

三种高盐苯胺废水对细菌群落结构的影响

余彬彬^{1,2}, 李钧敏², 金则新^{2,*}

(1. 杭州师范大学生命科学院, 杭州 310002; 2. 台州学院生态研究所, 临海 317000)

摘要:采用 PCR-DGGE 技术分析了含有不同 COD_{Cr}、盐、总磷、氨态氮、氯离子、苯胺浓度的 3 种高盐苯胺废水(1#、2#、3#)驯化的细菌群落结构变化,从分子水平阐明高盐苯胺废水对细菌群落结构的影响。结果表明,不同浓度高盐苯胺废水驯化过程中,2# 废水随着浓度的升高,细菌群落多样性逐渐下降;1#废水驯化的细菌群落多样性指数以 5% 的废水最高,20% 与 40% 的废水最低;3#废水驯化的细菌群落多样性指数以 0% 和 5% 的废水最高,20% 的废水最低。不同废水对细菌群落多样性有不同的影响,表明适应和突变是驯化过程中细菌适应环境的一个重要作用力。3 种不同高盐苯胺废水驯化的细菌群落多样性指数与 COD_{Cr}、盐含量之间均存在显著负相关,但与氯离子和苯胺含量之间相关不显著。3 种废水驯化的细菌的遗传多样性有较大差异,多态位点百分率、Shannon's 信息指数和 Nei's 指数均以 3#废水最高,1#废水次之,2#废水最低。但遗传多样性指标与 COD_{Cr}、盐含量、氯离子和苯胺含量之间均相关不显著。可知细菌群落多样性的变化是由于废水中所含的污染物质的综合作用结果,而非单一的因素。3 种废水的 5 种不同浓度驯化细菌之间的平均遗传距离分别为 0.4724、0.4350 和 0.4902,其中 3#废水驯化的细菌遗传变异最大。聚类分析表明,5 种不同浓度高盐苯胺废水驯化细菌均可明显地分为两组。1#和 2#废水均为 0%、5% 和 10% 废水驯化细菌聚成一组,而 20% 和 40% 废水驯化细菌聚成另一组;3#废水为 0% 与 5% 废水驯化细菌聚成一组,而 10%、20% 和 40% 废水驯化细菌聚成另一组。不同的废水由于水质背景值不同,选择压力不同,导致细菌突变的阈值不同,使得诱导细菌变异程度不同,从而最终引起细菌群落结构的不同。驯化过程中微生物种群的变化使得整个微生物群落能够快速适应外部环境变化。

关键词:多样性;驯化;细菌;适应; DGGE

文章编号:1000-0933(2009)11-6165-09 中图分类号:X72 文献标识码:A

Impacts of three different hypersaline aniline-containing waste water compositions on the bacterial community structure

YU Bin-Bin^{1,2}, LI Jun-Min², JIN Ze-Xin^{2,*}

1 School of Life Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310002, China

2 Institute of Ecology, Taizhou University, Linhai 317000, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(11): 6165 ~ 6173.

Abstract: In order to reveal the molecular mechanism of how high-salinity aniline-containing waste water affects the bacterial community structure, the PCR-DGGE technique was used to analyse the change of the bacterial community structure acclimated to three different hypersaline aniline-containing waste waters, with different content of chemical oxygen demand (COD), salts, phosphorus, nitrogen, chloride and aniline. The results were as follows. During acclimation to No. 2 waste water, the bacterial community diversity indices decreased when the concentration of waste water increased. During acclimation to No. 1 waste water, bacterial diversity was the highest in 5% waste water, while those in 20% and 40% were the lowest. During acclimation to No. 3 waste water, diversities in 0% and 5% of waste water were the highest, while those in 20% were the lowest. The different waste water compositions had different effects on the bacterial community diversity, indicating that adaptation and mutation might play important roles in the relationship between bacteria and their

基金项目:浙江省科技厅面上科技资助项目(2007C23052)

收稿日期:2009-03-03; 修订日期:2009-05-15

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jzx@tzc.edu.cn

environment. The bacterial community diversity indices correlated negatively with the concentration of COD and salinity, but not with the concentration of chloride and aniline. The genetic variation of bacteria acclimated to three different high-salinity aniline-containing waste waters was very high: the percentage of polymorphic bands, Shannon's informative index and Nei's gene diversity index of bacteria acclimated to No. 3 waste water was the highest, while those of bacteria acclimated to No. 1 waste water took second place and those of bacteria acclimated to No. 2 waste water was the lowest. The genetic diversity indices were not significantly correlated with the concentration of COD, salinity, chloride or aniline. This suggested that the change of the bacterial community diversity might not due to a single factor rather to the integrated effects of all the contaminants in the waste water. The pairwise genetic distance between bacteria acclimated to five different concentrations of three different waste waters averaged 0.4724, 0.4350 and 0.4902, indicating that the genetic variation induced to No. 3 waste water was the highest. Bacteria acclimated to five different concentrations of waste water could be clustered into two groups. During the acclimation to No. 1 and No. 2 waste water, bacteria acclimated to 0%, 5% and 10% waste water were clustered into one group while those acclimated by 20% and 40% wastewater were clustered into another group. Bacteria acclimated to 0% and 5% of No. 3 waste water were clustered into one group and those acclimated to 10%, 20% and 40% wastewater were clustered into another group. The change of the microbial communities could indicate a rapid adaptation of microorganisms to the change of the external environment.

Key Words: diversity; acclimation; bacteria; adaptation; DGGE

苯胺是农药、染料、医药和塑料工业的重要原料,也是一些含苯胺类化合物经生物降解过程中的中间产物^[1,2]。苯胺是广泛存在于环境中的难以被生物降解的有机污染物,具有长期残留性、生物蓄积性、致癌性等特点,被美国 EPA 列为优先控制的污染物^[3]。全世界每年排入环境中的苯胺类化合物约为 30000t^[4],随着化工工业的发展,进入环境的苯胺废水的量也会越来越多,对环境的毒害也会越来越大。苯胺废水经常是高酸与高盐的^[5]。高酸与高盐对微生物均具有毒性^[6],直接暴露于其中会使嗜盐微生物大量死亡,微生物酶活性降低甚至失去活性^[7]。高酸可以在调节池里进行平衡,但高盐的预处理却会带来很高的运行成本^[8]。

活性污泥是一个由好氧的微生物所组成的复杂的生态系统,其中细菌是主要的类群,它们个体小、数量多、更新快,在物质循环中起着关键作用。目前,国内外研究较多地关注废水生物处理系统中活性污泥微生物群落结构的变化^[9~12],以进一步了解微生物适应与变化的机理,更好地为活性污泥生物处理系统运行的稳定性提供理论参考依据。Saikaly 等^[13]认为活性污泥的细菌多样性对于废水处理系统的运行非常重要,但是关于活性污泥细菌多样性的影响因子的研究较少。仅 LaPara 等^[14]揭示了废水处理系统的微生物群落结构会随着环境条件的变化而变化,如废水的特性;LaPara 等^[15]发现医化废水的好氧处理池中的细菌群落结构受温度的影响,随着温度的升高,细菌种群的数量减少。但是至今未见高盐苯胺废水对细菌多样性的影响的相关报导,尤其是基于实验室水平的驯化研究。

变性梯度凝胶电泳(DGGE)是基于在含有线性浓度递增的变性剂(尿素和去离子甲酰胺的混合物)的聚丙烯酰胺凝胶电泳中,部分解链的双链 DNA 分子的电泳迁移率降低;而序列不同的 DNA 分子有着不同的解链行为,它们在凝胶的不同位置停止迁移,从而使长度相同而序列不同的 DNA 片段分离^[16]。目前,DGGE 技术较多地应用于微生物群落结构多样性的研究^[9~12, 17, 18]。本文应用 16S rDNA 的 PCR 扩增及 DGGE 技术分析高盐苯胺废水驯化细菌过程中细菌群落结构与多样性的变化,探讨盐度、COD、苯胺、氯离子浓度对细菌群落结构多样性的影响规律,为高盐苯胺废水的生物处理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用活性污泥来自浙江台州某化工厂二沉池中的活性污泥,高盐苯胺化工废水 1#、2#、3#分别取自浙江台州某化工厂生产过程中产生的原水,pH 值均小于 1,其背景值见表 1。用 NaOH 调节 pH 至 7.0 待用。

表 1 高盐苯胺废水水质指标

Table 1 Water quality of hypersaline aniline-containing wastewater

样品 Sample	COD _{Cr} (mg·L ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N (mg·L ⁻¹)	总含盐量 TDS (mg·L ⁻¹)	TP (mg·L ⁻¹)	Cl ⁻ (mg·L ⁻¹)	苯胺 Aniline (mg·L ⁻¹)	水色外观 Water Appearance
1#	97000	54.11	113630	1.88	29138	3800	棕色透明 Brown, Transparency
2#	19400	40.67	39900	0.68	13691	2480	棕色透明 Brown, Transparency
3#	58200	5.95	72515	7.56	11180	1370	棕色不透明 Brown, Opacity

1.2 方法

1.2.1 活性污泥细菌的富集培养

将活性污泥按 10% (体积分数) 的接种量加入到 LB 液体培养基中, 150 r/min, 30 °C 培养 48 h, 待用。

1.2.2 高盐苯胺废水对细菌的驯化

将富集后的活性污泥细菌按 10% 接种量接种到含不同浓度不同种类的高盐苯胺废水(1#、2#、3#) 的 LB 液体培养基中, 150 r/min, 30 °C 培养 48h 以增殖高盐苯胺废水降解或耐受细菌, 淘汰对高盐苯胺废水敏感的细菌。分别转接 6 次, 废水浓度分别为 5%、10%、20% 和 40%、60% 和 80%。每次转接后, 12000 r/min 离心 2min 收集菌体, 贮于 -20 °C 冰箱中待用。

1.2.3 细菌基因组 DNA 的提取

细菌基因组 DNA 的提取采用 CATB-溶菌酶-蛋白酶 K 法^[19]。DNA 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳后, 置于上海天能 GIS 凝胶成像分析系统(上海天能科技服务有限公司) 中拍照保存, 与标准 DNA 分子量参照比较进行定量, 并稀释成终浓度为 20 ng·μL⁻¹, -20 °C 保存备用。

1.2.4 细菌遗传多样性的 PCR-DGGE 分析

采用对大多数细菌的 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对: F338GC 和 R518, 它们的序列分别为: F338GC: (5'-CGCCCCCGCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGG CACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'), R518: (5'-ATTACCGCGGCTCGTGG-3')。

采用单因素试验对细菌基因组 DNA 的 DGGE 扩增条件进行优化, 得出最适的扩增条件为: PCR 反应总体积为 20 μL, 其中包括 2 μL 1 × Taq 酶配套缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH9.0, 50 mmol·L⁻¹ KCl, 0.1% Triton X-100), 0.4 μL mmol·L⁻¹ dNTP, 0.75 U Taq 酶(北京鼎国生物技术有限公司), 5 ng 模板 DNA, 正反引物各 2.5 pmol(上海 Sangon 公司), 2 mg·mL⁻¹ 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)。

扩增反应在 PTC-220 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司) 中进行。采用降落式(Touch-down) PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 65 °C 退火 1 min(每隔 1 个循环下降 1 °C), 72 °C 延伸 1 min, 共 10 个循环; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 25 个循环; 72 °C 完全延伸 5 min。

扩增产物在聚丙烯酰胺双梯度凝胶中电泳, 聚丙烯酰胺浓度为 4% 到 8%, 变性剂浓度从 35% 到 55% (100% 变性剂为 7 mol·L⁻¹ 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物)。1 × TAE 缓冲溶液, 60 °C 电泳 9 h, 点样量为 10 μL, 电泳完毕后, 银染, Epson 1680 扫描并保存。阴性对照加入除模板 DNA 外的以上各成分, 用双蒸水代替总 DNA。

1.3 数据统计与分析

1.3.1 表型带计数

对照反应产物在胶上的对应位置, 有带记为“1”, 无带记为“0”, 得到 0 ~ 1 原始数据矩阵。

1.3.2 群落结构多样性分析

采用 Excel-Biodiv 软件来计算土壤微生物群落功能多样性指数: Shannon-Wiener 多样性指数、Simpson 多样性指数和丰富度指数。

1.3.3 遗传多样性分析

采用 POPGEN32^[20] 软件计算多态位点百分率, Nei's 指数和 Shannon's 信息指数。

1.3.4 聚类分析

遗传距离分析采用 DPS 数据处理系统^[21], 利用 DPS 软件计算 Nei 遗传距离, 采用 UPGMA 法进行 0 ~ 1 数据的系统聚类。

1.3.5 数据分析

采用 SPSS 13.0 软件单因素方差分析 (One way ANOVA) 对多样性指数、COD_{Cr} 和盐含量的差异进行显著性检验。

2 结果

2.1 3 种废水的背景值及对细菌的驯化

3 种高盐苯胺废水的水质指标差异较大, 且苯胺含量与 COD_{Cr} 数值之间不具有明显的相关性, 表明 3 种废水中除了含有苯胺外还含有较多的其它物质。其中 1# 废水的 COD_{Cr}、Cl⁻ 及苯胺含量均最高, 2# 废水的总磷含量和 COD_{Cr} 的含量最低, 3# 废水的总磷含量最高, 但 Cl⁻ 和苯胺含量最低。实验表明 3 种高盐苯胺废水对细菌均具有一定的毒性。随着废水浓度的提高, 细菌的生长数量减少, 当加入的废水的体积分数提高至 60% 时, 150 r/min, 30 ℃ 培养 48 h 后, 菌液的 OD₆₀₀ < 0.2, 不再继续培养。由于 40% 浓度废水中所含的氨态氮与总磷均较低, 不是限制因子, 因此本文只考虑 COD_{Cr}、Cl⁻、盐及苯胺含量。不同浓度的 3 种高盐苯胺废水的 COD_{Cr}、Cl⁻、盐及苯胺含量见表 2 所示。

表 2 不同浓度高盐苯胺废水 COD_{Cr}、Cl⁻、盐及苯胺含量

Table 2 The content of COD_{Cr}、Cl⁻, salinity and aniline in different concentration of hypersaline aniline-containing wastewater

浓度 Concentration (%)	COD _{Cr} (mg·L ⁻¹)			苯胺 Aniline (mg·L ⁻¹)		
	1#	2#	3#	1#	2#	3#
0	0	0	0	0	0	0
5	4850	970	2910	190	124	69
10	9700	1940	5820	380	248	137
20	19400	3880	11640	760	496	274
40	38800	7760	23280	1520	992	548
浓度 Concentration (%)	Cl ⁻ (mg·L ⁻¹)			含盐量 Salinity (mg·L ⁻¹)		
	1#	2#	3#	1#	2#	3#
0	0	0	0	0	0	0
5	1456.9	684.6	559	5681.5	1995.0	3625.8
10	2913.8	1369.1	1118	11363.0	3990.0	7251.5
20	5827.6	2738.2	2236	22726.0	7980.0	14513.0
40	11655.2	5476.4	4472	45452.0	15960.0	29026.0

2.2 不同浓度高盐苯胺废水驯化过程中细菌的遗传变异

采用 DGGE 技术分析不同浓度高盐苯胺废水驯化过程中细菌群落结构, 其中不同浓度的 2# 废水驯化过程中细菌群落 16S rDNA 的 PCR-DGGE 结果如图 1 所示。不同浓度的废水驯化细菌的 16S rDNA 条带的数量与亮度均有不同程度的变化, 表明不同浓度高盐苯胺废水驯化细菌各个阶段的细菌具有较大差异, 且不同废水驯化引起的细菌的遗传变异程度不同。基于细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物的 DGGE 电泳结果, 由 POPGENE 软件所计算的多样性指数见表 3。由表 3 可知, 可扩增的条带数以 2# 废水驯化过程最多, 但多态位点百分率、Shannon's 信息指数和 Nei's 指数均以 3# 废水最高, 1# 废水次之, 2# 废水最低, 表明引起变异最大的是 3# 废水。相关性分析显示遗传多样性指标与 COD_{Cr}、Cl⁻、盐和苯胺含量之间均不存在显著性相关 ($P > 0.05$)。

2.3 不同浓度高盐苯胺废水驯化对细菌群落结构多样性的影响

3 种不同高盐苯胺废水驯化过程中细菌群落结构多样性指数如表 4 所示。不同浓度的 1#废水驯化细菌中,以 5% 废水驯化细菌的群落多样性指数最高,甚至略高于 0% 废水驯化细菌,而当浓度升高到 10% ~ 20% 时,又随着浓度的增加而逐渐下降,但当浓度升高至 40% 时,多样性不再变化;在不同浓度的 2#废水驯化细菌中,随着浓度的增加,细菌群落多样性逐渐下降;在不同浓度的 3#废水驯化细菌中,5% 废水驯化细菌的群落多样性指数与 0% 废水驯化细菌相同,但当浓度升高到 10% ~ 20% 时,又随着浓度的增加而逐渐下降,但当浓度升高至 40% 时,多样性反而高于 20% 废水驯化细菌。经单因素方差分析,3 种不同浓度高盐苯胺废水驯化过程中细菌群落结构多样性指数与不同浓度废水的 COD_{Cr} 、 Cl^- 、盐及苯胺含量之间的相关系数如表 5 所示,3 种多样性指数与 COD_{Cr} 及盐含量之间均存在显著负相关($P < 0.05$),但与 Cl^- 和苯胺含量之间不存在显著相关。

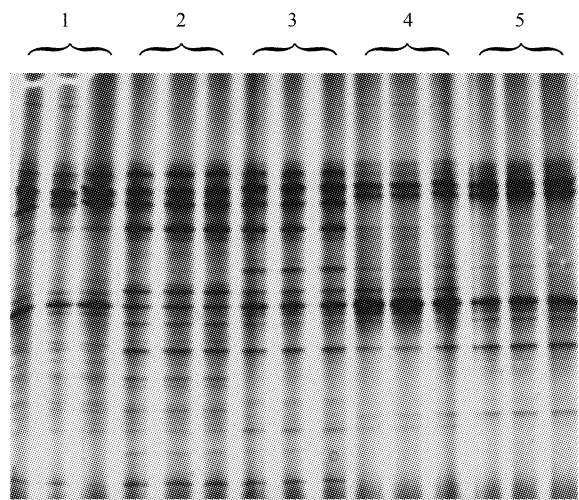


图 1 2#高盐苯胺废水不同浓度驯化细菌的 DGGE 分离图谱
Fig. 1 DGGE profile of bacteria acclimated by different content of No. 2 hypersaline aniline-containing wastewater
1:0% 废水驯化细菌;2:5% 废水驯化细菌;3:10% 废水驯化细菌;4:20% 废水驯化细菌;5:40% 废水驯化细菌 1: 0% wastewater domesticated bacteria; 2: 5% wastewater domesticated bacteria; 3: 10% wastewater domesticated bacteria; 4: 20% wastewater domesticated bacteria; 5: 40% wastewater domesticated bacteria

表 3 不同高盐苯胺废水驯化细菌的遗传多样性

Table 3 The genetic diversity of bacteria acclimated by different hypersaline aniline-containing wastewater					
样品 Sample	条带数 Bands	多态条带数 Number of polymorphic bands	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci (%)	Shannon's 多样性指数 Shannon's informative index	Nei's 多样性指数 Nei's diversity index
1#	33	17	51.52	0.3023 ± 0.3090	0.2071 ± 0.2167
2#	47	15	31.91	0.1766 ± 0.2728	0.1194 ± 0.1895
3#	34	27	79.41	0.4625 ± 0.2505	0.3144 ± 0.1761

表 4 不同浓度高盐苯胺废水驯化过程中的细菌群落结构多样性指数

Table 4 Bacterial community diversity indices of bacteria acclimated by different concentration of the hypersaline aniline-containing wastewater									
浓度 Concentration (%)	Shannon-Wiener 多样性指数 Shannon-Wiener diversity index			Simpson 多样性指数 Simpson's diversity index			丰富度指数 Richness index		
	1#	2#	3#	1#	2#	3#	1#	2#	3#
0	3.3322	3.8067	3.3322	0.9643	0.9778	0.9643	28	45	28
5	3.4012	3.7136	3.3322	0.9667	0.9756	0.9643	30	41	28
10	3.2189	3.6889	2.9444	0.9600	0.9750	0.9474	25	40	19
20	3.0910	3.5835	2.6391	0.9545	0.9722	0.9286	22	36	14
40	3.0910	3.5553	2.7081	0.9545	0.9714	0.9333	22	35	15

表 5 COD_{Cr} 、苯胺、 Cl^- 及盐含量与多样性指数之间的相关性

Table 5 Correlations between the concentration of COD_{Cr} , aniline, Cl^- , salinity and the diversity indices				
多样性指数 Diversity indices	COD_{Cr}	苯胺 Aniline	Cl^-	含盐量 Salinity
Shannon-Wiener 多样性指数 Shannon-Wiener diversity index	-0.5791 *	-0.2238	-0.3287	-0.5451 *
Simpson 多样性指数 Simpson's diversity index	-0.5503 *	-0.1875	-0.2882	-0.5225 *
丰富度指数 Richness index	-0.5824 *	-0.2508	-0.3541	-0.5455 *

* 具有显著性相关 correlation is significant at 0.05 level

2.4 不同浓度高盐苯胺废水驯化细菌的遗传距离及聚类结果

基于 DGGE 数据,采用 DPS 软件计算 Nei 遗传距离,结果如表 6~8 所示。5 种不同浓度的 1#废水驯化的细菌之间的平均遗传距离为 0.4724,0% 与 40% 废水驯化细菌的遗传距离最大,为 0.7500;0% 与 5% 废水驯化细菌的遗传距离最小,为 0.0909。5 种不同浓度的 2#废水驯化的细菌之间的平均遗传距离为 0.4350,5% 与 40% 废水驯化细菌的遗传距离最大,为 0.7500;20% 与 40% 废水驯化细菌的遗传距离最小,为 0.1459。5 种不同浓度的 3#废水驯化的细菌之间的平均遗传距离为 0.4902,0%、5% 废水驯化细菌与 20% 废水驯化细菌的遗传距离最大,为 0.7500;0% 与 5% 废水驯化细菌的遗传距离最小,为 0.2500。经比较,表明不同高盐苯胺废水驯化过程中细菌发生了较大变异,其中引起变异最大的是 3#废水。

表 6 1#废水不同浓度驯化细菌之间的遗传距离

Table 6 Pairwise genetic distance of bacteria acclimated by different concentration of No.1 hypersaline aniline-containing wastewater

	1	2	3	4	5
1	—				
2	0.0909	—			
3	0.4000	0.2727	—		
4	0.6000	0.4546	0.6000	—	
5	0.7500	0.5556	0.5000	0.5000	—

1:0% 废水驯化细菌;2:5% 废水驯化细菌;3:10% 废水驯化细菌;4:20% 废水驯化细菌;5:40% 废水驯化细菌 1: 0% wastewater domesticated bacteria; 2: 5% wastewater domesticated bacteria; 3: 10% wastewater domesticated bacteria; 4: 20% wastewater domesticated bacteria; 5: 40% wastewater domesticated bacteria

经 DPS 数据处理系统分析基于 DGGE 数据的 Nei 距离矩阵,以 UPGMA 法进行聚类分析,结果如图 2 所示。5 种不同浓度高盐苯胺废水驯化过程的细菌均可明显地分为 2 组。1#废水驯化后,0% 和 5% 废水驯化细菌聚在一起,再和 10% 废水驯化细菌聚为一组,20% 废水驯化细菌和 40% 废水驯化细菌聚在一起成一组;2#废水驯化后,5% 废水驯化细菌和 10% 废水驯化细菌聚在一起,再和 0% 废水驯化细菌聚成一组,而 20% 废水驯化细菌和 40% 废水驯化细菌同样聚成一组;3#废水驯化后,0% 和 5% 废水驯化细菌聚在一起成一组,20% 与 40% 废水驯化细菌先聚在一起,再与 10% 废水驯化细菌聚为另一组。

3 讨论

3.1 不同浓度高盐苯胺废水驯化对细菌群落结构多样性的影响

活性污泥是一种复杂的、具有生物多样性的微生态系统,生物多样性是活性污泥驯化的基础^[22]。高盐废水直接进入常规污水处理系统会对其生物处理系统产生冲击,盐度突然升高会使废水生物处理系统的处理效率下降,污泥沉降性能变差^[8],甚至使整个系统崩溃^[23]。研究发现驯化可以使活性污泥细菌适应高盐废水^[24, 25]。在驯化过程中,由于不同选择压力的作用,微生物适者生存,不适者被抑制或淘汰。随着驯化条件的不断强化,活性污泥微生物的多样性表现出递减趋势,驯化条件越极端,微生物的多样性越小^[26, 27]。本文的研究结果基本上也体现了这种变化趋势:如 2#废水的驯化过程中,随着废水浓度的提高,细菌多样性越来

表 7 2#废水不同浓度驯化细菌之间的遗传距离

Table 7 Pairwise genetic distance of bacteria acclimated by different content of No. 2 high salinity aniline-containing wastewater

	1	2	3	4	5
1	—				
2	0.4546	—			
3	0.4546	0.2000	—		
4	0.4000	0.5556	0.3333	—	
5	0.5556	0.7500	0.5000	0.1459	—

1:0% 废水驯化细菌;2:5% 废水驯化细菌;3:10% 废水驯化细菌;4:20% 废水驯化细菌;5:40% 废水驯化细菌 1: 0% wastewater domesticated bacteria; 2: 5% wastewater domesticated bacteria; 3: 10% wastewater domesticated bacteria; 4: 20% wastewater domesticated bacteria; 5: 40% wastewater domesticated bacteria

表 8 3#废水不同浓度驯化细菌之间的遗传距离

Table 8 Pairwise genetic distance of bacteria acclimated by different content of No. 3 high salinity aniline-containing wastewater

	1	2	3	4	5
1	—				
2	0.2500	—			
3	0.4000	0.4000	—		
4	0.7500	0.7500	0.4000	—	
5	0.5556	0.5556	0.2727	0.5685	—

1:0% 废水驯化细菌;2:5% 废水驯化细菌;3:10% 废水驯化细菌;4:20% 废水驯化细菌;5:40% 废水驯化细菌 1: 0% wastewater domesticated bacteria; 2: 5% wastewater domesticated bacteria; 3: 10% wastewater domesticated bacteria; 4: 20% wastewater domesticated bacteria; 5: 40% wastewater domesticated bacteria

越小。Benloch 等^[28]和 Casamayor 等^[29]均发现随着盐浓度的升高,微生物群落多样性逐渐降低。在微生物驯化过程中,随着选择压力的不断增高,微生物的种类减少,适应的种类在个体数上占据优势,不适者逐渐减少,甚至被淘汰。由 DGGE 电泳图谱也可观察到:随着废水浓度的逐渐增加,一些扩增条带逐渐减少,甚至消失,而一些扩增条带却会增强,甚至占据优势地位。这种驯化过程中微生物种群的变化使得整个微生物群落能够快速适应外部环境变化。

但是在 1#和 3#废水的驯化过程中,废水浓度对细菌多样性的影响有一定的差异。如 5% 的 1#废水驯化细菌的群落多样性指数最高,甚至略高于 0% 废水驯化细菌,而当浓度升高到 10% ~ 20% 时,又随着浓度的增加而逐渐下降;在不同浓度的 3#废水驯化细菌中,5% 废水驯化细菌的群落多样性指数与 0% 废水驯化细菌相同,但当浓度升高到 10% ~ 20% 时,又随着浓度的增加而逐渐下降。这与 Li 等^[30]在研究柴油污染废水对土壤微生物群落结构的影响时发现的结果相类似:低浓度的污染对微生物群落多样性没有明显的影响,而高浓度的污染(大于 $10000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 柴油)可以导致土壤微生物群落多样性显著性下降。

同时,以驯化过程中除了适应以外,突变是驯化过程中细菌适应环境的一个重要作用力。在细菌的驯化中,微生物种类存在进化性适应,即在驯化压力下,微生物基因型发生改变,出现新的物种^[22]。但是微生物突变的发生有一个阈值,这个阈值与选择压力的大小有关,不同的废水由于特性不同会有不同的浓度阈值。在 3#废水驯化细菌中,40% 废水可能会极强地诱使细菌发生突变,从而使其多样性反而高于 20% 细菌;但 40% 的

1#废水可能对细菌没有明显的影响,可能大部分细菌经过驯化均可以耐受此浓度,从而表现出多样性等同于 20% 废水的效应。而在 1#废水驯化细菌中,5% 的废水浓度可能不会使细菌死亡,却也在一定程度上诱发了细菌的突变,从而表现出多样性高于 0% 废水驯化细菌的效应。

3.2 不同高盐苯胺医药化工废水驯化过程中细菌的遗传变异

细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 结果来显示可扩增的条带数以 2#废水驯化过程最多,但多态位点百分率、Shannon's 信息指数和 Nei's 指数均以 3#废水最高,1#废水次之,2#废水最低。基于 DGGE 的研究结果,1#、2#、和 3# 种不同的高盐苯胺废水不同浓度驯化细菌之间的遗传距离分别为 0.4724、0.4350 和 0.7500,表明不同高盐苯胺废水驯化细菌群落结构已具有较大的差异,而引起变异最大的是 3#废水。以 UPGMA 法进行聚类分析,5 种不同浓度高盐苯胺废水驯化过程的细菌均可明显地分为两组。就 1#和 2#废水来说,均为 0%、5% 废水驯化细菌和 10% 废水驯化细菌聚成一组,而 20% 和 40% 废水驯化细菌聚成另一组;就 3#废水来说,0% 与 5% 废水驯化细菌聚成一组,而 10%、20% 和 40% 废水驯化细菌聚成另一组。这表明不同的废水引起细菌群落结构的变化存在不同的浓度。在本研究中,对于 1#和 2#废水来说,这个浓度为 20%;但对于 3#废水来

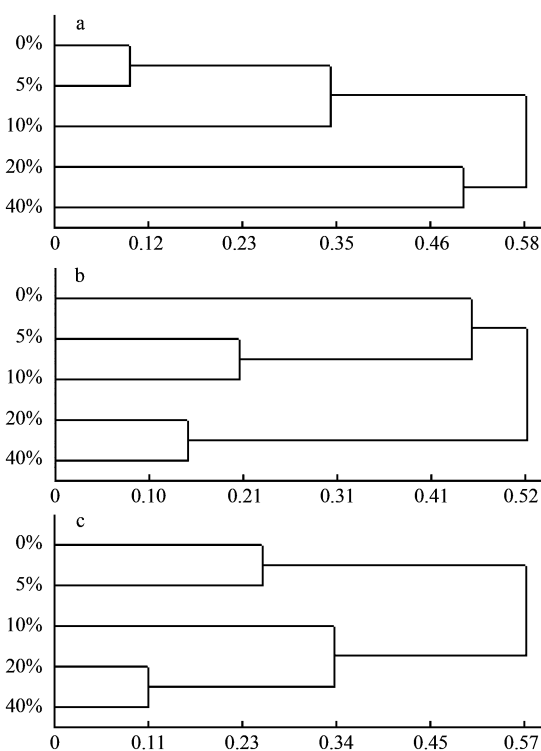


图2 3种高盐苯胺废水不同浓度驯化细菌的系统聚类图

Fig. 2 Clustering result of bacteria acclimated by different content of three different hypersaline aniline-containing wastewater

a. 1#废水; b. 2#废水; c. 3#废水; 0% : 0% 废水驯化细菌; 5% : 5% 废水驯化细菌; 10% : 10% 废水驯化细菌; 20% : 20% 废水驯化细菌; 40% : 40% 废水驯化细菌 a. No. 1 high salinity aniline-containing wastewater; b. No. 2 high salinity aniline - containing wastewater; c. No. 3 high salinity aniline-containing wastewater; 0% : 0% wastewater domesticated bacteria; 5% : 5% wastewater domesticated bacteria; 10% : 10% wastewater domesticated bacteria; 20% : 20% wastewater domesticated bacteria; 40% : 40% wastewater domesticated bacteria

说,这个浓度为 10%。当不同的废水浓度达到阈值时,细菌的群落结构发生了质的变化。相关性分析显示遗传多样性指标与 COD_{Cr} 、 Cl^- 和苯胺含量之间均不存在显著性相关,这也表明医化废水的复杂性,细菌群落多样性的变化是由于医化废水中所含的污染物质的综合作用结果,而非单一的因素。

3.3 废水水质对驯化过程中细菌群落结构变化的影响

在驯化过程中,废水水质是微生物直接接触的外部环境,因此,废水水质是影响活性污泥驯化的主要因素^[22]。废水水质不同,选择压力的大小不同,对微生物的影响也不同。LaPara 等^[14]认为不同的废水水质可以引起医化废水生物处理系统中活性污泥微生物群落多样性的变化。本研究采用相关分析显示不同浓度高盐苯胺废水驯化过程中细菌群落结构多样性与废水 COD_{Cr} 及盐含量之间均存在显著性负相关,但是 3 种多样性指标与 Cl^- 和苯胺含量之间无明显相关。这表明废水的含盐度对细菌群落结构及多样性具有明显的影响;同时由于医化废水的复杂性,在本文研究废水中除了苯胺外可能还存在其它较多的有机物质,因此,也证明了废水水质对驯化过程中细菌的影响可能是多种影响因子的综合作用结果。

References:

- [1] Hallas L E, Alexander M. Microbial transformation of nitroaromatic compounds in sewage effluent. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 45: 1234—1241.
- [2] Annachatre A P, Gheewala S H. Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnol Adv*, 1996, 14(1): 35—56.
- [3] Keith L H, Telliard W A. Priority pollutants I A perspective view. *Environ Sci Technol*, 1979, 13: 416—423.
- [4] Xu K X. Fine organic chemical materials and intermediates. Beijing: Chemical Industry Press, 2001.
- [5] O'Neill F J, Bromley-Challenor K C A, Greenwood R J. Bacterial growth on aniline; implications for the biotreatment of industrial wastewater. *Wat Res*, 2000, 34(18): 4397—4409.
- [6] Feijoo G, Soto M, M ndez R, *et al.* Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: Antagonism and adaption phenomena. *Enzy Micro Technol*, 1995, 17: 180—188.
- [7] Ventosa A, M rquez M C, Garabito M J, *et al.* Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles*, 1998, 2(3): 297—304.
- [8] Woolard C R, Irvine R L. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Wat Res*, 1995, 29(4): 1159—1168.
- [9] Yoshie S, Noda N, Miyano T, *et al.* Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation method. *J Biosci Bioeng*, 2001, 92(4): 346—353.
- [10] Liu X C, Zhang Y, Yang M, *et al.* Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method. *J Environ Sci*, 2007, 19: 60—66.
- [11] Boon N, Windt W D, Vestraete W, *et al.* Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, 39: 101—112.
- [12] Rani A, Porwal S, Sharma R, *et al.* Assessment of microbial diversity in effluent treatment plants by culture dependent and culture independent approaches. *Bioresour Technol*, 2008, 99: 7098—7107.
- [13] Saikaly P E, Stroot P G, Oerther D B. Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(10): 5814—5822.
- [14] LaPara T 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. *Wat Res*, 2002, 36: 638—646.
- [15] LaPara T M, Nakatsu C H, Pantea L M, *et al.* Aerobic biological treatment of a pharmaceutical wastewater: effect of temperature on COD removal and bacterial community development. *Wat Res*, 2001, 35(18): 4417—4425.
- [16] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695—700.
- [17] Zhu L, Xu X Y, Cao D F, *et al.* Star-up, formation and microbial community analysis of aerobic granules in SABR for treatment of organic wastewater containing aniline and chloroanilines. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(4): 654—661.
- [18] Zhao J H, He S Y, Li J X, *et al.* Microbial community structure of beer wastewater treatment plants analyzed by PCR-DGGE technique. *Environmental Science*, 2008, 29(10): 582—592.
- [19] Li J M, Jin Z X. A highly effective extraction method for PCR analysis of soil microbial DNA. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(11):

2107—2111.

- [20] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belg J Bot*, 1997, 129—157.
- [21] Tang Q Y, Feng M G. DPS data processing system for practical statistics. Beijing: Science Press, 2002.
- [22] Zhu T Q, Li K H, Zhang J. Microbial ecology principle of activated sludge acclimation. *Microbiology*, 2008, 35(6): 939—943.
- [23] Li Y, Lei Z F. Effects of increasing salinity on phenol biodegradation in three bioreactors. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2005, 44(4): 875—285.
- [24] Dincer A R, Kargi F. Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater. *Process Biochem*, 2001, 36: 901—906.
- [25] Kargi F, Dincer A R. Biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *J Chem Technol Biotechnol*, 1997, 69: 167—172.
- [26] Yoshie S, Makino H, Hirosawa H, *et al.* Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(1): 182—189.
- [27] Lee T H, Kurata S, Nakatsu C H, *et al.* Molecular analysis of bacterial community based on 16S rDNA and functional genes in activated sludge enriched with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) under different cultural conditions. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1): 151—162.
- [28] Benlloch S, López-López A, Casamayor E O, *et al.* Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern, *Environ Microbiol*, 2002, 4: 349—360.
- [29] Casamayor E O, Massana R, Benlloch R, *et al.* Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol*, 2002, 4: 338—348.
- [30] Li H, Zhang Y, Irina J, *et al.* Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment. *J Environ Sci*, 2007, 19: 1003—1013.

参考文献:

- [4] 徐克勋. 精细有机化工原料及中间体手册. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [10] 刘新春, 吴成强, 张昱, 等. PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析. *生态学报*, 2005, 25(4): 842~847.
- [17] 朱亮, 徐向阳, 曹丹凤, 等. 降解苯胺和氯苯胺类污染物好氧污泥颗粒化及微生物种群结构分析. *微生物学报*, 2007, 47(4): 654~661.
- [18] 赵继红, 何淑英, 李继香, 等. PCR-DGGE 分析啤酒废水生物处理工艺的微生物区系. *环境科学*, 2008, 29(10): 582~592.
- [19] 李钧敏, 金则新. 一种高效可直接用于 PCR 分析的土壤总微生物 DNA 抽提方法. *应用生态学报*, 2006, 17(11): 2107~2111.
- [21] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社, 2002.
- [22] 朱铁群, 李凯慧, 张杰. 活性污泥驯化的微生物生态学原理. *微生物学通报*, 2008, 35(6): 939~943.
- [23] 李源, 雷中方. 盐度升高对三种苯酚处理系统冲击的研究. *复旦学报(自然科学版)*, 2005, 44(4): 875~285.