

贵州典型煤矸石堆场微生物群落结构及功能特征

陈晨¹, 陈湮³, 李彦澄^{*1,2}, 唐欣¹, 王乐乐¹, 赵若男¹

1 贵州大学资源与环境工程学院 喀斯特地质资源与环境教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

2 贵州喀斯特环境生态系统教育部野外科学观测研究站, 贵州 贵阳 550025

3 重庆工程职业技术学院土木学院, 重庆 402260

陈晨, 陈湮, 李彦澄, 唐欣, 王乐乐, 赵若男. 贵州典型煤矸石堆场微生物群落结构及功能特征[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5300-5319.

CHEN Chen, CHEN Li, LI Yancheng, TANG Xin, WANG Lele, ZHAO Ruonan. Structural and functional characteristics of microbial communities of typical coal gangue dumps in Guizhou Province[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5300-5319.

摘要:【背景】煤矸石堆场用于堆放煤矿开采过程中产生的一种热值低、含重金属的固体废弃物,会产生大量的酸性废水,对堆场周边的生态环境造成严重影响。【目的】探究煤矸石堆场的微生物群落结构和功能特征。【方法】选择贵州省六枝特区典型煤矸石堆场作为研究对象,采集堆场表层土壤、矸石层土壤、废水浸出口沉积物和堆场下游河道沉积物,通过宏基因组学技术进行分析。【结果】细菌的优势菌门为变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*),优势菌属为钩端螺菌属(*Leptospirillum*)和硫化杆菌属(*Sulfobacillus*);古菌的优势菌门为 *Candidatus_Thermoplasmatota* 和泉古菌门(*Crenarchaeota*),优势菌属为热原体属(*Thermoplasma*)和金属球菌属(*Metallosphaera*)。不同采样点细菌和古菌的优势菌属存在显著差异,矸石层土壤和废水浸出口沉积物中的铁氧化细菌和硫氧化细菌比其他2个样点丰富。煤矸石堆场中微生物的碳、氮、硫代谢基因丰度较高,共检测到6条固碳途径、6条氮代谢途径和3条硫代谢途径。主要的固碳基因为 *ACAT* 和 *E2.2.1.1*,固碳途径以还原性三羧酸循环为主;主要的氮代谢基因为 *nirB*、*nasA* 和 *narG*,氮代谢途径以反硝化为主;主要的硫代谢基因为 *cysH* 和 *sir*,硫代谢途径以同化硫酸盐还原为主。【结论】本研究可进一步拓展对矿山生态环境的认识,为矿区生态修复、土壤和河流污染的治理提供理论依据。

关键词: 煤矸石堆场; 宏基因组学; 微生物群落; 代谢途径; 功能基因

资助项目: 贵州省科技计划项目(黔科中引地[2022] 4022); 国家自然科学基金地区科学基金项目(42267064)

This work was supported by the Science and Technology Program of Guizhou Province ([2022] 4022) and the National Natural Science Foundation of China Regional Science Foundation (42267064).

*Corresponding author. E-mail: ycli3@gzu.edu.cn

Received: 2023-04-27; Accepted: 2023-06-12; Published online: 2023-07-14

Structural and functional characteristics of microbial communities of typical coal gangue dumps in Guizhou Province

CHEN Chen¹, CHEN Li³, LI Yancheng^{*1,2}, TANG Xin¹, WANG Lele¹, ZHAO Ruonan¹

1 Key Laboratory of Karst Geological Resources and Environment, Ministry of Education, College of Resources and Environmental Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 Guizhou Karst Environmental Ecosystem Observation and Research Station, Ministry of Education, Guiyang 550025, Guizhou, China

3 College of Civil Engineering, Chongqing Vocational Institute of Engineering, Chongqing 402260, China

Abstract: [Background] Coal gangue dumps stockpile coal wastes with low calorific values and heavy metals, which are generated during coal mining, along with a large amount of acidic wastewater and deteriorated eco-environment nearby. [Objective] This paper aims to explore the structure and functional characteristics of microbial communities in coal gangue dumps. [Methods] The soil samples of the dump surface and gangue layers, as well as the sediment samples from wastewater leaching outlets and dump downstream river, of a typical gangue dump in Liuzhi special district, Guizhou Province were collected. Metagenomics was employed to reveal the microbial community structures and functional characteristics of the samples. [Results] The results showed that bacteria were more diverse and abundant than archaea. The dominant bacterial phyla were *Proteobacteria* and *Actinobacteria*, and the dominant genera were *Leptospirillum* and *Sulfobacillus*. The dominant archaeal phyla were *Candidatus_Thermoplasmatota* and *Crenarchaeota*, and the dominant genera were *Thermoplasma* and *Metallosphaera*. The dominant genera of bacteria and archaea in different sampling sites varied from each other, and Fe-oxidizing bacteria (FOB) and sulfur-oxidizing bacteria (SOB) were more abundant in the gangue layer soil and wastewater leaching outlet sediment than in the other two sampling sites. The genes for carbon, nitrogen, and sulfur metabolism were abundant in coal gangue, with six carbon fixation pathways, six nitrogen metabolism pathways, and three sulfur metabolism pathways detected. The dominant genes for carbon fixation were *ACAT* and *E2.2.1.1*, and the dominant pathway was reductive tricarboxylate cycle. For nitrogen metabolism, the dominant genes were *nirB*, *nasA* and *narG*, and the dominant pathway was denitrification. For sulphur metabolism, the dominant genes were *cysH* and *sir*, and the dominant pathway was assimilated sulphate reduction. [Conclusion] The findings are expected to enhance the understanding of mine ecology and provide a theoretical basis for the ecological restoration and pollution treatment in mining areas.

Keywords: coal gangue dumps; metagenomics; microbial communities; metabolic pathways; functional genes

人类的采矿活动会改变矿区附近的生态系统稳定性^[1],影响生态系统的生物多样性和功能,使生态系统受到严重的破坏^[2-3]。贵州省六盘水市是我国华南地区最大的煤炭基地,有“江南煤都”之称,而六枝特区是其重要组成部分,因此被称为“十里煤城”。六枝特区境内有丰富的矿产资源,如煤、铁、硫、砷、铅和锌等,其中煤炭资源遍布全境,六枝特区的煤矿开采历史悠久,煤炭开采文化底蕴深厚,煤电、煤焦化都是当地的传统支柱产业。六枝特区的煤炭开发、生产和利用为社会经济发展做出了重要贡献,但也造成了生态环境的严重污染^[4-5]和地质灾害^[6-7]。

煤矸石是煤矿开采过程中产生的一种热值低、含重金属的固体废弃物^[8-9],由于六枝特区的煤矸石含硫量较高,导致煤矸石在堆放过程中因化学和微生物的作用会产生大量的酸性废水,对堆场周边的生态环境造成严重影响。目前,对矿区生态环境的研究主要集中在矿区土壤^[10-12]、河流^[13-14]和植被^[15-16]方面,相关研究发现矿区周围土壤受到重金属的影响,物种复杂度与距离呈正相关^[17],植被的发育也与微生物的发育密切相关^[18],但是关于煤矸石堆场中微生物的研究较少。因此,选择贵州省六枝特区典型煤矸石堆场作为研究对象,采集堆场表层土壤、矸石层土壤、废水浸出口沉积物和堆场下游河道沉积物,通过宏基因组学技术分析样品中的微生物群落结构,并对功能基因和代谢功能进行分析,探讨酸性废水产生的微生物作用机理,以期能进一步拓展对矿山生态环境的认识,为矿区生态修复、土壤和河流污染的治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况和样品采集

贵州省六盘水市六枝特区属亚热带季风温

暖湿润气候,气候温和,夏无酷暑,冬无严寒,雨量充沛,年均气温 14.5 °C,年降水量 1 476.4 mm,年内降雨分布不均匀,大部分集中在 5-9 月,占全年年均降雨量的 77.6%。采样点位于六枝特区某煤矿的煤矸石堆场(26°25'80"-26°27'84"N, 105°29'50"-105°31'52"E),分别采集堆场的表层土壤(T)、堆场的矸石层土壤(G)、堆场废水浸出口的沉积物(J)和堆场下游河道的沉积物(H),如图 1 所示。由于土壤的不均匀性,在同一采样点不同位置采样 5 次,均匀混合。样品采集后暂存于干冰桶中,然后在-80 °C冰箱中保存。

1.2 主要试剂和仪器

邻苯二甲酸氢钾、磷酸氢二钠、铬黑 T、1.10-菲啰啉、苯甲酸,天津市科密欧化学试剂有限公司;乙酰苯胺、辛醇、溴甲酚绿、甲基红、硫酸钾,国药集团化学试剂有限公司;重铬酸钾,天津市致远化学试剂有限公司;乙二胺四乙酸二钠,成都金山化学试剂有限公司;氨基苯磺酸,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Fast DNA Spin Kit For Soil, MP Biomedicals 公司。pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;凯氏定氮仪,FOSS 公司;有机元素分析仪,Elementar 公司;自动聚焦声波基因组剪切仪,Covaris 公司;高通量测序平台,Illumina 公司。

1.3 宏基因组学分析

所采集的样品在低温环境下送至上海某生物科技有限公司进行宏基因组学分析。首先用试剂盒提取微生物 DNA,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的 DNA。用自动聚焦声波基因组剪切仪将其片段化(约 400 bp)然后进行接头连接,并使用磁珠筛选去除接头自连片段,再利用 PCR 扩增进行文库模板的富集,磁珠回收 PCR 产物得到最终的文库。完成文库构建后进行桥式 PCR 和测序。



图1 煤矸石堆场采样图 A: 表层土壤. B: 矸石层土壤. C: 废水浸出口的沉积物. D: 下游河道沉积物
Figure 1 Sampling map of gangue dumps. A: Surface soil. B: Gangue layer soil. C: Sediment of waste water leaching outlet. D: Downstream river sediment.

1.4 数据分析

首先对原始序列进行拆分、质量剪切以及去除污染等优化处理。然后使用 MEGAHIT 优化序列进行拼接组装, 采用 MetaGene 对基因进行预测, 利用 CD-HIT 和 SOA Paligner 对样品中预测出来的基因序列进行聚类 and 比对, 最后使用 BLASTp 将非冗余基因型与非冗余蛋白序列 (non-redundant protein sequence database, NR)、直系同源蛋白分组比对 (evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups, EggNOG)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 等数据库比对, 获得物种和功能上的注释以及分类。

2 结果与讨论

2.1 理化性质

从表 1 可知, 表层土壤 pH 为弱酸性, 矸石层土壤和浸出液出口沉积物 pH 为强酸性,

河道沉积物 pH 为中性。矸石层土壤的全碳含量最高, 表层土壤的全氮含量最高, 矸石层土壤和浸出液出口沉积物的有机质含量较高, 河道沉积物全碳、全氮和有机质含量都远低于其他样点, 矸石层土壤的硫酸盐含量远高于其他样点, 是因为煤矸石中的黄铁矿富含 S 元素。

2.2 α 多样性分析

本研究包含 4 个样品, T、G、H、J 样本分别获得 48 575 282、48 465 562、49 770 408 和 43 641 474 条 raw reads, 质控后获得 47 597 666、47 806 700、48 874 580 和 42 680 060 条 clean

表 1 样品理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of samples

Sample	pH	TC (%)	TN (mg/kg)	SOM (g/kg)	SO ₄ ²⁻ (g/kg)
T	5.01	7.170	2 603.002	133.548	2.451
G	2.29	8.270	2 286.555	214.371	113.049
H	7.15	4.680	860.191	89.585	8.749
J	2.39	7.300	1 861.742	207.549	22.527

reads, 并且质控后的样品覆盖度均在 97%及以上, 说明测序深度足以进行后续分析。 α 多样性主要包括物种丰富度和物种均匀度两个方面。采样点的细菌和古菌群落多样性表现出显著差异, 如表 2 所示, 采用 Chao1 指数和 ACE 指数计算群落分布丰度, 数值越大表示群落丰度越高。采用 Shannon 和 Simpson 指数计算群落分布多样性, 其中 Shannon 指数与微生物多样性成正比, 而 Simpson 指数与微生物多样性成反比。总体上, 细菌群落的丰富度和多样性明显高于古菌。细菌的群落丰富度和多样性依次为 J>T>H>G 和 J>H>T>G; 古菌的群落丰富度和多样性依次为 T>G>J>H 和 T>H>J>G。同一堆场不同采样点的微生物多样性存在差异, 说明其多样性与样品成分密切相关。表层土壤为弱酸性, 且碳、氮和有机质含量高, 因此适合微生物的生长发育。然而矸石层土壤和废水浸出口沉积物的酸性强, 硫酸盐含量较高, 环境复杂, 会有特定的微生物生存, 这也是此类环境中浸矿微生物丰度较高的原因。

2.3 微生物群落结构

在煤矸石堆场样品中, 细菌共获得 159 门 264 纲 468 目 959 科 3 598 属 22 830 种, 古菌共获得 24 门 43 纲 69 目 100 科 191 属 554 种。

在门水平上(图 2), 细菌群落的优势菌门为变形菌门(*Proteobacteria*, 2.23%–86.05%)、放线

菌门(*Actinobacteria*, 2.62%–48.88%)和厚壁菌门(*Firmicutes*, 0.15%–46.78%)。变形菌门在 4 个样本中相对丰度最高, 因为变形菌门(*Proteobacteria*)的种类丰富, 代谢形式多样, 在维持土壤生态系统方面起着主要作用^[19-20]。Liang 等^[18]发现在稀土矿区复杂的环境中, 变形菌门(*Proteobacteria*)显示出绝对的竞争优势。放线菌门在表层土壤和矸石层土壤中相对丰度最高, 因为放线菌门(*Actinobacteria*)可能是重金属污染的块状土壤和根际土壤中代谢活性细菌的主要组成部分^[21]。厚壁菌门(*Firmicutes*)是矸石层土壤中的另一个优势菌门, 对环境污染的耐受性较高, 是矿区的特征细菌^[22]。其他相关研究表明, 厚壁菌门(*Firmicutes*)的相对丰度在受重金属污染的土壤中占主导地位^[23-24]。古菌群落的优势菌门为 *Candidatus_Thermoplasmatota* (14.69%–84.49%)和泉古菌门(*Crenarchaeota*, 2.10%–23.43%)。土壤表层和河道沉积物中的广古菌门(*Euryarchaeota*, 18.79%–24.59%)和奇古菌门(*Thaumarchaeota*, 13.49%–37.72%)有较高丰度。泉古菌门(*Crenarchaeota*)包括很多嗜热生物, 在某些海洋的超微浮游生物中占有相当比例^[25], 嗜温性泉古菌门被认为是氮和碳循环的重要贡献者^[26]。

在属水平上(图 3), 煤矸石堆场细菌群落的优势菌属为钩端螺菌属(*Leptospirillum*, 0.04%–18.58%)和硫化杆菌属(*Sulfobacillus*, 0.01%–18.90%), 古

表 2 细菌和古菌群落 α 多样性指数

Table 2 Alpha diversity index of bacterial and archaeal communities

Class	Samples	ACE index	Chao1 index	Shannon index	Simpson index	Coverage
Bacteria	T	15 328	15 328	5.064	0.040	1
	G	3 914	3 914	3.529	0.091	1
	H	10 842	10 842	5.113	0.029	1
	J	16 361	16 361	5.343	0.022	1
Archaea	T	326	326	4.057	0.041	1
	G	291	291	1.995	0.291	1
	H	119	119	3.541	0.075	1
	J	267	267	2.804	0.142	1

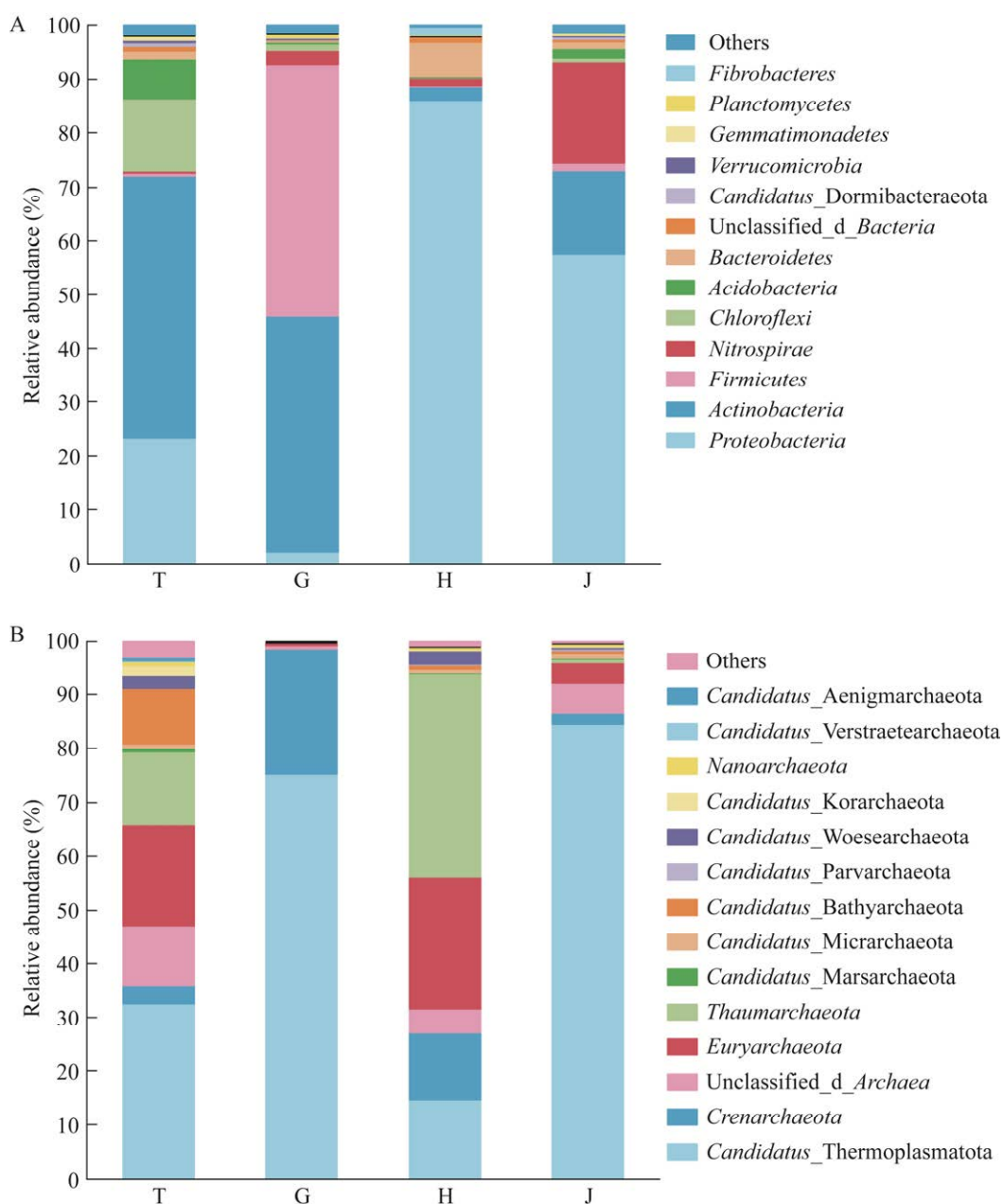


图 2 门水平上细菌群落(A)和古菌群落(B)的相对丰度

Figure 2 Relative abundance of bacterial communities (A) and archaeal communities (B) at the phylum level.

菌群落的优势菌属为热原体属(*Thermoplasma*, 1.11%–59.12%)和金属球菌属(*Metallosphaera*, 0.13%–22.28%)。表层土壤的优势细菌属为 unclassified_c_Actinomycetia (5.69%)和 unclassified_p_Actinobacteria (6.05%), 矸石层土壤的优势细

菌属为 unclassified_p_Firmicutes (22.42%)和硫化杆菌属(*Sulfobacillus*, 18.90%), 河道沉积物的优势细菌属为嘉利翁氏菌属(*Gallionella*, 11.49%)和 unclassified_o_Burkholderiales (8.98%), 废水浸出口的优势细菌属为钩端螺菌属(*Leptospirillum*,

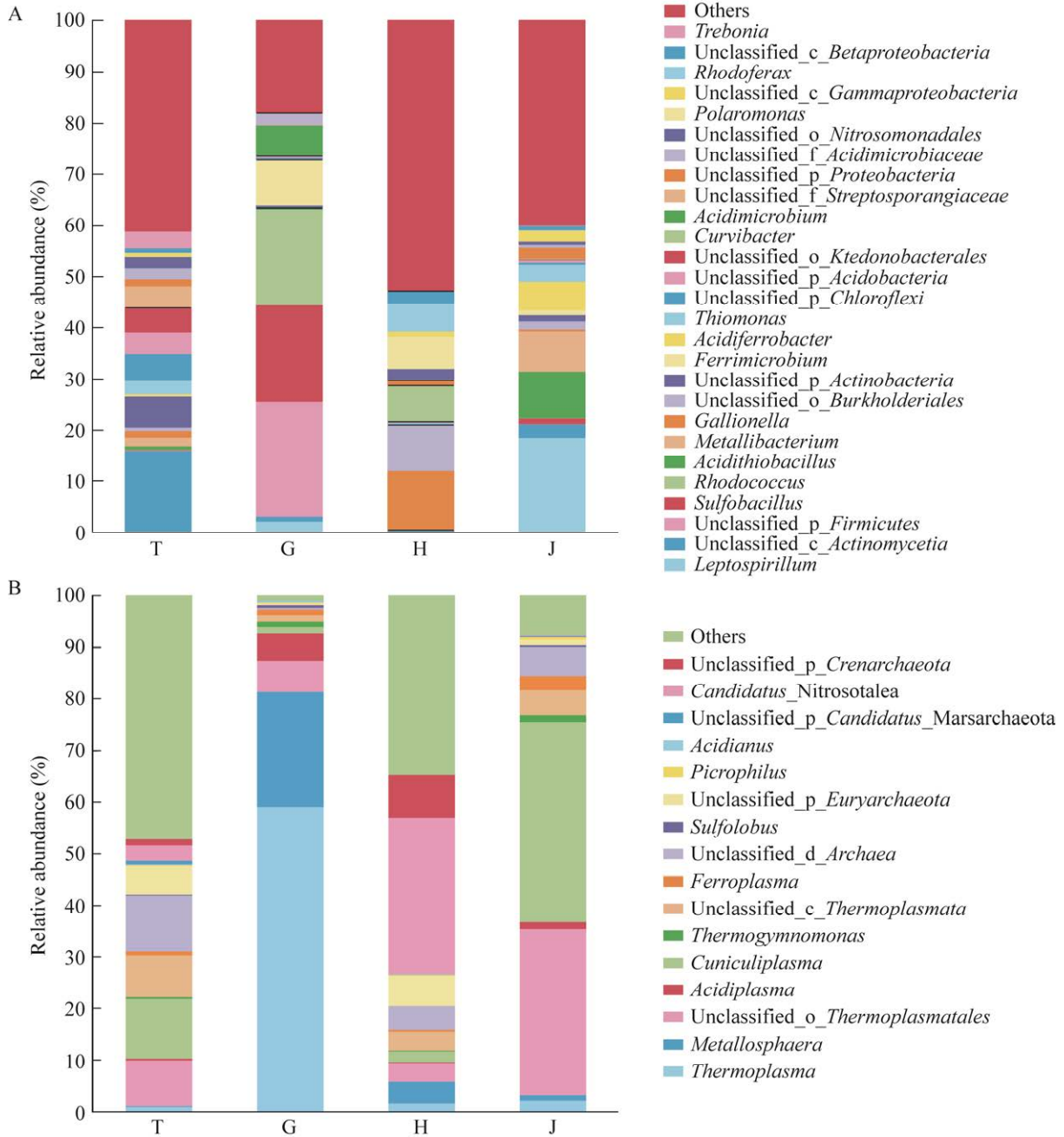


图3 属水平下细菌群落(A)和古菌群落(B)的相对丰度

Figure 3 Relative abundance of bacterial communities (A) and archaeal communities (B) at the genus level.

18.58%)和酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*, 9.17%)。表层土壤的优势古菌属为 *Cuniculiplasma* (11.46%) 和 *unclassified_d_Archaea* (11.06%)，矽石层土壤的优势古菌属为热原体属(*Thermoplasma*, 59.12%) 和金属球菌属(*Metallosphaera*, 22.28%)，河道沉

积物的优势古菌属为 *Candidatus_Nitrosotalea* (30.45%)和 *unclassified_p_Crenarchaeota* (8.09%)，废水浸出口的优势古菌属为 *Cuniculiplasma* (38.72%) 和 *unclassified_o_Thermoplasmatales* (32.11%)。

在生物浸出过程中, 硫氧化细菌(sulfur-oxidizing bacteria, SOB)和铁氧化细菌(Fe-oxidizing bacteria, FOB)是最主要的浸矿微生物, 它们分别通过氧化单质硫和 Fe^{2+} 获得能量^[27]。常见于土壤、淡水、咸水、温泉和硫矿中, 其种类多样、分布广泛^[28]。硫氧化细菌在生长过程中能利用可溶或溶解的硫化物, 从中获得能量, 可将低价硫化物氧化为硫, 再将硫氧化为硫酸盐^[29-30]。硫氧化细菌可用于硫化氢解毒、土壤生物修复和废水处理^[31]。目前鉴定的硫氧化细菌包括绿硫细菌(green sulfur bacteria, GSB)^[32]、紫硫细菌(purple sulfur bacteria, PSB)、紫色非硫细菌(purple nonsulfur bacteria, PNSB)^[28]和无色硫细菌(colorless sulfur bacteria, CSB)^[33]。绿硫细菌属于厌氧光合细菌, 可以厌氧氧化单质硫和 H_2S , 少数菌株可以厌氧氧化 S_2O_3 ^[28], 常见属有绿菌属(*Chlorobium*)和绿假单胞菌属(*Chloropseudomonas*)。紫硫细菌是不产氧光合细菌, 普遍存在于有光的厌氧水体、厌氧海洋、滞水层、富营养化湖泊和一些含硫化物的中性或者高 pH 值、高盐的极端环境里, 常见的有 *Allochromatium vinosum* DSM 180T^[34]和硫碱弧菌属(*Thioalkalivibrio*)。紫色非硫细菌的分布较广泛, 大多数紫色非硫细菌硫化物氧化的终产物是 SO_4^{2-} , 少数是单质硫, 主要包括红螺菌属(*Rhodospirillum*)、红球状菌属(*Rhodopila*)和红育菌属(*Rhodoferax*)等^[30]。无色硫细菌缺少光合色素, 大多数在好氧条件下进行硫氧化, 常见属有副球菌属(*Paracoccus*)、硫杆菌属(*Thiobacillus*)和酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)等。铁氧化细菌以氧气作为电子受体, 以 CO_2 作为碳源, 将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} , 广泛分布于地表水、土壤、海洋以及地下水生态系统中^[35]。铁氧化细菌是推动铁元素循环的微生物, 包含氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)等自

养菌^[36], 也包含纤发菌属(*Leptothrix*)和泉发菌属(*Crenothrix*)等异养菌^[37-38]。嗜酸性氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、氧化亚铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferrooxidans*)和氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*)是常见的脱硫微生物。以酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)、铁原体属(*Ferroplasma*)和钩端螺菌属(*Leptospirillum*)为代表的一系列铁氧化细菌已广泛应用于矿山冶金、废旧 PCB 板、废旧电池和电子废料处理等行业^[39-41], 具有环境友好、节能高效和工艺占地面积小等优势。在本研究中, 钩端螺菌属(*Leptospirillum*)、硫化杆菌属(*Sulfobacillus*)和酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)的相对丰度较高, 分别为 6.43%、4.31%和 3.14%, 且其在废水浸出口沉积物的丰度远高于其他样点, 这三者都是常见的浸矿细菌属^[42-43], 有研究表明在生物浸出工业的后期, 钩端螺菌属(*Leptospirillum*)很可能成为了最主要的氧化细菌^[44]。

热原体属(*Thermoplasma*)在炎热和酸性条件下生长最好, 通常存在于温泉中, 也在自热的煤炭废料堆和酸性硫质喷气环境中被发现。金属球菌属(*Metallosphaera*)严格好氧, 生长在元素硫和硫化物矿上, 可以从硫化矿中提取金属并生成硫酸^[45]。硫化叶菌属(*Sulfolobus*)是需氧型古菌, 也是最早发现的嗜酸热微生物之一, 其生长环境通常为富含硫的地热地区。矿区这种高酸性、含金属环境中的微生物种类繁多, 包括铁和硫氧化或还原的细菌, 其中的还原反应会产生碱, 因此在矿山生物修复方面具有应用潜力^[46-47]。

综上所述, 所有样品中细菌的群落多样性和丰度均高于古菌, 矸石层土壤的微生物群落结构较为特殊, 与其他 3 个样点相差较大, 可能是由于矸石层土壤中的黄铁矿(FeS_2)发生氧化反应放热导致温度较高, 因此硫化叶菌属(*Sulfolobus*)和热原体属(*Thermoplasma*)等嗜酸

热微生物的群落丰度较高。废水浸出口和矸石层土壤的硫氧化细菌和铁氧化细菌群比其他样点丰度高,可能是由于 pH 较低,富含金属离子和 SO_4^{2-} ,适宜此类微生物的生长。微生物的群落组成有差异,说明微生物在发生变化以适应重金属的污染^[41,48],特定的环境会选择适合生存和生长的微生物,Chen 等^[49]使用宏基因组和宏转录组学相结合的方法,发现微生物会调节基因的表达以适应其环境的变化。

2.4 微生物功能注释

基于 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)数

据库对比样品中的微生物功能类别,共注释到六大功能信息,其中新陈代谢(72.46%)占主导地位,其次是遗传信息处理(8.24%)、环境信息处理(6.53%)、细胞转化(5.78%)、人类疾病(4.49%)和组织系统(2.50%)。第 2 层代谢功能有 46 类,丰度较高的是全局和概述图谱(28.26%)、氨基酸代谢(8.69%)、碳水化合物代谢(8.58%)、能量代谢(6.42%)和辅助因子与维生素的代谢(5.94%),如图 4 所示。不同样本之间代谢功能的丰度相差较大,废水浸出口沉积物细菌的代谢功能丰度略高于其他样点,而矸

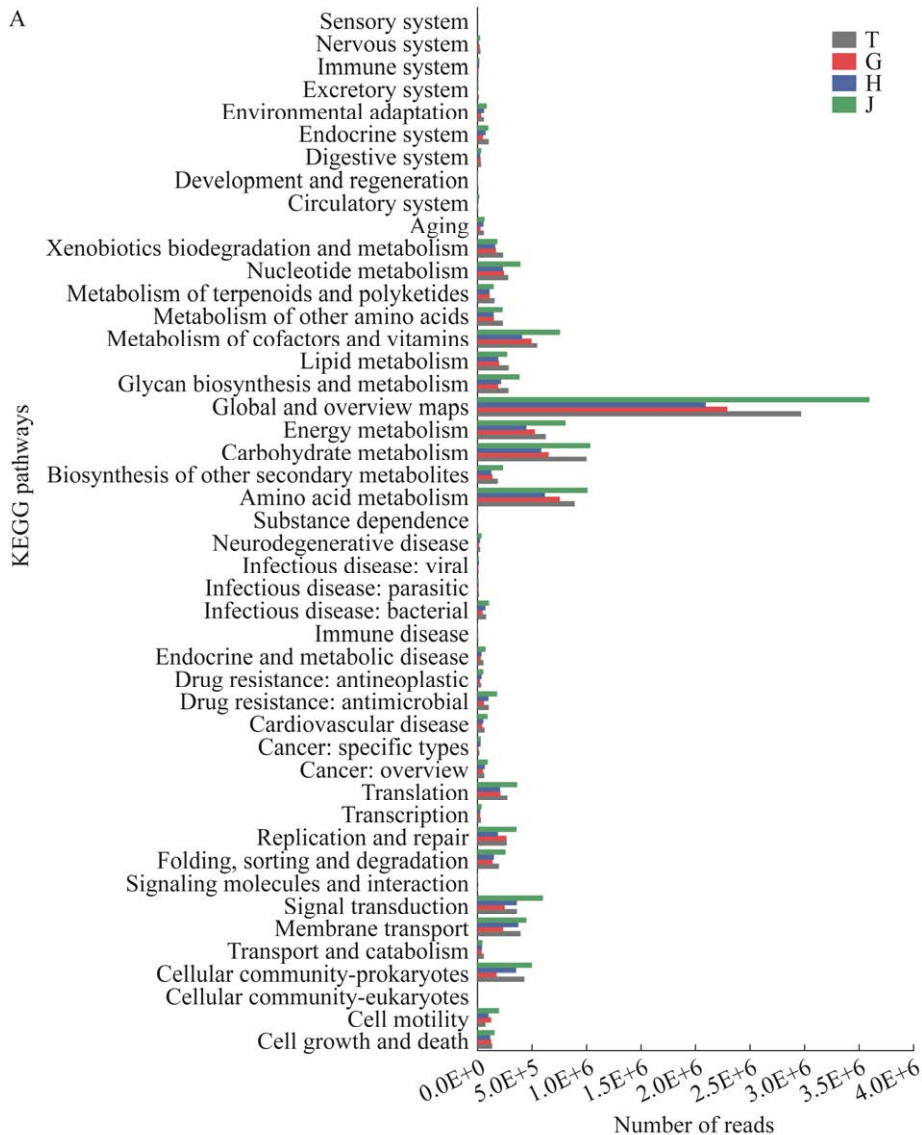




图 4 基于 KEGG 的细菌(A)和古菌(B)的代谢功能及丰度

Figure 4 Metabolic function and abundance of bacteria (A) and archaea (B) based on KEGG.

石层土壤古菌的代谢功能丰度明显高于其他样点,这可能与煤矸石堆场微生物的群落结构有关。

2.4.1 固碳

碳在调节土壤养分循环和增加土壤微生物活性方面起着至关重要的作用,微生物固碳途径多种多样,目前已确定的固碳途径有6种,分别为:还原性磷酸戊糖(卡尔文)循环(reductive pentose phosphate cycle/Calvin cycle, CBB)、还原性三羧酸循环(reductive citrate cycle/arnon-buchanan cycle, rTCA)、二羧酸/4-羟基丁酸循环(dicarboxylate-hydroxybutyrate cycle, DC/4-HB)、3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环(hydroxypropionate-hydroxybutyrate cycle, 3-HP/4-HB)、3-羟基丙酸双循环(3-hydroxypropionate bi-cycle, 3-HP)和还原性乙酰辅酶A途径(reductive acetyl-CoA pathway/Wood-Ljungdahl pathway)。卡尔文循环是光合作用里碳反应的一部分,反应场所为叶绿体内的底物,分为3个阶段,即羧化、还原和二磷酸核酮糖的再生,广泛存在于绿色植物、蓝细菌、藻类和一些变形菌门中。还原性三羧酸循环是存在于少数光合紫色细菌和绿硫细菌中自养固定CO₂的途径。二羧酸/4-羟基丁酸循环在古菌中被发现,核心反应第一次是乙酰CoA羧化为丙酮酸,第二次是磷酸烯醇式丙酮酸的羧化反应。3-羟基丙酸双循环存在于嗜热光合细菌中,其核心反应是乙酰CoA的羧化和代谢产物丙酰CoA的再次羧化。3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环的碳固定与3-羟基丙酸双循环相同,底物再生与二羧酸/4-羟基丁酸循环相同。还原性乙酰辅酶A途径存在于甲烷菌、硫酸盐还原菌和产乙酸菌等化能自养的厌氧细菌和古生菌中,是一条非循环的固碳途径。

在4个采样点中,如图5A所示,每条代谢途径的相对丰度为本途径功能基因数量占整

个代谢途径功能基因数量的百分比,除矸石层土壤以外的3个样点的6种固碳途径基因相对丰度无显著差异。其中,还原性三羧酸循环(25.92%–34.56%)和二羧酸/4-羟基丁酸循环(20.71%–28.38%)基因相对丰度较高,其次是3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环(4.17%–22.37%)、卡尔文循环(11.13%–20.30%)和3-羟基丙酸循环(9.53%–15.42%),基因相对丰度最低的是还原性乙酰辅酶A途径(2.65%–6.08%)。由此可见,还原性三羧酸循环是矿区微生物固碳的主要途径,此途径只需要2个ATP就能合成丙酮酸,是能源匮乏的矿区微生物的主要固碳途径,这与在碱性矿区^[50]和铁尾矿区^[51]的研究结果一致。还原性乙酰辅酶A通路是一些细菌和古菌使用的一组生化反应,此途径主要存在于产乙酸菌和产甲烷菌中,需要严格的缺氧环境^[52]。理论上,生活在恶劣环境中的生物可能会优先使用ATP消耗较低的途径——还原性乙酰辅酶A途径来固碳,但这条途径在4个样品中相对丰度却最低,可能与所需的严格缺氧环境有关。虽然这6种途径在4个样点中的相对丰度相似,但这些固碳基因的分类属性和比例存在一定差异,如图5B所示。ACTA和E2.2.1.1是主要的固碳基因,在表层土壤中的相对丰度分别为8.12%和8.18%,在矸石层土壤中的相对丰度分别为15.98%和5.06%,在河道沉积物中的相对丰度分别为8.37%和8.16%,在废水浸出口沉积物中的相对丰度分别为3.99%和6.90%。

固碳途径在属水平上的物种分类如图5C所示,矿区固碳的优势菌属为热原体属(*Thermoplasma*, 20.67%)和金属球菌属(*Metallosphaera*, 13.44%),两者均为古菌。矸石层土壤的主要固碳菌属为热原体属(*Thermoplasma*, 39.95%)和金属球菌属(*Metallosphaera*, 25.99%),表层土壤的主要固碳菌属为硫单胞菌属(*Thiomonas*, 2.88%)和金属

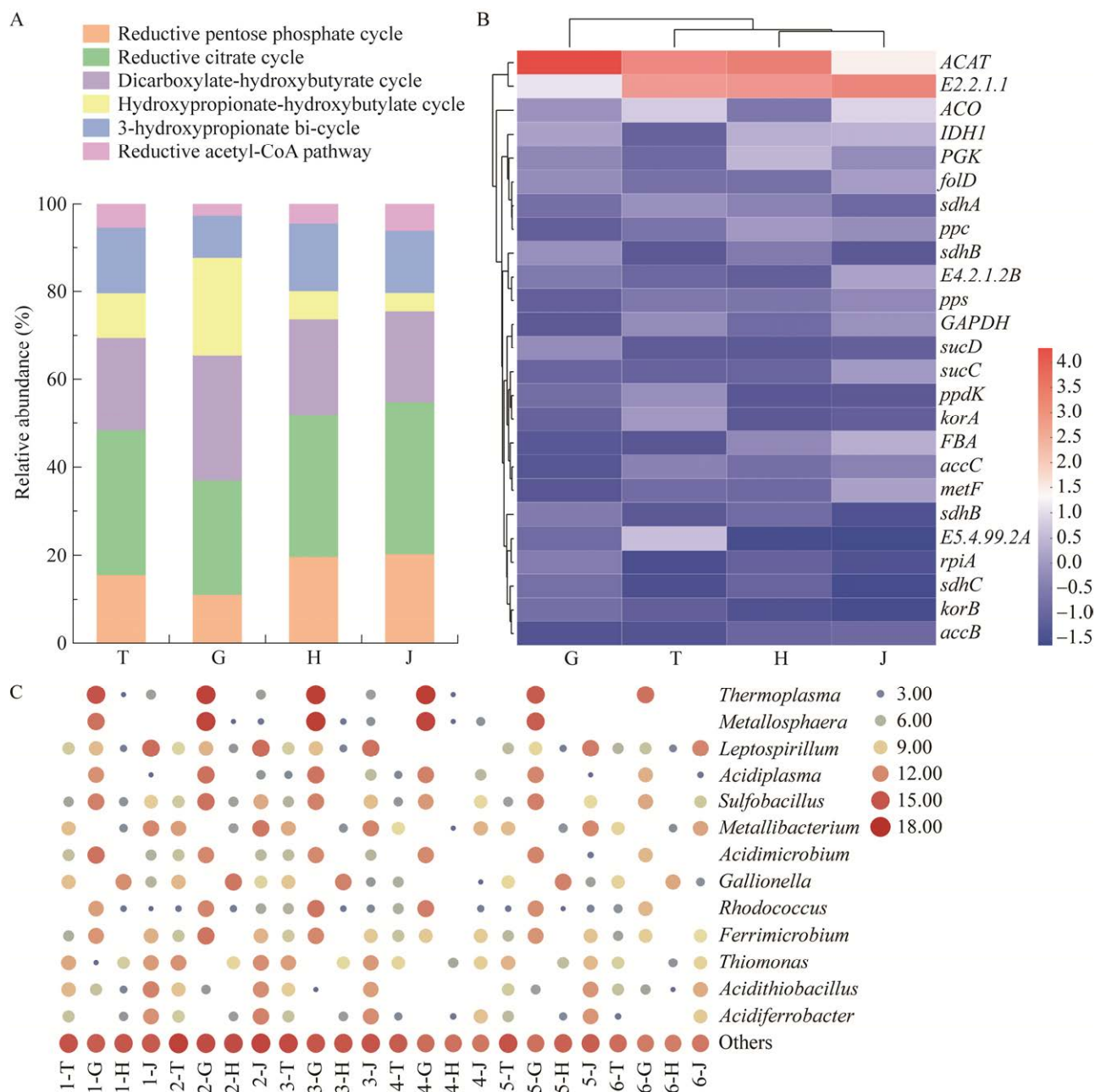


图5 微生物的固碳途径 A: 固碳途径相对丰度. B: 固碳途径功能基因热图. C: 固碳途径属水平物种丰度. 1-6 分别代表还原性磷酸戊糖(卡尔文)循环、还原性三羧酸循环、二羧酸/4-羟基丁酸循环、3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环、3-羟基丙酸循环和还原性乙酰辅酶 A 途径. 属水平物种丰度均进行 $\lg(X+1)$ 转换

Figure 5 Microbial pathways of carbon fixation. A: Relative abundance of carbon fixation pathways. B: Heatmap of functional genes of carbon sequestration pathways at the genus level. C: Species abundance of carbon sequestration pathways at the genus level. 1-6 represent reductive pentose phosphate cycle/Calvin cycle, reductive citrate cycle/arnon-buchanan cycle, dicarboxylate-hydroxybutyrate cycle, hydroxypropionate- hydroxybutyrate cycle, 3-hydroxypropionate bi-cycle and reductive acetyl-CoA pathway/Wood-Ljungdahl pathway, respectively. Species abundance at the genus level were $\lg(X+1)$ transformed.

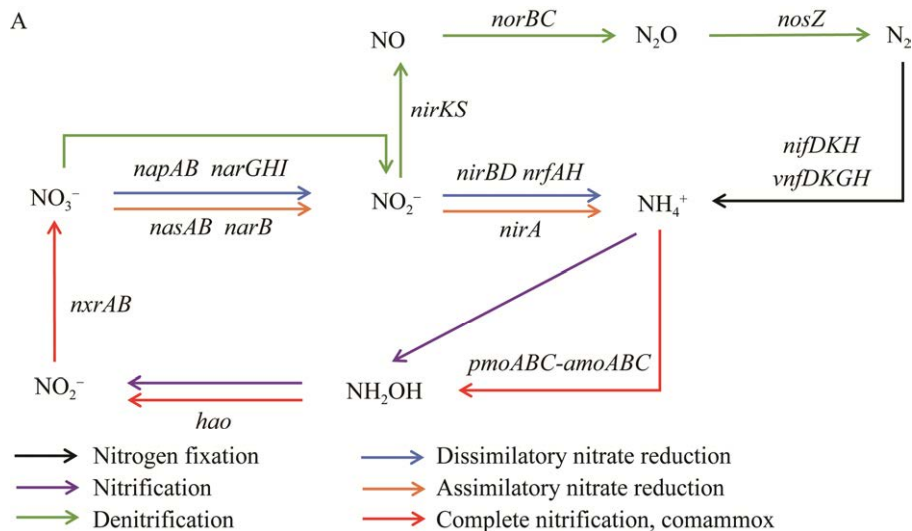
细菌属(*Metallibacterium*, 2.07%), 河道沉积物的主要固碳菌属为嘉利翁氏菌属(*Gallionella*, 13.98%), 废水浸出口沉积物的主要固碳菌属为钩端螺菌属(*Leptospirillum*, 18.39%)。

2.4.2 氮代谢

矿区生态系统的氮代谢途径和功能基因如图 6A 所示, 存在 6 条与氮代谢相关的途径, 分别为固氮(nitrogen fixation)、硝化(nitrification)、反硝化(denitrification)、异化硝酸盐还原(dissimilatory nitrate reduction)、同化硝酸盐还原(assimilatory nitrate reduction)和完全硝化(complete nitrification, comammox)。从图 6B 可知, 反硝化途径的基因相对丰度最高(11.76%–33.89%), 其次是异化硝酸盐还原(27.79%–31.39%)、完全硝化(6.34%–18.85%)、同化硝酸盐还原(9.91%–17.93%)、固氮(4.98%–32.22%)和硝化(0.16%–2.61%)。矽石层土壤的固氮基因相对丰度最高, 完全硝化基因相对丰度最低, 而其他样点均是反硝化基因相对丰度最高, 固氮基因相对丰度最低。

氮代谢途径的相关基因如图 6C 所示, 主要的氮代谢基因分别为 *nirB*、*nasA*、*narG*、*nifK*、*nirK* 和 *narH*。表层土壤中相对丰度较高的基因分别为 *nirB* (14.03%)、*nasA* (17.33%)、*narG*

(16.30%)和 *nirK* (10.34%), 矽石层土壤中相对丰度较高的基因分别为 *nirB* (28.19%)、*nasA* (17.80%)、*nifK* (15.94%)和 *nifD* (13.70%), 河道沉积物中相对丰度较高的基因分别为 *nirB* (16.38%)、*nasA* (21.37%)、*narG* (17.96%)和 *narH* (8.20%), 废水浸出口沉积物中相对丰度较高的基因分别为 *nirB* (15.95%)、*nasA* (11.68%)、*narG* (13.87%)和 *nirK* (9.78%)。氮代谢中异化硝酸盐还原和同化硝酸盐还原途径过程相同, 但使用的还原酶基因不同, 古菌缺少固氮和同化硝酸盐还原酶基因。反硝化在氮素循环中是很重要的一环, 主要是指细菌将硝酸盐中的氮(N)通过一系列的中间产物还原成氮气(N₂)的过程, 亚硝酸盐还原酶基因 *nirK* 是反硝化过程的代表基因。硝酸盐还原成亚硝酸盐是重要的反硝化过程, 可以通过微生物的呼吸完成, 这些微生物通常存在于有硝酸盐的厌氧环境中, 如土壤和海洋沉积物^[53-54]。然而固氮则是将 N₂ 还原为 NH₃, 是植物通过根部对含氮的无机化合物的吸收, 研究显示固氮酶复合物由 *nif* 基因簇编码^[55], *nifK*、*nifD* 是固氮基因。异化硝酸盐还原也是重要的氮代谢途径, 是在无氧或微氧条件下微生物进行的硝酸盐呼吸, 即以 NO₃⁻或 NO₂⁻代替 O₂



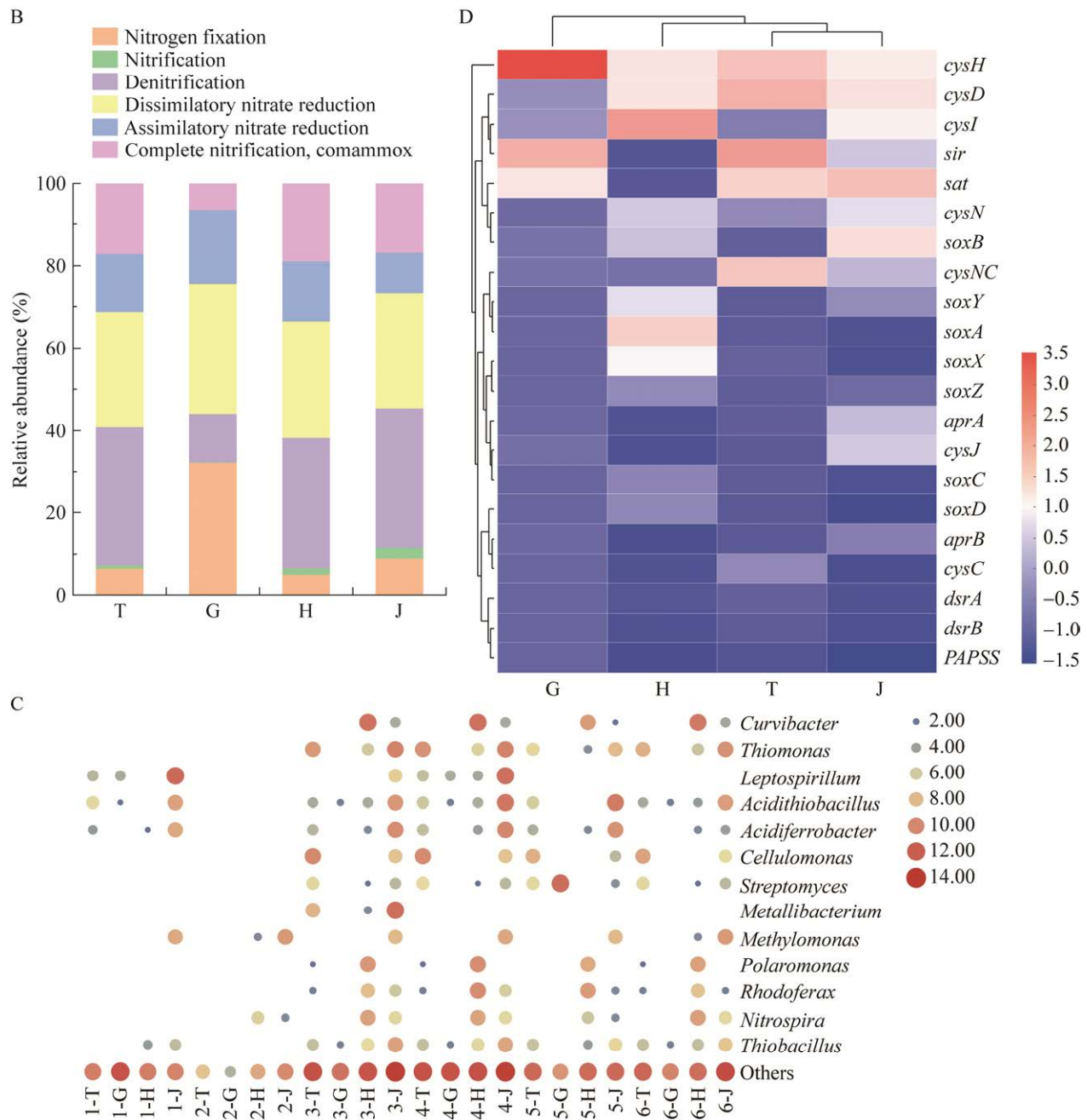


图 6 矿区微生物氮代谢途径 A: 氮代谢途径和功能基因. B: 氮代谢途径相对丰度. C: 氮代谢途径功能基因热图. D: 氮代谢途径属水平物种丰度. 1-6 分别代表固氮、硝化、反硝化、异化硝酸盐还原、同化硝酸盐还原和完全硝化途径. 属水平物种丰度均进行 $\lg(X+1)$ 转换

Figure 6 Microbial pathways of nitrogen metabolic in mining areas. A: Nitrogen metabolic pathways and functional genes. B: Relative abundance of nitrogen metabolic pathways. C: Heat map of functional genes of nitrogen metabolic pathways. D: Species abundance of nitrogen metabolic pathways at the genus level. 1-6 represent nitrogen fixation, nitrification, denitrification, dissimilatory nitrate reduction, assimilatory nitrate reduction and complete nitrification, respectively. Species abundance at the genus level were $\lg(X+1)$ transformed.

作为电子受体进行呼吸代谢,亚硝酸盐还原酶基因 *nirB* 和硝酸盐还原酶基因 *narG* 参与异化硝酸盐还原途径。

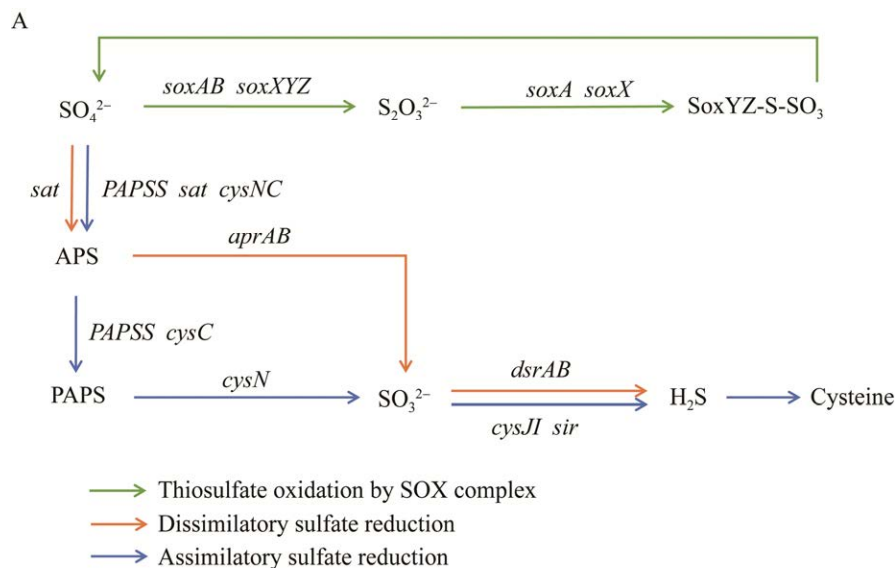
氮代谢途径在属水平上的物种分类如图 6D 所示,矿区微生物氮代谢的优势菌属为热原体属(*Thermoplasma*, 7.11%)和钩端螺菌属(*Leptospirillum*, 2.99%),分别为古菌和细菌。矸石层土壤的主要氮代谢菌属为热原体属(*Thermoplasma*, 24.38%),表层土壤的主要氮代谢菌属为硫单胞菌属(*Thiomonas*, 5.36%),河道沉积物的主要氮代谢菌属为嘉利翁氏菌属(*Gallionella*, 11.11%)和 *Curvibacter* (10.07%),废水浸出口的主要氮代谢菌属为钩端螺菌属(*Leptospirillum*, 9.28%)和酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*, 8.68%)。

2.4.3 硫代谢

在煤矸石堆场检测到较高的硫酸盐含量,存在 3 条与硫代谢相关的完整途径,如图 7A 所示,分别为同化硫酸盐还原(assimilatory sulfate reduction)、SOX 络合物氧化硫代硫酸盐(thiosulfate oxidation by SOX complex)和异化硫酸盐还原(dissimilatory sulfate reduction)。由图 7B

可知,同化硫酸盐还原途径(52.87%–82.98%)基因相对丰度最高,SOX 络合物氧化硫代硫酸盐(2.31%–43.17%)和异化硫酸盐还原(3.96%–16.85%)途径基因相对丰度较低。4 个样点的硫代谢途径差异较大,矸石层土壤的同化硝酸盐还原、SOX 络合物氧化硫代硫酸盐基因相对丰度较高,异化硝酸盐还原基因相对丰度最低,表层土壤、河道沉积物、废水浸出口中同化硝酸盐还原基因相对丰度最高,而异化硝酸盐还原基因和 SOX 络合物氧化硫代硫酸盐基因相对丰度较低。

硫代谢基因相对丰度如图 7C 所示, *cysH*、*sir*、*sat*、*cysD* 和 *cysI* 是主要的硫代谢基因,表层土壤中相对丰度较高的基因分别为 *sir* (17.29%)、*cysD* (14.40%)、*cysNC* (14.29%)、*sat* (12.59%)和 *cysH* (11.18%),矸石层土壤中相对丰度较高的基因分别为 *sir* (30.30%)、*cysH* (30.20%)和 *sat* (15.65%),河道沉积物中相对丰度较高的基因分别为 *cysI* (14.56%)、*cysD* (11.57%)、*cysN* (11.36%)和 *soxA* (10.18%),废水浸出口沉积物中相对丰度较高的基因分别为 *sat* (11.29%)、*cysI* (9.76%)、*soxB* (8.47%)和 *cysD* (8.25%)。同化硫酸盐还原和异化硫酸盐还原是硫酸盐还原



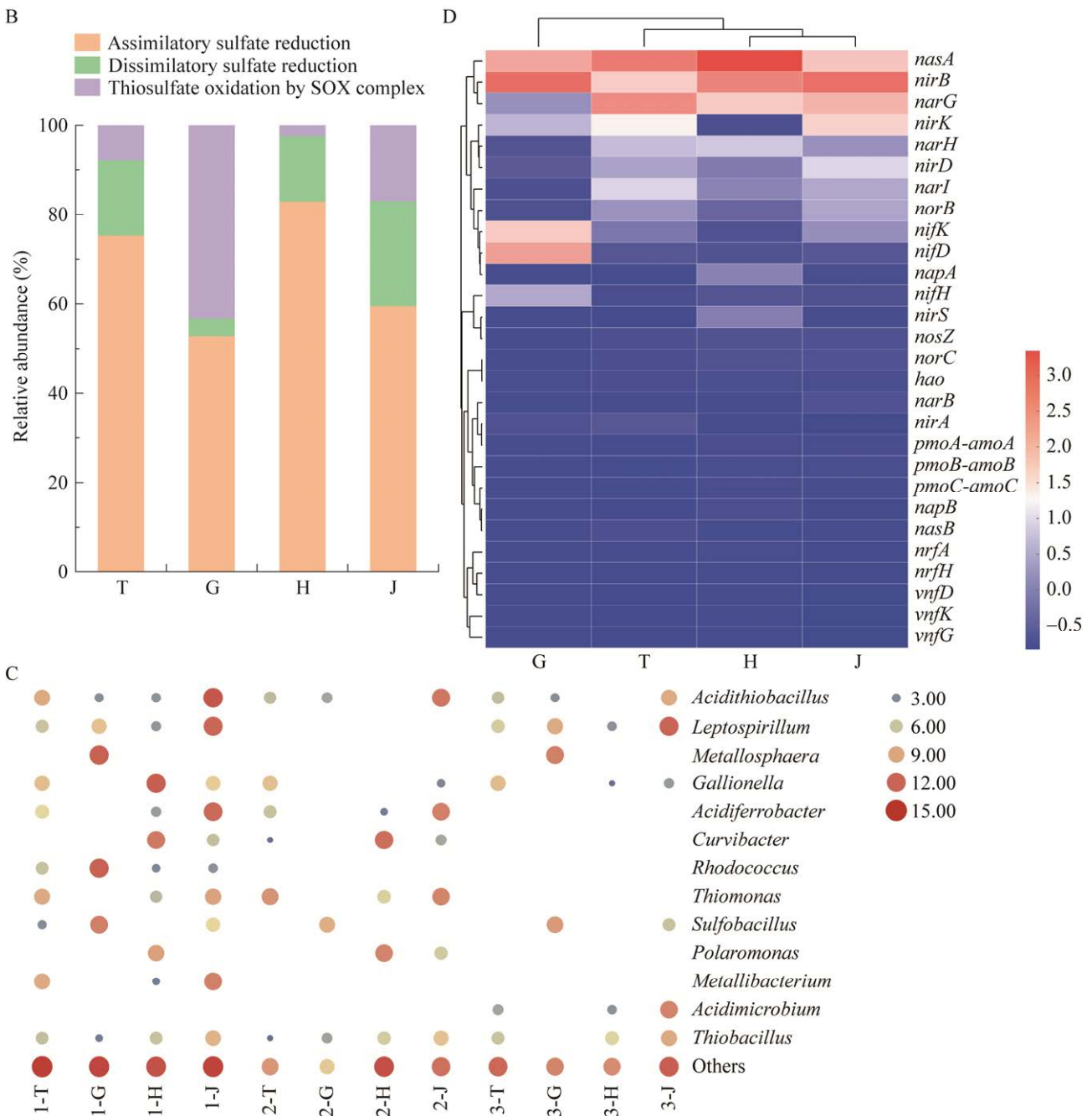


图 7 矿区微生物硫代谢途径 A: 硫代谢途径和功能基因. B: 硫代谢途径相对丰度. C: 硫代谢途径功能基因热图. D: 硫代谢途径属水平物种丰度. 1、2、3 分别代表同化硫酸盐还原、SOX 络合物氧化硫代硫酸盐和异化硫酸盐还原. 属水平物种丰度均进行 $\lg(X+1)$ 转换

Figure 7 Microbial pathways of sulfur metabolic in mining areas. A: Sulfur metabolic pathways and functional genes. B: Relative abundance of sulfur metabolic pathways. C: Heat map of functional genes of sulfur metabolic pathway. D: Species abundance of sulfur metabolic pathways at the genus level. 1, 2 and 3 represent assimilatory sulfate reduction, thiosulfate oxidation by SOX complex and dissimilatory sulfate reduction, respectively. Species abundance at the genus level were $\lg(X+1)$ transformed.

的两条途径,均在厌氧条件下进行,还原过程依赖于 ATP,主要区别在于同化硫酸盐还原最终产物为半胱氨酸,而异化硫酸盐还原最终产物为硫化物。*cysH*、*sir* 和 *sat* 均是参与同化硫酸盐还原途径的基因,值得注意的是,在古菌中未检测到 SOX 基因的存在,而其在细菌中普遍存在。当硫酸盐进入细胞时,被 ATP 硫酸化酶(*cysD*、*cysN* 编码)激活产生 APS,然后 APS 通过 APS/PAPS 还原酶(*cysH* 编码)还原为亚硫酸盐,亚硫酸盐再通过 *cysI*、*cysJ* 和 *sir* 还原为硫化物。

硫代谢途径在属水平上的物种分类如图 7D 所示,矿区微生物硫代谢的优势菌属为金属球菌属(*Metallosphaera*, 6.93%)和酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*, 4.44%),分别为古菌和细菌。矸石层土壤的主要硫代谢菌属为金属球菌属(*Metallosphaera*, 17.78%),表层土壤的主要硫代谢菌属为硫单胞菌属(*Thiomonas*, 5.91%),河道沉积物的主要硫代谢菌属为 *Curvibacter* (12.07%),废水浸出口沉积物的主要硫代谢菌属为酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*, 15.40%)。

3 结论

(1) 煤矸石堆场细菌群落的多样性和丰度均高于古菌群落。同一堆场不同采样点的微生物多样性存在显著差异,说明微生物的生长发育与环境条件密切相关。

(2) 细菌和古菌的优势菌属存在一定差异,矸石层土壤的优势菌属与其他样点差异较大,主要为嗜酸热型微生物,矸石层土壤和废水浸出口沉积物中的铁氧化细菌和硫化细菌丰度较高。

(3) 堆场微生物的碳、氮、硫代谢基因相对丰度较高,存在 6 条固碳途径、6 条氮代谢途径和 3 条硫代谢途径。虽然不同代谢途径的微生物群落结构存在明显差异,但不同样品中相同代谢途径的微生物群落结构相似。

REFERENCES

- [1] ZHANG M, WANG JM, LI SJ. Tempo-spatial changes and main anthropogenic influence factors of vegetation fractional coverage in a large-scale opencast coal mine area from 1992 to 2015[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 232: 940-952.
- [2] WU BH, LUO HY, WANG XT, LIU HK, PENG H, SHENG MP, XU F, XU H. Effects of environmental factors on soil bacterial community structure and diversity in different contaminated districts of Southwest China mine tailings[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 802: 149899.
- [3] KANE JL, MORRISSEY EM, SKOUSEN JG, FREEDMAN ZB. Soil microbial succession following surface mining is governed primarily by deterministic factors[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2020, 96(11): 114.
- [4] 张金池, 李翀, 贾赵辉, 刘鑫, 孟苗婧. 功能性微生物在废弃矿山生态修复中的应用[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2022, 46(6): 146-156.
ZHANG JC, LI C, JIA ZH, LIU X, MENG MJ. Application of functional microorganisms in ecological restoration of abandoned mines[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*, 2022, 46(6): 146-156 (in Chinese).
- [5] 马蕊. 矿山环境保护存在的问题及治理措施[J]. *能源与节能*, 2022(9): 159-161.
MA R. Problems existing in mine environmental protection and treatment measures[J]. *Energy and Conservation*, 2022(9): 159-161 (in Chinese).
- [6] SUH JW, KIM SM, YI H, CHOI Y. An overview of GIS-based modeling and assessment of mining-induced hazards: soil, water, and forest[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(12): 1463.
- [7] SONG ZX, SONG GF, TANG WZ, YAN DD, ZHAO Y, ZHU YY, WANG JH, MA YL. Molybdenum contamination dispersion from mining site to a reservoir[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 208: 111631.
- [8] 李振, 雪佳, 朱张磊, 熊善新, 李学振, 周安宁, 刘莉君, 于伟, 屈进州. 煤矸石综合利用研究进展[J]. *矿产保护与利用*, 2021(6): 165-178.
LI Z, XUE J, ZHU ZL, XIONG SX, LI XZ, ZHOU AN, LIU LJ, YU W, QU JZ. Research progress on comprehensive utilization of coal gangue[J]. *Conservation and Utilization of Mineral Resources*, 2021(6): 165-178 (in Chinese).

- [9] 常纪文, 杜根杰, 杜建磊, 石晓莉. 我国煤矸石综合利用的现状、问题与建议[J]. 中国环保产业, 2022(8): 13-17.
CHANG JW, DU GJ, DU JL, SHI XL. Current situation of the comprehensive utilization of coal gangue in China and the related problems and recommendations[J]. China Environmental Protection Industry, 2022(8): 13-17 (in Chinese).
- [10] 赵鑫娜, 杨忠芳, 余涛. 矿区土壤重金属污染及修复技术研究进展[J]. 中国地质, 2023, 50(1): 84-101.
ZHAO XN, YANG ZF, YU T. Review on heavy metal pollution and remediation technology in the soil of mining areas[J]. Geology in China, 2023, 50(1): 84-101 (in Chinese).
- [11] 魏洪斌, 罗明, 向垒, 查理思, 杨慧丽. 矿业废弃地重金属形态分布特征与迁移转化影响机制分析[J]. 环境科学, 2023, 44(6): 3573-3584.
WEI HB, LUO M, XIANG L, ZHA LS, YANG HL. Analysis on the distribution characteristics and influence mechanism of migration and transformation of heavy metals in mining wasteland[J]. Environmental Sciences, 2023, 44(6): 3573-3584 (in Chinese).
- [12] 尚誉, 桑楠. 煤矸石堆积区周边土壤重金属污染特征与植物毒性[J]. 环境科学, 2022, 43(7): 3773-3780.
SHANG Y, SANG N. Pollution characteristics and phytotoxicity of heavy metals in the soil around coal gangue accumulation area[J]. Environmental Science, 2022, 43(7): 3773-3780 (in Chinese).
- [13] 王春光, 刘军省, 耿浩, 贾晗, 殷显阳, 迟昊轩. 铜陵矿区主要河流水质分析与污染评价[J]. 地学前沿, 2021, 28(4): 175-183.
WANG CG, LIU JX, GENG H, JIA H, YIN XY, CHI HX. Water quality analysis and pollution evaluation of the main rivers in the Tongling mining area[J]. Earth Science Frontiers, 2021, 28(4): 175-183 (in Chinese).
- [14] 郭朝晖, 涂卫佳, 彭驰, 黄博, 肖细元, 薛清华. 典型铅锌矿区河流沿岸农田土壤重金属分布特征及潜在生态风险评价[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(10): 2029-2038.
GUO ZH, TU WJ, PENG C, HUANG B, XIAO XY, XUE QH. Distribution characteristics and potential ecological risk assessment of heavy metals in paddy soil along both sides of river from typical lead/zinc mine area[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2017, 36(10): 2029-2038 (in Chinese).
- [15] 袁鑫奇, 俞乃琪, 郭兆来, 汪斯琛, 唐春东, 杨化菊, 刘嫦娥, 段昌群. 会泽铅锌矿区废弃地优势草本植物的重金属富集特征[J]. 生态与农村环境学报, 2022, 38(3): 399-408.
YUAN XQ, YU NQ, GUO ZL, WANG SC, TANG CD, YANG HJ, LIU CE, DUAN CQ. The accumulation characteristics of heavy metals in dominant herbaceous plants in the abandoned Pb-Zn Mining area of Huize[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2022, 38(3): 399-408 (in Chinese).
- [16] 张龙, 张云霞, 宋波, 吴勇, 周子阳. 云南兰坪铅锌矿区优势植物重金属富集特性及应用潜力[J]. 环境科学, 2020, 41(9): 4210-4217.
ZHANG L, ZHANG YX, SONG B, WU Y, ZHOU ZY. Potential of accumulation and application of dominant plants in Lanping lead-zinc mine, Yunnan Province[J]. Environmental Science, 2020, 41(9): 4210-4217 (in Chinese).
- [17] XIANG YW, DONG YQ, ZHAO SY, YE F, WANG Y, ZHOU M, HOU HB. Microbial distribution and diversity of soil around a manganese mine area[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2020, 231(10): 506.
- [18] LIANG ZT, ZHANG WJ, YANG YS, MA JC, LI SX, WEN Z. Soil characteristics and microbial community response in rare earth mining areas in southern Jiangxi Province, China[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(40): 56418-56431.
- [19] FIERER N, LAUBER CL, RAMIREZ KS, ZANEVELD J, BRADFORD MA, KNIGHT R. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients[J]. The ISME Journal, 2012, 6(5): 1007-1017.
- [20] REN M, ZHANG ZF, WANG XL, ZHOU ZW, CHEN D, ZENG H, ZHAO SM, CHEN LL, HU YL, ZHANG CY, LIANG YX, SHE QX, ZHANG Y, PENG N. Diversity and contributions to nitrogen cycling and carbon fixation of soil salinity shaped microbial communities in Tarim Basin[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 431.
- [21] GREMION F, CHATZINOTAS A, HARMS H. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that *Actinobacteria* might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(10): 896-907.
- [22] JI HB, ZHANG Y, BARARUNYERETSE P, LI HX. Characterization of microbial communities of soils from gold mine tailings and identification of mercury-resistant strain[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 165: 182-193.

- [23] FERNANDES CC, KISHI LT, LOPES EM, OMORI WP, SOUZA JAMD, ALVES LMC, LEMOS EGDM. Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2018, 49(3): 489-502.
- [24] VISHNIVETSKAYA TA, MOSHER JJ, PALUMBO AV, YANG ZK, PODAR M, BROWN SD, BROOKS SC, GU BH, SOUTHWORTH GR, DRAKE MM, BRANDT CC, ELIAS DA. Mercury and other heavy metals influence bacterial community structure in contaminated Tennessee streams[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(1): 302-311.
- [25] TAKAI KEN, OIDA H, SUZUKI Y, HIRAYAMA H, NAKAGAWA S, NUNOURA T, INAGAKI F, NEALSON KH, HORIKOSHI K. Spatial distribution of marine *Crenarchaeota* group I in the vicinity of deep-sea hydrothermal systems[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(4): 2404-2413.
- [26] YAKIMOV MM, CONO VL, SMEDILE F, DELUCA TH, JUÁREZ S, CIORDIA S, FERNÁNDEZ M, ALBAR JP, FERRER M, GOLYSHIN PN, GIULIANO L. Contribution of crenarchaeal autotrophic ammonia oxidizers to the dark primary production in Tyrrhenian deep waters (Central Mediterranean Sea)[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(6): 945-961.
- [27] 余润兰, 石丽娟, 周丹, 邱冠周, 曾伟民. 生物浸出过程中微生物协同作用机制的研究进展[J]. *中国有色金属学报*, 2013, 23(10): 3006-3014.
- YU RL, SHI LJ, ZHOU D, QIU GZ, ZENG WM. Research development of microorganism synergy mechanisms during bioleaching[J]. *The Chinese Journal of Nonferrous Metals*, 2013, 23(10): 3006-3014 (in Chinese).
- [28] GHOSH W, DAM B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(6): 999-1043.
- [29] 冯云飞, 刘丽红, 张雷, 雷迪, 索雲凯, 屈霜. 硫氧化细菌在废水处理中的应用[J]. *当代化工*, 2021, 50(6): 1444-1449.
- FENG YF, LIU LH, ZHANG L, LEI D, SUO YK, QU S. Application of sulfur oxidizing bacteria in wastewater treatment[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2021, 50(6): 1444-1449 (in Chinese).
- [30] 刘阳, 姜丽晶, 邵宗泽. 硫氧化细菌的种类及硫氧化途径的研究进展[J]. *微生物学报*, 2018, 58(2): 191-201.
- LIU Y, JIANG LJ, SHAO ZZ. Advances in sulfur-oxidizing bacterial taxa and their sulfur oxidation pathways[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(2): 191-201 (in Chinese).
- [31] NGUYEN PM, DO PT, PHAM YB, DOAN TO, NGUYEN XC, LEE WK, NGUYEN DD, VADIVELLOO A, UM MJ, NGO HH. Roles, mechanism of action, and potential applications of sulfur-oxidizing bacteria for environmental bioremediation[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 852: 158203.
- [32] IMHOFF JF, THIEL V. Phylogeny and taxonomy of *Chlorobiaceae*[J]. *Photosynthesis Research*, 2010, 104(2): 123-136.
- [33] ENDE FP, MEIER J, GEMERDEN H. Syntrophic growth of sulfate-reducing bacteria and colorless sulfur bacteria during oxygen limitation[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 23(1): 65-80.
- [34] WEISSGERBER T, DOBLER N, POLEN T, LATUS J, STOCKDREHER Y, DAHL C. Genome-wide transcriptional profiling of the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* DSM 180T during growth on different reduced sulfur compounds[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(18): 4231-4245.
- [35] HEGLER F, LÖSEKANN-BEHRENS T, HANSELMANN K, BEHRENS S, KAPPLER A. Influence of seasonal and geochemical changes on the geomicrobiology of an iron carbonate mineral water spring[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(20): 7185-7196.
- [36] PRONK JT, BRUYN JC, BOS P, KUENEN JG. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(7): 2227-2230.
- [37] CHAKRABORTY A, RODEN EE, SCHIEBER J, PICARDAL F. Enhanced growth of *Acidovorax* sp. strain 2AN during nitrate-dependent Fe(II) oxidation in batch and continuous-flow systems[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(24): 8548-8556.
- [38] OSWALD K, GRAF JS, LITTMANN S, TIENKEN D, BRAND A, WEHRLI B, ALBERTSEN M, DAIMS H, WAGNER M, KUYPERS MM, SCHUBERT CJ, MILUCKA J. *Crenothrix* are major methane consumers in stratified lakes[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(9): 2124-2140.
- [39] PIRSAHEB M, ZADSAR S, RASTEGAR SO, GU TY, HOSSINI H. Bioleaching and ecological toxicity assessment of carbide slag waste using *Acidithiobacillus* bacteria[J]. *Environmental*

- Technology & Innovation, 2021, 22: 101480.
- [40] POURHOSSEIN F, MOUSAVI SM. Improvement of gold bioleaching extraction from waste telecommunication printed circuit boards using biogenic thiosulfate by *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 450: 131073.
- [41] LIU H, GU GH, XU YB. Surface properties of pyrite in the course of bioleaching by pure culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and a mixed culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. Hydrometallurgy, 2011, 108(1/2): 143-148.
- [42] 魏嘉欣. 生物冶金及其应用研究进展[J]. 江西化工, 2020(3): 48-53.
WEI JX. Research progress of bio-metallurgy and its application[J]. Jiangxi Chemical Industry, 2020(3): 48-53 (in Chinese).
- [43] 程义, 李宗春, 咸会杰, 范兴建. 浸矿微生物及其浸矿机理的研究进展[J]. 化学工程与装备, 2011(3): 148-150.
CHENG Y, LI ZC, XIAN HJ, FAN XJ. Research progress of leaching microorganisms and their leaching mechanism[J]. Chemical Engineering & Equipment, 2011(3): 148-150 (in Chinese).
- [44] 朱宏飞, 李辉, 刘东奇. 三种浸矿细菌协同作用的回顾及展望[J]. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2730-2737.
ZHU HF, LI H, LIU DQ. A review of synergy development and prospect of three leaching bacteria[J]. Microbiology China, 2016, 43(12): 2730-2737 (in Chinese).
- [45] AI CB, YAN Z, CHAI HS, GU TY, WANG JJ, CHAI LY, QIU GZ, ZENG WM. Increased chalcopyrite bioleaching capabilities of extremely thermoacidophilic *Metallosphaera sedula* inocula by mixotrophic propagation[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(8): 1113-1127.
- [46] JOHNSON DB. Acidophilic microbial communities: candidates for bioremediation of acidic mine effluents[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 1995, 35(1/2/3): 41-58.
- [47] 马智慧, 王亚娥, 李杰. 铁氧化菌特性及其在环境污染治理中的应用[J]. 环境科学与管理, 2011, 36(11): 67-71.
MA ZH, WANG YE, LI J. Properties of iron-oxidizing bacteria and its applications in environmental pollution control[J]. Environmental Science and Management, 2011, 36(11): 67-71 (in Chinese).
- [48] LI XQ, MENG DL, LI J, YIN HQ, LIU HW, LIU XD, CHENG C, XIAO YH, LIU ZH, YAN ML. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination[J]. Environmental Pollution, 2017, 231(Pt 1): 908-917.
- [49] CHEN LX, HU M, HUANG LN, HUA ZS, KUANG JL, LI SJ, SHU WS. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage[J]. The ISME Journal, 2015, 9(7): 1579-1592.
- [50] SHE JY, LIU J, HE HP, ZHANG Q, LIN YY, WANG J, YIN ML, WANG LL, WEI XD, HUANG YL, CHEN CZ, LIN WL, CHEN N, XIAO TF. Microbial response and adaption to thallium contamination in soil profiles[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 423: 127080.
- [51] GENG HH, WANG F, YAN CC, MA S, ZHANG YY, QIN QZ, TIAN ZJ, LIU RP, CHEN HL, ZHOU BH, YUAN RF. Rhizosphere microbial community composition and survival strategies in oligotrophic and metal(loid) contaminated iron tailings areas[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 436: 129045.
- [52] MOMPER L, JUNGBLUTH SP, LEE MD, AMEND JP. Energy and carbon metabolisms in a deep terrestrial subsurface fluid microbial community[J]. The ISME Journal, 2017, 11(10): 2319-2333.
- [53] CHEN QR, FAN JF, MING HX, SU J, WANG YT, WANG B. Effects of environmental factors on denitrifying bacteria and functional genes in sediments of Bohai Sea, China[J]. Marine Pollution Bulletin, 2020, 160: 111621.
- [54] REGAN K, STEMPFHUBER B, SCHLOTTER M, RASCHE F, PRATI D, PHILIPPOT L, BOEDDINGHAUS RS, KANDELER E, MARHAN S. Spatial and temporal dynamics of nitrogen fixing, nitrifying and denitrifying microbes in an unfertilized grassland soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 109: 214-226.
- [55] WALTER A, ANDREAS R, WERNER K, URSULA P, ALFRED P. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Molecular Biology, 1988, 203(3): 715-738.