

专一性 PCR 和变性梯度胶电泳协助从焦化废水处理装置中分离优势功能菌 *Thauera* 属菌株

毛跃建, 张晓君*, 张宝让, 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】在专一性 PCR 和变性梯度胶电泳(DGGE)的协助下, 从废水处理装置的微生物群落中分离较难分离的功能菌 *Thauera*。【方法和结果】本研究首先使用 *Thauera* 特异性 PCR-DGGE 的方法鉴定了焦化废水处理装置反硝化池生物膜中的 *Thauera* 在 6 种培养基、好氧/厌氧条件下的生长情况。挑选 *Thauera* 多样性较高的培养基 1/10 NB 与 MMQ 在好氧条件下进行分离培养。然后使用 *Thauera* 特异性 PCR 方法确定分离得到的菌落是否呈阳性, 并使用 DGGE 的方法检验其是否为纯菌。使用不同培养基对含有 *Thauera* 的混合菌落进行进一步纯化, DGGE 检测发现 MMP 培养基对混合细菌菌落 Q20 中的 *Thauera* 有明显的富集作用。经过 *Thauera* 特异性 PCR 结合 DGGE 检测对 *Thauera* 属细菌进行追踪, 将混合菌落在 MMP 培养基上多次划线, 最终分离得到纯菌。通过这种方法, 从反硝化池样品中分离获得了 3 株在样品中最为主要的 *Thauera* 菌株。【结论】以特异性分子标记为导向分离培养细菌, 不仅提高了分离效率及细菌筛选的灵敏度, 还能协助分离常规方法难以分离的细菌。

关键词: *Thauera*; 特异性 PCR; 变性梯度凝胶电泳(DGGE); 分离纯化

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 12-1634-08

厌氧-缺氧-好氧(A1-A2-O)固定生物膜法是目前常用的一种焦化废水处理工艺, 其中的缺氧池(A2)的主要功能是反硝化^[1]。这个池中的反硝化细菌能够利用从好氧池(O)回流进来的硝酸和亚硝酸盐作为电子受体进行反硝化, 在去除硝酸和亚硝酸盐的同时, 也消耗了污水中的有机物。这就大大降低了焦化废水中酚类化合物、含氮杂环类化合物等有毒污染物进入 O 池时的浓度, 从而避免这些物质对 O 池中硝化过程的产生抑制作用^[2]。

在对一个实验室反硝化生物反应器的研究中, 我们就发现 *Thauera* 与喹啉的降解有着密切的联系。在该反应器的驯化过程中, 随着反应器的喹啉降解效率从低于检测能力上升到 90.2%, 其中的 *Thauera* 的含

量也从 4% 增加到了 56%^[3]。*Thauera* 是一类广泛的存在于废水处理装置中, 并能降解多种有机化合物的细菌^[4, 5]。同时, 通过 *Thauera* 属纯菌的研究, 证实它们具有降解苯酚、多酚、甲苯等有机污染物的能力^[6-8]。因此, *Thauera* 可能在废水处理装置的焦化废水污染物的降解过程中起着重要的作用。

到目前为止, 虽然已有超过 40 株 *Thauera* 被分离得到, 但是这些菌的选择性分离过程基本都是功能导向性的。它们大多是在特殊的培养条件下富集某类功能细菌时分离得到的。例如 Shinoda 等人在反硝化条件下富集培养甲苯降解菌, 然后从中分离细菌时获得菌株 *Thauera* sp. DNT-1^[8]。虽然这种以功能为导向的常规分离方式, 能够相对容易的分离到某种污染物

基金项目: 国家自然科学基金(20677041); 国家“863 计划”重点项目(2007AA021301); 上海市国际合作项目(05SR07107); 上海市重点学科建设项目资助(B203)

*通讯作者。Tel: +86-21-34204878; E-mail: xjzhangsjtu@gmail.com

作者简介: 毛跃建(1981-), 男, 浙江人, 博士研究生, 从事微生物分子生态学研究。E-mail: mao.yuejian@gmail.com

收稿日期: 2008-06-26; 修回日期: 2008-08-25

的降解菌。但是由于这种分离方式使用的培养条件往往选择性很强,因而使得原始群落中一些起主导作用的功能菌可能会因为生长受到培养条件的限制而无法分离获得,即使它们在原始群落内丰度可能很高。由于培养条件与原始环境差别很大,使得用这种方式分离到的大部分细菌在原始的群落中可能并不占优,与原始群落的功能之间关系也并不密切,这就降低了这些菌的研究价值及应用前景。

为此在本研究中,我们使用了另外一种更具目的性的方法:以分子标记为导向的方式来分离群落中的目标菌。首先使用分子生物学的手段评估了一个焦化废水处理装置中的 *Thauera* 属细菌在各种不同类型的培养基上的生长情况。挑选出合适的培养基和培养条件后,再进行分离培养。并在 *Thauera* 特异性 PCR 方法的协助下,从大量的菌落中快速筛选目标菌。最终,我们从这个废水处理装置 A2 池的生物膜样品中成功分离获得了 3 株在原始群落中最为主要的 *Thauera* 菌株。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 生物膜样品:用于细菌分离的生物膜样品(A2)采自上海某焦化厂 A1-A2-O 废水处理装置的反硝化池(A2池)。

1.1.2 培养基: 营养肉汤培养基(NB):蛋白胨 5 g/L,牛肉浸膏 3 g/L,琼脂 15 g/L, pH7.0; 1/10 NB: 10 倍稀释的营养肉汤培养基; 厌氧培养时,加入 2 mmol/L KNO_3 。 废水培养基(WW):用 0.22 μm 的滤菌膜对焦化废水进行过滤除菌后加热至 60 左右,然后与融化状态下已灭菌的 7.5%的琼脂按照 4:1 的比例混合; 厌氧培养时,加入 2 mmol/L KNO_3 。 基本培养基(Basic mineral medium):取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.0 g), KH_2PO_4 (1.0 g), NH_4Cl (0.5 g), KNO_3 (0.5 g), K_2SO_4 (0.06 g) 溶于 1 L 水中,高温灭菌后加入 0.5 mL 过滤灭菌的 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (200 g/L) + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 g/L)溶液及 0.5 mL 1 mol/L NaHCO_3 无菌溶液; 基本培养基+醋酸钠(MMAC):取 990 mL 基本培养基加入 10 mL 20 g/L 无菌醋酸钠溶液; 基本培养基+苯酚(MMP):取 990 mL 基本培养基加入 10 mL 10 g/L 无菌苯酚溶液; 基本培养基+喹啉(MMQ):菌液涂布在基本培养基后,培养基中央放入含 2 μL 喹啉的无菌滤纸片。

1.1.3 主要试剂和仪器:本研究使用的主要试剂包括 Triton X-100、Taq DNA 聚合酶(Promega)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、去离子甲酰胺及 SYBR Green。使用的主要仪器包括超净工作台、恒温培养箱、厌氧培养罐、PCR 仪(Bio-Rad)、小型珠磨器(Mini Bead Beater)、电泳仪及 DGGE 仪(Bio-Rad D Code system)。

1.2 培养基筛选

将新鲜采集的生物膜用无菌水稀释 $10^3, 10^4, 10^5$ 倍(NB 和 1/10NB 培养基上为 $10^4, 10^5, 10^6$ 倍)后,取 100 μL 菌悬液涂布于培养基上,倒置于 28 的培养箱或厌氧罐中依据培养基类型培养 4~7 d。以无菌水洗涤收集平板上的菌体。玻珠击打法提取基因组 DNA 后,使用 *Thauera* 特异性 PCR-DGGE 方法分析不同培养基上的 *Thauera* 组成。根据 *Thauera* 的组成和丰度挑选出合适的培养基和培养条件。

1.3 菌株筛选

在好氧培养的过程中获得的菌落平均分为 8 组,玻珠击打法提取基因组 DNA 后,进行 *Thauera* 特异性 PCR,对含有 *Thauera* (PCR 为阳性)的组中所有的细菌以 Triton X-100 煮沸裂解法获得 DNA 后再进行 *Thauera* 特异性 PCR 检测。对 PCR 阳性的单菌落进行 16S rDNA 的 PCR-DGGE 分析,鉴定是否为纯菌。

1.4 基因组 DNA 提取

1.4.1 玻珠击打法(bead beating):玻珠击打的 DNA 提取法参照文献^[9]。并用 DyNA quantTM 200(美国, Amersham Pharmacia Biotech)测定 DNA 浓度。

1.4.2 Triton X-100 煮沸裂解法:用无菌的牙签将单菌落挑至含有 20 μL 1% Triton X-100 的 1.5 mL 离心管中,强烈震荡 1 min 后,放入沸水中水浴 10 min,放冰上冷却 3 min, 8000 \times g 离心 1 min 后取上清。

1.5 PCR

PCR 扩增体系如下:50 μL PCR 反应体系含有 1.25 U Taq DNA 聚合酶(Promega 公司),5 μL 10 \times 缓冲液,1.5 mmol/L MgCl_2 , 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 引物以及 2 μL 基因组 DNA。

1.5.1 *Thauera* 特异性 PCR^[10]:使用的引物为 P0 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'^[11])和 Thau832 (5'-TGCATTGCTGCTCCGAAC-3'^[12])。PCR 反应条件:95 5 min, 95 45 s, 60 1 min, 72 1 min, 25 个循环, 72 6 min。

1.5.2 细菌 16S rRNA 基因 PCR:使用的引物为 P0

和 P6 (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3')^[11]。PCR 反应条件: 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 20 个循环, 72 °C 8 min。

1.5.3 细菌 V3 区 PCR: 使用引物为 P2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 和 P3 (5'-CGCCGCGCGCGC GGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACG GGAGGCAGCAG-3')^[13]。PCR 反应条件: 预变性 5 min, 95 °C 1 min, 65 ~55 °C 退火 1 min(每 2 个循环降 1 °C, 最后 55 °C 10 个循环), 72 °C 1 min, 72 °C 7 min。

1.6 PCR 产物的 DGGE 分析^[13]

使用 Bio-Rad 公司的 D Code 系统对 16S rRNA 基因 V3 区 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析。使用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性剂梯度为 32%~58% (100% 变性剂浓度对应于 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺)。在电压 200 V 和温度 6 °C 下电泳 240 min。电泳所使用的缓冲液是 1×Tris-Acetate-EDTA (TAE, pH8.4)。电泳结束后用 1×SYBR Green (AMRESCO 公司) 染色, 然后用 UVI 凝胶成像系统保存试验结果。

1.7 测序与序列分析

将得到的 PCR 产物割胶纯化后, 由上海生工生物工程技术有限公司测序。序列通过 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) 中的 nucleotide blast 程序寻找其最接近的序列, 确定序列的系统发育地位。

1.8 核酸序列登录号(Accession number)

本研究分离到的 3 株菌的 16S rRNA 基因序列在

GenBank 数据库中的登录号为 EU850614 (Q20-C), EU850615 (3-35) 和 EU850616 (Q4)。

2 结果

2.1 *Thauera* 培养基的筛选

在好氧培养条件下, 所有的 6 种培养基上都有菌落生长。其中营养丰富的 NB 和 1/10 NB 培养基上的菌落生长速度最快(< 10 h), 菌落数量多。在原废水培养基(WW)上, 虽然菌落出现的时间较晚(24 h 以后), 但是生长菌落数量较多。在 3 种基本培养基(MMAC, MMP 和 MMQ)上, 菌落不仅出现时间较晚, 其数量也较少(稀释度为 10⁻³ 平板上的菌落数量小于 100)。在厌氧培养条件下, 只有 3 种培养基(NB, MMAC 和 MMP)上出现了菌落, 且数量很少。

随后, 洗脱各种培养基上的菌落, 并使用玻珠击打法提取基因组 DNA。除了菌量极少的 MMP (厌氧培养) 以外, 其他 8 个有菌落生长的培养基上都获得了 DNA (表 1)。使用 *Thauera* 特异性 PCR 的方法对得到的基因组 DNA 检测后发现, 好氧条件下培养的 6 种培养基上都有 *Thauera* 阳性信号; 在厌氧条件下, 只有 MMAC 上有阳性信号(图 1-A)。为了排除由于 PCR 抑制物抑制可能造成的假阴性, 我们还平行做了一组细菌的 16S rRNA 基因 PCR 作为对照(图 1-B)。在所有 DNA 浓度高于最低检测值的样品中都得到了 16S rRNA 基因 PCR 产物。对比两组 PCR 后, 发现只有在厌氧培养条件下的 NB 培养基上, 虽然有细菌生长, 但是却没有 *Thauera* 阳性信号。

表 1 不同培养基上生长的菌落提取得到的 DNA 总量(μg)
Table 1 The quantity of DNA extracted from colonies growing on different media (μg)

Medium	NB	1/10 NB	WW	MMAC	MMP	MMQ
Aerobic	8.64	9.85	5.09	2.28	1.47	1.14
Anoxic	1.27	NA	NA	1.61	NA	NA

NA: Concentration was below the detection limitation (10 ng/μL).

使用 *Thauera* 特异性 PCR-DGGE 的方法对 7 个阳性样品中 *Thauera* 的多样性进行分析, 并与生物膜样品(A2)中的 *Thauera* 组成进行比较。A2 样品中总共出现了 5 条可见条带, 其中条带 T3 含量最高(图 2)。而其它的 7 个平板培养的样品中, 都含有两条主要条带(T2 和 T3), 并且在不同培养基中的比例基本相同, 只有厌氧条件培养下的 MMAC 上的条带 T2 相对较弱。在所有的 7 个样品中, 好氧条件下的 1/10NB 培

培养基上出现的条带最多(4 条), 并在 A2 中都有对应条带。但是其组成发生了变化, 条带 T4 变弱, 条带 T2 则显著增强, 而条带 T3 依然是其中一条主要条带。好氧条件下的培养基 NB 和 WW 则都含有相同的 3 条带, 但条带 T5 比较微弱。其他的 4 个样品均只有 2 条条带。最终选择 *Thauera* 多样性最高的 1/10 NB 及菌落数量最少的 MMQ 为培养基, 在好氧条件下分离培养 *Thauera*。

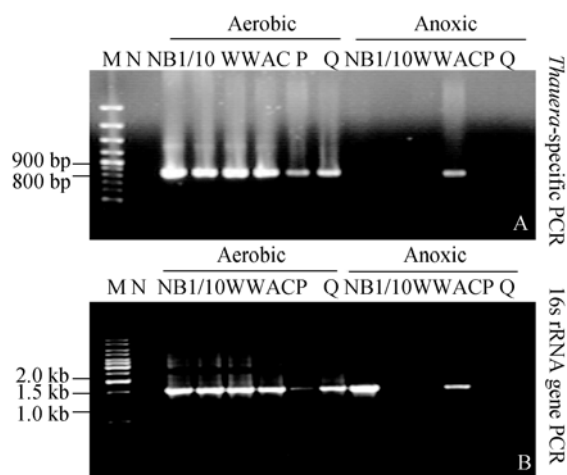


图1 PCR 检测不同培养基和培养条件下 *Thauera* 的生长情况

Fig. 1 PCR detection of *Thauera* in the culture growing on different media. A: *Thauera*-specific PCR products; B: 16S rRNA gene PCR products. M. DNA ladder; N. negative control; NB. 1/10, WW, AC, P and Q. six different media used in this study, NB, 1/10 NB, WW MMAC, MMP and MMQ.

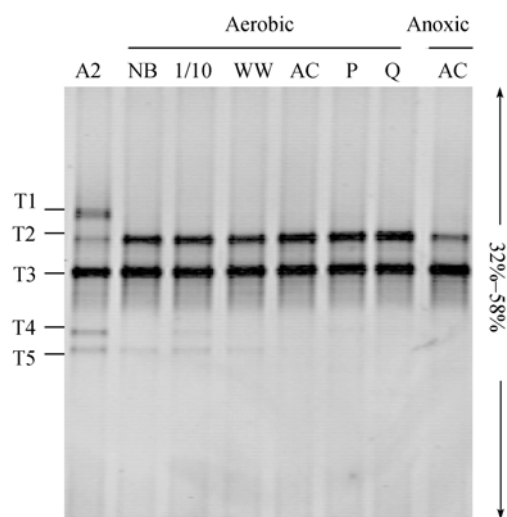


图2 *Thauera* 特异性 PCR-DGGE 分析不同培养基上生长的 *Thauera* 的组成

Fig. 2 *Thauera*-specific PCR-DGGE analysis of compositions of *Thauera* which grown on different media.

2.2 菌株筛选

分别从好氧培养的 1/10 NB 和 MMQ 平板上挑取 240 和 80 个菌落后, 通过两种途径筛选 *Thauera*。对 MMQ 上得到的 80 个菌落, 我们使用 Triton X-100 煮沸裂解法逐个提取 DNA 后进行 *Thauera* 特异性 PCR 检测。对于 1/10 NB 上得到的 240 个菌落, 我们把它平均分成 8 组, 每组 30 个。然后, 以组为单位用玻珠击打法提取 DNA, 并进行 *Thauera* 特异性 PCR 检测。最后, 再使用前面的方法对含有 *Thauera* 的组中的菌株逐个进行检测。为了排除由于没有获得可扩

增的 DNA 而出现的假阴性, 在做所有的 *Thauera* 特异性 PCR 检测的同时, 我们都平行做了 16S rRNA 基因的 PCR 检测。

在来自培养基 1/10 NB 的 8 组菌落中, 有 3 组 (G2, G7 和 G8) 出现了目标条带, 但是在 G2 组中还有另外一条非目标条带。对这 3 组中的所有的 90 株菌株逐个进行检测后发现, 在 G2 组中只有一个菌落 (1-38) 出现了目标条带, 但是与 G2 组的 *Thauera* 特异性 PCR 结果一样, 它也还有另外一非目的条带; 在 G7 和 G8 组中分别有一个菌落 (3-35 和 3-57) 出现了阳性信号。在对来自培养基 MMQ 上的 80 个菌落逐个进行 *Thauera* 特异性 PCR 检测后, 发现总共有 2 个菌落 (Q4 和 Q20) 中有 *Thauera* 的阳性信号。

随后使用 V3-DGGE 分析这 5 个有阳性信号的菌落, 并与 A2 中的 *Thauera* 的组成 (*Thauera* 特异性 PCR-DGGE) 进行比较 (图 3-A)。发现菌落 Q4 和 3-35 均只有一条条带, 位置与 A2 中的主要条带 T3 一致, 表明它们是 *Thauera* 纯菌。菌落 Q20, 1-38 和 3-57 中都出现了多条条带, 只有一条非常微弱的条带与 A2 的主要条带 T3 有相同的迁移位置。随后使用 *Thauera* 特异性 PCR-DGGE 对出现多条条带的菌落 (Q20, 1-38 和 3-57) 进行进一步的分析, 发现所有这 3 个样品均只出现一条条带, 位置与条带 T3 相同。结果表明这 3 个菌落中混有少量的 *Thauera*。

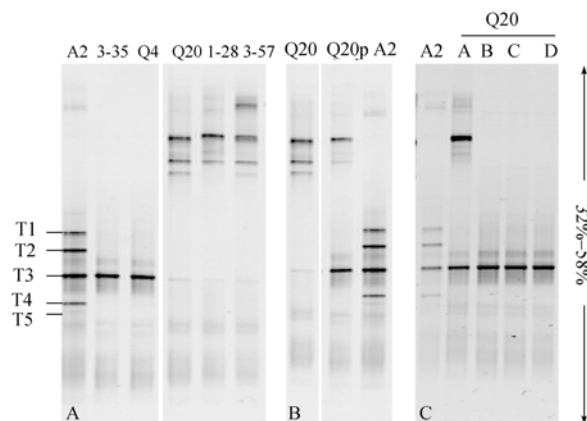


图3 *Thauera* 特异性 PCR 阳性菌落的 16S rRNA 基因 V3-DGGE 分析

Fig. 3 DGGE analysis of 16S rRNA gene V3 region fragment from *Thauera* colonies. Only A2 was the *Thauera*-specific PCR-DGGE pattern of biofilm samples from the denitrification tank (A2) of the coking wastewater treatment plant, the others were V3-DGGE pattern of single colonies. 1-38, 3-35 and 3-57 were from medium 1/10 NB; Q4 and Q20 were from medium MMQ; Q20p was single colony with positive *Thauera*-specific PCR signal from the striking of Q20 on medium MMP; Q20-A to Q20-D were the single colonies with positive *Thauera*-specific PCR signal, which were picked up after striking of Q20p on medium MMP.

2.3 划线纯化

将含有 *Thauera* 的混合菌落 Q20、1-38 和 3-57 在 1/10 NB 培养基上划线,然后从各个平板上随机挑取 10 个单菌落,并用 *Thauera* 特异性 PCR 进行检测。由于这些菌落中 *Thauera* 的含量很低,因此未能获得任何阳性菌落。由于在培养基筛选时,已经发现 Q20, 1-38 和 3-57 中的 *Thauera* 也能在培养基 MMP 上生长。因此,又将这 3 个菌落在 MMP 培养基上划线进行分离,希望通过碳源的选择性来富集和分离菌落中的 *Thauera*。同样,从各个划线平板上随机挑取 10 个单菌落后,进行 *Thauera* 特异性 PCR 检测,发现 Q20 的划线平板上有一个单菌落(Q20p)有阳性信号。对其用 V3-DGGE 分析后发现, Q20p 依然含有 3 条条带,但是其中与条带 T3 对应的条带的亮度显著增加(图 3-B)。这表明培养基 MMP 对菌落 Q20 中的 *Thauera* 有富集作用。将 Q20p 再次在 MMP 培养基上划线后,发现挑取的 10 个单菌落中有 4 个有 *Thauera* 阳性信号(Q20-A, Q20-B, Q20-C 和 Q20-D)。使用 V3-DGGE 分析后发现其中 3 个菌落(Q20-B, Q20-C 和 Q20-D)都只有一条条带,且与条带 T3 位置相同,表明它们应该是 *Thauera* 的纯菌。而 Q20-A 则依然含有 2 条条带(图 3-C)。

2.4 测序鉴定

对菌落进行 16S rRNA 基因测序后发现菌落 Q4, Q20-C 和 3-35 的 16S rRNA 基因序列完全相同。与 NCBI 数据库比对后发现,它们与 *Thauera* sp. PIV-1 的相似性为 100%。

3 讨论

在自然环境中,细菌基本上都是以群落的形式存在的,它们之间往往有着非常广泛而紧密的联系,例如信号传导及协同代谢等^[14]。因此,环境中能在目前的实验条件下分离培养的细菌其实只是其中的一小部分^[15]:海水中的微生物的可培养性最低,不到 0.1%^[16-18];淡水、沉积物及土壤约为 0.25%~0.3%^[19,20];活性污泥最高,也仅为 1%~15%左右^[21,22]。即便是那些可培养的细菌,它也可能因为培养基及培养条件不适合而无法生长,或者是几种菌一起生长而无法分离纯化^[23]。为此,本研究的第一项工作就是确定适合源自废水处理装置中的 *Thauera* 生长的培养基。根据前人的研究,我们设计了 6 种培养基。其中有营养成分丰富的 NB 和

1/10 NB 培养基,有分别以醋酸钠,苯酚及喹啉为唯一碳源的 MMAC, MMP 和 MMQ 培养基,还有与原始条件最接近的原废水培养基(WW)。由于已知的 *Thauera* 都是反硝化细菌,为此培养时使用了好氧和厌氧两种条件。对平板上生长的菌落通过 *Thauera* 特异性 PCR 分析后发现,在好氧条件下都有 *Thauera* 生长,但是在厌氧条件下只有 MMAC 上有 *Thauera* 生长。其他五种培养基上没有检测到 *Thauera*,并不意味着 *Thauera* 一定不能在這些培养基上生长,也有可能是因为在厌氧条件下 *Thauera* 的生长速度缓慢,到第 7 天的时候获得的量还低于我们的检测水平。通过 *Thauera* 特异性 PCR-DGGE 分析后发现在好氧条件下培养的 1/10 NB 培养基上的 *Thauera* 的条带最多(4 条),只比废水处理装置反硝化池(A2)中的 *Thauera* 少了一条条带(T1),表明这个废水处理系统中的大部分 *Thauera* (特别是含量最高的 T3)都能在这种培养基上生长。与 1/10 NB 相比,与其成分相同但浓度高了 10 倍的 NB 培养基上则反而少了一条条带(T4)。其原因可能并非是它不能在 NB 上生长,而是其他一些菌在营养更加丰富的 NB 上生长速度过快,使得它的比例相对减少,从而导致其无法被 DGGE 检测到。主要条带 T2 和 T3 在所有的培养基上都有生长,显示了 *Thauera* 对碳源广泛的适应能力。而条带 T1 却在所有的培养基上都没有检测到,即使在和原始环境条件最接近的原废水培养基 WW 上也未检测到,可能是由于它的生长需要其他一些共生细菌的存在^[23]。到目前为止,虽然还没有关于 *Thauera* 纯菌对于喹啉降解的报道,但是在本研究中发现 *Thauera* 能在以喹啉为唯一碳源的培养基 MMQ 上生长,结合本实验室曾对于一个以喹啉为唯一碳源的反硝化反应器中 *Thauera* 的研究,说明这些 *Thauera* 在好氧和反硝化条件下都能降解喹啉。

根据不同培养基上生长的菌落的分子分析结果,选择了 1/10 NB 培养基和 MMQ 培养基在好氧条件下进行分离纯化。虽然 1/10 NB 培养基上的 *Thauera* 的多样性最高,但由于营养丰富,生长的菌落数量众多,最终只从 240 个菌落中筛选到了 1 株 *Thauera*,得率仅为 0.4%。在培养基 MMQ 上,虽然 *Thauera* 多样性较低,但是依然包含 A2 中最主要的 *Thauera*。最终从 MMQ 的 80 个菌落中筛选到了 2 株 *Thauera*,得率为 2.5%。

使用 *Thauera* 特异性 PCR 初步筛选得到的 5 个阳性菌落中有 3 个不是纯菌,并且 *Thauera* 的含量很低。这使得我们在培养基 1/10 NB 上纯化这些菌落时并未获得任何 *Thauera*。由于这些菌落中含有的 *Thauera* 能在好氧条件下在 MMP 培养基上生长,而苯酚的存在又能抑制很多细菌的生长。因此,我们希望通过在这种选择性较强的培养基上划线来纯化混合菌落中的 *Thauera*。实验结果证实苯酚确实对菌落 Q20 中的 *Thauera* 有明显的富集作用,并最终帮助我们 Q20 中成功纯化获得了 *Thauera*。但是其余两个菌落(1-38 和 3-57)则没能纯化到 *Thauera*。其原因可能是由于苯酚不能对这两个菌落中含有的其它菌起到抑制作用。

我们分离到的 3 株 *Thauera* 菌株的 16S rRNA 基因都和分离自污水处理厂活性污泥的 *Thauera* sp. PIV-1 具有 100% 的相似性。虽然这 3 株 *Thauera* 菌株具有相同的 16S rRNA 基因序列,但是基因组 ERIC-PCR 指纹图谱(结果另文发表)结果却显示它们的基因组之间存在着很大的差别。到目前为止,已经有很多文献报道过细菌的微多样性^[24-28],但是对它的生物学意义却还不清楚。因此,这 3 个 16S rRNA 基因完全一致且来源相同的重要功能细菌将是研究细菌多样性的极好材料,有助于提高我们对自然界中存在的这种现象的了解。

自然界中的微生物群落的结构往往是非常复杂的,研究它的工作机理及微生物间的相互关系是极其困难的^[29]。而如果能将重要的功能细菌从群落中分离出来后加以研究,虽然它们并不能代表整个群落,但是对于了解群落的功能和工作机理还是会有很大的帮助。但是目前一般的细菌分离培养,可能更重视或者是仅仅考虑了分离到的细菌的功能,而大都忽视了这些菌在原始群落中的角色和作用。这使得所分离菌的研究结果对我们了解整个群落的功能和工作机理帮助有限。而本研究则是在了解了 *Thauera* 是废水处理装置中重要功能菌的基础上,有目的的去分离这些菌。通常的细菌分离只按照某种需求(例如分离反硝化功能的菌)设计一种培养基或者直接采用前人设计的培养基进行分离^[8, 30, 31]。考虑到不同环境中细菌的种类可能很不相同,它们生长所需要的条件可能也各不相同,本研究在开始分离培养之前先进行了培养基和培养条件的设计、评估和筛选。本文通过特异性

PCR 检测菌落是否含有 *Thauera* 特有的 16S rRNA 基因片段来完成的菌落的筛选,保证了筛选的靶向性,提高了效率。然后还使用 DGGE 对得到的菌落进行了分析,这不仅可以帮助我们鉴定它是否为纯菌,与原始群落对照后,还能知道它在原始群落中的组成。

总之,我们以 *Thauera* 的特异性分子标记为导向,不仅找到了适合培养废水处理装置中 *Thauera* 的培养基,并筛选到了反硝化池中最主要的 *Thauera*。从本研究可以看出,将这些分子技术运用于传统的分离培养中,不仅使得细菌分离更有目的性,极大的提高了分离效率。更为重要的是它还能检测到一些目标菌含量很低的混合菌落,并将其从中纯化出来,这极大的提高了细菌筛选的灵敏度。这种以分子标记为导向的细菌分离方式还可以应用于其它来源的各种细菌,为难分离微生物的分离纯化提供指导。

参 考 文 献

- [1] Zhang M, Tay JH, Qian Y, et al. Coke plant wastewater treatment by fixed biofilm system for COD and NH₃-N removal. *Water Research*, 1998, 32(2): 519-527.
- [2] Chakraborty S, Veeramani H. Response of pulse phenol injection on an anaerobic-anoxic-aerobic system. *Bioresource Technology*, 2005, 96(7): 761-767.
- [3] 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.
- [4] Thomsen TR, Kong Y, Nielsen PH. Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge. *Fems Microbiology Ecology*, 2007, 60(3): 370-382.
- [5] Valle A, Bailey MJ, Whiteley AS, et al. N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) affect microbial community composition and function in activated sludge. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(4): 424-433.
- [6] Dibenedetto A, Lo Noce RM, Narracci M, et al. Structure-biodegradation correlation of polyphenols for *Thauera aromatica* in anaerobic conditions. *Chemistry and Ecology*, 2006, 22: 133-143.
- [7] Schuhle K, Fuchs G. Phenylphosphate carboxylase: a new C-C lyase involved in anaerobic phenol metabolism in *Thauera aromatica*. *J Bacteriol*, 2004, 186(14): 4556-4567.

- [8] Shinoda Y, Sakai Y, Uenishi H, *et al.* Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(3): 1385–92.
- [9] Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(10): 3854–859.
- [10] Mao YJ, Zhang XJ, Yan X, *et al.* Development of group-specific PCR-DGGE fingerprinting for monitoring structural changes of *Thauera* spp. in an industrial wastewater treatment plant responding to operational perturbations. *J Microbiol Methods*, 2008, DOI: 10.1016/j.mimet.2008.06.005
- [11] Di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, *et al.* Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(11): 4485–4493.
- [12] Loy A, Schulz C, Lucker S, *et al.* 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order "Rhodocyclales". *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(3): 1373–1386.
- [13] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3): 695–700.
- [14] Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, *et al.* Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*, 1994, 176(8): 2137–2142.
- [15] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143–169.
- [16] Ferguson RL, Buckley EN, Palumbo AV. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 47(1): 49–55.
- [17] Kogure K, Simidu U, Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol*, 1979, 25(3): 415–20.
- [18] Kogure K, Simidu U, Taga N. Distribution of viable marine bacteria in neritic seawater around Japan. *Can J Microbiol*, 1980, 26(3): 318–23.
- [19] Jones J. The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. *Freshwater Biology*, 1977, 7(1): 69–71.
- [20] Torsvik V, Goksoyr J, Daae FL. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(3): 782–787.
- [21] Wagner M, Amann R, Lemmer H, *et al.* Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(5): 1520–1525.
- [22] Wagner M, Erhart R, Manz W, *et al.* Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(3): 792–800.
- [23] Kaerberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 2002, 296(5570): 1127–1129.
- [24] Ash C, Farrow JA, Dorsch M, *et al.* Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41(3): 343–6.
- [25] Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, 277(5331): 1453–1474.
- [26] Jaspers E, Overmann J. Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(8): 4831–489.
- [27] Lehtimäki J, Lyra C, Suomalainen S, *et al.* Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50 Pt 3: 1043–1053.
- [28] Perna NT, Plunkett G, Burland V, *et al.* Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 2001, 409(6819): 529–533.
- [29] Wagner M, Loy A, Nogueira R, *et al.* Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 81(1–4): 665–80.
- [30] Heylen K, Gevers D, Vanparys B, *et al.* The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(11): 2012–2021.
- [31] Mechichi T, Stackebrandt E, Gad'on N, *et al.* Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Arch Microbiol*, 2002, 178(1): 26–35.

Specific-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis assistant isolation of *Thauera* spp. from a coking wastewater treatment plant

Yuejian Mao, Xiaojun Zhang*, Baorang Zhang, Liping Zhao

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

Abstract: [Objective] We used specific-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to isolate *Thauera* spp. from a coking wastewater treatment plant. [Methods and results] To isolate *Thauera* from the denitrifying bioreactor of a coking wastewater treatment, biofilm was inoculated to six different media and cultured them under both aerobic and anaerobic conditions. We then compared the composition of *Thauera* spp. using *Thauera*-specific PCR-DGGE method. The media 1/10 NB and MMQ which grew higher diverse *Thauera* spp. and fewer colonies, were used to isolate *Thauera* sp. under aerobic condition. The colonies were then screened by *Thauera*-specific PCR. The purity of the colonies that shown *Thauera*-specific PCR positive signal was then checked by DGGE. The colonies with multiple species were further streaked on different media. DGGE analysis showed that *Thauera* in colony Q20 was enriched in medium MMP. The colony was finally purified by streaking on MMP medium for several rounds. The composition of the colonies were tracked by *Thauera*-specific PCR and DGGE at each step. Finally, three strains were purified, which were identified as *Thauera* sp. according to their 16S rRNA gene sequences. [Conclusion] Guiding with specific biomarker, the efficiency and sensitivity of bacteria isolation can be largely improved.

Keywords: *Thauera* ; specific-PCR; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); isolation

Support by the National Natural Science Foundation of China (20677041), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA021301), the Shanghai-Rhone research collaboration fund (05SR07107) and the Shanghai Leading Academic Discipline Project (B203)

*Corresponding author. Tel: +86-21-34204878; E-mail: xjzhangsjtu@gmail.com

Received: 26 June 2008/Revised: 25 August 2008

科学出版社新书推介 (2008-10)

启航 2008 北京生物工程和医药产业发展报告

北京生物技术和医药产业促进中心 编

978-7-03-023150-5 ¥ 100.00 2008 年 10 月 出版

内容简介

本书描述了 2007 年全球、我国及北京生物医药产业的最新进展和趋势。第一、第二章介绍了一年来全球及国内生物医药产业的发展状况、趋势及热点；第三章阐述了 2007 年北京生物医药产业所取得的进展及成果；第四章对北京生物医药产业的新增长点——研发服务业进行了详细分析；同时，正文部分还收录有三篇专论，分别从如何大力发展生产性服务业、新兴的虚拟研发服务对我国医药产业的启示以及北京中药企业进军保健品行业的机会等角度展开论述。附录部分收录了 2007 年全国和北京医药工业、医药商业的相关统计数据、2007 年全球批准上市的新药以及中国生物技术外包服务联盟机构名录等。

本书可供生物医药企业的管理者、咨询人员和证券分析师参考，也可为生物医药主管部门的决策提供依据。

