

UASB 反应器中厌氧氨氧化污泥的种群分析

杨 洋¹,左剑恶^{1*},全哲学²,Lee Sung-taik²,沈 平¹,顾夏声¹ (1.清华大学环境科学与工程系,北京 100084 ; 2.Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Korea)

摘要：利用变性梯度凝胶电泳、克隆和实时PCR等分子生物学技术对 2 个厌氧氨氧化反应器中的微生物进行了初步研究.变性梯度凝胶电泳结果表明,尽管 2 个反应器的接种污泥不同,但经过 1 年多的连续运行,二者的微生物种群结构基本相同;*Planctomycete*克隆结果表明,相似的 15 个序列(>99%)与已报道的 3 个属的厌氧氨氧化菌的序列均有较大距离(<92%),而与具有厌氧氨氧化功能的KSU-1 序列有 97%的相似,*amoA*基因克隆结果表明,反应器中的部分好氧氨氧化菌属于 β -*Proteobacteria*中具有厌氧氨氧化活性的*Nitrosomonas*;实时PCR结果表明,厌氧氨氧化细菌占细菌总量的 27%~29%,好氧氨氧化菌约为 5%.

关键词：厌氧氨氧化；变性梯度凝胶电泳；克隆；实时 PCR

中图分类号：X172 文献标识码：A 文章编号：1000-6923(2006)01-0052-05

Analysis of the species group of anaerobic ammonia oxidation sludge in UASB reactors. YANG Yang¹, ZUO Jian-e^{1*}, QUAN Zhe-xue², LEE Sung-taik², SHEN Ping¹, GU Xia-sheng¹ (1.Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China ; 2.Department of Biological Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Korea). *China Environmental Science*, 2006,26(1): 52~56

Abstract : The molecule biological techniques DGGE, clone and real-time PCR were utilized to study prinimarily the microorganism in 2 anaerobic ammonia oxidation reactors. The results of DGGE showed that despite the seeded sludge's in these two reactors were different, but in these two reactors the microorganism species group structure was similar basically through more than 1a continuous operation. The *Planctomycetales* clone results showed that the similar 15 sequences (>99%) had greater distance (<92%) with the reported sequences of 3 kinds of anaerobic ammonia oxidation bacteria; while had 97% similar with the KSU-1 sequence which possessed anaerobic ammonia oxidation function. The *amoA* gene clone results showed that part of the bacteria in the reactor belonged to *Nitrosomonas* in β -*Proteobacteria*, which possessed the anaerobic ammonia oxidation activity. The results of real-time PCR showed that the anaerobic ammonia oxidation bacteria occupied 27%~29% of the bacteria total amount, the aerobic ammonia oxidation bacteria occupied only 5%.

Key words : anaerobic ammonia oxidation ; DGGE ; clone ; real-time PCR

厌氧氨氧化工艺是目前最简捷和最经济的生物脱氮途径^[1-3],是指在厌氧或缺氧条件下,厌氧氨氧化细菌以 NO₂⁻为电子受体,将 NH₄⁺直接氧化为 N₂ 的过程.研究表明,厌氧氨氧化细菌属于浮霉状菌(*Planctomycete*),具有世代周期长和外形不规则等特点.目前利用 16S rDNA 序列分析方法已确定了 3 个属的厌氧氨氧化细菌:*Brocadia* 属包括 *B. anammoxidans* 和 *B. Fulgida*; *Kuenenia* 属包括 *K. Stuttgartiensis*; *Scalindua* 属包括 *S. wagneri*, *S. brodae* 和 *S. sorokinii*^[4].此外,一些属于 β -*Proteobacteria* 的典型好氧氨氧化细

菌也能表现出厌氧氨氧化活性^[5],因此在某些厌氧氨氧化研究中有好氧氨氧化细菌存在^[2].

杨洋等^[6]利用厌氧颗粒污泥与好氧活性污泥的混合物以及河底沉积物作为接种污泥,在 UASB 反应器中对厌氧氨氧化工艺和厌氧氨氧化颗粒污泥等方面进行了研究.本研究利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)、克隆和实时 PCR 等方法对 2 个 UASB 反应器中的厌氧氨氧化污泥进

收稿日期：2005-04-22

基金项目：国家“863”项目(2002AA601190)

* 责任作者,教授, jiane.zuo@tsinghua.edu.cn

行初步的种群分析.

1 材料与方法

1.1 厌氧氨氧化污泥

测试污泥取自厌氧氨氧化反应器 R1 和 R2. R1 采用厌氧颗粒污泥与好氧活性污泥的混合物接种,R2 采用河底沉积物接种,2 个反应器均采用无机配水为进水,在 30~35℃条件下连续运行.取泥样时 R1 的总氮容积负荷为 2.66kg/(m³·d),总氮去除率约为 93%,R2 的总氮容积负荷为 1.72kg/(m³·d),总氮去除率约为 86%.2 个反应器中的污泥均呈棕黄色,以絮状污泥为主,有部分颗粒污泥存在^[6].

1.2 DNA 提取方法

泥样用 Tris 缓冲液清洗 2 遍,5000r/min 离心 20min;加入 625μL TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;1mmol/L EDTA)和溶菌酶(最终浓度 1.0mg/mL),37℃水浴 30min;加入 10%(W/V)SDS 70μL 和 20mg/mL 蛋白酶 K 5μL,37℃水浴 2h,每隔 15~20min 轻轻摇动 1 次;冻融 3 次;加入核糖核酸酶(100mg/mL)10μL,室温水浴 20min;加入 5mol/L NaCl 120μL,混合均匀;加入 CTAB/NaCl 溶液 90μL,混合均匀后,65℃,水浴 20min;加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇混合液(体积比为 25:24:1),混合均匀,5000r/min 离心 10min;上清液中加入等体积的氯仿/异戊醇混合液(体积比为 24:1),混合均匀,5000r/min 离心 10min;上清液中加入 0.6 倍体积的异丙醇后静置 2h,12000r/min 离心 10min;70%乙醇清洗沉淀,干燥后溶于 400μL TE 缓冲液.总 DNA 用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测.

1.3 变性梯度凝胶电泳分析

提取的总 DNA 进行 PCR 扩增,扩增程序:94℃预变性 5min;94℃变性 1min,55℃退火 30s,72℃延伸 1min,33 个循环;72℃延伸 7min. PCR 反应体系为 40μL,其中 10×PCR 反应缓冲液 4μL,2.5mmol/L 的 dNTP 溶液 4μL,10pmol/μL 的引物 GC-341F 和 536R^[7]各 4μL, Taq 酶 2 个单位, DNA 模板 40ng. PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测.

利用 DGGE 电泳对 PCR 产物进行分离,仪器为 D-Code System(Bio-Rad 公司),电泳条件:凝胶变性梯度 30%~60%,电压 120V,电泳缓冲液为 1×TAE,电泳温度 60℃,电泳时间 6h.电泳结束后用溴乙锭(EB)染色 20min,在清水中退染 20min 后观察结果.

1.4 克隆和测序

提取的总 DNA 进行 PCR 扩增,扩增程序:94℃预变性 5min;94℃变性 1min,60℃退火 1min,72℃延伸 90s,18 个循环;72℃延伸 10min. PCR 反应体系为 40μL,其中 10×PCR 反应缓冲液 4μL,2.5mmol/L 的 dNTP 溶液 4μL,10pmol/μL 的引物 4μL(引物 Pla-46F 和 1390R^[8]用于扩增 *Plancto-mycetales*,引物 amoA-1F 和 amoA-2R^[9]用于扩增 *amoA* 基因),Taq 酶 2 个单位, DNA 模板 40ng. PCR 产物用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,PCR 产物用 AccuPrep 纯化试剂盒(Bioneer 公司)纯化.

纯化后的 PCR 产物与 T-载体(Promega 公司)连接,转化大肠杆菌感受态细胞,在含有 X-gal、IPTG 和 Amp 的 LB 培养基上培养 1d(37℃),提取质粒并纯化,用 PCR 检测.克隆结果测序由韩国 Genotech 公司完成.

1.5 系统进化树分析

利用 CLUSTALX 软件进行序列比对^[10](比对所需的基因序列从美国 GenBank 下载),并利用 BioEdit 软件进行缺失序列修正,然后通过 DNA 序列距离 *K* 计算公式计算出进化距离,最后采用 MEGA2 软件建立进化树^[11].

1.6 实时 PCR

PCR 扩增选用 SYBR Green qPCR 试剂盒(Finnzymes 公司),仪器为 96 孔板 DNA Engine Opticon System(MJ Research 公司).引物 Ana-F 和修正后的 Ana-R 用于扩增 *anammox* 细菌^[12],引物 amoA-1F 和 amoA-2R 用于扩增 *amoA* 基因^[9],通用引物 338F 和 518R 用于扩增真细菌^[13].用不同浓度的 *Planctomycetales* 克隆产物建立 *C-t* 标准曲线, $R^2>0.98$. PCR 步骤:95℃预变性 15min;94℃

变性 30s,54℃退火 30s,72℃延伸 30s,40 个循环.

2 结果与讨论

2.1 微生物种群结构比较

利用 QUANTA 200 型扫描电镜(FEI 公司)对 R1 和 R2 中的厌氧氨氧化污泥进行观察(图 1). 2 个反应器中的优势菌均为一种具有不规则外形的椭球菌,而且细菌周围存在着较多胞外多聚物,这与其他研究者对典型厌氧氨氧化细菌的研究结果类似^[3].

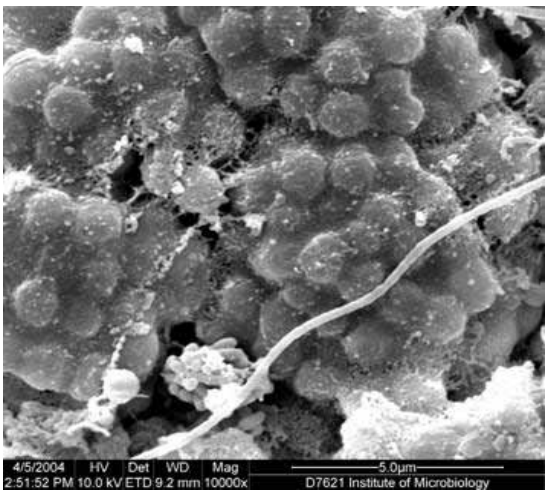


图 1 厌氧氨氧化污泥扫描电镜照片(×10000)
Fig.1 SEM photo of the ANAMMOX sludge (×10000)

虽然 R1 和 R2 的接种污泥不同,但在 1 年多的连续运行过程中,二者的运行条件基本相同.利用 DGGE 技术对 2 个反应器中微生物的种类进行了比较,结果如图 2 所示.由图 2 可见,R1 和 R2 中的微生物种类不是很丰富,这可能与反应器长期采用无机配水为进水有关.此外,从 2 组条带的位置可以看出,长时间的运行后,2 个反应器中的微生物种类基本相同.因此,在对微生物种类做进一步研究时,仅选取 R2 中的污泥作为代表.

2.2 厌氧氨氧化细菌

研究表明,目前发现的 3 个属的厌氧氨氧化细菌虽然都是 *Planctomycete* 的深层分支,但三者的进化距离非常大(<85%),与其它 *Planctomycete* 的同源性仅为 74%~77%.在属于 *Planctomycete* 的细菌之间,较大的进化距离很常见^[4],因此可能还存在其它厌氧氨氧化细菌.日本研究者获得了与上述 3 个属不同的厌氧氨氧化细菌 KSU-1,其

与 *B. anammoxidans* 的 16S rDNA 序列只有 92.2%的相似性,但在试验过程中以 KSU-1 为优势菌的污泥表现出了良好的厌氧氨氧化活性^[12].

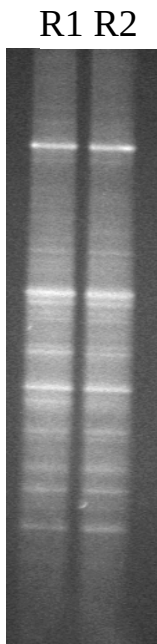


图 2 2 种污泥的 DGGE 结果比较
Fig.2 Comparison of DGGE results of ANAMMOX sludge

R2 的污泥具有较高的厌氧氨氧化活性^[14],对污泥中的 *Planctomycete* 细菌进行克隆,克隆结果测序后构建的厌氧氨氧化细菌的系统进化树如图 3 所示.在获得的 16 个结果中有 15 个序列相互之间很相似(>99%),与已报道的厌氧氨氧化细菌的序列均有较大距离(<92%),但与 KSU-1 的 16S rDNA 序列有 97%的相似.

2.3 好氧氨氧化细菌

有研究表明,当环境中供氧不足时,某些好氧氨氧化细菌能够利用亚硝酸盐作为电子受体进行厌氧氨氧化反应,从中获得能量用以生长^[5].氨单加氧酶(AMO)是与好氧氨氧化过程直接相关的酶,编码 AMO 的基因簇 *amo* 至少含有 3 个基因 (*amoA*, *amoB* 和 *amoC*),不同种之间的 *amo* 基因具有很高的相似性,在 1 个细胞中一般含有 3 个拷贝的 *amo*^[15],因此选用功能基因 *amoA* 表示好氧氨氧化细菌的存在.

本研究对提取的总 DNA 也进行了 *amoA* 基因克隆,克隆结果测序后构建的好氧氨氧化细菌的系统进化树如图 4 所示.由图 4 可知,在获得的

28 个克隆结果中,54%的序列与从厌氧氨氧化生物膜中分离出的好氧氨氧化细菌 K5F 序列十分相似,18%的序列与具有厌氧氨氧化活性的 *Nitrosomonas* 细菌^[5]序列之间存在较高的同源性.

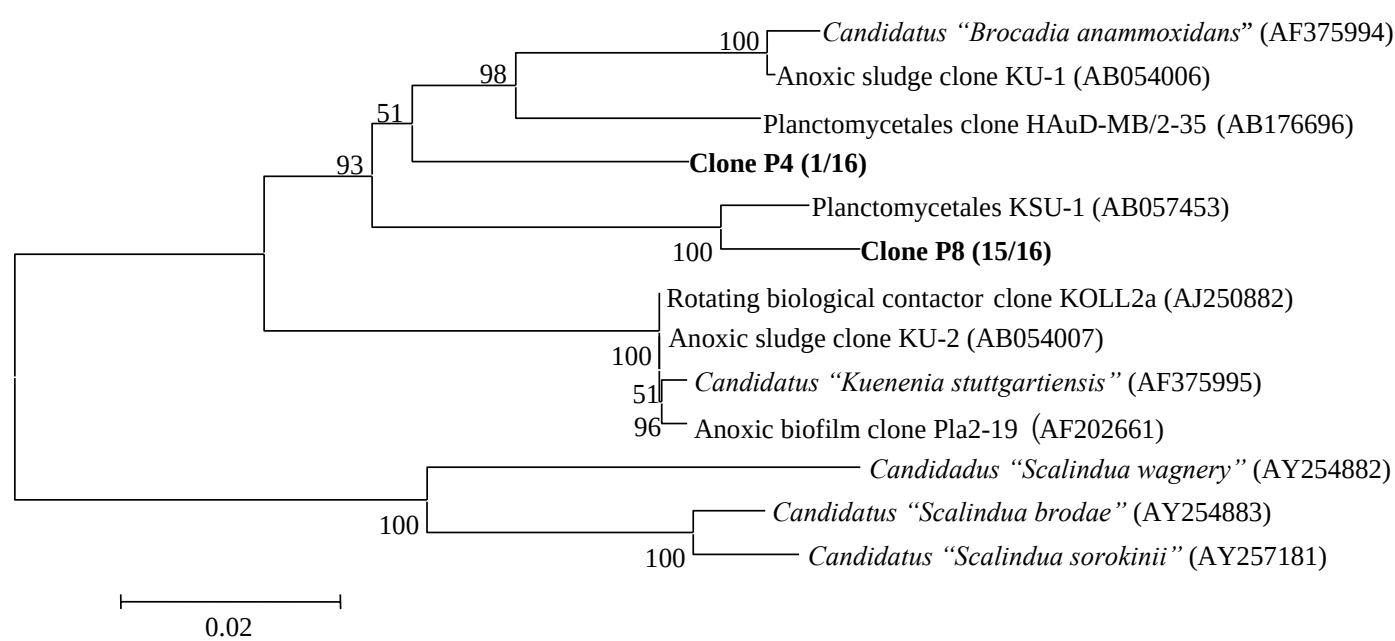


图 3 厌氧氨氧化细菌的系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree based on the sequences of ANAMMOX bacteria

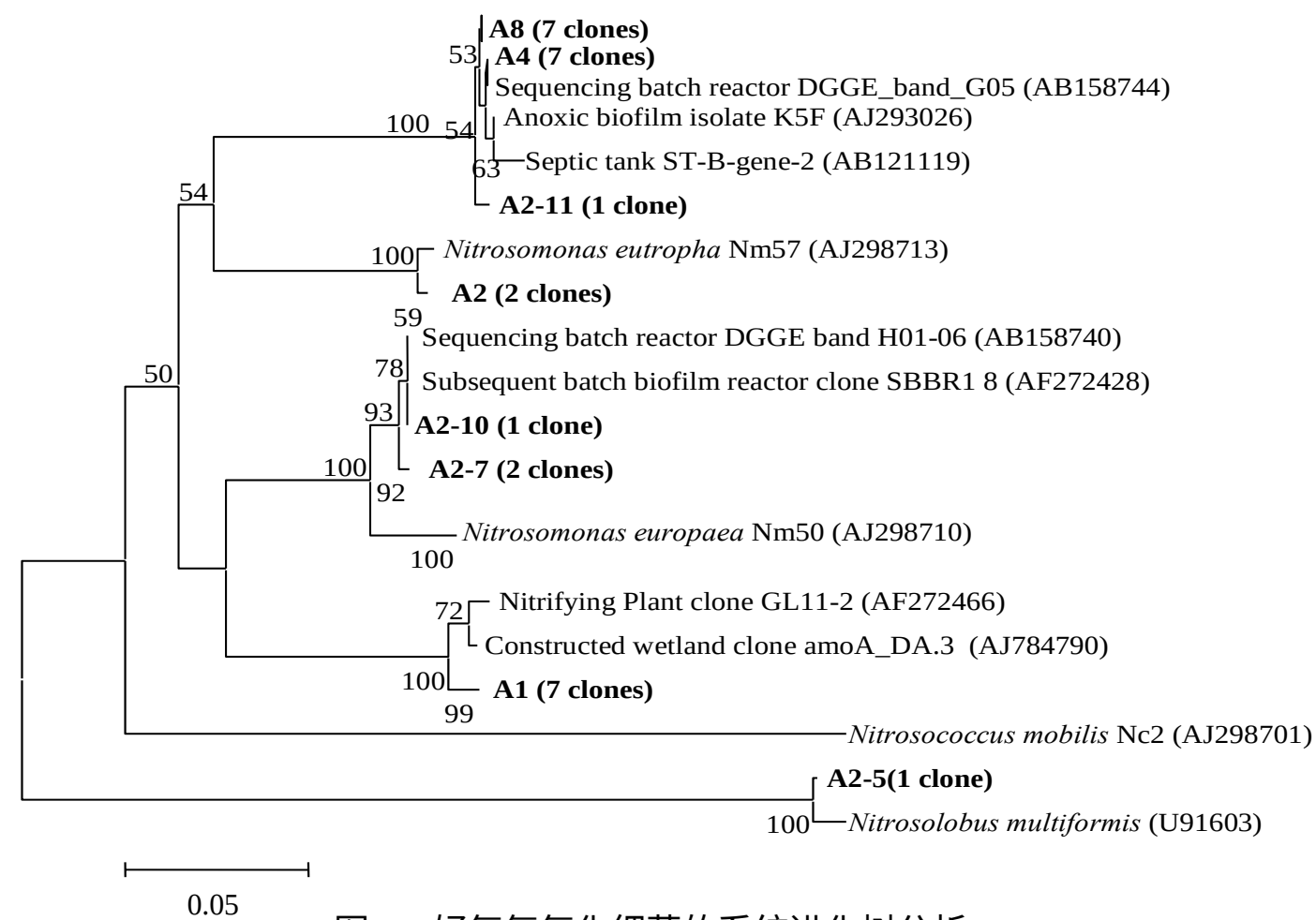


图 4 好氧氨氧化细菌的系统进化树分析

Fig.4 Phylogenetic tree based on the sequences of aerobic ammonia oxidation bacteria

2.4 厌氧氨氧化细菌和好氧氨氧化细菌的定量测定

由于实时 PCR 技术具有较高的灵敏度和精确度,因此目前广泛应用于环境微生物的定量测定.本研究利用实时 PCR 技术对 2 类氨氧化细菌进行了定量分析,结果表明,所提取的 1ng DNA 中含有 7.02×10^{10} 个真细菌基因的拷贝, 1.89×10^{10} 个 *Planctomytales* 细菌基因的拷贝,以及 3.12×10^9 个 *amoA* 基因的拷贝.Klappenbach 等^[16]在对纯培养细菌的研究中发现,真细菌中平均每个基因组的 16S rDNA 拷贝数为 3.6,而 *Planctomycetales* 细菌中每个基因组的 16S rDNA

拷贝数仅为 1.5~2.0 个^[17],因此可计算出在试验污泥的细菌中厌氧氨氧化细菌占 27%~29%,而好氧氨氧化细菌约为 5%.

综合克隆和实时 PCR 结果可以发现,尽管在 R2 反应器中好氧氨氧化细菌的种类多于厌氧氨氧化细菌,但厌氧氨氧化细菌的数量远多于好氧氨氧化细菌,因此可以确定,本研究中的反应器是以厌氧氨氧化细菌为优势菌的厌氧氨氧化反应器.

3 结论

3.1 DGGE 结果表明,尽管 2 个厌氧氨氧化反应器的接种污泥不同,但经过 1 年多的连续运行,二者的微生物组成基本相同.

3.2 *Planctomycete* 克隆结果表明,在所得 16 个结果中有 15 个序列相似(>99%),这 15 个序列与已报道的 3 个属的厌氧氨氧化菌的序列均有较大距离,而与具有良好厌氧氨氧化活性的 KSU-1 的序列有 97%的相似.

3.3 *amoA* 基因克隆结果表明,在所得 28 个结果中,54%的序列与厌氧氨氧化生物膜中分离出的好氧氨氧化细菌 K5F 序列相似,18%的序列与具有厌氧氨氧化氧化活性的 *Nitrosomonas* 细菌序列之间存在较高的同源性.

3.4 利用实时 PCR 技术对 2 类氨氧化细菌进行定量分析,结果表明,厌氧氨氧化细菌占细菌总量的 27%~29%,好氧氨氧化细菌约为 5%.

参考文献:

- [1] Strous M, Heijnen J J, Kuenen J G, *et al.* The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms [J]. Microbiol. Biotechnol., 1996,50(5):589-596.
- [2] Schmid M, Twachtmann U, Klein M, *et al.* Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation [J]. Sys. Appl. Microbiol., 2000, 23(1):93-106.
- [3] Van de Graaf A A, de Bruijn P, Robertson L A, *et al.* Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor [J]. Microbiology, 1996,142(8):2187-2196.
- [4] Jetten M S M, Cirpus I, Kartal B, *et al.* 1994 - 2004: 10 years of

research on the anaerobic oxidation of ammonium [J]. Biochemical Society Transactions, 2005,33(1):119-123.

- [5] Schmidt I, Bock E. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha* [J]. Arch. Microbiol., 1997, 167(2-3):106-111.
- [6] 杨 洋,左剑恶,沈 平,等.接种不同普通污泥的厌氧氨氧化反应器的启动运行研究 [J]. 环境科学, 2004,S1:39-43.
- [7] Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, *et al.* Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998,64(11):4396-4402.
- [8] Neef A, Amann R, Schlesner H, *et al.* Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes [J]. Microbiology, 1998,144(12):3257-3266.
- [9] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997,63(12):4704-4712.
- [10] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Res., 1997,25(24):4876-4882.
- [11] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 2001, 17(12):1244-1245.
- [12] Fujii T, Sugino H, Rouse J D, *et al.* Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a nonwoven biomass carrier [J]. J. Biosci. Bioeng., 2002,94(5):412-418.
- [13] Ibekwe A M, Grieve C M, Lyon S R. Characterization of microbial communities and composition in constructed dairy wetland wastewater effluent [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(9):5060-5069.
- [14] 杨 洋,左剑恶,沈 平,等.环境科学与工程 [M]. 北京:清华大学出版社, 2004.39-43.
- [15] Klotz M G, Norton J M. Sequence of an ammonia monooxygenase subunit A-encoding gene from *Nitrosospora* sp. NpAV [J]. Gene, 1995,163(1):159-160.
- [16] Klappenbach J A, Saxman P R, Cole J R, *et al.* rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database [J]. Nucleic Acids Res., 2001,29(1):181-184.
- [17] Schmidt T M. The Ribosomal RNA operon copy number database [EB/OL]. <http://rrndb.cme.msu.edu/rrndb/servlet/controller?page=phylo&level=2.20&levelMode=open#2.20>, 2005-02-16.

作者简介:杨 洋(1979-),男,云南昆明人,清华大学环境科学与工程系博士研究生,研究方向为废水厌氧生物处理技术.发表论文 12 篇.