

# 基于高通量测序技术的阳极生物膜群落结构

王有昭, 朱彤, 谢元华, 李现瑾

(东北大学 机械工程与自动化学院, 辽宁 沈阳 110819)

**摘要:** 利用高通量测序技术对阳极生物膜的微生物群落结构进行了分析. 实验结果表明, 高通量测序能够高效地获取电化学生物膜的群落结构信息, 产电模式菌 *Geobacter* 属在生物膜中占据着优势地位, 其数量比例达到 30% 左右, 其次的主要菌属为 *Thermovirga*, *Thauera* 和 *Syntrophorhabdus*. 对比电化学活性丧失前后的生物膜发现, 虽然 *Geobacter* 菌属在丧失了电化学活性的生物膜中仍然占据统治地位, 但是放线菌门的细菌增长显著, 其数量比例远高于正常阳极生物膜的 0.5%, 有可能是抑制生物膜电化学活性的因素之一.

**关键词:** 阳极生物膜; 生物电化学系统; 高通量测序; 微生物多样性; 16S rRNA

中图分类号: Q 89

文献标志码: A

文章编号: 1005-3026(2016)01-0105-05

## Community Structure of Anode Biofilm by High-Throughput Sequencing Technology

WANG You-zhao, ZHU Tong, XIE Yuan-hua, LI Xian-jin

(School of Mechanical Engineering & Automation, Northeastern University, Shenyang 110819, China.

Corresponding author: ZHU Tong, professor, E-mail: tongzhu@mail.neu.edu.cn)

**Abstract:** Microbial community structure of anode biofilm was analyzed using high-throughput sequencing technology. The results show that the technology can obtain community structure information from electrochemistry biofilm efficiently, and the exoelectrogenic modal bacteria *Geobacter* category is predominant in biological membrane, its quantity ratio reaches 30%; *Thermovirga*, *Thauera* and *Syntrophorhabdus* are also found in anode biofilm. However, through comparison of biofilm before and after electrochemical activity was lost, *Geobacter* still dominated in biofilm after the biofilm lost electrochemical activity, while *Actinomycetes*' proportion increased significantly, its quantity was much higher than that of the normal 0.5%. So *Actinomycetes* may be one of the factors which inhibit the electrochemical activity of the biofilm.

**Key words:** anode biofilm; bioelectrochemical system (BES); high-throughput sequencing; microbial diversity; 16S rRNA

生物电化学系统(bioelectrochemical system, BES)将微生物催化和电化学作用结合,在能源生产和污染物处理领域得到了充分的关注.在初始的研究阶段,其主要的利用是利用污水中可利用的底物生产电能,即微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC).底物在阳极电化学活性细菌的作用下被氧化产生电子,电子传递到阳极通过外电路达到阴极,被阴极的氧气等电子受体接受.由于阴极的电势远远高于阳极,所以产生电势差使电

子流动产生电流.如果人为地施加一个外加电压至阴阳极两端,造成阴极电位低于质子还原电位,氢气则由于还原作用从阴极产生,这种制氢技术被称作微生物电解池(microbial electrolysis cell, MEC).随着更多研究的深入,大量的难降解污染物被发现可以在阴极被还原降解,包括硝基苯、偶氮染料、含氯化合物、重金属等多种污染物.

BES的工作基础在于阳极生物膜高效的电化学活性,其主要作用是氧化底物产生电子,然后

收稿日期: 2014-10-27

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(2015M570255); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(N140303002); 辽宁省教育厅科学技术研究项目(L20150178); 东北大学博士后科研基金资助项目(20150304).

作者简介: 王有昭(1984-),男,辽宁大连人,东北大学博士后研究人员; 朱彤(1963-),男,辽宁沈阳人,东北大学教授,博士生导师.

通过胞外电子传递至阳极. 由大量种类繁多的电化学活性细菌所构成的阳极生物膜的催化作用都是 BES 稳定运行的关键, 所以了解阳极生物膜群落的结构与功能, 对更深入地开展 BES 的应用是非常必要的.

对于微生物群落构成的研究方法有很多种, 包括多种的生化指标分析、16S rRNA 文库构建和 PCR-DGGE 等方法<sup>[1-2]</sup>. 这些传统的分子生物学方法效率比较低, 不能有效地、系统地反映群落的丰度和多样性. 高通量测序技术是近年国际流行的对微生物群落进行群落结构分析的方法, 其能读取上万核酸片段的信息, 测序结果通过与数据库中已有数据进行比对, 大多数序列都可以鉴定到属或种<sup>[3-4]</sup>. 针对 BES 的阳极生物膜, 利用高通量测序技术, 深入地分析了微生物种类、结构和功能, 有助于揭示其中起着重要作用的微生物, 为 BES 的长期稳定运行提供理论依据.

## 1 实验材料与实验方法

### 1.1 BES 的结构及其阳极生物膜 DNA 的提取

阳极生物膜接种物采用本实验室之前的 BES 阳极室出水, 以乙酸盐作为底物, 碳纤维刷作为阳极材料, BES 反应器如图 1 所示. 实验组选取已连续运行了 2 年左右、性能稳定的阳极生物膜, 阳极电位可以达到标准的  $-500 \text{ mmol/L}$  (vs SCE); 对照组采用电位处于  $400 \text{ mV}$  左右的阳极生物膜, 其被认为已经丧失了电化学活性. 将附有生物膜的阳极碳刷放置于装有  $50 \text{ mmol/L}$  PBS 的离心管中, 高速震荡  $10 \text{ min}$ , 取上清  $10\,000 \text{ g}$  离心  $10 \text{ min}$ , 去上清, 沉淀即为生物膜. DNA 的提取采用 PowerSoil DNA 提取试剂盒 (MOBIO 公司生产), 利用  $1\%$  琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA.

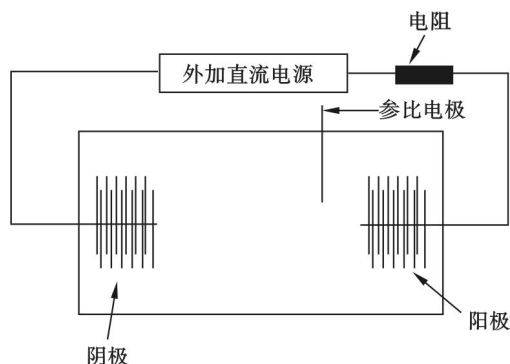


图 1 单室 BES 反应器示意图

Fig. 1 Schematic diagram of single-chamber BES reactor

### 1.2 高通量 16S rDNA 测序

利用高通量测序仪器 Roche 454 FLX 为测序平台. 首先进行 PCR 反应, 引物为细菌 16S rDNA 引物: 27F,  $5'$  AGAGTTTGATCCTGGCTCAG $3'$ ; 533R,  $5'$  TTACCGCGGCTGCTGGCAC $3'$ , 553R 作为测序端. PCR 产物用  $2\%$  琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司) 切胶回收 PCR 产物,  $2\%$  琼脂糖电泳检测. 将 PCR 产物用 QuantiFluor<sup>TM</sup>-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega 公司) 进行检测定量, 进行相应比例的混合以利于测序量要求.

## 2 结果与讨论

### 2.1 细菌群落的丰度和多样性

通过高通量测序, 实验组最终读取了  $10\,862$  个高质量片段, 对照组读取了  $12\,254$  个高质量片段. 经过开放读码框 OTU 聚类, 实验组的片段可以聚类为  $846$  个 OTU, 而对照组则可以聚类为  $984$  个 OTU. 这说明对照组的细菌群落丰度要高于实验组, Ace 和 Chao1 指数的推测也表明了该结果的准确性. 对于群落的多样性, 实验组的 shannon 指数 ( $3.76$ ) 要低于对照组的 shannon 指数 ( $4.08$ ), 说明实验组的多样性要低于对照组, simpson 指数也表明了这个结果 (表 1). 综上所述, 无论是群落的丰度, 还是群落的多样性, 实验组都要略微低于对照组. 这个结果的出现可以在一定程度上表明具有良好电化学活性的生物膜因为其功能以胞外传递电子为主, 所以汇聚了大部分的电化学活性细菌, 因此群落多样性相对单一; 而丧失了电化学活性的生物膜, 因为电化学活性细菌所占比重降低, 而其他一些没有电化学活性的细菌占据了生物膜的一部分空间, 导致胞外电子传递不畅通, 虽然其丰度和多样性都比较高, 但其发挥的作用却没有得到体现.

稀释性曲线用来比较测序数据量不同的样本中物种的丰富度, 也可以用来说明样本的测序数据量是否合理. 采用对序列进行随机抽样的方法, 以抽到的序列数与它们所能代表 OTU 的数目构成该曲线. 如图 2 所示, 当序列数超过  $10\,000$  时, 曲线趋向平坦, 说明本次测序数据量合理, 如果接着读取序列, 更多的数据量只会产生少量新的 OTU, 造成测序资源浪费. 从稀释曲线中也可以看到, 经过耐毒性驯化的阳极生物膜其 OTU 数量要低于驯化之前, 与之前的群落多样性的各项指数变化相一致.

表 1 阳极生物膜细菌群落丰度和多样性指数  
Table 1 Abundance and diversity index of bacterial communities from anode biofilm

组名	Reads	OTU	Ace	Chao1	shannon	simpson	coverage
实验组	10 862	846	1 929	1 432	3. 76	0. 089 9	0. 960 965
对照组	12 254	984	2 339	1 752	4. 08	0. 079 8	0. 958 871

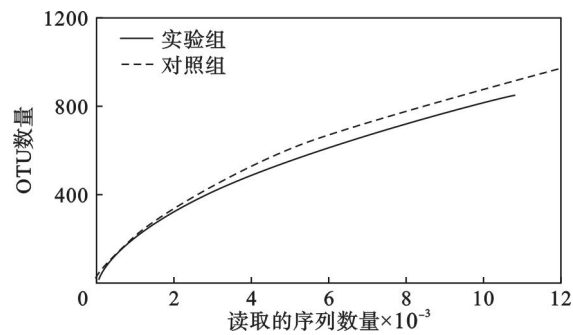


图 2 高通量测序中实验组和对照组的细菌群落稀释曲线

Fig. 2 Rarefaction curves of bacterial communities for experimental group and matched group based on high-throughput sequencing

2. 2 细菌群落结构的比较分析

在实验组的 846 个和对照组的 984 个 OTU 中,二者共同拥有的 OTU 个数为 410 个,占总 OTU 个数的 28. 9% ,说明二者的群落构成大不相同. 为了进一步鉴定二者群落的多样性,本文分别

从门、纲和属 3 个分类学水平去分析. 实验组和对照组的生物膜在一定程度上展现出了相似性,但是在具体的个别构成单元中差异比较明显.

首先从门分类学水平来分析,如图 3a 所示,二者主要组成部分由 7 个门的细菌构成,其中, *Proteobacteria* 占支配地位(实验组 68% ,对照组 63% ),这部分与之前 Lu 等的研究一致<sup>[5]</sup>;其次为 *Synergistetes* 门(实验组 16% ,对照组 12% )、*Bacteroidetes* 门(实验组 6% ,对照组 3% ),这两个门和 Lu 等的研究有着很大差别,*Synergistetes* 门并没有被发现或者其所占数量比例非常小, *Bacteroidetes* 门的细菌所占数量比例却为 30% 以上,这种差异的产生除了和接种物的选择相关之外,另一个可能是和 BES 的功能相关. 本实验的 BES 被用于高浓度染料废水脱色,其中染料废水具有生物毒性,这种毒性会影响某些耐受性弱的细菌的生存,而 Lu 等的 BES 主要用于生产氢气,并不涉及高浓度的毒性污染物. 所以推测从接种

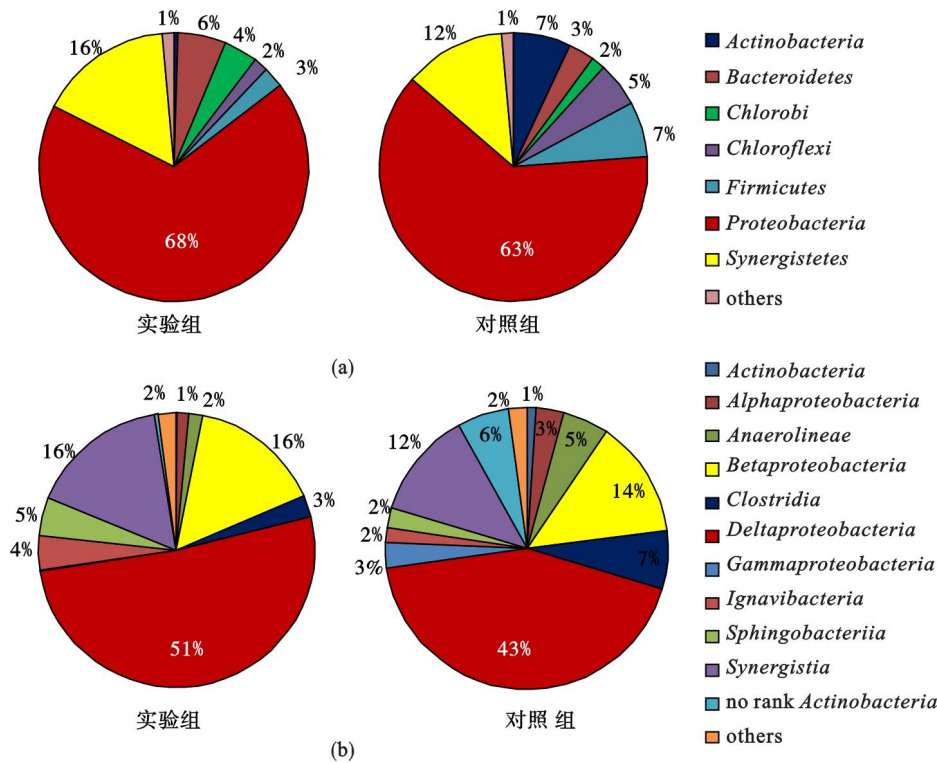


图 3 阳极生物膜细菌群落的系统分类鉴定

Fig. 3 Taxonomic classification identification of bacterial communities from anode biofilms

(a)—门分类水平; (b)—纲分类水平.



物的选择和 BES 的功能都会对阳极生物膜的构成产生影响. 在实验组和对照组比较过程中发现, 所占数量比例差别最为明显的是 *Actinobacteria* 门(放线菌)(实验组 0.5%, 对照组 7%), 在先前的各种报道中还未发现放线菌的电化学活性的报道, 对照组电化学活性是否和放线菌的数量比例过大有关还未可知, 但是不具有胞外电子传递的细菌如果占据阳极碳刷的面积过大, 必然会导致电极的电化学活性的衰退.

从纲分类学水平的分析显示, 如图 3b 所示, 电化学活性生物膜中占支配地位的依次为 *Deltaproteobacteria* (51%), *Synergistia* (16%), *Betaproteobacteria* (16%). 与实验组相比较, 具有明显变化的细菌纲仍然为放线菌门下属的还未有分类学信息的纲(no rank *Actinobacteria*), 这与上述的门分类学水平相对一致. 此外差异较大的为 *Clostridia* 纲和 *Anaerolineae* 纲.

门和纲的分类学水平相对较高, 包含的物种数量较多, 相对来说比较粗放, 属分类学水平的分析则精细很多. 从属水平的分析可以更好地从细菌功能的角度来解释阳极生物膜群落的构成(见表 2). 无论是在实验组还是对照组, *Geobacter* 属同时占据着优势地位, 其所占数量比例分别为 28.9% 和 29.7%. 关于 *Geobacter* 属的研究已经非常广泛, 存在于该细菌表面的细胞色素酶类具有胞外传递电子的能力已经被大家所认同, 尤其是该属中的 *Geobacter sulfurreducens* 作为一株模式产电菌, 其产电能力也被广泛研究, 无论是在 MFC, 还是 MEC 中, 在由混菌构成的生物阳极群落中, 其所占数量比例的优势地位已经得到了很多验证, 最高数量比例可以达到 80% 以上<sup>[6]</sup>. 虽然对照组的电化学活性缺失, 但是 *Geobacter* 仍占据优势地位, 一些没有分类学信息、功能未知的细菌极有可能参与了抑制电化学活性发挥的过程, 尤其要注意到对照组中存在着一一定量的放线菌, 其很可能产生低浓度的抗生素, 虽然没有杀死产电细菌, 但是对其活性产生抑制作用.

*Thauera* 属可以利用多种有机底物进行生存, 并具备固氮作用, 很多关于 MFC 阳极的研究中被检测并报道<sup>[7]</sup>, 但是其具体是否具有产电功能还未见报道. 在 Mardanpour 等开发的螺旋式阳极 MFC 中, 利用乳制品废水进行产电, *Thauera* 属细菌可以占到阳极生物膜的 17% 左右<sup>[8]</sup>, 如此高的数量比例预示着其作用不可忽视, 虽然没有其能够直接向电极传递电子的证据, 或许它可能对产电菌具有协同促进作用.

表 2 阳极生物膜在属分类水平上的细菌群落分布

Table 2 Taxonomic classification of bacterial communities from anode biofilms at genus

菌属名称	实验组	对照组
<i>Geobacter</i>	28.9	29.7
<i>Thermovirga</i>	15.9	11.9
<i>Thauera</i>	4.4	4.7
<i>Syntrophorhabdus</i>	2.1	0.8
<i>Syntrophomonas</i>	1.1	3.0
<i>Comamonas</i>	1.0	0.4
<i>Leptolinea</i>	0.5	1.2
<i>Fusibacter</i>	0.5	0.9
<i>Anaerolinea</i>	0.4	1.0
<i>Rhodopseudomonas</i>	0.4	1.1
<i>Bellilinea</i>	1.0	0.4
<i>Acinetobacter</i>	0.01	2.2

在关于 *Syntrophorhabdus* 和 *Syntrophomonas* 属的研究中, 有研究认为其可以进行氢气和乙酸盐之间的转换<sup>[9]</sup>, 考虑到本研究的 BES 中使用的是乙酸盐作为电子供体, 并且单室 BES 的阴极在低电位的条件下可能存在析氢副反应, 所以氢气和乙酸盐间的转换在理论上是可能的.

在其他检测到的非优势菌属中, *Comamonas* 属也在阳极生物膜群落中被发现, 其分离的纯菌具有产电能力已经被证实<sup>[10]</sup>. *Rhodopseudomonas* 在阳极生物膜中被发现其可以存在<sup>[11]</sup>, 虽然所占数量比例很小, 但该菌属具有光合器官, 可以直接从阳光中摄取能量, 对该菌属的深入研究表明, 可以辅助一些细菌进行产电的同时, 具备从乙酸盐中摄取电子并将其传递至电极的能力.

虽然从属水平分析可以有效地去判断菌属的功能, 但是其缺点是存在大量的未能分类到属水平的细菌, 这些细菌虽然能够被高通量测序技术检测出来, 但是分类学信息缺乏, 一些不能分离培养的细菌也会包含在内. 挖掘这些细菌个体的具体功能, 仍然需要今后进行深入的研究分析.

### 3 结 论

1) 通过高通量测序技术可以高效率地获取电化学生物膜的群落结构信息, 其序列覆盖率达到 95% 以上, 大量的 OTU 序列被发现.

2) 从门和纲的分类学水平分析发现, 放线菌门细菌在电化学生物膜中所占数量比例极低, 为 0.5%, 而在对照组中含量却高达 7%, 这个差异的影响有待深入验证.

(下转第 122 页)