

用 RISA 法评估地下水细菌群落结构差异及变化

田扬捷 杨虹* 李道棠 吴秀娟

(上海交通大学生命科学与技术学院 上海 200240)

摘 要 提出运用 RISA 法从细菌群落角度对垃圾填埋场地下水生态系统的空间异质性进行定量分析。RISA 图谱的相似度聚类分析表明:与随时间产生的变化相比,细菌群落在空间上的差异更大;同批取样不同位置和深度的地下水 RISA 图谱存在明显差异,整体在上在 60%~70% 相似度聚类。

关键词 空间异质性 细菌群落 RISA 地下水

中图分类号:Q938.1 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)05-0676-03

所有生态系统都表现出空间异质性的特点,这种空间异质是种群变迁、群落结构稳定、元素循环和能量流动等发生的基础^[1]。人们对空间异质性发生的程度尚知之甚少,多数情况下,对它的理解只停留于定性水平,定量描述空间异质性仍是一个有待发展的研究领域。

在相关软件^[2,3]辅助下,可以应用核糖体基因间区分析(ribosomal intergenic spacer analysis, RISA)方法^[4]利用细菌群落概览图谱间的相似度对生态系统的空间异质程度进行定量分析。RISA 以细菌 16S 和 23S rDNA 间隔片段(ITS)为研究对象,这一片段比 16S 和 23S rDNA 表现出更显著的序列尤其是长度特异性。ITS 片段的 PCR 扩增混合物用普通电泳即可分离并获得特异性的长度多态性图谱,这就是利用 RISA 概览图谱描述细菌群落的基本原理。本文采用 RISA 法对上海老港垃圾填埋场地下水细菌群落的空间异质性进行了定量评估。

1 材料和方法

1.1 样本采集

2002 年 11 月、2003 年 1 月和 5 月从上海老港垃圾填埋场 16 口环境监测井(井深和污染信息见图 2)进行了 3 批地下水取样。取样前先进行洗井,即抽空井内的水,待新鲜地下水渗出并稳定。洗井两次后用预先湿热灭菌的 500mL PVC 离心管取样,冰上运至实验室。

1.2 试剂和仪器

针对 ITS 片段的 PCR 引物由上海博彩生物公司(Biocolor)合成,碱基序列^[5]为 1406f:5'-TGC C/T)ACACACCGCCCGT-3'和 23Sr:5'-GGGTI(G/C/T)CCCCATTQ(A/G)G-3';凝胶染色剂:SYBR Gold(Molecular Probes, 荷兰);PCR 扩增仪:Gene Amp PCR System 2400(Applied Biosystems, 美国);垂直凝胶电泳仪:PROTEAN-II(BIO-RAD, 美国);凝胶成像系统:Gel-Doc2000(BIO-RAD)。

1.3 RISA 图谱分析

地下水样本的 DNA 提取方法参照文献[6], ITS 片段的 PCR 扩增采用 50 μ L 体系,含 2mmol/L Mg²⁺、200 μ mol/L dNTPs (each)、0.2 μ mol/L 引物(each)、2 μ L 模板 DNA、2.5U Taq 酶。酶的投加采用热启动方式即 94 $^{\circ}$ C 变性 3min 后于 80 $^{\circ}$ C 加 Taq 酶。循环条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 30s、47 $^{\circ}$ C 退火 30s、72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。扩增出的 ITS 混合物用 3.5% 的 1.5mm 聚丙烯酰胺凝胶(29:1)分离,每个加样孔加入 15 μ L 样品,电流 11mA,时间约 7~8h。电泳结束后采用比 EB 更敏锐的 SYBR Gold 进行凝胶染色,低速摇床避光染色 25min,脱色 25min。用凝胶成像系统拍照贮存。

所有凝胶图像用 Diversity Database 2.2.0 软件(BIO-RAD)进行转化、标准化处理以及相似度聚类分析,详细操作步骤参见软件使用手册。为了实现图谱的转化及标准化,加样时在凝胶外侧和每隔 4 个样品的加样孔加入分子量标记(Marker)作为分析修改的标准。图谱间基于 Pearson 相关系数和 UPGMA(Unweighted pair group method analysis)方法计算相似度矩阵和建立相似度树状图。

2 结果和讨论

A、B 和 C 为相同位置不同深度的 3 口井,分别反映 17m、7m 和 14m 深度的新鲜地下水。井孔内径 110mm,呈三角形排列,中心距为 0.5m。图 1 显示了这 3 口井 3 批样品的 RISA 概览图谱以及聚类分析结果。

聚类分析显示不同时间所取的同一监测井的样品被聚在一簇,这说明随着时间的推移,虽然每口井所含地下水环境微生物群落发生了一些变化,但仍具有一定的稳定性。而来自 3 口井的 RISA 图谱间仅以 69% 的相似度聚类,反映相同位置不同深度的微生物群落结构存在较大差异。图 1 的结果说明了与随时间产生的变化相比,细菌群落在空间上的差异更明显。

基金项目 国家自然科学基金资助(20377030)

* 通讯作者。Tel 86-21-54743342; Fax 86-21-54743343; E-mail: hongyang@sjtu.edu.cn

作者简介 田扬捷(1975-)男,江苏江都人,博士研究生,从事微生物分子生态学研究。E-mail: t-y-j@sjtu.edu.cn

收稿日期 2004-02-02,修回日期 2004-03-25

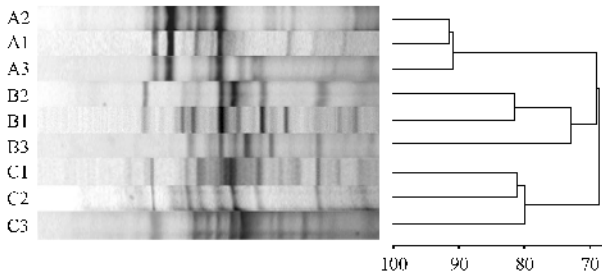


图 1 地下水样品 A, B 和 C 的 RISA 图谱及相似度聚类分析

Fig.1 Cluster analysis of RISA profiles of microbial communities in groundwater sample A, B and C.

A1, B1 and C1 were obtained in November 2002; A2, B2 and C2 were obtained in January 2003; A3, B3 and C3 were obtained in May 2003.

图 2 显示了 2003 年 5 月地下水样品的 RISA 图谱及相似度聚类分析结果。数据揭示同批取样不同位置和深度的地下水 RISA 图谱存在明显差异,整体在 64% 相似度聚类。研究发现,空间相距较近的样品 RISA 图谱并不一定比相距较远的样品间更相似,而且很难用聚类分析方法在样品的 RISA 图谱与所处环境的位置、深度及各种水化学参数之间找到相关性。另两批样品的 RISA 图谱整体上在 60% ~ 70% 相似度水平聚类,也反映了同样的结论(图略)。

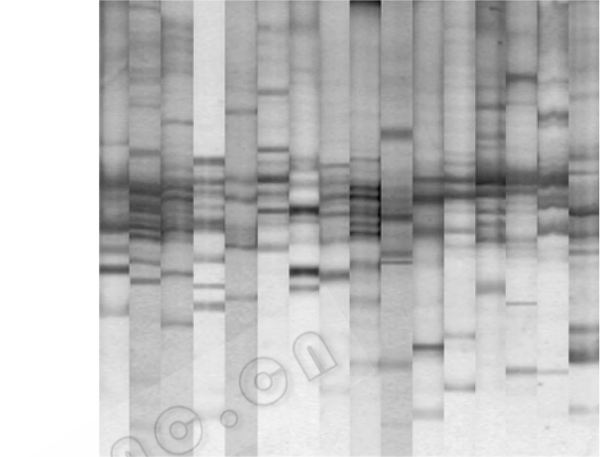
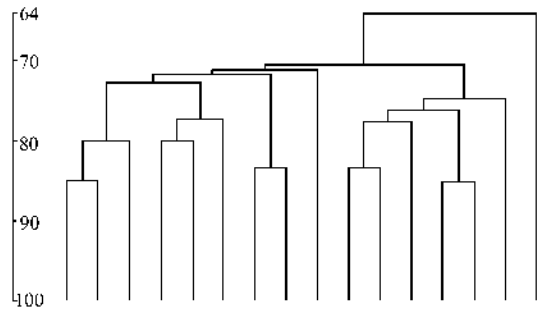
图 2 揭示了细菌群落在一个较大的尺度下的空间异质性,从中可以推测垃圾填埋场地下水含水层存在巨大的微生物多样性。由于空间异质性的存在,即使地下水的水化学参数一样,细菌群落的构成也呈现出极大的不均匀性和随机性,这就是难以用聚类分析将 RISA 图谱与这些参数加以相关的主要原因。我们认为细菌群落的空间异质性对于污染的降解是有利的,因为当垃圾渗沥液向地下环境扩散时,将会获得更多的机会接触到具有对应降解能力的合适细菌。

以上实验和分析过程初步肯定了 RISA 法可用于对生态系统的空间异质性从细菌群落角度进行定量分析。这种方法基于 DNA 来描述细菌群落,比起纯培养技术更能准确反映实际的情况。由于分子生物学操作尤其 PCR 反应会引起一定的偏差,因此所有样品被按照完全相同的步骤处理,以尽量使偏差发生的程度相同。除此之外,由于图谱相似度数值是样品间两两比较的相对值,样品的绝对偏差对相似度的影响会被部分抵消。

每个环境样本的 RISA 分析会产生由若干条带组成的特异性图谱,反映各自独特的细菌群落结构。对于复杂的图谱只有进行如上文所述的相似度聚类分析才能更好地比较样品间的差异和相关性。在计算相似度矩阵时,高度复杂的图谱可能造成条带分配的困难,本文用 Pearson 相关系数法主要依赖图谱间整条光密度曲线的比较,具有更好的适应性。

参 考 文 献

[1] 陈玉福,董 鸣. 生态学系统的空间异质性. 生态学报, 2003, 23(2): 346 - 351.



Samples: G3 Q3 S3 O3 T3 B3 A3 F3 R3 P3 L3 D3 C3 E3 K3 M3
Depth(m): 8.5 14 8.5 14 4 10 18 8 8.5 8.5 7 12 7 18.5 17 17
DOC (mg/L): 10.2 28.3 23.2 45.3 17.2 11.2 16.3 7.1 21.2 12.3 15.8 12.9 17.6 20.1 16.9 47.6

图 2 2003 年 5 月所取的地下水样品的 RISA 图谱及相似度聚类分析

Fig.2 Cluster analysis of RISA fingerprints of microbial communities in groundwater samples collected from different monitor wells in May 2003

DOC is abbreviation of dissolved organic carbon.

- [2] Cho J C, Kim S J. Computer-assisted PCR-single-strand-conformation polymorphism analysis for assessing shift in soil bacterial community structure during bioremediational treatments. *World J Microbiol Biot*, 2000, 16: 231 - 235.
- [3] Yu Z, Mohn W W. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and 16S ribosomal DNA sequencing. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 1565 - 1574.
- [4] Garcia-Martinez J, Acinas S G, Anton A I, et al. Use of the 16S - 23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J Microbiol Meth*, 1999, 36: 55 - 64.
- [5] Fisher M M, Triplett E W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 4630 - 4636.
- [6] Bond P L, Hugenholtz P, Keller J, et al. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 1910 - 1916.

Evaluation of Differences and Transition in Groundwater Bacterial Communities by Using Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA)

TIAN Yang-Jie YANG Hong* LI Dao-Tang WU Xiu-Juan

(School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) was applied for quantitative analysis of spatial heterogeneity in landfill leachate-polluted groundwater systems in terms of bacterial community. Computer-assisted cluster analysis of the RISA fingerprints indicated that the spatial differences in the bacterial communities were large relative to the temporal change. There was clear distinctness among the RISA fingerprints of samples collected at the same date but different locations and depths, and cluster analysis grouped them in one large cluster at a level of similarity of 60% ~ 70%.

Key words: Spatial heterogeneity, Bacterial community, RISA, Groundwater

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (20377030)

* Corresponding author. Tel 86-21-54743342; Fax 86-21-54743343; E-mail: hongyang@sjtu.edu.cn

Received: 02-02-2004

2005 年征订启事

《中国药学文摘》、中国药学文摘数据库网络版、光盘(2005 年)

中国药学文献数据网络系统即《中国药学文摘》刊物、数据库网络版、数据库光盘是国家科技部重点扶植、国家食品药品监督管理局主管的我国药学文献大型检索和查询系统。该系统于 1981 年创建,主要收载国内外公开发行的 700 余种药理学及相关学科期刊中的药学文献,以文摘、简介、题录等形式进行报道。

该系统内容涵盖药学各个领域,共设十二个栏目:药理学理论与发展动态、生药学和中药材、药物化学、药物生产技术、药剂学和制剂技术、药理学和毒理学、生物药剂学、药物分析、临床应用与药物评价、药品管理、制药设备和工厂设计及包装、药品和新药介绍等。该系统拥有近 32 万多条数据,本数据库每年以 3 万多条数据递增,且内容丰富,查询方便,可为医药生产、科研、教学、流通、医院药房、药店、情报和管理机构服务。该系统采用全新的系统结构和快速检索的新标引法,实现了对大容量、大范围全文本信息资料的零等待智能快速查询。根据实际工作需要,实现了库、刊、网为一体的服务系统,大大提高了查全率和查准率,即可全文检索,又可从文献类型、主题词、关键词等 12 个入口检索、查询。读者可分别从网络、光盘、文本三种途径查到所需要的文献。该系统曾获国家科技进步三等奖,文本版即国内外公开发行的杂志《中国药学文摘》曾多次获得有关部委的奖励(国家科委、国防科工委、中国科学院、中国科协、国家自然科学基金会五大部委的全国科技信息系统优秀成果二等奖、全国科技检索期刊一等奖、第二届全国优秀科技期刊评比三等奖、全国医药情报成果二等奖、第二届国家期刊奖百种重点期刊奖)。《中国药学文摘》为月刊,内容同中国药学文摘数据库,16 开本,每期 260 页左右,每期约 65 万字,全年 476 元。

《中国药品检验文摘》文本版每年两期,16 开本,每期正文 240 页左右,年报道最新信息量近 4500 条,90 万字,全年服务费 160 元。国家食品药品监督管理局信息中心为指导科研,服务医药,最新推出:

《动植物药有效成分提取分离和药理活性筛选汇编》(第一集)本汇编为大 16 开,近 160 万字,700 多页。

《中药资源调查开发利用资料汇编》(第一集),本汇编为大 16 开,近 160 万字,700 多页。

《药物新剂型产品、新辅料及新技术汇编》(第二集,分上下册)本汇编为大 16 开,文字 300 多万字,上册、下册各 600 多页。

《生物生化药品工艺与技术汇编》(第二集)本汇编为大 16 开,近 170 万字,700 多页。

订阅者可直接与国家食品药品监督管理局信息中心《中国药学文摘》编辑部联系。

开户名称:国家食品药品监督管理局信息中心;开户行:建设银行北京展览路支行;账号:6510003042610002517

发行部:北京市西城区北礼士路甲 38 号(邮编:100810)