

三氯乙烷污染地地下水中 *Dehalobacter* 属细菌 定量与多样性分析

靳利蕊¹ 张晓君^{1*} 李辉² 任红燕¹ 林匡飞² 刘勇第² 赵立平¹

(1. 上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

(2. 华东理工大学 资源与环境工程学院 国家环境保护化工过程环境风险评价与
控制重点实验室 上海 200237)

摘要:【目的】对某公司 6 个以 1,1,1-三氯乙烷(1,1,1-Trichloroethane, 1,1,1-TCA)为主要污染物的地下水样品中的降解微生物 *Dehalobacter* spp. (*Dhb*)进行相对定量和多样性分析。【方法】采用气相色谱法测定 6 个样品中 1,1,1-TCA、1,1-二氯乙烷(1,1-DCA)和氯乙烷(CA)的浓度;通过定量 PCR 法分别测定 6 个样品中 *Dhb* 占总菌的百分比;以 16S rRNA 基因通用引物和 *Dhb* 特异性引物扩增获得的 PCR 产物构建了 6 个样品的 *Dhb* 特异性克隆文库,所得序列与 GenBank 中的最相似序列构建系统发育树。【结果】6 个样品中均有 1,1-DCA 和(或) CA 的检出,推测此 6 处地下水中 1,1,1-TCA 可能存在生物降解。定量 PCR 结果表明,6 个样品中 *Dhb* 丰度差异较大。6 个 *Dhb* 特异性克隆文库获得 41 条序列,序列比对结果表明,与它们最相似的已知分类地位的序列全部属于 *Dhb* 属。这些序列按 99% 的相似性被划分成 7 个可操作性分类单元(OTU)。其中 24 条序列属于 OTU1,该 OTU 的序列与已知能降解 1,1,1-TCA 的 *Dehalobacter* sp. str. TCA1 的 16S rRNA 基因序列相似性达 98%;文库中的 3 个 OTU 与 GenBank 中 16S rRNA 基因序列同源性最高仅为 95%–96%。

【结论】该污染场地地下水中存在多样性较丰富的降解微生物 *Dehalobacter* 属细菌,它们可能与现场的 1,1,1-TCA 生物降解有关。

关键词: 1,1,1-三氯乙烷, *Dehalobacter*, 16S rRNA 基因克隆文库, Real-time qPCR, 生物降解, 多样性

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21177086, 41003130)

*通讯作者: Tel: 86-21-34204878; 信箱: xjzhang68@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2013-01-16; 接受日期: 2013-02-26

Diversity of 1,1,1-trichloroethane degrading *Dehalobacter* spp. in contaminated groundwater

JIN Li-Rui¹ ZHANG Xiao-Jun^{1*} LI Hui² REN Hong-Yan¹ LIN Kuang-Fei²
LIU Yong-Di² ZHAO Li-Ping¹

(1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science & Biotechnology,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Risk Assessment and Control on
Chemical Process, School of Resources and Environmental Engineering, East China University of
Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: [Objective] In order to study the diversity of *Dehalobacter* spp. from six 1,1,1-trichloroethane (TCA) contaminated groundwater samples. [Methods] The concentration of 1,1,1-TCA, 1,1-dichloroethane (DCA) and chloroethane (CA) of each sample was determined using gas chromatography. Real-time qPCR was performed on each sample to estimate the ratio of *Dehalobacter* spp. (*Dhb*) to the total bacteria. PCR products amplified by combining 16S rRNA gene universal primer and *Dehalobacter* group-specific primer were used to construct six *Dhb* group-specific clone libraries, respectively. Phylogenetic tree was constructed based on the sequences from the clone libraries and their nearest neighbors from GenBank. [Results] The existence of 1,1-DCA and (or) CA in the 6 samples may associate with 1,1,1-TCA biodegradation. Real-time qPCR results demonstrated that the ratio of *Dhb* to the total bacteria varied in each sample. In total 41 sequences were obtained from these 6 clone libraries and BLAST showed all their nearest sequences were affiliated to *Dhb*. These sequences were clustered into 7 operational taxonomic units (OTUs) at a threshold of 99% similarity. OTU1 (24 sequences) has a similarity of 98% with the 1,1,1-TCA reductively dechlorinating strain *Dehalobacter* sp. str. TCA1. Three other OTUs only has 95%–96% similarity with their nearest 16S rRNA gene sequences in GenBank. [Conclusion] This study demonstrated the existence of *Dhb* in all 6 samples with a relatively high diversity and these *Dhb* bacteria might be responsible for the biodegradation of 1,1,1-TCA in the groundwater of sampling sites.

Keywords: 1,1,1-Trichloroethane, *Dehalobacter*, 16S rRNA gene clone library, Real-time qPCR, Biodegradation, Diversity

三氯乙烷(1,1,1-Trichloroethane, TCA)是一种易挥发的氯代烃, 是公认的性能优异的金属清洗剂 and 高效溶剂, 曾被广泛应用于电子、机械、纺

织、制胶等工业, 还作为农业上的熏蒸剂和杀虫剂, 并常被用作干洗剂。1,1,1-TCA 可能具有致癌性, 还影响中枢神经系统、可致肝脏和肾脏损伤

等。1,1,1-TCA 密度比水大, 由于不合理的废水排放和意外泄漏等原因, 会很容易渗透到地下水系统并随之迁移, 而 1,1,1-TCA 化学性质非常稳定, 很难降解。因此, TCA 污染对生态系统和地下水安全造成严重威胁。我国已于 2010 年 1 月 1 日全部淘汰使用 TCA 作为溶剂, 但 TCA 的历史污染在短期内难以消除。

1,1,1-TCA 在自然条件下的转化主要分为非生物降解和生物降解^[1], 前者可将其转化为醋酸和 1,1-二氯乙烯(1,1-DCE)及 Cl^- , 后者则是通过一些微生物的还原脱氯作用, 使其得电子转化成 1,1-二氯乙烷(1,1-Dichloroethane, 1,1-DCA)或氯乙烷(Chloroethane, CA)及 Cl^- 。Sun 等分离了第一个可降解 1,1,1-TCA 和 1,1-DCA 的菌株 *Dehalobacter restrictus* str. TCA1^[2]。Groster 等对一个由 1,1,1-TCA 富集驯化的菌群 MS 构建了 16S rRNA 基因克隆文库, 发现文库中 27% 的克隆属于 *Dhb*^[3]。Yang 等发现一个 1,1-DCA 富集驯化的菌群中, *Dhb* 占绝对主导地位^[4]。大量研究表明, 来自 Peptococcaceae 科的 *Dehalobacter (Dhb)* 属细菌纯培养物或含有 *Dhb* 的混合培养物可催化 1,1,1-TCA 及 1,1-DCA 还原脱氯, 影响 1,1,1-TCA 和 1,1-DCA 的降解速率, 在其降解过程中起关键作用^[2-5]。*Dhb* 16S rRNA 基因特异性探针被用作生物标记物来评价 TCA 污染场地的生物降解潜能^[5-6]。有研究开始使用含有 *Dhb* 的菌群对 1,1,1-TCA 污染场地进行生物治理^[5]。然而迄今为止, *Dhb* 属只发现 1 个种 *D. restrictus*, 已分离的 *Dhb* 菌株只有 3 株, *D. restrictus* str. TCA1^[2]、*D. restrictus* str. PER-k23^[7] 和 *D. restrictus* str. TEA^[8], 且后面 2 株菌不能对 1,1,1-TCA 还原脱氯。Chen 等报道了用城市污泥成功对 1,1,1-TCA 实现生物转化, 但并未对该污泥进行菌群多样性分析^[9]。Klecka 等报道了某地下深层土壤和地下水对 1,1,1-TCA 的生物转化, 但并未对样品进行菌群

多样性分析^[10]。de Best 等报道了一个产甲烷菌群可将 1,1,1-TCA 转化成 CA, 但同样未对该菌群进行多样性分析^[11]。总之, 对 1,1,1-TCA 降解菌群, 尤其是 *Dhb* 的定量分析和多样性分析还远远不够。

本文研究了某 1,1,1-TCA 污染场地的地下水, 以 1,1,1-TCA 及其降解产物为目标污染物, 测定其污染浓度, 并对该地下水中的 *Dhb* 进行了定量分析和多样性分析, 为评价该场地的微生物降解潜能及对其进行微生物修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器和试剂

1.1.1 材料: 试验样品来自上海浦东某公司场地地下水污染调查时开挖的取样井。该公司自 1989 年建立以来, 主要生产汽车空调系统, 在其生产过程中, 曾经大量使用 1,1,1-TCA 对金属部件进行油污清洗。用贝勒管采集六口取样井中的地下水样, 迅速转入棕色瓶中, 瓶内保持厌氧, 并置于 4 °C 冰箱中短期保存, 用于后续分析。样品编号为 W1-W6。

1.1.2 主要仪器和试剂: 岛津 GC-2010; DM-AQUA 气相色谱柱(60 m×0.25 mm×1 μm), 迪马; TekmarHT3 顶空进样器; PCR 全套试剂, TaKaRa; PCR 仪, Bio-Rad; 荧光实时定量 PCR, BioEasy SYBR Green I Real Time PCR Kit; 荧光实时定量 PCR 仪, MJ Research, 配套软件为 Opticon Monitor 3; 1,1,1-TCA、1,1-DCA、CA 均为色谱纯。

1.2 样本有机物浓度及氯离子的测定

有机物浓度测定采用顶空 GC-FID 法。顶空进样器条件如下: 进样环容积: 1 mL; 顶空瓶压力: 68 947 Pa; 顶空温度: 50 °C; 进样环温度: 100 °C; 传输线温度: 100 °C; 平衡时间: 45 min; GC 循环时间: 35 min; 加压时间: 2 min; 放空时间: 0.20 min; 进样时间: 1 min。GC 分析条件如

下: 检测器: FID; 载气流量: 30 mL/min; 色谱柱流量: 3 mL/min; 进样口温度: 200 °C; 柱温: 40 °C; 检测器温度: 250 °C; 分流比: 10:1; 载气: N₂; 柱长: 60 m。氯离子浓度采用氯离子特异性电极(上海雷磁)以 PXJ-1B 型数字式离子计(江苏江分)进行测定。

1.3 6 个样品 DNA 的提取

1.1 中采集到的地下水, 先经 2 000×g 离心去样本中的泥沙等杂质, 得到的上清以 Liu 等的方法提取 DNA^[12]。

1.4 *Dhb* 特异性 PCR

采用 *Dhb* 特异性上下游引物 477f (5'-GATT GACGGTACCTAACGAGG-3')和 647r (5'-TACA GTTTC CAATGCTTTACGG-3')^[3]对 1.3 中得到的 6 个样品的 DNA 分别进行 *Dhb* 属细菌 16S rRNA 基因特异性扩增。本文使用 RDP-Release 10 中的 Probe Match 对该对引物的特异性和灵敏度进行了重新评估。

25 μL 扩增反应体系: 10×Buffer, 0.2 mmol/L dNTPs, 2 mmol/L MgCl₂, 0.75 U *Taq* 酶, 上下游引物各 12.5 pmol, DNA 模板量 10 ng。PCR 反应条件: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 63 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 45 个循环; 72 °C 10 min。以 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的片段大小。

1.5 *Dhb* 与总菌实时荧光定量 PCR

以 1.3 中 6 个样本的 DNA 为模板, 使用 Real-time qPCR 方法分别对 6 个样本中的 *Dhb* 和总菌进行相对定量检测。

1.5.1 *Dhb* 特异性实时荧光定量 PCR: 25 μL 反应体系: 1.5 U *Taq* 酶, 12.5 μL 2×SYBR green I mix, 上下游引物 DHB477f 和 DHB647r 均为 12.5 pmol, DNA 模板量 10 ng。扩增程序参考文献^[3]做了适当修改: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 63 °C 30 s, 72 °C 30 s, 83 °C 读板 5 s, 共 45 个循环; 72 °C 30 min; 熔解曲线 65 °C–95 °C 每 0.5 °C

读板 5 s。每个样本进行 3 次重复。

标准曲线的制备: 将 1.4 中得到的 PCR 产物纯化后, 采用 TA 克隆(pGEM-T easy vector system I, Promega, USA), 筛选阳性克隆用 T7 引物进行测序(上海美吉), 鉴定其为 *Dhb* 属, 与 *Dehalobacter* sp. str. PER-K23 16S rRNA 基因部分序列相似性为 100%。提取质粒后用作定量标准品。

1.5.2 总菌的实时荧光定量 PCR: 25 μL 反应体系同 1.5.1。总菌扩增引物为 Uni331F 和 Uni797R^[13]。扩增程序如下: 95 °C 4 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 80 °C 读板 5 s, 共 45 个循环; 熔解曲线 65 °C–95 °C, 每 0.5 °C 读板 5 s。每个样本进行 3 次重复。

标准曲线的制备: 采用本实验室含有 *Lactobacillus* sp. 16S rRNA 基因全长序列的质粒 DNA 作为定量标准品。

1.6 *Dhb* 特异性克隆文库的构建与序列分析

以 1.3 中 6 个样品提取的 DNA 作为模板, 以 16S rRNA 基因通用引物 27f^[14]和 DHB647r 为上下游引物, 对 6 个样品的 DNA 分别进行扩增。扩增体系同 1.4。PCR 反应条件: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。所得 PCR 产物纯化后用 T4 DNA 连接酶连接至 pGEM T-Easy 克隆载体(Promega), 转化到 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞中, 筛选阳性克隆, 分别用 T7 引物进行测序(上海美吉)。所得序列按相似性 99%为标准划分 OTU。采用 Good 等的方法计算克隆文库的库容, 计算公式如下: $[1-(n/N)] \times 100\%$, 其中 n 为单个克隆的 OTU 数, N 为总克隆数^[15]。Shannon-Wiener 多样性指数计算公式 $H' = -\sum P_i \ln P_i$ ($P_i = N_i/N$), 其中 N_i 为每个 OTU 的克隆数目, N 为文库中的总克隆数目^[16]。每个 OTU 选取一个代表序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 数据库中

BLAST, 寻找最相似序列。将每个 OTU 的代表序列及其在 GenBank 数据库的最相似的序列以 Clutser 和 MEGA 5.05 构建系统发育树 (Neighbor-Joining tree 法)。Bootstrap 分析进化树枝点处的统计学可信度。本研究所得的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号为 JQ757004–JQ757044。

2 结果与分析

2.1 6 个样本的有机物污染状况和氯离子浓度

6 个样本中 1,1,1-TCA, 1,1-DCA, CA 及 Cl⁻ 浓度测量结果见表 1。由表 1 可知, W1 样品和 W2 样品的 TCA 和 DCA 浓度远大于其它 4 个样品, W1 和 W6 的 Cl⁻ 浓度高于其它样品。

表 1 各样品中氯代烃与 Cl ⁻ 浓度 Table 1 Concentration of chlorinated hydrocarbon and Cl ⁻ in samples				
Samples	1,1,1-TCA (μg/L)	1,1-DCA (μg/L)	CA (μg/L)	Cl ⁻ (mol/L)
W1	75 866	54 757	111	0.076 8
W2	71 812	142 933	97	0.044 1
W3	8 612	5 155	3 407	0.003 6
W4	2 814	3 832	11	0.009 1
W5	2 167	7 235	5 678	0.002 8
W6	/	/	800	0.070 5

注: /: 低于检测限。
Note: /: Under detection limit.

2.2 6 个样品中 *Dhb* 的检测

通过使用 RDP-Release 10 中的 Probe Match, 选择不允许错配的条件下, 将引物对 DHB477f 和 DHB647r 与最新的 RDP 数据库中长度大于 1 200 bp 的所有 16S rRNA 基因进行比较, 发现与 DHB477f 完全匹配的序列均属于 *Dhb*。数据库中 *Dhb* 属中 81.3% 的 16S rRNA 基因能与该引物完全匹配。与 DHB647r 完全匹配的序列中 83.3% 属于 *Dhb* 属, 16.7% 属于与 *Dhb* 同科的 *Syntrophobotulus* 属。数据库中 *Dhb* 属中 78.1% 的 16S rRNA 基因能与该引物完全匹配。通过对已报道的文献中 *Dhb* 16S rRNA 基因特异性引物的比较, 经过对引物特异性和灵敏度的综合筛选, 发现此对引物具有较高的特异性和灵敏度, 后续的分析工作采用了这两个引物。

经过对 6 个样本的 DNA 分别进行 *Dhb* 特异性扩增(图 1), 发现 6 个样本均可扩增出长度为

171 bp 的 *Dhb* 特异性片段。证明 6 个采样井的地下水中都含有 *Dhb*。

2.3 6 个样本荧光实时定量分析结果

采用 1.5.1 中所得的质粒制作标准曲线, 稀释浓度从 10²–10⁹ Copies/μL, 得到 *Dhb* 特异性荧光实时定量 PCR 的标准曲线 *r*²=0.997。采用 1.5.2

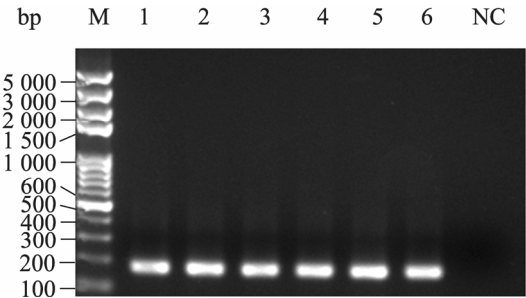


图 1 6 个样品 *Dhb* 特异性 PCR
Fig. 1 *Dhb* group-specific PCR result
注: M: DNA marker; 1–6: 地下水样品 W1–W6; NC: 阴性对照。
Note: M: DNA marker; 1–6: Ground water samples W1–W6; NC: Negative control.

中的质粒制作标准曲线, 稀释浓度从 10^2 到 10^9 Copies/ μ L, 得到总菌荧光实时定量 PCR 的标准曲线 $r^2=0.997$ 。将每 10 ng DNA 中 *Dhb* 的 16S rRNA 基因拷贝数除以总菌 16S rRNA 基因拷贝数, 得到各样品中 *Dhb* 在总菌中的百分比。结果表明各井样品中的 *Dhb* 细菌丰度差异很大(表 2), W2 含量最高, 为 31.5%; 而 W3 和 W6 两个样品的 *Dhb* 丰度仅为 0.1%。

2.4 *Dhb* 特异性克隆文库的构建与序列分析

所研究的 6 个样品分别构建了 6 个 *Dhb* 特异性克隆文库, 共测定了 41 条序列, 所有序列合并后按相似性高于 99% 的标准可划分为 7 个 OUT (表 3)。由表 3 可知 6 个样品的多样性差异较大, 其中 W1、W4 和 W5 样品的 *Dhb* 种类较单一。W2、W3 和 W6 样品的 *Dhb* 种类较其它样品丰富。

如图 2 所示, 在构建的 6 个 *Dhb* 特异性克隆文库中 OTU1 和 OTU2 是优势类型(含 5 个克隆以上), 分布在多口采样井中。样品 W6 中 OTU 类型最多, 多样性最高。OTU1 (24 个克隆)是总文库中丰度最大的 OTU, 占合并后序列总数的 58.5%, BLAST 和系统发育树表明 OTU1 与已知具有降解 1,1,1-TCA 能力的菌株 *Dehalobacter* sp. str. TCA1^[2] 的 16S rRNA 基因序列相似性为 98%, 与该属其它 2 株已知具有降解三氯乙烯和四氯乙烯能力的菌株 *Dehalobacter* sp. str. PER-K23^[7] 和 *Dehalobacter* sp. str. TEA^[8] 进化距离也较近, 相

似性均为 99%; 与来自降解三氯乙烯的菌群中未培养的克隆 YK19、来自降解三氯代苯菌群中未培养的克隆 SJA-47、来自降解 β -六氯化苯菌群中未培养的克隆 E1、来自降解 1,2-二氯丙烷菌群中未培养的克隆 SHA-67、SHD-11 进化距离也较近, 相似性均为 99%。OTU2 (8 个克隆)占合并后序列总数的 19.5%, 是文库中第二大优势 OTU, 与前述克隆 SHD-11 进化距离最近, 相似性为 100%; 与 *Dehalobacter* sp. str. TCA1 相似性为 98%。OTU4 和 OTU7 与 *Dehalobacter* sp. str. TCA1 相似性为 97%。OTU5 (2 个克隆)和 OTU6 (1 个克隆)与来自日本最北部第三纪断层边缘的微生物群落中的未培养克隆 HDBW-WB52 相似性最高, 均为 96%, 与前述克隆 E1 的序列相似性均为 94%。OTU3 (2 个克隆)与前述克隆 YK19 和克隆 E1 的相似性最高, 均为 95%。

该系统进化树还采用了与 *Dhb* 属同科的 *Desulfitobacterium* 属的两个菌株的序列, 它们对应菌株分别具有五氯苯酚和四氯乙烯还原脱氯的能力, 以 *Bacillus* 属菌株 DSM10 的序列作为外群。

表 2 各样品中 <i>Dhb</i> 相对定量结果						
Table 2 The relative percentage of <i>Dhb</i> to the total bacteria in each sample						
Samples	W1	W2	W3	W4	W5	W6
<i>Dhb</i> in total bacteria (%)	13.5	31.5	0.1	6.9	1.4	0.1

表 3 6 个 <i>Dhb</i> 特异性克隆文库的库容与多样性指数							
Table 3 Diversity index and coverage of six <i>Dhb</i> group-specific clone libraries							
Samples	W1	W2	W3	W4	W5	W6	Total
Number of clones	5	10	7	5	5	9	41
Number of OTUs	1	2	2	1	1	5	7
Good's coverage (%)	100	100	100	100	100	88.8	97.6
Shannon's index (<i>H</i>)	0	0.50	0.60	0	0	1.58	1.31

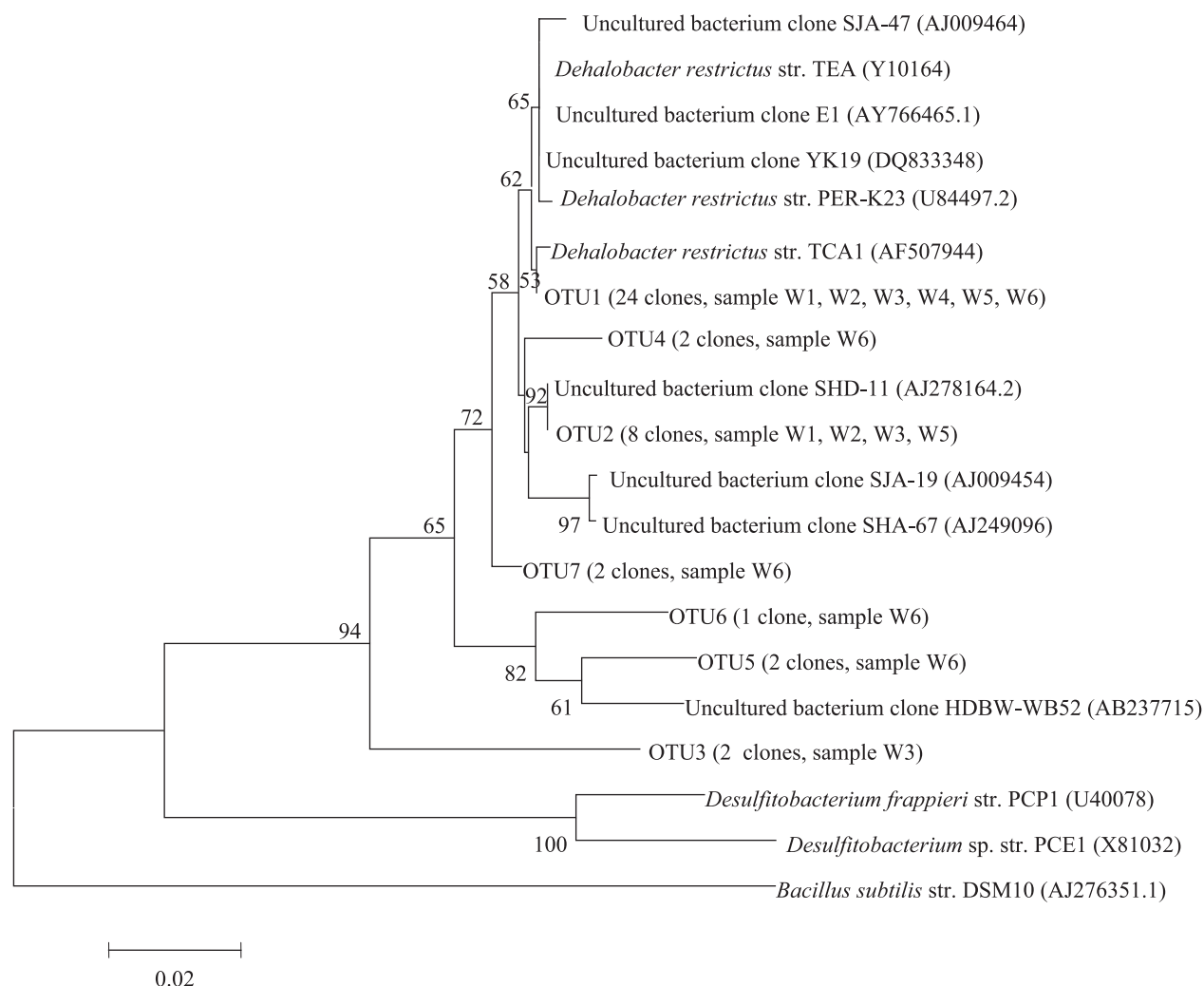


图2 6个克隆文库中 *Dhb* 细菌与 GenBank 中最相似序列构建的系统发育树

Fig. 2 Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among *Dhb* sequences in 6 clone libraries and their closely related sequences from GenBank

注: 每个 OTU 的克隆数目和来源都在括号中标出; 标尺代表 2% 进化距离。

Note: Number and the source of clones of each OTU were indicated in the parentheses. Scale bar length represents a 2% evolutionary distance.

3 讨论

样品的色谱检测结果表明, 6 个样品中均有 1,1,1-TCA 的生物降解产物 1,1-DCA 和(或) CA 的检出, 推测这 6 个取样井中 1,1,1-TCA 均可能发生了生物降解, 可能存在可降解 1,1,1-TCA 的微生物。 *Dhb* 特异性 PCR 和定量 PCR 结果表明 6 个样品中都存在 *Dhb*, 但 *Dhb* 在细菌中所占百分

比差异较大, 最高达 31.5% (样品 W2), 最低不足 1% (样品 W3 和 W6)。产生这种差异的原因很复杂, 在地下水中 1,1,1-TCA 作为环境外来化合物, 可抑制部分微生物的生长, 不能利用其降解并获得能量生长的细菌类型逐渐减少, 而一些能够通过对 1,1,1-TCA 还原脱氯, 并获得能量的微生物, 如 *Dhb* 就逐渐被富集。但如果地下水中同时存在其它有机物, 可利用这些有机物的细菌也可能会

生长。地下水有机物种类和浓度的不同、氧化还原电位不同、水文地质结构不同等因素, 都会影响 *Dhb* 的丰度。本研究结果显示 6 个地下水样品中的 Cl^- 浓度差异也很大, 可能是因为该场地地下积累的 1,1,1-TCA 在不同部位经过不同程度的降解所导致的。

6 个克隆文库获得的 41 条有效序列, 经 BLAST 比对分析后发现, 与它们最相似的已知分类地位的序列全部都属于 *Dehalobacter* 属。系统发育树显示, 文库中两个优势 OTU (OTU1 与 OTU2) 与 *D. restrictus* str. TCA1 相似性均为 98%, OTU4、OTU7 与 *D. restrictus* str. TCA1 相似性为 97%, 且上述 4 个 OTU 与来自降解三氯乙烯、三氯代苯、 β -六氯化苯、二氯丙烷菌群中的某些未培养克隆的相似性也很高, 表明本研究采样井中发现的 *Dehalobacter* 属细菌, 很可能具有 1,1,1-TCA 还原脱氯能力, 可能与 6 个采样井的地下水中 1,1,1-TCA 的生物降解有关。文库中 3 个非优势 OTU5、OTU6、OTU3 与 GenBank 中已有的 16S rRNA 基因序列同源性不高于 96%, 说明该地下水中还可能具有一些比较新颖的微生物资源, 它们可能为未知新种。样品 W6 中几乎不含有 TCA 和 DCA, 仅含有少量的 CA, 而这个样品中 *Dhb* 的多样性却是最高的, 包含 5 个 OTU, 这可能是由于 TCA 和 DCA 的去除降低了氯代烃对细菌的抑制作用; 但另一方面, *Dhb* 占总菌的比例在 W6 样品中却是最低的, 这可能是因为 TCA 与 DCA 的缺乏导致了 *Dhb* 底物的限制, 从而影响了 *Dhb* 的丰度。

许多研究在 1,1,1-TCA 或混合氯代烃的降解体系中人为添加电子供体, 如环氧大豆油(ESO)、乳酸盐、醋酸盐等, 促进 *Dhb* 纯培养物或含有 *Dhb* 的混合培养物还原脱氯的速率以达到污染治理的效果^[3,5,17]。还有文献报道, *Dhb* 纯培养物或者含有 *Dhb* 的混合培养物可以对氯代烯烃、氯代

烷烃、4,5,6,7-四氯苯酞、 β -六氯化苯、氯仿和二氯代苯进行还原脱氯作用^[18]。总之, 探索更多具有还原脱氯功能的 *Dhb* 菌株或菌群对治理氯代烃污染具有重要意义。本研究中克隆文库的建立, 为将来从该场地分离具有 1,1,1-TCA 还原脱氯功能的 *Dhb* 菌株或富集驯化 1,1,1-TCA 高效降解菌群奠定了一定的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Scheutz C, Durant ND, Hansen MH, et al. Natural and enhanced anaerobic degradation of 1,1,1-trichloroethane and its degradation products in the subsurface-A critical review[J]. Water research, 2011, 45: 2701–2723.
- [2] Sun BL, Griffin BM, Ayala-del-Rio HL, et al. Microbial dehalorespiration with 1,1,1-trichloroethane[J]. Science, 2002, 298: 1023–1025.
- [3] Grostern A, Edwards EA. A 1,1,1-trichloroethane degrading anaerobic mixed microbial culture enhances biotransformation of mixtures of chlorinated ethenes and ethanes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7849–7856.
- [4] Yang R, Sun BL. Physiological characterization of a microbial consortium that reductively dechlorinates 1,1-dichloroethane to chloroethane[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2009, 39: 83–89.
- [5] Duchesneau MN, Workman R, Baddour FR, et al. Combined *Dehalobacter* and *Dehalococcoides* bioaugmentation for bioremediation of 1,1,1-trichloroethane and chlorinated ethenes[C]//Proc. of the 9th International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, Baltimore, Maryland, May 2007. Battelle Press, ISBN 978-1-57477-161-9.
- [6] Postiglione J, Ferry M, Quandt L, et al. Bioremediation of TCE and TCA in groundwater by lactate injection[C]//Proc. of the 5th International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds Monterey, California,

- May 2006. Battelle Press, ISBN 1-57477-157-4.
- [7] Holliger C, Hahn D, Harmsen HJM, et al. *Dehalobacterrestrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration[J]. Archives of Microbiology, 1998, 169: 313–321.
- [8] Wild A, Hermann R, Leisinger T. Isolation of an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates tetrachloroethene and trichloroethene[J]. Biodegradation, 1996, 7: 507–511.
- [9] Chen C, Ballapragada BS, Puhakka JA, et al. Anaerobic transformation of 1,1,1-trichloroethane by municipal digester sludge[J]. Biodegradation, 1999, 10: 297–305.
- [10] Klecka GM, Gonsior SJ, Markham DA. Biological transformations of 1,1,1-trichloroethane in subsurface soils and ground water[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1990, 9(12): 1437–1451.
- [11] de Best JH, Hage A, Doddema HJ, et al. Complete transformation of 1,1,1-trichloroethane to chloroethane by a methanogenic mixed population[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51: 277–283.
- [12] Liu BB, Zhang F, Feng XX, et al. *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 55: 274–286.
- [13] Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, et al. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set[J]. Microbiology, 2002, 148: 257–266.
- [14] Grifoni A, Bazzicalupo M, Di Serio C, et al. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1995, 127: 85–91.
- [15] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. Biometrika, 1953, 40: 237–264.
- [16] Krebs CJ. Ecological Methodology[M]. New York: Harper and Row Publishers, 1989.
- [17] Grostern A, Edwards EA. Growth of *Dehalobacter* and *Dehalococcoides* spp. during degradation of chlorinated ethanes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72: 428–436.
- [18] Justicia-Leon SD, Ritalahti KM, Erin Mack E, et al. Dichloromethane fermentation by a *Dehalobacter* sp. in an enrichment culture derived from Pristine River sediment[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78: 1288–1291.