

对降解喹啉的厌氧生物反应器中重要功能菌群的鉴定

刘彬彬¹, 张 峰², 冯晓西², 刘勇弟², 张晓君¹, 赵立平^{1,*}

(1. 上海交通大学生命科学与技术学院微生物分子生态学与生态基因组学实验室, 上海 200240;

2. 华东理工大学资源与环境工程学院, 上海 200037)

摘要: 通过把微生物区系组成的分子水平的动态变化情况与微生物群落的整体功能变化相关联, 鉴定重要的功能类群是微生物分子生态学研究的一个重要的策略。应用分子生物学的方法, 对一个实验室规模的用于降解喹啉的厌氧反应器生物膜样品的微生物区系组成变化进行解析, 找出可能的主要功能菌。通过 DGGE 对反应器的种子污泥和运行稳定的厌氧生物膜反应器的微生物区系组成进行了对比分析, 并对主要的优势条带进行了分子鉴定。同时对以上两个样品构建 16S rDNA 克隆文库, 通过统计学分析对克隆文库的有效性进行验证, 并对文库进行测序分析。DGGE 条带及克隆文库的序列分析均表明, 在驯化过程中, *Gamma Proteobacteria* 亚纲与 *Desulfobacter postgatei* 种的微生物显著增加, 这种动态变化表明这些细菌可能是在厌氧条件下对喹啉的降解起关键作用的微生物。

关键词: 生物膜; 厌氧反应器; DGGE; 16S rDNA 克隆文库

文章编号: 1000-0933(2006)05-1390-06 中图分类号: Q143, Q938 文献标识码: A

Identification of functionally important microorganisms in a lab-scale anaerobic biofilm reactor for quinoline-degradation

LIU Bin-Bin¹, ZHANG Feng², FENG Xiao-Xi², LIU Yong-Di², ZHANG Xiao-Jun¹, ZHAO Li-Ping^{1,*} (1. Laboratory of Molecular Microbial Ecology and Ecogenomics, College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. College of Resource Science and Environmental Engineering, Eastern China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(5): 1390 ~ 1395.

Abstract: Microbial community structure in a lab-scale quinoline-degrading anaerobic biofilm reactor was dissected in comparison with the seeding sludge to identify the functionally important members. Samples were collected from the biofilm when the reactor reached the stable quinoline and COD removal efficiency. Total DNA was extracted from the samples. 16S rDNA v3 region was amplified and DGGE analysis was performed. The dominant bands were excised and the nucleotide sequences of the rRNA genes were determined. At the same time, a near-full length 16S rDNA library was constructed. Nucleotide sequences of 100 randomly selected clones were determined and identified by nearest neighbor analysis. Comparison analysis with the seeding sludge indicated a significant increase of the *Gamma Proteobacteria* and *Desulfobacter postgatei* during the acclimation period in the reactor, this suggested that these microorganisms may be functionally important for quinoline-degradation under anaerobic conditions.

Key words: biofilm; anaerobic reactor; DGGE; 16S rDNA clone library

利用分子生物学的技术, 对自然及人工的生态系统进行微生物区系的解析, 能够更深入的了解和更好的

基金项目: 国家 863 发展计划资助项目(2001AA214131); 国家自然科学基金资助项目(30470061)

收稿日期: 2005-12-15; 修订日期: 2006-03-15

作者简介: 刘彬彬(1978~), 男, 内蒙古赤峰人, 博士生, 主要从事微生物分子生态学研究. E-mail: liubinbin@sjtu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lpzhao@sjtu.edu.cn

致谢: James Borneman (Department of Plant Pathology, University of California, Riverside) 博士对英文摘要进行了修改润色, 在此谨表谢意

Foundation item: The project was supported by High Tech. Development Program of China (863) (No. 2001AA214131); National Natural Science Foundation of China (No. 30470061)

Received date: 2005-12-15; Accepted date: 2006-03-15

Biography: LIU Bin-Bin, Ph.D. candidate, mainly engaged in microbial ecology. E-mail: liubinbin@sjtu.edu.cn

利用这些系统。废水处理系统是目前研究较多的人工生态系统之一,而厌氧条件下的生物处理目前是很多废水处理系统的一个重要组成部分。当代废水处理的一个主要的变革就是将厌氧过程组合到废水处理中,使好氧和厌氧状况在反应体系中同时存在或反复周期地实现^[1]。许多在好氧条件下难以发生的反应,如多氯芳烃的脱氯,芳香族化合物和杂环化合物的开环,均可在厌氧条件下发生。但是厌氧微生物往往难以培养和分离,这使得人类对厌氧微生物的研究远远低于对好氧微生物的研究水平^[2]。近年来随着研究技术的发展,尤其是分子生物学的手段应用于解析环境样品中微生物的区系组成,使得人们对厌氧微生物的认识有了很大的进展。并不断有新的物种被发现,Chouari 等最近还在厌氧的废水处理系统中发现了一个新的微生物类群^[3]。这些发现有利于对废水的厌氧处理过程进一步的深入理解与改良。

传统的分离培养方法研究废水处理系统时,一个主要的问题就是将在实验室分离到的具有重要功能的微生物投回废水系统中时,该微生物很难发展成为系统中的优势种。这主要是由菌种本身的生存能力及其降解有机物的能力所决定的^[4,5]。分子水平的方法与传统培养方法的区别在于,传统方法是先进行菌种分离然后鉴定其功能与分类地位,也就是说其功能是在实验室条件下的功能,而分子方法是根据系统的功能直接鉴定其优势功能菌,避开了培养过程的选择性造成的偏差,所鉴定出的微生物已经具有了在废水处理系统中发展成为优势种的潜力,这对于工业废水处理过程的运行和改进具有指导意义。

微生物在废水的生物处理过程中起着重要的作用。随着分子技术应用于环境样品微生物区系的研究,通过对直接从环境中提取的 DNA 进行扩增、克隆测序,人们得到了越来越多的 rRNA 基因序列^[6]。但这些序列大多与已经培养得到的细菌的亲缘关系较远,无法用已知的信息对其进行鉴定。通过对微生物所在的系统功能与这些序列进行关联,可以得到一些关于这些微生物的功能方面的信息^[7],从而可以鉴定出该系统中的优势的功能均。

喹啉是一种主要的含氮杂环化合物,是存在于某些土壤和水体中的主要含氮污染物之一,实验表明喹啉具有毒性和致癌性^[8,9]。而在工业废水处理过程中,喹啉也是一种常见的难降解的复杂有机物之一。近年来,由喹啉污染引起的大众健康问题越来越多的受到人们的重视^[10,11]。

在本实验中,建立了一个能够稳定降解喹啉的厌氧生物膜反应器,应用 DGGE 和构建克隆文库的方法,对其微生物组成进行了解析,并与种子污泥的微生物区系组成进行对比分析,通过分析微生物区系组成的变化来找出厌氧条件下对喹啉的降解起主要作用的功能菌,这对研究废水中含氮杂环化合物的降解具有一定的意义。

1 实验方法

1.1 装置调试与样品采集

反应器的体积为 18L, 羰性材料作为填料。种子污泥采集于上海焦化厂废水处理系统的二沉池。该系统利用种子污泥进行挂膜,人工合成废水的成分为喹啉、葡萄糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 K_2HPO_4 。喹啉为 40mg/L, 保持系统中碳、氮、磷的比 150:5:1。合成废水由一个电磁刻度泵 (ES series, IWAKI, Japan) 连续加入反应器中并保持水力停留时间为 24h, 系统的温度由一个电子加热器 (YH, China) 控制在 30℃。经过 6 周的调试, 反应器达到了一个稳定的状态, 连续 5d 监测喹啉和 COD 去除效率。COD 由 Greenberg 国际标准方法测得^[12]。喹啉的浓度由 HPLC (high performance liquid chromatography, GC7890, Techcomp, Shanghai China) 法测定。pH 值和溶解氧 (DO) 分别由 pH 计 (pHS-3C, Leici, China) 和氧气表 (Oxi330i, WTW, German) 进行测定。当系统达到稳定状态后, 采集生物膜样品进行微生物组成分析。

1.2 样品预处理和 DNA 提取

本实验使用的种子污泥同文献^[13], 种子污泥的处理过程详见文献^[13]。

1.2.1 样品预处理 在生物膜样品中加 5 倍体积的 TENP 缓冲液 (50mmol/L Tris, 20mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl 0.01g/ml PVP, pH10) 及玻璃珠充分旋涡 (5min)。11821r/min (10000g), 4℃ 离心 5min, 收集沉淀。加 5 倍体积的 PBS 缓冲液 (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 1.44g/L Na_2HPO_4 , 0.24g/L KH_2PO_4 , pH7.4), 旋涡, 收集沉淀 (重复 2

次)。加 PBS 缓冲液悬浮,分装到 10ml 离心管,每管加 4ml 悬浮液和 1ml 甘油,一部分样品进行 DNA 的提取,暂时不用的样品放在 -70°C 保存。

1.2.2 DNA 的提取 将前处理好的样品分装到 1.5ml 离心管中,11821r/min (10000g), 4°C 离心 5min,收集 50~100mg 样品,加 200 μl 抽提缓冲液(100mmol/L Tris,100mmol/L EDTA,200mmol/L NaCl,1% PVP,2% CTAB,pH 8.0),加 2 粒玻璃珠,旋涡 5min,使样品充分悬浮。加入 200 μl SDS 缓冲液(2% SDS),上下颠倒 5min,放置冰上。样品进行 13479r/min (13000g)离心 10min,将上清液转移到一个新的离心管内。加入 400 μl 苯酚颠倒离心管混匀样品。样品进行 13479r/min (13000g)离心 15min,将上清液转移到一个新的离心管内。同样方法用 400 μl 苯酚和氯仿(1:1)及 400 μl 氯仿各抽提 1 次,在上清液中加入 0.6 倍体积的异丙醇,上下颠倒混匀后置于 -20°C 沉淀过夜,13987r/min(14000g)离心样品 20min,倒掉上清液。用 70% 乙醇洗涤两次,冷冻干燥 30min,用 100 μl 双蒸水悬浮样品。加入 1.5 μl RNaseA (20mg/ml) 37°C 消化 20min。得到的 DNA 样品于 -20°C 保存。

1.3 16S rRNA 基因 V3 区 PCR 扩增及变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

16S rRNA 基因的 V3 区扩增采用细菌通用引物 P2, P3^[14]。PCR 扩增体系及程序采用 Muyzer 等人的方法^[14]。PCR 产物通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)进行分析(Dcode system, Bio-Rad)。其中变性剂梯度为 35%~60%(100% 变性剂相当于 7mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺)。实验采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶,电泳缓冲液为 $1\times$ Tris-Acetate-EDTA (TAE) (pH8.4)。电泳在 200V 电压、 60°C 条件下运行 200min,电泳结束后用 SYBR green I (Amresco)染色。DNA 通过 UVI 凝胶成像系统(UVitec, Cambridge, United Kingdom)进行分析。对图谱中的主要条带进行割胶回收,通过重新扩增、克隆、测序并对其序列进行分子鉴定。

1.4 16S rRNA 基因全长扩增,克隆文库构建

16S rRNA 基因的全长扩增采用细菌通用引物 P0, P6^[15]。PCR 扩增体系及程序采用 Di cello 等人的方法^[15]。PCR 扩增产物通过连接酶连接至 pGEM T-easy 克隆载体(Promega),通过电击转化法(BIO-RAD)转化到大肠杆菌 DH5 α 中。筛选 100 个阳性克隆构建克隆文库。

1.5 测序及序列分析

对文库中的 100 个克隆首先用 P0 引物测序一个反应,共得到 100 个序列,测序委托上海英骏生物技术公司完成,一个反应大约得到 500bp 左右的有效序列,以序列相似性 99% 为标准,将这 100 个序列划分为临时分类操作单元(OTU, provisional operational taxonomic units)。对每个 OTU 选取一个代表克隆利用载体引物 T7 和 SP6 进行全长测序。所得的序列在 RDP 数据库中进行嵌合体(chimera)检测^[16]。

为了检测克隆文库的测序量是否充分,采用了 Kemp 等人^[17]的渐进采样法。通过随机采样,构建不同大小的假克隆库(pseudo-library)。对每一个克隆库,根据 Kemp 等人的方法^[18]计算两个 estimators, S_{chao} ^[19,20] 和 S_{ACE} ^[21]。克隆文库的数据输入一个在线的计算程序,得到的结果同样根据 Kemp 等人的方法进行处理^[18]。

为了对文库中的克隆的进化地位进行鉴定,在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 数据库中对全长序列进行比对分析,寻找亲缘关系最近的细菌或克隆。构建进化树(Phylogenetic tree)。

1.6 核酸序列登录号(Accession number)

本研究所得的生物膜样品的 DGGE 条带的序列及克隆文库 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中的登录号为 DQ296464- DQ296465 和 DQ296466-DQ296474。

2 结果分析

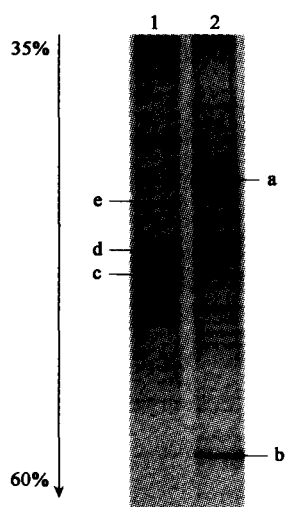
2.1 反应器的运行状况

经过 6 周的驯化,反应器达到了稳定的运行状态,系统的 pH 值为 7.0。溶解氧(DO) $< 0.1\text{mg/L}$ 。经过 5d 对喹啉和 COD 去除效率的连续监测,得到的平均喹啉去除效率为 53.6%,平均 COD 去除效率为 60.4%。

2.2 DGGE 图谱及主要条带的分子鉴定

提取种子污泥和生物膜样品微生物群落的基因组总 DNA,用细菌通用引物扩增 16S rDNA V3 区,通过 DGGE 分析得到的图谱见图 1。对其中的主带(条带 a~e)进行割胶,重新扩增,克隆测序分析。在 GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 数据库中进行比对分析,发现与条带 a 的序列同源性最高的是 *Pseudomonas* sp. PCP2(AF326380),与条带 b 同源性最高的是 *Desulfobacter postgatei* (AF418180)。而种子污泥中的优势条带(c~e)与 3 个尚未得到纯培养的微生物具有最高的同源性^[13],而 a 和 b 条带在种子污泥中几乎看不到,这一结果表明,在驯化过程中,条带 a 和 b 所代表的微生物的种类显著增加。而驯化是在含有喹啉的厌氧条件下进行的,所富集的微生物很有可能就是厌氧条件下降解喹啉的主要功能菌。



条带编号*	GenBank 中的同源序列	序列相似性	登录号
Bands	Related bacterial sequences	Similarity(%)	Accession No.
a	<i>Pseudomonas</i> sp. PCR2 (AF326380)	99	DQ296464
b	<i>Desulfobacter postgatei</i> (AF418180)	99	DQ296465
c	Uncultured beta Proteobacterium (AY133064)	95	AY945926
d	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium(AJ575722)	97	AY945927
e	Uncultured bacterium PHOS-HE36(AF314435)	97	AY945928

* 条带编号与左图中编号相对应 Bands were excised from DGGE gel shown left

图 1 厌氧反应器中的种子污泥及稳定状态的生物膜样品的微生物区系 DGGE 图谱及其中主要条带的分子鉴定结果

Fig.1 DGGE analysis of 16S rDNA v3 region amplified from the seeding sludge and the biofilm in the anaerobic reactor. The denaturing gradient was from 35% to 60%. Table 1 shows the result of the sequence analysis of bands obtained from DGGE gel

1:种子污泥样品 Lane1:Seeding sludge;2:厌氧反应器生物膜样品 Lane 2:Anaerobic Reactor

2.3 16S rRNA 基因全长文库的有效性

种子污泥克隆文库的分析见^[13],生物膜样品得到了 97 个有效的克隆(其中 3 个被检测为嵌合体),为了验证所建的文库是否足以用来准确的预测样品的丰度(phylotypes richness)。采用了 Kemp 等人^[17]的渐进采样(progressive sampling)的方法。结果如图 2 所示,从图中可以看出,两个 estimator 均达到饱和状态,说明所建的文库测序量充分。

2.4 克隆文库的序列分析

生物膜样品文库中的所有克隆按 99% 序列同源性的标准,共得到 9 个有效的 OTU,对每个 OTU 的全长序列,在 GenBank 数据库中进行比对分析,寻找亲缘关系最近的细菌或克隆。构建进化树(Phylogenetic tree)如图 3 所示。从图中可以看出文库中的最占优势的两个 OTU(AR2 和 AR1,比例分别为 54.6% 和 26.8%)的序列分别与 GenBank 一个 Gamma Proteobacteria 亚纲的细菌(AY972868)及 *Desulfobacter postgatei* 种的微生物(AF418180)具有最高的序列同源性。

3 结论

本实验应用分子生物学的方法,通过动态跟踪、对比分析了种子污泥及厌氧反应器稳定运行状态下的微生物区系组成状况,在生物膜样品中,16S rDNA 文库分

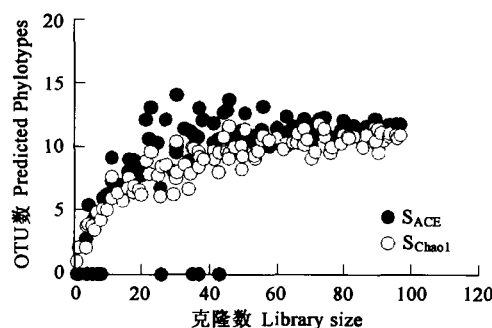


图 2 根据 Kemp 等的方法得到的 S_{ACE} 和 S_{Chao1} 的分布图

Fig.2 Predicted numbers of phylotypes based on the S_{ACE} and S_{Chao1} versus the subsamples in the library. The library reached an asymptotic maximum, indicating that this library was large enough to yield stable estimates of phylotype richness

析表明 *Gamma Proteobacteria* 亚纲和 *Desulfobacter postgatei* 种的微生物在文库中占有优势地位。在 DGGE 图谱分析中,条带 a 的序列同源性最高的是 *Pseudomonas* sp. PCP2,这是一个典型的 *Gamma Proteobacteria* 亚纲的微生物,因此两部分实验结果均表明 *Gamma Proteobacteria* 亚纲和 *Desulfobacter postgatei* 种的微生物是反应器中的优势微生物。在种子污泥中,这些微生物并不是优势种^[13]。也就是说当反应器在具有了厌氧条件下降解喹啉的功能时,其微生物区系中相应的一些微生物得到富集,所以本实验中鉴定出的优势种很有可能就是在厌氧条件下降解喹啉的主要功能菌。

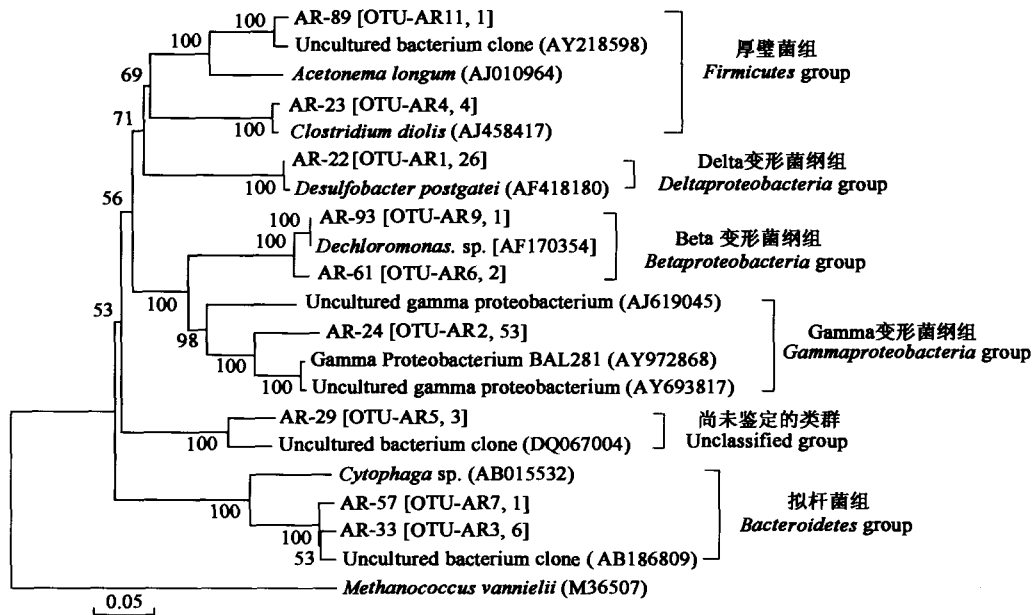


图3 生物膜样品克隆文库中所有 OTU 及其在 GenBank 中的亲缘关系最近的序列所构建的系统发育树

Fig.3 Dendrogram of 16S rDNA sequences showing the phylogenetic affiliation of the OTUs in AR. Neighbor joining tree was constructed of the near-full-length 16S rDNA sequences of the representative clones of each OTU and the retrieved sequences from the GenBank databases. The OTU name and the number of clones belongs belonging to that phylotype are shown in the square brackets. The scale bar represents 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides. Bootstrap value(100 replicates) above 50% are shown at nodes

虽然本实验鉴定出了一些主要的功能菌,但这些菌的生理特性及其降解复杂有机物的能力尚不能准确得知。这些信息可以通过功能基因多样性分析,荧光原位杂交技术(FISH),稳定性同位素探测技术(SIP)^[22-24]以及对已经鉴定的优势种进行分离等方法进行深入的研究。

References:

- [1] Dai Z S, Zhang J, Yu E J, *et al.* The application potential of the anaerobic-oxic activated sludge method. *China Water & Wastewater*, 1994, 10(4): 35 ~ 37.
- [2] Ling D W. The development of the research on anaerobe. *Bulletin of Microbiology*, 1995, 22(4): 245 ~ 252.
- [3] Chouari R, Le Paslier D, Dauga C, *et al.* Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(4): 2145 ~ 2153
- [4] Stephenson D and Stephenson T. Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. *Biotechnol Adv*, 1992, 10(4): 549 ~ 59.
- [5] Bokhamy M, Deront M, Adler N, *et al.* Survival and activity of *Comamonas testosteroni* in mixed population. *Water Research*, 1997, 31(11): 2802 ~ 2810.
- [6] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, 276(5313): 734 ~ 740.
- [7] Torsvik V and Ovreas L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5(3): 240 ~ 245.
- [8] Minako N, Takio Y, Yuko S, *et al.* Mutagenicities of quinoline and its derivatives. *Mutation Res*, 1977, 42: 335 ~ 342.

- [9] Azhar N and Stuckey D. The influence of chemical structure on the anaerobic catabolism of refractory compounds: a case study of instant coffee wastes. *Wat Sci Technol*, 1994, 30: 223 ~ 232.
- [10] O' Loughlin E J, Kehrmeier S R, Sims G K. Isolation, Characterization, and Substrate Utilization of a Quinoline-Degrading Bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1996, 38: 107 ~ 118.
- [11] Stuermer D H, Ng D J, Morris C J. Organic contaminants in groundwater near an underground coal gasification site in northeastern Wyoming. *Environ. Sci. Technol*, 1982, 16: 582 ~ 587.
- [12] Greenberg A E, Clesceri L S, Eaton A D. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th ed. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation, Washington D. C., 1992.
- [13] Liu B B, Zhang F, Feng X X, *et al.* *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 55(2): 274 ~ 286.
- [14] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3): 695 ~ 700.
- [15] Di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, *et al.* Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(11): 4485 ~ 4493.
- [16] Cole J R, Chai B, Marsh T L. *et al.* The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(1): 442 ~ 443.
- [17] Kemp P F and Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiol. Ecol*, 2004, 47: 161 ~ 177.
- [18] Kemp P F and Aller J Y. Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? *Limnol. Oceanogr. Methods*, 2004, 2: 114 ~ 125.
- [19] Chao A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*, 1987, 43: 783 ~ 791.
- [20] Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat*, 1984, 11: 265 ~ 270.
- [21] Chao A, Ma M C, Yang M C K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika*, 1993, 80: 193 ~ 201.
- [22] Lee N, Nielsen P H, Andreassen K H, *et al.* Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(3): 1289 ~ 1297.
- [23] Manfield M, Whiteley A S, Griffiths R I, *et al.* RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(11): 5367 ~ 5373.
- [24] Ginige M P, Hugenholtz P, Daims H, *et al.* Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescence in situ hybridization-microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 588 ~ 596.

参考文献:

- [1] 戴镇生, 张杰, 于尔捷, 等. 厌氧-好氧活性污泥法的应用前景. *中国给水排水*, 1994, 10(4): 35 ~ 37.
- [2] 凌代文. 厌氧微生物研究的新进展. *微生物学通报*, 1995, 22(4): 245 ~ 252.