

利用 FISH 和 DGGE 对产甲烷颗粒污泥中微生物种群的研究

邢薇, 左剑恶, 孙寓姣, 李建平

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要: 利用 FISH 和 DGGE 技术对厌氧反应器内处于不同运行阶段的 4 个产甲烷颗粒污泥进行研究, 考察其中真细菌和古细菌的种群结构, 并对其中的优势古细菌进行系统发育分析. FISH 结果表明, 颗粒污泥中真细菌含量明显高于古细菌, 真细菌主要分布在颗粒污泥外层, 古细菌则主要分布在内层; DGGE 结果表明, 随着反应器 COD 负荷的增加以及运行时间的延长, 真细菌种群结构相对较稳定, 而古细菌种群结构则发生了较明显变化, 其中占优势的古细菌种类逐渐减少; 将有代表性的 7 个古细菌条带切胶回收并测序, 结果显示, 反应器运行后期占优势的菌种主要包括甲烷微粒菌 (*Methanocorpusculum*)、甲烷杆菌 (*Methanobacterium*) 和甲烷髯毛菌 (*Methanosaeta*) 等.

关键词: 产甲烷颗粒污泥; 微生物种群; 荧光原位杂交 (FISH); 变性梯度凝胶电泳 (DGGE); 产甲烷菌

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)11-2268-05

Study on Microbial Community in Methanogenic Granular Sludge by FISH and DGGE

XING Wei, ZUO Jian'e, SUN Yur-jiao, LI Jian-ping

(Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Four methanogenic granules taken from an anaerobic reactor in different periods were investigated by FISH and DGGE, the eubacterial and archaeal community in these granules was researched and the phylogenetic analysis of dominant archaea was also studied. The FISH results indicated that the quantity of eubacteria was much more than archaea in the methanogenic granule and most eubacteria were located in the out layer of granule, while most archaea were located in the inner layer. The DGGE fingerprints indicated that as the organic loading rate of the reactor increased and the operating time elapsed, the eubacterial community was kept stable relatively, while the archaeal community was changed significantly, which resulted in the gradual decrease of the archaeal varieties. As seven typical bands were cut and sequenced, the results indicated that the dominant species of archaea in granule of the last period were *Methanocorpusculum*, *Methanobacterium*, *Methanosaeta*, and etc.

Key words: methanogenic granule; microbial community; FISH; DGGE; methanogen

产甲烷颗粒污泥是厌氧高效反应器稳定运行的基础和关键, 目前, 已有很多学者对其形成机理、微观结构和微生物种群进行了研究^[1~3]. 但以往对厌氧污泥中微生物种群的研究主要是采用电镜观察、培养基培养和计数等传统方法, 这些方法由于自身固有的局限性难以进行准确深入的研究^[4]. 分子生物学方法能够克服传统方法的缺陷, 近年来被广泛应用于微生物种群的研究中^[5~7], 国内学者也运用这些技术研究了好氧和厌氧活性污泥的微生物种群, 并取得了一定成果^[8~10]. 产甲烷颗粒污泥的结构较特殊且其中古细菌与真细菌共存, 利用分子生物技术对其微生物种群进行全面研究的报道相对较少. 本实验以厌氧产甲烷反应器内不同运行阶段的颗粒污泥作为研究对象, 利用荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术研究样品中真细菌和古细菌的相对数量和空间分布, 利

用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术比较了不同样品中真细菌与古细菌种群结构的差异, 通过对古细菌 DGGE 图谱中条带的切胶回收, 获得优势古细菌的序列信息, 进而进行系统发育分析, 并根据反应器的工艺条件对研究结果进行了讨论和分析.

1 材料与方法

1.1 污泥样品来源

试验中产甲烷颗粒污泥样品取自本实验室内的小试厌氧反应器, 反应器为有机玻璃制成, 总体积 15L. 接种污泥为处理实际淀粉废水的 EGSB 内

收稿日期: 2005-12-07; 修订日期: 2006-01-19

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA601190)

作者简介: 邢薇(1982~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为废水厌氧生物处理技术.

的颗粒污泥. 试验进水为葡萄糖自配水, 按 COD: N: P 约为 400: 2.5~ 5: 1 的比例投加尿素和磷酸二氢钾, 反应器内 pH 值控制在 6.8~ 7.2 之间, 温度在 35℃ 左右.

在反应器启动与稳定运行的过程中, 每隔一定时间从反应器底部取出泥样, 共取得 4 个产甲烷颗粒污泥样品, 其中样品 A: 启动后第 1d 取得, 即接种污泥; 样品 B: 运行 25d 后取得, 反应器的 COD 负荷约为 20 kg/(m³·d); 样品 C: 运行 75d 后取得, 反应器 COD 负荷为 35 kg/(m³·d); 样品 D: 反应器停止运行 1 个月后, 重新启动运行 45d 后取得, COD 负荷重新恢复至 35 kg/(m³·d).

1.2 荧光原位杂交(FISH)

采集污泥样品后, 立即用 4% 多聚甲醛溶液固定, 待 PBS 缓冲液洗涤后, 于 PBS 缓冲液和 100% 乙醇两者的等体积混合液中在 -20℃ 下保存, 再利用石蜡包埋切片技术进行处理.

采用 CY3(红色) 标记的 EUB338 探针和 FITC(绿色) 标记的 ARC915 探针, 其序列见表 1. 对上述预处理后的颗粒污泥样品进行双重原位杂交, 杂交温度为 46℃, 杂交甲酰胺浓度分别为 25% 和 35%. 同时利用 DAPI(4P, 6-diamidino-2-phenylindole) 染色作为泥样中所有微生物的背景, 在 Olympus 激光共聚焦显微镜上扫描成像观察.

表 1 FISH 探针序列

Table 1 Primers of FISH

细菌	FISH 探针	序列 ^[11]
真细菌	EUB338	5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3'
古细菌	ARC915	5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3'

1.3 总 DNA 提取

采用滚珠振荡机械破碎法^[12] 提取, 将颗粒污泥放入磨砂滚珠离心管中, 加 CTAB 充分振荡, 再用 fastprep 振荡破碎仪(Bio-Rad 公司) 振荡 1min; 样品破碎后, 采用溶菌酶蛋白酶 K 水解, Tris-饱和酚抽提与异丙醇沉淀分离提取 DNA; 最后采用 DNA 纯化试剂盒 A014(鼎国公司) 进行纯化.

1.4 PCR 扩增

使用 PTC-200 扩增仪(MJ 公司) 进行 PCR 扩增, 扩增对象为 16S-rDNA 的 V2-V3 可变区. 对于真细菌, 引物为 PRBA8F 与 PRUN518R; 对于古细菌, 引物为 PARC109F 与 PRUN518R; 其序列见表 2, 为提高 DGGE 分辨效率, 在 PRUN518R 的 5' 端加 GC 卡.

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Probes of PCR

细菌	PCR 引物	序列 ^[13, 14]
真细菌	PRBA8F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
	PRUN518R	5'-ATTACCGCGGCTGC TGG-3'
古细菌	PARC109F	5'-ACKGCTCAGTAACACGT-3'
	PRUN518R	5'-ATTACCGCGGCTGC TGG-3'

PCR 反应体系中各物质最终浓度如下: 10 × PCR 缓冲液 10%, MgCl₂ 溶液 1.5 mmol/L, dNTP 200 μmol/L, 引物各 0.5 μmol/L, 模板 5 ng/μL, Taq DNA 聚合酶 0.025 U/μL. 对于真细菌, 按照 94℃ 变性 1min, 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min 循环 25 次; 对于古细菌, 除退火温度为 55℃ 外, 其它条件均与上述相同.

1.5 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

在 Dcode 系统(Bio-Rad 公司) 上进行 DGGE 分析, 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 真细菌和古细菌的变性剂浓度范围分别是 35% ~ 50% 和 30% ~ 50%, 在 1 × TAE 缓冲液中, 以 120V 电压, 60℃ 恒温电泳 5 ~ 6 h. 电泳后, 以 1 × SYBR Gold (Invitrogen 公司) 染色, 用 GSD 8000 成像系统(UVP 公司) 进行结果观察和照相. 以 Phoretix 1D 软件(Nonlinear 公司) 对 DGGE 图谱进行分析, 考察样品之间的微生物种群的相似性, 并绘制相似性分析图.

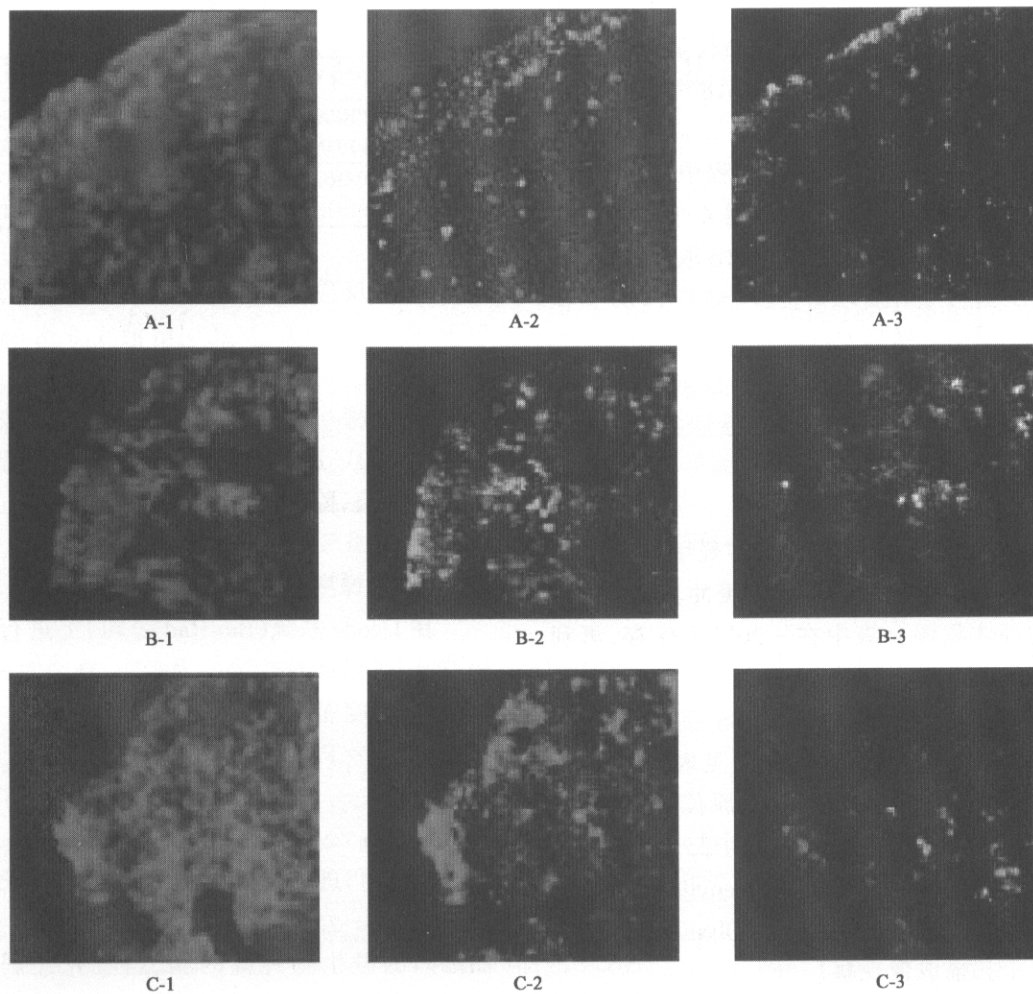
1.6 测序及系统发育分析

将 DGGE 图谱中亮度较明显的条带切下, 按前述的 PCR 体系和条件再次进行扩增, 扩增产物送北京诺赛基因公司纯化测序. 登陆 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), 将测序结果与数据库中的已知序列进行比对, 并提交序列. 利用 MEGA3 软件, 以邻接法(Neighbor-Joining, NJ) 绘制系统发育树.

2 结果与讨论

2.1 利用 FISH 对颗粒污泥中真细菌和古细菌种群的相对数量和空间分布的研究

对前 3 个污泥样品进行 FISH 实验, 结果如图 1. 在样品 A、B、C 中真细菌含量均明显高于古细菌; 真细菌主要分布在颗粒污泥外层, 古细菌主要分布在内层, 而颗粒中心则基本未表现出生物活性; 且随着反应器 COD 负荷的增加以及运行时间的延长, 古细菌的数量相应略有增加, 其分布更趋向于颗粒污泥的中心区域.



样品 A 为接种污泥; 样品 B 为运行第 25d 时的颗粒污泥; 样品 C 为运行第 75d 时的颗粒污泥; 1 为 DAPI 背景染色; 2 为真细菌探针 Eub338-CY3 杂交结果; 3 为古细菌探针 Arc915-FITC 杂交结果

图 1 3 个产甲烷颗粒污泥样品中真细菌与古细菌的 FISH 图

Fig. 1 FISH results of eubacteria and archaea in the former three methanogenic granules

在产甲烷颗粒污泥中, 水解菌、发酵产酸菌以及产氢产乙酸菌等真细菌并不是十分严格的厌氧细菌, 且通常这些真细菌直接吸收和利用原废水中的有机基质, 所以这些细菌通常会生长分布在颗粒污泥的外层; 而颗粒污泥中主要的古细菌是其中的产甲烷细菌, 它们是严格的厌氧细菌, 且利用真细菌的代谢产物, 因此, 在 3 个样品中, 古细菌均分布在颗粒污泥的内层; 同时, 厌氧反应器的启动过程实际上主要就是产甲烷菌的培养过程, 随着 COD 负荷的逐渐提高以及运行时间的延长, 古细菌的相对数量逐渐增多。

2.2 利用 PCR-DGGE 对颗粒污泥中真细菌种群结构的研究

对 4 个颗粒污泥样品同时进行总 DNA 提取、纯化, 经过 PCR 扩增后再进行 DGGE 分析, 最终得

到其中真细菌的 DGGE 图谱, 如图 2 所示, 利用 Phoretix1D 软件对真细菌的 DGGE 图谱进行相似性分析, 如图 3 所示。

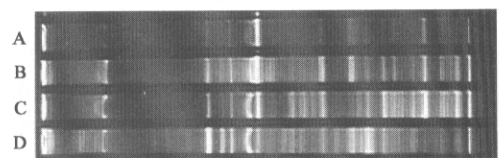


图 2 4 个产甲烷颗粒污泥样品中真细菌的 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE fingerprint of eubacteria in four methanogenic granules

一般认为, 在 DGGE 图谱上, 每一条带代表某种特定的微生物, 且亮度相对大的条带代表样品中的优势微生物。因此, 图 2 表明, 与接种污泥 A 相比, 在小试反应器中运行不同时间后的样品 B、C 和 D 中真细菌的种类和优势菌种均发生了一定的变

化;且样品 B 与 C 的真细菌种群结构基本相似;而样品 D 与 B、C 相比又有一定的差异.图 3 也表明类似的结果,样品 A 与 B、C 和 D 的真细菌种群相似性均较低;样品 B 与 C 的真细菌种群相似性高达 83%;而样品 D 与 B、C 的真细菌种群相似性又有所降低.

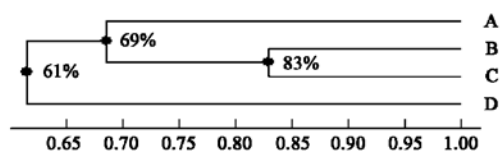


图 3 4 个产甲烷颗粒污泥样品中真细菌的相似性分析

Fig. 3 Similarity analysis of eubacteria in four methanogenic granules

与古细菌相比,真细菌生长迅速,易于死亡.接种污泥在接种之前已在常温、半封闭状态下放置了 2 个月左右,待反应器运行后,真细菌的活性逐渐恢复,故接种污泥与小试反应器运行后的样品之间,真细菌种群相似性较低;随着反应器稳定的运行,颗粒污泥中真细菌的种群结构没有因为 COD 负荷的增加以及运行时间的延长发生显著的变化;但反应器停止运行 1 个月后重新启动,真细菌经历了一个死亡后再生长的过程,真细菌种群结构再次发生一定的变化.

2.3 利用 PCR-DGGE 对颗粒污泥中古细菌种群结构的研究

对 4 个颗粒污泥样品同时进行总 DNA 提取、纯化,经过 PCR 扩增后再进行 DGGE 分析,最终得到其中古细菌的 DGGE 图谱,如图 4 所示,利用 Phoretix1D 软件对古细菌的 DGGE 图谱进行相似性分析,如图 5 所示.

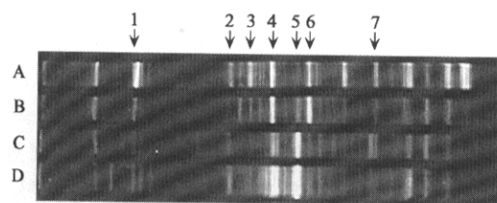


图 4 4 个产甲烷颗粒污泥中古细菌的 DGGE 图谱

Fig. 4 DGGE fingerprint of archaea in four methanogenic granules

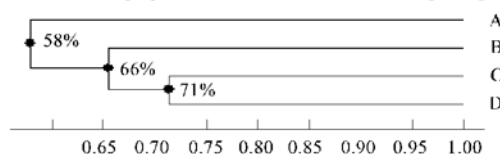


图 5 4 个产甲烷颗粒污泥样品中古细菌的相似性分析

Fig. 5 Similarity analysis of archaea in four methanogenic granules

图 4 表明,随着反应器 COD 负荷的增加以及运行时间的延长,颗粒污泥中古细菌种群结构发生较明显的变化,接种泥样 A 中各菌种数量上相对均匀,而反应器运行不同时间后的样品 B、C 和 D 中占优势的古细菌种类逐渐减少;且古细菌种群结构的变化速率由快到慢,样品 A 与其他 3 个样品中古细菌的种类和优势菌种有很大差异,而样品 C 与 D 中古细菌的种群结构差异较小.图 5 也表明类似的结果,样品之间的相似性分别为 58%、66% 和 71%,呈逐渐增加趋势.

古细菌生长易于受到环境因素的影响,进水成分和 COD 负荷的差异会导致古细菌种群结构发生较明显变化.接种污泥是处理实际淀粉废水的厌氧颗粒污泥,进水成分复杂,经发酵产酸过程后,生成的甲烷前体物种类也较复杂,因此,其古细菌种类较多.而小试厌氧反应器的进水为葡萄糖自配水,甲烷前体物种类较单一,使运行后期的样品中优势菌种的种类明显减少;且接种污泥对应的 COD 负荷较低,随着 COD 负荷的逐渐增加,古细菌种群结构不断地发生变化, COD 负荷相同的样品 C 与 D 中古细菌的相似性也较高.即与真细菌相比,古细菌种群结构更易受到进水成分和 COD 负荷改变的影响,这与其他学者的研究结果相符^[15].

2.4 颗粒污泥中优势古细菌的系统发育分析

将古细菌 DGGE 图谱中有代表性的 7 个条带自上至下编号,如图 4 所示.对 7 个条带切胶回收并测序,其序列输入 Genbank 数据库进行比对,并提交序列 (Accession No.: DQ272259~DQ272265),进而绘制系统发育树,见图 6.

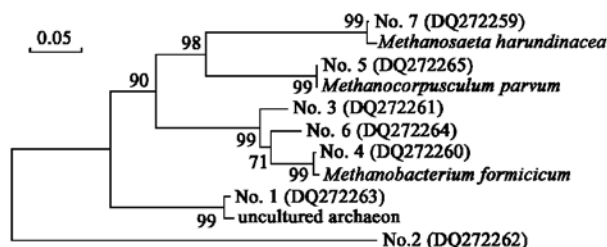


图 6 产甲烷颗粒污泥中优势古细菌的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the dominant archaea in methanogenic granules

可知,其中 3 个序列 3、4 和 6 与甲烷杆菌属中的模式菌种 (*Methanobacterium formicicum*) 相似性达 98% 以上;序列 5 与甲烷微粒菌属中的模式菌种 (*Methanocorpusculum parvum*) 相似性达 99%;序列 7 与甲烷髯毛菌属中的菌种 (*Methanosaeta*

harundinacea) 相似性达 99%; 序列 1 与可培养微生物相似性低, 与其他学者在厌氧反应器^[16]及自然厌氧环境^[17]中获得的克隆序列(uncultured archaeon)相似性达 98% 以上; 而序列 2 与 Genbank 数据库中已有序列相似性均低于 95%, 很可能是 1 种未知古细菌. 因此, 本研究中的小试厌氧产甲烷反应器内, 最适合生长的古细菌主要包括甲烷微粒菌、甲烷杆菌和甲烷髦毛菌等.

3 结论

(1) 颗粒污泥中真细菌的含量明显高于古细菌; 真细菌主要分布在颗粒污泥外层, 古细菌主要分布在内层, 而颗粒中心则基本未表现出生物活性; 且随着反应器 COD 负荷的增加以及运行时间的延长, 古细菌的数量相应略有增加, 其分布更趋向于颗粒污泥的中心区域.

(2) 随着反应器 COD 负荷的增加以及运行时间的延长, 真细菌种群结构相对较稳定, 而古细菌种群结构则发生了较明显变化, 接种泥样中各菌种在数量上并无明显差别, 而反应器运行后期的样品中占优势的古细菌种类逐渐减少, 最终仅限于几个特定的菌种.

(3) 将古细菌 DGGE 图谱中有代表性的 7 个条带切胶回收并测序, 结果表明本研究中的小试厌氧产甲烷反应器内, 古细菌的主要种类有甲烷微粒菌 (*Methanocorpusculum*)、甲烷杆菌 (*Methanobacterium*) 和甲烷髦毛菌 (*Methanosaeta*) 等.

参考文献:

- [1] MacLeod F A, Guiot S R, Costerton J W. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (6): 1598~ 607.
- [2] Fang H P, Chui H K, Li Y Y. Effect of degradation kinetics on the microstructure of anaerobic biogranules[J]. Water Sci. Technol., 1995, **32**(8): 165~ 172.
- [3] 胡纪萃, 周孟津, 左剑恶. 废水厌氧生物处理理论与技术[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2002. 19~ 65.
- [4] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol. Reviews, 1995, **59**(1): 143~ 169.
- [5] Raskin L, Amann R I, Poulsen L K. Use of ribosomal RNA-based molecular probes for characterization of complex microbial communities in anaerobic biofilms[J]. Water Sci. Technol., 1995, **31**(1): 261~ 272.
- [6] Torsvik V, Daae F L, Sandaa R A. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments[J]. J. Biotechnol., 1998, **64**(1): 53~ 62.
- [7] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems[J]. Curr. Opin. Microbiol., 1999, **2**(3): 317~ 322.
- [8] 王峰, 傅以钢, 夏四清, 等. PCR-DGGE 技术在城市污水化学生物絮凝处理中的特点[J]. 环境科学, 2004, **25**(6): 74~ 79.
- [9] 邢德峰, 任南琪, 宫曼丽. PCR-DGGE 技术解析生物制氢反应器微生物多样性[J]. 环境科学, 2005, **26**(2): 172~ 176.
- [10] 任艳红, 徐向阳, 唐全. 降解五氯酚厌氧生物反应器微生物种群结构的分子特性研究[J]. 环境科学学报, 2005, **25**(2): 214~ 219.
- [11] Yuji Sekiguchi, Yoichi Kamagata, Kazunori Nakamura. Fluorescence in situ hybridization using 16s rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1999, **65**(3): 1280~ 1288.
- [12] Schmidt T M, DeLong E F, Pace N R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing[J]. Bacteriol., 1991, **173**(14): 4371~ 4378.
- [13] Ovreas L, Forney L, Daae F L. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevanner, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16srRNA [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997, **63**: 3367~ 3373.
- [14] Großkopf R, Janssen P H, Liesack W. Diversity and Structure of the Methanogenic Community in Anoxic Rice Paddy Soil Microcosms as Examined by Cultivation and Direct 16S rRNA Gene Sequence Retrieval [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, **64**(3): 960~ 969.
- [15] Roest K, Heilig H G, Smidt H. Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater[J]. Syst. Appl. Microbiol., 2005, **28**(2): 175~ 185.
- [16] Collins G, Woods A, McHugh S. Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters[J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2003, **46**(2): 159~ 170.
- [17] Chan O C, Claus P, Casper P. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment[J]. Environ. Microbiol., 2005, **7**(8): 1139~ 1149.