

葡萄糖对嗜酸氧化亚铁硫杆菌与 *Acidiphilium acidophilum* 共培养的影响

刘宏伟^{1,2} 梁伊丽^{1,2} 尹华群^{1,2} 戴志敏^{1,2} 戴艳霞^{1,2} 刘学端^{1,2*}

(1. 中南大学 资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

(2. 教育部生物冶金重点实验室 湖南 长沙 410083)

摘要: 【目的】深入了解自养的嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)与异养的 *Acidiphilium acidophilum* 之间的协同作用, 为嗜酸异养微生物在生物浸出体系和酸性矿坑水(AMD)等极端酸性环境中的生态功能研究提供基础, 并为 AMD 环境的修复提供参考。【方法】应用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)及特异性引物, 定量 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 在类似自然状态下的共培养物受葡萄糖抑制时的生物量变化, 同时检测其生长过程中 Fe^{2+} 氧化和 pH 值的变化。【结果】无论是否加入葡萄糖, 共培养对 Fe^{2+} 氧化的效率均较 *At. ferrooxidans* 纯培养高。当葡萄糖浓度为 5 g/L 时, *At. ferrooxidans* 纯培养失去对 Fe^{2+} 的氧化能力, 而共培养仍能在 100 h 内将所有的 Fe^{2+} 氧化完, 且加入葡萄糖越多的培养体系氧化终点的 pH 值也越高。在不加入葡萄糖的条件下, *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 数量比在 100:1 的数量级, 表明以这两种菌为代表的自养菌和异养菌在自然条件下生物量的比例。无论纯培养还是共培养的 *At. ferrooxidans* 数量均随葡萄糖浓度的提高而减少, 且延滞期则变长; 而异养生长的 *Aph. acidophilum* 则相反。【结论】适合进行 Fe^{2+} 氧化的 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 的数量比例范围应在 100:1 的数量级。由于 *Aph. acidophilum* 能促进 *At. ferrooxidans* 对亚铁的氧化, 并能缓解或消除葡萄糖对 *At. ferrooxidans* 的抑制, 所以不能以加入类似于葡萄糖的有机物作为 AMD 环境生物修复的手段。

关键词: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌, *Aph. acidophilum*, 共培养, 酸性矿坑水, 生物修复策略

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2010CB630901); 国家自然科学基金项目(No. 31070104)

*通讯作者: Tel: 86-731-88830546; ✉: xueduanliu@yahoo.com

收稿日期: 2013-01-14; 接受日期: 2013-04-02

Influence of glucose on the co-culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidiphilium acidophilum*

LIU Hong-Wei^{1,2} LIANG Yi-Li^{1,2} YIN Hua-Qun^{1,2} DAI Zhi-Min^{1,2}
DAI Yan-Xia^{1,2} LIU Xue-Duan^{1,2*}

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)
(2. Key Laboratory of Biometallurgy of the Ministry of Education, Changsha, Hunan 410083, China)

Abstract: [Objective] To gain a better understanding of the synergic interactions between chemoautotrophic bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* and heterotrophic bacteria *Acidiphilium acidophilum* that usually occurred in bioleaching system and acid mine drainage (AMD). For suggestion on AMD bio-remediation and research foundation on ecology functions of acidophilic heterotrophic bacteria in bioleaching system and AMD environment. **[Methods]** The biomass dynamics of *At. ferrooxidans* and its natural co-culture with *Aph. acidophilum* in 9K-ferrous iron media with or without glucose were measured respectively by quantitative real-time PCR; meanwhile, the pH and Fe²⁺ oxidation were monitored. **[Results]** Whether the glucose was added in culture media or not, the Fe²⁺ oxidation efficiency of *At. ferrooxidans* is higher in co-culture than that in pure culture. When the concentration of glucose is 5 g/L, pure culture of *At. ferrooxidans* couldn't oxidize Fe²⁺ while the co-culture could finish the Fe²⁺ oxidation in 100 h, and the pH is higher when more glucose was added in both cultures. Without glucose, the cell number ratio of *At. ferrooxidans* to *Aph. acidophilum* in co-culture was about 100:1, which suggested the usual cell number ratio between autotrophic bacteria and heterotrophic bacteria in AMD environment. Both in pure and co-culture, the cell number of *At. ferrooxidans* decreased and the lag phase prolonged with the increase of glucose concentration; while in the case of *Aph. acidophilum* in co-culture, the cell number and lag phase showed a reverse trend. **[Conclusion]** For efficient Fe²⁺ oxidation, the proper cell number of *At. ferrooxidans* should be 100 times higher than that of *Aph. acidophilum*. Because *Aph. acidophilum* facilitated the Fe²⁺ oxidation by *At. ferrooxidans* and reduced the inhibition by glucose, the addition of organic compounds such as glucose could not be a good AMD bio-remediation strategy.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidiphilium acidophilum*, Co-culture, AMD, Bio-remediation strategy

我国金属矿产资源多为中小型矿,且矿石品位低,难于采选。近年来,运用微生物从低品位硫化矿中提取铜、锌、铀等金属的生物冶金技术^[1]

在我国得到快速发展与应用^[2]。酸性矿坑水(AMD)是在生物浸出过程或暴露于自然环境的金属硫化矿在微生物与水的共同作用下产生的,

将其排放到环境中将造成不同程度的污染。因此, AMD 的环境影响及防治研究也成为矿山环境恢复治理的重要工作内容, 其目的是中和 AMD 中的 H^+ 以提高 pH 值, 并通过沉淀、转移等方法去除其中的金属离子, 达到可向自然环境排放的程度^[3-4]。嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 是生物浸出体系和 AMD 等极端酸性环境中常见的微生物, 也是目前生物浸出相关研究中研究得较深入的微生物物种之一^[5-6]。*At. ferrooxidans* 通过氧化亚铁和(或)还原性硫化物获得能源并固定 CO_2 作为碳源营化能自养生长, 许多有机物能明显抑制其生长。Marchand 等发现 1 g/L 的葡萄糖即能使 *At. ferrooxidans* 失去氧化亚铁和生长的能力, 但加入能利用这些葡萄糖异养生长的 *Acidiphilium acidophilum* 能减轻葡萄糖对 *At. ferrooxidans* 氧化亚铁和生长的抑制^[7]。

以往大量研究结果表明, *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 在铁氧化与还原、碳源利用及相互解除生长和代谢抑制作用等方面存在明显的协同关系^[8]。*At. ferrooxidans* 能氧化 Fe^{2+} 作为能源生长, 而 *Aph. acidophilum* 在厌氧条件下对 Fe^{3+} 有还原能力^[9], 且 *Aph. acidophilum* 能利用 *At. ferrooxidans* 自养生长产生的有机代谢产物作为碳源和能源进行异养生长^[10]。在生物浸出体系中, *Aph. acidophilum* 能通过生长代谢分解矿物表面的有机物以提高 *At. ferrooxidans* 对矿物的浸出效率^[11], 而 *At. ferrooxidans* 则可以减轻硫化物对 *Acidiphilium* 属微生物的抑制作用^[12]。我们之前的研究也证实这两种微生物共培养时对一些金属离子的抗性和对黄铁矿的生物浸出效率均得到不同程度的提高^[13]。另外, 在生物浸出体系的极端酸性环境中进行生物修复方面, 有研究发现在 *At. ferrooxidans* 浸出黄铁矿的体系中加入 *Aph. acidophilum* 及促进其异养生长的葡萄糖(1 g/L), 黄铁矿的浸出将受到明显的抑制, 暗示提高异养

生长的 *Aph. acidophilum* 的生物量可能是一种对 AMD 环境进行修复的策略^[14]。

鉴于 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 在极端酸性环境中密切的相互关系及它们在生物冶金中的重要作用, 我们选用由 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 组成的共培养物作为简单的两物种群落进行研究, 检验其在葡萄糖存在的条件下 *At. ferrooxidans* 对 Fe^{2+} 氧化能力的改变以及两种微生物相应的生物量变化。与已往简单混合两种或多种浸矿微生物不同, 此共培养物经过驯化且不需加入有机物即可生长, 对其进行研究可以更深入地了解此共培养体系在有机物抑制条件下的生长和 Fe^{2+} 氧化情况, 从而为嗜酸异养微生物在生物浸出体系和 AMD 等极端酸性环境中的生态功能研究提供基础, 并为 AMD 环境的修复提供参考。

1 材料与方 法

1.1 菌种、培养基与培养条件

实验中所用菌株 *At. ferrooxidans* ATCC23270 和 *Aph. acidophilum* ATCC27807 均购自美国模式菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 共培养物已先期完成驯化, 其具体过程已另文发表^[10]。

At. ferrooxidans 及其与 *Aph. acidophilum* 的共培养物用 9K 培养基培养, 其基本盐成分为(g/L): KCl 0.1, $(NH_4)_2SO_4$ 3.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, KH_2PO_4 0.05, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 0.01, 1 L dH_2O , 用稀硫酸(0.5 mol/L)调 pH 值至 2.0, 100 mL 分装于 250 mL 三角瓶, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。在每瓶已灭菌的 9K 基本盐培养基中加入 4.47 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 待 $FeSO_4$ 完全溶解后(此时 pH 提高至 2.35 ± 0.04), 再用孔径为 0.22 μm 的无菌针头式过滤器(MILLEX[®] GP, Millipore)除菌, 用于 *At. ferrooxidans* 及其与 *Aph. acidophilum* 共培养物的培养。

葡萄糖预先配制成 10% (W/V) 的溶液, 经过滤除菌后按一定比例加入到上述 9K-FeSO₄ 培养基中。实验中所有处理均做 3 个平行培养, 培养温度为 30 °C, 转速为 200 r/min。

1.2 主要仪器

恒温培养振荡器 Sukun NSKY-2102, 上海苏坤; pH 酸度计雷磁 PHSJ-4A, 上海雷磁; 低温离心机 Avanti[®] J-E centrifuge, Beckman Coulter, USA; 微量分光光度计 Nano Drop ND-1000, NanoDrop[®] Technologies, Inc; 实时定量 PCR 系统 Bio-Rad Laboratories, USA。

1.3 分析测试

实验中 Fe²⁺ 浓度均采用重铬酸钾滴定法测定^[15], pH 值使用 pH 酸度计测量。

1.4 DNA 提取

定期收集各平行实验的 100 mL 菌液, 菌液样品先用低温离心机在 4 °C、1 000×g 条件下离心 2 min, 收集上清液。沉淀物用 pH 2.0 的稀硫酸洗涤并在 4 °C、1 000×g 条件下离心, 收集上清液。重复上述洗涤和上清收集过程 1 次, 然后合并 3 次离心所收集的上清液, 在 4 °C、15 000×g 条件下离心 20 min 以收集细胞。收集到的细胞用 TIANGEN 公司 TIANamp 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN BIOTECH, Beijing)按照操作说明提取其基因组 DNA。所提取的 DNA 用 58 μL pH 8.0 的 TE 缓冲液洗脱, 并加入 2 μL RNase (10 g/L) 37 °C 温育 10 min 后, 于 -20 °C 保存备用。

1.5 RT-qPCR 引物及其特异性检测

由于特定微生物基因组各个管家基因(如 16S rRNA 基因)的拷贝数是一定的, 可利用 RT-qPCR 定量各时间点两种微生物 16S rRNA 基因拷贝数^[16], 以检测两种微生物的生长数量动态变化情况及相对数量关系。RT-qPCR 引物用 Primer Premier 5.0 软件设计, 引物序列及相关信息如表 1 所示。

为确保在 RT-qPCR 定量其中一种菌 16S rRNA 基因拷贝数时不被另一种干扰, 应用常规 PCR 分别检测这两对引物的特异性。常规 PCR 扩增产物经梯度稀释后作为 RT-qPCR 标样制作标准曲线, 以确定所有待测样中相同基因的总拷贝数。由于本研究中每 100 mL 菌液经 DNA 提取最后得到的 DNA 待测样为 60 μL, 用于 RT-qPCR 的待测样为 0.5 μL, 则每毫升待测样中目的基因拷贝数=总拷贝数×6/5。标样拷贝数的计算公式为^[17]: $\text{Copy number} = 6.02 \times 10^{23}$

$$(\text{copies/mol}) \times \frac{\text{Concentration of standard (g/}\mu\text{L)}}{MV (\text{g/mol})},$$

其中 MV (分子量) = n (目的序列碱基数) × 660。标样浓度用微量分光光度计测定。在检测每种菌特异性引物的 PCR 体系中, 阴性对照模板使用共培养中另一种菌的基因组 DNA, 其 25 μL PCR 扩增体系如下: 10×体系缓冲液 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL, 正向/反向引物 (5 pmol/μL) 0.4 μL, dNTPs (2 mmol/L) 0.5 μL,

表 1 Real-time qPCR 引物
Table 1 The real-time qPCR primer pairs

Primer	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature (°C)	Target gene
Af1-f	GGGGTGCAAGCGTTAA	189	58	16S rRNA gene of <i>At. ferrooxidans</i> ATCC 23270
Af1-r	TCGCCACTGATGTTCTT			
Aa2-f	CCTTACCAGGATTTGACA	148	58	16S rRNA gene of <i>Aph. acidophilum</i> ATCC 27807
Aa2-r	CAACTAAAGGCGAGGG			

Taq 酶(1 U/ μ L) 0.2 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH₂O 18.0 μ L。PCR 扩增循环条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 反应结束后取 4 μ L 产物于 2%琼脂糖凝胶电泳成像。

1.6 Real-time qPCR

使用 iCycler iQ 实时定量 PCR 系统进行定量, 25 μ L qPCR 体系如下: 12.5 μ L SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix (Toyobo co., Ltd., Osaka, Japan), 0.5 μ L 标样或待测样 DNA, 正向/反向引物(5 μ mol/L) 0.5 μ L, ddH₂O 11.0 μ L。PCR 扩增循环条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s, 共 40 个循环; 72 °C 5 min。随后 95 °C 变性 1 min; 80 个循环温育(55 °C–95 °C, 每循环后温度提高 0.5 °C) 10 s; 用于熔解曲线的检测。

2 结果

2.1 *Aph. acidophilum* 和葡萄糖对 *At. ferrooxidans* 氧化亚铁能力的影响

At. ferrooxidans 对 Fe²⁺的氧化能力是衡量其生理活性的重要指标, 在接种量相同(接种后微生物细胞终浓度为(2.3±0.42)×10⁵ cells/mL 的情况下, 其对 Fe²⁺的氧化情况如图 1 所示。由图 1 可见, 无论是否加入葡萄糖, 共培养对 Fe²⁺氧化的效率均较 *At. ferrooxidans* 纯培养高。在葡萄糖浓度达到 5 g/L 时, *At. ferrooxidans* 纯培养失去对 Fe²⁺的氧化能力, 而共培养中的 *At. ferrooxidans* 仍能在 100 h 内将所有的 Fe²⁺氧化完; 当葡萄糖浓度达到 10 g/L 时, 共培养体系失去 Fe²⁺氧化能力。*At. ferrooxidans* 在 Fe²⁺氧化时的 pH 值变化趋势(图 2)与 Fe²⁺氧化结果一致, 但从氧化终点的

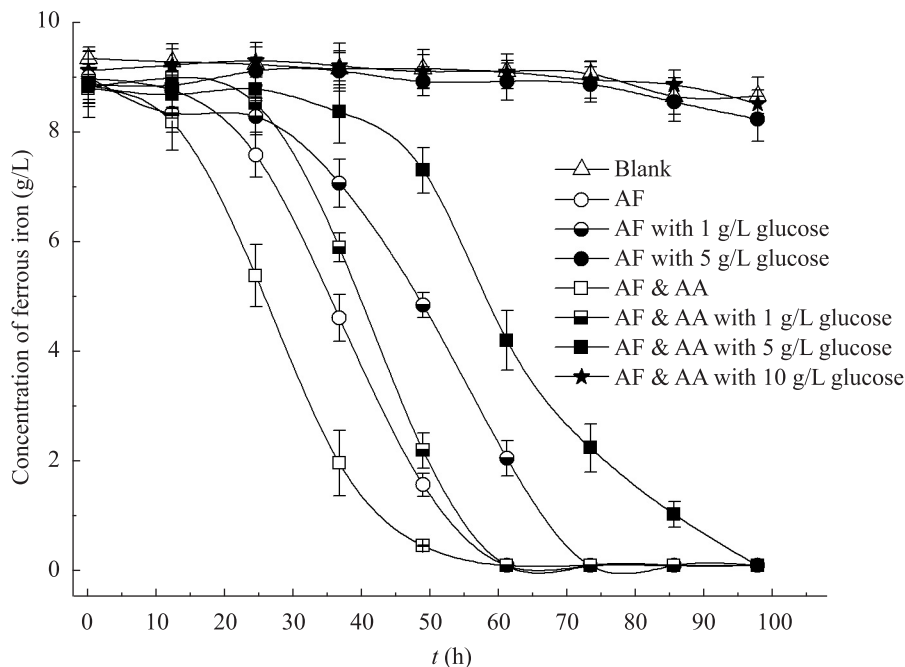


图 1 嗜酸氧化亚铁硫杆菌 Fe²⁺氧化曲线

Fig. 1 Curves of Fe²⁺ oxidation by *At. ferrooxidans*

注: AF: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌; AA: *Aph. acidophilum*; AF & AA: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌与 *Aph. acidophilum* 共培养; Blank: 不接种对照。以下图中所有与之相同的注释均与此同义。

Note: AF: *At. ferrooxidans*; AA: *Aph. acidophilum*; AF & AA: The co-culture of *At. ferrooxidans* and *Aph. acidophilum*; Blank: Abiotic control. All denotations as above have the same mean in the following figures.

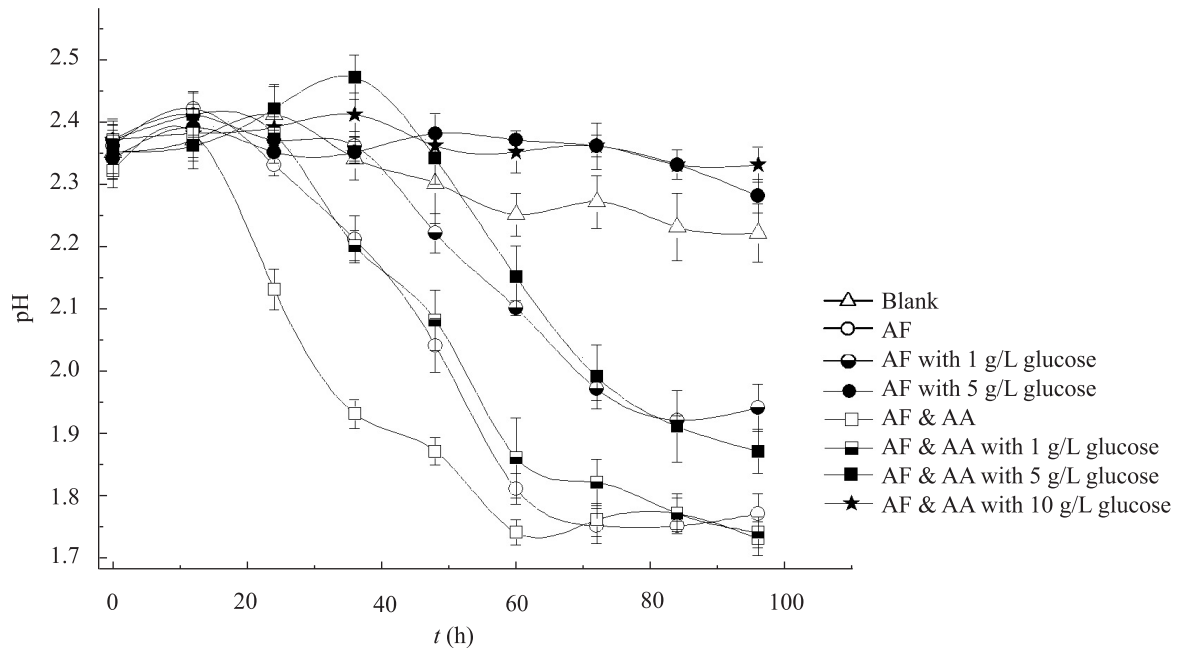


图 2 嗜酸氧化亚铁硫杆菌 Fe^{2+} 氧化过程中的 pH 值
Fig. 2 pH profiles in process of Fe^{2+} oxidation by *At. Ferrooxidans*

pH 值来看, 加入较多葡萄糖的培养体系氧化结束后其 pH 较不加的高。

2.2 Real-time qPCR 引物特异性检测

用于 RT-qPCR 的引物(表 1)特异性检测琼脂糖凝胶电泳结果如图 3 所示。由图 3 可见, 两对引物均只能扩增所检测菌种的目标序列, 而且对另一种菌无任何扩增结果。另外, 在之后用 Real-time qPCR 定量 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 数量时, 溶解曲线的检测结果表明每个 PCR 反应均为单峰, 提示所有 PCR 反应产物单一, 与上述结果一致。

2.3 Fe^{2+} 氧化过程中 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 的数量动态变化研究

在不加入葡萄糖的条件下 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 数量动态变化情况如图 4 所示。由图 4 可见, 在共培养体系中 *Aph. acidophilum* 的对数生长期紧随 *At. ferrooxidans* 之后, 在没有其他能源的培养条件下 *Aph. acidophilum* 是依靠自养菌 *At. ferrooxidans* 代谢产生的有机物

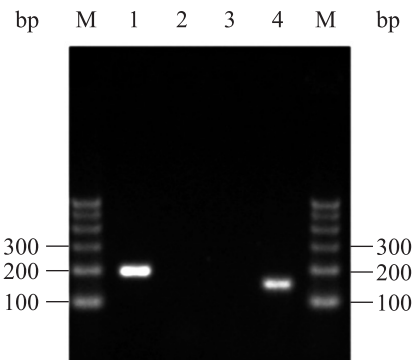


图 3 引物特异性的电泳分析

Fig. 3 Electrophoresis analysis of the specificity of primer pairs

注: 1 和 2 的 PCR 反应所用引物为 Af1-f 和 Af1-r, PCR 模板分别为嗜酸氧化亚铁硫杆菌基因组 DNA 和 *Aph. acidophilum* 基因组 DNA; 3 和 4 所用引物为 Aa2-f 和 Aa2-r, PCR 模板分别为嗜酸氧化亚铁硫杆菌基因组 DNA 和 *Aph. acidophilum* 基因组 DNA; M: DNA marker 100 bp ladder.

Note: The primer pairs used for PCR in lane 1 and 2 were Af1-f and Af1-r, the DNA templates were genomic DNA of *At. ferrooxidans* and *Aph. acidophilum*, respectively; The primer pairs used for PCR in lane 3 and 4 were Aa2-f and Aa2-r, the DNA templates were genomic DNA of *At. ferrooxidans* and *Aph. acidophilum*, respectively; M: DNA marker 100 bp ladder.

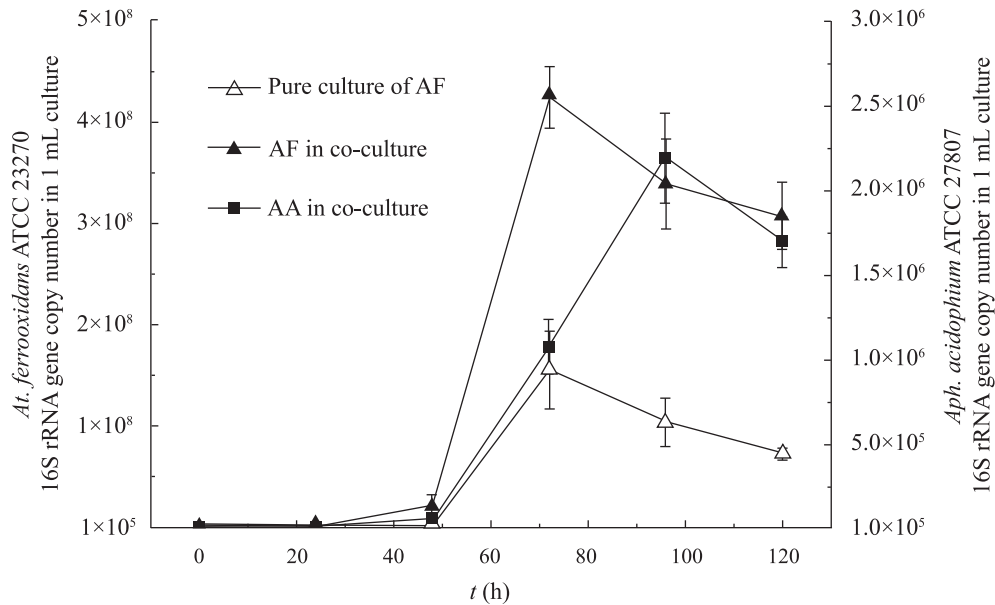


图4 Fe^{2+} 氧化过程中嗜酸氧化亚铁硫杆菌纯培养及其与 *Aph. acidophilum* 的生长曲线

Fig. 4 Growth dynamics of *At. ferrooxidans*, *Aph. acidophilum* and their co-culture in process of Fe^{2+} oxidation

进行生长。共培养中 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 16S rRNA 基因拷贝数之比保持在 100:1 的数量级, 这样的数量关系也能在一定程度上反映出以这两种菌为代表的自养菌和异养菌在自然条件下生物量大概比例。另外, 共培养中的 *At. ferrooxidans* 最大细胞数是其纯培养的 2.73 倍, 结合图 1 中 Fe^{2+} 情况可知共培养体系中 *At. ferrooxidans* 的活力高于其纯培养。

2.4 葡萄糖对嗜酸氧化亚铁硫杆菌与 *Aph. acidophilum* 的数量动态变化的影响

由图 5 和图 6 可见无论纯培养还是共培养中 *At. ferrooxidans* 的数量均随葡萄糖浓度的提高而减少, 延滞期则变长; 异养生长的 *Aph. acidophilum* 数量明显增加, 并且其延滞期随葡萄糖浓度的提高明显缩短。结合图 1 Fe^{2+} 氧化结果可知葡萄糖的加入抑制了 *At. ferrooxidans* 纯培养对 Fe^{2+} 的氧化。共培养中的 *At. ferrooxidans* 在加入葡萄糖的情况(图 5 和图 6)与不加的情况(图 4)相比, 其细胞数量减少了一个数量级, 且共培养中 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 两种微生物的

数量关系被完全改变。当葡萄糖浓度为 5 g/L 时(图 6), 共培养中的 *At. ferrooxidans* 不仅有生长现象, 而且仍能用较长时间将所有 Fe^{2+} 氧化完(图 1), 说明共培养中 *Aph. acidophilum* 的存在使葡萄糖对 *At. ferrooxidans* 氧化 Fe^{2+} 的抑制作用被明显削弱。

3 讨论

本文对嗜酸氧化亚铁硫杆菌与 *Aph. acidophilum* 构建的简单两物种群落进行研究, 发现嗜酸氧化亚铁硫杆菌对有机物葡萄糖的耐受能力极大的受到异养微生物 *Aph. acidophilum* 的影响。由于微生物之间的协同作用, 共培养中 *At. ferrooxidans* 对葡萄糖这类有机物的抗性会高于其纯培养, 这与 *At. ferrooxidans* 对金属离子的抗性情况类似^[13,18]。以往在 *At. ferrooxidans* 对葡萄糖的抗性研究中^[7]发现其最高葡萄糖抑制浓度为 1.5 g/L (与 *Aph. acidophilum* 混合培养), 而本研究中此浓度提高至 5 g/L。其最主要的原因是我们使用了经驯化后的由 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 组成的共培养物, 而不是简单混合这两

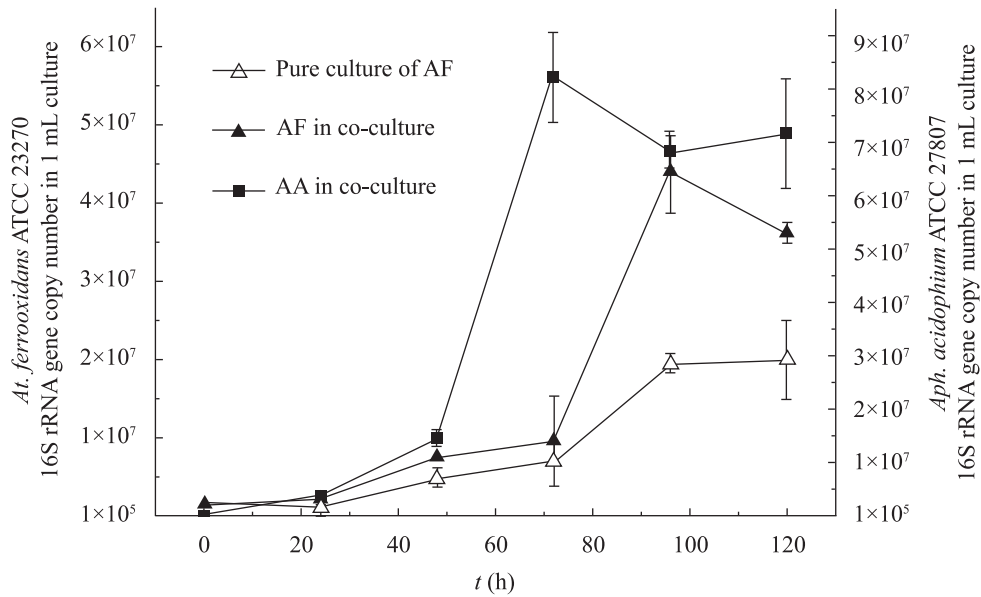


图5 含 1 g/L 葡萄糖的培养基 Fe^{2+} 氧化过程中嗜酸氧化亚铁硫杆菌纯培养及其与 *Aph. acidophilum* 的生长曲线
 Fig. 5 Growth dynamics of *At. ferrooxidans*, *Aph. acidophilum* and their co-culture in process of Fe^{2+} oxidation with 1 g/L glucose in culture media

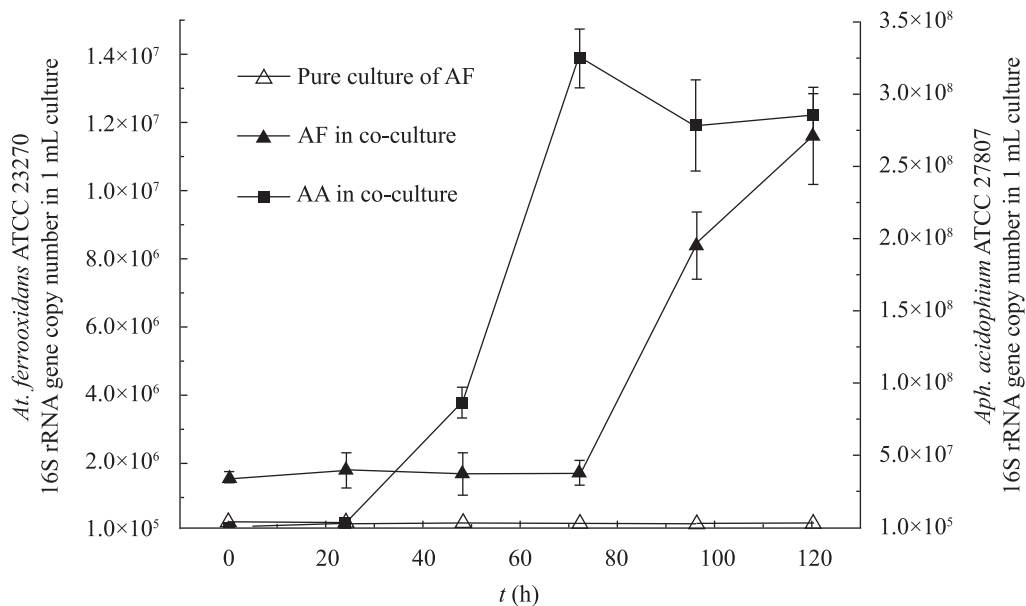


图6 含 5 g/L 葡萄糖的培养基 Fe^{2+} 氧化过程中嗜酸氧化亚铁硫杆菌纯培养及其与 *Aph. acidophilum* 的生长曲线
 Fig. 6 Growth dynamics of *At. ferrooxidans*, *Aph. acidophilum* and their co-culture in process of Fe^{2+} oxidation with 5 g/L glucose in culture media

种微生物进行实验。这样所得到的结果更能反映自然环境下两种微生物生理上协同作用的特性和程度。

综合图 1 和图 5 的结果可以看出, 抑制 *At.*

ferrooxidans 生长和 Fe^{2+} 氧化的并不是 *Aph. acidophilum*, 而是培养体系中的有机物葡萄糖, 所以在生物修复时需要加入比纯培养试验中更多的有机物才能达到效果。我们在已完成 Fe^{2+} 氧化

的 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 共培养体系中加入 5 g/L 葡萄糖培养后发现并没有 Fe^{3+} 被还原, 仅 pH 值从 1.7 提高到 3.0 左右(结果未给出)。在此情况下大量异养生长的 *Aph. acidophilum* 并不能还原 Fe^{3+} , 其产生还原作用还需要有无氧的环境^[9], 如 AMD 环境中的沉积物体系^[19-20]。可见 *Aph. acidophilum* 在有氧环境中对加入有机物进行生物修复的过程仅能起到降低有机物含量和提高 pH 的作用。由于嗜酸菌属另一异养物种 *Aph. cryptum* (隐藏嗜酸菌)能在有氧、较高 pH (pH 4.5-6.0)和较低浓度有机物(0.1 g/L 酵母膏和 1 g/L 葡萄糖)存在的条件下进行 Fe^{3+} 还原^[21], 提高 *Aph. acidophilum* 数量作为一种生物修复策略^[14]还需要加入更多的嗜酸异养微生物物种进行研究并在实践中进行检验。

目前已有研究指出^[22], *At. ferrooxidans* 浸出黄铁矿的过程可分为明显的两个阶段: ① 较慢的起始阶段以氧化 S^{2-} 并积累 Fe^{2+} 用于 *At. ferrooxidans* 的生长; ② 较快的主要阶段以迅速氧化剩余的大量黄铁矿。我们曾报道过 *At. ferrooxidans* 与 *Aph. acidophilum* 的共培养能提高黄铁矿浸出的效率^[13], 但对于广泛存在于生物浸出体系和 AMD 环境中并且能氧化硫进行生长的 *Aph. acidophilum* 是否分别对这两个阶段均有促进作用目前尚未见报道。仅有的关于 *Aph. acidophilum* 与 *At. ferrooxidans* 混合浸出黄铁矿的研究表明, 在加入葡萄糖使 *Aph. acidophilum* 大量生长的条件下, 黄铁矿的浸出受到明显限制^[14]。根据本研究和我们之前的研究结果^[13]表明, *Aph. acidophilum* 在黄铁矿浸出过程的起始阶段可能是与 *At. ferrooxidans* 共同作用以氧化 S^{2-} 并积累 Fe^{2+} ; 而在浸出过程的主要阶段, *Aph. acidophilum* 通过异养生长能缓冲或消除有机物(包括环境中的有机物和 *At. ferrooxidans* 自身代谢产生的有机物代谢产物, 如丙酮酸^[23]、乙醇酸^[24]等)对 *At. ferrooxidans* 氧化黄铁矿的影响。当然, 以上这些

推测还有待类似于 Brunner 等^[22]提供的化学方面的研究结果进行证实。

4 结论

(1) 适合进行 Fe^{2+} 氧化的嗜酸氧化亚铁硫杆菌与 *Aph. acidophilum* 的数量比例范围应在 100:1 的数量级, 在 5 g/L 葡萄糖抑制浓度条件下嗜酸氧化亚铁硫杆菌不能生长和氧化亚铁, 而其与 *Aph. acidophilum* 的共培养体系仍能在 100 h 内氧化完所有 Fe^{2+} ;

(2) *Aph. acidophilum* 能促进嗜酸氧化亚铁硫杆菌对 Fe^{2+} 的氧化, 并能缓解或消除葡萄糖对嗜酸氧化亚铁硫杆菌的抑制作用, 所以无论是否加入葡萄糖进行抑制, 共培养体系中的嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长与 Fe^{2+} 氧化能力明显高于其纯培养;

(3) 在加入大量葡萄糖对 AMD 环境进行生物修复时, *Aph. acidophilum* 之类的异养菌将影响修复效果。另外考虑到经济效益方面的问题, 也不能以加入葡萄糖作为生物修复的手段。

参考文献

- [1] Olson GJ, Brierley JA, Brierley CL. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 63(3): 249-257.
- [2] 殷志勇, 成海芳, 张文彬. 生物技术在湿法冶金领域的应用现状及研究趋势[J]. 湿法冶金, 2006, 25(3): 113-116.
- [3] Johnson DB, Hallberg KB. Acid mine drainage remediation options: a review[J]. Science of the Total Environment, 2005, 338(1/2): 3-14.
- [4] 倪师军, 李珊, 李泽琴, 等. 矿山酸性废水的环境影响及防治研究进展[J]. 地球科学进展, 23(5): 501-508.
- [5] Rawlings DE. The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur-oxidizing bacteria[J]. Hydrometallurgy, 2001, 59(2/3): 187-201.

- [6] Valdes J, Pedroso I, Quatrini R, et al. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications[J]. *Bmc Genomics*, 2008, 9(1): 597–613.
- [7] Marchand EA, Silverstein J. The role of enhanced heterotrophic bacterial growth on iron oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2003, 20(3): 231–244.
- [8] Baker BJ, Banfield JF. Microbial communities in acid mine drainage[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 44(2): 139–152.
- [9] Johnson DB, Bridge TA. Reduction of ferric iron by acidophilic heterotrophic bacteria: evidence for constitutive and inducible enzyme systems in *Acidiphilium* spp.[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(2): 315–321.
- [10] Liu HW, Yin HQ, Dai YX, et al. The co-culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidiphilium acidophilum* enhances the growth, iron oxidation, and CO₂ fixation[J]. *Archives of Microbiology*, 2011, 193(12): 857–866.
- [11] Hao J, Murphy R, Lim E, et al. Effects of phospholipid on pyrite oxidation in the presence of autotrophic and heterotrophic bacteria[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2009, 73(14): 4111–4123.
- [12] Gurung A, Chakraborty R. The role of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in alleviating the inhibitory effect of thiosulfate on the growth of acidophilic *Acidiphilium* species isolated from acid mine drainage samples from Garubathan, India[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(9): 1040–1048.
- [13] 刘宏伟, 戴艳霞, 黄伟, 等. 嗜酸异养菌对自养菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 金属离子抗性和生物浸出的影响[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(8): 1069–1078.
- [14] Marchand EA, Silverstein J. Influence of heterotrophic microbial growth on biological oxidation of pyrite[J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(24): 5483–5490.
- [15] Peng H, Yang Y, Li X, et al. Structure analysis of 16S rDNA sequences from strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 39(2): 178–182.
- [16] Bach HJ, Tomanova J, Schloter M, et al. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 49(3): 235–245.
- [17] Smith CJ, Nedwell DB, Dong LF, et al. Evaluation of quantitative polymerase chain reaction- based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(5): 804–815.
- [18] Cabrera G, Gomez JM, Cantero D. Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(8): 2683–2687.
- [19] Peccia J, Marchand EA, Silverstein J, et al. Development and application of small-subunit rRNA probes for assessment of selected *Thiobacillus* species and members of the genus *Acidiphilium*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 3065–3072.
- [20] 郑璐, 尹华群, 曹琳辉, 等. 德兴铜矿酸性矿坑水水样与底泥中微生物群落多样性及其群落结构变化[J]. *生态学报*, 2007, 28(10): 4841–4848.
- [21] Bilgin AA, Silverstein J, Jenkins JD. Iron respiration by *Acidiphilium cryptum* at pH 5[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49(1): 137–143.
- [22] Brunner B, Yu JY, Mielke RE, et al. Different isotope and chemical patterns of pyrite oxidation related to lag and exponential growth phases of *Acidithiobacillus ferrooxidans* reveal a microbial growth strategy[J]. *Earth and Planetary Science Letters*, 2008, 270(1/2): 63–72.
- [23] Schnaitman C, Lundgren DG. Organic compounds in the spent medium of *Ferrobacillus ferrooxidans*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1965, 11: 23–27.
- [24] Nancucheo I, Johnson DB. Production of glycolic acid by chemolithotrophic iron- and sulfur-oxidizing bacteria and its role in delineating and sustaining acidophilic sulfide mineral-oxidizing consortia[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(2): 461–467.