

# “传统”垃圾填埋场渗滤液中古细菌 16S rRNA 基因的 RFLP 分析\*

黄立南, 周 惠, 陈月琴, 罗 硕, 蓝崇钰, 屈良鹄  
(中山大学生命科学学院//基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

**摘 要:**“传统”垃圾填埋场渗滤液中古细菌群落的多样性通过不依赖于培养的分析而获得。将渗滤液中古细菌的 16S rRNA 基因片断(16S rDNA)选择性地扩增出来并用于构建 16S rDNA 克隆文库。文库内古细菌 16S rDNA 的遗传变异性通过 RFLP 分析(限制性内切酶 *Hha* I 和 *Hae* III)而得到。80 个随机选出的古细菌 rDNA 克隆子被划分为 29 个不同的 RFLP 型(组), 其中最大的 5 个型共占所有被分析克隆子的 53% 左右, 而其余 24 个型的丰度均处于相对较低的水平, 其中 16 个型更仅含有 1 个克隆子。有关结果表明, 对克隆 16S rDNA 片断的 RFLP 分析是评估复杂厌氧系统中微生物群落多样性的有力工具。

**关键词:**“传统”垃圾填埋场; 古细菌; 16S rRNA 基因; RFLP

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 01-0087-05

到目前为止, 各种自然或人工厌氧系统内部微生物种群和群落的生态大部分仍然是未知的。例如, 由于缺少有效的研究方法, 至今仍无法完全鉴定和定量复杂厌氧系统内部所有起作用的微生物种群, 从而也无法很好地建立微生物群落的结构及其功能(即代谢活动)之间的联系<sup>[1]</sup>。这在一定程度上是由于传统微生物技术的局限性所造成的。基于 rRNA 系统发育框架发展起来的分子生物学技术(rRNA 方法)使得对不同生境中的微生物群落进行全面而快速的分析成为可能。目前, 对细菌 16S rRNA 基因(16S rDNA)的选择性扩增、克隆以及序列的测定和比较分析已被广泛应用于分类学、生态学以及进化生物学等领域的研究。作为古细菌域的重要类群, 产甲烷微生物在厌氧食物链中扮演关键角色, 负责将有机废物降解的中间产物转化为甲烷和 CO<sub>2</sub>, 从而使整体的厌氧消化过程得以顺利进行<sup>[2]</sup>。因此, 研究垃圾填埋场内部古细菌群落的结构及其多样性, 对了解及优化被填埋垃圾的厌氧降解过程、缩短垃圾填埋场的稳定化周期具有重要意义。在文献 [3, 4] 中, 我们通过 PCR 选择性扩增及克隆了垃圾渗滤液中古细菌群落的 16S rDNA 片断, 然后利用 RFLP 法(限制片断长度多态性分析)对文库内部克隆片断的遗传变异性进行初步的筛选和分析, 最后再通过序列的测定及比较分析获

得有关垃圾填埋场内部古细菌群落的结构及其系统发育多样性的详细信息。在这里, 我们将有关的分子研究扩展至一个数年前关闭、不实施渗滤液回灌的“传统”垃圾填埋场。虽然目前世界上大部分的垃圾填埋场均属这一类型, 但迄今为止对这些复杂厌氧系统内部的微生物种群及其活动状况的了解甚少, 加上由于缺乏直接的实践经验, 我们甚至无法推断其稳定化过程所需要的时间。本研究利用 RFLP 法分析“传统”垃圾填埋场的渗滤液中古细菌 16S rDNA 的遗传变异性, 从而提供有关厌氧系统内部古细菌群落的结构及其多样性的初步信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 垃圾填埋场

狗仔坑垃圾填埋场位于广东省中山市东区新安村旁, 总填埋容量为  $1.2 \times 10^6 \text{ m}^3$ 。该填埋场建于 1982 年, 曾先后经过 4 次扩容, 最终于 1996 年填满封闭, 并铺以一层很薄的最终覆土层。建设初期由于经济、技术条件等的限制而未能按卫生填埋的技术要求设计和建设, 后来因填埋气体的问题严重, 为防止意外, 有关部门于 1997 年 8 月至 1998 年 4 月期间进行了填埋气体导排系统的建设, 初步完成钻井并安装导气管 30 个, 使填埋场的生物气得到有效控制。

\* 收稿日期: 2003-07-28

**基金项目:** 国家杰出青年基金资助项目 (39525007); 教育部长江学者特聘教授配套优秀青年教师骨干基金资助项目; 广东省自然科学基金资助项目 (011120)

**作者简介:** 黄立南 (1971 年生), 男, 博士, 讲师; **通讯联系人:** 屈良鹄; E-mail: lsbr04@zsu.edu.cn

用具螺旋盖的 1 L 采样瓶收集从填埋场底部流出的垃圾渗滤液(3 个重复),立即置于冰浴中并运往实验室。渗滤液样品经离心收集后(12 000 g, 4 ℃, 10 min)贮存于 -80 ℃ 直至核酸抽提。

## 1.2 克隆文库的构建及古细菌 16S rDNA 的 RFLP 分析

有关步骤详见文献[3]。简单地说,垃圾渗滤液中微生物群落的总 DNA 用溶菌酶/蛋白酶 K/SDS 法提取<sup>[5]</sup>;接着,总 DNA 中的古细菌 16S rDNA 片段用 Godon 等<sup>[6]</sup>所报道的引物对 w017 (5'-ATTCYGGTTGATCCYGCRCG-3', *E. coli* F6, 古细菌特异)和 w002 (5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3', *E. coli* R1509, 所有生物通用)选择性地扩增出来。PCR 产物经浓缩及割胶纯化之后平端连接至 pTZ 质粒载体上<sup>[7]</sup>,转化 *E. coli* TG1 感受态细胞。携带古细菌外源片段的克隆子经原位杂交(寡核苷酸探针 S-D-Arch-0915-a-A-20, GTGCTCCCCGCCAATTCCT, 以下简称 Arch915)<sup>[8]</sup>鉴别,而克隆文库内古细菌 16S rDNA 的遗传变异性则通过 RFLP 分析(限制性内切酶 *Hha* I 和 *Hae* III)而获得。

## 2 结果与分析

利用溶菌酶/蛋白酶 K/SDS 法所提取到的狗仔坑垃圾渗滤液的总 DNA,无需经任何的纯化处理,即可直接用于 w002/w017 引物对的选择性扩增,并获取具正确长度(约 1.5 kb)的 PCR 产物(图 1)。在此基础上采用平端连接策略建立 rDNA 克隆文库。之后,通过原位杂交的方法(Arch915, 古细菌特异 16S rRNA 寡核苷酸探针)确定文库内具有古细菌 16S rDNA 插入片段的克隆子(图 2)。

由于 w002/w017 引物对已被发现可以扩增少量的真细菌 16S rDNA 片段<sup>[6]</sup>,因而有必要通过额外的杂交步骤将混入文库内部的真细菌克隆子筛选掉。

利用 RFLP(限制性内切酶 *Hha* I 和 *Hae* III)对克隆文库内古细菌 16S rDNA 序列的多样性进行初步的比较分析及筛选。随机挑选 80 个经原位杂交确定的古细菌克隆子,其质粒上的外源片段用 w002 和 w017 引物对再扩增出来,经 *Hha* I 酶切及电泳分离之后,80 个克隆子被分成 21 个不同的 RFLP 型。而利用 *Hae* III 对含有两个或两个以上克隆子的 *Hha* I RFLP 型所进行的酶切分析结果表明,当中的某些型也可以被细分。为获得全部 *Hae* III RFLP 型的集合,对所有 80 个古细菌克隆子均进行了 *Hae* III 的酶切分析和比较。结果显示, *Hae* III 将它们划分为 17 个不同的 RFLP 型。最后,综合

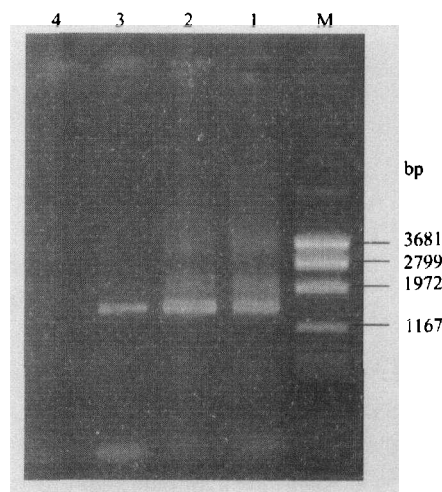


图 1 狗仔坑垃圾渗滤液总 DNA 中古细菌 16S rDNA 的选择性扩增(w002/w017 引物对)

Fig.1 Selectively amplification of archaeal 16S rDNAs from total community DNA from Gouzikeng landfill leachate

M: 相对分子质量标准;

1-3: 16S rDNA 扩增产物

(模板浓度以 10 倍梯度递减);

4: 阴性对照

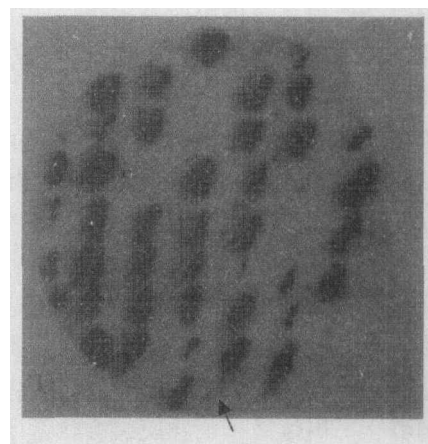


图 2 利用古细菌特异寡核苷酸探针 Arch915 对 rDNA 文库中的  $\beta$ -半乳糖苷酶-阴性重组克隆子进行原位杂交筛选;箭头所指为阴性对照

Fig.2 Screening of the 16S rDNA library by colony hybridization with oligonucleotide probe Arch91

两种限制性内切酶的分析结果,80 个古细菌 rDNA 克隆子被划分为 29 个不同的 RFLP 型(图 3),其中最大的 5 个型分别含有 11, 9, 9, 7 和 7 个克隆子;其余的 24 个型当中,共有 16 个型仅含 1 个克隆子,而另外的 8 个型所包含的克隆子均在 4 个以内。

值得一提的是,在所有 29 个狗仔坑 RFLP 型当中,仅有第 6 和第 11 两个型分别与先前所报道的李坑回灌型垃圾填埋场的第 4 和第 11 型相同<sup>[3]</sup>,

表明两种类型垃圾填埋场的渗滤液中古细菌群落的具体组成存在很大差异。所分析的 80 个克隆子在 29 个 RFLP 型中的分布如图 4 所示。图中各型的编号严格按照原来的酶切检测顺序进行（即由每一型

中第一个被发现的克隆子决定），从而完全是随机的。图中最大的 5 个型共占被分析古细菌克隆子的 53.8%，其余 24 个型当中只有 8 个型包含超过 1 个以上（2~4 个）的克隆子。

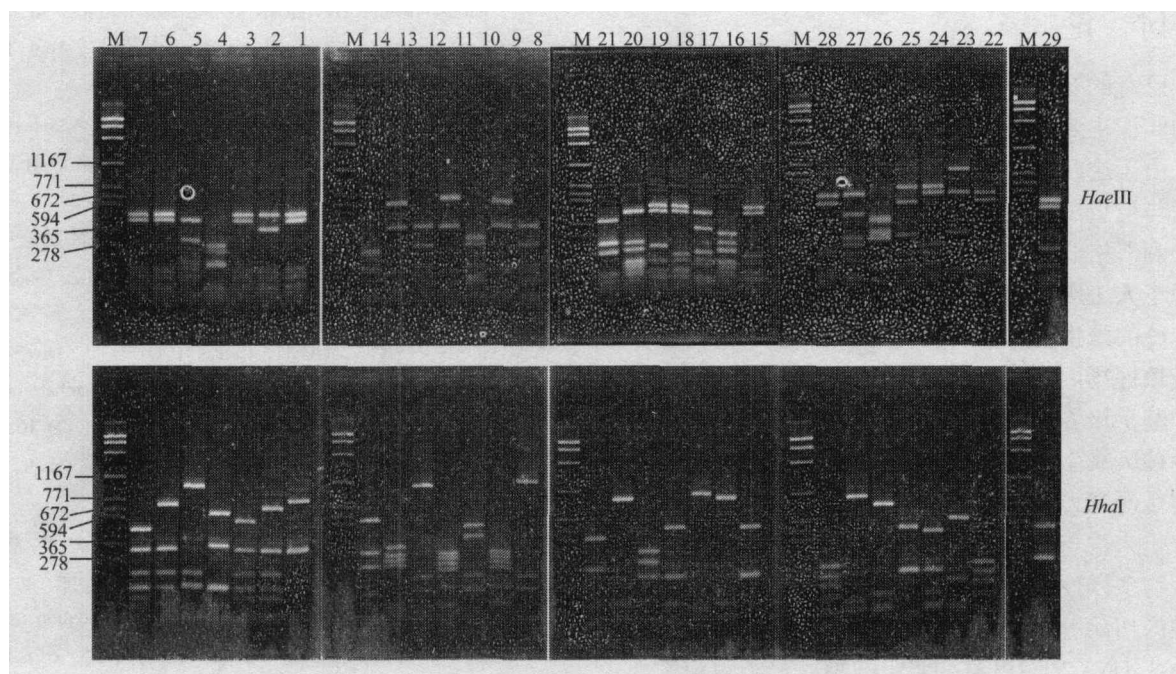


图 3 狗仔坑垃圾渗滤液中古细菌群落 16S rDNA 片断的 RFLP 型

Fig.3 *Hha* I- and *Hae* III-based RFLP patterns of 16S rDNAs from mixed archaeal populations in the leachate of Gouzikeng Landfill

M: 相对分子质量标准;

1-29: 综合两种限制性内切酶的分析结果而划分的 29 个不同的组 (型)

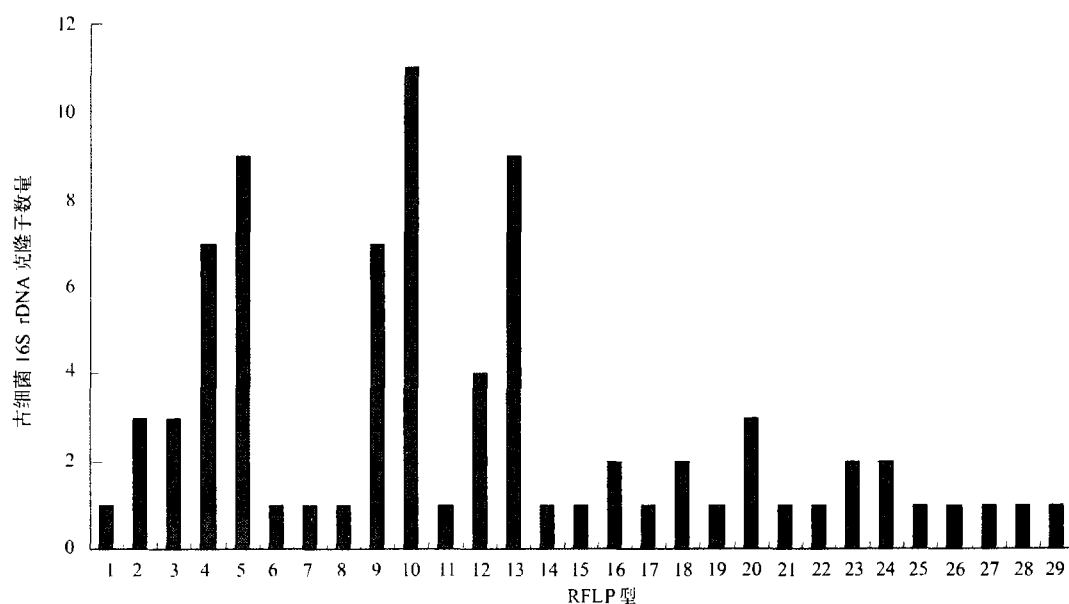


图 4 狗仔坑文库中各 RFLP 型在所分析的 80 个古细菌 16S rDNA 克隆子中的分布

Fig.4 Distribution in RFLP patterns of archaeal 16S rDNA clones from the microbial community in the Gouzikeng landfill leachate  
所有 RFLP 型均严格按照其原来的检测次序给出

由被检测到的 16S rDNA RFLP 型的总数量以及所分析的克隆子在各 RFLP 型中的分布推断, 相对于李坑垃圾渗滤液而言, 狗仔坑垃圾渗滤液中的古细菌具有较复杂的群落结构和多样性。

### 3 讨论

已有的有关垃圾填埋场内部厌氧微生物代谢过程的知识主要来自各种人工厌氧消化器的研究。然而, 由于这两种厌氧系统在许多方面存在很大的差异(与垃圾填埋场不同, 厌氧消化器的环境条件通常受到严格监控并处于较优化的状态), 加之现有的关于人工厌氧消化器内部微生物的知识主要是基于传统的微生物方法而获得的, 因此, 至今我们对垃圾填埋场内部厌氧微生物的了解仍然十分有限。

基于培养的传统技术的局限性已经限制了我们各种厌氧生境中微生物的认识。rRNA 技术已被证实是研究自然界中原核生物(不管是已知的还是至今仍未被培养的物种)的有力工具。最近的许多微生物多样性研究通过利用 RFLP 分析(涉及的限制性内切酶一般具有 4-bp 的识别位点)来筛选细菌 16S rDNA 文库以鉴别假定的独立分类单位<sup>[9-11]</sup>; 有关分析对快速、经济地评估大部分自然生境中复杂的微生物多样性起到关键作用。虽然这一步骤不应用于取代 16S rDNA 序列的测定及比较分析, 但在测序之前对有关的微生物多样性作初步的估计是十分有必要的, 尤其是至今我们仍未完全掌握自然界中微生物多样性的真正程度。

初步的结果显示, 狗仔坑“传统”垃圾填埋场的渗滤液中古细菌群落的 16S rDNA 包括至少 29 个不同的 RFLP 型, 当中丰度最高的 5 个型共占有被分析克隆子的 53% 以上, 而其余 24 个型的丰度均处于相对较低的水平。对这些 RFLP 型内的克隆子代表进行序列测定及比较分析, 将可获得有关垃圾渗滤液中古细菌群落的多样性及其在系统发育上的位置的更加深入而准确的信息。

随着对垃圾填埋场古细菌群落的研究工作的持续开展, 将来可望建立一个不断增长的 16S rDNA RFLP 型的数据库。有关工作对未来进一步比较来自其它垃圾填埋场的古细菌群落的克隆子、以及对研究同一垃圾填埋场内部古细菌群落的动态等都是相当有必要的。此外, 负责厌氧食物链中大部分的功能、从而在厌氧处理过程中扮演重要角色的真细菌域, 尚有待作进一步的研究。通过比较不同类型(或年龄)垃圾填埋场的微生物群落并将所检测到的微生物群落的差异与有关厌氧系统的整体表现联系起来, 对深入了解垃圾填埋场内部厌氧微生物过

程, 评估及改善垃圾填埋场的日常运作条件、优化和加快被填埋垃圾的稳定化过程具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] RASKIN L, STROMLEY J M, RITTMANN B E, et al. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 1232 - 1240.
- [2] FERRY J G. *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry and genetics* [M]. London: Chapman & Hall Inc., 1993.
- [3] 黄立南, 周惠, 陈月琴, 等. 垃圾填埋场渗滤液中古细菌群落 16S rRNA 基因的 ARDRA 分析 [J]. *生态学报*, 2002, 22(7): 1085 - 1090.
- [4] HUANG L N, ZHOU H, CHEN Y Q, et al. Diversity and structure of the archaeal community in the leachate of a full-scale recirculating landfill as examined by direct 16S rRNA gene sequence retrieval [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 214: 235 - 240.
- [5] 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 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 1910 - 1916.
- [6] GODON J J, ZUMSTEIN E, DABERT P, et al. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 2802 - 2813.
- [7] MEAD D A, SZCZESNA-SKORUPA E, KEMPER B. Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering [J]. *Protein Eng*, 1986, 1(1): 67 - 74.
- [8] STAHL D A, AMANN R I. Development and application of nucleic acid probes // STACHEBRANDT E, GOODFELLOW M, eds. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* [M]. New York: John Wiley & Sons Ltd., 1991: 206 - 248.
- [9] DELONG E F, FRANKS D G, ALLDREDGE A L. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages [J]. *Limnol Oceanogr*, 1993, 38: 924 - 934.
- [10] HADDAD A, CAMACHO F, DURAND P, et al. Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 1679 - 1687.
- [11] MOYER C L, TIEDJE J M, DOBBS F C, et al. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 2501 - 2505.

# Characterization of Archaeal Diversity in the Leachate of a Traditional Landfill by Determining Restriction Fragment Length Polymorphisms of 16S rRNA Genes

HUANG Li-nan, ZHOU Hui, CHEN Yue-qin, LAN Chong-yu, QU Liang-hu

(School of Life Sciences//Key Laboratory of Gene Engineering of the Ministry of Education,  
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The diversity of Archaea community associated with the leachate of a traditional municipal solid waste landfill was examined by cultivation-independent analysis. Total-community genomic DNA was isolated from the leachate and archaeal 16S rRNA gene sequences (16S rDNA) were selectively amplified. The 16S rDNA amplicon was subcloned and further characterized by a restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP, enzymes *Hha* I and *Hae* III). A total of 80 cloned 16S rDNA fragments were analyzed, and they were finally clustered into 29 different groups (RFLP patterns), with five most abundant groups accounting for 53% of all the 16S rDNA clones. The remaining 24 groups presented at low levels, of which a total of 16 groups were represented by a single clone. Our results demonstrated that RFLP analysis of PCR-amplified 16S rDNA is a powerful tool for assessing the diversity of microbial communities in complex anaerobic ecosystems.

**Key words:** traditional landfill; Archaea; 16S rRNA gene; RFLP

· 简 讯 ·

**本刊再度被评为“学术影响范围最广的前30名期刊”**

据中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库 2003 年底公布的《中国科学计量指标：论文与引文统计》的信息，中山大学学报（自然科学版）再度被评为“学术影响范围最广的前 30 名期刊”，是入选的 4 家大学学报之一（另 3 家是清华大学学报、南京大学学报、北京大学学报）。

中国科学引文数据库还公布了本年度中国科技期刊被引频次及影响因子排行表(分类),本刊被引频次列综合类第4位,影响因子列第5位,两项指标已连续多年进入中国科技期刊综合类的前10名。

(本刊通讯员)