

文章编号: 1004-0609(2006)06-1094-06

源自硫化矿区的氧化亚铁硫杆菌新菌系的鉴定^①

杨 宇^{1, 2}, 彭 宏¹, 万民熙¹, 邱冠周^{1, 2}, 黄菊芳^{1, 2}, 胡岳华^{1, 2}

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

摘 要: 从广西铜坑矿区多金属复杂硫化矿矿坑水中分离得到了一株嗜酸氧化亚铁硫杆菌(暂命名为 TK), 该菌株为革兰氏阴性细菌, 短杆状, 菌体大小为 $(0.4 \pm 0.1) \mu\text{m} \times (1.4 \pm 0.2) \mu\text{m}$, 最适生长温度为 $25 \sim 30^\circ\text{C}$, 最适 pH 值为 2.0, 化能自养型, 能利用亚铁、单质硫和葡萄糖生长, 不能利用硫代硫酸钠、蛋白胨生长。测定其亚铁和元素硫的氧化能力, 并考察它对铁闪锌矿的浸出效果。以 16SrDNA 序列同源性为基础构建了包括 15 株已报道菌种和其他菌属菌株作为外来群在内的系统发育树。结果表明: TK 菌株处于单独的一个分支内, 与嗜酸氧化亚铁硫杆菌株 D2 最为相似, 相似性为 98.67%, 推测 TK 菌株为嗜酸氧化亚铁硫杆菌的一个新菌系。该菌系的分离为嗜酸氧化亚铁硫杆菌多样性和生态分布研究提供了一种新材料。

关键词: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌; 生物浸出; 系统发育树; 16SrDNA

中图分类号: Q 939

文献标识码: A

Identification of new subspecies *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain from complex sulfide mines

YANG Yu^{1, 2}, PENG Hong¹, WAN Ming-xi¹, QIU Guan-zhou^{1, 2},
HUANG Ju-fang^{1, 2}, HU Yue-hua^{1, 2}

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering,
Central South University, Changsha 410083, China;

2. Key Laboratory of Biometallurgy of Ministry of Education,
Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: An *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain TK was isolated from the Tong Ken area, Guangxi province in China. The cell of TK strain is Gram negative and rod-shaped in $(0.4 \pm 0.1) \mu\text{m} \times (1.4 \pm 0.2) \mu\text{m}$. The optimum growth temperature is $25 \sim 30^\circ\text{C}$, and the optimum growth pH is 2.0. The TK strain can grow autotrophically by using Fe^{2+} , sulfur, glucose as sole energy sources, however, can not grow with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and peptone. The oxidation of Fe^{2+} , sulfur and bioleaching marmatite with this strain was studied. A phylogenetic tree was constructed by comparing with the published 16SrDNA sequences of the relative bacteria species. In the phylogenetic tree, the TK strain is in a new branch which has the closest relative to the *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain D2 with 98.67% sequence similarity. These results reveal that the TK strain may be a new strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. It offers a new material in order to study the polymorphism and bionomics of bioleaching microbes.

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans* (A. f); bioleaching; phylogenetic tree; 16SrDNA

嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferro-*
oxidans, 简称 A. f 菌), 是一种化能自养, 专性好

氧, 嗜酸革兰氏阴性菌。以自身细胞分裂的形式进
行繁殖, 可以固定空气中的 CO_2 , 以氧化 Fe^{2+} 、 S^0

① 基金项目: 国家创新研究群体科学基金资助项目(50321402); 国家重点基础研究发展规划资助项目(2004CB619201)

收稿日期: 2005-08-09; 修订日期: 2005-11-08

通讯作者: 胡岳华, 教授; 电话: 8877216; E-mail: hyh@mail.csu.edu.cn

及 S^{2-} 的化合物等来获得生长过程所需的能量^[1, 2]。自从 1947 年由 Colmer 和 Hinkle 首先分离纯化并命名以来, 一直是在生物浸出及其他如煤脱硫方面最主要的细菌之一, 受到国内外研究者的重视和研究^[2-7]。

嗜酸氧化亚铁硫杆菌广泛生存于土壤、海水、淡水、垃圾、硫磺矿泉和沉积硫内, 尤以金属硫化矿或煤矿的酸性矿坑水中最为常见^[3]。但各地的 *A.f* 菌呈现出复杂的多样性, 国内外的研究均表明, 来源不同的嗜酸氧化亚铁硫杆菌菌株对金属硫化矿物的浸出效果明显不同^[1, 3]。因此采集不同样点的水样, 以分离纯化各种适应于不同底物作用的嗜酸氧化亚铁硫杆菌, 对了解不同地域和环境下 *A.f* 菌的多样性(包括种群多样性、系统发育多样性和功能多样性)和生态演化规律, 进一步解析微生物冶金的群落结构和功能, 以及开发高效浸矿菌株有重要意义^[8]。

本文作者从广西大厂铜坑矿区的某废矿坑的水样中, 分离纯化了一株铁硫氧化细菌, 进一步的生理生化显示为嗜酸氧化亚铁硫杆菌, 同时考察其浸矿能力, 这可能揭示嗜酸氧化亚铁硫杆菌分布多样性同浸矿环境的相互关联。

1 实验

1.1 菌种分离

菌株由广西大厂铜坑矿区的矿坑水中分离得到, 故暂命名为 TK。矿区中矿石为多金属复杂硫化矿石, 主要矿物有: 铁闪锌矿、黄铁矿、锡石。矿坑水温度为 25℃ 左右, pH 值为 6.6, 呈弱酸性。将采集到的酸性水样先用 9 K 液体培养基^[9]富集培养, 待培养基的 pH 值下降到 1.0 左右, 用梯度稀释法在改进的 9 K 固体培养基^[10]涂布, 再用平板划线法分离。

1.2 培养基

采用的液体培养基(9 K)配方如下: $(NH_4)_2SO_4$ 3 g/L, KCl 0.1 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $Ca(NO_3)_2$ 0.01 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 44.7 g/L, pH 1.8~2.0。分离培养基为改进的 9 K 固体培养基, 即在每升 9 K 液体培养基中加入琼脂 15 g, KSCN 15.4 g, pH 2.0~2.2。基础培养基为不加 $FeSO_4$ 的 9 K 培养基。

1.3 生理生化特性

最适温度: TK 菌株都以相同的菌量接种到

9 K 液体培养基中, 分别置于不同的温度的条件下, 培养 3 d, 用血球计数板计数, 测定不同温度下 TK 的生长状况。

最适初始 pH 值: 用 1 mol/L 的硫酸将 9 K 液体培养基调至不同 pH 值, 接种相同的菌量, 培养 3 d, 用血球计数板计数, 测定不同 pH 条件下菌的生长状况。能量利用特性: 基础培养基(不加 Fe^{2+} 的 9 K 培养基)中分别加入蛋白胨 0.1%, 葡萄糖 0.1%, 硫磺 5%, 硫代硫酸钠 1%, 七水合硫酸亚铁 14.7%, 七水合硫酸亚铁 14.7% + 蛋白胨 0.1%, 七水合硫酸亚铁 14.7% + 葡萄糖 0.1%。其中硫代硫酸钠、七水合硫酸亚铁 14.7% 过滤除菌后加入培养基, 硫磺隔水蒸煮 1h 灭菌, 再加入培养基。以 TK 菌株悬液接种, 每培养 3 d 传代一次。连续传代 3 次, 涂片并在显微镜下观察菌的生长情况。

1.4 电镜观察

30℃ 液体培养细菌至对数生长期, 收集菌体, 经革兰氏染色后在光学显微镜下观察。将菌体涂布在小块盖玻片上, 自然晾干后, 再用导电胶贴于圆形贴片上, 喷金后在扫描电镜下观察。

1.5 亚铁和硫氧化活性测定

亚铁氧化活性测定: 取 TK 菌株的液体培养物, 用 5×10^4 mol/L 的 $K_2Cr_2O_7$ 对其中的 Fe^{2+} 进行滴定。每隔一段时间(一般为 3~4 h)取 0.5 mL 菌液, 用蒸馏水(或者 1% 稀硫酸)稀释 10 倍, 再取其中的 1 mL 滴定, 每次进行 3 次重复, 然后取其平均值作为滴定值。滴定用 1:1 的硫磷酸作为络合剂, 用 0.2% 二苯胺磺酸钠作指示剂, 滴定至亮紫色即到滴定终点。硫氧化活性测定: 将 TK 菌株接种到只添加了单质硫的基础培养基(硫浓度为 5%)中, 通过 pH 值的变化来考察 TK 菌株的硫氧化活性。

1.6 浸矿实验

矿样为铁闪锌矿, 粒度分布为 104~147 μm 。接种量为 10%, 调节初始菌浓度为 1.0×10^{-7} cell/mL, 浸矿条件: 矿样量 5%, 160 r/min, 30℃。

1.7 基因组提取及 16SrDNA 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、10× dNTPs 5 μL、引物 FC27 和 RC1492 各 2 μL、Taq DNA 聚合酶 1 μL、TK 菌株的基因组 DNA 2 μL。扩增程序: 94 ℃, 5 min; 94 ℃, 1 min; 55 ℃, 1 min; 72 ℃, 3 min(共 30 个循环); 72 ℃, 10 min。PCR 引物为通用引物^[9]如下: 正向引物(FC27)为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物(RC1492)为 5'-TACGCTACCTTGTTACGACTT-3'。

1.8 16SrDNA 测序及分析

采用克隆测序技术。克隆试剂盒为上海生工的 PCR 产物克隆试剂盒 SK2212。载体选用 pUCm-T, 蓝白筛选后所得的重组克隆交由北京三博远志生物技术有限责任公司测序。序列已经提交到 GenBank(登录号: DQ062114), 并将该 16SrDNA 序列与 GenBank 核酸序列数据库进行序列比较, 用 clustalx1.8 软件进行全序列比对^[11], 并构建系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 菌株形态与生理生化特性

菌株是革兰氏阴性细菌, 短杆状, 菌体大小为 $(0.4 \pm 0.1) \mu\text{m} \times (1.4 \pm 0.2) \mu\text{m}$ 。在改进的 9 K 固体培养基, 菌落呈圆形, 表面干燥, 直径约为 0.6 ~ 1.0 mm, 边缘不规则, 中央呈浅褐色(图 1)。最适生长温度为 25~ 30 ℃, 最适 pH 值为 2.0。可以利用亚铁、单质硫和葡萄糖生长, 且在亚铁葡萄糖混合培养基中也能生长; 不能利用蛋白胨生长, 且在亚铁蛋白胨混合培养基中不能生长(表 1)。考察葡萄糖和蛋白胨对 TK 菌株生长的影响, 适当加大了硫酸亚铁+ 蛋白胨混合培养基、硫酸亚铁+ 葡萄糖混合培养基中蛋白胨、葡萄糖的含量, 表明蛋白胨、葡萄糖对 TK 菌株的生长都是抑制作用。图 2 所示为在温度 30 ℃, pH 值 1.8 的 9 K 液体培养基中, TK 菌株的生长曲线。

表 1 TK 菌株能源利用特性

Table 1 Characteristics of TK strain with different substrates				
Substrate	Fe ²⁺	S ⁰	NaS ₂ O ₃	Glucose
Growth	+	+	-	+

Substrate	Peptone	Fe ²⁺ + glucose	Fe ²⁺ + peptone
Growth	-	+	-

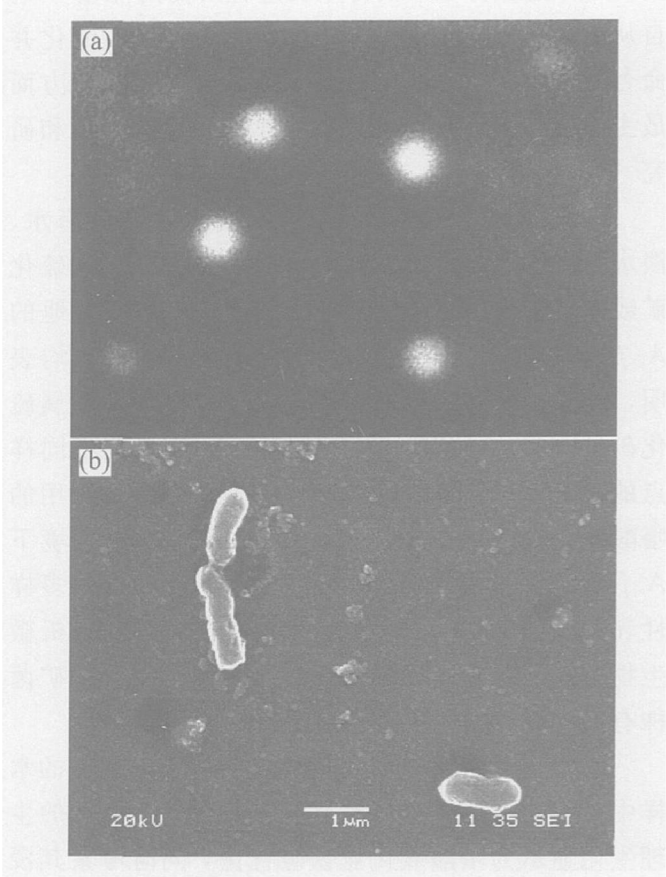


图 1 TK 菌株的菌落形态和透射电镜像

Fig. 1 Colony of TK and scanning electron micrograph

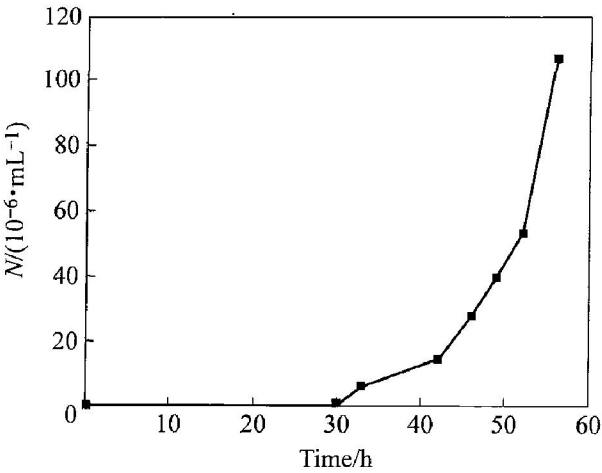


图 2 TK 菌株的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of TK strain

2.2 亚铁和硫氧化活性

2.2.1 亚铁氧化活性

TK 菌株有较强的亚铁氧化活性, 能够氧化 9 K 培养基中的 Fe²⁺ 成为 Fe³⁺ 来获取生命所需的能量, 实验表明亚铁氧化活性是与细菌的生长相关, 8 h 时该菌的亚铁氧化率较低, 和空白对照无明显差别, 这是细菌转移到新的环境后的一个适应过程, 生长繁殖处于诱导期; 随着培养时间的增加,

该菌开始进入缓慢生长期, 亚铁氧化率慢慢提高, 与空白对照差异显著; 34 h 时进入了对数生长期, 亚铁氧化率也急剧增高, 说明了亚铁氧化活性与细菌的生长密切相关, 细菌的生长越快, 亚铁氧化活性越强^[12]。52 h 亚铁氧化率达到 99.5%。虽然 TK 菌株利用 Fe^{2+} 为能源生长, 但与一般微生物所具有的生长规律一致^[13]。

图 3 所示为 TK 菌株在温度为 30 ℃, pH 值为 2.0 的 9 K 培养基中的亚铁氧化率曲线。其中: TK 曲线代表接种 TK 菌株的培养基中 Fe^{2+} 氧化随时间的变化, Control 曲线为空白对照。

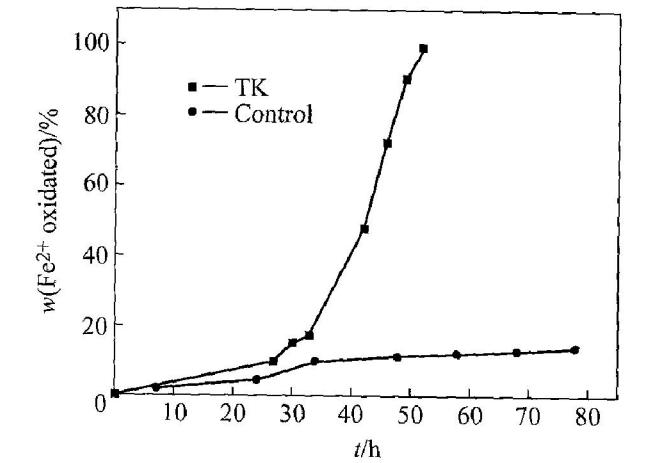


图 3 TK 菌株的亚铁氧化率曲线

Fig. 3 Ferrous ion oxidation curves by TK strain(control: without cells)

2.2.2 硫氧化活性

接种 3 d 后, pH 值开始下降; 3~ 18 d 之间, 细菌产酸速度加快, 故 pH 值显著下降, 此阶段菌处于对数生长期; 18 d 以后, pH 值变化不明显, 此时菌已处于平稳期。在生长代谢过程中, 细菌以元素硫为能源, 氧化生成硫酸, 导致培养基的 pH 值下降, 由初始 2.3 降到 1.0, 表明该菌具有较强的硫氧化活性。

图 4 所示为 TK 菌株接种添加了单质硫的基础培养基(硫浓度为 5%) 21 d 内, 培养基 pH 值随时间的变化。图 5 所示为相应的培养过程中, 在第 9、15 和 21 d 细菌菌数变化的柱型图。

2.3 浸矿实验

铁闪锌矿的浸矿试验, 证实了 TK 菌株具有浸矿能力, 能对锌离子有一定的浸出效果, 但效果不是很明显, 可能是由于该菌株未经驯化所致和矿石成分较复杂的原因^[4]。开始阶段, TK 菌株对铁闪锌矿的浸出速度比较稳定, 随时间变化不显著, 浸

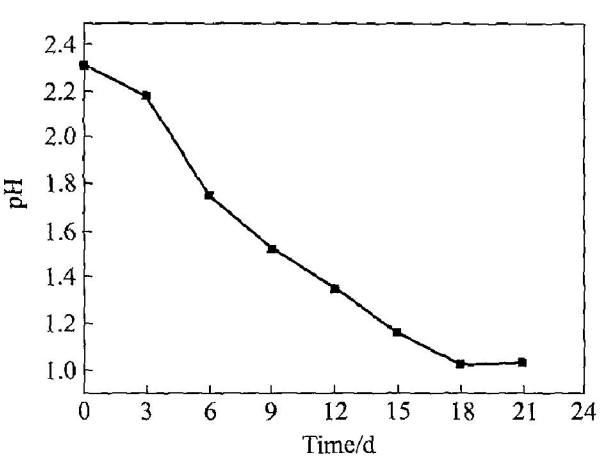


图 4 TK 菌硫氧化过程 pH 值的变化

Fig. 4 Variation of pH value in sulfur oxidation by TK strain

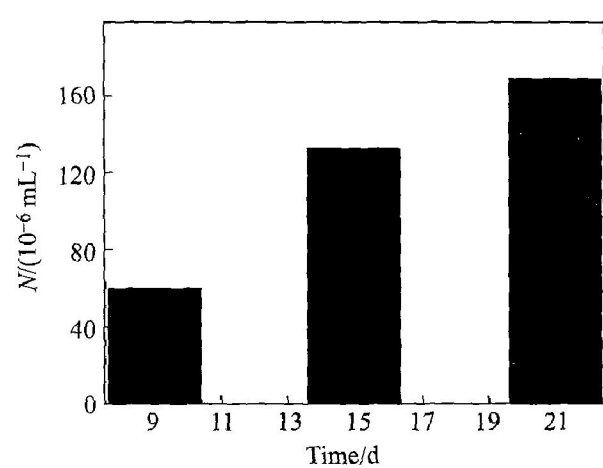


图 5 TK 菌硫源菌数变化柱形图

Fig. 5 Population number of TK strain with sulfur substrate

出锌离子的浓度维持在比无菌对照高出 150 mg/L 左右的水平上, 但 25 d 以后, 锌的浸出率呈现出加快的趋势, 由于细菌能够吸附在矿石表面能对矿物产生腐蚀电化学作用来加快浸矿速度。27 d 后, 细菌浸出的锌离子浓度达到 650 mg/L, 而无菌对照只有 392 mg/L, 如图 6 所示。其中 Control 为无菌对照。铁闪锌矿的浸矿试验中, 接种 10% 的未经过驯化的 TK 菌株能提高锌的浸出速率。

2.4 16SrDNA 序列分析与系统发育树

染色体 DNA 用 PCR 扩增出 16SrDNA 并进行测序, 序列长度为 1199bp, Genbank 中的序列登录号为 DQ062114。以 16SrDNA 序列同源性为基础构建系统发育树(图 7)。TK 菌株单独位于系统发育树一个新的分支中, 与目前 Genbank 中已有记录的其他菌株相比, 最相近的为 D2(登记序列号

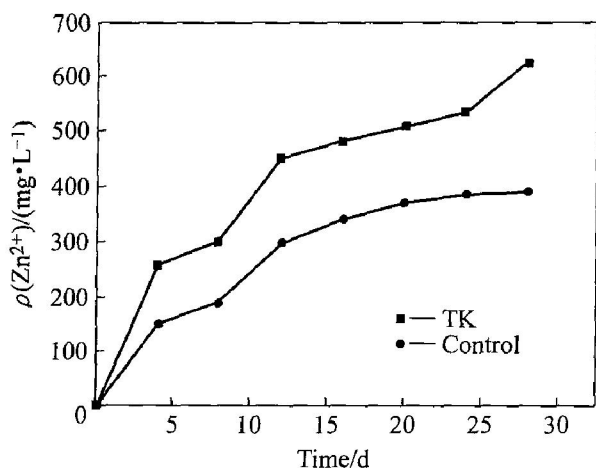


图 6 TK 菌株对铁闪锌矿中的锌的浸出

Fig. 6 Zinc extraction from marmatite concentrate by TK strain

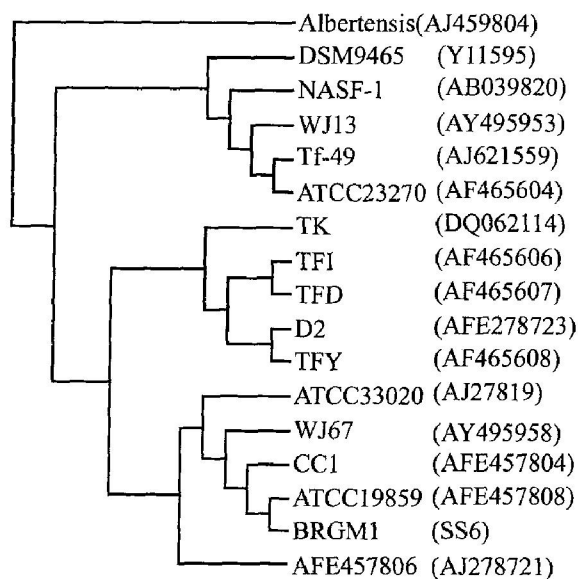


图 7 TK 菌株的 16SrDNA 序列系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree derived from 16SrDNA sequence of TK strain

AFE278723) 相似度 98.67%, 与标准株 ATCC23270(登记序列号 AF465604) 相似度为 97.68%。数据显示菌株 TK 为嗜酸氧化亚铁硫杆菌的一个新菌系^[14, 15]。该菌株的分离为嗜酸氧化亚铁硫杆菌多样性和生态分布研究提供了一种新材料, 同时通过其他功能基因的研究也揭示了嗜酸氧化亚铁硫杆菌生态多样性的特点^[16, 17], 这对浸矿细菌的遗传分类学研究具有一定的意义。

3 结论

1) 从广西铜坑矿区多金属复杂硫化矿矿坑水

中分离得到了一株嗜酸氧化亚铁硫杆菌 TK, 为革兰氏阴性菌, 短杆状, 菌体大小为 $(0.4 \pm 0.1) \mu\text{m} \times (1.4 \pm 0.2) \mu\text{m}$ 。最适生长温度为 $25 \sim 30^\circ\text{C}$, 最适 pH 值为 2.0。

2) 该菌株能利用亚铁、单质硫和葡萄糖生长, 不能利用蛋白胨生长。混合培养基中, 蛋白胨、葡萄糖对 TK 菌株的生长起抑制作用。该菌株具有很强的亚铁氧化活性, 52 h 亚铁氧化率达到 99.5%; 也具有很强的硫氧化活性, 在 15 d 以后导致培养基的 pH 值由初始的 pH 2.3 降到 pH 1.0。亚铁氧化活性和硫氧化活性的活性强弱都与菌所处长时期相关。TK 菌株对铁闪锌矿浸出, 在 27 d, 细菌浸出的锌离子浓度达到 650 mg/L, 而无菌对照只有 392 mg/L, 说明菌株具有浸出硫化矿的能力。

3) 16SrDNA 系统发育树的构建表明菌株 TK 为嗜酸氧化亚铁硫杆菌一个新菌系, 与目前 Genbank 中已有记录的其他菌株相比, 最相近的为 D2 (登记序列号: AFE278723) 相似度 98.67%。

REFERENCES

- [1] Kelly D P, Wood A P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 489 - 500.
- [2] Temple K L, Colmer A R. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. Journal of Bacteriology, 1951, 61: 605 - 611.
- [3] Rawlings D E. Heavy metal mining using microbes [J]. Annual Review Microbiology, 2002, 56: 65 - 91.
- [4] SHI Shaoyuan, FANG Zhao-heng. Bioleaching of marmatite flotation concentrate by *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. Hydrometallurgy, 2004, 75: 1 - 10.
- [5] Nestor D, Valdivia U, Chaves A P. Mechanisms of bioleaching of a refractory mineral of gold with *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. International Journal of Mineral Processing, 2001, 62: 187 - 198.
- [6] Brierley J A, Brierley C L. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy [J]. Hydrometallurgy, 2001, 59: 233 - 239.
- [7] Acharya C, Kar R N, Sukla L B. Bacterial removal of sulphur from three different coals [J]. Fuel, 2001, 80: 2207 - 2216.

- [8] Baker B J, Banfield J F. Microbial communities in acid mine drainage [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44: 139 - 152.
- [9] Silverman M P, Lundgren D C. Study on the chemotrophic iron bacterium *ferrobacillus ferrooxidans* (I): an improved medium and harvesting procedure for securing high cell yield [J]. Journal of Bacteriology, 1959, 77: 642 - 647.
- [10] 张在海, 邱冠周, 胡岳华, 等. 氧化亚铁硫杆菌的菌落分离研究 [J]. 矿产综合利用, 2002, 1: 19 - 23.
ZHANG Zaihai, QIU Guanzhou, HU Yuehua, et al. The investigation of the colony isolation of *thiobacillus ferrooxidans* [J]. Multipurpose Utilization of Mineral Resource, 2002, 1: 19 - 23.
- [11] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 24: 4876 - 4882.
- [12] Ageeva S N, Kondrat'eva T F, Karavaiko G I. Phenotypic Characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* Strains [J]. Microbiology, 2001, 70(2): 186 - 194.
- [13] Prescott L M, Harley J P, Klein D A. Microbiology [M]. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 1999. 115 - 117.
- [14] Karavaiko G I, Turova T P, Kondrateva T F, et al. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53: 113 - 119.
- [15] Rawlings D E. The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur-oxidizing bacteria [J]. Hydrometallurgy, 2001, 59: 187 - 201.
- [16] 杨 宇, 彭 宏, 孙 斌, 等. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌亚铁氧化酶基因分子多态性研究 [J]. 遗传, 2005, 27(5): 787 - 791.
YANG Yu, PENG Hong, SUN Bin, et al. Molecular diversity of the gene encoding Fe(II)-oxidizing enzyme in *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. Hereditas, 2005, 27(5): 787 - 791.
- [17] PENG Hong, YANG Yu, HU Yuehua, et al. Structure analysis of 16SrDNA sequences from strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 39(2): 178 - 182.

(编辑 陈爱华)