

尾矿废水对河流沉积物和稻田土壤细菌多样性的影响

贺梦醒,高毅,孙庆业*

(安徽大学生命科学学院,合肥 230039)

摘要:采用 PCR-DGGE 以及分子克隆技术,探讨富含重金属的尾矿废水污染条件下稻田土壤以及河流沉积物中细菌群落结构和多样性变化情况.结果表明,铜尾矿库废水导致了河流沉积物(H1~H6)和稻田土壤(D5)的 Fe、As、Cu、Pb 和 Zn 污染,其含量远高于未受铜尾矿废水污染的稻田土壤(D1~D4),且 As、Fe、Cu 的含量显著影响细菌群落结构.河流沉积物中细菌多样性低于稻田土壤,污染稻田土壤(D5)中细菌多样性高于未受污染的稻田土壤(D1~D4).DGGE 优势条带的测序及比对结果显示河流沉积物和稻田土壤中细菌主要优势类群包括 Actinobacteria、Acidobacteria、Firmicutes、 α -Proteobacteria 和 β -Proteobacteria,但 α -Proteobacteria 在河流沉积物中不占优势.

关键词:尾矿废水;重金属;16S rDNA;细菌多样性;PCR-DGGE

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)06-1778-08

Influence of Mine Tailings Drainage on Microbial Diversity in the River Sediment and Paddy Soil

HE Meng-xing, GAO Yi, SUN Qing-ye

(School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China)

Abstract: The changes of structure and diversity of microbial communities in paddy soil and river sediment defiled by heavy metals were explored with PCR-DGGE and cloning technique. The results showed that paddy soil and river sediment were contaminated by drainage from the impoundment of copper mine tailings containing Fe, As, Cu, Pb and Zn. The contents of heavy metals in contaminated sediments (H1-H6) and paddy soil (D5) were much higher than those in the paddy soils (D1-D4). The As, Fe and Cu contents significantly affected the structure of bacterial community. The diversities of microbial communities in river sediments were lower than that in paddy soils. The contaminated paddy soil (D5) presented higher microbial diversity comparing to the uncontaminated paddy soils (D1-D4). The sequencing of prominent DGGE bands and BLAST results indicated that dominant taxa in river sediments and paddy soils were Actinobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, α -Proteobacteria and β -Proteobacteria, whereas the α -Proteobacteria was not dominant in river sediments.

Key words: tailings drainage; heavy metals; 16S rDNA; microbial diversity; PCR-DGGE

铜尾矿(tailings)是铜矿开采、浮选后产生的矿业固体废弃物,其中含有一定量的重金属硫化物.长期暴露于空气中的铜尾矿,金属硫化物(特别是 FeS_2)发生氧化反应形成富含重金属的酸性矿业废水,这些酸性矿业废水对周围的农田、河流等生态系统造成了严重的影响.

近年来,重金属污染与环境中微生物群落之间的关系一直是污染生态学的热点问题^[1],利用微生物学指标来表征环境中重金属的污染越来越受到人们的普遍关注.有关研究表明,重金属污染能明显地降低微生物生物量和活性,影响微生物群落的结构和多样性组成^[2~4].在重金属胁迫条件下,微生物用于生长的能量可能被迫转移用于维持细胞功能,这可能是造成生物量、生物活性降低的一个重要原因;而微生物生长非必需的元素如 Cd、Pb 等的生物毒性更强,污染条件下会降低微生物的数量和种类从而影响微生物的群落结构和多样性组成^[5,6],

故微生物群落结构的变化被认为是最有潜力的敏感性生物指标.

传统的平板培养分离方法分离出的微生物种类只占土壤微生物种类总数的 0.1%~1%,不能很好地反映土壤微生物多样性信息^[7],且这种分离培养方法不能很好地反映土壤微生物多样性的原始状态.比较而言,分子生物学技术^[8~10](如 PCR-DGGE、PCR-SSCP 和 PCR-RFLP)能够不依赖于传统培养方法在分子水平上对样品微生物多样性进行快速、精确的诊断,从而得到更为全面的生物信息.自 1993 年 Muyzer 等^[11]将 PCR-DGGE 技术首次应用于微生物生态学研究以来,该技术在微生物群落结

收稿日期:2010-06-29;修订日期:2010-09-01

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA06Z359);安徽省自然科学基金项目(070415208)

作者简介:贺梦醒(1985~),女,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物学,E-mail:mengxing198520@163.com

* 通讯联系人,E-mail:sunqingye@ahu.edu.cn

构、多样性和种群动态监测中已获得广泛应用^[12~15]。近年来,PCR-DGGE 技术被应用于考察重金属胁迫下微生物的遗传多样性和群落结构的变化,能够更直接更可靠地反映重金属胁迫下土壤微生物的组成情况^[1]。

目前,国内外关于尾矿废弃地重金属与微生物群落结构和多样性研究主要集中于酸性尾矿废水中微生物群落结构和多样性变化等方面^[16~18],而关于富含重金属的尾矿废水对周围农田和河流沉积物生态系统中微生物群落结构和多样性变化情况的研究鲜见报道。本研究利用 PCR-DGGE 与分子克隆技术,分析了受铜陵铜尾矿废弃地重金属废水影响的农田土壤和河流沉积物中的微生物群落结构和多样性变化,以期重金属矿业废弃地的环境风险评价提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2009 年 4 月采集安徽省铜陵市杨山冲铜尾矿废弃地(30°54' N, 117°53' E)周围的河流沉积物及稻田土壤样品(图 1),采样区面积约 1 km²。在所采集的稻田土壤样本中,D1~D4 远离尾矿库、地势较高,未受到尾矿库废水直接污染,D5 直接接受尾矿库废水灌溉;河流样品 H1~H6 受尾矿库重金属废水不同程度污染。

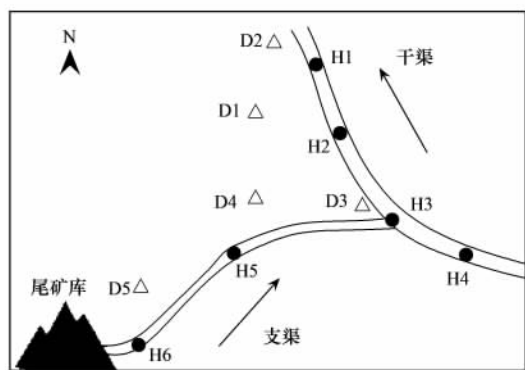


图 1 采样点示意

Fig. 1 Distribution of the sampling sites

稻田土壤(D1~D5)采集:在选定区域用土钻随机采集稻田中相邻 4 点的土壤样品,采集深度为 0~15 cm;河流沉积物(H1~H6)采集:在选定区域用 PVC 管随机采集沉积物样本,每个样本 4 点重复,采集深度 5~10 cm。将采集的样品立即带回实验室,将相同样地的 4 份样品等量混匀、分装,置于

-20℃ 保存,供细菌分子生物学分析使用;其余样品室内自然风干、研磨、过筛,用于理化性质和重金属含量分析。

1.2 样品理化性质和重金属总量分析

供试样品的 pH 值、总氮(N)、总磷(P)分别用 pH 计($W_{\text{样品}}:V_{\text{蒸馏水}}=1:5$)、凯氏定氮法、钼蓝比色法(硫酸-高氯酸消解)进行测定^[19],有机质用灼烧法(550℃±5℃,6 h)测定^[20],重金属(Cr、Fe、As、Cu、Pb 和 Zn)总量的测定采用 HF-HNO₃-HClO₄ 消煮,ICP-AES 测定^[21]。

1.3 数据处理

采用 SPSS 16.0 软件对数据进行分析,用 One-Way ANOVA (Duncan 检验)法进行显著相关性统计分析($p \leq 0.05$)。使用 CANOCO 4.5 软件对 DGGE 揭示的细菌群落结构与环境参数进行典范相关分析(canonical correlation analysis, CCA),采用蒙特卡罗排列检验进行显著性检验。

1.4 微生物分子生物学分析

1.4.1 基因组总 DNA 的提取

参照 Zhou 等^[22]的方法,取 0.5 g 供试样品于 2 mL 的灭菌离心管中,加入 540 μL DNA 提取缓冲液[0.1 mol/L PBS (pH = 8), 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris base (pH = 8), 1.5 mol/L NaCl, 1.0% CTAB]和 8 μL 的蛋白酶 K (10 mg/mL),在 37℃、225 r/min 振荡 30 min 后,加入 60 μL 20% 的 SDS,然后 65℃ 水浴 2 h (每隔 15 min 轻轻摇动一次),4℃ 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液;沉淀中加入 90 μL 的 DNA 提取液、10 μL 20% 的 SDS,漩涡振荡 10 s,65℃ 水浴 10 min,离心 10 min,取上清液,重复此步骤 1 次,将 3 次上清混合。在上述上清中加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)混匀,8 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入另一只离心管中,重复一次,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)混匀,8 000 r/min 离心 10 min 后,在上清液中加入 0.6 倍体积异丙醇混匀,室温静置 1 h 后于 25℃ 12 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,70% 冰乙醇清洗 2 次,无菌吹干,用 30 μL TE 缓冲液溶解沉淀得到总 DNA 的粗提液,-20℃ 保存,1.2% 的琼脂糖凝胶检测提取结果。

1.4.2 PCR 扩增

采用嵌套式 PCR,第一轮 PCR:采用细菌通用引物 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')和 1492R(5'-TGA CTG ACT GAG GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3')对 16S rDNA 接近全长的序列进

行扩增^[23]. 扩增体系(50 μL):10 × PCR buffer 5 μL (含 Mg²⁺),2 μL 稀释 50 倍的 DNA 粗提液为模板,上下游引物各 2 μL(10 μmol/L,上海生工),0.5 μL *Taq* 酶(5 U/μL),1 μL dNTP(10 mmol/L),2 μL BSA(25 mg/mL),超纯水补足 50 μL. 反应条件为:采用降落 PCR,94℃ 5 min,94℃ 60 s,65℃(前 20 个循环每个循环降 0.5℃直降至 55℃)45 s,72℃ 120 s,退火 55℃再延伸 10 个循环,共 30 个循环;72℃ 5 min,4℃ 保存.

第二轮 PCR:用细菌 16S rDNA 的 V3 ~ V5 区特异性引物 GC357F(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')和 907R^[24](5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'),扩增体系除模板是第一轮扩增产物的 100 倍稀释液以外其余与第一轮相同. 反应条件为:94℃ 5 min,94℃ 1 min,65℃(前 20 个循环每个循环降 0.5℃直降至 55℃)1 min,72℃ 3 min,退火 55℃再延伸 10 个循环,共 30 个循环,72℃ 8 min,4℃ 保存.

1.4.3 DGGE 电泳

制备 6% 的聚丙烯酰胺凝胶,变性剂梯度为 45% ~ 65%(100% 变性剂含 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺),其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增,每孔上样 30 μL PCR 产物(含 6 × Loading buffer),在 100 V、60℃ 下电泳 17 h,核酸染料染色 30 min,Tanon 凝胶成像系统进行图像采集分析,用 Tanon Gis 软件分析各样品电泳条带的数目和强度. 每个样品条带的细菌群落多样性用 Shannon-Wiener 指数(H')^[25] 计算表示:

$$H' = - \sum_{i=1}^s \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

式中, s 为各样品泳道的 DGGE 条带数; n_i 为各条带

峰面积; N 为所有峰的总面积.

1.4.4 切带、克隆、测序分析

切下 DGGE 胶上较亮的优势条带,用 30 μL TE 浸泡,4℃ 静置过夜. 取 2 μL DNA 浸出液为模板按照上述第二轮扩增方法进行扩增,引物为 357F 和 907R(无 GC 夹). 扩增产物用胶回收试剂盒进行回收纯化,然后连接到 *pEASY-T1* 克隆载体上,转化至 *E. coli* Top10 感受态细胞中,37℃ 孵育 1 h,涂布于含有氨苄青霉素的 LB 培养基平板,37℃ 培养过夜. 挑选抗氨苄青霉素的白色克隆子,接种于含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37℃ 摇床培养 4 ~ 8 h. 采用 T 载体通用引物 M13 进行菌落 PCR,电泳检测是否为阳性克隆,将阳性克隆子菌液送至上海生工生物工程有限公司进行测序. 登录 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),将所得的序列提交至 GenBank 数据库中运用 BLAST 进行序列检索和同源性比对,并用 Mega 4.1 进行数据分析.

2 结果与讨论

2.1 样品的理化性质和重金属含量

稻田土壤和沉积物样品理化性质及重金属含量分析结果见表 1. 由表 1 可知,受尾矿库废水污染的稻田土壤样品(D5) pH 值呈微碱性(7.49)、未受尾矿废水污染的稻田土壤(D1 ~ D4)呈酸性(5.32 ~ 6.39),河流沉积物样品的 pH 值均呈微碱性(7.46 ~ 7.82).

河流沉积物的有机质平均含量 47.0 mg·g⁻¹(30.9 ~ 67.0 mg·g⁻¹)与稻田土壤 48.0 mg·g⁻¹(37.1 ~ 62.4 mg·g⁻¹)差异性较小. 河流沉积物平均 C/N 为 61.9(21.4 ~ 102.1),不同样本 C/N 比差异很大,而稻田土壤平均 C/N 比为 47.1(45.1 ~ 49.7),不同样本之间 C/N 比差异很小. 河流沉积物

表 1 理化性质以及重金属总量(M ± S. D., $n = 4$)

Table 1 Basic properties and total concentration of heavy metals

编号	pH	总 N /g·kg ⁻¹	总 P /g·kg ⁻¹	有机质 /mg·g ⁻¹	重金属总量					
					Cr/mg·kg ⁻¹	Fe/g·kg ⁻¹	As/g·kg ⁻¹	Cu/g·kg ⁻¹	Pb/g·kg ⁻¹	Zn/g·kg ⁻¹
H1	7.55 ± 0.05	0.57 ± 0.13 ^{ab}	3.3 ± 0.4 ^c	58.6 ± 10.1 ^{bc}	108.9 ± 2.7 ^{bc}	139.0 ± 13.4 ^{de}	0.68 ± 0.08 ^{bc}	1.59 ± 0.03 ^{bc}	0.88 ± 0.12 ^c	1.57 ± 0.06 ^d
H2	7.82 ± 0.16	0.42 ± 0.14 ^a	2.7 ± 0.6 ^d	30.9 ± 8.5 ^a	90.3 ± 3.8 ^{abc}	103.6 ± 2.7 ^c	0.33 ± 0.09 ^{ab}	2.25 ± 0.18 ^{de}	0.49 ± 0.13 ^b	1.65 ± 0.09 ^d
H3	7.64 ± 0.08	1.45 ± 0.63 ^{de}	3.4 ± 0.3 ^c	67.0 ± 5.6 ^c	111.5 ± 13.3 ^c	141.1 ± 15.1 ^e	1.105 ± 0.18 ^c	2.35 ± 0.32 ^e	0.79 ± 0.13 ^c	1.56 ± 0.20 ^d
H4	7.76 ± 0.11	0.81 ± 0.24 ^{abc}	3.1 ± 0.5 ^{de}	58.5 ± 11.8 ^{bc}	87.6 ± 24.1 ^{ab}	112.4 ± 37.6 ^c	0.64 ± 0.17 ^{bc}	1.33 ± 0.26 ^b	1.18 ± 0.29 ^d	1.63 ± 0.16 ^d
H5	7.65 ± 0.08	1.62 ± 0.65 ^e	3.6 ± 0.5 ^e	34.6 ± 10.6 ^a	84.5 ± 9.0 ^a	101.1 ± 11.6 ^c	1.76 ± 0.35 ^d	1.86 ± 0.45 ^{cd}	0.15 ± 0.03 ^a	0.76 ± 0.11 ^c
H6	7.46 ± 0.14	0.58 ± 0.56 ^{ab}	3.4 ± 0.7 ^e	32.3 ± 19.7 ^a	109.6 ± 21.0 ^{bc}	116.7 ± 25.0 ^{cd}	2.00 ± 0.85 ^d	1.56 ± 0.66 ^{bc}	0.16 ± 0.04 ^a	0.64 ± 0.13 ^{bc}
D1	5.35 ± 0.17	0.82 ± 0.04 ^{abc}	1.5 ± 0.3 ^a	37.1 ± 7.1 ^a	86.7 ± 11.5 ^{ab}	21.7 ± 3.4 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.02 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	0.15 ± 0.02 ^a
D2	5.32 ± 0.24	0.99 ± 0.16 ^{bcd}	2.0 ± 0.3 ^{abc}	45.6 ± 9.0 ^{ab}	95.2 ± 11.3 ^{abc}	28.3 ± 2.2 ^a	0.04 ± 0.02 ^a	0.09 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.07 ^a	0.20 ± 0.02 ^a
D3	6.39 ± 0.65	1.14 ± 0.04 ^{cde}	2.3 ± 0.1 ^{bc}	56.7 ± 6.7 ^{bc}	99.4 ± 11.2 ^{abc}	38.4 ± 3.2 ^a	0.07 ± 0.04 ^a	0.25 ± 0.05 ^a	0.11 ± 0.04 ^a	0.29 ± 0.06 ^a
D4	5.71 ± 0.31	1.27 ± 0.12 ^{cde}	2.0 ± 0.3 ^{ab}	62.4 ± 8.5 ^c	89.9 ± 9.9 ^{abc}	38.9 ± 2.6 ^a	0.11 ± 0.04 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	0.25 ± 0.03 ^a
D5	7.49 ± 0.17	0.84 ± 0.17 ^{abc}	2.4 ± 0.4 ^{bc}	38.3 ± 9.5 ^a	101.9 ± 21.1 ^{abc}	65.2 ± 13.8 ^b	0.49 ± 0.40 ^{ab}	0.48 ± 0.18 ^a	0.09 ± 0.05 ^a	0.50 ± 0.16 ^b

中的总 N 平均含量为 $0.91\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($0.42 \sim 1.62\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 略低于稻田土壤样品 $1.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($0.82 \sim 1.27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$); 总 P 平均含量为 $3.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($2.7 \sim 3.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 高于稻田土壤样品 $2.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($1.5 \sim 2.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). 统计检验表明, H1 和 H5 总 N 含量存在显著的差异性, 而稻田各样品间差异性不显著; H2 与 H5 以及 D1 与 D5 总 P 含量差异性显著.

受尾矿废水污染的河流沉积物中重金属含量均高于未受尾矿废水污染的稻田土壤样品 (D1 ~ D4, 表 1). 河流沉积物中重金属 Cr、Fe、As、Cu、Pb 和 Zn 含量分别是未受尾矿废水污染的稻田土壤样品的 1.1、3.7、18.9、11.1、7.8 和 5.9 倍. 表明来自尾矿的废水已经导致河流沉积物 Fe、As、Cu、Pb 和 Zn 污染. 比较受尾矿废水污染的稻田土壤 (D5) 与未受污染的稻田土壤 (D1 ~ D4), 前者重金属 Cr、Fe、As、Cu、Pb 和 Zn 含量分别是后者的 1.1、2.0、8.6、2.9、1.2 和 2.3 倍, 表明尾矿废水灌溉导致稻田土壤的 Fe、As、Cu、Pb 和 Zn 污染.

2.2 DGGE 指纹图谱、细菌群落多样性分析

DGGE 指纹图谱可以检测随着环境参数的改变细菌群落多样性及结构变化情况. 供试样品 DGGE 电泳结果 (图 2) 可以看出, 不同样品 DGGE 指纹图谱的条带数目不等、强度不同. 稻田土壤各样品的 DGGE 总的条带数目略高于河流沉积物样品, 而优势种群的数量则相对较少. 从图 2 还可以看出, 受尾矿废水污染稻田土壤样品 (D5) 的 DGGE 条带数目以及优势菌群数量均高于其他未污染的稻田土壤样品 (D1 ~ D4); 河流沉积物各样品中两者的差异性不显著.

多样性指数是反映物种丰富度和均匀度的综合指标, 其值越高表明群落结构越复杂^[26]. PAST 软件计算各样品的细菌群落多样性结果见表 2. 表 2 表明, 11 个样品的细菌群落多样性指数 (Shannon- H')

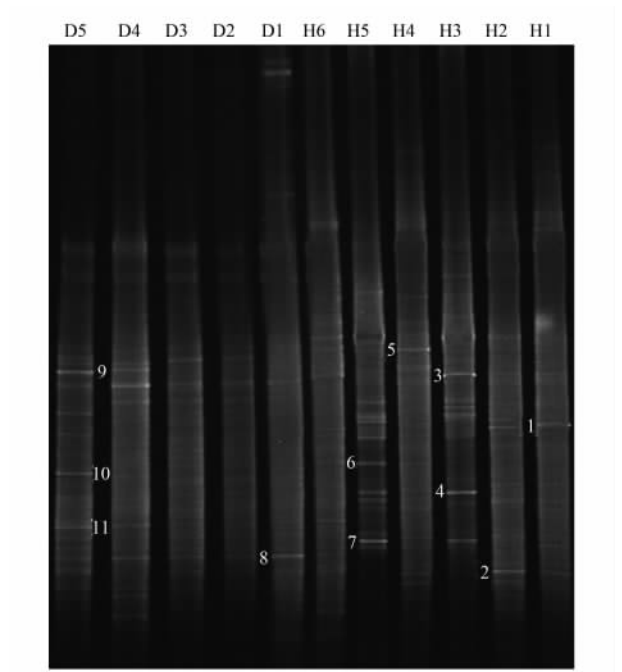


图 2 供试样品的 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE profiles of samples

存在一定的差异: 稻田土壤中细菌多样性指数总体上略高于河流沉积物样品, 其最大值出现在受污染的 D5 样品中; 河流沉积物中细菌多样性指数的最小值出现污染较严重的 H6 中, 最大值出现在中度污染区 H2 中, 其结果与 Zhao 等^[27]研究表明复合重金属污染的农田土壤其细菌多样性指数最大值并非出现在轻度污染区的报道相吻合. 这说明细菌群落多样性与尾矿废水重金属污染之间并非是简单的负相关, 样品的其他理化性质、细菌之间的相互作用等因素均可对环境样品中细菌群落结构和多样性产生影响, 诸如 pH、富含三价铁的表面沉积物以及有机物的输入^[27,28]等. CCA 分析也表明供试样品的 pH 值以及总磷、砷、铁、铜的含量显著影响细菌群落结构 ($p < 0.05$), 见表 3.

表 2 供试样品的细菌多样性指数

Table 2 Diversity index of bacterial communities in samples

项目	H1	H2	H3	H4	H5	H6	D1	D2	D3	D4	D5
Shannon- H'	2.485	2.773	2.708	2.485	2.485	2.398	2.89	2.565	2.708	2.708	2.944

受自然、人类活动干扰强烈的河流, 沉积物中有有机物氧化能力较强、有机物的外源性输入较少^[41], 重金属含量明显高于稻田土壤 (如 Fe, 表 1), 因而细菌群落结构简单. 而河流沉积物中一些突出的优势类群可能是因为长期受来自尾矿废弃地富含重金属废水的污染改变了原有细菌群落结构, 导致某些

对重金属产生了抗性 or 耐性的细菌种群优势度有所提高, 而另外一些对重金属污染较为敏感的细菌类群的生长、繁殖受影响. 稻田土壤由于受自然和人为因素长期共同作用, 土壤中积累了大量有机物和养分^[29], 创造了有利于细菌生存活动的生境. 未受尾矿废弃地废水污染的稻田土壤细菌的优势种群数量

并不多,可能主要由于在无高浓度重金属胁迫的状况下,细菌群落内部的种间关系稳定,各类群细菌之间处于一种平稳的生长状态.

表3 细菌群落结构参数与理化性质的典范相关分析¹⁾
Table 3 Canonical correlation analysis between the parameters of microbial communities structure and physicochemical properties

理化性质	细菌群落结构参数		
	R^2	F	p
pH	0.914	1.650	0.030 0 *
TP	0.919	1.780	0.014 0 *
As	0.908	1.579	0.046 0 *
Fe	0.934	1.788	0.016 0 *
Cu	0.923	1.706	0.026 0 *

1) * 表示相关显著($p < 0.05$)

2.3 优势种群分析

挑选 DGGE 图谱中 11 个优势条带进行切胶回收、克隆测序,将所得到的序列提交至 GenBank 数据库,登录号为 HM484210 ~ HM484220. 用 BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行序列检索和同源性比较分析. 结果表明,这些近缘种都来自于土壤环境,其中有 9 条序列与土壤环境中未培养的细菌相似,这说明所研究的稻田土壤和河流沉积物中的细菌大多数属于未培养的,这与其他人的研究结果相一致^[30],另外 2 条序列分别属于 Firmicutes 和 Actinobacteria.

已有研究表明,在分析环境样品 DGGE 条带时,一条 DGGE 条带有可能并非只代表一个种属^[31],且与不同类型的细菌种群可能有着相同的迁移行为,从而导致对环境样品中细菌群落的多样性的低估^[32,33]. 本研究中共切胶分离 14 个 DGGE 条带,仅有 11 个条带成功克隆测序分析,其余 3 个条带因具有多态性而未获得测序结果,这在其它研究报道也有类似的情况^[34]. 因此要对环境样品中的细菌群落多样性进行更为准确地描述,有必要将 DGGE 和其它分子生物学方法结合起来进行研究.

用邻接法 (Neighbor-joining method) 对以上 11 个条带的克隆序列进行系统进化树的构建 (图 3),结果表明这 11 个克隆序列都属于细菌界,归属于 5 大 类 群: Actinobacteria、Acidobacteria、Firmicutes、 α -Proteobacteria 和 β -Proteobacteria. 其中 β -Proteobacteria 所含的条带数最多 (条带 1、5、7 和 10),其次是 Actinobacteria、Acidobacteria 和 Firmicutes 各含有 2 个条带以及仅含 1 个条带的 α -Proteobacteria. 条带 3、5 和 8 与 GenBank 数据库

中最相近的近缘种相似度都在 95% 以下,表明这 3 个序列所代表的细菌可能是新的未培养细菌. 尽管条带 1 和 7 所代表序列无法确定其所属类群,但由系统发育树分析可以看出均分布于 β -Proteobacteria 分支内 (图 3),故推测它们属于 β -Proteobacteria 类群.

Proteobacteria 类群广泛存在于农田^[35]、河流、海洋沉积物^[36]等环境中. 本研究中,河流沉积物中的 Proteobacteria 主要为 β -Proteobacteria 亚群 (条带 1、5、7 和 10),这与其他人报道的沉积物中主要是 α -Proteobacteria 和 δ -Proteobacteria 亚群有一些差别^[37]. 单独归为一类的条带 9 是污染稻田土壤样品 (D5) 中的优势菌群,归属于 Proteobacteria 的另一亚群即 α -Proteobacteria 亚群.

隶属于 Firmicutes 条带 3 和 6 是一类低 G + C 的革兰氏阳性细菌,存在于所有的河流沉积物和稻田土壤样品中,研究表明 Firmicutes 类群广泛分布于土壤、水体和海洋^[38,39]等环境中. 本研究中,来自河流沉积物和稻田土壤的条带 3 和 6 的亮度差异很大 (图 2),河流沉积物中 2 个条带的亮度远远高于稻田土壤样品,故推测这 2 个条带所代表的细菌类群可能更适应于河流沉积物的缺氧环境,可能是兼性厌氧型细菌.

属于 Actinobacteria 类群的条带 4 和 8 在稻田土壤^[40]和湖泊底泥都有发现^[41],是稻田、底泥环境中共有的优势菌群,在有机物降解、碳氮磷循环中发挥着重要作用. 本研究中此类菌群的分布随着重金属污染程度的加重而发生显著变化,无论是河流沉积物还是稻田土壤样品随着重金属污染程度地逐渐加深,2 个条带的亮度都相应地减弱,表明此类菌群可能对重金属的胁迫很敏感.

条带 2 和 11 隶属于 Acidobacteria 类群,一些研究报道该类群细菌在酸性、碱性等环境中都有分布^[42],并且是高含量铅锌黄铁矿废水中的主要菌群^[38]. Barn 等^[43]对大量的土壤样品研究发现,酸杆菌门在生态系统中是广泛存在的,并具有重要的生态学意义. 它具有还原三价铁、氧化金属硫化物的功能,因此在尾矿废水的产生过程中发挥了重要的作用,是尾矿废水中的主要菌群^[44]. 本研究中,条带 11 在稻田土壤所有样品中都有分布,而在受尾矿废水污染的稻田土壤 D5 中条带的亮度最大,推测此类菌群可能对重金属污染具有较强的适应性、在重金属的胁迫下逐渐形成了对重金属的抗性 or 耐性.

- [7] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, **59**(1) : 143-169.
- [8] Maarit R N, Ilse H, Kaisa W, *et al.* Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia[J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, **45**(1) : 155-165.
- [9] Frank S, Christoph C T. A new approach to utilize PCR single strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene based microbial community analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64**:4870-4876.
- [10] Thomas L, Peter F D, Werner L. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, **32**(3) : 241-247.
- [11] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain amplified reaction genes encoding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**:695-700.
- [12] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用 [J]. 生态学报, 2003, **23**(8) : 1570-1575.
- [13] 段学军, 闵航. 镉胁迫下稻田土壤微生物基因多样性的 DGGE 分子指纹分析 [J]. 环境科学, 2004, **25**(5) : 122-126.
- [14] 邢德峰, 任南琪, 宋佳秀, 等. 不同 16S rDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响 [J]. 环境科学, 2006, **27**(7) : 1424-1428.
- [15] 邢德峰, 任南琪, 宫曼丽. PCR-DGGE 技术解析生物制氢反应器微生物多样性 [J]. 环境科学, 2005, **26**(2) : 172-176.
- [16] He Z G, Xiao S M, Xie X H, *et al.* Microbial diversity in acid mineral bioleaching systems of dongxiang copper mine and Yinshan lead-zinc mine [J]. Extremophiles, 2008, **12**:225-234.
- [17] Kim J, Koo S Y, Kim J Y, *et al.* Influence of acid mine drainage on microbial communities in stream and groundwater samples at Guryong Mine, South Korea [J]. Environmental Geology, 2009, **58**:1567-1574.
- [18] Nicomrat D, Dick W A, Dopson M, *et al.* Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treating acid coal mine drainage [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, **40**:312-321.
- [19] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978.
- [20] 李婧. 土壤有机质测定方法综述 [J]. 分析实验室, 2008, **27**(z1) : 154-156.
- [21] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.
- [22] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**(2) : 316-322.
- [23] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology, 1991, **173**(2) : 697-703.
- [24] Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70**(8) : 4800-4806.
- [25] Magurran A E. Ecological diversity and its Measurement [M]. Princeton NJ: Princeton University Press, 1988.
- [26] Hu Q, Qi H Y, Zeng J H, *et al.* Bacterial diversity in soils around a lead and zinc mine [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, **19**:74-79.
- [27] Zhao X W, Luo Y M, Teng Y, *et al.* Genetic diversity of microbial communities in farmland soils contaminated with mixed heavy metals [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2005, **25**:186-191.
- [28] Lglesia R, Castro D, Ginocchio R, *et al.* Factors influencing the composition of bacterial communities found at abandoned copper-tailings dumps [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, **100**: 537-544.
- [29] Lu J, Hu Z Y, Cao Z H, *et al.* Characteristics of soil fertility of buried ancient paddy at Chuodun Site in Yangtze River Delta, China [J]. Agricultural Sciences in China, 2006, **5**(6) : 441-450.
- [30] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity [J]. Journal of Bacteriology, 1998, **180**(18) : 4765-4774.
- [31] Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T. *et al.* A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis [J]. Biotechnology Letters, 2001, **23**: 1205-1208.
- [32] 高平平, 晁群芳, 张学礼, 等. TGGE 分析焦化废水处理系统活性污泥细菌种群动态变化及多样性 [J]. 生态学报, 2003, **23**(10) : 1963-1969.
- [33] Schabereiter C, Saiz C, Pinar G, *et al.* Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings [J]. Environmental Microbiology, 2002, **4**(7) : 392-400.
- [34] Lasse R, Grieg F S, Laura B F, *et al.* Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of rRNA genes [J]. Deep-Sea Research II, 1999, **46**(6) : 1791-1811.
- [35] Sun H Y, Deng S P, Raun W R. Bacterial community structure and diversity in a century old manure treated agroecosystem [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70**:5868-5874.
- [36] Ravensschlag K, Sahm K, Peruthaler J, *et al.* High bacterial diversity in permanently cold marine sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**:3982-3989.
- [37] López-García P, Duperron S, Philippot P, *et al.* Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the mid-Atlantic ridge [J]. Environmental Microbiology, 2003, **5**(10) : 961-976.
- [38] Tan G L, Shu W S, Hallberg K B, *et al.* Cultivation-dependent and

- cultivation-independent characterization of the microbial community in acid mine drainage associated with acidic Pb/Zn mine tailings at Lechang, Guangdong, China [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, **59**:118-126.
- [39] Bruneel O, Duran R, Koffi K, *et al.* Microbial diversity in a pyrite-rich tailings impoundment (Carnoules, France) [J]. Geomicrobiology Journal, 2005, **22**:249-257.
- [40] Ludemann H, Conrad R. Molecular retrieval of large 16S rRNA gene fragments from an Italian rice paddy soil affiliated with the class Actinobacteria [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2000, **23**:582-584.
- [41] 赵兴青, 杨柳燕, 陈灿, 等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究 [J]. 生态学报, 2006, **26**(11): 3610-3616.
- [42] Gontang E A, Fenical W, Jensen P R. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**(10): 3272-3282.
- [43] Barns S M, Takala S L, Kuske C R. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**(4): 1731-1737.
- [44] Tan G L, Shu W S, Hallberg K B. Culturable and molecular phylogenetic diversity of microorganisms in an open-dumped, extremely acidic Pb/Zn mine tailings [J]. Extremophiles, 2008, **12**:657-664.