

在酵母粉或 Cu^{2+} 胁迫下古菌 *Ferroplasma thermophilum* 与两种中度嗜热细菌的协同作用

仇丽娟, 姬厚国, 王玉光, 万利利, 周洪波

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

摘要: 本研究目的为考察在酵母粉或 Cu^{2+} 胁迫下, 古菌 *Ferroplasma thermophilum* 在分别与其他两种中度嗜热细菌(*Leptospirillum ferriphilum* 和 *Acidithiobacillus caldus*)混合培养体系中的生态功能。实验在 250 mL 摇瓶中进行, 采用纯培养与混合培养对照的方法, 结合荧光定量 PCR(Quantitative PCR, Q-PCR)技术考察 *F. thermophilum* 分别与其他两种中度嗜热菌之间的协同作用。结果表明: 在 0.04%(w/v)酵母粉胁迫下, *L. ferriphilum* YSK 纯培养物的生长受到完全抑制, 而 *At. caldus* s2 纯培养物的生长不受抑制。*F. thermophilum* L1 与 *L. ferriphilum* YSK 混合培养减轻了酵母粉对 *L. ferriphilum* YSK 的抑制作用且促进其生长; *F. thermophilum* L1/*At. caldus* s2 混合培养体系中, *F. thermophilum* L1 的加入能够促进平稳期 *At. caldus* s2 的生长。在 5 g/L Cu^{2+} 胁迫下, *F. thermophilum* L1 与 *L. ferriphilum* YSK 混合培养时, *F. thermophilum* L1 生长被促进, 而 *L. ferriphilum* YSK 的生长受到抑制; *F. thermophilum* L1 与 *At. caldus* s2 混合培养能够有效地促进彼此生长, 且协同促进铁/硫氧化代谢。

关键词: 中度嗜热菌; *Ferroplasma thermophilum*; 协同作用; 酵母粉; Cu^{2+}

中图分类号: TG146.4

文献标志码: A

Synergies between archaea *Ferroplasma thermophilum* and two moderately thermophilic bacteria under stress of yeast extract or Cu^{2+}

ZHANG Li-juan, JI Hou-guo, WANG Yu-guang, WAN Li-li, ZHOU Hong-bo

(Key Laboratory of Biometallurgy, Ministry of Education,

School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: The purpose of this study was to explore the ecological functions of *Ferroplasma thermophilum* when it was mixed with *Leptospirillum ferriphilum* or *Acidithiobacillus caldus* under the stress of yeast extract or Cu^{2+} . Population dynamics of pure culture and mixed culture were compared by using Quantitative PCR, and synergies between *Ferroplasma thermophilum* and the other two moderately thermophilic bacteria were evaluated. The results show that the growth of pure *L. ferriphilum* YSK is inhibited under the stress of 0.04% (w/v) yeast extract. Yet, *L. ferriphilum* YSK grows well in the presence of *F. thermophilum* L1, which indicates that the toxicity of yeast extract to *L. ferriphilum* YSK is reduced in the mixed culture. The results also show that there is no influence of yeast extract on the growth of *At. caldus* s2 in the pure culture, and compared with the pure culture, the cell density of *At. caldus* s2 at the stationary phase increases in the mixed culture. Under the stress of 5 g/L Cu^{2+} , when *F. thermophilum* L1 and *L. ferriphilum* YSK are mix-cultured, the growth of *F. thermophilum* L1 can be promoted, while the growth of *L. ferriphilum* YSK is inhibited. The mixed culture of *F. thermophilum* and *At. caldus* has a positive effect on the growth of each other, and can mutually promote ferrous or sulfur oxidation under the stress of 5 g/L Cu^{2+} .

Key words: moderately thermophilic bacteria; *Ferroplasma thermophilum*; synergy; yeast extract; Cu^{2+}

近年来,随着分子生态学技术的不断发展,发现在很多浸矿体系中,先前报道最多的常温菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 不再是优势种群,而中度嗜热菌越来越引起众多研究者的关注^[1-5]。尤其中度嗜热的 *Ferroplasma* 属古菌在浸矿后期体系中大量存在^[2,6],但目前对该类古菌与其他浸矿菌之间的协同作用研究报道甚少,因而研究其生态功能,对加深冶金微生物及生物冶金过程的认识具有重要意义。

Ferroplasma 属古菌氧化亚铁,能在低酸、富含重金属离子等极端条件下大量存在^[2,6]。目前已有 3 种 *Ferroplasma* 古菌从该类环境中分离得到,包括 *Ferroplasma acidiphilum* Y^[7]、*Ferroplasma acidarmanus* Fer1^[8]、*Ferroplasma cupricumulans* BH2^[9]。而本实验室从某黄铜矿浸出液中分离得到了第 4 种: *Ferroplasma thermophilum*, 命名为 L1^[10]。该菌最适 pH 值为 1.0, 最适温度为 45℃, 利用亚铁获得能源, 在含有蛋白胨, 葡萄糖或酵母粉等培养基中兼性生长。由于浸矿微生物代谢分解产物或者铜萃取有机溶剂等有机物, 对自养细菌, 尤其是专性化能铁氧化自养菌(如 *Leptospirillum* 等)有毒性作用^[11-12], 抑制其生长或亚铁氧化能力, 最终降低铜浸出效率。此外, 浸矿体系中通常富含重金属离子, 且对浸矿菌有毒性抑制作用。而 *Ferroplasma* 属嗜酸古菌由于其耐酸、抗重金属及利用有机物等特殊性质已被广泛应用于生物氧化浸出硫化矿, 提高浸出率。如 OKIBE 和 JOHNSON^[13]发现, *Ferroplasma* MT17/*Leptospirillum* MT6/*At. caldus* 混合浸出黄铁矿效果最佳, *Ferroplasma* 通过消耗浸矿体系中有有机物与其他两种浸矿菌相互作用促进低酸下硫化矿氧化。因此, *Ferroplasma* spp. 在浸矿体系中起到重要作用。

在本研究中, 本文作者以本实验室筛选得到的 *Ferroplasma thermophilum* L1 作为研究对象, 考察在有机物(以酵母粉作为代表)和重金属离子(以 Cu²⁺作为代表)胁迫下 *F. thermophilum* L1 分别与 *At. caldus* s2、*L. ferriphilum* YSK 之间的协同作用, 以初步了解 *Ferroplasma* spp. 在生物冶金浸出中的生态功能。

1 实验

1.1 菌种及培养条件

本实验所用菌种 *At. caldus* s2, *L. ferriphilum* YSK 和 *F. thermophilum* L1 均由教育部生物冶金重点实验室分离保存。*At. caldus* s2、*L. ferriphilum* YSK 和 *F. thermophilum* L1 培养全部参照已报道文献的方

法^[10,14-15]。

1.2 实验方法

1.2.1 在酵母粉胁迫下 *F. thermophilum* L1 分别与 *At. caldus* s2、*L. ferriphilum* YSK 之间协同作用在 0.04%(w/v)酵母粉胁迫下, *F. thermophilum* L1 分别与 *At. caldus* s2、*L. ferriphilum* YSK 之间协同作用实验设计如表 1 所列。*F. thermophilum* L1 和 *L. ferriphilum* YSK 都以亚铁作为能源, 所以研究其在有机物胁迫下的协同作用的实验组均添加 50 g/L FeSO₄·7H₂O 以提供充足的能源; 而由于 *At. caldus* s2 以单质硫作为能源物质, 所以 *F. thermophilum* L1 与 *At. caldus* s2 之间有机物协同作用研究的 5 组实验组均添加 20 g/L FeSO₄·7H₂O 和 10 g/L 单质硫作为能源物质。所有实验组初始 pH 值均为 1.5, 培养温度为 45℃, 每隔 12 h 取样测定分析, 采用血球计数板法计算菌浓度。

表 1 有机物胁迫实验设计

Table 1 Experimental design under stress of yeast extract

Test No.	<i>F. thermophilum</i>	<i>L. ferriphilum</i>	0.04% Yeast extract	Mark
1	+	—	+	Fer
2	—	+	—	—L.f
3	—	+	+	+L.f
4	+	+	—	—X
5	+	+	+	+X

Test No.	<i>F. thermophilum</i>	<i>At. caldus</i>	0.04% Yeast extract	Mark
6	+	—	+	Fer
7	—	+	—	—s2
8	—	+	+	+s2
9	+	+	—	—X
10	+	+	+	+X

+ Containing *F. thermophilum*, *L. ferriphilum* or Yeast extract in culture

— Without *F. thermophilum*, *L. ferriphilum* or Yeast extract in culture

1.2.2 在 Cu²⁺胁迫下 *F. thermophilum* 分别与 *At. caldus*、*L. ferriphilum* 之间协同作用

Cu²⁺(分析纯 CuSO₄·5H₂O 为铜胁迫添加试剂)胁迫浓度为 5 g/L。在铜胁迫条件下, *F. thermophilum* 分别与 *At. caldus*、*L. ferriphilum* 之间协同作用的实验设

计如表 2 所列。能源物质及培养条件与 1.2.1 节的一致。

表 2 Cu²⁺胁迫实验设计

Table 2 Experimental design under stress of Cu ²⁺				
Test No.	<i>F. thermophilum</i>	<i>L. ferriphilum</i>	Yeast extract (w/v)	Mark
1	+	—	0.02%	Fer
2	—	+	—	0Lf
3	—	+	0.02%	2Lf
4	+	+	0.01%	1M
5	+	+	0.02%	2M

Test No.	<i>F. thermophilum</i>	<i>At. caldus</i>	Yeast extract (w/v)	Mark
6	+	—	0.02%	Fer
7	—	+	0.02%	2Ac
8	+	+	0.02%	2M

+Containing *F. thermophilum*, *L. ferriphilum* or Yeast extract in culture
— Without *F. thermophilum*, *L. ferriphilum* or Yeast extract in culture

1.3 Q-PCR 分析群落变化

纯培养或混合培养实验组的全基因组 DNA 用 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取。提取的全基因组 DNA 利用 NanoDrop[®] ND-1000 spectrophotometer (Gene Company limited)检测纯度及定量。*At. caldus* 和 *L. ferriphilum* 特异性引物参照 LIU 等^[16]的报道。*F. thermophilum* 特异性引参照 ZHANG 等^[17]的文献。

常规 PCR 反应在 T-Gradient Thermoblock PCR 仪 (Biometra, Göttingen, Gemnany)中进行。Quantitative PCR 反应所用仪器为 iCycler iQ Real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA)。具体群落定量分析参照 ZHANG 等^[17]和 ZAMMIT 等^[18]方法。

2 结果与讨论

2.1 在酵母粉胁迫下 *F. thermophilum* L1 与 *L. ferriphilum* YSK 之间协同作用

GAO 等^[14]研究发现, *L. ferriphilum* YSK 对酵母粉十分敏感, 0.04%~0.08%(w/v)酵母粉已对其有显著性抑制作用。*F. thermophilum* L1^[10]兼性自养菌, 酵母粉为其生长所必须, 其在 0.02%~0.05%酵母粉条件下均能够较好生长。因此, 在本研究中选取添加 0.04%(w/v)酵母粉作为胁迫条件。纯培养及混合培养体系细胞生长及群落结构变化见图 1 和 2。

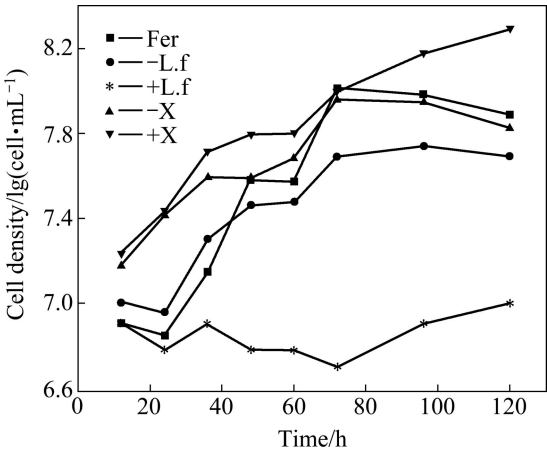


图 1 纯培养及混合培养实验组细胞生长曲线变化
Fig. 1 Variations of cell densities in pure culture and mixed culture

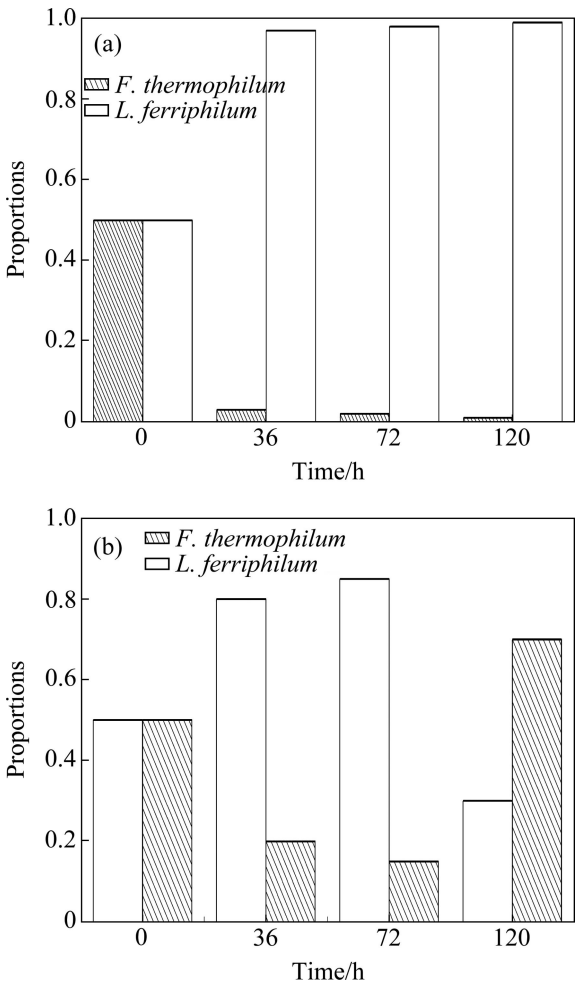


图 2 混合培养体系 *L. ferriphilum*/*F. thermophilum* 群落结构变化
Fig. 2 Molecular monitoring of bacterial community structure in *L. ferriphilum*/*F. thermophilum* mixed cultures at different times determined by Q-PCR: (a) Mixed culture without yeast extract; (b) Mixed culture with 0.04% yeast extract

结果表明,在 0.04% 酵母粉胁迫条件下, *L. ferriphilum* YSK 纯培养生长受到完全抑制(见图 1),这与 GAO 等^[14]的研究结果相符。如图 2(a)所示在不添加酵母粉的混合培养体系中, *L. ferriphilum* YSK 正常生长且占绝对优势,而 *F. thermophilum* L1 生长受到完全抑制。这进一步表明:酵母粉的存在对 *L. ferriphilum* YSK 生长产生抑制,但是为 *F. thermophilum* L1 正常生长所必需。

添加酵母粉的混合培养体系菌浓度显著高于各纯培养体系菌浓度(见图 1),由此可推测, *L. ferriphilum* YSK 在添加酵母粉的混合培养中的生长可能不再受到酵母粉抑制,Q-PCR 结果进一步验证了此推断的正确性(见图 2)。从图 2(b)所示混合培养体系群落变化可知, *F. thermophilum* L1 的加入解除了酵母粉的抑制作用,促进了 *L. ferriphilum* YSK 的生长,尤其在前 72 h。 *L. ferriphilum* YSK 在混合培养体系中不同时间(36、72 和 120 h)所占比例分别为 80%、85%和 30%,且其菌浓度显著高于有机物存在下的纯培养菌浓度(见表 3),其被促进生长提高的倍数最高达到 16 倍(见表 3)。在混合培养体系后期, *F. thermophilum* L1 占优势,其在混合体系中的菌浓度高于其纯培养的菌浓度,可能的原因是菌体在后期裂解或代谢分泌产物的大量累积维持其存在并促进其生长。

综合图 1 和 2 得出, *F. thermophilum* L1 的存在减轻了酵母粉对 *L. ferriphilum* YSK 的抑制作用,促进 *L. ferriphilum* YSK 在含酵母粉溶液培养中的生长;而菌体代谢或裂解产物促进或维持混合培养体系中 *F. thermophilum* L1 后期生长。

2.2 在酵母粉胁迫下 *F. thermophilum* L1 与 *At. caldus* s2 之间协同作用

由图 3 可知,酵母粉(0.04%)的存在对 *At. caldus* s2 生长没有抑制作用。这也与本课题组之前研究结果一致, *At. caldus* s2 可化能自养,能够利用单质硫、硫代硫酸钠等作为能源物质,在有机物(蛋白胨、酵母粉或葡萄糖)存在下正常生长。

在酵母粉胁迫下, *At. caldus*/*F. thermophilum* 混合培养体系菌浓度显著高于各纯培养菌浓度,但略低于两种纯培养菌浓度之和(见图 3)。通过 Q-PCR 进一步分析群落结构动态变化指出:与在有机物胁迫下的 *At. caldus* s2 纯培养相比, *F. thermophilum* L1 的加入提高了平稳期 *At. caldus* s2 的菌浓度(见表 4);在 72 h 平稳期时, *At. caldus* s2 在混合培养体系中的菌浓度达到 1.2×10^8 cell/mL,高于其纯培养的菌浓度(8.9×10^7 cell/mL)。在混合培养体系中, *F. thermophilum* L1 在前

表3 酵母粉胁迫下*L. ferriphilum*和*F. thermophilum*在纯培养及混合培养中不同时间的菌浓度比较

Table 3 Comparisons of *L. ferriphilum* or *F. thermophilum* cell densities between in pure culture and mixed culture with stress of 0.04% yeast extract

Time/h	Pure culture/ (10 ⁷ cell·mL ⁻¹)		Mixed culture/ (10 ⁷ cell·mL ⁻¹)	
	<i>L. ferriphilum</i>	<i>F. thermophilum</i>	<i>L. ferriphilum</i>	<i>F. thermophilum</i>
36	0.8	1.4	4.16	1.04
72	0.5	10.2	8.33	1.47
120	1	7.7	5.88	13.72

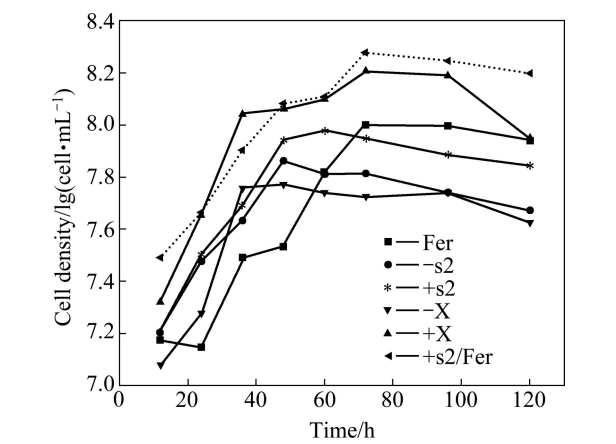


图3 纯培养和混合培养体系细胞生长曲线变化
Fig. 3 Variations of cell densities in pure or mixed culture (◄—Sum of *At. caldus* and *F. thermophilum* cell densities in their pure culture respectively under stress of 0.04% yeast extract)

期(36 h 前)大量存在,所占比例为 56%,其菌浓度高于纯培养的菌浓度(见表 4),原因是此阶段溶液中亚铁能源富足,且 *At. caldus* s2 将无机碳转化为有机碳促进 *F. thermophilum* L1 的生长^[19];中后期 *F. thermophilum* L1 在整个混合培养体系中所占比例(见图 4)及菌浓度(见表 4)随着时间的延长而逐渐减小,且低于其纯培养体系中的,原因可能是此时亚铁能源消耗殆尽,以及硫氧化比亚铁氧化产生更多能量^[20],促使 *At. caldus* s2 大量生长繁殖,进而消耗更多的氧,导致溶液中含氧量降低而抑制 *F. thermophilum* L1 生长,甚至导致其死亡。

2.3 *F. thermophilum* L1/*At. caldus* s2/*L. ferriphilum* YSK 分别 Cu²⁺抗性研究

在不同 Cu²⁺浓度条件下,3 种中度嗜热菌对数中期

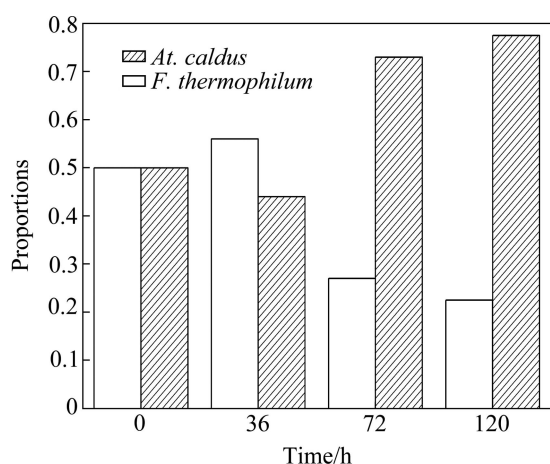


图4 在酵母粉胁迫下混合培养实验组 *F. thermophilum*/*At. caldus* 群落结构变化

Fig. 4 Molecular monitoring of bacterial community structure in *At. caldu*/*F. thermophilum* mixed culture at different times determined by Q-PCR under stress of 0.04% yeast extract

表 4 在酵母粉胁迫下 *F. thermophilum* 和 *At. caldus* 在纯培养和混合培养中不同时间的菌浓度比较

Table 4 Comparisons of *F. thermophilum* and *At. caldus* cell densities between in pure culture and mixed culture under stress of yeast extract

Time /h	Pure culture/ ($10^7 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$)		Mixed culture/ ($10^7 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	<i>At. caldus</i>	<i>F. thermophilum</i>	<i>At. caldus</i>	<i>F. thermophilum</i>
36	4.9	3.1	4.84	6.16
72	8.9	10	11.75	4.35
120	7	8.7	6.9	2

细胞浓度变化如图 5 所示。由图 5 可知, *F. thermophilum* L1 呈现出较强的铜抗性, 虽然随着 Cu^{2+} 浓度的增加, 其生长受到一定的抑制, 但 Cu^{2+} 浓度即使增加到 20 g/L 时, 其仍能生长, 且其细胞量和亚铁氧化率分别为 0 g/L Cu^{2+} 下的 36% 和 67.9%。 *L. ferriphilum* YSK 铜抗性最差, 随着 Cu^{2+} 浓度的增加, 其对数期菌浓度受到明显抑制; 当 Cu^{2+} 浓度达到 5 g/L 时, *L. ferriphilum* YSK 基本停止生长。该结果与已有研究报道一致^[17,21]: 浸矿后期, 低酸、高金属离子浓度及细胞裂解物或分泌物大量累积条件下, *L. ferriphilum* 所占比例减少, 而 *Ferroplasma* spp. 所占比例增加。与 *L. ferriphilum* YSK 相比, *At. caldus* s2 的铜抗性明显较强, 当 Cu^{2+} 浓度为 5 g/L 时, 菌浓度为 0 g/L Cu^{2+} 的 50%; 但当 Cu^{2+} 浓度大于等于 10 g/L 时, 其生长受到明显抑制且

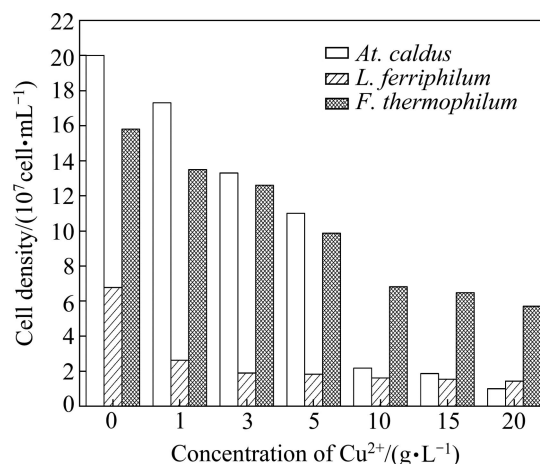


图5 Cu^{2+} 浓度对 *F. thermophilum* L1、*At. caldus* s2 和 *L. ferriphilum* YSK 生长的影响

Fig. 5 Effects of Cu^{2+} concentration on growth of *F. thermophilum* L1, *At. caldus* s2 and *L. ferriphilum* YSK at exponential phase

对数期菌浓度显著降低。基于以上结果, Cu^{2+} 胁迫实验中选择 5 g/L 的 Cu^{2+} 浓度作为胁迫条件。

2.4 在 Cu^{2+} 胁迫下 *F. thermophilum* L1 与 *L. ferriphilum* YSK 之间协同作用

由图 6 可知, 在 5 g/L Cu^{2+} 胁迫下, 添加酵母粉或不添加酵母粉的 *L. ferriphilum* YSK 纯培养生长受到完全抑制, 且亚铁氧化能力亦受到抑制, 132 h 后, 亚铁氧化率均仅为 29% 左右; 由于受到酵母粉和 Cu^{2+} 的双重抑制作用, 添加酵母粉的 *L. ferriphilum* YSK 纯培养生长受到的抑制作用更强。

因为酵母粉对 *L. ferriphilum* YSK 的生长有抑制作用, 而 *F. thermophilum* L1 在以亚铁作为唯一能源时不能正常生长, 所以本实验混合培养中选取 0.01% 和 0.02% 酵母粉两个梯度研究在 Cu^{2+} 胁迫下 *F. thermophilum* L1 与 *L. ferriphilum* YSK 之间协同作用。由图 6 可知, 两组混合培养体系的菌浓度显著高于纯培养实验组, 而从 Q-PCR 群落结构动态变化(见图 7)分析可见, 酵母粉添加量无论是 0.01% 还是 0.02%, *F. thermophilum* L1 在整个混合培养体系中均占绝对优势, 且其在混合培养中的菌浓度均高于自身纯培养的菌浓度(见表 5)。这是由于首先 *F. thermophilum* L1 自身铜抗性强; 其次 *L. ferriphilum* YSK 生长受到 Cu^{2+} 的抑制减少了亚铁能源的竞争作用, 且其细胞裂解产物可能进一步促进 *F. thermophilum* L1 生长。通过比较添加 0.01% 酵母粉混合体系(见图 7(a))和 0.02% 酵母粉混合体系(见图 7(b))发现, 在 0.02% 酵母粉

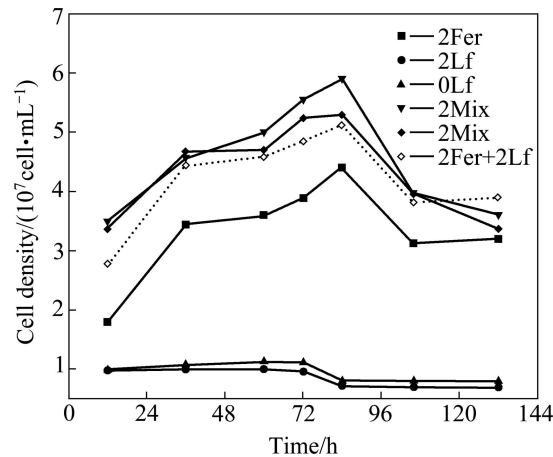


图 6 在 Cu^{2+} 胁迫下纯培养及混合培养体系菌浓度变化

Fig. 6 Variations of cell densities in pure or mixed culture under stress of 5 g/L Cu^{2+} ($\diamond$ —Sum of *L. ferriphilum* YSK (2Lf) and *F. thermophilum* L1(2Fer) cell density in their respective pure culture with 0.02% yeast extract)

体系中, *L. ferriphilum* YSK 的生长略微较好, 这是由于 *F. thermophilum* L1 最适酵母粉浓度为 0.02%。在此条件下, *F. thermophilum* L1 生长最佳, 不仅减轻了酵母粉对 *L. ferriphilum* YSK 的抑制作用, 同时还有可能促进 *L. ferriphilum* YSK 铜抗性生长。由表 5 可知, *L. ferriphilum* YSK 在混合体系中的菌浓度低于其纯培养体系的菌浓度, 这是由于有机物和铜双重抑制作用。

综上所述: 在 5g/L Cu^{2+} 胁迫下, *F. thermophilum* L1 与 *L. ferriphilum* YSK 混合培养中, *F. thermophilum* L1 的生长受到促进, 而 *L. ferriphilum* YSK 由于 Cu^{2+} 毒性及亚铁竞争等共同影响受到抑制。

2.5 Cu^{2+} 胁迫下 *F. thermophilum* L1 与 *At. caldus* s2 之间的协同作用

根据前文 2.2 节结果, 酵母粉对 *At. caldus* s2 的生长没有抑制作用, 所以本部分研究的 3 组实验体系均

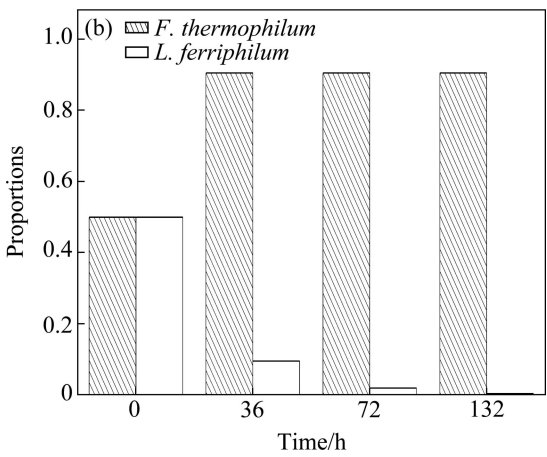
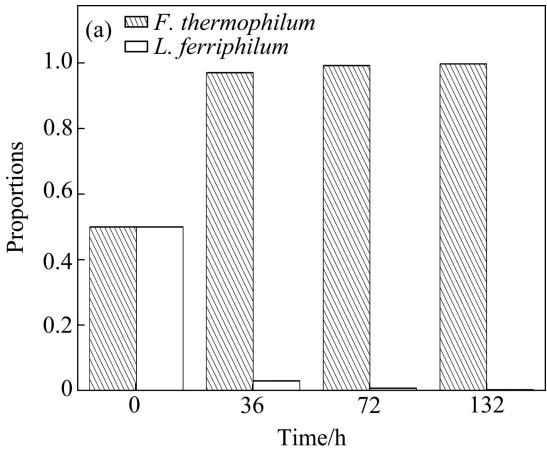


图 7 混合培养实验组 *F. thermophilum*/*L. ferriphilum* 群落结构变化

Fig. 7 Molecular monitoring of bacterial community structure in *F. thermophilum*/*L. ferriphilum* mixed cultures at different times determined by Q-PCR under stress of Cu^{2+} : (a) With 0.01% yeast extract; (b) With 0.02% yeast extract

添加了 0.02%的酵母粉, 以便研究两种中度嗜热菌之间的铜协同作用。

纯培养和混合培养菌浓度、 Fe^{2+} 及 SO_4^{2-} 浓度变化如图 8 所示。结果表明: 混合培养体系的菌浓度显著

表 5 在 Cu^{2+} 胁迫下 *F. thermophilum* 和 *L. ferriphilum* 在纯培养及混合培养不同时间的菌浓比较

Table 5 Comparisons of *F. thermophilum* and *L. ferriphilum* cell densities between in pure culture and in mixed culture under stress of Cu^{2+}

Time /h	Pure culture/(10 ⁷ cell·mL ⁻¹)		1M Mixed culture/(10 ⁷ cell·mL ⁻¹)		2M Mixed culture/(10 ⁷ cell·mL ⁻¹)	
	<i>F. thermophilum</i>	<i>L. ferriphilum</i>	<i>F. thermophilum</i>	<i>L. ferriphilum</i>	<i>F. thermophilum</i>	<i>L. ferriphilum</i>
36	3.44	1.07	4.54	0.135	4.140	0.430
72	3.89	1.11	5.204	0.036	5.028	0.101
132	3.2	0.8	3.64	0.006	3.261	0.010

1M containing 0.01% (w/v) yeast extract in mixed culture; 2M containing 0.02% (w/v) yeast extract in mixed culture

高于纯培养体系的, 且显著高于两种菌分别纯培养的菌浓度之和(见图 8(a)). 由此可推断, 铜胁迫混合培养体系中, 两种中度嗜热菌之间存在生长协同作用; 另外, 从 Q-PCR 分析群落结构及变化(见图 9)及通过一定换算得出混合培养体系中不同时间点各种菌的数量

与纯菌比较(见表 6). 由此可知: 与纯培养体系相比, 混合体系中 *F. thermophilum* L1 和 *At. caldus* s2 的菌浓度均较高. 该结果进一步证实: 在 Cu²⁺胁迫下, 两种菌混合培养能够有效协同生长.

由图 8(b)可以看出: 与纯培养相比, *F. thermophilum* L1 与 *At. caldus* s2 混合培养时, 亚铁完全氧化的时间提前近 24 h, 且混合体系中的 SO₄²⁻浓度显著高于纯培养体系中的, 即更多的单质硫被氧化. 由此可推测, 在 *F. thermophilum* L1 与 *At. caldus* s2 在 Cu²⁺胁迫下, 彼此之间存在一定的代谢协同促进作用.

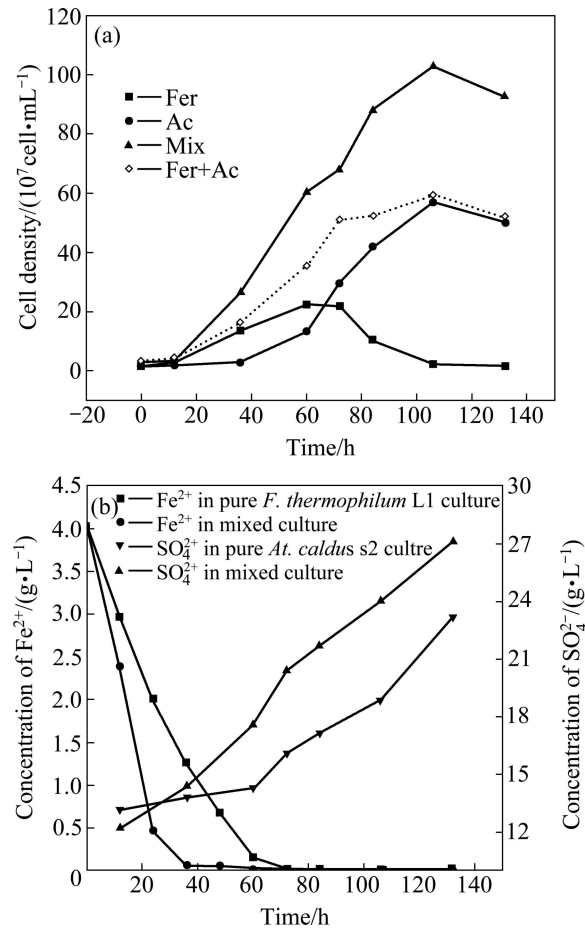


图 8 在 5g/L Cu²⁺胁迫下纯培养和混合培养中菌浓度的变化及 Fe²⁺和 SO₄²⁻浓度的变化

Fig. 8 Variations of cell densities (a) and concentrations of Fe²⁺ and SO₄²⁻ (b) in pure culture and in mixed culture under stress of 5 g/L Cu²⁺

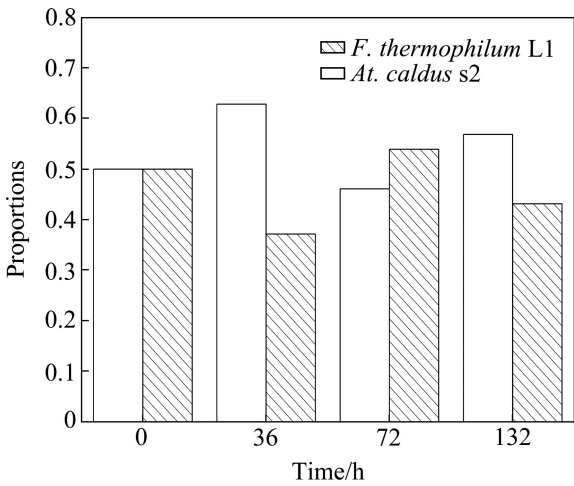


图 9 在 Cu²⁺胁迫下混合培养实验组 *F. thermophilum*/*At. caldus* 群落变化

Fig. 9 Molecular monitoring of bacterial community structure in *F. thermophilum*/*At. caldus* mixed culture at different times determined by Q-PCR under stress of Cu²⁺

3 结论

1) 在 0.04%(w/v)酵母粉胁迫下, *L. ferriphilum* YSK 生长被抑制; 当 *F. thermophilum* L1 加入 *L. ferriphilum*

表 6 在 Cu²⁺胁迫下 *F. thermophilum* /*At. caldus* 在纯培养及混合培养不同时间的菌浓度比较

Table 6 Comparisons of *F. thermophilum*/*At. caldus* cell densities between in pure culture and in mixed culture under stress of Cu²⁺ at different times

Time/h	Pure culture/(10 ⁷ cell·mL ⁻¹)		Mixed culture/(10 ⁷ cell·mL ⁻¹)	
	<i>At. caldus</i>	<i>F. thermophilum</i>	<i>At. caldus</i>	<i>F. thermophilum</i>
36	2.6	13.52	16.76	9.91
72	29.33	21.67	31.33	36.67
132	50	1.3	52.64	39.93

YSK 体系中混合培养时,减弱了有机物对 *L. ferriphilum* YSK 的抑制作用并促进其生长。*F. thermophilum* L1 的加入对 *At. caldus* s2 生长有促进作用,提高了平稳期 *At. caldus* s2 的菌浓度;而 *At. caldus* s2 对 *F. thermophilum* L1 的后期生长有一定抑制作用。

2) 在 5g/L Cu^{2+} 胁迫下,在 *F. thermophilum* L1 与 *L. ferriphilum* YSK 混合培养体系中, *F. thermophilum* L1 的生长受到促进,而 *L. ferriphilum* YSK 的生长由于 Cu^{2+} 毒性及亚铁竞争等共同影响受到抑制;*F. thermophilum* L1 与 *At. caldus* s2 混合培养时,能够有效促进彼此生长,且能够协同促进铁/硫氧化代谢。

REFERENCES

- [1] OKIBE N, GERICKE M, HALLBERG K B, JOHNSON D B. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 1936–1943.
- [2] HAWKES R B, FRANZMANN P D, PLUMB J J. Moderate thermophiles including “*Ferroplasma cupricumulans*” sp. nov. dominate an industrial-scale chalcocite heap bioleaching operation [J]. Hydrometallurgy, 2006, 83(1/4): 229–236.
- [3] ZENG Wei-ming, QIU Guan-zhou, ZHOU Hong-bo, PENG Juan-hua, CHEN Miao, TAN Su-nee, CHAO Wei-liang, LIU Xue-duan, ZHANG Yan-sheng. Community structure and dynamics of the free and attached microorganisms during moderately thermophilic bioleaching of chalcopyrite concentrate [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 7068–7075.
- [4] 刘 晰, 邬长斌, 曾伟民, 邱冠周, 王淀佐, 周洪波. 一种中高温富集混合菌对黄铜矿的浸出[J]. 稀有金属, 2009, 33(3): 396–400.
LIU Xi, WU Chang-bing, ZENG Wei-min, QIU Guan-zhou, WANG Dian-zuo, ZHOU Hong-Bo. Bioleaching chalcopyrite with a mixed moderate thermophilic enrichment [J]. The Chinese Journal of Rare Metals, 2009, 33(3): 396–400.
- [5] RAWLINGS D B. High level arsenic resistance in bacteria present in biooxidation tanks used to treat gold-bearing arsenopyrite concentrates: A review [J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18(6): 1311–1318.
- [6] EDWARDS K J, BOND P L, GIHRING T M, BANFIELD J F. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage [J]. Science, 2000, 287(5459): 1796–1799.
- [7] GOLYSHINA O V, PIVOVAROVA T A, KARAVAIKO G L, KONDRAT’EVA T F, MOORE E R B, ABRAHAM W R, LUNSDORF H, TIMMIS K N, YAKIMOV M M, GOLYSHIN P N. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(3): 997–1006.
- [8] DOPSON M, AUSTIN C B, HIND A, BOWMAN J P, BOND P L. Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(4): 2079–2088.
- [9] HAWKES R.B, FRANZMANN P D, O’HARA G, PLUMB J J. *Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaeon isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap [J]. Extremophiles, 2006, 10(6): 525–530.
- [10] 张汝兵. *Ferroplasma thermophilum* L1 的分离、鉴定及应用于黄铜矿浸出的研究[D].长沙: 中南大学, 2008: 18–31.
ZHANG Ru-bing. Isolation and characterization of *Ferroplasma thermophilum* sp. nov., a novel extremely acidophilic, moderately thermophilic archaeon and its role in bioleaching of chalcopyrite [D]. Changsha: Central South University, 2008: 18–31.
- [11] MAZUELOS A, N. IGLESIAS N, CARRANZA F. Inhibition of bioleaching processes by organics from solvent extraction [J]. Process Biochemistry, 1999, 35(5): 425–431.
- [12] ALEXANDER B, LEACH S, INGLEDEW W J. The relationship between chemiosmotic parameters and sensitivity to anions and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. Journal of General Microbiology, 1987, 133(5): 1171–1179.
- [13] OKIBE N, JOHNSON D B. Biooxidation of pyrite by defined mixed cultures of moderately thermophilic acidophiles in pH-controlled bioreactors: significance of microbial interactions [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 87(5): 574–583.
- [14] GAO Jian, ZHANG Cheng-gui, WU Xue-ling, WANG Hai-hua, QIU Guan-zhou. Isolation and identification of a strain of *Leptospirillum ferriphilum* from an extreme acid mine drainage site [J]. Annals of Microbiology, 2007, 57(2): 171–176.
- [15] QIU Guan-zhou, FU Bo, Zhou Hong-bo, Liu Xi, GAO Jian, LIU Fei-fei, CHEN Xin-hua. Isolation of a strain of *Acidithiobacillus caldus* and its role in bioleaching of chalcopyrite [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(9): 1217–1225.
- [16] LIU Chun-qiang, PLUMB J, HENDRY P. Rapid specific

- detection and quantification of bacteria and archaea involved in mineral sulfide bioleaching using real-time PCR [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(2): 330–336.
- [17] ZHANG Ru-bing, WEI Man-man, JI Hou-guo, CHEN Xin-hua, QIU Guan-zhou, ZHOU Hong-bo. Application of real-time PCR to monitor population dynamics of defined mixed cultures of moderate thermophiles involved in bioleaching of chalcopyrite [J]. *Applied Microbiology and Bioechnology*, 2009, 81(6): 1161–1168.
- [18] ZAMMIT C M, MUTCH L A, WATLING H R, WATKIN E L J. Evaluation of quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of biomining microorganisms in culture [J]. *Hydrometallurgy*, 2008, 94(1/4): 185–189.
- [19] JOHNSON D B. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 27(4): 307–317.
- [20] SAND W, GEHRKE T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria [J]. *Research in Microbiology*, 2006, 157(1): 49–56.
- [21] OKIBE N, GERICKE M, HALLBERG K B, JOHNSON D B. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 1936–1943.

(编辑 何学锋)