

生物造粒流化床污水处理反应器的微生物多样性*

袁宏林 刘永军 王晓昌 马美玲 左丽丽

(西安建筑科技大学环境与市政工程学院西北水资源与环境生态教育部重点实验室, 西安 710055)

摘要 为了研究生物造粒流化床污水处理反应器颗粒污泥的微生物种群多样性, 分别从生物造粒流化床 10、60 和 110 cm 处取颗粒污泥, 通过细胞裂解直接提取颗粒污泥细菌基因组 DNA, PCR 扩增后经变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分离, 获得微生物群落的 DNA 特征指纹图谱, 对特征条带进行序列测定及序列同源性分析。16S rRNA 序列分析表明, 获得的 18 个 OTUs 均属于细菌域, 其中 61% 属于变形菌, 17% 属于放线菌, 11% 属于低 G+C 革兰氏阳性菌, 11% 属于其它未知细菌。

关键词 变性梯度凝胶电泳; 生物造粒流化床反应器; 16S rRNA; 微生物多样性

中图分类号 X703 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2007)08-1199-05

Microbial diversity in fluidized pellet-bed bioreactor. YUAN Hong-lin, LU Yong-jun, WANG Xiao-chang, MA Mei-ling, ZUO Li-li (Key Laboratory of Northwest Water Resources, Environment and Ecology of Education Ministry, College of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture & Technology, Xi'an 710055, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(8): 1199-1203.

Abstract: To study the microbial diversity of granular sludge in fluidized pellet-bed (FPB) bioreactor, the sludge at different heights (10, 60 and 110 cm) of FPB was sampled, and the genomic DNA of microbial community was extracted directly. After purifying the genomic DNA, 16S rRNA genes were amplified, and the amplified DNA fragments were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The characteristic bands of DGGE were sequenced, and the phylogenetic diversity of microbes in the FPB bioreactor was surveyed based on the homology analysis of 16S rRNA sequences. The results indicated that the obtained 18 operational taxonomic units (OTUs) all belonged to *Eubacteria*, of which, 61% was *Proteobacteria*, 17% was *Actinobacteria*, 11% was low G+C gram-positive bacterium, and 11% belonged to other bacterial branches.

Key words: denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); fluidized pellet-bed (FPB) bioreactor; 16S ribosomal RNA; microbial diversity.

1 引言

近年来,用分子生物学的方法从微生物种群结构动态变化的角度,揭示污染物负荷与污水处理系统的相互关系,逐步改变污水处理系统的黑箱操作状态,已成为环境微生物分子生态学中一个具有重要理论价值和前景的研究方向 (Sun *et al*, 2004)。目前,用于活性污泥微生物区系结构分析

的分子技术主要包括: 16S rDNA 扩增、基因文库建立和序列分析, 变性梯度凝胶电泳 (DGGE), 探针杂交和限制性长度多态性分析 (RFLP) 等 (Howgrave-Graham & Steyn, 1988; Hernandez *et al*, 1994)。在这些技术中, 变性梯度凝胶电泳是目前研究微生物遗传多样性和种群动态性最有力的分子生物学技术。自从 10 年前首次将该技术应用于微生物生态的研究以来 (Muyzer *et al*, 1993), 该技术已被广泛应用于各种环境微生物生态的研究, 如湖泊 (Araya *et al*, 2003)、海洋 (Schafer *et al*, 2000)、活性污泥 (Li *et al*, 2002) 和生物膜 (Zhang *et al*, 2001) 等。由于避免了纯培养的局限, 直接对活性污泥总基因

* 国家自然科学基金项目 (50578132)、国家自然科学基金重大国际合作项目 (50621140001) 和国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2006AA06Z328)。

** 通讯作者 E-mail: liuyongjun@xauat.edu.cn
收稿日期: 2006-07-14 接受日期: 2007-04-30

组 DNA 进行分析,为比较全面、客观、精细和深入地描述活性污泥系统复杂微生物群落结构提供了方法。

生物造粒流化床反应器 (FPB) 是近年发展起来的一种集混凝、造粒、生物降解、固液分离于一体的污水处理系统 (Wang *et al.*, 2007)。在此前的研究中,作者对生物造粒流化床反应器中微生物的生长特性、微生物群落结构以及动态变化进行了较为深入的研究 (袁宏林等, 2007)。本研究将对生物造粒流化床反应器中微生物种群多样性的信息进行解析,为全面了解生物造粒流化床反应器生物降解特性及进一步对微生物进行过程控制奠定基础。

2 材料与方法

2.1 生物造粒流化床反应器

本研究所用的生物造粒流化床反应器系统如图 1 所示。关于该系统的详细描述参见文献 (Wang *et al.*, 2007)。

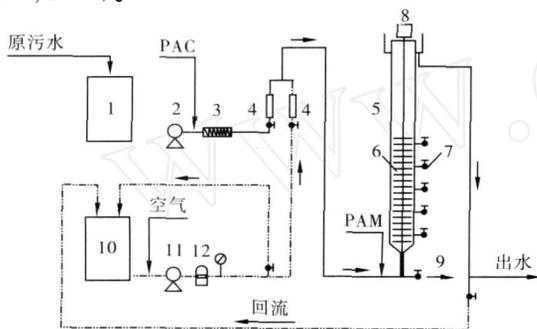


图 1 生物造粒流化床反应器系统流程

Fig 1 Diagram of the FPB bioreactor system

1:原水罐; 2:原水泵; 3:静态混合器; 4:流量计; 5:流化床柱; 6:螺旋叶片; 7:取样口; 8:电动机; 9:出口; 10:回流水罐; 11:空气压力泵; 12:压力罐。

2.2 原污水水质

原污水水质如表 1 所示。生物造粒流化床底部溶解氧 (DO) 的浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 随着流化床柱的

表 1 原污水水质

Tab 1 Raw wastewater quality

项目	范围 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均值 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
SS	42 ~ 240	162.3
COD	172 ~ 423	275.8
BOD ₅	90 ~ 202	134.7
TN	33.2 ~ 70.9	38.8
NH ₃ -N	18.2 ~ 41.2	26.2
NO ₃ ⁻ -N	0.22 ~ 0.90	0.48
TP	4.6 ~ 10.5	8.16

升高,溶解氧逐渐降低,在 110 cm 处,溶解氧的浓度约为 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 样品采集

生物造粒流化床反应器粒状污泥样品从生物造粒流化床柱壁上预留的取样管取样 (图 1), 柱的有效高度是 160 cm, 为了研究流化床柱底层、中层及顶层微生物情况, 用一个特制的取样器从取样管 10、60 和 110 cm 处分别取样。

2.4 样品处理

采用改进的化学裂解法直接从活性污泥中提取基因组 DNA, 方法参见文献 (袁宏林等, 2007); 使用 PE9700 型基因扩增仪, 以提取的总 DNA 为模板, 以原核生物通用引物 530F 和 1490R 为上下游引物扩增 16S rRNA 基因。引物序列以及 PCR 反应体系参见文献 (袁宏林等, 2007)。

2.5 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

变性梯度胶的制备: 使用梯度混合装置, 制备 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂浓度从 30% 到 60% (100% 的变性剂为 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物), 其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增。样品的加样: 待变性梯度胶完全凝固后, 将胶板放入装有电泳缓冲液的电泳槽中, 取 $8 \mu\text{l}$ PCR 回收样品和 10 倍加样缓冲液混合后加入上样孔。电泳: 在 150 V 的电压下, 60 电泳 4 h, 然后用 AgNO_3 染色。

2.6 序列测定及系统发育

切取并回收 DGGE 条带, PCR 再扩增产物用胶回收纯化试剂盒回收纯化, PCR 回收产物进行序列测定 (由上海生物工程公司完成)。所有的 16S rDNA 片段的序列通过 BLAST 与 GenBank 数据库中搜寻相似序列 (Altschul *et al.*, 1990), 将相关序列用 DNA-MAN (version 4.0) 进行比对并构建系统发育树。

3 结果与分析

3.1 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

图 2 所示为不同颗粒污泥样品的 DGGE 指纹图谱。从图 2 可以看出, 生物造粒流化床反应器颗粒污泥中的微生物群落非常丰富, 在生物造粒流化床不同高度都有一些各自的特征条带 (“ ”), 说明反应器内随着微生物生长的微环境发生变化, 在特定生态条件下出现一些微生物群落的特征种属同样, 在不同活性污泥样品中也有较多电泳位置相同的条带 (“ ”), 说明生物造粒流化床反应器不同高度的

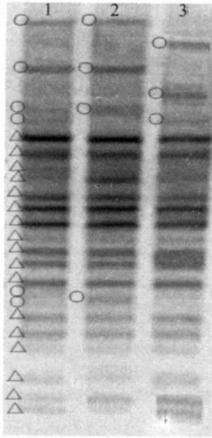


图 2 DGGE指纹图谱及聚类分析

Fig 2 DGGE finger printing and cluster analysis results
1, 2, 3分别为生物造粒流化床 10, 60和 110 cm处颗粒污泥;“○”为流化床不同高度颗粒污泥中的特征种属;“△”为流化床不同高度颗粒污泥中的共有种属。

微生物群落演替不明显,微生物群落结构较为稳定。

3.2 基于 16S rRNA 序列相似性的系统发育学分析

从颗粒污泥中扩增出长约 1.0 kb的基因部分片段并分别进行了测序。在 DGGE图谱中的相对位置如图 3所示。对这些 OTUs和迄今已描述的原核生物在 16S rRNA 序列相似性基础上进行了系统发育学分析,其中 11个属于变形菌,3个属于放线菌,2个属于低 G+C革兰氏阳性菌,2个属于其它细菌。这一微生物种群发育特征与其他学者对常规活性污泥中微生物种群的分析结果比较类似 (Snaidr *et al*, 1997)。对各类菌的详细描述如下。

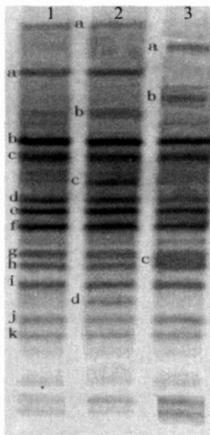


图 3 所获得得 18个 OTUs在 DGGE图谱中相对位置
Fig 3 Relative position of 18 OTUs in the DGGE finger printing

1, 2, 3分别为生物造粒流化床 10, 60和 110 cm处颗粒污泥; a, b, c, ..., k分别为不同颗粒污泥中所获得的 OTUs。

放线菌:有 3个 OTUs属于放线菌, 1-d, 1-h分别与节杆菌 (*Arthrobacter* sp.)和棒状杆菌属中的 *Corynebacterium terpenotabidum* 序列相似,其同源性为 99%; 1-k与节杆菌 (*Arthrobacter* sp.)聚在一起,但序列同源性比较低 (图 4)。

低 (G+C)革兰氏阳性菌和其它细菌:有 2个 OTUs属于低 (G+C)革兰氏阳性菌,有 2个 OTUs属于其它分支的细菌。1-f与芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)的序列同源性为 99%, 1-g与从环境样品中得

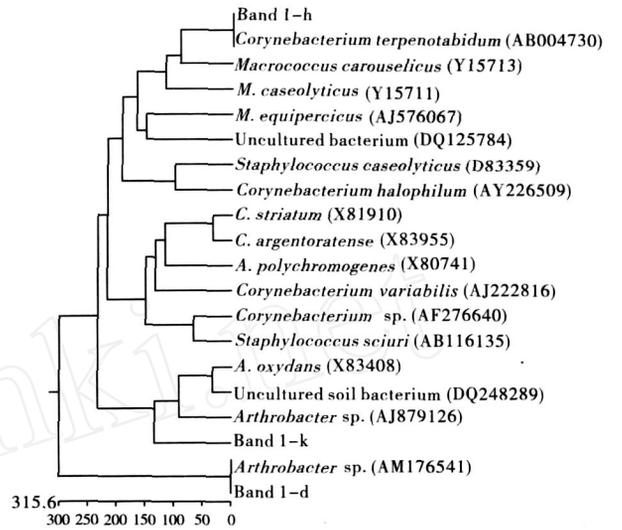


图 4 放线菌纲的 OTUs及其相关菌株的系统发育树
Fig 4 Phylogenetic tree of the OTUs and their relatives among Actinobacteria

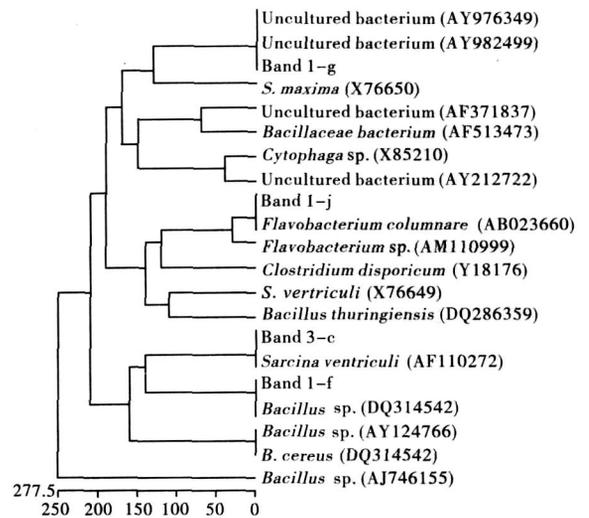


图 5 其它分支的 OTUs及其相关菌株的系统发育树
Fig 5 Phylogenetic tree of the OTUs and their relatives among other bacteria branches

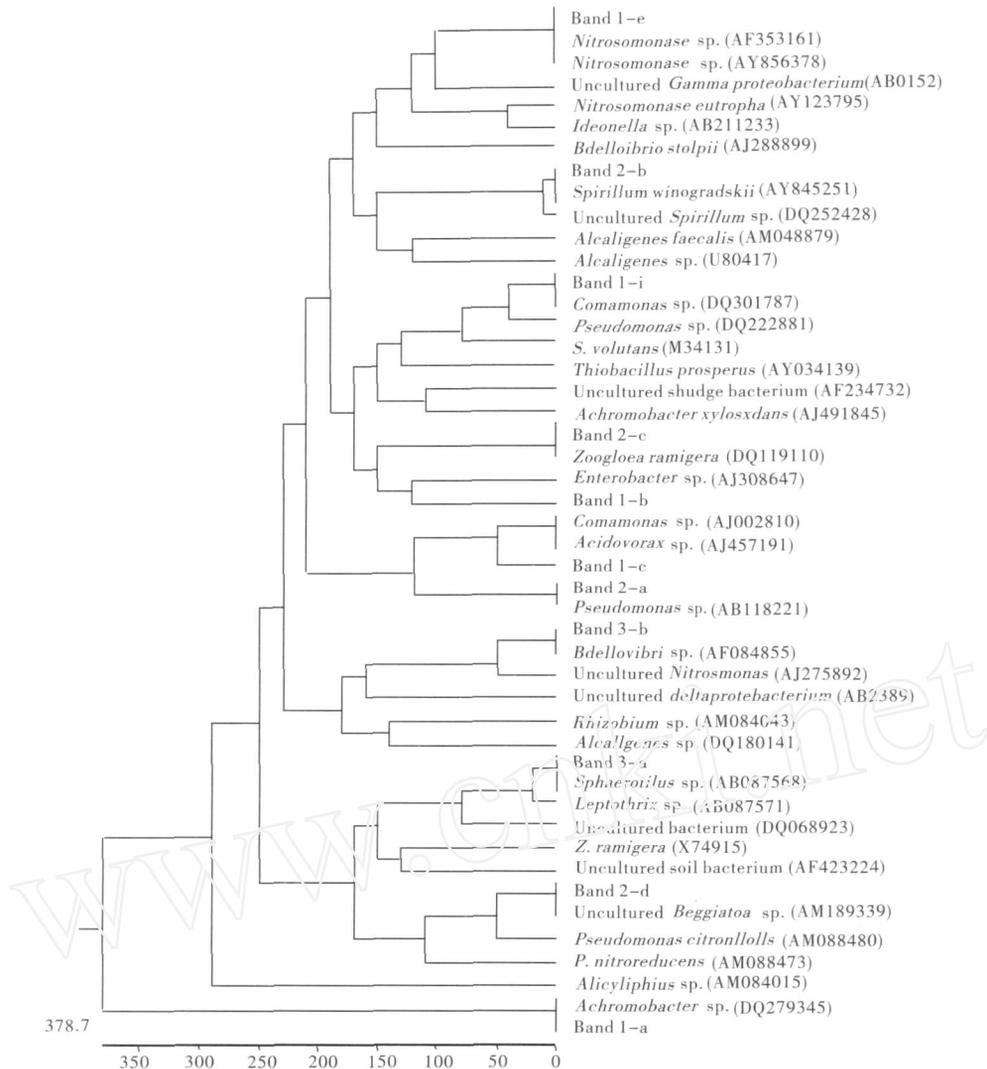


图 6 变形菌纲的 OTUs 及其相关菌株的系统发育树

Fig 6 Phylogenetic tree of the OTUs and their relatives among Proteobacteria

到的未培养细菌 Uncultured bacterium (AY982499) 16S rDNA 的序列同源性为 100%, 1-j 与黄杆菌属中的 *Flavobacterium columnare* 序列同源性为 99%, 3-c 与八叠球菌属中的 *Sarcina ventricum* 序列同源性为 98% (图 5)。

变形菌: 共有 11 个 OTUs 属于变形菌, 其中 1-a、2-a、3-a 分别与无色菌 (*Achromobacter* sp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)、球衣菌 (*Sphaerotilus* sp.) 的序列相似性较高, 其同源性为 99%; 1-b、2-b、3-b 分别与肠杆菌 (*Enterobacter* sp.)、螺菌 (*Spirillum* sp.)、蛭弧菌 (*Bdellovibrio* sp.) 的序列相似, 其同源性在 95% ~ 99%; 1-c、2-c 分别与丛毛单胞菌 (*Comamonas* sp.) 和生支动胶菌 (*Zoogloea ramigera*) 序

列相似, 其同源性都在 95% 以上; 1-e、1-i、2-d 分别与亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas* sp.)、丛毛单胞菌 (*Comamonas* sp.) 和贝氏硫菌 (*Beggiatoa* sp.) 聚为一类, 其同源性为 99% (图 6)。

4 讨论

通过对生物造粒流化床污水处理反应器中的微生物进行解析, 并结合对造粒流化床中 DO 和微生物的分布特征以及微生物群落结构变化动态和纵向迁移特性的研究 (Wang et al., 1993; Wang & Tambo, 1993), 认为生物造粒流化床反应器颗粒污泥中的微生物群落非常丰富, 说明生物造粒流化床反应器的微环境适宜多种微生物生长繁殖, 不同高度的微

生物群落演替不明显,微生物群落结构较为稳定;获得的 18 个 OTUs 均属于细菌域。其中 61% (11/18) 属于变形菌,17% (3/18) 属于放线菌,11% (2/18) 属于低 G+C 革兰氏阳性菌,11% (2/18) 属于其它未知细菌。

参考文献

- 袁宏林,刘永军,王晓昌,等. 2007. 生物造粒流化床污水处理反应器微生物群落结构及其动态变化. 微生物学杂志, **27**(2): 36-40.
- Altschul SF, Gish W, Miller W. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**: 403-410.
- Araya R, Tani K, Takagi T. 2003. Bacterial activity and communities composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, **43**: 111-119.
- Hernandez M, Jenkins D, Beaman BL. 1994. Mass and viability estimations of *Nocardia* in activated sludge and anaerobic digesters using conventional stains and immunofluorescent methods. *Water Science and Technology*, **29**: 249-259.
- Howgrave-Graham AR, Steyn PL. 1988. Application of the fluorescent-antibody technique for the detection of *Sphaerotilus natans* in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**: 799-802.
- Snaird J, Amann R, Huber I, et al. 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 2884-2896.
- Li WT, On-Chim C, Herbert H. 2002. Microbial communities dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors. *Water Research*, **36**: 3203-3210.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 695-700.
- Sun HY, Deng SP, Ruan WR. 2004. Bacterial communities structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 5868-5874.
- Schafer H, Servais P, Muyzer G. 2000. Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement. *Archives of Microbiology*, **173**: 138-145.
- Wang XC, Tambo N, Matsui Y. 1993. Kinetic study of fluidized pellet bed process. I. Characteristics of particle motions. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, **42**: 146-154.
- Wang XC, Tambo N. 1993. Kinetic study of fluidized pellet bed process. II. Development of a mathematical model. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, **42**: 155-165.
- Wang XC, Yuan HL, Liu YJ, et al. 2007. Fluidised pellet bed bioreactor: A promising technology for onsite wastewater treatment and reuse. *Water Science & Technology*, **55**: 59-67.
- Zhang T, Herbert H, Fang P. 2001. Phylogenetic diversity of a SRB rich marine biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**: 437-440.

作者简介 袁宏林,男,1965年生,博士,副教授。主要从事污水生物处理与回用技术研究。E-mail: hlyuan@xauat.edu.cn
责任编辑 王伟
