

处理含氮芳烃废水 SBR 生物反应器细菌多样性研究

刘兴宇^{1,2}, 王保军¹, 赵克新¹, 刘磊¹, 姜成英¹, 刘双江¹

(1. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101; 2. 北京有色金属研究总院生物冶金国家工程实验室, 北京 100088)

摘要: 为了研究处理含氮芳烃废水生物反应器细菌多样性及含氮芳烃降解的微生物学机制, 并为工艺改进提供依据, 采集处理含氮芳烃废水生物反应器从启动到稳定高效运行过程中不同时期污泥样品进行 PCR-DGGE 分析. 同时, 从稳定运行期反应器污泥中富集培养了 90 株细菌, 获得 36 株降解菌并对其中 5 株降解菌进行了芳烃双加氧酶活测试. 结果表明, 细菌种群结构自启动至稳定运行期变化明显, *Acidobacteria* (SBR1, SBR7), *Actinobacteria* (SBR4) 和 β -*Proteobacteria* (SBR6) 等类群细菌对含氮芳烃化合物降解可能起重要作用. 不同研究微生物多样性方法存在各自倾向性, 仅能反映细菌种群中的不同部分. 在分离细菌中, *Actinobacteria* 类群细菌为优势类群. 通过对降解菌芳烃开环双加氧酶酶活分析, 进一步了解了含氮芳烃在反应器内的降解机制. 研究结果为含氮芳烃废水处理研究提供了一些有价值的参考依据, 并丰富了含氮芳烃废水降解菌资源.

关键词: DGGE; 含氮芳烃; 细菌多样性; 16S rRNA 基因

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)09-2564-07

Bacterial Diversity in a Sequencing Batch Reactor Treating Nitrogen-Containing Aromatic Wastewater

LIU Xing-yu^{1,2}, WANG Bao-jun¹, ZHAO Ke-xin¹, LIU Lei¹, JIANG Cheng-yin¹, LIU Shuang-jiang¹

(1. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. National Engineering Laboratory of Biohydrometallurgy, General Research Institute for Nonferrous Metals, Beijing 100088, China)

Abstract: For understanding the mechanism of biodegradation in a SBR reactor treating nitrogen-containing aromatic wastewater, the reactor sludge samples were used for PCR-DGGE analysis. Meanwhile, 90 strains were isolated from the sludge sample after the start-up stage, 36 strains can degrade nitrogen-containing aromatic compounds. 5 strains nitrogen-containing aromatic degraders were further performed aromatic ring cleavage dioxygenase analysis. Result showed that bacterial diversity in the reactor were changed during the start-up stage, *Acidobacteria* (SBR1, SBR7), *Actinobacteria* (SBR4) and β -*Proteobacteria* (SBR6) may play important role in biodegradation of nitrogen-containing aromatic compounds, among the isolates. Different bacterial diversity research method all have bias, and reflected different part of the bacterial structure. Among the isolates, *Actinobacteria* were the majority, by analysis the ring cleavage enzyme activity, further understood how the four nitrogen-containing aromatic compound were degraded in the reactor. The results provided valuable references for studying microbiological degradation mechanism in the reactor, and enriched microbial resources of nitrogen-containing aromatic degrader.

Key words: DGGE; nitrogen-containing aromatic compounds; bacterial diversity; 16S rRNA gene

含氮芳烃类化合物广泛应用于染料、塑料、杀虫剂、炸药和药品的生产中, 是重要的化工品, 代表物质有硝基苯、硝基酚、苯胺等. 此类物质具有相当大的毒性, 摄入、吸入、甚至通过皮肤渗入均可导致呕吐、皮肤和眼睛发炎以及头痛、供氧不足、影响中枢神经系统, 导致肝损伤和贫血症和癌症^[1-3]. 由于这类物质可在环境中持续存在并可能在食物链中积累^[4], 对人类的毒性很大且其产量巨大, 美国环保局 (USEPA) 将硝基苯、4-硝基酚、2,4-二硝基酚等列入 129 种首要污染物 (priority pollutant) 名单^[1,5,6].

尽管有很多研究者对含氮芳烃类废水降解工艺进行了研究^[2,3,5], 然而对含氮芳烃废水降解反应器内微生物群落研究较少. 本课题组前期构建了一个高效含氮芳烃类废水降解反应器, 并对工艺和微生物多样性进行了初步研究^[7], 由于仅采用 16S rRNA

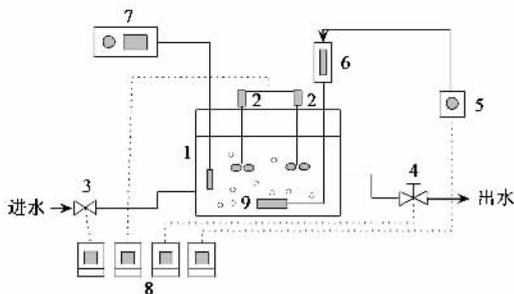
基因克隆文库的方法对细菌多样性变化进行分析, 可能存在倾向性, 且无法对降解菌降解机制进行评估. 因此本研究采用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术和 DNA 测序、系统发育分析等方法以及传统微生物学方法对含氮芳烃废水生物反应器细菌多样性进行分析, 以期获得反应器中细菌组成和功能以及动态变化规律, 从而为含氮芳烃废水处理提供了一些有价值的参考依据, 并丰富含氮芳烃降解菌资源.

1 材料与方法

1.1 含氮芳烃废水降解反应器构建及污泥样品采集

收稿日期: 2007-09-17; 修订日期: 2007-10-26
基金项目: 中国科学院知识创新工程项目 (KZCX2-YW-G-009)
作者简介: 刘兴宇 (1979 ~), 男, 博士, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: wellwoodliu@gmail.com

反应器如图 1 所示.其中 SBR 反应器由有机玻璃加工而成,长×宽×高为 300 mm×100 mm×300 mm,有效容积 6 L,委托北京市有机玻璃六厂加工.采用 4 个时序控制器分别控制进水阀、搅拌器、空气泵和出水电磁阀以实现周期运行,通过与电脑相联的溶氧仪在线监控溶解氧浓度,并通过带有阀门的转子流量计调节并计量曝气量.在整个试验过程中,试验用水均为人工配水,硝基苯(NB)、4-硝基酚(4-NP)、苯胺(AN)、2,4-二硝基酚(2,4-DNP) 4 种物质配制模拟废水,具体浓度为硝基苯 100~180 mg/L,4-硝基酚 100~150 mg/L,苯胺 50~100 mg/L,2,4-二硝基酚 25~50 mg/L,运行周期自启动至 118 d 为 12 h,119~141 d 为 8 h,自 142 d 以后为 6 h,自第 95d 起出水中检测不到 4 种进水物质存在,且出水 TOC 低于 10 mg/L.反应器运行数据参见文献[7].采样选取 0、60、90、120、150 和 190 d 反应器中污泥样品,每次取样约 1 g 污泥(湿重),于 -70 °C 冰箱冻存储备用.



1. SBR 反应器 2. 搅拌器 3. 进水泵 4. 出水电磁阀 5. 空气泵;
6. 空气流量计 7. 溶氧仪 8. 时序控制器 9. 曝气头

图 1 试验装置

Fig. 1 Pilot experimental system

1.2 活性污泥总 DNA 提取与纯化

参考 Oved 等^[8]的方法并进行了一些修改,具体步骤为:1.5 mL 灭菌离心管加入 0.2 g(湿重)活性污泥样品,离心,用超纯水清洗 2 遍;加入 1.0 mL pH 8.0 TE 溶液,100 μ L PVP,100 μ L SDS,500 mg 样品,465~600 μ m 灭菌玻璃珠 0.6 g;振荡器匀浆 5 min;12 000 r/min 离心 1 min,上清转移干净离心管,加入 1/10 体积的冰冷乙醇钠(5 mmol/L),冰上放置 10 min;12 000 r/min 离心 5 min,上清转移干净离心管,加入 1 mL 冰冷异丙醇,沉淀,冰上放置 30 min;12 000 r/min 离心 10 min,用 70% 乙醇洗沉淀,TE 溶解 20~50 μ L(10 mg/L Rnase 稀释 10 倍,加入 0.6 μ L).粗提 DNA 采用 Wizard DNA Clean-Up System Kit

(Promega, USA) 纯化, -20 °C 保存.

1.3 PCR 扩增

扩增引物为上海生工合成的细菌 16S rDNA 通用引物 968F-GC(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG AAC GCG AAG AAC CTT AC-3')和 1401R(5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3')^[9].50 μ L 反应体系内含有 1 \times PCR buffer,2 mmol/L MgCl₂,dNTPs 200 μ mol/L,引物各 30 pmol,Taq DNA polymerase(Promega)1 单位,模板 DNA 40 ng.PCR 反应条件为热启动结合降落 PCR,具体为:反应体系内先不加 Taq 酶,94 °C 预变性 4 min,然后迅速加入 Taq 酶,94 °C 1 min,65 °C;1 min,72 °C 1 min,每循环退火温度降低 0.5 °C,共 20 个循环,然后接 94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 1 min 循环共 10 个,72 °C 延伸 10 min,扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.4 DGGE 分析

扩增的 50 μ L PCR 产物直接在 DCode System (Bio-Rad, USA) 上进行电泳,变性梯度范围为 30%~60%,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 6.5%,200 V 预电泳 10 min,100 V 电泳 10~11 h.温度恒定为 60 °C.电泳结束后,凝胶以 0.5 μ g/mL 的溴化乙锭溶液染色,洗涤数次后于 GelDoc2000 凝胶成像系统(BioRad, USA)上成像检测.

1.5 条带测序结果分析及 DGGE 聚类分析

在紫外灯下切下 DGGE 条带,洗净后浸泡于 50 μ L 无菌 Milli-Q 水中 24 h 以上,取 2 μ L 进行 PCR 扩增,扩增产物经 DGGE 确认为单一条带后,送交测序公司(诺赛,北京)测序.

将测定的序列用 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),对 GenBank 数据库中的序列进行相似性搜索,并从中获取相近的典型菌株 16S rRNA 基因序列,采用 ClustalX^[10]排序,基于 Kimura-2^[11]模型构建系统进化树,自展数为 1 000.

凝胶聚类分析采用凝胶成像分析软件 Quantity One^[12]进行分析.采用 UPGMA 法(Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages)对 DGGE 图谱进行聚类分析,采用 Dice coefficient 法根据电泳图谱对样品进行相似性分析^[13,14].样品中得微生物群落多样性根据 Shannon 指数 H 计算.计算公式为:

$$H = - \sum (n_i/N) \lg (n_i/N)$$

式中, n_i 为每条电泳条带光密度峰值, N 是同一泳道中所有条带光密度峰值总和^[15,16],电泳条带

光密度的峰值通过分析软件 Quantity One[®] 进行读取。

1.6 细菌分离、培养、鉴定、保藏方法

参照俞毓馨等^[17]的方法进行,取 1 g 活性污泥,以无菌生理盐水制成 10 倍梯度系列稀释液,分别取 0.1 mL 涂布于 LB 或者稀释 LB 平板上,30℃ 培养 3 ~ 5 d。在适当的稀释倍数的平板上尽量挑取形态不同的菌落进行进一步纯化,纯化后的菌种一部分制备甘油管冻存,用于保藏的菌株培养至 D_{600} 约 0.3 ~ 0.4,取 0.7 mL 菌液于灭菌的 1.5 mL 离心管中,加入 0.3 mL 含 50% 甘油的灭菌 LB 培养基,混匀后于 -70℃ 保藏。另一部分提取基因组 DNA,采用 27f 和 1492R 扩增 16S rRNA 基因^[18],送交测序公司(诺赛,北京)测序,提交 GenBank 进行测序,并初步分类鉴定。

1.7 分离细菌对 4 种污染物质降解能力的测试

对于 4-硝基酚和 2,4-二硝基酚降解能力,挑选在 LB 平皿上分离纯化的细菌菌落,在加有 50 ~ 100 mg/L 4-硝基酚或 2,4-二硝基酚的基础无机盐琼脂平皿上点种,培养。因加有该类硝基酚化合物的固体培养基呈黄绿色,故观察点种后生长的菌落周围培养基呈现出的黄颜色是否消失或减弱;此外,用反应器样品稀释液直接在该类平皿上涂布的,也采用上述同样方式培养、观察,与无点种细菌的对照平皿比较,菌落周围黄颜色消失的视为降解阳性;对于硝基苯和苯胺降解测试,采用液体 MS 培养基,投加 100 mg/L 的硝基苯或苯胺,并设置空白对照,挑选在 LB 平皿上分离纯化的细菌菌落接种,摇床 30℃ 培养,试管塞紧,并用 PARAFILM 膜密封。定期测试液体硝基苯或苯胺的浓度,与空白对照相比确定是否降解。样品处理采用 13 000 r/min 离心 10 min,吸取 0.5 mL 上清液,加入等体积的乙酸乙酯,混匀萃取,离心,取上层的有机相,在微孔滤器(0.22 μ m)上过滤,吸取 5 μ L 滤液,注入 HPLC 中检测。

1.8 分离细菌芳烃开环双加氧酶酶活测定

待测酶活的菌株接入 LB 培养基或者投加降解污染物的 MSB 培养基中,于 30℃,130 r/min 的摇床振荡培养,待 D_{600} 为 0.2 时,8 000 r/min 离心收集 100 mL 培养液中的细胞,用 pH 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次,然后重悬于 1 mL 相同的缓冲液中制成细胞悬液,细胞悬液经过超声处理(200 W,每次 3 s,间隔 5 s,共 90 次),于 4℃,20 000 r/min 离心 30 min,其上清液即为细胞裂解液。

邻苯二酚 1,2-双加氧酶、邻苯二酚 2,3-双加氧

酶、偏苯三酚 1,2-双加氧酶、原儿茶酸 3,4-双加氧酶、龙胆酸 1,2-双加氧酶、2-氨基苯酚 1,6-双加氧酶酶活测试参见文献[7]。

2 结果与分析

2.1 DGGE 图谱的细菌多样性统计分析

DGGE 电泳结果如图 2 所示,可以看出,在不同运行时期样品里,条带数目都比较少,这可能是由于环境选择压力较大(4 种进水污染物均为难降解有机物)所致。将图 2 中优势条带进行切胶测序,所有切下的条带都成功进行了测序,结果见表 1。所有测序图背景值很小,说明这些条带都代表了单一的菌种。

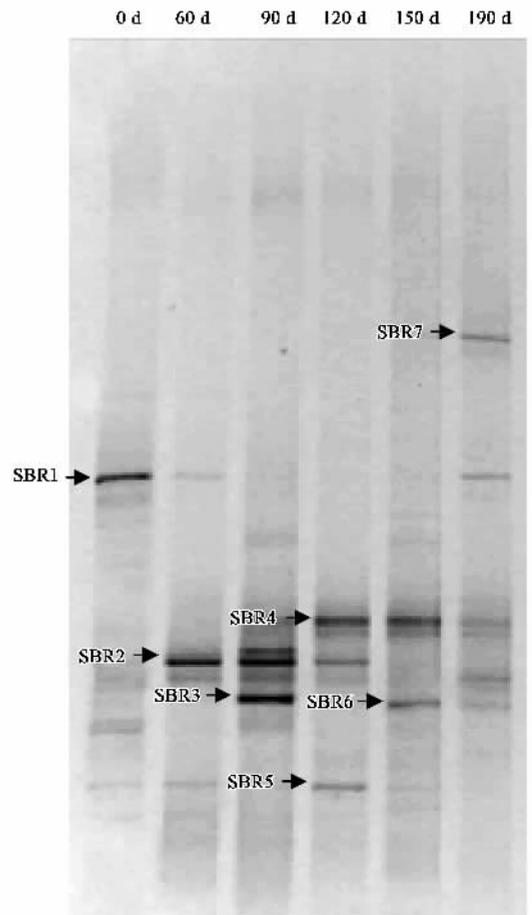


图 2 不同样品的 DGGE 电泳结果

Fig. 2 DGGE analysis of different sample

图 3 为 DGGE 图谱聚类分析,从中可以看出,反应器启动污泥(0 d)与稳定运行的 190 d 污泥条带聚类在了一起,而启动污泥取自某化工厂污水处理厂,该污水处理厂连续运行已经 10 多年,因此可以判定 190 d 反应器内污泥菌群结构也趋于稳定。虽然启动

表 1 DGGE 不同泳道细菌群落相似性分析/%

Table 1 Different lane bacterial structure similarity analysis /%

	0 d	60 d	90 d	120 d	150 d	190 d
0 d	100	28.9	24.7	24	17.7	41.5
60 d	28.9	100	34.6	37.4	6.8	7.5
90 d	24.7	34.6	100	45.1	47.1	37.7
120 d	24	37.4	45.1	100	60.7	24.1
150 d	17.7	6.8	47.1	60.7	100	35.5
190 d	41.5	7.5	37.7	24.1	35.5	100

污泥和 190 d 污泥细菌种群结构相似,2 种污泥对污染物去除效果却有很大差别,推测可能是因为启动污泥内本来就存在 4 种污染物降解菌,由于运行工况不合理,处理效果较差,工况调整稳定后,降解菌作用得到较好发挥,故处理效果较好。而 60 d 由于反应器处理效果不好,大量污泥解体,因此其微生物结构与其余的几个时期不同,单独成一支,而 90、120 和 150 d 的污泥聚为一支,这是由于 90~150d 属于提高负荷期,因此这 3 个样品微生物结构互相类似。表 1 为 DGGE 不同泳道细菌群落相似性分析,与图 3 能得到同样的结果。0 d 与 190 d 相似,60 d 与其他样品相似性较低,90、120 和 150 d 样品也较为相似。

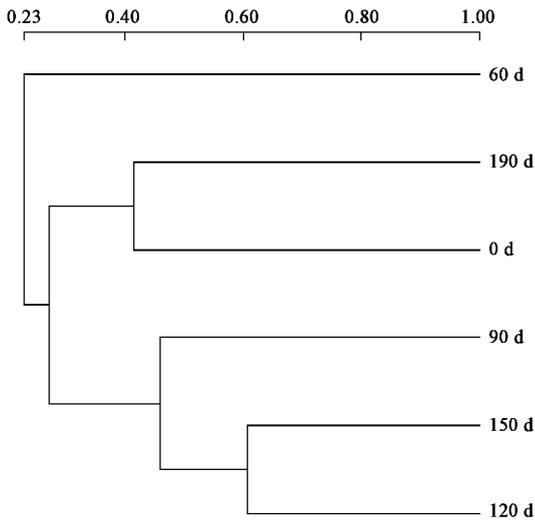


图 3 对不同时期样品 DGGE 条带带型的 UPGMA 方法聚类分析

Fig. 3 Analysis DGGE pattern by the clustering method using UPGMA method with arithmetic averages

图 4 为 DGGE 不同泳道的多样性分析,从中可以看出 0~60 d,反应器内污泥微生物多样性逐渐减少,这可能是由于 4 种进水污染物毒性较大,而相当一部分接种污泥内的细菌无法适应如此毒性较大的环境,纷纷死亡导致,而从 60~90 d,污泥微生物多

样性有所增加,这可能是由于选择性的培养出了降解细菌,在共代谢的作用下,使得原本活性受抑制的细菌活性恢复所致,而后一阶段,90~120 d,多样性减少,这可能是由于进水 4 种污染负荷提升,导致一些细菌无法适应存有高浓度 4 种毒性物质的环境,因而使得多样性减少。120~190 d 多样性又有增加,则可能是由于经过一段时间的运行,污泥内菌群逐渐适应高污染物浓度环境。对比启动污泥样品(0 d)和最终运行稳定的污泥样品(190 d),启动污泥多样性大于稳定运行的 190 d 样品,说明 4 种污染物毒性还是对微生物菌群结构有一定的毒害作用,使得反应器内菌群多样性在一定程度上减少。另外,启动污泥取自污水处理厂,而污水处理厂进水中碳源的复杂性也是导致启动污泥细菌多样性较为丰富的原因之一。

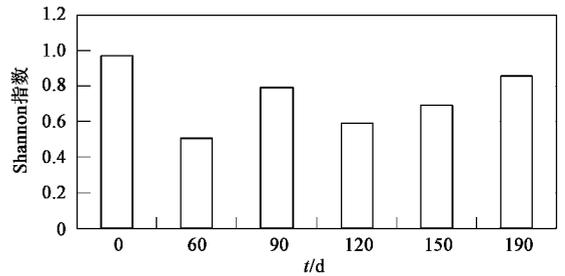


图 4 DGGE 不同泳道多样性分析

Fig. 4 Different DGGE lane diversity index analysis

2.2 DGGE 测序条带细菌系统发育分析

成功测序的条带结果如表 2 所示。对这些序列构建系统进化树如图 5 所示,从中可以看出,不同样品所展示的优势菌群多样性较少。这些条带代表的细菌类群分属于 *Acidobacteria* (SBR1, SBR7)、*Proteobacteria* (SBR2, SBR3, SBR6) 和 *Actinobacteria* (SBR4, SBR5)。

Acidobacteria 广泛存在于土壤中,有研究指出此类细菌是土壤微生物中的活跃种群^[19, 20], *Proteobacteria* 则包含了 72 个已命名科和 429 个已经命名的属^[21], 在各类环境中均存在大量此类群细菌。*Actinobacteria* 在近几年研究中发现^[22], 在脂肪烃和芳烃污染的土壤中属于优势类群,说明这类细菌在芳烃降解中可能起很重要的作用。

将各时期出现的优势菌进行了总结,如表 3 所示,从中可以看出在整个反应器启动过程中,反应器内优势菌群有明显的变化,在反应器启动(0 d)及 60 d 样品,反应器内优势细菌为 *Acidobacteria*

表 2 DGGE 优势条带序列 BLAST 比对结果

Table 2 Dominant DGGE bands BLAST result

DGGE 条带	可能的类群	GenBank 登录号	数据库中最相近种或克隆	相似性/%
SBR1	<i>Acidobacteria</i>	EU251149	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone AKYG1109 (AY921847)	96
SBR2	γ - <i>Proteobacteria</i>	EU251146	<i>Pseudomonas putida</i> (DQ111772)	98
SBR3	δ - <i>Proteobacteria</i>	EU251150	Uncultured <i>Geobacter</i> sp. clone NSK AF404348)	90
SBR4	<i>Actinobacteria</i>	EU251151	<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i> (Y17228)	99
SBR5	<i>Actinobacteria</i>	EU251147	<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i> (Y17228)	99
SBR6	β - <i>Proteobacteria</i>	EU251152	<i>Beta proteobacterium</i> OS-19(AB076848)	97
SBR7	<i>Acidobacteria</i>	EU251148	Uncultured <i>Acidobacterium</i> group bacterium clone SBR1013(AF368180)	95

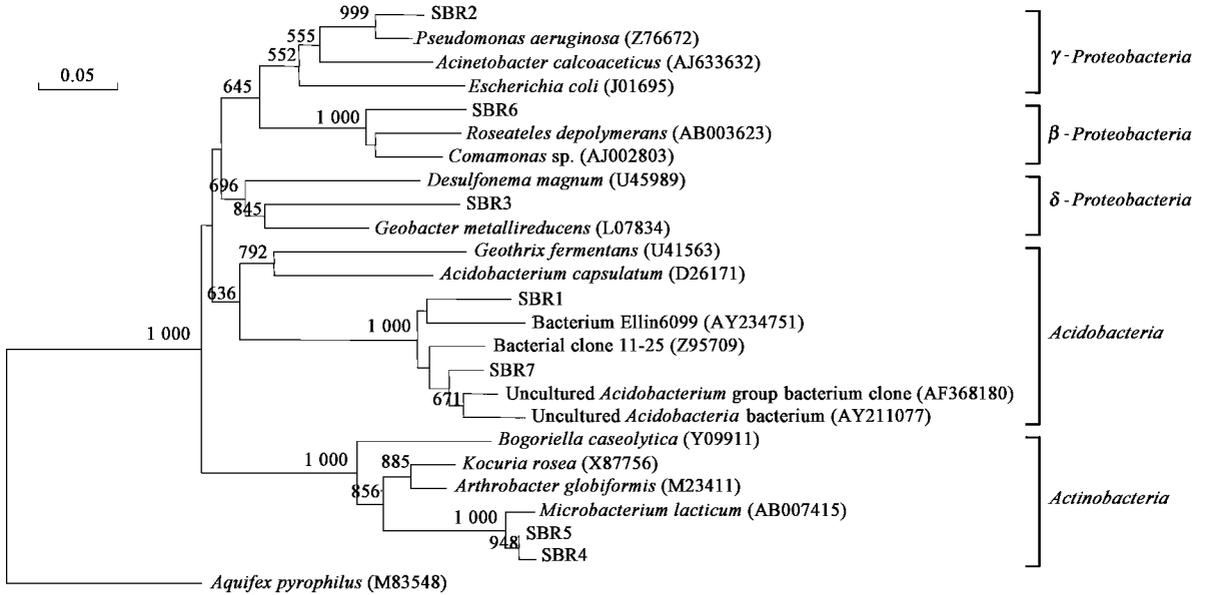


图 5 DGGE 切胶测序条带同相似序列构建的系统进化树

Fig. 5 Relationships of sequences derived from DGGE bands to previously documented sequences

(SBR1) γ -*Proteobacteria* (SBR2) 和 *Actinobacteria* (SBR5) ,自 90 d 起 ,由于反应器已经可以稳定降解进水中各种污染物 ,新的条带(SBR3)出现 ,而这一条带属于 δ -*Proteobacteria* ,而在运行周期减少到 8 h 后 ,这一条带消失了 ,说明这一类群的细菌可能不适应 8 h 运行周期下高有机负荷的工况 .从 150 d 的条带可以看出 ,由于反应器运行周期进一步缩短至 6 h ,对比 120 d 的带型来看 ,显得条带较多 ,这可能是由于反应器内已经存在降解菌群 ,且处理效果很好 ,因此细菌多样性有所增加 .同 120 d 带型相比 ,SBR4 仍然存在 ,由于 SBR4 和 SBR5 序列相似性为 99% ,而 SBR5 在 0、60、90 和 120 d 持续存在 ,而且信号增强 ,说明这类细菌在 4 种污染物降解过程中可能起很重要的作用 .在稳定运行的 190 d ,反应器内菌群多样性增多 ,优势菌群为 *Acidobacteria* (SBR1 , SBR7) *Actinobacteria* (SBR4) 和 β -*Proteobacteria* (SBR6) ,而 γ -*Proteobacteria* (SBR2) 的消失可能也是

表 3 DGGE 分析各时期污泥优势菌

Table 3 Dominant bacterial groups in different sample showed by DGGE analysis

时间/d	条带	可能的类群
0	SBR1	<i>Acidobacteria</i>
	SBR5	<i>Actinobacteria</i>
	SBR2	<i>Gammaproteobacteria</i>
60	SBR2	<i>Gammaproteobacteria</i>
	SBR5	<i>Actinobacteria</i>
90	SBR2	<i>Gammaproteobacteria</i>
	SBR3	<i>Deltaproteobacteria</i>
	SBR4	<i>Actinobacteria</i>
120	SBR4	<i>Actinobacteria</i>
	SBR2	<i>Gammaproteobacteria</i>
150	SBR5	<i>Actinobacteria</i>
	SBR4	<i>Actinobacteria</i>
190	SBR6	<i>Betaproteobacteria</i>
	SBR7	<i>Acidobacteria</i>
	SBR1	<i>Acidobacteria</i>
190	SBR4	<i>Actinobacteria</i>
	SBR6	<i>Betaproteobacteria</i>

由于无法适应后期的高负荷所致. *Acidobacteria* (SBR1) 在启动污泥(0 d)里存在,但在 60 d 的信号减少并在后面 120 和 150 d 消失,却又在 190 d 出现,说明这一类群细菌虽然不是降解 4 种污染物的主要菌群,但能够耐受这几种污染物,或者能够代谢降解中间产物.

2.3 分离细菌初步统计鉴定及酶活测试

在反应器运行稳定后 190 d 反应器样品液经常规系列稀释后,在 LB 或 1/20 LB 琼脂平皿上涂布,涂布后的平皿放置在 30℃ 温箱保温培养,生长至一定时间后(通常 3~7 d)后,从平皿上挑选有代表性的细菌菌落,划线纯化,共计 90 株.另外,测试了分离细菌对于 4 种污染物的降解能力,并通过 16S rRNA 基因序列和生理生化指标将 90 株细菌初步分类,见表 4.从中可以看出,分离细菌中的大部分为 *Actinobacteria* 和 γ -*Proteobacteria*,分别占 50% 和 36%.而此部分分离细菌与 16S rRNA 基因建库及 DGGE 条带测序结果均没有重复序列,说明这几种方法各自倾向性不同,反映了污泥中细菌菌群的不同类群.

为了进一步了解反应器内 4 种污染物的降解途径,测试了表 5 所列 5 株降解菌在 LB 培养基和 MS 培养基加上底物上的各开环酶酶活.在 LB 培养基

上生长的各株细菌均无法测到 6 种双加氧酶酶活,而在 MS 培养基+底物上生长的细菌中,LW9、LW18 和 LW21 测到偏苯三酚 1,2-双加氧酶酶活,LW15 和 LW19 测到邻苯二酚 2,3-双加氧酶酶活.LW14 无法测到 6 种双加氧酶酶活.

表 4 分离细菌菌株及含氮芳烃降解菌在各门级分类单元的分布

Table 4 Bacterial populations based on isolated bacterial strains, and nitrogen-containing aromatic degraders from the sequencing batch reactor system

细菌类群	分离菌株数目	降解 4 种污染物的菌株数目		
		NB	4-NP	2,4-DNP
<i>Actinobacteria</i>	45	5 ¹⁾	17 ²⁾	12 ³⁾
<i>Bacteroidetes</i>	4	0	0	0
<i>Firmicutes</i>	5	0	0	0
α - <i>Proteobacteria</i>	1	0	0	0
β - <i>Proteobacteria</i>	3	0	0	0
γ - <i>Proteobacteria</i>	32	0	0	2
总和	90	5	17	14

1) 4 株 NB 降解菌属于 *Rhodococcus* 属(16S rRNA 基因相似性 > 98%), 1 株 NB 降解菌属于 *Arthrobacter* 属; 2) 11 株 4-NP 降解菌属于 *Rhodococcus* 属(16S rRNA 基因相似性 > 98%), 6 株 4-NP 降解菌属于 *Arthrobacter* 属; 3) 5 株 2,4-DNP 降解菌属于 *Rhodococcus* 属(16S rRNA 基因相似性 > 98%), 2 株 2,4-DNP 降解菌属于 *Pseudomonas* 属, 4 株 2,4-DNP 降解菌属 *Janibacter* 属

表 5 反应器内分离的 5 株含氮芳烃降解菌

Table 5 Nitrogen-containing aromatic degraders isolated from the reactor

代表	数量	可能的类群	数据库中最接近种	相似性/%	功能
LW9	2	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcuszopfii</i> DSM 44108T(AF191343)	100	降解 4-NP
LW21	3	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter nicotianae</i> DSM2012(X80739)	98	降解 4-NP
LW18	1		failure to sequence		降解 4-NP
LW15	2	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus ruber</i> DSM 43338T(X80625)	100	降解 NB
LW14	2	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus ruber</i> DSM 43338T(X80625)	100	降解 2,4-DNP

3 讨论

在前期研究中,笔者采用 16S rRNA 基因克隆文库的方法,研究了反应器内微生物种群结构的动态变化^[7],而在本研究中则采用 PCR-DGGE 及传统微生物学研究方法进行研究,从方法学上来看,分子生物学方法如 16S rRNA 基因建库、DGGE 以及传统分离培养方法所获得的数据无法在种级分类单元上相互对应,说明这几种方法都存在各自的倾向性.引物 968-GC 和 1401R 相比扩增全长 16S rRNA 基因的引物,对于 *Actinobacteria* 类群具有偏好性,但对于 CFB 类群却无法得到较好信号.另外 DGGE 分析所得的优势菌群与克隆文库所得优势菌群对于

Proteobacteria 类群的偏向性基本相同. DGGE 和克隆文库对 190 d 样品的研究均能获得的优势类群为 *Actinobacteria*,其在分离的菌株里占 50%,且大部分分离的降解细菌均属于此类群,说明这类细菌在反应器内对含氮芳烃的降解起重要作用.

在前期研究中,也对反应器污泥几种双加氧酶酶活进行了分析^[7],发现在反应器内硝基苯和苯胺经由邻苯二酚 2,3-双加氧酶介导的开环途径被降解,4-硝基酚经由偏苯三酚 1,2-双加氧酶介导的开环途径被降解,而 2,4-二硝基酚在反应器内降解途径仍不清楚.而在本研究中,进一步获得了 5 株降解菌,而酶活分析也表明结果与前期研究能够互相印

证.结合前期研究,推测反应器内4种污染物的降解如图6所示.

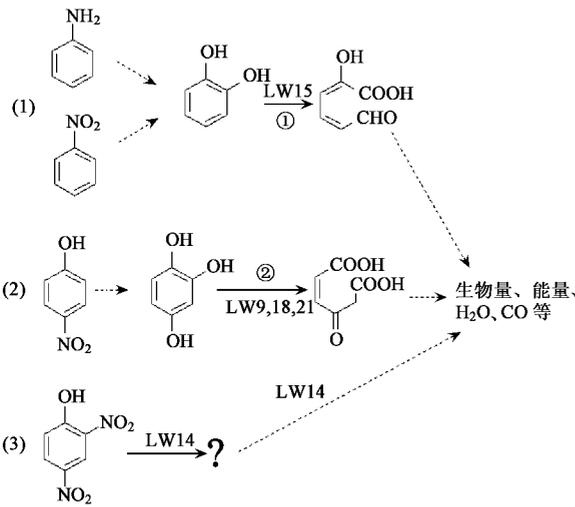


图6 反应器内4种含氮芳烃降解示意

Fig.6 Sketch map of how the four nitrogen-containing aromatic compounds were degraded in the reactor

4 结论

(1)细菌种群结构自启动至稳定运行期变化明显, *Acidobacteria* (SBR1, SBR7)、*Actinobacteria* (SBR4)和 β -*Proteobacteria* (SBR6)等类群细菌对含氮芳烃化合物降解可能起重要作用.

(2)不同的研究微生物多样性的方法如16S rRNA基因建库,PCR-DGGE,以及传统分离培养方法所获得的数据无法在种级分类单元上相互对应,说明这几种方法都存在各自的倾向性,反应了污泥中细菌菌群的不同类群.

(3)在分离的90株细菌中,36株能够降解含氮芳烃类物质, *Actinobacteria*类群细菌为优势类群.5株降解菌双加氧酶酶活测试表明,在反应器内硝基苯和苯胺经由邻苯二酚2,3-双加氧酶介导的开环途径被LW15所降解,4-硝基酚经由偏苯三酚1,2-双加氧酶介导的开环途径被LW9、LW18和LW21所降解,2,4-二硝基酚经由未知途径被LW14所降解.

致谢:在文章写作过程中,得到了瑞士苏黎世工学院Josef Zeyer教授的大力帮助,在此表示感谢.

参考文献:

[1] Majumder P S, Gupta S K. Hybrid reactor for priority pollutant nitrobenzene removal[J]. *Water Res*, 2003, **37**(18):4331-4336.
 [2] Dickel O, Haug W, Knackmuss H J. Biodegradation of nitrobenzene by a sequential anaerobic-aerobic process.[J]. *Biodegradation*, 1993, **4**:187-194.
 [3] Karim K, Gupta S K. Biotransformation of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket reactors[J]. *Bioresour Technol*, 2001, **80**

(3):179-186.

[4] Donlon B A, Razo-Flores E, Field J A, et al. Toxicity of N-substituted aromatics to acetoclastic methanogenic activity in granular sludge[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(11):3889-3893.
 [5] Tomei M C, Annesini M C, Bussolotti S. 4-nitrophenol biodegradation in a sequencing batch reactor: kinetic study and effect of filling time[J]. *Water Res*, 2004, **38**(2):375-384.
 [6] She Z, Gao M, Jin C, et al. Toxicity and biodegradation of 2,4-dinitrophenol and 3-nitrophenol in anaerobic systems[J]. *Process Biochemistry*, 2005, **40**:3017-3024.
 [7] Liu X Y, Wang B J, Dai X, et al. Simultaneous biodegradation of multiple nitrogen-containing aromatic compounds (NACs) in a sequencing batch bioreactor[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, **19**:530-535.
 [8] Oved T, Shaviv A, Goldrath T, et al. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(8):3426-3433.
 [9] Pereira M A, Roest K, Stams A J M, et al. Molecular monitoring of microbial diversity in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors treating oleic acid[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **41**:95-103.
 [10] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **24**:4876-4882.
 [11] Kimura M A. A simple method for estimating evolutionary rates base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *J Mol Evol*, 1980, **16**:111-120.
 [12] Bio-Rad. QuantityOne® User Guide for Version 4.2[M]. Bio-Rad Laboratories 2000.
 [13] Rasiah I A, Wong L, Anderson S A, et al. Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms[J]. *Arch Oral Biol*, 2005, **50**(9):779-787.
 [14] Van Der Gucht K, Sabbe K, De Meester L, et al. Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes[J]. *Environ Microbiol*, 2001, **3**(11):680-690.
 [15] Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, et al. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns[J]. *Environ Microbiol*, 2002, **4**(11):634-643.
 [16] Gafan G P, Lucas V S, Roberts G J, et al. Statistical analyses of complex denaturing gradient gel electrophoresis profiles[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, **43**(8):3971-3978.
 [17] 俞毓馨, 吴国庆, 孟宪庭. 环境工程微生物检验手册[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.
 [18] Liu X Y, Wang B J, Jiang C Y, et al. *Paracoccus sulfuroxidans* sp. nov., a sulfur oxidizer from activated sludge[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, **56**:2693-2695.
 [19] Axelrod P E, Chow M L, Radomski C C, et al. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance[J]. *Can J Microbiol*, 2002, **48**(7):655-674.
 [20] Furlong M A, Singleton D R, Coleman D C, et al. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(3):1265-1279.
 [21] Garrity G M, Winters M, Searles D B. Taxonomic outline of the prokaryotic genera, release 1.[M]. New York: Springer, 2001.
 [22] Saul D J, Aislabie J M, Brown C E, et al. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, **53**(1):141-155.