

## 不同能源条件下中度嗜热嗜酸细菌多样性分析

刘飞飞, 周洪波\*, 符波, 邱冠周

(中南大学资源加工与生物工程学院 长沙 410083)

**摘 要** 采用黄铁矿、黄铜矿、硫酸亚铁和硫粉混合物作为主要能源物质在 50°C 条件下分别培养中度嗜热细菌混合物, 研究其细菌多样性。提取细菌基因组总 DNA, 采用 PCR 结合限制性酶切片多态性分析 (RFLP) 方法进行细菌 16S rRNA 基因的系统发育分析, 比较不同能源条件下富集培养的混合细菌群落构成的差异。从 3 个培养物中共获得阳性克隆 303 个并进行 RFLP 分析, 对 29 种不同酶切谱型的克隆插入序列进行测定和系统发育分析。大部分序列与已报道的浸矿微生物 16S rRNA 序列相似性较高 (89.1% ~ 99.7%), 归属于硫化叶菌属的耐温氧化硫化杆菌 (*Sulfobacillus thermotolerans*) 和热氧化硫化杆菌 (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*), 嗜酸硫杆菌属的喜温硫杆菌 (*Acidithiobacillus caldus*), 钩端螺旋菌属的嗜铁钩端螺旋菌 (*Leptospirillum ferriphilum*) 以及 uncultured forest soil bacterium、uncultured proteobacterium。其中 *Acidithiobacillus caldus*, *Sulfobacillus thermotolerans*, *Leptospirillum ferriphilum* 3 种细菌为三类能源物质培养物中的优势细菌类群。*L. ferriphilum* 在黄铁矿培养体系 (53.8%) 和硫酸亚铁和硫粉为能源的培养体系中 (45.9%) 中丰度最高, 在以黄铜矿为能源物质的培养体系中, *S. thermotolerans* 的比例大幅上升 (70.1%)。

**关键词**: 中度嗜热细菌, 生物多样性, 生物浸矿, 喜温硫杆菌 (*Acidithiobacillus caldus*), 耐温氧化硫化杆菌 (*Sulfobacillus thermotolerans*); 嗜铁钩端螺旋菌 (*Leptospirillum ferriphilum*)

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)03-0381-06

利用微生物浸出低品位矿物中的金属, 又称为矿物的生物氧化法, 是近几十年来发展很快的一项新技术。与传统处理工艺相比, 生物氧化法具有简单、易操作、成本低、能耗少的特点, 最为重要的是其资源利用率高和对环境危害小, 在资源短缺和环境污染问题日益严重的今天更加引起了人们的重视<sup>[1]</sup>。然而, 生物氧化法处理矿物速率较低是该技术的一个主要障碍, 了解浸矿体系中的微生物种群类型及各种微生物在矿物浸出中的作用, 对于调控微生物种群结构、优化浸出过程, 提高浸出速率具有重要意义。

生物氧化法在实际工业生产当中主要采用堆浸和槽浸。由于微生物代谢热量和硫化物氧化产生热量的积累, 部分堆浸和槽浸体系的温度可快速升至 50°C 以上, 一些与外界隔绝的区域最高温度甚至可以达到 60°C ~ 80°C<sup>[2]</sup>。高温条件有助于加快硫化矿物的氧化, 提高浸矿速度, 但同时也造成了浸矿体系当中微生物群落组成结构的变化: 适应于 40°C 以下酸性浸矿环境的嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、嗜酸氧化硫硫杆菌 (*Acidithiobacillus thiooxidans*) 难以生存, 而适应 40°C

~ 50°C 酸性环境的硫片菌属等、适应于 50°C 以上酸性环境条件的硫化叶菌属等少数几种微生物数量快速增长<sup>[1,3]</sup>。这些中度嗜热嗜酸细菌和极端嗜热嗜酸细菌被认为在硫化矿物的硫、铁氧化过程中起到关键作用, 近几年来关于此类细菌的研究也倍受关注<sup>[4]</sup>。有研究表明, *Ferroplasma acidiphilum* 等一些极端嗜热古菌有助于金属矿物的增溶和浸出, 同样参与了硫、铁的氧化过程, 但由于古细菌细胞壁结构的特殊性, 导致其不耐受过高的机械剪切力, 一定程度上限制了其在工业上的应用<sup>[5,6]</sup>。

中高温酸性条件下, 不同矿物的生物浸出体系在经过一定时间运行之后, 浸出率逐渐趋于稳定, 此时的微生物组成也处于群落演化的较稳定阶段, 对于矿物的浸出效果也最高, 研究此时的微生物群落组成关系对于了解和优化矿物的微生物浸出意义重大。目前, 对于浸矿体系尤其是中高温浸矿环境中细菌的群落组成研究仍然很少, 且往往集中于某种单一矿物的生物浸出体系<sup>[7,8]</sup>。不同矿物的生物浸出体系在达到稳定浸出期时, 微生物的群落组成是否存在差异? 硫酸亚铁和硫粉作为能源物质的细菌人工培养体系中, 微生物群落的形成与演化是否和

基金项目: 国家 973 项目 (2004CB619204), 国家自然科学基金 (40646029)

\* 通讯作者。Tel: 86-731-8877216, E-mail: zhouhb@mail.csu.edu.cn

作者简介: 刘飞飞 (1981 - ) 男, 河南郑州人, 硕士研究生, 从事微生物生态学和生物冶金研究。E-mail: liufei106@gmail.com

收稿日期: 2006-10-08, 接受日期: 2006-11-21, 修回日期: 2007-02-22

普通矿物浸出系统的浸矿溶液中微生物的群落组成有所不同? 这些问题的回答将有助于人们对中度嗜热嗜酸温浸矿微生物的研究与应用。因此在本研究中, 针对黄铜矿、黄铁矿、硫酸亚铁和硫粉混合物 3 种不同培养体系, 分别提取了基因组总 DNA, 采用 PCR 结合限制性酶切片多态性分析(RFLP)方法对其中的主要细菌类群组成进行分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和培养条件:** 将采样自中国云南、江西、湖南、广东、甘肃等省矿场或温泉, 含有多种微生物的泥、酸性浸矿水样品相互混合, 作为接种物, 不经细菌分离直接用于实验。培养基采用 9k 基本盐<sup>[9]</sup>分别添加 1%(W/V)黄铜矿、黄铁矿、硫酸亚铁和硫粉混合物作为能源, pH2.0, 50℃, 200r/min 摇床培养, 细菌接种量 5%(V/V), 下文中 3 种培养体系分别以样品 A、样品 B、样品 C 表示。所用矿物经破碎, 用 75 $\mu$ m 孔径筛网过筛备用, 矿物元素组成分析见表 1。

表 1 实验用矿物主要成分分析

Table 1 Main composition of the minerals used in the study

Element	Ore Sample( % <sup>a</sup> )		Element	Ore Sample( % <sup>a</sup> )	
	Pyrite	Chalcopyrite		Pyrite	Chalcopyrite
Fe	37.46	24.12	Hg	< 0.0001	< 0.0001
S	49.73	36.47	As	0.74	0.002
Cu	0.082	36.02	Cr	0.006	0.006
Pb	1.02	8.49	Ag	0.003	< 0.001
Co	0.005	0.02	Zn	5.38	1.08
Ni	0.016	0.03			

<sup>a</sup>( wt/wt )

**1.1.2 主要试剂和仪器:** Taq DNA 聚合酶( MBI Fermentas, 美国); 16S rRNA 基因扩增引物<sup>[10]</sup> 27f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492r: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'; pGEM-T 载体扩增引物 T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', SP6: 5'-ATTTAGG TGACACTATAG-3' 引物由北京三博远志生物公司合成; 小量 DNA 凝胶回收试剂盒( Promega, 美国); pGEM-T 载体( Promega, 美国); 核酸内切酶 Afa I、Msp I( TAKARA, 日本); T gradient Thermocycler PCR 仪( Biometra, 美国); 小型台式高速离心机( Eppendorf, 德国); 紫外凝胶分析仪( UVIdoc, 英国); 序列测定北京三博远志生物公司完成。

### 1.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

**1.2.1 总 DNA 提取:** 15d 细菌培养物, 取固液混合样 5mL 用 0.22 $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 滤余物参照 Hurt 等<sup>[9]</sup>的方法提取总 DNA。所得 DNA 经过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后, 切下目的条带, 按照凝胶回收试剂

盒使用说明进行纯化回收。

**1.2.2 PCR 扩增:** 采用 50 $\mu$ L 反应体系, 反应条件: 94℃ 5min, 94℃ 1min, 65℃ 45s, 72℃ 1.5min, 30 个循环; 72℃ 10min。

### 1.3 16S rRNA 文库的构建与筛选

经过纯化的 PCR 扩增产物按照 pGEM-T 载体试剂盒说明进行克隆并筛选出含重组质粒的阳性克隆子。

### 1.4 阳性克隆子的 PCR-RFLP 分析

挑取阳性克隆子至新鲜 LB 平板( 含 100 $\mu$ g/mL Ampicillin ) 倒置过夜生长后, 挑取单菌落接入 30 $\mu$ L 无菌水中, 99.9℃ 3min, 冷却后直接作为模板进行 PCR。引物采用 T7-SP6, 其它药品及 PCR 反应程序均与扩增 16S rRNA 相同。扩增产物用 4 碱基限制性内切酶 Afa I ( 1U ), Msp I ( 1U ) 过夜消化, 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 选出酶切图谱不同的克隆子。

### 1.5 构建系统发育树

选取 PCR-RFLP 筛选出的阳性克隆子, 送北京三博远志生物技术公司进行序列测定。测序所得 16S rRNA 序列, 采用 Blast 软件在 GenBank 进行相似性搜索( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> ), 获取近似序列及对应菌种信息。用 Clustal X<sup>[11]</sup> 程序进行比对, 用邻接法( Neighbor-joining Method )<sup>[12]</sup> 构建系统发育树<sup>[13]</sup>。拓扑分析为 1000 次重复取样结果。

## 2 结果

### 2.1 三类培养物细菌总 DNA 及 16S rRNA 序列扩增

从 3 个样品中都成功获得了可直接进行 PCR 扩增的总 DNA, 通过 27f-1492r 引物进行 PCR 扩增得到 16S rRNA 序列, 扩增所得片断大小约为 1.5kb 左右, 条带单一, 无明显非特异性扩增现象。

### 2.2 16S rRNA 文库的构建与 RFLP 分析

从文库中共挑取白色菌落 345 个, 其中阳性克隆 303 个( 样品 A 106, 样品 B 99, 样品 C 98 ), 阳性率 87.8%。Quantity one 凝胶分析软件对 RFLP 图谱分析表明, 205 个阳性克隆中存在 29 种不同的酶切谱型, 在以黄铁矿和黄铜矿为能源的两个培养样品中各存在 14 种谱型、在以硫酸亚铁和硫粉混合物为能源的培养样品中存在 13 种谱型( 图 1 )。3 个样品所得克隆子之间, BS-A12 与 BS-B42; BS-A20 与 BS-C20; BS-A4 与 BS-C100; BS-A80 与 BS-B16; BS-A3, BS-B9 与 BS-C60; BS-A83, BS-C8 与 BS-B13; BS-A94 与 BS-C3; BS-B3 与 BS-A86; BS-C94 与 BS-B71; BS-C1 与 BS-A85 酶切图谱一致, 视为同种细菌, 均选取后者进行了序列测定, 重复序列不再另行测定。

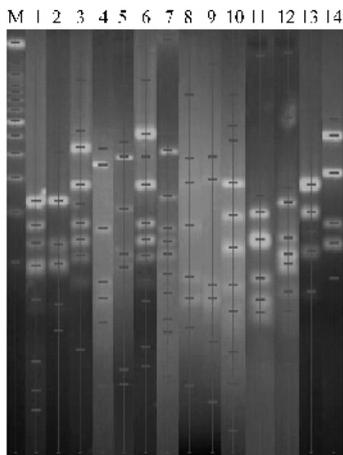


图1 阳性克隆 PCR 产物 RFLP 电泳图谱示意图

Fig.1 Part results agarose gel electrophoretic restriction fragment patterns by *Afa* I and *Msp* I of PCR products of positive clones. M was DL100 Marker, and 1-14 represents clone SA1, SA2, SA3, SA4, SA7, SA8, SA12, SA20, SA25, SA83, SA84, SA85, SA92, DA94.

### 2.3 序列对比及系统发育分析

对经过 RFLP 分析获得的 29 个克隆的插入序列进行序列测定,测序结果经过 BLAST 软件分析显示,全部 29 个 16S rRNA 序列所对应的细菌分属于 5 个属的 7 个种。其中 BS-A25, BS-B42, BS-A29, BS-C20, BS-B58, BS-C100, BS-A84 与嗜酸硫杆菌属的 *Acidithiobacillus caldus* 具有较高同源性,相似度为 99.4% ~ 99.7%, BS-A7, BS-C15, BS-A85, BS-A86, BS-C6, BS-C3, BS-C105, BS-A92 归于勾端螺旋菌属 (*Leptospirillum*) 相似性为 89.1% ~ 99.8%, 其中 BS-A7, BS-C15, BS-A85, BS-A86, BS-C6 与 *Leptospirillum ferriphilum* 有很高相似性,而 BS-C3 与 *Leptospirillum ferrooxidans* 相似性较高。BS-C60, BS-B5, BS-B71, BS-B16, BS-B99, BS-B44, BS-C11, BS-C13, BS-C27, BS-B13, BS-B17, BS-B70 归于硫化叶菌属 (*Sulfobacillus*) 相似度为 92.7% ~ 99.3%, BS-C60, BS-B5, BS-B71, BS-B16, BS-B99, BS-B44, BS-C11, BS-C13, BS-C27, BS-B13 与 *Sulfobacillus thermotolerans* 亲缘关系较紧密,而 BS-B17, BS-B70 进化距离上更接近于 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*。此外,BS-B54 和 BS-B92 在进化距离上与 uncultured forest soil bacterium clone (AY913475) 接近, BS-C104 与 uncultured proteobacterium clone EV221H2111601SAH95 (DQ223234) 相似度较高。图 2 为依据样品 A ~ C 中克隆子测序结果构建的系统发育树。

### 2.4 细菌丰度统计

通过统计具有相同 RFLP 图谱的克隆子数目,

间接反映不同培养体系中的菌种丰度。在分别以黄铁矿、黄铜矿、硫酸亚铁和硫粉为主要能源物质的培养体系中,存在相类似的优势菌种,例如, *L. ferriphilum* 在黄铁矿培养体系中占有很高丰度 (53.8%) 这种情况同样出现在以硫酸亚铁和硫粉为能源的培养体系中 (45.9%), 同样的, 在黄铁矿培养体系中所占比例约为 23.6% 和 22.6% 的 *S. thermotolerans* 和 *A. caldus*, 在以硫酸亚铁和硫粉为能源的培养体系中占了 41.8% 和 10.2% 的比例。在以黄铜矿为主要能源物质的培养体系中情况稍有差别,主要体现在 *S. thermotolerans* 比例的大幅上升 (70.1%), *A. caldus* 仍然是该体系中的主要优势菌种之一 (17.8%), 但 *L. ferriphilum* 所占比例与其它两种培养体系相比则降低到了 8.9%。图 3 为 3 种培养体系中菌种的比例关系。

## 3 讨论

平板固体培养等传统方法在研究微生物群落组成方面,尤其是对以化能自养细菌为主的极端酸性浸矿环境中的微生物种群研究方面存在较大不足,主要体现在 (1) 固体培养基所含的微量有机物等杂质,例如琼脂或琼脂糖中的少量糖份,对于 *A. ferrooxidans* 等自养微生物生长有明显抑制作用<sup>[14]</sup>, 即使选用高纯度的琼脂糖凝胶,细菌的生长情况仍然很差,可能由于凝胶中的糖分子由于酸水解作用被释放,从而抑制了微生物的细胞生长<sup>[41]</sup> (2) 液体稀释分离、固体平板分离等传统方法在对混合微生物培养和检测过程中,由于其难以去除的选择压力有可能造成微生物种群类型和比例关系的变化,从而导致检测结果与实际情况的偏差。随着分子生物学技术的发展,包括 PCR-RFLP, PCR-DGGE 在内的一批新技术的应用,使得微生物生态学和微生物群落结构研究摆脱了传统依靠纯培养分离鉴定的束缚,快速、全面、准确地反映微生物多样性成为可能。

本文通过 PCR-RFLP 方法研究了中高温酸性条件下,以黄铁矿、黄铜矿、硫酸亚铁和硫粉混合物为主要能源物质的培养体系在稳定浸出时期,中度嗜热微生物群落的组成情况,并对 3 种培养体系的菌落组成进行了比较,结果表明 *S. thermotolerans*, *A. caldes* 和 *L. ferriphilum* 3 种细菌在上述培养体系中均占有较高丰度,这与 S. Foucher<sup>[7]</sup>、Naoko Okibe<sup>[15]</sup> 等人的报道基本一致。其中, *S. thermotolerans* 是一种铁、硫氧化细菌,即能参与矿物或培养液中  $Fe^{2+}$  氧化为  $Fe^{3+}$  的反应,又能氧化代谢培养体系当中处

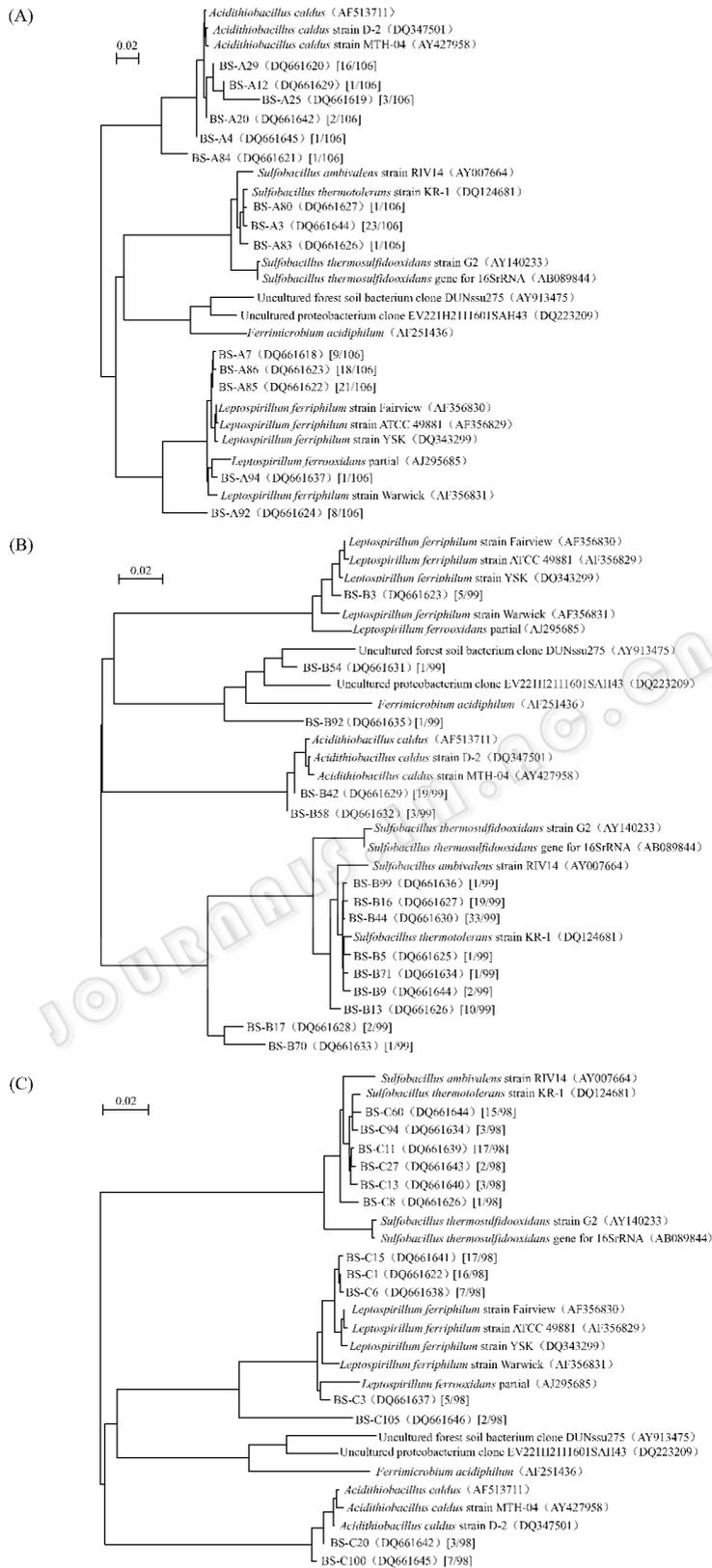


图 2 样品 A-C 中细菌系统发育树

Fig. 2 The phylogeny of the cultures and their relationship to other microorganisms (based on comparative 16S rRNA gene sequences). Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers in square brackets indicate the clone number out of the total clones. The scale bar indicates the 0.02 evolutionary distance unit.

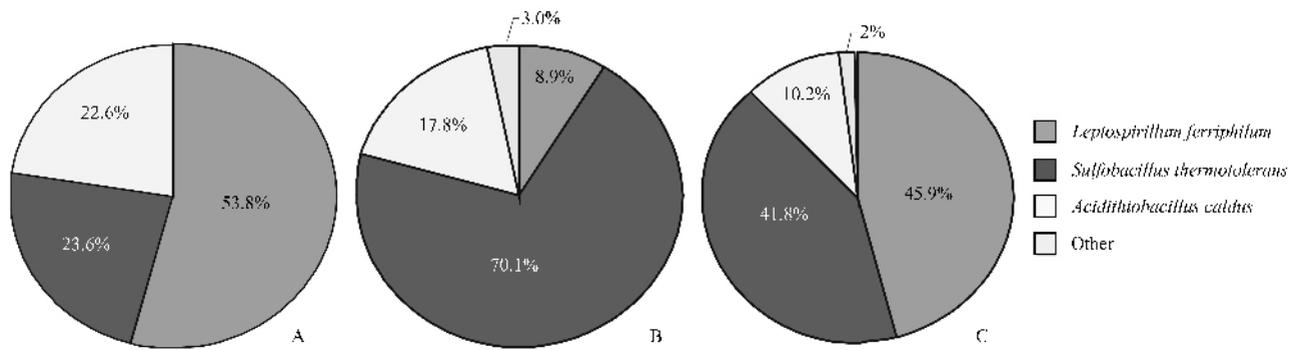


图3 样品 A-C 中细菌组成比例图

Fig.3 Proportion of bacteria in three samples. A : pyrite ; B : chalcopyrite ; C : pure ferrous iron supplemented with sulfur.

于还原态的硫<sup>[16]</sup>, *A. caldus* 只参与硫的氧化过程<sup>[17]</sup>; *L. ferriphilum* 只参与 Fe 的氧化过程<sup>[18]</sup>。有研究表明, *Leptospirillum* 属细菌的另一个种 *Leptospirillum ferrooxidans* 是一种重要的浸矿微生物<sup>[18]</sup>, 在本实验中基本没有发现, 可作如下解释, *L. ferriphilum* 与 *L. ferrooxidans* 相比, 基因组中 GC 含量更高, 更加耐受高温环境, *L. ferrooxidans* 似乎对于 50℃ 的高温条件及本实验的培养环境耐受性较差。

本文进一步对经过 15d 培养后, 3 种体系中主要细菌的组成比例差异进行了研究, 发现在以黄铁矿为主要能源物质的培养体系中 *L. ferriphilum* 所占比例最高, 相似的情况出现在以硫酸亚铁和硫粉混合物为能源的培养体系中, *L. ferriphilum* 所占比例均在 50% 左右, 两种培养体系中细菌比例差异主要体现在 *S. thermotolerans* 和 *A. caldus* 两种细菌在各自体系中所占比例的变化, 前一种培养体系中 *S. thermotolerans* 和 *A. caldus* 比例接近 1:1, 后一种培养体系中 *S. thermotolerans* 和 *A. caldus* 的比例则接近 4:1, 推测主要原因在于: 硫、铁被氧化过程中,  $Fe^{3+}$  在酸性环境下与体系中的  $SO_4^{2-}$ 、 $NH_4^+$ 、 $OH^-$  等形成黄钾铁矾和黄氨铁矾物质<sup>[19]</sup>, 消耗了对于黄铁矿溶蚀有重要作用的  $Fe^{3+}$  的同时, 生成的黄钾铁矾和黄氨铁矾沉淀附着于矿粉颗粒之上, 阻碍了矿物的利用效率, 而结晶的硫酸亚铁可溶于 9k 液体中, 不存在上述问题, 且离子化的硫酸亚铁较之于固体颗粒状态的黄铁矿更加容易被利用, 使得对铁和硫都有较高利用效果的 *S. thermotolerans* 相对于只能代谢硫的 *A. caldus* 比例增加。以黄铜矿为主要能源物质的培养体系中, 细菌比例最主要的变化体现在 *S. thermotolerans* 的大幅增加及 *L. ferriphilum* 的明显减少, 分析原因可能有以下几点 (1) 有研究认为, 黄铜矿和黄铁矿的浸出机理不同, 前者属于酸性矿物, 在生物浸出过程中产生固态硫, 附着于黄

铜矿物表面形成硫膜, 与上文提及的黄钾铁矾和黄氨铁矾沉淀一起阻碍了矿物的溶蚀; 后者属于酸性矿物, 在生物浸出过程中无固态硫产生, 矿物表面附着物也相对较少, 对矿物的进一步浸出影响较小<sup>[16]</sup>。对于黄铜矿培养体系而言, *S. thermotolerans* 可以代谢矿物表面的固态硫, 繁殖未受较大影响, 而 *L. ferriphilum* 则由于矿物表面成膜造成能源物质缺乏, 生长受到抑制。(2) *L. ferriphilum* 相对于 *S. thermotolerans* 对于  $Cu^{2+}$  较为敏感, 随着黄铜矿培养体系中  $Cu^{2+}$  浓度的增加, *L. ferriphilum* 生长受到抑制。

在实验中发现, 尽管克隆子的 PFLP 图谱存在多种类型, 但细菌种类则比较单一, 往往同种细菌的 16S rRNA 序列对应多种 RFLP 图谱, 分析原因如下: (1) 由于采样地点广泛, 虽然系统发育分析中被归为同种细菌, 但其 16S rRNA 序列可能存在个别碱基的差异, 从而造成酶切图谱差异 (2) 酶切时间和酶量等因素导致酶切效果产生差异, 从而造成部分克隆子的 PCR 产物酶切不完全, 导致 RFLP 图谱差异。

## 参 考 文 献

- [1] Briery L. 细菌的氧化作用. 陶德宁译. 湿法冶金, 1996, 4: 44-47.
- [2] Dees PM, Ghiorse WC. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 35: 207-216.
- [3] Takao I, Kazuo K, Tsuyoshi S. Isolation and some properties of a mesophilic and mixotrophic iron-oxidizing bacterium, OKM-9. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(10): 2059-2067.
- [4] Johnson DB. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology Ecol*, 1998, 27: 307-317.
- [5] Burton NP, Norris PR. Microbiology of acidic, geothermal springs of Montserrat: environmental rDNA analysis. *Extremophiles*, 2000, 4: 315-320.

- [ 6 ] Golyshina OV, Kenneth N. *Timmis Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**:1277.
- [ 7 ] Foucher S, Brunet FB, Hugues P, *et al.* Evolution of the bacterial population during the batch bioleaching of a cobaltiferous pyrite in a suspended-solids bubble column and comparison with a mechanically agitated reactor. *Hydrometallurgy*, 2003, **71**:5–12.
- [ 8 ] Demergasso CS, Galleguillos PPA, Escudero GLV, *et al.* Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy*, 2005, **80**:241–253.
- [ 9 ] Silverman MP, Lundgren DG. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferroplasma ferrooxidans*: I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology*, 1959, **77**:642–647.
- [ 10 ] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. Edited by E Stackebrandt & M Goodfellow. Chichester, UK: Wiley. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 1991:115–148.
- [ 11 ] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, **24**:4876–4888.
- [ 12 ] Saitou N, Nei MT. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Bio Evol*, 1987, **4**:406–425.
- [ 13 ] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, **39**:783–791.
- [ 14 ] Tuovinen OH, Niemela SI, Gyllenberg HG. Effect of mineral nutrients and organic substances on the development of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie Leeuwenhoek*, 1971, **37**:489–496.
- [ 15 ] Okibe N, Gericke M, Hallberg KB, *et al.* Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Applied and environmental microbiology*, 2003, **69**:1936–1943.
- [ 16 ] Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, *et al.* Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **63**:239–248.
- [ 17 ] Dopson M, Lindstrom EB. Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching. *Applied and environmental microbiology*, 1999, **65**(1):36–40.
- [ 18 ] Coram NJ, Rawlings DE. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates south African commercial biooxidation tanks that operate at 40 C. *Applied and environmental microbiology*, 2002, **68**(2):838–845.
- [ 19 ] Stott MB, Watling HR, Franzmann PD, *et al.* The role of iron-hydroxy precipitates in the passivation of chalcopyrite during bioleaching. *Minerals engineering*, 2000, **13**:1117–1127.

## Bacterial diversity analysis of moderately thermophilic microflora enriched by different energy sources

LIU Fei-fei, ZHOU Hong-bo\*, FU bo, QIU Guan-zhou

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

**Abstract**: Bacterial biodiversities of three moderately thermophilic bioleaching microfloras grown at 50°C on media with pyrite, chalcopyrite, and pure ferrous iron supplemented with sulfur as energy sources were investigated respectively. The 16S rRNA genes of the microorganisms in the cultures flasks were PCR amplified and cloned to identify the bacterial species by comparative sequence analysis, the structural differences of microfloras enriched by different energy sources were compared. A total of 303 clones were recovered and evaluated by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Cluster analysis identified 29 unique RFLP patterns, and the inserted 16S rRNA genes sequences were determined and for phylogenetic analysis. Most of sequences obtained were similar (89.1% ~ 99.7%) to the 16S rRNA gene sequences of the reported bioleaching microorganisms. The species identified from the flasks during bioleaching of pyrite, pure ferrous iron supplemented with sulfur, and chalcopyrite were closely related to *Acidithiobacillus caldus*, *Sulfobacillus thermotolerans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum*, two uncultured forest soil bacterium clones and one uncultured proteobacterium clone. Among these bacteria, *Acidithiobacillus caldus*, *Sulfobacillus thermotolerans* and *Leptospirillum ferriphilum* were the dominant bacterial species. *L. ferriphilum* was the most dominant species in microfloras enriched in media with pyrite and ferrous iron supplemented with sulfur as energy sources, the abundance were 53.8% and 45.9% respectively. In the culture with chalcopyrite as energy sources, *S. thermotolerans* had the highest abundance of 70.1%.

**Keywords**: moderately thermophilic bacteria; biodiversity; bioleaching; *Acidithiobacillus caldus*; *Sulfobacillus thermotolerans*; *Leptospirillum ferriphilum*

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB619204); National Nature Science Foundation of China (40646029)

\* Corresponding author. Tel 86-731-8877216; E-mail: zhouhb@mail.csu.edu.cn

Received: 8 October 2006/ Accepted: 21 November 2006/ Revised: 22 February 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>