

安徽某铁矿酸性矿山废水中真核生物的群落结构特征

张丽娜^{1,2}, 郝春博^{1,2*}, 王丽华^{1,2}, 李思远^{1,2}, 冯传平^{1,2}

¹中国地质大学(北京), 地下水循环与环境演化教育部重点实验室, 北京 100083

²中国地质大学(北京), 水资源与环境学院, 北京 100083

摘要: 【目的】研究酸性矿山废水中真核生物的群落结构特征以及群落结构与环境因子之间的关系。【方法】利用分子生物学方法, 通过构建 18S rRNA 基因克隆文库进行系统发育分析; 利用典范对应分析 (CCA) 方法解析环境因子对真核生物群落结构的影响。【结果】系统发育分析表明: 子囊菌门 (Ascomycota) 普遍存在于 4 个样品中, 并在样品 1 和样品 3 中占统治地位, 而绿藻门 (Chlorophyta) 和担子菌门 (Basidiomycota) 分别为样品 2 和样品 4 的优势类群。该酸性矿山废水中的克隆与许多已知的耐酸耐重金属真核生物亲缘关系较近, 如 *Sarcinomyces petricola*、*Penicillium janthinellum*、*Coniochaeta velutina*、*Trichoderma viride*、*Chlorella protothecoides* var. *acidicola*、*Ochromonas* sp. 等。此外, 样品中还存在大量的已知人类病原菌, 如 *Lecythophora hoffmannii*、*Cryptococcus neoformans*。CCA 分析表明: TN、 SO_4^{2-} 、 Fe^{2+} 、Eh 是影响真核生物群落空间分布的主要因素。【结论】所研究的酸性矿山废水中真核生物的群落结构在时间和空间上均有较大差异, 这可能与水体的理化性质有关; 高含量人类致病菌的存在是之前研究所未发现的; 酸性环境中真核生物的生态学研究有助于开发高效处理酸性矿山废水的方法。

关键词: 酸性矿山废水, 真核生物, 群落结构, 环境因子

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 07-0875-10

近年来, 随着金属硫化矿的大量开采, 暴露于地表的硫化矿物与水、大气及微生物相互作用而形成的酸性矿山废水 (acid mine drainage, AMD) 已严重污染了当地环境。酸性矿山废水 pH 通常低于 3, 并含有高浓度的 Fe, Al, Cu, As 等金属离子以及 SO_4^{2-} , 一般不能直接循环利用, 是人类矿业活动的主要污染物之一^[1]。由于嗜酸微生物可以通过氧化二价铁或还原态硫来获得能量并加速硫化矿物的溶解, 因此它们在 AMD 的形成过程中起着主要的作用^[2]。嗜酸菌种类丰富, 在三域中均有分布。关于

嗜酸菌分子生态学的研究工作在国际上才刚刚起步, 研究较深入的有美国 Iron Mountain, 以及西班牙 Río Tinto River 等少数典型酸性矿山废水区域^[3-4]。

一直以来人们对嗜酸菌的研究主要集中于参与铁硫循环的细菌^[3], 例如 *Leptospirillum ferrooxidans*、*Acidithiobacillus ferrooxidans* 和 *Acidiphilium* spp., 并且普遍认为原核生物中的嗜酸种类相对较多。然而, 近年来国外的一些研究却发现, 在某些极端酸性环境中真核生物的丰度比原核生物更高^[4]。目前国内研究较为深入的嗜酸菌均为原核微生物 (细菌

基金项目: 国家自然科学基金 (40802059); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2010ZD03, 2011YX1035)

* 通信作者。E-mail: hao20709@yahoo.com.cn

作者简介: 张丽娜 (1986-), 女, 山东人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物方面的研究。E-mail: zlena8023@gmail.com

收稿日期: 2012-02-17; **修回日期:** 2012-04-21

和古菌),主要是氧化亚铁硫杆菌和氧化硫硫杆菌等少数几种湿法冶金用的菌种,而对酸性环境中真核生物生态学的研究还相对甚少。

本研究中的酸性矿山废水(AMD)位于安徽某铁矿附近。在前期研究中,我们已对该 AMD 中原核生物的群落结构进行了系统分析^[5]。为了更全面系统地认识该酸性环境中嗜酸微生物的群落结构特征以及它们与环境因子的关系,我们采用分子生物学技术及典范对应分析(CCA)方法对该 AMD 中真核生物的群落结构进行解析,该结果不仅扩展了我们对酸性生态系统中嗜酸微生物多样性的了解,而且为设计高效修复酸性矿山废水的策略提供依据。

1 材料和方法

1.1 样品的采集及分析

样品采集于安徽某铁矿的酸性矿山废水库。该矿山中含有大量的硫化矿物,矿山开采过程中所产生的废矿石在排土场经过长年雨水侵蚀及微生物的作用,产生了大量酸性废水并在低洼处形成一封闭型酸水库。该酸水库东西宽约为 300 m,南北长约 700 m,库容量达 3000000 m³,严重污染周边环境并威胁到矿山的安全生产。

为研究酸性矿山废水中嗜酸微生物的空间变化(嗜酸微生物与环境因子间的关系),于 2010 年 10 月采集了酸水库周围 4 个不同位点的表层水样。采样点距离库边约 0.5 m,深度为 0.4 - 0.6 m。采样期正值当地秋季,温度在 20℃ 左右,而且经过长江中下游地区 7 - 9 月的雨季,因此酸水库水位较高。水样温度、pH、氧化还原电位及溶解氧(DO)等物化参数现场测定。水样采后储存于 4℃ 保温箱中,尽快返回实验室进行操作。

1.2 基因组 DNA 的提取

取 4 个水样各 1 L 分别于 0.22 μm 细菌滤膜上进行真空抽滤,将滤膜浸泡于 5 mL 0.02 mol/L H₂SO₄中,超声波振荡 10 min,使膜上细胞完全进入溶液中。10000 × g 离心 3 min 收集菌体。然后用基因组 DNA 提取试剂盒分别提取 4 个水样中的总 DNA(参照 MP bio 试剂盒生产商建议的步骤)。最后将提取的总 DNA 于 -20℃ 下保存。

1.3 18S rDNA 基因片段的扩增

以基因组 DNA 为模板,利用真核细菌通用引物

对 Euk-817F (5'-TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA-3') 和 Euk-1536 (5'-ATTGCAATGCYCTATCCCCA-3') 分别扩增 4 样品中真核微生物的 18S rDNA 基因片段。PCR 扩增反应条件按照之前所描述的^[6-7]进行。

1.4 克隆文库的构建

PCR 产物经 EZ-10 DNA 凝胶提取试剂盒(BBI)纯化后连接到 pGEM-T 克隆载体(Promega 公司)上,然后按照生产商的说明将质粒转化到 *E. coli* DH5α 细胞中构建 4 个真菌样品的克隆文库。利用载体特异性引物对 T7 (5'-TAATACGACTCAC TATAGGGC-3') 和 SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTA TAGAATACTC-3') 进行 PCR 扩增验证插入片段的大小,筛选阳性克隆。并用两种限制性内切酶(*Hha* I 和 *Msp* I)进行酶切分析,确定 ARARA 类型数目,然后将典型的代表克隆送交上海生工进行测序。

1.5 系统发育分析

运用 Bellerophon 程序对获得的序列进行嵌合体检验。然后用 Dotur 软件对所得序列进行分类。最后运用 Blast 程序将所得序列在 GenBank 数据库中进行相似性搜索,将所有序列用 BioEdit 中的 ClustalW 程序进行比对,并用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。

1.6 数据分析

采用 Canoco for Windows 4.5 软件对微生物群落和环境因子进行典范对应分析(CCA)。CCA 是一种直接分析与环境因子相关的物种的非线性多元直接梯度分析方法^[8],主要用于研究微生物群落与环境因子之间的关系。CCA 分析之前,物种数据和环境数据均用 lg(X + 1) 进行转换,使其趋于正态分布^[9-10]。由于许多环境参数是密切相关的,所以我们缩减了环境变量个数,有利于简化对结果的解释。

1.7 序列登录号

本研究所得序列均已提交 GenBank 中,序列登录号为 JQ316139-JQ316170。

2 结果和分析

2.1 酸性矿山废水样品的理化特性

表 1 为 2010 年 10 月 4 个酸性矿山废水样品的理化参数。分析发现,该酸性矿山废水中含有高浓

度的金属离子, 其中金属 Al 的含量最高, 达 1.02 g/L。Fe_{tot} 的含量为 48.0 - 57.5 mg/L, 而且以三价铁为主, Fe²⁺ 的浓度较低 (0.4 - 0.7 mg/L), 说明水体中大部分 Fe²⁺ 已被嗜酸菌氧化为 Fe³⁺ [11]。由于 Fe³⁺ 的大量存在, 水体的 Eh 也相对较高, 约 583.2 - 573.1 mV。水体中的阴离子主要为 SO₄²⁻, 其含量均在 1.0g/L 以上, 而我国地表水质量标准仅为 250 mg/L [12]。由此可见, 该酸性矿山废水对周边农田及居民饮用水造成了严重威胁。

表 1 四个酸性矿山废水样品的地球化学参数

Table 1 Physico-chemical characteristics of the four acidic mine drainage samples, Anhui, China

Sample	AMD-1	AMD-2	AMD-3	AMD-4
T/°C	20.2	19.9	20.6	21.0
pH	2.9	2.8	2.9	2.8
Eh/mV	583.2	547.6	573.1	565.8
c(DO)/(mg/L)	6.53	5.65	7.42	6.21
c(TDS)/(g/L)	4.02	4.04	4.03	4.03
c(TOC)/(mg/L)	6.4	5.3	2.9	4.7
c(TIC)/(mg/L)	1.0	1.1	1.0	1.1
c(TN)/(mg/L)	18.2	19.4	18.5	20.4
c(TP)/(mg/L)	0.59	0.71	0.85	0.6
Salinity/%	5.0	5.0	5.0	5.0
c(Fe _{tot})/(mg/L)	57.0	57.5	48.0	54.7
c(Fe ²⁺)/(mg/L)	0.4	0.7	0.5	0.6
c(Al)/(g/L)	1.02	0.85	0.82	0.85
c(Ca)/(g/L)	0.52	0.43	0.48	0.43
c(Cu)/(mg/L)	48.0	40.5	38.8	42.7
c(Mn)/(g/L)	0.24	0.21	0.21	0.22
c(Na)/(mg/L)	41.2	40.0	43.6	42.2
c(SO ₄ ²⁻)/(g/L)	1.09	1.11	1.07	1.16

DO = Dissolved Oxygen; TDS = Total Dissolved Solids; TOC = Total Organic Carbon; TIC = Total Inorganic Carbon; TN = Total Nitrogen; TP = Total Phosphorus.

与大多数酸性矿山废水的寡营养环境相比 [11], 本研究中酸性矿山废水的氮磷含量水平较高, TN 平均为 19.13 mg/L, TP 则平均为 0.69 mg/L, 这可能主要来自于岸边的废矿石和植物根际的土壤。

2.2 18S rDNA 基因文库的 ARDRA 分型结果

将 4 个样品筛选出的阳性克隆, 通过 *Hha*I 和 *Msp*I 双酶切进行 ARDRA 分析, 共得到 70 种存在差异的酶切图谱类型。挑选代表不同 ARDRA 型的克隆进行测序, 同时考虑内切酶本身的局限性, 增加了优势图谱类型的测序数量, 共得到 86 个 DNA 序列, 其中 AMD-1 为 33 个, AMD-2 为 15 个, AMD-3 为 30 个, AMD-4 为 18 个。运用 Bellerophon 程序检验并

剔除明显的嵌合体后, 利用 Dotur 软件对有效序列进行分析, 共分成 47 个 OTUs (操作分类单位, operational taxonomic units) (表 2), 其中 AMD-1, AMD-2, AMD-3, AMD-4 分别为 17, 7, 15, 8 个 OTUs, 表明 AMD-1 和 AMD-3 的丰度相对较高。

表 2 四个真菌克隆文库的多样性指数

Table 2 Diversity indices of the four eukaryotic clone libraries from acidic mine drainage lake, Anhui, China

Clone library	Total clones	Number of OTUs	Coverage (C)*	Shannon (H)
AMD-1	33	17	80.3%	2.42
AMD-2	15	7	88.9%	1.98
AMD-3	30	15	81.6%	2.74
AMD-4	18	8	86.4%	2.14

* Coverage (C) = 1 - (n/N) (n = the number of a clone being only contained in OTUs, N = total sequence number).

2.3 系统发育学分析

将每个 OTUs 的代表序列在 GenBank 数据库中进行相似性搜索得出, 4 个真菌克隆文库的 18S rDNA 基因序列共分属 10 个类群 (图 1): Ascomycota、Basidiomycota、Ciliophora、Chlorophyta、Lycopodiophyta、Chrysophyta、Arthropoda、Nematoda、Chytridiomycota、Alveolata。从图 1 中可以看出, Ascomycota 门普遍存在于 4 个样品中, 并且在 AMD-1 和 AMD-3 文库中占优势地位, 分别占 72.3%, 47.4%。而 Chlorophyta 门和 Basidiomycota 门分别为 AMD-2 和 AMD-4 的优势类群, 所占比例分别为 62.9%、50.0%。

为了进一步了解这些序列的系统发育地位, 采用邻接法和最大简约法, 用 MEGA 4.0 软件构建了 4 个样品的系统发育树 (图 2 和图 3)。

从图 2 中可以看出, 该酸性矿山废水中的真核生物与许多已知的耐酸耐重金属真菌亲缘关系较近, 如: Ascomycota (子囊菌门) 中与克隆 AMD-1-23、AMD-3-29 密切联系的 *Sarcinomyces petricola*, 是 Wollenzien [13] 等人首次从地中海盆地大理石上分离出来的一株具有分生组织状结构的黑酵母。这种分生组织状结构常在低 pH 等逆境中形成 [14], 可抵抗紫外线、高渗胁迫及重金属毒害等极端环境。进化树上, AMD-1-28、AMD-3-50 与 *Penicillium janthinellum* 聚为一簇 (同源率为 99%)。 *Penicillium janthinellum* 菌株 GXCR 对较高浓度的单一或多种重金属离子组合具有高抗性和高吸附性, 是目前国

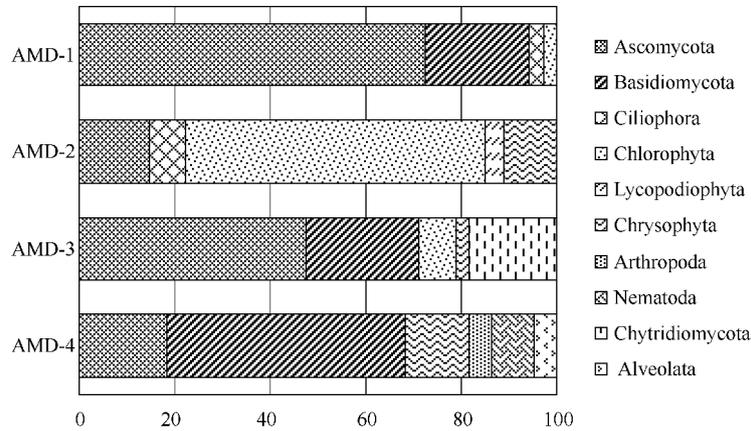


图 1 四个真菌文库中各种群所占的比例

Fig. 1 Relative proportions of major groups in the four eukaryotic clone libraries. The proportion was calculated from the number of clone sequences belonging to a particular group divided by the total number of clone sequences.

内公开文献报道中对废水重金属吸附量最高的微生物。与 AMD-1-58 聚为一类的 *Coniochaeta velutina* (同源性达 97%)，主要存在于动物粪便、树木及含极低 pH 和高浓度重金属的水体中^[15]。此外，AMD-3-34 与 *Hypocrea koningii* / *Trichoderma viride* 的亲缘关系较近。*Trichoderma viride* 可对含锌重金属废水中的 Zn^{2+} 有一定的耐受性而且吸附载量高、沉降效果好^[16]，并能降解有机氯，对有机污染的环境具有一定的生物修复作用^[17]。

Chlorophyta (绿藻门) 中，克隆 AMD-1-13 在 AMD-2 文库中占统治地位 (62.9%)，在 AMD-1 文库中仅占 1.7%。系统发育树上与 AMD-1-13 聚为一类的 *Chlorella protothecoides* var. *acidicola* 是一种耐酸藻，最初分离自 pH 非常低的土壤^[18]。文库中高含量 *Chlorella protothecoides* var. *acidicola* 的存在与 Mário Gadanho^[19] 等人的研究结果相吻合，他们曾利用分子克隆与 TGGE 相结合的方法从伊比利亚硫铁矿带 (极低 pH 值并含有高浓度的重金属离子) 发现大量的该类物种存在。这表明此类绿藻能抵抗这种极端恶劣的环境，暗示着 *Chlorella protothecoides* 类物种可能广泛分布在低 pH 环境中^[20]。

在图 3 中，克隆 AMD-2-27 在 AMD-2, AMD-3, AMD-4 中均有分布，分别为 11.1%、2.6%、13.6%。进化树上与 AMD-2-27 密切联系的 *Ochromonas* sp.，在极端酸性湖水的浮游食物链中，是重要的细菌食植者^[21-22]。该属物种为混合营养型，但在酸性湖水变温层，主要通过异养生长来影响变温层中细菌的

生存率，表明该属物种能够自上而下控制细菌的群落结构^[23]。与克隆 AMD-4-30 聚为一类的 *Anurida maritime* 是潮间带和岩石海岸重要的食腐动物，在高潮期可产生信息聚集素形成聚合体进行避难^[24]。*Gomphiocephalus hodgsoni* 主要生存于低温环境中，是一种避免冻结的昆虫，可以利用热滞活性和大量的甘油来降低其冷却点^[25]。同时，在本研究中还发现少量的 Ciliophora 类微生物，主要分布于 AMD-1 和 AMD-2 文库中，分别占 3.4%、7.4%。其中 *Oxytricha* sp. 不仅可以通过捕食原核嗜酸微生物来影响黄铁矿的氧化速率及 AMD 的形成速率，而且可以与军团菌 (一种可导致人类肺炎的强烈致病菌) 内共生，致使该致病菌能够抵抗干燥以及类似 AMD 的极端环境^[26]。这揭示了前期对该水体中原核生物的研究中所发现的少量军团菌存在的原因^[5]。

此外，该酸性矿山废水中还存在与人类致病菌相关的真核生物，如 *Lecythophora hoffmannii* (AMD-1-4)、*Cryptococcus* sp. (AMD-4-1)、*Nigrospora oryzae* (AMD-1-8)、*Magnaporthe grisea* (AMD-1-65)、*Phoma* sp. (AMD-1-12)、*Puccinia hordei* (AMD-3-23) 等。其中，克隆 AMD-1-4 在 AMD-1 文库中占统治地位，约 36.0%。进化树上与 AMD-1-4 亲缘关系较近的 *Lecythophora hoffmannii* / *Coniochaeta velutina* 是已知的人类病原体，可感染艾滋病患者引起慢性鼻炎等^[27]。主要分布于动物粪便、造纸材料、树木、土壤甚至 pH 值极低并含有高浓度重金属的水体

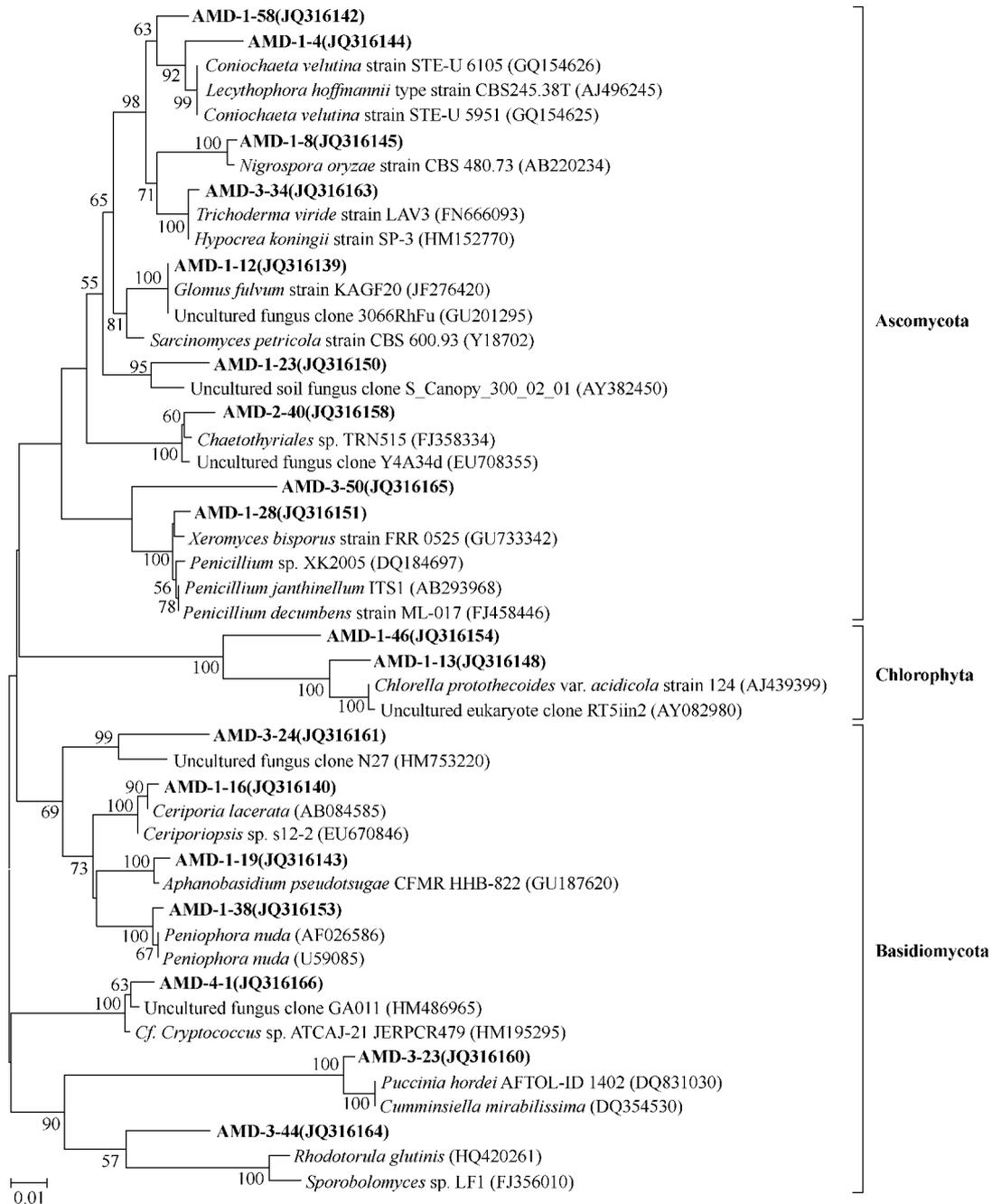


图 2 四个酸性矿山废水样品中占优势的真核生物 18S rDNA 基因序列系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining tree based on analysis of the 18S rDNA gene sequences showing the phylogenetic relationships among the dominant species of the four eukaryotic clone libraries from the acidic mine drainage lake. The scale bars 0.01 indicate the Jukes-Cantor distances. Bootstrap values of > 50% (for 1000 iterations) are shown.

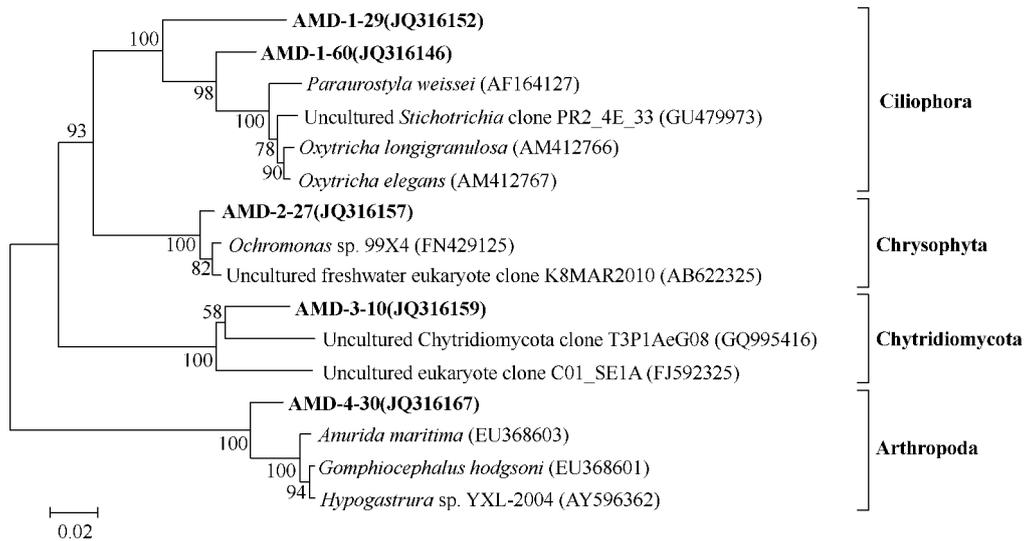


图3 四个真菌克隆文库中其他真核生物 18S rDNA 基因序列系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree based on analysis of the 18S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships among the other species of the four eukaryotic clone libraries from the acidic mine drainage lake. The scale bars 0.02 indicate the Jukes-Cantor distances. Bootstrap values of > 50% (for 1000 iterations) are shown.

中^[28-31]。

同样地, AMD-4-1 与 *Cryptococcus* sp. 同源性高达 98%, 在 AMD-4 文库中占统治地位, 约占 45.5%。*Cryptococcus neoformans* 是临床上常见的病原真菌, 主要感染免疫缺陷患者 (AIDS 和接受免疫抑制治疗的患者), 引起严重的大脑和脊髓疾病。主要分为 *C. neoformans* var. *neoformans*、*C. neoformans* var. *grubii* 和 *C. neoformans* var. *gattii* 3 种变异株, 其中 *C. neoformans* var. *neoformans* 的全基因组序列已于 2005 年被解读^[32]。*Cryptococcus neoformans* 主要存在于被鸟粪污染的土壤中, 最近的相关研究发现该种及相关的真菌可以 β 射线为能源在切尔诺贝利核电站融化反应堆的废墟中生长^[33]。此外, *Cryptococcus laurentii* 和 *Cryptococcus albidus* 偶尔会对免疫力受损的病人造成中度或严重的疾病^[34]。*Cryptococcus albidus* 与 AMD-4-1 的同源性高达 98%, 主要分离自空气、葡萄牙的干苔藓等^[35]。目前, 国内外关于 *Cryptococcus* 类物种生态分布的研究还不透彻, 本研究中高含量的 *Cryptococcus* 类微生物存在于酸性极端环境中之前未见有报道。因此, 该结果拓展了此类微生物的生存范围, 并为此类物种的生态学研究提供依据。

2.4 群落结构与环境因子之间的关系

通过 CCA 分析可以洞察微生物群落结构特征

以及与环境因子之间的关系。初始的去趋势对应分析 (DCA) 得到轴 1 的最大梯度为 2.767, 考虑到该研究中物种数据的特点, 故选择单峰模型继续进行分析。图 4 为该酸性矿山废水中真核生物种类与环

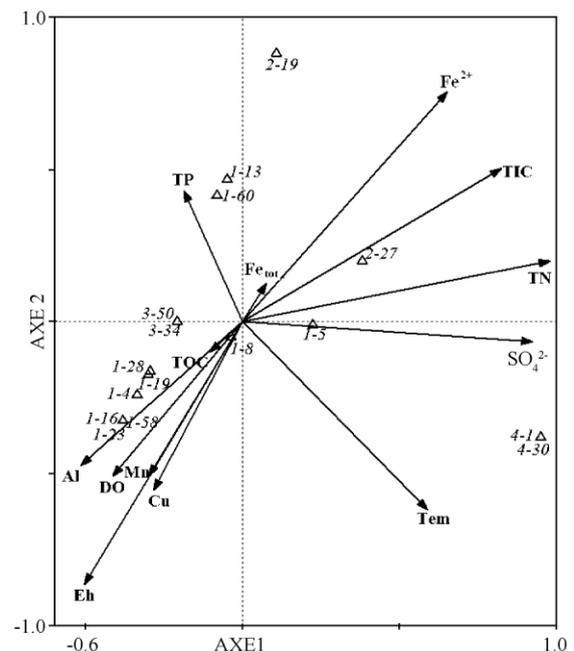


图4 四个酸性矿山废水样品中真核生物物种与环境因子的 CCA 排序图

Fig. 4 The canonical correspondence analysis showing the relationship among the eukaryotic species and environmental factors in the four acidic mine drainage samples.

境变量的 CCA 排序图, 两个主要轴(轴 1 和轴 2) 的特征值分别为 0.579 和 0.380。从排序图上可以明显反映出主要的 16 种真核生物对环境条件的不同适应特点。

从排序结果可以得到, TN 和 SO_4^{2-} 与 CCA 第一排序轴呈最大正相关(相关系数分别为 0.9789、0.9238), Fe^{2+} 与 CCA 第二排序轴呈最大正相关($r = 0.7545$), 而 Eh 与第二排序轴呈最大负相关($r = -0.8638$)。这表明, 酸性矿山废水中真核生物的群落结构和空间分布的主要影响因素包括 TN(总氮)、 SO_4^{2-} 、 Fe^{2+} 、Eh。此外, 还可发现 AMD-1 和 AMD-3 的群落结构特征基本类似, 大多数序列的存在与水体中高浓度的重金属离子相关, 而 AMD-2 和 AMD-4 文库中的多数序列则与水体中高含量的有机物及 SO_4^{2-} 相关。

3 讨论

在前期研究中, 我们已利用分子生物学方法对 2009 年 6 月 26 日(当地夏季) 该酸性矿山废水湖泊中真核生物的群落结构特征进行了研究, 结果表明 09 年夏季样品中的真核生物只存在 3 个序列类型: *Oxytricha* sp., *Nuclearia* sp. 和 *Penicillium* sp.^[36]。而 2010 年秋季样品中的真核生物分属 10 个类群。因此, 2010 年秋季样品中真核生物的丰度明显比 2009 年夏季样品高。此外, 在 2010 年秋季样品中, 子囊菌门(Ascomycota) 为 AMD-1 和 AMD-3 的优势种群, 绿藻门(Chlorophyta) 和担子菌门(Basidiomycota) 分别为 AMD-2 和 AMD-4 的优势类群。而 2009 年夏季样品的优势物种纤毛门(Ciliophora) 中的 *Oxytricha* sp. (83.3%)^[36], 在 2010 年秋季中所占的比例却非常低(在 AMD-1 和 AMD-2 文库中分别仅占 3.4%、7.4%)。这主要与两个采样季温度的变化有关。纤毛类原生动物的最适生长温度为 25–35℃, 在 25℃ 以下很难生长, 而 2010 年秋季的采样温度仅为 20℃ 左右, 这在很大程度上抑制了这类生物的生长。这一结果也证实了 2010 年秋季原核生物群落中军团菌数量降低的原因^[5], 即军团菌可以通过与真核原生物(*Oxytricha* sp.) 内共生来抵抗类似 AMD 的极端环境^[36], 因此少量的原生动物决定了军团菌的低丰富性。

此外, 本研究的酸性废水中还存在着一定数量的藻类, 如 *Chlorella protothecoides* var. *acidicola* 和 *Ochromonas* sp., 这是 2009 年夏季所未检测到的。其中 *Chlorella protothecoides* var. *acidicola* 在 AMD-2 文库中占统治地位(约 62.9%)。这类嗜酸小球藻最早是由 Pinto 在研究意大利酸性土壤中的真核微生物时发现的, 而且该属藻类在 30℃ 以下、pH 1.8–2.5 的生境中占优势地位^[37]。2010 年秋季采样时特定的物理化学条件, 导致光合藻类在该酸性矿山废水库中较为丰富。首先, 经过夏季的强烈降雨(约占全年降水量的 46%)^[38], 秋季酸性矿山废水库的水位已达全年最高, 这在很大程度上稀释了酸水中铁的浓度。与 2009 年夏季相比, 该水体的 Fe_{tot} 浓度下降了近 50%^[36]。总铁浓度的大幅度下降, 可使水体的透光率提高, 从而有利于藻类生物进行光能自养生长。其次, 由于降水的稀释作用, 该酸性矿山废水库的盐度已由夏季的 7.6% 下降至 5%, 而 *Chlorella protothecoides* var. *acidicola* 的盐度耐受上限也恰为 5%^[39]。第三, 与大多数酸性矿山废水的寡营养环境相比^[11], 该酸性矿山废水中的氮磷含量较高, 这为藻类生物的生长创造了良好的条件。而且 2010 年秋季酸水库中的 TN 水平比 2009 年夏季有了明显的上升, 达 18.2–20.4 mg/L, 这甚至比普通富营养化湖泊发生水华时还高(1.09–3.08 mg/L)^[40]; TP (0.59–0.85 mg/L) 也比德国同类型的 AMD 湖泊高 3 个数量级(5 μg/L 左右)^[41]。如此高浓度的营养物质, 可能是岸边废矿石或植物根际土壤经夏季雨水大量冲刷而汇入水库中造成的。

最后, 本研究中我们首次在酸性生态系统(AMD-1 和 AMD-4) 中检测出大量的人类致病菌(*Cryptococcus* sp.、*Lecythophora hoffmannii*)。这可能与周围被相关污染源污染的土壤、废矿石有关, 它们随雨水的冲刷而汇入该酸性废水库中。其次, 在真核生物中, 真菌可以通过与其他微生物形成生物膜来隔离特定的金属。该生物膜是金属和矿物沉淀的场所并可为其他微生物群提供生存基质, 从而可导致低耐受性物种大量存在, 这一特性在极端环境中是非常重要的^[19]。这一发现拓展了该类物种的生存范围, 但其具体的生存机制还需要做进一步的研究。

参考文献

- [1] Johnson DB, Hallberg KB. Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of the Total Environment*, 2005, 338: 3-14.
- [2] Johnson DB, Hallberg KB. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*, 2003, 154: 466-473.
- [3] González-Toril E, Llobet-Brossa E, Casamayor EO, Amann R, Amils R. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 4853-4865.
- [4] Zettler LAA, Zettler ER, Theroux SM, Palacios C, Aguilera A, Amils R. Microbial community structure across the tree of life in the extreme Río Tinto. *International Society for Music Education*, 2011, 5: 42-50.
- [5] Chunbo Hao, Lina Zhang, Lihua Wang, Siyuan Li, Hailiang Dong. Microbial community composition in acid mine drainage lake of Xiang Mountain sulfide mine in Anhui Province, China. *Geomicrobiology Journal*, 2011, in press.
- [6] Bruneel O, Duran R, Casiot C, Elbaz PF, Personné JC. Diversity of microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoulès, France. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 551-556.
- [7] Borneman J and Hartin RJ. PCR primers that amplify fungal Rna genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 4356-4360.
- [8] 栾青杉, 孙军, 宋书群, 沈志良, 俞志明. 长江口夏季浮游植物群落与环境因子的典范对应分析. *植物生态学报 (Acta Phytocologica Sinica)*, 2007, 31 (3): 445-450.
- [9] Lopes MRM, Bicudo CEM, Ferragut MC. Short term spatial and temporal variation of phytoplankton in a shallow tropical oligotrophic reservoir, southeast Brazil. *Hydrobiologia*, 2005, 542: 235-247.
- [10] Muylaert K, Sabbe K, Vyverman W. Spatial and temporal dynamics of phytoplankton communities in a freshwater tidal estuary (Schelde, Belgium). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2000, 50: 673-687.
- [11] Edwards KJ, Gihring TM, Banfield JF. Seasonal variations in microbial populations and environmental conditions in an extreme acid mine drainage environment. *Applied and Environment Microbiology*, 1999, 65: 3627-3632.
- [12] 国家环境保护总局, 国家质量监督检验检疫总局. GB3838-2002 地表水环境质量标准. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [13] Wollenzien U, DE-Hoog GS, Krumbein W, Uijthof MJM. *Sarcinomyces petricola*, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, 71: 281-288.
- [14] Zalar P, DE-Hoog GS, Gunde-Cimerman N. *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Studies in Mycology*, 1999, 43: 57-62.
- [15] Damm U, Fourie PH, Crous PW. *Coniochaeta (Lecytophora)*, *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of Prunus trees. *Persoonia*, 2010, 24: 60-80.
- [16] 胡亮, 王吉坤, 王鲁民, 林连兵, 魏云林. 绿色木霉对 Zn²⁺ 的吸附特性研究. *化学与生物工程 (Chemistry & Bioengineering)*, 2007, 24 (8): 38-40.
- [17] Smith WH. Forest occurrence of *Trichoderma* species: emphasis on potential organochlorine (Xenobiotic) degradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, 32 (2): 179-183.
- [18] Albertano, P., Taddei R. *Chlorella protothecoides Krüger* var. *acidocola*, a new variety from very low pH environments. *Algological Studies*, 1984, 37: 401-408.
- [19] Mário Gadanho, José Paulo Sampaio. Microeukaryotic diversity in the extreme environments of the Iberian Pyrite Belt: a comparison between universal and fungi-specific primer sets, temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 57: 139-148.
- [20] Franken M, Franken W. Limnologische untersuchungen am grossen Bullensee, einem sauren heideseenorddeutschlands I. Chemie, Hydrologie, Phytoplankton. *Archiv fuer Hydrobiologie Supplement*, 1977, 53: 364-403.
- [21] Wollmann K, Deneke, R, Nixdorf B, Packroff G. Dynamics of planktonic food webs in three mining lakes across a pH gradient (pH 2-4). *Hydrobiologia*, 2000, 433: 3-14.
- [22] Kamjunke N, Gaedke U, Tittel J, Weithoff G, Bell EM. Strong vertical differences in plankton composition of an extremely acidic lake. *Archiv fuer Hydrobiologie*, 2004, 161: 289-306.

- [23] Andrea Schmidtke, Elanor MB, Guntram Weithoff. Potential grazing impact of the mixotrophic flagellate *Ochromonas* sp. (*Chrysophyceae*) on bacteria in an extremely acidic lake. *Journal of Plankton Research*, 2006, 28: 991-1001.
- [24] Andrea Manica, McMeechan FK, Foster WA. An aggregation pheromone in the intertidal collembolan *Anurida maritima*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2001, 99 (3): 393-395.
- [25] Brent J. Sinclair, Heidi Sjørnsen. Cold tolerance of the antarctic springtail *Gomphiocephalus hodgsoni* (*Collembola*, *Hypogastruridae*). *Antarctic Science*, 2007, 13 (3): 277-279.
- [26] Sheehan KB, Henson JM, Ferris MJ. *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Applied and Environment Microbiology*, 2005, 71: 507-511.
- [27] Deborah JEM, Wong KH, Esther Aznar, John LH, David AC, David Muir. *Scytalidium dimidiatum* and *Lecythophora hoffmannii*: unusual causes of fungal infections in a patient with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35: 2949-2952.
- [28] Melin E, Nannfeldt JA. Researches into the blueing of ground woodpulp. *Svenska Skogsvardsforeningens Tidskrift*, 1934, 32: 397-585.
- [29] Eriksson OE. Non-lichenized pyrenomycetes in Sweden. Lund, Sweden, 1992.
- [30] López-Archilla AI, Gonzáles AE, Terrón MC, Amils R. Ecological study of the fungal populations of the acidic Tinto River in southwestern Spain. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50: 923-934.
- [31] Asgari B, Zare R, Gams W. *Coniochaeta ershadii*, a new species from Iran, and a key to well-documented *Coniochaeta* species. *Nova Hedwigia*, 2007, 84: 175-187.
- [32] Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, Vamathevan J, Miranda M, Anderson IJ, Fraser JA. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 2005, 307 (5713): 1321-1324.
- [33] Dadachova E, Bryan RA, Huang X, Moadel T, Schweitzer AD, Aisen P, Nosanchuk JD, Casadevall A. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS One*, 2007, 2 (5): 457-470.
- [34] Cheng MF, Chiou CC, Liu YC, Wang HZ, Hsieh KS. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39 (4): 1608-1611.
- [35] Fonseca A, Scorzeti G, Fell JW. Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology*, 1999, 46 (1): 7-27.
- [36] Chunbo Hao, Lihua Wang, Yanan Gao, Lina Zhang, Hailiang Dong. Microbial diversity in acid mine drainage of Xiang Mountain sulfide mine, Anhui Province, China. *Extremophiles*, 2010, 14: 465-474.
- [37] Pinto G. Acid-tolerant and acidophilic algae from Italian environments. *Giornale botanico italiano*, 1993, 127: 400-406.
- [38] 马鞍山气候概况. <http://www.masqx.org.cn/show.aspx?id=401&cid=48>. 2010-09-15.
- [39] Huss VA, Ciniglia C, Cennamo P, Cozzolino S, Pinto G, Pollio A. Phylogenetic relationships and taxonomic position of *Chlorella-like* isolates from low pH environments (pH < 3.0). *BMC Evolutionary Biology*, 2002, 2: 1471-2148.
- [40] Havens KE, Fukushima T, Xie P, Iwakuma T, James RT, Takamura N, Hanazato T, Yamamoto T. Nutrient dynamics and the eutrophication of shallow lakes Kasumigaura (Japan), Donghu (PR China), and Okeechobee (USA). *Environmental Pollution*, 2001, 111: 263-272.
- [41] Nixdorf B, Mischke U, Leßmann D. Chrysophytes and chlamydomonads: pioneer colonists in extremely acidic mining lakes (pH < 3) in Lusatia (Germany). *Hydrobiologia*, 1998, 369-370: 315-327.

Characteristics of the eukaryotic community structure in acid mine drainage lake in Anhui Province, China

Lina Zhang^{1,2}, Chunbo Hao^{1,2*}, Lihua Wang^{1,2}, Siyuan Li^{1,2}, Chuanping Feng^{1,2}

¹ Key Laboratory of Groundwater Circulation and Evolution, Ministry of Education, China University of Geosciences, Beijing 100083, China

² School of Water Resources and Environment, China University of Geosciences, Beijing 100083, China

Abstract: [Objective] We characterized eukaryotic community structure and the relationship between the community structure and environmental factors in acidic mine drainage (AMD) lake of a sulfide mine in Anhui Province, China. [Methods] The 18S rRNA gene clone libraries were constructed by using molecular biology techniques to analyze the eukaryotic phylogenetic relationships, and the canonical correspondence analysis (CCA) was used to analyze the relationship between the community structure and environmental factors. [Results] The phylogenetic analysis shows that Ascomycota is widespread in the four samples and dominated in the AMD-1 and AMD-3 clone libraries, whereas Chlorophyta and Basidiomycota are the predominant in AMD-2 and AMD-4 samples, respectively. Moreover, many sequences in libraries were closely related to those of acid-resisting and metal-resisting eukaryotic microbes, such as *Sarcinomyces petricola*, *Penicillium janthinellum*, *Coniochaeta velutina*, *Trichoderma viride*, *Chlorella protothecoides* var. *acidicola*, *Ochromonas* sp., and there are high content of known human pathogens, such as *Lecythophora hoffmannii*, *Cryptococcus neoformans*. CCA analysis revealed that the critical factors influencing the eukaryotic community structure include TN, SO_4^{2-} , Fe^{2+} and Eh. [Conclusion] Difference of eukaryotic community structure in time and space may be related with physico-chemical properties of acidic mine drainage. High content of human pathogens was detected in the acidic ecosystem. The ecological study of eukaryotes under the acidic conditions can help to find efficient methods to process acid mine drainage.

Keywords: Acid mine drainage, Eukaryotes, Community structure, Environment factors

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Science Foundation of China (40802059) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2010ZD03, 2011YXL035)

* Corresponding author. E-mail: hao20709@yahoo.com.cn

Received: 17 February 2012 / Revised: 21 April 2012