

## 一株嗜酸化能异养菌 *Acidiphilium* sp. 的分离鉴定 及其对 $\text{Fe(III)}$ 代谢的研究

刘艳阳<sup>1,2</sup>, 陈志伟<sup>1,2</sup>, 姜成英<sup>1\*</sup>, 刘双江<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所 北京 100080) (<sup>2</sup>中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘 要** 从云南省腾冲热泉酸性泥土样品中分离得到一株好氧嗜酸异养细菌 Teng-A。菌株 Teng-A 细胞大小  $0.6 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$ , 单生或成链状排列, 革兰氏染色反应为阴性, 有周生鞭毛, 不产芽孢, 该菌适宜的生长温度为  $29 \sim 33^\circ\text{C}$ 、pH 为  $3.0 \sim 4.0$ , 可以利用许多有机物生长, 但不能利用  $\text{Fe(II)}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$  等为能源生长。菌株 Teng-A 基因组 DNA 的  $(\text{G} + \text{C})\text{mol}\%$  为  $69.6\text{mol}\%$ , 其 16S rRNA 基因与 *Acidiphilium* 属菌种的 16S rRNA 基因的最高相似性大于  $99\%$ 。根据形态学、生理生化特点及系统发育分析表明, 菌株 Teng-A 是 *Acidiphilium* 属的一个新成员, 鉴定名为 *Acidiphilium* sp. strain Teng-A。厌氧条件下, 菌株 Teng-A 可以葡萄糖或  $\text{H}_2$  为电子供体, 将  $\text{Fe(III)}$  还原为  $\text{Fe(II)}$ , 还原速率分别为  $11.56\text{mg/L} \cdot \text{day}$  与  $15.34\text{mg/L} \cdot \text{day}$ 。菌株 Teng-A 与 *Acidithiobacillus ferrooxidans* LJ-1 和 *Leptospirillum ferriphilum* LJ-2 共同培养, 前 3d  $\text{Fe}^{2+}$  氧化速度分别为  $0.44\text{g/L} \cdot \text{day}$  和  $0.41\text{g/L} \cdot \text{day}$ , 比 LJ-1 ( $0.64\text{g/L} \cdot \text{day}$ ) 和 LJ-2 ( $0.60\text{g/L} \cdot \text{day}$ ) 单独培养时氧化  $\text{Fe(II)}$  的速率稍慢, 但当培养时间超过 5d 时,  $\text{Fe(II)}$  最终被全部氧化, 并且发现在共培养时,  $\text{Fe(II)}$  氧化生成的沉淀物的形态不同于 *At. ferrooxidans* 和 *L. ferriphilum* 单独培养时产生的沉淀物的形态。最后讨论了 *Acidiphilium* 对生物浸矿和生物成矿作用的影响。

**关键词** *Acidiphilium* sp.;  $\text{Fe(III)}$  还原; 铁呼吸; 生物浸矿; 生物成矿

**中图分类号** X172 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2007)02-0350-05

微生物通过还原  $\text{Fe(III)}$  生成  $\text{Fe(II)}$  获得能量的过程被称作铁呼吸, 该过程通常与有机质或  $\text{H}_2$  的微生物氧化相偶联。自然界中, 铁呼吸对水体沉积物、酸性采矿废弃物、溪流等环境中铁元素的价态转化和地球化学循环等具有重要的意义<sup>[1]</sup>。近年来还发现, 微生物的铁呼吸作用对于防止金属材料的腐蚀同样具有重要意义<sup>[2]</sup>。能够进行铁呼吸的微生物种类很多, 无论是在有氧或无氧条件下, 还是在中性或酸性环境中, 微生物均可进行铁呼吸作用<sup>[3-4]</sup>。

嗜酸杆菌属(*Acidiphilium* sp.)由 Harrison 于 1981 年提出, 并描述了该属的第一个成员-隐性嗜酸杆菌(*Acidiphilium cryptum*), 该菌能够进行铁呼吸作用, 利用有机物或者  $\text{H}_2$  还原  $\text{Fe(III)}$  而获得能量进行化能异养生长, 但不能利用元素硫( $\text{S}^0$ )或  $\text{Fe(II)}$  作为能源生长<sup>[5]</sup>, 并且在好氧生长条件下细胞内含有细菌叶绿素  $a$ <sup>[6]</sup>。该属的成员主要生活在酸性采矿水或者被该类废水污染的酸性环境中或者生物浸矿反应器中<sup>[7-8]</sup>, 并且常常与氧化亚铁硫杆菌共同生活在一起, 以氧化亚铁硫杆菌产生的有机物和  $\text{Fe(III)}$  为碳源和能源进行生长, 隐性嗜酸杆菌<sup>[9]</sup>、食有机嗜酸杆菌(*Acidiphilium organovorum*)<sup>[10]</sup>、以及共生嗜酸杆菌(*Acidiphilium symbioticum*)<sup>[11]</sup>都是从氧化亚铁硫杆菌的“纯培养物”中分离得到。鉴于其独特生理特性(嗜酸、铁呼吸、光合作用等)以及在生物浸矿和生物修复采矿引起的污染环境中的潜在

重要意义, 对嗜酸杆菌属细菌的研究愈来愈受到重视, 美国能源部联合基因组研究所(DOE Joint Genome Institute)目前基本上完成了隐性嗜酸杆菌 JF-5 的基因组(3.917Mbp, 序列组装阶段)测序, 该项工作的完成将极大地促进对隐性嗜酸杆菌生理、代谢、遗传等项研究工作。

1951 年, Temple 和 Hinkle 首次从煤矿的酸性矿坑中分离出能氧化  $\text{Fe(II)}$  及还原性硫化化合物的细菌-氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*, 现重命名为 *Acidithiobacillus ferrooxidans*)<sup>[12]</sup>。之后, 人们又发现了大量的铁氧化细菌和硫氧化细菌, 如 *Leptospirillum ferrooxidans*、*Leptospirillum ferriphilum*、*Acidimicrobium ferrooxidans*、*Ferroplasma acidiphilum*、*Acidithiobacillus caldus* 及 *Acidithiobacillus thiooxidans* 等, 这些微生物是参与生物冶金过程的主要微生物类群。关于这些细菌在生物冶金过程中对  $\text{Fe(II)}$  和还原性硫化化合物的氧化已进行了大量的研究, 但是, 对于浸矿过程中  $\text{Fe(III)}$  的微生物还原研究却较少。Küsel 等人研究了隐性嗜酸杆菌 JF-5 菌株在采煤后形成的酸性湖泊(acidic, coal mining lake)沉积物对  $\text{Fe(III)}$  的还原<sup>[3]</sup>, 但有关嗜酸杆菌在生物冶金过程中对铁的还原及其与其它浸矿微生物的协同代谢的研究还未见报道。本研究从云南腾冲硫磺泉附近的酸性环境中分离鉴定了一株能够还原  $\text{Fe(III)}$  的嗜酸杆菌 Teng-A, 本文报道对该菌的鉴定、对  $\text{Fe(III)}$  的代谢特性及其与两株生物冶金过程中分

\* 通讯作者。Tel 86-10-64807410; Fax 86-10-64807421; E-mail: jiangcy@sun.im.ac.cn

作者简介: 刘艳阳(1982-)女, 河南人, 硕士研究生, 从事环境微生物应用研究工作。E-mail: yanyang.liu@gmail.com

收稿日期: 2006-07-05; 接受日期: 2006-07-13; 修回日期: 2006-01-10

离细菌氧化  $\text{Fe(II)}$  的协同作用。

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器** :DNA 聚合酶、T4 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒均购自北京经科宏达生物科技有限公司 ;PCR 产物纯化试剂盒购自鼎国公司 ;T-easy vector 购自 Promega 公司 ;其它化学试剂均为分析纯。BH-2 光学显微镜 (Olympus 公司) ,H-600A 透射电镜 (Hitachi 公司) ,UV-2010 紫外分光光度计 (Shimadzu 公司) ,DU800™ 分光光度计 (Beckman-coulter 公司) ,T-Gradient PCR 仪 (Biometra 公司)。

**1.1.2 富集和分离培养基** :每升含 0.5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ,0.1g  $\text{KCl}$  ,2g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ,0.5g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ,0.1g 酵母提取物 ;2g 葡萄糖 ,用 1:1  $\text{H}_2\text{SO}_4$  将 pH 调至 3.0。固体培养基中加入 0.7% 的固化剂 Gelrite (Sigma)。

**1.1.3 样品及菌种分离方法** :样品采自我国云南省腾冲热泉周围偏酸性土壤 (pH 在 5.5 ~ 6.5 之间) 。采集的样品首先在 30℃ 条件下富集培养 4d ,然后经稀释涂布法进行分离 ,挑取单菌落进一步划线纯化 ,直至在显微镜下观察到菌体形态一致。

## 1.2 形态观察

菌株细胞形态经过革兰氏染色后采用光学显微镜进行观察 ,通过透射电镜、扫描电子显微镜进一步观察菌体结构 (例如鞭毛)。

## 1.3 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、碳源利用等测定时采用如上所述培养基 ,并进行如下调整 :对于初始生长 pH 测定 ,用硫酸或氢氧化钠调整 pH 在 1.0 ~ 8.0 范围内 ;对于生长 NaCl 浓度范围 ,灭菌前调整 NaCl 浓度为 0 ~ 10% ;测定不同碳源利用时 ,用各种糖、醇、有机酸等替代培养基中的葡萄糖。接触酶和氧化酶活性、抗生素抗性测定参见文献 [13]。

## 1.4 16S rRNA 基因的扩增、测序及系统发育分析

采用溶菌酶破碎细胞 ,酚 :氯仿抽提法提取基因组总 DNA 并作为模板 ,采用细菌 16S rRNA 基因通用引物和反应体系进行 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离后进行柱纯化 ,与 T-easy vector 连接并转化到 *E. coli* DH5α 中 ,筛选阳性克隆 ,提取质粒并测序 (上海生物工程公司) 。菌株 Teng-A 的 16S rRNA 基因序列号为 DQ631810 (GenBank)。

系统发育分析根据其 16S rRNA 基因序列用 MEGA3.1 软件构建系统进化树 ,使用 Neighbor-Joining 法进行 1000 次步长计算。

## 1.5 基因组 (G + C)mol% 测定

采用如上相同方法提取基因组 DNA ,根据热变性温度法 [14] ( $T_m$  值法) 测定 (G + C)mol%。利用 DU800™ 分光光度计测定 DNA 的热变性温度  $T_m$  值 ,根据公式 (G + C)mol% =  $2.08 \times T_m - 106.4$  计算样品的 (G + C)mol%。

## 1.6 厌氧条件下对 $\text{Fe(III)}$ 还原能力及 $\text{Fe(II)}$ 浓度的测定

在 25mL 厌氧培养试管中 ,加入培养基 3mL ,补充 0.5%

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  ,分别向培养基中加入葡萄糖 (0.2%)  $\text{CO}_2$  (100% 气相) 或者  $\text{CO}_2/\text{H}_2$  (4:1) ,培养一定时间后分别检测 Teng-A 对  $\text{Fe(III)}$  还原能力 ,还原能力以溶液中  $\text{Fe(II)}$  的生成量计算 , $\text{Fe(II)}$  测定方法采用 1,10-邻菲罗啉比色法 [15]。

## 1.7 菌株 Teng-A 对铁氧化细菌 *At. ferrooxidans* LJ-1 和 *L. ferriphilum* LJ-2 对 $\text{Fe}^{2+}$ 氧化能力的影响

好氧条件下 ,将菌株 Teng-A 分别与菌株 *At. ferrooxidans* LJ-1 和菌株 *L. ferriphilum* LJ-2 在 M9K 液体培养基中培养 (略有改动 ,加入 0.2% 葡萄糖 ,pH 调为 3.0) (Silverman et al. 1959) ,以不加菌株 Teng-A 为对照 ,检测菌株 Teng-A 对 *At. ferrooxidans* LJ-1 和 *L. ferriphilum* LJ-2 对  $\text{Fe(II)}$  氧化能力的影响 ,以溶液中  $\text{Fe(II)}$  的量为指标。

# 2 结果和讨论

## 2.1 菌株 Teng-A 的形态和生理生化特征

经富集培养后样品涂布在含有  $\text{Fe}^{2+}$  的固体平板上 ,进一步培养后获得了一些边缘为乳白色、中间为铁锈色的菌落 ,经多次划线分离 ,从中得到一纯菌株 ,命名为菌株 Teng-A。该菌株的菌落为圆形 ,早期乳白色 ,表面干燥 ,凸起 ,边缘整齐 ,培养后期菌落变为淡黄色。菌体为短杆状 ,大小为  $0.6 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$  ,单生或成链状排列 ,革兰氏染色反应为阴性 ,有周生鞭毛 ,未见芽孢 (图 1)。

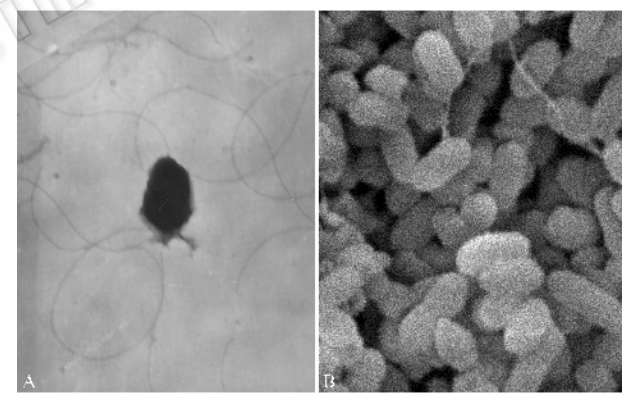


图 1 菌株 Teng-A 在透射电镜 (A ,20000 ×) 和扫描电镜 (B ,10000 ×) 下细胞形态

Fig.1 Cell morphology of strain Teng-A under transmission electron microscopy (A ,20000 ×) and scanning electron microscopy (B ,10000 ×) .

菌株 Teng-A 好氧生长 ,可以利用多种有机物做为碳源和能源 ;但在好氧条件下不能利用  $\text{Fe(II)}$  、 $\text{S}$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$  等做为能源。当  $\text{Fe(III)}$  存在时 ,可以利用  $\text{Fe(III)}$  为电子受体进行厌氧生长。菌株 Teng-A 生长温度范围为 10 ~ 45℃ ,最适生长温度 29 ~ 33℃ ;生长 pH 范围 2.0 ~ 6.0 ,最适生长 pH 为 3.0 ~ 4.0 ;无 NaCl 时生长最好 ,最高 NaCl 耐受浓度为 5%。菌株 Teng-A 基因组 DNA 的 (G + C)mol% 为 69.6mol%。

菌株 Teng-A 氧化酶阴性 ,接触酶阳性 ,酪素水解阳性。对新霉素、卡那霉素、链霉素、红霉素有抗性 ,而对四环素、氯霉素、氧氟西林、青霉素无抗性。好氧生长时可以利用葡萄

糖、蔗糖、核糖、阿拉伯糖、半乳糖、果糖、木糖、麦芽糖、甘露糖、棉子糖、谷氨酸、柠檬酸和甘油,但是不能利用乙醇、苹果酸、琥珀酸、酒石酸钾钠、乙酸、甘露醇、山梨(糖)醇、葡(萄)糖酸盐、乳酸盐、蛋白胨、酵母提取纤维、纤维糖、肌糖、丁醇、丁酸盐、丙酸盐、天门冬素、天门冬氨酸盐、亮氨酸及白氨酸等。

2.2 系统发育分析和生理生化特性比较

根据菌株 Teng-A 的 16S rRNA 基因测序结果(GenBank 核

酸登录号为 DQ631810)进行 BLASTn 分析表明,菌株 Teng-A 与嗜酸杆菌属细菌的 16S rRNA 基因相同性最高,与 *A. cryptum*、*A. multivorum* 和 *A. organovorum* 的 16S rRNA 基因的同源性均为 99%。菌株 Teng-A 与 *Acidiphilium* 属其他菌种的系统发育分析结果见图 2。根据这些结果,我们初步判定菌株 Teng-A 可能是 *Acidiphilium* 属的成员。表 1 为菌株 Teng-A 以及 *Acidiphilium* 属其它菌种的生理生化性状比较。

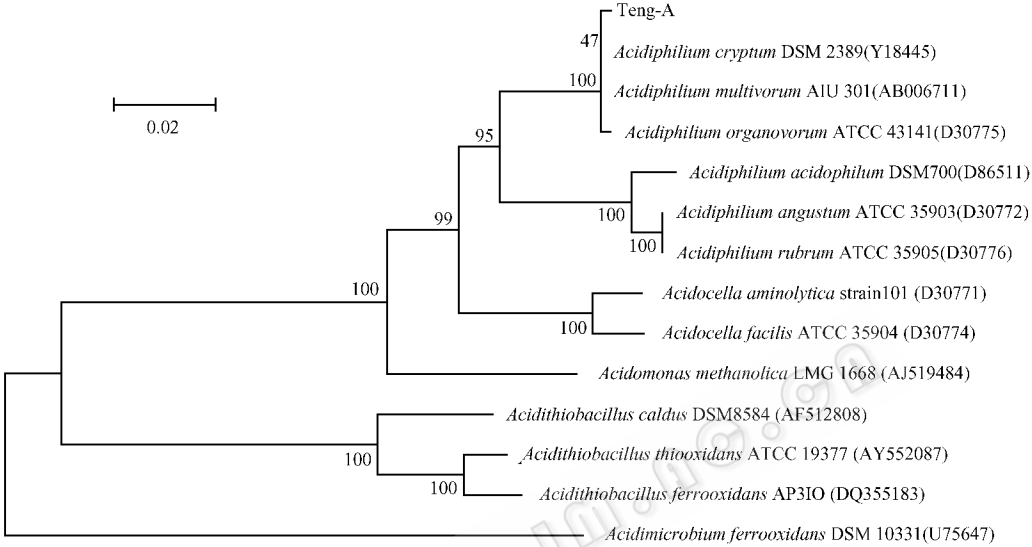


图 2 依据 16S rRNA 基因序列构建的菌株 Teng-A 和相关属菌种的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of Teng-A and related bacterial species. The tree was constructed according to 16S rRNA gene sequence with MEGA3.1 software.

表 1 菌株 Teng-A 与 Acidiphilium 属其它菌种(株)主要生理性状的比较

Table 1 List of some physiological properties of strain Teng-A and members of the genus Acidiphilium							
Strains	Flagella or motility	G	Utilization of S	Optimal growth temperature/℃	Growth pH range	Growth NaCl concentration/(g/L)	(G + C) mol %
1	Peitrichous	-	-	29 ~ 33	2.0 ~ 6.0	< 5	69.6
2 <sup>a</sup>	monochous or amphitrichous	+	-	35 ~ 41	1.9 ~ 5.9	/	68 ~ 70
3 <sup>a</sup>	monochous	+	-	/	acidophilic	/	63
4 <sup>a</sup>	monochous	-	-	27 ~ 35	1.9 ~ 5.6	< 3	66.2 ~ 68.1
5 <sup>a</sup>	monochous	+	/	30 ~ 45	acidophilic	< 7.5	67
6 <sup>a</sup>	monochous	-	/	Moderate temperature	acidophilic	< 3.5	62.4 ~ 64.4
7 <sup>a</sup>	motility	-	/	< 50	acidophilic	/	64
8 <sup>a</sup>	motility	-	/	25 ~ 37	3.0 ~ 6.0	/	58 ~ 59
9 <sup>a</sup>	/	-	+	Moderate temperature	2 ~ 6.0	/	63 ~ 64

1.Teng-A; 2. *A. Cryptum*; 3. *A. rubrum*; 4. *A. Multivorum*; 5. *A. Angustum*; 6. *A. facilis*; 7. *A. organovorum*; 8. *A. aminolytica*; 9. *A. acidophilum*; G. gram strain; /, without detection; -, negative; +, positive. <sup>a</sup> The physiological properties data are cited from literatures<sup>[6-11]</sup>.

2.3 厌氧条件下菌株 Teng-A 对 Fe<sup>3+</sup>(Ⅲ)还原能力

无论以葡萄糖还是以 H<sub>2</sub> 作为底物,在厌氧条件下菌株 Teng-A 均具有还原 Fe(Ⅲ)的能力(图 3-A)。当以 0.2% 的葡萄糖(气相为 100% CO<sub>2</sub>)为底物时,22d 后 Fe(Ⅱ)浓度达到 254.32mg/L,Fe(Ⅲ)的还原速率为 11.56mg/L·day;当以 H<sub>2</sub>(气相中 CO<sub>2</sub> 比例为 20%)为底物时,22d 后 Fe(Ⅱ)浓度达到 337.48mg/L,Fe(Ⅲ)的还原速率为 15.34mg/L·day。菌株 Teng-A 对 Fe(Ⅲ)的还原过程中,溶液 pH 从 4.0 下降到 2.0,表明还原过程有酸产生(图 3-B)。

2.4 菌株 Teng-A 对细菌 At. ferrooxidans 和 L. ferriphilum 铁氧化代谢的影响

*At. ferrooxidans* 和 *L. ferriphilum* 是生物冶金反应器中普遍存在并且十分重要的铁氧化细菌,它们氧化硫铁矿、砷黄铁矿等中的 Fe(Ⅱ),产生对浸矿过程十分重要的氧化剂 - Fe(Ⅲ)。为了研究菌株 Teng-A 对细菌 *At. ferrooxidans* 和 *L. ferriphilum* 铁氧化代谢的影响,分别与细菌 *At. Ferrooxidans* LJ-1 和 *L. ferriphilum* LJ-2 进行混合培养,并测定了 Fe(Ⅱ)的氧化速率,结果表明(图 4)当菌株 Teng-A 存在时,培养初

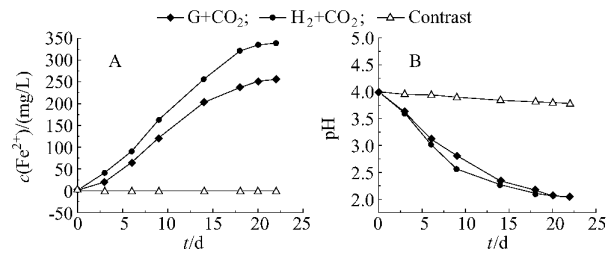


图3 菌株 Teng-A 分别以葡萄糖和  $\text{H}_2$  为底物对  $\text{Fe(III)}$  还原(A)和培养过程中 pH 变化(B)

Fig. 3 Ferric iron [ $\text{Fe(III)}$ ] reduction with glucose or molecular hydrogen by strain Teng-A (A) and changes of pH during growth of strain Teng-A (B).

期前 3d)菌株 LJ-1 和 LJ-2 氧化  $\text{Fe(II)}$  的速率分别为  $0.44\text{g/L}\cdot\text{day}$  和  $0.41\text{g/L}\cdot\text{day}$ , 比菌株 LJ-1( $0.64\text{g/L}\cdot\text{day}$ )和 LJ-2( $0.60\text{g/L}\cdot\text{day}$ )单独培养时  $\text{Fe(II)}$  的氧化速率减慢,我们推测这可能是一部分被氧化的  $\text{Fe(II)}$  又被菌株 Teng-A 还原了。但当培养时间超过 5d 时,  $\text{Fe(II)}$  最终被全部氧化,说明菌株 Teng-A 的存在不影响最终的反应平衡。

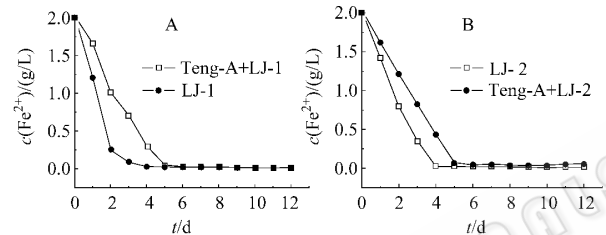


图4 菌株 Teng-A 对 *At. ferrooxidans* LJ-1(A)和 *L. ferriphilum* LJ-2(B)氧化  $\text{Fe}^{2+}$  的影响

Fig. 4 Effects of strain Teng-A on  $\text{Fe(II)}$  oxidation by *At. ferrooxidans* LJ-1 (A) and *L. ferriphilum* LJ-2 (B).

对培养过程中培养液中形成的沉淀形态观察发现,铁氧化细菌 *At. ferrooxidans* LJ-1 和 *L. ferriphilum* LJ-2 单独存在时形成的沉淀容易贴附在三角瓶内壁表面,形成一层铁锈色的膜,这些沉淀在扫描电子显微镜下观察发现其表面较整齐、光滑,为片状或者层状(图 5-A);而当与菌株 Teng-A 共同培

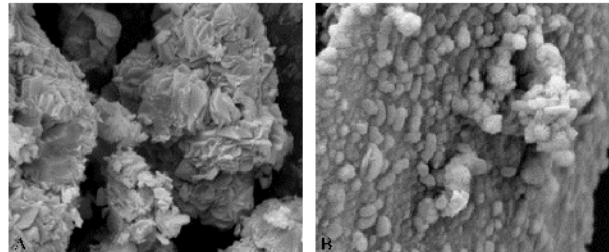


图5 铁氧化细菌 *L. ferriphilum* LJ-2 单独培养(A,  $10000\times$ )和与菌株 Teng-A 共同培养(B,  $10000\times$ )时形成的铁氧化物沉淀的扫描电镜图

Fig. 5 The morphology of precipitations produced by the [ $\text{Fe(II)}$ ] oxidizer *L. ferriphilum* LJ-2 when it was cultivated alone (A,  $10000\times$ ) and co-cultured with strain Teng-A (B,  $10000\times$ ) observed with scanning electron microscopy.

养时,培养液中形成的沉淀为絮状,不易在三角瓶内壁表面形成膜,收集的絮状沉淀在扫描电子显微镜下观察发现其表面为蜂窝状,沉淀虽经洗涤,表面仍附着有菌体细胞(图 5-B)。

### 3 讨论

本研究从云南腾冲地区硫磺热泉周围的泥土样品中分离获得了一株属于 *Acidiphilium* 的细菌,该菌株能够在  $\text{pH} 3\sim 4$ 、温度  $29\sim 33^\circ\text{C}$  进行化能异养生长,存在葡萄糖或者  $\text{H}_2$  条件下可以进行铁呼吸[ $\text{Fe(III)}$  还原],这些性质与它来源于富含矿物的酸性环境相关。从菌株 Teng-A 的系统发育关系来看,与 *Acidiphilium* 的菌种关系最为密切,16S rRNA 基因相似性最高达到 99% 以上,其他生理生化性质包括 DNA 的 G+C 含量等也与 *Acidiphilium* 属的描述相符,表明菌株 Teng-A 属于 *Acidiphilium* sp.。但是,菌株 Teng-A 细胞结构、生长温度范围、耐受 NaCl 浓度等方面,存在明显不同,因此菌株 Teng-A 是 *Acidiphilium* 属的一个新成员。

近年来,微生物的协同作用在浸矿方面越来越引起人们的注意,发现不仅硫氧化细菌和铁氧化细菌等自养型微生物的协同作用使得浸矿效率得到很大提高,而且异养型微生物例如 *Acidiphilium* sp.、*Alicyclobacillus* sp. 等在生物浸矿体系中的作用也越来越引起人们的注意<sup>[17,18]</sup>。本文报道的 *Acidiphilium* sp. 菌株 Teng-A 在  $\text{Fe(III)}$  还原过程氧化自养微生物产生的有机物,从而消除有机物对自养微生物生长的抑制和毒害作用;另一方面, *Acidiphilium* 还原  $\text{Fe(III)}$  生成  $\text{Fe(II)}$ , 可为铁氧化细菌源源不断地提供生长所需能源,并且消除有机物对自养微生物生长的抑制作用、促进铁氧化细菌的生长,利用 *Acidiphilium* sp. 这些性质,设计夹层培养(即在下层琼脂中混入 *Acidiphilium* 细胞,在上层琼脂中涂布自养微生物),可以大大促进进行铁氧化的自养微生物的生长,利用这种方法我们分离得到了多株自养铁氧化细菌。

我们的研究表明,把菌株 Teng-A 与铁氧化细菌 *At. ferrooxidans*、*L. ferriphilum* 等共同培养时并不影响最终的铁氧化平衡浓度,其对 *At. ferrooxidans*、*L. ferriphilum* 氧化亚铁离子的能力的影响不大,但是,当存在 *Acidiphilium* sp. 时,形成的铁氧化物的形态完全不同于 *At. ferrooxidans*、*L. ferriphilum* 单独培养时产生的沉淀物的形态。*Acidiphilium* 在自然界生物成矿中的作用及其对成矿类型的影响,将是我们进一步研究的关注点。

### 参考文献

[1] Lovley DR. Dissimilatory metal reduction. *Annu Rev Microbiol*, 1993, **47**: 263–290.  
[2] Dubiel M, Hsu CH, Chien CC, et al. Microbial iron respiration can protect steel from corrosion. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 1440–1445.  
[3] Kùsel K, Roth U, Drake HL. Microbial reduction of  $\text{Fe(III)}$  in the presence of oxygen under low pH conditions. *Environ Microbiol*, 2002, **4**: 414–421.  
[4] Pronk JT, Bruyn JC, Bos P, et al. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 2227

- [ 5 ] Harrison JAP. *Acidiphilium cryptum* gen. nov. , sp. nov. , heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. *Int J Syst Bacteriol* , 1981 , **31** : 327 – 332.
- [ 6 ] Wakao N , Shiba T , Hiraishi A , *et al.* Distribution of bacteriochlorophyll *a* in species of the genus *Acidiphilium*. *Curr Microbiol* , 1993 , **27** : 277 – 279.
- [ 7 ] Wichlacz PL , Unz RF , Langworthy TA. *Acidiphilium angustum* sp. nov. , *Acidiphilium facilis* sp. nov. , and *Acidiphilium rubrum* sp. nov. : acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic coal mine drainage. *Int J Syst Bacteriol* , 1986 , **36** : 197 – 201.
- [ 8 ] Johnson DB , Rolfe S , Hallberg KB , *et al.* Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environ Microbiol* , 2001 , **3** ( 10 ) : 630 – 637.
- [ 9 ] Harrison JAP , Jarvis BW , Johnson JJ. Heterotrophic bacteria from cultures of autotrophic *Thiooxidans ferrooxidans* : relationship determined by means of deoxyribonucleic acid homology. *J Bacteriol* , 1980 , **43** : 448 – 454.
- [ 10 ] Lobos JH , Chisolm TE , Bopp LH , *et al.* *Acidiphilium organovorum* sp. nov. , an acidophilic heterotroph isolated from a *Thiobacillus ferrooxidans* culture. *Int J Syst Bacteriol* , 1986 , **36** : 139 – 144.
- [ 11 ] Bhattacharyya S , Chakrabarty BK , Das A , *et al.* *Acidiphilium symbioticum* sp. nov. , an acidophilic heterotrophic bacterium from *Thiobacillus ferrooxidans* cultures isolated from Indian mines. *Can J Microbiol* , 1991 , **37** : 78 – 85.
- [ 12 ] Temple KL , Colmer AR. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium : *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* , 1951 , **62** : 605 – 611.
- [ 13 ] 东秀珠 , 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京 : 科学出版社 , 2001.
- [ 14 ] Mandel M , Marmur J. Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Methods Enzymol* , 1968 , **12** : 195 – 206.
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] Silverman MP , Lundgren DG. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium for harvesting procedure for securing high cell yields. *J Bacteriol* , 1959 , **77** : 642 – 647.
- [ 17 ] Bacelar-Nicolau P , Johnson DB. Leaching of pyrite by acidophilic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures. *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** : 585 – 590.
- [ 18 ] Kinnunen PHM , Robertson WJ , Plumb JJ , *et al.* The isolation and use of iron-oxidizing moderately thermophilic acidophiles from the Collie coal mine for the generation of ferric iron leaching solution. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2003 , **60** : 748 – 753.

## Isolation and characterization of *Acidiphilium* strain Teng-A and its metabolism of Fe( III ) during pure- and mixed cultivation

LIU Yan-yang<sup>1,2</sup> , CHEN Zhi-wei<sup>1,2</sup> , JIANG Cheng-ying<sup>1\*</sup> , LIU Shuang-jiang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

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

**Abstract** : An acidophilic , aerobic and chemoheterotrophic bacterial strain Teng-A was isolated from acidic environmental samples collected at sulfidic hot springs of Tengchong County , Yunnan Province , China. Cells of strain Teng-A was rod-shaped ( 0.6 ~ 0.8  $\mu\text{m}$   $\times$  1.0 ~ 1.5  $\mu\text{m}$  ) , Gram-negative , motile with flagella. Strain Teng-A grew well at temperature of 29 ~ 33°C and at pH of 3.0 ~ 4.0. It used a wide variety of organic compounds for growth , but did not use ferrous iron , elemental sulfur , thiosulfate and tetrathionate as the sole energy source. Its G + C content was determined to be 69.6 mol% . Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence demonstrated that it was closely related to species of *Acidiphilium*. Under anoxic conditions , the strain Teng-A reduced Fe( III ) to Fe( II ) with glucose or hydrogen as electron donor ( reduction rate is 11.56mg/L·day and 15.34mg/L·day , respectively ). Metabolisms/Oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* LJ-1 and *Leptospirillum ferrophilum* LJ-2 , in the presence and absence of strain Teng-A were studied. When incubated with strain Teng-A , the oxidation rates of Fe( II ) was slightly decreased at the first 3 days ( 0.44g/L·day and 0.41g/L·day respectively ) compared to pure culture of *At ferrooxidans* and *L. ferrophilum* , but all Fe( II ) was completely oxidized after 5 days. It was found that the morphologies of precipitates of Fe( III ) produced during pure and mixed cultivation were different. The potential application of *Acidiphilium* in bioleaching and its potential role during formation of precipitated ores were discussed.

**Keywords** : *Acidiphilium* sp. ; reduction of Fe( III ) ; ferric respiration ; bioleaching ; biomineralization

\* Corresponding author. Tel : 86-10-64807410 ; Fax 86-10-64807421 ; E-mail : jiangcy@sun.im.ac.cn.cn

Received : 5 July 2006 / Accepted : 13 July 2006 / Revised : 10 January 2007