

矿山废水中微生物生态多样性研究

谢学辉¹ 肖升木¹ 柳建设^{1,2*}

(1. 东华大学环境科学与工程学院 上海 201620)

(2. 中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

摘要: 从湖北铜绿山铜矿和山西中条山铜矿两地采集了矿山废水样品, 用 RFLP 方法(限制性片段长度多态性方法)分析不同矿山废水中微生物多样性及其群落结构组成变化。结果发现: 通过 16S rDNA 基因序列的系统发育树分析, 在 5 个矿山废水样品中检测到的细菌主要分为 4 大类: 即 Proteobacteria 纲、Nitrospira 纲、Firmicutes 纲和 Bacteroidetes 纲。通过对古菌 16S rDNA 的 PCR 分析发现, 取自湖北铜绿山铜矿的样品中检测到古菌的存在, 而取自山西中条山铜矿的样品中没有检测到古菌的存在。检测到的古菌主要是属于 *Ferroplasma* 属和 *Thermoplasma* 属。结合 5 个矿山废水样品的化学元素分析结果和细菌群落结构数据, 进行 PCA 分析(主成分分析), 发现不同矿山废水样品的生物地球化学性质及其微生物组成存在很大差异, pH 值、温度、不同浓度的元素如 S、Cu、Ni 和 Co 可能是形成细菌种群结构差异的关键因素。

关键词: RFLP, 矿山废水, 微生物生态多样性

Diversity of Microbial Communities in Waste Mining Water

XIE Xue-Hui¹ XIAO Sheng-Mu¹ LIU Jian-She^{1,2*}

(1. School of Environmental Science & Engineering, Donghua University, Shanghai, 201620, China)

(2. School of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)

Abstract: The composition of microbial communities in five waste mining water samples (from Tonglvshan copper mine, Hubei province, and Zhongtiaoshan copper mine, Shanxi province) were studied, using culture-independent 16S rDNA based cloning approach-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis method. Phylogenetic analysis revealed that the bacteria in these five samples fell into 4 major groups: Proteobacteria, Nitrospira, Firmicutes and Bacteroidetes. Archaea were only detected in samples from Tonglvshan copper mine. *Thermoplasma* and *Ferroplasma* lineages were detected abundantly in these two samples. Meanwhile, the results of Principal Component Analysis (PCA) revealed that biogeochemical properties affected the diversity of microbial communities in mine water. The pH, temperature and different concentrations of elements such as S, Ni, Co and Cu seemed to be key factors resulting in the diverse distribution of microbes among water samples in this study.

Keywords: RFLP, Waste mining water, Diversity of microbial communities

基金项目: 国家 973 项目课题(No. 2004CB619204); 全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目(No. 200549); 自然科学基金项目(No. 50874032); 上海市重点学科建设项目(No. B604); 上海同济高廷耀环保科技发展基金资助

* 通讯作者: ✉ liujianshe@dhu.edu.cn

收稿日期: 2009-01-22; 接受日期: 2009-02-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

酸性矿山废水是硫化物矿物暴露于地表,与水、大气及微生物相互作用发生氧化性溶解而形成的^[1]。它的排放不但造成矿山资源的流失,而且会对受其影响的陆地和水生生态造成毁灭性破坏,导致微生物多样性和生物量的严重减少,直接威胁人类的生存;酸性矿山废水的污染已成为一个世界性的环境问题^[2,3]。

在过去的30多年,国际上关于酸性矿山废水中微生物生态多样性、群落组成、典型微生物生理生化特性、工业微生物分离培养及应用等各方面的研究都有显著的增加。已有研究表明,在酸性矿山废水中原核微生物主要是真细菌和古细菌^[4],已经有11类细菌和古细菌被检测到^[5,6]。到目前为止,研究得最多的是两类铁氧化细菌: *Acidothiobacillus ferrooxidans* 和 *Leptospirillum ferrooxidans*^[5-7]。同时有研究发现,不同的温度、pH值、离子强度等生物地球化学性质对于样品中微生物群落结构的影响显著^[5,6,8,9]。

在矿产资源日趋贫乏、环境问题又日益严峻的今天,大力研究矿山废水环境中的微生物生态是很有必要的,可以为发现特种微生物、进一步分离培养并利用它们提供实验参数;更重要的是,为揭示酸性矿山废水的形成过程和机理,更好地有的放矢地阻止酸性矿山废水的生成,从而保护我们的环境提供理论依据。作者从湖北铜绿山铜矿和山西中条山铜矿采集了多种矿山废水样品,用 RFLP 方法研究了微生物多样及其群落结构变化情况,同时用 PCA 方法分析微生物生态多样性与环境的生物地球化学性质之间的相关性,为后续的微生物与硫化物相互作用产生毒害环境的酸性矿山废水的机理研究,打下基础。

1 实验材料

样品:从湖北铜绿山铜矿和山西中条山铜矿采集了矿山废水样品共5个,分别命名为K1、K2、SX1、SX2和SX3,测得pH值分别为2.5、2.5、2.0、3.0和6.0,水温变化范围为16℃~25℃。

2 实验方法

2.1 菌体收集

矿山废水样品取回之后,用孔径为0.22 μm的

滤膜过滤收集菌体,直接用于提取基因组DNA。

2.2 基因组DNA提取

实验中采取手工提取基因组DNA的方法。具体操作步骤按照Zhou等人(1996)的方法进行^[10]。

2.3 细菌的16S rDNA PCR扩增

实验中使用的扩增细菌16S rDNA的引物是细菌通用引物27F和1492R^[11],它们的序列为:27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-CGGCTACCTTGTACGACTT-3'。

进行细菌16S rDNA基因的PCR扩增的反应体系为50 μL: 10×PCR缓冲液5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 4 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μL, 上下游引物各1 μL, 模板DNA 1 μL, Taq酶(5 U/μL) 1 μL, 补足灭菌双蒸水到50 μL。PCR反应的程序为: 94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 32个循环; 72℃ 10 min。

2.4 古菌的16S rDNA PCR扩增

实验中用来扩增古菌的16S rDNA基因序列的引物对为: S-D-Arch-0344-a-S-20 (5'-ACGGGG CGCAGCAGGCGCGA-3') 和 S*-Univ-1517-a-A-21 (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3')^[12,13]。

古菌16S rDNA基因的PCR扩增的反应体系与2.3中描述的反应体系基本相同,只是用古菌扩增引物替代细菌扩增引物。古菌16S rDNA基因PCR反应的程序: 94℃ 预变性3 min; 94℃ 1 min, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 32个循环; 72℃ 10 min。

2.5 连接、转化和SP6、T7 PCR扩增

将扩增得到的16S rDNA先用Wizard plus SV Minipreps DNA 凝胶纯化系统(Promega corporation, USA)进行纯化,然后连接入T载体(Promega corporation, USA)。目的DNA片段的浓度与T载体浓度之比为3:1,在16℃下连接24 h~48 h。连接体系10 μL: 2×Rapid Ligation 缓冲液5 μL, 已纯化PCR产物3 μL, PGEM-T载体1 μL, T4 DNA 连接酶1 μL。

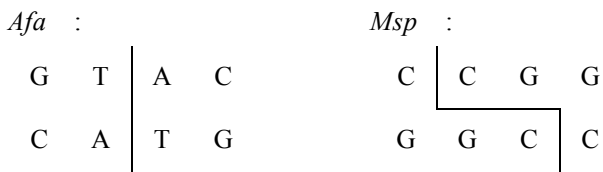
采用蓝白斑筛选的克隆方法,将连接了目的片段的T载体转入*E. coli* DH5α感受态细胞后,涂到含有X-Gal和IPTG并混有50 μg/mL 氨苄青霉素的LB固体平板上,37℃过夜培养,14 h~16 h后可见白色和蓝色菌落形成。

用灭菌的牙签挑取白色有效菌落,溶于50 μL 1×TE缓冲液中,在PCR仪上99.9℃破壁5 min。之

后,取破壁液作为模板 DNA 进行 SP6、T7 PCR 扩增实验。引物对 SP6 和 T7 的序列为:SP6: 5'-ATT TAGGTGACACTATAG-3', T7: 5'-TAATACGACT CACTATAGGG-3'。PCR 反应的程序:94°C 3 min; 94°C 1 min, 50°C 30 s, 72°C 1 min, 32 个循环; 72°C 10 min。

2.6 RFLP 中双酶切

接下来用双酶切方法消化上述 SP6、T7 PCR 扩增得到的 DNA 产物。我们选用的两种限制性内切酶为—*Afa* 和 *Msp* (TaKaRa Corporation, Japan), *Afa* 和 *Msp* 的酶切位点如下所示:



Afa 和 *Msp* 双酶切的反应体系为 10 μ L: 10 \times T Buffer 1 μ L, 模板 DNA 7 μ L, 0.1% BSA 1 μ L, *Afa* 和 *Msp* 各 0.5 μ L。酶切反应体系置于 37°C 反应 3 h。然后与 10 \times TAE 上样缓冲液混匀,用 2.5%的琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。电泳条件: 95 V, 3.5 h~4 h。

2.7 序列测定及其分析

重组克隆子交由北京三博远志生物技术有限责任公司测序。对各个序列与标准序列用 DAMBE (Data Analysis in Molecular Biology and Evolution) 进行比较。用 Clustal X 软件进行 16S rDNA 全序列比对,并构建系统发育树。

2.8 其他分析方法

(1) 原子吸收光谱: 矿山废水样品中主要元素的浓度用等离子发射光谱法(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, ICP-AES)进行测定。

(2) 统计分析方法: 采用主成分 PCA(Principal Component Analysis)分析方法,运用 SPSS 软件(版本 13.0; SPSS, Inc., Chicago, Ill.) 进行数据统计分析。软件自带的 SYSTAT 统计分析数据包能够自动地识别相关的变量,并将这些变量归类,用最少量的几个因子来替代这些变量的数据结构,从而可以将样品进行分离或聚合。在本文中,我们采用 PCA 分析方法,首先以样品的基本理化性质参数(如 pH 值、温度、化学元素 Fe、Cu、S、Co、Ni、Zn、Pb、

As、Au、Ag、Mo 等),以及不同克隆文库中不同 OTUs (Operational Taxnol Units) 所占百分数为分析因子,以样品 SX1、SX2、SX3、K1 和 K2 为分析变量,对矿山废水样品进行分离或聚合;另外为了了解影响矿山废水中微生物群落结构的主要因素是哪些,又以样品的基本理化性质参数为变量进行 PCA 聚类分析。

2.9 核酸序列登录号

从样品 SX1、SX2 和 SX3 中获得的细菌核酸序列登录号为:从 DQ469195 到 DQ469240。

从样品 K1 和 K2 中获得的细菌核酸序列登录号分别为:K1-30(DQ901258)、K1-13(DQ901259)、K1-80(DQ901260)、K1-93(DQ901261)、K1-90(DQ901268)、K1-83(DQ469201)、K1-21(DQ469229)、K1-62(DQ469222)、K1-78(DQ464128)、K1-22(DQ464151)、K2-23(DQ464134)、K2-47(DQ464154)、K2-5(DQ901262)、K2-46(DQ901263)、K2-28(DQ901265)、K2-21(DQ901266)、K2-62(DQ464156)、K2-99(DQ464132)。

从样品 K1 和 K2 中获得的古细菌核酸序列登录号分别为:K1G-32(DQ901269)、K1G-43(DQ901270)、K1G-48(DQ901271)、K1G-31(DQ901272)、K1G-13(DQ464159)、K1G-14(DQ464158)、K1G-9(DQ464157)、K1G-20(DQ901273)、K2G-46(DQ464161)、K2G-10(DQ901274)、K2G-41(DQ901275)、K2G-75(DQ901276)。

3 结果与讨论

3.1 矿山废水样品化学性质分析结果

将山西中条山铜矿和湖北铜绿山铜矿两地的矿山废水样品 SX1、SX2、SX3、K1 和 K2 用等离子发射光谱法测定主要元素,分析结果如表 1 所示。从表 1 中看出,两地矿山废水样品的化学性质有很大差别,这些差异将影响到样品中微生物群落结构组成。

3.2 16S rDNA 克隆文库的 RFLP 图谱分析

通过前面提到的分子生态学的方法,得到了 SX1、SX2、SX3、K1 和 K2 五个细菌 16S rDNA 克隆文库,以及 K1G 和 K2G 两个古细菌 16S rDNA 克隆文库(因 SX1、SX2、SX3 三个样品古细菌 16S rDNA PCR 产物未能检测得到,故无古细菌克隆文

表 1 五个矿山废水样品中各元素的含量
Table 1 Main elements in five water samples

| 元素(mg/L) Elements | 样品 Samples | | | | |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|---------|
| | SX1 | SX2 | SX3 | K1 | K2 |
| Fe | 1575.00 | 11.42 | 0.00 | 1300.00 | 545.00 |
| Cu | 1212.50 | 9.96 | 12.18 | 374.40 | 990.00 |
| S | 10783.33 | 70.00 | 236.67 | 2060.00 | 1610.00 |
| P | 8.00 | 1.23 | 2.00 | 7.30 | 5.40 |
| Zn | 5.00 | 0.91 | 0.14 | 53.00 | 57.50 |
| Pb | 0.14 | 0.07 | 0.10 | 2.80 | 3.20 |
| As | 0.39 | 0.04 | 0.04 | 3.50 | 2.60 |
| Co | 16.95 | 0.10 | 0.14 | 3.10 | 2.83 |
| Ni | 15.00 | 0.20 | 0.16 | 5.40 | 3.20 |
| Mn | 143.00 | 56.02 | 36.00 | 159.00 | 148.50 |
| Mg | 406.50 | 125.00 | 100.50 | 382.50 | 278.50 |
| Ca | 612.50 | 300.00 | 256.50 | 459.10 | 516.00 |
| Al | 269.50 | 158.00 | 98.50 | 275.90 | 284.90 |
| Si | 65.50 | 40.00 | 51.00 | 50.40 | 90.70 |
| Bi | 12.00 | 6.00 | 2.50 | 9.40 | 18.70 |
| In | 5.00 | 0.50 | 0.01 | 4.70 | 0.01 |
| Au | 0.05×10 ⁻³ | 0.00 | 0.00 | 3.40 | 2.90 |
| Ag | 0.03×10 ⁻³ | 0.00 | 0.00 | 0.50 | 0.01 |
| Mo | 0.01×10 ⁻³ | 0.01×10 ⁻³ | 0.01×10 ⁻³ | 0.50 | 0.60 |

库), 将 SP6、T7-PCR 扩增产物进行双酶切, 两限制性内切酶为 *Afa* 和 *Msp*。样品 K1 的双酶切的结果如图 1 所示(其他 4 个样品的双酶切图谱与此类似, 不一一列举)。RFLP 图谱条带类型的差异初步反映出文库中细菌种类的多样性以及群落结构的组成差异。

分别对细菌 16S rDNA 克隆文库和古细菌 16S rDNA 克隆文库的 RFLP 图谱条带类型进行比较分析, 最后得到以下结果: 57 个 SX1 细菌克隆子被分为 8 类可操作的分类单元(8 OTUs), 89 个 SX2 细菌克隆子被分为 25 OTUs, 80 个 SX3 细菌克隆子被分为 26 OTUs, 83 个 K1 细菌克隆子被分为 18 OTUs, 96 个 K2 细菌克隆子被分为 17 OTUs; 59 个 K1G 古细菌克隆子被分为 11 OTUs, 67 个 K2G 古细菌克隆子被分为 15 OTUs。最后总共得到 94 种细菌 OTUs 和 26 种古细菌 OTUs。

3.3 系统发育分析

将克隆文库中代表不同类型 RFLP 图谱条带的

克隆子放大培养后送去测序。测得的 16S rDNA 序列提交到 NCBI 数据库中进行 Blast 比对, 比对结果显示, 大多数测得的序列与当前 NCBI 数据库中序列差异小于 5%, 说明测序结果可用。采用 Bootstrap Neighbor-joining 计算方法进行系统发育树的构建。其结果分别见图 2、图 3 和图 4。

图 2 是来自样品 SX1、SX2 和 SX3 的 46 种不同的细菌的亲缘关系图, 从中可以看出, 这些细菌主要被划分为 4 大类, 即 Proteobacteria 纲、Nitrospira 纲、Firmicutes 纲及 Bacteroidetes 纲。其中 60.62% 的细菌克隆子序列是与 Proteobacteria 纲相关联的; 第二大类是 Nitrospira 纲, 占有 29.20% 的细菌克隆子数(其中 20.80% 与 *Leptospirillum ferrooxidans* 相关, 0.88% 与 *Leptospirillum ferriphilum* 相关, 最后 7.52% 与 *Leptospirillum* group 相关性最大); 2.65% 的细菌克隆子落到 Firmicutes 大类; 仅仅只有 3 条代表性的序列, 它们代表着 7.52% 的细菌克隆子数, 聚到亲缘关系较远的一大类—Bacteroi-

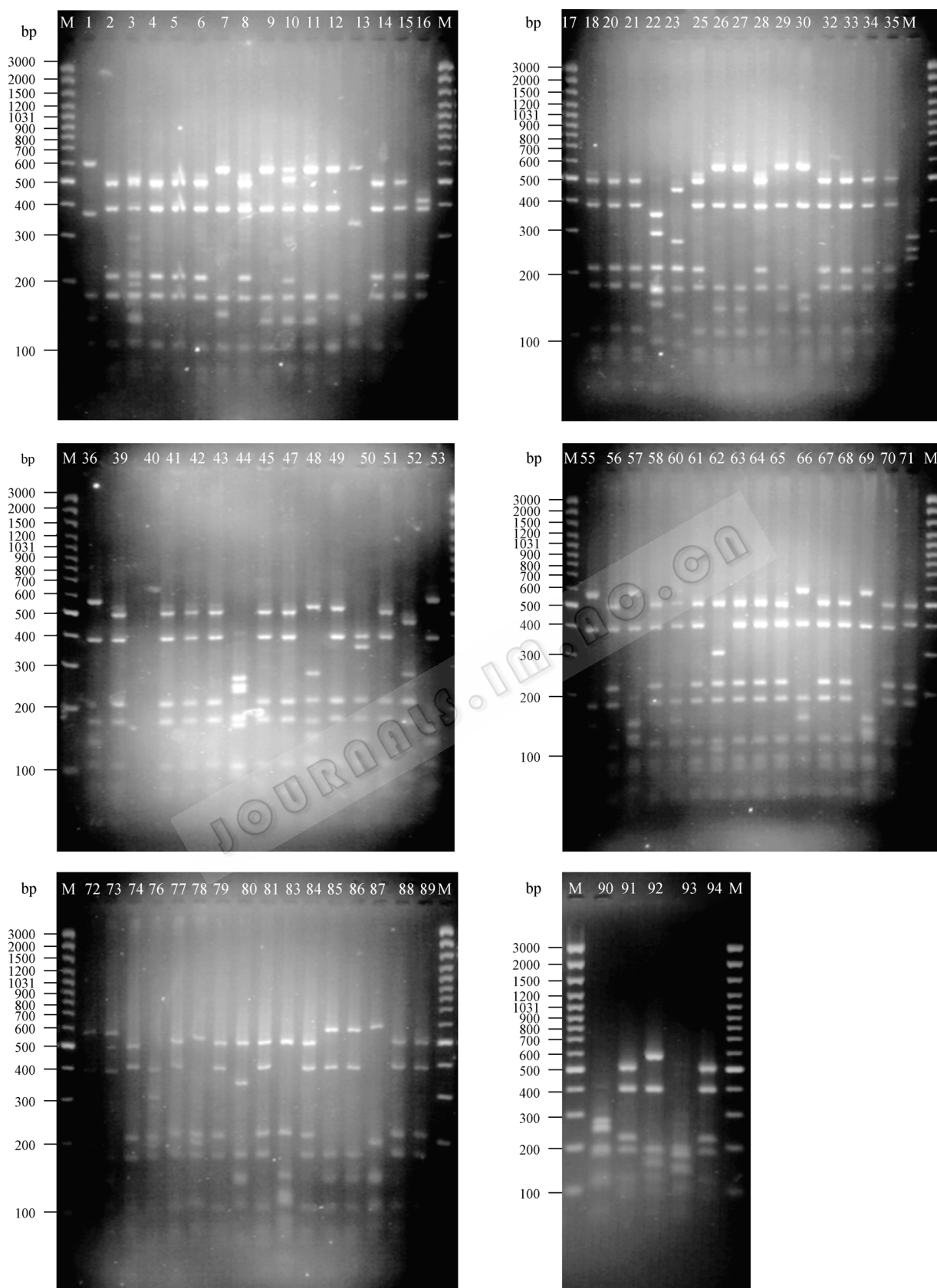


图 1 样品 K1 细菌 16S rDNA 克隆文库 RFLP 分析图谱

Fig. 1 Profile of RFLP patterns in bacterial library K1 from sample K1

注：M: 100 bp DNA 标记物; 1-94: 克隆子 K1-1-K1-94; K1: 湖北铜绿山铜矿采样点 1.

Note: M: 100 bp DNA ladder plus; 1-94: Clones K1-1-K1-94; K1: One sampling site in Tonglushan mine, Hubei, China.

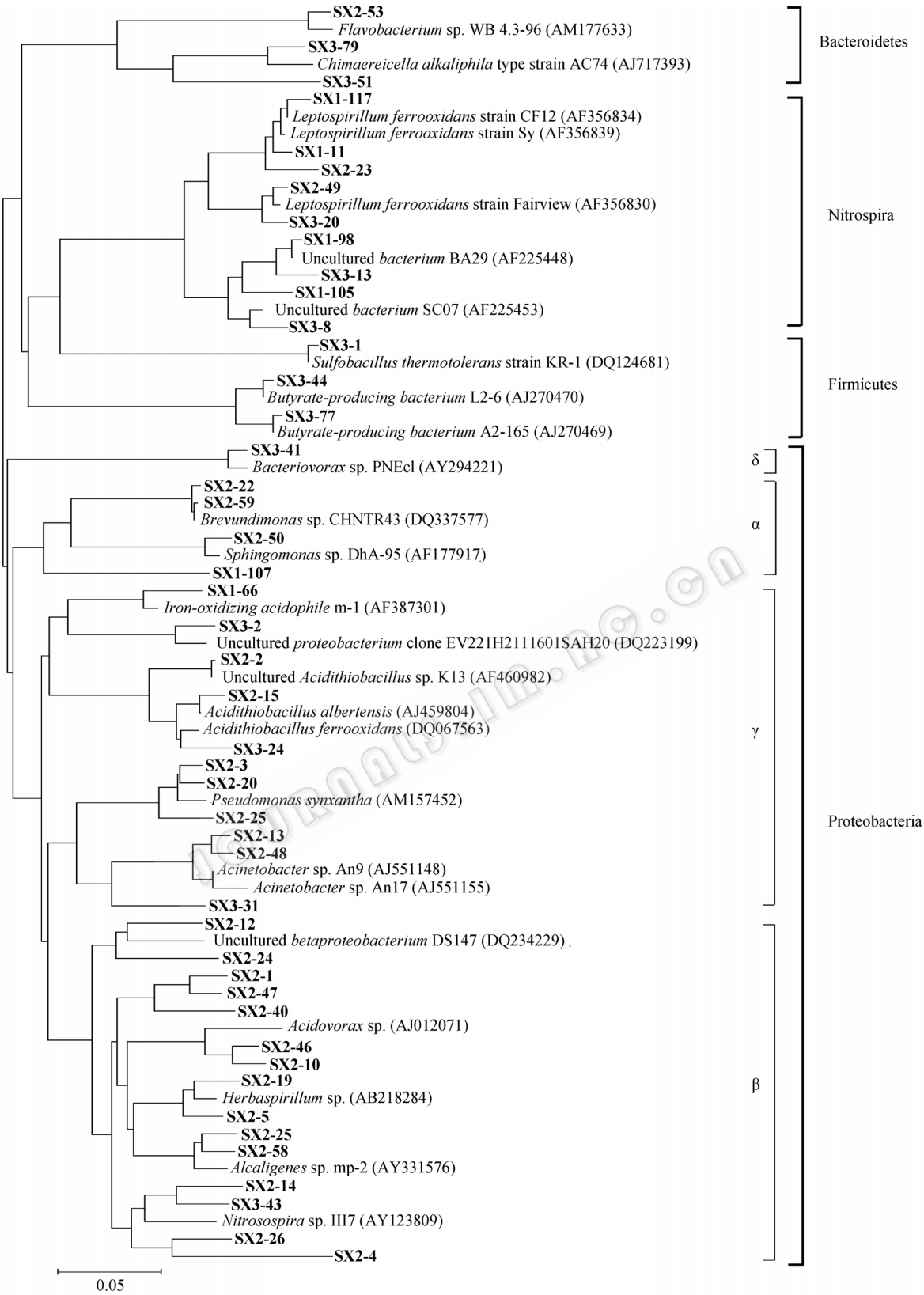


图 2 样品 SX1、SX2 和 SX3 中细菌 16S rDNA 基因系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic distribution of the bacterial representative 16S rDNA sequences from samples SX1, SX2 and SX3

注：本文中获得的序列用粗体标记；SX1、SX2 和 SX3：分别代表 3 个采样地点，来自山西中条山铜矿；数字 1、2、3... 117 分别代表不同的克隆子编号；图例 0.05 表示进化距离。

Note: The sequences obtained in this study were indicated in bold; SX1, SX2 and SX3: Three sampling sites in Zhong tiaoshan copper mine, China; Numbers 1, 2, 3... 117 represented different clones, respectively; Scale 0.05 represented the distance of evolution.

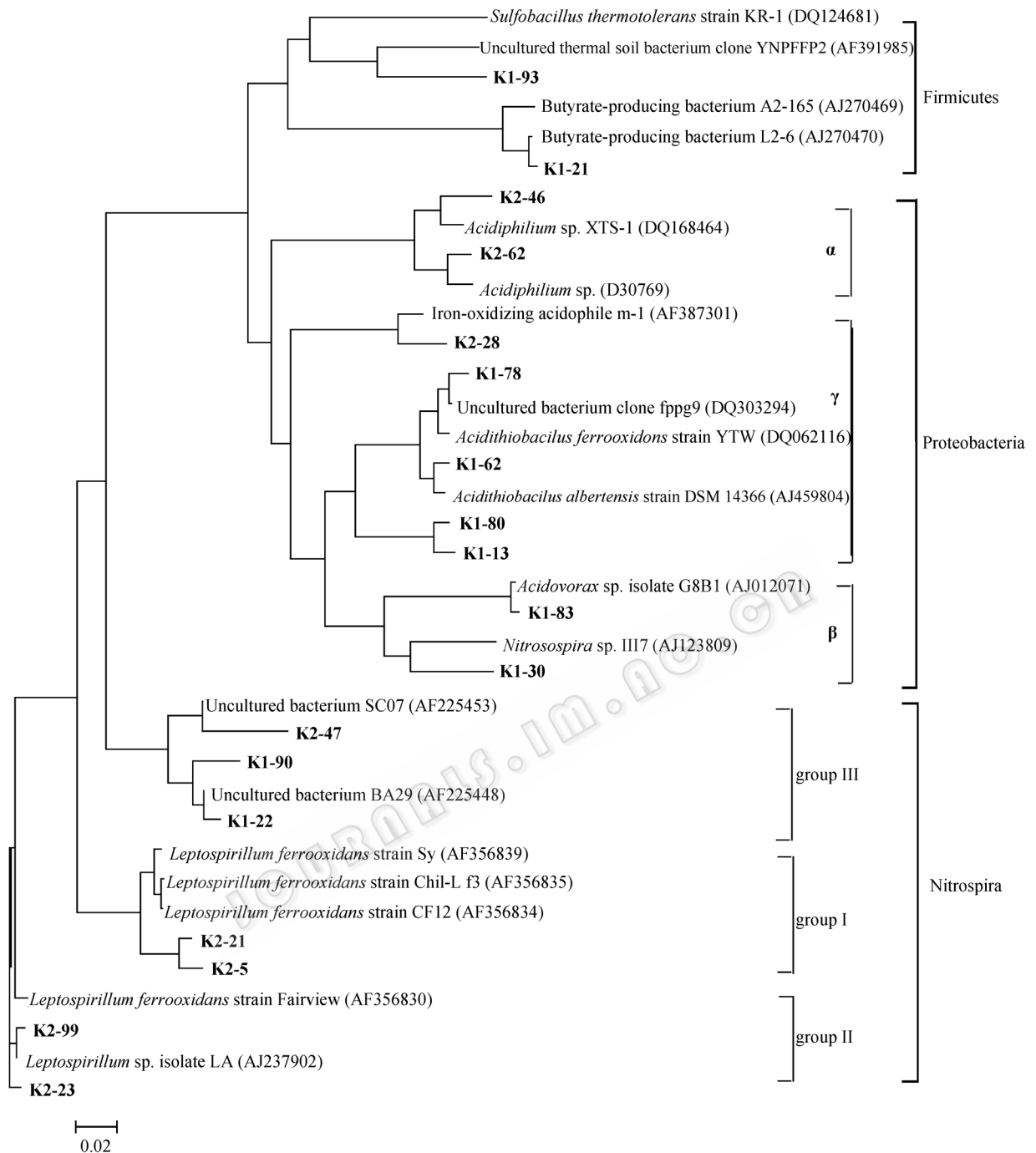


图3 样品 K1 和 K2 中细菌 16S rDNA 基因系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic distribution of the bacterial representative 16S rDNA sequences from samples K1 and K2

注:本文中获得的序列用粗体标记; K1 和 K2: 分别代表两个采样地点, 来自湖北铜绿山铜矿; 数字 5, 13, 21... 99 分别代表不同的克隆子编号; 图例 0.02 表示进化距离。

Note: The sequences obtained in this study were indicated in bold; K1 and K2: Two sampling sites in Tonglvshan mine, China; Numbers 5, 13, 21... 99 represented different clones, respectively; Scale 0.02 represented the distance of evolution.

detes 纲。

从图 3 可以看到, 来自样品 K1 和 K2 的总共 179 个有效的细菌克隆子被分成了 3 大类: Proteobacteria (占有 77.09% 的细菌克隆子数)、

Nitrospira (21.22%) 以及 Firmicutes (仅 1.68%)。在这两个细菌文库中, 代表克隆子数最多的典型序列是 K1-30, 它代表了 68 个 K1 细菌克隆子。它和另一条典型序列 K1-83 一起聚在 β -Proteobacteria

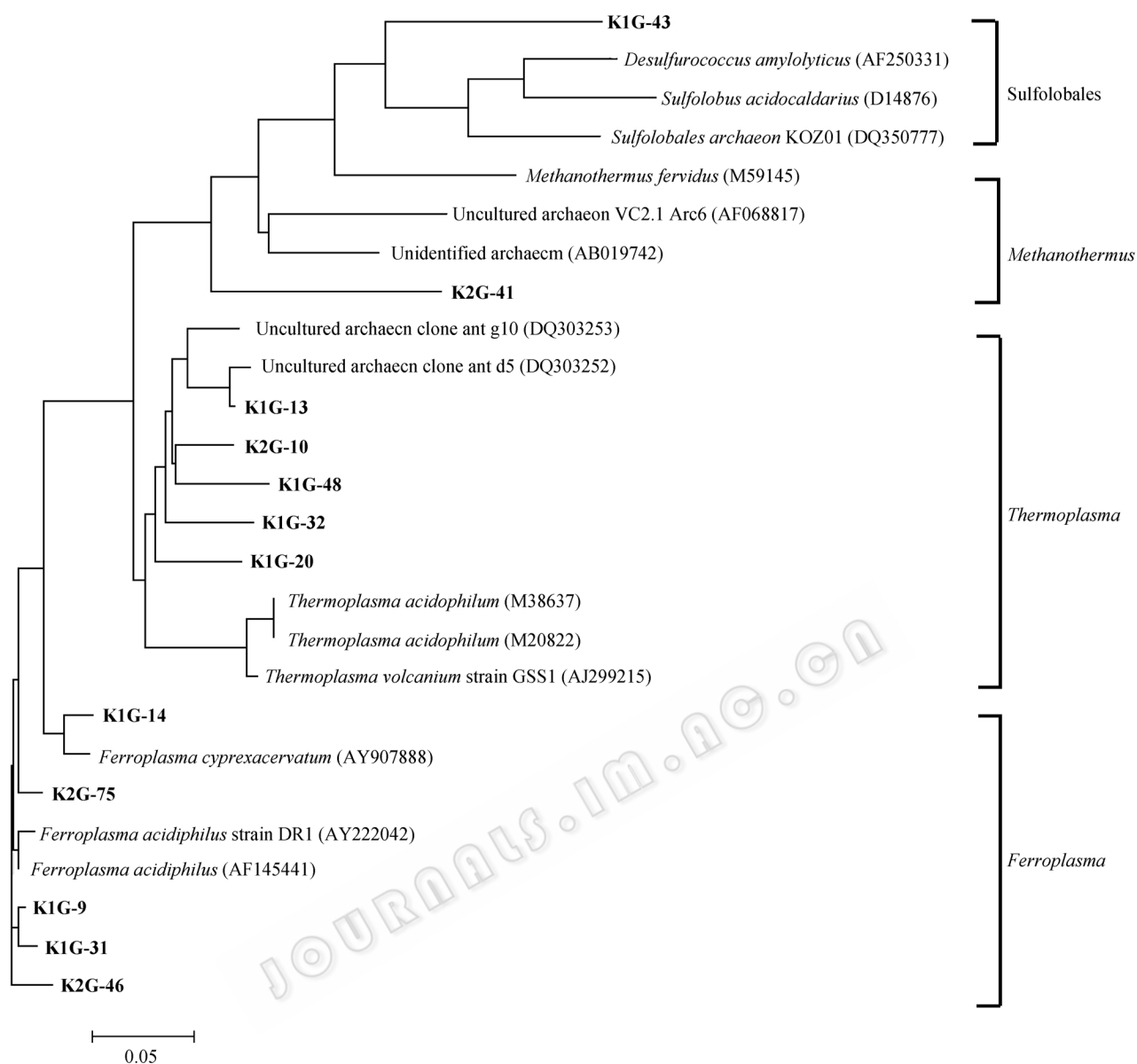


图 4 样品 K1 和 K2 中古细菌 16S rDNA 基因系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic distribution of the archaeal representative 16S rDNA sequences from samples K1 and K2

注: 本文中获得的序列用粗体标记; K1G 和 K2G: 分别代表两个采样地点, 来自湖北铜绿山铜矿; 数字 9、10、13... 75 分别代表不同的克隆子编号; 图例 0.05 表示进化距离。

Note: The sequences obtained in this study were indicated in bold; K1 and K2: two sampling sites in Tonglvshan mine, China; Numbers 9, 10, 13... 75 represented different clones, respectively; Scale 0.05 represented the distance of evolution.

亚类 (见图 3)。典型序列 K2-21、K2-5、K2-99 和 K2-23, 它们共同代表 23 个 K2 细菌克隆子, 与数据库中 *Leptospirillum* (*Leptospirillum* group 和 group) 序列有 98% 的相似性。典型序列 K2-47、K1-90 和 K1-22 代表余下的 15 个细菌克隆子 (其中 5 个 K1 和 10 个 K2 克隆子), 它们的序列属于 *Leptospirillum* group, 而与 *Leptospirillum* group 和 序列的相似度只有 68% 到 85%, 这些典型序列分别与

细菌菌株 3C07 和 BA29 的序列配对, 同属于 *Leptospirillum* group^[6,14]。这一结果表明, 在我们的样品中也发现了 *Leptospirillum* group 菌株的存在, 说明该菌株并不只局限于 Iron Mt. Mine^[8,9]。

图 4 是来自样品 K1 和 K2 的古细菌 16S rDNA 基因系统发育树。典型序列 K1G-13、K2G-10、K1G-48、K1G-32 和 K1G-20, 代表总共 126 个有效

古细菌克隆子中的 63 个克隆子, 属于第一大类—*Thermoplasma* 类。而 *Ferroplasma* 属古细菌克隆子数占总克隆子数的 46.03%, 包括典型序列 K1G-14、K2G-75、K1G-9、K1G-31 和 K2G-46, 是第二大的类群。典型序列 K2G-41 仅代表一个古细菌克隆子, 并且只存在于 K2G 古细菌文库, 它聚到 *Methanothermus* 属。另外典型序列 K2G-41 和 K1G-43 在两个古细菌文库中与其他典型序列相似性都非常低, 只有 59% 到 80%。

以上结果表明, 不同的性质的矿山废水样品中微生物的种类, 结构组成都存在着很大的差异, 同时, 同一种微生物在不同样品中的分布也明显不同。

3.4 主成分(PCA)分析

以样品的基本生物化学性质参数为分析因子的 PCA 分析结果见图 5(A)。从图中可以看出, 聚类分析后得到两个主成分因子 PC1 和 PC2, 它们能解释总变量的 96.93%。这两个主成分因子能很好地替代所有的基本性质参数来对样品进行归类, 如图 5(A)所示, 样品 SX1、SX2 和 SX3 聚在一起, 而样品 K1 和 K2 聚在一起, 它们相互分离较远。同时, 以不同克隆文库中不同 OTUs 所占百分数为分析因子, 以样品 SX1、SX2、SX3、K1 和 K2 为分析变量的 PCA 分析结果见图 5(B)。从图 5(B)得到的聚类结果与图 5(A)中有显著差异, 样品 SX2、SX3 和 K1 以及 K2 聚在一起, 而且都远离样品 SX1。这些结果说明 5 个矿山废水样品不论从它们的基本生物化学性质参数来看还是它们的微生物群落组成来看都是存在

着差异的, 而且性质类似的样品其微生物群落结构也不一定类似, 其中某些生物化学性质参数可能是起作用的主要的影响因素。

以 5 个矿山废水样品的基本生物化学性质参数为分析变量的 PCA 分析结果见图 6。两个主成分因子可以解释总变量的 80.62%。它们可以很好地将这些变量进行归类。从图 6 中可以看出, 变量 pH 值与其他变量分隔较远; 温度(temperature)与化学元素 Ni、S、Co 和 Cu 又与其他元素分离开。这些结果说明, 样品的 pH 值、温度以及化学元素 Ni、S、Co 和 Cu 可能是对样品中微生物群落结构起关键作用的影响因素。

4 结论

通过我们的研究发现:

1) 在 5 个矿山废水样品中检测到的细菌主要分为 4 大类: 即 Proteobacteria 纲、Nitrospira 纲、Firmicutes 纲和 Bacteroidetes 纲。

2) 通过对古菌 16S rDNA 的 PCR 分析发现, 取自湖北铜绿山铜矿的样品中检测到古菌的存在, 而取自山西中条山铜矿的样品中没有检测到古菌的存在。检测到的古菌主要是属于 *Ferroplasma* 属和 *Thermoplasma* 属。

3) 结合 5 个矿山废水样品的化学元素分析结果和细菌群落结构数据, 进行 PCA 分析, 发现不同矿山废水样品的生物地球化学性质及其微生物组成存在很大差异, pH 值、温度、和不同浓度的元素如 S、

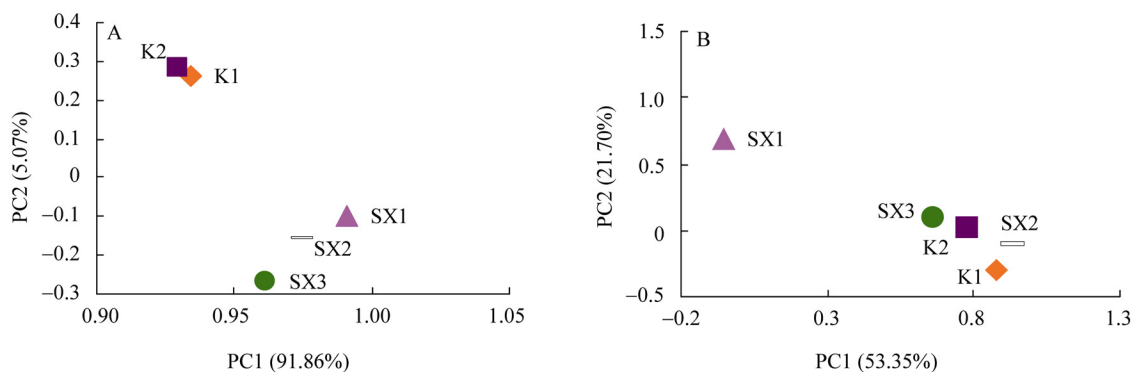


图 5 PCA 分析结果图

Fig. 5 Ordinate plots from PCA based on biogeochemical parameters

注: A: 以基本生物化学性质参数 (pH 值、温度和元素 Fe、Cu、S、Co、Ni、Zn、Pb、As、Au、Ag、Mo、etc.) 为分析因子; B: 以不同克隆文库中不同 OTUs 所占百分数为分析因子。PC1: 主成分分析因子 1; PC2: 主成分分析因子 2; SX1, SX2 和 SX3: 分别代表 3 个采样地点, 来自山西中条山铜矿; K1 和 K2: 分别代表两个采样地点, 来自湖北铜绿山铜矿。

Note: A: pH value and temperature, elements Fe, Cu, S, Co, Ni, Zn, Pb, As, Au, Ag, Mo, etc.; B: Based on different percentages of different unique OTUs in libraries. PC1: Principal component analysis factor 1; PC2: Principal component analysis factor 2; SX1, SX2 and SX3: Three different sampling sites in Zhongtiaoshan copper mine, China; K1 and K2: Two sampling sites in Tongshankou mine, China.

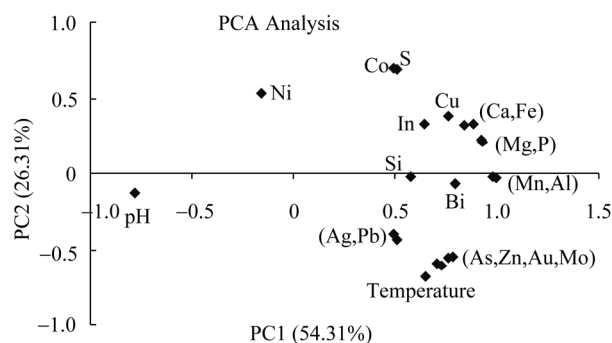


图6 PCA 分析结果图

Fig. 6 Ordinate plot from PCA based on biogeochemical properties

注：以5个样品的基本生物化学性质参数(pH值、温度和元素Fe、Cu、S、Co、Ni、Zn、Pb、As、Au、Ag、Mo、etc.)为分析变量；PC1：主成分分析因子1；PC2：主成分分析因子2。

Note: Data as variables from five samples (pH value and temperature, Fe, Cu, S, Co, Ni, Zn, Pb, As, Au, Ag, Mo, etc.). PC1: Principal component analysis factor 1; PC2: Principal component analysis factor 2.

Cu、Ni 和 Co 可能是形成细菌种群结构差异的关键因素。

以上结果为更完整的揭示世界范围内不同AMD废水环境中的微生物群落结构作出贡献，为研究由微生物介导产生AMD废水的机理提供数据参考。在今后的研究中，我们将着力于特种AMD微生物地分离、培养，微生物之间相互作用研究，微生物与矿物之间相互作用研究，AMD废水产生过程机理研究，希望能有效阻止酸性矿山废水的生成，从而保护我们的环境。

致谢：感谢中南大学资源加工与生物工程学院贺治国副教授的帮助，感谢东华大学环境科学与工程学院环境微生物学实验室提供的支持和帮助。

参 考 文 献

- [1] 冯颖, 康勇, 张忠国. 含重金属离子酸性废水的厌氧生物处理. 环境科学与技术, 2004, 27(6): 104–106.
- [2] Boshoff G, Dunchan J. Tannery effluent as a carbon source for biological sulfate reduction. *Water Research*, 2004, 38(11): 2681–2658.
- [3] 赵志怀, 尹秀贞, 杨军耀, 等. 脱硫酸菌去除煤矿酸性废水中硫酸盐的初步研究. 太原理工大学学报, 2007, 3(2): 112–115.
- [4] Johnson DB, Hallberg KB. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*, 2003, 154(7): 466–473.
- [5] Zhiguo H, Xuehui X, Shengmu X, et al. Microbial diversity of mine water at Zhong Tiaoshan copper mine, China. *Journal of Basic Microbiology*, 2007, 47(6): 485–495.
- [6] Baker BJ, Banfield JF. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 44(2): 139–152.
- [7] 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(2): 501–503.
- [8] Bond PL, Smruga SP, Banfield JF. Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(9): 3842–3849.
- [9] Druschel G, Baker B, Gihring T, et al. Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California. *Geochem Trans*, 2004, 5(2): 13–32.
- [10] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2): 316–322.
- [11] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, England, 1991, pp.115–175.
- [12] Raskin L, Stromley JM, Rittmann BE, et al. Group specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(4): 1232–1240.
- [13] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 1991, 173(2): 697–703.
- [14] Coram NJ, Rawlings DE. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferrophilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40°C. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(2): 838–845.