

T - RFLP 技术在厌氧氨氧化菌群结构分析中的应用

储昭瑞, 李相昆, 孟令威, 张 杰

(哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨)

摘 要: 为实现对样品中厌氧氨氧化菌群落组成的快速分析, 提出一种基于末端限制性片段长度多态性技术(T - RFLP)分析环境样品中厌氧氨氧化菌群结构的方法. 通过对 SILVA (R108) SSU Ref 数据库中已知厌氧氨氧化菌 16S rDNA 序列的模拟 PCR 和酶切分析, 选取合适的 PCR 引物(Amx368f - Amx820r)和限制性内切酶(MspI 和 RsaI), 使得不同厌氧氨氧化菌属对应不同末端片段长度(T - RFs), 从而完成对厌氧氨氧化菌群落组成的快速分析. 重复性和灵敏性检验结果表明, 该方法能够有效、稳定地应用于环境样品中厌氧氨氧化菌群落组成的快速分析.

关键词: 厌氧氨氧化; 末端限制性片段长度多态性技术; 菌群结构分析; 模拟聚合酶链式反应; 环境样品
中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367 - 6234(2013)02 - 0026 - 05

Identification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP

CHU Zhaorui, LI Xiangkun, MENG Lingwei, ZHANG Jie

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China)

Abstract: To rapidly identify anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in environmental samples, a cloning-independent method based on Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T - RFLP) was proposed. Based on SILVA (R108) SSU Ref database containing 400 16S rRNA gene sequences of anammox bacteria, defined lengths of terminal restriction fragments (T - RFs) were predicted by virtual PCR and restriction enzyme digestion using suitable PCR primers (Amx368f - Amx820r) and restriction enzyme (MspI & RsaI). Then the genus of anammox bacteria was identified by comparative analysis of T - RFs. The repeatability and sensibility analysis results show that the anammox bacteria specific T - RFLP analysis is a reliable tool to rapidly assess the complexity of anammox bacteria in environmental samples.

Key words: anaerobic ammonium-oxidizing (anammox); Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T - RFLP); community structure analysis; virtual PCR; environmental sample

厌氧氨氧化(anammox)是近几年发现的一种氮循环新途径, 是指在厌氧条件下, 微生物利用 NH_4^+ 为电子供体, NO_2^- 为电子受体, 直接将 NH_4^+ 和 NO_2^- 转化为 N_2 的生化过程^[1]. 厌氧氨氧化的发现对于研究地球氮循环、丰富微生物理论以及开发新型生物脱氮工艺均具有巨大的推动作用^[2]. 在环境工程领域, 厌氧氨氧化是目前已知最经济的生物脱氮途径, 具有良好的推广应用前景^[3]. 根

据 16S rRNA 基因系统发育分析, 厌氧氨氧化菌被确定为浮霉菌门(*Planctomycetes*)的一员. 目前已发现的 9 株厌氧氨氧化菌种分属于 5 个菌属, 即 *Candidatus Brocadia*^[4-5]、*Candidatus Kuenenia*^[6]、*Candidatus Anammoxoglobus*^[7]、*Candidatus Jettenia*^[8]、*Candidatus Scalindua*^[9].

在分析环境样品中厌氧氨氧化菌群落组成时, 常常采用克隆、测序构建 16S rDNA 克隆文库的方法. 该方法避免了对厌氧氨氧化菌纯培养的要求, 但是构建克隆文库工作量大, 费用高, 不能实现厌氧氨氧化菌群落结构的快速分析. 本文建立的基于 T - RFLP 技术分析厌氧氨氧化菌群落组成的方法, 充分发挥了 T - RFLP 技术高重复

收稿日期: 2012 - 05 - 12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51178137).

作者简介: 储昭瑞(1987—), 男, 博士研究生;

张 杰(1938—), 男, 博士生导师, 中国工程院院士.

通信作者: 李相昆, xkli312@163.com.

性、高灵敏度、高通量、易于数字化等特点,实现了对环境样品中厌氧氨氧化菌群落结构的快速分析.

1 实 验

1.1 T-RFLP 方法的确定

SILVA (R108) SSU Ref 数据库拥有 530 197 条细菌 16S rRNA 序列,是目前研究细菌 16S rRNA 基因最全、最大的数据库^[10]. 厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法的建立中,以 SILVA (R108) SSU Ref 为数据库,采用 MiCA 3 中 ISpaR 为分析工具,测试厌氧氨氧化菌引物的特异性,并通过比较不同限制性内切酶切得的末端片段长度,选择合适的限制性内切酶^[11].

选取 SILVA (R108) SSU Ref 数据库中 *Brocadiales* 目(目前已知厌氧氨氧化菌群)约 400 条序列为分析对象,采用 seqRFLP 软件预测理论末端片段长度(T-RFs)^[12].

1.2 污泥样品的采集

污泥样品分别取自:哈高科大豆废水处理 EGSB 工艺厌氧颗粒污泥(Hgk1);哈高科大豆废水处理 SBR 工艺好氧活性污泥(Hgk2);太平污水处理厂 A/O 工艺回流污泥(Tp);实验室 SBR 型厌氧氨氧化反应器(Hit). 各工艺的运行情况见表 1.

表 1 各污水处理工艺运行工况

污泥样品	取样点	COD/(mg·L ⁻¹)		ρ (TN)/(mg·L ⁻¹)	
		进水	出水	进水	出水
Hgk1	EGSB	10 000	400	150	135
Hgk2	SBR	400	60	125	15
Tp	二沉池	420	15	50	10
Hit	SBR	-	-	120	75

样品采集后立即置于冰上运至实验室,10 000 r/min 离心 10 min 弃上清,保存于 -20 ℃ 以备后续分析.

1.3 DNA 提取及 PCR 扩增

采用 PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO, CA)提取污泥样品的基因组 DNA. 操作步骤见试剂盒说明书. 并采用紫外分光光度仪(NanoDrop 2000, Gene)和 1% (质量分数)的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和质量.

为提高灵敏度,采用巢式 PCR 进行 DNA 的扩增. PCR 所用引物见表 2. 首先采用引物对 Pla46f - 1390r 进行首轮 PCR 扩增,然后以 1 μ L PCR 产物为模板,采用厌氧氨氧化菌特异性引物对 Amx368f - Amx820r 进行二次 PCR 扩增.

表 2 巢式 PCR 所用引物

引物	特异性	序列(5'-3')	文献
Pla46f	<i>Planctomycetales</i>	GGATTAGGCATGCAAGTC	[13]
1390r	Bacteria	GACGGGCGGTGTGTACAA	[14]
Amx368f ^a	Anammox bacteria	TTCGCAATGCCCGAAAGG	[15]
Amx820r	Anammox bacteria	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	[6]

注:a. 引物 5' 端带 6-FAM 荧光标记.

PCR 反应体系(50 μ L): 5.0 μ L 10X PCR Buffer, 4.0 μ L dNTPs, 1.0 μ L 引物 1, 1.0 μ L 引物 2, 1 μ L 模板 DNA, 1 μ L EasyTaq 酶(TransGen, China), 补充 ddH₂O 至 50 μ L. PCR 反应程序: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ (首轮扩增)/58 ℃ (二次扩增) 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 72 ℃ 终延伸 10 min. PCR 产物采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测.

1.4 T-RFLP 分析

PCR 产物采用 5 U 绿豆核酸酶(NEB, 10 U/ μ L) 消化, 以去除单链 DNA. 消化后, 使用 EasyPure PCR 纯化试剂盒(TransGen, China) 纯化 PCR 产物. 采用限制性内切酶 MspI (C⁺CGG) 和 RsaI (GT⁺AC) 对纯化后的 PCR 产物进行酶切. 反应体系 10 μ L: 7 μ L 纯化 PCR 产物, 1 μ L 10X Buffer, 1 μ L MspI (NEB, 20 U/ μ L), 1 μ L RsaI (NEB, 20 U/ μ L). 37 ℃ 酶切过夜, 65 ℃ 失活 20 min. 酶切产物采用乙醇沉淀法进行脱盐纯化. 酶切后的 PCR 产物, 连同 GeneScan - 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems, USA) 在 ABI 3130 (Applied Biosystems, USA) 上进行毛细管电泳.

实验原始数据采用 GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, USA) 进行初步分析, 后续分析由文献[16]的方法完成.

1.5 厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 的灵敏性和重复性检验

基于 PCR 技术的序列分析由于方法的固有偏差会导致数据的严重失真^[17-18]. 为了检验厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法的灵敏性, 选取克隆子 Hgk_2 (属于 *Brocadia*) 和 Tp_8 (属于 *Scalindua*), 以不同比例混合来模拟微生物群落(具体见表 3), 进行厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP (具体方法见 1.3 和 1.4).

表 3 模拟厌氧氨氧化菌群落组成

	M_1	M_2	M_3	M_4
模拟微生物群落				
Hgk_2 (<i>Brocadia</i>)	1	10	25	50
Tp_8 (<i>Scalindua</i>)	99	90	75	50

厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法的重复

性通过两次独立的平行实验进行检验.

2 结果与讨论

2.1 厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法的建立

应用 T-RFLP 技术快速分析厌氧氨氧化菌的群落组成,需要考虑两个前提条件(图 1):一是能够高效扩增厌氧氨氧化菌群的特异性引物,通过 seqRFLP 软件^[12],以数据库 SILVA (R108) SSU Ref 中 400 个厌氧氨氧化菌序列为研究对象模拟

PCR. 结果显示,引物组合 amx368f 和 amx820r 能够有效扩增厌氧氨氧化菌(在存在 3 个碱基错配的情况下,扩增效率为 385/400);二是合适的限制性内切酶能够将不同菌属的厌氧氨氧化菌切成不同的末端片段长度(T-RFs),对被 amx368f 和 amx820r 扩增出的厌氧氨氧化菌群(385 个序列),采用不同的限制性内切酶(MspI、RsaI、AluI、TaqI)进行酶切分析.

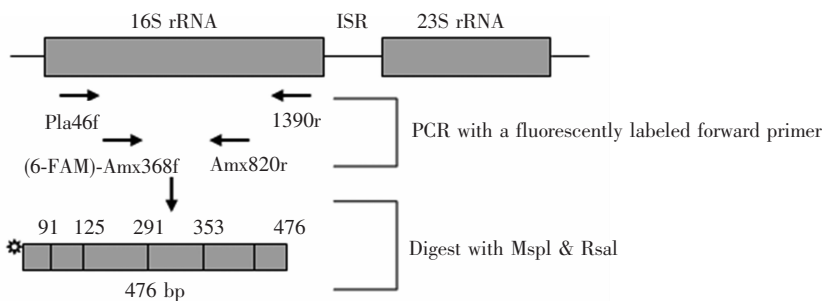


图 1 厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法的基本原理

结果表明,以 amx368f 和 amx820r 为引物(其中 amx368f 的 5'端带荧光),采用 MspI 和 RsaI 进行双酶切所建立的厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法能够有效地区分不同厌氧氨氧化菌属. SILVA (R108) SSU Ref 数据库中除了 30 个未归类序列外,其余厌氧氨氧化菌被归属于 5 个菌属: *Brocadia*、*Kuenenia*、*Anammoxoglobus*、*Jettenia*、*Scalindua*. 其对应理论末端片段长度分别为 125、291、91、476、353 bp.

2.2 厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法的重复性检验结果

为了检验厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法的可重复性,选取质粒混合物 M_4 为分析对象,进行两次相互独立的厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 实验,结果如图 2 所示. 可以看出,两次实验

无论是信号峰数量、信号峰位置还是信号峰强度均表现出高度的一致性. 因此,厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法具有较好的重现性,可以作为一种稳定的快速分析厌氧氨氧化菌群落组成的方法.

2.3 厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法的灵敏性检验结果

两种质粒按不同比例混合的模拟厌氧氨氧化菌群落(见表 3)用于探讨厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法的灵敏性,结果见图 3. 可以看出,该方法基本能够较准确地预测混合体系中厌氧氨氧化菌的群落组成和其相对丰度. 当混合体系 M_1 中 *Brocadia* 占总数的 1% 时,由于峰值过低,已与杂峰混淆,系统无法有效识别其信号,说明该方法存在一定的检测限(>1%).

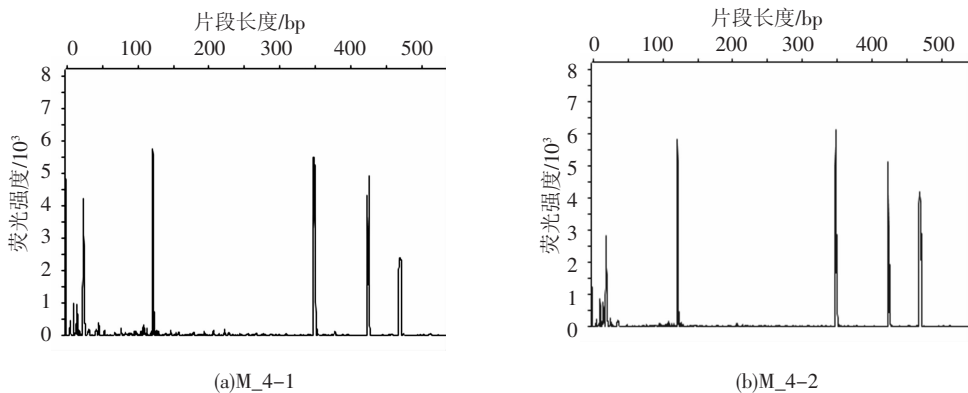


图 2 厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 原始图谱

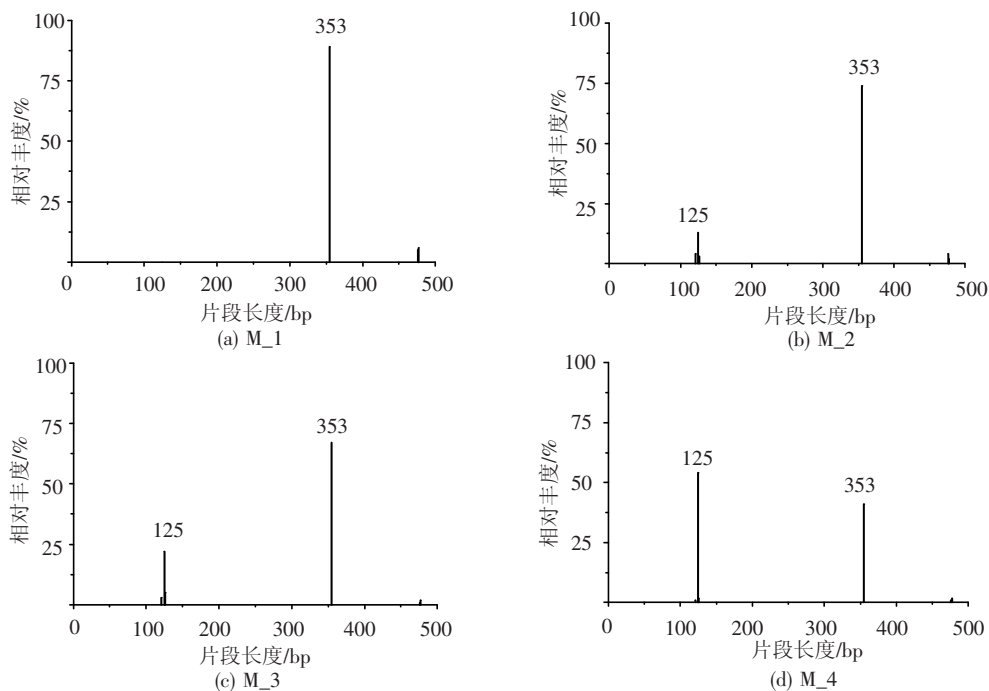


图 3 模拟厌氧氨氧化菌群落的末端片段长度 (T-RFs) 图谱

2.4 污泥样品中厌氧氨氧化菌的群落组成分析

采用所建立的厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法对污泥样品中厌氧氨氧化菌群落组成进行分析,结果如图 4 所示. 可以看出,厌氧氨氧化菌广泛存在于污水处理厂活性污泥中,且厌氧氨氧化菌的群落组成存在差异. 哈高科大豆废水处理厂 EGSB 颗粒污泥 (Hgk1) 中存在大量末端片段长度 (T-RF) 91 和 125 bp, 分别代表 *Anammoxoglobus* 属和 *Brocadia* 属, 其中 431 bp 可能是酶切不充分导致; 哈高科大豆废水处理厂 SBR 工艺活性污泥 (Hgk2) 中主要末端片段长度 125 和 353 bp, 分别代表 *Brocadia* 属和 *Scalindua* 属; 哈尔滨太平市政污水处理 A/O 工艺活性污泥 (Tp) 中存在着 91, 125, 353 bp 的末端片段长度, 分别代表 *Anammoxoglobus* 属、*Brocadia* 属和 *Scalindua* 属. 从实验室厌氧氨氧化反应器污泥 (Hit) 的 T-RFLP 图谱可以看出, 经过富集所得厌氧氨氧化菌的群落组成较单一, 主要为 *Brocadia* 属.

通过该方法可进一步分析污泥样品中厌氧氨氧化菌的丰度, 结果见表 4. 样品 Hgk1 和 Hgk2 中

优势厌氧氨氧化菌均为 *Brocadia* 属, 相对丰度分别为 61.7% 和 86.5%. 样品 Tp 中未形成单一的优势厌氧氨氧化菌, 其所含 *Anammoxoglobus* 属、*Brocadia* 属和 *Scalindua* 属的相对丰度分别为 38.2%, 25.7% 和 36.1%. 采用 Hgk2 为接种污泥的实验室厌氧氨氧化反应器污泥 (Hit) 中 *Brocadia* 属相对丰度达 100%.

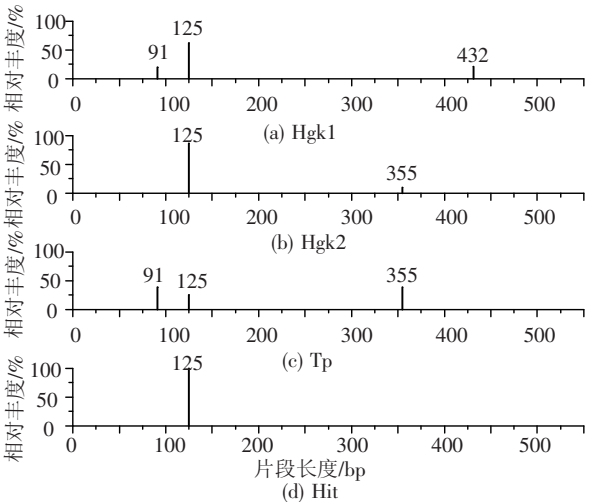


图 4 污泥样品中厌氧氨氧化菌群落的厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 图谱

表 4 污泥样品中厌氧氨氧化菌群落组成分析

污泥样品	取样点	末端片段长度及对应厌氧氨氧化菌属			%
		91 bp (<i>Anammoxoglobus</i>)	125 bp (<i>Brocadia</i>)	353 bp (<i>Scalindua</i>)	
Hgk1	EGSB	17.4	61.7	20.9	
Hgk2	SBR	—	86.5	13.5	
Tp	二沉池	38.2	25.7	36.1	
Hit	SBR	—	100	—	

3 结 论

1) 通过对 SILVA (R108) SSU Ref 数据库中 400 条厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因序列的分析, 建立了厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法. 重复性和灵敏性检验表明, 该方法是一种稳定的、可靠的分析厌氧氨氧化菌群落组成的方法. 该方法避免了繁琐的克隆过程, 尤其适合于对环境样品中厌氧氨氧化菌群落组成的快速分析, 能够有效地对各厌氧氨氧化菌进行相对定量分析.

2) 厌氧氨氧化菌广泛存在于现行污水处理工艺, 为采用普通活性污泥作为厌氧氨氧化反应器接种污泥提供了理论依据.

4 展 望

采用本文所建立的厌氧氨氧化菌特异性 T-RFLP 方法对样品中厌氧氨氧化菌群落多样性进行分析时, 需考虑几个关键因素:

1) 应尽量优化 PCR 体系和程序, 减少杂带和引物二聚体的生成, 以免在毛细管电泳中产生杂峰, 干扰对信号峰的分析.

2) 限制性酶切过程一定要充分. 每段序列的酶切位点很多, 酶切不充分会出现大量的杂峰, 干扰分析. 初期的实验中发现, T-RFLP 图谱在 477 bp 出现较强信号峰, 表明由于酶切不充分, 很多 PCR 产物未被切断.

3) 由于环境样品中厌氧氨氧化菌的含量一般较低, 采用巢式 PCR 有效扩增含量较低的厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因尤为必要.

参考文献

- [1] MULDER A, GRAAF A A, ROBERTSON L A, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, 16(3): 177-184.
- [2] DEVOL A H. Nitrogen cycle: solution to a marine mystery[J]. *Nature*, 2003, 422(6932): 575-576.
- [3] STAR van der W R, ABMA W R, BLOMMERS D, *et al.* Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam[J]. *Water Res*, 2007, 41(18): 4149-4163.
- [4] STROUS M, FUERST J A, KRAMER E H, *et al.* Missing lithotroph identified as new planctomycete[J]. *Nature*, 1999, 400(6743): 446-449.
- [5] KARTAL B, NIFTRIK van L, RATRAY J, *et al.* Candidatus 'Brocadia fulgida': an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 63(1): 46-55.
- [6] SCHMID M, TWACHTMANN U, KLEIN M, *et al.* Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2000, 23(1): 93-106.
- [7] KARTAL B, RATRAY J, NIFTRIK van L A, *et al.* Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2007, 30(1): 39-49.
- [8] QUAN Z X, RHEE S K, ZUO J E, *et al.* Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor[J]. *Environ Microbiol*, 2008, 10(11): 3130-3139.
- [9] KUYPERS M M, SLIEKERS A O, LAVIK G, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea[J]. *Nature*, 2003, 422(6932): 608-611.
- [10] PRUESSE E, QUAST C, KNITTEL K, *et al.* SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(21): 7188-7196.
- [11] SHYU C, SOULE T, BENT S J, *et al.* MiCA: a web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes[J]. *Microb Ecol*, 2007, 53(4): 562-570.
- [12] DING Qiong, ZHANG Jinlong. seqRFLP: Simulation and visualization of restriction enzyme cutting pattern from DNA sequences [EB/OL]. <http://CRAN.R-project.org/package=seqRFLP>, 2010.
- [13] 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.
- [14] ZHENG D, ALM E W, STAHL D A, *et al.* Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(12): 4504-4513.
- [15] SCHMID M, WALSH K, WEBB R, *et al.* Candidatus "Scalindua brodae", sp. nov., Candidatus "Scalindua wagneri", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2003, 26(4): 529-538.
- [16] ABDO Z, SCHUETTE U M, BENT S J, *et al.* Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes[J]. *Environ Microbiol*, 2006, 8(5): 929-938.
- [17] WINTZINGERODE von F, GOBEL U B, STACKEBRANDT E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, 21(3): 213-229.
- [18] CHANDLER D P, FREDRICKSON J K, BROCKMAN F J. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries[J]. *Mol Ecol*, 1997, 6(5): 475-482.

(编辑 刘 彤)