

安徽铜陵狮子山硫化物矿山酸矿水中微生物功能群的研究

孙青¹ 邢辉¹ 何斌¹ 李雪影¹ 陆现彩² 陆建军² 王睿勇¹

(1. 南京大学生命科学学院, 江苏南京 210093; 2. 南京大学地球科学与工程学院, 江苏南京 210093)

摘要:从安徽铜陵狮子山硫化物矿山酸矿水溪流获得样品,采用 YE、Feo、FeSo、FeTo 4 种选择性培养基,利用 overlay 分离技术,获得 7 株细菌菌株。利用 16S rRNA 基因序列同源性分析,与目前已分离得到的酸矿水微生物进行了比较。利用分离菌株 16S rRNA 基因序列构建系统进化树,结果表明获得的菌株可分为 3 个功能群:嗜酸性异养菌、嗜酸性自养菌、中度嗜酸性铁氧化细菌。嗜酸性异养菌主要与酸矿水中三价铁的异化还原和寡营养状态的维持有关,嗜酸性自养菌与酸矿水中铁、硫元素的氧化有关,是酸水中的生产者;中度嗜酸性铁氧化细菌能将二价铁氧化成三价铁,并产生难溶性的矿物,可实现酸矿水与酸矿水底泥之间铁元素的动态平衡。

关键词:金属硫化物矿山,酸矿水,overlay 分离技术,微生物功能群,系统进化树分析

中图分类号: X141; Q93-3; P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2009)06-0547-06

An investigation into microbial function groups of acid mine drainage in the Shizishan sulfide mine, Tongling, Anhui Province

SUN Qing¹, XING Hui¹, HE Bin¹, LI Xue-ying¹, LU Xian-cai², LU Jian-jun² and WANG Rui-yong¹

(1. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. School of Earth Sciences and Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Seven bacteria strains were isolated from the samples of an acid mine drainage stream in the Shizishan sulfide mine, Tongling, by using the overlay technique with four selective media of YE, Feo, FeSo and FeTo. The 16S rRNA gene sequences were amplified from total DNA of bacteria strains and were then sequenced and analyzed. The phylogenetic tree analysis with 16S rRNA gene sequences of isolated bacteria strains was carried out. The results show that every isolated bacteria strain can be divided into three microbial communities, namely heterotrophic acidophiles, autotrophic acidophiles and moderately acidophilic iron-oxidizing bacteria. The function of heterotrophic acidophiles lies in the dissimilatory ferric iron reduction and the creation of an oligotrophic environment. Autotrophic acidophiles can oxidize iron and sulfur elements in acid mine drainage, being producers of the acid mine drainage ecological system. Moderately acidophilic iron-oxidizing bacteria can oxidize ferrous iron and generate some insoluble minerals to realize the dynamic balance of iron element between the acid mine drainage and the sediments.

Key words: metallic sulfide mine; acid mine drainage; overlay technique; microbial function groups; phylogenetic analysis

酸矿水(acid mine drainage, AMD)是含硫化物矿石在表生条件下与水圈大气圈及微生物相互作用产生的,是矿山环境污染的重要来源(陆建军等,2005)。酸矿水具有 pH 值低、硫酸盐含量高等特点,同时往往还含有大量重金属离子,如

铜、锌、镍、铅等(李龙海等,1998)。酸矿水排入周围环境,会造成河流、湖泊、土壤、地下水的严重污染,其中重金属等有害物质还能通过鱼类、植物等从食物链进入人体,危害人类健康(蒋万祥等,2008)。酸矿水的主要防治措施是从源头防止酸

收稿日期:2009-09-01;修订日期:2009-10-12

基金项目:国家重点基础研究发展计划资助项目(2007CB815603)

作者简介:孙青(1984-),男,硕士研究生,主要从事微生物学研究;通讯作者:王睿勇, E-mail: wangry@nju.edu.cn.

矿水的产生及迁移,而对于酸矿水已造成的环境污染,可采用物理、化学、生物等方法进行处理(倪师军等 2008,鞠海燕等, 2008)。但酸矿水造成的环境污染具有处理费用高、处理效果差等缺点,因此,近年来,如何从源头防止酸矿水的产生,逐渐受到国内外学者的关注。早在 1947 年 Colmer 等就首次提出细菌在酸性废水产生过程中发挥着重要作用,其作用机理可归结为微生物对硫化物矿物的间接氧化作用、微生物对硫化物矿物的直接氧化作用等方式。Egiebor 和 On(2007)发现酸矿水的形成大致可分为 3 个阶段,随着酸矿水形成过程中 pH 值的降低,微生物群落的优势菌群也在不断变化,而微生物群落结构的变化又进一步加速了酸矿水的形成。Xie 等(2009)研究了酸矿水中的微生物群落与黄铁矿表面的相互作用,发现随着黄铁矿表面腐蚀程度的增强,各种微生物会在黄铁矿表面逐渐形成一种生物膜,且生物膜中微生物的种类和生物量也会随时间发生变化。Almeida 等(2009)发现重金属离子含量高、重度污染的酸矿水与重金属离子含量低、轻度污染的酸矿水相比,其原核生物的种类及生物量均存在较大差异。因此,通过对酸性排水中微生物功能群的分析,有可能为采用切实可行的生物修复策略提供科学依据。本文以安徽铜陵狮子山矿区中的酸性矿山排水为例,初步分析了硫化物矿山酸矿水中的微生物功能群及其与酸矿水发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 采样区描述与采样

安徽铜陵地区是长江中、下游典型的多金属矿集区之一,在长期的开采过程中,产生大量废矿石。该矿集区的矿石中富含黄铁矿、黄铜矿、磁黄铁矿、毒砂、闪锌矿和方铅矿等(高庚等 2006)在地表条件下,这些富含重金属的硫化物被氧化,不仅释放出大量的重金属元素,还产生了对生态环境有严重影响的酸矿水。本研究选取位于安徽省铜陵狮子山矿区的一处酸矿水溪流($N30^{\circ}54'18.3''$, $E117^{\circ}53'76.7''$),沿山而下选取 6 个采样点,采样点的分布如图 1 所示。其中第 6 采样点是酸矿水溪流汇聚成的一个水塘,水深约 50 cm,底部有大量褐色、黄褐色的高针铁矿、纤铁矿和铁硫酸盐矿物等沉淀。所取酸矿水放置于经过灭菌处理的血清瓶中,标记后放入冰盒中,快速带回实验室开展微生物功能群研究。

1.2 培养基

本研究中用于微生物功能群研究的培养基配方及配制方法主要参见 Johnson(1995)、Hallberg 和 Johnson(2003)。其中 YE 固体培养基主要用于筛选嗜酸性异养细菌,Feo 固体培养基主要用于筛选嗜酸性铁氧化细菌,FeSo 固体培养基主要用于筛选嗜酸性硫氧化细菌,FeTo 固体培养基主要用于筛选中度嗜酸性铁氧化细菌。

1.3 酸矿水的地化分析

样品中的金属元素含量在南京大学内生金属矿床成矿机制研究国家重点实验室采用 ICP-MS 分析,分析程序和精

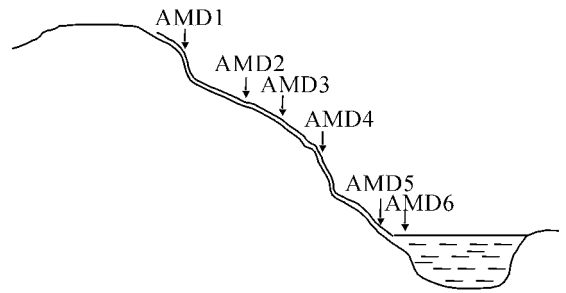


图 1 酸矿水采样点的分布

Fig. 1 Distribution of acid mine drainage sampling points

度参见高剑峰等(2003)。样品中的阴离子含量采用离子色谱法测定。样品的 pH 值采用 PHS-3C 型实验室 pH 计测定,电导率采用 DDS-307 电导率仪测定。

1.4 酸矿水中微生物的分离纯化及生物量测定

采用 YE、Feo、FeSo、FeTo 4 种选择性培养基,利用 Overlay 平板分离技术,分离筛选酸矿水中的嗜酸性异养菌、嗜酸性铁氧化细菌、嗜酸性硫氧化细菌、中度嗜酸性铁氧化细菌 4 类微生物功能群,并采用平板计数法统计这 4 类微生物功能群的生物量。挑选表型特征不同的单菌落进行多次连续划线培养,得到纯化菌株。对纯化后的菌株进行形态观察,具体方法参考东秀珠等(2001)。

1.5 菌株的 16S rRNA 基因分子鉴定

1.5.1 菌株基因组 DNA 的提取

将纯化菌株在相应的液体培养基中扩大培养,然后离心获取菌体,并利用细菌 DNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)提取相应菌株的 DNA,利用琼脂糖凝胶电泳检验所得 DNA 的纯度及含量。

1.5.2 菌株 16S rRNA 基因序列的扩增及测序

本研究采用的引物 fd1 和 rp2(南京金思特生物有限公司合成)引物序列为:fd1 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG 3',rp2 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'。PCR 反应采用 50 μ L 反应体系,各组分体积及添加顺序如下: H_2O 31 μ L,缓冲液 5 μ L, MgCl₂ 5 μ L,脱氧核糖核苷酸 5 μ L,菌株基因组 DNA 模板 1 μ L,fd1 和 rp2 引物各 1 μ L,DNA 聚合酶 1 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}C$ 预变性 5 min;接着进入 95 $^{\circ}C$ 变性 30 s,53 $^{\circ}C$ 退火 30 s,72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min,30 次循环;最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检验纯度及含量后,进行测序(南京金思特生物有限公司)。

1.5.3 菌株 16S rRNA 基因序列分析

将获得的菌株 16S rRNA 基因序列输入到 GenBank 进行同源性比对,选取与目的基因序列同源性较高的已知菌株,将这些菌株与目的菌株的 16S rRNA 序列利用 Clustal X 进行多序列匹配排列,再利用 MEGA 4 进行统计和聚类分析,采用邻接法(neighbor joining method)构建目的菌株的系统进化树,并结合该菌株的表型特征,鉴定其种属。

1.6 酸矿水中微生物的进化树分析及功能群界定

利用 ClustalX 软件对所有从酸矿水中分离出的菌株及与这些菌株具有相同生境且亲缘关系相近菌株的 16S rRNA 基因序列进行多序列匹配排列,再利用 MEGA 4 软件进行统计和聚类分析,采用邻接法构建所有菌株的系统进化树,然后依据系统进化树中形成的簇状结构对酸矿水中分离的菌株进行功能群界定(薛庆中,2008)。

2 结果与讨论

2.1 酸矿水的 pH 值、电导率、重金属及阴离子含量

从表 1 中可以看出,本次取样的酸矿水 pH 值 < 3.4,且大多数样品的 pH 值在 2.8~3.0 之间,沿山而下,酸矿水的 pH 值略有降低,而电导率的变化规律则与 pH 值相反。第 6 个采

样点(AMD6) pH 值和电导率的变化规律与前面 5 个采样点的变化规律不同,其原因可能有:①其他水流或雨水对酸矿水的稀释作用。酸矿水中金属元素主要是 Fe 和 Cu,第 6 个采样点(AMD6)的 Fe、Cu 的含量均比其他 5 个采样点少了很多,说明其他水流或雨水对酸矿水有稀释作用;②不同功能群微生物生物量的变化。采样点 AMD6 与其他 5 个采样点相比,嗜酸性硫氧化细菌的生物量显著增加,这些微生物氧化采样点 AMD6 底部的含硫矿物释放出 SO_4^{2-} 和金属元素,这可能是 SO_4^{2-} 、Cr、Cd、Pb 等稀释作用不明显,甚至含量增加的原因。

2.2 酸矿水中微生物功能群的生物量

本研究采用 YE、Fe₀、FeSO₄、FeTo 4 种选择性培养基从 6 个 AMD 样品中筛选嗜酸性异养菌、嗜酸性铁氧化细菌、嗜酸性硫氧化细菌、中度嗜酸性铁氧化细菌 4 类微生物,其生物量如图 2 所示。

表 1 酸矿水样品中 pH 值、电导率、重金属元素及阴离子含量分析

Table 1 Geochemical analyses of pH, conductivity, heavy metal elements and anions in acid mine drainage samples

样品	pH	电导率/ $\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$	Cl^-	SO_4^{2-}	PO_4^{3-}	As	Fe	Mo	Cr	Cd	Cu	Pb
AMD1	2.93	11.83	23.0	9 859	0.11	6.72	139.70	5.64	0.10	2.20	60.92	3.08
AMD2	2.86	12.00	28.70	9 815	0.10	6.64	77.37	6.40	0.15	2.77	48.91	4.15
AMD3	2.83	12.03	41.9	9 972	0.09	6.33	90.27	5.58	0.11	2.20	51.69	3.31
AMD4	2.83	12.03	77.7	9 668	0.08	6.09	44.04	6.55	0.21	3.41	21.68	4.86
AMD5	2.81	12.13	34.2	9 463	0.07	6.07	37.75	5.92	0.14	2.60	48.20	3.67
AMD6	3.33	10.93	27.0	9 255	0.06	5.23	15.99	6.00	0.25	3.15	17.58	5.05

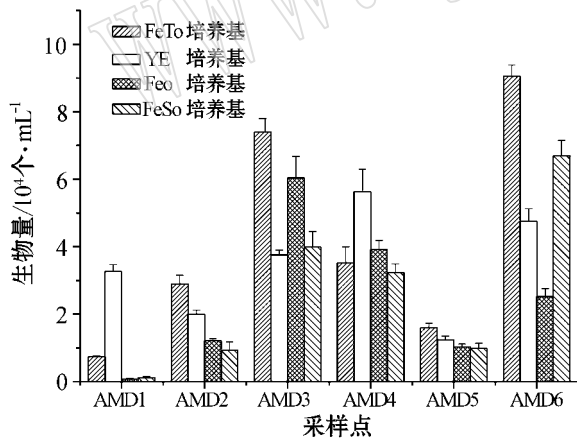


图 2 酸矿水中微生物的生物量

Fig. 2 Biomass of microorganisms in acid mine drainage

从图 2 中可以看出,嗜酸性异养菌沿 AMD 溪流而下,其生物量变化相对较小,但其生物量与其他 3 类微生物功能群的生物量之间存在协同作用,其原因可能是:①为了维持酸矿水中的寡营养状态,酸矿水中都需要一定数量的嗜酸性异养菌存在,所以同一条酸矿水溪流中不同采样点嗜酸性异养菌的生物量差异较小;②嗜酸性铁氧化细菌和嗜酸性硫氧化细菌等生产者的增多,可以提供更多的有机物、生长因子等物质

给嗜酸性异养菌,因此其他 3 类微生物生物量增加时,嗜酸性异养菌的生物量也会增加。从图中还可以看出,在前 5 个采样点,嗜酸性铁氧化细菌、嗜酸性硫氧化细菌、中度嗜酸性铁氧化细菌 3 类微生物功能群生物量的变化较大,其中第 3、4 号采样点这 3 类微生物的生物量较大,而其他 3 个采样点的微生物生物量较小。造成这种现象的原因可能是:酸矿水溪流沿山而下时,由于坡度的变化造成了酸矿水流速的变化,坡度较小的区域(第 3、4 号采样点)酸矿水流速缓慢,又会造成微生物在这段流域内的积累。酸矿水中的上述 4 类微生物功能群之间存在协同作用,当一种微生物功能群生物量增加时,也会促使其他微生物功能群生物量的增加。第 6 号采样点嗜酸性硫氧化细菌、中度嗜酸性铁氧化细菌的生物量与其他 5 个采样点相比,显著增多,其可能的原因是:6 号采样点底质中存在大量硫铁矿类尾矿砂,为硫氧化、铁氧化的微生物提供丰富的底物,促进了这些微生物的大量增殖;又因为 6 号采样点的 pH 值比其他 5 个采样点略高,约为 3.3,而且底质附近水体,由于矿石与氢质子反应,会造成 pH 值进一步升高,因此该采样点中度嗜酸性铁氧化微生物比嗜酸性铁氧化微生物的生物量增加更明显。

2.3 酸矿水中微生物的形态特征

利用 YE、Fe₀、FeSO₄、FeTo 4 种选择性培养基,从酸矿水样品中筛选得到 NJU-AMD1、NJU-AMD2、NJU-AMD3、NJU-

表 2 筛选菌株的培养特征和形态特征

Table 2 Colony and morphological characteristics of isolated strains

菌株编号	筛选培养基	菌落形态	菌体形态
NJU-AMD1	FeTo 培养基	淡白色、圆形、边缘整齐、菌落小、表面湿润	G ⁻ 、杆状、无芽孢
NJU-AMD2	FeTo 培养基	橙红色、圆形、边缘整齐、表面湿润	G ⁻ 、球状、无芽孢
NJU-AMD3	FeSo 培养基	乳白色、不规则形、边缘不整齐、表面湿润	G ⁻ 、杆状、无芽孢
NJU-AMD4	FeTo 培养基	锈红色、近圆、边缘不整齐、表面干燥	G ⁻ 、杆状、无芽孢
NJU-AMD5	Feo 培养基	锈红色、近圆、菌落小、边缘不整齐、表面干燥	G ⁻ 、杆状、无芽孢
NJU-AMD9	YE 培养基	淡白色、圆形、菌落较大、边缘整齐、表面湿润	G ⁻ 、杆状、无芽孢
NJU-AMD11	YE 培养基	淡白色、圆形、边缘整齐、菌落小、表面湿润	G ⁻ 、杆状、无芽孢

AMD4、NJU-AMD5、NJU-AMD9、NJU-AMD11 共 7 株细菌，其筛选培养基、菌落形态、菌体形态特征如表 2 所示。

2.4 筛选菌株的 16S rRNA 鉴定

对筛选出的 7 株细菌进行了 16S rRNA 鉴定，结果表明 NJU-AMD1、NJU-AMD11 与 *Acidiphilium* sp. YA-4 (GenBank 号: AM176778.1) 和 *Acidiphilium* sp. NO-14 (AF376023.1) 的序列同源性均达到 99%；NJU-AMD2 与 *Acidisphaera rubrifaciens* (D86512.1) (Hiraishi *et al.*, 2000) 的序列同源性达 98%；NJU-AMD3 与 *Acidithiobacillus* sp. YP-5 (EU084708.1) (Ni *et al.*, 2008) 和 *A. thiooxidans* Strain AUU (DQ834372.1) 的序列同源性均达 99%；NJU-AMD5 与 *A. ferrooxidans* Strain BRGM1 (AJ457806.1) 的序列同源性达 99%；NJU-AMD9 与

Acidocella facilis (D30774.1) (Kishimoto *et al.*, 1995) 和 *Acidocella* sp. IS10 (AF531477.1) 的同源性均达 99%；NJU-AMD4 与 *Sediminibacterium ginsengisoli* (EF067860.1) (Lee *et al.*, 2007) 和 *Sediminibacterium salmoneum* (EF407879.1) (Ou and Yuan, 2008) 亲缘关系最近，其序列同源性分别为 93% 和 92%，由于序列同源性远低于 97%，该菌株可能是 *Sediminibacterium* 属的一个新种，甚至也可能是一个新属，有关该菌株的鉴定工作正在进一步进行。

2.5 酸矿水中微生物的系统进化树分析及功能群界定

对分离得到的所有菌株的 16S rRNA 基因序列进行同源性分析，并采用邻接法获得所有菌株的系统进化树，其结果如图 3 所示。

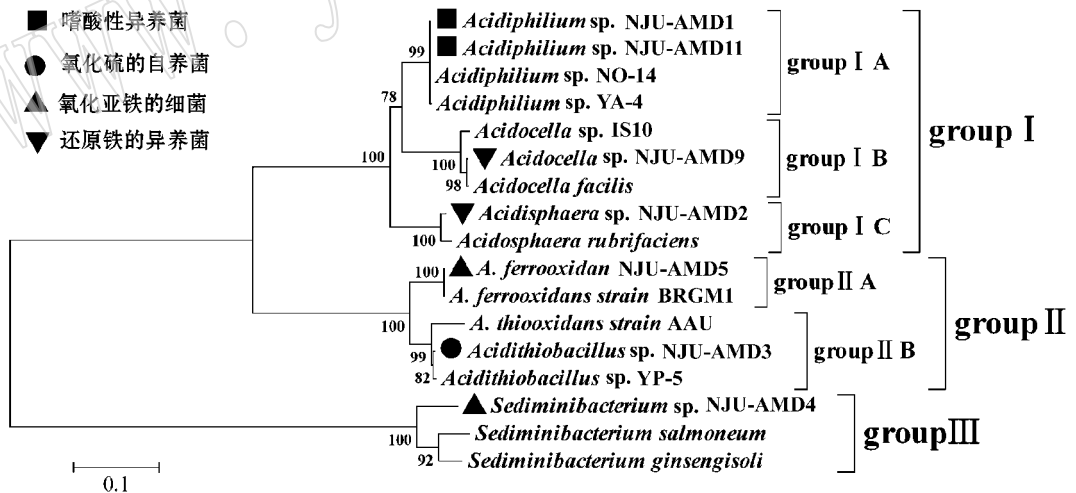


图 3 基于酸矿水中分离菌株 16S rRNA 基因序列的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of isolated strains from acid mine drainage

从图 3 中可以看出：硫化物矿山酸矿水中分离得到的 7 株细菌，按其在酸矿水系统中所发挥的不同功能，可分为 3 个功能群，group I、group II、group III。group I 代表嗜酸性的异养菌，又可分为 group I A、group I B、group I C 3 个小的组群。菌株 NJU-AMD1、NJU-AMD11 属于组群 group I A，目前从酸矿水中分离得到该组群的菌株有 *Acidiphilium* sp. YA-4、

Acidiphilium sp. NO-14。Johnson 等 (2001) 发现 *Acidiphilium* sp. NO-14 能有效消耗酸矿水中的单糖、寡糖、有机酸等有机物，在酸矿水中营造一种寡营养状态，从而解除上述有机物对适合寡营养环境的微生物的生长抑制，菌株 NJU-AMD1、NJU-AMD11 与 *Acidiphilium* sp. NO-14 的同源性达 99%，属同一种的不同菌株，因此，推测 NJU-AMD1、NJU-AMD11 在

酸矿水中可能发挥着同样的作用。菌株 NJU-AMD9 属于组群 group I B, 目前从酸矿水中分离得到该组群的菌株有 *Acidocella facilis*, *Acidocella* sp. IS10。NJU-AMD2 属于组群 group I C, 目前从酸矿水中分离得到该组群的菌株有 *Acidisphaera rubrifaciens*。Coupland 和 Johnson(2008)发现 *Acidocella facilis*, *Acidisphaera rubrifaciens* 除了营造酸矿水中的寡营养状态这一功能外, 还能异化还原酸矿水中的三价铁, 产生少量的二价铁。在实验过程中, 笔者发现菌株 NJU-AMD9、NJU-AMD2 具有将三价铁还原为二价铁的能力, 还原产生的二价铁可提供给酸矿水中的自养菌(如 *A. ferrooxidans*)氧化产能, 从而促进了这些酸矿水中生产者的生长和繁殖, 而这些自养菌的大量繁殖, 又会给其他微生物提供有机物、能量、生长因子等物质, 从而增强了酸矿水生态系统的稳态。group II 代表嗜酸性的自养菌, 又可分为 group II A、group II B 两个小的组群。菌株 NJU-AMD5 属于 group II A, *A. ferrooxidans* Strain BRGM1 与其同源性达 99%, NJU-AMD5 是 *A. ferrooxidans* 中的一株细菌。NJU-AMD3 属于 group II B, *A. thiooxidans* Strain AUU 与其同源性达 99%, NJU-AMD3 是 *A. thiooxidans* 中的一株细菌。*A. ferrooxidans*、*A. thiooxidans* 是从酸矿水中最早分离得到的两株细菌, 它们能氧化矿物中的铁和硫, 产生有机物、能量、生长因子等物质供酸矿水中的其他微生物利用, 是酸矿水生态系统中的生产者。此外, 嗜酸性自养菌在氧化硫元素的过程中会产生大量的氢质子, 造成水体的酸化, 而随着水体 pH 值的逐渐降低, 嗜酸性、中度嗜酸性微生物的生物量逐渐增加, 而其他微生物逐渐减少, 这一正反馈效应可能正是酸矿水能在短期内快速形成且自然条件下无法自动修复的原因。Group III 代表中度嗜酸的铁氧化细菌, NJU-AMD4 属于 group III, NJU-AMD4 能氧化溶液中的二价铁, 生成水铁矿、施氏矿物类的沉淀, 该菌株与能异化还原三价铁的微生物联合作用, 可调节酸矿水与酸矿水底泥之间铁元素的分配, 实现酸矿水中铁元素的动态平衡。

3 结论

(1) 从铜陵地区硫化物矿山酸矿水中分离得到的 7 株细菌, 按其在酸矿水系统中所发挥的不同功能, 可分为 3 大类: 嗜酸性异养菌、嗜酸性自养菌、中度嗜酸的铁氧化细菌。其中嗜酸性异养菌主要与酸矿水寡营养状态的营造以及三价铁的异化还原有关, 而嗜酸性自养菌主要参与了酸矿水及其邻近废弃矿石、岩石中以硫化物形式存在的铁、硫元素的氧化, 为其他微生物提供有机物、能量、生长因子等物质, 在酸矿水生态系统中担任生产者的角色, 此外嗜酸性自养菌还能营造酸矿水中的其他微生物生长所必须的酸性环境, 中度嗜酸的铁氧化细菌可氧化酸矿水中的二价铁, 并形成水铁矿、施氏矿物类的沉淀, 可实现酸矿水与酸矿水底泥之间铁元素的动态平衡。

(2) 硫化物相关的微生物与酸矿水最初的发生密切相关,

调控其生物量, 可从源头上控制硫化物矿山的酸矿水的产生; 而铁还原的嗜酸性异养菌、铁氧化的嗜酸性自养菌与酸矿水生态系统的稳定性密切相关, 调控其生物量, 可能会有利于已形成酸矿水的治理。

References

- Almeida W I, Vieira R P, Cardoso A M, *et al.* 2009. Archaeal and bacterial communities of heavy metal contaminated acidic waters from zinc mine residues in Sepetiba Bay[J]. *Extremophiles*, 13(2): 263~271.
- Colmer A R and Hinkle M E. 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage[J]. *Science*, 10(3): 253~256.
- Coupland K and Johnson D B. 2008. Evidence that the potential for dissimilatory ferric iron reduction is widespread among acidophilic heterotrophic bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 279(1): 30~35.
- Dong Xiuzhu and Cai Miaoying. 2001. Manual for the Systematic Identification of General Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 370~398 (in Chinese).
- Egiebor N O and Oni B. 2007. Acid rock drainage formation and treatment: a review[J]. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 2(1): 47~62.
- Gao Geng, Xu Zhaowen, Yang Xiaonan, *et al.* 2006. Geological characteristics and genesis of Chaoshan gold deposit in Tongling district, Anhui Province[J]. *Contributions to Geology and Mineral Resource Research*, 21(3): 162~167 (in Chinese).
- Gao Jianfeng, Lu Jianjun, Lai Mingyuan, *et al.* 2003. Analysis of trace elements in rock samples using HR-ICPMS[J]. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 39(6): 844~850 (in Chinese with English abstract).
- Hallberg K B and Johnson D B. 2003. Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters[J]. *Hydrometallurgy*, 71(1~2): 139~148.
- Hiraishi A, Matsuzawa Y, Kanbe T, *et al.* 2000. *Acidisphaera rubrifaciens* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from acidic environments[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(4): 1539~1546.
- Jiang Wanxiang, Tang Tao, Jia Xinghuan, *et al.* 2008. Impacts of acid pyrite drainage on the macroinvertebrate community in Gaolan River[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 28(10): 4805~4814 (in Chinese with English abstract).
- Johnson D B. 1995. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 23(2): 205~218.
- Johnson D B, Rolfe S, Hallberg K B, *et al.* 2001. Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine[J]. *Environmental Microbiology*, 3(10): 630~637.

- Ju Haiyan, Huang Chunwen, Luo Wenhai, *et al.* 2008. The damage and treatment techniques of metal mines acid wastewater[J]. China Tungsten Industry, 23(2): 41~44(in Chinese with English abstract).
- Kishimoto N, Kosako Y, Wakao N, *et al.* 1995. Transfer of *Acidiphilium facilis* and *Acidiphilium aminolytica* to the genus *Acidocella* gen. nov., and emendation of the genus *Acidiphilium* [J]. Systematic and Applied Microbiology, 18(1): 85~91.
- Lee H G, An D S, Im W T, *et al.* 2007. *Chitinophaga ginsengisegetis* sp. nov. and *Chitinophaga ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field in South Korea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(7): 1396~1401.
- Li Longhai and Miao Yingqi. 1998. Probe the resource recovering of acid mine drainage with biochemical treatment[J]. Journal of Jiangsu University of Science and Technology, 19(2): 69~73(in Chinese with English abstract).
- Lu Jianjun, Lu Xiancai, Zhu Changjian, *et al.* 2005. The effect of *Thiobacillus ferrooxidans* on the distribution of metal trace elements of acid mine drainage resulting in environmental pollution[J]. Journal of Nanjing University (Natural Sciences), 40(2): 113~119(in Chinese with English abstract).
- Ni Shijun, Li Shan, Li Zeqin, *et al.* 2008. Progress in the research of acid mine drainage impact and remediation[J]. Advances in Earth Science, 23(5): 501~508(in Chinese with English abstract).
- Ni Y Q, He K Y, Bao J T, *et al.* 2008. Genomic and phenotypic heterogeneity of *Acidithiobacillus* spp. strains isolated from diverse habitats in China[J]. FEMS Microbiology Ecology, 64(2): 248~259.
- Qu J H and Yuan H L. 2008. *Sediminibacterium salmoneum* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment of an eutrophic reservoir[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(9): 2191~2194.
- Xie X H, Xiao S M and Liu J S. 2009. Microbial communities in acid mine drainage and their interaction with pyrite surface[J]. Current Microbiology, 59(1): 71~77.
- Xue Qingzhong. 2008. Tools for Analysis of DNA and Protein Sequence Data[M]. Beijing: Science Press, 54~71(in Chinese).

附中文参考文献

- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 370~398.
- 高庚, 徐兆文, 杨小男, 等. 2006. 安徽铜陵朝山金矿床地质特征及成因研究[J]. 地质找矿论丛, 21(3): 162~167.
- 高剑峰, 陆建军, 赖鸣远, 等. 2003. 岩石样品中微量元素的高分辨率等离子质谱分析[J]. 南京大学学报(自然科学版), 39(6): 844~850.
- 蒋万祥, 唐涛, 贾兴焕, 等. 2008. 黄铁矿酸性矿山废水对大型底栖动物群落结构的影响[J]. 生态学报, 28(10): 4805~4814.
- 鞠海燕, 黄春文, 罗文海, 等. 2008. 金属矿山酸性废水危害及治理技术的现状与对策[J]. 中国钨业, 23(2): 41~44.
- 李龙海, 缪应祺. 1998. 酸性矿山废水生化处理及其资源化的探索[J]. 江苏理工大学学报(自然科学版), 19(2): 69~73.
- 陆建军, 陆现彩, 朱长见, 等. 2005. 氧化亚铁硫杆菌对矿山酸矿水中金属污染元素分布的影响[J]. 南京大学学报(自然科学版), 40(2): 113~119.
- 倪师军, 李珊, 李泽琴, 等. 2008. 矿山酸性废水的环境影响及防治研究进展[J]. 球科学进展, 23(5): 501~508.
- 薛庆中. 2008. DNA和蛋白质序列数据分析工具[M]. 北京: 科学出版社, 54~71.