

除磷工艺中含氧条件对聚磷菌种群结构影响研究

傅以钢, 戴睿, 刘洪波, 赵建夫, 夏四清

(同济大学环境科学与工程学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要:利用分子生物学技术直接从活性污泥样品中提取 DNA, 采用套式 PCR 技术对特征基因片断进行扩增, 结合 DGGE(变性浓度梯度凝胶电泳)分析活性污泥中微生物种群结构. 研究了除磷工艺在正常运行情况下的微生态系统种群结构, 并分析了微生物群落结构及行为特征. 测定了活性污泥中变形杆菌(*Proteobacteria*)和产酸菌(*Acidobacterium*)部分菌种的 16S rDNA V3 区片段序列, 通过 NCBI(美国国立生物技术信息中心)基因库比对, 初步确定了部分细菌的属. 在厌氧/好氧和缺氧/好氧工艺中各类优势菌群变化规律研究表明, 在除磷效果稳定的情况下, 系统中除磷微生物种群结构大致能保持不变, 少数数量或种类发生变化的种群与系统含氧量变化有关, 但是处于动态变化中的菌群结构总体能够适应工艺运行环境.

关键词:变形杆菌; 产酸菌; 16S rDNA; 微生态; 厌氧

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)02-0474-08

Influence of Community Structure of Phosphorus Removing Bacteria Under Oxygen Contain in Processes For Phosphorus Removal

FU Yi-gang, DAI Rui, LIU Hong-bo, ZHAO Jian-fu, XIA Si-qing

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: It was studied for community structure of microorganisms in the phosphorus removal processes under the circulating situation, and analyzed for microorganism's structure and behavior characteristics by the molecular biology technique with direct obtaining of DNA from samples of activated sludge, and by nested PCR and DGGE. It was also determined community structure of microorganisms. It was analyzed structures of *Proteobacteria* and *Acidobacterium* by 16S rDNA V3 area gene fragments sequences in activated sludge. By comparing gene sequences in the National Center of Biological Information (NCBI), were determined the kinds of part of microorganisms. Analyzing the low of changes of preponderant bacteria in anaerobic/aerobic and anaerobic/anoxic conditions takes to know, that under the stable situation of phosphorus removing, the system of microorganism's structure can kept mostly constant. Minority races that have changed in amount or kind has something to do with the variation of oxygen level in the system, but structure totally can adapt the environmental conditions of the processes, while it placed in dynamic varieties.

Key words: *Proteobacteria*; *Acidobacterium*; 16S rDNA; micro-ecosystem; anaerobic

聚磷菌是从工程角度对具有除磷功能微生物的一种界定, 关于该功能菌群的微生物知识研究鲜见^[1]. 常规的生物除磷脱氮系统, 主要是在厌氧、好氧交替运行的条件下, 通过活性污泥中聚磷菌“厌氧释磷”和“好氧吸磷”的机制去除废水中的磷. 然而, 传统的生物除磷脱氮系统存在自身难以解决的矛盾: 聚磷菌和反硝化菌对碳源的竞争始终存在; 聚磷菌、反硝化菌、硝化菌的菌龄不同, 各种菌群混合在一起互相制约, 难以使工艺达到最优的运行条件^[2].

为此, 各国水处理专家有针对性地进行了大量研究, 在工艺形式和工艺流程上进行了一系列的革新, 反硝化除磷脱氮技术作为一种采用全新理论建立起来的新工艺显示出广阔的发展前景. 在该工艺运行过程中, 聚磷菌在缺氧(无氧但存在硝态氮)条件下能够像在有氧条件下一样, 利用硝态氮作为电子受体, 产生同样的生物吸磷作用, 而且在生物吸磷

的同时, 硝态氮被还原为氮气, 实现同时反硝化和过量吸磷^[3]. 生物除磷工艺主要是通过聚磷菌在厌氧条件下释磷, 以及好氧条件下对磷的吸收来实现磷从液态(污水)到固态(污泥)转化^[4]. 研究表明, 变形杆菌(*Proteobacteria*)、放线菌(*Actinobacteria*)、产酸细菌(*Acidobacterium*)等菌群是生物除磷工艺活性污泥系统中的优势类群.

本研究对于聚磷菌种群结构在厌氧、缺氧和好氧条件下的变化规律进行了分析. 分析生物除磷工艺中聚磷菌的种类, 探讨除磷过程中各个阶段微生物结构的差异, 对于加深对生物除磷过程中聚磷菌的认识, 同时更好地了解工艺的处理运行结果, 具有重要的意义.

收稿日期: 2007-02-06; 修订日期: 2007-05-15

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NXCET-05-0387)

作者简介: 傅以钢(1971~), 男, 讲师, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: yigangcr@gmail.com

1 材料与方法

1.1 样品总 DNA 的提取及检测

1.1.1 样品总 DNA 的提取方法

所用接种污泥取自同济新村平行 AN/AO 工艺正常运行时反应器中的活性污泥,加入不同 SBR 内,注入需处理的生活污水,分别以厌氧/好氧、缺氧/好氧运行方式进行污泥的连续驯化培养(工艺见图 1)。取 SBR 厌氧/好氧及缺氧/好氧的活性污泥样品,经沉淀后取混合液9 000 r/min离心 1 min,取沉淀于 -30℃进行保存,用于总 DNA 的提取。取样位置及样品编号如表 1 所示。

实验中采用分子生物学方法对活性污泥中细菌的群落结构进行分析,污泥样品中细菌的总 DNA 采用试剂盒提取。试剂盒为上海申能博彩生物科技有限公司生产的 3S 柱离心式环境样品 DNA 抽提试剂盒。

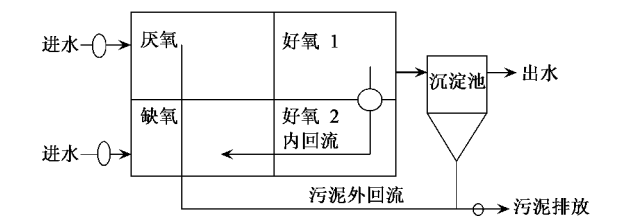


图 1 除磷工艺小试装置

Fig.1 Technology for phosphorus removal

表 1 取样位置及样品编号

Table 1 Sampling places and numeration of samples				
项目	厌氧	好氧 1	缺氧	好氧 2
取样位置	SBR1(厌氧/好氧)		SBR2(缺氧/好氧)	
样品编号	样品 I	样品 II	样品 III	样品 IV

1.1.2 提取总 DNA 的结果检测

提取到的总 DNA 采用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,在紫外灯下观察拍照。电泳条件如下。琼脂糖浓度:0.5%(琼脂糖 0.5 g,0.5 × TBE 缓冲液 100 mL);电压:150 V;电泳时间:约 20 min;溴化乙锭(EB)终浓度:1 μg/L;电泳所用 Marker 为宝生物工程(大连)有限公司生产的 DNA Marker λ-Hind III digest。

1.2 PCR 扩增

1.2.1 PCR 扩增方法及反应体系

在分析过程中为了增强 PCR 扩增的敏感性和 DGGE 分析的针对性,特采用了套式 PCR(nested PCR)技术。根据所要得到的目标序列采用不同的特异性引物及相应的条件,以细菌总 DNA 为模板进行第 1 轮 PCR 扩增;而后以第 1 轮 PCR 扩增产物作为模板,使用细菌的通用引物针对 16S rDNA V3 区进行第 2 轮 PCR 扩增。由于第 2 轮 PCR 引物的设计片段位于第 1 轮 PCR 扩增得到的片段之内,因此第 1 轮反应得到的产物可在第 2 轮 PCR 中再次得到扩增,从而增加了反应的特异性。

第 1 轮 PCR 反应体系:无菌双蒸水 40 μL,10 × PCR 反应缓冲液 5 μL,4 × dNTP 溶液 1 μL,10 mmol/L 引物各 1 μL,TaqDNA 聚合酶 1 个单位,模板(样品总 DNA 溶液)1 μL。

第 2 轮 PCR 反应体系:无菌双蒸水 80 μL,10 × PCR 反应缓冲液 10 μL,4 × dNTP 溶液 2 μL,10 mmol/L 引物各 2 μL,TaqDNA 聚合酶 2 个单位,模板(第 1 轮 PCR 扩增产物)2 μL。

各反应体系中需加入适量液体石蜡,防止反应液蒸发。混匀后轻度离心 45 s,置于 PCR 仪中,在相应程序下反应。

实验中采用的 PCR 扩增引物及程序如表 2 所示。PCR 反应循环开始前,95℃预变性 10 min,循环结束后 72℃延伸 12 min。

表 2 PCR 引物及扩增程序

Table 2 Primers and programs of amplification										
项目	扩增目标	引物	PCR 条件							参考文献
			循环次数	变性		退火		延伸		
				温度 /℃	持续时间 /s	温度 /℃	持续时间 /s	温度 /℃	持续时间 /s	
第 1 轮 PCR	细菌	P63F, R1378r	30	95	60	53	60	72	120	[5]
	放线菌	F243, R1378r	35	95	60	63	60	72	120	[6]
	产酸菌	31f, R1378r	30	95	60	53	60	72	120	[6,7]
	α -变形杆菌	F203a, R1378r	35	94	60	57	60	72	120	[8]
	β -变形杆菌	EUB341F, UNIV907r	30	94	60	53	60	72	60	[9]
第 2 轮 PCR	细菌	gc-P338F, P518r	35	94	45	60	45	72	90	[8]

1.2.2 PCR 扩增结果检测

PCR 扩增产物采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,在紫外灯下观察拍照.电泳条件如下.琼脂糖浓度:1% (琼脂糖 1 g, 0.5 × TBE 缓冲液 100 mL); 电压:150 V; 电泳时间:约 20 min; 溴化乙锭(EB)终浓度:1 $\mu\text{g/L}$; 电泳所用 Marker 为宝生物工程(大连)有限公司生产的 DNA Marker DL2000.

1.3 DGGE 分析

取第 2 轮 PCR 扩增产物 80 μL 进行 DGGE(变性梯度凝胶电泳)电泳分离.聚丙烯酰胺浓度为 8%, 凝胶厚 0.75 mm.凝胶变性梯度为:50% ~ 65%. 电压 150 V, 电泳缓冲液为 1 × TAE, 电泳温度 60℃, 电泳时间 7.5 h. 在含溴乙锭(0.5 mg/L)的 1 × TAE 缓冲液中染色后,在紫外灯下观察拍照.切下含目的 DNA 条带的凝胶块转移到微量离心管中,用吸头挤碎,加入 30 μL 超纯水溶解,重新进行 PCR 扩增,扩增产物可进行克隆文库分析或纯化、测序.

1.4 16S rDNA 片段的克隆

将切胶后获得的 16S rDNA 片段进行克隆,载体采用 pUCm-T, pUCm-T 载体(pUCm-T Vector)是用于克隆含有 A 末端 PCR 产物的理想载体.可以通过蓝白斑筛选有插入片断的重组克隆. *Taq* DNA 聚合酶在进行 PCR 扩增时会在 PCR 产物双链 DNA 每条链的 3' 端加上 1 个突出的碱基 A. pUCm-T 载体是一种已经线性化的载体,载体每条链的 3' 端带有 1 个突出的 T. 这样, pUCm-T 载体的 2 端就可以和 PCR 产物的两端进行正确的 AT 配对,在连接酶的催化下,就可以把 PCR 产物连接到 pUCm-T 载体中,形成含有目的片断的重组载体.

1.4.1 PCR 产物的准备

PCR 反应(50 μL 反应体系)结束以后,加入 1 μL 20 mmol/L dATP 和 2.5 μL 的 *Taq* 酶, 72℃ 保温 10 min, 然后回收 PCR 产物进行 T/A 连接.

1.4.2 连接反应

试验采用 50 μL 连接反应体系中,按次序加入 5 μL Ligation Buffer, 8 μL pUCm-T, 32 μL 纯化的 PCR 产物, 5 μL T4 DNA Ligase. 16℃ 下连接 2 h 至过夜.

1.4.3 转化

转化按照以下步骤进行:取 -70℃ 下保存的 100 μL 感受态细胞,置于冰上,完全解冻后轻轻地将细胞均匀悬浮;加入 2 μL 连接液,轻轻混匀;冰上放置 30 min; 42℃ 水浴热激 60 s; 冰上放置 2 min; 加 400 μL LB 培养基, 37℃ 200 ~ 250 r/min 振荡培养 1 h; 室温下 4 000 r/min 离心 5 min, 用枪头吸掉 400 μL 上清

液,用剩余的培养基将细胞悬浮;将细菌涂布在 90 mm 平板中,平板在使用前预先用 IPTG 和 X-gal 涂布.细菌的用量依连接的效率及感受态细胞的感受率而进行适当调整;平板在 37℃ 下正向放置 1 h 以吸收过多的液体,然后倒置培养过夜.

1.4.4 筛选-蓝/白斑筛选

当外源 DNA 片段插入到 pUCm-T 中后,由于外源 DNA 的核酸序列存在改变了 LacZ 基因的编码,从而影响了其产物 β -半乳糖苷酶 a 片段的活性,因此重组克隆在 X-gal/IPTG 平板上呈现为白色,而非重组克隆呈蓝色.挑取白色的菌落接到含氨苄青霉素的 LB 培养基, 37℃, 260 r/min 培养 5 ~ 6 h, 通过测序可以确定 pUCm-T 中插入的 PCR 产物是否为希望得到的目的基因.

1.5 测序及后续分析

DGGE 凝胶块的 PCR 扩增产物、16S rDNA 片段克隆所得菌液,均送至上海英竣生物技术有限公司进行测序.所得序列运用 BLAST 程序与 NCBI 核酸数据库中的公开序列进行比较,可初步确定细菌的种属.

2 结果与分析

2.1 工艺介绍

系统为小试装置.工艺由 4 个体积相等的反应池组成,厌氧区体积/缺氧区体积/好氧区体积为 1:1:1,装置的处理工艺流程图如 1 所示.该工艺将进水分成 2 部分,其中一部分进水经过厌氧/缺氧利用反硝化聚磷处理达到除磷脱氮的目的(AN 部分),另一部分进水采用厌氧/好氧的传统除磷脱氮工艺进行处理(AO 部分),实验用水为上海市同济新村生活污水.

从流程上看,工艺完全对称:1 套是利用反硝化聚磷菌的缺氧/好氧工艺,另 1 套是利用普通聚磷菌的厌氧/好氧工艺.在缺氧/好氧工艺中可以认为反硝化聚磷菌得到了充分利用.在流程的厌氧/好氧工艺中,基本可认为微生物是在空间上经过了周期的厌氧过程.因此,聚磷菌利用硝态氮(而不是 O_2)充当电子受体进行生物吸磷,而在生物吸磷的同时,硝态氮可以被还原为氮气,从而使生物除磷与反硝化脱氮有机地合二为一.与传统生物除磷技术相比,厌氧条件下除磷最大的优点就是节省了大量的 COD 和曝气量,而且减少剩余污泥量,适用于低 C 高 N、P 污水除磷脱氮^[10,11].装置进水 COD 多在 200 mg/L 以下, TN 40 ~ 60 mg/L, TP 5 ~ 10 mg/L, 是典型的低 C

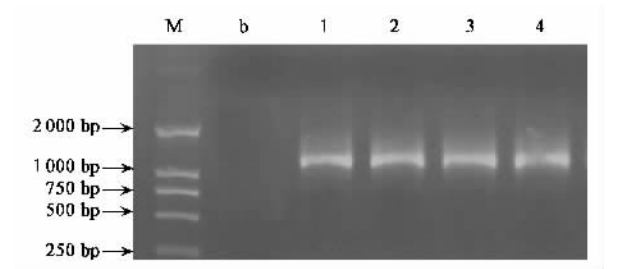
高 N、P 污水. 工艺数据表明, 在进水流量分配比 (AN/AO) 为 12:8 (进水总流量 20 L/h), 反应池总名义水力停留时间 (HRT) 为 6 h (各池名义 HRT 为 1.5 h), 污泥停留时间 (SRT) 为 15 d, 外回流比 25% (AN 或 AO 部分回流流量/该部分进水流量; AN 部分与 AO 部分取相同的内回流比) 时, 系统出水 COD 浓度平均为 49 mg/L, TN 浓度平均为 14.2 mg/L, 总磷浓度平均为 0.7 mg/L, 剩余污泥含磷量 (P/MLSS) 平均为 5.7%, 运行温度为 23℃. 厌氧池、缺氧池和好氧池的含氧量分别稳定在 0~0.1、0.2~0.3 和 2.5~3.0 mg/L. 可以认为工艺除磷效果理想, 运行稳定.

2.2 活性污泥样品总 DNA PCR 扩增结果

采用试剂盒法对 4 个样品中进行 DNA 提取, 提取的 DNA 通过 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳检验. 继而对提取出的 DNA 进行套式 PCR 扩增. 采用细菌 16S rDNA 通用引物以及针对放线菌 (*Actinobacteria*)、变形杆菌 (*Proteobacteria*)、产酸细菌 (*Acidobacterium*) 等菌群的特异性引物以 DNA 为模板进行第 1 轮 PCR 扩增, 而后采用细菌通用引物对第 1 轮扩增产物进行第 2 轮 PCR 扩增. 在 PCR 扩增过程中, 未检测到放线菌 (*Actinobacteria*) 的存在.

虽然有报道指出在生物除磷活性污泥系统中, 放线菌属于经常被检出的优势类群, 但在本实验多次重复的结果中却未被检测到, 这可能与工艺条件的特殊性有关. 对于放线菌在本实验中的缺失原因需深入研究.

第 1 轮 PCR 产物的检测电泳图如图 2~4 所示. 将第 1 轮扩增产物进行第 2 轮 PCR 扩增, 扩增产物片段大小约为 220 bp (图略), 即为所需的 16S rDNA 特异性片段.



M: Marker; 1: 样品 I; 2: 样品 II; 3: 样品 III;
4: 样品 IV; b 为阴性对照, 下同

图 2 α -变形杆菌 (α -*Proteobacteria*) PCR 扩增结果
Fig.2 Result of PCR amplification for α -*Proteobacteria*

根据 Smart View 软件分析的结果表明, α -*Proteobacteria*、 β -*Proteobacteria* 和 *Acidobacterium* 的 16S rDNA 片段 PCR 扩增结果分别为: 1 100、600 和

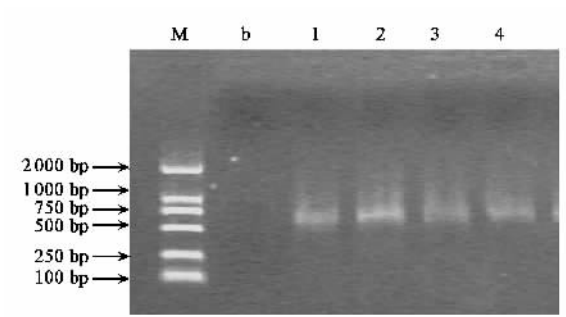


图 3 β -变形杆菌 (β -*Proteobacteria*) PCR 扩增结果
Fig.3 Result of PCR amplification for β -*Proteobacteria*

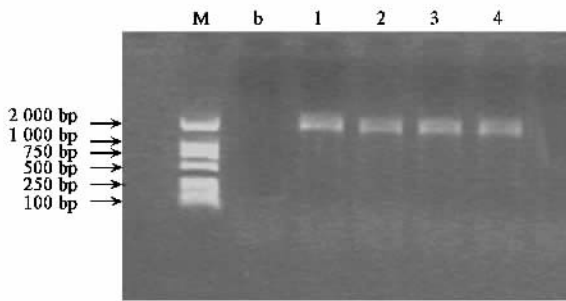
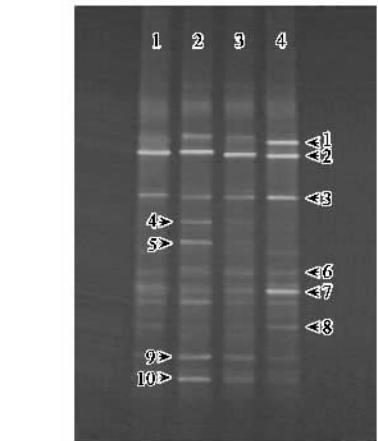


图 4 产酸细菌 (*Acidobacterium*) PCR 扩增结果
Fig.4 Result of PCR amplification for *Acidobacterium*

1 300 bp.
2.3 变性梯度凝胶电泳分离 16S rDNA 片段结果

取适量第 2 轮 PCR 扩增产物进行变性梯度凝胶电泳分离, 总菌群及各类细菌的 DGGE 电泳图如图 5~8 所示. 由图 5 可以看出, 培养驯化后的活性污泥中所含有的细菌类群极为丰富. 各类菌群的电泳图显示, 除磷系统中 β -变形杆菌所含的细菌最为丰富, 其次是 α -变形杆菌与产酸菌.



1: 样品 I; 2: 样品 II; 3: 样品 III; 4: 样品 IV, 下同
图 5 总菌群 DGGE 电泳图

Fig.5 Result of DGGE fingerprint for common microorganisms

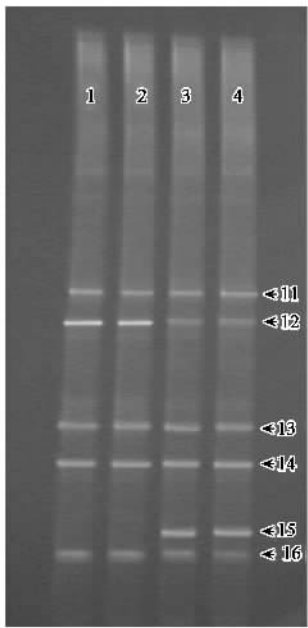


图 6 α -变形杆菌(α -*Proteobacteria*)DGGE 电泳图
Fig.6 Result of DGGE fingerprint for α -*Proteobacteria*

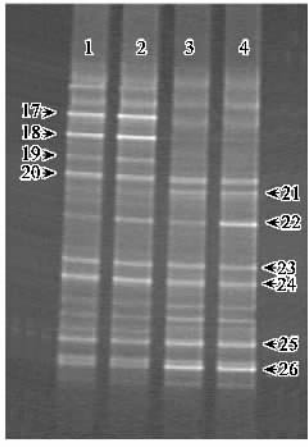


图 7 β -变形杆菌(β -*Proteobacteria*)DGGE 电泳图
Fig.7 Result of DGGE fingerprint for β -*Proteobacteria*

根据图 5~8 的 DGGE 图谱所示,总菌群图谱中细菌条带较为密集,各个样品中均含有较多共有条带与特有条带数目,且不同样品中共有条带亮度的明显差异表明其生物量上的显著差别。 β -变形杆菌的电泳图表明活性污泥中该类细菌的数量相当丰富,可识别的共有条带数目较多,并且不同样品所特有的条带数目也较多。 α -变形杆菌的电泳图显示,样品所含该类细菌的种类较少,个别条带表现出其代表菌种在不同样品中所特有或是生物量上的明显区别。电泳图显示样品中的产酸细菌含量比较丰富,但条带多为各个样品所共有,仅有少量条带显示出不

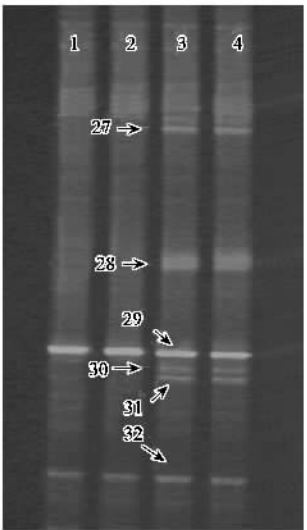


图 8 产酸细菌(*Acidobacterium*)DGGE 电泳图
Fig.8 Result of DGGE fingerprint for *Acidobacterium*

同样品中同类菌种在生物量上的差别。

在培养驯化过程中,SBR1(厌氧/好氧)与 SBR2(缺氧/好氧)的微生物种群结构有一定差别,且同一反应器内活性污泥在不同取样时间所含有的微生物种类也有所差异,说明不同电子受体的存在环境以及相同环境下除磷过程的不同阶段,都会使微生物产生种类和数量上的差别.但是总体来看,微生态的结构在 2 套反应体系中表现出动态的稳定性。

从图 5~8 还可以看出,绝大部分细菌能够在厌氧和好氧条件下同时存活.在好氧条件下,优势种群的数量相对多一些.如图 5 中,条带 1、3、7 和 8 表现为在好氧条件下的优势种群;图 6 中条带 15 表现为严格好氧的 α -*Proteobacteria*,在厌氧/好氧系统中几乎看不到;图 7 中条带 21、22、25 和 26 表现为在好氧条件下的优势 β -*Proteobacteria*;图 8 中的条带 27、28、30、31 则为严格好氧的 *Acidobacterium*,在厌氧/好氧系统中几乎成为背景。

而在厌氧条件下,图 5 中的条带 4、5、9、10 表现为优势种群;图 6 中条带 12 表现为厌氧条件的优势 α -*Proteobacteria*;在图 7 中条带 17 表现为厌氧条件的优势 β -*Proteobacteria*,而条带 18 和 19 则表现为严格厌氧的 β -*Proteobacteria*,在缺氧/好氧系统中几乎成为背景.可以初步判断,条带 4、5、9、10、17 为兼性厌氧菌。

条带 2、6、11、13、14、16、20、23、24、25、29、32 等,在 4 个样品中的各类图谱均存在且亮度变化不大,说明这些菌种普遍存在于生物除磷系统活性污泥中,对污水中磷的去除以及维护生物除磷过程中

表 3 部分优势菌种 16S rDNA DGGE 片段测序分析结果

Table 3 Sequences of 16S rDNA fragments for part of microorganisms by the DGGE fingerprint		
片段	查询号	NCBI 比对结果
1	1165371170-26247-153388800814 . BLASTQ2	<i>Bdellovibrio</i> sp. ETB 99% <i>Bdellovibrio</i> sp. L 99% <i>Bdellovibrio</i> sp. RO 99% <i>Bdellovibrio</i> sp. MTA 99%
2	1165373341-20881-52380411439 . BLASTQ2	<i>Flavobacterium</i> sp. Rud11 100%
3	1165303011-28556-198673443110 . BLASTQ4	Uncultured gamma <i>Proteobacterium</i> 98% Environmental clone CC-5 98% <i>Thiothrix</i> sp. CT3 98% Uncultured <i>Thiothrix</i> sp. 98% <i>Thiothrix</i> sp. NKBI-C 98%
7	1165371923-23354-124615745607 . BLASTQ2	<i>Bdellovibrio</i> sp. Ec13 100% <i>Bdellovibrio</i> sp. CHI 100% Uncultured delta <i>Proteobacterium</i> 100% <i>Bdellovibrio</i> sp. Tu-113 100%
9	1165372231-7312-34311478946 . BLASTQ4	Uncultured beta <i>Proteobacterium</i> 99%
10	1165372719-27281-22197996578 . BLASTQ4	Uncultured bacterium 99% <i>Dechloromonas hortensis</i> strain MA-1 99% <i>Dechloromonas</i> sp. SIUL 99%
12	1165401532-22328-6773713650 . BLASTQ4	Uncultured alpha <i>Proteobacterium</i> 96%
15	1165401921-12400-198896634968 . BLASTQ4	Uncultured sludge bacterium A26 97% <i>Rhodobacter gluconicum</i> 97% Uncultured alpha <i>Proteobacterium</i> 97%
17	1165386763-19518-24360391251 . BLASTQ4	Uncultured beta <i>Proteobacterium</i> 98% beta <i>Proteobacterium</i> RBE2CD-120 98% Uncultured <i>Rubrivivax</i> sp. 98% Uncultured <i>Nitrospira</i> sp. 98% <i>Acidovorax</i> sp. FBR-G1 98%
18	1165387137-32749-18560248664 . BLASTQ4	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 100% <i>Pseudomonas</i> sp. Hugh2814 100% <i>Pseudomonas</i> sp. iCTE22 100% <i>Pseudomonas</i> sp. CWX5 100%
19	1165387540-16417-8736185334 . BLASTQ2	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 90% <i>Pseudomonas</i> sp. S19 90%
20	1165387759-28630-58928863655 . BLASTQ4	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium 93% Uncultured <i>Actinobacterium</i> 93%
21	1165388784-32357-168941787168 . BLASTQ4	Uncultured <i>Leptospirillum</i> sp. 88% <i>Neisseria</i> sp. 05-8261 88% Uncultured <i>Neisseria</i> sp. 88% Uncultured gamma <i>Proteobacterium</i> 88%
22	1165388270-19090-155369671484 . BLASTQ4	Uncultured bacterium 96% Uncultured <i>Escherichia</i> sp. 96% <i>Escherichia</i> sp. ZY-2006a 96% Uncultured gamma <i>Proteobacterium</i> 96%
23	1165389075-12792-104614905460 . BLASTQ2	Uncultured beta <i>Proteobacterium</i> 98% <i>Thauera</i> sp. R-26885 98%
24	1165389733-11997-166004861842 . BLASTQ4	Uncultured beta <i>Proteobacterium</i> 98% <i>Thauera terpenica</i> 98%
25	1165390620-18775-10503611222 . BLASTQ2	<i>Perchlorate-reducing</i> bacterium EAB3 98% <i>Cardococcus australiensis</i> 98% <i>Dechloromonas</i> sp. NM 98% <i>Dechloromonas</i> sp. CL 98%
26	1165393820-30149-88843354368 . BLASTQ2	Uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium 95% Uncultured beta <i>Proteobacterium</i> 95% Uncultured <i>Nitrospira</i> sp. 95% <i>Thauera</i> sp. GPTSA18 95%
30	1165402205-21081-160062107654 . BLASTQ2	Unidentified bacterium 100% Uncultured <i>Acidobacterium</i> group bacterium 100%
31	1165402765-26243-82944573856 . BLASTQ2	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium 97%

微生物生态系统的稳定起着重要作用,为系统主要代谢流载体。

各类细菌的 DGGE 图谱均显示其所包含了丰富的微生物种类,且各类菌群都有其优势菌种出现,同时菌种的变化有较为明显的规律可循。

2.4 部分优势菌群的 DGGE 片段测序及入库比对

由于第 1 轮特异性扩增片段克隆建库后,缺失量比较大,准确性不高,结果并不理想。鉴于结果的可靠性,选择了第 2 轮 16S rDNA V3 可变区的片段进行建库,其大小为 200 bp 左右。在细菌 DGGE 图谱中选取比较典型的 20 条条带,切胶纯化后进行克隆,最后测序,通过 NCBI 比对后,查找与其最相近的序列如表 3 所示。

测序结果表明,这些优势菌种大多属于未被培养菌种。厌氧/好氧条件下,测定的菌种显示主要属于这样几个细菌种属: *Dechloromonas* sp.、*Acidovorax* sp.、*Pseudomonas* sp. 等。而缺氧/好氧条件中的大多数菌种主要属于: *Bdellovibrio* sp.、*Dechloromonas* sp.、*Neisseria* sp.、*Escherichia* sp.、*Thauera* sp. 等细菌种属。

3 讨论

本实验研究了平行 AN/AO 工艺正常运行时微生物生态系统种群结构,并分析了微生物群落结构及行为特征。在以厌氧/好氧方式运行的生物除磷系统中,聚磷菌在厌氧段利用细胞内多聚磷酸盐水解反应来获取能量,用于吸收外界有机物并同化为细胞内储备营养物 PHB,水解产物正磷酸盐则被释放到细胞外,在此阶段磷浓度呈现不断增加的趋势;而后在好氧条件下,聚磷菌利用 O_2 为最终电子受体氧化细胞内的 PHB 产生能量,用于从细胞外摄取磷酸盐并合成多聚磷酸盐,从而使好氧阶段系统内磷的浓度不断减少。

缺氧/好氧方式运行的系统同样存在厌氧/好氧中的厌氧释磷。但是,该系统与好氧聚磷不同,在缺氧段通过反硝化作用实现磷的去除。部分聚磷菌可利用 NO_3^- 作为电子受体取代 O_2 氧化 PHB,随着 NO_3^- -N 浓度的降低,磷浓度也不断降低,硝酸盐与磷浓度变化趋势相同,即出现同步反硝化聚磷。因此,与厌氧/好氧相比较,缺氧/好氧由于工艺条件及所提供的电子受体的不同,承担主流代谢的菌群也会发生演变。污泥聚磷所表现出的特性参数及运行结果,说明用 NO_3^- -N 取代 O_2 作为电子受体来氧化 PHB 的聚磷是可以实现的,聚磷菌能适应并及时改

变其代谢方式。

本实验对除磷工艺活性污泥样品中变形杆菌 (*Proteobacteria*)、产酸菌 (*Acidobacterium*) 的种群结构进行分析,证实生物除磷过程中 *Proteobacteria* 具有丰富的微生物种群结构。在工艺运行过程中,适宜的温度、充足的养分等特定的工况条件为具有特殊效果功能菌群的生长提供了环境条件,所以细菌总的数量很多,也说明变形杆菌在除磷微生态系统当中的确占据了比较重要的地位。相对而言, *Acidobacterium* 在数量和种类上都不占优势。通过对厌氧、好氧、缺氧等不同反应区域中变形杆菌的种群结构进行对比分析, DGGE 条带显示出部分优势菌群在除磷过程中表现出一定的差异,主要是因为各个工艺段含氧量的差别,使 4 个反应池中的活性污泥样品并不具有完全相同菌群结构,对含氧量的变化,某些 *Proteobacteria* 种类表现出一定的依赖性规律。而 *Acidobacterium* 在好氧和厌氧环境中都有出现,部分对氧气较为敏感(图 8 中条带 27、28、30、31)。

4 结论

(1)在生物除磷过程中 *Proteobacteria* 具有丰富的微生物种群结构。相对而言, *Acidobacterium* 在数量和种类上都不占优势。说明变形杆菌在除磷微生态系统当中的确占据了比较重要的地位。厌氧/好氧条件下,测定的菌种显示主要属于: *Dechloromonas* sp.、*Acidovorax* sp.、*Pseudomonas* sp. 等。而缺氧/好氧条件中的大多数菌种主要属于: *Bdellovibrio* sp.、*Dechloromonas* sp.、*Neisseria* sp.、*Escherichia* sp.、*Thauera* sp. 等细菌种属。其中有相当一部分种属属于未经培养。

(2)在工艺运行稳定状态时,活性污泥中的微生物种群结构也表现出相当的稳定性。虽然工艺运行中,由于污泥的内回流及外回流等因素会不可避免地造成对不同微生物专性生长环境的冲击,但是整个微生态系统随着工艺的稳定,也达到了一个基本动态稳定的状态。这也说明微生态系统菌群结构的稳定性不是绝对的,个别菌群的变化正说明了菌群结构的总体稳定具有动态的特征。

(3)本实验采用套式 PCR 方法,结合 DGGE 对通过对 AN/AO 工艺中主要变形杆菌的 16S rDNA 序列进行了分析。套式 PCR 特异性引物及适宜扩增条件的选择,对该工艺活性污泥样品中各类菌群的微生物种群结构给出了一个清晰的描绘。因此,可以进

一步分析不同活性污泥中微生物种群结构的差异,从而可以对该工艺中的微生态环境有一个初步的认识.

参考文献:

[1] 周可新,许木启,曹宏.生物除磷活性污泥系统微生物学研究进展[J].应用与环境生物学报,2005,11(5):638-641.

[2] Tsuneda S, Miyauchi R, Ohno T, *et al.* Characterization of Denitrifying Polyphosphate-Accumulating Organisms in Activated Sludge Based on Nitrite Reductase Gene[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005,99(4):403-407.

[3] Kishida N, Kim J, Tsuneda S, *et al.* Anaerobic/oxic/anoxic granular sludge process as an effective nutrient removal process utilizing denitrifying polyphosphate-accumulating organisms [J]. Water Research, 2006,40: 2303-2310.

[4] Liu Y, Zhang T, Fang H H. Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated sludge [J]. Bioresource Technology, 2005,96: 1205-1214.

[5] Fvreas L, Forney L, Daae F L, *et al.* Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevannet as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S

rRNA[J]. Appl Envir Microbiol, 1997,63(12):3367-3373.

[6] Heuer H, Krsek M, Baker P, *et al.* Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients[J]. Appl Envir Microbiol, 1997,63(12):3233-3241.

[7] Barns S M, Takala S L, Kuske C R. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment [J]. Appl Envir Microbiol, 1999,65: 1731-1737.

[8] Gomes N C M, Heuer H, Schonfeld J, *et al.* Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis[J]. Plant Soil, 2001,232: 167-180.

[9] Ahn J, Daidou T, Tsuneda S, *et al.* Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gelel ectrophoresis assay[J]. Water Research, 2002,36: 403-412.

[10] 刘洪波,孙力平.天津纪庄子污水处理厂反硝化聚磷菌作用初探[J].天津城市建设学院学报,2004,10(3):174-178.

[11] 刘洪波,孙力平,夏四清.生物膜中反硝化除磷作用的研究[J].工业用水与废水,2006,37(1):40-43.