

德兴铜矿尾矿重金属污染对土壤中 微生物多样性的影响

谢学辉 范凤霞 袁学武 朱文祥 刘娜 平婧 柳建设*

(东华大学 环境科学与工程学院 上海 201620)

摘要:【目的】为更好地了解重金属污染与微生物多样性之间的相互作用关系,以江西德兴铜矿 4 #尾砂库为研究对象,采集野外实地样品共 16 件进行分析(包括尾砂样品以及周围农田和菜地土壤样品)。【方法】一方面对样品中可培养异养细菌进行平板计数,一方面采用变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)对样品中可培养和不可培养微生物分子生态多样性进行研究;同时采用 PCA (Principle component analysis)方法分析样品理化性质、重金属及主要元素与可培养细菌数量及微生物多样性之间的相互关系。【结果】元素分析结果表明该尾矿区样品受到不同程度重金属 Cu、Cd、Zn、Ni、Pb 和 Cr 的污染;可培养异养细菌在尾砂样品中数量最少,在菜地和农田土壤样品中有明显增加;多样性指数(Shannon-Weaver index H')计算结果发现 H' 最大值出现在距离尾矿中等距离、重金属浓度在中等程度的样品中。PCA 分析结果表明可培养异养菌数量与理化性质如有机碳、有机质、含水率等相关性较大,重金属影响不明显;而多样性指数 H' 除与上述理化性质相关性较大外,还受到重金属 Ag、Zn、As、Pb、Ni、Cr 等的影响,而在样品中含量普遍比较高的重金属如 Cu、Cd 等并不成为影响微生物多样性的主要因素。【结论】从这些长期受重金属污染的野外实地样品来看,以上结果说明不同重金属浓度对微生物多样性的影响可能并不是实验室研究的简单的线性关系。

关键词: 重金属污染土壤, 可培养异养细菌, 微生物群落多样性, 变性梯度凝胶电泳 (DGGE), 主成分分析(PCA)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41073060); 上海市重点学科建设项目(No. B604); 国家环境保护纺织工业污染防治工程技术项目

*通讯作者: Tel: 86-21-67792535; 信箱: liujianshe@dhu.edu.cn, xiexuehui@dhu.edu.cn

收稿日期: 2012-02-15; 接受日期: 2012-02-22

Impact on microbial diversity of heavy metal pollution in soils near Dexing copper mine tailings

XIE Xue-Hui FAN Feng-Xia YUAN Xue-Wu ZHU Wen-Xiang
LIU Na PING Jing LIU Jian-She*

(College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: [Objective] In order to understand the interaction between heavy metal contamination and microbial diversity better, 16 wild field samples including tailing samples, near grain and vegetable soil samples were obtained from the 4 # tailing site of Dexing copper mine, Jiangxi province, China. On the one hand, number of culturable heterotrophic bacteria in samples was counted by plate method. **[Methods]** On the other hand, the diversity of culturable and unculturable microbial communities was further investigated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Principle component analysis (PCA) was used to reveal the influences of physico-chemical characteristics, contents of chemical/heavy metal elements on the diversity of culturable heterotrophic bacteria and microbial community. **[Results]** Results of elemental analysis revealed that these samples subjected to different levels of contamination by heavy metals Cu, Cd, Zn, Ni, Pb and Cr. Number of culturable heterotrophic bacteria was the least in tailing samples, and increased significantly in vegetable and grain soil samples. The diversity index of the samples (Shannon-Weaver index H) was calculated, and it found the greatest diversity of microbial community present in samples, which were at middle distance away from the mine tailing site and had middle level of heavy metal concentrations. PCA analysis showed that the number of culturable heterotrophic bacteria had significant relativity to the physic-chemical properties such as organic carbon, organic matter, moisture content and so on, except for heavy metals. For diversity index H , except above physico-chemical properties, some heavy metals such as Ag, Zn, As, Pb, Ni and Cr had significant influences on it. While heavy metals such as Cu and Cd, which were present in the samples with relatively high concentrations, did not become major factors affecting microbial diversity. **[Conclusion]** The results from these long-term heavy metals contaminated wild field samples, may indicate that the influence of different heavy metals on microbial diversity is not laboratory studied simple linear relationship with their concentrations.

Keywords: Heavy metal contaminated soil, Culturable heterotrophic bacteria, Microbial community diversity, DGGE, PCA

工业生产活动中矿山的开采冶炼、电镀, 汽车尾气的排放, 以及农业生产活动中含重金属污水的农田灌溉、污泥的农业利用、肥料的土壤施用等, 使地球上的许多土壤被重金属污染。土壤中的微生物是土壤有机组分和生态系统中最活

跃的部分, 在促进土壤质量和植物健康方面发挥着重要的作用, 被认为是最敏感的土壤质量生物学指标^[1-2]。重金属对土壤中微生物的生态效应一方面表现在生物量、代谢活性、种类数量和多样性降低; 一方面又因为重金属的选择和生物的适

应性反应,使得污染环境中生长有大量耐受重金属污染的类群。

随着现代生物技术和分子技术水平的提高,在分子水平上研究微生物结构和功能已成为可能^[3]。变性梯度凝胶电泳(DGGE)是目前研究微生物遗传多样性和种群动态性最有力的分子生物学技术。这一技术能够提供群落中优势种类信息,同时分析多个样品,具有可重复和容易操作等特点,适合于调查种群的时空变化,并且可通过对切下的带进行序列分析与特异性探针杂交分析鉴定群落成员^[4-6]。在近10年的时间里该技术已被广泛应用于各种环境微生物生态的研究,如高温热泉、湖泊、海洋、土壤、沙丘、根际、活性污泥和生物膜等^[7-8]。

为了更好地了解重金属污染对土壤微生物群落的影响,本文采集我国典型铜矿矿山开采尾矿区自然形成的重金属污染土壤样品16件进行研究,首先对其基本理化性质、重金属元素等进行测定,对其中可培养异养细菌进行平板计数;然后分别抽取样品中微生物基因组总DNA,通过PCR-变性梯度凝胶电泳获得了各土壤中微生物16S rDNA V3序列的分布,对土壤中微生物多样性变化情况进行研究,并采用PCA方法对样品理化性质、重金属及主要元素与可培养细菌数量及微生物多样性之间的相互关系进行了分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 采样区概况:德兴铜矿位于江西省上饶的德兴市泗洲镇境内,位于怀玉山脉孔雀山下,东经117°-118°,北纬28°40'-29°20'范围内,全矿总面积100 km²。拥有“中国铜都”称号,是亚洲最大的露天铜矿,也是中国第一、世界四大铜矿之一的超大型铜矿。德兴铜矿拥有丰富可靠的资源,铜金属储量占全国第一位,矿藏特点是储量大而

集中,埋藏浅,剥采比小,矿石可选性好,综合利用元素多^[9-10]。

德兴铜矿已有千余年的历史。自1965年以来,经过40多年的开采,逐渐形成了祝家村废石堆场和尾砂库两大污染源。其中,德兴铜矿4#尾砂库为目前正在使用的最大尾砂库,总设计库容量 8.35×10^8 m³,最终堆积高280 m,汇水面积14.3 km²。每天产生10万t尾沙和35万t选矿废水,废水经沉淀后汇集到选矿厂循环利用“中线法”堆积工艺处理。该库尾砂主要来源于大山选厂,其尾砂坝有亚洲第一大坝的称号,规模宏大,由上游至下游,周围村庄依次为石墩头村、杜村、浮溪口,该尾砂库下游的排水由浮溪口流入乐安河。其重金属的环境效应主要表现在尾砂中重金属元素在氧化环境中发生淋滤迁移,可能污染尾砂坝下游的水体和土壤。该尾砂坝尚未开展复垦工作^[9,11]。

1.1.2 样品采集与预处理:样品采集于2008年5月,在江西省德兴铜矿4#尾砂库坝顶、坝坡以及坝下游按照距离依次从石墩头村、杜村、浮溪口,到距离尾砂坝10 km外的海口镇采集土壤表层样品共16个,分别为:2个尾砂样品(T4、T7),6个菜地土壤样品(V8、V11、V13、V15、V18、V20)和8个农田土壤样品(G9、G10、G12、G14、G16、G17、G19、G21)。取样点分布示意图见图1。

采用梅花或“S”状采样方法,土壤采样深度为0-20 cm,用简易采样工具(不锈钢锹、塑料勺等)直接采集表层底质样品。将所采样品装入统一的聚乙烯塑料保鲜袋,贴上标签,并做好记录与描述。每个采样点采集6个分样品,充分混合标记为一个样品^[12]。最终每个样品重量约2 kg左右。将采集样品在24 h内带回实验室。挑选去除样品中大的植物碎片以及石块沙砾之后,一部分新鲜土壤无尘空气干燥72 h,研磨,过1 mm尼龙网筛,装入塑料袋,置于4 °C冰箱内保存,以备

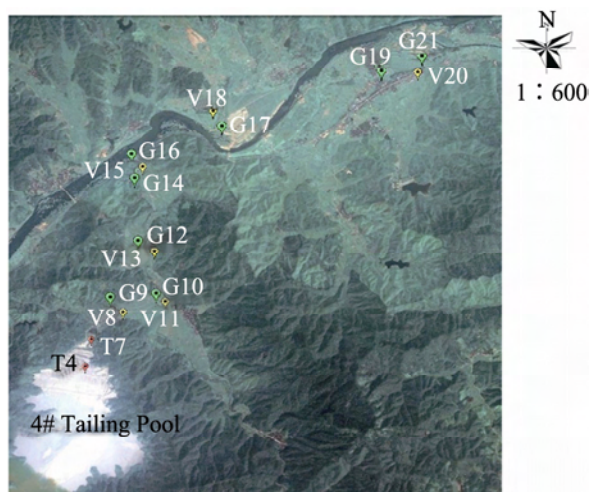


图1 土壤样品取样点分布示意图

Fig. 1 Distribution of sampling sites for soil samples

注: T4、T7 为 2 件尾砂样品; V8、V11、V13、V15、V18、V20 为 6 件菜地土壤样品; G9、G10、G12、G14、G16、G17、G19、G21 为 8 件农田土壤样品。

Note: T4、T7: 2 tailing samples; V8、V11、V13、V15、V18、V20: 6 vegetable soil samples; G9、G10、G12、G14、G16、G17、G19、G21: 8 grain soil samples.

土壤理化性质测定; 一部分土样于室内自然风干, 研磨, 过 200 目不锈钢筛(颗粒直径 $<74\ \mu\text{m}$), 进行重金属形态连续化学提取方法分析以及重金属总量测定分析^[13]。一部分新鲜土样进行提取细菌总基因组 DNA 之前预处理, 步骤如下: 称量土壤样品 1 g, 用 10 mL 灭菌 Eppendorf 离心管装, 加入 3 mL Buffer 1 溶液(Tris 6.057 g/L, NaCl 58.44 g/L, EDTA 5.844 g/L, PVP 10 g/L, pH 10.0), 漩涡振荡 10 min; 将样品在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 5 min, 倒掉上清; 然后再在沉淀中加入 3 mL Buffer 1 溶液, 按照上述方法洗涤 2 次, 最后加入 3 mL Buffer 2 溶液(NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, KH_2PO_4 0.24 g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.628 g/L, pH 7.4)洗涤 1 次。预处理后的土壤样品置于-20 °C 或-70 °C 保存, 以备分子生物学实验使用。

1.1.3 培养基: 进行可培养细菌计数用到的培养

基为 0.1×YTPG, 成分为: 每升培养基包含蛋白胨 0.25 g, 胰蛋白胨 0.25 g, 酵母浸膏 0.5 g, 葡萄糖 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.5 mg, 琼脂粉 15 g, 放线菌酮(Sigma-Aldrich Co., USA) 300 mg/L。

1.2 研究方法

1.2.1 土壤样品理化性质测定: 土壤基本理化性质测定采用常规分析方法, 土壤含水率测定采用电热恒温鼓风干燥箱在 105 °C \pm 2 °C 条件下, 烘干至恒重, 然后称量计算^[13]。pH 用玻璃电极法测定(土:水=1:2.5)^[14]; 阳离子交换量(Cation exchange capacity, CEC)采用 BaCl_2 交换法测定^[15]; 有机质采用重铬酸钾容量法测定, 一般情况下, 认为在土壤有机质中平均碳含量为 58%, 因此有机碳与有机质之间的换算系数为 1.724^[14]。

1.2.2 主要元素及重金属总量测定: 土壤样品中主要元素以及重金属总量测定方法为: 土壤样品经由浓硝酸-浓盐酸-氢氟酸-高氯酸消解后, 用等离子发射光谱法(Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, ICP-AES)测定。

1.2.3 可培养细菌计数: 可培养细菌计数采用 0.1×YTPG 培养基平板进行, 取适量土壤细菌悬浮液涂布固体平板, 倒置于 30 °C 恒温培养箱培养 3 d 后, 直接计算菌落数(Colony-Forming units, CFU 值)。

1.2.4 土壤样品基因组 DNA 提取与 16S rDNA PCR 扩增: 从-70 °C 冰箱中取出预处理好的保存土壤样品, 采用 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒(Bio 101, Vista, CA, USA)提取基因组 DNA。采用 NanoPhotometerTM(Implen GmbH, Germany)微量核酸蛋白分析仪测定提取液中双链 DNA 的浓度和 OD_{260}/OD_{280} 吸收值比值。以提取的基因组 DNA 为模板, 扩增细菌 16S rDNA, 所用通用引物为 27F (5'-AGAGTTTGTACCTGGCTCAG-3') 和

1492R (5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3')^[16]。PCR 反应体系(50 μ L): 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 3 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, 引物 27F (10 μ mol/L) 和引物 1492R (10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 DNA (约 100 ng/ μ L) 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 其余体积以 ddH₂O 补足。反应条件: 94 $^{\circ}C$ 3 min; 94 $^{\circ}C$ 1 min, 55 $^{\circ}C$ 30s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 共 32 个循环; 72 $^{\circ}C$ 10 min; 4 $^{\circ}C$ 保温。获得 PCR 产物后, 取部分反应混合物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测^[17-18]。将正确的条带切下来用凝胶纯化回收试剂盒 (Omega Corporation, USA)进行纯化回收, 按照其操作说明书进行。

1.2.5 DGGE-PCR 的扩增: 采用巢式-PCR 策略, 将上述纯化后的 16S rDNA 产物作为模板, 进行 DGGE-PCR 扩增。DGGE-PCR 的引物序列(细菌 16S rDNA V3 区): 338F-GC 序列: GC clamp-5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'^[16]; 517R 序列: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'^[4]。其中 GC-clamp 序列为 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3'。DGGE-PCR 的扩增条件: 95 $^{\circ}C$ 5 min; 95 $^{\circ}C$ 1 min, 55 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}C$ 10 min; 4 $^{\circ}C$ 保温。DGGE-PCR 产物在进行 DGGE 电泳前, 先用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测条带是否在 230 bp 左右。

1.2.6 变性梯度凝胶电泳(DGGE): DGGE 电泳采用 Bio-Rad DCodeTM Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)对 PCR 反应产物进行分离^[19]。

(1) 变性梯度凝胶的制备

使用梯度混合装置, 制备大小为 16 cm \times 16 cm \times 1 mm, 8%的聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂浓度从 60%到 80% (100%的变性剂为 7 mol/L 的尿素

和 40%的去离子甲酰胺的混合物), 其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增。

(2) PCR 样品的加样

待变性梯度胶完全凝固后, 将胶板放入装有电泳缓冲液的电泳槽中, 取 PCR 产物 25 μ L 和 10 倍加样缓冲液按 5 : 1 的比例混合后加入上样孔。

(3) 电泳及染色

在 1 \times TAE 电泳缓冲液中, 60 $^{\circ}C$ 、120 V 恒压电泳 5 h。电泳结束后, 将凝胶进行 EB 染色。

(4) 成像

染色结果用 Bio-Rad Gel DocTM XR 凝胶成像系统观察并拍照。

1.2.7 分析方法: (1) 多样性指数分析

采用美国伯乐公司与 Bio-Rad Gel DocTM XR 凝胶成像系统配套的 Quantity One 凝胶成像分析软件对凝聚电泳条带进行分析。Shannon 指数计算: 根据 Shannon CE、Weaver 的方法, 微生物结构多样性指数用 Shannon 指数 H 来表示, H 的计算是基于 DGGE 胶条带的位置和条带的强度, 而条带的强度则通过条带的峰面积来表示。

Shannon 指数的公式为:

$$H = -\sum (n_i/N) \log(n_i/N)$$

式中 n_i 为峰面积, N 为所有峰的总面积^[20]。

(2) 数据处理与分析

采用统计学分析软件 SPSS (Version 13.0; Inc., Chicago, IL)进行主成分(Principal component analysis, PCA)分析等; 采用 Microsoft Excel 2007 等进行常规数据分析。

2 结果与分析

2.1 土壤基本理化性质

德兴铜矿尾矿库及周边农田土壤 16 个土样的基本理化性质见表 1。

表 1 德兴铜矿尾矿库土壤样品主要理化性质
Table 1 Physico-chemical characteristics of soil samples near the Dexing copper mine tailings

样品 Sample	距离 4#尾砂库 Distance to the 4# tailings site (m)	pH	含水率 Moisture content (%)	有机碳 Organic carbon (g/kg)	有机质 Organic matter (g/kg)	CEC ^a (cmol/kg)
T4	0	10.30	10.00	1.80	3.10	9.52
T7	50	7.82	21.00	3.39	5.85	9.64
V8	200	7.83	21.88	17.55	30.27	9.97
V11	500	5.77	21.75	15.26	26.31	11.16
V13	1500	5.02	18.88	12.07	20.81	11.33
V15	2200	6.03	15.25	16.36	28.20	11.08
V18	4000	5.98	17.75	11.57	19.95	10.99
V20	10 000	4.61	31.50	24.14	41.62	10.06
G9	200	5.10	32.20	22.84	39.38	10.14
G10	500	3.76	27.57	7.98	13.76	11.16
G12	1500	5.10	28.00	23.74	40.93	10.40
G14	2200	5.49	28.71	22.54	38.86	10.23
G16	2500	5.97	37.03	21.55	37.15	10.48
G17	4000	5.08	32.80	28.03	48.32	9.63
G19	9 000	5.06	22.78	13.67	23.56	11.25
G21	10 000	5.05	40.68	33.32	57.44	9.89

注: T: 尾砂样; V: 菜地土壤样; G: 农田土壤样; a: 阳离子交换量。
Note: T: Mine tailing; V: Vegetable field soil; G: Grain field soil; a: Cation Exchange Capacity, CEC.

距尾砂库 10 km 范围内的各采样点的土壤性质差别较大, 土壤的 pH 变化明显, T4 尾砂样 pH 为 10.30, 其原因可能是因为选矿过程中大量碱性浮选药剂的添加, 导致尾砂样品 pH 偏高; 菜地样品 pH 平均值在 5.87 左右, 农田样品平均 pH 值为 4.93, pH 值偏低, 可能是由于尾矿库中大部分是富含硫化物的尾砂, 在氧化作用下产生含重金属离子的酸性废水, 污染周边的土壤^[13,21]。总体来说, 距尾砂坝越近的采样点的土壤碱度相对较大。土壤有机碳含量跨度也较大, 在 1.80–33.32 g/kg 之间, 平均为 16.04 g/kg, 呈现离尾砂坝越远土壤有机质含量越高的趋势; 阳

离子交换量范围为 9.52–11.25 cmol/kg, 在尾砂样品中平均为 9.58 cmol/kg, 在菜地样品中平均为 10.77 cmol/kg, 在农田样品中平均为 10.47 cmol/kg, 没有表现出明显的变化规律。Rodríguez 等在研究中发现, 尾砂样品平均 CEC 值为 8.53 cmol/kg, 农业土壤平均 CEC 值为 11.25 cmol/kg^[13]。这与我们的结果比较一致。

2.2 土壤重金属及其他元素总量

德兴铜矿尾矿库及周边农田土壤 16 个样品中重金属及其他主要元素, 共 19 个元素总量测定结果见表 2。

表 2 土壤样品中重金属及主要元素总量(mg/kg)
Table 2 Heavy metal/main elements' total concentration in soil samples (mg/kg)

	T4	T7	V8	V11	V13	V15	V18	V20	G9	G10	G12	G14	G16	G17	G19	G21
Zn	44.6	52.0	148.3	145.2	109.2	98.7	111.6	105.5	108.4	102.5	112.6	108.5	92.2	102.9	36.4	96.8
Fe ($\times 10^4$)	3.2	4.7	4.8	3.9	4.0	4.3	3.3	3.0	3.2	4.8	2.8	2.9	3.8	3.2	1.4	2.3
Cu	452.4	805.7	462.8	59.3	47.6	147.2	29.6	49.7	56.1	400.9	56.5	62.6	92.6	73.3	15.8	39.9
Pb	37.7	76.0	94.6	88.1	81.3	86.6	87.9	102.4	86.8	92.1	84.5	78.6	98.6	99.2	37.5	112.5
Cd	2.7	2.3	2.3	3.2	2.3	3.5	2.3	2.1	1.4	3.3	1.9	0.9	3.1	1.9	2.0	1.0
Cr	45.8	72.3	95.4	98.4	101.8	103.8	61.9	89.5	99.8	94.5	81.0	92.7	108.8	90.0	32.8	76.5
Hg	0.05	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.07	0.07	0.06	0.07	0.08	0.08	0.03	0.08
As	11.8	11.3	12.8	11.0	10.9	12.7	10.0	20.8	12.4	12.7	20.0	11.1	11.0	27.0	2.2	12.3
Mn	373.2	985.1	4706	598.0	611.0	983.3	873.1	294.5	293.9	415.9	298.1	231.9	304.3	285.8	268.7	242.6
Ag	0.7	5.7	4.6	4.4	4.8	5.5	4.5	4.8	4.0	4.9	4.5	4.6	6.6	4.8	4.5	5.0
Au	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Co	8.4	14.7	18.2	18.2	18.2	19.4	14.2	15.3	15.1	14.8	14.7	14.3	17.8	15.1	7.2	12.9
Ni	12.6	26.7	43.8	41.1	44.1	49.0	25.9	43.1	40.3	32.1	32.1	39.7	50.1	45.3	14.8	34.3
Ca ($\times 10^4$)	1.7	1.3	1.0	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.7
Mg ($\times 10^4$)	0.9	1.1	0.9	0.7	0.7	0.9	0.5	0.6	0.8	0.8	0.5	0.6	0.8	0.6	0.3	0.5
Al ($\times 10^4$)	6.4	7.1	7.4	7.3	7.4	7.0	6.9	8.0	7.7	7.6	7.0	7.6	7.8	8.2	3.3	8.2
K ($\times 10^4$)	2.7	2.8	2.4	1.8	1.8	1.7	1.8	1.9	1.8	2.4	1.6	1.7	1.8	1.8	0.9	1.9
P	639.0	727.1	1121	946.9	851.4	979.5	795.7	688.1	593.6	689.3	702.2	600.6	641.9	621.8	545.4	592.6
S	12200	15900	3800	170	140	160	140	340	520	3800	600	520	210	510	70	420

从表 2 中看出, Cu 的含量范围为 15.8–805.7 mg/kg, 平均值为 195.518 mg/kg; Cd 的含量范围为 0.3–3.5 mg/kg, 平均值为 1.956 mg/kg, 两者平均值均明显超过国家 II 级土壤标准 (Cu 50 mg/kg, Cd 0.3 mg/kg) (表 3), 并且全部 16 个样品中 Cd 的含量均高于国家 II 级土壤标准, 1/4 的样品中 Cu 的含量高于国家 II 级土壤标准。Zn、Ni、Pb、Cr 平均值低于国家 II 级土壤标准, 只有少数样点接近或超过 II 级土壤标准, 但其平均值分别是江西土壤元素背景值的 1.3、1.7、2.5 和 1.7 倍, 大部分样点已超过相应背景值(表 4)^[22–23], 应引起重视。

2.3 可培养异养细菌计数

计数有机异养细菌在营养培养基 YTPG 琼脂平板上形成的单菌落数, 用 CFU 值来表示, 如 CFU/mL 指的是每毫升样品中含有的细菌群落总数。计数土壤样品中 CFU 值时用 CFU/g 土壤干重来表示。菌落计数结果见图 2。由图 2 可知, 在尾砂样品 T4 和 T7 中可培养异养细菌数量最少, 约 0.5×10^7 CFU/g 土壤干重, 这可能与尾砂样品贫营养的恶劣条件相关。在菜地和农田等土壤样品中普遍高于尾砂样品中可培养细菌数, 在菜地土壤样品中, 可培养细菌数量范围为 $(1.40–2.75) \times 10^7$ CFU/g 土壤干重, 农田土壤样品中可培养细菌范围为

(0.60–3.60)×10⁷ CFU/g 土壤干重。可培养异养菌数量在样品之间的变化，并未体现出与重金属 Cu、Cd 等浓度变化之间存在明显的一致性。

2.4 土壤样品基因组 DNA 的 16S rDNA-PCR 扩增

将提取的土壤样品基因组 DNA 采用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rDNA-PCR 扩增，其产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳，用溴化乙锭 (EB) 染色，用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行检测和拍照记录(图片未给出)。结果表明 16 个土壤样品

基因组总 DNA 的 16S rDNA-PCR 扩增产物全部扩增出来，位置正确且亮度明显，大小在 1 500 bp 左右，将其切胶纯化后进行下一步实验。

2.5 16S rDNA V3 可变区的 PCR 扩增

采用巢式 PCR 方法进行扩增，即以上述获得的细菌 16S rDNA 纯化后产物为模板，采用对大多数细菌和古细菌的 16S rRNA 基因 V3 区通用引物(F338GC/R517)进行扩增，在引物 F338 的 5' 端添加 GC 夹以提高扩增片段的分离效果。不同土壤样品 PCR 扩增结果如图 3 所示。

表 3 国家土壤环境质量标准(GB 15618-1995, II 级) (mg/kg)						
Table 3 National soil environment quality standard (GB 15618-1995, level 2) (mg/kg)						
元素 Element	Cu	Zn	Ni	Pb	Cr	Cd
标准值 Standard	50	200	40	250	250	0.3

表 4 江西土壤元素背景值(mg/kg)						
Table 4 Background value of heavy metals in Jiangxi Province soils (mg/kg)						
元素 Element	Cu	Zn	Ni	Pb	Cr	Cd
背景值 Background	20.3	69.4	20.0	32.3	45.9	0.108

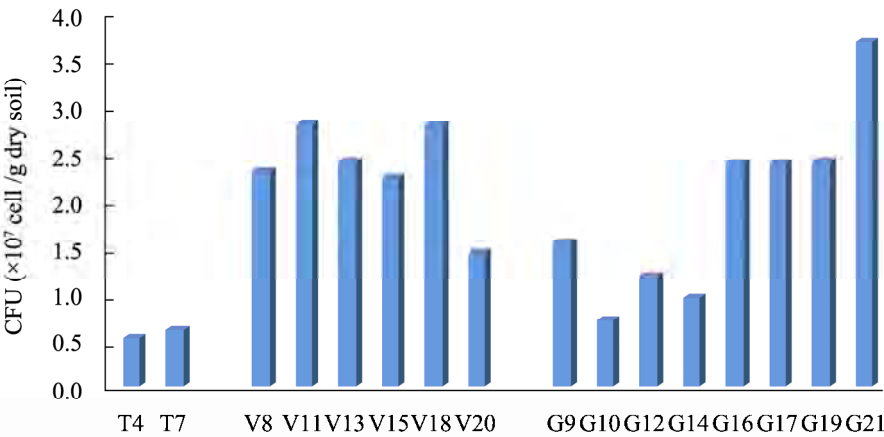


图 2 可培养异养细菌计数结果

Fig. 2 Number of heterotrophic bacteria capable of forming colonies in samples

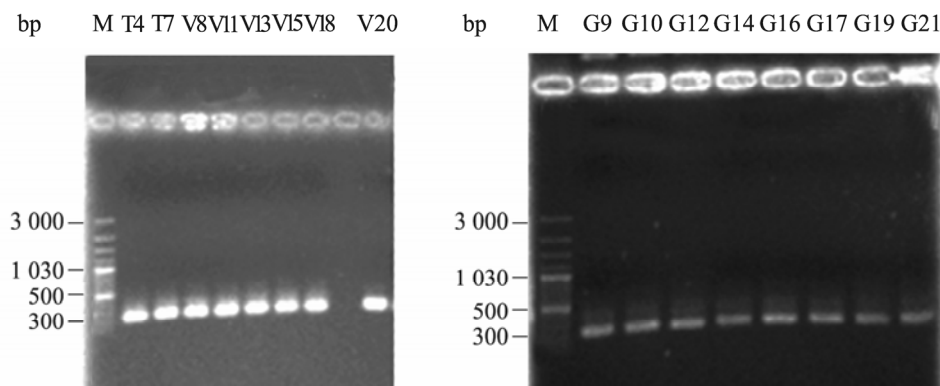


图3 16个土壤样品16S rDNA基因V3区PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis image of PCR amplified 16S rRNA (V3) gene of 16 samples

注: M: DNA 标记物; T: 表示尾砂样品; V: 表示菜地土壤样品; G: 表示农田土壤样品.

Note: M: DNA marker; T: Tailing samples; V: Vegetable field soil samples; G: Grain field soil samples.

经 PCR 反应后获得了不同样品中微生物的16S rRNA 基因 V3 区的目的片段, 琼脂糖凝胶电泳显示片段大小约 230 bp 左右(图3)。采用该巢式 PCR 扩增方法, 提高了样品的扩增特异性, 能降低变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析的误差。各个样品的扩增产物可以作为 DGGE 的样品, DGGE 能够分离各个样品中微生物种类, 达到揭示不同样品中微生物多样性的目的。

2.6 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

不同土壤样品 16S rRNA 基因 V3 区片段扩增产物采用美国伯乐公司 Bio-Rad Dcode™ 变性梯度凝胶电泳仪进行电泳分离。电泳完成后, EB 染色, 然后采用 Bio-Rad Gel Doc™ XR 凝胶成像系统进行观察和拍照记录。最后获得的变性梯度凝胶电泳(DGGE) DNA 指纹图谱(图4-6中A图)。由图A可知, 不同样品经过变性梯度凝胶电泳都可以分离出数目不等的电泳条带, 且各个条带的信号强度和迁移位置不同。根据变性梯度凝胶电泳(DGGE)对具有相同大小而不同DNA序列的片段分离原理, 可以得知各个样品PCR产物中含有十几种到几十种不同序列的DNA片段, 它们是一些特异微生物种类的16S rRNA 基因 V3 区的DNA片段, 每个独立分离的DNA片段理论上可

以代表一个微生物种属。电泳条带越多说明生物多样性丰富, 条带信号越强, 表示该种属的数量越多, 从而确定不同样品中所含有的微生物的种类和数量关系, 得出其中微生物多样性的信息^[19]。

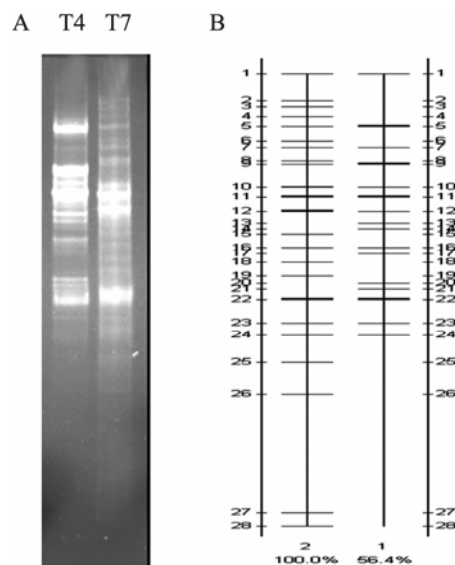


图4 DGGE电泳DNA指纹图谱Quantity One软件分析结果图

Fig. 4 Profiles of PCR amplified 16S rRNA (V3) gene separated by DGGE and analyzed by Quantity One software of samples T4 and T7

注: A: T4和T7样品DGGE电泳DNA指纹图谱; B: 条带模拟分析.

Note: A: Profile of PCR amplified 16S rRNA (V3) gene separated by DGGE; B: Bands simulating analysis.

2.7 DGGE 电泳 DNA 指纹图谱分析

采用与 Bio-Rad Gel Doc™ XR 凝胶成像系统 DGGE 电泳 DNA 指纹图谱进行分析。根据匹配配套的 Quantity One 凝胶成像分析软件, 对上述分析结果给出模拟条带分析图, 并计算样品之间的相似性。可知在样品 T4 中条带数为 21 条, 在样品 T7 中条带数为 24 条, 且二者之间的相似度为 56.4% (图 4B)。在样品 V8、V11、V13、V15、V18 和 V20 中条带数分别为 16、23、26、26、22、27 条, 样品 V8、V11、V15、V18、V20 与样品 V13 之间的相似度变化范围为 15.6%–53.1% (图 5B); 根据图谱中条带数目以及强度(软件中计算峰面积值来表示)进一步对样品进行

UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic means) 聚类分析, 结果见图 5C, 发现样品 V11、V13、V15、V18 和 V20 基本聚类在一起, 而 V8 与其它样品都分离开来, 说明该样品中微生物多样性与其他样品相比差异比较大。在样品 G10、G12、G14、G16、G17、G19 和 G21 中条带数分别为 10、20、25、20、16、16、17 条, 样品 G10、G12、G14、G16、G17、G19 与样品 G21 之间的相似度变化范围为 9.8%–44.9% (图 6B); 根据图谱中条带强度进一步对样品进行 UPGMA 聚类分析, 结果见图 6C, 发现样品 G10、G12、G14 和 G16 聚类在一起, 而样品 G17、G19 和 G21 聚类在一起。

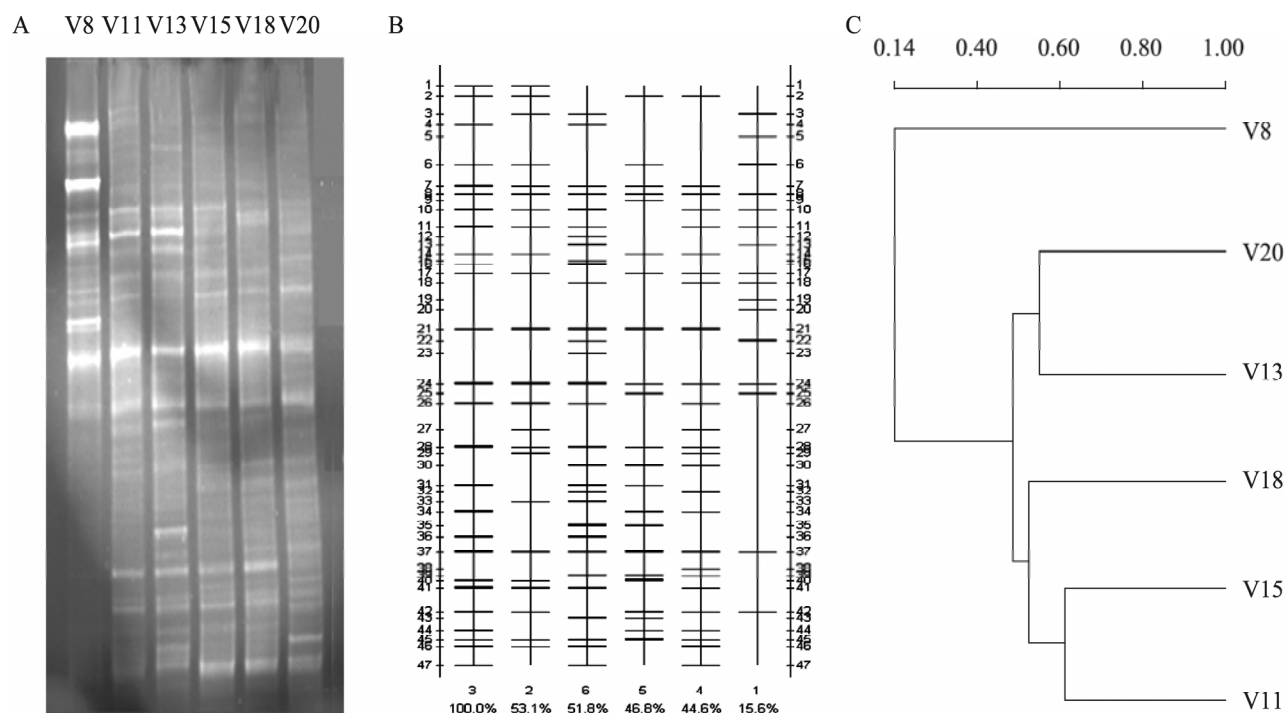


图 5 DGGE 电泳 DNA 指纹图谱 Quantity One 软件分析结果图

Fig. 5 Profiles of PCR amplified 16S rRNA (V3) gene separated by DGGE and analyzed by Quantity One software of samples V8, V11, V13, V15, V18 and V20

注: A: 菜地土壤样品 V8、V11、V13、V15、V18 和 V20 DGGE 电泳 DNA 指纹图谱; B: 条带模拟分析; C: DGGE 图谱 UPGMA 聚类分析。

Note: A: Profile of PCR amplified 16S rRNA (V3) gene separated by DGGE; B: Bands simulating analysis; C: Cluster analysis of DGGE by UPGMA.

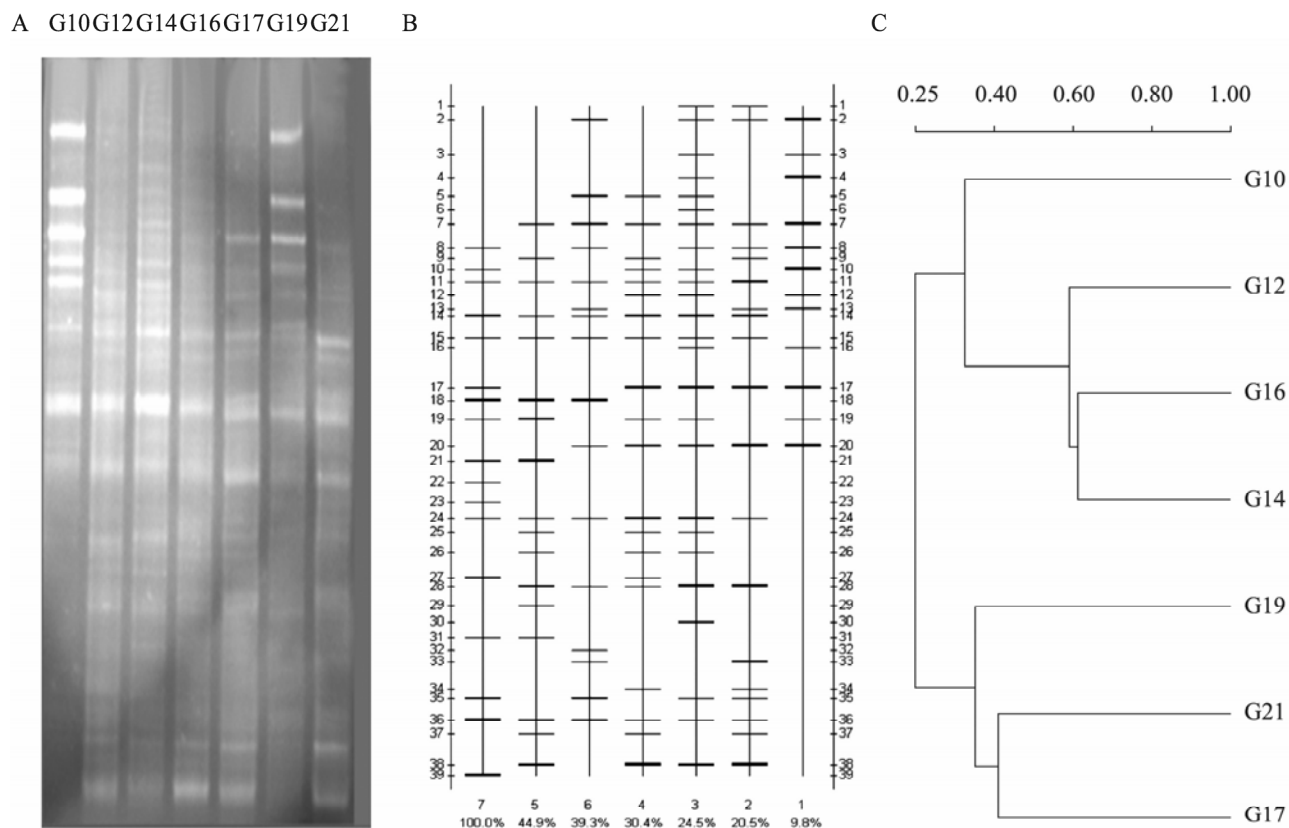


图 6 DGGE 电泳 DNA 指纹图谱 Quantity One 软件分析结果图

Fig. 6 Profiles of PCR amplified 16S rRNA (V3) gene separated by DGGE and analyzed by Quantity One software of samples G10, G12, G14, G16, G17, G19 and G21

注: A: 农田土壤样品 G10、G12、G14、G16、G17、G19 和 G21 DGGE 电泳 DNA 指纹图谱; B: 条带模拟分析; C: DGGE 图谱 UPGMA 聚类分析。

Note: A: Profile of PCR amplified 16S rRNA (V3) gene separated by DGGE; B: Bands simulating analysis; C: Cluster analysis of DGGE by UPGMA.

2.8 多样性指数(Shannon-Weaver index H') 分析

物种多样性是指群落中物种数目的多少,它是衡量群落规模和重要性的基础。一般来说种类越多,各种个体数量分布越均匀,物种多样性指数越大^[3]。按照 Shannon-Weaver (H')微生物多样性指数计算公式,分别对不同样品 16S rDNA V3 区的 DGGE 图谱软件分析结果进行计算,多样性指数结果见图 7。

可以看出不论是在菜地土壤样品中还是农田土壤样品中,微生物多样性并不随着距离增大而增多,相反地,多样性最大出现在距离尾矿中

等距离的样品中如菜地土壤样品 V13 和 V15,农田土壤样品 G12 和 G14 等,在这些样品中重金属铜和锌的含量不高,均不超过国家土壤质量 II 级标准,但也不是最低;在重金属铜和锌含量都是最高的菜地土壤样品 V8、农田土壤样品 G10 中,以及在重金属铜和锌含量几乎都是最低的,远离尾矿 10 km 之外的菜地土壤样品 V20、农田土壤样品 G19 中,微生物的多样性指数相近,且均低于最大值。赵祥伟等^[24]采用变性梯度凝胶电泳方法,分析浙江省富阳市环山乡某冶炼厂小高炉附近受铜、锌、铅、镉不同程度复合污染的 4 个农田土壤样品中微生物群落遗传多样性变化,研究

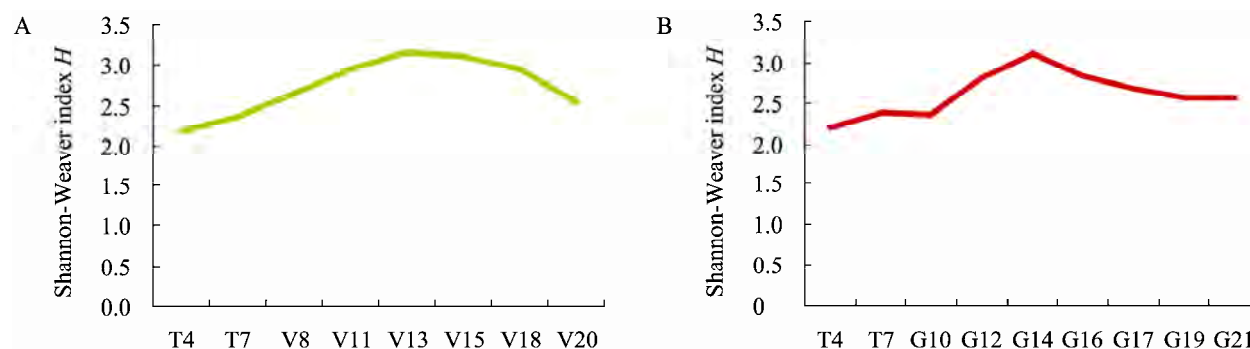


图 7 不同土壤样品 DGGE 条带的 Shannon-Weaver index H 指数分布图

Fig. 7 Profiles of Shannon-Weaver index H for the different soil samples

注: A: 尾砂样品 T4、T7 和菜地土壤样品 V8、V11、V13、V15、V18 和 V20; B: 尾砂样品 T4、T7 和农田土壤样品 G10、G12、G14、G16、G17、G19 和 G21.

Note: A: Tailing samples T4、T7 and vegetable field soil samples V8、V11、V13、V15、V18、V20; B: Tailing samples T4、T7 and grain field soil samples G10、G12、G14、G16、G17、G19、G21.

结果表明,不同程度的重金属复合污染明显改变了农田土壤的微生物群落遗传多样性,但与多样性的改变不是简单的负相关关系,最大的多样性指数出现在中等污染程度的土壤中。这与我们的结果具有相似性。分析其原因可能是一定程度的重金属污染能改变原有群落内部的种群之间的竞争关系,导致原始优势种群失去了优势作用,而新出现一些耐受菌种;或者是在这种长期受重金属污染土壤中可能有一部分微生物产生的抗性保护了其它种群的微生物使其免受毒害,如 Stephen 等发现接种重金属抗性细菌可以保护土壤中的氨氧化菌群^[24-25]。

2.9 PCA 分析

不同样品中微生物群落组成受到多种环境因子的影响,包括样品本身的理化性质因子如 pH、含水率、土壤有机质和土壤阳离子交换量,以及重金属含量等。以样品理化性质、19 个元素

含量、与可培养异养细菌数量和多样性指数分别作为变量进行主成分分析,结果见图 8。由图 8A 可知,可培养细菌(CB)主要与理化性质如含水率(MC)、有机质(OM)和有机碳(OC)相关性较大,而与 pH、重金属及其他元素相关性小。而微生物多样性除了与理化性质如含水率(MC)、有机质(OM)和有机碳(OC)相关性较大外,还与一些重金属元素如 Ag、Zn、As、Pb、Ni、Cr 等相关性显著(图 8B),而 pH、Cu、Cd 及元素 K、P、S、Mg、Ca 等与多样性指数 H 分开较远,相关性较小。可见人们比较关注的,而且在本实验样品中普遍含量都比较高的重金属如 Cu、Cd 并未成为影响样品中可培养细菌数量以及微生物多样性的主要因素。这也从另一个方面说明了在长期受到重金属污染的野外实地样品中,不同重金属浓度对微生物多样性的影响可能并不是实验室研究的简单线性关系^[26-27]。

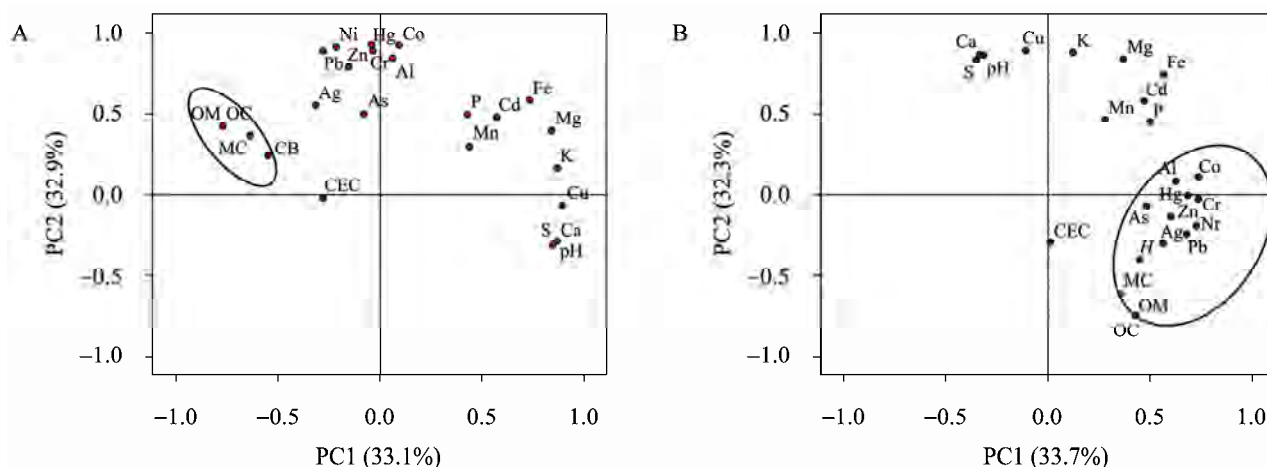


图8 样品中理化性质、19个元素、可培养异养细菌数量和多样性指数为变量进行主成分分析图

Fig. 8 Ordinate plot from PCA based on physical-chemical properties, 19 elements' concentrations, number of culturable heterotrophic bacteria and diversity index

注: 理化性质包括 pH、MC (含水率)、OC (有机碳)、OM (有机质)、CEC (阳离子交换量); 19 个元素包括 Zn, Fe, Cu, Pb, Cd, Cr, Hg, As, Mn, Ag, Au, Co, Ni, Mg, Ca, Al, K, S, P; A 中 CB: 可培养异养细菌数量; B 中 H: 多样性指数。PC1: 主成分因子 1, PC2: 主成分因子 2。

Note: Physical-chemical properties including pH value, MC (moisture content), OC (organic carbon), OM (organic matter) and CEC (Cation exchange capacity; 19 elements including Zn, Fe, Cu, Pb, Cd, Cr, Hg, As, Mn, Ag, Au, Co, Ni, Mg, Ca, Al, K, S, P; CB in A: culturable heterotrophic bacteria; H in B: Shannon-Weaver index H. PC1: principal component analysis factor 1, PC2: principal component analysis factor 2.

3 结论

(1) 该地区样品受到不同程度的 Cu、Cd、Zn、Ni、Pb 和 Cr 的污染, 尤其是 Cd 在几乎所有样品中, Cu 在 1/4 的样品中已明显超过国家Ⅲ级土壤标准, Zn、Ni、Pb、Cr 平均值均低于国家Ⅱ级土壤标准, 但多数样品重金属含量已超过江西土壤环境背景值。

(2) 可培养异养细菌在尾砂样品中数量最少, 在菜地和农田土壤样品中有明显增加; 在距离尾矿中等距离、重金属浓度在中等程度的样品中微生物多样性最大。样品理化性质差异引起微生物分布的差异, PCA 分析结果表明可培养异养菌数量与理化性质如有机碳、有机质、含水率等相关性较大, 重金属影响不明显; 而微生物多样性指数 H 除与上述理化性质相关性较大外, 还受到重金属 Ag、Zn、As、Pb、Ni、Cr 等的影响, 而在样品中含量普遍比较高的重金属如 Cu、Cd 等并

不成为影响微生物多样性的主要因素。以上结果说明在长期受到重金属污染的野外实地样品中, 不同重金属浓度对微生物多样性的影响可能并不是简单的实验室研究的线性关系, 更深入的机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Niemi RM, Heiskanen I, Wallenius K, 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(3): 155-165.
- [2] Brock TD. The study of microorganisms in situ: progress and problems[J]. Symposium of the Society for General Microbiology, 1987, 41: 1-17.
- [3] 王慧, 王远鹏, 林琦, 等. 应用 PCR-DGGE 研究铜冶炼厂附近根际土壤微生物生态变化[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(4): 903-907.
- [4] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling

- of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695–700.
- [5] 马悦欣, Holmström C, Webb J, 等. 变性梯度凝胶电泳(DGGE) 在微生物生态学中的应用[J]. *生态学报*, 2003, 23(8): 1561–1569.
- [6] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiology Reviews*, 1995, 59(1): 143–169.
- [7] Ferris MJ, Muyzer G, Ward DM. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 340–346.
- [8] Zhang T, Herbert H, Fang P. Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57(3): 437–440.
- [9] 初娜. 江西省德兴铜矿地区重金属元素的环境效应研究[D]. 北京: 中国地质科学院硕士学位论文, 2008.
- [10] 陈怀满, 郑春荣, 周东美, 等. 德兴铜矿尾矿库植被重建后的土壤肥力状况和重金属污染初探[J]. *土壤学报*, 2005, 42(1): 29–36.
- [11] 初娜, 赵元艺, 张光弟, 等. 德兴铜矿低品位矿石堆浸场与大坞河流域土壤重金属元素形态的环境特征[J]. *地质学报*, 2007, 81(5): 670–683.
- [12] Wang YP, Shi JY, Lin Q, et al. Heavy metal availability and impact on activity of soil microorganisms along a Cu/Zn contamination gradient[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(7): 848–853.
- [13] Rodríguez L, Ruiz E, Alonso-Azcárate J, et al. Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb-Zn mine in Spain[J]. *Journal of Environmental Management*, 2009, 90(2): 1106–1116.
- [14] Abollino O, Aceto M, Malandrino M, et al. Heavy metals in agricultural soils from Piedmont, Italy. Distribution, speciation and chemometric data treatment[J]. *Chemosphere*, 2002, 49(6): 545–557.
- [15] Bartels JM, Sparks DL. *Methods of Soil Analysis. Part III. Chemical Methods*[M]. Madison, Wis: Soil Science Society of America: American Society of Agronomy, 1996: 1201–1230.
- [16] Lane DJ. 16S/23S rDNA sequencing[A] // Stackebrandt E, Goodfellow M, eds. *Nucleic acid Techniques in Bacterial Systematics*[M]. Chichester: John Wiley & Sons, 1991: 115–175.
- [17] 郑春丽, 李艳君, 钱林, 等. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌半胱氨酸合成酶的表达、纯化及其性质鉴定[J]. *生物技术通报*, 2011(3): 180–184.
- [18] Jiang ST, Ho ML, Jiang SH, et al. Color and quality of mackerel surimi as affected by alkaline washing and ozonation[J]. *Journal of Food Science*, 1998, 63(4): 652–655.
- [19] 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.
- [20] Hoshino YT, Matsumoto N. DNA-versus RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis profiles of a bacterial community during replenishment after soil fumigation[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(2): 434–444.
- [21] Moreno L, Neretnieks I. Long-term environmental impact of tailings deposits[J]. *Hydrometallurgy*, 2006, 83(1/4): 176–183.
- [22] 国家环保总局. GB 15618-1995, 《土壤环境质量标准》[S].
- [23] 王志楼. 典型矿区重金属污染特性及其土壤酶活性研究[D]. 上海: 东华大学硕士学位论文, 2010.
- [24] 赵祥伟, 骆永明, 滕应, 等. 重金属复合污染农田土壤的微生物群落遗传多样性研究[J]. *环境科学学报*, 2005, 25(2): 187–191.
- [25] Stephen JR, Chang YJ, Macnaughton SJ, et al. Effect of toxic metals on indigenous soil β -subgroup *Proteobacterium* ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 95–101.
- [26] Kong WD, Zhu YG, Fu BJ, et al. The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 143(1): 129–137.
- [27] 张妍, 崔骁勇, 罗维. 重金属污染对土壤微生物生态功能的影响[J]. *生态毒理学报*, 2010, 5(3): 305–313.