

doi: 10.12029/gc20190206

何泽, 宁卓, 黄冠星, 刘丹丹, 张千千, 孙继朝. 2019. 太行山前平原浅层地下水污染的分子生物学响应特征——以滹沱河流域为例[J]. 中国地质, 46(2): 290–301.

He Ze, Ning Zhuo, Huang Guanxing, Liu Dandan, Zhang Qianqian, Sun Jichao. 2019. The response characteristics of microbial diversity to shallow groundwater contamination in the piedmont of the Taihang Mountains using molecular biotechnologies: A case study of groundwater of Hutuo River Basin[J]. *Geology in China*, 46(2): 290–301(in Chinese with English abstract).

太行山前平原浅层地下水污染的分子生物学响应特征 ——以滹沱河流域为例

何泽^{1,2}, 宁卓^{1,2}, 黄冠星^{1,2}, 刘丹丹³, 张千千^{1,2}, 孙继朝^{1,2}

(1. 中国地质科学院水文地质环境地质研究所, 河北 石家庄 050061; 2. 中国地质调查局/河北省地下水污染机理与修复重点实验室, 河北 石家庄 050061; 3. 中国地质调查局水文地质环境地质调查中心, 河北 保定 071051)

摘要: 分子生物学技术是地下水污染研究的前沿技术, 常用于场地尺度, 区域尺度罕见。以太行山前平原滹沱河流域的典型浅层地下水为研究对象, 沿河布点采样 67 组, 采用高通量测序技术, 测定样品 16S rDNA 基因序列, 以化学需氧量、硝酸盐、溶解性总固体为环境因子, 分析与污染相关的微生物种群结构响应及功能性指示菌属。结果显示: 采用累积概率分布法将样品分为背景(B)、硝酸盐污染(N)、有机污染(Y) 3 组, 该分类阈值与地下水质量标准的 III 类水阈值可较好对应; 微生物群落丰富度为 B 组 > N 组 > Y 组, 有机污染使微生物种群趋于单一, 且与背景差异更大。有机污染功能性指示菌属为 *Acinetobacter*, 硝酸盐污染为 *Nitrospira*。以上形成的分子生物学响应特征研究方法可为区域调查及修复提供技术方法理论依据。

关键词: 滹沱河; 浅层地下水; 硝酸盐污染; 有机污染; 分子生物学

中图分类号: P641 文献标志码: A 文章编号: 1000-3657(2019)02-0290-12

The response characteristics of microbial diversity to shallow groundwater contamination in the piedmont of the Taihang Mountains using molecular biotechnologies: A case study of groundwater of Hutuo River Basin

HE Ze^{1,2}, NING Zhuo^{1,2}, HUANG Guanxing^{1,2}, LIU Dandan³, ZHANG Qianqian^{1,2}, SUN Jichao^{1,2}

(1. *Institute of Hydrogeology and Environmental Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Shijiazhuang 050061, China;*
2. *Key Laboratory of Groundwater Remediation, China Geological Survey, Hebei, Shijiazhuang 050061, China;* 3. *Center for Hydrogeology and Environmental Geology, China Geological Survey, Baoding 071051, Hebei, China*)

Abstract: In the groundwater contamination research, molecular biotechnologies are one of the cutting-edge technologies. This kind of technologies have been commonly used at site scale, but rarely applied at regional scale. The shallow groundwater in Hutuo River Basin was selected as the study subject, because of it is one of the typical regions in front of the Taihang Mountains. 67

收稿日期: 2018-09-15; 改回日期: 2019-02-19

基金项目: 中国地质调查局地质调查项目(DD20160309)、国家自然科学基金资助项目(41602261)、中国地质科学院基本科研业务费专项经费(SK201702)及河北省自然科学基金资助项目(D2016504021)联合资助。

作者简介: 何泽, 男, 1981 年生, 高级工程师, 长期从事场地自然衰减、区域微生物调查工作; E-mail: heze25@163.com。

samples were collected along the river. The 16s rDNA gene sequences were tested by high-throughput sequencing technology. According to the environmental factors of NO_3^- , COD and TDS, the microbial communities and the functional indicator microorganisms related to groundwater contamination were studied. The results showed that, using the cumulative probability distribution method, the samples were divided into three groups: background (B group), nitrate pollution (N group), and organic pollution (Y group). This grouping rule was close to the III water grade threshold in the quality standard of groundwater. The order of microbial community richness is B group > N group > Y group. The organic pollution could decrease the richness diversity of microbial communities, and the difference was more significant in comparison with background microorganisms. The functional indicator microorganisms related to organic pollution was *Acinetobacter*, and the functional indicator microorganisms related to nitrate pollution was *Nitrospira*. The molecular biotechnologies and analysis methods used in this research could provide the theoretical evidence for regional environmental investigation and bioremediation.

Key words: Hutuo River basin; shallow pore groundwater; nitrate pollution; organic pollution; molecular biotechnologies

About the first author: HE Ze, male, born in 1981, senior engineer, engages in research on natural attenuation and microbial investigation; E-mail: heze25@163.com.

Fund support: Supported by China Geological Survey Program (No. DD20160309), National Science Foundation of China (No. 41602261), Fundamental Research Funds for Central Public Welfare Research Institutes, CAGS (No. SK201702) and Natural Science Foundation of Hebei Province (No. D2016504021).

1 引言

虽然南水北调工程缓解了华北平原饮用水紧张的情况,但浅层地下水仍是该地重要的饮用水源,其应急供水功能非常重要(张兆吉等, 2009)。地下水污染调查发现,该区域的浅层地下水已受到“三氮”、有机物的持续污染(石建省等, 2011;李亚松等, 2012;马震等, 2017),呈现由点源污染向面源污染发展的趋势,已影响到其作为饮用水源的功能,应引起足够的重视。

目前中国的地下水污染调查工作中,多使用现场7项、无机28项、有机36项指标描述地下水水质(文冬光等, 2008),其中微生物指标(总大肠菌群和细菌总数)仅2项(DZ/T 0288-2015),无法完全揭示地下水环境中微生物对各种污染物的响应特征。研究表明,微生物是地下水环境中极为重要的组成部分,可将有机物等为电子供体、以硝酸盐等无机物为电子受体进行生命活动,是浅层地下水污染演变、自然衰减地球化学过程的主要参与者(John and Rose, 2005; Casci, 2010),其存在和种群结构演变不仅可以指示地下水环境的变化(Macler and Merkle, 2000),还可一定程度上净化地下水污染,如有机污染(Bradley, 2000)、硝酸盐污染等(Groffman et al., 1996)。故针对微生物种群结构对污染的响应特征,已开展了大量研究(Watanabe et al., 2000; Bekins et

al., 2001; Kate and Kristin, 2005),主要使用的检测方法为分子生物学技术。分子生物学技术是近十几年来发展起来的微生物检测技术,主要包括变性梯度凝胶电泳(Hendrickx et al., 2010)、高通量测序(Abbai and Pillay, 2013)、宏基因组测试(Kao et al., 2016)等针对微生物种群结构的检测技术,以及实时荧光定量PCR(Fout et al., 2016)、数字PCR(Xue et al., 2018)等针对微生物功能基因数量的检测技术。国际上,这些技术已经在污染场地环境监测(Karczewski et al., 2017)、自然衰减(Wright et al., 2017)、强化生物修复(Safonov et al., 2018)等领域广泛应用。但在中国污染场地针对微生物群落结构,应用分子生物学技术进行的研究较少,如有个别学者在国内某石油类污染场地应用高通量测序技术评估了地下水污染条件下,微生物种群结构与污染物间的空间响应特征(Ning et al., 2018),在某石油污染场地应用变性梯度凝胶电泳技术研究了自然衰减条件下,微生物群落结构、活性与水化学指标间的响应关系(Zheng et al., 2016)。区域尺度的报道仅限小流域(2 km左右)的微生物空间差异分析,且未与污染指标建立联系(黄小兰等, 2010)。大尺度区域下,应用分子生物学技术研究微生物种群结构与污染间的响应关系则尚未见报道。

本研究以太行山前平原典型的浅层地下水为研究对象,在滹沱河流域冲洪积扇中上部沿河流向

进行布点采样,使用高通量测序技术测定微生物种群结构信息,结合污染水质指标测试数据,应用累积概率分布法并参考地下水质量标准,将样品分为背景(B)、硝酸盐污染(N)、有机污染(Y)3组,分析不同组别微生物的群落结构特征对污染相关环境因子的响应关系,确定了与污染相关的功能性指示微生物,为浅层孔隙地下水环境调查评估及微生物修复提供技术方法和理论支持。

2 水文地质背景

研究区位于滹沱河冲洪积扇的中上部,研究区内河段长度约150 km,面积约为6500 km²。滹沱河发源于山西繁峙县东部,是海河流域子牙河水系的干流之一,自西向东流入石家庄市的主要水源地岗南水库和黄壁庄水库,再通过引水渠道和石家庄市的水网连为一体(叶浩等,2008)。区域内主要含水层为第四系多层型含水层系统,上层包气带渗透性好,浅层地下水易受地表污染影响。浅部含水层岩性主要为砾石、卵石、粗砂、中细砂,导水性及富水性好,地下水埋深30 m左右(费宇红等,2010;郭海朋等,2017)。

研究区浅层地下水补给来源主要为大气降水入渗补给及河流侧向补给,受地形条件影响,区内地下水总体上由西北向东南方向迁移,径流条件良好。区内地下水的排泄以人工开采为主,已形成降落漏斗,地下水蒸发量微乎其微,故地表污染极易随大气降水进入浅层含水层,且运移较快,较易形成较大面积污染(张云等,2007;张兆吉等,2012)。

研究区地下水化学类型主要为重碳酸钙镁型,近年来该区浅层地下水化学环境发生了显著的变化。矿化度、总硬度总体呈上升趋势,氯化物、硫酸根离子含量略微增加,与污染相关的硝酸根等离子则有显著增加(张千千等,2017)。

3 样品分析方法

3.1 样品采集及运输储存

2016年6—8月,沿滹沱河冲洪积扇中上部的地下水流向,采集了地下水样品67个。布点原则为:(1)覆盖滹沱河冲洪积扇中上部大部分面积,使数据反映该区整体微生物多样性特征;(2)在易产生硝酸盐污染的养殖场、连片农田;(3)易发生有机污

染的工厂周边加密布点,重点研究硝酸盐污染、有机污染对地下水微生物多样性的影响。具体布点见图1。

采样井一般为农田灌溉井或养殖场、工厂自备井,取水深度为30~60 m。采样前按照区域地下水污染调查评价规范进行洗井、现场测试,测试数据稳定后采集样品。采样选择5 L超纯水塑料桶,采集时弃去超纯水,并用待采地下水清洗三遍后将水桶灌满,密封。采集的样品置于4℃保温箱中,在1~2 d内运输到实验室进行抽滤等预处理。抽滤采用高温灭菌的孔径0.22 μm,直径50 cm的聚四氟乙烯(TPFE)微孔滤膜,每张滤膜过滤2 L样品,置于一次性无菌培养皿中保存,统一存放于-86℃冰箱中,以备提取DNA等后续工作。

3.2 样品测试

(1)高通量测序:利用MP的FastDNA™ Spin Kit for Soil试剂盒进行样品DNA提取,取一张滤膜在冰上融化,用无菌剪刀剪碎,置于试剂盒提供的珠磨离心管中,按照说明书进行DNA提取。利用1%琼脂糖凝胶电泳对DNA质量进行检测,使用Nano Drop 2000进行DNA浓度测定。PCR扩增及后续测序采用国际地球微生物计划中推荐使用的16S rDNA扩增引物序列(<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/>),目标片段可兼顾细菌和古菌。上游引物为515FB(GTGYCAGCMGCCGCGGTAA),下游引物为806RB(GGACTACNVTGGGTWTC TAAT)。试剂为TransGen AP221-02: TransStart Fastpfu DNA Polymerase,扩增仪为ABI GeneAmp® 9700型,扩增体系为20 μL。将扩增后的产物进行回收,利用上海美吉生物医药科技有限公司的Illumina Miseq测序平台进行测序。

(2)水质指标测试:常规水质指标包括溶解性总固体(TDS)、硝酸盐(NO₃⁻)、化学需氧量(COD);其检测均根据中国生活饮用水卫生标准检验方法(GBT 5750.6.2.1-2006),委托自然资源部地下水矿泉水及环境监测中心测试。

3.3 数据分析方法

样品污染类型分组:根据水化学测定的化学需氧量(COD)、硝酸盐(NO₃⁻)、溶解性总固体(TDS)浓度,将采集的样品分为有机污染组(Y)、硝酸盐污

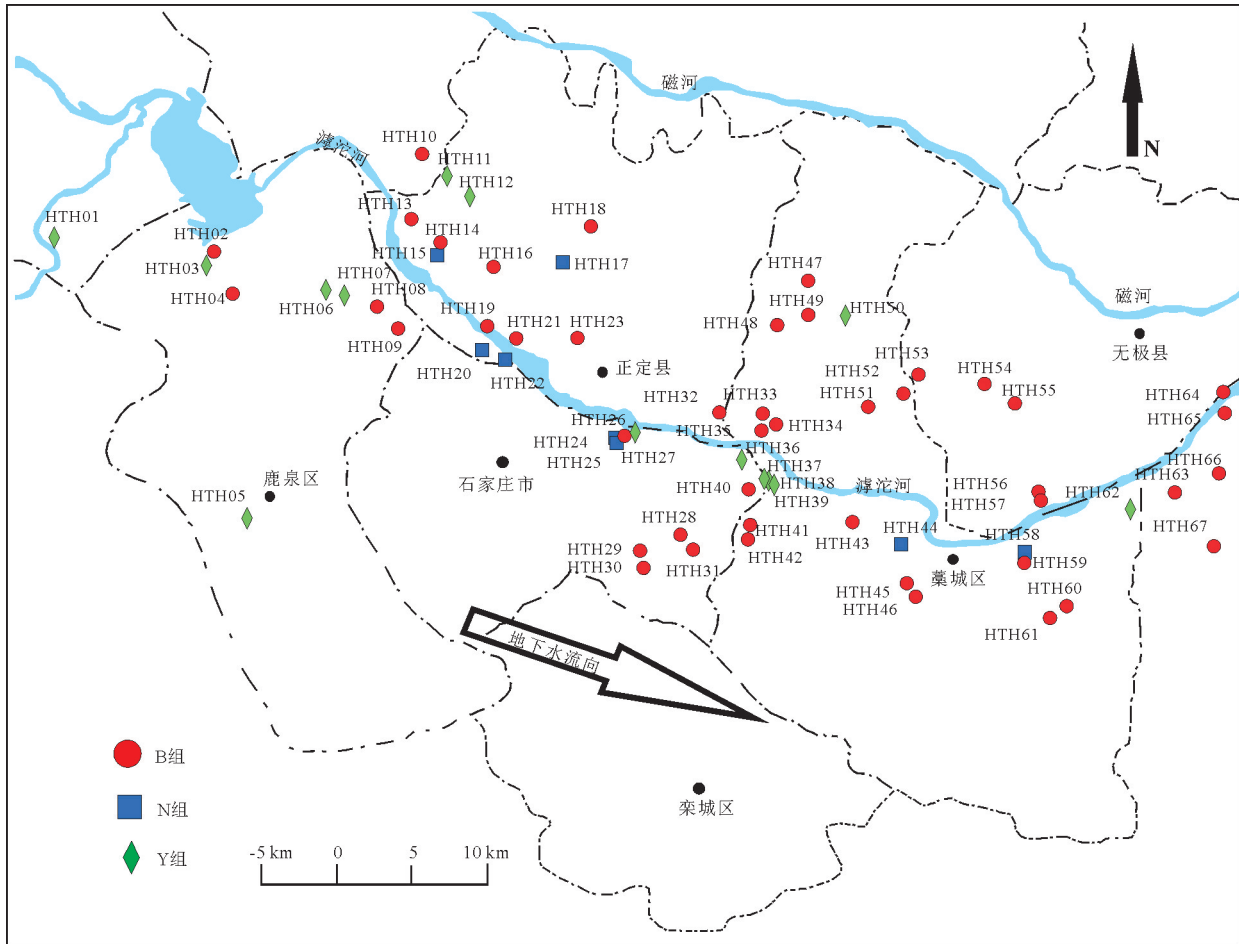


图1 滹沱河流域地下水采样布点图(B组为背景点;N组为硝酸盐污染点;Y组为有机污染点)

Fig.1 The distribution of groundwater sampling in Hutuo River Basin(Group B contained background samples; Group N contained nitrate pollution samples, and Group Y contained organic pollution samples)

染组(N)及未污染背景组(B)。分组阈值的筛选主要基于各指标累积概率曲线的拐点(宁卓等, 2018)当有多个拐点时,结合地下水质量III类标准进行选择。

结果可靠性检验: Miseq高通量测序得到的PE reads根据overlap关系进行拼接,同时对序列质量进行质控和过滤,并按照最小样品序列数进行抽平处理(Chen et al., 2016)。抽平后,采用稀释曲线(Rarefaction)分析对测序结果可靠性进行检验(Ye et al., 2017);采用基于Bray-curtis距离算法的Anosim分析,对分组方案的可靠性进行检验(Leung et al., 2016);继而,使用层级聚类(Hierarchical clustering)分析在OTU水平上,对样品分组进行分类比较,距离算法采用bray_curtis,样品层级聚类方式为Average(Jin et al., 2017)。

微生物群落结构分析:在OTU水平上进行了

Alpha多样性分析和Beta多样性分析。Alpha多样性分析主要有反映测序覆盖度的Coverage指数,反映群落丰富度的chao、ACE和sobs指数,以及反映群落多样性的shannon和simpson指数(Rogers et al., 2016)。Beta多样性分析采用Weighted unifracc距离算法的主坐标分析(PCoA)(Spor et al., 2016)。采用RDP classifier贝叶斯算法对97%相似水平的OTU代表序列进行分类学比对,物种分类数据库为silva128/16S,分类置信度设为0.7。基于该分类,在属(genus)水平上进行了韦恩图分析(Ji et al., 2017)。

污染相关的功能性指示菌属分析:首先进行了代表性菌种分析,该分析包括群落组成分析及组间差异显著性检验。群落组成分析以各组样品物种丰度的中位数进行计算;组间差异性检验利用单因素方差分析(One-way ANOVA),在属水平上,对样

品进行了组间差异显著性检验分析,其中,显著性 p 值多重检验校正方法采用 fdr , CI 计算方法采用 $scheffe$ (Song et al., 2017)。其次,为分析代表性菌种与污染环境因子间的响应,确定功能性指示微生物,对分组样品进行了典型关联分析(CCA)(Shen et al., 2016)。最后,比对已有研究,对功能性指示微生物的对地下水污染的指示作用进行了分析印证。以上分析在I-sanger云平台(<http://www.i-sanger.com/>)完成。

4 结果分析与讨论

4.1 样品污染类型分组

绘制67个样品 NO_3^- 和COD浓度的累积概率曲线如图2所示。

从图2a中看出,COD的第一个拐点为1 mg/L,此拐点恰为地下水质量标准的I类和II类阈值,第二个拐点为3.0 mg/L,为地下水质量标准III、IV类的阈值; NO_3^- 也存在两个拐点,分别为58.5 mg/L和98.3 mg/L,此拐点接近地下水质量标准II类与III类、III类与IV类的阈值(即59.1 mg/L,88.6 mg/L),考虑到III类以上水不再适合饮用,本研究选取III类水标准阈值COD 3.0 mg/L, NO_3^- 为88.57 mg/L作为硝酸盐污染组(N组)、有机污染组(Y组)的分类依据,进行样品分组,其余样品为背景组(B组)。

4.2 结果可靠性检验

通过对采集水样中细菌、古菌进行测序,67个样品共获得原始序列3739825条,过滤掉低质量的序列后,共获得有效序列总数为3056497条,平均每

个样品序列49298条,每条序列长度平均为250.76 bp。为了使数据标准化,按照各样品中序列最低数量14503条,对样品序列进行抽平处理后,再将有效序列进行分类学比对,统计得知67个样品共产生13013个OTU。

对样品进行稀释曲线(Rarefaction)分析,评价测序量是否足以覆盖所有类群。67个样品的sobs及shannon稀释曲线见图3。由图可见,各样品的稀释曲线已趋于平缓,即使再增大测序数据量对OTU的发现也没有贡献,说明样品的OTU覆盖度已基本饱和,测序数据量及抽平结果合理,具有很高的可信性。

为了检验本研究分组方案是否可靠,采用基于Bray-curtis的Anosim分析进行检验,主要是分析组间的差异是否显著大于组内差异,从而判断分组是否有意义。经过Anosim分析,得到该分组方案的 R^2 值为0.28, p 值为0.001,说明其组间差异显著大于组内差异($p < 0.05$)且解释度较高($R^2 > 0.25$),此分组方案具有很高的可靠性。

根据各样品分组,采用层级聚类将样品进行分析如图4。由图可见,有机污染Y组样品在进化树中基本聚集在三处,硝酸盐污染N组样品聚集在两处,其余为背景组样品,且Y组样品与N组样品的亲缘关系较远,说明本研究的分组方案较好的区分了背景、有机污染及硝酸盐污染样品,可进行后续相关分析。

4.3 样品微生物群落结构分析

首先,为了明确该区域微生物种群结构多样性与有机污染、硝酸盐污染是否具有响应关系,本研

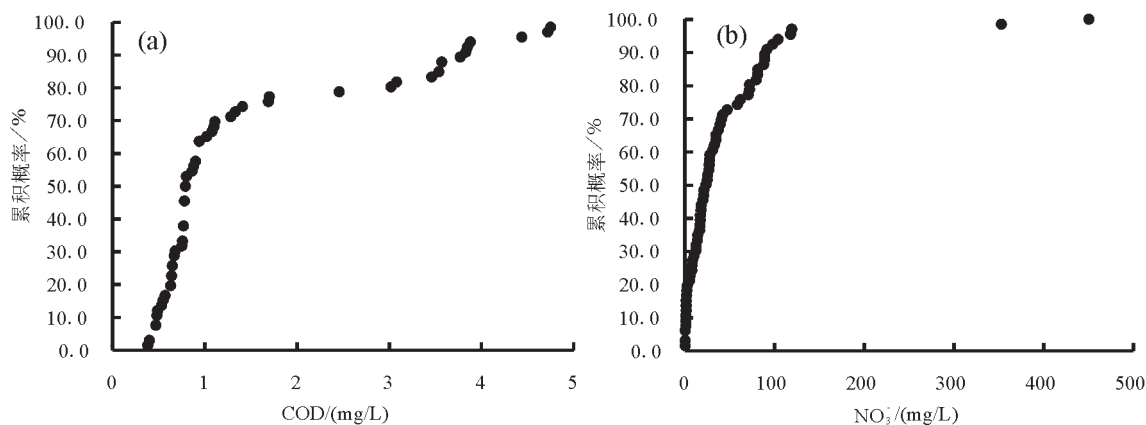


图2 累积概率曲线分析

Fig.2 Cumulative probability curve analysis

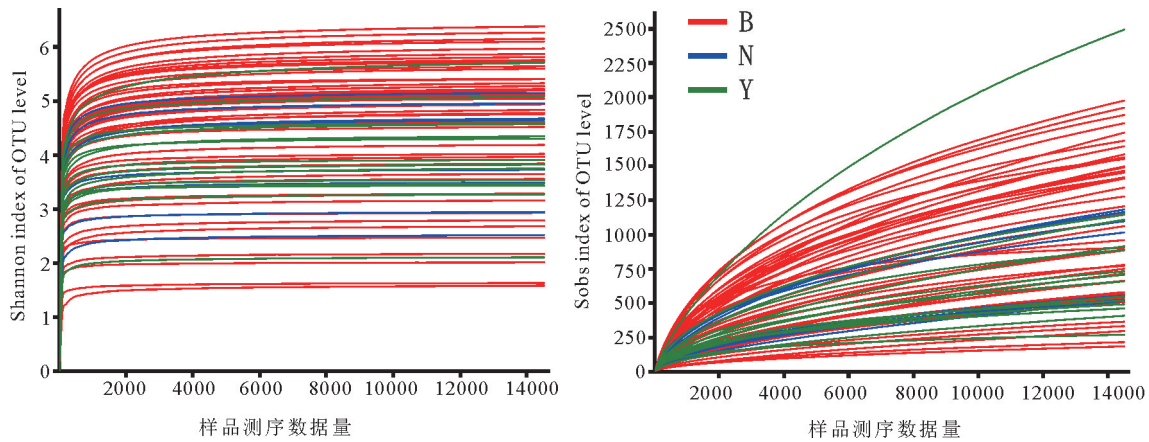


图3 相似度为 97%条件下各样本的稀释曲线
Fig.3 Rarefaction curves of each sample at cutoff level of 3%

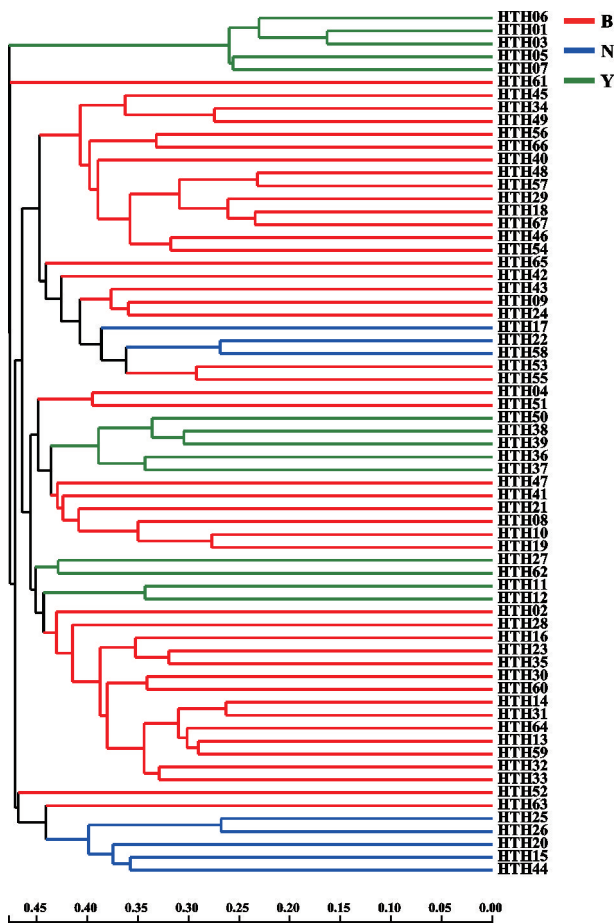


图4 样品层级聚类分析(OTU水平)
Fig.4 Hierarchical clustering tree on OTU level

究进行了 Alpha 多样性分析、Beta 多样性分析及物种韦恩图分析。

Alpha 多样性指数分析可展示样品中物种的覆

盖度 (Community coverage) 丰富度 (Community richness) 和多样性 (Community diversity) 等物种多样性信息,具体数据见表 1。Coverage 指数反应测序结果对群落的覆盖度,3 个分组 B、N、Y 的 Coverage 指数均值均为 0.97,展示本次测序对群落的覆盖度好,数据可靠性高。

Chao、ACE 和 sobs 指数用于分析群落物种丰富度,它的数值越大,表示样品所包含的物种种类越丰富。总体上看,3 个分组的 Chao、ACE 和 sobs 指数的均值为 B 组 > N 组 > Y 组,说明背景组的物种最为丰富,而受硝酸盐污染、有机污染影响,样品所包含物种的丰富度依次降低,说明能在污染环境中存活的物种种类较背景环境变少。

Shannon 和 Simpson 指数是反映样品物种多样性的两个指数,它们不仅反映物种丰富度,还指示了物种的均匀度。它们的数值越大,表示该样品中的物种种类越多且分布越均匀(Feng et al., 2017)。Shannon 指数对物种丰富度更敏感,而 Simpson 指数对物种均匀度更为敏感(Zhou et al., 2002)。将 3 组样品相比较,Shannon 指数的均值 B 组 > N 组 > Y 组, Simpson 指数均值为 N 组 > B 组 = Y 组。这说明在物种丰富度方面,与 Chao、ACE 和 sobs 指数得到的结果一致,而 N 组具有较高的物种分布均匀度,组内不同物种在个体数量上更为接近。

Beta 多样性(Beta diversity) 分析结果较 Alpha 多样性分析更为直观,本研究使用 Weight UniFrac 距离算法进行 Beta 多样性主成分分析(PCoA),该算法不仅体现了各类别物种的丰富度差异,还包含样

表1 样品 Alpha 多样性指数(每组均值)
Table 1 the Alpha-diversity of samples

分组	Coverage	Chao	ACE	sobs	Shannon	Simpson
B	0.97 a	1678.83 a	1988.46 a	1089.64 a	4.49 a	0.08 a
N	0.97 a	1429.38 b	1901.63 a	819.25 b	4.01 a	0.09 a
Y	0.97 a	1342.39 b	1691.55 b	807.07 b	3.99 a	0.08 a

品之间物种类别差异。分析结果见图5,由图可见,第一轴、第二轴的解釋度分别为20.19%及13.95%。Y组(有机污染)样品主要聚集在第二象限,与B组(背景)及N组(硝酸盐污染)的多样性差异较大,说明Y组具有明显不同于B、N组的物种类型。N组与B组在一、三、四象限均有分布,但N组的分布范围较B组更小,说明硝酸盐污染样品的微生物多样性与某些背景组样品较为相似。

综上所述,污染环境使其中的微生物多样性发生了不同于背景微生物的变化,有机污染下的微生物多样性发生了明显不同于背景的改变,而硝酸盐污染与原有微生物种群多样性相比变化较少。

将样品所含13013个OTU进行分类学比对得知,所有样品的物种共属于67个门、185个纲、367个目、689个科、1487个属及3301个种,物种组成较为丰富。在属(genus)水平上,使用韦恩图分析对B、N、Y 3组所含共有和独有的genus数目进行统计,初步比较各组物种组成的差异,具体的分析结

果见图6。由图可知,在属水平上,B、N、Y组分别包含1427、1108、795种微生物,其中三者共有的微生物为693种,B与Y组、B与N组、Y与N组共有的微生物分别为1071、773、694种,B、N、Y组各自独有的微生物为277、21、37种。由以上结果可知,背景组微生物组成最为丰富,有机污染组产生了更多与背景组不同的物种,而硝酸盐污染组独有物种则较少。

4.4 污染相关的功能性指示菌属分析

由以上分析可见,样品的微生物群落结构多样性较为丰富,要利用该信息进行地下水污染的功能性指示,则需进一步分析筛选。首先明确各组中具有代表性的菌属类型,其次根据代表性菌种与污染环境因子间的关系,判断其对地下水污染是否有指示作用,最后比对已有研究,印证其指示作用,最终确定地下水污染的功能性指示微生物。

代表性菌种分析包括群落组成分析及组间差异显著性检验。各样品在属水平上的群落组成分析见图7。图中信息主要包括:(1)各样品在属水平上含有何种微生物;(2)样品中各物种的相对丰度。由图可见,B组中丰度较高的物种为unclassified_f_Comamonadaceae(未分类丛毛单胞菌),其在B组中的丰度为17.58%;N组中丰度较高的物种为*Nitrospira*(硝化螺菌属),组内丰度为13.81%,*Vogesella*(福格斯氏菌属),组内丰度为

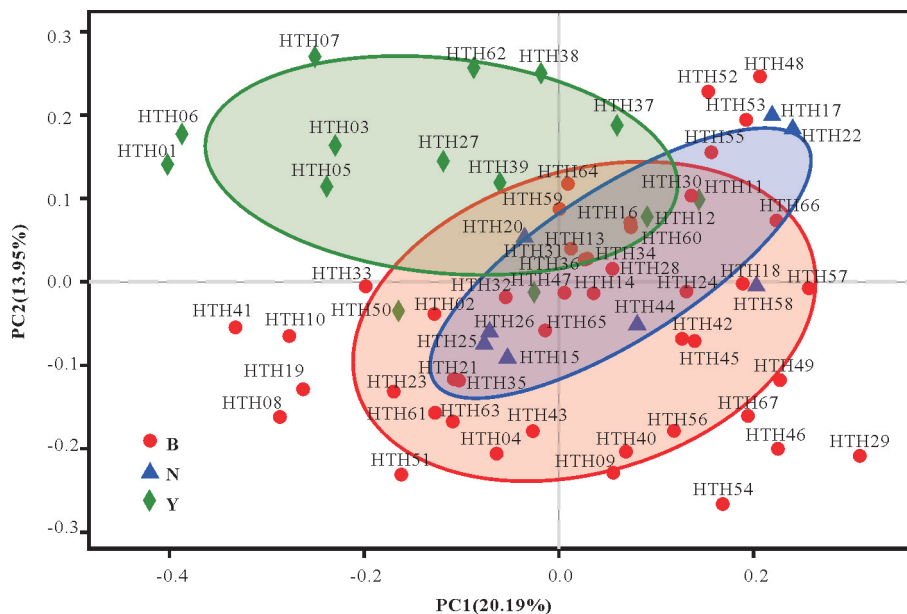


图5 Beta 多样性的主坐标分析(PCoA)图

Fig.5 Principal coordinate analysis (PCoA) scores plot of beta diversity

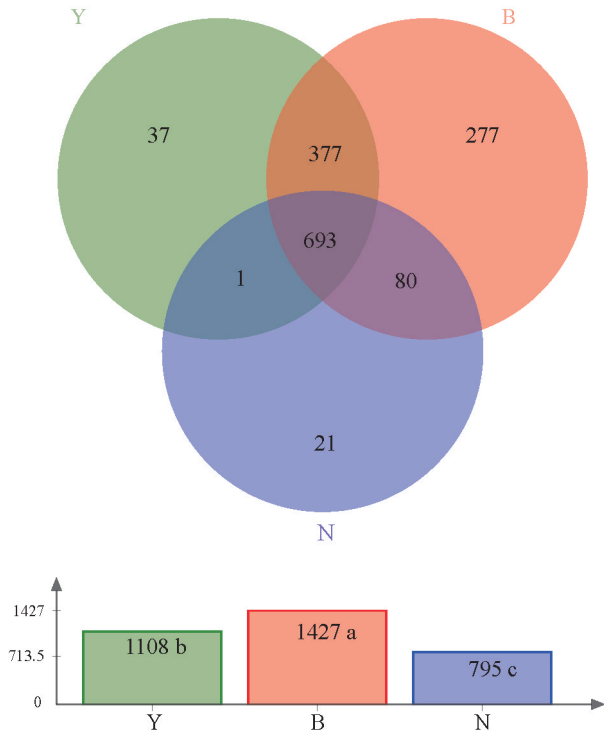


图6 不同样品之间比较的韦恩图

Fig.6 Venn diagram of representing the number on Genus level of B, N, Y Groups

12.36%; Y组中丰度较高的物种为 *Acinetobacter* (不动杆菌属), 组内丰度为22.39%, *hgcI_clade*, 组内丰度为8.70%。

综合样品群落组成分析, 得知了每个分组丰度较高的物种, 但这些物种是否在各组中具有代表性, 还需进行显著性差异检验。

组间显著性差异检验可评估物种丰度差异的显著性水平, 获得组间代表性菌种。本研究采用单因素方差(One-way ANOVA)分析, 进行组间显著性差异检验, 确定代表性菌种, 具体结果见图8。左侧为属水平下的物种名, 物种对应的柱子长度表示该物种在B、N、Y组中的平均相对丰度, 右侧为显著性p值。由图可见, 在丰度前五的物种中, *unclassified_f_Comamonadaceae* 在3组中均有分布, 在B组中丰度最高, 且具有显著性($p=0.019$)。 *Acinetobacter* 及 *hgcI_clade* 在Y组中丰度最高且具有显著性; *Nitrospira*、*Vogesella* 在N组中丰度最高, 但只有 *Nitrospira* 具有显著性, 故 *Nitrospira* 为N组中的代表性菌种。

综上所述, 经过群落组成分析及组间显著性差

异检验, 得到B组的代表性菌种为 *unclassified_f_Comamonadaceae*, N组为 *Nitrospira*, Y组为 *Acinetobacter* 及 *hgcI_clade*。这些物种在各组中广泛分布, 且具有显著性, 其与污染环境因子的响应关系值得深入发掘。

为了分析各组代表性菌种是否为功能性指示菌属, 首先要确定样品、代表性菌种与环境因子间的关系, 明确样品中的代表性菌种是否对环境变化有指示作用, 再进一步挖掘代表性菌种对环境的净化作用, 并将具有环境指示及自净作用的代表性菌种确定为功能性指示菌属。

环境因子关联分析主要用来反映样品、代表性菌种与环境因子之间关系, 本研究采用多元直接梯度(CCA)分析进行排序。结果如图9所示。N组、Y组样品分别大致沿 NO_3^- 、COD 展布, 说明其群落结构分别与 NO_3^- 、COD 正相关, 受到 NO_3^- 、COD 影响较大。大部分B组样品均不与TDS、 NO_3^- 、COD 相关, 说明溶解性固体、硝酸盐污染及有机污染对大部分背景样品群落多样性分布影响较小。

N组代表性菌种 *Nitrospira* 主要与 NO_3^- 环境因子正相关, 说明其分布受到硝酸盐污染的影响, 也说明此代表性菌种可以指示硝酸盐污染。同理, Y组代表性菌种 *Acinetobacter* 与COD正相关, 也说明 *Acinetobacter* 受有机污染影响, 并为有机污染的指示菌种。同为Y组代表性菌种的 *hgcI_clade* 与COD相关性较差, 不能作为有机污染的指示菌种。而在B组中的代表性菌种 *unclassified_f_Comamonadaceae*, 与各环境因子相关性均不强, 且在B、N、Y组中的丰度均高, 并不能将各组区分出来, 故不能作为功能性指示菌属。

经过与以往文献的比对发现, B组代表性菌种 *unclassified_f_Comamonadaceae* 多见于地下水 (Kimura et al., 2005) 及饮用水 (Lautenschlager et al., 2013) 中, 此类菌种在N组、Y组中也存在, 说明该菌种为地下水中普遍存在的原位微生物, 与是否污染无关。N组代表性菌种 *Nitrospira* 为硝化细菌的一种, 可将亚硝酸盐氧化成硝酸盐 (Daims et al., 2015), 多见于污水处理厂 (Daims et al., 2001) 中, 在地下水研究中有报道 (Pronk et al., 2009), Hovanec et al., 1998)。故此菌种的确对硝酸盐污染有指示及净化作用。Y组代表性菌种 *Acinetobacter*

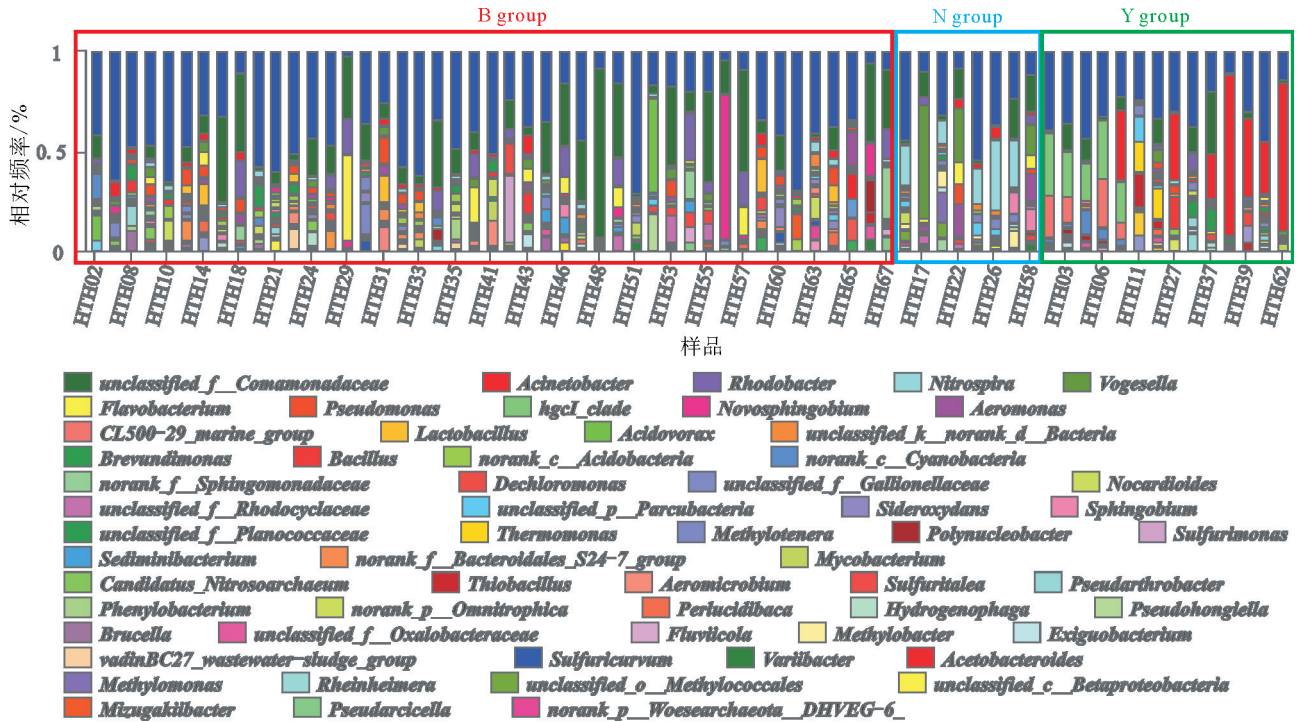


图7 细菌组成属分类水平的比较(丰度 > 5%)

Fig.7 Comparison of bacteria groups on genus level (abundance > 5%)

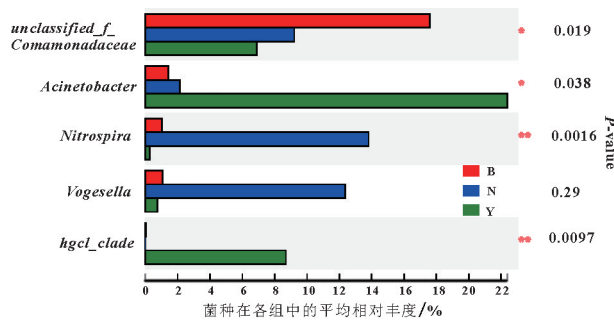


图8 组间显著性差异检验(丰度前五物种)

Fig.8 The tests of statistical significant differences between groups (abundance of the top five species)

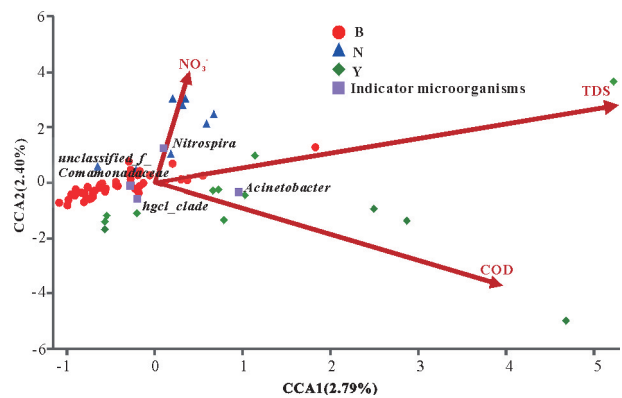


图9 CCA分析图(前4种优势属)

Fig.9 The CCA plot (the first 4 dominant genus)

是一种广泛存在的有机物降解菌,可降解萘(Yuan et al., 2013)、多种烷烃(Hassanshahian et al., 2012)、芳香烃(Chen et al., 2014)等,其对有机污染的指示及自净作用也很明确。综合以上分析,确定N组的功能性指示菌属为 *Nitrospira*, Y组功能性指示菌属为 *Acinetobacter*。

本研究力求将各组样品数量均一化,但由于水文地质复杂性、地层岩性非均质性、污染扩散的非线性等,导致了各组样本数量与预设不符,虽然其

不影响微生物群落结构及功能性指示菌属的分析,但却可能导致组间有关菌种数量分析的偏差,因此,以后在布设采样点时,应更充分地结合区域水文地质特征。

本研究选取的有机污染和硝酸盐污染指标—— NO_3^- 、COD、TDS作为环境因子,以此为代表分析微生物种群结构对其的响应关系,实际仅关注了微生物种群结构对典型污染的响应。在地下水环

境中,与污染过程相关的环境因子较多,微生物种群结构与其他环境因子的响应关系研究也应深入开展,以揭示更为全面的微生物对地下水污染的响应机制。

5 结 论

(1)对于滹沱河流域浅层地下水中的微生物,背景B组的多样性最为丰富,而受硝酸盐污染、有机污染影响,N组、Y组样品多样性丰富度依次降低,其机理可能为:微生物的种群结构对地下水污染产生了响应,即污染环境中产生了不同于背景的微生物类群。

(2)该区域具有显著差异的、且在某污染组具有显著优势的菌属可作为地下水污染的功能性指示菌属,该指示菌属在污染监测、污染修复方面具有较好的应用前景,但还需进一步研究。

References

- Abbai N S, Pillay B. 2013. Analysis of hydrocarbon-contaminated groundwater metagenomes as revealed by high-throughput sequencing[J]. *Molecular Biotechnology*, 54 (3): 900-912.
- Bekins B A, Cozzarelli I M, Godsy E M, Warren E, Essaid H I, Tuccillo M E. 2001. Progression of natural attenuation processes at a crude oil spill site: II. Controls on spatial distribution of microbial populations[J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 53 (3): 387-406.
- Bradley P M. 2000. Microbial degradation of chloroethenes in groundwater systems[J]. *Hydrogeology Journal*, 8 (1): 104-111.
- Casci T. 2010. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems[J]. *Freshwater Biology*, 54 (4): 649-677.
- Chen B, Teh B S, Sun C, Hu S, Lu X, Boland W, Shao Y. 2016. Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*[J]. *Scientific Reports*, 6 29505.
- Chen Y, Li C, Zhou Z, Wen J, You X, Mao Y, Lu C, Huo G, Jia X. 2014. Enhanced biodegradation of alkane hydrocarbons and crude oil by mixed strains and bacterial community analysis[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 172 (7): 3433-3447.
- China Geological Survey. 2015. Specification for Regional Groundwater Contamination Survey and Evaluation (DZ/T 0288-2015)[S] (in Chinese).
- Daims H, Lebedeva E V, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich N, Palatinszky M, Vierheilig J, Bulaev A. 2015. Complete nitrification by *Nitrospirabacteria*[J]. *Nature*, 528 (7583): 504-509.
- Daims H, Nielsen J L, Nielsen P H, Schleifer K H, Wagner M. 2001. In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 67 (11): 5273.
- Fei Yuhong, Zhang Zhaoji, Yang Mei, Li Yasong, Qian Yong, Meng Suhua, Chen Jingsheng. 2010. Health risk assessment of groundwater organic pollution in the Hutuohe Plain[J]. *Shanghai Geology*, (2): 13-19(in Chinese with English abstract).
- Feng Y, Li X, Song T, Yu Y, Qi J. 2017. Stimulation effect of electric current density (ECD) on microbial community of a three dimensional particle electrode coupled with biological aerated filter reactor (TDE-BAF)[J]. *Bioresource Technology*, 243 (Supplement C): 667-675.
- Fout G S, Cashdollar J L, Griffin S M, Brinkman N E, Varughese E A, Parshionikar S U. 2016. EPA Method 1615. Measurement of enterovirus and norovirus occurrence in water by culture and RT-qPCR. Part III. Virus detection by RT-qPCR[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (107): 52646.
- Groffman P M, Howard G, Gold A J, Nelson W M. 1996. Microbial nitrate processing in shallow groundwater in a riparian forest[J]. *Journal of Environmental Quality*, 25 (6): 1309-1316.
- Guo Haipeng, Bai Jinbin, Zhang Youquan, Wang Liya, Shi Jusong, Li Wenpeng. 2017. The evolution characteristics and mechanism of the land subsidence in typical areas of the North China Plain[J]. *Geology in China*, 44 (6): 1115-1127(in Chinese with English abstract).
- Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. 2012. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 64 (1): 7-12.
- Hendrickx B, Dejonghe W, Faber F, Boëne W, Bastiaens L, Verstraete W, Top E M, Springael D. 2010. PCR-DGGE method to assess the diversity of BTEX mono-oxygenase genes at contaminated sites[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 55 (2): 262-273.
- Hovanec T A, Taylor L T, Blakis A, DeLong E F. 1998. *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 64 (1): 258.
- Huang Xiaolan, Chen Jianyao, Xie Lichun, Fu Congsheng, Zhou Shining. 2010. Spatial characteristics of microbial groups associated with the groundwater flow in a small watershed[J]. *Environmental Science*, 31(10): 2299-2304(in Chinese with English abstract).
- Ji P, Rhoads W J, Edwards M A, Pruden A. 2017. Impact of water heater temperature setting and water use frequency on the building plumbing microbiome[J]. *ISME Journal*, 11 (6): 1318-1330.
- Jin S, Zhao D, Cai C, Song D, Shen J, Xu A, Qiao Y, Ran Z, Zheng Q. 2017. Low-dose penicillin exposure in early life decreases Th17 and the susceptibility to DSS colitis in mice through gut microbiota modification[J]. *Scientific Reports*, 7: 43662.
- John D E, Rose J B. 2005. Review of factors affecting microbial survival in groundwater[J]. *Environmental Science & Technology*, 39 (19): 7345-7356.

- Kao C M, Liao H Y, Chien C C, Tseng Y K, Tang P, Lin C E, Chen S C. 2016. The change of microbial community from chlorinated solvent-contaminated groundwater after biostimulation using the metagenome analysis[J]. *Journal of hazardous materials*, 302: 144–150.
- Karczewski K, Riss H W, Meyer E I. 2017. Comparison of DNA-fingerprinting (T-RFLP) and high-throughput sequencing (HTS) to assess the diversity and composition of microbial communities in groundwater ecosystems[J]. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters*, 67: 45–53.
- Kate M S, Kristin A H. 2005. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (3): 246–253.
- Kimura H, Sugihara M, Yamamoto H, Patel B K, Kato K, Hanada S. 2005. Microbial community in a geothermal aquifer associated with the subsurface of the Great Artesian Basin, Australia[J]. *Extremophiles*, 9(5): 407–414.
- Lautenschlager K, Hwang C, Liu W T, Boon N, Köster O, Vrouwenvelder H, Egli T, Hammes F. 2013. A microbiology-based multi-parametric approach towards assessing biological stability in drinking water distribution networks[J]. *Water Research*, 47 (9): 3015–3025.
- Leung M H Y, Chan K C K, Lee P K H. 2016. Skin fungal community and its correlation with bacterial community of urban Chinese individuals[J]. *Microbiome*, 4 (1): 46.
- Li Yasong, Zhang Zhaoji, Fei Yuhong, Wang Zhao, Chen Jingsheng, Zhang Fenge, Qian Yong. 2012. Preliminary study on organic pollution of shallow groundwater in the alluvial plain of Hutuo River[J]. *Journal of Arid Land Resources & Environment*, 26 (8): 52–56(in Chinese with English abstract).
- Ma Zhen, Xie hailan, Lin Liangjun, Hu Qiuyun, Qian Yong, Zhang Surong, Wang Guiling, Li Jianguo, Tan Chengxuan, Guo Haipeng, Zhang Fucun, Zhao Changrong, Liu Hongwei. 2017. The environmental geological conditions of Land resources in the Beijing-Tianjin-Hebei region [J]. *Geology in China*, 44 (5): 857–873(in Chinese with English abstract).
- Macler B A, Merkle J C. 2000. Current knowledge on groundwater microbial pathogens and their control[J]. *Hydrogeology Journal*, 8 (1): 29–40.
- Ning Zhuo, Guo Caijuan, Cai Pingping, Zhang Min, Chen Zongyu, He Ze. 2018. Geochemical evaluation of biodegradation capacity in a petroleum contaminated aquifer[J]. *China Environmental Science*, 38(11): 4068–4074(in Chinese with English abstract).
- Ning Z, Zhang M, He Z, Cai P, Guo C, Wang P. 2018. Spatial Pattern of Bacterial Community Diversity Formed in Different Groundwater Field Corresponding to Electron Donors and Acceptors Distributions at a Petroleum-Contaminated Site[J]. *Water*, 10 (7): 842.
- Pronk M, Goldscheider N, Zopfi J. 2009. Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring[J]. *Hydrogeology Journal*, 17 (1): 37–48.
- Rogers M B, Firek B, Min S, Yeh A, Brower-Sinning R, Aveson V, Kohl B L, Fabio A, Carcillo J A, Morowitz M J. 2016. Disruption of the microbiota across multiple body sites in critically ill children[J]. *Microbiome*, 4 (1): 66.
- Safonov A V, Babich T L, Sokolova D S, Grouzdev D S, Tourova T P, Poltarus A B, Zakharova E V, Merkel A Y, Novikov A P, Nazina T N. 2018. Microbial Community and in situ Bioremediation of Groundwater by Nitrate Removal in the Zone of a Radioactive Waste Surface Repository[J]. *Frontiers in microbiology*, 9: 1985.
- Shen L, Wu H, Gao Z, Xu L, Ji L. 2016. Comparison of community structures of *Candidatus Methylophilum oxyfera*-like bacteria of NC10 phylum in different freshwater habitats[J]. *Scientific Reports*, 6: 25647.
- Shi Jiansheng, Wang Zhao, Zhang Zhaoji, Fei Yuhong, Zhang Fenge, Li Yasong, Chen Jingsheng, Qian Yong. 2011. Preliminary analysis on the organic contamination of groundwater in the North China Plain[J]. *Ecology & Environmental Sciences*, 20 (11): 1695–1699 (in Chinese with English abstract).
- Song C, Wang B, Tan J, Zhu L, Lou D, Cen X. 2017. Comparative analysis of the gut microbiota of black bears in China using high-throughput sequencing[J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 292 (2): 407–414.
- Spor A, Violle C, Bru D, Bizouard F, Calderón K, Philippot L, Breuil M C, Barnard R L. 2016. Effectiveness of ecological rescue for altered soil microbial communities and functions[J]. *Isme Journal*, 11 (1): 272–283.
- Watanabe K, Watanabe K, Kodama Y, Sytsubo K, Harayama S. 2000. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude Oil storage cavities[J]. *Appl. Environ. Microbiol*, 66 (11): 4803–4809.
- Wen Dongguang, Lin Liangjun, Sun Jichao, He Jiangtao, Wang Suming, Rao Zhu, Qi Jixiang. 2008. Approach to investigation and assessment of organic contaminants in regional groundwater[J]. *Geology in China*, 35 (5): 814–819(in Chinese with English abstract).
- Wright J, Kirchner V, Bernard W, Ulrich N, McIlmains C, Campa M F, Hazen T, Macbeth T, Marabello D, Mcdermott J. 2017. Bacterial community dynamics in dichloromethane-contaminated groundwater undergoing natural attenuation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2300.
- Xue J, Caton K, Sherchan S. 2018. Comparison of next-generation droplet digital PCR with quantitative PCR for enumeration of *Naegleria fowleri* in environmental water and clinical samples[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 67 (4): 322–328.
- Ye Hao, Liu Changli, Jiang Jianmei, Pei Lixin, Zhang Yun, Hou Hongbing, Dong Hua, Guo Jiao. 2008. Risk assessments of groundwater pollution in the Shijiazhuang reach of the Hutuo River, China[J]. *Geological Bulletin of China*, 27(7): 1065–1070

- (in Chinese with English abstract).
- Ye J, Joseph S D, Ji M, Nielsen S, Mitchell D R G, Donne S, Horvat J, Wang J, Munroe P, Thomas T. 2017. Chemolithotrophic processes in the bacterial communities on the surface of mineral-enriched biochars[J]. *Isme Journal*, 11 (5): 1087-1101.
- Yuan H, Yao J, Masakorala K, Wang F, Cai M, Yu C. 2013. Isolation and characterization of a newly isolated pyrene-degrading *Acinetobacter* strain USTB-X[J]. *Environmental Science & Pollution Research International*, 21 (4): 2724.
- Zhang Qianqian, Wang Huiwei, Zhai Tianlun, Hua Mengjian. 2017. Characteristics and source apportionment of groundwater nitrate contamination in the Hutuo River alluvial-pluvial fan regions[J]. *Hydrogeology & Engineering Geology*, 44(6): 110-117 (in Chinese with English abstract).
- Zhang Yun, Wang Xiuyan, Liu Changli, Zhang Ming. 2007. Engineering technology of recharging groundwater in Shijiazhuang with water diverted from the Yangtze River[J]. *Geology in China*, 34(1):160-165(in Chinese with English abstract).
- Zhang Zhaoji, Luo Guozhong, Wang Zhao, Liu Chunhua, Li Yasong, Jiang Xianqiao. 2009. Study on sustainable utilization of groundwater in North China Plain[J]. *Resources Science*, 31(3): 355-360(in Chinese with English abstract).
- Zhang Zhaoji, Fei Yuhong, Guo Chunyan, Qian Yong. 2012. Regional groundwater contamination assessment in the North China Plain[J]. *Journal of Jilin University*, 42 (5): 1456-1461.
- Zheng Z, Zhang Y, Su X, Cui X. 2016. Responses of hydrochemical parameters, community structures, and microbial activities to the natural biodegradation of petroleum hydrocarbons in a groundwater-soil environment[J]. *Environmental Earth Sciences*, 75 (21): 1400.
- Zhou J, Xia B, Treves D S, Wu L Y, Marsh T L, O'Neill R V, Palumbo A V, Tiedje J M. 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (1): 326-334.
- 平原地下水有机污染健康风险评估[J]. *上海国土资源*, (2): 13-19.
- 郭海朋, 白晋斌, 张有全, 王丽亚, 石菊松, 李文鹏, 张作辰, 王云龙, 朱菊艳, 王海刚. 2017. 华北平原典型地段地面沉降演化特征与机理研究[J]. *中国地质*, 44 (6): 1115-1127.
- 黄小兰, 陈建耀, 谢丽纯, 付丛生, 周世宁. 2010. 小流域地下水微生物空间差异分析[J]. *环境科学*, 31 (10): 2299-2304.
- 李亚松, 张兆吉, 费宇红, 王昭, 陈京生, 张凤娥, 钱永. 2012. 滹沱河冲积平原浅层地下水有机污染研究[J]. *干旱区资源与环境*, 26 (8): 52-56.
- 马震, 谢海澜, 林良俊, 胡秋韵, 钱永, 张素荣, 王贵玲, 李建国, 谭成轩, 郭海朋, 张福存, 赵长荣, 刘宏伟. 2017. 京津冀地区国土资源环境地质条件分析[J]. *中国地质*, 44 (5): 857-873.
- 宁卓, 郭彩娟, 蔡萍萍, 张敏, 陈宗宇, 何泽. 2018. 某石油污染含水层降解能力地球化学评估[J]. *中国环境科学*, 38 (11): 4068-4074.
- 石建省, 王昭, 张兆吉, 费宇红, 张凤娥, 李亚松, 陈京生, 钱永. 2011. 华北平原地下水有机污染特征初步分析[J]. *生态环境学报*, 20 (11): 1695-1699.
- 文冬光, 林良俊, 孙继朝, 何江涛, 王苏明, 饶竹, 齐继祥. 2008. 区域性地下水有机污染调查与评价方法[J]. *中国地质*, 35 (5): 814-819.
- 叶浩, 刘长礼, 姜建梅, 裴丽欣, 张云, 侯宏冰, 董华, 郭娇. 2008. 滹沱河石家庄段地下水污染风险评估[J]. *地质通报*, 27 (7): 1065-1070.
- 张千千, 王慧玮, 翟天伦, 花劲健. 2017. 滹沱河冲积扇地下水硝酸盐的污染特征及污染源解析[J]. *水文地质工程地质*, 44 (6): 110-117.
- 张云, 王秀艳, 刘长礼, 张明. 2007. 利用北调江水补充调蓄石家庄地下水的工程技术方法探讨[J]. *中国地质*, 34(1):160-165.
- 张兆吉, 费宇红, 郭春艳, 钱永, 李亚松. 2012. 华北平原区域地下水污染评价[J]. *吉林大学学报(地球科学版)*, 2012 (5): 1456-1461.
- 张兆吉, 雒国中, 王昭, 刘春华, 李亚松, 姜先桥. 2009. 华北平原地下水资源可持续利用研究[J]. *资源科学*, 31 (3): 355-360.
- 中国地质调查局. 2015. 区域地下水污染调查评价规范(DZ/T 0288-2015)[S].

附中文参考文献

费宇红, 张兆吉, 杨梅, 李亚松, 钱永, 孟素花, 陈京生. 2010. 滹沱河