

PCR-DGGE 技术在城市污水化学生物絮凝处理中的特点

王峰,傅以钢,夏四清,杨殿海

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

摘要:通过 PCR-DGGE 等分子生物学技术可以不经常规培养直接从活性污泥和生物膜样品中提取 DNA,对 16S rDNA V3 区进行 PCR 扩增,结合 DGGE(变性梯度凝胶电泳),从而分析活性污泥与生物膜中微生物种群结构.研究证实,活性污泥培养前后微生物种群结构发生很大的改变.同时对 2 种污水处理工艺中微生物种群结构进行了对比研究,对同一反应器不同位置微生物分布以及不同工况下的微生物种群结构进行了初步探讨.测定了活性污泥中部分菌种的 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,初步确定细菌的属.结果显示,PCR-DGGE 结合测序技术是一种完全可行的快速进行环境学样品微生物研究的分析方法.

关键词:聚合酶链式反应;浓度梯度凝胶电泳;微生物结构;活性污泥;生物膜

中图分类号:X703.1 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2004)06-0074-06

Characteristics of Municipal Sewage Chem Biofloculation Treatment Process by Using PCR-DGGE Technology

WANG Feng, FU Yi-gang, XIA Si-qing, YANG Dian-hai

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

Abstract: It is reported that without cultivation, DNA could be directly extracted from environmental samples with molecular biological methods, such as polymerase chain reaction (PCR) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). To analyze the community diversity of activated sludge and bio-film in the municipal sewage, work was done to directly extrude crude DNA from activated sludge and bio-film samples, separate and amplify 16S rDNA by PCR and sequence it with DGGE. The results show the significant microbe community difference between cultivated and uncultivated activated sludge. Further research on the community diversity of two different sewage treatment processes was done and initial discussion on the microbial distribution in the same reactor and microbial structure in different experimental conditions was carried out. The sequences of several 16S rDNA DGGE fragments were determined and some possible bacteria were confirmed in comparison in GeneBank (NCBI). The results show that the PCR-DGGE technology combined with sequences determination is a feasible and efficient method for microorganism analysis in environmental sample.

Key words: PCR; DGGE; community diversity; activated sludge; bio-film

利用微生物降解污染物已经成为水污染处理领域中最重要方法之一.因此污水处理工艺中微生物的组成结构、数量以及多样性的分析对于研究生化反应的机理、污染物降解和转化途径具有非常重要的学术价值,并为达到优化工艺运行条件,提高污染物处理效率目的提供理论依据.

传统的显微镜观察和培养分离技术可分离取得单一菌株进行鉴定分析,但是这种方法受到微生物可培养性的限制,实际分离出的菌株往往只占样品中微生物种类很小的一部分.同时对于环境样品的培养分离周期一般较长,工作量大.应用 PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 方法对环境微生物进行研究,就可以不经过培养,直接从样品里提取细菌的

DNA,再将编码有 16S rDNA 的基因进行扩增,通过这种方法能够直接了解样品中细菌分布结构,并能大致比较相同条件下单一菌群的生物量.目前,将分子生物学技术应用于环境领域的研究已成为国内外研究的热点.

传统的城市污水处理工艺主要依赖于以生物降解作用,水力停留时间相对较长.而城市污水化学生物絮凝强化一级处理是利用化学混凝和生物絮凝联合作用强化沉淀的污水处理工艺.生物强化一级处理一般由一个停留时间较短(30 min 左右)的曝

收稿日期:2003-12-12;修订日期:2004-02-16

基金项目:国家高技术研究发展规划(863 计划)项目
(2002AA601320)

作者简介:王峰(1978~),男,籍贯江苏扬州,现为同济大学在读博士生,主要研究领域为环境工程微生物学

气池和沉淀池构成. 工艺中采用空气混合絮凝反应和污泥回流, 利用外加的化学絮凝沉淀剂和污水中的天然生物絮凝剂, 将化学絮凝强化处理与生物絮凝强化处理相结合, 充分发挥生物絮凝的絮凝吸附作用以及化学絮凝对颗粒状和胶体状物质的去除作用, 可达到经济有效地高程度去除磷酸盐与 SS、中等程度地去除 COD、BOD 的目的^[1,2]. 本研究应用 PCR-DGGE 技术分析了该种工艺与传统的完全混合式处理工艺反应池活性污泥样品在菌群结构上的差别, 同时对中试装置化学生物反应池中的不同位置微生物以及悬浮填料床中微生物种群进行了初步分析.

1 材料和方法

1.1 材料

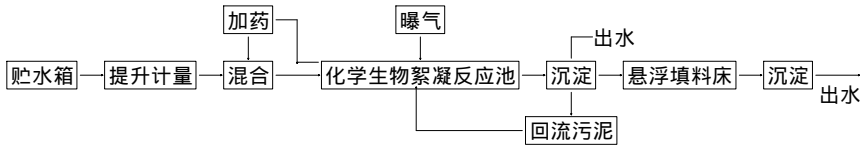


图 1 化学生物絮凝处理工艺中试装置 (50t/d)

Fig. 1 The pilot plant (50t/d) in Shanghai Zhuyuan wastewater treatment plant

(2) 取传统处理工艺曝气池污泥混合液 1 mL 用无菌水稀释 100 倍后振荡打碎絮体, 取 1 mL 接种到营养肉汤培养基中^[3], 置于摇床 120r/min, 32℃ 培养 4d 后将培养液 5000r/min 离心 20 min, 取沉淀用于 DNA 提取. 样品名称为样品 II.

(3) DNA 抽提缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)^[4], 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0)^[4], 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)^[4]. TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6^[4], 1 mmol/L EDTA (乙二胺四乙酸二钠), pH 8.0. PCR 引物被用于细菌 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增

(1) 活性污泥和生物膜样品分别取自上海曲阳污水处理厂曝气池混合液和上海竹园污水处理厂污水处理中试装置曝气池混合液以及试验装置硝化悬浮填料床顶端填料. 上述 2 个污水处理工艺, 均用以处理城市生活污水, 其进水成分相近. 上海曲阳污水处理厂采用传统的完全混合式处理工艺 (以下称传统处理工艺), 上海竹园污水处理厂污水处理中试装置中 (以下称化学生物絮凝处理工艺) 曝气池采用微孔曝气管曝气, 分 3 段推流回转式布置, 阶梯式速度梯度变化, 每段可独自调节曝气量以改变速度梯度. 后续脱氮采用悬浮填料接触氧化生物工艺, 用高比表面积型填料, 设计水力停留时间 1~2h, (中试装置见图 1). 针对 2 个典型的工况进行取样, 取样条件以及运行参数见表 1.

(P1 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', P2 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCCCATACGGGAGGCAGCAG-3'), 其中 GC 钳是为满足 DGGE 的温度而加^[4]. 由上海博亚生物工程技术有限公司合成. 电泳所用 Marker 为 Bebc0 DNA3000-100bp Marker.

(4) 活性污泥混合液 5000r/min 离心 20 min, 取沉淀放置于 -30℃ 冰冻储存用于 DNA 提取. 将悬浮填料床中填料上的生物膜用无菌刷刷取到装有无菌水的烧杯中, 取杯中混合液 5000r/min 离心 20 min, 沉淀 -30℃ 冰冻保存用于 DNA 提取.

表 1 取样位置和条件

Table 1 The positions and process conditions for sampling

取样装置	传统处理工艺	化学生物絮凝污水处理中试装置			
		工况 A		工况 B	
样品名称	样品 I	样品 III	样品 IV	样品 V、VI、VII	样品 VIII
样品类型	活性污泥	活性污泥	填料生物膜	活性污泥	填料生物膜
取样位置	曝气池	化学生物絮凝反应池第 1 廊道	悬浮填料床	化学生物絮凝反应池 1、2、3 廊道	悬浮填料床
进水	COD	320	263	126	
/mg·L ⁻¹	NH ₃ -N	28.0	26.0	24.1	
	TP	3.5	4.1	2.01	
	SS	174	156	60	
运行条件	DO	2.1 mg/L	1、2、3 廊道分别为 1.7 mg/L、1.5 mg/L、1.3 mg/L	1、2、3 廊道分别为 2.5 mg/L、2.2 mg/L、1.6 mg/L	
	pH	7.2	6.8~7.3	6.6~7.3	
	絮凝剂	无	投加聚合氯化铝 80 mg/L	投加聚合氯化铝 120 mg/L 助凝剂 PAM0.5 mg/L	

1.2 实验方法

(1) DNA 提取方法^[6~8] 从样品中提取总 DNA 方法:于离心所得菌体加入 13.5 mL DNA 抽提缓冲液和 100 μ L 蛋白酶 K (10 mg/ mL). 转移至三角烧瓶中,放置于 37 $^{\circ}$ C, 225 r/ min 摇床 30 min. 加入 1.5 mL 20% SDS(十二烷基硫酸钠)^[4], 65 $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 每隔 15 ~ 20 min 轻轻摇动一次. 所得产物于室温下 5000 r/ min 离心 10 min, 取上清液待用. 在沉淀中加入 4.5 mL DNA 缓冲液, 0.5 mL 20% SDS, 用玻璃棒小心搅匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 离心 10 min. 重复此步骤 1 次, 3 次所得上清合并, 均匀混合. 于上清液中加入等体积氯仿/ 异戊醇(体积比 24: 1), 5 000 r/ min 离心 10 min, 取水层; 再加入 0.6 体积的异丙醇, 室温放置 1 h, 9000 r/ min 室温离心 20 min, 取沉淀溶解于 500 μ L pH 7.6 的 TE 缓冲液中.

(2) PCR 扩增程序^[6~8] 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 45 s, 60 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C, 90 s, 30 cycles; 72 $^{\circ}$ C, 10 min. PCR 反应体系为无菌双蒸水 39 μ L, 10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ L, 2.5 mmol/ L dNTP 溶液 1 μ L, 10 mmol/ L 引物 P1、P2 各 1 μ L, Taq 酶 1 个单位, 样品 DNA 溶液 2 μ L.

(3) 提取总 DNA 及 PCR 检测 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行电泳检测

(4) PCR 产物浓缩 合并数管纯化产物, 用 Parafilm 膜封口, 置于 - 70 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻过夜保存, 取出后用冷冻抽干机处理 4 h, 将得到的干粉溶解于 30 μ L pH 7.6 TE 中, 保存于 - 20 $^{\circ}$ C 冰箱.

(5) PCR 产物进一步用 DGGE(变性梯度凝胶电泳)电泳分离 凝胶变性梯度 30% ~ 60%, 150 V, 电泳缓冲液为 1 \times TAE^[4], 60 $^{\circ}$ C, 电泳时间 5 h. 用溴乙锭染色后, 在紫外灯下割下含目的 DNA 条带的凝胶块. 转移到微量离心管中, 用吸头挤碎, 加入 30 μ L TE pH 7.6 溶解. 重新进行 PCR 扩增, 步骤参照(2). 送上海博亚生物公司测序.

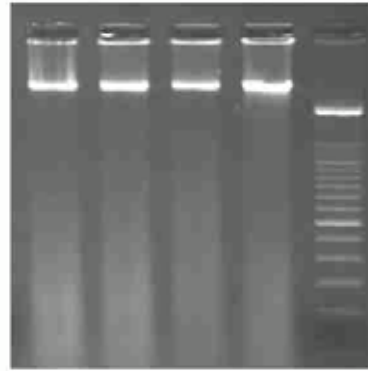
2 结果与讨论

2.1 活性污泥、生物膜和培养后菌落样品总 DNA 提取结果

从 8 个样品中提取的 DNA 通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检验(图 2、图 3). 通过 Smart View 软件分析提取出的 DNA 片段大小约为 5 ~ 6 kb.

环境样品由于组成复杂, 能否顺利提取目标 DNA 片段是能否采用 PCR-DGGE 技术进行分析的前提. 电泳结果显示, 采用文中的提取方法可以顺利

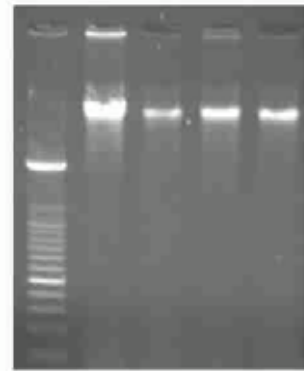
提取出样品中的 DNA 片段.



1. Marker; 2. Sample I; 3. Sample II; 4. Sample III; 5. Sample IV

图 2 传统处理工艺和化学生物絮凝处理工艺装置工况 A 样品提取的 DNA

Fig. 2 Extracted DNA from Sample I, II, III, IV



1. Marker; 2. Sample V; 3. Sample VI; 4. Sample VII; 5. Sample VIII

图 3 化学生物絮凝处理工艺装置工况 B 样品提取的 DNA

Fig. 3 Extracted DNA from Sample V, VI, VII, VIII

2.2 总 DNA 的 16S rDNA 片段扩增结果

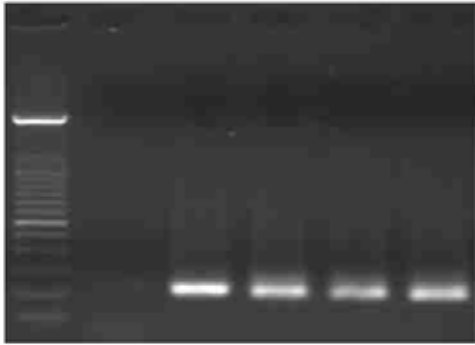
将提取出的 DNA 进行 16S rDNA 片段 PCR 扩增, 结果用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检验, 扩增出的 DNA 片段大小为 220 ~ 240 bp. 证实为 16S rDNA V3 区特异性片段(图 4、图 5).

2.3 变性梯度凝胶电泳分离扩增的 16S rDNA 片段结果

合并 6 管 PCR 样品(每管 50 μ L) 进行变性梯度凝胶电泳(图 6). 可以看出在活性污泥与生物膜样品中微生物多样性相当丰富.

传统的培养方法会对样品中微生物种群的结构造成相当大的改变. 通过曲阳污水处理厂活性污泥培养前后的对比可以看出(图 6a), 未经培养的样品(Sample I) 与经过培养的样品(Sample II), 细菌种

群的结构和数量都发生了很大的改变.培养过程中,由于生存环境的变化,营养物质充足,很多原来并不占优势的菌种在生物量上都得到了相当的增长.未经培养污泥样品中,原来数量上占优的菌种,一部分在培养后数量依然较多,而某些菌群数量则发生了锐减.



1. Marker; 2. Negative control ;3. Sample I ;
4. Sample II ;5. Sample III; 6. Sample IV

图 4 传统处理工艺和化学生物絮凝处理
工艺装置工况 A 样品 DNA 的 PCR 产物

Fig.4 Extracted DNA from Sample I , II III, IV

化学生物絮凝处理工艺反应池污泥样品(Sample III)与传统处理工艺曝气池污泥样品(Sample I)比较发现,2 种城市污水处理工艺中微生物多样性都相当丰富,但是种群结构相差很大(图 6b).



1. Marker;2. Negative control ;3. Sample V ;
4. Sample VI;5. Sample VII; 6. Sample VIII

图 5 化学生物絮凝处理工艺装置工况 B
样品 DNA 的 PCR 产物

Fig.5 Extracted DNA from Sample V , VI VII, VIII

这说明,在成分相近的城市生活污水中,不同的处理工艺中微生物种群结构差异相当明显.化学生物絮凝处理工艺的微生物作用与成分相近的城市污水处理工艺中微生物作用机理可能存在相当大的差别.通过 Smart View 软件分析,本试验化学生物絮凝处理工艺装置中活性污泥样品 DGGE 结果包含的细菌种类多于传统处理工艺曝气池污泥样品,说明在化学生物絮凝处理工艺的运行中,微生物对污染物的降解也起到了很大作用.部分优势菌种测序结果也显示其中一些为好氧菌群(表 2 Band 1).

化学生物絮凝处理工艺装置 2 个典型工况的活

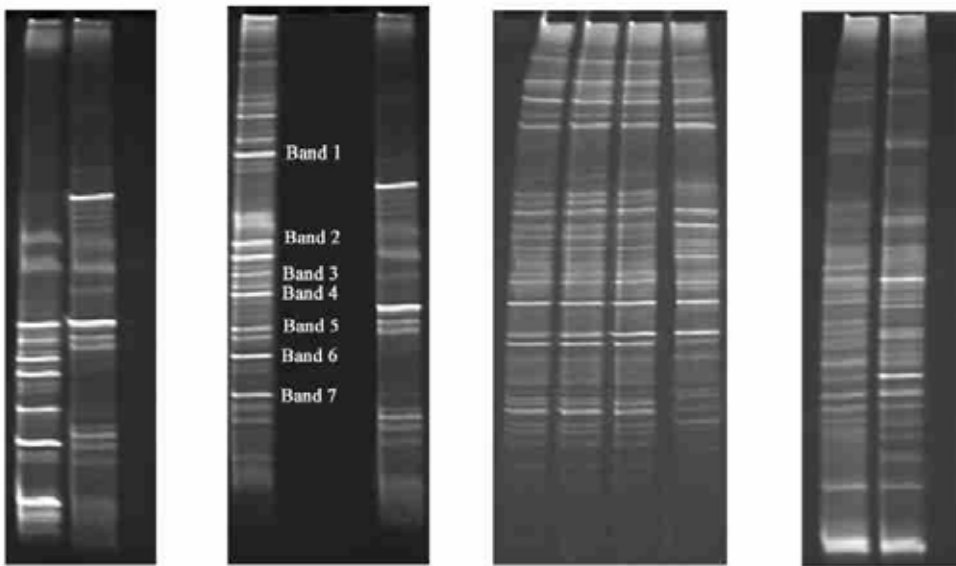


图 6 16S rDNA 片段 DGGE 分离结果

Fig.6 16S rDNA separated by DGGE

性污泥取样结果显示,在进水 COD、TP、SS 发生明显改变,同时絮凝剂加药量发生改变的情况下,2 种工况反应池污泥中微生物的结构相差不大,表明在微生物对于不同的进水变化和药剂投加量改变适应性较好,工艺运行较为稳定.在第 2 种工况下,化学生物絮凝池 3 个廊道内活性污泥样品(Sample V、VI、VII)中微生物的结构差异很小,3 种污泥样品中微生物种群结构基本相同,表明细菌在反应器不同位置的分布相当均匀.2 种工况下悬浮填料床生物

膜微生物种群结构的对比(Sample IV、VIII)结果显示(图 6d),少数细菌的种类与数量发生了改变,但总体来说相差不大.说明悬浮填料床微生物种群结构受工艺的影响较反应池明显,不过基本上保持稳定.

2.4 部分优势菌群的 16S rDNA 片段测序结果及入库比对

将化学生物絮凝处理工艺装置工况 A 活性污泥样品割胶后的几条片段 Band 1 ~ 7(见图 6b)进行 PCR 扩增并进行测序,结果输入 NCBI 基因库比对.

表 2 部分优势菌 16S rDNA DGGE 片断测序分析结果

Table 2 The sequences of several 16S rDNA DGGE fragments

测定样品	NCBI 比对结果	查询号
Band 1	<i>Arcobacter</i> sp. A3b2(98.5%)	1070783726-12118-45912774990.BLASTQ3
	<i>Arcobacter</i> sp. D1a1(98.5%)	
	<i>Arcobacter</i> sp. B4b1(98.5%)	
	<i>marine bacterium</i> MSC2(98.5%)	
	<i>Arcobacter</i> sp. KT0913(98.5%)	
Band 2	<i>uncultured eubacterium</i> WJGRT-117(96.3%)	1070783811-12475-105422660727.BLASTQ3
	<i>uncultured epsilon proteobacterium</i> (90.0%)	
	<i>Sulfurospirillum</i> sp. JPD-1(89.2%)	
	<i>uncultured proteobacterium</i> (89.2%)	
Band 3	未能找到全片段同源性较高的微生物种类,可能为新发现的菌种	1070784025-13442-182563779494.BLASTQ3
Band 4	<i>uncultured bacterium</i> PHOS-HD43(90.5%)	1070784105-17916-151282444648.BLASTQ3
	<i>Acinetobacter</i> sp. DVL00/879(90.5%)	
	<i>Acinetobacter</i> sp. IrT-R5 M2-138(90.5%)	
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (90.4%)	
	<i>Acinetobacter</i> sp. GOBB3-C107(89.9%)	
Band 5	<i>Acinetobacter parvus</i> (97.5%)	1070784154-13943-149682629269.BLASTQ3
	<i>Acinetobacter</i> sp. Ni38(96.9%)	
	<i>Acinetobacter</i> sp. An9(96.9%)	
	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (96.9%)	
	<i>Acinetobacter genomosp.</i> C1(96.3%)	
Band 6	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (94.9%)	1070784193-14091-122346313168.BLASTQ3
	<i>bacterium</i> K87(94.9%)	
	<i>Acinetobacter</i> sp. LBV326(94.3%)	
	<i>Acinetobacter</i> sp. ADPI(93.0%)	
	<i>Acinetobacter</i> sp. DSM 586(93.0%)	
Band 7	<i>Sphaerotilus</i> sp. L12.6.7.8.12.13.19(96.4%)	1070784248-18296-158658938339.BLASTQ3
	<i>Leptothrix</i> sp. L4.5.10.11.16.17.18(95.8%)	
	<i>Sphaerotilus</i> sp. IF14(95.2%)	
	<i>beta proteobacterium</i> A0640(95.2%)	
	<i>Leptothrix</i> sp. L14(95.2%)	

3 结论

(1) 通过对人工培养活性污泥和工艺中直接取得的污泥进行对比,发现由于环境条件的改变,活性污泥中菌群结构发生了很大改变.在人工培养条件下,由于温度适合、养分充足,所以细菌总的数量很

多,许多原来在活性污泥中数量不占优势的细菌大量繁殖,但是也由于生存竞争的原因,许多原本在活性污泥中存在的细菌就被淘汰了.因此活性污泥中菌群结构变化明显.这说明环境条件对活性污泥中菌群结构的影响很大,通过人工培养活性污泥增加细菌数量,从而达到在工艺中应用目的的思路是不

充分的。

(2) 本实验通过对传统城市污水处理工艺和化学生物絮凝处理工艺运行工况的比较,发现进水成分的相近并没有使活性污泥具有相同或者相似的菌群结构。原本认为初始条件和工艺运行条件相同或相似会导致活性污泥中微生物菌群结构类似的想法是不完全的。这说明活性污泥在工艺运行过程中,本身受到工艺运行环境的影响并被驯化,而在工艺运行达到稳定的状态时,活性污泥中的微生物种群结构也逐渐趋于稳定,从而形成了针对性较强的、适应于该工艺运行环境和条件的最佳菌群结构。初始进水成分的不完全相同和所含有有机物量的不同能够造成活性污泥中菌群结构的差异。

(3) 通过对化学生物絮凝处理工艺中不同位置的细菌 16S rDNA 序列的比较,发现在投加絮凝剂的反应池里,菌群在池中不同位置的分布都比较均匀,化学絮凝剂的投加对环境中的细菌结构并未产生很大的影响。在工艺运行稳定的情况下,微生物对外部环境条件的适应性比较好,而且菌群结构稳定。但是随着反应条件向脱氮反应转化,即由均一的水溶液生长环境转换为附着生物膜的生长环境时,菌群结构也有所改变,某些细菌个体种类在数量上显示出明显的差异(图 6d、图 6c)。悬浮填料床内的微生物菌群结构相对来说也比较稳定,受工艺运行条件影响不大,某些细菌的数量有比较明显的变化(图 6d)。

(4) 通过对化学生物絮凝池活性污泥中优势菌种 16S rDNA 序列的分析,可以看出这些优势菌种大多属于好氧菌群(表 2),基本上可以分为 *Acinetobacter* 属和 *Arcobacter* 属 2 大支。

由于环境学样品中样品成分相当复杂,微生物多样性相当丰富,使得对环境学样品的微生物分析比较困难。通过常规的培养分离进行分析工作量大,并且其结果受到微生物可培养性的限制。相对而言,

利用 PCR-DGGE 分子生物学技术进行环境样品的结构、多样性分析以及菌种鉴定更加迅速,结果更加准确,在不需取得菌种的情况下,是完全可行的研究方法。

同时这种方法也可以与常规培养分离技术结合,结合 2 种方法的优点,可在某些研究领域(如在特殊降解菌的分离筛选)取得更加高效准确的结果。目前利用 PCR-DGGE 分子生物学技术进行环境学样品的分析主要处于定性分析,准确的定量研究还较难进行。由于样品中微生物种类相当多,对于结果的分析也造成了一定的困难,因此,对于这种方法的进一步发展,还有相当的工作要做。

参考文献:

- [1] 尤作亮,蒋展鹏,祝万鹏,师绍琪.城市污水强化一级处理的研究进展[J].中国给水排水,1998,14(5):28~31.
- [2] 张智,邱维,张国庆.城市污水强化一级处理技术及发展趋势[J].重庆环境科学,2001,23(1):46~49.
- [3] 周群英,高廷耀.环境工程微生物学.第二版[M].北京:高等教育出版社,2000.330~332.
- [4] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T 著,金冬雁,等译.分子克隆试验指南.第二版[M].北京:科学出版社,1996.919~929.
- [5] Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, *et al.* Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol degrading bacteria in activated sludge[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64(11):4396~4402.
- [6] 陈灏,唐小树,林洁,等.不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究[J].微生物学报,2002,42(4):478~483.
- [7] 高平平,赵立平,等.可用于微生物群落分子生态学研究的活性污泥总 DNA 提取方法研究[J].生态学报,2002,22(11):2015~2019.
- [8] He mant J Purohit, Atya Kapley, Aditi A Moharikar, Guppreet Narde. A novel approach for extraction of PCR compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52:315~323.