

基于拟杆菌特异性 16S rRNA 基因的 塘坝型饮用水污染溯源研究

张 曦^{1,2}, 朱昌雄¹, 冯广达², 朱红惠², 郭 萍^{1*}

(1.中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081; 2.广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070)

摘 要: 微生物溯源是通过比较污染样品与可能的污染源中粪便污染指示微生物的差异或其生物标记的有无来判断污染样品和可能污染源之间存在的联系,从而确定污染来源。鉴于传统的溯源方法操作复杂、耗时长,建立了一种基于拟杆菌群体特异性 16S rRNA 基因进行溯源的方法,利用该方法证明了水源周围的池塘对饮用水的污染贡献较大。与已报道的另一种新的快速溯源方法——利用大肠杆菌特异性基因 *phoE*(膜外周磷通道蛋白编码基因)的 PCR-DGGE 技术进行比较研究的结果表明,利用拟杆菌特异性 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 溯源方法结果可靠、操作简便,较之大肠杆菌 *phoE* 基因的 PCR-DGGE 溯源方法,拟杆菌的溯源方法更适合塘坝型饮用水的溯源研究。

关键词: 微生物溯源;拟杆菌;群体差异性;16S rRNA 基因;大肠杆菌;膜外周磷通道蛋白编码基因 *phoE*

中图分类号: X502 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2011)09-1880-08

Potential Use of *Bacteroidales* Specific 16S rRNA in Tracking the Rural Pond-drinking Water Pollution

ZHANG Xi^{1,2}, ZHU Chang-xiong¹, FENG Guang-da², ZHU Hong-hui², GUO Ping^{1*}

(1.Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, CAAS, Beijing 100081, China; 2.Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Microbial source tracking(MST) is based on the differences of indicator bacteria or special band from environment samples and suggested production source. It provide accesss to track the sources of fecal pollution. Traditional MST methods is complex and time-consuming. In order to explore a quick an easy method, we practised to analyse the differences in *Bacteroidales* communities based on specific gene 16S rRNA by PCR-DGGE. The results indicated the drink water pollution were contributed by the pond. Additionally, this method was compared with reported PCR-DGGE which based on *Escherichia coli* specific gene *phoE* (the outer membrane phosphoporin protein coding gene). The results showed that *acteroidales* specific gene 16S rRNA could get more accurate result in investigated samples, which hinted that the researched method was more reliable and practical to tracking pollution.

Keywords: microbial source tracking; *Bacteroidales*; group-specific; 16S rRNA; *Escherichia coli*; *phoE*

近年来,随着养殖业在农村的迅猛发展,饮用水污染问题备受关注。我国华南地区广大农村饮用水主要以地表水和浅层井水为主,取水水源地多靠近村落和养殖区。养殖废水及生活污水构成了潜在的威胁

源。污染的水体已经严重威胁到人类的生存环境和饮水健康^[1],对其进行治理迫在眉睫,但由于缺乏对污染来源和途径的准确掌握,在很大程度上增加了治理的难度。近来一些发达国家纷纷开展了利用微生物进行污染源追踪的研究^[2-4],已开展的溯源研究多采用先分离污染指示微生物,如大肠杆菌等^[5],而后利用表现型分析或分子分型技术对指示微生物进行比较,从而判断污染来源。该技术存在耗费大、用时长等缺点,难以满足现实的需求^[6-8]。国内外学者们开始尝试利用非培养的分子生物学方法进行污染源的追踪研究,并取得

收稿日期:2011-03-15

基金项目:国家科技重大专项“水体污染控制与治理”资助项目(2008ZX07425-002)

作者简介:张 曦(1987—),女,山东聊城人,硕士研究生,主要从事环境微生物溯源方面的研究。

E-mail: zhangxi19871008@yahoo.com.cn

* 通讯作者:郭 萍 E-mail: pingguo120@hotmail.com

了一定的成绩^[9-11]。该技术不依赖分离培养指示微生物,直接通过比较污染水体和可疑污染源中污染指示微生物特异性基因的群体差异来判断样品之间的污染关系,具有操作简单,耗时短等优点^[12-15]。目前该技术尚处在初步研究阶段,国内外报道相对较少。

有研究报道利用大肠杆菌特异性基因的 PCR-DGGE 方法可以达到快速溯源的目的^[16],该方法直接以提取的水样中的混合 DNA 为模板,通过大肠杆菌特异性基因的引物进行 PCR 扩增后进行 DGGE 分析,不需要分离培养单菌落,在溯源过程中具有较好的应用性。

拟杆菌作为动物肠道内的主要组成微生物,被认为是水体的粪便污染指示微生物之一,利用拟杆菌特异性 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 分析来进行污染溯源的研究国内外尚无报道。本研究选择华南地区典型村镇的塘坝型地表饮用水作为研究对象,利用拟杆菌特异性 16S rRNA 基因进行 PCR-DGGE 技术分析,确定饮用水与周围可疑污染源中拟杆菌群体差异,同时与利用大肠杆菌特异性基因 *phoE* 的 PCR-DGGE 的方法进行比较,揭示饮用水污染的主要来源和途径,以期建立一种快速、准确的饮用水污染溯源技术和方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂:十六烷基三甲基溴化铵(威佳,广州),丙烯酰胺(杰顺,广州),甲叉双丙烯酰胺(Amresco, USA),去离子甲酰胺(Andy Bio, USA),尿素(杰顺,广州),琼脂糖(Lonza, USA),大肠杆菌显色培养基(Chromagar, France),0.22 μm 微孔滤膜(Millipore, USA),Taq 酶(申能博彩,上海),dNTP(东盛,广州),引物合成(英韦创津,广州)。

仪器及软件:核酸蛋白质分析仪 Ultraspec 6300 pro (GE, USA),Dcode™ 通用突变检测系统(BIO-RAD, USA),高速离心机(Sigma, USA),凝胶成像系统 ImageQuant 350 (GE, USA),5333 型 PCR 仪(Eppendorf, Germany),电泳仪 EPS601 (Pharmacia, USA);图谱分析软件 Quantity One V4.6.2 (Bio-Rad, USA)。

1.2 样品采集

饮用水样品:采样点位于惠州市潼侨镇新华农四队(北纬 23°02'021", 东经 114°16'655"),共采集 2 个饮用水样品,1 号为该区域的浅层井水,2 号为深层井水,两个井水的地理位置相互靠近(图 1)。

养殖池塘水样:养殖池塘面积约为 6.7 hm^2 ,采样点具有华南地区典型塘坝型农村地表饮用水源特征,样品采集位置的示意图如图 1 所示。3~6、8、9A、9B、9C 号样品均为饮用水周边池塘水,7 号为池塘外沟水,能够与各池塘进行水体互换,6 号为靠近 9A 号池塘的手摇井水,目前该井已经废弃。同一池塘进行多点采样,各样品的编号由池塘编号后加数字表示。水样采用消毒的采样瓶采集,低温保存,24 h 内将样品运回实验室进行分析。

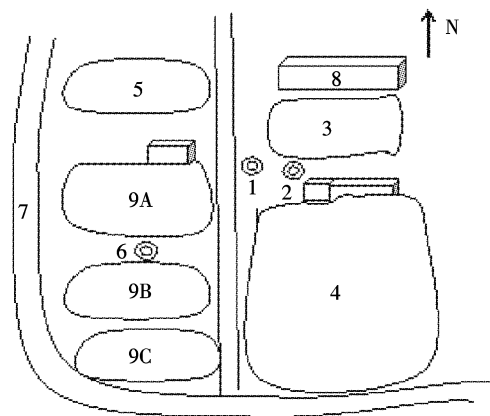


图 1 水样采集位点示意图

Figure 1 The location of sampling sites

1.3 样品 DNA 提取

拟杆菌 DNA 提取:将井水和池塘水采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,其中井水过滤量为 1 L,池塘水过滤量为 500 mL。将滤膜剪碎后采用改良 CTAB 法提取总 DNA^[18]。

大肠杆菌 DNA 提取:将同一个池塘分点采集的样品混合后过滤,将滤膜贴于大肠杆菌显色培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。采用改良的 CTAB 法提取培养基上所有菌体的 DNA。

DNA 稀释:利用蛋白质核酸分析仪测定提取的用于拟杆菌和大肠杆菌分析的总 DNA 浓度,用 Tris-EDTA 缓冲液(pH=8.0)分别将总 DNA 浓度稀释到 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 拟杆菌 V3 区的 PCR 扩增

根据文献^[9]设计合成拟杆菌通用引物(Bac32F:5'-AAC GCT AGC TAC AGG CTT-3'; Bac708R:5'-CAA TCG GAG TTC TTC GTG-3'),以稀释后的总 DNA 为模板进行第一轮 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL ,包括模板 50 ng ,dNTP 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,引物各 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,Taq 酶 1.25 U,1 $\times$ Buffer。扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预

变性 5 min; 94 ℃ 变性 40 s, 58 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 35 s, 共 35 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。

将 PCR 产物稀释至 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 作为模板, 采用 V3 区通用引物 341FGC/518R 进行扩增^[9](341F-GC: 5'-CGC CCG CCG CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC G GG GGG CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'; 518R: 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')。反应体系为 50 μL , 包括模板 100 ng, dNTP 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 引物各 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq 酶 5 U, 1×Buffer; 扩增程序: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 40 s, 56 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 大肠杆菌特异性基因 *phoE* 的 PCR 扩增

以稀释后的显色培养基混合菌体总 DNA 为模板, 采用大肠杆菌的膜外周磷通道蛋白编码基因 *phoE* 的引物 *phoE*-FGC/*phoE*-R^[16](*phoE*-F: 5'-CGC CCG CCG CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGG G AAA GCC GTG GCA CAG GCA AGC GT-3', *phoE*-R: 5'-TCA ATT TGT TAT CGC TAT CCA GTT GG-3') 进行 PCR 扩增, 反应体系为 50 μL , 退火温度为 56 ℃。

1.6 DGGE 指纹图谱分析

拟杆菌 16S rRNA 基因 V3 区 DGGE 指纹图谱分析: 采用 Dcode™ 通用突变检测系统对 PCR 产物进行分析, 凝胶浓度为 8%, 变性梯度为 35% ~ 65%, 电压为 60 V, 恒压条件下进行 12 h 电泳。

大肠杆菌特异性基因 *phoE* 的 DGGE 分析: 采用 Dcode™ 通用突变检测系统对 PCR 产物进行分析, 凝胶浓度为 8%, 变性梯度为 20% ~ 35%, 电压为 70 V, 恒压条件下进行 14 h 电泳。

两个分析过程均在 1×TAE 缓冲液中进行, 温度为 60 ℃, 采用 Gold View 染色液染色 30 min, 凝胶成像系统拍摄电泳图谱。

1.7 切胶回收测序

针对两个方法获得的凝胶, 选取 DGGE 优势条带进行切胶回收, 用 50 μL TE 缓冲液浸泡 10 h 后作为模板进行 V3 区扩增, 所得产物进行测序, 测序结果输入 NCBI 中进行比对并获取序列号。

1.8 DGGE 图谱分析

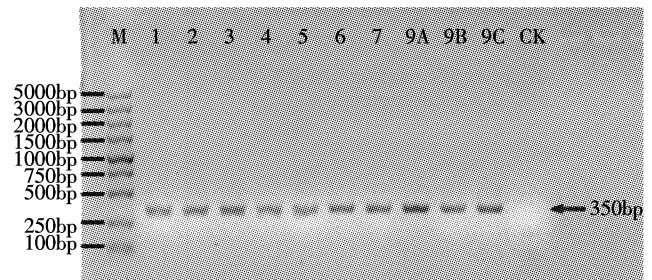
将利用拟杆菌 16S rRNA 基因 V3 区和大肠杆菌特异性基因 *phoE* 进行 DGGE 分析所得图像输入 Quantity One 软件中, 针对采集的所有样品获得的条带进行软件分析, 以 2% 的条带误差作为标准进行各

泳道之间的比较, 采用非加权平均值法 (UPGAMA) 对图谱进行聚类分析, 输出聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌特异性基因 *phoE* 的 PCR-DGGE 的溯源分析结果

研究表明大肠杆菌特异性基因 *phoE* 通过 PCR-DGGE 技术可以进行水体的粪便污染溯源^[16], 因此采用该方法针对本研究开展的溯源方法作出比较。在 PCR 扩增过程中, 以水样过滤后提取的 DNA 为模板直接扩增并没有目标条带的生成, 因此过滤水样后并未以直接提取的 DNA 为模板进行扩增, 而将滤膜放置在显色培养基上进行富集培养后提取菌落的 DNA, 大肠杆菌特异性基因 *phoE* 得到顺利扩增, 且没有非特异性杂带的生成, 片段大小在 350 bp 左右 (图 2)。



M 表示 Marker, DS5000; 1~9C 代表样品编号

M: DNA marker, DS5000; sample numbers are 1~9C

图 2 大肠杆菌特异性基因 *phoE* 扩增结果

Figure 2 PCR results with primer of *Escherichia coli* specific gene *phoE*

将扩增的产物进行 PCR-DGGE 分析, 其分析结果如图 3 所示。从图中看出, 2 号样品条带丰度低, 各样品产生的条带所表现的群体差异不够显著, 条带不清晰, 无法利用软件进行分析确定样品之间存在的区别与联系。虽然已有研究表明该方法适用于微生物溯源^[16], 但是从本研究成果来看, 结果并不理想, 无法达到溯源的目的, 故该方法不适用于研究的地区进行推广应用。

2.2 拟杆菌 V3 区 PCR 扩增结果

针对水体中指示微生物进行纯培养易导致样品中菌落的结构发生变化, 以及菌株漏检的情况发生, 因此直接以过滤水样提取的 DNA 作为模板, 采用拟杆菌通用引物 Bac32F/Bac708R 进行扩增, 达到将拟杆菌的遗传信息从环境样品中分离的目的。扩增所得片段大小在 670 bp 左右, 无非特异性杂带的产生, 结果如图 4 所示。但该片段较长, 直接用于 DGGE 分析

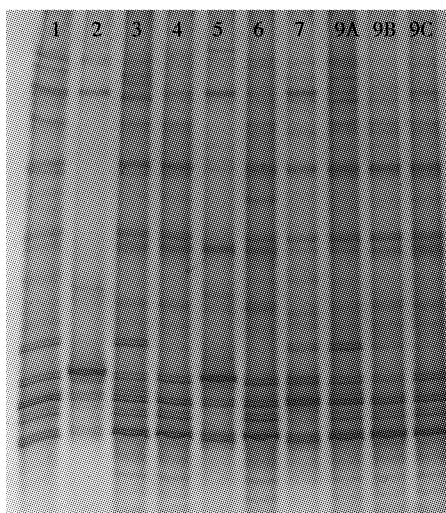
图 3 大肠杆菌特异性基因 *phoE* 的 PCR-DGGE 图谱

Figure 3 PCR-DGGE patterns based on *Escherichia coli* specific gene

效果不佳,因此先通过拟杆菌群体特异性 16S rRNA 基因的引物进行扩增,达到将拟杆菌从环境样品“提取”的目的,然后分析拟杆菌的 16S rRNA 基因上的 V3 高变区,将不同样品的拟杆菌群体差异性表现出来。

2.3 拟杆菌特异性基因 PCR-DGGE 结果分析及切胶测序

为了将大小相同而碱基序列存在差异的片段区分,采用 DGGE 技术针对所得产物进行分析,获得样

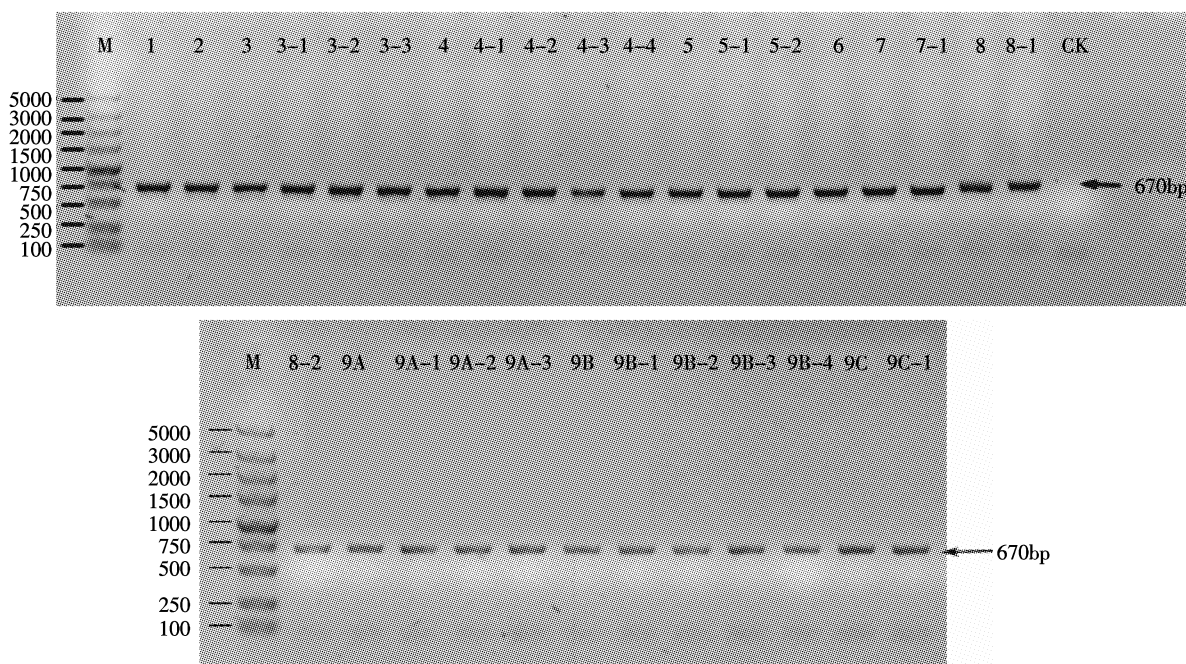
品中拟杆菌群落的多态性。拟杆菌 16S rRNA 基因 V3 区的 PCR-DGGE 分析所得指纹图谱如图 5 所示。从图中看出,各个样品所得条带清晰、多态性好,条带数目范围在 28~44 之间,同一水体不同采样点之间的样品呈现出一定的差异性,不同池塘样品之间条带存在差异,条带丰富度较高。

溯源过程中并未针对拟杆菌进行分离鉴定,直接利用拟杆菌通用引物从环境样品中获得其 DNA 片段,所以拟杆菌引物特异性的强弱直接决定了后续分析是否围绕拟杆菌展开。为了保证引物的特异性,经过 DGGE 分析后,将所得 DGGE 凝胶进行切胶测序,通过结果比对来判断该引物是否特异。针对 DGGE 图谱中不同位置的条带进行切胶、回收及测序,切胶条带共计 36 条,条带位置如图 4 所示。所得序列提交至 GenBank 核酸数据库中获取序列号,将测序结果与 GenBank 中的序列进行比对,结果如表 1 所示。

测序结果表明各条带均与拟杆菌保持着最高相似度,相似度为 93%~100%,说明本研究所采用的拟杆菌引物 Bac32F/Bac708R 在复杂的环境中依然具有较高的特异性,能够满足研究的要求,保证了围绕拟杆菌展开进一步分析及其结果的可靠性。

2.4 拟杆菌 PCR-DGGE 图谱的软件分析结果

应用 Quantity one 软件对不同样品的电泳条带进



M 表示 Marker, DS5000; 1~9B-4 代表样品编号

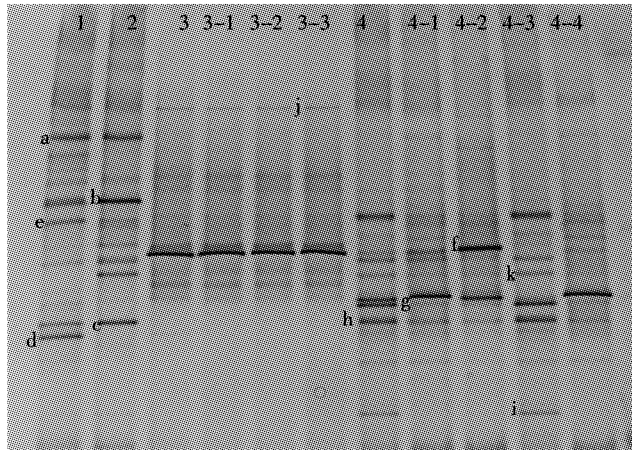
M: DNA marker, DS5000; sample 1~9B-4

图 4 拟杆菌特异性引物 Bac32F/Bac708R 扩增结果

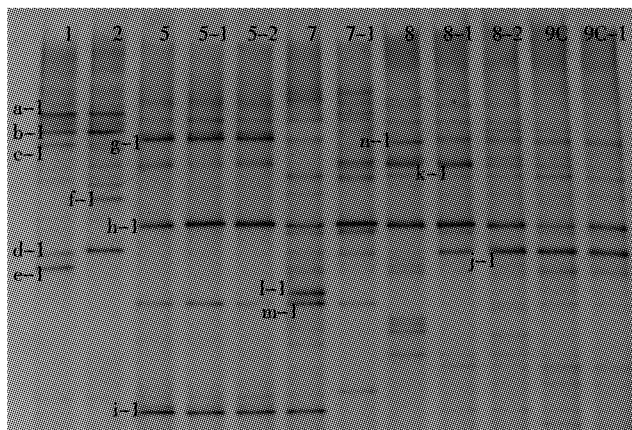
Figure 4 PCR results with *Bacteroidales* specific primer Bac32F/Bac708R

行系统进化树的建立和相似性分析,来明确各样品之间存在的相互关系,确定饮用水中的污染来源。样品的 DGGE 图谱各条带之间在进化树中聚在一起,表

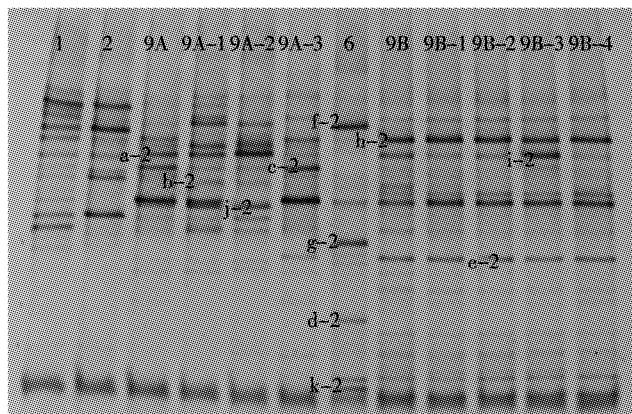
明拟杆菌群落分布越接近,样品之间关系也就越密切。在软件分析所建立的系统进化树中(图 6),每个



a



b



c

a 图为样品 1、2、3、4; b 图为样品 1、2、5、7、8、9C;

c 图为样品 1、2、6、9A、9B

a: sample 1, 2, 3, 4; b: sample 1, 2, 5, 7, 8, 9C;

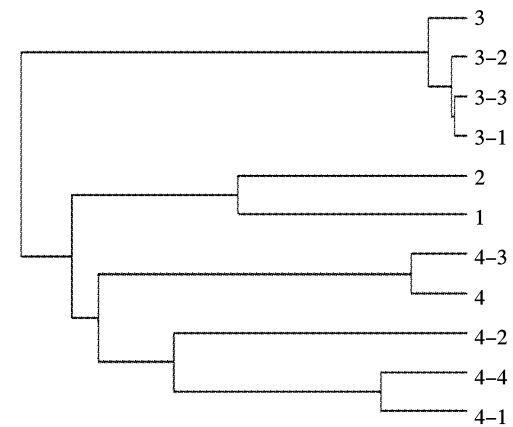
c: sample 1, 2, 6, 9A, 9B

图 5 拟杆菌特异性基因 PCR-DGGE 图谱

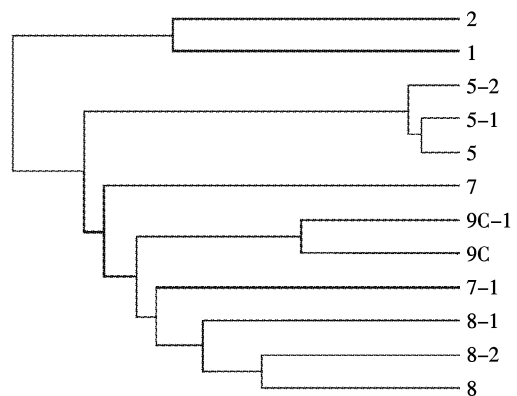
Figure 5 PCR-DGGE patterns based on

Bacteroidales specific gene

0.30 0.40 0.50 0.60 0.70 0.80 0.90 1.00



0.34 0.40 0.50 0.60 0.70 0.80 0.90 1.00



0.34 0.40 0.50 0.60 0.70 0.80 0.90 1.00

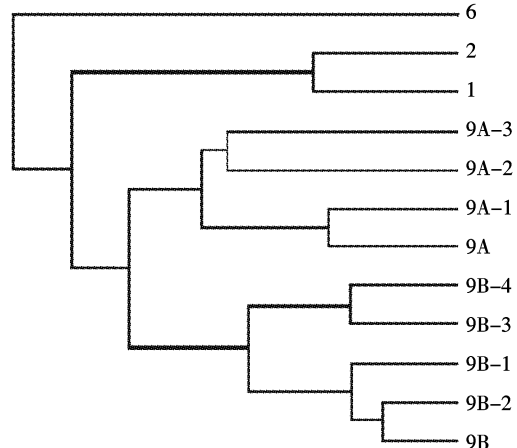


图 6 拟杆菌特异性基因 PCR-DGGE 聚类分析结果

Figure 6 Cluster analysis of PCR-DGGE patterns based on

Bacteroidales specific gene

表 1 拟杆菌 PCR-DGGE 条带序列比对结果

Table 1 Blast results of the main bands sequences in DGGE patterns based on <i>Bacteroidales</i> specific gene			
条带	登录号	GeneBank 中的最大相似菌株	相似度
A	HQ730980	<i>Bacteroides</i> oleiciplenus gene for 16S rRNA	100%
B	HQ730981	<i>Bacteroides</i> sp. enrichment culture clone CS3 16S rRNA	94%
C	HQ730982	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS160 16S rRNA	98%
D	HQ730983	<i>Bacteroides</i> nordii gene for 16S rRNA	99%
E	HQ730984	<i>Bacteroides</i> cellulosilyticus gene for 16S rRNA	98%
F	HQ730985	<i>Bacteroidales</i> bacterium clone PigG4 16S rRNA	93%
G	HQ730986	<i>Bacteroides</i> paurosaccharolyticus gene for 16S rRNA	95%
H	HQ730987	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS568 16S rRNA	99%
I	HQ730988	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS420 16S rRNA	99%
J	HQ730989	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS636 16S r RNA	99%
K	HQ730990	<i>Bacteroidales</i> bacterium clone ElkC1 16S rRNA	95%
L	HQ730991	<i>Bacteroidales</i> bacterium clone RWF27 16SrRNA	99%
M	HQ730992	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS99 16S rRNA	100%
N	HQ730993	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS515 16S rRNA	99%
A-1	HQ730994	<i>Bacteroidales</i> bacterium clone MS209A1_ B05 16SrRNA	98%
B-1	HQ730995	<i>Bacteroides</i> sp. clone CGOF23 16S rRNA	93%
C-1	HQ730996	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone T5-170 16S rRNA	100%
D-1	HQ730997	<i>Bacteroides</i> cellulosilyticus gene for 16S rRNA	100%
E-1	HQ730998	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS160 16SrRNA	100%
F-1	HQ730999	<i>Bacteroidales</i> bacterium clone ElkC1 16S rRNA	96%
G-1	HQ731000	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS515 16S rRNA	100%
H-1	HQ731001	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS569 16S rRNA	100%
I-1	HQ731002	<i>Bacteroides</i> sp. clone CGOF49 16S rRNA	95%
J-1	HQ731003	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone edNE33 16S rRNA	97%
K-1	HQ731004	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS96 16S rRNA	100%
A-2	HQ731005	<i>Bacteroidales</i> bacterium clone Fubc20 16S rRNA	94%
B-2	HQ731006	<i>ParaBacteroides</i> sp. clone Pig_H_B07 16S rRNA	97%
C-2	HQ731007	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS556 16S rRNA	97%
D-2	HQ731008	<i>Prevotella</i> sp. partial 16S rRNA gene, clone 601D02	94%
E-2	HQ731009	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS515 16S rRNA	98%
F-2	HQ731010	<i>Bacteroidales</i> bacterium clone ElkC1 16S ribosomal RNA	96%
G-2	HQ731011	<i>Prevotellaceae</i> bacterium clone 25B272 16S rRNA	99%
H-2	HQ731012	<i>Bacteroides</i> paurosaccharolyticus gene for 16S rRNA	100%
I-2	HQ731013	<i>Bacteroidales</i> bacterium clone ElkC1 16S rRNA	95%
J-2	HQ731014	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone SS1073 16S rRNA	99%
K-2	HQ845080	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone CM2-87 16S rRNA	94%

池塘不同位点采集的样品聚为一簇,两个饮用水样品与 4 号池塘、9A 号池塘和 9B 号池塘聚为一簇。根据条带相似性分析,1 号浅层井水与采集的 9A 号池塘的样品最大相似性达到 60.4%,同 4 号池塘及 9B 池塘的样品最大相似性分别为 41.7%和 48.2%;2 号深层井水同 4 号池塘、9A 池塘采集的样品之间的相似性较高,同 4 号池塘的样品最大相似性达到 45.8%,同 9A 池塘的样品最大相似性达到 58.5%。从分析结

果得出,4 号、9A 号和 9B 号池塘对 1 号浅层井水的污染贡献较大,其中 9A 号池塘对饮用水的污染贡献最大;对 2 号深层井水水质影响较大的池塘为 4 号和 9A 号。

3 讨论

研究表明利用大肠杆菌特异性基因 *phoE* 进行 PCR-DGGE 分析的溯源方法可行^[6],但在本研究中,

直接以提取的水样 DNA 模板进行 PCR 扩增,没有目标条带生成,这可能由于水样中大肠杆菌数量较少,造成提取的 DNA 模板中大肠杆菌 DNA 含量较少,导致扩增失败,通过大肠杆菌显色培养基富集之后提取的混合菌落 DNA 作为模板可以顺利得到扩增。进行 DGGE 分析的结果显示,水样中大肠杆菌特异性基因 *phoE* 的多态性较差,样品之间差异性不够明显,可能由于富集培养导致菌落的分布结构发生了变化或是本次分析的样品中大肠杆菌的特异性基因变异性较差。该方法效果不理想,在研究开展的地区并不适用。

本研究首次采用拟杆菌特异性 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 分析在微生物溯源方面进行研究。进行溯源分析过程中,该方法不同于传统的微生物溯源方法,不需要分离培养单菌落,直接以水样提取 DNA 为模板进行 PCR-DGGE 分析,节省了分离鉴定指示微生物这一过程中的耗时,操作也更为简便,利于该方法在微生物溯源的开展。从测序分析结果来看,各条带保持与拟杆菌最大相似性,说明采用的拟杆菌引物特异性强,该引物特异性能够满足研究的要求,保证了后续分析的可靠性。从 DGGE 分析获得图谱来看,各样品所得条带丰富度高,样品之间的差异性较为显著。条带的丰富度在一定程度上反应群落在水体中的多样性,同时与水体受污染程度呈现一定相关性。饮用水周围的池塘作为鱼塘使用,污染程度比饮用水高,分析的结果显示池塘水中拟杆菌的丰富度比饮用水高,与实际情况完全符合,反映了拟杆菌具备进行水体污染分析的潜质。

根据分析结果可知,4 号、9A 号池塘对 1 号及 2 号井水的污染贡献最大,结合实际采样情况来看,两个池塘在地理位置上靠近两个水井,4 号、9A 号池塘紧临猪舍,养殖废弃物直接排放于池塘中,污染较为严重,地下水流的相互渗透易使饮用水的水质受到影响,与分析所得的结果一致。采集水样时正值 4 号与 9B 号池塘之间进行换塘,因此 9B 池塘对饮用水水质的影响表现出一定的相关性。3 号池塘平时作为鱼苗养殖池塘使用,采样时正值该池塘进行晒塘,因此虽然其地理位置距离水井较近,并没有表现出对饮用水水质较大的影响。采样的实际情况与本文研究的溯源方法所得的结论完全符合,由此反映利用该方法进行微生物溯源所得分析结果是可靠的。

4 结论

(1)水体中检测到拟杆菌的存在说明饮用水受到

粪便的污染,微生物溯源的研究结果表明饮用水与周围池塘的样品之间表现出极大的相似性,说明周围池塘水造成了饮用水的污染。井水作为华南地区典型农村饮用水来源之一,这类饮用水可能正遭受着池塘水的污染,需要及时采取有效的管理和补救措施。

(2)本研究建立的利用拟杆菌的特异性引物 PCR-DGGE 溯源的方法首次通过拟杆菌群体差异分析进行微生物溯源,确定水体中污染来源的结果可靠,在实际过程中具有应用价值。

参考文献:

- [1] Stoner N, Dorfman M. Testing the waters: A guide to water quality at vacation beaches[EB/OL]. Natural Resources Defense Council (2007-08) [2010-12-08].
<http://www.nrdc.org/water/oceans/ttw/ttw2007.pdf>
- [2] Jiang S, Chu W, Olson B, et al. Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(4): 927-934.
- [3] Oyorzaly L, Tissier A, Bertrand I, et al. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water[J]. *Water Research*, 2009, 43(5): 1257-1264.
- [4] Ram J L, Ritchie R P, Fang J W, et al. Sequence-based source tracking of *Escherichia coli* based on genetic diversity of beta-glucuronidase[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33(3): 1024-1032.
- [5] Griffith J F, Weisberg S B, Mcgee C D. Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples[J]. *Journal of Water and Health*, 2003, 4(1): 141-151.
- [6] Huang X. Identification of putative geographic sources of bacterial pollution in Lake Erie by molecular fingerprinting[D]. Ohio: University of Toledo, 2007: 1-36.
- [7] Seurinck S, Verstraete W, Siciliano S D. Microbial source tracking for identification of fecal pollution[J]. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2005, 4(1-2): 19-37.
- [8] 冯广达, 邓名荣, 朱红惠, 等. 水体粪便污染的微生物溯源方法研究进展[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(12): 3273-3281.
FENG Guang-da, DENG Ming-rong, ZHU Hong-hui, et al. Microbial source tracking in fecal polluted water: A review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(12): 3273-3281.
- [9] Bernhard A E, Field K G. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S Ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1587-1594.
- [10] Fiksdal L, Maki J S, Lacroix S J, et al. Survival and detection of *Bacteroides* spp. Prospective indicator bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(1): 148-150.
- [11] Bernhard A E, Field K G. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*

- gy, 2000, 66(10):4571-4574.
- [12] Reischer G H, Kasper D C, Steinborn R, et al. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area[J]. *Applied Microbiology*, 2007, 44(4):351-356.
- [13] Okabe S, Okayama N, Savichtcheva O, et al. Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2007, 74(4):890-901.
- [14] Kildare B J, Leutenegger C M, McSwain B S, et al. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: a Bayesian approach[J]. *Water Research*, 2007, 41(16):3701-3715.
- [15] Fogarty L R, Mary A V. Comparison of *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for fecal samples from different animal species [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (10):5999-6007.
- [16] Esseili M A, Kassem I I, Sigler V. Optimization of DGGE community fingerprinting for characterizing *Escherichia coli* communities associated with fecal pollution[J]. *Water Research*, 2008, 42(17):4467-4476.
- [17] 赵兴青, 杨柳燕, 陈 灿, 等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究[J]. *生态学报*, 2006, 26(11):3610-3616.
- ZHAO Xing-qing, YANG Liu-yan, CHEN Can et al. Study on the microbial diversity in lake sediments by the method of PCR-DGGE[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(11):3610-3616.
- [18] Muyzer G, Wael E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3):695-700.

欢迎订阅 2012 年

《生态与农村环境学报》

《生态与农村环境学报》系环境保护部主管、环境保护部南京环境科学研究所主办的学术期刊,是中文核心期刊(GCJC)、中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊、中国学术期刊评价研究报告(RCCSE)核心期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),被中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)、中文社会科学引文索引(CSSCI)、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)、中国期刊全文数据库(CJFD)、中国核心期刊(遴选)数据库、CA、CABI、BA、BP、BD、UPD、GeoBase、ZR、EM、Scopus、AGRIS、中国农业文摘、中国生物学文摘等国内外重要刊库收录。系全国优秀环境科技期刊,江苏省优秀期刊,中国期刊协会赠建全国百家期刊阅览室指定赠送期刊。

本刊宗旨:及时报道生态与农村环境保护领域研究的动态、理论、方法与成果等。

主要栏目:研究报告、研究简报、研究方法、专论与综述、学术讨论与建议等。

主要内容:(1)区域环境与发展,包括生态环境变化与全球环境影响、区域生态环境风险评价、环境规划与管理、区域生态经济与生态安全等;(2)自然保护与生态,包括自然资源保护与利用,生物多样性与外来物种入侵,转基因生物环境安全与监控,生态保护、生态工程与生态修复,有机农业与农业生态等;(3)污染控制与修复,包括污染控制原理与技术、土壤污染与修复、水环境污染与修复、农业废物综合利用与资源化、农用化学品(以及化学品)风险评价与监控等。

主要读者对象:从事生态学、环境科学、农学、林学、地学、资源科学等研究、教学、生产的科技人员,相关专业的高等院校师生以及各级决策与管理人员。

本刊为双月刊,逢单月 25 日出版,A4 开本,每期定价 15.00 元,全年定价 90.00 元,公开发行,国内邮发代号 28-114,全国各地邮局均可订阅;国外由中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)负责发行,国外发行代号 Q5688。如漏订,可向本刊编辑部补订。

编辑部地址:江苏省南京市蒋王庙街 8 号

邮政编码:210042

电话:(025)85287036,85287052,85287053

网址:http://www.ere.ac.cn

E-mail:ere@vip.163.com,bjb@nies.org