

研究简报

硫酸盐废水处理系统强化菌株的 分离鉴定及功能基因分析

赵阳国, 任南琪, 王爱杰, 商淮湘

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090)

关键词: 硫酸盐废水处理; 脱硫脱硫弧菌 F28-1; 异化型亚硫酸盐还原酶基因

中图分类号: X 703.1; Q 494

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2006) 10-2401-06

Characterization of efficiency-enhancing bacterium for sulfate wastewater treatment and structure analysis of dissimilatory sulfite reductase gene

ZHAO Yangguo, REN Nanqi, WANG Aijie, SHANG Huaixiang

(School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, Heilongjiang, China)

Abstract Multiple strains of sulfate-reducing bacteria (SRB) were isolated from sulfate wastewater treatment bioreactor and determined by polymerase chain reaction (PCR) with SRB-specific 16S ribosomal RNA gene primers. One of the strains isolated, strain F28-1 was further studied by sequencing the complete 16S ribosomal RNA gene, testing carbon resource utilization, and demonstrating the key enzyme gene structure related to sulfate metabolism, dissimilatory sulfite reductase (Dsr) gene. Blast retrieving results indicated that the SRB belonged to *Desulfovibrio*, its 16S ribosomal RNA gene sequence was similar to *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* strain Essex 6 (AF192153), with identity 99.9%, and therefore, the strain was named as *D.* strain F28-1. Strain F28-1 was able to use glucose, propionic acid, lactic acid, acetic acid, ethanol and methanol as sole carbon resource and reduce sulfate to sulfide. It removed 95% sulfate within 72 h in a lab-scale experiment with lactic acid as electron donor. ORF finder program checked out two open reading frames (ORFs) in *dsr* gene sequence, *dsrA* and *dsrB*, which had 14% identity. Corresponding α - and β -subunit amino acid sequences were obtained according to the DNA sequence. α -subunit contained two conserved motifs, i. e. (C-X₅-C)-X_n-(C-X₃-C), which was required for binding to heme; and CP-X_n-C-X₂-C-X₂-C required for binding to Fe₄S₄ clusters. In addition, the β -subunit contained only the Fe₄S₄ clusters binding site, but the heme binding site was missing. The SRB, which had multi-substrates utilization and high sulfate reduction power, supplies the starting bacterium for enhancing the efficiency of sulfate wastewater treatment. The detailed knowledge of the enzyme structure provides the target for the quantitative PCR gene locus and helps to improve its biological sulfate-removal potential.

Key words: sulfate wastewater treatment; *Desulfovibrio desulfuricans* strain F28-1; dissimilatory sulfite reductase gene

2005-11-08收到初稿, 2006-04-10收到修改稿。

联系人: 任南琪. 第一作者: 赵阳国 (1976—), 男, 博士研究生。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50208006)。

Received date: 2005-11-08

Corresponding author: Prof. REN Nanqi E-mail: mq@hit.edu.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (50208006).

引 言

硫酸盐还原菌 (sulfate-reducing bacteria, SRB) 在自然界硫循环中起着重要作用, 由于其主要代谢产物硫化氢的毒害性和腐蚀性, 而备受石油开采、废水处理和管线保护等行业的关注。为高效处理富含硫酸盐废水, 于系统中投加性能稳定、硫酸盐代谢活跃及底物利用广泛的 SRB 菌株是较佳策略, 而高效 SRB 纯菌株的获得一直是这一策略得以实现的瓶颈^[1]。另外, 为彻底改观传统的废水处理模式, 通过分子生物学手段人为强化硫酸盐代谢途径中关键酶的活性来提高硫酸盐去除率也是发展趋势^[2]。

近年来, 利用 SRB 进行硫酸盐废水处理和重金属离子污染消除等的研究日渐增多^[3-4], 然而野生菌株无法承受这样的环境压力, 因此非常有必要采用生物化学和分子生物学技术提高 SRB 对这些污染物的耐受能力以及自身的代谢活性。在硫酸盐代谢途径中异化型亚硫酸盐还原酶 (dissimilatory sulfite reductase, Dsr) 是硫酸盐还原的关键酶之一, 要改良该代谢酶的活性必须对基因和酶的结构有详细的认识。

本研究中分离到一株典型的脱硫脱硫弧菌, 对其代谢过程中重要酶基因的结构进行了详细的分析, 为强化硫酸盐废水处理提供了出发菌株, 同时也将为硫酸盐代谢相关酶的实际应用以及进一步提高硫酸盐的去除能力提供有益的指导。

1 材料与方法

1.1 反应器运行状态及 SRB 菌株分离

硫酸盐废水处理采用连续搅拌槽式反应器 (CSTR), 温度控制在 $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ 种泥来自哈尔滨炼油厂废水处理车间二沉池。进水碳硫比 ($\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}$) 控制在 3.0, 硫酸盐为 $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, COD (糖蜜) 为 $6000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0, 水力停留时间 (HRT) 10.6 h。在反应器硫酸盐去除率大于 90% 并稳定运行的状态下取活性污泥样品直接用于 SRB 菌株的分离。

按 Hungate 厌氧滚管法以 Postgate C^[5] SRB 固体培养基对菌液进行反复选择性培养, 共分离 76 株 SRB 相关菌株, 从中选出形态区别明显的纯培养继续后续实验。

应用细菌 DNA 小量提取试剂盒提取 DNA (上

海华舜生物公司), 并采用 SRB 16S rDNA 特异的引物序列, 以 PCR 法快速筛检分离样品是否为 SRB^[6]。采用 16S rDNA 通用引物 BSF8/20, BSR534/20^[7] 扩增阳性菌株和阴性菌株的 16S rDNA 部分序列 (500 bp), 测序验证 PCR 快速筛检技术的可靠性。

1.2 菌株 F28-1 对底物利用和硫酸盐还原能力测试

选择 1 株典型硫酸盐还原菌株 F28-1 进行底物利用及硫酸盐还原能力实验。在静态实验装置中, 硫酸盐初始浓度为 $3500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{COD}/\text{SO}_4^{2-} = 2$, 充当 COD 的碳源分别为葡萄糖、丙酸、乳酸、乙酸、乙醇和甲醇, 接种 1% 的 SRB 菌株 F28-1, 于 35°C 培养 72 h, 检测菌株生长情况 (OD_{600} , 722 分光光度计, 上海分析仪器总厂) 及硫酸盐浓度 (BaCl_2 沉淀比浊法) 的变化。

1.3 菌株 F28-1 的 16S rDNA 和 dsr 基因克隆测序分析

采用 16S rDNA 通用引物 BSF8/20, BSR1451/20^[7] 扩增 SRB 菌株 F28-1, PCR 扩增使用 $100 \mu\text{L}$ 体系, 2.5U EX Taq DNA 聚合酶 (宝生物); PCR 程序: 94°C , 预变性 5 min; 然后接以 30 个循环包括: 94°C , 1 min; 50°C , 1 min; 72°C , 1.5 min; 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物回收后, 克隆进 T 载体 (宝生物), 采用 M13 正反向通用引物进行测序 (ABI, 3730)。将测得序列采用 GenBank 中的 Blastn^[8] 进行相似性检索并构建系统进化树。

采用引物 Dsr1F: 5'-AC (C/G) CACTGGAAG-CACG-3', Dsr4R: 5'-GTGTAGCA GTTACCGCA-3'^[9] 扩增菌株 F28-1 的 dsr 基因, PCR 扩增及克隆测序同 16S rDNA。全序列通过 Blastn 进行相似性检索, 获取相似性序列与 F28-1 构建系统进化树, 并与 16S rDNA 进化树进行对比。通过 GenBank 中的 ORF finder 软件对序列进行分析, 找出开放读码框 (ORF) 及相应的氨基酸序列, 以 ClustalW^[10] 与相近序列对比分析保守结构框架。

2 结果与讨论

2.1 SRB 相关菌株的分离及快速性筛检

通过显微镜观察选择 12 株形态区别较大的 SRB 相关菌株。采用 SRB-PCR 快速筛检技术对这些菌株进行快速筛检, 其中的 F1-2, F2-1, F21-1,

F24-1, F28-1等 5 个菌株为阳性, 其余菌株为阴性. 16S rDNA 部分测序比较表明 5 个阳性菌株均与脱硫弧菌属菌株相似性达 100%, 而阴性菌株均非 SRB. 因为 16S rDNA 前 500 bp 中含有 V2~V3 高度可变区, 在某些情况下可以代替全序列行使分类的功能^[11], 所以判断这 5 株 PCR 扩增阳性菌株为 SRB.

2.2 菌株 F28-1 对底物利用和硫酸盐还原能力

在筛检出的 SRB 中, 菌株 F28-1 为典型的弧菌, 大小 $0.4\ \mu\text{m} \times 8.0\ \mu\text{m}$, 在光镜下旋转前进, 运动迅速. 菌株 F28-1 能以葡萄糖、丙酸、乳酸、乙酸、乙醇和甲醇为唯一碳源生长, 当以乳酸和葡萄糖为碳源时, 该菌株生长迅速, 30 h 其 OD_{600} 即达到 0.5; 而以乙酸为碳源时, 生长较缓, 30 h 时的 $\text{OD}_{600} < 0.1$.

菌株 F28-1 能够利用 6 种不同碳源直接或间接提供电子还原硫酸盐 (图 1). 一般认为, SRB 在缺少电子受体时能够行使发酵产酸菌的功能, 菌株 F28-1 虽然能够利用葡萄糖, 并非直接为硫酸盐提供电子, 而是通过发酵供给自身能量, 在发酵过程中产生的挥发酸为硫酸盐提供电子, 所以在以葡萄糖为碳源时同样表现出较高的硫酸盐去除率. 许多研究均表明, 脱硫弧菌属的 SRB 不能利用乙酸作为电子供体^[12], 乙酸的进一步厌氧氧化是通过另外一些 SRB 种属完成的. 然而, 本研究中分离的菌株 F28-1 能够以乙酸为唯一碳源还原硫酸盐 (图 1). 另外, 当以乳酸为碳源时, 72 h 时硫酸盐去除

率高达 95% 以上. 考虑到实验中纯培养可能造成的限制, 以及对底物的广泛利用能力, 该菌株极有可能具备有别于其他 SRB 的特殊底物利用和硫酸盐代谢途径.

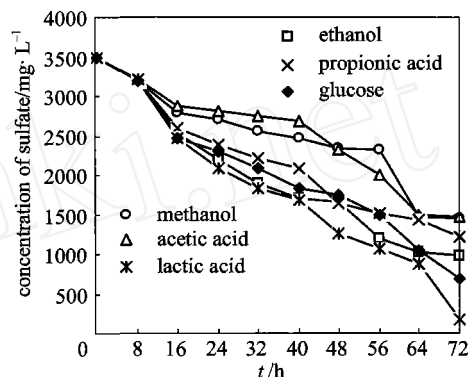


Fig. 1 Substrate utilization and sulfate-reduction potential of strain F28-1

2.3 菌株 F28-1 16S rDNA 全序列和 dsr 基因结构分析

菌株 F28-1 16S rDNA 序列全长为 1548 bp (GenBank 登录号: DQ092636). Blastn 检索表明同脱硫脱硫弧菌亚种菌株 Essex 6 (AF192153) 相似性达 99.9%, 故将该菌株命名为脱硫脱硫弧菌菌株 F28-1.

dsr 基因片段长 1948 bp (GenBank 登录号: DQ092635). Blastn 比较发现, 同脱硫脱硫弧菌 dsrAB (AF273034) 相似性最高, 为 94%. 根据相邻法绘制 F28-1 与相似序列系统进化树如图 2.

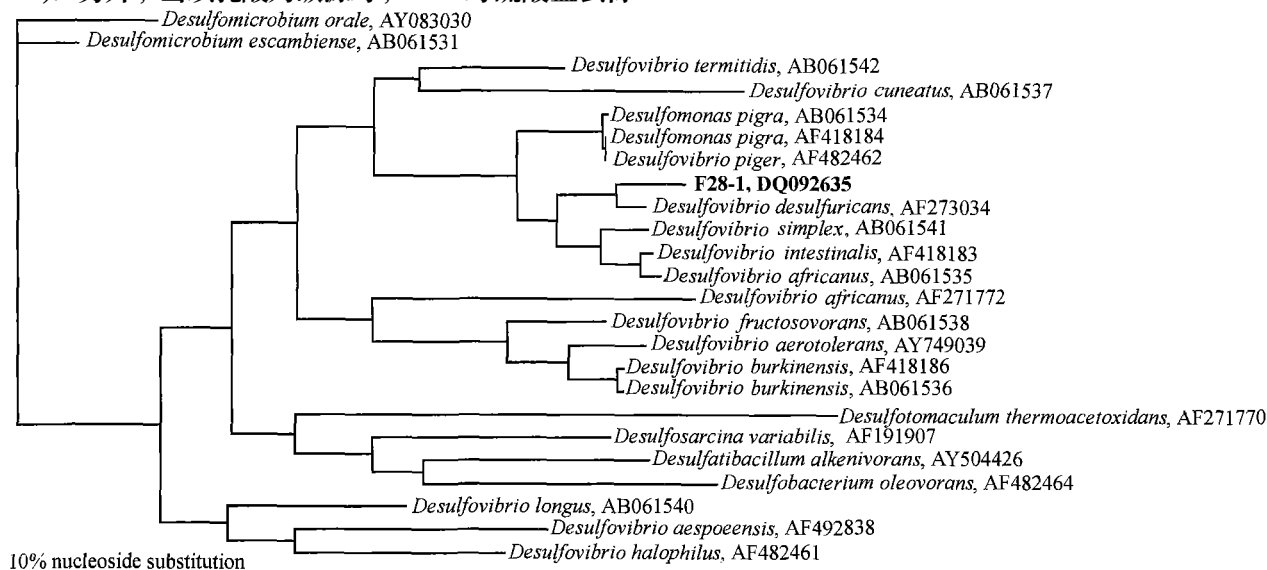


Fig. 2 Phylogenetic tree constructed with dsrAB of different SRBs, showing strain F28-1 with close relationship

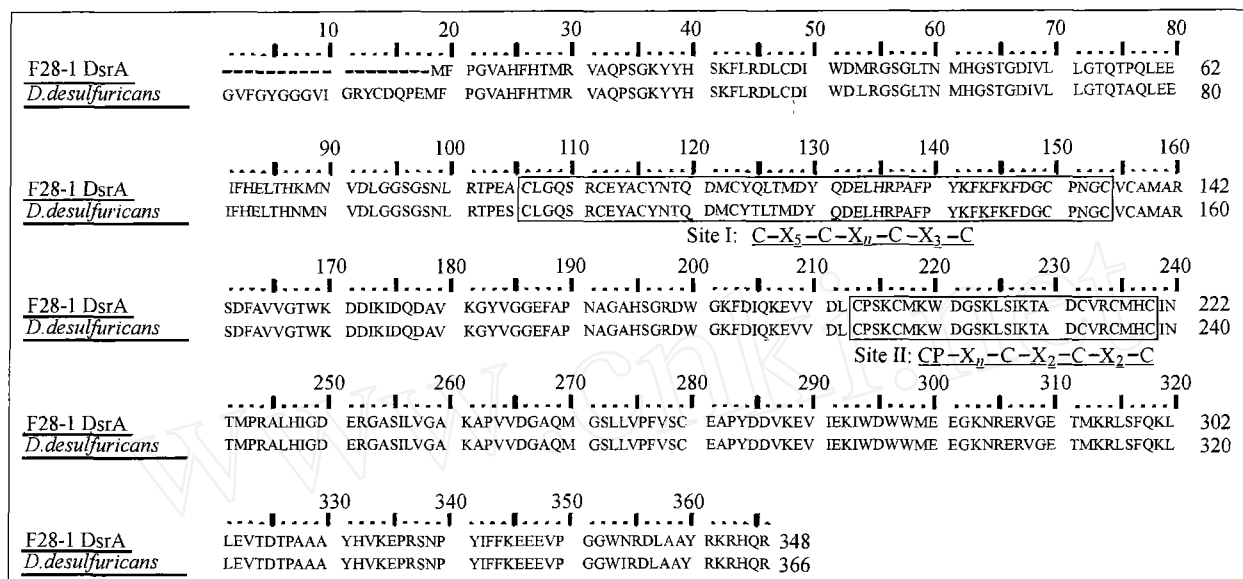
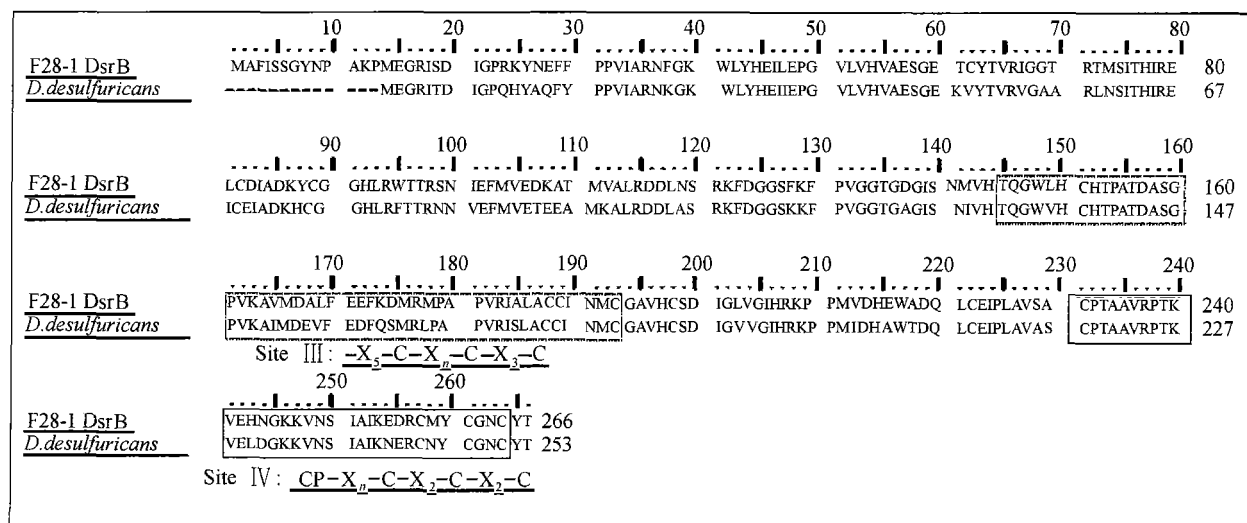
(a) alignment of DsrA of strain F28-1 and *D. desulfuricans* (GenBank accession No. AAK30045.1)(b) DsrB of F28-1 and *D. desulfuricans* (ZP_00130682.2)Fig. 3 Analysis of supposed Dsr protein structure
(sites I—IV show different metal-binding sites)

Table 1 Description of dsrAB ORF of strain F28-1

Subunit	Location	Protein length	Similar protein sequence (accession No.)	Identity
α (DsrA)	84—1130 bp	348	<i>D. desulfuricans</i> dissimilatory sulfite reductase α -subunit (AAK30045.1)	98% (342/348)
β (DsrB)	1149—1947 bp	266	<i>D. piger</i> sulfite reductase β -subunit (BAB55562.1)	89% (238/266)

F28-1与脱硫弧菌属聚成一簇 (*Desulfamonas pigra* 为 *D. piger*的同物异名词), 相似性明显高于同其他属 SRB, 这与根据 16S rDNA 序列构建的系统进化树基本吻合。

在线分析软件 ORF finder 分析表明序列包含两

个 ORF, 其氨基酸序列对应于 Dsr 的 α - (DsrA) 和 β 亚基 (DsrB), 这两个亚基的基因顺序排列于一个操纵子上, 受同一操作元件的控制。通过 Blastp^[8] 在 swissprot 蛋白数据库进行检索发现, α -亚基的 N 端缺少部分氨基酸, 而 β 亚基的 C 端未

见缺少, 其他描述如表 1。通过比对分析将 F28-1 的 DsrA 与脱硫脱硫弧菌 (AAK30045) DsrA, F28-1 的 DsrB 与脱硫脱硫弧菌 (ZP_00130682) DsrB 进行序列结构比较, 结果见图 3。

DsrA 中包含有典型的亚硫酸盐-亚硝酸盐还原酶保守框架 (Site I 和 Site II), 其中 Site I 与 Dahl 等^[13]描述的 (C-X₅-C)-X_n-(C-X₃-C) 框架一致, 框架内 4 个半胱氨酸 (C) 是 DsrA 与 [Fe₄S₄] 嗜咯铁卟啉 (siroheme) 结合所必需的; Site II 是 DsrA 与 Fe₄S₄ 基团结合的保守位点, 符合 Dahl 等^[13]描述的 CP-X_n-C-X₂-C-X₂-C 框架。DsrB 的结构与 DsrA 相似, 二者一级序列相似性为 14%, 由于在真细菌和古细菌界 SRB 中, 这两个亚基具有很高的同源性并保持独立, 所以推断它们是水平进化而来^[14]。DsrB 也含有 DsrA 类似的保守结构, Site III 与 Site I 相似, 但最前端缺少一个半胱氨酸, 所以不能结合 [Fe₄S₄]-siroheme, 可能在进化过程中丢失; Site IV 与 Site II 具相同的保守结构, 是 DsrB 结合 Fe₄S₄ 基团的位点, 但与 Dahl 等^[13]和 Morse 等^[15]自 *Archaeoglobus fulgidus* 和脱硫脱硫弧菌分离的 DsrB 保守框架 C-X₂-C-X₂-C-X₃-CP 不同。由此可见, 菌株 F28-1 的 dsr 序列结构同本种菌株相比有不同之处, 这也可能是导致其能够利用广泛碳源的原因。

3 结 论

采用 SRB 16S rDNA 特异引物进行 PCR 快速筛选, 自处理硫酸盐废水反应器中分离得到一株硫酸盐还原菌, 典型弧状, 0.4 μm × 8.0 μm, 16S rDNA 序列 (GenBank 登录号: DQ092636) 与脱硫脱硫弧菌亚种菌株 Essex 6 (AF192153) 的相似性达 99.9%, 据此将该菌株命名为脱硫脱硫弧菌 F28-1 (*D. desulfuricans* strain F28-1)。

菌株 F28-1 能够以乳酸、甲醇、乙醇、乙酸、丙酸和葡萄糖为唯一碳源进行硫酸盐还原代谢, 在以乳酸为碳源时, 72 h 内将 95% 以上的硫酸盐去除。

自菌株 F28-1 中克隆出硫酸盐代谢关键酶异化型亚硫酸盐还原酶基因序列, 分析表明包含两个串联的开放读码框, 分别编码该酶的 α 和 β 亚基。α 亚基含有亚硝酸盐-亚硫酸盐还原酶 α 亚基的保守结构, 能够分别与嗜咯铁卟啉和 Fe₄S₄ 基团相结

合; β 亚基的嗜咯铁卟啉结合域不完整, 只保留了与 Fe₄S₄ 基团相结合的保守位点。

References

- [1] King J, Kostka J, Frischer M, Saunders F. Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments. *Appl Environ Microbiol.*, 2000, 66: 2430-2437
- [2] Kosinska K, Miskiewicz T. Upgrading the efficiency of dissimilatory sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* via adjustment of the COD/SO₄²⁻ ratio. *Biotech Lett.*, 1999, 21: 299-302
- [3] Geets J, Borremans B, Vangronsveld J, Diels L, Lelie van der D. Molecular monitoring of SRB community structure and dynamics in batch experiments to examine the applicability of *in situ* precipitation of heavy metals for groundwater remediation. *J. Soils Sediments*, 2005, 5 (3): 149-163
- [4] O'Reilly C, Collieran E. Microbial sulphate reduction during anaerobic digestion: EGSB process performance and potential for nitrite suppression of SRB activity. *Water Sci Technol.*, 2005, 52 (1/2): 371-376
- [5] Postgate J R. The Sulphate-Reducing Bacteria. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1984
- [6] Ren N, Zhao Y, Wang A, Gao C, Shang H, Liu Y, Wan C. The effect of decreasing alkalinity on microbial community dynamics in a sulfate-reducing bioreactor as analyzed by PCR-SSCP. *Sci China C Life Sci.*, 2006, 49 (4): 370-378
- [7] Wilimotte A, van der Auwera G, De Wachter R. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis HTF* ('*Mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Lett.*, 1993, 317: 96-100
- [8] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. Gapped BLAST and PSBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25: 3389-3402
- [9] Joulain C, Ramasingh N B, Ingvorsen K. Congruent phylogenies of most common small-subunit rRNA and dissimilatory sulfite reductase gene sequences retrieved from estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol.*, 2001, 67: 3314-3318
- [10] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22: 4673-4680
- [11] Neefs J M, van de Peer Y, De Rijk P, Chapelle S, De Wachter R. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21: 3025-3049

- [12] Santegeds C M, Damgaard L R, Hesselink G, Zopfi J, Lens P, Muyzer G, De Beer D. Distribution of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in anaerobic aggregates determined by microsensor and molecular analysis *Appl Environ Microbiol.*, 1999, 65: 4618-4629
- [13] Dahl C, Kredich N M, Deutmann R, Truper H G. Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes *J. Gen. Microbiol.*, 1993, 139: 1817-1828
- [14] Crane B R, Siegel L M, Getzoff E D. Sulfite reductase structure at 1.6 Å: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions *Science*, 1995, 270: 59-67
- [15] Morse R, Gibson G R, Collins M D. Secondary structure analysis of the dissimilatory sulphite reductase in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Lett Appl Microbiol.*, 2000, 30 (5): 375-378

《化工学报》赞助单位

四川大学化工学院

浙江大学化学工程与生物工程学系

大连理工大学化工学院

浙江工业大学化工学院

湘潭大学化工学院

上海化工研究院

上海交通大学化学化工学院

华南理工大学化工学院

武汉工程大学