

垃圾渗滤液污染地下水中硫酸盐还原菌 种群结构多样性分析*

张双月¹ 吴秀娟¹ 任洪强² 廖庆¹ 杨虹^{1**}

(¹上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

(²南京大学环境学院 南京 210093)

摘要 实验样本取自上海老港垃圾填埋场两处受垃圾渗滤液和海水双重污染的地下水监测井. 通过 PCR 扩增异化型亚硫酸盐还原酶(Dissimilatory sulfite reductase, DSR)基因,建立 *dsrAB* 基因克隆文库,用系统发育分析的方法研究了两口污染程度不同的地下水监测井水样中硫酸盐还原菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)的种群结构. 结果表明, Desulfobacteraceae 在两口地下水监测井 G 和 I 井中均占主导地位(分别为 40.5% 和 49.0%),在海水混入比例更高、污染程度更重的 I 井文库中有 40.6% 类 Desulfobacteraceae 克隆子具有嗜盐或适盐性,相比较, G 井中有 31.0% 克隆子具有嗜盐或适盐性. 实验还发现, I 井中次优势菌群是 Syntrophobacteraceae (30.9%),而 G 井中次优势菌群是 Desulfobulbaceae (29.8%). 表明海水混入比例和污染程度的不同会导致地下水系统中 SRB 的种群结构差别. 研究结果也体现了老港地下水系统特殊的物理化学环境导致了其与国内外其它垃圾填埋场地下水中主要 SRB 种群的差别. 图 2 表 2 参 18

关键词 垃圾填埋场; 地下水; SRB; DSR

CLC X172 : X832

Diversity and Characterization of Sulfate-reducing Bacteria in Groundwater Polluted by Landfill Leachate and Seawater*

ZHANG Shuangyue¹, WU Xiujuan¹, REN Hongqiang², LIAO Qing¹ & YANG Hong^{1**}

(¹School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(²School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract The samples for this study were collected from two groundwater monitoring wells of Shanghai Laogang Landfill, where the groundwater was polluted by both leachate and seawater. The diversity of sulfate-reducing bacteria (SRB) was investigated by molecular techniques. After extracting total genomic DNA from the two samples, dissimilatory sulfite reductase (DSR) genes were amplified using specific primers, and then two clone libraries were established. The sequencing and subsequent phylogenetic analysis of the two clone libraries showed that Desulfobacteraceae was the most dominant bacterial clones in Sample G and Sample I (40.5% and 49.0%), and the halophilic characterization of the phylogenetic genera was more obvious in Sample I than in Sample G (40.6% and 31.0%) because of the higher pollution degree and ratio of seawater. The differences in the dominating SRB were found between the Laogang Landfill and other domestic and foreign landfills, which might be affected specially by the leachate and seawater. The result also showed that the second dominant SRB group was Syntrophobacteraceae (30.9%) in Sample I, and Desulfobulbaceae (29.8%) in Sample G. It indicated that the ratio of seawater and the pollution degree could affect the diversity of SRB. Fig 2, Tab 2, Ref 18

Keywords landfill; groundwater; SRB; DSR

CLC X172 : X832

上海老港垃圾填埋场是极少见的滩涂型海滨垃圾填埋场,位于长江口与杭州湾之间的东海之滨,由不断淤涨延伸的滩涂经围堤而成,承担着上海市绝大部分的市政生活垃圾的填埋处置任务.该填埋场未设底部防渗系统,历年的地下水监测资料表明,其地下水系统受到了垃圾渗滤液和海水的双重污染,是

一种特殊的物理化学环境,其中的微生物群落也非常独特.

未受污染的地下水生态系统中有固有的微生物群落结构,一旦受到污染,微生物利用有机物(电子供体)和无机物(电子受体)进行氧化还原反应的生物自修复过程将不同程度地发生,同时原有的微生物群落结构也会发生相应的变迁,生物自修复效率与微生物群落结构和多样性变迁具有关联性.在参与生物自修复的微生物群落中,硫酸盐还原菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)扮演着重要的角色: SO_4^{2-} 是受污染地下水中最常见的电子受体之一,硫酸盐还原反应是最主要的生物自修复反应之一,在受污染的地下水系统中普遍存在^[1].

收稿日期: 2006-02-15 接受日期: 2006-04-07

* 国家自然科学基金资助项目(No. 20377030, No. 50278053) Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20377030, No. 50278053)

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: hongyang@sjtu.edu.cn)

硫酸盐还原菌(以下简称 SRB)是所有具有还原硫酸盐能力的原核微生物的总称,广泛存在于厌氧的泥浆、淡水的沉积物、咸水和海水生境、金属管道等环境中^[2]. SRB 不仅在地球的硫元素循环中起着重要作用,而且在水体和土壤中的有机污染物去除、金属离子还原、卤代有机化合物的生物降解等方面都扮演了重要的角色,对维持生态环境和保护人类健康都有深远的意义^[3]. 异化型亚硫酸盐还原酶(Dissimilatory sulfite reductase, DSR)是 SRB 生命活动中的关键酶之一,它催化 SO_3^{2-} 还原为 S^{2-} . 由于 *dsr* 基因在各种 SRB 中高度保守,依据 *dsr* 基因序列能判断出 SRB 间的亲缘关系,是一种很有价值的分析 SRB 种群系统的分类方法^[4].

本课题通过建立 *dsr* 基因克隆文库,分析研究了上海老港垃圾填埋场不同污染程度地下水样品中硫酸盐还原菌的群落结构和特点,为其地下水生物自修复进程的生物监测和主动生物修复研究提供信息和基础.

1 实验材料和方法

1.1 样品采集

2004 年 11 月,从老港垃圾填埋场环境监测井中的 G 井和 I 井进行了地下水取样. 监测井内壁为直径 110 mm 的 UPVC 管,底部预定深度设有滤水管,地下水只能从滤水管渗出. 为确保井水就是预定深度的实际地下水,正式取样前进行了洗井. 将采集的样品用若干 500 mL 预先湿热灭菌的 PVC 离心管盛装,尽快置于 4 °C 保存.

1.2 水样总 DNA 提取

采用压滤装置过滤水样. 微孔滤膜孔径 0.22 μm ,压力为 0.4 MPa 左右,滤膜上的滤饼即为浓缩后的悬浮物,将其移入 50 mL 离心管中,−20 °C 保存直至 DNA 的提取. 总 DNA 的提取选用化学破壁法完成^[5](若无特别说明,涉及到分子学实验部分的试剂和试剂盒均购自上海申能博彩生物科技有限公司).

1.3 *dsr* 基因片段 PCR 扩增

PCR 反应使用扩增 SRB *dsrAB* 目的基因的特殊引物^[4]: *dsr1f*: 5'-ACS CAC TGG AAG CAC G-3'; *dsr4r*: 5'-GTG TAG CAG TTA CCG CA-3' (由上海生物工程公司合成). PCR 热循环包括 30 个周期: 95 °C 30 s; 55 °C 30 s; 72 °C 3 min (最后一个循环 10 min),反应总体积 50 μL ,每种引物 50 pmol/ μL . 扩增的 *dsrAB* 片段长 1.9 kb, PCR 反应在 Gene Amp PCR System

2400 (Applied Biosystems, 美国)型扩增仪上进行.

1.4 克隆文库建立和 RFLP 分析

PCR 产物经电泳分离后,用手术刀在紫外灯下割取目标条带,使用试剂盒 3S DNA Purification Kit 回收纯化. 纯化的片段用试剂盒 T-Vector PCR product cloning kit (上海生物工程公司)连接到 pUCm-T 载体并转化 *E. coli* DH5 α ,随机挑取 100 个重组克隆子,建立克隆文库.

对文库内所有克隆子用碱裂解方法^[6]抽提质粒. 用 M13 reverse 和 T7 引物(对应插入位点的两端)PCR 扩增克隆的插入片段,验证是否存在插入目标片段以及大小是否正常. PCR 热循环包括 35 个周期: 94 °C 30 s; 57 °C 30 s; 72 °C 3 min (最后一个循环 8 min). 经验证的阳性质粒 PCR 产物用限制性内切酶 *Msp* I (37 °C, 1.5 h)进行酶切反应,2% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果并根据酶切指纹图对克隆子进行归类. 对具有不同酶切指纹图的克隆子进行测序,测序工作委托上海申能博彩生物科技有限公司完成.

1.5 系统发育分析

测得序列通过 NCBI (National Center For Biotechnology Information) 中的 BLAST 程序在 GenBank 数据库中搜索最为相似的核苷酸序列. 运用 DNAMAN v. 5. 2. 2. 0、ClustalX v. 1. 81 软件进行序列相似性比对和排序. 基于序列比对的种系进化树的绘制使用 ClustalX 软件完成,算法为邻位相连法(Neighbour-joining analysis),使用 Bootstrap 算法进行统计可靠性检验. 树形图在 TreeView1. 6. 5 软件上可视化.

1.6 核苷酸序列接受号

本研究获得的细菌 *dsr* 基因核苷酸序列在 GenBank 数据库中的序列接受号(Accession number)为 DQ250751 ~ DQ250791 (对应 G-OTU1 ~ G-OTU20 以及 I-OTU1 ~ I-OTU21)、DQ269924 ~ DQ269939 (对应 G-OTU21 ~ G-OTU29 以及 I-OTU22 ~ I-OTU28).

2 结果与分析

监测井 G 和 I 在老港垃圾填埋场 15 口监测井中具有一定代表性, G 井深 7 m, I 井深 8.5 m,两者深度差不多,但 G 井距离海岸线 3.1 km, I 井距离海岸线 1.5 km. 两个监测井的污染评价结果见表 1(数据由上海老港垃圾填埋场提供),可以看出, I 井的海水混入比例以及污染程度都明显高于 G 井.

表 1 G 井和 I 井垃圾渗沥液污染评价结果
Table 1 Evaluation of the pollution of Sample G and Sample I

监测井 Sample	污染程度 Pollution degree	海水混入比例 Proportion of seawater	$\rho/\text{mg L}^{-1}$						
			SO_4^{2-}	S^{2-}	NH_4^+-N	COD_{Mn}	Cd	Cr^{6+}	Pb
G	Medium	0.031	5.0	1.2	0.10	2	0.001	0.0091	0.0095
I	Serious	0.176	15.0	5.0	0.47	2	0.001	0.0098	0.0099

G 井 *dsr* 基因克隆文库有 88 个阳性克隆,将具有不同酶切指纹图的克隆子进行测序,获得长度约为 600 bp 的 *dsr* 基因序列,将这些序列与 GenBank 数据库中的核苷酸序列进行相似性比较,整理后得到 29 个操作分类单位(Operational taxonomic units, OTUs). I 井 *dsr* 基因克隆文库有 90 个阳性克隆,测序整

理后得到 28 个 OTUs.

上海老港垃圾填埋场地下水系中 SRB 主要是 α -紫细菌纲(α -Proteobacteria)^[2]中的 Desulfobacteraceae、Desulfobulbaceae 和 Syntrophobacteraceae. 两井中的 SRB 种类大致相同,但是种系结构和各个类群所占的比例不同(表 2). 优势菌群 Desul-

fobacteraceae 在 G 井和 I 井中的比例分别为 40.5% 和 49.0%。G 井中第二优势菌群是 Desulfobulbaceae (29.8%), 还有 5.9% 的克隆子与 *Desulfotomaculum* 这种革兰氏阳性细菌有很近的同源关系; I 井中第二优势菌群是 Syntrophobacteraceae, 所占比例为 30.9%。

根据所测序列的系统发育分析, 构建出种系进化树(图 1、图 2)。I 井进化树归类为 A~E 组, G 井进化树归类为 F~I 组, 以代表不同科的 SRB。

Desulfobacteraceae 在两井文库中都是最优势的一类, 这种 Desulfobacteraceae 占主导地位的 SRB 种系结构与许多盐湿地和高盐度生物膜样品的研究结果有很大的相似性^[7-9], 这种嗜盐或适盐性也与老港垃圾填埋厂特殊的地理环境相符。

G 井中大部分类 Desulfobacteraceae 克隆子(图 1 中 C 组)表现出嗜盐或适盐性, 所占比例为 31.0%。例如, G-OTU4 (克隆子数目占文库的 4.8%) 的最相似菌株是一种来自深海的克隆子^[10] (AB124918); G-OTU5、G-OTU13 和 G-OTU14 (克隆子数目共占文库的 22.6%) 和一种来自英格兰盐湿地的克隆子 (AY741567) 有很近的进化关系^[9]; G-OTU18 (克隆子数目占文库的 3.6%) 和一种在海水中发现的 SRB (AF420282) 进化关系很近^[11]。

I 井中 Desulfobacteraceae (图 2 中 E 组) 种类非常丰富, 其中克隆子的相似菌株均来自高盐环境, 占文库中 40.6% 的克隆子表现出嗜盐或适盐性。例如, I-OTU15 和 I-OTU16 (克隆子数目共占文库的 17.9%) 与一种 Victoria 海港沉积物克隆文库中的克隆子 (DQ112199) 表现为最近的亲缘关系, 和一种在

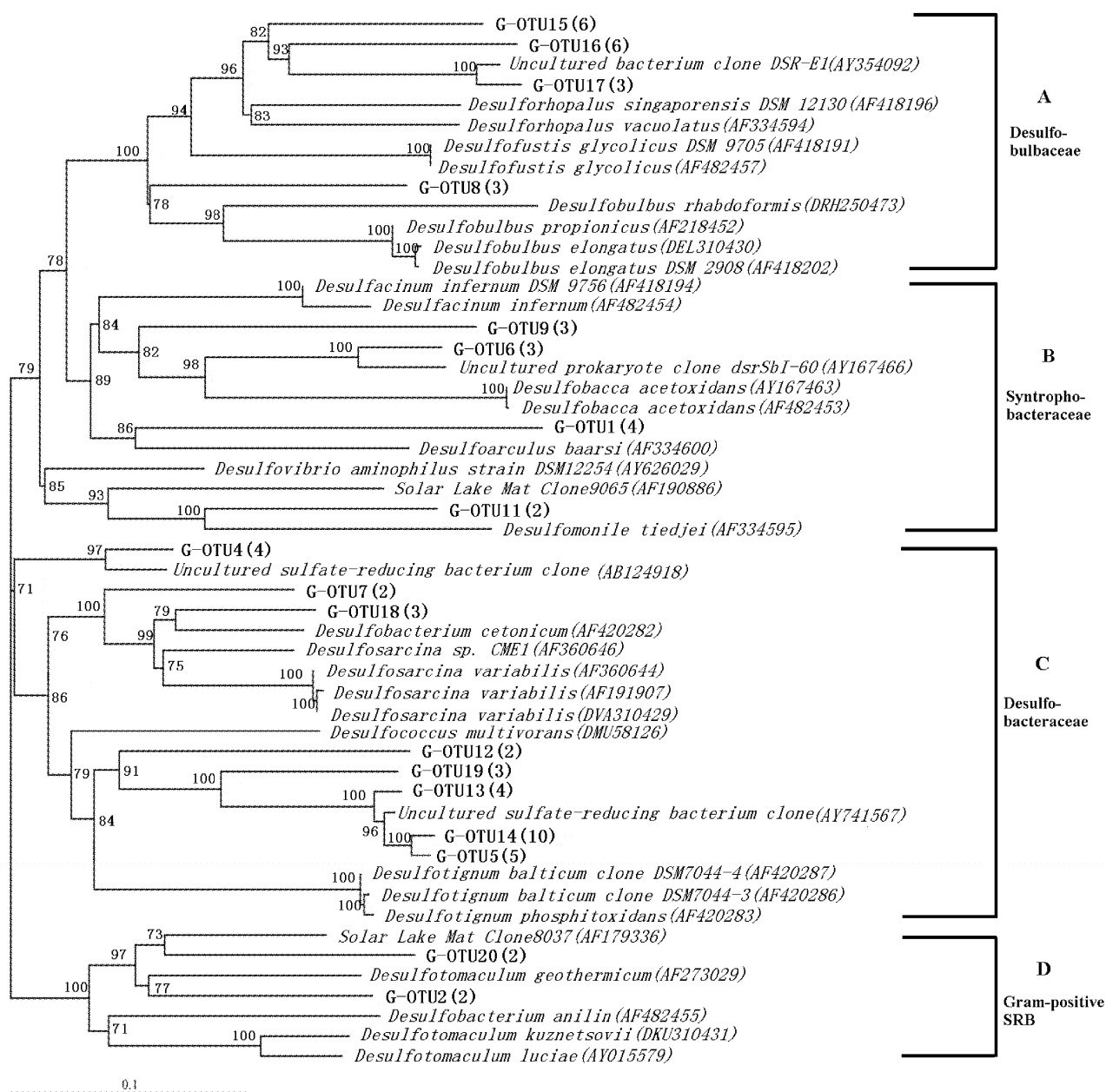
海水中发现的 SRB (AF388268) 进化关系也很近, 它还参与海底厌氧甲烷氧化反应^[7], 甲烷氧化反应也是地下水中主要的生物自修复反应之一, 所以此类细菌的存在与老港垃圾填埋厂特殊的地理环境相符。I-OTU4 (克隆子数目占文库的 12.0%) 和一种在海洋植物根表面泥样中发现的 SRB (AF419393S2) 亲缘关系最近, 它在还原硫酸盐的同时氧化丙酸盐^[12]。I 井的海水混入比例是 G 井的 6 倍左右, 两者的差异很可能是海水混入比例不同造成的影响。

3 讨论

综合看来, 上海老港垃圾填埋场地下水由于受到垃圾渗滤液和海水的多重污染, 微生物群落与国内外相关报道中的有很大差异。在荷兰 Banisveld 垃圾填埋场, 受渗沥液污染的地下水中 Desulfovibrionaceae 和 Desulfosporosinus 是主要的 SRB 类群^[13, 14]; 在国内的相关报道中, Desulfovibrionaceae 是重金属生物修复、废水处理等工艺中分离出的主要 SRB 类群之一^[16], 但其在在本研究的 G 井和 I 井文库中所占比例都很小(分别为 5.9% 和 5.8%); 在 LaSalle 一处垃圾填埋场, 地下水中主要的 SRB 类群是 Desulfovibrionaceae 和 Desulfobulbaceae^[15], 前者同样在本研究的两个克隆文库中所占比例都很小(分别为 5.9% 和 5.8%), 后者在 G 井克隆文库中是次优势类群, 所占比例为 29.8%。本研究地下水中的 SRB 主要是 Desulfobacteraceae (在 G 井和 I 井中分别占 40.5% 和 49.0%), 而在以上国外相关垃圾填埋场地下水研究中并未发现这类 SRB, 这与上海老港垃圾填埋场地下水系统所处的特殊的物理化学环境有关。

表 2 G 井和 I 井中各类 SRB 所占比例
Table 2 Composition of Sample G and Sample I *dsrAB* clone libraries

所属 SRB 类群 Phylogenetic group	OTU 编号(其中克隆子数目)		OTU No. (Number of clones)	
	Sample G		Sample I	
Desulfobacteraceae	OTU4 (4)	OTU13 (4)	OTU8 (2)	OTU15 (12)
	OTU7 (2)	OTU5 (5)	OTU1 (5)	OTU20 (1)
	OTU18 (3)	OTU14 (10)	OTU12 (1)	OTU22 (1)
	OTU12 (2)	OTU25 (1)	OTU14 (4)	OTU23 (1)
	OTU19 (3)		OTU4 (10)	OTU27 (1)
			OTU16 (3)	
	40.5%		49.0%	
Syntrophobacteraceae	OTU9 (3)	OTU11 (2)	OTU21 (1)	OTU9 (6)
	OTU6 (3)	OTU21 (1)	OTU5 (2)	OTU7 (4)
	OTU10 (1)	OTU27 (1)	OTU13 (3)	OTU19 (1)
	OTU1 (4)		OTU2 (2)	OTU11 (3)
			OTU3 (2)	OTU6 (2)
	17.9%		30.9%	
Desulfobulbaceae	OTU15 (6)	OTU8 (3)	OTU10 (1)	
	OTU16 (6)	OTU22 (1)	OTU17 (7)	
	OTU3 (4)	OTU24 (1)	OTU18 (3)	
	OTU17 (3)	OTU28 (1)	OTU24 (2)	
	29.8%		14.3%	
Desulfovibrionaceae	OTU23 (3)		OTU25 (1)	
	OTU29 (2)		OTU26 (3)	
			OTU28 (1)	
	5.9%		5.8%	
<i>Desulfotomaculum</i> (Gram-positive SRB)	OTU2 (2)			
	OTU20 (2)			
	OTU26 (1)			
	5.9%			

图1 基于G井 *dsr* 基因序列构建的种系进化树Fig. 1 Phylogenetic tree based on the sequences of PCR-amplified *dsr* gene fragments from Sample G

Numbers of the clones in each OTU are given in parentheses. Bootstrap values based on 100 replicates are shown with more than 50% bootstrap support. The scale bar indicates 10% estimated sequence divergence. The same below

Desulfobacteraceae 在两井中均占主导地位, I 井文库中有 40.6% 类 Desulfobacteraceae 克隆子具有嗜盐或适盐性, G 井有 31.0% 克隆子具有嗜盐或适盐性, 与他们进化关系最近的细菌均来自于高盐度生物膜或是盐湿地等含盐浓度较高的环境. 两口井都不同程度地受到海水的污染, I 井的海水混入比例是 G 井的 6 倍左右, 这就造成了两井中克隆子嗜盐或适盐性的差异. SRB 主要存在于氧气含量较少的深层水体中和厌氧淤泥环境中, 硫酸盐还原是其中一个重要的新陈代谢活动. Desulfobacteraceae 在还原硫酸盐的过程中, 伴随着醋酸盐或其他短链脂肪酸有机物的转化, 它们将这些有机物完全氧化成

CO₂ 和其他产物, 并且可利用的电子受体范围非常广^[8, 9].

不同监测井其污染程度的不同也使得其中各类 SRB 的分布不同. 在污染较轻的 G 井中次优势类群是 Desulfobulbaceae (29.8%), 有研究表明, 这类 SRB 在还原硫酸盐的同时不能完全氧化有机物, 它们只能把乳酸盐、乙醇、糖类和氨基酸氧化成醋酸盐^[8, 9]. 我们只在 G 井文库中发现了小部分的类 Desulfotomaculum 克隆子 (5.9%), 赵海、李安明等曾在四川自贡盐厂卤水污泥中分离出一株 Desulfotomaculum 菌, 且具有中度嗜盐性, 但在本研究中没有发现此类 SRB 有明显的适盐或嗜盐性^[17, 18]. 在污染严重的 I 井中, 次优势类群是 Syntrophobacter-

aceae (30.9%), 同样有研究表明, 这是又一类在还原硫酸盐的同时可以将有机物完全氧化的 SRB^[8, 9]; 而在 G 井文库中所

占比例只有 17.9%. 可见海水混入比例和污染程度的不同对地下水系统中 SRB 的种群结构具有较大的影响。

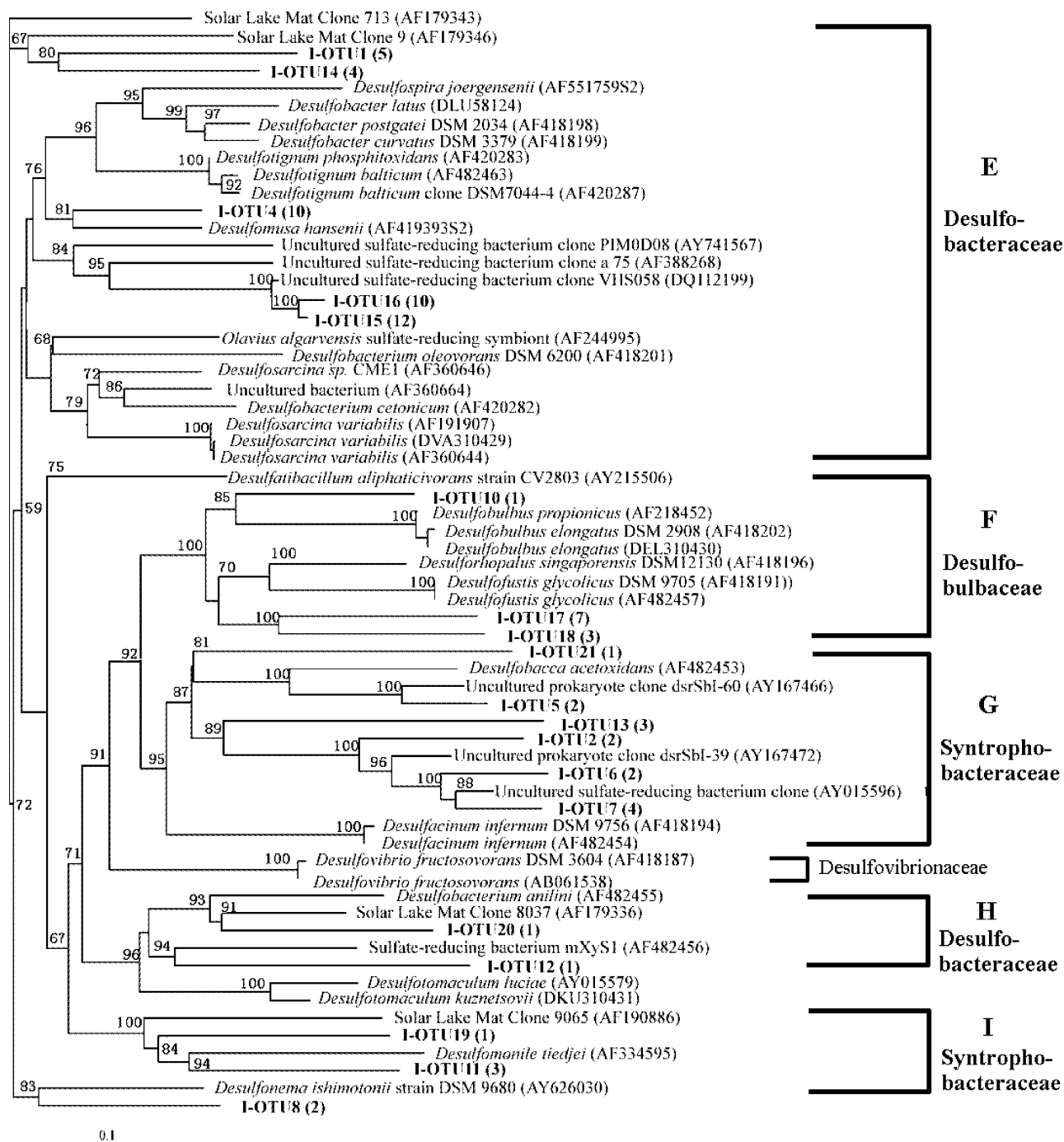


图 2 基于 I 井 *dsr* 基因序列构建的种系进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the sequences of PCR - amplified *dsr* gene fragments from Sample I

4 结论与展望

上海老港垃圾填埋场地下水系统中主要 SRB 类群是 Desulfobacteraceae, 并且具有相当程度的嗜盐或适盐性 (31.0% 和 40.6%), 正是由于老港地下水系统受海水和渗滤液双重污染这种特殊的物理化学环境, 导致了其与国内外其它垃圾填埋场地下水中主要微生物种群结构的差别。此外, 海水混入比例和

污染程度也影响着老港垃圾填埋场地下水样中 SRB 的种群结构。运用分子生物学手段能在不依赖于纯培养的基础上对地下水系统中 SRB 群落结构进行分析, 今后的实验将结合多种分析手段, 如应用 DGGE、荧光原位杂交等其他分子生物学方法, 以及摸索合适的纯培养条件, 对纯培养得到的重要菌株进行生理生化分析; 从而更全面地了解上海老港垃圾填埋场地下水中 SRB 的群落结构和代谢功能。

References

- 1 Ludvigsen. Anaerobic microbial redox processes in a landfill leachate contaminated aquifer. *J Contam Hydrol*, 1998, **33**: 273 ~ 291
- 2 Chen W (陈梧), Yu LJ (余龙江), Li CY (李春艳), Xiang F (向福), Liu Z (刘智). Phylogenetic analysis of spore forming thermophilic sulfate-reducing bacteria from oil field. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11** (6): 733 ~ 737
- 3 Castro HF, Williams NH, Ogram A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **31**: 1 ~ 9
- 4 Wagner M, Roger AJ, Flax JL, Brusseau GA, Stahl DA. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 2975 ~ 2982
- 5 Bond PL, Hugenholtz P, Keller J, Blackall LL. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 1910 ~ 1916
- 6 Burke DJ, Hamerlynck EP, Hahn D. Interactions among plant species and microorganisms in salt marsh sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 1157 ~ 1164
- 7 Thomsen TR, Finster K, Ramsing NB. Biogeochemical and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in a marine sediment. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 646 ~ 656
- 8 Dhillon A, Teske A, Dillon J, Stahl DA, Sogin ML. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 2765 ~ 2772
- 9 Bahr M, Crump BC, Klepac-Ceraj V, Teske A, Sogin ML, Hobbie JE. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh. *Environ Microbiol*, 2005, **8**: 1175 ~ 1185
- 10 Nakagawa T, Nakagawa S, Inagaki F, Takai K, Horikoshi K. Phylogenetic diversity of sulfate-reducing prokaryotes in active deep-sea hydrothermal vent chimney structures. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **232** (2): 145 ~ 152
- 11 Friedrich MW. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *J Bacteriol*, 2002, **184** (1): 278 ~ 289
- 12 Finster K, Thomsen TR, Ramsing NB. *Desulfomusa hansenii* gen. nov., sp. nov., a novel marine propionate-degrading, sulfate-reducing bacterium isolated from *Zostera marina* roots. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **11**: 2055 ~ 2061
- 13 Rölöf WFM, Breukelen BM, Braster M, Lin L, Verseveld HW. Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a Landfill Leachate-Polluted Aquifer. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **10**: 4619 ~ 4629
- 14 Minz D, Flax JL, Green SJ, Muyzer G, Cohen Y, Wagner M, Rittmann BE, Stahl DA. Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **10**: 4666 ~ 4671
- 15 Lloyd-Jones G, Laub P. A molecular view of microbial diversity in a dynamic landfill in Quebec. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **162**: 219 ~ 226
- 16 Li XR (李新荣), Shen DZ (沈德忠). Ecological characters and application of sulfate-reducing bacteria. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1999, **5** (suppl): 10 ~ 13
- 17 Zhao H (赵海), Li AM (李安明), Wan B (万波), Liu KX (刘克鑫). Isolation and physiology of a moderate halophilic sulfate-reducing bacterium. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1999, **1** (1): 61 ~ 67
- 18 Chang YJ, Peacock AD, Long PE, Stephen JR, McKinley JP, Macnaughton SJ, Hussain AK, Saxton AM, White DC. Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a Uranium Mill Tailings Site. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 3149 ~ 3160