

荧光定量 PCR 监测五氯酚对好氧颗粒污泥和活性污泥中氨氧化细菌数量的影响

李光伟¹, 刘 和^{1*}, 张 峰², 堵国成^{1,2}, 陈 坚^{1,2}

(江南大学¹生物工程学院环境生物技术研究室²工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘 要 通过特异引物扩增环境中氨氧化细菌 16S rDNA V2 保守区域,将该片段克隆到 T-easy 载体上,PCR 产物经测序和定量 PCR 扩增体系鉴定,证实 PCR 扩增产物为氨氧化细菌 16S rDNA 保守序列,以含该序列的重组质粒作为定量 PCR 监测氨氧化细菌数量的 DNA 标准品。用荧光定量 PCR 技术比较了五氯酚(PCP)对好氧颗粒污泥和活性污泥中氨氧化细菌数量的影响。结果表明,不加 PCP 的反应器中,好氧颗粒污泥和活性污泥中氨氧化细菌的数量分别为 $4.28 \times 10^7 \pm 5.44 \times 10^6$ cells/(g 干污泥)和 $2.51 \times 10^9 \pm 8.61 \times 10^8$ cells/(g 干污泥)。随着 PCP 浓度的增加(0~50mg/L),PCP 对氨氧化细菌数量的影响不大($P > 0.05$),而且,污泥中氨氧化细菌的数量与氨氮的去除率无直接的正相关关系($P > 0.05$)。PCP 主要是抑制氨氧化细菌的代谢活性导致污泥氨氮去除效率降低。

关键词: 荧光定量 PCR; 好氧颗粒污泥; 活性污泥; 氨氧化细菌; 五氯酚

中图分类号: X172 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2007)01-0136-05

氨氧化细菌(Ammonia Oxidizing Bacterium, AOB)在生物脱氮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,同时也是一个限速反应。由于 AOB 的生长速率相当低,生物量较少,采用传统的细菌培养平板计数方法研究 AOB 数量的变化非常费时、繁琐,因此迫切需要有新的方法来对 AOB 进行定量表征。近年来,荧光定量 PCR(Real-time PCR, RT-PCR)技术取得了很大的发展,该技术在指数扩增期间通过连续监测荧光信号出现的先后顺序以及信号强弱的变化来即时分析目的基因的拷贝数目,通过与加入已知量的标准品进行比较,可实现实时定量。RT-PCR 技术操作简便、快速、高效,具有很高的灵敏性和特异性。目前已经广泛应用到 DNA、mRNA 和病毒荷载量的定量、核酸多态性分析、基因突变分析等多个领域,近来也开始用于检测环境样品中的特定微生物的数量^[1]。

五氯酚(pentachlorophenol, PCP)是最常见的有毒物质之一^[2],大鼠的半致死量(LD₅₀)为 146mg/kg。天然水体中的浓度为 5~1000ng/L,某些自来水中的浓度也达到 5~100ng/L,生活污水中含酚量约为 0.1~1.0mg/L,受五氯酚污染的水体对人体健康构

成严重威胁^[3]。五氯酚会导致污泥的处理性能下降,造成出水水质下降,甚至处理系统瘫痪,这些影响在活性污泥处理工艺中得到了大量的研究^[4],然而五氯酚对好氧颗粒污泥的研究比较少。好氧颗粒污泥最大特点之一就是可进行同步硝化反硝化脱氮^[5,6],因此,作为一种具有广阔应用前景的废水处理技术,目前倍受研究者的关注。五氯酚的存在同样会对好氧颗粒污泥造成一定程度的影响,由于好氧颗粒污泥具有与活性污泥不同的结构,在毒性化合物存在条件下,好氧颗粒污泥的生物脱氮性能与活性污泥相比可能会具有不同的特性,然而这方面的研究还比较少。

因此本文的研究目的(1)建立检测 AOB 数量的 TaqMan RT-PCR 技术平台(2)以该技术检测 PCP 对好氧颗粒污泥和活性污泥中 AOB 数量的影响,阐明两类污泥脱氮性能与 AOB 数量之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:DNA 提取试剂盒(3SDNA Isolation Kit V2.1)为上海申能博彩生物科技有限公司产品;dNTPs 和 Taq DNA 聚合酶均为 Fermentas 公司产品;

基金项目:江苏省自然科学基金创新人才项目资助(BK2005402)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-510-85888301;E-mail: liuhe@sytu.edu.cn

作者简介:李光伟(1977-),男,安徽阜阳人,硕士研究生,主要从事环境微生物生态研究。E-mail: Lgw6713@163.com

其他作者:唐德友,李秀芬

收稿日期:2006-05-16;接受日期:2006-05-31;修回日期:2006-06-11 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

PCR 割胶纯化试剂盒(Catalog number: DV805A), 荧光定量 PCR 试剂盒 *Ex Taq RT-PCR V2.1*(Catalog number: DRR031A), 购于宝生物工程(大连)有限公司; pGEM[®]-T Easy 载体(Catalog number: A1360)为 Promega 公司产品; GoldView[™] DNA 染料, 购于上海赛百盛生物有限公司。

1.1.2 主要仪器: 细胞破碎仪 FP120 为 Thermo 产品; PCR 扩增仪 MJ-PTC200 和荧光定量 PCR 仪 Chrom4 为 MJ Research 产品; 紫外分光光度计 BioPhotometer, 购于 Eppendorf 公司。

1.2 实验装置与操作条件

实验装置采用 6 个如图 1 所示的 SBR 反应器(标记为 R0, R1 至 R5), 每个反应器形状相同。SBR 用有机玻璃制成, 直径 84mm, 高 260mm, 总体积为 1500mL, 有效体积为 900mL。好氧颗粒污泥由本研究室所培养^[7], 活性污泥取自无锡市城北污水处理厂。

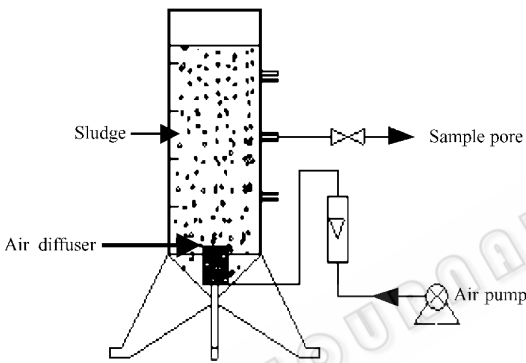


图 1 SBR 反应器示意图

Fig. 1 Schematic diagram of SBR bioreactor.

向 6 个反应器中首先加入颗粒污泥, MLSS 控制在 14~20g/L 之间, 在试验条件下作短期驯化, 运行稳定后向 R0 至 R5 加入 PCP, 使其终浓度依次为 0, 10, 20, 30, 40, 50mg/L, 考察 PCP 对其影响; 反应结束后倒出好氧颗粒污泥, 加入活性污泥, MLSS 控制在 6.5~7.5g/L 之间, 其他条件完全同好氧颗粒污泥, 作短期驯化, 运行稳定后向 R0 至 R5 加入 PCP, 使其终浓度依次为 0, 10, 20, 30, 40, 50mg/L, 考察 PCP 对活性污泥的影响。反应温度控制在 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 溶氧 4~5mg/L 左右, COD 浓度为 1400~1500mg/L, 氨氮浓度为 65~75mg/L, pH7.0 左右, 试验用水和微量元素的配方见参考文献[7]。一个反应周期为 330min, 其中进水 10min, 曝气 300min, 静止和出水共 20min。用 0.02mol/L NaOH 溶解 PCP 配制成 1g/L 的贮备液, 根据试验需要配制成不同浓度。每种污泥在每种 PCP 浓度下进行 3 次重复, 所测参数取平均

值, 污泥等量混合, 准确称取污泥约 200mg 提 DNA。

1.3 DNA 的提取

首先向污泥中加入灭菌玻璃珠 50mg, 用细胞破碎仪将细胞破碎(速度 4.5m/s, 30s, 4 次), 破碎的细胞用 DNA 提取试剂盒, 方法按厂商的说明进行。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, GoldView[™] 染色检测提取的总 DNA 片段。

1.4 AOB RT-PCR 检测标准品的构建

1.4.1 引物和探针的合成^[8]: 所用正向序列有 2 条, 分别为 CTO189fA/B(5'-3') GGAGRAAAGCAGGG GATCG 和 CTO189fC(5'-3') GGAGGAAAGTAGGGG ATCG, 两者 2:1 混合使用, 反向引物为 RT1r(5'-3') CGTCCTCTCAGACCARCTACTG, 探针为 TMP1(5'-3') CAACTAGCTAATCAGRCATCRGCCGCTC, 其中 5' 端用 6-羧基二乙酸荧光素(6-carboxyfluorescein, FAM) 标记, 3' 端用 6-羧基四甲基若丹明(6-carboxy-tetramethylrhodamine, TAMRA) 标记。正反向引物扩增的片段长度为 116bp, 该引物和探针是针对 β 亚纲的 AOB 16S rDNA V2 区域设计的, 使用两条正向混合引物是为了扩增更多的氨氧化细菌种类^[8]。引物和探针由上海基康生物工程公司合成。

1.4.2 PCR 扩增条件: 94°C 3min; 95°C 45s; 58°C 30s; 72°C 45s; 30 个循环, 72°C 4min。

1.4.3 PCR 产物的纯化: 配制 2% 琼脂糖凝胶, 取 50 μL PCR 产物进行电泳, 切下含 116bp 条带的胶块, 用 PCR 割胶纯化试剂盒纯化, 方法按说明进行。

1.4.4 PCR 产物与载体的连接: 纯化 PCR 产物 6ng, T-Easy 载体 50ng, T4 DNA 连接酶 3 Weiss 单位, 2 \times 连接酶缓冲液 5 μL , 加无菌双蒸水至总体积为 10 μL , 16 $^\circ\text{C}$ 过夜。

1.4.5 感受态细胞的制备及转化: 制备 M109 感受态大肠杆菌, 连接产物转化 M109, 在氨苄青霉素平板上根据蓝白斑试验筛选阳性转化菌。

1.4.6 重组质粒 PCR 扩增鉴定: 重组质粒进行扩增, 以从活性污泥中提取的 DNA 为阳性模板, 不加 DNA 的反应为阴性对照, 反应条件见 1.4.10, 观察是否有荧光信号的产生。

1.4.7 重组片段序列分析: 取部分有荧光信号的阳性转化菌 500 μL 送杭州华大生物工程有限公司进行测序, 测序结果在 GenBank 经 BLAST 软件进行同源性比对分析。

1.4.8 重组质粒的提取与纯化: 质粒提取方法见参考文献[9], 割胶纯化。

1.4.9 重组质粒浓度测定及标准曲线的建立: 测定

纯化重组质粒的质量浓度为 $23.3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 根据已知的重组质粒全序列, 计算其分子量为 1.934×10^6 道尔顿, 由分子量和阿伏加德罗常数 (6.02×10^{23} 分子数/mol) 换算为分子拷贝数为 7.25×10^9 拷贝/ μL , 因为氨氧化细菌 16S rDNA 基因操纵子 *rrn* 的拷贝数为 1, 每个拷贝对应一个细胞^[8], 即相当细胞浓度为 7.25×10^9 cells/ μL 。重组质粒进行 10 倍梯度稀释, 即稀释成 7.25×10^8 、 7.25×10^7 、 7.25×10^6 、 7.25×10^5 、 7.25×10^4 、 7.25×10^3 、 7.25×10^2 cells/ μL , 进行 AOB 的 RT-PCR 检测(条件如 1.4.10)。

1.4.10 RT-PCR 检测 AOB 在荧光定量 PCR 仪上扩增 扩增条件为 95°C 5min, 95°C 15s, 60°C 45s, 45 个循环。每个样品做 3 个重复, 取平均值。

1.5 分析项目和方法

pH 值采用 pH S-3 精密数显酸度计测定, 溶解氧用膜电极法, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 用纳氏试剂分光光度法^[10]。

1.6 相关性分析

应用 Matlab 软件中的 *corrcoef* 命令进行相关性分析, 并进行假设检验, 显著水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果和分析

2.1 重组质粒的鉴定

从污泥中提取的总 DNA 经扩增获得的 AOB 16S rDNA 片段约 116bp(图谱未列出), 纯化后连接到载体上。用定量 PCR 扩增鉴定重组质粒, 系统检测出强烈的荧光信号(图 2), 对部分有荧光信号的重组质粒测序, 经 GenBank 的 BLAST 软件比对, 检索返回结果均为氨氧化细菌(RID:1135689174-6121-142603802988.BLASTQ4), 与 AOB 同源性达到 98% 和 99%, 图 3 是其中一个比对结果。结果表明已获得了 AOB 16S rDNA 的保守区域, 重组质粒可以作为

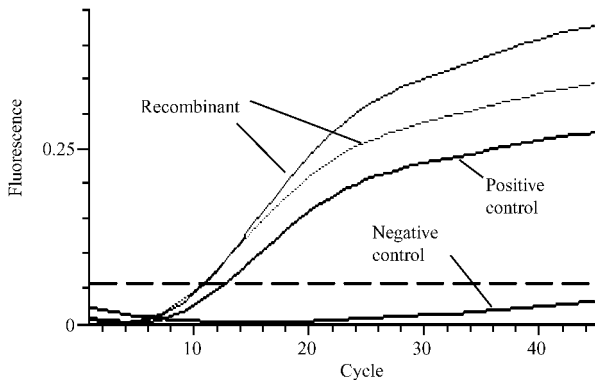


图 2 荧光定量 PCR 对重组质粒的鉴定

Fig. 2 Identification of recombined plasmid using real-time PCR method.

AOB 用 RT-PCR 方法进行定量的标准 DNA。

```

>gi:22023871.gb:AF525950.1:Uncultured bacterium clone AOB1 16S ribosomal RNA gene, partial
Query 22  CGTCCCTCAGACCAGCTACTGATCGTGTGCTTGGTAAGCCCTTACCCCACTAGCT81
Sbjct 116  CGTCCCTCAGACCAGCTACTGATCGTGTGCTTGGTAGCCCTTACCCCACTAGCT57
Query 82  AATCAGACATCGGCCGCTCCTTTAGCGCAAGGCTTTCGCGATCCCTACTTTCCTCC 137
Sbjct 56   AATCAGACATCGGCCGCTCCTTTAGCGCAAGGCTTTCGCGATCCCTACTTTCCTCC 1
  
```

图 3 克隆测序在 GenBank 比对的部分结果

Fig. 3 Partial result of recombinant sequence alignment with genes in GenBank.

2.2 标准曲线的建立

标准曲线共重复了 4 次, 每次的 r^2 均大于 0.995, 斜率为 -0.320 ± 0.014 (S.D.), 变异系数为 -4.4% 。对 4 次的标准曲线上每个浓度对应的点进行统计, Ct 值的标准差均小于等于 0.1(表 1), 变异系数 %CV 也比较小。这说明所建立的标准曲线具有较好的精确度和良好的重复性。根据重组质粒所制定的标准曲线(图 4), 线性范围可达 6 个数量级 ($10^2 \sim 10^7$)。

表 1 不同质粒浓度 Real-time PCR 检测的精度

AOB plasmid dilution	Ct (mean \pm S. D.)	CV/%
$7.25\text{E} + 07$	17.19 ± 0.14	0.79
$7.25\text{E} + 06$	19.89 ± 0.11	0.55
$7.25\text{E} + 05$	23.50 ± 0.03	0.11
$7.25\text{E} + 04$	23.50 ± 0.03	0.11
$7.25\text{E} + 03$	29.68 ± 0.16	0.55
$7.25\text{E} + 02$	32.58 ± 0.15	0.46

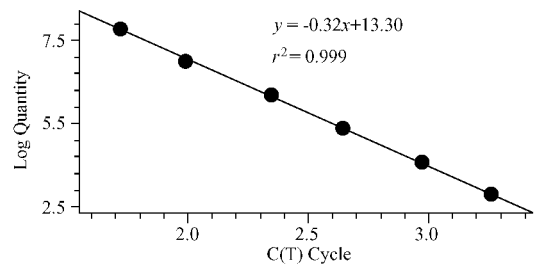


图 4 实时荧光定量 PCR 检测 AOB 的标准曲线

Fig. 4 Standard curves for AOB assay by real-time PCR.

2.3 PCP 对氨氮去除率的影响

在不加 PCP 的反应器中, 好氧颗粒污泥和活性污泥的氨氮去除率均为 100%(图 5)。PCP 为 $10 \sim 20 \text{ mg/L}$ 时, 颗粒污泥和活性污泥氨氮去除率仍在 87% 以上, 两者受 PCP 的影响程度相似; 当 PCP 浓度大于 30 mg/L 时, 活性污泥氨氮去除率的下降速度明显大于颗粒污泥氨氮去除率的下降速度, 在 PCP 的浓度为 50 mg/L 条件下, 活性污泥氨氮去除率为 33%, 好氧颗粒污泥的氨氮去除率为 65%, 这说明活性污泥氨氮的去除受到了较为严重的抑制。

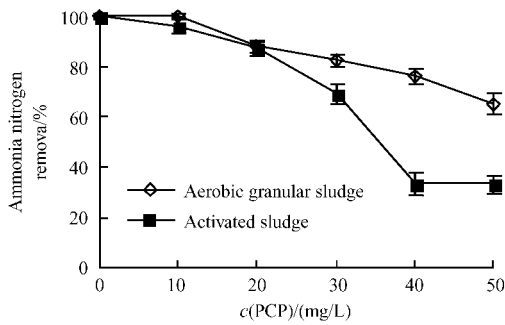


图5 PCP对氨氮去除率的影响

Fig.5 Ammonia nitrogen removal efficiency profiles under different PCP dosage.

2.4 PCP对AOB数量的影响

运用上述 RT-PCR 检测好氧颗粒污泥和活性污泥在 PCP 的影响下 AOB 数量的变化。如图 6 所示, 不加 PCP 的反应器中, 颗粒污泥和活性污泥含有 AOB 的数量分别为 $4.28 \times 10^7 \pm 5.44 \times 10^6$ cells/(g 干污泥) 和 $2.51 \times 10^9 \pm 8.61 \times 10^8$ cells/(g 干污泥)。含有 PCP 的反应器中, 颗粒污泥中 AOB 的数量均维持在 10^7 cells/(g 干污泥) 左右, 变化不大。PCP 浓度为 0~20mg/L 时, 活性污泥中氨氧化细菌为 10^9 cells/(g 干污泥); PCP 浓度为 30~50mg/L 时, AOB 下降到 10^8 cells/(g 干污泥)。这说明 PCP 对 AOB 主要起抑制作用, 对两类污泥中 AOB 的数量影响不大, 活性污泥中的 AOB 数量仅微小的降低。

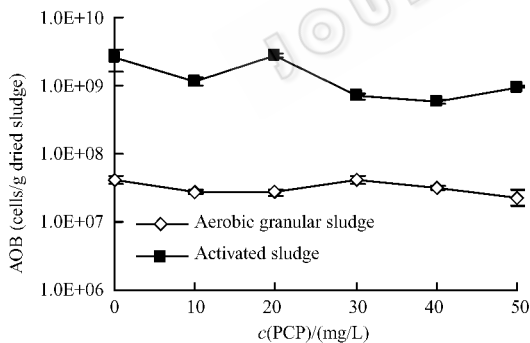


图6 PCP对氨氧化细菌的影响

Fig.6 Effect of PCP on AOB number.

3 讨论

目前对于细菌数量的 RT-PCR 定量研究, 大多数研究者都是采用从标准菌株中提取基因组 DNA, 经纯化后作为标准样品^[8]。然而, 由于有些菌株目前还没有建立标准菌株, 或非常难以分离培养(如 AOB), 因此本文设计了一个新的获得标准品的思路, 即通过特异性引物从环境样品中直接扩增目标细菌的 16S rDNA 的保守序列, 克隆到载体上, 通过 PCR 鉴定和测序后经 GenBank BLAST 比对验证, 然

后以重组质粒 DNA 作为定量 PCR 的标准样品。通过这一方法迅速建立了 AOB RT-PCR 检测体系, 周期短, 可重复性好, 与传统的抽提标准菌株基因组 DNA 作为标准品的方法相比较, 该方法尤其适合一些难以获得标准菌株的微生物, 如难培养的厌氧微生物或根本不能培养的微生物的 RT-PCR 定量研究。

好氧颗粒污泥和活性污泥的氨氮去除率与 PCP 浓度成负相关 ($P < 0.05$), 说明 PCP 对两种污泥的脱氮性能均造成了影响。应用本文所建立的 AOB 荧光定量 PCR 检测体系, 检测 AOB 数量, 结果发现在试验条件下 PCP 并不影响 AOB 的数量 ($P > 0.05$), 且 AOB 的数量与氨氮的去除也无直接正相关关系 ($P > 0.05$), 这和以前人们普遍认为污泥的氨氮去除率和 AOB 的数量密切相关的看法大相径庭。其原因可能为 (1) 虽然污泥中氨氧化细菌数量变化不大, 但是其代谢活性已受 PCP 的严重抑制并造成废水脱氮效率的明显下降 (2) 除 AOB 外, 氨氮还可以通过其它的脱氮微生物, 或转化为其他异养微生物的细胞组分或其他的代谢产物等方式去除。

虽然活性污泥系统中 AOB 的浓度大于好氧颗粒污泥反应系统 10~100 倍 (图 7), 但在同一浓度的 PCP 条件下, 好氧颗粒污泥的氨氮去除率大于活性污泥, 这是因为好氧颗粒污泥反应系统中具有很高的污泥浓度, 氨氮可通过多种方式被转化, 而高生物量正是好氧颗粒污泥的一大优势^[11]。

4 结论

通过本次实验, 得出以下结论。

(1) 本文建立的 AOB 荧光定量 PCR 检测方法, 与传统以标准菌株基因组 DNA 作为标准品的方法和 MPN (Most Probable Number) 计数法相比, 具有周期短, 可重复性好, 尤其为难以分离培养的微生物的计数提供了一条新的途径;

(2) 在相同浓度的 PCP 条件下, 好氧颗粒污泥的氨氮去除率大于活性污泥;

(3) 氨氮的去除率与 PCP 浓度成负相关, 但 AOB 的数量和氨氮去除率并无直接的相关性, PCP 并不导致 AOB 数量的下降, 而是抑制 AOB 的代谢活性。

参考文献

- [1] Harms G, Layton AC, Dionisi HM, et al. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol*, 2003, 37: 343-351.
- [2] Gribble GW. Natural production of organochlorine compounds. In: Turoski V, editor. Chlorine and chlorine compounds in the paper

- [3] 施 玮, 牛军峰, 余 刚. 水中五氯酚钠对发光细菌毒性测定的影响因素. *环境科学*, 2004, **25**(3):44-47.
- [4] Kao CM, Chai CT, Liu JK, *et al.* Evaluation of natural and enhanced PCP biodegradation at a former pesticide manufacturing plant. *Water Res*, 2004, **38**:663-672.
- [5] 阮文权, 陈 坚. 同步脱氮好氧颗粒污泥的特性及其反应过程. *中国环境科学*, 2003, **23**(4):380-384.
- [6] Yang SF, Tay JH, Liu Y. A novel granular sludge sequencing batch reactor for removal of organic and nitrogen from wastewater. *J Biotechnol*, 2003, **106**(1):77-86.
- [7] Wang Q, Du G, Chen J. Aerobic granular sludge cultivated under the selective pressure as a driving force. *Process Biochem*, 2004, **39**:557-563.
- [8] Hermansson A, Lindgren PE. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by Real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(2):972-976.
- [9] 郝福英. 分子生物学实验技术. 北京: 北京大学出版社, 1998. 7
- [10] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- [11] Liu LL, Wang ZP, Yao J, *et al.* Investigation on the formation and kinetics of glucose-fed aerobic granular sludge. *Enzyme Microbial Tech*, 2005, **36**:487-491.

Real time PCR quantification of ammonia-oxidizing bacteria in aerobic granular sludge and activated sludge influenced by pentachlorophenol

LI Guang-wei¹, LIU He^{1*}, ZHANG Feng², DU Guo-cheng^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(¹ Laboratory of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology; ² Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The V2 region of the 16S ribosomal DNA of the ammonia-oxidizing bacteria (AOB) was amplified directly from the environmental sample by using the specific PCR primers. The purified PCR product was cloned into T-vector and was identified as 16S rDNA fragment of AOB by sequencing and Real-time PCR method. Then, the recombinant plasmid was used as standard molecule sample in Real-time PCR for AOB quantification. The numbers of the AOB were monitored in samples of both aerobic granular sludge and activated sludge influenced by PCP by using Real-time PCR. The results showed that the numbers of AOB in aerobic granular sludge and activated sludge were $4.28 \times 10^7 \pm 5.44 \times 10^6$ cells/g dried sludge and $2.51 \times 10^9 \pm 8.61 \times 10^8$ cells/g dried sludge without PCP in the reactors, respectively. With the increase of PCP concentration (from 0mg/L to 50mg/L), the numbers of AOB in both types of sludge had no obvious change ($P > 0.05$). The numbers of AOB had no obvious correlation with ammonia removal ($P > 0.05$). The main effect of PCP on AOB in both types of sludge was to inhibit their metabolic activity.

Keywords: Real-time PCR; Aerobic granular sludge; Activated sludge; Ammonia-oxidizing bacteria; Pentachlorophenol

Foundation item: Natural Science Foundation of Jiangsu Province in China (BK2005402)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-510-85888301; E-mail: liuhe@sytu.edu.cn

Received: 16 May 2006/ Accepted: 31 May 2006/ Revised: 11 June 2006

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