

应用 16S rDNA 克隆文库解析人工快速渗滤系统细菌种群多样性

马鸣超¹ 姜昕^{1,2} 李俊^{2*} 王静¹

(1. 中国地质大学 水资源与环境学院 水资源与环境工程北京市重点实验室 北京 100083)
(2. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

摘要: 本文通过构建 16S rDNA 克隆文库开展了人工快速渗滤(CRI)系统表层(10 cm 深)细菌种群多样性研究, 结果表明, 在 CRI 系统表层填料中细菌多样性十分丰富, 存在 7 个主要类群, 其中不可培养的酸杆菌纲(uncultured Acidobacteria)和其它不可培养细菌(uncultured bacteria)在整个克隆文库中比例最大, 比例为 53.72%, 其次是浮霉菌纲(uncultured planctomycete)和 β -变形菌纲(β -proteobacterium), 分别占文库比例的 13.89%和 8.33%; 克隆文库中反硝化菌的比例高于亚硝化单胞菌属细菌(0.925%), 没有出现 *Nitrospira* 属的克隆子。本文通过 16S rDNA 克隆文库揭示了在生物膜上存在的优势菌为不可培养菌, 而假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和紫色色杆菌(*Chromobacterium* sp.)等在平板分离培养中出现的频率较高, 两种方法之间的结果存在差异。本研究采用 16S rDNA 克隆文库方法揭示的结果, 将为 CRI 系统生物降解的进一步提高提供依据。

关键词: 人工快速渗滤系统(CRI), 16S rDNA 克隆文库, 细菌种群多样性

Analysis of Bacterial Community Composition by 16S rDNA Clone Library Sampling from Constructed Rapid Infiltration System(CRI)

MA Ming-Chao¹ JIANG Xin^{1,2} LI Jun^{2*} WANG Jing¹

(1. Beijing Key Laboratory of Water Resources & Environmental Engineering, School of Water Resources and Environment, China University of Geosciences, Beijing 100083)
(2. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081)

Abstract: In order to analyze the bacterial population diversity in surface layer(10 cm depth) of CRI, a bacterial 16S rDNA gene clone library was constructed. The results indicated that the bacterial community composition in surface Layer of CRI was high diversity and could be divided into 7 groups. The uncultured Acidobacteria and uncultured bacteria were the largest fraction(53.72% of total clones), followed by uncultured planctomycete (13.89%) and β -proteobacterium (8.33%); In clone library, the proportion of denitrifying bacteria was larger than that of nitrosobacteria and *Nitrospira*-like bacteria wasn't found. The high percentage of uncultured bacterial clones predominated in clone library, but by plating culture method the ma-

majority colonies were only *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium* sp., Which were the minority presented in clone library. The results demonstrated that either the bacterial community composition diversity or the abundance of phylogenetic groups analyzed by 16S rDNA clone library were much higher than those by plating culture method. The bacterial population diversity shown by 16S rDNA gene library is certain meaningful to reveal the activity profile of biodegradation in CRI.

Keywords: Constructed Rapid Infiltration system (CRI), 16S rDNA clone library, Bacterial community composition

人工快渗污水处理系统(Constructed Rapid Infiltration System, 简称 CRI 系统)是北京市水资源与环境工程重点实验室近年来开发研制出的一种新型污水处理技术。它是在传统的污水土地处理基础上改进而来,克服了传统的污水土地处理中水力负荷低的弊端,开创性地引用淹水落干交替的工作方式,保证了良好的处理效果。人工快渗被认为是生态学原理加工程学方法形成的生态工程水处理的新技术^[1,2]。

CRI 系统建立和运行的时间较短,目前对该系统的研究主要集中在设计参数及其工艺的改进方面,而对其内部起关键作用的微生物的研究却很少,过去采用传统的纯培养方法对 CRI 系统中可培养微生物的研究取得了一定的成果,但纯培养法不能很好的反映微生物种群存在的原始状态^[3],并且在自然环境样品中可分离出的微生物种类仅占总微生物种类总数的 0.1%~1%^[4],因此得到的结论难以客观、全面地反映 CRI 内菌群的种群结构及变化;用 PCR-DGGE 技术对环境样品总 DNA 进行分析,克服了传统纯培养方法的弊端,可以初步比较 CRI 系统中不同深度的微生物种群结构差异,适用于定性的研究样品的动态变化规律,但准确定量的研究还比较困难,因此,要完全确定 CRI 系统中的菌群结构,还需要借助于其它的微生物分子生态学方法作进一步的研究。克隆文库的构建是微生物分子生态学中用来研究微生物组成的常用方法之一^[3],目前细菌菌群分析中应用最多的是 16S rDNA 克隆文库方法。它是通过对 16S rDNA 全长序列进行扩增和分析,达到研究和监测样品与环境中的细菌多样性、种群结构和区系变化的目的^[5,6],并应用于水体、土壤、海洋沉积物、生物水处理系统中的微生物分析。

本文采用建立 16S rDNA 克隆文库的方法,通过测序并与 GenBank 已知序列 Blast 比对确定细菌种类,以揭示 CRI 系统砂层填料中的细菌组成,同

时也可以根据克隆文库中克隆子出现的频率了解 CRI 系统中菌群构成比例。

1 材料与方法

1.1 样品采集

砂层样品于 2006 年 9 月取自深圳观澜高尔夫球场 CRI 一号快渗池 10 cm 深度。

1.2 实验方法

1.2.1 样品总 DNA 提取及纯化:采用间接法,对快渗池中砂层样品进行总 DNA 的提取。用差速离心的方法收集菌体,将菌体转入带有 O 型密封环的 2 mL 螺旋口离心管中,加入 900 μ L 裂解液(NaCl 500 mmol/L, Tris-HCl(pH 8.0) 50 mmol/L, EDTA 50 mmol/L, SDS 40 mg/mL), 1g 0.1 mm 瓷珠, 酚-氯仿-异戊醇抽提液 700 μ L, 涡旋使沉淀充分悬浮,将离心管置于珠式细胞破碎器(MINI-BEADBEATER)上均质化(3200 r/min) 2 min, 上清液继续用酚-氯仿-异戊醇抽提。DNA 粗体液采用 PCR-clean-up kit 试剂盒纯化。

1.2.2 PCR 扩增:样品细菌 16S rDNA 全长 PCR 扩增见文献[7]。PCR 扩增总体系为 25 μ L: 10 \times buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 引物 P₀、P₆(浓度为 10 mmol/L)各 0.5 μ L, Mg²⁺(2.5 mmol/L) 1.5 μ L, Taq 酶(2.5 U) 0.2 μ L, 稀释 DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。

1.2.3 克隆文库的构建:割胶纯化 PCR 产物,与 pMD19-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α , 涂板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后,挑取阳性克隆子,用限制性内切酶 *Csp6* 和 *Hinf* 分型,每个酶切类型挑取 1 个代表菌株进行测序(上海生工生物工程技术服务有限公司),用 DNAMAN、Gene Tool 等软件对测序结果进行编辑、分析,并把编辑好的序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 同源性检索后下载同源性序列,系统发育树的绘制使用 MEGA3.1 软件完成,算法为邻

位相连法(neighbour-joining-analysis)。

2 结果与分析

2.1 CRI 系统砂层样品总 DNA 提取和 PCR 扩增结果

在 CRI 系统中微生物大都集中在表层 20 cm 范围内^[8], 故用于构建基因文库的样品选自 CRI 一号快渗池 10 cm 深度。对砂层样品提取的 DNA 进行电泳检测, 条带大小为 10 kb 左右, 以其为模板进行 16S rDNA 全长 PCR 扩增, 得到约 1500 bp 的大小片段, 再采用 Thompson^[9]等提出的“Reconditioning PCR”的方法, 消除了异源双链 DNA (heteroduplex), 保证了目的片段的特异性扩增, 可满足后续实验要求。

2.2 CRI 系统砂层样品 16S rDNA 系统发育分析

只有当文库的库容大到足以检出群落中主要的成员时, 文库之间的比较才有意义。为了保证构建的克隆文库足够大, 能够检测出群落中主要的成员, 需要对实验数据进行统计学检验。以覆盖率 C 评估

所构建文库对细菌多样性的体现程度, 计算公式为

$$C=[1-(n_1/N)] \times 100\%$$

其中, N 代表阳性克隆子总数, n_1 代表仅含单个克隆子的数量^[10]。本实验中 n_1 为 8, 克隆文库的覆盖率为 92.6%, 表明该克隆文库能较全面地反映 CRI 系统中的细菌种群多样性。

对随机挑取样品的 108 个阳性克隆采用限制性内切酶 *Csp6* 和 *Hin f* 酶切, 共得 30 个酶切类型。每个酶切类型挑取 1 个代表克隆子进行测序, 测序结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对, 将序列比对结果相同的克隆子定义为一个操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。砂层样品共得到 27 个 OTU, 样品中主要 OTU 所含克隆子数目及其相似性菌株如表 1 所示。

表 1 中, 对 27 个 OTU 的序列分析结果表明, 其中的 25 个 OTU 分别属于细菌域的 7 个主要类群, 另外 2 个 OTU 与数据库中的已知序列相似性相对较低, 可能是 PCR 产物嵌合体或同源于其它尚未被描述的

表 1 CRI 系统表层样品主要细菌 16S rDNA 克隆文库分析结果
Table 1 Data of bacterial 16S rDNA clone library constructed with surface layer in CRI

OUT 编号 OUT No	每个 OTU 含克隆数 及百分比 Number, Percentage of clone	GenBank 中最大相似度细菌 (NCBI 登录号、相似度) Closest relative in GenBank (Accession Number, Similarity %)	所属细菌类群 Phylogenetic group
OTU1	18 (16.67%)	Uncultured bacterium clone (AY302113, 96%)	Uncultured bacteria
OTU2	3 (2.78%)	<i>Methylocystis</i> sp. 甲基孢囊菌属 (AY007196, 97%)	α -proteobacterium
OTU3	15 (13.89%)	Uncultured Acidobacteria clone 酸杆菌纲 (AY921811, 97%)	Uncultured Acidobacteria bacterium
OTU4	10 (9.26%)	Uncultured bacterium clone (EF516030, 98%)	Uncultured bacteria
OTU5	3 (2.78%)	Uncultured gamma proteobacterium clone (AY921861, 100%)	γ -proteobacterium
OTU6	2 (1.85%)	<i>Burkholderia thailandensis</i> 伯克氏菌属 (DQ388537, 95%)	β -proteobacterium
OTU7	13 (12.04%)	Uncultured Acidobacteria clone 酸杆菌纲 (EF111087, 95%)	Uncultured Acidobacteria
OTU8	2 (1.85%)	Uncultured bacterium clone (AF361091, 99%)	γ -proteobacterium
OTU9	2 (1.85%)	Uncultured Planctomycetaceae bacterium 浮霉菌纲 (EF020316, 95%)	Uncultured planctomycete
OTU10	6 (5.56%)	Uncultured Chloroflexi bacterium 绿弯菌纲 (AY922047, 96%)	Uncultured Chloroflexi bacterium
OTU11	3 (2.78%)	Uncultured beta proteobacterium (AF204252, 96%)	β -proteobacterium
OTU12	2 (1.85%)	<i>Sphingomonadaceae</i> bacterium 鞘脂单胞菌科 (AB220121, 96%)	α -proteobacterium
OTU14	7 (6.48%)	Uncultured planctomycete clone 浮霉菌属 (DQ329794, 100%)	Uncultured planctomycete
OTU15	2 (1.85%)	<i>Acidovorax</i> sp. 食酸菌属 (AM084011, 96%)	β -proteobacterium
OTU16	2 (1.85%)	<i>Hyphomicrobium</i> sp. 生丝微菌属 (AF279787, 96%)	α -proteobacterium
OTU17	6 (5.56%)	Uncultured planctomycete clone 浮霉菌属 (AY922083, 98%)	Uncultured planctomycete
OTU18	2 (1.85%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 假单胞菌属 (DQ464061, 100%)	γ -proteobacterium
OTU19	2 (1.85%)	<i>Chromobacterium</i> sp. 紫色色杆菌 (DQ985277, 100%)	β -proteobacterium

细菌。酸杆菌纲(Uncultured Acidobacteria)和某些不可培养菌(Uncultured bacteria)是克隆文库中最大的两个细菌类群,在文库中各占 26.86%;其次是浮霉菌纲(Uncultured planctomycete)和 β -变形菌纲(β -proteobacterium),分别占文库比例的 13.89%和 8.33%。根据 Wagner 对多篇关于废水生物处理反应器中细菌群落结构的研究报告的总结, β -变形菌纲和拟杆菌纲一直是废水处理系统中的最优势类群^[10],但本实验克隆文库中出现较多的还有酸杆菌纲和浮霉菌纲,这说明在 CRI 系统和其它废水处理生物反应器中,细菌的群落结构有所差异,其中最大的原因应归结于污水污染物种类和浓度的差别。

CRI 系统中氮类污染物的去除也是至关重要的一个反应过程,生长缓慢的自养硝化细菌更是脱氮过程中的限速步骤,本实验构建的克隆文库中发现了类似于亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.)的细菌(占文库比例 0.925%),其在 CRI 系统中承担着亚硝化作用,但文库中却没有出现 *Nitrospira* 属的克隆子,这与笔者通过 PCR-DGGE 技术得到的结论一致,即在快渗池上层,氨氧化菌的多样性较亚硝酸氧化菌丰富,但比起其它异养菌,它们所占的比例就很小了。克隆文库中还发现了紫色色杆菌(*Chromobacterium* sp.)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium* sp.)和假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)等反硝化细菌,其在克隆文库的比例高达 5.55%,高于亚硝化细菌(占文库比例 0.925%),这与喻治平等^[8]学者的研究结论一致,即:渗滤池表层中反硝化菌数量最多,其次是亚硝化菌。

值得注意的是,在 CRI 系统的表层填料中,优势菌种都是不可培养菌,而假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和紫色色杆菌(*Chromobacterium* sp.)这些在平板分离培养中出现频率较高的优势菌在克隆文库中占的比例却很少,这说明分离培养得到的细菌并不是 CRI 系统生物膜中的优势细菌。由于培养方法的选择性改变了样品的原始状态,从而导致了这些细菌在培养基中的频繁出现,这与 Mobarry 等学者得出的结论一样^[11],即容易培养的微生物并不一定是生态学上的优势菌。

用 OTU 代表克隆子的碱基序列构建在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对,同源性检索后下载同源性序列,绘制系统发育树(见图 1),结果表明,

与 CRI 系统表层填料中细菌相似性较高的 β -变形菌纲菌属主要是伯克氏菌属(*Burkholderia thailandensis*)、紫色色杆菌(*Chromobacterium* sp.)、食酸菌属(*Acidovorax* sp.)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.);类似于 α -变形菌纲的细菌主要是红游动菌属(*Rhodoplanes* sp.)、甲基孢囊菌属(*Methylocystis* sp.)、鞘脂单胞菌(*Sphingomonadaceae* bacterium)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium* sp.)和慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium elkanii*);样品中属于酸杆菌纲(Uncultured Acidobacteria)、浮霉菌纲(Uncultured planctomycete)、绿弯菌纲(Uncultured Chloroflexi bacterium)和 γ -变形菌纲(γ -proteobacterium)的细菌大多是不可培养菌。

3 讨论

CRI 系统中的细菌菌落结构组成是影响系统运行效果的重要因素,本文采用构建 16S rDNA 克隆文库的方法分析了 CRI 系统附着在砂层填料上的细菌组成,结果表明在砂层填料的生物膜中的细菌多样性十分丰富,酸杆菌纲和某些不可培养细菌在整个克隆文库中占了很大的比例(53.72%),其次是浮霉菌纲和 β -变形菌纲;本研究揭示了在生物膜上存在的优势菌为不可培养菌,而在平板分离培养中出现频率较高的优势菌在克隆文库中占的比例很少或并未出现,表明传统的纯培养方法改变了环境微生物生长的原始状态,其结果具有一定的片面性。

本实验构建的克隆文库中发现了亚硝化单胞菌属的细菌,却没有出现 *Nitrospira* 属的克隆子,说明在快渗池表层的亚硝化现象很少,基本不存在硝化作用,这与我们先前认知的观点相同;同时,克隆文库中反硝化菌的比例高于亚硝化细菌,这再次证明了在快渗池表层反硝化菌的数量多于亚硝化菌。

运用分子克隆手段和 16S rDNA 序列同源性分析的方法能在不依赖于纯培养的基础上对环境样品进行分析,可以更客观准确地研究 CRI 系统生物膜中的细菌群落结构。进一步的实验需要应用多种分析手段,如采用荧光原位杂交方法对 CRI 系统生物膜中不同的细菌类群或菌属在原位进行定量分析,以及摸索优化的纯培养条件,并对纯培养得到的重要菌株进行生理生化分析,综合各种手段可以更全面地了解 CRI 系统内细菌菌落结构和代谢功能。

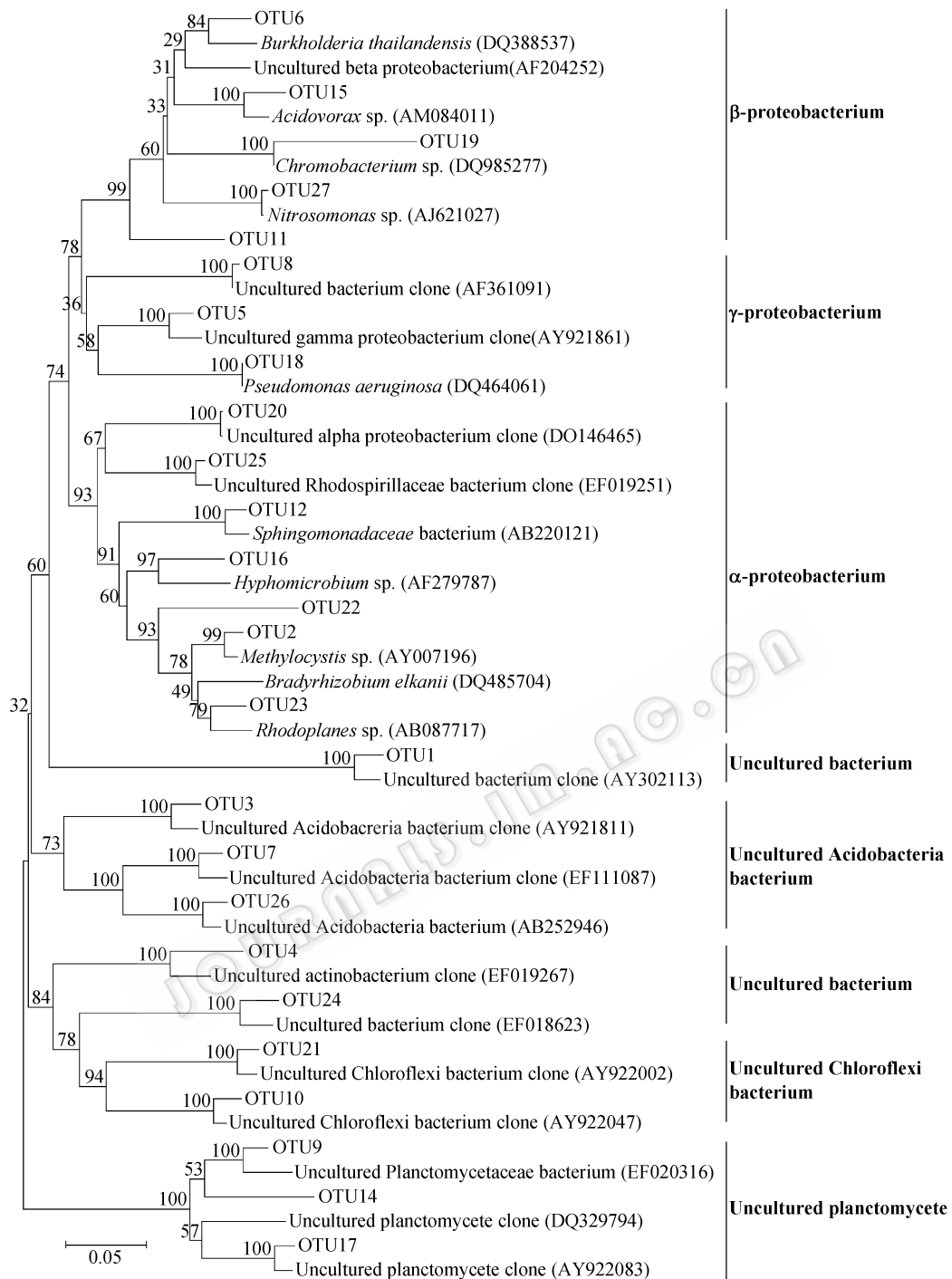


图 1 CRI 系统表层样品细菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the bacteria in the surface layer of CRI

注: 本文中的克隆子以 OTU 开头标识, 参照细菌序列引自 GenBank 数据库, 括号中的数字代表提交序号, 分支节点上的数字表示每 1000 次 bootstrap 分析所支持的次数, 线段表示 5% 序列差异的分支长度

Note: Clones in this study were identified by the sign of "OUT", the reference bacteria were gained from GenBank, numbers in parentheses represent the sequences' accession number, the numbers next to the nodes represent the bootstrap values of 1000 replications, the scale bar represents 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides

参考文献

- [1] 何江涛, 钟佐燊, 汤鸣皋, 等. 人工构建快速渗滤污水
处理系统的试验. 中国环境科学, 2002, 22(3): 239-243.
- [2] 郭伟, 李培军. 污水快速渗滤土地处理研究进展. 环境污染治理技术与设备, 2004, 5(8): 1-7.

- [3] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH, *et al.* Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**(1): 143–169.
- [4] Brock TD. The study of microorganisms in situ: progress and problems. *Symp Soc Gene Microbiol*, 1987, **41**: 1–17.
- [5] Brambilla E, Hippe H, Hagelstein A, *et al.* 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys. *Antarctica Extremophiles*, 2001, **5**: 23–33.
- [6] Baker GC, Gaiar S, Cowan DA, *et al.* Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, **200**: 103–109.
- [7] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 4485–4493.
- [8] 喻治平, 赵智杰, 杨小毛, 等. 人工快速渗滤池微生物活性的研究. *中国环境科学*, 2005, **25**(5): 589–593.
- [9] Thompson JR, Marcelino LA, Polz MF. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by ‘reconditioning PCR’. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: 2083–2088.
- [10] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**: 218–227.
- [11] Mobarry BK, Wagner M, Urbain V, *et al.* Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(6): 2156–2162.

稿件书写规范

高等院校教学栏目简介及撰稿要求

“高等院校教学”是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为高等院校教师开辟,是生物学教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名师讲堂”版块。旨在通过推广名家的教学经验,帮助青年教师尽快成长,进一步提高教学质量。欢迎获得国家“名师奖”或教育部“精品课程”等奖项的专家教授们积极撰稿,将你们在教学领域获得的经验和成功体会通过这个栏目展示出来。对于入选“名师讲堂”版块的文章,本刊将开辟快速审稿通道,优先发表,并免收审稿费和版面费,支付优厚的稿酬。刊发时还将在正文前附作者简介和大幅彩照,以鼓励和褒奖教学名家不吝赐稿,让所有的读者分享他们的经验和心得。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!