



研究报告

矿区高硫煤覆盖对土壤细菌群落组成和多样性的影响

董书博 李宁 许继飞 李静泉*

内蒙古大学生态与环境学院 内蒙古环境污染控制与废物资源化重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010021

摘要:【背景】土壤微生物生态研究对于矿区污染生态影响调查和矿区生态恢复都具有非常重要的意义,高硫煤覆盖对其下方土壤微生物群落的影响目前尚不清楚。【目的】探究煤矿区长期高硫煤覆盖对其下方土壤细菌群落组成和多样性产生的影响。【方法】从高硫煤矿附近煤场采集3种类型土壤样品(高硫煤覆盖层、高硫煤下方土壤、对照土壤),通过测定土壤理化性质和运用高通量测序技术研究高硫煤覆盖对土壤性质和细菌群落产生的影响。【结果】与对照土壤相比,高硫煤覆盖使其下方土壤 pH 值降低,硫酸盐、有机质、有效氮、有效磷含量升高。高硫煤覆盖使其下方土壤中细菌的多样性指数降低,细菌群落组成发生了较大改变。在属水平上,与对照土壤相比,高硫煤下方土壤中 *Bacillus* 的相对丰度较高;*Acidiphilium* 与 *Sulfobacillus* 在3个样本组中的相对丰度呈现为高硫煤覆盖层>高硫煤下方土壤>对照土壤,硫氧化菌在高硫煤中的优势地位及其对下方土壤的影响由此可以得到证实。共现性网络分析表明,*Acidiphilium* 和 *Sulfobacillus* 在高硫煤覆盖区域的土壤细菌群落中占有重要地位,对其他细菌类群影响非常大。【结论】高硫煤覆盖及硫氧化菌的优势存在,对高硫煤下方土壤的理化性质及细菌群落产生明显影响。研究结果有助于增进对矿区土壤微生物生态的认识,为高硫煤矿区生态恢复治理提供微生物学理论基础。

关键词: 高硫煤, 脱硫产酸, 土壤物理化学性质, 细菌群落, 影响

Influence of high-sulfur coal cover on composition and diversity of soil bacterial community in mining areas

DONG Shubo LI Ning XU Jifei LI Jingquan*

Inner Mongolia Key Laboratory of Environmental Pollution Prevention and Waste Resource Recycle, School of Ecology and Environment, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China

Abstract: [Background] The study of soil microbial ecology is very important for ecological investigation of pollution in mining areas and ecological restoration of mining areas. The influence of high-sulfur coal cover on underlying soil microbial community is still unclear. [Objective] The purpose of this study is to explore the influence of long-term high-sulfur coal cover on bacterial community composition and diversity of the underlying soil in coal mining areas. [Methods] Three types of soil samples (high-sulfur coal cover layer, soil beneath high-sulfur coal cover layer, soil as control) were collected from coal yard of

Foundation items: Opening Project for Major Basic Research of Inner Mongolia Autonomous Region (30500-515330304); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2018MS03074)

*Corresponding author: E-mail: lj198327@163.com

Received: 23-04-2020; **Accepted:** 25-07-2020; **Published online:** 20-10-2020

基金项目: 内蒙古自治区重大基础研究开放课题(30500-515330304); 内蒙古自治区自然科学基金(2018MS03074)

*通信作者: E-mail: lj198327@163.com

收稿日期: 2020-04-23; **接受日期:** 2020-07-25; **网络首发日期:** 2020-10-20

a high-sulfur coal mine. The influence of high-sulfur coal cover on soil properties and soil bacterial community was studied by measuring soil physical and chemical properties and using high-throughput sequencing technology. **[Results]** Compared with the soil as control, in the soil beneath high-sulfur coal cover layer, the pH value decreased, but the contents of sulfate, organic matter, hydrolyzed nitrogen and available phosphorus increased. For the underlying soil bacterial community, the diversity index decreased and the composition changed obviously. At genus level, the relative abundance of *Bacillus* in the underlying soil was higher than that of the control. The regularities of relative abundances of *Acidiphilium* and *Sulfobacillus* in three sample groups were “high-sulfur coal cover layer>its underlying soil>soil as control”. The preponderance of sulfur-oxidizing bacteria in the condition of high-sulfur coal and its influence on the underlying soil could be confirmed. The co-occurrence network analysis showed that *Acidiphilium* and *Sulfobacillus* played an important role in the soil bacterial community of the area covered by high-sulfur coal, and had a great impact on other bacterial genera. **[Conclusion]** The high-sulfur coal cover and the predominance of sulfur-oxidizing bacteria in it have obvious influence on the physical and chemical properties and the bacterial community of the underlying soil. The research results are helpful to enhance the understanding of soil microbial ecology in mining areas, and provide theoretical basis for the ecological restoration of high-sulfur coal mining areas in microbiology.

Keywords: high-sulfur coal, desulfurizing and acid-producing, physical and chemical properties of soil, bacterial community, influence

随着矿产资源的大量开采, 矿区土壤污染问题越来越受到人们的关注, 对当地生态环境造成了严重影响。微生物在土壤物质循环和能量流动中起着非常重要的作用, 对维护土壤生态平衡至关重要^[1-2]。土壤微生物生态研究对于矿区污染生态影响调查和矿区生态恢复都具有非常重要的意义^[3-6]。中国煤炭资源丰富、开采量大, 在能源消费中比重高。煤炭在给国民经济发展带来动力的同时, 其开采、储存和使用等过程会对环境产生影响^[7-10]。我国高硫煤(干燥基全硫含量>3.00%的煤)的储量和开采量均较高, 在煤矿区煤炭存放和运输过程中会造成土壤被高硫煤覆盖, 必然会对其下方土壤中的微生物群落产生影响, 破坏原有的土壤微生态平衡。

硫氧化菌是一类以硫化物或单质硫为能源的化能自养菌, 对无机硫和有机硫能够进行氧化脱除。Gonsalvesh 等^[11]研究发现恶臭假单胞菌对全硫、无机硫、有机硫的脱除效率分别可达 71.0%、90.6%、49.4%; 有研究表明嗜酸杆菌属菌株对煤的脱硫效率可达 84.68%^[12]; 詹晓等^[13]从新疆克拉玛依油田筛到一株戈登氏菌 JDZX13, 该菌能高效脱除二苯并噻吩(Dibenzothiophene, DBT), 脱除率在 48 h 可达 98%。脱硫菌具有硫氧化产酸能力, 高硫煤是其

适宜的生存环境, 在高硫煤矿区土壤微生物生态系统中扮演着非常重要的角色。

目前国内外关于矿区土壤微生物多样性的研究比较多, 但矿区土壤由于其上方长期的高硫煤覆盖对微生物生态所造成的影响方面却尚没有相关报道。在影响微生物生态的诸多环境因素中, pH 是最重要的因子^[14-15]。高硫煤覆盖层中脱硫菌的相对丰度及其对下方土壤中环境因子和微生态的影响以及两者之间的关系, 有待进一步研究。本研究从内蒙古高硫煤矿附近煤场采集土壤样品, 探究煤矿区长期高硫煤覆盖对其下方土壤细菌群落组成和多样性产生的影响, 以期高硫煤矿区的生态恢复治理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

土壤样品从高硫煤矿附近煤场采集得到, 采样范围在北纬 39.472 50°–39.472 78°之间和东经 106.628 06°–106.628 33°之间。高硫煤覆盖层厚度 7 cm, 表面有明显的硫析出。将高硫煤覆盖层命名为 HCCL (High-Sulfur Coal Cover Layer), 样品采集取 7 cm (其自身厚度); 将被其覆盖土壤命名为

SBH (Soil Beneath High-Sulfur Coal Cover Layer), 样品采集取 0–10 cm; 将对照土壤命名为 S (Soil as Control), 样品采集取 0–10 cm。采集完成以后, 一部分土样在实验室超低温冰箱中保存以进行后续的高通量测序, 一部分自然阴干, 过 60 目筛后用于测定土壤理化性质。

1.2 主要试剂和仪器

E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit, Omega 公司; 钼酸铵、抗坏血酸、邻菲罗啉、乙二胺四乙酸二钠、硼酸、硝酸、过硫酸钾、重铬酸钾、酒石酸锑钾、氟化钠、四苯硼钠、乙酸钠、硫酸钠、硫酸铵、硫酸亚铁、锌粉、硝酸银, 国药集团化学试剂有限公司; 甲基红、甲基橙、溴甲酚绿、氯化钡、三乙醇胺、磷酸氢二钾, 天津福晨化学试剂厂。酸度计, Ohaus 公司; 电导率仪, Mettler Toledo 公司; 紫外可见分光光度计, 上海谱元仪器有限公司; 循环水式多用真空泵, 河南省予华仪器有限公司; 电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 土壤理化性质测定方法

土壤有效氮(Effective Nitrogen, EN)测定用的是碱解扩散法, 有效磷(Effective Phosphorus, EP)测定用的是碳酸氢钠浸提-钼锑抗分光光度法(HJ 704-2014)^[16], 速效钾(Effective Potassium, EK)测定用的是联合浸提-比色法(NY/T 1849-2010)^[17], 土壤有机质(Soil Organic Matter, SOM)测定用的是重铬酸钾容量法-稀释热法^[18]; 土壤水溶性硫酸盐(Soluble Sulfate, sS)测定用的是重量法(HJ 635-2012)^[19], 烘干法测土壤含水率(Moisture Content, MC)。pH 值和电导率(Electric Conductivity, EC)的测定方法是: 称取土壤样品 10 g, 放入三角瓶中, 加入 50 mL 去离子水, 用玻璃棒搅拌 1 min 后静置 30 min, 取其上清液, 用酸度计和电导率仪分别测定土壤样本的 pH 值和 EC。

1.4 高通量测序及数据分析

将土壤样品送 Majorbio 公司进行扩增子高通量测序: 采用 E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit 提取土壤微生物总 DNA, 检验质量^[20]。通过引物 338F

(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[20]对 16S rRNA 基因中的 V3–V4 可变区进行 PCR 扩增^[20]。PCR 产物回收并检测定量后, 利用 Illumina MiSeq 平台构建 PE 2×300 的文库进行高通量测序。

对获得的原始序列先后用 Trimmomatic 和 Flash 软件进行质控和拼接。根据 3% 的差异水平通过 UPARSE 软件进行 OTU 聚类, 嵌合体剔除则通过 UCHIME 软件。各序列的物种分类注释通过 RDP 分类器完成, 在 70% 比对阈值的条件下与 SILVA 数据库(SSU123)进行比对^[20]。通过美吉生物云平台对样本进行微生物多样性分析。采用 Bray-Curtis 距离算法进行 PCoA 分析, Spearman 相关系数进行相关性 Heatmap 和 Network 网络分析, 单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行多组间差异显著性检验。

1.5 土壤理化性质试验数据统计分析

运用 Excel 2003 和 SPSS 19.0 软件对土壤理化性质试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质分析

从表 1 中可以看出, HCCL 的 pH 值最低、sS 含量最高, 这可能是因为 HCCL 中脱硫菌的硫酸化产酸所致, 其代谢产生硫酸, 使得 pH 值降低, 同时硫酸反应后产生 sS。HCCL 会对 SBH 产生影响, 酸下渗使 SBH 中 pH 值降低、sS 含量升高。HCCL 中 SOM、EN、EP 等营养物质比较丰富, 由于受到 HCCL 的影响, SBH 中 SOM、EN、EP 等营养物质含量比 S 中有所升高, 这可能是雨水经过高硫煤下渗到土壤过程中携带了大量营养物质。HCCL 中 EK 含量并不高, 因此 SBH 所受影响甚微, 和 S 相比无明显变化。MC 和 EC 都呈现 HCCL 中最高、SBH 居中、S 中最低的特点。

2.2 多样性指数分析

每个样本测序条数都接近 3 万条, 稀释曲线皆趋于平缓, 测序深度合理。由表 2 可知, 在 Shannon

指数、Simpson 指数、ACE 指数、Chao1 指数等多
样性指数方面, 样本组 HCCL 的细菌多样性指数最
低. 对照组 S 的 4 个细菌多样性指数均略高于 SBH,
说明高硫煤覆盖使其下方土壤的细菌多样性有所
降低. 样本组 HCCL、SBH 和 S 的覆盖度(Coverage

Degree)都在 99%以上, 指数信息能够较好地反映细
菌多样性情况。

2.3 土壤样本细菌群落组成分析

如图 1 所示, 在属水平上, HCCL 样本组中
相对丰度在 1% 以上的物种主要有 Norank_o_

表 1 不同样本组的土壤理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties of different sample groups

样品	pH 值	含水率	电导率	有效氮	有效磷	速效钾	土壤有机质	水溶性硫酸盐
Sample	pH value	MC (%)	EC (ms/cm)	EN (mg/kg)	EP (mg/kg)	EK (mg/kg)	SOM (mg/kg)	sS (g/kg)
HCCL	2.61±0.13a	8.50±0.24c	31.67±1.01c	100.33±13.34c	36.07±0.17c	130.84±7.48a	95.45±0.62c	12.32±0.21c
SBH	6.92±0.06b	4.31±0.17b	17.83±1.09b	58.33±1.91b	2.77±0.38b	348.16±10.79b	13.17±0.31b	6.74±0.08b
S	8.47±0.12c	2.73±0.06a	1.97±0.04a	3.50±0.00a	1.60±0.17a	351.11±11.76b	8.78±0.47a	0.33±0.00a

注: 同列不同字母表示试验处理间差异显著 (Duncan method, $P<0.05$)

Note: Different letters in the same row mean significant difference between treatments (Duncan method, $P<0.05$)

表 2 土壤样本的多样性指数

Table 2 Diversity index of soil samples

样品	香农指数	辛普森指数	ACE 指数	Chao1 指数	覆盖度
Sample	Shannon index	Simpson index	ACE index	Chao1 index	Coverage degree (%)
HCCL	2.32±0.32a	0.767±0.070a	172.74±31.46a	169.05±28.12a	99.89±0.03a
SBH	5.58±0.06b	0.991±0.001b	1 108.65±32.30b	1 122.38±32.42b	99.45±0.03a
S	5.98±0.04b	0.994±0.000b	1 267.12±27.94c	1 300.08±37.73c	99.50±0.02a

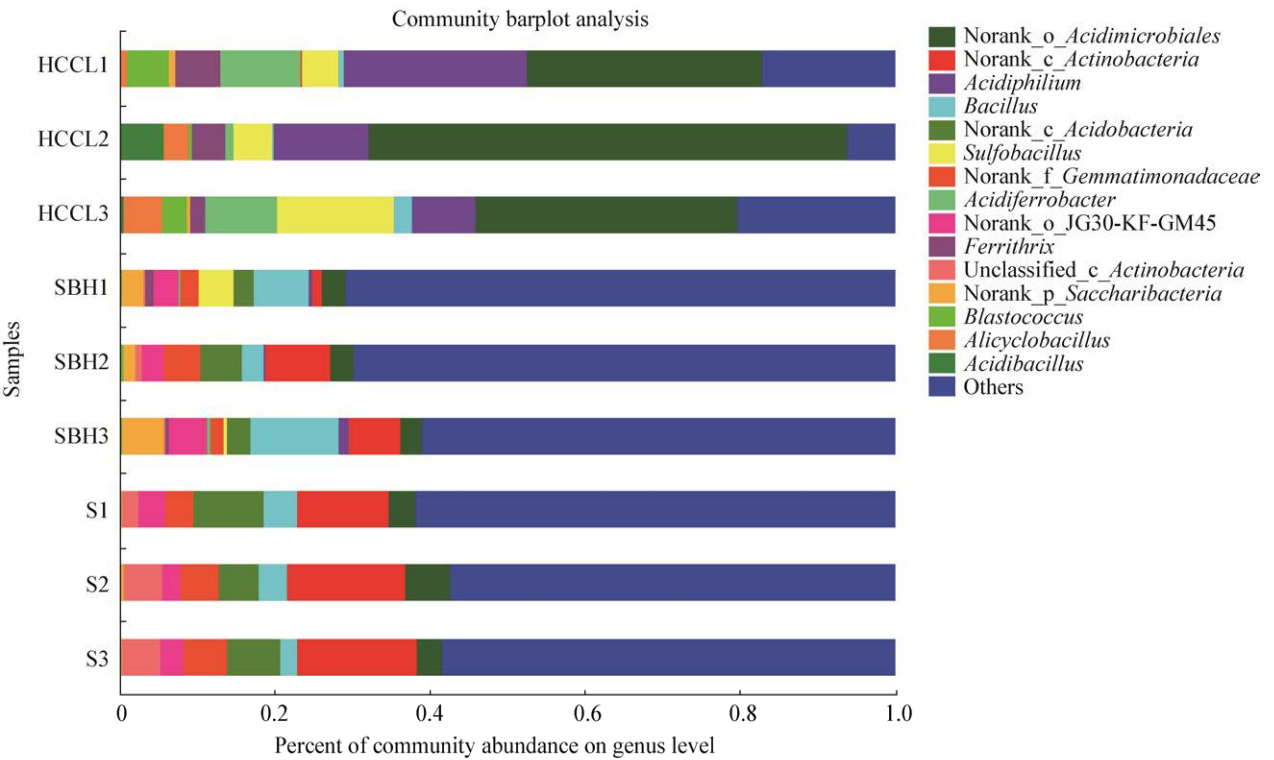


图 1 属水平上土壤样本细菌群落组成

Figure 1 Bacterial community composition of soil samples at genus level

Acidimicrobiales (41.91%)、嗜酸菌属(14.69%, *Acidiphilium*)、硫化芽胞杆菌属(8.26%, *Sulfobacillus*)、酸铁杆菌属(6.85%, *Acidiferrobacter*)、铁链丝菌属(4.02%, *Ferrithrix*)、脂环酸芽胞杆菌属(3.10%, *Alicyclobacillus*)、芽球菌属(2.99%, *Blastococcus*)、芽胞杆菌属(1.11%, *Balillus*); SBH样本组中相对丰度在1%以上的物种主要有 *Bacillus* (7.18%)、*Norank_c_Actinobacteria* (5.44%)、*Norank_c_Acidobacteria* (3.61%)、*Norank_o_JG30-KF-GM45* (3.58%)、*Norank_p_Saccharibacteria* (3.22%)、*Norank_f_Gemmatimonadaceae* (2.91%)、*Norank_o_Acidimicrobiales* (2.84%); S样本组中相对丰度在1%以上的物种主要有 *Norank_c_Actinobacteria* (14.09%)、*Norank_c_Acidobacteria* (7.11%)、*Norank_f_Gemmatimonadaceae* (4.69%)、*Norank_o_Acidimicrobiales* (4.19%)、*Unclassified_c_Actinobacteria* (4.01%)、*Bacillus* (3.36%)、*Norank_o_JG30-KF-GM45* (2.97%)。

2.4 土壤细菌群落组成 PCoA 分析

如图2所示,第1排序轴对变量的解释度为74.15%,第2排序轴对变量的解释度为12.05%,累积解释变量达到86.2%。图2中3个样本组分布在不同区域,表明相互之间细菌群落组成具有明显差

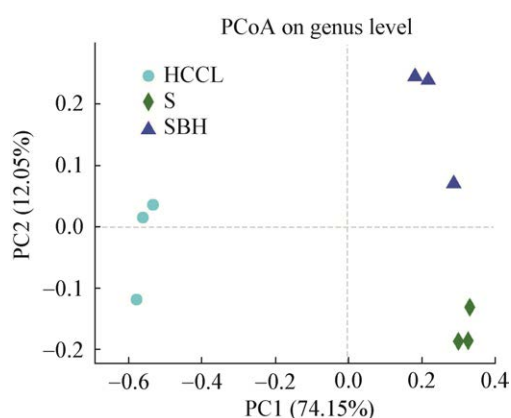


图2 高硫煤覆盖对土壤细菌群落组成影响的 PCoA 分析
Figure 2 Principal coordinate analysis of the influence of high-sulfur coal cover on soil bacterial community composition

异。在第1排序轴上, HCCL 与其他2个样本组之间完全区分开;在第2排序轴上,可将 SBH 与 S 样本组之间完全区分开。在 PCoA 图中, HCCL 与 SBH 和 S 之间距离均大于 SBH 与 S 之间的距离,说明 HCCL 中细菌群落组成与 SBH 和 S 中的细菌群落组成之间具有很大差异,在高硫煤的影响下, SBH 中的细菌群落组成与 S 中相比发生了较大改变。

2.5 土壤细菌群落组成与环境因子的 CCA 分析

如图3所示,在 CCA 分析中,第1排序轴对变量的解释度为54.34%,第2排序轴对变量的解释度为16.16%,累积解释变量达到70.5%。在所测环境因子中, EK 和 pH 与 SBH 和 S 样本组中的物种呈正相关,与 HCCL 样本组中的物种呈负相关; MC、EC、EN、EP、SOM、sS 与 HCCL 样本组中的物种呈正相关,与 SBH 和 S 样本组中的物种呈负相关。pH、EK、SOM、EP、MC 对 HCCL 与 SBH、S 样品之间的群落差异的影响比较大, sS、EC 次之, EN 的影响最小; sS、EC 和 EN 对 SBH 与 S 样品菌群的影响较大。

2.6 微生物种类与环境因子的相关性热图分析

从图4可以看出,在属水平上, EK 和 pH 对

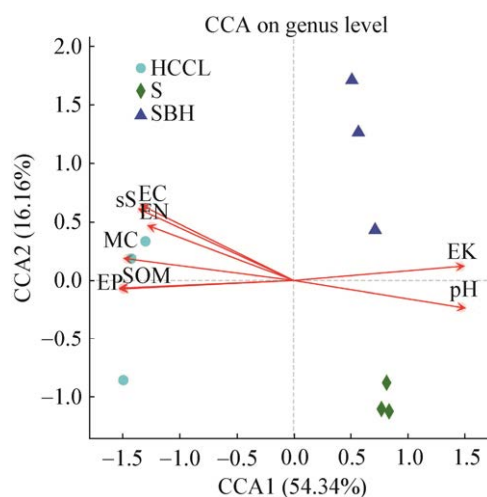


图3 高硫煤覆盖影响下土壤细菌群落组成与环境因子的 CCA 分析

Figure 3 Canonical correspondence analysis of soil bacterial community composition and environmental factors under the influence of high-sulfur coal cover

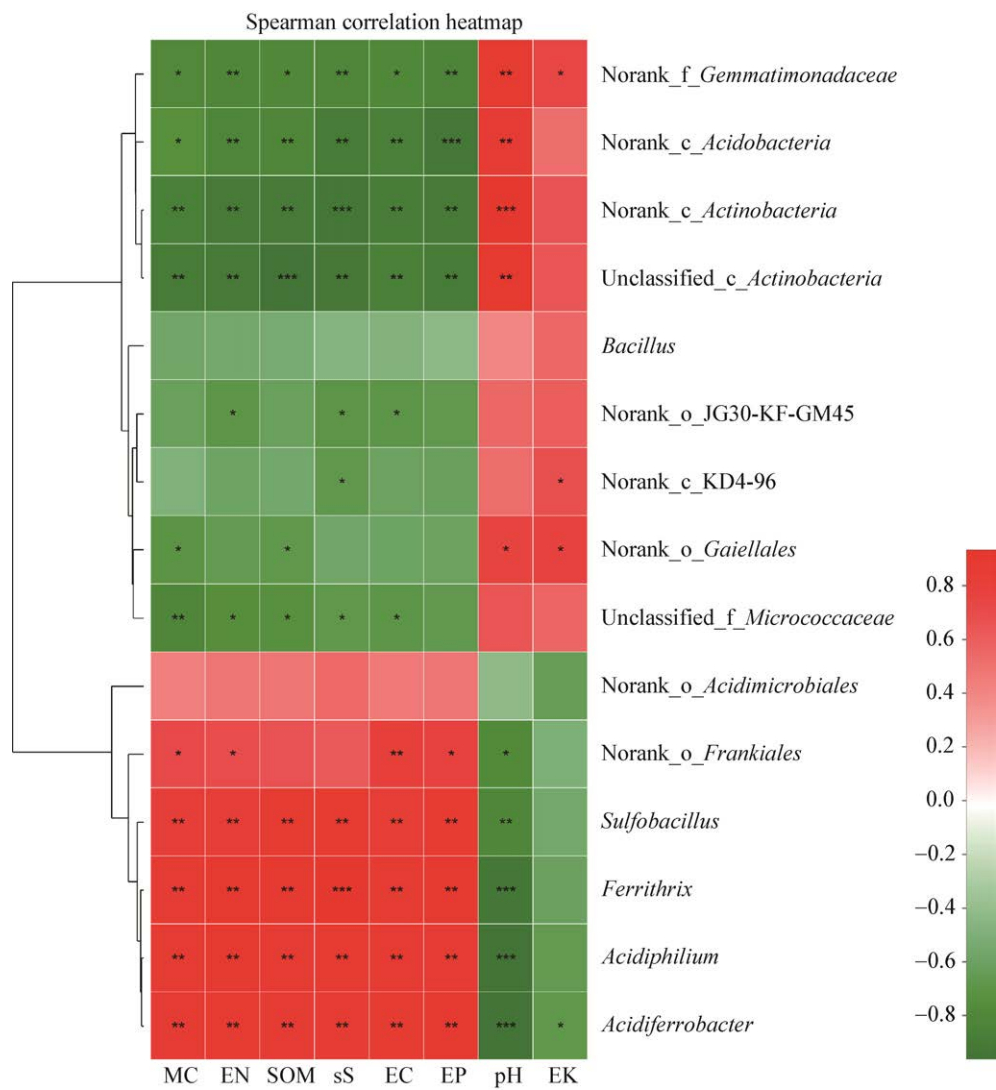


图 4 属水平细菌种类与环境因子的热图分析
Figure 4 Heatmap analysis of bacterial types at genus level and environmental factors
Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Acidiferrobacter、*Acidiphilium*、*Ferrithrix*、*Sulfobacillus*、*Norank_o_Frankiales*、*Norank_o_Acidimicrobiales* 等呈负相关性，其中 pH 对 *Acidiferrobacter*、*Acidiphilium*、*Ferrithrix*、*Sulfobacillus* 呈显著负相关，说明其比较适宜在酸性环境下生长；相反，与 *Acidiferrobacter*、*Acidiphilium*、*Ferrithrix*、*Sulfobacillus* 呈显著正相关的环境因子有 MC、EN、SOM、sS、EC 和 EP。

2.7 组间物种差异分析

如图 5 所示，在属水平上，*Acidiphilium* 和

Sulfobacillus 在 3 个样本组中的相对丰度表现出 HCCL>SBH>S 的特点，说明它们适应高硫煤环境，而且由于受高硫煤长期覆盖的影响，其在 SBH 中的相对丰度较 S 中增多。*Acidiphilium* 和 *Sulfobacillus* 均具有硫氧化产酸能力，意味着硫氧化产酸菌在高硫煤中占有重要地位，并且在高硫煤的影响下其下方土壤中硫氧化产酸菌的相对丰度也有所增加，而在对照土壤中 *Acidiphilium* 和 *Sulfobacillus* 的相对丰度为 0。

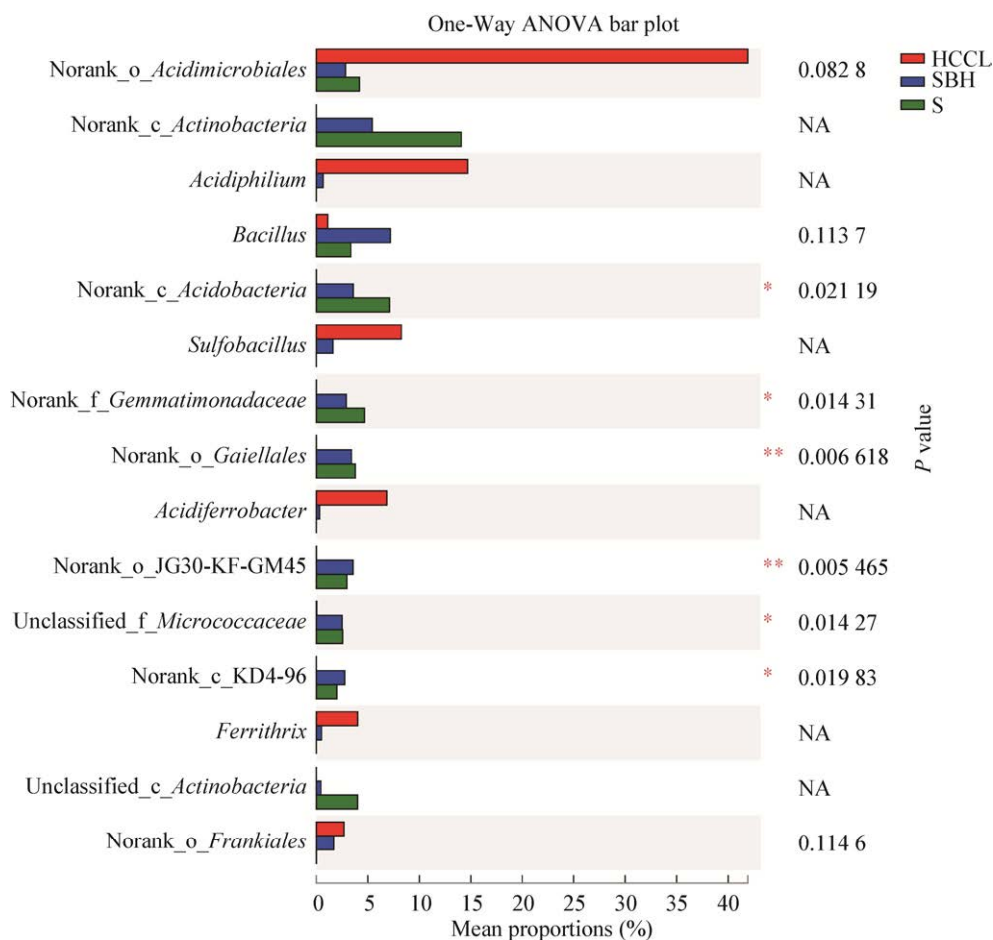


图5 属水平上组间物种差异分析

Figure 5 Analysis of bacterial types differences among groups at genus level

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

2.8 共现性网络分析

如图6所示,代表*Acidiphilium*和*Sulfobacillus*的2个节点与其他细菌属之间联系密切,其连接度(Degree of Connections)在所有节点中最高。说明在高硫煤中相对丰度占优势且具有硫氧化产酸能力的*Acidiphilium*和*Sulfobacillus*在高硫煤覆盖区域的土壤微生物生态中占有重要地位,对其他细菌类群影响非常大。此外,从图6中可以看出,在高硫煤覆盖区域放线菌门微生物所占比重很大,这与细菌群落组成(图1)显示的结果一致。在图1中,酸微菌目(*Acidimicrobiales*)属于放线菌门(*Actinobacteria*),未知属Norank_o_Acidimicrobiales和Norank_c_Actinobacteria同为放线菌门,其相对丰度之和较

高。说明放线菌在高硫煤覆盖区域的土壤细菌群落组成中也占有重要地位。

3 讨论

在HCCL中微生物氧化硫产酸以及酸下渗携带了大量硫酸盐和营养物质,将导致SBH中pH值降低,硫酸盐和营养物质含量升高,从而对SBH中细菌群落多样性和组成产生很大影响。与S中相比,SBH中微生物的 α 多样性减少;在属水平上,SBH中*Bacillus*、*Acidiphilium*、*Sulfobacillus*、*Acidiferrobacter*、*Ferrithrix*的相对丰度较高。在HCCL细菌群落组成中,*Acidiphilium*和*Sulfobacillus*的相对丰度分别为14.69% (第2位)和8.26% (第3位)。

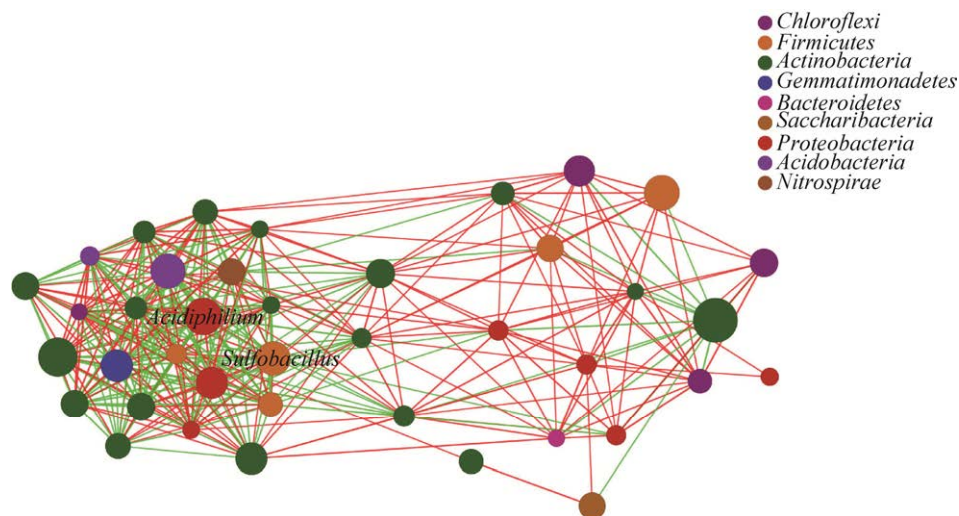


图 6 高硫煤覆盖影响下细菌共现性网络

Figure 6 Co-occurrence network of bacteria under the influence of high-sulfur coal cover

注: 红色线表示相互作用关系为正; 绿色线表示相互作用关系为负; 节点上标记的为关键菌群; $P < 0.05$

Note: The red line indicates positive interaction; The green line indicates negative interaction; Marked nodes represent key bacterial groups; $P < 0.05$

Acidiphilium 和 *Sulfobacillus* 与 pH 值呈显著负相关, 具有很强的酸性环境适应能力。样本组间物种差异分析表明 *Acidiphilium* 和 *Sulfobacillus* 的相对丰度在 3 个样本组中均呈现 HCCL>SBH>S 的特点, 与组间 pH 值的变化趋势一致, 并且 *Acidiphilium* 和 *Sulfobacillus* 均具有硫氧化产酸能力^[21-22]。由于硫氧化菌在高硫煤中的优势存在, 氧化硫产酸使得覆盖的高硫煤 pH 值非常低。共现性网络分析表明 *Acidiphilium* 和 *Sulfobacillus* 在高硫煤覆盖区域的土壤微生物生态中占有重要地位, 对其他细菌类群影响非常大。Sun 等^[23]研究发现 16S rRNA 基因在基因组内的异质性(多拷贝)引起原核微生物多样性高估, 会对土壤微生物生态分析产生影响; 但同时其研究中发现, 在 3% 差异水平定义 OTU 的条件下, V4-V5 区的高估度最低(3.0%), V3 区的高估度第二低(5.2%)。因此本文中选用 V3-V4 区对高硫煤矿区土壤细菌群落进行研究分析, 能较大程度地降低高估的影响, 所得结果仍具有重要的参考价值。此外, 设计 16S rRNA 基因特异引物可对环境样品中某类微生物进行快速检测。然而由于硫氧化菌种类较多, 目前主要对其中的某些属种进行特异引物设

计, 例如 Kojima 等设计了“*Thioplota*-specific”特异引物^[24], Brinkhoff 等设计了“*Thiomicrospira*-specific”特异引物^[25], Podgorsek 等对 *Thiobacillus*、*Halothiobacillus* 和 *Paracoccus* 每个属中的 2-3 个种设计了一组特异引物^[26]。

在自然环境中硫氧化细菌分布广泛、种类多样, 其中嗜酸氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)和嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)最具代表性^[27-29]。Ni 等^[30-31]依据转录间隔序列(Intergenic Spacer Regions, ISR)的差异性(主要包括序列长度、碱基组成)对嗜酸杆菌属(*Acidithiobacillus*)的菌株种类进行比较分析, 发现种内的序列相似度明显高于种间序列相似度。*Acidithiobacillus* 菌株的种间 ISR 序列相似度在 60.49%–84.71% 之间, *Acidithiobacillus thiooxidans* 种内序列相似度在 86.71%–99.56% 之间, *Acidithiobacillus ferrooxidans* 种内序列相似度在 92.36%–100% 之间, 并且 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 菌株被分为 Group1、Group2、Group3 等 3 个不同的系统学组。可见硫氧化菌在自然界中种类丰富, 在不同的矿山环境中具有适应当地生存条

件的硫氧化菌群存在。

硫氧化产酸形成酸性矿山废水(Acid Mine Drainage),对水体和土壤环境中微生物群落结构组成具有重要影响。Brofft 等^[32]从临近废弃煤堆的森林湿地采集沉积物样本,研究发现其细菌文库包括 *Acidiphilium*、酸杆菌属(*Acidobacterium*)、铁微菌属(*Ferromicrobium*)和钩端螺菌属(*Leptospirillum*)等类群微生物。Sun 等^[33]从云贵高原阿哈流域采集沉积物样本,与 Fe 和 S 代谢相关的微生物在样本细菌群落组成中占据优势地位,包括金属细菌属(*Metallibacterium*)、酸土单胞菌属(*Aciditerrimonas*)、嗜盐单胞菌属(*Halomonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、铁卵形菌属(*Ferrovum*)、*Alicyclobacillus* 和互营杆菌属(*Syntrophobacter*)。为了研究尾矿区微生物群落组成和功能与酸性矿山废水产生之间的关系,Chen 等^[34]从某铅锌矿的 6 个尾矿采集土壤样本,分别为原生尾矿(T1)、轻度酸化尾矿(T2)、重度酸化尾矿(T3、T4、T5)和橙色氧化尾矿(T6),发现在尾矿 T1-T3 的土壤样本中变形菌门(*Proteobacteria*)微生物为优势菌群(相对丰度为 56%–93%),而在 T4-T6 中广古菌门(*Euryarchaeota*)微生物为优势菌群(相对丰度为 46%–58%)。Fan 等^[35]对矿山废水处理沉淀池岸边土壤中的微生物群落进行研究,在进水区域的岸边土壤样本中发现更多的硫代谢微生物,其中有关硫氧化菌的有 *Acidiferrobacter*、热硫竿菌属(*Thermithiobacillus*)、池杆菌属(*Limnobacter*)、硫深渊菌属(*Thioprofundum*)和硫幡菌属(*Thiovirga*)。在金属硫化物矿区周边,从受酸性矿山废水长期灌溉的稻田采集土壤样本,其优势菌群为酸杆菌门(*Acidobacteria*)和泉古菌门(*Crenarchaeota*),其中 *Crenarchaeota* 中的 *Candidatus* 同样占优势地位;被酸性矿山废水污染严重的稻田土壤,在 0–80 cm 样本中细菌群落均以 *Acidobacteria* 为主^[36-37]。可见在与酸性矿山废水相关的不同环境中优势菌群因地而异,适应酸性环境的微生物种类丰富。在本研究中,于高硫煤覆盖层占优势地位的 *Acidiphilium* 和 *Sulfobacillus* 均具有硫氧化产酸能力,甚至能力更

强。有研究报道一些 *Acidiphilium* 菌株具有比 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 更高的铁闪锌矿浸出能力^[38],在黄铜矿精矿生物浸出系统中硫主要被 *Sulfobacillus* 菌株氧化^[39],强硫氧化产酸能力可能对矿区土壤微生态系统产生更大的影响。由于高硫煤覆盖层中 *Acidiphilium* 和 *Sulfobacillus* 的优势存在,使得下方土壤中细菌群落组成与对照土壤相比发生明显变化。在微生物分类学上, *Acidiphilium* 属于 *Proteobacteria*, *Sulfobacillus* 属于厚壁菌门(*Firmicutes*)。与已报道的酸性矿山废水研究相比较,少有优势菌群为 *Sulfobacillus* 的报道。

此外,关于中性矿山废水,Pereira 等^[40]从巴西索塞戈铜矿的中性矿山排水渠及其周边土壤采集样本进行高通量测序,分析发现中性矿山废水引起微生物群落组成和结构的改变,异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)菌在不同处理间差异最大,但对微生物多样性无影响。同为土壤环境受外界影响,土壤重金属污染会明显降低土壤微生物多样性^[41-43],高硫煤覆盖层降低了其下方土壤的微生物多样性,但与对照土壤相比降低程度较小。本研究分析了高硫煤覆盖对其下方土壤细菌群落组成和多样性的影响,加深了对矿区土壤微生物生态的认识,为高硫煤矿区生态恢复治理提供理论基础。

4 结论

自然条件下高硫煤覆盖层中的微生物氧化脱硫及酸下渗对其下方土壤中细菌群落多样性与组成产生重要影响。与对照土壤相比,高硫煤覆盖使其下方土壤中细菌的多样性指数降低,细菌群落组成发生了较大改变。在属水平上,与对照土壤相比,煤下方土壤中 *Bacillus* 的相对丰度较高,并且 *Acidiphilium*、*Acidiferrobacter*、*Sulfobacillus*、*Ferriethrix* 的相对丰度也高于对照土壤;*Acidiphilium* 与 *Sulfobacillus* 在 3 个样本组中的相对丰度均呈现高硫煤覆盖层>高硫煤下方土壤>对照土壤,脱硫产酸菌在高硫煤中的优势地位及其对下方土壤的影响由此可以得到证实。共现性网络分析表明

Acidiphilium 和 *Sulfobacillus* 在高硫煤覆盖区域的土壤微生物生态中占有重要地位, 对其他细菌类群影响非常大。因此, 高硫煤覆盖及其中硫氧化菌的优势存在对高硫煤下方土壤的细菌群落产生明显影响。本文研究结果有助于增进对矿区土壤微生物生态的认识, 可为高硫煤矿区生态恢复治理提供微生物学理论基础。

REFERENCES

- [1] Qi L, Yang J. Microbial community composition regulates SOC decomposition response to forest conversion in a Chinese temperate forest[J]. *Ecological Research*, 2017, 32(2): 163-172
- [2] Ribbons RR, Levy-Booth DJ, Masse J, Grayston SJ, McDonald MA, Vesterdal L, Prescott CE. Linking microbial communities, functional genes and nitrogen-cycling processes in forest floors under four tree species[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 103: 181-191
- [3] Epelde L, Lanzén A, Blanco F, Urich T, Garbisu C. Adaptation of soil microbial community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb-Zn mine[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(1): 1-11
- [4] Huang J, Zhu XY, Lu J, Sun Y, Zhao XQ. Effects of different land use types on microbial community diversity in the Shizishan mining area[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(12): 5550-5560 (in Chinese)
黄健, 朱旭炎, 陆金, 孙雨, 赵兴青. 狮子山矿区不同土地利用类型对土壤微生物群落多样性的影响[J]. *环境科学*, 2019, 40(12): 5550-5560
- [5] Li Y, Jia ZJ, Sun QY, Zhan J, Yang Y, Wang D. Ecological restoration alters microbial communities in mine tailings profiles[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25193
- [6] Zhan J, Sun QY. Development of microbial properties and enzyme activities in copper mine wasteland during natural restoration[J]. *Catena*, 2014, 116: 86-94
- [7] Wang JM, Liu WH, Yang RX, Zhang L, Ma JJ. Assessment of the potential ecological risk of heavy metals in reclaimed soils at an opencast coal mine[J]. *Disaster Advances*, 2013, 6(S3): 366-377
- [8] Liu JJ, Liu GJ, Zhang JM, Yin H, Wang RW. Occurrence and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil from the Tiefa coal mine district, Liaoning, China[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, 14(10): 2634-2642
- [9] Bian ZF, Dong JH, Lei SG, Leng HL, Mu SG, Wang H. The impact of disposal and treatment of coal mining wastes on environment and farmland[J]. *Environmental Geology*, 2009, 58(3): 625-634
- [10] Rodriguez-Iruretagoiena A, De Vallejuelo SFO, Gredilla A, Ramos CG, Oliveira MLS, Arana G, De Diego A, Madariaga JM, Silva LFO. Fate of hazardous elements in agricultural soils surrounding a coal power plant complex from Santa Catarina (Brazil)[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 508: 374-382
- [11] Gonsalvesh L, Marinov SP, Stefanova M, Carleer R, Yperman J. Biodesulphurized low rank coal: Maritza east lignite and its "humus-like" byproduct[J]. *Fuel*, 2013, 103: 1039-1050
- [12] Kusnierova M, Prascakova M, Fecko P, Janakova I. Chemical and biological desulphurization of boiler coal[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150(S1): 252
- [13] Zhan X, Feng SS, Zhang L, Huang X, Tang JD, Wu QQ, Yang HL. Isolation of a C_x-DBT desulfurizing strain and optimization of its fermentation conditions[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(6): 1171-1180 (in Chinese)
詹晓, 冯守帅, 张玲, 黄兴, 唐嘉鼎, 吴泉钱, 杨海麟. 一株 C_x-DBT 脱硫菌的筛选及发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(6): 1171-1180
- [14] Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15): 5111-5120
- [15] López-Archilla AI, Marín I, Amils R. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto river, Spain[J]. *Microbial Ecology*, 2001, 41(1): 20-35
- [16] Environmental Protection Department of the People's Republic of China. HJ 704-2014 Soil quality—Determination of available phosphorus—Sodium hydrogen[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2014 (in Chinese)
中华人民共和国环境保护部. HJ 704-2014 土壤 有效磷的测定 碳酸氢钠浸提-钼锑抗分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2014
- [17] Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NY/T 1849-2010 Method for determination of ammonium nitrogen, available phosphorus and rapidly-available potassium in acid soil—Universal extract-colorimetric method[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2010 (in Chinese)
中华人民共和国农业部. NY/T 1849-2010 酸性土壤铵态

- 氮、有效磷、速效钾的测定 联合浸提-比色法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2010
- [18] Ding YX. Isolation and identification of myxobacteria from Ordos Plateau area and preliminary analysis of their antibiotic activities against *Phytophthora infestans*[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2017 (in Chinese)
丁一秀. 鄂尔多斯高原地区粘细菌的分离鉴定及其拮抗致病疫霉活性的初步分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2017
- [19] Environmental Protection Department of the People's Republic of China. HJ 635-2012[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2012 (in Chinese)
中华人民共和国环境保护部. HJ 635-2012 土壤 水溶性和酸溶性硫酸盐的测定 重量法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012
- [20] Zhang B. Characteristics of coupled ultrasonic and alkaline pretreatment on enhancing anaerobic digestion of high-solid sludge[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2017 (in Chinese)
张博. 超声耦合碱解预处理促进高固污泥厌氧消化的工艺特性研究[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2017
- [21] Rohwerder T, Janosch C, Sand W. Elemental sulfur oxidation in *Acidiphilium* spp.[J]. Advanced Materials Research, 2007, 20-21: 583
- [22] Peng TJ, Zhou D, Liu YN, Yu RL, Qiu GZ, Zeng WM. Effects of pH value on the expression of key iron/sulfur oxidation genes during bioleaching of chalcopyrite on thermophilic condition[J]. Annals of Microbiology, 2019, 69(6): 627-635
- [23] Sun DL, Jiang X, Wu QL, Zhou NY. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969
- [24] Kojima H, Teske A, Fukui M. Morphological and phylogenetic characterizations of freshwater *Thioploca* species from Lake Biwa, Japan, and Lake Constance, Germany[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 390-398
- [25] Brinkhoff T, Muyzer G. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(10): 3789-3796
- [26] Podgorsek L, Petri R, Imhoff JF. Cultured and genetic diversity, and activities of sulfur-oxidizing bacteria in low-temperature hydrothermal fluids of the North Fiji Basin[J]. Marine Ecology Progress Series, 2004, 266: 65-76
- [27] Nuñez H, Covarrubias PC, Moya-Beltrán A, Issotta F, Atavales J, Acuña LG, Johnson DB, Quatrini R. Detection, identification and typing of *Acidithiobacillus* species and strains: a review[J]. Research in Microbiology, 2016, 167(7): 555-567
- [28] Zhang X, Feng X, Tao JM, Ma LY, Xiao YH, Liang YL, Liu XD, Yin HQ. Comparative genomics of the extreme acidophile *Acidithiobacillus thiooxidans* reveals intraspecific divergence and niche adaptation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(8): 1355
- [29] Paulino LC, Bergamo RF, De Mello MP, Garcia O Jr, Manfio GP, Ottoboni LMM. Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2001, 80(1): 65-75
- [30] Ni YQ, Yang Y, Bao JT, He KY, Li HY. Inter- and intraspecific genomic variability of the 16S-23S intergenic spacer regions (ISR) in representatives of *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 270(1): 58-66
- [31] Ni YQ, He KY, Bao JT, Yang Y, Wan DS, Li HY. Genomic and phenotypic heterogeneity of *Acidithiobacillus* spp. strains isolated from diverse habitats in China[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 64(2): 248-259
- [32] Brofft JE, McArthur JV, Shimkets LJ. Recovery of novel bacterial diversity from a forested wetland impacted by reject coal[J]. Environmental Microbiology, 2002, 4(11): 764-769
- [33] Sun WM, Xiao TF, Sun M, Dong YR, Ning ZP, Xiao EZ, Tang S, Li JW. Diversity of the sediment microbial community in the Aha watershed (Southwest China) in response to acid mine drainage pollution gradients[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(15): 4874-4884
- [34] Chen LX, Li JT, Chen YT, Huang LN, Hua ZS, Hu M, Shu WS. Shifts in microbial community composition and function in the acidification of a lead/zinc mine tailings[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(9): 2431-2444
- [35] Fan MC, Lin YB, Huo HB, Liu Y, Zhao L, Wang ET, Chen WM, Wei GH. Microbial communities in riparian soils of a settling pond for mine drainage treatment[J]. Water Research, 2016, 96: 198-207
- [36] Wang H, Zeng YF, Guo CL, Bao YP, Lu GN, Reinfelder JR, Dang Z. Bacterial, archaeal, and fungal community responses to acid mine drainage-laden pollution in a rice paddy soil ecosystem[J]. Science of the Total Environment, 2018, 616-617: 107-116
- [37] Wang H, Guo CL, Yang CF, Lu GN, Chen MQ, Dang Z. Distribution and diversity of bacterial communities and

- sulphate-reducing bacteria in a paddy soil irrigated with acid mine drainage[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(1): 196-206
- [38] Zhang YF, Yang Y, Liu JS, Qiu GZ. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of *Acidiphilium*-like bacteria from acid mine drainage[J]. *Advanced Materials Research*, 2007, 20-21: 473-476
- [39] Zhou D, Peng TJ, Zhou HB, Liu XD, Gu GH, Chen M, Qiu GZ, Zeng WM. Expression of critical sulfur- and iron-oxidation genes and the community dynamics during bioleaching of chalcopyrite concentrate by moderate thermophiles[J]. *Current Microbiology*, 2015, 71(1): 62-69
- [40] Pereira LB, Vicentini R, Ottoboni LMM. Changes in the bacterial community of soil from a neutral mine drainage channel[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96605
- [41] Teng Y, Huang CY, Luo YM, Long J, Yao HY. Microbial activities and functional diversity of community in soils polluted with Pb-Zn-Ag mine tailings[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(1): 113-119 (in Chinese)
- 滕应, 黄昌勇, 骆永明, 龙健, 姚槐应. 铅锌银尾矿区土壤微生物活性及其群落功能多样性研究[J]. *土壤学报*, 2004, 41(1): 113-119
- [42] Zhang XQ, Zhang Q, Cheng YY, Jia R. The impact of heavy metal contamination on soil microbial diversity and enzyme activities in a copper mine[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2016, 25(3): 517-522 (in Chinese)
- 张雪晴, 张琴, 程园园, 茆荣. 铜矿重金属污染对土壤微生物群落多样性和酶活力的影响[J]. *生态环境学报*, 2016, 25(3): 517-522
- [43] Xie Y, Fan JB, Zhu WX, Amombo E, Lou YH, Chen L, Fu JM. Effect of heavy metals pollution on soil microbial diversity and bermudagrass genetic variation[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 755