

铬污染土壤修复过程中土壤细菌群落多样性的 RFLP 分析

翟文^a, 王保莉^{a,b}, 曲东^c, 李杨^a

(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铬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 *Rsa* I 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(d_{Ma})和物种均匀度指数(J_{gi})均表现为 $S1 > S2 > S3 > S4$, 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 归为一类,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。添加铬矿渣处理(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】 铬污染;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^a, WANG Bao-li^{a,b}, QU Dong^c, LI Yang^a

(a College of Life Sciences, b State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on Loess Plateau; c College of Resource and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The changes of soil bacterial community were studied during the process of soil remediation. 【Method】The simulation Cr(VI) 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 (S1) 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 d_{Ma} , evenness index J_{gi} represented an identical order $S1 > S2 > S3 > S4$. The C. V. of four bacterial diversity indexes was 11.51%, 1.84%, 23.64% and 1.55%. Based on the bacterial

* [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(1960—),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

diversity index clustering analysis, treatments of S1 and S2 were classified into the same group, while S3 and S4 showed similarity to some degree. 【Conclusion】 After 10d anaerobic treatment by waterlogging, the chromium-contaminated was almost reduced, and the bacterial diversity level was similar between S1 and S2, which was higher than that of S3 and S4. Dominant bacteria which were helpful to eliminate heavy metal contamination and had Fe(Ⅲ)-reducing potential were found in S3 and S4.

Key words: chromium contamination; soil bacterium; community diversity; soil remediation; 16S rDNA; RFLP analysis

人工湿地生态系统是污染物净化的有效途径之一,对于土壤铬污染修复具有重要的参考作用^[1-2]。利用人工湿地的厌氧还原过程,可有效加速 Cr(VI)向 Cr(Ⅲ)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^[3]。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^[4-7]。

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(Ⅲ),同时 Fe(Ⅱ)被重新氧化成 Fe(Ⅲ),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(VI)的形态转化中具有“催化”作用^[5-6]。由此推断,微生物铁还原过程有可能是厌氧土壤和水中铬解毒的重要途径^[5-7]。

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^[8-11]。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,进而为探讨铬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)。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/kg。

1.2 土样的预处理

采用添加铬矿渣模拟铬污染土壤,污染强度按二级农田标准计算^[12]。铬矿渣取自青海省原海北化工厂矿渣堆积场,矿渣中的铬含量(以 CrO₃ 计)为 70 g/kg。将铬矿渣磨细,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)、添加铬矿渣后淹水 10 d(S2)、添加铬矿渣和人工合成 Fe(OH)₃(Ferrihydrite)^[13]后淹水 10 d(S3)及 20 d(S4)4 个处理。铬矿渣加入量为 28.0 g,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(Ⅲ)含量为 1.00 g。按 $m(\text{土}):V(\text{去离子水})=1:1$ 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 10 d 的淹水处理,水相中的 Cr(VI)浓度可基本达到最低稳定值^[14],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 80%,置于 28 ℃ 恒温培养箱中恢复培养 15 d,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。

1.4 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,引物序列分别为:5'-CAGGCCTAACACATG-CAAGTC-3' 和 5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-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:10×PCR Buffer 5 μL,1 mol/L dNTP 2.5 μL,引物各 1 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.25 μL,DNA 模板 1 μL,ddH₂O 补充体积至 25 μL。PCR 反应程序:95 ℃预变性 5 min;95 ℃ 30 s,50 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 7 min;4 ℃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 rDNA。

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。

1.5 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 μL):引物各 1.0 μL,rTaq 20.0 μL,ddH₂O 28.0 μL。菌落 PCR 程序为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 7 min,4 ℃保存。所得到的 DNA 片段经纯化后用 Rsa I 限制性内切酶消化(37 ℃,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 α 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^[18] 包括 Shannon-Wiener 指数(H')和 Gini 指数(D)。

(1)Shannon-Wiener 指数 H' 。 H' 的计算公式

为:

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i, \\ P_i = n_i / N.$$

式中: S 为 RFLP 的总类型数, n_i 为第 i 种 16S rDNA 的 RFLP 变异类型克隆数, N 为总克隆数。

H' 的方差为:

$$\text{Var}H' = \left| \sum P_i (\ln P_i)^2 - (\sum P_i \ln P_i)^2 \right| / \\ N + (S - 1) / 2N^2.$$

(2) Gini 指数 D 。 D 的计算公式为:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2.$$

1.6.2 Margalef 物种丰富度指数 $d_{M_{\alpha}}$ $d_{M_{\alpha}}$ 可用下式计算:

$$d_{M_{\alpha}} = (S - 1) / \ln N.$$

1.6.3 物种均匀度指数 J_{gi} J_{gi} 可用下式计算:

$$J_{gi} = (1 - \sum P_i^2) / (1 - 1/S).$$

1.6.4 文库的库容 C C 按下式计算:

$$C / \% = (1 - nl / N) \times 100 \%$$

式中: nl 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 μm 滤膜过滤,取滤液采用二苯碳酰二肼分光光度法测定 Cr(VI)的质量浓度^[19]。由铬矿渣带入土壤中的 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 Cr(VI)质量浓度降低,可以反映土壤中 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(VI)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 ℃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(VI)的残留量。

2 结果与分析

2.1 不同处理土样中 Cr(VI)转化率的比较

从表 1 可以看出,土壤添加铬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,铬污染土壤体系中的 Cr(VI)已发生显著的转化,转化率达 98% 以上。用于恢复培养

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铬矿渣处理(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(VI)的目的。

表 1 不同处理中的 Cr(VI)残留量及转化率
Table 1 Residue concentration and transform rate of chromate in different treatments

处理 Treatment	土壤溶液中 Cr(VI)的质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Chromate concentration in soil solution	Cr(VI)的转化率/% Transform rate of chromate	土壤样品中的 Cr(VI)残留量/ (mg · kg ⁻¹) Chromate residue content of soil
S1	—	—	—
S2	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

2.2 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 DNA。以细菌通用引物对(63F/1387R)和 S1、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 1)。

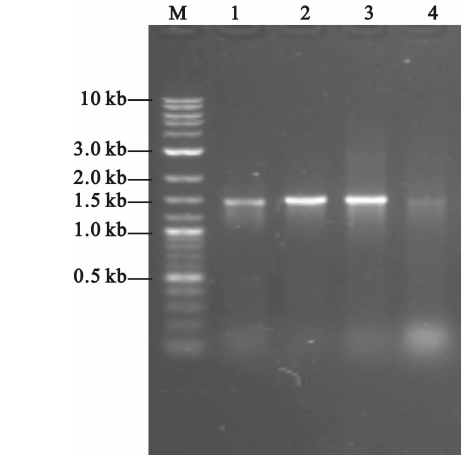


图 1 土壤细菌 16S rDNA 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果
M. 2-log DNA Ladder Marker; 1. S1; 2. S2; 3. S3; 4. S4

2.3 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。

Fig. 1 Argarose gel electrophoresis of soil bacterial 16S rDNA
M. 2-log DNA Ladder Marker; 1. S1; 2. S2; 3. S3; 4. S4

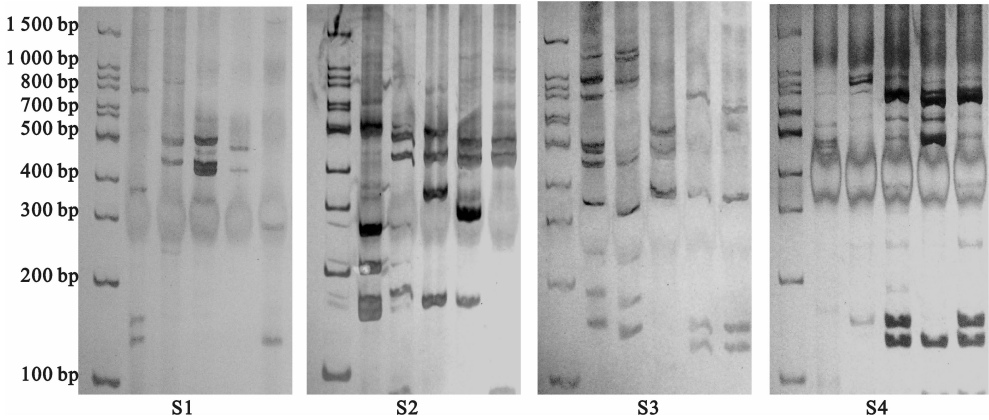


图 2 4 种处理土样土壤细菌 16S rDNA 的 *Rsa* I 部分酶切结果

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

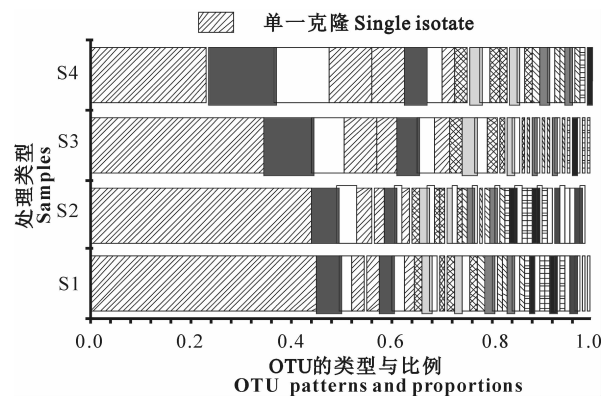


图 3 4 种处理土样土壤细菌 16S rDNA 的 RFLP 统计结果
Fig. 3 Statistic results of RFLP of soil bacterial 16S rDNA for four kinds of samples

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

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	d_{Ma}	$VarH'$	J_{gi}
S1	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(d_{Ma} 、 H' 、 D 、 $VarH'$ 、 J_{gi}),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

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 α 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(d_{Ma})、Shannon-Wiener 指数(H')、Gini 指数(D)及均匀度指数(J_{gi})均表现为 $S1>S2>S3>S4$,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 Shannon-Wiener 指数方差 $VarH'$ 表示)的增大,均匀度指数(J_{gi})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%,Gini 指数 D 为 1.84%,物种丰富度指数 d_{Ma} 为 23.64%, $VarH'$ 为 31.35%,均匀度指数 J_{gi} 为 1.55%。其中 H' 、 d_{Ma} 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-Wiener 指数和丰富度指数 d_{Ma} 是较为敏感的指标。

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、4-111 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 NCBI Blast,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。

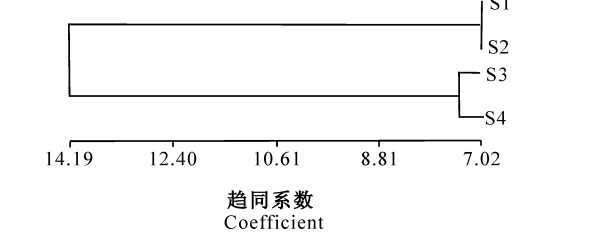


图 4 S1~S4 处理土壤类型的聚类分析
Fig. 4 Cluster analysis of soil type in four different treatments

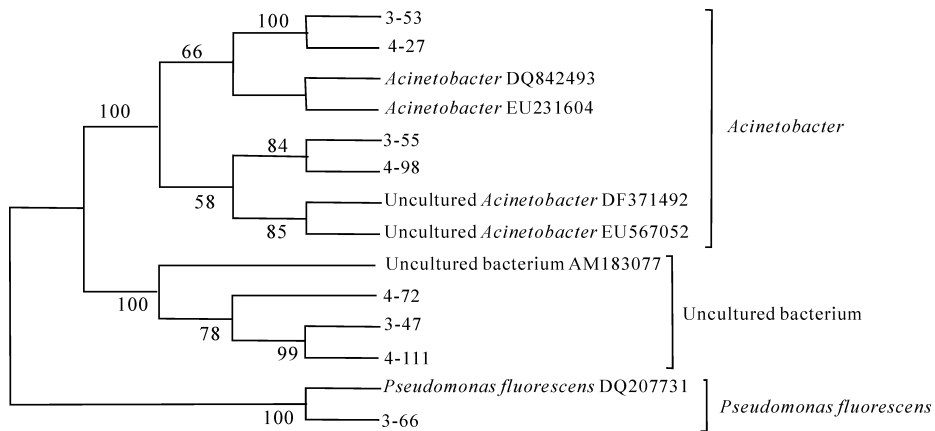


图 5 基于 16S rDNA 序列的土壤细菌系统发育树

Fig. 5 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 fluorescens*);克隆子 3-53、4-27、3-55、4-98 属于不动杆菌属 (*Acinetobacter haemolyticus*);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

重金属铬污染对土壤微生物的生物量和种群分布有很大影响^[9-11]。孟庆恒等^[9]对铬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。重金属铬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^[20-22]。李松等^[14]通过研究水稻土浸提液对 Cr(VI)的微生物还原能力,发现利用厌氧微生物可以直接还原 Cr(VI),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]。本试验显示,经过 10 d 淹水处理的铬污染土壤,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^[6,14,24],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^[10-11]。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 d 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^[3]。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]。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 (*Acinetobacter haemolyticus*),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^[26-27]从铬污染水体中分离出 1 株溶血不动杆菌 (*Acinetobacter 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(VI)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.
- [4] Singh I B, Singh D R. Influence of dissolved oxygen on aqueous Cr(VI) removal by ferrous ion [J]. Environ Technol, 2002, 23(12): 1347-1353.
 - [5] Anderson R T, Lovely D R. Influence of dissimilatory metal reduction on fate of organic and metal contaminants in the sub-surface [J]. Hydrogeology Journal, 2000, 8: 77-88.
 - [6] 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.
 - [7] 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.
 - [8] 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)
 - [9] 孟庆恒, 傅 珊, 张海江, 等. 微生物在铬污染土壤中的分布及铬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 assaying on distribution of microbes in Cr polluted soil and selection of Cr accumulative strains [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2007, 26(2): 472-475. (in Chinese)
 - [10] Camargo F A O, 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.
 - [11] Pattanapitpaisal P, Brown N L, Macaskie L E. Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI)-contaminated site [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 57(1-2): 257-261.
 - [12] 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: Standards Press of China, 1995. (in Chinese)
 - [13] Schwertmann U, Cornill R M. Iron oxides in the Laboratory [M]. New York: VCH Weinheim, 1991: 69-144.
 - [14] 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 an aerobic environment [J]. Jour of Northwest Sci Tech Univ of Agri and For: Nat Sci Ed, 2006, 34(10): 107-112. (in Chinese)
 - [15] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soil of diverse composition [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322.
 - [16] Tsai Y L, Olson B H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(4): 1070-1074.
 - [17] 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.
 - [18] 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, Qian Y Q. Principles and methodologies of biodiversity studies [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1994: 141-165. (in Chinese)
 - [19] 国家环境保护局. GB7467—87 水质-六价铬的测定——二苯碳酰二肼分光光度法 [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)
 - [20] 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(1): 51-54.
 - [21] 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.
 - [22] Wang Y T, Shen H. Bacterial reduction of hexavalent chromium [J]. J Ind Microbiol, 1995, 14(2): 159-163.
 - [23] 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.
 - [24] 曲 东, 毛 晖, 曾 辰. 添加铬、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)
 - [25] 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.
 - [26] 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.
 - [27] 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.