

紫金山铜矿浸矿微生物中一株硫杆菌的分子生物学鉴定

武名麟¹, 阮仁满¹, 翟永功², 温建康¹

(1. 北京有色金属研究总院, 北京 100088; 2. 北京师范大学 生命科学学院, 北京 100875)

摘要:对福建紫金山铜矿生物堆浸系统中的浸矿微生物进行分离纯化,对得到的纯化培养物采用了多相分类与系统发育分析方法,应用16S rRNA基因全序列分析技术,进行分子生物学鉴定、微生物形态性征与生理生化代谢特征鉴定。结果表明,该菌株归属于硫杆菌(*Thiobacillus*)属,可认定为 *Thiobacillus albertensis* 菌株。

关键词:冶金技术;生物冶金;细菌鉴定;分子生物学;16S rRNA基因;紫金山铜矿

中图分类号:TF111.311; Q93-331 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0211(2007)03-0043-06

生物冶金技术具有能耗低,投资省,流程短,污染小的优势,近年来在国内外广泛应用于低品位、难处理矿石的金属提取。位于福建上杭的紫金山铜矿是国内最早进行生物冶金工程化实践并取得成功的矿山之一,其万吨级生物提铜矿山已经建成投产^[1]。

用于生物冶金的微生物主要包括氧化亚铁硫杆菌、氧化硫硫杆菌、铁氧化钩端螺旋菌以及嗜酸性硫杆菌等化能自养菌,还包括一些异养菌,甚至一些真菌、酵母菌和藻类。多种微生物独立或协同作用促进浸矿反应的进行,构成一个完整的微生态系统^[2]。如何驾驭这些微生物,使它们在不同的矿物环境中充分发挥作用就成为生物冶金技术发展的关键问题之一。要解决这个难题,首先就要对浸矿微生物的分类归属情况进行鉴定,进而建立生物冶金微生物资源库,达到能够针对不同的矿石类型采用相应微生物来进行处理的目的。所以微生物鉴定工作是生物冶金技术中合适菌种选择应用的基础。

随着现代生物技术的发展,微生物的鉴定手段得到了不断完善,特别是分子生物学技术的发展,使微生物的分类鉴定达到了分子水平,鉴定结果更为快捷、准确。在国际上,有一些学者应用分子生物学鉴定方法对浸矿微生物进行了一些鉴定研究。如 Paul R Norris^[3], Golyshina O V^[4], Pascale De Wulf

- Durand^[5], Monica Vasquez^[6], Jaime Romero^[7], Geobel B M 和 E Stackbrandt^[8], P Pattnapitpaisal^[9]及 Joanne M Santini^[10]都进行过这方面的研究。目前国内有关这方面的研究尚未见公开报道。

研究中,采用了分子生物学鉴定、微生物形态性征测定与微生物生理生化代谢特征测定相结合的鉴定方法,对经过分离纯化的紫金山浸矿微生物进行了多相分类鉴定。

1 实验方法

1.1 混合菌群的分离与纯化

采用稀释平板、多种筛选性培养基及平板划线分离相结合的方法分离出了纯化培养物。同时对纯化培养物进行了生长行为研究。其中所选筛选性培养基配方为来自 DSMZ (German National Resource Centre for Biological Material 德国国家生物材料资源中心) 的 M882、M709 异养型、M709 自养型、M135、M70、M150、M150a、M88 共 8 种,分别编号为 1~8 号。

首先将培养于 9K 培养基中的混合菌原液转接入 1~8 号液体培养基中,观察其生长情况,若在该培养基中有浸矿菌生长,则在培养继代后进行稀释平板涂布法操作,接入固体斜面培养基后观察生长情况,若有必要则再采用平板划线分离法操作。如此反复,直至分离到纯化菌株为止。然后将该菌株转接至液体培养基中进行扩大培养。

试验中液体培养基接种量均为 10% (10mL/100mL),细菌计数均采用光电比浊法,试验中同步测量培养液的 pH 值及电位值。

收稿日期:2005-12-06

基金项目:“973”国家重点基础研究发展规划课题资助项目 (2004CB619206)

作者简介:武名麟(1974-),男,天津市人,工程师,硕士,主要从事矿物加工与生物冶金技术等方面的研究。

1.2 微生物鉴定

对纯化培养物采用了多相分类与系统发育分析方法,进行了分子生物学鉴定、形态学与生理生化代谢特征鉴定。

1.2.1 分子生物学鉴定。rRNA 分子存在于所有生物中,具有相同的生物学功能,rRNA 分子中既包括高度保守区又包含高度可变区,这些特征使 rRNA 分子成为适宜于细菌系统发育研究的“进化钟”^[11]。16S rRNA 普遍存在于原核生物和真核生物细胞之中,为蛋白质合成的必要场所,其生理功能重要而恒定。在细胞中 16S rRNA 大量存在,易于提取,基因稳定,分子量适中(核苷酸数量为 1475~1544 个)^[12-13],且信息量大而易于分析。更为重要的是 16S rRNA 基因分子序列变化缓慢,具有分子计时器的特点,其中的某些碱基顺序非常保守,以致在 30 多亿年的生物进化过程中仍保持着原始的状态,而不像另一些基因序列那样变化很大,由于 16S rRNA 基因分子中含有进化速度不同的区域,可用于进化程度不同的生物之间的系统发育研究。1977 年 Woese 等首先选择它作为研究生物进化的大分子。现在 16S rRNA 基因全序列分析已经成为细菌鉴定的常规方法之一^[14]。

研究中,以来源于大肠杆菌 16S rRNA 基因序列的保守区域为引物,利用 PCR 技术,扩增待测菌株的 16S rRNA 基因,然后将扩增产物直接测序,从而获得 16SrDNA 序列。通过相应的分子生物学软件,对所测得的序列与相关数据库中已知菌种的 16S rDNA 序列进行比对,计算聚类相似值,计算进化距离,根据相似性矩阵作出系统发育树,分析菌株系统发育地位^[13-14]。

由形态及菌落观察结果初步认定该纯化培养物为细菌,将其于适当培养基上进行继代扩大培养,采用水平空气浴摇床,150r/min,30℃,生长至该细菌的对数生长期时取样镜检,确定无杂菌后离心收集菌体。提取总 DNA,制备成模板 DNA,电泳检查其纯度和浓度,并调整模板 DNA 浓度约为 25(g/mL,进入 PCR 扩增反应。

PCR 反应是多聚酶链式反应(Polymerase chain reaction)的简称,是近年来发展起来的一种体外扩增特异性 DNA 片段的技术^[13]。该技术实际上是在模板 DNA,引物和 4 种脱氧核糖核苷酸(dNTP)存在的条件下依赖于 DNA 聚合酶的酶促反应,其特异性取决于引物和模板的特异性。

在试验中,采用了引物 P₁ 和 P₆,它们来源于大

肠杆菌 16S rRNA 基因序列的保守区域,并分别在 5' 端引入了 BamHI 酶切位点和两个保护碱基,为 16S rRNA 基因 PCR 反应的通用引物。引物配制成 50nmol/L 的浓度储存。

依次在 0.5mL 的 PCR 用薄壁管中加入 ddH₂O、10× 扩增缓冲液、MgCl₂、10mmol/L dNTP、P₁、P₆、模板 DNA、Taq DNA 聚合酶,建立扩增体系。混匀后速离心置于 PCR 仪中,进行 PCR 扩增反应。

取 5μL 扩增产物,分别与 5μL 无菌水和 2μL 上样缓冲液混合均匀后,在 0.7% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,以 200bp Ladder Marker 为标准 DNA 分子量对照物。电泳后经过 EB 染色,于 Alphamager 2200 凝胶成像系统下观察,检测扩增片段的长度和浓度。于 -20℃ 下保存扩增产物。

PCR 扩增产物委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。测序引物为引物 P₁ 和 P₆,测通。所用测序仪器为 ABI PRISM 377-96,测序试剂为 BigDye terminator v2.0。

采用 DNAMAN 软件对多个菌株 16S rDNA 序列测序结果进行碱基差异性分析,并建立 16S rDNA 序列同源树。

利用 BLAST 软件,将所测得的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的已知菌株的 16S rDNA 序列进行比较,依据比较结果选择相关菌株的 16S rDNA 序列(同时选用 E. coli 16S rDNA 序列,以衡量发育树的准确性),使用在线软件 clustalx 和 Phylogenetic Tree Prediction 及 phylip 构建系统发育树。

1.2.2 细菌的形态学与生理生化代谢特征鉴定。根据参比菌株的特征,选择等相关的生理生化测得项目对纯化菌株细胞的形态学特征和生理生化代谢特征进行测定。

形态学鉴定包括菌体形状、细胞排列方式、运动性、芽孢形状、芽孢着生方式、鞭毛着生方式、革兰氏染色、菌落特征、液体培养特征的观察和生长 pH 值范围、生长温度范围的测定。

生理生化代谢特征鉴定包括了碳源利用测定、氮源利用测定、Na₂S₂O₃ 氧化能力测定、H₂S 氧化能力测定、氧化酶测定、淀粉水解试验及 DNA 酶活性检测等,具体方法如下。

碳源利用测定。被测底物为蔗糖、麦芽糖、D-葡萄糖、甘露醇、乙醇、丙三醇。过滤灭菌,培养基中底物终浓度为 0.5%。培养基中加入灭菌 S 粉 10g,以菌悬液接种,连续转接培养三代,生长者为阳性。

氮源利用测定。将磷酸氢二铵、碳酸铵、硝酸钾

加到基础培养基中,浓度均为 0.1%。另做一份不加氮源的空白对照。培养基中加入灭菌 S 粉 10g。分别调节 pH 为适当值,分装试管,每管内培养基约 4~5cm 高。112℃ 灭菌 20~30min,制备好的培养基要求无沉淀。用接种环接种处于生长对数期的菌液于培养基中。30℃ 培养 5d 和 10d,与接种的对照管比较浑浊度,比对照管浑浊者为阳性反应,如难以判断时,可用该培养基连续转接培养 3 次,如仍明显生长则肯定阳性。

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 氧化能力测定。将 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10g 加入培养基中,培养基中加入灭菌 S 粉 10g。以菌悬液接种,连续转接培养三代,生长者为阳性。

H_2S 氧化能力测定。采用纸条法,培养基中加入灭菌 S 粉 10g,分别调节 pH 为适当值,分装试管,每管内培养基约 4~5cm 高。112℃ 灭菌 20~30min,制备好的培养基要求无沉淀。将普通滤纸剪成 0.5~1cm 宽的纸条,长度根据试管与培养基高度而定。用 10% 的醋酸铅将纸条浸透,然后烘干,放于培养皿中灭菌备用。用新鲜培养物分别接种于该培养基。接种后,用无菌镊子夹取一条醋酸铅纸条用棉塞塞紧,使悬挂于管中,下端接近培养基表面,不接触液面,适温培养。于接种后第 5, 10, 15d 观察。纸条变黑色者为阳性,不变者为阴性。另制作空白对照和阴性对照。

氧化酶测定。在干净培养皿中放一张滤纸,滴上二甲基对苯撑二胺的 1% 水溶液,仅使滤纸湿润即可,不可过湿。用白金丝接种环取 18~24h 的菌苔,涂抹在湿润的滤纸上,在 10s 内涂抹的菌苔显红色者为阳性,(四甲基对苯撑二胺为蓝色)10~60s 显红色者为延迟反应。60s 以上显红色者不计,按阴性处理。

淀粉水解试验。在适当培养基中加入 0.2% 可溶性淀粉,分装三角瓶,高压湿热灭菌 20min,冷却至 45~50℃,倒平板,在 37℃ 放置过夜备用,将供试菌株点种在平板上(每个平板点种 5 株),在 30℃ 培养形成菌苔后,在平板上滴加 Lugol 碘液(同革兰氏染色的碘液),使碘液覆盖在平板表面。如在菌苔周围或菌苔下(将菌苔移去后观察)的培养基由蓝色变为透明,为淀粉水解阳性。如在菌苔周围或菌苔下的培养基都为深蓝色,则说明该菌株为淀粉水解阴性。

DNA 酶活性检测。分别在培养基中加入 2% DNA 和 0.1% 的甲苯胺兰(Toluid - blue),制成平板培养基。接种,30℃ 培养 3~5d,若菌落周围出现粉红色晕圈则为反应阳性,反之为阴性。

2 试验结果与分析

2.1 分子生物学鉴定结果

2.1.1 DNA 提取物的电泳检测。采用上述方法提取细胞总 DNA,取 5 μL 提取物,分别与 5 μL 无菌水和 2 μL 上样缓冲液混合均匀后,在 0.3% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,上样量 5 μL 。电泳凝胶经 10mg/mL EB 染色 30min,放入 Alphamager 2200 凝胶成像系统,由波长为 302nm 的紫外光激发荧光,摄录成像,结果见图 1。在图 1 中,在凝胶上出现明亮的 DNA 条带,表明 DNA 提取试验结果良好。在上样孔中仍残留有 DNA 物质,这可能是所提细菌中存在质粒,在 DNA 提取过程中未予去除,或是 DNA 提取过程中有部分蛋白质没有去除干净,造成的轻微污染。但该残留不影响试验结果。

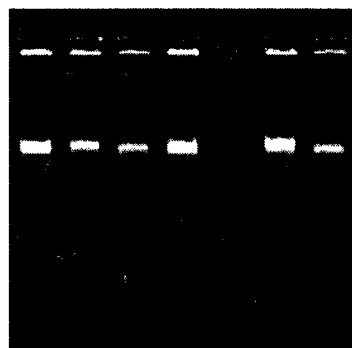
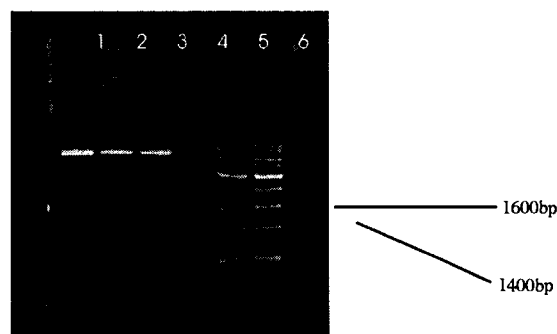


图 1 细菌总 DNA 提取物的电泳检测结果

Fig.1 Profiles of electroghotetic analysis to extract of total DNA in strain

2.1.2 16Sr DNA PCR 扩增产物的电泳检测。紫金山浸矿细菌的 16Sr DNA 序列的长度应该在 1500bp 左右。由图 2 可见,PCR 扩增产物的条带大小在 1400bp~1600bp 之间,这表明该扩增产物是目的 DNA 片段。



1 - zjs - 1; 2/3 - zjs - 3; 4 - 空白样品; 5/6 - 200bp ladder

图 2 PCR 扩增结果

Fig.2 Profiles of 16S rDNA PCR products

2.1.3 16S rDNA 扩增产物的测序结果。采用前述方法进行 DNA 测序,得到以下结果。纯化培养物测序结果,序列长度为 1438bp。

CGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGT-
AACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGGA-
CGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTGTCTTTG-
AGTGGGGGACAACCCAGGGAACTTGGGCTA-
ATACCGCATAAGCCCTGAGGGGGAAAGCGGG-
GGATCTTCGGACCTCGCGCTGGAAGAGGAGC-
CTACGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAA-
GGCCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTC-
TGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAG-
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-
GGGGAATTTTTTCGAATGGGGGCAACCCTGA-
CGAAGCAATGCCGCGTGAATGAAGAAGGCCT-
TCGGGTGTAAAGTTCTTTCGTGGAGGACGA-
AAAGGTGGGTGCTAATAACGCCTGCTGTTGA-
CGTGAATCCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC-
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGGTGC-
AAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGG-
GTGCGTAGGCGGTGCATTAGGTCTGTCTGTA-
AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCGGTG-
GAAACCGGTGTACTAGAGTATGGGAGAGGGT-
GGTGGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG-
TAGAGATCTGGAGGAACATCAGTGTCGAAGG-
CGGCCACCTGGCCCAATACTGACGCTGAGGCA-
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA-
CCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAATAC-
TAGATGTTTGGTGCCAAGCGTACTGAGTGTC-
GTAGCTAACGCGATAAGTATTCCGCCTGGGA-
AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAA-
TTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCAT-
GTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT-
ACCTGGGCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAG-
AGATGCGGGAGTGCCCTTCGGGGAATCAGAA-
CACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGT-
GTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG-
AGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCGGTT-
CGGCCGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGA-
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG-
TCCTCATGGCCTTTATGTCCAGGGCTACACAC-
GTGCTACAATGGCGGTACAGAGGGGAAGCCA-
AGCCGCGAGGTGGAGCAGACCCAGAAAGCG-
CGTCGTAGTTTCGGATTGCAGTCTGCAACTCG-

ACTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC-
GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG-
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGG-
AGTGGATTGTACCAGAAGCCGTTAGCCTAAC-
CTTCGGGAGGGCGATGACCACGGTATGGTTC-
ATGA

2.1.4 系统发育分析结果。利用 Blast 软件,应用 DNAMAN 软件将所测定的 16S rDNA 序列与 Genbank 中的已知菌株的 16S rDNA 序列进行比对^[15-16]。采用 clustalx 和 Phylip 软件对作该菌株系统发育树状图,结果见图 3,其中:TA 代表 *Thiobacillus albertensis*; 19377 为 *Thiobacillus thiooxidans* 的 ATCC19377 菌株;B53 为 *Thiobacillus thiooxidans* 的 S3 菌株;WJSo 为 *Thiobacillus thiooxidans* 的 WJSo 菌株;T 为 *Thiobacillus* sp 既某种未鉴定的硫杆菌;TF 为 *Thiobacillus ferrooxidans* 的 ATCC19859 菌株;E 为大肠杆菌 *E. coli*;ZJS-3 为待测菌株。

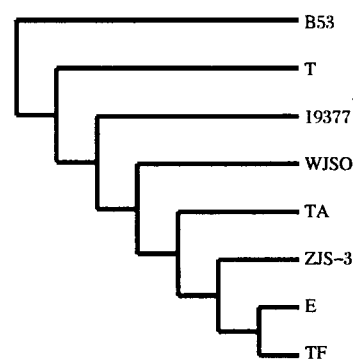


图 3 以 16S rRNA 序列为基础的系统发育树状图

Fig.3 Rooted phylogenetic tree derived from a distance matrix based on a comparison of 16S rDNA sequence

由以上数据可知,待测菌株与 *Thiobacillus albertensis* 的碱基序列基本一致,仅在第 700 位碱基上出现差异,其序列同源性高达 99.93%。同时,该菌株与 *Thiobacillus thiooxidans* (*Acidithiobacillus thiooxidans*) 的几个菌株 16S rDNA 序列同源性也达到了 97% 以上。由此可以认定该菌株归属于硫杆菌(*Thiobacillus*),即为 *Thiobacillus albertensis* 菌株。*Thiobacillus albertensis* 又名 *Thiobacillus albertis* 分别由 Bryant 等^[17]在 1988 年与 Kelly 和 Wood^[18]在 2000 年公开报道。

Thiobacillus albertensis 的已知系统归属情况为:细胞生物(cellular organisms)界,细菌(Bacteria)域,变形细菌(Proteobacteria)纲, γ -变形细菌

(Gammaproteobacteria) 亚群,嗜酸性硫杆菌 (Acidithiobacillales) 目,嗜酸性硫杆菌 (Acidithiobacillaceae) 科,嗜酸性硫杆菌 (Acidithiobacillus) 属。NCBI 分类号 (Taxonomy ID) 为 119978。

2.2 细菌的形态学与生理生化代谢特征鉴定结果

细菌的形态观察与生长条件的确定试验结果见表 1,形态特征见图 4。

表 1 菌株的形态特征和生长条件

Table 1 morphologic character and growth condition of strain

测定项目	结果	测定项目	结果
菌体形状	杆状	蔗糖	-
细胞排列方式	单生	麦芽糖	-
运动性	可运动	D-葡萄糖	-
芽孢形状	-	甘露醇	-
芽孢着生方式	-	乙醇	-
鞭毛着生方式	-	丙三醇	-
革兰氏染色	阴性	磷酸氢二铵	-
菌落特征	不规则凸起 白色 微小	碳酸铵	+
液体培养特征	浑浊 淡黄色 不贴壁生长	硝酸钾	+
生长 pH 值范围	2~6	Na ₂ S ₂ O ₃	+
生长温度范围	15~40℃	氧化酶活性	+
DNA 酶活性	+	H ₂ S 氧化能力	-
		淀粉水解能力	-

以上试验结果表明,该菌株细胞呈杆状,细胞单生,可运动,革兰氏染色呈阴性,固体菌落不规则,有凸起,显白色,菌落形态微小。该菌株不能以有机物为碳源生长,能以碳酸铵、硝酸钾为氮源生长具有氧化酶和 DNA 酶活性,不能水解淀粉,不具有硫化氢

氧化能力。该菌株最佳生长 pH 范围为 2~6,最佳生长温度范围为 15~40℃,为嗜中温嗜酸性自养菌。

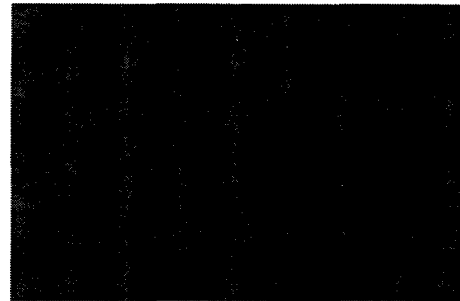


图 4 菌株形态

Fig.4 Appearance of strain

3 结论

将细菌分子生物学鉴定方法引入生物冶金领域,采用多相分类与系统发育分析方法,应用 16S rRNA 基因序列分析比对手段对对紫金山铜矿浸矿微生物经纯化得到的一株菌株进行了分子水平上的鉴定。结果表明,该菌株归属于硫杆菌 (Thiobacillus) 属,可认定是 Thiobacillus albertensis 菌株,该菌株又名 Thiobacillus alberti。Thiobacillus albertensis 的已知系统归属情况为:细胞生物 (cellular organisms) 界,细菌 (Bacteria) 域,变形细菌 (Proteobacteria) 纲,γ-变形细菌 (Gammaproteobacteria) 亚群,嗜酸性硫杆菌 (Acidithiobacillales) 目,嗜酸性硫杆菌 (Acidithiobacillaceae) 科,嗜酸性硫杆菌 (Acidithiobacillus) 属。其 NCBI 分类号 (Taxonomy ID) 为 119978。

参考文献:

- [1] 王淀佐,阮仁满,董清海. 矿物生物提取技术的研究与进展[C]//铜镍湿法冶金技术交流及应用推广会论文集. 厦门:中国有色金属学会, 2001: 2-9.
- [2] Rawlings D E. Biomining: Theory, Microbes and Industrial Process. Spriger-Verlag and Landes Bioscience [M]. New York: Spriger-Verlag and Landes Bioscience, 1997: 229-279.
- [3] Paul R Norris, Darren A Clark, Jonathan P Owen, et al. Characterization of Sulfolobus acidophilus sp. nov., and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing Bacteria [J]. Microbiology, 1996, 142: 775-783.
- [4] Golyshina O V, Pivovarova T A, Karavaiko G I, et al. Ferroplasma acidiphilum gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the Ferroplasmaceae fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 997-1006.
- [5] Pascale De Wulf-Durand, Lalette J Bryant, Lindsay I Sly. PCR-mediated detection of acidophilic bioleaching-associated bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(7): 2944-2948.
- [6] Monica Vasquez, Edward R B Moore, Romilio T Espejo. Detection by polymerase chain reaction-amplification and sequencing of an archaeon in a commercial-scale copper bioleaching plant [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 173(1): 183-187.
- [7] Jaime Romero, Carolina Yañez, Mónica Vásquez, et al. Characterization and identification of an iron-oxidizing, Leptospirillum-

- like bacterium, present in the high sulfate leaching solution of a commercial bioleaching plant [J]. *Res Microbiol*, 2003, 6(6): 154–155.
- [8] Brett M Goebel, Erko Stackbrandt. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in nature and commercial bioleaching environments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(5): 1614–1621.
- [9] Pattnapitpaisal P, Brown N L, Macaskie L E. Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr (VI) – contaminated site [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(6): 257–261.
- [10] Joanne M Santini, Lindsay I Sly, Roger D Schnagl, et al. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(1): 92–97.
- [11] 刘文彦. 新疆地区盐湖中度嗜盐菌的鉴定及其系统发育分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2003: 25–45.
- [12] 朱玉贤, 李 毅. 现代分子生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 77–78.
- [13] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 394–403.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 1–5, 399–417.
- [15] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 408–434.
- [16] 魏 群. 分子生物学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 56–59.
- [17] Bryant R D, Mc Groarty, K M Costerton, et al. Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T. albertis*) [J]. *Can J Microbiol*, 1983, 29(9): 1159–1170.
- [18] Kelly D P, Wood A P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50: 489–500.

Molecular Biological Identification of an *Acidithiobacillus* Species Separated from Mixed Microbial Populations in Zijinshan Copper Mine Bioleaching Plant

WU Ming-lin, RUAN Ren-man, ZHAI Yong-gong, WEN Jian-kang

(1. General Research Institute for Nonferrous Metals, National Engineering Laboratory of Biohydrometallurgy, Beijing 100088, China; 2. College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract

The mixed microbial populations from the bioleaching plant in Zijinshan Copper Mine is separated and purified, and the identification based on the molecular biological, morphologic and physiologic methods of the microbe depurated and cultured are conducted by polyphasic taxonomy and phylogeny analysis with application of the 16S rDNA sequences and DNA homology technology. The results show that the depuration strain is a moderately thermophilic acidophiles belongs to *Thiobacillus* genus and considered as *Thiobacillus albertensis* strain.

Keywords: metallurgical technology; bioleaching; bacterial Identification; molecular biology; 16S rRNA; Zijinshan Copper Mine