

PCR-DGGE 研究处理垃圾渗滤液序批式生物膜反应器(SBBR)中的细菌多样性

肖勇¹, 杨朝晖^{1*}, 曾光明¹, 马延和², 刘有胜¹, 王荣娟¹, 徐峥勇¹

(1. 湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要: 为了研究序批式生物膜反应器中的细菌多样性及其脱氮的微生物学机理, 为工艺改进提供依据, 从同步高效去除垃圾渗滤液中高氨氮和高 COD 的 SBBR 生物膜和渗滤液原水中采集微生物样品并提取微生物总 DNA, 使用细菌通用引物对(GC341F/907R)从总 DNA 中成功扩增出目标 16S rDNA 片段, 然后对扩增的 16S rDNA 进行 DGGE, 对凝胶染色并进行条带统计分析和切胶测序, 使用序列数据进行同源性分析并建立了系统发育树. 结果表明, 该驯化后的 SBBR 生物膜和渗滤液原水中都有比较丰富的细菌多样性, 驯化的生物膜细菌主要来自渗滤液原水, 而且生物膜细菌在反应器正常运行时不会出现明显的群落结构变化; 在该 SBBR 中有多种硝化细菌与反硝化细菌、好氧反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌共存, 说明该反应器中可能同时存在全程硝化反硝化、同步硝化反硝化和厌氧氨氧化 3 种脱氮方式. 研究结果为 SBBR 脱氮微生物机理研究提供了一些有价值的参考依据.

关键词: 16S rDNA; SBBR; PCR; DGGE; 垃圾渗滤液; 系统发育分析

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)05-1095-07

Bacterial Diversity in Sequencing Batch Biofilm Reactor (SBBR) for Landfill Leachate Treatment Using PCR-DGGE

XIAO Yong¹, YANG Zhao-hui¹, ZENG Guang-ming¹, MA Yan-he², LIU You-sheng¹, WANG Rong-juan¹, XU Zheng-yong¹

(1. College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China; 2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: For studying the bacterial diversity and the mechanism of denitrification in sequencing batch biofilm reactor (SBBR) treating landfill leachate to provide microbial evidence for technique improvements, total microbial DNA was extracted from samples which were collected from natural landfill leachate and biofilm of a SBBR that could efficiently remove NH_4^+ -N and COD of high concentration. 16S rDNA fragments were amplified from the total DNA successfully using a pair of universal bacterial 16S rDNA primer, GC341F and 907R, and then were used for denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis. The bands in the gel were analyzed by statistical methods and excised from the gel for sequencing, and the sequences were used for homology analysis and then two phylogenetic trees were constructed using DNASTar software. Results indicated that the bacterial diversity of the biofilm in SBBR and the landfill leachate was abundant, and no obvious change of community structure happened during running in the biofilm, in which most bacteria came from the landfill leachate. There may be three different modes of denitrification in the reactor because several different nitrifying bacteria, denitrifying bacteria and anaerobic ammonia oxidation bacteria coexisted in it. The results provided some valuable references for studying microbiological mechanism of denitrification in SBBR.

Key words: 16S rDNA; SBBR; PCR; DGGE; landfill leachate; phylogenetic analysis

垃圾渗滤液是一种高氨氮和高 COD 含量的废水, 因其低 C/N、成分复杂和水质水量变化较大等特点^[1], 而成为水处理研究中的难点和热点. 序批式生物膜反应器(SBBR)兼具 SBR 和生物膜反应器的优点, 序批式进水能提高系统的抗冲击负荷能力, 而生物膜能保证世代较长的硝化细菌生存, 利于硝化反应, 同时生物膜载体从表面到内部存在溶解氧浓度的梯度现象, 这种好氧、缺氧和兼氧共存的状态为直接脱氮提供了良好的环境, 因而成为新型脱氮反应器研究的热点.

尽管很多研究者对 SBBR 脱氮的工艺条件进行了大量研究^[2~5], 但是目前研究者对其脱氮的微生物机理尚不清楚. 现代分子生物学为深入研究各类环境系统中的微生物提供了先进的技术手段, 目前已有一些文献报道了利用分子生物学技术进行环境

收稿日期: 2006-07-13; 修订日期: 2006-08-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(50478053); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2005CB724203); 湖南省科技计划重点攻关项目(05FJ3001)

作者简介: 肖勇(1982~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: xiaoyong1982@msn.com

* 通讯联系人, E-mail: yzh@hnu.cn

微生物学研究^[6-8],但鲜见有关使用分子生物学技术研究脱氮 SBBR 中微生物群落的研究报道。

通过从运行中的反应器生物膜提取总 DNA,并应用 PCR-变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术和 DNA 测序以及系统发育分析等新的分子生物学技术,对 SBBR 反应器中的细菌群落进行研究,以期获得 SBBR 反应器中细菌组成和功能以及动态变化规律,从而为工艺改进提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 SBBR 处理工艺及取样

SBBR 反应器中生物膜用长沙市某污水处理厂活性污泥接种,并用长沙市某垃圾填埋场的垃圾渗滤液进行 3 个月挂膜驯化,反应器有效容积为 3.0 L.SBBR 处理工艺的单个运行周期为 24 h,每天 10:00 换水,出水量为 600 mL,进水为 300 mL 渗滤液原水与 300 mL 蒸馏水混合,瞬时进水,瞬时出水;进水完毕,4 h 曝气,然后静置 2 h,循环 4 次。

SBBR 反应器的主要测定参数为 pH、COD 和氨氮浓度。

本研究共取样 8 个,其中,在 SBBR 反应器出水水质稳定(氨氮去除率 > 90%)后的 1 个处理周期内,从进水完毕,每 4 h 从生物膜取样 1 次,每次取样量约 0.3 g,共计 6 个样品,编号为 N1~N6,冻存于 -20℃ 备用;驯化的生物膜取样 1 个,编号为 N7,冻存于 -20℃ 备用;原水(未经稀释的垃圾渗滤液)10 mL 以 6 000 r/min 离心,沉淀冻存于 -20℃ 备用,编号为 N8。

1.2 生物膜总 DNA 提取与纯化

生物膜总 DNA 的提取与纯化采用改进的杨朝晖等的蛋白酶 K-CTAB 法^[9],采集的生物膜样品解冻后,加入 1.0 mL DNA 提取缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L 磷酸盐, 1.5 mol/L NaCl, 质量分数 1% 的 CTAB, pH 8.0)混合,再加入 20 μ L 蛋白酶 K(10 mg/mL), 37℃ 下,混合液在摇床上 225 r/min 摇动 30 min;加入 150 μ L 10% SDS, 65℃ 水浴 2 h,每 20 min 轻微颠倒一下;室温下, 9 000 r/min 离心 10 min,上清液转移到新离心管中;沉淀中再加入 0.5 mL 提取液和 20 μ L 10% SDS;涡旋混合, 65℃ 水浴 10 min,室温下, 9 000 r/min 离心 10 min,上清液合并;合并后的上清液与等体积氯仿-异戊醇(24:1)缓慢振荡混合至不再分层, 9 000 r/min 离心 10 min,吸取水相(即初提 DNA)转移至新离心管中,取 5 μ L 以 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测;初提的 DNA 与

0.6 倍体积异丙醇混合后沉淀 1 h 以上;室温下, 18 000 r/min 离心 20 min,弃上清,沉淀以 1 mL 冰预冷的 70% 乙醇洗涤;4℃ 下, 13 000 r/min 离心 5 min;弃上清,沉淀再次洗涤,离心弃上清后自然风干;以 200 μ L Milli-Q 水(Millipore, USA)重悬沉淀,取 5 μ L 以 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR 扩增

采用由上海生工合成的细菌 16S rDNA 通用引物 341F(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')^[10-14]和 907R(5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3')^[14-16]直接对总 DNA 进行 PCR 扩增,其中在 341F 的 5'端加有 40 bp 的 GC 夹(5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC G-3')^[12-14],用于后续的 DGGE. PCR 扩增体系为: *Taq* DNA 聚合酶(TianGen, 北京)4 U, 10 倍反应缓冲液为 10 μ L, 其中 Mg^{2+} 浓度为 15 mmol/L, dNTP(10 mmol/L each, TianGen, 北京)为 4 μ L, 引物为 1.0 μ L(20 μ mol/L), BSA(Amresco, USA)溶液(10 mg/mL)为 0.5 μ L, 最后加灭菌的 Milli-Q 水至体积为 100 μ L. PCR 反应在 MyCycler(Bio-Rad, USA)上进行,反应过程为 94℃ 变性 4 min,然后 94℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min,循环 35 次,然后在 72℃ 保持 10 min,最后 4℃ 保温. PCR 反应液使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 DGGE 分析

PCR 扩增产物使用 1% 琼脂糖进行凝胶电泳,目的条带用 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen, Germany)回收,溶解于 60 μ L 无菌 Milli-Q 水中.取 30 μ L 纯化后的 PCR 产物在 DCode System(Bio-Rad, USA)上进行电泳,变性梯度范围为 30%~60%,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 6%,电压为 140 V,电泳时间为 15 h,温度恒定为 55℃^[14].电泳结束后,凝胶以 0.5 μ g/mL 的溴化乙锭溶液染色,洗涤数次后于 Gel Doc 2000 凝胶成像系统(BioRad, USA)上成像检测。

1.5 统计分析

为了解菌种群在 SBBR 反应器中的动态变化,对 DGGE 条带图谱进行了统计分析,着重讨论了各时刻细菌种群的丰富度和相关性.其中,丰富度分析以图谱中所有的条带数为 1,不同时刻样品的细菌种群丰富度值为该时刻样品的条带数除以图谱中的总条带数(同一位置的条带只算 1 条):

$$Rs_i = L_i / L_T$$

式中, Rs_i 为第 i 泳道的细菌种群丰富度值; L_i 为第 i 泳道上的条带数; L_T 为图谱中的总条带数

(同一位置的条带只算 1 条)。

相关性分析主要分析不同时刻之间细菌种群的相似性,2 条带之间的相似性系数可以用 Sorensen 配对比较相似性系数(C_s)公式^[17,18]计算:

$$C_{sAB} = 2L_{AB} / (L_A + L_B) \times 100$$

式中, C_{sAB} 为泳道 A 和泳道 B 之间的相似性系数; L_{AB} 为泳道 A 上的与泳道 B 上位置相同的条带数; L_A 为泳道 A 上的条带数; L_B 为泳道 B 上的条带数。

1.6 切胶测序和系统发育分析

在紫外灯下切下 DGGE 条带,洗净后浸泡于 60 μ L 无菌 Milli-Q 水中 24 h 以上,取 20 μ L 进行 PCR 扩增,扩增产物经 DGGE 确认为单一条带后,送交生物公司(Sangon, 上海)测序.测序结果提交 GenBank 并获得接受号。

使用 GenBank 的 BLAST 对测序结果进行同源性分析,根据同源性分析结果使用 DNASTar5.0 分析软件建立系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 SBBR 反应器的运行情况

SBBR 反应器驯化结束后,连续运行了 30 d,隔天监测出水水质,主要运行参数包括 pH、COD 去除率和氨氮去除率,具体结果见图 1.取样时间为运行的第 16 d,取样时的水质见图 2。

从图 1 可以发现,反应器在运行期间的出水水质都达到了很好的出水效果,氨氮的去除率都达到了 97% 以上,COD 的去除率虽然有一定的波动,但始终保持在 86% 以上.图 2 中,0 h 表示的是进水的水质情况,4~24 h 表示的是反应器中的水质情况,从图 2 可以发现,进水 pH 约 7.8,主要是因为渗滤液经过长期的厌氧反应,产生了有机酸类,将高浓度的氨氮中和,使 pH 降低,经过 4 h 的曝气后,有机酸类被微生物消耗,同时由于稀释作用,pH 升高到 8.74,在后续处理过程中,pH 则随着氨氮和 COD 的同时去除而稍有下降。

2.2 DNA 提取与纯化以及 PCR 扩增

初提的 DNA 和纯化后的 DNA 经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明初提和纯化后的 DNA 片段长度均大于 23 kb,且获得了较高的量,见图 3(a)和图 3(b)。

PCR 扩增产物以 1% 琼脂糖电泳后以 EtBr 染色,经凝胶成像系统检测拍照,结果见图 3(c),表明 PCR 扩增获得了高量和高特异性的 PCR 产物,片段长度约为 630 bp,为目标片段长度。

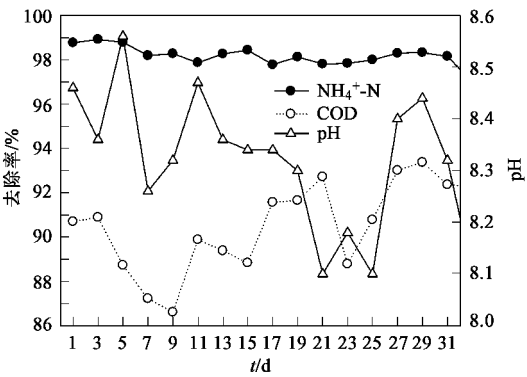


图 1 SBBR 运行过程中出水水质

Fig.1 Water quality of treated wastewater in SBBR at runtime

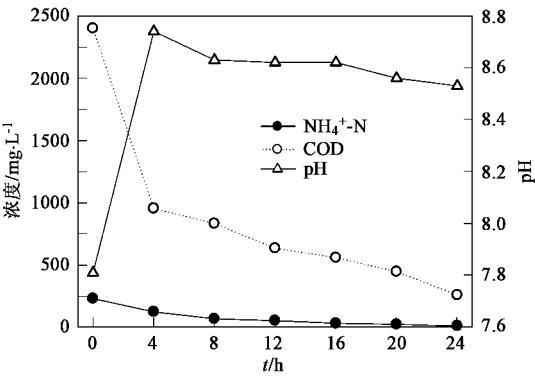


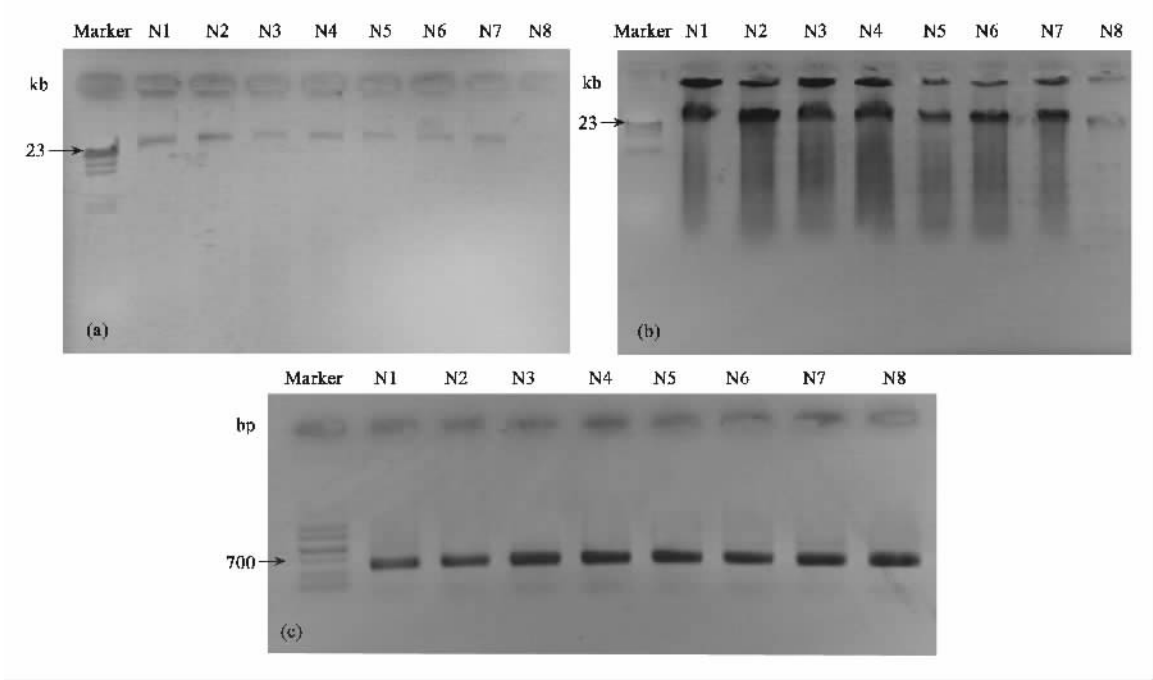
图 2 SBBR 在 1 个周期(24 h)内的水质变化

Fig.2 Changes of water quality in a cycle time (24 h) in SBBR

2.3 DGGE 图谱的细菌多样性统计分析

在 Gel Doc2000 凝胶成像系统下,使用 Quantity One V4.52 (Bio-Rad, USA) 软件对经溴化乙锭(0.5 μ g/mL)染色的 DGGE 凝胶进行成像,在 8 条泳道上一共观察到 29 条不同的条带,见图 4(a);图 4(b)是根据凝胶成像系统的成像照片,经过软件分析和人工分析后绘制的 DGGE 图谱示意图,简单描述了各条带的相对强度和分布;有关丰富度值和相关性分析的统计分析结果分别见表 1 和表 2。

根据图 4 和表 1 以及表 2,发现泳道 N7 中的条带,除了 J 和 V,在泳道 N1~N6 中都可以找到,而且 N7 与 N1~N6 的 C_s 值都比较高,这说明生物膜的驯化是比较成功的,在正常运行后生物膜细菌群落没有发生很大的变化;条带 J 和 V 是来自接种污泥中的细菌,因为在泳道 N8 中没有发现与其对应的条带;条带 J 和 V 经过驯化过程仍存在于生物膜中,但又从正常运行的生物膜中消失,可能是驯化过程采用了比较低的氨氮负荷,正常运行时高氨氮负荷将其最终选择掉,因为其条带亮度本来不大,表明其



(a)和(b)中 Marker 为 λ DNA/*Hind* III, (c)中 Marker 为 Marker V, 所有点样用量均为 5 μ L
图 3 初提(a)和纯化(b)DNA 以及 PCR 扩增产物(c)的琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig.3 Map of crude DNA (a), purified DNA (b) and PCR products (c) after agarose gel electrophoresis

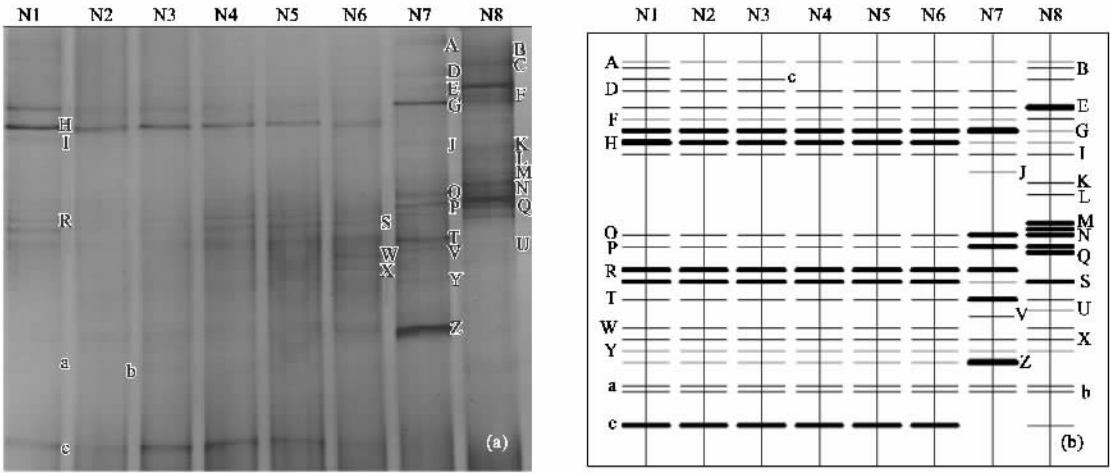


图 4 (a) PCR 产物的 DGGE 凝胶(30% ~ 60%, 140 V, 15 h); (b) PCR-DGGE 图谱的条带分布和相对强度示意

Fig.4 (a) DGGE gel (30% ~ 60%, 140 V, 15 h) of PCR products; (b) Sketch map of bands distribution and relative luminance of the PCR-DGGE map

表 1 SBBR 各阶段的细菌群落丰富度值(R_s)								
Table 1 Richness value (R_s) of bacterial community in SBBR in different periods								
指标	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8
条带数	21	20	20	19	19	19	19	24
R_s	0.724	0.690	0.690	0.655	0.655	0.655	0.655	0.828

在生物膜中的存在量不大。

N8 中的细菌多样性无疑是最丰富的,表 1 中的 R_s 值也证实了这一点,这可能是因为 在渗滤液贮池

这一厌氧环境中,不仅存在很多有脱氮功能的细菌,同时也存在着大量的厌氧细菌,但是这些厌氧细菌在 SBBR 运行过程中大多无法继续生长,可能是因

表 2 SBBR 各阶段的细菌种群相似性系数(C_s)

Table 2 Comparability index of bacterial population in SBBR in different periods

	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8
N1	100	97.6	97.6	95.0	95.0	95.0	80.0	81.8
N2	97.6	100	100	97.4	97.4	97.4	87.2	72.7
N3	97.6	100	100	97.4	97.4	97.4	87.2	72.7
N4	95.0	97.4	97.4	100	100	100	89.5	74.4
N5	95.0	97.4	97.4	100	100	100	89.5	74.4
N6	95.0	97.4	97.4	100	100	100	89.5	74.4
N7	80.0	87.2	87.2	89.5	89.5	89.5	100	65.1
N8	81.8	72.7	72.7	74.4	74.4	74.4	65.1	100

为 pH 改变,或是因为间歇曝气破坏了其生长必需的厌氧环境,所以图谱中, N8 中的一些条带,比如 K、L、M、N、Q 和 U 并没有出现在 N1 ~ N7 中,即使其中某些条带亮度比较大;而条带 B 和 C,虽然没有立即从生物膜中消失,但是经过短暂的 1 ~ 2 个曝气阶段后,也从生物膜中消失,由此可推断条带 B 和 C 代表的细菌对反应器运行环境不适应,所以无法存活下来;条带 W 和 c 则是例外,它们仅出现于 N1 ~ N6 和 N8 中,在 N7 中没有发现对应条带,是何原因造成这种现象的出现,还有待进一步研究. N8 与 N1 ~ N7 的 C_s 不高,这主要是由于 N8 细菌丰富度较大引起. 从图 4(b)中可以发现,无论是驯化后的生物膜还是运行中的生物膜,它们的大多数条带都能在 N8 中找到对应条带,也就是说反应器中的生物膜细菌有可能主要来自于渗滤液原水,接种污泥的贡献并不大,这也为反应器微生物驯化提供了一定的参考依据.

N1 ~ N6 的 R_s 值都比较小,可能是因为经过驯化过程,很多细菌都被比较苛刻的驯化环境所淘汰掉了,造成生物多样性下降. N1、N2、N3、N4、N5 和 N6 之间的 C_s 值很大,尤其是 N4、N5 和 N6 之间的 C_s 值达到了 100,可见生物膜的细菌组成在单个运行周期内也是比较稳定的,这也从另一方面说明驯化是比较成功的,获得了比较稳定的生物膜.

2.4 细菌系统发育分析

29 条条带经切胶回收、PCR 重扩增和 DGGE 鉴定后,送交测序,一共获得 29 条不同的 16S rDNA 序列,使用 GenBank 的 Sequin win32 将序列提交给 GenBank 注册,并获得接受号(DQ838671 ~ DQ838699),条带与接受号之间的对应关系见表 3.

使用 GenBank 的 BLAST 程序,将 29 条序列与数据库中的序列进行比对,获得各条序列的同源性信息(表 3),然后从 GenBank 得到与其同源性最近的序列,使用 DNASTar5.0 程序的 MegAlign,使用 Clustal

V 方法建立系统发育树,见图 5.

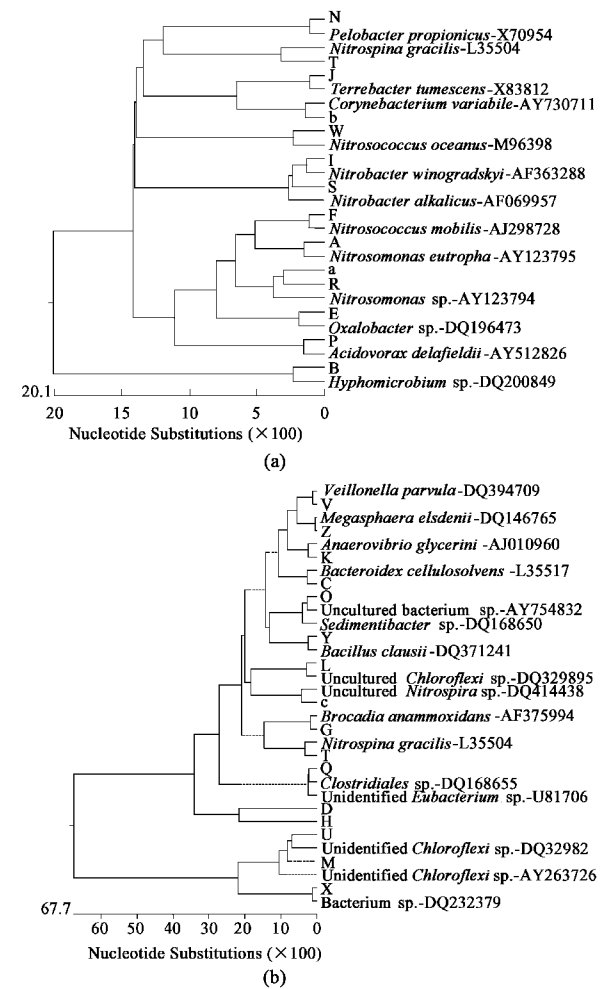


图 5 根据 29 条序列和 BLAST 结果建立的 SBBR 细菌系统发育树

Fig.5 Phylogenetic trees ((a) and (b)) of bacteria in SBBR based on the results of BLAST of 29 sequences

从表 3 可以发现,除了条带 D、H 和 M 不能在 GenBank 中找到与其同源性很高的种群以外,其它条带基本上都可以找到与其序列同源性较高(> 90%)的种群;根据同源性分析结果,并结合 3.4 节的讨论可以发现,大多数仅存在于 N8 中的细菌确

为厌氧细菌,尤其是其中竟然有 3 种(条带 U、M 和 L)不同的 *Chloroflexi* 属细菌;根据分析结果,反应器中存在着比较丰富的脱氮种群,但大部分均为硝化细菌和反硝化细菌,包括 *Nitrosomonas*、*Hyphomicrobium*、*Nitrosococcus*、*Nitrobacter*、*Nitrospina* 和 *Nitrospira* 等多个属的菌株以及 *Bacillus clausii* 和

Pelobacter propionicus 等菌种,具有厌氧氨氧化作用的只有条带 G 所代表的 *Brocadia anammoxidans*^[19],此外,还有条带 B 所代表的具有好氧反硝化功能的 *Hyphomicrobium* 属^[20]细菌,由此也可以看出,该反应器在该工艺条件下,可能同时存在全程硝化反硝化、同时硝化反硝化和厌氧氨氧化 3 种脱氮形式.

表 3 29 条序列的 BLAST 结果

Table 3 Results of 29 sequences using BLAST

编号	序列长度/bp	GenBank 接受号	比对序列		同源性
			GenBank 接受号	物种名	
A	547	DQ838686	AY123795	<i>Nitrosomonas eutropha</i>	97%
B	548	DQ838694	DQ200849	<i>Hyphomicrobium</i> sp.	95%
C	527	DQ838693	L35517	<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	97%
D	547	DQ838681	U81706	Unidentified eubacterium sp.	64%
E	547	DQ838698	DQ196473	<i>Oxalobacter</i> sp.	96%
F	542	DQ838674	AJ298728	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	95%
G	547	DQ838671	AF375994	<i>Brocadia anammoxidans</i>	97%
H	547	DQ838680	DQ168650	<i>Sedimentibacter</i> sp.	77%
I	545	DQ838679	AF363288	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	97%
J	547	DQ838699	X83812	<i>Terre bacter tumescens</i>	97%
K	547	DQ838692	AJ010960	<i>Anaerovibrio glycerini</i>	95%
L	528	DQ838687	DQ329895	Uncultured <i>Chloroflexi</i> sp.	94%
M	547	DQ838688	AY263726	Uncultured <i>Chloroflexi</i> sp.	88%
N	546	DQ838697	X70954	<i>Pelobacter propionicus</i>	97%
O	548	DQ838684	AY754832	Uncultured bacterium	95%
P	543	DQ838695	AY512826	<i>Acidovorax delafieldii</i>	97%
Q	529	DQ838685	DQ168655	<i>Clostridiales</i> sp.	95%
R	547	DQ838672	AY123794	<i>Nitrosomonas</i> sp.	95%
S	547	DQ838678	AF069957	<i>Nitrobacter alkalicus</i>	97%
T	547	DQ838675	L35504	<i>Nitrospina gracilis</i>	93%
U	547	DQ838683	DQ329882	Uncultured <i>Chloroflexi</i> sp.	90%
V	549	DQ838691	DQ394709	<i>Veillonella parvula</i>	97%
W	547	DQ838677	M96398	<i>Nitrosococcus oceanus</i>	95%
X	547	DQ838682	DQ232379	<i>Bacterium</i> sp.	99%
Y	542	DQ838689	DQ371241	<i>Bacillus clausii</i>	95%
Z	547	DQ838690	DQ146765	<i>Megasphaera elsdenii</i>	99%
a	547	DQ838673	AY123794	<i>Nitrosomonas</i> sp.	97%
b	532	DQ838696	AY730711	<i>Corynebacterium variabile</i>	97%
c	539	DQ838676	DQ414438	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp.	93%

图 5(a)代表大部分硝化和反硝化细菌种群的系统发育关系,树图显示它们在系统发育上存在较亲近的遗传关系,只有 *Hyphomicrobium* 属细菌(条带 B)由于具有好氧反硝化作用,与其他脱氮种群有较远的亲缘关系.图 5(b)代表反应器中除大多数脱氮种群之外的细菌之间的遗传关系,从图 5(b)可以发现,这些细菌由于在生长环境和代谢机能上的差异

比较大,在反应器中所起的作用差异也比较大,因而在系统发育上亲缘关系也比较远;尤其是条带 D 和 H 所代表的菌种,在同源性分析中和系统发育树上都难以找到与其亲缘关系比较近的种,而这 2 种细菌都是反应器和渗滤液中的功能微生物,因此,2 种细菌有可能是尚未知的具有脱氮功能的菌种;作为反应器中目前已知的唯一已知的厌氧氨氧化细菌,

条带 G (*Brocadia anammoxidans*) 仅与 T (*Nitrospina gracilis*) 的亲缘关系比较近,而 2 种细菌都以 NO_2^- 作为底物,只不过 1 种细菌以其作为电子供体,1 种细菌以其作为电子受体,两者之间是否存在某种联系还有待进一步的研究。

3 结论

(1)经过较长时间的驯化,SBBR 的载体上形成了种群比较丰富、群落结构和功能都比较稳定的生物膜,驯化的稳定生物膜在运行过程中的不同周期和单个周期的不同时刻,细菌种群组成都没有发生明显的改变,在高氨氮负荷下运行能够同时实现很高的氨氮去除率和较高的 COD 去除率。

(2)驯化的脱氮生物膜中的细菌可能主要来自于渗滤液,而用于接种的常规污水处理厂污泥对脱氮生物膜的形成贡献可能并不大,因此,在驯化过程中根据处理对象不同选择合适的接种污泥很有必要。

(3)PCR-DGGE 技术很好地对 SBBR 中的微生物群落结构和动态变化进行了监测,结合 DNA 测序、序列同源性分析和系统发育分析对 SBBR 中的微生物做出了种属鉴定。根据种属鉴定结果,渗滤液中存在丰富的厌氧细菌,为生物膜驯化提供了丰富的脱氮功能菌种;驯化的生物膜中同时存在好氧反硝化细菌、厌氧氨氧化细菌、大量的硝化细菌和反硝化细菌,控制好工艺条件,在 1 个 SBBR 内实现多种脱氮途径是有可能的。

参考文献:

[1] Christensen T H, Kjeldsen P, Bjerg P L, *et al.* Bio-geochemistry of landfill leachate plumes[J]. *Applied Geochemistry*, 2001, **16**(7~8): 659~718.

[2] Rodgers M, Zhan X, O'Reilly E. Small-scale domestic wastewater treatment using an alternating pumped sequencing batch biofilm reactor system[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2006, **28**(5): 323~330.

[3] Rodgers M, Zhan X M, Burke M D. Nutrient Removal in a Sequencing Batch Biofilm Reactor (SBBR) using a Vertically Moving Biofilm System[J]. *Environmental Technology*, 2004, **25**(2): 211~218.

[4] 徐峥勇, 杨朝晖, 曾光明, 等. 序批式生物膜反应器(BBR)高氨氮渗滤液的脱氮机理研究[J]. *环境科学学报*, 2006, **26**(1): 55~60.

[5] 李军, 顾国维, 韦苏, 等. 序批式膜反应器同步硝化和反硝化的特性[J]. *中国环境科学*, 2005, **25**(6): 646~649.

[6] Gieseke A, Bjerrum L, Wagner M, *et al.* Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm[J].

Environmental Microbiology, 2003, **5**(5): 355~369.

[7] Schramm A. *In situ* analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates, and sediments [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2003, **20**(4): 313~333.

[8] 孙嵩蛟, 左剑恶, 李建平, 等. 厌氧颗粒污泥中微生物种群变化的分子生物学解析[J]. *中国环境科学*, 2006, **26**(2): 183~187.

[9] 杨朝晖, 肖勇, 曾光明, 等. 用于分子生态学研究的堆肥 DNA 提取方法[J]. *环境科学*, 2006, **27**(8): 1613~1617.

[10] Yoshida N, Yagi K, Sato D, *et al.* Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, **99**(2): 143~149.

[11] Ishii K, Fukui M. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(8): 3753~3755.

[12] Kjellerup B V, Veeh R H, Sumithraratne P, *et al.* Monitoring of microbial souring in chemically treated, produced-water biofilm systems using molecular techniques [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2005, **32**(4): 163~170.

[13] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial community [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(1): 340~346.

[14] Muyzer G, Brinkhoff T, Ulrich N, *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology [J]. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 1998, **3.4.4**: 1~27.

[15] Suzuki K, Koyanagi M, Yamashita H. Genetic characterization and specific detection of beer-spoilage *Lactobacillus* sp. LA2 and related strains[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **96**(4): 677~683.

[16] Hashizume T, Takai C, Naito M, *et al.* Characteristics of the mucus layer on the surface of the bluegill (*Lepomis macrochirus*) and the bacterial flora in the mucus[J]. *Microbes and Environments*, 2005, **20**(1): 69~80.

[17] Gillian D C, Speksnijder A G C L, Zwart G, *et al.* Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR amplified gene fragment coding for 16S rDNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(9): 3464~3472.

[18] Murray A E, Hollibaugh J T, Orrego C. Phylogenetic composition of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(7): 2676~2680.

[19] Kuenen J G, Jetten M S M. Extraordinary anaerobic ammonium-oxidizing bacteria[J]. *ASM News*, 2001, **67**(9): 456~463.

[20] Meiberg J B M, Bruinenbrg P M, Harder W. Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated amines in *Hyphomicrobium* X in the absence and presence of nitrate: aerobic denitrification[J]. *Journal of Genetic Microbiology*, 1980, **120**(2): 453~463.