

大宝山重金属污染土壤微生物群落优势种群分析

郭建华^{1,2}, 李华平², 朱红惠¹

(1 广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070; 2 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:采用 16S rDNA PCR-DGGE 技术, 对大宝山重金属污染土壤中的微生物群落多样性进行了分析, 并对其中的优势种群进行了比较研究. 结果表明, 重金属污染土壤中的微生物还保持着高的多样性; 克隆测序结果表明重金属污染土壤中的优势菌大多为未培养菌 (Uncultured bacteria), 其主要优势菌群为未培养的 α -变形菌纲 alpha Proteobacterium、劳尔氏菌属 *Ralstonia*、酸杆菌门 Acidobacteria 和放线菌属 *Actinobacterium*, 以及产卟啉菌属 *Porphyrobacter*、*Pseudochrobactrum*、无色杆菌属 *Achromobacter* 和链霉菌属 *Streptomyces* 等.

关键词:重金属污染土壤; DGGE; 优势种群

中图分类号: Q938.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)03-0056-05

Analysis of Dominant Species of Microbial Community in Heavy Metals Contaminated Soil from Dabaoshan Area

GUO Jian-hua^{1,2}, LI Hua-ping², ZHU Hong-hui¹

(1 Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Provincial Common Laboratory of Microbial Applied Technology, Guangzhou 510070, China;
2 College of Resources and Environmental, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The microbial diversity of the dominant microbes in heavy metals contaminated soil from Dabaoshan area was studied by 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The heavy metals contaminated soil showed microbial diversity. The result of sequence showed that most of the dominant microorganisms in heavy metal contaminated soil were uncultured bacterium, including Uncultured alpha Proteobacterium, Uncultured *Ralstonia*, Uncultured Acidobacteria, Uncultured *Actinobacterium*, *Porphyrobacter*, *Pseudochrobactrum*, *Achromobacter* and *Streptomyces* etc.

Key words: heavy metal contaminated soil; DGGE; dominant species

重金属对土壤、水体和大气的污染已经具有广泛性, 并严重危害到社会的可持续发展. 位于粤北的大宝山矿是一座大型多金属伴生矿床, 该矿区长期粗放采矿, 且缺少有效防污措施, 使得大量重金属物质汇入横石河和翁江, 已对矿区周边及河流下游生态环境造成严重破坏. 据调查, 受采矿废水污染的河流内, 鱼虾绝迹; 用污染河水灌溉或受洪泛影响的农田, 土质已被破坏, 农作物产量剧降甚至绝收. 重金属的污染会导致土壤中生物种群数量严重下降, 多样性显著减少^[1]. 土壤微生物对于维持土壤肥力、促

进植物健康生长, 特别是在重金属污染土壤的生物修复等方面具有极为重要的作用^[2-3]. 目前, 关于大宝山重金属污染区的土壤微生物种群多样性以及长期暴露在重金属环境中的主要优势种群还缺少研究报告, 而明确这些问题对于分离筛选重金属耐受微生物资源, 促进重金属抗性微生物资源的保护和重金属抗性机制研究等均具有重要意义.

本研究选用广东地区重金属污染严重的大宝山矿区土壤, 采用分子生态学技术分析大宝山重金属污染土壤的微生物多样性, 并进一步分析了其优

收稿日期: 2009-04-14

作者简介: 郭建华 (1986—), 女, 硕士; 通信作者: 朱红惠 (1970—), 女, 研究员, E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展计划前期专项 (2008CB417207)

势种群的信息,为筛选生物修复重金属污染土壤的微生物菌种提供了依据,也为该区域重金属耐受微生物资源的保护和开发应用提供基础信息.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 重金属污染土壤样品及未污染土壤样品采集于广东大宝山重金属污染区与非污染

区(表 1). 2008 年 3 月在各取样点取距地表 5 ~ 10 cm 的土壤,编号并记录采样点植被情况,立即带回实验室,土壤样品经风干后于 4 ℃ 保存. 采用原子吸收光谱法^[4]测定出土壤中重金属 Cd、Pb、Zn、Cu 的总质量比(表 1). 从测定的样品中,选取 Cd、Pb、Zn、Cu 复合污染最重的土样以及上坝癌症村重金属污染土样进行 DGGE 分析.

表 1 大宝山重金属污染土壤样品特性及重金属含量测定¹⁾
Tab. 1 The characteristics and concentration of heavy metals in contaminated soil from Dabaoshan

土样编号	取样位置	地表植物	$w/(mg \cdot kg^{-1})$			
			Cu	Zn	Pb	Cd
1	曲江凡洞	蕨类	1 798.00	831.50	1 172.00	1.36
2	矿区沉淀区	蕨类	396.30	801.60	3 648.00	1.34
3	矿区排水沟上游	蕨类	455.30	819.40	4 180.00	1.27
4	矿区沉淀区	蕨类	666.10	1 998.00	5 715.00	2.02
5	尾矿区	蕨类	1 298.00	1 449.00	1 323.00	4.17
6	矿山水池	香根草	772.70	1 525.00	2 544.00	4.28
7	尾矿区	未知植物	1 258.00	1 282.00	1 273.00	8.37
8	非污染区	蕨类	136.10	68.80	153.50	0.19
9	上坝横石河床污染区	空心莲子草	607.70	462.40	1 868.00	0.76
10	上坝横石河床污染区	禾本科植物	670.80	586.20	1 762.00	1.60
11	非污染区	草竹	91.50	89.90	140.00	0.12
12	上坝横石河床清水区	含羞草	628.60	436.40	1 693.00	0.54
13	上坝横石河床清水区	乌桕	632.40	485.60	1 839.00	0.68
14	上坝横石河边	芦苇草	649.90	496.40	2 057.00	0.74
15	上坝横石河边	空心莲子草	653.50	547.60	2 116.00	1.27
16	上坝横石河边	含羞草	671.30	503.70	2 084.00	0.95

1) 土壤质量二级标准(GB15618—1995)^[4]: Cu < 50 mg/kg, Zn < 200 mg/kg, Pb < 250 mg/kg, Cd < 0.3 mg/kg.

1.1.2 主要仪器设备与试剂 DNA 纯化试剂盒 Wizard DNA Clean up system 购于美国 Promega 公司; 引物由赛百盛公司合成; Taq DNA 聚合酶及其他试剂购于威佳公司; PCR 扩增仪 GeneAmp PCR system 2400, 德国 PE 公司生产; 变性梯度凝胶电泳仪 The DcodeTM Universal Mutation system, 美国 Bio-Rad 公司生产; UVI 紫外成像系统, 英国 UVI 公司生产.

1.1.3 引物 引物(GC-357F: 5' - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG - 3'; 518R: 5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3')^[5] 由上海英骏生物技术有限公司合成.

1.2 土壤总 DNA 的提取与纯化

采用修改后的 Bead-Beating 法^[6].

1.3 16S rDNA 的 PCR 扩增

土壤 DNA 适当稀释后作模板, 进行 PCR 扩增 (GeneAmp PCR system 2400, PE 公司). 使用特异性引物 GC-357F 和 518R 对细菌 16S rDNA V3 区进行扩增, 片段长度约为 220 ~ 230 bp (包括 GC 夹子),

PCR 反应体系(50 μ L) 组成是 10 $\times$ Buffer (含 Mg^{2+}) 5 μ L, 引物 GC-357F 和 518R (10 μ mol/L) 各 1 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 加去离子水补齐 50 μ L. 采用降落 PCR^[7] 策略, 程序为: 预变性 94 ℃ 5 min, 前 20 个循环为 94 ℃ 30 s, 65 ~ 55 ℃ 30 s (其中每个循环降低 0.5 ℃) 和 72 ℃ 40 s, 后 10 个循环为 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s 和 72 ℃ 40 s, 最后 72 ℃ 延伸 20 min, 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

1.4 变性梯度凝胶电泳分析

使用美国 Bio-Rad 公司的 The Dcode Universal Mutation Detection System 电泳系统进行变性梯度凝胶电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE). 所用 $w = 8\%$ 的聚丙烯酰胺凝胶的变性梯度为 35% ~ 65% (100% 的变性剂中含有 7 mol/L 尿素和 $\varphi = 40\%$ 的甲酰胺), 上样量为 50 μ L PCR 浓缩产物. 运行条件: 1 $\times$ TAE [40 mmol/L Tris, 40 mmol/L 冰乙酸, 1.0 mmol/L EDTA (pH8.0)] 电泳缓冲液中, 恒温 60 ℃, 30 V 电泳 30 min 后, 180 V 电泳 6 h.

电泳完毕,用 ddH₂O 漂洗凝胶,再用 Gold View 染料染色 30 min,UVI 成像系统拍照.使用 Quantity one V4.6(美国 Bio-Rad 公司)软件对 DGGE 电泳图谱进行分析,同时进行 UPGMA 聚类分析不同样品间细菌群落结构的相似性.

用 Sorenson 配对比较相似性系数(Pairwise similarity coefficient, C_s),比较不同样品 DGGE 指纹图谱的相似性^[8]: $C_s = 2j/(a+b)$. 其中 a 、 b 分别表示 2 个比较对象中的 DNA 条带的数目, j 表示 a 和 b 中相同的条带数量.

多样性指数(H),物种丰度(S)指标被用来比较各个样品的细菌多样性.公式如下^[9]:

$$H = \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = - \sum_{i=1}^S (N_i/N) \ln (N_i/N),$$

其中, p_i 是某个样品中某一条带的强度在该样品中所有条带总强度中所占的比率, S 是某个样品中所有条带数目的总和, N_i 为某一泳道所有条带的强度总和, N 为某一泳道里某一条带的强度.

1.5 基因克隆和序列分析

从 DGGE 图谱中切胶回收优势亮带,无菌水漂洗 2~3 次,装于灭菌的 1.5 mL 离心管中.加 20 μ L 无菌水浸泡条带,4 $^{\circ}$ C 过夜,离心后取上清作为 PCR 的模板进行扩增,反应程序和体系同 1.3,所用引物为 357F(不带 GC 夹子)和 518R.扩增产物切胶回收后,采用 TaKaRa 凝胶回收纯化试剂盒进行纯化.将 PCR 纯化物用 TaKaRa pMD18-T Vector 进行克隆.进行蓝白斑筛选后,挑取克隆子进行 PCR 扩增, DGGE 验证,迁移位置与原始切胶位置一致的克隆送去上海英骏生物技术有限公司测序.测序结果经 NCBI Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行比对分析.

2 结果与分析

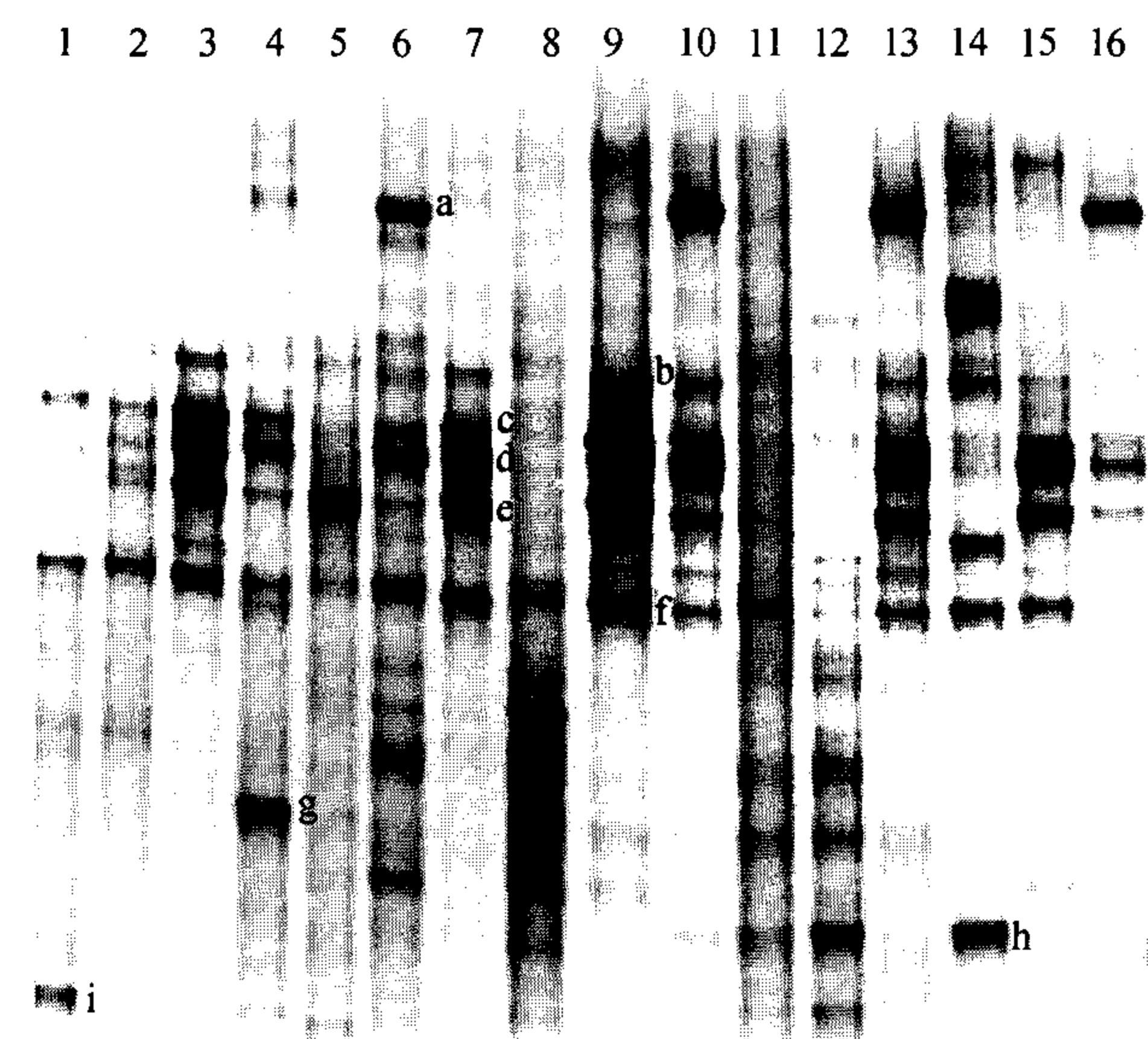
2.1 土壤总 DNA 提取及 16S rDNA V3 区 PCR 扩增

将土壤总 DNA 抽提物纯化后,所得的总 DNA 片段大小介于 18~23 kb,纯度较高.以纯化后的基因组 DNA 为模板进行 V3 区片段扩增,PCR 扩增出 V3 区片段约为 230 bp,适用于 DGGE 分析.

2.2 不同重金属污染土壤样品的细菌种群多样性及优势条带分析

对提取纯化的土壤总 DNA 进行 16S rDNA V3 区扩增,扩增产物进行 DGGE 分析.从 DGGE 指纹图谱(图 1)中可以看出,不同的样品分离出的条带不一样,但是 a、b、c、d、e、f 为重金属污染土样所共有的优势条带,而 i、g、h 分别为土样 1、4、14 所特有.这些优势条带可能是重金属污染土壤中的优势耐受重金

属种群. DGGE 图谱分析表明,在重金属复合污染的土样中都有明显的优势条带,而未污染土壤 8 和 11 中没有明显的优势条带.



1~7:复合重金属污染最重土样;9、10、12~16:相同生境的上坝癌症村重金属污染土样;8、11:未污染土样

图1 提取土壤 DNA 的 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析

Fig.1 DGGE analysis of 16S rDNA V3 fragments of PCR products amplified from soil-DNA extracts

图 2 可以看出,土样 6、8、11 的生物多样性指数和物种丰度均较高,而土样 3、7、14 的数值相对较低.6 号土样为 Cd 污染最重的土样,其多样性指数为 2.36,从该土壤的 DGGE 图谱(图 1)上看其有优势条带较其他土样多,且总条带数为 16 条,其物种丰度较高.该土样的地表植物为香根草 *Vetiveria zizanioides*,而香根草为重金属积累植物.这表明,土壤根际植物以及土壤特性对微生物多样性具有一定的影响.未污染土样 8 和 11 的生物多样性指数分别为 2.39 和 2.56,总条带数都是 16 条,但其优势条带较少.

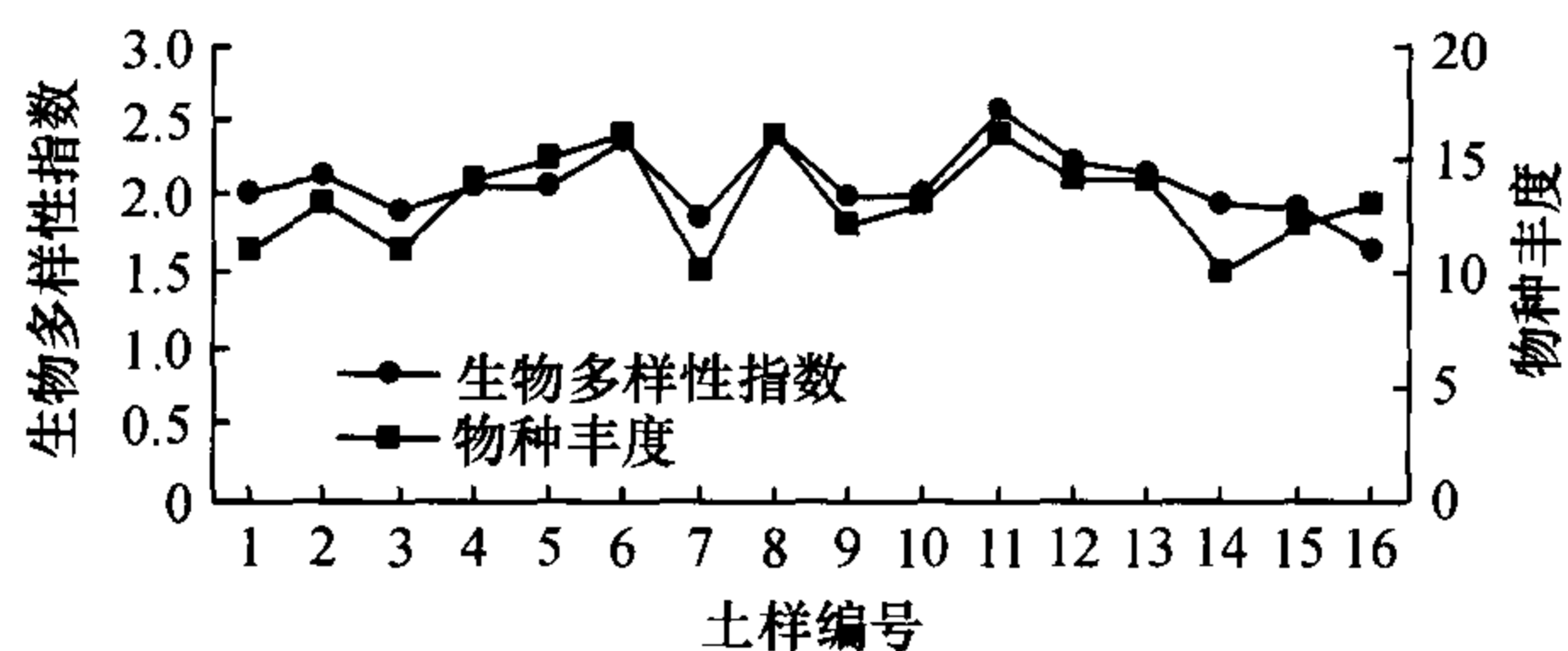


图2 大宝山重金属污染土壤微生物多样性及物种丰度分析
Fig.2 Analysis of microbial diversity and abundance of heavy metal-contaminated soil in Dabaoshan

DGGE 条带聚类分析(图 3)表明,土样 3、4、5 聚在一起,相似性为 45% 以上.土样 8、11、12 聚在一起,相似性为 58%.土样 15、9 聚在一起,相似性达到 86%,土样 10、13 相似性为 87%.结果表明,相同生

境的土壤样品可以聚到一起,复合重金属污染较重的土样基本聚在一起,相似性为 38%,而采集于上坝癌症村的土样也可以聚在一起,相似性为 43%.

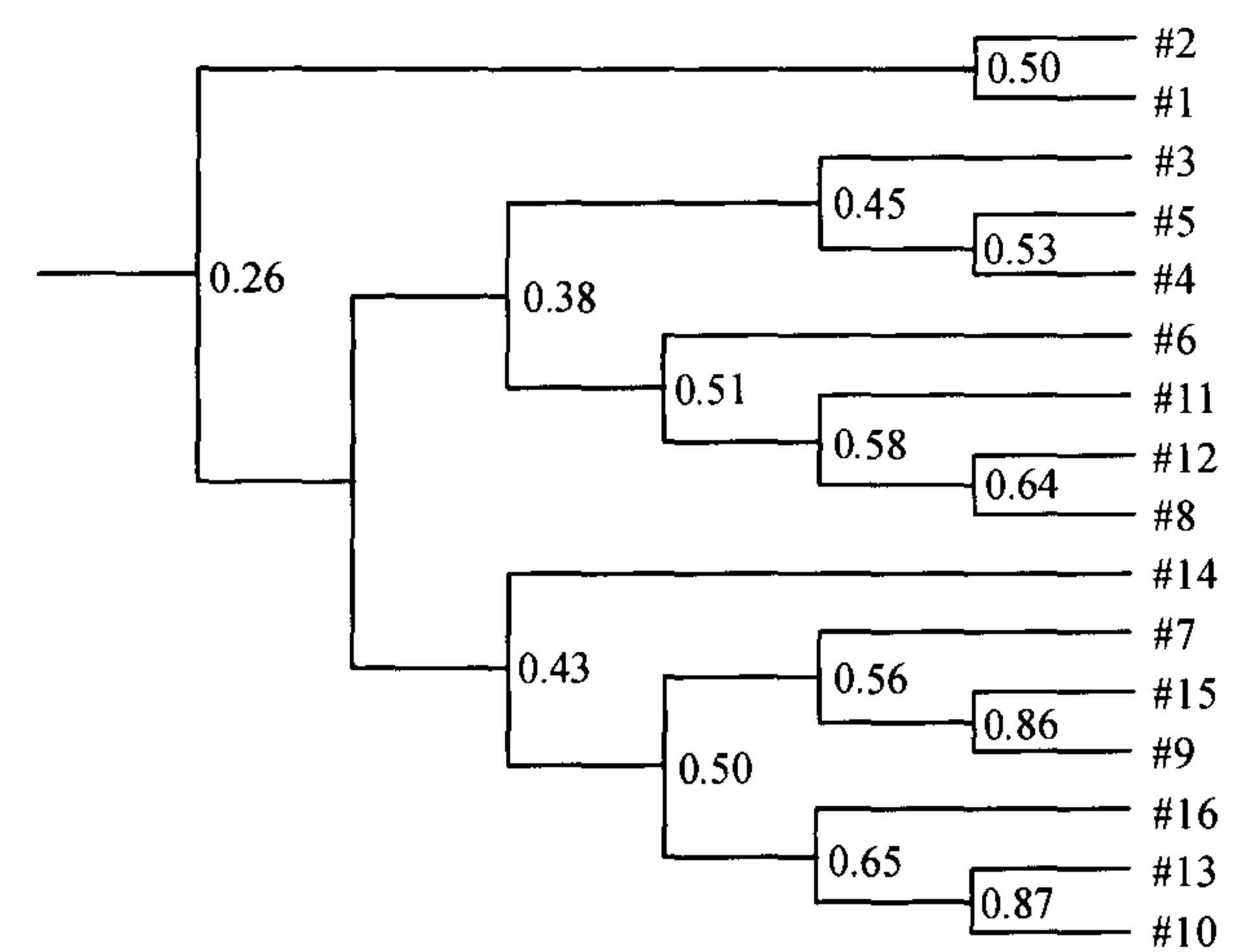


图 3 大宝山重金属污染土壤微生物 DGGE 条带聚类分析
Fig. 3 Dendrogram showed the microbial community of heavy metal-contaminated soil in Dabaoshan by DGGE patterns analysis

2.3 优势种群的分析

对指纹图谱(图 1)中优势条带(共有条带 a、b、c、d、e、f,差异条带 g、h、i)进行了克隆测序.测序结果经 NCBI Blast 比对分析(表 2),其中大部分为未培养细菌的 16S rDNA V3 区片段.主要优势菌群为未培养的 α -变形菌纲 alpha Proteobacterium、劳尔氏菌属 *Ralstonia*、酸杆菌门 Acidobacteria、放线菌属 *Actinobacterium*,以及产卟啉菌属 *Porphyrobacter*、*Pseudochrobactrum*、无色杆菌属 *Achromobacter* 和链霉菌属 *Streptomyces*.

优势种群分析表明,复合重金属污染较重的土壤中,未培养的劳尔氏菌属、*Achromobacter xylosoxidans*、未培养的 α -变形菌纲、*Pseudochrobactrum* 是占优势的种群.未培养的酸杆菌门为 Cu 污染最重的 1 号土样中的特有优势种群;链霉菌属为 Pb 污染最重的 4 号土样中的优势种群;未培养的放线菌属为 14 号土样中的优势种群.

表 2 测序克隆序列与其 GenBank 最相似序列的比对结果
Tab.2 Alignment of sequenced clone to its most-similar GenBank sequence

克隆条带	16S rDNA V3 区 片段长度/bp	近缘菌株		相似度/%
		来源	GenBank 登录号	
a	197	Uncultured <i>Ralstonia</i> sp.	EU794311	100
b	172	<i>Porphyrobacter</i> sp. Bo53 ~ 33	EU839360	100
c	193	Uncultured bacterium clone RH. 204i-50-6	DQ458423	100
d	197	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	EU833933	99
e	172	Uncultured alpha proteobacterium clone g51	EU979060	99
f	172	<i>Pseudochrobactrum</i> sp. KSS 7. 8	FM209496	100
g	173	<i>Streptomyces</i> sp.	FJ025786	100
h	177	Uncultured <i>Actinobacterium</i> clone A_24	EU138987	98
i	192	Uncultured Acidobacteria	AM749754	97

3 讨论

目前,国内对于该矿区的细菌多样性及优势种群的研究鲜见报道,对该地区已有的研究主要是关于土壤中重金属特性以及生态退化的现状,水体重金属污染的评价和相关治理途径的探讨等方面^[10-13]. 本研究结果表明,重金属严重影响了微生物群落结构和多样性,重金属污染的胁迫导致了微生物群落多样性的减少,优势种群数量增多. 重金属污染土壤与未污染土壤相比较,在微生物群落结构、多样性以及物种丰度、优势种群方面都发生了明显改变,其 DGGE 指纹图谱中的总条带数目以及优势条带都有明显差异,微生物多样性也明显减少,出现优

势种群. 这说明重金属污染的胁迫会促使某些在没有污染胁迫的土壤上不占优势的微生物种类成为优势种群,而这些微生物可能具有某些特殊功能,能够耐受重金属胁迫. 这可能是一定程度的重金属污染改变了原有群落内部种群之间的竞争关系,导致原始优势种群失去了优势作用,或者是一部分微生物产生的重金属抗性保护了其他种群的微生物,从而使重金属污染土壤的优势种群发生了明显改变. 长期生活在富含重金属环境中的微生物群体对重金属形成了一定的耐性和抗性,从而成为重金属污染环境中的优势种群^[14]. 因此,污染土壤中的优势种群一般为重金属耐受菌^[15].

此外,本试验也表明,污染土壤的微生物群落多

样性又不简单地随重金属污染程度增大而减少,这与 Smit 等^[16]报道不一致. 6 号土样为 Cd 污染较严重,但是从指纹图谱上可以看出,此样品分离条带较多. 其原因可能是两个方面:一是和土壤的特性有关. 例如土壤 pH 与细菌群体生物量成正相关. 并且, pH 可以影响土壤重金属的生物有效性^[17-18]. 不同的土壤 pH,使土壤生境有较大差异;二是植物的种类多样性影响土壤微生物的多样性和种群结构. 本研究各个采样点的植被不相同,一些植物为重金属超积累植物,如空心莲子草 *Alternanthera philoxeroides* 根、茎、叶中 Zn 的含量可高达 1 699.28、1 108.77 和 753.08 mg/kg;香根草 *Vetiveria zizanioides* 的茎叶对 Cd、Ni、Pb 等存在不同程度的富集性,可以承受非常严重的重金属污染和很强的毒性条件,其承受阈值远远高于其他植物^[19]. 一些陆生蕨类植物能从环境中蓄积大量的重金属. 这些重金属积累植物,改变了微生物的生境,使微生物多样性指数及生物丰度高. 同时,本研究结果也显示:同样的植被,微生物区系和多样性却完全不同,如样品 1~5 号,植被都是蕨类植物,但是土壤微生物的优势种群和多样性却有差异,其原因可能是这些蕨类植物生长年限短,对土壤中微生物种群结构的调节作用还未有显现. 再者,1~6 号是来源于不同地点的土壤样品,土壤样品特性复杂且影响因素多,对微生物种群的影响就更为复杂.

本研究通过对土壤微生物群落的分析及对优势条带克隆测序,发现大宝山重金属污染土壤中的优势菌大多是未培养菌,其主要菌群为未培养的 α -变形菌纲、劳尔氏菌属、酸杆菌门和放线菌属,以及产卟啉菌属、*Pseudochrobactrum*、无色杆菌属和链霉菌属. 这些优势种群的种属信息为下一步从重金属污染土壤中分离筛选耐受重金属胁迫的微生物菌种提供了一定的科学依据. 从而可以更有针对性地设计分离培养基,更快、更准确地筛选到土壤中占优势的耐受重金属污染胁迫的微生物菌种资源,用于重金属污染的修复. Hu Qing 等^[20]通过 PCR-DGGE 对 Pb-Zn 尾矿的微生物群落分析,对主要优势菌群测序,根据测序结果设计特殊的选择性培养基,分离到 2 个耐 Cd 的细菌 *Bacillus cereus* 和 *Enterobacter cloaca*. 但同时对于未培养菌的分离也是一个难点,未培养微生物大多是因为培养方法和培养条件的限制,使得目前还无法培养,设计特殊的培养基、寻找合适的培养条件来培养采用常规方法无法培养的微生物,是未来的发展方向和研究热点.

参考文献:

- [1] WANG Yuan-peng, SHI Ji-yan, WANG Hui, et al. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007, 67: 75-81.
- [2] SHENG Xia-fang, XIA Juan-juan. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria [J]. *Chemosphere*, 2006, 64 (6): 1036-1042.
- [3] ABOU-SHANAB R A I, ANGLE J S, CHANEY R L. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils [J]. *Soil Biol Biochem*, 2006, 38: 2882-2889.
- [4] 国家环境保护局. GB15618-1995 土壤环境质量标准 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 1996: 11-12.
- [5] MUYZER G, WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations using 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.
- [6] YEATES C, GILLING M R. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification [J]. *Biological Procedures Online*, 1998, 1: 40-47.
- [7] DON R H, COX P T, WAINWRIGHT B J. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 4008.
- [8] GILLAN D C, SPEKSNIJDER A G C L, ZWART G, et al. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragment coding for 16S rDNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (9): 3464-3472.
- [9] ANDREONI V, CAVALCA L, RAO M A, et al. Bacteria communities and enzyme activities of PAHs polluted soils [J]. *Chemosphere*, 2004, 57: 401-412.
- [10] 陈炳辉, 韦慧晓, 周永章. 粤北大宝山多金属矿山的生态环境污染原因及治理途径 [J]. *中国矿业*, 2006, 15 (6): 40-42.
- [11] 付善明, 周永章, 曾锋, 等. 广东大宝山铁多金属矿废水对河流沿岸土壤的重金属污染 [J]. *环境科学*, 2007, 28 (4): 805-812.
- [12] 邹晓锦, 仇荣亮, 黄穗虹, 等. 广东大宝山复合污染土壤的改良及植物复垦 [J]. *中国环境科学*, 2008, 28 (9): 775-780.

- [2] OBERLEY T D. Mitochondria, manganese superoxide dismutase, and cancer [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2004, 6 (3): 483-487.
- [3] HUANG Ting-ting, CARLSON E J, RAINERI I, et al. The use of transgenic and mutant mice to study oxygen free radical metabolism [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 893: 95-112.
- [4] CHUANG Tzu-chao, LIU Jah-yao, LIN Chi-tsai, et al. Human manganese superoxide dismutase suppresses HER2/neu-mediated breast cancer malignancy [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581 (23): 4443-4449.
- [5] EPPERLY M W, WEGNER R, KANAI A J, et al. Effects of MnSOD-plasmid liposome gene therapy on antioxidant levels in irradiated murine oral cavity orthotopic tumors [J]. *Radiat Res*, 2007, 167 (3): 289-297.
- [6] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHAFFER A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (17): 3389-3402.
- [7] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIK F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24): 4876-4882.
- [8] BORGSTAHLE G E, PARGE H E, HICKEY M J, et al. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles [J]. *Cell*, 1992, 71 (1): 107-118.
- [9] YAN Shi-qing, BROWN S L, KOLOZSVARY A, et al. Mitigation of radiation-induced skin injury by AAV2-mediated MnSOD gene therapy [J]. *J Gene Med*, 2008, 10 (9): 1012-1018.
- [10] EPPERLY M W, WEGNER R, KANAI A J, et al. Effects of MnSOD-plasmid liposome gene therapy on antioxidant levels in irradiated murine oral cavity orthotopic tumors [J]. *Radiat Res*, 2007, 167 (3): 289-297.
- [11] SFAXI I H, FERRARO D, FASANO E, et al. Inhibitory effects of a manganese superoxide dismutase isolated from garlic (*Allium sativum* L.) on *in vitro* tumoral cell growth [J]. *Biotechnol Prog*, 2009, 25 (1): 257-264.
- [12] CHEN Che-sheng, ZHAO Qing, WANG Jia, et al. Enhanced anti-tumor effects achieved in a murine tumor model using combination therapy of recombinant human manganese superoxide dismutase and adriamycin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370 (4): 663-668.
- [13] 张婷婷, 叶波平. 包涵体蛋白质的复性研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2007, 14 (4): 306-309.
- [14] 王义华, 徐梅珍, 党云琨, 等. 拟南芥 MnSOD 的原核表达、纯化及抗体制备 [J]. *生物技术通讯*, 2004, 15 (2): 13-15.

【责任编辑 柴焰】

(上接第60页)

- [13] 龙良鲲, 姚青, 黄永恒, 等. 粤北大宝山重金属污染土壤中 AM 真菌的研究 [J]. *华南农业大学学报*, 2009, 30 (2): 117-120.
- [14] PRASENJIT B, SUMATHI S. Uptake of chromium by *Aspergillus foetidus* [J]. *Material Cycles and Waste Management*, 2005, 7 (2): 88-92.
- [15] 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. *环境科学学报*, 2005, 25 (2): 186-191.
- [16] SMIT E, LEEFLANG P, WERNARS K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 23 (3): 249-261.
- [17] 陈素华, 孙铁珩, 周启星, 等. 微生物与重金属的相互作用及其应用研究 [J]. *应用生态学报*, 2002, 13 (2): 239-242.
- [18] ERIKSSON J E. The influence of pH soil type and time on adsorption and uptake by plants of cadmium added to the soil [J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 1989, 48: 317-335.
- [19] 韩露, 张小平, 刘必融, 等. 香根草对土壤中几种重金属离子富集能力的比较研究 [J]. *生物学杂志*, 2005, 5: 20-23.
- [20] HU Qing, DOU Min-na, QI Hong-yan, et al. Detection, isolation, and identification of cadmium-resistant bacteria based on PCR-DGGE [J]. *Environmental Sciences*, 2007, 19: 1114-1119.

【责任编辑 李晓卉】