

嗜酸硫化杆菌 (*Sulfobacillus* sp.) 的分离鉴定及其在黄铁矿浸取中的应用

彭堂见^{1, 2}, 衷水平³, 陈超然⁴, 彭诚⁴, 姜成英^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 北京 100080

²中国科学院大学, 北京 100049

³低品位难处理黄金资源综合利用国家重点实验室(紫金矿业集团股份有限公司), 龙岩 364200

⁴北京市第二中学, 北京 100010

摘要: 【目的】分离、培养获得中高温硫化矿浸取菌, 为利用其进行生物冶金研究及应用奠定基础。【方法】利用二价铁或单质硫为底物, 对酸性热泉泥水样品进行富集培养, 以获得能够氧化二价铁或还原性硫的菌株; 根据形态学、生理生化特点及系统发育分析对分离菌株进行分类鉴定; 通过分析黄铁矿的铁氧化速率评估菌种在生物冶金中应用的潜力。【结果】从哥斯达黎加酸性热泉泥水样品中分离得到两株好氧嗜酸兼性自养细菌 Costa C 和 Costa E。两株菌革兰氏染色反应为阳性, 细胞大小相近, 分别为 $(0.4 - 0.6) \mu\text{m} \times (2.5 - 4.0) \mu\text{m}$ 和 $(0.4 - 0.7) \mu\text{m} \times (2.4 - 4.9) \mu\text{m}$, 端生芽胞, 生长温度范围均为 $30\text{ }^\circ\text{C} - 55\text{ }^\circ\text{C}$, 最适生长温度分别为 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $40\text{ }^\circ\text{C}$, 生长 pH 范围分别为 $1.2 - 5.0$ 和 $1.4 - 5.0$, 最适生长 pH 均为 2.8 。可以利用 $\text{Fe}(\text{II})$ 、 S 、 $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 等为能源进行自养生长, 也可利用酵母浸粉等有机物生长。两株菌的 16S rRNA 基因与硫化杆菌属 (*Sulfobacillus*) 其他菌种的最高相似性大于 99%, $(\text{G} + \text{C})\%$ 含量分别为 56.1 mol % 和 56.7 mol %。【结论】形态学、生理生化特点及系统发育分析表明, 研究中筛选获得的两株菌均属于 *Sulfobacillus* 属, 分别定名为 *Sulfobacillus* sp. strain Costa C 和 *Sulfobacillus* sp. strain Costa E。浸矿结果显示两株菌在 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 时可以氧化黄铁矿, 氧化速率分别为 $63.0\text{ mg/L}\cdot\text{d}$ 与 $56.8\text{ mg/L}\cdot\text{d}$, 表明两株菌具有在中高温条件下浸取硫化矿的能力。
关键词: 硫化杆菌, $\text{Fe}(\text{II})$ 氧化, 硫氧化, 生物浸矿

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2013)12-1318-08

生物浸矿技术以其效率高、流程短、生产成本低、无环境污染等特点, 在低品位矿、复杂矿等一些采用常规手段不能经济有效进行处理的矿石浸取方面有独到的优势^[1]。该技术发展历史悠久, 已被广泛用于铜、锌、金、银、铀、镍、锰、铬、钼、砷、硒、钒等金属的浸取过程^[2]。针对目前环境问题日益严重、

金属富矿匮乏的现状, 生物浸矿技术越来越受到人们的关注。

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, 包括中温菌、耐热菌、嗜热

基金项目: “低品位难处理黄金资源综合利用重点实验室”开放基金 [ZJKY2011(B)KFJJ001]; 国家“863 计划”(2012AA061501)

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

作者简介: 彭堂见(1987-), 男, 湖南人, 硕士研究生, 从事环境微生物应用研究工作。E-mail: jianshen.yixiao@163.com

收稿日期: 2013-04-23; 修回日期: 2013-06-13

菌等,其中有细菌也有古菌。长期以来,人们一直认为中温菌氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*,后重新命名为氧化亚铁嗜酸硫杆菌 *Acidithiobacillus 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,一些研究发现严格化能自养细菌钩端螺旋菌属(*Leptospirillum* sp.)和古菌铁质菌属(*Ferroplasma* sp.)等在浸矿过程中起关键作用;而当环境温度大于 60℃时,嗜酸热古菌如硫化叶菌(*Sulfolobus*),酸两面菌(*Acidianus*)和金属球菌(*Metallosphaera*)等却显示出极大的优势^[3-4]。

硫化杆菌属(*Sulfobacillus* sp.)于 1978 年由 Golovacheva 等人命名,之后分离获得 6 个新种:嗜热硫化物氧化硫化杆菌(*S. thermosulfidooxidans*)^[5],二硫化物氧化硫化杆菌 *S. disulfidooxidans*^[6](后重新命名为二硫化物氧化脂环酸芽胞杆菌 *Alicyclobacillus disulfidooxidans*^[7]),嗜酸硫化杆菌(*S. acidophilus*)^[8],西伯利亚硫化杆菌(*S. sibiricus*)^[9],耐热硫化杆菌(*S. thermotolerans*)^[10]和供利硫化杆菌(*S. benefaciens*)^[11],该属细菌由于具有嗜酸、耐高温、能够氧化二价铁、硫化矿、还原性含硫化合物、兼性异养等特点,显示出其具有生物冶金应用潜力,同时对于酸热环境中碳素、硫素的循环起着重要作用。关于硫化杆菌属菌种生理生化特点及物种分类的研究已有一些^[12-13],但对于这些微生物在生物冶金过程中作用的研究并不多。

目前生物浸矿所用微生物绝大多数是自养或(和)兼性自养菌,其生长缓慢、生物量低,且易受培养体系中有机的抑制。因此,寻求一些能以有机物作为碳源,适应浸矿高温、低 pH 环境,并能大量生长、具备浸矿功能的微生物是解决生物浸矿现存问题的途径之一。

本文从哥斯达黎加热泉泥水样中分离到两株中度嗜热嗜酸细菌,对它们的形态、生理生化特征、系统进化地位进行了分析,并对其浸出黄铁矿的能力进行了测定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:DNA 聚合酶、DNA 凝胶回收试剂盒均购自上海基星生物科技有限公司;基因

组 DNA 提取试剂盒购自 Omega 公司;PCR 产物纯化试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、T-easy vector 购自 Promega 公司;其它化学试剂均为分析纯。Axiostar plus 光学显微镜(Zeiss 公司,德国),JEM-1400 透射电镜(JEOL 公司,日本),FEI QUANTA 200 扫描电镜(FEI 公司,荷兰),BioSpec-1601 紫外分光光度计(Shimadzu 公司,日本),DU800TM 分光光度计(Beckman-coulter 公司,美国),T-Gradient PCR 仪(Biometra 公司,德国)。

1.1.2 富集和分离培养基:样品富集分别采用自养及异养培养基。基础培养基:0.5 g MgSO₄·7H₂O;0.1 g KCl;0.01 g Ca(NO₃)₂;3.0 g (NH₄)₂SO₄;0.5 g K₂HPO₄·3H₂O;1000 mL 蒸馏水,用 1:1 H₂SO₄ 调 pH 至 2.5。自养培养基:每升基础培养基添加 0.2 g 酵母浸膏和 13.9 g FeSO₄·7H₂O 或 5 g 灭菌硫磺。异养培养基:每升基础培养基添加 1 g 酵母浸膏。固体培养基:基础培养基中加入 0.7% 的固化剂 Gelrite (Sigma,美国),硫源由硫磺改为 5 mmol/L 连四硫酸钾(K₂S₄O₆)。

1.1.3 样品:菌种分离样品为采自哥斯达黎加的酸性热泉泥水样(pH 在 5.0-5.5 之间),浸矿样品为湖南省桃江黄铁矿。矿石基本组成为:Fe 33.79%;Cu 0.012%;S 27.93%;As 0.008%。

1.2 菌种分离方法

采集的样品在 45℃ 下分别利用自养与异养培养基富集培养 7d,重复 3 次;富集菌液经稀释涂布法进行分离,挑取单菌落进一步涂布纯化,直至在显微镜下观察到菌体形态一致。

1.3 形态观察

菌体经过革兰氏染色后采用光学显微镜观察菌株细胞形态;通过透射电镜、扫描电子显微镜进一步观察菌体结构(例如芽胞)。

1.4 生理生化特性测定

对菌株最适生长条件,包括初始生长 pH、温度及 NaCl 浓度范围等测定时采用如上所述异养培养基,并进行如下调整:对于初始生长 pH 测定,用 1:1 硫酸调整 pH 在 1.0-5.5 范围内;对于生长 NaCl 浓度范围,灭菌前分别调整 NaCl 浓度为 0%、0.5%、1%、1.5% 和 2%;测定不同碳源利用时,用各种糖、有机酸等替代培养基中的酵母浸膏。测定菌株对无机能源的利用时,分别用以下能源代替酵母浸膏:

5 mmol/L $K_2S_4O_6$ 、10 mmol/L $Na_2S_2O_3$ 、5 g/L 单质硫和 50 mmol/L $FeSO_4$ 。通过测定 OD_{600} 检测菌株在不同碳源、 $K_2S_4O_6$ 和 $Na_2S_2O_3$ 中的生长,分别通过测定三价铁浓度、pH 和硫酸根离子浓度来检测菌株对亚铁和单质硫的利用情况。

1.5 16S rRNA 基因的扩增、测序及系统发育分析

吸取培养至对数期的菌液 1.5 mL,离心收集菌体,倒掉上清液,用生理盐水洗涤菌体 2-3 次,以质粒提取试剂盒中的碱液裂解菌体,用 150 μ L 去离子水稀释,吸取 2-2.5 μ L 作为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:95 $^{\circ}C$ 5 min;94 $^{\circ}C$ 1 min,55 $^{\circ}C$ 1 min,72 $^{\circ}C$ 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}C$ 10 min。扩增引物为通用引物 27F 和 1492R^[14]。将扩增产物以 PCR 产物试剂盒纯化后,连接至 T-easy Vector 并转化至 *E. coli* DH5 α 中,将转化产物涂布于加卡那霉素 (50 μ g/mL) 的 LB 固体培养基中,过夜后挑取白斑送测序公司测序(华大基因公司)。

系统发育分析根据其 16S rRNA 基因序列用 MEGA4.1 软件构建系统进化树,使用 Neighbor-Joining 法进行 1000 次步长计算。

1.6 基因组 (G + C) mol% 测定

采用 Bacterial DNA Kit (Omega 公司,美国) 提取基因组 DNA,根据热变性温度法^[15] (T_m 值法) 测定

(G + C) mol%。利用 DU800TM 分光光度计测定 DNA 热变性温度 T_m 值,以大肠杆菌 K-12 菌株做参比,根据测得的 T_m 值,按照下式计算待测菌株的 T_m 值:

$$\text{待测菌株的 (G + C) mol\%} = \text{参比菌株 (G + C) mol\%} + 2.08 \times (\text{待测菌株 } T_m - \text{参比菌株 } T_m)$$

1.7 菌株浸矿能力测定

菌种培养至对数期,在无菌操作下,接种至含有 1.5% 硫化矿的灭菌培养基 (自养培养基, pH2.0),菌的初始浓度为 5.0×10^6 cells/mL 左右,设置无菌对照,置于 45 $^{\circ}C$ 恒温培养箱中。每 4 d 取样测定总铁和亚铁含量,判断菌种浸矿能力。 $Fe(II)$ 及总铁测定方法采用 1,10-邻菲罗啉比色法^[16]。

2 结果

2.1 菌株 Costa C 和 Costa E 的系统发育分析

经富集培养后样品涂布在含有 $FeSO_4$ 或连四硫酸钾的自养固体平板或异养固体平板上,进一步培养后获得了一些黄色菌落,经多次梯度稀释涂布分离,从中挑取 19 株纯菌株进行 16S rRNA 基因测序及 BLAST 分析,结果表明这些菌与 *Sulfobacillus acidophilus* 16S rRNA 基因相似性达 99% 以上,根据 16S rRNA 基因比对结果,从中选取两株,分别命名

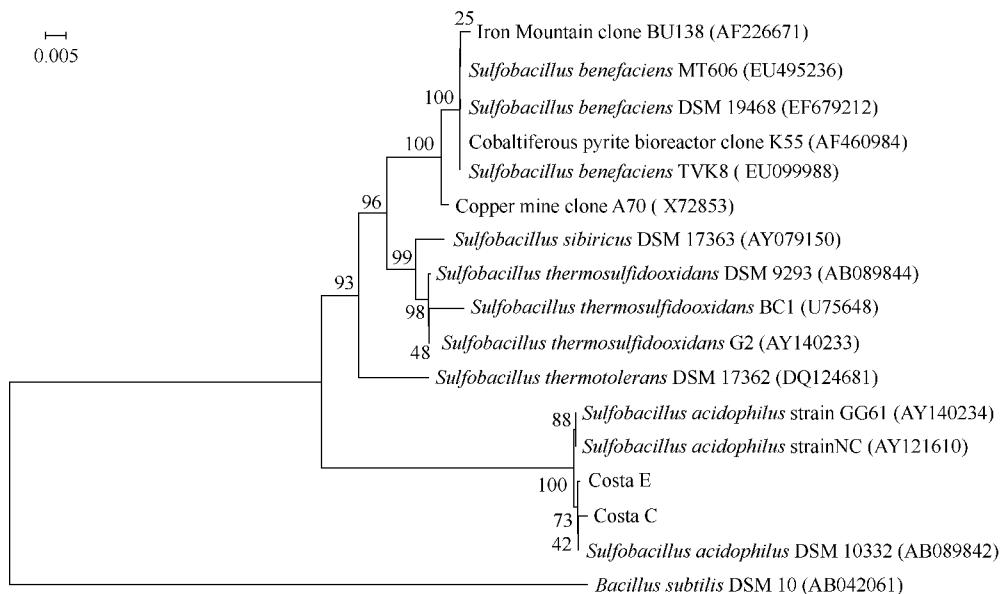


图 1. 依据 16S rRNA 基因序列构建的菌株 *Costa C*、*Costa E* 和相近菌种的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree of *Costa C*, *Costa E* and related bacterial species. The tree was constructed according to 16S rRNA gene sequence similarity with MEGA4.1 software. *Bacillus subtilis* DSM 10^T was used as an outgroup. GenBank accession numbers were given in parentheses. The number at each branch points represented the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

为 Costa C 和 Costa E, 两株菌与其他相近菌种的系统发育分析结果见图 1。根据比对结果, 我们初步判定菌株 Costa C 和 Costa E 可能是 *Sulfobacillus* 属的成员。

2.2 菌株形态和生理生化特征

菌株 Costa C 和 Costa E 的菌落为圆形, 黄色, 表面干燥, 凸起, 边缘整齐, 革兰氏染色反应为阳性, 扫描电镜及透射电镜观察菌体为杆状, 大小分别为 $(0.4 - 0.6) \mu\text{m} \times (2.5 - 4.0) \mu\text{m}$ 和 $(0.4 - 0.7) \mu\text{m} \times (2.4 - 4.9) \mu\text{m}$ (图 2)。

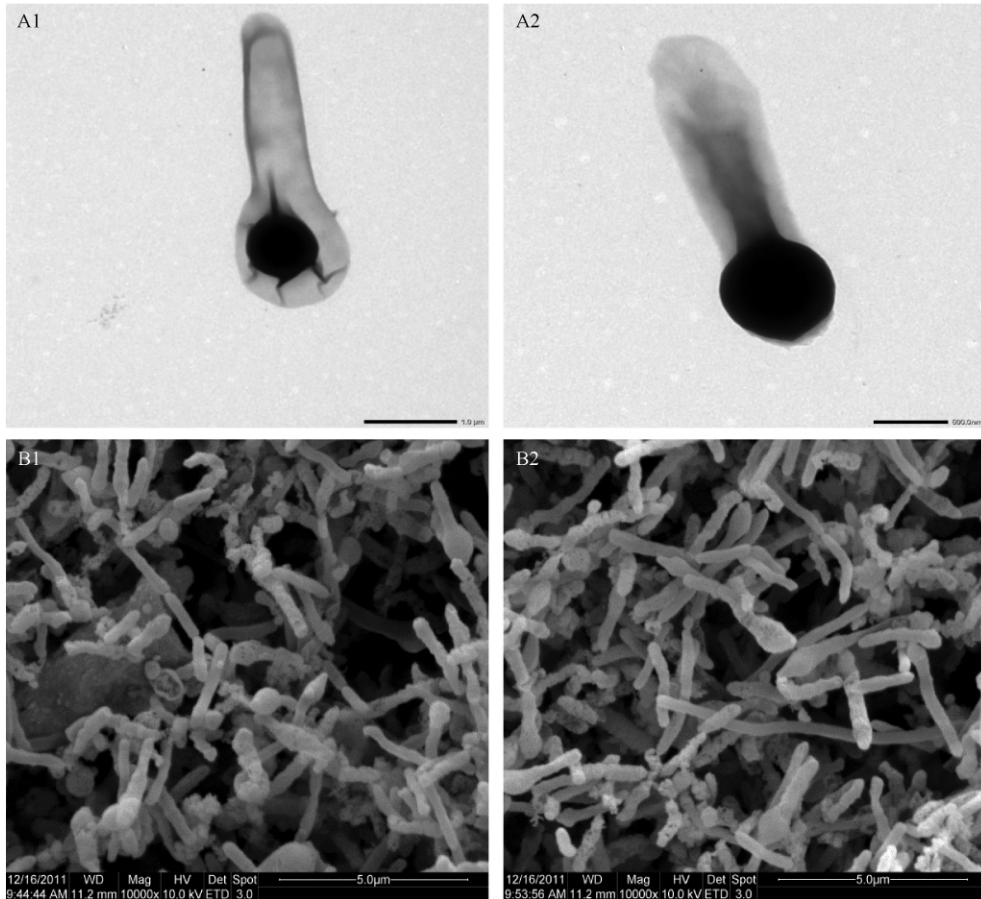


图 2. Costa C 和 Costa E 透射电镜 (A1 和 A2, 50000 \times) 和扫描电镜 (B1 和 B2, 10000 \times) 下细胞形态

Figure 2. Cell morphology of strain Costa C and Costa E under transmission electron microscopy (A1 and A2, 50000 \times) and scanning electron microscopy (B1 and B2, 10000 \times). A1, B1: Costa C; A2, B2: Costa E.

菌株 Costa C 和 Costa E 生长温度范围均为 $30^{\circ}\text{C} - 55^{\circ}\text{C}$ 、最适生长温度分别为 50°C 和 40°C , 生长 pH 范围分别为 $1.2 - 5.0$ 和 $1.4 - 5.0$, 最适生长 pH 均为 2.8 , 最高 NaCl 耐受浓度均为 1% 。两株菌均好氧生长, 既可以利用硫磺、连四硫酸钾、硫酸亚铁等无机能源生长, 也可利用酵母浸膏等有机物做为碳源和能源生长 (表 1、图 3、图 4)。

如图 3 所示, 菌株 Costa C 和 Costa E 具有氧化亚铁的能力, 培养 4d 时, 三价铁浓度分别为 0.013 mol/L 和 0.01 mol/L , 铁氧化率分别为 26% 和 20% 。随后, 生成的三价铁离子与培养基中的钾离

子和硫酸根离子等生成沉淀 [主要是黄钾铁矾 $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$], 随着生长, 菌株氧化亚铁的速率变慢。培养 4 d 后, 三价铁生成沉淀的速率大于其生成速率, 因而三价铁浓度下降。

两株菌氧化单质硫如图 4 所示, 氧化过程中, pH 从 2.5 下降至 1.3 左右, 而无菌对照组 pH 几乎没有发生改变 (图 4-A); 随着硫被氧化, 硫酸根离子浓度增大, 最高达到 0.063 mol/L , 两株菌对硫的氧化率均达到 40% 左右 (图 4-B), 说明菌株 Costa C 和 Costa E 具有较强的氧化单质硫的能力, 且能够耐受极低的 pH。

表 1. Costa C 和 Costa E 与 *Sulfobacillus* 属其它菌种 (株) 主要生理生化性状的比较Table 1. List of some physiological properties of strain Costa C, Costa E and members of the genus *Sulfobacillus*

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Cell size (μm)	(0.4 - 0.6) \times (2.5 - 4.0)	(0.4 - 0.7) \times (2.4 - 4.9)	(0.8 - 1.2) \times (1.5 - 4.5)	(0.6 - 0.8) \times (1.0 - 3.0)	(0.5 - 0.8) \times (3.0 - 5.0)	(0.7 - 1.1) \times (1.0 - 3.0)
Growth pH range (optimum)	1.2 - 5.0 (2.8)	1.4 - 5.0 (2.8)	1.2 - 2.4 (2.0)	1.5 - 5.5 (1.7 - 2.4)	(2.0)	1.1 - 2.6 (2.0)
Growth temperature range (optimum) ($^{\circ}\text{C}$)	30 - 55 (50)	30 - 55 (40)	20 - 60 (40)	20 - 60 (50 - 55)	(45 - 50)	17 - 60 (55)
(G + C) mol%	56.1 \pm 1.1	56.7 \pm 1.0	48.2 \pm 0.5	47.2 - 47.5	56.0 \pm 1.0	48.2 \pm 0.2
Inorganic substrates	Fe^{2+} , S^0 , $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$	Fe^{2+} , S^0 , $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$	Fe^{2+} , S^0 , $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$	Fe^{2+} , S^0 , $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$	Fe^{2+} , S^0	Fe^{2+} , S^0
Oxidation of sulfide ores	+	+	+	+	+	+
Organic substrates:						
Malate	+	-	+	-	-	-
Fructose	-	-	+	+	+	-
Glucose	-	-	+	+	+	-
Sucrose	-	-	+	+	+	-
Glutathione (reduced)	+	+	+	+	-	-
Casein	+	+	-	+	-	-
Trehalose	-	-	-	+	-	-
Mannose	-	-	-	+	-	-
Glycine	-	-	-	+	-	-
Raffinose	-	-	-	+	-	-
Glutamate	-	-	-	+	-	-
Ribose	-	-	-	-	+	-
Yeast extract	+	+	+	+	+	+
Peptone	+	+	/	/	/	/
Beef extract	+	+	/	/	/	/
Tryptone	+	-	/	/	/	/
Casamino acid	+	+	/	/	/	/

1, Costa C; 2, Coast-E; 3, *S. thermotolerans* Kr1^T; 4, *S. thermosulfidooxidans* VKM B - 1269^T; 5, *S. acidophilus* NAL^T; 6, *S. sibiricus* N1^T; /, without detection; -, negative; +, positive. The physiological properties data are cited from literatures [5 - 11].

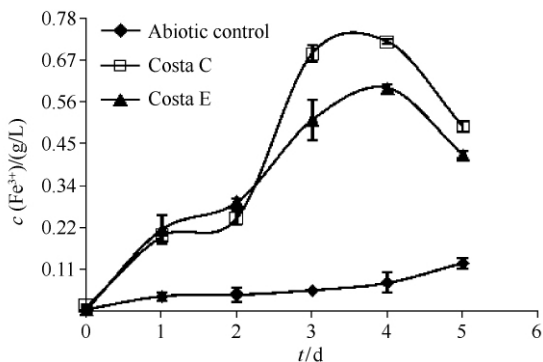


图 3. Costa C 和 Costa E 氧化亚铁过程中三价铁的浓度变化

Figure 3. Change of ferric iron concentration during oxidation of ferrous iron by strain Costa C and Costa E.

2.3 菌株浸矿能力

如图 5 所示, Costa C 和 Costa E 均具有浸取黄铁矿的能力。在浸出的前 5 d, 实验组体系中总铁浓

度变化很小, 第 5 - 19 天, 总铁浓度快速上升, 最高时分别达到 1.54 g/L 和 1.58 g/L, 19 d 之后总铁浓度达到稳定, 此时 Costa C 和 Costa E 的浸出率分别达到 30.4% 和 31.2%, Costa C 和 Costa E 对该黄铁矿的氧化速率分别为 63.0 mg/L·d 与 56.8 mg/L·d。

3 讨论

矿物的微生物浸出是放热过程, 浸矿系统的温度会随着浸矿过程的进行逐步上升, 这就需要浸矿菌能够在高温条件下保持浸矿活性; 此外由于常温条件下, 生物浸矿速度较慢, 严重地制约了生物冶金技术的应用, 而高温浸矿能够缓解矿石表面钝化的问题, 提升金属矿物的氧化速率, 同时高温时一些原来在常温条件下难以氧化的金属矿物 (如黄铜矿) 也能被顺利分解, 一些研究利用从酸性热泉中

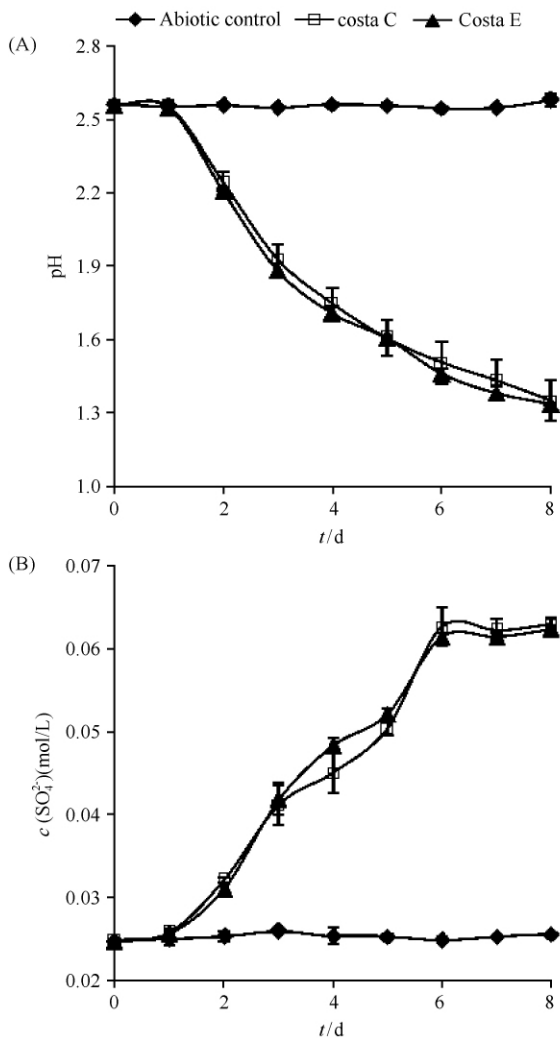


图 4. *Costa C* 和 *Costa E* 氧化单质硫过程中 pH (A) 和硫酸根浓度 (B) 变化

Figure 4. Change of pH (A) and sulfate concentration (B) during oxidation of elemental sulfur by strain *Costa C* and *Costa E*.

分离到的嗜酸热古菌如硫化叶菌属^[17]、酸两面菌属^[18]及金属球菌属^[19]进行硫化矿浸取,显示了高温浸矿的优点。但是由于浸矿微生物数量少、筛选困难,目前获得的能够耐受高温的浸矿菌种较少,因此本研究选择哥斯达黎加热泉泥水样品作为分离源,利用不同的培养条件进行菌种筛选。在中高温条件下,分离得到两株中度嗜热嗜酸细菌,这两株菌不仅能耐受 50℃ - 55℃ 高温,同时可以营兼性异养生长,具有较好的生长活性。浸矿研究表明,两株菌可以在 45℃ 氧化黄铁矿,氧化速率达到 63.0 mg/L·d 与 56.8 mg/L·d,说明这两株菌具有高温浸矿的应用潜力。

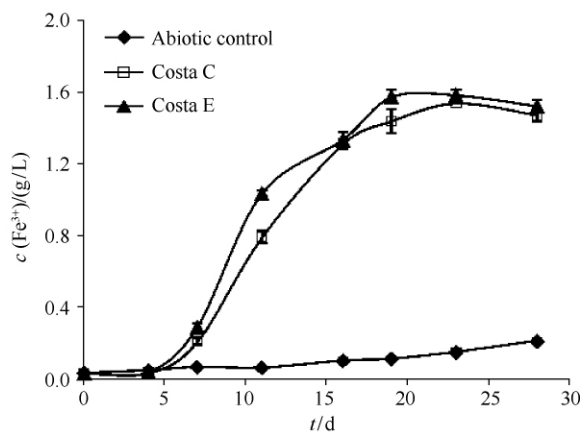


图 5. *Costa C* 和 *Costa E* 浸出黄铁矿过程中的总铁浓度变化

Figure 5. Change of concentration of total iron during bioleaching of pyrite by strains *Costa C* and *Costa E*.

研究中对两株菌的形态特征、生理生化特点及系统发育地位进行了分析,结果显示两株菌细胞大小分别为 $(0.4 - 0.6) \mu\text{m} \times (2.5 - 4.0) \mu\text{m}$ 和 $(0.4 - 0.7) \mu\text{m} \times (2.4 - 4.9) \mu\text{m}$, 端生芽胞, 生长温度范围均为 30℃ - 55℃、最适生长温度分别为 50℃ 和 40℃, 生长 pH 范围分别为 1.2 - 5.0 和 1.4 - 5.0, 最适生长 pH 均为 2.8; 既可以利用 Fe(II)、S、 $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 等无机物为能源进行自养生长, 也可利用酵母浸粉等有机物进行异养生长; 两株菌的 (G + C)% 分别为 $(56.1 \pm 1.1) \text{mol}\%$ 和 $(56.7 \pm 1.0) \text{mol}\%$, 与 *S. acidophilus* NAL^T 的 (G + C)% $(56.0 \pm 1.0) \text{mol}\%$ 非常接近。从菌株系统发育关系来看, 两株菌与 *Sulfobacillus* 属菌种的 16S rRNA 基因的最高相似性大于 99%, 综合以上特点, 研究认为两株菌属于 *Sulfobacillus* 属, 分别定名为 *Sulfobacillus* sp. strain *Costa C* 和 *Sulfobacillus* sp. strain *Costa E*。关于这两株菌浸取矿物的最佳条件、浸取机理及在浸矿工业中的应用有待进一步研究和推广。对一些浸矿环境中微生物菌群的调查发现, 在浸矿过程中存在中度嗜酸热细菌 *Sulfobacillus* 属菌种^[4], 对于该菌属细菌碳代谢及硫代谢机理的研究已有一些报道^[20], 但对该属微生物在酸热环境的分布及在生物冶金中的作用的相关研究较少, 因此本研究中筛选获得的菌种为了解嗜酸热细菌在浸矿过程中的作用提供了菌种资源, 为发展中高温浸矿过程奠定了基础。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所的李春立高级工程师和梁静南老师在拍摄电镜照片中给予的帮助。

参考文献

- [1] Zeng LP, Huang JF, Zhang YF, Qiu GZ, Tong JB, Chen D, Zhou J, Luo XG. An Effective Method of DNA Extraction for Bioleaching Bacteria from Acid Mine Drainage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 75(5) : 11-18.
- [2] Akcil A. Potential bioleaching developments towards commercial reality: Turkish metal mining's future. *Minerals Engineering*, 2004, 17(3) : 477-480.
- [3] Rawlings DE. Biomining: Theory, Microbes and Industrial Process. Berlin: Springer-Verlag, 1997.
- [4] Liu Y, Guo X, Jiang C. Microbial diversity and characteristics of cultivable microorganisms in bioleaching reactors. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(2) : 244-250. (in Chinese)
刘艳阳, 郭旭, 姜成英. 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. *微生物学报*, 2010, 50(2) : 244-250.
- [5] Golovacheva RS, Karavaiko GI. *Sulfobacillus*, a new genus of spore forming thermophilic bacteria. *Mikrobiologiya*, 1978, 47(5) : 815-822.
- [6] Dufresne S, Bousquet J, Boissinot M, Guay R. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(4) : 1056-1064.
- [7] Karavaiko GI, Bogdanova TI, Tourova TP, Kondrat'eva TF, Tsaplina IA, Egorova MA, Krasil'nikova EN, Zakharchuk LM. Reclassification of '*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. thermotolerans' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3) : 941-947.
- [8] Norris PR, Clark DA, Owen JP, Waterhouse S. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology*, 1996, 142(4) : 775-783.
- [9] Melamud VS, Pivovarova TA, Tourova TP, Kalganova TV, Osipov GA, Lysenko AM, Kondrat'eva TF, Karavaiko GI. *Sulfobacillus sibiricus* sp. nov., a new moderately thermophilic bacterium. *Microbiology*, 2003, 72(4) : 605-612.
- [10] Bogdanova TI, Tsaplina IA, Kondrat'eva TF, Duda VI, Suzina NE, Melamud VS, Tourova TP, Karavaiko GI. *Sulfobacillus thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant, chemolithotrophic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(5) : 1039-1042.
- [11] Johnson DB, Joulain C, Dhugues P, Hallberg KB. *Sulfobacillus benefaciens* sp. nov., an acidophilic facultative anaerobic Firmicute isolated from mineral bioleaching operations. *Extremophiles*, 2008, 12(11) : 789-798.
- [12] Qi H, Chen H, Ao J, Zhou H, Chen X. Isolation and Identification of a strain of moderate thermophilic and acidophilic bacterium from deep sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 2009, 31(2) : 152-158. (in Chinese)
漆辉洲, 陈红, 敖敬群, 周洪波, 陈新华. 一株深海中等嗜热嗜酸菌的分离及鉴定. *海洋学报*, 2009, 31(2) : 152-158.
- [13] Li Y, He Z. Study on the characteristics of a moderately thermoacidophilic iron-oxidizing bacterium. *Microbiology China*, 2001, 28(6) : 45-49. (in Chinese)
李雅琴, 何正国. 一株中度嗜热嗜酸铁氧化细菌特性研究. *微生物学通报*, 2001, 28(6) : 45-49.
- [14] Weisburg WC, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2) : 697-703.
- [15] Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology*, 1962, 5(1) : 109-118.
- [16] Tamura H, Goto K, Yotsuyanagi T, Nagayama M. Spectrophotometric determination of iron (II) with 1, 10-phenanthroline in the presence of large amounts of iron (III). *Talanta*, 1974, 21(4) : 314-318.
- [17] Astudillo C, Acevedo F. Adaptation of *Sulfolobus metallicus* to high pulp densities in the biooxidation of a flotation gold concentrate. *Hydrometallurgy*, 2008, 92(1) : 11-15.
- [18] Zhang LM, Peng JH, Wei MM, Ding JN, Zhou HB. Bioleaching of chalcopyrite with *Acidianus manzaensis* YN25 under contact and non-contact conditions.

Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2010, 20(10):1981-1986.

2672.

[19] Kathryn SA, Robert MK. Impact of molecular hydrogen on chalcopyrite bioleaching by the extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2668-

[20] Paul EC, Martin RM, Paul RN. Ribulose biphosphate carboxylase activity and a Calvin cycle gene cluster in *Sulfobacillus* species. *Microbiology*, 2007, 153(7): 2231-2240.

Isolation and identification of *Sulfobacillus* sp. strains and their application in pyrite bioleaching

Tangjian Peng^{1,2}, Shuiping Zhong³, Chaoran Chen⁴, Cheng Peng⁴, Chengying Jiang^{1*}

¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³State Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Low-Grade Refractory Gold Ores (Zijin Mining Group Co. Ltd.), Longyan 364200, China

⁴Beijing No. 2 Middle School, Beijing 100010, China

Abstract: [Objective] The work aimed to isolate and culture the acidophilic and moderately thermophilic microorganisms for leaching the sulfide ore. [Methods] We enriched and incubated iron- or sulfur-oxidizing strains from muddy water of acuric hot spring utilizing ferrous irons or elemental sulfur as substrates. Then, we identified the strains by their morphological, physiological, biochemical properties and phylogenetic positions, and estimated their bioleaching potential according to their oxidation rate of pyrite. [Results] Two acidophilic, aerobic and facultative heterotrophic bacterial strains, Costa C and Costa E, were isolated from the samples of sulfuric hot springs of Costa Rica. Cells of the two strains were gram-positive, spore-forming and rod-shaped [(0.4–0.6) μm \times (2.5–4.0) μm and (0.4–0.7) μm \times (2.4–4.9) μm , respectively]. Strain Costa C grew at a temperature range of 30°C–55°C and a pH range of 1.2–5.0, optimally at 50°C and 2.8. Strain Costa E grew at a temperature range of 30°C–55°C and at a pH range of 1.4–5.0, optimally at 40°C and 2.8. Two strains could autotrophically grow on inorganic substrates such as ferrous irons, element sulfur and $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ and also could utilize organic substrates like yeast extract for heterotrophic growth. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences alignment demonstrated that the highest similarity between strain Costa C, Costa E and other species of the genus *Sulfobacillus* was above 99%. [Conclusion] Based on morphological, physiological and biochemical analysis, Costa C and Costa E can be affiliated to the genus *Sulfobacillus*, for which the names *Sulfobacillus* sp. strain Costa C and *Sulfobacillus* sp. strain Costa E were proposed. Both strains could oxidize pyrite, and the oxidation rates arrived 63.0 mg/L·d and 56.8 mg/L·d, respectively.

Keywords: *Sulfobacillus* sp., iron oxidation, sulfur oxidation, bioleaching

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Open Fund of State Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Low-Grade Refractory Gold Ores [ZJKY2011(B)KFJJ001] and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA061501)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807581; Fax: +86-10-64807421; E-mail: jiangcy@im.ac.cn

Received: 23 April 2013/Revised: 13 June 2013