

重金属污染环境中的节杆菌群体遗传结构分化

张汉波¹, 任维敏¹, 邵启雍¹, 段昌群²

(1. 云南大学生物系, 昆明 650091; 2. 云南大学环境科学系, 昆明 650091)

摘要:从堆积时间分别有 10、20a 和 80a 以上的 3 个矿渣堆 5~10cm 层面、25~30cm 层面采集了 6 个样品, 经测试分析发现它们有极高的 Pb、Zn 和 Cd 等重金属含量。在这些样品中分离纯化出 48 株细菌, 经过分析它们的部分 16S rRNA 基因序列(分析片段长度在 474bp~708bp 之间变化), 发现这些菌株属于节杆菌属的成员, 同 *Arthrobacter keyseri* 和 *A. ureafaciens* 两个种的系统发育地位最为接近, 大约 600bp 碱基片段的序列同源性在 99.1%~100%。接下来利用 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)技术探讨了该种群在遗传结构上的分化。结果表明来自矿渣 A(堆积时间为 10a)和矿渣堆 C(堆积时间大于 80a)的亚群之间遗传分化最大。此外, 不论是来自同一个矿渣堆 5~10cm 层面和 25~30cm 层面之间的亚群还是来自不同矿渣堆相同深度的亚群, 它们之间的遗传距离都随矿渣堆积时间延长而增加。有趣的是各亚群的 Nei 基因多样性减少同矿渣可溶性 Pb 含量呈现明显负相关, 表明可溶性 Pb 可能是导致该节杆菌类群遗传多样性减少的主导环境因子。

关键词:铅锌矿渣; 节杆菌; 系统发育; RAPD; 遗传结构

文章编号: 1000-0933(2005)10-2569-05 中图分类号: Q143, Q938, X172 文献标识码: A

Genetic differentiation of *Arthrobacter* population from heavy metal-contaminated environments

ZHANG Han-Bo¹, REN Wei-Min¹, SHAO Qi-Yong¹, DUAN Chang-Qun² (1. Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. Department of Environmental Science, Yunnan University, Kunming 650091, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(10): 2569~2573.

Abstract: Six samples contained extremely high concentration of Pb, Zn and Cd were obtained from the layers of 5~10cm and 25~30cm of three tailing piles, with age of about 10, 20 and more than 80 years, respectively. Then forty-eight bacterial strains were obtained from these samples, and subsequently their phylogenetic positions were determined by analysis of the partial sequence of 16S rRNA gene (fragment length ranged from 474 to 708bp). These isolates were members of *Arthrobacter* genus, phylogenetically close to *A. keyseri* and *A. ureafaciens*, with sequence similarity ranged from 99.1 to 100%. Furthermore, genetic variation between subpopulations from different samples was revealed by analysis of their RAPD profiles. Nei genetic distance showed that the greatest differentiation occurred between subpopulation A and C. Notably, either genetic distance between subpopulations from the layer of 5~10cm and 25~30cm of each tailing pile or between same layers of different tailing pile was increased with the history of tailings. Moreover, correlation analysis showed that soluble Pb was significantly negative relationship with Nei' gene diversity of subpopulation. It was assumed that soluble Pb may be responsible for the reduced genetic diversity of *Arthrobacter* population. Our data provided evidence that genetic differentiation of microbial populations was consistent with the changes of environmental factors, particularly heavy metals.

Key words: Lead-zinc mine tailings; *Arthrobacter*; phylogenetic analysis; RAPD; genetic structure

近年来,人们越来越重视长期的化学污染物对自然生物群体的遗传多样性影响^[1]。在众多化学污染物中,重金属较难被生

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(No. 2002C0001Q); 云南省教育厅自然科学基金重点资助项目(No. 02ZD013)

收稿日期: 2004-08-03; 修订日期: 2005-02-15

作者简介: 张汉波(1970~), 男, 云南人, 博士, 副教授, 主要从事微生物生态学和遗传学的研究。E-mail: zhbdm@yahoo.com.cn.

Foundation item: Project Granted by Yunnan Province Natural Science Foundation(No. 2002C0001Q); Project Granted by Key Program of Yunnan Province Education Administration Fund(No. 02ZD013)

Received date: 2004-08-03; **Accepted date:** 2005-02-15

Biography: ZHANG Han-Bo, Ph. D., Associate professor, mainly engage in microbial ecology and genetics. E-mail: zhbdm@yahoo.com.cn

物降解,一旦排放,将在环境中留存并长期作用于生物群体。因此研究重金属对生物群体的毒害作用应重点考察后者在遗传结构上的变化。目前有研究者利用等位酶技术调查了重金属污染区植物群体的遗传结构变化^[2~3],但对土壤微生物的毒性效应,多数工作仍集中在研究重金属对微生物群体的生物量、代谢功能变化,以及群落结构变化等方面^[4~12],没有关于这些受胁迫群体的遗传多样性变化的研究,主要原因可能是由于微生物分离鉴定有一定困难。

在前期报道中曾描述了云南会泽县境内 3 个堆积时间大约在 10a、20a 和 80a 以上的铅锌矿渣的化学性质以及其中的细菌数量^[13~15]。尽管矿渣中可溶性 Pb 含量有的高达 300mg/kg,但生活的可培养化能异养细菌(chemoorganotrophs, COT)数量仍达到近 1×10^6 个/g 矿渣。在这些可培养细菌中,有一种奶油色不扩散类型的菌落(creamy and nondiffusionable, CND)占的比例平均达到约 55%,有的样品接近 90%,占了绝对优势。它们可能属于系统发育地位很近的种类,具有某些特殊生理特性而比较适应矿渣这种特殊环境。因此,有必要对它们的系统发育地位进行确定,以便今后探讨这些特殊种类对极端重金属污染环境的适应机理。此外,由于 3 个矿渣堆的堆积时间不同,重金属的含量也有差异^[13],推测这些细菌群体为了适应不同的污染强度,应当在遗传结构上发生分化。本文测定了这些菌株的 16S rRNA 基因部分序列来确定它们的系统发育地位,并结合 RAPD 技术探讨了属于同一个系统发育类群的细菌群体在遗传结构上的分化同环境分异之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验样地

在堆积时间大约有 10、20a 和 80a 以上的 3 个矿渣堆 A、B 和 C 的 5~10cm、25~30cm 层面共采集了 6 个样品,分别命名为 A1、A2、B1、B2、C1 和 C2。样地的详细信息、样品的采集方法和理化分析指标见参考文献^[13,14]。

1.2 菌株系统发育研究

实验菌株用常规平板稀释涂布法分离自上述 6 个样品,保存在改良的 TY 固体斜面培养基上^[15]。

1.2.1 细菌的 16S rRNA 基因扩增和序列测定 斜面保藏菌种经 TY 平板划线获得单菌落,然后在液体 TY 培养基中 30℃ 摇瓶 16~18 h。取 1ml 菌液用 WATSON 小量细菌基因组提取试剂盒(Bacteria Genomic DNA Isolation Mini Kit)提取基因组 DNA。1500bp 的 16S rRNA 基因片段用两个引物(前引物为:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';后引物为:5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3')来扩增^[16]。扩增体系为 50 μ l,含有:1 μ l DNA 模板(大约 20 到 100ng);5 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲溶液(100mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 500mmol/L KCl; 15mmol/L MgCl₂), 4 μ l dNTP 混合物(每个 dNTP 浓度为 2.5mmol/L)(TaKaRa), 1.25U Taq 酶(TaKaRa), 两个引物各 1 μ l(终浓度为 0.4 μ mol/L),去离子水补足体积。PCR 扩增仪器为 GeneAmp PCR system,扩增程序为:95℃ 4min;94℃ 1min,60℃ 1min,72℃ 1min,共 32 个循环;72℃ 10min,4℃ ∞ 。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,然后用手术刀切出 1500bp 大小的片段,用 WATSON 胶回收试剂盒(Gel Extraction Mini Kit)回收并纯化目的片段。

纯化的目的片段用 ABI PRISM 377-96 sequencer 进行序列测序,BigDye(Perkin-Elmer)作为终止剂,测序引物为:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'。测序反应体系:纯化后的扩增产物约 1 μ l (约 30ng),BigDye 2.5 μ l,引物 1 μ l (约 3.2pmol/L),用水补足 10 μ l。扩增程序为:95℃ 1min,56℃ 1min,72℃ 1min,35 循环;72℃,5min,4℃ 保存。

1.2.2 系统发育树构建 测得的 DNA 序列经 NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST 引擎搜索后,用 CLUSTAL X (ver. 1.8) 软件将这些序列与若干个近缘种以及其他几个系统发育相关种的 16S rRNA 基因序列进行排列。在系统发育分析时排除碱基缺失位点,用邻接法(Neighbor-joining analysis)构建系统发育树。距离矩阵按照 Kimura's 双参数模型进行计算^[17],Bootstrap 检验进行 1000 次取样。

1.3 RAPD 分析

提取的 DNA 用 10bp 随机引物来扩增。20 μ l 反应体系含 0.5 μ l 基因组 DNA, 2 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲溶液(100mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 500mmol/L KCl; 15mM MgCl₂), 1 μ l dNTP 混合物(每个 dNTP 浓度为 2.5mmol/L)(TaKaRa), 0.2U Taq 酶(TaKaRa), 2 μ l 引物(终浓度为 0.4 μ mol/L), 去离子水补足体积。使用 GeneAmp PCR system 扩增,程序为:94℃ 4min, 35℃ 2min,72℃ 2min,两个循环;94℃ 30s, 35℃ 1min, 72℃ 2min,35 循环;72℃ 5min。电泳后,用 SynGene 分析凝胶电泳图,DNA 带匹配耐受度为 2%。弱带排除分析,主要带型存在记为“1”,不存在记为“0”,5 个引物的扩增结果组合后,得到一个二元数据矩阵,然后用 Popgene 软件(ver. 1.32)分析和计算 Nei 遗传距离和基因多样性^[18]。

1.4 统计分析

统计分析采用 SPSS 软件(SPSS Inc. USA, Release 10.0, 1999)。 $p < 0.05$ 为统计显著差异概率。

2 结果

2.1 菌株的系统发育地位分析

为了表明在 6 个样品中生活的细菌群体在遗传结构上的变化,需要筛选在系统发育地位上相同的细菌群体。在调查这些样

品中的可培养细菌数量时,发现在TY平板上高频率出现一类奶油色不扩散菌落(CND),推测它们可能是系统发育关系相似(可能是一个种)的细菌。本实验随机挑选了60个菌落,通过分析16S rRNA基因的部分序列来确定它们的系统发育地位。结果表明这些菌落都是节杆菌属(*Arthrobacter*),但包含了3个系统发育地位有明显差异的群体(未显示数据)。

其中一个类群包含的菌株数达到了48株,测定的16S rRNA基因序列长度和Genbank登记号见表1,构建的系统发育树见图1。分析这些数据表明48个菌株之间序列的类似性较大,达到99.1%~100%,同*A. keyseri*和*A. ureafaciens*两个种的系统发育地位最接近。加上这些个体在细胞形态、以及对49个碳源的利用特征等方面具有较大相似性,它们应当属于一个种。由于这些菌株在6个样品中都有分布,因此可以进一步研究它们的遗传结构差异。

表1测定的48个矿渣节杆菌菌株的16S rRNA基因序列长度和GenBank登记号

Table 1 GenBank accession numbers and length of 16S rRNA gene sequence of 48 *Arthrobacter* strains

菌株号	获取号	长度	菌株号	获取号	长度	菌株号	获取号	长度	菌株号	获取号	长度
Strains	Accession No.	Length(bp)	Strains	Accession No.	Length(bp)	Strains	Accession No.	Length(bp)	Strains	Accession No.	Length(bp)
AS11	AY371216	553	AL16	AY371207	483	BS15	AY371238	567	BL19	AY371233	474
AS12	AY371217	548	AL17	AY371208	553	BS16	AY371239	478	CS11	AY371253	587
AS13	AY371218	632	AL18	AY371209	534	BS17	AY371240	505	CS12	AY371254	587
AS14	AY371219	492	AL19	AY371210	483	BS18	AY371241	536	CS13	AY371255	535
AS15	AY371220	540	AL20	AY371211	534	BL11	AY371225	531	CS14	AY371256	600
AS16	AY371221	676	AL21	AY371212	599	BL12	AY371226	553	CS15	AY371257	553
AS17	AY371222	543	AL22	AY371213	536	BL13	AY371227	553	CS16	AY371258	615
AL11	AY371202	587	AL23	AY371214	524	BL14	AY371228	529	CL11	AY371246	586
AL12	AY371203	553	BS11	AY371234	483	BL15	AY371229	495	CL12	AY371247	535
AL13	AY371204	538	BS12	AY371235	493	BL16	AY371230	553	CL13	AY371248	520
AL14	AY371205	542	BS13	AY371236	562	BL17	AY371231	582	CL14	AY371249	553
AL15	AY371206	600	BS14	AY371237	561	BL18	AY371232	563	CL15	AY371250	552

2.2 遗传多样性研究

首先选取100个10碱基随机引物对5个节杆菌菌株进行扩增,结果发现有19个能成功扩增出PCR产物。在这19个引物中选取带型较好,扩增结果稳定的5个引物(5'-CAG CGA CAA G-3', 5'-GTG ACA GGC T-3', 5'-AAT CGG GCT G-3', 5'-GAA ACG GGT G-3', 和 5'-GTG ATC GCA G-3'),对48个菌株进行扩增,最后有44个菌株的电泳结果较好,5个引物扩增后平均每个菌株产生约11条带。仅从这个数量看,3个群体的菌株并没有显著差异(表2)。

对44个菌株的带型进行综合分析后,可以确定的基因位点数有40个,其中有39个是多态位点。用40×44(位点数×菌株数)的数据矩阵来计算该节杆菌群体的遗传多样性为0.35,10a和20a矿渣群体之间的Nei遗传距离为0.043,10a和80a矿渣群体之间为0.058,20a和80a之间的距离为0.034,差异最大的群体在10a和80a矿渣群体之间。

不同层面的群体之间的遗传距离见表3。从这6个亚群的遗传距离可以看到一个有趣的现象,即从矿渣堆A到C,同一矿渣堆上下两个层面之间,以及不同矿渣相同层面的节杆菌群体之间的遗传距离都是逐渐增加的。比如,在矿渣堆A中,上下两个层面群体之间的遗传距离是0.063,在矿渣堆B中是0.072,而在矿渣堆C中,距离达到了0.085。在不同矿渣堆之间,A1与B1的遗传距离是0.089,而A1与C1之间达到了0.121。同样地,A2与B2之间为0.050,而A2与C2之间为0.098。

2.3 相关性分析

是什么原因导致了节杆菌群体之间的遗传分化呢?将矿渣的Pb、Zn、Cd总量和有效态含量,以及pH、有机质8个理化指标同上述6个亚群体的Nei基因多样性指数进行相关分析,结果发现矿渣的可溶性Pb含量同亚群体的Nei基因多样性指数具有显著的负相关(图2)。因此,在众多的理化因子中,可溶性Pb可能是导致节杆菌群体遗传多样性减少的主导环境因子。

3 讨论

自然环境中的氧气、水分、营养条件等生态因子在宏观、中观和微观等层次影响微生物的生长^[19]。由于不同的地理环境在这些生态因子配置上具有较大差异,因此倾向生活着在生理和遗传特性等方面极其不同的同种微生物群体。但目前关于具体的

表23个类群的菌株5个随机引物扩增后平均产生的RAPD条带数量

Table 2 The number of RAPD bands produced by amplification of 5 primers

种群 Populations	A(n=20)	B(n=16)	C(n=8)
平均条带数 Number of bands±SE	12.35±0.57	11.88±0.66	10.88±1.16
卡方检验 χ^2 test	$\chi^2=1.778, p=0.411$		

n为菌株数量 Represents the number of strains detected

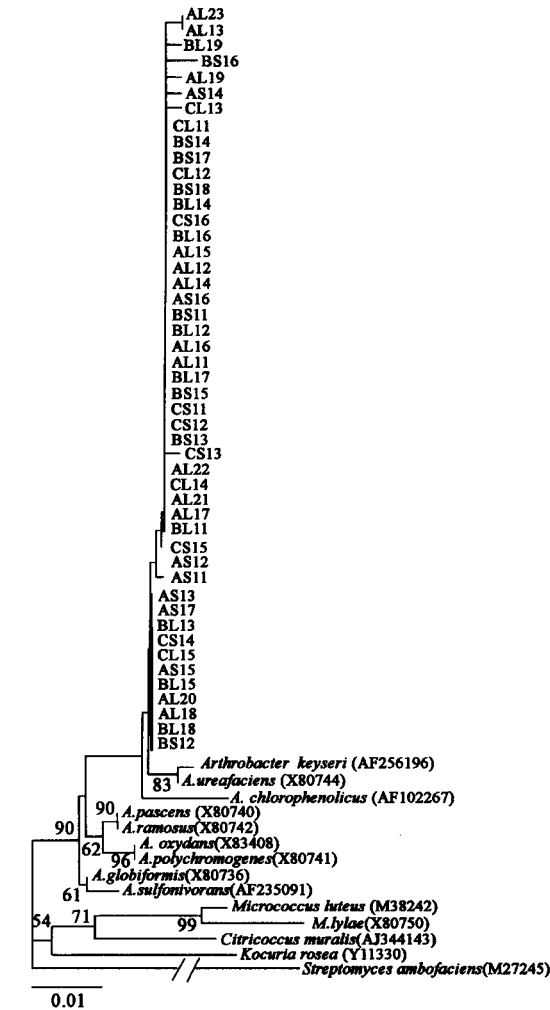


图1 来自矿渣堆 48 个节杆菌菌株和其近缘种的 16SrRNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed from the 16S rDNA sequences of 48 strains isolated from tailings and its closest relatives

Streptomyces ambofaciens 作为外群, 节上数字表示 1000 次 Bootstrapping 测试出现的次数, 仅显示 >50% 的值; 括号中表示各参考菌株的 GenBank 登记号; 48 个矿渣菌株的 GenBank 登记号见表 1

Streptomyces ambofaciens was used as an outgroup; The numbers at the nodes indicate the percentages of occurrence in 1000 bootstrapped tree; only values that are 50% or greater are shown; For each previously described strain, the GenBank accession number is indicated in parentheses and for 48 tailing strains, are described in table 1

本研究利用 RAPD 技术, 对分布在几个矿渣样品中的一个系统发育关系极其密切的节杆菌群体(图 1)的遗传结构进行了分析。结果显示, 同一个矿渣堆 5~10cm 层面和 25~30cm 层面之间, 以及在不同矿渣堆相同层面的节杆菌群体之间的遗传距离都随堆积时间延长而增加(表 3), 表明了节杆菌群体的遗传分化同矿渣堆积时间有某种密切的联系。由于堆积时间不同的矿渣堆上定植的草本植物有差异(未显示数据), 加上雨水长期自上而下的淋溶作用, 3 个矿渣堆之间, 以及同一矿渣堆不同层面的理化性质都发生了分异, 且这种异质性确实随堆积年代逐渐增加^[14], 因此该实验结果反映了细菌群体的遗传分化特征同环境因子配置变化的一致性。特别地, 此节杆菌群体的基因多样性降低同矿渣的可溶性 Pb 显著负相关(图 2), 表明可溶性 Pb 是导致节杆菌群体遗传多样性减少的主导环境因子。

某个微生物种群对这些生态因子的适应效应, 即种群遗传结构的分化仅局限在对少数病原微生物种群的研究^[20~23], 仍然没有关于化学污染物对微生物遗传结构影响的研究报道。主要限制因素是分离和鉴定微生物往往需要花费大量的时间和精力, 不像以动物和植物作为研究对象那样较为容易得到足够量的样本。本实验选取的几个铅锌矿渣堆有极高含量的 Zn、Pb 和 Cd 等重金属^[13], 极强的选择压力选择了绝对优势的细菌群体, 可培养的种类相对较少, 减少了获得同种类群样本的难度, 使得这些矿渣比较适合作为探讨环境分化对微生物遗传结构影响的理想样点。

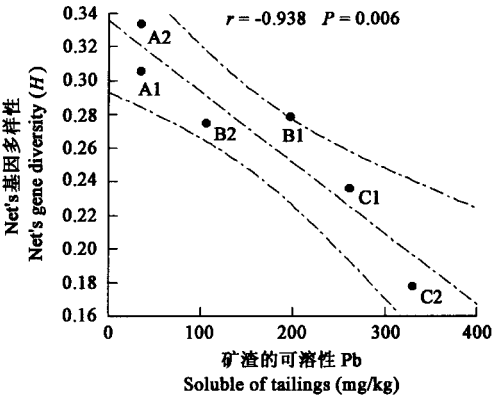


图2 矿渣可溶性 Pb 和 6 个节杆菌亚群体的 Nei's 基因多样性之间的相关分析

Fig. 2 Correlation between Nei's gene diversity of *Arthrobacter* subpopulation and soluble Pb of tailings

虚线表示 95% 的置信区间 Dash lines represent 95% of confidence internal for means

表 3 节杆菌亚群之间的 Nei 遗传距离

Table 3 Nei distance of geographically distinct subpopulations of *Arthrobacter*

亚群	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Subpopulation (n=7)	(n=13)	(n=8)	(n=8)	(n=5)	(n=3)	
A1						
A2	0.063					
B1	0.089	0.075				
B2	0.119	0.050	0.072			
C1	0.121	0.078	0.056	0.067		
C2	0.091	0.098	0.068	0.114	0.085	

方框中的数字强调了两个层面的细菌群体之间的遗传距离 Data in box emphasize the difference between the layers of 5~10cm below surface and 25~30cm below surface in each tailing pile

由于野外影响生物适应进化的因素较复杂,加上这些节杆菌群体的初始遗传背景并不清楚,它们在矿渣中适应的时间长短也无法考证,增加了准确判断这些细菌群体遗传分化同理化性质变化之间的对应关系的难度。但本文利用矿渣这一特殊环境,首次在种群水平上探讨了污染物对微生物群体遗传多样性的影响,将有助于促使更多的研究者涉足于这一领域开展工作。

References:

- [1] Bickham J W, Sandhu S, Hebert P D N, *et al.* Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Res.*, 2000, **463**:33~51.
- [2] Bergmann F, Hosius B. Effects of heavy-metal polluted soils on the genetic structure of Norway spruce seedling populations. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1996, **89**:363~373.
- [3] Duan C, Tao G, Xu X, *et al.* Ecological genetical responses of plants to environmental pollution and relevant molecular ecological mechanism. In: Zu Y, Sun M, Kang L, eds. *The molecular mechanism of ecological adaptation and evolution*. Beijing: Higher Education Press and Springer-Verlag, 2000, 171~192.
- [4] Roane T M, Kellogg S T. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can. J. Microbiol.*, 1996, **42**: 593~603.
- [5] Barajas M, Grace A C, Ansorena J, *et al.* Soil microbial biomass and organic C in a gradient of zinc concentrations in soils around a mine spoil tip. *Soil Biol. Biochem.*, 1999, **31**: 867~876.
- [6] Giller K E, Witter E, McGrath S P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, **30**: 1389~1414.
- [7] Insam H, Hutchinson T C, Reber H H. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. *Soil Biol. Biochem.*, 1996, **28**: 691~694.
- [8] Kandeler E, Kampichler C, Horak O. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biol. Fert. Soils*, 1996, **23**: 299~306.
- [9] Kuperman R G, Carreiro M M. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, **29**: 179~190.
- [10] Fritze H, Pietikäinen J, Pennanen T. Distribution of microbial biomass and phospholipids fatty acids in Podzol profiles under coniferous forest. *Euro. J. Soil Sci.*, 2000, **51**: 565~573.
- [11] Knight B P, McGrath S P, Chaudri A M. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper, or Zn. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**: 39~43.
- [12] Pennanen T, Frostegård Å, Fritze H, *et al.* Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 420~428.
- [13] Zhang H, Duan C, Hu B, *et al.* Dynamic of heavy metals in a Lead-zinc tailings deposited in different years. *J. Agro-Environ. Sci.*, 2003, **22**(1):67~69.
- [14] Zhang H, Shi W, Yu C, *et al.* Resistant features of heavy metals and antibiotics of the bacteria from mine tailings with different deposited history. *J. Agro-Environ. Sci.*, 2004, **23**:348~351.
- [15] Zhang H, Yu C, Shi W, *et al.* Spatial and temporal changes in colonization of heavy metal-tolerant bacteria in the lead-zinc tailings with different deposited history. *Rural Eco-Environment*, 2004, **20**(1):44~47.
- [16] Edwards U, Rogall T, Blöcker H, *et al.* Isolation and direct sequencing of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.*, 1989, **17**: 7843~7853.
- [17] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 1980, **16**: 111~120.
- [18] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, **89**: 583~590.
- [19] Holden P A, Firestone M K. Soil microorganisms in soil cleanup: How can we improve our understanding? *J. Environ. Qual.*, 1997, **26**: 32~40.
- [20] Eldar A, Gorla M, Ghittino C, *et al.* Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**:1005~1008.
- [21] Gray N D, Howarth R, Rowan A, *et al.* Natural communities of *Achromatium oxaliferum* comprise genetically, morphologically, and ecologically distinct subpopulations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**:5089~5099.
- [22] Grayson T H, Atienzar F A, Alexander S M, *et al.* Molecular diversity of *Renibacterium salmoninarum* isolates determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**:435~438.
- [23] Souza V, Rocha M, Valera A, *et al.* Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**: 3373~3385.

参考文献:

- [3] 段昌群,郭涛,徐晓勇,等. 植物对污染环境的生态遗传学响应及分子生态机制. 见:祖元刚,孙梅,康乐编. 生态适应与生态进化的分子机理. 北京:高等教育出版社,2000. 171~192.
- [13] 张汉波,段昌群,胡斌,等. 不同年代废弃的铅锌矿渣堆中重金属的动态变化. 农业环境科学学报,2003,**22**(1):67~69.
- [14] 张汉波,施雯,于春蓓,等. 不同年代铅锌矿渣中细菌的重金属和抗生素抗性特征. 农业环境科学学报, 2004,**23**:348~351.
- [15] 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. 农村生态环境,2004,**20**:44~47.