



## 嗜酸藻类研究进展

李洪毅, 郝春博\*

中国地质大学(北京)水资源与环境学院, 北京 100083

李洪毅, 郝春博. 嗜酸藻类研究进展. 微生物学报, 2022, 62(12): 4684–4699.

Li Hongyi, Hao Chunbo. Research progress in acidophilic algae. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4684–4699.

**摘要:** 酸性矿山废水(acid mine drainage, AMD)是硫化矿物暴露于地表, 与水、大气及微生物相互作用发生氧化性溶解而形成的, 其 pH 通常在 3.5 以下, 并含有高浓度的金属离子, 危害十分严重。因为嗜酸原核生物可通过氧化硫化矿物获得能量, 从而加速酸性矿山废水的形成过程, 所以一直以来都是嗜酸微生物研究的焦点。但事实上, 真核生物在酸性生态系统中往往发挥着更重要的作用。尤其是光合藻类, 它们在很多酸性环境都是主要的初级生产者, 对酸性矿山废水的演化和修复起着关键的推动作用。本文从嗜酸藻类的常见种类和生态分布、适应极端环境的生理机制以及它们在污染治理和工业生产中的应用 3 个方面, 综述了该领域近 30 年来的研究进展, 并以此为基础提出了将来需要着力加强的 5 个研究方向。

**关键词:** 嗜酸藻类; 酸性矿山废水; 适应机制; 生物修复; 叶黄素

## Research progress in acidophilic algae

LI Hongyi, HAO Chunbo\*

School of Water Resources and Environment, China University of Geosciences, Beijing 100083, China

**Abstract:** Acid mine drainage (AMD) refers to acidic water that forms when sulfide minerals are exposed to air and water. AMD is generally characterized by low pH (<3.5) and high concentration of metal ions, which is thus one of the most serious threats to nature. Acidophilic prokaryotes, especially the iron- and sulfur-oxidizing bacteria and archaea that catalyze the generation of AMD, have long been the focus of research on acidophilic microorganisms. However, microbial eukaryotes in AMD environments often play a more important role in acidic ecosystems. Acidophilic photosynthetic algae

**基金项目:** 国家自然科学基金(91951115)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (91951115)

\*Corresponding author. E-mail: chunbohao@cugb.edu.cn

Received: 12 June 2022; Revised: 2 September 2022; Published online: 9 September 2022

are the primary producers and can drive the evolution and remediation of AMD. In this review, we outlined the research in recent 30 years on taxonomy and ecological distribution of acidophilic algae, mechanisms for their adaptation to the extreme environments, and the application in pollution control and industrial production. Finally, we proposed the future research directions of acidophilic algae which need to be strengthened.

**Keywords:** acidophilic algae; acid mine drainage; adaption mechanism; bioremediation; lutein

酸性矿山废水(acid mine drainage, AMD)是矿业废水的主要形式之一,它是硫化物矿物暴露于地表,与水、大气及微生物相互作用发生氧化性溶解而形成的。酸性矿山废水 pH 值通常在 3.5 以下,并含有高浓度的铁、铝、铜、铅、锌等金属阳离子和硫酸根阴离子,一般不能直接循环利用<sup>[1]</sup>。酸性矿山废水的排放,不但造成矿山资源的流失,而且会对受纳环境造成毁灭性的破坏,并直接威胁人类的生存健康。目前,酸性矿山废水的危害已经成为一个世界性的难题。在我国,广东、江西、安徽和湖南省一些矿区的酸性矿山废水危害也非常严重,甚至导致了“癌症村”的出现<sup>[2-3]</sup>。

因为酸性矿山废水是嗜酸微生物氧化硫化物产生的,所以要理解酸性矿山废水的形成机制及演化过程,针对性地治理其污染,就需要我们真正认识酸性矿山废水区域嗜酸微生物的群落组成、变化规律和生态功能。近 30 年来,人们在全球范围内对嗜酸菌的多样性、生理性质和生态功能做了大量的研究,美国加州的 Iron Mountain 矿区、西班牙的 Rio Tinto 矿区、德国的 Lusatia 矿区、法国的 Carnoulès 矿区已成为嗜酸菌研究的典范<sup>[4-7]</sup>,使人们对嗜酸菌的认识进入了一个新的时代。因为氧化铁硫的嗜酸细菌和古菌在酸性矿山废水的形成过程中起着重要的催化作用,所以一直以来它们都是嗜酸微生物研究的焦点<sup>[8-10]</sup>,而对于嗜酸真核生物的研究还非

常薄弱。但事实上,真核生物在酸性生态系统中往往发挥着更重要的作用。尤其是光合藻类,它们在很多酸性环境都是主要的初级生产者。在西班牙 Rio Tinto 矿区著名的酸性河流 Tinto river 中,真核藻类贡献了 65% 以上的生物量<sup>[11]</sup>,它们对酸性矿山废水的演化和修复起着关键的推动作用。

长期生活在酸性矿山废水中的嗜酸藻类已经进化出特殊的生理机制以应对严酷的生存环境。对嗜酸藻类的研究不仅有助于我们理解酸性生态系统的碳循环机制,针对性地开发酸性矿山废水污染治理方法,还能利用它们特殊的生理性质进行专门的工业生产,发挥它们不可替代的社会经济价值。

## 1 嗜酸藻类的常见种类和生态分布特征

虽然低 pH 和高浓度的金属离子对绝大多数生物是致命的,但仍然有大量的光合藻类可以旺盛地生活在酸性环境中,如绿藻门的衣藻(*Chlamydomonas*)、小球藻(*Chlorella*)、胶球藻(*Coccomyxa*)、杜氏藻(*Dunaliella*)、丝藻(*Ulothrix*)、*Zygonium*, 红藻门的 *Cyanidium*、*Galdieria*、*Cyanidioschyzon*, 金藻门的棕鞭藻(*Ochromonas*)和 *Chromulina*, 裸藻门的 *Euglena* 和 *Lepocinclis*, 隐藻门的 *Cyathomonas* 和 *Rhodomonas*, 硅藻门的 *Eunotia*、*Frustulia* 和

*Pinnularia* , 轮藻门的 *Actinotaenium* 、*Klebsormidium* 和 *Spirogyra* 等<sup>[12-13]</sup>。

衣藻(*Chlamydomonas*)在酸性矿山废水中分布最为广泛,而且容易在有一定营养条件的水体中发生聚集。这得益于嗜酸衣藻宽广的 pH (1.5-7.0, 最适 3.0)生长范围和对多种金属离子的适应性能<sup>[14]</sup>。Nixdorf 等在研究了德国 Lusatia 矿区的 32 个酸性矿山废水湖泊后发现, *Chlamydomonas* 在其中 14 个酸性最强的湖泊 (pH<4.0)中占统治地位<sup>[15]</sup>。本课题组经长期研究发现, 每年冬季 *Chlamydomonas* 都会在安徽某铁矿排土场酸水库中(pH 约为 3.0)产生周期性的湖泊水华,叶绿素 *a* 最高可达 500 mg/m<sup>3</sup> 以上(图 1A 和 B), 这一浓度在普通淡水湖泊中也是非常罕见的<sup>[16-17]</sup>。这证明嗜酸 *Chlamydomonas* 不但具有较强的耐酸性能, 还具有很强的耐冷性能。与 *Chlamydomonas* 相反, 嗜酸 *Chlorella* 往往生

活在较温暖的环境中, 其最适生长温度在 30 °C 左右, 低于 20 °C 生长会受到明显抑制<sup>[18]</sup>。同样, 本课题组也发现 *Chlorella* 在夏季的酸水库中具有较高的丰度<sup>[17]</sup>。另一种绿藻 *Dunaliella* 则具有极强的耐酸性能, 它只能生活在 pH 0.0-3.0 的环境中, 最适 pH 为 1.0。因此, 该藻往往分布在酸性最强的矿山废水中。类似的, 红藻 *Cyanidium* 也具有极强的耐酸性能, 所以经常在 pH 约为 2.0 的酸性废水中大量出现<sup>[12]</sup>。

两种丝状藻 *Klebsormidium* 和 *Zygnemopsis* 一般分布在酸性湖泊的岸边或者酸性溪流中。它们可固定在岩石表面生长, 在溪流中形成长度超过 1 m 的丝带状生物膜(图 1C 和 D)。这些生物膜一般在干燥的夏季最丰富, 此时水位最低, 酸水的物理化学条件更加极端。这一方面说明这些丝状藻类有很强的耐受性能, 另一面也说明它们具有一定的陆生性<sup>[13]</sup>。某些胶球藻(*Coccomyxa*)

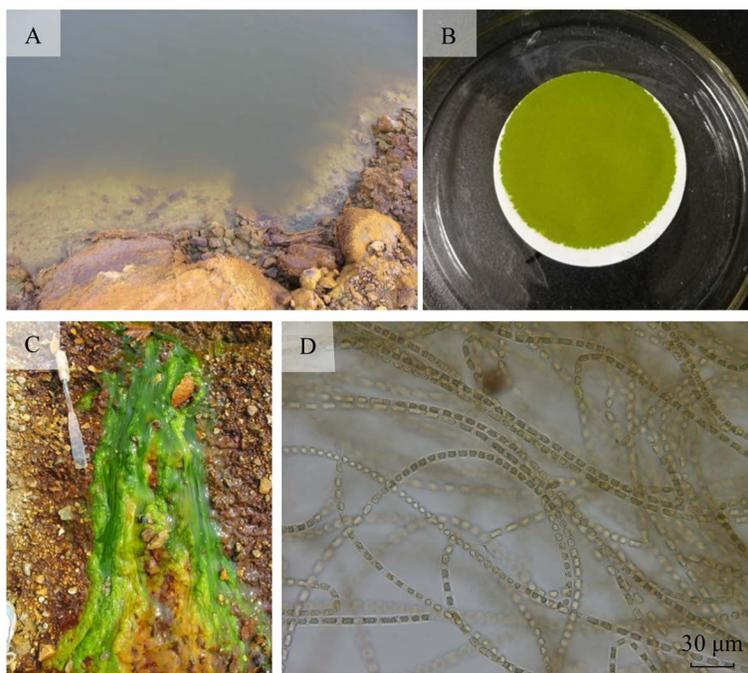


图 1 安徽某铁矿嗜酸藻类

Figure 1 The acidophilic algae in an iron mine in Anhui province. A: the acidophilic algae bloom of an AMD lake; B: filtered biomass of 200 mL AMD water; C: the streamer in an acidic creek; D: micrograph of the streamer.

很好地适应了低光照强度,所以它们在某些酸性湖泊的 6–10 m 深度处居于主导地位,但在表层水的丰度却非常低<sup>[19]</sup>。在光照条件更差的湖泊底部,藻类多样性一般比较低,主要是 *Euglena* 和 *Eunotia* 等<sup>[13]</sup>。

金藻门的棕鞭藻(*Ochromonas*)比较特殊,它是混合营养生物,不但可以进行光合作用,还可以通过捕食作用吞噬其他小型生物生长。所以它们在酸性矿山废水中不但是初级生产者,同时还是顶级消费者<sup>[20]</sup>。Kalin 等对加拿大安大略省的一个酸性矿山废水湖泊进行了 17 年的(1986–2003)跟踪研究,发现湖泊中浮游生物群落组成发生了剧烈的变化,只有棕鞭藻(*Ochromonas*)和衣藻(*Chlamydomonas*)一直存在于系统中<sup>[21]</sup>。本课题组在安徽某铁矿酸性矿山废水区域也经常检测到棕鞭藻,它往往在 pH 2.0–3.0 的酸水中占优势地位,丰度最高达 50%以上,表明该藻对酸性环境有着较强的适应能力<sup>[22–23]</sup>。

蓝藻(蓝细菌)在酸性环境中分布较少。人们一般认为蓝藻没有成型的叶绿体,外界高浓度的氢离子会对它的光合作用产生强烈的抑制,所以它的 pH 生长下限为 4.8。但有人却在 pH 2.9 的酸性湖泊中发现了丝状的蓝藻<sup>[24]</sup>。因此, pH 4.8 这一生长下限,也许对单细胞蓝藻有效,而某些具有胶质鞘保护的丝状蓝藻对低 pH 具有更强的耐受性。

## 2 嗜酸藻类抗性机制研究进展

生活在酸性矿山废水中的嗜酸光合藻类,时刻面对着严酷的环境条件。为了应对强酸性、低无机碳和高浓度重金属等极端环境因素的胁迫,这些藻类已经进化出了一系列特殊的生理机制。

### 2.1 维持 pH 稳态的生理机制

#### 2.1.1 细胞膜对 H<sup>+</sup> 的屏障作用

生活在酸性环境的藻类必须面对极高的 H<sup>+</sup>

浓度。但现在人们已知,即使生活在 pH 1.0 环境中的藻类,它的细胞质也是中性的。这就意味着细胞内外要保持一个 1:10<sup>6</sup> 的 H<sup>+</sup> 浓度差。细胞膜是生物体的第一道生理屏障,嗜酸藻类的细胞膜表现出对 H<sup>+</sup> 极大的不渗透性(图 2)。一般植物细胞对 H<sup>+</sup> 的渗透系数为 10–50 000 nm/s,而嗜酸衣藻 *Chlamydomonas* sp. ATCC PRA-125 的细胞膜渗透系数只有 0.7 nm/s<sup>[25]</sup>。藻类这种细胞的不渗透性是如何保持的,目前人们还不清楚。有可能是因为细胞膜上存在特殊的蛋白质或不饱和脂肪酸。有些古菌(例如 *Ferroplasma acidiphilum*、*Picrophilus oshimae* 等)在细胞膜上存在双极性的四醚脂,使它的细胞膜对 H<sup>+</sup> 具有高的不渗透性<sup>[26]</sup>,但这种物质在嗜酸藻类细胞中还没有发现。

除了细胞膜直接的屏障作用外,嗜酸藻类还能通过正的膜电势(membrane potential)抑制 H<sup>+</sup> 进入细胞。一般来说,嗜中性藻类细胞内钾离子浓度是细胞外的 100 倍以上,这样就造成了一个负的跨膜电势(–40–180 mV)<sup>[27]</sup>。但通常情况下,嗜酸藻类细胞外的 H<sup>+</sup> 浓度比细胞内高几个数量级,这里面蕴含着极大的扩散势能(约+350 mV),从而使嗜酸藻类的跨膜电势为正值。例如极端嗜酸绿藻 *Dunaliella acidophila* 的跨膜电势约为 +30–+65 mV<sup>[27]</sup>。这样一个正的跨膜电势有利于嗜酸藻类对抗环境中高浓度的 H<sup>+</sup> (图 2)。如果嗜酸藻类生活在 pH 大于 5.0 的环境中,它的跨膜电势将转为负值。类似的,环境中高浓度的 H<sup>+</sup> 会将细胞膜表面的羧基、磷酸基全部质子化,导致嗜酸藻类的表面 zeta 电势为正值,如 *Dunaliella acidophila* 的 zeta 电势为 +5–+20 mV,这与常规藻类正好相反<sup>[28]</sup>。正的表面电势对于环境中高浓度的 H<sup>+</sup> 同样有直接的对抗作用,抑制 H<sup>+</sup> 内流(图 2)。如果 *Dunaliella acidophila* 在中性环境中生长,它的 zeta 电势也将转为负值(–30 mV)。

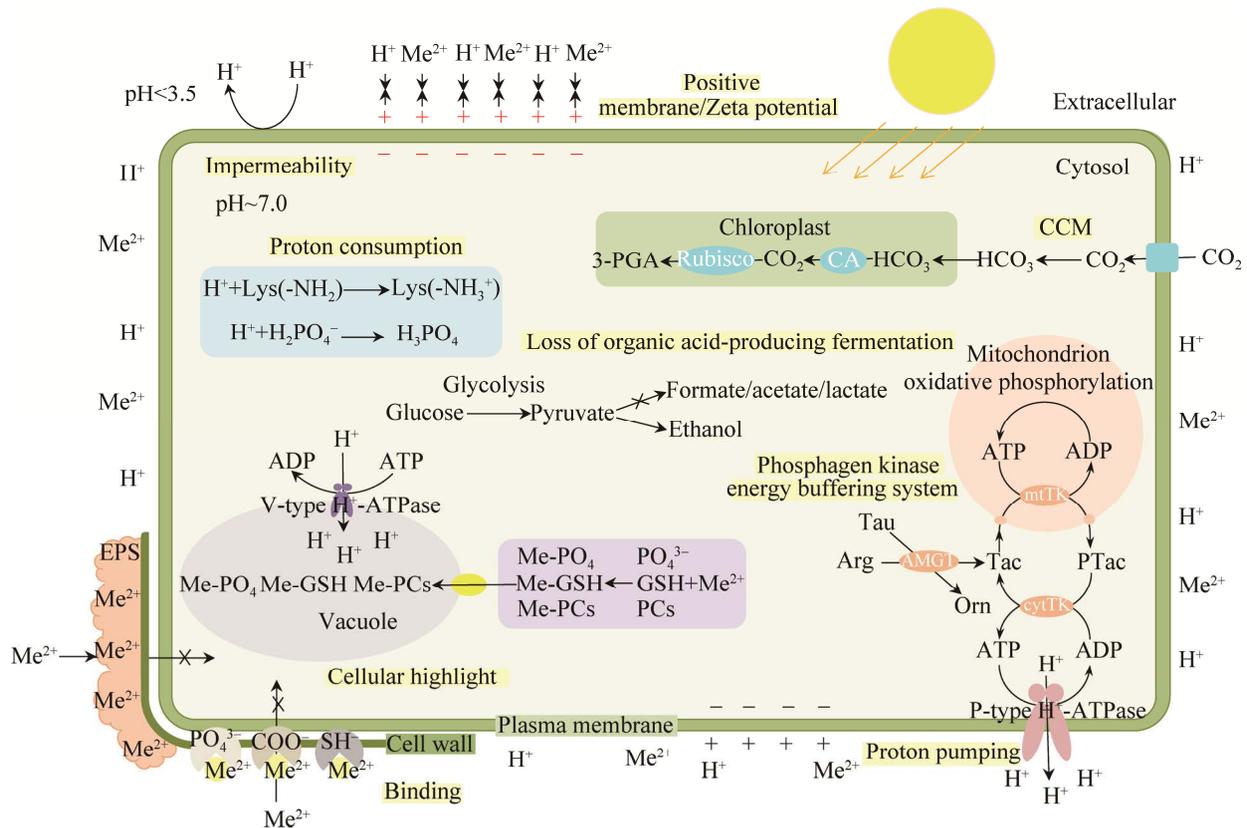


图 2 嗜酸藻类适应机制图

Figure 2 The adaption mechanism schematic of acidophilic algae to extreme conditions. 3-PGA: 3-phosphoglycerate; CA: carbonic anhydrase; Tau: taurine; Tac: taurocyamine; Orn: ornithine; Lys: lysine.

### 2.1.2 细胞质的缓冲作用、H<sup>+</sup>的外排功能及磷酸原激酶的作用

如果有些 H<sup>+</sup> 穿透细胞膜进入了细胞，嗜酸藻类还可以通过细胞质的缓冲作用中和 H<sup>+</sup> 的酸化作用。嗜酸藻类细胞质内通常含有大量的碱性氨基酸(如赖氨酸、精氨酸和组氨酸)和磷酸基团来中和进入细胞的 H<sup>+</sup> (图 2)。例如, *D. acidophila* 的细胞质缓冲容量为 100 mmol H<sup>+</sup>/L·pH unit, 比同属的嗜中性藻高两倍以上<sup>[29]</sup>。

除了细胞膜的不渗透性和细胞质的缓冲作用外, 嗜酸藻类还具有很强的 H<sup>+</sup> 主动外排功能。嗜酸藻类可以在酸性条件下高效表达 H<sup>+</sup>-ATPase, 从而将细胞内过剩的 H<sup>+</sup> 泵到细胞外 (图 2)。研究表明, *D. acidophila* 的 H<sup>+</sup>-ATPase

活性高达 2 μmol Pi/mg protein·min, 是它同属嗜中性藻类 *D. salina* 活性的 15–30 倍。同时, 该酶表现出对 ATP 极高的亲和力, 它对 ATP 的  $K_m$  值为 60 μmol/L, 比常规植物中类似酶的  $K_m$  低 10 倍<sup>[30]</sup>。嗜酸藻类细胞膜上的 H<sup>+</sup>-ATPase 一般为 P 型 H<sup>+</sup>-ATPase, 每消耗一分子 ATP 就可以向细胞外泵出一分子 H<sup>+</sup>。依靠该酶的作用, *D. acidophila* 向细胞外泵出 H<sup>+</sup> 的速度可达 3–15×10<sup>-8</sup> mol H<sup>+</sup>/m<sup>2</sup>·s<sup>[31]</sup>。与 *D. acidophila* 不同, *Chlamydomonas* sp. ATCC PRA-125 主要依靠 H<sup>+</sup>-ATPase 将 H<sup>+</sup> 泵到细胞内的液泡(vacuole)中来控制细胞质中的 H<sup>+</sup> 浓度(图 2)。细胞内的 H<sup>+</sup>-ATPase 属于 V 型 H<sup>+</sup>-ATPase, 它们不用像位于细胞膜上的 H<sup>+</sup>-ATPase 一样面对外界严酷的

条件, 所以往往表现出更强的活性。V 型  $H^+$ -ATPase 每消耗一分子 ATP 可向液泡中泵入 2-3 分子  $H^+$ , 所以比细胞膜上的 P 型  $H^+$ -ATPase 效率更高<sup>[25]</sup>。

很多动物体内的磷酸原激酶(phosphagen kinase)在抵御低 pH 过程中发挥着重要的作用。例如精氨酸激酶(arginine kinase, EC 2.7.3.3)就可以在生物体内形成一个磷酸精氨酸能量缓冲体系, 在酸性条件下迅速放能用于  $H^+$  的泵出, 帮助生物体克服外界酸性的胁迫(图 2)。有人将该基因在大肠杆菌和酿酒酵母中表达后, 使这两种本来没有耐酸性能的微生物可以抵御 pH 2.0-3.0 的酸性环境<sup>[32-33]</sup>。有学者根据基因组和转录组学数据推断嗜酸衣藻 *Chlamydomonas eustigma* 中就存在利用磷酸原激酶抵御酸性环境的机制<sup>[34]</sup>。

### 2.1.3 代谢调节和热休克蛋白的作用

大多数藻类不但可以进行光合作用, 在厌氧和缺氧的条件下还可以通过发酵产能。在发酵的过程中, 藻类会产生一些醇类和有机酸。例如莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)就可以在厌氧条件下产生甲酸、乙酸、乳酸和乙醇等发酵产物<sup>[35]</sup>。有机酸在一定程度上会酸化藻类的细胞质。这种酸化作用对嗜中性藻类的生长一般不会产生明显的影响, 但对于时刻都需要应对外界高浓度  $H^+$  的嗜酸藻类来说, 就是一种严重的威胁。因此, 嗜酸藻类在长期的进化过程中缺失了发酵产有机酸的途径。例如, 嗜酸衣藻 *Chlamydomonas eustigma* 缺失了产生甲酸的丙酮酸甲酸裂解酶(pyruvate formate lyase, PFL), 产乳酸的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH), 以及负责产乙酸的磷酸乙酰转移酶(phosphate acetyltransferase, PAT2 和 PAT1)和乙酸激酶(acetate kinase, ACK1 和 ACK2)。相反, *Chlamydomonas eustigma* 保留了发酵产乙醇的

代谢途径(图 2)。通过这样的代谢调节, 嗜酸藻类可以极大地降低细胞质中  $H^+$  浓度<sup>[34]</sup>。

热休克蛋白(hot shock protein, HSP)是广泛分布在生物体内的一类应激蛋白。在细胞受到胁迫时, 热休克蛋白在保持蛋白质可折叠状态、促进蛋白质的重折叠和装配等方面发挥着重要作用。虽然它们最早发现于受热胁迫的细胞中, 但后来人们发现其他的一些压力, 如高离子浓度、强光、干燥、氧化压力和细胞能量缺乏都会诱导产生热休克蛋白。Gerloff-Elias 等研究发现, 虽然 *Chlamydomonas acidophila* 已经很好地适应了酸性环境, 但它比生活在中性环境的莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 含有更高的背景 HSP, 证明热休克蛋白在嗜酸衣藻的适应过程中发挥着重要的作用<sup>[36]</sup>。

### 2.2 对低浓度无机碳的适应机制

藻类进行光合作用的碳源来自水中溶解的无机碳, 然而强酸性对水中无机碳的存在状态有着巨大的影响。在中性和碱性条件下, 水中含有大量的  $HCO_3^-$ , 光合作用消耗的  $CO_2$  会很快得到补充。但是在  $pH < 4.0$  的酸性环境下, 水中  $HCO_3^-$  含量低于 1%, 无机碳主要以  $CO_2$  形式存在。 $CO_2$  的来源主要是大气扩散, 达到平衡时的浓度一般仅为 10-15  $\mu mol/L$ <sup>[37]</sup>。如此低的无机碳浓度, 很容易被光合作用消耗掉。但大量的研究表明, 环境中低浓度的无机碳并没有限制嗜酸藻类的生长。因为在酸性条件下, 大气中的  $CO_2$  向水中的扩散速度非常快。在  $pH 7.0$  和  $18^\circ C$  的条件下, 大气中的  $CO_2$  向水中的扩散过程需要 3.5 min 才能达到平衡; 而在  $pH 2.0$  ( $18^\circ C$ ) 时, 这一过程只需要 0.42 s 就可以达到平衡<sup>[38]</sup>。因此, 在地形开阔、大气环流顺畅的情况下, 酸性水体中的无机碳可以快速地从大气中得到补充。

虽然嗜酸藻类细胞膜对  $H^+$  有着极强的不渗透性, 但它对  $CO_2$  的渗透系数却与普通植物细

胞相当( $10^{-6}$  m/s)<sup>[39]</sup>。如前所述, 无论外界 pH 条件如何变化, 嗜酸藻类细胞质的 pH 总是中性的。虽然酸性环境的无机碳浓度很低, 但是外界的  $\text{CO}_2$  扩散进入藻类中性的细胞质后, 就会快速转化成  $\text{HCO}_3^-$  并被转移到叶绿体内用于光合作用, 直到细胞内外的  $\text{CO}_2$  浓度达到平衡<sup>[37]</sup>(图 2)。通过这种被动的  $\text{CO}_2$  浓缩机制( $\text{CO}_2$ -concentrating mechanism, CCM), 嗜酸藻类可以将无机碳浓缩 10–15 倍<sup>[38]</sup>。除此之外, *Chlamydomonas acidophila*、*Dunaliella acidophila*、*Chlorella saccharophila* 和 *Cyanidioschyzon merolae* 等嗜酸藻类还可以通过主动运输  $\text{CO}_2$  的方式达到浓缩无机碳的目的<sup>[40]</sup>。通过主动的 CCM 机制, 嗜酸藻类可以将细胞外的  $\text{CO}_2$  浓缩 35 倍以上<sup>[41]</sup>。

因为长时间地生活在低无机碳环境中, 嗜酸藻类对  $\text{CO}_2$  都有着极强的亲和力。例如, 嗜酸藻类 *Chlamydomonas acidophila* 对  $\text{CO}_2$  的半饱和常数( $K_{1/2}$ )仅为  $2 \mu\text{mol/L}$ , *Euglena mutabilis* 也仅为  $6.4 \mu\text{mol/L}$ , 而嗜中性藻类 *Euglena gracilis* 对  $\text{CO}_2$  的半饱和常数( $K_{1/2}$ )则高达  $25 \mu\text{mol/L}$ <sup>[37,41]</sup>。因此, 生活在酸性环境的嗜酸藻类并不会受到低浓度无机碳的影响。

### 2.3 对金属的耐受机制

自然界的金属可以分为两类, 有些金属在低浓度时对生物体是有益的, 如锌和铜; 另外一些金属, 如汞和镉, 则对生物体完全没有益处。无论哪种金属, 在高浓度时对生物体都有严重的危害, 它们可以使蛋白质变性、取代有用的金属离子、作为结构类似物干扰代谢、破坏生物膜的完整性、产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)胁迫<sup>[42]</sup>。酸性矿山废水中通常含有高浓度的重金属, 生活在其中的嗜酸藻类通常表现出极强的金属耐受性, 如嗜酸衣藻 *Chlamydomonas* sp. RT1 对镉的抗性比普通藻类高 2 个数量级左右<sup>[43]</sup>, 这是因为它们在长期的适应过程中已经进化出

多种解毒机制。

#### 2.3.1 细胞壁和胞外聚合物(EPS)的作用

嗜酸藻类细胞壁表面含有大量可以吸附重金属的带负电基团, 所以它对金属离子具有很强的屏蔽作用(图 2)。例如 Samadani 等对比研究了嗜酸衣藻 *Chlamydomonas* sp. CPCC 121 和莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 对高浓度镉的不同生理反应。结果发现, *Chlamydomonas* sp. CPCC 121 细胞壁表面吸附沉淀了大量的镉, 只有少量金属进入了细胞, 所以细胞还能保持较高的活性; 而 *Chlamydomonas reinhardtii* 的细胞壁却没有这样的屏障作用, 有大量的镉进入了细胞, 毒性作用明显, 细胞活性受到了强烈的抑制<sup>[44]</sup>。

除了细胞壁的吸附作用, 有些藻类还能分泌胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)来抵御外界高浓度的重金属。在遇到 pH、金属、营养条件等外界环境条件胁迫时, 这些藻类会分泌 EPS, 最终在多个细胞外形成一个公共的胶质鞘, 用以保护内部的细胞<sup>[45]</sup>。EPS 主要由糖类、蛋白质和脂类等大分子组成, 能与金属离子结合并形成络合物<sup>[46]</sup>, 使金属离子不能进入细胞内部(图 2)。例如 García-Meza 等在研究金属尾矿生物膜的生存机制时发现, 这种生物膜主要由 2 种藻类(*Chlorococcum* 和 *Phormidium*)组成。在向该生物膜添加 Cu 和 Zn 时, 这 2 种藻类会迅速产生 EPS, 而且 EPS 的产生量与金属浓度呈正相关。同时, EPS 中的金属含量随着体系中金属浓度的增加而增加, 且 EPS 中的金属浓度远高于细胞内的金属浓度<sup>[47]</sup>。本课题组在研究嗜酸衣藻对 Al 的抗性机制时也发现, 在高浓度 Al 的作用下嗜酸衣藻会在细胞外分泌大量 EPS, 多个细胞形成一个胶状群体(palmelloid)。细胞群体外有很厚的胶状层, 可以吸附金属, 保护内部的细胞个体(图 3)。

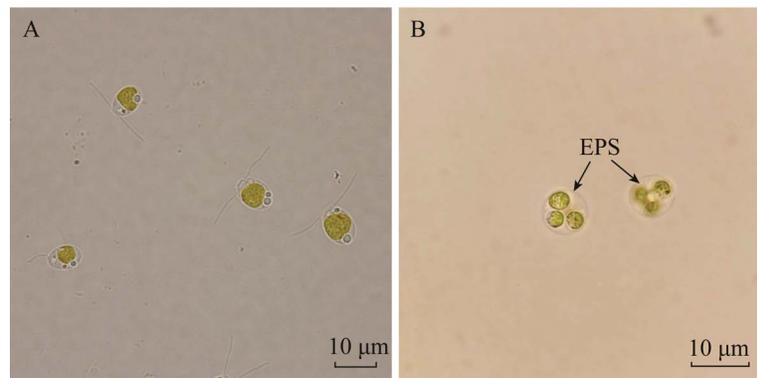


图3 嗜酸衣藻 *Chlamydomonas* sp. 1710 的细胞形态

Figure 3 Micrograph of acidophilic *Chlamydomonas* sp. 1710. A: the algae in Al-free medium; B: the algae in the medium containing 300 mg/L Al.

### 2.3.2 细胞膜对金属离子的屏障作用

如果金属离子穿透了细胞壁的屏蔽作用,就会与藻类的细胞膜直接接触。如前所述,嗜酸藻类的膜电势和膜表面 zeta 电势都是正值,因此对外界带正电的金属离子有很强的抵御作用(图2)。即使有少量金属离子与细胞膜表面的带负电基团结合,也会进一步加强膜的正电性,使它们对金属离子的对抗作用更加明显。

还有的嗜酸藻类在金属的胁迫下,会改变细胞的表面性质,从而减小金属对细胞的毒性。例如 Halter 等对比研究了嗜酸藻类 *Euglena mutabilis* 和它的同属嗜中性成员 *Euglena gracilis* 对砷的不同生理反应。结果发现,*Euglena mutabilis* 在高浓度砷的胁迫下改变了细胞膜的脂肪酸组成,增强了细胞表面的疏水性,从而使环境中大量溶解态的砷无法接触到细胞,最终只有少量的砷可以进入细胞内部。相反,嗜中性的 *Euglena gracilis* 却没有此特性,细胞内累积的砷浓度是 *Euglena mutabilis* 的 3 倍以上<sup>[48]</sup>。

### 2.3.3 细胞内的代谢作用

多数藻类体内都有可伸缩的液泡(vacuole)。与应对高浓度  $H^+$  类似,藻类在受到金属胁迫时,可以将进入细胞内部的金属离子转移到液泡中隔离起来,从而减少它们对细胞的毒性。但与

$H^+$  的转移过程不同,藻类细胞是先利用磷酸盐、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、植物螯合肽(phytochelatins)和金属硫蛋白(metallothionein)等分子与金属结合后,再将金属离子转移到液泡内部<sup>[48]</sup>(图2)。

藻类体内都含有多聚磷酸盐(polyphosphate),它们是大量正磷酸盐通过高能磷酸键连接而成的线状高分子聚合物。多聚磷酸盐不但可以作为磷源储存物,在藻类应对金属离子胁迫时也发挥着重要的作用。例如 Nishikawa 等研究表明,分离自酸性湖泊 Katanuma (pH 1.8)的嗜酸衣藻 *Chlamydomonas acidophila* 在受到镉胁迫时,不但液泡的数量和体积会明显增加,而且多聚磷酸盐也会发生水解。水解生成的磷酸盐会与镉结合形成络合物,然后被运送到细胞内部的液泡中。实验证明,这种 phosphate-Cd 络合物无法再返回细胞质,所以被认为是 Cd 最终的解毒状态<sup>[49]</sup>。Olsson 等用转录组学方法从分离自西班牙 Rio Tinto 矿区的 *Chlamydomonas acidophila* 体内鉴定出一种新的植物螯合肽合成酶基因 CaPCS1,并证明该基因在 *Chlamydomonas acidophila* 体内的表达受 Cd 的强烈诱导。将该基因在大肠杆菌 (*Escherichia coli*)中表达后,可显著提高大肠杆

菌抗 Cd 性能<sup>[50]</sup>, 证明植物螯合肽在 *Chlamydomonas acidophila* 抗 Cd 过程中发挥着重要的作用。

有些光合藻类细胞内还存在一种特异化的液泡——酸钙体(acidocalcisome)。酸钙体内部存在大量的多聚磷酸盐,膜上含有丰富的质子泵(V型H<sup>+</sup>-ATPase和V型H<sup>+</sup>-PPase)和阳离子转运体,可将细胞质中多余的H<sup>+</sup>和金属离子转运到酸钙体中,形成电子密度(electron density)极高的基质。因此,酸钙体在这些藻类对抗高浓度金属等不良环境条件时发挥着重要的作用<sup>[51]</sup>。Yagisawa等发现嗜酸红藻 *Cyanidioschyzon merolae* 细胞内也存在类似结构和功能的细胞器<sup>[52]</sup>。

此外,热休克蛋白(HSP)在嗜酸藻类对抗重金属的过程中也发挥着重要的作用。例如Spijkerman等发现 *Chlamydomonas acidophilus* 生活在含有高浓度重金属的真实AMD中时,比生活在人工酸性培养基中时可产生更高浓度的HSP<sup>[53]</sup>。

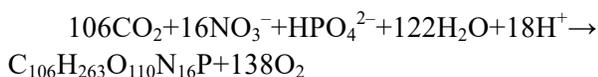
### 3 嗜酸藻类的应用

#### 3.1 治理酸性矿山废水

嗜酸藻类处理酸性矿山废水具有成本低,操作简单,没有二次污染和易于回收重金属等优点,已日益引起人们的关注。藻类对酸性矿山废水的治理作用主要体现在以下几个方面。

##### 3.1.1 生长产生碱度

传统的酸性矿山废水处理方法就是利用石灰、熟石灰或碳酸钙来中和废水。但是这种方法不但成本高昂,还会产生大量低浓度(约5%)的中和渣无法处理。而嗜酸藻类生长可以大量吸收水中的CO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>和HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>,从而产生碱度,中和酸性矿山废水<sup>[54]</sup>。



Davison等通过向英国的一个轻微酸化的湖泊中(pH约5.0)添加磷酸盐来促进藻类的生长。旺盛生长的藻类大量吸收水中的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>产生碱度,使湖水的pH逐渐升高。经过3年的实验,湖水的平均pH从5.16上升到了5.85,水中金属离子的浓度也有了明显的下降<sup>[55]</sup>。

##### 3.1.2 吸附和吸收重金属

嗜酸藻类生活在高重金属浓度的环境中,不但对重金属有很强的抗性,还对其有很强的吸附吸收能力。同时,很多研究发现死亡藻体也能通过多种物理化学机制吸附重金属,并且吸附能力更强,如 *Sargassum* sp.对实际废水中的Cu<sup>2+</sup>的吸附容量是商品化活性炭的6倍<sup>[56]</sup>。因此,活藻体,死亡藻体,或者生产生物柴油、色素之后的废弃藻体,都可以用来处理重金属废水。

藻类去除水中的重金属,主要包括两个过程,第一个过程发生在细胞表面,这是一个不涉及生物代谢的快速吸附过程,因此无论是活的藻体还是死亡藻体都可以起到这个作用。藻类的细胞壁上有很多官能团可以结合重金属,例如OH<sup>-</sup>、SH<sup>-</sup>、COO<sup>-</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、RNH<sub>2</sub><sup>-</sup>、RS<sup>-</sup>和RO<sup>-</sup>等。同时,藻类产生的大量胞外聚合物也可以促进重金属的吸附。第二个过程发生在细胞内部,涉及到细胞代谢和物质的运输,只发生在活的藻类细胞中。藻类将重金属吸收到细胞内部后,固定在蛋白质或其他分子上形成复合物,然后运输富集于液泡区<sup>[57]</sup>。

利用嗜酸藻类去除酸性矿山废水中的重金属已有较多研究。例如Orandi等构建了以丝状嗜酸藻 *Klebsormidium* 为主的光照旋转反应体系(photo-rotating biological contactor, PRBC)来处理酸性矿山废水。结果表明,该反应器对Cu、Mn和Ni等主要金属离子的去除效率为35%–50%,对微量金属离子的处理效率达80%<sup>[58]</sup>。Phillips等则在美国某矿山构建了藻席(algae mat)系统处

理从岩石裂隙中流出的酸性废水。结果表明,该系统对废水中Mn的去除效率高达 $2.59 \text{ g/m}^2 \cdot \text{day}$ , 优于作为对照的石灰处理系统<sup>[59]</sup>。

### 3.1.3 作为基质促进铁硫还原作用

嗜酸原核生物氧化还原态铁硫产生酸性矿山废水,而酸性矿山废水的生物治理过程则要利用它的逆过程,即微生物对 $\text{Fe}^{3+}$ 和 $\text{SO}_4^{2-}$ 的还原。铁和硫的还原过程都能产生碱度<sup>[60]</sup>,因此可以中和酸水,沉淀金属离子,达到生物治理的目的。

还原态铁硫的氧化是一个产能过程,可自发进行,而 $\text{Fe}^{3+}$ 和 $\text{SO}_4^{2-}$ 的还原过程则需要额外的有机质作为能量的来源。在酸性矿山废水体系中,有机质的来源主要有2个:化能自养的铁硫氧化菌和光合藻类。有研究表明,乙醇酸(glycolic acid)是 *Leptospirillum ferriphilum* 和 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 等铁硫氧化菌产生的主要代谢产物,可占整个体系DOC的24%。但目前已知,只有少数化能异养菌如 *Sulfobacillus* 才能利用这种有机物质,而该属的绝大多数菌种均没有还原铁硫的能力<sup>[61]</sup>。相反, *Euglena mutabilis* 和 *Chlorella protothecoides* var. *acidicola* 等光合藻类在生长过程中则可产生大量的单糖类物质(如葡萄糖、果糖、甘露糖等),这些有机物可支持大多数铁硫还原菌(如 *Acidiphilium*、*Acidocella*、*Acidobacterium*、*Desulfosporosinus* 等)的生长<sup>[62]</sup>。Nancucheo 等将光合藻类和铁硫还原菌接种到尾矿中,培养一年后发现该组样品比只接种铁硫还原菌的样品具有更高的pH、更低的氧化还原电位和更低的离子浓度,表明光合藻类明显地促进了铁硫还原作用<sup>[63]</sup>。

在形成时间较长酸性矿山废水中, $\text{Fe}^{3+}$ 经过水解沉淀,主要以施氏矿物(schwertmannite)的形式存在于沉积物中,而溶解态的 $\text{Fe}^{3+}$ 含量较少。相反, $\text{SO}_4^{2-}$ 通常在酸性矿山废水中有着极高的浓度,它是体系中主要的阴离子<sup>[64]</sup>。如在本课

题组长期研究的安徽某铁矿酸性矿山废水中,硫酸根浓度常年都在 $10\ 000 \text{ mg/L}$ 左右<sup>[17]</sup>。因此,与 $\text{Fe}^{3+}$ 相比, $\text{SO}_4^{2-}$ 是更易利用的电子受体。利用硫酸盐还原菌处理酸性矿山废水,不但可以消耗废水中的酸度,提高废水的pH值,产生的 $\text{H}_2\text{S}$ 还可以与金属离子形成硫化物沉淀(图4)。因为金属硫化物在水中的溶解性远远低于氢氧化物,所以去除水中的重金属更彻底<sup>[66]</sup>。在酸性矿山废水的自然衰减(natural attenuation)过程中,硫酸盐还原菌和光合藻类都发挥着关键的作用<sup>[67]</sup>。它们往往会围绕着碳循环形成一种共生关系:藻类固定 $\text{CO}_2$ 为硫酸盐还原菌的生长提供有机物,硫酸盐还原菌降解有机物形成 $\text{CO}_2$ ,为光合藻类提供无机碳源(图4)。如此循环,可大大提高酸性矿山废水的治理效率。同样,光合藻类也经常作为一种廉价的碳源物质被添加到在人工构建的酸性矿山废水生物处理系统中,来促进硫酸盐还原菌的生长,从而提高处理效率<sup>[68]</sup>。

## 3.2 嗜酸藻类在工业生产方面的应用

### 3.2.1 生产生物柴油

随着化石能源的日益减少,生物柴油作为其替代品备受关注。许多微藻在细胞中可以脂滴的形式积累储存脂质,被认为是未来生物柴油的主要来源。但目前利用藻类生产生物柴油成本较高,难以用于工业化生产,主要原因就是开放的藻类培养池很容易受到其他微生物的污染。在这种情况下,利用嗜酸藻类生产生物柴油就有巨大的优势,因为强酸性对绝大多数微生物都是致命的。日本学者 Hirooka 等从酸性矿山废水中分离出一株嗜酸藻 *Pseudochlorella* sp. YKT1,其最适生长pH为3.0,最适生长温度 $20\text{--}25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。该藻在强酸性的条件下可以累积细胞干重约30%的脂滴,证明在酸性的开放培养体系中,该藻具有很好的工业生产前景<sup>[69]</sup>。

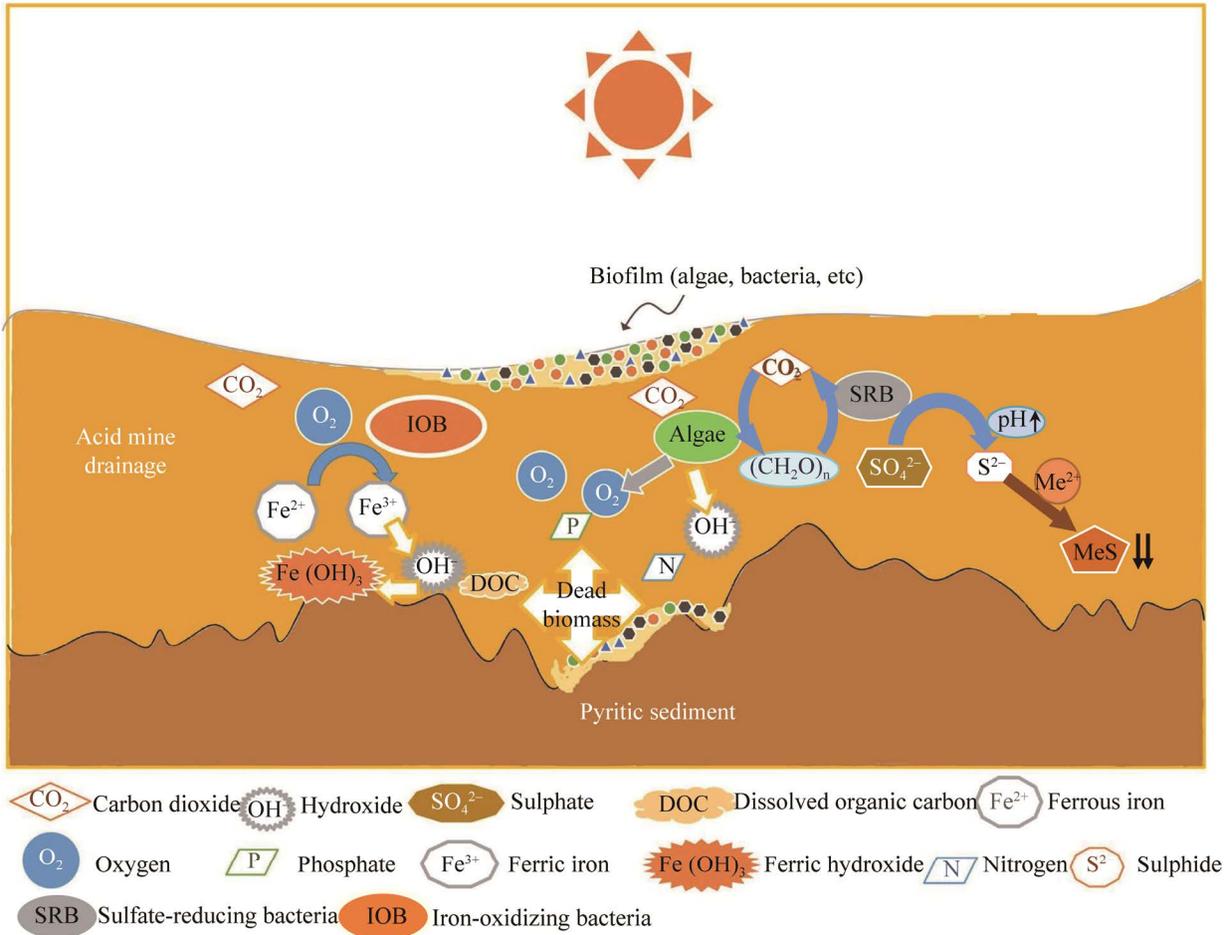


图 4 嗜酸藻类-SRB 在 AMD 中形成互生关系<sup>[65]</sup>

Figure 4 Mutualistic relationship between acidophilic algae and SRB in AMD<sup>[65]</sup>.

### 3.2.2 生产叶黄素

叶黄素(lutein)是一种类胡萝卜素,在生物体内是重要的抗氧化剂。叶黄素是人类视网膜的主要色素成分,如果缺乏这种色素,眼睛就会失明。同时,叶黄素还有助于预防由于机体衰老引发的心血管硬化,冠心病和肿瘤等疾病。因此,叶黄素在医药保健领域具有重要的应用价值。嗜酸藻类生活在含有高浓度金属离子的酸性废水中,时刻面对着强烈的氧化压力。为了避免氧化损伤,嗜酸藻类会在体内富集高浓度的抗氧化剂,如叶黄素(lutein)和玉米黄素(zeaxanthin)等。Cuaresma 等对比研究了不同碳

源和培养方式对 *Chlamydomonas acidophila* 体内抗氧化剂累积的影响。结果表明,该藻以尿素(urea)作为基质进行混合营养生长时,会累积最大量的类胡萝卜素(主要为叶黄素)。此时叶黄素的产量高达 10 g/kg 干生物量,这在文献报道中是最高的产量之一。当甘氨酸(glycine)作为碳源时,该藻则会大量累积另一种重要的抗氧化色素——玉米黄素(zeaxanthin)<sup>[70]</sup>。类似的, Vaquero 等发现酸性矿山废水中另一种常见的嗜酸绿藻 *Coccomyxa onubensis* 在生长过程中也可累积较高浓度的叶黄素,生产效率高达 10 mg/(L·day)<sup>[71]</sup>。

### 3.2.3 处理高氨废水

厌氧处理后的高浓度有机废水(如畜禽养殖废水)往往含有高浓度的氨氮。用这种废水培养藻类既去除了水中的氨氮,又能获得一些有价值的藻类代谢产物。但一般藻类因为生长过程中的产碱效应可以使 pH 迅速上升至 8.0 以上,导致水中的氨氮挥发,造成二次污染。因此,在一般工艺中,都要通过加强 CO<sub>2</sub> 曝气,使 pH 保持在 8.0 以下。这在很大程度上增加了生产成本<sup>[72]</sup>。嗜酸藻类 *Chlamydomonas acidophila* 可以在 pH 3.0 的环境中生长,所以利用它在酸性条件下去除厌氧出水的氨氮,可大大节省 CO<sub>2</sub> 曝气产生的费用。Escudero 等研究表明,在 pH 3.0 时,*Chlamydomonas acidophila* 可以在 1 000 mg/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的环境中生长,而且不受有机废水高浓度的影响,展现出了良好的应用前景<sup>[72]</sup>。

## 4 总结与展望

嗜酸藻类长期生活在酸性矿山废水中,时刻面对严酷的选择压力,使它们进化出了一系列特殊的生理机制以应对低 pH、低无机碳和高浓度金属等各种不利环境条件。利用这些特殊的生理性质,人们可以将嗜酸藻类用于生物修复和生产高附加值的工业产品,使嗜酸藻类在污染治理和工业生产中发挥不可替代作用。从 20 世纪 90 年代开始,德国、美国、日本和西班牙等国的科学家对嗜酸藻类进行了长期的研究,积累了丰富的研究成果。但相对于嗜酸细菌和古菌来说,嗜酸藻类的研究还相对薄弱。因此,在未来一段时间内嗜酸藻类还需从以下几个方面着力进行研究。

(1) 关于嗜酸藻类的适应机制,虽然已有一些研究成果,但还缺乏一个相对系统和清晰的蓝图。例如 H<sup>+</sup> 的泵出作用是 *Chlamydomonas acidophila* 应对酸胁迫的重要生理机制,但它在 pH 3.0 比 pH 7.0 需要花费更多的 ATP 用于泵出

H<sup>+</sup>。在这种情况下,为什么 *Chlamydomonas acidophila* 的最适 pH 仍然是 3.0,目前还不得而知。要回答这一问题,需要从该藻的细胞结构、产能过程、物质运输、大分子的生物合成和功能行使等多个角度进行综合研究。

(2) 关于嗜酸藻类生理机制和生态功能的研究,主要是围绕 *Chlamydomonas acidophila* 和 *Dunaliella acidophila* 等少数几种藻类展开的。但实际上嗜酸藻类多样性巨大,生态分布和生理性质也千差万别,关于少数几种藻类的研究结果代表性非常有限。因此,需要研究者们扩大研究范围,以更多的嗜酸藻类为研究对象,探究其生理性质,完善人们对嗜酸藻类的认识。

(3) 作为酸性生态系统的重要组成部分,嗜酸藻类的生态功能还不明确。目前,人们只是粗浅地认为嗜酸藻类在酸性矿山废水中是初级生产者,但它对有机碳的贡献究竟有多大还不清楚。关于嗜酸藻类产生有机碳的性质也只有很少量的研究。嗜酸藻类通过有机碳的合成和降解与原核微生物建立起了复杂的相互关系,但这种关系是如何形成、维持、调节和演变的,这些细节还少有研究。如何将这种复杂的关系优化或强化后用于污染治理,这方面也有待加强。此外,有些藻类如棕鞭藻,除了进行光合作用,还能捕食细菌等小型生物,兼具顶级消费者的角色。但它们是如何通过捕食作用影响嗜酸菌群落结构的现在还不清楚。

(4) 用嗜酸藻类处理酸性矿山废水和高氨废水的研究,大多数是实验室规模的,实现工业化的案例非常少。这就需要研究者加强现场研究,积累实际经验,以早日实现嗜酸藻类处理特殊废水的大规模推广应用。

(5) 目前已有关于嗜酸藻类生产生物柴油和叶黄素等抗氧化剂的研究,并且获得了较好的累积效率。但这些高附加值生物制品的提取和纯化

工艺还未见报道,这也是实现嗜酸藻类工业化应用的重要一环。

## 参考文献

- [1] Naidu G, Ryu S, Thiruvengkatachari R, Choi Y, Jeong S, Vigneswaran S. A critical review on remediation, reuse, and resource recovery from acid mine drainage. *Environmental Pollution*, 2019, 247: 1110–1124.
- [2] 邹晓锦, 仇荣亮, 周小勇, 郑文晖. 大宝山矿区重金属污染对人体健康风险的研究. *环境科学学报*, 2008, 28(7): 1406–1412.  
Zou XJ, Qiu RL, Zhou XY, Zheng WH. Heavy metal contamination and health risk assessment in Dabao Mountain, China. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(7): 1406–1412. (in Chinese)
- [3] 王爱云, 李瑞萍, 倪善芹. 江西乐安江流域稻田土重金属累积变化与德兴矿集区关系. *地质通报*, 2014, 33(8): 1213–1219.  
Wang AY, Li RP, Ni SQ. Relationship between heavy metal accumulation of rice field topsoils along the Le'an River and the Dexing oreconcentration area, northeast Jiangxi province. *Geological Bulletin of China*, 2014, 33(8): 1213–1219. (in Chinese)
- [4] Druschel GK, Baker BJ, Gihring TM, Banfield JF. Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California. *Geochemical Transactions*, 2004, 5(2): 13.
- [5] Amils R, González-Toril E, Fernández-Remolar D, Gómez F, Aguilera Á, Rodríguez N, Malki M, García-Moyano A, Fairén AG, De La Fuente V, Luis Sanz J. Extreme environments as Mars terrestrial analogs: the Rio Tinto case. *Planetary and Space Science*, 2007, 55(3): 370–381.
- [6] Meier J, Babenzien HD, Wendt-Potthoff K. Microbial cycling of iron and sulfur in sediments of acidic and pH-neutral mining lakes in Lusatia (Brandenburg, Germany). *Biogeochemistry*, 2004, 67(2): 135–156.
- [7] Volant A, Desoeuvre A, Casiot C, Lauga B, Delpoux S, Morin G, Personné JC, Héry M, Elbaz-Poulichet F, Bertin PN, Bruneel O. Archaeal diversity: temporal variation in the arsenic-rich creek sediments of Carnoulès Mine, France. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2012, 16(4): 645–657.
- [8] 欧阳冰洁, 陆现彩, 陆建军, 李娟, 王朝华, 朱婷婷, 王汝成, 耿建华. 嗜酸性氧化亚铁硫杆菌与硫化物矿石相互作用的实验研究. *岩石矿物学杂志*, 2011, 30(6): 1021–1030.
- [9] 刘丽君, 刘双江, 姜成英. 嗜热微生物及在高温生物冶金过程中的应用. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 1101–1112.  
Liu LJ, Liu SJ, Jiang CY. Thermophiles and their application in high temperature-biomining processes. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 1101–1112. (in Chinese)
- [10] 刘美林, 臧宏, 周成英, 温建康. 嗜温菌、中等嗜热菌、嗜热菌分段浸出原生硫化铜矿表外矿万吨级工业堆浸试验. *湿法冶金*, 2012, 31(6): 357–362.  
Liu ML, Zang H, Zhou CY, Wen JK. A 10 000-tons industrial test on dump leaching of primary copper sulfide submarginal ores by sequential inoculation of mesophiles, moderate thermophiles and thermophiles. *Hydrometallurgy of China*, 2012, 31(6): 357–362. (in Chinese)
- [11] Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the tinto river, Spain. *Microbial Ecology*, 2001, 41(1): 20–35.
- [12] Gimmler H. Acidophilic and acidotolerant algae. *Algal Adaptation to Environmental Stresses*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001: 259–290.
- [13] Nixdorf B, Fyson A, Krumbeck H. Review: plant life in extremely acidic waters. *Environmental and Experimental Botany*, 2001, 46(3): 203–211.
- [14] Gerloff-elias A, Spijkerman E, Pröschold T. Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negoro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6). *Plant, Cell & Environment*, 2005, 28(10): 1218–1229.
- [15] Nixdorf B, Mischke U, Leßmann D. Chrysophytes and chlamydomonads: pioneer colonists in extremely acidic mining lakes (pH<3) in Lusatia (Germany). *Phytoplankton and Trophic Gradients*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1998: 315–327.
- [16] Hao CB, Wei PF, Pei LX, Du ZR, Zhang Y, Lu YC, Dong HL. Significant seasonal variations of microbial community in an acid mine drainage lake in Anhui province, China. *Environmental Pollution*, 2017, 223: 507–516.

- [17] Xin RR, Banda JF, Hao CB, Dong HY, Pei LX, Guo DY, Wei PF, Du ZR, Zhang Y, Dong HL. Contrasting seasonal variations of geochemistry and microbial community in two adjacent acid mine drainage lakes in Anhui province, China. *Environmental Pollution*, 2021, 268: 115826.
- [18] Nancucheo I, Johnson DB. Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 325.
- [19] Sánchez-España J, Falagán C, Ayala D, Wendt-Potthoff K. Adaptation of *Coccomyxa* sp. to extremely low light conditions causes deep chlorophyll and oxygen maxima in acidic pit lakes. *Microorganisms*, 2020, 8(8): 1218.
- [20] Tittel J, Bissinger V, Zippel B, Gaedke U, Bell E, Lorke A, Kamjunke N. Mixotrophs combine resource use to outcompete specialists: implications for aquatic food webs. *PNAS*, 2003, 100(22): 12776–12781.
- [21] Kalin M, Wheeler WN, Olaveson MM. Response of phytoplankton to ecological engineering remediation of a Canadian Shield Lake affected by acid mine drainage. *Ecological Engineering*, 2006, 28(3): 296–310.
- [22] 张丽娜, 郝春博, 王丽华, 李思远, 冯传平. 安徽某铁矿酸性矿山废水中真核生物的群落结构特征. *微生物学报*, 2012, 52(7): 875–884.  
Zhang LN, Hao CB, Wang LH, Li SY, Feng CP. Characteristics of the eukaryotic community structure in acid mine drainage lake in Anhui province, China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(7): 875–884. (in Chinese)
- [23] 曹子敏, Joseph Frazer Banda, 裴理鑫, 卫朋飞, 辛瑞瑞, 董慧渊, 郝春博. 安徽某铁矿不同矿山废水库中微生物群落结构特征. *微生物学报*, 2019, 59(6): 1076–1088.  
Cao ZM, Banda J, Pei LX, Wei PF, Xin RR, Dong HY, Hao CB. Microbial community structure characteristics in different mine drainage lakes of an iron mine in Anhui province. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(6): 1076–1088. (in Chinese)
- [24] Steinberg CEW, Schäfer H, Beisker W. Do acid-tolerant cyanobacteria exist? *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 1998, 26(1): 13–19.
- [25] Messerli MA, Amaral-Zettler LA, Zettler E, Jung SK, Smith PJS, Sogin ML. Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. *The Journal of Experimental Biology*, 2005, 208(Pt 13): 2569–2579.
- [26] Baker-Austin C, Dopson M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(4): 165–171.
- [27] Gimmler H, Weis U, Weis C, Kugel H, Treffny B. *Dunaliella acidophila* (Kalina) Masyuk—an alga with a positive membrane potential. *New Phytologist*, 1989, 113(2): 175–184.
- [28] Gimmler H, Schieder M, Kowalski M, Zimmermann U, Pick U. *Dunaliella acidophila*: an algae with a positive zeta potential at its optimal pH for growth. *Plant, Cell & Environment*, 1991, 14(3): 261–269.
- [29] Gimmler H, Weis U. *Dunaliella acidophila*-life at pH 1.0 In: Avron M, Ben Amotz A (eds) *Dunaliella*. Physiology, biochemistry and biotechnology. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1992.
- [30] Sekler I, Gläser HU, Pick U. Characterization of a plasma membrane H(+)-ATPase from the extremely acidophilic alga *Dunaliella acidophila*. *The Journal of Membrane Biology*, 1991, 121(1): 51–57.
- [31] Weiss M, Pick U. Primary structure and effect of pH on the expression of the plasma membrane H(+)-ATPase from *Dunaliella acidophila* and *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*, 1996, 112(4): 1693–1702.
- [32] Canonaco F, Schlattner U, Pruett PS, Wallimann T, Sauer U. Functional expression of phosphagen kinase systems confers resistance to transient stresses in *Saccharomyces cerevisiae* by buffering the ATP pool. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(35): 31303–31309.
- [33] Canonaco F, Schlattner U, Wallimann T, Sauer U. Functional expression of arginine kinase improves recovery from pH stress of *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(13): 1013–1017.
- [34] Hirooka S, Hirose Y, Kanesaki Y, Higuchi S, Fujiwara T, Onuma R, Era A, Ohbayashi R, Uzuka A, Nozaki H, Yoshikawa H, Miyagishima SY. Acidophilic green algal genome provides insights into adaptation to an acidic environment. *PNAS*, 2017, 114(39): E8304–E8313.
- [35] Catalanotti C, Yang WQ, Posewitz MC, Grossman AR. Fermentation metabolism and its evolution in algae. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 150.
- [36] Gerloff-Elias A, Barua D, Mölich A, Spijkerman E. Temperature- and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*. *FEMS Microbiology*

- Ecology*, 2006, 56(3): 345–354.
- [37] Balkos KD, Colman B. Mechanism of CO<sub>2</sub> acquisition in an acid-tolerant *Chlamydomonas*. *Plant, Cell & Environment*, 2007, 30(6): 745–752.
- [38] Gross W. Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. *Hydrobiologia*, 2000, 433: 31–37.
- [39] Novis, PM, Harding, JS. Extreme acidophiles: freshwater algae associated with acid mine drainage. Netherlands: Springer, 2007.
- [40] Diaz MM, Maberly SC. Carbon-concentrating mechanisms in acidophilic algae. *Phycologia*, 2009, 48(2): 77–85.
- [41] Spijkerman E. Inorganic carbon acquisition by *Chlamydomonas acidophila* across a pH range. *Canadian Journal of Botany*, 2005, 83(7): 872–878.
- [42] Das BK, Roy A, Koschorreck M, Mandal SM, Wendt-Potthoff K, Bhattacharya J. Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization. *Water Research*, 2009, 43(4): 883–894.
- [43] Aguilera A, Amils R. Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (*Chlorophyta*) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). *Aquatic Toxicology*, 2005, 75(4): 316–329.
- [44] Samadani M, Perreault F, Oukarroum A, Dewez D. Effect of cadmium accumulation on green algae *Chlamydomonas reinhardtii* and acid-tolerant *Chlamydomonas* CPCC 121. *Chemosphere*, 2018, 191: 174–182.
- [45] Karsten U, Schumann R, Mostaert A. Algae and cyanobacteria in extreme environment. Dordrecht, Netherlands: Springer, 1994.
- [46] Beech IB, Sunner J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(3): 181–186.
- [47] García-Meza JV, Barrangue C, Admiraal W. Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(3): 573–581.
- [48] Halter D, Casiot C, Heipieper HJ, Plewniak F, Marchal M, Simon S, Arsène-Ploetze F, Bertin PN. Surface properties and intracellular speciation revealed an original adaptive mechanism to arsenic in the acid mine drainage bio-indicator *Euglena mutabilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(4): 1735–1744.
- [49] Nishikawa K, Yamakoshi Y, Uemura I, Tominaga N. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (*Chlorophyta*) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 44(2): 253–259.
- [50] Olsson S, Penacho V, Puente-Sánchez F, Díaz S, Gonzalez-Pastor JE, Aguilera A. Horizontal gene transfer of phytochelatin synthases from bacteria to extremophilic green algae. *Microbial Ecology*, 2017, 73(1): 50–60.
- [51] Docampo R, Huang GZ. Acidocalcisomes of eukaryotes. *Current Opinion in Cell Biology*, 2016, 41: 66–72.
- [52] Yagisawa F, Nishida K, Yoshida M, Ohnuma M, Shimada T, Fujiwara T, Yoshida Y, Misumi O, Kuroiwa H, Kuroiwa T. Identification of novel proteins in isolated polyphosphate vacuoles in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *The Plant Journal*, 2009, 60(5): 882–893.
- [53] Spijkerman E, Barua D, Gerloff-Elias A, Kern J, Gaedke U, Heckathorn SA. Stress responses and metal tolerance of *Chlamydomonas acidophila* in metal-enriched lake water and artificial medium. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2007, 11(4): 551–562.
- [54] Wendt-Potthoff K, Neu TR. Environmental Science. Berlin, Heidelberg: Springer, 1998.
- [55] Davison W, George DG, Edwards NJA. Controlled reversal of lake acidification by treatment with phosphate fertilizer. *Nature*, 1995, 377(6549): 504–507.
- [56] Jacinto MLJAJ, David CPC, Perez TR, De Jesus BR. Comparative efficiency of algal biofilters in the removal of chromium and copper from wastewater. *Ecological Engineering*, 2009, 35(5): 856–860.
- [57] Bwapwa JK, Jaiyeola AT, Chetty R. Bioremediation of acid mine drainage using algae strains: a review. *South African Journal of Chemical Engineering*, 2017, 24: 62–70.
- [58] Orandi S, Lewis DM. Biosorption of heavy metals in a photo-rotating biological contactor—a batch process study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(11): 5113–5123.
- [59] Phillips P, Bender J, Simms R, Rodriguez-Eaton S, Britt C. Manganese removal from acid coal-mine

- drainage by a pond containing green algae and microbial mat. *Water Science and Technology*, 1995, 31(12): 161–170.
- [60] Fortin D, Prahraj T. Role of microbial activity in Fe and S cycling in sub-oxic to anoxic sulfide-rich mine tailings. *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences*, 2005, 6(1): 39–42.
- [61] Nancuqueo I, Johnson DB. Production of glycolic acid by chemolithotrophic iron- and sulfur-oxidizing bacteria and its role in delineating and sustaining acidophilic sulfide mineral-oxidizing consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(2): 461–467.
- [62] Johnson DB, Kanao T, Hedrich S. Redox transformations of iron at extremely low pH: fundamental and applied aspects. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 96.
- [63] Nancuqueo I, Johnson DB. Significance of microbial communities and interactions in safeguarding reactive mine tailings by ecological engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(23): 8201–8208.
- [64] Thisani SK, Kallon DVV, Byrne P. Geochemical classification of global mine water drainage. *Sustainability*, 2020, 12(24): 10244.
- [65] Abinandan S, Subashchandrabose SR, Venkateswarlu K, Megharaj M. Microalgae-bacteria biofilms: a sustainable synergistic approach in remediation of acid mine drainage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(3): 1131–1144.
- [66] Ayala-Parra P, Sierra-Alvarez R, Field JA. Algae as an electron donor promoting sulfate reduction for the bioremediation of acid rock drainage. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 317: 335–343.
- [67] Van Der Graaf CM, Sánchez-España J, Yusta I, Ilin A, Shetty SA, Bale NJ, Villanueva L, Stams AJM, Sánchez-Andrea I. Biosulfidogenesis mediates natural attenuation in acidic mine pit lakes. *Microorganisms*, 2020, 8(9): 1275.
- [68] Russell RA, Holden PJ, Wilde KL, Neilan BA. Demonstration of the use of *Scenedesmus* and *Carteria* biomass to drive bacterial sulfate reduction by *Desulfovibrio alcoholovorans* isolated from an artificial wetland. *Hydrometallurgy*, 2003, 71(1/2): 227–234.
- [69] Hirooka S, Higuchi S, Uzuka A, Nozaki H, Miyagishima SY. Acidophilic green alga *Pseudochlorella* sp. YKT1 accumulates high amount of lipid droplets under a nitrogen-depleted condition at a low-pH. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107702.
- [70] Cuaresma M, Casal C, Forján E, Vilchez C. Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(1): 167–177.
- [71] Vaquero I, Vázquez M, Ruiz-Domínguez MC, Vilchez C. Enhanced production of a lutein-rich acidic environment microalga. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(4): 839–850.
- [72] Escudero A, Blanco F, Lacalle A, Pinto M. Ammonium removal from anaerobically treated effluent by *Chlamydomonas acidophila*. *Bioresource Technology*, 2014, 153: 62–68.

**郝春博**, 中国地质大学(北京)水资源与环境学院教授, 博士生导师。2003年毕业于南京大学环境学院, 获硕士学位。2006年毕业于中国科学院生态环境研究中心, 获博士学位。2009年6–9月在香港大学地球科学系任访问学者。2013年入选北京高等学校“青年英才计划”。2017年11月-2018年12月在美国迈阿密大学微生物学系任访问学者。主要研究方向为环境微生物学、矿山环境的生物修复。主持国家自然科学基金重大研究计划项目、教育部博士点基金等科研项目 20 余项; 在 *Environmental Pollution*、*Science of the Total Environment*、*Extremophiles* 等杂志上发表学术论文 20 多篇。

