

张翔, 余育和, 冯伟松, 等. 2008 污水处理厂中浮游生物群落 DNA 指纹及其与水质指标的关系 [J]. 环境科学学报, 28 (8): 1526 - 1533

Zhang X, Yu Y H, Feng W S, et al. 2008. Relationship between DNA fingerprints of plankton community and indicators of wastewater in wastewater treatment plant [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 28 (8): 1526 - 1533

污水处理厂中浮游生物群落 DNA 指纹及其与水质指标的关系

张翔^{1, 2}, 余育和^{1, *}, 冯伟松¹, 周伟³, 颜庆云^{1, 2}

1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039

3. 武汉市龙王嘴污水处理厂, 武汉 430079

收稿日期: 2007-07-10

修回日期: 2007-10-25

录用日期: 2008-05-20

摘要: 以武汉龙王嘴污水处理系统为研究对象, 揭示了污水处理各阶段中浮游生物群落的 DNA 指纹拓扑结构, 进而探索了其浮游生物群落结构和环境理化因子的关系. 首先建立了污水处理系统中浮游生物群落总 DNA 提取方法, 然后用原核与真核特异性引物对流程 (A²/O 氧化沟工艺) 中不同阶段的浮游生物群落总 DNA 进行 PCR 扩增, 用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 检测, 并对平行水样分别进行常规理化因子和浮游生物物种的检测与鉴定. 结果显示, 各采样点理化因子、物种组成与浮游生物 DNA 指纹的统计分析结果十分吻合, 厌氧、缺氧和好氧阶段间差异较小, 进水、出水分别与其它采样点间差异较大. 研究结果表明, 污水中浮游生物群落具有丰富的多样性, 其 DNA 指纹在空间距离较短的污水处理过程中发生了改变, 而且其改变的趋势与生物组成和理化指标的趋势相符, 说明浮游生物群落 DNA 指纹与水质指标密切相关.

关键词: 浮游生物; DNA 指纹; 理化指标; 物种组成; PCR-DGGE; 活性污泥

文章编号: 0253-2468 (2008) 08-1526-08

中图分类号: X703

文献标识码: A

Relationship between DNA fingerprints of plankton community and indicators of wastewater in wastewater treatment plant

ZHANG Xiang^{1, 2}, YU Yuhe^{1, *}, FENG Weisong¹, ZHOU Wei³, YAN Qingyun^{1, 2}

1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039

3. Longwangzui Wastewater Treatment Plant, Wuhan 430079

Received 10 July 2007;

received in revised form 25 October 2007;

accepted 20 May 2008

Abstract: Plankton community DNA fingerprints of five distinct sites from the Longwangzui wastewater treatment plant (A²/O oxidation ditch) were investigated with PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) using specific primers of 16S rDNA for prokaryotes and 18S rDNA for eukaryotes. The correspondence of physico-chemical factors and species composition was also studied. The results of principal component analysis (PCA) based on physico-chemical factors and species composition were very similar to those based on the prokaryotic and eukaryotic organism DNA patterns. All results indicated that the anaerobic, anoxic, and aerobic reactor sites were similar to each other, while the influent and effluent were very different from the three reactors and from each other. The many common bands in the DGGE patterns suggest that the common bands with distinct intensity contain important information that is related to environmental changes. We conclude that the plankton community structure and its DNA fingerprints change over a short spatial distance, and the plankton community DGGE patterns show a close relationship to the physico-chemical factors and the species composition of the wastewater.

Keywords: plankton; DNA fingerprints; physical-chemical factors; species composition; PCR-DGGE; activated sludge

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30570240, 30490232); 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (No. 2002CB412308)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30570240, 30490232) and the National Basic Research Program of China (No. 2002CB412308)

作者简介: 张翔 (1982—), 男, E-mail: jhon618@sohu.com; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: yhyu@ihb.ac.cn

Biography: ZHANG Xiang (1982—), male, E-mail: jhon618@sohu.com; * Corresponding author, E-mail: yhyu@ihb.ac.cn

1 引言 (Introduction)

城市污水处理厂的二级污水处理工艺大都是活性污泥法及其改进工艺,其原理是通过由各种细菌、真菌、藻类和原生动物等构成的一个复杂的生态系统(陈敏等, 2004),对有机污染物进行生物降解,同时吸收污水中过量的磷和氮、吸附重金属离子甚至浮游病毒等,来达到净化水质的目的。污水处理厂通常只检测常规理化指标以判断污水处理效果,很少对浮游生物群落进行监测。城市污水来源复杂,通常含有多种污染物,若同时结合浮游生物群落动态对污水处理效果进行评价,则不但能了解污染物浓度的变化情况,还可了解其对浮游生物群落的影响,从而揭示活性污泥的运行状态,并对此后的污水处理效果进行预报。

自变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术被用于分子生态学研究以来,已经成为研究生物群落多样性的重要工具。人们已经利用 PCR-DGGE 技术分析了环境中微生物群落(马悦欣等, 2003)及真核生物群落(van Hannenden *et al*, 1998; Diez *et al*, 2001)的 DNA 指纹,从而揭示了更加丰富的生物多样性。余育和等(2004)利用 DNA 指纹技术研究了武汉东湖浮游生物的群落多样性,认为 DNA 指纹分析技术在群落级生命系统中进行应用同样是可行的。有研究者继续研究了多个天然水生态系统中浮游生物群落的 DNA 指纹,并分析了其与理化因子及物种组成的关系,并且认为 DNA 指纹与理化因子有密切关系(颜庆云等, 2005a; 颜庆云等, 2005b; 颜庆云等, 2006a; Yan *et al*, 2006b; Yan *et al*, 2006c)。DNA 指纹技术既然能用于天然水生态系统中浮游生物群落的分析,其可能同样也可应用于污水处理系统中浮游生物群落的 DNA 指纹分析。

基于上述问题,本研究中利用 16S 及 18S rDNA 特异性引物扩增污水处理系统中浮游生物群落 DNA,通过 DGGE 技术检测 PCR 产物,期望可以建立起 DNA 指纹拓扑结构与浮游生物群落结构及水质理化指标之间的关系。

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 样品采集

武汉市龙王嘴污水处理厂的运行流程见图 1。水样采集于污水进水口()、厌氧池()、缺氧池

()、曝气池()、二沉池出水口()5个采样点。因厌氧池、缺氧池和曝气池的生物量大、杂质多,只用采水器在池内采集水样后直接收集于 50mL 塑料瓶,其它采样点水样经 25 号浮游生物网(孔径 0.064 mm)过滤后收集。

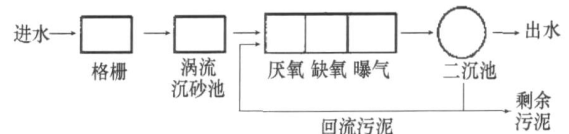


图 1 污水处理流程图

Fig 1 Flow chart of the wastewater treatment process

2.2 理化指标的测定

水样理化指标由武汉龙王嘴污水处理厂实验室测定,包括 pH、化学需氧量(Chemical Oxygen Demand, COD, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、氨态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、总氮(Total Nitrogen, TN, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、总磷(Total Phosphorus, TP, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和悬浮固体物浓度(Suspended Solid, SS, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.3 污水浮游动物种类鉴定

浮游生物种类的鉴定在 Zeiss Axioplan 2 imaging 显微镜下进行(200 \times)。大多数鉴定到种或属,极个别鉴定到采样点间可以区分即可。

2.4 群落总 DNA 提取

污水水样经充分混匀,各吸取水样 1.5 mL 转入 1.5 mL 离心管,离心($10000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min 去除上清液后用灭菌双蒸水清洗 1 次,清洗后离心($10000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min)以去除黏附于浮游生物表面的水溶性杂质。再将沉淀悬浮于 1.5 mL 灭菌的 TENP 缓冲液($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-base; $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA; $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl; $0.01\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 聚乙烯吡咯烷酮; pH = 10)后离心($8000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min)。去除上清液,以灭菌双蒸水清洗沉淀,然后离心($8000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min),重复这个步骤直至上清液清亮。最后将沉淀悬浮于 300 μL 灭菌双蒸水,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏 30 min;室温下融解,直接加入裂解液组分配制成裂解液(0.5% SDS; $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl, pH = 8.0; $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH = 8.0; $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛋白酶 K),于水浴箱中($50\sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$)裂解至清亮。DNA 抽提参照使用酚氯仿抽提法,最后加 TE 缓冲液溶解。总 DNA 用 0.7% 的琼脂糖凝胶(含 EB)进行电泳评估制备效果,并测定 DNA 含量及纯度。

2.5 PCR-DGGE

PCR扩增所用引物:原核生物 16S rDNA 引物为 F357GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')和 R518 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3');真核生物 18S rDNA 引物为 F1427GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CTC TGT GAT GCC CTT AGA TGT TCT GGG-3')和 R1616 (5'-GCG GTG TGA CAA AGG GCA GGG-3'). PCR反应采用 50 μ L 的反应体系,其组分为:10 \times PCR buffer(不含 Mg^{2+}), 5 μ L; $MgCl_2$, 25 $mmol \cdot L^{-1}$ 溶液, 4 μ L; 4种脱氧核苷酸(dNTP)的混合物, 2 $mmol \cdot L^{-1}$, 2 μ L;上下游引物各含 0.3 $\mu mol \cdot L^{-1}$; Taq酶 3.0 U;模板 DNA 20 ng左右;最后加灭菌双蒸水至 50 μ L. 扩增反应在 GeneAmp PCR System 9600 thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, USA)中进行. 采用 Touchdown PCR 模式,运行条件如下:94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}C$ 下变性 1 min; 69 (原核)或 67 (真核)下退火 30 s; 72 $^{\circ}C$ 下延伸 1 min,之后每个循环降低复性温度 1 $^{\circ}C$,共计 10个循环.接着再进行 18(原核)或 20(真核)个循环,扩增参数为 94 $^{\circ}C$ 下变性 1 min; 59 (原核)或 57 (真核)下退火 30 s; 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min;最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min.

DGGE电泳在 NGEN YphoU-2 system (NGEN Y International BV, Leiden, TheNetherlands)中进行,所用的胶浓度为 9% 聚丙烯酰胺(丙烯酰胺 21.9156g, N,N 甲叉双丙烯酰胺 0.5844g, 50 \times TAE 5mL,加水补足至终体积 250mL). 扩增产物的线性梯度凝胶浓度范围:原核生物为 35% ~ 65%,真核生物为 40% ~ 60% (100%的变性剂含有 7 $mol \cdot L^{-1}$ 尿素和 40% (体积分数)甲酰胺). 运行条件:在 1 \times TAE 缓冲液 (40 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris; 40 $mmol \cdot L^{-1}$ 冰乙酸; 1.0 $mmol \cdot L^{-1}$ EDTA, pH 7.6) 中,60、120 V 条件下运行 11 h.

2.6 数据处理

利用 Quantity One 4.6.2 (Bio-Rad)定量分析真核及原核生物 DGGE图谱,同时利用主成分分析其量化后的数值和各采样点的理化指标. 浮游生物物种组成分别以 1、0代表物种的有、无,将其转化为 0/1矩阵后进行相似性聚类. 以上统计分析均利用 STATISTICA 6.0软件完成.

3 结果 (Results)

3.1 水质理化指标

除固体悬浮物浓度 (SS)外,各项常规理化指标在进水中均是最高的,且随着污水处理的进行逐渐降低,其中缺氧池理化指标数值略高于厌氧池 (见图 2). pH 值较为稳定,最高为 7.48,最低为 6.85. 化学需氧量、总磷、总氮和氨氮的浓度在厌氧段降幅较大,氨氮浓度在曝气段明显下降. 由于回流的活性污泥与进水混合,致使厌氧段 SS 值急剧增大,经过二沉池沉淀后,出水中 SS 值下降至最小.

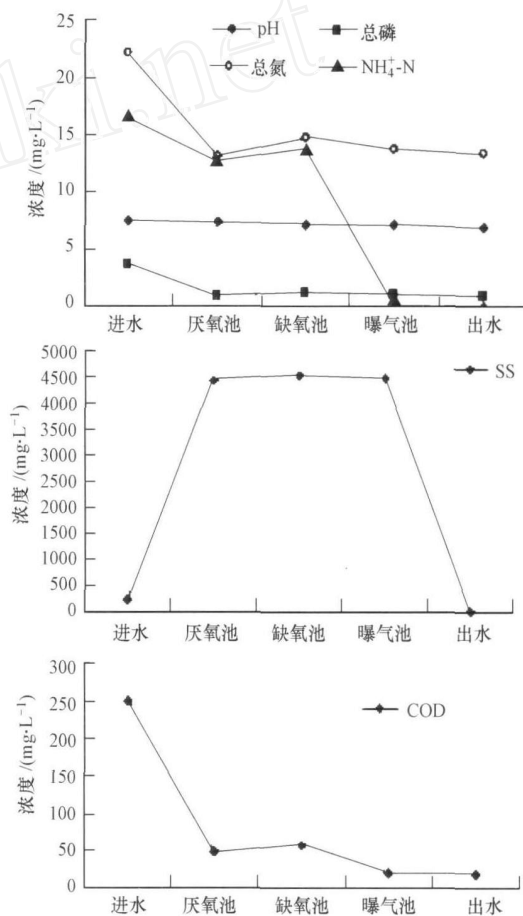


图 2 各站点水质理化指标变化情况

Fig 2 Physico-chemical factors in five stations of the wastewater treatment plant

3.2 污水中浮游动物种类

5个污水处理阶段共观察到 52种 类浮游生物. 出水中浮游生物种类最多,有 32种 类;进水次多,有 26种 类;厌氧、缺氧和曝气 3个阶段较少,仅 20~21种 类. 各处理阶段的浮游生物主要是原生动物和少量轮虫,其中以纤毛虫种类最多且生物量较大,鞭毛虫和肉足虫的种类数量只有纤毛虫的 1/2左右,但肉足虫个别种类数量较多,鞭毛虫数量则较少.

表 1 污水处理各阶段浮游生物种类组成

Table 1 Species composition of plankton in the five stations of the wastewater treatment plant

种类 Species	进水	厌氧池	缺氧池	曝气池	出水
纤毛虫 Ciliate					
沟钟虫 <i>Vorticella convallaria</i>	+	+	+	+	+
车轮虫 <i>Trichodina</i> sp.		+			+
尾草履虫 <i>Paramecium caudatum</i>					+
螳状独缩虫 <i>Carchesium polypinum</i>	++	++	++	++	++
锐利楯纤虫 <i>Aspidisca lynceus</i>	+	++	++	++	+
如意扭头虫 <i>Metopus es</i>					+
双小核草履虫 <i>Paramecium aurelia</i>	+	+	+		++
有肋楯纤虫 <i>Aspidisca costata</i>		+	+	++	+
小口钟虫 <i>Vorticella microstoma</i>				+	
毛板壳虫 <i>Coleps hirtus</i>		+	+	+	++
湖累枝虫 <i>Eystylis lacustris</i>	++	++	+	+	+
弯豆形虫 <i>Cepidium campylum</i>	++		+	+	+
小康纤虫 <i>Cohnilabus pusillus</i>	+	+	+	+	+
长钟虫 <i>Vorticella elongate</i>	+				+
浮萍锤吸管虫 <i>Tokophya lananum</i>		+	+		
累枝虫 <i>Eystylis</i> sp.	+	+	+		
闪烁目虫 <i>Glaucocystis scintillans</i>	+				
蠕形长吻虫 <i>Lacrymaria vermicularis</i>		+			
四膜虫 <i>Tetrahymena</i> sp.	+				
天蓝喇叭虫 <i>Stentor coeruleus</i>					+
瘦尾虫 <i>Pantroleptus</i> sp.					+
腐生尖尾虫 <i>Oxytricha fallax</i>					+
斜板虫 <i>Plagiocampa</i> sp.					+
僧帽斜管虫 <i>Chilodonella cucullulus</i>		+	+	+	
肉足虫 Sarcodines					
半圆表壳虫 <i>Arcella hamisphaerica</i>	+	+		+	+
弯凸表壳虫 <i>Arcella gibbosa</i>	+		+		+
普通表壳虫 <i>Arcella vulgaris</i>					+
针棘匣壳虫 <i>Centropyxis aculeate</i>	+	+	+		+
蛞蝓筒变虫 <i>Vahlkampfiella livax</i>	+				
扇形马氏虫 <i>Mayorella penardi</i>	+		+		
蛞蝓囊变虫 <i>Saccamoeba livax</i>				+	
三足虫 <i>Trinema</i> sp.			+		+
蒲变虫 <i>Vannella</i> sp 1.				+	
蒲变虫 <i>Vannella</i> sp 2.				+	
匣壳虫 <i>Centropyxis</i> sp.					+
鞭毛虫 Flagellate					
针眼虫 <i>Euglena acus</i>	+				
跳侧滴虫 <i>Pleuromonas jaculans</i>	+				
三角袋鞭藻 <i>Peranona trichophorum</i>	+	+	+	+	+
小滴虫 <i>Monas minima</i>			+	+	
卵形波豆虫 <i>Bodo ovatus</i>	+				
衣藻 <i>Chlamydomonas</i> sp.	+	+			+
裸囊藻 <i>Trachelomonas</i> sp.					+
马索隐藻 <i>Cryptomonas marssonii</i>	+				
背沟藻 <i>Notosolenus</i> sp.				+	+
球波豆虫 <i>Bodo globosus</i>		+	+	+	+
轮虫 Rotifer					
长肢多肢轮虫 <i>Polyarthra dolichoptera</i>	+				
囊形单趾轮虫 <i>Monostyla bulla</i>	+				+
转轮虫 <i>Rotaria rotatoria</i>	+	+	+	+	+
月形腔轮虫 <i>Lecane luna</i>	+				
沼轮虫 <i>Limnias</i> sp.				+	+
巨头轮虫 <i>Cephalodella</i> sp.		+		+	
同尾轮虫 <i>Diurella</i> sp.					+

注：“+”表示此物种出现的频率“+”represents the appearance frequency of species

3.3 DNA多态性分析

5个不同处理阶段的原核生物群落 DNA 指纹

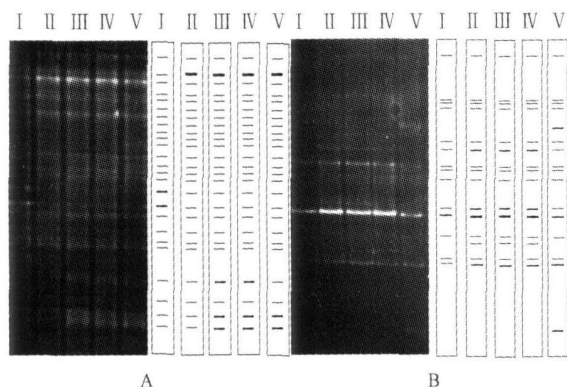


图 3 原核 (A)与真核 (B)生物群落 DNA 指纹图谱

Fig 3 A: Prokaryotic organism DNA fingerprints; B: eukaryotic organism DNA fingerprints

拓扑结构基本一致,仅一些共有带的亮度有差异;中间 3 个处理阶段水样的真核生物群落 DNA 指纹拓扑结构相似;出水水样的真核生物图谱中 DNA 条带较前 4 个水样多 2 条, DNA 条带亮度也有差异;进水水样指纹图谱中一些共有带亮度在厌氧、缺氧、好氧阶段中表现为增强。

3.4 数据分析

利用凝胶图像分析软件 Quantity One 4.6.2 (Bio-Rad)处理原核及真核生物 DGGE指纹图谱,将所得数值进行主成分分析 (STATISTICA 6.0),所得结果如图 4A 和图 4B 所示.由图可知,厌氧池 ()、缺氧池 ()和曝气池 () 3 个处理阶段较为接近,进水 () 和出水 (V) 则相距较远.这说明 、 、 站浮游生物群落结构相似,而 、V 站与其它 3 站差异较大,同时 、V 站之间差异也较大.理化指标的

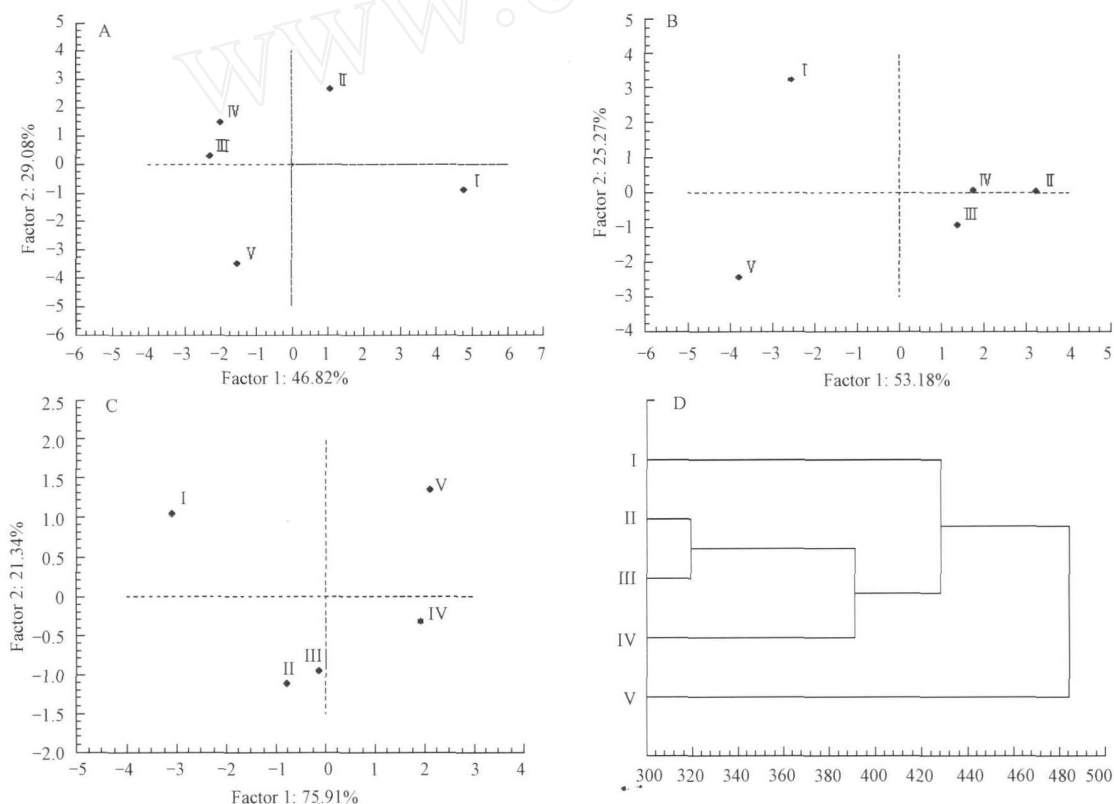


图 4 A. 原核生物 PCA 分析结果 (基于原核生物图谱量化数值); B. 真核生物 PCA 分析结果 (基于真核生物图谱量化数值), C. 理化指标 PCA 分析结果 (基于各站理化指标数值); D. 物种组成聚类分析结果 (基于物种组成的 0/1 矩阵)

Fig 4 A. PCA analysis of prokaryotic organisms (based on prokaryotic organism DNA fingerprints); B. PCA analysis of eukaryotic organisms (based on eukaryotic organism DNA fingerprints); C. PCA analysis of physico-chemical factors (based on the physico-chemical parameters of the five stations); D. Cluster analysis of species composition (based on 0/1 matrix of species composition)

主成分分析结果如图 4C 所示,与浮游生物指纹图谱相似, 、 、 水样的理化指标指纹图谱分布较近, 、V 水样各自成为独立的一类,这说明 、 、 水样的理化指标较为相似,而 、V 水样与其它水

样差异较大.浮游生物群落物种组成相似性聚类分析结果如图 4D 所示, 、 水样首先聚为一支,然后依次与 、 、V 水样聚为一支.结果显示, 、 、 水样中的物种组成较为相似,而 、V 水样则其之

差异较大。

4 讨论 (Discussion)

4.1 DNA 提取

能否制备优质的 DNA 模板是 PCR 扩增效果的重要影响因素之一,也是 DNA 指纹能否真实反映环境样品情况的前提。实验初期直接进行细胞破碎,所得 DNA 呈棕红色,经稀释虽可进行 PCR 扩增,但含有较多腐殖质,作出的 DNA 指纹图谱多态性较低。本研究中参照文献 (Picard *et al*, 1992;高平等, 2002)利用 TENP 缓冲液去除污水中的腐殖质。结果表明, DNA 模板溶液颜色明显变淡,经检测,水样中腐殖质被有效去除。同时,去除腐殖质后样品的 DNA 指纹图谱含有更多 DNA 条带,显示出更高的 DNA 多态性。这表明,腐殖质对 PCR 反应有一定抑制作用。本实验中 DNA 提取方法所获得的 DNA 样品纯度较高,降解少,可用于污水中浮游生物群落 DNA 指纹的研究。

4.2 DNA 指纹拓扑结构与物种组成

污水中浮游生物群落结构的变化与活性污泥的效能相关,被用作生物指标对污水处理效果进行评价 (陈声贵等, 2002; 陈声贵等, 2003)。由本研究中原核生物群落的 DGGE 图谱可知,原核生物群落变化主要体现在条带亮度的变化,推测各处理阶段水样中的优势种组成没有变化,仅生物量发生了变化。从浮游生物物种组成 (表 1)来看,各站间物种组成发生了变化,这可能是由于污水中真核生物对环境变化较原核生物敏感。Ⅰ、Ⅱ水样中的物种组成相似,而 Ⅲ、Ⅳ水样则与之差异较大 (图 4D),这与浮游生物群落 DNA 指纹图谱的量化统计分析结果十分相似。出水 (Ⅴ)中出现不少前 4 个处理阶段水样中未见的纤毛虫和鞭毛虫新种类,同时在真核生物群落 DGGE 图谱中可见 Ⅲ水样中出现了前 4 个水样中未见的新 DNA 条带。这可能是由于出水中出现了前面各处理阶段未见的新物种。以上结果表明,浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构的改变与其物种组成的变化相吻合,浮游生物物种组成与 DNA 指纹拓扑结构不仅在天然湖泊中有密切关系 (颜庆云等, 2005a; 颜庆云等, 2006a),在人工环境中同样能反映出浮游生物群落结构的变化。有研究表明,在相同的操作条件下 2 个系统中优势菌群的结构会变得越来越相似 (刘新春等, 2005),而各采样点水样中浮游生物 DNA 指纹都含大量共有带,同时不同站

点也含有大量相同的浮游生物。可以推测,可能是污水处理厂的工艺条件使污水处理系统各阶段的浮游生物群落的组成趋于相似,尤其是厌氧-缺氧-好氧阶段中更是有惊人的相似度。

4.3 DNA 指纹拓扑结构与理化指标

从各站点水质理化指标变化情况 (图 2)可知,在原污水进入活性污泥系统后,除 SS 外各理化指标下降较大。这可能是由于污水在厌氧池 (Ⅰ站)与活性污泥接触后,大部分有机污染物被吸附到污泥中,因此,水样理化指标的检测结果显示水质迅速改变,实际上有机污染物总量并没有减少。由理化指标和浮游生物 DGGE 图谱统计分析结果可知,两者相当吻合。有文献 (颜庆云等, 2005a; 颜庆云等, 2005b)报道,洞庭湖浮游生物 DNA 指纹的聚类结果与浮游生物分布的主要制约因子——泥沙含量有密切关系,其中泥沙含量高的站点 DNA 指纹也与其它站有较大差异。本文中各采样点间理化指标差异越大,其浮游生物群落 DGGE 图谱统计分析结果的对应处理阶段之间相距越远,这说明浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构的改变与水质理化指标的变化有密切关系。各处理阶段水样中原核及真核生物 DNA 指纹含有大量共有带,且不因环境 (水流流态、溶氧量等)快速变化而产生较大改变,而 PCR-DGGE 技术只能检测出在微生物群落中占 1% 以上的优势物种 (Muyzer *et al*, 1993)。这表明各站点浮游生物群落中优势物种的组成十分相似,对污水处理流程的改变有一定的缓冲作用,而缓冲所造成的结果可能就是 DNA 条带亮度的增减。进水中原核及真核生物 DNA 指纹拓扑结构与厌氧、缺氧和曝气池水样在条带数目及其所处位置上相似,说明可能已经适应污水环境的优势种群进入活性污泥后仍在污水处理系统中占优势。由于进水的组成对污水处理系统的细菌群落结构有很大影响 (Miura *et al*, 2007),同时有研究发现,在生物制氢反应器中的发酵生物群落 DNA 指纹图谱随着时间推移逐渐改变直至稳定 (邢德峰等, 2004);由此可以推测,若进水组成发生改变,活性污泥中优势种群的组成可能也会随着时间推移发生改变。对武汉东湖浮游生物群落 DNA 指纹研究结果表明,原核生物 DNA 多态性高于真核生物且不同站点差异较大 (Yan *et al*, 2007)。本研究中原核生物群落 DNA 指纹图谱多态性也明显高于真核生物群落,但不同处理阶段间的差异没有 Yan 等 (2007)的研究结果明显,其原因可

能是文献中站点间空间分布较远,而本研究中各处理工艺的空间分布较近且伴随污泥回流,使得各站浮游生物群落趋于相似.其中原核生物 DNA 指纹研究结果与 A²/O 生物膜工艺中的微生物群落 DNA 指纹结果相似(李亮等,2004),DNA 指纹在同一时间的不同站点差异较小.有研究者在考察 16S rDNA 带克隆的序列时发现,同一条带中有不同的细菌种类,说明 DGGE 技术可能在种的水平上低估了生物群落遗传结构的多样性(Yang *et al.*, 2000),所以各站 DNA 指纹条带可能包含了不止一个物种,从而降低了 PCR-DGGE 技术可检出的生物多样性.

各水样中一些共有谱带亮度有较明显差异,是引起各站间 DNA 指纹差异的主要原因之一.这可能是因为在一条谱带中一种或多种生物数量的增大或减少,使其在模板 DNA 中所占的比例改变,从而令扩增产物 DNA 谱带亮度有变化.其中在不同阶段有亮度变化的 DNA 谱带中可能含有对环境变化有指示作用的物种,如果通过长期连续的浮游生物群落 DNA 指纹监测,有可能在污水处理系统中找出适应于某种水质长期稳定的环境指示种,从而建立起污水水质与污水中浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构的关系模型.

5 结论 (Conclusions)

1) 去除了腐殖质的 DNA 模板和未经过处理的 DNA 模板,都能得到 PCR 扩增产物.但是,经过检测发现,去除过腐殖质的 DNA 模板的 PCR 产物指纹图谱具有更高的多态性,这表明大量腐殖质的存在会阻碍 PCR 过程,从而降低群落多样性的检出程度.

2) 污水中浮游生物群落多样性十分丰富,而且在空间距离较短的污水处理各阶段中发生了改变,其中原核生物优势种群多样性高于真核生物优势种群多样性.浮游生物 DNA 指纹统计分析结果表明,各处理阶段浮游生物 DNA 指纹改变的趋势与生物组成和理化指标的趋势相符,说明浮游生物群落 DNA 指纹与水质指标密切相关.若进行长期跟踪研究,则有可能建立起水质与浮游生物 DNA 指纹的关系模型.

责任作者简介:余育和(1956—),男,中国科学院水生所研究员, E-mail: yhyu@ihh.ac.cn

References:

- Chen M, Wei G F, Gao P P, *et al.* 2004. Using ERIC-PCR and molecular hybridization for monitoring changes in the structure of microbial community in coking wastewater treatment system [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 24(7): 1330—1334 (in Chinese)
- Chen S G, Xu M Q, Cao H, *et al.* 2002. Biological monitoring of the activated sludge activity [J]. *Chinese Journal of Applied Environment Biology*, 8(4): 438—442 (in Chinese)
- Chen S G, Xu M Q, Cao H, *et al.* 2003. Relationship between the dynamics of mixed liquor fauna and the efficiency of wastewater purification [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 49(6): 775—786 (in Chinese)
- Diez B, Pedros-Allo C, Marsh T, *et al.* 2001. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2942—2951
- Gao P P, Zhao L P. 2002. DNA extraction from activated sludge for molecular community analysis [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 22(11): 2015—2019 (in Chinese)
- Li L, Wei G F, Tong G L, *et al.* 2004. Analysis of the microbial community differences between suspending sludge and biofilm in oxidation tank for coking wastewater treatment with PCR fingerprinting technique [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 16(1): 8—9, 12 (in Chinese)
- Liu X C, Wu C Q, Zhang Y, *et al.* 2005. Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) to the analysis of changes of microbial ecological communities in activated sludge systems [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 25(4): 842—847 (in Chinese)
- Ma Y X, Carola H, Jeremy W, *et al.* 2003. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 23(8): 1561—1569 (in Chinese)
- Miura Y, Hiraiwa M N, Ito T, *et al.* 2007. Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance [J]. *Water Research*, 41(3): 627—637
- Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695—700
- Picard C, Ponsionnet C, Paget E, *et al.* 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2717—2722
- van Hannen E J, van Agterveld M P, Gons H J, *et al.* 1998. Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Journal of Phycology*, 34: 206—213
- Xing D F, Ren N Q, Gong M L, *et al.* 2004. Application of DGGE to monitor microbial community structure and succession in fermentative hydrogen-producing system [J]. *Science in China (Series C)*, 34(6): 569—574 (in Chinese)

- Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S. 2005a. Corresponding relations between DNA fingerprinting topological structure and species composition of plankton community in Dongting Lake [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 25(9): 2221—2226 (in Chinese)
- Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S, *et al*. 2005b. Relationship between DNA fingerprinting of plankton community and physico-chemical factors [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 29(6): 601—606 (in Chinese)
- Yan Q Y, Shu S W, Feng W S, *et al*. 2006a. Relationships between DNA fingerprinting topology and dominant species of plankton community in the trail lake for transgenic fish [J]. *Progress in Natural Science*, 16(7): 889—893 (in Chinese)
- Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S. 2006b. Genetic fingerprinting of plankton community provides new insights into aquatic ecology [J]. *Progress in Natural Science*, 16(9): 893—898
- Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S, *et al*. 2006c. DNA polymorphism of the plankton community and its relationships to species composition in the Three Gorges Reservoir Region of the Yangtze River [J]. *Journal of Freshwater Ecology*, 21: 385—390
- Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S, *et al*. 2007. Genetic Diversity of plankton community as depicted by PCR-DGGE fingerprinting and its relation to morphological composition and environmental factors in Lake Donghu [J]. 54(2): 290—297
- Yang C H, Crowley D E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 345—351
- Yu Y H, Zhang W J, Yan Q Y. 2004. The feasibility for application of DNA fingerprinting to community-level life system [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 28(5): 457—463 (in Chinese)
- 焦化废水处理系统 (A^2/O) 中微生物群落结构的变化 [J]. *生态学报*, 24(7): 1330—1334
- 陈声贵, 许木启, 曹宏, 等. 2002. 活性污泥运转效能的生物监测 [J]. *应用与环境生物学报*, 8(4): 438—442
- 陈声贵, 许木启, 曹宏, 等. 2003. 活性污泥微型动物种群动态与水质净化效能的关系 [J]. *动物学报*, 49(6): 775—786
- 高平平, 赵立平. 2002. 可用于微生物群落分子生态学研究的活性污泥总 DNA 提取方法研究 [J]. *生态学报*, 22(11): 2015—2019
- 李亮, 魏桂芳, 童耕雷, 等. 2004. 用 PCR 指纹图技术分析焦化废水接触氧化池中悬浮污泥和生物膜的微生物种群组成 [J]. *中国微生态学杂志*, 16(1): 8—9, 12
- 刘新春, 吴成强, 张昱, 等. 2005. 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*, 25(4): 842—847
- 马悦欣, Carla H, Jeremy W, 等. 2003. 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 在微生物生态学中的应用 [J]. *生态学报*, 23(8): 1561—1569
- 邢德峰, 任南琪, 官曼丽, 等. 2004. DGGE 技术监测生物制氢反应器微生物群落结构和演替 [J]. *中国科学 (C 辑)*, 34(6): 569—574
- 颜庆云, 舒少武, 冯伟松, 等. 2006a. 转基因鱼试验湖浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构与优势种的关系 [J]. *自然科学进展*, 16(7): 889—893
- 颜庆云, 余育和, 冯伟松. 2005a. 洞庭湖浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构与物种组成对应关系 [J]. *生态学报*, 25(9): 2221—2226
- 颜庆云, 余育和, 冯伟松, 等. 2005b. 洞庭湖浮游生物群落 DNA 指纹与理化因子的关系 [J]. *水生生物学报*, 29(6): 601—606
- 余育和, 张文静, 颜庆云. 2004. DNA 指纹分析技术在群落级生命系统应用的可能性 [J]. *水生生物学报*, 28(5): 457—463

中文参考文献:

陈敏, 魏桂芳, 高平平, 等. 2004. 用 Eric-PCR 结合分子杂交监测