

姚英杰 张永奎* 宋航 卢涛

(四川大学化学工程学院, 四川成都 610065)

摘要 本文进行了利用氧化亚铁硫杆菌(HSS)产生的微生物酸性溶液分解磷矿物的实验研究。细菌在 9K 培养基中能够氧化硫磺生成硫酸, 使菌液 pH 值下降至 1.02; 与摇床培养相比, 细菌连续培养时细菌生长较快, 产酸能力较强; 细菌连续培养时, 随着换液量的增加, 菌液每天氧化硫磺的产酸量增大, 硫酸根离子的生成能力达到 $2.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}$; 磷矿分解实验表明采用普通浸矿的方式比批浸法好。普通浸矿法的适宜 pH 为 1.6~2.2, 浸矿时间为 28 天左右较好; 通过细菌分解磷矿、磷酸钙的对比实验发现氟离子对细菌活性有决定性的影响; 在磷矿过量的条件下, 磷矿分解率取决于细菌产酸量。

关键词 氧化亚铁硫杆菌 细菌氧化 磷矿分解

Experimental Investigation on Phosphate Rock

Decomposed by *Thiobacillus ferrooxidans*

YAO Yingjie, ZHANG Yongkui*, SONG Hang and LU Tao

(College of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu, 610065, China)

Abstraction The experimental investigation on phosphate rock decomposed by the metabolized acid produced by *Thiobacillus ferrooxidans* (HSS) was carried out in this paper. The bacterium HSS can grow in 9K medium and oxidize sulfur into sulfuric acid, and the pH value of the liquid can reach 1.02. HSS grows faster and produces more acid in continuous cultivation than it does in shaking culture. In continuous culture, the more volume of bacterial solution was replaced with fresh 9K medium daily, the more sulfuric acid was produced by bacterial oxidation, and the throughput of sulfate produced by bacterial oxidation can reach $2.10 \text{ g/L} \cdot \text{d}$. The research showed that general leaching of phosphate rock was better than batch leaching of phosphate rock. In general leaching of phosphate rock, the adaptive pH value was 1.6-2.2, and the time was 28 days. The contrastive experiment showed that the concentration of fluoride anion was a crucial influence factor to the activity of bacterium. When the amount of phosphate rock is excessive, the rate of decomposition of phosphate rock was decided by the amount of the sulfuric acid produced by bacterial oxidizing sulfur.

Keywords *Thiobacillus ferrooxidans*, bacterial oxidation, decomposition of phosphate rock

姚英杰, 男, 25 岁, 硕士, 生于 1978.10, 四川大学化工学院 02 级生物化工专业。

* 张永奎, 生于 1966.3, 四川大学化工学院副教授。国家自然科学基金项目, 批准号: 29876032。

* 张永奎, 1966 年 3 月出生, 四川大学化工学院副教授。本项目获得国家自然科学基金支助, 批准号: 20876024。

引言

我国的磷矿资源丰富，但大多数为低品位磷矿，且磷主要是以各种非水溶性的磷灰石的形式存在，不能被植物利用，所以目前磷肥工业利用硫酸或硫磷混合酸分解磷矿，生产水溶性磷酸盐，如磷铵（DAP）、尿素磷铵（UAP）等。

利用硫酸或硫磷混合酸分解磷矿，生产水溶性磷肥是研究工业化成熟的工艺技术，由于酸耗量大，工艺复杂，工厂投资大，生产成本低，长期施用不当不仅造成土壤板结，而且污染环境等原因，目前还无法利用中低品位的磷矿资源。为了充分利用我国丰富的中低品位的磷矿资源，探索将中低品位磷矿粉直接施用于土壤作为肥料，并且提高磷矿粉的速效性是技术关键。采用微生物技术，将微生物与磷矿粉混合施用，微生物在生长过程中可以通过产酸、酶及其它代谢物来提高磷的速效性和有效性，从而降低农业生产成本，提高磷矿利用率，并且保护了生态环境^[1-3]。

能够分解磷矿提高磷矿粉速效性的微生物种类有很多，主要有磷酸盐分解细菌（Phosphate Solubilising Bacteria），真菌（Phosphate Solubilising Fungi），放线菌（Phosphate Solubilising Actinomycetes）等^[4-8]。微生物分解磷酸盐的生物化学机理主要有四种：（1）微生物生长代谢有机酸，分解不溶性磷酸盐矿物；（2）微生物生长代谢有机酸及其它有机物，与不溶性磷酸盐矿物发生络合交换反应；（3）微生物生长代谢无机酸如硝酸、硫酸等，分解不溶性磷矿物；（4）微生物生长代谢硫化氢，与含铁不溶性磷酸盐矿物反应等，从而释放出可溶性磷酸盐。

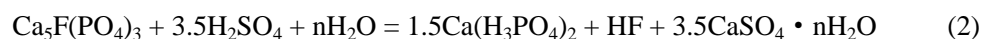
氧化亚铁硫杆菌（*Thiobacillus ferrooxidans*）是一种无机化能自养型细菌，通过氧化还原态硫化物获取能量生长，并且产生硫酸^[9]。本文将对一种氧化亚铁硫杆菌的生长特性、代谢硫酸的能力、细菌及细菌代谢酸液分解磷矿的条件等进行实验研究。

1 基本原理

硫酸分解磷矿(以氟磷灰石为例)的反应式如下^[10]：



在不同的 pH 值条件下，反应的产物可能是磷酸二氢盐和磷酸一氢盐的混合物，其反应式为：



在不同的 pH 值条件下，磷酸根、磷酸二氢根和磷酸一氢根在溶液中以一定比例分配，因此浸出完全相同的矿样，其耗酸量也受溶液终点 pH 值的影响。由于细胞活性的限制，对于氧化亚铁硫杆菌的代谢酸液 pH 值一般在 1~3 范围内，分解磷矿后，磷酸根主要是以磷酸和磷酸二氢盐两种形式存在。

氧化硫硫杆菌氧化还原态硫化物（以硫磺为例）产生稀硫酸的反应式为：



2 实验部分

2.1 细菌及培养

本实验所用细菌(HSS)，从四川某温泉采样，经过富集培养、分离、纯化所得。经过实验鉴定，该细菌为氧化亚铁硫杆菌菌属。细菌用 Starky 培养基培养。摇瓶培养：在锥形瓶中加入一定量的培养基，按 10% (V/V%) 接种，置于空气浴恒温摇床 (HZQ-C) 中振荡培养，温度 30℃，转速 150r·min⁻¹。连续培养：在自制 2500 毫升充气搅拌发酵罐中培养，按 10% (V/V%) 接种，温度 30℃，搅拌转速 500 r/min，充气量 10 L·min⁻¹。定期取一定体积的菌液，测试 pH 值、菌浓度和硫酸根的含量，计算细菌的产酸能力。

2.2 矿样及试剂

磷矿样品为贵州息峰磷矿，P₂O₅ 含量为 34.12%，CaO 含量为 40.2%，F 含量为 3.0%，平均粒度为 200 目。培养细菌用的硫磺为升华硫化学试剂，硫含量大于 98%，粒度为-150 目。其它试剂为市售的分析纯试剂。

2.3 细菌液分解磷矿

细菌的浸矿可分为普通浸矿法和批浸法两种。两者的共同之处在于：均要在锥形瓶中准确加入一定体积的 Starky 培养基（或修正的 9K 培养基），接种 10% (V/V%) 的细菌，加入磷矿粉，在摇床中振荡培养（温度 30℃，转速 170 r·min⁻¹）。每天用蒸馏水恒重补充液体蒸发量，定期检测溶液 pH 值、取 10ml 锥形瓶上清液测定溶液的 P₂O₅ 含量。不同之处在于：批浸法在接种细菌的同时就加入磷矿粉，而普通浸矿法则是在菌液 pH 值下降到一定程度后才加入磷矿粉。

细菌生成酸液分解磷矿实验，在一定体积的细菌生成酸液中加入一定量的磷矿石，在体积为 500 毫升的搅拌反应器中进行，温度 30℃，搅拌转速 200 r·min⁻¹。定期取一定体积的溶液，测试 pH 值和 P₂O₅ 的含量，计算磷矿样的分解率。

2.4 化学分析

原矿及菌液中 P₂O₅ 用钼酸喹啉重量法，SO₄²⁻ 采用硫酸钡重量法分析，活性细菌浓度用血球计数板计数法，氟离子浓度用氟离子选择电极法，溶液 pH 用精密酸度计 (PSH-2C, 上海雷磁仪器厂) 测试。

3 实验结果与讨论

3.1 摇床培养

细菌在摇床培养过程中细菌菌液的 pH 值与培养时间的关系见图 1。实验细菌生长的初始 pH 值为 3.5。实验结果可见，细菌在 Starky 培养基中生长，氧化硫磺生成硫酸，使菌液的 pH 值下降，但当 pH 值下降至 1.0 左右时，由于酸性太强，细菌活性受到影响，其产酸能力下降。

3.2 细菌连续培养实验

细菌 (HSS) 连续培养实验，首先在发酵罐中进行间歇式培养 11 天，培养液体积 1000

毫升，接种量为 100 毫升菌液，细菌菌液 pH 值由初始的 2.5 下降至 1.02，细菌大量生长后进行连续培养。在连续培养过程中，每隔 2 小时移去一定体积的菌液，同时补充相同体积的培养基，保证硫磺的过量以消除底物量对细菌生长与产酸的影响。细菌在间歇培养期间菌液 pH 值与培养时间的关系见图 2。连续培养实验条件与结果见表 1。

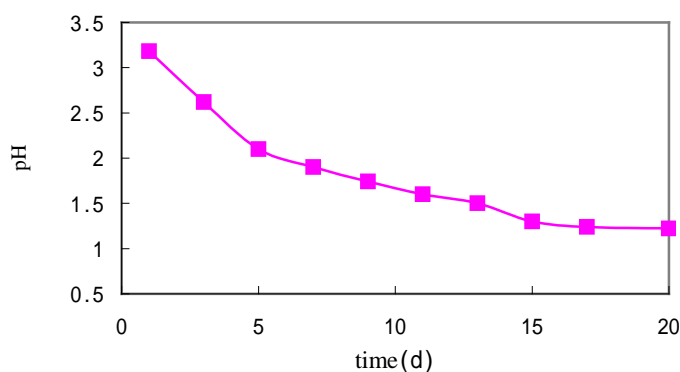


Figure 1: The relation of pH value and culture time of the bacterial liquid by serial cultivation

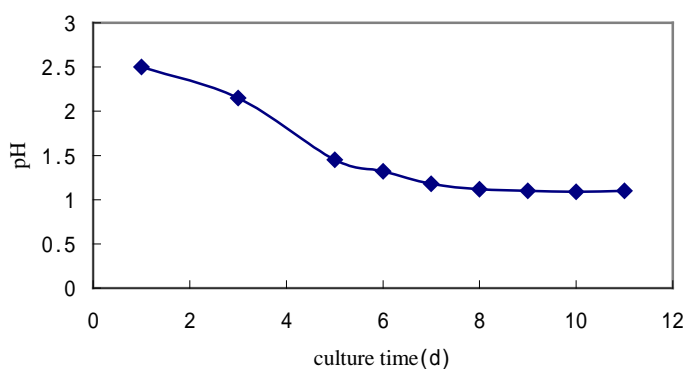


Figure 2: The relation of pH value and culture time of the bacterial liquid by shaking culture

比较图 1 与图 2 可知，细菌连续培养时菌液 pH 与培养时间的变化趋势与摇床培养基本一致，但连续培养时细菌生长较快，产酸能力较强，接种后连续培养 9 天时菌液的 pH 值达 1.09，而摇床培养 20 天时 pH 值达 1.22。可见细菌连续培养方式优于摇床培养。由表 1 可见，换液量大小对细菌生长与硫酸的产生能力影响很大。在相同的培养温度条件下，随着换液量的增加，菌液每天氧化硫磺的产酸量增大。这可能是由于换液时换出了部分活力不足的老细菌，导致溶液细菌浓度下降，同时又产生了一些氧化硫磺能力强的新细菌来使菌液浓度稳定在 1×10^{15} Cells/M³ 左右。换液量越大，则产生的新细菌越多，菌液中新细菌所占比例越大，因此其每天氧化硫磺的产酸量越大。

Table 1:the condition and result in shaking culture

Total volume(ml)	1100					
Volume of extraction (ml/d)	100	200	350	550	750	1000
Resident time(d)	11	5.5	3.14	2.0	1.47	1.1
Total Volume of extraction (ml/d)	500	1000	1750	2750	3750	5000
pH	1.08	1.25	1.58	1.72	1.75	1.79
SO_4^{2-} (g/L)	7.188	7.011	4.392	3.368	3.067	2.314
SO_4^{2-} (g)	3.594	7.011	7.686	9.262	11.5013	11.57
SO_4^{2-} throughput (g/d.L)	0.6535	1.2747	1.5372	1.684	2.091	2.1036

3.3 细菌分解磷矿实验

3.3.1 浸矿方式的比较

细菌浸出采用普通方式和批浸方式两种。批浸法是指在接种细菌的同时加入磷矿粉，然后培养细菌产酸解矿；普通浸矿法是指先培养细菌到一定酸度才加入磷矿粉，若菌液酸度继续下降，则再逐步加入磷矿粉使细菌酸液保持在一定 pH 值。

浸矿实验中，在最初的 10 天内溶液的 pH 值下降很慢，其活性受到加入矿粉的影响，而一般的细菌培养在 9 天内 pH 值都会下降到 1.09（见图 2）。为了充分利用细菌在无矿粉影响时产酸快的特点，应避免在接种细菌的同时加入矿粉，应在细菌培养到一定酸度后才加入矿粉。表 2 给出了批浸法和普通浸矿法的对比结果。在相同体积菌液的条件下，普通浸矿方式比批浸法的浸矿时间短、浸矿量大、分解率高。因此应采用普通浸矿法。

Table 2:The contrast between general-leaching and batch-leaching

Number	Bacterium	Method	Leaching time (d)	Quantity of phosphorite(g)	The rate of decomposition of phosphorite
1	HSS	general-leaching	20	1.203	86.0%
2	SII		24	1.117	100.0%
3	HSS		42	0.200	45.3%
4	HSS	batch-leaching	42	0.353	34.3%
5	HSS		42	0.505	21.7%
6	HSS		42	0.986	13.7%

The volume of liquid is 110ml; The quantity of inoculation is 10%;

3.3.2 普通浸矿法 pH 值优化实验

溶液 pH 值的大小不仅影响细菌的生长和产酸，而且影响浸出磷酸根在溶液中的分布形式，从而引起单位质量磷矿的耗酸量变化，并最终影响细菌的浸矿量和浸出率。因此应控制菌液在一定的酸度，考察在不同恒定酸度条件下细菌的浸矿情况，其结果见表 3。

实验过程中菌液 pH 值的恒定通过控制加入磷矿粉的量来实现。当菌液 pH 值低于设定

值时，加入一定质量的磷矿粉（具体的量由经验判断）消耗酸液使 pH 值上升至设定值；当菌液 pH 值高于设定值时，培养细菌产酸使 pH 值下降到低于设定值后再加矿粉。这样就可以控制菌液 pH 值在很小的范围内波动，达到恒定菌液酸度的目的。

由表 3 可知：pH 值在 1.6~2.2 范围时细菌的浸矿量相对较大、矿的分解率也较高，相应溶液的五氧化二磷质量百分含量高。在 pH 值为 2.2~2.4 的酸度范围时，随着溶液 pH 值的增高其加矿量变大，但相应的分解率降低。随着浸矿时间的加长，这一现象更为明显。细菌的浸矿时间以 22~28 天为佳，再延长浸矿时间，溶液的五氧化二磷质量百分含量提高不大，也说明浸磷矿粉 28 天后细菌的活性已非常小。

Table3 The result of general-leaching in several pH value

pH	Leaching time (d)	Quantity of phosphorite(g)	The rate of decomposition of phosphorite	P ₂ O ₅ %
1.2	22	0.6324	100.0%	0.275
1.4		1.6636	100.0%	0.435
1.6		2.1437	100.0%	0.509
2	28	2.4336	96.4%	0.530
	42	2.9085	89.8%	0.584
2.2	28	2.5873	94.7%	0.546
	42	4.0434	64.5%	0.583
2.4	28	2.8373	81.8%	0.526
	42	4.5029	56.6%	0.573

Note: Condition: HSS; 200ml Starky liquid culture medium; 2g sulfur; 15% inoculation quantity; culture time is 8 days before leaching; general-leaching;

3.3.3 HSS 菌浸磷酸钙实验

在实验 4.3.1 中判定磷矿中的某些化学成分影响细菌的活性，而实际上细菌受其生物特性的影响，其对任何盐浓度的耐受都是有限的，考察细菌对磷酸盐的耐受浓度就显得很有必要，表 4 给出了细菌浸出磷酸钙的结果。

经过 49 天的浸磷酸钙，细菌的浸矿浓度达到了 40.7 g 磷酸钙/L 菌液，溶液五氧化二磷质量百分浓度达到 2%。与此同时，我们也做了细菌耐磷酸二氢钾的实验，在磷酸二氢钾浓度高达 80 g·L⁻¹ 菌液的情况下细菌依然生长、产酸，此时溶液五氧化二磷含量高达 3.7%。这说明用磷酸钙制生物肥是可行的。

对比表 4 细菌浸磷酸钙与表 3 中 pH 为 2.0 时细菌浸磷矿数据可知：由于没有磷矿中其它成分（主要是氟离子）的影响，细菌浸磷酸钙比浸磷矿的量要大得多，其浸矿的活性周期也长达 49 天。这也进一步证明磷矿中的某些成分严重降低细菌的浸矿活性。

Table4 HSS-leaching of calcium phosphate

Leaching time(d)	Quantity of calcium phosphate (g)	Decomposition rate	P ₂ O ₅ %	pH value
12	2.413	77.56%	0.945	1.95
25	3.2252	57.65%	-	2.05
49	4.4858	97.93%	2	1.84

Note:Condition: HSS; 100ml Stark liquid culture medium; 1g sulfur; 10% inoculation quantity; general-leaching; pH about 2.0;

3.3.4 细菌生成酸液分解磷矿实验

在实验 4.3.1, 4.3.2 中, 细菌生长产酸的同时分解磷矿, 由于磷矿分解时产生的氟化合物等影响细菌生长, 故进行了细菌单独培养产酸, 用细菌产生的酸液分解磷矿实验。细菌进行连续培养, 用每天产生 pH 值为 1.5 左右 300 ml 酸液进行分解磷矿。磷矿样 20 克。实验条件及结果见表 5。从实验结果可见, 由于磷矿过量, 一定酸度和体积的细菌酸液的磷矿分解率相近, 磷矿分解率取决于细菌产酸量。

Table 5:the condition and result of decomposition phosphorite by bio-acid

Time (d)	Volume of acid (ml)	pH value of decomposing liquid	The rate of decomposition of phosphorite (%)	The accumulative rate of decomposition (%)
1	300	2.31	6.7020	6.7020
2	300	2.20	8.2933	14.9953
3	300	2.13	8.0695	23.0648
4	300	2.14	8.3102	31.3750
5	300	2.16	8.3642	39.7392
6	300	2.20	8.1588	47.8980
7	300	2.15	8.0168	55.9148
8	300	2.15	8.0104	63.9252
9	300	2.15	8.0010	71.9262
10	300	2.05	7.8799	79.8061
11	300	2.05	7.7947	87.6008
12	300	1.65	5.6336	93.2344
13	300	1.51	4.5804	97.8148

5 实验结论与展望

实验证明用氧化硫杆菌分解磷矿在原理上是可行的。

细菌在 9K 培养基中能够生长, 氧化硫磺生成硫酸, 使菌液 pH 值下降至 1.02。溶液 pH 值影响细菌的生长, pH 为 2.0~2.50 时细菌生长最好, pH 为 2.50 时其氧化硫磺的能力最强, 培养细菌的最佳 pH 为 2.50。

与摇床培养相比, 细菌连续培养时细菌生长较快, 产酸能力较强。细菌连续培养时, 换液量大小对细菌生长与硫酸的产生能力影响很大。在相同的培养温度条件下, 随着换液量

的增加,菌液每天氧化硫磺的产酸量增大,每升培养液每天的硫酸根离子的生成能力达到2.10克。

磷矿分解实验采用普通浸矿的方式比批浸法好,并优化普通浸矿 pH 为 1.6~2.2,确定浸矿时间为 28 天左右较好。通过细菌浸磷矿、磷酸钙的对比,确定氟离子对细菌活性有决定性的影响,而磷矿中其他成分对细菌的影响可以忽略。随着培养液中氟离子浓度的加大,细菌的生长和产酸滞后期变长,其生长量和氧化硫磺的能力也大大降低。细菌生成酸液分解磷矿实验表明,在磷矿过量的条件下,一定酸度和体积的细菌酸液的磷矿分解率相近,磷矿分解率取决于细菌产酸量。

利用氧化硫硫杆菌氧化硫磺产生稀硫酸来分解磷矿还处于基础研究阶段,建议今后从以下几个方面展开工作:用磷酸钙和细菌混合做植物栽培实验,开发生物磷肥技术;用细菌做碱性土壤改良实验研究;用细菌做柱浸、堆浸实验,开发细菌应用于从低品位磷矿或磷矿尾矿中提取磷技术;筛选出部分耐高温菌种,提高产酸能力。

References

- 1 吕贻峰,曹金绪,王占岐.磷矿山环境污染的形成与防治[J],矿产保护与利用,2002,000(006):10-15
- 2 汤贤勇.开阳磷矿洋水矿区矿山开采与环境综合治理[J]. 贵州地质,2001,018(001):64-67
- 3 李端,周少奇,陈晓武.城市污泥的重金属生物活性及其控制[J].环境污染治理技术与设备,2003,4(7):60-65
- 4 林启美,赵海英,赵小蓉.4株溶磷细菌和真菌溶解磷矿粉的特性[J].微生物学通报,2002,029(006):24-28
- 5 Olanipekun.E.O,oderinde.R.A,Okurumeh.O.K. Dissolution of phosphorite in dilute hydrochloric acid solution .Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 1994, 37(5):183-186
- 6 Boulos,Tawpik.Refaat,Abdel-Khalek,Naqui A,Lbrahi, Susan Samim.Rationalization of the flotation circuit of an Egyptian phosphorite plant .Tenside, Surfactants, Detergents, 2000, 37(3): 176-182
- 7 Sedayeva,K.M. Bacterial origin of phosphorite.Transaction (Doklady) of the Russian Academy of Sciences: Earth Science Sections, 1996, 339(8):66.
- 8 赵小蓉,林启美,赵紫鹃,李保国.一株节杆菌溶解磷矿粉的动态[J].微生物学杂志,2003,023(005):12-17
- 9 范伟平,方苹,张俊,刘厚明.氧化亚铁硫杆菌能量代谢产物之间反应促进硫化矿细菌浸出[J].化工学报,2004,055(002):242-246.
- 10 侯翠红,王光龙,张宝林,蒋登.高脉硫酸分解磷矿反应过程及机理的研究[J].化工矿物与加工,2003,032(010):12-15.