

石油污染地下水中细菌多样性研究

郝春博^{1,2}, 王广才^{1*}, 董健楠¹, 张倩¹, 蔡五田³

(1. 中国地质大学(北京)水资源与环境学院, 北京 100083; 2. 中国地质大学(北京)地质微生物学实验室, 北京 100083; 3. 中国地质调查局水文地质环境地质调查中心, 保定 071051)

摘要:采集了某废弃炼油厂的石油污染地下水样品,提取水中微生物总DNA,构建细菌16S rDNA克隆文库,并通过16S rDNA序列的系统发育分析,对样品中的细菌种群多样性以及群落结构进行了研究.结果表明,文库中阳性克隆的16S rDNA序列分属10个细菌类群,分别为 γ -Proteobacteria (49.1%)、 α -Proteobacteria (12.9%)、 β -Proteobacteria (11.1%)、Bacteroidetes (9.2%)、Verrucomicrobia (6.7%)、Acidobacteria (2.5%)、 δ -Proteobacteria (1.2%)、Actinobacteria (1.2%)、Planctomycetes (0.6%)、Unidentified bacteria (5.5%).在这一生态系统中, γ -Proteobacteria 类细菌占据主导地位,接近50%,尤其是假单胞菌属(*Pseudomonas*)微生物在文库中的比例达35.6%.该石油污染地下水样品中细菌与许多其它已知的降解菌亲缘关系较近,如鞘胺醇单胞菌(*Sphingomonas*)、红球菌(*Rhodococcus*)和短波单胞菌(*Brevundimonas*)等.此外,文库中克隆的16S rDNA序列与许多类似的污染场地中发现的环境克隆相似性很高,如氯代烃污染的土壤及地下水、多环芳烃污染的土壤及地下水、多氯联苯污染的土壤、抗生素生产废水及活性污泥等,证明该石油污染地下水中有大量降解菌群的存在.

关键词:石油污染;地下水;16S rDNA;克隆文库;细菌多样性

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2009)08-2464-09

Bacterial Biodiversity in the Groundwater Contaminated by Oil

HAO Chun-bo^{1,2}, WANG Guang-cai¹, DONG Jian-nan¹, ZHANG Qian¹, CAI Wu-tian³

(1. School of Water Resources and Environment, China University of Geosciences, Beijing 100083, China; 2. Laboratory of Geomicrobiology, China University of Geosciences, Beijing 100083, China; 3. Centre for Hydrogeology and Environmental Geology, China Geological Survey, Baoding 071051, China)

Abstract: An oil-contaminated groundwater sample was collected at an abandoned petrochemical factory. Bacterial genome DNA was extracted for the 16S rDNA gene amplification, and then a bacterial 16S rDNA gene clone library was constructed. After the phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences, bacterial diversity and community structure of the groundwater were studied. The results showed the bacteria in the groundwater could be divided into 10 groups, which were as follows: γ -Proteobacteria (49.1%), α -Proteobacteria (12.9%), β -Proteobacteria (11.1%), Bacteroidetes (9.2%), Verrucomicrobia (6.7%), Acidobacteria (2.5%), δ -Proteobacteria (1.2%), Actinobacteria (1.2%), Planctomycetes (0.6%), Unidentified bacteria (5.5%). γ -Proteobacteria was predominant in the ecosystem (near 50% of total clones), and especially *Pseudomonas* accounted for 35.6% of all bacteria. Many clones also affiliated with other degrading bacteria, such as *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Brevundimonas*. Furthermore, a lot of 16S rDNA sequences in the clone library had high similarity to the ones originated from similar polluted environments, such as soil and groundwater contaminated with chlorinated hydrocarbon, soil and groundwater contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbon, soil contaminated with PCBs, antibiotics production wastewater and activated sludge, which proved that there were lots of degrading bacteria population in the oil-contaminated water.

Key words: oil-contaminated; groundwater; 16S rDNA; clone library; bacterial diversity

石油是工业的血液,石油工业的飞速发展,为人类文明和社会进步做出了巨大的贡献.然而,在石油的开采、运输、储藏、加工过程中,由于意外事故或管理不当等原因使相当量的石油进入环境.尤其是石油工业区域含油废水排放管道、储油罐的泄漏造成地下包气带、含水系统的环境污染问题,在石化工业区是非常普遍的.已有部分学者对石油污染厂区内污染物的迁移转化和最终归宿做了初步研究,并对石油污染场地环境风险评价的方法做了一定探索.例如陈余道等^[1]研究了淄博市乙烯厂区包气带中石油物质的分布特征及归宿.李凌波等^[2]调查了某润

滑油添加剂厂区不同深度土壤中总石油烃(TPH)、挥发性有机物(VOC)及半挥发性有机物(SVOC)的分布特征,以作为开展风险评价和采取补救措施的依据.但是,对石油污染地下水中微生物多样性及群落结构的研究却鲜见报道.因为微生物对地下水中石油污染物赋存状态、分布特征及自然衰减都有重要的影响,所以石油污染地下水中微生物多样性的

收稿日期:2008-10-21; 修订日期:2008-12-14

基金项目:国家自然科学基金项目(40802059);中国地质调查局地质调查工作项目(1212010634606)

作者简介:郝春博(1978~),男,博士,讲师,主要研究方向为环境工程微生物学, E-mail: chunbohao@cugb.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: wanggc@cugb.edu.cn

研究有助于人们理解污染物在系统中的迁移转化规律,并为受污染地下水的原位生物修复提供科学依据.

传统微生物学方法对微生物多样性的研究都是建立在平板分离基础上的,但目前已知的可培养微生物只占微生物总数的 0.1% ~ 10%,而且这种分离培养的方法往往不能很好地反映自然界微生物多样性的原始状态.现代分子生物学的发展为微生物多样性研究提供了许多行之有效的手段,如扩增长度片段多态性技术(AFLP),随机引物扩增多态性技术(RAPD),荧光原位杂交技术(FISH),变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)和 16S rDNA 克隆文库技术等.其中,16S rDNA 克隆文库技术方法使用简便、重复性好和信息量大而应用更为广泛,近年来已经成为各种生境中微生物群落结构及其多样性研究的主要手段^[3,4].

本研究的场地为华北某市一废弃的石化冶炼厂.该厂 1972 年建成并投产,2000 年停产,运营 28 a.在长期的原油储存、炼制过程中,大量的原油及其加工产物、副产物泄漏到厂区及周边的地下水中,造成了严重的环境污染.本研究通过分子生物学手段,构建厂区内石油污染地下水样品中细菌的 16S rDNA 克隆文库,分析了这一样品中细菌种群多样性,并通过 16S rDNA 序列的系统发育分析,对样品中细菌群落结构进行了探讨.

1 材料与方法

1.1 场地概况

该石油化工厂场地面积约75 000 m²,北部为原油卸油沟区和储油罐区,中部自西向东分别为沥青车间、常减压车间,西南为催化裂化车间(图 1).厂区土壤分为 4 层,上层为杂性土层,厚度为 9.5% ~ 12.3 m;中层为中-粗砂层,厚度为 2.8 ~ 5.6 m;下层为粉质粘土层夹粉土层,厚度为 29.8 ~ 37.15 m;底层为粉砂-细砂层,厚度为 1.75 ~ 5.9 m.杂性土、中-粗砂层现状条件下为包气带,粉质粘土夹粉土层,粉砂-细砂层为饱水带.

1.2 样品采集

本研究的采样地点为 SH-2 地下水污染监测井(图 1),位于原油罐区和常减压车间之间.含水层顶板位于地表以下约 50 m,为深层承压水,取样时取样井中的地下水位埋深为 19.25 m. pH、电导率等参数用哈纳多参数水质测定仪现场测定.水样采集后装于无菌棕色瓶中,储存于 4℃ 保温箱中,尽快返回

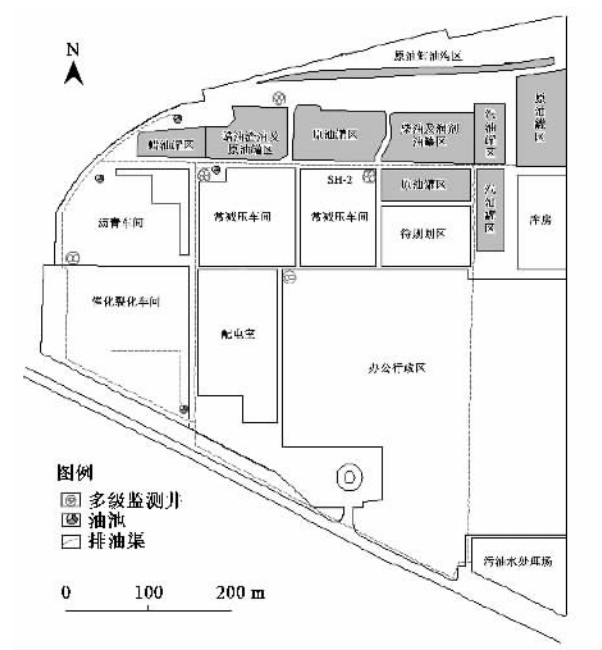


图 1 某石油污染场地平面示意
Fig.1 Schematic diagram of a petrochemical contamination site

实验室进行实验操作.

1.3 水质参数测试

TN、TP、COD 测试方法参见文献[5].水中细菌总数测定采用牛肉膏蛋白胨平板培养法.有机污染物指标测试采用气相色谱/质谱法进行测试,所用仪器型号为 Agilent 5973/6890, VOC 测试依据方法为 US EPA METHOD 524.2, SVOC 测试依据方法为 US EPA METHOD 8270C,柴油组分、汽油组分、重油组分测定参见文献[5].

1.4 地下水中细菌总 DNA 提取

取 2 L 水样真空抽滤于 0.22 μm 细菌滤膜上,将滤膜浸泡于 10 mL 无菌生理盐水中.超声波振荡 10 min,然后用移液枪反复吹打使膜上细胞完全进入溶液中.10 000 r/min 离心 3 min 收集菌体.用 STE 缓冲溶液洗涤 1 遍(蔗糖 10%, Tris-HCl 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, pH 8.0);然后用 STE 缓冲溶液悬浮,加入溶菌酶至终浓度 5 mg/mL, 37℃ 水浴处理 30 min, 然后加入蛋白酶 K 至终浓度 3 mg/mL, SDS 至终浓度 2%, 50℃ 水浴处理 45 min;等体积的氯仿抽提 2 次,取上清;向上清液中加入 10% 的 3 mol/L 乙酸钠,再加入等体积的异丙醇, -20℃ 放置 1 h; 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清;沉淀用 75% 的乙醇洗涤 1 次,自然干燥,最后用 50 μL 无菌水溶解,并加入 1 μL 浓度为 1 μg/mL 的 RNase.

1.5 16S rDNA 基因全长的 PCR 扩增

使用细菌 16S rDNA 通用引物 16S1(5'-AGA GTT

TGA TCM TGG CTC AG-3')和 16S2(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'),以地下水中细菌总 DNA 为模板,PCR 扩增样品中的相应基因.PCR 反应条件为:预变性条件为 95℃ 5 min,94℃变性 30 s,52℃退火 30 s 和 72℃延伸 2 min,共 35 个循环,最后在 72℃下延伸 7 min.PCR 反应的产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.6 16S rDNA 基因文库的构建

PCR 产物经北京天根胶回收试剂盒纯化后,连接到 pGEM-T easy vector(Promage 公司)上,然后热激转化到大肠杆菌 DH5α 细胞中,涂布含有 Amp/X-Gal/IPTG 的 LB 平板,37℃静置培养 16 h.然后 4℃静置 1 h,使蓝色充分显现后,随机调取白色菌落,重新划线纯化培养.以 T7(5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3')和 SP6(5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C-3')为引物,以少许菌体为模板,PCR 扩增验证插入片段的大小,筛选阳性克隆.将筛选好的阳性克隆保存于含有 20% 甘油和 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中,−70℃保藏.

1.7 基因文库的 ARDRA 分型

将引物 T7 和 SP6 鉴定出的阳性克隆 PCR 产物,使用限制性内切酶 *Hha* I 和 *Msp* I (Promage 公司)进行酶切分析.酶切反应使用 20 μL 体系,包括:2 μL Buffer,1 μL 内切酶,10 μL PCR 产物,18 μL 双蒸水.*Hha* I 于 60℃酶切 4 h,*Msp* I 则于 37℃酶切 4 h.酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,经 EB 染色后,使用凝胶成像仪照相.用 Quantity One 凝胶处理系统分析酶切图谱,确定 ARDRA 类型数目.

1.8 序列测定和系统发育分析

选取每种 ARDRA 型的代表克隆测序.测序工作由上海生工完成.获得序列后,首先用 RDP 网站上的 Chimera Detection 程序检测是否有嵌合体存在.然后用 Dutor 软件对所得序列进一步分类,剔除相同序列,并做饱和曲线.将所得序列输入 NCBI 网站,用 Blast 程序与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 中已有的序列进行比对,下载相似性最高的序列和相似性较高的已知种的序列作为参考.将所有序列用 BioEdit 中 ClustalW 程序比对后,用 MEGA 4.0 软件绘制系统发育树.

2 结果与讨论

2.1 样品的物理化学性质

该地下水样品的基本水质参数如表 1 所示.水样的 COD 达 37.49 mg/L,而该石化厂附近农村的相

同深度地下水 COD 仅为 10.48 mg/L,证明厂区内距地表 50 m 的深层承压地下水受到了严重的污染.挥发性有机污染物主要为 1,1-二氯乙烷,达 25.4 μg/L.半挥发性有机污染物主要为萘烯 636 ng/L; 芴 38.8 ng/L; 菲 87 ng/L; 总六六六 3.08 ng/L,证明地下水中多环芳烃的污染也非常严重.在原油的 3 种组分中,柴油的污染程度最高,达 68.8 μg/L.

表 1 水样的物理化学性质

Table 1 Characteristics of the groundwater sample			
参数	测定值	参数	测定值
pH	8.07	萘烯/ng·L ⁻¹	636
COD/mg·L ⁻¹	37.49	芴/ng·L ⁻¹	38.8
TN/mg·L ⁻¹	6.75	菲/ng·L ⁻¹	87
TP/mg·L ⁻¹	0.54	总六六六/ng·L ⁻¹	3.08
电导率/μS·cm ⁻¹	551	汽油类组分/μg·L ⁻¹	15.9
细菌总数/CFU	8.63 × 10 ⁵	柴油类组分/μg·L ⁻¹	68.8
1,1-二氯乙烷/μg·L ⁻¹	25.4	重油类组分/μg·L ⁻¹	25.0

2.2 总 DNA 提取结果

本研究的细菌总 DNA 提取结果如图 2 所示,泳道 1,2 为平行样.所提 DNA 片段大小约为 23 kb,证明已获得较为完整的基因组 DNA.所提取的细菌基因组 DNA 的 A260/A280 比值在 1.83 左右,其 DNA 的纯度较高,可以直接用于 PCR.

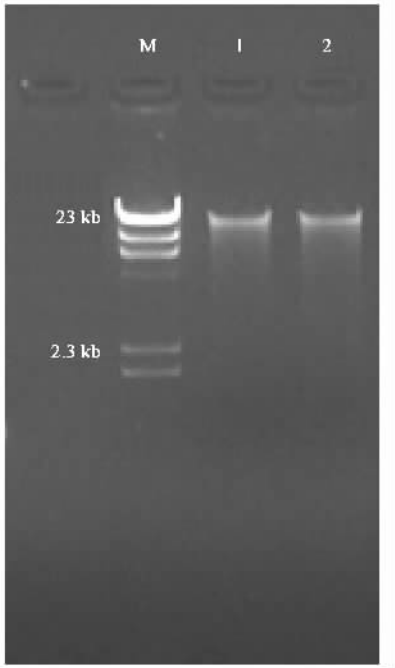


图 2 总 DNA 提取结果

Fig. 2 Extracted genome DNA of bacteria

2.3 16S rDNA 全长扩增结果

图 3 为 16S rDNA 全长扩增结果,泳道 1,2 为 16S rDNA 全长扩增平行样,CK 为阴性对照.从图 3

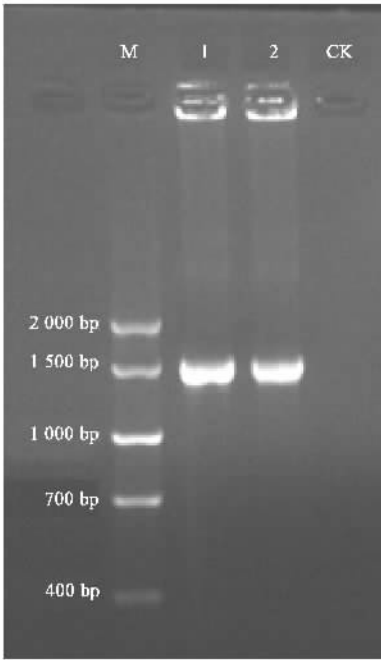


图 3 16S rDNA 全长扩增

Fig.3 Amplified full-length 16S rDNA

可以看出,用 16S rDNA 全长通用引物对(16S1/16S2)对地下水中细菌总 DNA 进行扩增,得到约1 500 bp 目的片断.

2.4 16S rDNA 基因文库的 ARDRA 分型结果

随机挑取 180 个白色克隆建立克隆文库.以 T7 和 SP6 为引物,少量菌体为模板,PCR 扩增克隆质粒上的插入片断.如果扩增产物为约1 700 bp 片断,则为阳性克隆.经过筛选,共得到 165 个阳性克隆.

用 *Hha* I 和 *Msp* I 对阳性 PCR 产物进行酶切分析,将克隆文库中的序列分成 50 种类型.

选取每种 ARDRA 型的代表性克隆进行测序,将所得序列用 Dutor 软件进行重新分类,并绘制饱和曲线(图 4).从图 4 中可以看出,剔除相同序列后,共得到 45 种基因型,文库分析已经趋于饱和.

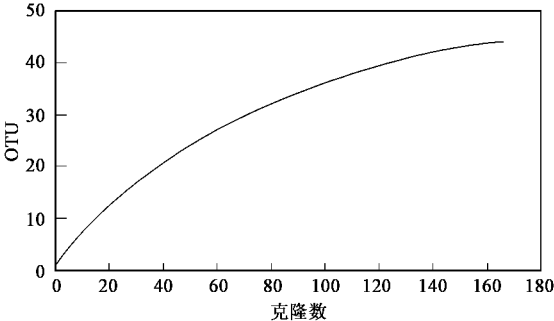


图 4 16S rDNA 克隆文库饱和曲线

Fig.4 Evolution of representation clones obtained from the contaminated groundwater sample

2.5 地下水中细菌多样性及系统发育学分析

将每种基因型的序列输入 RDP 网站,利用 Classifier 程序确定其系统发育类群.结果表明,文库中细菌的 165 个阳性克隆的 16S rDNA 序列分属 10 个细菌类群(如图 5),分别为: *γ-Proteobacteria* (49.1%)、*α-Proteobacteria* (12.9%)、*β-Proteobacteria* (11.1%)、*Bacteroidetes* (9.2%)、*Verrucomicrobia* (6.7%)、*Acidobacteria* (2.5%)、*δ-Proteobacteria* (1.2%)、*Actinobacteria* (1.2%)、*Planctomycetes* (0.6%)和 Unidentified bacteria(5.5%).

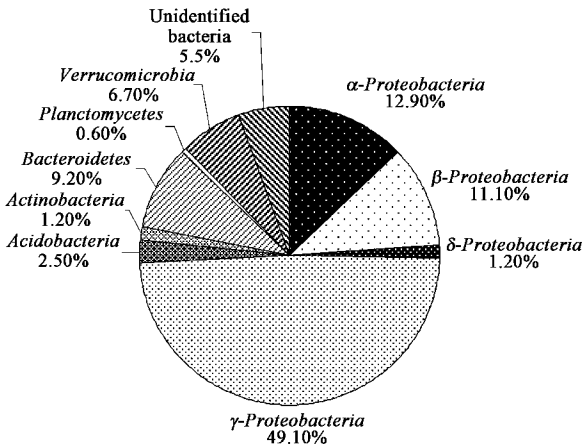


图 5 各类细菌在文库中所占比例

Fig.5 Proportion of each phylotype in the clone library

将每种基因型的序列输入 NCBI 网站,用 BLAST 程序与数据库中已有的序列进行比对分析,主要比对结果如表 2 所示.

从表 2 可以看出,该石油污染地下水样品中细菌与许多已知的降解菌亲缘关系较近,如假单胞菌(*Pseudomonas*)、鞘胺醇单胞菌(*Sphingomonas*)和红球菌(*Rhodococcus*)等.此外,文库中的克隆的 16S rDNA 序列与许多类似的污染场地中发现的环境克隆相似性很高,如氯代烃污染的土壤及地下水、多环芳烃污染的土壤及地下水、多氯联苯污染的土壤、抗生素生产废水及活性污泥等.还有,水样中许多细菌的 16S rDNA 序列与数据库中已经存在序列相似性比较低,很多相似性在 96% 以下,而且其最相近种大多数为未培养的微生物,证明这是一个比较特殊微生物类群,是认识和发现新型细菌的良好材料.

为了进一步了解这些细菌的系统发育地位,除了数据库中同源性最高的序列之外,本研究还下载了一些同源性较高的已知菌种的序列,与所得序列分别构建了 *Proteobacteria* 和其它类群细菌的系统发育树.

表 2 地下水中部分细菌 16S rDNA 序列比对结果

Table 2 BLAST analysis of 16S rDNA sequences of bacteria in the oil-contaminated groundwater				
克隆号	基因频率/%	系统类群	数据库中最近种或克隆	同源性/%
2-4-8	0.6	<i>α-Proteobacteria</i>	Uncultured Sphingomonadaceae bacterium clone MKC17 in soil contaminated with chlorinated hydrocarbons (EF173348)	98
2-4-16	0.6	<i>α-Proteobacteria</i>	Uncultured pyrene degradaing bacterium clone PAH-Bio-66 (DQ123731)	99
2-4-27	0.6	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. HI-K4	97
2-4-40	1.2	<i>α-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PK_ V in soil contaminated with semi-coke (EF540436)	99
2-4-43	1.2	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i> sp. 28/28-Antarctic hydrocarbon-degrading bacteria (DQ310472)	99
2-4-115	1.2	<i>α-Proteobacteria</i>	Uncultured eubacterium WD2107 polychlorinated biphenyl-polluted soil (AJ292610)	90
2-4-20	5.5	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Hydrogenophaga</i> sp. Rs71 in benzene-contaminated sandstone aquifer (AM110076)	99
2-4-71	2.5	<i>β-Proteobacteria</i>	Uncultured beta proteobacterium clone CLi51 at a PCE-contaminated site (AF529336)	96
2-4-4	2.5	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone D44 in penicillin G production wastewater (EU234314)	92
2-4-6	1.8	<i>γ-Proteobacteria</i>	Aromatic hydrocarbons degrading bacterium clone 12 in aquifer (AY250091)	96
2-3-10	4.3	<i>γ-Proteobacteria</i>	Hexane degrading Gamma proteobacterium MN 28 (AJ555478)	95
2-4-18	0.6	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. CT-1 in naphthalene degrading soil enrichment cultures (DQ984204)	93
2-4-32	4.3	<i>γ-Proteobacteria</i>	Gamma proteobacteria MN 154.3 in hexane degrading biofilters (AJ313020)	94
2-4-37	0.6	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas avellanae</i> (AJ889838)	95
2-4-64	1.8	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Hydrocarboniphaga</i> sp. B2-9 (EU313812)	96
2-4-113	31.3	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. CT-1 (DQ984204)	99
2-4-114	1.2	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. CT-1 (DQ984204)	96
2-4-170	0.6	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. GmFRB024 (AB369338)	91
2-4-47	1.2	<i>δ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone 215b2 in in Baltic Sea sediment (EF459952)	96
2-4-25	1.8	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured bacterium clone M0509-78 in activated sludge (EU104155)	99
2-4-26	2.5	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured bacterium clone 57-ORF18 in wastewater (DQ376571)	92
2-4-101	3.1	<i>Bacteroidetes</i>	Flavobacteria bacterium KF030 (AB269814)	99
2-4-14	3.7	<i>Verrucomicrobia</i>	Uncultured bacterium clone FFCH4250 in soil (EU135408)	92
2-4-50	3.1	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Prosthecoacter</i> sp. FC1 (PFU60012)	97
2-4-52	1.2	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp. djl-6-2	99
2-4-63	1.8	Unidentified bacteria	Uncultured bacterium HOCiCi9 in drinking water system (AY328558)	87

下面分别描述主要类群代表克隆的系统发育关系。

(1)*α-Proteobacteria* α -变形杆菌纲的细菌绝大多数是寡营养类型,即能在相对贫瘠的营养环境中生活^[6]。本研究的样品虽然是石油污染的地下水,但它的 COD 只有 37.49 mg/L,相对于常规的地表污染环境来说,已经是营养物质较少的了。所以,该类群细菌在文库中所占比例达 12.9%,是样品中的第二大类群。其中,克隆号 2-4-43、2-4-103、2-4-124 属于短波单胞菌属 (*Brevundimonas*),其中 2-4-43 在 GenBank 中最相似种为 *Brevundimonas* sp. 28/28,相似性达 99%,这是 1 株在南极发现的烃类降解菌(图 6)。 *Brevundimonas* 属中的许多菌具有降解有毒有害

污染物的作用,如 *Brevundimonas diminuta* MG 可产生对硫磷水解酶,也是对硫磷降解菌中研究最多的菌株。它产生组合型的膜结合酶,对一组相关的有机磷农药有水解作用,并且具有较广泛的 pH 和温度范围^[7]。克隆号 2-4-8、2-4-16、2-4-27 属于鞘氨醇单胞菌科 (*Sphingomonadaceae*),它们在进化树上聚为一枝。其中克隆号 2-4-27 属于鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*),该属细菌因其细胞膜内含有特殊的鞘糖脂而得名^[6]。鞘氨醇单胞菌属微生物是目前已知著名的降解菌,已有大量鞘氨醇单胞菌降解 PCBs、五氯酚、除草剂、六六六、多环芳烃等有毒有害污染物的报道^[8,9]。克隆号 2-4-80 与慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)细菌亲缘关系比较近,该属细菌的

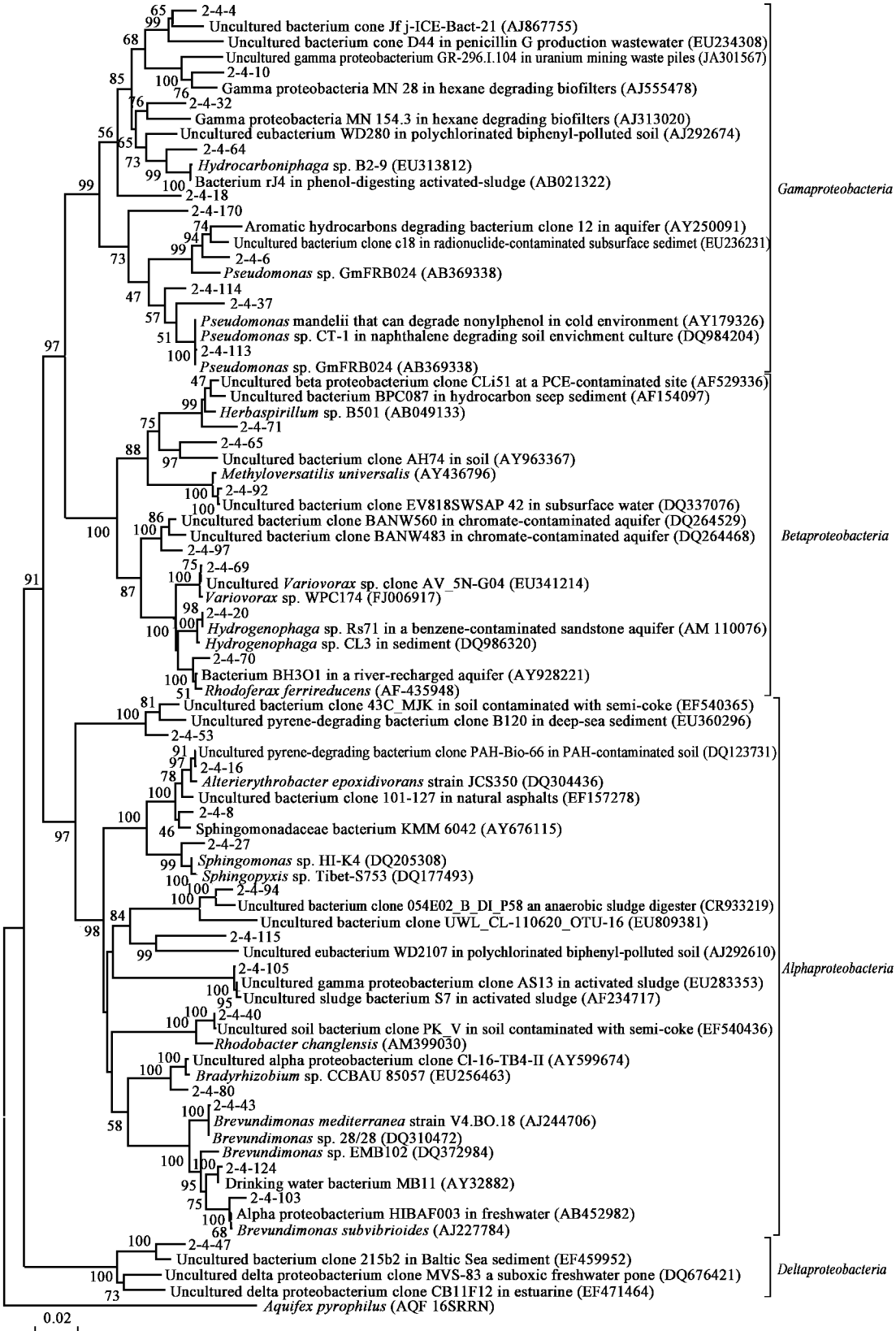


图 6 基于 16S rDNA 序列的 *Proteobacteria* 细菌系统发育树

Fig.6 Phylogenetic analysis of *Proteobacteria* in the groundwater based on 16S rDNA sequences

某些菌株可在自生状态下固氮. 另外, 文库中属于 β -变形杆菌纲的克隆号 2-4-71 与另一类固氮菌——草螺菌属 (*Herbaspirillum*) 细菌也有较近的亲缘关系, 所以该微生物群落中可能存在一定数量的自生固氮菌, 从而促进降解菌群对有机污染物的降解. 不过, 这一点还有待进一步研究.

α -变形菌纲的其余序列与已知菌的相似性都较低, 但它们在 GenBank 的最相似序列大多数都来自类似的污染环境, 比如克隆号 2-4-40 的最相似序列来自油页岩化工厂废弃物污染的土壤, 克隆号 2-4-115 来源于多氯联苯污染的土壤等.

(2) β -Proteobacteria β -变形杆菌纲序列在文库中所占比例为 11.1%, 是文库中的第三大类群. 其中, 克隆号 2-4-20 在文库中所占比例最高, 达 5.5%. 克隆号 2-4-20 属于噬氢菌属 (*Hydrogenophaga*), 在 GenBank 相似性最高的菌种是 *Hydrogenophaga* sp. Rs71, 是英国研究者筛选自苯污染砂岩地下水中的 1 株细菌^[10]. 噬氢菌属可降解多种有机污染物, 尤其对苯环类污染物有很好的降解作用, 例如帕氏氢噬胞菌 (*Hydrogenophaga palleronii*) LHJ38 就可高活性的降解萘^[11]. 克隆号 2-4-70 属于红育菌属 (*Rhodoferrax*), 与 *Rhodoferrax ferrireducens* 亲缘关系较近, 这是 1 株耐冷的、兼性厌氧的, 以 Fe^{3+} 为电子受体氧化有机物的细菌^[12]. 克隆号 2-4-92 在系统发育树上与 *Methyloversatilis* 属细菌聚为一簇. *Methyloversatilis* 是 2006 年刚刚建立的一个属, 它最早分离自有机污染的土壤^[13], 模式种为 *Methyloversatilis universalis*. 该属细菌对一碳有机物的降解性能非常强. 此外, 克隆号 2-4-65 最相似序列来自 TCE 污染的场地, 克隆号 2-4-71 最相似序列来自 PCE 污染的场地, 克隆号 2-4-97 最相似序列来自人工模拟的受污染地下水.

(3) γ -Proteobacteria γ -变形杆菌纲序列在文库中所占比例达 49.1%, 也就是说该地下水样品中近一半是的细菌是 γ -变形杆菌, 它们是文库中的最大的一个细菌类群. 克隆号 2-4-6、2-4-37、2-4-113、2-4-114、2-4-170 属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 它们在文库中所占比例高达 35.3%, 即该石油污染地下水中假单胞菌的数量占整个细菌生态系统的三分之一以上. 其中文库中丰度最高的为克隆号 2-4-113 (31.3%), 它在 GenBank 中最相似的种为 *Pseudomonas* sp. CT-1, 筛选自萘降解的土壤富集培养物. 与克隆号 2-4-113 相似性较高的假单胞菌还有 *Pseudomonas fluorescens* strain PC17, 分离自苯酚和甲

酚的共代谢降解体系^[14]; *Pseudomonas mandelii*, 分离自壬基酚的降解体系^[15], 它们的相似性均超过了 99%. 假单胞菌代谢类型多种多样, 它可以降解烷烃、多环芳烃、多氯联苯、杀虫剂、除草剂、硝基苯等各种有毒有害污染物. 该属的恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 一直以来都是污染治理的“明星”菌. 假单胞菌在石油污染治理领域的作用非常显著, 早在 20 世纪 70 年代, 就有研究者将多种降解质粒转化到铜绿色假单胞菌中构建“超级细菌”, 用以治理海洋中石油的污染. 目前, 每年都有大量的关于假单胞菌降解石油污染物的报道^[16~18]. 该地下水样品中有如此大量的假单胞菌存在也是因为受到了较严重的石油污染. 克隆号 2-4-64 属于 *Hydrocarboniphaga*, 在系统发育树上与该属的菌株和序列聚在一个分枝上 (图 6). *Hydrocarboniphaga* 是 2004 年刚刚确立的一个新属, 最早的菌株筛选自石油污染的土壤^[19], 有很强的烷烃和芳香烃降解能力. 该属目前只确定了一个种即 *Hydrocarboniphaga effusa*, 克隆号 2-4-64 与它的相似性为 95%. 此外, 克隆号 2-4-10 和 2-4-32 在 GenBank 中最相似的序列均来自降解烷烃的生物膜, 它们在文库中所占比例为 8.6%, 推测它们在系统中的作用是降解烷烃类石油污染物.

(4) δ -Proteobacteria 文库中只有一种基因型属于 δ -变形杆菌纲, 即克隆号 2-4-47, 在文库中所占比例为 1.2%. 由于 δ -变形杆菌的主要特征是硫还原, 所以推测克隆号 2-4-47 可能是硫酸盐还原菌, 即以硫酸盐为电子受体降解有机污染物.

(5) Bacteroidetes 拟杆菌门序列在文库中所占比例为 9.2%, 是除变形杆菌外最大的一个门, 包括 4 种基因型, 即克隆号 2-4-25、2-4-26、2-4-48、2-4-101. 其中, 克隆号 2-4-101 的丰度最高, 达 3.1%, 它的最相似序列来自富营养湖泊.

(6) Verrucomicrobia 疣微菌门序列在文库中所占比例为 6.7%, 包括克隆号 2-4-14 和 2-4-50 这 2 种基因型. 克隆号 2-4-50 与突柄杆菌属 (*Prostheco bacter*) 聚为一类 (图 7), 突柄杆菌属 (*Prostheco bacter*) 细菌一般生活在低营养的水体中.

(7) Actinobacteria 放线菌门在文库中只有一个基因型, 即克隆号 2-4-52, 在文库中所占比例为 1.2%. 克隆号 2-4-52 在 GenBank 中相似较高的序列均来自红球菌属 (*Rhodococcus*), 相似性达 99%. 在系统发育树上克隆号 2-4-52 也与该属细菌聚为一簇 (图 7), 所以可以认定克隆号 2-4-52 为红球菌属微

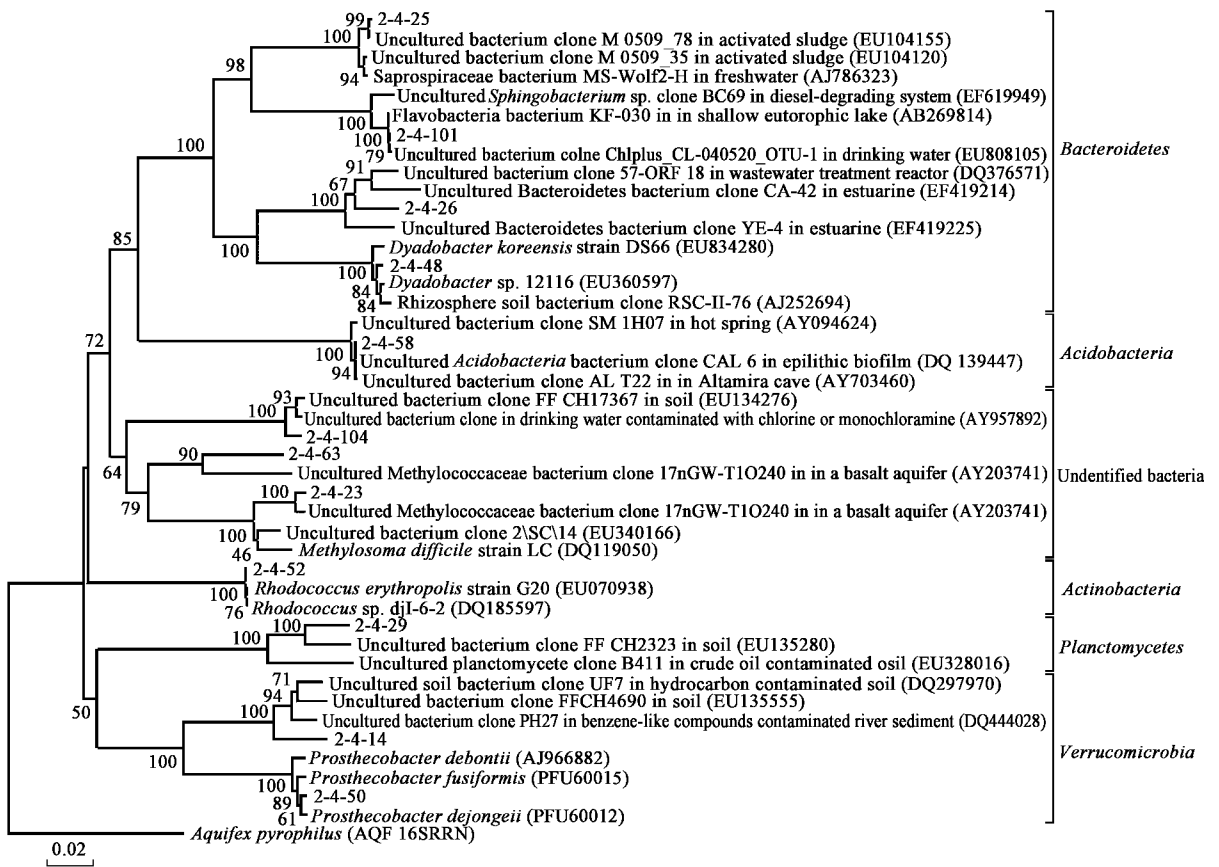


图 7 基于 16S rDNA 序列的其它门细菌系统发育树

Fig.7 Phylogenetic tree of other bacteria in the groundwater based on 16S rDNA sequences

生物.红球菌属细菌能降解苯胺、壬基酚、氯代苯甲酸、环己酮、聚乙烯醇等多种有毒有害污染物,对石油烃的降解性能尤为高效,已有大量文献报道^[20,21].

3 结论

(1)石油污染地下水含有 10 个细菌类群,分别为 γ -Proteobacteria、 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria、Bacteroidetes、Verrucomicrobia、Acidobacteria、 δ -Proteobacteria、Actinobacteria、Planctomycetes 和 Unidentified bacteria.

(2) γ -Proteobacteria 在该石油污染地下水中居于主导地位,所占比例高达 49.1%.

(3)石油污染地下水中存在大量的降解菌群,如假单胞菌(*Pseudomonas*)、鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)、红球菌(*Rhodococcus*)、短波单胞菌(*Brevundimonas*)、噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)、*Methyloversatilis*、*Hydrocarboniphaga* 等.如此多类的降解菌群的存在是与地下水中复杂多样的石油污染物密切相关的.

参考文献:

[1] 陈余道,朱学愚.淄博市乙烯厂区包气带中石油物质的分布特征及归宿[J]. 南京大学学报(自然科学), 1998, 34(3): 371-375.

[2] 李凌波,林大泉.某石油化工厂有机污染物的表征 I. 土壤[J]. 石油学报(石油加工), 2001, 17(4): 87-96.

[3] 高丽娟,王小芬,杨洪岩,等.秸秆发酵乳酸菌复合系 SFC-2 的构建及其组成多样性研究[J]. 环境科学, 2007, 28(5): 1088-1094.

[4] Nercessian O, Fouquet Y, Pierre C, et al. Diversity of Bacteria and Archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge [J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(5): 698-714.

[5] 国家环保局.水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

[6] 陶天申,杨瑞璇,东秀珠.原核生物系统学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.

[7] Happer L L, Mcdaniel C S, Miller C E, et al. Dissimilar Plasmids Isolated from *Brevundimonas diminuta* MG and a *Flavobacterium* sp. (ATCC 27551) Contain Identical opd Genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54: 2586-2589.

[8] Nam I H, Kim Y M, Schmidt S, et al. Biotransformation of 1, 2, 3-Tri- and 1, 2, 3, 4, 7, 8-Hexachlorodibenzo-*p*-Dioxin by *Sphingomonas*

- wittichii* Strain RW1 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(1): 112-116.
- [9] 洪源范, 洪青, 沈雨佳, 等. 氟菊酯降解菌 *Sphingomonas* sp. JQL4-5 对污染土壤的生物修复[J]. 环境科学, 2007, **28**(5): 1121-1125.
- [10] Fahy A, McGenity T J, Timmis K N. Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, **58**(2): 260-270.
- [11] 宋昊, 邱森, 章俭, 等. 高活性萘降解细菌 *Hydrogenophaga Palleronii* LHJ38 的研究[J]. 化工环保, 2006, **26**(2): 87-90.
- [12] Finneran K T, Johnsen C V, Lovley D R. *Rhodoferrax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III) [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, **53**: 669-673.
- [13] Kalyuzhnaya M G, Marco P D, Bowerman S, et al. *Methyloversatilis universalis* gen. nov., sp. nov., a novel taxon within the *Betaproteobacteria* represented by three methylotrophic isolates[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, **56**: 2517-2522.
- [14] Heinaru E, Truu J, Stottmeister U, et al. Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, **31**(3): 195-205.
- [15] Soares A, Guieysse B, Delgado O, et al. Aerobic biodegradation of nonylphenol by cold-adapted bacteria [J]. Biotechnology Letters, 2003, **25**(9): 731-738.
- [16] Gupta S K, Kumari R, Prakash O, et al. *Pseudomonas panipatensis* sp. nov., isolated from an oil-contaminated site [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, **58**: 1339-1345.
- [17] Popp N, Schlomann M, Mau M. Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils [J]. Microbiology, 2006, **152**: 3291-3304.
- [18] Bordenave S, Soledad M, Caumette P, et al. Effects of Heavy Fuel Oil on the Bacterial Community Structure of a pristine Microbial Mat [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**: 6089-6097.
- [19] Palleroni N J, Port A M, Chang H K, et al. *Hydrocarboniphaga effusa* gen. nov., sp. nov., a novel member of the γ -Proteobacteria active in alkane and aromatic hydrocarbon degradation [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, **54**: 1203-1207.
- [20] Yu B, Xu P, Shi Q, et al. Deep Desulfurization of Diesel Oil and Crude Oils by a Newly Isolated *Rhodococcus erythropolis* Strain [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**: 54-58.
- [21] Ohhata N, Yoshida N, Egami H. An Extremely Oligotrophic Bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4, Isolated from Crude Oil [J]. Journal of Bacteriology, 2007, **189**: 6824-6831.