

SSCP 技术分析不同废水处理系统中微生物群落结构

赵阳国, 王爱杰, 任南琪*, 赵焱

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090)

摘要: 为研究不同废水处理系统中微生物群落结构以及认识群落结构与系统处理效能的关系, 采用单链构象多态性技术 (SSCP) 分别对稳定运行的脱氮除磷反应器 (N), 中药废水处理反应器 (P), 啤酒废水处理反应器 (W), 糖蜜废水发酵制氢反应器 (H) 以及硫酸盐还原反应器 (S) 等 5 种废水处理系统中的微生物群落结构进行了解析. 结果表明, 处理同种废水且状态均一的反应器中微生物群落结构相似性最大; 微生物种群多样性与废水中的有机质复杂性成正相关, 中药废水由于含有较复杂的有机质成分, 种群多样性最高, 而人工配水的处理系统由于营养成分单一, 种群多样性较低; 与模式群落中微生物 SSCP 条带比较显示, 某些功能微生物类群在整个系统中相对数量并非占优势, 发酵产氢菌 *Ethanologenbacterium* sp. 在状态良好的制氢反应器中相对含量仅占 5%, 而脱硫弧菌 *Desulfovibrio* sp. 在硫酸盐还原反应器中的相对比例小于 1.5%. SSCP 指纹图谱技术能够揭示不同处理系统中微生物群落结构的差别, 并对这些工艺中的部分功能微生物进行监测, 进而为提高反应器的运行效果提供有益的指导.

关键词: 废水处理系统; 微生物群落结构; 群落多样性; 单链构象多态性技术

中图分类号: X835 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)07-1429-05

Microbial Community Structure in Different Wastewater Treatment Processes Characterized by Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Technique

ZHAO Yang-guo, WANG Ai-jie, REN Nan-qi, ZHAO Yan

(School of Environmental and Municipal Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: In order to investigate microbial community structures in different wastewater treatment processes and understand the relationship between the structures and the status of processes, the microbial community diversity, variety and distribution in five wastewater treatment processes were studied by a culture-independent genetic fingerprinting technique single-strand conformation polymorphism (SSCP). The five processes included a denitrification and phosphorus removal bioreactor (N), Chinese traditional medicine wastewater treatment bioreactor (P), beer wastewater treatment bioreactor (W), fermentative biohydrogen production bioreactor (H) and sulfate-reduction bioreactor (S). The results indicate that the microbial community profiles in the same wastewater bioreactors are very similar. The diversity of microbial populations is correlated with the complexity of organic contaminants in wastewater. Chinese traditional medicine wastewater contains more complex organic components, so the population diversity is higher than that of simple nutrient bioreactors fed with molasses wastewater. Compared with the strain bands in a simulated community, the relative proportion of some functional microbial populations in bioreactors was not dominant, namely, fermentative biohydrogen producer *Ethanologenbacterium* sp. in the better condition bioreactor had only 5% band density, and the *Desulfovibrio* sp. in the sulfate-reducing bioreactor had less than 1.5% band density. SSCP profiles can define the difference in microbial community structures in wastewater treatment processes and monitor some of the functional microbes in these processes, providing useful guidance for improving its efficiency.

Key words: wastewater treatment process; microbial community structure; community diversity; single-strand conformation polymorphism (SSCP)

废水生物处理反应器的功能是由微生物代谢活动和反应器运行参数共同控制实现的, 而微生物的群落结构(多样性, 种类, 数量和分布)决定着其功能, 反应器的处理效果可以通过微生物的群落结构得以反映^[1,2]. 由于不同废水提供的底物种类不同, 从而使相应的微生物类群得以富集, 表现出与特定废水相对应的特异微生物群落结构. 当种泥中微生物种类异常丰富时, 通过运行参数的调节可以定向选育出具有某些特殊生理功能的微生物类群^[1]. 如将种泥用于处理含硫酸盐废水时, 其中与硫酸盐还

原相关微生物便随着反应器的运行而逐渐富集, 最终形成优势功能种群. 在废水的生物处理过程中, 对整个微生物群落的结构进行快速监测是至关重要的环节, 当监测到功能微生物发生蜕变时, 可以通过改变运行参数重新富集, 从而及时发现问题, 使反应器

收稿日期: 2005-07-14; 修订日期: 2005-09-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(50208006)

作者简介: 赵阳国(1976~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为硫酸盐废水处理与微生物分子生态学, E-mail: sunshine.zhao@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: rnq@hit.edu.cn

始终处于最佳处理状态。

基因指纹技术(genetic fingerprinting) 是近年来随着分子生物学的发展而迅速崛起的用于分析微生物群落的结构、动态等特征的技术, 不需要对微生物进行培养, 以群落总 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增不同种属中的目标基因, 再以特定技术将代表不同类群微生物的 PCR 产物以独特的带型、波峰等图谱的形式展现出来, 如扩增的 rDNA 限制性酶切分析(ARDRA)^[3], 单链构象多态性(SSCP)^[4], 末端限制性片段长度多态性(TRFLP)^[5], 变性/ 温度凝胶电泳(D/TGGE)^[6] 等技术。其中 SSCP 技术是将 PCR 产物加热变性成单链, 这些单链核酸分子在非变性的聚丙烯酰胺凝胶中电泳时, 通过碱基互补配对形成不同的三维结构, 这些不同构象的分子受到的凝胶分子筛作用力也会不同, 最终使长度近似而碱基

序列不同的核酸分子分开^[4]。该技术要求设备简单, 凝胶中的单链易于后续的 southern 杂交, 分辨率与 DGGE 等技术相当^[4,6]。故本文采用该技术, 分别对处理不同有机废水反应器中的微生物群落结构进行了比较, 重新认识了微生物群落结构与反应器处理效能的关系, 从而为提高各反应器的处理能力、及时调整反应器的运行策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 反应器及取样口的描述

取样口的部位以及反应器的运行状态如表 1, 反应器运行数据均按文献[7] 进行检测。采用灭菌的移液管从反应器取样孔吸取活性污泥 2mL 置于无菌的离心管中, 并迅速插入冰中, 直接用于提取 DNA。

表 1 取样时反应器的运行状态
Table 1 Status of bioreactors during sampling

处理系统	反应器类型	取样时反应器状态	取样口描述
脱氮除磷(N)	A ² /O	稳定运行, 除磷率为 99.03%, 脱氮率为 67.88%	N1, N2 和 N3 样品分别采自厌氧、好氧和缺氧反应池
中药废水(P)	UASB	稳定运行	P1 取自进水口混合区, P2 取自中部厌氧区, P3 直接采用出水
啤酒废水(W)	A/O	稳定运行, UASB 厌氧区(A) HRT = 4.5h, 好氧生物膜区(O) HRT = 2.5h, COD 去除率> 95%	W1 取自进水口附近, 缺氧; W2 取自反应器中部, 厌氧; W3 取自顶部为好氧状态
糖蜜废水发酵产氢(H)	CSTR	稳定运行, 乙醇型发酵	H1 产氢量一般; H2 为典型的乙酸型发酵, 产氢量最高; H3 产氢量一般
糖蜜废水硫酸盐还原(S)	CSTR	稳定运行, pH7.0, HRT = 10.6h, 硫酸盐去除率> 90%	S1 为 COD/SO ₄ ²⁻ = 3, S2 为 COD/SO ₄ ²⁻ = 5, 其余条件均相同

1.2 基因组 DNA 提取, PCR 扩增

总 DNA 提取采用 PowerSoil^(TM) DNA Isolation kit(MoBio, CA USA), 按产品说明书进行, 最后用 50μL 2mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.0~ 8.5) 溶解纯化的 DNA, 采用相同的方法重复提取 DNA 1 次。

SSCP 使用的引物为 SRV3-1 (5'-CGG (C/T) CCAGACTCCTACGGG-3') 和 SRV3-2 (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCA-3')^[4]。分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的 330~ 348bp 和 533~ 515bp, 其中 SRV3-2 的 5' 端采用磷酸标记, 用于 λ 核酸外切酶识别并将反意义链切除。引物均由 Invitrogen(上海) 合成并标记。PCR 采用宝生物工程(大连) 有限公司的 PCR 扩增试剂盒, 在 PE 公司 2700 PCR 仪上进行, 50μL 反应体系中分别包括 5μL 10×PCR buffer(plus 2.5 mmol/L Mg²⁺), 4μL dNTP(各 2.5 μmol/L), 引物各 1.5μL(20 μmol/L),

EX Taq DNA 聚合酶 0.5μL (5 U/μL), 模板 2μL (0.05~ 1μg)。反应程序为: 94℃变性 5min 后, 接以 30 个循环, 即 94℃变性 40s, 50℃退火 30s, 72℃延伸 30s; 循环完毕后 72℃延伸 10min。取 3μL 于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 并与 DNA 定量 marker DL2000 (宝生物(大连) 有限公司) 比较确定浓度。剩余 PCR 产物用于后续酶切分析。

1.3 PCR 产物的处理

对于 SSCP 分析, 优化的方法是采用 λ核酸外切酶将反向互补链切除, 这样既减少了 SSCP 图谱中的非特异性带, 又提高了精确度。λ核酸外切酶能够很专一地降解双链 DNA 中 5'-磷酸标记的链, 从而使非标记的单链释放出来^[8]。60μL 反应体系中包括 λ核酸外切酶(NEB, MA USA) 30U, PCR 产物 30μL, 37℃温浴 4h。为减少其中蛋白质和核苷酸等杂质对 SSCP 图谱质量的影响, 采用酚/ 氯仿法纯化

酶切产物,并最终溶于 20 μ L ddH₂O 中。

1.4 SSCP 图谱的产生及分析

电泳(PowerPac 1000, Bio-Rad, CA USA)采用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶(Sigma, MO, USA),控制在 10℃ 恒温下进行。酶解产物 10 μ L(约 100ng)与 5 μ L 变性液混合后于 95℃ 变性 10min,迅速插入冰中,5min 后上样。10℃ 下,恒压 250V,13h,采用相同的上样量及电泳条件对重复实验样品电泳。电泳结束后,按 Bassam^[9]的方法进行银染。获得的 SSCP 图谱采用 UMAX Powerlook 1000(TX USA)扫描。凝胶定量分析软件 Gel-Pro(Media Cybernetics, MD, USA)分析部分条带的含量,并以 UPGMA 聚类方法比较不同群落图谱的相似性^[5]。

2 结果与讨论

2.1 DNA 提取及 PCR 扩增

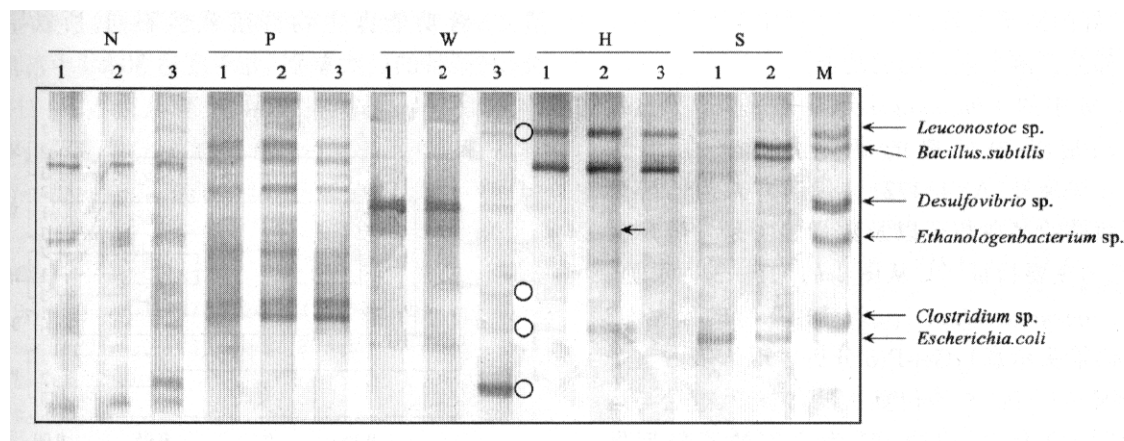
污泥中微生物群落总 DNA 的提取质量是后续实验成功与否的关键。高质量的基因组 DNA,不单以得率和片段大小来衡量,更重要的是看是否影响到真实微生物群落的多样性,多样性越高,则证明 DNA 的提取质量也越好^[10]。而玻璃珠打碎法(bead-beating)提取污泥或土壤 DNA 是多数文献建议使

用的方法,微生物多样性较一般法要高^[11],本实验提取污泥 DNA 即采用此类试剂盒,提取的总 DNA 片段均 23kb,且没有 RNA 污染和降解,DNA 样品透明无色, $D_{260}/D_{280}=1.6\sim 1.8$,可用于后续实验分析。使用引物 SRV3-1 和 SRV3-2 进行 PCR 扩增,结果均得到约 200bp 的序列,采用 Gel-Pro 与 marker 比较确定每一 PCR 产物的量均已 > 100 ng/ μ L。

2.2 SSCP 分析

对 14 个样品和 1 个模拟群落(M)的单链产物进行非变性凝胶电泳结果如图 1(重复实验图谱相同,从略),M 为包含 6 种微生物的生物标记(marker)。分析的每一样品均得到多条带(对应不同的微生物类群),据研究,SSCP 技术同 DGGE 技术一样,当某一种群的 DNA 占群落 DNA 含量少于 1.5% 时,便无法检测到^[4,6]。可见 SSCP 条带只能反映在数量上占优势(> 1.5%)的微生物类群;若要研究群落中比例极少的类群,可采用改进的技术和类群特异的 PCR 引物来完成^[10,12]。本文所用引物为真细菌通用引物,反映的是各反应器优势真细菌构成的群落的总体状况。

2.2.1 群落多样性



N. 脱氮除磷系统;P. 中药废水处理系统;W. 啤酒废水处理系统;H. 糖蜜废水生物制氢系统;S. 硫酸盐废水处理系统;M 为包含 6 个菌株的模拟群落,用作 SSCP 中的标记(marker);←表示 H2 中与 *Ethanologobacterium* sp. 平行条带;○表示 W 系统进入好氧区后出现的条带

图 1 不同反应器中微生物群落的 SSCP 图谱

Fig. 1 SSCP profiles of microbial communities in different bioreactors

SSCP 中的每 1 条带均对应于 1 个或几个不同的操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)^[13,14],因此对于稳定运行的反应器来说,SSCP 条带越多,说明反应器中在数量上占优势的微生物类群越多,这些优势类群共同维持小生态系统的稳定;反之,条带越少,则证明反应器形成了以

该条带所代表的微生物类群为顶极群落的生态系统,与废水处理功能不相关的微生物类群已经被淘汰掉。

在不同的废水处理系统中,条带的多寡也与废水的成分关系密切。当废水成分异常复杂时,则需要多种类型的微生物共同代谢,有机成分才能最终走

完消化链,表现出多种微生物共同处于优势的生态关系.相对其它废水而言,中药废水成分非常复杂,可生化性较差,含有大量难降解的天然有机质^[15].本实验的中药废水来源于哈尔滨中药二厂,COD高达19 000 mg/L,添加氮、磷后直接加入到反应器中进行处理.所以中药废水处理系统泳道中出现至少11条可辨析的条带(图1中P1~3),而且较为分散,这预示着废水成分复杂,微生物在亲缘关系上相距较远.啤酒废水处理系统(图1中W1~3)的配水直接采用啤酒并添加其它必需成分,这决定了该废水除了糖分之外,还含有蛋白以及各种微量元素,所以其在厌氧处理阶段的2个样品(W1, W2)也显示出复杂的群落特征.另外,微生物类群单一化同底物过于简单有直接关系,在本文所研究的废水处理系统中,除了中药废水和啤酒废水外,其它废水主要以废糖蜜为COD,并辅以其它必需物质,所以这些系统包含的微生物类群较为单一,以某一些种类占绝对优势.如在脱氮除磷系统(图1中N1~3)中,虽然3个样品分别来自厌氧、缺氧和好氧池,但由于3池相通,且下一池的部分废水又泵回前池,致使群落混合较为严重,差别很小,但较高的去除率(总磷去除率99%,总氮去除率97%)意味着功能微生物的高度富集和较好的协调关系.

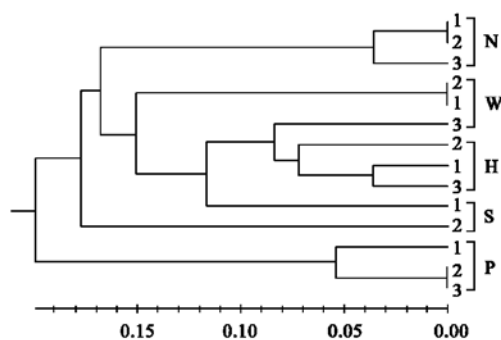
2.2.2 部分群落中微生物的功能

图1 M中的 *Ethanologenbacterium* sp. 为自发酵产氢反应器中分离的高效发酵产氢细菌(GenBank 登录号: AY434721),代谢方式为乙醇型发酵,该菌株的存在与否以及数量多少是发酵产氢效能高低的重要指征^[16].从图1的H1~3中可见,与 *Ethanologenbacterium* sp. 条带相平行的只有H2中的条带(箭头示意),Gel-Pro 分析发现该带占整个群落的5%,H1, H3在该位置上没有条带,这恰与运行的结果相吻合,反应器H2为典型的乙醇型发酵^[17],产氢量最高,反应器H1, H3产氢量一般.乙醇型发酵类型和氢气的高产量,与 *Ethanologenbacterium* sp. 条带的有无成正相关.在H中,数量更多的微生物种类,并非是因为 *Ethanologenbacterium* sp., 这是因为 *Ethanologenbacterium* sp. 不能直接利用多糖,必须在其它发酵微生物的作用下将糖蜜分解成单糖后才能被利用,由此可见这些微生物与 *Ethanologenbacterium* sp. 之间可能存在一种“底物代谢链”的关系,正是这种链式的关系维持着反应器良好的状态.

图1中S1和S2分别来自2个不同的CSTR硫酸盐还原反应器.同S2相比,S1反应器的脱硫效果很差,取样后硫酸盐去除率下降到40%左右.图1 M中的 *Desulfovibrio* sp. 为自硫酸盐还原反应器S2中分离的硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacterium, SRB)菌株^[18],但在运行良好的S2中却没有与之对应的条带,由于SSCP技术可以检测到最低只占群落1.5%的菌株,所以这说明在S2中 *Desulfovibrio* sp. 类群微生物的含量小于1.5%.通过对S2中的部分条带进行克隆测序分析表明,绝大部分条带与 *Enterococcus* sp. 和 *Clostridium* sp. 2个属的菌株相似性最大,而没有与脱硫直接相关的菌株,须经SRB培养基富集培养后才能够通过SSCP技术检测到SRB^[14].由此可见,某些功能微生物类群在反应器群落系统中所占比例很小,绝大多数微生物类群均是为其服务、相互作用的辅助菌.

2.2.3 群落的相似性分析

对各条带进行聚类分析(图2)表明,每种处理系统,不论是来自相同反应器的不同部位,还是来自不同的反应器,其微生物群落均能够形成独特的一群(系统N, P, H 尤为明显),W系统中W1, W2为UASB的厌氧产甲烷阶段,而W3为好氧膜处理阶段,二者功能微生物群落截然不同,所以导致在SSCP条带的巨大差别(分离度达30%).



图下标尺为不同群落的分离度

图2 不同微生物群落SSCP图谱条带多样性聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of microbial community SSCP profiles

S1反应器群落与S2相距较远,而与产酸反应器群落(H)以及W3较近,这表明S1中发酵产酸菌群占优势,对S1和S2的对比实验也证实S1的硫酸盐去除效果很差.以糖蜜为碳源和电子供体的硫酸盐还原过程包括2个阶段,其一是产酸发酵阶段,主要是在发酵微生物的作用下将大分子碳水化合物分解成挥发酸(VFA),这一阶段的微生物群落同产酸

反应器群落是一致的,且都是乙醇型发酵类型^[19];而硫酸盐的还原效果体现在第2个阶段,即SRB类群以小分子挥发酸为电子供体,以硫酸盐为电子受体,将硫酸盐最终还原为硫化物,可见,若SRB数量较少或该阶段受到抑制,则反应器即停留在产酸发酵阶段,表现出与发酵产酸反应器(H)较相近的群落图谱。

3 结论

(1)不同废水处理系统中微生物群落的多样性与废水的成分关系密切,中药废水由于含有复杂的难降解有机质,所以其群落多样性最高,SSCP得到11个条带;啤酒废水中微生物群落多样性次之,其它系统由于以废糖蜜为碳源,多样性最低。

(2)同一废水处理系统中微生物群落的相似性最大,如N、P、H废水处理系统;W系统中W1、W2为UASB的厌氧产甲烷阶段,而W3为好氧膜处理阶段,二者功能微生物群落截然不同,所以导致在SSCP条带的巨大差别;S1、S2虽为处理同样废水的系统,但由于S1基本处于发酵产酸阶段,硫酸盐还原功能较差,从而使S1的SSCP图谱与发酵产酸系统H更加接近。

(3)废水处理系统中,某些功能微生物SSCP条带在群落中并非占优势,如在状态良好的发酵制氢系统H2中,产氢细菌*Ethanologebacterium* sp. 仅占5%;在硫酸盐还原率较高的S2中脱硫弧菌*Desulfovibrio* sp. 占的比例小于1.5%。

参考文献:

- [1] Burrell P C, Keller J, Blackall L L. Microbiology of a nitrite oxidizing bioreactor[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, **64**: 1878~ 1883.
- [2] Fernandez A S, Hashsham S A, Dolhopf S L, et al. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, **66**: 4058~ 4067.
- [3] Vaneechoutte M, Rossau R, Gillis M, et al. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA)[J]. FEMS Microbiol. Lett., 1992, **93**: 227~ 233.
- [4] Lee D H, Zo Y G, Kim S J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single strand conformation polymorphism[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, **62**: 3112~ 3120.
- [5] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997, **63**: 4516~ 4522.
- [6] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59**: 695~ 700.
- [7] 时红, 孙新忠, 范建华, 等. 水质分析方法与技术[M]. 北京: 地震出版社, 2001.
- [8] Subramanian K, Rutvisuttinunt W, Scott W, et al. The enzymatic basis of processivity in λ exonuclease. [J] Nucleic Acids Res., 2003, **31**: 1585~ 1596.
- [9] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Anal. Biochem., 1991, **196**: 80~ 83.
- [10] Stach J E M, Bathe S, Clapp J P, et al. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods[J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2001, **36**: 139~ 151.
- [11] Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1999, **65**: 4715~ 4724.
- [12] Dar S A, Kuenen J G, Muyzer G. Nested PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Approach To Determine the Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in Complex Microbial Communities[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, **71**: 2325 ~ 2330.
- [13] Schmalenberger A, Tebbe C C. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies[J]. Mol. Ecol., 2003, **12**: 251~ 262.
- [14] 赵阳国, 任南琪, 王爱杰, 等. SSCP技术解析硫酸盐还原反应器中微生物的群落结构[J]. 环境科学, 2005, **26**(4): 171~ 176.
- [15] 施悦, 任南琪, 闫险峰, 等. 中药废水高效生物处理技术生产性试验研究[J]. 大连理工大学学报, 2003, **43**(4): 438~ 441.
- [16] 邢德峰, 任南琪, 李秋波. 高效产氢细菌新种*Ethanologebacterium* sp. X21的分离鉴定及其产氢效能[J]. 微生物学报, 2004, **44**(6): 724~ 728.
- [17] Ren N Q, Wang B Z, Huang J C. Ethanol-type Fermentation from Carbohydrate in High Rate Acidogenic Reactor [J]. Biotechnol. Bioeng., 1997, **54**(5): 428~ 433.
- [18] 任南琪, 赵阳国, 王爱杰, 等. PCR-SSCP技术分析碱度影响下硫酸盐还原反应器中微生物群落动态[J]. 中国科学(C辑), 2006, **36**(1): 51~ 58.
- [19] 刘广民. 硫酸盐还原工艺中微生物生理生态特性及单质硫回收研究[R]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2003.