

## 源自硫化矿区的 *Acidiphilium* 属菌的分离及其浸矿性能

邹俐宏<sup>1,2</sup>, 钱林<sup>1</sup>, 张燕飞<sup>1</sup>, 万民熙<sup>1</sup>, 邱冠周<sup>1,2</sup>, 杨宇<sup>1,2</sup>

- (1. 中南大学 资源加工与生物工程学院, 长沙 410083;
2. 中南大学 生物冶金教育部重点实验室, 长沙 410083)

**摘要:** 从湖北大冶铜矿的铜山口硫化矿坑水中分离得到了一株嗜酸兼性异养细菌, 暂命名为 DY。该菌株为革兰氏阴性细菌, 短杆状, 菌体大小为 $(0.4 \pm 0.1) \mu\text{m} \times (1.2 \pm 0.2) \mu\text{m}$ , 最适生长温度为 30 °C, 最适初始生长 pH 值为 3.5, 能利用葡萄糖、乳糖、蔗糖和单质硫生长, 不能利用  $\text{FeSO}_4$  进行生长。其系统发育树结果表明, 菌株 DY 与 *Acidiphilium cryptum*(Y18446)位于系统发育树的同一分支中, 相似度为 99.69%。黄铜矿( $\text{CuFeS}_2$ )摇瓶细菌浸出实验显示, DY 菌株单独浸出黄铜矿的能力较弱, 但和嗜酸自养的氧化亚铁硫杆菌 ATCC 23270 混合浸矿时, 与氧化亚铁硫杆菌单独浸矿相比, 30 d 后黄铜矿的浸出率提高了 35.98%。

**关键词:** 酸性矿坑废水; *Acidiphilium*; 黄铜矿; 生物浸出

中图分类号: Q 939

文献标识码: A

## Isolation and identification of *Acidiphilium* strain DY from complex sulfide mines and its bioleaching characterization

ZOU Li-hong<sup>1,2</sup>, QIAN Lin<sup>1</sup>, ZHANG Yan-fei<sup>1</sup>, WAN Min-xi<sup>1</sup>, QIU Guan-zhou<sup>1,2</sup>, YANG Yu<sup>1,2</sup>

- (1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Changsha 410083, China;
2. Key Laboratory of Biometallurgy of Ministry of Education, Central South University, Changsha 410083, China)

**Abstract:** An *Acidiphilium* strain DY was isolated from acid mine drainage of Daye mine, Hubei Province, China. The cell of DY strain is Gram negative and rod-shaped in  $(0.4 \pm 0.1) \mu\text{m} \times (1.2 \pm 0.2) \mu\text{m}$ . The optimum growth temperature is 30 °C, and the optimum growth pH is 3.5. It can grow facultative heterotrophically by using glucose, lactose, sucrose and elemental sulfur as sole energy sources, but can not grow with  $\text{FeSO}_4$ . A phylogenetic tree was constructed with the published 16S rRNA gene sequences of the relative bacteria species. In the phylogenetic tree, the DY strain has the closest relative to the *Acidiphilium cryptum* (Y18446) with 99.69% sequence similarity. The bioleaching experiment of chalcopyrite revealed that the DY strain has little efficiency of leaching chalcopyrite, but when it is coupled with acidophilic autotrophic bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, it can increase the chalcopyrite leaching efficiency by 35.98% after 30 d, compared with *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 leaching efficiency.

**Key words:** acid mine drainage; *Acidiphilium*; chalcopyrite; bioleaching

生物湿法冶金是以微生物对矿石的直接、间接以及两者的共同作用浸出矿石中有用金属的一种新工艺, 现已成为矿冶工程研究和应用的重点之一。与其他工艺相比, 其最大特点是适用于传统工艺难以处理

的矿石, 并具有流程短、工艺简单、易操作、投资少、能耗少、成本低和对环境友好等优点<sup>[1]</sup>。我国所开采的铜矿物多为难浸的黄铜矿<sup>[2-3]</sup>, 且低品位的铜矿资源尤为丰富<sup>[4]</sup>。随着我国高品位铜矿资源的日益减少,

基金项目: 国家创新研究群体科学基金资助项目(50621063); 国家重点基础研究发展计划资助项目(2004CB619201)

收稿日期: 2007-06-13; 修订日期: 2007-10-12

通讯作者: 杨宇, 副教授, 博士; 电话: 0731-8877216; E-mail: csyangyu@gmail.com

低品位黄铜矿的细菌浸出已成为人们研究的重点。

酸性矿坑废水(Acid Mine Drainage, 简称 AMD)中, 广泛存在着多种具有浸矿作用的嗜酸自养菌和异养菌。嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, 简称 A.f)、氧化亚铁钩端螺旋菌 (*Leptospirillum ferrooxidans*) 和嗜酸杆菌属 (*Acidiphilium* sp.) 分别是其中的典型代表<sup>[5]</sup>。嗜酸杆菌属 (*Acidiphilium* sp.) 由 HARRISON<sup>[6]</sup> 于 1981 年首次提出, 并描述了该属的第一个成员—隐性嗜酸杆菌 (*Acidiphilium cryptum*)。该菌能够进行铁呼吸作用, 利用有机物或者 H<sub>2</sub> 还原 Fe<sup>3+</sup> 而获得能量进行化能异养生长, 但不能利用元素硫或 Fe<sup>2+</sup> 作为能源生长<sup>[6]</sup>, 并且在好氧生长条件下细菌胞内含有细菌叶绿素 a<sup>[7]</sup>。HIRAISHI 等<sup>[8]</sup> 报道的 *Acidiphilium acidophilum* 能够参与硫的代谢。其独特的生理学特征以及在 AMD 微生物群落中的显著生态地位, 使得它成为具有吸引力的微生物模型, 受到越来越多的关注<sup>[9-11]</sup>。目前对于生物浸矿反应过程中嗜酸氧化亚铁硫杆菌和氧化亚铁钩端螺旋菌的作用已经进行了大量的研究<sup>[12-14]</sup>, 但对嗜酸杆菌属在生物冶金过程中的研究则很少。本文作者从湖北大冶铜矿的酸性矿坑水中, 分离得到一株既能以葡萄糖为能源异养生长、又能以单质硫为能源自养生长的兼性细菌, 对其进行初步的鉴定及浸矿性能的研究, 并探讨其与其他浸矿微生物之间的协同作用, 以期为进一步的冶金应用提供依据。

## 1 实验

### 1.1 菌种来源

菌株分离自本实验室在 2005 年 7 月采集于湖北大冶铜矿坑矿区的矿坑水, 取样时矿坑水温度为 25 °C, pH 值为 2.1。AMD 水样元素分析如表 1 所列。

表 1 AMD 水样元素分析

Table 1 Element analysis of AMD(mg/L)

S	Mg	Fe	Al	Cu
3 035	358	1 890	114.8	91.51
Mn	Si	Zn	As	Mo
149	30.79	38.36	2.13	0.43

### 1.2 富集与纯化

#### 1.2.1 培养基

采用 9 K 基础培养基<sup>[15]</sup>, 配方如下: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g/L, KCl 0.1 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5

g/L, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.01 g/L。分离培养基采用 9 K-葡萄糖固体培养基: 9 K 基础培养基+1%葡萄糖+1.5%琼脂粉, pH 3.5。

#### 1.2.2 菌种的分离纯化

对菌种的分离纯化采用适应分离法, 先适应性富集, 再选择性培养。利用可以进行化能异养这个特点, 逐步改变培养基中 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 和葡萄糖的比例, 使之成为优势菌种。重复液体培养和固体平板分离 4 次。最终从固体平板中挑选出 1 个单菌落, 经 9 K 葡萄糖液体培养基扩大培养, 命名为 DY, 随后对其开展了一系列研究。

### 1.3 生理生化特性

#### 1.3.1 最适生长温度的测定

将相同数量的 DY 菌株接种到多份 9 K 葡萄糖液体培养基中, 分别置于不同温度条件下, 经 170 r/min 振荡培养, 第 72 h 时, 在显微镜下直接计数, 确定不同温度下菌株的生长情况。

#### 1.3.2 最适初始 pH 值的测定

将相同数量的 DY 菌株接种到不同初始 pH 值的 9 K 葡萄糖液体培养基中, 经 30 °C、170 r/min 振荡培养, 第 72 h 时于显微镜下直接计数, 确定不同 pH 条件下细菌的生长情况。

#### 1.3.3 底物利用特性研究

无机底物利用方面, 采用 9 K 基础培养基中分别加入 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、单质硫、黄铁矿、黄铜矿各 1%(w/v); 有机底物利用方面, 采用 9 K 基础培养基中分别加入葡萄糖、乳糖、蔗糖各 1%。将一定数量的 DY 菌株接种到含上述底物的 9 K 基础培养基中, 经 30 °C、170 r/min 振荡培养, 3 d 传代 1 次。连续传代 3 次时, 在显微镜下观察菌株的生长情况。

### 1.4 菌株形态观察

在 30 °C 液体中培养细菌至对数生长期, 离心收集菌体, 经革兰氏染色后在光学显微镜下观察。用无菌水反复清洗菌体, 用 4%戊二醛固定, 经制样处理后在扫描电子显微镜下进行观察。

### 1.5 硫氧化活性的测定

将 DY 菌株接种到含 5%(w/v)单质硫的 9 K 基础培养基中, 经 30 °C、170 r/min 振荡培养, 通过改变培养基 pH 值及菌浓度来考察 DY 菌株的硫氧化活性。

### 1.6 浸矿实验

矿样为湖北大冶矿山的黄铜矿, 矿石样品的粒度

≤0.075 mm。矿样化学成分分析结果如表 2 所列。

表 2 黄铜矿的矿样成分

Table 2 Component analysis of chalcopyrite (mass fraction, %)

CuFeS <sub>2</sub>	FeS <sub>2</sub>	CaCO <sub>3</sub>	SiO <sub>2</sub>
60.8	20.7	8.4	4.6

接种量为 10%，调节初始菌浓度为  $1.0 \times 10^7$  cell/mL，浸矿条件：250 mL 摇瓶装液 100 mL，矿样量 5%，170 r/min，30 °C。同时进行 4 组对比实验，分别是：样品 1 为 DY 菌株单独浸矿，样品 2 为 *A.f* 标准菌株 ATCC 23270(登记序列号 AF465604)单独浸矿，样品 3 为上述两种菌株按 1:1 比例混合浸矿，样品 4 为空白对照。

### 1.7 基因组提取及 16SrRNA 基因扩增

对纯化后培养的菌株使用 Sangon 公司的 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA。扩增体系 50 μL 组成为：33 μL 无菌水、10× PCR buffer 5 μL、dNTPs 5 μL、引物 63F(5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3')和 1387R(5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3')<sup>[16]</sup>各 2 μL (5 pmol/μL)、Taq DNA 聚合酶 1 μL、DY 菌株的基因组 DNA 2 μL。

扩增程序：94 °C 5 min；94 °C 45 s，55 °C 45 s，72 °C 1 min(共 30 个循环)；72 °C，10 min。

### 1.8 16S rRNA 基因测序及分析

PCR 产物用 E.Z.N.A<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit (OMEGA)回收，后用 PBS-T 载体(BBI)连接后转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，经蓝白筛选后挑阳性克隆子送北京三博远志生物技术生物有限公司测序。序列已经提交到 GenBank(登录号：EF585285)，并将菌株 DY 的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行序列比较，用 clustalx1.8 软件进行全序列比对<sup>[17]</sup>，并用 MEGA 3.1 构建系统发育树<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株形态与生理生化特性

革兰氏染色结果表明，菌株 DY 为革兰氏阴性；扫描电子显微镜显示，该菌为短杆状，菌体大小为(0.4 ± 0.1) μm × (1.2 ± 0.2) μm，如图 1(a)所示；在 9 K 固体培养基上，菌落呈圆形，乳白色半透明，直径约为 0.6~1.0 mm，表面光滑，如图 1(b)所示。

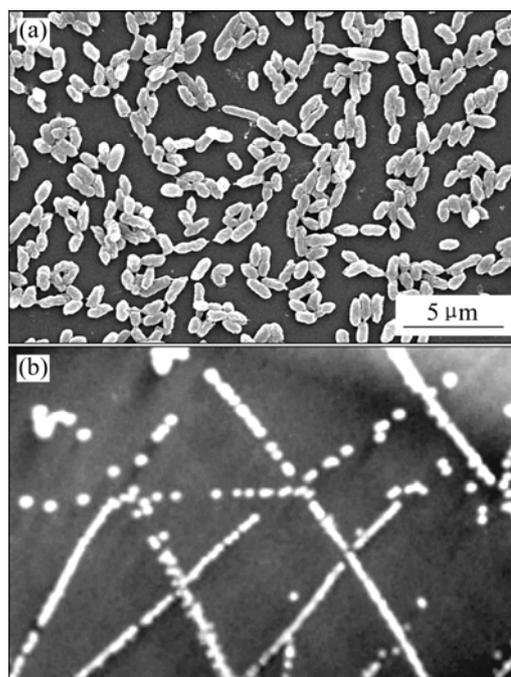


图 1 DY 菌株的 SEM 像和菌落形态

Fig.1 SEM image and colony of DY

### 2.2 最适生长温度和最适初始 pH 值

图 2 所示为 DY 菌株的生长温度曲线，该菌可在 20~40 °C 间进行生长，其中最适生长温度约为 30 °C。图 3 所示为该菌的 pH 适应情况，该菌可在初始 pH2.0~6.0 之间进行生长，最适生长初始 pH 值约为 3.5。

### 2.3 能源利用特性

如表 3 所列，菌株 DY 能利用单质硫、黄铜矿、

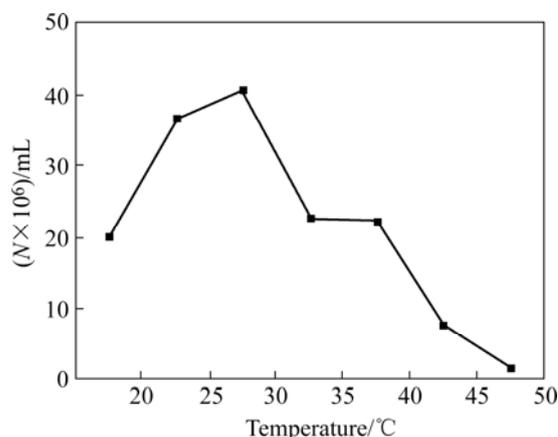


图 2 DY 菌株在不同温度下的生长曲线

Fig.2 Curve of cell destinies in stable phase at different temperatures

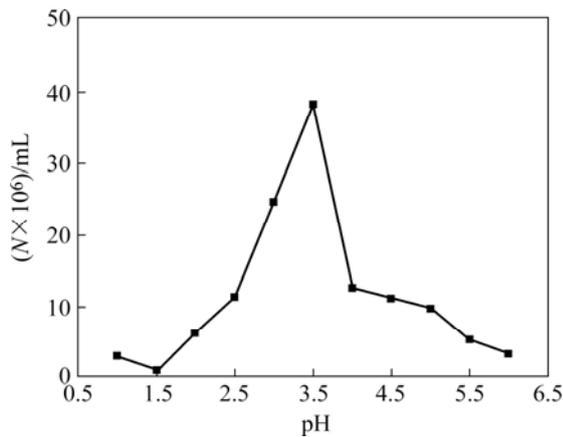


图 3 DY 菌株在不同 pH 值时的生长曲线  
Fig.3 Curve of cell destinies at different initial pH values

黄铁矿、葡萄糖、乳糖、蔗糖, 进行生长, 但不能利用  $\text{FeSO}_4$  进行生长。这些数据表明该菌具有一定的无机底物适应性, 在自养环境中既可以氧化硫获得能量进行生长, 也可以利用多种硫化矿进行生长。同时该菌也可以利用多种有机物进行异养生长。

表 3 DY 菌株能源利用特性

Table 3 Characteristics of DY strain with different substrates

Substrate	$\text{Fe}^{2+}$	$\text{S}^0$	$\text{CuFeS}_2$	$\text{FeS}_2$
Growth	-	+	+	+
Substrate	Glucose	Lactose	Sucrose	
Growth	+	+	+	

### 2.4 硫氧化活性

图 4 所示为 DY 菌株在接种了 5%(w/v)单质硫的 9 K 基础培养基中菌株生长曲线和培养基 pH 值的变化曲线。将 DY 菌株接种到只含单质硫的 9 K 基础培养基的前 3 d 时间里, 细菌的生长处于迟滞期, pH 持续下降比较缓慢; 从第 3 d 到第 15 d 中, 菌株的生长处于对数生长期, pH 下降的很快; 18 d 到 21 d 间, pH 变化趋于平缓, 此时菌株的生长处于平稳期中, 17 d 以后 pH 下降到 1.0 以下。这说明在单质硫的 9 K 基础培养基中, 菌株在生长过程中不断地把硫氧化为硫酸, 导致培养基的 pH 值不断下降, 由初始的 pH 3.5 降到 pH 0.9。因此, 该 DY 菌株具有较强的硫氧化活性。

### 2.5 菌株 DY 的 16SrRNA 基因序列分析

采用 PCR 技术, 成功扩增出 16S rRNA 基因, 然后克隆和测序, 测定的序列长度为 1307bp, 在 GenBank 中的序列登记号为 EF585285。以 16S rRNA 基因序列

同源性为基础构建系统发育树, 如图 5 所示。菌株 DY 与 *Acidiphilium cryptum*(Y18446)最为相似, 相似度为 99.69%。

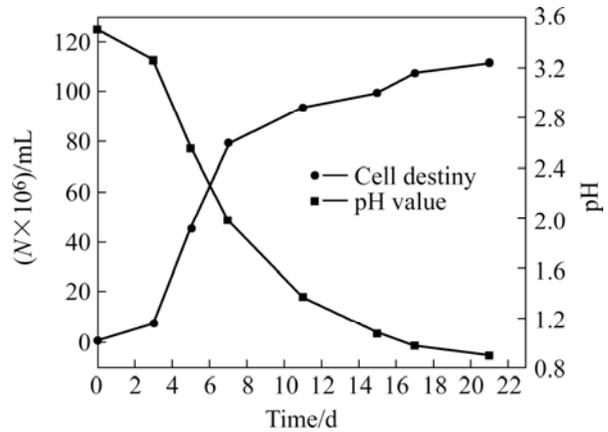


图 4 DY 菌株硫氧化过程中的生长曲线及培养基 pH 值的变化曲线

Fig.4 Growth curve and pH value curve in sulfur oxidation by DY strain

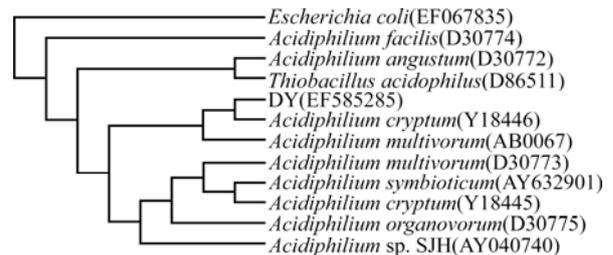
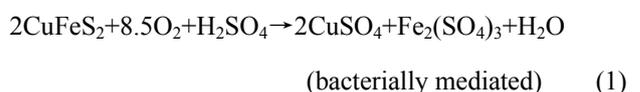


图 5 DY 菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育树  
Fig.5 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequence of DY strain

### 2.6 浸矿实验

黄铜矿的细菌浸出实验结果如图 6 所示, 在最初的 4 d 之内,  $\text{Cu}^{2+}$ 的浸出主要是浸矿液为酸性所造成的化学作用。此后, 细菌对  $\text{Cu}^{2+}$ 的浸出作用占主导地位。在黄铜矿浸出 30 d 之后, DY 菌株单独浸出黄铜矿的  $\text{Cu}^{2+}$ 浓度仅为 0.51 g/L, A.f 标准菌株 ATCC 23270 单独浸出黄铜矿的  $\text{Cu}^{2+}$ 浓度为 1.82 g/L, 而 DY 和 A.f 标准菌株 ATCC 23270 混合浸矿的  $\text{Cu}^{2+}$ 浓度则达到 2.47 g/L。数据表明两种细菌混合浸矿的效果要大大高于两种细菌单独浸矿的效果。

在细菌浸出黄铜矿的过程中, 细菌首先将  $\text{Fe}^{2+}$ 氧化成  $\text{Fe}^{3+}$ :



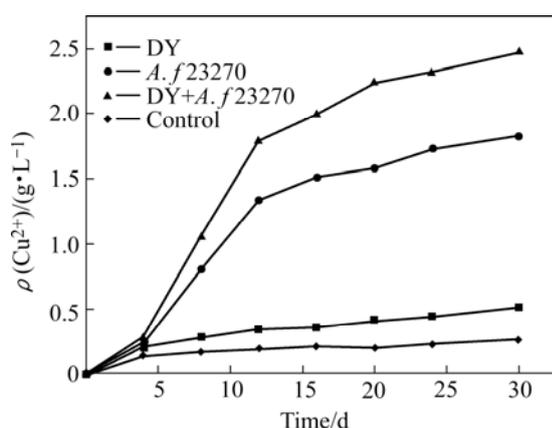
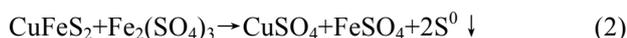


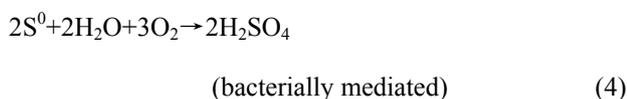
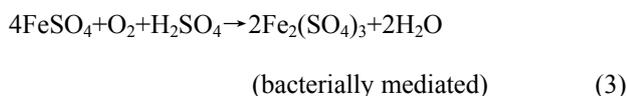
图6 DY菌株对黄铜矿中的Cu<sup>2+</sup>浸出作用

Fig.6 Copper extraction from chalcopyrite by DY strain

Fe<sup>3+</sup>离子是一种很有效的金属离子氧化剂和浸出剂,在酸性条件下,可以将黄铜矿氧化:



在酸性条件下,生成的Fe<sup>2+</sup>和S<sup>0</sup>被细菌再次氧化,生成Fe<sup>3+</sup>和H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:



当A.f标准菌株ATCC 23270单独浸出黄铜矿时,由于该菌可以氧化Fe<sup>2+</sup>和S<sup>0</sup>,因此理论上可以促进上述4个反应循环进行,直到黄铜矿被全部氧化。然而,实际浸矿数据显示:浸出反应初期Cu<sup>2+</sup>浓度增长较快,随着反应的进行,Cu<sup>2+</sup>浓度增长速度减慢。其原因可能是:第一在黄铜矿的浸出过程中,由于一些沉淀物质如单质硫、黄钾铁矾和黄胺铁矾等逐渐覆盖于黄铜矿表面形成一层致密的钝化膜<sup>[19-21]</sup>,使得细菌本身和氧化剂Fe<sup>3+</sup>难以吸附到黄铜矿的表面,阻碍了反应的进一步发生;第二A.f菌生理代谢所产生的一些有机废物积累到了较高浓度,对于自身的生长会产生显著的抑制作用<sup>[22-24]</sup>,从而影响了矿物的进一步浸出。而DY菌株单独浸出黄铜矿时,由于它不具备氧化Fe<sup>2+</sup>的能力,仅具有氧化S<sup>0</sup>的能力,只能催化反应(4)、并进而促进反应(2)进行,实验数据也证实了其单独浸出黄铜矿的能力较弱。而当DY菌株和A.f标准菌株ATCC 23270混合浸矿时,DY菌株能促进S<sup>0</sup>氧化为硫酸,分解浸矿体系中的黄钾铁矾和黄胺铁矾<sup>[22-24]</sup>,从而阻止或延缓黄铜矿表面钝化膜的形成,

使得细菌和Fe<sup>3+</sup>不断的吸附到黄铜矿的表面,从而促进反应不断进行。另外,DY菌株在生长过程中还原Fe<sup>3+</sup>生成Fe<sup>2+</sup>,一方面为氧化亚铁硫杆菌的生长提供能源,一方面消除了浸矿体系中对氧化亚铁硫杆菌的生长有抑制和毒害作用的有机物<sup>[21,25]</sup>,促进了氧化亚铁硫杆菌的生长,从而有效地提高了氧化亚铁硫杆菌对黄铜矿的浸出水平。

### 3 结论

1) 从湖北大冶矿坑水中分离得到了一株细菌DY,为革兰氏阴性细菌,短杆状,菌体大小为(0.45±0.05) μm×(1.5±0.4) μm。最适生长温度为30℃,最适pH值为3.5。16SrRNA基因测定及系统发育分析显示该菌应归为Acidiphilium属。

2) 该菌株为兼性异养菌,能单独利用葡萄糖、乳糖、蔗糖和单质硫作为能源生长,不能以FeSO<sub>4</sub>作为能源单独生长,并能利用多种硫化矿进行生长。

3) DY菌株单独浸出黄铜矿的能力较弱,但在同A.f标准菌株ATCC 23270混合浸出黄铜矿时,与A.f标准菌株ATCC 23270单独浸矿相比,30天的浸出率提高了35.98%。

4) 在混合菌浸矿的过程中,自养菌和异养菌之间对矿物存在协同效应,一方面减缓了在浸矿过程中黄铜矿表面钝化膜的形成,另一方面阻止了有机化合物的积累,从而提高了浸出效果。

### REFERENCES

- [1] 王淀佐. 生物工程与矿物提取技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 155.  
WANG Dian-zuo. Bioengineering and extraction technology of minerals[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999: 155.
- [2] RAWLINGS D E. Mesophilic, autotrophic bioleaching bacteria: Description, physiology and role[M]//Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes. Springer-Verlag and Landes Bioscience, 1997: 229-245.
- [3] OLSON G J, BRIERLEY J A, BRIERLEY C L. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2003, 63: 249-257.
- [4] YANG Song-rong, XIE Ji-yuan, QIU Guan-zhou, HU Yue-hua. Research and application of bioleaching and biooxidation technologies in China[J]. Minerals Engineering, 2002, 15: 361-363.
- [5] YANG Yu, WAN Min-xi, SHI Wu-yang, PENG Hong, QIU

- Guan-zhou, ZHOU Ji-zhong, LIU Xue-duan. Bacterial diversity and community structure in acid mine drainage from Dabaoshan Mine, China[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2007, 47(2): 141–151.
- [6] HARRISON A P Jr. *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments[J]. Int J Syst Bacteriol, 1981, 31: 327–332.
- [7] WAKAO N, SHIBA T, HIRAIISHI A, ITO M, SAKURAI Y. Distribution of bacteriochlorophyll a in species of the genus *Acidiphilium*[J]. Current Microbiology, 1993, 27: 277–279.
- [8] HIRAIISHI A, KENJI V, NAGASHIMA P, MATSUURA K, SHIMADA K, TAKAICHI S, WAKAO N, KATAYAMA Y. Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: Its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48: 1389–1398.
- [9] KUSEL K, DORSCH T, ACKER G, STACKEBRANDT E. Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: Isolation of *Acidiphilium crytum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe( III ) to the oxidation of glucose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 3633–3640.
- [10] JOHNSON D B, BRIDGE T A M. Reduction of ferric iron by acidophilic heterotrophic bacteria: Evidence for constitutive and inducible enzyme systems in *Acidiphilium* spp[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92: 315–321.
- [11] BAKER B J, BANFIELD J F. Microbial communities in acid mine drainage[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44: 139–152.
- [12] RAWLINGS D E. Heavy metal mining using microbes[J]. Annual Review Microbiology, 2002, 56: 65–91.
- [13] BRIERLEY J A, BRIERLEY C L. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy[J]. Hydrometallurgy, 2001, 59: 233–239.
- [14] RAWLINGS D E, TRIBUTSCH H, HANSFORD G S. Reasons why ‘*Leptospirillum*’ like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores[J]. Microbiology, 1999, 145: 5–13.
- [15] SILVERMAN M P, LUNDGREN D C. Study on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*: I. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yield[J]. Journal of Bacteriology, 1959, 77: 642–647.
- [16] LANE D J. 16S/23S rRNA sequencing[M]. STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M, eds. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, 1991: 115–175.
- [17] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS D G. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 24: 4876–4882.
- [18] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5: 150–163.
- [19] MCGUIRE M M, EDWARDS K J, BANFIELD J F, HAMERS R J. Kinetics, surface chemistry and structural evolution of microbially mediated sulfide mineral dissolution[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2001, 65(8): 1243–1258.
- [20] FOWLER T A, CRUNDWELL F K. Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: Bacterial oxidation of the sulfur product layer increases the rate of zinc sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 5285–5292.
- [21] WATLING H R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides—A review[J]. Hydrometallurgy, 2006, 84: 81–108.
- [22] PAIMENT A, LEDUC L G, FERRONI G D. The effect of the facultative chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus acidophilus* on the leaching of low-grade Cu-Ni sulfide ore[J]. Geomicrobiology Journal, 2001, 8: 157–165.
- [23] BACELAR-NICOLAU P, JOHNSON D B. Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 5: 585–590.
- [24] WICHLACZ P L, THOMPSON D L. The effect of acidophilic heterotrophic bacteria on the leaching of cobalt by *Thiobacillus ferrooxidans*[C]//Biohydrometallurgy, Proceedings of the 1987 International Symposium, Kew, UK, 1987: 77–88.
- [25] 刘艳阳, 陈志伟, 姜成英, 刘双江. 一株嗜酸化能异养菌 *Acidiphilium* sp. 的分离鉴定及其对 Fe(III) 代谢的研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 350–354.
- LIU Yan-yang, CHEN Zhi-wei, JIANG Cheng-ying, LIU Shuang-jiang. Isolation and characterization of *Acidiphilium* strain Teng-A and its metabolism of Fe(III) during pure- and mixed cultivation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(2): 350–354.

(编辑 何学锋)