

凡口铅锌矿酸性底泥可培养微生物资源的探索分离

房保柱¹, 王怡欢¹, 张 堃², 廖俊杰², 欧阳欣², 岳 秀², 肖 吉², 李文均^{1*}

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 广东轻工职业技术学院 生态环境技术学院, 广东 广州 510300)

摘要 通过改良优化多种传统分离培养基, 对凡口铅锌尾矿的酸性底泥可培养微生物资源进行分离, 并结合多种分子标记基因对分离资源进行系统发育地位分析。结果表明, 凡口铅锌尾底泥中分离获得细菌 41 株, 分属于放线菌门 (Actinomycetes)、变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 的 11 目, 18 科, 18 属; 真菌 8 株, 分属于 2 门, 5 目, 5 科, 5 属; 藻类 1 株, 属于 *Galdieria* 属的红藻。改良 ISP 2 和改良 9 号培养基的分离效果较好, 分离获得的微生物多样性较为良好。研究结果为矿山酸性废水微生物多样性研究提供参考, 为酸性废水的修复及生态治理研究提供物质基础。

关键词 凡口铅锌尾矿; 极端微生物; 分离

中图分类号 Q93-33

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2020)02-0010-12

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2020.02.002

Isolation of Culturable Microbes in Sediments from *Fankou* Lead-Zinc Mine

FANG Bao-zhu¹, WANG Yi-huan¹, ZHANG Kun², LIAO Jun-jie²,
OUYANG Xin², YUE Xiu², XIAO Ji², LI Wen-jun¹

(1. Schl. of Life Sci., Sun Yat-sen Uni., Guangzhou 510275; 2. Schl. of Eco-jEnviron' t Tech.,
Guangdong Light Indust. Vocational Polytech., Guangzhou 510300)

Abstract Adopting improved and optimized the traditional various isolation media, microbes from tail bottom mud in *Fankou* lead-zinc mine were performed the isolation of culturable microbial resources, combined with different molecular biomarker genes to carry out phylogenetic position analysis. The results showed that a total of 41 bacterial strains obtained from *Fankou* lead-zinc tail bottom mud respectively belonged to 11 orders, 18 families and 18 genera of the phyla of Actinomycetes, Proteobacteria, and Firmicutes; and 8 fungal strains respectively belonged to 2 phyla, 5 orders, 5 families, and 5 genera; 1 alga strain belonged to the genus *Galdieria* of the phylum of red alga. The improved ISP 2 and improved No. 9 medium have shown better isolation effect, and the isolated-and-obtained had fine microbial diversity. This study had laid theoretical basis for studying on the microbial diversity in acid wastewater of mine, and provided material foundation for restoring acid wastewater and ecological control research.

Keywords *Fankou* lead-zinc refused mine; extreme microorganisms; isolation

矿山酸性废水 (Acid Mine Drainage, AMD), 是由还原性的硫化矿物暴露在环境中氧化而生成的, 包括矿坑水、废石场淋滤水、选矿废水及尾矿堆废水等^[1-2]。矿山酸性废水 (AMD) 具有 pH 极

低 (通常 pH < 3), 重金属 (Pb、Zn、Cu、Mn、Cd、As、Fe、Al 等) 及 SO₄²⁻ 含量高的特点, 废水的排放不仅造成矿山资源的浪费, 而且会对周围的陆地和水体生态系统造成毁灭性的破坏, 导致绝大多数动

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2016A030312003, 2018A0303130014); 广东轻工职业技术学院优秀青年基金项目 (QN2018-003)

作者简介: 房保柱 男, 副研究员。研究方向为环境微生物资源与分类、微生物生态学。E-mail: fangbaozhu2009@126.com

* 通讯作者。男, 教授, 博士生导师。研究方向为微生物资源与生态。Tel: 020-84111727, E-mail: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2019-09-24

植物,如鱼类、藻类等生物死亡,直接危害人类生存^[3-4]。因此,国内外学者对此特殊极端生境开展了大量研究^[5]。尽管矿山酸性废水的 pH 极低且溶解性有机碳的浓度非常低 (<20 mg/L),但其中仍蕴含着丰富的嗜酸微生物资源。嗜酸微生物广泛分布于自然界中,多个门中都有嗜酸微生物存在。嗜酸原核微生物主要分布在变形菌门(Proteobacteria)的 α -变形菌、 β -变形菌和 γ -变形菌,如酸硫杆菌纲(Acidithiobacillia);硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、产水菌门(Aquificae)和疣微菌门(Verrucomicrobia)。革兰阳性菌放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)^[6-7];与此同时,在古菌类群中也分布着丰富的嗜酸类群,如泉古菌门(Crenarchaeota)、广古菌门(Euryarchaeota)和微古菌门(Parvarchaeota)等^[8-9]。丰富的嗜酸微生物资源不仅参与到特殊生境的物质能量循环,而且对污染环境的修复起到了关键作用。目前,酸性矿山废水环境微生物多样的研究方法很多,除高通量测序外,还有传统的微生物纯培养和分离技术。虽然测序技术在进步,但是为了更准确、有针对性地研究微生物的功能代谢与生态适应机制,为后续利用提供种质资源^[10],纯培养技术在酸性矿山废水微生物的研究中也必不可少。近年来,随着分离培养基的不断优化^[11],利用纯培养方法研究特殊酸性环境中的微生物多样性已成为当前的热点。凡口铅锌矿是中国最大的铅锌矿,在生产过程中产生了大量尾矿等废弃物,经过长期的自然风化、雨水侵蚀,并在微生物的作用下,产生了大量富含重金属的酸性矿山废水,对周边居民的生活用水及农业生产造成了严重危害^[12]。目前,酸性矿山废水的主要处理方法有酸碱中和法、混凝沉降法、化学氧化法、人工湿地法、可渗透反应墙法等^[13]。但这些方法往往存在处理成本高、适用性差、易造成二次污染的问题。因此,利用特殊的嗜酸微生物进行酸矿废水修复,成为当前研究者关注的热点,因其环境友好、适应性强,具有广阔的应用前景^[14]。本研究对凡口铅锌尾矿酸性底泥进行微生物资源分离及培养,并利用多种分子标记基因对分离资源进行初步分析,研究凡口铅锌尾矿底泥中微生物的多样性,收集、保藏特殊嗜酸微生物资源,为后续矿山酸性废水污染的治理提供参

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 样品采自广东省韶关市仁化县凡口铅锌矿(N25°2'57.5",E113°39'34.1"),如图1所示。凡口铅锌尾矿5个采样点采集表层5 cm的底泥样品各10份,每个样品分别由5个金属钻孔获得的样品(呈圆周分布)混合而成。样品采集后,立即放入已灭菌的玻璃血清瓶中,置于冰盒中保存,送回实验室于4℃冰箱中保存,备用。

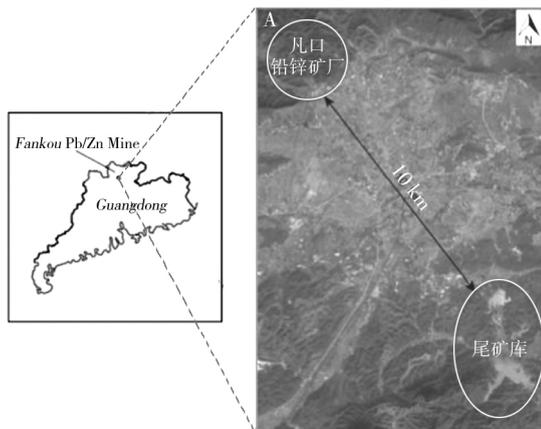


图1 凡口铅锌矿示意图

Fig. 1 The location of Fankou Lead-Zinc Mine, China

1.1.2 培养基 通过查阅文献选出13种微生物分离用培养基(表1)。经过筛选与优化确定3种培养基用于微生物的纯培养:①改良ISP2培养基(3号培养基)^[15](g/L),加入酪氨酸0.4 g,pH 3.0;②改良FeO(9号培养基)固体培养基,加入连四硫酸钾0.76 g,pH 2.5;③改良9K(12号培养基)培养基^[16]。所有培养基均加入100 mL采样点酸性废水原液过滤液(滤膜孔径0.22 μm)。

1.1.3 仪器与设备 电感耦合等离子体发射光谱仪(inductively coupled plasma optical emission spectrometry, ICP-OES; Optima 2100DV; 珀金埃尔默,马萨诸塞州,美国);原子荧光光谱法(atomic fluorescence spectrometry, AFS; AFS-820; Gi-Tian, 北京,中国);光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS);Star Prep Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒(GenStar 北京康润诚业生物科技有限公司);pMD™18-T Vector Cloning Kit(Takara Bio 宝

生物工程(大连)有限公司);便携式pH计(HACH,5055)。

1.2 方法

1.2.1 样品理化特性测定 本次样品的理化参数测定分为原位测定和实验室测定。原位测定主要针对样品的pH值,测定时按照尾矿和纯水1:2.5(质量体积比)的比例混合,通过便携式pH计进行测定。实验室测定主要针对样品的总硫(SO_4^{2-}),以及重金属(Fe、Pb、Zn、Cu、Cr、Mn、As)含量等的测定。其中, SO_4^{2-} 的含量通过硫酸钡比

浊法测定^[17]。对于Fe、Pb、Zn、Cu、Cr、Mn等重金属的测量,先取一定体积(或质量)的样品,加入硝酸和盐(1:3,体积比),在180℃微波下消化后通过电感耦合等离子体发射光谱仪进行测定^[18]。As则通过原子荧光光谱法测定。 Fe^{3+} 的浓度测定在530 nm波长下使用1,10-邻二氮杂菲紫外比色法测定;对于同一样品,可以通过将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} 得到 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的总浓度,从中减去 Fe^{3+} 的浓度,即可得到 Fe^{2+} 的浓度。样品中主要的无机硫化物相对丰度通过光电子能谱进行测定。

表1 13种分离培养基组成

Table 1 The composition of 13 isolation media

培养基编号	培养基组成及制备
1	K_2HPO_4 0.8 g, KH_2PO_4 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, NH_4Cl 0.4 g, DMSO 0.78 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.2 g, 微量元素溶液 2.0 mL, 蒸馏水 1 000 mL, pH 3.0 微量元素溶液:乙二胺四乙酸 50.0 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.0 g, CaCl_2 5.54 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.06 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.99 g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.10 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.61 g, 蒸馏水 1 000 mL
2	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.9 g, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4 g, DMSO 0.78 g, 酵母提取物 0.05 g, 微量元素溶液 2.0 mL, 琼脂糖 2 g, 蒸馏水 100 mL, pH 3.0
3	胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, 葡萄糖 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 3.0
4	酵母提取物 1 g, L-半胱氨酸 0.04 g, 焦磷酸铁 0.025 g, 琼脂糖 1.7 g, 蒸馏水 100 mL, pH 3.0
5	酵母提取物 1 g, L-半胱氨酸 0.04 g, 焦磷酸铁 0.025 g, 活性炭 0.15 g, 琼脂糖 1.7 g, 蒸馏水 100 mL, pH 3.0
6	牛肉膏 3.0 g, 酸水解酪蛋白 1.75 g, 可溶性淀粉 0.15 g, L-半胱氨酸 0.04 g, 焦磷酸铁 0.25 g, 琼脂糖 1.7 g, 蒸馏水 100 mL, pH 3.0
7	酵母提取物 1.0 g, L-酪氨酸 0.04 g, 琼脂糖 1.7 g, 蒸馏水 100 mL, pH 3.0
8	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.3 g, KH_2PO_4 0.28 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.8 mg, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 4.5 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 mg, $\text{VOSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 mg, CoSO_4 0.01 mg, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 1 g, 蒸馏水 100 mL, pH 3.0
9	A液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 g, 蒸馏水 25 mL, pH 2.0; B液: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8 g, TSB 0.25 g, 蒸馏水 725 mL, pH 2.5; C液: 琼脂糖 10 g, 蒸馏水 250 mL
10	A液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 g, 蒸馏水 25 mL, pH 2.0; B液: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8 g, $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 0.76 g, TSB 0.25 g, 蒸馏水 725 mL, pH 2.5; C液: 琼脂糖 10 g, 蒸馏水 250 mL
11	A液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 g, 蒸馏水 5 mL, pH 2.0; B液: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8 g, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 1.58 g, TSB 0.25 g, 蒸馏水 725 mL, pH 6.5; C液: 琼脂糖 10 g, 蒸馏水 250 mL
12	A液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, KCl 0.1 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 蒸馏水 500 mL, pH 2.5; B液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 33 g, 蒸馏水 300 mL, pH 2.5; C液: 琼脂糖 15 g, 蒸馏水 200 mL
13	A液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, KCl 0.1 g, K_2HPO_4 0.05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.015 g, 蒸馏水 600 mL, pH 2.5; B液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22 g, 蒸馏水 150 mL, pH 2.5; C液: 琼脂糖 15 g, 蒸馏水 250 mL

注:A、C液121℃灭菌20 min, B液过滤,混合后倒平板

1.2.2 微生物的分离纯化 样品预处理:无菌条件下,称取底泥样品2.0 g于200 mL PBS缓冲液(pH 3.0)的三角瓶,放入数粒玻璃珠,28℃、200 r/min振荡1 h,并用PBS缓冲液(pH 3.0)分别稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 浓度。取200 μL 经预处理的样品涂布于分离培养基上。分别置于20、28、37、45℃

四组不同培养温度, 10^{-2} 、 10^{-3} 两组浓度梯度,在各温度的恒温培养箱中培养21 d。根据菌落的质地、形态和颜色、边缘凹凸、是否产生可溶性素及其颜色等形态特征,进行初步归类。对每个分离培养基上生长的不同类群单菌落转接于培养基平板上,培养直至获得纯菌落。将初步归类为藻类的

藻株接种到其对应的液体培养基中,进行摇瓶培养,200 r/min,设置光照和避光两组对照,在各温度下培养 14 d 并观察其生长状况。

1.2.3 微生物的分子生物学鉴定 ①菌体/藻体的收取:细菌/真菌的菌体收取:收集新鲜菌体,放入无菌的 10 mL 离心管中,置于液氮中快速冷冻, -80 ℃ 备用;藻体收取:在无菌环境下,将三角瓶中的菌液转移到无菌的 50 mL 离心管中, 4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min,去上清,用 PBS 缓冲液漂洗 2 次,再次离心去除上清。将收集好藻体的离心管放入液氮中快速冷却,然后置于 -80 ℃ 备用。②DNA 的提取:细菌的基因组提取采用简化的酶小量法提取^[19]。提取基因组 DNA 加入 50 μL 的 1 × TE,溶解后, -20 ℃ 保存。真菌及藻类:采用液氮研磨并配合 CTAB 法提取^[15]。加入 50 μL 的 1 × TE 溶解基因组 DNA,放置 -20 ℃ 保存,备用。③PCR 扩增:PCR 扩增引物分别用于细菌、真菌及藻类的 DNA 扩增(表 2)。④生物标记基因的确定:使用 Star Prep Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒进行胶产物回收,胶回收产物利用 pMD™18-T Vector Cloning Kit 进行连接转化,挑取白色克隆子,送上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.4 生物标记基因的系统发育分析 利用 EzBioCloud (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 和 NCBI 数据库的 BLAST 对获得的基因序列进行比对分析,寻找与目的序列相似性最高的已知分类地位的菌/藻株作为比较对象^[20-21],使用软件 MEGA 7.0 进行聚类分析,通过邻接法(Nighbor-

Joining) 构建系统进化树^[22-23]。用于检验支持率的重复抽样次数为 1 000 次。

表 2 细菌的 16S rRNA、真菌的 ITS、藻类的 18S rRNA 基因引物序列

Table 2 Primer sequences of 16S rRNA, ITS and 18S rRNA genes

引物名称	引物序列(5'-3')
27f	CAGAGTTTGATCCTGGCT
1492r	AGGAGGTGATCCAGCCGCA
18S-up	ACCTGGTTGATCCTGCCAGT
18S-down	TCACCTACGGAAACCTTGT
ITS 1	TCCGTAGTGTAACCTGCCG
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

2 结果与分析

2.1 样品的理化特征

样品中重金属 Cr、Mn 的含量趋于一致,总硫(SO₄²⁻)及其他重金属(Fe、Pb、Zn、Cu、As 等)则存在比较明显的差异,尤其在总硫(T-S)、总铁(T-Fe)和砷(As)含量等方面,差异尤为显著。如表 3 所示,10 个样品 pH 值为 2.2 ~ 2.5,各样品中均含有极高浓度的 Pb、Zn 和较高浓度的 Cr、Mn。在总铁(T-Fe)方面,S1、S2 中的总铁分别接近 S8 中总铁含量的 3 倍,其他样品中的总铁含量趋于相似。而在 As 含量上,S1、S2、S8 中的 As 含量显著高于其他 7 个样品。以上的理化特征充分表明凡口铅锌矿底泥酸性极低,重金属含量极高,属于极端环境。

表 3 凡口铅锌矿底泥样品理化特征

Table 3 Geochemical characteristics of sediment samples from the Fankou Pb/Zn Mine, China

样品	pH	SO ₄ ²⁻ / T-S (%)	T-Fe/ (g · kg ⁻¹)	Fe ²⁺ / T-Fe (%)	Pb/ (mg · kg ⁻¹)	Zn/ (mg · kg ⁻¹)	Cu/ (mg · kg ⁻¹)	Cr/ (mg · kg ⁻¹)	Mn/ (mg · kg ⁻¹)	As/ (mg · kg ⁻¹)
S0	2.3	0.99	7.5	0.07	18 707	748	78	16	29	508
S1	2.2	0.97	9.8	0.03	19 857	1 268	109	27	40	2 188
S2	2.2	0.74	9.1	0.12	16 253	1 133	63	23	35	2 072
S3	2.5	0.18	6.0	0.82	15 790	1 635	117	36	27	201
S4	2.4	0.43	7.1	0.03	16 205	689	33	14	31	537
S5	2.3	0.52	6.8	0.04	24 068	672	82	15	30	498
S6	2.3	0.59	6.6	0.04	19 738	743	78	14	41	829
S7	2.4	0.32	6.9	0.46	16 640	763	31	20	31	1 276
S8	2.5	0.63	3.2	0.07	15 796	824	53	28	48	2 034
S9	2.4	0.63	5.9	0.75	18 829	772	62	32	26	1 169

2.2 凡口铅锌矿可培养微生物多样性

利用多种分离培养基对 10 份底泥样品进行微生物分离,共分离得到细菌 92 株,真菌 31 株,藻类 3 株。去重复后最终获得 41 株细菌、8 株真菌、1 株藻,分别对其进行 16S rRNA、18S rRNA 和 ITS 的基因序列测定,上传 EzBioCloud 网站进行比对。结果显示,有 41 株不同种细菌分布在放线菌门、变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 的 8 个纲 11 个目 18 个科 18 个属,分别为酸硫杆菌属 (*Acidithiobacillus*) 3 株、产碱菌属 (*Alcaligenes*) 2 株、芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 4 株、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*) 1 株、科恩氏菌属 (*Cohnella*) 1 株、代尔夫特菌属 (*Delftia*) 1 株、戈登氏菌属 (*Gordonia*) 2 株、白蚁菌属 (*Isop-*

tericola) 1 株、微杆菌属 (*Microbacterium*) 13 株、微球菌属 (*Micrococcus*) 4 株、栖水菌属 (*Enhydrobacter*) 1 株、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) 2 株、假单胞菌属 (*Pseudochrobactrum*) 1 株、嗜冷芽胞杆菌属 (*Psychrobacillus*) 1 株、氧化硫杆菌属 (*Sulfobacillus*) 1 株、冢村氏菌属 (*Tsukamurella*) 1 株 (表 4); 有 8 株真菌分布在 2 个门 4 个纲 5 个目 5 个科 5 个属,分别为四球菌属 (*Teratosphaeria*) 2 株、红酵母属 (*Rhodotorula*) 1 株、青霉属 (*Penicillium*) 1 株、外瓶霉属 (*Exophiala*) 2 株、隐球菌属 (*Cryptococcus*) 2 株 (表 5); 此外, S2 样品分离获得 1 株 *Galdieria* 属的红藻,与藻株 *Galdieria sulphuraria* 最相近,其 18S rRNA 基因的相似性为 93.73%。

表 4 原核微生物 16S rRNA 基因相似性比对结果

Table 4 16S rRNA gene sequence similarities of strains isolated from sediment samples

菌株编号	最相似菌株	相似性/%	样品
SYSU C17001	<i>Cohnella phaseoli</i>	99.58	S0
SYSU C17002	<i>Microbacterium jejuense</i>	98.98	S0
SYSU C17003	<i>Nocardiopsis alba</i>	100.00	S0
SYSU C17004	<i>Tsukamurella carboxydivorans</i>	100.00	S0
SYSU C17005	<i>Microbacterium testaceum</i>	99.84	S1
SYSU C17006	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	99.83	S1
SYSU C17007	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	99.83	S1
SYSU C17008	<i>Delftiaacidovorans</i>	99.71	S1
SYSU C17009	<i>Gordonia terrae</i>	100.00	S1
SYSU C170010	<i>Microbacterium kyungheense</i>	99.21	S1
SYSU C170011	<i>Microbacterium jejuense</i>	99.17	S1
SYSU C170012	<i>Micrococcus aloeverae</i>	99.17	S1
SYSU C170013	<i>Bacillus cereus</i>	100.00	S1
SYSU C170014	<i>Isoptricola variabilis</i>	99.01	S2
SYSU C170015	<i>Microbacterium jejuense</i>	99.05	S2
SYSU C170016	<i>Microbacterium kyungheense</i>	99.33	S2
SYSU C170017	<i>Microbacterium resistens</i>	100.00	S2
SYSU C170018	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	99.14	S2
SYSU C170019	<i>Micrococcus aloeverae</i>	99.73	S2
SYSU C170020	<i>Moraxella osloensis</i>	99.67	S2
SYSU C170021	<i>Nocardiopsis alba</i>	100.00	S2
SYSU C170022	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	99.51	S2
SYSU C170023	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	100.00	S2
SYSU C170024	<i>Bacillus cereus</i>	100.00	S2
SYSU C170025	<i>Brevundimonas diminuta</i>	99.86	S2
SYSU C170026	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	99.33	S2
SYSU C170027	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	99.72	S3
SYSU C170028	<i>Micrococcus aloeverae</i>	99.66	S3

续表 4

菌株编号	最相似菌株	相似性/%	样品
SYSU C170029	<i>Bacillus cereus</i>	100.00	S4
SYSU C170030	<i>Microbacterium flavum</i>	98.67	S5
SYSU C170031	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	99.33	S5
SYSU C170032	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i>	100.00	S6
SYSU C170033	<i>Microbacterium jejuense</i>	99.00	S6
SYSU C170034	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	98.80	S7
SYSU C170035	<i>Microbacterium jejuense</i>	99.17	S8
SYSU C170036	<i>Microbacterium kyungheense</i>	99.09	S8
SYSU C170037	<i>Gordonia terrae</i>	99.83	S8
SYSU C170038	<i>Microbacterium assamensis</i>	98.94	S8
SYSU C170039	<i>Micrococcus aloeverae</i>	99.67	S8
SYSU C170040	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	100.00	S8
SYSU C170041	<i>Sphingobacterium cladoniae</i>	99.19	S9

表 5 部分菌株 ITS 基因相似性比对结果

Table 5 ITS gene sequence similarities of strains isolated from sediment samples

菌株编号	最相似菌株	相似性/%	样品
SYSU C17042	<i>Penicillium citrinum</i>	100.00	S0
SYSU C17043	<i>Cryptococcus laurentii</i>	100.00	S0
SYSU C17044	<i>Teratosphaeria flexuosa</i>	94.12	S1
SYSU C17045	<i>Teratosphaeria flexuosa</i>	94.08	S2
SYSU C17046	<i>Exophiala alcalophila</i>	100.00	S2
SYSU C17047	<i>Rhodotorula minuta</i>	99.78	S5
SYSU C17048	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	100.00	S6
SYSU C17049	<i>Exophiala alcalophila</i>	100.00	S8

以上分离结果显示,通过前期不同培养基、温度和稀释梯度的培养,不同样品表现出了不同的分离效果。其中,样品 S1、S2、S8 的微生物资源多样性较高,且分离效果较好。在所选择培养基中,改良 ISP 2 培养基和改良 9 号培养基的培养效果更好,分离得到菌株多样性较为丰富。

2.3 凡口铅锌矿可培养微生物系统进化分析

将所分离微生物的 16S rRNA、ITS 或 18S rRNA 基因序列进行 BLAST 比对分析,选取与每个种类菌株相似性最大的典型菌株的 16S rRNA、ITS 或 18S rRNA 基因序列,利用软件 MEGA 7.0

进行聚类分析,构建系统发育树。

结果如图 2 所示,18 个属中的细菌主要包含放线菌门的戈登氏菌属 (*Gordonia*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardopsis*)、冢村氏菌属 (*Tsakamurella*)、白蚁菌属 (*Isopterocola*) (图 3);其次变形菌门的产碱菌属 (*Alcaligenes*)、代尔夫特菌属 (*Delftia*)、酸硫杆状菌属 (*Acidithiobacillus*)、栖水菌属 (*Enhydrobacter*)、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*) 和假单胞菌属 (*Pseudochrobactrum*) (图 4);以及厚壁菌门的芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、葡萄球菌属

(*Staphylococcus*)、嗜冷芽胞杆菌属 (*Psychrobacillus*) 和科恩氏菌属 (*Cohnella*) 等;除此之外,分离获得少量真菌(图 5)和藻类的纯培养,进一步说明了凡口铅锌矿可培养微生物种类存在多样性。

如图 6 所示,藻类 SYSUC C17050 在 *Galdieria* 属的分支上稳定,与 *Galdieria sulphuraria* 的相似性最高,Blast 的结果显示两者之间的相似度仅为 93.7%,其准确的分类地位需要进一步研究。

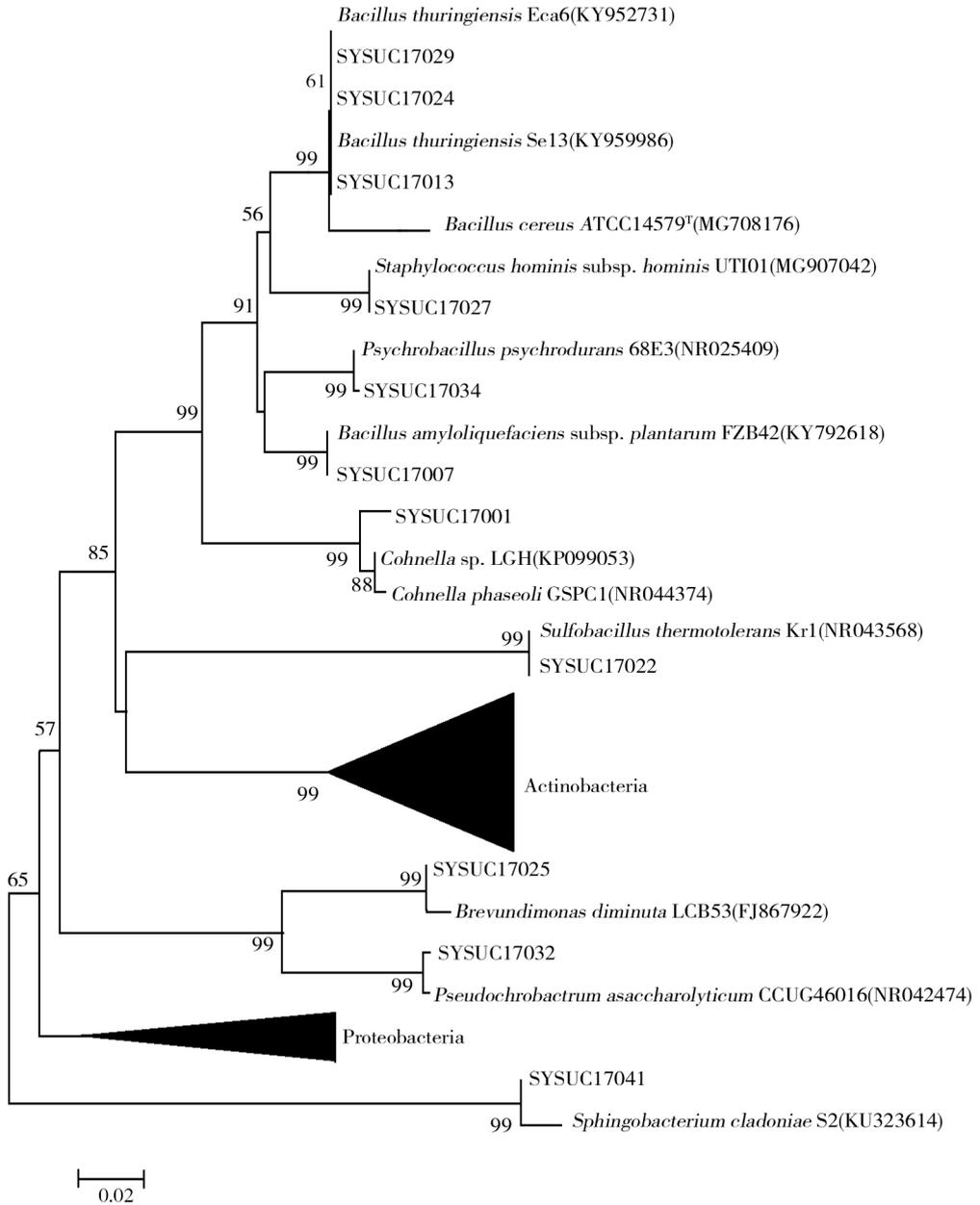


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的邻位连接法构建凡口铅锌矿可培养细菌系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of culturable microbial community in Fankou Pb/Zn Mine, constructed by using the Neighbor-Joining method based on the 16S rRNA gene sequences

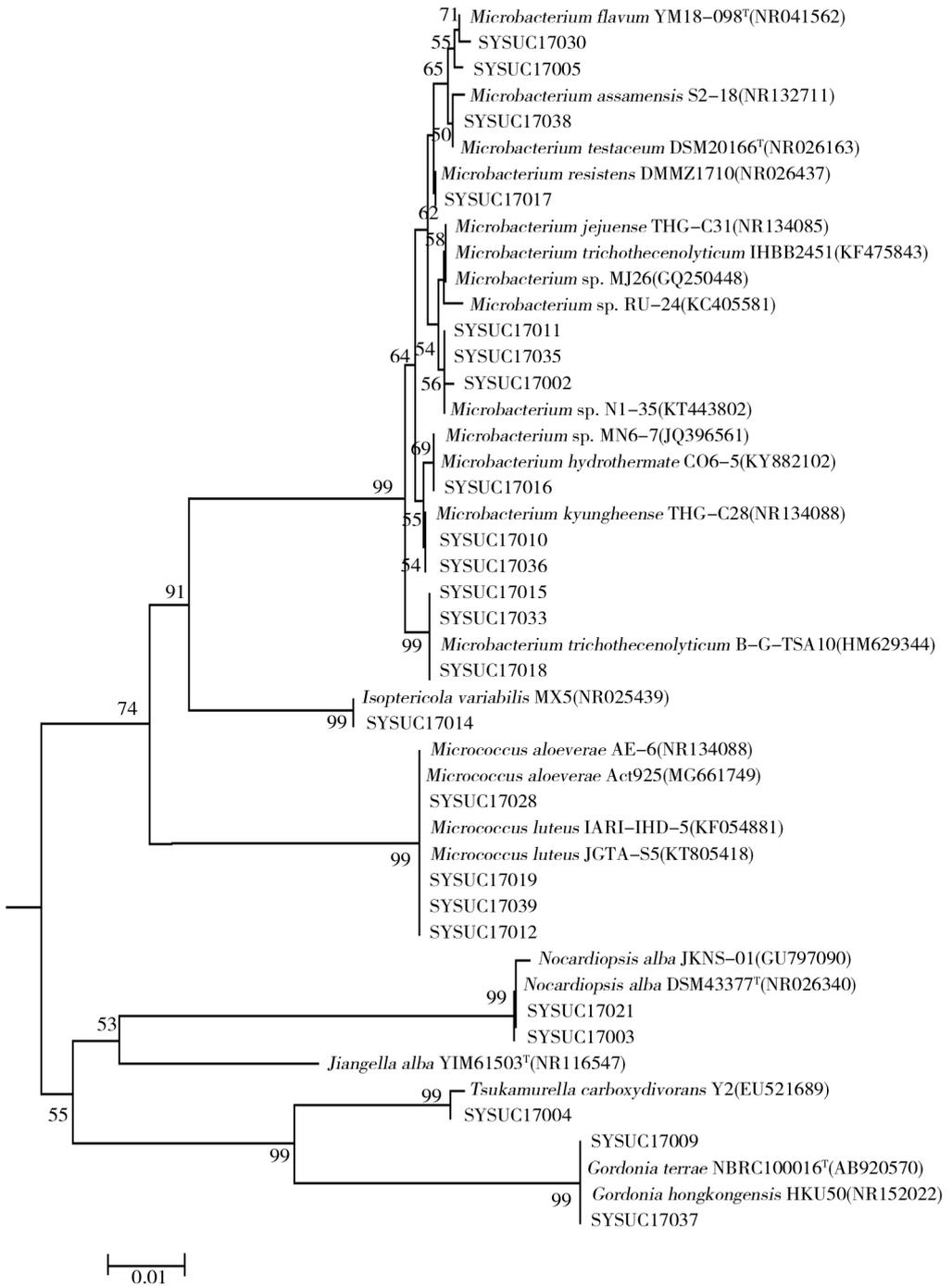


图3 基于16S rRNA基因序列的邻位连接法构建的可培养放线菌门系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of culturable Actinobacteria community in Fankou Pb/Zn Mine, constructed by using the Neighbor-Joining method based on the 16S rRNA gene sequences

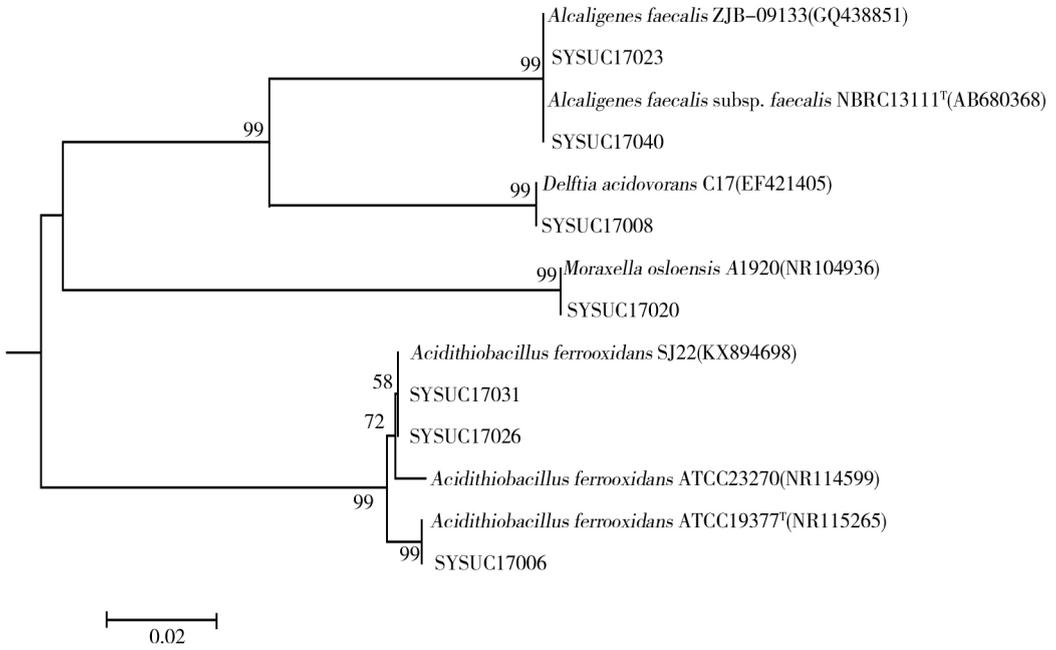


图 4 基于 16S rRNA 基因序列的以邻位连接法构建凡口铅锌矿可培养变形菌门系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of culturable Proteobacteria community in Fankou Pb/Zn Mine, constructed by using the Neighbor-Joining method based on the 16S rRNA gene sequences

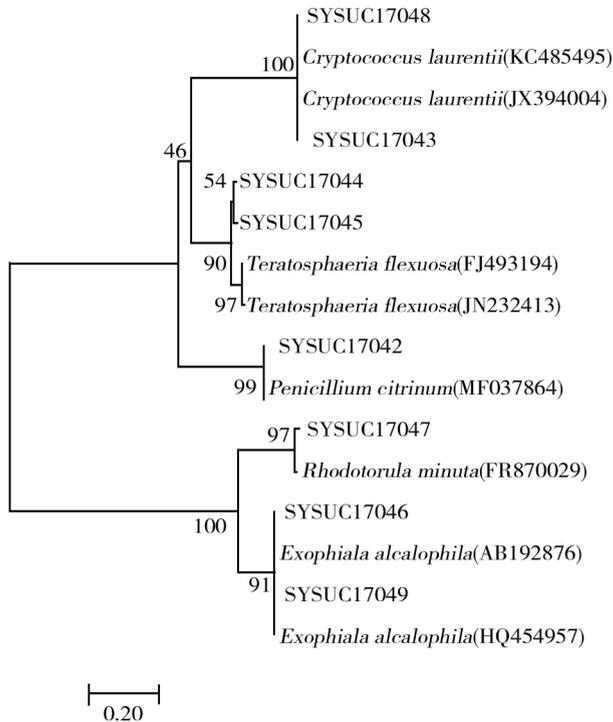


图 5 基于 ITS 基因序列的以邻位连接法构建凡口铅锌矿可培养真菌系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of culturable fungi community in Fankou Pb/Zn Mine, constructed by using the Neighbor-Joining method based on the ITS gene sequences

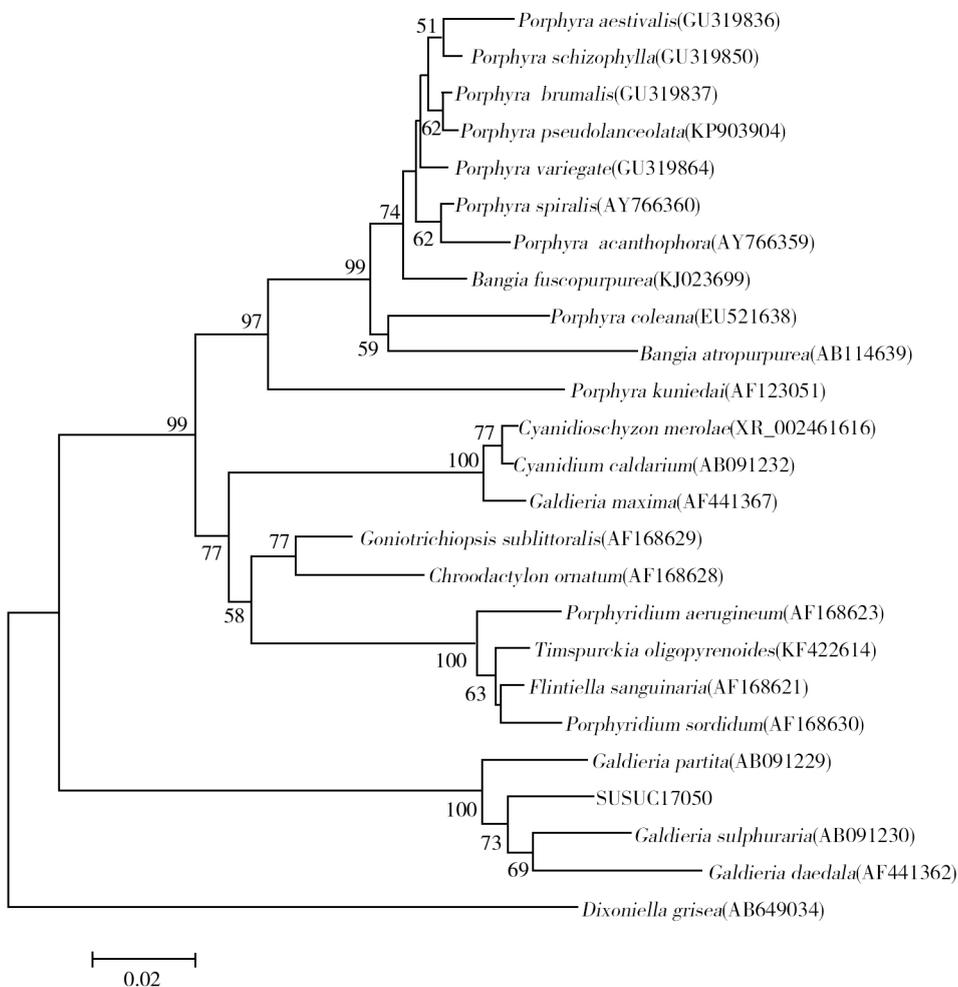


图6 基于 18S rRNA 基因序列的以邻位连接法构建凡口铅锌矿可培养藻类 SYSU C17050 系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of culturable alga SYSU C17050 in Fankou Pb/Zn Mine, constructed by using the Neighbor-Joining method based on the 18S rRNA gene sequences

3 讨论

凡口铅锌矿作为中国最大的铅锌矿,在生产过程中产生大量尾矿等废弃物,由于地处亚热带气候地区,因降雨量大,温度高等特点,加速了矿山酸性废水污染的大量产生,而这类特殊酸性污染环境中存在丰富的嗜酸或耐酸的微生物资源。本研究选取广东凡口铅锌矿的多份底泥样品,结合优化已有的分离培养基对此类生境中可培养微生物资源的多样性进行探索性研究,为矿山酸性废水的生物修复提供有效的微生物资源基础。

通过多种分离培养基对嗜酸或耐酸的微生物进行全面分离,共获得细菌 92 株,真菌 31 株,藻类 3 株。根据形态或分子标记基因去重复,最终

获得 41 株细菌、8 株真菌、1 株藻。比对结果显示,有 41 株不同种细菌分布在放线菌门、变形菌门和厚壁菌门的 8 个纲 11 个目 18 个科 18 个属; 8 株真菌分布在 2 个门 4 个纲 5 个目 5 个科 5 个属; 1 株来自 *Galdieria* 属的红藻。分离结果表明,凡口铅锌矿极端环境的可培养微生物类群丰富多样,有极大的微生物资源开发潜力。

分离得到的细菌中,微杆菌属、微球菌属和酸硫杆菌属所占比例较高,其中酸硫杆菌属为矿环境典型微生物。酸矿环境中的其他典型属如酸硫杆菌属和 *Teratosphaeria* 属的菌株也在本研究中获得纯培养。酸性矿山废水属于酸度高、重金属含量高的极端生境,对于微生物而言,它们

必须要有特殊的适应机制以适应生存。其中嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 为典型的适应酸矿环境的微生物菌株。一般而言, 三价铁 (Fe^{3+}) 是低 pH 环境下最主要的氧化剂^[24], Fe^{2+} 的氧化又可以生成 Fe^{3+} , 是一个动态循环的过程。 Fe^{2+} 氧化的具体代谢途径在 *A. ferrooxidans* 中已经得到了充分研究^[25]。许多研究表明, 微生物具氧化还原性无机硫的作用^[26-28]。在本研究的样品中, 还原性无机硫化物主要以 FeS 和 FeS_2 两种形式存在, 而这两种形式的硫化物都不能被微生物直接利用, 必须要经过环境中 Fe^{3+} (和 H^+) 的氧化, 从而生成可以被微生物直接利用的产物^[29]。耐温嗜酸氧化硫杆菌 (*Sulfobacillus thermotolerans*) 的基因组中含有大量与硫或还原性无机硫化物相关的基因^[30-31], 这也有可能是 *S. thermotolerans* 能够适应如此极端的生境的原因之一。

本次分离得到的藻株 SYSU C17050, 与其最相似藻株 *Galdieria sulphuraria* 的相似度达到 93.7%, 通过系统进化树的构建, 藻株 SYSU C17050 与 *Galdieria* 属亲缘相似度最近, 可能归属于同一个科。*G. sulphuraria* 是一株温泉红藻, 能够在低 pH、高温、多重金属离子的极端环境下存活, 并且表现出广泛的代谢多样性^[32]。在自然情况下, *G. sulphuraria* 存在于火山岩硫磺热泉、硫质土壤及一些人为干预的环境中^[33]。在一些砷、铝、镉、汞等重金属含量极高的生境中, *G. sulphuraria* 通常占总生物量的 90% 和几乎所有的真核生物量^[34-35]。因此, 本次分离得到的藻株 SYSU C17050 是研究凡口铅锌矿中真核藻类极端环境适应性和新陈代谢灵活性的绝佳材料。

参考文献:

- [1] Rawlings DE. Heavy metal mining using microbes[J]. Annu Rev Microbiol, 2002, 56(1): 65-91.
- [2] Baker BJ, Banfield JF. Microbial communities in acid mine drainage[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2003, 44(2):139-152.
- [3] Dudka S, Adriano DC. Environmental Impacts of metal ore mining and processing: a review[J]. J Environ Qual, 1997, 26(3): 590-602.
- [4] Johnson DB. Development and application of biotechnologies in the metal mining industry[J]. Environ Sci Pollut R, 2013, 20(11):7768-7776.
- [5] Akcil A, Koldas S. Acid mine drainage (AMD): causes, treatment and case studies[J]. J Clean Prod, 2006, 14(12-13): 1139-1145.
- [6] Okabe S, Odagiri M, Ito T, et al. Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems[J]. Appl and Environ Microb, 2007, 73(3):971-980.
- [7] Jones DS, Albrecht HL, Dawson KS, et al. Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm[J]. The ISME Journal, 2012, 6(1):158-170.
- [8] 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.
- [9] Chen LX, Méndez - García C, Dombrowski N, et al. Metabolic versatility of small archaea micrarchaeota and parvarchaeota [J]. The ISME Journal, 2017, 12(3): 756-775.
- [10] Hallberg KB. New perspectives in acid mine drainage microbiology[J]. Hydrometallurgy, 2010, 104(3-4, SI):448-453.
- [11] Johnson DB. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria[J]. J Microbiol Meth, 1995, 23(2): 205-218.
- [12] 王凯荣, 张秋利, 钟杰. 花甲矿山踏平坎坷成大道——写在中金岭南公司凡口铅锌矿建矿 60 周年之际[J]. 中国有色金属, 2018, (20): 27-31.
- [13] 严群, 黄俊文, 唐美香, 等. 矿山废水的危害及治理技术研究进展 [J]. 金属矿山, 2010, (8):183-186.
- [14] Johnson DB, Hallberg KB. Acid mine drainage remediation options; a review [J]. Sci Total Environ, 2005, 338(1-2):3-14.
- [15] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 1966, 16(3): 313-340.
- [16] Johnson DB, Macvicar JHM, Rolfe S. A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria [J]. J Microbiol Meth, 1987, 7(1): 9-18.
- [17] Sperber I. A direct turbidimetric method for determining ethereal sulfates in urine[J]. J Biol Chem, 1948, 172(2): 441-444.
- [18] Analytical Methods Committee. Standardised general method for the determination of iron with 1,10-phenanthroline [J]. Analyst, 1978, 103: 391-396.
- [19] Orsin M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples[J]. Lett Appl Microbiol, 2001, 33(1): 17-20.
- [20] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, et al. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 67(5): 1613-1617.
- [21] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool [J]. J Mol Bio, 1990, 215: 403-410.

- [22] Kumar S, Stecher G, Tamura K. Mega7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33: 1870-1874.
- [23] Nei M, Saitou N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406-425.
- [24] Hedrich S, Schlomann M, Johnson DB. The iron-oxidizing proteobacteria[J]. *Microbiology*, 2011, 157(6): 1551-1564.
- [25] Violaine B, David SH. Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments [J]. *Environ Microbiol*, 2012, 14(7): 1597-1611.
- [26] Ghosh W, Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, 33(6): 999-1043.
- [27] Rohwerder T, Sand W. Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes [J]. *Eng Life Sci*, 2007, 7(4): 301-309.
- [28] Dopson M, Johnson DB. Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms [J]. *Environ Microbiol*, 2012, 14(10): 2620-2631.
- [29] Schippers A, Sand W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two Indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur [J]. *Appl Environ Microb*, 1999, 65(1): 319.
- [30] Van der Merwe JA, Deane SM, Rawlings DE. The chromosomal arsenic resistance genes of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* [J]. *Hydrometallurgy*, 2010, 104(3): 477-482.
- [31] Bogdanova TI, Tsaplina IA, Kondrateva TF, et al. *Sulfobacillus thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant, chemolithotrophic bacterium [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56(pt 5): 1039-1042.
- [32] Gross W, Schnarrenberger C. Heterotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36(4): 633-638.
- [33] Schönknecht G, Chen W, Ternes CM, et al. Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote [J]. *Science*, 2013, 339(6124): 1207-1210.
- [34] Gross W, Lenze D, Nowitzki U, et al. Characterization, cloning, and evolutionary history of the chloroplast and cytosolic class I aldolases of the red alga *Galdieria sulphuraria* [J]. *Gene*, 1999, 230(1): 7-14.
- [35] Doemel WN, Brock TD. The Physiological ecology of *Cyanidium caldarium* [J]. *Microbiology*, 1971, 67(1): 17-32.

欢迎订阅《微生物学杂志》