



研究报告

紫金山铜矿酸性矿山废水微生物群落多样性

彭珣萍^{1,2} 曾伟民^{*1,2}

1 中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083

2 生物冶金教育部重点实验室 湖南 长沙 410083

摘要:【背景】为避免环境污染,酸性矿山废水需经处理后才能排放,处理后的废水理化性质会发生显著变化,将影响整个微生物群落的结构。【目的】分析处理前后的细菌和真菌群落变化及其与理化参数的关系,为矿山废水的处理提供参考指标,并为矿山污染场地的修复提供理论基础。【方法】采集福建紫金山铜矿的酸性矿山废水并测定其理化性质。采用基于原核微生物 16S rRNA 基因 V4 区和真菌 18S rRNA 基因 ITS 的高通量测序技术分析水样的微生物群落结构。【结果】经中和处理后的回水与矿坑水和生物浸出液相比, pH 升高,重金属离子含量显著降低。原核微生物的多样性高于真菌,回水的物种多样性高于矿坑水和浸出液。回水中变形菌门的丰度最高,矿坑水和浸出液中分别以广古菌门和硝化螺菌门的丰度最高。回水中噬氢菌属为优势类群,矿坑水和浸出液中的优势菌是钩端螺旋菌属,铁质菌属等古菌也有一定的比例。pH、Al、Mn、Zn 与回水中相对丰度较高的菌属显著相关,而矿坑水和浸出液中的高丰度类群与环境因子没有显著的相关性。【结论】研究表明酸性废水的中和沉淀处理对微生物群落产生了较大的影响,微生物群落变化可以作为矿山酸性废水污染处理效果的一个参考指标。

关键词: 酸性矿山废水,理化参数,原核微生物,真菌,群落结构

Diversity of microbial community in acid mine drainage from Zijinshan copper mine

PENG Yu-Ping^{1,2} ZENG Wei-Min^{*1,2}

1 School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China

2 Key Laboratory of Biomaterials, Ministry of Education, Changsha, Hunan 410083, China

Abstract: [Background] Acid mine drainage should be treated before discharge. After treatment, its

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (51934009, 51604308, 31900108); Natural Science Foundation of Hunan Province (2018JJ2486); Youth Talent Foundation of Hunan Province (2017RS3003); Postdoctoral Research Funding Plan in Hunan Province (207159); China Postdoctoral Science Foundation (2019M662802); Post-Graduate Investigate and Research Projects of Central South University (2018DCYJ058)

***Corresponding author:** E-mail: zengweimin1024@126.com

Received: 23-03-2020; **Accepted:** 27-08-2020; **Published online:** 02-09-2020

基金项目: 国家自然科学基金(51934009, 51604308, 31900108); 湖南省自然科学基金(2018JJ2486); 湖南省青年人才基金(2017RS3003); 湖南省博士后科研资助计划(207159); 中国博士后科学基金(2019M662802); 中南大学研究生调查研究项目(2018DCYJ058)

***通信作者:** E-mail: zengweimin1024@126.com

收稿日期: 2020-03-23; **接受日期:** 2020-08-27; **网络首发日期:** 2020-09-02

physicochemical properties will be changed significantly, which would affect the whole microbial community structure. **[Objective]** The changes of bacterial and fungal communities before and after treatment and their relationships with physicochemical parameters were analyzed to provide reference indexes for the treatment of acid mine drainage and theoretical basis for the remediation of mine-contaminated sites. **[Methods]** Acid mine drainage in Zijinshan copper mine, Fujian province was collected, followed by analysis of physicochemical properties. The microbial community structures of water samples were analyzed by high-throughput sequencing technology based on 16S rRNA gene V4 region of prokaryotes and 18S rRNA gene ITS sequences of fungi. **[Results]** Compared with the pit water and leachate from the dump-leaching, the back water showed a higher pH and a lower content of heavy metal ions after the neutralization treatment. The diversity of prokaryotes was higher than that of fungi in all samples, and the microbial diversity of back water was higher than that of pit water and leachate. *Proteobacteria* was the most abundant lineage in the back water, and *Euryarchaeota* and *Nitrospirae* were of the highest abundance in the pit water and the leachate, respectively. At the genus level, *Hydrogenophaga* in the back water was the dominant group, while *Leptospirillum* was the dominant bacterium in the pit water and leachate, and archaea such as *Ferroplasma* also accounted for a considerable proportion. The pH, Al, Mn and Zn were significantly correlated with the genera with high relative abundance in the back water, while the high-abundance groups in the pit water and leachate had no significant correlation with the environmental factors. **[Conclusion]** The study indicated that the neutralization and precipitation treatment of acid mine drainage imposes a great impact on the microbial community, and the changes in microbial community structure could be used as a reference index for acid mine drainage pollution treatment efficiency.

Keywords: Acid mine drainage, Physicochemical parameters, Prokaryotic microorganism, Fungus, Microbial community

金属矿产资源的开发利用过程中, 由于硫化矿的氧化会产生大量的酸性废水, 包括矿井水、矿坑水、尾矿淋滤水和生物堆浸产生的浸出液等。这些废水的 pH 低且含有大量的重金属离子^[1]。酸性矿山环境广泛分布于全球范围内, 如美国的 Iron Mountain 和西班牙的 Rio Tinto River, 以及国内的紫金山和大宝山等都是典型的酸性矿山废水区域^[2-3]。

微生物在酸性矿山废水的形成过程中起到了重要的作用。一些微生物能够氧化二价铁或还原性无机硫化物来获得能量, 从而加速了硫化矿物的溶解。典型的矿水废水中的微生物包括严格自养的酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)和钩端螺旋菌属(*Leptospirillum*), 以及可异养生长的硫化杆菌属(*Sulfobacillus*)、铁质菌属(*Ferroplasma*)和嗜酸菌属(*Acidiphilium*)等^[4]。目前对酸性矿山废水微生物的研究以原核微生物为主, 对于真核微生物仅

有少量报道。如 Amaral Zettler 等发现在 Rio Tinto River 中, 真核藻类的比例较高, 占到总生物量的 60%以上^[5]。研究人员通过构建 18S rRNA 基因文库发现, Iron Mountain 的强酸性废水(pH<0.9)中存在锁掷酵母(*Sporidiobolus pararoseus*)以及一些未培养真菌^[6]。

酸性矿山废水排放到环境中会对水体和土壤造成污染, 是采矿业面临的一个严重的环境问题。为此, 人们提出了一些措施来处理酸性矿山废水, 包括化学法和生物法等。处理后的矿山废水, 其理化性质会发生明显的变化, 从而对微生物的生长造成影响, 最终将影响整个微生物群落的结构。本研究从紫金山采集了处理前后的矿山废水, 分析了处理前后的细菌和真菌群落变化及其与理化参数的关系, 以期为矿山废水的处理提供参考指标以及为矿山污染场地的修复提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DNeasy PowerSoil DNA 提取试剂盒, Qiagen 公司; PCR 试剂盒, 诺唯赞生物科技有限公司; 胶回收纯化试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; PCR 仪, 北京东胜创新生物科技有限公司; 电感耦合等离子体发射光谱仪, Agilent 公司。

1.2 样品采集及理化性质测定

采集紫金山铜矿 3 水样, 分别为矿坑水、生物堆浸的浸出液及回水。紫金山铜矿设有水处理系统, 主要采用中和沉淀法处理含铜酸性溶液, 在反应槽中加入石灰乳或液碱进行中和, 并加入絮凝剂促进沉淀。部分收集的矿坑水和生物浸出液经萃取和电积处理后产生的废水进入水处理系统。处理后的废水(回水)一部分回用于采矿井下用水(形成矿坑水)、废水处理站用水、生物堆浸用水和碎矿等。每种水样均采集 3 份, 每份 10 L, 先用定性滤纸过滤除去固体杂质。滤液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 用 PBS 溶液将滤膜上的微生物洗下来, 所得菌悬液 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。菌体于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。现场测定水样的温度和 pH, 以 Ag/AgCl 电极为参比测定水样的电位。采用电感耦合等离子体发射光谱仪测定过滤后水样的金属离子含量。

1.3 DNA 提取及微生物多样性测序

采用 DNA 提取试剂盒提取微生物基因组 DNA, 该试剂盒采用振荡破碎法, 可同时提取细菌和真菌的基因组 DNA^[7]。采用 NanoDrop ND-100 测定提取的 DNA 浓度, 琼脂糖凝胶电泳观察提取的 DNA 完整性。

采用通用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCG CGGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWT CTAAT-3') PCR 扩增细菌和古菌的 16S rRNA 基因 V4 区, PCR 反应体系和反应条件参照文献[8], 采用真菌 ITS 通用引物 ITS3_KYO2 (5'-GATGAAGA ACGYAGYRAA-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTAT

TGATATGC-3') PCR 扩增真菌 ITS 序列, PCR 反应体系和反应条件参照文献[9]。琼脂糖凝胶电泳检测产物, 并用胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物。纯化产物送到罗宁生物科技有限公司采用 Illumina HiSeq 2500 平台测序。

根据原始序列的质控信息去除低质量的碱基。采用 Flash^[10]软件将正反向序列进行拼接, 用 UCHIME^[11]检测并去除拼接后序列的嵌合体。使用 UPARSE^[12]算法在 97% 的一致性水平上进行 OTU 聚类, 挑选每个 OTU 中出现频数最高的序列作为 OTU 的代表序列。使用 UCLUST^[13]分类法与原核 SILVA 数据库和真菌 UNITE 数据库进行物种注释分析。采用 R 语言中的 Vegan^[14]软件包计算 Shannon 指数和 Simpson 指数。采用 Mantel test 分析微生物群落结构与环境因子的相关性^[15]。

2 结果与分析

2.1 水样理化性质

3 个样品的理化性质见表 1。矿坑水的 pH 最低, 为 1.45, 浸出液的 pH 也低于 2.00, 回水经过石灰乳和碱液中和后, pH 相对于矿坑水和浸出液明显升高, 达到 4.50 以上。回水中的重金属离子含量很低, 矿坑水和浸出液的重金属离子浓度很高, 其中矿坑水中铜离子含量达到 2 608.7 mg/L, 总铁离子含量达到 7 788.7 mg/L, 而浸出液中的总

表 1 紫金山铜矿水样的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of water samples from Zijinshan copper mine

项目 Item	S1	S2	S3
酸碱度 pH	4.55±0.01	1.45±0.02	1.89±0.01
电位 Eh (mV)	297±3.2	576±5.8	458±6.9
铝 Al (mg/L)	1.5±0.6	1 486.3±6.7	1 876.3±40.2
砷 As (mg/L)	0.1±0.05	35.8±0.6	82.7±2.3
铜 Cu (mg/L)	1.4±0.7	2 608.7±11.0	1 861.0±47.2
铁 Fe (mg/L)	1.8±0.5	7 788.7±53.5	12 143.3±260.1
锰 Mn (mg/L)	1.8±0.3	19.2±0.2	23.7±0.5
锌 Zn (mg/L)	1.9±0.8	325.2±3.8	325.3±7.4

注: S1: 回水; S2: 矿坑水; S3: 浸出液。

Note: S1: Back water; S2: Pit water; S3: Leachate from the dump-leaching.

铁含量高达 12 143 mg/L。矿坑水和浸出液的电位值明显高于回水。

2.2 水样微生物 OTU 聚类与多样性

采用 HISEQ 2500 PE250 分别对原核生物 16S rRNA 基因 V4 区和真菌 ITS 测序。原核微生物 V4 区测序, S1、S2 和 S3 分别产生 33 912、31 748 和 36 042 条有效序列, 序列平均长度 290 bp, 真菌 ITS 测序, S1、S2 和 S3 分别产生 41 779、41 538 和 42 306 条有效序列, 序列平均长度为 360 bp。原核微生物 V4 区和真菌 ITS 测序的覆盖度均达到 99.9% 以上, 表明测序结果已足够代表样品的真实情况。回水、矿坑水和浸出液 V4 区测序的 Shannon 指数分别为 2.95、2.57 和 2.76, Simpson 指数分别为 0.87、0.83 和 0.87, 真菌 ITS 测序的 Shannon 指数分别为 1.87、0.91 和 1.27, Simpson 指数分别为 0.68、0.50 和 0.53, 可见回水的物种多样性要高于矿坑水和浸出液, 并且原核微生物

的多样性要高于真菌。按照 97% 的序列相似性划分为一个 OTU, 原核微生物 V4 区测序 S1、S2 和 S3 分别产生 216、216 和 218 个 OTU, 总 OTU 数为 244 个, 3 组样品共有的 OTU 有 167 个, 占总 OTU 数的 68.4%, 这 167 个共有 OTU 的丰度占总生物量的 97.3%; 真菌 ITS 测序分别产生 133、113 和 124 个 OTU, 总 OTU 数为 167 个, 3 组样品共有的 OTU 为 72 个, 占总 OTU 数的 43.1%, 这 72 个共有 OTU 的丰度占总生物量的 90.8%。

2.3 原核微生物群落结构组成

3 组水样的原核微生物群落结构组成见图 1 和图 2。从门水平(图 1)看, 样品的原核微生物分布在 19 个门中, 回水中以变形菌门(*Proteobacteria*)的丰度最高, 占比达 75.4%, 其次为疣微杆菌门(*Verrucomicrobia*, 7.1%)、厚壁菌门(*Firmicutes*, 6.9%)、硝化螺菌门(*Nitrospirae*, 3.5%)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 2.24%)。矿坑水中的原核微生物

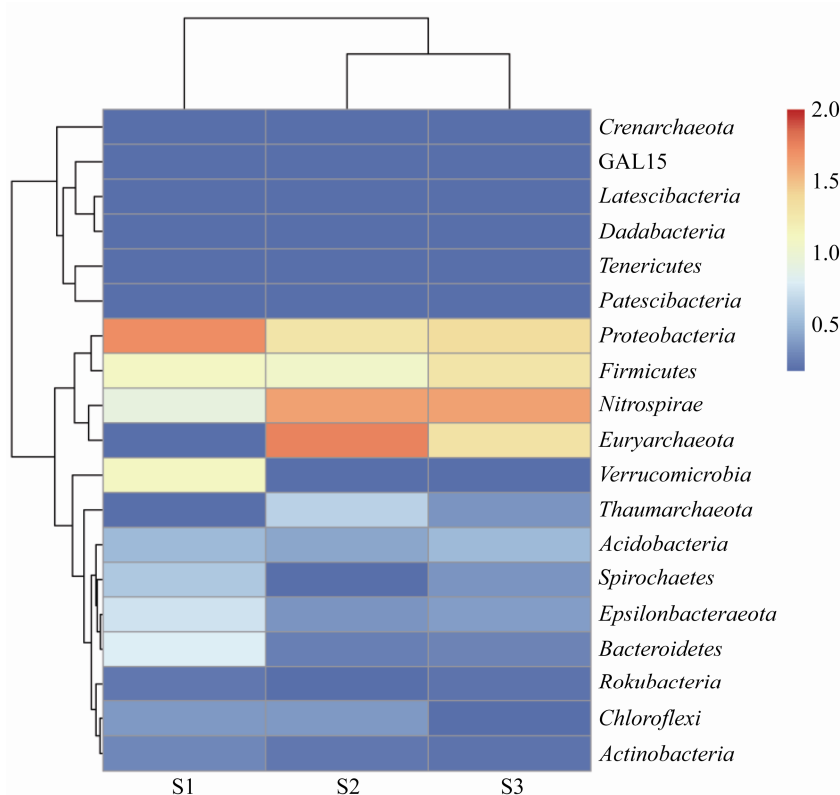


图 1 样品在门水平上的原核微生物群落结构

Figure 1 Prokaryotic microbial community structure of the samples on the phylum level

物丰度最高的是广古菌门(49.81%), 丰度较高的有硝化螺菌门(31.85%)、变形菌门(10.3%)和厚壁菌门(4.52%); 另外, 还有一定比例的奇古菌门(*Thaumarchaeota*, 1.1%)。浸出液中硝化螺菌门(50.9%)丰度最高, 比例较高的还有变形菌门(17.9%)、广古菌门(*Euryarchaeota*, 14.3%)和厚壁菌门(14.0%), 其他门的微生物丰度均在 1%以下。总体来看, 回水中原核微生物在门水平的结构组成与矿坑水和浸出液的差别较大, 而矿坑水和浸出液的物种类别相似。

从属水平(图 2)看, 回水中丰度最高的是噬氢菌属(*Hydrogenophaga*), 比例为 29.6%, 其次为硫幡菌属(*Thiovirga*, 12.4%)和新鞘脂菌属(*Novosphingobium*, 10.8%)。典型极端嗜酸菌的丰度很低, 如酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*, 0.23%)、嗜酸菌属(*Acidiphilium*, 0.63%)和硫化杆菌(*Sulfobacillus*, 0.45%), 但是钩端螺旋菌

(*Leptospirillum*)有较高的丰度(3.5%)。矿坑水中钩端螺旋菌是优势菌(31.8%), 古菌的比例较高, 属于古菌的 A-plasma、铁质菌属(*Ferroplasma*)和酸质菌属(*Acidiplasma*)的丰度分别为 16.3%、6.2%和 1.3%。值得注意的是, 一种 *Unclassified Ferroplasmaceae* 的相对丰度达到 17.02%, 表明该水样中可能存在新的 *Ferroplasmaceae* 物种。古菌在矿坑水中的比例较高, 可能是因为古菌如铁质菌属等对 pH 的耐受性很强^[16]。此外, 酸硫杆菌也有较高的比例, 相对丰度为 7.5%。与矿坑水相似, 浸出液中的优势菌也是钩端螺旋菌属, 但是相对丰度更高, 为 50.9%。钩端螺旋菌属在很多酸性矿山废水中都是优势类群^[17]。嗜酸菌属的相对丰度为 16.1%, 硫化杆菌(*Sulfobacillus*)为 10.4%。A-plasma (6.9%)、铁质菌属(3.1%)和酸质菌属(1.9%)也有一定的比例, 但是酸硫杆菌属的比例极低(0.07%)。

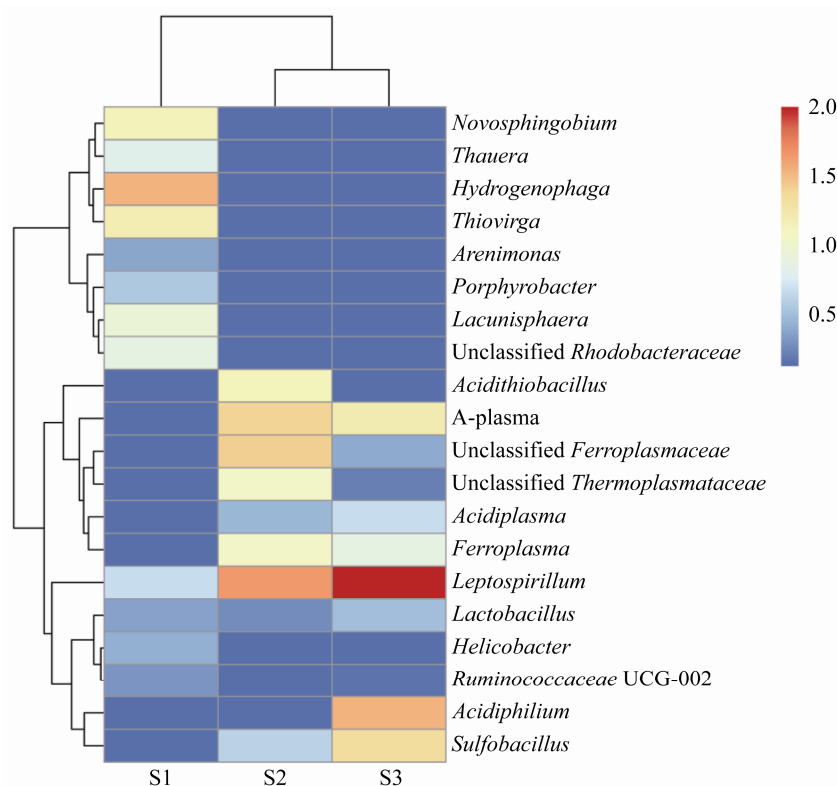


图 2 样品在属水平上的原核微生物群落结构

Figure 2 Prokaryotic microbial community structure of the samples on the genus level

2.4 真菌群落结构组成

水样的真菌群落结构组成见图 3 和图 4。从门水平(图 3)看, 3 组样品的差别不明显, 子囊菌门 (*Ascomycota*)为绝对优势类群, 在 3 组样品中的丰度分别为 98.2%、99.4%和 98.9%, 可能是因为

Ascomycota 对酸性环境的耐受较强。从属水平 (图 4)看, 回水和矿坑水及浸出液的真菌群落结构差别较大。回水中相对丰度最高的为曲霉属 (*Aspergillus*, 54.6%), 其次为轮枝菌属(*Verticillium*, 23.1%), 而顶囊壳属(*Gaeumannomyces*, 2.8%)、外

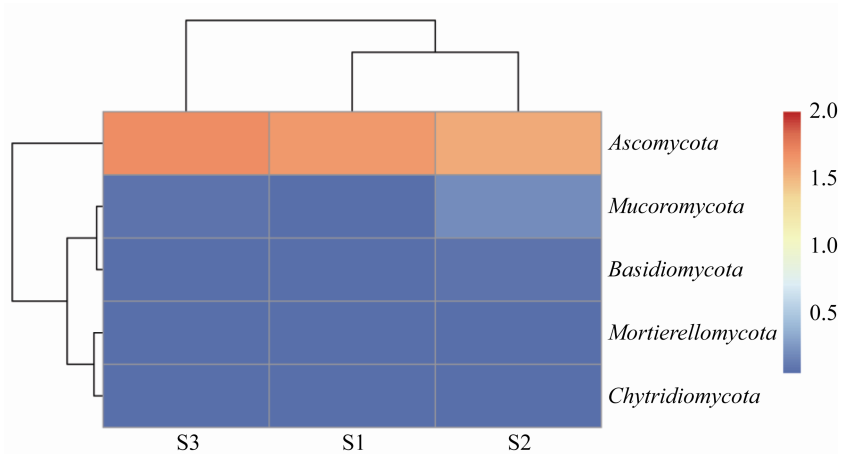


图 3 样品在门水平上的真菌群落结构
Figure 3 Fungal community structure of the samples on the phylum level

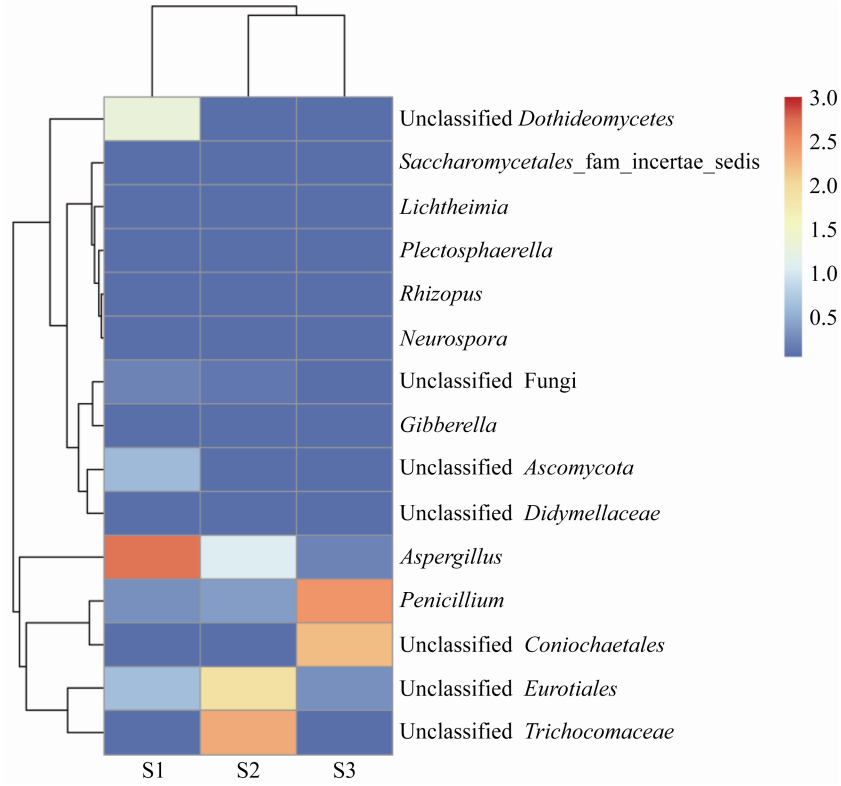


图 4 样品在属水平上的真菌群落结构
Figure 4 Fungal community structure of the samples on the genus level

瓶霉属(*Exophiala*, 1.6%)和青霉属(*Penicillium*, 1.1%)也有一定的比例, 其他属的物种相对丰度均在 1%以下。在矿坑水中, 未培养真菌的相对丰度很高, 其中 Unclassified *Trichocomaceae* 为优势类群, 其相对丰度达到 64.1%, 而来自 *Eurotiales* 的未培养真菌相对丰度为 26.7%。曲霉和青霉的相对丰度分别为 4.3%和 1.0%。浸出液中, 青霉为优

势类群, 相对丰度为 61.8%; 其次为 Unclassified *Coniochaetales*, 相对丰度为 35.4%, 其他类群的相对丰度均很低。

2.5 微生物群落结构与环境因子的关系

水样环境因子与相对丰度最高的 20 个原核菌属的相关性见表 2。从表 2 可以看出, pH、Al、Mn 和 Zn 与群落组成的相关性最强, 而 Eh、As、Cu

表 2 样品环境因子与相对丰度较高的原核菌属的相关性

Table 2 Correlation between environmental parameters and prokaryotic genera with high relative abundance of the samples

属 Genus	酸碱度 pH <i>r</i> /(<i>p</i>)	电位 Eh <i>r</i> /(<i>p</i>)	铝 Al <i>r</i> /(<i>p</i>)	砷 As <i>r</i> /(<i>p</i>)	铜 Cu <i>r</i> /(<i>p</i>)	铁 Fe <i>r</i> /(<i>p</i>)	锰 Mn <i>r</i> /(<i>p</i>)	锌 Zn <i>r</i> /(<i>p</i>)
<i>Hydrogenophaga</i>	0.990 (0.010)	-0.848 (0.152)	-0.982 (0.019)	-0.819 (0.181)	-0.942 (0.058)	-0.938 (0.062)	-0.983 (0.017)	-1.000 (0.000 1)
<i>Thiovirga</i>	0.991 (0.009)	-0.852 (0.148)	-0.980 (0.020)	-0.815 (0.185)	-0.945 (0.055)	-0.936 (0.064)	-0.982 (0.019)	-1.000 (0.000 2)
<i>Novosphingobium</i>	0.990 (0.010)	-0.850 (0.150)	-0.981 (0.019)	-0.817 (0.183)	-0.943 (0.057)	-0.937 (0.063)	-0.982 (0.018)	-1.00 (0.000 1)
<i>Lacunisphaera</i>	0.990 (0.010)	-0.849 (0.151)	-0.981 (0.019)	-0.818 (0.182)	-0.943 (0.057)	-0.938 (0.062)	-0.983 (0.017)	-1.000 (0.000 1)
Unclassified <i>Rhodobacteraceae</i>	0.990 (0.010)	-0.850 (0.150)	-0.981 (0.019)	-0.817 (0.184)	-0.944 (0.056)	-0.937 (0.063)	-0.982 (0.018)	-1.000 (0.000 2)
<i>Thauera</i>	0.989 (0.011)	-0.846 (0.154)	-0.982 (0.018)	-0.821 (0.179)	-0.941 (0.059)	-0.939 (0.061)	-0.983 (0.017)	-1.000 (0.000)
<i>Leptospirillum</i>	-0.857 (0.143)	0.583 (0.417)	0.979 (0.022)	0.969 (0.031)	0.741 (0.259)	0.999 (0.001)	0.975 (0.025)	0.924 (0.076)
<i>Porphyrobacter</i>	0.991 3 (0.009)	-0.854 (0.146)	-0.980 (0.021)	-0.813 (0.187)	-0.946 (0.054)	-0.935 (0.065)	-0.981 (0.019)	-1.000 (0.000 2)
<i>Helicobacter</i>	0.991 (0.009)	-0.854 (0.146)	-0.980 (0.020)	-0.813 (0.187)	-0.946 (0.054)	-0.935 (0.065)	-0.981 (0.019)	-1.000 (0.000 3)
<i>Arenimonas</i>	0.989 (0.011)	-0.845 (0.155)	-0.983 (0.017)	-0.822 (0.178)	-0.940 (0.060)	-0.940 (0.060)	-0.984 (0.016)	-1.000 (0.000 1)
<i>Lactobacillus</i>	0.893 (0.107)	-0.933 (0.067)	-0.717 (0.283)	-0.440 (0.560)	-0.934 (0.066)	-0.607 (0.393)	-0.718 (0.282)	-0.832 (0.168)
<i>Ruminococcaceae</i> UCG-002	0.995 (0.006)	-0.867 (0.133)	-0.973 (0.027)	-0.800 (0.202)	-0.954 (0.046)	-0.924 (0.076)	-0.975 (0.025)	-0.999 (0.001)
<i>Acidiphilium</i>	-0.435 (0.565)	0.040 (0.960)	0.704 (0.296)	0.927 (0.073)	0.251 (0.750)	0.809 3 (0.191)	0.694 (0.306)	0.565 (0.435)
<i>Sulfobacillus</i>	-0.488 (0.512)	0.104 (0.896)	0.699 (0.301)	0.921 (0.079)	0.312 (0.689)	0.784 (0.216)	0.681 (0.319)	0.603 (0.397)
<i>Acidithiobacillus</i>	-0.448 (0.552)	0.766 (0.234)	0.133 (0.867)	-0.279 (0.721)	0.614 (0.386)	-0.029 (0.972)	0.147 (0.854)	0.308 9 (0.691)
A-plasma	-0.788 (0.213)	0.970 (0.030)	0.552 (0.448)	0.155 (0.846)	0.894 (0.106)	0.411 (0.589)	0.565 (0.435)	0.687 (0.313)
Unclassified <i>Ferropasmaceae</i>	-0.504 (0.496)	0.807 (0.193)	0.196 (0.804)	-0.220 (0.781)	0.664 (0.336)	0.036 (0.964)	0.210 (0.790)	0.369 (0.632)
<i>Acidiplasma</i>	-0.873 (0.127)	0.727 (0.273)	0.926 (0.074)	0.775 (0.225)	0.819 (0.181)	0.908 (0.092)	0.935 (0.065)	0.898 (0.102)
Unclassified <i>Thermoplasmataceae</i>	-0.542 (0.458)	0.832 (0.168)	0.240 (0.760)	-0.176 (0.824)	0.696 (0.304)	0.080 (0.920)	0.254 (0.747)	0.410 (0.590)
<i>Ferroplasma</i>	-0.824 (0.176)	0.982 (0.019)	0.611 (0.389)	0.222 (0.778)	0.919 (0.081)	0.478 (0.522)	0.625 (0.375)	0.733 (0.267)

和 Fe 与群落结构的相关性较弱。pH 与 *Hydrogenophaga*、*Thiovirga*、*Novosphingobium*、*Lacunisphaera*、*Porphyrobacter*、Unclassified *Rhodobacteraceae*、*Thauera*、*Helicobacter*、*Arenimonas* 及 *Ruminococcaceae* UCG-002 的相对丰度显著正相关，而 Al、Mn、Zn 与这些菌属的相对丰度显著负相关。Al、As、Fe、Mn 与 *Leptospirillum* 的相对丰度显著正相关，Eh 与 A-plasma 和 *Ferroplasma* 的相对丰度显著正相关。

水样环境因子与相对丰度最高的 10 个真菌菌属的相关性见表 3。其中，pH 与 Unclassified *Ascomycota*、Unclassified *Didymellaceae*、Unclassified *Dothideomycetes* 的相对丰度显著正相关，而 Al、Mn、Zn 则与上述菌属的相对丰度显著负相关。Al、Fe、Mn 与 *Aspergillus*、Unclassified *Fungi* 及 *Gibberella* 显著负相关。除此之外，*Aspergillus* 的相对丰度还与 pH 显著正相关，与 Zn 显著负相关，*Gibberella* 与 Zn 显著负相关。Eh、As 和 Cu 与真菌群落组成没有显著相关性。

3 讨论

矿山废水因其 pH 极低且含有高浓度的重金属离子，如果不经处理而任意排放，将对周边的生态造成危害，如造成鱼类、藻类等水生生物死亡，破坏土壤结构使土壤板结，造成金属管道的腐蚀等^[18]。因此，矿山企业在排放废水之前需采用各种方法去除重金属离子及中和废水 pH。经处理后的废水除了以各种理化参数来评价处理效果外，还可以考虑用微生物群落结构作为监测水体污染的指标^[19]。

本研究采集了紫金山铜矿矿坑水和浸出液，这两组样品的 pH 很低、重金属离子浓度很高，符合典型的酸性矿山废水的特征。同时采集了中和沉淀处理后的水样(回水)，处理后的水样 pH 显著升高，而重金属离子已经降至很低的浓度。采用基于 16S rRNA 基因和真菌 ITS 测序的技术分析了 3 组水样的原核微生物和真菌群落结构，回水中的微生物群落组成明显不同于矿坑水和浸出液。矿坑水和浸出液中以钩端螺旋菌等典型极端嗜酸

表 3 样品环境因子与相对丰度较高真菌菌属的相关性

Table 3 Correlation between environmental parameters and fungal genus with high relative abundance of the samples

属 Genus	酸碱度 pH <i>r</i> /(<i>p</i>)	电位 Eh <i>r</i> /(<i>p</i>)	铝 Al <i>r</i> /(<i>p</i>)	砷 As <i>r</i> /(<i>p</i>)	铜 Cu <i>r</i> /(<i>p</i>)	铁 Fe <i>r</i> /(<i>p</i>)	锰 Mn <i>r</i> /(<i>p</i>)	锌 Zn <i>r</i> /(<i>p</i>)
<i>Penicillium</i>	-0.451 (0.549)	0.051 (0.949)	0.709 (0.291)	0.939 (0.061)	0.265 (0.735)	0.810 (0.190)	0.695 (0.305)	0.580 (0.420)
Unclassified	-0.430 (0.570)	0.072 (0.928)	0.698 (0.302)	0.873 (0.127)	0.263 (0.737)	0.798 (0.202)	0.695 (0.305)	0.552 (0.448)
<i>Coniochaetales</i>	-0.414 (0.586)	0.742 (0.258)	0.096 (0.904)	-0.315 (0.685)	0.584 (0.416)	-0.066 (0.934)	0.110 (0.890)	0.273 (0.727)
Unclassified	0.979 (0.021)	-0.814 (0.186)	-0.992 (0.008)	-0.852 (0.148)	-0.920 (0.080)	-0.958 (0.042)	-0.992 (0.008)	-0.998 (0.002)
<i>Aspergillus</i>	0.854 (0.146)	-0.600 (0.400)	-0.974 (0.026)	-0.939 (0.061)	-0.748 (0.252)	-0.990 (0.010)	-0.974 (0.026)	-0.916 (0.084)
Unclassified	0.938 (0.062)	-0.725 (0.275)	-0.100 (0.000)	-0.911 (0.089)	-0.854 (0.146)	-0.980 (0.010)	-0.999 (0.001)	-0.978 (0.022)
<i>Gibberella</i>	-0.464 (0.536)	0.778 (0.222)	0.151 (0.850)	-0.262 (0.738)	0.629 (0.371)	-0.010 (0.990)	0.165 (0.835)	0.326 (0.674)
<i>Trichocomaceae</i>	0.990 (0.010)	-0.849 (0.151)	-0.981 (0.012)	-0.817 (0.183)	-0.943 (0.057)	-0.938 (0.062)	-0.983 (0.017)	-1.000 (0.000 1)
Unclassified	0.977 (0.023)	-0.829 (0.171)	-0.987 (0.013)	-0.826 (0.174)	-0.926 (0.074)	-0.950 (0.050)	-0.990 (0.010)	-0.992 (0.008)
<i>Ascomycota</i>	0.989 (0.011)	-0.846 (0.154)	-0.982 (0.018)	-0.82 (0.179)	-0.941 (0.059)	-0.940 (0.060)	-0.983 (0.017)	-1.000 (0.000 1)
Unclassified								
<i>Dothideomycetes</i>								

微生物为主, 而回水中原核微生物以 *Hydrogenophaga* 属为优势菌属, *Thiovirga* 和 *Novosphingobium* 也有较高的含量, 这些菌属常见于弱酸性或近中性且重金属离子浓度低的环境中, 如人工湿地等^[20-21]。从门水平看, 3 组水样中, 真菌均以 *Ascomycota* 的相对丰度最高。张丽娜等^[22]分析了安徽某铁矿酸性矿山废水中真核生物的群落结构, 发现 *Ascomycota* 普遍存在于水样中, 并且在其中 2 个样品中是优势门类。Auld 等^[23]则研究发现加拿大 Copper Cliff 酸性水样中, *Ascomycota* 的相对丰度很低, 而在其冬季样品中, *Basidiomycota* 下的 *Microbotryomycetes* 含量较高。从属水平看, 矿坑水中以未分类的真菌丰度较高, 浸出液中 *Penicillium* 为优势类群, 而回水中 *Aspergillus* 为优势类群。Amaral-Zettler^[24]分析了 Rio Tinto 某处酸性水样中的真核类群, 发现硅藻 *Pinnularia* 的相对丰度最高。Baker 等^[6]发现 Richmond mine 中的 *Sporidiobolus* 占真核微生物的比例最高 (37%), 其次为 *Dothideomycetes* IM groups II (22%)。这些结果表明相对于原核微生物, 真核微生物在酸性矿山废水中的物种分布较为分散, 物种的特异性较低。

从水的流向来看, 3 种水样之间存在关联, 因此三者的微生物群落存在一定的相似性, 如 *Leptospirillum* 和 *Ferroplasma* 等极端嗜酸微生物同样存在于 pH>4.00 的回水中。但是, 环境因子(重金属离子浓度、pH 等)对微生物的选择作用, 导致了微生物在 3 种水中的相对丰度产生了差异。通过分析微生物群落结构与理化参数的相关性发现, pH、Al、Mn、Zn 与回水中相对丰度较高的菌属如 *Hydrogenophaga*、*Thiovirga* 和 *Aspergillus* 有很强的相关性, 而在矿坑水与浸出液中有较高丰度的 *Acidiphilium*、*Sulfobacillus*、*Ferroplasma*、*Penicillium* 等菌属与环境因子没有显著的相关性。回水和矿坑水及浸出液中微生物群落结构的明显差异性表明, 将一些微生物作为矿山废水处理效果的生物性指标具有可行性。随着极端微生

物组计划^[25]的深入开展, 高通量测序技术的发展和大数据的整合将使我们更全面深入地探究酸性矿山废水微生物的全貌, 从而揭示矿山环境微生物演变的普遍规律, 结合分子生物学技术, 未来可能通过分析微生物的变化来监测矿山的生态状况。随着测序成本的进一步降低, 采用微生物群落监测水样污染情况将是一种经济有效的方法, 是理化参数检测的有益补充。

4 结论

(1) 经过中和沉淀处理的矿山废水(回水) pH 明显升高, 重金属离子浓度显著降低。回水中微生物的群落结构相对于未处理的矿坑水和浸出液有很大差异。

(2) pH、Al、Mn、Zn 对回水的微生物群落结构有显著影响, 而这些环境因子对矿坑水和浸出液中的微生物群落结构没有显著影响。微生物的群落变化可以作为衡量矿山废水处理效果的指标。

REFERENCES

- [1] Ding C, Li Q, Guo CL, et al. Responses of microbial communities in paddy soils to the intrusion of acid mine drainage[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2019, 39(9): 3080-3089 (in Chinese)
丁翠, 李琦, 郭楚玲, 等. 酸性矿山废水对稻田土壤微生物菌群结构的影响[J]. 环境科学学报, 2019, 39(9): 3080-3089
- [2] Quatrini R, Johnson DB. Microbiomes in extremely acidic environments: functionalities and interactions that allow survival and growth of prokaryotes at low pH[J]. Current Opinion in Microbiology, 2018, 43: 139-147
- [3] Kuang JL, Huang LN, Chen LX, et al. Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage[J]. The ISME Journal, 2013, 7(5): 1038-1050
- [4] Méndez-García C, Peláez AI, Mesa V, et al. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 475
- [5] Amaral Zettler LA, Gómez F, Zettler E, et al. Microbiology: Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire[J]. Nature, 2002, 417(6885): 137
- [6] Baker BJ, Tyson GW, Goosherst L, et al. Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(7): 2192-2199

- [7] Ai CB, Yan Z, Zhou H, et al. Metagenomic insights into the effects of seasonal temperature variation on the activities of activated sludge[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(12): 713
- [8] Ma LY, Wang XJ, Liu XD, et al. Intensified bioleaching of chalcopyrite by communities with enriched ferrous or sulfur oxidizers[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 268: 415-423
- [9] Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S, et al. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40863
- [10] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963
- [11] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200
- [12] Edgar RC. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998
- [13] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461
- [14] Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology[J]. *Journal of Vegetation Science*, 2003, 14(6): 927-930
- [15] Niu JJ, Deng J, Xiao YH, et al. The shift of microbial communities and their roles in sulfur and iron cycling in a copper ore bioleaching system[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 34744
- [16] Zhou HB, Zhang R, Hu P, et al. Isolation and characterization of *Ferroplasma thermophilum* sp. nov., a novel extremely acidophilic, moderately thermophilic archaeon and its role in bioleaching of chalcopyrite[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(2): 591-601
- [17] Rawlings DE, Tributsch H, Hansford GS. Reasons why 'Leptospirillum'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores[J]. *Microbiology*, 1999, 145(1): 5-13
- [18] Cong ZY, Zhao FH. Current situation and prospect of the research on acid mine drainage[J]. *China Mining Magazine*, 2003, 12(3): 15-18 (in Chinese)
- 丛志远, 赵峰华. 酸性矿山废水研究的现状及展望[J]. *中国矿业*, 2003, 12(3): 15-18
- [19] He ZL, Zhang P, Wu LW, et al. Microbial functional gene diversity predicts groundwater contamination and ecosystem functioning[J]. *American Society for Microbiology*, 2018, 9(1): e02435-02417
- [20] Cheng LF, Fan LY, Zhang X, et al. Diversity of microbial community in winter at constructed wetlands sediment around coal mining area at Zuoyun, Shanxi Province[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(12): 3181-3192 (in Chinese)
- 程丽芬, 樊兰英, 张欣, 等. 山西左云县采煤区人工湿地冬季沉积物细菌群落多样性[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(12): 3181-3192
- [21] Ito T, Sugita K, Yumoto I, et al. *Thiovirga sulfuroxydans* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a microaerobic waste-water biofilm[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3): 1059-1064
- [22] Zhang LN, Hao CB, Wang LH, et al. Characteristics of the eukaryotic community structure in acid mine drainage lake in Anhui Province, China[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(7): 875-884 (in Chinese)
- 张丽娜, 郝春博, 王丽华, 等. 安徽某铁矿酸性矿山废水中真核生物的群落结构特征[J]. *微生物学报*, 2012, 52(7): 875-884
- [23] Auld RR, Mykytczuk NCS, Leduc LG, et al. Seasonal variation in an acid mine drainage microbial community[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2017, 63(2): 137-152
- [24] Amaral-Zettler LA. Eukaryotic diversity at pH extremes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 3: 441
- [25] Liu SJ, Shi WY, Zhao GP. China microbiome initiative: Opportunity and challenges[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017, 32(3): 241-250 (in Chinese)
- 刘双江, 施文元, 赵国屏. 中国微生物组计划: 机遇与挑战[J]. *中国科学院院刊*, 2017, 32(3): 241-250