

doi:10.3799/dqkx.2011.061

土著微生物参与下河套平原地下水中砷的还原作用

杨会^{1,2}, 王焰新², 谢先军², 段萌语²

1. 中国地质科学院岩溶地质研究所, 广西桂林 541004

2. 中国地质大学环境学院, 教育部生物地质与环境地质重点实验室, 湖北武汉 430074

摘要: 为查明土著微生物活动对高砷地下水形成的影响, 利用河套平原高砷地下水中分离出的土著微生物(YH002)进行了微宇宙实验研究. 实验结果表明: 高砷地下水加入的葡萄糖提供了微生物生长所需要的碳源, 微生物大量繁殖, 分泌的有机酸使溶液的pH值降低. 在缺氧条件下, 溶液中的OD值最高达到了0.189, pH值最低为6.22; 在有氧条件下, OD值最高达到了0.286, pH值最低为6.04. 溶液中As(III)的初始质量浓度为74 μg/L, 占总砷质量浓度的11.2%, 在加入微生物和葡萄糖后, 在缺氧和有氧条件下, As(III)的质量浓度分别为278 μg/L和310 μg/L, 占总砷质量浓度的42%和47%. 微宇宙实验说明地下水中的土著微生物能将As(V)还原成As(III).

关键词: 砷; 微生物; 地球化学; 氧化还原; 地下水; 河套平原.

中图分类号: P593

文章编号: 1000-2383(2011)03-0594-05

收稿日期: 2010-07-29

Reduction of Arsenic in Groundwater from Hetao Plain with the Involvement of Indigenous Microbes

YANG Hui^{1,2}, WANG Yan-xin², XIE Xian-jun², DUAN Meng-yu²

1. Institute of Karst Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Guilin 541004, China

2. School of Environmental Studies, MOE Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China

Abstract: In order to understand the effect of microbial activities on the occurrence of high arsenic groundwater, microcosm experiments were conducted using the indigenous microbe (YH002) isolated from high arsenic groundwater collected from Hetao Plain. The experiments show that the microcosm supplemented with bacteria and glucose, bacterial metabolism can excrete the organic acid which can cause pH decline. Under anoxic conditions, the maximal OD values reached 0.189 on the 7th day and the pH reduced to 6.22. However, under oxic conditions, the maximum of OD value also occurred on the 7th day with the value of 0.286, while pH values reduced to 6.04 at the end of the experiment. The initial concentration of As (III) was 74 μg/L, accounting for 11.2% of the total arsenic, when at the presence of the microbe and glucose, As (III) concentrations were 278 μg/L and 310 μg/L, accounting for 42% and 47% of the total arsenic, in the N₂ and O₂ atmosphere, respectively. The experimental results show that the indigenous microbe is capable of reducing As (V) to As (III) in groundwater.

Key words: arsenic; microbes; geochemistry; redox; groundwater; Hetao plain.

砷是一种致癌物质, 长期饮用高砷地下水会导致各种与砷有关的疾病出现(Ng *et al.*, 2003). 地下水砷污染在世界范围内广泛存在, 已成为人们关注的重点. 近年来, 由于过度开采地下水, 在印度和孟加拉发生了严重的污染事件, 威胁着3600万人的生命与健康. 水中砷的存在形式有很多种, 包括

无机砷化物和有机砷化物. 其中无机砷化物主要以As(III)和As(V)的形式存在; 有机砷化物包括: 甲基砷酸盐、二甲基砷酸盐等(Cullen and Reimer, 1989). 越来越多的研究表明, 微生物在砷的迁移、转化过程中起了关键作用(Kasan, 1993; Gihring *et al.*, 2001; Katsoyiannis *et al.*, 2002). 微生物参与

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(No. 40425001); 国家自然科学基金重点项目(No. 40830748).

作者简介: 杨会(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境地球化学. E-mail: hy53022@163.com

了天然水体中砷的不同形式之间的转化过程,主要是 As(V) 和 As(III) 之间的氧化还原作用(Croal *et al.*, 2004). 异化还原菌(DARP)在砷的地球化学循环中起着重要作用(Islam *et al.*, 2004; Oremland and Stolz, 2005; Herbel and Fendorf, 2006). Duan *et al.* (2009)通过模拟实验,证明了微生物的活动能够加快砷的释放. Islam *et al.* (2004)对印度孟加拉地区被砷污染的含水层中的沉积物的研究表明,金属还原细菌与有机碳的利用与沉积物中固相的 Fe(III) 和 As(V) 的还原和迁移是相关的,证明厌氧微生物在孟加拉三角洲的沉积物中砷的释放过程中起关键作用.

本文对河套平原高砷地下水中的土著耐砷细菌进行了筛选和鉴定,并利用分离的土著细菌进行模拟实验,研究了在缺氧和有氧两种环境中,微生物对水体中砷的形态的影响.

1 材料与方法

1.1 培养基与试剂

采用普通培养基对高砷含水层系统中的土著微生物进行分离,普通培养基配方如下:每升蒸馏水中添加 10 g 蛋白胨,3 g 牛肉膏,5 g NaCl,20 g 琼脂. 质量分数为 15% 的 NaOH 溶液调节 pH 至 7.2~7.4. 在培养基中加入不同浓度梯度的亚砷酸钠溶液(As 的浓度在 0~1 000 mg/L),以获取耐砷细菌.

1.2 土著耐砷菌的培养与纯化

河套平原是一个长期下沉、盐分高度富集的封闭湖积环境,地下水的形成、含水层的结构、分布及富水性都受到以湖相为主的古地理环境和黄河泛滥改道的影响. 用于土著耐砷菌培养的水样采自河套平原西部的杭锦后旗沙海乡五星村二社有癌症患者家旁的手压井(图 1),总砷含量为 806.3 $\mu\text{g/L}$. 采用 10 倍稀释法获得 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的水样稀释溶液. 细菌的培养选取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 3 种体积分数的稀释液进行接种. 在 27 $^{\circ}\text{C}$ 下培养,直到平板上长出细菌. 对培养出的耐砷菌再次稀释、涂布、培养得到单个菌种.

1.3 细菌总 DNA 提取

将纯化好的细菌接种到液体培养基中,于 27 $^{\circ}\text{C}$ 不振荡培养 24~48 h,以获得适量的菌体. 取 1.5 mL 培养物离心 5 min,在沉淀物中加入 1.5 mL STE 缓冲液(缓冲液含 10 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA- Na_2 , pH 8.0; 0.1 mmol/L

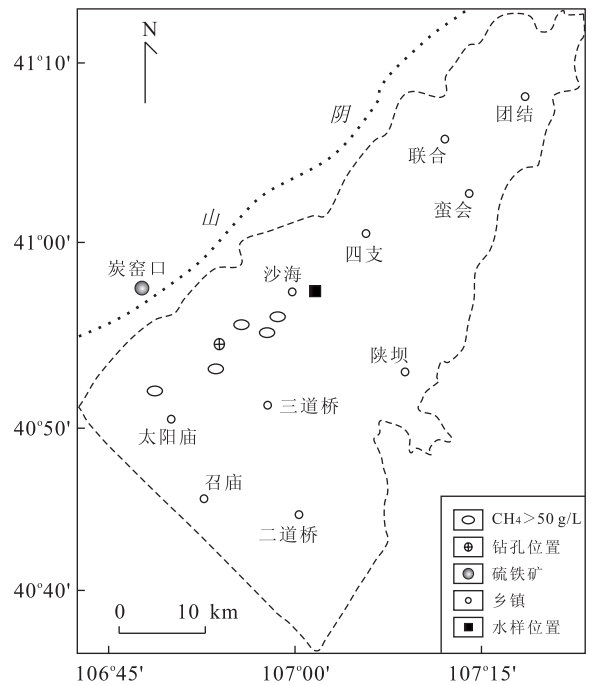


图 1 采样点位置

Fig. 1 Site of sampling

NaCl), 于涡旋混合仪上重悬洗涤一次,离心弃上清液,再加入 0.6 mL TE 缓冲液(缓冲液含 10 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA- Na_2 , pH 8.0). 每管中加入体积百分数为 10% 的 SDS 65 μL ,剧烈震荡后于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5~8 min,至溶液变清. 向溶液中加入等体积的酚氯仿抽提 3 次,每次充分混匀后,10 000 转/min 离心 25 min,取上清液. 在上清液中加入 10% 体积的 3M 的 NaAc 溶液,再加入等体积的无水乙醇,13 000 转/min 离心 10 min. 用体积百分数为 70% 的乙醇 400 μL 洗涤一次,自然晾干. 将 DNA 溶于 100 μL TE 溶液中,加入终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 RNase 1.5 μL 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 30 min,去除 RNA,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.4 聚合酶链式反应(PCR)和 16S rDNA 的扩增

用上述提取到的基因组 DNA 作为 PCR 模板,扩增近全长的 16S rDNA,正向引物 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'),反向引物 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). PCR 扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,30 个循环后延伸 10 min. 扩增产物采用质量百分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测是否扩增到目的基因片段 16S rDNA. 将剩余的 PCR 扩增产物由上海英骏生物技术有限公司直接测序. 并将测序结果用 BLAST 软

件与 GenBank 中的 16S rDNA 序列进行同源性比较,通过邻接法构建进化树。

1.5 微生物对水中砷形态转化实验

将前面从地下水中分离的一株细菌 YH002 用于本实验中。其步骤如下:用接种环取一定量的细菌 YH002 到 4 瓶装有 30 mL 的液体培养基中培养,在摇床上以 150 转的速度振荡培养 3 d,以获得较大的生物量。将从野外采回的高砷地下水过滤后取 400 mL 分装到 2 个 500 mL 的三角瓶中,一半加入占水样体积 6% 的葡萄糖 24 g 作为碳源,灭菌后备用。取 10 mL 菌悬液加入灭过菌的部分水样中,一半的水样每天通氮气 30 min,另一半水样不通氮气,分别模拟缺氧和有氧两种情况。按照设计的时间培养 1、2、4、7、11 d 取样。取样后立即测水样的 pH 和 OD 值,将剩余的水样冷冻离心后用阴离子交换柱分离 As(III) 和 As(V) (Le *et al.*, 2000),并用原子荧光光度计测总砷和 As(III) 的浓度。

2 结果与分析

2.1 进化树分析

笔者从高砷地下水中分离了一株细菌 YH002,并进行了测序,根据测序结果进行了进化树分析。与 YH002 作进化树分析的细菌如下: FJ217200 (*Stenotrophomonas maltophilia* strain BQAPs-03d), EF377303 (*Bacillus* sp. CCBAU 10727), EU596930 (*Bacillaceae bacterium* D2), AY345482 (*Bacterium* K2-83), EU647705 (*Bacillus pumilus* strain REG15), FJ607434 (*Bacillus cibi* strain 102), AY523411 (*Bacillus catenulatus*), AJ878859 (*Bacillus* sp. NHTS-47), DQ176422 (*Bacillus ni-abensis* strain 5M53)。根据 Menna *et al.* (2006) 提出的方法,进化树是使用 Mega4.0 软件中的 Neighbor-Joining 方法绘制的,重复次数为 1 000 次,其结果如图 2。从图 2 中可以看到, YH002 与 EF377303 具有最大的相似性,达到 97%。根据 Stackebrandt and Goebel 提出的 (Stackebrandt and Goebel, 1994) 相似性达到 97%, 就可以认为这两种不同的菌种可能属于同一种,而 EF377303 只鉴定到属,未鉴定到种,所以笔者只能认为 YH002 属于杆菌。Humayoun *et al.* (2003) 对湖底水域中的微生物进行了原位多样性表征时,指出 *Bacillus* 是主要的菌种,与本研究的结果一致。

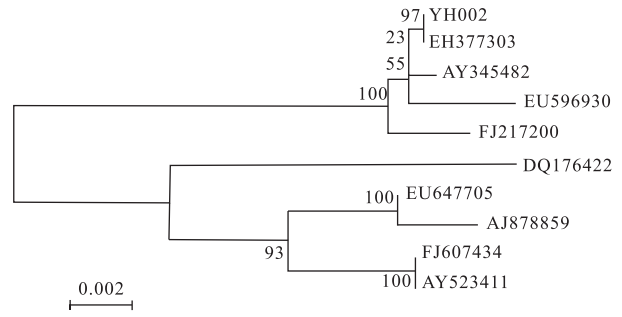


图 2 YH002 与 16S rRNA 构建的进化树

Fig. 2 Phylogenetic relationships between 16S rRNA sequence of the YH002 strain and related sequences

2.2 OD 值变化

OD 值的变化可以反应出溶液中生物量的变化。从图 3 中可以看到,灭菌后菌液的最初 OD 值为 0.05 左右,加入微生物后生物量增加,并且在加入碳源后,微生物的生物量增加的更多,并在培养 7 天后达到最大值。在氮气和有氧环境下,最大 OD 值分别为 0.198 和 0.291,这说明菌株 YH002 在有氧环境中比在缺氧环境中生长的更快。在氮气环境下,生物量在培养 24 h 后就达到 0.176,随时间变化的幅度不是很明显。在有氧环境下,微生物在第 1 天到第 2 天变化不是很明显,从培养 2 天到培养 4 天生长的比较迅速,OD 值从 0.213 增加到 0.276,在培养 4 天后微生物生长变得较缓慢。

2.3 pH 值变化

微生物新陈代谢会分泌大量的有机酸,从而导致溶液的 pH 值下降。从图 4 中可以看出,在不加微生物和葡萄糖时,溶液的 pH 值均为 9.2 左右。当微生物和葡萄糖分别加入时,pH 均有所降低。当微生物和葡萄糖同时加入时,溶液的 pH 值变化更明显,特别是在有氧环境下,pH 值最低降到 6.04。

2.4 砷形态变化

笔者研究了杆菌 YH002 对地下水中砷形态的改变。水样经高温灭菌后主要是 As(V),As(III) 的浓度为 74 $\mu\text{g/L}$,占总砷浓度的 11.2%,如图 5,在氮气环境下,As(III) 浓度从培养 2 天到培养 7 天增加的较快。当加入微生物后,在氮气环境下,As(III) 浓度从第 2 天到第 7 天增加的较快,从 38.5 $\mu\text{g/L}$ 增加到 131 $\mu\text{g/L}$,而在有氧环境中,经过 24 h 的培养后,As(III) 的浓度就达到了 140 $\mu\text{g/L}$ 。葡萄糖作为碳源被加入时,微生物将 As(V) 还原成 As(III) 的现象更明显。在氮气环境中,溶液中 As(III) 的最高浓度为 278 $\mu\text{g/L}$,占总砷的 42%。在有氧环境中,溶液中 As(III) 的最高

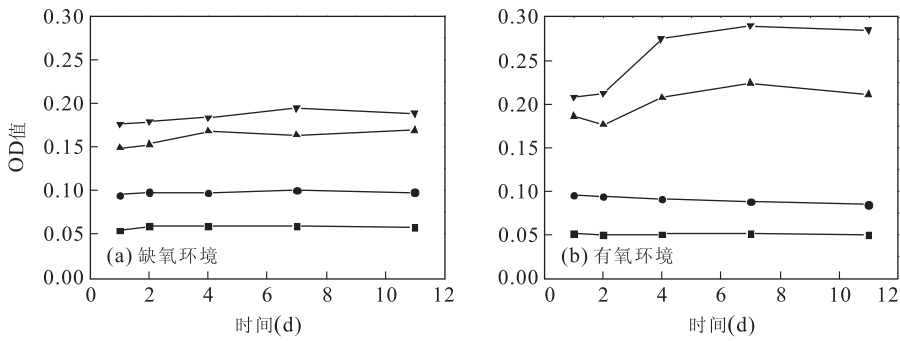


图 3 菌液 OD 值(600 nm)随土著微生物培养时间的变化

Fig. 3 The change of OD value (600 nm) in solution with the time of indigenous microbial culture

■表示不加微生物不加葡萄糖;●表示加葡萄糖;▲表示加微生物;▼表示加葡萄糖加微生物

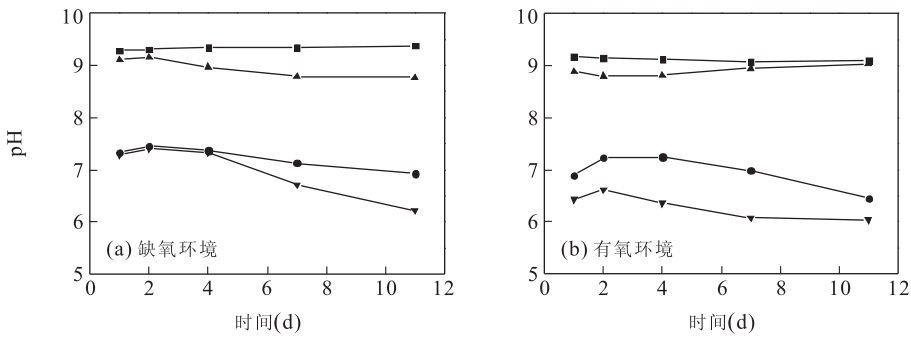


图 4 pH 值随土著微生物培养时间的变化

Fig. 4 The change of pH value in solution with the time of indigenous microbial culture

■表示不加微生物不加葡萄糖;●表示加葡萄糖;▲表示加微生物;▼表示加葡萄糖加微生物

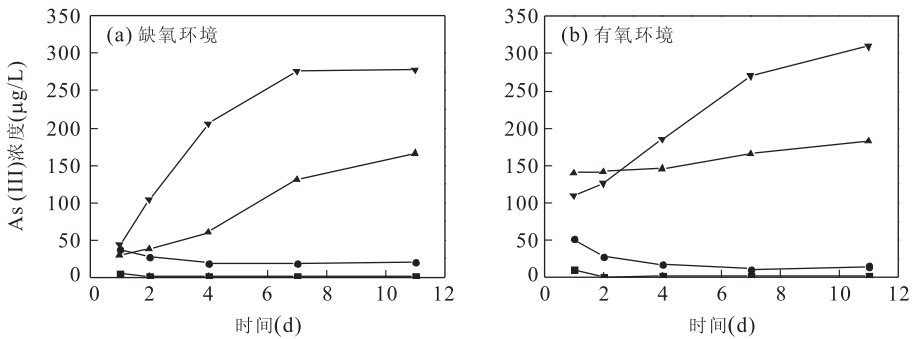


图 5 As(III)含量随土著微生物培养时间的变化

Fig. 5 The change of As(III) in solution with the time of indigenous microbial culture

■表示不加微生物不加葡萄糖;●表示加葡萄糖;▲表示加微生物;▼表示加葡萄糖加微生物

浓度为 310 $\mu\text{g/L}$, 占总砷的 47%。

3 结论

从河套平原高砷地下水中分离出一株细菌 YH002. 通过构建 YH002 与 16S rRNA 的进化树, 该地区以杆菌属(*Bacillus*)为主要的优势菌群.

土著耐砷菌 YH002 对地下水中砷形态影响的

模拟研究表明: 加入微生物后, 溶液中的 OD 值增加, pH 值降低, 并且 As(III) 的浓度增加, 当葡萄糖作为碳源被加入时, 这种现象更明显. 在氮气环境中, 溶液中 As(III) 的最高浓度为 278 $\mu\text{g/L}$, 占总砷的 42%. 在有氧环境中, 溶液中 As(III) 的最高浓度为 310 $\mu\text{g/L}$, 占总砷的 47%. 实验说明地下水中砷的形态受微生物活动的影响, 微生物能将地下水中的 As(V) 还原成毒性更强的 As(III).

References

- Croal, L. R. , Gralnick, J. A. , Malasarn, D. , et al. , 2004. The genetics of geochemistry. *Annual Review of Genetics* , 38: 175—202. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.091138
- Cullen, W. R. , Reimer, K. J. , 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* , 89(4): 713—764. doi: 10.1021/cr00094a002
- Duan, M. Y. , Xie, Z. M. , Wang, Y. X. , et al. , 2009. Microcosm studies on iron and arsenic mobilization from aquifer sediments under different conditions of microbial activity and carbon source. *Environmental Geology* , 57: 997—1003. doi:10.1007/s00254-008-1384-z
- Gihring, T. M. , Druschel, G. K. , McCleskey, R. B. , et al. , 2001. Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: field and laboratory investigations. *Environmental Science and Technology* , 35: 3857—3862.
- Herbel, M. , Fendorf, S. , 2006. Biogeochemical processes controlling the speciation and transport of arsenic within iron coated sands. *Chemical Geology* , 228(1—3): 16—32.
- Humayoun, S. B. , Bano, N. , Hollibaugh, J. T. , 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Applied and Environmental Microbiology* , 69: 1030—1042. doi: 10.1128/AEM.69.2.1030-1042.2003
- Islam, F. S. , Gault, A. G. , Boothman, C. , et al. , 2004. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal deltsediments. *Nature* , 430: 68—71.
- Kasan, H. C. , 1993. The role of waste activated sludge and bacteria in metal-ion removal from solution. *Environmental Science and Technology* , 23(1): 79—117.
- Katsoyiannis, I. , Zouboulis, A. , Althoff, H. , et al. , 2002. As (III) removal from groundwaters using fixed-bed up-flow bioreactors. *Chemosphere* , 47: 325—332.
- Le, X. C. , Yalcin, S. , Ma, M. , 2000. Speciation of submicrogram per liter levels of arsenic in water: on-site species separation integrated with sample collection. *Environmental Science and Technology* , 34: 2342—2347.
- Menna, P. , Hungria, M. , Barcellos, F. G. , et al. , 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology* , 29(4): 315—332. doi:10.1016/j.syapm.2005.12.002
- Ng, J. C. , Wang, J. P. , Shraim, A. , 2003. A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere* , 52: 1353—1359.
- Oremland, R. S. , Stolz, J. F. , 2005. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends in Microbiology* , 13(2): 45—49.
- Stackebrandt, E. , Goebel, B. M. , 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal Systematic Bacteriology* , 44(4): 846—849.