

酸性矿山废水区域沉积物中嗜酸菌多样性研究

郝春博¹, 张洪勋^{1*}, 白志辉¹, 张保国¹, 张徐祥²

(中国科学院生态环境研究中心环境生物技术室, 北京 100085; 2. 南京大学环境学院污染控制与资源化国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 采集了酸性矿山废水区域酸性沉积物样品, 运用 16S rDNA 克隆文库技术和变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术, 研究了沉积物中的嗜酸菌类群以及它们的群落结构。结果表明, 沉积物中的嗜酸菌类型较新, 大多数 16S rDNA 序列与已知序列的相似性均在 97% 以下。这些嗜酸菌主要为 *Acidobacteria*, β/γ -*Proteobacteria*, δ -*Proteobacteria*, *Nitrospira*, Candidate Division TM7, low G + C Gram-positive 类微生物。在这一酸性生态系统中, δ -*Proteobacteria* 类细菌占据主导地位。对酸性沉积物中嗜酸菌多样性的研究有利于发现高效处理酸性矿山废水的方法。

关键词: 酸性矿山废水; 沉积物; 嗜酸菌; 16S rDNA; 变性梯度凝胶电泳

中图分类号: X176 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)11-2255-06

Biodiversity of Acidophiles in the Sediment at an Acid Mine Drainage Site

HAO Chun-bo¹, ZHANG Hong-xun¹, BAI Zhihui¹, ZHANG Baoguo¹, ZHANG Xu-xiang²

(1. Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: A sediment sample was collected at an acid mine drainage site in Anhui. The acidophiles composition and community structure in the sediment was studied with 16S rDNA clone library and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results indicated that the acidophiles in the sediment were novel compared with the data in GenBank. The acidophiles affiliated with *Acidobacteria*, β/γ -*Proteobacteria*, δ -*Proteobacteria*, *Nitrospira*, Candidate Division TM7, low G + C Gram-positive. δ -*Proteobacteria* were major group in this acidic ecosystem. The research of acidophiles community in sediment can help us develop high efficient method to treat acid mine drainage (AMD).

Key words: acid mine drainage; sediment; acidophile; 16S rDNA; DGGE

酸性矿山水(acid mine drainage, AMD)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 通常在 3 以下, 并含有高浓度的铁、铝、铜等重金属阳离子和硫酸根阴离子, 一般都不能直接循环利用。酸性矿山废水排出后可酸化水体, 污染河流底泥、农田土壤, 使水生生物绝迹, 农业减产, 危害十分严重, 是人类矿业活动的主要污染物之一^[1]。

在以黄铁矿(FeS₂)为主的硫化矿物氧化过程中, 三价铁是主要的氧化剂, 其反应方程式为: FeS₂ + 14Fe³⁺ + 8H₂O → 15Fe²⁺ + 2SO₄²⁻ + 16H⁺。三价铁的浓度是这个反应的限制因素^[2]。在 pH 低于 3 时, 二价铁的正常氧化速度是很慢的。但是, 嗜酸微生物却可以通过氧化二价铁而获得能量。所以, 嗜酸菌在酸性矿山废水的形成过程中起着主要的作用。氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)也是人们最为了解的嗜酸菌, 人们对它的铁硫氧化系统和氧化黄铁矿的动力学模型做了大量的研

究^[3,4]。过去一直认为氧化亚铁硫杆菌是形成酸性矿山废水的主要微生物。但最近的一些研究表明, 其它嗜酸菌如 *Leptospirillum* spp. 和 *Ferroplasma* spp. 可能发挥着更重要的作用。为了更深刻地了解酸性矿山废水的形成机制以找到更好的治理方法, 就需要真正认识酸性矿山废水形成区域的嗜酸菌存在状况和群落结构。

传统的微生物研究方法是建立在平板分离基础上的, 而大多数嗜酸菌为化能自养菌, 对有机物非常敏感, 而且代时很长, 所以很难在传统的固体培养基上得到纯种分离。现代分子生物学的发展为微生物多样性研究提供了许多行之有效的手段, 如扩增长度片断多态性技术(AFLP), 随机引物扩增多态性技术(RAPD), 荧光原位杂交技术(FISH), 变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)和 16S rDNA 克隆文库技术等。

收稿日期: 2005-11-25; 修订日期: 2006-01-09

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(KJCX2-SW-206-4)

作者简介: 郝春博(1978~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: hao20709@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: hxzhang@rcees.ac.cn

其中, DGGE 技术和 16S rDNA 克隆文库技术方法使用简便、稳定性高和重复性好而应用更为广泛, 近年来已经成为各种生境中微生物群落结构及其多样性研究的主要手段^[5~7]。

安徽某铁矿排土场是该铁矿废矿石的主要堆放地。因为大部分废矿石中含有黄铁矿, 在排土场经过长年雨水侵蚀和微生物的作用, 产生了大量酸性矿山废水并形成一酸水库, 库容达 $300 \times 10^4 \text{ m}^3$, 严重污染周边环境并威胁到矿山的安全生产。为了解该酸性矿山废水的形成机制, 进而采取相应措施加以治理, 于 2005~08 对该酸水库进行了采样研究。本文报道酸水库边一种特殊沉积物中的新的嗜酸菌多样性及群落结构研究结果。

1 材料与方法

1.1 样品采集

采样点位于酸水库边, 水平面上 5m 处。用便携式 pH 计测定其 pH。样品采集后放入无菌袋中。用于提取 DNA 的样品置于冰上, 尽快返回实验室进行操作。

1.2 沉积物总 DNA 提取

取 5g 样品于无菌离心管中, 用 STE 缓冲溶液洗涤 2 遍(蔗糖 10%, Tris·HCl 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, pH8.0); 然后用 STE 缓冲溶液悬浮, 加入溶菌酶至终浓度 5 mg/mL, 37℃水浴处理 30min, 然后加入蛋白酶 K 至终浓度 3 mg/mL, SDS 至终浓度 2%, 50℃水浴处理 45min; 等体积的氯仿抽提 2 次, 取上清液; 向上清液中加入 10% 的 3 mol/L 乙酸钠, 再加入等体积的异丙醇, -20℃放置 1h; 12 000r/min 离心 10min, 弃上清; 沉淀用 75% 的乙醇洗涤 1 次, 自然干燥, 最后用 50μL 无菌水溶解, 并加入 1μL 浓度为 1 μg/mL 的 RNase。

1.3 16S rDNA 基因全长的 PCR 扩增

使用细菌 16S rDNA 通用引物 16S1($5'$ -AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- $3'$) 和 16S2($5'$ -TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T- $3'$), 以沉积物总 DNA 为模板, PCR 扩增样品中的相应基因。PCR 反应条件为: 预变性条件为 95℃ 5min, 94℃ 变性 1min, 50℃ 退火 1min 和 72℃ 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后在 72℃ 下延伸 10min。PCR 反应的产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 16S rDNA 基因文库的构建

PCR 产物经上海生工胶回收试剂盒纯化后, 连接到 pGEM-T easy vector(Promage 公司) 上, 然后热

激转化到大肠杆菌 DH5α 细胞中, 涂布含有 Amp/X-Gal/IPTG 的 LB 平板, 37℃ 静置培养 16h。然后 4℃ 静置 1h, 使蓝色充分显现后, 随机调取白色菌落, 重新划线纯化培养。以 T7($5'$ - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC- $3'$) 和 SP6($5'$ - ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C- $3'$) 为引物, 以少许菌体为模板, PCR 扩增验证插入片段的大小, 筛选阳性克隆。将筛选好的阳性克隆保存于含有 20% 甘油和 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, -70℃ 保藏。

1.5 基因文库的 ARDRA 分型

将引物 T7 和 SP6 鉴定出的阳性克隆 PCR 产物, 使用限制性内切酶 *Alu* I 和 *Rsa* I (Toyobo 公司) 进行酶切分析。酶切反应使用 20μL 体系, 包括: 2μL Buffer, 0.5μL 的内切酶, 15μL PCR 产物, 2.5μL 双蒸水, 于 37℃ 酶切 1h。酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 经 EB 染色后, 进行凝胶成像仪照相。用 GIS 凝胶处理系统分析酶切图谱, 确定 ARDRA 类型数目。

1.6 序列测定和系统发育分析

选取每种 ARDRA 型的代表克隆测序。测序工作由北京华大生物工程公司完成。将所得序列输入 NCBI 网站, 用 Blast 程序与 GenBank + EMBL + DDBJ+ PDB 中已有的序列进行比对, 下载相似性最高的序列和相似性较高的已知种的序列作为参考。将所有序列用 ClustalX(1.81) 比对后, 用 Phylogenetic 3.65 软件绘制系统发育树, 用 TreeView 软件输出。

1.7 用于 DGGE 的 PCR 扩增

选用 F968GC($5'$ -CCG CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC- $3'$) 和 R1401($5'$ -CGG TGT GTA CAA GAC CC- $3'$) 为引物^[8], 以沉积物总 DNA 为模板, PCR 扩增 16S rDNA 基因片断, 扩增长度约为 430bp。PCR 反应采用降落 PCR 方法, 即: 预变性条件为 95℃ 5min, 前 20 个循环为 94℃ 变性 1min, 65~55℃ 延伸 1min 和 72℃ 延伸 1min(其中每个循环后退火温度下降 0.5℃), 后 10 个循环为 94℃ 1min, 55℃ 延伸 1min 和 72℃ 延伸 1min, 最后在 72℃ 下延伸 7min。

1.8 DGGE 分离

采用 Bio-Rad 公司 Dcode 的基因突变检测系统对 1.7 中的 PCR 反应产物进行电泳分离。制备含有变性剂(尿素和甲酰胺的混合物)的 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 其中变性剂的浓度从 40% 到 60%, 在每个

加样孔加入 PCR 样品 30 μ L. 在 100V 的电压下, 60℃电泳 10h. 电泳完毕后, 将凝胶用 EB 中染色 15min, 然后放入纯水中脱色. 将脱色后的凝胶置于 YLN-2000 凝胶影像分析系统下观察并拍照, 得到 DGGE 图谱.

2 结果与讨论

2.1 样品的物理化学性质

图 1 中箭头所指即为所采样品, 呈红褐色, 层状分布, 间或有黑色物质, 其上下均为黄色的砂石. 样品有明显的硫化物气味, pH 值为 2.5.

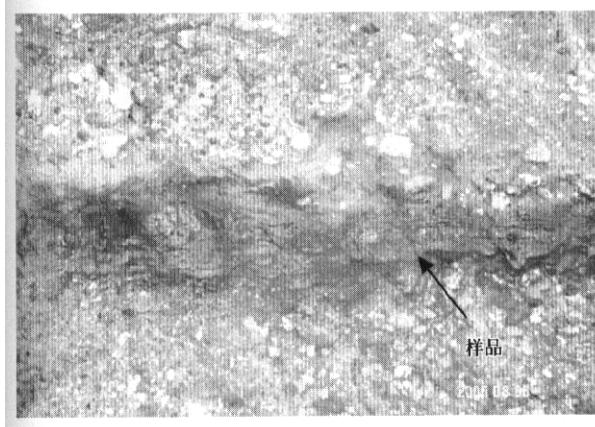


图 1 样品的形态

Fig. 1 The sediment sample

2.2 总 DNA 提取结果

本研究所提取的总 DNA 大小约为 23kb, 证明已获得较为完整的基因组 DNA. 所提取的沉积物基因组 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值在 1.83 左右, 其 DNA 的纯度较高, 可以直接用于 PCR.

2.3 16S rDNA 全长扩增结果

图 2 为 16S rDNA 全长扩增结果, 池道 1, 2 为 16S rDNA 全长扩增平行样, CK 为阴性对照. 从图 3 可以看出, 用 16S rDNA 全长通用引物对 (16S1/16S2) 对沉积物总 DNA 进行扩增, 得到约 1 500bp 目的片断.

2.4 16S rDNA 基因文库的 ARDRA 分型结果

随机挑取 100 个白色克隆建立克隆文库. 以 T7 和 SP6 为引物, 少量菌体为模板, PCR 扩增克隆质粒上的插入片断. 如果扩增产物为约 1 700bp 片断, 则为阳性克隆(图 3). 经过筛选, 共得到 85 个阳性克隆.

用 *Alu* I 和 *Rsa* I 对阳性 PCR 产物进行酶切分析, 将克隆文库中的序列分成 15 种类型.

2.5 沉积物中嗜酸菌多样性及系统发育学分析

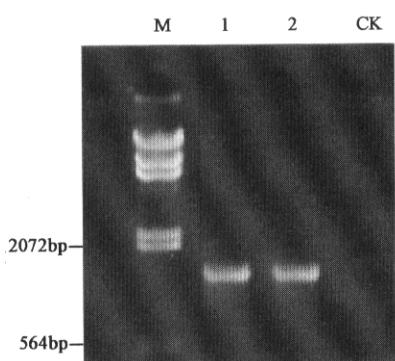


图 2 16S rDNA 全长扩增

Fig. 2 Amplified full-length 16S rDNA

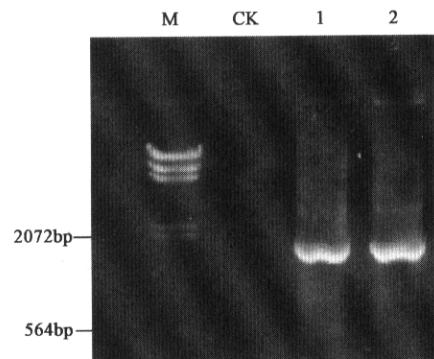


图 3 插入片断扩增

Fig. 3 Amplified inserted fragment

选取每种 ARDRA 型的代表性克隆进行测序, 将所得序列输入 DNAMAN 软件进行序列间比对. 剔除相同序列, 共得到 10 种基因型. 将每种基因型的序列输入 NCBI 网站, 用 BLAST 程序与数据库中已有的序列进行比对分析, 结果如表 1 所示.

从表 1 可以看出, 沉积物中的嗜酸菌 16S rDNA 序列与数据库中已经存在序列相似性比较低, 除 H65 以外其它的序列相似性均在 97% 以下, 而且其最相近种大多数为未培养的微生物, 证明这是一个非常特殊微生物类群, 是认识和发现新型细菌的良好材料.

为了进一步了解这些微生物的系统发育地位, 除了数据库中同源性最高的序列之外, 本研究还下载了一些同源性较高的已知菌种的序列, 与所得序列构建系统发育树, 结果如图 4.

克隆 H65 与 *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain QXS-1 相似性很高, 而且也处于系统发育树的同一分枝上, 证明体系中存在氧化亚铁硫杆菌. 但 H65 在文库中的基因频率并不高, 只有 4.4%, 说明

表1 沉积物中嗜酸菌16S rDNA序列比对结果

Table 1 BLAST analysis of 16S rDNA sequences of acidophiles in the sediment

编号	碱基数/bp	基因频率/%	类群	数据库中最接近种或克隆	相似性
H5	1 461	4.4	<i>Acidobacteria</i>	Uncultured bacterium (AB179509)	1378/1462 (94%)
H6	1 494	4.4	γ - <i>Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone 1013-28-CG34 (AY532575)	1423/1492 (95%)
H11	1 517	51.1	δ <i>Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium BA71 (AF225447)	1418/1451 (97%)
H12	1 521	6.7	<i>Nitrospira</i>	Uncultured bacterium clone ASL9 (AF544226)	1476/1515 (97%)
H24	1 502	4.4	β - <i>Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone DSBACT9 (AY762628)	1030/1109 (92%)
H40	1 432	2.2	Candidate Division TM7	Uncultured soil bacterium clone C129 (AF507687)	1297/1411 (91%)
H50	1 520	6.7	<i>Nitrospira</i>	Uncultured bacterium (DQ223212)	1473/1517 (97%)
H65	1 500	4.4	γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> strain QXS-1 (DQ168465)	1491/1498 (99%)
H70	1 491	2.2	low G+C Gram-positive	Uncultured low G+C Gram-positive bacterium (DQ223211)	782/799 (97%)
H74	1 484	13.3	δ <i>Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium BA71 (AF225447)	967/992 (97%)

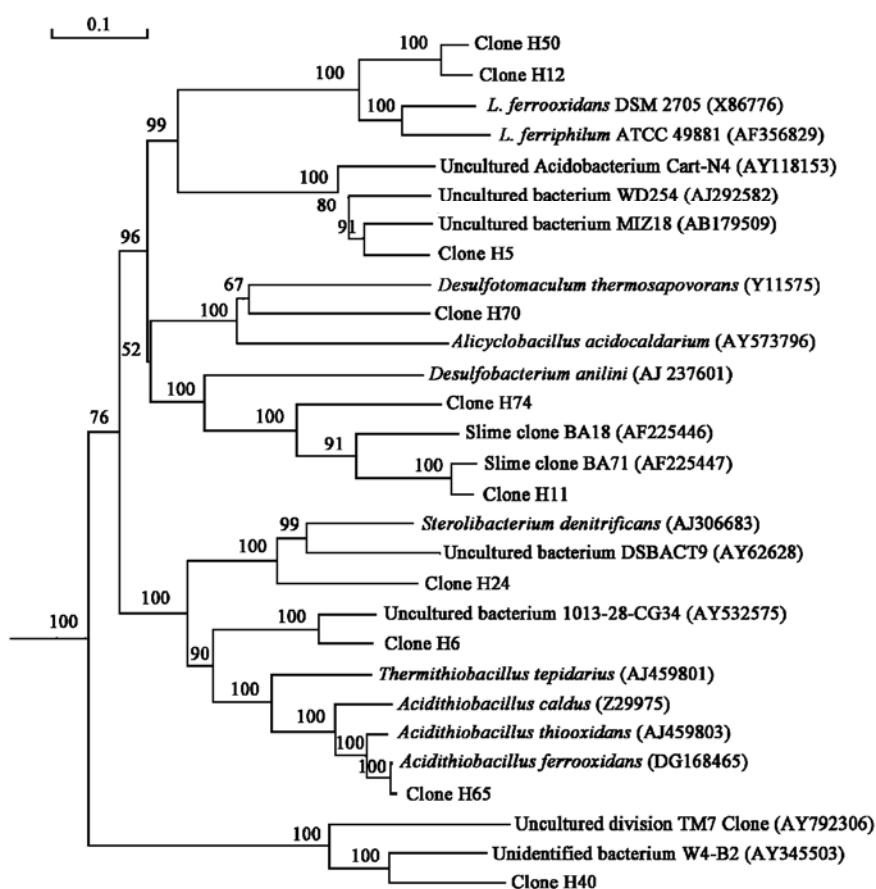


图4 沉积物中嗜酸菌得系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of acidophiles in the sediment

其在这一微生物生态系统的数量并不大，在酸性矿山废水的形成过程中起的作用比较有限。除 H65 外，H6 和 H24 也属于变形杆菌(*Proteobacteria*)的 β / γ 亚类。H24 与已有序列的相似性极低，只有 92%，与之最相似的已知种为 *Acidithiobacillus denitrificans* ATCC 25259，所以 H24 很有可能是硫杆菌属的 1 个新种。H6 与已有序列最高只有 95% 的相似性，而且与之相似性较高的菌种中有 1 个是

未培养的金矿细菌 (uncultured gold mine bacterium)，所以 H6 可能是 1 种有价值的浸矿微生物。

H12 和 H50 都是 *Nitrospira* 类微生物，在系统发育树上与 *Leptospirillum* 属细菌聚为一类。H12 和 H50 的基因频率和为 13.4%，远高于 H65，说明 *Leptospirillum* 属微生物在岩石的风化和酸性矿山废水的形成过程中发挥着比氧化亚铁硫杆菌更

为重要的作用。

H5 为属于 *Acidobacteria* 类微生物, 与已知序列只有 94% 的相似性, 这类细菌常存在于极端酸性生态系统中, 为异养嗜酸菌, 它能分解体系中其它自养菌的代谢产物和死亡的菌体, 在酸性微生物生态系统里面扮演着分解者的角色。H70 是 low G + C Gram-positive 类细菌, 在进化树上它与 *Alicyclobacillus acidocaldarius*、*Desulfotomaculum thermosavorans* 等聚为一类, 这些都是异养嗜酸菌。所以, H70 在酸性生态系统中所起作用可能与 H5 类似。H70 与已有序列虽有 97% 的相似性, 但其 1491bp 的 16S rDNA 序列只有 799bp 与已知序列匹配, 所以 H70 可能是一种新的异养嗜酸菌。

H40 属于 TM7 类细菌。Hugenholtz 等人在研究了大量已经发表的环境 16S rDNA 序列后, 建立成立一个新的细菌类群即 TM7^[9]。这是一类目前没有分离培养只是根据 16S rDNA 序列建立起来的细菌类群, 它广泛分布于土壤、地表水、深海沉积物以及废水处理系统等环境中, 但是在极端酸性环境中还未见报道。H40 与已有序列只有 91% 的相似性, 应该是 TM7 类微生物里比较新的类群。

本研究在这种酸性沉积物中发现了大量变形杆菌(*Proteobacteria*) δ 亚类微生物, 它们分别是 H11、H74。它们的基因频率在 60.0% 以上, 说明这类微生物在系统中居于统治地位。目前发现的大多数嗜酸变形杆菌均属于 β/γ 亚类^[10], Bond 等人在研究美国 Iron Mountain 铁矿的嗜酸菌时首次在酸性环境中发现了 δ -*Proteobacteria* 类微生物, 但只在系统中占很小的比例^[11]。 δ -*Proteobacteria* 类微生物在酸性生态系统中占统治地位还是首次发现。为了进一步了解 H11、H74 的系统发育地位, 本研究下载了 δ -*Proteobacteria* 类微生物的各个代表种的序列与这 2 个克隆的序列构建了系统发育树(图 5)。发现 H11 和 H74 不属于 δ -*Proteobacteria* 的任何一个已知属, 只是与 Bond 等人发现的 B71 和 B18 克隆聚为一类, 说明这可能是一类新的嗜酸菌。

2.6 PCR-DGGE 结果

沉积物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)结果如图 6, 2 个泳道为平行样。

图谱中有 2 条主体条带分别为条带 1 和带 2。经切胶回收、PCR 扩增、测序、比对后发现, 条带 1 和带 2 即分别为克隆文库中的 H11 和 H74。所以, DGGE 结果与克隆文库结果一致, δ -*Proteobacteria* 类微生物在沉积物样品中占据主导地位。

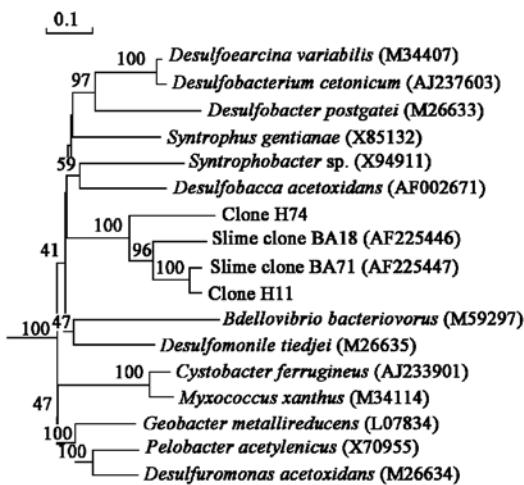


图 5 δ -*Proteobacteria* 细菌系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of δ -*Proteobacteria*

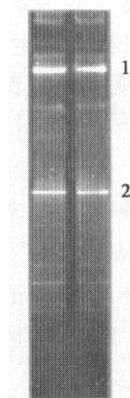


图 6 沉积物 DGGE 图谱
Fig. 6 DGGE profile of PCR products of the sediment

经过元素含量和 X-射线晶体衍射鉴定, 本研究所采沉积物是褐铁矿和二氧化硅等杂质的混合物。褐铁矿是含水氧化铁矿石, 是由其他矿石风化后生成的, 在自然界中分布广泛。采样地周边矿山均为黄铁矿(FeS₂), 经过采选后的废矿石都堆放于排土场。暴露在空气中的废矿石在氧气、雨水和微生物的共同作用下不断风化, 释放出的 Fe³⁺、H⁺、SO₄²⁻ 等物质随雨水沿碎石缝隙向下淋溶在比较致密的岩层上沉积下来, 形成本研究所采沉积物。由于是嗜酸菌的氧化产物, 所以里面含有 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 和 *Leptospirillum* 属细菌就不足为奇了。但是沉积物里含有在系统中占统治地位的 δ -*Proteobacteria* 类微生物似乎不合常理, 因为这类微生物的最适 pH 为中性, 而且以前的相关研究从没有发现这一现象。 δ -*Proteobacteria* 类的主体微生物是硫酸盐还原菌(SRB), 这是一类化能异养厌氧

微生物,能通过还原硫酸盐获得能量.出现这一现象的原因可能是经过多年的氧化、沉积以后,褐铁矿中的铁大多为 Fe^{3+} ,而作为*Acidithiobacillus ferrooxidans*和*Leptospirillum* spp.能源的 Fe^{2+} 已经很少了.而且,经过氧化淋溶形成的沉积物中含有大量的 SO_4^{2-} ,这正是硫酸盐还原菌可以利用的能量,而且沉积物很致密,又含有大量的水,这就在沉积物内部造成了一个厌氧的微环境,这些条件都适合于硫酸盐还原菌的生长,导致它们在系统中居于主导地位.

过去对酸性矿山废水的处理人们多采用中和法.这种处理方法不但成本高昂,而且会产生大量的中和渣无法处理.最近几年国外有人用硫酸盐还原菌处理酸性矿山废水,取得了很好的效果^[12].这种方法没有二次污染,运作费用低,同时还可以回收单质硫或硫化物,已经成为酸性矿山废水处理技术的前沿课题.对酸性沉积物中微生物的研究,可以帮助筛选到效率更高的硫酸盐还原菌.

3 结论

(1) 沉积物中嗜酸菌类群丰富,包括*Acidobacteria*, $\beta/\gamma\text{-Proteobacteria}$, $\delta\text{-Proteobacteria}$, *Nitrospira*, Candidate Division TM 7, low G + C Gram-positive类细菌.用分子生物学的方法发现了传统方法难以发现的多样性.

(2) $\delta\text{-Proteobacteria}$ 类细菌在沉积物中占主导地位.

(3) 对沉积物中嗜酸菌的研究有利于筛选高效处理酸性矿山废水的微生物.

参考文献:

- [1] Johnson D B, Hallberg K B. Acid mine drainage remediation options: a review [J]. *Science of the Total Environment*, 2005, **338**: 3~ 14.
- [2] Johnson D B, Hallberg K B. The microbiology of acidic mine waters[J]. *Research in Microbiology*, 2003, **154**: 466~ 473.
- [3] Vincenzo B, Mario P, Ferda S. A novel gene encoding a sulfur-regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, **72**: 85~ 93.
- [4] Malhotra S, Tankhiwale A S, Rajvaidya A S, et al. Optimal conditions for bio-oxidation of ferrous ions to ferric ions using *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. *Bioresource Technology*, 2002, **85**: 225~ 234.
- [5] Watanabe K, Kodama Y. Molecular Characterization of Bacterial Populations in Petroleum Contaminated Groundwater Discharged from Underground Crude Oil Storage Cavities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 4803~ 4809.
- [6] 殷峻,陈英旭,刘和,等.应用PCR-DGGE技术研究处理含氨废气的生物滤塔中微生物多样性[J].*环境科学*, 2004, **25**(6): 11~ 15.
- [7] 王峰,傅以钢,夏四清,等. PCR-DGGE 技术在城市污水化学生物絮凝处理中的特点[J].*环境科学*, 2004, **25**(6): 74~ 79.
- [8] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, **44**: 253~ 262.
- [9] Hugenholtz P, Tyson G W, Webb R I. Investigation of candidate division TM 7, a recently recognized major lineage of the domain bacteria with no known pure culture representatives [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**: 411~ 419.
- [10] Rawlings D E. The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron or sulfur-oxidizing bacteria [J]. *Hydrometallurgy*, 2001, **59**: 187~ 201.
- [11] Bond P L, Smriga S P, Banfield J F. Phylogeny of Microorganisms Populating a Thick, Subaerial, Predominantly Lithotrophic Biofilm at an Extreme Acid Mine Drainage Site [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 3842~ 3849.
- [12] Luptakova A, Kusnierova M. Bioremediation of acid mine drainage contaminated by SRB[J]. *Hydrometallurgy*, 2005, **77**: 97~ 102.