

研究报告



基于代谢组的厌氧氨氧化菌群对温度的响应机制

霍唐燃 潘珏君 刘思彤*

北京大学环境科学与工程学院 北京 100871

摘要:【背景】在环境工程领域中,大多数耐冷菌从活性污泥中分离得到。了解活性污泥菌群对低温的响应有助于耐冷菌的驯化培养。【目的】以厌氧氨氧化污泥菌群作为研究对象,研究温度对厌氧氨氧化菌群代谢通路与代谢产物的影响,以期初步阐释厌氧氨氧化菌群低温响应机理。【方法】在 25 °C 与 35 °C 条件下驯化培养厌氧氨氧化污泥,研究温度对反应器脱氮效能、菌群活性与生长以及群落结构的影响,通过代谢组学比较两个温度下厌氧氨氧化菌群代谢物丰度以及代谢通路活性。【结果】虽然低温导致厌氧氨氧化菌群 CO₂ 固定、TCA 循环与丙酮酸代谢的下调,进而导致氮去除活性以及增长速率显著下降,但菌群 RNA 合成水平、腐胺与信号分子合成上调,从而通过转录调控、调控膜脂组成与改变膜结构的方式,调控菌群代谢以适应低温环境。【结论】从分子机理的角度探究了厌氧氨氧化污泥菌群适应低温环境的生理机制,首次阐释了腐胺与信号分子在污泥菌群适应低温过程中的重要作用。

关键词: 厌氧氨氧化菌群, 降温, 响应机制, 代谢组学

Metabolomics insight into the response mechanism of anammox consortia to temperature

HUO Tang-Ran PAN Jue-Jun LIU Si-Tong*

College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract: [Background] Most cold-tolerant bacteria are isolated from activated sludge. Understanding the response of activated sludge consortia to low temperatures contributes to the domestication of cold-tolerant bacteria. [Objective] Anammox consortia was studied as the research object to study the effects of decreasing temperature on metabolic pathways and metabolites of anammox consortia, in order to explain the response mechanism of anammox consortia to decreased temperature. [Methods] The anammox sludge was domesticated at 25 °C and 35 °C to study the effects of temperature on the nitrogen removal performance of the reactors, bacterial activity and biomass yield, and community structure. Metabolite abundance and metabolic pathway activity of anammox consortia were compared under two temperatures by metabolomics. [Results] Under decreased temperature, although CO₂ fixation, TCA cycle and pyruvate metabolism of anammox consortia were down-regulated, which led to a significant decrease in nitrogen removal activity and biomass yield. However, RNA synthesis level, and synthesis of putrescine

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (51878008)

*Corresponding author: Tel: 86-10-62754290; E-mail: liusitong@pku.edu.cn

Received: 14-04-2019; Accepted: 21-06-2019; Published online: 26-06-2019

基金项目: 国家自然科学基金(51878008)

*通信作者: Tel: 010-62754290; E-mail: liusitong@pku.edu.cn

收稿日期: 2019-04-14; 接受日期: 2019-06-21; 网络首发日期: 2019-06-26

and signal molecules were up-regulated, thereby regulating the metabolism of the consortia to adapt to the low temperature through transcriptional regulation, regulation of membrane lipid composition and changes in membrane structure. **[Conclusion]** The physiological mechanism of anammox consortia adapting to low temperature was explored from the perspective of molecular mechanism, and the important role of putrescine and signal molecules in the adaptation of sludge consortia to low temperature was explained for the first time.

Keywords: Anammox consortia, Decreased temperature, Response mechanism, Metabolomics

在自然界所有极端的环境条件中,低温是最普遍存在的环境条件,同时对生命活动的影响最大^[1]。为适应生产发展需要,培育出在低温下具有高生物活性的微生物一直是微生物领域的研究重点。因此,微生物对温度的响应机制研究一直备受关注。微生物对温度的响应机制包含两个方面:温度对微生物代谢活动的影响机制,以及微生物在长期进化过程中为了抵御低温造成的不利影响而逐渐形成的一套完善的低温适应机制^[2]。由于耐冷菌能够适应低温环境,在食品、保健品及环境工程等领域具有广泛的应用前景。在环境工程目前的研究应用中,大多数耐冷菌从活性污泥中分离得到,应用于低温环境中复杂有机物的降解转化以及污水处理方面。因此,了解活性污泥菌群对温度的响应有助于耐冷菌的驯化培养。

厌氧氨氧化菌群作为活性污泥法水处理中节能高效的生物菌群,被报道最适生长温度为35–40 °C,对低温条件十分敏感^[3]。已有的低温对厌氧氨氧化菌群的影响研究主要集中在氮去除活性、胞外聚合物含量、群落结构变化等方面,很少有研究从分子机理的角度对厌氧氨氧化菌群低温下的代谢特性进行研究。已有研究表明,低温会导致厌氧氨氧化菌代谢与生长速率的下降,同时也会影响厌氧氨氧化菌群的群落结构,主要表现为厌氧氨氧化菌占比下降,细菌多样性的降低。低温导致的厌氧氨氧化菌个体水平以及群落水平的变化,最终影响到污泥的宏观特性,主要表现为污泥脱氮效率的下降、胞外聚合物含量的改变以及污泥颗粒的解体^[3]。本课题组的前期工作表明,利用代谢组学可以从分子机理的角度深入研究厌氧氨氧化菌群

在不同条件下代谢通路与代谢产物的变化,并阐释厌氧氨氧化菌群对不同条件的代谢响应机理^[4–7]。在此基础上,本文采用厌氧氨氧化污泥菌群作为研究对象,详细分析了温度对厌氧氨氧化污泥菌群代谢通路与代谢产物的影响,以期初步阐释厌氧氨氧化菌群低温响应机理,从而为耐冷菌的驯化培养奠定一定的理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 污泥来源

试验接种的厌氧氨氧化污泥取自实验室35 °C下长期稳定运行的厌氧氨氧化反应器。

1.2 主要试剂和仪器

反应器进水成分及 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度测定等相关试剂均为国产分析纯试剂;FastDNA[®] Spin Kit for Soil, MO BIO Laboratories公司。整个试验装置由进水系统、曝气系统、序批式反应器(Sequencing batch reactor, SBR)、出水系统、水浴循环系统以及自控系统组成。本试验选用两个相同的序批式反应器对厌氧氨氧化菌群低温特性进行相关研究。所用反应器由有机玻璃制造而成,有效体积为5 L。反应器外部设有水浴夹套,用以进行恒温水浴。UV-1800紫外分光光度计,岛津公司;超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 反应器启动及运行

反应器进水采用人工配置的模拟废水^[8],进水中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度均保持在50 mg/L。2个反应器均严格厌氧,进水pH控制在7.5–8.0。2个反应器初始运行温度均为35 °C(厌氧氨氧化菌最适生长温度),接种的厌氧氨氧化污泥生物量浓度

均为 510 mg/L [以挥发性悬浮固体 (Volatile suspended solids, VSS) 计]。待 2 个反应器运行稳定后, R1 反应器水浴温度降为 25 °C, 并持续在 25 °C 条件下运行。R2 反应器水浴温度依旧维持在 35 °C。SBR 启动初期水力停留时间为 24 h。2 个反应器在 2 个温度下共运行 100 d, 在反应器运行期间, 每隔 2 d 监测进出水中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度。在反应器运行的最后一天(第 100 天)测定厌氧氨氧化污泥活性、生物量以及群落结构。在 2 个反应器运行稳定且脱氮效能差异明显的不同时期(第 85、90、95 与 100 天)采集污泥样品, 并对污泥代谢物进行提取与分析。

1.4 检测项目与分析方法

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度采用纳氏试剂分光光度法, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度采用酚二磺酸分光光度法^[9]。厌氧氨氧化污泥活性以单位质量污泥单位时间内去除 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的质量来作为衡量指标, 采用 Feng 等的测定方法^[5]。污泥生物量用 VSS 进行表征^[5]。所有测量一式三份取平均值。

1.5 微生物群落结构分析

收集 0.5 g 厌氧氨氧化湿污泥, 使用 FastDNA[®] Spin Kit for Soil 进行 DNA 提取, 重复 3 次。使用 338F/806R 的扩增引物^[4], 其中正向引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'), 反向引物为 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。通过 PCR 扩增 16S rRNA 基因, PCR 反应体系和条件同 Guo 等^[4], 在上海美吉生物医药有限公司 Illumina MiSeq 平台 (Illumina Inc., CA, USA) 进行高通量测序, 使用 I-sanger (<http://www.i-sanger.com/>) 进行数据分析^[5]。

1.6 代谢组学分析

1.6.1 代谢物的提取

为了研究厌氧氨氧化污泥代谢物的变化, 采用 Tang 等的方法^[10], 将不同时期收集的污泥进行代谢组学分析 (n=4)。首先快速收集污泥菌样, PBS

冲洗后, 使用 -40 °C 60% (体积比) 冷甲醇淬灭, -20 °C、9 000×g 离心 10 min 从冷甲醇中分离菌体。然后将菌体重悬于 5 mL 80% 冷甲醇中, 在冰浴中 200 W 超声处理 30 min 后得到菌体的裂解溶液。以 10 000×g 离心裂解溶液 20 min 后收集上清液。最后将上清液在室温下氮吹蒸干用于代谢组学分析。同时, 为了消除每个样品中由于细菌生物量的差别造成的偏差, 对破碎菌体的蛋白含量(即菌体裂解溶液离心后的沉淀)进行测定, 从而对代谢物含量进行标准化, 蛋白含量的测定采用 BCA 法^[11]。

1.6.2 代谢物的检测

使用 Q Exactive 质谱仪收集质谱数据。代谢提取物用 80% 甲醇复溶, 所得溶液两等份分别用于正离子模式与负离子模式下的分析。样品用含有 10 mmol/L 甲酸铵的 50% 乙腈作为洗脱剂注入正相层析柱。数据采集使用范围为 70–1 050 *m/z* 的数据依赖性质谱。全扫描和碎片光谱分别以 70 000 和 17 500 的分辨率收集, 采用 Tang 等的源参数^[10]。使用包含 740 种化合物的自制数据库来查找识别代谢物。

1.6.3 代谢组数据分析

对于代谢组学数据, 首先应用对数转换, 然后通过 *t* 检验分析两个温度下污泥代谢物丰度之间的差异, 以此鉴定它们之间存在显著差异的代谢物。在检验中, $P < 0.05$ 和倍数变化 (R1 vs R2) 大于 1.2 或小于 0.83 的代谢物被认为存在显著差异。使用 Metaboanalyst (www.metaboanalyst.ca) 对代谢组学数据进行分析^[7], 通过将代谢物匹配到 KEGG 数据库中的代谢途径鉴定污泥菌群中表达的代谢通路。采用 Aggio 等^[12]的方法, 利用 PAPI 的 R 语言安装包分析代谢组数据, 基于代谢物丰度在实验组 (R1) 与对照组 (R2) 的差异, 计算每个 KEGG 代谢通路的活性值, 比较两个温度下污泥菌群的代谢通路活性, 并通过 *t* 检验找出通路活性具有显著差异的代谢通路。

2 结果与分析

2.1 降温对反应器脱氮效能、菌群活性与生长的影响

降温对反应器脱氮效能有显著影响。2 个反应器在 2 个温度下运行 100 d 进出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 变化情况如图 1A、1B 所示, 降温后的前 30 天, R1 对 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的去除性能较差, 但接下来的运行过程中 R1 的脱氮效能逐步提升, R1 的厌氧氨氧化菌群逐渐适应 25 °C 的温度, 而 R2 的脱氮效能一直在提升并始终高于 R1 的脱氮效能。如图 1C 所示, 在 100 d 的反应器运行过程中, R1 的总氮去除负荷维持在 $48.39\pm 14.10 \text{ mg N}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 而 R2 的总氮去除负荷维持在 $143.25\pm 24.82 \text{ mg N}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 。两个反应器的总氮去除性能存在显著差异($P<0.001$),

R2 的平均总氮去除负荷是 R1 的 2.96 倍。降温导致反应器脱氮效能大幅降低。

降温也会对厌氧氨氧化污泥菌群氮去除活性产生显著影响, 如图 1D 所示。在反应器运行最后一天监测污泥菌群的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 去除活性, R2 菌群平均 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除活性是 R1 的 4.85 倍, R2 菌群平均 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 去除活性是 R1 的 4.28 倍 ($P<0.001$)。降温导致厌氧氨氧化污泥氮去除活性大幅下降。

在反应器运行最后一天监测污泥菌群的生物量, 计算 2 种温度下污泥菌群生物量的增长速率。R1 与 R2 菌群平均增长速率分别为 $20.88 \text{ mg VSS}/\text{d}$ 和 $32.88 \text{ mg VSS}/\text{d}$ 。降温导致厌氧氨氧化污泥菌群增长速率显著降低($P<0.05$)。

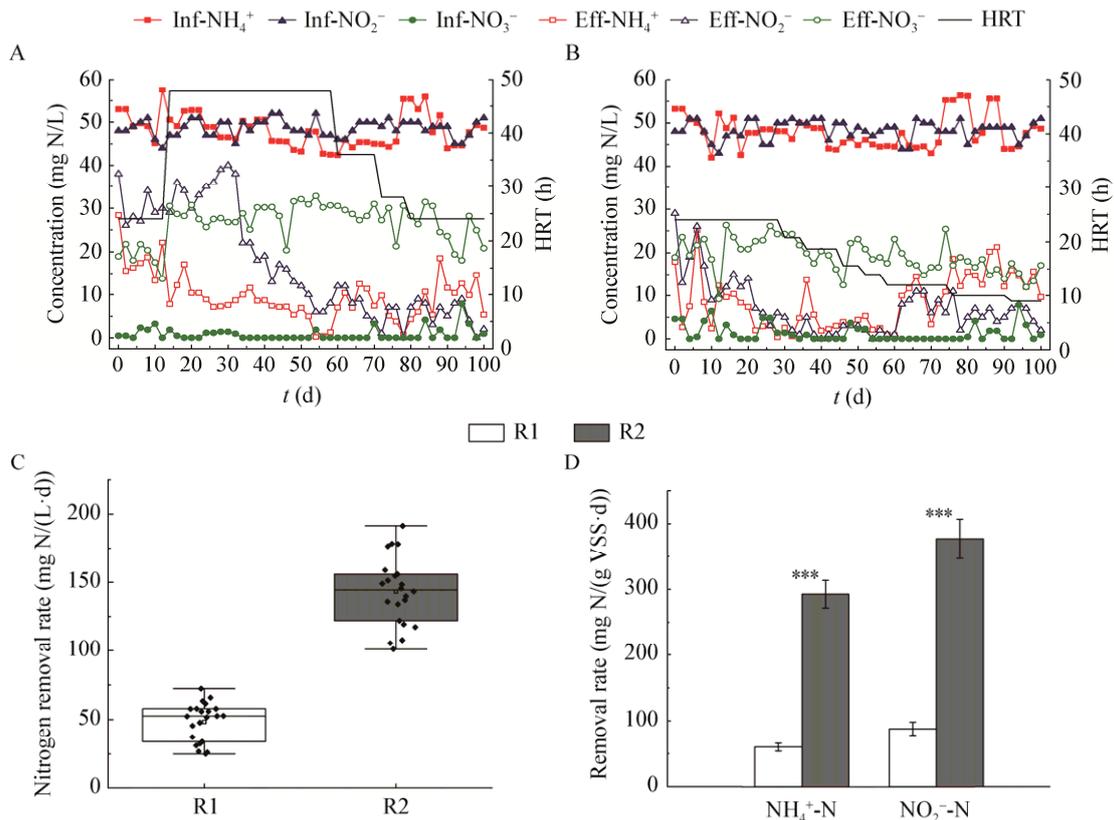


图 1 R1 反应器进出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 变化(A), R2 反应器进出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 变化(B), 不同温度下厌氧氨氧化反应器总氮去除负荷(C), 以及厌氧氨氧化污泥菌群 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 去除活性(D)

Figure 1 Nitrogen concentration profile of R1 (A). Nitrogen concentration profile of R2 (B). Total nitrogen removal rate of anammox reactors under different temperatures (C). $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_2^-\text{-N}$ removal rate of anammox consortia under different temperatures (D)

Note: ***: $P<0.001$.

2.2 降温对污泥群落结构的影响

降温导致厌氧氨氧化污泥群落结构产生明显差异。如图 2 所示,污泥中存在 3 种厌氧氨氧化菌,分别为 *Candidatus Jettenia caeni*、*Candidatus Brocadia sinica* 和 *Candidatus Brocadia fulgida*。这 3 种厌氧氨氧化菌在 R1 中的平均占比分别为 37%、37%和 7%,在 R2 中的平均占比分别为 41%、39%和 6%。R1 中厌氧氨氧化菌的总占比平均为 81%,R2 中厌氧氨氧化菌的总占比平均为 86%,25 °C 条件下污泥中厌氧氨氧化菌的占比要显著低于 35 °C 的污泥($P<0.05$)。同时也检测到了硝化螺菌属(*Nitrospira*),其最适生长温度为 20–30 °C。R1 中硝化螺菌属的总占比平均为 5%,R2 中硝化螺菌属的总占比平均为 4%,25 °C 条件下污泥中硝化螺菌属的占比要显著高于 35 °C 的污泥($P<0.05$)。

2.3 降温对菌群总体代谢通路活性的影响

此次代谢组学分析共检测到 816 种代谢物,其中有 436 种代谢物匹配到了 KEGG 数据库的代谢通路,其他未匹配上的代谢物大多为组成细胞结构的物质。丰度具有显著性差异的代谢物共有 575 种。如图 3A 所示,以 R1 作为实验组,R2 作为对照组,降温导致丰度显著上调的代谢物数量要高于丰度显著下调的代谢物数量。

降温导致污泥菌群的代谢通路活性发生显著变化。图 3B 显示了通路活性具有显著性差异的代谢通路。降温导致菌群的脂肪酸延长、CO₂ 固定途径、TCA 循环与丙酮酸代谢的通路活性显著下调。然而,降温也会导致菌群一些代谢通路活性显著上调,包括肽聚糖合成、蛋白质降解与吸收、氨酰基-tRNA 合成、脂多糖合成、谷胱甘肽代谢、嘌呤与嘧啶代谢、磷酸戊糖途径。

2.4 降温对菌群脂肪酸组成的影响

降温导致污泥菌群的脂肪酸组成发生显著变化。如图 4A 所示,降温导致短链的饱和脂肪酸十一酸(C11:0)及不饱和脂肪酸蓖麻油酸(C18:1)、二十碳烯酸(C20:1)、二十二碳六烯酸(C22:6)的丰度

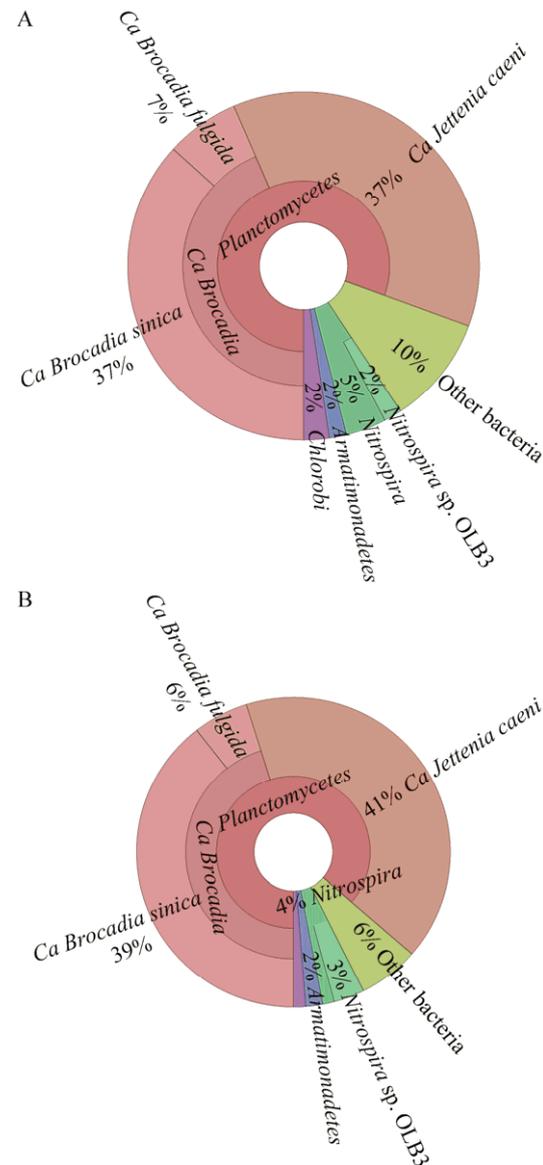


图 2 R1 (A)与 R2 (B)反应器内厌氧氨氧化污泥的群落结构

Figure 2 Community structure of anammox sludge in R1 (A) and R2 (B)

显著上调,而具有较长碳链的软脂酸(C16:0)的丰度显著下调,其倍数变化为 0.82。

2.5 降温对菌群磷脂代谢的影响

降温导致污泥菌群的磷脂代谢发生显著变化,代谢组学检测到了厌氧氨氧化菌群磷脂酰胆碱(PtC)与磷脂酰乙醇胺(PtE)合成通路中代谢物的变化。PtC 与 PtE 生物合成的直接前体物质包括乙醇胺磷酸

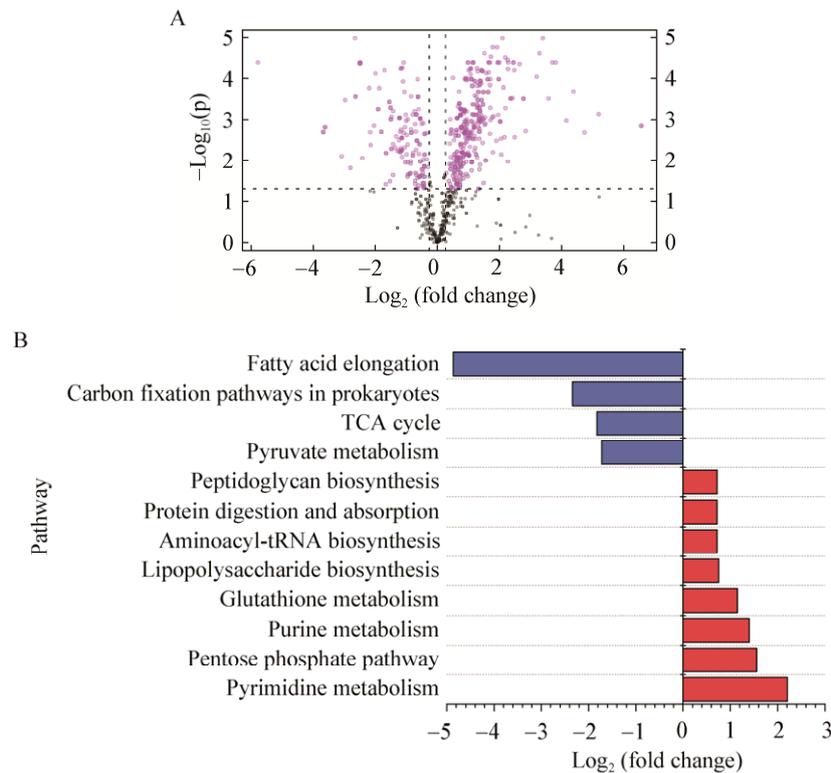


图3 代谢物的丰度差异火山图(A)及 R1 与 R2 污泥菌群代谢通路活性的变化倍数(B)

Figure 3 Statistical analysis of metabolites extracted from consortia samples (A) and metabolic pathway activity fold changes in R1 and R2 samples (B)

注: 紫色圆点表示在实验组与对照组比较中具有显著差异的代谢物($P < 0.05$ 且倍数变化 > 1.2 或倍数变化 < 0.83); 黑色圆点表示在实验组与对照组比较中不具有显著差异的代谢物; 图 3B 只展示具有显著性差异的代谢通路($P < 0.05$ 且倍数变化 > 1.2 或倍数变化 < 0.83 , R1 vs R2).

Note: Purple dots represent metabolites with significant difference in two groups ($P < 0.05$ and Fold change > 1.2 or Fold change < 0.83); Black dots represent metabolites with no significant difference in two groups; Only pathways with significant difference were shown in Figure 3B ($P < 0.05$ and Fold change > 1.2 or Fold change < 0.83 , R1 vs R2).

(PE)、胆碱磷酸(PC)与甘油磷酸(Sn-glycero-3P), 而乙酰胆碱(Acetylcholine)是胆碱磷酸生物合成的前体物质。如图 4B 所示, 随着温度的降低, 乙醇胺磷酸与胆碱磷酸的丰度显著下调, 而甘油磷酸与乙酰胆碱的丰度没有显著变化; 降温造成乙醇胺磷酸与胆碱磷酸的丰度显著下调, 从而导致代谢通路的下游物质磷脂酰胆碱与磷脂酰乙醇胺含量减少。

2.6 降温对菌群嘌呤与嘧啶丰度的影响

降温导致污泥菌群的嘌呤与嘧啶丰度发生显著变化。如图 4C 所示, 随着温度的降低, 胸腺嘧啶(Thymine)的丰度显著下调, 鸟嘌呤(Guanine)、腺嘌呤(Adenine)与尿嘧啶(Uracil)丰度显著上调,

而胞嘧啶(Cytosine)的丰度没有显著变化。鉴于胸腺嘧啶是 DNA 特有的碱基, 其丰度的下调表明降温导致污泥菌群 DNA 的合成减少, 进一步影响到了菌群的细胞增殖。而尿嘧啶作为 RNA 特有的碱基, 其丰度的上调表明降温条件下污泥菌群 RNA 合成的提高。可见, 降温导致厌氧氨氧化菌群 DNA 与 RNA 的合成受到了影响。

2.7 降温对菌群抗低温胁迫关键代谢物丰度的影响

降温导致污泥菌群抗低温胁迫关键代谢物的丰度发生显著变化。如图 4D 所示, 随着温度的降低, 精氨酸(Arginine)、脯氨酸(Proline)、胍丁胺

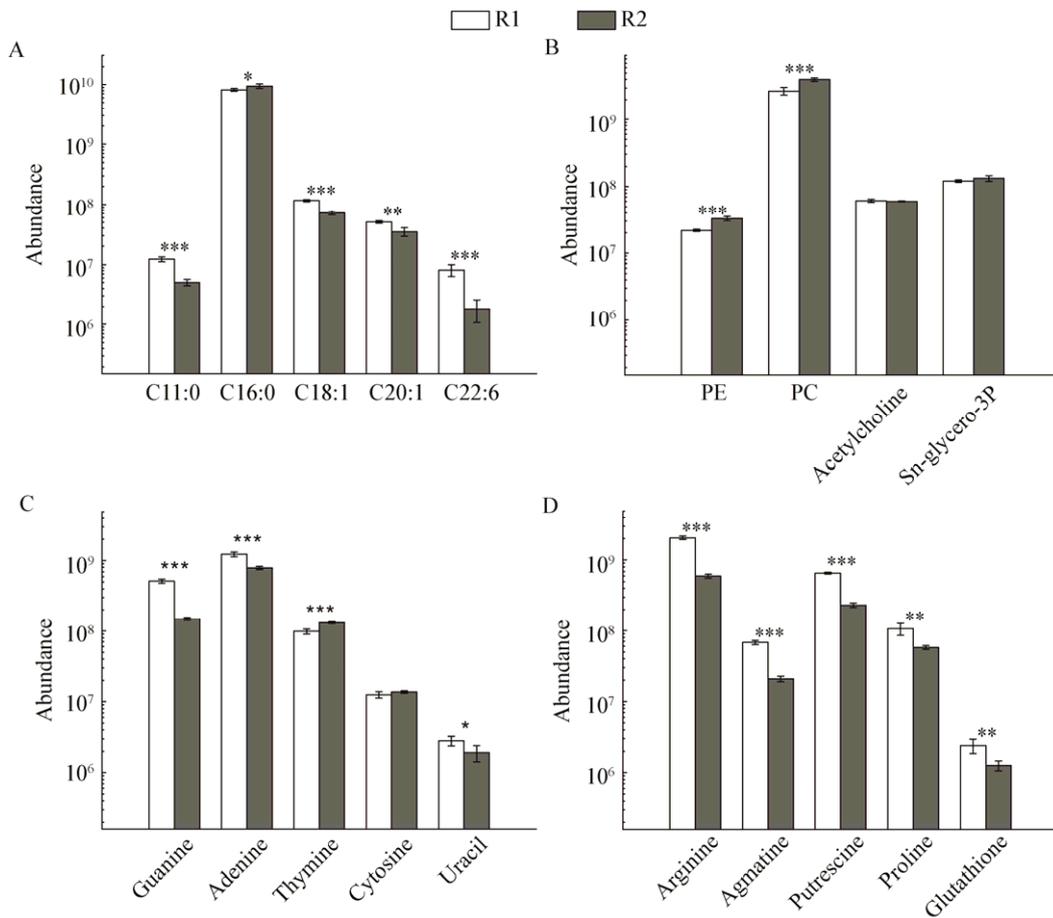


图4 不同温度下厌氧氨氧化污泥菌群脂肪酸丰度(A)、磷脂代谢相关代谢物丰度(B)、嘌呤与嘧啶丰度(C)以及抗低温胁迫关键代谢物丰度(D)

Figure 4 Abundance of fatty acid (A), metabolites involved in phospholipid metabolism (B), purine and pyrimidine (C), and key metabolites against low temperature stress (D) of anammox consortia at different temperatures

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

(Agmatine)、胍丁胺的下游代谢产物腐胺(Putrescine)以及谷胱甘肽(Glutathione)的丰度均显著上调。

2.8 降温对菌群信号分子丰度的影响

降温导致污泥菌群信号分子的丰度发生显著变化。如图5所示, c-AMP、c-GMP与c-di-GMP作为第二信使,随着温度的降低,c-AMP与c-GMP的丰度没有显著变化,而c-di-GMP的丰度显著上调。S-腺苷基甲硫氨酸(S-Adenosylmethionine, SAM)作为厌氧氨氧化菌群中重要的第一信使AHL生物合成的前体物质,降温条件下其丰度显著上调,导致其下游代谢物AHL的含量增加。两种温度下厌氧氨氧化菌的代谢模型如图6所示。

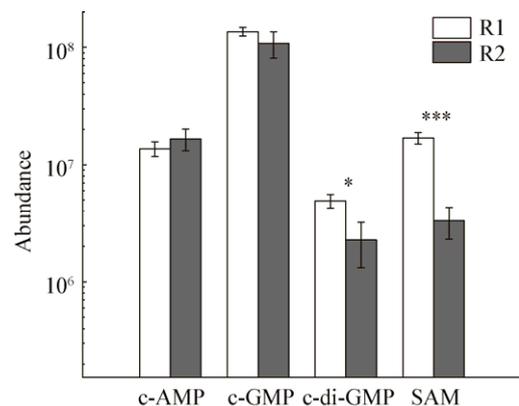


图5 不同温度下厌氧氨氧化污泥菌群信号分子丰度

Figure 5 Signal molecule abundance of anammox consortia at different temperatures

Note: *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

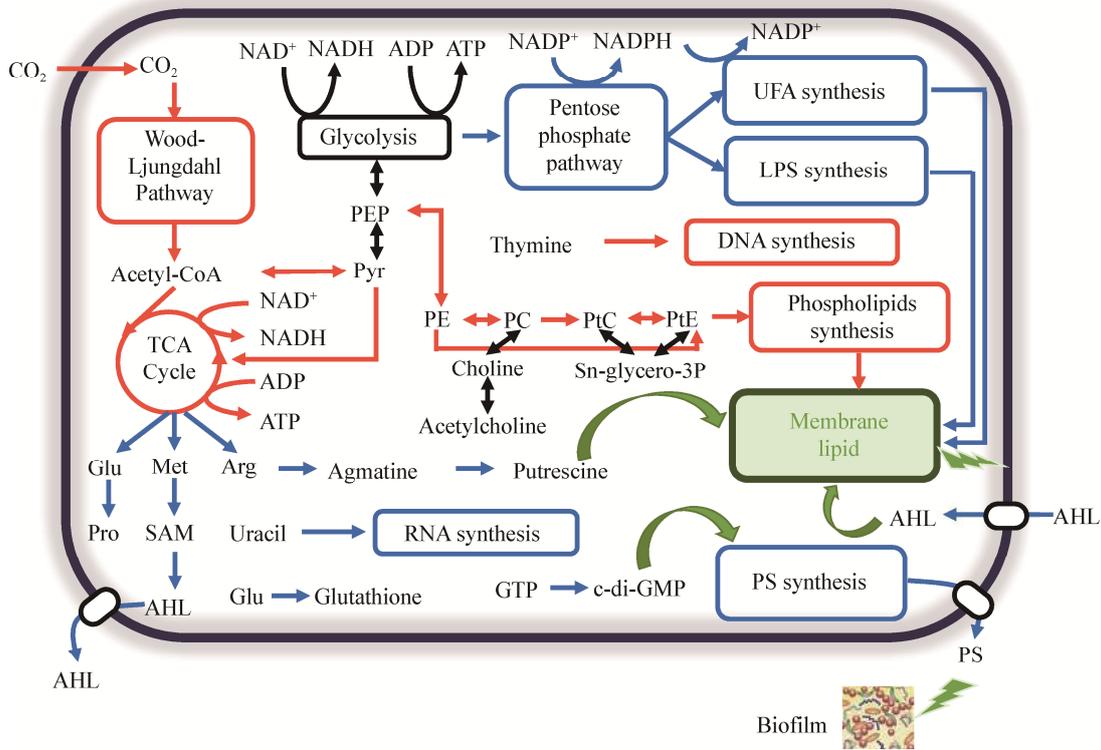


图 6 不同温度下厌氧氨氧化菌的代谢模型

Figure 6 Key metabolic pathways in anammox bacteria at different temperatures

注: 蓝线表示该代谢通路在 25 °C 下是上调的; 红线表示该代谢通路在 35 °C 下是上调的; 绿色箭头表示该代谢物对相应的代谢通路起调控作用; UFA: 不饱和脂肪酸; LPS: 脂多糖; PS: 多糖。

Note: The blue lines indicate that the metabolic pathways were up-regulated at 25 °C; The red lines indicate that the metabolic pathways were up-regulated at 35 °C; The green arrows indicate that the metabolites regulated the corresponding metabolic pathways; UFA: Unsaturated fatty acid; LPS: Lipopolysaccharide; PS: Polysaccharide.

3 讨论与结论

研究活性污泥系统对低温的响应有助于耐冷菌的驯化培养。低温除了会影响到菌群的代谢活性与增长速率, 也会导致菌群调控自身代谢, 进行细胞的全局性响应, 形成多种适应低温环境的生理机制^[13]。本研究以厌氧氨氧化污泥菌群作为研究对象, 试图阐释厌氧氨氧化菌群的低温响应机理。在不同温度下, 厌氧氨氧化菌群具有完全不同的代谢响应。TCA 循环与磷酸戊糖途径同属于细胞的中心碳代谢通路, 细胞内其他代谢通路都是在此基础上进行的。TCA 循环可以产生大量还原力供生命活动需要, 同时通过其中间产物为合成复杂的细胞物质提供碳骨架^[14]。磷酸戊糖途径是细胞嘌呤与

嘧啶核苷酸、脂肪酸以及脂多糖合成的枢纽^[14]。厌氧氨氧化菌属于化能自养型菌, 将 CO₂ 固定后转化为丙酮酸参与细胞物质合成^[15]。研究表明, 35 °C 条件下 TCA 循环上调, 导致菌群能从 TCA 循环中获得的参与一系列氨基酸与碳氢化合物合成的中间产物增多, 进而促进碳骨架的合成, 导致该温度条件下菌群的活性与增长速率提高。而 25 °C 下厌氧氨氧化菌群磷酸戊糖途径上调, 进一步导致了下游通路中 RNA 合成水平的提高、脂肪酸组成的变化以及脂多糖的大量合成。这种差异说明了不同温度条件下的厌氧氨氧化菌群会上调不同的中心碳代谢通路, 进而导致不同的生长与代谢策略。35 °C 条件下菌群偏向于合成碳骨架促进自

身生长,导致厌氧氨氧化菌群活性更强,增长更快。而 25 °C 条件下菌群偏向于提高转录水平、调控膜脂组成、积累抗低温胁迫代谢物等方式来帮助自身抵御低温带来的不利影响。

转录调控与腐胺的积累有助于厌氧氨氧化菌群适应低温。已有研究表明,降温会抑制细菌生长相关基因的转录水平^[1,13-14]。然而本研究发现,基于尿嘧啶含量的上升、氨酰基-tRNA 合成通路活性的上调以及磷酸戊糖途径上调,推测低温条件下厌氧氨氧化菌群 RNA 合成水平反而提高。鉴于低温条件下厌氧氨氧化菌群增长速率下降,菌群提高 RNA 合成水平并不是用于合成碳骨架促进细胞增殖与生长,而是进行低温下的转录调控,如合成冷应激蛋白维持基因正常表达^[16]、合成蛋白酶降解低温下变性蛋白^[14]等。通过转录调控,厌氧氨氧化菌群可以维持低温下基本的生理代谢。在厌氧氨氧化菌群通过转录调控以适应低温的过程中,腐胺合成通路上调。目前尚未有腐胺调控细菌适应低温条件的报道。Song 等的研究表明,在低温驯化过程中,植物叶片中腐胺含量有明显累积,腐胺通过提高抗氧化系统效率,减少低温造成的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)产生,从而降低膜脂的过氧化程度,缓解低温胁迫对植物造成的伤害^[17]。也有研究表明,腐胺可以与 DNA、RNA、蛋白质和磷脂发生相互作用,涉及到酶活性与膜结构的调节^[18-19]。Feng 等的研究表明,腐胺在促进细菌正常增殖与生长的过程中起到重要作用^[5]。本研究首次发现 25 °C 条件下厌氧氨氧化菌群腐胺含量的上调,推测腐胺是调控低温下菌群细胞正常增殖与生长的重要物质,起到调节膜组成与结构的作用。

信号分子在厌氧氨氧化菌适应低温过程中起重要调控作用。已被证实厌氧氨氧化菌具有合成分泌信号分子 AHL 的能力,且基于 AHL 的群体感应系统能够参与菌群代谢的调控^[10,20-21]。目前基于 AHL 的群体感应系统是否参与了厌氧氨氧化菌群低温适应性鲜有报道。本研究结果表明,在 25 °C 条件下菌群 AHL 合成的前体物质 SAM 显著增加,

推测导致厌氧氨氧化菌用于种内通讯的关键信号分子 AHL 的含量增加。已有研究表明,群体感应系统与低温适应性有关联,群体感应信号分子通过改变细菌细胞膜的结构以及冷应激蛋白的含量,进而影响细菌低温下的代谢调控^[22]。本研究发现,25 °C 条件下菌群 AHL 含量增加的同时,不饱和脂肪酸与短链饱和脂肪酸的含量增加,菌群通过改变膜脂组成进而改变了细胞膜结构,提高了低温条件下细胞膜的流动性。同时,随着温度的下降,厌氧氨氧化菌群脂多糖的合成上调,进而改变了细胞膜的组成以应对低温胁迫。厌氧氨氧化菌具有特殊的细胞膜组成,阶梯烷膜脂与胆碱磷酸、乙醇胺磷酸或甘油磷酸结合形成膜脂作为细胞膜骨架^[23]。本研究结果表明,25 °C 条件下厌氧氨氧化菌基于胆碱磷酸与乙醇胺磷酸的磷脂代谢发生了显著变化。以上分析结果表明,基于 AHL 的群体感应系统很可能通过调控厌氧氨氧化菌细胞膜结构参与了厌氧氨氧化菌的低温适应性。本研究表明,通用第二信使 c-AMP 与 c-GMP 随着温度的降低,其含量并没有显著变化,而 c-di-GMP 的含量显著增加。Guo 等的研究表明,c-di-GMP 通过调控胞外多糖的分泌以促进厌氧氨氧化污泥生物膜的形成^[24]。本研究中,随着温度降低,厌氧氨氧化菌通过合成更多的 c-di-GMP 以促进生物膜的形成,有利于菌群抵抗低温造成的不利生长环境。

本研究以厌氧氨氧化污泥菌群为研究对象,从分子机理的角度初步分析了污泥菌群适应低温环境的生理机制,阐释了转录调控、腐胺以及信号分子在菌群适应低温过程中的重要作用。低温下厌氧氨氧化菌群通过大量合成腐胺与信号分子,通过调控膜脂组成与改变膜结构的方式,调控菌群代谢以适应低温环境。后续还需要深入、系统研究基于活性污泥系统菌群的低温响应机制,从而为耐冷菌的驯化培养奠定良好的理论基础。

REFERENCES

- [1] de Maayer P, Anderson D, Cary C, et al. Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles[J]. EMBO

- Reports, 2014, 15(5): 508-517
- [2] Casanueva A, Tuffin M, Cary C, et al. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies[J]. Trends in Microbiology, 2010, 18(8): 374-381
- [3] Tomaszewski M, Cema G, Ziemińska-Buczyńska A. Influence of temperature and pH on the anammox process: a review and meta-analysis[J]. Chemosphere, 2017, 182: 203-214
- [4] Guo YZ, Zhao YP, Zhu TT, et al. A metabolomic view of how low nitrogen strength favors anammox biomass yield and nitrogen removal capability[J]. Water Research, 2018, 143: 387-398
- [5] Feng Y, Zhao YP, Guo YZ, et al. Microbial transcript and metabolome analysis uncover discrepant metabolic pathways in autotrophic and mixotrophic anammox consortia[J]. Water Research, 2018, 128: 402-411
- [6] Guo YZ, Liu ST, Tang X, et al. Insight into c-di-GMP regulation in anammox aggregation in response to alternating feed loadings[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(16): 9155-9164
- [7] Zhao YP, Feng Y, Li JQ, et al. Insight into the aggregation capacity of anammox consortia during reactor start-up[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(6): 3685-3695
- [8] van De Graaf AA, de Bruijn P, Robertson LA, et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor[J]. Microbiology, 1996, 142(8): 2187-2196
- [9] American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater[M]. 19th ed. New York: American Public Health Association, 1995
- [10] Tang X, Guo YZ, Wu SS, et al. Metabolomics uncovers the regulatory pathway of acyl-homoserine lactones based quorum sensing in anammox consortia[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(4): 2206-2216
- [11] Hou XL, Liu ST, Zhang ZT. Role of extracellular polymeric substance in determining the high aggregation ability of anammox sludge[J]. Water Research, 2015, 75: 51-62
- [12] Aggio RBM, Ruggiero K, Villas-Bôas SG. Pathway Activity Profiling (PAPi): from the metabolite profile to the metabolic pathway activity[J]. Bioinformatics, 2010, 26(23): 2969-2976
- [13] Ting L, Williams TJ, Cowley MJ, et al. Cold adaptation in the marine bacterium, *Sphingopyxis alaskensis*, assessed using quantitative proteomics[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(10): 2658-2676
- [14] Jozefczuk S, Klie S, Catchpole G, et al. Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*[J]. Molecular Systems Biology, 2010, 6: 364
- [15] Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete[J]. Nature, 1999, 400(6743): 446-449
- [16] Giuliadori AM, Di Pietro F, Marzi S, et al. The *cspA* mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA[J]. Molecular Cell, 2010, 37(1): 21-33
- [17] Song YJ, Diao QN, Qi HY. Putrescine enhances chilling tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through modulating antioxidant systems[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(11): 3013-3027
- [18] Gupta K, Dey A, Gupta B. Plant polyamines in abiotic stress responses[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2013, 35(7): 2015-2036
- [19] Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, et al. Advances in polyamine research in 2007[J]. Journal of Plant Research, 2007, 120(3): 345-350
- [20] Tang X, Guo YZ, Jiang B, et al. Metagenomic approaches to understanding bacterial communication during the anammox reactor start-up[J]. Water Research, 2018, 136: 95-103
- [21] Tang X, Liu ST, Zhang ZT, et al. Identification of the release and effects of AHLs in anammox culture for bacteria communication[J]. Chemical Engineering Journal, 2015, 273: 184-191
- [22] Zheng BB. Mechanism of QS system involved in temperature adaptation in *Bacillus cereus* MYB41-22[D]. Kunming: Master's Thesis of Kunming University of Science and Technology, 2018 (in Chinese)
郑贝贝. 耐冷菌 *Bacillus cereus* MYB41-22 群体感应系统与其温度适应性相关功能研究[D]. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文, 2018
- [23] Zheng P, Zhang L. Characterization and classification of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2009, 35(5): 473-481 (in Chinese)
郑平, 张蕾. 厌氧氨氧化菌的特性与分类[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2009, 35(5): 473-481
- [24] Guo YZ, Liu ST, Tang X, et al. Role of c-di-GMP in anammox aggregation and systematic analysis of its turnover protein in *Candidatus Jettenia caeni*[J]. Water Research, 2017, 113: 181-190