

罗 佳, 韩士群, 宋 伟, 等. 生物膜载体对富营养化水体细菌群落结构的影响 [J]. 江苏农业学报, 2011, 27(5): 1016-1020.

生物膜载体对富营养化水体细菌群落结构的影响

罗 佳, 韩士群, 宋 伟, 周 庆, 严少华

(江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 利用主要成分为秸秆处理物(ZT2)、颗粒状活性炭(ZT3)和纤维碳膜(ZT4)作为生物膜载体材料对富营养化水体进行生物脱氮。室内模拟试验结果表明, 3 个处理对富营养化水体全氮的去除率达到了 40% 以上。ZT2、ZT3 和 ZT4 生物膜表面细菌比对照提高了 2 个数量级, 硝化细菌和反硝化细菌数量也提高 10 倍左右。PCR-DGGE 检测结果显示, 添加生物膜载体材料能够增加水体中细菌群落的多样性。ZT2、ZT3 和 ZT4 处理的 Shannon-Wiener 指数由 2.838 分别提高到 3.483、3.498 和 3.458, 丰度由 19 提高到了 36、41 和 35。

关键词: 富营养化水体; 生物膜载体; 细菌群落结构; PCR-DGGE

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2011) 05-1016-05

Effect of biofilm carrier material on bacterial community structure in eutrophic water

LUO Jia, HAN Shi-qun, SONG Wei, ZHOU Qing, YAN Shao-hua

(Institute of Agricultural Resources and Environmental Sciences, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The three different materials as bio-film carriers were applied into biological denitrogenation of eutrophic water. The materials were ZT2 (straw), ZT3 (granular activated carbon) and ZT4 (fiber carbon film). The results of simulation experiments (in greenhouse) showed that total nitrogen removal rates by ZT2, ZT3 and ZT4 reached up to over 40%. Compared with control, the bacterial count on bio-film surfaces of ZT2, ZT3 and ZT4 were enhanced by two orders of magnitude, and the nitrifying or denitrifying bacterial count were also enhanced by approximate 10 times. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis(PCR-DGGE) result indicated that the bio-film carriers could improve the diversity of bacterial community in eutrophic water. Shannon-Wiener indexes of ZT2, ZT3 and ZT4 treatments increased from 2.838 to 3.483, 3.498 and 3.458 respectively, and richnesses also increased from 19 to 36, 41 and 35.

Key words: eutrophic water; bio-film carrier; bacterial community structure; Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis(PCR-DGGE)

水体氮污染是引发水体富营养化的重要原因, 目前中国大量湖泊水体均受到不同程度的氮污染, 局部水域已十分严重^[1-3]。反渗透、离子交换、化学

吸附、生物反硝化等技术都是目前常用的水体脱氮技术^[4-6], 其中生物脱氮被认为是最经济、最环保的一种技术^[7]。生物膜法作为生物脱氮实际应用的主要方法, 是利用附着生长于某些固体表面的微生物(即微生物膜) 进行水体处理的方法。因其处理效率高, 耐冲击负荷, 运行稳定及经济节能等优点, 近年来在污水处理中得到了广泛应用^[7-9], 但是在湖泊水体净化中应用相对较少。生物膜是由高度密集细菌、真菌、原生动物以及藻类组成的生态系统, 其附着的固体介质称为生物膜载体^[10-11]。生物

收稿日期: 2011-04-06

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07103-005); 江苏省环保科研项目(201012)

作者简介: 罗 佳(1982-), 江苏滨海人, 博士, 助理研究员, 主要从事富营养化水体治理。(Tel) 025-84390241; (E-mail) luo_jia_428@163.com

通讯作者: 韩士群, (Tel) 025-84390241; (E-mail) shqunh@hotmail.com

膜载体是生物膜工艺的核心部分,在水体净化过程中发挥着重要的作用,而载体的好坏对水体净化效果有直接影响,研发出优质的生物膜载体材料成为提高生物膜法水体脱氮效果的一个重点问题。周海红等^[2]采用一种非水溶性、可生物降解的多聚物材料 PBS 颗粒作为固体碳源和生物膜载体去除饮用水源中的硝酸盐,在 PBS 颗粒表面能够形成反硝化生物膜,有效降低水体中的氮含量。王华等^[3]以火山石作为生物膜载体材料净化养殖废水,对氨态氮的去除率达到了 95% 以上。

目前,对于生物膜载体材料的研究十分广泛,从理化性质上主要分为两大类,即无机类载体和有机类载体。但是,不同的生物膜载体材料对反硝化菌固着及硝态氮处理能力有不同程度的影响。马兆昆等^[4]研究结果表明,碳纤维及活性炭粒生物膜载体的生物固着量、反硝化微生物数量及硝态氮的处理能力大于泡沫聚酯和改性聚乙烯等塑料类载体。同时,考虑到一些材料由于成本高、比表面积小、易堵塞等缺点,难以大面积应用与富营养化湖泊水体治理,需研发一种低成本、无污染、净化效果好的生物膜载体材料。本试验利用自行研发的几种生物膜载体材料对富营养水体的净化效果及水体细菌群落结构的影响进行研究,为生物膜载体材料的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

采用静态试验,在 70 cm × 40 cm × 45 cm 的周转箱内壁安装一个潜水泵构成内循环。生物膜载体材料大小为 35 cm × 35 cm,悬挂于周转箱中间。试验设置 5 个处理,分别为: (1) CK,对照; (2) ZT1,载体材料为尼龙网; (3) ZT2,载体材料主要成分为秸秆处理物; (4) ZT3,载体材料主要成分为颗粒状活性碳; (5) ZT4,载体材料主要成分为纤维碳膜。每个处理设置 3 个重复,每个处理盛 100 L 水,水取自沟渠中富营养化的自然水体,全氮为 2.43 mg/L,全磷为 0.31 mg/L。

1.2 样品采集与测定

每间隔 10 d 取生物膜表面水样测定全氮、全磷含量和细菌、硝化细菌、反硝化细菌的数量,对第 50 d 的样品进行 PCR-DGGE,分析其细菌群落结构。

全氮和全磷含量按照国家标准测定^[5];细菌数量采用平板计数法,培养基为牛肉膏蛋白胨培养

基^[6];硝化细菌和反硝化细菌计数采用 MPN 计数法,培养基及具体方法见文献^[7]。

1.3 PCR-DGGE 检测

利用 PCR-DGGE 技术^[8],通过直接法提取水体中细菌 DNA,进行 PCR 扩增,PCR 引物为 PR-BA338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 PRUN518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'),在 PR-BA338F 的 5' 端添加 GC clamp (5'-CGCCCGC-CGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG-3'),采用 D-Code 突变检测系统 (Bio-Rad) 对样品进行 DGGE 分析。所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,变性梯度为 40% ~ 60%,80 V、恒温 60 ℃、1 × TAE 中电泳 16 h,银染后扫描。所得图像用 Bio Rad Quantity One 4.6.3 软件进行处理,有关泳道和条带的技术处理都用该软件进行。DGGE 条带图案相似性的系统树图,由系统依据戴斯系数 C_s (Dice coefficient) 按照有关方法 (如 Eighbor joining 算法,UPGMA 算法等) 计算绘出。 $C_s = 2j / (a + b)$, j 是样品 A 和 B 共有的条带, a 和 b 分别是样品 A 和 B 中各自的条带数。戴斯系数的范围是从 0 (没有共同带) 到 1 (所有的条带相同)。用戴斯系数计算出各泳道样品相似性矩阵,用它可以对 DGGE 图谱中各泳道样品间的相似性进行比较。通过系统将 DGGE 条带转换成数字信息,用 Shannon-Wiener index $[H, H = -\sum P_i \times \ln P_i]$ (P_i 表示每个种群在群落中的百分比)、丰度 (S)、均匀度指数 ($E_H, E_H = H / \ln S$) 等指标比较各个样品的多样性^[9]。

1.4 数据分析与统计

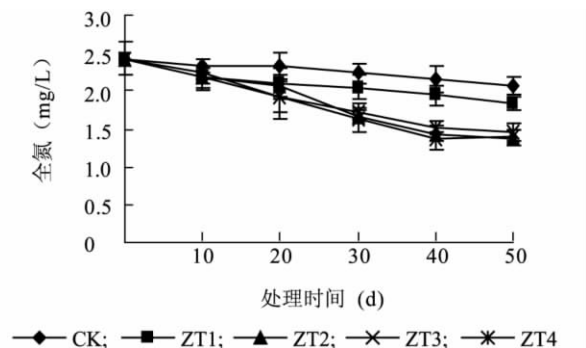
试验数据处理使用 Excel 2003 程序和 SPSS 13.0 统计分析软件,用 Duncan 氏分析差异显著性,Quantity One 软件 (Bio-Rad) 分析样品 DGGE 电泳条带。

2 结果

2.1 生物膜载体材料对水质净化效果

在室内模拟试验中,每隔 10 d 对水质进行监测,水体总氮和总磷含量变化见图 1 和图 2。在前 20 d 内各处理与对照比较全氮无显著差异 ($P > 0.05$),20 d 后 ZT2、ZT3 和 ZT4 水体中氮的去除率提高。50 d,对照水体中全氮由 2.43 mg/L 下降到 2.07 mg/L,去除率为 14.8%; ZT1 水体全氮下降到 1.83 mg/L,去除率为 24.7%; ZT2、ZT3 和 ZT4 水体全氮分别下降到

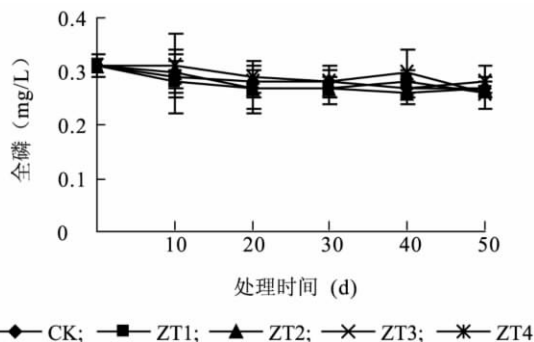
1.38 mg/L、1.45 mg/L和 1.41 mg/L,对全氮的去除率达到了 40% 以上。但是,与对照比较,ZT1、ZT2、ZT3 和 ZT4 对全磷的移除效果不明显。



CK: 对照; ZT1: 载体材料为尼龙网; ZT2: 载体材料主要成分为秸秆处理物; ZT3: 载体材料主要成分为颗粒状活性炭; ZT4: 载体材料主要成分为纤维碳膜。

图 1 水体中全氮含量变化

Fig. 1 The change of total nitrogen content in the water



CK、ZT1、ZT2、ZT3、ZT4 见图 1 注。

图 2 水体中全磷含量变化

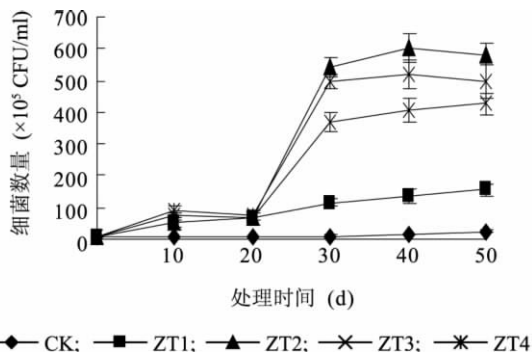
Fig. 2 The change of total phosphorus content in the water

2.2 生物膜载体材料对细菌数量的影响

从图 3 可以看出,添加生物膜载体材料的前 20 d 4 个处理水体中细菌数量与对照比较增加不明显,20~30 d,细菌数量快速增加,尤其是 ZT2、ZT3 和 ZT4 处理,细菌增加了 100 倍。30 d 后细菌数量趋于稳定,各组差异明显,ZT2、ZT3 和 ZT4 处理均能大量增加水体中细菌数量,比对照提高了 2 个数量级,比 ZT1 提高了 1 个数量级,其中 ZT2 处理细菌数量增加最多。

2.3 生物膜载体材料对硝化细菌和反硝化细菌数量的影响

利用 MPN 计数法测定不同处理生物膜表面水体中硝化细菌和反硝化细菌数量,结果见图 4 和图 5。随着时间的推移,生物膜表面硝化细菌和反硝化

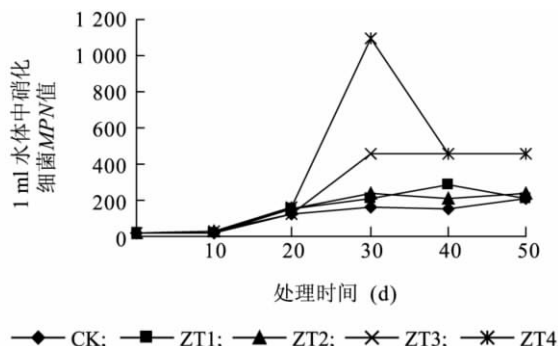


CK、ZT1、ZT2、ZT3、ZT4 见图 1 注。

图 3 水体中细菌数量变化

Fig. 3 The changes of bacterial count in the water

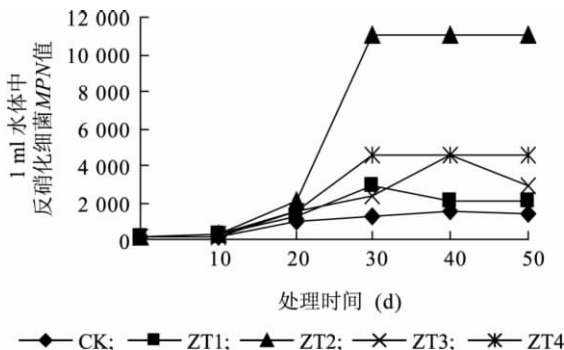
细菌数量逐渐增加,30 d 后趋于稳定,但是各个处理间增加幅度不同。与对照相比,ZT3 和 ZT4 处理能明显增加硝化细菌的数量,而 ZT1 和 ZT2 处理增加不明显。在反硝化细菌数量方面,ZT2、ZT3 和 ZT4 处理增加明显,其中以 ZT2 处理增加最多。



CK、ZT1、ZT2、ZT3、ZT4 见图 1 注。

图 4 水体中硝化细菌数量变化

Fig. 4 The change of nitrifying bacterial count in the water



CK、ZT1、ZT2、ZT3、ZT4 见图 1 注。

图 5 水体中反硝化细菌数量变化

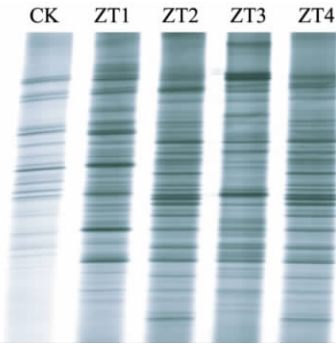
Fig. 5 The change of denitrifying bacterial count in the water

2.4 生物膜载体材料对细菌群落结构的影响

应用 DGGE 技术分离 16S rDNA V3 片段 PCR

产物,可以看到分离为若干条带(图6),但不同处理样品的16S rDNA V3 片段 PCR 产物出现的带型有一定的差别。对 DGGE 图谱进行初步统计发现:5 个处理的样品在 DGGE 图谱中电泳条带数目、强度和迁移率均存在一定的差异,与对照比较充分显示了生物膜载体材料表面水体中细菌群落结构的多样性。利用软件 Quantity One 将 DGGE 图谱转换为数字模式,并计算各个样品的 Shannon-Wiener 指数、丰度和均匀度指数,结果见表1。添加生物膜载体材料后 Shannon-Wiener 指数和丰度与对照比较明显提高,处理 ZT2、ZT3 和 ZT4 的 Shannon-Wiener 指数分别从 2.838 提高到 3.483、3.498 和 3.458,丰度由 19 提高到 36、41 和 35,说明添加生物膜载体材料能

够提高水体中细菌群落的多样性。



CK、ZT1、ZT2、ZT3、ZT4 见图1注。
图6 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 图谱

Fig. 6 DGGE profile of amplified 16S rDNA fragments of bacterial community in soil samples

表1 各处理样品细菌的多样性指数、丰度和均匀度

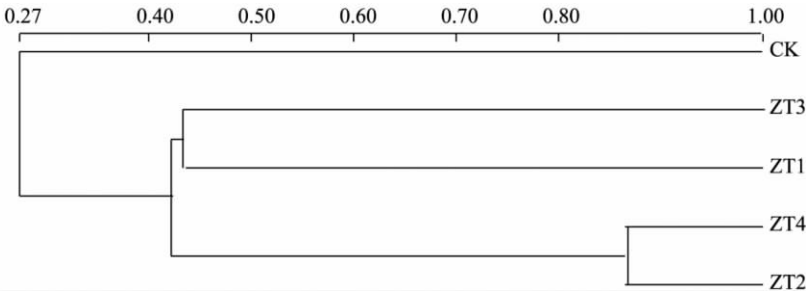
Table 1 Shannon-Wiener index, richness and evenness of the bacterial communities

项 目	处理				
	CK	ZT1	ZT2	ZT3	ZT4
丰度	19	29	36	41	35
Shannon-Wiener 指数	2.838	3.269	3.483	3.498	3.458
均匀度	0.964	0.971	0.972	0.942	0.972

CK、ZT1、ZT2、ZT3、ZT4 见图1注。

采用 UPGMA 方法通过软件 Quantity One 对 DGGE 图谱进行相似分析,结果(图7)表明 5 个处理分为三大类,对照单独一类,ZT1 和 ZT3 群落结构相似,ZT2 和 ZT4 相似,添加生物膜可能改变水体的细菌群落结构,但不同的生物膜影响不同。从相似

性指数来看,各个样品间的相似性较小,且与对照之间的相似性都低于 50%,其中,ZT4 与对照之间的相似性最小,只有 20.5%。说明生物膜的加入对水体细菌群落的影响较大。



CK、ZT1、ZT2、ZT3、ZT4 见图1注。

图7 DGGE 图谱系统(UPGMA)分析

Fig. 7 UPGMA analysis of 16S rDNA profiles of bacterial communities in soil samples

3 讨论

生物膜载体主要功能是为微生物生长提供适宜的栖息场所,大量富集微生物,在载体周围构建微生

态系统,形成生物膜。因此,大量研究者在选择生物膜载体时都考虑该材料能否大量富集硝化细菌和反硝化细菌等与脱氮相关的有益微生物。王小娇等^[2]利用玉米芯作为生物膜载体材料净化水体,在低溶解

氧条件下生物膜上的优势种以兼氧/厌氧的 *Clostridium* 等反硝化异养菌为主。胡绍伟等^[2] 研究以碳膜做生物膜载体材料,硝化细菌和反硝化细菌在生物膜内的共存实现了同步硝化反硝化。本研究采用 3 种不同材料的生物膜载体来富集脱氮微生物,结果表明所选材料对全氮的去除率达到了 40% 以上,能够大量富集微生物,增加水体中细菌群落结构多样性,增加硝化细菌和反硝化细菌等脱氮微生物的数量,与上述报道一致。综合考虑湖泊实际应用中要降低成本,可以选择以秸秆处理物作为主要成分的生物膜载体材料,这为解决秸秆资源再利用提供了新的途径。

运用 PCR-DGGE 技术对水体中微生物群落进行分析具有明显的优势,但是影响其分辨率的因素也很多,PCR-DGGE 技术不能将样品中所有的 DNA 片段进行分离,只能分离群落中的优势种群,而且这些条带容易受 PCR 条件的影响产生偏差^[23]。尽管 PCR-DGGE 技术存在一些不足,但是到目前为止仍然是一种比较理想的研究不同环境中微生物群落变化的工具^[23]。本研究利用 PCR-DGGE 技术分析不同材料所形成的生物膜表面水体中细菌群落结构,结果显示细菌多样性的增加与氮的去除显著相关($P < 0.05$),相关系数 $r = -0.949$,随着细菌多样性的提高水体中总氮的浓度降低。本研究结果与相关报道^[24-25] 一致。本试验对不同材料为载体形成的生物膜细菌群落结构进行了初步研究,但生物膜载体是如何影响微生物群落结构的,还有待于进一步研究。可以相信随着对生物膜研究的不断深入,生物膜在自然环境生态修复中必将发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] 邵留,徐祖信,金伟,等. 以稻草为碳源和生物膜载体去除水中的硝酸盐 [J]. 环境科学, 2009, 30(5): 1414-1419.
- [2] 胡正峰,张磊,邱勤,等. 温度条件对澎溪河藻类生长的影响 [J]. 江苏农业科学, 2010(2): 384-388.
- [3] SHRIMALI M, SINGH K P. New methods of nitrate removal from water [J]. Environ Pollut, 2001, 112: 351-359.
- [4] ROCCA C D, BELGIORNO V, MERI S. Overview of in-situ applicable nitrate removal processes [J]. Desalination, 2007, 204: 46-62.
- [5] RIJN J V, TAL Y, SCHREIER H J. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications [J]. Aquacul Eng, 2006, 34: 364-376.
- [6] SOARES M I M, ABELIOVICH A. Wheat straw as substrate for water denitrification [J]. Wat Res, 1998, 32(12): 3790-3794.
- [7] LIANG Z W, HAN Z Y, YANG S Y, et al. A control strategy of partial nitrification in a fixed bed biofilm reactor [J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 710-715.
- [8] WANG X M, LIU J L, MA M Y, et al. Response of freshwater biofilm to pollution and ecosystem in Baiyangdian Lake of China [J]. Procedia Environmental Sciences, 2010, 2: 1759-1769.
- [9] 曹文平,谭水成. 竹丝生物膜反应器修复校园景观水体的实验研究 [J]. 环境工程学报, 2010, 7(4): 1585-1590.
- [10] SCHORER M, EICELE M. Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilm in the aquatic environment [J]. Water, Air and Soil Pollution, 1997, 99: 651-659.
- [11] 陈静,刘显军,边连全,等. 细菌生物膜及细菌群体感应系统的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2010(5): 32-33.
- [12] 周海红,赵璇,王建龙. 利用可生物降解聚合物去除饮用水源水中硝酸盐 [J]. 清华大学学报: 自然科学版, 2006, 46(3): 32-35.
- [13] 王华,刘长发,秦传新. 用火山石载体生物膜和角叉菜去除水中氮和磷的效果 [J]. 大连水产学院学报, 2006, 22(6): 421-425.
- [14] 马兆昆,刘杰. 碳纤维生物膜载体在反硝化脱氮中的应用 [J]. 中国环境科学, 2003, 23(3): 247-250.
- [15] 国家环保局. 《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [16] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [17] 张光亚,陈美慈,闵航,等. 设施栽培土壤氧化亚氮释放及硝化、反硝化细菌数量的研究 [J]. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(2): 239-243.
- [18] 罗佳,蒋小芳,孟琳,等. 不同堆肥原料的有机无机复合肥对油菜生长及土壤供氮特性的影响 [J]. 土壤学报, 2010, 47(1): 97-106.
- [19] LUO H F, QI H Y, ZHANG H X. Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20: 509-515.
- [20] 王小娇,席亚萍,张明. 生物反硝化脱氮碳源上微生物的多样性 [J]. 上海化工, 2010, 36(6): 1-4.
- [21] 胡绍伟,杨凤林,刘思彤,等. 膜曝气生物膜反应器同步硝化反硝化研究 [J]. 环境科学, 2009, 30(2): 416-420.
- [22] MUYZER G, WAAL 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.
- [23] MUYZER G, SMALLA K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73: 127-141.
- [24] KATLEEN V G, TOM V, NELE V. Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure [J]. FEMS Microbial Ecol, 2005, 53: 205-220.
- [25] 冯胜,秦伯强,高光. 细菌群落结构对水体富营养化的响应 [J]. 环境科学学报, 2007, 27(11): 1823-1829.