

ERIC-PCR 图谱分析生物栅填料生物膜微生物群落结构

李华芝, 李秀艳*, 赵雅萍, 黄民生, 于学珍, 金承翔, 徐亚同

(上海华东师范大学资源与环境学院环境科学与技术系, 上海 200062)

摘要: 采用以填料生物膜和水生植物为主体, 以微生物、浮游植物、水生动物为要素的生物栅集成装置, 处理上海市某一富营养化水体, 实验采用 $6\text{m}^3/\text{d}$ 的中试规模, 7 个廊道并联运行, 连续进出水. 测试进出水的理化指标, 并采用 ERIC-PCR 指纹图谱技术对生物栅填料生物膜微生物进行分析. 结果显示, 生物栅技术对富营养化水体的污染物降解效果显著, 稳定运行后, 采用设置生物栅的 2~7 号净化池的 COD、总氮、氨氮、总磷的去除率较对照池分别提高了 20.7%~48.5%、20.1%~49.7%、39.8%~66.2% 和 60.0%~73.9%. 水生植物有利于水体氮、磷的吸收和去除, 设置水生植物的 2 号、5 号、6 号净化池对总氮去除率较未设置水生植物的 3 号、4 号和 7 号净化池分别提高了 30.1%、24.9%、17.6%, 总磷的去除率也都提高了 10% 以上. ERIC-PCR 指纹图谱分析显示, 设置水生植物的 3 个净化池微生物群落结构相似, 且微生物种类较未设置植物的净化池丰富. 指纹图谱在第 2d、第 15d、第 30d 的微生物多样性指数分别为 1.89~2.22、2.17~2.43 和 2.28~2.68, 平均相似系数分别为 71.8%、86.9% 和 91.0%, 表明随着系统的运行微生物多样性指数逐渐增大, 条带的相似性逐渐增加, 系统中微生物种群趋于多样化, 结构趋于稳定, 污染物降解效率也同步提高.

关键词: ERIC-PCR; 生物膜; 微生物群落结构; 富营养化水体

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)12-2542-05

Analysis of Structure Changes of Microbial Community in Medium Biofilm by ERIC-PCR Fingerprinting

LI Huazhi, LI Xiuyan, ZHAO Yaping, HUANG Minsheng, YU Xuezhen, JIN Chengxiang, XU Yatong
(Department of Environmental Science and Technology, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: A new technique, with medium biofilms and hydrophytes as main components, with microbes, plankton, hydrophytes and aquatic animals as basic ecological elements, was adopted to deal with eutrophication water in Shanghai. A pilot-scale test was carried on, with influent as $6\text{m}^3/\text{d}$, 7 ponds parallelly connected, and with continuous influent and effluent. Water qualities were analyzed and ERIC-PCR fingerprinting method was used to study the natures of biofilm microbes. The results show that, the device has obvious affection on eutrophication water pollution removal, COD, TN, NH_4^+-N and TP removal efficiencies are respectively 20.7%~48.5%, 20.1%~49.7%, 39.8%~66.2% and 60.0%~73.9% higher than those of control experiment. Water plants contribute for N and P absorption and removal, the three ponds with plants have higher TN and TP removal efficiency than the tree ones without hydrophytes, the enhanced TN removal efficiencies are 30.1%, 24.9% and 17.6% respectively. ERIC-PCR fingerprinting indicate that the three ponds with water plants have more similar microbial community structure to each other than no hydrophyte ponds, and that mean pairwise similarity coefficient value are 71.8%, 86.9% and 91.0% respectively on 2nd, 15th and 30th day, and at the same time the population diversity indexes rang from 1.89 to 2.22, 2.17 to 2.43 and 2.28 to 2.68, respectively. The above discussions conclude that the systemic population diversity indexes and structure similarity increase, biofilm microbes have gradually abundant population and stable structure, which are in accord with pollution removal efficiencies.

Key words: ERIC-PCR; biofilm; microbial community structure; eutrophication water

随着城市化和工农业生产的发展, 江河湖库水体富营养化现象日益严重, 利用生物修复技术净化富营养化水体是目前国内外的研究热点. 微生物种群结构多样性、稳定性在生物栅强化净化系统中起着重要的作用. 长久以来, 微生物群落结构的调查方法一直是建立在分离和培养的方法上, 这种方法不但费时费力, 而且对于一些培养条件要求较苛刻或未被培养的细菌往往不能达到预期效果^[1]. 因此,

建立和发展一种不依赖微生物培养的方法来进行微生物群落结构研究是非常必要的. ERIC 序列 (enterobacterial repetitive intergenic consensus

收稿日期: 2005-12-29; 修订日期: 2006-03-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2003AA601020)

作者简介: 李华芝(1979~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染控制和生物修复研究, E-mail: huazhili2003@163.com

* 通讯联系人, E-mail: xyli@des.ecnu.edu.cn

sequence) 是首先在肠道细菌基因组中发现的长为 126bp 的非编码保守重复序列^[2], 随后相继又在其它许多肠道的、非肠道的细菌中发现了 ERIC 序列. 用 ERIC-PCR 指纹图谱技术对天然微生物生态系统, 如活性污泥和动物肠道中的细菌群落进行分析, 结果表明这是一种简便快速、重复性好、能较好反映复杂微生物群落主要种群组成特征的分子监测手段^[3,4]. Giovanni 等于 1999 年首次将这种 ERIC-PCR 技术应用到混合菌群群落结构的分析研究上, 得到能够反映菌群组成差异的、重复性好而又稳定的指纹图谱^[5]. 本研究采用以填料生物膜和水生植物为主体, 以微生物、浮游生物、水生动物为要素的生物栅集成技术, 治理富营养化水体. 通过 ERIC-PCR 指纹图谱技术分析生物栅填料生物膜微生物群落结构, 通过比较污染物的降解情况, 样品的 ERIC 条带的分布、数量和亮度, 以及种群的多样性指数和相似性等信息, 探讨生物栅处理系统微生物群落结构与污染物降解的相互关系.

1 材料与方法

1.1 试验装置

试验采用 9 个并联的推流式砖混结构反应池, 前端设有平衡水箱(图 1). 平衡水箱前端设有格栅, 末端布置溢流管和放空管, 填料采用悬浮填料、组合填料和新型填料 3 种. 富营养化河水通过潜水泵抽入平衡水箱, 通过水箱上设置的管嘴流入反应池内. 反应池每格有效体积 1.47m³. 填料置于不锈钢正立方体框架内, 置于 6 个净化池内, 同时种植水生植物和放置螺类, 各池有穿孔 U 形管曝气充氧.

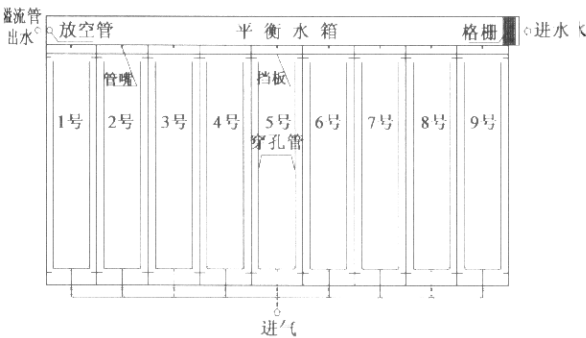


图 1 生物栅中试装置平面示意
Fig. 1 Plan of equipment

1.2 试验设计

试验时间为 2005-09-14~ 2005-10-14, 选取 1~7 号 7 条廊道进行试验, 实验设计如表 1 所示.

表 1 试验设计

Table 1 Experimental design

廊道	填料类型	填料填充率/%	填料比表面积/ m ² ·m ⁻³	植物	水力停留时间/h	曝气
1 号	无	0	0	无	12	
2 号	悬浮填料	35	285	水花生	12	间歇曝气, 每次间隔 1h, 强度 30 ~ 40 m ³ /h
3 号	悬浮填料	35	285	无	12	
4 号	组合填料	30	1 310	无	12	
5 号	组合填料	30	1 310	水花生	12	
6 号	新型填料	30	1 050	水花生	12	
7 号	新型填料	30	1 050	无	12	

1.3 进水水质

实验装置设置在上海市某一富营养化水体岸边, 通过潜水泵汲取河水作为实验进水, 连续监测试验期间进水水质, 见表 2, 表明试验水体富营养化问题十分突出^[6].

表 2 试验期间富营养化水体的水质分析

Table 2 Water quality of eutrophication water during experiment period

测定项目	范围	加权平均
透明度/cm	27.0~ 50.0	36.0
总氮/mg·L ⁻¹	5.9~ 11.6	9.1
氨氮/mg·L ⁻¹	3.0~ 9.6	6.0
COD/mg·L ⁻¹	46.3~ 98.4	53.3
总磷/mg·L ⁻¹	0.7~ 1.2	1.0
亚硝酸盐氮/mg·L ⁻¹	0.003~ 0.010	0.01
硝酸盐氮/mg·L ⁻¹	0.05~ 0.08	0.1

1.4 样品的预处理和总 DNA 的提取纯化

工况运行的第 2d、第 15 d 和第 30 d 取净化池的生物膜样品, 置于 5mL 的离心管中 9 500r·min⁻¹ 离心 10min, 弃上清液, 加 5 倍体积的 TENP(Tris 50 mmol·L⁻¹, EDTA 20 mmol·L⁻¹, NaCl 100 mmol·L⁻¹, PVP 10g) 缓冲液, 超声波振荡 3min, 9 500r·min⁻¹ 离心 5min, 收集沉淀. 如此重复, 直到上清液澄清为止. 加 5 倍体积的 PBS(1L: NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.44g, KH₂PO₄ 0.24g) 缓冲液, 振荡 5min, 9 500r·min⁻¹ 离心 5min, 收集沉淀. 如此重复, 直至上清液澄清为止.

采用标准的 CTAB-NaCl/ 破壁+ 蛋白酶 K 裂解-酚/ 氯仿/ 异戊醇, 加酚/ 氯仿/ 异戊醇抽提, 从预处理后的样品中提取细菌基因组 DNA, 干燥, 最后溶解于 TE 缓冲液(pH = 8.0), 具体步骤参照文献[7]. DNA 样品纯化采用从低熔点琼脂糖凝胶中进行回收, 详见参考文献[8].

1.5 ERIC-PCR 引物序列、反应体系与反应参数

反应体系^[9]: 在 25μL 的 PCR 反应体系中, 3μL

10×扩增缓冲溶液, 2.5μL MgCl₂ (25 mmol·μL⁻¹), 0.5μL dNTP (2.5 mmol·μL⁻¹) 混合液, 0.5μL ERIC-PCR 引物 E1 (20 pmol·L⁻¹), 0.5μL ERIC-PCR 引物 E2 (20 pmol/L), DNA 模板用量约为 40ng, 5 U·μL⁻¹ Taq DNA 聚合酶. ERIC-PCR 引物 E1 序列为: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGATTAC-3'; ERIC-PCR 引物 E2 序列为: 5'-AAGTAAGTGACTGGGCTGAGCG-3'.

PCR 反应条件参考文献[9]: 95℃预变性 7min, 94℃变性 1min, 52℃退火 1min, 65℃延伸 8min, 30个循环, 65℃最后延伸 16min, 4℃停止反应. 1.2% 质量分数琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, UV Ipro 凝胶成像仪照相、分析结果.

1.6 ERIC-PCR 指纹图谱分析

微生物群落多样性指数采用 Shannon Weaver 指数 (H') 表示, 表达式为: $H' = -\sum (n_i/N) \ln(n_i/N)$, 式中 N 为所有波峰的面积, n_i 为每个波峰的面积. H' 可反映种群内及种群之间的遗传多样性分布和差异.

用 Sorenson 配对相似性系数 (pairwise similarity coefficient, C_s) 比较生物膜微生物 ERIC-PCR 指纹图谱间的相似性, $C_s = 2j/(a+b) \times 100$, 其中 a 是某一泳道生物膜微生物的 ERIC-PCR 指纹图谱的条带数目, b 是另一泳道的 ERIC-PCR 图谱的条带数目, j 是在 2 种图谱中共享的条带数目.

2 结果与讨论

2.1 污染物降解情况

生物栅净化系统对富营养化水体的处理效果见表 3, 采用生物栅技术的 2~7 号净化池的 COD、总氮、氨氮、总磷的去除率较 1 号对照池分别提高了 20.7%~48.5%、20.1%~49.7%、39.8%~66.2% 和 60.0%~73.9%, 表明生物栅填料和水生植物在污染物去除方面起到重要作用. 3 种填料对比, 相同的运行条件下, 组合填料和新型填料对氮和磷的去除率要稍微高于悬浮填料, 而对 COD 的去除没有明显差别, 可能由于组合填料与新型填料的比表面积比悬浮填料大的原因.

表 3 污染物去除率/%

Table 3 Pollutant removal efficiency/%

廊道	第 2d				第 15d				第 30d			
	COD	总氮	氨氮	总磷	COD	总氮	氨氮	总磷	COD	总氮	氨氮	总磷
1 号	15.1	3.1	2.3	1.8	21.3	6.8	7.2	4.9	30.5	12.4	12.0	9.6
2 号	25.3	19.5	15.0	17.8	56.0	36.0	56.2	75.3	78.3	52.6	76.6	79.6
3 号	17.3	22.2	28.1	21.3	42.7	27.5	52.1	67.0	76.1	32.5	73.3	69.6
4 号	17.3	23.1	27.0	22.5	42.0	34.1	47.0	65.2	76.8	37.2	74.4	65.8
5 号	26.3	18.4	16.5	17.4	60.0	48.9	58.9	78.8	79.0	62.1	77.1	82.6
6 号	24.0	18.6	17.9	16.9	63.7	50.0	65.5	72.5	78.7	52.1	78.2	82.3
7 号	20.0	20.1	28.6	20.6	50.5	30.4	56.8	69.3	73.9	34.5	75.7	73.5

表 3 显示, 从第 2~30d, 各净化池对 COD、总氮、氨氮、总磷的去除率都在提高, 如 2 号的氨氮去除率, 第 2d 为 15%, 第 15d 为 56.2%, 第 30d 达到了 76.6%, 说明生物栅填料作为微生物的载体, 能将微生物固定化, 使得生物膜微生物的生物量逐渐增加, 从而提高系统的生物量和种群的丰富度, 增强系统中污染物去除效率.

从相对稳定运行的第 15d 和 30d 的处理结果来看, 设置水生植物的 2 号、5 号、6 号净化池的污染物去除效果要明显大于未设置水生植物的 2 号、5 号、6 号, 前者比后者在总氮的去除分别提高了 30.1%、24.9%、17.6%, 总磷的去除率也都提高了 10% 以上(以第 30d 为例), 主要是由于水生植物对可溶性氮、磷的吸收, 同时植物根系微生物在氮、磷的降解与转化中也起到了非常重要的作用.

2.2 微生物群落遗传指纹图分析

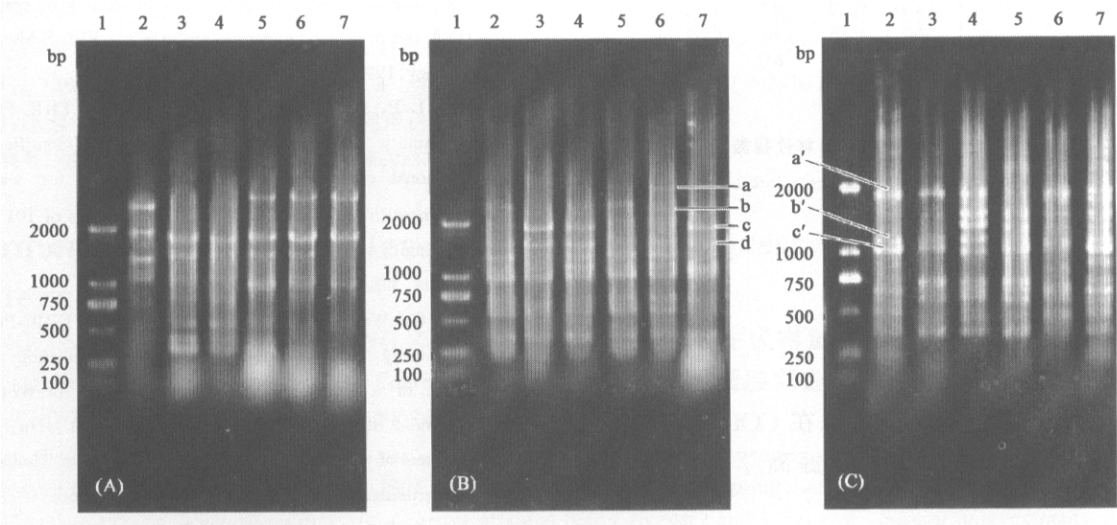
图 2 为第 2d, 第 15d 和第 30d 各净化池微生物指纹图变化情况, 表明 3 个不同阶段主带的变化不明显, 显示微生物优势菌群是相对稳定的, 但微生物群落的多样性在逐渐提高, 表现为条带数目及条带亮度的变化, 较明显的是 2000bp 处的条带变化.

图 2(A) 显示 2 号、5 号廊道条带最多, 3 号和 4 号廊道的条带相似性 100%; 5 号和 6 号廊道的相似性达到了 87.5%; 从条带的相似性可看出, 虽然 3 号和 4 号廊道放置的填料不一样, 但由于曝气量和水力停留时间是一样, 结果微生物群落结构也是一样的. 5 号和 6 号廊道的情况也同 3 号和 4 号廊道, 只是放置了水花生, 结果相似性稍低于后者, 可能由于水花生根系微生物的原因.

图 2(B) 中, a、b 条带是 2、5、6 泳道共有条带, 而

3, 4, 7 泳道上 a b 条带不明显, 而 2 号 5 号和 6 号 3 个净化池在总氮、总磷的去除率高于另外 3 个净化池, a b 条带可能与总氮、总磷的去除有关. c 条带 (即 2 000bp 处) 在 6 条泳道中都存在, 但在 3, 4, 7 泳道中条带亮度强于 2, 5, 6 泳道, 表明 2 号、5 号和 6 号 3 个净化池系统中微生物群落结构相似, 但与 3 号、4 号、7 号净化池存在差异. 另外, 2 号、5 号、6 号 3 泳道的条带数比 3 号、4 号、7 号多, 说明 2 号、5 号、6 号微生物种群更丰富, 从而更有利于污染物的去除.

图 2(C) 中, 6 条泳道的条带数和条带亮度都高于第 15d, 相对迁移率在 0. 365~ 0. 710 之间. 2 号在第 15d, 相对迁移率在 0. 365~ 0. 710 之间. 2 号在 2 000bp 和 1 000bp 处有 3 条(a' b' c') 主带较亮, 而 3 号 a' 条带较亮, b' c' 条带相对较弱, 表明 2 号这 3 个条带所代表的微生物数量高于 3 号, 这与 2 号和 3 号在污染物降解方面的差异性相一致. 4 号与 7 号的带谱相似, 而且 4 号与 7 号的污染降解性能较接近, 但是 4 号和 7 号泳道同其它泳道带谱的差异较大, 这可能是随着植物及植物根系微生物系统的成熟, 对填料生物膜微生物组成的影响.



(A) 第 2d; (B) 第 15d; (C) 第 30d; Lane1: Marker; Lane2: 悬浮填料+ 水花生; Lane3: 悬浮填料; Lane4: 组合填料; Lane5: 组合填料+ 水花生; Lane6: 新型填料+ 水花生; Lane7: 新型填料

图 2 净化池生物膜样品 ERIC-PCR 指纹图

Fig. 2 ERIC-PCR fingerprints for biofilm microbes

由表 4 得出, 第 2d, 第 15d 和第 30d, 条带平均相似性系数分别为 71. 8%、86. 9% 和 91. 0%, 表明条带的相似性在逐渐增加, 系统微生物结构趋于稳

定, 污染物降解效率也同步提高, 同表 3 的污染降解效果相吻合.

2. 3 微生物群落多样性指数分析

表 4 生物膜微生物 ERIC-PCR 指纹图谱相似性系数 $C_s/\%$

Table 4 Matrix values of ERIC-PCR fingerprints for biofilm microbes $C_s/\%$

样品	第 2d						第 15d						第 30d					
	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号
2 号	100						100						100					
3 号	62. 5	100					83. 3	100					96. 0	100				
4 号	62. 5	100	100				72. 0	87. 0	100				92. 0	96. 0	100			
5 号	52. 6	87. 5	87. 5	100			83. 3	90. 9	95. 7	100			92. 0	95. 0	90. 9	100		
6 号	62. 5	71. 4	71. 4	87. 5	100		80. 0	95. 7	83. 3	95. 7	100		92. 0	96. 0	83. 3	90. 9	100	
7 号	42. 9	66. 7	66. 7	71. 4	83. 3	100	85. 7	90. 0	85. 7	90. 0	85. 7	100	89. 0	83. 0	80. 0	88. 0	96. 0	100

以 Shannon-Weaver 公式计算的 6 个净化池生物膜样品在 3 个不同监测时期的 ERIC 条带多样性指数分布, 见图 3, 第 2d 在 1. 89~ 2. 22 之间, 第 15d 在 2. 17~ 2. 43 之间, 第 30d 在 2. 28~ 2. 68 之间. 第

2d 各净化池样品多样性指数比较接近, 除 4 号池为 1. 89 外, 其它 5 个净化池 H' 值都在 2. 01~ 2. 22 之间. 随着系统的运行多样性指数显示出逐渐增大的趋势, 在第 30d, 6 个净化池 H' 值都在 2. 28 以上, 表

明系统中微生物种群趋于多样化,多样性指数增加,相似性指数增高,系统处于良好的稳定状态.同时,也表明当系统中微生物种群结构保持稳定时,氮、磷等污染物的去除效率变动也不剧烈.

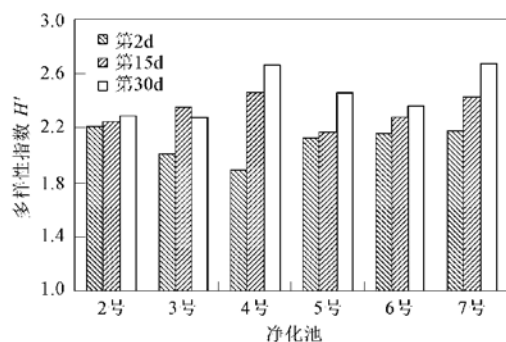


图3 净化池生物膜微生物多样性指数

Fig. 3 Biofilm microbial diversity index

3 结论

(1) 以微生物生物膜和水生植物为主体的生物栅技术对富营养化水体的污染物去除起到了非常重要的作用,设置生物栅的净化池在COD、总氮、氨氮、总磷的去除率上较对照池提高了20.1%~73.9%;

(2) 植物在总氮、总磷的去除中起到重要作用,设置水生植物的净化池比未设置水生植物的净化池在总氮的去除上分别提高了30.1%、24.9%、17.6%,总磷的去除率也提高了10%以上(以第30d为例);

(3) ERIC-PCR遗传指纹图分析表明,设置水生植物的3个净化池微生物群落结构相似性大于未设置植物的净化池,且微生物多样性也较未设置植物的净化池高,与设置水生植物的净化池的污染物净化效果较好相一致.

(4) 生物膜微生物群落的ERIC-PCR指纹图谱在第2d、15d、30d的平均相似系数分别为71.8%、86.9%和91.0%,多样性指数分别为1.89~2.22、

2.17~2.43和2.28~2.68.表明随着系统的运行,微生物多样性指数增加,微生物种群趋于丰富,相似性指数增高,系统处于良好的稳定状态,表现在对氮、磷等污染物的去除效果也相对稳定.

参考文献:

- [1] Wanger M, Amann R, Lemmer H, *et al.* Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 1520~1525.
- [2] Per W, Anr Chrisstin A, Mats F. Biomonitoring complex microbial communities using random amplified polymorphic DNA and principal component analysis [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **28**: 131~139.
- [3] Zhao L P, Gao P P, Wang L H, *et al.* ERIC-PCR as a community fingerprinting technology for identification of functional components in activated sludge for wastewater treatment in coke industry [A]. In: *Proceedings of 101st Annual Meeting of American Society for Microbiology* [C]. Orlando, Florida, USA, 2001: 600.
- [4] Song G, Wei G, Cao Y, A *et al.* Use of ERIC-PCR as a community fingerprinting technology in elucidation of mode action of a new probiotic formulation for prevention and treatment of bacterial diarrhea in piglets [A]. In: *Book of abstracts of the Asia Pacific Conference on Plant Tissue Culture & Agribiotechnology*. Singapore 2000, G16. 166.
- [5] Giovanni D I, Lidia S, Watrud R J, *et al.* Fingerprinting of mixed bacterial strains and BIOLOG gram-negative (GN) substrate communities by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR) [J]. *Cur. Microbiol.*, 1999, **38**: 217~223.
- [6] 马磊, 林英, 牛翠娟. 淡水水域富营养化及其治理 [J]. *生物学通报*, 2003, **38**(11): 5~9.
- [7] Harry M, Jusseaume N, Gambier B. *et al.* Use of RAPD markers for the study of microbial community similarity from termite mounds and tropical soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, **33**: 417~427.
- [8] Sambrook J, Russell D W 著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南 [M]. (第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] 赵立平, 肖红, 李艳琴, 等. ERIC-PCR: 一种快速鉴别环境细菌菌株的方法 [J]. *应用与环境生物学报*, 1999, **5**(增刊): 30~33.