

生物造粒流化床微生物落结构及其动态变化

袁宏林, 刘永军*, 王晓昌

(西安建筑科技大学 环境与市政工程学院, 陕西 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中微生物群落结构及其动态变化, 分别从生物造粒流化床 10、60、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。以细菌和古细菌 16S rRNA 基因通用引物 530F/1490R, 对活性污泥中提取的细菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 长约 1 kb 的 PCR 扩增产物纯化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。结果显示, 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 10 cm 处微生物的种属达到 23 种, 60 cm 处为 21 种, 110 cm 处为 20 种; 生物造粒流化床不同高度都有一些各自的特有种属和共有种属, 反应器不同高度的微生物群落演替不明显, 微生物群落相似性为 83.1%, 群落结构较为稳定。

关键词 变性梯度凝胶电泳; 生物造粒流化床反应器; 群落结构; 动态变化

中图分类号 X703.3 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2007)02-0001-05

Microbial Community Structure and Dynamic Changes of Fluidized-Pellet-Bed Bioreactor

YUAN Hong-lin, LU Yong-jun, WANG Xiao-chang

(Coll. of Environ. & Municipal Engin. Xi'an Univ. of Architect. & Technol. Xi'an 710055)

Abstract In order to study microbial community structure and dynamic changes of granular sludge in fluidized-pellet-bed (FPB) bioreactor, sludge from different heights (10, 60 and 110 cm) of FPB was sampled respectively. And the genome DNA of the sludge bacteria was directly extracted through splitting. And then amplified by PCR with the universal primers of 16S rRNA genes of *Eubacteria* and *Archaeobacteria* (530F and 1490R). After purification with DNA gel recover kit, the PCR products about 1 kb were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and obtained DNA characterized fingerprint atlas of the microbial communities. The results showed that microbial communities of granular sludge in FPB bioreactor are very abundant. There are 23 strips, 21 strips, and 20 strips at the heights of 10, 60 and 110 cm respectively, suggested that at different heights of the FPB there are some special species of genus and common species of genus, and the succession of microbial communities in the FPB bioreactor is not obvious. The similarity of the microbial communities in the three sections is 83.1%, indicating that the community structure is fairly stable.

Keywords denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); fluidized-pellet-bed (FPB) bioreactor; microbial community; dynamic change

活性污泥微生物群落结构、稳定性和恢复性能在维护污水生物处理系统有效性中起着重要作用^[1]。及时监测活性污泥微生物种群结构在不同冲击负荷下的动态变化, 可以系统地优化群落结

构并对群落结构的失调做出早期预警。然而, 传统的微生物研究方法, 如显微镜观察和分离培养无法满足对群落结构进行动态跟踪研究的要求^[2,3]。因此, 用分子生物学的方法从微生物种群

收稿日期: 2006-08-14

作者简介: 袁宏林 男, 副教授。研究方向为污水生物处理与回用技术。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (50138020); 国家自然科学基金项目 (50578132)

* 通讯作者

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^[4]。本研究运用现代分子技术—聚合酶链式反应(PCR)和变性梯度凝胶电泳(DGGE)的方法来研究生物造粒流化床中微生物群落结构及其变化动态。

1 材料与方法

1.1 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作者早先发表的论文^[5~7]。

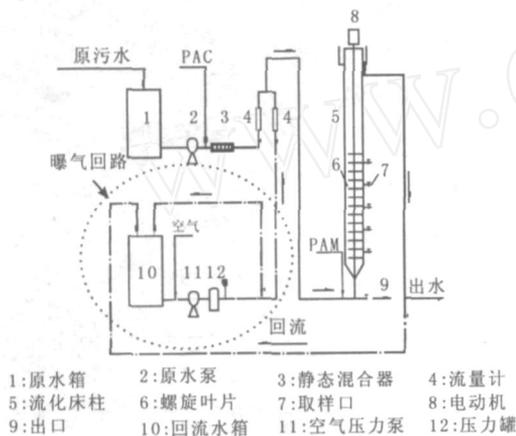


图1 生物造粒流化床反应器系统流程图

Fig 1 Diagram of the Fluidized-pellet-bed (FPB) bioreactor system

1.2 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、110 cm处分别取样。原样为泥水混合物,经离心分离得到污泥样品。

采样时生物造粒流化床工况条件如下:平均水温12.4℃,回流比1:2,混凝剂投加量PAC为50 mg/L, PAM为5 mg/L,平均搅拌速度10 r/min,上升流速6 cm/min。

1.3 化学分析

本研究中的化学分析指原水、处理后水和FPB反应器不同高度处水样的溶解氧(DO)的测

定。检测方法为给水溶解氧测定方法。

1.4 好氧菌计数

细菌总数的计数用平板计数法。先对水样进行梯度稀释,然后接种到平板培养皿上,37℃恒温培养24 h后进行计数。对于污泥样品,计数过程如下:5 000 r/min离心5 min将固体沉淀物从泥水混合物中分离,弃去上清液;用无菌水重新悬浮该固体沉淀物,充分混匀,静沉10 min;梯度稀释后,接种于平板培养基上,37℃培养24 h;计数。

1.5 基因组DNA的提取

采用改进的化学裂解法直接从活性污泥中提取基因组DNA,方法如下:将1 mL污泥样品8 000 r/min离心5 min;加入567 μL的TE缓冲液重悬;加30 μL质量浓度10%的SDS和3 μL 20 mg/mL的蛋白酶K,混匀,于37℃温育1 h;加入100 μL 5 mol/L NaCl,充分混匀,再加入80 μL CTAB/NaCl缓冲液(10% CTAB, 0.7 mol/L NaCl),混匀,于65℃温育10 min;加入等体积的氯仿/异戊醇,混匀,12 000 r/min离心5 min;将上清液转入一支新离心管中,加入0.6倍体积异丙醇,30 min后12 000 r/min离心10 min;弃上清,干燥;重溶于30 μL TE缓冲液中。

1.6 基因组DNA的PCR扩增

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。530F(5'-GTGCCAGCA/GGCCGCGG-3')和1490R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')分别靶向大肠杆菌(*Escherichia coli*) 16S rDNA的514~529位和1 491~1 509位核苷酸。PCR产物采用上海申博DNA柱式胶回收试剂盒回收纯化。

PCR反应体系:50 μL反应体系包括50 ng模板、20 pmol正反引物、100 μmol/L dNTP、10 μL 10×PCR buffer、2U Taq DNA聚合酶,无菌纯水补齐到50 μL。反应条件:95℃预变性5 min,94℃变性50 s,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,30个循环,最终延伸7 min。反应的产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 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 mol/L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 μ 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150V的电压下,60 电泳4 h,然后用AgNO₃染色。DGGE聚类分析采用UPGMA聚类运算法则。

2 结果与讨论

2.1 DO及好氧细菌在生物造粒流化床中的分布

图2所示为生物造粒流化床中溶解氧的变化情况。由于回流水(DO约7.8 mg/L)和原污水(DO约1.3 mg/L)以1:2的比例混合,在床体底部进口处,溶解氧的浓度为3.5 mg/L。当回流比增加到1:1时,底部进口处的DO浓度增大到5.5 mg/L。在这2种条件下,DO浓度都会随着水流的向上流动而迅速降低,这也表明溶解氧被迅速地消耗掉了。如图2所示,绝大部分的溶解氧在流化床的下半部分反应器中消耗掉了。

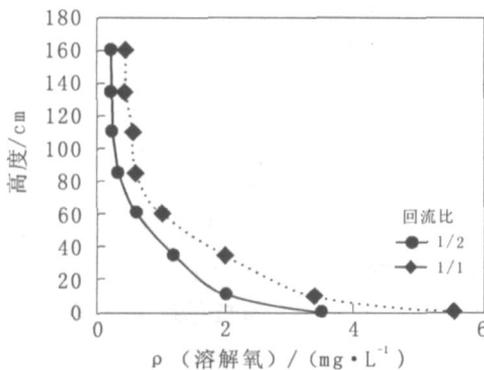


图2 生物造粒流化床反应柱中DO分布

Fig 2 Profiles of DO along the FPB column

图3所示为生物造粒流化床反应器中好氧细菌的计数结果。该FPB反应器中存在着非常丰富的好氧菌。随着FPB反应柱中从底部到顶端溶解氧浓度的降低(图2),使得柱内环境向上的方向上氧气越来越少,因而好氧菌总数也逐渐减少。尽管如此,即使在柱高110 cm的断面上,好氧菌总数也可以与A²/O反应池的好氧区相

当^[8]。这表明生物造粒流化床的微环境非常适合好氧菌的生长。

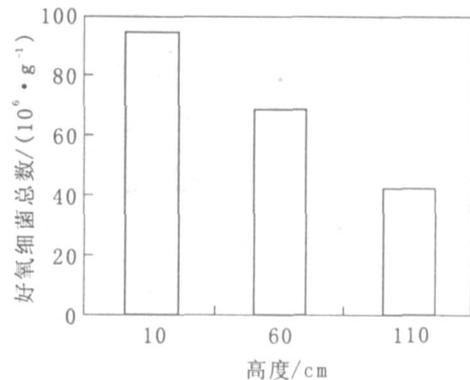


图3 生物造粒流化床反应器各高度处好氧菌总数的变化

Fig 3 Total counts of aerobic bacteria along the FPB column

2.2 颗粒污泥细菌总DNA提取和PCR扩增

采用化学裂解法提取从生物造粒流化床不同高度处所取得的活性污泥细菌基因组DNA,然后用16S rRNA基因通用引物530F/1490R进行PCR扩增,PCR产物采用上海申博DNA柱胶回收试剂盒回收纯化。图4为细菌基因组DNA、PCR扩增产物及产物回收纯化后的琼脂糖凝胶电泳图谱。

如图4a所示,所提取的各种活性污泥样品的细菌基因组DNA大于15 kb,所得的总DNA较为完整。以细菌基因组DNA为模板,经PCR扩增后获得了各种污泥微生物的16S rRNA基因的目的片段,大小约1 kb左右(图4b)。由于所提取的基因组DNA不是很纯,加之所用引物为通用引物,所以PCR扩增产物中还有杂带,但是经过回收纯化,杂带完全去除(图4c)。

2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)及微生物多样性分析

图5所示为不同颗粒污泥样品的DGGE指纹图谱,不同颗粒污泥样品经过变性梯度凝胶电泳(DGGE)都可以分离出数目不等的电泳条带,且各个条带的信号强度和迁移位置不同。按照DGGE的分析原理,每个独立分离的DNA片段都可以代表一个微生物种属。电泳条带越多说明生物多样性丰富,条带信号越强,表示该种属的数量

越多,从而确定不同活性污泥中所含微生物的种 类和数量关系,得出其中微生物多样性的信息。

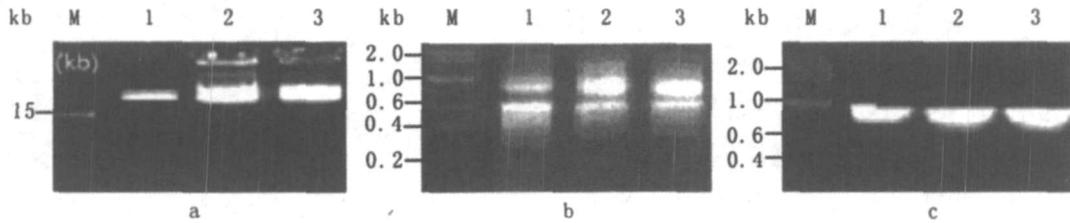


图 4 基因组 DNA、PCR 扩增产物及扩增产物回收电泳图谱

Fig 4 Agarose gel electrophoregrams of the genome DNA, PCR products and purified PCR products

a: 细菌总 DNA; b: PCR 产物; c: PCR 产物纯化 (M: Marker; 1, 2, 3: 分别为生物造粒流化床 10、60、110 cm 处颗粒污泥)

a: genome DNA of bacteria; b: PCR products; c: purified PCR products

(M: marker; 1, 2, 3: samples of pellets from the FPB bioreactor at h = 10, 60, 110 cm)

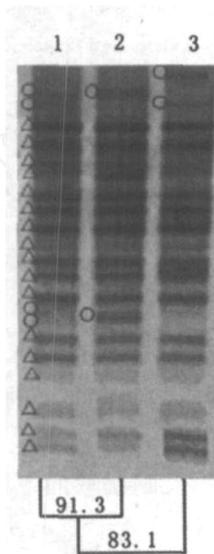


图 5 DGGE 指纹图谱及聚类分析

Fig 5 DGGE finger printing and cluster analysis results

1, 2, 3: 分别为生物造粒流化床 10、60、110 cm 处颗粒污泥;

“△”表示流化床不同高度颗粒污泥中的特征种属,

“○”表示流化床不同高度颗粒污泥中的共有种属

1, 2, 3: samples of granular sludge from the FPB at h = 10, 60, 110 cm, respectively;

“△”: specific strip; “○”: common strip

从图 5 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 10 cm 处微生物的优势种属达到 23 种,60 cm 处为 21 种,110 cm 处为 20 种,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。分析这些特征条带发现,不同床层高度都有一些各自的特征

条带(“△”),这说明随着反应器中微生物生长的微环境的变化,在特定生态条件下出现了一些微生物群落的特征种属。而同时,在不同床层高度的活性污泥样品中也有较多电泳位置相同的条带(“○”),这表明生物造粒流化床中各个不同断面微生物群落结构存在很大的相似性。聚类分析可知(图 5),反应器底层、中层、上层的微生物群落相似性为 83.1%。这种相似性的存在说明生物造粒流化床反应器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。在本研究基础之上,将在以后的研究工作中对生物造粒流化床污水处理反应器中微生物的多样性进行解析。

3 结 论

通过上述对造粒流化床颗粒污泥中细菌 DGGE 分析,并结合流化床中 DO 及细菌分布等的研究结果,得到了对生物造粒流化床微生物群落结构和变化动态的以下认识: 在 10 cm 处细菌总数为 9 500 万个 /g(干污泥),微生物的优势种属达到 23 种; 60 cm 处细菌总数为 7 000 万个 /g(干污泥),微生物的优势种属为 21 种,110 cm 处 4 100 万个 /g(干污泥),微生物的优势种属为 20 种。表明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,生物造粒流化床适宜多种微生物生长繁殖; 生物造粒流化床不同高度都有一些各自的特征种属,也有较多共有种属,其底层、中层、上层的微生物群落相似性为 83.1%,微生物群落演替不明显,微生物群落

结构较为稳定; 虽然生物造粒流化床中的 DO 水平并不高,且存在图 2 所示的纵向分布,但流化床底部较为充足的溶解氧和较高的底物浓度为好氧微生物的生长提供了良好条件,因此,生物造粒流化床的主要生化作用是好氧生化反应; 上部床体虽然处于较低的 DO 环境,但由于床内(尤其是底部)伴随着颗粒污泥的成长和破碎过程的纵向颗粒迁移或返混(Back mixing)作用,底部生长的好氧微生物不断迁移到上部,导致上部颗粒污泥具有与下部相近的微生物群落结构。

参考文献:

- [1] Eichner C. A., Erb R. W., Timmis K. N. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial communities[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 65: 102-109.
- [2] Marsh T. L., Liu Wen-Tso, Fomey L. J. Beginning of molecular analysis of the eukaryal communities in activated sludge [J]. Wat Sci Tec, 2000, 37: 455-460
- [3] Whitely A. S., Bailey M. J. Bacterial communities structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 2 400-2 407.
- [4] Wagner M., Amann R., Lemmer H. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods describing microbial communities structure[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 59: 1 520-1 525.
- [5] Wang X. C., Liu Y. J., Yuan H. L., et al. A study on the microbiological characteristics of a fluidized-pellet-bed bioreactor for wastewater treatment[C]. The Specialty Conference of Wastewater Reclamation & Reuse for Sustainability (WRRS2006), Beijing, China, 2006, 11-13.
- [6] Wang X. C., Yuan H. L. and Liu Y. J. Fluidized-pellet-bed bioreactor: a promising technology for onsite wastewater treatment and reuse - Part 1 [C]. The Specialty Conference of Wastewater Reclamation & Reuse for Sustainability (WRRS2005), Jeju, Korea, 2005, 8-11.
- [7] Yuan H. L., Wang, X. C., Liu Y. J., et al. Pilot study of a fluidized-pellet-bed bioreactor for simultaneous biodegradation and solid/liquid separation in municipal wastewater treatment [C]. Future of Urban Wastewater Systems - Decentralization and Reuse, Proceedings of WA Conference Xian, 2005, 253-260.

本刊声明

为适应信息化建设需要,实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,扩大广大作者学术交流渠道,《微生物学杂志》已加入《中国学术期刊(光盘版)》并上网“万方数据-数字化期刊群”。凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据-数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。如作者不同意转让光盘版和网络版,请另投他刊。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。