

不同嗜酸氧化亚铁硫杆菌(DY15, DY26, DC)对黄铜矿的浸出及其基因 *Afe0022* 的差异表达

吴学玲^{1,2}, 袁 鹏^{1,2}, 胡 琪^{1,2}, 侯冬梅^{1,2}, 苗 博^{1,2}, 邱冠周^{1,2}

(1. 中南大学 资源加工与生物工程学院, 长沙 410083;

2. 中南大学 教育部生物冶金重点实验室, 长沙 410083)

摘 要: 通过摇瓶浸矿比较研究 3 株 *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*At. ferrooxidans*) 菌 DY15、DY26 和 DC 的耐受 Cu^{2+} 能力的差异以及在不同的初始 Cu^{2+} 浓度影响下菌对黄铜矿浸出能力的不同。采用 Real time RT(Reverse transcriptase) PCR 检测这些菌株的阳离子通道蛋白基因 *Afe0022* 在不同 Cu^{2+} 环境下的差异表达, 进行相对表达量分析。结果表明: DY15、DY26 和 DC 菌的最高 Cu^{2+} 抗性分别是 0.40、0.22 和 0.04 mol/L, 且在以元素硫为能源的 9K 培养基中, 3 株菌 DY15, DY26 和 DC 对应的培养体系 pH 值在 7 d 内由 1.8 分别降到 0.8、1.2 和 1.3, 说明 DY15 的硫氧化能力最强; 3 株菌都具有较好的亚铁氧化能力, 在 40 h 内, DY15、DY26 和 DC 的 Fe^{2+} 氧化率分别是 80%、100%、100%。黄铜矿精矿浸矿实验表明, DY15 对黄铜矿精矿的浸出效率最高, DY26 的其次, DC 的最低, 但 DY15 的单菌浸出效率略低于 3 株菌的混合浸出效率。对 Cu^{2+} 抗性越强的菌株, 其基因 *Afe0022* 表达量越高, 这对菌株的 Cu^{2+} 抗性能力有一定的理论解释作用, 在分子层面上为研究 *At. ferrooxidans* 菌抗铜机理提供一定的理论依据。

关键词: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌; 黄铜矿精矿浸出; 元素硫氧化; Cu^{2+} 抗性; 差异表达

中图分类号: Q819

文献标志码: A

Bioleaching of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* DY15, DY26 and DC and difference expressions of gene *Afe0022*

WU Xue-ling^{1,2}, YUAN Peng^{1,2}, HU Qi^{1,2}, HOU Dong-mei^{1,2}, MIAO Bo^{1,2}, QIU Guan-zhou^{1,2}

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

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

Abstract: The effects of different initial concentrations of Cu^{2+} on chalcopyrite concentrate bioleaching and the difference of ability in response to copper ion (Cu^{2+}) were investigated with three strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*At. ferrooxidans*) DY15, DY26 and DC. The real time reverse transcriptase (RT) PCR was used to analyze the difference expression of gene *Afe0022* cation channel protein in copper ion with different concentrations. The results show that strain DY15, DY26 and DC have the copper ion tolerance level of 0.40, 0.22 and 0.04 mol/L, respectively. When the elemental sulfur acts as the energy resource in 9K medium, the oxidation capacity of elemental sulfur of strain DY15 is better than that of elemental sulfur of DY26 and DC, and after 7 d, the pH values of DY15, DY26 and DC decline from 1.8 to 0.8, 1.2 and 1.3, respectively. All three strains can oxidize ferrous ions well, and after 40 h, the oxidation capacities of ferrous ions of three strains are 80% (DY15), 100% (DY26), and 100% (DC), respectively. In the leaching experiment, strain DY15 has the highest bioleaching efficiency on chalcopyrite concentrate while strain DC has the least bioleaching efficiency in the three strains, but the mixed cultures containing 3 strains exhibit the highest bioleaching efficiency than the pure cultures of DY15. The stronger the capacity of strain resistance to Cu^{2+} is, the more the expression of gene *Afe0022* is. This result assists interpretation of bacterium resistance to Cu^{2+} , and provides theoretical basis to study the mechanism of bacterium resistance to Cu^{2+} in molecular level.

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; chalcopyrite concentrate bioleaching; sulfur oxidation; Cu^{2+} resistance; difference expression

Acidithiobacillus ferrooxidans 是一种嗜酸性的革兰氏阴性菌,它能够氧化 Fe^{2+} 、元素硫以及还原无机硫化物来获取能量,在生物冶金领域受到广泛的应用和深入的研究^[1-4]。生物冶金通过黄铜矿和次生铜硫化物的氧化提取金属,是从低品位矿石中获取金属的经济有效的方法^[5-7]。一些研究得分析了它的流程及机制,为进一步研究生物冶金的分子机制起到了理论和实践指导作用^[8-10]。

在生物浸出过程中,一些重金属离子在高浓度时对细菌是有害的^[11]。黄铜矿生物浸出的主要产物是 Cu^{2+} ,当 Cu^{2+} 浓度比较低时,它对细胞是低害或者无害的,但是当浓度上升后,这些离子就会抑制细菌的活性,进而影响浸出过程。因此,关于菌株浸出黄铜矿的能力大小与菌株耐受 Cu^{2+} 的能力大小是否相关的研究至关重要。筛选出既具有较高的浸出效率同时又具有较高抗 Cu^{2+} 能力的菌株是生物浸出成功的关键^[12]。本研究针对具有不同 Cu^{2+} 抗性的 3 株 *At. ferrooxidans* 菌株展开,测定它们的最高 Cu^{2+} 耐受水平及 Fe^{2+} 和元素硫的氧化能力,并对其黄铜矿精矿的浸出能力进行了分析比较,并就初始 Cu^{2+} 浓度对细菌浸矿的影响进行了研究,以探究不同铜离子抗性的 *At. Ferrooxidans* 的 Fe^{2+} 和元素硫的氧化能力及黄铜矿浸矿能力的差异。为了进一步探究 *At. ferrooxidans* 菌的抗铜机理,采用 Real time RT-PCR 法检测不同菌株在不同 Cu^{2+} 浓度下的 *Afe0022* 的 mRNA 差异表达。

1 实验

1.1 菌株

1.1.1 菌种资源和生长条件

本研究中的 3 个菌株分别来自广西大厂铜矿山(DC)、湖北大冶铜矿山(DY15、DY26)。

1.1.2 菌株的培养, Fe^{2+} 和元素硫的氧化测定

培养基(9K 基本培养基): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g/L, KCl 0.1 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 g/L, pH 2.0, 初始菌浓度为 0.5×10^7 cell/mL,利用直接细胞计数法做出生长曲线。利用重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)滴定法对培养基中 Fe^{2+} 浓度进行分析。1 mL 6 mmol/L 的 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (1.8 mg) 可以与 2 mg Fe^{2+} 起反应。二苯磺酸钠用作指示剂,当出现紫色时即为滴定的终点。由此测出菌株对 Fe^{2+} 的氧化能力。在进行元素硫氧化能力测定时,培养基为无 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的 9K 培养基,加入 10 g/L 的元素硫做为能源,绘制生长曲线,用 pH 值的变化来监控元素

硫的氧化。

为了进一步确定不同菌株的 Cu^{2+} 抗性,基于一定预实验的基础,在不同 Cu^{2+} 浓度(0.02~0.42 mol/L)的 9K 培养基中于 160 r/min 30 恒温状态下对三株菌进行培养^[13-14]。利用重铬酸钾滴定法($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)测定培养基中的 Fe^{2+} 浓度,若培养体系中 Cu^{2+} 浓度超过菌株的耐受能力,则 Fe^{2+} 不会被氧化。

1.2 黄铜矿精矿的生物浸出

1.2.1 黄铜矿精矿样品

本实验使用的黄铜矿精矿为广西德兴铜矿的 0.125 mm 粒径的矿粒,其化学组成见表 1。

表 1 黄铜矿精矿的主要成分

Table 1 Main components of chalcopyrite concentrate (mass fraction, %)

S	Zn	Pb	Fe	Ca	Cu	Co	Ni	Mg
29.39	1.28	22.6	21.41	0.24	24.65	0.06	0.03	0.08

1.2.2 黄铜矿精矿的生物浸出

利用摇瓶实验浸出黄铜矿精矿,无铁 9K 培养基加入 150 g/L 的黄铜矿精矿作为能源,初始菌浓度为 1.0×10^7 cell/mL^[15-16]。为了评估浸矿过程中初始 Cu^{2+} 浓度的影响,在该浸矿体系中分别加入不同初始浓度(0、0.001 和 0.05 mol/L)的 Cu^{2+} ,160 r/min 30 培养。在浸出过程中维持 pH 值在 2.0。利用光学显微镜对浸出体系中的细菌进行计数。在 36 d 的培养周期内利用原子吸收光谱 AA-6800 每 6 d 测定一次浸出液中的 Cu^{2+} 浓度。同时进行无菌空白对照实验,所有的实验同时设定 3 组平行实验。

1.3 Real-time RT-PCR

将 3 株菌分别接种于含有不同浓度 Cu^{2+} 的 9K 培养基中,并使接种后的菌浓度保持一致,分别培养至对数生长初期(Fe^{2+} 氧化率为 20%) 经 4 离心(12 000 r/min)分离 10 min,收集菌种,并立即提取细菌总 RNA。

用 TRIzol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA,用 RNeasy Mini Kit 试剂盒(Qiagen)纯化 RNA, RNase-free DNase set 试剂盒(Qiagen)去掉基因组 DNA 的污染,使用反转录试剂盒(Revert Aid TM First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI)合成 cDNA。

使用 MyiQTM single color Real-time PCR Detection system (BIO-Rad)和 SYBR Green Realtime PCR MasterMix 试剂盒(QPK-201, YOBO Co.Ltd.),

鉴定目标基因在不同 Cu^{2+} 浓度环境下的差异表达。以持家基因 *rrs* (16s rDNA) 为参照基因。实时定量 (Real-time) PCR 数据由 Optical system software (Version 1.0) 收集并处理。

2 结果与讨论

2.1 铜抗性菌的抗性能力测定

菌株 DY15、DY26 和 DC 对 Cu^{2+} 最高抗性分别为 0.40、0.22 和 0.04 mol/L (见图 1)。显然, 这 3 种菌在 Cu^{2+} 抗性上有很大的差异, DY15 的 Cu^{2+} 抗性最强, DC 的 Cu^{2+} 抗性最弱, 抗性曲线也显示菌株在不同 Cu^{2+} 浓度下的生长情况, 同时也可以看出, Cu^{2+} 的抑制作用主要是延长了菌株刚开始适应生长环境的时间, 并提高了菌浓度。

2.2 菌株的生长和对 Fe^{2+} 及元素硫的氧化能力 Fe^{2+}

DY15、DY26 和 DC 在以元素硫为能源的 9K 培养基中, 7 d 内菌数由 0.5×10^7 cell/mL 分别增加至 1.1×10^8 , 1.0×10^8 和 1.0×10^7 cell/mL, 同时 pH 值由 1.8 分别降至 0.8、1.2、1.3 (见图 2(a) 和 (b)), 显然 DY15 的硫氧化能力最强, DY26 居中, DC 最低。

当 Fe^{2+} 作为能源物质时, 在 40 h 内, DY15、DY26 和 DC 的菌浓度从 0.5×10^7 cell/mL 分别上升至 3.25×10^7 cell/mL、 4.75×10^7 cell/mL 和 5.25×10^7 cell/mL (见图 2(c))。经过 40 h, DY15、DY26 和 DC 的 Fe^{2+} 氧化率分别是 80%、100% 和 100%。说明当 Fe^{2+} 作为能源物质时, DY15 的细菌生长能力及对 Fe^{2+} 氧化能力最弱。比较这 3 株菌, 不难发现 DY15 的 Cu^{2+} 抗性最强, 元素硫氧化能力最强, 但 Fe^{2+} 氧化能力最弱。而 DC 的 Fe^{2+} 氧化能力最强, 但 Cu^{2+} 抗性及元素硫氧化能力均最弱 (见图 2(c) 和 (d)), 这为进一步的实际应用提供了一定的参考依据, 根据不同的环境, 应选择不同的菌株, 以达到在浸矿过程中的菌株浓度最高, 并且菌株的活性最高, 从而使得矿的浸出效果最佳。

2.3 黄铜矿精矿浸出

2.3.1 菌株在浸矿体系中的生长

据有关文献报道, 浸矿 36 d 时, 浸出液中 Cu^{2+} 约为 0.001 mol/L^[17]; 由于菌株 DC 对 Cu^{2+} 的最高耐受能力为 0.04 mol/L, 所以浸矿体系的初始 Cu^{2+} 浓度设置为 0、0.001 和 0.05 mol/L 3 个浓度梯度, 浸矿周期为 36 d。

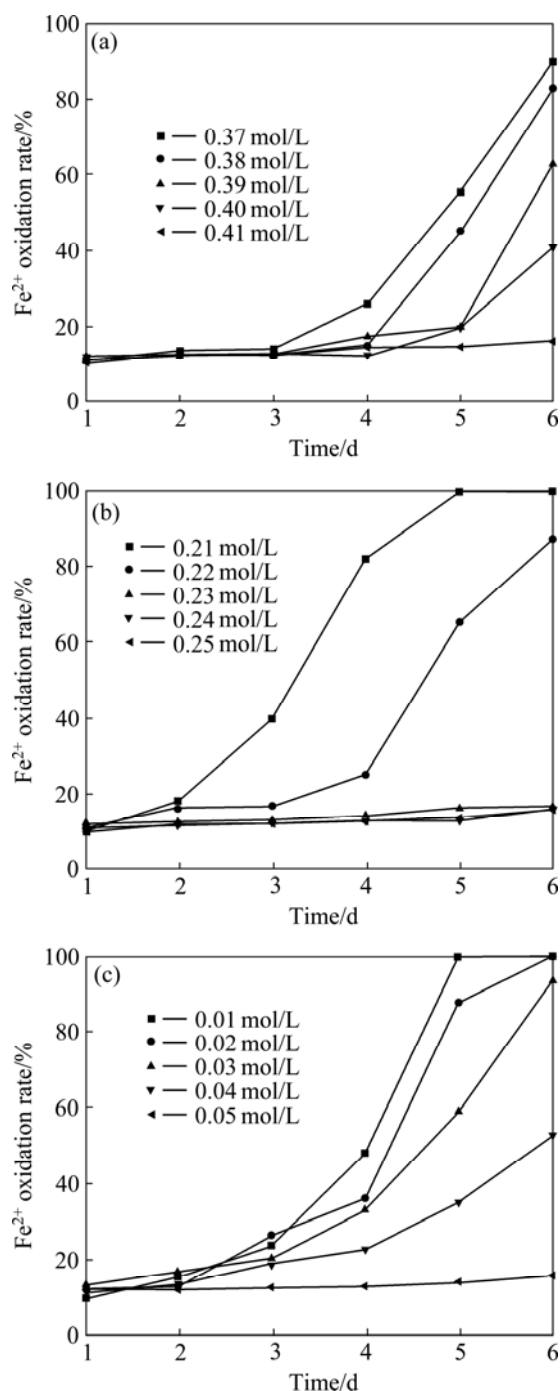


图 1 不同 Cu^{2+} 浓度下的 Fe^{2+} 氧化曲线

Fig.1 Oxidation curves of Fe^{2+} at different initial Cu^{2+} concentrations: (a) 0.40 mol/L, DY15; (b) 0.22 mol/L, DY26; (c) 0.04 mol/L, DC

在浸矿过程的第一周, 3 株菌的菌浓度均从 1.0×10^7 cell/mL 降至 0.4×10^7 cell/mL (见图 3), 说明此时细菌还不适应新的浸矿环境, 细菌生长缓慢并有部分细菌死亡。在第二周, 3 株菌逐渐适应浸矿环境, 开始进入指数生长期。经过 36 d 的浸矿, 菌的浓度都有

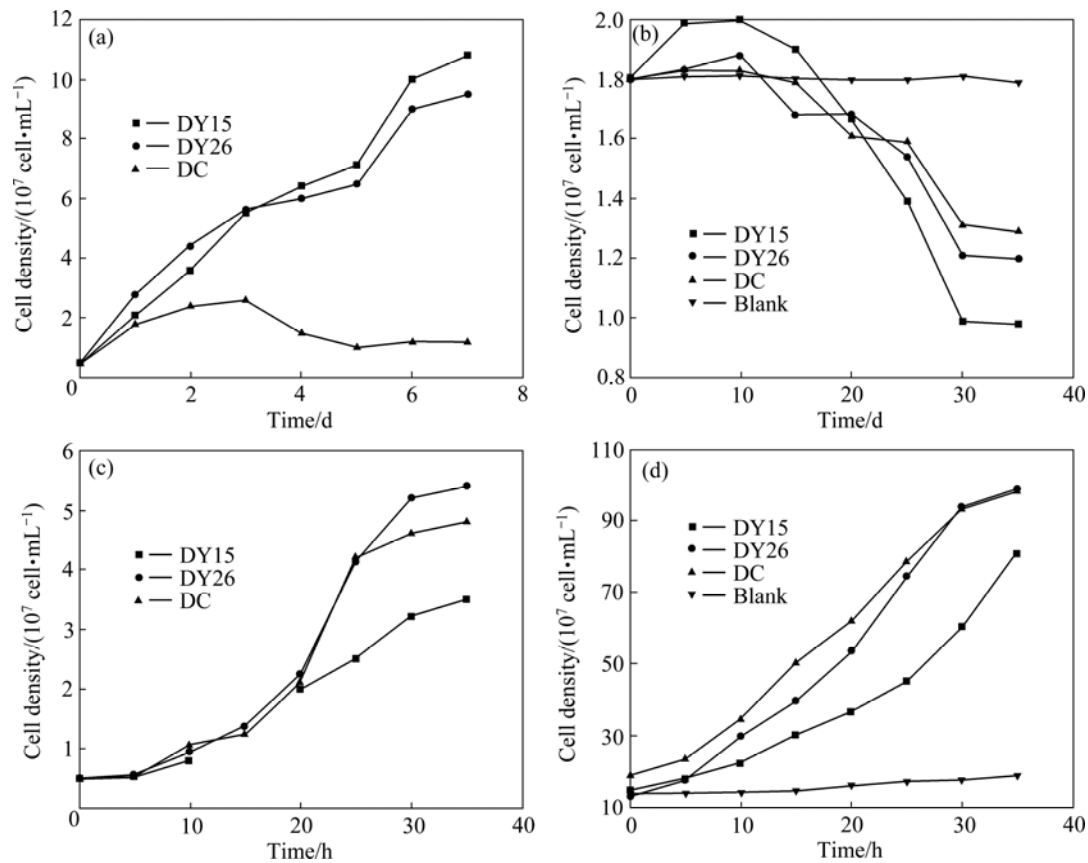


图 2 不同能源物质时的生长和元素硫氧化曲线

Fig.2 Growth(a) and sulfur oxidation(b) of 3 strains in 9K medium with different energy resources: (a), (b) Sulfur; (c), (d) FeSO₄·7H₂O

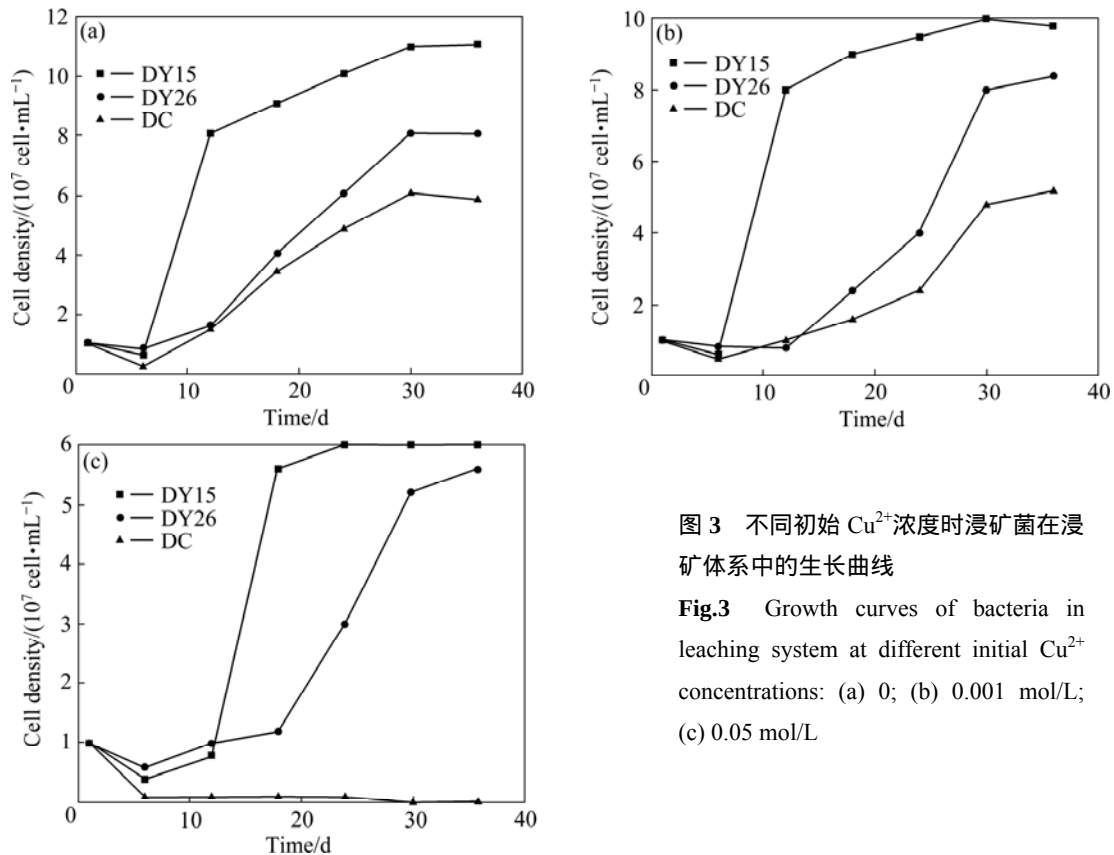


图 3 不同初始 Cu²⁺浓度时浸矿菌在浸矿体系中的生长曲线

Fig.3 Growth curves of bacteria in leaching system at different initial Cu²⁺ concentrations: (a) 0; (b) 0.001 mol/L; (c) 0.05 mol/L

明显上升,但每株菌浸矿效率明显不同,也说明了菌株对浸矿体系的适应程度不同。初始 Cu^{2+} 浓度为 0 时,浸矿体系中菌株 DY15、DY26 和 DC 的菌浓度从 1.0×10^7 cell/mL 分别上升至 1.1×10^8 cell/mL, 8.0×10^7 cell/mL 和 5.0×10^7 cell/mL(见图 3(a))。显然, DY15 在浸矿体系中菌浓度最高。同时,在以元素硫作为能源物质的 9K 培养基中, DY15 的菌浓度也是最高,达 1.1×10^8 cell/mL(见图 2(a)),但在 Fe^{2+} 作为能源物时,它的最高菌浓度只有 3.5×10^7 cell/mL(见图 2(c)),说明 DY15 能够高效氧化元素硫并获得能量,在黄铜矿精矿作为能源物质时也能够很好地生长,浸矿菌对不同的浸矿环境会表现出极大的差异性。

在 Cu^{2+} 初始浓度为 0.001 mol/L 时, DY15 的最高菌浓度为 1.0×10^8 cell/mL,也高于 DY26(7.75×10^7 cell/mL)和 DC(4.75×10^7 cell/mL)(见图 3(b)),说明 DY15 的生长能力仍然最高,但此浓度的 Cu^{2+} 对 3 株菌已有一定的抑制,3 株菌的浓度都要低于初始 Cu^{2+} 浓度为 0 时的菌浓度。当 Cu^{2+} 初始浓度上升至 0.05 mol/L 时,3 株菌的生长受到明显抑制,由于 0.05 mol/L 的 Cu^{2+} 浓度高于 DC 的最高耐受能力(0.04 mol/L),在此环境下 DC 不能生长。DY26 菌浓度为 5.6×10^7 cell/mL, DY15 菌浓度仍然最高(6.0×10^7 cell/mL)(见图 3(c))。显示了 DY15 在实际浸矿中一定的优越性,即使浸矿体系中的 Cu^{2+} 浓度较高,也可以延迟从浸矿液中提取铜的时间,这将减少实际浸矿中频繁提取铜带来的成本,具有一定的实际应用价值。

2.3.2 3 株菌在不同起始 Cu^{2+} 浓度时黄铜矿精矿浸出

在浸出的前 6 d,由于菌株还没适应新浸矿环境而导致菌浓度很低,所以黄铜矿的浸出效率很低(见图 4,其中 Mix 代表 3 株菌的混合浸矿)。随后,菌株进入对数生长期,浸矿效率也随之升高。当初始 Cu^{2+} 浓度为 0.001 mol/L 时,它对 3 株菌的抑制比较弱(见图 4(b)),浸矿结束后,浸矿体系中浸出的 Cu^{2+} 浓度(减初始 Cu^{2+})分别为 2.926 g (DY15)、2.432 g (DY26) 和 2.436 g (DC),这跟初始 Cu^{2+} 浓度为 0 时的浸出相似(见图 4(a))。说明了低浓度的 Cu^{2+} (0 到 0.001 mol/L)对 3 株菌的浸矿能力无影响。

当初始 Cu^{2+} 浓度为 0.05 mol/L 时(见图 4(c)),3 株菌的浸矿效率都较低,细菌的生长受到抑制(见图 3(c)),导致在此环境下浸矿能力的下降。在此条件下, DY15 的浸矿效率仍然高于 DY26 和 DC 的。但同时含有以上 3 株菌的混合浸矿效率要高于 DY15 纯菌浸矿的效率。

黄铜矿精矿可能受到 Fe^{3+} 和质子的攻击而溶解,方程式如下:

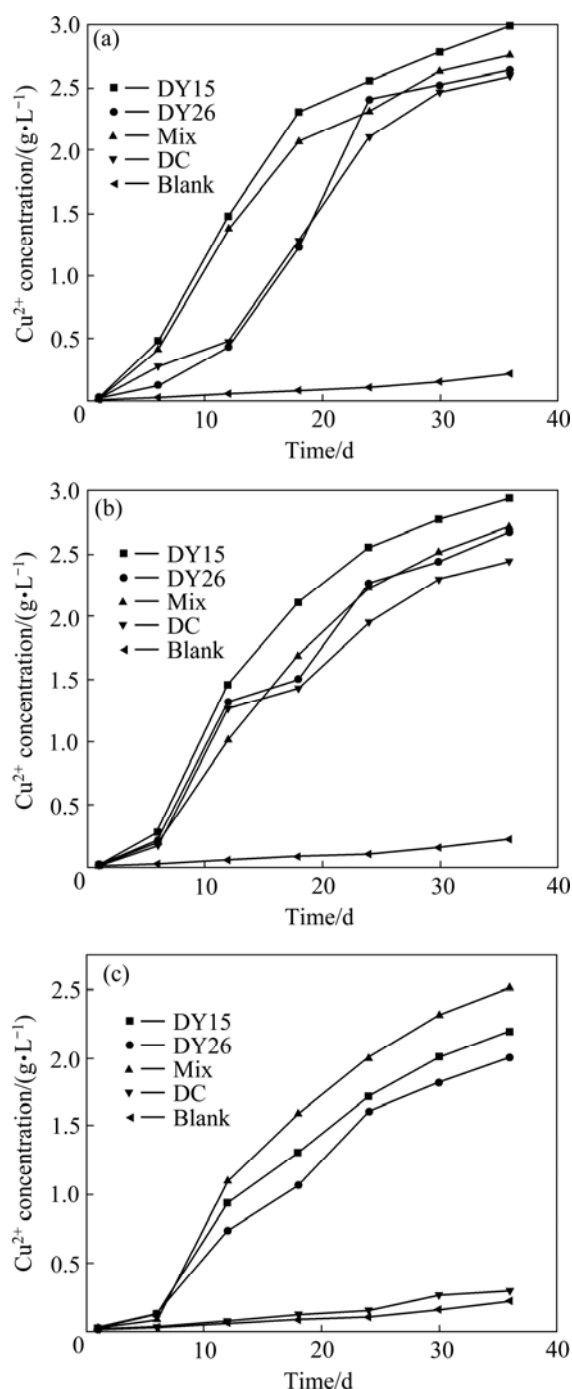
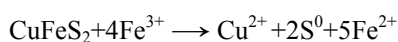


图 4 不同初始 Cu^{2+} 浓度时 Cu^{2+} 的浸出曲线

Fig.4 Cu^{2+} leaching curves in leaching system at different initial Cu^{2+} concentrations: (a) 0; (b) 0.001 mol/L; (c) 0.05 mol/L



嗜酸亚铁氧化硫杆菌(*At. ferrooxidans*)通过氧化 Fe^{2+} 、S 和还原性硫化物来获得能量。在浸矿中,黄铜矿是唯一的能源物质。因此,菌株的 Cu^{2+} 耐受能力、硫氧化能力与黄铜矿精矿的浸出效果直接相关。通过图 4(a)和(b)可发现,在单菌浸矿中, DY15 的浸出效率最高。一般而言,黄铜矿浸出效率主要依赖于菌种

各项生理特征,包括菌的生长速率、重金属抗性、对 Fe^{2+} 和元素硫以及还原性硫化物的氧化能力等。在浸矿过程中, DY15 能够如上述方程式描述的那样使黄铜矿精矿溶解,就是能够耐受一定浓度的 Cu^{2+} 并能氧化元素硫及其还原性氧化物。但是当浸矿体系的 Cu^{2+} 初始浓度很高时(0.05 mol/L)(见图 4(c)), 浸矿能力最强的 DY15 也受到一定的抑制。而在混合培养液中, DY26 的硫氧化能力虽然低于 DY15 的,但其对 Fe^{2+} 的氧化能力较强,所以,混合菌浸矿效率要高于单菌浸矿效率的原因,很可能是 DY15 和 DY26 的协同作用^[18],各株菌都有一定的浸矿优势,并在混合浸矿中,每种菌都将优势得以发挥,所以一般来说,混合浸矿的效果要优于纯菌浸矿的。

2.4 不同 Cu^{2+} 环境中 3 株菌抗铜基因 *Afe0022* 的差异表达

菌株 DC、DY26 和 DY15 在不同浓度 Cu^{2+} 胁迫下抗铜基因 *Afe0022* 的表达上调倍数如表 2 所列。

在 Cu^{2+} 作用时,只要尚未达到菌株最高耐受 Cu^{2+} 浓度,基因 *Afe0022* 的表达都上调,DC、DY26 和 DY15 菌在各自最高 Cu^{2+} 胁迫时的抗铜基因 *Afe0022* 表达量相对于无 Cu^{2+} 胁迫情况下的上调倍数分别为 18.31、55.53 和 186.22,这说明培养体系中 Cu^{2+} 对细菌的抗铜基因 *Afe0022* 的表达具有一定的刺激作用, DY15 的抗性最强,故其抗铜基因 *Afe0022* 表达量在最高耐受浓度时是 3 株菌中最高的,DC 对 Cu^{2+} 的抗性最弱,所以 DC 的抗铜基因表达量最低。且在菌株的最大 Cu^{2+} 耐受范围内,随着 Cu^{2+} 浓度的上升,抗铜基因 *Afe0022* 的表达量也上升。这也说明了菌株对 Cu^{2+} 的

抗性强弱,在一定程度上跟菌株自身抗铜基因 *Afe0022* 的表达量成正比关系。3 株菌抗铜基因 *Afe0022* 对同一 Cu^{2+} 浓度的敏感程度也不一样,在 Cu^{2+} 浓度为 0.04 mol/L 的时候,3 株菌抗铜基因 *Afe0022* 的表达增加量分别是: DC 为 18.31 倍, DY26 为 11.55 倍, DY15 为 1.17 倍。由此可以看出,对 Cu^{2+} 抗性越强的菌株,其对 Cu^{2+} 的敏感性越弱,也就是说,较低浓度的 Cu^{2+} 还不足以促使高耐受 Cu^{2+} 的菌株大量表达抗铜基因,但是对于不同菌株,一旦 Cu^{2+} 浓度达到一定高度,那么菌株抗铜基因 *Afe0022* 的表达量就会迅速提升。当培养体系中 Cu^{2+} 浓度超过菌株的最大耐受浓度时,菌株不能生长。

3 结论

1) 3 株 *At. ferrooxidans* DY15、DY26 和 DC 有着不同的 Cu^{2+} 耐受能力、元素硫氧化能力和 Fe^{2+} 氧化能力。其对 Cu^{2+} 的最大耐受浓度依次为 0.40 mol/L、0.22 mol/L 和 0.04 mol/L,对元素硫的氧化能力由大至小的顺序依次为 DY15、DY26 和 DC,对 Fe^{2+} 的氧化能力由大至小的顺序依次为 DY15、DY26 和 DC。

2) 3 株菌中 DY15 对 Cu^{2+} 的耐受能力最强,对元素硫的氧化能力最强,在纯菌浸矿过程中,在各种条件下 DY15 的生长速度均最快且浸矿效率最高,说明浸矿效率的高低与菌株的 Cu^{2+} 耐受能力和元素硫的氧化能力密切相关。

3) 在浸矿过程中,当浸矿体系中起始 Cu^{2+} 浓度很高时, DY15 的生长速度及浸矿效率仍高于 DY26 和 DC 的,但略低于混合菌浸矿效率。这可能与其 Fe^{2+} 的氧化能力较弱有关,并说明不同菌种之间的相互作用可有效提高浸矿效率。

4) 环境中 Cu^{2+} 浓度只要尚未达到细菌最高耐受 Cu^{2+} 浓度,抗铜基因 *Afe0022* 的表达都上调, Cu^{2+} 浓度高的环境中比在 Cu^{2+} 浓度低的环境中上调倍数更高,说明抗铜基因 *Afe0022* 对 Cu^{2+} 的胁迫是敏感的,且其表达量与菌株对 Cu^{2+} 耐受能力的强弱成一定的正相关。

REFERENCES

[1] SASAKI K, NAKAMUTA Y, HIRAJIMA T, TUOVINEN O H. Raman characterization of secondary minerals formed during chalcopyrite leaching with *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Hydrometallurgy, 2009, 95: 153–158.

表 2 不同 Cu^{2+} 浓度环境下抗铜基因 *Afe0022* 的差异表达
Table 2 Difference expression of *Afe0022* in *At. ferrooxidans* strain DC and DY26 under different Cu^{2+} concentrations

Bacteria	Cu^{2+} concentration/ (mol·L ⁻¹)	Fold expression
<i>At. ferrooxidans</i> strain DC	0.02	1.31
	0.04	18.31
<i>At. ferrooxidans</i> strain DY26	0.02	1.34
	0.04	11.55
	0.22	55.53
<i>At. ferrooxidans</i> strain DY15	0.04	1.17
	0.22	71.88
	0.40	186.22

- [2] ZHANG Lin, QIU Guan-zhou, HU Yue-hua, SUN Xiao-jun, LI Jian-hua, GU Guo-hua. Bioleaching of pyrite by *At. ferrooxidans* and *L. ferriphilum*[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18: 1415–1420.
- [3] WATLING H R, PERROT F A, SHIERS D W. Comparison of selected characteristics of *Sulfobacillus* species and review of their occurrence in acidic and bioleaching environments[J]. Hydrometallurgy, 2008, 93: 57–65.
- [4] QIU Mu-qing, XIONG Shui-ying, ZHANG Wei-min, WANG Gen-xuan. A comparison of bioleaching of chalcopyrite using pure culture or a mixed culture[J]. Minerals Engineering, 2005, 18: 987–990.
- [5] PETERSEN J, DIXON D G. Competitive bioleaching of pyrite and chalcopyrite[J]. Hydrometallurgy, 2006, 83: 40–49.
- [6] WATLING H R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides—A review[J]. Hydrometallurgy, 2006, 84: 81–108.
- [7] RAWLINGS D E, JOHNSON D B. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia[J]. Microbiology, 2007, 153: 315–324.
- [8] BOSECKER K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms[J]. FEMS Microbiol Rev, 1997, 20: 591–604.
- [9] FU Bo, ZHOU Hong-bo, ZHANG Ru-bing, QIU Guan-zhou. Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. and *Leptospirillum ferriphilum*[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62: 109–115.
- [10] CABRERA G, GOMEZ J M, CANTERO D. Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 2683–2687.
- [11] ABOU-SHANAB R A I, BERKUM P V, ANGLE J S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*[J]. Chemosphere, 2007, 68: 360–367.
- [12] XIA Jin-lan, PENG An-an, HE Huan, YANG Yu, LIU Xue-duan, QIU Guan-zhou. A new strain *Acidithiobacillus albertensis* BY-05 for bioleaching of metal sulfides ores[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2007, 17: 168–175.
- [13] SUZUKI I. Microbial leaching of metals from sulfide minerals[J]. Biotechnology Advances, 2001, 19: 119–132.
- [14] THIRD K A, CORD-RUWISCH R, WATLING H R. The role of iron-oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopyrite bioleaching[J]. Hydrometallurgy, 2000, 57: 225–233.
- [15] WANG Jun, QIN Wen-qing, ZHANG Yan-sheng, YANG Cong-ren, ZHANG Jian-wen, NAI Shao-shi, SHANG He, QIU Guan-zhou. Bacterial leaching of chalcopyrite and bornite with native bioleaching microorganism[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18: 1468–1472.
- [16] BEVILAQUA D, LEITE A L L C, GARCIA Jr O, TUOVINEN O. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks[J]. Process Biochemistry, 2002, 38: 587–592.
- [17] 李金龙, 李得春. 低品位原生黄铜矿生物浸出技术的应用实践[J]. 铜业工程, 2006, 2: 7–10.
- LI Jin-long, LI De-chun. The practice of low grade primary chalcopyrite bacteria leaching technology[J]. Copper Engineering, 2006, 2: 7–10.
- [18] ZHANG Yan-sheng, QIN Wen-qing, WANG Jun, ZHEN Shi-jie, YANG Cong-ren, ZHANG Jian-wen, NAI Shao-shi, QIU Guan-zhou. Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed culture[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18: 1491–1496.

(编辑 李艳红)