

长三角地区有机农药污染地下水的微生物群落分析

吴海燕¹, 徐红霞¹, 洪宜斌², 马宏瑞³, 邱宇平⁴, 张景飞¹, 吴吉春¹

(1.南京大学水科学系,污染控制与资源化研究国家重点实验室,江苏 南京 210093; 2.中国石化管道储运公司,江苏 南京 211100; 3.陕西科技大学资源与环境学院,陕西 西安 710021; 4.浙江工业大学生物与环境学院,浙江 杭州 310032)

摘 要:选择长江三角洲地区一处长期受到有机农药污染的浅层含水层,采集水样,采用不依赖于培养的 16S rDNA 序列分析方法,对该污染地下水中的微生物群落特征进行了分析和鉴定。结果表明,这种分析方法完全可行,该有机污染含水层具有较好的生物多样性,且可能有一种未经鉴定的新菌种。

关键词:有机污染;地下水;微生物多样性;16S rDNA

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)09-1898-05

Analysis for the Microbial Communities of an Aquifer in Yangtze River Delta Polluted Long-term by Organic Compounds

WU Hai-yan¹, XU Hong-xia¹, HONG Yi-bin², MA Hong-rui³, QIU Yu-ping⁴, ZHANG Jing-fei¹, WU Ji-chun¹

(1.Department of Hydrosience, State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2.SINOPEC Pipeline Storage and Transportation Company, Nanjing 211100, China; 3.College of Resource & Environment, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China; 4.College of Biology & Environment, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

Abstract: A shallow aquifer, located in Yangtze River Delta and polluted by organic substances for long time, was chosed to study the microbial diversity and the relations of genus and species, adopting the 16S rDNA sequencing method, a microbial molecular ecology technique that analyzed microbial community and without any cultivation. Experimental results showed, the 16S rDNA sequencing method was well successful. The shallow aquifer suffering from long-time organic contamination had a good microbial diversity, while the bacterium belonging to an unknown genus was probably discovered. The present study builds a practical method for the identification of microbial diversity in the polluted groundwater and provides scientific basis, to some extent, for the further studies on the biological remediation technology of groundwater polluted by organic compounds.

Keywords: organic contamination; groundwater; microbial diversity;16S rDNA

近年来,随着工农业生产的发展及人口增长,工业“三废”、城市生活污水、垃圾排放等通过明渠、下水道、渗坑、农港和岩溶落水等多种途径直接或间接进入含水层,致使部分地下水源和地表水遭受污染^[1]。另

外,大气降水及溜洒都会使地面污染物质淋洗带人地下水中^[2]。

目前,地下水中已发现有机污染物 180 多种,其中包括芳香烃类、卤代烃类、农药类等,且数量和种类仍在迅速增加,甚至还发现了一些没有注册使用的农药。地下水污染研究已从无机污染转向有机污染,微量有机污染上升为地下水环境保护领域的首要问题^[3]。

从国内外研究情况看,地下水有机污染主要分为卤代烃污染、单环芳烃污染、有机农药污染、多环芳烃污染等几类。其中卤代烃作为重要的化工原料和有机溶剂,成为地下水中最普遍的有机污染物,威胁最大;

收稿日期:2008-11-14

基金项目:国家自然科学基金青年基金(40502024);国家杰出青年基金(40725010);污染控制与资源化研究国家重点实验室开放基金(PCR200406);浙江工业大学环境工程“重中之重”学科开放基金(20080206)

作者简介:吴海燕(1983—),女,江苏盐城人,硕士,主要从事有机污染土壤和地下水微生物修复研究。

通讯作者:张景飞 E-mail:jfz@nju.edu.cn

单环芳烃主要来源于燃料油,由燃料油储存、加工、运输过程中的跑、冒、滴、漏而对地下水造成的污染威胁也很大;随着农业的发展,农药使用量增加,对地下水的污染也日见普遍;多环芳烃由于其中一些组分已被证实具有致癌作用,也引起了人们的广泛关注^[4]。

传统的微生物生态学研究可以分析确定微生物的量、群体结构和活性,在保护和改善生态环境,提高废水生物处理效率方面有着一定的科学价值,但它主要基于微生物的直接培养,从而分析环境微生物的种群结构及其生态关系。然而,地下水中存在着大量不可培养的微生物(unculturable microorganisms, UCM),通过传统分离方法鉴定的微生物只占0.1%~10%。应用现代分子生物学方法,则可以最大限度地获取相关微生物(包括 UCM)的遗传信息,全面地分析样品的微生物多样性,并最终明确微生物功能基因在地下水环境中的表达调控。

本研究采用分子生物学手段、非培养的方法,在国内率先研究了长期受有机农药污染地下水中的微生物群落状况,通过对细菌 16S rDNA 序列的分析确定污染地下水中微生物的种类及其种属间关系,为后续修复研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

在长江三角洲地区寻得一处长期受到有机农药污染的浅层含水层,采集 1 L 水样。

1.2 实验方法

1.2.1 菌细胞提取

将水样在 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下离心 15 min; 弃去上清液,用 6 mL STE 洗涤沉淀 1 次,把此菌液分装至 6 个 1.5 mL 离心管中, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min; 弃去上清液,用 200 μL 蒸馏水重悬沉淀,将 6 管溶液合并到一管中, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min; 弃去上清液,用 500 μL 蒸馏水重悬沉淀,把装此溶液的离心管放在沸水中 10 min, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min; 小心把上清液转移至另一干净的离心管中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增

将样品细菌进行 16S rDNA 全长扩增,采用细菌通用引物(工作液浓度为 $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$):

8f(5' AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3')

1492r(5' GGTACCTTGTTACGACTT 3')

PCR 扩增体系为 21 μL : 取 3 μL 煮沸的 DNA 模板, $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物各 2 μL , 10 $\times$ buffer 2 μL , 1.2 μL Mg^{2+}

($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1.6 μL $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTP, 0.2 μL ($5\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$) Taq Polymerase, 加双蒸水 9 μL 。同时以水为模板, 设置空白对照。PCR 条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s) $\times 35$ cycles, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。

扩增完毕, 配制 1.0% 的琼脂糖凝胶, 取 4 μL PCR 产物检测扩增效果。通过凝胶电泳判断扩增片段的大小可以达到检测目的^[8]。

1.2.3 PCR 产物克隆

将 PCR 产物进行克隆, 发现采用酶切的方式不能将 PCR 产物克隆进载体, 故采用 T-A 克隆的方法。T 载体购自 TaKaRa 公司的 pMD18-T Simple Vector。

1.2.3.1 PCR 产物连接到 T 载体

用于 T-A 克隆的 PCR 产物不要超过 1 周($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), 否则 3' 末端的 A 可能丢失。连接前采用凝胶回收的方法将 PCR 产物纯化, 然后测定 PCR 产物的浓度, 本实验中 PCR 产物浓度为 $59\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ($=0.059\text{ pmol}$)。

在 200 μL 离心管中配制下列 DNA 溶液, 全量为 5 μL 。

pMD18-T Simple Vector 1 μL

PCR 产物 4 μL

加入等量的 Ligation Mix (5 μL)

同时做一个对照反应:

pMD18-T Simple Vector 1 μL

Control Insert DNA 1 μL

ddH₂O 3 μL

加入等量的 Ligation Mix (5 μL) 于 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 3 h。

1.2.3.2 大肠杆菌感受态的制备与转化步骤

(1) 感受态制备

在试管中加入 3 mL LB 培养基, 然后接入 30 μL DH5- α 保种菌液; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡过夜培养; 第 2 d 将 3 mL 菌液分装到两个 1.5 mL 离心管中, 冰上放置 10 min, 然后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $3\,600\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min; 弃去上清液, 用预冷的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 溶液 800 μL 轻轻悬浮细胞, 冰上放置 30 min 后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $3\,600\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min; 弃去上清液, 倒置 1 min 除去管内液体, 加入 100 μL 预冷的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 溶液, 轻轻悬浮细胞, 冰上放置 2 h, 即成感受态细胞悬液。

(2) 转化

将 10 μL 连接产物加入 100 μL 上述制备的感受态细胞中, 轻轻摇匀, 在冰上放置 30 min; 将管放入 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中热激 90 s, 不要摇动管, 热激后迅速置于冰上冷却 2~3 min; 向管中加入 700 μL LB 液体培养

基(不含 Amp^r),混匀后 37°C 振荡培养 1 h,使细菌恢复正常生长状态,并表达质粒编码的抗生素抗性标记基因(Amp^r); 4°C $3\,600\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃去部分上清液,留 $200\,\mu\text{L}$ LB 液体培养基,轻轻混匀;将上述菌液摇匀后涂布于含 X-Gal、IPTG 和 Amp^r 的 LB 平板上,正面向上放置 30 min,待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿, 37°C 培养 16~24 h。

阳性对照组:用试剂自带的 Control Insert 代替 PCR 产物,其他操作与上面相同。此组正常情况下出现的应都是白色菌落。

1.2.3.3 克隆的检测

(1)操作方法

实验组:平板上共长出 130 个白色菌落,随机挑出 16 个单菌落,接种到 $15\,\mu\text{L}$ 含 Amp^r 的 LB 液体培养基中,混匀。

对照组:也长出大量白色菌落,随机挑出 8 个单菌落,接种到 $15\,\mu\text{L}$ 含 Amp^r 的 LB 液体培养基中,混匀。

(2)PCR 检测

模板(菌液)	$2\,\mu\text{L}$
ddH ₂ O	$9\,\mu\text{L}$
引物(M3-F 和 M3-R)	$2+2\,\mu\text{L}$
10×Buffer	$2\,\mu\text{L}$
Mg ²⁺	$1.2\,\mu\text{L}$
dNTP	$1.6\,\mu\text{L}$
Taq Polymerase	$0.2\,\mu\text{L}$
Total volumn	$20\,\mu\text{L}$

PCR 条件: 94°C 5 min, (94°C 30 s, 40°C 40 s, 72°C 1 min 30 s)×30 cycles, 72°C 10 min。

(3)电泳

实验组:16 个克隆,其中 14 个为阳性,阳性转化率为 $(14/16)\times 100\% = 87.5\%$ 。

对照组:8 个克隆,全为阳性,阳性转化率为 100%。

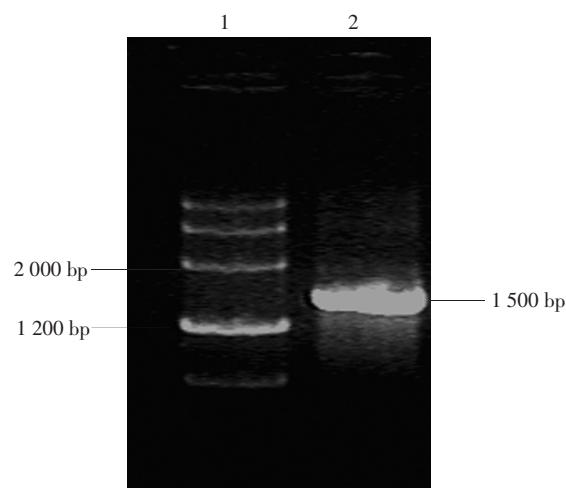
1.2.4 DNA 测序

从所得到的 14 个阳性克隆中挑出 10 个进行 DNA 序列测试,将获得的序列进行比对,即可获悉该地下水环境中的微生物多样性以及种属关系^[9]。

2 结果与讨论

2.1 细菌 16S rDNA 全长扩增

利用细菌 16S rDNA 的通用引物 8f 和 1492r,扩增目的序列 1 500 bp 左右。如图 1 所示,在 1 500 bp 处出现特异性条带,说明采用这种非培养非提取的方法分析地下水微生物群落是可行的。



1. DNA ladder 2. 16S rDNA (1 500 bp 左右)

图 1 细菌 16S rDNA 全长扩增

Figure 1 The full-length 16S rDNA amplification for the bacterium

2.2 细菌 16S rDNA 全长克隆

将 PCR 产物连接到 pMD 18-T Simple Vector (TaKaRa, 大连宝生物)中,然后转化到 E.coli DH5- α 中,在含 X-Gal、IPTG 和 Amp^r 的 LB 平板上培养 12 h 以上,挑出平板上的白色克隆于 $15\,\mu\text{L}$ 液体 LB 中,然后直接取菌液作 PCR。随机挑选的 16 个克隆有 14 个得到特异性扩增,大小约 1 500 bp (如图 2),鉴定引物为 M3-F 和 M3-R。

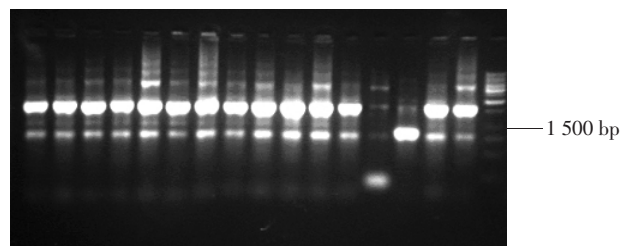


图 2 16S rDNA 全长克隆鉴定

Figure 2 The identification of full-length 16S rDNA clone

2.3 测序及同源性、进化分析

测序工作由上海申能博彩公司完成。序列比对用 clustalX, 建树及评估用 Mega 软件。从 14 个阳性克隆中取出 10 个样品测序,除一个因故损失未测、另一个未测完整外,其余 8 个样品均得到很好的测序结果。分别将这 8 个序列提交到 RDP (Ribosomal Database Project) 中,所得到的样品属于两个系统类群。其中 sample 1、4、5、7、11、16 属于 Proteobacteria 类群,而 sample 3、8 属于 Bacteroidetes 类群。除 sample 7 不能确定属于哪个种外,其他 7 个样品均可以在 RDP 中

表 1 污染含水层的微生物 16S rDNA 序列克隆分析

Table 1 The cloning and 16S rDNA sequence analysis for microbe in the polluted aquifer

克隆编号	序列长度/bp	所属种	系统类群
Sample1	1 523	<i>Arcobacter</i>	Proteobacteria
Sample3	1 520	<i>Flavobacterium</i>	Bacteroidetes
Sample4	1 576	<i>Aeromonas</i>	Proteobacteria
Sample5	1 571	<i>Duganella</i>	Proteobacteria
Sample7	1 548	未定	Proteobacteria
Sample8	1 496	<i>Flavobacterium</i>	Bacteroidetes
Sample11	1 491	<i>Janthinobacterium</i>	Proteobacteria
Sample16	1 513	<i>Janthinobacterium</i>	Proteobacteria

找到所属的种(如表 1)。此外,序列比对及 RDP 分析可知,sample 11 和 sample 16 同源率为 95.5%, 归为 *Janthinobacterium* 属,sample 3 和 sample 8 同源率为 95.8%,归为 *Flavobacterium* 属。

对 sample 7 的聚类分析表明,它与一种未鉴定的细菌自然的归为一类。NCBI 中比对可知,与其最接近的是 *Ralstonia* sp. M22(AY864081)菌株,但同源性只有 91%,与另一种菌 *Blood disease bacterium*(AB095535)的相似性也只有 91%(图 3)。这说明 sample 7 可能是一个新的未鉴定的菌种。

2.4 讨论

从表 1 知道,该有机污染地下水中的微生物具有较好的多样性,且可能存在一种未经鉴定的新菌种。较好的微生物多样性与该含水层的水文地质特征密不可分,该含水层较薄,水文地质条件简单,含水层岩

性总的来说以细砂、粉砂为主,局部有中细砂、中粗砂。另外,该含水层所在地表透水性较好,具有良好的径流和排泄条件,降雨和河川径流补给量较丰富,水循环交替迅速。由此,该含水层具备了类似土壤环境的较好微生物多样性存在的基本条件。新菌种的存在则不排除含水层长期受到有机农药污染,土著菌种 DNA 发生变异所引起。

本实验对浅层污染含水层中的微生物群落状况成功建立了一个可行的分子生物学鉴别方法,可供国内类似的环境微生物多样性研究参考并与国外相关研究进行比较^[10],也可为地下水的污染控制及生物修复研究提供一定的科学依据与参考。

3 结论

利用分子生物学的方法对微生物进行分析鉴定,由于无需进行培养,大大提高了微生物的可筛选性。鉴于地下水污染问题的日益严重,本实验针对长期受到有机农药污染地下水中的微生物群落进行了分析。随机挑选 10 个克隆样品,进行测序及聚类分析,结论如下:

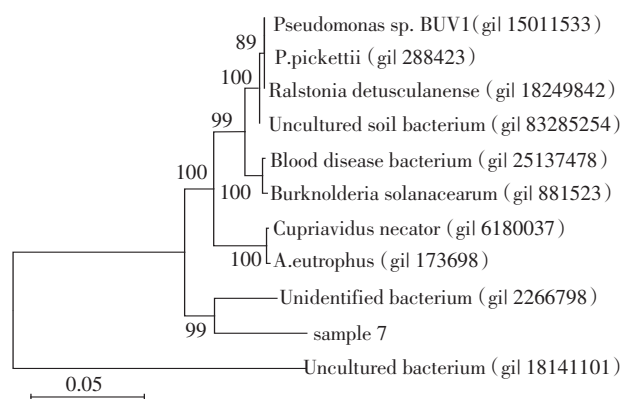
(1)该有机污染含水层中的微生物具有较好的多样性,sample 7 可能是一种未经鉴定的新菌种。

(2)后续研究可望发现一些有效的污染物高(特效降解菌,为地下水有机污染的生物修复提供经济有效的方法。

总之,本研究对有机污染地下水中的微生物多样性状况建立了一个可行的鉴别方法,可为进一步的污染地下水生物修复研究提供一定的科学依据与参考。

参考文献:

- [1] 陆光华,刘颖洁. 地下水有机污染的生物修复技术及应用[J]. 水资源保护, 2003, 4: 15-18.
LU Guang-hua, LIU Ying-jie. Bioremediation technology for groundwater contaminated by organic pollutants and its application[J]. *Water Resources Protection*, 2003, 4: 15-18.
- [2] 郭华明,王焰新. 地下水有机污染治理技术现状及发展前景[J]. 地质科技情报, 1999, 18(2): 69-72.
GUO Hua-ming, WANG Yan-xin. Remediation of organic contaminants in groundwater: State of the art and perspectives[J]. *Geological Science and Technology Information*, 1999, 18(2): 69-72.
- [3] 汪 珊,孙继朝,张宏达,等. 我国水环境有机污染现状与防治对策[J]. 海洋地质动态, 2005, 21(10): 5-10.
WANG Shan, SUN Ji-chao, ZHANG Hong-da, et al. Status of organic contamination in water environment of China and the measures to combat[J]. *Marine Geology Letters*, 2005, 21(10): 5-10.



(neighbour-joining 法构树)外类群为 Uncultured bacterium (gil18141101)
(Neighbour-joining method used, and the outgroup is uncultured bacterium (gil18141101))

图 3 对克隆 sample 7 的聚类分析

Figure 3 The cluster analysis for sample 7 clone

- [4] 陈鸿汉, 何江涛, 刘 菲, 等. 太湖流域某地区浅层地下水有机污染特征[J]. 地质通报, 2005, 24(8): 735–739.
CHEN Hong-han, HE Jiang-tao, LIU Fei, et al. Organic contamination characteristics of shallow groundwater in a study area of the Taihu Lake basin, Jiangsu[J]. *Regional Geology of China*, 2005, 24(8): 735–739.
- [5] 张惠文, 张倩茹, 周启星, 等. 分子微生物生态学及其研究进展[J]. 应用生态学报, 2003, 14(2): 286–292.
ZHANG Hui-wen, ZHANG Qian-ru, ZHOU Qi-xing, et al. Introduction and progress of molecular microbial ecology[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(2): 286–292.
- [6] 胡宏韬, 林学钰, 陆雍森. 地下水除草剂阿特拉津污染微生物治理的实验研究[J]. 环境科学, 2003, 24(6): 144–147.
HU Hong-tao, LIN Xue-yu, LU Yong-sen. Experimental research on bioremediation of groundwater contaminated by herbicide atrazine [J]. *Environmental Science*, 2003, 24(6): 144–147.
- [7] 余利岩, 姚天爵. 微生物生态学研究方法的新进展[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 89–93.
YU Li-yan, YAO Tian-jue. New advances in the research methods for microbial ecology[J]. *Microbiology*, 2001, 28(1): 89–93.
- [8] 王廷华, 景 强. PCR 理论与技术. 21 世纪生物技术丛书[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 24.
WANG Ting-hua, JING Qiang. PCR theories and technologies, 21th century biological technologies Series[M]. Beijing: Science Press, 2005: 24.
- [9] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H, et al. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143–169.
- [10] Abraham W, Wenderoth D F, Gläßer W. Diversity of biphenyl degraders in a chlorobenzene polluted aquifer[J]. *Chemosphere*, 2005, 58: 529–533.