

铅锌矿区重金属污染对微生物数量及放线菌群落结构的影响

李小林¹, 颜 森¹, 张小平^{1*}, 韦成健²

(1.四川农业大学资源环境学院微生物系, 四川 雅安 625014; 2.西南交通大学环境科学与工程学院环境工程系, 成都 610031)

摘 要:采集四川省汉源县富泉乡万顺铅锌矿区 5 个不同重金属浓度的土壤样品,进行了微生物数量及放线菌多样性的研究。经分离、纯化得到 43 株不同的放线菌,然后对其进行 BOXAIR-PCR 和 16S rDNA PCR-RFLP 分析。结果表明,铅锌矿区重金属复合污染对土壤微生物数量有较大的影响,随着铅锌矿区重金属污染程度的加剧,土壤微生物的总数下降。相关性分析表明,重金属含量与细菌数量呈极显著负相关($P<0.01$),与放线菌数量、真菌数量呈显著负相关($P<0.05$)。供试菌株的 16S rDNA 用 *Hae* III、*Hinf* I 和 *Taq* I 酶切后具有 32 种遗传图谱类型。BOXAIR-PCR 的聚类结果表明在 86% 的水平上,所有菌株分为 10 个遗传类型,结果基本与 16S rDNA PCR-RFLP 聚类差异不大。来源于高重金属的含量样品的菌株基本聚在一起,可能是重金属含量影响了放线菌的分布。同时,16S rDNA 序列聚类分析结合系统发育树分析表明链霉菌属是汉源铅锌矿区主要的放线菌属并且具有遗传多样性。

关键词:铅锌矿区;微生物数量;放线菌;BOX-AIR;16S rDNA PCR-RFLP

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2011)03-0468-08

Response of Microbe Quantity and Actinomycetes Community of Heavy Metal Contaminated Soils in Lead-zinc Mine

LI Xiao-lin¹, YAN Sen¹, ZHANG Xiao-ping^{1*}, WEI Cheng-jian²

(1.Department of Microbiology, College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 2.Department of Environmental Engineering, School of Environmental Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: To understand the influence of the heavy metal pollution on actinomycetes, the microbe quantity of soils, diversity and dominant microbial groups of actinomycetes were tested. Forty-three strains of actinomycetes in the lead-zinc mine soils were isolated from Fuquan town, Hanyuan country, Sichuan Province. The genetic diversity was evaluated by BOXAIR and 16S rDNA PCR-RFLP. The results indicated that heavy metals pollution had a significant impact on the number of soil microbes in lead-zinc district. With the intensification of heavy metal pollution levels, the total number of soil microorganisms declined. There was a very significant negative correlation between the number of bacteria and heavy metal content ($P<0.01$), whereas significant negative correlation for the number of fungi and actinomycetes ($P<0.05$). The strains used in numerical taxonomy were analyzed by 16S rDNA PCR-RFLP with three kinds of restriction endonucleases (*Hae* III, *Hinf* I and *Taq* I) and had 32 genotypes. Based on the dendrograms generated by BOXAIR-PCR, the strains were divided into 10 groups at the similarity of 86%. In addition, BOXAIR-PCR and 16S rDNA PCR-RFLP clustering analysis showed that the strains isolated from soil samples with the high content of heavy metal clustered together. It could be concluded that *Streptomyces* was the dominant genus of actinomycetes at the lead-zinc mine in Hanyuan country and had high genetic diversity.

Keywords: lead-zinc mine; microbe quantity; actinomycetes; BOX-AIR; 16S rDNA PCR-RFLP

四川省是我国铅锌生产重要基地之一,铅锌矿产资源十分丰富。然而近年来随着该区域矿产资源的

大量开发和无序开采,使矿区周边大量土壤遭重金属污染而退化,随之产生一系列环境问题^[1]。由于微生物群落在土壤中的敏感性,常常将微生物参数用做土壤质量评价的指标^[2-5]和环境变化监测指标^[6]。

有研究报道指出,重金属污染能明显影响微生物的生物量、活性及结构^[7]。Hiroki^[8]报道,在含 Cd 很少的对照土壤中加 Cd 会使土壤中细菌数目锐减,由每

收稿日期:2010-09-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31070004);四川农业大学“双支”计划项目(01470104)

作者简介:李小林(1985—),男,四川泸州人,硕博连读研究生,主要从事微生物多样性研究。E-mail:kerrylee_tw@sina.com

* 通讯作者:张小平 E-mail:zhangxiaopingphd@126.com

克土壤 4.8×10^7 个减少 2.0×10^3 个,在长期受重金属污染的土壤中加入 Cd 可使细菌数目减少 50 倍。Kuperman 等^[9]研究表明,在 As、Cd、Cr、Cu、Pb、Ni、Zn 复合污染的土壤中,重金属总量达到 $658.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,细菌和真菌数量分别是对照 ($120.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的 29% 和 45%,而当重金属总量为 $346.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,其分别下降达到 81% 和 85%。腾应等^[10]在研究铅锌银尾矿污染区土壤微生物时发现,细菌、放线菌及真菌的数量均出现了显著降低,且放线菌对重金属污染的敏感性最大,细菌次之,真菌最小。张汉波^[11]研究表明,铅锌矿渣堆积区的土壤微生物数量依然是细菌最多,放线菌次之,真菌最少。同时,细菌和放线菌数量与可溶性锌含量呈明显负相关。

相比于铅锌矿区污染对植物的影响,对微生物多样性的影响研究报道目前仍然较少。本研究直接采取四川省汉源县富泉乡万顺铅锌矿区自然土样为研究对象,没有人为添加重金属,因此能比较真实地反映自然状态下微生物的情况。同时利用传统培养技术分析了不同重金属浓度对三大微生物数量的影响,并用 BOXAIR-PCR 和 16S rDNA PCR-RFLP 技术对放线菌群落结构及多样性进行了研究。探讨了铅锌矿区重金属污染与土壤微生物之间的内在关系,为同类污染矿区土壤环境质量评价提供科学依据,为重金属污染环境的生物修复提供有益的抗重金属微生物资源,进而在一定程度上指导矿区重金属污染土壤的改良及修复。

1 材料与方法

1.1 土样采集

选取四川省汉源县富泉乡万顺铅锌矿区,该矿区位于四川省流沙河下游左岸,地理位置 N $29^\circ 23' 17'' \sim 29^\circ 23' 58''$, E $102^\circ 38' 02'' \sim 102^\circ 38' 14''$ 。根据矿区污染情况,距离尾矿堆积区不同距离进行采样。每个采样区取 10 个采样点,按 S 形布点,采取 0~15 cm 土层混合土样,四分法去掉多余土壤,装入无菌袋中,贴上标签,并用冰袋保存,立即带回实验室。将一部分新鲜土样于室内风干、研磨、过筛供土壤理化性质、重金属含量测定;一部分新鲜土样研磨过 2 mm 尼龙网筛,装入无菌塑料袋,置于 4°C 冰箱保存^[12],供微生物分离与计数分析。

1.2 土壤理化性质及重金属测定

土壤基本理化性质采用常规分析方法进行测定^[13]。pH 采用电位法;有机碳含量采用重铬酸钾法;含水率

采用烘干法;全氮测定采用凯氏定氮法。

土壤 Pb、Zn 有效态含量采用 DTPA 提取剂提取(液:土=5:1),原子吸收分光光度法测定^[14-15]。

1.3 细菌、放线菌及真菌数量测定

细菌、放线菌和真菌的数量测定采用稀释平板法^[16]。

1.4 放线菌遗传多样性分析

1.4.1 供试菌株 DNA 的提取

放线菌 DNA 的提取参考 Lee 等的简单提取细菌 DNA 法^[17]。

1.4.2 BOXAIR-PCR 指纹分析

BOX-PCR 是 rep-PCR 的一种,本试验中 BOX-PCR 的引物序列^[18]:BOXAIR 5'-CTACGGCAAGGC-GACGCTGACG-3'。反应体系($20 \mu\text{L}$):2×PCR Mix(购自北京天根生物科技) $10 \mu\text{L}$;引物(30 pmol) $0.32 \mu\text{L}$;模板 DNA($30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) $1.0 \mu\text{L}$;双蒸水补足至 $20 \mu\text{L}$,少量矿物油覆盖。

PCR 反应条件为: 95°C 预变性 2 min, 94°C 变性 1 min, 52°C 退火 1 min, 65°C 延伸 8 min, 30 个循环, 65°C 最终延伸 18 min。扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳(60 V , 4 h)检测,用 EB 染色,使用 UV 凝胶成像系统记录成像,图像保存为 TIF 形式。

1.4.3 RFLP 指纹图谱分析

16S rDNA PCR 扩增用引物 (PA, 8-27f: 5'-A-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; PB, 1523-1504r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')由上海生工合成^[19]。

反应体系($50 \mu\text{L}$):2×PCR Mix(购自北京天根生物科技) $25 \mu\text{L}$;引物 A(25 pmol) $0.5 \mu\text{L}$, 引物 B(25 pmol) $0.5 \mu\text{L}$;模板 DNA($30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) $1.0 \mu\text{L}$;双蒸水补足至 $50 \mu\text{L}$ 。

PCR 反应条件为: 92°C 预变性 3 min, 94°C 变性 1 min, 58°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 30 个循环, 72°C 最终延伸 8 min。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物^[20]。

16S rDNA PCR-RFLP 选用了 3 种限制性内切酶^[21],分别为 *Hae* III (5'-GG/CC-3'), *Hinf* I (5'-G/ANTC-3'), *Taq* I (5'-T/CGA-3')。酶切反应体系: $6 \mu\text{L}$ PCR 扩增产物, 5 U 内切酶, $10 \times$ 酶切缓冲液 $1 \mu\text{L}$, 双蒸水补足至 $10 \mu\text{L}$, 少量矿物油覆盖; 37°C 过夜 (Taq 酶 65°C 过夜)。酶切产物经 3% 的琼脂糖凝胶电泳(80 V , 3.5 h)检测,用 EB 染色,使用 UV 凝胶成像系统记录成像,图像保存为 TIF 形式。

将相同电泳谱带合并后,将在同一位置上扩增带

的编码为“1”,无扩增带的编码为“0”。再通过简单匹配系数法计算各菌株间的相似性,采用软件NTSYS2.1中的平均连锁聚类法将结果转化为树状图。

1.4.4 16S rDNA 序列测定

根据形态特征观察以及 BOX-PCR、16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析结果,选择有代表性的中心菌株。将选取菌株进行 16S rDNA 扩增,以 PA、PB 为测序引物,送上海生工测序。

1.4.5 序列系统发育树的构建

将所测的序列拼接后,通过 BLAST 获取与所测序列相似度最高的序列,采用 Clustral X 进行多序列匹配比对排列,用聚类分析软件 MEGA4.0 邻位相连法获得系统发育树。

1.5 数据处理

试验数据采用 SPSS(17.0)和 Excel(2003)进行统计分析,样品与样品之间采用 ANOVA 方法进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 供试土样理化性质及重金属含量

各采样区土壤的基本理化性质如表 1。5 个采样区的 pH 值范围为 7.71~7.83;有机碳含量为 3.85~7.16 g·kg⁻¹,全 N 变化范围为 0.09~0.14 g·kg⁻¹;含水率为 3.32%~8.19%,矿区保水性较差。总体而言,5 个样地的土壤基本理化性质相似。

在矿区,一般均由几种金属共同存在,重金属污染呈复合状况。由表 1 可看出,供试土壤中 Zn、Pb 及 Cd 有效量的变化范围分别为 16~790 mg·kg⁻¹、8~883 mg·kg⁻¹ 和 1~8 mg·kg⁻¹。同时矿区(Hanyuan 1~Hanyuan 4 Zn、Pb、Cd 含量远远高于非矿区土壤 Hanyuan5)。以上分析说明该矿区重金属复合污染非常严重,而且不同区域污染程度有所不同,这与该铅锌矿的长年开采、冶炼以及尾矿的堆积有关,由此导致土壤重金属元素 Zn、Pb 的含量较高,而伴生元素 Cd 也较多残留于土壤中。

2.2 土壤重金属对微生物数量的影响

2.2.1 不同污染程度的微生物数量变化

表 2 结果显示,在不同污染程度土样中,土壤微生物的数量组成变化明显。供试土壤的细菌菌落的范围是 0.27×10⁵~21.75×10⁵ cfu·g⁻¹,放线菌的菌落范围是 0.17×10⁵~18.36×10⁵ cfu·g⁻¹,真菌的菌落范围是 0.42×10⁴~5.37×10⁴ cfu·g⁻¹,微生物总数的变化范围是 0.48×10⁵~40.59×10⁵ cfu·g⁻¹。通过对细菌、放线菌和真菌的分离计数,纯化培养,发现不同采样点放线菌的表型较丰富。

表 2 不同污染程度土壤微生物数量				
Table 2 Soil microbes number under different pollution degree				
土样编号	细菌/ 10 ⁵ cfu·g ⁻¹	放线菌/ 10 ⁵ cfu·g ⁻¹	真菌/ 10 ⁴ cfu·g ⁻¹	总数/ 10 ⁵ cfu·g ⁻¹
Hanyuan1	0.27	0.17	0.42	0.48
Hanyuan2	21.75	18.36	4.78	40.59
Hanyuan3	16.95	13.81	2.96	31.06
Hanyuan4	10.17	1.91	0.63	12.14
Hanyuan5	19.35	16.83	5.37	36.72

2.2.2 土壤重金属与微生物数量相关性分析

通过对土壤有效锌、铅、镉与土壤微生物数量进行相关性分析(表 3),结果表明,土壤有效锌、铅、镉与微生物数量呈负相关,但其显著水平不尽相同。有效铅、锌、镉与细菌数量的相关性达到了极显著水平($P<0.01$),有效铅、镉与放线菌的相关性达到了显著水平($P<0.05$)和极显著水平($P<0.01$),有效镉与真菌

表 3 土壤有效锌、铅、镉与土壤微生物数量相关系数			
Table 3 Correlation coefficient between soil available Zn、Pb、Cd and soil microbes number			
重金属	细菌数量	放线菌数量	真菌数量
有效态 Pb	-0.97**	-0.86*	-0.81
有效态 Zn	-0.94**	-0.78	-0.74
有效态 Cd	-0.99**	-0.96**	-0.92*

注:*,** 分别表示相关系数达 0.05 和 0.01 的显著水平。
Note:*,**mean significantly different at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

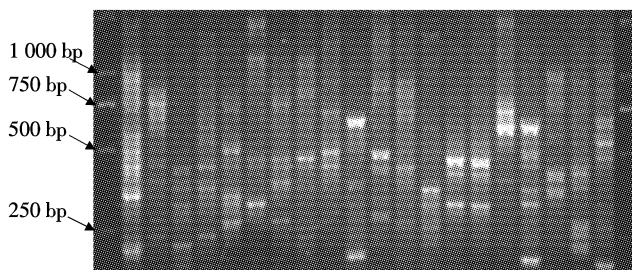
表 1 供试土壤基本情况								
Table 1 The characteristics of the tested soil samples								
土样编号	采样地点	pH	含水率/%	全 N/g·kg ⁻¹	有机碳/g·kg ⁻¹	有效态 Zn/mg·kg ⁻¹	有效态 Pb/mg·kg ⁻¹	有效态 Cd/mg·kg ⁻¹
Hanyuan1	尾矿区	7.71	3.88	0.10	4.73	790	883	8
Hanyuan2	选矿区	7.63	6.73	0.11	5.10	81	60	1
Hanyuan3	弃渣场	7.78	7.15	0.09	3.85	133	78	2
Hanyuan4	进山口	7.78	3.32	0.12	5.67	200	324	5
Hanyuan5	对照	7.83	8.19	0.14	7.16	16	8	1

数量达到了显著水平($P<0.05$)。

2.3 BOXAIR-PCR 分析

2.3.1 BOXAIR-PCR 指纹图谱分析

BOXAIR-PCR 结果表明(图 1),该方法可以获得较多的遗传带谱,图中的绝大多数菌株间遗传差异极为明显,说明该方法能够分辨出不同菌株的细微差异;同时也可反映不同的重金属浓度对放线菌影响不同,导致放线菌向不同的遗传方向进化,如菌株 A56 和菌株 A57 分离自同一地方,其带谱完全相同。



从左到右依次为:Marker、A43、A44、A45、A46、A47、A48、A49、A410、A51、A52、A53、A54、A55、A56、A57、A58、A59、A510、A511、A512、Marker

图 1 部分供试菌株的 BOXAIR-PCR 指纹图谱

Figure 1 Fingerprints of BOXAIR-PCR electrophoresis

2.3.2 BOXAIR-PCR 指纹图谱聚类分析

将 BOXAIR-PCR 的电泳图谱转化成“1”和“0”,通过 NTSYS2.1 采用平均锁链聚类法(UPGMA)将结果转化为树状图,得到 BOXAIR-PCR 聚类树状图(图 2)。

结果显示,在 72%的相似水平处,所有的菌株都聚在一起,在 86%的相似水平上,供试菌株可分为 10 个群,其中 A11、A37、A45、A510、A14 和 A33 单独成群。在 10 个遗传群中,群 I 最大,共有 27 株菌株,其次为群 3,由 10 个菌株组成。

2.4 16S rDNA PCR-RFLP 酶切图谱分析

2.4.1 16S rDNA 扩增

供试菌株以 PA 和 PB 为引物,特异性地对放线菌 16S rDNA 区段进行扩增,扩增产物条带清晰,所有扩增片段大小约 1.5 kb。

2.4.2 16S rDNA 酶切结果

利用 *Hinf* I、*Taq* I 和 *Hae* III 3 种限制性内切酶分别对 16S rDNA 扩增产物进行酶切,经 3%琼脂糖凝胶电泳分离后成像,部分酶切结果如图 3 所示。

对 3 种不同内切酶酶切结果综合分析后得到酶切图谱类型的组合表(表 4)和酶切图谱聚类分析树

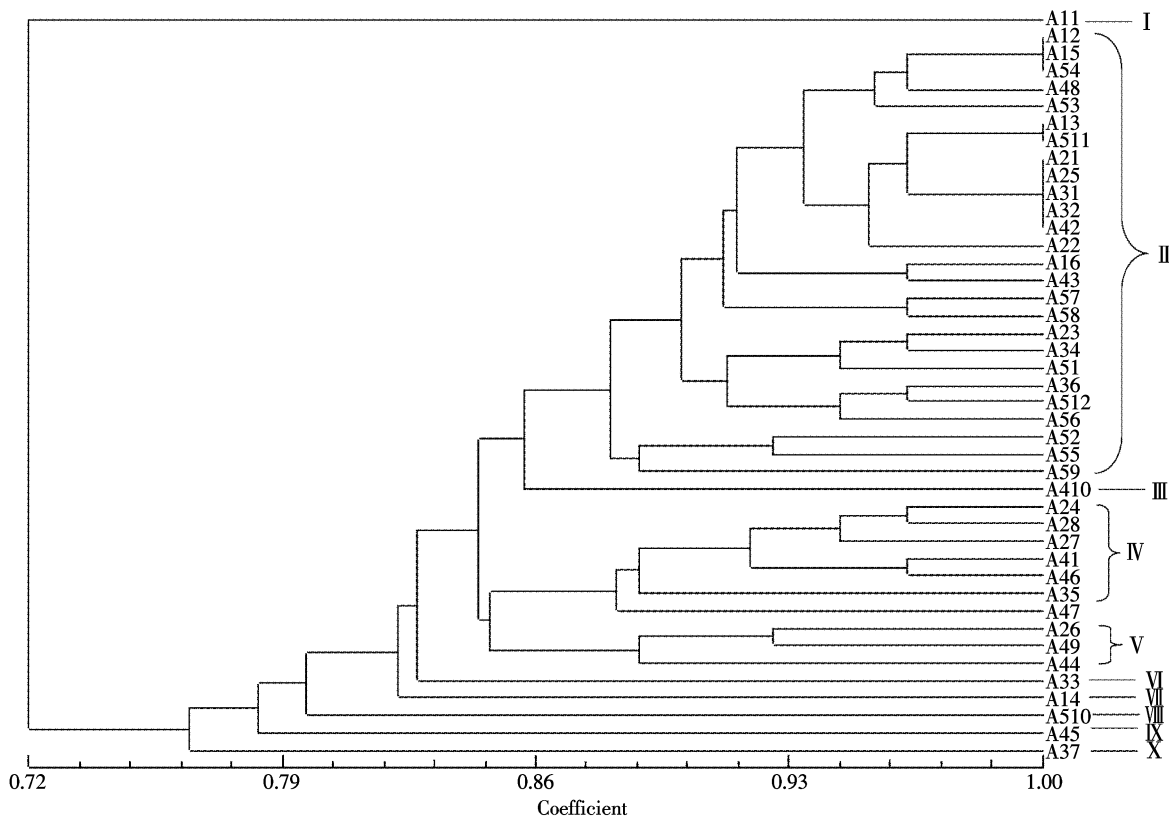
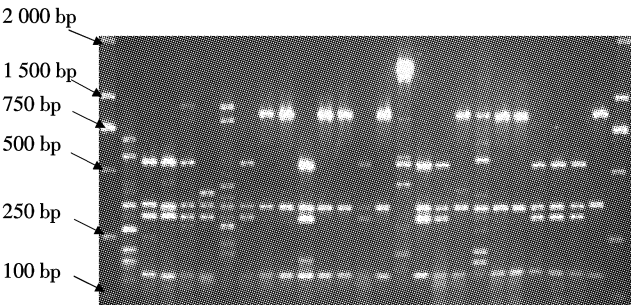


图 2 供试放线菌 BOXAIR-PCR 树状图

Figure 2 The dendrogram of actinomycetes based on the fingerprints of BOXAIR-PCR



从左到右依次为:Marker、A11、A12、A13、A14、A15、A16、A21、A22、A23、A24、A25、A26、A27、A28、A31、A32、A33、A34、A35、A36、A37、A41、A42、Marker

图 3 部分供试菌株的 *Taq*I 酶切图谱

Figure 3 Fingerprints of 16S rDNA PCR-RFLP digested by *Taq*I

状图(图 4)。从表 4 可以看出,供试菌株共有 32 种 16S rDNA 遗传图谱类型。从图 4 来看,供试菌株在 64%的相似水平处,所有的菌株都聚在一起,在 92%的相似水平上,供试菌株可分为 19 个遗传群,从聚类结果看,来自相同土样的菌株大都聚在一起,说明重金属对放线菌的分布有一定影响。

大量来自矿区的菌株具有相同的遗传类型,比如遗传类型 2、8、14、17。同时,许多来自非矿区的菌株却具有同样的遗传类型,如遗传类型 26、27。

2.4.3 16S rDNA 基因序列分析

根据 16S rDNA PCR-RFLP 的聚类分析结果,选取了 10 株放线菌作为代表菌株,扩增其 16S rDNA 片段,送上海生工测序。代表菌株的 16S rDNA 基因序列在 Genbank 序列登录号分别为 GU479439~GU479448。将所测的序列采用 Blast 在 NCBI 中搜索后,从 Genbank 数据库中选取了包括 *Streptomyces*、*Rhodococcus*、*Oerskovia*、*Promicromonospora*、*Microbispora* 等 37 株参比菌株的 16S rDNA 序列和供试菌株序列利用 ClustalX 进行 Alignment 分析,然后通过 Mega4 软件利用 Neighbour-joining 法生成系统发育树(图 5)。

由图 5 可以看出,所有选出的中心菌株均属于链霉菌属。链霉菌属为铅锌矿区主要优势菌群,对重金属的耐受性较高。菌株 A11、A16 和 A51 亲缘关系较近,相似性在 96%,聚为一个分支;A24、A25 和 A46 在 99%的相似性上聚在一起,应该属于同一个种;A410 和 A56 相似性为 82%,聚在一起;另外,A31 和 A512 聚为一个分支,但两者相似性较低。

在本研究中,链霉菌属的菌株分布在整个聚类树中,从采样地看,这些菌株分布在尾矿堆积区、选矿厂

表 4 供试菌株 16S rDNA PCR-RFLP 限制性内切酶图谱类型
Table 4 16S rDNA PCR-RFLP restriction endonuclease mapping

type of the tested strains				
菌株编号	16SrDNA 限制性内切酶图谱类型 <i>Msp</i> I、 <i>Hinf</i> I、 <i>Hae</i> III			16S rDNA 遗传图谱类型
A11	a	a	a	1
A12、A42	b	b	b	2
A13	c	b	c	3
A14	d	c	d	4
A15	c	d	e	5
A16	b	e	f	6
A21	c	b	g	7
A22、A23、A25、A26、 A44	b	f	h	8
A24	b	b	e	9
A27	b	b	i	10
A28	b	f	j	11
A31	b	g	k	12
A32	b	b	c	13
A33、A41、A43	b	b	h	14
A34	a	h	l	15
A35	b	i	h	16
A36、A37	b	h	e	17
A45	e	h	f	18
A46	b	j	c	19
A47	b	f	b	20
A48	c	b	m	21
A49	c	c	m	22
A410	b	b	m	23
A51	b	k	n	24
A52	b	b	o	25
A53、A58、A510	b	b	n	26
A54、A512	b	d	n	27
A55	f	d	n	28
A56	c	f	i	29
A57	c	b	n	30
A59	c	d	n	31
A511	g	b	n	32

区、弃渣场、运输区以及非矿对照区,涉及到每个采样区域。由此可初步推断,链霉菌属的菌株应是汉源铅锌矿土壤中的优势放线菌类群。

3 讨论

人类的生存和发展要依靠水源和可耕地的土壤,但目前水和土壤的污染已成为影响社会发展的主要问题之一。特别是重金属的污染对动物和人类的健康都构成了严重的影响^[22]。由于大量的工业活动造成了

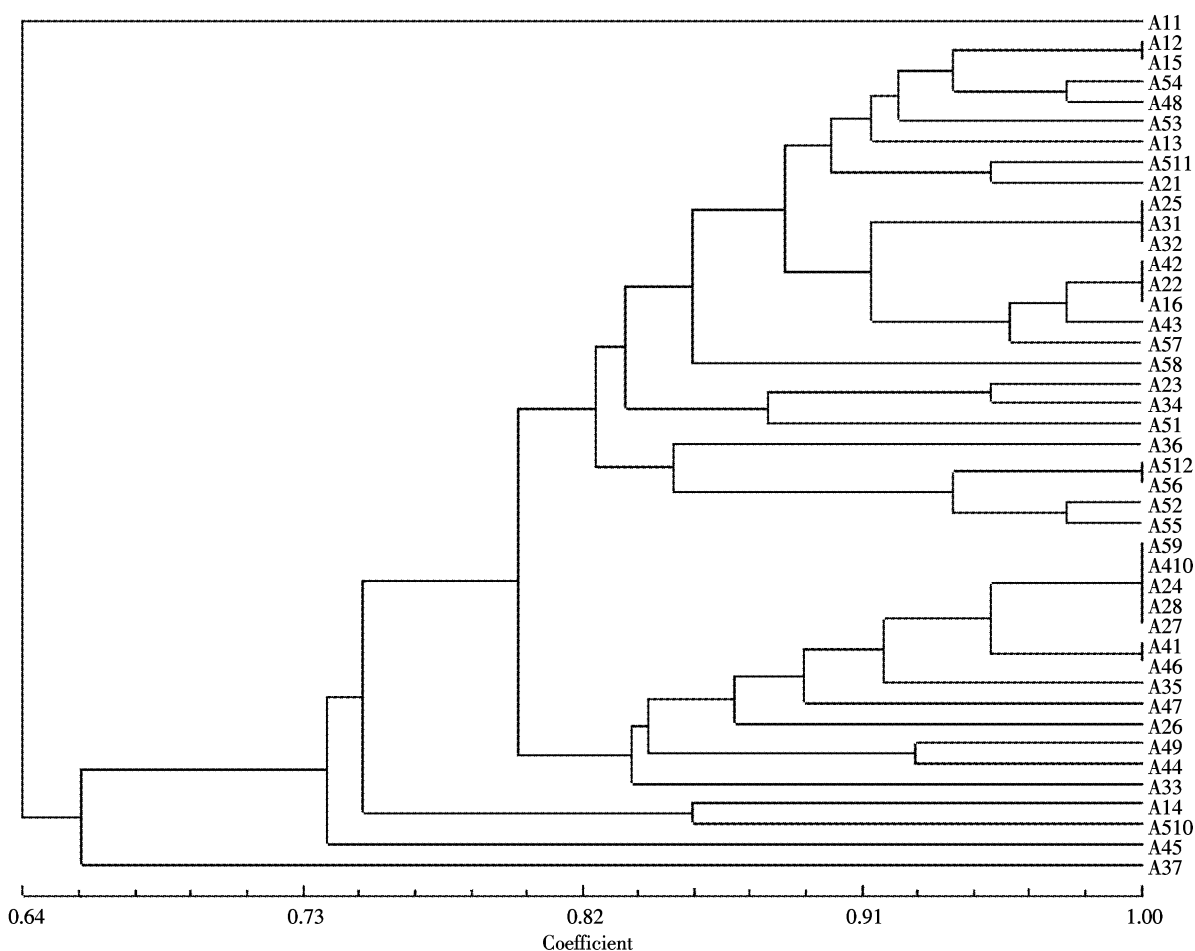


图4 16S rDNA PCR-RFLP 分析树状图

Figure 4 The dendrogram obtained from 16S rDNA PCR-RFLP

许多微量元素如镉、铜、铅、锌和汞等非常有毒的重金属都频繁出现在人类的环境中,并且不断增加^[23]。有些微生物能比较有效地集中、消除和恢复污染源、土壤中的金属元素^[24]。不同类型的微生物,如霉菌、酵母、细菌和放线菌都不同程度地用于检测其对重金属的吸附能力^[22,28]。但到目前为止,有关放线菌吸附重金属的报道仍然不多见。

本研究所用土壤样品直接采自矿区,没有人为了添加重金属,因此能真实反映自然状态下微生物状况。而当前许多关于这方面的试验是通过试验室培养试验或田间试验^[25],这类实验中重金属是直接加入的,按照试验设计控制有机质、pH 值和含水率,一次性或分几次地加入相应的重金属,这样可以比较清楚地揭示重金属对土壤微生物的短期污染行为,但是由于大部分矿区土壤中的重金属是长期积累的结果,使得这些人为试验结果与自然污染土壤分析结果存在一定的差异。

放线菌是土壤微生物的重要组成部分,在重金属的环境中,放线菌对不同重金属具有吸附作用^[26]。有研究表明,链霉菌可通过产生具有絮凝活性的代谢物分泌到细胞外使水中的胶体悬浮物互相凝聚沉淀,从而降低重金属的生态毒性^[27]。本研究中利用传统的分离方法对放线菌的遗传多样性进行了研究,发现链霉菌是该铅锌矿区的优势放线菌类群,这与 Amoroso 等^[28]研究结果一致。通过 16S rDNA 序列系统发育树来看,所有选出的中心代表菌株均与链霉菌聚在一个大群,而具体到单独菌株却与不同的种聚到小群里。这既反映了汉源铅锌矿区抗重金属链霉菌的多样性又表明了其独特性。

4 结论

铅锌矿区土壤中 Zn、Pb、Cd 几种重金属含量明显高于非矿区土壤。铅锌矿区重金属对土壤微生物活性有明显抑制作用。随着铅锌矿区重金属污染程度的

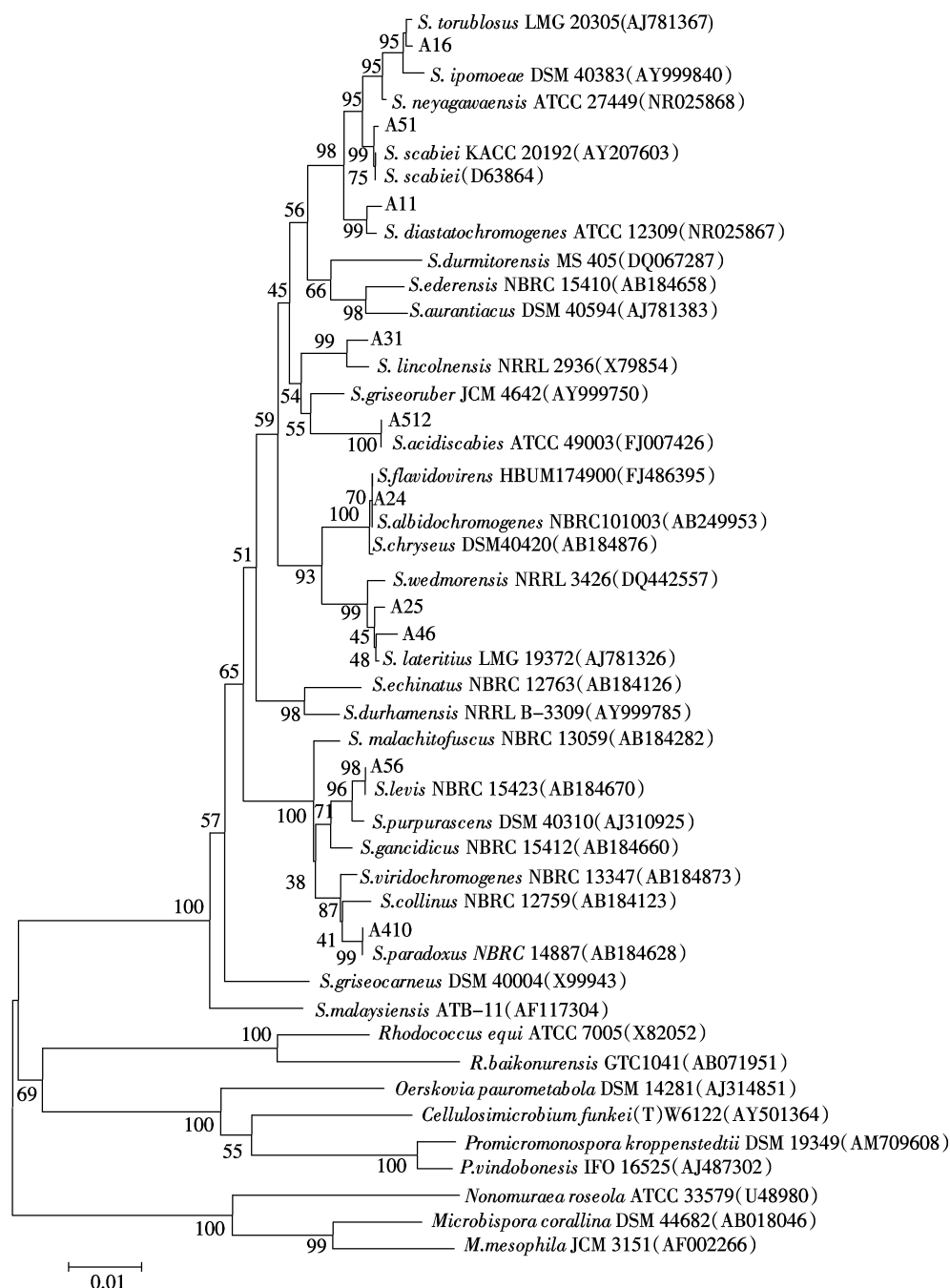


图 5 基于供试菌株 16S rDNA 序列信息的系统发育图

Figure 5 Dendrogram of actinomycetes strains by neighbor-joining based on 16S rDNA gene sequences

加剧,土壤微生物的总数下降。矿区可培养放线菌的 BOXAIR-PCR 和 16S rDNA PCR-RFLP 指纹图谱的聚类结果显示,重金属含量高的土样中分离出来的菌株聚在一起,说明重金属含量在一定程度上影响了放线菌的分布,也表明链霉菌属是汉源铅锌矿区主要的放线菌菌属。同时,本研究分离出来的抗重金属菌株可为相类似污染区的生物修复提供有益的微生物资源。

参考文献:

- [1] Valery B, Eugene K. Soil surface geochemical anomaly around the copper-nickel metallurgical smelter[J]. *Water Air and Soil Pollution*, 1998, 103:197-218.
- [2] Caravaca F, Alguacil M, Figueroa D, et al. Re-establishment of *Retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in a semiarid Mediterranean land[J]. *Forest Ecology & Management*, 2003, 182:49-58.

- [3] Waldrop M, Balser T, Firestone M. Linking microbial community composition to function in a tropical soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 1837–1846.
- [4] Mummey D L, Stahl P D, Buyer J S. Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation [J]. *Applied Soil Ecology*, 2002, 21: 251–259.
- [5] Kelly J J, Häggblom M M, Tate R L. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles[J]. *Biology & Fertility of Soils*, 2003, 38: 65–71.
- [6] Craig L M, Dobbs F C, Tiedje J M. Phyllogenetic diversity of the bacterial community from microbial from microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loch Seamount, Hawaii[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1995(61): 1555–1562.
- [7] Giller K E, Witter E, McGrath S P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1998, 30: 1389–1414.
- [8] Hiroki M. Decomposition of organic matter with previous cadmium adsorption in soils[J]. *Soil Sci Plant Nutr*, 1994, 42(2): 745–752.
- [9] Kuperman R G, Carreiro M M. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem[J]. *Soil Biol Biochem*, 1997, 29: 179–190.
- [10] 滕应, 黄昌勇, 龙健, 等. 铅锌银尾矿污染区土壤微生物区系及主要生理类群研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(4): 408–411. TENG Ying, HUANG Chang-yong, LONG Jian, et al. Ecological effect of heavy metals on soil microbes and research advances on the mechanisms of bioremediation[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22(4): 408–411.
- [11] 张汉波, 于春蓓, 施雯, 等. 不同时空铅锌矿渣中耐受重金属细菌群体的变化[J]. 农村生态环境, 2004, 20(1): 44–47. ZHANG Han-bo, YU Chun-bei, SHI Wen, et al. Spatial and temporal changes in colonization of heavy metal-tolerant bacteria in the lead-zinc tailings with different deposited history[J]. *Rural Eco-Environment*, 2004, 20(1): 44–47.
- [12] Hu Qing, Qi Hong-yan, Zheng Jing-hai, et al. Bacterial diversity in soils around a lead and zinc mine [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19: 74–79.
- [13] 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, 1983. Institute of Soil Sciences, Chinese Academy of Sciences. Physical and chemical analysis methods of soils[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technological Press, 1983.
- [14] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2000. BAO Shi-dan. Physical and chemical analysis methods of soils[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000.
- [15] 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, 2000: 107–240. Lu R K. Analytical methods of soil and agricultural chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000: 107–240.
- [16] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法 [M]. 北京: 科学出版社, 1985. Institute of Soil Sciences, Chinese Academy of Sciences. Research of soil microorganism[M]. Beijing: Science Press, 1985.
- [17] Lee Y K, Kim H W, Liu C L, et al. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials[J]. *Microbiol Methods*, 2003, 52: 245–250.
- [18] Versalovic J, Koeuty T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 6823–6831.
- [19] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波快速提取放线菌基因组 DNA[J]. 微生物学通报, 2003(4): 82–84. XU Ping, LI Wen-jun, XU Li-hua, et al. A Microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes[J]. *Microbiology*, 2003(4): 82–84.
- [20] 刘杰, 陈文新. 我国中东部地区紫穗槐、紫荆、紫藤根瘤菌的数值分类及 16S rDNA PCR-RFLP 研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(1): 17–25. LIU Jie, CHEN Wen-xin. Numerical taxonomy and 16S rDNA PCR-RFLP of root nodule bacteria isolated from the nodules of leguminous trees, *Amorpha fruticosa*, *Cercis racemosa* Oliv. and *Wisteria* (sims) Sweet[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(1): 17–25.
- [21] Angela S, Birgit R, Ulrike P, et al. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002(39): 23–32.
- [22] Volesky B, Holan Z R. Biosorption of heavy metals [J]. *Biotechnol Prog*, 1995, 11: 235–250.
- [23] Nriagu J O, Pacyma J M. Quantitative assessment of world-wide contamination of air, water and soils by trace elements[J]. *Nature*, 1988, 333: 134–139.
- [24] Brown M J, Lester J N. Metal removal in activated sludge: The role of bacterial extracellular polymer[J]. *Water Res*, 1979, 13: 817–837.
- [25] 荆延德, 何振立, 杨肖娥. 汞污染对水稻土微生物和酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(1): 218–222. JING Yan-de, HE Zhen-li, YANG Xiao-e. Effects of Hg contamination on paddy soil microbial and enzymatic activities[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(1): 218–222.
- [26] Marta A P, Amoroso M J, Abate C M. Chromium(VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments [J]. *Chemosphere*, 2007, 67: 660–667.
- [27] Nies D H. Microbial heavy-metal resistance [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51: 730–750.
- [28] Amoroso M J, Castro G, Carlino Federico J, et al. Screening of heavy metal-tolerant actinomycetes isolated from the Sali River[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 1998, 44: 129–132.