

应用 QC-PCR 技术研究高效菌株 *Rhodococcus ruber* Em1 在废水处理中的作用

黄 玲^{1,3} 李习武¹ 李旭东² 刘双江¹ 刘志培^{1*}

(¹中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(²中国科学院成都生物研究所 成都 610041) (³中国科学院研究生院 北京 100039)

摘 要 应用竞争性定量 PCR(QC-PCR)技术,对石化废水处理系统中投加的高效芳烃降解菌株 *Rhodococcus ruber* Em1 数量变化趋势及其作用进行了分析。持续 5 个月从处理系统中不定期采集活性污泥样品,进行 Em1 菌株定量测定和处理系统的效果分析。结果表明,基于 16S rRNA 基因的特异引物具菌种水平的特异性,用其扩增污泥总 DNA,并对产物克隆测序,所扩增的产物中 62.2% 为 Em1 菌株 16S rRNA 基因片段。检测得到活性污泥样品中含 Em1 菌株数量范围为 $3.4 \times 10^5 \sim 4.3 \times 10^8$ CFU/g,表明所投加的高效降解菌在处理系统中长期稳定存活并繁殖,Em1 菌量与 COD 去除量之间的相关性系数(R^2)高达 0.89,表明 Em1 菌量与系统的处理效果具有明显的正相关性。这些结果说明,投加的 Em1 菌株在高浓度多环芳烃等污染物存在的条件和复杂菌群环境中,仍能长期稳定地存活并繁殖,在废水处理系统中发挥重要的作用。

关键词: 废水处理; 高效菌; 生物强化技术; QC-PCR; 作用分析

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)02-0307-06

目前,包括炼油厂排放的污水等含多环芳烃的废水处理已成为环境治理的重大课题^[1]。由于生物技术所具有的成本低、作用条件温和、无二次污染等优点^[2],使其成为环境治理中的首选技术。其中投加高效菌的生物强化处理技术(bio-augmentation)是环境治理的重要发展方向^[3]。为了更有效地控制生物强化处理过程,提高其效率,需要对加入的活性菌株的数量和降解活性进行实时检测。因而跟踪监测所投加的高效菌并分析其功能表达,是今后强化生物处理技术领域的又一研究热点^[4~7]。然而,活性污泥是一个十分复杂的共生体系,微生物种类极其繁多且生态结构极其复杂,要对其中的某种微生物进行定量测定,若采用传统以培养为基础的方法^[8],如稀释菌落计数法(Colony forming unit, CFU),需要对所有的微生物进行分离纯化和分类鉴定等,不但工作量巨大、耗费大量的物力和财力,而且试验周期长,不能及时反映处理系统的状况;其次投加的高效菌种还受到活性污泥中很多因素,例如营养成分(碳、氮、磷源等)、温度、氧分压、含水量、pH 值或盐

浓度的变化等的影响,部分细胞转变为不可培养状态,无法进行纯培养,从而导致定量不准确。

近 20 年来分子生物学方法在环境微生物学中得到了日益广泛的应用。从环境样品中直接提取细菌群体基因组 DNA,并对 16S rRNA 基因进行克隆和序列分析^[9],证明是对环境样品中不可培养菌进行检测和定量的有效方法。竞争性定量 PCR(Competitive Quantitative Polymerase Chain Reaction, QC-PCR)技术是基于某一细菌所特有的 DNA 序列进行细菌定量的分子生物学方法。已经被国外许多研究者应用于环境微生物群体的绝对组成和结构的研究^[9,10],以及一个细菌类群或基因在群体中的动态变化分析^[11]。

本研究利用竞争性定量 PCR 技术对南充炼油废水处理系统中投加的高效菌数量动态变化进行定量分析,结合处理效果如 COD 去除量,进而分析该菌株在处理系统中发挥的作用。为生物强化技术处理炼油厂废水污染实时监控和高效菌株作用的发挥提供了可靠依据。

基金项目: 国家“863 计划”(2002AA601150)

* 通讯作者。E-mail: liuzhp@sun.im.ac.cn

作者简介: 黄 玲(1982-),女,湖南人,硕士研究生,从事环境微生物学研究。E-mail: huangling@mail.im.ac.cn

其他作者: 谭周亮

收稿日期: 2006-06-16; 接受日期: 2006-08-22; 修回日期: 2006-11-09

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:赤红球菌 Em1 (*Rhodococcus ruber* Em1),分离于华北油田石油污染土壤,该菌株具有降解多种烷烃、多环芳烃及产生生物乳化剂的能力^[12,43],已成功地应用于南充炼油厂废水处理工程。其他与 Em1 菌株不同亲缘关系的 10 个参照菌株:*Rhodococcus ruber* JCM3342, *Rhodococcus erythropolis* DSM43060, *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, *Gordonia amicalis* DSM44461, *Gordonia desulfuricans* DSM44462, *Gordonia sihwaniensis* DSM44576, *Nocardioides albus* DSM43109, *Escherichia coli* K12, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032。所用菌株皆购于中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。

1.1.2 待测样品:待检测污泥样品采自南充炼油厂废水处理工程。

1.1.3 试剂和仪器:玻璃珠购于 SIGMA-ALDRICH 公司; *Taq* DNA 聚合酶购于天根生物技术有限公司; RNase A、溶菌酶、蛋白酶 K 购于鼎国生物技术有限公司; DNA 柱纯化试剂盒购于赛百盛基因技术有限公司; PCR 所用的引物均由上海 Sangon 公司合成; DNA 测序均由三博远志生物技术有限公司完成。DNA 提取液 Solution A:100mmol/L Tris pH8.0, 100mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 2% SDS, 1% CTAB/NaCl。

1.2 活性污泥总 DNA 的提取

1.2.1 样品预处理:将污泥样品于 12000r/min 离心 3min,弃上清,取 1.0g 样品于 4mL 120mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH8.0)中,150r/min 匀速震荡 15min,然后以 6000 × g 离心 10min;沉淀再次洗涤后用于后续试验。

1.2.2 玻璃珠破壁法提取活性污泥总 DNA:采用 Laurent 等^[14]的方法,并作适当调整。具体如下,取 0.5g 污泥,加入 1.0mL 提取液(100mmol/L Tris, 100mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 1% polyvinylpyrrolidone 2% SDS)和 0.5g 玻璃珠(直径 460μm),漩涡仪剧烈振荡 5min,每振荡 1min 于冰上静置 1min,在 13000r/min 下离心 5min,取上清,加入 1/10 体积冰冷的乙酸钠(5mol/L),冰上放置 10min 后,在 14000r/min 离心 10min,取上清,等体积酚:氯仿:异戊醇抽提,12000r/min 4℃ 离心 10min,弃下层取上清,加入等体积的异丙醇,沉淀 30min,12000r/min 离心

10min,收集沉淀,溶解于 50μL TE(10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA, pH 8.0)缓冲液中。DNA 经过稀释后用于 QC-PCR 分析。

1.2.3 粗提 DNA 的纯化:采取基因组 DNA 纯化试剂盒纯化粗提 DNA。

1.3 引物设计

利用 Primer Premier 5.0 软件设计基于 Em1 菌株 16S rRNA 基因序列的通用引物和特异引物。HYB Em1F 为杂合引物,前 21 个碱基对应于 Em1 菌株 16S rRNA 基因的 139 ~ 159bp 位点,后 19 个碱基对应于 305 ~ 323bp 位点。试验所设计的引物如表 1 所示。

表 1 试验所用的引物

Table 1 Primers used in this study		
Primer name	Primer sequence(5'→3')	Specificity
357 F	CCTACGGGAGGCAGCAG	Universal
1482 R	ACGGCTACCTTGTACGACT	Universal
HYB-Em1 F	GGACCTCGGGATGCAATGTTCC GGAGCGACGAGTGGGAAT	Specific to Em1
1401 R	CGGTGTGTACAAGGCC	Universal
Em1 159 F	GGACCTCGGGATGCAATGTTCC	Specific to Em1
Em1 960 R	CACTCTGCGGGCGTCCGGTGTAT	Specific to Em1

1.4 竞争性模板的构建

通过两次 PCR 反应^[15]构建长度 1068bp 的竞争性模板(图 1)。杂合引物 HYB Em1F 引导扩增能产生发生了内删除的竞争性模板 DNA 分子。以竞争性模板,进一步 PCR₃ 扩增得到 677bp 的产物,该产物跟竞争性模板一样缺失了 160 ~ 304 之间的 145bp 序列。而以基因组 DNA 为模板 PCR₃ 扩增得到长为 822bp 的产物。通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳即可清晰地分辨出两条不同长度的 PCR 产物条带以进行后续分析。

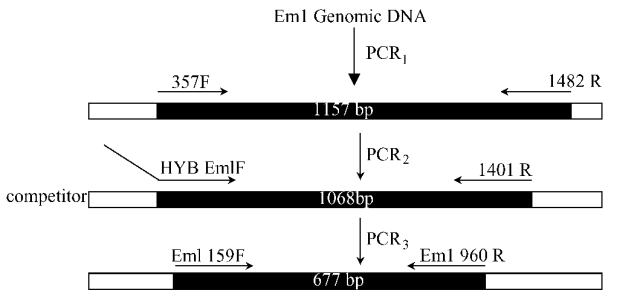


图 1 竞争性模板的构建

Fig.1 The strategy of constructing competitor.

1.5 标准曲线的构建

将不同浓度的 Em1 细胞悬液加入到 0.2g 无菌污泥中,使其终浓度分别达到 1.48×10^8 , 5.94×10^8 , 2.38×10^9 , 9.5×10^9 , 1.9×10^{10} 和 2.85×10^{10} CFU/g, 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

分别提取污泥样品总 DNA ,进行 QC-PCR 扩增 ,其中竞争性模板恒定为 140fg ($140 \times 10^{-12}\text{mg}$)

1.6 样品定量分析

1.6.1 污泥样品菌量的检测 :不定期从南充炼油废水处理工程采集污泥样品 ,称取定量样品提取总 DNA 。粗提液进行 PCR 预试验 ,若能扩增出目标产物 ,则模板不需进一步纯化 ;若不能扩增 ,则进一步用试剂盒纯化。取处理好的基因组 DNA 进行 QPCR 扩增 ,基因组 DNA 模板的量通过 PCR 预试验确定。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 ,EB 染色 ,通过 Quantity One(Bio Rad)读取条带亮度 ,结合标准曲线分析样品中目标菌的数量。

1.6.2 污泥样品 COD 的检测 :本试验采用国标 GB11914-89 方法(重铬酸钾法)对处理系统中采集样品的化学需氧量进行分析。

2 结果和分析

2.1 不同菌株的特异引物 PCR 及引物特异性分析
采用设计的特异性引物对与 *Rhodococcus ruber* Em1 菌株具有不同亲缘关系的菌种进行 PCR 扩增 ,引物 Em1 159F , Em1 960R 只能从 *Rhodococcus ruber* Em1 及 *Rhodococcus ruber* JCM3342 扩增得到产物 (822bp) ,而不能从其他菌株 ,包括与 Em1 菌株同属不同种 ,近缘的不同属和远缘的不同属菌株 ,扩增出产物 ,初步说明引物 Em1 159F , Em1 960R 至少具有种水平的特异性。

进一步对污泥样品扩增产物构建文库 ,从文库中随机挑取 45 个阳性克隆进行测序^[21] ,结果表明 , 28 个克隆与 *Rhodococcus ruber* Em1 菌株 16S rRNA 基因上相应片段完全相同 ;11 个克隆与 *Rhodococcus ruber* Em1 菌株 16S rRNA 基因的相应片段虽不完全一致 ,但也具有很高的相似性 ,应为同一物种的不同菌株 ,另外 6 个克隆与一些未培养细菌有较高的相似性。进一步说明所用的引物不仅具有种水平特异性 ,而且其扩增产物中绝大多数(62.2%)为目标菌株(Em1 菌株)的相应片段 ,为了更准确计算 Em1 菌株在样品中的数量 ,以 0.622 作为计算系数。

2.2 竞争性模板和 Em1 基因组 DNA 扩增效率比较
扩增效率是 QC-PCR 的一个重要参数 ,应尽量避免倾向性扩增。只有当竞争性模板与目标模板的扩增效率相等或相近时才能正确反映目标模板的真实初始数量^[17,18]。分别以竞争性模板与 Em1 基因组 DNA 为模板进行扩增 ,在反应分别进行到 22 24 , 26 28 30 个循环时取样 ,在 1.5% 琼脂糖凝胶上进

行电泳 ,EB 染色后 ,通过凝胶成像分析软件 Quantity One(Bio Rad)读取条带亮度 ,并换算为单位面积的光密度 ,与循环数对应做回归曲线 ,分别得到两者的扩增效率(图 2)。

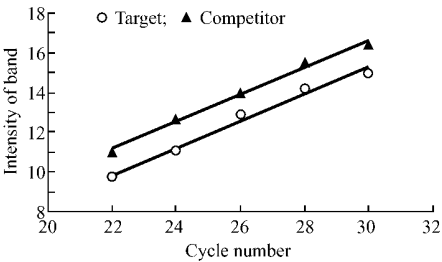


图 2 目标模板和竞争性模板的扩增效率比较
Fig.2 Comparison of amplification efficiency of target and competitor.

图 2 表明 ,目标模板和竞争性模板在 22 ~ 30 循环内产物的量与循环次数呈线性相关 ,竞争性模板的扩增速率为 $y = 0.6845x - 3.891$ ($R^2 = 0.9931$) ,目标模板的扩增速率为 $y = 0.6785x - 5.091$ ($R^2 = 0.9856$) 。根据公式 $\text{Efficiency}[\text{eff}] = 10^{\alpha} - 1$ (α 为斜率) 可以计算出竞争性模板扩增效率为 3.8362 ;目标 Em1 模板扩增效率为 3.7978 ,二者扩增效率基本一致 ,而且其比值恒定为 1.010。根据结果推测当循环数大于 30 时 ,扩增趋于饱和 ,不再成线性关系 ,因此将 QC-PCR 循环数确定为 28 个。

2.3 菌株 Em1 的细胞数量与 PCR 产物的相关性
将 Em1 菌体加入灭菌污泥样品中使其浓度分别为 1.48×10^8 , 5.94×10^8 , 2.38×10^9 , 9.5×10^9 , 1.9×10^{10} 和 2.85×10^{10} CFU/g 提取污泥样品总 DNA ,在竞争性模板恒定为 140fg ($140 \times 10^{-12}\text{mg}$) 下进行 QC-

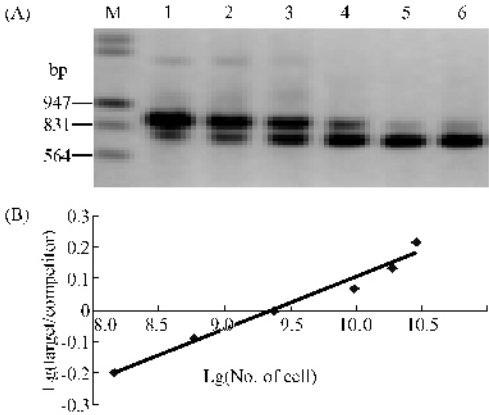


图 3 不同浓度 Em1 细胞与 PCR 产物量之间的关系
Fig.3 Relationship between the density of Em1 cells and amount of QPCR products A : The results of QPCR with gradient density of Em1 cells. M. Marker ; The amount of Em1 cells : 1 2.85×10^{10} ; 2 1.90×10^{10} ; 3 9.5×10^9 ; 4 2.38×10^9 ; 5 5.94×10^8 ; 6 1.48×10^8 ; B : Standard curve calculated based on the density of bands on A .
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

PCR 扩增 构建曲线。标准曲线反映菌株 Em1 的细胞数量与 PCR 产物的相关性,其线性范围是 $2.85 \times 10^{10} \sim 1.48 \times 10^8$ CFU/g,依据标准曲线可以推算待测污泥样品中菌株 Em1 的数量,不需要考虑 DNA 的提取效率以及纯化所带来的偏差(图 3)。

2.4 污泥样品中 Em1 菌株的菌量分析

不同时期从南充炼油厂废水处理工程流化床反应器和生物接触氧化池采集污泥样品:2005 年 9 月 28 日一级反应池,9 月 28 日二级反应池,2006 年 1 月 26 日一级反应池,1 月 26 日二级反应池,2006 年 2 月 18 日一级反应池,2 月 18 日二级反应池。对以上 6 个样品进行 QC-PCR 分析,得到相关数据和样品中菌体数量如表 2 所示。根据 PCR 产物条带的光密度比值从标准曲线计算得到对应的菌体数量。由于引物非特异扩增以及试验过程中通过样品多管合并和标准体系相比增大了样品中的目标菌数量,因此需要将标准曲线所读取的数据以一定比例进行必要的校正和数据换算,最终得到污泥样品中 Em1 的相对菌体数量。对前 4 个样品依照标准曲线读到的菌量应乘以参数 0.622 (28/45),以除去污泥中非特异扩增带来的误差,方得到样品中真实的 Em1 菌株数量。试验中对后两个样品进行了平行样品的多管合并,故测得的数值相当于原初污泥样品菌量的 5 倍,其后将平行提取的两管 DNA 溶液再次混合,并将 DNA 最终溶解于 20 μ L TE (标准体系溶解于 50 μ L TE),吸取 2 μ L DNA 溶液作模板(标准体系取 1 μ L)。故读得的 Em1 菌体数量必须乘以参数:0.012444(28/45 * 5 * 2 * 2.5 * 2),才能如实地反映样品中 Em1 菌株的数量(表 2)。

表 2 污泥样品 QC-PCR 参数和 Em1 菌株数量					
Table 2 Data from QC-PCR and the number of strain Em1 in samples					
Sample	Ig (Target/Competitor)	Ig (Number of cell)	Cell No. from standard curve	Index	Cell No. in sample (CFU/g)
9.28 (1)	-0.1904	8.2474	1.77×10^8	0.6222	1.1×10^8
9.28 (2)	-0.1194	8.6684	4.66×10^8	0.6222	2.9×10^8
1.26 (1)	-0.1015	8.7742	5.95×10^8	0.6222	3.7×10^8
1.26 (2)	-0.0904	8.8395	6.91×10^8	0.6222	4.3×10^8
2.18 (1)	-0.0973	8.7993	6.30×10^8	0.0124	7.9×10^6
2.18 (2)	-0.3282	7.4314	2.7×10^7	0.0124	3.4×10^5

2.5 处理系统中 COD 的去除量分析

于不同时期采集反应池进水和出水样品,采用国标 GB11914-89 法对采集的样品检测化学需氧量,所得 COD 数据如表 3 所示。反应池进水与该池出水化学需氧量的差值反映了处理池有机污染物的去除量,即该处理系统对有机污染物的降解情况。

表 3 污泥样品中 COD 的去除量			
Table 3 Data of COD removed in the sediment samples			
Sample	COD of influx (mg/L)	COD of effusion (mg/L)	COD removed (mg/L)
9.28 (1)	588.33	95.24	493.09
9.28 (2)	588.33	78.34	509.99
1.26 (1)	780.45	110.86	669.59
1.26 (2)	780.45	109.87	670.58
2.18 (1)	485.66	76.48	409.18
2.18 (2)	485.66	56.6	429.06

2.6 样品污泥菌量与 COD 去除量之间的关系分析

对南充炼油厂废水处理系统中不同的流化床反应器和生物接触氧化池不定期采集的污泥样品,进行目标菌株 Em1 的定量。通过分析 05 年 9 月 28 日,06 年 1 月 26 日和 06 年 2 月 18 日污泥样品的 Em1 菌量和 COD 去除量之间的相关性,结果表明(图 4),Em1 菌量与系统 COD 去除量之间有明显的正相关关系,其相关性系数达到了 $R^2 = 0.89$,说明该菌株在处理系统中对污染物的降解有重要的作用。

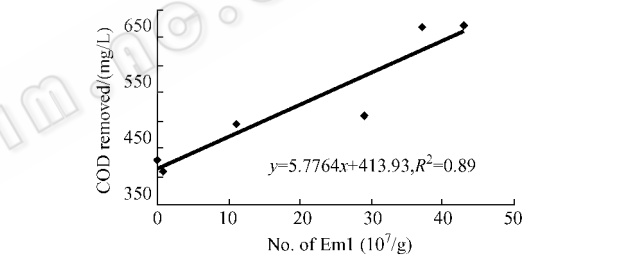


图 4 Em1 菌量与 COD 去除量之间的相关性分析
Fig.4 Analysis of the relationship between the number of strain Em1 and the removal of COD.

3 讨论

南充炼油厂废水处理工程利用生物强化处理技术,针对炼油厂排放的炼油废水中高浓度、难生化降解的污染物(其中 90% 为多环芳烃和各种烷烃类)投加活性高、降解能力强的高效菌株 *R. ruber* Em1 并进行强化处理。菌株 *R. ruber* Em1 为新分离菌株,能以石油烃为唯一碳源很好生长,Em1 具有极其广泛的底物降解谱,能降解烷烃,简单芳烃如苯、萘和聚环芳烃蒽、菲、萜等多种石油烃,同时该菌株产生新型实用的生物乳化剂,通过提高石油烃在水中的溶解度从而促进对炼油废水中有机污染物的降解^[2,13]。以较高数量的高效菌加入处理系统中,使其在环境菌群中能以较高数量存活并稳定繁殖,从而更好地发挥降解作用,达到经济而高效处理污染的效果^[3]。由于投加的高效微生物数量直接影响废水处理系统的运行效果。本试验利用 QC-PCR 技术

对处理系统不同时期的高效菌株进行定量分析。

QC-PCR 技术具有简单、准确、快捷和低成本的优点,已被广泛应用于环境样品中目标菌的定量^[9,11]。由于活性污泥成分复杂,含有腐殖质^[14,20]、酶抑制剂、各种离子和未知成分的化学干扰物质等,都会降低所提取 DNA 的纯度,干扰 PCR 定量扩增;同时提取方法对目标 DNA 的回收率也会影响到定量结果。本试验采用玻璃珠法破碎菌体细胞^[14],并结合酚:氯仿:异戊二醇抽提^[17],得到纯度符合 PCR 扩增的污泥总 DNA 模板。

利用 QC-PCR 技术进行准确的定量,理想的特异性引物必须能准确并唯一地识别目标菌株。本试验特异引物依据目标菌株的 16S rRNA 基因超变区设计而成,由于细菌同一物种内不同菌株具有高度相似的 16S rRNA 基因序列,相似性高达 97%~100%。因此很难设计一对引物能唯一地识别某一菌株 16S rRNA 基因。为了提高扩增特异性,对特异性 PCR 体系和扩增程序进行了优化,采取较高的退火温度(58℃),并通过检索分析和 PCR 扩增产物测序检测了引物特异性,试验选取 10 个与 Em1 菌株具有不同的亲缘关系的对照菌株进行 PCR 扩增检测。以上两方面皆证明引物具有种水平的特异性。为了进一步排除污泥中非特异扩增的干扰,试验得到了非特异扩增的比例。通过对污泥样品扩增产生的序列进行测序分析表明,扩增的序列中目标菌株 Em1 16S rRNA 基因约占 28/45;其余 6/45 为非培养的未知菌 16S rRNA 基因;11/45 为赤红球菌菌种的不同菌株 16S rRNA 基因。该统计结果表明^[21]:用设计的特异性引物扩增总 DNA,只有赤红球菌及其近源菌的 16S rRNA 基因能被扩增,因此在进行菌量分析时,应将所得菌量乘以 28/45 才能依据扩增产物正确地反映 Em1 菌体数量。

对处理系统采集的样品进行 Em1 菌体数量分析并结合污泥 COD 数据^[19],绘制两者相关曲线。经过长期样品分析,可知 Em1 菌株在高浓度石油烃污染物和复杂菌群环境中,仍能长期稳定地存活和繁殖,并很好地发挥降解功能。因而表明 *R. ruber* Em1 是含石油烃类污染物废水生物强化处理的理想菌株。南充炼油厂排放的待处理废水中石油烃,包括多环芳烃和各种烷烃,含量高达废水总 COD 的 90%(数据未显示)。而 *R. ruber* Em1 通过产生高效的生物乳化剂,同时对多种石油烃能高效降解。Em1 菌体数量与处理系统中废水 COD 去除量的相关性^[19]表明,随着废水中 Em1 菌体数量的增加,废

水 COD 去除量也呈上升趋势,相关性系数 R^2 达 0.89,表明 Em1 菌株在所研究的南充炼油厂废水处理工程中确实发挥着重要的作用。

高效菌株在处理系统中的存在状态、生理状况、功能基因的表达情况、菌体所处的微环境和污染物的接触程度以及表面活性剂的分泌等直接影响到降解效果^[2]。系统不同时期受到进水量的冲击,气候骤变等各种物理和化学因素影响,将造成部分菌体死亡并影响降解功能的发挥。而 QC-PCR 技术对 Em1 定量结果和废水 COD 去除量相关性分析表明,两者具有一致的变化趋势和较高的相关性,因此表明外界所带来的冲击等因素和死亡菌体细胞的数量可以忽略,绝大部分 Em1 菌株仍以高效理想的活性状态存在并对有机污染物处理发挥作用。故 QC-PCR 技术能较为可靠而准确地反映环境处理系统中所发挥功能的菌株的整体相对数量。

参 考 文 献

- [1] Weavers LK, Ling FH, Hoffmann MR. Aromatic compound degradation in water using a combination of sonolysis and ozonolysis. *Environ Sci Technol*, 1998, **32**(18): 2727–2733.
- [2] Dua M, Singh A, Sethunathan N, et al. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, **59**(2–3): 143–152.
- [3] Boon N, Top EM, Verstraete W, et al. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**(3): 1511–1520.
- [4] Ines IR Baptista, Ludmila GP, Zhou NY, et al. Stability and performance of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 during 1, 2-dichloroethane biodegradation. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(6): 4411–4418.
- [5] Lanthier M, Juteau P, Lépine F, et al. *Desulfitobacterium hafniense* is present in a high proportion within the biofilms of a high-performance pentachlorophenol-degrading, methanogenic Fixed-Film Reactor. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(2): 1058–1065.
- [6] Marc Viñas, Jordi Sabaté, María José Espuny, et al. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(11): 7008–7018.
- [7] Barbara Hendrickx, Winnie Dejonghe, Wesley Boënné, et al. Dynamics of an oligotrophic bacterial aquifer community during contact with a groundwater plume contaminated with benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes: an *in situ* mesocosm study. *Appl Envir Microbiol*, 2005, **71**(7): 3815–3825.
- [8] Michotey V, Mejean V, Bonin V. Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd*₁-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Appl Environ Microbiol* **66**(4): 1564

- [9] Rosado AS, Seldin L, Wolters AC, *et al.* Quantitative 16S rDNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization for the detection of *Paenibacillus azotofixans* in soil and the wheat rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, **19**(12): 153 – 164.
- [10] Tuomi P, Torsvik T, Heldal M, *et al.* Bacterial population dynamics in a meromictic lake. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(6): 2181 – 2188.
- [11] Tay TL, Hemond H, Krumholz L, *et al.* Population dynamics of two toluene degrading species in a contaminated stream assessed by quantitative PCR. *Microb Ecol* 2001, **41**(7): 124 – 131.
- [12] 李习武, 刘志培, 刘双江. 生物乳化剂产生菌及其产生生物乳化剂条件初步研究. 微生物学通报 2003, **30**(6): 39 – 43.
- [13] 李习武, 刘志培, 刘双江. 新型复合生物乳化剂的性质及其在多环芳烃降解中的作用. 微生物学报 2004, **44**(3): 373 – 378.
- [14] Laurent MF, Philippot L, Hallet S, *et al.* DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**(5): 2354 – 2359.
- [15] Schwartz E, Trinh SV, Scow KM. Measuring growth of a phenanthrene-degrading bacterial inoculum in soil with a quantitative competitive polymerase chain reaction method. *FEMS Microbiology Ecology* 2000, **34**(1): 1 – 7.
- [16] Sambrook J, Fritsch EF. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [17] Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**(2): 625 – 630.
- [18] Raeymaekers L. Basic Principles Quantitative PCR. *Molecular Biotechnology* 2000, **15**(2): 115 – 122.
- [19] Jonathan D Van H, Singh A, Owen PW. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003, **67**(4): 503 – 549.
- [20] Tebbe CC, Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(8): 2657 – 2665.
- [21] Soo Youn Lee, Bollinger J, Bezdicek D, *et al.* Estimation of the abundance of uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(10): 3787 – 3793.

Function analysis of the effective strain *Rhodococcus ruber* Em1 in wastewater treatment system by quantitative competitive PCR

HUANG Ling^{1,3}, LI Xi-wu¹, LI Xu-dong², LIU Shuang-jiang¹, LIU Zhi-pei^{1*}

(¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(² Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

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

Abstract : A quantitative competitive PCR (QC-PCR) system was developed to quantify the number and analyze the function of the *Rhodococcus ruber* Em1 strain in a wastewater treatment system in Nanchong oil refinery plant. Strain Em1 was able to degrade various kinds of hydrocarbons and aromatic compounds with high efficiency and produce bio-emulsifier, so it was introduced into the waste liquid petroleum-disposing system. The sediment samples were collected from the disposing system in the range of 5 months, and then the numbers of strain Em1 and degrading efficiencies were studied. The results showed that the primers based on 16S rRNA gene sequence of strain Em1 were specific at species level. The PCR products amplified from sediment total DNA with the specific primers were cloned and sequenced, in which 62.2% were the fragments of 16S rRNA gene of strain Em1. Furthermore, the number of Em1 strain ranging from $3.4 \times 10^5 \sim 4.3 \times 10^8$ CFU/g in the sediment samples were detected, which indicated that the strain Em1 added into purposely did exist stably and reproduced well in the waste-deposing system during a long period. The high relativity, with relative coefficient R^2 of 0.89, between Em1 cell number and the amount of COD (Chemical Oxygen Demand) removal proved that the strain Em1 played an important role in this bio-augmentation treatment system.

Keywords : oil refinery wastewater ; bio-augmentation ; highly-effective strain Em1 ; QC-PCR ; function analysis

Foundation item : National Programs for High Technology Research and development of China (2002AA601150)

* Corresponding author. E-mail : liuzhp@sun.im.ac.cn

Other author : TAN Zhou-liang

Received : 16 June 2006 / Accepted : 22 August 2006 / Revised : 9 November 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>