

SBR 中 SRT 对总细菌群落结构的影响研究

马瑶¹ 孙宝盛¹ 周冬冬²

(1. 天津大学环境科学与工程学院, 天津 300072; 2. 天津大学建筑设计研究院, 天津 300072)

摘要 为了揭示序批式反应器不同污泥停留时间(SRT)下总细菌群落结构的异同及 SRT 变化对总细菌群落结构的影响,应用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)进行研究。通过克隆测序发现,不同的 SRT 条件下生物多样性和种群结构会有所差异,既存在各 SRT 条件下相同的优势菌群(*Escherichia coli* 和 *Aeromonas sp.*),也存在某些 SRT 下特有的优势菌群(*Uncultured Peptostreptococcaceae*),SRT 为 40 d 时检测到以降解硫酸盐获得能源的优势微生物。研究还表明,SRT 为 40 d 时多样性指数取得最大值,各 SRT 条件下微生物的种群相似性差别较大。

关键词 序批式反应器 群落结构 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 相似性分析 克隆测序

中图分类号 X703 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2012)01-0168-05

Influence of sludge retention time on microbial community in SBR

Ma Yao¹ Sun Baosheng¹ Zhou Dongdong²

(1. School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Tianjin University Research Institute of Architectural Design, Tianjin 300072, China)

Abstract In order to reveal the succession procedure of bacteria community structure under different sludge retention times in SBR, the molecular biological techniques of polymerase chain reaction (PCR) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were applied. The results of cloning and sequencing revealed that the difference of the structure of bacteria between the samples was obvious. *Escherichia coli* and *Aeromonas sp.* were dominant species in the reactor, however, *Uncultured Peptostreptococcaceae* was only found in the sample under the SRT of 40 d. It was also found that Shannon-Wiener index was biggest when the SRT was 40 d. The results of similarity analysis showed that the samples were obviously different from each other.

Key words sequencing batch reactor; microbial community; PCR-DGGE; similarity analysis; cloning and sequencing

污泥停留时间(SRT)是对活性污泥系统进行设计和改造的重要参数,许多主要的咨询公司均采用 SRT 作为设计参数的指标。SRT 可以作为活性污泥工艺设计和运行的重要变量,其原因是 SRT 可以直接影响微生物的增殖速率,即可通过控制反应器中的基质浓度来限制微生物的生长,同时 SRT 所涉及的所有参数均可以精确和连续的测定。

近年来,对 SRT 的研究也越来越多。有研究显示,SRT 对污水的处理效率(如脱氮功能^[1,2],COD 和氮、磷的去除^[3,4])及污泥特性^[5,6]等,有较大影响。此外,通过比较溶解氧的消耗速率,发现 SRT 还能够影响污泥活性^[7,8],有研究^[9]也表明,污泥活性受 SRT 的影响较大,且认为 MBR 系统在 SRT 增长到 17 d 后污泥活性就会下降。还有学者^[10]研究了不同 SRT 下污泥的流变特性,Yu 等^[11]则研究了在不同污泥龄条件下硝化特性的异同。

随着分子生物学的推广,从微生物角度揭示 SRT 对污水处理系统影响的研究^[12]越来越多,Pascal 等^[13]研究了污泥龄分别为 2 d 和 8 d 条件下生物多样性的异同,还有学者^[14]研究了短泥龄对微生物种群结构的影响,发现不同泥龄下有各自不同的优势菌种,且污泥龄较长时生物多样性也更丰富。还有研究表明^[15],SRT 的增长有利于生长较缓慢的微生物繁衍生息。

为了更深入地探讨不同 SRT 下总细菌种群结构的异同,以及 SRT 的变化对于微生物种群结构的影响,本实验采用 PCR-DGGE,对序批式反应器进行了研究分析,以期优化运行参数、提高污水处理效

基金项目:天津市自然科学基金重点项目(07JCZDJC02100)

收稿日期:2011-05-26; 修订日期:2011-09-28

作者简介:马瑶(1987~),女,硕士研究生,主要从事污水处理与中水回用技术研究工作。E-mail:mayao@tju.edu.cn

果提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验装置与取样条件

本实验采用 3 个并联的间歇进水的序批式反应器(SBR),如图 1 所示,反应器主体有效容积为 2 L。反应器中间为有机玻璃隔板,隔板上端距水面大约为 20 cm,下端为高度为 20 cm 左右的过水孔,形成自下而上的环流;在隔板的两侧分别为可控温度加热器(温度保持在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$)与曝气器。曝气器采用微孔曝气头。进气量由空气流量计调节,保持每个反应器中的溶解氧量为 2 mg/L 左右。反应器运行周期为 12 h,曝气 8 h,静沉 4 h。

实验中所用的活性污泥取自某游泳馆污水站 MBR 反应池,在 SRT 为 20 d 的条件下,用原水对活

性污泥进行培养。反应器运行期间进出水水质见表 1。COD、总磷、总氮和氨氮等参照标准方法^[16]测定。样品编号如表 2 所示。

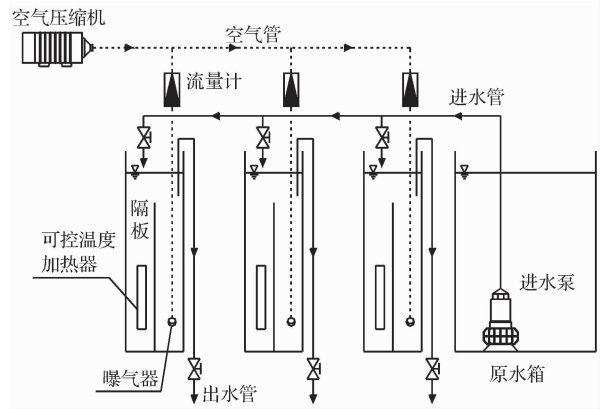


图 1 实验工艺流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the process

表 1 进出水水质

Table 1 Qualities of influent and effluent

SRT(d)	COD(mg/L)		SS(mg/L)		总磷(mg/L)		总氮(mg/L)		氨氮(mg/L)	
	进水	出水	进水	出水	进水	出水	进水	出水	进水	出水
5	440~460	<60	100~200	<15	5~7	<2	115~120	<20	107	<15
10	440~460	<50	100~200	<11	5~7	<2	115~120	<18	107	<10
20	440~460	<46	100~200	<10	5~7	<1	115~120	<15	107	<5
30	440~460	<42	100~200	<5	5~7	<1	115~120	<12	107	<5
40	440~460	<40	100~200	<5	5~7	<0.9	115~120	<10	107	<4

表 2 样品编号

Table 2 Sampling numbers

批次	SRT(d)	编号	备注
1	30	A1	表中
	20	A2	30→10
	10	A3	代表
2	30→10	A4	SRT 由
	10→30	A5	30 d 变
3	5	B1	为 10 d,
	20	B2	10→30、
	40	B3	5→40、
4	5→40	B4	40→5
	40→5	B5	同理

1.2 主要试剂

细胞裂解处理液、TE 缓冲液、 $1 \times$ TAE、固定/终

止液、染色液和显影液均为自制,TaqDNA 聚合酶、 $10 \times$ Buffer、扩增引物、琼脂糖、核酸染料、基因组 DNA Marker、dNTPs 和 PCR 产物 DNA Marker 均为外购。

1.3 样品预处理

取 10~20 mL 污泥混合液于 50 mL 灭菌离心管内,于 $6 \sim 10^\circ\text{C}$ 、 $9 \ 165 \times g$ 下离心 10 min,弃上清液。加入 30 mL 灭菌蒸馏水并振荡混匀,离心 10 min,弃上清液。加入 30 mL 无菌 TE 缓冲液,离心 10 min,弃上清液。将沉淀污泥加入 15 mL 蒸馏水并振荡混匀,得到的污泥样品可以直接用于下游总 DNA 的提取。

1.4 基因组 DNA 的提取

采用 Biospin 细菌基因组 DNA 试剂盒提取基因组 DNA。经电泳检测,所得 DNA 片断等于或略大于 23 kb,可以此为模板进行 PCR 扩增。

1.5 基因组 16S rDNA 基因 V3 区的扩增

以提取和纯化的基因组 DNA 作为 PCR 扩增的模板,采用对大多数细菌和古细菌 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 F357-GC 和 R518。PCR 扩增产物片段大小约为 250 bp。

PCR 扩增反应体系:采用 50 μL 反应体系:约 50 ng 模板,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 每种引物,25 μL 2 \times Taq PCR Master Mix,其余用无菌超纯水补足至 50 μL 。

PCR 反应策略:采用降落式 PCR 反应策略:94 $^{\circ}\text{C}$ 下预变性 5 min,前 20 个循环为 94 $^{\circ}\text{C}$ 条件下运行 1 min,65 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下运行 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 条件下运行 1 min(其中每个循环后退火温度下降 0.5 $^{\circ}\text{C}$),后 10 个循环为 94 $^{\circ}\text{C}$ 条件下运行 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下运行 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 条件下运行 1 min;最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 条件下延伸 8 min。

1.6 总细菌 PCR 扩增产物的变性梯度凝胶电泳分析

取总细菌 PCR 产物 25 μL ,进行变性梯度凝胶电泳,电泳条件为:凝胶浓度为 8%,变性梯度为 30% ~ 60%,温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,电压为 150 V,在 1 \times TAE 中电泳 6.5 h,完毕后将凝胶进行硝酸银染色,并将图像在观测仪中拍照存档。结果如图 2 所示。

1.7 DGGE 图谱的多样性度量——Shannon 指数

应用凝胶分析软件 Quantity One 对所得的 DGGE 图谱进行分析。采用 Shannon 多样性指数来表征样品中微生物多样性。其原理与计算公式见文献[17]。

1.8 总细菌种群相似性分析

根据 DGGE 电泳图谱利用 Quantity One 软件进行相似系统树的生成,其生成主要根据戴斯系数 Cs 自动绘制,而戴斯系数由软件根据样品间条带的相似程度自动绘制(图 2)。

1.9 部分优势菌群的切胶测序

切取聚丙烯酰胺凝胶上主要的条带溶于 50 μL 已灭菌的 TE 缓冲液,于 60 ~ 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min;将离心管置于冰箱中,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下静置过夜。将离心管于 5 000 r/min 低速离心 5 min,取 6 μL 浸出液作为模板,进行 PCR 扩增。

PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中检测, DGGE 鉴定为单一条带后,送至生物技术公司进行测序。然后将结果提交给 GenBank 数据库进行同源性分析并建立系统进化树(图 3)。

2 结果与讨论

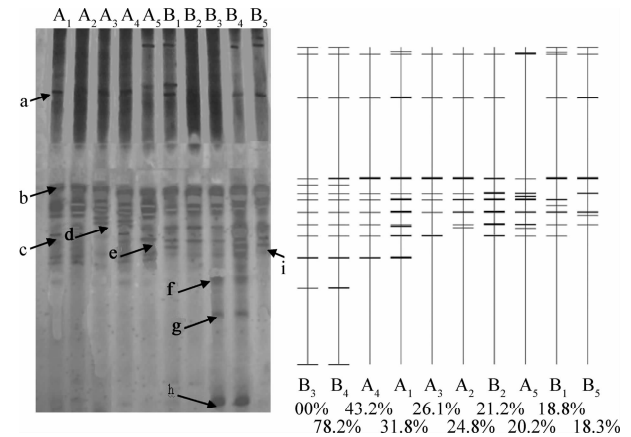
2.1 不同 SRT 条件下总细菌种群结构的比较

2.1.1 总细菌群落结构的 DGGE 图谱

本实验获得的 DGGE 图谱如图 2 所示。图中显示条带 a、b 为所有泳道共有的条带,尤其是条带 b 所代表的微生物占据明显的优势地位,表明条带 a、b 所代表的微生物受 SRT 变化的影响较小,对外界条件变化有较好的适应性。

图中可见有些条带为特定 SRT 下独有的微生物,如条带 d、e 在 SRT 为 10 d(A3)时较明显,它们代表的微生物为优势菌种。条带 c 在 SRT 为 30 d(A1)时丰度较大,而条带 f、g、h 在 SRT 为 40 d(B3)时的优势菌群且在其余 SRT 系统中并不明显。条带 i 在 SRT 为 5 d(B1)时较为明显,在其余系统中并不显著。

由于 SRT 为 40 d 时微生物种群最多,因此将 B3 泳道作为标准。图中显示各泳道间的相似性相差较大,表明 SRT 对系统中微生物种群结构的影响较大。图中还显示,相同的 SRT 的样品之间相似性也相差较大,这是由于系统的稳定程度不同。



(A. DGGE 图谱; B. 各样品泳道相似性示意图

(以 B3 为标准,下侧数字为各泳道与 B3 相似百分数)

图 2 总细菌 PCR 产物的 DGGE 指纹图谱

Fig. 2 DGGE profile of bacteria in ten sludge samples

2.1.2 总细菌种群多样性分析

在分子生物学中,通常以多样性指数评价微生物种群内物种的丰富性,其值越高微生物种群越丰富。由表 3 可知,SRT 为 40 d 时多样性指数最高,说明其微生物种群最丰富,SRT 为 30 d 时次之。

表 3 显示 A1 和 A5、A3 和 A4、B1 和 B5、B3 和

B4 之间的 SDI 值相差较小,表明系统的 SRT 通过何种途径变化而来对最终的生物多样性影响不大。同时表 3 显示系统中生物多样性与 SRT 的变化并不呈线性关系,在 SRT 为 10 d 时多样性指数最小(分别为 0.74 和 0.69);而 SRT 为 5 d 和 20 d 时 SDI (0.98、0.85 和 0.80、0.79)均高于 SRT 为 10 d 的系统,原因有待进一步研究分析。

表 3 样品多样性指数

Table 3 Shannon-wiener index of samples

样品编号	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5
SRT	30 d	20 d	10 d	10 d	30 d	5 d	20 d	40 d	40 d	5 d
SDI	0.98	0.80	0.74	0.69	0.97	0.98	0.79	0.99	1.06	0.85

2.2 部分优势菌种的鉴定及系统进化树的构建

采用 DNAMAN (V5.2.2 版) 软件对测序结果与 Genbank 中的相似序列建立系统进化树,如图 3 所示。

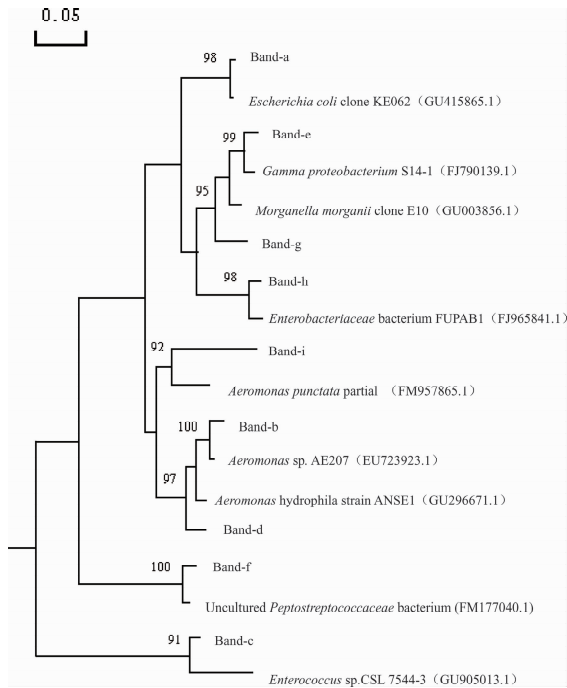


图 3 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences

由图 3 可知,SBR 系统污泥中微生物的优势菌群大部分都是厌氧或者兼性厌氧。这是由于 SBR 系统有一段较长的静沉期,兼性厌氧的微生物在 SBR 系统中生存与其间歇运行的方式更一致。

条带 a 与大肠杆菌同源率为 98%。大肠杆菌在有氧的条件下可以较好地生存且利用葡萄糖时可

产酸产气,因此,在各 SRT 条件下均较为活跃。条带 b 与气单胞菌的同源率为 100%,由于气单胞菌为好氧或兼性厌氧菌,因此 SBR 特殊的运行方式对其的影响并不显著,同时气单胞菌对营养要求不高,这也使得在不同 SRT 条件下气单胞菌生长活跃。条带 a、b 所代表的微生物的生化特性与 DGGE 图谱中各泳道里条带丰度状况是一致的。

条带 c 在 SRT 为 30 d 时较为明显,由系统进化树可知条带 c 与肠球菌的同源率为 91%,其对营养物质要求不高,能降解多种糖类和蛋白质,形成不同代谢产物。

条带 d、e 在 SRT 为 10 d 时相对明显,与杀雄菌属和 γ -变形菌同源性较大,分别为 97% 和 99%。杀雄菌属代谢能力较弱,不能彻底利用营养物质,如在利用 D-葡萄糖和其他糖类时只能产酸不能产气,因此当 SRT 增加时营养物质相对缺乏时,其优势地位下降迅速,使得在长 SRT 条件下的泳道中不能明显检测出条带。同时 γ -变形菌在缺氧条件下会发育不良,也限制了其在不同环境中的生长。

条带 f、g、h 在 SRT 为 40 d 时成为优势菌群,通过 NCBI 基因库的比对发现,它们与厚壁菌类群、柠檬酸杆菌属和肠杆菌科微生物同源性较好,分别为 100%、95% 和 98%。肠杆菌属和柠檬酸杆菌属微生物对营养物质要求不高且能彻底利用营养物质。因此,在 SRT 为 40 d 的恶劣环境下仍能保持较大的活跃性。而属于厚壁菌类群的微生物可以通过降解硫酸盐化合物来获得能源而不必依靠碳水化合物,这类微生物在 SRT 为 40 d 系统中成为优势菌群,为了解此时系统中 EPS 含量呈恢复性增长提供了帮助。

条带 i 与斑点假单胞菌同源性达 92%,其生理特点为进行严格的呼吸代谢,以氧为最终电子受体,只有在某些条件下才利用硝酸盐为电子受体进行厌氧呼吸。在 SRT 为 5 d 时为优势菌群,但随着 SRT 增加系统环境恶化使得微生物生存受限,以致在其余泳道中不能明显检测。

3 结 论

(1) SRT 对总细菌群落多样性影响显著,既存在各个 SRT 下共有菌种,也存在某一 SRT 下特定菌种。

(2) SRT 影响系统总细菌种群多样性,相同的 SRT 条件下多样性系数较接近,而 SRT 通过何种途

径变化而来对最终生物多样性影响不大。SRT 与种群多样性不呈线性关系。SDI 值在 SRT 为 10 d 时取得最小值。SRT 为 40 d 时生物多样性最大。

(3) SBR 系统中总细菌的优势菌群大部分都是厌氧菌或是兼性厌氧菌,如 γ -变形菌、柠檬酸菌等。SRT 为 40 d 时存在以降解硫酸盐获得能源的优势微生物。

参考文献

- [1] 尚会来,彭永臻,张静蓉,等. SRT 对于污水脱氮过程中 N_2O 产生的影响. 环境科学学报, **2009**, 29(4): 754-758
Shang Huilai, Peng Yongzhen, Zhang Jingrong, et al. Effects of SRT on N_2O production during nitrification and denitrification. Acta Scientiae Circumstantiae, **2009**, 29(4): 754-758 (in Chinese)
- [2] 刘秀红,杨庆,吴昌永,等. 不同污水生物脱氮工艺中 N_2O 释放量及影响因素. 环境科学学报, **2006**, 26(12): 1940-1947
Liu Xiuhong, Yang Qing, Wu Changyong, et al. N_2O emissions from different biological nitrogen removal processes and factors affecting N_2O production. Acta Scientiae Circumstantiae, **2006**, 26(12): 1940-1947 (in Chinese)
- [3] 李亚静,孙力平,郑淑平. 碳源浓度和污泥龄对反硝化聚磷脱氮影响研究. 环境科学与技术, **2008**, 31(5): 112-115
Li Yajing, Sun Liping, Zheng Shuping. Effect of carbon source and SRT on denitrifying phosphorus removal. Environmental Science and Technology, **2008**, 31(5): 112-115 (in Chinese)
- [4] 徐伟峰,陈银广,张芳,等. 污泥龄对 A/A/O 工艺反硝化除磷的影响. 环境科学, **2007**, 28(8): 1693-1696
Xu Weifeng, Chen Yinguang, Zhang Fang, et al. Effect of SRT on denitrifying phosphorus removal in A/A/O Process. Environmental Science, **2007**, 28(8): 1693-1696 (in Chinese)
- [5] 曹占平,张宏伟,张景丽. 污泥龄对膜生物反应器污泥特性及膜污染的影响. 中国环境科学, **2009**, 29(4): 386-390
Cao Zhanping, Zhang Hongwei, Zhang Jingli. Effects of sludge retention time on the sludge characteristics and membrane fouling in membrane bioreactor. China Environmental Science, **2009**, 29(4): 386-390 (in Chinese)
- [6] Ouyang K., Liu J. X. Effect of sludge retention time on sludge characteristics and membrane fouling of membrane bioreactor. Journal of Environmental Sciences, **2009**, 21(10): 1929-1935
- [7] Sung-Soo Han, Tae-Hyun Bea, Gyung-Gug Jang, et al. Influence of sludge retention time on membrane fouling and bioactivities in membrane bioreactor system. Process Biochemistry, **2005**, 40(7): 2393-2400
- [8] Xia Huang, Ping Gui, Yi Qian. Effect of sludge retention time on microbial behavior in a submerged membrane bioreactor. Process Biochemistry, **2001**, 36(10): 1001-1006
- [9] 李绍峰,刘玉强,崔崇威,等. SRT 影响 MBR 污泥体系去除污染物动力学研究. 环境工程学报, **2007**, 1(5): 105-108
Li Shaofeng, Liu Yuqiang, Cui Chongwei, et al. Effect of SRT on kinetics of polluted substance removal by sludge system in MBR. Chinese Journal of Environmental Engineering, **2007**, 1(5): 105-108 (in Chinese)
- [10] Laera G., Giordano C., Pollice A., et al. Membrane bioreactor sludge rheology at different solid retention times. Water Research, **2007**, 41(18): 4197-4203
- [11] Tao Yu, Rong Qi, Dong Li, et al. Nitrifier characteristics in submerged membrane bioreactors under different sludge retention times. Water Research, **2010**, 44(9): 2823-2830
- [12] Zubair Ahmed, Jinwoo Cho, Byung-Ran Lim, et al. Effects of sludge retention time on membrane fouling and microbial community structure in a membrane bioreactor. Journal of Membrane Science, **2007**, 287(2): 211-218
- [13] Pascal E. Saikaly, Peter G. Stroot, Daniel B. Oerther. Use of 16S rDNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. Applied and Environmental Microbiology, **2005**, 71(10): 5814-5822
- [14] Duan L., Ivan Moreno-Andrade, Huang C. L., et al. Effects of short solids retention time on microbial community in a membrane bioreactor. Bioresource Technology, **2009**, 100(14): 3489-3496
- [15] Anthony Masse, Mathieu Spe'randio, Corinne Cabassud. Comparison of sludge characteristics and performance of a submerged membrane bioreactor and an activated sludge process at high solids retention time. Water Research, **2006**, 40(12): 2405-2415
- [16] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, **2002**. 105-256
- [17] 陈谊,孙宝盛,张斌,等. 不同 MBR 反应器中硝化菌群落结构的研究. 中国环境科学, **2010**, 30(1): 69-75
Chen Yi, Sun Baosheng, Zhang Bin, et al. Nitrifying bacteria structure community of different MBR reactor. China Environmental Science, **2010**, 30(1): 69-75 (in Chinese)