

极端嗜酸性专性化能自养硫细菌有机质代谢的研究进展

刘相梅, 林建群, 田克立, 颜望明

山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要: 极端嗜酸性专性化能自养硫细菌具有独特的生理特性, 在农业、细菌冶金、含硫废水处理以及环境保护等方面发挥着重要作用, 但这类细菌在其特殊能源缺乏时不能代谢有机质, 生长缓慢, 代时长, 细胞得率低, 限制了它在实际生产中的应用效率。对其进行遗传改造, 构建能够利用有机质快速生长的基因工程菌, 将为这类细菌的工业化应用提供一条可行的途径。主要对极端嗜酸性专性化能自养硫细菌有机质代谢的研究进展进行了综述, 其中包括有机化合物的抑制作用、有机化合物的有限利用、中心代谢途径及物质的转运等, 还包括专性化能自养硫细菌有机质代谢遗传改造研究的最新进展。

关键词: 专性化能自养, 硫细菌, 有机质代谢

Metabolism of Organic Compounds by Extremely Acidophilic, Obligately Chemolithoautotrophic *Thiobacilli*-a review

Xiangmei Liu, Jianqun Lin, Keli Tian, and Wangming Yan

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: The extremely acidophilic, obligately chemolithoautotrophic thiobacilli can obtain energy from the chemolithotrophic oxidation of inorganic-sulphur. They have industrial applications in metal leaching, desulfurization from coal and oil, agriculture, and environmental protection. However, their inability to use organic substance, their slow growth rate and low cell yield, has limited their further industrial use. The construction of engineered strains with better growth rate and improved ability to use organic compounds is important. In this paper, the inhibition of growth by organic compounds, limited use of organic compounds, central metabolic pathways, and transport mechanism of the extremely acidophilic obligately chemolithoautotrophic thiobacilli are reviewed, as well as the current research progress in their genetic modification to use organic compounds.

Keywords: obligately chemolithoautotrophic, thiobacilli, metabolism of organic compounds

Received: April 18, 2007; **Accepted:** May 22, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation (No. 30670064), the National Basic Research Program (No. 2004CB619202), and the Reward Fund for Young Scientists of Shandong Province (No. 2004BS08006).

Corresponding author: Xiangmei Liu. Tel: +86-531-88364384; E-mail: liuxiangmei@sdu.edu.cn.

Jianqun Lin. E-mail: jianqunlin@sdu.edu.cn

国家自然科学基金资助 (No. 30670064), 国家重点基础研究发展计划(973) (No. 2004CB619202), 山东省优秀中青年科学家奖励基金计划 (No. 2004BS08006)资助。

化能自养细菌可以在完全无机的培养基中生长,以 CO_2 或碳酸盐为主要碳源,从无机物的氧化反应中获得能量。自被发现之日起,研究化能自养细菌在完全无机的环境中摄取生活物质的非凡能力,与外源有机质的关系成为科学界的一项重要课题。

硫细菌是一类引起元素硫和还原态无机硫化物氧化的化能无机自养菌。极端嗜酸性氧化硫硫杆菌 (*Acidithiobacillus thiooxidans*)、氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*)等,不能利用有机质,被称为专性化能自养硫细菌;新型硫杆菌(*Thiobacillus novellas*)、中间硫杆菌(*Thiobacillus intermedius*)等,既能自养生长,也能异养生长,被称为兼性化能自养硫细菌。硫细菌在石油和煤炭的脱硫、土壤的改良、细菌冶金、含硫废水处理以及环境保护等方面都有广阔的应用前景。但是,这类细菌尤其是极端嗜酸性专性化能自养细菌,在其特殊能源缺乏时不能代谢有机质,存在生长缓慢、代时长、细胞得率低等诸多缺陷,导致细菌培养周期长,操作费用增加和设备占用大,其实际应用效率被限制。同时,由于不能提供足够的细胞材料,也给生化检测、蛋白质和酶的分离及 DNA 提取等带来困难。因此,必须深入了解自养细菌与有机质代谢的关系,才能有目的地对其进行遗传改良,构建能够利用有机质快速生长的基因工程菌,为这类细菌的工业化应用提供一条可行的途径,也可从理论上探讨细菌自养和异养的相互关系。本文综述了国内外极端嗜酸性专性化能自养硫细菌有机质代谢的研究进展。

1 专性化能自养硫细菌与有机质的关系

1.1 有机化合物的抑制作用

根据化能自养细菌最初的定义,专性化能自养细菌不能利用有机质,而且有机质对其生长具有抑制作用。因此,早期自养细菌代谢有机质研究主要集中在有机质的毒性方面,通过实验证实,许多有机化合物(包括有机酸、氨基酸等)在较低浓度范围内(10^{-4} ~ 10^{-3} mol/L 浓度)即可完全或者部分抑制这类细菌的生长^[1,2],不同有机物对不同细菌产生抑制作用的浓度范围不同^[3,4],说明不同细菌对有机物的敏感性存在差异^[2]。

有机物对生长的抑制作用在异养菌中也很常见,只是化能自养菌独特的自养生活方式使其对某些有

机物的抑制作用更为敏感。通过研究几种有机酸对氧化亚铁硫杆菌的影响,发现有机酸可引起细胞质酸化,从而影响电子传递链末端氧的还原而抑制呼吸作用,对菌体产生毒性^[5]。由氨基酸引起的抑制作用机制与异养菌相同,都是由于氨基酸代谢失衡造成。一种氨基酸对某种专性自养菌的抑制作用可被另一种或另一组氨基酸解除,而且专性化能自养菌对不同氨基酸抑制作用的敏感性并不比异养菌更高,如缬氨酸抑制大肠杆菌(*Escherichia coli*)K12 和氧化硫硫杆菌生长的浓度分别是 4×10^{-5} mol/L 和 10^{-3} mol/L^[2]。

其他有机质对自养菌生长的抑制作用机制尚未完全清楚,推测是有机质代谢产生了有毒物质对菌体生长产生抑制作用。如葡萄糖代谢产物丙酮酸积累达 0.2 mmol/L 时即可完全抑制氧化硫硫杆菌的生长。采用连续不断更新培养基的方法降低丙酮酸累积的浓度,可使菌体生长抑制现象得以缓解。显然,有机酸的毒性作用可以通过将底物浓度维持在一个较低水平的方法而消除^[6]。

1.2 有机化合物的利用

在潜心研究有机化合物对专性化能自养菌生长的抑制作用时,发现这类细菌在其特殊能源存在时,能不同程度地吸收和同化部分有机物质作为细胞碳^[7,8]。但这种同化能力很有限,而且不同有机酸掺入细胞的能力不同^[4]。有机酸尤其是乙酸,结合进入细胞碳的能力相对大,氨基酸和糖相对弱得多。山东大学初立恩等研究了几种有机酸对专性自养氧化硫硫杆菌生长的影响,发现它们可使细菌延迟期延长,但不能阻止细菌生长,进入对数期后,细菌利用有机酸生长,增加了稳定期的生物量^[8]。有机物底物浓度可以影响自养菌对有机物的同化率,但即使在很高的底物浓度下,也只有很少有机物被利用,而且仅能合成有限的细胞成分。通过在自养培养基中添加不同的有机物实验,证明每一种有机物同化变成专性化能自养细菌细胞碳最多不超过 10%^[4]。

专性化能自养菌同化有机物并结合进入细胞需要无机能量和 CO_2 ,只有在其特殊能源存在时,才能同化有机物,说明有机物不能完全代替细菌对 CO_2 的依赖,合成细胞的大部分碳还必须从 CO_2 中得到, CO_2 仍然是细胞碳的主要来源^[9]。因为同化有

机物的受体分子不能从外源有机物本身产生, 外源有机质同化产生的能量既不足以使 CO_2 转化成受体分子, 也不足以使外源有机质转运到细胞内。所以, 专性化能自养菌生命活动必需的能量还必须从氧化无机物中获得。

1.3 中心代谢途径

异养菌中分解葡萄糖的途径很多, 主要有己糖二磷酸途径(EMP)、单磷酸己糖途径(HMP)和 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸裂解途径(ED)等, 研究极端嗜酸性专性化能自养菌中的这些途径, 证明它们缺少 EMP 和 ED 途径的关键酶(见图 1)。例如, 氧化硫硫杆菌和排硫硫杆菌缺乏 EMP 途径的磷酸果糖激酶^[10,11], 氧化硫硫杆菌和那不勒斯硫杆菌(*Thiobacillus neaplitanus*)缺乏 ED 途径的 6-磷酸葡萄糖酸脱水酶和特征性酶 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸醛缩酶^[11]。因此, 专性化能自养菌不能通过 EMP 和 ED 途径使葡萄糖分解为磷酸丙糖进入 TCA 循环, 代谢途径的缺陷很可能是它们无法利用葡萄糖的主要原因。但是, 通过分析 CO_2 固定产物, 这些细菌具有 HMP 途

径的各种酶, 包括葡萄糖激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶等, 并且在菌体内存在丙酮酸脱氢酶^[10,12], 说明这些专性化能自养细菌尽管没有完全的 EMP 和 ED 途径, 但可以通过 HMP 途径引导糖类进入三羧酸(TCA)循环^[4,11]。

TCA 循环在异养菌中是沟通糖、脂类和蛋白质代谢的桥梁, 可产生大量能量供生命活动需要, 而且通过其中间产物为合成复杂细胞物质提供碳骨架。专性化能自养菌不能像异养菌一样利用有机物作为碳源和能源, 说明这些细菌的 TCA 循环可能存在代谢缺陷。通过研究 ^{14}C 有机物的吸收和结合到细胞碳的方式, 证实专性化能自养细菌只能同化有机物合成有限的细胞成分^[4]。如乙酸只出现在细胞蛋白质和脂类中, 并且只出现在来自乙酸或 α -酮戊二酸的四种氨基酸中, 丙酮酸的碳主要出现在直接来自丙酮酸、乙酸或 α -酮戊二酸的氨基酸中, 标记的 ^{14}C 进入不到门冬氨酸族的氨基酸, 表明这些细菌缺乏由 TCA 循环 C6 或 C5 中间产物形成 C4 的机制^[12,13]。

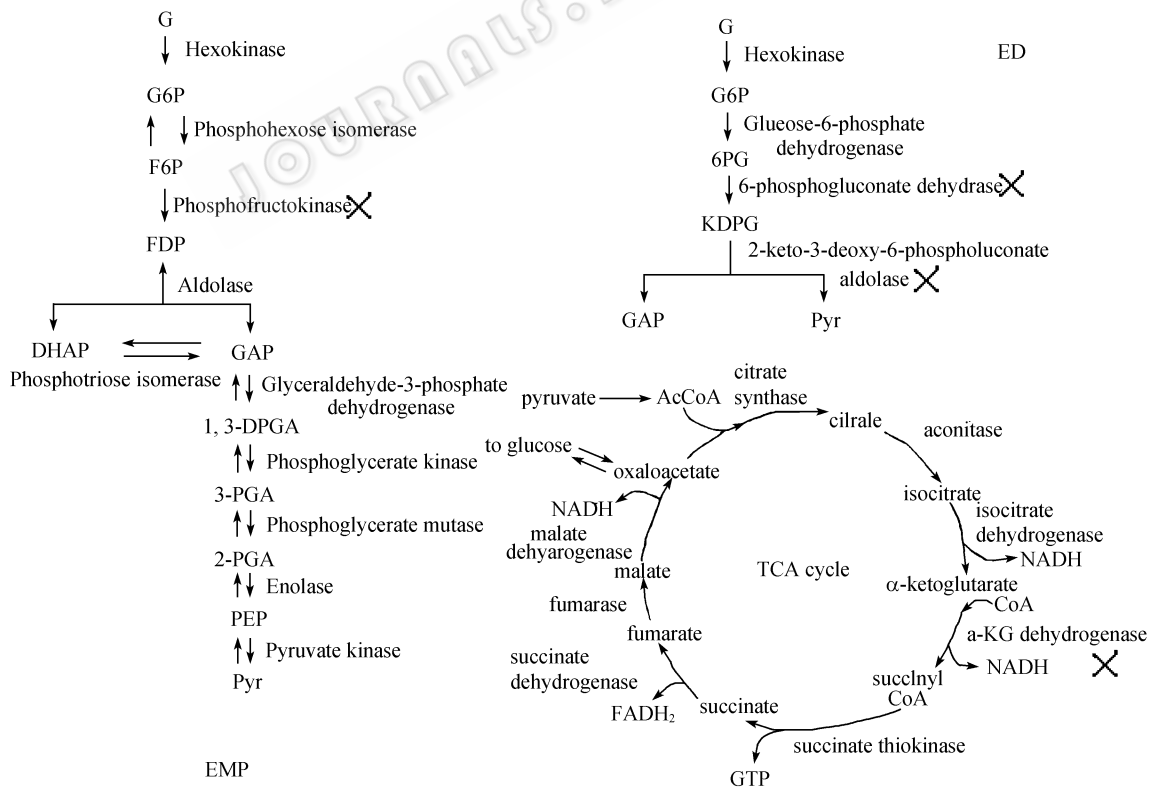


图 1 葡萄糖代谢的 EMP 途径、ED 途径和 TCA 循环显示极端嗜酸性专性自养硫杆菌缺少的关键酶

Fig. 1 The EMP, ED pathways and TCA cycle showing the deficient key enzymes of extremely acidophilic, obligately chemolithoautotrophic thiobacilli

酶学分析表明,专性化能自养细菌不仅缺乏关键酶- α -酮戊二酸脱氢酶(图 1),而且 TCA 循环的其它酶如琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的活性也很低^[10,14]。另外,乙酸的掺入模式表明这类有机体也缺乏有功能的乙醛酸循环^[13]。由于缺少完整的 TCA 循环和乙醛酸循环,这类细菌不能代谢 TCA 循环的中间产物获得大量能量,TCA 循环仅起一个纯粹的生物合成作用,参与 CO_2 的固定和谷氨酸的合成,提供合成细胞物质的碳架。因此专性化能自养菌必须从氧化无机物中获得能量。

1.4 物质的转运机制

专性化能自养菌同化外源有机物的能力有限,推测这些细菌可能缺乏异养菌中各种基质的特异转运机制。与其他有机物相比自养细菌能较好地利用乙酸,因为乙酸可以通过自由扩散进入细胞。研究发现专性自养那不勒斯硫杆菌有合适电子供体时,氨基酸转运与异养菌一样是耗能的主动转运过程。虽然专性自养菌氨基酸转运中的能量偶联和动力学特征都与异养菌类似,但是二者转运的特异性是有区别的。异养菌中,如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌,已发现 9~12 种转运系统,它们分别特异地转运一组结构相关的氨基酸。那不勒斯硫杆菌中只发现 2 个主要转运系统。也许这种特异性较低的氨基酸转运系统正是自养菌适应非正常碳代谢长期进化的结果,因为自养菌依赖 CO_2 为碳源,较多的转运系统将会引起外源有机质的代谢不平衡,而自养菌拥有这种特异性较低的转运系统,各种氨基酸转运量很少,可以减少某种氨基酸的过量摄入而抑制菌体生长,这对自养菌适应环境是非常有利的^[15,16]。

1.5 能量代谢的特点与自养生长的特点

不同类群的专性化能自养细菌对基质要求有严格的专一性,如硫细菌只能利用元素硫和还原态的无机硫化物,不能利用氢,氧化亚铁硫杆菌还可以氧化亚铁离子,因此专性化能自养细菌对无机基质的氧化没有共同的机制。不同的细菌由脱氢酶或氧化还原酶参与基质氧化脱下来的电子进入电子传递链的部位也不一样(如图 2)^[17]。由于无机基质的氧化还原电位较高,基质的氧化不能提供足够的能量供菌体生长;另一方面,除少数氢细菌以外,大多数化能自养菌基质的氧化也不能直接还原 NAD(P)^+ ,只能通过呼吸链的反向电子传递产生 NAD(P)H ,提

供 CO_2 固定所需的还原力,这是一个很耗能的过程^[18]。以上两方面决定了这类细菌必须氧化大量基质来满足能量的需求,造成化能自养生长时,细菌生长缓慢,代时长,细胞得率低。

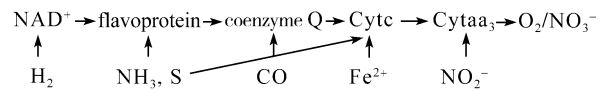


图 2 各类无机基质氧化进入电子传递链的水平
Fig 2 The electronic transport chain showing the initial entrances of different inorganic compounds

专性化能自养细菌能够利用部分有机物,但不能替代 CO_2 作为细胞物质的主要碳源,这一事实说明这类菌不能从有机物氧化中获取足够能量,而且还缺少代谢有机质的基本能力。低效率的物质转运机制和低酶活水平(包括酶的缺失)使有机质代谢不足以提供细胞生长所需的主要能源和碳源^[4]。例如 TCA 循环中酶的缺失或低活性无疑会限制代谢中间产物的产生,从而进一步影响能量的产生和细胞的生物合成。对于葡萄糖代谢,还没有数据证明它能够刺激专性化能自养细菌的生长,提高合成细胞碳的量,很可能是因为葡萄糖转运能力的不足,因为至今这类细菌中未见葡萄糖转运方面的研究报道。

专性化能自养细菌不能广泛利用有机物的另一个原因可能是这些有机物的代谢产物扰乱了其特有的代谢途径^[4]。这类细菌能够有效地利用 CO_2 作为唯一的碳源,需要各种酶活性的精细调节,某种外源有机物的异化作用会导致代谢产物整体水平中某一产物量的增加而扰乱这种调节,因此,反过来又限制了有机物的利用。

2 专性化能自养硫细菌有机质代谢的遗传改造

兼性化能自养细菌拥有对无机能量和碳源及有机能量和碳源都能利用的能力,与仅能利用无机物或有机物生长的专性自养或异养菌相比,兼性化能自养细菌的混养生长能力在自然界显然更具有选择优势。

除新型硫杆菌缺少磷酸葡萄糖酸脱水酶外,通过检测几种在己糖培养基上生长的兼性化能自养硫细菌的无细胞提取物,发现它们都具有 EMP、ED 和 HMP 途径的关键酶,也具有完整的 TCA 循环代谢

途径^[4]。当这类细菌由自养生长转到异养生长时, 每种代谢途径中各种酶的活性都会有所增加或改变。根据酶活变化情况可以推测每种途径在有机质代谢中的作用^[19]。相反, 兼性化能自养细菌异养生长时, 自养生长有关的能量产生和 CO₂ 固定的关键酶活性都大幅度降低, 大多数情况下是因为缺少酶的合成引起^[20]。

因此, 对专性化能自养硫杆菌进行遗传改造, 补充其有机质代谢缺失的关键酶, 使其能够利用有机质快速生长, 这将不仅可以解决该类菌在实际应用中的限制因素, 而且还可以从理论上为揭示细菌自养和异养的相互关系提供更多实验依据和理论基础。

2.1 专性化能自养硫细菌的遗传学研究基础

专性化能自养硫细菌代谢有机质的问题, 仅依赖这类细菌的生态学和生理学研究是不够的。上个世纪 70 年代基因工程的诞生为这类细菌的基础和应用研究注入了活力, 更多的研究学者把兴趣转到遗传学研究领域。硫细菌遗传学研究自上世纪 80 年代才开始起步, 研究工作主要集中在硫杆菌质粒的分离、载体的构建、遗传信息转移系统、硫杆菌基因在大肠杆菌中的克隆与表达及染色体的初步分析等方面, 并已经取得了一些进展, 为用遗传学方法改良这类细菌的性状奠定了基础。

通过克隆硫杆菌中与 CO₂ 固定、参与有机酸合成和代谢酶类的基因以及其它与物质及能量代谢有关的酶基因, 包括 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶基因^[21,22]、3-异丙基苹果酸脱氢酶基因^[23,24]、丙酮酸脱氢酶复合体基因(*pdhABC*)、柠檬酸合酶基因(*gltA*)和 α -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因(*gshA*)^[25]、异柠檬酸脱氢酶基因^[26]、Glu-tRNA^{Gln} 和 Asp-tRNA^{Asn} 氨基转移酶基因^[27]等, 对部分基因进行了序列分析, 并在遗传背景清楚的细菌(如大肠杆菌)中表达, 发现许多基因都能在相应大肠杆菌基因突变株中实现遗传互补, 说明硫杆菌与异养细菌在基因序列和表达机制上差别不大^[28,29]。

生物信息学、基因组学和蛋白质组学的发展, 极大地带动了硫杆菌分子遗传学研究。在克隆大量硫杆菌基因、研究酶的结构与功能的基础上, 氧化亚铁硫杆菌全基因组序列的测定和功能基因注释的相关研究提供了许多信息^[30,31], 利用计算机分析软

件对染色体片段进行序列分析比对、基因定位及代谢重建等研究, 得到大量有关氧化亚铁硫杆菌功能基因组的资料^[32-34]。因此, 鉴于自养生活方式决定了专性化能自养硫细菌生长缓慢, 要想从根本上改善这类细菌的物质代谢和能量代谢状况, 可以通过基因工程方法导入某些代谢酶基因, 使其能够部分利用有机物质作为碳源或能源, 提高细菌的生长速率, 增强铁、硫氧化系统的活性, 提高细菌的氧化能力和应用效率。

2.2 专性化能自养硫细菌基因转移系统的研究

尽管硫杆菌的分子遗传学研究取得了一系列进展, 但由于缺少把外源基因引入专性自养硫细菌的方法, 使这类细菌的遗传改造研究一直止步不前。直到上个世纪 90 年代初, 山东大学金松谟和彭基斌等先后在异养的大肠杆菌和两种极端嗜酸性专性自养硫杆菌(氧化硫硫杆菌、氧化亚铁硫杆菌)之间建立起接合转移系统, 实现了大肠杆菌与专性自养嗜酸性硫杆菌之间遗传信息的转移^[35, 36], 2007 年刘相梅等又成功地建立了极端嗜酸性喜温硫杆菌的接合转移系统^[37]。接合转移系统的建立使外源基因在专性自养极端嗜酸性硫杆菌的表达成为可能, 硫杆菌的遗传学研究向前迈出了重要一步, 也为这类菌的遗传改造奠定了基础。

2.3 专性化能自养硫细菌的遗传改造研究

向极端嗜酸性专性自养硫杆菌转移基因的其它方法至今国内外未见报道, 山东大学彭基斌和赵清等利用建立的接合转移方法成功地将外源抗砷基因分别转入氧化亚铁硫杆菌和喜温硫杆菌, 并获得表达^[38, 39], 提高了菌株的抗砷能力。2003 年, 山东大学田克立等也对极端嗜酸性专性自养硫杆菌有机质代谢遗传改良进行了探索, 针对 EMP 途径缺失的磷酸果糖激酶, 首先尝试克隆了大肠杆菌磷酸果糖激酶基因(*pfkA*), 通过接合转移方法导入极端嗜酸性专性自养氧化硫硫杆菌中, *pfkA* 在自身启动子控制下在宿主菌中获得了表达, 实验证明构建的基因工程菌能部分利用葡萄糖促进其生长^[40]。该项研究首次证明了异养菌(大肠杆菌)中心代谢酵解途径的关键酶基因能够在专性自养极端嗜酸性氧化硫硫杆菌中表达。刘玮等进一步采用 ¹³C NMR 及 ³¹P NMR 技术对葡萄糖在氧化硫硫杆菌基因工程菌中的代谢途径进行了研究, 结果表明外源 *pfkA* 在氧化硫硫杆菌

中的表达弥补了细菌本身代谢酶的缺陷,使葡萄糖可以通过 EMP 途径生成丙酮酸(结果待发表)。从试验结果中也可以看出,仅仅一个酶的表达并没有很大程度上改善自养菌代谢有机质的能力,但毕竟朝着这个方向迈出了第一步。

3 展望

专性化能自养硫细菌缺乏 EMP、ED 途径以及 TCA 循环中的许多关键酶,可以看出,从根本上改造这类菌的自养生活方式是一项很大的工程。磷酸果糖激酶基因(*pfkA*)的表达,仅补充了 EMP 途径缺陷的酶,使葡萄糖能通过 EMP 途径生成丙酮酸,还必须通过 TCA 循环才能为菌体提供大量能量和合成细胞物质的中间体。因此,必须针对专性化能自养硫细菌 TCA 循环缺陷的特征酶—— α -酮戊二酸脱氢酶,对其进一步改造,克隆异养菌的 α -酮戊二酸脱氢酶基因,导入专性自养极端嗜酸性硫杆菌,重建 TCA 循环,把代谢有机质的 EMP 途径和 TCA 循环串接起来,改善硫细菌能量代谢状况,以期进一步提高自养菌代谢有机质的能力。这也是目前我们正在进行的工作。

专性化能自养硫细菌代谢有机质的遗传改造研究最终会对自养菌的生长有多大促进作用以及相应的改造是否会影响自养菌本身的性质(包括硫的氧化和铁的氧化等)还有待进一步研究。不管怎样,全面了解专性化能自养硫细菌与有机质代谢的关系,不仅可以从理论上为进一步阐明该类菌与大肠杆菌的系统进化关系以及揭示细菌自养和异养的相互关系提供实验依据和理论基础,而且在应用方面还有助于有目的地对其进行遗传改造,构建能够利用有机质快速生长的基因工程菌,为提高这类细菌的工业化应用提供一条可行的途径。

REFERENCES

- [1] Pan P, Umbreit WW. Growth of obligate autotrophic bacteria on glucose in a continuous flow-through apparatus. *J Bacteriol*, 1972, **109**: 1149–1155.
- [2] Lu MC, Matin A, Rittenberg SC. Inhibition of growth of obligately chemolithotrophic *Thiobacilli* by amino acids. *Arch Mikrobiol*, 1971, **79**: 354–366.
- [3] Frattini CJ, Leduc LG, Ferroni GD. Strain variability and the effects of organic compounds on the growth of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, **77**: 57–64.
- [4] Matin A. Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 1978, **32**: 433–468.
- [5] Alexander B, Leach S, Ingledew WJ. The relationship between chemiosmotic parameters and sensitivity to anions and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Gen Microbiol*, 1987, **133**: 1171–1179.
- [6] Pronk JT, Meesters PJ, Diken JP, et al. Heterotrophic growth of *Thiobacillus acidophilus* in batch and chemostat cultures. *Arch Microbiol*, 1990, **153**: 392–398.
- [7] Pronk JT, Meijer WM, Hazeu W, et al. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on formic acid. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 2057–2062.
- [8] Chu LN, Yan WM, Wang ZN. Effect of exogenous organic acids on the growth and sulfur oxidation of *Thiobacillus thiooxidans*. *J Shandong University*, 1981, **4**: 110–117. 初立恩, 颜望明, 王祖农. 几种外源有机酸对于氧化硫硫杆菌的生长和氧化硫的影响. *山东大学学报*, 1981, **4**: 110–117.
- [9] Matin A, Konings WN, Kuenen JG, et al. Active transport of amino acids by membrane vesicles of *Thiobacillus neapolitanus*. *J Gen Microbiol*, 1974, **83**: 311–318.
- [10] Johnson EJ, Abraham S. Enzymes of intermediary carbohydrate metabolism in the obligate autotrophs *Thiobacillus thioiparus* and *Thiobacillus neapolitanus*. *J Bacteriol*, 1969, **100**: 962–968.
- [11] Matin A, Rittenberg SC. Enzymes of carbohydrate metabolism in *Thiobacillus* species. *J Bacteriol*, 1971, **107**: 179–186.
- [12] Johnson EJ, Abraham S. Assimilation and metabolism of exogenous organic compounds by the strict autotrophs *Thiobacillus thioiparus* and *Thiobacillus neapolitanus*. *J Bacteriol*, 1969, **97**: 1198–1208.
- [13] William PJ, Watson SW. Autotrophy in *Nitrosocystis oceanus*. *J Bacteriol*, 1968, **96**: 1640–1648.
- [14] Smith AJ, London J, Stanier RY. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green *Algae* and *Thiobacilli*. *J Bacteriol*, 1967, **94**: 972–983.
- [15] Lombardi FJ, Kaback HR. Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. *J Biol Chem*, 1972, **247**: 7844–7857.
- [16] Matin A, Konings WN, Kuenen JG et al. Active transport of amino acids by membrane vesicles of *Thiobacillus neapolitanus*. *J Gen Microbiol*, 1974, **83**: 311–318.
- [17] Tian KL. Studies on the cloning, expression of *E. coli* phosphofructokinase gene in the chemolithotroph *Thiobacillus thiooxidans* and its organic metabolism. *Ph.D. Thesis of Shandong University*, 2003, 16–17. 田克立. 大肠杆菌磷酸果糖激酶基因在氧化硫硫杆菌中的克隆、表达及其对有机质代谢的研究. *山东大学博士论文*, 2003, 16–17.
- [18] Roth CW, Hempfling WP, Conners JN et al. Thiosulfate- and sulfide-dependent pyridine nucleotide reduction and gluconeogenesis in intact *Thiobacillus neapolitanus*. *J*

- Bacteriol*, 1973, **114**: 592–599.
- [19] Wood AP, Kelly DP, Thurston CF. Simultaneous operation of three catabolic pathways in the metabolism of glucose by *Thiobacillus* A2. *Arch Microbiol*, 1977, **113**: 265–274.
- [20] Matin A, Rittenberg SC. Utilization of glucose in heterotrophic media by *Thiobacillus intermedius*. *J Bacteriol*, 1970, **104**: 234–238.
- [21] Kusano T, Takeshima T, Inoue C, *et al.* Evidence for two sets of structural genes coding for ribulose biphosphate carboxylase in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 7313–7323.
- [22] Liu ZY, Yan WM, Xu HY, *et al.* Cloning of the RubisCO gene (*rbcL-rbcS*) from *Thiobacillus versutus* and analysing of the restriction map of the recombinant plasmid. *J Shandong University*, 1996, **31**: 102–107.
刘振盈, 颜望明, 徐海岩. 多能硫杆菌 RubisCO 基因 (*rbcL-rbcS*) 的克隆及限制性内切酶图谱分析. *山东大学学报*, 1996, **31**: 102–107.
- [23] Inagaki K, Kawaguchi H, Kuwata Y, *et al.* Cloning and expression of the *Thiobacillus ferrooxidans* 3-isopropylmalate dehydrogenase gene in *Escherichia coli*. *J Ferment Bioeng*, 1990, **70**: 71–74.
- [24] Kawaguchi H, Inagaki K, Kuwata Y *et al.* 3-Isopropylmalate dehydrogenase from chemolithoautotroph *Thiobacillus ferrooxidans*: DNA sequence, enzyme purification, and characterization. *J Biochem*, 1993, **114**: 370–377.
- [25] Powles R, Deane S, Rawlings D. The gene for gamma-glutamylcysteine synthetase from *Thiobacillus ferrooxidans* has low homology to its *Escherichia coli* equivalent and is linked to the gene for citrate synthase. *Microbiology*. 1996, **142**: 2543–2548.
- [26] Inoue H, Tamura T, Ehara N, *et al.* Biochemical and molecular characterization of the NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from the chemolithotroph *Acidithiobacillus thiooxidans*. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **214**: 127–132.
- [27] Salazar JC, Zuniga R, Raczniack G, *et al.* A dual-specific Glu-tRNA^{Gln} and Asp-tRNA^{Asn} amidotransferase is involved in decoding glutamine and asparagines codons in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEBS Letters*, 2001, **500**: 129–131.
- [28] Lane DJ, Harrison AP, Stahl D, *et al.* Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing bacteria. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 269–278.
- [29] Wood AP, Aurikko JP, Kelly DP. A challenge for 21st century molecular biology and biochemistry: what are the cause of obligate autotrophy and methanotrophy? *FEMS Microbiol Rev*, 2004, **28**: 335–352.
- [30] Selkov E, Overbeek R, Kogan Y *et al.* Functional analysis of gapped microbial genomes: amino acid metabolism of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 3509–3514.
- [31] Irazabal N, Marin I, Amils R. Genomic organization of the acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 21834. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 1946–1950.
- [32] Barreto M, Jedlicki E, Holmes DS. Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 2902–2909.
- [33] Acosta M, Beard S, Ponce J, *et al.* Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. *OMICS: A Journal of Intergrative Biology*, 2005, **9**: 13–29.
- [34] Valdes J, Veloso F, Jedlicki E, *et al.* Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *Bio-med Cent Genomics*, 2003, **4**: 51–67.
- [35] Jin SM, Yan WM, Wang ZN. Transfer of IncP plasmids to extremely acidophilic *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 429–430.
- [36] Peng JB, Yan WM, Bao XZ. Plasmid and transposon transfer to *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 2892–2897.
- [37] Liu XM, Lin JQ, Zhang Z, *et al.* Construction of conjugative gene transfer system between *E. coli* and moderately thermophilic, extremely acidophilic *Acidithiobacillus caldus* MTH-04. *J Microbiol Biotech*, 2007, **17**: 162–167.
- [38] Peng JB, Yan WM, Bao XZ. Expression of heterogenous arsenic resistance genes in the obligately autotrophic biomining bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 2653–2656.
- [39] Zhao Q, Liu XM, Zhan Y, *et al.* Construction of an engineered *Acidithiobacillus caldus* with high-efficiency arsenic resistance. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, **45**: 675–679.
赵清, 刘相梅, 詹杨, 等. 一株高效抗砷喜温硫杆菌工程菌的构建. *微生物学报*, 2005, **45**: 675–679.
- [40] Tian KL, Lin JQ, Liu XM, *et al.* Conversion of an obligate autotrophic bacteria to heterotrophic growth: expression of a heterogeneous phosphofructokinase gene in the chemolithotroph *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**: 749–754