

喹啉与吡啶驯化的反硝化反应器的微生物群落结构分析比较

洪璇, 刘彬彬, 张晓君*, 赵立平

(上海交通大学生命科学技术学院, 教育部微生物代谢重点实验室, 上海 200240)

摘要:【目的】本研究旨在比较分析分别以喹啉和吡啶为底物, 在相同条件下驯化的两个反硝化生物反应器的微生物群落结构。【方法】采用相同的种子污泥和相同的驯化条件, 经过大约 6 周的驯化后, 两个反应器均达到稳定而高效的污染物去除能力, 通过 16S rDNA 克隆文库技术对两个反应器的微生物群落结构进行研究。【结果】研究发现, 微生物群落结构表现出很大的差异。喹啉驯化的群落中所有的 OTU 都属于 Betaproteobacteria, 而吡啶驯化的群落中 Betaproteobacteria 占 56.3%, 吡啶驯化的群落具有更高的多样性。两个群落的优势 OTU 也不同, 喹啉驯化群落中 *Thauera* 及其它 Rhodocyclaceae 科的微生物占整个群落的 73%, 而吡啶驯化群落中优势 OTU 为 Comamonadaceae 科、Alcaligenaceae 科和 Rhodocyclaceae 科等类型的微生物, 其中 Comamonadaceae 科的一个 OTU 占整个群落的 28.7%。【结论】不同的驯化底物对微生物群落的组成具有较强的选择作用。首次报道并比较了可高效降解喹啉和吡啶的反硝化生物反应器的微生物群落结构。

关键词: 喹啉; 吡啶; 反硝化; 细菌群落; 16S rDNA

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0503-05

喹啉和吡啶是煤炭化工产生的工业废水中常见的氮杂环类污染物, 都属于难降解化合物, 且具有较强的毒性, 喹啉还对人类具有潜在的致癌作用。由于对工业废水中含量相对较小的氮杂环类难分解芳香族污染物的去除效率关注不够, 喹啉、吡啶等成为土壤、地下水和其它水体中较常见的污染物^[1,2]。目前对喹啉和吡啶的研究大多集中在对其代谢途径以及降解相关菌的研究, 如 Wang 等分离并研究了 *Burkholderia pickettii* 对喹啉的降解^[3], 在废水处理反应器中添加该菌可以明显促进反应器对喹啉的降解效率^[4]。而对于喹啉与吡啶废水的反应器群落结构的研究非常有限, 尤其是缺乏对能稳定高效地降解喹啉或吡啶的反应器的微生物群落结构的报道。

微生物的群落结构与其功能具有复杂的对应关

系, 特定的群落结构决定了其特定的功能。在工业废水处理反应器的设计中, 由于工艺的不同会形成具有相似功能但结构完全不同的微生物群落。如 Manefield 等在对两个处理含酚废水工业装置的研究中发现, 其微生物群落中最重要的苯酚降解菌分别属于 *Thauera* 属和 *Acidovorax* 属^[5,6]。因此, 不同的工艺和反应器的设计对于微生物的群落和结构都有着深远的影响。在处理复杂工业废水的微生物群落中, 各种不同的功能菌负责对不同的化合物进行降解。群落结构的差异虽然不一定会导致 COD 去除能力的变化, 但由于某些降解特定类型污染物的微生物种群存在很大差异, 导致废水中一些低含量的难降解污染物的去除能力下降。因此, 研究这些难降解化合物相关的功能菌群及其群落功能间的关系, 不仅有利

基金项目: 国家自然科学基金(20677041); 上海市国际合作项目(05SR07107)

*通讯作者。Tel: +86-21-34204878; E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

作者简介: 洪璇(1983-), 女, 福建人, 硕士研究生, 从事微生物分子生态学研究。E-mail: amoy.hong@gmail.com

收稿日期: 2007-11-02; 修回日期: 2007-12-28

于了解复杂工业废水中各种污染化合物的降解功能菌,而且对于进一步选择适当的工艺和设计合理的反应器,进行群落结构优化,从而提高处理功能具有重要意义^[7]。

本研究以从某焦化废水处理工业装置采集的活性污泥为种子污泥,采用相同的工艺条件,分别以喹啉和吡啶为主要碳源,驯化了两个生物反应器,比较这两个反应器的微生物群落结构的异同,指出两个群落中主要的功能菌群,并且揭示了底物的差异会对微生物群落具有不同的筛选作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 反应装置及样品采集:种子污泥采集于某焦化厂废水处理系统的二沉池。反硝化反应器的体积为18L,鞣性材料作为填料。实验采用人工配水,以 KH_2PO_4 为磷源,喹啉(或吡啶)和葡萄糖为碳源,浓度分别为0.3mmol/L和1mmol/L。两个反应器的进水中加入 NaNO_3 调整 $\text{COD}:\text{NO}_3^--\text{N}=5:1$ 。实验控制在 $\text{HRT}=12\text{h}$ 、 $T=30^\circ\text{C}$ 、进水 $\text{pH}=7.0$ 、 $\text{DO}<3.1\mu\text{mol/L}$ 时进行。经过6周的调试,反应器达到运行稳定状态,采集生物膜样品进行分析。

1.1.2 主要试剂和仪器:PCR反应体系所需试剂购自Promega公司;PCR扩增所用引物由上海生工公司合成;DNA割胶回收试剂盒购自Axygene公司;pGEM T-easy载体和连接试剂盒购自Promega公司。冷冻离心机(SIGMA);冷冻干燥仪(美国,SAVANT);DyNA Quant 200核酸浓度测定仪(美国,PHARMACIA BIOTECH);核酸电泳仪(BIO-RAD);GDS凝胶成像系统(英国,UVI BTS-20);PCR仪(Bio-Rad Tetrad 2);电转仪(Bio-Rad)。

1.2 样品预处理和DNA提取

样品预处理和DNA提取方法详见文献[8]。

1.3 16S rDNA全长扩增和克隆文库构建

16S rDNA的全长扩增采用细菌通用引物27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1391r(5'-GACGGGCGGTGTGTRCA-3')^[9]。PCR采用50 μL 反应体系,扩增程序为:94 $^\circ\text{C}$ 4min;94 $^\circ\text{C}$ 45s,55 $^\circ\text{C}$ 1min,72 $^\circ\text{C}$ 1min,共30个循环;72 $^\circ\text{C}$ 6min。PCR扩增产物经纯化后(Axygen),用T4连接酶连接至pGEM T-easy克隆载体(Promega),通过电击转化法转化到*E.coli* DH10B感受态细胞中。筛选阳性克隆构建克隆

文库。

1.4 序列分析

对吡啶驯化群落文库的96个克隆分别用27f引物进行测序,得到大约850bp的有效序列,去除chimera后,以序列相似性98%为标准,划分为分类操作单元(OTU, operational taxonomic units)。喹啉驯化群落的文库共获得125个有效序列,按照相同的方法进行了OTU的划分。

为了检测所构建的克隆文库是否取样充分,采用Kemp等人的渐进采样法(Kemp),构建不同大小的假克隆库(pseudo-library)。对每一个克隆文库,计算两个非参数估计值 S_{chao1} 和 S_{ACE} ^[10, 11]。并以在线的计算程序(<http://www.aslo.org/lomethods/free/2004/0114a.html>)处理数据,得到的结果以Kemp等的方法进行了处理^[12, 13],结果表明两个文库都已足够大。

1.5 核酸序列登录号(Accession number)

本研究中所获得的16S rRNA基因序列在GenBank数据库中的登录号为EU136218-EU136304(吡啶驯化群落文库)和AY945901-AY945924(喹啉驯化群落文库)。

2 结果

2.1 吡啶驯化的反硝化反应器的微生物群落结构特征
经过大约6周的驯化,喹啉和吡啶反硝化反应器的污染物去除等功能达到稳定状态,在连续五天的检测中保持稳定的COD去除率及喹啉(吡啶)去除率,分别为 $90.2\%\pm 3.2\%$ 和 $80.4\%\pm 1.7\%$ 。从吡啶驯化的反应器建立的文库中选取96个克隆进行16S rDNA序列的分析,经Chimeras分析后,共获得87个有效序列。这些序列共划分为39个OTU。这些OTU经NCBI数据库网上Blast后,获得它们的系统发育信息(表1)。

从表中可以看出,吡啶驯化的微生物群落具有较高的多样性。在文库中既有Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Deltaproteobacteria等Proteobacteria纲的序列,还有Clostridia、Actinobacteria、Bacteroidetes、Flavobacteria等纲的序列,属水平的多样性更高。文库中Betaproteobacteria占有很高的比例,该亚纲克隆在整个文库中所占比例高达56.3%;而Comamonadaceae科的序列占整个Betaproteobacteria的57.1%,其中与Alicyclophilus属的DQ342277序列具有完全相同序列的OTU-DR2在整个克隆文库中占明显的优势,在文库中比例达28.7%。Thauera属相关序列的克隆在此文库中仅占9.2%。

表 1 吡啉反硝化反应器 16S rDNA 文库 OTU 的系统发育分析

Table 1 Information of 16S rDNA clone library constructed from indole acclimated denitrifying bioreactor

Type of OTU	Number of clone	Accession number of most closest sequence	Similarity /%	Phylogenetic position of most closest sequences	
				family	genus
OTU-DR1	2	AB021360	99.9	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>
OTU-DR2	25	DQ342277	100.0	Comamonadaceae	<i>Alicyclophilus</i>
OTU-DR3	2	AB076844	99.9	Comamonadaceae	<i>Acidovorax</i>
OTU-DR4	4	DQ211905	100.0	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>
OTU-DR5	1	DQ413076	99.6	Incertae sedis 5	<i>Thiobacter</i>
OTU-DR6	1	AY570581	97.6	unclassified_Clostridia	Unidentified
OTU-DR7	2	AY921756	99.3	unclassified_Burkholderiales	Unidentified
OTU-DR8	1	AB109439	99.6	Anaerolineaceae	<i>Anaerolinea</i>
OTU-DR9	6	DQ232423	99.9	Rhodocyclaceae	<i>Thauera</i>
OTU-DR10	1	DQ337593	97.1	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>
OTU-DR11	2	AY548757	98.5	Rhodocyclaceae	<i>Thauera</i>
OTU-DR12	3	DQ211905	97.0	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>
OTU-DR13	1	AJ306795	92.9	Anaerolineaceae	<i>Anaerolinea</i>
OTU-DR14	1	AY439269	98.1	Microbacteriaceae	<i>Leifsonia</i>
OTU-DR15	1	AY548775	100.0	Desulfobulbaceae	<i>Desulfobulbus</i>
OTU-DR16	1	AJ316024	95.5	Syntrophaceae	<i>Desulfomonile</i>
OTU-DR17	2	DQ069214	99.9	Desulfomicrobiaceae	<i>Desulfomicrobium</i>
OTU-DR18	3	AB195875	99.7	Porphyromonadaceae	<i>Dysgonomonas</i>
OTU-DR19	2	DQ129396	99.7	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>
OTU-DR20	1	AJ863372	94.0	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>
OTU-DR21	1	AF395430	99.5	Eubacteriaceae	<i>Anaerovorax</i>
OTU-DR22	5	AY661464	99.5	Brucellaceae	<i>Ochrobactrum</i>
OTU-DR23	2	AY513503	99.3	Bradyrhizobiaceae	<i>Afipia</i>
OTU-DR24	1	AJ863372	99.9	Bradyrhizobiaceae	<i>Shinella</i>
OTU-DR25	1	AY570581	90.6	Unidentified bacteria	Unidentified
OTU-DR26	1	AF418954	89.4	Unidentified bacteria	Unidentified
OTU-DR27	1	AB074595	95.7	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>
OTU-DR28	2	AF508094	99.6	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>
OTU-DR29	1	AF332709	96.3	Clostridiaceae	Unidentified
OTU-DR30	1	AY928661	98.6	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>
OTU-DR31	1	AF508094	97.7	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>
OTU-DR32	1	AB127972	99.7	Rhodobacteraceae	<i>Pannonibacter</i>
OTU-DR33	1	Y11584	99.2	Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i>
OTU-DR34	1	DQ337018	99.7	Flavobacteriaceae	<i>Cloacibacterium</i>
OTU-DR35	1	AY921846	97.6	Rhizobiales	Unidentified
OTU-DR36	1	AY513503	94.7	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>
OTU-DR37	1	AJ224610	99.7	Bradyrhizobiaceae	<i>Bosea</i>
OTU-DR38	1	AB021355	99.7	Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>
OTU-DR39	1	AB245395	98.4	Nocardioideae	<i>Aeromicrobiu</i>

2.2 吡啉和喹啉驯化的反硝化反应器的微生物群落结构的比较

喹啉驯化的群落的克隆文库结果已在另一论文报道^[8]。喹啉反硝化反应器文库共 125 个序列, 划分为 24 个 OTU, 各 OTU 的代表序列保存在 Genbank 中。喹啉驯化的反硝化生物反应器的驯化条件除所用的驯化污染物不同外, 其它所有条件保持一致。我们对这两个反应器的生物膜的微生物群落结构进行了比较。结果发现它们具有较大的差异。喹啉驯化的反应器的微生物全部属于 Betaproteobacteria, 而吡啉驯化的群落虽然 Betaproteobacteria 占很大比例(56%), 但其它 Proteobacteria、甚至

Actinobacteria 等也占有一定比例(图 1)。吡啉驯化的群落的微生物多样性显著地高于喹啉驯化的群落。喹啉驯化的微生物群落的最主要 OTU 属于 Rhodocyclaceae 科 *Thauera* 属, 在整个群落中占 73%。吡啉驯化的群落中, 属于 Rhodocyclaceae 科 *Thauera* 属的 OTU 约占 10%, 而最优势的 OTU 类型属 Comamonadaceae 科, 占整个群落的比例约 33%。吡啉驯化的群落中, 另一个属于 Betaproteobacteria 的 OTU 占整个群落的 12%, 该 OTU 属 Alcaligenaceae 科。喹啉驯化群落和吡啉驯化群落唯一有一个相同的 OTU, 该 OTU 在喹啉驯化群落中占 56%, 为最优势 OTU; 而它在吡啉驯化的群落中仅占 2.3%(OTU-DR11)。

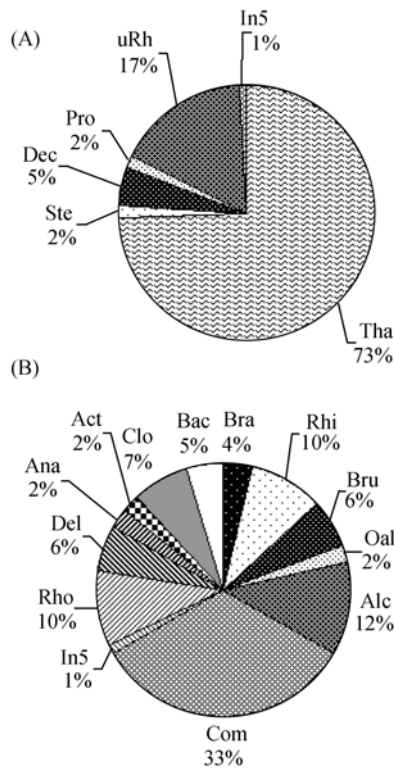


图 1 喹啉与吲哚驯化的反硝化反应器的微生物群落结构的比较

Fig. 1 Comparison of microbial community structure of quinoline and indole acclimated denitrifying bioreactors. A:community structure of quinoline acclimated denitrifying bioreactor;B:community structure of indole acclimated denitrifying bioreactor. (A) Tha: *Thauera*, Ste: *Sterolibacterium*, Dec: *Dechloromonas*, Pro: *Propionivibrio*, uRh: *unclassified_Rhodocyclaceae*, In5: *Incertae sedis 5*. (B) Bra: *Bradyrhizobiaceae*, Rhi: *Rhizobiaceae*, Bru: *Brucellaceae*, Oal: *otherAlphaproteobacteria*, Alc: *Alcaligenaceae*, Com: *Comamonadaceae*, In5: *Incertae sedis 5*, Rho: *Rhodocyclaceae*, Del: *Deltaproteobacteria*, Ana: *Anaerolinaeacea*, Act: *Actinobacteria*, Clo: *Clostridiaceae*, Bac: *Bacteroidetes*.

3 讨论

喹啉和吲哚都是氮杂环类化合物,是焦化废水等工业废水中的主要污染物,在一般的污染物处理过程中,都属于难降解化合物。揭示废水中这两类污染物驯化的微生物群落,并对它们进行比较,将有利于了解工业废水中微生物处理过程的微生物群落组成与污染物降解间关系,为提高废水处理的效率奠定基础。

通过对喹啉和吲哚驯化的微生物群落的比较,我们发现尽管使用了几乎相同的驯化条件,所用的底物的差异导致了两个反应器微生物群落的巨大差异。喹啉驯化的群落仅有 Betaproteobacteria,而吲哚驯化的群落具有更高的多样性。可能是由于降解喹啉的微生物类型较少,且喹啉对非降解微生物的毒性更大,使其生长受到抑制。

在我们的研究中发现,喹啉驯化的群落中主要的优势功能菌可能是 *Thauera* 属的菌株,其中占有绝对优势的序列为 DR1,它与数据库中的序列 AB066262 具有几乎相同的序列,该序列来自从废水处理厂厌氧活性污泥分离的以甲苯为唯一碳源生长的 *Thauera* 属细菌^[14]。而在吲哚驯化的群落中可能是 *Alicyclophilus* 属的菌株和 *Ochrobactrum* 属、*Alcaligenes* 属以及 *Thauera* 属的菌株,其中占有绝对优势的 OTU-DR2 与 *Alicyclophilus* 属的 DQ342277 序列具有完全相同序列,该序列是以氯酸盐为电子受体降解苯的富集培养物中的序列^[15],它们与反硝化菌 *Alicyclophilus denitrificans* K601 具有很高的相似性,而该菌株以环己醇为唯一碳源,分离自城市污水处理厂^[16]。这些属的菌株也是废水处理和其它污染环境常见的降解菌^[17]。

吲哚驯化的群落中属于 Rhodocyclaceae 科 *Thauera* 属的序列仅为 10%。且整个文库中仅有 2.8% 的克隆与喹啉驯化的群落中的序列相同。吲哚和喹啉虽都是氮杂环类化合物(NHCs),但是它们从相同的种子污泥中驯化出几乎完全不同的群落结构。结果表明了有毒化合物底物对微生物群落具有较强的筛选作用。因此,研究不同的污染物所选择的微生物群落,了解污染物与其微生物降解间的关系,对于了解复杂废水处理系统的微生物群落降解机制具有重要意义。文献报道中还未曾见过使用相同的种子,以不同的污染物驯化的群落的比较研究,本工作将有助于了解不同微生物对污染物的适应性和发现分解驯化的良好功能菌群中利用污染物的优势功能菌。

参 考 文 献

- [1] Fetzner S. Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 49: 237-250.
- [2] 杨云龙, 白晓平. 焦化废水的处理技术与进展. *工业用水与废水(Industrial Water and wastewater)*, 2001, 32(3): 8-10.
- [3] Wang JL, Quan XC, Wu LB, et al. Bioaugmentation as a tool to enhance the removal of refractory compound in coke plant wastewater. *Process Biochemistry*, 2002, 38: 777-781.
- [4] Wang JL, Quan XC, Han LP, et al. Kinetics of Co-metabolism of quinoline and glucose by *Burkholderia pickettii*. *Process Biochem*, 2002, 37(8): 831-836.
- [5] Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI, et al. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to Phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology*,

- 2002, 68(11): 5367–5373.
- [6] Manefield M, Griffiths RI, Leigh MB, *et al.* Functional and compositional comparison of two activated sludge communities remediating coking effluent. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(5): 715–722.
- [7] Yuan Z, Blackall LL. Sludge population optimisation: a new dimension for the control of biological wastewater treatment systems. *Water Research*, 2002, 36(2): 482–490.
- [8] Liu BB, Zhang F, Feng XX, *et al.* *Thauera* and *Azoarcus* as Functionally Important Genera in a Denitrifying Quinoline Removal Bioreactor as Revealed by Microbial Community Structure Comparison. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 55 (2): 274–286.
- [9] Reysenbach AL, Pace NR. Thermophiles. in: Robb FT. *Archaea: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.
- [10] Chao A. Estimating the population size for capture–recapture data with unequal catchability. *Biometrics*, 1987, 43(4): 783–791.
- [11] Chao A, Ma MC, Yang MCK. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika*, 1993, 80: 193–201.
- [12] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47: 161–177.
- [13] Kemp PF, Aller JY. Estimating prokaryotic diversity: when are 16S rDNA libraries large enough? *Limnol Oceanogr Methods*, 2004, 2: 114–125.
- [14] Shinoda Y, Sakai Y, Uenishi H, *et al.* Aerobic and Anaerobic Toluene Degradation by a Newly Isolated Denitrifying Bacterium, *Thauera* sp. Strain DNT-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 1385–1392.
- [15] Weelink SA, Tan NC, Ten Broeke H, *et al.* Physiological and phylogenetic characterization of a stable benzene-degrading, chlorate-reducing microbial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60(2): 312–21.
- [16] Mechichi T, Stackebrandt E, Fuchs G. *Alicyclophilus denitrificans* gen. nov., sp. nov., a cyclohexanol-degrading, nitrate-reducing β -proteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(1): 147–152.
- [17] Heylen K, Vanparys B, Wittebolle L, *et al.* Cultivation of Denitrifying Bacteria: Optimization of Isolation Conditions and Diversity Study. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 2637–2643.

Comparison of microbial community structure of quinoline and indole acclimated denitrifying bioreactor

Xuan Hong, Binbin Liu, Xiaojun Zhang*, Liping Zhao

(Key Laboratory of Microbial Metabolism, Ministry of Education, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] We compared the microbial communities of two denitrifying bioreactors acclimated by quinoline and indole under identical condition. [Methods] We acclimated two reactors by using the same seeding sludge and acclimating conditions. When both reactors reached steady stage with a high pollutant removal capacity after 6 weeks adaptation, we constructed the 16S rDNA clone libraries to analyze the structure of microbial communities of those 2 bioreactors. [Results] Despite the same seeding sludge and identical acclimating condition, molecular ecological analysis showed distinctly different communities of two reactors. All operational taxonomic units (OTUs) of 16S rDNA clone library of quinoline acclimated bioreactor were affiliated to Betaproteobacteria, whereas in library of indole acclimated bioreactor, the percentage of Betaproteobacteria was only 56.3%. Results showed that microbial diversity in indole acclimated community was higher. Clones (73%) in quinoline acclimated community were *Thauera* related OTUs from the Rhodocyclaceae family. But OTUs from the families of Comamonadaceae, Alcaligenaceae and Rhodocyclaceae were dominant OTUs in indole acclimated community. The most dominant OTU from Comamonadaceae was 28.7% in clone library. [Conclusion] The type of pollutants in the wastewater had a strong effect on the selection of population in microbial community. Our study was the first report comparing the microbial structure of two effective denitrifying communities which could efficiently degrade quinoline and indole.

Keywords: quinoline; indole; denitrifying; bacterial community; 16S rDNA

Supported by the National Natural Science Foundation of China(20677041) and the Shanghai-Rhone research collaboration fund(05SR07107)

*Corresponding author. Tel: +86-21-34204878; E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

Received: 2 November 2007/ Revised: 28 December 2007