

研究报告

黄铁矿生物浸出菌群的驯化及其优势物种与功能

王璐^{#1,2}, 赵维^{#2}, 成婷婷², 韩一凡^{*2}, 王敬敬², 张小霞², 黄志勇^{*2}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津市工业生物系统与过程工程重点实验室, 天津 300308

王璐, 赵维, 成婷婷, 韩一凡, 王敬敬, 张小霞, 黄志勇. 黄铁矿生物浸出菌群的驯化及其优势物种与功能[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5006-5025.

WANG Lu, ZHAO Wei, CHENG Tingting, HAN Yifan, WANG Jingjing, ZHANG Xiaoxia, HUANG Zhiyong. Pyrite-bioleaching microbial community: domestication, identification of dominant species, and characterization of functions[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 5006-5025.

摘要:【背景】生物浸矿效果与浸矿过程中微生物群落的结构变化密切相关, 解析浸矿过程中的微生物群落结构和功能对于进一步认识微生物在浸矿过程中的作用、构建高效菌群具有重要意义。

【目的】通过驯化获得稳定高效浸出黄铁矿的微生物菌群, 并解析其菌群结构和功能。【方法】以黄铁矿为能源来源将微生物菌群在 9K 培养基中长期传代转接, 对比驯化前后菌群的铁硫氧化能力, 利用宏基因组测序结合 16S rRNA 基因克隆文库对驯化后的菌群进行群落结构解析, 通过分化培养实验, 探究驯化后菌群中优势微生物在浸出黄铁矿过程中的功能, 结合宏基因组功能注释结果分析驯化前后菌群功能基因的变化。【结果】通过为期 10 代的转接驯化, 获得了组成稳定、浸矿功能提升, 更加适应黄铁矿浸出环境的微生物菌群。基于宏基因组的结果, 驯化后的菌群相对于驯化前, 嗜酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)和硫化杆菌属(*Sulfobacillus*)的比例均上升; 16S rRNA 基因克隆文库的检测结果显示, 驯化后菌群主要由氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)和耐热硫化芽胞杆菌(*Sulfobacillus thermotolerans*)这 2 种微生物组成。驯化后菌群的铁氧化能力提升 15.15%, 硫氧化能力提升 70.86%。对菌群的浸矿效果和组成它的优势种属单独的浸矿效果进行比较, 以浸出黄铁矿中总铁的含量计算, 驯化后 5BioI 菌群 16 d 的浸出率可达 81.18%, 氧化硫硫杆菌(*A. thiooxidans*)和耐热硫化芽胞杆菌(*S. thermotolerans*)单独的浸出率分别为 51.86%和 37.65%, 5BioI 菌群的浸矿能力优于组成它的优势种属的单独浸矿能力, 说明菌群内优势种属之间可能存在协同

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102200); 国家自然科学基金青年基金(31400116); 国家高技术研究发展计划子课题(2012AA021203); 天津市科技计划(23YFYSHZ00050); 中央引导地方科技发展专项资金(2024YD009)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102200), the National Natural Science Foundation of China (31400116), the National High Technology Research and Development Program Subproject (2012AA021203), the Tianjin Science and Technology Project (23YFYSHZ00050), and the Central Guidance Fund for Local Scientific and Technological Development (2024YD009).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: HUANG Zhiyong, huang_zy@tib.cas.cn; HAN Yifan, han_yf@tib.cas.cn

Received: 2024-06-26; Accepted: 2024-10-19; Published online: 2024-11-08

作用, 使得其浸矿效果达到了单物种不能达到的效果。通过分化培养后菌群组成的变化, 判断氧化硫硫杆菌(*A. thiooxidans*)的主要作用是硫的氧化, 而耐热硫化芽胞杆菌(*S. thermotolerans*)的主要作用是铁的氧化, 耐热硫化芽胞杆菌(*S. thermotolerans*)需要依赖氧化硫硫杆菌(*A. thiooxidans*)的存在才能发挥铁氧化能力, 说明菌群中不同物种可能通过协同合作共同提高了浸出黄铁矿的能力, 这与 5Biol 菌群驯化后嗜酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)和硫化杆菌属(*Sulfobacillus*)的比例提高、浸矿能力得到增强是一致的。对驯化前后与铁硫代谢相关的功能基因进行分析, 发现驯化后菌群铁的氧化主要通过 sulfocyanin-like 蛋白实现, 硫的氧化主要通过 sox 系统、sor 系统和非 sox 子系统实现。

【结论】通过长期驯化传代的方法, 可以获得组成稳定、功能强化的高效浸矿菌群。由于长期驯化菌群更加稳定, 更容易解析其中不同菌种在执行浸矿功能中的作用。这对高效浸矿菌群的构建具有重要的指导意义。

关键词: 黄铁矿浸出; 驯化; 浸矿菌群; 氧化硫硫杆菌; 耐热硫化芽胞杆菌; 协同作用

Pyrite-bioleaching microbial community: domestication, identification of dominant species, and characterization of functions

WANG Lu^{#1,2}, ZHAO Wei^{#2}, CHENG Tingting², HAN Yifan^{*2}, WANG Jingjing², ZHANG Xiaoxia², HUANG Zhiyong^{*2}

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Key Laboratory for Industrial Biological Systems and Bioprocessing Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: **[Background]** The bioleaching performance is closely related to the microbial community structure and its dynamics during the bioleaching process. Understanding the changes in microbial community structure and function during the bioleaching process is crucial for elucidating the role of microorganisms in this process and building efficient microbial combinations. **[Objective]** To obtain the microbial community with stable and high pyrite-leaching efficiency by domestication, and analyze the structure and function of the microbial community. **[Methods]** The microbial community was subcultured in the 9K medium with pyrite as the energy source. The iron and sulfur oxidation capacity of the microbial community was measured before and after domestication. The structure of the domesticated microbial community was analyzed by metagenomic sequencing combined with 16S rRNA gene clone library. Differentiation culture experiments were carried out to study the functions of dominant microorganisms in the domesticated microbial community during pyrite bioleaching. The functional annotation of metagenomic sequencing results was carried out to analyze the functional changes of the microbial community before and after domestication. **[Results]** The microbial community with a stable structure, improved bioleaching ability, and adaptability to the pyrite leaching environment was obtained after domestication. The metagenomic sequencing

results showed that the relative abundance of the genus *Acidithiobacillus* and *Sulfobacillus* were both increased. Detection results from the 16S rRNA gene clone library showed that the domesticated microbial community mainly consisted of *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Sulfobacillus thermotolerans*, with the iron and sulfur oxidation capacity increasing by 15.15% and 70.86%, respectively. The leaching effects were compared between the bacterial community and the dominant species alone. In terms of total iron leached from pyrite, the 16-day leaching rate of the domesticated community 5Biol reached 81.18%, while those of *A. thiooxidans* and *S. thermotolerans* were 51.86% and 37.65%, respectively. The better leaching ability of 5Biol than that of single dominant species indicated that the existence of synergistic effect between dominant species in the community, which endowed 5Biol with the leaching effect that a single species cannot achieve. The differentiation culture experiments showcased that *A. thiooxidans* primarily contributed to sulfur oxidation, while *S. thermotolerans* was mainly responsible for iron oxidation. *S. thermotolerans* was dependent on *A. thiooxidans* for iron oxidation. This indicated that different strains within the community may collaborate synergistically, leveraging their respective strengths to enhance the overall leaching efficiency. This is consistent with the increases in the relative abundance of *Acidithiobacillus* and *Sulfobacillus* and the enhancement of leaching ability of 5Biol after domestication. After domestication, sulfocyanin-like proteins were the key proteins involved in iron oxidation, while sulfur oxidation included the sox system, sor system, and non-sox subsystems. **[Conclusion]** Long-term domestication by passages with a specific ore can yield a stable microbial community with enhanced bioleaching performance. The simplified stable microbial community makes it easy to elucidate the functional roles of different microbial species. The findings provide insights into the construction of efficient microbial communities for bioleaching.

Keywords: pyrite leaching; domestication; microbial community for bioleaching; *Acidithiobacillus thiooxidans*; *Sulfobacillus thermotolerans*; synergistic effect

生物浸出(bioleaching)是利用微生物自身的氧化还原特性及其代谢产物对金属矿物的氧化或还原获得金属组分的过程^[1]。黄铁矿是自然界中分布最广的硫化矿物,往往与其他矿物伴生^[2],黄铁矿可为矿石中的微生物提供能源^[3-4],微生物对黄铁矿的浸出对伴生重金属的浸出具有良好的促进作用^[3-4]。黄铁矿在微生物的作用下可以产生大量硫酸,在浸矿过程中可以减少酸耗,缩短浸出周期,还可为浸出体系提供 Fe^{3+} ,减少氧化剂的使用,提高浸出效率^[3]。微生物群落结构及其变化与生物浸出效果密切相关^[5],解析浸矿过程中微生物群落结构和功能,对于获得适应矿物环境的菌种,提高微生物群落浸出

性能意义重大。

微生物菌群通常以协作的方式产生比单一菌种更为高效的功能特征^[6-7]。因此,在研究中多使用群落构建的方法获得高效稳定的混合菌群。Rawlings^[8]采用“top down”方法在不同精矿中构建了由 11 株嗜中温菌和 11 株中等嗜热菌组成的菌群,发现不同的矿物浸出体系中会发展出不同的优势物种。Bacelar-Nicolau 等^[9]和 Tuffin 等^[10]利用“bottom up”方法构建微生物群落用于黄铁矿及含砷黄铁矿的浸出,Tuffin 等^[10]发现基于这种方法进行微生物群落构建后依然需要长时间驯化,使微生物适应新工艺环境。这说明,微生物菌群为了适应特定的浸矿环境会以

自组装的方式发展出适应环境条件的群落结构。

微生物菌群浸矿的研究比较常见,但大多是针对已知的功能菌株进行组合,对特定矿物条件下极端嗜酸菌群的功能、代谢特征、环境作用,以及不同菌种的协作机制的研究仍然需要更广泛和深入的探索。然而,自然环境中微生物菌群结构复杂、功能多样,菌种分离与功能解析非常困难,因此,为了获得结构简单、功能稳定的浸矿菌群,解析其中不同微生物所执行的主要功能,本文拟利用黄铁矿作为单一矿物底物,对实验室已有浸矿菌群^[11]进行长期驯化,预期获得一个能够浸出黄铁矿中铁元素和硫元素的简单微生物组,并对驯化前后的浸矿菌群进行研究,揭示浸出过程中物种和功能的演化规律和环境适应机制,阐明浸矿物种在浸出黄铁矿过程中所起的作用,对指导菌群构建、调控及优化浸矿过程、探索地质环境变化、提高矿产资源利用有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 样品

本实验所用菌群来自实验室既有的能够耦合黄铁矿浸出软锰矿的菌群^[11]。该菌群源头来自云南省腾冲县热泉的泥样及河北省迁西县软锰矿土样,经混合后在含有黄铁矿和软锰矿的酸性无机盐培养基中富集得到,该菌群 15 d 在双矿浸出体系中对锰的浸出率达到 92.48%,微生物在两矿浸出过程中通过促进黄铁矿解离,维持体系低 pH 等作用加速反应的进行^[12]。本文选择该菌群在黄铁矿单矿浸出环境中进行驯化,以简化和稳定群落组成,进一步研究菌群中不同物种的功能。

本实验使用的与菌群进行浸矿效果比较的单菌株氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*) ATCC 19377、耐热硫化芽胞杆菌(*Sulfobacillus*

thermotolerans) DSMZ 17362 和嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*) ATCC 23270 均购自 DSMZ 公司。

本实验所用的黄铁矿取自辽宁省葫芦岛市硫酸厂,其主要元素成分如表 1 所示,矿相成分如表 2 所示,X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)检测报告上传至国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center, NMDC),编号为 NMDCX0001728。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

9K 培养基参考文献^[11]配制。

浸矿培养基:在 9K 培养基^[11]的基础上,不添加 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,将黄铁矿研磨至 100 目,黄

表 1 黄铁矿主要化学成分

Table 1 Chemistry composition of the pyrite

元素	含量
Element	Content (%)
Mn	2.450
Si	20.790
Fe	29.440
Ca	5.360
P	0.044
Al	0.760
Mg	2.298
Cu	0.008
Zn	0.008
K	0.300
Na	0.148
Pb	1.950×10^{-6}
Cd	2.360×10^{-6}
Ti	0.023
S	35.650

表 2 黄铁矿的矿相成分

Table 2 Mineral composition of pyrite

矿相	重量含量
Mineral phase	Weight content (%)
FeS_2 pyrite	53.3
$\text{Ca}(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})$ calcium sulfate	20.4
$\text{FeSO}_4(\text{H}_2\text{O})$ szomolnokite	21.2
SiO_2 -quartz	5.0

铁矿充氮于 121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 后根据需以 20 g/L 的终浓度加入到体系中。

9K+S 培养基: 将浸矿培养基中的黄铁矿替换为添加 10 g/L 的硫单质。

9K+Fe 培养基: 将浸矿培养基中的黄铁矿替换为添加 44.2 g/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

9K+Fe+S 培养基: 将浸矿培养基中的黄铁矿替换为添加 10 g/L 硫单质和 44.2 g/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

哈希硫酸盐试剂粉枕包, 哈希水质分析仪器(上海)有限公司; 土壤 DNA 基因组提取试剂盒, 上海 Biomiga 生物技术有限公司。总有机碳分析仪, 耶拿分析仪器股份有限公司。

1.3 黄铁矿浸矿菌群的驯化

将 1.1 中实验室已有浸矿菌群命名为 5Biol, 在浸矿培养基中做传代培养, 每代转接量为 30%, 培养条件为 30 °C、180 r/min。记录转接起始点和终止点的浸矿体系 pH 值、记录转接起终点的时间。根据以往经验浸矿体系 pH 下降到 1.5 左右为浸矿稳定期, 选此点作为转接点。

1.4 驯化前后菌群浸出黄铁矿特征评价指标

将接种菌液的浸矿体系, 与自然浸出体系对照, 检测菌群在浸出过程中的作用。每 4 d 检测 2 个体系 pH、硫酸根离子含量、亚铁含量和总铁含量的变化。其中, 利用 pH 计进行 pH 的测定, 硫酸根含量的测定利用浊度法^[13], 亚铁的测定采用邻菲罗啉分光光度法^[14], 总铁的测定采用改进的邻菲罗啉分光光度法^[15], 驯化后菌群总有机碳含量的测定使用总有机碳分析仪进行。驯化后菌群和单菌总铁浸出率的计算公式: 浸出体系总铁含量/初始黄铁矿中总铁含量 $\times 100\%$ 。

1.5 “分化培养”

“分化培养”在本文指的是将菌群置于含有

不同底物的培养基中, 由于不同微生物对不同底物的利用具有偏向性, 从而在培养过程中表现出物种相对比例的变化, 基于此判断微生物在菌群中的功能特征。将驯化后的菌群分别在 9K+S 培养基、9K+Fe 培养基、9K+Fe+S 培养基中培养, 监测其代谢特征的变化及群落水平的变化。分化培养共进行了 5 代, 测定第 1 代、第 3 代和第 5 代的代谢特征参数, 主要包括体系 pH、硫酸根和铁氧化率。铁氧化率计算公式: (总铁含量-亚铁含量)/总铁含量 $\times 100\%$ 。在第 1 代分别监测第 1 天、第 4 天、第 8 天、第 14 天的参数; 在第 3 代和第 5 代分别监测第 1 天、第 7 天和第 14 天的参数。

对第 5 代分化培养 14 d 后的各组样品使用 16S rRNA 基因克隆文库的方法进行群落组成分析, 16S rRNA 基因克隆文库通过对 16S rRNA 基因全长序列进行扩增和分析, 具体方法参考文献[16], 其中菌群 DNA 使用土壤 DNA 基因组提取试剂盒进行提取, 菌群 16S rRNA 基因序列的扩增采用细菌通用引物 27F (5'-AG RGTTCGATCMTGGCTCAG-3')和 1387R (5'-GG GCGGWGTGTACAAGGC-3')进行。PCR 反应体系(25 μL): 10 \times Buffer 2.5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL , 引物(10 mmol/L)各 0.5 μL , Mg^{2+} (2.5 mmol/L) 1.5 μL , *Taq* 酶(2.5 U/ μL) 0.2 μL , 稀释 DNA 模板 1 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 28 次循环; 72 °C 10 min。割胶纯化 PCR 产物, 与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂板, 37 °C 培养 12 h 后挑取阳性克隆子, 利用限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hha* I 对 PCR 产物进行酶切分型, 每个酶切类型挑取 1 个代表菌株进行测序, 与 GenBank 已知序列进行 BLAST 比对确定细菌种类, 以揭示样品的物种组成。

1.6 驯化前后菌群宏基因组测序与分析

取驯化前后稳定期(浸矿周期第 16 天)的 5Biol 菌群使用土壤 DNA 基因组提取试剂盒提取 DNA, 检测合格的 DNA 样品由诺禾致源公司进行 Illumina PE100 测序。每个样品构建一个文库, 对这些文库进行双端(paired-end, PE)测序。插入片段长度为 180 bp, 双端测序长度为 100 bp。对测序得到的原始数据(raw data)使用软件 SeqPrep 去除含 N 碱基的 reads, 对序列 5'端和 3'端进行质量剪切, 然后使用软件 Sickle 去除剪切后长度小于 50 bp 及平均质量值低于 20 的 reads, 保留高质量的 clean reads。将优化处理后的序列使用拼接软件 SOAPdenovo v1.06 进行拼接组装, 拼接参数 k-mer 值设置范围为 39-47。在 scaffolds 内部 gap 处, 将 scaffolds 打断成新的 contigs, 并对 ≥ 500 bp 的 contigs 进行统计, 从中选择最优组装结果采用 MetaGeneMark 进行基因预测, 并对各样品预测产生的基因进行去冗余, 构建 gene catalogue, 综合各样品的 clean reads, 可获得 gene catalogue 在各样品中的丰度信息; 将 gene catalogue 和 MicroNR 库进行比对, 获得每个基因的物种注释信息, 结合基因丰度表, 获得不同分类层级的物种丰度表; 同样, 将 gene catalogue 和 KEGG 数据库、eggNOG 数据库等进行比对获得基因功能注释结果和丰度信息。在属水平上对比驯化前后菌群中优势物种的丰度差异。对驯化前后的功能基因基于同源基因簇(eggNOG)的功能注释结果统计各个聚类中 reads 数目, 利用 R 软件绘制热图。同时, 针对功能基因基于 KEGG 数据库的注释结果, 在 KEGG orthology (KO)水平上进行差异分析, 并使用韦恩图进行展示。针对驯化前后的优势物种(*Acidithiobacillus* 和 *Sulfobacillus*), 在属内进行功能注释结果的统计, 并绘制热图。

1.7 驯化前后菌群铁硫代谢基因分析

在 NCBI 数据库下载 *Acidithiobacillus* 与铁氧化相关的功能基因, 作为数据库, 使用 blast-2.11.0+软件进行本地 BLAST, 比较驯化前后宏基因组数据中与铁氧化相关的基因对应的 reads 数, 并绘制热图; 针对 *Sulfobacillus* 的铁氧化相关基因 sulfocyanin, 在 NCBI 数据库以 sulfocyanin 为关键词搜索与其相关的全部物种的 sulfocyanin-like 蛋白序列, 组成 sulfocyanin 蛋白数据库, 分别与驯化前后的宏基因组预测结果进行比对, 在其中筛选出相似度较高 (bit score >200 , 蛋白序列相似度 $>60\%$, *E*-value 设为 0.000 01)的序列, 并对驯化前后的比对序列进行 reads 数目和百分比统计, 结果展示在 sulfocyanin-like 蛋白的系统发育树中。Sulfocyanin-like 蛋白的系统发育树使用 MEGA 5 软件完成, 算法为最大似然法。

针对硫氧化基因, 分别基于 KEGG 数据库和 eggNOG 数据库的注释结果进行统计, 比较参与硫代谢的基因在驯化前后的宏基因组中的种类变化。

2 结果与分析

2.1 驯化前后 5Biol 菌群浸出黄铁矿特征

5Biol 菌群在以黄铁矿为能源的浸矿培养基中培养并连续转接了 10 代(约 160 d)。如图 1A 所示, 驯化过程中, 菌群在浸矿环境中达到稳定 pH 后, 随驯化代数增多, pH 下降程度也变大, 达到稳定 pH 所需时间在减少。对驯化前后 5Biol 菌群浸出体系中 pH、总铁浸出量进行比较, 如图 1B 所示, 驯化前 5Biol 菌群 16 d 可将体系中的总铁含量从 1 243 mg/L 提升到 3 486 mg/L; 驯化后 5Biol 菌群 16 d 可将体系中的总铁含量从 1 176 mg/L 提升到 3 472 mg/L。二价铁的氧化情况如图 1C 所示, 驯化前后的

5Biol 菌群均能将体系中的亚铁含量维持在较低水平, 其中驯化后的菌群浸出体系中二价铁含量更低, 而驯化前后同时期的对照组, 亚铁含量则呈现明显的上升趋势。说明, 5Biol 菌群的存在会将体系中的二价铁转化成其他形式的铁。总铁和亚铁的差值指示高铁离子的含量, 也即微生物氧化铁的含量, 根据图 1B 和图 1C 所示, 推算出驯化前 5Biol 菌群 16 d 浸出体系中高价铁的含量是 2 885 mg/L, 驯化后 5Biol 菌群 16 d 浸出体系中高价铁的含量是 3 322 mg/L, 相较于驯化前高价铁含量提高 15.15% (编号 NMDCX0001728), 驯化后菌群的铁氧化能力有所提高。图 1D 显示浸出体系 pH 的变化, 驯化前 5Biol 接菌体系 pH 值从初始的 1.91 降到 16 d 的 1.36, 接菌体系 pH 下降值为 0.55; 驯

化后 5Biol 接菌体系 pH 值从初始的 2.48 降到 16 d 的 1.34, 接菌体系 pH 下降值为 1.14。同时, 驯化后 5Biol 菌群积累硫酸根的能力也明显增加, 驯化前 5Biol 菌群浸出体系可将硫酸根的含量从初始的 14.83 mg/L 积累至 26.27 mg/L; 驯化后 5Biol 菌群浸出体系可将硫酸根的含量从初始的 12.40 mg/L 积累至 32.63 mg/L (编号 NMDCX0001728), 驯化后菌群对硫酸根的积累量较驯化前提高 70.86%。综上, 驯化后菌群的铁氧化能力和硫氧化能力均有提升。

2.2 驯化前后 5Biol 菌群结构和功能

为了进一步分析驯化前后 5Biol 菌群的群落结构和功能变化, 分别对驯化前后的 5Biol 菌群进行了宏基因组分析。序列详细信息见编号 NMDCX0001728。分类学分析结果显示, 在

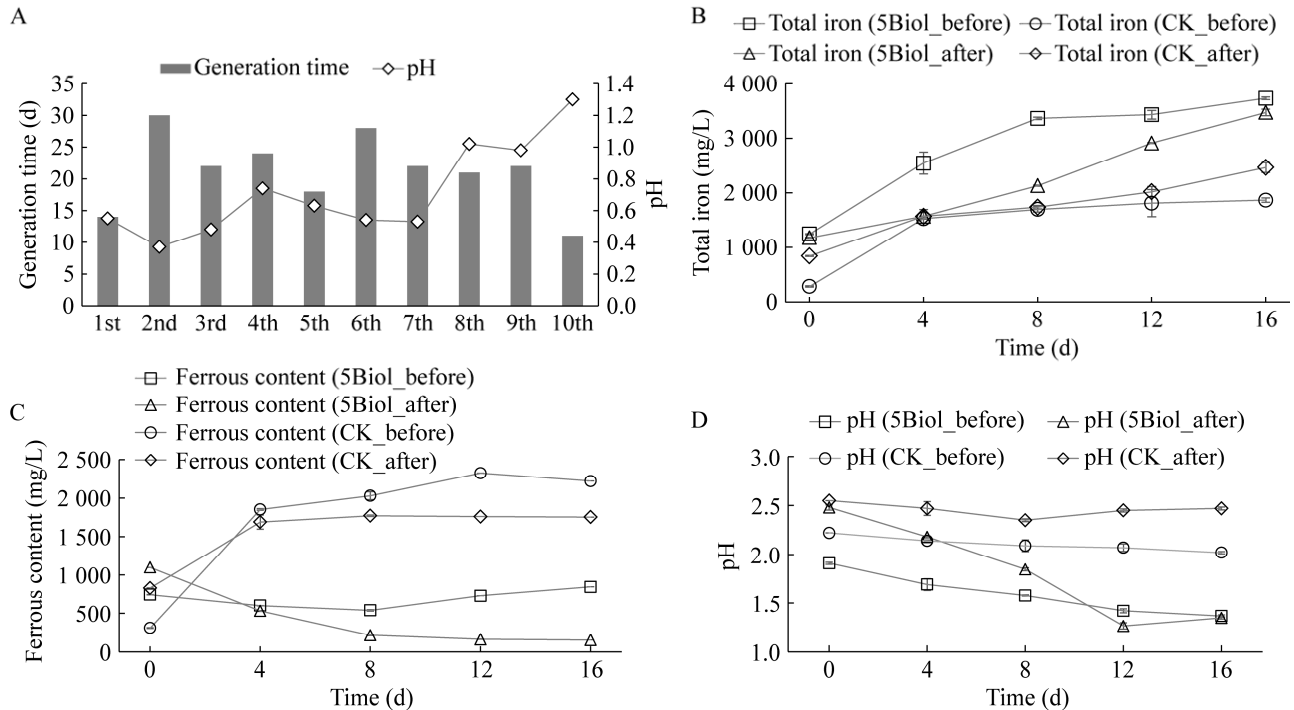


图 1 驯化前后 5Biol 菌群浸出黄铁矿的参数变化
含量; C: 亚铁离子含量; D: pH 变化

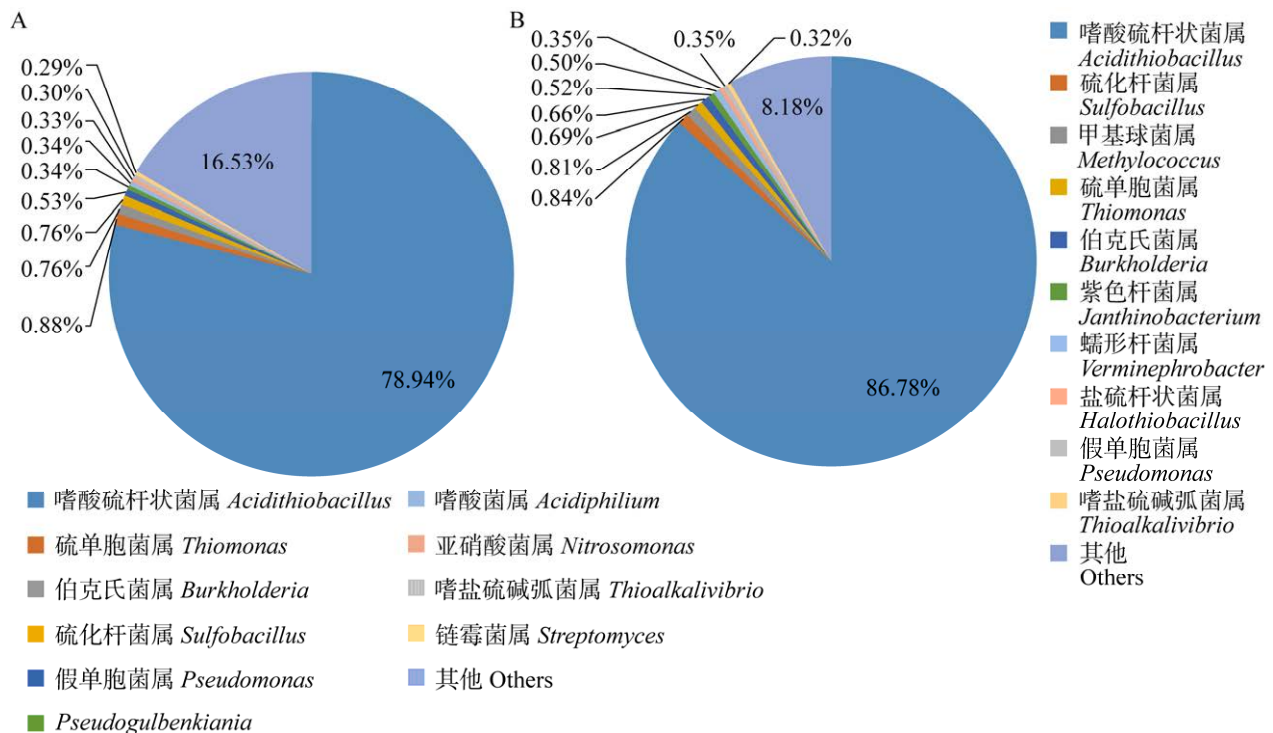
A: 驯化过程每代转接前后 pH 的变化; B: 总铁

Figure 1 The parameters variation during bioleaching experiment of 5Biol before and after domestication. A: The variation of the pH decrease for every generation during the domestication; B: Total iron content; C: Ferrous content; D: Variation of pH.

属水平上, 驯化前排名前 10 的物种主要有嗜酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*) (79%)、硫单胞菌属(*Thiomonas*) (0.88%)、伯克氏菌属(*Burkholderia*) (0.76%)、硫化杆菌属(*Sulfobacillus*) (0.76%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) (0.53%)、*Pseudogulbenkiania* (0.34%)、嗜酸菌属(*Acidiphilium*) (0.34%)、亚硝酸菌属(*Nitrosomonas*) (0.33%)、嗜盐硫碱弧菌属(*Thioalkalivibrio*) (0.30%)、链霉菌属(*Streptomyces*) (0.29%)及其他 others (16.53%) (图 2A)。驯化后排名前 10 的物种主要有 *Acidithiobacillus* (86.77%)、*Sulfobacillus* (0.84%)、甲基球菌属(*Methylococcus*) (0.80%)、*Thiomonas* (0.69%)、*Burkholderia* (0.66%)、紫色杆菌属(*Janthinobacterium*) (0.51%)、蠕形杆菌属(*Verminephrobacter*) (0.49%)、盐硫杆菌属(*Halothiobacillus*) (0.35%)、*Pseudomonas* (0.35%)、*Thioalkalivibrio* (0.32%)及其他(8.17%) (图 2B)。驯化前后的 5Biol 菌群中 *Acidithiobacillus* 均是优势物种, 驯化后 *Acidithiobacillus* 的占比

有提升, 在排名前 10 的物种中, 驯化后与驯化前的菌群相比, 保留了 *Sulfobacillus*、*Thiomonas*、*Burkholderia* 和 *Pseudomonas*。其中, *Sulfobacillus* 由驯化前排名第 4 上升到了驯化后排名第 2, 相对比例由 0.76% 上升至 0.84%。这可能与 *Sulfobacillus* 在浸矿体系中的作用有关。

功能基因分析结果显示, 驯化前有 24 个直系同源蛋白簇(clusters of orthologous groups of proteins, COG)被检测到, 驯化后有 22 个 COG 被检测到。可以看到驯化后群落中大部分功能基因的丰度都明显降低, 但是, 与氨基酸转运和代谢(E)相关的功能基因相对丰度明显增加(图 2C)。利用 KEGG 数据库比对的结果也显示, 驯化后相较于驯化前的 KEGG orthology (KO) 数量减少了 340 个(图 2D), 说明驯化过程简化了菌群结构和功能组成。但是 2.1 的结果显示驯化后的菌群保持了较高的铁硫氧化能力, 为了进一步解析驯化后菌群是如何发挥铁硫氧化能力的, 本文对驯化后菌群进行重点分析。



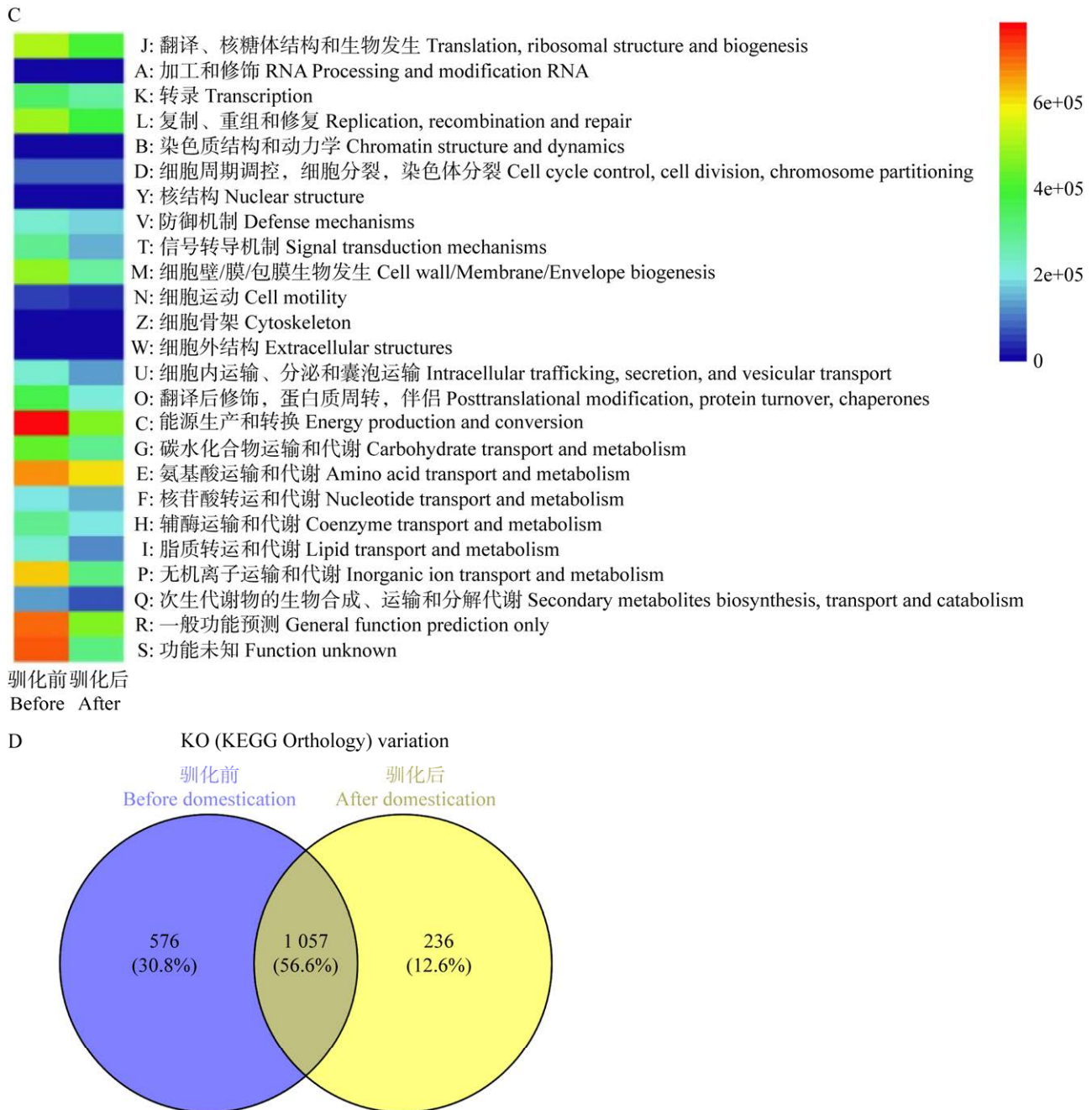


图2 基于宏基因组测定的5Biol菌群驯化前后物种和功能变化 A: 驯化前菌群物种组成; B: 驯化后菌群物种组成; C: 驯化前后直系同源蛋白分类相对丰度变化; D: 驯化前后 KEGG orthology 种类变化

Figure 2 Changes in taxonomy and function of 5Biol microbial community before and after domestication based on metagenome analysis. A: Taxonomy distribution of microbial community before domestication; B: Taxonomy distribution of microbial community after domestication; C: Changes in relative abundance of cluster of orthologous groups (COG) category before and after domestication; D: Changes of KEGG orthology (KO) before and after domestication.

2.3 分化培养实验解析菌群优势物种功能

为了深入分析驯化后菌群的优势物种组成和功能特征,使用 16S rRNA 基因克隆文库的方法进一步在种水平上解析了驯化后 5Biol 菌群的群落结构。并通过分化培养的方法,明晰了 5Biol 菌群中发挥黄铁矿浸出功能的优势物种。

如图 3A 所示,驯化后的菌群基于 16S rRNA 基因克隆文库的结果显示检测到了氧化硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)和耐热硫化芽胞杆菌(*Sulfobacillus thermotolerans*)这 2 个物种的 16S rRNA 基因序列,前者占 97%,后者占 3%。*A. thiooxidans* 是一种典型的极端嗜酸环境硫氧化菌,不具备铁氧化能力^[17];*S. thermotolerans* 据报道能氧化二价铁、硫单质、连四硫酸盐和硫化矿作为能量生长,是一种兼性营养菌^[18]。驯化后 5Biol 菌群与经典铁氧化菌 *A. ferrooxidans*、硫氧化菌 *A. thiooxidans* 及 *S. thermotolerans* 这 3 株单菌的浸矿能力进行了比较(编号 NMDCX0001728),基于浸矿体系氧化还原电位(oxidation-reduction potential culture, ORP)、亚铁含量及 pH 的变化,驯化后 5Biol 菌群浸出黄铁矿的能力优于任何一株单菌,以浸出

黄铁矿中总铁的含量计算,驯化后 5Biol 菌群 16 d 的浸出率可达 81.18%,*A. thiooxidans*、*S. thermotolerans* 和 *A. ferrooxidans* 的浸出率分别为 51.86%、37.65 和 63.14% (编号 NMDCX0001728)。说明菌群中不同的微生物之间可能存在协同互作共同提高了菌群的浸矿能力。

通过分化培养进一步探究不同物种在浸矿过程中群落结构和功能的变化。发现在 9K+S 培养基中分化培养传代后,菌群组成变为 *A. thiooxidans* 占 98%,*S. thermotolerans* 占 2% (图 3B);在 9K+Fe 培养基中,培养 5 代后已不能在培养体系中提取出菌群 DNA,镜检显示无菌;在 9K+Fe+S 培养基中分化培养传代后,*A. thiooxidans* 占 73%,*S. thermotolerans* 占 27% (图 3C)。对应的功能变化如图 4 所示,在 9K+Fe 培养基中,体系 pH 接菌组和对照组传代过程中一直无较明显变化,铁氧化能力只有第 1 代达到 54%,随传代次数增加,铁氧化能力越来越弱,接菌组和对照组差异不大(图 4A-4C)。在 9K+S 培养基中,随着传代次数的增多,硫利用能力逐渐下降,第 1 代 pH 降低 1.6,第 3 代降低 1.24,第 5 代降低 0.75 (图 4D-4F),同时随着

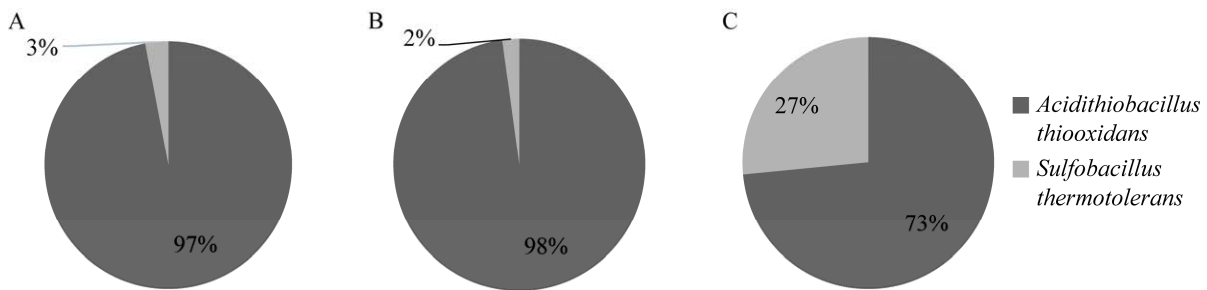


图 3 5Biol 菌群优势物种组成 A: 驯化后 5Biol 菌群优势物种组成; B: 5Biol 菌群在 9K+S 培养基分化培养后的优势物种组成; C: 5Biol 菌群在 9K+Fe+S 培养基分化培养后优势物种组成

Figure 3 Dominant taxa composition of 5Biol microbial community. A: The dominant taxa composition of 5Biol microbial community after domestication; B: The dominant taxa composition of 5Biol microbial community after differentiation culture in 9K+S medium; C: The dominant taxa composition of 5Biol microbial community after differentiation culture in 9K+Fe+S medium.

传代次数增加, 硫酸根的积累能力也逐渐降低(编号 NMDCX0001728): 第 1 代积累 21.1 mg/L, 第 3 代积累 11 mg/L, 第 5 代积累 7.75 mg/L。在 9K+Fe+S 培养基中, 菌群铁氧化能力保持稳定(图 4G-4I), 硫氧化能力(图 4G-4I) (编号 NMDCX0001728)有所下降, 可能和菌群组成变化有关。结合在不同培养基中培养传代后的菌群结构变化分析, 在以硫为能源物质时, *A. thiooxidans* 的生长占优势, 发挥硫氧化功能;

在只含铁的 9K 培养基中菌群难以持续生长, 说明 *S. thermotolerans* 虽然被报道具有铁氧化能力, 但是在不含 *A. thiooxidans* 的培养环境中无法发挥铁氧化能力; 在铁源和硫源同时存在的情况下, 2 种菌能保持生长, 并且 *S. thermotolerans* 占比增多体现了其在铁源存在的条件下具有生长优势。结合文献资料中关于 *S. thermotolerans* 的生长需要有机物的存在^[18], 猜测 *A. thiooxidans* 的存在为 *S. thermotolerans* 的生长提供了有机

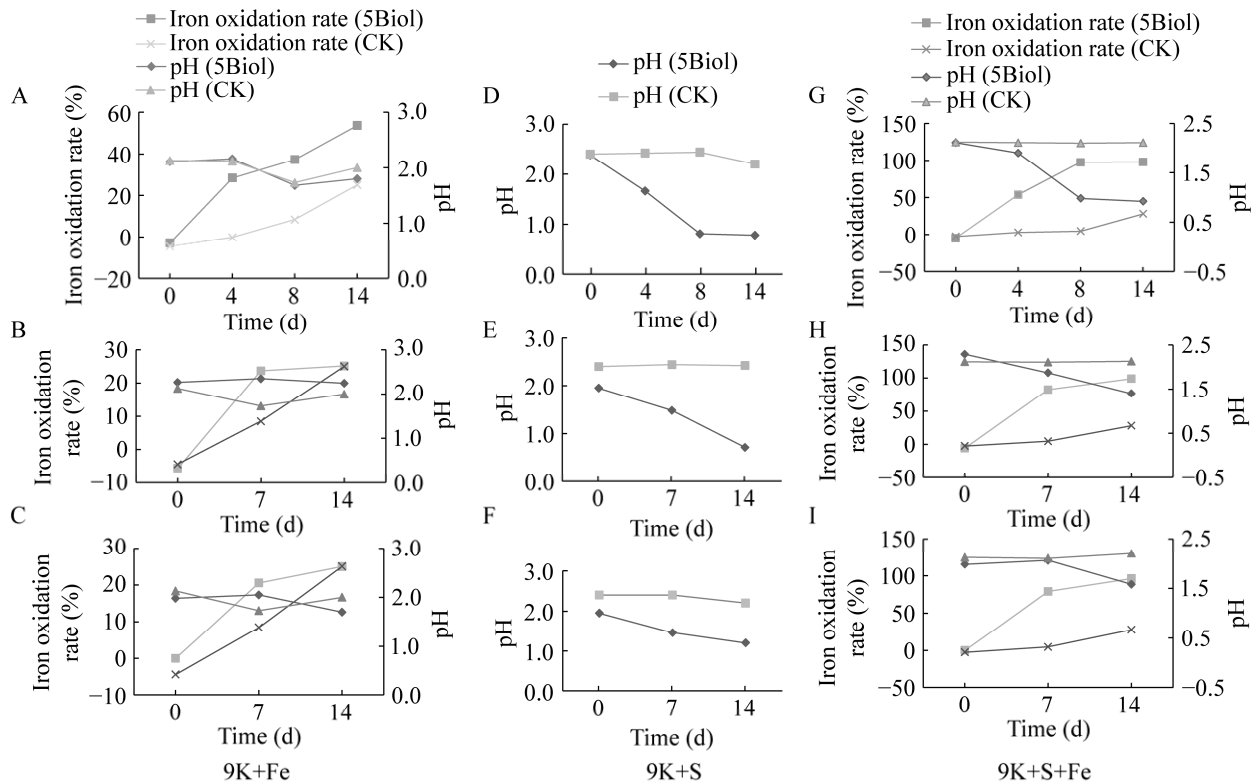


图 4 基于分化培养的 5Biol 菌群铁硫代谢特征 A-C: 5Biol 菌群在 9K+Fe 培养基中连续传代的铁硫代谢特征(A: 第 1 代; B: 第 3 代; C: 第 5 代). D-F: 5Biol 菌群在 9K+S 培养基中连续传代的硫代谢特征(D: 第 1 代; E: 第 3 代; F: 第 5 代). G-I: 5Biol 菌群在 9K+S+Fe 培养基中连续传代的铁硫代谢特征(G: 第 1 代; H: 第 3 代; I: 第 5 代)

Figure 4 The iron-sulfur metabolic characteristics of 5Biol based on differentiation culture. A-C: Iron-sulfur metabolic characteristics of 5Biol microbial community during successive subcultures in 9K+Fe medium (A: First generation; B: Third generation; C: Fifth generation). D-F: Sulfur metabolic characteristics of 5Biol microbial community during successive subcultures in 9K+S medium (D: First generation; E: Third generation; F: Fifth generation). G-I: Iron-sulfur metabolic characteristics of 5Biol microbial community during successive subcultures in 9K+S+Fe medium (G: First generation; H: Third generation; I: Fifth generation).

源, 因此二者协作共同发挥浸矿功能。结合菌群浸矿的表现, 猜测在不同的浸矿时期, 二者发挥的功能不同, 在数量上应该也会有变化, 同时结合以上猜测, 随二者数量的变化, 浸矿体系中的有机碳含量也应该会有一些的变化, 为此, 本文进一步探究了浸矿过程中有机碳含量的变化。

2.4 驯化后 5Biol 菌群浸矿过程群落结构和有机碳含量变化

在 5Biol 菌群的浸矿过程中, 取第 4 天(初期)、第 8 天(中期)、第 16 天(末期)的生物样品进行 16S rRNA 基因克隆文库的构建, 分析群落组成可以看出, *Sulfobacillus* 在初期和末期都占比 16%, 而在中期占比 25%, 中期 *Sulfobacillus* 的数量明显上升(图 5)。结合浸矿体系中有有机碳含量的变化, 在初期和末期, 体系中总有机碳含量均较低, 而在中期, 有机碳含量较高(图 6)。考虑到 *S. thermotolerans* 产芽孢^[18], 猜测在初期 0–8 d 的时间里, 菌群中 *A. thiooxidans* 生长占优势, 其利用环境中的无机硫进行生长代谢, 产生了一些分泌物, 或者菌体死亡等为整个体系贡献了有机物, 到中期(8 d 左右) *S. thermotolerans*

利用这些有机物生长繁殖, 导致相对丰度提高, 同时发挥更强的铁氧化功能。到浸矿末期(16 d 左右), 由于代谢时间过长, 浸矿体系产生了一定的毒性(如随矿物浸出释放的重金属), 伴随有机物的耗尽使得 *S. thermotolerans* 的生长再次进入芽孢状态。自此, 一个浸矿周期结束。注意到浸矿体系有机碳含量在第 8 天陡然升高, 这可能与菌群中 *A. thiooxidans* 和 *S. thermotolerans* 的数量变化有关, 图 5 给出的是 2 种菌的相对比例, 有机物含量与 *A. thiooxidans* 的绝对数量变化有关系, 在后续的实验分离到了 *A. thiooxidans* 和 *S. thermotolerans* 这 2 株单菌, 发现 *A. thiooxidans* 在 9K+S+Fe 培养基中前 4 天数量变化不明显, 在第 6 天开始明显升高, 第 8 天继续升高, 随之, *S. thermotolerans* 在第 8 天出现明显的生长(编号 NMDCX0001728)。结合图 6 总有机碳含量的变化, 前 4 天 *A. thiooxidans* 数量变化不大, 因此, 测定的总有机碳含量偏低。第 8 天由于 *A. thiooxidans* 数量翻倍, 代谢产物积累导致有机碳含量明显升高, 但是由于 *S. thermotolerans* 在第 8 天左右开始生长繁殖, 消耗有机物, 导致后期体系中有有机碳含量降低。这说明 2 种优

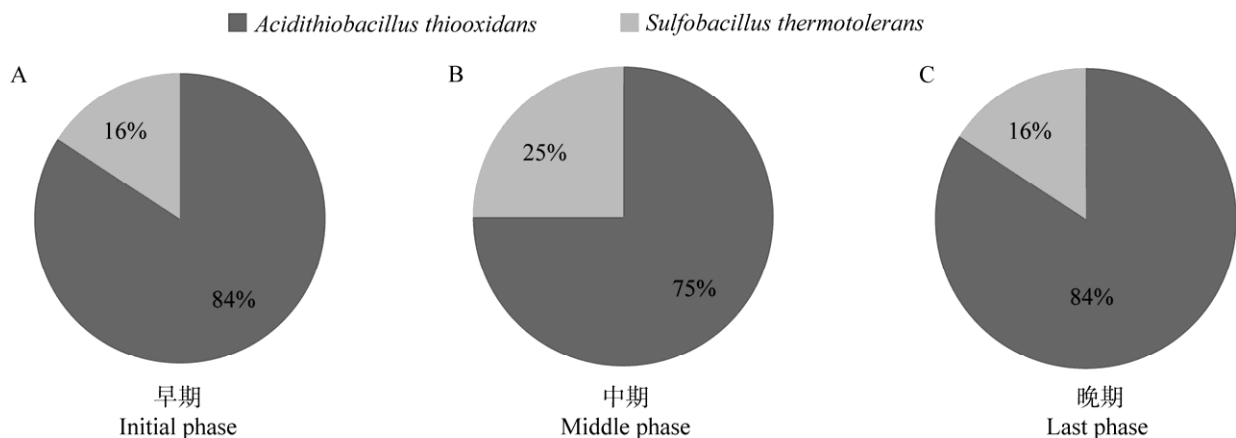


图 5 微生物浸矿过程各阶段 5Biol 菌群结构变化 A: 早期; B: 中期; C: 晚期

Figure 5 Changes of dominant taxa composition of 5Biol microbial community at each stage. A: Initial stage; B: Middle stage; C: Last stage.

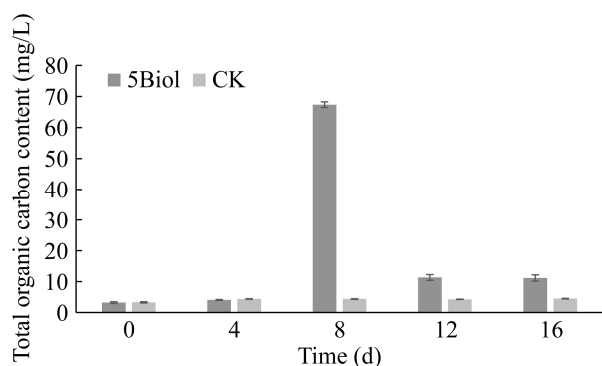


图6 微生物浸矿过程各阶段总有机碳含量
Figure 6 Total organic carbon content at each stage of microbial leaching.

势菌在一个浸矿周期中的生长代谢存在先后规律, *S. thermotolerans* 的生长与体系中有有机物的积累密切相关。

2.5 5Bio 菌群优势物种驯化前后功能大类及铁硫代谢基因的变化

确认了 5Bio 菌群中发挥铁硫氧化功能的两大优势物种, 进一步利用宏基因组测序的数据定位到两类菌在驯化前后的功能变化。*Acidithiobacillus* 功能基因的变化趋势与整个微生物群落是一致的(图 7A, 图 2C), 这也与 *Acidithiobacillus* 是优势物种相一致。而在 *Sulfobacillus* 中, 与碳水化合物运输和代谢、氨基酸运输和代谢相关的功能明显增加(图 7B), 结合直系同源蛋白序列分析结果, 与之相应的分别是 COG0580 (GlpF 甘油摄取促进剂及相关渗透酶)和 COG0531 (PotE 氨基酸转运体)在驯化后的 *Sulfobacillus* 中含量明显增加, 这暗示驯化后 *Sulfobacillus* 利用有机物的功能在群落中更加突出。

进一步关注了和铁硫代谢相关的功能基因。驯化后, 与铁代谢相关的基因中, AFE_0632 (*cyoB*)、AFE_2625 (*nuoF*)、AFE_2618 (*nuoM*)、AFE_2619 (*nuoL*)、AFE_3205 (*atpA*)、AFE_2554 (*hdrB*)、AFE_0955 (*cydA*)和 AFE_2586 (*hdrB*)

较驯化前增加(图 7C)。说明与铁价态变化相关的电子转运路径功能增强。然而, 与铁氧化密切相关的 *rus* 操纵子相关基因(编号 NMDCX0001728)并未出现在驯化前后的基因组中。根据分化培养实验, 推测菌群中发挥铁氧化作用的菌株主要由 *Sulfobacillus* 来贡献, 据报道, sulfocyanin 蛋白是 *Sulfobacillus* 氧化铁的关键蛋白^[19]。图 8 展示了驯化前后的样品中能比对到 sulfocyanin 蛋白序列的系统发育树。其中, 驯化前的 gene_id_7745 和驯化后的 gene_id_4207 均能比对到来自 *Sulfobacillus* sp. hq2 的 sulfocyanin-like 蛋白, 与其相似度>99%, 说明这 2 个基因可能来自同一种菌, 驯化前 gene_id_7745 对应的 reads 数占驯化前总 reads 数的 0.000 45%, 驯化后 gene_id_4207 对应的 reads 数占驯化后总 reads 数的 0.000 86%, 相对于驯化前有所提高。此外, 驯化前的 gene_id_5652 (0.000 63%)和驯化后的 gene_id_673 (0.000 80%), 以及驯化前的 gene_id_6805 (0.000 65%)和驯化后的 gene_id_4324 (0.001 32%)也都比对到 *Sulfobacillus* sp. hq2 的 sulfocyanin-like 蛋白, 并且相对丰度都在驯化后升高。另外, 驯化前的 gene_id_6392 和驯化后的 gene_id_232 均能比对到 *S. thermotolerans* Kr1 的 BXT84_05090 蛋白序列, 该蛋白也是 sulfocyanin 的同源蛋白^[19], 也在驯化后比例升高。另外, 驯化前的 gene_id_1046 和 gene_id_4273 均对比到 *Acetobacteraceae* 的 sulfocyanin-like 蛋白, 然而, 在驯化后的样品中则未发现与其对应的序列。说明随着驯化时间的延长, *Sulfobacillus* 的 sulfocyanin 蛋白序列被保留下来并且相对丰度得到提升, 而其他具有铁氧化能力的种属由于对环境的不适应则被淘汰掉。

根据 KEGG 数据库注释结果, 硫代谢路径中(编号 NMDCX0001728)驯化前注释到的蛋白

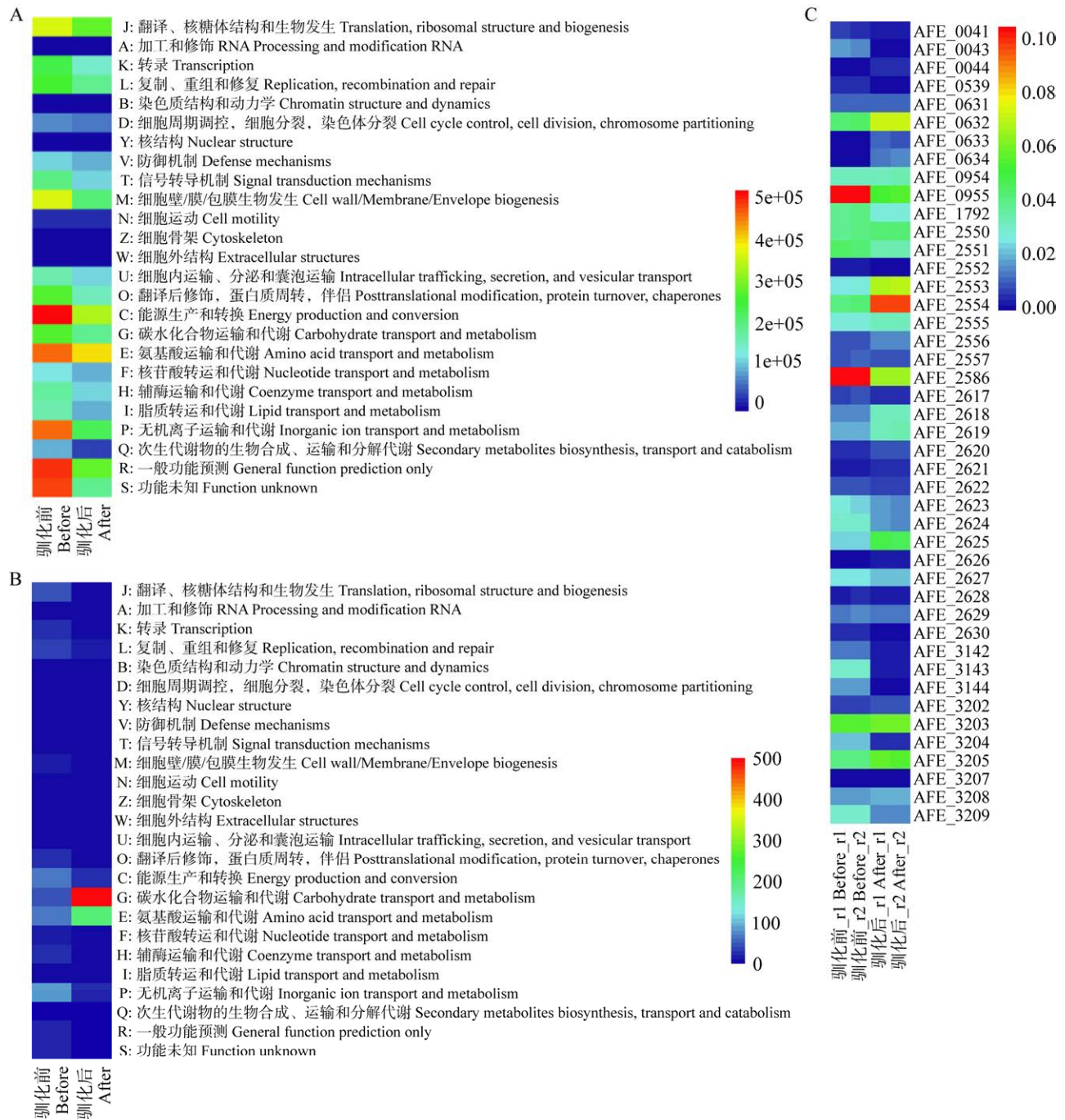


图 7 驯化前后 5Biol 菌群优势物种功能基因变化 A: 驯化前后 5Biol 菌群中 *Acidithiobacillus* 功能大类变化; B: 驯化前后 5Biol 菌群中 *Sulfolobus* 功能大类变化; C: 驯化前后与铁氧化功能相关基因的变化, 基因编号对应 KEGG 数据库铁代谢基因信息

Figure 7 Functional changes of the dominant taxa of 5Biol community. A: Functional changes of the *Acidithiobacillus* in 5Biol community; B: Functional changes of *Sulfolobus* in 5Biol community; C: Changes of genes related to iron oxidation before and after domestication, the information of gene numbers was corresponded with the iron metabolism gene in KEGG database.

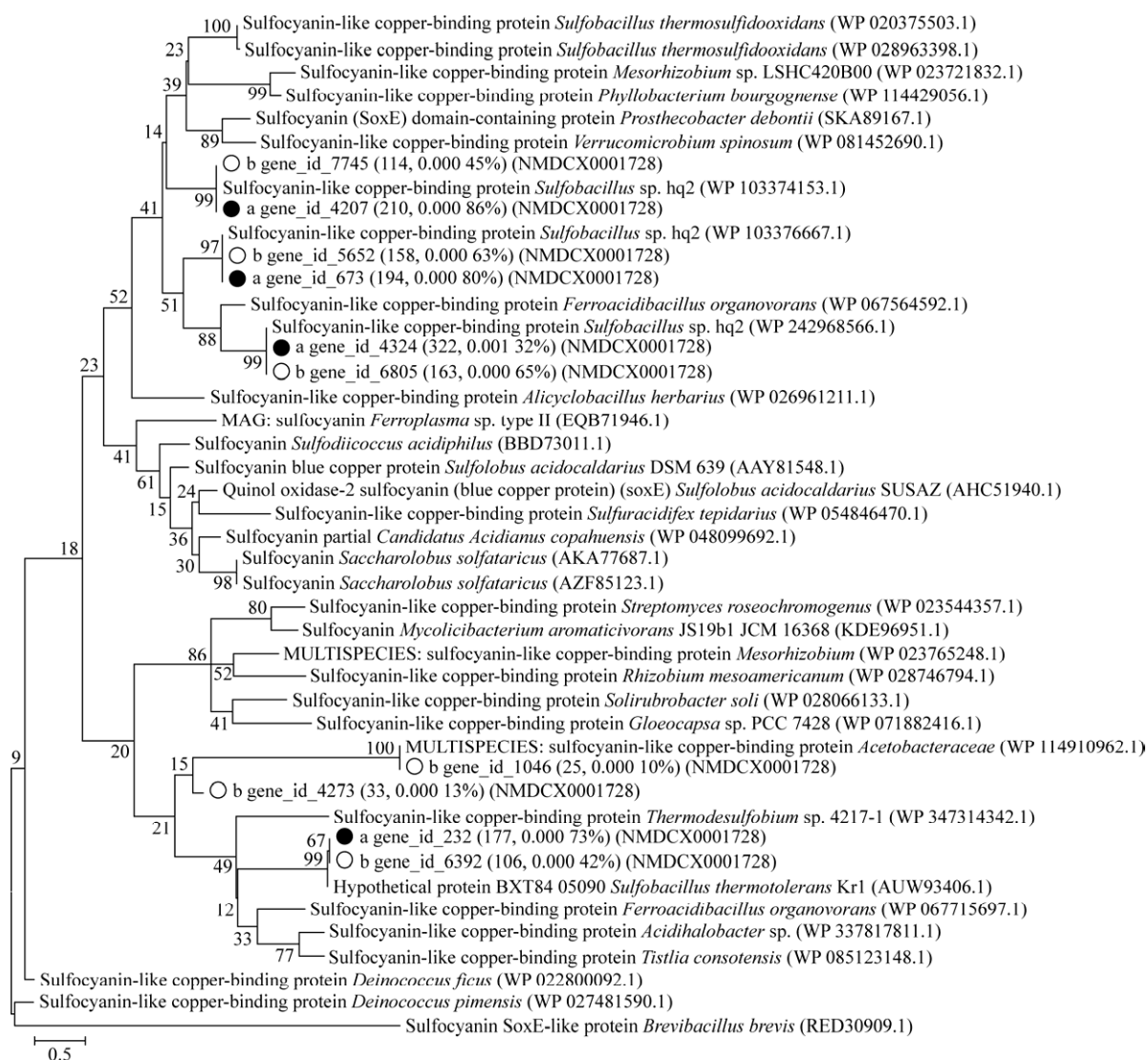


图 8 基于最大似然法^[20]构建的 sulfocyanin 类似蛋白质序列系统发育树 其中标记实心圆圈的为 5Biol 菌群驯化后的宏基因组中找到的序列, 标记空心圆圈的为 5Biol 菌群驯化前的宏基因组中找到的序列. 括号中的数据为该基因的序列数及其占宏基因组总序列数的比例. 进化树一共包含 44 个氨基酸序列, 进化分析使用 MEGA 5^[21]软件完成. 分支节点上的数字表示每 1 000 次 bootstrap 分析所支持的次数, 线段表示 5% 序列差异的分支长度. 图中圆圈标记的蛋白和基因序列信息上传至国家微生物科学数据中心 (NMDC), 编号 NMDCX0001728

Figure 8 Molecular phylogenetic analysis of sulfocyanin-like proteins in 5Biol community before and after domestication by Maximum Likelihood method^[20]. Among them, the sequence marked in solid circle is found in the metagenome after domestication of 5Biol community, and the sequence marked in hollow circle is found in the metagenome before domestication of 5Biol community. The data in brackets is the number of the corresponded sequences and the ratio of it to the total number of sequences in the metagenome. The analysis involved 44 amino acid sequences. There were a total of 44 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 5^[21]. The percentage of replicate trees, in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1 000 replicates), are shown next to the branches. The scale bar represents 5 amino acid substitutions per 100 amino acids. The protein and gene sequence marked by circles in the tree could be found in National Microbiology Data Center (NMDC) with accession numbers NMDCX0001728.

包括硫酸腺苷酰转移酶 Sat、腺苷酰硫酸激酶 CysC、磷酸腺苷磷酸硫酸还原酶 CysH，它们都属于同化硫酸盐还原模块；3'(2'), 5'酮糖核苷酸酶 CysQ [3'(2'), 5'-biphosphate nucleotidase]，可以将 3'-3'-磷酸腺苷酸硫酸盐转化为腺苷酰硫酸。

半胱氨酸合酶 CysK 和丝氨酸-O-乙酰基转移酶 CysE 都属于半胱氨酸合成模块；高丝氨酸 O-乙酰基转移酶 MetA/MetX、胱硫醚 γ 合酶 MetB、MetZ (O-succinylhomoserine sulfhydrylase) 均属于甲硫氨酸生物合成模块。

连四硫酸盐还原酶 TtrA、TtrB，可以将连四硫酸盐转化为硫代硫酸盐；硫代硫酸盐/巯基丙酮酸硫基转移酶 TST，可以将硫代硫酸盐转化为亚硫酸盐；亚硫酸盐氧化酶 SUOX (sulfite oxidase) 可以将亚硫酸盐氧化为硫酸盐；牛磺酸运输系统底物结合蛋白 TauA 和牛磺酸转运系统渗透酶蛋白 TauC 均参与牛磺酸从胞外到胞内的转运；磺酸盐转运系统渗透酶蛋白 SsuC 则参与磺酸盐的转运。

驯化后与驯化前相比，减少了 8 个基因 (SUOX, cysC, cysQ, metZ, TST, ttrA, ttrB, ssuC)，增加了 7 个基因 (glpE, sor, sqr, soxA, soxB, soxY, soxZ)。其中，glpE 编码硫代硫酸硫基转移酶，参与将硫代硫酸盐转化为亚硫酸盐的过程；sor 编码硫氧合还原酶，可以将硫单质转化为硫化氢；sqr 编码硫化:醌氧化还原酶，可以将硫化氢转化为多硫化物；soxA、soxB、soxY、soxZ 编码 SOX 系统，SOX 系统负责将硫代硫酸盐转化成硫酸盐，在硫的价态转化过程中具有重要的作用。驯化增加的硫转化相关基因在浸矿体系中对无机硫的利用过程中起关键作用。

另外，eggNOG 数据库注释结果显示，驯化前的 5Biol 菌群中还检测到了 tetH (COG1520)、HdrA (COG1148)、HdrB (COG2048)、HdrC (COG1150) 和 Rhd (COG2897) 编码基因，然而，

在驯化后的 5Biol 宏基因组中则未检测到这些相关的基因。

3 讨论

3.1 通过驯化获得简单稳定的微生物组，更易解析浸矿环境中不同物种的作用

与单菌体系相比，微生物多细胞体系具有更多优势，例如，减少菌株新陈代谢负担、通过分工可同时执行多个任务、更好的底物利用模式及拓宽底物谱、对环境干扰的鲁棒性等^[22]。然而，由于菌株间的生长竞争、生长条件不同和代谢物不相容性等因素，多细胞体系面临不稳定和效率低下的问题^[23]。为了克服这些挑战，许多研究者报道了设计高效稳定的人工多细胞体系的多种策略。如时空分隔以降低菌株不相容性^[24]，营养物分别利用以减少资源竞争^[25]，营养物互相补给^[26]等。但是，在进行菌种选择和组合设计的过程中会遇到很多问题，获得一个高效稳定的人工菌群往往需要清晰地了解每个菌株的遗传及代谢特性，耗费巨大的人力、物力。在本例中，基于黄铁矿浸出的极端嗜酸环境特征，通过长期驯化更加易于获得组成简单、功能稳定的微生物组合。驯化后的菌群以 *A. thiooxidans* 为主、*S. thermotolerans* 为辅协同浸矿。2 株菌单独浸出的效果均不如驯化后菌群，且分化培养实验证实了双菌共存时对 Fe 和 S 的利用效率更高。说明 2 株菌存在协同合作。

在构建微生物浸矿菌群的研究中，主要应用的组合有铁氧化菌与硫氧化菌的组合、自养菌与异养菌的组合等。其中，铁/硫氧化菌最常见的组合是铁氧化菌 *A. ferrooxidans* 和硫氧化菌 *A. thiooxidans*，其中，铁氧化菌可氧化 Fe^{2+} 生成 Fe^{3+} ， Fe^{3+} 在硫酸体系中是一种强氧化剂，可以氧化多种硫化矿将金属离子释放^[5]。硫氧化菌可以将单质硫持续氧化成硫酸，以维持整

个浸矿体系的酸性环境^[5]。2种菌种协作可大幅提高浸出速率与浸出率^[17]。自养菌和异养菌的协同作用机制是异养菌可以降解由自养菌生长代谢和自我衰亡产生的有机物，并消除有机物对 *A. ferrooxidans* 等自养菌的生长抑制，提高自养菌氧化能力，最终提高浸出率^[27-28]。在本例中，*A. thiooxidans* 被报道是一种严格自养的硫氧化菌，具有从无机硫化物中获取能量并具有在高浓度重金属中生存的能力^[29]。另外一种优势菌的同种 *S. thermotolerans* Kr1 被报道是一株兼性化能营养菌，可以以亚铁、硫单质、连四硫酸盐或硫化物矿物作为能源，在 0.02% 酵母提取物或其他有机底物存在的条件下生存^[18]。*Sulfobacillus* 的细菌在硫化矿浸出中较为常见，在极端嗜酸菌群中对 Fe^{2+} 和 S 的氧化起主导作用^[30]。已知该属包含的种有嗜热硫氧化硫化杆菌 (*S. thermosulfidooxidans*)、*S. thermosulfidooxidans* subsp. *Asporogenes*、嗜酸硫化芽孢杆菌 (*S. acidophilus*)、嗜酸硫化杆菌 (*S. sibiricus*)、*S. benefaciens* 和 *S. thermotolerans*。其中，*S. thermotolerans* 是该属基因库中被报道较少和较晚的^[19,31]。后期，我们在 5Biol 菌群中也分离获得了 *S. thermotolerans* 这株单菌^[32]，其生理生化特性与 *S. thermotolerans* Kr1 差异较大，不能利用硫单质、连四硫酸盐或硫化物矿物作为能源生长，不能以葡萄糖作为碳源进行异养生长。这提示该菌可能为一株新的 *S. thermotolerans* 菌。关于 *S. thermotolerans* 和嗜酸性喜温硫杆菌 (*Acidithiobacillus caldus*) 的协同作用在污染沉积物中多种重金属的浸出过程中被报道^[33]，作者在解释二者之间的协同作用机制时猜测，在生物浸出过程中产生的 Fe^{2+} 以及死细胞中释放的溶解有机物可以被 *S. thermotolerans* 菌株利用，这可以降低有机物对自养菌株的毒性，并促进生物浸出过程。这与本文的发现是一致的，

本文 *A. thiooxidans* 是 5Biol 菌群的绝对优势菌，对于降低体系 pH 起到关键作用，促进矿物的溶出，随着浸出过程的进行，*A. thiooxidans* 的比例逐渐下降，可能伴随菌体的裂解及自身代谢产物的外排，被 *S. thermotolerans* 利用繁殖，同时发挥铁氧化功能。与前者不同的地方在于，本研究发现的 *A. thiooxidans* 和 *S. thermotolerans* 协同作用，是通过富集驯化的方式，可以为人工构建高效浸矿菌群提供可靠参考。

3.2 驯化改变了微生物菌群中参与铁硫代谢功能的基因组成

驯化后 5Biol 菌群的功能基因整体上出现了相对丰度的降低，而参与铁硫代谢的基因则有选择性地增加。

在 5Biol 菌群中找到的铁氧化基因主要是编码 sulfocyanin-like 蛋白的基因，该蛋白被报道与古菌的铜蓝蛋白具有较高的相似性^[34]，sulfocyanin-like 蛋白和铁的氧化密切相关^[34]。本研究中发现的 sulfocyanin-like 蛋白的基因序列主要来自 *Sulfobacillus*，且驯化后的 sulfocyanin-like 蛋白的基因序列占比更高，更加集中于 *Sulfobacillus*。这与上文推测的菌群铁氧化能力主要由 *Sulfobacillus* 来贡献是一致的，说明驯化后导致的微生物群落结构改变是与其功能变化密切相关的。

根据目前对硫氧化系统的研究，结合 5Biol 驯化前后的宏基因组注释结果，可以发现，驯化前菌群中主要存在非 SOX 硫氧化系统，包含的硫氧化酶有 TtrA、TtrB、TetH、TST、Rhd 和 SUOX；驯化后菌群主要存在 SOX 系统 (SoxA、SoxB、SoxY、SoxZ)、SOR 系统 (SOR)，

以及非 SOX 硫氧化系统(Sqr、GlpE)。其中, TST 主要出现在 *A. ferrooxidans* 中, HdrABC、Rhd 在 *A. ferrooxidans* 和 *A. caldus* 中都被报道过^[35], 这几种基因在驯化后都未被检测到, 说明含有这些基因的相应的微生物数量在群落中减少了, 相反增加了编码 SOR 酶的基因 *sor*, SOR 酶是一种主要存在于古菌中的硫氧化酶, 能够催化元素硫的歧化反应, 生成亚硫酸盐、硫代硫酸盐和硫化物^[35]。该酶催化的硫氧化不与电子转移或底物水平磷酸化耦合, 是一个相对独立的酶氧化系统^[35]。驯化后 5Biol 菌群中这种基因的增加可能与 *Sulfobacillus* 的增多有关系, 因为在后续的研究中我们分离到了 5Biol 菌群中的 *A. thiooxidans* 和 *S. thermotolerans* 单菌, 并进行了基因组测序, 只在 *S. thermotolerans* 的基因组中注释到了 *sor* 基因, 而未在 *A. thiooxidans* 中注释到该基因。另外, 在 *A. thiooxidans* 基因组中发现了 *soxA*、*soxB*、*soxY*、*soxZ* 基因, 在 *S. thermotolerans* 的基因组中发现了 *soxCD*, 这说明随着驯化的进行, 被保留下来的优势物种可能在硫代谢路径中进行了互补, 增强了对无机硫的利用。这也与分化培养实验中, 9K+S 体系中 *A. thiooxidans* 成为绝对优势微生物后, 体系氧化硫的能力下降的现象相符(图 4)。

4 结论

(1) 通过连续 10 代的长期驯化, 在以黄铁矿为能源基质的培养基中获得了一组以 *A. thiooxidans* 为主、以 *S. thermotolerans* 为辅且有较强铁硫氧化能力的菌群, 其 16 d 对黄铁矿的总铁浸出率可高达 81.18%, 浸出效果优于 *A. ferrooxidans*、*A. thiooxidans* 及 *S. thermotolerans* 中的任意一株单菌。

(2) 通过对驯化后菌群进行分化培养, 明晰

了 *A. thiooxidans* 主要在黄铁矿的浸出中发挥硫氧化功能, *S. thermotolerans* 主要发挥铁氧化功能, 二者相辅相成, 合作浸矿。

(3) 结合宏基因组测序技术, 发现驯化后菌群较驯化前的菌群功能种类大为减少, 与碳水化合物运输和代谢、氨基酸运输和代谢相关的功能丰度增加。驯化后菌群参与铁氧化的 sulfocyanin-like 蛋白的基因序列集中在 *Sulfobacillus*, 驯化后的硫氧化途径主要包含 SOX 系统、SOR 系统和非 SOX 子系统。功能基因的改变与 *Sulfobacillus* 利用有机物生长, 双菌协作提升铁和硫的利用紧密相关。

(4) 通过驯化获得的简单稳定微生物组, 更加容易分析不同菌的功能特征, 对难分离培养微生物的菌群构建具有指导作用。

REFERENCES

- [1] JONES S, SANTINI JM. Mechanisms of bioleaching: iron and sulfur oxidation by acidophilic microorganisms[J]. *Essays in Biochemistry*, 2023, 67(4): 685-699.
- [2] 武彪, 温建康, 王淀佐. 黄铁矿表面 XPS 分析与生物浸出机制研究[J]. *稀有金属*, 2017, 41(6): 720-724. WU B, WEN JK, WANG DZ. XPS analysis and mechanism of pyrite biooxidation[J]. *Chinese Journal of Rare Metals*, 2017, 41(6): 720-724 (in Chinese).
- [3] FENG SS, YIN YJ, YIN ZW, ZHANG HL, ZHU DQ, TONG YJ, YANG HL. Simultaneously enhance iron/sulfur metabolism in column bioleaching of chalcocite by pyrite and sulfur oxidizers based on joint utilization of waste resource[J]. *Environmental Research*, 2021, 194: 110702.
- [4] VERA M, SCHIPPERS A, HEDRICH S, SAND W. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of microbial metal sulfide oxidation: part a[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(21): 6933-6952.
- [5] 刘佳晨, 刘金辉, 徐玲玲, 周义朋, 文旭祥. 生物浸矿微生物群落结构研究进展[J]. *稀有金属*, 2021, 45(10): 1258-1268. LIU JC, LIU JH, XU LL, ZHOU YP, WEN XX. Recent research advances on microbial community structure in bioleaching[J]. *Chinese Journal of Rare Metals*, 2021,

- 45(10): 1258-1268 (in Chinese).
- [6] WANG LM, YIN SH, WU AX, CHEN W. Synergetic bioleaching of copper sulfides using mixed microorganisms and its community structure succession[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 245: 118689.
- [7] BOSSE M, HEUWIESER A, HEINZEL A, NANCUCHEO I, MELO BARBOSA DALL'AGNOL H, LUKAS A, TZOTZOS G, MAYER B. Interaction networks for identifying coupled molecular processes in microbial communities[J]. *BioData Mining*, 2015, 8: 21.
- [8] RAWLINGS DE. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates[J]. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4(1): 13.
- [9] BACELAR-NICOLAU P, JOHNSON DB. Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2): 585-590.
- [10] TUFFIN IM, HECTOR SB, DEANE SM, RAWLINGS DE. Resistance determinants of a highly arsenic-resistant strain of *Leptospirillum ferriphilum* isolated from a commercial biooxidation tank[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 2247-2253.
- [11] HAN YF, MA XM, ZHAO W, CHANG YK, ZHANG XX, WANG XB, WANG JJ, HUANG ZY. Sulfur-oxidizing bacteria dominate the microbial diversity shift during the pyrite and low-grade pyrolusite bioleaching process[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 116(4): 465-471.
- [12] 马晶梅, 韩一凡, 路福平, 张小霞, 温丹, 刘勇金, 白利明, 胡影, 黄志勇. 功能菌群耦合黄铁矿浸出软锰矿的研究[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(11): 1551-1559.
- MA XM, HAN YF, LU FP, ZHANG XX, WEN D, LIU YJ, BAI LM, HU Y, HUANG ZY. Study of coupled pyrite leached pyrolusite by functional microflora[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(11): 1551-1559 (in Chinese).
- [13] 苑凯君, 谢远东, 卜玲慧. 微乳液增稳浊度法测定硫酸根[J]. *新疆石油科技*, 2000, 10(2): 2.
- YUAN KJ, XIE YD, BU LH. Determination of sulfate by microemulsion enhanced turbidity method[J]. *Xinjiang Petroleum Science Technology*, 2000, 10(2): 2 (in Chinese).
- [14] HJ/T 345—2007. 水质 铁的测定 邻菲罗啉分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007.
- HJ/T 345—2007. Water quality: determination of iron: phenanthroline spectrophotometry[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2007 (in Chinese).
- [15] 金瑜, 茅文湖. 邻菲罗啉分光光度法测定水中总铁的改进[J]. *北方环境*, 2010, 22(6): 76-77.
- JIN Y, MAO WH. The improvement of determination of total iron in water with phenanthroline spectrophotometry[J]. *Environment and Development*, 2010, 22(6): 76-77 (in Chinese).
- [16] 马鸣超, 姜昕, 李俊, 王静. 应用 16S rRNA 基因克隆文库解析人工快速渗滤系统细菌种群多样性[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(5): 731-736.
- MA MC, JIANG X, LI J, WANG J. Analysis of bacterial community composition by 16S rRNA gene clone library sampling from constructed rapid infiltration system (CRI)[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(5): 731-736 (in Chinese).
- [17] XIA LX, LIU JS, XIAO L, ZENG J, LI BM, GENG MM, QIU GZ. Single and cooperative bioleaching of sphalerite by two kinds of bacteria: *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2008, 18(1): 190-195.
- [18] BOGDANOVA TI, TSAPLINA IA, KONDRAT'EVA TF, DUDA VI, SUZINA NE, MELAMUD VS, TOUROVA TP, KARAVAIKO GI. *Sulfobacillus thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant, chemolithotrophic bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(Pt 5): 1039-1042.
- [19] PANYUSHKINA AE, BABENKO VV, NIKITINA AS, SELEZNEVA OV, TSAPLINA IA, LETAROVA MA, KOSTRYUKOVA ES, LETAROV AV. *Sulfobacillus thermotolerans*: new insights into resistance and metabolic capacities of acidophilic chemolithotrophs[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 15069.
- [20] JONES DT, TAYLOR WR, THORNTON JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences[J]. *Computer Applications in the Biosciences*, 1992, 8(3): 275-282.
- [21] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [22] XU CM, YU HM. Insights into constructing a stable

- and efficient microbial consortium[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2021, 30: 112-120.
- [23] JONES JA, VERNACCHIO VR, COLLINS SM, SHIRKE AN, XIU Y, ENGLAENDER JA, CRESS BF, McCUTCHEON CC, LINHARDT RJ, GROSS RA, KOFFAS MAG. Complete biosynthesis of anthocyanins using *E. coli* polycultures[J]. mBio, 2017, 8(3): e00621-17.
- [24] LINDEMANN SR, BERNSTEIN HC, SONG HS, FREDRICKSON JK, FIELDS MW, SHOU WY, JOHNSON DR, BELIAEV AS. Engineering microbial consortia for controllable outputs[J]. The ISME Journal, 2016, 10(9): 2077-2084.
- [25] LI ZH, WANG XN, ZHANG HR. Balancing the non-linear rosmarinic acid biosynthetic pathway by modular co-culture engineering[J]. Metabolic Engineering, 2019, 54: 1-11.
- [26] ZIESACK M, GIBSON T, OLIVER JKW, SHUMAKER AM, HSU BB, RIGLAR DT, GIESSEN TW, DiBENEDETTO NV, BRY L, WAY JC, SILVER PA, GERBER GK. Engineered interspecies amino acid cross-feeding increases population evenness in a synthetic bacterial consortium[J]. mSystems, 2019, 4(4): e00352-19.
- [27] 聂毅磊, 陈宏, 罗立津, 贾纬, 陈星伟. 一种浸矿混合菌种的筛选、鉴定及浸矿的研究[J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 177-183.
- NIE YL, CHEN H, LUO LJ, JIA W, CHEN XW. Screening and identification of mixed culture, and its bioleaching capacity[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(8): 177-183 (in Chinese).
- [28] XIAO CQ, CHI R, FANG YJ. Effects of *Acidiphilium cryptum* on biosolubilization of rock phosphate in the presence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2013, 23(7): 2153-2159.
- [29] VALDES J, OSSANDON F, QUATRINI R, DOPSON M, HOLMES DS. Draft genome sequence of the extremely acidophilic biomining bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 provides insights into the evolution of the *Acidithiobacillus* genus[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(24): 7003-7004.
- [30] KONDRAT'EVA TF, PIVOVAROVA TA, TSAPLINA IA, FOMCHENKO NV, ZHURAVLEVA AE, MURAV'EV MI, MELAMUD VS, BULAYEV AG. Diversity of the communities of acidophilic chemolithotrophic microorganisms in natural and technogenic ecosystems[J]. Microbiology, 2012, 81(1): 1-24.
- [31] JUSTICE NB, NORMAN A, BROWN CT, SINGH A, THOMAS BC, BANFIELD JF. Comparison of environmental and isolate *Sulfobacillus* genomes reveals diverse carbon, sulfur, nitrogen, and hydrogen metabolisms[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 1107.
- [32] 中国科学院天津工业生物技术研究所. 一株极端嗜酸的铁硫氧化菌及其在生物浸矿中的应用: CN202410207869.7[P]. 2024-05-07.
- Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences. An extremely acidophilic iron-sulfur oxidizing bacterium and its application in bioleaching: CN202410207869.7[P]. 2024-05-07 (in Chinese).
- [33] GAN M, JIE SQ, LI MM, ZHU JY, LIU XX. Bioleaching of multiple metals from contaminated sediment by moderate thermophiles[J]. Marine Pollution Bulletin, 2015, 97(1/2): 47-55.
- [34] ZHANG X, LIU XD, LIANG YL, GUO X, XIAO YH, MA LY, MIAO B, LIU HW, PENG DL, HUANG WK, ZHANG YG, YIN HQ. Adaptive evolution of extreme acidophile *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* potentially driven by horizontal gene transfer and gene loss[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(7): e03098-16.
- [35] CHEN LX, REN YL, LIN JQ, LIU XM, PANG X, LIN JQ. *Acidithiobacillus caldus* sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur oxygenase reductase defective mutant[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e39470.