

Bacillus spp.的筛选鉴定及浸矿渣效果研究*

成应向^{1,2} 王强强^{1,2△} 许有泽^{1,2} 钟振宇^{1,2}

(1 湖南省环境保护科学研究院 湖南 长沙 410004 2 水污染控制技术湖南省重点实验室 湖南 长沙 410004)

摘要 目的 研究 Bacillus spp.的生长特性及浸镉渣效果。方法 采用 9K 培养基划线分离纯化目标菌种,利用传统的测定方法测定其生长特征,采用 16S rDNA 对菌株进行分子生物学鉴定,最后对该菌株浸三种矿渣浸出效果进行了分析。结果 该微生物形态为扁球形,革兰氏染色呈阳性,能运动,单生鞭毛,最适生长温度 30℃,最适 pH 值为 3,代谢类型为兼性营养型,耐受 NaCl 浓度为 4%,微生物氧化酶为阴性,接触酶为阳性。经鉴定该菌株属于 Bacillus 属。以 5%的接种量,培养基 pH 为 3 条件下,镉浸出效果较好,沉渣中浸出率为 90.4%,其余两种渣中浸出效果最佳。结论 Bacillus spp.可应用于镉渣中镉的浸出。

关键词 Bacillus spp. 分离鉴定 矿渣 生物浸出

中图分类号 Q939.99, X172 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 02-256-06

Study on Screening and Identification of Bacillus spp. and its Leaching Properties of Slag*

CHENG Ying-xiang^{1,2}, WANG Qiang-qiang^{1,2△}, XU You-ze^{1,2}, ZHONG Zhen-yu^{1,2}

(1 Hunan Research Academy of Environment Science, Changsha, 410004, China;

2 Hunan Key Laboratory of Water Pollution Control Technology, Changsha, 410004, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the growth and the leaching residue of Bacillus spp. **Methods:** The target species were isolated and identified by 16S rDNA electrophoresis. Traditional method was used to detect their growth characteristics. Leaching properties of three types of slags were analyzed. **Results:** The spherical form of the microbial plants is flat and the gram stain G+. The organism is movable, solitary, with an optimum growth temperature of 30 °C, an optimum pH of 3, a facultative type of metabolism and a salinity tolerance of 4%; The microbial oxidase is negative and catalase positive. By molecular biology analysis, it was identified that this indigenous microorganism belongs to Bacillus spp. An optimistic result was attained under the conditions of 5 % of microbial inoculum and the medium pH 3: the leaching rate of Cd was 90.4 % in the sediment. The optimum results can be found in the other two slags. **Conclusion:** Bacillus spp. can be applied in the leaching of Cd in slag.

Key words: Bacillus spp.; Identification; Leached residue; Bio-leaching

Chinese Library Classification(CLC): Q939.99, X172 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)02-256-06

前言

生物冶金技术通常指矿石经自然界存在微生物的氧化,从矿石中溶解出有价值金属的方法^[1-2]。生物冶金技术是本世纪最为活跃的学科之一,与传统工艺相比成本低、无污染、能有效处理低品位矿产资源,其开发利用有着广阔的前景^[3]。生物法冶金涉及到的微生物种类繁多^[4],目前就浸出机理可分为 3 种:第一,氧化硫化矿物、元素硫和亚铁^[5],主要用于硫化矿浸出,其作用微生物是氧化亚铁硫杆菌等硫化细菌;第二,异养微生物产生的有机物、过氧化物破坏矿物,氧化或还原不同价态元素^[6],主要用于非硫化矿浸出,例如,采用硅酸盐细菌脱除铝土矿中杂质硅^[7]。第三,化学元素的微生物积累和沉淀^[8],用于从各种溶液中去掉或回收有毒或有害金属,这些细菌主要由一些真菌组成^[9]。微生物的多样性影响其所在生态系统的生化反应。其组成和活性能够反应所在生态系统的运行状况。传统的培养方法虽然可以检测环境中的活细胞,但不能全面地反映微生物区系组成状况,而且很多研究表明环境中的大部分的微生物不能被分离^[10]。较之传统培养方法,采用遗传指纹图谱技术可直接对环

境中微生物总 DNA 进行研究,避免了纯培养的步骤,缩短处理时间^[11]。本论文利用 16S rDNA 对课题组分离的高效浸镉菌种进行分子生物学鉴定,并对其生理生化特性和几种矿渣浸出效果展开了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

9K 培养基: (NH₄)₂SO₄ 3.0g, KCl 0.1g, K₂HPO₄ 0.5g, Mg-SO₄ 0.5g, Ca(NO₃)₂ 0.01g, FeSO₄·7H₂O 44.1g。用去离子水定容至 1000mL,用 1 :1H₂SO₄ 调整其 pH 值为 2。

固体培养基: 9K 培养基 +1.2 %琼脂,调整 pH 值到 3,9K 培养基和琼脂分开灭菌再混合。

1.2 渣样理化参数

供试沉渣 pH 为 6.5,为酸性渣。通过能谱分析发现沉渣中重金属元素有 Zn、Pb、Mn、Cd 和 Cu 等,含量依次为 62350mg/kg、29530mg/kg、7650mg/kg、4530mg/kg 和 830mg/kg,且主要以非晶态存在于渣中。

1.3 微生物的分离纯化

* 基金项目 湖南省科研机构技术创新发展专项基金支持项目 (2010TF1012)

作者简介 成应向 (1965),男,副研究员,主要从事环境科研

△通讯作者 王强强, Tel: +86-15173250695, E-mail: wqx1221@yeah.net

(收稿日期 2011-05-28 接受日期 2011-06-23)

分离所采用的培养基为固体 9K 培养基,即在培养基中加入 1.2% 的琼脂。采用稀释平板法进行分离纯化。纯化主要步骤如下:(1)制备稀释液:称取渣样 10g,放入 100 mL 无菌水中,30℃ 下,摇床上振荡培养 5d,低速率下离心上清液。用无菌枪头吸取上清液 100mL 加入 900mL 无菌水中,用无菌水稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 共八个浓度梯度。(2)培养:利用制备好的各浓度的稀释液,涂于灭菌的 9K 固体培养基平板。倒置恒温箱内 30℃ 培养。(3)富集培养:经过 3-4d 的培养,待平板上长出菌落后,根据形态挑取单细菌菌落于 100 mL 灭菌的 9K 液体培养基中,摇床上 30℃ 恒温振荡培养。(4)纯化:采用平板划线分离法进行纯化。涂平板检验直到获得纯培养。制备得到纯培养后采用甘油保存法。在菌种管中,加入 1 mL 30% 的甘油,灭菌后加入 1 mL 细菌培养液,使甘油终浓度为 15%, -20℃ 下冻存,待用。

1.4 生化特征测定

(1) 氧化酶测定 选取一片干净的滤纸,并在其上滴加 1% 二甲基对苯撑二胺溶液,使滤纸润湿即可。用接种环挑取 3-5 天的菌苔,涂抹在润湿的滤纸上。若在 10s 内涂抹的菌苔现红色,则其氧化酶为阳性,10-60s 之间出现红色,按阴性处理,60s 以上出现红色不计。

(2) 接触酶测定 用接种环挑取 3-5 天培养的菌种,涂抹于滴有 3% 过氧化氢的干净玻璃片上,若有气泡产生则为阳性,无气泡则为阴性^[12]。

1.5 微生物浸出及重金属测定

微生物浸出:量取 100mL 配制好的 9K 培养基于 250mL 锥形瓶中,加入适量的沉渣,培养基 pH 为 3,接种菌液量为 5%,放入回转式恒温培养箱中进行培养,设置摇瓶转速约为 120r/min,检测浸出液中 Cd、Cr、Cu、Pb、Zn 含量,每个样品做三次平行。

重金属含量测定:准确称取干燥后的渣 0.5g 于 100mL 的聚四氟乙烯坩埚中,用微量蒸馏水将样品润湿,然后在坩埚内加 10mLHCl,将坩埚于砂浴电热板上加热,控制温度在 120-140℃,蒸发至约 5mL 时加入 15mL 浓 HNO₃,继续加热至近粘稠状,加入 10mLHF 继续加热,为达到良好的飞硅效果,经常摇动坩埚。再加 2mL HClO₄,加盖消解,蒸至白烟冒尽时取下坩埚,加 1mL 浓 HNO₃ 及少量蒸馏水,继续加热直至残渣全部溶解,转移并定容至 50mL。浸出液中的 Zn、Pb、Cd、Cu、Cr 等元素的含量采用原子吸收分光光度法测定。所用器皿在清洗后用 15% 的硝酸溶液浸泡,然后再用去离子水清洗后烘干,备用。

1.6 菌株的分子生物学鉴定

1. 细菌总 DNA 的提取^[13]

(1) 菌体的培养:以 5% 的接种量在 100mL 9K 液体培养基中接入菌株,在 500mL 摇瓶中培养 72-96 小时。

(2) 菌体的收集:培养至对数期,12000r/min,10min 收集菌体。

2. DNA 的提取和纯化:

将离心收集后的菌体用 pH 8.0 的 TE 缓冲液即 10 mmol/L Tris-HCL;1 mmol/L EDTA,反复冲洗菌体,然后悬浮于 50 mmol/L Tris-HCL;5 mmol/L EDTA, pH 8.0 的缓冲液中;37℃ 下加溶菌酶 (0.5-1 mg/mL) 并摇动 30min;60℃ 下加 SDS (10%-20%)至终浓度 1-2%,摇动 10min 将菌液在分别在 -20℃、65℃ 下反复冻融,以致细胞充分破裂;加入 20mg/mL 蛋白酶 K 加等体积的苯酚-氯仿-异戊醇,12000 r/min 下离心 5min;取水相加入等体积的氯仿-异戊醇,12000 r/min 下离心 5min,取水相加入 50μg/mL 的 RNA 酶,温浴 10min 加入 1/10 体积 3mol/L, pH5.2 的乙酸钠;2 倍体积无水乙醇,过夜用 70%乙醇反复冲洗 DNA,于 TE 缓冲液中保藏,备用。

3. PCR 扩增

样品 16SrDNA 扩增程序,连接、转化和克隆等操作均采用 Yin H. Q^[14]等文献报道的方法。用灭菌的牙签挑取菌斑(切忌挑选卫星斑,尽量挑选较大的单个菌落),溶于 50 μL TE buffer 中,在 PCR 仪上 99℃ 破壁 5 min。然后,取破壁液作为模板 DNA 进行菌落 PCR 实验。在菌落 PCR 实验中,使用的前后引物为 M13 F 和 M13 R,其序列分别为 M13F (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3') M13R (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3')。菌落 PCR 扩增的反应体系与反应程序与 16S rDNA 扩增相同,只是用 M13 F 和 M13 R 引物替代细菌扩增的引物。

2 结果

2.1 细菌形态学特征

将培养好的菌液涂于固体培养基平板,30℃ 恒温培养 3-5 天,观察其形状、大小、边缘、表面、隆起形状、透明度、菌落及培养基的颜色等。菌株在 9K 固体培养基上生长 3-5 天后,发现形成橘红色菌落 (1-2mm) (见图 1A)。将菌株于 9K 液体培养基中恒温振荡培养适合时间后染色镜检。光学相差显微镜下观察细胞形态、大小及运动性 (见图 1B)。用结晶紫草酸胺染色法作革兰氏染色。采用扫描电镜观察土著微生物形态,并且拍照 (图 1C)。研究发现该微生物形态为球形,革兰氏染色呈阳性,能运动,单生。

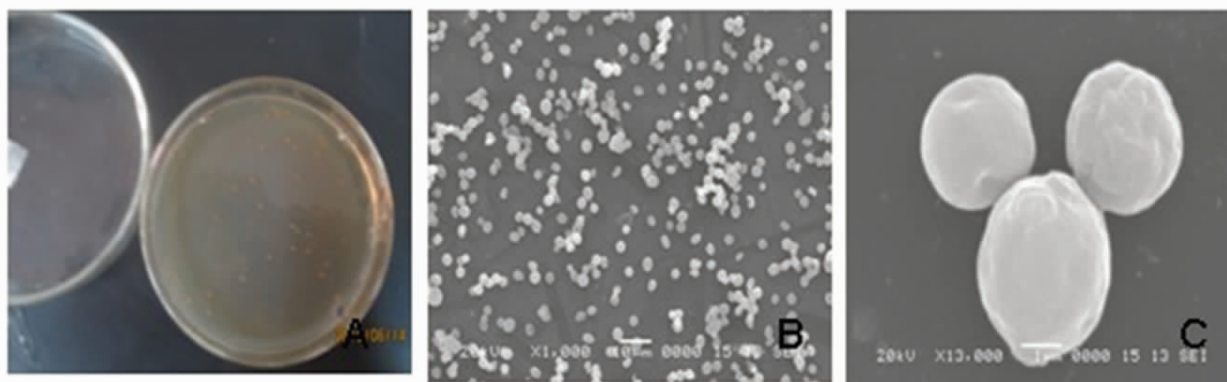


图 1 菌落形态及扫描电镜下微生物形态

Fig.1 Cultural features and pictures in scanning electron microscopy of microorganism

2.2 细菌生理特征

2.2.1 最适生长温度 将 5mL 的幼龄菌液接入 30mL 的 9K 液体培养基中, 分别放入 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃ 恒温摇床中, 120r/min 下振荡培养 96h 后, 测定培养物的 OD₆₀₀ 值。

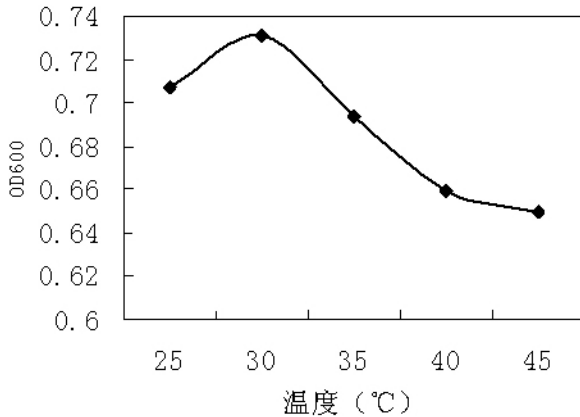


图2 温度对菌种生长的影响

Fig.2 Influence of temperature on growth of strain

由图 2 所示, 该菌种的最适生长温度为 30℃, 在 25℃-45℃ 范围内都能较好的生长, 为常温菌。温度对生物的影响主要是通过影响生理代谢过程中酶的活性, 并且每种酶的活性都有最低温度、最适温度、最高温度。温度超过生物体的耐受限度, 其体内酶活性被抑制, 生长受阻。

2.2.2 最适初始 pH 值 制备 pH 值 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 的 9K 液体培养基, 将等量 5mL 菌液分别接入 30mL 液体培养基, 保证各培养瓶中接入的菌液浓度一致。120r/min 培养微生物, 定时测定培养物的 OD₆₀₀ 值。

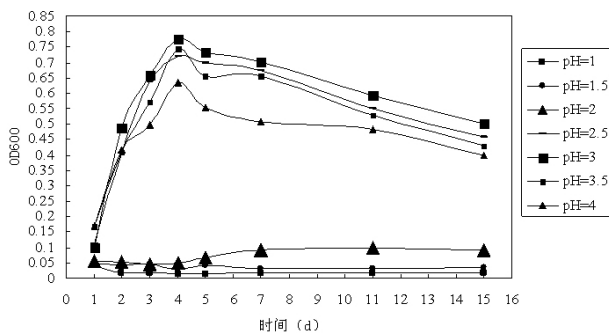


图3 初始 pH 值对微生物的影响

Fig.3 Influence of pH on growth of microorganism

由图 3 可知, 该微生物在 pH 值小于 2 的环境中不能生长。当 pH 值高于 4.0 时, 细菌生长受到抑制, 吸光度降低, pH 值为 3 是生长最适 pH 值。

2.2.3 Fe²⁺ 氧化检测 制备含 4.41%FeSO₄ 的 9K 液体培养基, 加入的菌液接入 30mL 的 9K 液体培养基中, 设一个空白对照(防止 Fe²⁺ 自身氧化的干扰), 120r/min, 30℃ 下振荡培养, 观察微生物的生长。亚铁离子在 pH 值 3-9 之间的溶液中与邻菲罗啉生成稳定的橙红色络合物, 在测量波长为 510 nm 下测定亚铁离子浓度。Fe³⁺ 则是总铁减去 Fe²⁺。由图 4 可知在微生物作用 1d 后 Fe²⁺ 浓度开始降低, 2d-5d 降低趋势最为明显。表明该微生物

能够氧化 Fe²⁺。

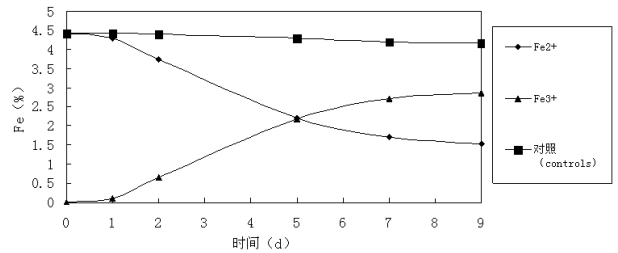


图4 Fe²⁺→Fe³⁺ 氧化曲线

Fig.4 The oxidation curve of Fe²⁺→Fe³⁺

2.2.4 有机能源利用 分别制备含 1%有机物的 9K 液体培养基 (不投加 FeSO₄), 将 5mL 等量的菌液分别接入 30mL 的 9K 液体培养基中, 设置空白对照组, 120r/min, 30℃ 下振荡培养, 观察培养物的生长, 结果见图 5。由图 5 可看出, 该菌对葡萄糖有微量的利用, 而对果糖、蔗糖和乳糖都未能利用, 但是该菌种能够利用乙酸钠进行生长。微生物通过生物氧化反应获得能量, 不同种类的微生物, 能分别利用不同的有机物或无机物为基质, 以分子氧或无机物或小分子有机物为最终电子受体, 通过生物氧化, 获得能量, 由图 5 结果可知, 该微生物属兼性营养型细菌。

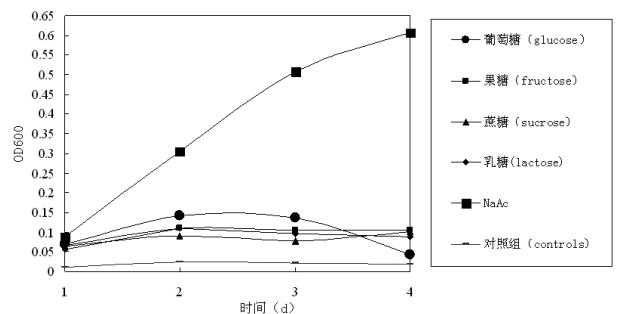


图5 不同有机培养基中的生长

Fig.5 The growth of microorganism on the different organic medium

2.2.5 耐受盐度分析 分别制备含 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% NaCl 的 9K 液体培养基, 将 5mL 等量的幼龄菌液接入 30mL 的上述液体培养基中, 0%为对照组, 120r/min, 30℃ 下振荡培养, 观察培养物的生长情况。

由图 6 结果可知, 该菌种耐受盐度范围较窄, 当盐度为 6% 时, 对微生物生长产生严重影响。生长耐受盐度的范围为小于 4%。当环境介质的盐度大于细胞内部浓度时细胞会引起细胞失水。当内部浓度大于细胞外部浓度, 细胞会自动吸水, 细胞溶胀。盐度作为影响微生物生长的重要生态因子之一, 根据限制 Shelford 耐性定律, 微生物的最佳耐受盐度为 4%。

2.3 细菌生化特征研究

根据的 1.3.1 和 1.3.2 的测定方法, 该微生物的氧化酶为阴性, 接触酶为阳性。

2.4 16S rDNA 基因序列分析

提取微生物的基因组 DNA, 利用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增微生物的 16S rDNA, 再回收及纯化 DNA, 将纯化后

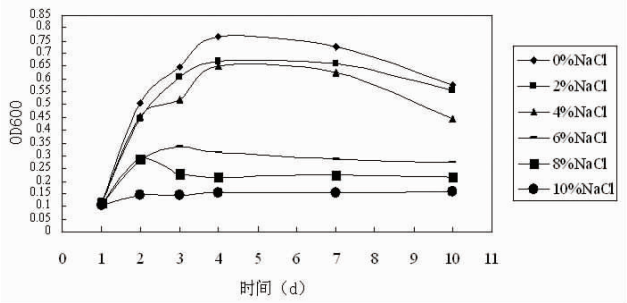


图 6 耐受盐度对菌种生长的影响

Fig.6 Influence of concentration of NaCl on growth of microorganism

的 DNA 产物进行 pGM-T 载体连接,转化,挑取含重组质粒的转化子的菌落进行测序。通过 16S rDNA PCR 扩增产物的电泳检测得到以下结果:检测结果显示,PCR 扩增产物的条带大小在 1200bp~2000bp 之间,见图 7。这表明该扩增产物是目的 DNA 片段。扩增鉴定土著微生物的 16S rDNA 基因,并对其进行序列的测定,序列长度为 1514bp。

将微生物菌株的 16S rDNA 序列提交到 Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中,用 BLAST 程序对土著微生物的 16S rDNA 基因序列和 Genbank 中已登录的 16S rDNA 基因序列进行核苷酸同源性比较,图 8。结果发现该微生物属于

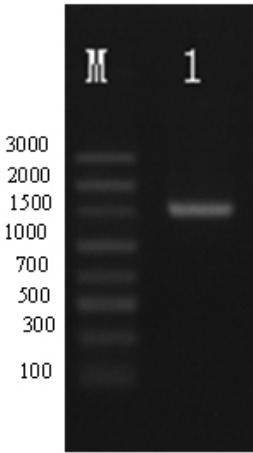


图 7 PCR 扩增结果 M 对照; 1 分离菌株

Fig.7 PCR results M Control group 1 Isolated strain

Bacillus 属。芽孢杆菌属呈杆状居多,扫描电镜下检测结果呈扁球状,实验操作过程在无菌室内进行,且做平行样检测结果,PCR 样品染菌的可能性较小。因此,呈球形的可能原因是:1、该微生物是在大量沉渣中分离纯化而来,形态特征发生变异。2、该微生物菌属在自然界中有以扁球状存在的细菌。

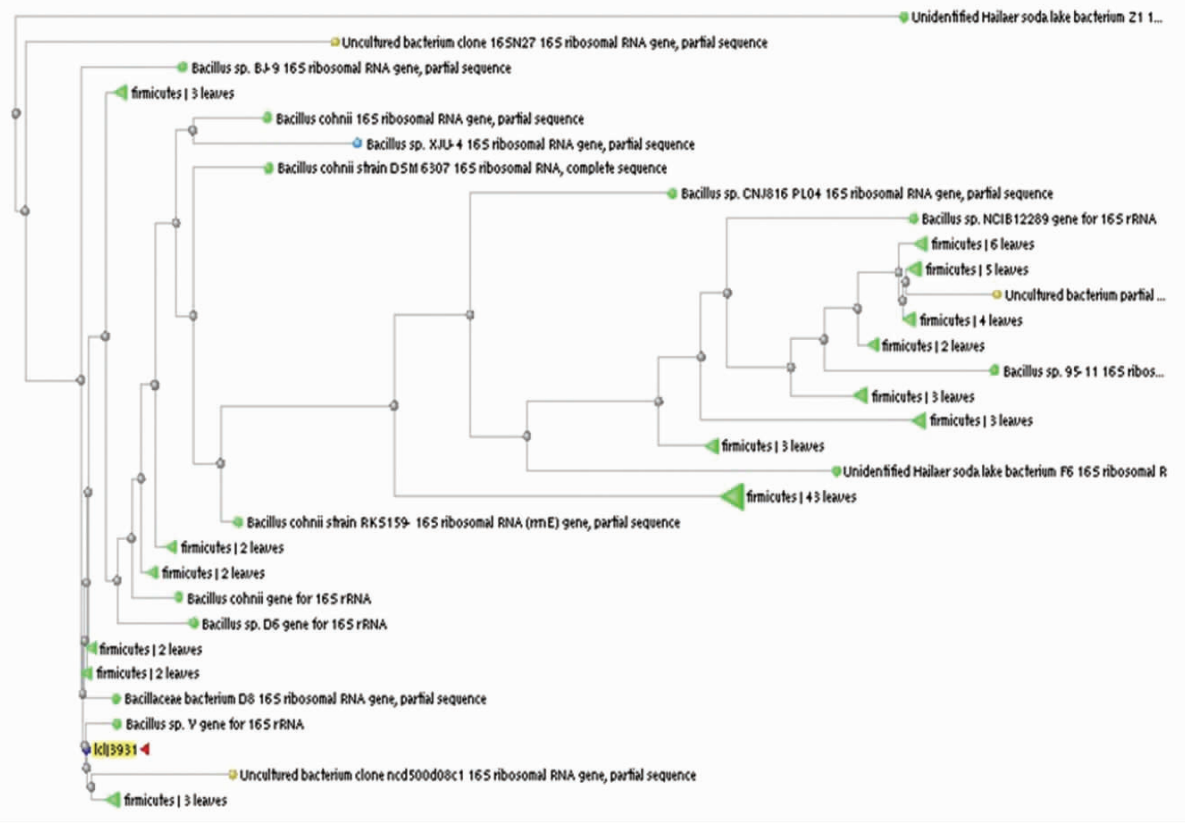


图 8 细菌系统进化树

Fig.8 Phylogenetic relationships among related acidophilic heterotrophs based on analysis of 16SrRNA gene sequences

3 讨论

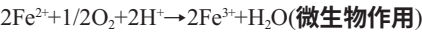
3.1 pH 值对微生物生长的影响

pH 值对微生物的生命活动的影响主要作用于:引起细胞膜内电荷的变化,影响了微生物对营养物质的吸收,影响代谢过程中酶活性;以及改变生长环境中营养物质的供给、有害物

质的毒性^[17]。最适 pH 条件下酶活性最高,微生物的生长速率较其它 pH 值条件下高。微生物在基质中生长,代谢作用改变了介质中 H⁺ 浓度。随着介质中 pH 值的不断变化,微生物生长受阻。所以为了维持微生物生长过程中 pH 值的稳定,配制培养基时要注意调节 pH 值,且还需加入缓冲物保证介质中 pH 值在微生物生长繁殖过程中保持稳态。

3.2 Fe²⁺ 转化

检测微生物的主要作用机理是利用其代谢产物高价铁与渣中重金属发生氧化 - 还原作用^[18-19]。高铁被还原成亚铁,金属以离子的形式溶解出来,而亚铁又被微生物氧化成高铁,构成一个氧化 - 还原的循环系统^[20]。通过微生物淋滤,系统 pH 下降到,这又大大促进了渣中重金属的溶解,其反应如下:



3.2 对不同种类渣的浸出效果

在自然界中,除了氧化亚铁硫杆菌等硫化细菌能够浸出金属外,还有一些微生物如曲霉、青霉等也可以浸出矿物中的金属元素。这种微生物生长时能产生大量的有机酸,这些有机酸在浸矿过程中不仅提供酸解矿物的 H⁺, 还具有较强的还原作用以及与金属形成络合物的螯合作用,可以加速矿物的溶解^[21]。利用该微生物 (Bacillus spp) 对某大型冶炼厂渣进行实验研究,实验结果见下表,以去离子水浸出和采用硫酸调节 pH 为 3 的酸浸出作为对照实验。浸出体系采用 9K 培养基,最适初始 pH 值为 3,浸出时间 4d,温度 30℃,矿浆浓度 5%。由表可看出对不同种类的渣中的重金属都有一定的浸出效果。

表 1 土著微生物浸出不同种类渣

Table 1 The result of different kinds of slag in Indigenous microorganisms

渣渣 (Sediment)					
	Cd	Zn	Cu	Pb	Cr
重金属含量 (Heavy metal content)	17.89g/kg	17.1 g/kg	0.02 g/kg	0.478g/kg	0.21 g/kg
水浸出率 (Water leaching rate)	22.5%	19.3%	0	5.6%	0
酸浸出率 (Acid leaching rate)	49.3%	29.8%	0	7.1%	0
微生物浸出率 (Microbial leaching rate)	90.4%	68.0%	12.96%	27.5%	99%以上
水淬渣 (Water quenching slag)					
重金属含量 (Heavy metal content)	0.077g/kg	43.95 g/kg	0.78 g/kg	6.89 g/kg	0.16 g/kg
水浸出率 (Water leaching rate)	40.7%	3.3%	0	2.7%	0
酸浸出率 (Acid leaching rate)	47.3%	5.7%	0	5.5%	0
微生物浸出 (Microbial leaching rate)	78.7%	19.7%	17.1%	13.6%	74.33%
烟化炉渣 (Fuming furnace slag)					
重金属含量 (Heavy metal content)	0.113g/kg	28.3 g/kg	0.88 g/kg	49.43g/kg	1.3 g/kg
水浸出率 (Water leaching rate)	7.1%	1.3%	0	0.03%	0
酸浸出率 (Acid leaching rate)	21.4%	2.7%	0	0.04%	0
微生物浸出 (Microbial leaching rate)	49.7%	22.4%	12.3%	4.3%	20.4%

由实验结果可知,该土著微生物能够较好的浸出渣中的一些重金属元素,渣渣中 Cd、Cr 浸出率均在 90%以上。水淬渣效果中重金属元素的浸出较渣渣弱, Cd 浸出率 78.7%、Cr 浸出率为 74.33%。液化炉渣中大部分重金属都很少浸出,Cd 浸出率较其它几种元素较好,为 49.7%。重金属的浸出率不尽相同、主要与渣的组成及结构密切相关。渣渣为污水处理后沉淀物,

其组成和结果与渣不同,所以其浸出率较高。

4 结论

- 1) 该微生物形态为球形,革兰氏染色呈阳性,能运动,单生。
- 2) 微生物的基本生理特征 :最适生长温度 30℃,最适初始

pH 值为 3 ,代谢类型为兼性营养型 ,耐受盐度为 4%。

3) 微生物的生化特征 :微生物氧化酶为阴性,接触酶为阳性。

经鉴定该土著微生物属于 *Bacillus* 属,并且对不同种类渣中的重金属都有一定的浸出效果。

参考文献 (References)

- [1] 李雄,柴立元,王云燕.生物浸矿技术研究进展[J].工业安全与环保, 2006,32(3):1-3
Li Xiong, Chai Li-yuan, Wang Yun-yan. Research Progress on Bioleaching Technology[J]. Industrial Safety and Environmental Protection, 2006,32(3): 1-3(In Chinese)
- [2] Rawlings DE. Heavy metal mining using microbes[J].AnnuRev Microbial, 2002,56: 65-69
- [3] Brett JB, Banfield JF. Microbial communities in acid mine drainage[J]. FEMS microbial.LEcol, 2003,44: 139-152
- [4] 王清良,刘迎九,杨光辉,等. 721 铀矿石细菌渗滤浸出及细菌的驯化培养研究[J].金属矿山. 2003,(10) : 37-39
Wang Qing-liang, Liu Ying-jiu, Yang Jin-hui, et al. Study on Bacteria Permeating Leaching of Uranium Ore and Domesticated Incubation [J]. Metal Mine. 2003,(10) : 37-39(In Chinese)
- [5] Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, et al. Bioleaching review PartA:Progress in bioleaching: Fundamentals and mechanisms of bacterial meral sulfide oxidation [J]. Appl Microbiol Biorechnol, 2003,63: 239-248
- [6] Castro IM, Fietto JLR. Bioleaching of zinc and nickel from silicates using *Aspergillus niger* cultures[J]. Hydrometallurgy,2000,57: 39-49
- [7] Leduc LG, Ferroni GD. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. FEMSMicrobiol .Rev. 1994, 14:103-120
- [8] Mishra SP, Roy CG. Kinetics of Zn²⁺ adsorption by *Penicillium* sp[J]. Hydrometallurgy,1996, 40: 11-23
- [9] Mera MU, Beveridge TJ. Mechanism of silicate binding to the bacterial cell wall in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1993,175 (7): 1936-1945
- [10] Amann, R. I, Ludwig W, Schleifer K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1995, 59(1-3):143-169
- [11] Davidson C M, Duncan A L, Littlejohn D, et al. A critical evaluation of the three-stage BCR sequential extraction procedure to assess the potential mobility and toxicity of heavy metals in industrially- contaminated land [J]. Analytical Chimical Acta, 1998, 363(1): 45-55
- [12] Hutchins SR. Microorganisms in Reclamation of Metals [J]. Annual Review of Microbiology, 1986, 40(3): 311-336
- [13] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 EF,曼尼阿蒂斯 T.分子克隆实验指南(第二版)[M].北京:科学出版社,2002
- [14] Yin H. Q, Qiu G. Z, Wu L. Y. Microbial community diversity and changes associated with a mine drainage gradient at the Dexing copper mine, China [J]. Aquatic Microbial Ecology, 2008, 51(1): 67-76
- [15] He Z. G, Xiao S. M, Xie X. H. Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine [J]. Extremophiles, 2007, 11:305-314
- [16] Jack B, Hughes MN. Metal Extraction by Bacterial Oxidation of Minerals[M].New York, London, Toronto, Sydney, Tokyo, Singapore: Ellis Horwood.1, 1993,115
- [17] Bosecker K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms[J]. FEMS Microbiol. Rev, 1997, 20: 591-604
- [18] Tyagi R D, Tran FT. Bacterial leaching of metal from digested sewage sludge by indigenous iron²⁺ oxidizing [J]. Environ. Pollut., 1993, 82: 9-12
- [19] Johoson DB. Acidophilic Microbial Communities: Candidates for Bioremediation of Acidic Mine Effluents[J]. International Biodeterioration & Biodegradation,1995,56:41-58
- [20] Nalini J, Sharma DK. Biohydrometallurgy for nonsulfidic minerals - A review[J]. Geomicrobiology Journal, 2004, 21: 135-144
- [21] 周吉奎,钮因健.一株浸矿微生物的筛选及对铝土矿的除铁效果[J].金属矿山,2006,2:36-40
Zhou Ji-kui, Niu Yin-jian. Screening of Microorganism for Bioleaching and Its Effect of Removing Iron from Bauxite Ore[J].Metal Mine, 2006, 2:36-40(In Chinese)