



耐铀颗粒污泥微生物群落结构解析

曾涛涛^{1,2}, 鲁慧珍², 刘迎九², 刘金香², 荣丽杉², 马华龙², 谢水波^{2,3}

(1. 南华大学 矿业工程博士后流动站, 衡阳 421001;

2. 南华大学 污染控制与资源化技术湖南省高校重点实验室, 衡阳 421001;

3. 南华大学 铀矿冶生物技术国防重点学科实验室, 衡阳 421001)

摘 要: 以厌氧颗粒污泥为对象, 测试其对不同浓度 U(VI)(2.4~12 mg/L)的去除效果, 通过环境扫描电子显微镜(ESEM)和高通量测序技术等方法解析铀胁迫下微生物群落结构特性。结果表明: 在初始 U(VI)浓度为 9.6mg/L、pH 为 6、投加湿污泥 2g(污泥的可挥发性悬浮在体浓度为 0.1g)条件下, U(VI)的去除率最高, 达到 95.1%; 颗粒污泥中微生物以直径约 1 μm 的球形细菌为主, 能谱分析(EDS)也证明细胞表面铀的存在。高通量测序得到 15939 条有效序列, 可划分操作分类单元 939 个。样品文库覆盖率为 0.967, Shannon 指数、ACE 指数和 Chao1 指数分别为 4.099、3140.55 与 2122.53, 表明样品具有较高的微生物多样性与丰富度。菌属分类显示: 颗粒污泥中包含许多典型的铀还原固定菌属, 如 *Acinetobacter*、*Clostridium*、*Pseudomonas*、*Sulfurovum*、*Sulfurospirillum* 及 *Trichococcus*, 这是颗粒污泥具有高效除铀效果与耐铀性能的原因。

关键词: 耐铀性能; 颗粒污泥; 微生物群落; 高通量测序

中图分类号: X172

文献标志码: A

随着我国铀矿冶的发展, 产生了大量含铀废水, 其中铀浓度一般为 1~5 mg/L, 有些地方甚至更高, 达到 10 mg/L, 对环境构成严重威胁。在自然界中, 铀主要以难溶态四价铀(U(IV))和溶解态六价铀(U(VI))两种形态存在, 溶解态 U(VI)极易随水流迁移, 引起铀污染扩散^[1]。因此, 水体除铀通常指去除溶液中的六价铀及其化合物, 避免其通过重金属化学毒性和放射性辐射两种方式对人体健康产生危害^[2]。

与物理和化学处理方法相比, 利用微生物进行含铀废水处理, 具有低耗、价廉、环保的优点^[3]。在实际铀污染场地, 通常存在一些耐铀微生物, 如假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)、硫酸盐还原菌(SRB)、地杆菌(*Geobacter spp.*)、希瓦氏菌(*Shewanella spp.*)、梭菌(*Clostridium spp.*)、嗜酸细菌(*Acidotolerant*)等^[4], 这些微生物通过生物吸附及还原作用, 将铀进行沉淀、固定, 降低其对环境的危害。颗粒污泥因其独特的层状结构, 成为多种微生物栖身的理想场所, 成为常规污水生物处理研究的热点^[5]。目前, 一些研究者尝试利用颗粒污泥进行含铀废水处理。TAPIA-RODRIGUEZ

等^[6]研究了不同电子供体对颗粒污泥除铀的影响, 并探讨除铀机理, 结果表明: 颗粒污泥主要通过还原、沉淀作用去除废水中的 U(VI), 在无外加电子供体情况下, 也具有很好的除铀效果。本文作者前期研究中发现, 以粉末厌氧颗粒污泥为吸附剂, 在 pH=6.0、温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 时, 对初始浓度为 10 mg/L 的 U(VI)去除率达到 93.72%^[7]。研究发现^[8], 利用 SRB 颗粒污泥处理含 U(IV)废水, 铀在颗粒污泥上主要以稳定 U(VI)形式沉积。

这些研究表明, 颗粒污泥在铀废水生物处理中具有良好的应用潜力, 但目前尚缺乏对除铀颗粒污泥中微生物菌属及群落结构特性的深入分析。本文作者利用厌氧颗粒污泥对低浓度含铀废水进行处理, 并通过环境扫描电子显微镜(ESEM)观察颗粒污泥微观结构, 通过高通量测序技术, 全方位、超深度解析铀胁迫下颗粒污泥微生物菌属多样性及群落结构特征, 为耐铀颗粒污泥在含铀废水处理的进一步研究提供理论基础及技术借鉴。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51408293, 11475080); 中国博士后基金面上项目(2014M562114); 湖南省教育厅优秀青年基金资助项目(14BB154); 湖南省博士后日常资助项目(2014SBH01); 南华大学博士科研启动基金资助项目(2013XQD10)

收稿日期: 2015-05-19; **修订日期:** 2015-09-02

通信作者: 谢水波, 教授, 博士; 电话: 0734-8281603; E-mail: xiesbmr@263.net

1 实验

1.1 污泥来源及理化性质分析

实验用颗粒污泥取自湖南某柠檬酸厂的厌氧内循环(IC)反应器中,颗粒污泥取样后,立即置于冰箱 -20°C 厌氧保存备用。进行试验前,颗粒污泥用去离子水淘洗过筛。通过数码相机,拍摄颗粒污泥外观(见图1(a))。用总悬浮固体(TSS)来表示颗粒污泥固体含量 $w(\text{TSS})$,用可挥发性悬浮固体(VSS)来衡量颗粒污泥中活性微生物量的含量($w(\text{VSS})$), $w(\text{TSS})$ 、 $w(\text{VSS})$ 通过灼烧法测定。

1.2 U(VI)去除试验

称取一定量 U_3O_8 (分析纯),按GBW04201方法配制标准铀溶液(20 mg/L)。U(VI)去除试验装置如图1(b)所示,血清瓶上部为微氧条件($0.5\sim 1\text{ mg/L}$)。取铀标准溶液,分别用去离子水稀释成 2.4 、 4.8 、 7.2 、 9.6 、 12 mg/L 并调节 $\text{pH}=6.0$,加入淘洗后的颗粒污泥 2 g ,通过摇床振荡培养。U(VI)浓度采用5Br-PADAP分光光度法测定^[9]。

1.3 颗粒污泥微观结构观察

取 0.5 g 反应后的颗粒污泥样品,通过 10000 r/min 、 4°C 离心 10 min ,去除上清液。置于 -80°C 冰箱(SANYO, MDF-U32V)冷冻 24 h ,通过真空冷冻干

燥机(Freeze Dryer, FD5-series)对样品真空干燥 24 h 。之后将样品喷金,通过FEI QUANTA 200环境扫描电子显微镜(ESEM)观察颗粒污泥微观结构,并取典型细胞表面,利用EDAX Genesis 2000 X射线能谱仪(EDS)分析细胞表面元素组成。

1.4 高通量测序及数据分析

1.4.1 基因组DNA提取及PCR扩增

取 0.5 g 颗粒污泥,按照OMEGA公司E.Z.N.A Soil DNA试剂盒操作步骤,抽提颗粒污泥基因组DNA,利用Qubit2.0 DNA检测试剂盒对基因组DNA精确定量,以确定PCR反应应加入的DNA量。

采用融合了Miseq测序平台的V3-V4通用引物341F(CCTACACGACGCTCTTCCGA TCTN(barcode) CCTACGGGNGGCWGCAG)与805R(GACTGGAGT-TCCTTGGCACC CGA GAATTC CAGACTACHVGGG-TATCTAATCC),对细菌16S rDNA片段进行扩增。 $50\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系包括: $5\text{ }\mu\text{L}$ $10\times$ Buffer, $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 10 mmol/L dNTPs, $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 50 uM 前引物, $0.5\text{ }\mu\text{L}$ $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ 后引物, 10 ng DNA模板以及 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ Plantium Taq Polymerase (5 U/uL , Thermo)。

PCR扩增程序如下:先在 95°C 反应 3 min ,然后进入扩增循环,每一次扩增循环分别在 95°C 、 55°C 和 72°C 温度下保持 30 s ,共循环 25 次,最后在 72°C 保持 5 min ,最后在 10°C 条件下 5 min 退火结束反应。每个样品重复 3 次,将同一样品混合后用2%(质量分数)琼脂糖凝胶电泳检测,使用上海生工公司生产的SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(cat:SK8131)切胶回

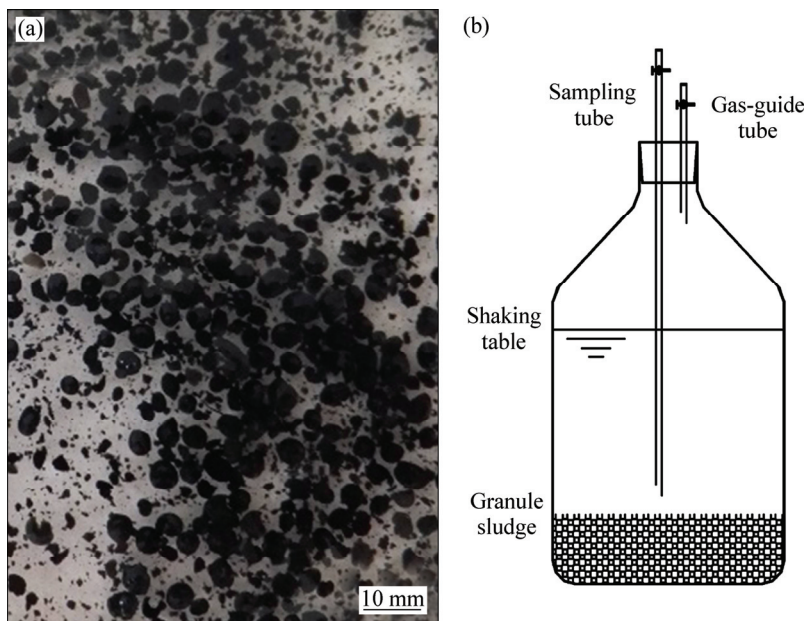


图1 颗粒污泥及U(VI)去除试验装置示意图

Fig. 1 Morphology of granular sludge (a) and schematic diagram of U(VI) removal test equipment (b)

收 PCR 产物。

1.4.2 高通量测序与数据分析

利用 Qubit2.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量, 通过 Miseq 测序平台进行高通量测序。对所得序列进行质控, 去除引物序列、短片段、低复杂度序列及低质量序列。将多条序列根据相互之间的距离进行聚类, 根据序列之间的相似性作为域值(0.97)划分操作分类单元(OTU)。

采用 Mothur 软件(<http://www.mothur.org/>)分析 Alpha 多样性指数, 包括丰富度指数(Richness)、香农指数(Shannon Index)、ACE 指数、Chao1 指数等。丰富度指数用于衡量单个样本中物种种类个数, 实际通过操作分类单元的个数来计算。香农指数(H)衡量群落的异质性, 公式 $H=-\sum P_i \ln P_i$ 来计算(其中 P_i 为各种群物种数与样本总物种比值; 用 ACE 指数和 Chao1 指数估计群落中含 OTU 数目, 结果可反映物种多样性)。计算样品文库的覆盖率(Coverage, C), 计算公式为 $C=1-N_1/N$ (其中: N_1 为只含有一条序列的 OTU 的数目; N 为抽样中出现的总的序列数目)^[10]。采用 RDP classifier 将序列进行物种分类, 以菌属(Genus)为分类单位, 进行序列与物种丰度计算, 绘制菌属丰度柱状图。

2 结果分析

2.1 颗粒污泥性质

数码照相发现, 颗粒污泥为深黑球状, 粒径约为 0.5~3 mm(见图 1(a))。颗粒污泥的 $w(\text{TSS})$ 、 $w(\text{VSS})$ 与 $w(\text{VSS})/w(\text{TSS})$ 值测定结果如表 1 所列。其中, $w(\text{VSS})/w(\text{TSS})$ 可用来衡量微生物在颗粒污泥中所占的比例, $w(\text{VSS})/w(\text{TSS})$ 值越大, 微生物所占比例就越高。由表 1 可知, 颗粒污泥的 $w(\text{VSS})$ 为 5%(质量分数)湿污泥, $w(\text{VSS})/w(\text{TSS})$ 为 0.611, 微生物所占比例较高。颗粒污泥独特的层状结构, 是多种厌氧微生物理想的栖身场所, 而许多厌氧微生物对 U(VI) 具有吸附和还原作用, 因此, 以颗粒污泥进行 U(VI) 去除效果分析。

表 1 重量法测污泥浓度试验结果

Table 1 Result of sludge concentration by weight test		
Wet sludge/g	Dry sludge/g	Burnt sludge/g
4.076	0.332	0.129
$w(\text{TSS})$ in wet sludge/%	$w(\text{VSS})$ in wet sludge/%	$w(\text{VSS})/w(\text{TSS})$
8.1	5.0	0.611

2.2 U(VI) 的去除效果

地浸与堆浸渗出废水中铀的浓度一般在 5 mg/L 以下, 在余酸较多或存在凸镜体时, 坑道渗出液中铀的浓度可能会升高至 10 mg/L 以上。配置 U(VI) 初始浓度时, 设置 2.4~12 mg/L 的梯度溶液, 温度为室温条件(25 ℃), 并调节 pH 为 6.0, 投加湿污泥 2 g(对应 VSS 为 0.1), 反应 24 h 后, 测定血清瓶剩余 U(VI) 浓度, 计算 U(VI) 的去除率, 结果如图 2 所示。

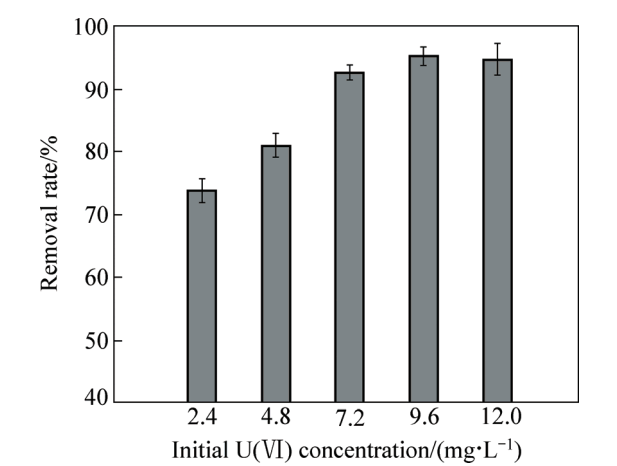


图 2 U(VI) 的去除效果

Fig. 2 Removal rate of U(VI)

由图 2 可见, 颗粒污泥对不同浓度的 U(VI) 溶液去除效果不同, 在低浓度 U(VI) 溶液中(2.4 mg/L), 去除率为 73.6%。随着 U(VI) 浓度升高, 去除率也逐渐提高, 初始 U(VI) 浓度为 9.6 mg/L 时, 去除率最高, 达到 95.1%。在初始 U(VI) 浓度为 12 mg/L 情况下, 去除效果略有下降(94.7%)。反应 24 h 之后, 5 个样品剩余 U(VI) 浓度在 0.47~0.92 mg/L 之间, 大部分 U(VI) 被去除, 显示颗粒污泥中微生物具有良好的耐铀能力。在初始 U(VI) 浓度为 9.6 mg/L 情况下, U(VI) 去除率最高, 剩余 U(VI) 浓度最低(0.47 mg/L), 能较好地反映颗粒污泥去除铀的特性, 选取此条件下的颗粒污泥进行微观结构观察与微生物群落结构解析。

2.3 微生物形态特征

颗粒污泥真空干燥之后, 样品压平、喷金 30 s, 在 20 kV 加速电压下的形态结构如图 3 所示。并从细胞表面取点进行能谱分析, 其能谱图和各元素的组成如图 4 和表 2 所示。

由图 3 可知, 颗粒污泥微生物形态为球形, 直径接近 1 μm。许多球形菌聚集在一起, 形成团聚结构, 这有助于微生物在缺氧环境生长及相互间的物质、能量传递。在此之前进行了不加铀处理的颗粒污泥环境

扫描电镜及能谱分析,空白组颗粒污泥细胞聚集紧密,EDS 显示没有 U 元素存在。而经过 9.6 mg/L 铀处理,颗粒污泥细胞表面光滑、形态均称、生长良好,表明厌氧颗粒污泥能够耐受较高 U(VI) 浓度,推测其中微生物具有较强的铀还原、固定效果。与普通活性污泥相比,颗粒污泥对废水中重金属毒性抵抗能力大大增强, TYUPA 等^[1]研究银与铀对活性污泥的毒害作用,发现颗粒污泥对重金属毒害作用的抗性能够提高 50%。通过能谱分析颗粒污泥中元素组成及比例,结

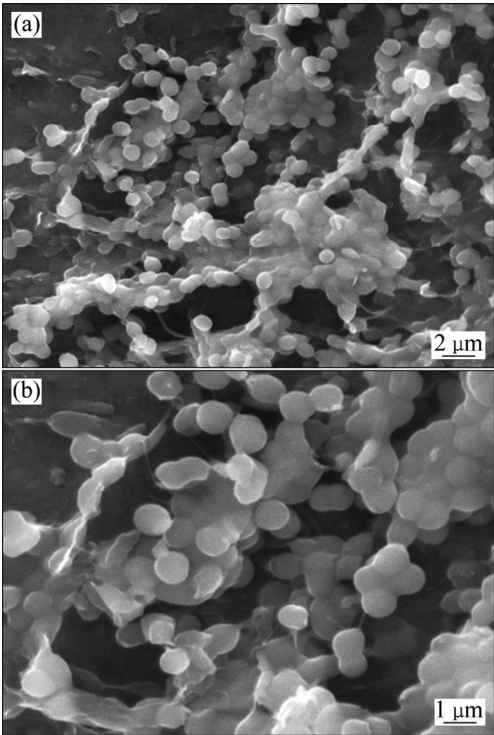


图 3 颗粒污泥的微生物形态结构
Fig. 3 Microorganisms morphologies of sludge particles

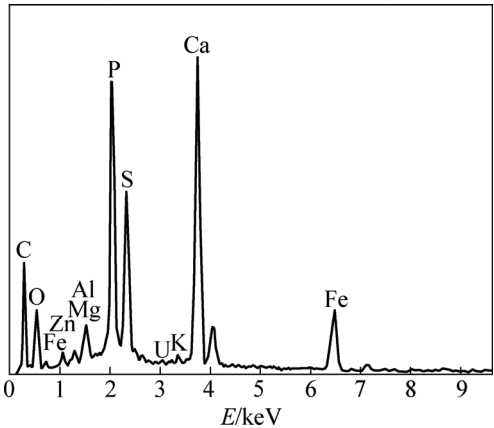


图 4 颗粒污泥微生物元素 EDS 谱
Fig. 4 EDS results of elemental composition in granular sludge

表 2 图 4 中各元素的组成及含量

Table 2 Composition and content of elements in Fig. 4

Element	Mass fraction/%	Mole fraction/%
C	35.98	58.21
O	13.15	15.97
Zn	1.22	0.36
Mg	0.45	0.36
Al	1.42	1.02
P	11.21	7.03
S	7.14	4.32
U	0.59	0.05
K	0.35	0.18
Ca	18.91	9.17
Fe	9.58	3.33
Matrix	Correction	ZAF

果表明: C、O、P、S、Ca、Fe 6 种元素的特征峰最明显,所占质量分数之和达到 95.97%。由于 U 的原子序数大,不容易激发,特征峰不明显,质量分数为 0.59%。

2.4 微生物群落结构解析

2.4.1 样本序列

对测序的原始序列(17683 条)进行质控,包括去除 Barcode、两端 Primer、以及部分低质量序列,去除嵌合体及靶区域外序列。质控后样本可用于分析的序列数量为 15939,长度大部分在 400~500 之间,平均长度为 416(见表 3),满足序列分析要求。

表 3 微生物序列分析结果

Table 3 Microbial community sequencing results of anaerobic granular sludge

Sequencing number	Filtered number	Mean length
17683	15939	416

2.4.2 微生物多样性分析

将多条序列按其序列间的距离对它们进行聚类,后根据序列之间的相似性作为阈值(0.97)分成操作分类单元(OTU)。计算 Alpha 多样性指标,包括丰富度指数(Richness)、香农指数(Shannon Index)、ACE 指数、Chao1 指数等、覆盖率(Coverage)等,其结果如表 4 所示。样本中随机抽取序列数为横坐标,分别以相应的 OTU 数目、香农指数、ACE 指数、Chao1 指数为纵坐标,绘制出丰富度稀疏分析图、香农指数图、ACE 指数图与 Chao1 指数图,结果如图 5 所示。

表 4 颗粒污泥微生物 Alpha 多样性统计表

Table 4 Alpha index of microbial diversity in granular sludge

Filtered number	OUT number	Shannon index	ACE index	Chao1 index	Coverage
15939	939	4.099	3140.55	2122.53	0.967

本试验中样本覆盖率数值达到0.967,非常接近1,反映样本中序列没有被测出的概率极低,能很好地代表样本真实情况。15939 条序列可分成 939 个 OUT,每个操作分类单元被类似为一个微生物菌种,表明颗粒污泥中微生物种类很多。图 5(a)所示的丰富度稀疏曲线最终趋向平坦,说明取样的数量合理,能很好地反映取样深度。

由表 4 可知,Shannon 指数值为 4.099,ACE 指数达到 3140.55,Chao1 指数为 2122.53,对应图 5(b)~(d) 3 种曲线,序列数量达到或接近饱和,表明本研究所得的菌属信息能全面地反映微生物多样性。由此说明,在 9.6 mg/L 初始 U(VI)浓度下,颗粒污泥微生物仍然表现出很高的菌属多样性,即颗粒污泥含有较多的耐铈菌种。

2.4.3 微生物群落结构解析

选择 OTU 操作单元里的代表序列(默认丰度最

高),采用软件 RDP classifier 进行物种分类,分析 genus(属)水平对应序列数量及其比例,对于所占比例小于 1%的物种统一用“Other”表示,根据菌属类别及其比例,绘制物种丰度柱状图,其结果如图 6 所示。从图 6 可知,颗粒污泥中包含许多典型的耐铈菌属,它们具有较强的铈还原、固定作用。如 *Acinetobacter*、*Clostridium*、*Pseudomonas*、*Sulfurovum*、*Sulfurospirillum* 及 *Trichococcus*。*Acinetobacter*(不动杆菌)所占比例为 17.81%,包含序列 2838 条,为颗粒污泥中第二大微生物菌属。*Acinetobacter* 为污水处理中常见微生物菌属,ISLAM 等^[12]通过传统培养及不依赖培养的分子生物学技术研究了铈矿细菌群落特性,发现两种分析方法均显示 *Acinetobacter* 为其中优势菌属,具有抵抗铈及其他重金属毒性的能力。*Clostridium*(梭菌属)所占比例为 7.2%,包含序列 1148 条,是颗粒污泥固铈的主要菌属。*Clostridium* 属于厚壁菌门(Firmicutes),是铁还原菌中的一种,具有还原沉淀铈的能力。ZHANG 等^[13]研究离子液体对 *Clostridium sp.*的生长及吸附铈的影响,发现离子液体会对 *Clostridium sp.*的生长产生毒害作用,从而降低其对铈的去除效果。

Pseudomonas(假单胞菌)所占比例为 2.85%,包含序列 454 条,是颗粒污泥耐铈的主要菌种之一。许多

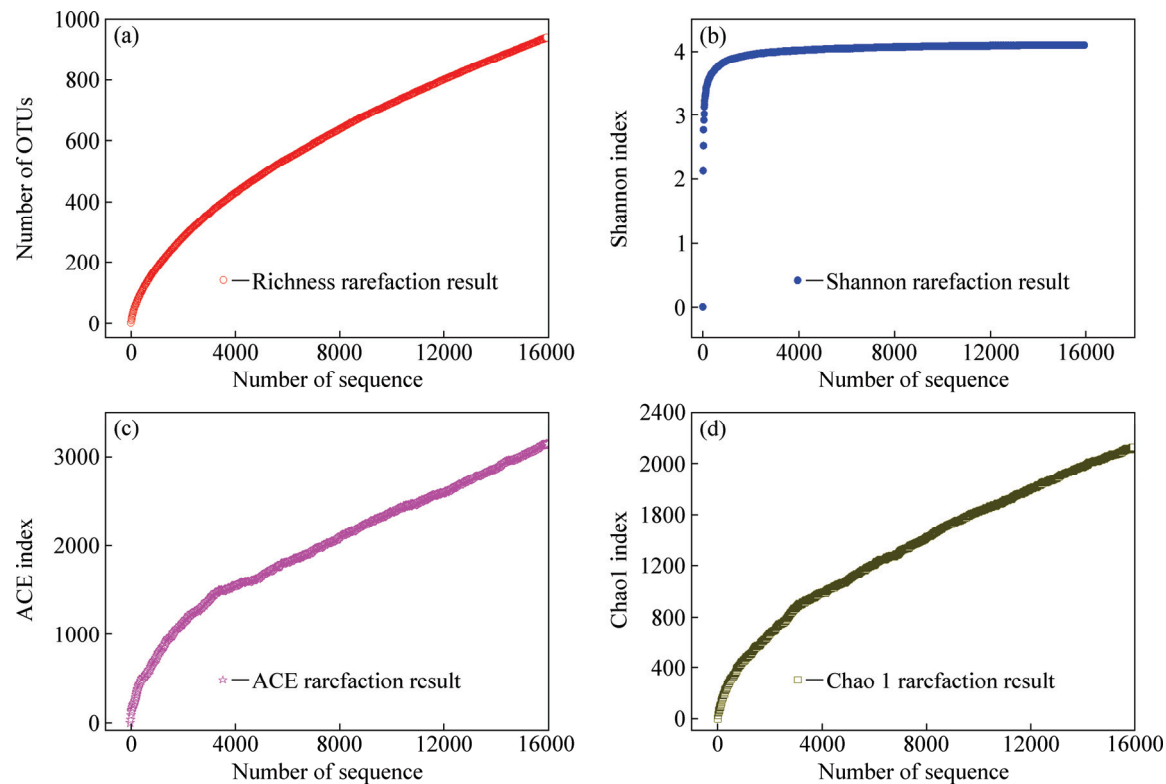


图 5 物种多样性分析图

Fig. 5 Results of microbial diversity: (a) Richness rarefaction chart; (b) Shannon rarefaction chart; (c) ACE rarefaction; (d) Chao1 rarefaction

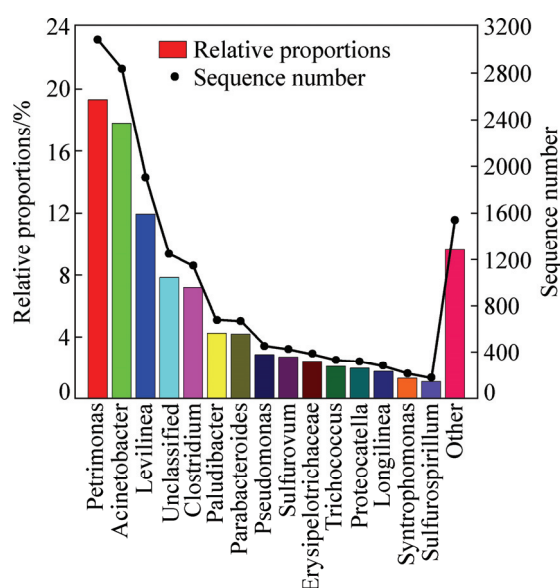


图6 Genus水平上物种丰度图

Fig. 6 Abundance of microbial species in genus level

研究发现 *Pseudomonas* 对铀具有很高的吸附固定效果, CHOUDHARY 等^[14]研究发现, 在 pH 为 4 的酸性条件下, 假单胞菌种 *Pseudomonas aeruginosa* 对铀的吸附容量达 275 mg/g(干细胞), 该菌种可以通过生物矿化作用去除 99% 的溶解性铀, 并能保持良好的生物活性, 显示其超强固铀除铀性能。

颗粒污泥中含有两种典型硫酸盐还原菌, 即 *Sulfurovum*(2.7%, 包含序列 430 条) 与 *Sulfurospirillum*(1.11%, 包含序列 177 条)。*Sulfurovum* 具有自养脱硫反硝化功能, HANDLEY 等^[15]进行了铀污染生物修复中的微生物群落结构分析, 发现 *Sulfurovum* 与其他硫酸盐还原菌丰度较高。*Sulfurospirillum* 属于微氧或兼性厌氧的革兰氏阴性细菌, 其广泛存在于活性污泥、沉积物、地下水及微生物电化学合成系统中, 目前, 已有个别菌种完成了全基因组测序^[16]。推测在本试验中, *Sulfurovum* 与 *Sulfurospirillum* 通过将硫酸根离子还原, 间接完成 U(VI) 的还原与固定。*Trichococcus*(明串珠菌属)所占比例为 2.1%, 包含序列 334 条。李于于^[17]进行砂岩型铀矿中铁素氧化还原相关细菌类群分析, 发现此类细菌的存在, 证明其与铁的氧化还原相关, 且能够适应铀存在环境。

除了典型铀还原固定菌属之外, 颗粒污泥还存在较多其他微生物菌属。排在首位的是 *Petrimonas*(理研菌属), 相对比例达到 19.33%, 包含序列数量 3081 条。*Petrimonas* 具有厌氧发酵产氢能力, SUN 等^[18]进行活性污泥微生物燃料电池群落结构解析时发现,

Petrimonas 与产甲烷菌是其中优势微生物, 负责产氢产甲烷过程。*Levilinea*(11.96%)和 *Longilinea*(1.77%)均属于绿弯菌门的厌氧绳菌纲(*Anaerolineae*), 曹新垵等^[19]通过厌氧活性污泥对工业废水中的苯进行生物处理, 发现微生物群落中 *Levilinea* 的存在; 王学华等^[20]研究处理印染废水的高效水解酸化 UASB 反应器内活性污泥菌群结构, 发现 *Levilinea*、长绳菌属(*Longilinea*)是其中优势菌属。这些研究结果表明: *Levilinea* 与长绳菌属(*Longilinea*)具有适应工业废水复杂环境的能力。

Paludibacter 和 *Parabacteroides* 菌属所占比例分别为 4.25%与 4.19%, 均属于拟杆菌门。拟杆菌是专性厌氧微生物, 研究资料表明, 拟杆菌属在纤维素降解过程中发挥着重要的作用^[21], 能发酵多种单糖和二糖产丙酸、乙酸和少量丁酸, 有些菌种还有厌氧发酵产氢作用。*Erysipelotrichaceae* 所占比例为 2.43%, 研究发现此菌种与乳酸代谢相关^[22], 由于颗粒污泥取自柠檬酸废水处理厌氧反应器中, 该类菌种可能负责将中间产物进行代谢。*Proteocatella* 属于专性厌氧菌, 在本试验中所占比例为 1.98%。黄龙^[23]研究碱和接种物对剩余污泥厌氧酸化及其微生物群落多样性的作用机理, 发现 *Proteocatella* 存在厌氧颗粒污泥中, 不能适应 pH 为 9 的碱性环境。*Syntrophomonas*(互营单胞菌)可以降解丁酸, 是厌氧发酵中常见的微生物, 在颗粒中所占比例为 1.34%。周轩宇^[24]进行了新型厌氧反应器处理造纸废水效能及功能菌群落分析, 发现 *Syntrophomonas* 为其中优势菌群, 所占比例最高时达到(20.76%±0.51%), 对造纸废水容积负荷波动表现出良好的抗冲击性。

由于颗粒污泥中含有许多未明确分类细菌(*Unclassified bacteria*), 所占比例 7.85%, 包含序列 1252 条。*Unclassified bacteria* 的序列与已有菌属相似性低, 单独列为一类, 是颗粒污泥群落结构的重要组成部分。另外, 将所有比例低于 1% 的菌属统一用 other 表示, 这些菌属之和所占比例为 9.6%, 序列之和为 1540 条。表示颗粒污泥中还含有大量的各类微生物菌属, 它们不属于优势菌群, 但与 *Unclassified bacteria* 一样, 它们对颗粒污泥群落结构的稳定及耐铀性能起到重要作用。另外, 对不同浓度铀浓度胁迫下微生物群落结构特性, 将在后续实验进行深入分析。

3 结论

1) U(VI)浓度在 2.4~9.6 mg/L, 随着 U(VI)浓度增

加,颗粒污泥去除 U(VI)的速率加快。在初始 U(VI)浓度为 9.6 mg/L、pH 为 6、投加湿污泥 2 g(w(VSS)=0.1 g)的条件下, U(VI)的去除率最高,达到 95.1%,剩余 U(VI)浓度最低,为 0.47 mg/L。

2) 环境扫描电镜(ESEM)结果显示:颗粒污泥中微生物以直径约 1 μm 的球形细菌为主,细胞表面光滑、形态均称、生长良好,相互形成团聚结构。能谱分析(EDS)也证明了细胞表面铀的存在。

3) 高通量测序得到 15939 条有效序列,可划分操作分类单元 939 个。样品文库覆盖率为 0.967, Shannon 指数、ACE 指数与 Chao1 指数分别为 4.099、3140.55 与 2122.53,反映颗粒污泥中微生物多样性与丰富度均较高。菌属分类显示,颗粒污泥中包含许多典型的铀还原固定菌属,如 *Acinetobacter*、*Clostridium*、*Pseudomonas*、*Sulfurovum*、*Sulfurospirillum* 及 *Trichococcus*,这是颗粒污泥具有高效除铀效果与耐铀性能的原因。

REFERENCES

- [1] 吴唯民, CARLEY J, WATSON D, 等. 地下水铀污染的原位微生物还原与固定: 在美国能源部田纳西橡树岭放射物污染现场的试验[J]. 环境科学学报, 2011, 31(3): 449–459.
WU Wei-min, CARLEY J, WATSON D, et al. Bioreduction and immobilization of uranium in situ: A case study at a USA Department of Energy radioactive waste site, Oak Ridge, Tennessee[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2011, 31(03): 449–459.
- [2] 彭国文, 丁德馨, 胡 南, 杨雨山, 王晓亮. 纳米 Fe_3O_4 负载啤酒酵母菌对铀的吸附性能与机理[J]. 中国有色金属学报, 2012, 22(2): 604–610.
PENG Guo-wen, DING De-xin, HU Nan, YANG Yu-shan, WANG Xiao-liang. Adsorption properties and mechanism of *saccharomyces cerevisiae* loaded by nano- Fe_3O_4 on uranium[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2012, 22(2): 604–610.
- [3] WILLIAMS K H, BARGAR J R, LLOYD J R, LOVLEY D R. Bioremediation of uranium-contaminated groundwater: A systems approach to subsurface biogeochemistry[J]. Curr Opin Biotechnol, 2013, 24(3): 489–497.
- [4] KENAROVA A, RADEVA G, TRAYKOV I, BOTEVA S. Community level physiological profiles of bacterial communities inhabiting uranium mining impacted sites[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 100(2): 226–232.
- [5] GAO D, LIU L, LIANG H, WU W M. Aerobic granular sludge: Characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment[J]. Crit Rev Biotechnol, 2011, 31(2): 137–152.
- [6] TAPIA-RODRIGUEZ A, LUNA-VELASCO A, FIELD J A, SIERRA-ALVAREZ R. Anaerobic bioremediation of hexavalent uranium in groundwater by reductive precipitation with methanogenic granular sludge[J]. Water Research, 2010, 44(7): 2153–2162.
- [7] 陈华柏, 谢水波, 刘金香, 肖拾红, 曾涛涛, 凌 辉, 王劲松. 厌氧颗粒污泥吸附铀(VI)的特性与机理[J]. 中国有色金属学报, 2014, 24(9): 2418–2425.
CHEN Hua-bai, XIE Shui-bo, LIU Jin-xiang, XIAO Shi-hong, ZENG Tao-tao, LING Hui, WANG Jin-song. Characteristics and mechanism of uranium(VI) absorbed by anaerobic granular sludge[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2014, 24(9): 2418–2425.
- [8] 谢水波, 陈 胜, 马华龙, 唐振平, 曾涛涛, 凌 辉, 吴宇琦. 硫酸盐还原菌颗粒污泥去除 U(VI)的影响因素及稳定性[J]. 中国有色金属学报, 2015, 25(6): 1713–1720.
XIE Shui-bo, CHEN Sheng, MA Hua-long, TANG Zhen-ping, ZENG Tao-tao, LING Hui, WU Yu-qi. Influence factors and stability of U(VI) removal by sulfate reducing bacteria granular sludge[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2015, 25(6): 1713–1720.
- [9] 谢水波, 马华龙, 唐振平, 凌 辉, 曾涛涛, 陈 胜, 王劲松. 微氧条件下硫酸盐还原菌颗粒污泥处理废水中铀(VI)的实验研究[J]. 原子能科学技术, 2015, 49(1): 26–32.
XIE Shui-bo, MA Hua-long, TANG Zhen-ping, LING Hui, ZENG Tao-tao, CHEN Sheng, WANG Jin-song. Study of U(VI) removal by sulfate reducing granular sludge under micro-aerobic condition[J]. Atomic Energy Science and Technology, 2015, 49(1): 26–32.
- [10] PENG X, GUO F, JU F, ZHANG T. Shifts in the microbial community, nitrifiers and denitrifiers in the biofilm in a full-scale rotating biological contactor[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(14): 8044–8052.
- [11] TYUPA D V, KALENOV S V, SKLADNEV D A, KHOKHLACHEV N S, BAURINA M M, KUZNETSOV A Y. Toxic influence of silver and uranium salts on activated sludge of wastewater treatment plants and synthetic activated sludge associates modeled on its pure cultures[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2015, 38(1): 125–135.
- [12] ISLAM E, SAR P. Culture-dependent and -independent molecular analysis of the bacterial community within uranium ore[J]. J Basic Microbiol, 2011, 51(4): 372–384.
- [13] ZHANG C, MALHOTRA S V, FRANCIS A J. Toxicity of ionic liquids to *Clostridium sp.* and effects on uranium biosorption[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 264(1): 246–253.

- [14] CHOUDHARY S, SAR P. Uranium biomineralization by a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from contaminated mine waste[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 186(1): 336–343.
- [15] HANDLEY K M, WRIGHTON K C, PICENO Y M, ANDERSEN G L, DESANTIS T Z, WILLIAMS K H, WILKINS M J, N'GUESSAN A L, PEACOCK A, BARGAR J, LONG P E, BANFIELD J F. High-density PhyloChip profiling of stimulated aquifer microbial communities reveals a complex response to acetate amendment[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2012, 81(1): 188–204.
- [16] MIURA T, UCHINO Y, TSUCHIKANE K, OHTSUBO Y, OHJI S, HOSoyAMA A, ITO M, TAKAHATA Y, YAMAZOE A, SUZUKI K, FUJITA N. Complete genome sequences of sulfurospirillum strains UCH001 and UCH003 isolated from groundwater in Japan[J]. *Genome Announc*, 2015, 3(2): 1–2.
- [17] 李于于. 砂岩型铀矿中铁素氧化还原相关细菌类群分析[D]. 西安:西北大学, 2013: 36.
- LI Yu-yu. Community structure of iron-oxidating bacteria and iron-reducing bacteria in sandstone uranium deposits[D]. Xi'an: Northwestern University, 2013: 36.
- [18] SUN R, ZHOU A, JIA J, LIANG Q, LIU Q, XING D, REN N. Characterization of methane production and microbial community shifts during waste activated sludge degradation in microbial electrolysis cells[J]. *Bioresour Technol*, 2014, 175(1): 68–74.
- [19] 曹新垲, 杨琦, 郝春博. 厌氧污泥降解苯动力学与生物多样性研究[J]. *环境科学*, 2012, 33(10): 3535–3541.
- CAO Xin-kai, YANG Qi, HAO Chun-bo. Degradation kinetics of naphthalene by anaerobic sludge and analysis of the bacterial biodiversity[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(10): 3535–3541.
- [20] 王学华, 黄俊, 宋吟玲, 黄勇, 李蕾. 高效水解酸化 UASB 活性污泥的菌群结构分析[J]. *环境科学学报*, 2014, 34(11): 2779–2784.
- WANG Xue-hua, HUANG Jun, SONG Yin-ling, HUANG Yong, LI Lei. Analysis on bacterial community structure in UASB reactor's sludge with hydrolysis acidification capacity of dyeing wastewater treatment process[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34(11): 2779–2784.
- [21] 吴俊妹, 马安周, 崔萌萌, 于清, 齐鸿雁, 庄绪亮, 庄国强. 降解纤维素产甲烷的四菌复合系[J]. *环境科学*, 2014, 35(1): 327–333.
- WU Jun-mei, MA An-zhou, CUI Meng-meng, YU Qing, QI Hong-yan, ZHUANG Xu-liang, ZHUANG Guo-qiang. Bioconversion of cellulose to methane by a consortium consisting of four microbial strains[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(1): 327–333.
- [22] JIANG J, NAKAYAMA J, SAKAMOTO N, 等. 454 pyrosequencing study on the basal microbiota of healthy asian youngsters[C]//第七届乳酸菌与健康国际研讨会暨第三届亚洲乳酸菌研讨会, 无锡: 中国科学技术学会, 2012: 2.
- JIANG J, NAKAYAMA J, SAKAMOTO N, et al. 454 pyrosequencing study on the basal microbiota of healthy asian youngsters[C]//The 7th International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Health & The 3rd Asian Symposium on Lactic Acid Bacteria Abstracts. Wuxi: Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012: 2.
- [23] 黄龙. 碱和接种物对剩余污泥厌氧酸化及其微生物群落多样性的作用机理[D]. 广州: 华南理工大学, 2014: 49–50.
- HUANG Long. Inoculation and alkali coefficient in volatile fatty acids production and microbial community shift in the anaerobic fermentation of waste activated sludge[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014: 49–50.
- [24] 周轩宇. 新型厌氧反应器处理造纸废水效能及功能菌群落分析[D]. 广州: 华南理工大学, 2014: 49–51.
- ZHOU Xuan-yu. Performance and functional bacteria community characteristics of a new anaerobic reactor treating papermaking wastewater[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014: 49–51.

Analysis of microbial community structure of uranium-resistant granular sludge

ZENG Tao-tao^{1,2}, LU Hui-zhen², LIU Ying-jiu², LIU Jin-xiang², RONG Li-shan², MA Hua-long², XIE Shui-bo^{2,3}

(1. Postdoctoral Research Centre of Mining Engineering, University of South China, Hengyang 421001, China;

2. Hunan Province Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse Technology,
University of South China, Hengyang 421001, China;

3. Key Discipline Laboratory for National Defence for Biotechnology in Uranium Mining and Hydrometallurgy,
University of south China, Hengyang 421001, China)

Abstract: Anaerobic granular sludge was used for uranium removal under various U (VI) concentrations (2.4–12 mg/L). The environmental scanning electron microscope (ESEM) and high throughput sequencing were carried out for microbial community structure analysis. The results show that the maximum uranium removal rate of 95.1% is achieved under the conditions of initial U(VI) concentration of 9.6 mg/L, pH value of 6 and wet sludge of 2g (the volatile suspended solid concentration is 0.1g). ESEM results show that the spherical bacteria with diameters of 1 μm is the dominant microorganisms in granular sludge. The energy dispersive spectrum (EDS) proves the existence of uranium in the cell surface. The total dataset comprises 15939 high quality sequences, which can be divided into 939 operational taxonomic units. There are high microbial diversity and abundance in the granular sludge as the library coverage is 0.967, and the Shannon index, ACE index and Chao1 index are 4.099, 3140.55 and 2122.53, respectively. Genus classification indicates that there are many typical uranium-reducing or precipitated bacteria, such as *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Sulfurovum*, *Sulfurospirillum* and *Trichococcus*, which contributes to high efficiency of uranium removal and uranium-resistant property in the granular sludge.

Key words: uranium-resistant property; granular sludge; microbial community; high throughput sequencing

Foundation: Projects (51408293, 11475080) supported by the National Natural Science Foundation of China; Project (2014M562114) supported by the China Postdoctoral Science Foundation; Project (14B154) supported by the Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department, China; Project (2014SBH01) supported by the Postdoctoral Foundation of Hunan Province, China; Project (2013XQD10) supported by the Research Fund for Doctoral Program of University of South China, China

Corresponding author: XIE Shui-bo; Tel: +86-734-8281603; E-mail: xiesbmr@263.net

(编辑 李艳红)