

高效厌氧产甲烷颗粒污泥微生物多样性及定量化研究

孙寓姣, 左剑恶*, 邢薇, 李建平, 鲁颐琼

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要: 以小试高效厌氧反应器不同运行阶段的颗粒污泥为对象, 利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)、荧光原位杂交(FISH)和实时定量链式聚合酶反应(RTQ-PCR)等技术研究了其中微生物种群的多样性、特征微生物的空间分布和定量关系, 结果表明: 随着反应器有机负荷逐渐提高, 颗粒污泥中古菌的群落结构的变化较细菌更为明显; 细菌多分布在颗粒外层, 而古菌则主要分布在颗粒内层; 古菌含量略少于细菌, 但有逐渐增多的趋势; 产甲烷丝菌在古菌中的含量增加明显。

关键词: 产甲烷颗粒污泥; 微生物群落结构; PCR-DGGE; FISH; RTQ-PCR

中图分类号: X176; X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)11-2354-04

Diversity and Quantity of Different Microorganisms in Methanogenic Granular Sludge

SUN Yur-jiao, ZUO Jian-e, XING Wei, LI Jian-ping, LU Yi-qiong

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

Abstract: PCR-DGGE, FISH and RTQ-PCR techniques were used to study the microbial community structure and quantity of different microorganisms in the methanogenic granule in different phases from a lab-scale anaerobic reactor. The results indicated that as the organic loading rate of the reactor increasing, the archaea community changed more significantly than bacterial community. Most bacteria were located in the out layer of granule, while most archaea were located in the inner layer. The quantity of archaea was a little less than bacteria, and the quantity of methanosaeta increased significantly.

Key words: methanogenic granule sludge; microbial community structure; PCR-DGGE; FISH; RTQ-PCR

高效厌氧反应器中的颗粒污泥是由多种厌氧微生物共同生长而形成的微生物聚集体, 不同种类的微生物在颗粒污泥中合理的空间分布以及颗粒污泥中通过自然驯化而形成的优化微生物群落结构和定量关系, 使颗粒污泥能够消除废水中某些物质对敏感细菌(主要是产甲烷细菌)的毒害或抑制, 加快某些中间产物(如氢或乙酸)在不同种微生物之间的传递速率, 提高反应器处理功能。因此高品质颗粒污泥是厌氧反应器高效稳定运行的关键和基础。对颗粒污泥开展系统、深入的研究一直是厌氧领域的热点课题之一。目前, 对厌氧颗粒污泥的形成机理^[1]、工艺条件^[2~4]、微观结构^[5]以及利用传统微生物学的方法对其微生物组成^[6]等均已进行了大量研究, 取得了一定的研究成果^[7,8]。本研究以小试高效厌氧反应器中不同运行阶段的颗粒污泥作为对象, 利用PCR-DGGE技术研究了颗粒污泥中微生物的多样性及其变化, 利用FISH技术研究了细菌和古菌在颗粒污泥中的空间分布, 最后利用RTQ-PCR技术^[9]重点研究了颗粒污泥中细菌、古菌、产甲烷丝菌之间的定量关系。

1 材料与方法

1.1 厌氧反应器的运行及颗粒污泥样品

小试厌氧反应器为有机玻璃制成, 总有效体积为 15L, 其中反应区体积 10L, 沉淀区体积 5L; 反应器总高度为 2.04m。接种污泥为颗粒污泥, 取自某处理淀粉废水的生产性 EGSB 反应器。进水为自配模拟高浓度有机废水, 即在自来水中加入一定量的葡萄糖、尿素、磷酸二氢钾等配制而成, 其 COD:N:P 约为 400:2.5~5:1。反应器内 pH 值调整控制在 6.8~7.2 之间, 温度控制在 35℃ 左右。在反应器的启动与稳定运行过程中, 分 3 次取得颗粒污泥样品, 样品 A: 接种启动后第 1d, 相当于接种污泥; 样品 B: 运行第 25d, 反应器的有机负荷(OLR)约为 20 kg/(m³·d), COD 去除率约为 96%; 样品 C: 运行第 75d, OLR 为 35 kg/(m³·d), COD 去除率约为 90%。

1.2 分子生物学实验技术

1.2.1 PCR-DGGE

DNA 的提取与纯化采用天为时代生物公司 DP301 型试剂盒。以提取的 DNA 为模板, 利用带 GC 夹的细菌引物 P338F-p518r GC^[11] 和古菌引物

收稿日期: 2005-12-30; 修订日期: 2006-03-07

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

作者简介: 孙寓姣(1975~), 女, 博士, 主要研究方向为水污染控制中微生物生态学, E-mail: sunyj@tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: jiane.zuo@tsinghua.edu.cn

Arc 109f- Arc344r GC^[12] 进行 PCR 扩增. 再利用 Bio-rad 公司的 DGGE 仪对细菌和古菌 PCR 产物进行分析, 聚丙烯酰胺凝胶电泳的梯度凝胶浓度为 8%, 变性梯度为 45%~60%, 温度 60℃, 电压 60V, 1×TAE 缓冲液中跑胶 16h 后, TE 染色 20min, 最后在紫外照射仪上观察拍照.

1.2.2 FISH

从反应器中采集活性颗粒污泥样品后, 立即用新鲜配制的 4% 多聚甲醛溶液固定, 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℃ 保存 (最长可贮存 6 个月). 利用石蜡包埋切片技术对颗粒污泥进行处理, 即将颗粒污泥包埋于熔点为 60℃ 的白地蜡中, 冷却后切片, 切片厚度为 8μm, 展于载玻片上, 并用脱蜡剂进行脱蜡. 杂交采用 CY3 (红色) 标记的 EUB338 (5' ACT CCT ACG GGA GGC AG3') 探针和 FITC (绿色) 标记的 ARC915 (5' GTG CTC CCC CGC CAATTC CT3') 探针, 对颗粒污泥样品进行双重原位杂交, 杂交温度 46℃, 杂交甲酰胺浓度分别为 25% 和 35%^[10].

1.2.3 RTQ-PCR

试验中针对细菌、古菌、产甲烷丝菌分别采用 3 对不同引物 P338f-p518r^[11]、Arc 109f-Arc344r^[12]、518f-MX825r^[13], 结合 SYBR Green 荧光定量试剂盒 (天为时代生物公司 FP201 型试剂盒) 使用博日荧光定量 PCR 仪 (Bioer FQD-33A) 进行扩增 (扩增参数: 预变性 94℃ 3min, 变性 94℃ 10s, 复性 57℃ 20s, 延伸 72℃ 30s, 32 个循环). 细菌定量标准品是利用大肠杆菌 16S rDNA 序列的 T 质粒载体克隆; 古菌和产甲烷丝菌定量标准品采用其 16S rDNA 的 46-825 序列片段的 T 质粒载体克隆. 定量标准品的制备采用 TA 粘端克隆法制备阳性对照重组质粒, 将其进行倍比稀释, 取 0.5μL 作为反应模板, 制作标准曲线进行 PCR 荧光定量检测, 对重组质粒稀释后定量, 选择最接近下面数值的稀释度: 1×10^6 copies/mL, 1×10^7 copies/mL, 1×10^8 copies/mL, 1×10^9 copies/mL.

2 结果与讨论

2.1 颗粒内微生物菌群多样性

对 3 个颗粒污泥样品进行了 DNA 提取, 经 PCR 扩增, 再进行 DGGE 分析, 分别得到 3 个样品中细菌和古菌的 DGGE 图谱, 如图 1 所示.

从图 1(a) 中可知, 在接种污泥 (样品 A) 中细菌

的条带数较少, 特别是亮度大的条带更少, 这是由于接种污泥已经在室温下放置了较长时间, 导致其中细菌大量死亡; 但在样品 B 和 C 中, 细菌的条带数和条带亮度均有明显增加, 说明随着反应器的运行和有机负荷的提高, 颗粒污泥中细菌的种类、数量均有明显增加, 其中优势菌种也有很大变化. 还可看出, 与接种污泥相比, 样品 B、C 中的细菌种群结构更为接近, 说明虽然接种污泥中细菌的种类和数量较少, 但反应器启动运行了 25d 后, 颗粒污泥中的细菌种群结构就已基本建立起来; 虽然随后再经过 50d 的运行, 反应器的有机负荷也有大幅提高, 但颗粒污泥中细菌的种群结构基本维持相对稳定.

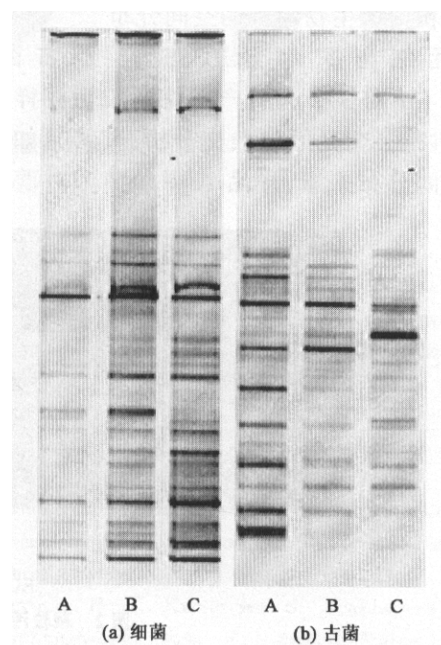


图 1 3 个颗粒污泥样品中细菌与古菌的 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profile of archaea and bacteria in three sewage samples

从图 1(b) 中可知, 与细菌不同, 接种污泥中古菌 (实际上主要是其中的产甲烷菌) 的种类和数量在接种污泥中十分丰富; 而随着在小试反应器中的运行, 颗粒污泥中古菌的种类, 特别是优势菌种发生了明显变化. 在接种污泥中, 亮度明显的条带有 12 条, 而在样品 B 中, 则主要只有 2 个较亮的条带; 在样品 C 中则主要只有 1 个较亮条带. 这可能是由于接种污泥来自 1 个处理实际工业废水的厌氧反应器, 由于进水成分复杂, 导致产甲烷菌种较多, 分布比较均衡, 优势种群的优势地位不明显; 虽然接种污泥在室温下放置了较长时间, 导致其中细菌大量死亡, 但由于古菌多生长分布在颗粒内层 (见 2.2), 在一定程度上受到了较好地保护, 同时, 产甲烷菌生长缓慢,

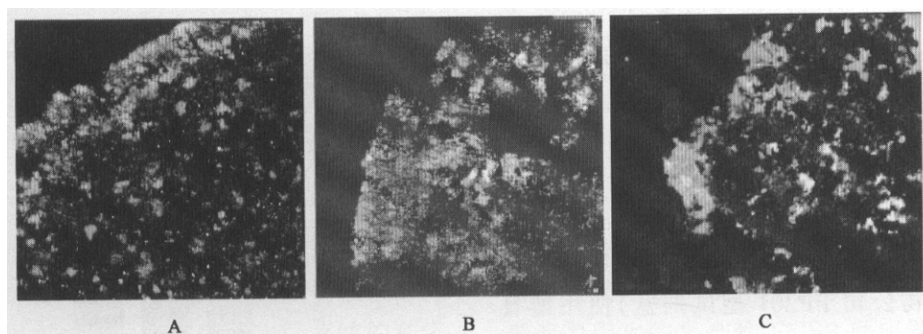
所需基质量较少,因此,其由于饥饿而导致死亡的速率也相对缓慢.而在小试反应器中,进水是由葡萄糖配制而成的人工废水,基质比较单一,导致古菌多样性有所减少,优势种群有所变化,形成优势菌群种类较单一的群落结构形式.

从图 1 可以看出,随着反应器的运行和有机负荷的逐渐提高,颗粒污泥中细菌和古菌的多样性变化是不同的,细菌的种类和数量由少变多,而古菌则相反.这说明,有机负荷的提高对污泥中细菌多样性的影响较小,但对古菌的多样性的影响则很明显,最终导致优势菌群较单一的群落结构形式.这与其他学者的研究结果相似^[14].

2.2 颗粒内微生物菌群的空间分布

利用细菌探针 EUB338-cy3 和古菌探针 ARC915-fite 对 3 个厌氧产甲烷颗粒污泥样品的超薄切片进行了荧光原位杂交分析,其结果如图 2 所示.从空间分布来看,样品 A 中细菌和古菌分布比

较均匀;样品 B、C 中古菌多数集中在颗粒内部,与古菌相比,分布均匀的细菌分布更集中于颗粒外层.而且,3 个样品中,从荧光强度来看,细菌的数量要多于古菌,而且随着反应器有机负荷的提高,古菌的数量略有增加.反应器接种污泥后,由于接种污泥本身就是颗粒污泥,而且接种污泥量也较大,因此,反应器就在较高负荷约 $7.0 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 下快速启动,到第 5d 时,负荷达到 $20.0 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$,到第 75d 时,负荷达到 $35.0 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$.在这样一个较快速地负荷提高过程中,颗粒污泥中的各种微生物均处在代谢旺盛、生长快速的状态.其中的发酵产酸菌、产氢产乙酸菌等细菌会在更接近大分子营养物质的颗粒外层生长分布;而主要是产甲烷细菌的古菌,由于不能直接利用进水中的大分子物质,只能利用产氢产乙酸菌的代谢产物,同时,其对生长环境(如 pH、ORP、温度等)的要求相当苛刻,因此,古菌的分布就相对集中在颗粒的内层.



EUB338(红色), ARC915(绿色)

图 2 颗粒污泥中细菌与古菌的空间分布($\times 200$ 倍)

Fig. 2 Spatial distribution of bacteria and archaea in three methanogenic granule samples

因此,颗粒污泥中多种不同种类的微生物不是简单地随意或杂乱地聚集生长在一起的,而是根据反应器内的基质类型、环境条件等多种因素,通过自然筛选和驯化使其群落结构不断演替,最终形成的一个微生物多样性及空间分布都最为适宜的顶级状态.

2.3 颗粒内微生物菌群的定量化分析

前面的试验结果表明,随着反应器有机负荷的提高,颗粒污泥中微生物的群落结构和空间分布均发生了明显变化.虽然,前面 2 种技术可以根据条带亮度或荧光强度来简单判断某种微生物的相对数量,但均不能作为真正意义上的定量化研究的技术手段.因此,在本小节中采用实时定量 PCR 技术对 3 个样品中的细菌、古菌以及产甲烷丝菌的含量进行了定量化研究.

根据标准曲线,确定样品 A、B、C 中的细菌、古

菌和产甲烷丝菌的 16S rRNA 基因的拷贝数量,同时考虑到各类微生物细胞中所含的 16S rRNA 基因拷贝数量不同^[15],依据 <http://rrndb.cme.msu.edu> 提供的数据,采用了细菌、古菌和产甲烷丝菌细胞的平均 16S rRNA 基因拷贝数(分别为 4.1、1.5、2.0)为换算系数,最终可以计算得出原始样品中 3 大类微生物的细胞含量,结果表明,样品 A、B、C 中,细菌细胞含量分别为 1.00×10^{10} 、 1.61×10^{10} 、 0.48×10^{10} 个/mL;古菌的细胞含量分别为 0.77×10^{10} 、 1.09×10^{10} 、 4.99×10^9 个/mL;产甲烷丝菌的细胞含量分别为 0.99×10^9 、 1.35×10^9 、 1.25×10^9 个/mL.经计算得出样品 A、B、C 中的古菌细胞与细菌细胞含量分别为 43.72%:56.28%、40.45%:59.55%、51.23%:48.76%;产甲烷丝菌细胞在古菌细胞中的含量分别为 12.6%、12.35%、25.05%(见

图 3). 从中可看出, 在厌氧产甲烷颗粒污泥中, 随着厌氧反应器有机负荷的增加, 古菌(主要是产甲烷细菌)在总细菌量中的含量也相应略有增加; 更明显的是, 产甲烷丝菌在古菌总量中的含量, 从启动初期的 12.6%, 增加到负荷为 $35.0 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 时的 25.05%, 增幅约为 100%. 一般认为, 产甲烷过程是

厌氧消化过程中的限速步骤, 产甲烷菌含量的增加, 说明反应器处理能力的提高; 产甲烷丝菌是厌氧反应器中常见的优势产甲烷菌, 它的丝状细胞结构对颗粒的形成起到骨架支撑作用, 其含量的增加, 在一定程度上说明了在本实验的颗粒污泥中, 产甲烷丝菌是其中的优势产甲烷菌之一.

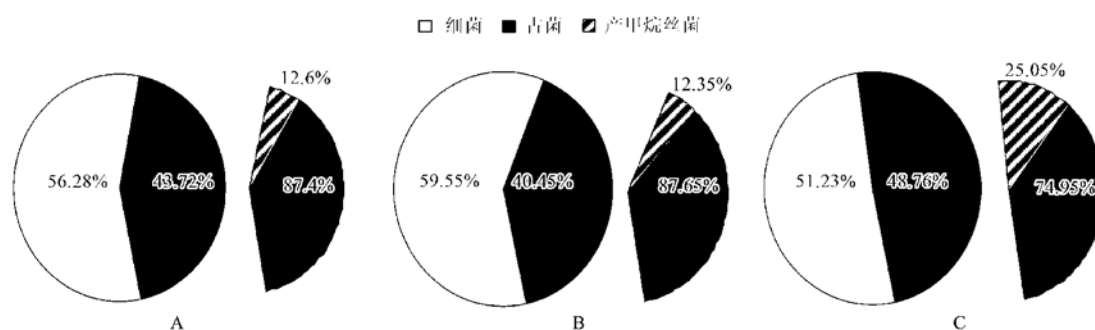


图 3 颗粒污泥中细菌、古菌及产甲烷丝菌的含量变化

Fig. 3 Relative abundance of bacteria, archaea and methanosaeta in three granule samples

3 结论

(1) 随着厌氧反应器有机负荷的增加和运行时间的延长, 颗粒污泥中细菌群落结构较快趋于稳定, 而古菌的种类、数量则发生了明显的变化, 优势菌种逐渐固定在少数菌种上.

(2) 细菌主要生长分布在产甲烷颗粒污泥的外层, 而古菌则倾向于生长分布在颗粒内层.

(3) 厌氧产甲烷颗粒污泥中细菌含量略高于古菌; 随着反应器有机负荷的提高, 古菌(主要是产甲烷菌)的含量略有增加, 其中产甲烷丝菌的含量增加较明显.

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Batstone D J, Keller L. Variation of bulk properties of anaerobic granules with wastewater type [J]. *Wat. Res.*, 2001, **35**(7): 1723~1729.
- [3] Fang H P, Chui H K, Li Y Y, *et al.* Performance and granule characteristics of UASB process treating wastewater with hydrolyzed proteins [J]. *Water Sci. Technol.*, 1994, **30**(1): 55~63.
- [4] 胡纪萃, 周孟津, 左剑恶, 等. 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.
- [5] 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.
- [6] 陈美慈, 闵航, 赵宇华. 厌氧微生物学 [M]. 杭州: 浙江大学出

版社, 1993. 243~275.

- [7] Wu Jerhorng, Liu Wentao, Tseng Icheng, *et al.* Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system [J]. *Microbiology*, 2001, **147**: 373~382.
- [8] Werr Tso Liu, Orr Chim Chanc, Herbert H P. Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater [J]. *Water Res.*, 2002, **36**(7): 1767~1775.
- [9] Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000, **25**(1): 169~193.
- [10] Bercovier H O, Kafri, Sela S. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **136**(5): 1136~1141.
- [11] Overas L, Forney L, Dae F L. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevanner, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(8): 3367~3373.
- [12] Regin G, Peter H J, Werner L. 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]. *American Society for Microbiology*, 1998, **64**(3): 960~969.
- [13] Stahl D A, Amann R. Development and application of nucleic acid probes [A]. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* [C]. Wiley Chichester, 1991. 205~248.
- [14] 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**: 175~185.
- [15] 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**: 4371~4378.