

高浓度酒精废水厌氧处理工程系统中古菌 多样性及其代谢特征

高瑞芳 袁旭峰 王小芬 朱万斌 程序 崔宗均*

(中国农业大学 农学与生物技术学院 生物质工程中心 北京 100193)

摘要: 颗粒污泥形成快、抗冲击能力强、悬浮性好是新型高浓度有机废水厌氧处理系统的重要特征。为了研究颗粒污泥中古菌组成多样性及其功能特征,采集活性污泥样品,提取总基因组DNA,应用PCR-DGGE和16S rDNA克隆测序技术对系统内古菌群落进行研究。结果表明:古菌克隆文库中克隆子的近缘种归属于 *Methanosaeta*、*Methanosarcina*、*Methanobacterium* 和 *Methanomethylovorans* 4个类群,所占文库容量比例依次为58.2%、23.6%、12.7%和3.6%,1个克隆子未能找到相似菌株,占1.8%。系统发育分析找到了未知克隆子C10、C11、C13和C19的相似菌株FJ618821、AB479397、AJ244290和AB447878,并明确相应的分类地位。古菌类群以乙酸利用型 *Methanosaeta*、*Methanosarcina* 为主,说明甲烷形成过程以乙酸途径为主。中间代谢产物VFAs组成与不同产甲烷菌代谢功能分析的结果证明了古菌群落组成多样性与其代谢功能的对应关系。

关键词: 古菌类群, 克隆文库, 多样性, 代谢特征

Archaeal diversity and metabolic function in anaerobic digest process treating high concentration ethanol wastewater

GAO Rui-Fang YUAN Xu-Feng WANG Xiao-Fen ZHU Wan-Bin CHENG Xu
CUI Zong-Jun*

(Center of Biomass Engineering, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Fast conformation, good shock resistance and good suspensibility of anaerobic granular sludge are the important characteristics of a new anaerobic treatment plant dealing with high concentration organic wastewater. In order to investigate the diversity and functional characteristics of archaea, most important component of granular sludge, total archaeal genomic DNA was extracted from sample. The community structure was studied by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electro-

基金项目: 国家“十一五”支撑计划项目(No. 2008BAD4B01, 2008BAD4B17)

* 通讯作者: Tel: 86-10-62731857; 邮箱: acuijzj@cau.edu.cn

收稿日期: 2010-12-29; 接受日期: 2011-02-14

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

phoresis (PCR-DGGE) and cloning-sequencing based 16S rDNA. The results showed that archaeal community clones were classified into *Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanobacterium* and *Methanomethylovorans* all four clusters, accounting for 58.2%, 23.6%, 12.7% and 3.6% of the clone library capacity separately, one clone with 1.8% proportion could not be found the most similar strain. The sequences blast results and phylogenetic analysis of archaea showed that clones C10, C11, C13 and C19 had high similarity with the known strains FJ618821, AB479397, AJ244290 and AB447878 separately and their relative taxonomy groups also be found. *Methanosaeta* and *Methanosarcina* were the main clusters in archaeal community, so methane production approach was acetic acid-based. Intermediate metabolites VFAs analysis was combined with different metabolic functions comparison, which confirmed the corresponding relationship between archaeal community diversity and its metabolism function.

Keywords: Archaeal community, Clone library, Diversity, Functional analysis

针对广西众多木薯酒精淀粉生产厂排出的大量高浓度有机废水(COD_{Cr} 浓度 20 000–30 000 mg/L), 本研究室研制出了一套新型厌氧发酵系统进行处理。该系统在传统 UASB 基础上进行改进, 使反应装置内形成涡流、层流和脉冲流, 提高了反应器内水力混合效率。同时, 采用罐外配比驯化、罐内培养的方法形成的生物活性高、沉淀性能好的颗粒污泥, 保证了系统对高浓度、复杂有机废水的处理效果。

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, 不同类型的微生物群落之间形成共生或互生关系, 能促进细菌、古菌生长以及相互之间基质的传递, 提高生化反应速率, 有利于废水中有机物的快速降解。高活性的颗粒污泥形成快且抗冲击能力强是该系统的重要特征。污泥颗粒化是一个复杂的物理化学与微生物过程, 至今还不能完全弄清楚整个过程。现有的颗粒化理论和模型大致有 3 类, 物理化学理论、微生物理论和热力学理论。其中, 微生物理论综合了物理-化学因素, 通过对颗粒污泥特性的观察和反应器中的优势条件相联系提出的。目前主要有: ECP (胞外多聚物) 结合模型、互营联合微生物群落模型、多层模型等, 均认为以甲烷鬃毛菌和甲烷八叠球菌为代表的产甲烷菌对颗粒污泥形成起到重要的骨架、细胞联合和支配作用, 是构成颗粒污泥的重要组成^[1-5]。根据厌氧甲烷发酵原理, 产甲烷菌作为末端微生物和甲烷形成的功能微生物, 其代谢原理、功能特征及其与功能性细菌的互营共生作用是影响原料发酵效率和甲烷生成效

率的重要因素^[4-5]。因此, 对系统内古菌多样性及其代谢特征的研究, 有助于搞清生产过程中颗粒污泥形成原理和高浓度有机废水的处理过程, 进一步提高处理效率, 开发更加高效稳定的废水处理系统。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品取自广西明阳木薯酒精厂废水厌氧处理系统。取样时, 反应器处于高效运行状态。取样点位于厌氧反应器下部。

1.2 基因组 DNA 提取与 PCR 扩增

取少量活性污泥样品, 加入无菌去离子水冲洗 3 遍, 低速离心, 去除杂质及难溶物质, 加入 1 mL Extraction buffer (100 mmol/L Tris-HCl, 40 mmol/L EDTA), 用 Vortex 振荡仪充分涡旋振荡。随后采用苯酚/氯仿法提取基因组 DNA^[6]。对古菌 16S rDNA 基因进行扩增^[7]。扩增引物为: A109f (5'-ACKGCT CAGTAACACGT-3'), A912rt (5'-GTGCTCCCCCG CCAATTCCTTA-3')。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 93 °C 60 s, 50 °C 60 s, 72 °C 70 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收。

1.3 克隆文库构建

将纯化后的 16S rDNA 扩增片段与 pGEM-T Easy Vector (Promega, US) 连接, 热激转化到 *Escherichia coli* JM 109 感受态细胞, 经 37 °C 培养 1 h 后以氨苄青霉素(100 mg/L)、X-Gal、IPTG 的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜 12 h, 随机挑选白斑阳性转

化子, 构建克隆文库。

对古菌阳性克隆子 16S rDNA V3 进行扩增, 使用引物 A348If (5'-GGIGCAICAGGCGCGAAA-3')和 U806Ir (5'-GGACTACCI GGGTITCTAA-3')进行菌落 PCR。反应条件同上, 循环数为 25 个^[8]。

使用 DCode 突变检测系统(Bio-Rad, Laboratories, Hercules, Calif)对 16S rDNA V3 区域的 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析, 通过 V3 区的差异筛选克隆文库中不同阳性克隆子, 以提高筛选效率, 减少测序工作量。聚丙烯酰胺凝胶浓度梯度为 6%–12% (100%的变性剂组成为尿素 7 mol/L, 甲酰胺体积分数为 40%), 尿素与甲酰胺变性梯度为 35%–65%, 在 61 °C 恒温下, 200 V 电泳 5 h, Subgreen 染色。

1.4 16S rDNA 测序及分析

将测得的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析, 采用 Clustal-X (Version 1.81)软件包和 MEGA 4 软件构建系统发育树, 参照 Neighbor-Joining 法进行, 分析亲缘关系及相似性^[9]。

1.5 挥发性脂肪酸(VFA)测定

样品预处理: 取水样 3 mL, 加入等量 1%甲酸溶液(体积比), pH 值在 2–3 之间, 过 0.22 μm 滤膜, -40 °C 条件下保存, 用岛津公司产 QP2010 型进行 GC-MS 测定。

测定条件: 分析柱为 CP-Chirasil-Dex CB (25 m×0.25 mm)毛细管柱; 柱箱温度 50 °C (1 min)→100 °C (1 min), 7 °C/1 min→195 °C (2 min), 18 °C/min, 共 14 min; 进样口温度 190 °C; 检测器温度 200 °C; 载气 He (60 kPa), 流量 34 mL/min; 分流比 1/22; 监测器电压 115 kV; 进样量 1 μL。

对测定的数据, 利用 NIST 数据库进行定性分析。根据出峰物的定性分析结果, 配制相应标准样品的稀释液作为标准物进样, 用于该物质的定量分析^[9]。

2 实验结果

2.1 古菌多样性组成及系统发育分析

随机挑选活性污泥古菌克隆文库的 55 个阳性克隆子进行筛选(图 1), 其 16S rDNA 序列的 BLAST

比对分类结果见图 2。

将测得序列与 GenBank 数据库中相似菌株序列进行比对, 得到最高相似度为 100%, 最低为 93%, 相似度 ≥99% 的比例为 78%。查得的相似菌株均隶属于广域古菌门(*Euryarchaeota*), 以属为类群分类依据, 将近缘种归属于 *Methanosaeta*、*Methanosarcina*、*Methanobacterium* 和 *Methanomethylovorans* 4 个类群, 所占比例依次为 58.2%、23.6%、12.7%和 3.6%, 还有 1 个克隆子(1.8%)未能找到相似菌株, 几乎所有的古菌都是产甲烷菌。

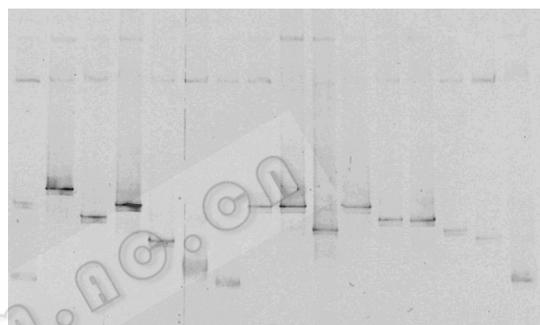


图 1 经 DGGE 筛选古菌 16S rDNA 基因序列克隆文库组成多样性

Fig. 1 16S rDNA gene diversity of archaea in clone library after DGGE screening

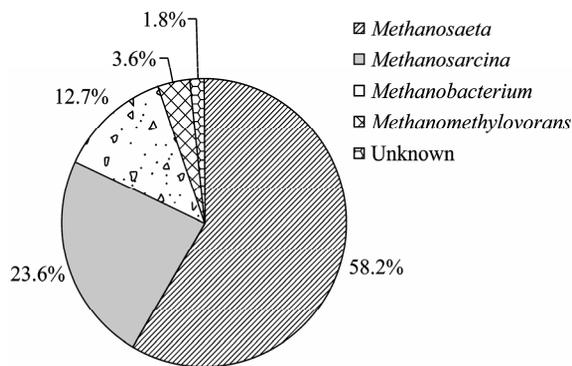


图 2 厌氧反应器中古菌类群组成结构

Fig. 2 Archaeal community composition in anaerobic reactor

克隆文库中, *Methanosaeta* 类群在整个克隆文库的比例最大, 为 58.2%, 在群落中占绝对优势。*Methanosaeta* 通常是产甲烷颗粒污泥的优势菌, 在古菌群落中丰富度可达 70%以上, 其形成的稳定的丝状结构是颗粒污泥的重要成分, 广泛用于处理各

种废水,尤其是成分复杂的废水厌氧处理过程,对高负荷系统的稳定起到根本性作用^[10]。*Methanosaeta* 类群和 *Methanosarcina* 类群共占文库容量的 80%,前者比例为 58.2%, 32 个克隆子,后者比例为 23.6%, 13 个克隆子。颗粒污泥形成的相关研究表明, *Methanosaeta* 形成的特定丝状纤维,为其他细菌相连接形成生物膜提供了网状结构,在颗粒污泥形成过程中起到重要的骨架、细胞联合和支配作用。*Methanosarcina* 有较强的成团能力,在高温污泥和高乙酸基质中较为常见。这两类群互利共生,是活性污泥的重要组成成分^[12-13]。

Methanobacterium 类群包含 7 个克隆子,占比例 12.7%。此类群只能利用 H_2/CO_2 作为底物合成甲烷,属于氢利用型产甲烷菌。同时,可利用多种形式的硫酸盐,转化谷氨酸、铵、尿素等氮源物。*Methanomethylovorans* 类群占 3.6%, 2 个克隆子。该类群不利用 H_2/CO_2 , 也不能利用乙酸,只利用甲醇、甲胺等甲基类物质合成 CH_4 , 属于甲基利用型产甲烷菌。

通过构建古菌 16S rDNA 系统发育树(图 3), 可以将未能确定分类地位的克隆子归属分类或找到其近缘种。编号为 C10 的克隆子与 Uncultured archaeon clone AA9 (FJ618821)、C19 与 Uncultured archaeon (AB447878) 的相似性为 100%, 可以认定该菌株存在。C13 与 Anaerobic methanogenic archaeon E15-4 (AJ244290) 相似性为 99%, 是其近缘种, 以上 3 个克隆子均属于 *Methanosaeta* 类群。C11 与 Uncultured euryarchaeote (AB479397) 的相似度为 99%, 但该菌株的分类地位只能确定为 Euryarchaeota, 其分类地位和代谢功能还需进一步研究。

2.2 中间代谢产物与古菌代谢特征

目前的研究认为, 甲烷生物合成有 3 条途径, 以底物不同相区别, 即甲烷合成的原料主要有 3 种, 分别为乙酸、 H_2/CO_2 和甲基化合物, 其他还有甲硫醇、二甲基硫化物等。颗粒污泥中存在的发酵细菌、水解酸化细菌将复杂的有机物转化为产甲烷菌可以直接利用的原料。因此, 系统中存在的中间代谢产物 VFAs 的组成特征在一定程度上决定了产甲烷菌

的多样性和代谢特征。GC-MS 分析结果表明, 乙酸浓度最高为 6.75 g/L, 丙酸、丁酸、戊酸浓度依次为 1.27、0.08、0.42 g/L, 乙酸浓度占到了总 VFAs 量的 79.3%, 是产甲烷菌最主要的原料, 乙酸型产甲烷菌在微生物群落中应处于优势, 这与以上古菌群落多样性分析结果相对应。

2.2.1 乙酸与古菌: McCarty 和 Smith 研究发现, 厌氧发酵产生的甲烷气体中, 有 72% 是通过乙酸转化的。颗粒污泥中能代谢乙酸的产甲烷菌日前仅发现 2 种, 即 *Methanosaeta* 和 *Methanosarcina*。*Methanosaeta* 只能在乙酸基质中生长, *Methanosarcina* 可以利用的基质较多, 有乙酸、甲醇、甲胺, 有时也可利用 H_2 和 CO_2 。在对二者之间相互作用关系的研究中发现, 在乙酸基质中, *Methanosarcina* 的比增长速度 μ_{max} (0.21/d) 高于 *Methanosaeta* (0.11/d), 但其对基质的亲和力较低, 半饱和常数 $K_s=3-5$ mmol/L; 厌氧发酵装置内的乙酸浓度时影响古菌群落组成的重要因素。Diaz 等使用 UASB 反应器处理啤酒厂废水, 装置内乙酸浓度较高, 研究古菌群落发现, *Methanosaeta* 是最重要类群, 占总古菌细胞数的 75%–95%, 少量 *Methanosarcina mazei* 和 *Methanospirillum hungatei* 并存^[14]; Tabatabaei 等人在研究处理棕榈油生产废水的厌氧装置时发现, *Methanosaeta* 占到了古菌类群总量的 99% 以上^[15]; 养牛场、养猪场废水中含有大量的氨和 VFA, 在厌氧处理的相关研究中, Karakashev 等人发现, 乙酸发酵类群的 *Methanosaeta* 和 *Methanosarcina* 远高于氢发酵类群的 *Methanobacteriales*、*Methanomicrobiales* 和 *Methanococcales*^[16]。

2.2.2 其他 VFAs 组成与古菌: GC-MS 分析结果中, 一定量的丙酸、丁酸、戊酸也存在于反应器中。这些小分子的有机酸是各种发酵细菌和水解酸化细菌的代谢产物。在作者以往对细菌的相关研究中, *Firmicutes* 类群、*Chloroflexi* 类群和 *Proteobacteria* 类群都属于产氢产乙酸菌, 相似菌株 *Spirochete* 和 *Levilinea saccharolytica* 可以代谢丙酸、丁酸、戊酸等形成乙酸^[15]; Uncultured *Clostridia* bacterium clone X3Ba50、Uncultured *Clostridium* sp. clone B03

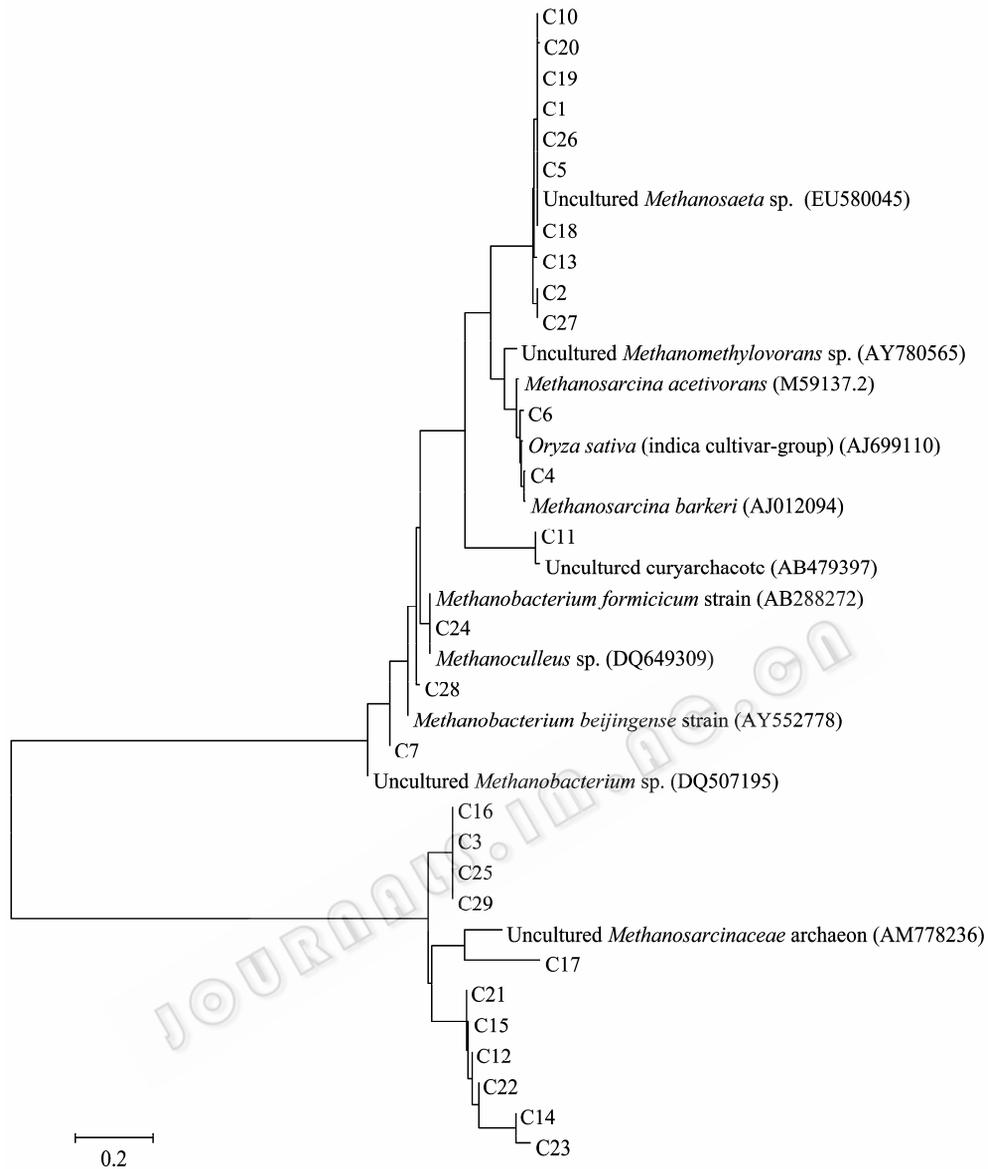


图3 基于16S rDNA基因序列构建的厌氧反应器中古菌系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic analysis results of the archaeal 16S rDNA gene in anaerobic reactor

参与丙酸盐的代谢形成乙酸^[17-18], *Pelotomaculum propionicum* sp.和 *Longilinea* sp.分解丙酸产生 H₂, 与其他产氢细菌一起共同为 H₂ 利用型产甲烷菌提供原料^[19]。系统中 *Methanobacterium* 类群是一类氢营养型产甲烷菌, 从 H₂ 氧化中获得能量, 从 CO₂ 中获得碳, 在新陈代谢中, 它们以 CO₂ 为电子受体形成甲烷。*Anaerofilum pentosovorans* 和 *Proteobacteria* 类群则可代谢葡萄糖产生甲酸^[20], 为甲基利用型 *Methanomethylovorans* 类群提供原料。

3 结论

(1) 厌氧发酵系统内古菌组成具有高度的多样性, 均隶属于广域古菌门(Euryarchaeota), 几乎全部为产甲烷菌。比对分析得到的近缘种按在克隆文库中出现频率, 类群优势顺序为 *Methanosaeta*、*Methanosarcina*、*Methanobacterium* 和 *Methanomethylovorans* 4 个类群, 所占文库容量的比例分别为 58.2%、23.6%、12.7%和 3.6%, 还有

1 个克隆子未能在 GenBank 数据库中找到相似菌株, 占 1.8%。

(2) 系统发育分析结果表明, 未知古菌克隆子 C10 与 FJ618821、C19 与 AB447878、C13 与 AJ244290 的相似性较高($\geq 99\%$), 认为该菌株存在于活性污泥中, 均属于 *Methanosaeta* 类群。C11 的近缘种 AB479397, 只能确定为 Euryarchaeota 水平。乙酸利用型近缘种占到了克隆子总量的 80%, 系统的甲烷产生过程以乙酸途径为主。

(3) 系统中间代谢产物 VFAs 组成和含量的分析结果, 结合不同产甲烷菌的代谢特征分析, 证明了古菌群落多样性组成与其代谢功能的对应关系。

参 考 文 献

- [1] Thiele JH, Wu WM, Jain MK, et al. Ecoengineering high rate anaerobic digestion systems: analysis of improved syntrophic biomethanation catalysis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35(10): 990-999.
- [2] Daffonchio D, Thaveesri J, Verstraete W. Contact angle measurement and cell hydrophobicity of granular sludge from upflow anaerobic sludge bed reactors[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(10): 3676-3680.
- [3] Sam-Soor P, Loewenthal RE, Dold PL, et al. Hypothesis for pelletisation in the upflow anaerobic sludge bed reactor[J]. *Water SA*, 1987, 13(2): 69-80.
- [4] 孙寓姣, 左剑恶, 李建平, 等. 厌氧颗粒污泥中微生物种群变化的分子生物学解析[J]. *中国环境科学*, 2006, 26(2): 183-187.
- [5] 孙寓姣, 左剑恶, 邢薇, 等. 高效厌氧产甲烷颗粒污泥微生物多样性及定量化研究[J]. *环境科学*, 2006, 27(11): 2354-2357.
- [6] Zhu H, Qu F, Zhu LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(22): 5279-5280.
- [7] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [8] Pedro MS, Haruta S, Hazaka M, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(2): 159-165.
- [9] Wang XF, Gao LJ, Yang HY, et al. Composition diversity of lactic acid bacteria (LAB) community A12 used for alfalfa silage[J]. *Microbiology*, 2006, 46(5): 767-772.
- [10] Dojka MA, Hugenholtz P, Haack SK, et al. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3869-3877.
- [11] Ferguson JT, Wenger CD, Metcalf WW, et al. Top-down proteomics reveals novel protein forms expressed in *Methanosarcina acetivorans*[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20(9): 1743-1750.
- [12] Mccarty PL, Smith DP. Anaerobic wastewater treatment[J]. *Environmental Science and Technology*, 1986, 20(12): 1200-1206.
- [13] Fernández N, Díaz EE, Amils R, et al. Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 56(1): 121-132.
- [14] Díaz EE, Stams AJM, Amils R, et al. Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 4942-4949.
- [15] Tabatabaei M, Zakaria MR, Rahim RA, et al. PCR-based DGGE and FISH analysis of methanogens in an anaerobic closed digester tank for treating palm oil mill effluent (POME)[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2009, 12(3): 1-12.
- [16] Karakashev D, Batstone DJ, Angelidaki I. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 331-338.
- [17] Fernández N, Sierra-Alvarez R, Field JA, et al. Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge[J]. *Chemosphere*, 2008, 70(3): 462-474.
- [18] Worm P, Feroso FG, Lens PNL, et al. Decreased activity of a propionate degrading community in a UASB reactor fed with synthetic medium without molybdenum, tungsten and selenium[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 45(2): 139-145.
- [19] Imachi H, Sakai S, Ohashi A, et al. *Pelotomaculum propionicum* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(7): 1487-1492.
- [20] 秦振平, 李巍, 纪树兰, 等. 处理避孕药废水优势菌的分离鉴定及强化作用[J]. *北京工业大学学报*, 2008, 34(5): 528-533.