T-RFLP 方法分析城市污水处理厂中细菌群落的动态 变化

王晓慧¹,文湘华¹,丁鵾¹,张辉²,周军²

(1. 清华大学环境科学与工程系,北京 100084; 2. 北京排水集团,北京 100044)

摘要:采用基于 16S rRNA 基因的末端限制性片段长度多态性技术(T-RFLP),分析了功能稳定的 2 个城市污水处理系统中(系 统 A 及系统 B),细菌群落结构在 105 d 中的动态变化.在研究中,系统 A 和系统 B 功能稳定,BOD 出水浓度均在 8 mg/L左右, 总氮(TN)出水浓度分别在 25 mg/L和 23 mg/L之下.T-RFLP 图谱分析表明,系统 A 中,115、118、123、471、482 和 835 bp 等 T-RFs 的相对丰度变化显著,系统 B 中,123、471、750 和 835 bp 等 T-RFs 的相对丰度变化显著.移动窗口分析表明,系统 A 中 细菌群落的平均变化率 $\Delta t_{(15 d)}$ 为 21.5% ±5.7%,系统 B 的平均变化率 $\Delta t_{(15 d)}$ 为 22.6% ±5.0%.洛伦兹曲线分析表明,系统 A 中 20% 的微生物的累积相对丰度为 43% ~50%;系统 B 中 20% 的微生物的累积相对丰度为 47% ~52%.结果表明,在城市 污水处理厂中,稳定的功能并没有藕联着稳定的细菌群落结构.

关键词:细菌;群落动态变化;T-RFLP;移动窗口分析;洛伦兹曲线;城市污水处理厂 中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)05-1307-06

Bacterial Community Dynamics in Wastewater Treatment Plants Based on T-RFLP Profiles

WANG Xiao-hui¹, WEN Xiang-hua¹, DING Kun¹, ZHANG Hui², ZHOU Jun²

(1. Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Beijing Drainage Group Co. Ltd., Beijing 100044, China)

Abstract: Bacterial communities in two full-scale wastewater treatment systems (system A and system B) with functional stability were monitored over 105 days using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) based on 16S rRNA genes. During the study period, system A and system B were functionally stable. The effluent BOD concentration of two systems was always around 8 mg/L, and at the same time the effluent TN concentrations of two systems were always below 25 mg/L and 23 mg/L respectively. However, the T-RFLP profiles showed that for system A, the relative abundance of T-RF of 115, 118, 123, 471, 482 and 835 bp changed significantly. For system B, the T-RF of 123, 471, 750 and 835 bp changed significantly. The moving window analysis showed the average community change rates (every 15 days) of system A and system B were 21.5% \pm 5.7% and 22.6% \pm 5.0% respectively. Based on the Lorenz curves, it was observed for system A that 20% of the species corresponded with 43% to 50% of the cumulative relative abundance. In conclusion, the results of this study clearly revealed that, in the full-scale wastewater treatment systems, the functional stability did not correlate to the stable bacterial communities.

Key words: bacteria; community dynamics; terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP); moving window analysis; Lorenz curve; wastewater treatment plant

微生物是城市污水生物处理系统中污染物去除 的主体,系统的稳定运行是以其中的微生物群落为 基础的.然而,系统功能的稳定性与微生物群落结构 之间的关系并不明确,如系统稳定的功能是否一定 耦联着稳定的群落结构^[1].深入理解污水处理工艺 中微生物的群落结构和系统稳定性的关系,对保持 污水处理系统的稳定运行具有重要作用^[2~4].

传统的微生物培养方法很难获得微生物群落结构的准确信息^[5]. 近年来,基于 16S rRNA 基因和功能基因的现代分子生物学方法的出现,提供了更快速、更准确地解析环境中微生物群落结构的有效方

法.由于 T-RFLP 技术具有相对高的分辨率和可重 复性^[6],其已经被广泛用来解析环境中微生物的群 落结构^[7-12].

已有研究表明,在小试规模的反应器中,尽管反 应器的运行参数不变,功能稳定,但其细菌群落结构 却发生了显著的变化^[13,14],Wittebolle等^[15]研究表

收稿日期:2009-07-06;修订日期:2009-08-31

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAC19B01-02);国家水体污 染控制与治理科技重大专项(2008ZX07313-3)

作者简介:王晓慧(1980~),男,博士研究生,主要研究方向为微生物群落结构与功能,E-mail: wangxiaohui05 @ mails. tsinghua.edu.cn

^{*} 通讯联系人, E-mail:xhwen@tsinghua.edu.cn

明在小试反应器中,功能稳定并不一定耦联着稳定 的细菌群落结构.但对实际城市污水处理厂中,微生 物群落结构与功能稳定性的研究还很少.而基于岛 屿生物地理学的平衡模型表明,生物反应器的规模 会影响微生物群落结构的稳定性^[3],因此,目前还 未知在规模较大的城市污水处理厂中,稳定的功能 是否藕联着稳定的群落结构.

本研究的目的是利用现代分子生物学诊断技术 T-RFLP,分析稳定运行的城市污水处理厂中细菌群 落结构的动态变化,以判断污水处理厂中稳定的功 能是否耦联着稳定的微生物群落结构,以期为污水 处理系统的稳定运行提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 污水处理系统及采样

活性污泥样品采集于北京市某个污水处理厂的 2 个污水处理系统中,分别表示为系统 A 和系统 B. 系统 A 和系统 B 处理相同水质,处理规模均为 548 m³/d,但系统 A 为厌氧/缺氧/好氧(A^2O)工艺,而 系统 B 为缺氧/厌氧/好氧(倒置 A^2O)工艺.在研究 期间内,2 个污水处理系统的 HRT 均为 14 h,SRT 均为 15 d,污泥浓度(MLSS)均控制在 2~3 g/L.

所有活性污泥样品均采集于 2007 年 9 ~ 12 月, 每 15 d 采样 1 次. 具体的采样点为每个系统好氧区 的末端,每个样品 1.5 mL,样品采集后立即置于冰 上,运至实验室. 离心(12 000 r/min)弃上清后, -20℃保存.

1.2 DNA 提取

采用 FastDNA[®] Spin Kit for Soil 试剂盒 (Qbiogene,美国)提取活性污泥中的总 DNA. 活性 污泥样品首先用灭菌高纯水离心(12 000 r/min)清 洗 2 遍后,再按照试剂盒产品说明书提取总 DNA.

1.3 PCR 扩增

对于细菌 16S rRNA 基因的扩增,选用细菌的 通用引物对 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGT2TACCTTGTTACGACTT-3')^[16].其中正向引物 8F 的 5'用 FAM 荧光素标记. PCR 反应体系为 50 μ L,包括 1 μ L 模板 DNA,5 μ L 10×缓冲液,4 μ L dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L), 正反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L 和 0.25 μ L *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L, TaKaRa,日本), 35.75 μ L 灭 菌高纯水. PCR 扩增程序如下:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 60 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,共 25 个循环;72℃ 延伸 10 min.

1.4 T-RFLP 分析

采用内切酶 *Rsa* I(TaKaRa,日本)对纯化后的 细菌 PCR 产物进行酶切,酶切之后进行脱盐纯 化^[10],荧光标记的片段再在 ABI 3130 型遗传分析 仪(Applied Biosysterms,美国)中进行分离,内标为 500LIZ(Applied Biosysterms,美国),详细的实验步 骤见文献[17].取荧光强度 50 RFU 为基线,得到的 T-RFLP 图谱用 GeneMap version 3.7 进行分析.将 末端限制性片段(T-RF) > 50 bp 的峰面积进行标准 化处理,计算相对应 T-RF 的丰度.

采用移动窗口分析法(moving-window analysis)^[18]分析群落结构的动态变化. 其步骤为: 首先采用 Pearson 相关系数,计算所有样品 T-RFLP 图谱之间的相似矩阵,然后以时间为横坐标,每2个 连续样品(第x d 与第x – 15 d)的相关系数为纵坐 标作图,这样即可图示样品群落结构的动态变化. 采 用 $\Delta t_{(15 d)}$ ^[15]表示细菌群落结构的变化速率,其值为 100%减去对应的2个图谱之间的 Pearson 相关 系数.

采用洛伦兹曲线(Lorenz curve)^[15] 图示微生物 在群落中分布的均匀度.具体步骤为:首先将每个图 谱中的峰(即 T-RF)按照相对丰度从高到低排列,然 后以 T-RF 的累积个数为横轴,以 T-RF 的累积相对 丰度为纵轴作图,即可绘出洛伦兹曲线图.越远离理 论完美曲线(45°斜线)的洛伦兹曲线,表示其群落 均匀度越差.本研究采用帕累托法则(Pareto principle)^[15]来评价洛伦兹曲线,即通过横轴 20% 处对应的纵轴值来评价群落的均匀度.

1.5 其它分析方法

BOD:经典稀释方法^[19];TN:过硫酸钾氧化-紫 外分光光度计法^[19];污泥浓度:标准重量法^[19].

2 结果与分析

2.1 污水处理系统的运行效果

系统 A 的进出水 BOD 和 TN 如图 1 所示,尽管 进水 BOD 在 100 ~ 250 mg/L之间波动,但出水非常 稳定,一直在 8 mg/L左右,平均 BOD 去除率为 95%.进水 TN 有些波动,在第 45 d 之前,一直维持 在 40 mg/L左右,在第 45 d 之后,升高到了 60 mg/L 左右.但出水 TN 较稳定,基本维持在 25 mg/L之下. 稳定的 BOD 及 TN 出水浓度,表明系统 A 功能 稳定.

系统 B 的运行效果见图 2,系统 B 和系统 A 进 水 BOD 和 TN 相同,出水 BOD 也一直在 8 mg/L左



图 1 系统 A 进出水 BOD 及 TN 浓度

Fig. 1 Influent and effluent BOD and TN concentration of system A



图 2 系统 B 进出水 BOD 及 TN 浓度 Fig. 2 Influent and effluent BOD and TN concentration of system B

右,平均 BOD 去除率为 95%. 出水 TN 比系统 A 稍低,基本在 23 mg/L之下. BOD 及 TN 的出水浓度, 表明系统 B 功能稳定.

2.2 群落结构的动态变化.

系统 A 及系统 B 的群落结构动态变化见图 3. 图 3 中每种颜色的柱状体代表一种 T-RF,柱状体的 高度代表 T-RF 的相对丰度. 可以看出,在研究期间 内,系统 A 中的细菌群落结构发生了显著变化,特 别是 115、118、123、471、482 和 835 bp 等 T-RF. 115 bpT-RF 在第0 d时,相对丰度为 2.9%,随后逐 渐增加,到第45d时达到了12.7%,之后又逐渐下 降,在第105 d时下降到了 6.2%.118 bp的 T-RF 在 第0 d 时, 未检测到该 T-RF 存在, 从第 15 d 的 2.9% 起,逐渐增加,到第60d时达到了最大值 10.5%, 之后又逐渐下降, 第115 d 降到了4%. 128、 123 和 471 bpT-RF 的相对丰度,也经历了先增加后 降低的变化,最低相对丰度分别为0%、0%和3%, 最高相对丰度分别为 10.5%、8.1% 和 13.7%.482 bp 的 T-RF 在第 0 d 时,相对丰度最高为 16.9%,之 后逐渐下降,到第45 d之后,基本维持在5% 左右.

835 bp T-RF 在 1%~10.7% 之间波动.

系统 B 的群落也发生了显著的变化.如123、 471、750和835 bp等.在第0d时,未检测到118 bp T-RF的存在,第15d时,其相对丰度为1.9%,之后 其相对丰度波动上升,最后在第105d达到了最大 值16%.750 bp T-RF的相对丰度在第0d时最大, 为12.1%,之后逐渐下降,第105d达到了最低值 1.8%.123和835 bp的相对丰度分别在0%~ 5.8%和1.1%~6.5%之间波动.

采用移动窗口分析法,定量分析了群落结构的 动态变化.如图 4 所示,系统 A 的相关系数基本在 70%~85%之间,相应的变化则为 15%~30%,平 均变化率 $\Delta t_{(15 d)}$ 为 21.5% ±5.7%.系统 B 的相关 系数在 70%~85%之间,相应的变化则为 15%~ 30%,平均变化率 $\Delta t_{(15 d)}$ 为 22.6% ±5.0%.

为了分析群落内微生物分布的均匀度,分别对 系统 A 和系统 B 在第 0、60 和 105 d 的群落结构建 立了洛伦兹曲线,见图 5. 在横轴的累积 T-RF 含量 为 20% 时,系统 A 在第 0、60 和 105 d 的累积相对 丰 度分别为49%、50% 和43%;系统 B在第0、60



图 3 系统 A 及系统 B 中 T-RF 相对丰度的柱状图





图 4 细菌群落动态变化的移动窗口分析

Fig. 4 Moving-window analysis for the dynamics of bacteria communities



图 5 细菌群落结构的洛伦茨曲线图

Fig. 5 Lorenz curves analysis of bacteria community structures

和 105 d 的累积相对丰度分别为 52%、48% 和 47%.

3 讨论

为了研究功能稳定的城市污水处理系统中是否 耦联着稳定的细菌群落结构,本研究采用 T-RFLP 方法分析了 2 个污水处理系统中,细菌群落结构在 105 d 中的动态变化.结果表明,2 个功能稳定的城 市污水处理系统中,细菌的群落结构均发生了显著 的变化.

移动窗口分析法表明,系统 A 的平均变化率 $\Delta t_{(15 \text{ d})}$ 为 21.5% ± 5.7%,系统 B 的平均变化率 $\Delta t_{(15 \text{ d})}$ 为 22.6% ± 5.0%. Wittebolle 等^[15] 采用 DGGE 方法,分析了功能稳定的 SBR 及 MBR 小试 反应器中细菌群落结构的动态变化,结果表明 $\Delta t_{(7 \text{ d})}$ 分别为 9.6% ± 4.9% 和 13.4% ± 4.8%,该 值小于本研究中的细菌群落变化率.这可能是因为 Δt 的时间间隔不同,本研究为 15 d,而 Wittebolle 等 的研究为 7 d. 另外,2 个研究分别采用了 DGGE 和 T-RFLP 方法,也可能影响群落结构的变化率.

洛伦兹曲线表明,在系统 A 中 20% 的微生物第 0、60 和 105 d 的累积相对丰度分别为 49%、50% 和 43%;系统 B 在第 0、60 和 105 d 的累积相对丰 度分别为 52%、48% 和 47%.这表明在 2 个系统 中,少数种类的微生物发挥了重要的作用.其它相对 丰度较小的微生物,可能作为功能储存,在环境条件 改变到适合的时候,可以迅速繁殖成为优势种 群^[15].

有研究表明,在功能稳定的小试生物反应器中, 细菌的群落结构发生了显著的变化^[13-15].基于岛屿 生物地理学的平衡模型预测,规模越大的生态系统, 微生物群落结构越趋向于稳定^[3].本研究表明,在 城市污水处理厂规模的,功能稳定的生态系统中,微 生物的群落结构也发生了显著变化. Marzorati 等^[20] 认为在一个稳定的生态系统中,微生物群落结构也 必须经历一定程度的动态变化,使新的物种进入系 统而不影响系统功能的稳定.

Briones 等^[3]认为生态系统的功能稳定本质上 并不是微生物群落结构所决定,而是功能冗余,即生 态系统中,存在许多具有相同功能的物种,这些物种 中必然有些是冗余种,冗余种的去除不会使群落发 生改变,但并不意味着冗余种是不必要的,随着环境 条件的改变,那些冗余种在新的环境下可以变为优 势种或关键种,从而维持原有生态系统的稳定,可以 说冗余是对生态系统功能丧失的一种保险.

4 结论

(1) T-RFLP 分析表明,在功能稳定的 2 个城市 污水处理系统中,细菌的群落结构均发生了显著的 变化,系统 A 中,115、118、123、471、482 和 835 bp 等的 T-RF 变化显著,系统 B 中,123、471、750 和 835 bp 等的 T-RF 变化显著.

(2)移动窗口分析法表明,系统 A 中,细菌群落 结构的平均变化率 $\Delta t_{(15 \text{ d})}$ 为 21.5% ±5.7%,系统 B 中,细菌群落结构的平均变化率 $\Delta t_{(15 \text{ d})}$ 为 22.6% ± 5.0%.

(3)洛伦兹曲线分析表明,在系统 A 中 20% 的 微生物,在第0、60 和 105 d 的累积相对丰度分别为 49%、50%和 43%;系统 B 中,20% 的微生物在第 0、60 和 105 d 的累积相对丰度分别为 52%、48% 和 47%.

参考文献:

- Gentile M E, Jessup C M, Nyman J L, et al. Correlation of functional instability and community dynamics in denitrifying dispersed-growth reactors [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(3): 680-690.
- [2] Rittmann B E, Hausner M, Loffler F, et al. A vista for microbial ecology and environmental biotechnology [J]. Environ Sci Technol, 2006, 40(4): 1096-1103.
- Briones A, Raskin L. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability [J]. Current Opinion Biotechnol, 2003, 14 (3): 270-276.
- [4] Curtis T P, Head I M, Graham D W. Theoretical Ecology for engineering biology [J]. Environ Sci Technol, 2003, 37 (3): 64A-70A.
- [5] Eschenhagen M, Schuppler M, Roske I. Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents [J]. Water Res, 2003, 37(13): 3224-3232.
- [6] Osborn A M, Moore E R B, Timmis K N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics [J]. Environ Microbiol, 2000, 2(1): 39-50.
- [7] Regan J M, Harrington G W, Noguera D R. Ammonia-and nitrite-oxidizing bacterial communities in a pilot-scale chloraminated drinking water distribution system [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(1): 73-81.
- [8] Mintie A T, Heichen R S, Cromack K, et al. Ammoniaoxidizing bacteria along meadow-to-forest transects in the oregon cascade mountains [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(6): 3129-3136.
- [9] Park H D, Noguera D R. Evaluating the effect of dissolved oxygen

学

on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge [J]. Water Res, 2004, **38**(14-15): 3275-3286.

- [10] Bernhard A E, Donn T, Giblin A E, et al. Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system [J]. Environ Microbiol, 2005, 7(9): 1289-1297.
- [11] Yeager C M, Northup D E, Grow C C, et al. Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(5): 2713-2722.
- [12] Cabezas A, Draper P, Muxi L, et al. Post-treatment of a slaughterhouse wastewater: stability of the microbial community of a sequencing batch reactor operated under oxygen limited conditions [J]. Water Sci Technol, 2006, 54(2): 215-221.
- [13] Fernandez A, Huang S Y, Seston S, et al. How stable is stable?
 Function versus community composition [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(8): 3697-3704.
- [14] Zumstein E, Moletta R, Godon J J. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation

polymorphism analysis [J]. Environ Microbiol, 2000, 2(1): 69-78.

- [15] Wittebolle L, Vervaeren H, Verstraete W, et al. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors
 [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(1): 286-293.
- [16] Galkiewicz J P, Kellogg C A. Cross-Kingdom Amplification Using Bacteria-Specific Primers: Complications for Studies of Coral Microbial Ecology [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74 (24): 7828-7831.
- [17] 王晓慧,文湘华,杨宁宁,等. 污水处理工艺对氨氧化菌及细菌群落的影响 [J]. 中国环境科学,2009,29(6):622-628.
- [18] Possemiers S, Verthe K, Uyttendaele S, et al. PCR-DGGEbased quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2004, 49(3): 495-507.
- [19] 国家环境保护总局.水和废水监测分析方法 [M].(第四版).北京:中国环境科学出版社,2002.
- [20] Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, et al. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology [J]. Environ Microbiol, 2008, 10(6): 1571-1581.