

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(7):882-891; 4 July 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140535

污水处理系统中氨氧化古菌的富集培养以及性质

李雨阳, 文湘华*, 丁鷟, 张冰, 申博

清华大学环境学院, 北京 100084

摘要:【目的】从污水处理系统中富集培养氨氧化古菌, 鉴定其系统发育地位, 进行初步的形态观察以及生长和代谢特性研究。【方法】使用添加抗生素的自养培养基, 通过连续传代的方法富集培养氨氧化古菌, 使用多种分子生物学方法检验富集纯度和古菌单一性, 鉴定其系统发育地位; 通过扫描电镜观察菌体基本形态; 利用生长和代谢曲线计算相关性质参数。【结果】氨氧化古菌 HJ-2b 富集培养成功, 在体系中的纯度达到 93%; 经 16S rRNA 基因鉴定属于亚硝化球菌 (*Nitrososphaera*) 属, 与 *Nitrososphaera* sp. JG1 相似度为 100%, 但功能基因 *amoA* 的相似度仅为 72%; HJ-2b 细胞呈杆状, 其最大比增长速率为 0.43 d^{-1} , 最大比氨氧化速率为 $3.9 \text{ fmol}/(\text{cell}\cdot\text{d})$ 。【结论】HJ-2b 富集物来源于污水处理系统, 对于研究氨氧化古菌在该系统中的存在条件及其在污水脱氮方面的贡献有重要意义。

关键词: 污水处理系统, 氨氧化古菌, 富集培养, 比增长速率, 比氨氧化速率

中图分类号: X172 **文章编号:** 0001-6209(2015)07-0882-10

硝化反应在氮循环中起着重要作用, 同时也是污水处理系统脱氮的关键反应。氨氧化反应是硝化反应的第一步, 也是其中的限速步骤。一直以来该步骤都被认为是由氨氧化细菌 (*Ammonia-oxidizing bacteria*, AOB) 独自参与的。然而近年来研究发现, 参与氨氧化反应的微生物还有另外一个大的类群, 即氨氧化古菌 (*Ammonia-oxidizing archaea*, AOA) [1-2]。AOA 属于古菌中的奇古菌门 (*Thaumarchaeota*) [3], 与 AOB 在进化归属, 生理生化特性方面存在较大差异, 但二者参与氨氧化过程的部分基因是同源的。其中应用最多的是编码氨单加氧酶 α 亚基的 *amoA* 基因, 以该基因作为指示, 发现 AOA 广泛分布于海洋 [4]、土壤 [5]、热泉以及污水处理系统 [6] 等环境中, 是氨氧化过程的重要参与者。

与 AOB 相比较, AOA 对于底物氨氮和氧具有较高的亲和力 [23], 这使得 AOA 在低氨氮和低溶解氧条件下依然能够有较好的氨氮去除效果。

当前国内外的研究主要以调研和统计 AOA 的分布情况为主, 对 AOA 进行富集和分离的研究仍然较少。由于古菌本身生长缓慢, 受环境波动影响大, 富集和分离较为困难。目前已报道的纯培养 AOA 只有两株: 海洋亚硝化短小杆菌 (*Nitrosopumilus maritimus* [1]) 和维也纳亚硝化球菌 (*Nitrososphaera viennensis* [7]), 此外富集培养的 AOA 有 8 株。这些菌株都是从海洋沉积物 [1, 8-9]、土壤 [7, 10-13]、热泉 [14-15] 等自然环境中富集得到的, 到目前为止, 还没有从污水处理系统 (活性污泥) 中富集分离 AOA 的报道。

基金项目: 国家自然科学基金 (51178239)

* 通信作者。Tel: +86-10-62772837; E-mail: xhwen@tsinghua.edu.cn

作者简介: 李雨阳 (1990-), 男, 云南省人, 硕士研究生, 研究方向环境微生物学。E-mail: liyuyang12@mails.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2014-11-13; 修回日期: 2015-01-14

污水处理系统依靠氨氧化反应来去除氨氮, 研究者在国内外多个污水处理系统中均发现了 AOA^[6, 16-18], 在部分系统中, AOA 的数量甚至超过 AOB 几个数量级^[16, 18-19]。但与 AOB 不同的是, 并非每一个氨氮去除效果良好的系统中都能发现 AOA 的存在。研究者对于影响 AOA 存在性的因素做出了多种不同的猜测, 包括氨氮浓度^[17]、溶解氧^[6, 8]、盐度^[20]、停留时间^[21]等。由于缺乏来源于污水处理系统的富集菌株, 上述猜测无法通过直接的微生物学实验证实, 仅停留在调研和统计阶段。

本研究针对上述存在的问题, 从污水处理系统中富集得到高纯度的 AOA, 经过系统发育鉴定之后, 确认其中仅含有一种 AOA, 之后对其生长特性和代谢特性进行了研究。本研究对深入了解污水处理系统中 AOA 的独特性质, 探究 AOA 在污水处理系统中的存在条件具有重要参考价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 富集来源: 活性污泥取自天津市某污水处理厂 HJ, 该厂采用 BDP 生物倍增工艺, 进水氨氮 80 - 300 mg/L, 出水氨氮小于 1 mg/L, 污泥浓度 6000 - 8000 mg/L。取样点溶解氧浓度为 0.6 mg/L。取样后将污泥置于冰盒中暂时保存, 带回实验室后立即开始接种培养。

1.1.2 富集培养基: 采用的液体培养基包含 NH_4Cl (0.5 mmol/L), KH_2PO_4 (0.1 mmol/L), NaHCO_3 (2.5 mmol/L), 1% 污泥上清液 (原始污泥离心后取上清, 过 0.2 μm 滤膜 (GTPP, millipore) 除菌, 提供必须的微量元素和维生素等物质)。用 1 mol/L 的 HCl 调 pH 至 6.5, 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min。之后加入氨苄青霉素 (50 mg/L) 以及链霉素 (25 mg/L)。后续的生长和代谢试验采用的培养基与富集一致。

1.1.3 主要试剂和仪器: 主要化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。PCR 等分子生物学相关试剂均购自 TaKaRa 公司。仪器包括 PCR 仪 (SI1000, 伯乐), 定量 PCR 仪 (iQ5 Multicolor, 伯乐), 变性梯度凝胶电泳系统 (Decode DGGE, 伯乐), 凝胶成像仪 (Gel Doc XR, 伯乐), 紫外分光光度计 (DR5000, 哈希), 环境扫描电子显微镜 (Quanta 200, FEI)

1.2 AOA 的富集培养

用 120 mL 血清瓶作为培养装置, 采用连续传代 (consecutive passage)^[7] 的方法进行 AOA 富集。具体步骤是: 初始接种时在 50 mL 培养基中加入 5 mL 活性污泥, 用橡胶塞密封之后于 30 $^\circ\text{C}$ 培养箱避光静置培养。此后每周抽取一定量的培养基进行氨氮和亚硝态氮浓度的检测, 氨氮的测量采用水杨酸-次氯酸钠分光光度法, 亚硝态氮采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法。在确认 80% 的氨氮得到降解之后, 将 5 mL 菌液转移到新的 50 mL 培养基内, 进行下一个周期的培养。培养后的细胞用 0.2 μm 滤膜过滤收集之后用于进一步的分析。

1.3 16S rRNA 基因和 *amoA* 基因的检测及系统发育分析

1.3.1 16S rRNA 基因和 *amoA* 基因的检测: DNA 的提取采用 FastDNA SPIN Kit For Soil 试剂盒 (MP Biomedicals), DNA 浓度和纯度采用 Nanodrop 分光光度计 (Thermo Nanodrop) 分析。PCR 试验采用的引物一共有 5 对, 如表 1 所示。其中细菌 *amoA* 基因采用的扩增程序: 94 $^\circ\text{C}$ 2 min; 94 $^\circ\text{C}$ 40 s, 51 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 循环 35 次; 72 $^\circ\text{C}$ 5 min。除此之外其余基因扩增程序均为: 94 $^\circ\text{C}$ 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 55 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 循环 35 次; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.2 16S rRNA 基因和 *amoA* 基因测序: 扩增后的产物采用 Gel extraction Kit 试剂盒 (Qiagen) 进行切胶纯化, 一部分用于直接测序, 测序采用相应的 PCR 引物双向进行, 由北京诺赛基因公司完成。另一部分用于克隆文库测序, 首先将 PCR 回收产物连接到 pGEM-Teasy 载体上, 再转化到 JM109 感受态细胞 (Promega 公司) 中。平板培养之后挑取阳性克隆摇菌, PCR 鉴定合格之后送出测序。测序采用通用的 T7 和 SP6 引物双向进行。

1.3.3 16S rRNA 基因和 *amoA* 基因系统发育分析: 测序得到的双向序列采用 DNA star 进行拼接, 使用 NCBI 的 BLAST 数据库进行序列比对并下载相关序列。使用 MEGA 5.2 中的 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树。

1.4 16S rRNA 基因和 *amoA* 基因的定量

16S rRNA 基因和 *amoA* 基因采用实时荧光定量 PCR 进行定量。采用的引物有 3 对, 如表 1 所示。古菌 16S rRNA 基因和细菌 16S rRNA 基因的

扩增程序:95℃ 5 min;95℃ 10 s,51℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环;72℃ 30 s。古菌 *amoA* 基因程序与此类似,只是退火温度改为 55℃。在制作溶解曲线时,程序均为 95℃ 30 s,55℃ - 95℃ 升温 0.05℃/s。标准曲线采用的模板为相应的目的基

因与 pGEM-Teasy 载体连接制作而成的单克隆质粒。质粒的制作主要包含转化,克隆文库筛选,测序确认等步骤,最后使用 Plasmid mini kit 试剂盒 (Qiagen) 提取获得。质粒拷贝数通过测定 DNA 浓度换算得到。

表 1. 本研究所使用的引物

Table 1. The primers used in this study

Name	Sequence(5'→3')	Target gene	Application
20F	TTCCGGTTGATCCYGCCRG	Archaeal 16S rRNA	Detection and phylogeny
1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT		
519F	CAGCMGCCCGGCTAA		
727R	GCTTTCRTCCCTCACCGT		
344F ^[22]	GC * -ACGGGGYGCAGCAGGCCGCA	Archaeal 16S rRNA	qPCR
915R ^[22]	GTGCTCCCCCGCAATTCTCT		
23F ^[7]	ATGGTCTGGCTWAGACG		
616R ^[7]	GCCATCCATCTGTATGTCCA	Archaeal <i>amoA</i>	Detection, phylogeny and qPCR
<i>amoAF</i>	STAATGGTCTGGCTTAGACG		
<i>amoAR</i>	ACATACAGATCGATGGCCCGC	Archaeal <i>amoA</i>	Detection
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Bacterial 16S rRNA	Phylogeny
1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT		
<i>bac518F</i>	CCAGCAGCCCGGTAAT		
<i>bac786R</i>	CTACCAGGGTATCTAATC		
<i>amoA1F</i>	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Bacterial <i>amoA</i>	Detection
<i>amoA2R</i>	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		

* GC clamp;CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG. All the primers were from reference 12, except those specially marked.

1.5 古菌 16S rRNA 基因变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析

用于 DGGE 的古菌 16S rRNA 基因引物如表 1 所示。扩增程序为 95℃ 30 s;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,循环 30 次;72℃ 10 min。DGGE 采用 8% 聚丙烯酰胺,40% 到 60% 的变性梯度 (100% 变性为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺)。采用 1 × TAE 缓冲液,60 V,60℃,电泳 17 h。取出后使用 Gelred 核酸染料 (Biotium 公司) 染色 30 min 之后拍照。目的条带被切下之后溶解于 50 μL 无菌水中,采用不含 GC 夹的 DGGE 引物扩增之后送出测序。

1.6 扫描电镜分析

取 5 mL 培养后期的菌液,过 0.2 μm 的 GTP 膜截留细胞。将膜取出并置于 2.5% 的戊二醛溶液中,在 4℃ 条件下静置过夜。用 1 × PBS 缓冲液清洗 3 次,依次在 50%、70%、80%、95% 和 100% 的乙醇溶液脱水。用 100% 叔丁醇置换乙醇后置于 -20℃,使用冷冻干燥机进行干燥,喷金 60 s 之后可进行扫描电镜观测。

1.7 生长和代谢参数计算。

根据氨氮浓度、亚硝态氮浓度以及古菌 16S rRNA 基因拷贝数作出 1 个周期内的生长和代谢曲线图。细胞的最大比增长速率和最大比氨氧化速率根据文献[23]中的方法进行计算。

2 结果

2.1 AOA 的富集培养

原始污泥经检测含有 AOA,进行初始接种之后,在最初的两个培养周期之内,培养基的氨氮浓度在两周之内降低到了接近于 0 的水平,氨氮降解速率较高。然而在第 3 个周期的培养中,氨氮降解速率变缓,在历时近 200 d 的培养之后氨氮浓度才达到传代要求 (80% 氨氮被降解)。经 PCR 检测,第 3 个周期末期古菌 *amoA* 基因和古菌 16S rRNA 基因均呈较强的阳性,表明培养基中的 AOA 已经大量增长。从第 4 个周期开始,氨氮降解一般在 3-4 周的时间内完成。之后继续采用连续传代的方法进行富集,迄今为止一共进行了 2 年多的培养。

2.2 AOA 的富集效果检测

2.2.1 AOB 的存在性检测: 对第 5 个周期之后多个时段的富集物进行检测, 针对细菌 *amoA* 基因进行 PCR 扩增, 均未见条带。此外, 针对细菌 16S rRNA 基因进行克隆文库测序, 在随机挑选的 29 个单克隆序列中, 并未发现与 AOB 亲缘关系较近的序列。由此可证明富集体系中并不含 AOB, AOA 是唯一的氨氧化微生物, 也是体系内氨氧化反应的全部贡献者。

2.2.2 古菌的单一性判断: 使用 PCR-DGGE 对不同时间段的古菌 16S rRNA 基因多样性进行检测, 结果如图 1 所示。经过长时间的选择性培养, 到第 690 天时, DGGE 图谱显示只有唯一的一个条带 a。经切胶测序, 峰形单一, 不含非特异信号, 为单一序列 (552 bp, GenBank 序列号 KP053272)。经初步比对分析确认是 AOA 序列。

此外, 针对第 690 天的样品进行古菌 16S rRNA 基因 (20F/1492R 引物) 克隆文库分析, 随机挑取的 53 个单克隆测序结果高度一致 (相似度在 99.7% 之上, 有不超 3 个碱基的突变, 可认为在 PCR 扩增的误差之内), 测序结果经过比对为 AOA 序列 (1439 bp, GenBank 序列号 KP027212)。且该序列的中间部分与 DGGE 测序得到的序列比对一致。综合 DGGE 和克隆文库的结果, 可断定富集物中的古菌仅有唯一的一种, 该种经确认是 AOA, 在本研究中命名为 HJ-2b。

2.2.3 AOA 在培养体系中的纯度: 本研究尝试采用平板分离和极限稀释 (dilution to extinction) 等方法纯培养 AOA, 但没有获得成功。培养基中仍然有少量细菌存在。使用定量 PCR 进行分析, 在每 1 mL 培养基中, 古菌 16S rRNA 基因的拷贝数为 $(3.33 \pm 0.82) \times 10^8$, 细菌 16S rRNA 基因的拷贝数为 $(2.52 \pm 0.39) \times 10^7$, 古菌拷贝数比细菌高一个数量级。假设每个细胞含有 1 个 16S rRNA 基因拷贝数^[24], 则古菌占培养体系中所有原核生物 (古菌 + 细菌) 的比例为 93%。由于古菌全部是 HJ-2b 菌, 该结果表明在本研究构建的培养体系中, 该 AOA 得到了高度的富集。

采用细菌 16S rRNA 基因克隆文库测序对培养体系中的杂菌种类进行分析, 针对第 690 天样品, 一共得到 29 条序列。结果表明体系中杂菌全部属于 α -变形菌纲, 其中最多的属是鞘氨醇单胞菌属

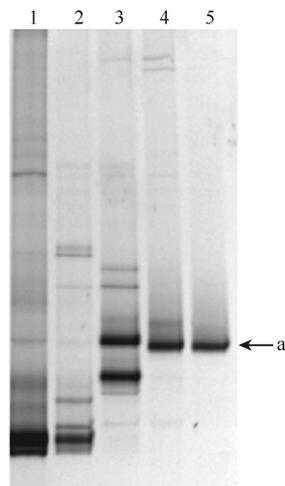


图 1. 富集培养过程中的古菌 16S rRNA 基因 DGGE 图谱变化

Figure 1. The changes of DGGE profile for archaeal 16S rRNA gene during enrichment. Lane 1 stand for enrichment sample from Day 0 (original sludge); lane 2 from Day 21; lane 3 from Day 44; lane 4 from Day 400; lane 5 from Day 690.

(62%), 其次还有少部分的慢生根瘤菌属 (17%) 以及不粘杆菌属 (14%)。未发现 AOB 以及亚硝酸盐氧化细菌 (Nitrite-oxidizing bacteria, NOB) 的存在。

2.3 富集 AOA 的系统发育鉴定

2.3.1 基于 16S rRNA 基因的系统发育地位鉴定: 将克隆文库得到的古菌 16S rRNA 基因序列 (1439 bp) 用 BLAST 数据库比对, 做出的系统发育树如图 2 所示。本研究富集得到的 HJ-2b 菌与之前报道的 *Nitrososphaera* sp. JG1^[10] 最为接近, 在覆盖度为 94% 时序列相似度为 100%; 其次与 *Nitrososphaera evergladensis* SR1^[13] 较为接近, 覆盖度 99% 时, 序列相似度为 99%。依据 16S rRNA 基因进化关系进行鉴定, HJ-2b 菌与上述两株已报道的 AOA 为同一个属, 即 *Nitrososphaera* 属。此外, 根据 AOA 研究中常用的古菌分类方法, HJ-2b 属于 Group I. 1b 组, 该组内的 AOA 大多数来源于土壤环境。

2.3.2 *amoA* 基因的系统发育分析: 对同样的样品使用古菌 *amoA* 基因引物 (23F/616R) 进行扩增。PCR 产物直接测序和克隆文库测序 (39 个单克隆) 得到的序列完全一致 (630 bp, GenBank 登录号 KP027213)。用 BLAST 数据库对比建树之后进化关系如图 3 所示。与 16S rRNA 基因不同, *amoA* 基因比对的结果显示 HJ-2b 与 *Nitrososphaera* sp. JG1 进化关系距离较远, 二者相似度只有 72%。而与

HJ-2b 进化关系最接近的一株 AOA 是 *Nitrosopumilus maritimus*^[1], 相似度为 83%。按照比对结果, HJ-2b 的 *amoA* 基因属于 AOA 的另外一个分支: Group I. 1a 组, 该组 AOA 成员大部分来自于海洋环境。HJ-2b 的 16S rRNA 基因和 *amoA* 基因在系统发育归属上产生了较大差异。

为了排除由于 *amoA* 基因引物的选择性对结果产生干扰的可能, 本研究使用了另外一对引物 *amoAF/amoAR* 对样品 *amoA* 基因构建克隆文库, 随机挑选了 16 个单克隆进行测序, 得到的序列唯一, 且与 23F/616R 得到的序列有效部分完全一致, 归属于 Group I. 1a 组。

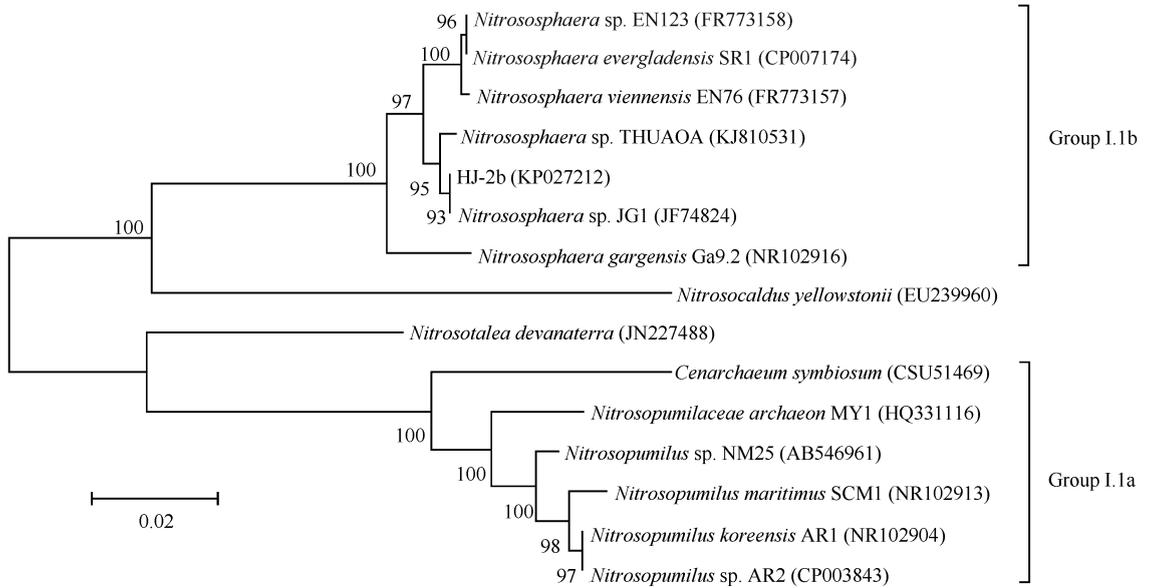


图 2. 基于古菌 16S rRNA 基因 (1439 bp) 构建的系统发育进化树

Figure 2. Phylogenetic tree generated from alignments of archaeal 16S rRNA gene sequences by means of neighbor-joining. Numbers in parentheses represent the accession numbers in GenBank. Significant bootstrap values higher than 50% are shown at branch nodes. Scale bar represent 2% estimated sequence divergence.

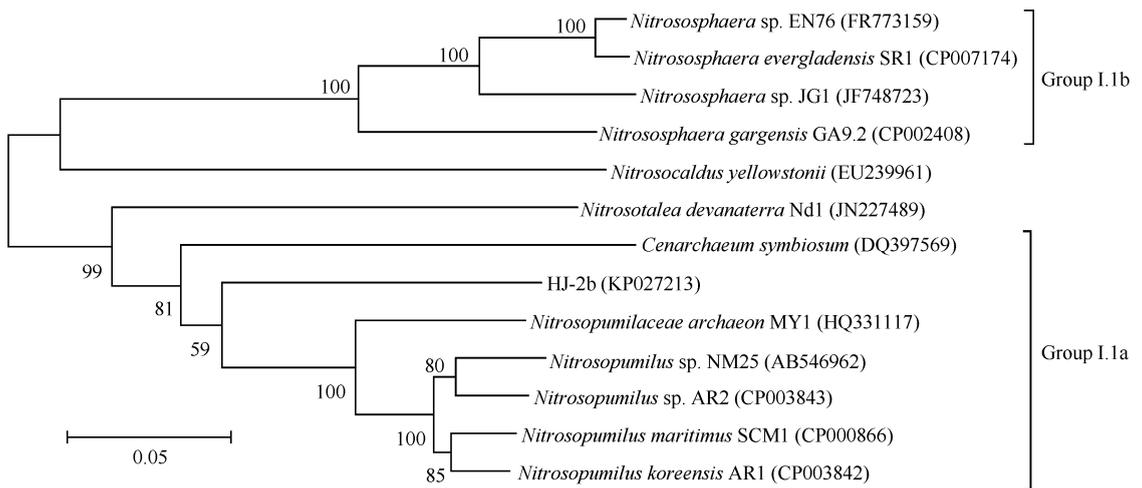


图 3. 基于古菌 *amoA* 基因 (630 bp) 构建的系统发育进化树

Figure 3. Phylogenetic tree generated from alignments of archaeal *amoA* gene sequences by means of neighbor-joining. Numbers in parentheses represent the accession numbers in GenBank. Significant bootstrap values higher than 50% are shown at branch nodes. Scale bar represent 5% estimated sequence divergence.

为排除样品随机性的影响, 本研究又选取了第 690 天之后其余两个周期的 AOA 富集样品再次进行 16S rRNA 和 *amoA* 基因的系统发育分析, 得到的结果与之前一致。16S rRNA 和 *amoA* 基因仍然处于不同的进化分支。

2.4 富集 AOA 的细胞形态观察

使用扫描电镜对富集后的培养基进行观察, 视野中大多数细胞为如图 4 所示的杆状细胞, 可认为该细胞就是富集得到的 HJ-2b 菌。细胞大小为 $(1.0 \pm 0.2) \mu\text{m} \times (0.30 \pm 0.04) \mu\text{m}$ 。与 *Nitrososphaera* sp. JG1 细胞形态(球状)差异较大, 与 *Nitrosopumilus maritimus* 相比形状和大小则较为接近。

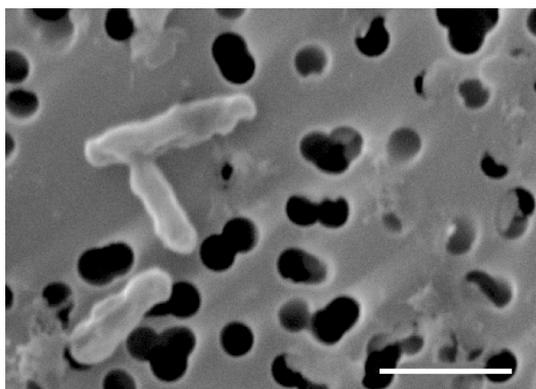


图 4. 富集物中 HJ-2b 菌的扫描电镜观察 (50000 ×)

Figure 4. Scanning electron microscopy image of enrichment HJ-2b (50000 ×). Scale bar represent 1 μm , dark pores are from GTTP membrane.

2.5 富集 AOA 的生长和代谢特性

对一个周期内 AOA 富集培养基的氨氮、亚硝态氮, 16S rRNA 基因拷贝数和 *amoA* 基因拷贝数进行连续监测, 得到的结果如图 5 所示。氨氮的降解在第 10 天的时候全部完成, 同时生成的亚硝态氮趋于稳定, 细胞数(近似用 16S rRNA 基因拷贝数代替)在第 12 天时达到顶峰, 之后便进入衰退期开始下降。

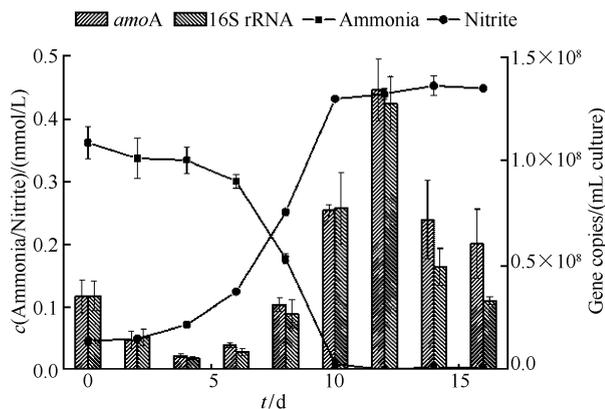


图 5. HJ-2b 在一个周期内的生长和代谢情况

Figure 5. The growth and metabolism of the HJ-2b enrichment culture. The error bars represent the standard deviations based on triplicate measurement of one sample.

根据图 5 计算得到 HJ-2b 的生长和代谢速率, 如表 2 所示。HJ-2b 的最大比增长速率为 0.43 d^{-1} , 代时为 1.6 d, 该速率比 *N. maritimus* 稍低, 和其余 AOA 菌株大致相当, 但远低于纯培养的 AOB 菌株 *N. europaea*。最大比氨氧化速率为 $3.9 \text{ fmol}/(\text{cell} \cdot \text{d})$, 稍低于 *N. maritimus* 和 *N. devanattera*, 与 *N. europaea* 相比差距仍然较大。

为了探究 16S rRNA 基因和 *amoA* 基因的对应关系。在同一周期中我们也同时检测了 *amoA* 基因的拷贝数。如图 5 所示, *amoA* 基因的变化趋势与 16S rRNA 基因一致, 为了进一步进行比较, 我们对两个基因的数目进行了线性回归分析, 如图 6 所示。两个基因数目变化显著相关, 随着 AOA 的繁殖和衰亡呈现同样的增减趋势。且在此过程中两个基因数的比值基本保持不变, 整体上在 0.8793 约为 0.9 左右浮动。由此可以排除 16S rRNA 基因与 *amoA* 基因分别来源于两种不同菌的可能, 从而也就间接证明了本研究得到 16S rRNA 基因与 *amoA* 基因序列均属于 HJ-2b 菌的基因组。

表 2. HJ-2b 和其他氨氧化菌株的生长和代谢速率对比

Table 2. The growth and metabolic rates of HJ-2b and other ammonia oxidizers

Strain	Specific growth rate (d^{-1})	Specific ammonia oxidation rate [$\text{fmol}/(\text{cell} \cdot \text{d})$]
HJ-2b	0.43	3.9
<i>Nitrosoarchaeum koreensis</i> ^[12]	—	2.5
<i>Nitrososphaera</i> sp. JG1 ^[10]	0.23	1.4
<i>Nitrosopumilus maritimus</i> ^[1]	0.78	12.8
<i>Nitrosotalea devanattera</i> ^[11]	0.37	11.0
<i>Nitrosomonas europaea</i> ^[23, 25]	3.0	86–230

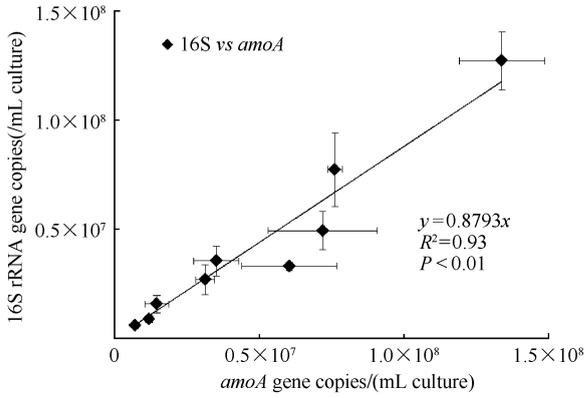


图 6. 16S rRNA 和 *amoA* 基因的对应关系

Figure 6. The relationship between 16S rRNA and *amoA* gene. The copies of genes are from Figure 5. The error bars represent the standard deviations based on triplicate measurement of one sample.

3 讨论

本研究经过长达 2 年的富集培养,最终从污水处理系统中得到了以 HJ-2b 为主的高纯度 AOA 富集物,后续对 HJ-2b 生理生化特性的进一步研究将有助于理解 AOA 在污水处理系统中存在的条件以及发挥的作用。

以通用的 16S rRNA 基因的进化关系为准,本研究将 HJ-2b 归于 *Nitrososphaera* 属。尽管该 AOA 与 *Nitrososphaera* sp. JG1 的 16S rRNA 基因相似度达到 100%,但在 *amoA* 基因的进化关系上却与之相距较远,且细胞形态有较大差异,是不同于 *Nitrososphaera* sp. JG1 的一种 AOA。

由于以抗生素和自养培养基作为选择压,原始活性污泥中的 AOB、NOB 被彻底除去,其余细菌大部分被淘汰,古菌只剩唯一的 HJ-2b 菌,最终达到 93% 的富集纯度。培养体系中残留的细菌多为异养菌。以鞘氨醇单胞菌属为例,这是一种能降解多种复杂有机物的好氧异养菌,生存能力较强^[26]。在长期的富集过程中,该菌有可能逐渐具备了较强的抗生素抗性,此外还可能利用了 AOA 衰亡裂解之后的细胞物质作为营养,最终得以存活下来。其他杂菌的存活原理与此类似,因此之后要杀灭残留的细菌,则需要选用其他种类的细菌抗生素进行进一步的探索。

本研究经过尝试最终未能获得 AOA 的纯培养

菌种,一方面是因为残留的杂菌难以被去除,另一方面也与 AOA 的生存方式存在一定的关系。据相关报道,AOA 并非完全都是严格的自养菌,有时也会利用有机物进行生长。如 *N. viennensis* 在丙酮酸存在时生长较快,在完全自养条件下生长速率则大幅下降^[7]。有的 AOA 会与特定种类的细菌共生,如硫酸化菌等,在去除细菌之后便无法生存^[8]。因此本研究富集得到的 AOA 有可能与杂菌共生,利用杂菌的代谢产物作为营养物质。在不清楚这些营养物质的具体种类时,很难将 AOA 与杂菌分开来单独培养。

HJ-2b 的代时为 1.6 d,约为 38 h。且该数据是在实验室条件下测定得到的,在实际的污水处理系统中,比生长速率会更慢,代时会更长。而 AOB 的代时一般在 7–36 h^[27] 之间。相比之下 AOA 在实际情况下的代时比 AOB 要长,这可能是在很多污水处理系统中只存在 AOB 的原因。较短的污泥停留时间导致 AOA 不能够充分增长,最终流失。因此,如果要将在 AOA 应用在实际的污水处理中,可能需要采用添加填料或进行菌体固定化等方法来减缓 AOA 的流失速度。此外,可将 AOA 应用于低氨氮污水或者饮用水的处理,发挥 AOA 对氨氮具有较高亲和力的优势^[23]。

HJ-2b 在 16S rRNA 基因和 *amoA* 基因的进化关系上产生了较大的差异,换用不同的引物检测之后,该差异仍然存在。这是在之前的 AOA 富集中从未被报道过的。Pester 等认为 AOA 的 *amoA* 基因和 16S rRNA 基因是共同进化的^[28],同一种 AOA 的两个基因都应该归于到同一个组,即同为 Group I. 1a 或者同为 Group I. 1b。而本研究得到的 HJ-2b 菌的 16S rRNA 基因归属于 Group I. 1b,而 *amoA* 基因归属于 Group I. 1a,与 Pester 的理论矛盾。考察该菌的原始生存环境,一种可能的解释是 HJ-2b 菌的 *amoA* 基因并不是其本身具有的,而是来自于横向的基因转移。因为该菌是从污水处理系统中富集得到的。相比于土壤和海洋等自然环境,污水处理系统环境更为复杂,由于营养物质丰富,微生物密度高,导致它们的功能基因之间发生横向转移的可能性也更大^[29]。有研究者在膜生物反应器 (MBR) 中就发现不同细菌之间存在抗生素抗性基因的横向转移现象^[30]。而 AOA 作为古菌的一种,其在上亿年的进化过程中基因转移现象也较为普遍^[31]。因此我们

猜想 HJ-2b 菌的 *amoA* 基因最初有可能是来自于另外一个属于 Group I. 1a 的 AOA (称为供体 AOA)。接受了基因转移后的 HJ-2b, 其氨氧化活性更能够匹配之前具有的一些性质 (比如菌体大小, 细胞膜通透性等), 因此相比而言更能够适应污水处理系统环境以及本研究采用的培养基条件, 最终得以富集。而供体 AOA 虽然具有同样的 *amoA* 基因, 但由于与整个菌体的其他性质不匹配, 不适应富集条件而最终被淘汰。

考虑到本研究仅就 HJ-2b 的两个基因进行了分析, 并未涉及其他更多的基因。在今后的研究中, 进行全基因组测序尤为必要。由此能够更进一步地明确不同基因的分类归属, 进而研究该菌整体的进化关系。

参考文献

- [1] Konneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437 (7058): 543-546.
- [2] Jia Z, Weng J, Lin X, Conrad R. Microbial ecology of archaeal ammonia oxidation - A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (4): 431-437. (in Chinese)
贾仲君, 翁佳华, 林先贵, Conrad Ralf. 氨氧化古菌的生态学研究进展. *微生物学报*, 2010, 50 (4): 431-437.
- [3] Zhang L, He J. A novel archaeal phylum: Thaumarchaeota-A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(4): 411-421. (in Chinese)
张丽梅, 贺纪正. 一个新的古菌类群——奇古菌门 (thaumarchaeota). *微生物学报*, 2012, 52 (4): 411-421.
- [4] Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (41): 14683-14688.
- [5] He J, Shen J, Zhang L, Zhu Y, Zheng Y, Xu M, Di HJ. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2364-2374.
- [6] Park HD, Wells GF, Bae H, Criddle CS, Francis CA. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5643-5647.
- [7] Tourna M, Stieglmeier M, Spang A, Konneke M, Schintlmeister A, Urich T, Engel M, Schloter M, Wagner M, Richter A, Schleper C. Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(20): 8420-8425.
- [8] Park BJ, Park SJ, Yoon DN, Schouten S, Damste J, Rhee SK. Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in coculture with sulfur-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(22): 7575-7587.
- [9] Preston CM, Wu KY, Molinski TF, Delong EF. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp., nov.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(13): 6241-6246.
- [10] Kim JG, Jung MY, Park SJ, Rijpstra W, Damste J, Madsen EL, Min D, Kim JS, Kim GJ, Rhee SK. Cultivation of a highly enriched ammonia-oxidizing archaeon of thaumarchaeotal group i. 1b from an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2012, 14 (6): 1528-1543.
- [11] Lehtovirta-Morley LE, Stoecker K, Vilcinskas A, Prosser JI, Nicol GW. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (38): 15892-15897.
- [12] Jung M, Park S, Min D, Kim J, Rijpstra WIC, Sinninghe Damste JS, Kim G, Madsen EL, Rhee S. Enrichment and characterization of an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of mesophilic crenarchaeal group i. 1a from an agricultural soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (24): 8635-8647.
- [13] Zhalnina KV, Dias R, Leonard MT, de Quadros PD, Camargo F, Drew JC, Farmerie WG, Daroub SH, Triplett EW. Genome sequence of candidatus nitrososphaera evergladensis from group i. 1b enriched from everglades soil reveals novel genomic features of the ammonia-oxidizing archaea. *PLoS One*, 2014, 9

- (e1016487).
- [14] de la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, Konneke M, Stahl DA. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(3): 810-818.
- [15] Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(6): 2134-2139.
- [16] Gao JF, Luo X, Wu G X, Li T, Peng YZ. Abundance and diversity based on amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(7): 3339-3354.
- [17] Yapsakli K, Aliyazicioglu C, Mertoglu B. Identification and quantitative evaluation of nitrogen-converting organisms in a full-scale leachate treatment plant. *Journal of Environmental Management*, 2011, 92(3): 714-723.
- [18] Limpiyakorn T, Furrhacker M, Haberl R, Chodanon T, Srithep P, Sonthiphand P. AmoA-encoding archaea in wastewater treatment plants: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(4): 1425-1439.
- [19] Gao JF, Luo X, Wu GX, Li T, Peng YZ. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, 2013, 138: 285-296.
- [20] Wu YJ, Whang LM, Fukushima T, Chang SH. Responses of ammonia-oxidizing archaeal and betaproteobacterial populations to wastewater salinity in a full-scale municipal wastewater treatment plant. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(4): 424-432.
- [21] Kayee P, Sonthiphand P, Rongsayamanont C, Limpiyakorn T. Archaeal amoA genes outnumber bacterial amoA genes in municipal wastewater treatment plants in Bangkok. *Microbial Ecology*, 2011, 62(4): 776-788.
- [22] Raskin L, Stromley JM, Rittmann BE, Stahl DA. Group-specific 16S ribosomal-rna hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(4): 1232-1240.
- [23] Martens-Habbena W, Berube PM, Urakawa H, de la Torre JR, Stahl DA. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea and bacteria. *Nature*, 2009, 461(7266): 234-237.
- [24] Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM. Rna operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1328-1333.
- [25] Sato C, Schnoor JL, McDonald DB, Huey J. Test medium for the growth of nitrosomonas-europaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(5): 1101-1107.
- [26] Hu J, He X, Li D, Liu Q. Progress in research of sphingomonas. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2007(3): 431-437. (in Chinese)
胡杰,何晓红,李大平,刘强.鞘氨醇单胞菌研究进展. *应用与环境生物学报*, 2007,(3): 431-437.
- [27] Philips S, Wyffels S, Sprengers R, Verstraete W. Oxygen-limited autotrophic nitrification/denitrification by ammonia oxidisers enables upward motion towards more favourable conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(4-5): 557-566.
- [28] Pester M, Rattei T, Flechl S, Grongroft A, Richter A, Overmann J, Reinhold-Hurek B, Loy A, Wagner M. AmoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(2): 525-539.
- [29] Schluter A, Heuer H, Szczepanowski R, Forney LJ, Thomas CM, Puhler A, Top EM. The 64508 bp incp-1 beta antibiotic multiresistance plasmid pb10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the incp-1 beta group. *Microbiology-Sgm*, 2003, 149(11): 3139-3153.
- [30] Yang D, Wang JF, Qiu ZG, Jin M, Shen ZQ, Chen ZL, Wang XW, Zhang B, Li JW. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in a membrane bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 2013, 167(4): 441-447.
- [31] Petitjean C, Moreira D, Lopez-Garcia P, Brochier-Armanet C. Horizontal gene transfer of a chloroplast dnaJ-fer protein to thaumarchaeota and the evolutionary history of the dnaK chaperone system in archaea. *BMC Evolutionary Biology*, 2012, 12: 226.

Cultivation and characterization of an ammonia oxidizing archaeon enriched from wastewater treatment plant

Yuyang Li, Xianghua Wen^{*}, Kun Ding, Bing Zhang, Bo Shen

School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: [**Objectives**] To enrich ammonia-oxidizing archaeon (AOA) from wastewater treatment plants, identify its phylogenetic status, morphology and determine its growth and ammonia oxidation rates. [**Methods**] AOA was enriched in autotrophic medium containing antibiotics by using consecutive passage. The purity, uniformity and phylogenetic status of archaeal enrichment were determined with different molecular tools. The morphology was determined with scanning electron microscopy. The AOA growth and ammonia oxidation rates were calculated from the corresponding experimental results. [**Results**] An AOA enrichment HJ-2b with purity of 93% was obtained. The similarity of its 16S rRNA gene with *Nitrososphaera* sp. JG1 was 100% , suggesting it belonged to *Nitrososphaera* spp. , although the similarity of *amoA* gene between these two species was only 72% . HJ-2b cell was rod-shaped, with the maximum specific growth rate of 0.43 d⁻¹, the specific ammonia-oxidation rate of 3.9 fmol/(cell·d). [**Conclusions**] HJ-2b has great significance in studying the occurrence and contribution of AOA in wastewater treatment.

Keywords: wastewater treatment plant, ammonia-oxidizing archaea, enrichment, specific growth rate, specific ammonia oxidation rate

(本文责编: 王晋芳, 李磊)

Supported by the National Natural Foundation of China (51178239)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-10-62772837; E-mail: xhwen@tsinghua.edu.cn

Received: 13 November 2014/Revised: 14 January 2015