

贫营养条件下 EPS、SMP 和微生物多样性的研究

黄兴^{1,2}, 孙宝盛^{1*}, 孙井梅¹, 张斌^{1,3}

(1. 天津大学环境科学与工程学院, 天津 300072; 2. 中国市政工程中南设计研究院, 武汉 430010; 3. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050)

摘要: 为了考察活性污泥在营养缺乏的条件下, 胞外聚合物(EPS)、溶解性微生物产物(SMP)和微生物种群结构自身的变化情况, 为优化 MBR 系统运行、延缓膜污染等提供理论依据, 对天津大学游泳馆 MBR 中的污泥混合液进行贫营养实验, 测定了污泥混合液中 EPS 和 SMP 的含量, 通过聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术和克隆测序技术对微生物多样性进行分析, 根据序列数据进行同源性分析并构建系统进化树。实验初期, EPS 和 SMP 的浓度由 15.04 mg/g 和 0 mg/g 分别上升到 17.99 mg/g 和 3.29 mg/g。随着实验的进行, EPS 有很大的降低, 最终只有 2.40 mg/g; SMP 则一直在 3.5 mg/g 左右变化。实验表明, EPS 和 SMP 对外界环境变化具有一定的缓冲作用, 并且在营养缺乏的条件下微生物能够以降解 EPS 和 SMP 来维持自身生命活动。由于对 EPS 和 SMP 的利用, 污泥的 Shannon 多样性指数由最初的 0.81 上升到最高时的 1.09, 随后开始降低, 并最终稳定在 0.95。克隆测序的结果表明, 污泥中微生物的种类比较丰富, 并且优势菌种大部分为未经培养菌种。部分菌种能够通过产生蛋白质和多糖水解酶来实现对 EPS 和 SMP 的降解, 主要属于拟杆菌(*Bacteroidetes*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)、腐螺旋菌(*Saprospiraceae*)和厚壁门菌(*Firmicutes*)等。

关键词: 膜生物反应器; 胞外聚合物; 溶解性微生物产物; 微生物多样性; 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳; 克隆测序

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)05-1468-07

EPS, SMP and Microbial Biodiversity Under the Oligotrophic Environment

HUANG Xing^{1,2}, SUN Bao-sheng¹, SUN Jing-mei¹, ZHANG Bin^{1,3}

(1. School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Middle-South China Municipal Engineering Design and Research Institute, Wuhan 430010, China; 3. Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

Abstract: In order to investigate the extracellular polymeric substances (EPS), soluble microbial product (SMP) and microbial biodiversity of the sludge lacking of nutrition, to provide evidence for optimizing MBR's operation and lessening membrane fouling, a series of experiments were undertaken under the oligotrophic environment using the sludge from the MBR of Tianjin University. The contents of EPS and SMP were determined, and microbial biodiversity was analyzed by PCR-DGGE technology and cloning-sequencing. Furthermore, the sequences were used for homology analysis and then the phylogenetic tree was constructed. In the initial stage, the EPS and SMP contents raised from 15.04 mg/g and 0 mg/g to 17.99 mg/g and 3.29 mg/g, respectively. Along with the experiment progress, the EPS content dropped to 2.40 mg/g; but the SMP content varied around 3.5 mg/g. This indicates that the EPS and SMP possess the buffer action towards the variation of the environment, and the microorganism can utilize the EPS and SMP under the condition of oligotrophic. Because of the utilization of the EPS and SMP, the Shannon index of the sludge raised from 0.81 to 1.09. Then, it began to decline and stabilized at 0.95 finally. The clone and sequence results reflect that the microbial structure is very rich, and most of the dominant species are uncultured bacterium. Some of the bacterium, which are mostly belong to *Bacteroidetes*, *Flavobacterium*, *Saprospiraceae* and *Firmicutes*, can degrade the EPS and SMP by secreting protein and polysaccharide hydrolyzing enzymes.

Key words: membrane biological reactor (MBR); extracellular polymeric substances (EPS); soluble microbial product (SMP); microbial biodiversity; PCR-DGGE; clone and sequence

MBR 工艺中 90% 以上的被去除污染物是由活性污泥去除的^[1], 同时污泥混合液特性与膜污染紧密相关^[2,3], 这说明污泥混合液特性很大程度上决定了最终的出水水质和膜分离性能。而胞外聚合物(EPS)、溶解性微生物产物(SMP)和微生物多样性是 3 个表征污泥混合液特性的重要因素。

EPS 是在一定条件下由细菌分泌于体外的一些高分子聚合物作为含水凝聚基质将微生物粘结在一起的产物^[4]。SMP 是生物处理出水中溶解性 TOC 或

COD 的主要组成部分, 其主要产生于微生物的基质分解过程(UAP)和内源呼吸过程(BAP)^[5], 两者均是膜污染的优势污染物^[6,7]。蛋白质和多糖均是 EPS 和 SMP 的主要成分^[8,9]。根据统一理论^[10]的观点, 溶解性的 EPS 实际上就是 SMP, 并且 EPS 和 SMP 之间存

收稿日期: 2008-06-11; 修订日期: 2008-09-10

基金项目: 天津市应用基础研究计划项目(07JCZDJC02100)

作者简介: 黄兴(1983~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染控制与环境生态学, E-mail: kingxing_1121@163.com

* 通讯联系人, E-mail: haosheng_sun@sina.com

在一个相互转化的关系。

目前, 国内外在污水处理过程中微生物群落的作用和生态学特性已经逐渐成为研究热点^[11~14]。只有了解微生物群落多样性和动态性等信息, 才能提高对处理系统的控制能力。并且, 对于反应器内活性污泥中微生物种群结构的研究, 可以从根本上找出影响其结构与功能的主要因素及内在关系。

在膜生物反应器中, 随着 HRT 的延长, 反应器中污泥浓度不断升高, 这有利于提高系统的容积负荷和反应器对污染物的去除率。但是在 HRT 不变的情况下, 随着污泥浓度的升高, F/M 下降, 一部分微生物会处于一种营养相对贫乏的条件下。当微生物长期处于贫营养条件下时, 微生物会加剧自身的内源呼吸, 并大量死亡, 对整个反应器中 EPS、SMP 和活性污泥微生物自身都会产生很大影响。本研究利用分子生物学技术讨论了 MBR 中的活性污泥在贫营养的条件下, EPS、SMP 和微生物种群结构自身的变化情况, 以期对 MBR 实际运行过程中优化 MBR 系统运行、延缓膜污染等提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 贫营养体系的构建和取样方法

于天津大学游泳馆中水回用系统的 MBR 系统中取一定体积的活性污泥混合液, 静沉、弃去上清液、蒸馏水清洗, 重复上述操作 3 次, 以去除污泥中存在的原水基质和 SMP。最后以蒸馏水补充至 1 000 mL, 加入无机盐营养, 配成污泥浓度为 6 220 mg/L 的混合液。混合液在 150 r/min, 30℃ 下培养。于培养的第 0、2、5、7、10、14、16、19 d 分别取样(编号为 P₁ ~ P₈), 取样后测定污泥浓度, 提取 EPS、SMP 和 DNA。无机盐营养的组成为(mg/L): (NH₄)₂SO₄ 220; NaHCO₃ 50; MgSO₄·7H₂O 50; KH₂PO₄ 23; FeCl₃·6H₂O 4; CaCl₂ 10。

1.2 EPS 和 SMP 的提取方法和表征

取 40 mL 污泥混合液, 于 6 000 r/min 低速离心 10 min, 弃去上清液, 用蒸馏水补足, 使污泥重新悬浮, 然后再于 6 000 r/min 低速离心 10 min。如此重复, 用蒸馏水将污泥清洗 3 次, 最后用蒸馏水补足至原体积, 并使污泥重新悬浮。于恒温水浴锅中在 80℃ 下热提 10 min 后, 于 8 000 r/min 低速离心 10 min, 取上清液。将上清液用 0.45 μm 的醋酸纤维微滤膜抽滤, 滤液即 EPS^[15]。取 50 mL 污泥混合液, 中速滤纸快速过滤, 收集滤过液。再将滤过液用 0.45 μm 的醋酸纤

维微滤膜抽滤, 滤液即为 SMP。EPS 和 SMP 的量均以 TOC 来表征。

1.3 污泥样品的预处理和 DNA 的提取纯化

取 500 mL 污泥混合液, 经 30 min 沉降后, 去上清液, 取沉淀部分 40 mL 于 50 mL 灭菌离心管内, 6 ~ 10℃、9 000 r/min 下离心 10 min; 弃上清液, 重新加入 30 mL 灭菌蒸馏水并振荡混匀, 离心 10 min; 弃上清液后, 再加入 30 mL 无菌 TE 缓冲液, 离心 10 min; 倒掉上清液后将所得的沉淀污泥重新加入 15 mL 蒸馏水并振荡混匀, 立刻取 5 mL 用于污泥中基因组 DNA 的提取。基因组 DNA 的提取方法参照文献[16]。用 DNA 提纯试剂盒(购自北京赛百盛基因技术有限公司基因组 DNA 提纯试剂盒 CSG-50)对上述所得的粗提液进行纯化, 最终得到 100 μL 的 DNA 溶液置于 -20℃ 冷冻保存。基因组 DNA 通过 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检验, 结果表明所得到的 DNA 片断约为或略大于 23 kp。

1.4 总细菌的 PCR 扩增

将提纯到的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。采用对大多数细菌和古细菌 16S rRNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 F357-GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGC-CCCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 R518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), 扩增产物片段长约 240 bp(下划线部分为“GC 夹”)。50 μL 反应体系组成为: 10~100 ng 模板, 5 μL 的 10×PCR buffer (20 mmol MgCl₂), 200 μmol/L 的 dNTPs, 0.5 μmol/L 每种引物, 2.5 U 的 *Taq* 酶, 其余用无菌超纯水补足 50 μL。采用降落式 PCR 反应策略: 94℃ 下预变性 5 min; 前 20 个循环为 94℃ 1 min, 65~55℃ 1 min, 72℃ 1 min(其中每个循环后退火温度下降 0.5℃); 后 10 个循环为 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min; 最后在 72℃ 下延伸 8 min。扩增产物在 2.0% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测。

1.5 DGGE 分析

将总细菌 PCR 产物在 DGGE 电泳系统(型号 DGGE-2001, C. B. S. SCIENTIFIC 公司)进行变性梯度凝胶电泳分离, 电泳缓冲液为 1×TAE。丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性剂浓度从 45% ~ 60% (100% 的变性剂为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子的甲酰胺的混合物), 其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增。在 150 V 的电压下, 60℃ 电泳 6.5 h。电泳完毕后, 将凝胶进行硝酸银染色, 并将图像在观测仪中拍照存档。

1.6 Shannon 指数

微生物群落多样性采用 Shannon 指数(H) 表示, 公式为: $H = - \sum P_i \lg P_i$, H 的计算是基于 DGGE 胶条带的位置和条带的强度, 而条带的强度则通过 Quantity One 分析后得到的波峰面积来表示, 即 $P_i = n_i / N$, 式中, n_i 为峰面积, N 为所有峰的总面积。

1.7 切胶回收克隆测序

用灭菌刀片切取凝胶上主要的独立 16S rDNA 条带并置于 1.5 mL 离心管中, 加入 50 μ L 已灭菌的 TE 缓冲液, 于沸水中水浴 10 min; 将离心管于 4 $^{\circ}$ C 下静置过夜, 以使 DNA 片断从胶中慢慢扩散出来; 取 3 μ L 的浸出液作为模板, 重新进行 PCR 扩增。所用引物为 F357 和 R518, 扩增产物片段长约 200 bp。PCR 反应策略为: 94 $^{\circ}$ C 下预变性 5 min; 共 30 个循环为 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 8 min。PCR 后产物在 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳检测, 并送北京英骏生物技术有限公司克隆测序。

1.8 同源性分析和系统进化树的构建

将测序结果提交到 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 采用 BLAST 将目标序列和基因库中所含序列进行比对, 得到同源性最近的序列。最后采用 MEGA 3.1 建立进化树, 构建方法为距离依靠法中的除权配对法(UPGMA)。

2 结果与讨论

2.1 EPS 和 SMP 含量的变化

由于活性污泥在贫营养培养之前, 用蒸馏水反复清洗了 3 次, 将原污泥上清液中含有的一些营养成分及其他代谢产物洗出, 所以初始条件下的 SMP 浓度近似为 0。

实验过程中 EPS 和 SMP 含量变化如图 1 所示。在实验初期, 即 1~2 d, EPS 含量有一定升高, 由 15.04 mg/g 上升到 17.99 mg/g。而 SMP 含量则上升到 3.29 mg/g。说明在贫营养初期, 原始污泥样品中的微生物对外界环境的变化有一定的抵抗力, 其能够通过释放 EPS 和 SMP 来缓解环境变化带来的压力, 并且这部分 SMP 主要是较难降解的 BAP。

第 2~5 d, EPS 含量开始有很大降低, 由 17.99 mg/g 降低到 8.63 mg/g, 而 SMP 含量则上升到 3.68 mg/g。说明在这个时期, 微生物细胞活性较大, 能够利用 EPS 中能生物降解部分用于维持自身细胞的生命活动, 并且在基质利用过程中产生了 UAP。

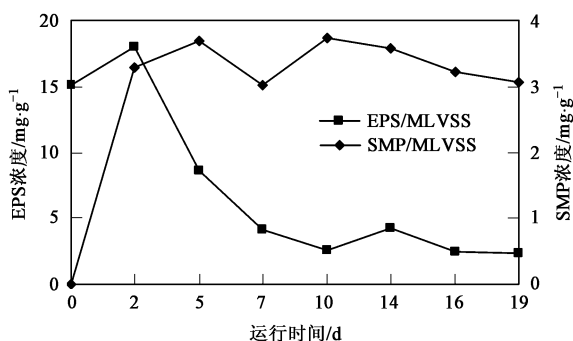


图 1 贫营养过程 EPS 和 SMP 浓度变化

Fig. 1 EPS and SMP content changes under the oligotrophic environment

第 5~7 d, EPS 含量继续降低, 由 8.63 mg/g 降低到 4.12 mg/g, SMP 含量也开始降低, 由 3.68 mg/g 降低到 3.03 mg/g。说明在这段时间里, 微生物不仅能够利用 EPS, 而且对于刚产生的 SMP 中相对容易生物降解的部分——UAP, 也能够有一定程度的利用。

第 7~10 d, SMP 有少量升高, 由 3.03 mg/g 上升到 3.73 mg/g, 可能是少量细胞自溶, 释放出了一部分 SMP, EPS 含量则继续降低到 2.61 mg/g。

第 10 d 开始, EPS 含量又有升高, 有可能是上一阶段微生物细胞水解过程中溶出物被 EPS 所吸附所致。之后 EPS 与 SMP 一样降低, 最后不再有很大的变化。

2.2 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳分析

总细菌的 DGGE 结果如图 2 所示。可以看到, 活性污泥在贫营养条件下, 其种群的丰富性和多样性都经历了一个比较明显的变化。

有一些菌种在原始样品中保持优势, 而随着反应的进行, 优势地位逐渐消失, 演变成非优势种群, 甚至逐渐消失, 如条带 c、g、h 等。这些菌种对营养条件依赖程度比较大, 营养的缺乏对其生命活动造成了很大的影响。有一些菌种在整个贫营养过程中, 一直处于优势地位, 并没有因为营养的缺乏而受到很大影响, 如条带 j、k、m、n 等。这些菌种可能对营养的依赖程度较小, 其能够适应这种贫营养的条件; 或者因为这些菌种在原始污泥样品中已经处于休眠状态, 而营养的缺乏对其并不造成很大影响。有一些菌种在原始污泥样品中并不占优势, 但是随着贫营养的进行, 反而刺激了其生长, 并且在实验后期还处于优势地位, 如条带 a、i 等。这种现象的出现是因为相对于营养丰富环境而言, 这些菌种更适合在营养缺乏的条件下生长, 还有一些菌种在初始阶段并不

占优势,但是随着实验的进行,其开始变为优势菌种,而到了反应后期,其优势地位有逐渐消失,如条带 b、d、e、f 等。这是因为这些菌种对原始污泥中或者贫营养环境刺激下产生的次生代谢产物(EPS 和 SMP)有一定的降解能力,造成了其增殖,但随着贫营养的进行,环境中的次生代谢产物浓度也随之降低,这些菌种的生存也受到很大影响,其优势地位也逐渐消失。

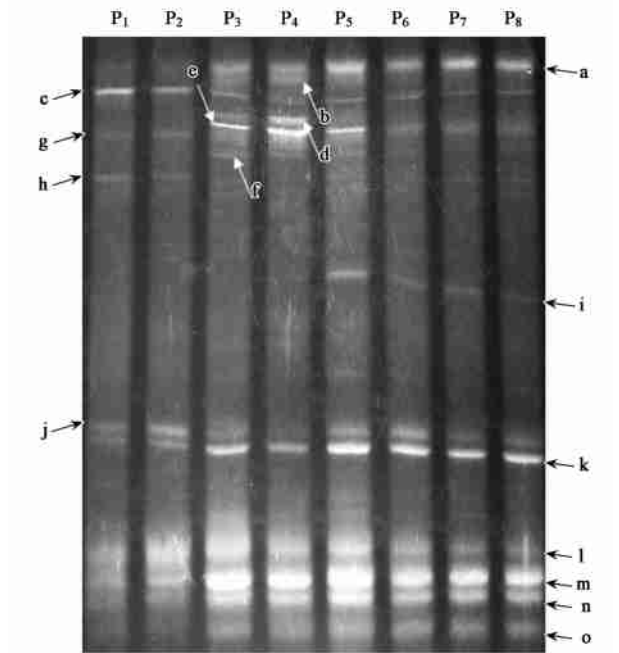


图2 贫营养污泥样品的 DGGE 分离图谱

Fig.2 DGGE profile of the sludge sample under the oligotrophic environment

2.3 总细菌 Shannon 多样性指数分析

随着实验的进行,污泥的 Shannon 多样性指数经历了一个逐渐增加又逐渐减少,最终稳定的过程。从 Shannon 多样性指数的变化来看(表 1),微生物多样性并没有因为营养的缺乏而降低,反而刺激了一些微生物的生长,而使得微生物多样性有一定的增加,直到 P₄ 时期(即实验的第 7 d),微生物多样性达到最高。对照前面的 EPS 和 SMP 来看,这个时期刚好是 EPS 含量降到比较低的时期。所以,在贫营养过程中,不仅一部分微生物能够利用 EPS 和 SMP 等微生物次生代谢产物,用于维持自身生命活动,并且还有一部分微生物在对 EPS 和 SMP 的利用中,产生了增殖并且成为优势菌种。而在 P₄ 时期之后,微生物的 Shannon 多样性指数开始降低,而这个时期之后, EPS 和 SMP 因为前期的消耗,而处于比较低的水

平。不仅对那些能够利用 EPS 和 SMP 维持生命活动的微生物造成了影响,而且对于那些对 EPS 和 SMP 有很强依赖性的微生物来说,更是受到了巨大影响。在 P₇ 和 P₈ 时期,微生物 Shannon 多样性指数相同,而 DGGE 电泳图中这 2 个泳道显示了很大的相似性。对照 EPS 和 SMP 含量及成分来看,从 P₇ 时期开始,大部分微生物已经基本失去活性。

表 1 Shannon 多样性指数计算结果

Table 1 Shannon index of the DGGE gel patterns

样品	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈
H	0.81	0.95	1.00	1.09	1.03	1.02	0.95	0.95

2.4 切胶回收 DNA 克隆测序分析

基因比对结果(表 2)表明,这些优势菌种大部分为未经培养菌种(uncultured bacterium)。Amann 等^[17]在研究中曾得出如下结论:自然环境尤其是极端环境中存在大量不可培养的微生物(unculturable microorganisms, UCM),已经被分离并鉴定的微生物仅占估计数量的极少一部分。本研究所得结论与上述结论一致。

根据基因比对结果(表 2)和优势菌种的系统进化树(图 3)可以看到,污泥中微生物的种类比较丰富。如条带 a 和 i 与 γ 变形菌纲(gamma Proteobacterium)细菌相似性很高;条带 c 与腐螺旋菌科(Saprosiraceae)细菌相似性较高;条带 b、d、e 与一种未培养的拟杆菌门(Bacteroidetes)细菌以及几种黄杆菌(Flavobacterium)相似性较高;条带 f 与厚壁门(Firmicutes)细菌有一定相似性;条带 h 也与一种未培养的厚壁门(Firmicutes)细菌相似;条带 j 与几种固氮弧菌属(Azoarcus)细菌都有很高的相似性;条带 1 与 2 种硝化螺旋菌纲(Nitrospira)细菌的相似性高达 98%;条带 m 也与一种未培养的芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)细菌有很高的相似性;而条带 g 在 NCBI 中则未找到相似度很高的相似序列,有可能为污水处理中的新菌种。

在活性污泥运行系统中,γ 变形菌(gamma Proteobacterium)为优势菌群,在污水处理过程中起着非常重要的作用^[18];在所有的水处理污泥和生物膜样品中都可以发现大量的硝化螺菌(Nitrospira)^[19];固氮弧菌(Azoarcus)属于反硝化细菌,具有脱氮作用^[20, 21];闻岳等^[22]发现芽单胞菌(Gemmatimonadetes)是水解酸化-缺氧生物法处理油田废水中的优势菌种。

表2 部分优势菌 16S rDNA DGGE 片段测序分析结果
Table 2 Sequences of several 16S rDNA DGGE fragments

测序条带	NCBI 查询号	GenBank 比对结果		
		登记号	相似菌种	相似性/ %
Band a	A5VN2EXE015	EF417600	uncultured gamma <i>Proteobacterium</i>	99
		AJ786005	gamma <i>Proteobacterium</i> TH-N59	99
Band b	A5VKV92F014	AY510262	uncultured <i>Bacteroides</i> sp.	92
		DQ778314	<i>Flavobacterium</i> sp. YO46	89
Band c	A5VW4DW1015	DQ106965	uncultured bacterium	89
		EU177738	uncultured <i>Saprospiraceae</i> bacterium	87
Band d	A5W107ZC014	AY510262	uncultured <i>Bacteroides</i> sp.	92
		EU434462	<i>Flavobacterium</i> sp. a27	90
Band e	A5W54ZAR011	AY510262	uncultured <i>Bacteroides</i> sp.	89
		EU434462	<i>Flavobacterium</i> sp. a27	87
Band f	A5X21Y9J014	EU298693	uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium	86
Band g	A5WKFAKE01R		未找到相似度很高的相似序列	
Band h	A5X2HVX001R	EF651037	uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium	90
		AY792283	uncultured gamma <i>Proteobacterium</i>	97
Band i	A5WPMBOR014	AB286179	<i>Rhodanobacter thioacydans</i>	97
		Y13222	<i>Azoarbus</i> sp. 22Lin	95
Band k	A5WTG2UG015	AF515816	<i>Azoarbus</i> sp. CIB	94
		EU499598	uncultured <i>Nitrospira</i> sp.	98
Band l	A5WYNOMG015	EF434840	uncultured <i>Nitrospira</i> sp.	98
		EU297425	uncultured <i>Gemmatimonadetes</i> bacterium	98
Band m	A5WZ9G9V01R	AB280333	uncultured bacterium	95

值得注意的是条带 b、d、e 的测序结果及进化树表明, 它们之间的同源性很高. 条带 e 与其对应的相似菌种的相似性相对于条带 b、d 来说, 要低一些, 但是在 DGGE 图谱中条带 e 的亮度和丰度都比条带 b、d 要高, 这有可能是因为在贫营养的过程中, 细菌为了更好地适应贫营养的环境而发生突变所致. 而结合 EPS 和 SMP 的变化来看, 推测这些菌种又很有可能与 EPS 和 SMP 的降解及相互转化有很大关系. 实际上, 从表 2 和图 3 可以看到条带 b、d、e 所对应的相似菌种为拟杆菌 (*Bacteroidetes*) 和黄杆菌 (*Flavobacterium*). 许跃强等^[23]对造纸废水纸浆沉淀物中未培养微生物进行了多样性分析, Yu 等^[24]也对造纸废水处理过程中不同阶段的细菌多样性进行研究, 两者的研究结果均表明拟杆菌 (*Bacteroidetes*) 为优势细菌类群. 由于纸浆的主要成分是纤维素, 故拟杆菌中可能含有丰富的纤维素酶, 对纤维素进行分解活动. 而大量的研究结果也表明^[25], 黄杆菌 (*Flavobacterium*) 能够产生几丁质酶、壳聚糖酶和纤维素酶等.

条带 c 与腐螺旋菌科 (*Saprospiraceae*) 细菌相似性较高, Xia 等^[26]最近发现在污水处理厂中, 存在一些附着在丝状菌上的细菌为能够水解蛋白质的腐螺旋菌 (*Saprospiraceae*). 条带 h、f 分别与未培养的厚壁

门 (*Firmicutes*) 细菌有一定的相似性. 研究表明, 厚壁门细菌中的芽孢杆菌和梭菌等都能水解蛋白质. Tang 等^[27]对在以牛血清蛋白为唯一碳源和能量来源的反应器中的微生物进行研究, 发现厚壁门细菌的比例占到了 43%. 浙江大学的何若^[28]也发现炭疽芽孢杆菌能够降解蛋白质.

3 结论

(1) 实验初期, EPS 和 SMP 含量均有升高, 它们均作为缓冲物质用于抵抗外界环境的变化. 随后, EPS 含量有很大降低, 被微生物用来维持自身细胞的生命活动; SMP 的含量则既有升高又有降低, 是微生物利用、EPS 的转化和细胞自溶的共同结果.

(2) 实验过程中, 各污泥样品的 DGGE 图谱经历了一个比较明显的变化过程, Shannon 多样性指数经历了一个逐渐增加又逐渐减少, 最终稳定的过程. 从 DGGE 图谱, 可以看到在营养缺乏的条件下一部分微生物能够利用 EPS、SMP 作为营养物质用于自身的生长, 并造成了种群结构的很大变化. 由于微生物对 EPS 和 SMP 的利用, 造成了一部分菌种成为优势菌.

(3) 对 DGGE 图谱中的优势菌种切胶回收并克隆测序的结果表明, 污泥中微生物种类很丰富,

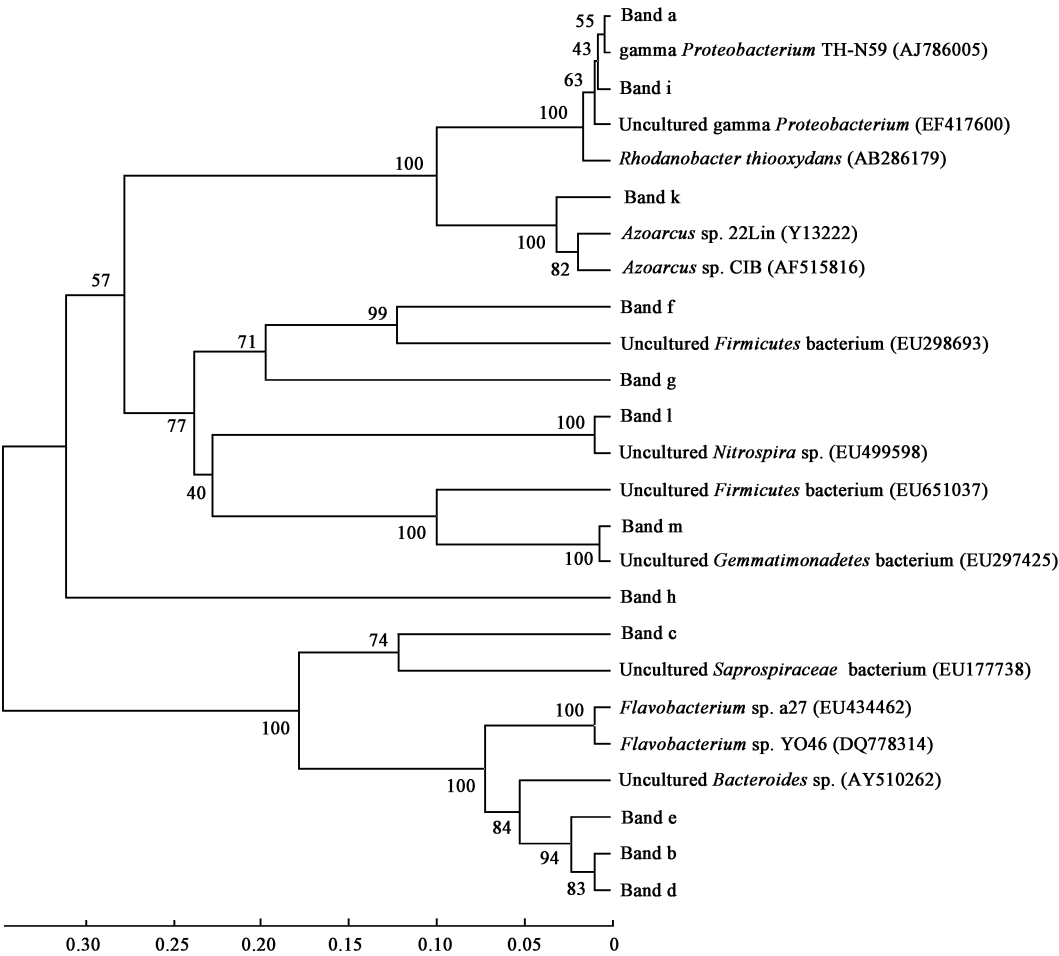


图 3 优势菌种的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of the dominant bacteria

大部分微生物都属于未经培养菌种 (uncultured bacterium), 并且其中某些种属能够通过产生蛋白质和多糖水解酶, 来实现对 EPS 和 SMP 的降解这些菌种主要属于拟杆菌 (*Bacteroidetes*)、黄杆菌 (*Flavobacterium*)、腐螺旋菌 (*Saprospiraceae*) 和厚壁门菌 (*Firmicutes*) 等.

参考文献:

[1] 何义亮, 顾国维, 刘洁. 膜生物反应器生物降解与膜分离共用特性研究[J]. 环境污染与防治, 1998, **20**(6): 18-20.

[2] Choi H, Zhang K, Dionysiou D D, *et al.* Effect of activated sludge properties and membrane operation conditions on fouling characteristics in membrane bioreactors [J]. Chemosphere, 2006, **63** (10): 1699-1708.

[3] Lee W, Kang S, Shin H. Sludge characteristics and their contribution to microfiltration in submerged membrane bioreactors [J]. J Membr Sci, 2003, **216**(1-2): 217-227.

[4] 臧倩, 孙宝盛, 张海丰, 等. 胞外聚合物对一体式膜生物反应器过滤特性的影响[J]. 天津工业大学学报, 2005, **24**(5): 41-44.

[5] Rittmann B E, Bae W, Namkung E, *et al.* A critical evaluation of microbial product formation in biological processes [J]. Water Sci Technol, 1987, **19**(3-4): 517-528.

[6] Nagaoka H, Veda S, Miya A. Influence of bacterial extracellular polymers on the membrane separation activated sludge process [J]. Water Sci Technol, 1996, **34**(9): 165-172.

[7] 刘锐, 黄霞, 范彬, 等. 膜生物反应器中溶解性微生物产物的研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2002, **3**(1): 1-7.

[8] Evenblij H, van der Graaf J. Occurrence of EPS in activated sludge from a membrane bioreactor treating municipal wastewater [J]. Water Sci Technol, 2004, **50**(12): 293-300.

[9] Liang S, Liu C, Song L. Soluble microbial products in membrane bioreactor operation: Behaviors, characteristics, and fouling potential [J]. Water Res, 2007, **41**(1): 95-101.

[10] Lapidou C S, Rittmann B E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass [J]. Water Res, 2002, **36**(11): 2711-2720.

[11] Lapara L M, Nakatsu C H, Pantea L M, *et al.* Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE [J]. Water Res, 2002, **36**(3): 638-646.

- [12] Miura Y, Hiraiwa M N, Ito T, *et al.* Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance [J]. *Water Res*, 2007, **41**(3): 627-637.
- [13] 黄爱群, 傅以钢, 陈皓, 等. 降解 2-氯酚厌氧污泥中微生物种群结构研究[J]. *同济大学学报(自然科学版)*, 2006, **34**(12): 1651-1656.
- [14] 王伟东, 王小芬, 朴哲, 等. 堆肥化过程中微生物群落的动态[J]. *环境科学*, 2007, **28**(11): 2591-2597.
- [15] Zhang X Q, Paul L B, Kinkle B. Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms [J]. *Water Sci Technol*, 1999, **39**(7): 211-218.
- [16] 孙宝盛, 张斌, 吴卿, 等. 应用 PCR-DGGE 技术解析 MBR 中微生物群落多样性[J]. *天津大学学报(自然科学版)*, 2008, **41**(2): 356-361.
- [17] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiol Rev*, 1995, **59**(1): 143-169.
- [18] 刘新春, 吴成强, 张昱. PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析[J]. *生态学报*, 2005, **25**(4): 842-847.
- [19] Louise R, Raymond M, Zeng JX, *et al.* Challenges for simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in microbial aggregates: mass transfer limitation and nitrous oxide production [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, **52**(3): 329-338.
- [20] Juretschko S, Loy A, Lehner A, *et al.* The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach [J]. *System Appl Microbiol*, 2002, **25**(1): 84-99.
- [21] Hagman M, Nielsen J L, Nielsen P H, *et al.* Mixed carbon sources for nitrate reduction in activated sludge-identification of bacteria and process activity studies [J]. *Water Res*, 2008, **42**(6-7): 1539-1546.
- [22] 闻岳, 黄翔峰, 裘湛, 等. 水解酸化-缺氧生物法处理油田废水的机理[J]. *中国环境科学*, 2006, **26**(3): 288-292.
- [23] 许跃强, 段承杰, 周权能, 等. 造纸废水纸浆沉淀物中未培养微生物纤维素酶基因的克隆和鉴定[J]. *微生物学报*, 2006, **46**(5): 783-788.
- [24] Yu Z T, Mohn W. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenic spacer analyses and 16S ribosomal DNA sequencing [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **6**(4): 1565-1574.
- [25] 牟海津, 江晓路, 刘志鸿. 利用微生物开发海洋多糖降解酶的研究[J]. *海洋科学*, 2003, **27**(11): 10-14.
- [26] Xia Y, Kong Y, Thomsen T R, *et al.* Identification and ecophysiological characterization of epiphytic protein-hydrolyzing *saprospiraceae* (" *Candidatus Epiflobacter*" spp.) in activated sludge [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(7): 2229-2238.
- [27] Tang Y, Shigematsu T, Morimura S, *et al.* Microbial community analysis of mesophilic anaerobic protein degradation process using bovine serum albumin (BSA)-fed continuous cultivation [J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, **99**(2): 150-164.
- [28] 何若. 生物反应器填埋场中生活垃圾快速降解及其生物脱氮的机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004. 37-42.