

文章编号: 1000-5013(2010)03-0313-04

SBR 系统驯化过程的微生物群落结构变化

郑娜, 周作明, 李艳, 刘艳锋

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 采用三角瓶摇床振荡培养, 模拟序列间歇式活性污泥法(SBR)处理经微电解预作用后的皮革废水, 考察驯化过程中微生物群落结构的变化情况. 提取驯化过程中 4 个不同阶段混合菌群总 DNA, 采用降落式聚合酶链式反应和变性梯度凝胶电泳技术, 对细菌 16S rDNA V3 区进行扩增和产物分离, 并比较驯化过程中的微生物群落结构. 结果表明, 微生物群落结构和种群数量在驯化过程中存在明显的演替过程, 不同微生物种群通过协同和竞争作用, 最终形成一种具有新功能, 性质稳定的群落结构.

关键词: 群落结构; 变性梯度凝胶电泳; 聚合酶链式反应; 驯化过程; 皮革废水

中图分类号: Q 178.1⁺4; X 794.03

文献标识码: A

序列间歇式活性污泥法(SBR)是当前废水生物处理中最常用的方法之一, 了解其中的微生物群落结构对于分析生化反应过程等具有重要意义, 并可为优化工艺运行条件、提高净化效率提供参考依据. 传统显微镜观察和培养分离技术可从污泥中分离得到单一优势菌株, 但该方法受微生物可培养性的限制, 实际分离出的菌株仅占其中的小部分, 且培养分离周期长, 工作量大^[1]. 应用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE)分析微生物的群落结构, 不用培养分离, 可直接从样品中提取微生物总 DNA, 再将编码有 16S rRNA 的基因进行扩增, 进而得到样品中微生物的群落结构, 并能比较相同条件下单一菌群的生物量^[2]. 文[3]对取自福建泉州某皮革厂的污泥在 SBR 池中进行驯化, 最终 COD 去除率达到并稳定在 80 % 左右. 为深入了解驯化过程, 本文采用 PCR-DGGE 技术, 对不同阶段 SBR 系统中的微生物群落结构变化进行比较, 考察系统条件对微生物群落结构的影响.

1 实验部分

1.1 主要仪器

H-2050R 型离心机(湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司); EC250-90 型琼脂糖凝胶电泳系统, PCT-200 型基因扩增(PCR)仪(美国 Thermo 公司); GiS-2008 型凝胶成像分析系统(上海天能公司); Dcode TM 基因突变检测系统(美国 BIO-RAD 公司).

1.2 试剂材料

1.2.1 工具酶及试剂盒 Taq DNA 聚合酶(DR001A, 辽宁大连宝生物工程有限公司); 总 DNA 提取试剂盒(BS423/EZ, 上海生工生物工程有限公司); UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(SK1131-N/UNIQ-10, 上海生工生物工程有限公司).

1.2.2 无机培养基(MSM) $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$, $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pH = 7.2, 于 121 °C 下灭菌 15 min.

1.2.3 引物 由上海英骏生物技术有限公司合成. Eubac 341F: $5' \text{-TAC GGGAGG CAG CAG-3'}$; Eubac 517R: $5' \text{-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'}$; GC-夹子: $5' \text{-CGC CCG CCG CGC GCG GCG}$

收稿日期: 2009-04-27

通信作者: 周作明(1975-), 男, 副教授, 主要从事环境生物技术研究. E-mail: zhoujing @hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(D0710019); 福建省科技计划重大项目(2005 HZ03-3)

GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC-3'.

1.2.4 活性污泥 取自福建泉州某皮革厂废水处理车间的生化反应池.

1.3 实验方法

1.3.1 菌种的培养 采用三角瓶摇床振荡培养实验,模拟 SBR 法处理经微电解作用后的皮革废水,以考察驯化过程中微生物群落结构的变化. 在三角锥瓶中加入 5 g 活性污泥和混合培养液,于 30 ,120 r ·min⁻¹条件下振荡培养 48 h;然后,将菌悬液静置 30 min 后,取上清液于离心机(2 000 r ·min⁻¹)离心 2 min,再于 10 000 r ·min⁻¹下离心 5 min,收集菌体. 最后,加入 3 mL 体积分数为 20 %的甘油(已灭菌),重悬后分装入 3 个 2 mL 的 EP 管中,置于 - 20 冰箱中保存. 以此菌悬液作为下一阶段驯化的菌种,每个阶段分别驯化 4 次. 驯化过程共分 3 个阶段(顺次为 1[#],2[#],3[#]阶段),并与皮革废水原水条件(0[#]阶段)下的微生物群落结构进行比较. 混合培养液组成(质量分数 w),如表 1 所示.

1.3.2 细菌总 DNA 的提取 采用总 DNA 提取试剂盒对 4 个阶段的混合菌液提取总 DNA,最后溶于 20 μL 经灭菌的双蒸水中,取 5 μL 样品用于 0.8 %的琼脂糖凝胶电泳检测. 电泳所用 Marker 为 Fermentas DNA 100 ~ 10 000 bp Marker.

1.3.3 PCR 扩增 25 μL 的 PCR 反应体系组成:2.5 μL 10 ×PCR 缓冲液(不含 Mg²⁺),1.5 μL MgCl₂ (25 mmol ·L⁻¹),1 μL dNTP(10 mmol ·L⁻¹),1 μL 引物 341F(3 μmol ·L⁻¹),1 μL 517R(3 μmol ·L⁻¹),116.67 nkat 普通 Taq DNA 聚合酶,50 ng DNA 模板,并将经灭菌的双蒸水补至 25 μL. PCR 反应程序:94 ,预变性 5 min;94 ,变性 1 min;65 ,复性 1 min;之后,每两个循环降低复性温度 1 ,共计 10 个循环;72 延伸 1 min;剩下 20 个循环的扩增参数为 94 ,变性 1 min;55 ,复性 1 min;72 ,延伸 1 min. 最后 72 延伸 10 min,于 10 保存. 将 PCR 产物经 0.8 %琼脂糖凝胶电泳检测,电泳所用 Marker 为天根 DNA200 ~ 4 500 bp Marker,该扩增产物用胶回收试剂盒回收后用于 DGGE 分析.

1.3.4 DGGE 分析方法 制备 10 %聚丙烯酰胺凝胶,变性剂的质量分数为 30 % ~ 70 %,变性剂为 7 mol ·L⁻¹尿素和质量分数为 40 %的去离子甲酰胺混合物,电泳电压为 120 V,电泳时间为 7 h,电泳温度为 60 . 电泳完毕后,将凝胶进行银染;然后,将染色后的凝胶进行凝胶成像系统分析.

1.4 统计分析

为了解菌种群在整个驯化过程中的动态变化,运用统计学软件对 DGGE 图谱进行统计分析,主要有各样品的丰富度、Shannon-Wiener 多样性和相似性分析.

1.4.1 丰富度 不同时刻样品的细菌种群丰富度值(R_s),是该时刻样品的条带数与图谱中的总条带数(同一位置的条带只算 1 条)的比值.

1.4.2 Shannon-Wiener 多样性指数 物种多样性是指群落中物种数目的多少,它是衡量群落规模和重要性的基础. 种类越多,各物种个体数量分布越均匀,物种多样性指数越大. 利用 Tanon GIS 凝胶成像系统对 DGGE 图谱进行分析后,再进行 Shannon-Wiener 多样性指数(H_{sw})计算^[4]. 计算公式为

$$H_{sw} = - \sum_{i=1}^s P_i \log_2 P_i.$$

上式中:P_i为第 i 个物种所占的百分比;s 为种群当中物种的数目.

1.4.3 相似性系数 主要分析不同样品之间细菌种群的相似性,选择 Jaccard 指数(G)表征各样品间的相似性指数(C_s)^[5]. 其计算公式为

$$G = j / (a + b - j).$$

上式中:j 为 2 个样品间共有种数;a,b 分别为 2 个样品的各自种数.

2 结果与讨论

2.1 总 DNA 的提取

混合菌群总 DNA 提取的琼脂糖凝胶电泳结果,如图 1(a)所示. 由图 1(a)可知,通过与 DNA Mark-

er 进行对比,其片断大小大于 10 000 bp ,大部分亮度和纯度都较好,没有拖尾现象,说明 DNA 的提取获得了较为满意的结果.

2.2 16S rDNA PCR扩增

混合菌群 PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳结果,如图 1 (b)所示. 由图 1 (b)可知,经 PCR 反应后获得了各个阶段微生物 16S rDNA V3 区的目的片断,琼脂糖凝胶电泳显示片断大小为 200 bp 左右,亮度和纯度都比较好,说明 PCR 扩增效果较好.

2.3 DNA 片段的 DGGE 分析

PCR 产物可经 DGGE 分离出数目、强度和迁移位置都不同的电泳条带,这些不同位置的条带代表着不同的细菌种群. 电泳条带越多,说明细菌种群越多;条带信号越强,表示该条带代表的相应细菌数量越多^[6]. 为考察活性污泥驯化过程中微生物的群落多样性,对 4 个阶段混合菌群 16S rDNA V3 区的 DNA 片段进行了 DGGE 分析,结果如图 2 所示.

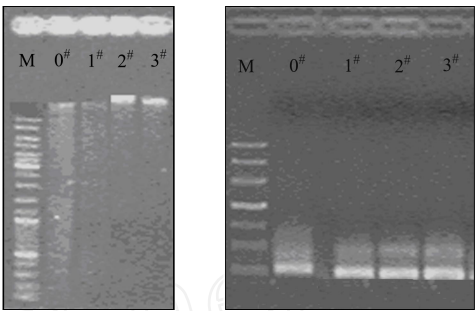
由图 2 可见,0[#] 阶段含有的微生物种群最少,仅检测出 5 根条带,且亮度淡. 说明,皮革废水原水对微生物的毒性强,大部分种群被显著抑制. 1[#] 阶段微生物种群数目较多,共有 18 根条带,其中多条细小条带因拍照条件限制无法清楚显示. 说明,废水经微电解预作用后毒性明显下降,且在投加葡萄糖作为外加碳源的情况下微生物得到大量繁殖,多样性也较 0[#] 阶段显著提高,为后期驯化提供基础.

逐步降低进水的稀释倍数和外加碳源、培养基等,经 2[#],3[#] 阶段驯化后,微生物的群落结构出现变化,既有种群的消亡也有新种群的出现. 1[#] 阶段的优势种群 1,2,5,7,16,18 号条带变弱或消失,其中的 1,2 号条带在 3[#] 阶段完全消失;2[#] 阶段出现新种群 6,9,10,11,13,14,15,17,19 号条带,其中的 15,17,19 号条带在 3[#] 阶段遭到淘汰;3[#] 阶段出现一个新种群 3 号条带. 说明在驯化过程中,部分微生物无法利用废水中的有机污染物作为碳源生长,遭到抑制,同时部分微生物种群为了适应驯化压力,基因类型发生改变,出现新的基因类型. 这种适应称为微生物的进化型适应.

从图 2 还发现,4 号条带存在于整个驯化阶段. 说明该种群具有很强的环境适应性,仅依靠细胞形态或生理变化去适应各种条件. 该种适应称为表型适应^[7].

从 DGGE 图谱分析结果可知,2[#] 阶段驯化混合菌的丰富度值(R_s)最大,其值为 0.52;而 1[#],3[#],0[#] 阶段混合菌的 R_s 值依次降低,分别为 0.36,0.24,0.20. 此外,2[#] 阶段的 Shannon-Wiener 多样性指数 H_{sw} 也是最高,其值为 1.11;而 1[#],3[#],0[#] 阶段混合菌的 H_{sw} 值依次降低,分别为 0.95,0.78 和 0.65. 这 4 个阶段的 Shannon-Wiener 多样性指数均偏低,这可能是由于样品中微生物多样性很高,导致微生物的含量太少,而不能形成明显的条带^[8];同时,DGGE 图谱也受变性梯度范围、引物的选择、电泳时间、染色等因素的影响^[9].

DGGE 图谱的相似性分析,如表 2 所示. 根据 Jaccard 相似性系数原理:相似性系数 0 % ~ 25 % 时为极不相似;25 % ~ 50 % 时为中等不相似;50 % ~ 75 % 时为中等相似;75 % ~ 100 % 时为极相似. 由表 2 可见,0[#] 阶段混合菌与 1[#] ~ 3[#] 混合菌均极不相似,1[#] 富集混合菌和后期驯化菌也极不相似. 待到驯化的 2[#] 阶段,混合菌和已驯化菌群(3[#] 阶段)的相似性有所提高,但仍为中等不相似. 这说明在驯化的 2[#] 阶段已形成降解废水的菌群落结构. 若要达到较高的相似度,则应在驯化 2[#],3[#] 阶段之间再安排一个阶段,以便能更好地观察驯化过程中的降解菌群落结构的稳定形成.



(a) 总 DNA (b) 16S rDNA PCR 扩增
图 1 混合菌群琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Mixed bacteria agarose gel electrophoresis map

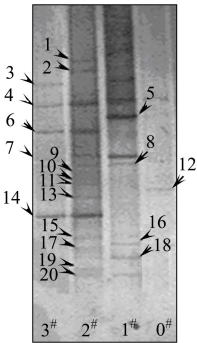


图 2 DGGE 图谱
Fig. 2 DGGE fingerprint

表 2 DGGE 图谱的相似性分析

Tab. 2 Similarity coefficient analysis of the DGGE profiles					%
驯化阶段	0 [#]	1 [#]	2 [#]	3 [#]	
0	100.0	9.5	4.2	7.1	
1	9.5	100.0	15.2	7.7	
2	4.2	15.2	100.0	42.5	
3	7.1	7.7	42.5	100.0	

3 结束语

PCR-DGGE 分析表明,在 SBR 活性污泥驯化过程中,微生物群落结构和种群数量存在明显的演替过程.低浓度废水条件下的优势种群,在高浓度时被另一种群取代;适应驯化条件的微生物得以生存并增长,不适应者受到显著抑制.微生物种群结构的多样性是活性污泥驯化调整的基础.在驯化作用下,活性污泥除通过调整菌群的种类适应驯化条件外,还可通过微生物的表型适应和进化型适应适应驯化条件,最终形成稳定的生态系统.

参考文献:

- [1] WARD D M, WELLER R, BATESON M M. 16S rDNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. *Nature*, 1990, 345 (6270): 63-65.
- [2] HEDRICK D B, PEACOCK A, STEPHEN J R, et al. Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 41 (3): 235-248.
- [3] 李艳, 荆国华, 董梅霞. 微电解-Fenton 法预处理制革废水[J]. *华侨大学学报: 自然科学版*, 2008, 29 (2): 270-272.
- [4] WATANABE T, ASAKAWA S, NAKAMURA A, et al. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil[J]. *FEMS Microbiology Letter*, 2004, 232 (2): 153-163.
- [5] 殷峻, 陈英旭, 刘和. 应用 PCR-DGGE 技术研究处理含氨废气的生物滤塔中微生物多样性[J]. *环境科学*, 2004, 25 (6): 1-16.
- [6] BRAMUCCI M G, MCCUTCHEN C M, SINGH M, et al. Pure bacterial isolates that convert *p*-xylene to terephthalic acid[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58 (2): 255-259.
- [7] 朱铁群, 李凯慧, 张杰. 活性污泥驯化的微生物生态学原理[J]. *微生物学通报*, 2008, 35 (6): 939-943.
- [8] SHABIR A D, KUENEN J G, MU YZER G. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate reducing bacteria in complex microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (5): 2325-2330.
- [9] VALLAEYS T, TOPP E, MU YZER G, et al. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, 24: 279-285.

Analysis of Microbial Community Diversity in the Acclimation Process of SBR System

ZHENG Na, ZHOU Zuo-ming,
LI Yan, LIU Yan-feng

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: This article used flask shaking experiment to imitate treating micro-electrolysis pre-treated tannery wastewater by sequencing batch reactor (SBR). The diversity of the culture of microbial community in acclimation process was investigated. The genomic DNA of microbial community in four different periods was extracted. The bacterial 16S rDNA V3 fragment was amplified by touch-down polymerase chain reaction (PCR) method and the products were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results showed that there was an obvious sylogistic process of community structure and amount of dominant populations. A stabilized community structure with new function was formed at last through a series of cooperation and competition effects among each kind of microbe.

Keywords: community structure; denaturing gradient gel electrophoresis; polymerase chain reaction; acclimation process; tannery waste-water

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)