

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20121223001

罗艳, 谢作明, 周义芳, 等. 16S rDNA 克隆文库解析江汉平原高砷地下水系统中的细菌多样性[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(2): 194-200

Luo Y, Xie Z M, Zhou Y F, et al. Bacterial diversity in high arsenic groundwater system of Jiangnan Plain by 16S rDNA clone library [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(2): 194-200 (in Chinese)

16S rDNA 克隆文库解析江汉平原高砷地下水系统中的细菌多样性

罗艳, 谢作明*, 周义芳, 王焰新, 甘义群

中国地质大学(武汉)环境学院 武汉 430074

摘要: 为研究江汉平原高砷地下水系统中细菌多样性和种群结构, 以 2011 年 11 月采自江汉平原仙桃市沙湖镇高砷含水层沉积物为研究对象, 沉积物采自同一 50 m 钻井, 分别选取埋深 9.9 ~ 10.1 m 和 15.7 ~ 16.0 m 样品。提取沉积物中总 DNA, 采用 16S rDNA 克隆文库方法, 分析高砷含水层沉积物中土壤细菌的多样性。结果发现, 伯克氏菌目(Burkholderiales)、假单胞杆菌目(Pseudomonadales)和肠杆菌目(Enterobacteriales)构成了高砷系统中抗砷的优势菌群。结果表明, 高砷含水层中生活有大量微生物, 这些微生物在砷的地球化学循环中扮演着重要角色。

关键词: 砷; 微生物; 细菌多样性

文章编号: 1673-5897(2013)2-194-07 中图分类号: X171.5; X172 文献标识码: A

Bacterial Diversity in High Arsenic Groundwater System of Jiangnan Plain by 16S rDNA Clone Library

Luo Yan, Xie Zuoming*, Zhou Yifang, Wang Yanxin, Gan Yiqun

School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China

Received 23 December 2012 accepted 6 January 2013

Abstract: To study bacterial diversity and population structure of high arsenic groundwater system in Jiangnan plain, high arsenic sediment samples were collected from different depths of a 50 m deep borehole 9.9-10.1 m and 15.7-16.0 m, at Shahu Town, Xiantao city of Jiangnan plain in November 2011. Total DNA was extracted from the sediments. 16S rDNA clone library was used to analyze the bacterial diversity in the high arsenic aquifer sediments. The dominant bacterial community included Burkholderiales, Pseudomonadales, and Enterobacteriales in the high arsenic groundwater system. In high arsenic aquifers, there are a large number of micro-organisms living which play important roles in the geochemistry behaviors of arsenic.

Keywords: arsenic; microorganism; bacterial diversity

砷是一种无色无味的剧毒物质, 在极低浓度下就有很高的致毒性。砷污染已经成为全世界面临的最主

要的环境问题之一。亚洲是地下水砷污染最为严重的地区, 砷污染主要分布在孟加拉国、印度和中国^[1]。世

收稿日期: 2012-12-23 录用日期: 2013-01-06

基金项目: 国家自然科学基金(41172219); 国家自然科学基金国际重大合作项目(41120124003); 863 计划项目(2012AA062602)

作者简介: 罗艳(1988-), 女, 硕士, 研究方向为环境微生物学, E-mail: luoyan_hb@126.com;

* 通讯作者: (Corresponding author) E-mail: zuoming.xie@cug.edu.cn

世界卫生组织规定饮用水中砷的最高浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ [12]。在世界范围内,由于长期饮用高砷地下水而导致砷中毒的事件已多有报道。长期暴露在高砷环境下,人体健康会受到威胁,高砷环境还会使皮肤角质化,甚至诱发皮肤癌和胃肠道癌,并影响中枢神经系统 [3-4]。

我国地下水砷含量超标地区遍及山西、内蒙古、新疆、宁夏和台湾等地 [5-9]。近年来,江汉平原地区出现的砷中毒现象引起了研究者的重视 [10-11]。微生物对地下水中的砷的形态和分布特征都有重要影响,所以研究地下水系统中的细菌多样性有助于研究砷的迁移转化规律。现代分子生物学的方法为研究微生物的多样性提供了有效的手段,尤其是 16S rDNA 克隆文库技术,该方法重复性好,携带的信息量大,应用广泛。然而目前很少有研究者开展耐砷基因文库方面的工作,通过构建 16S rDNA 克隆文库,可以分析和研究环境中的细菌多样性和种群结构差异以及得到一些有砷抗性的微生物的序列。越来越多的研究表明 [12-15],砷代谢微生物广泛参与了砷的地球化学循环,影响着环境中砷的地球化学行为。微生物对不同价态砷的溶解、迁移和利用的差异影响着砷形态的转化,表明了微生物在砷的生物地球化学循环中发挥着重要作用 [16]。

本研究以仙桃沙湖高砷地区的土壤为例,运用 16S rDNA 克隆文库方法分析土壤细菌多样性,并确定优势种群,对微生物的群落结构进行了初步分析。本研究可为江汉平原高砷地下水系统中微生物的群落组成和多样性提供一定的参考信息。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 土壤样品的采集

采样地点为湖北省仙桃市沙湖镇某农户家门前的空地上,海拔 18 m,位于 $30^{\circ}9.393'N$, $113^{\circ}40.655'E$ 。在该地方打 1 个 50 m 的钻井,取埋深分别为 9.9 ~ 10.1 m、15.7 ~ 16.0 m 的 2 个土样放入冻存管中,再将冻存管放入 -196°C 液氮中保存。

1.2 土样中的 As 含量

将埋深为 9.9 ~ 10.1 m、15.7 ~ 16.0 m 的 2 个土样分别编号为 5 和 7。分别准确称取 5 号和 7 号土样 (50 ± 1) mg 采用 HNO_3 和 HF 高温高压法消解土样,所用 HNO_3 和 HF 均为高纯,由市售分析纯 HNO_3 和 HF 蒸馏提纯制得。用质量分数为 2% 的 HNO_3 稀释定容,最后用双道原子荧光分光光度计 (AFS930,北京吉天仪器有限公司)测定砷的浓度。5 号样和 7 号样中的砷的浓度分别为 30.12 和 $30.27 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.3 16S rDNA 分析

总 DNA 模板提取:称取 0.2 ~ 0.5 g 土样,加 1 mL buffer SLX Mlus 振荡 3 ~ 5 min,加 100 μL buffer DS 并振荡混合, 90°C 水浴 10 min, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,去上清液并且加入 270 μL buffer sp2 振荡混合。 4°C 、 $3\ 000 \times g$ 下离心 10 min,沉淀 DNA,加 200 μL E-lution Buffer 65°C 水浴 20 min,溶解 DNA。加 50 μL HTR Reagent, $13\ 000 \times g$ 下离心 2 min,取上清液,加入等体积的 XP2 Buffer,振荡混匀。全样加入到 Hilbind DNA 柱子中, $10\ 000 \times g$ 下离心 1 min,弃掉直液,再加入 300 μL XP2 Buffer $10\ 000 \times g$ 下离心 1 min,用 700 μL 的 spw wash buffer 进行清洗 2 遍,弃掉废液,加入 60 μL 的 Elution buffer 65°C 水浴 15 min, $13\ 000 \times g$ 下离心 1 min,洗提 DNA。

目的基因片段的 PCR 扩增:选择通用引物 27F (5'-AGAGTTT GATT CCT GGCT CAG-3') 1492R (5'-GGCTACCTT GTT ACGACTT -3')。PCR 反应体系 (50 μL): dNTP 混合物 ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 4 μL ; $10 \times$ PCR buffer, PCR 扩增条件:预变性温度 94°C , 5 min; 变性温度 94°C , 30 s; 退火温度 55°C , 1 min; 延伸温度 72°C , 2 min; 36 个循环后, 72°C , 延伸 10 min。

16S rDNA 连接、转化和文库构建:将 PCR 扩增产物用胶回收试剂盒回收纯化目标条带。纯化后与 PMD19-T 载体连接,之后转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中, 37°C 培养过夜。用 X-gal 进行蓝白斑初步筛选,筛选具有氨苄青霉素抗性的阳性白色转化子,用无菌牙签挑取白色克隆子转接于 LB/氨苄青霉素液体培养基中于恒温 37°C 摇床中培养 4 ~ 5 h 后再做扩增,剔除假阳性克隆子,扩增引物为 RV-M (5'-GAGCGGATAACAATTT CACACAGG-3') M13-47 (5'-CGCCAGGGT TTT CCCAGT CACGAC-3')。扩增条件为预变性温度 94°C , 10 min; 变性温度 94°C , 30 s; 退火温度 53°C , 30 s; 延伸温度 72°C , 30 s; 25 个循环后, 72°C , 延伸 5 min。将阳性克隆子送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序。结果用 MEGA5 软件进行系统发育学分析,构建 16S rDNA 克隆文库。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 样品总 DNA 提取和 PCR 扩增结果

选取埋深分别为 9.9 ~ 10.1 m、15.7 ~ 16.0 m 的 2 个沉积物土样,分别提取了总 DNA,且以其为模板进行 16S rDNA 全长 PCR 扩增,得到约 1 500 bp 大小的片段,回收纯化后电泳检测结果见图 1。

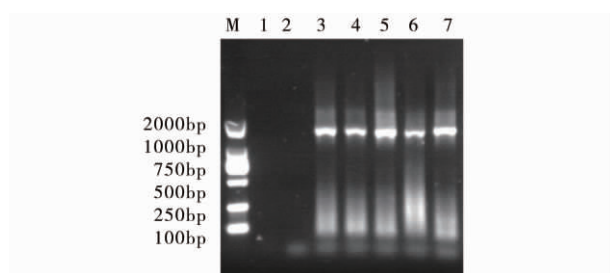


图1 DNA的PCR产物电泳图

注: M, DL2000; 3~7, DNA样品。

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR products of DNA

2.2 土样的16SrDNA系统发育分析

挑取5号样(9.9~10.1 m)中的阳性克隆子进行测序,测序结果在GenBank数据库中进行Blast比对,后建立NJ(neighbor joining)进化树。从图2可以看出,根据同源性可信度高低由NJ进化树可将定属或定种的56个菌株主要分为4大类,伯克氏菌目(Burkholderiales)是文库中最大的细菌菌群,在文库中占39.29%,其次分别是假单胞杆菌目(Pseudomonadales)和肠杆菌目(Enterobacteriales),在文库中所占比例分别为37.50%和27.78%,乳杆菌目(Lactobacillales)是文库中最小的细菌菌群,在文库中占8.33%。

挑取7号样(15.7~16.0 m)中的阳性克隆子进行测序,测序结果在GenBank数据库中进行Blast比对,之后建立NJ进化树。从图3可以看出,根据同源性可信度高低由NJ进化树可将定属或定种的78个菌株主要分为4大类,伯克氏菌目(Burkholderiales)是文库中最大的细菌菌群,在文库中占38.46%。其次分别是肠杆菌目(Enterobacteriales)和假单胞杆菌目(Pseudomonadales),分别占文库的24.36%和23.08%。放线菌目(Actinomycetales)是文库中最小的细菌菌群,在文库中占14.01%。

其中,在假单胞杆菌目中的不动杆菌属(Acinetobacter)和假单胞菌属(Pseudomonas)分别占23.21%和14.29%,它们都是高耐砷的菌属。5号样中的不动杆菌属和假单胞菌属分别占23.21%和14.29%,7号样中的不动杆菌属和假单胞菌属分别占6.41%和16.67%。

将不同深度的5号样和7号样的测序结果进行对比可知,伯克氏菌目、假单胞杆菌目和肠杆菌目在文库中所占的比例最大。这3个菌目构成了高砷系统中抗砷的优势菌群。它们都属于变形菌门,变形菌门根据rRNA序列被分为5个纲,用希腊字母 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ

命名。伯克氏菌目属于 β -proteobacteria,假单胞杆菌目和肠杆菌目属于 γ -proteobacteria。目前可知 γ -proteobacteria是仙桃沙湖地区高砷地下水沉积物中耐砷微生物的主要类群。陈双喜和邵宗泽^[17]在西南印度洋中脊深海沉积物中筛选到了8株砷抗性菌,它们都属于 γ -proteobacteria。 γ -proteobacteria类群在环境砷元素的生物地球化学循环中扮演着重要角色。伯克氏菌目(Burkholderiales)可以在某种条件下减少As(V)向As(III)的转化^[18]。伯克氏菌目(Burkholderiales)中的丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)是一种砷氧化反硝化细菌,目前研究者已将其从不同的受砷污染的湖泊、土壤、原始的沉积物及土壤中分离了出来^[19-22]。假单胞杆菌目中的不动杆菌属(Acinetobacter)和假单胞菌属(Pseudomonas)具有较强的抗性。Turpeinen等^[23]采用磷酸-脂肪酸分析(PLFA)法和16SrRNA末端限制性片段多态性分析(t-RFLP)法研究了砷、铬和铜复合污染土壤中的微生物群落结构,发现仅有不动杆菌属和假单胞菌属的数量和活性增强。假单胞杆菌目中的不动杆菌属和假单胞菌属长期生活在砷胁迫环境下,通常具有砷抗性,它们是将高毒性的As(III)氧化为低毒性的As(V)的细菌。在肠杆菌目(Enterobacteriales)中有很多“铁细菌”,它们是一种能使Fe(II)氧化成Fe(III)并从中得到能量的一群菌落,如锈铁菌属和纤毛铁细菌属等。在水中能使亚铁化合物氧化,并使之生成三价的氢氧化铁沉淀。在含水层沉积物中铁的氧化物和氢氧化物是砷的最重要的吸附剂^[24]。“铁细菌”氧化水中溶解的Fe(II)和Mn(II)形成不溶产物:氧化铁或氧化锰,并覆盖在过滤介质上形成天然(生物)吸附层。近年来,也有研究表明^[25-26]微生物能利用铁的多种矿物质,并还原其中的铁氧化物或氢氧化物,砷随之被释放出来。在5号样中出现了乳杆菌目,而在7号样中却没有发现。乳杆菌目链球菌科链球菌属,是革兰氏染色阳性细菌,是一种营养要求较高的兼性厌氧或厌氧的菌种。在7号样中出现了放线菌目,在5号样中却没有找到。放线菌目,革兰氏染色阳性,不抗酸,不能运动,大部分嫌气或兼性嫌气,少数好气或兼性好气,大多为发酵型,少数为氧化型。5号样和7号样中出现的微生物的不同可能与土样的深度和砷的浓度有关。

本研究对在江汉平原高砷地下水系统中的两个不同埋深沉积物样提取了土壤总DNA,并且构建了16SrDNA克隆文库,结果可知伯克氏菌目、假单胞杆菌目和肠杆菌目构成了高砷系统中抗砷的优势菌群。由于研究只选取了2个埋深的土壤,不能代表

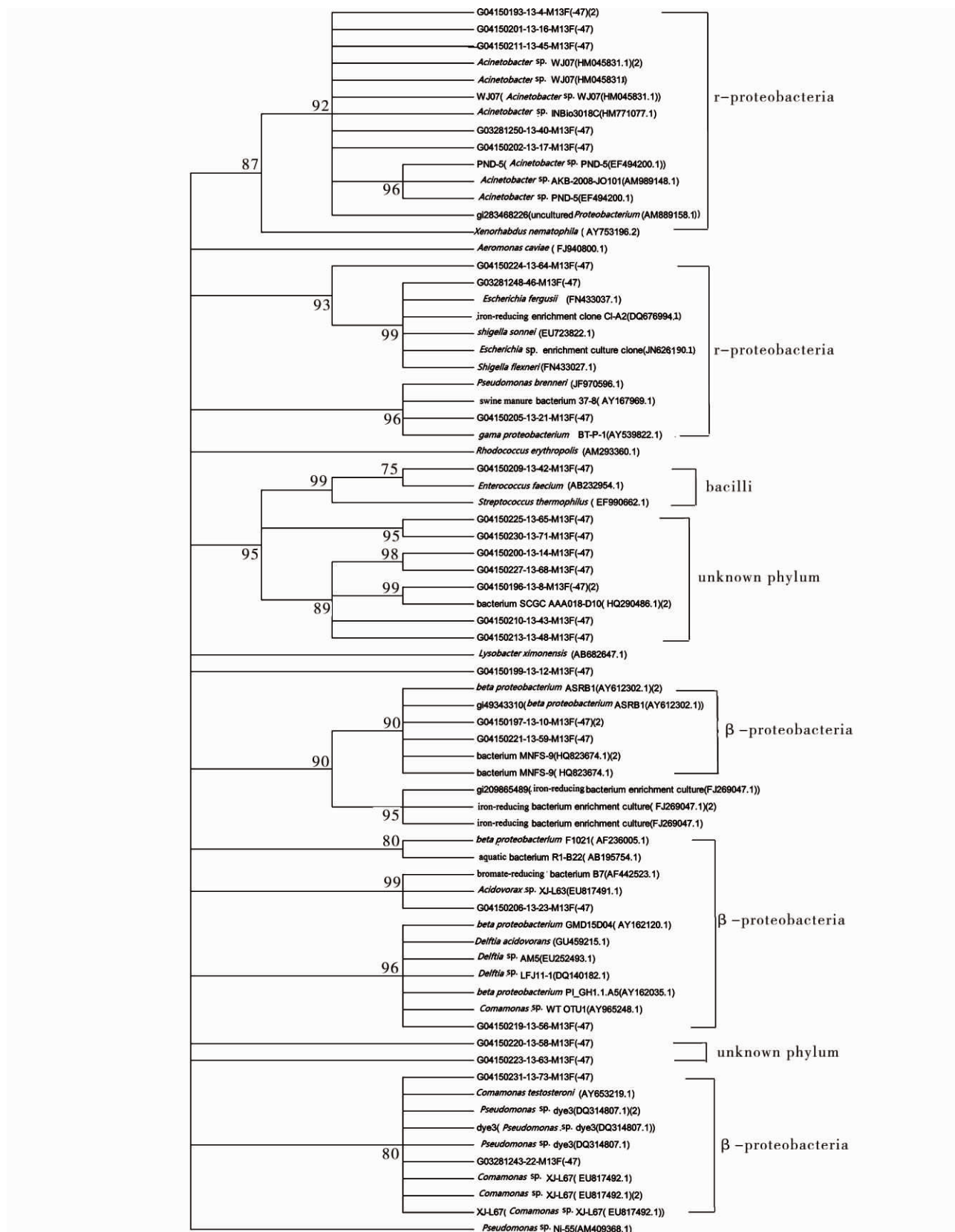


图2 5号样的NJ进化树

Fig. 2 NJ evolutionary tree of sample No. 5

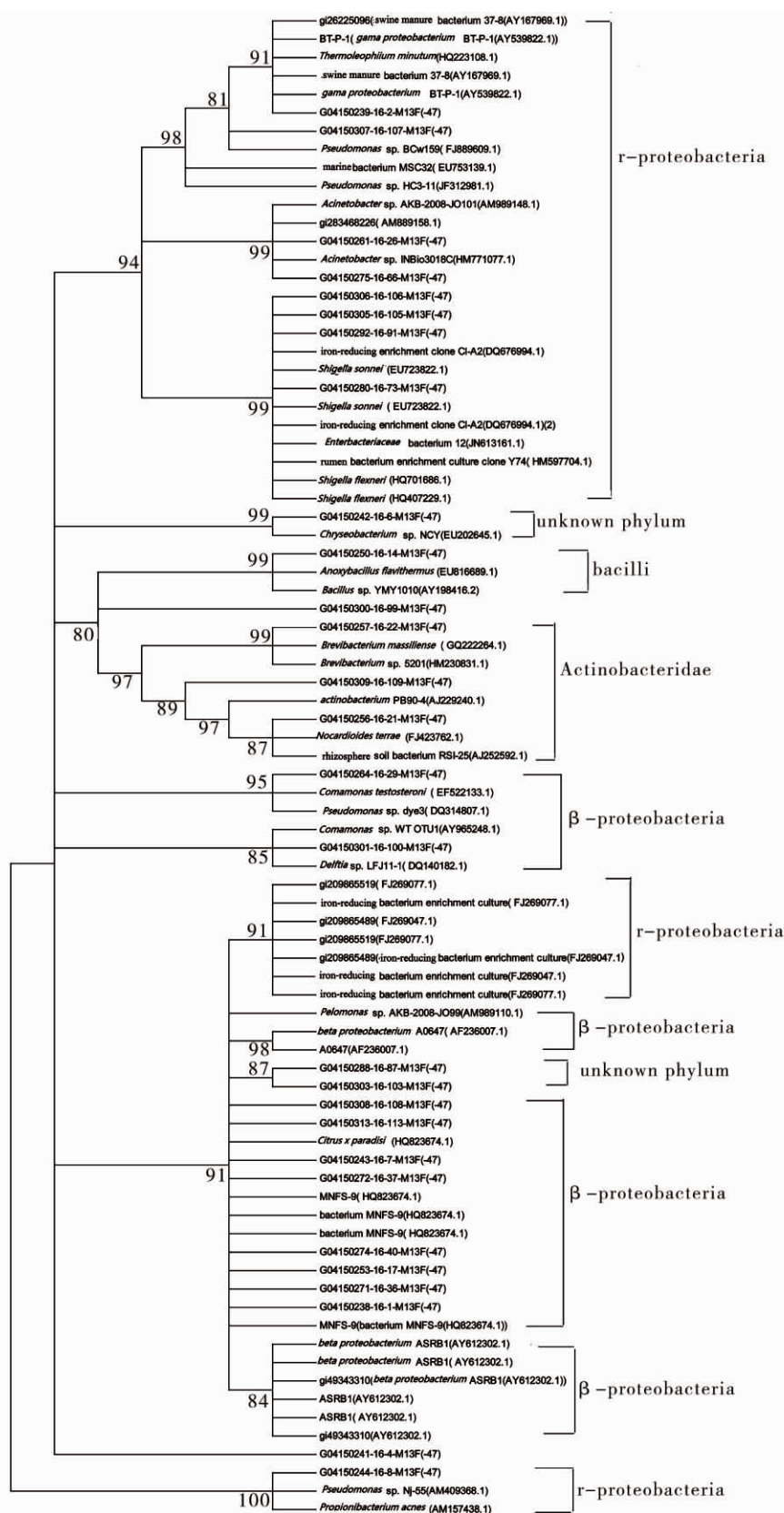


图3 7号样的NJ进化树

Fig. 3 NJ evolutionary tree of sample No. 7

整个地下水系统,但是却为研究江汉平原高砷地下水系统中的微生物群落组成和多样性提供一定的参考信息。同时,通过分子生物学筛选出一些砷抗性菌群,可以考虑利用这些优势菌群来修复砷污染的土壤和地下水。微生物种类繁多,代谢方式多样,抗砷机理也不同,而目前对抗砷微生物种类研究由于环境条件的限制而有限,甚至有的抗砷机理还需完善,因而还需开展大量研究。在分子生物学水平研究砷污染环境中的微生物种群多样性,能够为研究砷的毒理效应以及砷对生态的影响提供一定的参考。同时如何将不同环境的水文地球化学条件与微生物研究联系起来,来探讨砷的生物地球化学循环也是一个难点问题。应用性更广泛的是:找到合适微生物资源,探索更合适、有效的原位修复技术来达到除砷目的也是目前的热点问题。

通讯作者简介:谢作明(1973—),男,副教授,主要研究方向为环境生物修复与地微生物学。

参考文献:

- [1] 谢先军,王焰新,李俊霞,等.大同盆地高砷地下水稀土元素特征及其指示意义[J].地球科学(中国地质大学学报),2012,37(2):381-390
Xie X J, Wang Y X, Li J X, et al. Characteristics and implications of rare earth elements in high arsenic groundwater from the Datong Basin [J]. Earth Science (Journal of China University of Geosciences), 2012, 37 (2): 381-390 (in Chinese)
- [2] World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality. Recommendations [R]. Geneva: World Health Organization, 2004
- [3] 王国荃,吴顺华.地方性砷中毒的研究进展[J].新疆医科大学学报,2004,27(1):18-20
- [4] Rosado J L, Ronquillo D, Kordas K, et al. Arsenic exposure and cognitive performance in Mexican schoolchildren [J]. Environmental Health Perspectives, 2007, 115(9): 1371-1375
- [5] 赵伦山,武胜,周继华,等.大同盆地砷、氟中毒地方病生态地球化学研究[J].地学前缘,2007,14(2):225-235
Zhao L S, Wu S, Zhou J H, et al. Eco-geochemical investigation on the endemic As and F poisoning in Datong Basin [J]. Earth Science Frontiers, 2007, 14(2): 225-235 (in Chinese)
- [6] 何薪,马腾,王焰新,等.内蒙古河套平原高砷地下水赋存环境特征[J].中国地质,2010,37(3):781-788
He X, Ma T, Wang Y X, et al. Geochemical characteristics of the As-bearing aquifer in the Hetao Plain, Inner Mongolia [J]. Geology in China, 2010, 37(3): 781-788 (in Chinese)
- [7] 罗艳丽,余艳华,郑春霞,等.新疆奎屯垦区土壤砷含量及耐砷植物的筛选[J].干旱区资源与环境,2010,24(2):192-194
Luo Y L, Yu Y H, Zheng C X, et al. Arsenic concentrations in soils and plants in Kuitun Farm, Xinjiang [J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2010, 24(2): 192-194 (in Chinese)
- [8] 郁冬梅,吴学华,崔向红.从土壤地球化学看宁夏平罗县砷、氟中毒地方病的起因与分布[J].农业科学研究,2011,32(4):45-47
Yu D M, Wu X H, Cui X H. Causes and distribution of endemic disease about arseniasis and fluorosis in Pingluo Country from a view of geochemistry [J]. Journal of Agricultural Sciences, 2011, 32(4): 45-47 (in Chinese)
- [9] Lu K L, Liu C W, Wang S W, et al. Assessing the characteristics of groundwater quality of arsenic contaminated aquifers in the blackfoot disease endemic area [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 185(2-3): 1458-1466
- [10] 陈兴平,邓云华,张裕曾,等.湖北南洪村饮水砷含量及砷中毒调查[J].中国地方病防治杂志,2007,22(4):281-282
Chen X P, Deng Y H, Zhang Y Z, et al. The epidemiological survey and analysis to arsenism in Nanhong Village of Plain Hubei Province [J]. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 2007, 22(4): 281-282 (in Chinese)
- [11] Huang S B, Wang Y X, Cao L, et al. Multidimensional spectrofluorometry characterization of dissolved organic matter in arsenic-contaminated shallow groundwater [J]. Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 2012, 47(10): 1446-1454
- [12] 洪斌.微生物对砷的地球化学行为的影响——暨地下水砷污染机制的最新研究进展[J].地球科学进展,2006,21(1):77-82
Hong B. Influence of microbes on biogeochemistry of arsenic—Mechanism of arsenic mobilization in groundwater [J]. Advances in Earth Science, 2006, 21(1): 77-82 (in Chinese)
- [13] Oremland R S, Stolz J F. The ecology of arsenic [J]. Science, 2003, 300(5621): 939-944
- [14] 唐小惠,郭华明,刘菲.富砷水环境中微生物及其环境

- 效应的研究现状[J]. 水文地质工程地质, 2008(3): 104 – 107
- Tang X H, Guo H M, Liu F. Review of microbes and their effects in arsenic-rich waters [J]. Hydrogeology and Engineering Geology, 2008(3): 104 – 107 (in Chinese)
- [15] 陈云嫩, 柴立元. 砷在地下水环境中的迁移转化[J]. 有色金属, 2008, 60(1): 109 – 112
- Chen Y N, Chai L Y. Migration and transformation of arsenic in groundwater [J]. Nonferrous Metals, 2008, 60 (1): 109 – 112 (in Chinese)
- [16] Silver S, Phung L T. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71 (2): 599 – 608
- [17] 陈双喜, 邵宗泽. 西南印度洋中脊深海沉积物砷抗性菌的富集分离多样性分析[J]. 微生物学报, 2008, 48 (10): 1351 – 1355
- Chen S X, Shao Z Z. Enrichment and diversity analysis of arsenite-resistant bacteria in deep sea sediment samples from southwest Indian Ocean ridge [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(10): 1351 – 1355 (in Chinese)
- [18] Yoshinaga M, Cai Y, Rosen B P. Demethylation of methylarsonic acid by a microbial community [J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(5): 1205 – 1215
- [19] Oremland R S, Hoefl SE, Santini J A, et al. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain ML-HE-1 [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 4795 – 4802
- [20] Rhine E D, Phelps C D, Young L Y. Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(5): 899 – 908
- [21] Sun W J, Serra R, Field J A. Anoxic oxidation of arsenite linked to denitrification in sludges and sediments [J]. Water Research, 2008, 42(17): 4569 – 4577
- [22] Sun W J, Serra-Alvarez R, Fernandez N, et al. Molecular characterization and in situ quantification of anoxic arsenite-oxidizing denitrifying enrichment cultures [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 68(1): 72 – 85
- [23] Turpeinen R, Kairesalo T, Häggblom M M. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(1): 39 – 50
- [24] Violante A, Huang P M, Gadd G M. Biophysico-Chemical Processes of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments [M]. Hoboken: Wiley, 2008: 313 – 338
- [25] Islam F S, Gault A G, Boothman C, et al. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments [J]. Nature, 2004, 430: 68 – 71
- [26] Chow S S, Tallefert M. Effect of arsenic concentration on microbial iron reduction and arsenic speciation in an iron-rich freshwater sediment [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2009, 73(20): 6008 – 6021 ◆