抑制作用。

综上,非极性氨基酸、成环氨基酸、分子量较小的甘氨酸、含有巯基的半胱氨酸对 *At. f* 菌的生长均有较好的促进作用,其中非极性氨基酸促进作用最强;丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸对 *At. f* 菌生长有抑制作用。

### 参考文献:

- [1] 胡岳华,康自珍. 氧化亚铁硫杆菌的细菌学描述[J]. 湿法冶金,1996(4):36-40.
- [2] 温建康,阮仁满,孙雪南. 氧化亚铁硫杆菌生长行为的研究[J]. 中国稀土学报,2000,18(9):453-456.
- [3] 王艳锦,郑正,周培国,等. 不同培养基中氧化亚铁硫杆菌生长及沉淀研究[J]. 生物技术,2006,32(4):70-73.
- [4] 张俊,范伟平,方苹,等. 底物对亚铁硫杆菌生物氧化过程的影响[J]. 南京化工大学学报,2001,23(6):37-41.
- [5] 孙先锋,郭爱莲,朱宏莉,等. 氧化亚铁硫杆菌的分离及生长条件的研究[J]. 西北大学学报(自然科学版),2000,30(2):143-146.

## Effect of Different Amino Acids on *Acidithiobacillus ferrooxidans*' Growth

LIU Zheng<sup>1</sup>, YANG Shao-bin<sup>1</sup>, XIU Jin-jun<sup>2</sup>, ZHANG Li<sup>3</sup>

(1. Science College of Liaoning Technical University, Fuxin, Liaoning 123000; 2. Pharmaceutical School of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000; 3. Fuxin Grain and Edible Oil Trade Company, Fuxin, Liaoning 123002)

**Abstract:** Culturing *Acidithiobacillus ferrooxidans* under the different pH conditions, the growth was monitored to determine the optimum pH, then adding different kinds of amino acids in the 9K medium with the determined optimum pH, the effect of different amino acids on the growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* was studied. The results showed that: the bacteria grew best with pH of 2.0; the utilization rate of alanine, valine, leucine, isoleucine, methionine, phenylalanine, tryptophan, proline, tyrosine, glycine and cysteine on  $\text{Fe}^{2+}$  were higher, while the action of serine, asparagine, glutamine and histidine were the opposite. It could be concluded that: the optimum pH to the growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* was 2.0; non-polar amino acids and cyclization of amino acids could promote the growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, serine, asparagine, glutamine, histidine inhibited the growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

**Key words:** *thiobacillus ferrooxidans*; amino acids;  $\text{Fe}^{2+}$  utilization; pH; growth