

# 厌氧氨氧化污泥中效应菌的分子生物学研究

雒怀庆<sup>1,2</sup> 胡勇有<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 华南理工大学环境科学与工程学院 广州 510640)

(<sup>2</sup> 吉林化工学院环境科学与工程系 吉林 132022)

**摘 要** 对具有厌氧氨氧化作用的细菌进行更深入的了解有助于该新型生物脱氮过程在实践中的应用,采用分子生物学方法从已培养的具有厌氧氨氧化活性的污泥中提取细菌总 DNA,经纯化、特异引物 PCR 扩增、克隆、测序等过程,得到厌氧氨氧化菌部分 16S rDNA 序列(长度为 836bp),少部分克隆具有 1~2 个碱基的突变。此外,进化分析结果显示培养获得的细菌与已发现的 *Candidatus Brocadia anammoxidans*, Anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete*, Uncultured anoxic sludge bacterium KU1 细菌在进化上关系较近,但对比分析结果表明所研究的细菌与上述细菌的 DNA 序列相似度不高,这表明自然环境中还存在一种以前未被发现的可进行厌氧氨氧化的细菌。

**关键词** 生物脱氮 厌氧氨氧化菌 16S rDNA

中图分类号:Q938 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)03-0335-04

1990 年荷兰 Delft 工业大学的 Kluyver 生物技术实验室发现了厌氧氨氧化现象(ANAMMOX-anaerobic ammonium oxidation)<sup>[1]</sup>。其实质是在厌氧条件下,微生物以 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>为电子受体, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>为电子供体,将 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>转变为氮气的生化过程<sup>[2]</sup>。这一特性比传统硝化-反硝化生物脱氮途径具有更明显的优点<sup>[3]</sup>。因此,厌氧氨氧化处理工艺将为废水脱氮提供一种经济有效的处理手段。

在厌氧氨氧化基础研究方面,对起厌氧氨氧化作用细菌的分类研究是其中的重点之一,由于对氧的极度敏感、生长非常缓慢及营自养生长,使得传统的生物学方法到目前还无法分离和培养厌氧氨氧化菌<sup>[4]</sup>,因此对这类细菌的研究非常困难。目前,借助分子生物学的方法对环境中的细菌进行研究高效快捷,在厌氧氨氧化细菌的分类研究中起了至关重要的作用。Strous 等<sup>[4]</sup>最先测定了一种厌氧氨氧化细菌的 16S rDNA 序列,最终确定出他们发现的厌氧氨氧化菌在细菌进化树上的位置,研究表明该种细菌属于浮霉状菌目(Planctomycetales),并命名为 *Candidatus Brocadia anammoxidans*。此后,又有一种具有 ANAMMOX 作用的细菌被发现和鉴定,并被命名为 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*<sup>[5]</sup>。

为了探索自然界中是否还存在起同样作用的细

菌,本文采用上流式厌氧污泥床反应器对厌氧氨氧化污泥进行了培养,将培养后的污泥进行处理,提取出污泥中总的 DNA,再经一系列分子生物学手段,得到了一种 ANAMMOX 菌的部分 16S rDNA 序列。

## 1 材料和方法

### 1.1 厌氧氨氧化污泥

实验研究的污泥为无机环境下的 ANAMMOX 混合培养物。该混培物由好氧污泥(取自广州大坦沙污水处理厂)在 1 个上流式厌氧污泥床反应器中,在进水仅包括氨氮、亚硝酸盐氮、碳酸氢钠和微量元素的情况下经 100 多天连续培养得到,此时的污泥具有明显的厌氧氨氧化活性和特征。

### 1.2 主要试剂

pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector system、EcoR I 购自 Promega 公司;蛋白酶 K 购自 Merk 公司;JM109 菌株购自华美生物;DNA 凝胶回收纯化试剂盒和日常型小量质粒抽提试剂盒购自杭州维特洁生化技术有限公司;Pfu 高保真聚合酶、dATP 均购自上海 Sangon。

ANAMMOX 菌特异引物<sup>[6]</sup>由上海博亚生物技术有限公司合成,正向引物 Pla46rc 5'-GGATTAGGCAT-GCAAGTC-3',反向引物 Amx820 :5'-AAAACCCCTC-TACTTACTGCCC-3'。

基金项目 国家自然科学基金(50378039)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-20-87114706 E-mail jppyyhu@scut.edu.cn

作者简介 雒怀庆(1971-)男,陕西人,讲师,博士,主要研究方向为废水生物处理。E-mail :edwards-luo@sohu.com

收稿日期 2004-10-21,修回日期 2005-01-07

### 1.3 污泥细菌总 DNA 的提取

对 Zhou 等<sup>[7]</sup>给出的土壤细菌总 DNA 提取方法作了适当改动,具体步骤为:在 50mL 无菌离心管中加入 5mL 污泥后以 12000r/min 4℃离心 10min,弃上清,往离心管中加入已灭菌的双蒸水 10mL,振动重悬污泥,再以 12000r/min 4℃离心 10min,弃上清,该步骤重复 3 次。

污泥洗涤后,在离心管中加入 9mL DNA 提取缓冲液(100mmol/L pH8.0 的 Tris-HCl,100mmol/L pH8.0 的 EDTA,100mmol/L pH8.0 的磷酸钠缓冲液,1.5mol/L NaCl,1% CTAB)以及 100 $\mu$ L 蛋白酶 K (10mg/mL)将污泥与各溶液混合均匀,在 37℃下置水平振荡器上以 225r/min 振动 30min,振动结束后,加入 1.0mL 20% 的 SDS,混匀置 65℃水浴 2h,期间每 15~20min 轻摇 1 次。将上述样品在室温下以 9000r/min 离心 10min,得到的上清液转至另一 50mL 无菌离心管。离心后的污泥再加入 4.5mL DNA 提取缓冲液和 0.5mL 20% SDS,摇动 10~20s,混匀后置 65℃水浴 10min,9000r/min 再离心 10min,合并离心得到的上清液,本步骤重复两次。合并各步骤上清液并混匀后,加入等体积的酚-氯仿(1:1),轻缓混合使溶液成乳浊液。乳浊液在室温以 4000r/min 离心 3min,将上层水相转移至另一无菌离心管,重复抽提步骤直至水-有机相界面无白色絮状体。在最后得到的水相中加等体积氯仿,混匀至乳浊状,室温下 4000r/min 离心抽提 3min,收集水相,该步骤重复 3 次。在水相中加入 0.6 倍体积的异丙醇,混合均匀后在室温下沉淀 1h,之后 18000r/min 室温离心 20min,弃上清。加 2mL 用冰预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀,以 18000r/min 4℃离心 5min,小心吸去上清,开管口于室温下使残留的液体挥发至干。加入 200 $\mu$ L 灭菌的双蒸水溶解 DNA,将 DNA 溶液转移至一无菌 1.5mL 离心管,最后定容至 500 $\mu$ L,抽提的粗制 DNA 以 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检查。粗制 DNA 采用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒纯化法,纯化过程按照纯化试剂盒说明书进行。

### 1.4 ANAMMOX 细菌 16S rDNA 片段的扩增

细菌 16S rDNA 基因片段的 PCR 反应体系(25 $\mu$ L):dNTP 12.5 $\mu$ L(终浓度 200 $\mu$ mol/L),MgCl<sub>2</sub> (1.5mmol/L),Plat46rc 0.5 $\mu$ L(0.534 $\mu$ mol/L),Amx820 0.5 $\mu$ L(0.492 $\mu$ mol/L),模板 DNA 0.25 $\mu$ L,Pfu Taq 聚合酶 1 $\mu$ L(0.5U),三蒸水 10.25 $\mu$ L。PCR 反应条件:95℃ 4min,94℃ 30s,56℃ 45s,72℃ 1min,进行 30 个循环,72℃ 5min。扩增反应的产物以 1% 琼脂糖凝

胶电泳检查。PCR 产物以 DNA 凝胶回收纯化试剂盒纯化。

### 1.5 PCR 扩增产物 3'加 A 和加 A 产物的克隆

加 A 的程序(200 $\mu$ L PCR 反应管中,顺序加入):1 $\mu$ L 纯化的 PCR 产物、1 $\mu$ L 10 $\times$  Taq 酶反应缓冲液、1 $\mu$ L 2mmol/L 的 dATP 使其终浓度为 200 $\mu$ mol/L、1.5 $\mu$ L Taq 酶(5U/ $\mu$ L)、灭菌三蒸水 5.5 $\mu$ L,将上述各成份混匀,在 70℃下恒温 25min,同时设 1 个平行反应,反应结束后合并两管产物。

按照 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector system 说明书分别做标准、阳性和阴性连接反应,连接反应后以 CaCl<sub>2</sub> 热击法制备 JM109 感受态细胞<sup>[8]</sup>,将连接产物导入大肠杆菌 JM109,之后铺 LB(氨苄青霉素/IPTG/X-Gal)平板,37℃过夜培养后进行蓝白筛选。在过夜培养后的平板上以无菌牙签挑取白色菌落,加入盛 5mL LB 液体培养基(氨苄青霉素 100 $\mu$ g/mL)的试管,37℃ 190r/min 培养 12h。取菌液 2mL,16000r/min 离心 20s 收集菌体,弃去上清后以日常型质粒小量提取试剂盒提取质粒,质粒提取步骤按试剂盒说明书进行。由于 pGEM<sup>®</sup>-T Easy 载体的多克隆区两端均有 EcoR I 酶的识别位点,因此用 EcoR I 酶切进行鉴定。

### 1.6 16S rDNA 序列测定和系统进化分析

根据酶切结果挑出的阳性克隆送上海博亚生物技术有限公司测序。本研究所测得的 ANAMMOX 菌 16S rDNA 序列已在 GenBank 中登录,登录号为 AY518553。测定的序列用 BLAST 在 GenBank 中搜索相近序列(<http://blast.cbi.pku.edu.cn/>)。同时将该序列与已发表的相关细菌的 16S rDNA 序列以 DNAMAN 5.0Demo 软件进行多重序列对齐,以 NJ 法构建进化树(Kimura 法估算遗传距离),并对构建的树进行 Bootstrap 分析(1000 个样本)。文中凝胶电泳图形均以 Photoshop 7.0 反相处理并加标注。

## 2 结果

将厌氧氨氧化污泥抽提所得 DNA 溶液经过 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳,在 21kb 左右出现条带(图 1,第 1 道)表明已获得较长片段的污泥微生物的总 DNA 基因组。另外也可以看出,目标条带的弥散和拖尾现象十分明显,这显示粗提 DNA 溶液中含有较多的污染物,尤其是核酸酶,核酸酶污染导致 DNA 降解产生长短不等的碎片,电泳时长短不同的 DNA 的电泳速度不同,因此出现拖尾现象。

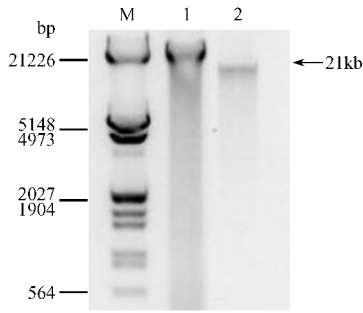


图 1 厌氧氨氧化污泥抽提的 DNA 和纯化结果

Fig.1 Crude and purified DNA extracts obtained from ANAMMOX sludge

M. Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker ;1. Crude DNA ;2. Purified DNA by DNA gel extraction kit.

从纯化的结果看,凝胶纯化回收试剂盒得到的 DNA 纯度比较好,大片段略有损失,但对进一步的分析研究不会产生严重影响。

本研究采用的引物对鉴别厌氧氨氧化细菌具有特异性,这可从国外研究者利用该对引物从具有厌氧氨氧化活性的污泥中扩增出目标菌的核酸片段得到证明<sup>[6,9]</sup>。从扩增 ANAMMOX 类菌的 16S rDNA 片段的结果看(图 2),采用这类菌的特异引物 Pla46rc 和 Amx820 从纯化的细菌总 DNA 中扩增出的片段大于 800bp,而这对引物对已发现的几种厌氧氨氧化细菌的 16S rDNA 扩增得到的片段长度与此接近,这初步表明与这些细菌相近且生理活性相似的细菌存在于本研究所培养的 ANAMMOX 污泥中。

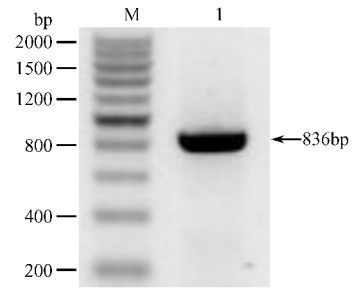


图 2 厌氧氨氧化菌的 16S rDNA 片段扩增

Fig.2 16S rDNA fragment PCR product of the ANAMMOX bacteria  
M. 200bp Ladder ;1. 16S rDNA fragment PCR product of the ANAMMOX bacteria.

对纯化后的污泥细菌总 DNA 以特异引物经 PCR 扩增后,扩增产物以 T-A 克隆方式连接到 pGEM-T easy 载体上,转 JM109 感受态细胞,最后铺平板进行蓝白筛选。实验共得到 64 个白色克隆,随机调选 24 个克隆经 EcoRI 限制性内切酶酶切去除假阳性克隆,最后得 23 个克隆送上海 Sangon 公司测序。

测序得到 22 个有效的克隆序列,这些序列经多重对齐分析发现它们均为同一种细菌,其中 9 个克隆序列表现为突变株,它们有 1~2 个碱基的突变,其余 13 个序列相同。所有克隆的序列长度为 836bp,不同于相同引物下 Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete KOLL2a、Candidatus Brocadia anammoxidans 和 Candidatus Kuenenia stuttgartiensis 等厌氧

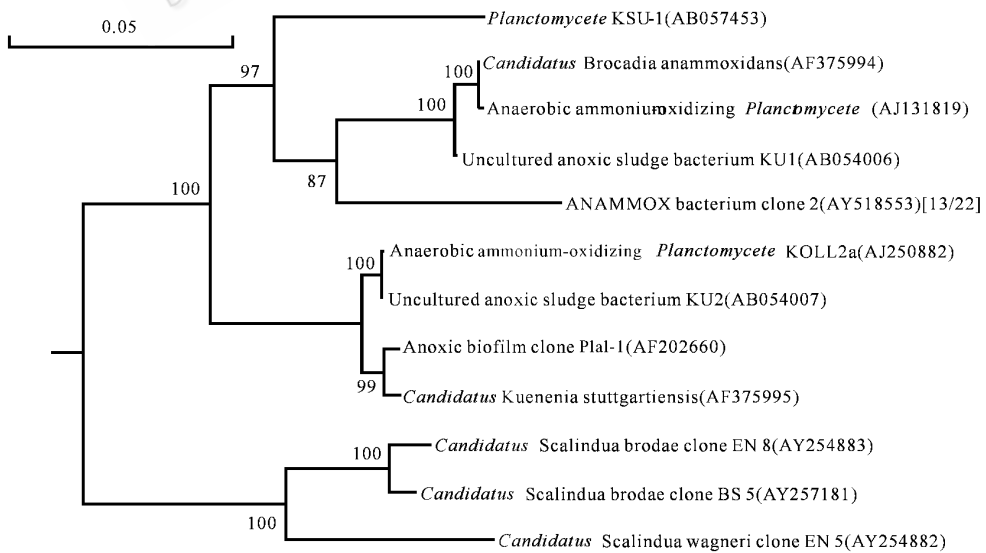


图 3 厌氧氨氧化污泥中厌氧氨氧化细菌与其它相关细菌的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of the ANAMMOX bacteria in ANAMMOX sludge with its relatives

Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers in square brackets indicate the clone number out of the total clones. The numbers next to the nodes represent the bootstrap values of 1000 replications. The scale bar represents 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

氨氧化菌 832bp<sup>[6]</sup>、834bp 和 827bp<sup>[10]</sup> 的 16S rDNA 扩增片段长度。此外在 22 个克隆中选最保守的核酸序列(未突变株)进行 BLASTN 检索,得到多个相近细菌的 16S rDNA 片段,以这些序列构建系统发育树(图 3)。

从图上看,本实验得到的厌氧氨氧化菌与 *Candidatus Brocadia anammoxidans*、Anaerobic ammonium-oxidizing *planctomycete*、uncultured anoxic sludge bacterium KU1 细菌聚为一群,显示它们在进化关系上比较接近。对相同引物的扩增产物比对分析表明,本研究所得的细菌 16S rDNA 序列与上述细菌相同区段的相似度分别为 92.7%、92.6% 和 93.2%,由此可见,实验中的厌氧氨氧化菌与其它已发现的同类菌有一定差别。由于实验所培养的污泥具有明显的厌氧氨氧化活性,因此可以认为在自然环境中还存在一种以前未被发现的可进行厌氧氨氧化的细菌。

致谢 本研究过程中得到了暨南大学环境工程系尹华教授、生命科学技术学院生物工程研究所洪岸教授、戴云、程晓佳、刘翠兰等老师和颜艳玲、李国辉、杨小柯等同学的热心帮助,在此表示衷心感谢!

### 参 考 文 献

- [1] Jetten M S M, Strous M, van de Pas-Schoonen K T, *et al.* The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, **22** (5): 421 - 437.
- [2] van de Draaf A A, Mulder A, Peter de B, *et al.* Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** (4): 1246 - 1251.
- [3] Verstraete W, Philips S. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental Pollution*, 1998( s1 ), **102**: 717 - 726.
- [4] Strous M, Fuerst J A, Kramer E H M, *et al.* Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 1999, **400**: 446 - 449.
- [5] Schmid M, Twachtman U, Klein M, *et al.* Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Sys Appl Microbiol*, 2000, **23**: 93 - 106.
- [6] Egli K, Fanger U, Alvarez P J J, *et al.* Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch Microbiol*, 2001, **175**: 198 - 207.
- [7] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 316 - 322.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [9] Schmid M, Walsh K, Webb R, *et al.* *Candidatus Scalindua brodae*, sp. nov., *Candidatus Scalindua wagneri*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol*, 2003, **26** (4): 529 - 538.
- [10] Schmid M C, Schmitz-Esser S, Jetten M, *et al.* 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environ Microbiol*, 2001, **3** (7): 450 - 458.

## Molecule biology study on the effective bacteria in ANAMMOX sludge

LUO Huai-qing<sup>1, 2</sup> HU Yong-you<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> School of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 540640, China)

(<sup>2</sup> Department of Environmental Science and Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China)

**Abstract:** A greater understanding of anaerobic ammonium oxidation bacteria will help to pave the way for the new biological nitrogen removal process application in practice. To this end, this study used molecule biology methods. Crude DNA of the total bacteria in a cultivated sludge with ANAMMOX capability was extracted and purified. Then PCR amplification using specific primers, clone and sequencing processes were performed. The partial 16S rDNA sequence of cultivated ANAMMOX bacteria is 836bp. Some clones have one to two base mutation(s). Phylogenetic analysis indicates that the cultivated ANAMMOX bacteria in this study close to *Candidatus Brocadia anammoxidans*, anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete* and uncultured anoxic sludge bacterium KU1 with the same function, whereas the cultivated ANAMMOX bacteria are relatively low DNA sequence similarity to the forementioned bacteria using alignment analysis. The results suggest that there is a kind of bacterium which has never been found before with ANAMMOX capability existing in nature.

**Key words:** Biological denitrification, Anaerobic ammonium oxidation bacteria, 16S rDNA

Foundation item: Chinese National Natural Science Fund(50378039)

\* Corresponding author. Tel: 86-20-87114706; E-mail: jpyyhu@scut.edu.cn

Received date: 10-21-2004