

污水人工快速渗滤系统中氨氧化菌 16S rDNA的DGGE分析

马鸣超¹, 姜昕^{1,2}, 刘菲^{*1}, 李俊²

(1. 中国地质大学 水资源与环境学院 水资源与环境工程北京市重点实验室, 北京 100083;
2. 中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要: 为了研究污水人工快速渗滤系统(CRI)中氨氧化菌的空间分布规律以及 $\text{NH}_4\text{-N}$ 在CRI中的迁移转化机理,从深圳运行中的CRI系统砂层填料中以5~10 cm间隔垂直取12个样品,对其氨氧化菌的16S rDNA进行DGGE分析。结果表明,CRI系统中氨氧化菌菌群随着深度的增加先增多后减少,在表层至10 cm处氨氧化菌约有4~5种组成,主要由某些以有机氮为降解底物的微生物和进水中被砂粒介质截流吸附的微生物组成;在20~90 cm范围内氨氧化菌增加至9种左右,多样性最为丰富,是亚硝化作用发生的主要区域;而在100 cm以下的范围,由于 $\text{NH}_4\text{-N}$ 浓度的降低或系统复氧不足,氨氧化菌迅速减少至5~6种。该研究结果证明了氨氧化菌在快渗池内分布范围的变化对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 去除率的影响,即氨氧化菌在快渗池内分布的越接近中上层,对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除效果越好。关于CRI系统中氨氧化菌的空间分布规律及其与 $\text{NH}_4\text{-N}$ 去除率关系的认识,为工艺改进和效果提高提供了理论基础。

关键词: 人工快渗系统(CRI); 氨氧化菌; 16S rDNA; 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 1006-7493(2007)04-0688-06

1 引言

污水人工快速渗滤系统(Constructed Rapid Infiltration System,简称CRI系统)在传统污水快速渗滤系统的基础上发展而来,是一种综合了生态学原理和工程学方法的处理新技术(何江涛等,2002;郭伟和李培军,2004)。其主要创新点在于用渗透性较好的天然砂等代替传统的污水快渗中的天然土层,克服了传统处理系统中水力负荷低、占地面积大等缺点;同时该系统采用干、湿交替的运行方式,既保证有较高的水力负荷(1.0~2.0 m/d),又能提高污水净化能力、达到达标排放的处理目标。

CRI系统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,而对起关键作用的微生物研究却不多见。硝化作用是CRI系统中去除 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的重要环节,由硝

化菌群完成。硝化菌群主要由氨氧化菌(ammonia oxidizing bacteria)和亚硝酸氧化菌(nitrite oxidizing bacteria)这两类不同的菌组成。其中氨氧化菌负责将 $\text{NH}_4\text{-N}$ 氧化为 $\text{NO}_2\text{-N}$,即亚硝化作用,主要包括Nitrosomonas和Nitrospira两类;亚硝酸氧化菌负责将 $\text{NO}_2\text{-N}$ 进一步氧化为 $\text{NO}_3\text{-N}$,即硝化作用,主要包括Nitrobacter和Nitrospira两类菌(Focht and Verstraete, 1977);氨氧化反应是化能自养硝化作用的第一个步骤,自养型氨氧化作用主要与矿化作用有关。因为多数环境中的亚硝酸盐不易积累,在很多环境条件下,氨氧化细菌是影响硝化作用速率大小的一个决定因素(Hans-Peter et al, 2004),也是限速步骤,在整个硝化作用起着至关重要的作用,所以目前对硝化细菌的研究大多针对氨氧化菌。

对于氨氧化菌,由于生理学实验的室内条件不能完全取代原位的环境条件,从环境中分离出

收稿日期: 2007-07-31; 修回日期: 2007-09-06

基金项目: 国家科技支撑项目(2006BAD25B04)

作者简介: 马鸣超,男,1983年生,山东济南人,硕士研究生,环境科学专业,主要从事污水处理技术和微生物分子生态学研究,

E-mail: jndxmcc@163.com; * 通讯作者: 刘菲,副教授, E-mail: feiliu@cugb.edu.cn

的菌株可能不代表环境中氨氧化菌的主要生理类群, 分离的氨氧化菌菌株的生理学特征也往往不能解释其在取样环境中的原位活性。要对环境中的氨氧化菌做更为细致的分析, 仅靠纯培养的方法是不够的。随着分子生物学技术的不断发展, 变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)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, 能更真实的反映系统中微生物种群的构成和分布(罗海峰等, 2003)。本文通过提取CRI系统砂层样品中微生物总DNA, 再用氨氧化菌的特异性引物进行PCR扩增和DGGE指纹图谱分析, 便可以了解其在快渗池中的分布规律, 从而为揭示 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的迁移转化机理以及CRI系统工艺的改进和处理效果的提高提供理论基础。

2 材料与方法

2.1 样品采集

砂层样品于2007年1月取自深圳观澜高尔夫球场CRI系统一号快渗池, 取样深度分别为5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100和120 cm, 对应编号为1~12; 进水、出水水样分别取自沉淀池的出水口和快渗池出水口。

2.2 实验方法

2.2.1 渗滤介质粒度分布试验

采用筛分试验的方法确定渗滤介质的粒度分布。

2.2.2 样品总DNA提取

选用间接法对12个砂层样品进行总DNA的提取。采用差速离心的方法收集菌体, 细胞裂解使用珠式细胞破碎器(Mini-beadbeater)机械破壁2.5 min, 采用该方法释放细菌细胞内DNA, 比传统的液氮冻融、SDS和溶菌酶联合使用大大缩短了实验时间, 并提高了细胞裂解效率, 最后用酚-氯仿-异戊醇抽提的方法去除蛋白。纯化采用试剂盒PCR-clean-up kit。

2.2.3 巢式PCR扩增(Nest PCR)

(1) 第一轮PCR扩增: 氨氧化菌的特异PCR扩增采用的特异性引物(Kowalchuk et al, 1998)为CTO189f(5' ggA gRA AAg CAg ggg ATC G 3')和CTO654r(5' CTA gCY TTg TAg TTT CAA ACg C 3'), 25 μL 的反应体系组成如下: 100 ng

的模板, 0.2 μL 每种引物(10 mmol/L), 2.0 μL dNTPs, 2.5 μL 的10 \times PCR buffer(不含 MgCl_2), 1.5 μL 的 MgCl_2 (25 mmol/L), 0.4 μL 的TaqE聚合酶(2.5U)和适量的双蒸水补足25 μL 。反应条件: 94 $^\circ\text{C}$, 3:00 min; 94 $^\circ\text{C}$, 1:00 min; 57 $^\circ\text{C}$, 1:30 min和72 $^\circ\text{C}$, 1:30 min, 35个循环, 最后在72 $^\circ\text{C}$ 下延伸10:00 min。

(2) 第二轮PCR扩增: 以第一轮PCR扩增产物为模板, 采用带40 bp“GC夹子”的引物P338f和R518(5' ATT ACC gCg gCT gCT gg 3')进行扩增(V3区), 反应条件见文献(Vreas et al, 1997)。

2.2.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

DGGE是一种能够可靠快速地检测到含有一个碱基突变的DNA片段(小于500 bp)的分子检测技术, 其原理是在其中一条引物的5'端加入30~50bp的GC夹子, 进行PCR反应, 然后将这些具有GC片段的较高解链温度的PCR产物, 上样到含一定梯度变性剂(尿素和甲酰胺)的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, 根据不同DNA在同一变性剂中解链点的不同, 来分离不同的DNA片段, 实验步骤如下:

(1) 变性胶的制备: 变性剂浓度范围为30%~60%(100%的变性剂为7 mol/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 μL 。

(3) 电泳及染色: 150V, 60 $^\circ\text{C}$ 电泳5 h。电泳完毕后, 将凝胶在SYBR Green I中染色约30 min。

(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。

2.2.5 水样的测定

主要的水质监测指标有: pH, COD_{cr} , $\text{NH}_4\text{-N}$ 和TN。其中, 用重铬酸钾法测定 COD_{cr} , 纳氏试剂分光光度法测定 $\text{NH}_4\text{-N}$, 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定TN。

3 分析结果

3.1 渗滤介质粒度分布结果

快渗池采用穿孔布水方式, 渗透区的介质由

天然河砂和大理石砂组成,天然河砂和大理石砂的体积比为9:1。天然河砂的粒径分布见表1,其有效粒径为0.324 mm,不均匀系数为4.71;大理石砂的粒径为0.6~0.8 mm,不均匀系数为1.8。

表1 渗滤介质粒度分布

Table 1 The particle size distribution of filtering medium

粒径(mm)	>2	2~1	1~0.5	0.5~0.25	0.25~0.075	<0.075
冲积砂(%)	30.46	19.80	30.06	13.79	4.75	1.14

3.2 总DNA提取及纯化

对从12个样品提取的总DNA进行电泳检测,条带大小为10 kb左右(见图1),可满足后续实验要求。

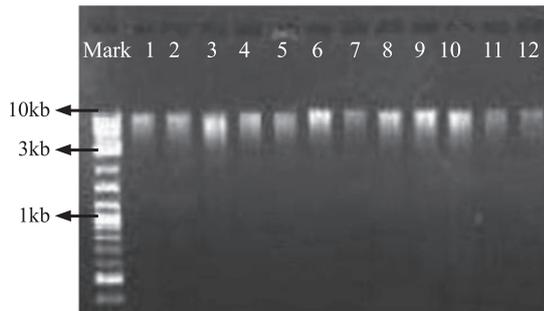


图1 总DNA琼脂糖凝胶电泳图像

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total microbial DNA

3.3 16S rDNA巢式PCR (Nest PCR) 扩增

以纯化后的不同深度砂层样品总DNA为模板,采用改进的巢式PCR技术(Boon, 2002)对目的基因16S rDNA的部分片段进行了PCR扩增,样品经第一轮PCR扩增后,均得到了与预期大小相符的氨氧化菌(约470 bp)特异性扩增片段,接着采用16S rDNA V3区通用引物R518和P338f(含约40 bp的GC夹子),以适度稀释的第一轮PCR产物为模板,进行了第二轮PCR扩增,得到了与预期大小相符的扩增片段,片段的大小约为220 bp(图2)。

3.4 DGGE图谱分析

由DGGE图谱(图3)可以看出,不同深度的样品经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各不相同。在CRI系统不同深度,氨氧化菌的菌群组成差异很大,其菌群多样性随深度增加而先增加后减少,在表层至10 cm处氨氧化菌菌群有4~5种组成,在20~90 cm范围内增加至9种左右,而在100 cm以

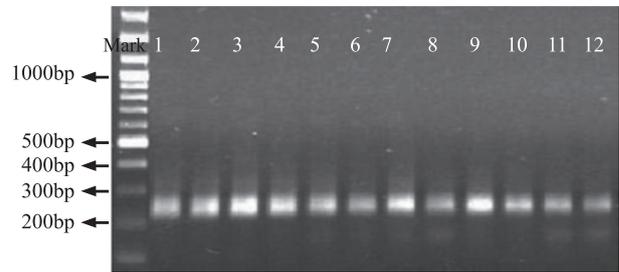


图2 氨氧化菌的16S rDNA巢式PCR产物

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of nest PCR amplified 16S rDNA of ammonium oxidizing bacteria

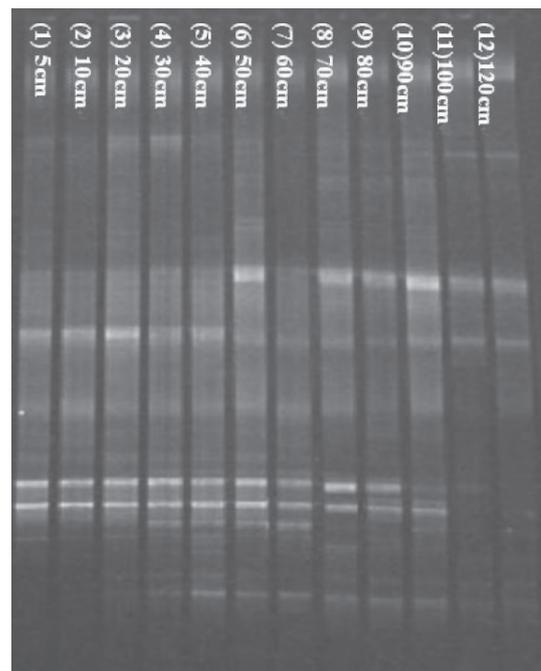


图3 氨氧化菌群的DGGE指纹图谱

Fig. 3 DGGE profiles of ammonium oxidizing bacteria

下,迅速减少至5~6种。

用BIO-RAD QUANTITY ONE4.5.1软件对氨氧化菌DGGE图谱进行聚类分析可以看出(图4),氨氧化菌在快渗池中的分布有一定的规律性,根据其相似性关系大致分为四大族:一族(表层)为表层至10 cm区域,对应1, 2号样品;二族(中上层)为20~50 cm的范围,对应的样品为3~6号;三族(中下层)为60~90 cm的范围,对应为7~10号样品;四族(底层)是100~120 cm,对应11, 12号样品。各族内的样品间相似性较高,而族间相似性差异却很大,表明其中的氨氧化菌菌群结构发生变化,各族间呈现出不同的菌群组成,这与NH₄-N在快渗池内的浓度变化有直接关系。

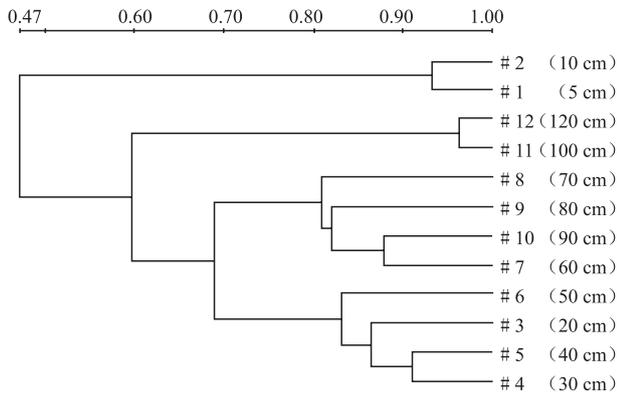


图4 氨氧化菌DGGE图谱UPGMA聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of DGGE by UPGMA of ammonium oxidizing bacteria

将以上结果与上次取样(2006年9月24日)的氨氧化菌DGGE图谱分析结果(图5)对比可以看出,上次DGGE结果显示,氨氧化菌的多样性随着快渗池深度的增加也是先增加后减少,但氨氧化菌多样性最丰富的区域是20~60 cm范围,两图谱的差异除了由于两次取样季节不同造成之外,还由堵塞导致的系统复氧能力不同所造成。本次取样前,由于暴雨夹带黄泥淹没过该快渗池,虽然事后采取了一定措施,但该快渗池堵塞现象仍然比较严重,大大影响了系统复氧,从而导致 $\text{NH}_4\text{-N}$ 氧化受阻,随着水流下渗,快渗池中下部仍然存在足够的氨氧化菌降解底物($\text{NH}_4\text{-N}$),因此快渗

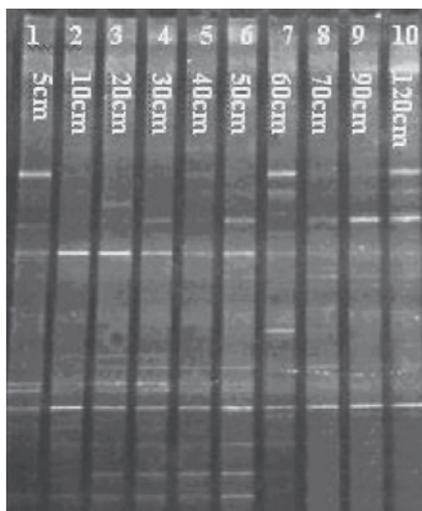


图5 氨氧化菌群的DGGE指纹图谱(2006年9月24日)

Fig. 5 DGGE profiles of ammonium oxidizing bacteria (Sept. 24 2006)

池中下部的氨氧化菌多样性丰富,造成两次取样对应的DGGE图谱不同。

3.5 CRI系统水质测定结果

由出水水质测定结果(表2)看出,出水pH有所下降,这可能与快渗池中的微生物代谢产酸和发生硝化作用有关; COD_{cr} 和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 主要发生好氧生物降解,快渗池的堵塞影响了系统的复氧,从而导致 COD_{cr} 和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除率较上次取样时(2006年9月24日,当时该快渗池对 COD_{cr} 和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除率分别为90.6%和89.2%)^①低;总氮的去除率仅有28.1%,一是由于 $\text{NH}_4\text{-N}$ 去除率过低,直接迁出系统,二是系统缺少硝酸还原菌或者反硝化碳源等抑制了反硝化作用的进行,从而也可能导致TN的去除率较低。

表2 快渗池进、出水水质测定结果
Table 2 The results of water quality determination

指标	进水	出水	去除率(%)
pH	6.77	6.30	—
COD_{cr} (mg/L)	136	28	79.4
$\text{NH}_4\text{-N}$ (mg/L)	27.8	15.9	42.8
TN (mg/L)	30.2	21.7	28.1

4 讨论

在CRI系统中,氮的去除主要经历下列过程(吴永锋等,1996):在淹水期, $\text{NH}_4\text{-N}$ 被吸附在土壤颗粒表面,从而被截留在系统中;在落干期,吸附在介质颗粒表面的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 在氨氧化菌的作用下被氧化为 $\text{NO}_2\text{-N}$,随后又被亚硝酸氧化菌氧化为 $\text{NO}_3\text{-N}$,渗滤介质的吸附位被空出,为下一次淹水过程中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸附做好准备。由于进水中含有一定量的有机氮,因此在快渗池表层,有机氮化合物在微生物的作用下,发生氨化作用转化成 $\text{NH}_4\text{-N}$,形成一部分以有机氮为营养物质的菌落组成,并且进水中的微生物被表层的渗滤介质吸附截留,从而对应的一族(1,2号样品)与其它族样品的相似性低;同时在快渗池表层有机物的浓度相对较高,这会使增殖速率较大的异养细菌迅速繁殖,从而抑制了自养型的氨氧化菌,因此

① 姜昕,马鸣超,李俊,等. 2007. 用DGGE技术分析污水人工快速渗滤系统中微生物种群分布. 微生物学通报, 34(6): 157-161. (待刊)

表层氨氧化菌的多样性较中层贫瘠。在落干期,由于快渗池表层的氨氧化菌较少,很少一部分吸附在砂粒填料表面的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 被氧化,所以吸附空位较少,从而导致在下一个淹水期,只有很少一部分 $\text{NH}_4\text{-N}$ 被吸附;而在快渗池中层20~90 cm的范围内,氨氧化菌多样性丰富,吸附在砂粒填料表面的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 在氨氧化菌的作用下被氧化为 $\text{NO}_2\text{-N}$,由于介质颗粒带有负电荷,对同样带有负电荷的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 没有吸附截留能力, $\text{NO}_2\text{-N}$ 将随着水流继续下渗,这样在砂粒表面存在 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸附空位,以满足下一个淹水期对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸附,从而在快渗池20~90 cm的范围内形成一个以 $\text{NH}_4\text{-N}$ 为营养物质的、稳定的微生物菌群结构,因此所对应的3~10号样品之间的相似性就较高,亚硝化作用主要发生在该区域内;但由于快渗池在垂直方向的复氧能力不同,因此导致20~90 cm的范围内的氨氧化菌种类不同,故在聚类分析时,进一步细分为二、三两族。而在100 cm以下的深度范围,由于降解底物浓度的减少,加之快渗池底部缺氧,从而导致氨氧化菌的多样性减少。

由2006年9月取样的DGGE图谱可以看出,亚硝化作用主要发生在快渗池20~60 cm的范围内,60 cm以下的区域为剩余的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 进一步氧化去除提供了足够的空间,从而系统对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除率很高(89.2%);而本次取样的DGGE图谱显示,亚硝化作用主要发生在快渗池20~90 cm的范围内,这样剩余的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 来不及被氧化而直接迁出系统,从而导致对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除率只有42.8%,由此可以推断,氨氧化菌分布范围的下移直接影响了CRI系统对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除效果。

5 结论

(1) 本研究进一步证明了使用PCR-DGGE技术研究CRI系统内氨氧化菌空间分布规律的可行性。其中,机械破壁法,缩短了实验时间,提高了裂解的效率;酚氯仿抽提法,能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;Nest PCR法,降低了扩增多个靶位点的可能,提高了检测的敏感性和可靠性,为后续的DGGE提供了理想的模板。

(2) 揭示了CRI系统中氨氧化菌的空间分布

规律以及氨氧化菌的分布范围与 $\text{NH}_4\text{-N}$ 去除效果之间的关系,即在快渗池20~90 cm的范围内氨氧化菌多样性最为丰富,是亚硝化作用的主要场所;同时,氨氧化菌在快渗池内的分布越接近中上层,对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除效果越好,因此合理控制氨氧化菌在CRI系统内的分布范围对CRI系统 $\text{NH}_4\text{-N}$ 去除是非常重要的。

本文只是根据氨氧化菌在快渗池内的分布,推知 $\text{NH}_4\text{-N}$ 在快渗池内的迁移转化规律,但要确定上述观点,必须还要在快渗池不同深度取得水样,根据 $\text{NH}_4\text{-N}$ 浓度的变化从而加以验证。由于如何在包气带中取水样这一难点始终未得到解决,因此这也是一个亟待解决的问题,建议在今后的研究中寻找包气带取样的合适方法,弥补这点不足。

参考文献 [References]:

- Boon N. 2002. Bioaugmentation of activated sludge reactors to enhance chloroaniline removal. PhD Thesis of Gent University, 151-155.
- Focht D D, Verstraete W. 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Adv. Microb. Ecol.*, 1 (1): 135-142.
- 郭伟, 李培军. 2004. 污水快速渗滤土地处理研究进展. 环境污染治理技术与设备, 5(8): 1-7.
- [Guo Wei, Li Peijun. 2004. Research advances on rapid infiltration land treatment system for wastewater. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 5 (8): 1-7. (in Chinese with English abstract)]
- Hans-Peter H, Adrian B, Christopher B F, et al. 2004. Bohannan Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *PNAS*, 101: 15136-15141.
- 何江涛, 钟佐荣, 汤鸣皋, 等. 2002. 人工构建快速渗滤污水处理系统的试验. 中国环境科学, 22 (3): 239-243.
- [He Jiangtao, Zhong Zuoshen, Tang Minggao, et al. 2002. Experimental research of constructed rapid infiltration wastewater treating system. *China Environmental Science*, 22 (3): 239-243. (in Chinese with English abstract)]
- Kowalchuk G A, Bodelier P L E and Heilig G H J. 1998. Community analysis of ammonium-oxidizing bacterium in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR-DGGE and oligonucleotide probe hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 24: 339-350.
- 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. 2003. 在PCR-DGGE研究土壤微生物多样性中应用GC发卡结构的效应. 生态学报, 23 (10): 2170-2175.
- [Luo Haifeng, Qi Hongyan, Xue Kai, et al. 2003. Influence of application of GC-clamp on study of soil microbial diversity by PCR-DGGE. *ACTA Ecologica Sinica*, 23 (10): 2170-2175. (in Chinese with English abstract)]
- Vreas L, Forney L, Daae F L, et al. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (8): 3367-3373.

吴永锋, 钟佐燊, 王继堂, 等. 1996. 生活污水快速渗滤处理现场试验研究. *环境科学学报*, 16 (3): 282-286.
[Wu Yongfeng, Zhong Zuoshen, Wang Jitang, et al. 1996. The in-situ

test of rapid infiltration treatment system of municipal wastewater. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 16 (3): 282-286. (in Chinese with English abstract)]

DGGE Analysis of 16S rDNA for Ammonium Oxidizing Bacteria in Constructed Rapid Infiltration System (CRI)

MA Ming-chao¹, JIANG Xin^{1,2}, LIU Fei¹, LI Jun²

(1. School of Water Resources and Environment; Beijing Key Laboratory of Water Resources & Environmental Engineering, China University of Geosciences, Beijing 100083, China;

2. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to reveal the microbial community distribution of ammonium oxidizing bacteria and the removal mechanism of $\text{NH}_4\text{-N}$ in constructed rapid infiltration system (CRI), sands of different depths were sampled from CRI in Shenzhen, and were analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The profiles of DGGE show that the microbial community of ammonium oxidizing bacteria increases followed by a decrease from top to bottom. There are about 4~5 species in the upper 10 cm part, and they are composed of microorganisms in sewage or those who played important roles in the biodegradation of organonitrogen. About 9 species are found in CRI between 20 cm and 90 cm in depth, where the nitrosation capacity is stronger. For lack of $\text{NH}_4\text{-N}$ or oxygen, the species of ammonium oxidizing bacteria reduce to 5~6 at the depth below 100 cm. The results will be that, the upper level the ammonium oxidizing bacteria distribute in CRI, the higher the removal rate of $\text{NH}_4\text{-N}$. The relationship between community distribution of ammonium oxidizing bacteria and the removal rate of $\text{NH}_4\text{-N}$ is meaningful to improve the treatment performance of CRI.

Key words: constructed rapid infiltration system (CRI); ammonium oxidizing bacteria; 16S rDNA; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)