|  |  |
| --- | --- |
| EOI ：10. 13207<j. cnki. jmafu. 2009. (M. 001  第37卷 第4期 西北农林科技大学学报(自然科学版)  2009 年 4 月 Journal of Northwest A M7 University (Nat. Sci. Ed.) | Vol. 37 No.4  Apr. 2009 |

縮污染土壤修复过程中土壤细菌群落  
多样性的**RFLP**分析"

翟 文玄,王保莉”b,曲 东駡李 杨[[1]](#footnote-2)

(西北农林科技大学a生命科学学院,b黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室,c资源环境学院，陕西杨凌712100)

［摘 要］【目的】对污染土壤修复过程中土壤细菌群落多样性的变化进行研究。【方法】以淹水培养后的模拟 珞污染土壤为供试材料,通过直接提取土壤中总细菌DNA,利用细菌专一引物克隆细菌16S rDNA片段，分别建立克 隆文库。利用PCR-RFLP技术，分析比较了土壤淹水10 d(对照，S1)、添加Cr( VI)淹水10 d(S2)、添加Cr( VI)和 Fe(OH)3淹水10 d(S3)及20 d(S4)4个处理中土壤细菌群落的变化。【结果】用专一引物克隆细菌16S rDNA片段， 分别建立了克隆文库；用限制性内切酶RvqI进行细菌16S rDNA PCR-RFLP分析，分别得到123, 120, 97和69个酶 切类型，库容值分别为54.92%, 55.43%, 65.33%和76.60%； Shannon-Wiener指数、Gini指数、物种丰富度指数(〃％ ) 和物种均匀度指数(丿歩)均表现为Sl> S2> S3> S4,以上4个指数的变异系数分别为11.51%, 1.84%, 23.64%和 1.55%；基于细菌多样性参数的聚类分析结果,将对照S1和添加Cr(VI)处理的S2归于一类，而2个添加Fe处理的 土壤S3和S4聚为一类。【结论】经过10 d淹水处理，土壤中添加的Cr( VI)有98 %以上可发生转化，土壤残留的 Cr( VI)含量基本达到稳定。添加珞矿渣处理(S2)的土壤细菌群落多样性和对照(S1)基本一致,添加氧化铁的2个处 理(S3和S4)的细菌群落多样性基本接近，但低于S1和S2；添加氧化铁的处理(S3和S4)中，均出现了明显的优势细 菌群落，其分别属于荧光假单胞菌属和不动杆菌属。

［关键词］铭污染;土壤细菌;群落多样性;土壤修复；16S rDNA； RFLP分析

［中图分类号］X53；X172 ［文献标识码］A ［文章编号］1671 -9387 (2009)04-0128-07

RFLP analysis bacterial communities of remedied  
chromium-contaminated soil by different methods

ZHAI Wen\ WANG Bao-lia \ QU Dong% LI Yanga

*Qa College of Life Sciences, b State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on Loess Plateau College of  
Resource and Environment, Northwest A* &F *University, Yang ling, Shaanxi* 712100, *China)*

**Abstract：**【Objective】 The changes of soil bacterial community were studied during the process of soil remediation・【Method】 The simulation Cr ( VD contaminated soil was used as test material, which had been treated by waterlogging for 10 days (S2)，adding ferrihydrite and waterlogging for 10 days (S3 ) and 20 days (S4 )・ As control, the nature soil waterlogged for 10 days (SI) was used ・ Total genomic DNA of bacte­ria was extracted directly from soil treatments・ The 16S rDNAs were amplified by PCR with the bacterial universal primers 63F/1387R・【Result! Using RFLP four clone libraries were analyzed based on patterns of restriction endonuclease *Rsa* I，the OUT of four samples was 123, 120, 97 and 69 respectively .And the cov­erage was 54・ 92%，55.43 %，65.33 % and 76.60%・ The bacterial diversity indexes of Shannon-Wiener, Gini and species richness index 〃胚，evenness index *Jg* represented an identical order Sl> S2> S3〉S4・ The C・ V ・ of four bacterial diversity indexes was 11 ・ 51%， 1.84 %， 23 ・ 64 % and 1 ・ 55 %・ Based on the bacterial

diversity index clustering analysis, treatments of SI and S2 were classified into the same group, while S3 and S4 showed similarity to some degree ・【Conclusion】 After lOd anaerobic treatment by waterlogging, the chromium-contaminated was almost reduced, and the bacterial diversity level was similar between SI and S2, which was higher than that of S3 and S4・Dominant bacteria which were helpful to eliminate heavy met­al contamination and had Fe ( IID-reducing potential were found in S3 and S4・

**Key words：** chromium contamination； soil bacterium； community diversity； soil remediation； 16S rD- NA； RFLP analysis

人工湿地生态系统是污染物净化的有效途径之 一,对于土壤銘污染修复具有重要的参考作用■习。 利用人工湿地的厌氧还原过程，可有效加速Cr ( VI) 向Cr (IID的转化，其中湿地土壤中氧化铁的还原占 有至关重要的地位⑴。因此，淹水条件下土壤污染 物的转化与氧化铁还原的研究，已逐渐成为土壤修 复研究的热点之一牛刀。

已有研究表明，Cr ( VI)可被异化铁还原中产生 的Fe (II)还原为Cr (IID，同时Fe(II)被重新氧化 成Fe (IID并能被铁还原微生物循环利用，通过连 续的生物-非生物还原反应，加速对Cr ( VI)的还原， 因而微生物铁还原在Cr(VD的形态转化中具有“催 化,，作用皿。由此推断，微生物铁还原过程有可能 是厌氧土壤和水中銘解毒的重要途径^ o

尽管Cr(VI)的转化可指示环境化学指标的改 善，但在综合评价土壤质量过程中，土壤微生物群落 多样性的变化同样也受到了高度重视用“ o人们不 仅期望环境中的污染物形态向低毒性转变，而且在 修复过程中，也能使微生物群落结构得以优化或尽 量减少对其多样性的影响。目前，已经有许多关于 重金属污染土壤中土壤微生物多样性的研究，但对 于污染修复后土壤微生物多样性的研究报道尚比较 少。因此，研究污染土壤修复过程中土壤细菌群落 多样性的变化，对探讨环境修复的生物学机理具有 重要的理论意义。

本研究拟通过土壤淹水处理模拟湿地修复系 统，人为添加氧化铁用于强化土壤中的铁还原过程。 在模拟Cr(VI)污染的条件下，通过不同淹水处理获 得修复后的土壤样品，直接提取不同土壤样品中微 生物的总DNA，利用细菌通用引物克隆细菌基因组 中的16S rDNA基因片段。然后在分别建立克隆文 库的基础上，采用PCR-RFLP技术对不同处理土壤 的细菌群落多样性变化信息进行比较，以期评价修 复过程中土壤细菌群落分布的多样性差异，进而为 探讨銘污染土壤修复过程中微生物群落的变化特征 提供理论依据。

1材料与方法

1・1供试土壤

供试土壤采自陕西杨凌农田的表层土壤(5〜20 cm)。采样地临近渭河，传统种植方式为水旱轮作， 但近年来以旱作为主。土壤类型为土垫旱耕人为土 (Earth-cumuli-Orthic Anthrosols)0 土样自然风干 后，磨细，过孔径2 mm的土壤筛。土壤样品中的有 机质含量为16.95 g/kg,全氮、全磷和全钾含量分别 为 1.03, 1.59 和 16.76 g/kg，NO3\_-N.NH4 + -N.速 效磷和速效钾全量分别为19. 2, 10. 3, 20. 39和 153.71 mg/kgo

1. 土样的预处理

采用添加銘矿渣模拟銘污染土壤，污染强度按 二级农田标准计算銘矿渣取自青海省原海北 化工厂矿渣堆积场，矿渣中的乍各含量(以&O3计) 为70 g/kgo将乍各矿渣磨细，过孔径0.25 mm 土壤 筛。分别称取5.0 kg风干土于25 L聚乙烯桶中， 土壤设置淹水10 d (对照，S1 )、添加乍各矿渣后淹水 10 d(S2).添加铮矿渣和人工合成Fe (OH )3 (Ferri- hydrite)[13]后淹水 10 d(S3)及 20 d(S4)4 个处理。 銘矿渣加入量为28.0 $其中Cr(VI)含量为1.00 g； Fe(OH )3添加量为60. 61 mL悬液，其中Fe (IID含量为1.00 go按加(土)去离子水)= 1订比例添加去离子水，避光淹水培养。分别在淹 水培养10和20 d后，吸出上清液，经4 000 r/min 离心10 min后，自然风干，磨细，过孔径1 mm 土壤 筛。淹水时间依据土壤溶液中Cr(VI)浓度的变化 确定。通过10d的淹水处理，水相中的Cr(VI)浓度 可基本达到最低稳定值已，而设计20 d的淹水处理 旨在比较淹水时间对土壤微生物群落结构的影响。

分别称取10. 00 g经上述处理的风干土若干 份，置于10 mL塑料离心管中。控制土壤水分为最 大毛管持水量的80X置于28 °C恒温培养箱中恢 复培养15山用于土壤微生物总DNA的提取。每 处理设3个重复。

1・3 土壤微生物总DNA的提取

分别采用文献［15-17］报道的3种方法，从经恢 复培养的土壤样品中提取土壤微生物总DNA。将 3种提取方法所提取的DNA进行合并，经8 g/L琼 脂糖凝胶电泳，切胶回收总DNA。

1. 土壤细菌16S rDNA片段的扩增与克隆文库 的构建

采用细菌16S rDNA通用引物对63F/1387R, 弓I物序列分另I」为：5lCAGGCCTAACACATG- CAAGTC-3’ 和 5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC- *3、*以1・3中提取的土壤微生物总DNA为模板， 进行PCR扩增。PCR扩增体系为：10XPCR Buffer 5 ML, 1 mol/L dNTP 2・ 5 ML,弓| 物各 1 ML, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ML)0. 25 ML, DNA 模板 1 ML, (MH2O补充体积至25 ML。PCR反应程序：95 °C预 变性 5 min； 95 °C 30 s, 50 °C 30 s，72 *°C* 1 min, 30 个循环;72 °C延伸7 min； 4 °C保存。PCR扩增产 物采用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测，胶回收试剂盒 回收 16S rDNAo

将所得到的细菌16S rDNA扩增片段与 PMD19-T载体进行连接反应，并转入大肠杆菌 JM109中，通过蓝白斑筛选挑取阳性克隆子，建立土 壤细菌16S rDNA克隆文库。

1. RFLP 分析

通过菌落PCR方法，随机挑取约200个阳性克 隆，用pMD19-T载体通用引物M13扩增质粒上插 入的16S rDNA片段。挑取白色菌斑并编号，以菌 落为模板，将其直接加入PCR反应体系中。PCR 反应体系为(50 ML)：引物各1.0 ML, *xTaq* 20. 0 ML, ddH2O 28.0 MLO 菌落 PCR 程序为：95 °C预变 性 5 min； 95 °C 30 s，55 °C 40 s, 72 °C 1 min, 30 个 循环;72 °C延伸7 min, 4 °C保存。所得到的DNA 片段经纯化后用*Rsal*限制性内切酶消化(37 °C 4 h)。酶切产物用50 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳分离， 银染。将酶切图谱进行数据转换，对酶切类型进行 统计与分析。

1.6多样性指数及统计分析方法

采用*Q*多样性测度分析RFLP的分型结果，聚 类分析以细菌分布之间的Bray-Curtis相异性测度 系数为距离指标，用非加权平均配对法(UPGA)在 NTsys 2.10统计软件上进行数据处理。

1.6.1物种多样性指数门引 包括Shannon-Wiener 指数(才)和Gini指数⑦)。

(1)Shannon-Wiener 指数 H’。的计算公式

为：

*H'=-±PAnPi,*

*Pi = rii/No* 式中:S为RFLP的总类型数，*m*为第*i*种16S rD­NA 的RFLP变异类型克隆数，*N*为总克隆数。

的方差为：

Var/f = I (InP/ )2-(SpzlnP/ )2 I /  
N+ (S—1)/2N—

(2) Gini指数D。*D*的计算公式为：

s  
d=i-Spz2o

Z = 1

1. Margalef物种丰富度指数〃加 〃胚可用下 式计算：

*dMa =* (S—1 )/lnN。

1.6.3物种均匀度指数丿印丿刃可用下式计算： 丿刃=(1—H/(［—i/s)。

1.6.4文库的库容C C按下式计算： C/%=(1-h//7V)X100%o 式中为文库中仅出现1次的OTU (分类操作单 位)的数量。

1.7序列测定与种属性质分析

通过分析RFLP分型图谱，从S3和S4处理的 优势菌群中挑取克隆子进行序列测定。将测定序列 提交NCBI数据库，基于N-J法构建细菌系统发育 树，选取的构建软件是MEGA4.0和Clustal X。序 列测定由上海生物工程技术服务有限公司完成。 1.8 Cr(VI)质量浓度的测定

土壤淹水处理10及20 d后，将土壤泥浆搅匀， 吸取悬液用0.45卩m滤膜过滤，取滤液采用二苯碳 酰二腓分光光度法测定Cr(VI)的质量浓度由 銘矿渣带入土壤中的Cr(VI)具有极强的水溶性，在 淹水过程中，土壤中的Cr(VI)可与其水溶液中的Cr (VI)质量浓度形成动态平衡。若土壤溶液中的& (VI)质量浓度降低，可以反映出土壤中Cr ( VI)发生 转化的比率。因此，本试验以土壤溶液中Cr(VI)质 量浓度的变化计算土壤中Cr(VI)的残留量,依据土 壤中Cr(VD的添加量及水土比计算Cr ( VI)的转化 率。

恢复培养土样中残留的水溶性Cr ( VI)的测定 方法为:称取淹水处理过的风干土样10.00 g，置于 80 mL离心管中，加去离子水50 mL, 25 °C恒温振 荡1 h，4 000 r/min离心10 min，收集上清液，用 0.45 m滤膜过滤，测定滤液中Cr(VI)的质量浓度， 计算土壤中Cr(VD的残留量。

2结果与分析

2.1不同处理土样中Cr(VD转化率的比较

从表1可以看出，土壤添加銘矿渣并经淹水处 理后，土壤溶液中残留的Cr(VI)质量浓度由添加时 的200 mg/L降低到4 mg/L以下，说明经过10或 20 d的淹水培养汪各污染土壤体系中的Cr(VI)已发 生显著的转化，转化率达98%以上。用于恢复培养 表1 的土样中残留的Cr( VI)也降低到2 mg/kg以下，表 明淹水处理已达到了有效降低Cr(VI)质量浓度的 目的。添加Fe(OH)3处理(S3和S4)的Cr(VI)残 留量明显低于只添加銘矿渣处理(S2),且淹水20 d 的S4处理又低于淹水10 d的S3处理。从土壤化 学角度分析，淹水及添加Fe(OH)3处理均达到了有 效去除Cr(VD的目的。

不同处理中的Cr(VI)残留量及转化率

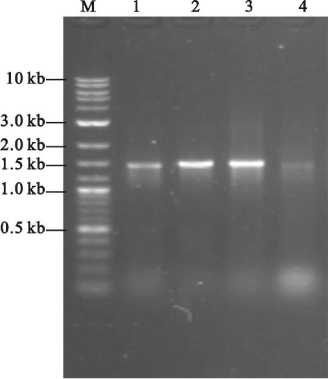


图1 土壤细菌16S rDNA扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果 M.2-log DNA Ladder Marker； 1. SI； 2. S2； 3. S3； 4. S4

Fig. 1 Argarose gel electrophoresis of soil bacterial 16S rDNA M.2-log DNA Ladder Marker； 1. SI； 2. S2； 3. S3； 4. S4

Table 1 Residue concentration and transform rate of chromate in different treatments

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 处理  T reatment | 土壤溶液中Cr(VI)的质量浓度厂 (mg ° L\_i)  Chromate concentration in soil solution | Cr(VI)的转化率/ %  Transform rate of chromate | =壤样品中的Cr(VI)残留量/ (mg ° kg\_i)  Chromate residue content of soil |
| 51  52 | 3.94+0.21 | 98.03 | 1.92 ±0.15 |
| S3 | 3.55+0.13 | 98.22 | 0.95 +0.11 |
| S4 | 2.68+0.07 | 98.66 | 0.16+0.09 |

* 1. 土壤微生物总DNA的提取与土壤细菌16S

rDNA片段的PCR扩增

直接提取不同处理土壤中微生物基因组DNA， 经过纯化后可以得到长度为10 kb以上的土壤微生 物基因组DNAo以细菌通用引物对(63F/1387R) 和SI、S2、S3、S4 4个处理的土壤微生物总DNA，采 用PCR扩增土壤细菌16S rDNA,扩增片段大小为 1 325 bp(图 l)o

* 1. 克隆文库中土壤细菌16S rDNA片段的

RFLP分析

S1、S2、S3和S4 4个处理土样的土壤细菌16S rDNA部分酶切结果如图2所示。S1〜S4 4个处理 的土壤细菌16S rDNA RFLP酶切类型(OTU)分别 为123, 120, 97和69种。克隆文库经*Rsa* I酶切产 生的OTU比例分布如图3所示。

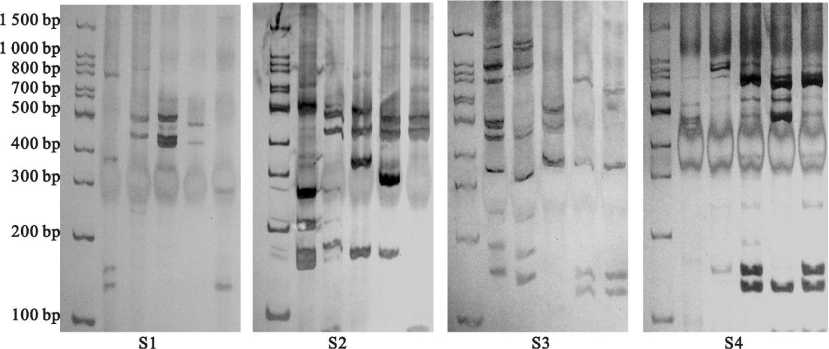
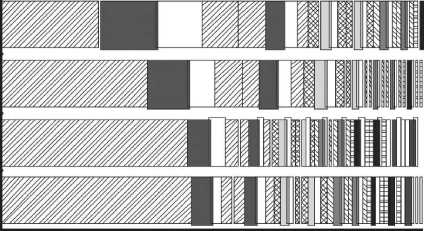


图2 4种处理土样土壤细菌16S rDNA的*Rsa* I部分酶切结果

Fig. 2 Partial RFLP of soil bacterial 16S rDNA by *Rsa* I cleavage for four samples

**单一克隆 Single isotate**



0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0

**OTU的类型与比例**

**OTU patterns and proportions**

图3 4种处理土样土壤细菌16S rDNA的RFLP统计结果

Fig. 3 Statistic results of RFLP of soil bacterial

16S rDNA for four kinds of samples

图3显示，4个处理土壤细菌的16S rDNA RFLP酶切类型呈现出不同的分布特征。其中，单 一克隆在4个处理中出现的比例为:S1 (45.08%)〉 S2(44.98%)> S3 (34・ 67%)〉S4 (23.40%),说明 S1和S2的物种多样性明显大于S3及S4。将具有 相同OTU的克隆子的数量占总克隆数的2%以上 定义为优势细菌种群，则优势细菌群落在4种处理 中的数量分别为 7 (S1)、5 (S2)、11 (S3)和 11 (S4 )， 其中S4处理中出现了 2种比例大于10%的OTU 类型，表明在淹水过程中添加氧化铁，可以促进土壤 优势细菌群落的产生，并且随着淹水时间延长优势 菌群所占比例增大。

2.4不同处理土样土壤细菌多样性指数的比较

采用«多样性测度方法，根据S1、S2、S3和S4 *4*种处理土样土壤细菌16S rDNA的PCR-RFLP结 果，计算多样性指数，所得结果见表2。由表2可 知，4种处理土样土壤细菌克隆文库的库容值为 54.92% ~76・60%。4种处理土样土壤细菌的物种 丰富度指数(〃Ma )、Shannon-Wiener 指数(H‘)、Gini 指数⑦)及均匀度指数(几)均表现为Sl> S2> S3〉S4,其中S1与S2处理数值接近，且均与S3及 S4差异明显。随着OTU所占比例差异(用Shan- non-Wiener指数方差VarH’表示)的增大，均匀度 指数(丿刃)呈减小趋势。各多样性指数的变异系数 (C.V.)分 别为：Shannon-Wiener 指数 *H，为* 11.51 X Gini指数D为1・84%，物种丰富度指数 〃⑷为23・64 %，VarH’为31.35%，均匀度指数*Jgl*为 1.55%。其中*HldMa*与VarH’的变异系数较大，表 明在土壤细菌群落的多样性比较中，Shannon-Wie- ner指数和丰富度指数〃⑷是较为敏感的指标。

表2 4种处理土样土壤细菌16S rDNA克隆文库PCR-RFLP多样性指数的比较

Table 2 Diversity of restriction endonuclease types in soil bacterial 16S rDNA clone library

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 处理  Treatment | OTU/克隆总数  OTU/Total clones | 库容值/ %  Coverage value | 多样性指数Diversity index | | | | |
| *H'* | *D* | 〃**Ma** | Var// | *J gi* |
| SI | 123/193 | 54.92 | 4.616 | 0.987 3 | 23.18 | 0.004 043 | 0.995 3 |
| S2 | 120/184 | 55.43 | 4.588 | 0.986 8 | 22.61 | 0.005 609 | 0.995 1 |
| S3 | 97/199 | 65.33 | 4.091 | 0.970 8 | 18.13 | 0.007 119 | 0.980 9 |
| S4 | 69/188 | 76.60 | 3.589 | 0.949 2 | 12.98 | 0.008 693 | 0.963 2 |

采用4种处理土样土壤细菌群落的多样性指数 *(dMa、H'、D、7aYH‘、Jgi* )，利用聚类分析软件 SLT\_ NTsys\_2对4种处理土样土壤类型进行聚类。从图 4可以看出，添加Cr处理(S2)与对照(S1 )的土壤细 菌多样性指数有所差别，但总体上比较相近，S1和 S2 土壤细菌多样性指数趋于一致，表明淹水处理后 的土壤类型与对照组趋于一致;添加氧化铁处理(S3 和S4)的土样与另外两组差异较大，S3和S4可趋于 另一类，但相互之间土壤细菌的多样性指数也存在 不同。S3与S4的聚类差异表明，延长淹水处理时 间同样可导致土壤细菌的多样性产生明显变化，这 可能与长期淹水过程促进了厌氧微生物种群的大量 繁殖有关。

2.5优势细菌种属性质分析

通过分析RFLP分型图谱，从S3和S4处理的 优势菌群(OTU比率为6.53%〜13.0%)中，挑取 3-47 3-53 3-55 3-66.4-27.4-72.4-98 4111 等 8 个 克隆子进行测序，测定的16S rDNA插入片段长度 为800〜850 bp。通过NCBIElast，得到基因库中 与8个克隆子同源性较高的细菌序列信息，并构建 细菌系统发育树，其结果如图5所示。

I S1

Is2

厂S3

I—S4

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 14.'19 | 12\*40 10\*61 | 8.81 | 7.02 |
|  | **趋同系数**  Coefficient |  |  |

图4 S1-S4处理土壤类型的聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of soil type in four different treatments

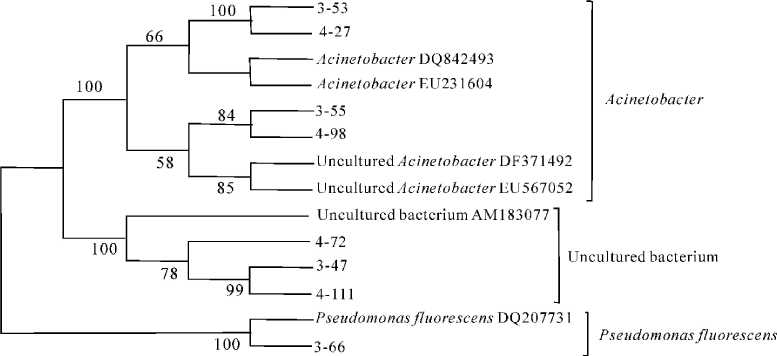
Fig. 5

图5基于16S tDNA序列的土壤细菌系统发育树

A phylogenetic tree of soil bacteria based on 16S rDNA sequencing

由图5可知，克隆子3-66属于荧光假单胞菌属 *^Pseudomonas fluor escens* )；克隆子 3-53、4-27、3- 55 >4-98 属于不动杆菌属*｛Acinetobacter haemolyti-* ss)；3-47、4-72、4-111与未鉴定种属的不可培养细 菌遗传距离相近。

3讨论

重金属铭污染对土壤微生物的生物量和种群分 布有很大影响。孟庆恒等凹对乍各矿渣堆放区污 染土壤的微生物数量分布进行了分析，并且分离得 到了具有耐受Cr(VI)毒性能力的菌株。重金属銘 污染可导致微生物数量与种群明显下降，但是在污 染土壤中也存在对Cr(VI)毒性有耐受能力并可以 将其还原的微生物㈤四。李松等凹通过研究水稻 土浸提液对Cr(VD的微生物还原能力，发现利用厌 氧微生物可以直接还原CrCVIX但还原程度和速率 有限,而直接添加到土壤泥浆中的Cr(VI)能被较好 地还原，其原因可能与土壤中存在的有机质、铁矿物 以及多样性的微生物组成有关[23'24] o本试验显示， 经过10 d淹水处理的乍各污染土壤，Cr(VI)的转化率 可达到98 %，S2处理与对照(S1)的土壤细菌群落多 样性指数相近，采用聚类分析软件SLT\_NTsys\_2 进行的土壤类型聚类结果显示，土壤分型与对照基 本处于相同类型，说明采用淹水处理的Cr(VI)污染 修复方法对土壤中的细菌群落不仅不会产生严重影 响,而且可以保持土壤微生物群落的相对稳定。

异化铁还原过程可以促进Cr ( VI)的还 原614,24],并可通过对环境微生物代谢过程的控制 影响到土壤细菌群落分布的多样性⑷“ o从本试验 结果可以看出，添加Fe(OH)3处理(S3和S4)的土 壤在淹水10及20(1后，其Cr ( VI)的转化效率与单 纯淹水培养处理基本相同，但其土壤细菌群落的分 布却产生了较大变化。一般认为，淹水过程可以促 进厌氧微生物群落的形成，通过延长淹水处理时间 发现，S4处理土壤中细菌群落多样性的变化较S3 更为突出，其中出现了 2种比例大于10%的优势菌 群。通常情况下，在外源Fe (OH )3存在时，其可强 化土壤中的微生物铁还原过程，有利于铁还原微生 物种群的繁殖⑴。理论上讲，当土壤中铁还原微生 物的活力增大时，土壤对一些污染物的净化能力也 将随之增强[3,25] o由S3和S4处理中出现的优势菌 群的序列测定及系统发育树可知，其优势菌群主要 属于荧光假单胞菌属*^Pseudomonas aeruginosa* )和 不动杆菌属*(Acinefobacte? haemolyticus* )9 其中不 动杆菌属*｛Acinetobacter* )属于变形菌门莫拉氏菌 科，在土壤和水体中分布广泛。Zakaria等宙勺从銘 污染水体中分离出1株溶血不动杆菌*QAcinetobact- er haemolyticus* 其在适合的温度与足够的碳源条 件下，可将水中质量浓度为70〜100 mg/L的Cr (VD完全降解。然而，关于S3和S4处理中细菌群 落的多样性变化，能否反映铁还原条件下污染物厌 氧修复过程中土壤微生物群落的变化特征，还需要 进一步深入地研究。

[参考文献]

1. Tokunaga T K, Wan J, Firestone M K, et al. In situ reduction of chromium ( VI) in heavily contaminated soils through organic carbon amendment [ J] . J Environ Qual, 2003, 32 (5 )： 1641- 1649.
2. Oliver D S, Brockman F J, Bowman R S, et al. Microbial reduc­tion of hexavalent chromium under vadose zone conditions [ J]. J Environ Qual, 2003, 32(1 )： 317-324.
3. Lovely D R.Dissimilatory Fe( III) and Mn( IV) reduction [ J].

Microbial Rev, 1991, 55 (2)： 259-287.

1. Singh I B Singh D R. Influence of dissolved oxygen on aqueous Cr( VD removal by ferrous ion [ J] . Environ Technol, 2002, 23 (12)：1347-1353.
2. Anderson R T, Lovely D R. Influence of dissimilatory metal re­duction on fate of organic and metal contaminants in the sub­surface [J] . Hydrogeology Journal, 2000, 8： 77-88.
3. Wielinga B, Mizuba M M, Hansel C M, et al. Iron promoted re­duction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria *[J] .* Environ Sci Technol, 2001,35(3):522-527.
4. Hwang I, Batchelor B, Schlautman M A, et al. Effects of fer­rous iron and molecular oxygen on chromium ( VI) redox kinet­ics in the presences of aquifer solids [ J] . J Hazard Mater, 2002, 92(2)： 143-159.
5. 王 新,周启星.重金属与土壤微生物的相互作用及污染土壤 的修复[J].环境污染治理技术与设备,2004,5(11):1-4.

Wang X, Zhou Q X. Interaction between heavy metals and soil microorganisms and remediation of contaminated soils [ J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Con­trol, 2004,5(11)： 1-4. (in Chinese)

1. 孟庆恒，傅 珊,张海江，等.微生物在钻污染土壤中的分布及 珞累积菌株的初步筛选[J].农业环境科学学报,2007, 26(2)： 472-475.

Meng Q H, Fu S, Zhang H J, et al. Preliminary assayingon dis­tribution of microbe sin Cr polluted soiland selection of Cr accu­mulative strains [ J] . Journal of Agro-Environment Science, 2007, 26(2):472-475. (in Chinese)

1. Camargo FAO, Okeke B C, Bento F M, et al. Diversity of chromium-resistant bacterial isolated from soils contaminated with dichromate [ J] . Applied Soil Ecology, 2005, 29(2)： 193- 202.
2. Pattanapipitpaisal P, Brown N L, Macaskie L E. Chromate re­duction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr ( VI)-contaminated s让e [ J] . Appl Microbiol Biotechnol, 2001,57(1-2):257-261.
3. 国家环境保护局.GB 15618- 1995 土壤环境质量标准[S]. 北京：中国标准出版社，1995.

Ministry of Environmental Protection of the People's Repub­lic of China. GB 15618— 1995 Environmental quality stand­ard for soils [ S] . Beijing： Standars Press of China, 1995. (in Chinese)

1. Schwertmann U, Cornll R M. Iron oxides in the Laboratory [M] .New York： VCH Wenhein, 1991： 69-144.
2. 李松，曲 东.厌氧环境下Cr(VI)的微生物还原能力[J]. 西北农林科技大学学报：自然科学版,2006, 34(10)： 107-112.

Li S, Qu D. Reduction capabilities of microbial Cr ( VI) in an­aerobic environment [ *J]* . Jour of Northwest Sci Tech Univ of Agri and For： Nat Sci Ed, 2006, 34 (10)： 107-112. (in Chi­nese)

1. Zhou J 乙 Bruns M A, Tiedjie J M. DNA recovery from soil of diverse composition [ J] . Applied and Environmental Microbi­ology, 1996, 62(2):316-322.
2. Tsai Y L, Olson B H. Rapid method for direct extraction of DNA from soul sand sediments [ J] . Applied and Environmen­tal Microbiology, 1991, 57(4)： 1070-1074.
3. Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, et al. DNA extraction from soils old bias for new microbial diversity analysis meth­ods [J] . Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (5):2354-2359.
4. 马克平，钱迎倩.生物多样性研究的原理与方法[M].北京： 中国科技出版社，1994： 141-165.

Ma K P, QianY Q. Principles and methodologies of biodiversi­ty studies [ M] . Beijing： China Science and Technology Press, 1994： 141-165. (in Chinese)

1. 国家环境保护局.GB7467-87 水质-六价铮的测定——二

苯碳酰二耕分光光度法[S].北京：中国标准出版社，1987.

Ministry of Environmental Protection of the People's Repub­lic of China. GB7467 — 87 Water quality-determination of chromiun( VI)-1, 5 Diphenylcarbohydrazide spectrophotomet­ric method [ S] . Beijing： Standards Press of China, 1987. (in Chinese)

1. Megharaj M, Avudainayagam S, Naidu R. Toxicity of hexava­lent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste [ J] . Curr Microbiol, 2003, 47(l)：51-54.
2. Geelhoed J S, Meeussen J C, Roe M J, et al.Chromium reme­diation or release ? Effect of iron( II) sulfate addition on chro­mium ( VI) leaching from columns of chromite ore processing residue [J] .Environ Sci Technol, 2003, 37 (14)： 3206-3213.
3. Wang Y T, Shen H. Bacterial reduction of hexavalent chromi­um [ J] . J Ind Microbiol, 1995, 14(2)： 159-163.
4. Jeyasingh J, Philip L. Bioremediation of chromium contamina­ted soil： optimization of operating parameters under laborato­ry conditions [J] .J Hazard Mater, 2005, 118(1-3)： 113-120.
5. 曲东，毛晖，曾辰.添加珞、铁及葡萄糖对土壤中异化铁 还原的影响[J].西北农林科技大学学报：自然科学版,2004, 32(10):43-46.

Qu D, Mao H, Zeng C. Effect of chromate ferrihydrite and glucose on dissimilatory Fe (III) reduction in paddy soil [ J]. Jour of Northwest Sci Tech Univ of Agri and For： Nat Sci Ed, 32(10)： 43-46. (in Chinese)

1. Fredrickson J K, H M Kostandarithes, Li S W, et al. Reduc­tion of Fe ( III), Cr ( VI), U ( VI), and Tc ( VII) by deinococcus radiodurans R1 [ J] . Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (5 )： 2006-2011.
2. Zakariaa Z A, Zakariaa Z, Ahmada W A, et al. Hexavalent chromium reduction by Acinetobacter haemolyticus isolated from heavy-metal contaminated wastewater [ J] . Journal of Hazardous Materials, 2007, 146： 30-38.
3. Zakariaa Z A, Zakariaa Z, Ahmada W A, et al. Biological de­toxification of Cr( VI) using wood-husk immobilized *Acineto­bacter haemolyticus* [ J] . Journal of Hazardous Materials, 2007, 148：164-171.

1. ［收稿日期］2008-05-27

   ［基金项目］国家自然科学基金项目(40741005)；黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室基金项目(10501-178)

   ［作者简介］翟 文(1982—)，女，陕西西安人，硕士，主要从事微生物分子生态学研究。E-mail： zw8202 @nwsuaf. edu.cn ［通信作者］王保莉(I960—),女，陕西西安人，教授，博士，主要从事分子生物学研究。E-mail： wbl @nwsuaf. edu.cn [↑](#footnote-ref-2)