

分子检测技术对活性污泥中氨氧化细菌的比较研究

许玫英^{1,2,3} 曾国驱¹ 任随周^{2,3} 岑英华¹ 孙国萍^{1*} 郭俊¹

(¹ 广东省微生物研究所 广州 51007)

(² 中国科学院华南植物研究所 广州 510650)

(³ 中国科学院研究生院 北京 100039)

摘 要 采用 PCR 扩增、随机克隆测序等技术,分析处理含高浓度氨氮的废水处理系统不同驯化时期的 4 个活性污泥样品,对样品中氨氧化细菌(AOB)的种类和氨单加氧酶(AMO)的活性进行分析比较,并在国内首次采用 PCR-变性梯度凝胶电泳(DGGE)相结合的技术对样品中总的细菌类群的差异进行研究。结果表明所检测到的氨氧化细菌优势菌群均属于变形细菌的 β 亚类,与 *Nitrosomonas* sp. 具有较高的相似性。活性污泥驯化成熟后,废水处理系统中 AMO 的活性有明显提高,活性污泥中的细菌类群更加集中,优势菌群相对稳定,系统对废水的处理效率也相应提高。结果表明采用分子检测技术有利于更全面地了解 AOB 的类群和功能,进而改善废水处理系统的处理效果。

关键词: 分子检测, 氨氧化细菌, 变性梯度凝胶电泳

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2003)03-0372-07

硝化作用是自然界氮循环及废水处理系统中实现氨氮去除的关键步骤。由于氨氮对水生生物有一定的毒害作用,而且其氧化过程中需要消耗大量的氧气^[1],对水生生物造成很大的威胁,因此详细了解废水处理系统中氨氮去除过程中的微生物及其活性的作用情况,并进一步提高其处理效率,是解决氨氮污染问题的关键。氨氧化细菌(*Ammonium-oxidizing bacterium*, 简称 AOB)在硝化作用过程中负责将氨氧化为亚硝酸盐,实现亚硝化作用,是硝化过程中必不可少的步骤,同时也是其第一个限速反应^[2]。由于 AOB 的生长速率相当低,生物量很少,采用传统的细菌分离培养分析检测法研究 AOB 相当费时、繁琐,而且许多在自然界存活的细菌尚未能在实验室培养获得,由这种方法分析检测到的细菌往往很有局限性,无法真实地反映废水处理系统中细菌的类群和数量^[3]。近年来发展起来的 16S rDNA 分子检测技术可以有效地克服传统分析检测方法中的缺点,大大地提高分析检测的速度以及结果的准确性、全面性。这种分子检测技术已在海洋微生物及污水处理微生物研究中广泛应用。在我国,应用此类技术进行微生物生态的研究见报较少。其中 PCR-变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, 简称 DGGE)相结合的技术可以使碱基序列稍有区别的 PCR 扩增产物(实际上是混合物)在变性浓度逐步提高的

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目(015017)

* 通讯作者。Tel 86-20-87782471, Fax 86-20-87601587, E-mail: zebiotech@gis.sti.gd.cn

作者简介: 许玫英(1974-),女,广东省饶平县人,硕士,主要从事环境微生物学研究,现于中国科学院华南植物研究所攻读博士学位。E-mail: zebiotech@gis.sti.gd.cn

收稿日期: 2002-09-16, 修回日期: 2002-12-23

聚丙烯酰胺凝胶中具有不同的迁移位点,从而实现不同序列的分离。DGGE 已成为研究微生物类群的强有力的工具^[4-6]。

废水处理系统中的氨氧化作用主要由 β 亚类中的 *Nitrosomonas* spp. 负责^[7],高浓度氨氮环境尤其有利于 *Nitrosomonas* spp. 的生长^[8]。氨单加氧酶(Ammonium monooxygenase,简称 AMO)是 AOB 所特有的一种酶,它催化氨的氧化,为该类微生物提供能量^[9,10]。因此通过对 AMO 的编码基因进行扩增可反映出环境中 AOB 的数量及其活性。目前已报道了 *Nitrosomonas europaea* amoA 基因的完整序列(amoA: GenBank 登录号为 L08050)^[11]。

本研究用 AOB β 亚类特异性的 16S rDNA 引物、编码氨单加氧酶 α -亚基基因 amoA 的特异性引物及扩增细菌 16S rDNA V3 区域的通用引物,对进水氨氮浓度高达 200 ~ 300mg/L 的重油裂解制气废水处理系统中,不同运转时期氨去除效率有显著差异的 4 个活性污泥 DNA 样品进行 PCR 扩增,结合随机克隆技术及 DGGE 技术对样品中的 AOB 及其它菌群进行检测分析,并对 amoA 基因的数量进行了分析和比较。本文的研究结果对指导废水处理过程中提高氨氮去除效率可提供有益的参考。

1 材料和方法

1.1 活性污泥样品来源

样品取自广州某油制气厂废水处理系统的活性污泥,其进水氨氮浓度高达 200 ~ 300mg/L,由串联的两个曝气池组成,在活性污泥启动驯化早期,系统去除氨氮能力总体较差的情况下所取的样品分别标记为 F1 和 F3,而在活性污泥驯化成熟后,该处理系统对氨氮去除率达到 90% 以上时取的样品标记为 L1 和 L3。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌的培养 取适量的活性污泥样品分别投加于含有 100mL 氨氧化细菌(AOB)或亚硝酸盐氧化细菌(NO₂-)培养基的 500mL 三角瓶中进行长期富集培养,培养基配方及培养条件如参考文献^[12,13]所述。

1.2.2 纯培养细菌 DNA 的分离 6 000r/min 离心收集菌体,将菌体重悬于 3mL DNA 抽提缓冲液,采用蛋白酶 K、氯仿-异戊醇(24:1, V/V)抽提,用 0.6 体积的异丙醇沉淀 DNA。

1.2.3 活性污泥样品中 DNA 的分离 这 4 个活性污泥样品总 DNA 的抽提参照 Zhou 等所采用的方法^[14]。

1.2.4 β 亚类 AOB 16S rDNA 的 PCR 扩增、克隆测序及系统进化分析 采用特异性扩增 β 亚类 AOB 16S rDNA 的特异性引物对 NitA 和 NitB^[15]的 4 个活性污泥样品的总 DNA 分别进行 PCR 扩增。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

NitA: 5'-CTTAGTGGGAATAACGCATCTG-3'; NitB: 5'-TTACGTGTGAAGCCCTACCCA-3'

采用 T-载体(Promega)对 PCR 扩增产物进行直接克隆随机挑单测序,利用 BLAST 将所测得的序列与 GenBank 中已登录的序列进行同源性比较,选取 400bp 长度的序列与选自 GenBank 中有代表性的序列进行比对[ClustelX(1.8)],采用邻接(Neighbour joining,简称 NJ)法作出进化树(PHYLIP, Version 3.5),比较各活性污泥样品中所有 AOB 的主要种类及其相应的分类地位。

1.2.5 氨单加氧酶基因 amoA 的检测 根据已报道的 *Nitrosomonas europaea* amoA 基因的

序列 ,设计 *amoA* 基因特异性引物对 AMO-F 和 AMO-R 分别对应于该基因序列的 247 ~ 269 位点和 1056 ~ 1079 位点。

AMO-F : 5'-GGGTGAGTATATTTAGAACGGAA-3'
AMO-R : 5'-TTATTTGATCCCCTCTGGAAAGCC-3'

100 μ L PCR 反应体系中每种引物的浓度分别为 0.1 μ mol/L ,每种 dNTP 的浓度分别为 0.2mmol/L ,*Taq* DNA 多聚酶的浓度为 2.5U。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 1min ,44 $^{\circ}$ C 退火 1min ,72 $^{\circ}$ C 延伸 3min ,反应 30 个循环 ,最终采用 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 ,EB 染色 ,采用紫外凝胶成像系统对图像进行分析。阳性对照采用实验室富集培养的 AOB 的 DNA 作为模板。

1.2.6 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增及其 DGGE 分析 16S rDNA V3 区的通用引物及其 PCR 扩增条件如 Muyzer 等^[16]所述。采用 D-Code 系统 (Bio-Rad , Hercules ,Calif.)对 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析。电泳所用聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10% ,规格为 16mm \times 16mm \times 1.0mm (L \times W \times H) ,变性梯度为 30% ~ 60% (尿素为 7mol/L 甲酰胺为 40% 时的变性浓度为 100%) ,在 60 $^{\circ}$ C 恒温下 ,85V 电泳 9.5h 后 ,采用 EB 染色 ,紫外凝胶成像系统分析结果。

1.3 核酸序列登录号

本研究所测得的 AOB 16S rDNA 序列已在 GenBank 中登录 ,登录号为 AJ441263-AJ441286。

2 结果和讨论

2.1 不同活性污泥样品中 AOB 种类的差异

采用随机克隆测序对 β 亚类 AOB 16S rDNA 特异性引物扩增产物直接克隆随机挑单进行测序 ,共测 53 个克隆序列 ,经筛选去除其中的重复序列及长度不足 400bp 的序列 ,共选得 21 条序列 (表 1) 与 GenBank 中 19 条相关序列进行系统分类分析 (图 1) ,以变形细菌 α 亚类的 *Nitrobacter* sp. NRB5220 (AY055797) 为外类群。所测得的序列基本上聚为两大类 ,其中来自活性污泥样品 F3 的绝大多数序列 (除 F36、F38、F35 外) 及来自样品 L1 的序列 L15 聚于类群 II 中 ,其余 14 条序列均聚于类群 I 中。有趣的是这些序列均与来自 *Nitrosomonas* spp. 的菌株序列有较高的同源性 ,即这 4 个活性污泥样品中的 AOB 以 *Nitrosomonas* spp. 的菌株为主要类群。这主要是由于该废水处理系统进水氨氮浓度长期高达 200 ~ 300mg/L ,在这么高的氨氮浓度条件下 ,*Nitrosomonas* spp. 逐步形成了系统中的优势菌群。这一结论与 Ulrike^[7]及 Hiorns^[8]等人的研究结论相当的一致。

表 1 用于系统分类分析的序列

Table 1 The sequences selected for the phylogenetic analysis

Samples	The number of sequences selected	Sequences
F1	5	F11 F12 F13 F14 F15
F3	9	F31 F32 F33 F34 F35 F36 F37 F38 F40
L1	3	L13 L14 L15
L3	4	L34 L35 L36 L37

2.2 不同活性污泥样品中 *amoA* 基因的差异

采用 *amoA* 特异性引物 AMO-F 和 AMO-R 分别对 4 个活性污泥 DNA 样品进行 PCR 扩

增,以实验室富集培养的 AOB DNA 为阳性对照,结果如图 2。来自活性污泥样品 F3、L1、L3 的 DNA 样品经 PCR 扩增后均得到大小为 823bp 左右的单一扩增带,活性污泥样品 F1 的 DNA 样品在相同的实验条件下无法得到扩增产物,本实验尝试着采用模板系列稀释法和提高模板量等方法均无法得到扩增条带,最后采用 Wizard DNA 纯化试剂盒(Promega)对该 DNA 样品进行纯化,尽量除去样品中可能存在的杂质,终于得到了目的扩增片段。

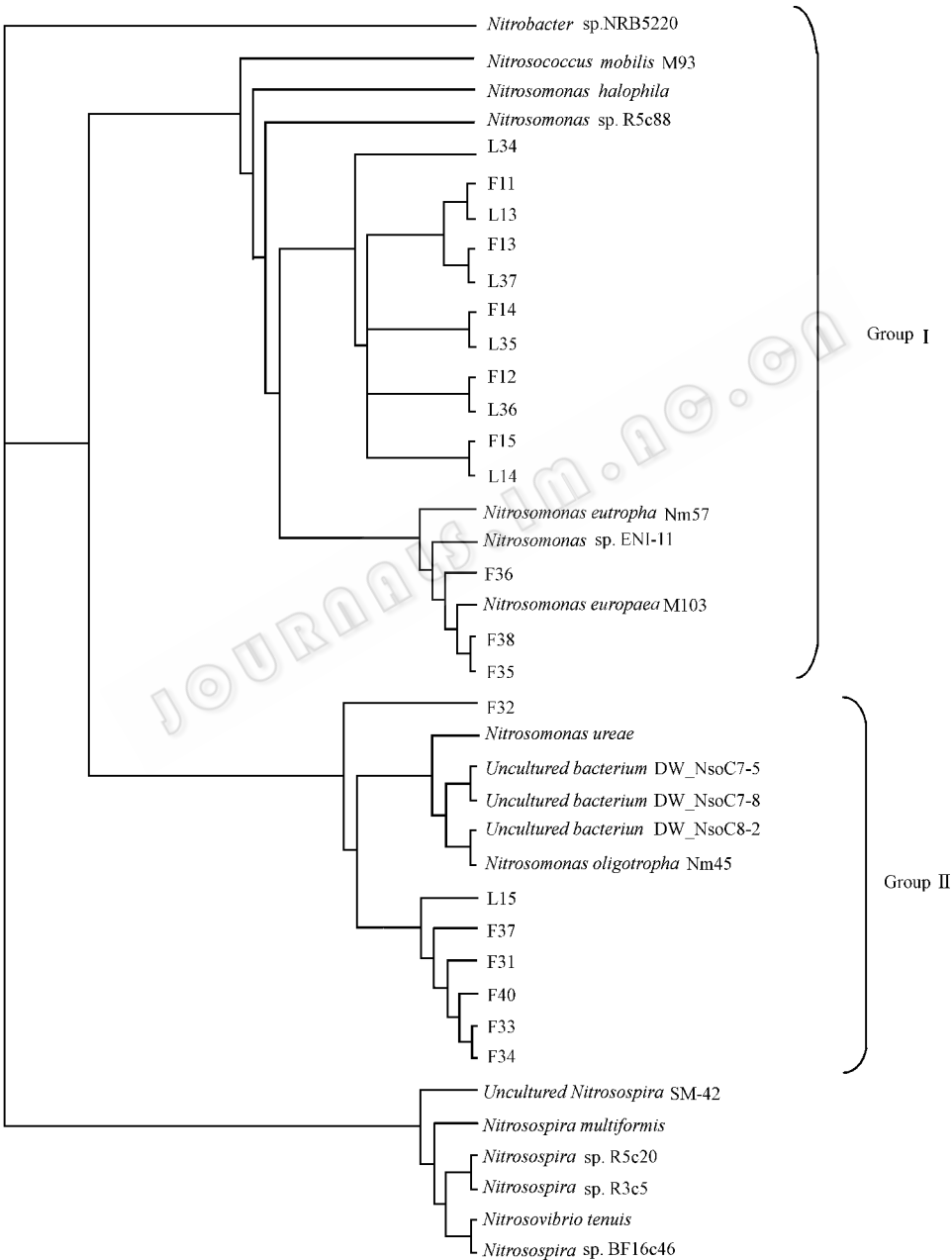


图 1 活性污泥样品中氨氧化细菌的系统分类关系

Fig.1 Phylogenetic relationships of the strains found in this study

由此可见,样品 F1 中存在对 PCR 反应有干扰作用的杂质, *amoA* 基因的拷贝数也很低。这表明,在活性污泥驯化初期,系统中 AOB 的数量及活性均处于很低的水平,面对含高浓度氨氮的进水,系统中氨氧化菌群一时无法进行快速、有效地转化,造成大量有毒有害物质残留, *amoA* 数量之低这一结论也由 UVlband version 97 软件分析结果得到进一步的证实。

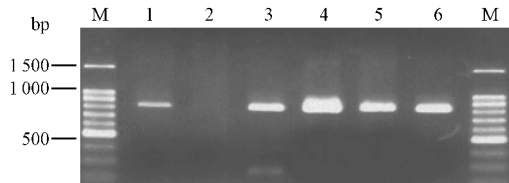


图 2 活性污泥样品中氨氧化酶基因的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of the *amoA* from the activated sludge samples

M.100bp DNA ladder; 1. AOB enriched in lab; 2. F1(The template DNA was unpurified); 3. F1(The template DNA was purified); 4. F3; 5. L1; 6. L3.

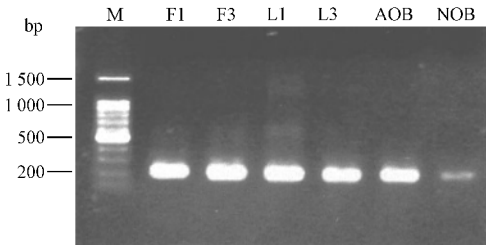


图 3 活性污泥样品 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增

Fig.3 PCR amplification of 16S rDNA V3 region from the activated sludge samples

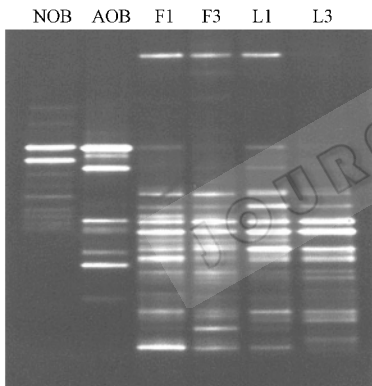


图 4 活性污泥样品 16S rDNA V3 区扩增片段的 DGGE 分析

Fig.4 DGGE analysis of 16S rDNA amplified fragments obtained from the activated sludge samples

2.3 不同活性污泥样品中细菌类群组成的差异

采用细菌 16S rDNA V3 区的通用引物对实验室富集培养的 AOB 和 NOB 中的主要类群及 4 个活性污泥样品的 DNA 进行 PCR 扩增,分别得到大小为 233bp 左右的单一扩增条带(图 3),将扩增产物适当浓缩后进行 DGGE 分析,了解各样品中的主要菌群,同时比较实验室富集培养样品与活性污泥样品中所含的细菌类群的差异(图 4)。结果可见,活性污泥样品 F1、F3 中含的细菌类群明显多于样品 L1、L3,这主要是由于样品 F1、F3 是取自活性污泥驯化初期,处理系统中的细菌尚未得到充分的选择压力、驯化、富集,优势菌群尚未形成,而样品 L1、L3 中的细菌经过长时间的筛选、富集,优势菌群基本上已经形成,菌群的分工相对较明确,细菌类群相对较集中。AOB 和 NOB 培养液中菌群组成存在很大的差异,两个样品中所含的扩增条带基本上均可以在 4 个活性污泥样品中的相应位置上找到,只是扩增带的强弱存在一定的差异,这是由于两个富集培养液的原始菌种均来自活性污泥样品,只是在培养过程中所选用的选择性培养基对细菌进行选择性的培养,逐步形成了 AOB 和 NOB 两个主要的菌群。实验室富集培养的样品的扩增条带的强弱与活性污泥样品存在较大的差异,这主要是由于实验室富集培养的条件与实际废水处理系统中的条件存在较大的差异,因此,所富集培养出来的菌群数量未必真实地反映实际废水处理系统中的菌群分布。

2.4 不同活性污泥中氨氧化菌的数量和种类与硝化效率的比较

4个活性污泥样品分别取自同一个高浓度氨氮废水处理系统中的两个串联的活性污泥曝气池。其中F1和F3分别是该处理系统刚经过技术改造后的调试、驯化前期的样品。当时第一级曝气池的氨氮去除效率很低,而第二级曝气池氨氮的去除率较高,两级曝气池的硝化效率存在明显差异(表2)。由硝化细菌16S rDNA特异性引物扩增的PCR产物克隆测序结果可见,两级曝气池AOB的种类基本相似,均与*Nitrosomonas* spp.的菌株序列有较高的同源性。分析造成硝化效率差异的主要原因是硝化过程的关键微生物——AOB的数量与活性。*amoA*基因的扩增试验结果表明,在相同的PCR扩增条件下,驯化初期第一级曝气池的活性污泥样品F1无法得到扩增片段,只有经过充分纯化,尽量去除样品中的杂质之后才得到目的扩增产物。经UVIband v.97软件分析,发现驯化初期第一级曝气池活性污泥样品中,*amoA*基因的拷贝数与来自第二级曝气池的样品存在显著差异(图5)。采用常规细菌分离培养和鉴定方法,对不同活性污泥样品中主要细菌类群数量分析的结果也显示,两级曝气池的AOB数量存在一个数量级的差异(结果另文报道)。本研究的结果充分说明,高浓度氨氮废水处理系统中影响氨氮去除效率的主要因素是AOB的数量和活性。在活性污泥驯化期间对废水处理运行的参数进行调整,形成有利于AOB生长及其活性发挥的环境,促进AOB数量的增加和*amoA*基因的表达是至关重要的。

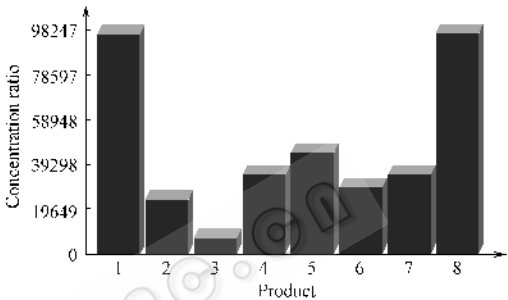


图5 活性污泥样品中氨氧化酶基因PCR扩增产物的UVIband v.97定量分析结果

Fig.5 The quantified analysis result of the PCR amplified products of the *amoA* from the activated sludge samples with UVIband v.97 software 1. 8. 100bp DNA ladder ; 2. AOB enriched in lab ; 3. F1(The template DNA was unpurified) 4. F1(The template DNA was purified) ; 5. F3 ; 6. L1 ; 7. L3 .

表2 污泥驯化初期两级曝气池的氨氮去除率

Table 2 The ammonia removal efficiencies of the two aerobic plants in the initial stage			
The aerobic plants	Maximal removal efficiencies/ %	Minimal removal efficiencies/ %	Average removal efficiencies/ %
The first pool	21.61	0	9.63
The second pool	56.12	28.62	42.28

参 考 文 献

[1] Arthur J W , West C W , Allen K N , et al . Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species . *Bull Environ Contam Toxicol* , 1987 , **38** : 324 ~ 331 .

[2] Wood P M , Nitrification as a Bacterial energy Source . In : Prosser J I . ed . Nitrification , Special Publ Soc Gen Microbiol , vol 20 . Oxford : IRL Press , 1986 . 39 ~ 62 .

[3] Prosser J I . Autotrophic nitrification in bacteria . *Adv Microb Physiol* , 1989 , **30** : 125 ~ 181 .

[4] 陈 灏 唐小树 林 洁 等 . 不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究 . *微生物学报* , 2002 , **42** (4) : 478 ~ 483 .

[5] Whiteley A S , Bailey M J . Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation . © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- system. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(6): 2400 ~ 2407.
- [6] Oved T, Shaviv A, Goldrath T, *et al.* Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(8): 3426 ~ 3433.
- [7] Ulrike P, Andreas P R, Stefan J, *et al.* Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(12): 5368 ~ 5382.
- [8] Hioms W D, Hastings R C, Head I M, *et al.* Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Microbiology*, 1995, **141**: 2793 ~ 2800.
- [9] Bock E, Koops H P, Harms H. Cell biology of nitrifying bacteria. In Prosser J I. ed. Nitrification Spec Publ Soc Gen Microbiol, vol 20. Oxford: IRL Press, 1986. 17 ~ 38.
- [10] Hooper A B. Biochemistry of the nitrifying lithoautotrophic bacteria. In Schlegel H G, Bowien B. ed. Autotrophic Bacteria, Madison. Wisconsin: Science Tech Publishers, 1989. 239 ~ 265.
- [11] McTavish H, Fuchs J A, Hooper A B. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J Bacterial*, 1993, **175**: 2436 ~ 2444.
- [12] Vanzella A, Guerrero M A, Jones R D. Effect of CO and light on ammonium and nitrite oxidation by *Chemolithotrophic bacteria*. *Mar Ecol Prog Ser*, 1989, **59**: 69 ~ 76.
- [13] Navarro E, Simonet P, Normand P, *et al.* Characterization of natural population of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Arch Microbiol*, 1992, **157**: 107 ~ 115.
- [14] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(2): 316 ~ 322.
- [15] Ward B B, Martino D P, Diaz M C. *et al.* Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from Hypersaline Mono lake, California, on the basis of 16S rRNA sequence. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(7): 2873 ~ 2881.
- [16] Muyzer G, Dewaal 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**: 695 ~ 700.

Study on the Ammonia-oxidizing Bacteria from Activated Sludge Samples by the Molecular Analysis

Xu Meiyang^{1 2 3} Zeng Guoqi¹ Ren Suizhou^{2 3} Cen Yinghua¹ Sun Guoping^{1*} Guo Jun¹

(¹ Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

(² Guangzhou Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

(³ Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The molecular analysis methods of PCR amplification, random cloning and sequencing were used to investigate the ammonia-oxidizing bacterial community composition and the activity of ammonia-monooxygenase (AMO) from the activated sludge samples of an industrial wastewater treatment plant receiving sewage with high ammonia concentration. It is the first time to use PCR-DGGE combined technique to analysis the difference of dominant bacterial community compositions of the activated sludge samples in China. The result showed that the ammonia-oxidizing bacteria (AOB) detected from the activated sludge samples all belong to *Nitrosomonas* sp.. The activity of AMO, the stability of bacteria community composition and the treatment efficiency of the wastewater treatment system were improved evidently, after the activated sludge system was operated for a certain extant. It is suggested that the molecular techniques will contribute to our understanding of the diversity and function of AOB and will benefit to improve the industrial wastewater treatment system.

Key words: Molecular analyses, Ammonia-oxidizing bacterium, DGGE

Foundation item: Guangdong Province Chinese National Natural Science Fund(015017)

* Corresponding author. Tel 86-20-87782471, Fax 86-20-87601587, E-mail: ebitech@gis.sti.gd.cn

Received date 09-16-2002