

PCR-DGGE 用于油脂废水处理系统中 酵母菌群落结构解析

吕文洲* 刘 英 朱建林

(宁波大学建筑工程与环境学院环境工程系 宁波 315211)

摘 要: 本研究建立了适合于 PCR-DGGE 分析的环境样品中酵母菌基因组 DNA 的快速提取方法并利用 PCR-DGGE 对酵母菌处理油脂废水系统中的酵母菌群落结构进行了解析。结果表明,并非所有可以降解含油废水中污染物的菌株都可以稳定存在于系统中;系统对于菌株的选择开始于菌株的扩大培养阶段;系统从连续运行开始到稳定的过程中, G1、O2 或 W1 成为优势菌株并稳定存在于系统中。

关键词: 酵母菌, DNA 提取, PCR-DGGE, 群落结构

Analysis of Yeast Community Structure in a Salad Oil-containing Wastewater Treatment System by PCR-DGGE

LÜ Wen-Zhou* LIU Ying ZHU Jian-Lin

(Department of Environmental Engineering, College of Architectural Civil Engineering and Environment,
Ningbo University, Ningbo 315211)

Abstract: A rapid extraction of yeast genomic DNA suitable for PCR-DGGE analysis was established and the yeast community structure in a salad oil-containing wastewater treatment system was investigated. The results show, not all yeast strains capable of degrading pollutants in wastewater can be planted by system; the selection of system to yeast strains starts from the period of yeast biomass cultivation; from beginning to stable status of continuous wastewater treatment, G1, O2 or W1 are the dominant yeast strains and survive in selection of system.

Keywords: Yeast, DNA extraction, PCR-DGGE, Community structure

Muyzer^[1] 于 1993 年首次将变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术引入微生物生态学研究, 并用以确定自然环境中微生物群体的多样性。随后, 该技术被逐渐应用到了废水生物处理过程中对总细菌或功能细菌的微生态结构进行解析^[2-7]。近年来, 国内也相

继利用此技术对活性污泥系统^[8,9]、特种反应器^[10-13]、受重金属污染土壤^[14]以及堆肥^[15]中的微生物群落结构进行分析, 并快捷、准确地揭示了系统中细菌群落结构的变化及其对系统功能的影响。纵观以前的研究, 大多是以系统中的细菌为研究主体,

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(No. Y507701); 浙江省教育厅科研项目(No. 20070970); 宁波市工业攻关项目(No. 2006B100071);
宁波市自然科学基金项目(No. 2007A610057); 宁波大学博士基金项目

* 通讯作者: Tel: 0574-87600314; E-mail: luwenzhou@nbu.edu.cn

收稿日期: 2008-03-01; 接受日期: 2008-05-23

对于酵母菌的研究较少。2000 年Cocolin建立了分析酿酒过程中酵母菌多样性的PCR-DGGE方法^[16,17],随后成功应用于牛奶中酵母种群的结构分析。Prakitchaiwattana^[18]和Nielsen^[19]也分别用此技术分析了葡萄表面以及可可发酵过程中的酵母菌群。但截至目前,尚未见到该技术应用于解析酵母菌废水处理系统中酵母菌群落结构的报道。

前期研究中,由 10 株功能酵母菌构建的 SBR 系统在处理高含油废水中取得了良好的效果,但在系统运行中经常出现出水混浊,并在出水中检出大量酵母细胞,说明这一过程中可能存在菌株流失现象。为了深入探讨各酵母菌株在系统中的演替,并最终确定优势种群以构建高效、稳定的酵母菌废水处理系统,本研究利用 PCR-DGGE 方法对酵母菌处理高含油废水中的酵母群落结构进行了初步分析,并在此过程中建立了适用于 PCR-DGGE 分析的环境样品中酵母菌基因组 DNA 的快速提取方法。

1 材料与方法

1.1 酵母菌菌株

研究中使用了 10 株酵母菌株,其中,5 株是从含油废水中筛选的酵母菌(O 系列);3 株由中科院微生物所菌株保藏中心购买的油脂降解酵母菌株(G 系列)以及 2 株从味精废水中筛选到的、能够耐高盐、高渗透压环境的酵母菌菌株(W 系列)。10 株酵母菌对含油废水都具有较高的降解能力,COD 去除率最低达 81%。菌株编号和菌株名称如表 1 所示。

1.2 废水连续处理及环境样品采集

1.2.1 废水连续处理:10 株酵母菌株经 YPD 培养基活化 48 h,等量混合培养液后在序批式反应器

(SBR)中用实际含油废水进行扩大培养,含油废水取自天津某色拉油加工厂。在获得足够菌体后,转入废水连续处理。运行中,污泥 BOD 负荷控制在 0.5 kg/(kg·d)。1 个 SBR 运行周期分为进水期(1 h),曝气期(9 h),静置期(2.5 h),排水期(0.5 h),排水比 1/2。

1.2.2 环境样品的采集:自废水连续处理开始,分别于第 0 d、6 d、9 d、18 d、25 d、32 d、44 d对SBR 中生物样进行取样。然后用去离子水清洗 2~3 次,8000 r/min离心,去上清液后保存于-20 冰箱中;为了验证所建立的快速DNA提取方法,特向生物样品中加入了纯培养的G3 菌株细胞。用血球计数板计数使得样品中G3 细胞浓度约为 1.5 × 10⁸ 个/mL。

1.3 酵母菌基因组 DNA 的快速提取

1.3.1 实验设计:酵母菌基因组 DNA 提取采用冻融法:根据文献[20]中提取纯培养酵母菌基因组 DNA 的方法,采用正交实验设计,考察了预处理方法、裂解液用量和冻融次数对 DNA 提取及后续 PCR-DGGE 实验的影响。为了比较该方法提取 DNA 和后续实验的有效性,实验 10~11 用酵母菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)作为对照。具体实验设计见表 2。

表 2 DNA 提取条件实验设计表 Table 2 Design of DNA extraction experiments			
实验编号 Experiments	样品前处理 Pretreatment of sample	裂解液量 Volume of lysis solution	冻融次数 Freezing times
1	不处理	200	2
2	不处理	300	3
3	不处理	400	4
4	石油醚清洗	200	3
5	石油醚清洗	300	4
6	石油醚清洗	400	2
7	玻璃珠	200	4
8	玻璃珠	300	2
9	玻璃珠	400	3
10	试剂盒	/	/
11	石油醚清洗 +试剂盒	/	/

1.3.2 样品预处理:为了更有效的破碎酵母细胞,设计了加入酸化玻璃珠的预处理操作,具体是每样品加入 0.25 g 酸化玻璃珠;为了考察酵母细胞表面尚未降解的油脂对 DNA 提取以及下游技术的影响,采用了石油醚清洗的预处理,每个样品加入 1 mL 石油醚清洗 3 次。

表 1 试验中所用的酵母菌菌株编号及名称 Table 1 Yeast strains and corresponding codes in experiments	
菌株编号 Strain code	菌株名称 Strain
O2	<i>Candida tropicalis</i>
O3	<i>Canida boidinii</i>
O3i	<i>Rhodotorula glutinis</i>
O4	<i>Candida utilis</i>
O5	<i>Trichosporon cutaneum</i>
G1	<i>Candida lipolytica</i>
G2	<i>Candida intermedia</i>
G3	<i>Candida pseudolambica</i>
W1	<i>Candida halophila</i>
W2	<i>Trichosporon asteroides</i>

1.3.3 DNA 提取: 先将菌体悬浮于 200 μL ~400 μL 的裂解液中, 接着将离心管放入 -80°C 的超低温冰箱(NU-6511E, NUAIRE, 美国) 5 min 直到全部冰冻, 然后迅速将离心管置于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 2 min。重复冻融次数根据实验设计进行。而后在漩涡振荡器上剧烈振动 30 s; 加入 200 μL 的苯酚-氯仿(1:1, V/V), 剧烈振荡 2 min; 在室温下 16000 r/min 离心 3 min; 水相转移到一个干净的离心管中, 加入冰乙醇到 1 mL。室温下自然沉降 5 min, 然后在 16000 r/min 下离心 5 min; 小心倒掉上清液; 加入 0.5 mL 70% 的乙醇清洗, 离心倒去上清液, 开盖, 放于室温通风处使乙醇挥发; 加入 20 μL TE 到离心管中, 用手指弹动离心管, 使 DNA 溶解。提取的 DNA 用电泳仪(i-Mupid[®]J, 日本)进行琼脂糖凝胶电泳以证明 DNA 是否被成功提取。DNA marker 采用北京天根生化科技有限公司的 λ DNA /Hind III。

1.3.4 试剂: 裂解液: 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0); 苯酚-氯仿(1:1); 100% 乙醇; TE: 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。

1.4 PCR

1.4.1 仪器和引物: (1) 仪器: PCR 扩增仪(Icycler Thermal Cycler, Bio-rad, 美国); (2) 引物: 第一轮 PCR: 上游引物 NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和下游引物 NL-4 (5'-GGTCCGTGT TTCAAGACGG-3')。第二轮 PCR: 上游引物 NL1-GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGG GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和下游引物 LS2 (5'-ATTCCCAAACAAC TCGACTC-3')^[18]。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.4.2 操作条件: (1) 反应体系: 为 50 μL 反应体系。向 0.2 mL 的 PCR 薄壁管中依次加入: 10 \times PCR 缓冲液 5 μL ; 10 nmol DNTP 4 μL ; 10 pmol 引物各 1.5 μL ; DNA 模板 1 μL , Taq 酶 2.5 U, 最后用双蒸水补足 50 μL ; (2) PCR 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 退火 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 36 个循环; 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 10 min。

1.4.3 PCR 产物检测: 使用电泳仪对两次 PCR 结果进行检测。第一轮和第二轮 PCR 扩增的目标产物大小分别约为 600 bp 和 300 bp。使用北京天根生化科技有限公司的 100 bp DNA ladder marker。

1.5 DGGE

1.5.1 试剂药品: 用于酵母菌 DGGE 的胶浓度为 8%

(丙烯酰胺/双丙烯酰胺 37.5:1, V/V), 其变性梯度为 30%~50% (100% 的变性剂中含有 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺)。

1.5.2 操作条件: 向第二轮 PCR 扩增产物的 50 μL 体系中加入 6 \times loading buffer 10 μL , 用移液器吸头吸打数次, 使之混合均匀后点样 30 μL 。使用美国的 DcodeTM, Bio-Rad 基因突变检测系统, 电泳条件: 60 、140V 下运行 4 h~6 h, 电泳完毕后, 将凝胶在 1% EB 溶液中染色 20 min, 用去离子水或者自来水清洗 2 次, 每次 5 min, 最后置于凝胶成像系统 (UNIVERSAL HOOD-S.N.75S/02564, Bio-Rad, 美国) 进行观察并拍照。

1.5.3 DGGE 阳性参照体系: 使用酵母菌基因组 DNA 提取试剂盒提取单菌株细胞 DNA, 进行 PCR 扩增; 取 10 株菌的 PCR 产物进行等量混合后取 1 μL 进行第二轮 PCR 操作, 获得的产物用做 DGGE 的阳性参照样品。在 DGGE 试验中, 在最外的 2 个泳道设置 2 个阳性参照样, 用于识别生物样品中的具体酵母菌菌株。

2 结果与讨论

2.1 酵母菌基因组 DNA 的快速提取

图 1 为不同条件提取的酵母基因组 DNA 的电泳图。其中, 两边的条带为 DNA Marker, 1~11 条带分别对应实验设计中不同的提取方法。由图可以看出, 试剂盒提取结果具有明亮的条带(10 和 11 泳道), 而没有经石油醚清洗的样品提取效率高于经清洗的样品。除此之外, 1、6、8 泳道有较明显的目的条带, 但不及试剂盒提取效果好, 表现为条带亮度低; 其他泳道则没有明显的目的条带。结合实验设计条件, 可以看出, 冻融次数对于 DNA 提取的影响最大, 并决定了 DNA 的提取效率, 且以 2 次为宜, 更多次的冻融无益于 DNA 提取; 而样品预处理、裂解液用量对于 DNA 的提取效率没有明显的影响, 考虑到实验的经济性, 样品预处理是完全没有必要的; 裂解液用量为 200 μL 即可。

2.2 PCR 扩增

图 2、图 3 分别是对提出的 DNA 进行两次 PCR 扩增的电泳图。其中两边及中间标为 M 的条带为 DNA Marker。值得一提的是, 经过第一次 PCR 扩增, 所有条件提取的 DNA 均在 600 bp 处出现明显的目的条带, 这表明图 1 中没有出现条带的原因不

是没有提取出样品的 DNA, 而是由于提取的 DNA 量比较小的缘故, 但提取的 DNA 量完全可以满足后续 PCR 的需要。同时由图 2 可以看出, 除了目的条带外, 还出现了非目的条带, 后经实验证明为模板用量过大, 稀释后此现象即消失。第一次 PCR 产物经稀释后进行第二次 PCR 的结果显示, 各处理均获得清晰的目的条带, 扩增产物大小为 300 bp。

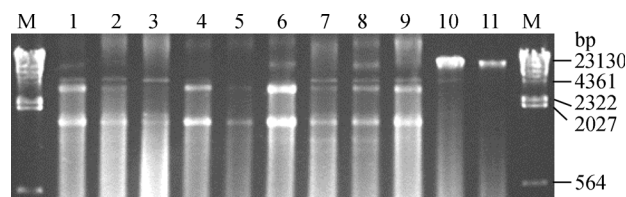


图 1 不同实验下 DNA 提取结果的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic image of DNA extraction in different experiments

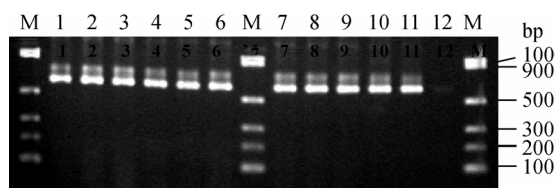


图 2 第一次 PCR 扩增结果

Fig. 2 Electrophoretic image of the first PCR

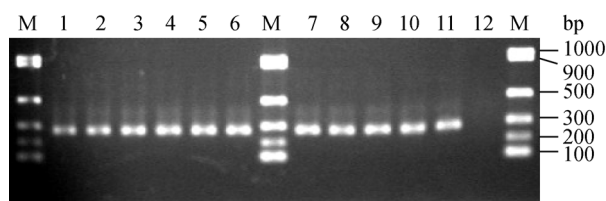


图 3 第二轮 PCR 扩增结果

Fig. 3 Electrophoretic image of the second PCR

2.3 DGGE 分析

对 10 株酵母菌的纯培养物进行了 DNA 提取和 PCR-DGGE 分析, 建立了阳性参照体系, 如图 4。可以看出, 系统使用的 10 株酵母菌中, 从 DGGE 图谱上只可以看到 7 个条带, 其中 O2 和 W1、O3 和 G3、O4 和 O5 的条带分别重合。

随后对连续运行的 SBR 系统中酵母菌群落结构进行了 DGGE 解析, 如图 5, 其中泳道 1 和 9 为阳性参照体系。可以看出, 从 SBR 连续运行的第 1 天起, 系统中仅存有 G1、O2 或 W1。这说明, 系统对于菌株的选择开始于扩大培养阶段(约在接种后的 6 d~10 d); 从连续运行到系统稳定后, 各菌株已趋于稳定。系统对菌株的选择估计与酵母菌细胞表面和油

的亲水性有关, 具体机理有待于进一步深入探讨。另外可以看出, 由于 O2 和 W1 菌株的 DGGE 条带重合, 因此在此条件下无法判断是 O2、W1 单独还是共同存在于系统。后续的研究中利用分组培养的方法证实了是 O2 与 W1 同时存在。

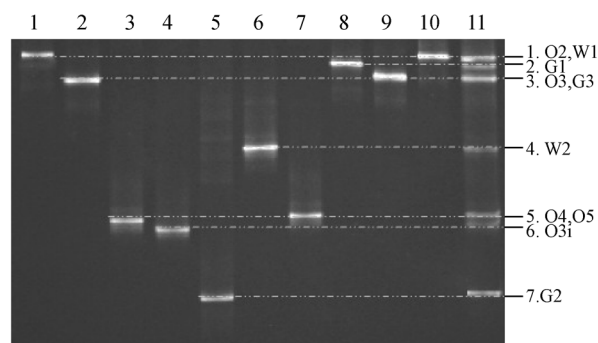


图 4 系统中 10 株酵母菌的 DGGE 图谱

Fig. 4 DGGE image of 10 yeast strains' reference system

1~11: 菌株 O2、O3、O4、O3i、G2、W2、O5、G1、G3、W1 及全部菌株的 DGGE 图谱

1~11: Represent DGGE image of O2, O3, O4, O3i, G2, W2, O5, G1, G3, W1 and all strains

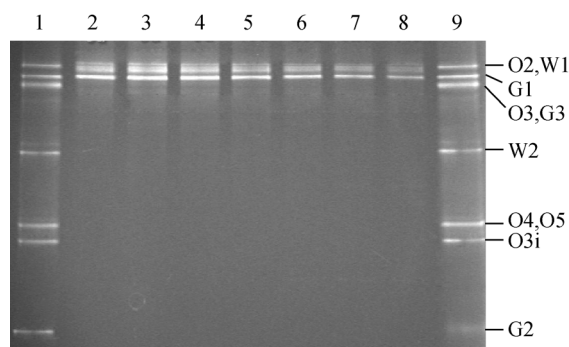


图 5 SBR 系统连续运行中酵母菌 DGGE 分析图谱

Fig. 5 DGGE image of 10-yeast-strain complex in continuous wastewater treatment

1, 9: 全菌株的 DGGE 图谱; 2~8: 运行的第 0 d、6 d、9 d、18 d、25 d、32 d、44 d 的 DGGE 图谱

1, 9 and 2~8: Represent DGGE image of all strains and yeasts in SBR after operation of 0 d, 6 d, 9 d, 18 d, 25 d, 32 d, 44 d, respectively

图 6 是对 DNA 快速提取方法是否可以得到可靠 PCR-DGGE 分析结果的进一步验证。在 DGGE 图谱中, 两侧的 M 泳道为阳性参照, 1-11 则对应不同 DNA 提取条件的 DGGE 结果。可以看出, 所有泳道均检出了 G3 菌株的对应条带, 而且各泳道具有相同的检出条带数和亮度, 说明不同 DNA 提取条件获得了相同的 PCR-DGGE 结果, 而且与使用试剂盒的结果无明显差异, 说明快速 DNA 提取方法具有可靠性。与传统 DNA 提取方法比较, 该方法的显著特点在于快速、简便且经济, 可以在 2 h 之内提取适用于

PCR-DGGE 分析的 DNA 样品, 且样品无需预处理, 更适合于环境样品的实时动态分析。

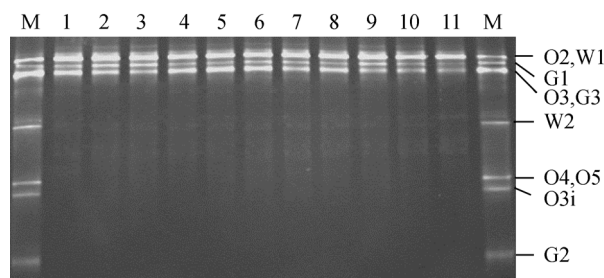


图 6 不同 DNA 提取条件下的酵母菌 DGGE 图谱

Fig. 6 DGGE image under different DNA extraction conditions

3 结论

(1) 建立了适用于 PCR-DGGE 技术的酵母菌基因组 DNA 的快速提取方法;

(2) 利用 PCR-DGGE 对系统中酵母菌群落结构进行了解析, 证明 G1、O2 或 W1 是可以长期稳定存在于系统中的菌株;

(3) 系统对于菌株的选择开始于扩大培养阶段; 而且并非可以降解废水中污染物的菌株都可以稳定存在于系统中。

参 考 文 献

- [1] Muyzer G, Ellen CDW, Andre GU. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695–700.
- [2] Kreuzinger N, Farnleitner A, Wandl G, *et al.* Molecular biological methods (DGGE) as a tool to investigate nitrification inhibition in wastewater treatment. *Water Sci Technol*, 2003, **47**(11): 165–172.
- [3] LaPara TM, Nakatsu CH, Pantea LM, *et al.* Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE. *Water Res*, 2002, **36**(3): 638–646.
- [4] Noda N, Yoshie S, Miyano T, *et al.* PCR-DGGE analysis of denitrifying bacteria in a metallurgic wastewater treatment process. *Water Sci Technol*, 2002, **46**(1–2): 333–336.
- [5] Tam K, Yang CH, Matsumoto MR, *et al.* Comparison of PCR-DGGE and selective plating methods for monitoring the dynamics of a mixed culture population in synthetic brewery wastewater. *Biotechnol Prog*, 2005, **21**(3): 712–719.
- [6] Yoshie S, Noda N, Miyano T, *et al.* Characterization of microbial community in nitrogen removal process of metallurgic wastewater by PCR-DGGE. *Water Sci Technol*, 2002, **46**(11–12): 93–98.
- [7] David M Stamper, Marianne Walch, Jacobs RN. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for gray-water treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 852–860.
- [8] 刘新春, 吴成强, 张 昱, 等. PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析. *生态学报*, 2005, **25**(4): 842–847.
- [9] Liu Xinchun, Zhang Yu, Yang Min, *et al.* Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method. *环境科学学报(英文版)*, 2007, **19**(1): 60–66.
- [10] 邢德峰, 任南琪, 宫曼丽. PCR-DGGE 技术解析生物制氢反应器微生物多样性. *环境科学*, 2005, **26**(2): 172–176.
- [11] 邢 薇, 左剑恶, 孙寓姣, 等. 利用 FISH 和 DGGE 对产甲烷颗粒污泥中微生物种群的研究. *环境科学*, 2006, **27**(11): 2268–2272.
- [12] 苏俊峰, 马 放, 王弘宇, 等. 利用 PCR-DGGE 技术分析生物陶粒硝化反应器中微生物群落动态. *环境科学学报*, 2007, **27**(3): 386–390.
- [13] 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. *环境科学*, 2007, **28**(5): 1095–1101.
- [14] 王 慧, 王远鹏, 林 琦, 等. 应用 PCR—DGGE 研究铜冶炼厂附近根际土壤微生物生态变化. *农业环境科学学报*, 2006, **25**(4): 903–907.
- [15] 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. *中国环境科学*, 2005, **25**(B06): 98–101.
- [16] Cocolin L, Bisson LF, Mills DA. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **189**(1): 81–87.
- [17] Cocolin L, Aggio D, Manzano M, *et al.* An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal*, 2002, **12**(5): 407–411.
- [18] Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH, Heard GM. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res*, 2004, **4**(8): 865–877.
- [19] Nielsen DS, Honholt S, Tano-Debrah K, *et al.* Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, 2005, **22**(4): 271–284.
- [20] Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol*, 2004, **4**: 8.