

文章编号:1673-0062(2017)03-0025-04

组合浸矿细菌菌群的氧化特性及其群落结构分析

李 乾^{1,2,3}, 蒋潇宇^{1,2}, 王星星^{1,2}, 王清良^{1,2}, 胡鄂明^{1,2}, 史文革^{1,2}

(1.南华大学 铀矿冶生物技术国防重点学科实验室,湖南 衡阳 421001;2.南华大学 核资源工程学院,湖南 衡阳 421001;
3.南华大学 矿业工程博士后流动站,湖南 衡阳 421001)

摘 要:为了探究组合浸矿细菌菌群的氧化特性及其群落结构,构建4株浸矿细菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, *Leptospirillum ferriphilum* YSK, *Acidithiobacillus thiooxidans* A01, *Acidithiobacillus caldus* S1)的组合浸矿菌群.实验结果表明:此组合浸矿细菌菌群中的菌体具有较高的生物活性,表现出良好的铁、硫氧化能力.并采用实时荧光定量PCR技术对菌群的群落结构进行了分析.结果表明:此体系中*A.ferrooxidans* ATCC 23270、*A.thiooxidans* A01是优势种群;*L.ferriphilum* YSK和*A.caldus* S1是劣势种群.

关键词:浸矿细菌菌群;铁/硫氧化;群落结构

中图分类号:TD853.37 **文献标志码:**A

Oxidation Characteristics and Community Structure of a Mixed Bioleaching Bacterial Consortium

LI Qian^{1,2,3}, JIANG Xiao-yu^{1,2}, WANG Xing-xing^{1,2},
WANG Qing-liang^{1,2}, HU E-ming^{1,2}, SHI Wen-ge^{1,2}

(1.Key Discipline Laboratory for National Defence of Biotechnology in Uranium Mining and Hydrometallurgy, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2.School of Nuclear Resources Engineering, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3.Postdoctoral Research Station of Mineral Engineering, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: In order to explore the oxidation characteristics and community structure of mixed bioleaching bacterial consortia, a bacterial consortium including four typical bioleaching strains (*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, *Leptospirillum ferriphilum* YSK, *Acidithiobacillus thiooxidans* A01, *Acidithiobacillus caldus* S1) was constructed. The re-

收稿日期:2017-05-05

基金项目:中国博士后科学基金(2014M562116);湖南省自然科学基金(14JJ6024);南华大学核资源与环境大学生创新训练中心创新实验项目

作者简介:李 乾(1984-),男,讲师,博士,主要从事于浸矿微生物学、湿法冶金、环境修复等方面的研究.E-mail: liqianusc@126.com

sults show that strains in bioleaching bacterial consortium exert high biological activity and great oxidation ability to iron and sulfur. Microbial community structure was analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR technology. The results show that *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and *A. thiooxidans* A01 are the dominant species, while the minor is *L. ferriphilum* YSK and *A. caldus* S1.

key words: bioleaching bacterial consortium; iron/sulfur oxidation capability; community structure

微生物浸矿是一项环境友好的浸矿技术,利用特定浸矿微生物对矿物的直接氧化和间接氧化等作用,从低品位硫化矿中回收有价金属以及处理常规方法难以经济开采的矿物.相对于常规浸矿技术而言,其具有能耗省、成本低、污染少等优点.浸矿微生物主要是一些嗜酸性微生物,在这些微生物当中,大部分是利用铁、硫的氧化代谢来获得生长发育所需能量的化学自养菌^[1-3],这些不同种群的微生物在浸矿系统中相互作用,共同维持着体系的物质循环.很多研究者对不同种类的单一菌种的浸出效果进行了比较,并试图通过对浸矿微生物的分离、驯化、诱变、以及基因工程育种等改良工作来提高菌种对矿物的浸出能力,但在实际应用中,使用单一菌种进行生物浸出遇到了很多问题^[4].

在生物浸矿过程中,嗜酸硫氧化细菌与铁氧化细菌起着主要的作用^[5].研究^[6-8]表明:在浸出过程中,由于不同种类的浸矿微生物相互协同,组合浸矿菌群的浸矿效率比单一浸矿菌明显提高. Xue Feng^[9]等研究了6种典型浸矿细菌的组合,认为在混合浸矿系统中增加硫氧化细菌的比例能有效地提高浸矿效果. Xia^[10]等研究了闪锌矿在混合菌群(*A. ferrooxidans*与*A. thiooxidans*)和单一细菌(*A. ferrooxidans*或*A. thiooxidans*)下的浸出行为,发现混合体系对闪锌矿的浸出能力比单一菌种浸出强,并认为在浸出过程中,*A. ferrooxidans*使体系中保持较高的氧化还原电位,*A. thiooxidans*则作用于氧化矿物表面的钝化层硫,两株菌互相协同,维持反应的高效进行.研究^[5-10]表明,由于不同浸矿菌对铁离子、元素硫及其它金属离子的不同作用方式,组合浸矿菌群具有优势互补作用.

综上所述,了解组合浸矿菌群的群落结构和氧化特性,对下一步的菌群结构优化和提高浸矿效果有着重要意义.考虑到其多样性和稳定性,选取以下4种典型的浸矿微生物:1)嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*);2)嗜酸氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*);3)嗜

铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*);4)喜温嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*),构建了上述4种铁硫氧化细菌的组合菌群,研究该浸矿细菌菌群的生长速率及铁、硫氧化速率,并将其作为反映浸矿性能的指标,同时应用实时荧光定量PCR技术检测该浸矿细菌菌群的群落结构,通过分析群落结构发现浸矿菌在生长繁殖过程中的相互关系.

1 实验

1.1 组合浸矿菌群的构成与培养条件

将四株浸矿细菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, *Acidithiobacillus thiooxidans* A01, *Leptospirillum ferriphilum* YSK, *Acidithiobacillus caldus* S1)等量混合构成组合浸矿菌群,每株细菌的接种量为 6×10^5 cells/mL.培养基含9 mmol/L的KCl溶液,加入 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44.7 g/L和单质硫10.0 g/L作为能源物质,培养温度为30℃,摇床转速为175 r/min.

1.2 菌群生长测定与铁硫氧化速率分析

菌群密度用血细胞计数板检测,每隔10 h取样镜检,分析菌群生长曲线.铁氧化速率通过重铬酸钾滴定 Fe^{2+} 浓度来测定,菌群通过将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} 来获得一部分能量,从而提高氧化还原电位,有利于浸矿.硫氧化速率通过测定pH值来间接反映^[11],因为菌群中的硫氧化细菌将单质硫氧化为 H_2SO_4 ,所以pH的变化可以反映溶液中硫的氧化程度.

1.3 菌体收集及其DNA提取、纯化

于组合菌群稳定生长期,取菌液200 mL,采用定性滤纸过滤后,11 000 r/min离心收集菌体,并用pH为2.0的稀硫酸洗涤菌体.后续的DNA提取与纯化采用TIAN amp细菌基因组DNA提取试剂盒.提取的基因组DNA采用2%的琼脂糖凝胶电泳检测其质量,并采用Nano Drop[®] ND-1000微量分光光度计检测其浓度及纯度^[12].

1.4 Real-time PCR分析

实时荧光定量PCR技术(Real-time PCR)分析

所用的 *gyrB* 基因引物使用“Primer Premier 5.0”软件设计,然后经上海生工生物公司合成,各株细菌的特异性引物序列及相关信息如文献[12]所示。Real-time PCR 操作步骤也参照文献[12]执行。

2 结果与讨论

2.1 组合浸矿菌群的构建

将处于对数生长期的四种浸矿微生物(*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, *Leptospirillum ferriphilum* YSK, *Acidithiobacillus thiooxidans* A01, *Acidithiobacillus caldus* S1)的纯培养物收集于 50 mL 收集管中,10 000 r/min 离心 2 min 收集菌体后,稀释到约 10^7 cells/mL,检测其细菌密度。将构建的浸矿细菌菌群接种到已灭菌的相同培养基中(含亚铁和硫粉),培养基的 pH 值为 2.3,接种后菌体浓度为 3×10^6 cells/mL 左右。置于 30 °C、175 r/min 转速下的摇床中振荡培养,培养周期为 4 d,之后测定铁、硫的氧化效率。连续传代培养直至该组合浸矿细菌菌群稳定,且铁硫氧化速率高效,即为构建好的组合浸矿细菌菌群。

2.2 组合浸矿菌群的生长速率分析

如图 1 所示,所构建的浸矿细菌菌群能很快进入对数生长期,延滞生长期相当短,说明该浸矿细菌菌群适应环境比较快,而且生长很快,48 h 后,最高菌密度可达 2.0×10^8 cells/mL。随后进入平稳期,在显微镜下观察,可见细菌运动能力很强,表现出很高的菌密度和菌种活性。

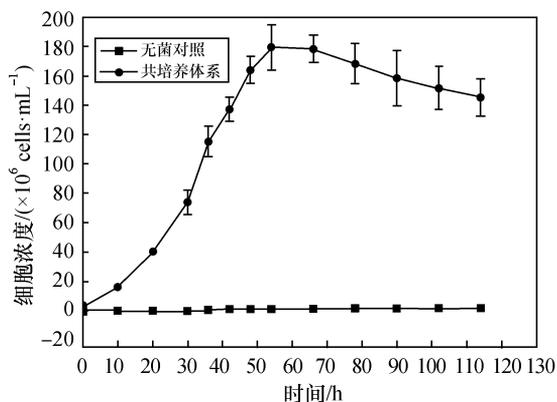


图 1 所构建的浸矿细菌菌群的生长曲线

Fig.1 Growth curve of the bioleaching bacterial colony

2.3 组合浸矿菌群的铁/硫氧化速率分析

如图 2 所示,该浸矿细菌菌群的铁氧化速率很高,48 h 后培养基中的亚铁被完全氧化,氧化率达到 100%,质量浓度 $\rho(\text{Fe}^{3+})$ 达到 9 g/L 左右;如

图 3 所示,培养基中 pH 变化非常快,说明该浸矿细菌菌群的硫氧化速率很高。因此,该浸矿细菌菌群表现出了很好的铁、硫氧化能力。

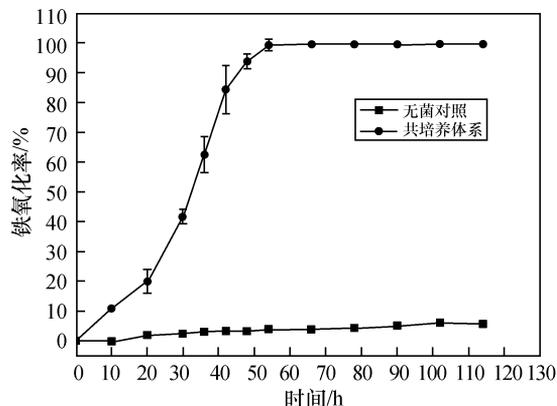


图 2 所构建的浸矿细菌菌群的铁氧化率

Fig.2 Iron oxidation rate of the bioleaching bacterial colony

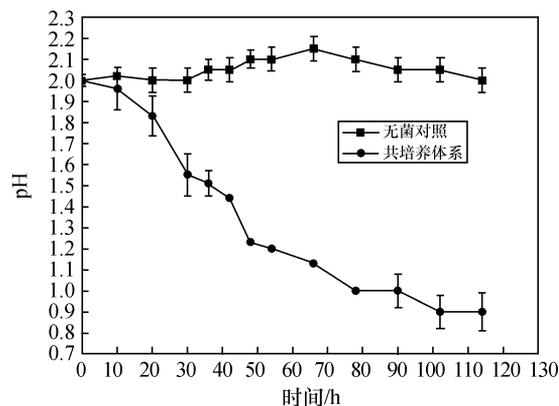


图 3 所构建的浸矿细菌菌群的 pH 变化曲线

Fig.3 The pH variation of the bioleaching bacterial colony

许莹^[13]研究发现,在单独接种嗜酸氧化硫杆菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* A01 110 h 左右,体系中 pH 从初始值 1.8 降至 0.9;单独接种嗜铁钩端螺旋菌 *L.ferriphilum* YSK 60 h 后,培养基中亚铁氧化率接近 100%。硫氧化细菌具有很强的硫氧化能力,但不能氧化亚铁;相反铁氧化细菌可以氧化亚铁获得能量,但是没有氧化硫的能力。与单一铁/硫氧化细菌相比,本文构建的浸矿细菌菌群包含硫氧化细菌和铁氧化细菌,能够同时对铁和硫进行氧化,具有更高的氧化效率。并且在相似的实验条件下,该菌群在亚铁的氧化速率上存在着一定优势。

2.4 组合浸矿菌群的群落结构分析

为了探明该组合浸矿细菌菌群中的种群关系,本研究应用 Real-time PCR 技术分析了浸矿细菌菌群的群落结构.如图 4 所示,结果表明,菌群在接种后生长稳定,均保持了较高的活性,但等量接种的菌群结构发生了较明显的变化,*A.ferrooxidans* ATCC 23270、*A.thiooxidans* A01 成为了菌群中的优势种群,而 *L.ferriphilum* YSK 和 *A.caldus* S1 生长较为缓慢,成为了劣势种群.产生这种现象的主要原因可能是 30 ℃ 的培养温度最接近 *A.ferrooxidans* ATCC 23270 和 *A.thiooxidans* A01 的最适生长温度.

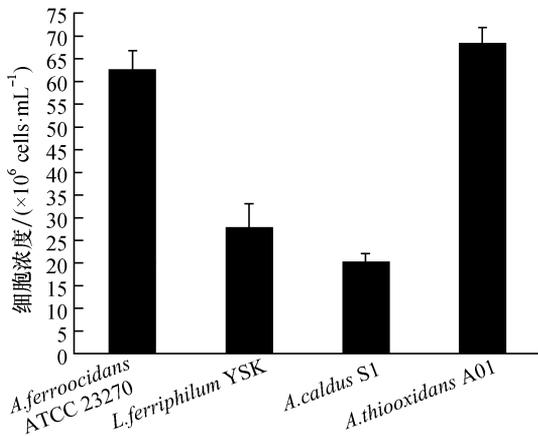


图 4 所构建的浸矿细菌菌群的群落结构

Fig.4 Community structure of the bioleaching bacterial colony

3 结论

1) 所构建的组合浸矿菌群对于环境具有良好的适应性,四种菌体均能在体系中保持稳定的生长.在接种 48 h 后体系内达到最高菌密度约为 2.0×10^8 cell/mL.同时,对比无菌体系和单一菌种体系,此浸矿细菌菌群表现出较高的铁/硫氧化率和较快的氧化速率.

2) 群落结构分析表明,菌群生长稳定时,等量接种的菌群结构发生了较明显的变化,*A.ferrooxidans* ATCC 23270、*A.thiooxidans* A01 成为了菌群中的优势种群;而 *L.ferriphilum* YSK 和 *A.caldus* S1 生长较为缓慢,成为了劣势种群.

参考文献:

[1] VERA M, SCHIPPERS A, SAND W. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial

metal sulfide oxidation-pat A [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2013, 97(17): 7529-7541.

[2] MAHMOUD A, CÉZAC P, HOADLEY A F A, et al. A review of sulfide minerals microbially assisted leaching in stirred tank reactors [J]. International Bio Deterioration & Biodegradation, 2017, 119: 118-146.

[3] JERIC S, BEŠKOSKI V P, DJOKIC L, et al. Interactions of the metal tolerant heterotrophic microorganisms and iron oxidizing autotrophic bacteria from sulphidic mine environment during bioleaching experiments [J]. Journal of Environmental Management, 2016, 172: 151-161.

[4] 刘毅. 土著浸矿微生物群落引种机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2011.

[5] AXEL S, SABRINA H, JÜRGEN V, et al. Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms [M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014.

[6] BOSSE M, HEUWIESER A, HEINZEL A, et al. Interaction networks for identifying coupled molecular processes in microbial communities [J]. BioData Mining, 2015, 8(1): 21.

[7] ZHANG R, WEI M, JI H, et al. 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 Biotechnology, 2009, 81(6): 1161-1168.

[8] XIA L, TANG L, XIA J, et al. Relationships among bioleaching performance, additional elemental sulfur, microbial population dynamics and its energy metabolism in bioleaching of chalcopyrite [J]. Transactions of Nonferrous Metal Society of China, 2012, 22(1): 192-198.

[9] FENG X, MA L Y, DENG Y, et al. Different leaching efficiency and microbial community structure variation in chalcopyrite bioleaching process based on different Initial microbe proportions [J]. Advanced Materials Research, 2015, 1130: 431-435.

[10] XIA L X, LIU J S, XIAO L, et al. Single and cooperative bioleaching of sphalerite by two kinds of bacteria—acidithiobacillus ferrooxidans and acidithiobacillus thiooxidans [J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18(1): 190-195.

[11] 李乾, 丁德馨, 王清良, 等. 五种典型浸矿微生物的耐氟性状对比研究 [J]. 南华大学学报(自然科学版), 2013, 27(2): 16-22.

[12] 李乾, 丁德馨, 王清良, 等. 浸矿微生物共培养体系及其在氟胁迫下的群落动态分析 [J]. 中国有色金属学报, 2014, 24(6): 1678-1684.

[13] 许莹. 嗜酸氧化硫硫杆菌与嗜铁钩端螺旋菌的镍抗性及其机理研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2013.