

不同驯化手段下多氯联苯降解菌群落结构差异分析

梁文涓¹, 闫勇² (1. 沈阳建筑大学市政与环境工程学院, 辽宁沈阳 110168; 2. 沈阳建筑大学土木工程学院, 辽宁沈阳 110168)

摘要 [目的] 研究不同驯化手段下多氯联苯降解菌群落结构差异, 为多氯联苯污染场址的生态修复提供借鉴。[方法] 应用 PCR-DGGE 技术对 8 种驯化手段下的活性污泥进行分析。[结果] 加入同一种 PCB 单品的体系中, 生物群落的相似度相对较高; 好氧体系之间的相似性较好氧与厌氧体系之间的相似性要高; 在好氧条件下, 高氯 PCB 体系较低氯 PCB 体系中生物相丰富; 好氧体系较厌氧体系的生物相丰富; 一些物种在好氧体系和厌氧体系中均存在。[结论] 该研究有利于多氯联苯降解菌库的充实和完善。

关键词 多氯联苯; PCR-DGGE; 活性污泥; 群落结构

中图分类号 S188; X171.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)22-011-03

Analysis on the Community Structure of PCBs Degrading Bacteria under Different Domestication Means

LIANG Wen-juan¹, YAN Yong² (1. School of Municipal and Environmental Engineering, Shenyang Jianzhu University, Shenyang, Liaoning 110168; 2. School of Civil Engineering, Shenyang Jianzhu University, Shenyang, Liaoning 110168)

Abstract [Objective] The aim was to analyze the differences of community structure of PCBs degrading bacteria under different means of domestication means, and provide references for the ecological restoration of contaminated sites by polychlorinated biphenyls. [Method] PCR-DGGE technology was used to analyze the activated sludges under 8 kinds of domesticated methods. [Result] To join the same kind of PCB item system, the similarity of biological communities was relatively high; In aerobic system the similarity was higher than between aerobic and anaerobic systems; Under aerobic conditions, biological phase in the high chlorine PCB system was richer than in low chloride PCB system; biological phase in aerobic system was richer than the anaerobic system; Some species was existed in aerobic system and anaerobic systems. [Conclusion] Some empirical rules were obtained, which was conducive to the enrichment and improvement of the library of PCBs degradation bacteria.

Key words Polychlorinated biphenyls; PCR-DGGE; Activated sludge; Community structure

微生物降解被认为是 PCBs 在自然界中降解的主要途径, 有关此类的研究相当活跃。近年来在其基础上发展起来的应用生物降解原理治理被污染环境的生物修复技术发展很快, 由于其经济、安全, 能处理的阈值低、残留少, 其应用前景十分广阔。研究不同驯化手段下多氯联苯降解菌群落结构差异可以为多氯联苯污染场址的生态修复提供借鉴。

变性梯度凝胶电泳 (denatured gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术是基于核酸序列的不同, 将片段大小相同的 DNA 序列分开^[1]。不同序列的 DNA 片段都有一个或多个溶解区域, 首先在解链温度较低的碱基区域开始解链, 即 DNA 中 A:T 碱基区域首先溶解, 而 G:C 含量高的区域仍保持双链。部分溶解的 DNA 双链最后停留在各自相应的变性剂浓度下变性, 发生空间构型的变化, 导致电泳速度急剧下降, 最后在其相应的变性剂梯度位置停滞^[2], 这种电泳迁移率的差异经过染色后可以在凝胶上呈现为分散的条带。由于 DNA 分子中 G:C 碱基对比 A:T 碱基对结合更为牢固, G:C 含量高的区域需要较高的解链温度。为了提高 DGGE 对序列差异的分辨率, 通常在引物的 3' 端加上一个“GC 夹板” (GC-clamp), 一般含有 30~50 个碱基, 从而形成一个人工高温解链区, 使 DNA 片段的原有部分由于处在低温解链区, 从而实现更好的分离效果。通过“GC 夹板”与 PCR 技术相结合, 运用 DGGE 技术可检测 PCR 扩增 DNA 片段的多态性, 分辨具有相同或相近分子量目的片段的序列差异, 进一步分析活性

污泥微生物群落中优势种群以及群落结构多样性。该技术是目前研究微生物群落结构的主要分子生物学方法之一。笔者应用凝胶分析软件 BandScan5.0 对 DGGE 图谱的条带进行影像定位和相似性分析, 并建立系统发育树, 进行聚类分析。

1 材料与方法

1.1 活性污泥 DNA 提取 取天津市纪庄子污水处理厂和天津市大沽化工污水处理厂处理过程中的活性污泥。

50 ml 培养体系中有 10 ml 活性污泥混合液, 加入不同的 PCB 单品 (表 1), 浓度均为 5 mg/L, 培养基成分同富集培养基。

按 Biospin Bacteria Genomic DNA 提取试剂盒的使用说明书对上述预处理后污泥混合液的细菌 DNA 进行提取, 最终得到 100 μl DNA 溶液置于 -20 °C 冷冻保存。对编号 1~8 活性污泥体系的 DNA 逐一进行提取。

表 1 DNA 提取体系

体系编号	活性污泥来源	PCB 种类
1	纪庄子污水处理厂	2,2'-二氯联苯
2	大沽化工厂	2,2'-二氯联苯
3	纪庄子污水处理厂	3,3',4,4'-四氯联苯
4	大沽化工厂	3,3',4,4'-四氯联苯
5	纪庄子污水处理厂	2,2',3,4,5-五氯联苯
6	大沽化工厂	2,2',3,4,5-五氯联苯
7	纪庄子污水处理厂 (厌氧)	3,3',4,4'-四氯联苯
8	大沽化工厂 (厌氧)	3,3',4,4'-四氯联苯

注: 1~6 为好氧降解体系, 7 和 8 为厌氧降解体系。

提取出的 DNA 溶液在 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测, 电泳条件: 电压 120 V, 上样液为 6 × Loading Buffer, 上样

作者简介 梁文涓 (1990-), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 研究方向: 污染修复生态学。

收稿日期 2015-06-01

比例为 DNA 溶液 10 μl + 6 \times Loading Buffer 2 μl , 每个 DNA 提取体系设 2 个上样点, 每个泳道上样量为 20 μl , Marker 为 λ Hind III, 电泳时间为 50 min。

1.2 PCR 扩增 将提取的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。扩增引物 1 为带有一“GC 夹”^[3] (5'-CGCCCGC-CGCGCGGCGGCGGGCGGCACGGGGG-3') 的 357F (5'-GC clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'); 扩增引物 2 为 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), 扩增产物片段长约为 600 bp^[4], 引物浓度调节到 0.1 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

50 μl 反应体系: 1 μl DNA 模板, 25 μl 2 \times PCR Master Mix (含有 3 mmol MgCl_2 , 0.2 mmol/L 的 dNTP, 0.1 U/ μl 的 *Taq* DNA 聚合酶和 2 \times PCR 缓冲液), 2 μl 引物 1, 2 μl 引物 2, 其余用无菌超纯水补足 50 μl ^[5]。

PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 2 min。扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测。电泳条件: 电压 90 V, 每个泳道上样量为 15 μl , Marker 为 λ

Hind III, 电泳时间为 50 min。PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

1.3.1 PCR 产物变性梯度凝胶电泳分析。 将总细菌 PCR 产物用变性梯度凝胶电泳分离, 电泳缓冲液为 1 \times TAE。使用梯度混合器制备 6% ~ 12% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂浓度 30% ~ 50%。在 150 V、60 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下电泳 6.5 h。电泳完毕后, 将凝胶进行硝酸银染色。

1.3.2 DGGE 图谱分析。 应用凝胶图像分析软件 Band-Scan5.0 对扫描所得的 DGGE 图谱进行条带分析, 获取条带的数字化信息, 然后用 NTSYS-PC 软件计算材料间的 Dice 遗传相似系数进行相似度分析, 按不加权重对算术平均法 (UPGMA) 建立系统聚类分支树状图进行聚类分析, 评价样品微生物群落结构。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物电泳结果 将 PCR 产物取样 15 μl 进行变性梯度凝胶电泳, 结果见图 1。

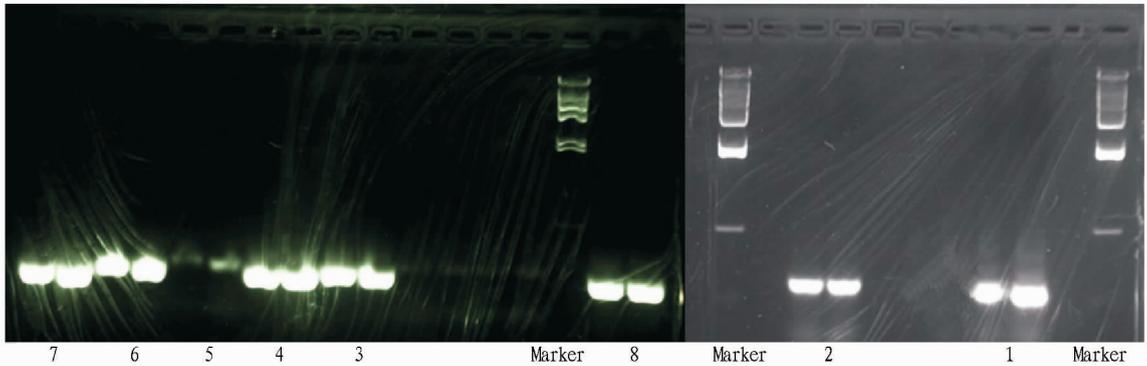


图 1 8 个体系的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 变性梯度凝胶电泳分离扩增结果 将 8 个驯化体系所得的 16S rRNA 片段通过变性梯度凝胶电泳。应用凝胶分析软件 BandScan 对扫描所得的 DGGE 图谱进行条带分析, 获取条带的数字化信息。由图 2 可知, 分离得到一系列条带, 根据条带对比的结果, 根据戴斯系数 (Dice coefficient) 计算出各样品相似性矩阵 (表 2), 最大相似度为 0.806 (体系 5 和体系 6), 最小相似度为 0.627 (体系 2 和体系 4)。相似性高说明体系中生物群落相似性越高; 相似性低说明微生物群落多样化。

由图 3 可知, 1~6 好氧体系中, 来自大沽化工厂活性污泥的体系条带个数明显多于纪庄子污水处理厂。天津大沽化工厂以食盐电解为基础, 另外还生产烧碱、聚氯乙烯树脂、环氧丙烷、聚醚、液体氯、合成盐酸等产品, 是一家综合性大型氯碱企业, 该厂废水的含氯有机物种类繁多, 造成了活性污泥中特殊的微生物群落。因此, 大沽化工厂的污泥中适应 PCBs 的微生物相明显比处理生活污水的纪庄子污水处理厂污泥的微生物相丰富。该研究中厌氧体系只有 2 个, 可以作为对照。

在四氯代的体系中 (体系 3、4、7、8), 好氧条件下, 大沽化工厂的污泥体系 (体系 4) 可利用 PCBs 的微生物比纪庄子

的污泥体系 (体系 3) 丰富; 而厌氧条件下, 纪庄子的污泥体系 (体系 4) 可利用 PCBs 的微生物比大沽化工厂的污泥体系 (体系 3) 丰富。

从氯取代的个数来看, 可利用四氯代的 PCBs 微生物可能比可利用二氯联苯、五氯联苯的种类更多。

表 2 8 个驯化体系微生物群落结构的相似性矩阵

体系	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1							
2	0.746	1						
3	0.731	0.687	1					
4	0.702	0.627	0.672	1				
5	0.761	0.716	0.762	0.701	1			
6	0.746	0.702	0.746	0.716	0.806	1		
7	0.716	0.672	0.716	0.687	0.776	0.761	1	
8	0.731	0.687	0.791	0.672	0.761	0.746	0.716	1

由图 2 可知, 每个样品各分离出不同位置的电泳条带, 各条带的形成是基于 PCR 产物产量和迁移率的不同, 因此可以表征污泥样品中优势菌群的分布^[6]。根据 DGGE 对不同 DNA 片段的分离原理, 可以得知样品的 PCR 产物中既含有相同的 DNA 片断, 也含有多种不同的 DNA 片断。从原理

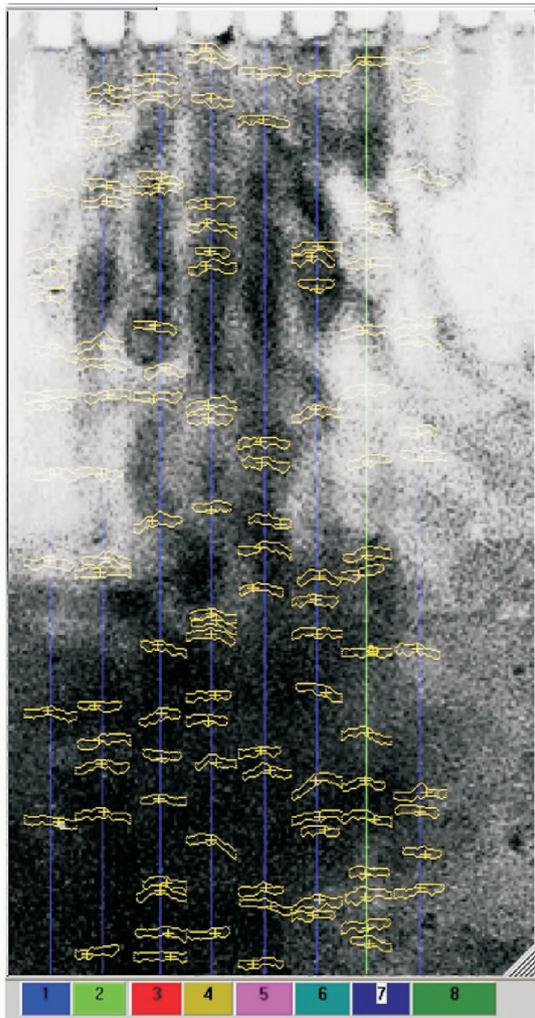


图2 8个驯化体系 16S rDNA 的 DGGE 分离结果

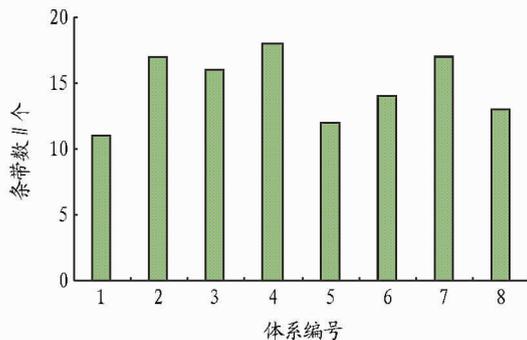


图3 8个驯化体系 DGGE 分离条带个数

上,每一个片断可以代表一个微生物种属,条带信号越强,该种属在污泥中具有越明显的优势地位。

2.3 聚类分析 通过 NTSYS-PC 软件对 DGGE 指纹图谱进行 UPGMA 聚类分析(图4)。当相似度为 0.72 时,8 个体系可聚为 3 类。

类 I 包含 2 个体系,分别是:添加二氯联苯(2,2'-二氯联苯)和纪庄子污水处理厂活性污泥的好氧体系(编号 1)、添加二氯联苯(2,2'-二氯联苯)和大沽化工厂活性污泥的好氧体系(编号 2)。两者均为好氧培养条件下添加二氯联苯(2,2'-二氯联苯)的体系。

类 II 有 5 个体系,分别是:添加四氯联苯(3,3',4,4'-四氯联苯)的纪庄子污水处理厂的好氧体系(编号 3)、添加四氯联苯(3,3',4,4'-四氯联苯)的大沽化工厂活性污泥的好氧体系(编号 4)、添加五氯联苯(2,2',3,4,5-五氯联苯)的纪庄子污水处理厂活性污泥的好氧体系(编号 5)、添加五氯联苯(2,2',3,4,5-五氯联苯)的大沽化工厂活性污泥的好氧体系(编号 6)、添加四氯联苯(3,3',4,4'-四氯联苯)的纪庄子化工厂活性污泥的厌氧体系(编号 7)。

类 III 只有一个体系:添加四氯联苯(3,3',4,4'-四氯联苯)的大沽化工厂活性污泥的厌氧体系(编号 8)。

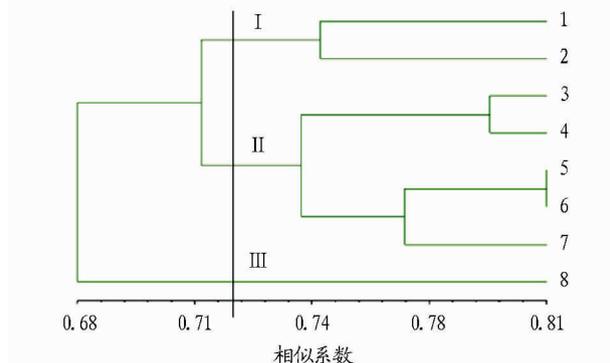


图4 8个驯化体系微生物群落结构的 UPGMA 聚类分析

3 结论与讨论

该研究总体呈现如下规律:①加入同一种多氯联苯单品的体系中,生物群落的相似度相对较高;②好氧体系之间的相似性较好氧与厌氧体系之间的相似性要高;③在好氧条件下,高氯 PCB 体系较低氯 PCB 体系中生物相丰富;④好氧体系较厌氧体系的生物相丰富;⑤一些物种在好氧体系和厌氧体系中均存在。

采用不同驯化手段分析了多氯联苯降解菌群落结构差异性,该研究主要从好氧、厌氧,以及加入不同的多氯联苯单品形成不同的驯化环境,对多氯联苯降解菌进行定向驯化。通过 NTSYS-PC 软件对 DGGE 指纹图谱进行 UPGMA 聚类分析,可以了解多氯联苯降解菌群落结构差异性以及相关性的规律,得出一些经验性的规律,有利于多氯联苯降解菌库的充实和完善。

参考文献

- [1] 张振冬,王淑芬,曹宇峰. DGGE 技术及其在海洋环境微生物多样性研究中的应用[J]. 海洋环境科学,2008,27(3):298-300.
- [2] 邢德峰,任南琪. 应用 DGGE 研究微生物群落时的常见问题分析[J]. 微生物学报,2006,46(2):331-335.
- [3] AHN J, DAIDOU T. Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay [J]. Water Research, 2002, 36:403-412.
- [4] LIU Y N, XUE G. Comparing results of cultured and uncultured biological methods used in biological phosphorus removal [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19:1373-1379.
- [5] HERBERT H H P, ZHANG T, LIU Y. Characterization of an acetate-degrading sludge without intracellular accumulation of polyphosphate and glycogen [J]. Water Research, 2002, 36:3211-3218.
- [6] 齐云. 氯苯甲酸降解菌的分离筛选及降解特性研究[D]. 天津:天津大学,2007.