

研究报告

云南热带户用沼气池的原核生物群落结构研究

李秋敏¹ 吴燕² 董明华² 田光亮¹ 杨斌¹ 张莉娟¹ 李映娟¹ 尹芳¹ 赵兴玲¹
王永霞² 肖炜² 张无敌^{1*} 崔晓龙^{2*}

(1. 云南师范大学 云南 昆明 650500) A-Lin

(2. 云南大学 云南省微生物研究所 云南 昆明 650091)

摘要:【目的】揭示云南热带农村户用沼气池中的原核生物(细菌和古菌)的群落结构特征。【方法】采用 16S rRNA 基因克隆文库技术对云南(北)热带代表性气候区的户用沼气池中的原核生物(细菌和古菌)多样性进行研究。【结果】得到细菌 330 条有效序列,划分为 108 个 OTUs,文库覆盖度为 81.5%;古菌有效序列 185 条,划分为 17 个 OTUs,文库覆盖度为 97.8%。通过 GenBank 数据库进行相似性比对与系统发育分析,结果表明:大部分细菌为未知细菌(Unclassified bacteria, 占 24.19%),优势细菌类群归属拟杆菌门(Bacteroidetes, 占 23.58%)、绿弯菌门(Chloroflexi, 占 21.46%)、厚壁菌门(Firmicutes, 占 13.91%)和变形菌门(Proteobacteria, 占 8.74%);古菌主要的优势类群为乙酸盐营养型的甲烷八叠球菌目(Methanosarcinales)的髯毛甲烷菌属(*Methanosaeta*, 占 76.75%);此外还检测到少量未培养的泉古菌门细菌(*Crenarchaeota*, 占 9.19%)。【结论】云南(北)热带代表性气候区的农村户用沼气池中的微生物种类十分丰富,不同微生物种类的丰度存在明显差异,并存在明显优势种群,且细菌比古菌具有更丰富的多样性。

关键词: 户用沼气池, 原核生物, 细菌, 古菌, 群落结构, 16S rRNA 基因克隆文库技术

Prokaryotic community structure of household biogas digesters in the tropical climate zones of Yunnan

LI Qiu-Min¹ WU Yan² DONG Ming-Hua² TIAN Guang-Liang¹ YANG Bin¹
ZHANG Li-Juan¹ LI Ying-Juan¹ YIN Fang¹ ZHAO Xing-Ling¹ WANG Yong-Xia²
XIAO Wei² ZHANG Wu-Di^{1*} CUI Xiao-Long^{2*}

(1. Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China)

(2. Yunnan University, Yunnan Institute of Microbiology, Kunming, Yunnan 650091, China)

Abstract: [Objective] Unveil the characteristics of prokaryotic (bacteria and archaea) community structure of household biogas digesters in the tropical climate zones of Yunnan. [Methods] 16S rRNA gene clone library technique was constructed to study prokaryotic (bacteria and archaea) diversity of the household biogas digesters in Yunnan (north) typical tropical climate zones. [Results] Total 330 effective sequences of bacteria were obtained and divided into 108 OTUs, bacterial library coverage is

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31160123/C0309); 云南省科技条件平台建设项目(No. 2010DH012)

*通讯作者: 张无敌: wootichang@163.com; 崔晓龙: xlcuiynu@aliyun.com

收稿日期: 2014-04-23; 接受日期: 2014-06-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-07-30

81.5%; 185 archaeal effective sequences were obtained and divided into 17 OTUs, archaeal library coverage is 97.8%. A typical sequence in each OTUs was selected and to perform similarity comparison and analysis in the GenBank database, the results showed that: most bacteria are uncultured bacteria (24.19%), the dominant bacterial phyla include Bacteroidetes (23.58%), Chloroflexi (21.46%), Firmicutes (13.91%) and Proteobacteria (8.74%); the dominant archaeal group is *Methanosaeta* (76.75%) of the order Methanosarcinales which is acetoclastic. In addition, a small amount of uncultured *Crenarchaeota* archaea (9.19%) was detected. **[Conclusion]** The results showed that microbial species are very rich in the household biogas digesters of Yunnan (north) typical tropical climate zones, different microbial species have obvious differences in the abundance and have obvious dominant population, and the diversity of bacteria is more abundant than that of archaea.

Keywords: Household biogas digesters, Prokaryotes, Bacteria, Archaea, Community structure, 16S rRNA gene clone library technique

沼气发酵系统中众多的微生物为未培养微生物(As-yet uncultured microorganisms)^[1-3],这使得沼气发酵系统成为“黑箱”^[4-5],对其中的生态学基本问题认识有限,而基于纯培养的传统微生物学技术难以揭示沼气发酵系统的生物过程。近年来,研究者积极采用新的分子生态学方法与技术来研究沼气发酵系统中的生态学基本问题,但由于着重点不同,很难涉及系统中微生物群落的方方面面,特别是不同地理区域与气候条件下的沼气发酵系统中微生物群落多样性及差异等问题^[6]。云南沼气发酵应用具有独特地理、气候优势和特征,是发展沼气的理想地区,其中景洪市位于云南省南端,西双版纳傣族自治州中部,属北热带,年平均气温约 21.7 °C,长夏无冬,基本无霜,非常适合沼气发酵^[7],且目前对于云南省热带气候区域的农村户用沼气池的微生物群落多样性研究还尚未见报道,因此本研究采用 16S rRNA 基因克隆文库技术(即 rRNA 分析法)^[8]首次对云南景洪市普文镇农村户用沼气池中的细菌和古菌多样性进行研究,以期揭示云南热带农村户用沼气池中的细菌和古菌的群落结构特征,并通过比较不同沼气池中优势微生物类群,探讨影响沼气池中群落时空动态的主要因素,以及不同沼气池中产甲烷菌主要营养类型存在差异的原因,为云南省不同气候区域沼气池微生物群落多样性的比较研究以及高效沼气发酵系统的设

计与建立奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究于 2012 年 7 月 10 日自云南省西双版纳州景洪市普文镇秤杆村委会曼果塘村(以下简称景洪,东经 101°05',北纬 22°54',海拔 838.90 m)采集了 10 个户用沼气池活性污泥样品,样品用 50 mL 无菌 EP 管冰浴带回实验室-80 °C 保存,样品经过 DGGE 初步分析其中的原核微生物多样性,分析结果显示原核微生物受沼气池发酵状态、原料、进料情况、建池时间等不同因素的影响,且相同区域不同样品间微生物多样性差异较小,因此考虑到实验成本、工作量以及必要性,本文选择了 1 个以猪粪为主要发酵原料且发酵正常的沼气池活性污泥样品,采用 16S rRNA 基因克隆文库技术进一步深入地分析其中的原核微生物多样性。

此户用沼气池池容为 6 m³,2007 年建池后开始使用,以猪粪为主要发酵原料,此外还添加一些季节作物(夏季为咖啡豆壳、红薯藤等),能正常发酵产沼气且火焰颜色为蓝黄色(甲烷含量约 65%)^[9],采样当日气温 34 °C,池温 26 °C,所得沼液 pH 6.50,在正常范围之内。经测定沼气池发酵液的各项理化参数分别为: pH 7.37, TS 11.18%, 总磷 190.19 mg/L, 氨氮 231.9 mg/L, COD 6 989.4 mg/L。

1.2 实验方法

1.2.1 样品基因组 DNA 的提取: 按照 PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA)试剂盒操作说明进行提取。

1.2.2 16S rRNA 基因克隆文库构建: 细菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增引物为 27F (5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCG-3')和 1541R (5'-AAGGAGGT GATCCAGCCGCA-3')^[10]; 古菌引物为 ARC-8F (5'-TCCGGTTGATCCTGCC-3')和 ARC 1492R (5'-G GCTACCTTGTTACGACTT-3')^[11]。

细菌和古菌扩增体系和条件相同。PCR 扩增体系: 5 μ L 10 \times PCR buffer (含 1.5 mmol/L Mg^{2+}), 4 μ L dNTPs mix (2.5 mmol/L each), 5 μ L BSA (0.1%), 上下游引物各 2 μ L (10 pmol/L), 2.5 U *Taq* 酶(5 U/ μ L), 样品 DNA 溶液 3 μ L, 补水至 50 μ L。PCR 扩增条件采用 Touch down PCR^[11]: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60–52 $^{\circ}$ C (每循环降 0.5 $^{\circ}$ C) 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 进行 16 个循环; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 进行 9 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。切胶纯化选用 SanPrep 柱式 DNA 回收试剂盒[生工生物工程(上海)有限公司]。使用 pMD[®]19-T Vector 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]作为连接反应试剂。细菌和古菌分别挑取 500 和 200 个单菌落进行 16S rRNA 基因片段序列测序。

1.2.3 分析方法: 克隆测序所得的序列先采用 Mallard-1.02 进行嵌合体检测^[12], 去除确定的和疑似嵌合体; 可操作分类单元(OTU)的划分采用软件 DOTUR 1.53^[13], 将相似性 $\geq 97\%$ 的划分为同一个 OTU; 每个 OTU 中选取一个代表序列在 GenBank (www.ncbi.nih.gov)数据库中进行相似性比对; 采用 MEGA 4.0 软件邻接(Neighbor-Joining)法构建系统进化树, Kimura-2 模型计算进化距离^[14]; 采用 SPADE 软件计算 Good's coverage^[15]。

2 结果与分析

2.1 细菌克隆文库

序列去除低质量序列和嵌合体, 得 330 条有效序列, 文库覆盖度为 81.5%, 330 条序列按 $\geq 97\%$ 的相似度被划分为 108 个 OTUs, 经在 GenBank 数据库中比对后 96 个 OTUs (共 250 条序列, 占 75.81%) 可确定其分类地位, 其余 12 个 OTUs (共 80 条序列, 占 24.19%) 不能确定其分类地位, 为“未知细菌 (Unclassified bacteria)”。108 个 OTUs 中相似度大于等于 97% 的有 67 个 (253 条序列, 占 76.67%), 相似度在 90%–96% 的有 35 个 (66 条序列, 占 20.00%), 80%–89% 的有 6 个 (11 条序列, 占 3.33%)。96 个可确定分类地位的 OTUs 中相似度大于 97% 的可培养细菌仅有 9 个 OTUs (22 条序列), 占 6.67%, 其余 93.33% 均为未培养细菌, 且在此部分未培养细菌中有 50 个 OTUs (129 条序列, 占 39.09%) 仅能鉴定到门。

在 108 个 OTUs 中, 共检测到 13 个已知门的细菌类群, 各门的相对丰度如图 1 所示, 其中除未知细菌丰度最高为 24.19% 外, 已知门的类群中相对丰度最高的是拟杆菌门 (Bacteroidetes, 17 个 OTUs, 占 23.58%), 其次是绿弯菌门 (Chloroflexi, 25 个 OTUs, 占 21.46%)、厚壁菌门 (Firmicutes, 21 个 OTUs, 占 13.91%)、变形菌门 (Proteobacteria, 14 个 OTUs, 占 8.74%), 它们所占比例之和达 67.69%, 其余门的类群丰度较小, 共计 8.12%。在拟杆菌门中包括拟杆菌目 (Bacteroidales)、鞘脂杆菌目 (Sphingobacteriales), 其中以拟杆菌目居多, 包括紫单胞菌科 (Porphyromonadaceae) 和拟杆菌科 (Bacteroidaceae)。绿弯菌门中以厌氧绳菌纲 (Anaerolineae)、厌氧绳菌目 (Anaerolineales)、厌氧绳菌科 (Anaerolineaceae) 居多, 包括纤绳菌属 (*Leptolinea*)、*Bellilinea*、*Levilinea*、*Dehalococcoides* 四个属。厚壁菌门中除只能鉴定到门的以外, 大部分属于梭菌纲 (Clostridia)、梭菌目 (Clostridiales), 少

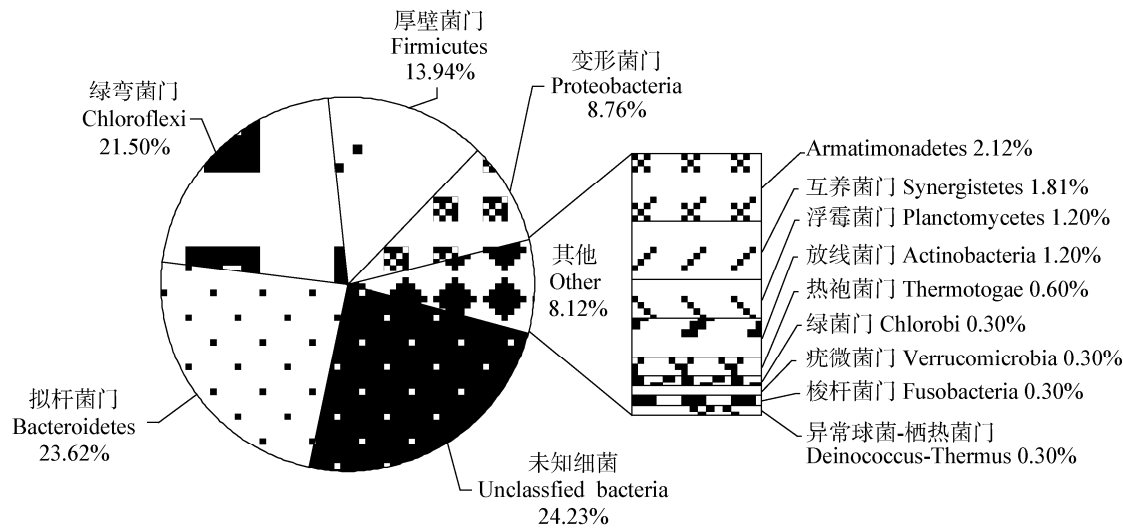


图 1 细菌克隆文库各门类相对丰度
Figure 1 Relative abundance of various categories of bacterial clone libraries

部分属于芽孢杆菌纲 (Bacilli)、芽孢杆菌目 (Bacillales), 包括梭菌属 (*Clostridium*)、互营单胞菌属 (*Syntrophomonas*)、解纤维素菌属 (*Cellulosilyticum*)、醋弧菌属 (*Acetivibrio*)、*Alkalibacter*、*Pelospora* 六个属。变形菌门中除只能鉴定到门的以外, 其余均属于 δ 变形菌纲 (Deltaproteobacteria), 包括互营菌属 (*Syntrophus*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、*Smithella*, 其中以互营菌属居多。各门类中能鉴定到属的较少, 大部分仅能鉴定到目和科, 在已鉴定到属的细菌中优势属为: 拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和梭菌属 (*Clostridium*)。丰度较小的门类包括 Armatimonadetes (2.12%)、互养菌门 (Synergistetes, 1.81%)、浮霉菌门 (Planctomycetes, 1.20%)、放线菌门 (Actinobacteria, 1.20%)、热袍菌门 (Thermotogae, 0.60%)、绿菌门 (Chlorobi, 0.30%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia, 0.30%)、梭杆菌门 (Fusobacteria, 0.30%) 和异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus, 0.30%), 其中 5 个门的丰度均小于 1%。

在系统进化树中 (图 2), 除未知细菌 (Unclassified bacteria) 外, 各门类在系统进化树上均显现出明显的聚集优势, 而未知细菌在系统进化树

上的分布比较分散, 没有形成明显的聚集现象。

2.2 古菌克隆文库

测序所得序列去除低质量序列和嵌合体, 得 185 条有效序列, 文库覆盖度为 97.8%。185 条序列按 $\geq 97\%$ 的相似度被划分为 17 个 OTUs (表 1), 且 17 个 OTUs 均能鉴定到门, 其中 9 个 OTUs (168 条序列) 属于广古菌门 (Euryarchaeota, 占 92.81%), 8 个 OTUs (17 条序列) 属于泉古菌门 (Crenarchaeota, 占 9.19%)。17 个 OTUs 中相似度 $\geq 97\%$ 的有 16 个, 其余 1 个相似度为 94%, 表明比对结果可信度较高。17 个 OTUs 中可培养的有 6 个 OTUs (145 条序列, 占 78.38%), 其余 11 个 OTUs (21.62%) 均为未培养的类型, 且未培养古菌中的 7 个 OTUs (17 条序列, 9.19%) 归属泉古菌门, 4 个 OTUs (23 条序列, 12.43%) 为广古菌门, 表明此克隆文库中广古菌门古菌为优势菌群。

在系统进化树中 (图 3), 17 个 OTUs 被分为两支: 广古菌门和泉古菌门, 广古菌门中可培养的和未培养的分别聚集成两支, 可培养广古菌门菌包括甲烷八叠球菌目 (Methanosarcinales) 和甲烷微菌目 (Methanomicrobiales), 其中甲烷八叠球菌目比例较高, 达 77.83%, 八叠球菌目中鬃毛甲烷菌属

(*Methanosaeta*) 占 97.18%，甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)和甲烷叶菌属(*Methanolobus*)极少，表明广古菌门中主要的优势类群属甲烷八叠球菌目中的鬃毛甲烷菌属。未培养的广古菌门古菌包括未培养的甲烷球菌科 (Uncultured

Methanosarcinaceae, 1.08%)和未培养的广古菌门古菌(Uncultured euryarchaeote, 4.86%)，两者所占比例较少，表明在广古菌门中可培养的古菌居多。泉古菌门的菌均为未培养古菌，所占比例为 9.19%，仅为广古菌门的 1/9。

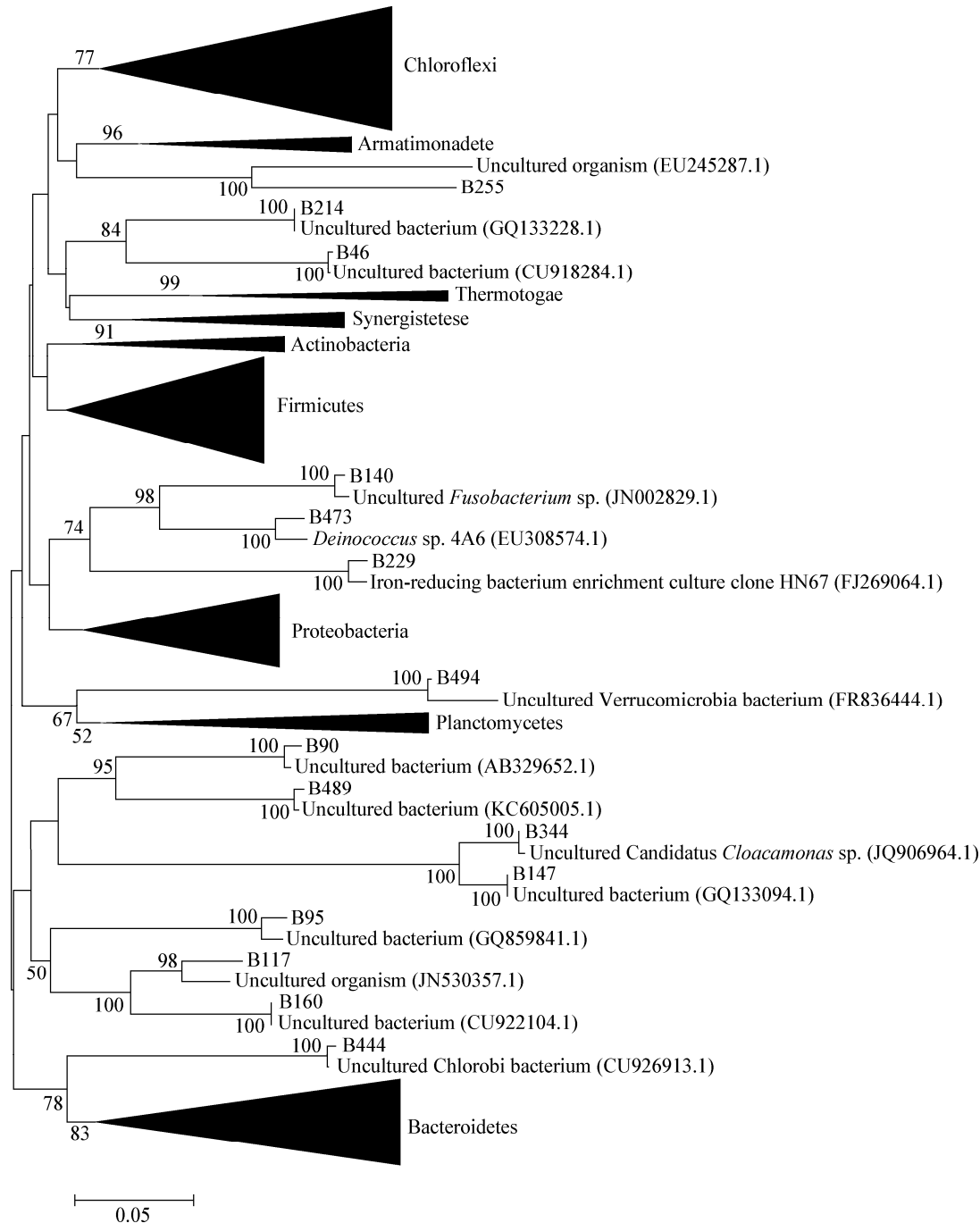


图 2 细菌克隆文库系统进化树(简图)

Figure 2 Phylogenetic tree of the bacterial clone libraries (sketch)

表 1 古菌克隆文库 BLAST 比对结果						
Table 1 BLAST alignment results of archaeal clone library						
OTU 序号 OTU No.	比例 Proportion (%)	系统发育相似度最高微生物 (登录号) The closest related taxon (accession numbers)	相似度 Similarity (%)	属名称 Genus	功能 Functional group	来源 Source
BA01	1.08	Uncultured Methanosarcinaceae archaeon (JQ079960.1)	98	—	—	Anoxic sediment of Lake
BA02	1.08	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1 (NR_074177.1)	98	<i>Methanospirillum</i>	Hydrogenotrophic	—
BA03	0.54	<i>Methanospirillum</i> sp. X-18 (KF153052.1)	97	<i>Methanospirillum</i>	Hydrogenotrophic	Soil
BA04	0.54	Uncultured Methanomicrobiales archaeon (KF198699.1)	94	—	—	Cellulose- degrading enrichment cultures
BA05	71.35	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6 (NR_102903.1)	99	<i>Methanosaeta</i>	Aceticlastic	—
BA06	3.24	<i>Methanosaeta concilii</i> (KF431940.1)	98	<i>Methanosaeta</i>	Aceticlastic	Soil horizon of paddy fields
BA07	1.08	<i>Methanolobus profundi</i> (NR_041665.1)	97	<i>Methanolobus</i>	methyilotrophic	Deep subsurface sediments in a natural gas field
BA08	1.08	<i>Methanosarcina mazei</i> Go1 (NR_074221.1)	100	<i>Methanosarcina</i>	Hydrogenotrophic/acet iclastic/methyilotrophic	—
BA09	4.86	Uncultured euryarchaeote (HQ141835.1)	99	—	—	Leachate sediment
BA10	5.95	Uncultured crenarchaeote (KC661944.1)	99	—	—	Root surfaces
BA11	1.08	Uncultured crenarchaeote (JX576137.1)	99	—	—	Pit mud
BA12	0.54	Uncultured <i>crenarchaeote</i> (KC661852.1)	99	—	—	Root surfaces
BA13	1.62	Uncultured crenarchaeote (FJ968086.1)	99	—	—	Cold sulfur-rich spring
BA14	1.08	Uncultured crenarchaeote (JN052741.1)	99	—	—	Anaerobic digestion of animal waste
BA15	3.24	Uncultured crenarchaeote (KC661655.1)	98	—	—	Root surfaces
BA16	1.08	Uncultured crenarchaeote (HQ141842.1)	98	—	—	—
BA17	0.54	Uncultured crenarchaeote (KC661657.1)	98	—	—	Anoxic sediment of Lake

在可培养古菌中，主要功能群为：氢营养型、乙酸盐营养型，其中氢营养型的主要属甲烷螺菌属 (*Methanospirillum*, 1.62%)、乙酸盐营养型的主要属鬃毛甲烷菌属(76.75%)，部分古菌未能确定其营养类型，表明在沼气发酵系统中甲烷的形成以乙酸盐代谢产甲烷为主，这与张无敌等^[16]认为的在厌氧消

化过程中，甲烷的产生有 72%是来源于乙酸盐的代谢, 28%则来源于氢还原二氧化碳的理论是一致的。此外，在系统发育上与克隆文库最匹配的细菌和古菌均来自环境样品，如猪或其他动物肠道、污水处理厂污泥或生物膜、深层土壤、厌氧反应器或沼气池、垃圾渗滤液以及堆肥等(表 1)。

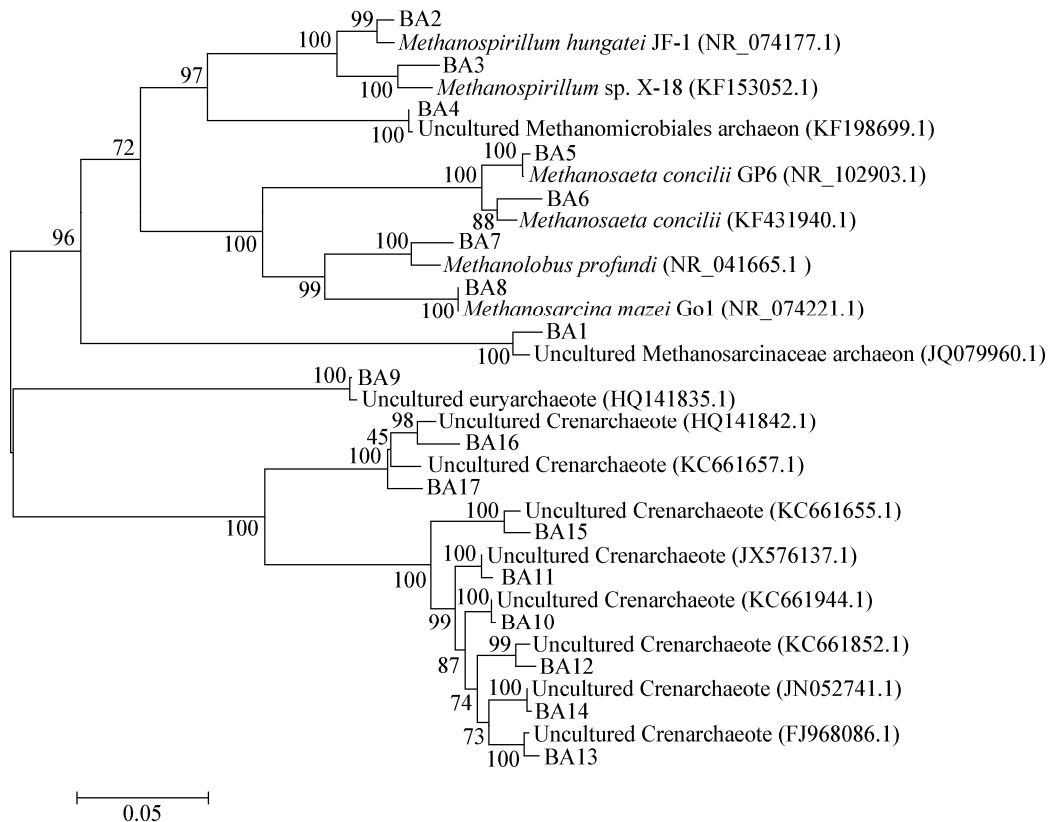


图3 古菌克隆文库系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of archaeal clone library

2.3 序列号

本研究所得序列的 GenBank 登录号为：细菌：KJ730065–KJ730172；古菌：KJ730048–KJ730064。

3 讨论

本文对一发酵正常且使用5年的农村户用沼气池的样品进行细菌和古菌16S rRNA基因克隆文库的构建与多样性分析，结果表明：景洪农村户用沼气池中存在大量的未培养细菌(93.33%)，优势细菌类群是拟杆菌门(23.58%)、绿弯菌门(21.46%)、厚壁菌门(13.91%)和变形菌门(8.74%)，主要的优势属为：拟杆菌属(*Bacteroides*)和梭菌属(*Clostridium*)，分布于拟杆菌门和厚壁菌门，大部分为发酵性细菌，厚壁菌门中部分细菌能水解纤维素，拟杆菌门中的大部分细菌能水解蛋白质^[17]；古菌主要的优势类群是甲烷八叠球菌目的鬃毛甲烷菌属(76.75%)。本研究与大部分以猪粪为主要原料的沼气池中细

菌和古菌优势类群的研究结果是类似的。相关的研究显示^[17-23]：以猪粪为主要原料的沼气池中细菌主要优势类群基本相似，但丰度存在差异，而古菌类群和丰度存在较大差异，这可能是由于来源不同的猪粪所含成分基本相同，主要包括纤维素、蛋白质、脂肪等，因而降解这几类物质的发酵性细菌和产氢产乙酸菌类型基本相同，但因各成分含量不一样以及温度等因素的差异致使不同类型的细菌丰度不同，而古菌类群和丰度存在的差异可能与沼气池的投料量、发酵温度等有关，不同的投料量和发酵温度致使发酵性细菌和产氢产乙酸菌产生的供产甲烷菌产甲烷的物质不同，因此产甲烷菌的代谢类型和丰度差异较大。

本文中优势古菌为甲烷鬃毛菌属，为乙酸盐营养型；而不同的研究^[17-24]显示，不同沼气池中产甲烷菌的营养类型不同，主要分为两类：氢营养型和乙酸盐营养型，而沼气池中产甲烷菌营养类型的影

响因素可能和有机负荷率、温度、挥发性脂肪酸等有关^[25-28]。

在沼气池中除优势细菌和古菌外, 还存在着一些丰度较小的细菌和古菌, 虽然这些细菌和古菌在沼气发酵微生物中的比例较小, 但发挥着重要的作用, 如放线菌门的细菌大多是好气型腐生菌, 主要能促使发酵原料腐烂以便于分解, 因此在沼气发酵中含 量 较 少; 浮 霉 菌 门 包 括 浮 霉 菌 纲、Phycisphaerae、厌氧氨化菌 3 个纲, 该类微生物广泛存在于厌氧环境中, 但可培养的专性厌氧的浮霉菌门的物种较少, 其中厌氧氨化菌能将氨氮转化为氮气去除^[29]; 热袍菌门是一类嗜热或者超嗜热细菌, 可以利用碳水化合物, 不同的种类可适应不同的盐浓度和氧含量。由此可以看出, 在沼气发酵过程中复杂有机物的代谢是由不同微生物共同作用的, 不论微生物比例大小, 每种微生物类群在其中发挥着不可替代的作用。

在古菌中, 除大部分为广古菌门的产甲烷菌外, 还有少部分是泉古菌门的未培养细菌。在大多数研究中显示沼气发酵过程中的古菌均为广古菌门, 但也有少量文献检测到泉古菌门菌的存在。目前获得纯培养的泉古菌, 主要是从高温和超高温环境中分离出的; 同时, 研究者们也已经证实了非高温环境中普遍存在泉古菌, 如广泛存在于土壤、淡水和海洋生态系统及动物体内消化系统等。这些环境中, 泉古菌在种类上和数量上的优势以及其鲜明的生理代谢方式似乎都表明, 其在所处的生态系统中扮演着重要的角色^[30]。因此, 本文古菌中泉古菌门的存在并非意外, 泉古菌门在沼气发酵中占有一定比例但其具体的作用目前尚不清楚, 有待深入研究。

本文通过构建 16S rRNA 基因克隆文库对户用沼气池中的原核微生物进行了研究, 在分析的克隆数目足够多的情况下, 16S rRNA 基因克隆文库可以定量和定性地反映群落组成^[31], 但是 Sun 等^[32]研究表明 16S rRNA 基因在原核生物内往往同时存

在多个拷贝, 而且拷贝之间的基因序列并不完全一致, 因此在原核生物生态学研究, 基于 16S rRNA 基因的群落多样性分析会引起一定程度的高估, 因此本文通过构建 16S rRNA 基因克隆文库对户用沼气池中的原核微生物多样性进行分析的结果存在一定程度的高估, 不能真实地反映其中原核微生物的多样性, 但也能在一定程度上对户用沼气池的原核微生物多样性进行了解, 具有一定的科学意义。此外, 克隆文库的构建与分析成本较高、工作量较大, 不适合对微生物群落结构变化进行动态跟踪研究^[17]。因此, 将 16S rRNA 基因克隆文库技术与其他分子生物学技术(如 DGGE 图谱分析)相结合, 不仅对群落结构变化进行动态跟踪研究, 而且能比较完整地进行定量和定性的群落组成分析, 进一步发挥 16S rRNA 基因克隆文库技术的效能, 更好地为微生物群落结构和功能分析服务。

4 结论

本文采用 16S rRNA 基因克隆文库技术对云南(北)热带代表性区域样点景洪农村户用沼气池中的细菌和古菌多样性进行了研究, 结果显示: 在此沼气发酵系统中大部分细菌为未培养细菌, 优势细菌类群是拟杆菌门、绿弯菌门、厚壁菌门和变形菌门; 古菌主要的优势类群是甲烷八叠球菌目的鬃毛甲烷菌属; 此外, 还检测到少量未培养的泉古菌门细菌; 表明农村户用沼气池中的微生物种类非常丰富, 且细菌比古菌具有更丰富的多样性。通过分析讨论得出: (1) 猪粪为主要原料的沼气池中, 细菌主要优势类群基本相似, 但丰度存在差异, 而古菌类群和丰度存在较大差异; (2) 不同沼气池中产甲烷菌的营养类型不同, 主要分为氢营养型和乙酸盐营养型两类, 沼气池中产甲烷菌营养类型的不同可能与有机负荷率、温度、挥发性脂肪酸等因素有关; (3) 沼气发酵过程中复杂有机物的代谢由不同微生物共同作用与完成, 不论微生物比例大小, 每种微生物类群在其中都发挥着不可替代的作用。

致谢: 在此特别感谢在本实验采样过程中提供热心帮助和支持的西双版纳普文镇农业局、林业局、能源站的工作人员, 以及积极配合采样的各沼气池农户, 感谢他们的大力支持。

参考文献

- [1] Hofman-Bang J, Zheng D, Westermann P, et al. Molecular ecology of anaerobic reactor systems[J]. *Advances Biochemical Engineering/Biotechnol*, 2003, 48(6): 57-64
- [2] Cui XL, Xu LH, Wen ML, et al. Uncultured microbial resources[J]. *Microbiology China*, 2004, 32(3): 144-146 (in Chinese)
崔晓龙, 徐丽华, 文孟良, 等. 未培养微生物资源[J]. *微生物学通报*, 2004, 32(3): 144-146
- [3] Jaenicke S, Ander C, Bekel T, et al. Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing[J]. *PLoS One*, 2003, 6(1): e14519
- [4] Collins G, Kavanagh S, McHugh S, et al. Accessing the black box of microbial diversity and ecophysiology: recent advances through ployphasic experiments[J]. *Journal Environment Science and Health, Part A*, 2006, 41: 897-922
- [5] Sanz JL, Köchling T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview[J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42(2): 119-133
- [6] Cui XL, Zhang WD, Wang YX, et al. Advances in Microbial community biogas fermentation ecosystem[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)*, 2013, 35 (3): 399-406 (in Chinese)
崔晓龙, 张无敌, 王永霞, 等. 沼气发酵生态系统的微生物群落动态研究进展[J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2013, 35(3): 399-406
- [7] Writing Group. *Yunnan Agricultural Geography*[M]. Kunming: Yunnan People's Publishing House, 1981: 31 (in Chinese)
编写组. *云南农业地理*[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1981: 31
- [8] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 143-69
- [9] Jiang YH, Xu XH. The use of flame color judgment methane content in biogas[J]. *Chinese Biogas*, 1983(3): 28 (in Chinese)
江蕴华, 余晓华. 利用火焰颜色判断沼气中甲烷含量[J]. *中国沼气*, 1983(3): 28
- [10] Muyer G, De Waa EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 659-700
- [11] Teske A, Hinrichs KU, Edgcomb V, et al. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1994-2007
- [12] Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, et al. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7724-7736
- [13] Schloss PD, Handelsman J. A computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3): 1501-1506
- [14] Kumer S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163
- [15] Ma XL. *Yunnan plateau lake Lugu Lake bacterial diversity research*[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2013: 44 (in Chinese)
马晓亮. *云南高原湖泊泸沽湖细菌多样性研究*[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2013: 44
- [16] Zhang WD, Song HC, Yin F, et al. *Biogas Fermentation and Comprehensive Utilization*[M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2004: 91 (in Chinese)
张无敌, 宋洪川, 尹芳, 等. *沼气发酵与综合利用*[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2004: 91
- [17] Liu FH, Wang SB, Zhang JS, et al. The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(3): 952-966
- [18] Jiang JL. *Study on the properties of methane fermentation and diversity of the microorganisms community in the processing of methane fermentation*[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2009 (in Chinese)
蒋建林. *沼气发酵的物料理化特性及微生物群落多样性分析*[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2009
- [19] Shi XS. *Analyse on microbial community structure of rural household biogas digesters by the molecular methods*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Central China Normal University, 2007 (in Chinese)
师晓爽. *农村户用沼气池发酵微生物群落结构的分子解析*[D]. 武汉: 华中师范大学硕士学位论文, 2007
- [20] Wang LY. *Biogas fermentation microflora change and methane-producing archaea community structure analysis*[D]. Chengdu: Master's Thesis of Biogas Research Institute of Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008: 32 (in Chinese)
王刘阳. *沼气发酵微生物区系变化及产甲烷古菌群落结构分析*[D]. 成都: 中国农业科学院农业部沼气科学研究所硕士学位论文, 2008
- [21] Zhu CG, Zhang JY, Tang YP, et al. Diversity of methanogenic archaea in biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by *mcrA* analysis[J]. *Microbiological Research*, 2011, 166(1): 27-35
- [22] Nettmann E, Bergmann I, Pramschüfer S, et al. Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(18): 2540-2548
- [23] Cui XG. *Study on identification and distribution of methanogens in biogas digester*[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2007 (in Chinese)
崔晓光. *沼气池中产甲烷菌的分离鉴定及其分布的研究*[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2007
- [24] Niclas K, Stefan S, Paul S. Mesophilic fermentation of renewable biomass: does hydraulic retention time regulate methanogen diversity?[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(18): 6322-6326
- [25] Blume F, Bergmann I, Nettmann E, et al. Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(2): 441-450

- [26] Xing P, Zheng JW, Li HB, et al. Methanogen genotypes involved in methane formation during anaerobic decomposition of Microcystisblooms at different temperatures[J]. Word Journal Microbiology Biotechnology, 2013, 29(2): 373-377
- [27] Kundu K, Sharma S, Sreekrishnan TR. Effect of operating temperatures on the microbial community profiles in a high cell density hybrid anaerobic bioreactor[J]. Bioresource Technology, 2012, 118: 502-511
- [28] Lva W, Zhang WF, Yu ZG. Evaluation of system performance and microbial communities of a temperature-phased anaerobic digestion system treating dairy manure: thermophilic digester operated at acidic pH[J]. Bioresource Technology, 2013, 142: 625-632
- [29] Liu YD, Liu Y, Men XH, et al. Isolation and physiological characteristics on strictly anaerobic hydrogen-producing bacteria (*Thermopirellula anaerolimosa*) of Planctomycetes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(8): 994-1001 (in Chinese)
- 刘冬英, 刘奕, 门学慧, 等. 浮霉菌门严格厌氧产氢细菌 (*Thermopirellula anaerolimosa*) 的分离及其生理特性[J]. 微生物学报, 2012, 52(8): 994-1001
- [30] Song ZQ, Chen JQ, Zhi XY, et al. Preliminary analysis on archaea and phylogenetic diversity of two hot springs in Tengchong[J]. Acta Microbiologica Sinica 2008, 35(3): 372-377 (in Chinese)
- 宋兆齐, 陈经全, 职晓阳, 等. 腾冲两热泉古菌多样性及系统发育的初步分析[J]. 微生物学报, 2008, 35(3): 372-377
- [31] Liu HD, Wang L, Liu M, et al. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR-DGGE and clone library analyses[J]. Aquaculture, 2011, 317(1/4): 32-36
- [32] Sun DL, Jiang X, Wu L, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2013, 79(19): 5962-5969

(上接 p.53)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>