

研究报告

基于基因芯片对微生物基因功能与群落结构分析的硫化矿生物浸出分析

申丽^{1,2}, 刘学端^{1,2}, 邱冠周^{1,2}

1 中南大学资源加工与生物工程学院, 长沙 410083

2 教育部生物冶金重点实验室, 长沙 410083

摘要: 生物冶金技术因具有流程短、成本低、环境友好, 且特别适合处理低品位、复杂、难处理的矿产资源等优点, 已经成为研究热点。然而由于缺少高效菌种以及不能对浸矿体系微生物进行定量分析, 难以对浸矿工艺参数和微生物种群进行优化调控, 从而导致硫化矿生物浸出速度慢、浸出率低。随着基因芯片、菌种保存技术的发展, 这些难题在逐一被解决。对近年来针对硫化矿浸出过程微生物的基因功能与群落结构分析的研究进行了概述, 将帮助我们更好地了解基因组学与生物冶金技术结合的重要作用。

关键词: 硫化矿, 生物浸出, 生物冶金, 基因组学, 基因芯片

Gene Function and Microbial Community Structure in Sulfide Minerals Bioleaching system Based on Microarray Analysis

Li Shen^{1,2}, Xueduan Liu^{1,2}, and Guanzhou Qiu^{1,2}

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

2 The key Lab of Biometallurgy, Ministry of Education, Changsha 410083, China

Abstract: Biohydrometallurgy technology received more and more attention because of its simple process, low cost and kind to environment, especially in dealing with low-grade and complex minerals. However, it is difficult to optimize microorganism species and process parameters in bioleaching procedure because of the lack of suitable bacteria and quantitative analysis methods at micro-level for bioleaching system. This has resulted in the low efficiency and poor yield of the target metal in bioleaching. With the development of microarray and bacteria conservation technology, solutions to the above problems were being found. This article summarizes the latest findings on genetic elucidation and the community structure of microorganisms in sulfide minerals bioleaching system, in the aim of providing a better understanding on the significance of cross-field technology of biohydrometallurgy and genomics.

Keywords: sulfide minerals, bioleaching, biohydrometallurgy, genomics, microarray

我国矿产资源的显著特点是品位低、复杂、难处理和中小型矿居多。采用传统采矿、选矿、冶金工艺处理这些矿产资源时, 效率低、流程长、生产成本高、环境污染严重, 其对资源的可利用率低。

Received: March 15, 2008; **Accepted:** April 10, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 50621063), The National Basic Research Program of China (No. 2004CB619200).

Corresponding author: Guanzhou Qiu. Tel: +86-731-8877212; E-mail: qgz@mail.csu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 50621063); 国家重点基础研究发展计划(973)(No. 2004CB619200)资助。

如果仅仅采用传统选冶技术,我国铜、铅、锌、铋、钼、金等主要有色金属储量的保证年限只在10年左右。国家中长期科学技术发展规划战略研究指出:“我国矿产资源紧缺,形势严重”。要解决我国矿产资源紧缺的问题,就必须发展资源高效利用新技术。生物冶金是通过利用以矿物为能源的微生物的作用,氧化分解矿物使金属离子进入溶液(生物浸出),进一步分离、提取金属的技术,具有流程短、成本低、环境友好和低污染等特点,特别适合处理低品位、复杂、难处理的矿产资源,是21世纪矿物提取前沿科学技术。

国外在上世纪50年代就开始生物浸出技术的工业化应用,目前美国30%(世界上25%)铜金属产量是通过生物湿法冶金生产的,但主要应用于次生硫化铜矿及氧化铜矿,且很少有报道应用基因芯片技术来研究生物冶金的生理生化功能^[1]。国内生物冶金技术工业化应用起步晚,目前较多地应用于铜矿,但也仅占铜产量的3%左右。主要原因是由于缺少优良菌种以及不能对浸矿体系微生物进行定量分析,难以对浸矿工艺参数和微生物种群进行优化调控,导致硫化矿生物浸出速度慢、浸出率低。浸矿微生物种类多、性状与功能差异大、相互作用关系复杂,使得高效浸矿菌种和优良种群组合筛选过程冗长、复杂、可靠性差。此外,由于大多数浸矿微生物都属于一些化能自养菌,目前很难人工培养,传统的以分离培养为基础的分析技术难以对浸矿微生物进行定量分析和实时监控^[1]。

根据菌种的浸矿性能受相关的功能基因控制,在基因水平上对菌种的浸矿性能开展研究,找到与浸矿作用相关的基因,就可以找到决定菌种浸矿性能的根本原因,从而进一步通过对浸矿性能的微生物种群及其相关基因的检测,获得检测高活性浸矿细菌的方法,再以基因组学、基因芯片等基因新技术为主要手段,就可以对菌种进行定性与定量检测,了解其基因的功能与群落结构组成,实现菌种的快速筛选和种群的优化调控,从而最终提高硫化矿生物浸出速度和浸出率^[2]。

利用上述基于基因水平的研究所达到的技术指标与国内外生物冶金相比,都有了很好的提高,具体表现在以下几个方面:

菌种筛选时间由一年或几个月缩短到3~6天;

传统技术只能测定形态、生长速率、浸矿效果等表现型特征,而现有技术已经可以测定控制性状的功能基因及其表达量,实现了从表征型向基因型的跨越;

从稳定性的角度上来说,传统方法受环境和试验条件影响大,稳定性差,现有技术受环境和试验条件影响小,稳定性强;

对浸矿微生物群落结构分析,传统方法是以分离培养为基础,偏差大(因为不同微生物培养性状差异大),而基因水平上的研究是以基因和基因组DNA为基础,偏差小(基因与DNA数量稳定);

对浸矿微生物群落结构分析,传统方法直接测定各菌株的性能,在复杂的混合体系中难以测定,而基因水平的研究利用高通量的基因芯片测定功能基因及其数量变化情况,实现了群落结构与功能的同步分析;

对浸矿微生物种群的定量分析,传统方法直接进行菌体计数,不能识别不同菌种和菌株,难以进行定量分析,而本技术可以对重要基因和标志性基因进行定量检测,实现了种群的定量分析;

在利用工艺参数对种群优化调控过程中,传统技术不能测定工艺参数引起的微生物种群变化情况,不能明确二者的相关性,不能实现优化调控,而本技术通过测定工艺参数引起的微生物种群变化规律,确定二者的相关性,可以进行优化调控,实现了从宏观到微观和从理论到实践的跨越;

硫化矿浸出率由28%提高到75%;

硫化矿浸出时间由1年缩短至55天。

1 浸矿细菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 模式菌 ATCC23270 全基因组基因芯片的构建与应用

1 全基因组芯片(Whole genomic arrays)的构建

嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*,以下简称A.f菌)属于变形菌门、 γ -变形菌纲、酸硫杆菌目、酸硫杆菌科、酸硫杆菌属,革兰氏阴性,有鞭毛。该菌好氧嗜酸、化能自养,能氧化金属硫化物,将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} ,将还原态的硫氧化成 SO_4^{2-} ,是生物冶金中最常用的菌种,同时也是研究最多的浸矿微生物和目前完成全基因组序列测

定的唯一浸矿细菌。在 Tiger 公司公布 A. f 标准菌株 ATCC 23270 全基因组 3217 个基因序列信息(图 1)的基础上, 现已经构建了 A. f 标准菌株全基因组基因芯片^[3]。

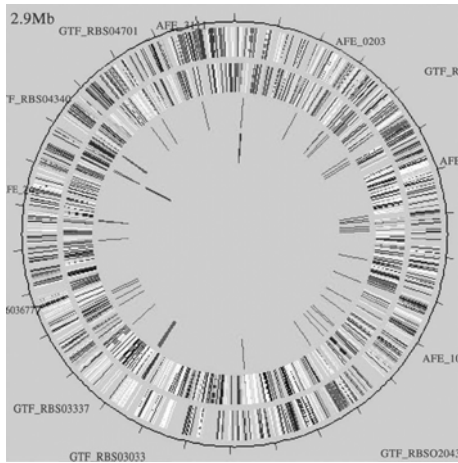


图 1 A. f ATCC 23270 全基因组图谱
Fig. 1 Whole genomic schematic of A. f ATCC 23270

对全国各个不同矿区的硫化矿进行摇瓶试验、柱浸试验和堆浸试验, 筛选得到各种不同氧化活性类型的 A. f 菌, 同时对样品菌株和模式菌株基因组 DNA 和 RNA 进行提取与纯化, 并进行荧光标记, 再与全基因组基因芯片杂交, 得到杂交信号。实验结果表明, 在 3217 个基因中发现有 967 个基因为不同的菌株所特有, 其余的 2250 个(2250/3217=70%)基因为所有 A. f 菌共有(图 2); 另发现 320 个高氧化活性菌特征基因, 其中, 与中间代谢(硫、氮代谢)相关的基因 24 个, 与胞壁质、肽聚糖、多聚糖和脂多糖的生物合成与降解相关的基因 33 个, 与解毒作用有关的基因 15 个, 与 DNA 代谢相关的基因 36 个, 与能量代谢相关的基因 85 个, 与脂肪酸和磷酸代谢相关的基因 5 个, 与蛋白质的合成相关的基因 26 个,

与核苷酸合成相关的基因 12 个, 与 DNA 转录相关的基因 15 个, 与调节作用相关的基因 34 个, 与信号转导相关的基因 10 个, 与转运和结合蛋白相关的基因 25 个。将上述基因作为 A. f 菌冶金性能快速检测的标准, 实现了筛选高效浸矿菌株由表征型(表现型)向基因型(遗传型)的根本转变, 解决了生物浸出菌种及其活性鉴定常规方法的盲目性、经验性、不确定性和时间长的问题, 使高效菌种筛选时间从 1 年或几个月缩短为 3~6 d^[4]。

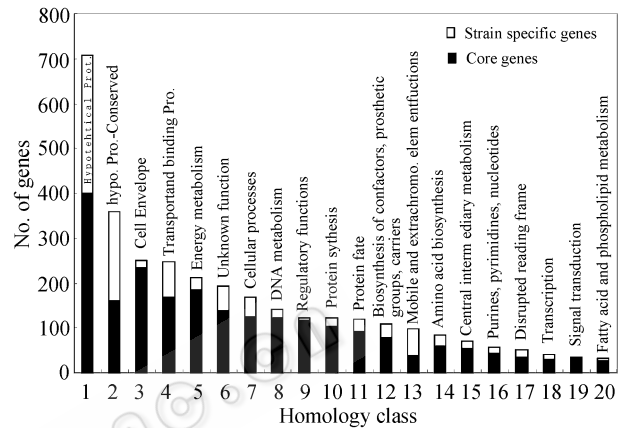


图 2 不同 A. f 菌株共有和特有基因的功能分布
Fig. 2 The distribution of common and special genes in different A. f

1.2 利用基因芯片快速筛选菌种与浸矿试验活性对应研究

从广西大厂、云南东川、思茅、广东大宝山、梅州、湖北大冶、江西德兴、甘肃白银、湖南浏阳七宝山等 20 多个典型矿区的酸性矿坑水、积液池或浸矿堆进行采样再进行 3 代以上的富集分离培养获得了纯培养物 82 个。将这些纯培养物提取 DNA 并进行荧光标记后, 通过分析计算样品菌与模式菌相同的基因个数与比例(比例大于或等于 70%时鉴定为 A. f 菌); 基因组 DNA 与基因芯片杂交后, 获取

表 1 5 株高活性 A. f 菌基因芯片检测结果
Table 1 The testing results of 5 high activity A. f by gene chip

A. f	Collection place	The testing results by gene chip		
		The same gene as mode bacteria(number/ratio)	characteristic gene (number)	Functional gene (number/ratio)
XQS012	Xixiashan mine in Nanking	2685/83.5%	320	98/72.6%
DX025	Dexing copper mine in Jiangxi	2560/79.6%	320	92 /68.1%
CMS005	Chenmenshan copper mine in Jiangxi	2782/86.5%	320	106/78.5%
YN002	Guanfang mine in Yunnan	2462/76.5%	320	90 /66.7%
TK016	Dachang mine in Guangxi	2756/85.6%	320	102/75.6%

样品菌中直接与矿物氧化密切相关的 320 个特征基因的杂交信号(表 1), 将杂交信号与模式菌 ATCC23270 相应的 320 个基因杂交信号进行比较, 计算其占模式菌 320 个基因的比例; 将 RNA 与芯片杂交后, 获取样品菌的 135 个重要功能基因的杂交信号, 将杂交信号与模式菌 ATCC23270 相应的 135 个基因杂交信号进行比较, 计算其占模式菌 135 个基因的比例。通过上述分析从样品中检测出 5 株高活性 A. f 菌株(表 1)。

经过对培养性状、形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列等分析, 鉴定这些菌株为嗜酸氧化亚铁硫杆菌。现场浸矿试验发现, 利用这些菌株浸矿 75 天后, 其浸出率达到 65.25%, 标准菌 ATCC 23270 为 37.54%, 而另一株低活性菌仅为 24.86%, 这与芯片检测结果相符^[5]。

而获得的 CMS005 菌株, 已经应用于云南省江天矿冶有限责任公司硫化铜矿生物浸出, 经济效益十分显著。该工艺生产成本低、流程短、环境友好, 污染少, 所生产的产品质量优良, 具有很强的市场竞争力, 取得了较好的社会效益和环境效益。

2 浸矿微生物功能基因芯片和群落基因组芯片的构建与应用

2.1 浸矿微生物功能基因芯片(Functional Genomic Arrays)的构建

所谓功能基因芯片, 是以与生理活动相关的功能基因作探针所构建的基因芯片, 是与不同的生物地理化学循环过程相关的功能基因, 对于检测自然环境中微生物种群和群落的生理状态和功能活动是很有用的标记^[6], 可以实现对浸矿过程中微生物种群变化的定量分析。目前构建的针对浸矿微生物群落结构与功能分析的功能基因芯片, 探针除含有功能基因外, 还含有能反映微生物系统发育和分类地位的浸矿微生物 16S rRNA 基因。这些探针是在构建我国典型矿区浸矿微生物基因文库和基因测序的基础上, 结合 NCBI 基因库中已有序列而设计出来的。其中, 从 38 种微生物和 518 个克隆中获得 825 个与浸矿过程相关的功能基因序列 629 条, 并设计出 603 个探针, 从与浸矿体系相关的微生物及克隆子中获得 16S rRNA 基因序列 2003 条, 并设计出探针 600 条。功能基因芯片上所涉及的功能基因中, 有

金属离子抗性基因(39 个)、碳代谢相关基因(168 个)、氮代谢相关基因(107 个)、硫代谢相关基因(48 个)、铁代谢相关基因(13 个)、DNA 代谢与修复基因(57 个)、膜蛋白相关基因(19 个)以及其它相关功能基因(178 个)。

2.1.1 芯片杂交特异性

选取芯片中包含的 16S rDNA, 亚铁氧化酶基因(*iro*), 编码 DNA 螺旋酶 B 亚单位的 *gyrB* 基因, 编码光合反应中心复合体 M 亚单位的 *pufM* 基因, 以及 *cbbQ* 基因, 作为靶标序列来检测芯片探针的杂交特异性。将这些基因通过 PCR 方法扩增后, 使用纯化试剂盒对其产物进行纯化, 所有基因的 PCR 纯化产物按照等量混合, 使用 cy3 荧光染料标记后与寡核苷酸芯片在 50°C 杂交, 结果显示芯片上与这五个基因对应的探针位置点上都产生了很强的荧光信号, 并且在芯片上没有发现与非靶标基因间的非特异性交互杂交现象。说明特异性的寡核苷酸探针与其对应的目标基因之间具有很强的特异性。

同时还使用 cy3 标记的 A. f ATCC23270 的纯基因组 DNA 对 50 mer 寡核苷酸芯片的杂交特异性进行了检测。芯片上对应于 A. f 的探针点都具有很强的杂交信号, 在总共 161 个 A. f 探针中, 有 147 个探针位点的 $SNR \geq 3$ ($SNR = \text{signal intensity} - \text{background} / \text{standard deviation of background}$)。而其他探针中只有部分存在较低的交叉杂交信号。此外, A. f 23270 菌株的 *ferredoxin* 基因(登录号 NC_005023)具有 $SNR = 47.09$ 的信噪比。这一结果也表明设计的探针与它们对应的靶标基因之间具有很好的特异性。

2.1.2 芯片杂交灵敏度

使用 A. f 23270 的纯基因组 DNA 来检测本发明芯片的灵敏度, 将 A. f 23270 的纯基因组 DNA 按照一定的浓度梯度稀释(浓度分别为 0.2, 1, 5, 25, 50, 100, 250, 500 and 750 ng), 并使用 cy3 进行标记后与芯片杂交。从芯片杂交结果分析可以发现(图 3): 在 25~750 ng 的梯度之间, 所有 A. f 基因都具有很强的信号, 5 ng 的基因组 DNA 杂交中可检测到大部分的基因信号, 但是有一小部分的探针只有很微弱的杂交信号, 而在 0.2 和 1 ng 基因组 DNA 作为标记模板杂交的时候, 我们只检测到很少的基因信号。因此, 根据芯片梯度杂交实验结果, 确定芯片对纯培养微生物基因组 DNA 的检测极限为 5 ng。

2.1.3 功能基因芯片的定量性能

通过测定目标 DNA 浓度与芯片杂交信号之间的关系, 评估了芯片用于核酸定量的能力。如前所述, 纯的 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 23270 基因组 DNA 按照梯度稀释后, 使用 cy3 进行标记并与芯片进行杂交, 每一浓度的 DNA 制备三个平行杂交, 每一探针对应的信号取其均值, 以 DNA 浓度的对数值和荧光信号强度对数值作图(图 4)。对于 *iro* 基因探针, DNA 浓度在 1 到 500ng 之间时, 浓度与信号强度之间存在很强的线性相关性($r^2 = 0.982$), 同样的线性相关性也存在与 16S rRNA 基因探针($r^2 = 0.984$)。此外, 当 DNA 浓度范围在 5~500 ng 之间时, DNA 浓度与芯片的总信号强度之间也存在很强的线性关系($r^2 = 0.98$)。这一结果表明芯片杂交对于特定浓度范围内的 DNA 具有定量作用, 说明了所构建的芯片也可以作为一种定量工具使用。

2.2 浸矿微生物群落基因组芯片 (Community genomic arrays) 的构建

群落基因组芯片就是用纯培养微生物的整个 DNA 基因组构建的, 根据可培养的微生物来研究环境微生物群落。CGAs 表明了基因组芯片技术可以根据微生物基因型的变异应用于确定微生物群落的

特性, 是一种特异、灵敏和具有定量能力的微生物生态研究的方法^[7]。这种芯片, 能够检测酸性环境中丰度较低的微生物, 具有高通量、同时、快速、准确、灵敏地分析酸性环境中微生物群落组成的优点, 实现了浸矿微生物种群的快速检测。

在改进浸矿微生物基因组提取方法的基础上, 将分离培养所获得的纯菌基因组 DNA 直接点样于芯片片基上, 制备出了浸矿微生物群落基因组芯片。该群落基因组芯片含有 5 个属、15 个种 50 多个菌株。研究表明, 在 55°C、50%甲酰胺的杂交条件下, 该芯片具有种间特异性, 其灵敏度到达 0.1 ng 基因组 DNA(图 5), 并具有较好的定量性能^[8]。

2.3 基因芯片的应用分析结果

利用所构建的群落基因组芯片和功能基因芯片, 探明了不同矿区硫化矿浸矿体系的微生物群落组成与结构, 解决了浸矿微生物群落结构与功能活动同步检测的难题。

通过对江西德兴铜矿共 9 个不同的浸矿样点进行研究, 发现了在浸矿过程中不同样点有多种不同的微生物在发挥着作用。这些微生物主要涉及到如下 19 个属或种: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum* spp., *Acidithiobacillus thiooxidans*,

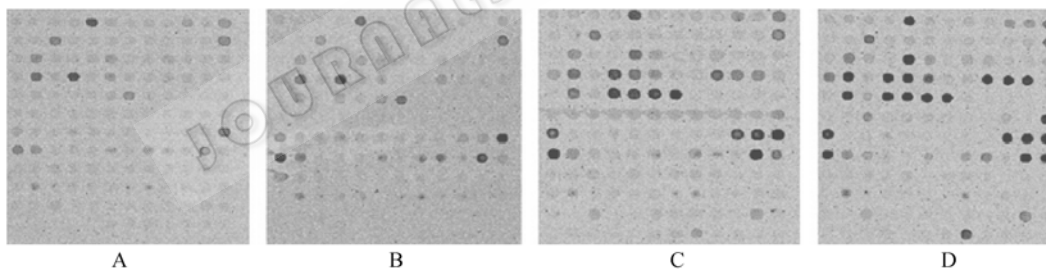


图 3 芯片灵敏度的检测

Fig. 3 Detection sensitivity of microarray

The target DNA was hybridized to the microarray at total concentrations of 0.2 ng(A), 1 ng (B), 5 ng (C) and 25 ng (D)

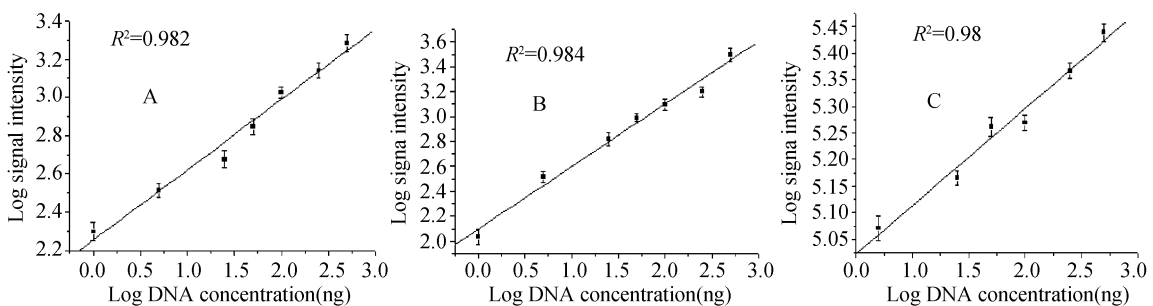


图 4 芯片定量性能的评估

Fig. 4 Evaluation of quantitative potential of microarray

A: *iro* gene; B: 16S rRNA gene; C: the correlation between the total signal intensity from A. f and DNA concentration

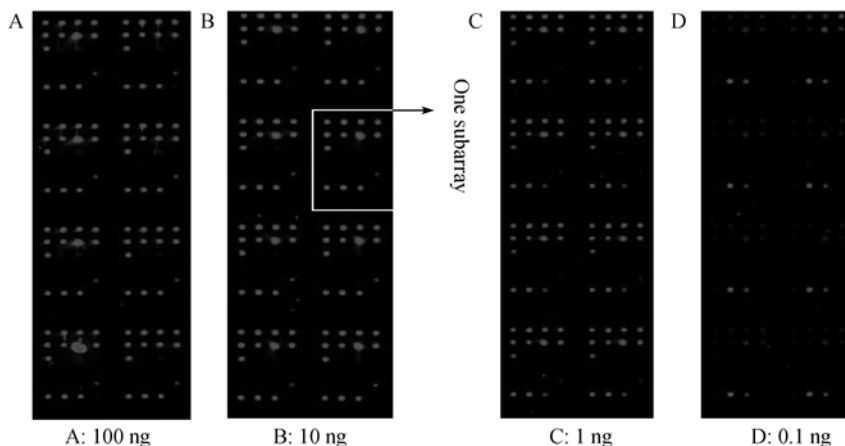


图 5 不同量的基因组 DNA 与群落基因组芯片杂交图谱

Fig. 5 Hybridization schematic different amount of genome DNA with community genome microarray

A: 100 ng; B: 10 ng; C: 1 ng; D: 0.1 ng

Acidotherrnus cellulolyticus, *Thermoplasmataceae archaeon*, *Sulfolobus*, *Sulfobacillus* sp., *Thiomonas* sp., *Hydrogenobacter acidophilus*, *Alicyclobacillus herbarius*, *Acidianus* sp., *Actinomyces naeslundii*, *Microthrix parvicella*, *Acidobacteria*, *Desulfovibrio longus*, *Acidiphilum* spp., *Holophaga* sp., *Thermomicrobium roseum* 和 *Metallosphaera* sp.(图 6)^[9]。

correspondence analysis)进一步发现, Fe, S, pH, Cu 和 Ca 是影响嗜酸微生物群落分布的主要影响因子(图 8)。这些因子主要影响到微生物群落的铁代谢途径、硫代谢途径, 及抗金属的能力。这些为进一步调控生物冶金过程提供重要的指导作用^[10]。

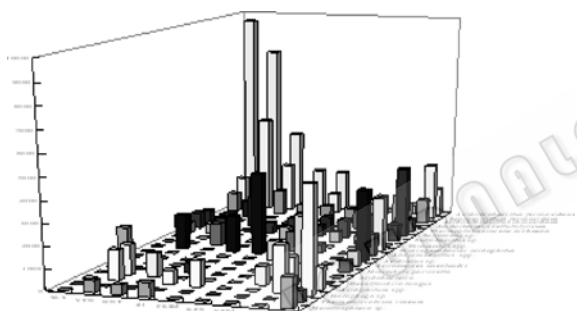


图 6 在浸矿过程中所涉及到的微生物

Fig. 6 The microorganisms involved in bioleaching process

进一步的分析发现, 微生物存在的环境其理化性质的差异, 与其微生物种群结构存在很强的相关性(Mantel 分析: $P < 0.05$)。在理化性质相同的浸矿环境中, 其微生物种群较相似。与此同时, 在不同的样点, 其微生物所进行的活动也存在较大的差异性, 这主要表现在功能基因的差异上, 如涉及到微生物代谢的功能基因, *iro* 基因, *dsr* 基因 和 *sox* 基因。通过基因芯片, 共检测到 286 个功能基因, 这些基因主要涉及到与铁代谢、硫代谢、碳代谢、氮代谢相关的重要基因。这些基因在不同的样点中, 其功能基因芯片所检测到的丰度有很大的不同(图 7)^[9]。

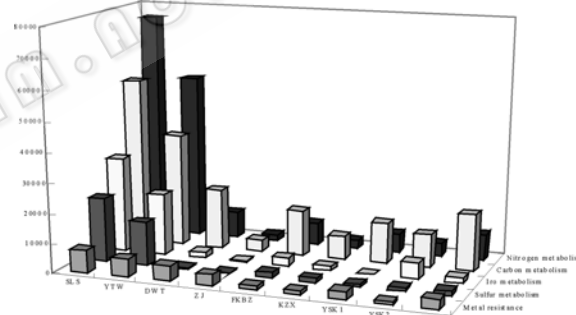


图 7 利用基因芯片所检测到的各个浸矿样点的功能基因的丰度

Fig. 7 The richness of functional gene in different bioleaching stations testing by gene chip

通过去趋势对应分析(Distrend correspondence analysis)、Mantel 分析以及典范对应分析(Canonical

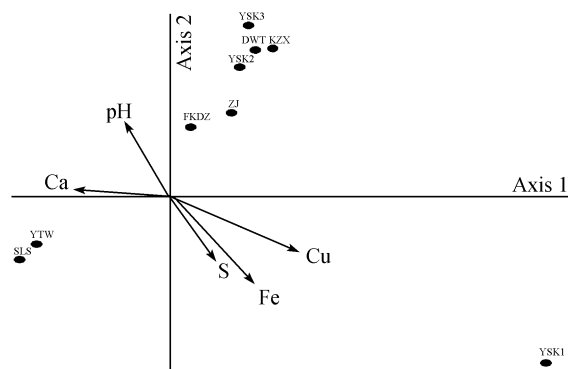


图 8 典范对应分析

Fig. 8 Canonical correspondence analysis

3 结语

占我国有色金属矿产资源 70%以上的低品位、复杂硫化矿生物冶金的难点在于缺少专属性强、环境适应性好的菌种,而使得浸出速度慢及浸出率低。而从基因水平创建了简单、快速、准确的生物冶金菌种快速筛选的基因芯片方法不仅使菌种浸矿性能的检测时间从传统浸矿试验的几个月缩短到 3~5 d,而且由于通过基因芯片对控制生物冶金微生物浸矿性状相关基因的全面检测而对其性能进行评判,克服了传统浸矿方法只测定表型特征,受环境影响很大,结果不稳定的缺点,使检测结果更加准确。芯片的构建实现了对浸矿过程中微生物种群变化的定量分析;将微生物群落结构和功能基因分析与生物冶金过程的宏观工程条件、物理化学的因素相结合,对微生物群落结构进行优化调控,实现了生物冶金从传统的描述性研究向目前的预测性研究跨越,利用所筛选的菌种进行生物冶金大大降低了矿产资源的边界品位,扩大了有色金属贮量,具有良好的应用前景。

REFERENCES

- [1] Zhou JK, Niu YJ. Advance in research of biological metallurgy of sulfide ore. *Metal Mine*, 2005, **346**(4): 24–30.
周吉奎, 钮因健. 硫化矿生物冶金研究进展. *金属矿山*, 2005, **346**(4): 24–30.
- [2] Zhang CG, Xia JL, Wang J, *et al.* Progress on researches of sulfur oxidation system of *Acidithiobacillus* spp. *Biotechnology Bulletin*, 2007, **24** (1): 59–65.
张成桂, 夏金兰, 王晶, 等. 嗜酸硫氧化细菌硫氧化系统研究进展. *生物技术通报*, 2007, **24**(1): 59–65.
- [3] Qiu GZ, Liu XD, Liu JS, *et al.* The methods of testing *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its activity by microarray technology. National Standard of the People's Republic of China, 2006.
邱冠周, 刘学端, 柳建设, 等. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌及其活性的基因芯片检测方法. 中华人民共和国国家标准, 2006.
- [4] Yin HQ, Cao LH, Qiu GZ, *et al.* Development and evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in Acid Mine Drainages and bioleaching systems. *Journal of Microbiological Method*, 2007, **70**: 165–178.
- [5] Yin HQ, Qiu GZ, Wang DZ. Comparison of microbial communities in three different mine drainages and their bioleaching efficiencies to low grade of chalcopyrite. *Journal of Central south University Technology*, 2007, **14**: 460–466.
- [6] Zhou JZ. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curenrt opinion in microbiology*, 2003, **6**(3): 288–294.
- [7] Zhang YG, Li DQ, Xiao QM, *et al.* Microarrays and their application to environmental microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, **44**(3): 406–410.
张于光, 李迪强, 肖启明, 等. 基因芯片及其在环境微生物研究中的应用. *微生物学报*, 2004, **44**(3): 406–410.
- [8] Wu LY, Liu XD, Schadt WC, *et al.* Microarray-based analysis of subnanogram quantities of microbial community DNAs using Whole Community Genome Amplification (WCGA). *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(8): 4931–4941.
- [9] Zhang YG, Zhang XQ, Liu XD. Microarray-based analysis of changes in diversity of microbial genes involved in organic carbon decomposition following land use/cover changes. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, **266**(2): 144–151.
- [10] Yin HQ, Qiu GZ, Luo HL, *et al.* The research of ferrous iron-oxidizing capability of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and the efficiency of low grade chalcopyrite bioleaching. *Progress in Modern Biomedicine*, 2007, **7**(5): 641–642.
尹华群, 邱冠周, 罗海浪, 等. 氧化亚铁硫杆菌氧化活性与其对低品位铜矿浸矿速率关系的研究. *现代生物医学进展*, 2007, **7**(5): 641–642.