

基于正交设计的畜禽废水处理中活性污泥 DNA 的 16S rDNA–PCR 扩增体系

谢 晴¹, 曹 伟², 伍 阳¹, 邓仕槐¹, 胡小梅¹, 段莎丽¹, 叶 红¹

(1. 四川农业大学资源环境学院环境科学与工程系, 四川 雅安 625014; 2. 重庆市垫江县环保局, 重庆 408300)

摘 要:用 SBR 反应器处理畜禽废水,提取其中好氧活性污泥总 DNA,比较 3 种物理破壁方法对 DNA 质量的影响,同时选择 4 个因素(DNA 模板, Mg^{2+} , dNTP, 引物)对 16S rDNA–PCR 反应体系进行正交优化,并确定最适退火温度。结果表明,反复冻融法的 DNA 纯度大于玻珠振荡法和摇床振荡法,可不经纯化直接扩增;DNA 浓度对 PCR 结果影响最大, Mg^{2+} 和 dNTP 浓度的影响次之且程度相同,引物浓度影响最小;最佳 PCR 扩增体系 (25 μ L) 的组成为:模板 DNA 0.32 μ g, dNTP 200 μ mol $\cdot$ L⁻¹, Mg^{2+} 1.5 mmol $\cdot$ L⁻¹, 引物 1.0 μ mol $\cdot$ L⁻¹, Taq DNA 聚合酶 0.2U, 且最适退火温度为 56.5 $^{\circ}$ C。

关键词: SBR; 冻融; PCR 扩增; 正交设计

中图分类号: Q5–33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672–2043(2008)05–2018–05

The 16S rDNA–PCR Reaction System of DNA from Activated Sludge in Livestock Wastewater Treatment Optimized by Orthogonal Design

XIE Qing¹, CAO Wei², WU Yang¹, DENG Shi-huai¹, HU Xiao-mei¹, DUAN Sha-li¹, YE Hong¹

(1. College of Resources and Environment, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Environmental Protection Bureau of Dianjiang County, Chongqing 408300, China)

Abstract: Extracted the total DNA from activated sludge, which were domesticated in raw livestock wastewater by SBR process. Compared three cell lysis treatments (shaker vibration, shaker and glass beads, shaker and freeze–thawing) under the same chemical method "ProteaseK+SDS+CTAB", which was used to disrupt dispersed cells and release DNA. The quality of extracted DNA was determined by 1.0% agarose gel electrophoresis and spectrophotometer measurement. Then an orthogonal experiment ($L_9(3^4)$) was designed to probe the best 16S rDNA–PCR reaction system. Some factors were analyzed, including the DNA concentration, primers, Mg^{2+} , dNTP and annealing temperature. After 9 times PCR amplification, the results were made into 4 ranks according to their brightness and expressed for statistical analysis by the scoring method. Results showed that the purity of total DNA was higher by freeze–thawing ($DO_{260}/DO_{280}>1.8$) than the other two physical ways. The impact order of factors through analyzing the value "R": the most important factor was template DNA (factor C), the concentrations of Mg^{2+} (factor A) and dNTP (factor B) were equal and in the second range, yet the concentration of primers (factor D) was the least influence; The optimum set in 25 μ L reaction system was contained: 1.5 mmol $\cdot$ L⁻¹ Mg^{2+} , 200 μ mol $\cdot$ L⁻¹ dNTP, 1.0 μ mol $\cdot$ L⁻¹ of primers, 0.32 μ g of genomic DNA template and 0.2U TaqDNA polymerase. Meanwhile, the optimized annealing temperature was 56.5 $^{\circ}$ C.

Keywords: SBR; freeze–thawing; PCR amplification; orthogonal design

SBR 法(序批式活性污泥法)作为一种较早的污水活性污泥处理系统,随着自动化技术的提高加之其

自身的许多独到之处而愈发受到重视。与其他工艺相比, SBR 工艺处理构筑物少, 调节功能好, 对水质、水量的变化具有一定的适应性等优点^[1]。SBR 系统中的活性污泥主要是通过硝化作用和反硝化作用起到生物脱氮效果^[2]。

活性污泥是生物处理污染水体的主体, 尤其对氨氮含量高且成分复杂的畜禽废水处理效果明显。了解其细菌区系和种类数量, 认识细菌群落的稳定性和一

收稿日期: 2007–08–31

基金项目: 四川农业大学青年科技创新基金(2006a057); 四川省公益性重大项目(2007NGY006)

作者简介: 谢 晴(1983—), 女, 四川江油人, 硕士研究生, 研究方向为废弃物处理与资源化利用。

E-mail: qingxiexq@yahoo.com.cn

作者简介: 邓仕槐 E-mail: shdeng8888@sina.com

些功能菌在有害物降解中的功能和作用对提高畜禽废水处理效果具有重要意义。但由于其活性污泥特殊的絮状结构,大量杂质、病原菌和有毒物质的存在,都影响着进一步研究^[3]。本文在土壤提取 DNA 方法的基础上做出改进,探讨 SBR 反应器中,3 种不同物理破壁方法对活性污泥总 DNA 质量的影响;同时对影响 PCR 反应结果的几个重要因素设计正交实验(4 因素 3 水平),优化 PCR 反应体系,得到优水平和最优组合,为废水中细菌的鉴定和遗传多样性研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 污泥来源和性质

试验活性污泥取自四川农业大学污水处理站 CASS 工艺中曝气池污泥,其以处理氨氮含量高的畜禽养殖废水为主。氨氮去除率为 77.26%~87.79%, COD_{Cr} 去除率最高为 75%,MLSS 为 $1\,970\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.1.2 试验用水

a. 人工模拟高 $\text{NH}_3\text{-N}$ 废水在每 1 L 自来水中加入 $54\text{ gNH}_4\text{Cl}$ 、 100 gNaHCO_3 以及少量的 KH_2PO_4 、 $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 KCl 、 NaCl 、 MgSO_4 等药品,然后根据所需不同浓度稀释而成;碳源则向其提供葡萄糖。

b. 畜禽养殖废水:取自四川农业大学污水处理站 ABR 池进水口。

1.1.3 酶和主要试剂

Protease K, PCR 扩增试剂盒(购至上海生工生物工程公司);2000 bp Marker (购至成都博瑞克生物工程公司)。

化学试剂包括: $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 8), $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 缓冲液 (pH 8), $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA- Na_2 , $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 1.0% CTAB, 20% 的 SDS, 氯仿, 异丙醇等。

1.2 方法

1.2.1 活性污泥的驯化

前期:用 SBR 间歇好氧处理工艺,采用人工模拟高氨氮废水,开始阶段采用的是 $\text{C/N}=2:1$,即 COD_{Cr} 为 $640\sim 560\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{NH}_3\text{-N}$ 为 $310\sim 280\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的废水。试验采用进水-曝气 18 h-厌氧搅拌 2 h-静置 1 h-出水-下一周期。经过几周的培养和驯化达到一定效果, COD_{Cr} 去除率为 86%, $\text{NH}_3\text{-N}$ 为 95% 时,认为驯化阶段基本完成。

后期:进畜禽废水,采用进水-曝气 6 h-厌氧搅

拌 2 h-静置 2 h-出水-下一周期;当进水 COD 由 $1\,500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降到 $70\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,去除率达到 95%;进水 $\text{NH}_3\text{-N}$ 由 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降到 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,去除率达到 94% 时,污泥性质稳定,沉降性能好,MLSS 达到 $2\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

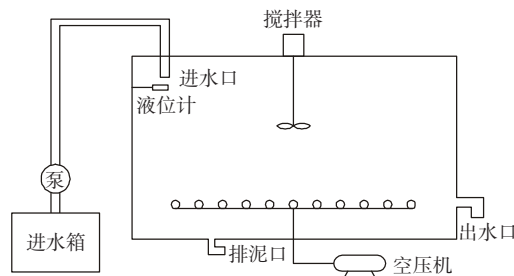


图 1 SBR 反应装置

Figure 1 The equipment of SBR system

1.2.2 活性污泥总 DNA 的提取

参照土壤总 DNA 提取方法^[4],在化学处理和酶处理相同的情况下选择摇床振荡,摇床+玻璃珠,摇床+反复冻融 3 个不同物理处理作比较,各做 2 个平行:

将 6 个离心管分别编号 1、2、3、4、5、6,其中 3、4 管加入粒径约 3~4 mm 的灭菌玻璃珠各 10 粒;前 3 个步骤参考文献方法;第 4 步将样品 1、2、3、4 置于摇床, $225\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡 30 min,同时将样品 5、6 反复冻融处理 3 次(煮沸 2 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻 3 min),将各样品离心 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}\times 15\text{ min}$,将上清液转入新的 50 mL 离心管中;第 5 步取 20 mL CHCl_3 于各上清液中混匀,以 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}\times 20\text{ min}$,取其上清液,于上清液中加入等体积的异丙醇,此时混合液中部出现无色丝状悬浮物;最后静置过夜,丝状物缩小,呈白色物质浮到溶液表面,常温下 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,小心倒出有机试剂,用 70%乙醇洗涤沉淀,尽量晾干,加入 300 μL dd H_2O ,溶解黏附于离心管底部和管壁的 DNA,并收集于 1.5 mL epp.管中,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存留用。

1.2.3 细菌 16S rDNA 的扩增

采用细菌 16S rDNA 通用引物:

16(+): $5'\text{-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'}$

1492r: $5'\text{-GGTTACCTTGTACGACTT-3'}$

其分别对应于 *E.coli* 16S rRNA 的 8~27 位和 1 510~1 492 位核苷酸。引物委托上海生工生物工程公司合成。

反应参数: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,接以 35 个循环: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $56.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min;最

后 72 ℃延伸 7 min ;PCR 产物在 1.0%琼脂糖凝胶电泳中检测。

1.2.4 反应体系的正交设计

采用正交试验,以 Mg^{2+} 浓度(A),dNTP 浓度(B),模板浓度(C)以及引物浓度(D)为试验因素,取 1、2、3 (3 种)水平,见表 1。选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,见表 3。

1.2.5 退火温度的筛选

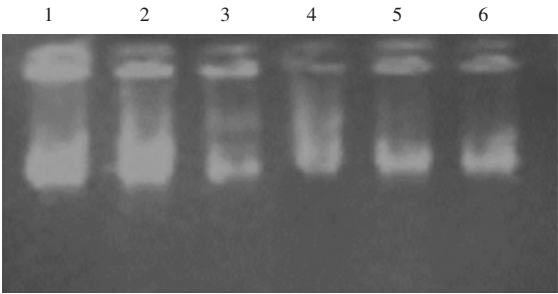
在确定最佳反应体系的基础上,对退火温度进行探索:选择 50、54、56.5、58、60 ℃进行比较。

2 结果与分析

2.1 污泥总 DNA 质量检测

将 DNA 初提物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳条件:1.0%琼脂糖凝胶,电泳缓冲液 0.5×TAE,电压 90 V,时间 40 min,经 EB ($1.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 染色 20 min 后,BIO-RAD Universal HOOD2 凝胶电泳图像分析仪紫外光成像,如图 2。

利用 UV-2802 型紫外可见分光光度计对提取的活性污泥 DNA 样品纯度进行检测。



1,2-摇床振荡;3,4-摇床+玻璃珠;5,6-摇床+冻融

图 2 基因组 DNA 的凝胶电泳图谱

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of total DNA

表 2 DNA 纯度比较

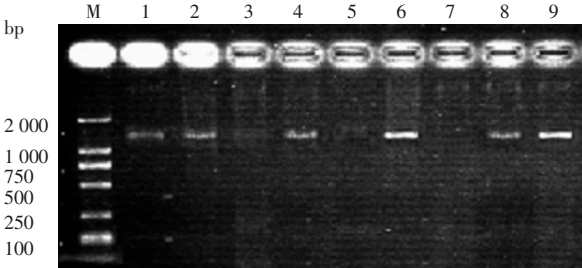
Table 2 Comparing the purity quotient of DNA

	摇床	摇床+玻璃珠	摇床+冻融
OD ₂₆₀ /nm	2.705	2.830	1.907
OD ₂₈₀ /nm	2.280	2.340	1.040
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1.190	1.209	1.834

当 $OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$,说明 DNA 样品的纯度较好^[5],从图 2 和表 2 看出,仅使用恒温摇床,DNA 纯度最低,用玻珠振荡法,纯度也不高,也可能是过于温和的条件使 DNA 片段被细胞内的 DNA 酶所降解,拖带现象最严重,且含有较多的蛋白质和其他杂质;用冻融法,将细胞在-20 ℃冰冻,室温融解,100 ℃沸水浴,反复几次,由于细胞内冰粒形成和剩余细胞液的盐浓度增高引起溶胀,使细胞结构破碎^[6],虽然 DNA 总量不大,但纯度最高,可不经纯化,直接进行下一步 PCR 扩增。

2.2 16S rDNA-PCR 反应体系的正交优化

按照 9 个处理,电泳结果见图 3。



1-Marker DL2000;1~9:实验号

图 3 正交实验中 PCR 扩增产物的电泳结果

Figure 3 Electrophoresis of PCR Products in Orthogonal design

从 1~9 个泳道中存在明显差异:3、5、7 道没有扩出条带,主要是模板 DNA 的浓度过低所致;1 道出现极弱带,考虑是 dNTP 浓度过低;2、4、8 道出现弱带,且有一些拖带现象;6、9 道的条带最清晰,亮度最高,是较理想的效果。

2.3 极差分析

由于电泳结果只是定性的而非定量指标,所以将其用评分法人为地转化为数量指标以便统计分析^[7]。根据电泳条带的亮度大小将其量化为 4 个等级:0-没有条带(3、5、7),1-极弱带(1),2-弱带(2、4、8),3-亮带(6、9)。

通过表 3 中极差 R 的大小可知:因素的主次影响次序为:C>A=B>D,即模板 DNA 浓度影响最显著,引物浓度影响最小, Mg^{2+} 和 dNTP 浓度影响居中等

表 1 因数水平表

Table 1 The factors and their levels in orthogonal design

Level	$Mg^{2+}/mmol\cdot L^{-1}$ A	dNTP/ $\mu mol\cdot L^{-1}$ B	Template/ μg C	Primer/ $\mu mol\cdot L^{-1}$ D
1	2	3	1.0	1.5
2.0	120	160	20	3.2
0.32	0.032	0.5	1.0	2.0

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验表
Table 3 Orthogonal design with $L_9(3^4)$

Grope	Mg^{2+} A	d NTP B	Template C	Primer D	Result (量化)
1	1(1.0)	1(120)	1(3.2)	1(0.5)	1
2	1	2(160)	2(0.32)	2(1.0)	2
3	1	3(200)	3(0.032)	3(2.0)	0
4	2(1.5)	1	2	3	2
5	2	2	3	1	0
6	2	3	1	2	3
7	3(2.0)	1	3	2	0
8	3	2	1	3	2
9	3	3	2	1	3
K_1	3	3	5	4	
K_2	5	4	6	5	
K_3	4	5	0	4	0-无带
k_1	1	1	1.7	1.3	1-极弱带
k_2	1.7	1.3	2	1.7	2-弱带
k_3	1.3	1.7	0	1.3	3-亮带
R	0.7	0.7	2	0.4	
主次顺序			$C>A=B>D$		
优水平	A_2	B_3	C_2	D_2	
最优组合			$A_2B_3C_2D_2$		

同;根据 k_i 值大小可知,各因素最优组合为 $A_2B_3C_2D_2$,即正交试验中最佳反应体系为: Mg^{2+} 1.5 mmol·L⁻¹, dNTP 200 μmol·L⁻¹,模板 DNA 0.32 μg,引物浓度 1.0 μmol·L⁻¹, TaqDNA 酶 0.2 U。

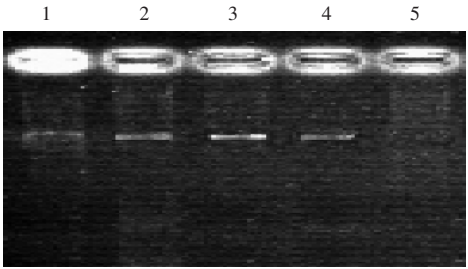
2.4 退火温度对处理的影响

PCR 反应中若退火温度过低,虽引物容易结合到靶序列上,但反应的特异性会下降;过高,虽特异性增加,但扩增效果却不佳。根据公式 $Tm=4(G+C)+2(A+T)$ 计算,引物 P₁ 的退火温度在 60 ℃左右,引物 P₂ 的退火温度在 54 ℃左右。在选择了最优组合的基础上,设置 50、54、56.5、58、60 ℃几个退火温度,考察扩增效果。

如图 4 看出:除 5 道没有扩增出条带外,1、2、3、4 道均扩出条带,但 3 道最亮,即退火温度为 56.5 ℃时,扩增效果最好。

3 讨论

(1)污泥总 DNA 提取过程中应用了夏北成等^[4]从土壤中提取 DNA 时建立的提取缓冲液,其中 Tris 和 EDTA 被用于保护提取的 DNA 免受溶液中 DNA 酶的攻击;NaCl 可使溶液保持较好的解絮凝状态^[8];十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 选择性沉淀 DNA 的



1~50 ℃; 2~54 ℃; 3~56.5 ℃; 4~58 ℃; 5~60 ℃

图 4 退火温度对 PCR 产物的影响

Figure 4 The effect of reannealing temperatures

方法常被用于抽提生物组织,特别是植物组织的总 DNA,但在本试验中,我们发现 DNA 有部分降解的情况,可在提取缓冲液中加入菲咯啉(phenanthroline),降解现象将被大大抑制,因其具有与溴乙锭相似的分子结构,估计其能插入 DNA 双链,保护 DNA 不受 DNA 酶的进攻,从而抑制了 DNA 的降解^[9]。

冻融处理和玻璃珠研磨振荡是较为常用的物理方法,样品处理后可有助于活性污泥解絮凝,最大限度得获取整个细菌群落的总 DNA。在本试验中冻融处理取得了较高的纯度,后续的 PCR 扩增则以此为模板进行。

(2)正交设计应用于 PCR 扩增体系中,不仅提高

了工作效率,而且能全面、科学地反映试验结果。在本试验中,利用 $L_9(3^4)$ 正交表,用 9 次 PCR 就得到了较多的信息。通过极差分析,考察出了 4 个因素对扩增的影响程度,并得到了重复性好,稳定性高的反应体系。但该试验设计中,并没有考虑因素间交互作用的影响,所以,根据考察目的和对象的不同,试验方案也会相应改变。由此,对 PCR 扩增体系的探索是非常有意义的,目的片断的成功扩增为畜禽废水的分子生物学下游操作提供了有利保障。

参考文献:

[1] 彭永臻.SBR 法的五大优点[J].中国给水排水, 1993, 9 (2):29–31.
Peng Y Z. The five merits of the SBR reactor[J]. *China Water & Wastewater*, 1993, 9(2):29–31.

[2] 郑 平,徐向阳,胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术[M]. 北京:科学出版社,2004.115–189.
Zhen P, Xu X Y, Hu B L. The theory and technique of new type biology denitrogenation[M]. Beijing: Science Press, 2004. 115–189.

[3] Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, et al. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge[J]. *Appl Envir Microbiol*, 1998,64(11): 4396–4402.
Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, et al. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge[J]. *Appl Envir Microbiol*, 1998,64(11): 4396– 4402.

[4] 夏北成, Zhou J Z, Tiedjo J M. 分子生物学方法在微生物生态学中的应用[J]. 中山大学学报(自然科学版),1998,37(2): 97–101.
Xia B C, Zhou J Z, Tiedjo J M. Application of molecular biological method in micro-ecology[J]. *Journal of Sun Yat-Sen University:Science*, 1998,37(2):97–101.

[5] La Montagne M G, Michel F C, Holden P A, et al. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis[J]. *Micro Methods*, 2002,49: 255–264.

[6] Roose A C L, Garnier S E, Harry M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples[J]. *Applied Soil Ecology*, 2001,42(8):47–60.

[7] 杨艳秋,贺 丹,王 爽,等. 正交法用于真菌微卫星 PCR 体系优化[J]. 吉林大学学报(医学版),2006,32(6): 1108–1112.
Yang Y Q, He D, Wang S, et al. Optimization of SSR-PCR reaction system in fungus by orthogonal design[J]. *Journal of Jilin University: Med ed*, 2006, 32(6): 1108–1112.

[8] 高平平,赵立平.可用于微生物群落分子生态研究的活性污泥总 DNA 提取方法研究[J]. 生态学报,2002, 22(11):2015–2019.
Gao P P, Zhao L P. DNA extraction from activated sludge for molecular community analysis[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22 (11):2015 – 2019.

[9] 李 红,乐学义,吴建中,等.铜(Ⅱ)邻菲咯啉蛋氨酸配合物与 DNA 相互作用的研究[J].化学学报,2003, 61(2):245–250.
Li H, Yue X Y, Wu J Z, et al. Studies on the interaction between copper (Ⅱ)complex with phenanthroline and L-Methionine Ligands and DNA[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2003, 61(2):245–250.