

采油废水模拟处理系统中酵母菌群落 结构动态初步解析

王振宇^{1,2} 赵更峰¹ 陈威¹ 张昱^{2*}

(1. 河南师范大学生命科学学院 河南 新乡 453007)

(2. 中国科学院生态环境研究中心 北京 100085)

摘要: 本研究建立好氧活性污泥的模拟体系处理经过物化预处理的采油废水, 控制温度等条件接近实际运行体系的情况下, 考察系统 COD 去除率和污泥体系中酵母菌多样性变化。结果显示系统稳定后 COD 去除率在 70%以上; 利用非培养的方法考察了污泥中酵母菌在系统启动和稳定后的多样性变化, 结果表明酵母菌在采油废水处理系统中具有较高的多样性和稳定性; 原水中具有较高的酵母菌多样性, 并在系统稳定过程中呈现逐渐增加的趋势。表明酵母菌可以在活性污泥系统中稳定存在, 同时酵母菌等真核微生物在烃类污染物去除和环境治理上具有一定的研究和应用价值。

关键词: 采油废水, 酵母菌, 群落结构

Analysis on Yeast Population Dynamics of Simulated Oilfield Produced Water Biotreatment System

WANG Zhen-Yu^{1,2} ZHAO Geng-Feng¹ CHEN Wei¹ ZHANG Yu^{2*}

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

(2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: The simulated activated sludge system was set up to treat the oilfield produced water after physical-chemical treatment in this study. The molecular methods such as PCR-DGGE and sequencing were applied to study population dynamics and diversity of yeast during system starting up and running. The result indicated that both in the influent and activated sludge showed higher yeast diversity. And yeast diversity increased during system running. It suggested that yeast would exist in the sludge and contribute to COD removal. And also yeast would perform well in hydrocarbon transformation and pollutant removal.

Keywords: Produced Water, Yeast, Population Structure

采油废水是石油生产中产生的主要废水, 具有高温、高盐度和大量疏水性烃类物质的特点^[1,2], 是行业废水全面达标排放的主要对象。采油废水处理

后可以回注地下, 也可以直接排放到环境水体。国内现有处理工艺都是以 COD、油含量等指标而设计的, 常见的为重力沉降、气浮等物化处理串联生

基金项目: 天津市科技创新专项资金(No. 06FZZDSH00900); 河南省科技攻关项目(No. 082102220014); 河南师范大学青年基金(No. 2007037)

* 通讯作者: Tel: 86-10-62849149; ✉: zhangyu@rcees.ac.cn; zywang@henannu.edu.cn

收稿日期: 2008-06-27; 接受日期: 2008-09-09

物处理。一般来说,生物处理是保证废水最终达标排放的关键步骤,利用微生物的代谢作用,可以把废水中残留的一些油份和其他有机烃类化合物予以降解去除^[3]。目前针对生物处理如活性污泥中微生物群落动态变化和功能的研究主要集中在细菌,有关酵母菌在废水生物处理中的地位和作用,至今为止还缺乏相关研究。

基于核糖体 RNA 基因的 PCR 扩增(Polymerase Chain Reaction)和变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)结合起来的 PCR-DGGE 技术,可对同一长度的 PCR 扩增片断根据序列的不同在变性梯度凝胶上得到分离,从分子水平上表征环境样品微生物群落结构多样性和动态变化,是对传统分离培养方法的有力补充,同时具有快速、客观等优势,近年来在点突变检测和细菌群落多样性研究方面得到普遍认可和广泛应用,并快速地渗透到水处理领域,为水处理系统中微生物群落结构和功能的解析提供了强大的技术支持。而对于酵母菌分子多样性的研究很少,而且仅限于在酒制品、饮料和酸奶等酵母菌发酵的食品生产过程中酵母菌的动态变化^[4-6]。

本文在已有基础上建立并优化了环境样品中酵母菌总 DNA 的提取方法,利用 PCR-DGGE 的方法初步考察了酵母菌在处理体系稳定过程中的多样性和变化规律。环境样品中酵母菌的研究,提示污水处理过程中微生物群落组成的复杂性和多样性,对于研究系统内微生物功能的强化和不同微生物类群间的协同作用提供重要信息。

1 材料与方 法

1.1 实验装置

在有效处理容积为 1 L 的有机玻璃容器中接种 200 mL 的种污泥和 800 mL 物化处理后的污水(均取至北方某油田污水处理系统)进行好氧启动,恒温循环水控制水温在 $45^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, DO 控制在 $2\text{ mg/L}\sim 3\text{ mg/L}$ (同实际运行体系)。每天停止曝气 45 min 进行水样的更新,同时检测污泥 SV 值。每周取污泥样品进行酵母菌多样性分析,每天测定出水 COD 直至稳定在 100 mg/L 以下。如图 1 所示。

1.2 仪器和试剂

PCR 扩增仪 iCycler Thermal Cycler 和变性梯度凝胶电泳仪 The Dcode Universal Mutation Detection

System(美国 BioRad 公司);凝胶成像系统 GelDoc 2000 (BioRad Laboratories-Segrate, 美国);PCR 反应试剂(大连宝生物公司)。DNA 提取和电泳分析试剂为国产分析纯。

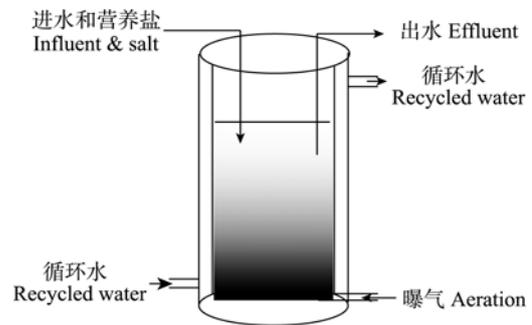


图 1 反应装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the reactor

1.3 进水和污泥真菌 DNA 提取方法

取采油废水 50 mL 和污泥样品 1 mL 离心 (5000 r/min , 10 min), 收集沉淀, PBS(磷酸盐缓冲液)洗涤 2 次后进行酵母菌 DNA 提取。真菌染色体 DNA 提取参照文献[7]并加以修改, 加入酸化玻璃珠结合蜗牛酶和蛋白酶强化破壁。

1.4 PCR-变性梯度凝胶电泳(DGGE)和结果分析

1.4.1 PCR 扩增引物: 采用巢氏扩增, 第一轮采用酵母菌 26S rDNA D1/D2 区通用引物 NL1 和 NL4^[8], 取扩增产物 $1\text{ }\mu\text{L}$ 作为第二次 PCR 扩增的模版 DNA, 引物是携带 GC-Clamp 的 NL1 和 LS2^[5]。

1.4.2 PCR 反应体系: $50\text{ }\mu\text{L}$ 的 PCR 反应体系其组分为: $10\times\text{PCR buffer } 5\text{ }\mu\text{L}$, $200\text{ }\mu\text{mol dNTP 混合物 } 4\text{ }\mu\text{L}$; 引物 $10\text{ pmol}\sim 20\text{ pmol}$; Taq DNA 聚合酶 1.25 U ; 模板 DNA $1\text{ }\mu\text{L}$; 加无菌双蒸水补至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.4.3 扩增条件: 首轮扩增 30 个循环应用 Touchdown 模式(iCycler Thermal Cycler, BioRad, 美国): 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 复性 30 s, 以后每循环降低复性温度 0.5°C , 72°C 延伸 40 s, 共 16 个循环; 接着 14 个循环为: 94°C 变性 30 s, 52°C 复性 30 s, 72°C 延伸 40 s; 72°C 延伸 10 min。二次扩增条件为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 52°C 复性 30 s, 72°C 延伸 40 s, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。

1.4.4 DGGE 分离: DGGE 电泳用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶(g/L), 变性梯度范围为 30%~50%, 电泳上样量为 $30\text{ }\mu\text{L}$ 的 PCR 产物; 电泳条件为: $1\times\text{TAE}$ 电泳

缓冲液, 60°C、25 V 运行 20 min 后 150 V 继续运行 6 h。溴化乙啶(EB)染色和纯水洗涤各 20 min, 然后紫外成像(Gel Doc 2000™, BioRad, 美国)和实验结果分析(BioRad Quantity One 4.3.0)。

1.4.5 部分条带的测序: 选取进水样品 DGGE 图谱在紫外下肉眼可见的条带进行切胶并测序。

2 结果与讨论

2.1 废水处理效果

经过物化预处理的采油废水 COD 在 300 mg/L 左右, 经过 20 d 的稳定后, 出水 COD 稳定在 100 mg/L 以下, 去除率在 80% 左右, 结果见图 2。说明活性污泥系统的处理可以满足污水外排的要求。一般认为细菌是活性污泥中的主体, 负责污染物的转化, 大部分的研究也集中在细菌多样性和功能的研究。而酵母菌具有耐盐、耐酸等特征, 并对疏水性较强的物质有很好的转化利用能力, 尤其对烷烃的去除贡献较大, 认为以单加氧的方式对烃类进行羟基化后矿化或去毒, 其中 P450 单加氧酶就是真核微生物在污染物的诱导下表达, 负责烷烃去毒和污染物转化的多功能蛋白质, 同时也有研究认为酵母菌可以共代谢的方式对其中含苯酚的芳香类物质进行高效利用^[9], 包括其中较高含量的多环芳烃进行转化。本研究也发现模拟系统对总 PAHs(多环芳烃)的去除率在 90% 以上, 尤其是三环以下的芳香烃, 去除率在 95% 以上。和细菌相比, 酵母菌对烷烃类和芳香烃类有机物去除的机理研究以及酵母菌在环境治理上的应用还处于起步阶段, 相关的工作有待进一步深入。

2.2 酵母菌 DNA 提取和 PCR 扩增

可参考的酵母菌 DNA 提取方法仅针对纯培养

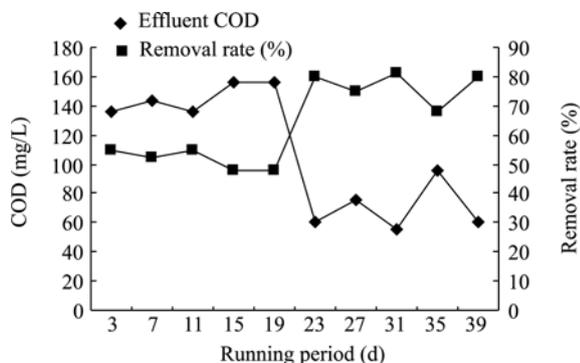


图 2 出水 COD 值和去除率

Fig. 2 COD of effluents and removal rate

或从样品上洗出酵母菌后进行, 一般采用蜗牛酶的方法破壁, 而对于活性污泥中酵母菌 DNA 提取鲜见报道, 本文在纯种酵母菌 DNA 提取的基础上, 利用酸化玻璃珠震荡分散污泥并促进酵母菌细胞壁的破裂, 而后采用常规的 DNA 沉淀方法获得酵母菌的染色体 DNA, 获得的 DNA 溶液直接用于 PCR 扩增可以获得满意的效果, 图 3 是利用酵母菌总 DNA 二次扩增后的结果, 片段长度 280 bp。二次扩增时的引物携带 GC 发卡结构利于扩增产物的 DGGE 分析, 同时二次扩增可以大大降低 PCR 产物的非特异性, 有利于下一步的 DGGE 电泳分离。

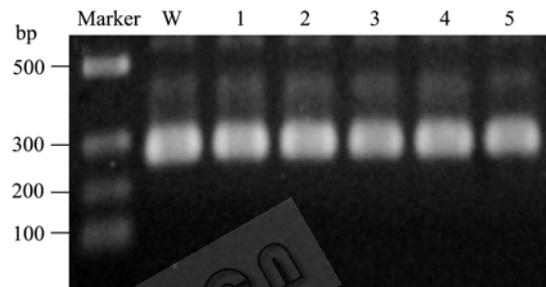


图 3 二次 PCR 的扩增结果

Fig. 3 Result of the nested PCR for DGGE

2.3 酵母菌多样性变化

利用 DGGE 对系统启动和稳定运行过程中, 活性污泥体系中酵母菌群落组成和动态变化进行了跟踪, 并和原水酵母菌进行了比较, 结果见图 4。可以看出, 进水中就有比较丰富的酵母菌群落组成, 酵母菌的条带数为 13。在系统启动后, 微生物群落结构发生了明显变化, 说明系统内微生物在不同的处理条件下发生了明显的定向调整。同时系统 COD 去除效果稳定后(18 d), 污泥中酵母菌结构也趋向稳定, 原水样品中的 13 个条带在污泥样品中持续存在, 说明酵母菌可以在活性污泥中稳定。酵母菌群落和原水微生物群落的相似性达到 50%, 说明污泥中存在的优势菌群和进水由来的微生物群落有关。这和前期对实际工艺考察分析的结果一致^[10]。在此基础上原水样品中肉眼可见的 6 个条带进行切胶测序结果如表 1。

从表中可见, 除了一株青霉菌外, 其余都是子囊菌酵母菌, 其中一株是假丝酵母, 4 株酵母属于德巴利酵母, 它们和常见的红酵母及毕赤酵母都有很强的烷烃氧化和发酵石油的能力。在前期的工作中

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

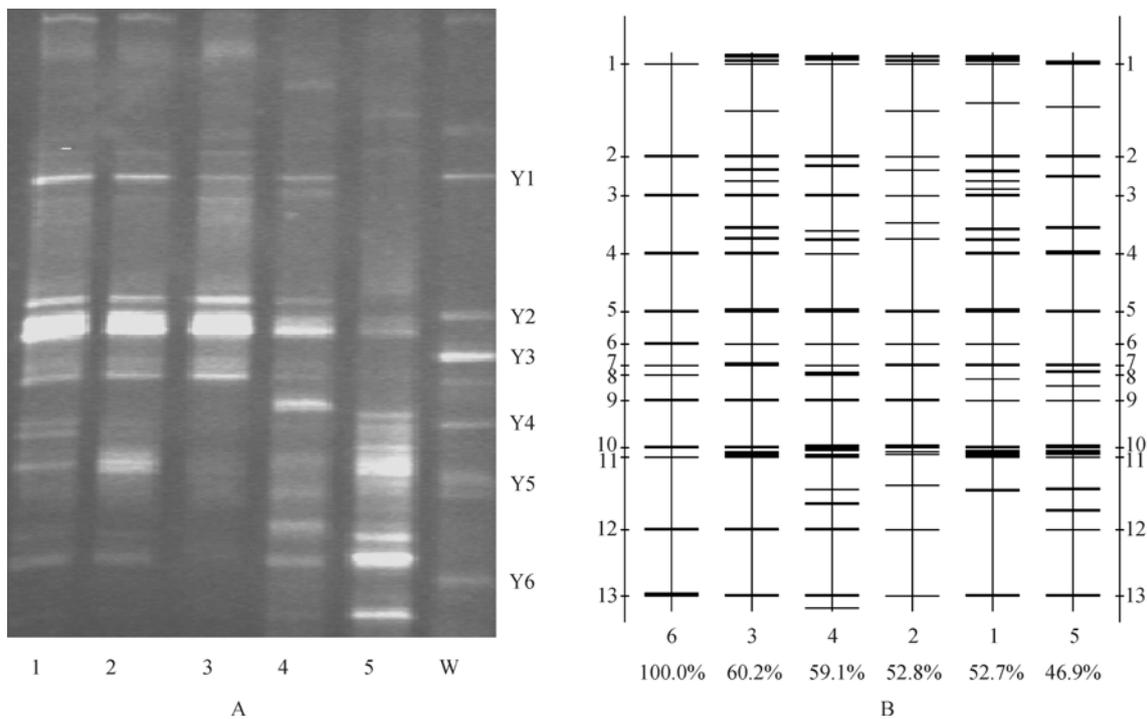


图4 酵母菌群落在好氧体系中的动态变化,电泳图(A) 模式图(B)

Fig. 4 Dynamic change of yeast population in aerobic system, A: Electrophoresis profile; B: Pattern

A: DGGE 谱图(S1—S5 泳道是每周运行时间的污泥样品; W: 采油废水样品; Y1—Y6: 测序条带); B: DGGE 示意图(两侧是以进水样品为标准的条带号, 下面为相似百分数).

A: DGGE profile (S1-S5: Activated sludge samples; W: Produced water sample. Y1-Y6: Band for sequencing); B: DGGE pattern (Band number according to produced water sample, Percent for similarity).

表1 凝胶回收测序结果
Table 1 Results of sequences from gel bands

条带 Bar	同源性 Identity(%)	相近菌 Closest match
1	98	<i>Debaryomyces polymorphus</i>
2	98	<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i>
3	97	<i>Candida</i> sp.
4	97	<i>Debaryomyces vanriijiae</i> .
5	97	<i>Debaryomyces hansenii</i>
6	98	<i>Penicillium purpurogenum</i>

也分别从石油污染的土壤和采油废水处理的活性污泥中分离出相关的酵母菌^[11], 这说明非培养方法和传统培养方法有很好的 consistency。提示可以根据非培养的结果有目的的获得部分微生物。从 DGGE 图谱上可见有丰富的酵母菌存在, 同时结合电泳图和示意图显示 6 株真菌在整个运行周期内可稳定存在于污泥样品中。但测序和分离结果表明利用烷烃和芳香烃的酵母菌都属于子囊菌纲, 这与可利用石油烃的细菌具有较宽的分类地位明显不同, 对于酵母菌在该系统中的组成和变化规律有待进一步研究。

从为数不多的有关酵母菌用于废水处理的的研究结果来看, 酵母菌可以降解处理染料、油脂类和 PAHs 等各种有机污染物, 特别是对于高油脂类废水的处理具有独特的优势^[12]。但是, 目前针对活性污泥中微生物群落动态变化和功能的研究主要集中在细菌及有关酵母菌在废水生物处理中的地位和作用, 至今为止还缺乏系统研究。本研究发现酵母菌在采油废水处理系统中有较高的种群多样性, 表明酵母菌等真核微生物在含烃类、油脂类污染物的特定废水处理和环境整治上具有一定的研究和应用价值。

3 结论

1) 本研究利用修改的真菌染色体 DNA 提取方法, 成功地从污泥样品中提取了酵母菌的染色体 DNA, 获得的 DNA 样品不经纯化可以直接进行 PCR 扩增等分子操作;

2) 利用非培养的 PCR-DGGE 的方法初步研究了酵母菌在采油废水处理中的多样性变化, 发现系统存在较丰富的酵母菌种群, 测序结果表明都属于

子囊菌纲。提示了酵母菌在环境保护上的潜在应用价值;

3) 活性污泥中的酵母菌群落与原水具有较高的相似性,表明原水中的优势菌可能是活性污泥优势菌的重要来源。

参 考 文 献

- [1] Telleza GT, Nirmalakhandan N, Gardea-Torresdey JL. Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water. *Adv Environ Res*, 2002, **6** (4): 455–470.
- [2] Hamme JDV, Singh A, Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Molecul Biol Rev*, 2003, **67** (4): 503–549.
- [3] 李化民, 苏显举, 马文铁. 油田含油污水处理. 北京: 石油工业出版社, 1992, pp.145–149.
- [4] Cocolin L, Aggio D, Manzano M, *et al.* An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *Intern Dairy Journal*, 2002, **12** (5): 407–411.
- [5] Cocolin L, Bisson LF, Mills DA. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **189** (1): 81–87.
- [6] David AM, Eric AJ, Cocolin L. Yeast diversity and persistence in botrytis affected wine fermentations. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (10): 4884–4893.
- [7] 李绍兰, 周 斌, 杨丽源, 等. 真菌 DNA 提取方法的改良. 云南大学学报(自然科学版), 2002, **24** (6): 471–472.
- [8] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, **73**: 331–371.
- [9] Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele JP. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and co-metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **43**: 156–164.
- [10] Wang ZY, Li J, Zhang Y, *et al.* Co-variations of bacterial community structures and catabolic genes related to PAH levels in a produced water treatment system consisting of successive anaerobic and aerobic units. *Science of the Total Environment*, 2007, **373** (1): 356–362.
- [11] Hesham AEL, Khan S, Liu XC, *et al.* Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast*, 2006, **23**: 879–887.
- [12] Pan F, Yang QX, Zhang Y, *et al.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pichia anomala*. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**: 803–806.

~~~~~

稿件书写规范

## 论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字,年份必须用全称。对科技期刊来说,凡处在计量单位和计数单位前面的数字,包括9以下的各位数字,除个别特例外,均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字,例如:一本教材、两种商品等。