

# 用 DGGE 技术分析污水人工快速渗滤系统中微生物种群分布\*

姜昕<sup>1,2</sup> 马鸣超<sup>1</sup> 李俊<sup>2\*\*</sup> 李力<sup>2</sup> 钟佐燊<sup>1</sup>

(中国地质大学(北京)水资源与环境学院/中国地质大学(北京)水资源与环境工程北京市重点实验室 北京 100083)

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

**摘要** :从深圳运行中的人工快速渗滤系统(CRI)的砂层填料中以5cm~10cm间隔垂直取10个样品,进行16S rDNA V3区的DGGE分析,结果表明,CRI系统中微生物种群随着深度的增加逐渐减少,在快渗池砂层填料的30cm深度范围内,微生物群落组成至少有18种,主要是Firmicutes、alpha proteobacterium中的异养菌,它们是COD降解的主要参与者,而在40cm及更深范围,菌群减少为12种甚至更少,优势菌是*Acidovorax* sp.、*Nitrospira* sp.、*Clostridium* sp.等,表明快渗池下部存在较强的硝化作用和厌氧的微环境,快渗池上、下层之间呈现出不同的多样性。结果揭示出CRI系统中的微生物种群空间分布状况,为其处理效果的稳定和提高提供了理论基础。

**关键词** :人工快渗系统,变性梯度凝胶电泳(DGGE),16S rDNA,微生物种群分布

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1179-05

## Analysis of Microbial Community Distribution in Constructed Rapid Infiltration System(CRI) by DGGE\*

JIANG Xin<sup>1,2</sup> MA Ming-Chao<sup>1</sup> LI Jun<sup>2\*\*</sup> LI Li<sup>2</sup> ZHONG Zuo-Shen<sup>1</sup>

(School of Water Resources and Environment, China University of Geosciences/Beijing Key

Laboratory of Water Resources & Environmental Engineering, Beijing 100083)

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081)

**Abstract** Sands of different depth were sampled from Constructed Rapid Infiltration system(CRI) in Shenzhen, and they were analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE). The profile of DGGE showed that, the microbial community decreased from top to bottom and in the upper 30cm part, CRI was rich in microbial community about 18 species which played some important roles in the biodegradation of COD, such as Firmicutes, alpha proteobacterium and so on; but less than 12 species existed below 40cm, such as *Acidovorax* sp., *Nitrospira* sp., *Clostridium* sp., this indicated that there were some nitrification phenomenon and anaerobic microenvironment in the lower part of CRI. The microbial diversity was prominent different spatially. The results showed the microbial community distribution and were certain meaningful to the stabilization and improvement of CRI.

**Key words** :Constructed Rapid Infiltration system(CRI), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE), 16S rDNA, Microbial community distribution

人工快速渗滤系统(Constructed Rapid Infiltration System,简称CRI系统)是在传统污水快速渗滤系统的基础上发展起来的一种新的污水处理技术<sup>[1]</sup>。它的主要创新点在于用渗透性能较好的天然砂等代替传统的污水快渗中的天然土层,克服了传统土地处理系统中水力负荷低、占地面积大等缺点,同时这一新系统采用干、湿交替的运行方式,既保证有较高的

水力负荷(1.0 m/d~2.0m/d),又能提高污水净化能力、达到达标排放的处理目标。

鉴于CRI建立和运行时间较短,目前对该系统的研究主要集中在设计参数及其工艺的改进方面,而对其内部起关键作用的微生物的研究却很少,且所采用的方法是基于传统的纯培养,由于该方法不能很好的反映微生物种群存在的原始状态<sup>[2]</sup>,并且

\* 国家科技支撑项目(No. 2006BAD25B04)

\*\* 通讯作者 Tel 010-68975891, E-mail jli@caas.ac.cn

收稿日期:2007-02-13,修回日期:2007-05-10

在自然环境样品中可分离出的微生物种类占总微生物种类总数的0.1%~1%<sup>[3]</sup>,因此通过纯培养得到的结论不能客观、全面地反映CRI内微生物的种群结构及变化,也不能很好解释系统中微生物组成与污水处理效果的关系,这已影响CRI处理效果的稳定和进一步提高。目前,不依赖微生物培养的各种新技术方法不断涌现,并在微生物的生态研究中得到应用。变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术不仅可以对可培养的微生物进行分析,而且还可以对不可培养的微生物进行研究,能更真实地反映系统中微生物种群的构成和分布<sup>[4]</sup>。该技术将样品中不同微生物的16S rDNA的V3区扩增产物在DGGE中分离,根据电泳条带的多寡和亮度辨别样品中微生物的种类多少和丰度,分析微生物的多样性;同时,对不同条带回收测序并与GenBank中的序列比对可以确定微生物种类。DGGE认为是目前研究微生物遗传多样性和种群动态性最有力的分子生物学技术<sup>[5]</sup>。本研究的目的是采用DGGE技术对CRI系统不同空间分布的样品总DNA分析,以全面客观揭示该系统中微生物种群分布,为CRI处理效果的稳定与提高提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

砂层样品于2006年9月取自深圳观澜高尔夫球场CRI一号快渗池不同深度,取样间隔为5cm~10cm,共取10个样品。进水、出水水样分别取自沉淀池的出水口和快渗池出水口。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 样品总DNA提取及纯化:**采用改进的Kuake<sup>[6]</sup>等人的间接法,对快渗池中以5cm~10cm间隔垂直取的10个砂层样品进行总DNA的提取,细胞裂解采用珠式细胞破碎器(MINI-BEADBEATER)机械破壁2.5min,纯化采用试剂盒PCR-clean-up kit。

**1.2.2 PCR扩增**(1)样品总DNA的PCR扩增:以样品总DNA为模板,采用16S rDNA基因V3区特异性的引物对<sup>[7]</sup>F338GC和R518,进行PCR扩增。反应条件和反应体系见参考文献[8]。

(2)Reconditioning PCR<sup>[9]</sup>:反应体系中以1.5 $\mu$ L第一轮PCR产物为模板,其余同前。PCR反应条件94 $^{\circ}$ C 3.5min,94 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,5个循环,72 $^{\circ}$ C延伸6min。

(3)用于测序的PCR扩增:反应体系中的引物为R518和F338(不带GC夹),其余体系同前,反应条件94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,30个循环,72 $^{\circ}$ C延伸6min。

以上PCR产物均用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)**(1)变性胶的制备:变性剂浓度范围为35%~60%(100%的变性剂为7mol/L的尿素和40%的去离子甲酰胺的混合物),胶浓度为8%,变性剂的浓度从上向下递增。

(2)PCR样品的加样:在每个加样孔加入含有10%的加样缓冲液的PCR样品20 $\mu$ L。(3)电泳及染色:150V,60 $^{\circ}$ C电泳5h。电泳完毕后,将凝胶在SYBR Green I中染色约30min。(4)照相及观察:将染色后的凝胶用凝胶影像分析系统分析,观察电泳条带并拍照。

**1.2.4 割胶、测序:**选择DGGE胶上的优势条带进行切割,在每条条带中间切下约30mg放入2mL的离心管中,再加入100 $\mu$ L的TE buffer。将凝胶压碎后,-20 $^{\circ}$ C冷冻过夜,然后用65 $^{\circ}$ C的热水温浴20min,5000r/min离心5min。取上清液6 $\mu$ L为模板进行PCR扩增,扩增产物送上海生工公司测序。

**1.2.5 水质测定:**主要的水质监测指标有:pH、COD<sub>cr</sub>、氨氮和总氮,其中,用重铬酸钾法测定COD<sub>cr</sub>,纳氏试剂分光光度法测定氨氮,碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定总氮。

## 2 结果与分析

### 2.1 总DNA提取和PCR扩增

对从10个样品提取的DNA进行电泳检测,条带大小为10kb左右,可满足后续实验要求。以其为模板进行16S rDNA V3区(含“GC夹子”)扩增,得到约220bp的大小片段,再采用Thompson<sup>[9]</sup>等提出的“Reconditioning PCR”的方法,消除了异源双链DNA(heteroduplex),保证了目的片段的特异性扩增(见图1,其中0为阴性对照)。

### 2.2 DGGE图谱分析

10个样品16S rDNA V3区的DGGE指纹图谱见图2。从图谱中可知,不同深度的样品经过DGGE后都可以分离出数目不等的电泳条带,且条带的强度和迁移速率也不相同。CRI系统中微生物种群随

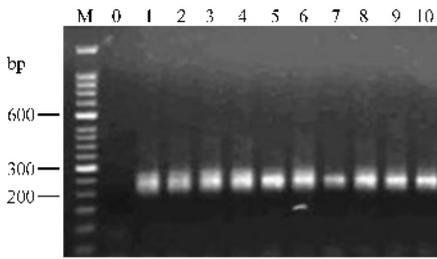


图1 Reconditioning PCR产物琼脂糖凝胶电泳图像

着深度的增加逐渐减少,在快渗池 30cm 深度范围内,微生物群落组成至少有 18 种,而在 40cm 及更深范围微生物种属减少至 12 种以下,快渗池上、下层之间表现出不同的微生物多样性。同时,除少数菌群(条带 B)贯穿所有样品之外,许多菌群随着深度的增加逐渐消亡(条带 A、E、F、G、H)或产生(条带 C、D、I)这与污水的水质随着下渗不断发生变化有很大关系。选取优势条带 A~I 进行回收测序,将测序结果进行 BLAST 比对,结果见表 1。

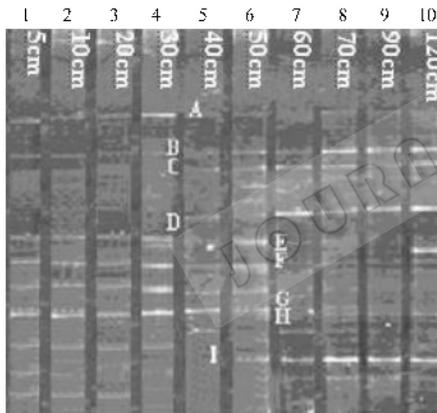


图2 DGGE 指纹图谱

由表 1 可知,条带 B 贯穿了所有样品,它所代表的是一种不可培养的土著菌群,在快渗池深度方向的分布比较均匀;从 30cm 以上取得的样品 1~4 中的主要条带有 A、E、F、G、H,主要是某些属于 Firmicutes、alpha proteobacterium 的在土壤中的不可培养菌,它们大多是异养菌,是 COD 降解的主要参与者;从 40cm 以下的样品 5~10 中的优势条带 C、D、I,主要代表的是 *Acidovorax* sp.、*Nitrospira* sp.、*Clostridium* sp. 等不可培养种属,其中 *Nitrospira* sp. 是硝化螺旋菌属,有较强的硝化能力。条带 I 代表 *Clostridium* sp.,它是一类厌氧菌,这表明在快渗池 50cm 深度以下开始出现厌氧的微环境,这与文献报

道的有所不同。张永华<sup>[10]</sup>指出,好氧生物降解是 CRI 系统去除有机污染物的主要机制。CRI 系统采用淹水、落干交替运行的布水方式,在落干阶段,水的下渗将空气吸入,系统复氧,系统内保持良好的好氧状态。起初,该快渗池一天布水 4 次,系统落干速度很快,复氧能力很强,但目前由于该快渗池堵塞现象比较严重,每天只能淹水 2 次,因此认为快渗池的堵塞影响了系统的复氧,从而在该快渗池下部出现厌氧的微环境。

表 1 优势菌群 16S rDNA V3 区的测序结果

条带	提交序号	相似性(%)	最相近的序列
A	DQ337021.1	96	Uncultured bacterium
	AJ400574.1	95	Uncultured bacterium
	DQ180108.1	95	Uncultured bacterium
B	EF019221.1	99	Uncultured bacterium
	EF455191.1	99	Uncultured soil bacterium
	EF392926.1	99	Uncultured bacterium
C	EF208659.1	100	Uncultured bacterium
	DQ862512.1	100	Uncultured bacterium
	DQ922753.1	100	<i>Acidovorax</i> sp.
D	EF434853.1	99	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp.
	AB259560.1	99	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp.
	AB252944.1	99	Uncultured <i>Nitrospirae</i> bacterium
E	EF073377.1	99	Uncultured Firmicutes bacterium
	AB205790.1	96	Uncultured bacterium
	DQ221458.1	99	Uncultured bacterium
F	AF128675.1	93	Uncultured soil bacterium
	AF234723.1	93	Uncultured sludge bacterium
	AF507695.1	93	Uncultured soil bacterium
G	EF378189.1	95	Uncultured bacterium
	EF378554.1	95	Uncultured bacterium
	DQ202407.1	95	Uncultured bacterium
H	EF075670.1	98	Uncultured alpha proteobacterium
	AF431104.1	98	Uncultured alpha proteobacterium
	AY917891.1	98	Uncultured bacterium
I	AB294941.1	99	Uncultured <i>Clostridium</i> sp.
	EF052865.1	99	<i>Clostridium</i> sp.
	EF052864.1	99	<i>Clostridium</i> sp.

用 BIO-RAD QUANTITY ONE4.5.1 软件对 DGGE 图谱进行聚类分析(见图 3)。

由图 3 可以看出,从 CRI 系统的 5cm 至 30cm 获

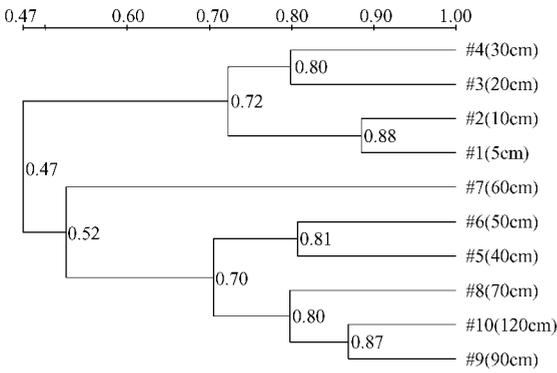


图3 DGGE图谱的UPGMA聚类分析

取的1~4号样品,它们的DGGE指纹图谱相似性很高,说明快渗池上层约30cm内微生物种群变化不明显;40cm以下采集的5、6、8、9、10号样品之间的相似性也较高,说明快渗池下部(40cm以下)的微生物种群结构相对稳定;但上层和下层之间的相似性差异却很大,表明其中的微生物种群结构发生变化,上、下层内的微生物呈现出不同的菌群组成。其原因与CRI系统中水质不断发生变化有很大关系,快渗池采用下向流的布水方式,在污水下渗过程中,污染物发生物理、化学、生物等作用而发生变化,因此,降解这些污染物的微生物也相应发生改变,最终形成稳定的群落结构。样品7(60cm)相对于其它样品的相似性很低,这是由于该快渗池为减少堵塞,曾将上层约60cm的砂层填料上下翻动,翻动后60cm处的填料含有少量的浮油,取样时也发现,快渗池60cm处产生明显的分层,上层砂的颜色明显比下层砂的深,浮油对微生物的分布产生很大的影响,由此推断样品7较其它样品的相似性较低。

### 2.3 CRI系统中的菌群分布与系统水处理效果的关系

采集水样测定的水质结果见表2。从中可知,出水pH有所下降,这可能与快渗池中的微生物代谢产酸以及硝化作用产生 $H^+$ 有关; $COD_{Cr}$ 的去除率很高,可能是由于Firmicutes、alpha proteobacterium中某些异养菌作用的结果,*Nitrospira* sp.的存在使CRI系统有较强的硝化能力,从而对氨氮的去除率也很高,同时,DGGE图谱表明,快渗池上部微生物种群多样性丰富, $COD_{Cr}$ 和氨氮等污染物发生好氧生物降解得以去除,随着污染物浓度的下降,相应的微生物的生长受到抑制,从而在快渗池下部的多样性较上部贫瘠;在快渗池50cm以下检测到*Clostridium*

sp.,标志着快渗池下部开始出现厌氧的微环境,这有利于反硝化作用的进行,但可能因为硝酸还原菌的数量少或活性低,也可能是由于缺少反硝化所需要的碳源等原因抑制了反硝化作用,因此CRI系统对总氮的去除率很低。为增加反硝化碳源,可以直接投加甲醇、葡萄糖等有机物或者将适量原水引入工艺的反硝化段,以原水中的有机物质充当有机碳源,但投加甲醇、葡萄糖的成本太高,不适合采用,而引入原水必将减小工艺的水力负荷并加大工程的能耗,因此对CRI系统也不建议采用。锯末中含有大量的纤维素,在其缓慢降解过程中持续释放的有机产物可以充当碳源,并且降解的时间越长,其充当碳源的寿命也就越长,因此建议在快渗池下部填料中添加适量的锯末,以提高CRI系统对总氮的去除率,但添加的量以及添加后如何减少系统的堵塞有待进一步研究。

表2 快渗池进、出水水质指标

指标	pH	$COD_{Cr}$ (mg/L)	氨氮 (mg/L)	总氮 (mg/L)
进水	6.79	106	11.5	20.6
出水	5.95	10	1.24	14.3
去除率	-	90.6%	89.2%	30.6%

### 3 讨论

采用DGGE等分子生物学手段研究环境系统中微生物菌群结构和多样性,获得样品中全部的DNA是前提,本研究采用机械破壁和酚氯仿抽提的方法,有效地释放细胞内的DNA并去除蛋白,满足环境样品总DNA提取的要求。这样对环境样品中总DNA分析,才能表征环境样品中的微生物菌群组成及其多态性。采用Reconditioning PCR的方法,有效地消除了heteroduplex,保证了目的片段的特异性扩增,为后续的DGGE提供了理想的模板,这也是研究的关键环节。

本研究表明,采用PCR-DGGE技术对CRI系统内微生物种群分布的解析是可行的,在快渗池5cm~30cm深度范围内,微生物群落组成至少有18种,主要是一些属于Firmicutes、alpha proteobacterium等的常见异养菌,这是COD降解的主要因素;而40cm深度以下,菌群减少为12种甚至更少,主要的优势菌属是*Acidovorax* sp.、*Nitrospira* sp.、*Clostridium* sp.等,表明快渗池下部存在较强的硝化作用和厌氧的

微环境,快渗池上、下层之间呈现出不同的多样性。

本研究只是从 DGGE 指纹图谱上初步比较了 CRI 系统中不同深度的微生物种群结构差异,由于目前该技术只能定性地分析环境样品,准确定量的研究还较难进行,因此,要完全确定快渗系统中的种群结构,还需要借助于荧光原位杂交、基因文库的构建等其他分子生态学的方法作进一步的研究,同时,由于快渗池 50cm 以下呈现厌氧的微环境,可以在快渗池下部的填料中添加适量锯末,以加强系统的反硝化能力,从而提高总氮的去除率,但添加的量以及添加后如何减少系统的堵塞问题,有待进一步研究。

### 参考文献

[ 1 ] 何江涛,钟佐燊,汤鸣皋,等.中国环境科学,2002,22(3):239~

243.

[ 2 ] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H, *et al.* Microbiol. Rev. 1995 **59** (1):143~169.

[ 3 ] Brock T D. Symp. Soc. Gene. Microbiol, 1987 **41** :1~17.

[ 4 ] 罗海峰,齐鸿雁,薛凯,等.生态学报,2003,23(10):2170~2175.

[ 5 ] 邢德峰,任南琪,宫曼丽,等.环境科学,2005,26(2):172~176

[ 6 ] Kuake C R, Barns S M, Busch J D. Diverse Appl Envir. Microbiol, 1997 **63** (9):3614~3621

[ 7 ] Muyzer, Ellen C W, Andre G U, *et al.* Environ. Microbiol, 1993 **59** :695~700.

[ 8 ] 刘新春,吴成强.生态学报,2005,25(4):842~847.

[ 9 ] Thompson J R, Marcelino L A, Polz M F. Nucleic Acids Res 2002 **30** :2083~2088.

[ 10 ] 张永华,张金炳,殷淑华,等.华北水利水电学院学报,2004,25(3):68~71.