

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(2):244-250; 4 February 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

# 生物浸矿反应器中的微生物种群结构及其中可培养微生物的特征

刘艳阳<sup>1,2</sup>, 郭旭<sup>1,2</sup>, 姜成英<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

(<sup>2</sup> 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:**【目的】本文旨在了解生物浸矿反应器中的微生物种群结构及其中可培养微生物的特征。【方法】通过构建微生物冶金反应器中矿浆原样的 16S rRNA 基因文库,测定 16S rRNA 基因序列,分析矿浆中种群结构。同时在不同培养条件下,对样品进行富集培养,分离获得纯菌株;并对各个菌株的 16S rRNA 基因序列,生理生化特征及对不同矿物的氧化能力进行了分析。【结果】研究中所选生物浸矿反应器中主要的微生物物种有细菌: *Leptospirillum* sp., *Sulfobacillus* sp., *Acidithiobacillus* sp., *Spingomonas* sp. 及古菌 *Sulfolobus* sp., *Ferroplasma* sp. 等菌属。同时分离出 5 株纯菌株,这些菌分别与 *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 相似。分离获得的菌株具有氧化硫或二价铁和不同硫化矿的能力。【结论】生物浸矿反应器是个微生物种类相对简单的生境,利用非培养和培养技术全面地了解生物浸矿体系中的微生物群落及其生理、浸矿特性,有利于洞察生物浸矿过程中微生物种群结构,强化控制种群组成及浸矿活性,从而提高生物湿法冶金的效率。

**关键词:** 生物浸矿; 喜温硫杆菌; 硫化叶菌; 非培养技术

**中图分类号:** Q938    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0244-07

生物浸矿技术具有悠久的历史,早已被应用于难处理金属矿石的浸取和预处理<sup>[1]</sup>,与化学浸矿方法相比,该技术具有能耗低、对环境污染小、可以处理常规化学方法难处理的低品位矿石等优点,因而在环境问题日益严重、金属富矿匮乏的今天,越来越受到人们的关注<sup>[2]</sup>。

浸矿微生物主要是一些在酸性环境中生长的,可利用低价态铁或还原态无机硫化物作为电子供体的菌。这类菌具有嗜酸性,多为化能自养菌,也有兼性异养菌及异养菌,包括嗜酸中温菌、嗜酸耐热菌、嗜酸嗜热菌等,其中有细菌也有古菌。长期以来,人们一直认为氧化亚铁酸性硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) (以前被定名为

*Thiobacillus ferrooxidans*), 在浸矿过程中起主要作用,近年的研究却表明情况并非如此,当环境温度大于 40℃,小于 60℃时,钩端螺旋菌属 (*Leptospirillum* sp.), 如 *L. ferriphilum* 和新发现的古菌 *Ferroplasma* sp. 等在浸矿过程中起关键作用;而当环境温度大于 60℃时,一些嗜酸热古菌如 *Sulfolobus*、*Acidianus* 等却显示出极大的优势<sup>[3]</sup>。以往的研究工作主要集中于浸矿微生物的浸矿机理研究及浸矿条件的摸索<sup>[4]</sup>,对于浸矿生境中微生物的群落结构及各种群间的相互作用的研究相对较少。分子技术的发展促进了环境中微生物群落的研究,通过分析非培养和培养后生物浸矿样品,可以发现生物浸矿体系中的微生物群落与浸出条件的关系及体系中各种微生物

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (30670018 and 30870039)

\* 通信作者。Tel: +86-10-64807581; Fax: +86-10-64807421; E-mail: jiangy@sun.im.ac.cn

**作者简介:** 刘艳阳 (1982-), 女, 河南漯河人, 硕士, 研究方向为环境微生物学。E-mail: liuyy515@hotmail.com

**收稿日期:** 2009-07-01; **修回日期:** 2009-09-15

协同作用对金属浸出效率的影响<sup>[5]</sup>。因此,剖析生物浸矿反应器中的微生物群落结构,了解各种微生物的生理及浸矿特性,有利于加深对体系中各种微生物协同作用的理解,提高生物浸矿效率。

本研究通过分析矿浆原样中 16S rRNA 基因序列来确定生物浸矿反应器中的微生物群落组成与结构;同时在不同培养条件下,对样品进行富集培养,分离不同的菌株,对各菌株进行了初步鉴定及生理生化特征分析,并比较了各菌株对不同矿物的氧化能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:**样品来自于 4 个铜黄铁矿浸取生物反应槽,在不同时间取样两次,反应槽运行温度平均为 45 - 50℃,pH 为 1.0 - 1.5。

**1.1.2 培养基:**采用不同的培养基进行菌种的分

离、培养,自养及兼性异养菌株培养基组成及培养条件见表 1,固体培养基加 7 g/L Gelrite 胶(Sigma 公司)。分离异养菌的营养培养基组成为(g/L):鱼蛋白胨 10,牛肉膏 3,酵母粉 1,NaCl 5,维生素混合液 1 mL,pH 7.2 - 7.4,37℃ 培养。固体培养基加 15 g/L 琼脂粉。

### 1.3 构建基因文库

**1.3.1 总 DNA 的提取:**反应器样品总 DNA 提取按照 Laurent 方法<sup>[12]</sup>;样品在 4℃ 冰箱静置过夜后,离心收集菌体和矿浆颗粒的混合物。称取 1 g 此混合物,0.6 g 玻璃珠(直径 465-600 μm,Sigma 公司),振荡破碎细胞,经抽提、沉淀、洗涤后获得基因组总 DNA。以硫为能源生长的纯菌株基因组 DNA 按照 Marmur 法<sup>[13]</sup>提取。以 Fe<sup>2+</sup>为能源生长的纯菌株通过 0.22 μm 的滤膜抽滤收集菌体,利用 DNA 提取试剂盒(Tiagen)提取基因组 DNA。

表 1 自养及兼性异养菌株培养基及培养条件

Table 1 Composition of media and cultural conditions for autotrophic and heterotrophical microorganism

Component/(g/L)	StA <sup>a</sup>	StC <sup>b</sup>	MS9b <sup>c</sup>	9K <sup>d</sup>	Liq ( II ) <sup>e</sup>	FeTSB <sup>f</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4	0.4	0.1	3.0	0.2	1.3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2	0.2	0.04	0.5		0.28
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>					3	
KCl	0.1	0.1		0.1		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O					0.16	0.07
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.28
K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	0.15					
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	13.9	0.01	16.5	44.2		
Trace element solution <sup>g</sup> (mL)						1
S		5			10	
Yeast Extract	0.2	0.25				
Tryptone						1
pH	1.8	2.5	1.9	1.8	3.5	2.5
Temperature/℃	45	30	30	30	45	65
Reference	Norris P R <sup>[6]</sup>	Murray N G <sup>[7]</sup>	Romero J <sup>[8]</sup>	Kelly D P <sup>[9]</sup>	Hallberg K B <sup>[10]</sup>	Johnson D B <sup>[11]</sup>

<sup>a</sup>. For ferrous-oxidizing microbe, <sup>b</sup>. For sulfur-oxidizing microbe, <sup>c</sup>. For *Leptospirillum* sp., <sup>d</sup>. For *Acidithiobacillus ferrooxidans*, <sup>e</sup>. For *Acidithiobacillus caldus*, <sup>f</sup>. For *Sulfolobus* sp

<sup>g</sup>. Trace element solution (g/L): MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 8, NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O 4.5, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.22, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.03, V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.03, CoSO<sub>4</sub> 0.01

**1.3.2 16S rRNA 基因扩增:**扩增细菌 16S rRNA 基因的引物为通用引物<sup>[14]</sup> BPr: 5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3' 和 BPr: 5'-ACGGCTACCTTGTTA CGACT-3'。PCR 反应体系(50 μL)为:10 × buffer 5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4 μL, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, 25 μmol/L 引物各 1 μL, BSA 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 37 μL, Taq DNA 聚合酶 0.4 μL。PCR 反应条件为:94℃ 4 min;95℃ 40 s,48℃ 40 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。扩增古菌 16S rDNA 的引物为

通用引物<sup>[15]</sup> Ar20F: 5'-TTCCGGTTGATCCYGCCRG-3' 和 Ar958R: 5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3'。反应体系与扩增细菌 16S rRNA 的体系相同,反应条件基本相同,退火温度改为 55℃,延伸时间为 45 s。

**1.3.3 文库构建:**PCR 扩增产物经柱纯化(鼎国 PCR 产物纯化试剂盒)后,与 T-vector (T-easy, Promega 公司)连接并转化到大肠杆菌 JM109 中,氨苄平板蓝白斑筛选阳性克隆,每个平板随机挑选 50 个阳性克隆,分别在 LB 液体培养基中培养,提取质

粒,通过 *EcoR* I 酶切检验建库质量并考察文库的深度;测序分析文库筛选菌的类群。

#### 1.4 菌种分离纯化

将样品在上述不同培养基中(表1),于30℃及45℃富集培养10d左右。以S为能源的菌种,梯度稀释后在以 $K_2S_2O_4$ 为能源的固体培养基上划线分离纯化。以 $Fe^{2+}$ 为能源的菌种,待培养基颜色变成红棕色,梯度稀释后在固体培养基上涂布分离,30℃及45℃培养7d左右,待长出铁锈色单菌落,挑取单菌落再在固体培养基上连续分离纯化,显微镜观察,直至菌体形态一致。

#### 1.5 $S^0$ 、 $Fe^{2+}$ 氧化及矿物浸出实验

将硫氧化菌株或 $Fe^{2+}$ 氧化菌株分别接入Liq(II)或St.A液体培养基,加入灭好菌的硫粉或矿粉(黄铁矿、金精矿、硫精矿、黄铜矿),以不加菌体为对照,30℃摇床培养,每24h测定溶液中 $SO_4^{2-}$ 、 $Fe^{2+}$ 或 $Cu^{2+}$ 的浓度。

#### 1.6 测定方法

$Fe^{2+}$ 的测定采用邻菲罗啉法<sup>[16]</sup>。 $SO_4^{2-}$ 浓度的测定采用Pb-EDTA滴定法<sup>[17]</sup>(宋金如等2002)。 $Cu^{2+}$ 浓度的测定采用双环己酮草酰二脲(BCO)分光光度法<sup>[18]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 矿浆原样中微生物菌群的组成

从两次取样建库的*EcoR*I酶切图谱看,反应器中细菌应该有3-4种不同的类型;而古菌文库单一,酶切条带只有一种,挑取10-20个不同酶切分型的菌落进行16S rRNA基因测序,两次建库的序列分析结果(表2)均表明4个反应槽矿浆样品中的主要微生物类群属于细菌 *Leptospirillum*, *Sulfobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Spingomonas* 属及古菌 *Ferroplasma* 属等,与各属菌种16S rRNA基因相似性的范围在98-99.9%;细菌在微生境中的丰度分别为57%-93% (*Leptospirillum*), 0-20% (*Sulfobacillus*), 5%-21% (*Acidithiobacillus*)及0-21% (*Spingomonas*),而古菌种类单一,丰度为100%。菌群分布表明在所选反应器及中高温操作条件下,铁氧化细菌 *Leptospirillum* 所占比例较高,可能为主要的功能菌,负责 $Fe^{2+}$ 氧化;耐中高温硫杆菌 *Acidithiobacillus* 和 *Sulfobacillus* 在该环境中也占有较大的比例,负责反应器中硫及其他还原型硫化化合物的氧化;此外反应器中还有中温古菌 *Ferroplasma* 存在,该结果与Rawlings等人对中高温浸矿体系菌群的分析结果一致。异养菌 *Sphingomonas echinoides* 在浸矿体系中的作用还待进一步研究。

表2 生物浸矿反应器中微生物的种类及丰度

Table 2 The varieties and abundance of microorganism in the bioleaching reactors

Sample No.	<i>Leptospirillum</i> sp.		<i>Sulfobacillus</i> sp.		<i>Acidithiobacillus</i> sp.		<i>Spingomonas</i> sp.		Total number of clones	
	clones/abundance		clones/abundance		clones/abundance		clones/abundance		first <sup>a</sup>	second
	first <sup>a</sup>	second	first <sup>a</sup>	second	first <sup>a</sup>	second	first <sup>a</sup>	second		
1#	15/88%	9/69%	1/6%	1/7.7%	1/6%	2/15%	0	1/7.7%	17	13
2#	15/75%	8/57%	1/5%	0	1/5%	3/21%	3/15%	3/21%	20	14
4#	13/93%	9/82%	0	0	1/7%	2/18%	0	0	14	11
5#	8/80%	6/60%	1/10%	2/20%	1/10%	2/20%	0	0	10	10

abundance = (Clones/Total number of clones) % ; <sup>a</sup> Reference<sup>[19]</sup>

### 2.2 菌种分离培养及鉴定结果

经过在不同培养基及不同培养条件下的富集及分离,在培养温度30℃,以还原型S为能源的培养条件下分离得到了菌株SM-1, SM-2,这两株菌在固体平板上呈半透明菌落,显微镜下为短杆状,革兰氏染色阴性,能利用 $S^0$ ,  $K_2S_4O_6$ ,  $Na_2S$ ,  $Na_2S_2O_3$ 为能源生长,但不能利用 $Fe^{2+}$ 为能源生长。经16S rRNA基因序列分析及BLAST比对,结果表明菌株SM-1与*A. caldus*的相似性为99.8%, SM-2与*A. thiooxidans*的相似性为99.9%。

在培养温度为30℃,以 $Fe^{2+}$ 为能源的培养条件下分离得到了菌株TSB-2-6, Lf A1,这两株菌在固体平板上呈铁锈色菌落,革兰氏染色阴性,可运动。

TSB-2-6为杆状菌,能利用 $S^0$ ,  $Fe^{2+}$ 和硫化矿物为能源生长。Lf A1为弧状或螺旋状菌,能利用 $Fe^{2+}$ 和硫化矿物为能源生长,不能利用 $S^0$ 或有机物为能源生长。经16S rRNA基因序列分析及BLAST比对,结果表明菌株TSB-2-6与*A. ferrooxidans*的相似性为99.6%, Lf A1与*L. ferriphilum*的相似性为99.9%。

在培养温度为45℃,以 $Fe^{2+}$ 为能源培养得到了菌株St.A-5-4,该菌在固体平板上菌落初始为乳白色,4-5d后中心变为铁锈色,外围仍为乳白色。革兰氏染色阳性,不运动,杆状,可形成芽孢。能利用 $S^0$ ,  $Fe^{2+}$ 和硫化矿物为能源生长,不能利用酵母浸膏为唯一能源生长,但酵母浸膏可作为生长因子促进该菌生长。经16S rRNA基因序列分析及BLAST比

对, 结果表明菌株 St. A-5-4 与 *S. thermosulfidooxidans* 的相似性为 99.6%。各菌株的形态、生理及生化特

性见图(1)和表(3)。

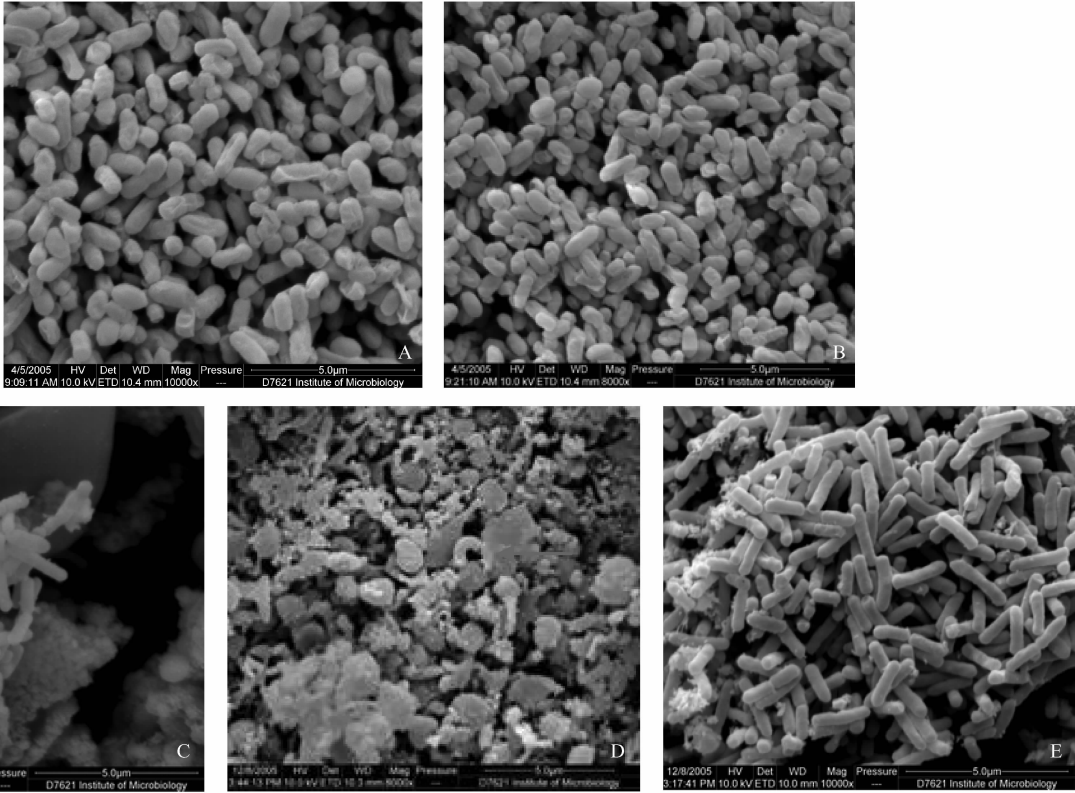


图 1 富集培养获得菌株的形态 (STE 照片)

Fig. 1 Scanning electron micrograph of the strains. A; SM-1 (10000 ×); B; SM-2 (8000 ×); C; St. A-5-4 (10000 ×); D; Lf A1 (8000 ×); E; TSB-2-6 (10000 ×).

表 3 富集培养获得菌株的生理生化特征

Table 3 The physiology and biochemistry character of the strains

Strain	Gram stain	Spore	Energy utility	Organic carbon	Optimal temperature	Optimal pH	16S rRNA gene sequences similarity
SM-1	-	-	$S^0$ , $K_2S_4O_6$ , $Na_2S$ , $Na_2S_2O_3$	-	30 - 40°C	2.5 - 3.0	<i>A. caldus</i> 99.8%
SM-2	-	-	$S^0$ , $K_2S_4O_6$ , $Na_2S$ , $Na_2S_2O_3$	-	25 - 37°C	2.0 - 4.0	<i>A. thiooxidans</i> 99.9%
TSB-2-6	-	-	$S^0$ , $K_2S_4O_6$ , $Na_2S$ , $Na_2S_2O_3$ , $Fe^{2+}$ , MS	-	30 - 35°C	2.0 - 2.5	<i>A. ferrooxidans</i> 99.6%
Lf A1	-	-	$Fe^{2+}$ , MS	-	40 - 45°C	2.0 - 2.5	<i>L. ferriphilum</i> 99.9%
St. A-5-4	+	+	$S^0$ , $K_2S_4O_6$ , $Na_2S$ , $Na_2S_2O_3$ , $Fe^{2+}$ , MS	-	40 - 55°C	2.0 - 2.5	<i>S. thermosulfidooxidans</i> 99.6%

MS; metal sulfide minerals

对照菌种分离培养结果及反应器样品原位菌群分析结果可以发现, 通过目前的分离培养方法很难获得自然生境中存在的全部微生物; 而且对于生境中丰度较低的微生物通过原位分析检测也存在一定的困难, 如分离得到的 *A. ferrooxidans* 和 *A. thiooxidans*, 在建库分析中并未发现, 因此结合原位分析和传统的培养方法对于了解自然界的微生物尤其是功能微生物具有重要意义。

### 2.3 菌株对 $Fe^{2+}$ 及不同矿物的氧化能力比较

纯菌株培养发现, 菌株 SM-1, SM-2 可以氧化  $S^0$  生成硫酸, 却不能利用  $Fe^{2+}$  为能源生长。图 2 的结果表明, 菌株 SM-1, SM-2 氧化硫的过程前 3 d 较为缓慢, 后 4 d 氧化速度较快 (以生成硫酸根浓度计), 分别为 0.01 mol/L/d, 0.012 mol/L/d。

菌株 TSB-2-6 和 Lf A1 氧化  $Fe^{2+}$  的能力较强 (以溶液中  $Fe^{2+}$  浓度减少量计), 图 3 的结果表明, 在中温条件下菌株 TSB-2-6 氧化  $Fe^{2+}$  的速率比 Lf

A1 稍快,分别为 37.2 mg/L/h、36.7 mg/L/h。

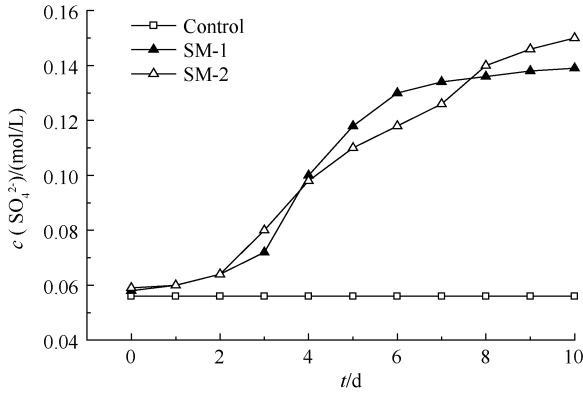


图 2 菌株 SM-1 和 SM-2 氧化元素硫的能力

Fig. 2 The ability of sulfur oxidation of strain SM-1 and SM-2.

菌株 TSB-2-6 和 Lf A1 对黄铁矿、金精矿、硫精矿及黄铜矿等不同矿石的氧化结果见图 4,在中温条件下菌株 TSB-2-6 氧化矿物的速率比 Lf A1 稍快,氧化速率以浸取液中可溶性总铁(包括  $Fe^{2+}$  和  $Fe^{3+}$ )或  $Cu^{2+}$  浓度计,TSB-2-6 对黄铁矿,金精矿及

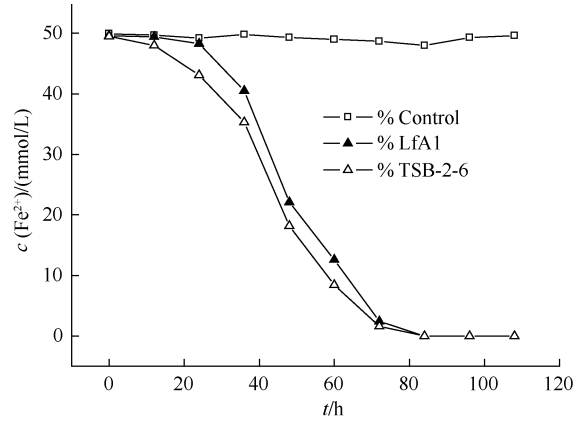


图 3 菌株 TSB-2-6 和 Lf A1 氧化  $Fe^{2+}$  的能力

Fig. 3 The ability of  $Fe^{2+}$  oxidation of strain TSB-2-6 and Lf A1 (30°C, pH2.0).

硫精矿的氧化速率分别为 100、195、83 mg/L/d, Lf A1 不能够氧化黄铁矿,可以氧化金精矿及硫精矿,氧化速率分别为 165 和 92 mg/L/d,10 天内对难处理黄铜矿的氧化速率分别为 820 mg/L/d (TSB-2-6) 和 580 mg/L/d (Lf A1)。

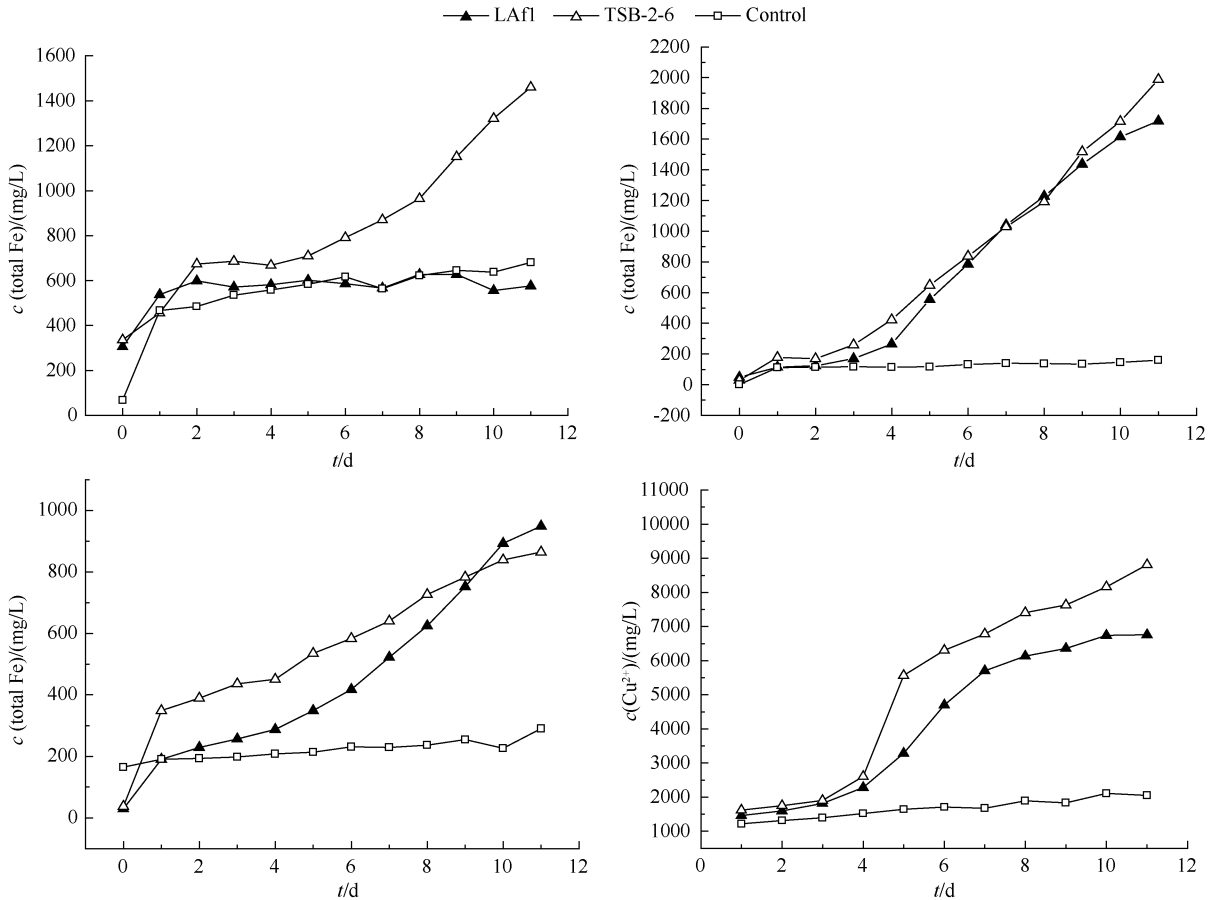


图 4 菌株 TSB-2-6 与 Lf A1 在 30°C, pH2.0 时对不同矿石的氧化

Fig. 4 The oxidation of strain TSB-2-6 and Lf A1 to different ore (30°C, pH2.0). A: Pyrite; B: Gold concentrate; C: Pyrite concentrate; D: chalcopyrite.

### 3 讨论

生物浸矿反应器是个微生物种类相对简单的生境,利用分子生物学手段,通过构建反应器矿浆中非培养微生物的 16S rRNA 基因文库,可以较全面地发现生物浸矿体系中的微生物群落,从文库分析结果可以看出,研究中所选浸矿反应器中既有细菌菌属如 *Leptospirillum*, *Sulfobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Spingomonas*, 也有古菌 *Ferroplasma* 等菌种;有氧化硫及氧化 Fe(II) 的自养微生物,也有功能未知的异养微生物如 *S. echioides* 等。从各菌在反应器中分布的丰度,可以发现在反应器操作条件下(45–50℃, pH 2.0), 中等嗜温菌 *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* 与 *Acidithiobacillus caldus* 在环境中占优势,该结果不仅显示了生物浸矿反应器中的微生物群落结构,也可作为分离培养纯菌株的指导。

纯培养技术是获得环境中微生物菌种的基础,但一种合成培养基的营养结构很难适应不同生境或自然环境中微生物的多样性,不能分离得到尽可能多的菌种,而根据 16S rRNA 文库分析结果,分别选择针对不同菌种的培养基及培养条件进行菌种的富集培养,分离得到了 75% 的未培养技术检测到的细菌,同时得到两株非培养技术未检测出的细菌:SM-2 (*A. thiooxidans*) 和 TSB2-6 (*A. ferrooxidans*),但未分离得到异养菌 *Spingomonas* 及古菌 *Ferroplasma*, 由此可见只有将非培养技术、富集培养技术及其它手段相结合,才有利于培养得到更多的微生物菌种,更全面地了解环境中的微生物群落结构。

对 S, Fe<sup>2+</sup> 及不同矿物的氧化结果表明:研究中分离得到的菌株 SM-1 和 SM-2 具有氧化还原型硫的能力,中温条件下,菌株 TSB-2-6 对铁(II) 的氧化能力略胜于菌株 Lf A1, 这是因为 Lf A1 属于 *Leptospirillum* 菌属,是中度嗜温菌,其最佳生长及氧化温度为 40–45℃, 而 TSB-2-6 与 *A. ferrooxidans* 相似,为中温菌,其最佳生长及氧化温度为 30–35℃。如前所述,当环境温度大于 40℃, 小于 60℃ 时,钩端螺旋菌属 (*Leptospirillum*. sp) 的 *L. ferriphilum* 等在浸矿过程中起关键作用,而环境温度小于 40℃ 时,中温菌如 *A. ferrooxidans* 等占优势。

SM-1, SM-2, TSB-2-6, Lf A1, St. A-5-4 等菌株的最佳浸出条件及体系中各种微生物协同作用对金属浸出效率的影响有待于进一步研究。因此,了解各种微生物的生理及浸矿特性,有利于加深理解体系中各微生物的协同作用,提高生物浸矿效率。

### 参考文献

- [ 1 ] Olson GJ, Brierley JA, Brierley CL. Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63(3):249-57.
- [ 2 ] Dopson M, Lindström EB. Analysis of community composition during moderately thermophilic bioleaching of pyrite, arsenical pyrite, and chalcopyrite. *Microbial Ecology*, 2004, 48(1):19-28.
- [ 3 ] Rawlings DE. *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Process*. Berlin: Springer-Verlag, 1997.
- [ 4 ] Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, et al. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63:239-248.
- [ 5 ] Pizarro J, Jedlicki E, Orellana O, et al. Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62:1323-1328.
- [ 6 ] Norris PR, Clark DA, Owen JP. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology*, 1996, 142:775-783
- [ 7 ] Murray NG, Shelly MD, Douglas ER. Isolation of a new broad-host-range IncQ-like plasmid, pTC-F14, from the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* and analysis of the plasmid replicon. *The Journal of Bacteriology*, 2001, 183(11):3303-3309.
- [ 8 ] Romero J, Yañez C, Vásquez M, et al. Characterization and identification of an iron-oxidizing *Leptospirillum*-like bacterium, present in the high sulfate leaching solution of a commercial bioleaching plant. *Research in Microbiology*, 2003, 154:353-359.
- [ 9 ] Kelly DP, Harrison AH. Genus *Thiobacillus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3. 1<sup>st</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989.
- [ 10 ] Hallberg KB, Lindstrom EB. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology*, 1994, 140:3451-3456.
- [ 11 ] Johnson DB, Macvicar JHM, Rolfe S. A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, 7:9-18.
- [ 12 ] Laurent FM, Philippot L, Hallet S, et al. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis method. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67:2354-2359.

- [13] Marmur M. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology*, 1961, 3:208-218
- [14] Devereux R, Willis SG. Amplification of ribosomal RNA sequences. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1995.
- [15] Beja O, Koonin EV, Aravind L, et al. Comparative genomic analysis of archaeal genotypic variants in a single population and in two different oceanic provinces. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68:335-345.
- [16] Tamura H, Goto K, Yotsuyanagi T, et al. Spectrophotometric determination of iron ( II ) with 1, 10-phenanthroline in the presence of large amounts of iron ( III ). *Talanta*, 1974, 21:314-318.
- [17] 宋金如, 刘淑娟, 朱霞萍. 测定水中硫酸根方法的概述. 华东地质学院学报 ( *Journal of East China geological institute* ), 2002, 25 ( 2 ):154-158.
- [18] 成文等著. 合金钢化学分析. 北京:冶金工业出版社, 1973.
- [19] Chen ZW, Liu YY, Wu JF, et al. Novel bacterial sulfur oxygenase reductases from bioreactors treating gold-bearing concentrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74:688-698.

## Microbial diversity and characteristics of cultivable microorganisms in bioleaching reactors

Yanyang Liu<sup>1,2</sup>, Xu Guo<sup>1,2</sup>, Chengying Jiang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(<sup>2</sup> Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] In order to study the microbial diversity and the characteristics of cultivable microorganisms in bioleaching reactors. [ **Methods** ] Both conventional culture technique and analysis of a 16S rRNA sequence library were used. The pure cultures were isolated by enriching the samples under different cultural conditions. The morphology characters, physiology and biochemistry characters, genetic characters and oxidation efficiency to different minerals of cultured isolates were analyzed. [ **Results** ] The microbial community in bioleaching reactors identified through the gene clone libraries were closely related to bacteria including *Leptospirillum* sp. , *Sulfobacillus* sp. , *Acidithiobacillus* sp. , *Spingomonas* sp. and Archaea including *Sulfolobus* sp. , *Ferroplasma* sp. Five strains were isolated after enriching and culturing, which were corresponding to *Acidithiioxidians caldus*, *Acidithiioxidians thiooxidans*, *Acidithiioxidans ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum* and *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. These isolates could oxidize sulfur or Fe<sup>2+</sup> and different sulfide ores. [ **Conclusion** ] The bioleaching reactors were dominated by a small number of microbial species that were commonly found at thermoacidophilic environments.

**Keywords:** bioleaching; *Acidithiobacillus caldus*; *Sulfolobus* sp. ; culture-independent method

( 本文责编:王晋芳 )