

# 低品位硫化铜矿生物柱浸过程细菌种群结构及演替规律

邹平<sup>1,2</sup>, 周兴龙<sup>1</sup>, 张文彬<sup>1</sup>, 林连兵<sup>1</sup>, 张兰兰<sup>1</sup>

(1. 昆明理工大学国土资源工程学院, 云南 昆明 650039; 2. 云南冶金集团总公司技术中心, 云南 昆明 650031)

**摘要:** 利用分子生物学的 PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)分析技术和 PCR-16S rDNA 序列分析技术研究了以黄铜矿为主的低品位硫化铜矿中温硫杆菌柱浸过程中细菌种群结构、演替规律及与铜浸出率之间的关系. DGGE 电泳图谱共 6 个条带中有 5 个条带对应的菌株 16S rDNA 序列与已知菌—嗜酸氧化亚铁硫杆菌 *A.f* 的同源性均为 98% 以上. 用 9K 固体培养基从柱浸浸出液中随机分离出 3 个纯菌株的 16S rDNA 序列, 与已知菌 *A.f* 的同源性也均为 99%, 均证明该生物柱浸过程以 *A.f* 为优势菌种. 细菌柱浸的菌群演替发生在 *A.f* 同菌种内的各菌株之间. 柱浸前期易浸的次生硫化铜矿选择了 02 和 05 两条带所对应的 *A.f* 菌株, 柱浸中后期难浸的黄铜矿则选择了 01, 02, 03, 04, 06 五条带所对应的 *A.f* 菌株.

**关键词:** 黄铜矿; 细菌种群结构; 种群演替规律; 16S rDNA; 序列分析; 嗜酸氧化亚铁硫杆菌

**中图分类号:** TF111.311; TF803.21; Q939.99; **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2009)01-0088-07

## 1 前言

微生物以群落的形式存在于各种环境中, 种群结构决定其生态功能, 通过改变微生物群落的结构可以使其功能达到最佳<sup>[1]</sup>. 但目前细菌冶金领域对微生物群落研究常采用的平板法研究结果不准确, 由于培养基对细菌生长有明显的选择性<sup>[2,3]</sup>, 99% 的细菌不能培养<sup>[4]</sup>. 同时平板法还存在培养周期长(5~8 d)、无法在线精确反映浸矿体系中微生物种群的动态变化过程等问题, 使对浸矿微生物的种群结构和演替规律还不清楚, 细菌浸矿过程犹如“黑箱”反应.

分子生物学技术特别是 PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)技术的引入避免了传统分离方法的弊端, 以微生物基因组 DNA 序列信息为依据, 通过分析样品中 DNA 分子的种类和数量来反映微生物的区系组成和群落结构. 由于每种微生物的细胞都有自己的基因组 DNA, 其核苷酸序列组成也有独特的特征, 因此, 通过直接从样品中提取所有微生物的基因组总 DNA, 依据核苷酸序列的不同, 分析 DNA 的种类和相对数量, 就可以反映出微生物的种类组成及种群数量比例, 从而对微生物的群落结构有比较客观全面的认识, 可鉴定出无法用传统方法分离出来的菌种<sup>[5]</sup>, 而且提供的信息量大, 因而特别适合对生物浸矿微生物群落这样复杂系统的群落结构进行连续动态分析, 从而达到解析群落结构与功能关系、实现对群落功能定向调控的目的. DGGE 技术可以分辨具有相同大小 DNA 片段的序列差异, 可用于检测单一碱基的变化<sup>[6]</sup>. 本工作利用 PCR-DGGE 技术率先

在细菌冶金领域研究微生物群落结构, 在国内处于领先地位. 对于了解浸矿体系微生物种群的变化与铜浸出效率的关系、深入了解中温硫杆菌的浸矿机理具有理论价值. 优化出的分子生物学监控方法具有普遍应用价值, 对于实现细菌冶金过程的人工控制具有重要意义.

## 2 实验

### 2.1 实验用菌种

菌种: 柱浸实验所用中温硫杆菌菌种 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 是从云南某大型铜矿的酸性矿坑水中分离、经以黄铜矿为主的低品位硫化铜矿驯化而得到的浸矿效果优良的菌种—自然混菌菌种 (Domestic bacteria).

### 2.2 细菌分离和柱浸培养基的组成

9K 液体培养基 A 液(g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, KCl 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.01; 去离子水 800 mL, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调节 pH 至 2.0, 121 °C 高压灭菌 20 min.

B 液: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 44.78 g/L, 去离子水 200 mL, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调节 pH 至 2.0, 孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤除菌. 将灭菌后的 A 液与 B 液混匀后分装.

9K 固体培养基: A 液+15 g 琼脂与 B 液混匀后在 70 °C 左右倒平板若干.

柱浸培养基: 无 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 的 9K 液体培养基(OK 培养基).

### 2.3 实验矿样

实验矿样主要金属矿物为黄铜矿和磁铁矿, 其次是

斑铜矿、黄铁矿和赤铁矿, 有少量褐铁矿、铜蓝及孔雀石等。脉石矿物以黑云母、长石、白云石、石英和绿泥石为主, 其次是方解石和石榴石。其主要化学成分和物相分析结果如表 1, 2 所示。

表 1 矿样的主要化学成分

Table 1 Main composition of the ore sample

Component	Cu	S	Fe	CaO	MgO	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SiO <sub>2</sub>
Content (% , ω)	0.89	0.9	23.92	4.5	2.88	7.46	32.8

表 2 矿样含铜物相铜含量分析

Table 2 Cu contents of copper-containing phases of the ore sample

Component	Content (% , ω)	Distribution (% , ω)
Sulphate	0.0075	0.84
Free oxide	0.0042	0.47
Combined oxide	0.0550	6.18
Secondary sulphide	0.2400	26.97
Primary sulphide	0.5800	65.17
Total	0.8967	100

## 2.4 实验方法

### 2.4.1 柱浸实验

称取 1~10 mm 粒度的矿石 3.5 kg, 装入 PVC 塑料浸出柱(圆柱,  $\phi 70$  mm $\times$ 700 mm)内, 室温下用稀硫酸溶液酸化, 待酸化液 pH 稳定在 2.0 后, 加入营养物和 10% 中温硫杆菌菌种, 浸出柱移入 30 °C 培养箱内, 通气培养浸出, 共浸出 2 个月。每天 3 次调节浸出液 pH, 维持在 2.0。每天 2 次补充蒸发水分到定量。每 7 d 用新鲜培养基替换浸出液, 替换出的浸出液取 30 mL 过滤, 滤液分析 Cu, Fe 等含量, 计算每个周期 Cu 的浸出率; 剩下的约 1000 mL 浸出液离心分离中温硫杆菌, 随后提取基因组 DNA, 进行 DGGE 实验, 以分析柱浸细菌的种群结构和演替规律。

### 2.4.2 浸出液细菌基因组 DNA 的提取

将浸出液低转速(离心力 800~1200 g)离心去除绝大部分矿粒, 再高转速(离心力 6000 g)离心收集菌体细

胞, 用 pH 8.0 的 TE 缓冲液多次洗涤沉淀, 将处理后的细胞用基因组抽提试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)提取菌株基因组 DNA。具体操作步骤按试剂盒附带说明书进行。

### 2.4.3 PCR 扩增

利用 16S rDNA 的 1 对加了 GC 发夹的通用引物(北京三博远志公司)进行 PCR 扩增, 引物序列<sup>[7,8]</sup>见表 3, PCR 扩增反应体系组成见表 4。

表 3 DGGE 引物<sup>[7,8]</sup>Table 3 The sequences of two set primers of DGGE<sup>[7,8]</sup>

Primer	Sequence (5' to 3')	Target site (bp)
341F	5-GC-clamp <sup>1)</sup> CCTACGGGAGGCAGCAG-3	341~348
907R	5-CCGTCAATTCCTTTTCAGTTT-3	907~927

Note: 1) 5'GCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCG-3'.

表 4 PCR 扩增反应体系组成

Table 4 Composition of the PCR reaction system (50  $\mu$ L)

Composition	Volume and concentration
10 $\times$ Ex-Taq buffer	5 $\mu$ L
2.5 mmol/L dNTP	3 $\mu$ L
Model	10 ng
P1: 341F	50 pmol
P2: 907R	50 pmol
Ex-Taq DNA polymerase	0.2 $\mu$ L
Deionized water	to 50 $\mu$ L

PCR 反应条件: 采用热启动降落 PCR 策略<sup>[9]</sup>, 预变性条件为 94 °C 5 min, 80 °C 加入酶液, 前 20 个循环为 94 °C 1 min, 60~50 °C 1 min(每个循环降 0.5 °C), 72 °C 1.5 min, 后 15 个循环为 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 最后在 72 °C 下延伸 10 min。

### 2.4.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

#### (1) DGGE 相关试剂的配制

含变性梯度为 30% 和 50% (7 mol/L 尿素和 40% 甲酰胺为 100% 的变性剂浓度) 的 6% 聚丙烯酰胺, 电泳缓冲液、上样缓冲液的配制见表 5。

表 5 变性梯度为 30% 和 50% 的聚丙烯酰胺、电泳缓冲液、上样缓冲液的组成

Table 5 Compositions of 30%, 50% denaturing gel, gel loading dye and electrophoresis buffers

Acrylamide 38 g	Tris base 2 mol/L	2% Bromophenol blue 0.25 mL	40% Acrylamide/bis-acrylamide 15 mL	40% Acrylamide/bis-acrylamide 15 mL
Bis-acrylamide 2 g	0.5 mol/L EDTA, pH 8.0, final conc. 50 mmol/L	2% Xylene cyanol 0.25 mL	50 $\times$ Tae buffer 2 mL	50 $\times$ Tae buffer 2 mL
Deionized water to 100 mL	Acetic acid glacial 1 mol/L	10% Glycerol 7.0 mL Deionized water 2.5 mL	Formamide (deionized) 12 mL	Formamide (deionized) 20 mL
			Urea 12.6 g	Urea 21 g
			Deionized water to 100 mL	Deionized water to 100 mL

#### (2) 变性梯度胶的配制

分别量取 9 mL 高浓度和低浓度变性胶液于 2 个小烧杯中, 分别加入 10% 过硫酸铵 40  $\mu$ L 和 TEMED (*N,N,N,N'*-四甲基乙二胺) 9  $\mu$ L, 混匀, 快速灌胶, 插入梳子, 聚合约 30 min, 胶凝固后拔去梳子, 用缓冲液冲洗加样孔。

#### (3) DNA 电泳

将胶和相关设备移至含已预热到 60 °C 的缓冲液电泳槽内, 调节缓冲液高度, 使其刚刚超过胶上加样孔。上热循环换热器使缓冲液能从槽内流至顶部槽内。向胶顶部的加样孔中加入 25  $\mu$ L 浓缩 PCR 产品, 其中包括 10  $\mu$ L 上样染料, 60 °C、恒流 35 mA 下电泳 6.5 h。

#### (4) 染色与成像

将电泳后的胶浸泡于含 50  $\mu\text{g/mL}$  溴化乙锭的 1 $\times$ Tae 缓冲液中染色 20 min, 再转入 1 $\times$ Tae 缓冲液中浸泡 15 min, 以紫外凝胶成像系统进行成像。

#### (5) DGGE 胶回收、PCR 扩增及序列测定分析

将 DGGE 电泳图上的条带分别进行回收(同一位置的条带割一条即可), 放入离心管中, 加入 20  $\mu\text{L}$  去离子水, 将其捣碎, 12000 r/min 离心 2 min, 取上清液, 以此作为模板进行 PCR 的再次扩增, 条件同前。

再次 PCR 的产物纯化后, 经连接转化, 获得阳性克隆, 交由上海生物工程技术有限公司进行测序, 方法同前。

#### 2.4.5 柱浸出液细菌的分离

取 10 mL 稍静置的柱浸出液于盛有 100 mL 9K 液体培养基的三角瓶中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$  下 150 r/min(pH 2.0 左右)恒温摇床培养约 3~4 d, 待锥形瓶中液体呈红棕色, 采用梯度稀释法, 用 pH 2.0 的 9K 培养基分别按  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  的稀释度进行 10 倍稀释, 取稀释液各 0.1 mL 均匀涂布到 9K 固体培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$  下生化恒温培养箱中倒置培养约 5~6 d, 即可获得单菌落。

#### 2.4.6 铜浸出率的测定

浸出率通过分析矿样 Cu 品位和浸出液  $\text{Cu}^{2+}$  浓度计算[用原子吸收光谱法(低浓度)或碘量法(高浓度)测定]。

$$\text{铜浸出率}(\%) = CV / (0.01\rho W) \times 100\%,$$

式中,  $C$  为浸出液  $\text{Cu}^{2+}$  终浓度(g/L),  $V$  为浸出液体积(L),  $W$  为矿样质量(g),  $\rho$  为矿样铜品位(%).

#### 2.4.7 pH 测定

采用精密 pH 计或精密 pH 试纸检测。

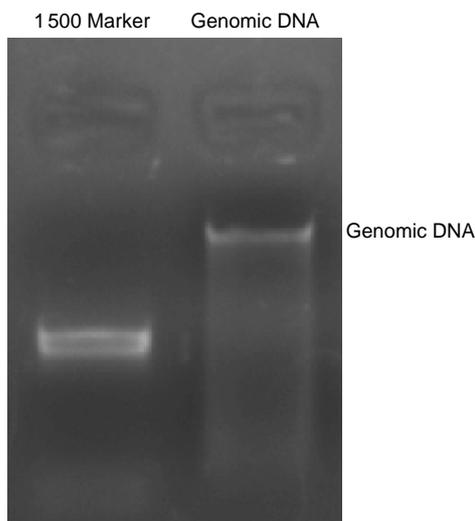


图2 柱浸细菌基因组 DNA 凝胶电泳图  
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of bacterial culture genomic DNA in column bioleaching

## 3 结果及讨论

### 3.1 柱浸出液细菌基因组总 DNA 的提取

采用分级分离多次浓缩方法对柱浸细菌浸出液进行预处理。在不同柱浸时段取出的细菌浸出液中分别加入适量离子表面活性剂 TritonX-100, 振摇一定时间, 采用多次离心方法分离矿粉和细菌, 最后将细菌浓缩。

图1为浓缩菌体显微图。可见加入离子表面活性剂可促使菌体从矿石颗粒上脱落, 从而收集到较多菌体, 为后续基因组总 DNA 的提取从量上提供一定的保障。

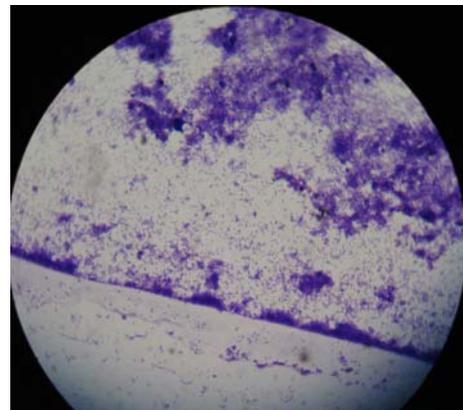


图1 浓缩后菌体显微形貌

Fig.1 Bacterial morphology in concentrated bacteria in the bioleaching of low-grade chalcopyrite ore ( $\times 1000$ )

用试剂盒提取浓缩菌体的基因组总 DNA, 用带有 GC 发夹(40 bp)的 DGGE 专有引物热启动降落 PCR 扩增 16S rDNA V3~V6 高可变区片段。图2为柱浸细菌的基因组总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图。

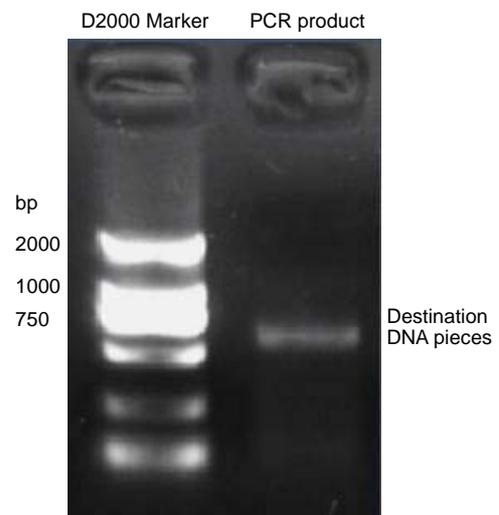


图3 16S rDNA 基因 V3~V6 区 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶(1.7%)电泳图  
Fig.3 Agarose gel (1.7%) electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA (V3~V6) gene of column bioleaching bacterial culture

### 3.2 PCR 扩增

为了检测 PCR 产物的纯度及片段长度是否符合下一步 DGGE 实验需要, 上述 PCR 结束后, 通过 1.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测目的条带. 图 3 为 16S rDNA V3~V6 区 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱, 可知 PCR 扩增的 V3~V6 区片段条带大小约为 625 bp, 且只有 1 个清晰的条带, 片段纯度和长度符合要求, 随后进行 DGGE 电泳.

在 PCR 扩增实验中, 为了提高扩增效果, 使用了热启动、降落 PCR 扩增程序. 热启动 PCR 是将反应体系中的某种成分(如 *Taq* 酶)在加热变性前先扣除, 变性彻底后, 再加入混合液并开始进入循环. 这样可以防止非特异性扩增、引物二聚体的形成等. 在 PCR 反应中, 退火温度越高, 引物与模板结合的特异性就越高. 在降落 PCR 的扩增中, 扩增的前几个循环的退火温度较高, 随后退火温度在每一个循环中逐渐降低, 这就可以使混合样品中尽可能多的 DNA 模板被扩增出来, 从而在一定程度上体现出模板中不同物种 DNA 的数量, 即 PCR 产物混合物中不同物种 rDNA 的比例, 可以反映混合模板中不同物种 DNA 的比例, 此外还有效抑制了非特异产物的积累. 采用热启动降落 PCR 避免了非特异 PCR 产物的出现, 同时不断优化条件, 尽量使低丰度的样品也能得到很好的 PCR 扩增. 本实验获得的 PCR 扩增较优条件是 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 60~50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 20 个循环; 然后 94℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 10 个循环; 72℃ 延伸 10 min.

进行 PCR 扩增时, 在正向引物 5' 端添加 40 个碱基的高 GC 片段, 目的是使 PCR 产物在含有变性剂的电泳胶中难以完全解链而保持部分解链, 从而使有序列差异的 DNA 被完全分离出来, 而无 GC 发夹的 PCR 产物会在某个梯度变性剂的电泳胶中解链为 2 条单链, 此时相同长度的此类 PCR 产物具有相同的电泳行为, 在 DGGE 中有序列差异的 DNA 就不能被完全分开<sup>[10]</sup>.

### 3.3 变性梯度凝胶电泳

将上述合格的 PCR 产物进行变性梯度凝胶电泳 (DGGE), 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 6%, 变性胶梯度为 30%~50%, 电泳时所用电压为 100 V, 时间为 9 h. 图 4 为不同柱浸时段浸出液细菌样品变性梯度凝胶电泳图.

在凝胶电泳图谱中每个条带代表 1 个不同的微生物物种, 同一迁移距离的 DGGE 条带可以认为是同一微生物物种. 从图 4 可知, 共有 6 个位置出现条带, 从下向上分别命名为 01, 02, 03, 04, 05, 06 条带.

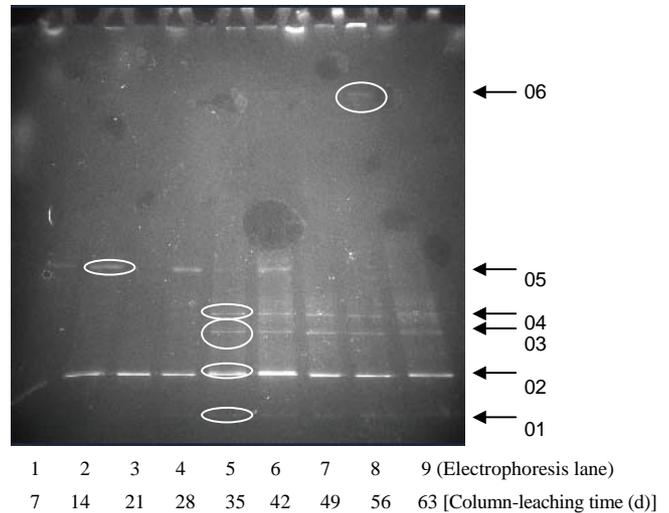


图 4 不同柱浸时段细菌样品的 DGGE 图

Fig.4 DGGE patterns of PCR amplified 16S rDNA(V3~V6) gene of bacterial samples of different periods in column bioleaching culture

### 3.4 DGGE 条带的回收及序列测定分析

将 DGGE 电泳图上的 6 个条带分别进行回收, 以此 6 条带的 DNA 为模板分别进行 PCR 的再次扩增, 再次扩增的引物无 GC 发夹. 其产物经过纯化, 通过 1.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测目的条带是否符合下一步 DNA 克隆的要求, 如图 5 所示. 从图可知, 再次 PCR 扩增出来的片段条带大小约为 585 bp, 均为单一条带. 片段纯度和长度符合要求, 随后进行克隆测序分析.

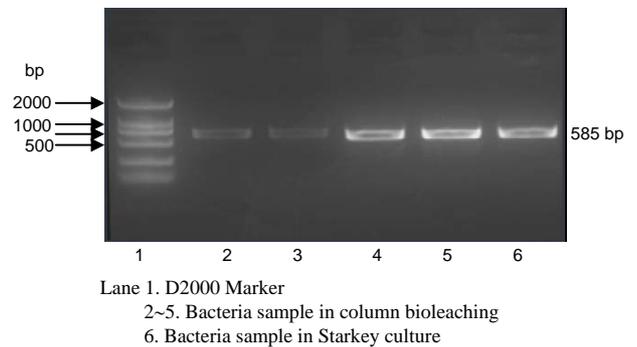


图 5 DGGE 胶回收 DNA 再次 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图  
Fig.5 Agarose gel (1.7%) electrophoresis of PCR amplified recycling 16S rDNA (V3~V6) gene from DGGE gel (primers without GC-clamp)

将经过纯化的再次 PCR 扩增产物分别进行克隆测序, 将所测序列提交 NCBI, 通过 Blastn 比对. 利用 DNASTar 软件对上述各条带所对应菌株与其相关的菌株采用 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树, BAND 标记为从 DGGE 重新扩增条带的 16S rDNA 序列, 节点数字表示经过 1000 次 Bootstrap 分析所得到的结果, 标

尺表示每 100 个核苷酸中有 2 个碱基替换,如图 6 所示.从图可知,条带 05 克隆序列与已知菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* DXH (EU084714) 的 16S rDNA 序列相似性为 98%,条带 04, 02 克隆序列与已知菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* DXH (EU084714) 的 16S rDNA 序列相似性为 99%,条带 03 克隆序列与 *A. ferrooxidans* (DQ067563)

的 16S rDNA 序列相似性为 99%,条带 01 克隆序列与 *A. ferrooxidans* BY-3 (DQ676505) 的 16S rDNA 序列相似性为 100%,条带 06 克隆序列也与 *A. ferrooxidans* DXH 具有最高的同源性,但相似度仅为 95%,通过引入外群菌株序列进行比对,可知该条带所对应的菌株仍属于嗜酸硫杆菌属.

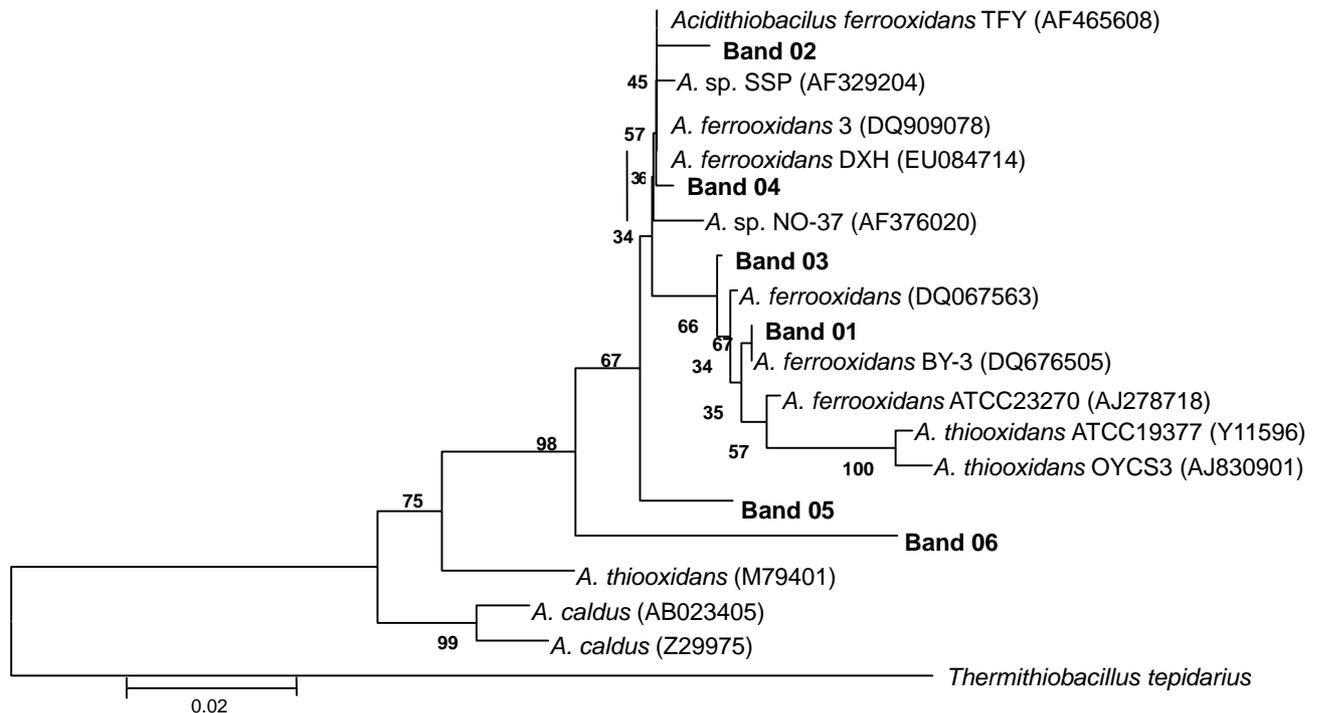


图 6 以 16S rDNA(V3-V6)序列为基础的柱浸样品克隆系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of the colonies based on the 16S rDNA (V3-V6) sequence of DGGE band of bacterial samples in different periods of column bioleaching culture

结果表明,01~05 条带对应的细菌与嗜酸氧化亚铁硫杆菌的同源性最高,它们均属嗜酸氧化亚铁硫杆菌同菌种的不同菌株.以黄铜矿为主的低品位硫化铜矿整个柱浸过程的优势菌种为嗜酸氧化亚铁硫杆菌.

### 3.5 中温硫杆菌柱浸细菌演替规律分析

从 DGGE 电泳图(图 4)可知,柱浸大致分为 3 个阶段,第一阶段(1~28 d)主要能见条带 05 和 02,其所代表的菌株占优势;第 2 阶段(29~42 d)出现新条带 04, 03 和 06,其中 04, 03 条带较亮,条带 02~05 所代表的菌株成为优势菌;第 3 阶段(43~63 d)主条带 05 消失,条带 01~04 所代表的菌株占优势.从整个柱浸过程看,最亮的 02 条带所代表的菌株始终作为优势菌起着重要作用,具有一定的应用价值.从以上现象可以得出,在细菌柱浸的 63 d 中,菌群发生了演替.由于绝大多数条带所对应的菌株均为嗜酸氧化亚铁硫杆菌,所以其演替主要发生在嗜酸氧化亚铁硫杆菌种内各菌株之间.

将图 4 和图 7 结合分析,发现柱浸早期(1~28 d) Cu 浸出率上升较快,此时细菌的种群数量较少,只有 02

和 05 两条带,主要浸出易浸的次生硫化铜矿.随着浸出继续进行,Cu 浸出率上升减缓,05 条带逐渐消失,同时却出现 01, 03, 04, 06 条带,此时细菌的种群数量大大增加,主要原因是易浸的次生硫化铜矿减少,难浸的黄铜矿相对含量增加.

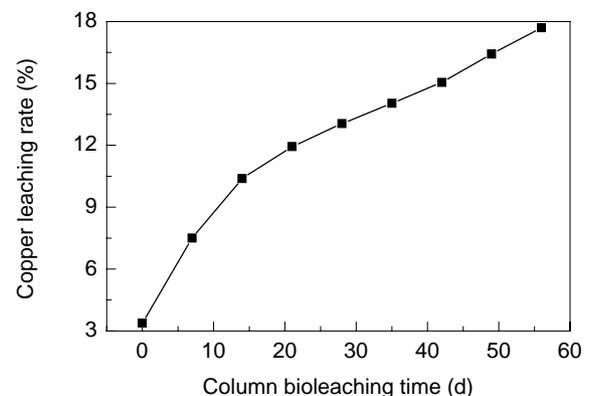


图 7 不同细菌柱浸时段的铜浸出率

Fig.7 Copper leaching rate of different periods of time in column bioleaching culture with mesophile

有研究者<sup>[11]</sup>认为浸矿体系中不同的矿种有其不同的菌群. 本实验结果证明了此观点, 易浸的次生硫化铜矿选择了 02 和 05 两条带所对应的嗜酸氧化亚铁硫杆菌菌株, 难浸的黄铜矿则选择了 01, 02, 03, 04, 06 五条带所对应的嗜酸氧化亚铁硫杆菌菌株.

### 3.6 中温硫杆菌柱浸出液纯菌株的分离

为了验证中温硫杆菌柱浸出液细菌 PCR-DGGE 分析结果的可靠性, 取柱浸细菌浸出液 0.1 mL 涂布于 9K 固体培养基, 于 37℃ 培养 4~5 d, 有白色针尖状菌

落长出, 继续培养 2~3 d, 菌落成为黄色针尖状. 随机挑取 10 个单菌落, 分别接种于 10 瓶 100 mL 的 9K 液体培养基中, 37℃ 下 150 r/min 摇瓶培养, 约 3 d 时 9K 液体培养基开始变红, 5 d 时 10 瓶 9K 液体培养基全部变红. 随机挑取 3 瓶变红的 9K 培养液, 编号为 X03, X04, X05, 高速离心浓缩细菌, 用上海生工试剂盒提取基因组总 DNA, PCR 扩增 16S rDNA, 对扩增产物进行克隆测序分析, 以 16S rDNA 全序列为基础的柱浸出液分离纯菌株克隆系统进化树如图 8 所示.

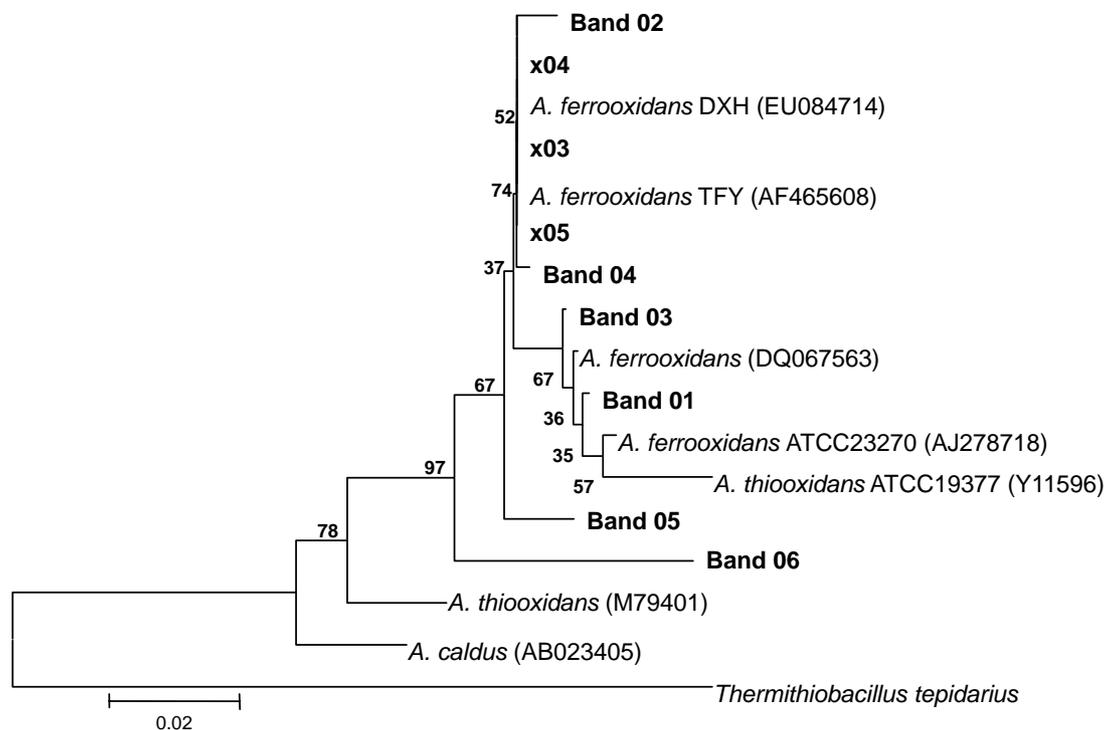


图 8 以 16S rDNA 全序列为基础的柱浸出液分离纯菌株克隆系统进化树

Fig.8 Phylogenetic tree of the colonies based on the 16S rDNA sequence of bacterial sample in column bioleaching culture

从图 8 可知, X03, X04, X05 三菌株同图 6 中条带 04 对应菌株的序列相似度最高. 同时测序结果分析表明, X03 和 X04 的 16S rDNA 全长序列相似度为 100%, 即 X03 和 X04 可能是同一株菌, 而 X05 与前两株的 16S rDNA 全长序列也相差很小, 相似度为 99%, 表明 X03, X04 和 X05 与 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的同源性也为 99% 及以上, 3 株菌仍鉴定为嗜酸氧化亚铁硫杆菌.

柱浸出液纯菌株的分离实验结果与 PCR-DGGE 分析结果相互印证, 证明以黄铜矿为主的低品位硫化铜矿生物柱浸过程确以嗜酸氧化亚铁硫杆菌 *A.f* 为优势菌种.

嗜酸氧化亚铁硫杆菌 *A.f* 能利用硫化矿中黄铜矿 ( $\text{CuFeS}_2$ ) 的还原硫和亚铁两部分能源, 具备了使矿物彻底氧化分解的生理、生化条件. 因此, 在宏观上表现为直接作用. 黄铜矿的细菌氧化作用, 直接作用占主导地

位, 嗜酸氧化亚铁硫杆菌 *A.f* 是主导菌种<sup>[12]</sup>. 尽管国内一些研究者<sup>[13-16]</sup>从其他不同角度证实了黄铜矿的细菌直接作用机理, 但至今还没有人从黄铜矿生物浸出体系细菌种群结构和演替的角度加以证明. 本工作利用 PCR-DGGE 技术在细菌冶金领域在分子水平从细菌学角度证实了以黄铜矿为主的低品位硫化铜矿生物浸出过程以直接作用机理为主, 在国内属首创.

## 4 结论

(1) 以黄铜矿为主的低品位硫化铜矿生物柱浸过程中嗜酸氧化亚铁硫杆菌 *A.f* 为优势菌种, 以直接作用机理为主.

(2) 在细菌柱浸过程中, 种群演替主要发生在嗜酸氧化亚铁硫杆菌种内各菌株之间.

(3) 易浸的次生硫化矿选择了 02 和 05 两条带所对

应的嗜酸氧化亚铁硫杆菌菌株,此时铜浸出率曲线上升较快。难浸的黄铜矿则选择了 01, 02, 03, 04, 06 五条带所对应的嗜酸氧化亚铁硫杆菌菌株,此时铜浸出率曲线上升缓慢。

(4) 优化出的 PCR-DGGE 分析技术参数切实可行。

#### 参考文献:

- [1] 肖琳, 杨柳燕, 尹大强, 等. 环境微生物试验技术 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004. 174-179.
- [2] Johnson D B. Importance of Microbial Ecology in the Development of New Mineral Technologies [J]. Hydrometallurgy, 2001, 59: 147-157.
- [3] Brierley C L. Bacterial Succession in Bioheap Leaching [J]. Hydrometallurgy, 2001, 59: 249-255.
- [4] 王涛, 柴丽红, 崔晓龙, 等. 免培养法对一热泉细菌多样性的初步研究 [J]. 微生物学报, 2003, 43(5): 541-546.
- [5] 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用 [J]. 微生物学报, 2004, 44(5): 845-848.
- [6] 邢德峰, 任南琪. 应用 DGGE 研究微生物群落时的常见问题分析 [J]. 微生物学报, 2006, 46(2): 331-335.
- [7] Casamayor E O, Pedros-Alio C, Muyzer G, et al. Microheterogeneity in 16S Ribosomal DNA-defined Bacterial Populations from a Stratified Planktonic Environment Is Related to Temporal Changes and to Ecological Adaptations [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68(4): 1706-1714.
- [8] Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, et al. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology [M]. New York: Molecular Microbial Ecology Manual, 1996. 1-27.
- [9] Andreas T, Pavel S, Yehuda C, et al. Molecular Identification of Bacteria from a Coculture by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of 16S Ribosomal DNA Fragments as a Tool for Isolation in Pure Cultures [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(11): 4210-4215.
- [10] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. 在 PCR-DGGE 研究土壤微生物多样性中应用 GC 发卡结构的效应 [J]. 生态学报, 2003, 23(10): 2170-2175.
- [11] Dopson M, Lindstrom E B. Analysis of Community Composition during Moderately Thermophilic Bioleaching of Pyrite, Arsenical Pyrite, and Chalcopyrite [J]. Microbial Ecology, 2004, 48(4): 19-28.
- [12] 张在海, 王淀佐, 邱冠周, 等. 细菌浸矿的细菌学原理 [J]. 湿法冶金, 2000, 19(3): 16-21
- [13] 李雅芹, 蔡文六, 陈秀珠, 等. 以黄铜矿为主的低品位硫化铜矿生物氧化的研究 [J]. 微生物学报, 1983, 23(2): 156-162.
- [14] 胡岳华, 康自珍, 王军, 等. 黄铜矿的细菌氧化 [J]. 国外金属矿选矿, 1997, (8): 42-45.
- [15] 张维庆, 魏德洲, 沈俊. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌对黄铜矿的氧化作用 [J]. 矿冶工程, 1999, 19(3): 330-333.
- [16] 项拥军. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌对黄铜矿的氧化作用 [J]. 金属矿山, 2000, 292(10): 24-26.

## Bacterial Population Composition and Succession in Column Bioleaching Process of Low-grade Copper Sulphide Ore

ZOU Ping<sup>1,2</sup>, ZHOU Xing-long<sup>1</sup>, ZHANG Wen-bin<sup>1</sup>, LIN Lian-bing<sup>1</sup>, ZHANG Lan-lan<sup>1</sup>

(1. Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650093, China;

2. Technology Center, Yunnan Metallurgy Group Co., Ltd., Kunming, Yunnan 650031, China)

**Abstract:** Based on PCR-DGGE analysis, there were 5 bands in DGGE patterns of PCR amplified 16S rDNA (V3~V6) of bacterial samples of different periods in column bioleaching process of chalcopyrite corresponding to bacteria which were highly related to *Acidithiobacillus ferrooxidans* with 98% sequence similarity. During the bioleaching of 63 d, the bacterial population succession took place. The bacterial succession came about among bacterial strains of *A.f.* Using a 9K solid culture medium, 3 pure strains of mesophiles were isolated, which were random-sampled from the bioleaching pulp of the ore. The sequence analysis of 16S rDNA showed that 3 pure strains were highly related to *A.f.* with 99% sequence similarity. These results indicated that the dominant bacteria in the bioleaching process of low-grade copper sulphide ore consisting mainly of chalcopyrite was *A.f.* In the early stages of bioleaching, 02 and 05 bands corresponding to bacterial strains of *A.f.* were chosen in the leaching of easily dissolved secondary copper sulphide ore. In the middle and latter stages of bioleaching, 01, 02, 03, 04 and 05 bands corresponding to the bacterial strains of *A.f.* were selected in the leaching of hardly dissolved primary ore. The technical parameters of PCR-DGGE analysis were optimized.

**Key words:** chalcopyrite; bacterial population composition; bacterial population succession; 16S rDNA; sequence analysis; *Acidithiobacillus ferrooxidans*