

张斌,孙宝盛,季民,等. 2008. MBR 中微生物群落结构的演变与分析[J]. 环境科学学报,28(11):2192-2199  
Zhang B, Sun B S, Ji M, et al. 2008. Analysis and succession of microbial community structure in a membrane bioreactor [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 28(11):2192-2199

## MBR 中微生物群落结构的演变与分析

张斌<sup>1,2</sup>, 孙宝盛<sup>1,\*</sup>, 季民<sup>1</sup>, 赵祖国<sup>2</sup>

1. 天津大学环境科学与工程学院, 天津 300072

2. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050

收稿日期: 2007-12-04 修回日期: 2008-04-29 录用日期: 2008-08-04

**摘要:**为了揭示膜-生物反应器中微生物群落结构多样性的演变过程,通过细胞裂解法直接提取不同时期污泥中的基因组 DNA,利用基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE 技术获得了微生物群落的 DNA 特征指纹图谱,并对条带进行了统计分析和切胶测序,使用序列数据进行了同源性分析并建立了系统发育树.DGGE 分析表明,在反应器运行前 17d 内污泥中微生物群落结构变化很大,与接种污泥的相似性系数下降到了 29.2%,从而说明 MBR 中处理工艺和进水质的改变导致微生物群落结构多样性降低. 在试验过程中,*Pseudomonas* 和 *Aeromonas hydrophila* 等种群一直保持着较为稳定的优势地位,也有原始种群如 *Bacillus* sp. 的消亡和以 *Enterococcus faecalis*、*Comamonas* sp.、*Fusobacterium* sp. 等为代表的次级种群的强化和演变. UPGMA 聚类分析将 DGGE 图谱区分为 3 大类群并对应于各自的运行时期. 测序结果表明,MBR 中微生物菌群间进化距离较大,其中 Proteobacteria 纲和 *Bacillus* 属细菌较多. 在反应器运行后期演变为优势地位的菌群(如 *Comamonas* sp.)加剧了膜污染物的产生和积累.

**关键词:**膜-生物反应器;微生物多样性;PCR-DGGE;克隆测序

文章编号: 0253-2468(2008)11-2192-08 中图分类号: X703 文献标识码: A

## Analysis and succession of microbial community structure in a membrane bioreactor

ZHANG Bin<sup>1,2</sup>, SUN Baosheng<sup>1,\*</sup>, JI Min<sup>1</sup>, ZHAO Zuguo<sup>2</sup>

1. School of Environmental Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072

2. Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050

Received 4 December 2007; received in revised form 29 April 2008; accepted 4 August 2008

**Abstract:** In order to reveal the succession of microbial community diversity in a membrane bioreactor (MBR), the genome DNA of sludge at different period was directly extracted through chemical splitting. PCR-amplified 16S rDNA and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were applied to obtain the DNA fingerprint profile of the microbial communities. The bands in the gel were analyzed by statistical methods and excised from the gel for sequencing. The sequences were then used for homology analysis and phylogenetic trees were constructed. DGGE analysis indicated that a noticeable change took place in microbial structure after 17 days of MBR operation. This suggests that the treatment process and influent wastewater composition has a significant impact on bacterial community structures. Populations such as *Pseudomonas* and *Aeromonas hydrophila* were the predominant species throughout the study, while primary communities such as *Bacillus* sp. died out, and secondary microbial communities such as *Enterococcus faecalis*, *Comamonas* sp. and *Fusobacterium* sp. increased. Cluster analysis of DGGE by UPGMA (unweighted pair group method, arithmetic mean) divided all lanes into three clusters, which corresponded to three manipulation periods during the whole experiment. The sequences indicated that the phylogenetic tree presented the longer genetic distance among the bacteria in the MBR biomass, where Proteobacteria and *Bacillus* were the dominant species. The preponderant bacteria (such as *Comamonas* sp.) that increased during the later stage of operation had a greater impact on the production and accumulation of membrane pollutants.

**Keywords:** MBR; microbial diversity; PCR-DGGE; cloning and sequencing

---

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目(No. 07JCZDJC02100)

Supported by the Natural Science Foundation of Tianjin(No. 07JCZDJC02100)

作者简介: 张斌(1980—),男,博士研究生, E-mail: tzhb1980@yahoo.com; \* 通讯作者(责任作者), E-mail: baosheng\_sun@sina.com

Biography: ZHANG Bin (1980—), male, Ph. D. candidate, E-mail: tzhb1980@yahoo.com; \* Corresponding author, E-mail: baosheng\_sun@sina.com

## 1 引言( Introduction)

膜-生物反应器(Membrane Bioreactor, MBR)是一种集膜过滤和生物处理于一体的高效生物处理技术,同常规好氧生物处理法相比具有污泥浓度高、污泥龄长、容积负荷高、出水水质好及占地面积小等优点(Thomas H et al., 2000; Rosenberger S et al., 2002),这使其得到了迅速发展和广泛应用。在好氧MBR中,多种微生物大量繁殖,彼此相互作用而形成了一个相对封闭的生态系统,籍此实现废水的高效、快速净化。膜污染是影响MBR高效而低成本运行的主要问题,由于较长的污泥停留时间和较低的F/M值,微生物在自裂解( autolysis) 和代谢过程中逐渐积累了大量的次生级代谢产物(如EPS、SMP等),而这些物质是造成膜污染的主要因素(Meng F G et al., 2006; 张斌等,2007)。因此,对于反应器内活性污泥中微生物种群结构和多样性的研究可以从根本上找出影响其结构与功能的主要因素及其内在关系,这对优化MBR系统运行、提高废水处理效果、控制膜污染等都具有重要的实际应用价值和理论探索意义。

近年来,随着现代分子生物技术的发展,有关不同的处理工艺内污泥或生物膜中微生物群落结构的研究在国内外均取得了一定的成果。如Rowan(2003)运用DGGE比较了处理同种废水的生物滴滤反应器和生物滤池内氨氧化菌菌群的组成;LaPara等(2002)发现,在功能稳定的废水处理生物反应器中,在正常运行条件下有着稳定的微生物群落结构;Calli等(2006)采用DGGE技术比较和分析了在处理相同高氨氮垃圾渗滤液的不同反应器中微生物多样性的异同;孙寓娇等(2006a; 2006b)研究了厌氧和好氧亚硝化颗粒污泥中微生物群落的多样性,并进行了定量分析。为了更为深入地探索MBR中微生物群落的多样性和演变规律,本研究中以小试MBR活性污泥为对象,利用PCR-DGGE技术对接种驯化开始至膜污染较为严重为止的一个完整运行周期内污泥中微生物群落结构的演变进行观察,对不同时期微生物的多样性结构进行相似

性和聚类分析,对其中的主要优势种群进行克隆测序并将测序结果在GenBank中进行比对和鉴定;旨在揭示反应器不同运行时期微生物群落结构的演变过程,从而为进一步优化系统运行、提高处理效果提供一定的理论依据。

## 2 材料与方法( Materials and methods)

### 2.1 实验装置与取样条件

小试MBR总有效体容积为30L,总高1.5m。接种污泥取自某污水处理厂好氧池回流污泥,进水为实验室中人工配水,具体组成成分见表1。进水TOC为 $160\sim180\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为 $40\sim45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,总磷浓度为 $5.0\sim5.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。试验工艺流程示意图见参考文献(张斌等,2007)。本研究中采用膜天集团FP-T型PVDF中空纤维膜组件,膜内径为0.65mm、外径为1.0mm,过滤孔径为 $0.22\mu\text{m}$ ,膜面积为 $1\text{m}^2$ ,试验温度始终维持在 $15\sim18^\circ\text{C}$ 。在膜组件底部采用穿孔曝气的方式对污泥混合液进行搅拌和充氧,并对膜表面进行气泡擦洗以减缓膜污染速度,曝气量为 $0.10\sim0.20\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ 。水力停留时间为6h,膜出水为恒流间歇方式,出水10min,停2min。反应器运行期间始终没有排泥。

表1 人工配水的组分及浓度

Table 1 Components and concentration of artificial wastewater

组分	浓度/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
葡萄糖	400
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	220
$\text{NaHCO}_3$	50
$\text{MgSO}_4\cdot7\text{H}_2\text{O}$	50
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	23
$\text{CaCl}_2\cdot2\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{FeCl}_3\cdot6\text{H}_2\text{O}$	4

反应器共运行了85d。试验期间共取样品10次,第1次为反应器开始运行时污泥接种期间,此后,在反应器启动初期每间隔约5d取样1次;随着处理效果趋于稳定,出水水质较好后,每间隔约10d取样一次,直至试验结束。具体取样条件及运行参数见表2。

表2 取样时间和工艺条件

Table 2 Characteristics of MBR at the sampling times

取样时间/d	取样 编号	运行条件			出水水质/(mg·L <sup>-1</sup> )		污泥性状		跨膜压力/ MPa
		DO /(mg·L <sup>-1</sup> )	pH	气水比	TOC	氨氮 /(mg·L <sup>-1</sup> )	MLSS /(mg·L <sup>-1</sup> )	MLVSS/ MLSS	
接种期	1	G1	7.8	7.1	20:1	75.1	38.5	5996	0.54
	5	G2	8.2	7.3		62.9	34.9	4950	0.72
	11	G3	7.9	7.3		42.7	33.6	6220	0.78
稳定期	17	G4	7.5	7.5	20:1	30.1	18.7	7340	0.80
	28	G5	7.8	6.9		25.5	15.7	7860	0.81
	37	G6	7.5	7.2		15.3	13.6	9300	0.82
	50	G7	7.3	7.2		11.5	12.5	9120	0.19
膜污染期	62	G8	7.3	7.5	20:1	11.8	11.2	11440	0.82
	70	G9	7.0	7.9	↓	14.0	12.7	13500	0.84
	80	G10	6.8	7.8	50:1 *	11.5	12.3	14840	0.33

注: \*至试验后期为延缓膜污染速率,将曝气量逐渐加大

## 2.2 污泥中基因组 DNA 提取方法

每次取样后为了保证污泥中微生物群落的原始面貌,立即采用化学裂解(酚\氯仿\异戊醇抽提)-试剂盒纯化的方法提取基因组 DNA(孙宝盛等,2008).经电泳检测,所得 DNA 片断等于或略大于 23kb;经分光光度计检测,其  $A_{260}/A_{280}$  均为 1.76 ~ 1.79,表明得到较为完整和纯度较高的基因组 DNA,可以此为模板进行 PCR 扩增.

## 2.3 总细菌的 PCR 扩增

采用对大多数细菌和古细菌 16S rDNA 基因 V3 区都具有特异性的引物对 F357-GC 和 R518,使用降阶式 PCR 反应策略(Muyzer G et al., 1993),以反映各个阶段反应器中优势细菌群落的总体构成状况.

100 μL 反应体系组成: 10 ~ 100ng 模板, 10 μL 的 10 × PCR buffer (with 20mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>), 200 μmol · L<sup>-1</sup> 的 dNTPs, 0.5 μmol · L<sup>-1</sup> 每种引物, 2.5U 的 Ex Taq 酶, 其余用无菌超纯水补足. PCR 产物经试剂盒(BIO BASIC INC. Cat. No. BS363)纯化回收最终浓缩于 40 μL Buffer.

## 2.4 总细菌 16S rDNA 片段的 DGGE 分析

采用 C. B. S. SCIENTIFIC 公司的 DGGE-2001 系统, 凝胶浓度为 8%, 变性梯度为 35% ~ 55%, 温度为 60℃, 电压为 150V, 在 1 × TAE 中电泳 6.5h, 完毕后将凝胶进行硝酸银染色, 并将图像在观测仪中拍照存档.

## 2.5 DGGE 图谱的多样性与聚类分析

2.5.1 Shannon-Weaver 指数 微生物群落多样性采用 Shannon 指数( $H$ )表示,公式为:

$$H = - \sum P_i \log P_i \quad (1)$$

$H$  的计算是基于 DGGE 胶条带的位置和条带的强度,而条带的强度则通过经凝胶分析软件 Quantity One 分析后得到的波峰面积来表示,即  $P_i = n_i/N$ , 其中  $n_i$  为峰面积,  $N$  为所有峰的总面积.

2.5.2 UPGMA 聚类分析 由于取样较多,而试验目的是为了探讨在 MBR 的一个运行周期内(从接种驯化到膜污染较为严重)微生物种群结构的变化,故对得到的 DGGE 图谱进行 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic averages)聚类分析,并依据不同样本之条带分布相似程度构建系统进化树.

## 2.6 目的条带的克隆与测序

挑取 DGGE 图谱中的目的条带溶于 20 μL ddH<sub>2</sub>O 中, 4℃ 下过夜. 以此为模板, 以 F357 和 R518 为引物进行 PCR 扩增, 设定退火温度为 55℃, 其它扩增程序同 2.3 节. PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并切胶纯化. 纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接(Promega 公司 pGEM® -T Vector System I)后, 转化到 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 在含有 X-gal、IPTG 和 Amp 的 LB 培养基上平板培养 16h (37℃); 蓝白斑筛选阳性转化子接种于 LB 培养基中, 37℃ 下振荡过夜, 提取质粒并纯化, 重新 PCR 后对产物进行测序(上海 Invitrogen 生命技术有限公司).

## 2.7 同源性分析与系统进化树构建

利用 BioEdit(v7.0.5 版)对测序结果进行处理后提交到 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 采用 BLAST 进行目标序列和基因库中所

含序列的相似性分析。最后采用 DNAMAN (v5.2.2 版) 建立进化树。

### 3 实验结果(Experimental results)

针对 MBR 运行周期内所提取的 10 个污泥样品

基因组中总细菌 16S rDNA V3 区片段 341~534 位点进行 PCR 扩增,再进行 DGGE 分析,结果如图 1 所示。污泥中微生物多样性 Shannon 指数变化趋势如图 2 所示。总细菌多样性的 UPGMA 聚类分析结果如图 3 所示。

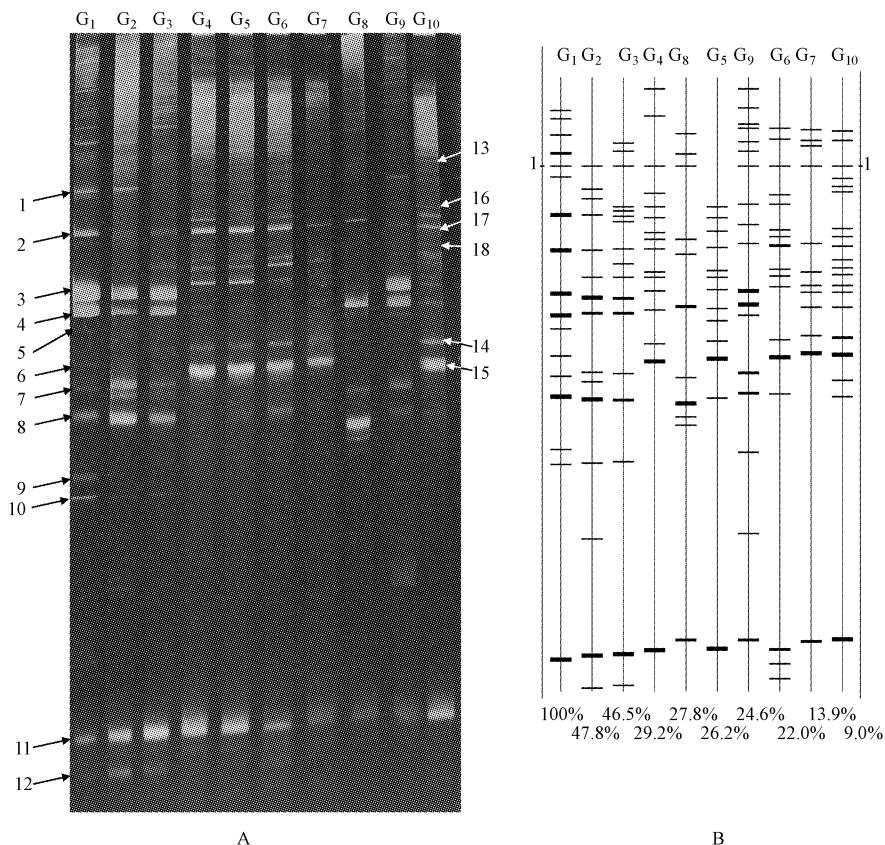


图 1 污泥样品中总细菌 DGGE 谱图(A. DGGE 谱图(图中主要条带被标记为 1~18);B. 各样品泳道相似性示意图(以样品 G1 为标准,下侧数据为各样品与 G1 的相似系数由大到小排列))

Fig. 1 DGGE profile of bacteria in ten sludge samples (A. DGGE profile (The principal bands observed are labeled with digital letters (1 to 18); B. Similarity diagram of sample lanes (lane G1 is defined as 100%. Values along the bottom indicate the similar coefficients with G1. ))

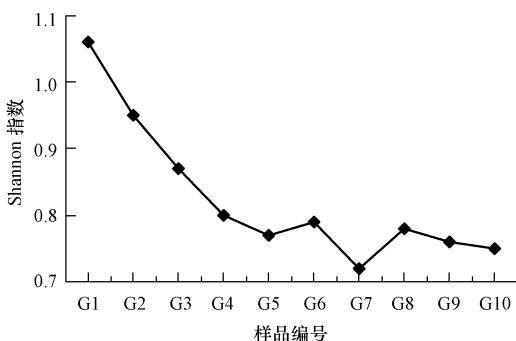


图 2 污泥样品 DGGE 条带的 Shannon 指数

Fig. 2 Shannon index of the DGGE gel in sludge samples

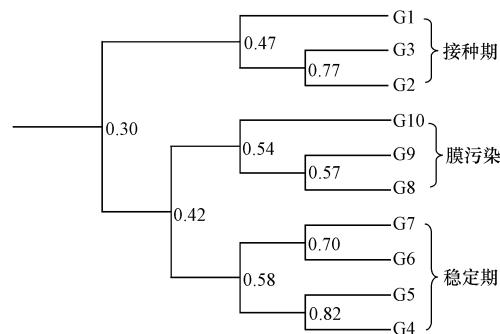


图 3 总细菌 DGGE 图谱 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of bacterial DGGE by UPGMA

将图1A中主要条带进行切胶测序后,在GenBank中进行比对,获得各条带的同源性信息,结

果如表3所列,系统发育树如图4所示。

表3 部分条带16S rDNA序列比对结果

Table 3 Results of some partial 16S rDNA sequences using BLAST in GenBank

条带编号	NCBI查询号	GenBank比对结果		同源性
		登记号	菌种名	
1	DEZDG1X8015	AJ853605	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene	100%
2	FR91MT65014	EU071522	Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp clone EHFS1_S14e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
4	DF0U3A7V01R	DQ805501	Uncultured bacterium clone RL203_aai63e01 16S rRNA gene partial sequence	95%
5	JGYW3GH4012	DQ444188	Uncultured bacterium clone cs90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
6	FRDGD4GU014	AY803983	<i>Bacillus</i> sp. HPC40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
7	EFTKWUH801R	EF584540	<i>Bacillus</i> sp. JDM-2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
8	DF3NEPVU015	EF645247	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	100%
9	FTHY8ZYNO15	CR933234	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene from clone 054B10_B_DI_P58	99%
11	DDJ075E0015	EF681114	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99%
14	FTYW1TE8012	AB244434	<i>Enterococcus faecalis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	98%
15	FTZUZJYA014		未找到同源性较高菌种	-
17	FVKP3C96012	EU031774	<i>Comamonas</i> sp. BS27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
18	FTWH82B1012	DQ490529	Uncultured <i>Fusobacterium</i> sp. clone F91-270306 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%

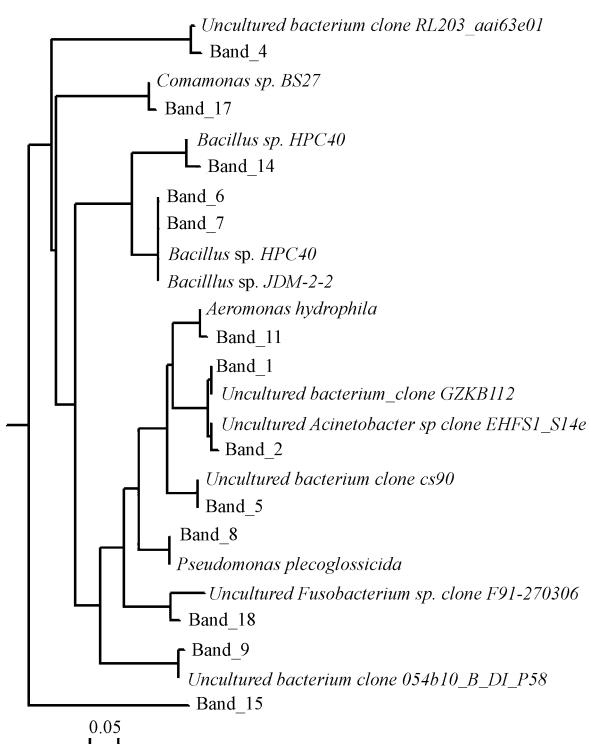


图4 根据BLAST结果构建的MBR中总细菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of bacteria in MBR based on the results of BLAST

## 4 讨论(Discussion)

### 4.1 总细菌群落结构的演变与多样性分析

从图1A中可知,可将条带所代表的细菌种类大致分为3类,如表4所列。运行期间部分菌群始终保持优势地位,这些接种污泥中的细菌对环境的改变具有较强的适应能力,可以在新的工艺条件下发挥作用。在反应器运行前期( $G_1 \sim G_3$ ),接种污泥中的部分条带随着时间的推移而逐渐消失,如图1中的Band 7、10、12,其所代表的菌种在接种污泥中占有较大的优势地位,但在后期的DGGE图谱中几乎看不到的这些条带,说明这部分细菌无法适应环境的变化而逐渐减少。但是,由于DGGE技术的局限性:当某一种群的DNA在总DNA中含量少于1.5%时,便无法应用该技术检测到(Muyzer *et al.*, 1993),因此,这些种属并不是都已经被淘汰,只是演变为非优势群落而不能在后期的图谱中显示出来。

表4 DGGE图谱中细菌条带分类

Table 4 Classification of bacterial bands in the DGGE profile

特征	细菌种属	典型条带
运行期间始终保持稳定的优势地位的种属	<i>Uncultured Acinetobacter</i> sp、 <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> 、 <i>Aeromonas hydrophila</i>	Band 2, 3, 4, 8, 11
接种阶段为优势种属,后期逐渐演变为非优势种属或消失	<i>Bacillus</i> sp	Band 1, 5, 6, 7, 9, 10, 12
前期为非优势种属,至后期演变为优势种属甚至顶级优势种属	<i>Enterococcus faecalis</i> 、 <i>Comamonas</i> sp、 <i>Uncultured Fusobacterium</i> sp	Band 13, 14, 15, 16, 17, 18

由于进水为实验室配水,水质组成成份稳定,因此,在反应器运行中期( $G_4 \sim G_7$ )微生物群落结构组成也较为稳定,种群数量较接种污泥大为减少,某一些种群的绝对优势地位明显,使得微生物总体结构多样性较低。这也与 LaPara 等的研究结果相一致,虽然在他的研究中所用的工艺和处理的废水性质完全不同(LaPara et al., 2002)。而在某些研究中因进水水质的波动较大使得微生物群落结构也随之产生较大变化,从而表现出较高的多样性(Yuki M et al., 2007)。这种生化条件方面的稳定性与微生物群落维持相对稳定状态的特点相结合,使得反应器在这一时期具有较高的污染物去除率,也说明这些细菌能够很好的适应 MBR 中的环境,对于污水处理效果的提高起了至关重要的作用;若能将这些微生物进行分离培养,以一定的比例和接种污泥同时投加到反应器中,将会实现 MBR 的“跳跃式启动”(Stamper et al., 2003),并可在稳定后进一步提高 MBR 的容积负荷。后期( $G_7$ 之后),虽然处理效果依然保持稳定,但膜比通量逐渐减小,膜污染日趋严重。相比于  $G_4 \sim G_7$ ,在  $G_{10}$  中细菌条带增加了很多,这些在反应器运行后期逐渐占有优势地位的菌种与膜污染之间的关系,值得作进一步的研究和探讨。

由图 1B 可见,试验末期污泥样品  $G_{10}$  主要微生物种群多样性与接种污泥  $G_1$  相比,有着较大的差别,其条带的相似性只有 9%,说明接种来的污泥内菌群结构在 MBR 运行期间经历了较大的变化。特别是在接种驯化 5d 后,样品  $G_2$  与接种污泥相似性已经下降到了 47.8%,这也说明污水处理运行工艺的改变对于污泥内部微生物种群结构有着较大的影响。

Shannon 指数是由样品中微生物种属的数量和每个种属的丰度所决定的。从图 2 中可以看出,MBR 中总细菌 Shannon 指数的演变经历了一个逐渐减少到趋于稳定的过程,这也说明接种来的污泥进入反

应器后,由于环境的改变微生物种群数量有一定的减少,而对 MBR 中环境能够较好适应的菌种则很好的存活了下来;在试验驯化期之后,Shannon 指数变化幅度很小(0.7~0.8 之间),说明在 MBR 中虽然微生物浓度很高但丰度较大的优势种群的数量较低,即在不同时期反应器内处于优势地位的微生物的种类数量要少于接种污泥所处的工艺(A-O 工艺),这也和进水中营养物质较为单一有关。

由图 3 可见,根据 DGGE 条带的同源性,Quantity One 自动将依照时间顺序所取的 10 个样品分为 3 类独立的群,恰好与实际操作中反应器运行的 3 个时期相对应,这也说明污泥内种群结构变化随着处理工艺运行在不同的时期而呈现出一定的演替;而且稳定期群和膜污染期群之间又表现出更为接近的同源性,说明了随着反应器的运行二者之间逐渐过渡的过程。

#### 4.2 测序结果与系统进化分析

目前,Genbank 数据库中已存有大量各类微生物的基因组和保守性序列可供检索、比对,这为微生物的分类鉴定提供了丰富的生物信息学资源。一般来说,当微生物的 16S rDNA 同源性达到 97% 或以上时,可以将这些菌划为一个种;同源性达到 94% 或以上时,可以将这些菌划为一个属(刘志恒,2002)。

DGGE 谱图中的每一条带代表一个可能的细菌类群或可操作分类单位(OTU)。从表 3 可见,所提交的条带除 Band\_15 外均在 GenBank 中找到了与其同源性很高的种群。综合表 3 和图 4 可见,MBR 中微生物群落中的主要优势种群分布于不同的纲或属,且之间进化距离较大,其中 Proteobacteria 纲和 *Bacillus* 属细菌种类略多一些。本研究中分离到的很多菌种为未经培养菌种(Uncultured bacterium),而且某些细菌所属的具体种属和理化性质还没有被鉴定清楚。在始终保持明显优势地位的种属中 Band\_8 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),属

于化能有机营养,可严格好氧,利用呼吸代谢;Band\_11属亲水气单胞菌属(*Aeromonas hydrophila*),是常见的腐物寄生菌,在水中分布很广。这2种菌对环境改变的适应能力较强,且最为适应MBR中所提供的生长条件。在反应器运行后期膜污染逐渐加重的情况下,演变为优势种属的菌群中,Band\_14属硬壁菌门(Firmicutes)、Band\_17属变形菌 $\beta$ 亚纲( $\beta$ -Proteobacteria)、Band\_18属梭杆菌纲(Fusobacteria)。其中,已有研究表明,*Comamonas* sp. BS27在污泥中会产生大量的粘液胞外聚合物(slime-EPS)和荚膜胞外聚合物(Capsular-EPS)(Bala S S et al., 2006);随着这些物质在反应器中的积累会降低污泥间的Zeta电位,进而产生高疏水性的不规则型污泥絮体,这些污泥絮体大量地吸附在膜表面,形成了密实的滤饼层,成为MBR中的主要膜污染物(Meng F G et al., 2006)。这说明,在MBR运行后期以Band\_17为代表的菌群优势地位的加强导致了膜污染物的过量积累,加速了膜污染现象的日益严重。

某些在功能上十分重要的次级细菌群落,如氨氧化菌等,不能通过本试验所设计的引物被有效地揭示出来,而这些菌群的演变过程对MBR的运行效果有着重要的影响。因此,研究者需要运用更为深入的研究手段,如针对这些细菌设计特异性强的探针和引物等,来探讨这些细菌群落结构和反应器功能之间的关系。

## 5 结论(Conclusions)

1) 在反应器运行期间,既存在始终保持稳定的优势菌群,也有对新环境适应能力较弱的原始优势种群以及适应能力较强的次级种群。这说明,污水处理工艺和进水水质的改变对于污泥内部微生物种群结构有着较大的影响,微生物整体结构也在随反应器内不同时期环境的变化而做出改变,从而保证对污水处理效果的稳定性。

2) 在反应器启动初期,培养驯化阶段,污泥中微生物群落结构随时间变化最大;而在MBR处理效果稳定后,其内部菌群结构也变得较为稳定;在试验后期,随着膜污染的日益严重,微生物种群结构也随之产生变化。聚类分析表明,不同的类群对应于各自所在的运行时期,而不同类群间的相似性,说明二者存在着一定的演变关系。

3) 测序结果表明,MBR中微生物种群分布较为广泛,主要优势种群分布于不同的纲或属,很多菌

种为未经培养菌种(Uncultured bacterium),其中Proteobacteria纲和*Bacillus*属细菌略多一些。在反应器运行后期,以*Comamonas* sp.为代表的优势菌群对膜污染物的产生和积累有着重要的影响。

**责任编辑简介:**孙宝盛(1957—),男,副教授,硕士生导师。主要研究方向:水污染控制与治理。E-mail:baosheng\_sun@sina.com.

## References:

- Bala S S, Yan S, Tyagi R D, et al. 2006. Isolation of Extra Cellular Biopolymer Producing Microorganisms from Wastewater Sludge for Sludge Settling and Dewatering [A]. // Water Environment Federation. Proceedings of Water Environment Federation (WEFTEC-06), 79th Annual Technical Exhibition and Conference [C]. Dallas, Texas, USA: Water Environment Federation, 473—489
- Calli B, Mertoglu B, Roest K, et al. 2006. Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate [J]. Bioresource Technology, 97 (3): 641—647
- LaPara T M, Nakatsu C H, Pantea L M, et al. 2002. Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE [J]. Water Research, 36 (3): 638—646
- Liu Z H. 2002. Modern microbiology [M]. Beijing: Science Press, 38—42 (in Chinese)
- Meng F G, Zhang H M, Yang F L, et al. 2006. Effect of filamentous bacteria on membrane fouling in submerged membrane bioreactor [J]. Journal of Membrane Science, 272 (3): 161—168
- Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 59 (3): 695—700
- Rosenberger S, Kriger U, Witzig R, et al. 2002. Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater [J]. Water Research, 36 (2): 413—420
- Rowan A K, Snape J R, Fearnside D, et al. 2003. Composition and diversity of ammonia-oxidizing bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater [J]. FEMS Microbiology Ecology, 43 (2): 195—206
- Stamper D M, Walch M, Jacobs R N. 2003. Bacterial Population Changes in a Membrane Bioreactor for Graywater Treatment Monitored by Denaturing Gradient Gel Electrophoretic Analysis of 16S rRNA Gene Fragments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 69 (2): 852—860
- Sun B S, Zhang B, Wu Q, et al. 2008. Application of PCR-DGGE to Analysis of Microbial Community Diversity in MBRs [J]. Journal of Tianjin University, 41 (3): 356—361 (in Chinese)

- Sun Y J, Zuo J E, Li J P, et al. 2006a. Analysis of microorganism population in anaerobic granule with molecular bio-techniques [J]. *China Environmental Science*, 26(2): 183—187 (in Chinese)
- Sun Y J, Zuo J E, Yang Y, et al. 2006b. Community structure of nitrification bacteria in aerobic short-cut nitrification granule [J]. *Environmental Science*, 27(9): 1858—1861 (in Chinese)
- Thomas H, Judd, S., Murrer J. 2000 Fouling characteristics of membrane filtration in membrane bioreactors [J]. *Membrane Technology*, 122(6): 10—13
- Yuki M, Mirian N H, Tsukasa I, et al. 2007 Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance [J]. *Water Research*, 41(3):627—637
- Zhang B, Sun B S, Jin M, et al. 2007. Extraction and analysis of extracellular polymeric substances in membrane fouling in SMBR [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 27 (3): 391—395 (in Chinese)
- 刘志恒. 2002. 现代微生物学[M]. 北京:科学出版社,38—42
- 孙宝盛,张斌,吴卿,等. 2008 应用PCR—DGGE技术解析MBR中微生物群落多样性[J]. 天津大学学报(自然科学版),41(3): 356—361
- 孙寓姣,左剑恶,李建平,等. 2006a. 厌氧颗粒污泥中微生物种群变化的分子生物学解析[J]. 中国环境科学,26(2):183—187
- 孙寓姣,左剑恶,杨洋,等. 2006b. 好氧亚硝化颗粒污泥中硝化细菌群落结构分析[J]. 环境科学,27(9):1858—1861
- 张斌,孙宝盛,金敏,等. 2007. 浸没式膜-生物反应器膜污染物中胞外聚合物的提取与分析[J]. 环境科学学报,27(3):391—395