

生物转鼓过滤器反硝化去除 NO 过程中微生物群落结构多样性解析

陈浚¹, 王智晔², 蒋轶锋^{1*}, 钱海丰¹, 沙昊雷¹, 陈建孟¹

(1. 浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310032; 2. 浙江大学生命科学院, 杭州 310058)

摘要: 采用 PCR-DGGE 技术分析了生物转鼓过滤器(RDB)反硝化去除 NO 过程中的微生物多样性. 研究表明, RDB 中存在 16 种优势菌, 并且沿填料径向不同位置的 DGGE 图谱差异性不大, 细菌群落结构具有较高相似性. 通过 DGGE 图形比较和微生物群落生物多样性指数计算, 发现在 RDB 内加入 Cu^{II} (EDTA) 络合剂后, NO 去除率上升, 而微生物群落多样性先增加后又下降, 但群落结构变化不显著. 对 DGGE 图谱中 8 条主带进行回收、扩增、克隆和测序, 结果显示 RDB 中微生物群落主要由 *Cytophaga-Flexibacteria-Bacteroides* (CFB) group *Bacteroides*、 β -*Proteobacterium*、 γ -*Proteobacterium* 和 *Clostridium* sp. 组成. 反硝化功能与条带 G-5 (属于 γ -*Proteobacterium*) 和 G-6、G-8 (属于 β -*Proteobacterium*) 所代表的菌种相关, 相似性 $\geq 98\%$. G-3 序列与 GenBank 数据库中 2 个最相似序列的相似性只有 93% 和 92%, 表明这个条带所代表的微生物可能为新的未培养微生物.

关键词: 生物转鼓过滤器; 微生物多样性; 变性梯度凝胶电泳(DGGE); 16S rRNA; 序列测定

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)04-1092-07

Microbial Diversity Analysis in Rotating Drum Biofilter for Nitric Oxide Denitrifying Removal

CHEN Jun¹, WANG Zhi-ye², JIANG Yi-feng¹, QIAN Hai-feng¹, SHA Hao-lei¹, CHEN Jian-meng¹

(1. College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: PCR-DGGE was applied to analyze the microbial communities in rotating drum biofilter (RDB) for nitric oxide denitrifying removal under anaerobic conditions. The 16S rRNA genes (V3 region) were amplified with two universal primers (338F-GC and 518R). These amplified DNA fragments were separated by parallel DGGE. The DGGE profiles of biofilm samples from different sections of RDB are similar and about sixteen types of microorganisms are identified in the biofilm samples. These results show that microbial diversity of RDB firstly increases but then decreases with the addition of Cu^{II} (EDTA) and the increase of NO removal efficiency. However, the change of microbial community is not significant during the process. Eight major bands of 16S rRNA genes fragments from DGGE profiles of biofilm samples were further eluted from gel, re-amplified, cloned and sequenced. The sequences of these fragments were compared with the database in GeneBank (NCBI). The gene analysis of 16S rRNA showed that the major populations are *Cytophaga-Flexibacteria-Bacteroides* (CFB) group *Bacteroides*, β -*Proteobacterium*, γ -*Proteobacterium* and *Clostridium* sp.. In addition, denitrification is related with band G-5, G-6 and G-8. G-5 is affiliated with γ -*Proteobacterium*. Both G-6 and G-8 are affiliated with β -*Proteobacterium*.

Key words: rotating drum biofilter; microbial diversity; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); 16S ribosome RNA (16S rRNA); sequence

氮氧化物(NO_x)是导致酸雨、光化学烟雾等大气污染的主要污染物, 其中一氧化氮(NO)约占 95%. 近年来, 微生物技术应用于 NO 的净化已引起广泛的关注, 国内外学者采用生物反应器对 NO 的硝化和反硝化过程进行了实验研究, 取得了一定的成果^[1~3]. 生物转鼓过滤器(rotating drum biofilter, RDB)是 Yang 等^[4,5]提出的新型生物净化装置, 能够有效地运用在恶臭和 VOCs 的处理上, 国内 Wang 等^[6]将生物转鼓过滤器运用在了 NO 处理上, 取得了很好的效果. 变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)于 1979 年由 Fischer 等^[7]提出, 1993 年 Muyzer 等^[8]首次将 PCR-DGGE 方

法运用在微生物生态学研究上, 现在该技术在微生物群落多样性和种群动态监测中得到了广泛地使用^[9~11]. PCR-DGGE 技术能够从样品中直接提取微生物群落的基因组 DNA, 选择对大多数细菌和古细菌的 16S rRNA 基因都能有效扩增的引物进行 PCR 扩增, 然后对 PCR 产物采用 DGGE 分离, 最后通过鉴定得出环境样品中微生物群落多样性的信息, 该

收稿日期: 2007-09-08; 修订日期: 2007-10-29

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA649310); 国家自然科学基金项目(20576124, 20776134)

作者简介: 陈浚(1975~), 男, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: bec@zjut.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: jyf@zjut.edu.cn

技术现已广泛应用于土壤、水体、食品、活性污泥中微生物群落多样性的研究和微生物群体动态的追踪研究上^[12]。

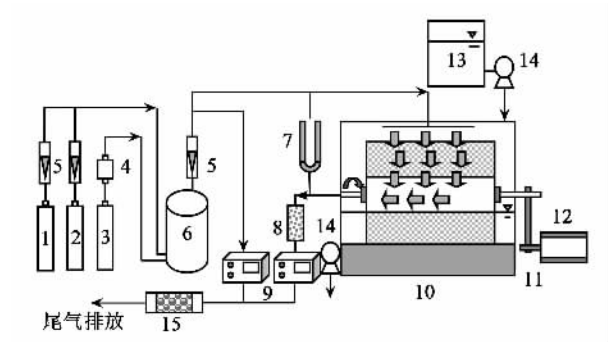
RDB 能够有效利用反硝化菌来去除 NO, 为了更好地了解 RDB 内微生物的作用并优化 RDB 运行条件, 提高 RDB 去除 NO 的效率, 必须对其群落结构进行分析, 而采用传统的分离培养方法, 不足以得到丰富的微生物多样性信息. 本研究直接采用 PCR-DGGE 技术来分析 RDB 内微生物群落结构的变化, 并结合条带回收、扩增、克隆和序列测定, 从而了解 RDB 中的微生物多样性和群落结构组成.

1 材料与方法

1.1 实验设备与材料

1.1.1 实验设备

实验装置主体材料采用不锈钢, 全密封设计, 装置外径 400 mm、内径 260 mm、长 250 mm, 有效体积约为 14.4 L, 选用多孔泡沫聚醚型聚氨酯(PU)作为生物填料(孔径为 2.5PPC). 生物转鼓实验装置包括配气、气体成分分析、温度控制、RDB 等 4 个主要部分(见图 1). NO 废气从 RDB 顶部进入外壳和转鼓之间的空腔中, 经微生物净化后, 从转鼓中间空心轴排出, RDB 底部装有营养液, 随着鼓的转动, 转鼓上生物膜可以间歇地与营养液接触, 摄取营养组分和排出代谢产物. 另外, 通过计量泵添加微生物所需营养液并排放代谢产物. NO 废气采用高纯 N₂ 和 NO 配制而成. 实验期间, 控制反应器温度 28℃、pH 6.5 ~ 7.5.



1. N₂ 罐 2. 空气罐 3. NO 罐 4. 质量流量计 5. 转子流量计
6. 混合气体罐 7. 压差计 8. 干燥剂 9. NO/NO_x 测定仪
10. RDB 11. 水浴温控槽 12. 配套电机 13. 营养液 14. 计量泵 15. 尾气吸收装置

图 1 实验装置
Fig. 1 Schematic representation of the experimental system

1.1.2 样品

系统稳定运行后, 在 NO 去除率为 85% 时, 从生物转鼓填料的横截面外延、中部、内延和转鼓底部淤泥中分别取样品, 编号为 CK85-1、CK85-2、CK85-3、CK85-4; 在 NO 去除率稳定在 92% 时, 再分别从上述位点取样, 编号为 S92-1、S92-2、S92-3、S92-4; 继续向培养液中添加适量 Cu^{II} (EDTA) 络合剂, 在 NO 去除率稳定在 99% 时, 取生物转鼓实验装置内生物膜和污泥样品各 1 个, 编号为 S99-1、S99-2.

1.1.3 实验仪器

DcodeTM 基因突变检测系统(美国 Bio-Rad), Gel Doc 2000TM 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad), PTC-100TM Peltier Thermal Cycler(美国 Bio-Rad), GE-100TM 微型凝胶电泳仪(杭州博乐), 冷冻离心机 5804 R(德国 Eppendorf).

1.2 方法

1.2.1 细菌总 DNA 提取

取 10 g 带生物膜的 PU 加入到 10 mL 灭菌的蒸馏水中, 120 r/min 振荡 30 min 后, 从中取 500 μL 悬浮的活性污泥, 12 000 r/min 振荡 10 min, 将上清液移入到 1 个新离心管中, 加入 300 μL DNA 提取液(0.1 mol/L PBS, 0.1 mol/L Tris base, 0.1 mol/L EDTA, 0.2 mol/L NaCl, 2% CTAB, pH = 8.0), 在 37℃、225 r/min 振荡 30 min 后, 加入 80 μL 10% 的 SDS, 在 65℃ 下加热 2 h(每隔 15 min 轻轻摇动 1 次). 然后在 12 000 r/min 下离心 10 min, 将上清液移至 1 个新离心管中, 加 30 μL NaAC 冰浴 10 min, 在 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清液移入到 1 个新离心管中, 加 400 μL 氯仿/戊醇(体积比 24:1)上下颠倒混匀, 在 12 000 r/min 离心 5 min, 加入 400 μL 氯仿, 混匀后在 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清液转移到 1 个新离心管中. 样品放置在 -20℃ 冰箱内保存 1 h 或隔夜进行沉淀, 最后 12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 在室温下晾样品 6 h 使其干燥, 用 20 μL TE 缓冲液溶解沉淀得到总 DNA 样品.

1.2.2 基因组总 DNA 16S rRNA V3 区扩增

将提取的基因组 DNA 作为聚合酶链反应(PCR)模板, 采用大多数细菌适用的 16S rRNA 基因 V3 区特异性引物对 338F-GC(5'-GCCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 518R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 进行扩增. 50 μL PCR 反应体系组成如下: 模板 5 μL, 10 × Buffer(including Mg²⁺) 5 μL, dNTPs 200 μmol/L, 338F-GC 和 518R 各 0.5 μmol/L, Taq 酶 2.5 U 和适量的超纯水补足 50 μL. PCR 反应采用降落

PCR 策略^[13],即预变性条件为 94℃ 5 min,前 20 个循环为 94℃ 1 min,65~55℃ 1 min 和 72℃ 1 min(其中每 2 个循环后退火温度下降 1℃),后 10 个循环为 94℃ 1 min,55℃ 1 min 和 72℃ 1 min,最后在 72℃ 下延伸 5 min. PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.3 双梯度变性梯度凝胶电泳(DG-DGGE)

采用 Bio-Rad 公司 DcodeTM的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离.使用梯度混合装置制备双梯度聚丙烯酰胺凝胶^[14],即丙烯酰胺浓度和变性剂浓度从上至下依次增加,丙烯酰胺浓度为 6%~12%,变性剂浓度为 35%~55%(100%变性剂为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺的混合物). DG-DGGE 相对于传统 DGGE,能更好地分清条带^[15].凝胶在 160 V 电压下,60℃ 电泳 4.5 h(采用时间进程法优化确定^[16]).

DG-DGGE 凝胶用 Goldviewna II (1×TAE, 1:5 000)染色 20 min,染色结果用 Bio-Rad 公司 Gel Doc 2000TM凝胶成像系统成像.

1.2.4 DG-DGGE 凝胶 DNA 条带分析

PCR 产物经 DGGE 分离后的电泳图谱采用 Quantity One 4.6.3(Bio-Rad)进行 DNA 条带分析,用 UPGMA (the unweighted pair group method with arithmetic averages)算法对样品进行聚类分析,计算各样品中微生物群落生物多样性指数(Shannon-Weaver 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数).

1.2.5 割胶、克隆与测序

(1)割胶回收主要条带并克隆纯化 选择 DGGE 图谱上的 8 个主要条带用无菌手术刀割下,分别编号为 G-1~G-8,浸泡在条带回收缓冲液中(200 μL 缓冲液加 1 mg 凝胶),37℃ 水浴 2 h,然后 8 000 r/min 离心 3 min;取上清,加 2 倍体积无水乙醇,混匀,静置 10 min;再 12 000 r/min 离心 5 min;弃上清,用 75% 乙醇洗涤沉淀;再 10 000 r/min 离心 5 min;弃上清,干燥 8 min;最后加 10 μL 超纯水溶解 DNA 沉淀,−20℃ 保存.用无 GC 发夹的 338F 和 518R 引物对回收 DNA 进行扩增,用 PCR 产物克隆试剂盒(上海生工)将扩增产物与 pUCm-T 载体连接,连接产物通过热激法^[17]转化到大肠杆菌 DH5α 中,每个条带挑取 3 个阳性克隆转化子.

(2)回收条带测序和结果分析 将 DG-DGGE 检验正确的阳性单克隆送宝生物工程(大连)有限公司测序,将所测得的序列递交到 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)登记,在 Genbank 数据库中用

BLAST 进行比对分析.

2 结果与讨论

2.1 生物过滤器运行效果

在营养液量为 5 L、营养液更新为 0.2 L/d、pH 控制在 7.0~7.5、转鼓转速 1.0 r/min、废气流量 0.1 m³/h、空床停留时间(empty bed residence time, EBRT) 86.4 s,温度为 28~30℃ 的条件下,NO 的进出其浓度和去除率随实验时间的变化情况如图 2 所示.在挂膜阶段,随着反硝化菌的生长、富集,NO 的去除效率不断提高;在 RDB 启动前期,为方便反硝化菌的挂膜,采用低浓度 NO 废气,NO 进气浓度在 107~300 mg/m³ 之间,且此时去除率相对较低;挂膜 30 d 后,NO 去除率上升到 60%,之后去除率相对稳定,生物转鼓过滤器反硝化去除 NO 在 30 d 内去除率基本稳定,生物膜生长成熟,挂膜启动完成.

之后,系统进入稳定运行和考察参数阶段,共进行了 120 d.由图 2 可知,在 3 个月的稳定运行阶段,进气 NO 浓度在 90~533 mg/m³ 范围变化,去除率稳定在 60%~85%,在此阶段去除率有起伏,主要是 NO 的进口浓度波动所致;相对稳定的去除率表明 RDB 能有效防止填料堵塞,有较强的耐冲击负荷能力,能长时间保持其稳定性和适应性.为提高生物转鼓过滤器对 NO 的去除效率,改善水溶性较差的 NO 在 RDB 内的气液传质效果和处理效率,在营养液中添加了 Cu^{II}(EDTA),NO 去除率随着 Cu^{II}(EDTA)的添加浓度的增加而上升的,Cu^{II}(EDTA)浓度从 0 增加到 500 mg/L,去除率从 85.8% 上升到 99.1%,获得了很好的 NO 去除效果.

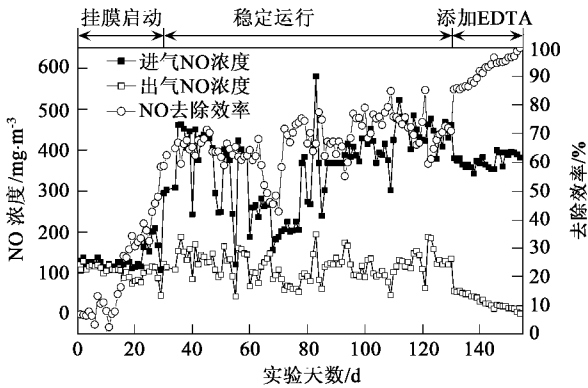


图 2 NO 随时间去去除效率

Fig. 2 NO removal efficiency in RDB over 155 days operation

2.2 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

由于生物膜样品中组分复杂,能否成功提取目

标 DNA 片段以及提取效率的高低直接影响后续 PCR-DGGE 分析,因此,对 DNA 提取物通过琼脂糖凝胶电泳进行了检验,如图 3 所示,显示生物转鼓中微生物基因组 DNA 均已提取出,通过与左边的 DNA marker 进行对比,微生物基因组 DNA 分子量 > 21 kb,与细菌基因组的大小相近,因此所提取的 DNA 属于较为完整的细菌基因组 DNA,亮度和纯度都较好,证明 DNA 提取获得了较为满意结果. 然后进行 16S rDNA 的扩增,如图 4 显示,微生物基因组的 16S rDNA V3 区已扩增出目的片段,通过与 DNA Marker 对比,可知扩增片段大小约为 230 bp,而且扩增片段的亮度和纯度都较好,PCR 扩增效果较好.

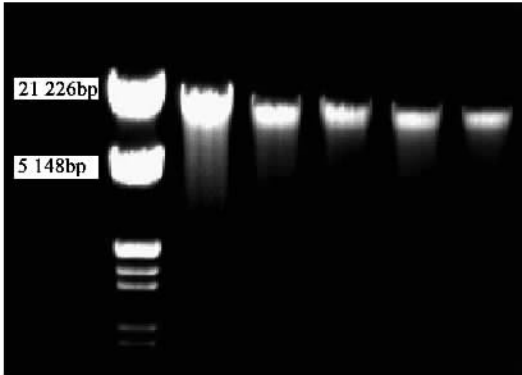


图 3 微生物基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图像
Fig.3 Agarose gel(0.7%) electrophoresis of genomic DNA of biofilm samples

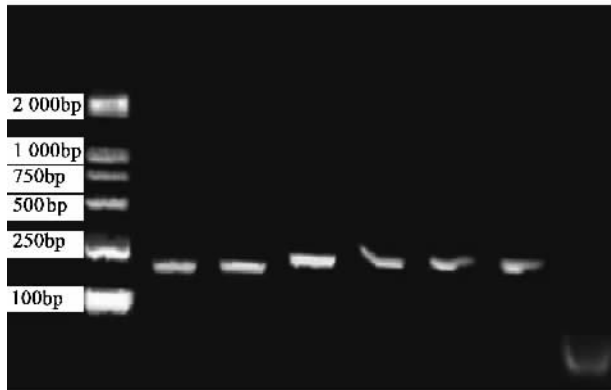


图 4 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图像
Fig.4 Agarose gel (0.7%) electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA gene of biofilm samples

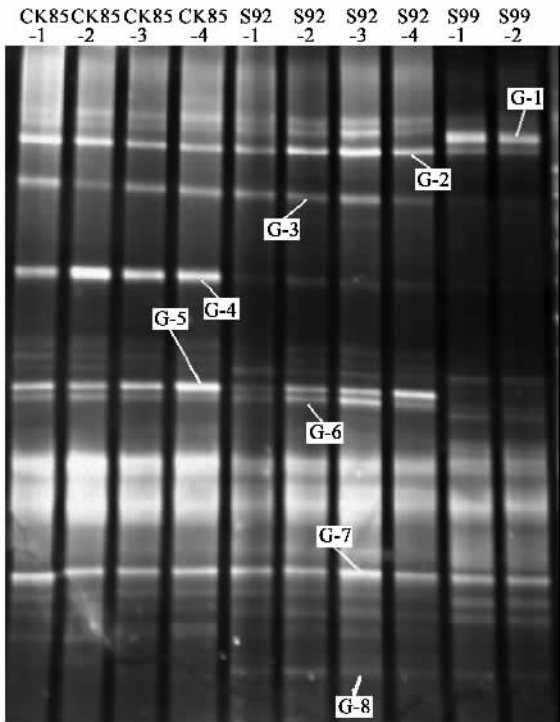
2.3 微生物多样性分析

2.3.1 DG-DGGE 图像分析

对各个样品的扩增产物进行 DGGE 分离,可以分离出数目不等、位置各异的电泳条带,从而能够鉴别出不同样品中微生物群落结构的差异性和生物多

样性.根据 DGGE 能分离长度相同而 DNA 序列不同的原理,每一个条带大致与群落中的一个优势菌群或操作分类单位(operational taxonomic unit, OTU)相对应,条带越多说明生物多样性越丰富,条带染色后的荧光强度则反应该细菌的丰富度,条带信号越亮,表示该种属的数量越多,从而反映生物转鼓过滤器中微生物的种类和数量.

采用凝胶图像分析系统对 DGGE 凝胶电泳的结果分析表明(图 5 和图 6),10 个生物膜样品的 DGGE 图谱在条带的位置和数目上均有一定的差异.随着 Cu^{II} (EDTA)络合剂加入,生物转鼓 NO 去除率提高, DGGE 条带发生了一定变化.对未加入 Cu^{II} (EDTA)络合剂的 CK85(NO 去除率为 85%)和加入 Cu^{II} (EDTA)络合剂的 S92(NO 去除率为 92%)、S99(NO 去除率为 99%)图形比较发现,有些条带随着 Cu^{II} (EDTA)络合剂加入而亮度逐渐增加(如条带 G-1 和 G-8),可能加入的 Cu^{II} (EDTA)促进其去除 NO 能力,使其种群数量增加;而有些条带在加入 Cu^{II} (EDTA)络合剂后亮度下降,甚至消失,但亮度下降的时间有所不同(如条带 G-2 ~ G-6),推测是因为加入的 Cu^{II} (EDTA)络合剂改变了这些菌种原有适合其生长的培养液理化环境而种群数量减少.还有一些条带自始至终都没发生明显变化(如条带 G-7).图 6 是以



G- * 代表为割胶回收条带
图 5 不同样品的 DGGE 分离图谱

Fig.5 DGGE profile of different biofilm samples

第一泳道(CK85-1)为标准做出的各泳道条带比较图,泳道中条带粗细不一,对应其在 DG-DGGE 凝胶上亮度不同,粗条带对应高亮度,细条带对应低亮度.从图中可对各样品的条带多样性及均匀分布程度有一直观了解.每个泳道下的百分数值是各泳道与第一泳道的相似性指数,通过戴斯系数(Dice coefficient)计算而得.

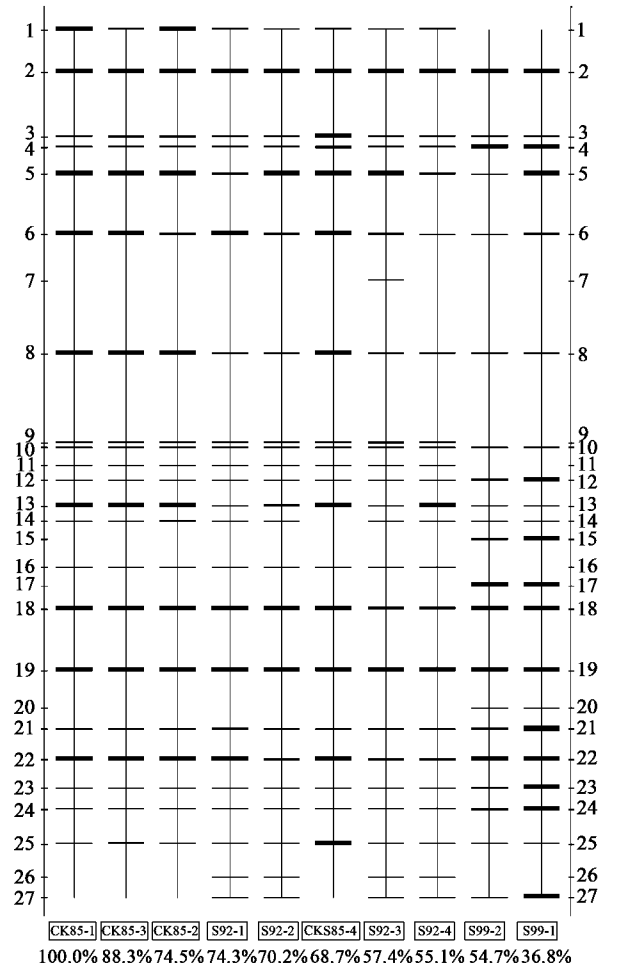


图 6 不同样品的泳道示意
Fig.6 DGGE sketch map of different samples

从图 6 中可得,CK85、S99 各样品的 DGGE 条带数都为 21,S92-3 条带数是 24,S92 其余 3 个样品的条带数为 23,且各样品具有很多相同迁移行为的条带.这说明加入 Cu^{II} (EDTA)络合剂,NO 去除率从 85%上升到 99%过程中,生物转鼓实验装置内微生物种群数没有发生显著变化.

2.3.2 微生物多样性聚类分析

聚类分析(cluster analysis)就是根据样品之间相似性差异,按照一定原则,将样品依次归于不同类别,从而形成一套等级分类系统^[18].用 UPGMA(the

unweighted pair group method with arithmetic averages)算法对 DG-DGGE 图形进行聚类分析,结果如图 7 所示,S99 与 CK85、S92 分属于 2 个大族群,族群间的相似性为 42%,而 CK85 与 S92 也属于不同的族群,族群间的相似性为 55%.说明随着 Cu^{II} (EDTA)络合剂加入和 NO 去除率不断提高,生物转鼓内微生物群落发生了一定变化.虽然相同 NO 去除率下不同位置的环境样品其微生物群落相似性存在一些差异,但差异较小,表明生物转鼓内不同位置的微生物群落较相近.

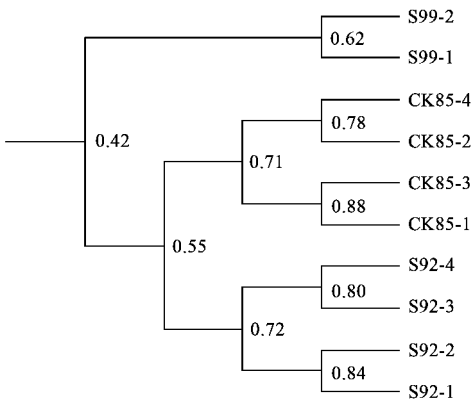


图 7 UPGMA 算法计算出的环境样品微生物多样性聚类分析
Fig.7 UPGMA clustering of different samples

2.3.3 环境样品生物多样性指数分析

生物多样性的描述至少需要 2 个统计量,即物种数(物种丰富度, species richness)和各物种的相对多度(物种均匀度, species evenness 或异质性, species heterogeneity),常将这 2 个统计量概括为一个综合指数即物种多样性指数^[18].

McIntosh 指数、Simpson 指数和 Shannon-Weaver 指数都是较为常用的生物多样性指数,分别是多样性的几何量度、概率量度和信息量度.3 个指数从不同的侧面反映群落的生物多样性,其中 McIntosh 指数是群落物种均一性的反映,Simpson 指数主要反映了群落中最常见的物种,而 Shannon-Weaver 指数受群落物种丰富度的影响较大^[19].

根据 DG-DGGE 图形和相关软件分析,计算出不同环境样品生物多样性指数.如表 1 所示,McIntosh、Simpson 和 Shannon-Weaver 指数都反映 S92 生物多样性最高(分别为 0.684、0.896 和 2.532),其次是 CK85,生物多样性指数最低的是 S99(分别为 0.644、0.868 和 2.388),反映出生物转鼓内微生物群落多样性先增加后又减少的一个变化过程,但变化幅度不大.

表 1 环境样品生物多样性指数
Table 1 Diversity indices of different samples

样品	McIntosh 指数	Simpson 指数	Shannon-Weaver 指数
CK85	0.671	0.888	2.430
S92	0.684	0.896	2.532
S99	0.644	0.868	2.388

2.4 DGGE 条带基因片段的测序分析

在 DGGE 分离后的条带中,选取其中 8 个荧光强度较亮、并具有代表性的主要条带进行割胶回收、扩增、克隆转化和测序,测序的结果再与 GenBank 数据库中用 BLAST 进行检索和进行同源性比较,如表 2 所示.

分析的 8 个割胶条带大致分属于 *Clostridium* sp.、 β -*Proteobacterium*、 γ -*Proteobacterium* 和 *Cytopahga-Flexibacteria-Bacteroides* (CFB) group *Bacteroides*. 图 5 中 G-6 和 G-8 的相似菌种与反硝化作用相关,与 G-8 具有 99% 序列相似性的 β -*Proteobacterium* OcN1 是一种反硝化菌(GenBank 数据库信息,未发表),与 G-6 序列相似度达 98% 的 *Thauera aromatica* (属于 β -*Proteobacterium* 亚纲)具有反硝化作用, *Thauera* sp. 也具有反硝化作用,一般生长 pH 范围为 7 ~ 8,嗜温 (28 ~ 40℃)^[20]. 与 G-5 序列相似度达 98% 的 Uncultured *Piscirickettsia* group bacterium (AY090118)属

于 γ -*Proteobacterium* 中 *Piscirickettsia* 科 *Methyiophaga* spp., *Piscirickettsia* 科虽有反硝化作用^[21],但属好氧菌,可能培养液中微量溶解氧供好氧菌生长所需,这种异常现象也在其他文献中报道过^[22]. G-2 ~ G-4 属于 *Cytopahga-Flexibacteria-Bacteroides* (CFB) group *Bacteroides*,这一类菌在环境中分布较广^[23]. 序列比对结果表明, G-4 与 *Alkaliflexus imshenetskii* (属于 CFB)的典型菌种 Z-7010 序列具有 98% 相似性. 菌种 Z-7010^[24]是一种厌氧异养菌,能以纤维二糖等为碳源,其生长的 pH 范围为 7.2 ~ 10.2. 观察 DG-DGGE 电泳图谱发现, G-2 ~ G-4 随着 Cu^{II} (EDTA)络合剂加入和 NO 去除率升高,条带亮度不断下降甚至消失,尤其是 G-4. 根据菌种 Z-7010 的生长习性,可推测 Cu^{II} (EDTA)络合剂加入和整个实验装置内微生物群落演变,装置微环境 pH 值下降(实验测得生物转鼓内 pH 值在整个演变过程中由 7.5 缓慢下降到 6.7),导致一些偏碱性细菌数量减少. G-1 和 G-7 属于 *Clostridium* sp.,研究表明, *Clostridium* sp. 的一些菌种具有固氮功能,如 *Clostridium butyrium* 等^[25]. 在 DG-DGGE 图谱中, G-7 亮度一直保持不变,而 G-1 是 S99 主要条带之一. 可能 G-1 和 G-7 所代表的细菌是一种能固氮的 *Clostridium*,随着 NO 去除率上升,越来越多的 NO 通过反硝化作用转化为 N₂,促进其生长.

表 2 DGGE 优势条带的基因片段序列的比对结果

Table 2 Comparison of 16S rDNA sequences in dominant DGGE bands by sequencing and BLAST analysis

割胶条带	序列长度/bp	GenBank 数据库中最相似菌种名称(登陆号)	相似度/%
G-1	170	<i>Clostridium butyrium</i> , strain DSM523 (X77834)	95
		<i>Clostridium butyrium</i> , strain IDCC5101 (EF533982)	95
G-2	193	Uncultured bacterium (EF559223)	99
		Uncultured CFB group bacterium (AJ582209)	98
G-3	193	Uncultured <i>Bacteroides</i> bacterium (DQ432404)	93
		Uncultured <i>Bacteroides</i> bacterium (DQ432315)	92
G-4	193	Uncultured <i>Alkaliflexus</i> sp. (EF445464)	98
		<i>Alkaliflexus imshenetskii</i> , type strain Z-7010 (AJ784993)	98
G-5	198	Uncultured bacterium (AB205628)	100
		Uncultured <i>Piscirickettsia</i> group bacterium (AY090118)	98
G-6	198	Uncultured <i>Thauera</i> sp. (DQ507137)	98
		<i>Thauera aromatica</i> , strain LG356 (AJ315680)	98
G-7	175	Uncultured low G + C Gram-positive bacterium (AY245474)	96
		<i>Clostridium</i> sp. (AJ291836)	94
G-8	198	<i>Beta proteobacterium</i> OcN1 (AF331976)	99
		Perchlorate-reducing bacterium MLC33 (AF444791)	99

3 结论

(1)利用 DG-DGGE 技术对处理 NO 废气的 RDB 中生物多样性进行了研究, RDB 中有 16 种优势菌种,且沿填料径向的不同位置采样点 DGGE 图谱的差异性不大,细菌群落结构具有较高的相似性.

(2)通过 DG-DGEE 图形比较,用 UPGMA 算法对样品的聚类分析和各样品的微生物群落生物多样性指数计算,发现加入 Cu^{II} (EDTA)络合剂和随着 NO 去除率增加, RDB 内微生物群落多样性先增加后又有所下降,但微生物群落在整个演变过程中变化幅度不显著.

(3)对 DG-DGGE 图谱中 8 个条带进行回收、扩增、克隆和测序,结果表明,RDB 中微生物群落主要由 *Clostridium* sp.、 β -*Proteobacterium*、 γ -*Proteobacterium* 和 *Cytopahga-Flexibacteria-Bacteroides* (CFB) group *Bacteroides* 组成.反硝化功能与 G-5 (属于 γ -*Proteobacterium*)和 G-6、G-8(属于 β -*Proteobacterium*)所代表的菌种相关.随着 RDB 中 NO 去除率增加,促进了一些固氮 *Clostridium* sp.(G-1)生长和抑制了一些嗜碱性的 *Cytopahga-Flexibacteria-Bacteroides* (CFB) group *Bacteroides*(G-2 ~ G-4)数量.G-3 序列与其 GenBank 数据库中 2 个最相似序列的序列相似性分别只有 93%、92%,表明这个条带所代表的微生物有可能为新的未培养微生物种.

参考文献:

- [1] Barnes J M, Apel W A, Barrett K B. Removal of Nitrogen-Oxides from Gas Streams Using Biofiltration[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 1995, **41**(2-3): 315-326.
- [2] Huang S B, Zhang J G, Hu H P, *et al.* A new approach for removal of nitrogen oxides from synthetic gas-streams under high concentration of oxygen in biofilters[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2005, **16**(4): 505-508.
- [3] Jin Y M, Veiga M C, Kennes C. Bioprocesses for the removal of nitrogen oxides from polluted air[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2005, **80**(5): 483-494.
- [4] Yang C P, Chen H, Zeng G M, *et al.* Modeling biodegradation of toluene in rotating drum biofilter [J]. *Water Science and Technology*, 2006, **54**(9): 137-144.
- [5] Yang C P, Suidan M T, Zhu X Q, *et al.* Removal of a volatile organic compound in a hybrid rotating drum biofilter[J]. *Journal of Environmental Engineering-Asce*, 2004, **130**(3): 282-291.
- [6] Wang J D, Wu C Q, Chen J M, *et al.* Denitrification removal of nitric oxide in a rotating drum biofilter[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2006, **121**(1): 45-49.
- [7] Fischer S G, Lerman L S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Cell*, 1979, **16**(1): 191-200.
- [8] Muyzer G, Dewaal 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 ribosomal-RNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(3): 695-700.
- [9] Araya R, Tani K, Takagi T, *et al.* Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2003, **43**(1): 111-119.
- [10] Grove J A, Kautola H, Javadpour S, *et al.* Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, **18**(2): 111-114.
- [11] Yang G M, Bao B L, Peatman E, *et al.* Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus*[J]. *Aquaculture*, 2007, **262**(2-4): 183-191.
- [12] 马悦欣, Carola H, Jeremy W, *et al.* 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)在微生物生态学中的应用[J]. *生态学报*, 2003, **23**(8): 1561-1569.
- [13] Zwart G, Huismans R, Van Agterveld M P, *et al.* Divergent members of the bacterial division *Verrucomicrobiales* in a temperate freshwater lake[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **25**(2): 159-169.
- [14] Cremonesi L, Firpo S, Ferrari M, *et al.* Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations[J]. *Biotechniques*, 1997, **22**(2): 326-330.
- [15] James J B, Sherman T D, Devereux R. Analysis of bacterial communities in seagrass bed sediments by double-gradient denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. *Microbial Ecology*, 2006, **52**(4): 655-661.
- [16] 宋业颖, 赵丽华, 邢德峰. 利用时间进程法优化活性污泥 DG-DGGE 图谱[J]. *生物技术*, 2006, **16**(2): 43-45.
- [17] 魏群. 分子生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 53-58.
- [18] 付必谦, 张峰, 高瑞如. 生态学实验原理与方法[M]. 北京: 科学出版社, 2006. 178-228.
- [19] 肖勇, 杨朝晖, 曾光明, 等. PCR-DGGE 研究处理垃圾渗滤液序批式生物膜反应器(SBBR)中的细菌多样性[J]. *环境科学*, 2007, **28**(5): 1095-1101.
- [20] Mechichi T, Stackebrandt E, Gadon N, *et al.* Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov.[J]. *Archives of Microbiology*, 2002, **178**(1): 26-35.
- [21] Labbe N, Juteau P, Parent S, *et al.* Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the Montreal biodome, Canada [J]. *Microbial Ecology*, 2003, **46**(1): 12-21.
- [22] Yoshie S, Noda N, Miyano T, *et al.* Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation method[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, **92**(4): 346-353.
- [23] O'sullivan L A, Weightman A J, Fry J C. New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-specific* 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(1): 201-210.
- [24] Zhilina T N, Appel R, Probian C, *et al.* *Alkaliflexus imshenetskii* gen. nov. sp. nov., a new alkaliphilic gliding carbohydrate-fermenting bacterium with propionate formation from a soda lake[J]. *Archives of Microbiology*, 2004, **182**(2-3): 244-253.
- [25] Chen J S, Toth J, Kasap M. Nitrogen-fixation genes and nitrogenase activity in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2001, **27**(5): 281-286.