

浸矿细菌—钩端螺旋菌属菌株研究进展*

刘 缨 林建群** 颜望明

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要: 钩端螺旋菌属菌株在微生物浸矿工业中具有重要作用。介绍了钩端螺旋菌属菌株的种类、特性, 分离、培养方法, 以及近些年来有关该属菌株在分子生物学及浸矿机理方面的研究进展。

关键词: 钩端螺旋菌属, 种类, 特性, 分子生物学, 浸矿机理

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0151-05

Bioining Microbes—Recent research Progress of Bacteria Belonging to the Genus *Leptospirillum**

LIU Ying LIN Jian-Qun** YAN Wang-Ming

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract: Bacteria species belonging to the genus *Leptospirillum* are of great importance in bioleaching industry. This paper introduces the varieties and characteristics of *Leptospirillum*, its isolation and cultivation methods, as well as the advance of molecular biology and bioleaching mechanism researchs about *Leptospirillum*.

Key words: *Leptospirillum*, Varieties, Characteristics, Molecular biology, Bioleaching mechanism

利用微生物进行生物浸矿具有悠久的历史, 我国古代就有利用微生物浸出矿石中铜的记载。矿石中的一些金属成分在浸矿微生物的作用下, 可以直接氧化成可溶性的离子形式, 释放到溶液中, 如铜、镍、锰、钴的浸出; 有些金属通过微生物的作用并不能直接溶出, 如矿石中的金, 但通过浸矿微生物作用后, 可以除去金矿中大部分难溶的黄铁矿杂质及一些重金属离子, 提高金矿石的品位, 有利于下一步化学冶金的进行, 提高金的提取率。生物浸矿由于成本低, 能耗小, 无污染, 在冶金工业中具有重要地位。在能源日益短缺, 环境污染严重的今天, 人们越来越多的利用微生物进行生物浸矿。近些年来, 已发现多种可以氧化金属硫化矿物的微生物, 如硫杆菌属、钩端螺旋菌属 (*Leptospirillum*) 以及一些高温嗜酸古细菌。在研究浸矿微生物和矿物相互作用的过程中, 越来越多的研究报道显示, 在工业浸矿系统中, *Leptospirillum* 属具有非常重要的作用, 该属的研究对生物浸矿工业具有非常重要的意义。本文综合了近些年以来有关该属菌株的研究进展, 作一简要的介绍。

1 *Leptospirillum* 属菌株的种类及特性

Leptospirillum 属菌株为革兰氏阴性细菌, 螺旋状, 具有嗜酸性, 端生鞭毛, 最适生

* 国家基础研究发展计划资助项目 (No. 2004CB619202)

国家自然科学基金资助项目 (No. 50174034, 30170026)

** 通讯作者 Tel: 86-531-88364429, Fax: 86-531-88565610, E-mail: jianqunlin@sdu.edu.cn

收稿日期: 2005-07-04, 修回日期: 2005-12-23

长 pH 为 1.5 ~ 1.8, 严格好氧, 专性化能自养, 通过将二价铁氧化成三价铁获得能量, 有机质的存在对其生长有抑制作用。能氧化二价铁离子、黄铁矿, 不能氧化硫和硫的其它还原性化合物^[1]。

Leptospirillum 属的 16S rRNA 序列系统发育分析结果显示, 该属在分类上属于硝化螺菌属 (*Nitrospira*) 分支, 分为 3 个类群。而嗜酸性氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 在分类上和 *Proteobacteria* 相近, 非常靠近 *Proteobacteria* 亚群中 α 和 δ 类群的分支^[2]。

Leptospirillum 属类群 I 的代表菌株是氧化亚铁钩端螺旋菌 (*L. ferrooxidans*), 该菌在 1972 年由 Markosyan^[3] 首次报道; 类群 II 的代表菌株是嗜铁钩端螺旋菌 (*L. ferriphilum*), 这是 2002 年 Coram 和 Rawlings^[4] 根据 16 株 *L. ferrooxidans* 的 16S rDNA 序列分析、DNA-DNA 杂交及 16S-23S 区间分析结果, 从 *L. ferrooxidans* 中划分出的一个新类群; 类群 III 主要存在于自然界矿山酸性废水中, 但在实验室条件下, 一直没有分离和培养成功。2005 年, Tyson 等^[5] 通过连续稀释法, 用不加氮源的 9K 培养液作为液体培养基, 从矿山酸性废水中获得属于类群 III 的纯菌, 并定名为固氮氧化亚铁钩端螺旋菌 (*Leptospirillum ferrodiazotrophum*)。

Leptospirillum 属的 3 个类群在形态、生理生化特性方面无特征性差异。分子水平上的研究结果显示, *L. ferriphilum* 的 G + C 摩尔百分比为 55% 至 58%, 有两个 *rrn* 操纵子; *L. ferrooxidans* 的 G + C 摩尔百分比为 49% 至 52%, 有 3 个编码 rRNA 的 *rrn* 操纵子。通过扩增 16S rRNA 基因后进行限制性酶切, 可以将这两类菌快速区分开来^[4]。

我国对 *Leptospirillum* 属的研究报道很少, 2002 年, 本室从云南腾冲高温温泉中分离到一株螺旋状铁氧化细菌, 通过对其进行形态学、生理生化研究, 将该菌定为 *L. ferrooxidans*, 2004 年, 对其进行了分子鉴定, 结果显示, 该菌属于类群 II, 与 *L. ferriphilum* 的 16S rDNA 序列相似度达 99.7% 以上^[6-7]。这是国内有关 *Leptospirillum* 属菌株的首次报道。

2 *Leptospirillum* 属菌株的分离和培养

Leptospirillum 属菌株对营养要求非常低, 能够以亚铁离子作为能源, CO₂ 作为碳源, 在无机盐培养基中生长。由于它们专性化能自养, 生长周期长, 细胞得率低, 对该属菌株的培养难度大。常用的液体培养基是 9K 培养基。在固体培养基上, 它们难以形成菌落, 培养基中的固化剂所含有的微量有机成分对其生长有抑制作用。1991 年, Johnson 等^[8] 报道了一种广泛适用于嗜酸性铁氧化细菌的双层平板培养基, 以无机盐作为培养基、以琼脂糖为固化剂, 并向下层平板中加入极端嗜酸性的异养细菌 *Acidiphilium* SJH, 通过异养菌的生长, 消耗了培养基中的微量寡糖类物质, *L. ferrooxidans* 在该培养基上可以形成菌落。本室根据双层平板培养基配方并进行了一些简化, 也获得了 *L. ferrooxidans* 的单菌落^[9]。

3 *Leptospirillum* 属菌株的分子生物学研究进展

Leptospirillum 属的遗传学研究工作较少。1998 年, Amils 等^[10] 利用脉冲电泳技术研

究嗜酸性化能自养细菌的基因组,发现 *L. ferrooxidans* ATCC 49879 的染色体为环型,长度为 1.9Mb,是已知嗜酸性化能自养细菌中最小的。2004 年, Tyson 等^[11] 用鸟枪测序法,从矿山酸性废水样品中提取出总 DNA,构建基因组文库,测序得到了属于 *Leptospirillum* 属类群 II 的接近全部基因组序列和类群 III 的部分基因组序列。序列分析结果显示,类群 II 不含固氮基因,类群 III 中含有编码固氮酶的基因。2005 年, Coram 等^[12] 从 *L. ferrooxidans* ATCC 49879 中分离到两个大小分别为 28,878 bp 和 28,012 bp 的质粒,进行了序列测定及分析,确定了其中的开放阅读框 (ORFs) 数目及可能的氨基酸编码产物特性。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 及许多具有鞭毛,能运动的细菌在细胞膜上具有趋化性信号转导系统。*Leptospirillum* 属菌株的染色体中也发现了类似的基因序列,由此推测, *Leptospirillum* 属菌株中也存在化学趋化信号转导系统。

1998 年, Delgado 等^[13-14] 从 *L. ferrooxidans* 染色体上克隆到一个可能是编码趋化性受体蛋白的基因 *lcrI*,完整的开放阅读框为 2,262bp,推导的蛋白有 577 个氨基酸,分子量 63,957 D。比较 *lcrI* 和其它微生物的趋化性受体蛋白基因 (*mcp*) 序列发现, *lcrI* 和 *mcp* 基因中的功能保守区域具有对应区间,在对应区间内有很高的序列相似性。推导的 LcrI 蛋白包括胞外周质区域和胞质区域,胞外周质区域有很高的正电荷;在胞质区域含有两个两性螺旋结构、一个高度保守区 (HCD 区域) 和两个可能的甲基化位点,两性螺旋结构可能在细胞跨膜信号传导中具有重要作用。Delgado 等人通过构建重组质粒,使 *lcrI* 基因在 *E. coli* 中得到了表达,但是未能检测到表达蛋白在 *E. coli* 细胞膜上的功能,这可能是由于 *L. ferrooxidans* 和 *E. coli* 的胞外区域 pH 差别很大, LcrI 蛋白在 *E. coli* 的胞外区域不能形成正确结构。

Leptospirillum 属的类群 I 和类群 III 具有生物固氮作用。Parro 等^[15,16] 建立了 *L. ferrooxidans* 的基因组文库,用基因芯片方法研究 *L. ferrooxidans* 中和固氮有关的基因,发现 *L. ferrooxidans* 包含完整的固氮操纵子 *nifHDKENX* 及其它和氮的传递和运输有关的基因。2005 年, Tyson 等^[5] 的研究表明, *Leptospirillum* 属类群 III 和 *L. ferrooxidans* 的固氮操纵子基因序列相似性在 73% ~ 94% 左右。

4 *Leptospirillum* 属细菌在浸矿微生物中的重要作用

多年以来,人们一直以为嗜酸性氧化亚铁硫杆菌 (*A. ferrooxidans*) 是浸矿工业中最重要的微生物,近些年来,随着分子生物学的发展,人们发现,在环境温度较低,铁离子浓度不高的条件下,如自然界矿山的矿床中及堆浸反应初期,检测到的往往是 *A. ferrooxidans* 及一些硫氧化细菌。但在许多环境温度较高,三价铁离子浓度高的条件下, *Leptospirillum* 属菌株占浸矿微生物种群的优势,是主要的铁元素氧化者,对矿物的浸出起着重要作用,该属菌株在浸矿工业中的重要性引起了人们的关注。同 *A. ferrooxidans* 相比, *Leptospirillum* 属具有更高的氧化还原电势,对二价铁离子的亲和力更高,受到高浓度三价铁离子的生长抑制作用更小。在常规的工业化分批浸矿条件下,浸矿初期,体系中三价铁和二价铁离子的比率低,氧化还原电势低,有利于 *A. ferrooxidans* 的生长,并成为反应体系中的优势菌;随着反应的进行,三价铁和二价

铁离子的比率逐渐升高, 氧化还原电势增高, *A. ferrooxidans* 的生长受到抑制, *Leptospirillum* 属菌株迅速生长, 成为反应体系中的优势菌。在工业化连续流动的浸矿条件下, 体系中三价铁离子的浓度一直处于比较高的水平, *A. ferrooxidans* 的生长受到抑制, *Leptospirillum* 属菌株一直是反应体系中的优势菌^[17]。

Leptospirillum 属的不同类群生长条件也有差别。*L. ferrooxidans* 一般在 pH 1 以上, 35℃ 以下的环境中生长, 而 *L. ferriphilum* 可以在 pH 1 以下, 35℃ 至 45℃ 的温度下生长^[18], 在工业化生物浸提含砷金精矿的连续氧化罐中, 大多数反应在 40℃, pH 1 左右的条件下进行, 这样的环境往往更适于 *L. ferriphilum* 的生长。2002 年, Coram 等人的研究显示, 从南非 Fairview 矿区砷黄铁矿连续浸提罐中检测到的螺旋菌都是 *L. ferriphilum*^[4]。

5 *L. ferrooxidans* 参与生物浸矿的机理

在研究 *Leptospirillum* 属菌株和矿物相互作用机理的过程中, 人们研究较多的是 *L. ferrooxidans*, 并建立了一些矿物浸出模型, 利用这些模型来分析 *L. ferrooxidans* 和 *A. ferrooxidans* 参与浸矿作用的异同点^[19], 其中最主要的是直接浸出模型, 又称接触浸出模型。该模型认为, 在 *L. ferrooxidans* 和 *A. ferrooxidans* 的细胞膜与矿物之间存在着胞外多聚物 EPS (extracellular polymeric substances), 通过 EPS 的介导, 在细胞膜和矿物之间相互作用, 造成黄铁矿的溶蚀。透射电镜照片显示出, *L. ferrooxidans* 的 EPS 中包含黄铁矿颗粒, 而 *A. ferrooxidans* 的 EPS 中包含胶体硫。人们推测, *L. ferrooxidans* 通过 EPS 的作用吸收电子, 堆积 Fe^{3+} , 使黄铁矿表面发生电化学氧化; 而 *A. ferrooxidans* 通过硫作为能量中间体, 在 EPS 中形成胶体硫作为能量传递者。此外, 还有间接浸出模型, 即细菌是通过其氧化产物 Fe^{3+} 和 H^+ 的作用氧化硫化矿物, 细菌再生 Fe^{3+} 和 H^+ 。还有些人支持协同浸出模型, 即矿物的氧化既有细菌吸附的直接作用, 又有细菌氧化产物的间接作用, 这也是目前大多数研究者认可的细菌氧化机理。

2004 年, Rojas-Chapana 等^[20]研究了 *L. ferrooxidans* 在黄铁矿表面的界面活性及矿物浸出模型, 通过扫描及透射电镜观察发现, *L. ferrooxidans* 和黄铁矿接触的起始阶段, 细菌随机分布在黄铁矿表面; 随后, 释放出胞外多聚物 EPS, 形成胞外多聚物桥, 结合至矿物表面, 相邻的细菌也彼此结合, 从而形成了细菌生物膜。因此, EPS 在吸附、形成细菌生物膜的过程中及细菌—基质的界面作用中起着重要作用。吸附至矿物表面的细菌被 EPS 包裹, 吸收并储存纳米状的黄铁矿电子致密物, 并逐渐形成电子致密物包被。人们推测, 通过 EPS 的介导, 细胞外形成了一个独特的囊膜, 细胞吸收并利用囊膜中的黄铁矿颗粒, 将其氧化成 Fe^{3+} , Fe^{3+} 是一种强氧化剂, 具有氧化硫化矿物的能力, 可以介导 EPS 与矿物表面发生电化学相互作用, 在细菌与硫化矿物的吸附位点形成蚀刻坑, 细菌再生三价铁离子并利用此过程产生的能量生长。

6 展望

随着人们对环境保护意识的加强, 人们越来越青睐于利用浸矿微生物进行生物冶金, 同时人们还不断发现浸矿微生物的新用途, 如从废弃的旧电器、垃圾中回收金属,

以及处理废塑料、废水等。*Leptospirillum* 属菌株由于在工业生产中具有重要的作用, 该属细菌资源的发掘及其浸矿特性的研究, 对生物浸矿技术的发展和具有十分重要的意义。此外, *Leptospirillum* 属菌株作为极端环境微生物, 通过对其代谢过程的研究, 如能量代谢过程、生物固氮过程, 还可能有助于揭示地球上早期生命起源和进化的问题。

目前, *Leptospirillum* 属菌株已在工业化生产的许多方面发挥着重要作用, 如含砷金精矿的预处理, 铜的生物浸提。但是在工业应用中, 同其它浸矿微生物一样, 该菌也存在着生长速度慢、对重金属离子耐受性差等问题。对 *Leptospirillum* 属菌株进行遗传改良, 是今后研究的一个重要方向。本室 90 年代曾成功建立了氧化亚铁硫杆菌的基因遗传转移系统, 在此基础上, 我们尝试建立 *Leptospirillum* 属菌株的基因遗传转移系统, 对该属菌株进行抗砷、抗汞及抗其它重金属离子改造, 以更好的应用于工业生产, 目前这方面的工作正在进行中。此外, 工业浸矿中采用 *Leptospirillum* 属菌株和其它浸矿微生物组成复合菌株, 浸矿效果往往比单独使用 *Leptospirillum* 属菌株好, 因此, 研究 *Leptospirillum* 属和其它浸矿微生物之间的关系, 建立复合菌株在不同成分矿物中的浸矿模型, 实现浸矿工艺条件的优化, 也是今后的另一个研究方向。

参考文献

- [1] Rawlings D E. Annu Rev Microbiol, 2002, **56**: 65 ~ 91.
- [2] Rawlings D E. Hydrometallurgy, 2001, **59**: 187 ~ 201.
- [3] Markosyan G E. Biol J Armenia, 1972, **25**: 26 ~ 29.
- [4] Coram N J, Rawlings D E. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 838 ~ 845.
- [5] Tyson G W, Lo I, Baker B J, et al. Appl Environ Microbiol, 2005, **71** (10): 6319 ~ 6324.
- [6] 刘 纓, 刘相梅, 郑力真, 等. 山东大学学报, 2004, **39** (2): 116 ~ 119.
- [7] 刘 纓, 齐放军, 刘相梅, 等. 山东大学学报, 2004, **39** (5): 112 ~ 115.
- [8] Johnson D B, McGinness S. Journal of microbiological Methods, 1991, **13**: 113 ~ 122.
- [9] 刘 纓, 刘相梅, 田克立, 等. 微生物学通报, 2003, **30** (6): 70 ~ 72.
- [10] Amils R, Irazabal N, Moreira D, et al. Biochimie, 1998, **80**: 911 ~ 921.
- [11] Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, et al. Nature, 2004, **428**: 37 ~ 43.
- [12] Coram N J, Leonardo J, Rawlings D E. Appl Environ Microbiol, 2005, **71** (11): 7515 ~ 7522.
- [13] Delgado M, Toledo H, Jerez C A. Appl Environ Microbiol, 1998, **64** (7): 2380 ~ 2385.
- [14] Jerez C A. Hydrometallurgy, 2001, **59**: 347 ~ 356.
- [15] Parro V, Moreno-Paz M. PNAS, 2003, **100** (13): 7883 ~ 7888.
- [16] Parro V, Moreno-Paz M. Research in Microbiology, 2004, **155**: 703 ~ 709.
- [17] Rawlings D E, Tributsch H, Hansford G S. Microbiology, 1999, **145**: 5 ~ 13.
- [18] Baker B J, Banfield J F. FEMS Microbiol Ecol, 2003, **44**: 139 ~ 152.
- [19] Tributsch H. Hydrometallurgy, 2001, **59**: 177 ~ 185.
- [20] Rojas-Chapana J A, Tributsch H. FEMS Microbiology Ecology, 2004, **47**: 19 ~ 29.