微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn

Jan. 20, 2014, 41(1): 43−49
© 2014 by Institute of Microbiology, CAS
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.130087

研究报告

包头泉山金矿浸矿酸性微生物群落优势度变化的比较研究

聂立　税刘杨　王建英*

(内蒙古科技大学 数理与生物工程学院　内蒙古 包头　014010)

摘　要：【目的】研究不同矿石组成对微生物群落结构的影响。【方法】选取包头泉山金矿的酸性矿坑水(Acid mine drainage，AMD)对 4 种不同组成的矿石样品进行浸矿，采用 16S rRNA-PCR 和 RFLP 相结合的方法，研究浸矿前后浸矿微生物种群优势度的变化情况。【结果】所选取的 3 个酸性矿坑水考查点之间浸矿微生物的种类及数量相似度较大，浸矿微生物结构相对变化度不大。H71 和 F11 相对其他两个样品的群落结构差异较大，而 J72 和 S71 几乎一样，说明在钾长型和石英型矿石的选择压力下，浸矿微生物的被选择趋势是大致相同的。【结论】浸矿前后样品中浸矿微生物的系统发育分析结果表明，所考查的克隆子的序列可分为两大分支：*Acidithiobacillus* 菌属和一个相对独立的菌属，且这两个分支内部菌株之间的发育距离较近。

关键词：AMD，优势群落，浸矿微生物，重金属浸出

Comparison of bacterial communities in the Baotou Quanshan gold before and after acid leaching

NIE Li　SHUI Liu-Yang　WANG Jian-Ying*

(*School of Mathematics*, *Physics and Biological Engineering*, *Inner Mongolia University of Science and Technology*, *Baotou*, *Inner Mongolia* 014010, *China*)

Abstract: [Objective] Influence on bacterial communities of different ore composition. **[Methods]** The change of acidic microbial community dominance before and after leaching ore were investigated by using 16S rRNA-RFLP methods. **[Results]** AMD of three sampling points are the independent *Acidithiobacillus* bacteria genera of microbes, which accounts for about half the number of tested strains, three sample points between ore leaching microbial species and quantity larger similarity. Meantime, we use the AMD to bioleaching ore, the result of microbial community of four ore samples indicated that H71 and F11 community structure difference are bigger, J72 and S71 are almost the same. **[Conclusion]** The test sequences can be divided into two branches: *Acidithiobacillus* bacteria genera and relatively independent bacteria genera.

Keywords: AMD, Advantage community, Bioleaching microbial, Heavy metal leaching

基金项目：国家自然科学基金项目(No. 51264029)；环保部公益项目(No. 201309005)
*通讯作者：Tel: 86-472-5954358; ✉: jianyw@yahoo.com
收稿日期：2013-02-04；接受日期：2013-06-03；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2013-10-11

暴露在空气和水中的硫化矿在氧化剂的作用下会溶解析酸和金属离子，这类含有高浓度的金属离子如铁、铜、锌、镁及非金属离子如硫、砷等的酸性溶液称为酸性矿坑水(AMD)[1]。AMD 由于在生物学和化学上的简单性，微生物群落的多样性，使其环境成为研究分析极端微生物的生理生化交互作用以及极端微生物群落结构与功能的典型系统[2]。

AMD 环境中生存的极端微生物对金属矿物的生物浸出具有重要意义，因此，AMD 能够用于矿物预处理加工，已经有大量关于利用酸性微生物从矿物中回收铜、金、镍和铀等金属的研究报道[3-5]。微生物的多样性被认为是环境敏感性生理指标之一[6]，目前主要是通过测定样品中微生物的 16S rRNA 基因序列的方法来研究浸矿微生物的种群丰度、系统发育关系以及地理化学因素是如何塑造浸矿类微生物群落结构[7]。

RFLP 通常的方法是直接从环境样品中提取总基因组 DNA[8]，克服了传统方法对于部分极端微生物难培养甚至不能培养这一难题。单独的 RFLP 由于操作的复杂会导致其测定结果稳定性和可靠性降低，所以将 RFLP 和测序技术综合应用已经成为微生物群落多样性分析的趋势[9]。现已有大量采用 RFLP 对 AMD 中微生物群落的报道研究，刘新星等[10]利用 16S rRNA 基因库的重建和 RFLP 分析相结合的方式，得出在古矿井区域酸性矿坑水中微生物群落的多样性很低，以及在生物地球化学特性相近的酸性矿坑水环境中微生物群落组成相近的结论。通过综合应用 RFLP 和测序的方法可以从铜矿酸性矿坑水中分离出极端嗜酸、耐受中度碱性条件的异养微生物等[11]。

1 材料与方法

1.1 菌种的采集和富集

含菌 AMD 采自包头市泉山金矿矿区的具有代表性的 3 个矿坑，分别命名为 11 平、71 平及 72 平。样点中浸矿微生物采用 9K+$FeSO_4$ 培养基富集培养 2 次，9K 培养基的配方为(g/L)：$(NH_4)_2SO_4$ 3，KCl 0.1，K_2HPO_4 0.5，$MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.5，$Ca(NO_3)_2$ 0.01，$FeSO_4$ 44.2，pH 2.0。

1.2 浸矿方法及浸矿后菌种的收集

将从泉山金矿采得的 4 种矿石：石英型(S)、黄铁型(H)、钾长型(J)及方铅型(F)，磨成 200 目的矿粉，浸矿条件为：9K+$FeSO_4$ 培养基体系，接菌量为 10%，30 °C、170 r/min 培养，体系中先不加入矿石，待微生物长到对数期时($K_2Cr_2O_7$ 法滴定消耗的 $K_2Cr_2O_7$ 为 4−6 mL)再加入矿石，矿浆浓度为 2% (质量体积比)，浸矿周期为 30 d。浸矿后采用过滤的方法收集菌体，主要有 71 平 AMD 浸石英型矿石(S71)、71 平 AMD 浸黄铁型矿石(H71)、72 平 AMD 浸钾长型矿石(J72)及 11 平 AMD 方铅型矿石(F11)的样品。

采用离心的方法收集浸矿后的菌种，将过滤得到的培养基在 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min，收集到的菌体用 pH 2 的稀硫酸洗涤 3 次(12 000 r/min，离心 15 min)，4 °C 保存。

1.3 总基因组的提取及 16S rDNA 基因扩增

采用 SDS 裂解法提取浸矿微生物的总基因组。16S rRNA-PCR 扩增引物采用 16S 通用引物对：63F (5′-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3′)；1387R (5′-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3′) 进行 PCR 反应扩增并纯化回收 16S rRNA 片段。

1.4 TA 克隆连接及转化

采用 TA Cloning@双启动子试剂盒进行克隆连接，连接体系如下(10 μL)：无菌水 4 μL；10×连接缓冲液 1 μL；新鲜 PCR 产物 2 μL； PCR@ II 载体 2 μL；T4 DNA 连接酶 1 μL，体系充分混匀后，于 16 °C 连接 12−16 h，连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞 (DH 5α)中。在含有氨苄青霉素的固体琼脂平板上先加入 IPTG，16 μL (0.05 g/mL)；40 μL X-gal (0.02 g/mL)，避光置于 37 °C 放置 1−3 h，取转化后的菌体 50 μL，均匀涂布，37 °C 恒温培养。

1.5 菌落 PCR 和限制性酶切

从每个样品板上随机挑选出转化得到的白色

单菌落 30−50 个进行菌落 PCR，菌落 PCR 采用康为世纪的 2×Es *Taq* Master Mix，采用 Invitrogen 通用引物对 T7 与 SP6，引物序列如下：SP6 (5′-ATTTAGGTGACACTATAG-3′)，T7 (5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′)，反应体系为(20 μL)：2×*Taq* Master Mix，10 μL；T7，0.5 μL；SP6，0.5 μL；菌液，1 μL；RNase-free water，8 μL。反应条件如下：94 °C 10 min；94 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 30 s，共 30 个循环；72 °C 10 min。采用琼脂糖凝胶电泳检测，并挑选出阳性克隆子。

用限制性内切酶 *Hin* 6 I 和 *Hha* I 对阳性克隆子的菌落 PCR 产物进行双酶切，酶切体系如下：Nuceles-free water 13 μL；10×Buffer Tango^{TM} 3 μL；PCR reaction mixture 10 μL；*Hin*6 I 2 μL；*Hha* I，2 μL。37 °C 双酶切 14−16 h，酶切产物用 3%的琼脂糖凝胶电泳验证，并对电泳条带做 RFLP 分析，挑选不同带型的克隆子送样测序。

1.6 统计分析

定义限制性酶切后，具有高度相似带形的图谱为一个初始可操作单元(IOTU)；采用软件比对得到的高度相似的序列为可操作单元(OTU)。

为了将测序得到的多个克隆进一步分类比对，采用 Mothur 软件对所有测的序列在 97%的相似度上做序列的 OTU 再次聚类分析。

采用覆盖率(C)来考查所构建克隆子文库对样点覆盖情况，覆盖率用以评估所构建的文库对此环境中浸矿酸性微生物多样性的体现程度，计算公式如下：

$$C = 1 - \frac{n}{N} \times 100\% \tag{1}$$

其中，N 为每个克隆文库中克隆总数，n 为具有不重复序列的克隆子数[12]。

对 OTU 进行聚类后的数据，采用统计软件 SPSS 19.0 对采样点进行主成分分析 (Principal component analysis，PCA)用以评价各个样点之间的整体差异性。

1.7 系统发育树的建立

将每个样点的代表性 OTU 序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对，下载相似性大于 90%的序列，将下载得到的序列与代表性 OTU 序列采用生物信息学软件 MEGA 5.10 按相邻连接方法(Neighbor-Joining，NJ)构建系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 样品覆盖率分析

采用式(1)对 3 个样点中微生物 16S rRNA 克隆文库的覆盖率分析，分析结果见表 1。

分析结果表明 3 个样点的 16S rRNA 克隆子文库包含的多样性比例均在 60.0%−81.8%之间，其中 11 平样点的覆盖率最高，达到 81.8%，72 平样点的覆盖率最低，为 60.0%。

以上的覆盖率数据可以说明：所构建的克隆子文库中 11 平的克隆子文库能够反映该样点中优势浸矿微生物群落的情况，而 71 平和 72 平的覆盖率数据也能对样点中优势浸矿微生物群落状况有一定的反映。

表 1 克隆子文库覆盖率结果
Table 1 Fraction of coverage of clone library

样品 Sample	挑取的克隆子数 The number of clones	N	阳性率 The positive rate (%)	n	C (%)
11 平 11 ping	24	11	45.8	2	81.8
71 平 71 ping	24	9	37.5	3	66.7
72 平 72 ping	24	10	41.6	4	60.0

注：N：阳性克隆子数；n：OTU 数(97%相似度)；C：覆盖率.
Note: N: The number of positive clones; n: The number of OTU (97% similarity); C: Fraction of coverage.

2.2 OTU 分析

利用Mothur软件对所有测得的序列在97%的相似度上对测序得到的序列进行进一步的OTU分类分析。统计分析结果及克隆子分布情况如表2所示。

将分析得到的每个优势 OTU 序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对，从比对结果中挑选相似度大于90%的已知序列做后续的建树分析。

如表 3 所示，对于浸矿后的各个样品，F11、H71、J72 样品的 OTU 数目相对浸矿前的 AMD 中 OTU 数目大幅度减少，而 S71 样品的 OTU 数目基本不变，说明在方铅矿、黄铁矿、钾长矿的影响下，样品中浸矿微生物种类有所减少，而石英矿对 AMD 中的浸矿微生物种类的影响相对较小。

2.3 主成分分析

采用 SPSS 19.0 软件分别对浸矿前后的各个样品进行主成分分析，其解释总方差如表 4、5 所示。

表 2 各个样点的 OTU 分布统计

Table 2 Result of clone library coverage before bioleaching

样品名称 Sample name	11 平 11 ping	71 平 71 ping	72 平 72 ping
OTU 数 Number of OTU	21	19	17
代表性 OTU Representative of OTU	11−12、11−1、11−7	71−8、71−30、71−4	72−23、72−11
比例 Proportion (%)	60	61	60

注：11−12 表示 11 平 AMD 样品中挑选的第 12 个单克隆，下同.

Note: 11−12 is the No. 12 clones of 11 ping AMD.

表 3 浸矿后样品的 OTU 分类统计

Table 3 Result of clone library coverage after bioleaching

样品名称 Sample name	F11	S71	H71	J72
OTU 数 Number of OTU	14	21	14	15
代表性 OTU Representative of OTU	F11−11、F11−20	S71−6、S71−25	H71−10、H71−11、H71−37	J72−10、J72−4
比例 Proportion (%)	64	54	56	66

表 4 浸矿前样品的解释总方差

Table 4 PCA explanation total variance before bioleaching

成分 Component	初始特征值 Initial eigenvalue		
	合计 Total	方差的贡献率 The variance rate (%)	累积贡献率 The cumulative rate (%)
1	2.902	96.720	96.720
2	0.097	3.233	99.953
3	0.001	0.047	100

表 5 浸矿后样品的解释总方差
Table 5 PCA explanation total variance after bioleaching

成分 Component	初始特征值 Initial eigenvalue		
	合计 Total	方差的贡献率 The variance rate (%)	累积贡献率 The cumulative rate (%)
1	3.577	89.427	89.427
2	0.423	10.573	100
3	1.154E–5	0	100
4	−3.003E–16	−7.509E–15	100

根据抽取的因子的固定数量为 3，生成的主成分载荷图如图 1 所示。

如表 4 所示，其中成分 1 就捕获了其 96.720%的可变性，成分 2 才捕获了 3.233%的可变性，甚至成分 3 只捕获了 0.047%的可变性，说明成分 1 就能基本代表总共 3 个成分的基本信息。由图 1 可看出 3 个样点中的优势浸矿微生物没有特别显著的差异性，其中 11 平和 71 平的相似度最大。

如表 5 所示，其中成分 1 就捕获了其 89.427%的可变性，成分 2 才捕获了 10.573%的可变性，成分 3 和成分 4 基本没有捕获到可变性，说明成分 1 和成分 2 就能基本代表总共 4 个成分的基本信息。

由图 2 可知，4 个样品中的浸矿微生物群落有一定的差异性，其中 H71 和 F11 相对其他两个的差别较大，J72 和 S71 几乎一样，说明在钾长型和石英型矿石的选择压力下，浸矿微生物的被选择趋势是大致相同的。

2.4 系统发育树的构建

将浸矿前后的样品通过 RFLP 和 Mothur 软件进行 OTU 分类后，选择在样品 97%的相似度以上代表性 OTU 序列，将每个具有代表性的 OTU 序列与比对得到的已知序列构建系统发育树图谱，如图 3、4 所示。由图 3 可知，所考查的 3 个样点中的浸矿微生物均可分为两大分支，一个分支与嗜酸氧化亚铁硫杆菌 ATCC 23270 距离最近，属于 *Acidithiobacillus* 菌属的微生物；另一分支是处在相对独立的分支中，且与已知菌株距离较远。这两大分支内部均具有较近的发育距离。浸矿后，测得的样品序列和已知菌株的序列构建系统发育树，如图 4 所示，所比对的序列分为两大部分：

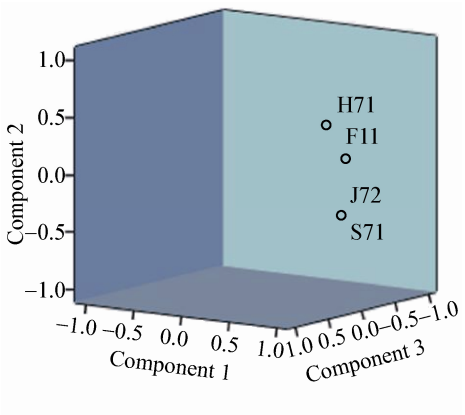

图 1 浸矿前样品浸矿微生物群落的 PCA 分析
Figure 1 PCA analysis of sample microbial communities before bioleaching

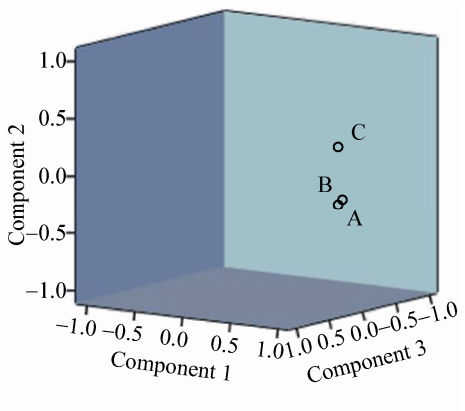

图 2 浸矿后样品的载荷分析图
Figure 2 PCA analysis of sample microbial communities after bioleaching
注：A：11 平；B：71 平；C：72 平.
Note: A: 11 ping; B: 71 ping; C: 72 ping.

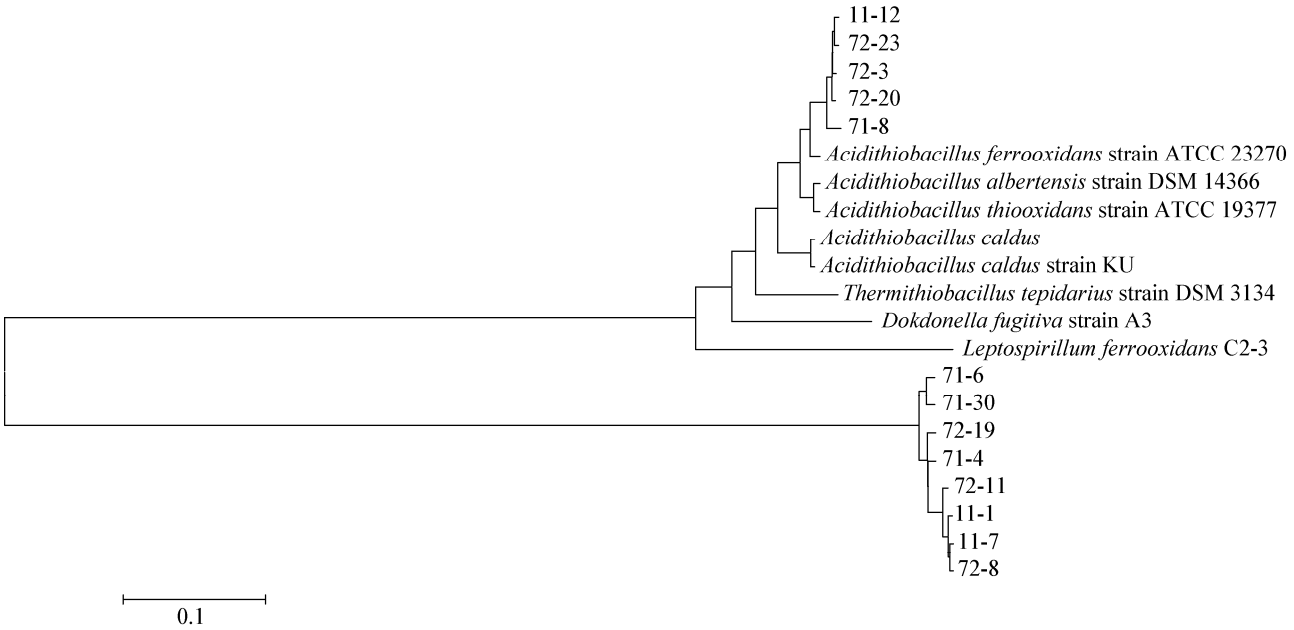

图 3 浸矿前的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of bacteria 16S rRNA gene sequences before ore leaching

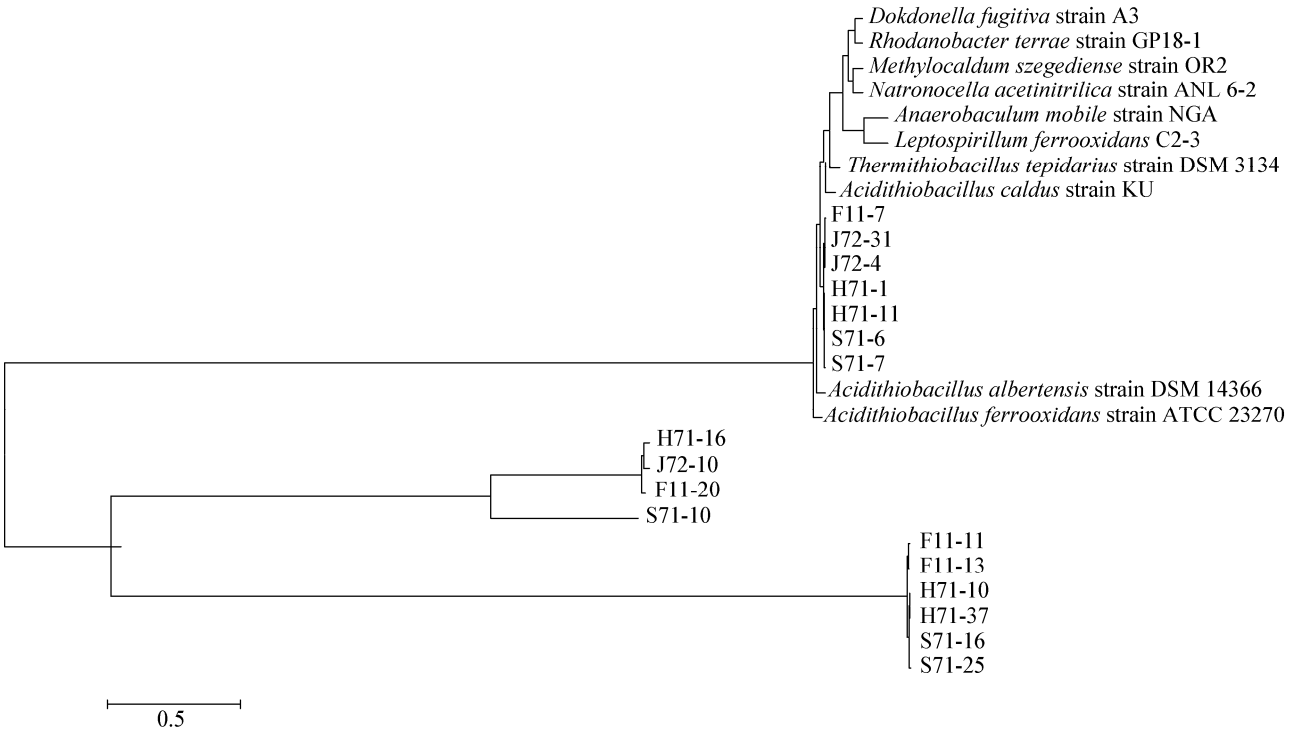

图 4 浸矿后的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of bacteria 16S rRNA gene sequences after ore leaching

Acidithiobacillus 菌属菌株和相对独立的菌属，比对得到的 *Acidithiobacillus* 菌属中，4 种矿石的体系中均存在。

出现上述情况的可能原因为：(1) 所鉴定的 AMD 中浸矿微生物主要为 *Acidithiobacillus* 菌属的微生物。(2) 所鉴定的浸矿微生物有部分属于数据库中尚未收录的新种，因此与数据库中已收录的菌株之间关系较远。(3) RFLP 这种分子生物学的分析方法同其他的方法一样，都存在一定的局限性，对于浸矿前后的浸矿类微生物群落，由于微生物细胞内的 16S rRNA 存在多个拷贝数，而这些拷贝之间又存在异质性的问题[13]，可能使得研究结果相对于微生物的本身群落数被过高的估计。

3 总结

本文选取的 3 个考查点之间浸矿微生物的种类及数量相似度较大，浸矿前后微生物群落结构变化不大，在同一个矿山之内的 3 个点之间能够相互影响，相关的研究也表明微生物的多样性受到微生物生存系统与周围环境交换程度的影响[14]。

从微生物的系统发育分析结果可知：所考查的克隆子的序列可分为两大分支：*Acidithiobacillus* 菌属和相对独立的菌属；不同矿石处理后的样品在这两分支中均有存在；这两个分支内部菌株之间的发育距离较近。说明在不同的浸出样品中微生物的种类差异性不大。对浸矿后的样品比较分析，得出在钾长型和石英型矿石的选择压力下，浸矿微生物的被选择趋势是大致相同的，而方铅型和黄铁型的选择压力均不同。

通过对泉山金矿 AMD 中浸矿类优势浸矿前后微生物变化的研究，结果为受重金属污染地区的环境评价，AMD 中优势浸矿类微生物的研究及利用现有的 AMD 微生物浸矿和对利用浸矿微生物进行重金属环境污染治理提供理论基础和指导。

参 考 文 献

[1] Johnson DB, Kevin B, Hallberg KB. The microbiology of acidic mine waters[J]. Researeh in Microbiology, 2003, 154: 466-473.

[2] Johnson DB. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 27(4): 307-317.

[3] Baker BJ, Banfield JF. Microbial communities in acid mine drainage[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44: 139-152.

[4] Silverman MP, Ehrlich HL. Microbial formation and degradation of minerals[J]. Advancesin in Applied Microbiology, 1964, 6: 153-206.

[5] 何焕华. 世界镍工业现状及发展趋势[J]. 有色冶炼, 2001, 2: 12-14.

[6] 孙波. 土壤质量与持续环境Ⅲ-土壤质量评价的生物学指标[J]. 土壤, 1997, 29: 225-234.

[7] Brierlry JA, Brierlry CL. Present and future commercial application of biohydrometallurgy[J]. Hydrometallurgy, 2001, 59: 233-237.

[8] 余素林, 吴晓磊, 钱易. 环境微生物群落分析的 T-RFLP 技术及其优化措[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 861-868.

[9] Rzhetsky A, Nei M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1992, 9: 945-967.

[10] 刘新星, 霍强, 刘学端, 等. 古矿井区域酸性矿坑水微生物群落的多样性[J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2007, 38(3): 414-420.

[11] Huo Q, Liu X, Xie JP, et al. Analysis of microbial community composition in obturating acid mine drainage[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 12(9): 2255-2259.

[12] Giovannoni SJ, Mullins TD, Field KG. Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study of unculturable microbes[J]. Molecular Ecology of Aquatic Microbes, 1995, 38: 217-248.

[13] Anna YP, William EO, Carlos WN, et al. Diversity of 16S rRNA genes within Individual prokaryotic genomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76: 3886-3897.

[14] 曹琳辉. 银山铅锌矿酸性矿坑水微生物群落结构分析[D]. 长沙: 中南大学硕士学位论文, 2007.