



应用 16SrDNA 序列分析对砾石接触氧化反应器中细菌多样性

付丽丽

辽宁石油化工大学石油天然气工程学院, 辽宁抚顺 113001

摘要 运用分子生物学手段,对砾石接触反应器内的典型区域,包括石球表面的生物膜、石球内部污泥及反应器底部的沉淀污泥,通过 DNA 提取、PCR 扩增、纯化与回收、TA 克隆、序列测定,基因比对等方法,对反应器内的细菌多样性进行分析。结果表明,系统中主要存在好氧呼吸菌群及厌氧发酵菌群两大类,优势菌群为以呼吸代谢为主的假单胞菌属、以发酵为主要代谢方式的拟杆菌/噬纤维菌属和纤毛菌属。同时好氧菌群中还发育有 α 蛋白菌、 β 蛋白菌、 γ 蛋白菌、硝化螺菌属、土壤杆菌属、衣原体属、葡萄糖杆菌属及褐色高温单孢菌属细菌;厌氧菌群中则发育属于螺旋体属、 δ 蛋白菌、反硝化菌、乳杆菌属;此外,使生物量的增长减少的各种慢速生长菌群也是本系统内的一大特色菌群。生物多样性的存在,是污泥减量化研究的关键。

关键词 细菌多样性; 16SrDNA; 砾石接触; 氧化

中图分类号 X703

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)03-0051-04

Analysis of Bacterial Diversity of Gravel Contact Oxidation Reactor by 16SrDNA Sequencing

FU Lili

College of Petroleum Engineering, Liaoning Shihua University, Fushun 113001, Liaoning Province, China

Abstract Microbes are important members in a biological treatment system, especially, in the gravel contact oxidation reactor filled with crushed stone globular aggregates as carriers, which is discussed in this paper. By means of molecular biology techniques, for the gravel contact reactor, in its typical area, including the surface biological membrane of gravel, internal sludge of gravel and bottom sludge of the reactor, after DNA extraction, PCR and cloning, 16SrDNA sequence determination, the bacterial diversity is analyzed. The results indicate that the reactor bacterial communities are composed of aerobic bacteria group and anaerobic bacteria group. The dominant members are respiratory metabolized microbes *Pseudomonas* and fermentative metabolized microbes *Bacteroidetes bacterium/Cytophaga*. Non-dominant members in the aerobic group include α -, β -, and γ -*Proteobacterium*, *Nitrosospira*, *Chlamydia*, *Gluconobacter* and *Agrobacterium*. Anaerobic members are *Spirochaeta* Sp., *delta preobacterium*, *Denitrifying bacterium*. In addition, to reduce the growth of biomass, the slow-growth bacterial group is also a feature group in this reactor. The existence of biodiversity is the key of the sludge reduction.

Keywords bacterial diversity; 16SrDNA; gravel contact; oxidation

0 引言

微生物在污水生化处理技术中起决定性的作用,微生物种群的组成与数量在很大程度上会影响出水水质,所以微生物种群的组成分析对揭示生物处理机制,尤其是剩余污泥减量化机制是十分重要的。但是自然界中很多微生物不能用传统的微生物分析测定方法进行分离和鉴定,如显微镜微生物

形态观察、选择性培养基计数、纯种分离和生理生化鉴定等,且有 85%~99.9% 的微生物至今尚是不可培养的^[1]。这给微生物新种的发现和分类鉴定以及生态多样性研究带来了很大的问题。

近年来,分子生物学技术的发展及其在环境微生物领域的应用以其高效、可重复、快速及操作简便等优点得到广泛

收稿日期: 2010-01-06

作者简介: 付丽丽,助教,研究方向为水污染控制,电子信箱: lily_lemon@163.com



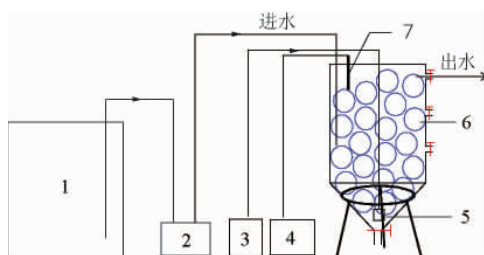
的应用。其中,用 16SrRNA 对环境样品中的微生物多样性进行分析是较为广泛应用的技术,可以采取不同的策略。目前采用的主要方法有:① 从环境样品中提取微生物总 DNA,经过 PCR 扩增 16SrRNA 基因后,对扩增产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)或温度梯度凝胶电泳(TGGE)分析,直接观察其多样性;② 提取 DNA 和经 PCR 扩增后,扩增产物用限制性内切酶进行酶切并电泳,然后用标记探针杂交,从而可以进行 RFLP 分析,用以分析微生物 RFLP 的多样性;③ 提取微生物总 DNA 后,建立 DNA 文库,用 16SrRNA 基因探针筛选 DNA 文库中的 rDNA 克隆,进行测序和比较,用以揭示微生物序列的多样性或利用已知各物种的 16SrRNA 基因序列数据库鉴定未知菌的归属,从而可发现新菌种;④ 先从环境样品中分离微生物菌落,对各单菌落分离微生物总 DNA,以 16SrRNA 基因探针进行杂交,以鉴定未知菌或研究微生物物种的多样性^[2]。

本文针对特定的生活污水处理装置—砾石接触氧化反应器中的微生物群落,对其进行 16SrRNA 基因序列测序分析,构建其 16SrRNA 基因文库,并分析系统发育情况,阐明反应器内的细菌多样性,筛选优势种群,进而研究各主要微生物的功能及其对污泥减量的贡献。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验装置:实验原水经初沉后进入主反应器后溢流水(见图 1)。其中主反应器中的砾石球为若干 2~3cm 碎石块粘制而成的直径 10cm 的多孔载体(见图 2),为微生物的生长提供大量的好氧、厌氧及兼性的生长环境。



1—储水池;2—恒流泵;3—曝气泵;4—恒温控制计;
5—曝气头;6—砾石球;7—恒温探头

图 1 砾石接触氧化反应器装置

Fig. 1 Gravel contact oxidation reactor

主要仪器和试剂:低温高速离心机,凝胶电泳仪,凝胶成像系统,PCR 反应仪,PCR 反应试剂盒,PCR 产物纯化回收试剂盒,TA 克隆试剂盒,限制性内切酶产品等。

1.2 采样

以实验室中生物砾石接触氧化法的小试反应器为研究对象,对其中石球载体表面的生物膜、石球内部污泥和反应器底部的沉淀污泥等三处具有环境代表性的污泥和生物膜取样。



图 2 生物砾石球载体

Fig. 2 Biological gravel carrier

1.3 样品预处理及总 DNA 提取

由于颗粒污泥中含有部分有机物,DNA 提取物颜色偏黑,PCR 扩增效果不好。因此,需要进行预处理,提取 DNA 之前,用缓冲液冲洗,以减少 DNA 提取物中杂质的含量。此外,污泥细菌种类组成复杂且混杂有大量有毒物质,如何使所有细胞裂解、充分释放 DNA,有效去除杂质,得到可以进行分子生物学操作的高纯度 DNA 是研究活性污泥种群结构与功能关系的关键所在。为此,本实验对国外报道的方法进行了改进^[3-6],建立了不需购置专用设备、细胞裂解完全、快速、简便的 DNA 提取方法,实验采用“冻融,溶菌酶-SDS 裂解,酚氯仿抽提”^[7]方案,得到的 DNA 可以满足分子生态学研究需要。

1.4 PCR 扩增

本实验中,选择以原核生物通用引物 530F (5'-GTGCCAGCA/GGCCGCGG-3') 和 1490R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 分别靶向大肠杆菌的 514~529 位和 1491~1509 位核苷酸^[8]。PCR 产物片段长度为 1kb 左右。设置热循环反应条件如下:95℃,5min;94℃,1min,50℃,1min,72℃,1.5min,30 个循环;72℃,10min。

1.5 DNA 纯化回收

将 PCR 产物全量进行琼脂凝胶电泳,后将其置于紫外灯下切割保留含有目的片段的亮带,依照 PCR 产物纯化回收试剂盒(上海博光公司)说明书进行回收纯化,回收后的 DNA 于-20℃保存。

1.6 TA 克隆

TA 克隆是一种快速克隆,避免了传统克隆连接过夜的操作,快速连接液可在 0.5h 内连接完毕,提高了克隆的效率。克隆过程为:连接 T 载体,转化感受态细胞,挑单菌落 LB 培养基培养,碱裂法小量制备质粒 DNA,电泳检测,酶切验证。

1.7 DNA 序列测定

将已插入 16SrRNA 基因片段的阳性转化子样本送至测序工作。应用 Sanger 末端终止法的原理,采用 4 色荧光末端测序法进行测序反应。测序引物为 M13,测序试剂盒为美国 ABS 公司的 Big Dye Terminator Sequencing Kit。测序反应在 PE 公司的 ABI377 测序仪上进行。

1.8 16SrDNA 文库的建立和系统发育分析

将测序拼接结果,用 NCBI BLASTN 程序在 GenBank 中搜索相似序列,确定其相似种属,将序列相同的 16SrDNA 克

隆子定义为同一个 OTU(Operational Taxonomic Units,作为分类单元),分析系统中的优势菌群。并将相关序列用 DNAMAN 5.29 进行比对,进行系统发育分析,进而分析颗粒污泥中微生物的多样性^[9]。

2 结果和分析

系统经培养达到稳定运行后,COD_{Cr} (Chemical Oxygen Demand,化学需氧量)由进水的 368.64mg/L 降到 (20±5)mg/L;出水 SS(Suspended Substance,水质中的悬浮物)平均 10mg/L;NH₃-N 从 58.61mg/L 降到 15.59mg/L。应器连续运行 5 个月,出水效果好,与平行实验的活性污泥法相比抗冲击能力强,且期间无剩余污泥排出。

2.1 DNA 提取

提取的 DNA 电泳结果如图 3 所示,由于 DNA 浓度较高,都有不同程度的电泳拖尾现象,电泳拖尾现象可能是由降解的 DNA、RNA 和杂质组成,若电泳时提取的 DNA 经稀释再电泳,可以减轻拖尾现象。

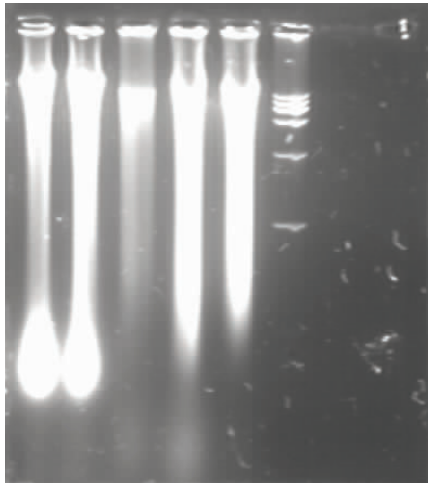


图 3 样品基因组 DNA 的提取

Fig. 3 Results of genomic DNA sample extraction

2.2 PCR 扩增及纯化回收

在一定的提取 DNA 稀释倍数下,达到了较好的扩增效果,且均没有非特异性条带。纯化结果条带明显增亮,证明回收效果较好。扩增及纯化结果如图 4、图 5 所示。

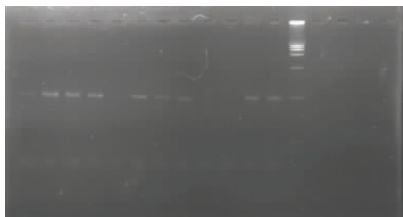


图 4 基因组 DNA 的 PCR 结果

Fig. 4 Results of genomic DNA PCR

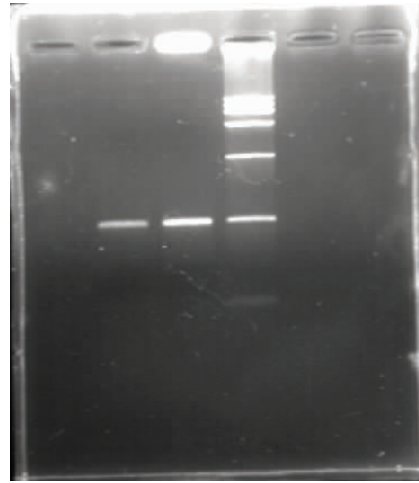


图 5 纯化回收后的 DNA 电泳图

Fig. 5 Results of DNA electrophoresis after purification recovery

2.3 16SrDNA 文库的建立及菌群多样性的分析

通过对生物砾间接接触氧化反应器内石球外膜、石球内泥以及沉淀污泥中提取并扩增出来的长约 1kb 的 16SrRNA 部分片段的克隆和测序,共得到 126 个克隆子,分别代表 75 个 OTUs(Operational Taxonomic Units,作为分类单元),其中石球外膜 46 个克隆子(35 个 OTUs),石球内泥 34 个克隆子(21 个 OTUs),沉淀污泥 46 个克隆子(19 个 OTUs)。用 Blast 工具在 NCBI 中进行相似序列的搜索以及比对,以确定微生物的所属类别。其中 96%的克隆子找到了其相对应的分类,且相似度均在 90%以上,只有 5 个克隆子未得到具体分类。通过测序结果发现,系统中微生物种类丰富,石球表面的生物膜中好氧菌占 20%,兼性厌氧菌占 46%,厌氧菌占 22%,慢速生长菌群占 4%,其他 9%;石球内部污泥中,好氧菌占 21%,兼性厌氧占 30%,厌氧菌占 35%,慢速生长菌群占 15%;沉淀污泥中,好氧菌占 55%,厌氧菌占 36%,其他细菌 9%。

其中,优势菌群分别是假单胞菌属、拟杆菌/噬纤维菌属和纤毛菌属。假单胞菌属的细菌以好氧呼吸为主,由于其能利用各种有机化合物作为唯一或主要碳源而生长的特性^[10]。因此在该系统中,主要功能是降解生活污水中的溶解有机物;同时,假单胞菌属的大部分细菌又是噬菌体的寄主,为噬菌体的生长、繁殖直至寄主的分裂溶解提供了条件。拟杆菌/噬纤维菌属的细菌以水解发酵为主,能将复杂有机物(固体有机物)如:纤维素、淀粉等水解为单糖后,再酵解为乳酸、乙酸、甲酸或丙酮酸;将蛋白质水解为氨基酸和有机酸等;脂类水解为低级脂肪酸和醇。纤毛菌属通过发酵各种糖类产生乳酸和乙酸^[11]。

同时,好氧菌中的硝化螺菌属细菌也是系统内的一大主要菌群,属化能自养,利用污水中的尿素作基质,生成亚硝酸盐,是去除 NH₄-N 的功能性微生物^[12];葡萄糖杆菌主要是将乙醇氧化成乙酸;衣原体属细菌代谢分解葡萄糖、丙酮酸或

谷氨酸,产生 CO_2 ;其余的 α 、 β 、 γ 蛋白菌及土壤杆菌属细菌均可利用广泛的碳水化合物、有机酸和氨基酸作为能源,将有机物氧化成无机物,同时合成新的微生物体^[13]。

厌氧菌中的反硝化细菌,主要功能是还原硝酸盐成气态氮,为总氮的去除做出贡献;螺旋体属细菌,主要作用是发酵葡萄糖成为乙醇、乙酸、乳酸、 CO_2 和 H_2 ; δ 蛋白菌则具有水解蛋白质、淀粉、核酸及各种脂肪,降解芳香族有机物成有机酸的功能;乳杆菌除了能分解糖外,还可以将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ;真菌属细菌将糖及碳水化合物分解成丁酸、醋酸和甲酸^[14]。

此外,在石球外膜和石球内泥中的各种慢速生长菌群,消耗同样的能量,分解有机物,但生长速度缓慢,从而使生物量的增长速度减慢,是该系统内的一大特色菌群。

3 结论

本试验对生物砾石接触氧化器内的外膜、内泥、余泥 3 种样品进行总基因组 DNA 的提取、PCR 扩增、回收纯化、TA 克隆、基因测序,并建立了 16SrDNA 基因文库;运用 Blast 程序与 GenBank 基因库进行基因比对,搜索相似基因序列;最终进行系统发育分析,确定优势种群,以便于其机制研究。

通过对克隆子进行功能菌群的分类及统计,分析各功能菌群在系统中的分布,证明在外膜中的主要菌群是兼性厌氧菌,占 46%;内泥中的主要菌群是厌氧菌,占 35%;而在沉淀污泥中好氧菌是主要菌群,达 55%。总体来看,反应器内部优势种群为以呼吸代谢为主的假单胞菌属、以发酵为主要代谢方式的拟杆菌/噬纤维菌属和纤毛菌属。

反应系统内微生态环境复杂,微生物多样性高,好氧、厌氧、兼性厌氧菌群以及慢速生长菌群等多种细菌共同作用,为污泥减量化做出巨大贡献,为进一步的机制研究奠定基础。

参考文献 (References)

- [1] 王晓丹,李艳红. 分子生物学方法在水体微生物生态研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 777-782.
Wang Xiaodan, Li Yanhong. *Microbiology*, 2007, 34(4): 777-782.
- [2] 杨永华,姚健. 分子生物学方法在微生物多样性研究中的应用 [J]. 生物多样性, 2000, 8(3): 337-342.
Yang Yonghua, Yao Jian. *Biodiversity Science*, 2000, 8(3): 337-342.
- [3] Bourrain M, Achouak W, Urbain V, *et al.* DNA extraction from activated sludges[J]. *Current Microbiology*, 1999, 38: 315-319.
- [4] 高平平,赵立平. 可用于微生物群落分子生态研究的活性污泥总 DNA 提取方法研究[J]. 生态学报, 2002, 22(11): 2015-2019.
Gao Pingping, Zhao Liping. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22 (11): 2015-2019.
- [5] Blackall L L, Burrell P C, Gwilliam H, *et al.* The use of 16SrDNA clone libraries to describe the microbial diversity of activated sludge communities[J]. *Wat Sci Tech*, 1998, 37:451-454.
- [6] Helmut B, Manuel P, Franco W, *et al.* A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil [J]. *Microbiological Methods*, 2001, 45:7-20.
- [7] 林山杉,金玉花. 生物砾石接触氧化反应器中原核生物多样性及其对

剩余污泥减量化的贡献[J]. 自然科学进展, 2006, 16(10): 1245-1251.

Lin Shanshan, Jin Yuhua. *Progress in Natural Science*, 2006, 16(10): 1245-1251.

- [8] Lemarchand K, Berthiaume F, Maynard C, *et al.* Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays [J]. *Microbiological Methods*, 2005, 63: 115-126.
- [9] Silyn Roberts G, Lewis G. In situ analysis of *Nitrosomonas* Spp. in wastewater treatment wetland biofilms [J]. *Wat Res*, 2001, 35: 2731-2739.
- [10] 张春杨,刘晓黎,东秀珠. 豆腐废水 UASB 反应器中的原核生物多样性及主要功能菌群[J]. 微生物学报, 2004, 44: 141-147.
Zhang Chunyang, Liu Xiaoli, Dong Xiuzhu. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44: 141-147.
- [11] Estelle M, Christain A, Gilles B. Changes in the structure and metabolic activities of periphytic communities in a stream rectifying treated sewage from a waste stabilization pond[J]. *Wat Res*, 1998, 32: 2299-2314.
- [12] Yoshikazu K, Hisaya K, Manabu F. Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16SrDNA and reversely transcribed 16SrDNA fragments [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 46: 147-157.
- [13] Andreas F, Arthur W, van Robert L, *et al.* Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16SrRNA levels of the predominant ribotypes [J]. *Appl Envir Microbiology*, 2000, 66: 3998-4003.
- [14] Watanabe T, Asakawa S, Nakamura A, *et al.* DGGE method for analyzing 16SrDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 232: 153-163.

(责任编辑 王芷)

·学术动态·



“2010 年全国软件与应用 学术会议”征文

由中国计算机学会系统软件专业委员会和软件工程专业委员会联合主办,苏州大学和中创软件股份有限公司承办的“2010 年全国软件与应用学术会议 (NASAC2010)”将于 2010 年 11 月 4—6 日在苏州举行。

会议现面向相关科技工作者征文,会议议题如下:需求工程;构件技术与软件复用;面向对象与软件 Agent;软件体系结构与模式;软件开发方法及自动化;软件过程管理与改进;软件质量、测试与验证;软件再工程;软件工具与环境;软件理论与形式化方法;操作系统;软件中间件与应用集成;分布式系统及应用;软件语言与编译;软件标准与规范;软件技术教育;计算机应用软件。

论文征稿截止日期:2010 年 7 月 1 日。

联系方式:苏州大学计算机科学与技术学院(215006),章晓芳,陈冬火;电话:13814866951。