

活性污泥中微生物种群特性及对底物降解的影响研究*

聂艳秋

周青**

(湖南工学院建工系 衡阳 421101)(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要 简介了分离微生物培养基的选择以及 PCR、ERIC、DGGE、TGGE、FISH、T-RFLP 等种群特性测定方法,阐述了活性污泥微生物的种群多样性、结构稳定性和功能稳定性等特性,指出活性污泥微生物种群多样性是结构稳定性的基础,而结构稳定性是功能稳定性的前提,功能稳定性又是底物有效降解的保证,同时底物及环境因子的变化也影响活性污泥群落结构及功能的稳定,并可能使种群多样性发生变化,结构稳定性与功能稳定性二者变化并不同步。

关键词 污水处理 种群特性 测定方法

Population characterization of microorganism in activated sludge and its influence on substrate degradation. NIE Yan-Qiu (Department of Architecture Engineering, Hunan Institute of Technology, Hengyang 421101, China), ZHOU Qing (The Key Lab. of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China), *CJEA* 2005, 13(4): 25~28

Abstract The choice of culture medium of microbial isolation and measuring technologies including PCR, ERIC, DGGE, TGGE, FISH and T-RFLP are introduced briefly. Then, the microbial population characterizations in the activated sludge, i. e. microbial diversity, microbial community structure stability and its function stability are stated. Finally, it is pointed out that the microbial diversity in the activated sludge is the base of its community structure stability which is the precondition of its function stability being the guarantee of effective substrate degradation. In reverse, the variety of substrate and environment factor will also affect the stability of community structure and function, and may make the population diversity change. The change of the microbial community structure stability doesn't keep in step with that of its function stability.

Key words Wastewater treatment, Population character, Measurement method

(Received Nov. 30, 2004; revised Dec. 31, 2004)

活性污泥处理污水过程实际是微生物对污水中底物的降解过程,深入了解活性污泥微生物的种群特性,有助于提高污水处理系统效能,降低污水处理成本。本研究综述了污水处理生物反应器中活性污泥微生物种群特性及群落结构的最新测定方法,初步探讨了活性污泥微生物种群间关系及微生物种群与底物间的相互影响。

1 微生物种群特性及群落结构测定

活性污泥中微生物种群多样性、结构稳定性和功能稳定性在维护污水处理系统有效性中起着重要作用。表示微生物种群特性的主要参数有指纹图谱条带数、操作分类单元数(Operational taxonomic unit, OTU)、生物多样性指数(Diversity index, H)和配对相似性系数(Pairwise similarity coefficient, C_s)。生物多样性指数(H)与配对相似性系数(C_s)计算^[6]式为:

$$H = - \sum (ni/N) \ln(ni/N) \quad (1)$$

$$C_s = 2j/(a+b) \times 100 \quad (2)$$

式中, ni 为每个波峰面积, N 为所有波峰面积, a 、 b 为 DNA 指纹图谱的条带数目, j 为 2 个图谱中共有的条带数目。

1.1 微生物群落结构测定方法

培养基。为观察微生物种群特性,需对活性污泥样品进行培养。以含苯污水处理为例,对苯酚降解菌

* 湖南省高校青年骨干教师项目资助

** 通讯作者

收稿日期 2004-11-30 改回日期 2004-12-31

进行培养的批式富集培养结合选择性培养基回收方法效果较差,不能把系统中优势功能菌分离出来。高平等^[1]采用 4 种不同培养基分离焦化污水处理厂曝气池活性污泥中优势功能菌群发现,不同培养基回收优势菌的能力不同,以污水为基础的培养基从活性污泥中回收的优势菌群最多(30.8%~42.9%),表明用合成培养基得到的降解菌并非完全是生态环境中优势功能菌。陈敏等^[2]采用 3 种培养基进行上述实验并对分离物进行种群多样性研究表明,以组成酵母抽提物为 0.2%、蛋白胨 0.1%、葡萄糖 0.2%、pH7.0~7.5 的培养基比其他 2 种培养基更合适。同一曝气池活性污泥样品由于采用培养基不同,所观察到的细菌种群多样性也不同。因此评价不同分离技术效果时,其关键是看该培养基能否从环境样品中分离到代表菌、优势菌或主要功能菌^[7]。

测定方法。传统测定方法检测速度慢且准确性差,难以及时指导生产实践。以聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术为主的分子生物学方法因其快速、灵敏特点而被广泛应用。利用分子生物学技术可及时监测微生物群落结构在不同冲击负荷下动态变化,进而可系统地优化群落结构并对群落结构失调给出早期预警。肠细菌基因间共有重复序列(Enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC)最初是在部分革兰氏阴性菌基因组中发现的(长度为 126bp),以多拷贝形式存在于细菌基因组非编码区的反向重复序列。该序列在细菌染色体上分布多态性允许设计特异引物对其进行扩增,并形成具种、属、菌株特异性指纹图谱,以该序列中心保守区域(44bp)设计反向引物,无论进行纯菌还是混合细菌菌群基因组 DNA 扩增,均能得到对模板遗传组成有足够敏感性和重复性好的 ERIC-PCR 指纹图谱,现已被广泛用于纯培养细菌鉴别、分类、基因组多态性和系统进化等方面研究^[3];变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和温度梯度凝胶电泳(Temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)为 DNA 指纹图谱技术,因其可对长度一致、但碱基序列不同的 DNA 片段进行有效分离,该技术最初被用于基因点突变研究,在有关 TGGE/DGGE 环境样品研究中通常用指纹图谱中条带数目多少反映微生物种群多样性,用条带染色强度反映不同细菌种群丰度^[4];荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)是利用特异 DNA 探针,标以生物素、地高辛和荧光素,并进行原位杂交,其杂交定位信号用荧光显示,该方法灵敏性强,操作简单,可迅速得出结果,探针标记后稳定^[5];末端限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)与末端限制性片段分析(Terminal restriction fragment analysis, TRFA)是指用限制性内切酶切割不同个体基因组 DNA 后,含同源序列酶切片段在长度和数量的差异,为扩大 T-RFLP 使用范围,可应用 PCR 技术,使原来不涉及限制性内切酶识别位点的 DNA 变异并适用于 T-RFLP,其方法是在突变位点附近设计 1 个引物,便于扩增后能被酶解^[5]。

1.2 微生物种群特性

活性污泥微生物多样性是指一定时间活性污泥中所有种类微生物基因总和,对不同活性污泥采用一定测试方法可得到相应种群多样性参数。陈敏等^[2]对焦化污水处理系统活性污泥培养基分离物扩增,并用限制性内切酶对 PCR 产物进行扩增 rDNA 限制性分析(Amplified rDNA restriction analysis, ARDRA)得出 14 种不同操作分类单元数。高平等^[4]采用 TGGE 图谱研究同一系统得出 9 条主要条带,并从每条带选 4 个转化子进行序列分析结果显示 TGGE 条带是由序列不同的片段组成,32 个序列在 97% 相似性下分成 16 个操作分类单元数。Martin Eschenhagena 等^[8]用 FISH 技术和 T-RFLP 对具脱 P 功能的活性污泥中微生物种群分子特性分析表明,起脱 P 作用的有机体不只 1 种, *Tetrasphaera* spp. 为主要聚 P 菌,其他可能聚 P 菌如 *Micrococcus*, *Rhodocyclus* 也被检出。活性污泥微生物群落结构是指一定时间活性污泥中各种微生物组成,群落结构稳定性是功能稳定性前提,因而对结构稳定性测定尤显重要。Martin Eschenhagena 等^[8]比较 2 个实验工厂活性污泥中聚 P 菌组成发现,二者存在微小差别,这表明运行模式不同,微生物群落结构亦不同。高平等^[4]用 TGGE 技术对 2 个曝气池细菌种群动态变化测定结果发现,同一曝气池活性污泥的 16S rDNA V3-PCR TGGE 指纹图谱基本一致,图谱间配对相似性系数为 100%,且同一曝气池不同位点活性污泥 TGGE 指纹图谱也完全一致,但功能不同曝气池活性污泥 TGGE 指纹图谱存在差异,配对相似性系数为 83.3%。高平等^[3]对焦化污水处理系统 A¹ 污水二段生物处理)工艺 2 个曝气池微生物群落结构分析表明,污水污染物负荷,特别是化学耗氧量(COD_{Cr})发生一定程度变化,甚至出现矿物油冲击造成污泥不能沉降和 COD_{Cr} 去除受阻,但 ERIC-PCR 指纹图谱反映出的系统微生物群落结构较稳定,苯酚和氰化物去除效率变动并不剧烈。Stamper David M. 等^[9]对膜生物反应器(Membrane bioreactor, MBR)观察发现,水质变化大时微生物种群变化较大,依据分析方法不同,种群间长期相似性为 0%~25%,细菌种群虽不稳定,但

膜生物反应器去除效率均达 90%。Forney L. J. 等^[10]认为微生物种群结构和功能不同归因于污水成分、污水处理厂运行或活性污泥收藏后的操作不同,且活性污泥样品间存在时空差异,采用葡萄糖-蛋白胨混合物培养 35d 后活性污泥结构发生明显变化,种群对底物利用以及采用 DGGE 和 TRFA 分析优势种群的 16S rDNA 区别均很明显。Klatt Christian G. 等^[11]利用 2 级厌氧膜生物反应器处理人工合成城镇污水对其中微生物 DGGE 种群分析表明,稳定种群的变化在运行前 7d 即已开始,黄质菌属占种群主要部分(>50% 总带强度)。Carolina Casserly 等^[6]研究发现上流式厌氧污泥床(Uplow anaerobic sludge bed, UASB)启动期间细菌群落结构有较大变化,但细菌多样性仅少许增加,不同产 CH_4 菌相对丰度有较大变化,故细菌 16S rRNA/细菌 16S rDNA 比率与允许最大有机负荷率相关,纠正了过去将许多厌氧污水处理系统失败归于缺乏足够接种体的认识。活性污泥微生物种群功能性是指微生物对底物降解性能,是污水处理最直接利用的种群特性。Annette F. Muttray 等^[12]对纸浆污水处理系统中复杂种群(树脂酸降解菌)——假单胞菌“*Abietaniphila*”牛皮纸漂白厂污水(Bleached kraft mill effluent, BKME-9)特性研究发现连续培养时, rRNA/rDNA 与 BKME-9 生长速率呈线性负相关。批培养时在 BKME-9 早期指数生长期 rRNA/rDNA 有一峰值,突然加碱后 BKME-9 的 rRNA/rDNA 值下降, pH 冲击过后伴随 BKME-9 代谢活性和种群恢复,系统对树脂酸的降解活性恢复。Gavin Collins 等^[13]采用厌氧颗粒污泥处理基于挥发性脂肪酸(Volatile fat acid, VFA)的人工合成污水(负荷率为 $\text{COD}5\text{kg}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ 、环境温度 18°C 、90d)试验表明,耐寒性生物发育良好。

2 微生物生长与底物降解的相互影响

不同生物反应器中由于生态环境不同,微生物种类、数量和代谢活性等方面均不相同,微生物之间、微生物与其底物及环境因子之间形成了相互联系、相互制约的动态平衡体系,这种动态平衡形成和变化直接影响着工艺运行效果。一是纵向影响,纵向影响定义为底物(环境因子)、细菌、原(后)生动物之间相互作用。Klatt Christian G. 等^[11]利用 2 级厌氧膜生物反应器处理污水,在膜生物反应器中加入淀粉、凝胶、聚乙二醇、山梨聚糖和油酸后发现,膜生物反应器中细胞生物量增加,随之污染物去除率增加,出水 COD、蛋白质和糖类浓度降低,反过来促进了以胞外酶为中介的多糖(葡萄糖苷酸)和蛋白质(亮氨酸、氨基酸)水解。Ghyoot Wouter 等^[14]采用 2 级膜生物反应器去除有机物、N 及 P 时发现,第 1 级大多数 N、P 靠生物结合去除,第 2 级由于原、后生动物对功能菌过度掠食,导致 N、P 释回水中,出水溶解性 COD_{Cr} 增加。Luxmy B. S. 等^[15]采用膜生物反应器处理污水,当 pH=6,后生动物数多且稳定(1000~2000 个/mL)时污泥积聚高,且有大量后生动物粘附膜上,跨膜压力增加但比另 2 套(pH 分别为 5 和 7)低,因为介质为后生动物提供了合适的小生境,后生动物特别是粘附膜上的后生动物对膜污染控制有重要意义。改变混合液悬浮固体浓度也会带来较大影响。Luxmy B. S. 等^[16]研究发现随大型生物体特别是固着型和游泳型纤毛虫的增加,细菌种群($1\mu\text{m}$ 左右)减少较多,细菌数与大型生物数呈负相关,当高级生物体(原生动物和后生动物)数量高时($<10\mu\text{m}$ 絮状体比例较小)。活性污泥法中微型动物以掠食菌胶团、细菌营生,对控制菌胶团、减少污泥生成量、捕食游离细菌、减少出水微生物含量和保持污泥沉降性、稳定性起着重要作用。二是横向影响,细菌种群间相互影响主要表现为微生物之间相互提供生长因子,代谢或降解对方代谢抑制物,平衡 pH,维持氧化还原电位或消除中间产物累积,解除反馈抑制等方式。厌氧过程中产 CH_4 菌专性利用产氢、产乙酸菌代谢产物乙酸和氢产生 CH_4 ,而产氢产乙酸菌则利用水解菌产物单糖、氨基酸、脂肪酸、甘油等产生乙酸和氢。细菌种群间相互影响还表现在遗传信息交换,如炼油污水处理厂中萘降解质粒可以高频接合转移,使受体菌获得降解污染物萘的性质。质粒转移可通过接合作用从携带质粒的细菌转移到无质粒细菌内,接合不受细菌种属和质粒来源影响。质粒在污水处理厂生物相中传播,提高了污泥对环境变化抗性。三是优势种群演替的综合作用影响,在各种污水处理反应器中优势微生物仅有几个种,其原因在于特定浓度或特定成分的水环境适合一些种类微生物增殖,而少数种为争夺有限营养而分泌抑制性毒物,使其他微生物难以增殖。当外界条件如水温、进水生化需氧量(BOD)、毒物负荷等发生变化时,有可能降低原有优势种代谢活性,引起新种大量增殖形成新优势种。通过底物诱导作用,系统内混合微生物菌群出现复杂的种群演替过程,导致群落结构改变,形成适应新环境的优势菌群,实现对资源充分利用。控制反应器运行条件可使某种或几种高效降解菌(优势菌群)在其内占优势,同时形成多种属混合菌系协同作用的稳定生态体系,这是纵向影响与横向影响综合作用的结果,通过高效优势降解菌与混合菌系的协同作用,进水中的有机污染物得以高效率降解。对具体反应器而言可通过分析优势微生物种类及其环境条件改变时的群落结构变化,摸索反应器运行时生物相不同平衡态,以实现污水处理系统的优化运行。

3 小结

活性污泥微生物具有种群多样性、结构稳定性和功能稳定性等多种特性,种群多样性是结构稳定性的基础,而结构稳定性是功能稳定的前提,功能稳定性又是底物降解的根本保证。反之,当底物或环境因子突然变化,微生物功能稳定性相应改变,表明微生物群落结构发生了变化,但种群多样性的变化并不确定,有些情况下变化较大,而有些情况下变化则较小。底物(环境因子)、细菌、原(后)生动物之间存在纵向作用,细菌种群之间存在横向作用。根据生态学观点,环境因子对微生物个体的影响首先是影响某些敏感生物,然后通过微生物之间相互作用逐步传递,最终当影响超过一定限度时才引起群落结构的波动。活性污泥微生物优势种群的变化反映了群落结构的变化,是纵向影响与横向影响综合作用的结果。微生物群落结构的改变与功能的变化并不同步,二者是否存在有规律的时差尚未见报道。

参 考 文 献

- 1 高平平,赵立平.微生物种群结构探针杂交评价不同培养基从活性污泥分离优势菌群的能力.微生物学报,2003,43(2):264~270
- 2 陈敏,赵立平.焦化污水处理系统中不同培养基分离的细菌种群多样性.微生物学报,2003,43(3):366~377
- 3 高平平等.焦化污水处理系统微生物种群结构动态的ERIC-PCR指纹图谱分析.环境科学学报,2003,23(6):705~710
- 4 高平平等.TGGE分析焦化污水处理系统活性污泥细菌种群动态变化及多样性.生态学报,2003,23(10):1963~1969
- 5 蔡文琴.现代实用细胞与分子生物学实验技术.北京:人民军医出版社,2003.204~403
- 6 Carolina Casserly, Leonardo Erijman. Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, 52: 7~12
- 7 Allison E., McCaig A., Susan J., et al. Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacteria communities. FEMS Microbiol Ecol., 2001, 35: 37~48
- 8 Martin Eschenhagena, Markus Schupplerb, Isolde Roskea. Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. Water Research, 2003, 37: 3224~3232
- 9 Stamper David M., Walch Marianne, Jacobs Rachel N. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for gray water treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 852~860
- 10 Forney L. J., Liu J. B., et al. Structure of microbial communities in activated sludge: Potential implications for assessing the biodegradability of chemicals. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2001, 49: 40~53
- 11 Klatt Christian G., LaPara Timothy M. Aerobic biological treatment of synthetic municipal wastewater in membrane-coupled bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 82(3): 313~320
- 12 Annette F. Muttray, Zhontang Yu, William W. Mohn. Population dynamics and metabolic activity of Pseudomonas abietaniphila BKME-9 within pulp mill wastewater microbial communities assayed by competitive PCR and RT-PCR. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 38: 21
- 13 Gavin Collins, Adele Woods, Sharon McHugh, et al. Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 46: 159~170
- 14 Ghyoot Wouter, Verstraete Willy. Reduced sludge production in a two-stage membrane-assisted bioreactor. Water Research, 2000, 34(1): 205~215
- 15 Luxmy B. S., Kubo T., Yamamoto K. Sludge reduction potential of metazoa in membrane bioreactors. Water Science and Technology, 2001, 44(10): 197~202
- 16 Luxmy B. S., Nakajima F., Yamamoto K. Predator grazing effect on bacterial size distribution and floc size variation in membrane-separation activated sludge. Water Science and Technology, 2000, 43(3): 211~217