

应用 PCR-DGGE 技术研究处理含氨废气的生物滤塔中微生物多样性

殷峻, 陈英旭*, 刘和, 王远鹏

(浙江大学环境与资源学院环境工程系, 杭州 310029)

摘要:变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)在微生物生态学领域有着广泛的应用. 本文应用 DGGE 技术对处理含氨废气的生物滤塔中微生物多样性随时间的变化进行了研究. 在生物滤塔运行的不同时间采集滤塔中的填料样品, 进行了生物滤塔对氨处理效果的分析和 DGGE 分析. 结果显示, 污泥和混合填料生物滤塔氨的出气浓度在经过一段时间后, 逐渐升高, 而堆肥生物滤塔的运行情况较好, 对氨的去除效率始终在 98% 以上. PCR-DGGE 图谱显示, 不同时间的相同填料中微生物 DGGE 图谱有着明显的差异性. Shannon 指数分析表明, 填料中微生物的多样性都随着反应器运行时间的延长而有所减少. 运行一个月后, 混合填料的微生物多样性指数最低为 0.389; 其次为污泥填料, 其多样性指数为 0.473; 堆肥填料的微生物多样性程度最高为 0.569. 生物滤塔对氨的去除效果与填料中微生物多样性 Shannon 指数之间有一定的相关关系. 主成分分析(PCA)显示对于堆肥和污泥来说, 填料样品之间微生物群落结构相似性较高, 而混合填料样品间的微生物群落结构相似性较低.

关键词:生物滤塔; 氨; 微生物多样性; 变性梯度凝胶电泳技术

中图分类号: X511 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)06-0011-05

Preliminary Application of PCR-DGGE to Analyzing Microbial Diversity in Biofilters Treating Air Loaded with Ammonia

YIN Jun, CHEN Ying-xu, LIU He, WANG Yuan-peng

(Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: As a new DNA fingerprinting technique, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) can be used to analyze the microbial diversity in different environmental samples. Three biofilters treating air loaded with ammonia will be studied with respect to microbial diversity by applying cultivation-independent molecular methods DGGE. The principal objectives of this paper include the development and application of a suitable set of molecular tools to deliver information about the possible microbial community changes within carriers during treatment of ammonia-contaminated gas. Carriers were sampled at different time during operation of biofilters. After extraction and purification of the genomic DNA, the 16S rRNA genes (V3 region) were amplified by using the specific primers. These amplified DNA fragments were then separated by paralleled DGGE. The profile of DGGE showed that the same carrier at different time had the different bands' patterns. The structural diversity of the microbial community was examined by the Shannon index of general diversity H' . Shannon indexes of three kinds of carriers all showed a decrease with time, which had a similar trend to NH_3 removal efficiency.

Key words: biofilter; ammonia; microbial diversity; DGGE

生物过滤是一种能有效处理恶臭和挥发性有机废气的气体污染控制技术. 在美国和欧洲, 该技术已被广泛应用了 40 多年, 主要用于处理来自城市生活污水处理设施、炼油厂、堆肥设施以及其它产生恶臭的操作过程所产生的恶臭气体^[1-3]. 生物滤塔是该技术的一种装置形式, 装置内填充有土壤、泥炭或其它填料, 含有可生物降解的挥发性有机物(Volatile Organic Compound, VOC), 其它有毒或恶臭物质的气体通过填料, 被填料中的微生物所降解.

目前对生物滤塔处理恶臭气体的研究主要集中在工艺参数和设计参数的优化, 而对其中微生物的研究涉及很少. 而实际上, 生物滤塔中微生物的种群结构以及微生物多样性对于恶臭气体的处理效率以

及反应器的稳定运行至关重要. 由于传统的基于可培养的微生物学研究方法对填料中微生物多样性的研究有很大的缺陷, 目前的趋势是采用分子生物学的手段来对反应器内的微生物生态进行研究^[4,5]. 本研究采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(Polymerase Chain Reaction-Denature Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE)技术研究了处理含氨废气的生物滤塔填料中微生物, 通过比较反应器不

收稿日期: 2004-01-19; 修订日期: 2004-04-08

基金项目: 浙江省科技厅重大科技项目(021103723)

作者简介: 殷峻(1977~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境污染模拟与控制.

* 通讯作者 E-mail: yxchen@zju.edu.cn Tel: 0571-86971159

和 40 %去离子甲酰胺的混合物)的 10 %聚丙烯酰胺凝胶,其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增. PCR 样品的加样:待胶完全凝固后,将胶板放入装有电泳缓冲液的装置中,在每个加样孔加入含有 10 %的加样缓冲液的 PCR 样品 15 ~ 20 μL . 电泳及染色:在 155 V 的电压下,60 电泳 5.5 h. 电泳完毕后,将凝胶进行硝酸银染色. 照相及观察: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.

(4) 变性梯度凝胶电泳(DGGE)胶 DNA 条带分析 Shannon 指数:物种多样性是指群落中物种数目的多少,它是衡量群落规模和重要性的基础. 种类越多,各个种个体数量分布越均匀,物种多样性指数越大. 实验后,对 DGGE 图谱进行软件分析,后进行 Shannon 指数计算. 根据 Shannon CE、Weaver (1963 年)的方法^[10],微生物种群结构多样性指数可用 Shannon 指数 H 来表示, H 的计算是基于 DGGE 胶条带的位置和条带的强度,而条带的强度则通过条带的峰面积来表示. 分析软件是 Tanon GIS 凝胶成像系统. Shannon 指数的公式为:

$$H = - \sum (ni / N) \log (ni / N)$$

其中 ni 为峰面积, N 为所有峰的总面积. 主成分分析(PCA):根据分析软件得到通过 DGGE 的条带配对图,在条带出现的地方定义为 1,未出现的地方记为 0,这样就得到的 DGGE 条带配对的二次矩阵,根据二次矩阵用 SPSS 11.0 进行主成分分析.

2 结果与讨论

2.1 生物滤塔处理含氨废气的效果

实验开始时没有向生物滤塔处理系统中接种硝化细菌,完全靠填料中固有的微生物来进行含氨废气的处理. 实验的目的就是考察在不接种微生物的情况下,是否可以依靠填料中本身富集的微生物进行反应器的启动. 不同填料的生物滤塔对氨的处理结果见图 2,反应器运行过程中填料中各种形态氮的浓度见图 3. 氨的平均进气浓度在 45mg/ m^3 左右,从图 2 中可以看出,污泥和混合填料生物滤塔氨的出气浓度在经过一段时间后,逐渐升高. 而堆肥的运行情况较好,对氨的去处效率始终在 98 %以上. 结合图 3,可知堆肥填料中亚硝态氮和硝态氮的浓度是不断增加的,氨氮稍有积累,说明填料中发生了氨化和硝化作用,该填料本身含有大量的氨氧化菌和硝化细菌,能及时地将吸附的氨转化为亚硝酸盐和硝酸盐,使得出气中氨的浓度较低,表现出较高的去除效率.

而污泥和混合填料的情况恰恰相反,亚硝态氮和硝态氮的浓度的变化不明显,氨氮的浓度急剧增高,这说明由于污泥和混合填料系统中硝化细菌数量较少,对氨的去除以吸附作用为主,因此,在运行一段时间后,当吸附达到饱和,去除能力开始下降.

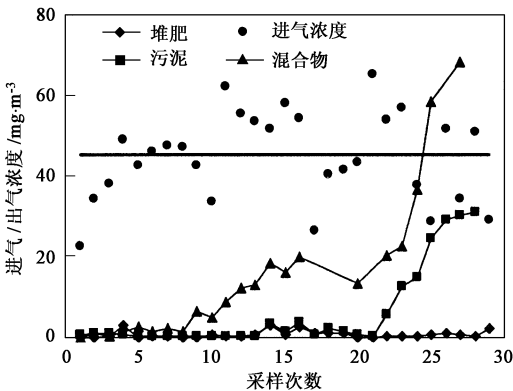


图 2 不同填料的生物滤塔对氨的处理结果
Fig. 2 The removal of NH₃ in the different biofilters

2.2 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

为了考察样品的重复性,14 个样品在相同的 DGGE 电泳条件下重复做了 2 次,2 次的电泳结果相同. 各个填料样品的 DGGE 电泳结果如图 4 所示,每个填料样品经过变性梯度凝胶电泳(DGGE)都可以分离出数目不等的电泳条带,且各个条带的强度和迁移率各不相同.

为了分析各个样品的 DNA 电泳带型所代表的微生物种群多样性,计算了各个样品的 Shannon-Weaver (H). Shannon-Weaver (H) 多样性指数分别对不同填料中微生物 16S rRNA 的 DGGE 结果进行计算,计算结果如表 2. 根据表 2 可以看出与对照(D0

表 2 不同填料样品 DGGE 条带的 Shannon 指数
Table 2 Shannon index of the DGGE gel patterns

样品名称	采样号	Shannon 指数	对氨的去除效率/ %
堆肥	D0	1. 021	
	D1	0. 974	99. 0
	D2	0. 888	98. 6
	D3	0. 546	98. 7
	D4	0. 569	98. 5
混合填料	H1	0. 864	91. 7
	H2	0. 764	66. 1
	H3	0. 764	25. 2
	H4	0. 389	- 50. 0
污泥	W0	1. 000	
	W1	0. 865	98. 4
	W2	0. 687	96. 0
	W3	0. 662	69. 1
	W4	0. 473	25. 9

和 W0)相比,填料微生物的多样性指数都随着反应器的运行时间的延长而逐渐减小,说明 3 种填料内部的微生物多样性均逐渐降低,分析原因可能是由于反应器中氨的去除主要依靠氨氧化菌和硝化细菌(功能型微生物),而氨对其它微生物(非功能型微生物)有毒害作用,因此微生物数量会逐渐减少,导致多样性程度降低.运行 1 个月后混合填料的微生物多样性指数最低为 0.389,此时该反应器的去除能力最差;其次为污泥填料,其多样性指数为 0.473;堆肥填料的微生物多样性指数最高为 0.569,此时该反应器的去除能力也最好.

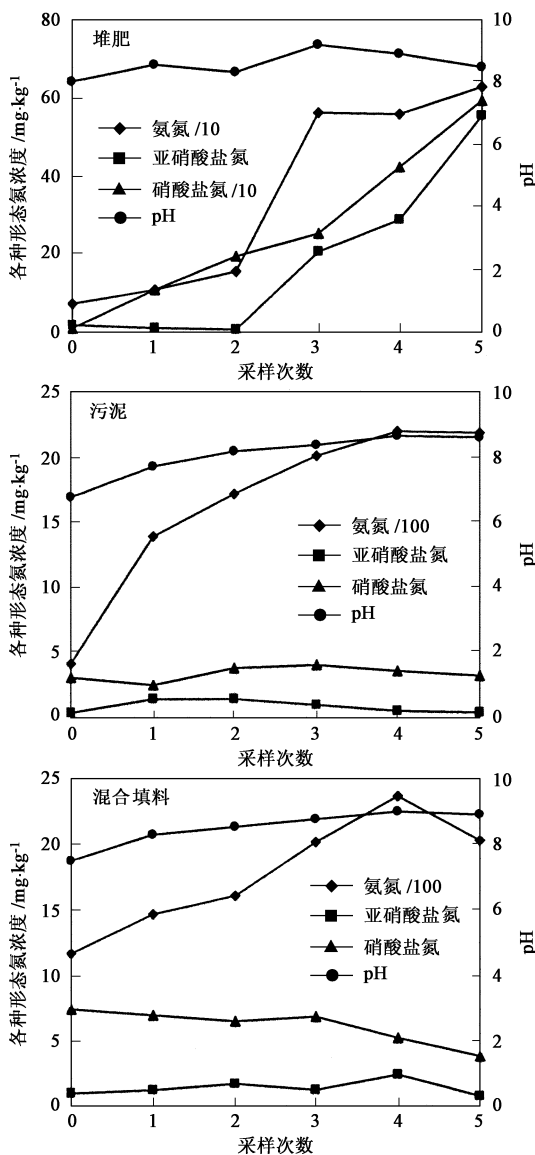


图 3 生物滤塔中各种形态氮浓度的变化

Fig. 3 Change in various forms of nitrogen during the biofilter experiment

从表 2 和图 4 可以看出,污泥和混合填料的

DGGE 电泳条带数目的减少最为明显,结合图 2 和图 3 说明 2 体系去除效率的下降是由于填料中微生物种群结构发生了显著变化,细菌种类和数量减少,系统中氨氧化和硝化细菌数量较少.根据 DGGE 对不同 DNA 片断分离原理,可以得知 14 个填料样品的 PCR 产物中含有多种数目不等的不同的 DNA 片断,它们是一些种类的微生物的 16S rRNA 基因 V3 区的 DNA 片断,如果通过对这些 DNA 片断的测序以及和国际标准核酸库的比对,就可以得出这些在 DGGE 中被分离的 DNA 片断所代表的微生物的种属关系,从而确定不同样品中所含有的微生物的种类.

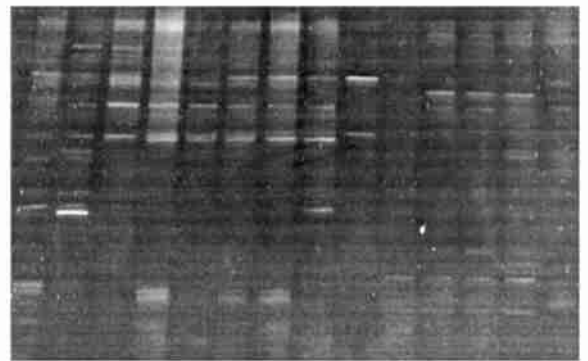


图 4 不同填料样品的 DGGE 分离图谱

Fig. 4 DGGE profile of different carriers samples

根据主成分分析得到 DGGE 数据的因子载荷,由于因子载荷通常反映了微生物群落的生理轮廓,是其群落结构和功能多样化的具体体现,因此因子载荷图能直观地反映出随着反应器的运行填料中微生物群落的变化.图 5 反映了不同时间采集的填料样品中微生物 DGGE 结果的因子载荷变化.从图 5 可以看出,和堆肥填料一样,污泥填料样品之间的微生物群落结构相似性较高;而混合填料样品点的离散程度较高,说明其样品间微生物种群结构变化较大.不过从图中也可以看出混合填料开始的 3 个样品点的位置靠近堆肥样品,最后 1 个样品点的位置靠近污泥样品,说明在反应器运行过程中其微生物群落结构与堆肥的更为相似.

2.3 不同填料中微生物多样性 Shannon 指数与氨的去除效率的相关性

不同生物滤塔对氨的去除效率与微生物多样性 Shannon 指数的相关关系见表 3.污泥和混合填料生物滤塔对氨的去除效率与 Shannon 指数的相关指数

分别为 0.904 和 0.953,表明反应器中微生物的多样性和氨的去除效率存在比较明显的正相关关系.堆肥生物滤塔对氨的去除效率与其微生物多样性之间的相关性不明显,表现为滤塔中微生物多样性虽然有所减少,但是氨的去除效率并没有下降.这是由于该滤塔中存在着的氨氧化微生物(即功能性微生物)的种类和数量并没有减少,因此氨的去除效率没有降低.目前,笔者正在对堆肥填料的 DGGE 凝胶上的 DNA 条带进行割胶回收,并克隆测序来鉴定这些功能性微生物的种属.这将有助于探明这一现象的微生物学机理.

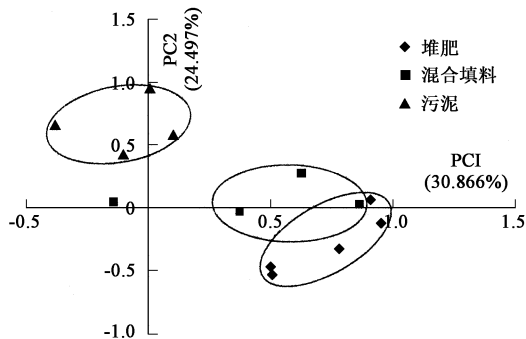


图 5 不同填料样品 DGGE 结果的主成分分析
Fig.5 PCA analysis of the DGGE gel patterns

表 3 氨的去除效率与 Shannon 指数的相关性¹⁾

Table 3 Relativity between NH₃ removal efficiency and Shannon index

填料	氨的去除效率与 Shannon 指数的相关性
堆肥	0.632
混合填料	0.953
污泥	0.904

1) $n = 4, r_{0.05} = 0.950, r_{0.01} = 0.990$

3 结论

利用 DGGE 技术对处理含氨废气的生物滤塔中微生物多样性的研究发现,不同时期的相同填料中微生物 DGGE 图谱有着明显的差异性.由于氨对微生物的生长有抑制作用,氨的加入改变了填料中微生物原来的群落结构,从而使其微生物多样性在 DGGE 胶上表现为条带数目的变化.随着微生物的群落结构和基因型的改变,各反应器氨的出口浓度有明显的变化. Shannon 指数分析表明,填料中微生物的多样性都随着反应器运行时间的延长而有所减少.主成分分析 (PCA) 显示对于堆肥和污泥来说,相同填料样品之间微生物群落结构相似性较高,而混合填料样品间的微生物群落结构相似性较低.生物滤塔对氨的去除效果与填料中微生物多样性

Shannon 指数之间有一定的相关关系.

本研究只是从 DGGE 带谱的差异上初步比较了反应器在不同运行时间下,其中细菌多样性的差异.最终要确定某一环境中的微生物群落的结构及组成需要与其它分子生物学的方法^[11,12]结合起来,但是该研究得到的信息对进一步应用 DGGE 或其它方法研究该环境中的微生物多样性有很重要的指导意义.

参考文献:

[1] Burgess JE, Parsons SA, Stuetz RM. Developments in odour control and waste gas treatment biotechnology: a review [J]. Biotechnol. Adv. , 2001, **19**: 35 ~ 63.

[2] Kennes C, Thalasso F. Waste gas biotreatment technology [J]. J. Chem. Technol. Biotechnol. , 1998, **72**: 303 ~ 319.

[3] Leson G, Winer AM. Biofiltration: an innovative air pollution control technology for VOC emissions [J]. J. Air Waste Manage. Assoc. , 1991, **41**, 1045 ~ 1054.

[4] M ØLLER S, PEDERSEN AR, POULSEN L K, *et al.* Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy [J]. Appl. Environ. Microbiol. , 1996, **62**: 4632 ~ 4640.

[5] Bruns MA, Hanson JR, Mefford J, *et al.* Isolate PM1 populations are dominant and novel methyl tert-butyl ether-degrading bacteria in compost biofilter enrichments [J]. Environ. Microbiol. , 2001, **3**: 220 ~ 225.

[6] Zhou J, Mary B, James M T. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Appl. Environ. Microbiol. , 1996, **62**: 316 ~ 322.

[7] Helmut B, Manuel P, Franco W, *et al.* A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted form soil [J]. J Microbiol. Meth. , 2001, **45**: 7 ~ 20.

[8] Muyzer G, Ellen CW, Andre GU. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction genes coding for 16S rRNA [J]. Appl. Environ. Microbiol. , 1993, **59**: 695 ~ 700.

[9] Zwart G, Huismans R, Agterveld MP, *et al.* Divergent members of the bacterial division *Verrucomicrobiales* in a temperate freshwater lake [J]. FEMS Microbiol. Ecol. , 1998, **25**: 159 ~ 169.

[10] Shannon C E, Weaver W. University of Illinois Press, Urbana, IL. , 1963.

[11] Thomas L, Peter F D, Werner L. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and nontransgenic potato plants[J]. FEMS Microbiol. Ecol. , 2000, **32**: 241 ~ 247.

[12] van Elsas JD, Duarte GF, Rosado AS, Smalla K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment [J]. J. Microbiol. Meth. , 1998, **32**: 133 ~ 154.