

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

郑 璐, 尹华群, 曹琳辉, 晁 婧, 陈棋炯, 刘学端*

(生物冶金教育部重点实验室, 中南大学资源加工与生物工程学院, 长沙 410083)

摘要:江西铜业集团德兴铜矿是中国最大的露天开采铜矿, 已有 1000 多年的开采历史, 因此它为极端环境下微生物群落结构研究提供了一个优良素材。应用 16S rRNA 基因的 PCR 克隆技术检测了来源于该铜矿 3 个不同样地的水样与底泥中的微生物多样性。通过 RFLP 分析获得 40 个 OTUs, 测序和系统发育分析表明它们属于 7 个不同的系统发育分区, 即 *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Nitrospira*, α -Proteobacteria 和 γ -Proteobacteria, *Firmicutes*, δ -Proteobacteria。这些克隆中的大部分属于 γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria 和 *Nitrospira*。进一步的分析结果表明在各样点水样中的嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 所占比例大于其在底泥中的比例, 而底泥的嗜酸菌属 (*Acidiphilium*) 所占比例明显高于水样, 这可能与底泥的缺氧环境和 *Acidiphilium* 菌能够将三价铁还原成二价铁的特性有关。

关键词:酸性矿坑水 (AMD); 底泥; 微生物多样性; 16S rRNA; RFLP

文章编号: 1000-0933(2008)10-4841-08 中图分类号: Q145, Q178, Q938 文献标识码: A

Microbial community diversity of acid mine drainage and sediment at the Dexing Copper Mine

ZHENG Lu, YIN Hua-Qun, CAO Lin-Hui, CHAO Jing, CHEN Qi-Jiong, LIU Xue-Duan*

Key Laboratory of Biohydrometallurgy of Ministry of Education, School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(10): 4841 ~ 4848.

Abstract: One of the largest, original open-cast copper mines in China provides an excellent opportunity to investigate microbial community structure in extreme environments. Microbial diversity of acid mine drainage and sediment samples from three sites within the mine were analyzed by 16S rRNA gene library and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. A total of 40 unique 16S rRNA genes, screened from 558 clones, were obtained from all sites. The sequenced clones fell into seven phylogenetic divisions. The majority of the clones were affiliated with the γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria and *Nitrospira*. At all sites examined, the proportion of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the acid mine drainage is greater than that in the sediment. In contrast, the proportion of *Acidiphilium* is greater in the sediment than that in the acid mine drainage. This may be due to the anaerobic environment within the sediment, which inhibited aerobic bacteria, such as *A. ferrooxidans*. However, *Acidiphilium*, a heterotrophic bacterium, is able to catalyze the dissimilatory

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目 (2004CB619201); 国家创新研究群体自然科学基金资助项目 (50321402)

收稿日期: 2007-07-03; 修订日期: 2007-12-14

作者简介: 郑璐 (1982 ~), 女, 安徽淮北人, 硕士生, 主要从事微生物分子生态学研究。

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xueduanliu@yahoo.com

Foundation item: The project was financially supported by Major State Basic Development Program of China (No. 2004CB619201); Innovative Group, NSFC of China (No. 50321402)

Received date: 2007-07-03; **Accepted date:** 2007-12-14

Biography: ZHENG Lu, Master candidate, mainly engaged in microbial molecular ecology.

reduction of ferric iron to ferrous even in the presence of small amounts of oxygen.

Key Words: acid mine drainage; sediment; microbial diversity; 16S ribosome RNA; RFLP

硫化矿生物氧化形成的酸性矿坑水(acid mine drainage, AMD),通常含有高浓度的铁、铝、硅以及重金属离子如铜、锌、砷、金、银、铅、钙等^[1]。酸性矿坑水能引起严重的水体污染,进而影响周边区域的生态系统,并最终影响人类健康。另外酸性矿坑水从地表下渗,可破坏土壤团粒结构,使土壤板结,农作物枯黄减产^[2,3]。酸性矿坑水中的微生物可以加速硫化矿物的氧化,而筛选出的某些微生物则可用于生物浸出。因此,这些极端酸性环境引起了许多研究人员的重视,并为此开展了卓有成效的研究。但是目前有关这些环境中的微生物群落结构研究却较为少见。为了有效地治理此类环境污染,必须了解不同矿区 AMD 中的微生物群落组成。此外,对这一环境中微生物多样性的分析,可为高效浸矿菌种的选育提供理论基础和指导。

从少数了解较为清楚的酸性矿坑水的微生物群落结构来看,在水体中存在的酸性细菌和其它微生物只限于几个特定的属或种中,如 Lopez-Archilla 等研究表明,西班牙 Tinto 河中微生物的序列与目前已知微生物的序列相似度极低。目前认为最典型的嗜酸微生物属于嗜酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)^[4],最先从这个属中分离出能够利用 S 和 Fe^{2+} 的极端嗜酸细菌如嗜温的 *Acidithiobacillus thiooxidans* 和 *A. ferrooxidans*,以及中度嗜温的 *Acidithiobacillus caldus*,这些嗜酸细菌都属于革兰氏阴性 γ -变形细菌(γ -Proteobacteria)。在 AMD 环境中,还存在一些其它的嗜酸细菌如革兰氏阴性嗜酸兼性异养细菌 *Acidiphilium* 属和属于一个新细菌门-*Leptospirillum* 属^[5,6],以及主要包括 *Acidimicrobium*, *Ferromicrobium* 和 *Sulfobacillus* 属的革兰氏阳性嗜酸细菌^[7,8]。由于在 AMD 环境中,可利用的底物类型非常有限,因此,一些研究人员曾经认为,此类生态环境中的微生物是极其贫乏的。然而,现已知在 AMD 中同样存在大量的微生物,至少有 11 个原核生物门^[1]。

德兴铜矿是全球最大的几个露天开采铜矿之一,日产量超过 10 万 t^[9]。由于金属硫化物的自然氧化以及微生物活动的影响,导致了大量 AMD 废水的产生,给周围造成了严重的环境污染。为了缓解污染,大约 20 年以前,德兴铜矿兴建了 2 个用于生物浸出的集液池,并以此回收铜,经处理过的 AMD 水样被排至大坞河。酸性矿坑水中的重金属离子等其他的一些污染物,许多是以底泥作为其归属,而底泥在一定的条件下,可能与水体发生物质交换,这种物质交换作用可能对于污染环境的生物治理具一定指导意义^[10]。因此本文的研究目标就是确定德兴铜矿的微生物群落结构以及水样与底泥的微生物群落结构差异。实验结果表明,德兴铜矿酸性矿坑水的微生物大部分属于 γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria 和 *Nitrospira* 三类;在所研究的 3 个样地中,水样中 *A. ferrooxidans* 所占比例大于其在底泥中所占的比例,而在底泥中 *Acidiphilium* 所占比例则大于其在水样中所占的比例。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2006 年 7 月从德兴铜矿 3 个不同地点采集用于微生物群落和地理化学参数分析的水样与底泥。其中祝家(ZJ)和杨桃坞(YTW)水库为集液池,在集液池的水中包含矿坑水,渗透水以及一些雨水混合物,其中 YTW 水库比 ZJ 水库年代更久远。另一个水样来自大坞河中的上游水(KZX)。在 3 个样地中,样品 YTW 与 ZJ 的 pH 为 3.0, KZX 的 pH 值为 5.0。从每个样点各收集 150L 水样,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,过滤物迅速转入容器中并于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。底泥取自 KZX, YTW, ZJ 3 个样地的表层底泥,然后将其放入塑料袋中,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 群落基因组 DNA 的抽提、纯化以及 16S rRNA 基因的扩增和克隆

参照 Zhou J Z 等^[11]的方法提取微生物总 DNA。实验方案如下:称取 5g 样品,与 3g 干热灭菌的沙子混合,液氮研磨 3 次,与 13.5ml 的抽提缓冲液(0.1mol/L 磷酸钠, 0.1mol/L Tris-HCl, 0.1mol/L EDTA, 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB[pH 8.0]) 和 50 μl 蛋白酶 K (10 mg/ml) 混合,经 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30min,加入 1.5ml 的 20% SDS,

置于 65℃ 水浴锅中处理 2h, 离心后取其上清并加入等体积的异丙醇使 DNA 析出, 将粗提 DNA 在 100V 电压下 1% 琼脂糖电泳 1.5h, 然后用 DNA 纯化试剂盒 (OMEGA, USA) 凝胶回收进行纯化。

纯化的基因组 DNA 用作模板来进行 16S rRNA 基因扩增, 反应体系中包含 100ng/1 DNA, 1 × PCR buffer, 2mmol/L dNTPs, 2.5mmol/L MgCl₂, 各 5pmol/L 正向和反向引物, 并加入 1.25U Taq 酶。正向引物为通用引物 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'), 反向引物为通用引物 1387R (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3')^[12]。扩增先放在 4℃ 预冷, 然后立即放入 PCR 仪中, 迅速升温到 94℃, 预变性 5min; 扩增程序是预变性 45s, 55℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 1min, 30 个循环, 最后在 72℃ 延伸 7min。PCR 产物采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 采用 DNA 纯化试剂盒 (OMEGA, USA) 纯化目的片段^[12]。

纯化的 PCR 产物克隆进 TOPO TA 克隆试剂盒带的载体中, 然后转入 *Escherichia coli* TOP10F 感受态细胞 (Invitrogen, USA)。每个样点随机挑选了 115 个白色克隆子进行 PCR 扩增筛选, 并进行电泳检测, 阳性 PCR 产物加入限制性内切酶 *Hin*6I 和 *Msp*I 各 2U, 置于 37℃ 水浴锅酶切过夜。酶切产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳后进行 RFLP 结果分析。

1.3 序列测定及系统发育分析

通过分析 RFLP 图谱, 共挑选 40 个具有代表性的 16S rRNA 基因序列进行测序分析。序列采用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 的 BLASTN 工具进行分类鉴定, 并利用 Clustal W (版本 1.8) 和 Mega (版本 3.0) 中的邻接法 (neighbor-joining) 对所有可用的核酸序列进行初步的系统发育分析。基于初步的系统发育分析结果, 可用的 16S rRNA 序列子集被挑选出来并使用 ClustalW 程序构建系统发育树。

1.4 数据统计及分析

为了分析各个样点之间的多样性, 定义具有高度相似带型的 RFLP 图谱为一可操作单元 (OTU); 并计算其 Shannon-Weaver 多样性指数 (H):

$$H = - \sum (p_i) (\log_2 p_i)$$

式中, p_i 为每一个 OTU 在样点中所占的比例, 即在每个样点中每一个独特 OTU 的分布频率及其占总克隆数目的比例。对每个样地的 OTU 进行相关性指数分析。

此外, 采用饱和度曲线 (SigmaPlot V8.0) 去分析所挑选的克隆子数目所代表整个微生物群落水平。其公式如下:

$$y = a \times [1 - e^{(-bx)}]$$

使用统计软件 SPSS V13.0 进行主成分分析 (PCA), 以 OTUs 作为变量进行主成分分析, 将样地聚类分析。

2 结果

2.1 RFLP 分析

从 3 个样点的水样和底泥 16S rRNA 克隆文库中各挑选 115 个克隆子。RFLP 图谱分析显示, 不同样点中其 OTU 数量存在明显的差异性 (图 1)。

在所有发现的 OTU 中, 没有 1 种类型的 OTU 存在于所有的 3 个样点的水样与底泥中。与此同时, 在每个样点, 至少有 3 到 4 个 OTU 在整个群落中占主导优势。

在 KZX 样点, DX19 占有绝对优势, 占了 KZX 样点全部克隆子数目的 71%, 其在底泥中也占了全部克隆子数目的 22%。然而, DX19 在其它样点中都未出现过。另有 6 个 OTU (DX19, DX25, DX32, DX34, DX35, DX36) 共存于在水样与底泥中, 但是每个 OTU 在全部克隆子数目中的比例相当不同。以 OTU 为基础计算出的多样性指数 (H) 表明, 样点 KZX 的水样样品的多样性指数为 1.76, 而其底泥的多样性指数是 2.89, 两者相差甚多。

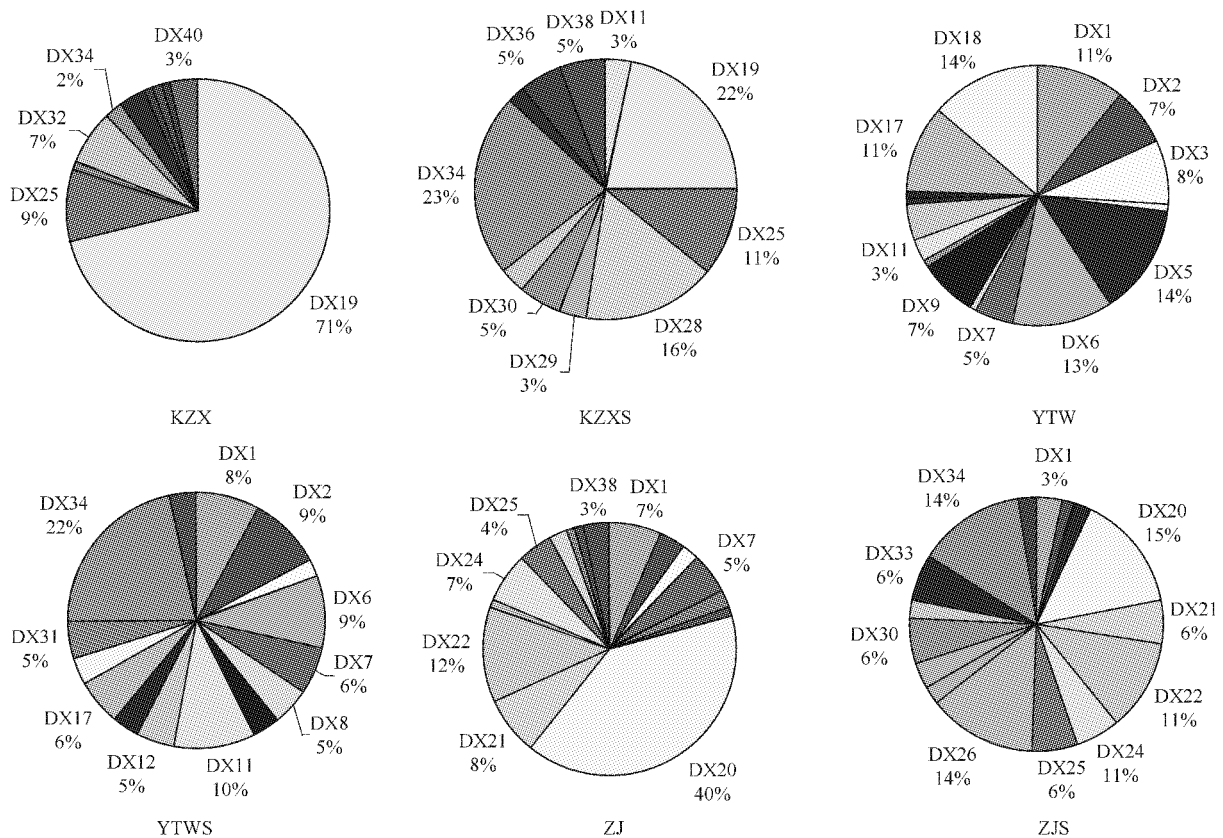


图1 样品中各克隆子的分布情况

Fig. 1 Distribution of OTUs in clone libraries for 16S rRNA fragments amplified from genomic DNA in AMD samples and its sediment

在 YTW 样点水样中, DX5, DX6 和 DX18 占有优势, 它们分别各占 YTW 样点全部克隆子数目的 14% 左右, 其在底泥中所占比例则很少。而 DX34 则在底泥中占一定优势, 占了 YTW 样点底泥全部克隆子数目的 22%。在此样点中, 水样与底泥有 12 个 OTU 是共有的, 水样中有 4 个 OTU (DX4, DX5, DX10, DX13) 是底泥中没有的, 而底泥中也有 3 个 OTU (DX31, DX34, DX38) 是水样中所没有的。以 OTU 为基础计算出的多样性指数 (H) 表明, 样点 YTW 的水样样品的多样性指数为 3.54, 而其底泥的多样性指数为 3.62, 两者相近。

在 ZJ 样点, DX20 占据绝对优势, 它占 ZJ 样点全部克隆子数目的 40%, 在其底泥中也占了全部克隆子数目的 15%。然而, DX20 在其它样点中未出现过。另外有 7 个 OTU (DX1, DX2, DX20, DX21, DX22, DX24 和 DX25) 在水样与底泥中是共有的, 但是每个 OTU 在全部克隆子数目中的比例相当不同。占了 ZJ 样点底泥全部克隆子数目的 15% 的 2 个 OTU (DX26, DX34) 在水样中则没有。以 OTU 为基础计算出的多样性指数 (H) 表明, 样点 ZJ 的水样样品的多样性为 3.1, 而其底泥的多样性指数为 3.67。

16S rRNA 饱和度曲线分析表明本研究所检测的克隆子数目足以反映整个样点微生物群落的多样性及其分布水平 (图 2)。

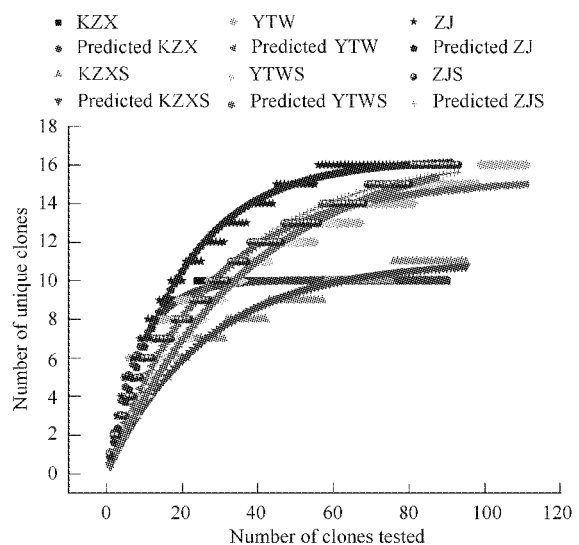


图2 16S rRNA 的饱和度曲线分析

Fig. 2 Evaluation of the representation of the clones obtained from the AMD samples and its sediment by rarefaction analysis

2.2 系统发育分析

在 16S rRNA 基因的克隆文库中,挑选 50 个具有代表性的克隆子进行测序。测序结果表明大部分序列(97%)与 NCBI 数据库中已知序列有 72% 到 99% 的相似性,其中只有 3% 的序列与已知序列的相似度低于 85%。

在 3 个样点的水样与底泥中,其微生物群落的结构主要分布在 7 个主要分区中。其中大部分的序列属于 5 个类群: γ -Proteobacteria, Acidobacteria, δ -Proteobacteria, Nitrospira 和 α -Proteobacteria,另外一小部分的克隆属于 Actinobacteria, Firmicutes(图 3)。

其中属于 Proteobacteria 的克隆为整个克隆文库中最重要的部分,且主要为 α -Proteobacteria 和 γ -Proteobacteria。特别是 γ -Proteobacteria 在每个样点的水样与底泥中均有出现,而 α -Proteobacteria 则大多出现在各个样点的底泥中,并且均是优势菌株。

系统发育树分析显示,在 3 个样点的水样与底泥中,均出现 Nitrospira,且所有属于 Nitrospira 的细菌也分为 3 个部分。在这个纲的细菌中,Leptospirillum ferrooxidans 存在于除 KZX 样点底泥与 ZJ 样点底泥以外的其它样品中。Leptospirillum ferriphilum 存在于除 KZX 样点水样以外的其他样品中。

在微生物种的范畴之内,A. ferrooxidans 出现在除 KZX 样品底泥以外的所有样地的水样与底泥中(KZX, YTW, YTWS, ZJ, ZJS),并且在 YTW 样点的水样中为优势种群,占样点整个克隆子数的 32% (表 1)。Leptospirillum ferrooxidans 在 YTW 样点的水样中也是优势种群(分别占各自克隆子总数的 15%),但在其它样点的水样与底泥中,其所占的比例很小(<6%)。另外,隶属于 Pseudomonas 细菌的克隆只在 ZJ 样点的底泥中发现,这与样点的特性有密切关系。

在 KZX 样点的水样与底泥中均存在 Acidobacteria, Nitrospira, γ -Proteobacteria 和 α -Proteobacteria。对于 Acidobacteria,均只有 DX25,只是所占比例不同。对于 Nitrospira,在 KZX 样点的水样中均为 Leptospirillum ferrooxidans,而在其底泥中则均为 Leptospirillum ferriphilum。对于 α -Proteobacteria,样品的底泥比水样中多了一个类别(DX11)。对于 γ -Proteobacteria,样品的水样与底泥中则相差不大。

在 YTW 样点的水样中存在 γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria, Nitrospira, δ -Proteobacteria, Actinobacteria 和 Firmicutes,在其底泥中则缺少 δ -Proteobacteria。对于 Actinobacteria, Firmicutes 和 Nitrospira,样品的水样与其底泥中则相差不大。而对于 α -Proteobacteria,底泥中则比水中多了一个类别(DX34)。

在 ZJ 样点的底泥中存在 γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria, Nitrospira, δ -Proteobacteria 和 Acidobacteria,而在其水样中则缺少 α -Proteobacteria。

表 1 各个样地中微生物种群的分布情况

Table 1 The affiliation of the sequenced clones and percentage found at various sites

	KZX(%)	KZXS(%)	YTW(%)	YTWS(%)	ZJ(%)	ZJS(%)
Acidobacteria	9	11	0	0	46	20
Actinobacteria	0	0	1	3	0	0
Firmicutes	0	0	5	10	0	0
Nitrospira	1	9	23	15	20	22
γ -Proteobacteria	88	54	42	31	26	36
α -Proteobacteria	2	26	3	32	0	14
δ -Proteobacteria	0	0	26	9	8	8
A. ferrooxidans of γ -Proteobacteria	1	0	32	19	7	3

2.3 主成分分析

使用统计软件 SPSS V13.0 对 OTU 数据作主成分分析(PCA),见表 2。

根据需选取特征值 >1,故选这 3 个进行分析,结果见图 4。

所有 OTU 的 PCA 分析捕获了其 78.8% 的可变性,其中 PC1 捕获了 29.5%,而 PC2 捕获了 27.3%,而 PC3 捕获了 22%。由图 4 可看出 3 个样地中的微生物群落具有显著差异性,但是同一样地的水样与底泥差异

性不是很大。

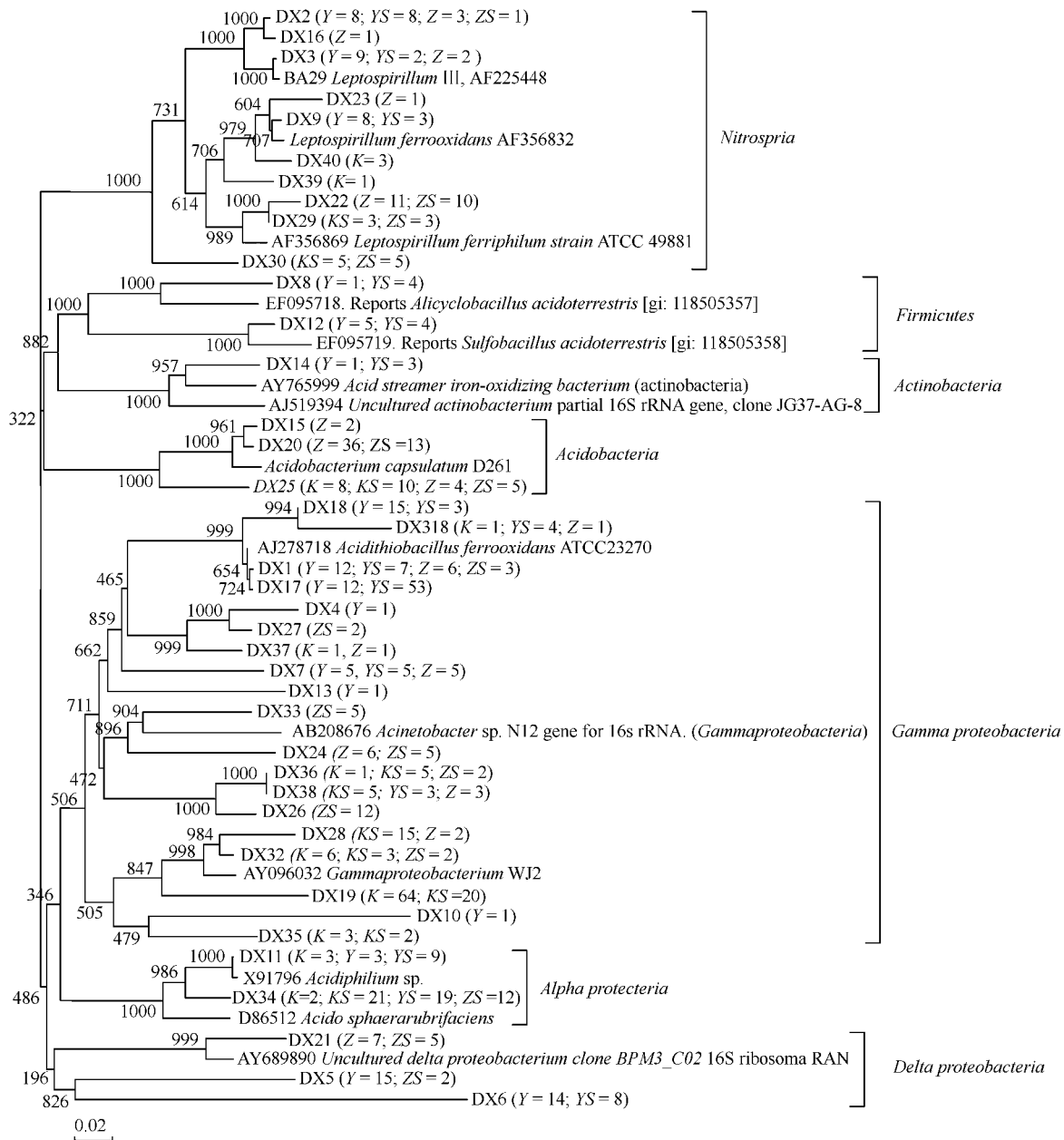


图3 16S rRNA 系统发树分析

Fig. 3 Phylogenetic distribution of the 16S rRNA sequences present in these three AMD samples and its sediment; The clone composition of each station are provided; Cloned sequences from three stations are labeled by margin

K: 某种群在大坞河中的上游水样点中出现的次数, KS: 某种群在大坞河中的上游水的底泥中出现的次数, Y: 某种群在杨桃坞样点中出现的次数, YS: 某种群在杨桃坞的底泥中出现的次数, Z: 某种群在祝家样点中出现的次数, ZS: 某种群在祝家的底泥中出现的次数

The occurrence number of population in station of the Dawu River = K; The occurrence number of population in station of the Dawu River's sediment = KS; The occurrence number of population in station of the Yangtaowu = Y; The occurrence number of population in station of the Yangtaowu's sediment = YS; The occurrence number of population in station of the Zhujiia = Z; The occurrence number of population in station of the Zhujiia's sediment = ZS

3 讨论

一些研究发现, 存在于 AMD 环境中的细菌主要属于 *Actinobacteria*, *Nitrospira*, *Firmicutes* 和 *Acidobacteria* 4

类,以及很少的 *Proteobacteria*^[1]。然而,在不同的酸性环境中,其微生物群落的组成差异很大。在本研究中,所有来自酸性矿坑水中的细菌隶属于 *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Nitrospira*, α -*Proteobacteria* 和 γ -*Proteobacteria*, *Firmicutes*, δ -*Proteobacteria*。

表 2 主成分分析初始统计值

Table 2 Initial Eigenvalues

主成分 Component	特征值 Total	初始特征值方差贡献率(%) % of Variance	累积方差贡献率(%) Cumulative
1	1.77	29.54	29.54
2	1.63	27.30	56.84
3	1.32	22.00	78.84

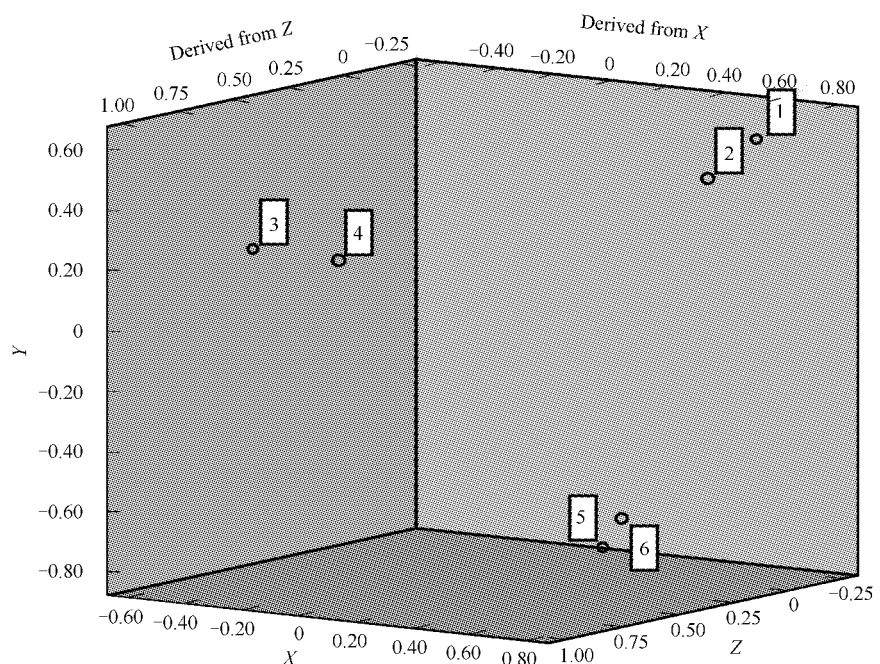


图 4 各样地微生物群落结构的 PCA 分析

Fig. 4 PCA at the three sites

1:大坞河中的上游水, 2:大坞河中的上游水的底泥, 3:杨桃坞, 4:杨桃坞的底泥, 5:祝家, 6:祝家的底泥 1 = Station Dawu River; 2 = Station Dawu River's sediment; 3 = Station Yangtaowu; 4 = Station Yangtaowu's sediment; 5 = Station Zhujia; 6 = Station Zhujia's sediment

Schrenk 等的研究表明 *Leptospirillum* 的分布与低 pH 值紧密相关^[13]。Edwards 等利用荧光原位杂交的方法对位于美国铁矿的 *Leptospirillum* 菌进行定量分析,发现在温度较高、pH 较低的环境下 *Leptospirillum* 比 *A. ferrooxidans* 生存得更好。在本研究中,尽管 YTW 和 ZJ 样点的 pH 值比美国铁矿 AMD 环境高,但是这 2 个样点较 KZX 具有更低的 pH 值,其 *Leptospirillum* 菌的比例也比 KZX 样点更高。

从 *Leptospirillum* 菌纯培养或利用分子生物学方法从环境中获得的一系列序列分析比较,迄今为止, *Leptospirillum* 菌主要分为 3 个不同的 Group: Group I (*L. ferrooxidans*), Group II (*L. ferriphilum*) 与 Group III^[1,6,7,14]。本研究中,在所有的样点中基本上都能发现上述 3 个 Group 的克隆,且没有明显的优势 Group。

Acidiphilium 属于 α -*Proteobacteria* 的 1 个属,研究表明,这个属的细菌能够为 *Leptospirillum* 和 *Acidithiobacillus* 移除有机毒性物质^[15]。尽管在本研究中只发现少量的 *Acidiphilium*,由于其能够利用不同的底物作为能源以及还原铁离子的能力,表明它们可能在 AMD 生态系统中起重要作用^[16,17]。

在 AMD 生态系统中还存在着 *Ferrimicrobium acidiphilum*,可在有氧条件下氧化铁而在厌氧条件下能够还

原铁^[18,19]。在本次研究中,也发现了此类嗜酸性微生物,只是在数量上比较少。有趣的是,本研究发现 2 种克隆子(DX28,DX32)与 1 种既能营自养又能营异养生长的 γ -Proteobacteria WJ-2 菌株具有高度相似性,这种 WJ-2 菌株也许代表着 1 个新的未知种或者属^[20]。

对 3 个样点的水样与底泥进行总体分析,发现 *A. ferrooxidans* 在水中所占克隆子的比例大于其在底泥中的比例。*A. ferrooxidans* 属好氧菌,而底泥属缺氧环境,因此其不能在底泥中大量存在,而且底泥中缺少 *A. ferrooxidans* 生长所需的亚铁离子,含有大量 *A. ferrooxidans* 不能利用的三价铁离子。而 *Acidiphilium* 在底泥样品中大量存在,而在水样中存在较少,这可能是因为底泥的缺氧环境适于 *Acidiphilium* 菌将三价铁还原成二价铁,供自己生长所需^[21,22]。

References:

- [1] Baker B J J F Banfield. Microbial communities in acid mine drainage. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44:139—152.
- [2] Yin G X, Deng Y S, Li D C. Coal mine environmental geological hazard and its control. Beijing: China Coal Industry Publishing House, 1997. 7.
- [3] Zhang R R, Chen K Y. The discussion on several issues of acid mine drainage. Coal Mine Environmental Protection, 1992, 6(5):15—18.
- [4] 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. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50:511—516.
- [5] Hippe H. *Leptospirillum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev., including *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev. and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. (Golovacheva et al. 1992). Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50:501—503.
- [6] Coram N J, Rawlings D E. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 degrees C. Appl Environ Microbiol, 2002, 68:838—845.
- [7] Clark D A, Norris P R. *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. Microbiology, 1996, 142:785—790.
- [8] Johnson B, Roberto F F, Heterotrophic acidophiles and their roles in the bioleaching of sulfide minerals. In: Rawlings DE ed. Biomining: theory, microbes and industrial processes. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1997. 259—279.
- [9] Wen X H, Allen H E. Mobilization of heavy metals from Le An River sediment. Science of the Total Environment, 1999, 227:101—108.
- [10] Jin X C. Chemistry of sediment pollution. Beijing: China Environmental Science Press, 1992. 154—155.
- [11] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62:316—322.
- [12] Marchesi J R, Sato T, Weightman A J. Design and evaluation of useful bacterial specific PCR primers that amplify bacterial 16S rDNA genes, Appl Environ Microbiol, 1998, 64(2):795—799.
- [13] Schrenk M O, Edwards K J, Goodman R M. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for generation of acid mine drainage. Science, 1998, 279, 1519—1522.
- [14] Bond P L, Smriga S P, Banfield J F. Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. Appl. Environ. Microbiol, 2000, 66, 3842—3849.
- [15] Johnson D B. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. Journal of Microbiological Methods, 1995, 23:205—218.
- [16] Kusel K, Roth U, Trinkwalter T, Peiffer S. Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments. Environmental and Experimental Botany, 2001, 46: 213—223.
- [17] Kusel K, Dorsch T, Acker G. Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: Isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65:3633—3640.
- [18] Brofft J E, McArthur J V, Shimkets L J. Recovery of novel bacterial diversity from a forested wetland impacted by reject coal. Environ. Microbiol, 2002, 4:764—769.
- [19] Hallberg K B, Johnson D B. Biodiversity of acidophilic prokaryotes. Adv. Appl. Microbio, 2001, 49:37—84.
- [20] Hallberg K B, Johnson D B. Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. Hydrometallurgy, 2003, 71:139—148.
- [21] Sel K K, Roth U, Drake H L. Microbial reduction of Fe(III) in the presence of oxygen under low pH conditions. Environ. Microbiol, 2002, (4): 414—421.
- [22] Johnson D B, Bridge T A M. Reduction of ferric iron by acidophilic heterotrophic bacteria: Evidence for constitutive and inducible enzyme systems in *Acidiphilium* spp. J. Appl. Microbiol, 2002, (92) 315—321.

参考文献:

- [2] 尹国勋, 邓寅生, 李栋臣. 煤矿环境地质灾害与防治. 北京: 煤炭工业出版社, 1997.
- [3] 张仁瑞, 陈魁荫. 有关酸性矿井水的几个问题的探讨. 煤矿环境保护, 1992, 6(5): 15~18.
- [10] 金相灿. 沉积物污染化学. 北京: 中国环境科学出版社, 1992.