

# 百乐克(BIOLAK)活性污泥宏基因组的生物多样性及功能分析

田美<sup>1,2</sup>, 刘汉湖<sup>1\*</sup>, 申欣<sup>2,3</sup>, 赵方庆<sup>3</sup>, 陈帅<sup>3</sup>, 姚永佳<sup>4</sup>

(1. 中国矿业大学环境与测绘学院, 徐州 221116; 2. 淮海工学院海洋学院, 连云港 222005; 3. 中国科学院北京生命科学研究院, 北京 100101; 4. 连云港恒隆水务有限公司, 连云港 222002)

**摘要:** 百乐克(BIOLAK)是一种在全球范围内得到成功推广的多级活性污泥工艺,然而,迄今对于百乐克工艺的核心元件——活性污泥的生物群落及其功能尚鲜见报道。以连云港市大浦工业区污水处理厂为例,借助于新一代高通量测序技术,获得百乐克活性污泥中大规模的宏基因组数据(428 588条高质量DNA序列)。鉴定出47个门类、872个属及1351个物种。细菌域(289 933条序列)中包含33个门,其中变形菌门 Proteobacteria 是生物量最丰富的门(62.54%),其次是拟杆菌门 Bacteroidetes(11.29%)、硝化螺旋菌门 Nitrospirae(5.65%)和浮霉菌门 Planctomycetes(4.79%),显示这些生物类群在百乐克废水处理系统中发挥着关键作用。在748个细菌属中,硝化螺菌属 *Nitrospira* (5.60%)最为丰富,为活性污泥氮循环过程中的关键菌群。其次为芽单胞菌属 *Gemmatimonas* (2.45%),是生物除磷过程的重要菌属。在古菌域(1 019条序列)中鉴定出3个门及39个属。在真核域(1 055序列)鉴定出10个门及60个属,其中纤毛虫门 Ciliophora 是最大的门(257条序列)。同时,检测到448条病毒序列,主要为噬菌体。在百乐克活性污泥中,参与氮、芳香化合物和磷代谢的功能基因比例分别为2.50%、2.28%和1.56%,均高于美国和澳大利亚两个污水处理厂活性污泥中功能基因的比例。在氮代谢的4个过程中,反硝化相关基因所占比重最高,达到80.81%,其次是氨化(12.78%)、硝化(4.38%)和固氮(2.04%)。总之,在百乐克活性污泥中蕴藏着惊人的生物多样性,同时,参与氮、芳香化合物和磷代谢的功能基因非常丰富。

**关键词:** 百乐克(BIOLAK); 宏基因组; 活性污泥; 生物多样性; 氮代谢; 反硝化

中图分类号: X172; X703 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2015)05-1739-10 DOI: 10.13227/j.hjxk.2015.05.032

## Biodiversity and Function Analyses of BIOLAK Activated Sludge Metagenome

TIAN Mei<sup>1,2</sup>, LIU Han-hu<sup>1\*</sup>, SHEN Xin<sup>2,3</sup>, ZHAO Fang-qing<sup>3</sup>, CHEN Shuai<sup>3</sup>, YAO Yong-jia<sup>4</sup>

(1. School of Environment Science and Spatial Informatics, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, China; 2. College of Marine Science, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 3. Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 4. Lianyungang Henglong Water Co., Ltd., Lianyungang 222002, China)

**Abstract:** The BIOLAK is a multi-stage activated sludge process, which has been successfully promoted worldwide. However, the biological community and function of the BIOLAK activated sludge (the core component in the process) have not been reported so far. In this study, taking Lianyungang Dapu Industrial Zone WWTP as an example, a large-scale metagenomic data (428 588 high-quality DNA sequences) of the BIOLAK activated sludge were obtained by means of a new generation of high-throughput sequencing technology. Amazing biodiversity was revealed in the BIOLAK activated sludge, which included 47 phyla, 872 genera and 1 351 species. There were 33 phyla identified in the Bacteria domain (289 933 sequences). Proteobacteria was the most abundant phylum (62.54%), followed by Bacteroidetes (11.29%), Nitrospirae (5.65%) and Planctomycetes (4.79%), suggesting that these groups played a key role in the BIOLAK wastewater treatment system. Among the 748 bacterial genera, *Nitrospira* (5.60%) was the most prevalent genus, which was a key group in the nitrogen cycle. Followed by *Gemmatimonas* (2.45%), which was an important genus in the biological phosphorus removal process. In Archaea domain (1 019 sequences), three phyla and 39 genera were detected. In Eukaryota domain (1 055 sequences), 60 genera and 10 phyla were identified, among which Ciliophora was the largest phylum (257 sequences). Meanwhile, 448 viral sequences were detected in the BIOLAK sludge metagenome, which were dominated by bacteriophages. The proportions of nitrogen, aromatic compounds and phosphorus metabolism in the BIOLAK sludge were 2.50%, 2.28% and 1.56%, respectively, which were higher than those in the sludge of United States and Australia. Among four processes of nitrogen metabolism, denitrification-related genes were most abundant (80.81%), followed by ammonification (12.78%), nitrification (4.38%) and nitrogen fixation (2.04%). In conclusion, the BIOLAK activated sludge had amazing biodiversity, meanwhile, functional genes involved in nitrogen, aromatic compounds and phosphorus metabolism were very abundant.

**Key words:** BIOLAK; metagenome; activated sludge; biodiversity; nitrogen metabolism; denitrification

收稿日期: 2014-11-04; 修订日期: 2014-12-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(41430643)

作者简介: 田美(1979~),女,博士研究生,主要研究方向为水处理生物技术, E-mail: genomeresearch@163.com

\* 通讯联系人, E-mail: hanhucumt@sina.com

据估算地球上存在  $10^6 \sim 10^8$  种微生物,而且其中绝大多数无法通过常规方法获得纯培养<sup>[1]</sup>. 传统的宏基因组学研究策略,一般先采用 PCR 等方法扩增目的基因(譬如 16S rRNA)片段,然后构建文库进行测序<sup>[2,3]</sup>. 然而,这种研究策略存在的问题是:不存在针对所有生物类群(细菌、古菌、动物、植物和真菌)的“通用引物”,因此,最优化的 PCR 也只能得到部分生物类群信息,从而造成群落信息的残缺. 近年来,高通量测序(high-throughput sequencing)技术得到快速发展,如 Illumina、454 焦磷酸测序和 SOLiD 等<sup>[4-6]</sup>. 高通量测序技术是对传统测序的一次革命性改变,可以同时几十万到几百万条(甚至更多)DNA(或 RNA)分子进行序列测定,因此在有些文献中称其为下一代测序技术(next-generation sequencing),足见其划时代的价值和影响,突出特点是测序通量高、测序成本和时间显著下降. 新一代测序技术问世之后,在重要物种基因组解析、模式物种重测序、生物医学、古基因组学和生物进化等领域得到广泛应用,为相关的学科领域带来革命性的影响. 最近,高通量测序作为新兴的方法被应用到研究不同生境的生物群落及其功能,如人的肠道<sup>[7-10]</sup>、海洋<sup>[11-13]</sup>、土壤<sup>[14,15]</sup>和动物肠道<sup>[16-18]</sup>等.

百乐克(BIOLAK)处理工艺是一种生物脱氮除磷的多级活性污泥工艺. 百乐克工艺具有以下优点:高效的生物脱氮除磷性能、对污染物浓度变化的缓冲能力强、工艺稳定性高,以及能源消耗、人力成本、空间需求和剩余污泥量较低(www.biolak.de/). 百乐克工艺基于多级 A/O(Anoxic/Oxic,缺氧/好氧)工艺和非稳态理论,可以重复缺氧和好氧过程,从而有效提高了活性污泥的处理性能. 自 1972 年建立第一个工厂以来,目前在全球已经建立超过 750 座不同规模的污水处理厂,服务人口的范围从最少仅有 300 人,到多达 300 万人. 在我国城市污水废水处理中,百乐克工艺已得到成功推广,广泛应用于处理居民生活污水,以及石化、制药、造纸、纺织和食品等各种行业的工业废水<sup>[19,20]</sup>. 然而,到目前为止,对于百乐克工艺的核心元件——活性污泥的生物组成及其功能尚鲜见报道. 本研究借助于新一代高通量测序技术,首次获得百乐克活性污泥中大规模的宏基因组数据,结合现有的其它活性污泥(包括美国和澳大利亚等地污水处理厂中采集的活性污泥)宏基因组的信息,进行比较宏基因组学研究,旨在系统探讨百乐克活性污泥这一典型

的脱氮除磷生物反应器中生物的群落组成及其功能特征.

## 1 材料与方法

### 1.1 百乐克活性污泥样本采集

活性污泥样本采自江苏省连云港市经济技术开发区大浦工业区废水处理厂的曝气池(34.650 038°N,119.177 463°E). 本处理厂为外商(新加坡)独资企业(连云港恒隆水务有限公司),总投资约 2 000 万美元,占地面积 80 000 m<sup>2</sup>. 建设总规模日处理废水 10 万 t,处理工艺采用的是百乐克污水处理工艺,稳定运行数年. 主要处理生活污水和企业预处理后的工业废水,采集活性污泥样本当月的进、出水水质均值为:进水(COD = 177 mg·L<sup>-1</sup>,BOD<sub>5</sub> = 58.5 mg·L<sup>-1</sup>,SS = 108 mg·L<sup>-1</sup>,TN = 32.8 mg·L<sup>-1</sup>,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N = 21.67 mg·L<sup>-1</sup>,TP = 4.12 mg·L<sup>-1</sup>,pH = 7.35)与出水(COD = 58.7 mg·L<sup>-1</sup>,BOD<sub>5</sub> = 3.6 mg·L<sup>-1</sup>,SS = 13 mg·L<sup>-1</sup>,TN = 3.49 mg·L<sup>-1</sup>,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N = 1.72 mg·L<sup>-1</sup>,TP = 1.43 mg·L<sup>-1</sup>,pH = 7.2). 采集的新鲜污泥样本置于冰桶中保鲜,即刻运回实验室. 对悬浮物进行离心(15 min,12 000 r·min<sup>-1</sup>),收集备用.

### 1.2 宏基因组 DNA 的提取和 Illumina 高通量测序

对获取的新鲜污泥样本,在 24 h 内进行 DNA 的提取. 采用 QIAamp DNA 试剂盒(Qiagen),按照试剂盒说明书的要求,进行活性污泥宏基因组 DNA 的分离和纯化. 使用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳(Bio-Rad)和 Nano Drop 分光光度计(Thermo),对分离纯化后的 DNA 进行检测和评价.

将大约 5 μg 纯化后的宏基因组 DNA,破碎回收,按照试剂盒说明书中的实验流程,利用 Paired-end DNA Sample Prep Kit 构建末端配对的 DNA 文库,其插入片段大小约为 180 bp. 制备过程包括在补平的基因组 DNA 片段的反向平行链上引入两个独特的测序引物结合位点和接头序列,然后进行凝胶法大小选择和纯化,从而成功构建配对末端文库. 随后,按照 Illumina 公司提供的标准实验流程,通过 HiSeq 2000 高通量 DNA 测序平台(Illumina)进行测序. 利用自编的脚本程序,对高通量测序平台获得的原始序列进行筛查,进而获得四十多万条高质量的宏基因组 DNA 序列.

### 1.3 生物多样性和功能分析

将获得的大规模的宏基因组数据,使用 MEGAN 5<sup>[21]</sup>和 MG-RAST 宏基因组平台([http://](http://www.metagenomics-analyse.org/)

metagenomics. anl. gov/) [22] 进行分析. 首先将 GenBank 非冗余 (nr) 数据库下载到本地服务器, 进行格式化后, 利用自编的脚本程序, 将新完成的宏基因组序列与非冗余数据库, 进行批量的 BLAST 序列比对, 将序列比对结果加载到 MEGAN 5 软件包中, 进行数据分析, 以统计各个生物类群的丰度. 通过 MG-RAST 宏基因组学研究平台, 获得多个宏基因组数据集 (包括美国和澳大利亚等地污水处理厂中采集的活性污泥宏基因组数据) [23], 进行比较宏基因组学分析. 在域 (domain)、门 (phylum)、属 (genus) 和种 (species) 等多个层级上, 全面分析其生物组成与数量.

同时, 还利用 MEGAN 5 中 SEED 子系统分析宏基因组序列的基因功能 [24]. 在第一层级, 注释后的序列被分 27 个 SEED 子系统, 揭示了宏基因组中生物功能的整体轮廓. 针对百乐克活性污泥在脱氮除磷, 以及硫和化合物代谢方面具有优异性能, 因此, 采用 MEGAN 5 的二级 SEED 子系统, 对参与氮、磷、硫和芳香化合物代谢的功能基因进一步分析. 此外, 为了探讨百乐克活性污泥中, 参与氮代谢的功能基因及代谢通路, 使用 MEGAN 5 提取出与氮循环相关的基因序列, 提交到 GenBank 非冗余数据库中, 使用 BLASTX 进行序列比对, 比对结果利用 KEGG (Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes, 京都基因与基因组百科全书) [24] 进行分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 百乐克活性污泥生物群落概述

共获得的 428 588 条高质量的宏基因组 DNA 序列, 随后使用 MEGAN5 进行生物群落分析. 在百乐克活性污泥生态系统中共检测到 47 个门类、872 个属、1 351 个物种, 这远远超出先前一些活性污泥中所报道的生物多样性 [2 25]. 在 4 个生物域中 (292 455 条序列), 大多数序列归属于细菌域 (289 933 条序列, 99.14%), 其余的序列被分配到真核域 (1 055 条序列, 0.36%)、古细菌域 (1 019 条序列, 0.35%) 和病毒 (448 条序列, 0.15%) (图 1). 值得注意的是, 宏基因组中存在大量的高质量序列 (136 133 条序列, 占总数据量的 31.76%) 并未匹配到以上任何生物域中 (图 1). 这些序列没有与任何生物类群匹配, 意味着与当前生物信息数据库中任何已知生物的序列没有相关性或者与它们的亲缘关系非常远. 因此, 百乐克活性污泥中蕴藏着惊人的生物多样性.

美国和澳大利亚污水处理厂活性污泥宏基因组中共获得 42 个门 [23], 除了古菌域的初古菌门 Korarchaeota (在两个样本中分别检测到 3 条与 4 条序列) 和真核域的眼虫门 Euglenida (在两个样本中分别检测到 3 条与 13 条序列) 外, 其余 40 个门在本活性污泥宏基因组样本中均检测到. 同时, 有 7 个类群在本活性污泥样本中检测获得, 并未在美国和澳大利亚样本中报道. 包括: Ignavibacteriae (1859 条序列)、病毒 Viruses (448 条序列)、Candidatus Saccharibacteria (227 条序列)、Cloacimonetes (40 条序列)、热脱硫杆菌门 Thermodesulfobacteria (36 条序列)、嗜热丝菌门 Caldiserica (9 条序列) 和 Latescibacteria (6 条序列). 其中, Ignavibacteriae 在百乐克污泥宏基因组中为常见类群, 在 47 个门类中排在第 11 位.

### 2.2 细菌域的生物组成与数量

细菌域由 33 个不同门组成, 包括变形菌门 Proteobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、硝化螺旋菌门 Nitrospirae、浮霉菌门 Planctomycetes、绿弯菌门 Chloroflexi、放线菌门 Actinobacteria、芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、酸杆菌门 Acidobacteria、疣微菌门 Verrucomicrobia、厚壁菌门 Firmicutes、蓝菌门 Cyanobacteria、Ignavibacteriae、衣原体门 Chlamydiae、螺旋体门 Spirochaetes、异常球菌-栖热菌门 Deinococcus-Thermus、绿菌门 Chlorobi、Candidatus Saccharibacteria、互养菌门 Synergistetes、海绵杆菌门 Poribacteria、产水菌门 Aquificae、热袍菌门 Thermotogae、黏胶球形菌门 Lentisphaerae、梭杆菌门 Fusobacteria、Cloacimonetes 门、热脱硫杆菌门 Thermodesulfobacteria、脱铁杆菌门 Deferribacteres、产金菌门 Chrysiogenetes、网团菌门 Dictyoglomi、纤维杆菌门 Fibrobacteres、迷踪菌门 Elusimicrobia、软壁菌门 Tenericutes、嗜热丝菌门 Caldiserica 和 Latescibacteria (图 1). 其中, 变形菌门是最丰富的门 (181 316 条序列, 62.54%), 其次是拟杆菌门 (32 728 条序列, 11.29%)、硝化螺旋菌门 (16 379 条序列, 5.65%) 和浮霉菌门 (13 886 条序列, 4.79%). 研究显示它们是百乐克活性污泥中的主要细菌类群, 因此表明, 这些菌群在生物降解过程中发挥着重要作用. 细菌域中其它一些丰富的门类包括: 绿弯菌门 (2.80%)、放线菌门 (2.62%)、芽单胞菌 (2.48%)、酸杆菌门 (1.99%)、疣微菌门 (1.78%) 和厚壁菌门 (1.51%) (图 1).

本宏基因组中共检测得到 748 个细菌属, 其中,

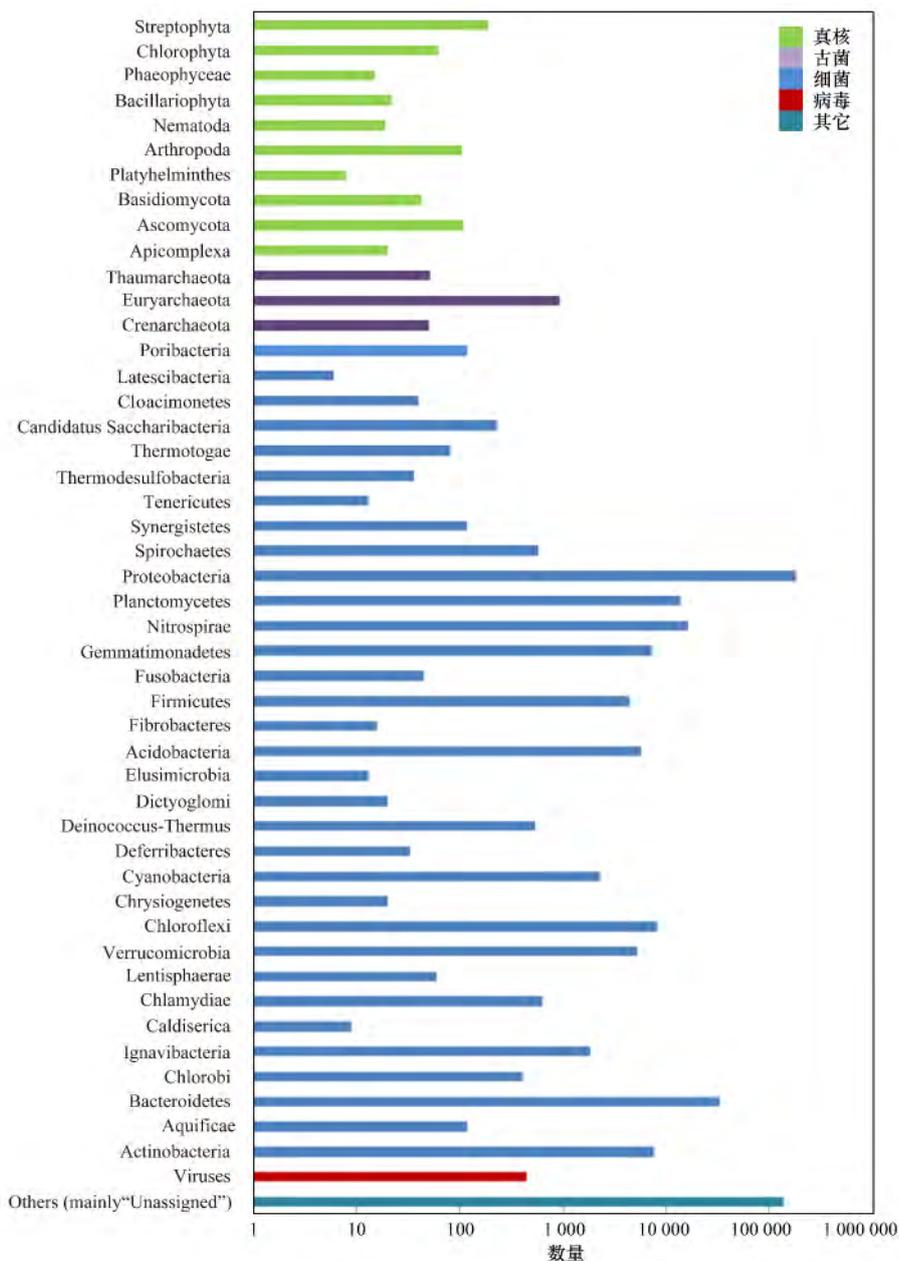


图1 百乐克(BIOLAK)活性污泥宏基因组中生物(门的层级)的组成与数量

Fig. 1 Biological composition and abundance ( phylum level) in the BIOLAK sludge metagenome

硝化螺菌属 *Nitrospira* (5.60%) 为百乐克活性污泥宏基因组的第一大菌属。实际上,硝化螺菌属是活性污泥氮循环过程中至关重要的菌群<sup>[26-31]</sup>。第二大菌属是芽单胞菌属 *Gemmatimonas* (2.45%), 其是生物除磷过程中的重要菌属<sup>[32-33]</sup>。随后是丝杆菌属 *Niastella* (1.35%)、堆囊菌属 *Sorangium* (1.22%) 和生丝微菌属 *Hyphomicrobium* (1.05%) (图2), 它们是丰度最高的5个菌属, 在细菌域所占的比例均超过1%。具有亚硝酸氧化功能的硝化螺菌属、具有氨氧化功能的亚硝化单胞菌属 *Nitrosomonas* 和聚磷菌属 *Candidatus Accumulibacter* 为 A<sup>2</sup>O (Anaerobic /

Anoxic/Oxic, 厌氧/缺氧/好氧) 活性污泥中的常见菌属<sup>[2]</sup>。这些菌属也大量出现在 BIOLAK 活性污泥中(硝化螺菌属: 16238条序列, 亚硝化单胞菌属: 1817条序列, 聚磷菌属: 730条序列) (图2)。在以前的研究中, 参与反硝化作用的副球菌属 *Paracoccus* 和产碱杆菌属 *Alcaligenes* 并未检测到<sup>[2]</sup>。然而, 在本研究中副球菌属和产碱杆菌属均被检出(序列数分别为64和23)。另外, 亚硝化螺菌属 *Nitrosospira* 是一个常见的氨氧化细菌<sup>[34-36]</sup>。在本宏基因组中检出164条序列, 然而, 在近期完成的活性污泥宏基因组中并未检测到<sup>[2]</sup>。

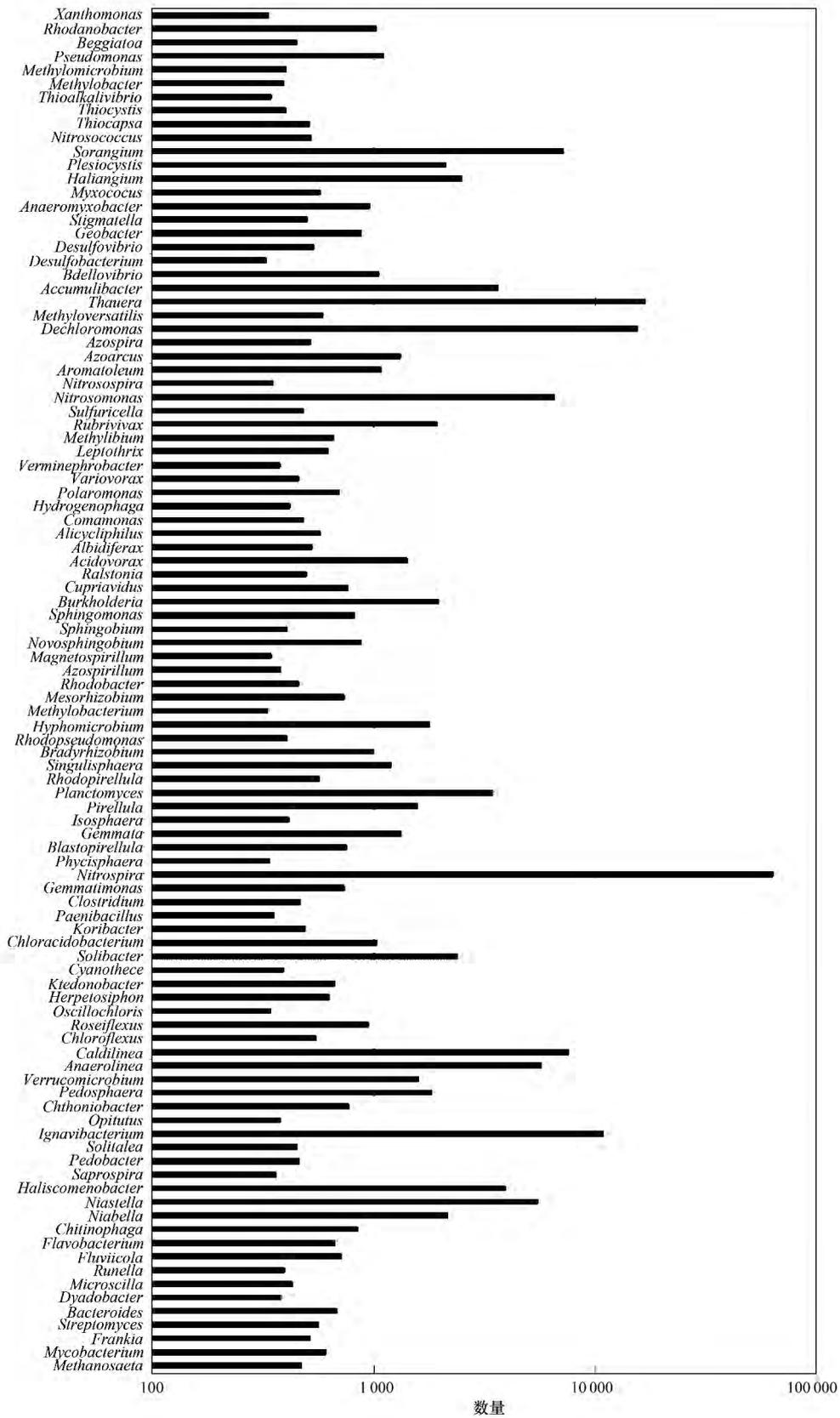


图2 百乐克( BIOLAK) 活性污泥宏基因组中最丰富的 100 个属

Fig. 2 Top 100 most abundant genera in the BIOLAK sludge metagenome

### 2.3 古细菌域、真核域和病毒群落

对于古菌域(1 019条序列),在百乐克活性污泥宏基因组中检测到3个门、39个属. 广古菌门 Euryarchaeota 是最丰富的门(916条序列,占比89.89%),其次为奇古菌门 Thaumarchaeota(52条序列,5.10%)和泉古菌门 Crenarchaeota(51条序列,5.00%)(图1). 此外,对于真核域(1 055序列),共检测到10个门、60个属. 其中,纤毛虫门 Ciliophora 是最大的门(257条序列),其次是链形植物门 Streptophyta(192条序列)和子囊菌门 Ascomycota(111条序列).

在百乐克活性污泥宏基因组中,共检测到448条病毒序列,与先前报道的废水病毒组<sup>[37]</sup>类似,检测到的病毒也是以噬菌体为主. 大多数病毒属于有尾噬菌体目 Caudovirales,分属于肌尾噬菌体科 Myoviridae、短尾噬菌体科 Podoviridae 和长尾噬菌体科 Siphoviridae 等科. 除了有尾噬菌体外,检测到的其它病毒类群包括:拟菌病毒科 Mimiviridae、藻类去氧核糖核酸病毒科 Phycodnaviridae 和虹彩病毒科 Iridoviridae 等. 利用PCR扩增的方法,在先前常规的活性污泥宏基因组研究中均未检测到这些病毒<sup>[2]</sup>,这可能是PCR方法的局限性所致. 活性污泥中存在的噬菌体是维持生态系统平衡的重要组成,并可能会对废水处理效果以及接纳水体产生潜在影响,因此,活性污泥中的病毒类群值得今后深入研究.

### 2.4 百乐克活性污泥的功能分析

利用 MEGAN5 中的 SEED 注释活性污泥中的

功能基因(图3),在第一层级的27个子系统中,碳水化合物相关的功能基因最为丰富(26 865条基因序列,13.51%),其次是毒力相关的基因(20 549条基因序列,10.33%). 其它高丰度的子系统包括氨基酸及其衍生物(19 076条基因序列,9.59%)、蛋白质代谢(16 629条基因序列,8.36%)、呼吸(12 754条基因序列,6.41%)和DNA代谢(12 694条基因序列,6.38%)等(图3). 这些与碳水化合物、氨基酸和蛋白质代谢相关的功能基因,与活性污泥中各个生物类群的生长与存活密不可分. 参与磷、硫和芳香化合物等代谢相关的功能基因是实现活性污泥高性能的保证<sup>[38]</sup>(图3),同时,采用二级 SEED 子系统进一步分析参与磷、硫和芳香化合物代谢的功能基因(图4).

美国和澳大利亚的废水处理厂采取的是 EBPR (enhanced biological phosphorus removal, 强化生物除磷)工艺,在两个强化生物除磷活性污泥中分别检测到1 115和388条序列,参与磷代谢功能基因的比例均为0.89%<sup>[23]</sup>. 本研究进出水的水质监测数据显示,TP的去除率为65.2%. 在此宏基因组中共检测到3 104条基因序列涉及磷代谢(占比1.56%),高于美国和澳大利亚活性污泥宏基因组中磷代谢功能基因的比例. 在磷代谢 SEED 二级子系统中,参与磷酸盐代谢的功能基因数量最多,达到2 857个(71.69%),其它还包括高亲和力磷酸盐转运和PHO调节子的控制(22.11%)、烷基膦酸酯的利用(5.12%)和膦酸盐代谢(1.08%). 活性污泥中的微生物组成和数量决定了废水生物处理工艺中磷去

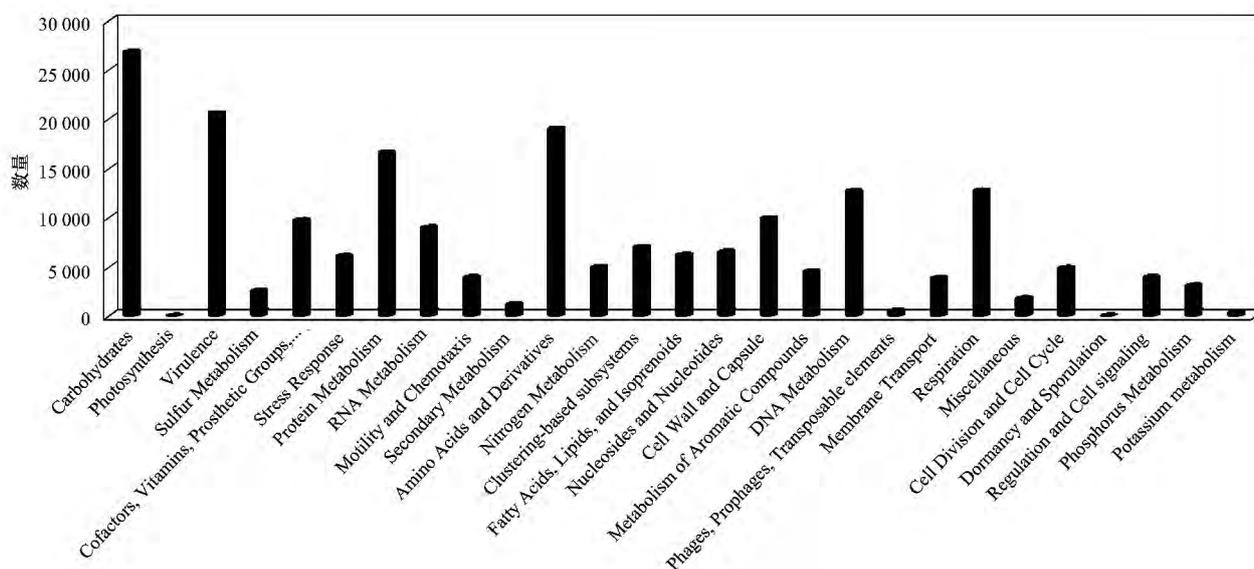


图3 百乐克(BIOLAK)活性污泥宏基因组 SEED 子系统(层级1)的数量

Fig. 3 Abundance of SEED subsystems (Level 1) in the BIOLAK sludge metagenome

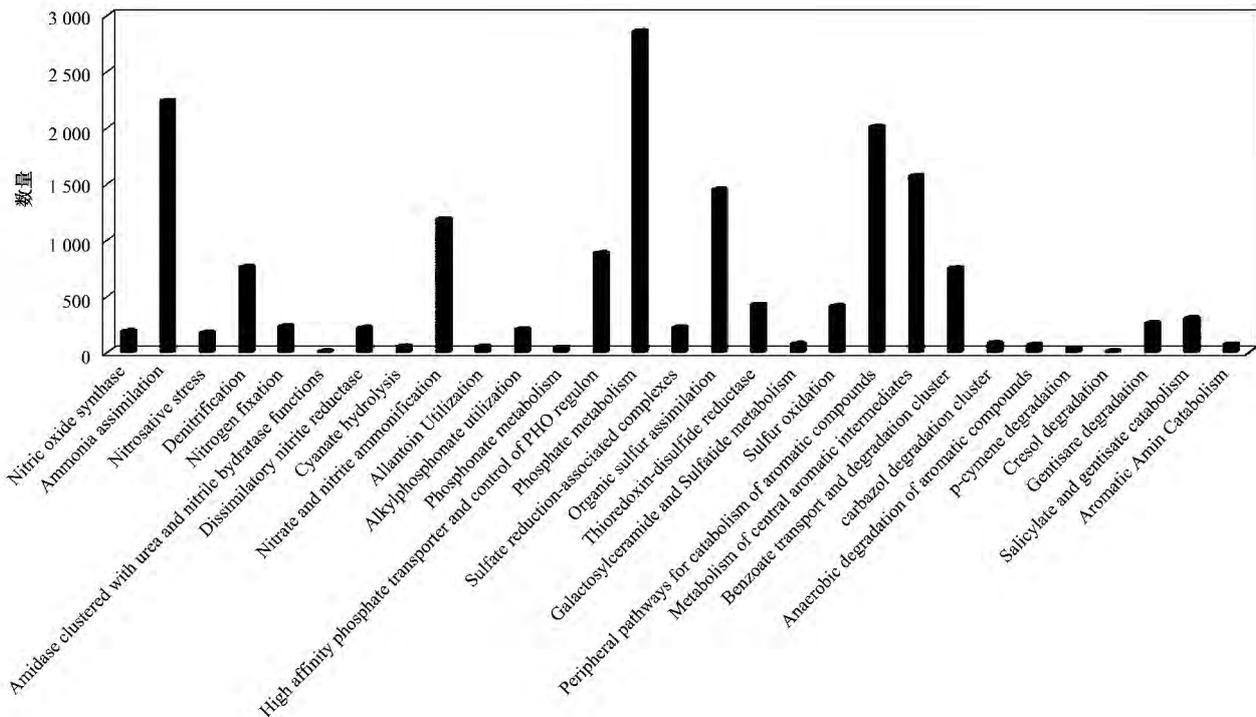


图4 氮、磷、硫和芳香化合物代谢的 SEED 子系统( 层级2)

Fig. 4 Nitrogen , phosphorus , sulfur and aromatic compounds metabolism classification analysis based on Level 2 SEED subsystems

除的性能。先前研究表明聚磷菌属 *Candidatus Accumulibacter* 在活性污泥法的磷去除方面具有至关重要的作用,负责磷的累积和去除,目前该菌属仅包含一种聚磷菌 *Candidatus Accumulibacter phosphatis*,而且并未得到纯培养<sup>[23]</sup>。在目前的百乐克活性污泥中,聚磷菌的比例为 0.66% (730 条序列)(图2),这高于 Kim 等<sup>[2]</sup> A<sup>2</sup>O 工艺活性污泥中聚磷菌的比例(0.1%~0.5%)。

在百乐克活性污泥中,参与硫代谢功能基因的比例为 1.29% (2572 条基因序列),与美国和澳大利亚活性污泥中硫代谢功能基因的比例(分别为 1.19% 和 1.32%)相当。在硫代谢 SEED 二级子系统中,参与有机硫同化的功能基因所占的比例最高,达到 56.22% (1446 条基因序列),其次为硫氧还蛋白二硫键还原酶(16.45%)、硫氧化(15.94%)、硫酸盐还原相关的复合物(8.55%)、半乳糖和硫脂代谢(2.84%)。

进出水的水质监测数据显示,COD 和 BOD<sub>5</sub> 的去除率分别为 66.9% 和 93.8%。在百乐克活性污泥中共检测到 4531 条基因序列参与芳香化合物的代谢,比例达到 2.28%,但在美国和澳大利亚活性污泥中只有 1.44% 和 1.56%。在芳香化合物代谢 SEED 二级子系统中,芳香族化合物分解代谢途径的外周相关的基因数量最多,达到 2004 条

(38.96%),其次为芳香族中间体的代谢(30.46%)、苯甲酸酯转运和降解(14.54%)和水杨酸和龙胆酸代谢(5.91%)等(图4)。

除了基于 SEED 的子系统对宏基因组序列进行功能分析外,同时还利用 KEGG 分析百乐克活性污泥宏基因组的功能分类及丰度(图5)。共分为 6 个大类、36 个小类。在 6 个大类中,与代谢相关的功能基因最多(114582 条功能基因序列,61.19%),其次是环境信息处理(28734 条功能基因序列,15.35%)和遗传信息处理(28347 条功能基因序列,15.14%)。

## 2.5 氮代谢相关的功能基因和通路

进出水的水质监测数据显示,TN 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的去除率分别达到 89.4% 和 92.1%。在百乐克活性污泥中,参与氮代谢的功能基因达到 2.50% (4968 条序列),比美国和澳大利亚污水处理厂活性污泥中氮代谢基因所占的比例要高(分别为 1.94% 和 1.64%)(图3)。在氮代谢的 SEED 二级子系统中,绝大部分基因序列均与氮循环的关键通路相关,如硝酸盐、亚硝酸盐氨化过程脱硝,这是废水处理中去除复杂的含氮化合物最重要的过程之一。氨同化和硝酸盐/亚硝酸盐氨化相关基因具有最高的基因数(分别为 2237 和 1183 条基因序列),其次为反硝化(759 条基因序列)、固氮(230 条基因序列)和异

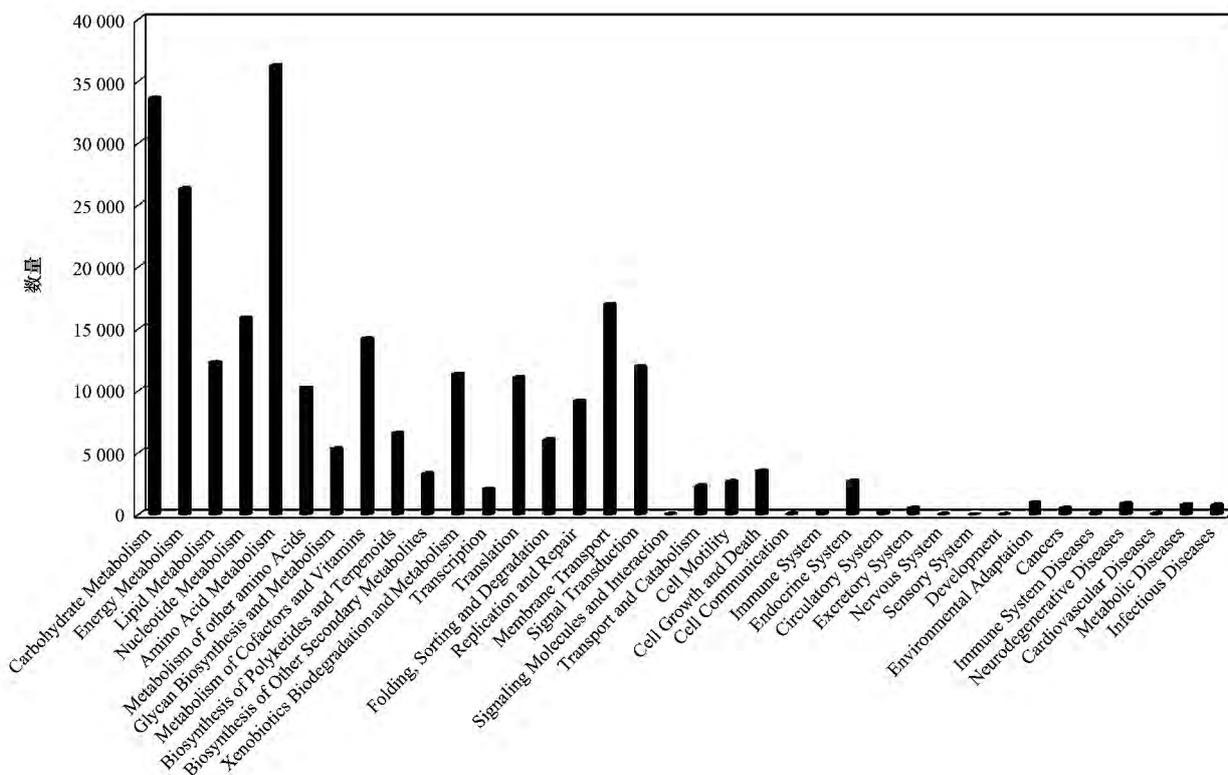


图 5 基于 KEGG (MEGAN) 分析的功能分类及数量

Fig. 5 Functional classification and abundance based on KEGG analysis in MEGAN

化亚硝酸盐还原酶 (216 条基因序列), 其它还有一氧化氮合成酶 (188 条基因序列) 等, 占得比例较少 (图 4)。

氮代谢包括 4 个过程, 即硝化、反硝化、氨化和固氮, 将与 4 个过程相关的序列映射到 MEGAN 的 KEGG 中。在 4 个过程中, 反硝化相关基因所占比重最高, 达到 80.81% (1385 条序列), 其次是氨化 (219 条序列, 12.78%)、硝化 (75 条序列, 4.38%) 和固氮 (35 条序列, 2.04%) (图 6)。这一结果表明, 反硝化过程相关的功能基因序列在这 4 个过程中占据优势地位, 与以前的研究类似<sup>[39]</sup>。

在反硝化过程中, 反硝化酶的编码基因, 包括 EC1.7.1.1 和 EC1.7.99.4 酶, 它们的序列数分别为 25 和 718。一氧化氮还原酶 EC 1.7.99.7 拥有 361 条基因序列。氮氧化物还原酶 (EC1.7.99.6) 的编码基因序列 (187 条序列) 具有较高的丰度, 同时亚硝酸盐还原酶 (NO-forming) (EC1.7.2.1) 的编码基因有 94 条序列。在氨化过程中, 发现存在高丰度的氨化酶基因编码序列, 包括亚硝酸盐还原酶 (EC1.7.1.4、EC1.7.2.2 和 EC1.7.7.1) 其基因序列数分别为 109、29 和 14。羟胺还原酶 (EC1.7.99.1) 基因编码序列为 67 条。在硝化过程

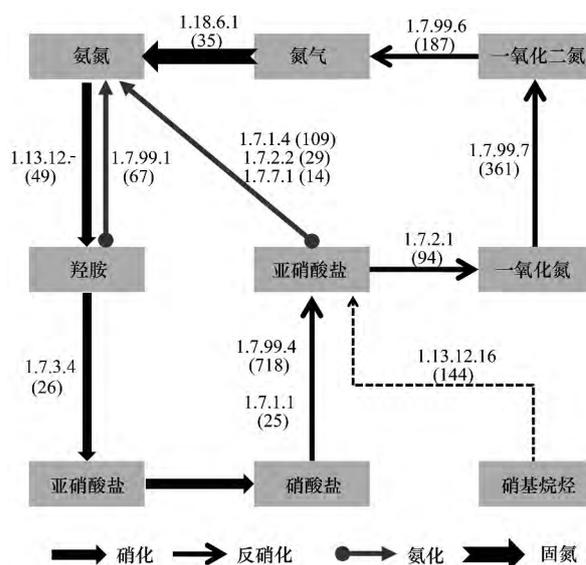


图 6 百乐克 (BIOLAK) 活性污泥氮循环 (硝化、反硝化、氨化和固氮) 中关键酶的数量

Fig. 6 Abundance of key enzymes in nitrogen cycle ( nitrification , denitrification , ammonification , and nitrogen fixation) in the BIOLAK sludge metagenome

中, 氨单加氧酶 ( EC 1.13.12.- ) 和 Hao ( EC1.7.3.4 ) 的编码基因, 分别有 49 和 26 条基因序列。在所有 4 个过程中, 参与固氮 ( EC1.18.6.1 )

的编码 Nif 基因序列最少(35 条)。以上结果表明,与氮代谢相关的基因广泛存在于百乐克活性污泥中(图 6),为废水中氮的去除起到关键作用。

厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, ANAMMOX)是微生物参与的全球氮循环的重要过程<sup>[40]</sup>。细菌介导的这一过程在发现之初,引起科学界的极大轰动<sup>[41]</sup>。通过厌氧氨氧化过程,亚硝酸盐和铵可以被直接转化成氮气,从而将废水中含有的氨氮去除。执行厌氧氨氧化过程的细菌均属于浮霉菌门(Planctomycetes)。在所研究的百乐克污泥样本中,浮霉菌门中共确定 13 886 条序列,属于 14 个菌属。其中 *Planctomyces* 是最丰富菌属(2 330 条序列,排名 7),其次是 *Gemmata*(1 765 条序列,排名 13)、*Singulisphaera*(1 336 条序列,排名 20)、*Pirellula*(1 291 条序列,排名 21)、*Blastopirellula*(618 条序列,排名 42)、*Phycisphaera*(539 条序列,排名 43)、*Isosphaera*(335 条序列,排名 60)和 *Rhodopirellula*(263 条序列,排名 73),浮霉菌门中上述所有 8 个属都位列最丰富的前 100 个属(图 2),从而揭示厌氧氨氧化过程在百乐克活性污泥的氮代谢中起着非常重要的作用。

### 3 结论

连云港大浦工业区污水处理厂百乐克活性污泥中蕴藏着丰富的生物多样性,鉴定出 47 个门类、872 个属与 1 351 个物种。细菌域中包括 33 个门,其中变形菌门是最丰富的门,其次是拟杆菌门、硝化螺旋菌门和浮霉菌门。在 748 个细菌属中,硝化螺旋菌属为第一大菌属。其次是芽单胞菌属、丝杆菌属、堆囊菌属和生丝微菌属。在古菌域,鉴定获得 3 个门、39 个属。在真核域,鉴定出 10 个门、60 个属。同时检测到 448 条病毒序列,主要为噬菌体。在此活性污泥中,参与氮、磷和芳香化合物代谢功能基因的比例,均高于美国和澳大利亚两个活性污泥中相应功能基因的比例。

#### 参考文献:

[1] Liaw R B, Cheng M P, Wu M C, et al. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge [J]. *Bioresource Technology*, 2010, **101**(21): 8323-8329.

[2] Kim B C, Kim S, Shin T, et al. Comparison of the bacterial communities in anaerobic, anoxic, and oxic chambers of a pilot A(2)O process using pyrosequencing analysis [J]. *Current Microbiology*, 2013, **66**(6): 555-565.

[3] Paulo A M S, Plugge C M, Garcia-Encina P A, et al. Anaerobic

degradation of sodium dodecyl sulfate (SDS) by denitrifying bacteria [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, **84**: 14-20.

- [4] Mardis E R. A decade's perspective on DNA sequencing technology [J]. *Nature*, 2011, **470**(7333): 198-203.
- [5] Neafsey D E, Haas B J. 'Next-generation' sequencing becomes 'now-generation' [J]. *Genome Biology*, 2011, **12**(3): 303.
- [6] Metzker M L. Sequencing technologies—the next generation [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, **11**(1): 31-46.
- [7] Qin J J, Li R Q, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. *Nature*, 2010, **464**(7285): 59-65.
- [8] Karlsson F H, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control [J]. *Nature*, 2013, **498**(7452): 99-103.
- [9] Ridaura V K, Faith J J, Rey F E, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice [J]. *Science*, 2013, **341**(6150): 1241214.
- [10] Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, et al. Genomic variation landscape of the human gut microbiome [J]. *Nature*, 2013, **493**(7430): 45-50.
- [11] Walsh D A, Zaikova E, Howes C G, et al. Metagenome of a versatile chemolithoautotroph from expanding oceanic dead zones [J]. *Science*, 2009, **326**(5952): 578-582.
- [12] Metcalf W W, Griffin B M, Cicchillo R M, et al. Synthesis of methylphosphonic acid by marine microbes: a source for methane in the aerobic ocean [J]. *Science*, 2012, **337**(6098): 1104-1107.
- [13] DeLong E F. The microbial ocean from genomes to biomes [J]. *Nature*, 2009, **459**(7244): 200-206.
- [14] Mackelprang R, Waldrop M P, DeAngelis K M, et al. Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw [J]. *Nature*, 2011, **480**(7377): 368-371.
- [15] Fierer N, Ladau J, Clemente J C, et al. Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States [J]. *Science*, 2013, **342**(6158): 621-624.
- [16] Warnecke F, Luginbühl P, Ivanova N, et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite [J]. *Nature*, 2007, **450**(7169): 560-565.
- [17] Ley R E, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes [J]. *Science*, 2008, **320**(5883): 1647-1651.
- [18] Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen [J]. *Science*, 2011, **331**(6016): 463-467.
- [19] Ju Y K, Wang H L, Zhang Q, et al. Effect of dissolved oxygen on nitrogen and phosphorus removal rate in Biolak process [J]. *Advanced Materials Research*, 2013, **779/780**: 1629-1633.
- [20] 刘汉湖, 李桂杰, 裴宗平, 等. 中小城镇生活污水处理新技术——BIOLAK 技术及实例 [J]. *江苏环境科技*, 2004, **17**

- (4): 19–21.
- [21] Huson D H, Mitra S, Ruscheweyh H J, *et al.* Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4 [J]. *Genome Research*, 2011, **21**(9): 1552–1560.
- [22] Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, *et al.* The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, **9**: 386.
- [23] Martín H G, Ivanova N, Kunin V, *et al.* Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, **24**(10): 1263–1269.
- [24] Mitra S, Rupek P, Richter D C, *et al.* Functional analysis of metagenomes and metatranscriptomes using SEED and KEGG [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, **12**(Suppl 1): S21.
- [25] Bae H, Park K S, Chung Y C, *et al.* Distribution of anammox bacteria in domestic WWTPs and their enrichments evaluated by real-time quantitative PCR [J]. *Process Biochemistry*, 2010, **45**(3): 323–334.
- [26] Jogler C, Wanner G, Kolinko S, *et al.* Conservation of proteobacterial magnetosome genes and structures in an uncultivated member of the deep-branching *Nitrospira* phylum [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(3): 1134–1139.
- [27] Ushiki N, Fujitani H, Aoi Y, *et al.* Isolation of *Nitrospira* belonging to sublineage II from a wastewater treatment plant [J]. *Microbes and Environments*, 2013, **28**(3): 346–353.
- [28] Gilbert E M, Agrawal S, Brunner F, *et al.* Response of different nitrospira species to anoxic periods depends on operational do [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**(5): 2934–2941.
- [29] Chiellini C, Munz G, Petroni G, *et al.* Characterization and comparison of bacterial communities selected in conventional activated sludge and membrane bioreactor pilot plants: a focus on *Nitrospira* and *Planctomycetes* bacterial phyla [J]. *Current Microbiology*, 2013, **67**(1): 77–90.
- [30] Maixner F, Wagner M, Lückner S, *et al.* Environmental genomics reveals a functional chlorite dismutase in the nitrite-oxidizing bacterium '*Candidatus Nitrospira defluvii*' [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**(11): 3043–3056.
- [31] Kostan J, Sjöblom B, Maixner F, *et al.* Structural and functional characterisation of the chlorite dismutase from the nitrite-oxidizing bacterium '*Candidatus Nitrospira defluvii*': Identification of a catalytically important amino acid residue [J]. *Journal of Structural Biology*, 2010, **172**(3): 331–342.
- [32] Zhang H, Sekiguchi Y, Hanada S, *et al.* *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, **53**(4): 1155–1163.
- [33] Takaichi S, Maoka T, Takasaki K, *et al.* Carotenoids of *Gemmatimonas aurantiaca* (*Gemmatimonadetes*): identification of a novel carotenoid, deoxyoscollol 2-rhamnoside, and proposed biosynthetic pathway of oscollol 2, 2'-dirhamnoside [J]. *Microbiology*, 2010, **156**: 757–763.
- [34] Wang L M, Luo X Z, Zhang Y M, *et al.* Community analysis of ammonia-oxidizing Betaproteobacteria at different seasons in microbial-earthworm ecofilters [J]. *Ecological Engineering*, 2013, **51**: 1–9.
- [35] Winkler M K H, Kleerebezem R, de Bruin L M M, *et al.* Microbial diversity differences within aerobic granular sludge and activated sludge flocs [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, **97**(16): 7447–7458.
- [36] Zhang C Q, Liang Z H, Hu Z Q. Bacterial response to a continuous long-term exposure of silver nanoparticles at sub-ppm silver concentrations in a membrane bioreactor activated sludge system [J]. *Water Research*, 2014, **50**: 350–358.
- [37] Cantalupo P G, Calgua B, Zhao G Y, *et al.* Raw sewage harbors diverse viral populations [J]. *MBio*, 2011, **2**(5): 180–190.
- [38] Silva C C, Hayden H, Sawbridge T, *et al.* Phylogenetic and functional diversity of metagenomic libraries of phenol degrading sludge from petroleum refinery wastewater treatment system [J]. *AMB Express*, 2012, **2**(1): 18.
- [39] Yu K, Zhang T. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of microbial community structure and gene expression of activated sludge [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(5): 38183.
- [40] Arrigo K R. Marine microorganisms and global nutrient cycles [J]. *Nature*, 2005, **437**(7057): 349–355.
- [41] Strous M, Fuerst J A, Kramer E H M, *et al.* Missing lithotroph identified as new planctomycete [J]. *Nature*, 1999, **400**(6743): 446–449.