

有机污染物对水体真细菌群落结构的影响

赵阳国,任南琪*,王爱杰,万春黎

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院 哈尔滨 150090)

摘 要:为了揭示有机污染物对环境真细菌组成和多样性的影响,应用末端限制性片段长度多态性(tRFLP)和 16S rDNA文库技术并结合水质分析方法,比较分析了松花江流域内受不同程度有机污染的 4 个水体及其沉积物中真细菌的群落结构。tRFLP 分析表明各水体及底泥均呈现较为复杂的群落结构模式,不同底泥群落形成的末端限制性片段(TRF)图谱具有很高的相似性,但随着污染程度的加强,部分类群明显富集,而且在水样组和泥样组内,群落结构的相似性同水质相似性是一致的,主成分分析(PCA)显示水样和泥样中的真细菌 TRF 形成不同的群。16S rDNA文库分析表明松花江哈尔滨段底泥中真细菌分布于 10 个门,Proteobacteria 门占优势,达群落总数的 21.92% (β -Proteobacteria 亚门占 10.96%),而有机染污物严重超标的生活污水排污道底泥中的微生物多样性较低,分布于 7 个门,Proteobacteria 门为优势群,占群落的 47.37% (α -Proteobacteria 亚门占 21.05%, δ/ϵ -Proteobacteria 亚门占 15.79%)。该研究表明向水体中长期排放高浓度有机物能使系统中微生物群落多样性降低,与污染物降解相关的功能微生物类群明显富集。

关键词:有机污染物;真细菌群落;末端限制性片段长度多态性(tRFLP);16S rDNA 文库

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)02-0313-06

随着人类活动范围不断扩大,越来越多的副产物被排放到自然生态系统中,作为主要分解者,微生物群落受到了严重影响,尤其是化肥农药^[1]、放射性^[2]、石油废物^[3]和重金属^[4~6]等污染物已经对自然微生物群落系统造成了破坏。所以,很有必要将微观世界中发生的真实图景展示给人们。

在揭示微生物群落结构与动态过程中,分子生物学起到了重要推动作用。其中变性/温度梯度凝胶电泳(denaturing/temperature gradient gel electrophoresis, D/TGGE)^[7]、单链构象多态性(single-strand conformation polymorphism, SSCP)^[8]和末端限制性片段长度多态性(terminal-restriction length fragment polymorphism, tRFLP)^[9]等分子指纹技术的应用最为广泛。由于 tRFLP 技术整合了自动测序仪的高分辨率和高通量特征,对分析复杂群落的结构较其它指纹技术具有明显优势,具有广阔的应用前景;对于该技术无法将特异条带进行测序分析及原位杂交的缺点,可以通过与克隆文库序列进行比较,或采用软件将多酶切的末端限制性片段(terminal restriction fragment, TRF)与现有数据库进行叠加比较的方式加以弥补^[10,11]。

采用水质分析与分子生物学技术相结合的策略,分析了松花江流域内受不同程度有机污染的 4 个水体及其沉积物中真细菌微生物群落结构特征,以及水质污染与微生物群落结构的取向关系。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

土壤 DNA 提取试剂盒 PowerSoil DNA Isolation kit (Mobio, CA USA); Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP、pMD19-T 载体 (TaKaRa 公司); PCR 引物 (Invitrogen, 上海); 胶回收或柱式 PCR 产物回收试剂盒 (NucleoSpin[®] Extract II, Macherey-Nagel, Germany); 内切酶 *Msp* I、*Hha* I 和 *Rsa* I (Fermentas, MD USA); 电泳系统 Power Pac1000 (Bio-Rad, CA USA); 紫外分光光度仪 (Beckman Coulter DU800, CA USA); 离子色谱 (Optima 5300DV ICP-OES, Perkin Elmer, MA USA); TOC-VCS/CP, Shimadzu, Japan); GenScan size standard ROX1000、GeneAmp[®] PCR system 2700 PCR 仪、测序仪 (Applied Biosystems, CA USA); 测序仪 377 分析软件 GenScan 3.1 (Applied Biosystems, CA USA); Sequencher 5.0 (Gene Codes, MI USA); Phylip

基金项目:国家 973 项目(2002AA001036);国家自然科学基金(50208006)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-451-86282008; E-mail: mq@hit.edu.cn

作者简介:赵阳国(1975-),男,山东人,博士,从事废水处理与微生物分子生态学研究。E-mail: yg.zhao@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-07-31 接受日期:2006-09-22 修回日期:2006-11-13

3.65^[12]、SPSS 1X (SPSS Inc., IL USA)。

1.2 样品采集及水质分析方法

样品采集于2005年11月6日,气温5℃左右,地点选择松花江流域内有机污染程度不同的4种水体(图1,采样点A~D),分别为生活污水排污沟(A),田间溪流(B),松花江支流拉林河(C),松花江干流哈尔滨段(D)。分别于4个地点收集20 cm以下水样(简称为S1),沉积物表层样品(S2)和表层以下20 cm的深层样品(S3)。12个样品收集时,各平行收集3份,混合后置于冰盒中保存,当日进行水质各项参数的测量以及样品总DNA的提取。水质参数主要检测了用于标志水体受有机污染的几项指标,包括化学需氧量(COD,重铬酸钾法^[13]),总磷(TP)和总氮(TN)(离子色谱法^[13])。

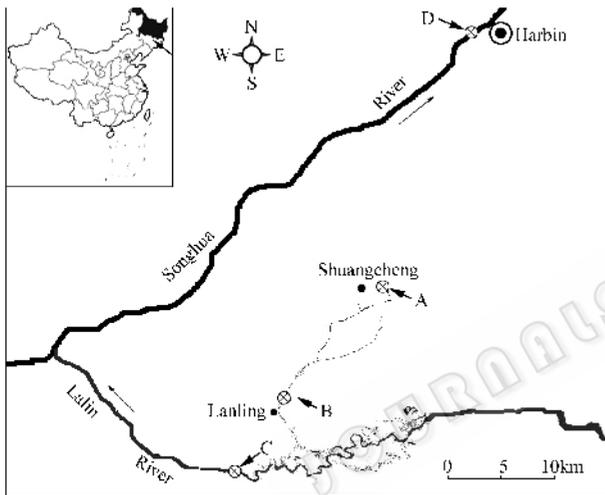


图1 样品采集地点在松花江流域的位置

Fig.1 Descriptions of sampling sites. Symbols (⊗) show the sampling sites A to D.

1.3 DNA提取和PCR扩增

取100mL水样于10000 × g离心(4℃,10min),收集沉淀,或称取0.25~0.5mg污泥,采用土壤DNA提取试剂盒提取总DNA,最终溶解于100μL 2mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)。在构建16S rDNA文库和tRFLP分析时均采用真细菌16S rDNA保守引物:Eub-8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3^[14]和Eub-926R 5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3^[15],分别对应于*E. coli* 16S rRNA的8~27bp和926~907bp。在tRFLP分析时,引物Eub-8F的5'端采用6-FAM进行荧光标记。PCR反应程序为:94℃ 40s,53℃ 40s,72℃ 1min,共30个循环。对于构建16S rDNA文库和tRFLP分析的PCR产物,分别采用胶回收或柱式PCR产物回收试剂盒进行纯化。最终均使用40μL 2mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)洗脱PCR产物。

1.4 构建16S rDNA文库和tRFLP分析

将纯化的PCR产物连接于pMD19-T载体中,采用氨苄和PCR法筛选阳性克隆,每个样品随机挑取100个阳性克隆进行测序。采用软件Sequencher 5.0拼接测序结果并去掉载体污染。自GenBank中下载真细菌各门的序列,采用Phylip 3.65软件包以相邻法绘制真细菌系统进化树框架,根据文库序列在真细菌系统树框架中的位置,对各文库序列进行分类统计。

分别采用内切酶*Msp* I, *Hha* I和*Rsa* I消化纯化的PCR产物。取消化样品1μL加1μL含有内标ROX1000的上样缓冲液,于95℃变性后上样。采用4.5%的聚丙烯酰胺凝胶和1×TBE缓冲液,于基因测序仪中以3kV收集3.5h,片段的长度和浓度采用GenScan 3.1进行分析,同时采用内切酶软件模拟酶切16S rDNA文库序列,将序列长度与GenScan分析结果进行对比,找出TRF所对应的细菌种属。采用SPSS 12软件对*Msp* I产生的TRF图谱进行主成分分析(principal component analyses, PCA)^[16]。

2 结果

2.1 各取样点水质分析

COD、总磷和总氮是标识水体有机物污染程度的重要指标,中国《地表水环境质量标准GHZB1-1999》中规定适于集中供水的水体最低标准中COD须小于20mg/L,总磷小于0.1mg/L,总氮小于20.65mg/L。根据图2,取样点A和B水样COD、总磷和总氮的含量均远远超过这一规定,尤其是A点水中含有较多黑色有机颗粒并伴有H₂S气体味道,周围植物生长茂密;B点水质较混浊,没有气味,河道中长满芦苇和香蒲,A和B均含有未经处理的生活污水,水中含有大量的未降解有机质。河道A经B流入河流C中,水中的有机质经过沉淀、降解以及稀释,COD、总磷和总氮分别降至27mg/L,0.12mg/L

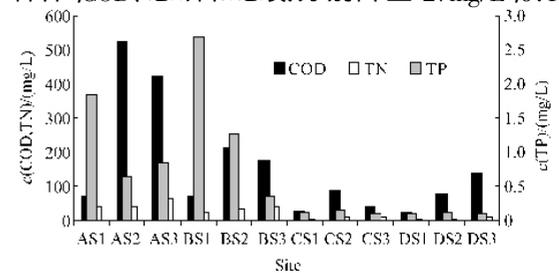


图2 取样点水质分析结果

Fig.2 Analysis of water quality for different samples. TP, total phosphorus; TN, total nitrogen.

和 2.2mg/L 以下,已接近最低标准,在该位点水质澄清,底泥中以泥沙为主,呈灰白色。而取样点 D 为哈尔滨市的主要饮用水水源,水体中 COD、总磷和总氮分别为 24mg/L,0.09mg/L 和 2.6mg/L,基本符合集中供水标准。

2.2 16S rDNA 文库分析底泥中微生物群落的组成
试剂盒提取的水样和泥样总 DNA 无色透明,产率为 50 ~ 200μg/g 泥样(湿重),OD₂₈₀/OD₂₆₀ = 1.6 ~ 2.0,浓度 659 ~ 1549μg/mL,片段约为 23kb,无降解,无 RNA 污染。

表 1 2 个样品克隆文库序列分析

Table 1 Comparison of 2 groups of 16S rDNA clone libraries

| Samples | GenBank Nos | Total sequences | Total OTU | Coverage rate/% | Probable total species |
|---------|---------------------|-----------------|-----------|-----------------|------------------------|
| AS3 | DQ088228 ~ DQ088273 | 77 | 50 | 35.1 | 143 |
| | DQ444158 ~ DQ444188 | | | | |
| DS3 | DQ444081 ~ DQ444124 | 73 | 70 | 4.3 | 1698 |
| | DQ463224 ~ DQ463252 | | | | |

从松花江哈尔滨段底泥(DS3)16S rDNA 文库中得到的序列分布于 10 个已分类的门(图 3),占群落比例较大的门分别为:Proteobacteria 为 21.9%(其中 β-Proteobacteria 占 10.96%, δ/ε-Proteobacteria 占 8.22%),Bacteroidetes 19.18%,Deinococcus-Thermus 17.81%,Acidobacteria 占 15.01%,其余各门均在 10% 以下,且分布均匀。与之相比,排污沟底泥(AS3)16S rDNA 文库序列仅分布于 7 个已分类的门,且较为集中,其中 Proteobacteria 占 47.37%(α-Proteobacteria 占 21.05%,δ/ε-Proteobacteria 占 15.79%),

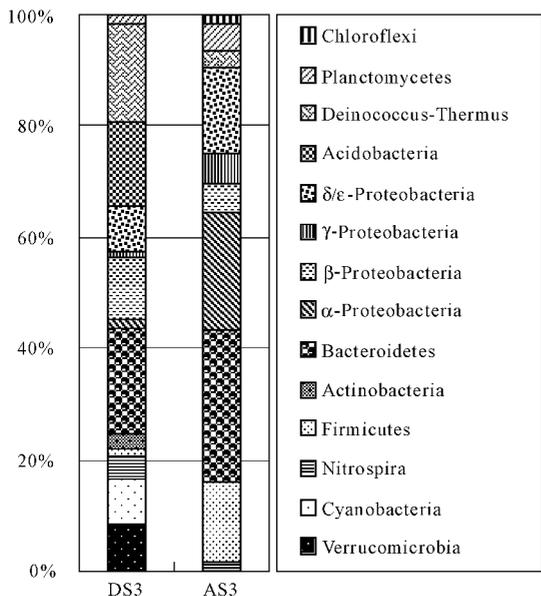


图 3 16S rDNA 文库分析 AS3 和 DS3 细菌群落的组成
Fig.3 Bacterial composition of the two sediment samples.

对污泥样品 AS3 和 DS3 随机挑取克隆测序,拼接后分别得到 77 和 73 条完整序列。采用 Sequencher 5.0 将相似性 > 97% 的序列归为同一个操作分类单元(operational taxonomy unit, OTU),分别得到 50 和 70 个 OTU。以覆盖率(C)来评价构建的 16S rDNA 文库对环境微生物多样性的体现,公式为:

$$C = [1 - n_1/N] \times 100\%$$

其中, N 代表测序的克隆总数, n₁ 代表 OTU 数量^[17]。根据公式,计算文库序列对 2 个样品覆盖率及可能的微生物种类见表 1。

Bacteroidetes 占 27.63%,Firmicutes 占 14.47%。

2.3 rFLP 对各样品微生物群落结构进行相似性分析

12 个样品的 TRF 图谱均得到 30 ~ 50 个条带,显示出较为复杂的多样性。将各泳道条带数字化,在同一迁移率下,有则计为 1,无则计为 0。主成分分析结果(图 4)显示,水样中的微生物群落(S1)同污泥中微生物群落(S2,S3)各自形成独特的群(group),而有机污染较为严重的 A 和 B 泥样中的微生物类群同污染较轻的 C 和 D 明显分开,各自形成较为独立的群。

样品 AS3 和 DS3 对应的 TRF 图谱如图 5 所示。

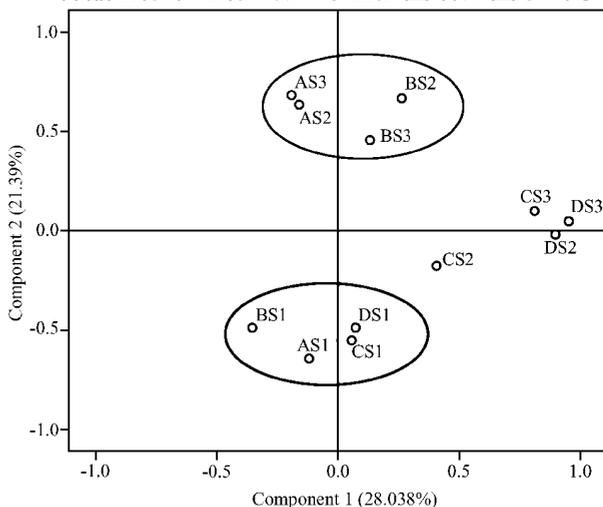


图 4 不同微生物群落 TRF 图谱的主成分分析(PCA)

Fig.4 Principle component analysis (PCA) for TRFs of different communities. Ellipses show high similar groups.

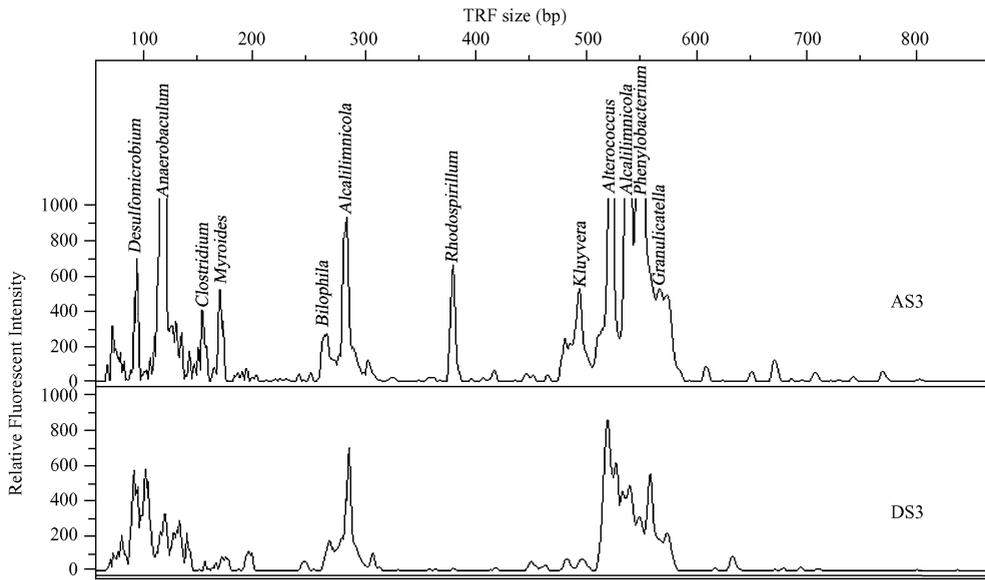


图5 AS3和DS3的TRF图谱及部分相应菌属

Fig. 5 Illustrations of the TRFs and corresponding genera. Genus names originated from comparison of TRF length with 16S rDNA sequences.

将 AS3 和 DS3 样品 16S rDNA 文库序列采用限制性内切酶模拟酶切后的序列长度,与 GenScan 软件分析得到的条带长度进行对比,将部分条带代表的种属标于图谱中。AS3 中, *Anaerobaculum* (属于 Firmicutes 门), *Clostridium* (Firmicutes), *Myroides* (Bacteroidetes), *Rhodospirillum* (α -Proteobacteria), *Kluyvera* (γ -Proteobacteria) 等属的数量明显高于 DS3, 这些结果同 16S rDNA 文库对比分析的结果是吻合的。

3 讨论

3.1 水体污染使细菌多样性降低,特殊功能微生物类群富集

从水质分析的角度来看,取样点 A 处已经明显受到有机物污染,而取样点 D 处则水质较好。将二者的理化指标及群落组成进行比较不难发现,松花江底泥受到人为因素影响较小,其中真菌微生物群落多样性很高,占有更宽泛的生态位,生态系统具有更高的稳定性;而排污沟底泥微生物群落由于长期受高 COD 等外界条件的选择作用,某些特定的微生物类群高度富集,这种单一化的微生物群落生态系统是极不稳定的,当外界条件有较大的改变时,整个系统就会全部崩溃。所以生态学理论认为,大量生态位彼此交叉的种群处于优势时,一个类群数量的改变会由另一类群来弥补,这样的生态系统更稳定,更能抵御外来干扰的冲击^[18]。显然,水体受到

污染程度越高,微生物多样性越低。这正如在运行废水处理反应器时,启动期微生物的多样性是最高的,但随着不断使用单一底物驯化,微生物多样性逐渐降低,与废水处理相关的某些微生物类群得以富集^[19]。可见,在水体污染治理过程中,首先要杜绝高浓度污染物的排放。在高度污染水体中部分特殊微生物类群将过度富集,造成生态失衡。再者,对已经出现污染迹象的水体,可暂时富集部分与污染物降解相关的微生物类群,当有机污染物被降解完成后,由于底物限制,合理的群落结构将会重新建立。

长期的有机污染物驯化致使微生物多样性降低,松花江底泥(DS3)中微生物群落分布多达 10 个门,而生活污水排污沟底泥(AS3)微生物仅分布于 7 个已分类的门,而且 Firmicutes α -和 δ/ϵ -Proteobacteria 所占比例急剧上升。Firmicutes 门是低 G+C 革兰氏阳性菌,包含大量的产酸发酵微生物类群,如 *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. 等,其直接产物是乙醇、乳酸、乙酸、丙酸等小分子挥发酸[反应式(1)],这为 δ/ϵ -Proteobacteria 亚门的硫酸盐还原菌提供了最好的碳源,从而致使 AS3 中水质暗黑,并伴有 H_2S 气味[反应式(2)]。研究表明,各种污染物大量排放均能降低自然生态系统中微生物的多样性。Wassel 等^[20]和 Burkhardt 等^[21]分别采用传统的平板计数方法研究了酸性矿山废水和重金属对受纳水体或土壤中微生物群落的影响,表明受污染环境中微生物多样性均明显降低;同样, Fahy 等^[22]采用 rFLP

和 16S rDNA 文库对长期受苯污染的地下水中微生物群落结构研究表明,其多样性下降了一半。可见,传统方法和分子指纹技术的研究均表明,污染物的长期排放将降低环境中微生物的多样性。



2.3 微生物群落相似性与水质的相似性是一致的,外界环境因素决定微生物类群的分布

根据图 4,无论对于水样或泥样,A-B 取样点群落结构相似性很高,形成相近的一组,而 C-D 取样点群落也形成较为独立的一组,这种群落结构的相似模式是由其水质决定的。将 A-B 和 C-D 2 个组的水质差别进行显著性检验,结果表明,2 组样本中 COD 的差别较为显著($P < 0.05$),TN,TP 的差别为极显著($P < 0.01$)。由此可见,水质的相似性与微生物群落的相似性是完全一致的,有研究也得到类似的结论^[23]。这提示我们可以通过简单比较同一水体水质的相似性来粗略推断不同生态环境中微生物群落的差别。当然 COD 等参数的瞬时变化并不能指示生物种群发生改变,尚需借助分子生物学手段快速分析生物群落动态。

此外,水体与沉积物是 2 个完全不同的生态环境介质,决定了主要微生物类群的差别。根据图 4,水体微生物群落组成与底泥中微生物群落截然不同,形成不同的群。水体流动性较大,透光性好,含氧量高,与有机质接触面积大,温度变化大,这些外界因素决定了生活在水体中的微生物类群为好氧、代谢活性高、可进行光合作用等特点,而沉积物底泥中微生物类群一般是处于分解代谢链的末端固着式生活或是兼性厌氧的类群,如反硝化菌、硫酸盐还原菌等。所以,对于同一水体类型,水体中的微生物类群相似性较高,而同一取样点水样和底泥中微生物群落的相似性很小。

致谢 感谢中国水产科学院黑龙江水产研究所孙效文研究员和梁丽群研究员在实验过程中给予的支持和帮助。

参 考 文 献

[1] Girvan MS, Bullimore J, Ball AS, *et al.* Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(5): 2692 - 2701.

[2] Chandler DP, Brockman FJ, Bailey TJ, *et al.* Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in a deep subsurface paleosol. *Microb Ecol*, 1998, **36**(1): 37 - 50.

[3] Kaplan CW, Kitts CL. Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *J Microbiol Methods*, 2003, **54**(1): 121 - 125.

[4] Tom-Petersen A, Leser TD, Marsh TL, *et al.* Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. *FEMS Microb Ecol*, 2003, **46**(1): 53 - 62.

[5] Iglesia R, Castro D, Ginocchio R, *et al.* Factors influencing the composition of bacterial communities found at abandoned copper-tailings dumps. *J Appl Microbiol*, 2006, **100**(3): 537 - 544.

[6] Shi W, Becker J, Bischoff M, *et al.* Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(8): 3859 - 3866.

[7] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden A. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 695 - 700.

[8] Lee D-H, Zo YG, Kim SJ. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(9): 3112 - 3120.

[9] Liu WT, Marsh TL, Cheng H, *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(11): 4516 - 4522.

[10] Marsh TL. Terminal restriction fragment length polymorphism (tRFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplicons. *Curr Opin Microbiol*, 1999, **2**(3): 323 - 327.

[11] Marsh TL, Saxman P, Cole J, *et al.* Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Program, a Web-Based Research Tool for Microbial Community Analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(8): 3616 - 3620.

[12] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. 2005.

[13] 时红,孙新忠,范建华,等.水质分析方法与技术.北京:地震出版社,2001.

[14] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**(1): 143 - 169.

[15] Muyzer G, Teske A, Wirsén CO. Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol*, 1995, **164**(3): 165 - 172.

[16] Wang M, Ahme S, Antonsson M, *et al.* T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA gene sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of

- [17] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, **40**(3-4) :237 – 264.
- [18] 任南琪编著. 污染控制微生物学. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社, 2002.
- [19] Ren N, Zhao Y, Wang A, *et al.* The effect of decreasing alkalinity on microbial community dynamics in a sulfate-reducing bioreactor as analyzed by PCR-SSCP. *Sci China Ser C*, 2006, **49**(4):370 – 378.
- [20] Wassel RA, Mills AL. Changes in water and sediment bacterial community structure in a lake receiving acid mine drainage. *Microb Ecol*, 1983, **9**: 155 – 169.
- [21] Burkhardt C, Insam H, Hutchinson TC, *et al.* Impact of heavy metals on the degradative capabilities of soil bacterial communities. *Biol Fertil Soils*, 1993, **16**: 154 – 156.
- [22] Fahy A, Lethbridge G, Earle R, *et al.* Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater. *Environ Microb*, 2005, **7**(8):1192 – 1199.
- [23] Kostanjšek R, Lapanje A, Drobne D, *et al.* Bacterial community structure analyses to assess pollution of water and sediments in the Lake Shkodra/Skadar, Balkan Peninsula. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2005, **12**(6):361 – 368.

Influence of organic pollutants on the bacterial community in Songhua River drainage area

ZHAO Yang-guo, REN Nan-qi^{*}, WANG Ai-jie, WAN Chun-li

(*School of Environmental and Municipal Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China*)

Abstract : In order to investigate the potential influence of the organic pollutants on the microbial composition and diversity, terminal restriction fragment length polymorphism (tRFLP) and 16S ribosomal DNA (rDNA) clone libraries combined with water quality analysis were selected to compare the structure of bacterial communities in four water bodies contaminated by different degrees of organic matter. tRFLP profiles of the waters and sediments all showed complex patterns and high similarity, however, some certain populations enriched with the pollution enhanced. Especially, the similarity of communities accorded strictly with that of water quality. Principal component analysis (PCA) indicated that the terminal restriction fragments (TRF) of bacteria in the waters and sediments grouped into different clusters. 16S ribosomal DNA sequences in the Songhua River sediment fell into ten known phyla and Proteobacteria are predominant with 21.92% of clones (in which the β -Proteobacteria accounts for 10.96%). The sediment seriously polluted by domestic wastewater comprised of only 7 phyla, in which Proteobacteria was predominant with 47.37% of clones (subdivisions α -Proteobacteria and δ/ϵ -Proteobacteria were 21.05% and 15.79%, respectively). This study demonstrated that the long-term drainage of organic wastewater reduced the microbial diversity, and some functional microbes that are responsible for the degradation of organic matter, became dominant.

Keywords : organic contamination ; bacterial community ; terminal restriction fragment length polymorphism (tRFLP) ; 16S rDNA clone library