

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第9期

Vol.33 No.9

2012

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

我国4个WMO/GAW本底站大气CH ₄ 浓度及变化特征	方双喜,周凌晔,许林,姚波,刘立新,夏玲君,王红阳	(2917)
我国东北地区大气降水稳定同位素特征及其水汽来源	李小飞,张明军,马潜,李亚举,王圣杰,汪宝龙	(2924)
2010年广州亚运期间空气质量与污染气象条件分析	李婷苑,邓雪娇,范绍佳,吴兑,李菲,邓涛,谭浩波,蒋德海	(2932)
厦门市冬春季灰霾期间大气PM ₁₀ 中多环芳烃的污染特征及来源分析	钱冉冉,闫景明,吴水平,王新红	(2939)
气溶胶OCEC切割点确定方法改进及应用	王莉华,董华斌,闫才青,曾立民,郑玫,张延君,刘久萌,Weber R J	(2946)
松花江上游夹皮沟金矿土壤与大气汞污染特征	张刚,王宁,王媛,刘特,艾建超	(2953)
河北农居环境颗粒态汞污染特征及健康评估研究	赵亚娟,龚巍巍,栾胜基	(2960)
印刷电路板(PCB)厂挥发性有机物(VOCs)排放指示物筛选	马英歌	(2967)
烹调油烟中挥发性有机物的排放初探	何万清,田刚,聂磊,曲松,李靖,王敏燕	(2973)
生物滴滤塔降解甲苯废气长期运行生物膜相特性研究	胡俊,郑江玲,吴越新,张丽丽,陈建孟	(2979)
分期布液生物滴滤床净化H ₂ S废气性能研究	刘春敬,李坚,刘佳,彭淑婧,李超,陈英,何洪	(2987)
粉煤灰综合利用过程中汞的二次释放规律研究	孟阳,王书肖	(2993)
太湖、巢湖水体总悬浮物浓度半分析反演模型构建及其适用性评价	刘忠华,李云梅,檀静,郭宇龙,周莉,刘阁	(3000)
巢湖水质与流域农业投入的关联性研究	张燕,高翔,张洪	(3009)
巢湖十五里河水花生长区沉积物及间隙水中营养盐的基本特性	李如忠,李峰,周爱佳	(3014)
巢湖沉积物中磷蓄积时空变化及人为污染定量评价	刘恩峰,杜臣昌,羊向东,沈吉	(3024)
巢湖周边表土中有机质、全氮和全磷空间分布及其相关性	陈书琴,储昭升,胡社荣,刘俊,王长春,王曼	(3031)
丹江口水库典型入库支流氮磷动态特征研究	雷沛,张洪,单保庆	(3038)
水温分层对三峡水库香溪河库湾春季水华的影响	刘流,刘德富,肖尚斌,孔松,陈媛媛,方小凤	(3046)
平水期和丰水期殷村港污染物浓度时空变异比较研究	杨晓英,罗兴章,郑正,方淑波	(3051)
江苏西部湖泊沉积物营养盐赋存形态和释放潜力差异性分析	刘涛,胡志新,杨柳燕,肖琳,席北斗,许其功	(3057)
太湖西岸湖滨带沉积物氮磷有机质分布及评价	甘树,卢少勇,秦普丰,金相灿,焦伟,王佩	(3064)
南四湖流域种植业面源污染氮磷源解析研究	刘静,路风,杨廷钊,徐娜,王田妮	(3070)
珠江水体中有机物分布、组成及与消毒副产物生成的关系	何洪威,周达诚,王保强,梁艳红	(3076)
东江流域典型乡镇饮用水源地重金属污染健康风险评价	王若师,许秋瑾,张炯,魏群山,颜昌宙	(3083)
深圳茅洲河表层沉积物卤代多环芳烃污染研究	孙建林,倪宏刚,丁超,曾辉	(3089)
福建罗源湾潮间带沉积物重金属含量空间分布及其环境质量影响	高文华,杜永芬,王丹丹,高抒	(3097)
渤海湾大型底栖生物群落结构变化及原因探讨	蔡文倩,刘录三,乔飞,林岍璇,周娟	(3104)
地下水污染防治区划体系构建研究	王俊杰,何江涛,陆燕,刘丽雅,张小亮	(3110)
北京市平原区地下水污染防治区划不确定性分析	陆燕,何江涛,王俊杰,刘丽雅,张小亮	(3117)
川东平行岭谷区典型岩溶含水系统中NO ₃ ⁻ 的存储和运移	杨平恒,袁道先,任幼蓉,谢世友,贺秋芳,胡晓风	(3124)
改性活性炭对水中PFOS的吸附去除研究	董锡臻,石宝友,解岳,王东升	(3132)
水溶液中臭氧和溴离子的反应研究	俞潇婷,张家辉,潘循哲,张仁熙,侯惠奇	(3139)
HPSEC-UV-TOC联用技术测定有机物相对分子质量分布	张晗,董秉直	(3144)
不同有机基质诱发的水体黑臭及主要致臭物(VOSC _s)产生机制研究	卢信,冯紫艳,商景阁,范成新,邓建才	(3152)
不同pH下纳米铁镍颗粒对生物降解苯酚的影响	况烨,周琰,王清萍,陈祖亮	(3160)
多级微氧生物流化床预处理高浓度丙烯酸废水	李莎,郑盛之,宋玉栋,周岳溪,朱长军,刘淑玲,潘玲,蒲文晶	(3167)
三级生物膜深度处理腈纶废水生化出水的脱氮研究	徐少阳,蒋进元,周岳溪,崔俊涛,段妮妮	(3172)
改性花生壳对水中镉的动态吸附研究	龙腾,易筱筠,党志	(3177)
硫氰酸根在粒状镁铝复合氧化物上的吸附性能	王秀娟,王海增,孙宝维,韩文军	(3182)
海水生物滤器氨氮沿程转化规律模型	罗荣强,侯沙沙,沈加正,陈珠,刘鹰	(3189)
营养物质缺乏引起的好氧颗粒污泥膨胀及其恢复	张著,高大文,袁向娟,勾倩倩	(3197)
生物表面活性剂强化污泥水解的研究	易欣,罗琨,杨麒,李小明,邓伟光,张植平	(3202)
厌氧氨氧化菌的富集培养与分子鉴定	刘冬英,邱艳玲,袁宪正,师晓爽,郭荣波	(3208)
阿特拉津降解菌株的分离、鉴定及降解特性研究	李绍峰,朱静,李铁晶	(3214)
农业废物堆肥中高产漆酶新菌株的分离鉴定及酶学性质研究	任秀娟,范长征,鲁伦慧,王聪,曾光明	(3220)
糖蜜酒精废水脱色微生物的筛选及鉴定	李必金,刘幽燕,贺锴,滕芳明,何熙璞,李青云	(3228)
餐厨垃圾乳酸发酵过程中的微生物多样性分析	刘建国,汪群慧,王爽,孙晓红,仇天雷,李焕	(3236)
共价功能化对单壁碳纳米管产生DNA损伤和活性氧的影响研究	吴仁人,陶雪琴,党志,李开明,蔡美芳	(3241)
<i>Geobacter sulfurreducens</i> 对汞的甲基化及其影响因素研究	邹嫣,司友斌,颜雪,陈艳	(3247)
单一与复合胁迫下油菜对镉、铅的吸收效应	武文飞,南忠仁,王胜利,赵转军,周婷	(3253)
金铜矿下游农户家养番鸭体内重金属分布特征及其评价	杭小帅,梁斌,王文林,王霞,李维新	(3261)
环境激素氯菊酯对萼花臂尾轮虫繁殖的影响	董学兴,杨家新,吕林兰,赵卫红,於叶兵	(3266)
地聚物固化生活垃圾焚烧飞灰固化体抗氧化硫杆菌腐蚀性能的研究	金漫彤,孙鑫,董海丽,金赞芳	(3272)
焚烧飞灰高温过程中重金属的挥发及其氯转化特征	刘敬勇,孙水裕	(3279)
城市废弃物处理温室气体排放研究:以厦门市为例	于洋,崔胜辉,林剑艺,李飞	(3288)
NPEOs及其代谢产物在城市污水处理厂中的归趋分析	连静,刘俊新	(3295)
《环境科学》征订启事(3037)	《环境科学》征稿简则(3151)	信息(2999,3030,3096,3227)

餐厨垃圾乳酸发酵过程中的微生物多样性分析

刘建国¹, 汪群慧^{1*}, 王爽¹, 孙晓红², 仇天雷², 李焕¹

(1. 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083; 2. 北京市农林科学院农业生物技术研究中心, 北京 100089)

摘要: 采用 PCR-DGGE 等分析手段, 研究了餐厨垃圾乳酸发酵过程中的微生物种群动态变化。结果表明, 餐厨垃圾不灭菌而接种的开放式发酵体系中微生物的多样性高于灭菌后接种的非开放式发酵体系, 而乳酸产量也是前者高于后者。说明发酵体系中的微生物多样性与乳酸产量有很大的相关性。通过对部分条带的测序可知, 餐厨垃圾开放式发酵体系中除含有接种用的嗜淀粉乳杆菌外, 还含有很多土著乳酸菌, 如 *Lactobacillus* sp.、*Lactobacillus casei* 和 *Lactobacillus plantarum*, 以及土著水解菌, 如假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 等, 这些土著菌的存在是促进乳酸发酵的重要因素。PCR-DGGE 结合技术对于成分复杂的餐厨垃圾中的细菌种群结构的动态变化分析是可行的。

关键词: 餐厨垃圾; 乳酸发酵; 微生物多样性分析; 嗜淀粉乳杆菌; PCR-DGGE

中图分类号: X172; X705 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)09-3236-05

Analysis of Microbial Community Structure in Lactic Acid Fermentation from Kitchen Waste

LIU Jian-guo¹, WANG Qun-hui¹, WANG Shuang¹, SUN Xiao-hong², QIU Tian-lei², LI Huan¹

(1. School of Civil and Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China; 2. Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract: In this study, PCR-DGGE was used to analyze the microbial community structure in lactic acid fermentation from kitchen waste. The results showed that with *Lactobacillus amylophilus* inoculation, both the microbial diversity and lactic acid production in the open fermentation system were higher than those in the sterilized fermentation system. These results indicated that the microbial diversity and the lactic acid production have great correlation in the kitchen waste fermentation system. Through analyzing the sequence of some DNA bands excised from the DGGE gel, it showed that in addition to the inoculation of *Lactobacillus amylophilus* there were some indigenous lactic acid bacteria, such as *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and indigenous hydrolytic bacteria, such as *Pseudomonas* sp.. These indigenous bacteria can help to promote lactic acid production. PCR-DGGE is feasible for analyzing the dynamic changes of microbial community structure in kitchen waste with complicated composition.

Key words: kitchen waste; lactic acid fermentation; microbial diversity analysis; *Lactobacillus amylophilus*; PCR-DGGE

餐厨垃圾含有丰富的营养成分, 利用其发酵生产乳酸是实现资源化的有效途径之一^[1,2]。乳酸作为一种重要的有机酸, 广泛应用于食品、化工等多种领域, 聚乳酸类可生物降解塑料的开发使“白色污染”的问题得到减轻^[3], 更显示出乳酸在包装材料等方面的巨大潜力。本课题组前期已对餐厨垃圾乳酸发酵过程的工艺优化做了深入的研究, 发现底物不灭菌时乳酸产率更高^[4], 采用基质不灭菌的开放式发酵, 接种自行筛选的解淀粉乳酸细菌, 比不接种发酵的乳酸浓度高 19.2%^[5]。推测可能灭菌杀死了垃圾中大部分微生物, 而开放式发酵中由于垃圾存在各种代谢类型的微生物, 可降解蛋白质、纤维素等大分子, 提高了乳酸菌可利用的小分子化合物的含量, 从而使乳酸产量增加^[6]。但是, 目前对于开放式发酵提高乳酸产量的机制只有简单的推测, 缺乏足够的理论依据。

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术由 Mzyer

等^[7]于 1979 年最先提出, 用来检测 DNA 片段中的点突变, 1993 年 Muzyer 等^[8]首次将 DGGE 技术应用于微生物生态学研究。近年来, PCR-DGGE 技术在微生物群落多样性和种群动态监测中得到了广泛应用, 如用于活性污泥、土壤、底泥等环境样品中的微生物多样性检测。傅以钢等^[9]用 DGGE 指纹图谱技术对污泥堆肥工艺的细菌种群动态变化进行了研究, 张春林^[10]运用 DGGE 分析了内蒙古发酵酸粥中的微生物多样性, 但关于餐厨垃圾的乳酸发酵过程的 PCR-DGGE 的研究分析未见报道。

本研究运用 PCR-DGGE 方法研究餐厨垃圾不同发酵条件下的微生物种群变化, 以阐明主要微生

收稿日期: 2011-11-14; 修订日期: 2012-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50978028); 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20090010)

作者简介: 刘建国 (1980 ~), 男, 博士, 主要研究方向为固体废弃物, E-mail: jgliu_yxc@163.com

* 通讯联系人, E-mail: wangqh59@sina.com

物种群间的相互竞争、协同的动态关系,解释餐厨垃圾不灭菌的开放式发酵产乳酸量高的生物学机制,丰富乳酸发酵理论,以期餐厨垃圾回收再利用的发酵过程提供更多的信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

餐厨垃圾取自北京科技大学学生食堂,挑去大块杂质后经绞碎保存于 -20°C 冰箱待用。由于餐厨垃圾中淀粉含量相对较高(约 50%),为了获得较好的发酵结果,实验所用菌种为嗜淀粉乳杆菌,购买于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 乳酸发酵方法

不灭菌而接种的开放式发酵:按固液比 1:2(餐厨垃圾/水, $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 配制培养基,按 0.2 g(菌体湿重)/100 mL(餐厨垃圾培养基)接入嗜淀粉乳杆菌,通入高纯氮气生成厌氧环境,密封后 35°C 下发酵,每隔 24 h 取样,经离心机(eppendorf centrifuge, 5417C)固液分离后的上清液再经 0.45 μm 膜过滤后用高效液相色谱仪(日本岛津公司,LC-20AT)分析乳酸浓度;而离心后的固相样品用作微生物的群落分析。

灭菌后接种的非开放式发酵:将餐厨垃圾用灭菌锅(HV50, Hirayama, Japan)在 120°C 高温灭菌 20 min 后再接嗜淀粉乳杆菌,在上述同样条件下进行发酵、取样和分析。

既不灭菌也不接种的开放式发酵:作为对照,餐厨垃圾既不灭菌也不接种嗜淀粉乳杆菌,在上述同样条件下进行发酵、取样和分析。

1.3 乳酸测定方法

采用日本岛津公司高效液相色谱仪 LC-20AT,检测器为 UV-VIS 检测器:SPD(紫外分光检测)-20A;色谱柱:Inertsil ODS-SP (5 μm 4.6 mm $\times$ 250 mm),保护柱:Inertsil ODS-SP 5 μm ;超纯水(pH 用磷酸调至 2.5 ~ 3.0)作为流动相;流速为 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温为室温;进样量为 5 μL ;二极管阵列检验波长为 210 nm。

利用超纯水作为流动相,使用前将超纯水的 pH 值用磷酸调到 2.5 ~ 3.0。将流动相溶液用 0.45 μm 孔径的微孔滤膜过滤,再经超声波脱气。洗液的使用及配制,在使用柱子前先利用色谱纯甲醇清洗系统 0.5 ~ 1 h,然后利用甲醇和超纯水(体积比 15:85)的混合液洗脱柱子再次冲平基线,最后换成超纯水流动相。

1.4 微生物多样性分析方法

(1) 基因组 DNA 的提取和纯化

DNA 的提取采用 Zhou 等^[11] 提出的蛋白酶 K-CTAB 法,粗提后的 DNA 溶液采取 Promega 公司的 Wizard 少量 DNA 纯化系统对总 DNA 进行纯化。取粗提及纯化后的 DNA 溶液 5 μL 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

(2) 基因组 DNA 的 PCR 扩增

采用对大多数细菌的 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物^[12] 对 F338-GC (CGCCCGCCGCGCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG) 和 R518 (ATTACCGCGGCTGCTGG) 对纯化后的 DNA 进行 PCR 扩增 (EDC-810, 北京东胜创新生物科技有限公司)。PCR 反应体系:1 μL 模板,4 μL dNTP 混合溶液(终浓度为 1 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$),引物(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 1 μL , 10 $\times$ PCR 反应缓冲液(已加 MgCl_2) 5 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1 μL ,加无菌 Milli-Q 水补足至 50 μL 。PCR 反应扩增条件为: 94°C 预变性 3 min;接下来是 94°C 变性 60 s, 57°C 退火 90 s, 72°C 延伸 90 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 扩增结束,使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

(3) PCR 产物变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

PCR 扩增结束,采用变性梯度凝胶电泳系统(DCodeTM Universal Detection System, Bio-Rad, USA)对 PCR 产物进行基因突变检测。本实验的电泳条件为凝胶变性梯度 30% ~ 60%,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,电泳温度 60°C ,电泳电压 100 V,电泳时间 6 h。电泳结束后,将凝胶进行银染,用凝胶成像分析系统(Gel Doc 2000, Bio-Rad, USA)观察凝胶上的条带并拍照。使用 Quantity One 对 DGGE 图谱进行自动优化处理,去除背景噪音,分析得到样品的相似性矩阵。

(4) 目的条带测序

从 DGGE 图谱中选取目的条带进行切割回收。回收的条带转移到 1.5 mL 离心管中,用枪头挤碎,加入 30 μL TE 缓冲液, 4°C 浸泡过夜,反复冻融 1 到 3 次,取 1 μL 为模板重新进行 PCR 扩增,用 DGGE 检查回收条带的纯度和分离状况。重复上述步骤,直到 DGGE 鉴定为单一条带后,取 20 μL PCR 扩增产物送交测序,获得不同的 16S rDNA 序列,将测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析,找到最相似菌株,获得各条序列的同源性信息。

2 结果与讨论

2.1 发酵过程中乳酸浓度变化

按 1.2 节所述的乳酸发酵方法,分别进行了餐厨垃圾不灭菌而接种嗜淀粉乳杆菌的开放式发酵、餐厨垃圾灭菌后接种嗜淀粉乳杆菌的非开放式发酵和既不灭菌也不接种的开放式发酵. 3 种发酵过程的乳酸浓度变化如图 1 所示.

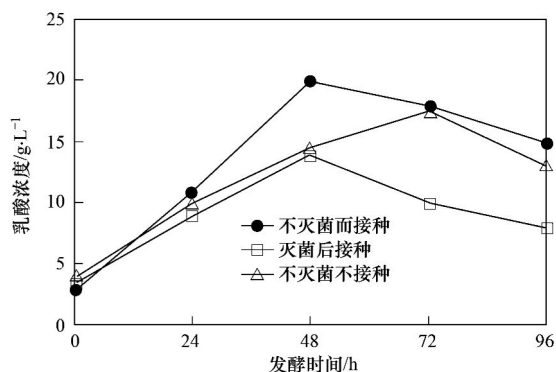


图 1 3 种条件下的乳酸浓度随发酵时间变化

Fig. 1 Time courses of lactic acid production under different fermentation conditions

由图 1 可知,餐厨垃圾不灭菌而接种的开放式发酵所产乳酸的速率大于其他 2 种,且获得最高乳酸产量的顺序为:不灭菌而接种 > 不灭菌不接种 > 灭菌后接种.

不灭菌体系的产乳酸量高于灭菌体系可能是因为乳酸发酵存在水解、糖化、乳酸化阶段,水解阶段需要水解菌(或水解酶),废物中如存在能分泌糖化酶的细菌,也可促进糖化,不灭菌体系的餐厨垃圾中本身含有大量的土著菌,它们可分解出许多水解酶和糖化酶等胞外酶,这些酶可将餐厨垃圾中的淀粉、蛋白质等大分子物质逐级水解、糖化为乳酸菌可以利用的糖、氨基酸(作为氮源)等小分子物质,进而促进了乳酸的产生. 而餐厨垃圾经蒸汽灭菌后,其中大部分的土著菌群被高温蒸汽杀死,乳酸的产生主要依靠外加嗜淀粉乳杆菌的作用,部分原料不能转化为乳酸菌可利用的物质,因此最终其乳酸的产量不如开放式发酵的乳酸产量高.

既不灭菌也不接种的对照实验中,即使没有外加嗜淀粉乳杆菌,餐厨垃圾利用自身的土著菌群也产生了较多的乳酸,这意味着土著菌中也存在较多的土著乳酸菌. 由此可推测,不灭菌的开放式发酵体系的微生物多样性应该高于灭菌的非开放式发酵体系,为了证实这一点,对 3 种发酵过程进行了下述

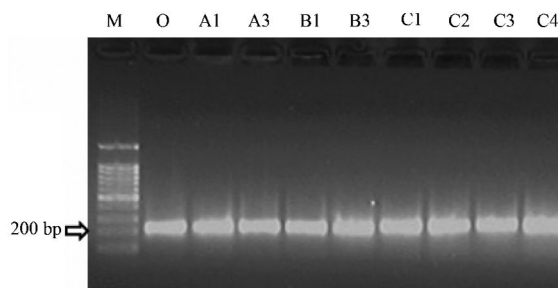
的微生物群落分析.

2.2 发酵样品基因组 DNA 的提取与纯化

取餐厨垃圾部分发酵样品进行 PCR-DGGE 的分析. 首先采用蛋白酶 K-CTAB 法对基因组总 DNA 进行提取,提取后的样品中含有较多的腐殖酸等其它杂质,不能直接进行 PCR 等后续实验操作. 使用 Wizard DNA Clean-Up System 对粗提 DNA 进行纯化,纯化后所得 DNA 条带亮度明显,说明用文中所述的 DNA 提取方法可以顺利地从发酵样品中提取出总 DNA 片段,没有导致严重的 DNA 断裂. 纯化后提高了总 DNA 的纯度与浓度,有利于后续的 PCR 扩增.

2.3 发酵样品的 PCR 扩增结果

以细菌 16S rDNA V3 序列的通用引物 F338-GC 和 R518 对纯化后的发酵样品 DNA 进行 PCR 扩增反应. PCR 扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳后用 EtBr 染色,紫外灯下经凝胶成像系统检测拍照,PCR 扩增结果如图 2 所示.



O 代表餐厨垃圾初始样品(即发酵 0 h); A1、A3 代表灭菌后接种发酵第 1 d 和第 3 d 样品; B1、B3 代表不灭菌不接种发酵的第 1 d 和第 3 d 样品; C1、C2、C3、C4 代表不灭菌而接种发酵的第 1~4 d 的样品,下同

图 2 发酵样品的 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 2 PCR electrophoresis image of samples

图 2 中的片段长度约为 200 bp,条带单一,亮度明显,表明获得了高产量和高特异性的 PCR 产物,均可作为变性梯度凝胶电泳(DGGE)的样品.

2.4 发酵样品的细菌种群 DGGE 指纹图谱结果与多样性分析

餐厨垃圾糖化发酵的样品 PCR 扩增产物经 DGGE 分离出数目、强度和迁移位置都不同的条带(见图 3),这些不同位置的条带代表着不同的细菌种群,同时也可以看出细菌的种类和数目在发酵过程中的演替规律. 由 DGGE 图谱(图 3)可以看出,不同发酵条件下餐厨垃圾样品中的细菌 16S rDNA 序列使用 PCR-DGGE 分析得到了比较好的分离,条带位置清晰,亮度明显. 不灭菌的开放式发酵后试

样(无论接种与否)的微生物多样性明显高于灭菌的非开放式发酵后试样. 这 2 种不灭菌的开放式发酵中,条带 a、b、c、d 几乎存在于整个发酵过程,说明这些条带所代表的细菌为土著菌,具有广泛的适应性. 而接种比未接种的发酵试样中增加了条带 e,条带 e 的强度没有随着发酵时间而增强. 但这些条带哪个代表土著乳酸菌、哪个代表接种的嗜淀粉乳杆菌,哪个代表其他菌种需要在下述目的条带测序结果中证实.

由图 3 还可知,灭菌后餐厨垃圾中的微生物多样性明显低于灭菌前的试样. 餐厨垃圾初始试样中存在很多土著菌,但经过高温蒸汽灭菌后,其中的菌群数量大为减少,接种嗜淀粉乳杆菌后,随着发酵的不断进行,条带 e 在发酵第 1d 时亮度增加较为明显,之后保持稳定.

同时,利用 Quantity One 软件对电泳图谱进行

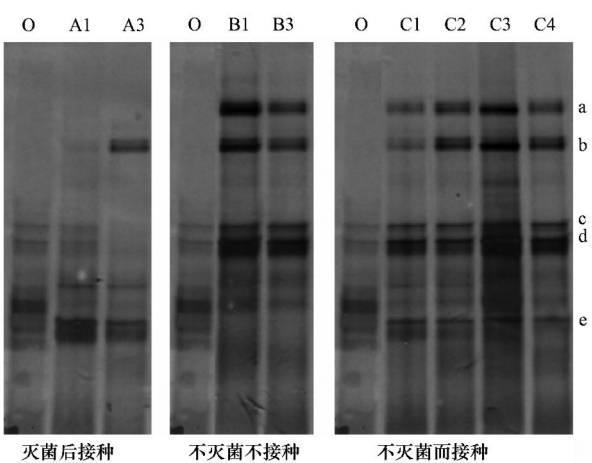


图 3 发酵样品的 DGGE 电泳图谱
Fig. 3 DGGE electrophoresis image of samples

了泳道和条带的识别后,通过系统运算得出各个样品的相似性矩阵,见表 1.

表 1 发酵样品相似性分析结果

Table 1 Similarity analysis result of samples									
	O	A1	A3	B1	B3	C1	C2	C3	C4
O	100.0								
A1	12.8	100.0							
A3	15.3	47.6	100.0						
B1	29.8	15.8	18.5	100.0					
B3	33.4	17.2	20.2	87.9	100.0				
C1	27.9	33.5	30.7	54.4	62.9	100.0			
C2	22.1	30.4	28.1	74.3	85.6	70.8	100.0		
C3	30.4	26.0	32.9	84.0	76.1	54.9	70.4	100.0	
C4	22.0	26.1	35.5	84.8	80.8	66.0	88.3	73.9	100.0

由表 1 知,最低相似度为 12.8% (样品 O 和样品 A1),即灭菌后接种发酵 1 d 后的样品与餐厨垃圾初始样品的种群结构相似性较低,同时可以看到灭菌后接种发酵的样品(样品 A)与其他的样品(样品 B 和样品 C)的相似度均较低,说明灭菌杀死了环境中大部分的微生物,使得其与开放式发酵(无论是否添加乳酸菌)样品的种群结构相差很大. 另外,样品 B 与样品 C 之间的相似度均比较高(如 B1 和 C3 的相似度为 84%),可知在开放式发酵过程中,添加嗜淀粉乳杆菌并没有使样品的种群结构发生大的变化.

2.5 目的条带的测序分析

选取 DGGE 图谱(图 3)中的部分条带,经切胶回收、PCR 重扩增和 DGGE 鉴定为单一条带后,取 20 μL PCR 扩增产物送交北京博迈德科技发展有限公司测序,一共获得 5 条不同的 16S rDNA 序列,将 5 条序列与数据库中的序列进行比对,获得各条序列的同源性信息,见表 2.

表 2 发酵样品 5 个条带的序列比对结果

Table 2 Sequence comparison result of 5 bands			
条带编号	比对序列		同源性/%
	序列号	种属	
a	HQ697623	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98
b	JF286632	Uncultured bacterium	100
c	JF767386	<i>Pseudomonas</i> sp.	98
d	HQ697665	<i>Lactobacillus casei</i>	90
e	JF811579	<i>Lactobacillus</i> sp.	100

从表 2 中可以发现,DGGE 切胶测序的 5 个条带均可以在 GenBank 中找到与其序列同源性较高(>90%)的种群. 其中条带 b 为未培养的菌种,条带 a、d 都属于乳酸菌属,它们同 *Lactobacillus plantarum* 和 *Lactobacillus casei* 的同源性分别达到了 98% 和 90%,研究表明有些乳酸菌可产生淀粉酶,如 Narita 等^[13]发现 *Lactobacillus casei* 能够产生 α-淀粉酶,故此类乳酸菌可直接利用淀粉生成乳酸;条带 c 与假单胞菌属 *Pseudomonas* sp. 的同源性达到了 98%,假单胞菌广泛存在于土壤、水、污物及空

气中,以多种有机物为碳源和能源,有的可产生多种胞外酶,在其作用下可水解餐厨垃圾,因而多具有分解蛋白质、脂肪和淀粉的能力,水解产生的小分子物质可供给乳酸菌利用,进而促进了乳酸的产生.如张志强^[14]从海洋沉积物中分离出1株高产淀粉酶的假单胞菌.条带e与乳酸杆菌 *Lactobacillus* sp. 的同源性高达100%,由DGGE图谱(图4)可以看到不灭菌不接种中并没有出现条带e,因此推测它有可能是本实验所添加的嗜淀粉乳杆菌,该菌在发酵初期起到了加速乳酸发酵的作用,但随着发酵不断进行并没有逐渐增强成为优势菌种,可能该菌种并不太适应餐厨垃圾这样复杂的底物,而餐厨垃圾自身存在的土著乳酸菌(条带a、d)适应性强,其数量无衰减趋势.这也说明了本课题组以往在开放式发酵中接种与不接种乳酸菌对产酸量影响不大的原因.

3 结论

(1)PCR-DGGE 分析的结果表明餐厨垃圾不灭菌而接种的开放式发酵体系中微生物多样性高于灭菌后接种的非开放式发酵体系,而乳酸产量也是前者高于后者.说明发酵体系中的微生物多样性与乳酸产量有一定的相关性.

(2)通过对部分条带的测序可知,餐厨垃圾开放式发酵体系中除含有接种用的嗜淀粉乳杆菌外,还含有很多土著乳酸菌,如 *Lactobacillus* sp.、*Lactobacillus casei* 和 *Lactobacillus plantarum*,以及土著水解菌,如假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)等,这些土著菌的存在是促进乳酸发酵的重要因素.

(3)接种用的嗜淀粉乳杆菌无论在开放式还是非开放式发酵,都可在一定程度上提高乳酸产量,但在发酵过程中,代表嗜淀粉乳杆菌的条带e并没有增强的趋势,可能该菌种不太适应餐厨垃圾这样复杂的底物,而餐厨垃圾自身存在的土著乳酸菌适应性强,其数量无衰减趋势.因此,为节省生产成本,可不接乳酸菌种,或从餐厨垃圾中筛选出更优势的乳酸菌,经过驯化、培养后接种发酵,以显著提高乳酸产量.

(4)PCR-DGGE 结合技术对于成分复杂的餐厨垃圾中的细菌种群结构的动态变化分析是可行的.

PCR-DGGE 可以帮助全面和深刻地理解餐厨垃圾发酵过程的微生物变化规律,为优化控制发酵过程提供理论基础.

参考文献:

- [1] Wang X M, Wang Q H, Ren N Q, *et al.* Lactic acid production from kitchen waste with a newly characterized strain of *Lactobacillus plantarum* [J]. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2005, **19**(4): 383-389.
- [2] Wang Q H, Wang X M, Wang X Q, *et al.* Bioconversion of kitchen garbage to lactic acid by two wild strains of *Lactobacillus* species[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2005, **40**(10): 1951-1962.
- [3] Wang Q H, Xu Z, Meng L H, *et al.* Influence of temperature on production of lactic acid from kitchen garbage[J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2003, **10**(2): 195-199.
- [4] 王孝强,汪群慧,王旭明,等.餐厨垃圾发酵生产乳酸的工艺优化[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2009, **41**(10): 58-63.
- [5] 王旭明,汪群慧,任南琪,等.解淀粉乳酸细菌在厨余垃圾乳酸发酵中的应用[J]. *环境科学*, 2006, **27**(4): 800-804.
- [6] 王旭明,汪群慧,刘建丽,等.高产乳酸细菌发酵厨余垃圾生产乳酸的试验研究[J]. *现代化工*, 2005, **25**(S1): 148-150.
- [7] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, **73**(1): 127-141.
- [8] 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[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(3): 695-700.
- [9] 傅以钢,王峰,何培松,等. DGGE 污泥堆肥工艺微生物种群结构分析[J]. *中国环境科学*, 2005, **25**(S1): 98-101.
- [10] 张春林. 内蒙古传统发酵酸粥中微生物多样性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
- [11] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(2): 316-322.
- [12] 刘灿,生吉萍,申琳. 变性梯度凝胶电泳技术及其在食品微生物研究中的应用[J]. *食品科学*, 2009, **30**(11): 266-271.
- [13] Narita J, Okano K, Kitao T, *et al.* Display of α -amylase on the surface of *Lactobacillus casei* cells by use of the PgsA anchor protein, and production of lactic acid from starch[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(1): 269-275.
- [14] 张志强. 海洋假单胞菌 C40 产淀粉酶的发酵生产、分离纯化及性质研究[D]. 青岛: 中国石油大学(华东), 2010.

CONTENTS

CH ₄ Concentrations and the Variation Characteristics at the Four WMO/GAW Background Stations in China	FANG Shuang-xi, ZHOU Ling-xi, XU Lin, <i>et al.</i> (2917)
Characteristics of Stable Isotopes in Precipitation over Northeast China and Its Water Vapor Sources	LI Xiao-fei, ZHANG Ming-jun, MA Qian, <i>et al.</i> (2924)
Study on Air Quality and Pollution Meteorology Conditions of Guangzhou During the 2010 Asian Games	LI Ting-yuan, DENG Xue-jiao, FAN Shao-jia, <i>et al.</i> (2932)
Characteristics and Sources of PM ₁₀ -bound PAHs During Haze Period in Winter-Spring of Xiamen	QIAN Ran-ran, YAN Jing-ming, WU Shui-ping, <i>et al.</i> (2939)
Improvement and Application of the Method for Determination of OCEC Split	WANG Li-hua, DONG Hua-bin, YAN Cai-qing, <i>et al.</i> (2946)
Characteristics of Mercury Pollution in Soil and Atmosphere in Songhua River Upstream Jia-pi-gou Gold Mining Area	ZHANG Gang, WANG Ning, WANG Yuan, <i>et al.</i> (2953)
Pollution Characteristics and Health Assessment of Particulate Mercury in Hebei Rural Households	ZHAO Ya-juan, GONG Wei-wei, LUAN Sheng-ji (2960)
Composition and Characteristics of Volatile Organic Chemicals Emission from Printed Circuit Board Factories	MA Ying-ge (2967)
Preliminary Study Concerning Emissions of the Volatile Organic Compounds from Cooking Oils	HE Wan-qing, TIAN Gang, NIE Lei, <i>et al.</i> (2973)
Characteristics of Biofilm Phase During the Long-term Degradation of a Toluene-contaminated Gas Stream Using BTF	HU Jun, ZHENG Jiang-ling, WU Yue-xin, <i>et al.</i> (2979)
Performance of Cross Flow Trickling Filter for H ₂ S Gas Treatment	LIU Chun-jing, LI Jian, LIU Jia, <i>et al.</i> (2987)
Study on Mercury Re-emissions During Fly Ash Utilization	MENG Yang, WANG Shu-xiao (2993)
Construction of Semi-analytical Model for Inversing Total Suspended Matter in Lake Taihu and Assessment of Its Applicability	LIU Zhong-hua, LI Yun-mei, TAN Jing, <i>et al.</i> (3000)
Association Study Between Water Quality of Chaohu Lake and Resources Input in Agriculture of Basin	ZHANG Yan, GAO Xiang, ZHANG Hong (3009)
Sediment and Pore Water Nutrient Characteristics in Growing Zones of <i>Alternanthera philoxeroides</i> in the Shiwuli River, Chaohu Lake	LI Ru-zhong, LI Feng, ZHOU Ai-jia (3014)
Enrichment Characteristic of Phosphorus in Surface and Core Sediments of Chaohu Lake and the Pollution Quantification	LIU En-feng, DU Chen-chang, YANG Xiang-dong, <i>et al.</i> (3024)
Spatial Distribution Characteristics and Correlation Analysis of Organic Matter, Total Nitrogen and Total Phosphorus in Topsoil Around Chaohu Lake	CHEN Shu-qin, CHU Zhao-sheng, HU She-rong, <i>et al.</i> (3031)
Dynamic Characteristics of Nitrogen and Phosphorus in the Representative Input Tributaries of Danjiangkou Reservoir	LEI Pei, ZHANG Hong, SHAN Bao-qing (3038)
Effects of Thermal Stratification on Spring Blooms in Xiangxi Bay of the Three Gorges Reservoir	LIU Liu, LIU De-fu, XIAO Shang-bin, <i>et al.</i> (3046)
Explore the Spatial and Temporal Patterns of Water Pollution in the Yincungang Canal of the Lake Taihu Basin, China	YANG Xiao-ying, LUO Xing-zhang, ZHENG Zheng, <i>et al.</i> (3051)
Analysis on the Forms and Release Potential of Nutrients in Sediments from Lakes in the West Jiangsu Province	LIU Tao, HU Zhi-xin, YANG Liu-yan, <i>et al.</i> (3057)
Spatial Distribution and Evaluation of Nitrogen, Phosphorus and Organic Matter in Surface Sediments from Western Lakeside Belt of Lake Taihu	GAN Shu, LU Shao-yong, QIN Pu-feng, <i>et al.</i> (3064)
Source Apportionment of Nitrogen and Phosphorus from Cropping Non-point Source Pollution in Nansi Lake Basin	LIU Jing, LU Feng, YANG Yan-zhao, <i>et al.</i> (3070)
Relationship Between Dissolved Organic Carbon and DBP in the Pearl River Water	HE Hong-wei, ZHOU Da-cheng, WANG Bao-qiang, <i>et al.</i> (3076)
Health Risk Assessment of Heavy Metals in Typical Township Water Sources in Dongjiang River Basin	WANG Ruo-shi, XU Qiu-jin, ZHANG Xian, <i>et al.</i> (3083)
Halogenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments of Maozhou River, Shenzhen	SUN Jian-lin, NI Hong-gang, DING Chao, <i>et al.</i> (3089)
Distribution Patterns of Heavy Metals in Surficial Sediment and Their Influence on the Environment Quality of the Intertidal Flat of Luoyuan Bay, Fujian Coast	GAO Wen-hua, DU Yong-fen, WANG Dan-dan, <i>et al.</i> (3097)
Study on the Changes of Macrobenthos Communities and Their Causes in Bohai Bay	CAI Wen-qian, LIU Lu-san, QIAO Fei, <i>et al.</i> (3104)
Construction of Groundwater Contamination Prevention Mapping System	WANG Jun-jie, HE Jiang-tao, LU Yan, <i>et al.</i> (3110)
Uncertainty Analysis of Groundwater Protection and Control Zoning in Beijing Plain	LU Yan, HE Jiang-tao, WANG Jun-jie, <i>et al.</i> (3117)
Nitrate Storage and Transport Within a Typical Karst Aquifer System in the Paralleled Ridge-valley of East Sichuan	YANG Ping-heng, YUAN Dao-xian, REN You-rong, <i>et al.</i> (3124)
Adsorption of Perfluorooctanesulfonate (PFOS) onto Modified Activated Carbons	TONG Xi-zhen, SHI Bao-you, XIE Yue, <i>et al.</i> (3132)
Investigation of the Oxidation Reaction of O ₃ with Bromide Ion in Aqueous Solution	YU Xiao-ting, ZHANG Jia-hui, PAN Xun-xi, <i>et al.</i> (3139)
Determination of the Distribution of Relative Molecular Mass of Organic Matter by High Pressure Size Exclusion Chromatography with UV and TOC Detectors	ZHANG Han, DONG Bing-zhi (3144)
Black Water Bloom Induced by Different Types of Organic Matters and Forming Mechanisms of Major Odorous Compounds	LU Xin, FENG Zi-yan, SHANG Jing-ge, <i>et al.</i> (3152)
Effect of Fe and Fe/Ni Nanoparticles on the Biodegradation of Phenol by BFN at Different pH Values	KUANG Ye, ZHOU Yan, WANG Qing-ping, <i>et al.</i> (3160)
Pretreatment of High-Concentration Acrylic Acid Wastewater by the Multi-Stage Microaerobic Biological Fluidized Bed Reactor	LI Sha, ZHENG Sheng-zhi, SONG Yu-dong, <i>et al.</i> (3167)
Denitrification on Secondary Effluent of Acrylic Fiber Wastewater by Tri-Stage Biofilm Advanced Reactor	XU Shao-yang, JIANG Jin-yuan, ZHOU Yue-xi, <i>et al.</i> (3172)
Dynamic Adsorption of Cadmium (II) in Water on Modified Peanut Shells	LONG Teng, YI Xiao-yun, DANG Zhi (3177)
Adsorption Properties of Thiocyanate Anion on Granular Mg/Al Mixed Oxides	WANG Xiu-juan, WANG Hai-zeng, SUN Bao-wei, <i>et al.</i> (3182)
Model of Regularity of Ammonia Transformation Along Marine Biological Aerated Filter	LUO Rong-qiang, HOU Sha-sha, SHEN Jia-zheng, <i>et al.</i> (3189)
Aerobic Granular Sludge Bulking Due to the Lack of Nutrient and Its Recovery	ZHANG Zhu, GAO Da-wen, YUAN Xiang-juan, <i>et al.</i> (3197)
Enhanced Hydrolysis of Waste Activated Sludge by Biosurfactant	YI Xin, LUO Kun, YANG Qi, <i>et al.</i> (3202)
Enrichment and Identification of Anaerobic Ammonium Oxidation Bacteria	LIU Dong-ying, QIU Yan-ling, YUAN Xian-zheng, <i>et al.</i> (3208)
Isolation, Identification and Characterization of an Atrazine Degrading Bacterium	LI Shao-feng, ZHU Jing, LI Tie-jing (3214)
Isolation, Identification and Enzymological Characterization of a New Fungal with High Laccase Production from Agricultural Waste Composting	REN Xiu-juan, FAN Chang-zheng, LU Lun-hui, <i>et al.</i> (3220)
Screening and Identification of Microorganisms for Decolorization of Molasses Spent Wash	LI Bi-jin, LIU You-yan, HE Kai, <i>et al.</i> (3228)
Analysis of Microbial Community Structure in Lactic Acid Fermentation from Kitchen Waste	LIU Jian-guo, WANG Qun-hui, WANG Shuang, <i>et al.</i> (3236)
Effect of Covalent Functionalization on DNA Cleavage Activity and ROS Formation of Single-Walled Carbon Nanotubes	WU Ren-ren, TAO Xue-Qin, DANG Zhi, <i>et al.</i> (3241)
Research on Mercury Methylation by <i>Geobacter sulfurreducens</i> and Its Influencing Factors	ZOU Yan, SI You-bin, YAN Xue, <i>et al.</i> (3247)
Uptake Effect of Cd and Pb by Rape Under Single Cd/Pb and Cd-Pb Combined Stress	WU Wen-fei, NAN Zhong-ren, WANG Sheng-li, <i>et al.</i> (3253)
Distribution Characteristics and Risk Assessment of Heavy Metals in Farming Domestic Muscovy Duck Originated from Au/Cu Mining and Smelting Activities	HANG Xiao-shuai, LIANG Bin, WANG Wen-lin, <i>et al.</i> (3261)
Effects of the Environmental Hormone Cypermethrin on the Reproduction of <i>Brachionus calyciflorus</i>	DONG Xue-xing, YANG Jia-xin, LÜ Lin-lan, <i>et al.</i> (3266)
Research on Anti-Corrosion of <i>Thiobacillus</i> for the Geopolymer Solidification MSWI Fly Ash	JIN Man-tong, SUN Xin, DONG Hai-li, <i>et al.</i> (3272)
Chlorination Transformation and Volatilization of Heavy Metals in Fly Ash from the Incineration During the Disposal Process with Higher Temperature	LIU Jing-yong, SUN Shui-yu (3279)
Study on Greenhouse Gas Emissions from Urban Waste Disposal System; A Case Study in Xiamen	YU Yang, CUI Sheng-hui, LIN Jian-yi, <i>et al.</i> (3288)
Fate Analysis of NPEOs and Their Metabolites in Municipal Wastewater Plants	LIAN Jing, LIU Jun-xin (3295)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2012年9月15日 33卷 第9期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol.33 No.9 Sep. 15, 2012

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科学出版社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印刷装订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科学出版社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencecp. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencecp. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 70.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发售