



中华人民共和国国家标准

GB/T 39303—2020

废水处理系统微生物样品前处理 通用技术规范

General technical specification for pre-treatment of microorganism
samples in wastewater treatment system

2020-11-19 发布

2021-10-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国石油和化学工业联合会提出。

本标准由全国化学标准化技术委员会(SAC/TC 63)归口。

本标准起草单位:南京大学、南京大学宜兴环保研究院、南京江岛环境科技研究院有限公司、中海油天津化工研究设计院有限公司、蓝保(厦门)水处理科技有限公司、东莞理工学院、国网天津市电力公司电力科学研究院、石家庄给源环保科技有限公司、珠海京工检测技术有限公司。

本标准主要起草人:任洪强、何席伟、张徐祥、白莹、吕奋勇、牛军峰、苏展、耿金菊、李永广、王庆、王磊、吴兵。



废水处理系统微生物样品前处理 通用技术规范

1 范围

本标准规定了废水处理系统中微生物样品的现场处理、微生物菌种分离与保藏、微生物样品宏基因组 DNA 提取以及微生物样品的保存。

本标准适用于采用生物处理工艺(活性污泥法工艺和生物膜法工艺)的废水处理系统中微生物样品的现场处理、提取与保存。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

HJ 91.1 污水监测技术规范

SN/T 2632 微生物菌种常规保藏技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微生物样品 microorganism samples

已培养或已提取纯化的,可直接应用于分析研究的各种菌株(包括细菌、真菌、放线菌等)、DNA 等遗传物质;以及包含上述菌株和遗传物质的废水处理系统中的进出水样品、活性污泥样品、生物膜样品等。

3.2

前处理 pre-treatment

在开展废水处理系统微生物研究工作之前对采集的各种微生物样品所进行的各种处理。

3.3

宏基因组 metagenome

不经菌株分离筛选步骤,直接从环境样品中提取的遗传物质(DNA 或 RNA),包含了样品中所有微生物的遗传信息。

[GB/T 30744—2014,定义 3.1.6]

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethylammonium bromide)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid)

LB:肉汤培养基(Luria-bertani)

OD:光密度(Optical density)

RNase A:核糖核酸酶 A

SDS:十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate)

TE:Tris-HCl 和 EDTA-2Na 配成的缓冲液

Tris:三羟甲基氨基甲烷(2-Amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol)

16S rRNA 基因:细菌染色体上编码核糖体 RNA 16S 亚基的基因

18S rRNA 基因:真核生物染色体上编码核糖体 RNA 18S 亚基的基因

5 试剂或材料

5.1 本标准所用试剂和水,除非另有规定,应使用分析纯试剂和电阻率大于 $18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 的超纯水。

5.2 无水乙醇。

5.3 异丙醇。

5.4 盐酸溶液:1 mol/L。量取 83 mL 盐酸,缓慢加入 917 mL 水中,混匀。

5.5 氢氧化钠溶液:40 g/L。

5.6 重铬酸钾溶液:5 g/L。

5.7 SDS 溶液:100 g/L。

5.8 生理盐水:称取 9 g NaCl,溶于 1 L 水中。混匀后在高压灭菌锅中 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min(简称灭菌处理)。

5.9 乙醇溶液:50%。

5.10 乙醇溶液:75%。

5.11 1/3 000 孟加拉红溶液(玫瑰红水溶液):称取 1 g 孟加拉红溶解于 3 L 水中。

5.12 链霉素溶液:0.3 g/L。

5.13 Tris-HCl 贮液:1 mol/L。称取 121.14 g Tris,溶解于 800 mL 水中,用盐酸溶液调节 pH 值至 8.0,加水稀释至 1 L。

5.14 Tris-HCl 溶液:移取 10.00 mL Tris-HCl 贮液置于 1 L 容量瓶中,用水稀释至刻度。

5.15 DNA 抽提缓冲液:称取 37.3 g EDTA-2Na、17.8 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、15.6 g 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、87.8 g 氯化钠和 10 g CTAB,溶解于 700 mL 水中,加入 100 mL Tris-HCl 贮液,用盐酸溶液和氢氧化钠溶液调节 pH 值至 8.0,加水稀释至 1 L 后灭菌处理。

5.16 TE 溶液:称取 0.373 g EDTA-2Na,溶解于 800 mL 水中,加入 10 mL Tris-HCl 贮液,用氢氧化钠溶液调节 pH 值为 8.0,加水稀释至 1 L 后灭菌处理。

5.17 酚-氯仿-异戊醇溶液:将 500 mL Tris 饱和酚、480 mL 氯仿和 20 mL 异戊醇溶液混合均匀,贮存于棕色玻璃瓶中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可保存两周。

5.18 LB 培养基:称取 10 g 蛋白胨,5 g 酵母膏,10 g 氯化钠,18 g 琼脂粉溶解于 1 L 水中,混匀后灭菌处理。

5.19 高氏一号培养基:称取 20 g 可溶性淀粉,1 g 硝酸钾,0.5 g 磷酸氢二钾,1 g 硫酸镁($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、0.01 g 硫酸亚铁,溶解于 1 L 水中,用氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.2~7.4。加入 10 mL 重铬酸钾溶液,再加入 18 g 琼脂粉,混匀后灭菌处理。

5.20 马丁氏培养基:称取 10 g 葡萄糖,5 g 蛋白胨,1 g 磷酸二氢钾,0.5 g 硫酸镁($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$),溶解于 800 mL 水中,加入 100 mL 1/3 000 孟加拉红溶液,再加入 18 g 琼脂粉,混匀后灭菌处理。冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,加入 100 mL 链霉素溶液,混匀。

5.21 溶菌酶贮液:10 g/L。称取 1 g 溶菌酶,溶解于 100 mL Tris-HCl 溶液。于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

5.22 RNase A 贮液:10 g/L。称取 1 g RNase A,0.09 g NaCl,溶解于 100 mL 预先用盐酸溶液调节

pH 值至 7.5 的 Tris-HCl 溶液,于 100 ℃加热 15 min,按每管 1 mL 分装,于-20 ℃保存。

5.23 无菌滤膜:直径 47 mm,孔径为 0.22 μm 或 0.45 μm 的混合纤维素酯滤膜。

5.24 离心管:材质为聚丙烯。

6 仪器设备

6.1 真空泵:真空度大于或等于-80 kPa,空载流量大于或等于 20 L/min。

6.2 砂芯过滤器:滤头直径为 50 mm,接收瓶体积为 500 mL~1 000 mL 的砂芯过滤器。

6.3 超低温冰箱:最低保存温度为-80 ℃。

6.4 高速冷冻离心机:配有 50 mL 离心管。温度调节范围 4 ℃~20 ℃,转速 0 r/min~18 000 r/min。

6.5 振荡培养箱:温度调节范围 0 ℃~60 ℃,转速 0 r/min~300 r/min。

6.6 生化培养箱:温度调节范围 0 ℃~60 ℃。

6.7 高压灭菌锅:温度可升至 121 ℃,压力可维持 0.1 MPa~0.15 MPa。

6.8 超净工作台:洁净度级别 100 级。

6.9 恒温水浴锅:温度调节范围室温~99 ℃。

6.10 光学显微镜:放大倍数 40×~2 000×。

6.11 微量移液枪:100 μL~1 000 μL。

6.12 涡旋仪:转速 0 r/min~3 000 r/min。

6.13 超微量紫外分光光度计:波长范围 200 nm~850 nm。

7 样品的现场处理

7.1 一般规定

7.1.1 样品的现场处理包括样品的分装、固定与现场保存,样品包括水样、活性污泥样品以及生物膜样品。

7.1.2 采样前应了解废水处理系统的处理工艺、废水类型和废水排放规律等情况,并按 HJ 91.1 的规定进行采样。

7.1.3 用于分样和装样的器具均应灭菌处理,如现场条件无法实现,应用 75%乙醇溶液擦拭后使用。

7.2 水样的现场处理

7.2.1 用于菌种分离的水样处理

将无菌滤膜置于砂芯过滤器内,使用真空泵对水样进行抽滤。滤膜的过水量视水样的浑浊程度而定,通常进水水样每张滤膜的过水量为 50 mL~200 mL,出水水样每张滤膜过水量为 500 mL~1 000 mL;水样过滤应于 2 h 内完成。过滤后,将滤膜放入 50 mL 离心管中,于 1 ℃~5 ℃保存。

7.2.2 用于宏基因组 DNA 提取的水样处理

7.2.2.1 按 7.2.1 操作将水样进行过滤处理,过滤后,将滤膜放入 50 mL 离心管中,于-20 ℃保存。

7.2.2.2 若水样不能进行现场过滤,应将水样置于 1 ℃~5 ℃保存,并于 24 h 内带回实验室进行过滤处理。

7.3 活性污泥样品的现场处理

7.3.1 用于镜检或菌种分离的活性污泥样品处理

将采集的泥水混合物静置 5 min~15 min 至泥水产生明显分层,弃去上层清液,将下层活性污泥装

入 50 mL 离心管中,于 1℃~5℃ 保存。

7.3.2 用于宏基因组 DNA 提取的活性污泥样品处理

7.3.2.1 将采集的泥水混合物静置 5 min~15 min 至泥水产生明显分层,弃去上层清液,将下层活性污泥装入 50 mL 离心管中,于-20℃ 保存。

7.3.2.2 若现场无法进行-20℃ 保存,可在装有活性污泥的离心管中加入等体积的无水乙醇进行固定后于 1℃~5℃ 保存。

7.4 生物膜样品的现场处理

7.4.1 用于镜检或菌种分离的生物膜样品处理

7.4.1.1 用铲子或刀片等工具将生物膜从反应器内的填料(主要见于移动床生物膜反应器工艺、生物接触氧化工艺、生物滤池工艺等)、生物转盘(主要见于生物转盘工艺)或滤膜(主要见于膜生物反应器工艺)表面刮下,装入 50 mL 离心管中,于 1℃~5℃ 保存。

7.4.1.2 对于难以刮取的填料附着型生物膜样品,直接采集其附着的部分填料装入聚丙烯采样瓶中(采样瓶规格可视填料尺寸而定),于 1℃~5℃ 保存。

7.4.2 用于宏基因组 DNA 提取的生物膜样品处理

7.4.2.1 用铲子或刀片等工具将生物膜从反应器内的填料、生物转盘或滤膜表面刮下,装入 50 mL 离心管中,于-20℃ 保存。

7.4.2.2 对于难以刮取的填料附着型生物膜样品,直接采集其附着的部分填料装入聚丙烯采样瓶中(采样瓶规格可视填料尺寸而定),于-20℃ 保存。

7.4.2.3 若现场无法进行-20℃ 保存,可在装有生物膜的离心管或装有填料的采样瓶中加入 50%乙醇溶液,将生物膜或填料浸没、固定,于 1℃~5℃ 保存。

7.5 数据记录

将采样时间、地点、样品类型、工艺类型、采样方式、处理方式、样品体积、保存方式等参数记录于废水处理系统微生物样品现场处理记录表(参见附录 A 中表 A.1)。

8 菌种分离与保藏

8.1 一般规定

8.1.1 菌种分离是指从所采集的水样、活性污泥以及生物膜样品中分离微生物菌株,包括细菌、放线菌、真菌。

8.1.2 进行微生物菌种分离应选用 1℃~5℃ 保存的未经固定的样品。

8.1.3 菌种分离与保藏工作应在无菌条件下进行,所用的离心管、枪头、配制的溶液均应灭菌处理,冷却后使用。

8.1.4 细菌的分离筛选采用 LB 培养基;放线菌的分离筛选采用高氏一号培养基;真菌的分离筛选采用马丁氏培养基。

8.2 微生物的分离培养

8.2.1 分离培养样品前处理

8.2.1.1 含菌滤膜的前处理:取经 7.2.1 处理而得的含菌滤膜一张,在超净工作台中剪碎装入 50 mL 离

心管中,加入 20 mL 生理盐水使其浸没,在涡旋仪上振荡 1 min 制成菌悬液,除去滤膜,取 10 mL 菌悬液待用。

8.2.1.2 活性污泥的前处理:取 1 mL 经 7.3.1 处理而得的活性污泥,用生理盐水稀释到 10 mL,在涡旋仪上振荡 30 s 使其混匀后待用。

8.2.1.3 生物膜的前处理:对于从填料或生物转盘上刮下的生物膜,取 1 mL 经 7.4.1.1 处理而得的生物膜,用生理盐水稀释到 10 mL,在涡旋仪上振荡 30 s 使其混匀后待用。对于附着于填料上的生物膜,取 10 g 经 7.4.1.2 处理而得的填料放入三角瓶中(三角瓶体积视填料尺寸而定),加入生理盐水使其浸没,在 250 r/min 的振荡培养箱振荡 2 min 制成菌悬液,取 10 mL 菌悬液待用。

8.2.2 菌种的分离

8.2.2.1 取 1 mL 8.2.1 制得的菌悬液,用生理盐水稀释到 10 mL,制成 10^{-1} 样品稀释液,振荡均匀。

8.2.2.2 取 1 mL 8.2.2.1 制得的菌悬液,用生理盐水稀释到 10 mL,制成 10^{-2} 样品稀释液,振荡均匀。

8.2.2.3 按上述步骤依次稀释成 $10^{-3} \sim 10^{-9}$ 的样品稀释液,振荡均匀。

8.2.2.4 取各梯度样品稀释液 100 μ L 分别涂布于培养基平板上,LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 2 d \sim 3 d,高氏一号培养基 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 3 d \sim 5 d,马丁氏培养基 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 5 d \sim 7 d,观察菌落生长情况。

8.2.2.5 将长出的单菌落分别转接到新的相同培养基平板上,并做好相应的记号,于相同温度下继续培养。

8.2.2.6 将平板上长出的单菌落多次划线分离培养,根据平板上的菌落形态和颜色,辅以镜检检测,直至获得纯的单菌落。

8.2.2.7 对获得的单菌落,通过比较细菌和放线菌的 16S rRNA 基因序列,或真菌的 18S rRNA 基因序列,进行菌种鉴定,排除重复的菌株。

8.3 菌种保藏

按照 SN/T 2632 操作。

8.4 数据记录

将所分离的菌株来源、种属、培养条件、保存方式等相关参数记录于废水处理系统微生物分离鉴定记录表(参见表 A.2)。



9 微生物样品宏基因组 DNA 提取与保存

9.1 一般规定

9.1.1 进行宏基因组 DNA 提取应选用 -20° C 保存的样品,或经乙醇固定的样品。

9.1.2 宏基因组 DNA 提取过程中,所用的离心管、枪头、配制的溶液均应灭菌处理,冷却后使用。

9.1.3 用微量分光光度计测定 DNA 溶液的浓度和纯度,宏基因组 DNA 应达到的质量标准: OD_{260}/OD_{280} 的比值在 1.8 \sim 2.0 之间,且 OD_{260}/OD_{230} 的比值大于 2.0。

9.2 宏基因组 DNA 提取样品前处理

9.2.1 含菌滤膜前处理:取经 7.2.2 处理而得的含菌滤膜二至四张,在超净工作台用灭菌剪刀将含菌滤膜剪成碎片,浸泡于装有生理盐水的 50 mL 离心管中,充分振荡制成菌悬液,除去滤膜,菌悬液经 8 000 r/min 离心分离 10 min 后弃去上层清液,沉淀用于宏基因组 DNA 提取。

9.2.2 活性污泥前处理:将经 7.3.2 处理的活性污泥于 8 000 r/min 下离心分离 2 min,弃去上层清液,

沉淀用于宏基因组 DNA 提取。

9.2.3 生物膜前处理:对于从填料或生物转盘上刮下的生物膜,若经过固定,则将混合物于 8 000 r/min 下离心分离 10 min,弃去上层清液,沉淀用于宏基因组 DNA 提取,未经固定的生物膜可直接用于宏基因组 DNA 提取;对于填料附着型生物膜,将填料浸泡于装有生理盐水的三角瓶中,振荡制成菌悬液,于 8 000 r/min 下离心分离 10 min 后弃去上层清液,沉淀用于宏基因组 DNA 提取。

9.3 宏基因组 DNA 提取

9.3.1 向经 9.2 处理的样品中加入 5 mL DNA 抽提缓冲液,混匀,在振荡培养箱中于 37 ℃,200 r/min 条件下振荡 30 min。

9.3.2 加入 1 mL TE 溶液和 0.5 mL 溶菌酶贮液,继续振荡 30 min,加入 0.5 mL SDS 溶液,于 65 ℃水浴 30 min 后,6 000 r/min 离心分离 10 min,将上层清液转移至新的离心管中。

9.3.3 向沉淀中加入 5 mL DNA 抽提缓冲液和 0.5 mL SDS 溶液,于 65 ℃水浴 10 min,6 000 r/min 下离心分离 10 min,将上层清液与 9.3.2 中的上清液合并于同一离心管中。

9.3.4 重复 9.3.3 步骤,将上层清液与 9.3.2 中的上清液合并于同一离心管中。

9.3.5 测量合并后的上层清液体积,加入 RNase A 贮液至其终浓度为 200 μg/mL,于 37 ℃水浴 15 min。

9.3.6 加入等体积的酚-氯仿-异戊醇溶液,轻轻摇匀,13 000 r/min 下离心分离 15 min,将上层水相移入新的离心管中,加入等体积的异丙醇,于-20 ℃中沉淀 1 h 后,于 4 ℃下 13 000 r/min 离心分离 10 min,弃去上层清液。

9.3.7 向沉淀中加入 200 μL 无水乙醇,放置 3 s~5 s 后弃去无水乙醇,再重复一次,然后将沉淀物放置于超净工作台吹干,加入 50 μL TE 溶液溶解沉淀物,即为 DNA 溶液。

注 1:宏基因组 DNA 也可采用商用试剂盒进行提取。

注 2:若提取的 DNA 质量达不到 9.1.3 中的要求,可采用商用试剂盒进行纯化,或重新提取。

9.4 微生物样品保存

9.4.1 水样按 7.2.2 或 9.2.1 处理后,将含菌滤膜或沉淀于-20 ℃或-80 ℃保存。

9.4.2 活性污泥和生物膜样品分别按 9.2.2 和 9.2.3 处理后,于-20 ℃或-80 ℃保存。

9.4.3 DNA 样品保存前应分装多份,于-20 ℃或-80 ℃保存,避免反复冻融。

9.5 数据记录

将所提取的微生物样品种类、DNA 浓度、纯度、保存方式等相关参数记录于废水处理系统微生物样品宏基因组 DNA 记录表(参见表 A.3)。



附 录 A
(资料性附录)

废水处理系统微生物样品前处理记录表

表 A.1～表 A.3 给出了废水处理系统微生物样品现场处理、菌种分离、宏基因组 DNA 提取记录表格式。

表 A.1 废水处理系统微生物样品现场处理记录表

第 页 共 页				
时间：				
地点：				
废水处理厂名称：				
工艺类型：				
样品编号				
采样位点				
样品类型				
采样方式				
样品体积				
处理方式				
保存方式				
备注				
采样人				
记录人				
校对入				

表 A.2 废水处理系统微生物分离鉴定记录表

第 页 共 页				
样品编号				
菌株编号				
菌株种属				
菌株来源				
培养基				
培养温度				
分离日期				
保存方式				
备注				
操作人				
校对入				

表 A.3 废水处理系统微生物样品宏基因组 DNA 提取记录表

第 页 共 页				
样品编号				
DNA 编号				
样品类型				
DNA 浓度				
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀				
OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀				
提取日期				
保存方式				
备注				
操作人				
校对入				

参 考 文 献

- [1] GB/T 30744—2014 深海微生物样品前处理技术规范
-



