

不同 pH 条件下除臭生物滤池微生物种群结构的分子生态分析

陈桐生^{1,3} 李建军² 岑英华¹ 孙国萍^{1*}

(¹ 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(² 中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)

(³ 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 采用分子生物学方法研究生物滤池中不同 pH 环境下的微生物种群的基因多样性,通过扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3 可变区,结合应用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术分析除臭生物滤池的生物种群的结构变化,并回收主要的 DNA 片段,采用 PCR 测序及 T 载体克隆测序,明确优势菌群的系统发育地位。结果表明,除臭生物滤池在不同的 pH 条件下,微生物的多样性及其丰度存在较大差别,强酸性对微生物具有较高的选择作用,与中性条件相比,微生物种群多样性相对较低。同时在滤池的不同层次上也表现出明显的空间分布多样性差异,序列比对显示硫酸化细菌在除臭过程中占有优势地位。为更好的处理恶臭气体提供可靠的科学依据,同时也为生物除臭的应用提供一定的理论基础。

关键词 生物滤池 恶臭处理 微生态 PCR-变性梯度凝胶电泳

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)03-0446-05

自 20 世纪 20 年代土壤微生物首次被应用于处理 H₂S 废气后^[1],生物滤池作为一种生物处理恶臭气体的简单有效的方法,得到了快速的发展。但在我国直至 90 年代初才逐步开始对大气中的含 S、N 等恶臭物质,如 H₂S、NH₃、甲硫醇等进行研究。同时对于生物滤池的滤料、处理过程中物化条件及动力学方面也有过报道,但对于处理过程中的微生物种群结构及生态变化的相关研究却未见报道。

由于自然生境中的大多数微生物目前尚不能培养,基于传统的培养和纯种分离技术在研究微生物生态、微生物群落结构和多样性时面临巨大障碍。大多应用于医学领域对突变基因研究的 PCR-DGGE 技术,由 Muzzyer^[2] 1993 年首次应用于微生物生态的研究,由于 DGGE 技术可以使只有一个碱基差别的核酸序列在梯度凝胶泳动中分离^[3],已被证实能区别不同种群的最初调查以及数量上占优势群落的鉴定中是尤其有用,已允许多个样品快速筛选,由此提供有关群体变化和差异的信息,并且得到广泛的应用^[4,5]。在国内赵立平、许玫英^[6]、陈灏^[7]等人也开始应用 DGGE 技术对不同类型的微生物生态进行研究。

本研究采用 PCR、DGGE、T-载体克隆等分子生物学技术,结合 16S rDNA 同源性分析及生物信息学手段,对除臭生物滤池的微生物生态进行研究。分析不同 pH 值条件下的细菌种群结构差异以及在空间分布上多样性特征,并根据序列比对结果初步确定优势菌群的进化地位。为更好的处理恶臭气体提供科学依据,同时也为生物除臭的应用研究提供一定

的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 样品取自广州市某污水处理厂的除臭生物滤池中试装置,分别对处于较强酸性和中性的两种不同运行环境下生物滤池进行填料样品采集,两次采样时间相隔为 1 个月左右。每次采样同时兼顾上、中、下三层,在采样口附近采集样品,用 A1、A2、A3 分别表示酸性条件下的上、中、下层, N1、N2、N3 分别表示中性条件下的上、中、下层。同时检测进气及出气的 H₂S 气体浓度,样品于 -20℃ 冰箱保存。

1.1.2 主要试剂 pBS-T 克隆载体,购于北京天为时代科技有限公司,引物由赛百盛公司合成;TaqDNA 聚合酶及其他试剂购于威佳公司。

1.2 H₂S 浓度及 pH 测定

H₂S 的测定采用亚甲基兰比色法,pH 的测定用 BECKMAN0720 型 pH 计

1.3 PCR 扩增

1.3.1 滤池填料的总 DNA 提取 对文献^[8]所述方法稍加改进,称取滤料 10g,对样品进行预处理后加入 20mL PBS (pH7.4),充分振荡 10min,6000 × g 室温离心 10min,弃上清,重复两次。以下步骤参照文献,沉淀溶于 300μL 超纯水,使用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3.2 梯度 PCR 为确定最适退火温度,将抽提所得总 DNA

基金项目 广东省自然科学基金团队项目(015017);广州市重点攻关项目(2002Z1-E0021)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-20-87684471; E-mail: ebiotech@gd.ac.cn

作者简介 陈桐生(1978-)男,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。E-mail: sand-cts@yahoo.com.cn

收稿日期 2004-09-13,修回日期 2004-12-31

中的一种适当稀释后作为模板,使用 16S rDNA 中 V3 区特异性引物^[21],梯度 PCR 仪(PTC200)扩增目的片段。反应体系(100μL)正反向引物浓度为 0.1μmol/L,每种 dNTP 的浓度为 0.2mmol/L,Taq 酶 5U。反应条件 94℃ 5min 94℃ 30s 55℃ ~ 65℃梯度区间设计八个退火温度退火,72℃ 30s,30 循环;72℃ 7min。扩增产物采用 1.5% 琼脂糖分析检验。

1.3.3 PCR 扩增 V3 可变区:根据梯度 PCR 结果,选择 62℃ 作为退火温度,其它条件参照梯度 PCR,并设置阴性对照。

1.4 DGGE

PCR 产物浓缩后,采用 D-Code 突变检测系统(Bio-Rad, Hercules, Calif.)进行 DGGE 分析。所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10%,变性梯度为 30% ~ 60%(尿素为 7mol/L,甲酰胺为 40%时为 100%变性浓度),180V 恒温电泳 4.5h,GoldView 染料染色 30min,UVI 成像系统分析结果。

1.5 DNA 的序列测定

参照文献[9]回收目的条带中的 DNA。将回收所得 DNA 进行 PCR 扩增,条件同 1.3.2 节所述,扩增产物送由上海博亚生物公司测序。对几个直接测序不能获得结果的目标 DNA 片段,将其 PCR 产物经凝胶纯化后采用 pBS-T 载体克隆,方法及条件参照试剂说明书,菌液直接送于上海博亚生物公司广州测序部测序。

本研究所得序列已全部提交到 GenBank 数据库中,登录号为 AY742259 ~ AY742270。

2 结果

2.1 不同时期滤池的 pH 值及气体中 H₂S 的浓度

酸性条件下的 pH 值介于 2 ~ 3 之间,H₂S 平均进气浓度为 6.11mg/m³,出气为 0.07 mg/m³;中性条件下 pH 值为 6.5 ~ 7.5,H₂S 平均进气浓度为 2.19mg/m³,出气为 0.01mg/m³,去除率都在 99% 左右。

2.2 填料总 DNA 的抽提

土壤 DNA 的抽提一直都是环境微生物生态分析以及其它分子生物学研究的难题之一^{—[10,11]},本实验各个滤料样品抽提所得的总 DNA 片段较为完整,大小介于 18 ~ 23kb 之间,可以满足 PCR 要求。虽然所得总 DNA 略带棕黄色,但经稀释后无需进一步纯化即可直接用于 PCR 反应,即所含的色素等杂质经过稀释后不会成为 PCR 反应的抑制因素。这与抽提过程有很大关系,在样品的预处理操作时使用 PBS 溶液充分洗涤,可以去除很多影响 PCR 扩增的潜在因素,有利于后续实验。

2.3 PCR 条件的优化及 V3 区扩增

梯度 PCR 产物的结果如图 1 所示,可以清楚的看到 8 个不同退火温度在 250bp 附近都出现了目的条带,其中 62.4℃ 对应的产物没有非特异带出现,且条带信号较强。再次退火温度下,以不同 pH 值、不同层次抽提所得的总 DNA 作为模板进行扩增,都得到大小为 233bp 左右的单一-特异性扩增片段,同时阴性对照没有 DNA 条带出现,适合于 DGGE 分析。

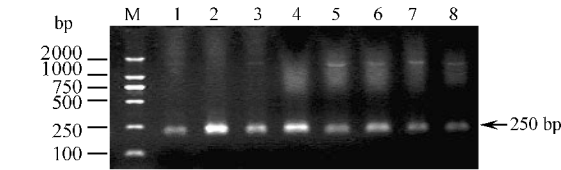


图 1 梯度 PCR 扩增滤料样品 16S rDNA V3 区

Fig.1 V3 fragment amplified by Gradient PCR

M: Marker ;1 ~ 8: PCR product.

2.4 不同 pH 条件下滤池的群落结构差异

将不同 pH 条件下,不同层次的滤池滤料的 6 种总 DNA 分别作 V3 区 PCR 扩增,其扩增产物浓缩后进行 DGGE 分析。从电泳结果可以看到酸性和中性环境下的电泳图谱有很大的区别(图 2-A)。从模式图(图 2-B)中可以更直观的说明,酸性条件下的条带数量明显少于中性条件下的条带数量,同时上、中、下层滤池样品也表现出不同的空间多样性,优势菌群丰度存在较大变化。

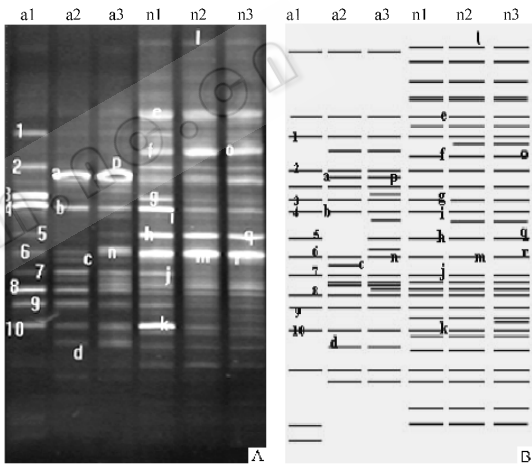


图 2 (A)不同 pH 条件下生物滤池的 DGGE 图谱 (B)不同 pH 条件下生物滤池的 DGGE 模式图

Fig.2 (A) DGGE profile for samples of different pH conditions in deodor biofilter (B) Mode picture of DGGE profile for different samples

a1 ~ a3 :Sample A1-A3 under acid condition ;n1 ~ n3 :Sample N1-N3 under neutral condition .

根据相似系数公式^[12]: $C_s = 2j / (a + b)$ 计算酸性和中性条件下生物滤池中总的细菌种类相似度,以及不同条件下上、中、下层之间的种群差异(表 1)。公式中 a、b 表示两个比较对象中的 DNA 条带数目,j 表示 a 和 b 中相同的条带数量,C_s 值为 0 时表示完全不同,C_s 值为 1 时表示不存在差异。表 1 数据显示,条带数目从 A1 到 N3 呈递增趋势,反应微生物多样性从酸性到中性逐步丰富,同时 C_s 值在每列呈递减趋势。

2.5 主要目标条带的回收测序和进化分析

对亮度最强且最有代表性的条带 1、2、3、8、9、a、b、f、h、j、k、r 切胶回收 DNA 片段后再进行 PCR 扩增,将产物直接测序及 T-载体克隆测序。采用 Clustal W 和 Phylip 邻位连接法,选取核酸数据库中的 33 条序列,构建系统进化树(图 3)。

表 1 生物滤池中不同条件下微生物群落的 Cs 值
Table 1 Cs values of microbial population under different conditions

Sample	AI(16)	AX(20)	AX(24)	NI(28)	NX(30)	NX(31)	A _T
AI(16)	1						
AX(20)	0.72	1					
AX(24)	0.70	0.86	1				
NI(28)	0.64	0.58	0.62	1			
NX(30)	0.61	0.56	0.60	0.96	1		
NX(31)	0.60	0.55	0.58	0.95	0.98	1	
NT							0.59

AI(16)~ NX(31):The number of visible band in DGGE profile of sample A1 ~ N3 ; A_T :Total microbial diversity under acid condition ; NT :Total microbial diversity under neutral condition .

系统进化树中可以明显的分成两大类群 ,以类群 I 和类群 II 表示。 I 类中以 *Acidithiobacillus* 为主要种群 ,包括回收条带 1 ~ 4、j、k ,II 类则由 *Thiomonas* 和一些未培养的微生物种群组成 ,包括了回收条带 8、9、a、f、h、r。

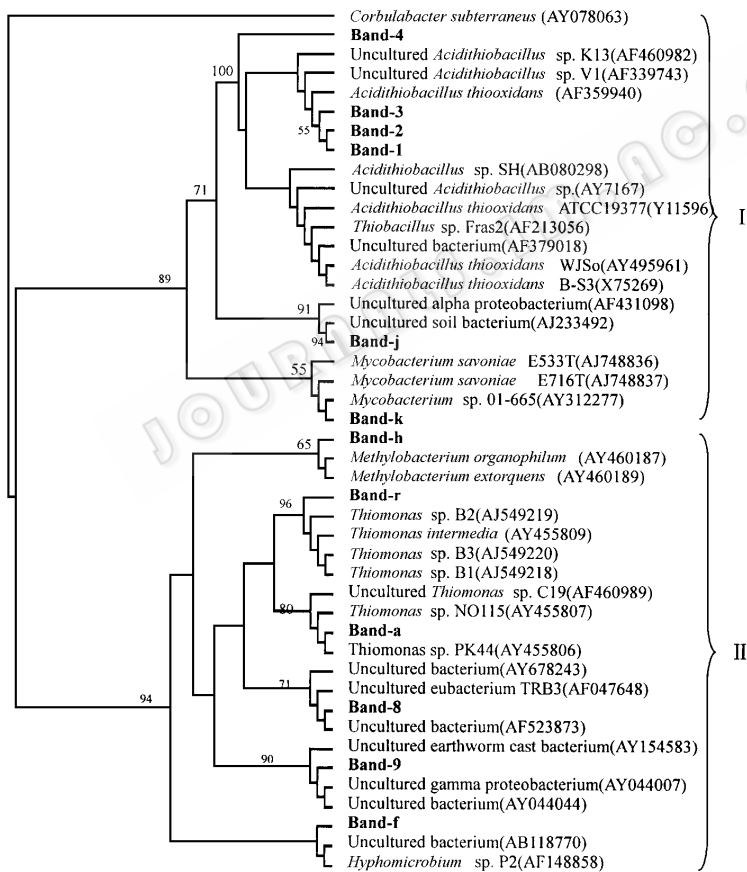


图 3 除臭生物滤池中优势微生物种群的亲缘进化关系

Fig.3 Phylogenetic of predominant microbial populations in the deodor biofilter
The numbers on the branches refer to bootstrap values , only values relate to Band are shown .

3 讨论

硫酸化细菌在生物处理恶臭气体中发挥了很大的作用 ,但大多数的硫酸化细菌属于自养型微生物 ,如硫杆菌属 (*Acidithiobacillus*) 难以从传统的形态学上分析其群落结构及多样性。生物技术的兴起与发展为微生物生态学的研究提

供了一种强有力手段和工具 本研究通过直接抽提滤料样品的总 DNA 采用 PCR-DGGE 等生物学技术对除臭生物滤池进行相应的细菌生态学分析。

从 DGGE 图谱上可以看到 ,生物滤池在不同的 pH 条件下运作时 ,微生物的多样性及其丰度存在较大差别。总的来说 ,强酸性相对中性而言对微生物具有较高的选择压力 ,在

选择作用较大的酸性条件下,微生物群落结构相对比较简单,多样性较低,但个别菌群却出现较高的丰度,这从条带 3、4、a、p 中可以明显看出。而中性环境下的多样性则较为丰富,分布也相对均匀,并且可以看出,在 A1、A2、A3 中出现的 DNA 条带,在 N1、N2、N3 中很多都可以找到相同的对应位置,但在 N1、N2、N3 却有很多条带不能在 A1、A2、A3 中找到。也就是说,在除臭生物滤池中,酸性强酸性条件下可以生存的细菌,大多数也可以在中性条件下存活。相反,中性环境中生存的微生物却不一定可以忍受强酸环境。表 1 数据显示,强酸性条件与中性条件下的微生物种类的相似指数仅为 0.59,说明它们之间存在较大的差异。同时,强酸环境中的上、中、下层与中性条件下对应的各层相比, C_s 值分别为 0.64、0.56 和 0.58,与总的相似指数基本相符。

条带 1、3、4 和 8 在所有的样品中都可以找到,但在样品 A1 中亮度最高,说明这几类细菌在酸性条件下有数量上的优势。与 NCBI 的序列比对结果显示,条带 1、3 与 *Acidithiobacillus thiooxidans* 和 Uncultured *Acidithiobacillus* K13 的相似性分别为 99% 和 100%,有极高的相似性,条带 4、8 与 *Acidithiobacillus thiooxidans* 和 Uncultured bacterium 的同源性分别为 94% 和 98%。条带 a 所代表的菌种是酸性样品里特有的,而且具有很高的丰度,其序列与 *Thiomonas* sp. NO115 的相似性达到 97%。同样的,条带 h、r 所对应的两类微生物却在中性条件下占有优势地位,比对结果显示分别为 *Methylobacterium extorquens* 和 *Thiomonas* sp. B3,相似度为 97% 和 100%。条带 f 对应的细菌是中性环境下特有的微生物,与 *Hyphomicrobium* sp. 的相似性高达 99%,同时条带 e 虽然是共有的,但是在酸性样品中只能检测到微弱的信号。从生物信息学分析的结果来看,强酸性时除臭生物滤池的微生物种类以硫氧化细菌为主,并且 *Acidithiobacillus* 占有优势地位。在这种具有强选择压力的环境下,也必然会形成能以 H_2S 作为能源生长并且可以耐酸的细菌占种群优势,与信息学分析结果很好的吻合。González-Toril^[13] 等人采用 DGGE 对极度酸性且含有高浓度的硫化物的河流微生物生态进行研究,也得出相似结论。

生物滤池在处理过程产酸而引起的 pH 值下降是滤池工艺要面对的关键问题之一,经常为了防止出现过酸度而采取很多必要的措施。从研究结果来看,无论是在 pH 值低至 2~3,还是在中性条件,处理效果都能达到 98% 左右,也就是说都有能够适应环境的相应群落结构出现,从而维持一个稳定的系统功能。因此在生物滤池运行过程中,只要维持微生物系统稳定,pH 值在一个较宽的范围内波动,仍可以得到理想的去除效果。

进气方式对微生物群落分布也有较大影响,从而引起不同的滤池层次上也表现出明显的空间多样性差异,对于酸性条件下的微生物更是如此。本实验的除臭生物滤池采用的是上方进气方式,在 DGGE 图谱中我们可以看到,A1 的微生物多样性最少,并且所生存的细菌具有较高的丰度,与 A2、A3 相比较,相似度分别为 0.72 和 0.70。并且多样性从上到

下呈上升趋势,中性环境中也存在类似情况,但是不如酸性明显,N1 与 N2、N3 的相似系数达到 0.96 和 0.95。产生这种空间差异可能是由于上层微生物首先接触以 H_2S 为主的恶臭气体,细菌氧化 H_2S 生成 H_2SO_4 的浓度较高,对一般的细菌具有较大的毒害作用,从而降低了微生物种群的复杂性。随着 H_2S 浓度的降低,对微生物的毒害作用也相对减少,多样性增加。从具体条带上分析可看到,条带 1、2、3、4、8 在 A1 中的信号最强,而在 A2、A3 中却明显减弱,条带 2 序列与核酸数据库比对显示和 *Acidithiobacillus thiooxidans* 有 99% 的同源性。N1、N2 和 N3 中也有类似情况,如条带 g、i、j、k,序列分析 j、k 分别对应 Uncultured soil bacterium 和 *Mycobacterium*,同源性都为 100%。

为了验证在本实验中相同位置的 DNA 条带是否代表相同的菌种,选取具有同一电泳位置的条带 10 和条带 k 测序,所得序列完全相同,证实了 DGGE 条带分析具有较高可靠性。

在这种贫营养和毒性环境生长的微生物,不可能形成很复杂微生物群落结构和丰富的细菌数量,有些种类可能只有少量存在,这在研究过程中会由于 PCR 扩增偏差^[14]以及 DGGE 中 DNA 片段分离程度的限制^[15]等因素的影响而没有检测到,从而低估了微生物的基因多样性。这种不在数量上占优势的菌群也可能在系统中起着重要的作用。

稳定的微生物系统是保证除臭效果的一个很重要因素。通过对除臭生物滤池中优势菌群的生态研究,加深了对生物除臭机理的认识,同时对生物除臭工程提供一定的理论支持,对生物除臭装置的设计与运行也有一定的指导作用,对我国的环保事业有着重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Sakano Y, Kerkhof L. Assessment of changes in microbial community structure during operation of an ammonia biofilter with molecular tools. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 4877 - 4882.
- [2] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695 - 700.
- [3] Myers R M, Fischer S G, Lerman L S, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 1985, **13**: 3131 - 3145.
- [4] 余利岩,姚天爵. 微生物生态学研究方法的新进展. *微生物学通报*, 2001, **28**(1): 89 - 93.
- [5] Tresse O, Lorrain M J, Rho D. Population dynamics of free-floating and attached bacteria in a styrene-degrading biotrickling filter analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **59**: 585 - 590.
- [6] 许玫英,曾国驱,任随周,等. 分子检测技术对活性污泥中氨氧化细菌的比较研究. *微生物学报*, 2003, **43**(3): 372 - 378.
- [7] 陈 灏,唐小树,林 洁,等. 不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究. *微生物学报*, 2002, **42**(4): 478 - 483.

- [8] Zhou J , Bruns M A , Tiedje J M . DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** (2) 316 – 322 .
- [9] Sambrook J , Russell D W . 分子克隆实验指南 . 黄培堂等译 . 第三版 . 北京 : 科学出版社 , 2002 .
- [10] Christon J H , Crawford R L , Knudsen G R , *et al.* Manual of Environmental Microbiology . 2nd ed . Washington : ASM Press , 2002 , 503 – 673 .
- [11] Jackson C R , Harper J P , Willoughby D . A Simple , Efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* , 1997 , **63** (12) : 4993 – 4995 .
- [12] Zijjge V , Harmsen H J M , Kleinfelder J W , *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis analysis to study bacterial community structure in pockets of periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology* 2003 , **18** (1) 59 – 65 .
- [13] González-Toril E , Llobet-Brossa E , Casamayor E O , *et al.* Microbial ecology of an extreme acidic environment , the Tinto River. *Appl Environ Microbiol* , 2003 , **69** (8) 4853 – 4865 .
- [14] Suzuki M T , Giovannoni S J . Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** (2) 625 – 630 .
- [15] Jackson C R , Roden E E , Churchill P F . Denaturing gradient gel electrophoresis can fail to separate 16S rDNA fragments with multiple base differences. *Molecular Biology Today* , 2000 , **1** (2) 49 – 51 .

Microbial community composition and phylogenetic analysis of deodor biofilter under different pH conditions

CHEN Tong-sheng^{1,3} LI Jian-jun² CEN Ying-hua¹ SUN Guo-ping^{1*}

(¹ Guangdong Institute of Microbiology , Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application , Guangzhou 510070 , China)

(² South China Sea Institute of Oceanology , Chinese Academy of Sciences , Guangzhou 510301 , China)

(³ Graduate School of the Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

Abstract : Molecular biological methods were applied to analyze the genetic diversity of microbe community in biofilter. V3 variable fragments of genes coding for 16S rRNA were amplified by Polymerase Chain Reaction. Then PCR-DGGE combined technique were used to analyze the microbial population composition and phylogeny of deodorant biofilter. The results indicate that there are prominent differences in microbial diversity and abundance between acid and neutral conditions. Owing to the selective pressure of extreme acidity , there is less diversity of microbe compared with that in neutral environment. It is demonstrated the obvious distinction of spacial diversity in different biofilter bed as well. PCR and T-vector cloning sequencing results shows that the sulfur-oxidizing bacteria are the predominant population. The research offers the valid scientific basis for better treatment of odorant gas and the theoretical foundation for application of bio-deodorization .

Key words : Biofilter , Deodor , Microbial ecology , PCR-DGGE