

活性污泥驯化过程中芘降解菌的群落多样性分析

周作明, 郑 娜, 方柏山

(华侨大学 福建省高校工业生物技术重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘 要: 将采自炼油厂污水处理生化反应池的活性污泥以芘为唯一碳源进行富集培养与驯化, 通过对 6 个不同时期混合菌群总 DNA 的提取, 采用降落式 PCR 和变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对细菌 16S rDNA 基因 V3 区进行扩增和产物分离, 对活性污泥驯化过程中芘降解菌的群落多样性进行了研究。结果表明, 在驯化过程中, 芘降解菌的群落结构和种群数量存在明显的演替过程, 芘浓度的大小是影响芘降解菌的群落结构和种群数量的重要因素。

关 键 词: 变性梯度凝胶电泳; 芘; 降解菌; 群落多样性; 活性污泥

中图分类号: X172

文献标志码: A

Community diversity analysis of pyrene degradable bacteria in the cultivable process of activated sludge

ZHOU Zuo-ming, ZHENG Na, FANG Bai-shan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology Fujian Province, Hua Qiao University, Xiamen 361021, Fujian, China)

Abstract: The refinery-activated sludge was cultivated with pyrene as one single source of carbon and energy. The community diversity of pyrene degrading strains was studied by extracting the genomic DNA of microbial community in 6 different periods, amplifying the bacterial 16S rDNA V3 fragment with touch-down PCR method, and separating the products by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The result showed that there was an obvious sylogistic process in community structure and amount of dominant populations. The concentration of pyrene was a main factor to influence the community diversity of pyrene degradable strains.

Key words: denaturing gradient gel electrophoresis; pyrene; degrading strains; community diversity; activated sludge

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类广泛存在于环境中的难降解有机污染物, PAHs的遗传毒性和致癌性随苯环数目加大而增强, 4~5环毒性最高^[1]。芘为具有4个苯环的PAH, 其被确立为检测PAHs污染的指示物^[2], 它普遍存在于环境中, 其代谢物醌(Quinone)比芘毒性更大, 且具有致突变性^[3]。研究表明, 微生物降解在PAHs的迁移转化乃至最终从环境中消失的过程中占有重要的地位, 是去除环境中PAHs最主要的途径^[4]。目前, 国内外对芘降解菌进行了大量研究, 主要有降解特性^[5-6]、降解基因^[7]、降解机理^[8]

及构建工程菌^[9]等, 但有关芘降解菌群落多样性的研究报道较少。

传统的微生物多样性研究以纯培养技术为主, 但实验室能够分离培养出的微生物只占其中的0.01%~10.0%^[10], 不能很好反映微生物的实际存在状态。变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)是基于16S rDNA基因保守性的DNA指纹技术, 具有可重复、快速和操作简便等特点, 在不需要纯培养的条件下能够对微生物的复杂群落进行分析^[11]。1993年Muyzer首次将该技术应用于微生物群落结构研究^[12]。此后10多年间, 该技术被广泛用于微生物分子生态研究的各个领域, 目前已经发展成为研究微生物群落结构的主要分子生物学方法之一^[13-14]。笔者运用PCR-DGGE技术研究取自福建某炼油厂污水处理生化反应池的活性污泥, 在以芘为唯一碳源驯化过程中芘降解

收稿日期: 2009-06-22

基金项目: 国务院侨办自然科学基金项目(06QZR09); 福建省自然科学基金项目(D0710019)

作者简介: 周作明(1975-), 男, 湖南常德人, 博士研究生, 副教授, 主要从事环境生物技术方面的研究, zhoujing@hqu.edu.cn.

菌群落结构及其动态变化情况,以期筛选得到高效茈降解菌提供指导,进而为茈的微生物修复提供科学依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

福建某炼油厂污水处理生化反应池的活性污泥;无机培养基(MSM):1.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.8 g/L Na_2HPO_4 、0.2 g/L KH_2PO_4 、0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、5.0 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 mg/L $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pH 7.2, 121 °C 灭菌15 min。

1.2 方法

1.2.1 茈降解菌群的富集培养与驯化

量取10 mL活性污泥(1.8 mg/mL)到90 mL无菌水中,加入一定量的玻璃珠,150 r/min摇床震荡3 h。静置30 min后分离上清液,加入经过灭菌的纯甘油(上清液与甘油的体积比为4:1),于-20 °C保藏。另移取5 mL上清液到45 mL含茈的无机培养液中,茈的终质量浓度为50 mg/L。25 °C,150 r/min黑暗培养,观察培养液的浊度、颜色变化。如颜色呈黄色混浊时,移取5 mL上清液到新配制的45 mL含茈的无机培养液,再进行富集培养;如此富集培养5次,茈质量浓度分别为50、100、200、300、400 mg/L。每次收集混合菌液,加入20%甘油,于-20 °C保藏。

1.2.2 总DNA的提取

采用上海生工生物工程技术服务有限公司的细菌总DNA提取试剂盒DNA Isolation Kit,对6个时期的混合菌液提取总DNA,最后溶于20 μL 灭菌 ddH_2O ,取5 μL 样品用于0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测。电泳所用Marker为Fermentas DNA 100~10 000 bp Marker。

1.2.3 16S rDNA V3区PCR扩增

(1) 引物。采用由上海英俊生物技术有限公司合成的细菌16S rDNA通用引物341F(5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3')^[14-15]和517R(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')^[15]直接对总DNA进行PCR扩增,其中在341F的5'端加有42 bp的GC夹(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGC GCG GGC

GCA CGG GGG GCC-3')^[16],GC夹是为满足DGGE的温度而加^[17],用于后续的产物分离。

(2) PCR扩增体系。25 μL 的PCR反应体系组成如下:10 $\times$ PCR buffer(不含 Mg^{2+})2.5 μL , MgCl_2 (25 mmol/L)1.5 μL , dNTP(10 mmol/L)1 μL ,引物341F、517R(3 $\mu\text{mol/L}$)各1 μL ,普通Taq DNA聚合酶1 U, DNA模板50 ng,灭菌 ddH_2O 补至25 μL 。

(3) PCR反应条件。扩增反应在美国BIO-RAD公司的Peltier Thermal Cycler(PTC-200)中进行,采用降落(Touchdown)PCR模式运行。具体运行条件为:94 °C,预变性5 min,94 °C,变性1 min;65 °C,复性1 min,之后每2个循环降低复性温度1 °C,共计10个循环,72 °C延伸1 min;剩下20个循环的扩增参数为94 °C,变性1 min;55 °C,复性1 min;72 °C,延伸1 min。最后72 °C延伸10 min;10 °C保存。

(4) 回收PCR产物。将PCR产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,电泳所用Marker为天根DNA 200~4 500 bp Marker,切出目的片段约200 bp的条带置于2.0 mL离心管中,用购自OMEGA公司的试剂盒Gel Extraction Kit进行回收。

1.2.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

采用美国Bio-Rad公司DcodeTM的基因突变检测系统对PCR产物进行电泳分离。制备8%聚丙烯酰胺凝胶,变性剂的质量分数为30%~70%。待变性梯度胶完全凝固后,取PCR样品15 μL 和2倍加样缓冲液混合后加入上样孔。60 °C、40 V预电泳25 min,然后150 V电泳7 h。电泳完毕后,将凝胶进行银染。将染色后的凝胶用上海Tanon GIS凝胶成像系统分析,观察每个样品的电泳条带并拍照,计算各个样品的电泳条带的数量及面积,用于对图谱的统计分析。

运用统计学软件对DGGE图谱进行统计分析,主要包括各样品的丰富度、Shannon-Wiener多样性、相似性与聚类分析。

2 结果与分析

2.1 总DNA的提取

从图1可知,活性污泥驯化的6个不同时期的混合菌群总DNA均已提出,通过与DNA marker进行对比,其分子量大于10 000 bp,亮度和纯度都

较好, 没有拖尾现象, 说明 DNA 的提取获得了满意的结果。

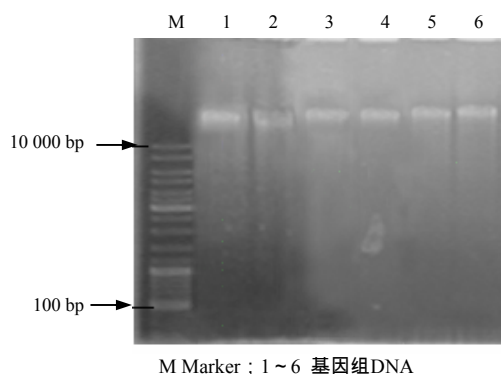


图1 基因组DNA的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel(0.8%)electrophoresis of genomic DNA of 6 samples

2.2 PCR扩增

采用降落PCR扩增,以等量的混合菌群总DNA为模板,采用对大多数细菌和古细菌的16S rDNA V3区通用引物(GC341F/517R)对每个时期混合菌群的总DNA进行扩增,在引物341F的5'端添加GC夹提高扩增片段的分离效果,不同时期混合菌群的PCR扩增结果如图2所示.不同时期混合菌群样品经PCR反应后获得了各个时期微生物的16S rDNA V3区的目的片段,琼脂糖凝胶电泳显示片段大小约200 bp,亮度和纯度都比较好,未出现非特异性扩增且阴性对照未有产物出现,说明PCR扩增效果良好.各个样品的扩增产物可以作为DGGE的样品,能够达到分离和鉴别各个样品中微生物种类的目的。

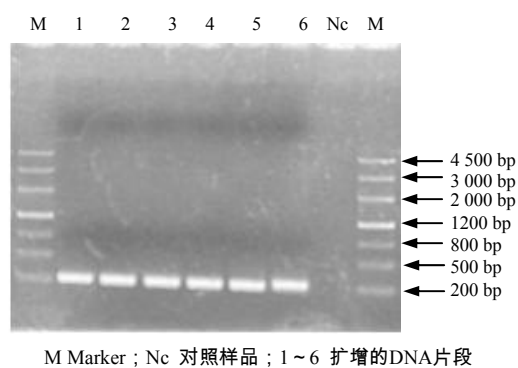


图2 PCR扩增产物凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel(0.8%)electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA of 6 samples

2.3 DGGE图谱分析

为考察活性污泥驯化过程中芘降解菌的群落多样性,对6个时期混合菌群的16S rDNA V3区的DNA片段进行了DGGE分析,结果如图3所示.6个样品中均有大量微生物种群存在,不同样品经过DGGE都可以分离出数目不等的电泳条带,且各个条带的信号强度和迁移位置不同.根据DGGE对具有相同大小而不同DNA序列的片段分离原理,可以得知6个样品中含有十几种不同序列的DNA片段,它们是一些特异微生物种类的16S rDNA V3区的DNA片段,每个独立分离的DNA片段原则上可以代表一个微生物种属.电泳条带越多说明生物多样性丰富,条带信号越强,表示该种属的数量越多^[20],从而可以确定样品中所含微生物的种类和数量关系,得出其中微生物群落多样性的信息。

根据DGGE图谱(图3),1号代表驯化前活性污泥中的混合菌群,有13根条带,其中a、b和c3个条带很亮,属于优势种群.以芘为唯一碳源对活性污泥进行驯化后,a、b、c3个条带消失,这3个种群不能以芘为唯一碳源生长.2~6号代表活性污泥驯化过程中芘质量浓度分别为50、100、200、300、400 mg/L 5个不同时期的混合菌群,电泳条带呈现一定变化,2号样品的条带数最多,有18个,3号样品的条带数降到了11个,4、5和6号样品的条带数维持在13个.他们既有一些相同的微生物种群,如条带A、B、C、D、E和F,虽然亮度有所变化,但存在于整个驯化过程中,在微生物群落的物质和能量代谢中发挥着重要作用;也有其各自独有的种群,如2号样品的条带d,5号样品的条带e,6号样品的条带f和g.条带D是驯化过程一直存在的优势种群,此种微生物能很好地以芘为唯一碳源进行生长,属于芘高效降解菌.另外,条带G和H代表3~6号样品的共有种群,不存在于1号和2号样品中,属于驯化过程中丰度提高显著的2个种群.通过条带亮度可以看出,G条带在3、4和5号样品中可视为顶级优势种群,而在6号样品中只是一般优势种群,该微生物种群在芘质量浓度低于300 mg/L时能很好生长,而当芘质量浓度增加到400 mg/L时,其生长受到抑制.如Calder等^[21]的研究发现,PAHs因水溶性差及其稳定的环状结构而不易被生物利用,它们

对细胞的破坏作用抑制普通微生物的生长。在活性污泥的驯化过程中，茚降解菌的群落结构和种群数量存在明显的演替过程，在演替过程中，既有原始种群的消亡，也有一些种群的增强，还有始终处于优势的种群，种群的功能地位处于动态变化中。如 Li 等^[22]在对不同深度重金属污染土壤样品的微生物多样性研究中，发现有新增条带出现。

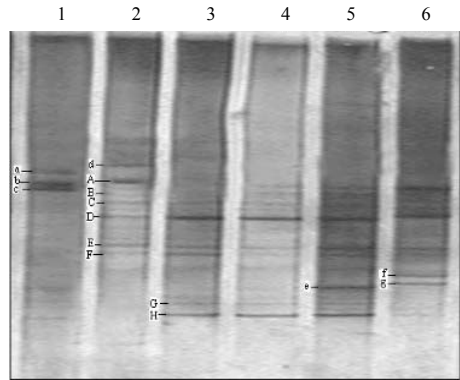


图 3 DGGE 凝胶电泳图象
Fig.3 DGGE patterns produced from 6 different samples

DGGE图谱的丰富度与Shannon-Wiener多样性分析结果见表1。2号样品的丰富度值最大，Shannon-Wiener多样性指数 H' 也最高，达3.78。活性污泥中的微生物能很好地利用50 mg/L的茚，形成了茚降解菌群，随着茚质量浓度的提高，茚降解菌群结构发生变化，一些种群因受到高浓度茚的抑制而被淘汰，同时有一些茚降解种群的丰度明显提高，微生物种群通过协同和竞争作用形成了稳定的茚降解菌群。DGGE图谱的相似性分析见表2。根据Jaccard相似性系数原理：当相似性系数为0.00~0.25时，为极不相似；0.25~0.5时为中等不相似；0.5~0.75时为中等相似；0.75~1.00时为极相似。由表2可以看出，在这个群落中，3号样品与4号样品最相似，其相似性系数为0.917，属于极相似。当茚质量浓度为100 mg/L和200 mg/L时，茚降解菌群处于稳定状

表 1 各阶段的细菌群落丰富度 (R_s) 与 Shannon-Wiener 多样性指数 (H')

Table1 Richness(R_s) and Shannon-Wiener index(H') of bacteria community in different periods						
Lane	1	2	3	4	5	6
R_s	0.17	0.24	0.15	0.17	0.17	0.17
H'	3.47	3.78	3.12	3.53	3.42	3.12

表 2 DGGE 图谱的相似性分析
Table 2 Coefficients (C_s) comparing the similarities of the DGGE profiles

	% profiles					
Lane	1	2	3	4	5	6
1	100	34.78	33.33	31.58	36.84	30.00
2	34.78	100	52.63	57.89	47.62	34.78
3	33.33	52.63	100	91.67	71.43	50.00
4	31.58	57.89	91.67	100	66.67	66.67
5	36.84	47.62	71.43	66.67	100	62.50
6	30.00	34.78	50.00	66.67	62.50	100

态，变化小。1号样品与6号样品最不相似，相似性系数仅为0.3，属于中等不相似。活性污泥经过以茚为唯一碳源的驯化后，微生物种群的群落结构发生了很大变化。

根据样品的聚类分析结果(图4)可知，茚的添加对活性污泥中的微生物种群结构造成很大影响，是影响微生物群落结构的重要因素^[23-24]。3号和4号样品单独聚在一起，5号6号样品没有聚在一起，当茚质量浓度达到200 mg/L时，茚降解菌群的群落结构处于稳定状态；茚质量浓度大于200 mg/L时，茚降解菌群的群落结构发生变化。如 Chinalia 等^[23]在研究2,4-二氯苯氧基乙酸的生物降解中微生物的多样性时发现，2,4-二氯苯氧基乙酸是影响微生物群落多样性的主要因素；任瑞霞等^[24]研究发现，当污染物的浓度达到一定程度时，土壤微生物群落结构会发生明显的改变。

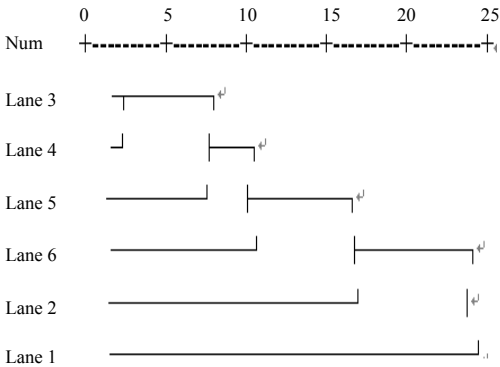


图 4 各阶段细菌群落的聚类分析
Fig.4 Cluster analysis for bacteria community in different periods

3 小 结

活性污泥以茚为唯一碳源驯化中，微生物群落经历了明显的演替过程，既有原始种群的消亡和新种群的增强，也有始终处于优势的种群，种群的功能

能地位处于动态变化中。群落结构和优势种群数量具有时序动态性,不同时期样品中既存在共同的微生物种群,也存在各自独有的微生物种群。

芘浓度是影响芘降解菌群落结构与种群数量的重要因素。当芘质量浓度逐步增加到200 mg/L时,芘降解菌的群落结构逐渐趋于稳定,群落相似性达0.917;当芘质量浓度超过200 mg/L时,芘降解菌的群落结构再次发生变化,群落多样性与相似性都逐步减小。

参考文献:

- [1] 郭楚玲,郑天凌. 多环芳烃的微生物降解与生物修复[J]. 海洋环境科学, 2000, 19(3): 24-29.
- [2] 巩宗强,李彬. 芘在土壤中的共代谢降解研究[J]. 应用生态学报, 2001, 12(3): 447-450.
- [3] Ravelet C, Krivobok S, Sage L, et al. Biodegradation of pyrene by sediment fungi[J]. Chemosphere, 2000, 40(5): 557-563.
- [4] Gibson D T, Mahadevan V, Jerina R M, et al. Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and dibenz[a, h]anthracene to dihydrodiols by a bacterium[J]. Science, 1975, 189(4199): 295-297.
- [5] 贾宝亮,范丙全,隋新华,等. 分枝杆菌 TZh51 菌株的分离鉴定及其生物修复污染土壤的特性[J]. 微生物学报, 2008, 48(9): 1214-1220.
- [6] 李全霞,范丙全,龚明波,等. 降解芘的分枝杆菌M11的分离鉴定和降解特性[J]. 环境科学, 2008, 29(3): 763-768.
- [7] 张杰,刘永生,冯家勋,等. 邻苯二酚 2, 3-双加氧酶基因克隆、定位和高效表达[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(5): 542-545.
- [8] Kim S J, Kweon O, Jones R C, et al. Complete and integrated pyrene degradation pathway in mycobacterium vanbaalenii PYR-1 based on systems biology[J]. J Bacteriol, 2007, 189(2): 464-472.
- [9] 张清敏,侯树宇,多淼,等. 高效降解芘基因工程菌及其构建: 中国, CN1746293[P]. 2006-03-15.
- [10] Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rDNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. Nature, 1990, 345(6270): 63-65.
- [11] Hedrick D B, Peacock A, Stephen J R, et al. Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data[J]. J Microbiol Methods, 2000, 41(3): 235-248.
- [12] Muyzer G, 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 RNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700.
- [13] 廖晓兰,朱水芳,罗宽. 基因突变和单核苷酸多态性分析技术新进展[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2002, 28(5): 447-451.
- [14] Muyzer G, Brinkhoff T, Ulrich N. Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) in microbial ecology[J]. Molecular Microbial Ecology Manual, 1998, 34(4): 1-27.
- [15] Antegoeds C M, Nold S, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacterial mat[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(11): 3922-3928.
- [16] 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[J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13(9): 3131-3145.
- [17] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1996: 919-929.
- [18] Watanabe T, Asakawa S, Nakamura A, et al. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil[J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 232(2): 153-163.
- [19] Whittaker R H. Evolution and measurement of species diversity[J]. Taxon, 1972, 21(2/3): 213-251.
- [20] 邢德峰,任南琪,宋业颖,等. DG-DGGE分析产氢发酵系统微生物群落动态及种群多样性[J]. 生态学报, 2005, 25(7): 1818-1823.
- [21] Calder J A, Lader J H. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Appl Environ Microbiol, 1976, 32(1): 95-101.
- [22] Li Z J, Xu J M, Tang C X, et al. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn- and Cd-contaminated paddy soils[J]. Chemosphere, 2006, 62(8): 1374-1380.
- [23] Chinalia F A, Killham K S. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) biodegradation in river sediments of Northeast - Scotland and its effect on the microbial communities (PLFA and DGGE)[J]. Chemosphere, 2006, 64(10): 1675-1683.
- [24] 任瑞霞,张颖,李慧,等. 石油污染土壤水改旱后污染物组份及微生物群落结构变化[J]. 应用生态学报, 2007, 18(5): 1107-1112.

责任编辑: 娄敏

英文编辑: 罗文翠