

# BEAC 工艺中微生物群落变化和种群稳定性

解丰波<sup>1</sup>, 李伟光<sup>1</sup>, 张多英<sup>2</sup>, 王广智<sup>1</sup>, 郜玉楠<sup>1</sup>, 张淑梅<sup>3</sup>

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 哈尔滨 150090, xiefengbo1984@163.com; 2. 黑龙江东方学院, 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省科学院微生物研究所, 哈尔滨 150010)

**摘要:** 为了解生物增强活性炭(BEAC)上微生物群落变化和种群的稳定性, 从运行 13 d、26 d 和 39 d 的 BEAC 炭柱的上层、中层、下层进行取样, 通过细胞裂解来获取基因组 DNA, 纯化后, 用对细菌 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的通用引物 F357 - GC 和 R518 对其进行聚合酶链式反应(PCR)扩增, 得到长约 250 bp 的 PCR 产物. 用变性梯度凝胶电泳(DGGE)对 PCR 产物进行分离, 获得炭柱内微生物群落的 16S rDNA 基因 V3 区的指纹图谱. 研究表明: 随着反应器的运行, 活性炭柱内微生物的群落结构、种类以及数量都具有时序动态性; 原水带入的其他菌的种类和数量不断减少; 人工强化固定的 5 株菌一直存在, 它们在空间上呈现不同的分布, 这些菌经历了动态的演替后, 逐渐成为优势菌群, 群落结构趋于稳定. 固定化菌群的稳定性从根本上保证了整个系统的运行和处理效果的稳定性.

**关键词:** 变性梯度凝胶电泳; 生物增强活性炭; 微生物群落变化; 种群稳定性

**中图分类号:** TU991.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0367 - 6234(2010)12 - 1874 - 05

## Analysis of microbial community dynamics and population stability in BEAC procedure

XIE Feng-bo<sup>1</sup>, LI Wei-guang<sup>1</sup>, ZHANG Duo-ying<sup>2</sup>, WANG Guang-zhi<sup>1</sup>, GAO Yu-nan<sup>1</sup>, ZHANG Shu-mei<sup>3</sup>

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, xiefengbo1984@163.com; 2. Heilongjiang East University, Harbin 150086, China; 3. Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010, China)

**Abstract:** To study microbial community dynamics and population stability on the bioenhancement activated carbon(BEAC), the samples were taken from different position of the carbon column at different operation time. The Genomic DNA of the microbes on the activated carbon was released by breaking the bacterial cells. After purification of the genomic DNA, the V3 region of genomic 16S rDNA was amplified by using specific primers(F357 - GC and R518). The polymerase chain reaction(PCR) products were about 250 bp and then separated by parallel denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The profile of DGGE showed that the structure, categories and number of microbial community were changing dynamically during running of the reactor. The categories and number of the inbreaking bacteria were reducing continuously. 5 artificial enhanced and immobilized bacteria were existing all through and distributed differently in the carbon column. Further more, they became dominant community after dynamic succession and community structure tended to be stable. The stability of the immobilized bacteria ensured the stability of operation and removal effect of BEAC procedure.

**Key words:** denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); bioenhancement activated carbon(BEAC); microbial community dynamics; population stability

收稿日期: 2009 - 02 - 15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50678046).

作者简介: 解丰波(1984—), 男, 硕士研究生;

李伟光(1962—), 男, 教授, 博士生导师.

生物增强活性炭(Bioenhancement Activated Carbon, BEAC)技术是指从自然界中筛选、驯化具有降解有机物作用的细菌, 并将其固定在活性炭载

体上,从而增强对有机物的降解效能、提高降解速率的一种措施<sup>[1]</sup>. 该技术充分发挥了生物降解和活性炭吸附的协同作用,大大缩短生物活性炭形成并稳定运行所需要的时间,加快了生物活性炭系统的启动,同时由于人工强化固定的细菌具有显著的生物再生作用,使得活性炭的使用寿命大大延长,达到经济高效除污染的目的. 目前关于 BEAC 的研究主要集中在<sup>[2-4]</sup>; BEAC 的净水效能、工艺条件优化、活性炭上生物量的变化规律等,而对于微生物群落动态以及种群稳定性方面的研究较少. BEAC 上微生物群落结构的稳定性决定了其功能的稳定性,而功能的稳定性又是水中微污染物有效降解的保证,因此,系统地研究 BEAC 工艺中微生物的群落变化和种群的稳定性,对于解决 BEAC 工艺的稳定运行,保证高效、稳定的去除效果以及指导生产实践有着重要的意义.

PCR - DGGE 技术能够在分子水平上对微生物多样性进行快速和精确的分子诊断,并可以监测不能被培养的微生物种类,非常适合研究微生物群落的时空分布,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之一. 1979 年, Fischer 和 Lerman 最先提出将其用于检测 DNA 突变<sup>[5]</sup>, 1993 年 Muiyzer<sup>[6]</sup>首次将该技术应用于微生物菌苔和生物膜系统的群落多样性研究,显示了其独特的优越性. 此后该技术被广泛应用于微生物分子生态学研究的各个领域,如土壤<sup>[7]</sup>、活性污泥<sup>[8]</sup>、食品<sup>[9-10]</sup>、生物制氢<sup>[11]</sup>、制浆和造纸废水<sup>[12]</sup>、淡水

湖<sup>[13]</sup>等. 最近几年该技术在污水和饮用水处理领域的应用也越来越受到重视.

## 1 试 验

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验装置

原水采用松花江水,试验期间的原水水质如表 1 所示. 试验装置如图 1 所示. BEAC 工艺的水力停留时间  $t = 10 \sim 20 \text{ min}$ ; 流量  $Q = 10 \sim 20 \text{ L/h}$ ; 滤柱材料为有机玻璃,柱内径 60 mm,高 2 000 mm,在距离柱底 1 200,700,200 mm 处分别设置上、中、下 3 个取样口;柱内装填柱状活性炭,规格 ZJ15 型 ( $d = 1.5 \text{ mm}$ ),高度为 1 200 mm,垫层为砾石,规格  $d = 6 \sim 8 \text{ mm}$ ,厚度为 100 mm. 从装置开始运行起,每隔 13 d 取样 1 次,样品编号分别为 B11、B12、B13 (运行 13 d 后上层、中层、下层炭样), B21、B22、B23 (运行 26 d 后上层、中层、下层炭样), B31、B32、B33 (运行 39 d 后上层、中层、下层炭样), B0、B01 (装置运行之前,固定化完成之后活性炭柱上层、下层炭样),炭样分别存放在塑料规格袋中,于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中保存.

表 1 试验期间原水水质

数值	水温/ $^\circ\text{C}$	pH 值	浊度/NTU	COD <sub>Mn</sub> /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
最小值	8	7.08	0.35	2.01
最大值	16	7.85	2.67	3.98
平均值	12	7.60	0.94	3.01

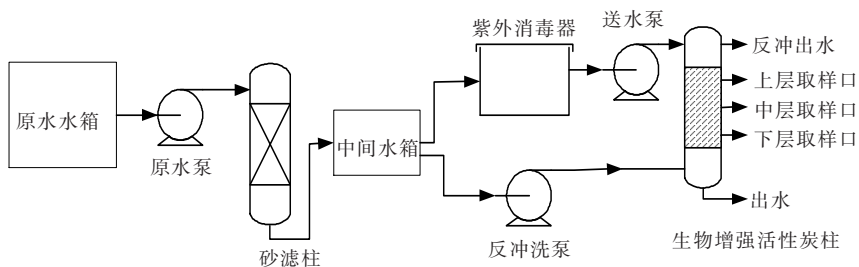


图 1 试验装置示意图

#### 1.1.2 主要仪器和设备

离心机(上海安亭科学仪器厂 TGL - 16G), 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司 754N), PCR 扩增仪(Eppendorf PCR system 2700), 凝胶成像分析系统(UVP BioImaging Systems Bio-Spectrum AC), 基因突变检测系统(Bio - Rad Dcode), 电泳仪(Bio - Rad PowerPac Basic).

#### 1.1.3 固定化应用的菌种

从松花江中筛选了 20 株在低温条件下具有有机物降解作用的细菌,从中优选了 5 株菌,对这

5 株菌进行鉴定,鉴定结果为:恶臭假单胞菌 1 株 (*Pseudomonas putida*); 穿孔假单胞菌 1 株 (*Pseudomonas pertucinogena*); 枯草芽孢杆菌 1 株 (*Bacillus subtilis*); 短杆菌 1 株 (*Brevibacterium mcbrellneri*); 鲁菲氏不动杆菌 1 株 (*Acinetobacter lwoffii*). 5 株菌以相同的比例混合后投加于生物处理系统中进行固定.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 优选菌的固定方法

先用清水浸没活性炭以去除活性炭中气泡,

然后通入配制好的混合菌剂,再用蠕动泵使菌液循环通过活性炭,固定时间为12~48 h,空床接触时间10~25 min;固定结束后,通入清水进行清洗,并检测细菌总数,直至出水细菌总数低于100 CFU/mL;通入原水,滤速7~8 m/h.

### 1.2.2 COD<sub>Mn</sub>检测方法

COD<sub>Mn</sub>检测方法采用高锰酸钾酸性氧化法<sup>[14]</sup>.

### 1.2.3 基因组DNA的提取和纯化

DNA的提取采用Zhou(1996)提出的DNA提取方法<sup>[15]</sup>,得到的DNA粗提液用DNA柱式胶回收试剂盒(TIANGEN)进行纯化.

### 1.2.4 基因组DNA的PCR扩增

将纯化后的基因组DNA作为PCR反应的模板,采用对大多数细菌16S rDNA基因V3区具有特异性的引物对F357-GC和R518(Muyzer, 1993)进行扩增,引物序列分别为:F357-GC(5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGCGCCCGCCGCGCC - CCCGCCCCCTACGGGAGGCAGCAG-3'),R518(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'),扩增产物片段长约250 bp. 25 μL的PCR反应体系组成如下:9.5 μL去离子水,12.5 μL Master Mix(TaKaRa),2种引物各1 μL,模板1 μL.采用降落PCR反应条件<sup>[16]</sup>:94℃预变性5 min,前20个循环为94℃变性1 min,65~55℃退火1 min,72℃复性1 min(每个循环,退火温度下降0.5℃),后10个循环为94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃复性1 min,最后72℃延伸10 min. PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测.

### 1.2.5 PCR反应产物变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

采用Bio-Rad公司的Dcode基因突变检测系统对PCR反应产物进行电泳分离.变性胶的制备:使用梯度胶制备装置,制备变性剂体积分数从30%~60%(100%的变性剂为体积分数40%的去离子甲酰胺和浓度7 mol/L的尿素)的8%聚丙烯酰胺凝胶,变性剂体积分数从上到下依次递增,倒完胶后,凝固1 h;点样:先清洗点样口,在每个点样口中加入含有10%的加样缓冲液的PCR产物样品15~20 μL;电泳:150 V电压下,60℃,电泳4 h;染色:采用硝酸银染色法;照相及观察.

## 2 结果与分析

### 2.1 优选菌的固定化效果

5株优选菌分别用a(恶臭假单胞菌)、b(穿孔假单胞菌)、c(枯草芽孢杆菌)、d(鲁菲不动杆

菌)、e(短杆菌)表示.图2显示上层固定效果(B0)优于下层(B01),其中菌a、b、c、e固定效果明显,菌d固定效果稍差,但在DGGE图谱上仍然可以看到清晰的条带,说明5株优选的菌均已固定上,同时也表明不同菌在活性炭表面的附着能力不一样,附着越紧密的菌固定化效果越好.

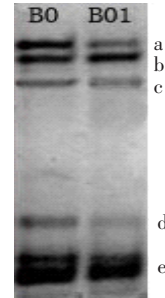


图2 固定化后BEAC样品的DGGE指纹图谱

### 2.2 BEAC系统中微生物种群分布和变化

#### 2.2.1 微生物种群在空间上的动态变化

从运行时间相同取样位置不同的样品比较中可以看出微生物种群在空间上的分布不同(如图3所示).总的来看,炭柱上层微生物最多,下层次之,中层最少.一方面原水经过常规处理后,水中溶解氧充足,而各种基质的质量浓度都比较低,有机物质量浓度从上到下逐渐递减,营养物质的缺乏限制了中、下层微生物的生长;另一方面水流对上层和中层的微生物冲刷剪切作用较大,在下层受到炭柱底部的阻碍作用变得平缓,对下层微生物影响较小,这也是下层微生物比中层稍多的主要原因.固定的5株优选菌在活性炭柱内亦呈现不同的生态分布:菌a、b在炭柱内分布比较均匀,条带信号要强于其他菌,说明在整个生态系统内它们的数量占有绝对优势,是生态幅比较广泛的菌属;菌c在炭柱内上层多,中层和下层少,这可能是由于营养物质成为菌c生长和繁殖最重要的影响因素;菌d分布在柱的中、下层,上层没有,这可能是由于水流的冲刷对菌d影响较大;另外菌d信号强度在这5株菌中最弱,说明在整个生态系统中菌d的生长受到其他菌的生长抑制,生态幅变窄;菌e在第一周期内上层分布多,由上而下递减,随着反应器的不断运行,空间分布上逐渐变得均匀.

#### 2.2.2 微生物种群在时间上的动态变化

从图3中运行13 d的样品可以看出,运行初期BEAC系统中除最初固定的5株菌外还存在部分其他菌,主要是由原水携带的细菌在炭上生长形成的,这些原水带入的其他菌和强化固定的菌一起生长在活性炭柱内,同周围的无机环境、营养物质等一起构成了一个完整的微生态系统,运行

26 d 时部分原水带入的其他菌在生态竞争中已被淘汰,到第 39 天它们的种类和数量已经明显减少.人工强化固定的 5 株菌在与原水带入的其他菌的竞争中逐渐占据主导地位,在数量上占有绝对的优势.这充分说明了人工强化固定的 5 株菌生态幅广泛,在贫营养环境中它们适应环境和利用基质的能力要明显强于原水带入的其他菌种.

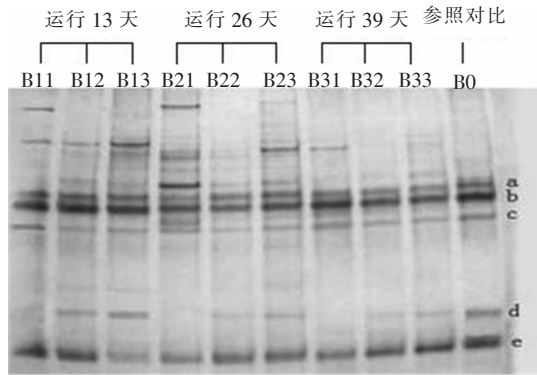


图 3 生物增强活性炭样品的 DGGE 分离图谱

### 2.3 BEAC 系统中固定化菌群的稳定性

由图 3 还可以看出,人工强化固定的 5 株菌在反应器运行过程中一直存在,没有在与原水带入的其他菌的竞争中淘汰,只是条带信号的相对强度发生了变化,说明这些强化固定的菌经历了动态演替后,逐渐成为优势菌群,群落结构趋于稳定.这主要是因为一方面不同的微生物适应环境和利用营养物质的能力不同,外界环境的变化对它们的影响程度也不同,微生物之间、微生物与其底物及环境因子之间构成了相互联系、相互制约的动态平衡,因此,外界环境的变化必然会导致这些微生物在生态系统中重新分布,表现在数量上的变化.另一方面这 5 株菌通过筛选、驯化后,适应环境和利用基质的能力大大增强,使它们在与原水带入的其他菌的竞争中处于优势地位,其生长和繁殖占用了大量的营养物质和绝大部分的生存空间,必然会导致原水带入的其他菌在种类和数量上的减少,另外这 5 株菌之间又相互联系和制约,使它们和外界环境构成了一个完整的微生态系统,由于其适应环境能力强,当外界环境发生变化时,这 5 株菌仍能使整个生态系统保持动态平衡,从根本上保证了整个工艺运行和处理效果的稳定性.

### 2.4 固定化菌群的稳定性对降解效果的影响

COD<sub>Mn</sub>表征的是水中易被高锰酸钾氧化的还原性物质,以有机物为主.通过进、出水 COD<sub>Mn</sub>的变化可以了解 BEAC 工艺对带羟基的有机酸、苯酚、苯胺及糖类有机物的去除效果. BEAC 运行

期间的处理效果如图 4,5 所示,进水 COD<sub>Mn</sub>最大值 3.98 mg/L,最小值 2.01 mg/L,均值 3.01 mg/L,出水 COD<sub>Mn</sub>最大值 2.65 mg/L,最小值 1.45 mg/L,均值 2.13 mg/L, COD<sub>Mn</sub>的去除率最大值 45.78%,最小值 9.83%,平均去除率 28.32%. BEAC 工艺在前 26 天对 COD<sub>Mn</sub>的去除率波动较大,26 天后出水水质和 COD<sub>Mn</sub>去除率都逐渐趋于稳定.结合图 3 可以看出, BEAC 系统在运行初期人工强化固定的 5 株菌与原水带入的其他菌竞争营养物质和生存空间,影响了整个生态系统的稳定性,所以,处理效果在运行初期会出现较大的波动,经过一段时间后,经过人工强化的 5 株菌能够更快、更好地适应周围的环境,在生态竞争中处于主导地位,且这 5 株菌为人工培养、驯化后优选的菌株,具有对有机物降解能力强、对环境适应能力强等特点,因此,26 天后的处理效果能够保持稳定.另外进水基质质量浓度对去除率的影响也较大,特别是当基质质量浓度很低时,菌群的代谢活动受到很大影响,因此,去除率较低.由此可见固定化菌群的稳定性是群落结构稳定性的基础,群落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,保证固定化菌群的稳定性对于 BEAC 工艺的稳定运行至关重要.

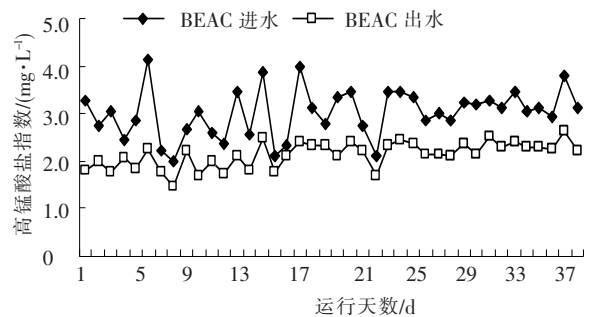


图 4 BEAC 运行期间对高锰酸盐指数的去除效果

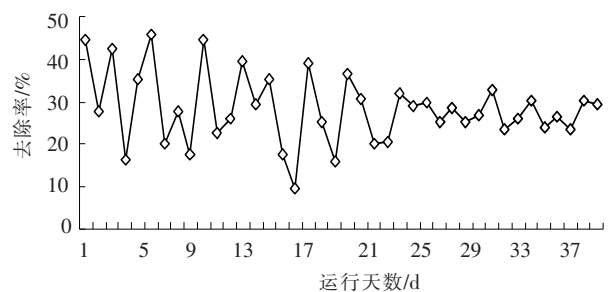


图 5 BEAC 运行期间对 COD<sub>Mn</sub>的去除率

## 3 结 论

1) 生物增强活性炭柱在运行过程中,柱内的微生物群落经历了明显的演替过程,微生物群落

结构、种类以及数量呈现出时序动态变化的特性.

2) DGGE 指纹图谱显示原水带入的其他菌的种类和数量在运行过程中逐渐减少.

3) 人工强化固定的 5 株菌在与原水带入的其他菌的生态竞争中占据着主导地位, 逐渐成为整个生态系统内的优势菌群.

4) 5 株优选菌在运行过程中一直存在, 只是在分布位置和菌的数量上发生着动态变化, 它们相互联系、互相制约, 共同维持着整个生态系统的平衡.

5) 固定化菌群的稳定性从根本上保证了整个系统的运行和处理效果的稳定性. 总的来说, 用现代分子生物学的方法来研究 BEAC 工艺群落的动态变化和种群稳定性, 对于解决微污染水源水问题, 开发经济高效的饮用水处理新技术具有重要的意义.

参考文献:

[1] GRABINSKA L A, PERCHUC M, KORNIOWICZ K T. Biocenosis of BACFS used for groundwater treatment[J]. *Water Research*, 2004, 34: 1695 - 1706.

[2] 王广智, 李伟光. 活性炭性质对固定化生物活性炭净水效果的影响研究[J]. *环境科学*, 2006, 27(10): 2040 - 2044.

[3] 黄丽坤, 王广智, 李伟光, 等. 固定化生物活性炭技术处理微污染水源水特性研究[J]. *供水技术*, 2007, 1(5): 29 - 31.

[4] 邵玉楠, 李伟光. 优势菌在活性炭表面固定中生物量的变化规律研究[J]. *中国环境科学*, 2008, 28(12): 1079 - 1083.

[5] FISCHER S G, LERMAN L S. DNA fragments differing by single base - pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 1579 - 1583.

[6] MUYZER G, WAAL de E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA

[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695 - 700.

[7] GOMES N C, FAGBOLA O, COSTA R, *et al.* Dynamics of fungal communities in bulk and maize - rhizosphere soil in the tropics [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 3758 - 3766.

[8] EICHNER C A, ERB R W, TIMMIS K N, *et al.* Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 102 - 109.

[9] ERCOLINI D. PCR - DGGE finger printing: Novel strategies for detection of microbes in food [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56: 297 - 314.

[10] RANTSIOU K, COMI G, COCOLIN L. The rpoB gene as a target for PCR - DGGE analysis to follow lactic acid Bacterial population dynamics during food fermentations [J]. *Food Microbiology*, 2004, 21: 481 - 487.

[11] 邢德峰, 任南琪, 宫曼丽. PCR - DGGE 技术解析生物制氢反应器微生物多样性[J]. *环境科学*, 2005, 26(2): 172 - 176.

[12] 陈竹, 陈元彩. PCR - DGGE 在制浆造纸废水处理微生物检测中的应用[J]. *造纸科学与技术*, 2006, 25(6): 128 - 131.

[13] SEKIGUCHI H, WATANABE M, NAKAHARA T, *et al.* Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 5142 - 5150.

[14] 魏复盛. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 223 - 226.

[15] ZHOU J, MARY B, JAMES M T. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 316 - 322.

[16] ZWART G, HUISMANS R, AGTERVELD M P, *et al.* Divergent members of the bacterial division Verrucomicrobiales in a temperate freshwater lake [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1998, 25: 159 - 169.

(编辑 刘 彤)