

金矿化指示菌的分子生物学鉴定

杨娇艳¹, 张勇^{1,2}, 王红梅³, 宋冬林², 程琴¹, 梅娟¹, 吴刚¹

1. 华中师范大学生命科学学院, 湖北武汉 430079

2. 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071

3. 中国地质大学环境学院, 湖北武汉 430074

摘要: 近年来, 土壤微生物蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)芽孢计数对下伏金矿化的指示作用已被不同国家的地质工作者所证实, 但由于鉴别手段的限制, 对金矿化指示菌株的鉴定一直停留在传统的微生物分类鉴定上, 本研究将分子生物学的技术引入到金矿化指示菌株的鉴定中, 从而将微生物找矿中的微生物鉴定手段提高到分子水平。从湖北省嘉鱼县蛇屋山金矿区分离到的矿化指示菌株中随机挑取2株菌 Y1 和 Y2, PCR 扩增并测定其 16S rDNA 和 16S-23S rDNA 区间序列, 经系统发育和生理生化试验综合分析, 表明 Y1 为蕈状芽孢杆菌(*B. mycooides*), Y2 为蜡样芽孢杆菌, 两者都属于蜡样芽孢杆菌群, 证明蜡样芽孢杆菌群是金矿化指示菌, 同时也证明了传统微生物找矿法利用选择性培养基对蜡样芽孢杆菌群菌芽孢计数方法的可靠性和利用分子生物学技术进行采矿的可行性。菌株 16S rDNA 和 16S-23S rDNA 区间核苷酸序列的确定也为下一步微生物找矿中的基因探针试剂盒的制作奠定了基础。

关键词: 16S rDNA; 16S-23S rDNA 间区; 菌种鉴定; 金矿化指示菌; 微生物找矿。

中图分类号: Q93-31

文章编号: 1000-2383(2006)03-0355-06

收稿日期: 2005-04-05

Molecular Identification of Gold-Mineralization Indicating Bacteria

YANG Jiao-yan¹, ZHANG Yong^{1,2}, WANG Hong-mei³, SONG Dong-lin²,
CHENG Qin¹, MEI Juan¹, WU Gang¹

1. College of Life Science, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China

2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

3. School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China

Abstract: Recently the microbial mineral exploration method, spore counting of *Bacillus cereus* in soil samples which is indicative for blind gold ore deposit, has been confirmed by many geologists in different countries. However, the identification of bacterial strains, indicators for gold mineralization, was still done through the culturing method in previous studies. This paper employed molecular biology technique to microbial identification in mineralized areas. Two bacterial strains as indicators of gold mineralization were randomly isolated from the gold deposit of Shewu mountain in Jiayu county, Hubei Province. On the basis of biochemical and physiological identification, phylogenetic analysis dedrived from 16S rDNA and 16S-23S rDNA sequence, strains Y1 and Y2 were identified as *Bacillus mycooides* and *B. cereus* respectively, both of which belong to "*B. cereus* group". So it is "*B. cereus* group" that is the indicator for gold mineralization instead of *B. cereus* species. The results assured the reliability of the traditional selective culturing method of *B. cereus* group, and the feasibility of molecular biology techniques on mineral exploration. In addition, 16S rDNA and 16S-23S rDNA sequence analyses were helpful to make fluorogenic-probe reagent box in future work.

Key words: 16S rDNA; 16S-23S rDNA internal transcribed spacer; bacteria identification; gold-mineralization indicating bacteria; microbial mineral exploration.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 40202011); 武汉市晨光计划项目(No. 20035002016-29); 中国地质大学(武汉)环境学院科研类研究项目(04-200404)。

作者简介: 杨娇艳(1979-), 女, 硕士研究生。E-mail: yangjiaoyan1979@163.com

自 20 世纪 80 年代以来,先后有不少国家的地质学家和微生物学家在美国、加拿大、比利时、中国等国的不同气候带内进行了微生物找矿的研究. 结果表明(Watterson 1985; Melchior *et al.*, 1994, 1996; 李珍福等, 1994; 谢树成等, 1997; 王红梅等, 1999; Wang *et al.*, 2003a, b), 矿区上覆土壤中蜡样芽孢杆菌的芽孢计数要比背景区的芽孢计数高数倍至上百倍, 对下伏金矿化具有很好的指示作用, 证明蜡样芽孢杆菌可以作为下伏基岩金矿化的指示菌种. 然而纵观微生物找矿技术的发展, 大部分有关微生物的研究还是停留在传统的显微镜观察、培养及生理生化特性的鉴别上, 而当今能快速、准确鉴别微生物物种的分子生物学方法在微生物找矿中的应用还较少, 特别是对我国 20 世纪 90 年代后陆续发现的红土型金矿更无人问津(王燕等, 2003). 这在一定程度上限制了微生物找矿成果的实际应用. 本文中我们利用研究细菌进化和亲缘关系的重要指标——16S rDNA(焦振泉和刘秀梅, 1998)和 16S-23S rDNA 间区序列(Internal transcribed spacer, ITS)(Gurtler and Stanisich, 1996; 焦振泉和刘秀梅, 2001), 对从亚洲最大的红土型金矿——湖北蛇屋山金矿区分离到的矿化指示菌株进行分子生物学鉴定, 为微生物找矿的进一步发展奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 实验菌株及培养基

实验菌株 Y1 和 Y2 分离自湖北省蛇屋山金矿区剖面 15 号勘探线上 20~25 cm 深的土样. 菌株分离采用鉴别性培养基——甘露醇-卵黄-多粘菌素琼脂培养基(MYP): 牛肉膏, 1.0 g; 蛋白胨, 10.0 g; D. 甘露醇, 10.0 g; 氯化钠, 10.0 g; 琼脂, 15.0 g; 0.2% 酚红溶液, 13 mL. 蒸馏水稀释至 900 mL, pH7.2±0.1, 每瓶分装 225 mL, 高压灭菌 121 °C 15 min, 临用时每瓶加入 50% 卵黄溶液 12.5 mL 和多粘菌素 B 溶液 2.5 mL. 土样稀释后涂平板, 30 °C 下培养 12 h, 挑取单菌落.

1.2 形态观察

利用相差显微镜(NIKON E600)观察该菌的菌体形态.

1.3 16S rDNA 及 16S-23S rDNA ITS 序列测定和分析

1.3.1 PCR 模板 DNA 的简单制备 供试菌株用

LB 培养基培养 48 h, 吸取 0.5 mL 菌液于 1.5 mL Eppendorf 管中, 8 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 0.5 mL 去离子水重悬菌体, 沸水浴 10 min, 8 000 r/min 离心 5 min, 上清液作为模板 DNA 直接用于 PCR 扩增.

1.3.2 16S rDNA 及 16S-23S rDNA ITS 的 PCR 扩增与测序

用于 16S rDNA 的 PCR 扩增反应的引物为一对通用引物(购自上海生工生物工程技术服务有限公司). 正向引物 BSF8: 5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3' (*Escherichia coli* 的 16S rDNA 对应位置为 8~27), 反向引物 BSR1541: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (*Escherichia coli* 的 16S rDNA 对应位置为 1 541~1 522). 用于扩增 ITS 序列的正向引物为 16SF: 5'-CCTTG-TACA CACCGCCGT-3', 反向引物为 23SR: 5'-GTGGGTTTCCCCATTCGG-3' (上海生工生物工程技术服务有限公司合成). 在 50 μL 的 PCR 反应体系中含有: 1×PCR 缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂, 4×dNTP 混合物各 200 μmol/L, 引物各 0.2 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U, 1 μL 模板 DNA. PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 56 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 温育 7 min. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果. PCR 扩增产物经 Omega 试剂盒纯化后, 由上海

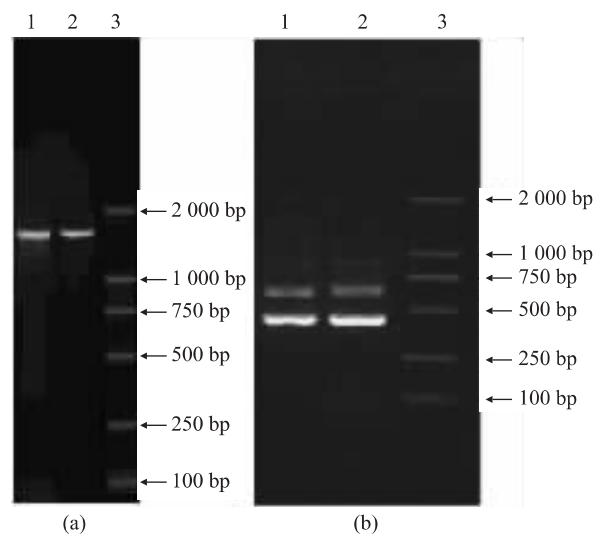


图 1 PCR 扩增 16S rDNA(a) 和 ITS(b) 的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 Gel electrophoresis showing the PCR-amplification products of 16S rDNA (a) and ITS (b)

(a): 1. Y1; 2. Y2; 3. marker; (b): 1. Y1; 2. Y2; 3. marker

中科开瑞生物芯片科技公司进行序列测定。

1.3.3 16S rDNA 及 16S-23S rDNA ITS 的同源性比较及系统发育分析 用 ClustalX1.83 程序进行多序列比对分析;统计和聚类分析用系统发生推断软件包 PHYLIP 3.6 版本进行;序列两两间的分化距离用 F84 模型计算,缺少和不确定的位点在计算中被省略。采用邻接法(neighbor-joining)获得分支系统树,并通过自展分析(bootstrap)进行置信度检测,自展数据集为 1 000 次。在 16S rDNA 系统树和 ITS 系统树构建中都不选择外类群。在 PHYLIP 中构建好的进化树用 treeview 打开,进行编辑。

1.4 生理生化试验鉴定

按照微生物学检验方法对该菌进行必要的生理生化鉴定。

2 结果

2.1 形态观察和生理生化指标

菌株 Y1 和 Y2 在 MYP 培养基上培养 24 h 的菌落呈微粉红色,具环绕沉淀圈。两者革兰氏染色均为阳性,短杆状或连接成链状,芽孢呈椭圆形位于菌体中央或偏端,不使菌体胀大。

表 1 16S rDNA 基因序列来源和数据库存取号

Table 1 16S rDNA sources and accession number

| 代号 | 菌株号 | 存取号 |
|------------------------------|------------|----------|
| <i>B. anthracis</i> | Sterne | X55059 |
| 1- <i>B. thuringiensis</i> | ATCC 10792 | AF290545 |
| 2- <i>B. thuringiensis</i> | ATCC 33679 | AF290549 |
| 1- <i>B. cereus</i> | ATCC 4342 | AJ577288 |
| 2- <i>B. cereus</i> | ATCC 27877 | Z84581 |
| 1- <i>B. mycoides</i> | ATCC 6462 | AB021192 |
| 2- <i>B. mycoides</i> | DSM 2048 | X55061 |
| 1- <i>B. megaterium</i> | DSM 32 | X60629 |
| 2- <i>B. megaterium</i> | IAM 13418 | D16273 |
| 1- <i>B. subtilis</i> | ATCC 21331 | AB018487 |
| 2- <i>B. subtilis</i> | ATCC 6633 | AB018486 |
| <i>B. acidovorans</i> | ATCC 51159 | X77789 |
| <i>B. schlegelii</i> | DSM 2000 | Z26934 |
| <i>B. licheniformis</i> | DSM 13 | X68416 |
| <i>B. weihenstephanensis</i> | DSM 11821 | AB021199 |
| <i>B. badius</i> | ATCC 14574 | X77790 |

2.2 16S rDNA 及 16S-23S rDNA ITS 的 PCR 扩增结果及序列分析

PCR 扩增 16S rDNA 得到一条带(如图 1a),约 1 500 bp。对 Y1 和 Y2 的 16S rDNA 序列进行部分测序(约 650 bp)(序列登陆号分别为 DQ092385、DQ092386)。PCR 扩增 Y1 和 Y2 的 ITS 序列得到 2

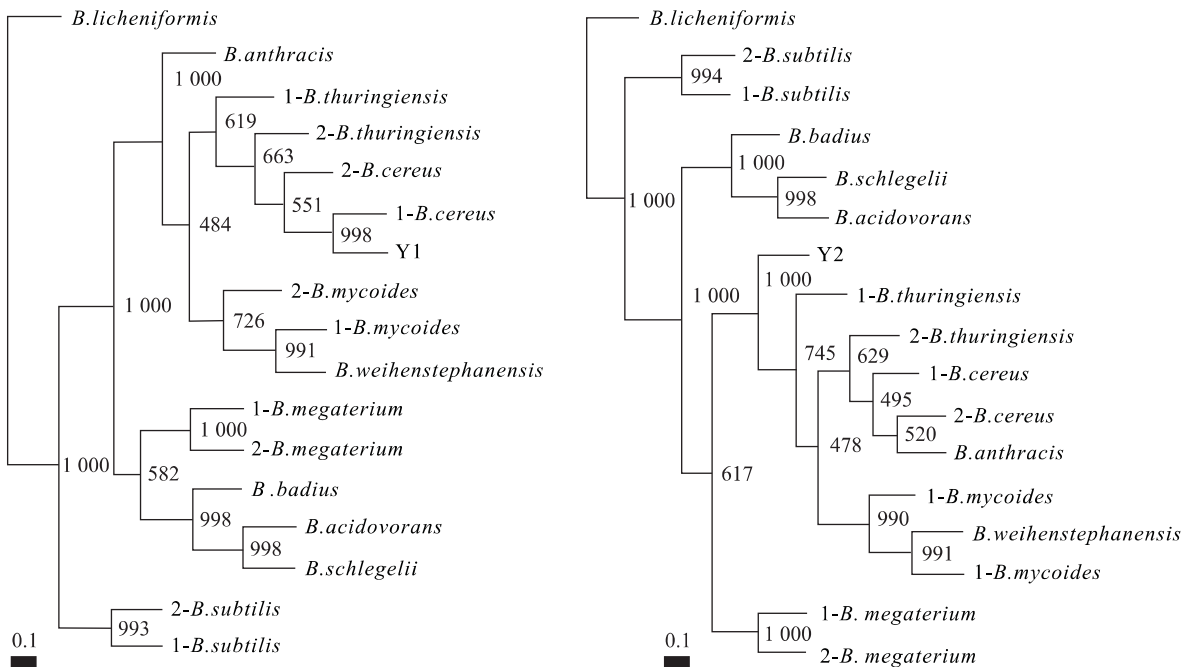


图 2 基于 16S rDNA 部分序列的系统发育树

Fig. 2 Unrooted phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of two isolates and sequences of relating species 基于 16S rDNA 部分序列用邻接法完成,分支上的数字是 1 000 次重复抽样检测的 bootstrap 值,标尺尺度表示 10%的核苷酸取代

表 2 ITS 基因序列来源和数据库存取号

Table 2 ITS sources and accession number

| 代号 | 菌株号 | 存取号 |
|----------------------------|------------|------------|
| 1- <i>B. thuringiensis</i> | WS 2617 | Z84594 |
| 2- <i>B. thuringiensis</i> | NCTC 4042b | AF267904 |
| 1- <i>B. mycooides</i> | ATCC 10206 | AF267905 |
| 2- <i>B. mycooides</i> | MWS 5303 | Z84591 |
| 1- <i>B. anthracis</i> | Cepanzo | AJ420071 |
| 2- <i>B. anthracis</i> | Ames | AF267897 |
| 1- <i>B. cereus</i> | ATCC 25621 | AF267907 |
| 2- <i>B. cereus</i> | ATCC 14579 | AE016999.1 |

条带(如图 1b),选择较小的片断进行测序,得到的 ITS 序列不含 tRNA 基因序列,约 140 bp(序列登陆号分别为 DQ092387、DQ092388)。

2.3 16S rDNA 的同源性比较和序列系统发育分析

将 2 菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank、EMBL、DDB 和 JPDB 非冗余数据库进行相似性比较,结果表明 Y1 和 Y2 与芽孢杆菌属菌的相似程度非常高,一般都为 99%。选择 16 个菌种或菌株的 16S rDNA 序列(表 1)与 Y1 和 Y2 的 16S rDNA 序列作系统发育分析,结果如图 2。Y1 和 Y2 与炭疽芽孢杆菌 (*B. anthracis*)、苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)、蜡样芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌和魏登施泰滕芽孢杆菌 (*B. weihenstephanensis*) 聚类,得到 bootstrap 分析的极强支持(100%)。一般认为:16S rDNA 序列同源性小于 98%,可以认为属于不同的种;同源性小于 93%~95%,可以认为属于不同属(Devereux *et al.*, 1990; Fry *et al.*, 1991)。但是有资料显示,炭疽芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌和魏登施泰滕芽孢杆菌的 16S rDNA 相似性非常高,所以这几种菌又被称为蜡样芽孢杆菌群 (*B. cereus* group) (Drobniowski, 1993; Daniele *et al.*, 2000; Bjarne *et al.*, 2001)。因此,16S rDNA 的系统发育分析表明 Y1 和 Y2 应属于芽孢杆菌属的蜡样芽孢杆菌群。

2.4 ITS 的同源性比较和序列系统发育分析

ITS 的进化速率比 16S rDNA 大 10 多倍,适用于相近种或同一种内的不同株的鉴别和分类(Volker and Vilma, 1996; 焦振泉和刘秀梅, 2001)。将 Y1 和 Y2 菌株的 ITS 序列与 GenBank、EMBL、DDB 和 JPDB 非冗余数据库进行相似性检索,发现 Y1 和 Y2 与蜡样芽孢杆菌群的 ITS 序列自然聚类。选择 8 个序列(表 2)与 Y1 和 Y2 的 ITS 序列作系统发育分析,结果如图 3。Y1 与 *B. mycooides* 聚类,

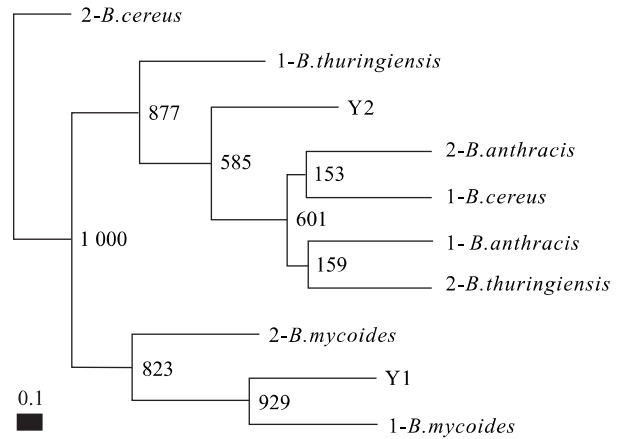


图 3 基于 ITS 序列的系统发育树

Fig. 3 Unrooted phylogenetic tree based on the ITS sequence of two isolates and sequences of relating species

基于 ITS 序列用邻接法完成,分支上的数字是 1 000 次重复抽样检测的 bootstrap 值,标尺尺度表示 10% 的核苷酸取代

bootstrap 自展支持率为 93%。Y2 与 *B. anthracis*、*B. anthracis*、*B. thuringiensis* 和 *B. cereus* 聚类, bootstrap 自展支持率为 59%。故 Y1 是 *B. mycooides*, Y2 是 *B. anthracis*、*B. thuringiensis* 和 *B. cereus* 中的一种。

2.5 系统发育分析和形态观察、生理生化试验综合分析

从 Y1 和 Y2 的 16S rDNA、ITS 系统发育分析结果,很容易将 Y1 和 Y2 鉴定到蜡样芽孢杆菌群。然后根据蜡样芽孢杆菌群菌种间的形态和生理生化特征区别,如苏云金芽孢杆菌和其他相似种间的区别在于有伴孢晶体,蜡样芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌的区别在于有运动性和溶血反应,和蕈状芽孢杆菌的区别在于无假根等,可以在系统发育分析的基础上鉴定菌种。其简单的生理生化特性如表 3 所示。Y1 有假根,有运动性,无溶血反应,无伴孢晶体,可以确定为蕈状芽孢杆菌;Y2 无伴孢晶体,无假根,有运动性和溶血反应,可以鉴定为蜡样芽孢杆菌。

3 讨论

由于蜡样芽孢杆菌群各个种的 16S rDNA 和 ITS 等核苷酸序列具有高度的相似性,比如 *B. anthracis* 和 *B. cereus* 催吐株的 16S rDNA 序列毫无区别(Ash *et al.*, 1991), 23S rDNA 仅有 2 个核苷酸不同(Ash and Collins, 1992)等,这给利用 16S rDNA 和 ITS 系统发育方法对矿化指示菌株的

表 3 供试菌株的几项生理生化特性

Table 3 Some physiological characteristics of strains Y1 and Y2

| 菌株 | 蛋白质结晶毒素试验 | 溶血试验 | 动力试验 | 根状生长试验 |
|----|-----------|------|------|--------|
| Y1 | — | + | + | + |
| Y2 | — | + | + | — |

“+”表示阳性反应;“—”表示阴性反应。

鉴定带来一定困难。为此,进一步将系统发育分析和生理生化试验结果相结合,可以将矿化指示菌株鉴定到种,Y1 为蕈状芽孢杆菌,Y2 为蜡样芽孢杆菌,两者都属于蜡样芽孢杆菌群,因此可以说明矿区的指示菌为蜡样芽孢杆菌群。另外相对于其他细菌种属而言,蜡样芽孢杆菌群各个种的 16S rDNA 和 ITS 彼此之间高度保守,利用本实验的方法很容易与其他菌群加以区分。

传统微生物找矿方法都是对选择性培养基上卵黄反应呈阳性的菌落计数,而蜡样芽孢杆菌群菌的卵黄反应均为阳性。故该结果证明了传统微生物找矿法利用选择性培养基对蜡样芽孢杆菌群芽孢计数方法的可靠性。但是传统观点认为金矿化指示菌为蜡样芽孢杆菌,我们在系统发育和生理生化综合分析的结果基础上,认为金矿化指示菌应该为蜡样芽孢杆菌群菌,这点是与已往的研究所不同的。

另外,近 20 年来,随着现代分子生物学技术的高速发展,发展了一系列基于核苷酸序列分析、PCR、基因探针、荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)、Southern 杂交(DNA 印迹法)和 Northern 杂交(RNA 印迹法)等对环境样品进行定性定量分析的方法。基于此,我们的研究结果为现代分子生物学技术在微生物找矿、采矿中的应用提供了可能。对从矿区分离到的指示菌株进行分子生物学鉴定后,就可以通过测序找到该菌的特异性核酸序列,作出基因探针及探针试剂盒,然后利用荧光原位杂交或 DNA 印迹法、RNA 印迹法可以对土壤中该种指示微生物进行定性和定量分析。这种微生物找矿方法比传统的物理化学找矿方法简单、经济、无污染,又比传统的微生物找矿方法准确、及时,为地质工作者提供了一种新的探矿方法,扩大了视野,具有广阔的应用前景。

References

Ash, C., Farrow, J. A., Dorsch, M., et al., 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase se-

quencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41:343—346.

- Ash, C., Collins, M. D., 1992. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.*, 94:75—80.
- Bjarne, M. H., Thomas, D. L., Niels, B. H., 2001. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 202:209—213.
- Daniele, D., Ameer, C., Sara, B., 2000. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the “*Bacillus cereus* group”. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:5460—5468.
- Devereux, R., He, S. H., Doyle, C. L., et al., 1990. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: Phylogenetic definition of a family. *J. Bacteriol.*, 172:3609—3619.
- Drobniowski, F. A., 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6:324—338.
- Fry, N. K., Warwick, S., Saunders, N. A., et al., 1991. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *J. Gen. Microbiol.*, 137:1215—1222.
- Jiao, Z. Q., Liu, X. M., 1998. 16S rRNA sequence homology analysis and systematics and identification of bacteria. *Foreign Medical Sciences • Section of Hygienics*, 25(1):12—16 (in Chinese).
- Jiao, Z. Q., Liu, X. M., 2001. The hot discussion about systematics and identification of bacteria; 16S-23S rDNA internal transcribed spacer. *Microbiology*, 28(1):85—89 (in Chinese).
- Li, Z. F., Li, X. J., Zhang, R. Z., et al., 1994. A microbial method of geochemical exploration—A study of using soil *Bacillus cereus* method to prospect for Au and U. *Uranium Geology*, 10(6):360—365 (in Chinese with English abstract).
- Melchior, A., Cardenas, J., Dejonghe, L., 1994. Geomicrobiology applied to mineral exploration in Mexico. *J. Geochem. Explor.*, 51(2):193—212.
- Melchior, A., Ddjonghe, L., Hughes, G., 1996. A geomicrobiological study of soils collected from auriferous areas of Argentina. *J. Geochem. Explor.*, 56:217—227.
- Gurtler, V., Stanisich, V. A., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142:3—16.
- Wang, H. M., Yang, F. Q., Zhou, Q. W., et al., 1999. The gold-mineralization indication of *Bacillus cereus* from

gold deposit's upper soil in the northwest of Sichuan Province. *Earth Science—Journal of China University of Geosciences*, 24 (Suppl.): 78—82 (in Chinese with English abstract).

- Wang, H. M., Yang, F. Q., Zhou, X. G., et al., 2003a. Evaluation of the potential of microbial exploration for gold ores; Mineralized and non-mineralized factors. *Science in China (Series D)*, 46(5): 508—515.
- Wang, H. M., Yang, F. Q., Qiao, S. Y., 2003b. Characteristics of *Bacillus cereus* spore counts in soils with underlying gold mineralization in Northwestern Sichuan, China; Results from a pilot study. *Journal of China University of Geosciences*, 14(1): 8—15.
- Wang, Y., Tan, K. X., Liu, S. S., et al., 2003. Experimental study of gold adsorption by minerals and its significance in forming of lateritic gold deposits. *Earth Science—Journal of China University of Geosciences*, 28 (1): 26—30 (in Chinese with English abstract).
- Watterson, J. R., 1985. A procedure for estimating *Bacillus cereus* spores in soil and stream-sediment samples—A potential exploration technique. *J. Geochem. Explor.*, 23: 243—252.
- Xie, S. C., Yin, H. F., Wang, H. M., et al., 1997. A potential

microbial method of mineral exploration; Study on *Bacillus cereus* as an indicator of gold mineralization. *Earth Science—Journal of China University of Geosciences*, 22(4): 383—386 (in Chinese with English abstract).

附中文参考文献

- 焦振泉, 刘秀梅, 1998. 16S rRNA 序列同源性分析与细菌系统分类鉴定. 国外医学卫生学分册, 25(1): 12—16.
- 焦振泉, 刘秀梅, 2001. 细菌分类与鉴定的新热点: 16S—23S rDNA 间区. 微生物学通报, 28(1): 85—89.
- 李珍福, 李学军, 张瑞增, 等, 1994. 微生物地球化学探矿——蜡样芽孢杆菌法寻找铀矿的试验研究. 铀矿地质, 10(6): 360—365.
- 王红梅, 杨逢清, 周乔伟, 等, 1999. 川西北地区金矿床上覆土壤 *Bacillus cereus* 对金矿化的指示意义. 地球科学——中国地质大学学报, 24(增刊): 78—82.
- 王燕, 谭凯旋, 刘顺生, 等, 2003. 矿物吸附金的实验研究及其在红土型金矿形成中的意义. 地球科学——中国地质大学学报, 28(1): 26—30.
- 谢树成, 殷鸿福, 王红梅, 等, 1997. 一种潜在的微生物找矿法——蜡样芽孢杆菌指示金矿化的试验研究. 地球科学——中国地质大学学报, 22(4): 383—386.