PCR-DGGE 分析啤酒废水生物处理工艺的微生物区系

赵继红[1]，何淑英[2]，李继香[3]，刘永德[1]，楼燕[1]

（1. 河南工业大学化学化工学院，郑州 450001；2. 华东师范大学资源与环境科学学院，上海 200062；3. 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室，上海 200092）

摘要：应用基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE（变性梯度凝胶电泳）技术对啤酒废水“水解酸化 + SBR”工艺的微生物多样性进行研究. 分别取水解酸化池与 SBR 池中不同深度以及不同处理时段的活性污泥，提取样品总 DNA，通过 PCR 扩增、变性梯度凝胶电泳，将 16S rDNA（V3 区）的 PCR 扩增片段割胶克隆测序确定样品中的微生物群落，与筛选出的高效菌株进行对比分析. 结果表明，水解酸化池中的微生物群落随深度的改变，在结构组成和种群数量上均有较大差异，2 m深处微生物群落相对丰富，优势条带突出；SBR 池不同深度微生物种群结构一致，沉淀期、进水期和曝气期不同处理时段的微生物种类一致，但优势菌群不同；所测序列 y2、23、25、31、h5 和 15 号分别与菌株 uncultured *Thermotogales* sp.、*Comamonas* sp. WT OTU1、*Agrobacterium tumefaciens*、*Bacillus subtilis*、*Bdellovibrio bacteriovorus*、*Comamonas testosteroni* 有高度同源性，活性污泥样品中的优势条带与高效菌株的序列不同，表明筛选出的高效菌并非为实际处理过程中的优势菌.

关键词：啤酒废水；PCR-DGGE；生物处理；微生物区系

中图分类号：X172 **文献标识码**：A **文章编号**：0250-3301（2008）10-2950-06

Microbial Community Structure of Beer Wastewater Treatment Plants Analyzed by PCR-DGGE Technique

ZHAO Ji-hong[1], HE Shu-ying[2], LI Ji-xiang[3], LIU Yong-de[1], LOU Yan[1]

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China; 2. School of Resources and Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 3. State Key Laboratory of Pollution Control & Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: The microbial community structure of beer wastewater treatment plants with hydrolyze-acidification and SBR process was studied by PCR amplification and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) based 16S rDNA. Activated sludge samples were collected from both hydrolyze-acidification tank and SBR tank at different depth and disposal period. The total DNA was extracted and the 16S rDNA was amplified by universal primer. The microbial community structure was analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis, compared with the DGGE band pattern of the screened high efficient bacteria. The PCR products were cloned and sequenced to analyze the microbial community in phylogenic evolution. The DGGE pattern showed that the microbial community in hydrolyze-acidification tank changed with the variation of depth both in microbial structure and population, and at the depth of two-meter the microbial community was relatively rich, the dominant bands were notable. The microbial community in SBR tank at different depths and different disposal periods (precipitation period, inflow period, aeration period) were consistent respectively, but the dominant bands were different. Sequences of y2, 23, 25, 31, h5, 15 yielded high homogeneity with the strains uncultured *Thermotogales* sp., *Comamonas* sp. WT OTU1, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Comamonas testosteroni* from GenBank. The 16S rDNA sequences of the dominant bands were not completely same with that of the high efficient bacteria, which indicated that the strains screened were not the dominant strains in actual process.

Key words: beer wastewater; PCR-DGGE; biological treatment; microbial community

目前，我国啤酒工业发展迅速，啤酒产量不断增加，因而生产过程中排放的工业废水的生物处理也越来越重要. 传统方法通过观察活性污泥和生物相的物化变化，根据污泥中动物的种类、它们的营养特性与净化程度之间的关系来判断系统运行情况[1, 2]. 为了更进一步了解废水处理过程的内在机制与变化，近年来，研究废水处理系统的微生物区系已经得到国内外的普遍重视，各种新的分子微生物学技术已经在这一领域中得到应用[3~10]. 用 DGGE 研究微生物群落中的细菌多样性[11]，分析反应器中的微生物群落动态变化情况[12, 13]，了解生物修复对环境微生物群落多样性及菌群活性的影响[14].

收稿日期：2007-10-19；**修订日期**：2008-02-27

基金项目：河南省杰出青年科学基金项目（0512001500）

作者简介：赵继红（1968～），女，博士，副教授，主要研究方向为水处理与应用环境微生物，E-mail：zhaojihong@haut.edu.cn

PCR-DGGE方法在污水处理中的应用，使人们对污水处理过程中微生物群落的变化产生了新的认识.

本研究对啤酒废水生物处理工艺中水解酸化池与 SBR 池各位点及不同处理时段污泥样品的微生物区系进行分析检测.首先提取所采集水样的总 DNA，通过 PCR 扩增、变性梯度凝胶电泳确定样品中的微生物区系，与筛选出的高效菌株的 DGGE 条带进行对照，将 16S rDNA（V3 区）的 PCR 扩增片段割胶克隆测序进一步分析群落微生物在系统进化中的地位[15]，以期为真正弄清楚废水处理的活性菌株种类及作用，进一步提高废水处理效果提供理论参考.

1　材料与方法

1.1　样品采集

样品取自郑州市金星啤酒厂废水处理系统，该系统采用“水解酸化 + SBR”工艺处理啤酒废水.水解酸化池与 SBR 池的取样深度分别为 1、2 和 3 m，分别标记为：a1、a2、a3 与 o1、o2、o3.同时，对 SBR 池分别采集了沉淀期、进水期以及曝气期的污泥样品，标记为 Q1、Q2、Q3；不同时期（曝气期）的样品标记为 D1、D2、D3、D4.

1.2　高效降解菌株

15、23、25 和 31 号菌株，分离于 SBR 池活性污泥（实验室保存的菌株），经筛选为 COD 高效降解菌株.

1.3　DNA 的提取

1.3.1　活性污泥样品的预处理及总 DNA 的提取与纯化

参照高平平等[16]的方法，对污泥样品进行预处理，分解絮凝，去除部分腐殖质.

采用修改后的 CTAB 法从污泥样品中提取基因组 DNA.参考 Ogram 等[17]的方法，运用 SDS 裂解和 bead-beating 均质相结合的方法对样品进行裂解.用上海生工的柱式 DNA 胶回收试剂盒，对所提取总 DNA 进行纯化，即用或于 －20℃冰箱冻存.

1.3.2　高效降解菌的基因组 DNA 提取

将牛肉膏斜面培养的高效降解菌 15、23、25 和 31 号菌体用移液枪吹下制成菌悬液，取 4 mL 于离心管中，收集菌体.纯菌株的基因组 DNA 提取方法同污泥样品.

1.4　基因组 DNA 的 PCR 扩增

扩增反应参照 Niemi 等[18]的方法.

16S rDNA 基因 V3 区的引物：选用对大多数细菌与古菌的 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对：F_{357}GC 与 R_{518}.各自的序列为：F_{357}：（5′-CCCTACGGGAGGCAGCAG-3′）；R_{518}：（5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′）；GC 发卡结构：（5′-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3′）.

扩增反应体系为 50 μL，组成如下：1 μL 的 DNA 模板、0.5 μmol/L每种引物、200 μmol/L dNTP（每种 10 mmol/L）、1 × PCR buffer（无 Mg^{2+}）、1.5 mmol/L $MgCl_2$、2.5U Heatstart *Taq* 酶，用适量无菌超纯水补足50 μL.

扩增条件如下：94℃预变性 5 min；94℃变性 45 s，65 ~ 55℃退火 45 s，72℃延伸 60 s，前 20 个循环每个循环退火温度降低 0.5℃，后 10 个循环退火温度为 55℃；最后 72℃延伸 120 s.扩增在梯度 PCR 仪（德国 Biometra 热循环仪）上进行，PCR 产物用 1.7% 琼脂糖凝胶电泳进行分析检测，DNA Marker 选用 pUC19（上海生工），紫外成像保存结果.

1.5　DGGE 分析

1.5.1　变性胶的制备

使用梯度胶制备装备，制备变性剂浓度适合的 10% 聚丙烯酰胺凝胶，其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增.

1.5.2　PCR 样品的加样

待胶完全凝固以后，将胶板放入装有电泳缓冲液的装置中，在每个加样孔加入含有 10% 加样缓冲液的 PCR 样品 30 ~ 35 μL.

1.5.3　电泳及染色

在 120 V 的电压下，62℃电泳 6 h.电泳完毕后，将凝胶在核酸染色液中染色 30 min.

1.5.4　DGGE 条带的割胶回收

将优势条带和特异性条带用手术刀片切割下来，用 70% 的乙醇溶液洗涤，加入 30 μL 的无菌超纯水反复冻溶 3 次，上清液为回收的 DNA 溶液.

1.5.5　DGGE 条带的纯化

将割胶回收后的 DNA 溶液重新进行 PCR 扩增，扩增条件与基因组 DNA 的扩增一致.将扩增产物进行 DGGE 鉴定，直至出现单条带.

1.6　DGGE 纯化条带与高效菌株 16S rDNA 序列的测定

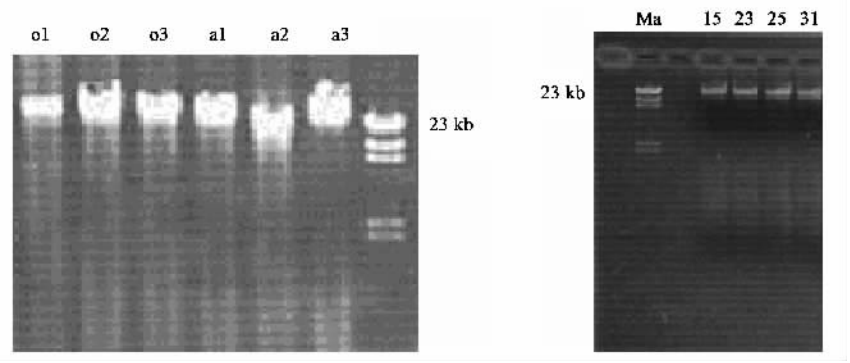
将好氧与厌氧污泥样品中纯化回收的 DNA 与提取得到的纯菌株 DNA 进行再次扩增，所用引物为：GC-2（5′-GAAGTCATCATGACCGTTCTGGCACGGGGGGCCTA-3′）[19]与 R_{518}.扩增产物用 DNA 凝胶回收试剂盒（Ver.2.0，TAKARA）纯化，寄往华大鼎安测序.

测序时出现叠峰的样品重新扩增，所用引物为：F_{357}与 R_{518}，纯化后进行克隆，即将目的片断与 pMD 19-T vector(TAKARA)连接，将质粒 DNA 转入大肠杆菌 DH5α，平板培养 17～20 h 后随机挑取白斑，用液体 LB 培养基培养后抽提质粒，对可能转入的质粒进行双酶切鉴定，对鉴定完毕的重组子再次摇菌后，将菌液提供给华大鼎安测序.利用 BLAST 将所测得的序列与 GenBank 中已经登录的序列进行同源性比较分析.

2 结果与分析

2.1 不同污泥样品基因组 DNA 的提取

水解酸化池与 SBR 池的各个深度活性污泥中提取的基因组 DNA，经过琼脂糖凝胶电泳进行检测，从图 1 中可知，得到的片断大约为 23 kb.同时，从 3 株高效菌中提取的 DNA 检测结果也相近.



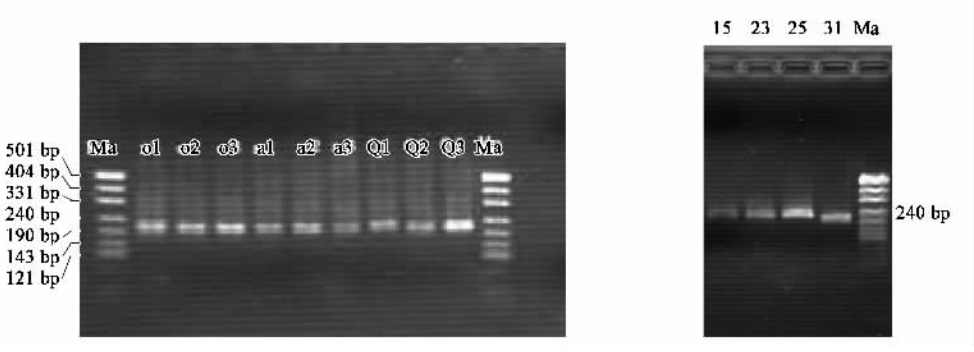
DNA Marker: λ-*Hin*d Ⅲ digest

图 1 不同污泥样品中基因组 DNA 和高效菌株 15、23、25、31 号 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of different sludge samples and DNA extracted from strains capable of high COD-degradation (15, 23, 25, 31)

2.2 不同污泥样品中的细菌类群的差异

活性污泥样品与高效菌株的 16S rDNA V3 区扩增结果如图 2 所示，得到的 DNA 基因片断约为 230 bp.



DNA Marker: pUC19

图 2 不同污泥样品与高效菌株 16S rDNA 基因 V3 区 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA(V3) of different sludge samples and strains capable of high COD-degradation

2.3 不同污泥样品中的细菌类群的差异

SBR 池不同深度 o1、o2、o3，不同处理时段 Q1、Q2、Q3 和水解酸化池不同深度 a1、a2、a3 的污泥样品 DGGE 图谱如图 3 所示，5 株高效菌株与污泥样品 D1、D2、D3、D4 的 DGGE 图谱如图 4 所示.

可以看出，SBR 池不同位点的活性污泥样品 o1、o2、o3 的 DGGE 指纹图谱基本一致，表现为 6 条主条带.SBR 池不同处理时段的样品 Q1、Q2、Q3 条带数目基本一致，但优势菌有明显差别.同时，筛选出的高效菌并非为实际处理过程中的优势菌.水解酸化池的活性污泥样品 a1、a2、a3 的 DGGE 图谱表现出来的条带数目有差异，且主条带的位置不一致，a2 中的细菌相对丰富，优势条带突出.

2.4 不同污泥样品中细菌群落相似性分析

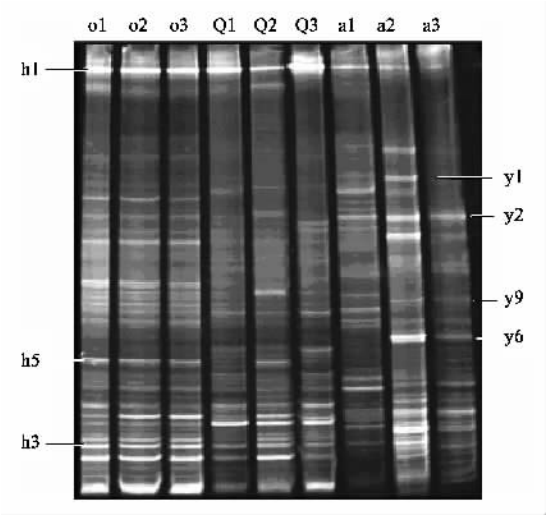


图 3　SBR 池中不同深度、不同处理时段与水解酸化池中的 DGGE 图谱

Fig.3　DGGE pattern of different sludge samples: different depth and different disposal period of SBR tank and hydrolyze-acidification tank

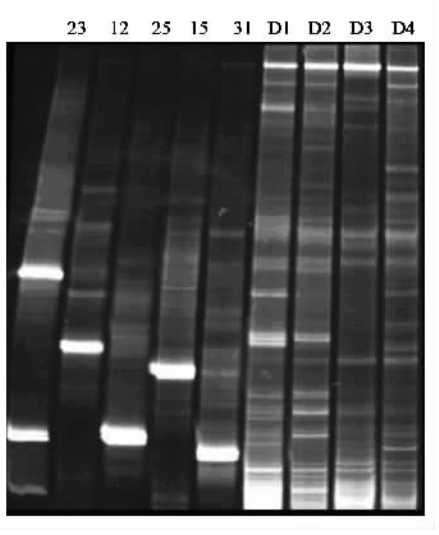


图 4　高效菌株 12、15、23、25、31 号与不同时间的污泥样品 D1 ~ D4 的 DGGE 图谱

Fig.4　DGGE pattern of different strains (12, 15, 23, 25, 31) and sludge samples: D1-D4

根据图 3 DGGE 图谱中每个样品不同条带的强度及迁移率，对每个污泥样品的条带图谱进行细菌群落相似性进行分析，结果如表 1 所示，相似性程度的聚类分析结果如图 5 示. 不同深度的 SBR 池与水解酸化池中细菌群落的相似性不尽相似，如 o2 与 o3 之间的相似性最高，达到 89.2%；而水解酸化池污泥样品 a1、a2、a3 之间的相似性比 SBR 池污泥样品都低，其中 a1、a2 之间的相似性仅为 49.6%；各 SBR 池与水解酸化池污泥样品之间的相似性更低，最低为 Q3、a2 之间的相似性 33.1%.

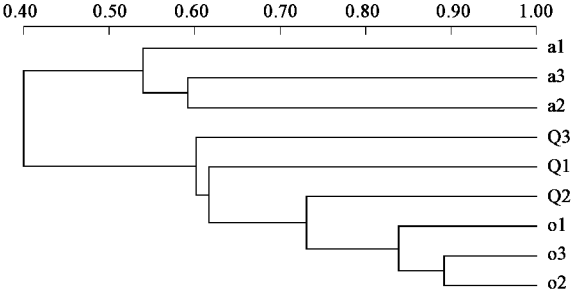


图 5　不同 SBR 池、水解酸化池污泥样品中的细菌群落相似性的聚类分析

Fig.5　Tree representing the genetic similarity of the bacterial community in different sludge samples

厌氧活性污泥与好氧活性污泥中选择了 y1、y2、y6、y9、h1、h2、h3 共 7 个条带进行割胶回收如图 3，每个条带经过 DGGE 反复分离纯化，形成单条带后重新扩增，纯化，进行 16S rDNA(V3)序列测定，得到 y1、h1、h3、h5 共 4 个序列. y2、y6、y9 共 3 个条带扩增纯化后进行连接，转化，各挑取 2 个转化子测序. 15、23、25 和 31 号 4 个高效菌株提取 DNA 后，扩增、纯化、克隆，各挑取 1 个转化子测序.

表 1　各 SBR 池、水解酸化池污泥样品之间的细菌群落相似性 /%

Table 1　Calculation Method Dice Coefficient of sludge samples from SBR tank and hydrolyze-acidification tank /%

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100	85.6	82.2	64.6	74.3	61.1	36.8	40.6	40.9
2	85.6	100	89.2	63.3	72.2	62.2	38.7	38.8	39.6
3	82.2	89.2	100	61.5	72.7	61.3	40	38.5	43.1
4	64.6	63.3	61.5	100	57.4	59.3	49.8	47.3	45.8
5	74.3	72.2	72.7	57.4	100	57.4	36.6	38.9	44.2
6	61.1	62.2	61.3	59.3	57.4	100	35.3	33.1	33.4
7	36.8	38.7	40	49.8	36.6	35.3	100	49.6	58.5
8	40.6	38.8	38.5	47.3	38.9	33.1	49.6	100	59.3
9	40.9	39.6	43.1	45.8	44.2	33.4	58.5	59.3	100

2.5　同源性分析

将所得到的序列片断在 GenBank 数据库用 Blast

进行检索与同源性分析，结果见表 2.得到与所测序列具有高度同源性的细菌种类：y2、23、25、31、h5 和 15 号分别与已知菌株 uncultured *Thermotogales* sp.、*Comamonas* sp. WT OTU1、*Agrobacterium tumefaciens*、*Bacillus subtilis*、*Bdellovibrio bacteriovorus*、*Comamonas testosteroni* 有高度同源性；与活性污泥样品中的优势条带 y2、y6、y9、h1 和 h2 相似的细菌种类为不可培养菌株；y6 的 2 个转化子 y6-4、y6-6 的测序结果相似，仅为 DNA 片断长度相差 4 个碱基，y2 与 y9 各取的 2 个转化子测序结果一致.各菌株来源于不同污染环境，大多具有重要生态功能.各序列在 GenBank 中的登录号为 DQ339470 ~ DQ339481.

表 2 各样品克隆测序序列的种属关系

Table 2 Phylogenetic relationship of different clone sequences

序号	登录号	Genbank 中接近的细菌种类	来源	相似性/%
y1	DQ339470	Bacterium W18	UASB 的颗粒污泥	95
y2-6	DQ339471	uncultured *Thermotogales* sp.	厌氧生物膜	100
y6-4	DQ339472	uncultured *Chloroflexi* sp.	河流沉淀物	97
y6-6	DQ339473	uncultured *Chloroflexi* sp.	河流沉淀物	97
y9-7	DQ339474	uncultured Archaeon	厌氧颗粒污泥	98
h1	DQ339475	uncultured soil bacterium S058	土壤	99
h3	DQ339476	uncultured bacterium GKS2-30	冰河冰水	97
h5	DQ339477	*Bdellovibrio bacteriovorus*		98
23	DQ339478	*Comamonas* sp. WT OTU1	种植玉米的土壤	100
15	DQ339479	*Comamonas testosteroni*		98
25	DQ339480	*Agrobacterium tumefaciens*	制药废水的活性污泥	100
31	DQ339481	*Bacillus subtilis*		100

3 讨论

“水解酸化 + SBR”工艺是啤酒废水生物处理的典型工艺之一，其中微生物群落的作用和生态学特性一直没有得到深入的研究.了解微生物种群结构等信息，能为废水处理工艺的运行提供指导.

污泥样品的 DGGE 指纹图谱可以反映废水处理系统的微生物区系多样性，然而一种细菌的电泳结果不一定只有一个条带[20]，一条 DGGE 条带也并非只代表一种细菌[21]，通过对割胶条带进行反复的 DGGE 分离纯化，能更准确研究细菌菌群中的优势菌株.

将样品 DGGE 图谱中的优势条带与筛选高效菌株的 16S rDNA 序列进行同源性分析，表明分离筛选出的高效菌株并非实际工艺中的优势菌株.因此，采用分子生物技术原位研究废水处理工艺中的微生物种群结构具有重要意义.

4 结论

(1)水解酸化池中的微生物群落随深度的改变，在结构组成和种群数量上均有较大差异，2 m 深处微生物群落相对丰富，优势条带突出.

(2)SBR 池不同深度微生物种群结构一致，沉淀期、进水期和曝气期不同处理时段的微生物种类一致，但优势菌群不同.

(3)所测序列 y2、23、25、31、h5 和 15 号分别与已知菌株 uncultured *Thermotogales* sp.、*Comamonas* sp. WT OTU1、*Agrobacterium tumefaciens*、*Bacillus subtilis*、*Bdellovibrio bacteriovorus*、*Comamonas testosteroni* 有高度同源性；与活性污泥样品中的优势条带 y2、y6、y9、h1 和 h2 相似的细菌种类为不可培养菌株；活性污泥样品中的优势条带与特异性条带与高效菌株的序列不同，表明筛选出的高效菌并非为实际处理过程中的优势菌.

参考文献：

[1] 刘彩萍，叶成梅.浅谈活性污泥生物相的观察在生产中的应用[J].中国市政工程，2002，**1**：52-53.

[2] 肖作义，王利平.城市污水厌氧好氧工艺活性污泥性状和生物相的指示作用[J].内蒙古科技与经济，2003，**1**：77-78.

[3] Nicolaisen M H，Ramsing N B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria [J]. Journal of Microbiological Methods，2002，**50**(2)：189-203.

[4] Forney L J，Liu W T，Guckert J B，*et al*. Structure of Microbial Communities in Activated Sludge：Potential Implications for Assessing the Biodegradability of Chemicals [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety，2001，**49**(1)：40-53.

[5] Liu W T，Marsh T L，Forney L J，*et al*. Determination of the microbial diversity of anaerobic-aerobic activated sludge by a novel molecular biological technique [J]. Water Science and Technology，1998，**37**(4)：417-422.

[6] 赵阳国，王爱杰，任南琪，等.SSCP 技术分析不同废水处理系统中微生物群落结构[J].环境科学，2006，**27**(7)：1429-1433.

[7] 邢德峰，任南琪，宋业颖，等. DG-DGGE 分析产氢发酵系统微生物群落动态及种群多样性[J]. 生态学报，2005，**25**(7)：1818-1823.

[8] 曾薇，杨庆，彭永臻，等. 采用 FISH、DGGE 和 Cloning 对短程脱氮系统中消化菌群的比较分析[J]. 环境科学学报，2006，**26**(5)：734-739.

[9] Ahn J，Schroeder S，Seviour R J，*et al*. Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch reactor [J]. Applied and Environmental Microbiology，2007，**73**(7)：2257-2270.

[10] Liu X C，Zhang Y，Yang M，*et al*. Analysis of bacterial community structure in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method [J]. Journal of Environmental Sciences (China)，2007，**19**(1)：60-66.

[11] 肖勇，杨朝晖，曾光明，等. 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[J]. 环境科学，2007，**28**(5)：1095-1101.

[12] 刘惠军，杨凤林，张捍民，等. 炭膜曝气生物膜反应器硝化作用及其微生物群落结构分析[J]. 环境科学，2007，**28**(9)：2123-2128.

[3] Miura Y，Hiraiwa M N，Okabe S，*et al*. Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance [J]. Water Research，2007，**41**(3)：627-637.

[14] Baek K H，Byung D Y，Kim H S，*et al*. Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude oil-contaminated soil with different treatments [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology，2007，**17**(1)：67-73.

[15] Muyzer G，Waal E C，Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of Polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Applied and Environmental Microbiology，1993，**59**(3)：695-700.

[16] 高平平，赵立平. 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.

[17] Ogram A，Sayler G S，Barkey T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments [J]. Journal of Microbiological Method，1987，**7**：57-66.

[18] Niemi R M，Heiskanen I，Wallenius K. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia [J]. Journal of Microbiological Method，2001，**45**(3)：155-165.

[19] Ogino A，Koshikawa H，Nakahara T，*et al*. Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses [J]. Journal of Applied Microbiology，2001，**91**(4)：625-635.

[20] Claudia S G，Cesareo S J，Pinar G，*et al*. Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave，Spain，and on its Palaeolithic paintings [J]. Environmental Microbio1ogy，2002，**4**(7)：392-400.

[21] 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.