

微生物醌指纹法在环境微生物群体组成研究中的应用*

胡洪营 童中华

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室 北京 100084)

摘要: 微生物醌是能量代谢过程的电子传递体, 不同的微生物含有不同种类和分子结构的醌。因此, 环境样品中微生物醌的组成, 即醌指纹可在一定程度上反映微生物的群体结构。本文简要介绍了微生物醌的分析方法, 并利用醌指纹对活性污泥中的微生物群体组成进行了解析。

关键词: 微生物群体组成, 醌指纹, 泛醌, 甲基萘醌, 活性污泥

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0095-04

BACTERIAL QUINONE PROFILE FOR THE STUDY OF MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE IN ENVIRONMENTAL SAMPLES

HU Hong - Ying TONG Zhong - Hua

(ESPC, Department of Environmental Science & Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract: Quinone is one of the electron transporters of the microbial respiratory chain. The dominant quinone of one species of bacteria is different from other bacteria. So the quinone profile of environmental samples can reflect the microbial community. This paper briefly introduces the analytical method used for microbial quinones. The microbial community in an activated sludge sample is studied using this method.

Key words: Microbial community, Quinone profile, Ubiquinone, Menaquinone, Activated sludge

河流、湖泊、土壤等自然生态系统和废水生物处理装置是极其复杂的微生物生态体系, 微生物的量、群体组成及结构和活性是决定该生态体系的物质循环和污染物分解能力的3大要素。准确地评价微生物的量、群体组成和活性, 对于保护、改善自然环境、构建人工生态系统、提高废水生物处理装置的处理效率等都有重要的科学意义和实用价值。但由于环境微生物的可培养性差, 传统的培养技术能分离培养的微生物只占环境微生物总数的0.1%~10%^[1], 显然传统的培养技术不适用于环境微生物群体组成和结构的解析。近年来, 以遗传基因或生物特征化合物为标记的分子生物学解析方法成为环境微生物和微生物生态领域的研究热点。本文旨在介绍一种以微生物醌为标记的新的微生物群体组成解析方法^[2-4], 即醌指纹(Quinone Profile)法及其在活性污泥微生物群体组成解析中的应用。

1 微生物醌及其分析方法

根据在能量代谢过程中的作用不同, 微生物醌可分为呼吸型醌和光合型醌两大类。呼吸型醌是呼吸链中的电子传递体, 主要有泛醌(ubiquinone, UQ)即辅酶Q和甲基萘醌(menaquinone, MK), 即维生素K两大类。泛醌广泛存在于真核微生物线粒体内膜和革兰氏阴性细菌的细胞膜上, 一般用于微生物的好氧呼吸; 而甲基萘醌存在于革兰氏阳性细菌和个别革兰氏阴性细菌的细胞膜上, 一般用于微生物的厌氧呼吸或好氧呼吸。光合型醌主要有质体醌(plastoquinone, PQ)和维生素K1(vitamin K1, VK1), 它们是

* 国家重点基础研究专项 973 项目 (No. G1999045711)

收稿日期: 2001-05-12, 修回日期: 2002-01-25

光反应电子传递链即光合链的电子传递体，主要存在于能进行光合作用的藻类和植物中。

虽然泛醌、甲基萘醌、质体醌、维生素 K1 分子骨架不同，但它们都有一个聚异戊二烯侧链。根据异戊二烯侧链的长度，即异戊二烯的单位数 (n) 和侧链中的使双键饱和的氢原子的个数 (x)，泛醌和甲基萘醌分别被命名为 UQ-n (Hx) 和 MK-n (Hx)。例如 UQ-9 表示含有 9 个异戊二烯单位侧链的泛醌，MK-8 (H₄) 表示含有 8 个异戊二烯单位侧链的甲基萘醌，其侧链中的两个双键被 4 个氢所饱和。最常见的质体醌为含有 9 个异戊二烯单位侧链的质体醌，即 PQ-9。

光合细菌中醌的主要类型为泛醌，以泛醌 10 最为常见，也有些含有 UQ-8, UQ-9 和 UQ-7^[5]。

表 1 部分微生物中所含的主要醌的种类

微生物名称	醌种类
<i>Achromobacter, Corynebacterium</i> *	UQ-8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	UQ-9
<i>Ancylbacter, Methylobacterium</i> **	UQ-10
<i>Bacillus pumilus</i> *, <i>Sporolactobacillus</i>	MK-7
<i>Brevibacterium</i> *	MK-8 (H ₂)
<i>Mycobacterium</i> **	MK-9 (H ₂)

* 脂降解菌 ** 二甲基甲酰胺降解菌

不同微生物所含醌的种类和分子结构不同^[6]，表 1 是部分微生物所含主要醌的种类。环境中微生物醌的组成（一般以醌的摩尔比来表示），即醌指纹可以反映微生物群体组成，因此混合培养的微生物群体组成的变化可以利用醌指纹来解析。该法已经成为分析微生物群落的简单有效的方法，并成功地应用于生活污水和工业废水生物处理过程中微生物群体组成的确定^[2, 7]。泛醌与甲基萘醌的摩尔比 (UQ/MK) 反映革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌之比，呼吸型醌与光合型醌的摩尔比 (UQ + MK) / (PQ-9 + VK1) 则可以在一定程度上反映环境中细菌与藻类的比例。另外，由于在一定条件下微生物醌的含量变化不大，利用微生物醌也可以测定环境中活性微生物的浓度。

根据微生物醌的摩尔组成可以计算出微生物的多样性 (DQ) 和微生物种的分布均匀性 (EQ) (参见公式 1 和 2)^[4]。DQ 的数值越大表明微生物多样性越大。EQ 的最大值为 1，EQ = 1 表示所有微生物的比例相同，EQ 的数值越小表明微生物种的分布越不均衡。另外，利用非相似性指数 (D) (参见公式 3) 可以定量比较两个环境样品中的微生物群体组成差异的大小。D 的数值越大表明两者之间的差别越大，D = 0 表示两者完全相同。

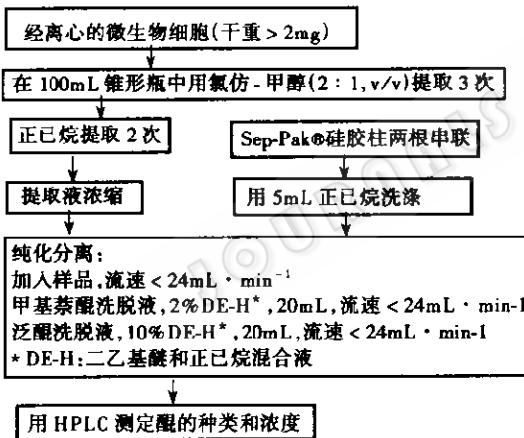


图 1 微生物细胞中醌的分析步骤

利用图 1 所示的分析方法对某一污水处理厂曝气池内活性污泥的微生物醌进行了为期一年的定期分析 (1996 年 10 月 ~ 1997 年 9 月，每月一次)。图 2 是活性污泥中微

$$DQ = [\sum (f_k)]^{1/2} \tag{1}$$

$$EQ = DQ/n \tag{2}$$

$$D(i, j) = (\sum |f_{ki} - f_{kj}|) / 2 \tag{3}$$

f_k: 醌 k 的摩尔比, n: 试样中醌的种类数, i, j: 试样 i 和 j

微生物醌的分析为 3 步骤，即醌萃取、提纯分离和定性定量分析^[8]，如图 1 所示。

2 活性污泥的微生物群体组成解析

利用图 1 所示的分析方法对某一污水处理厂曝气池内活性污泥的微生物醌进行了为期一年的定期分析 (1996 年 10 月 ~ 1997 年 9 月，每月一次)。图 2 是活性污泥中微

生物醌的典型液相色谱图，微生物醌的组成列于表2。

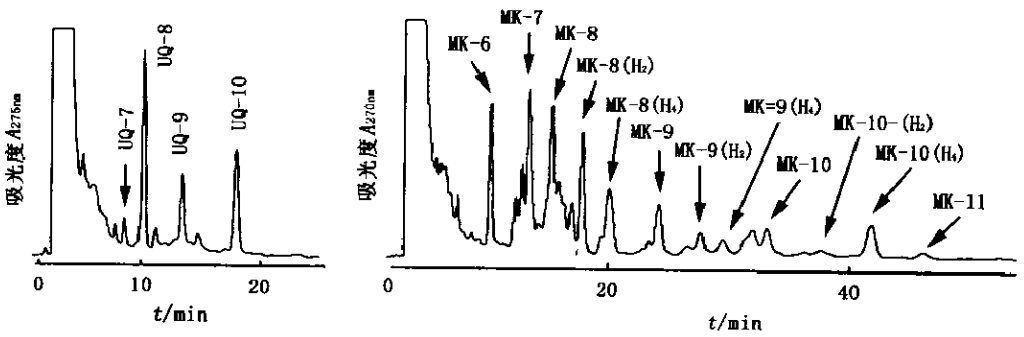


图2 活性污泥中泛醌(左)和甲基萘醌(右)的高效液相色谱图

表2 活性污泥中醌的组成(摩尔分数)

日期	10/96	11/96	12/96	1/97	2/97	3/97	4/97	5/97	6/97	7/97	8/97	9/97
UQ-7	ND*	ND	0.010	0.010	0.013	ND	ND	0.002	ND	ND	ND	0.003
UQ-8	0.156	0.179	0.172	0.206	0.177	0.142	0.192	0.169	0.201	0.204	0.163	0.200
UQ-9	0.044	0.053	0.058	0.088	0.087	0.076	0.085	0.082	0.072	0.067	0.053	0.051
UQ-10	0.073	0.106	0.111	0.136	0.120	0.149	0.113	0.109	0.118	0.132	0.100	0.097
UQ-others	ND	0.019	ND	ND	ND	ND	ND	0.001	ND	ND	ND	ND
VK1	0.001	0.006	0.003	0.004	0.002	0.002	0.001	0.002	ND	0.001	0.002	0.003
MK-6	0.169	0.093	0.080	0.071	0.071	0.066	0.078	0.079	0.078	0.071	0.072	0.075
MK-7	0.218	0.168	0.177	0.132	0.124	0.118	0.142	0.135	0.135	0.122	0.131	0.155
MK-8	0.074	0.100	0.102	0.080	0.091	0.097	0.096	0.109	0.107	0.077	0.070	0.051
MK-9	0.038	0.039	0.023	ND	0.049	0.042	0.044	0.043	0.042	0.019	0.035	0.035
MK-10	0.028	0.031	ND	0.046	0.039	0.031	0.030	0.032	0.029	0.038	0.037	0.028
MK-11	ND	0.005	ND	0.024	ND	0.008	0.009	0.009	0.012	0.008	0.011	0.004
MK-8 (H ₂)	0.053	0.063	0.079	0.067	0.074	0.086	0.081	0.086	0.073	0.031	0.062	0.046
MK-9 (H ₂)	0.020	0.017	0.050	0.027	0.028	0.029	0.024	0.021	0.017	0.017	0.017	0.015
MK-10 (H ₂)	0.005	0.006	0.018	0.025	0.011	0.011	0.004	0.011	0.013	0.017	0.016	0.009
MK-8 (H ₄)	0.019	0.018	0.021	0.019	0.013	0.017	0.011	0.012	ND	0.024	0.019	0.024
MK-9 (H ₄)	0.039	0.045	0.038	0.027	0.050	0.055	0.042	0.041	0.037	0.049	0.049	0.043
MK-10 (H ₄)	0.063	0.051	0.057	0.031	0.048	0.071	0.048	0.057	0.065	0.078	0.073	0.060
MK-others	ND	ND	ND	0.005	ND	ND	ND	ND	ND	0.044	0.089	0.099

ND: Not detected

从图2和表2可以看出，所有的活性污泥都含有UQ-8, UQ-9和UQ-10这3种泛醌，只有少数活性污泥含有UQ-7和其它泛醌。同时活性污泥含有MK-6、MK-7、MK-8、MK-8(H₂)、MK-10(H₄)、MK-9(H₂)、MK-9、MK-10、MK-9(H₂)、MK-8(H₄)、MK-10(H₂)、MK-11等10~12种甲基萘醌。几乎所有的活性污泥中都含有维生素K1，但不含质体醌。微生物醌的摩尔比以UQ-8最高，其次按MK-7、UQ-10、MK-8、MK-6、UQ-9和MK8(H₂)的顺序递减。含有UQ-8的细菌有 *Comamonas* sp. 和 *Pseudomonas* sp. 等、含有MK-7的细菌有 *Flavobacterium* sp., *Cytophaga* sp. 和 *Bacillus* sp.、含有UQ-10的细菌有 *Paracoccus* sp. 和 *Protomonas* sp. 等、含有MK-6或MK-7的细菌有 *Flavobacterium* sp. 和 *Cytophaga* sp. 等^[2]。因此，从微生物醌的组成可以推断以上所提到的细菌是活性污泥中的主要细菌。

单位活性污泥重量以粒状有机碳 (Particulate organic carbon, POC) 计，所含的微生物醌量列于表3。泛醌的含量为0.36~0.94 μmol/g-POC，平均为0.56 μmol/g-POC。甲基萘醌的含量高于泛醌，为0.56~1.73 μmol/g-POC，平均为0.98 μmol/g-POC。泛醌与甲

基萘醌的摩尔比 $UQ/MK = 0.38 \sim 0.78$, 平均为 0.59。这些数据表明在活性污泥中革兰氏阳性细菌比阴性细菌的含量高。

表3 活性污泥中醌的含量 ($\mu\text{mol/g-POC}$)

醌	日期 (月/年)											
	10/96	11/96	12/96	1/97	2/97	3/97	4/97	5/97	6/97	7/97	8/97	9/97
MKs	1.34	1.12	1.73	1.05	0.69	1.00	0.85	1.09	0.59	0.56	0.77	1.02
UQs	0.50	0.62	0.94	0.82	0.45	0.58	0.55	0.62	0.38	0.38	0.36	0.55
Total*	1.85	1.75	2.68	1.88	1.14	1.59	1.40	1.71	0.97	0.93	1.13	1.57

* 包括 VK1

微生物醌的总含量 (包括泛醌、甲基萘醌、维生素 K1) 为 $0.93 \sim 2.68 \mu\text{mol/g-POC}$, 平均为 $1.55 \mu\text{mol/g-POC}$ 。按公式 (1) 计算出的活性污泥的微生物多样性平均为 13.3, 此值略低于土壤值。Fujie^[9] 等人报道, 以微生物醌为标记的土壤微生物多样性为 13.4 ~ 16.8。另外, 按公式 (2) 计算出的活性污泥的微生物种分布均匀性为 0.81, 此值接近于 EQ 的最大值 1, 表明活性污泥中的微生物种的分布比较均匀。

3 结束语

通过分析微生物醌的组成, 可以定量评价环境中的微生物群体组成和微生物多样性。该方法简单方便、灵敏度高、数据的信赖性高, 为微生物生态以及环境微生物研究提供了一个新的简便可靠的研究手段。

但醌指纹法也存在一定的局限性。它不能反映具体哪个属或哪个种的变化, 因此如需对活性污泥中的微生物生态系统进行更详细的分析, 还应结合其他方法进行深入研究。

参考文献

- [1] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. *Microbiol Rev*, 1995, **59** (1): 143 ~ 169.
- [2] Hiraishi A. *J Gen Appl Microbiol*, 1988, **34**: 39 ~ 56.
- [3] Hedrick D B, White D C. *J Microbiol Methods*, 1986, **5**: 243 ~ 254.
- [4] Hu H Y, Fujie K, Nakagome H, *et al.* *Water Research*, 1999, **33** (15): 3263 ~ 3270.
- [5] 北村博主编. 光合细菌, 日本东京: 学会出版中心, 1994. 287 ~ 288.
- [6] Collins M D, Jones D. *Microbiol Rev*, 1981, **45** (2): 316 ~ 354.
- [7] Hu H Y, Fujie K, Tanaka H, *et al.* *Wat Sci Tech*, 1997, **35**: 103 ~ 110.
- [8] Hu H Y, Fujie K, Urano K. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87** (3): 378 ~ 382.
- [9] Fujie K, Hu H Y, Tanaka H, *et al.* *Soil Science and Plant Nutrition*, 1998, **44** (3): 393 ~ 404.