

研究报告

中高温污泥厌氧消化系统中微生物群落比较

王腾旭 马星宇 王萌萌 褚厚娟 左剑恶* 杨云锋*

(清华大学环境学院 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室 北京 100084)

摘要:【目的】结合中温与高温消化两者优势的两相厌氧消化工艺可能是推进污泥厌氧消化发展的重要方向,因此,探究和比较中温和高温污泥厌氧消化系统中微生物群落组成的异同具有重要意义。【方法】利用高通量测序技术检测中温和高温厌氧消化系统中细菌与古菌的 16S rRNA 基因序列信息和真菌的内转录间隔(ITS)序列信息,利用基因芯片(GeoChip 5.0)检测病毒和病原菌致病基因的信息,以对比中温和高温条件下微生物群落在物种组成和功能基因层面上的异同。【结果】中温和高温条件下细菌和古菌在群落物种组成上存在显著差异,病毒和病原菌毒性基因也显著不同,而两种系统中真菌群落的物种组成相似且丰度相对较低。中温条件下产甲烷古菌和未分类微生物相对丰度较高,而高温条件下产酸及嗜热菌相对丰度较高,且高温消化后病毒和病原菌毒性基因相对丰度下降。微生物群落结构与 COD、TS 和 VS 有着显著相关性。【结论】微生物群落组成和功能基因在中高温的污泥厌氧消化系统中显著不同,从而解释了两个系统功能的差异。微生物群落的形成与进水参数相关,说明微生物对进水条件敏感。

关键词: 污泥厌氧消化, 微生物, 高通量测序, 基因芯片, 微生物生态

A comparative study of microbial community compositions in thermophilic and mesophilic sludge anaerobic digestion systems

WANG Teng-Xu MA Xing-Yu WANG Meng-Meng CHU Hou-Juan
ZUO Jian-E* YANG Yun-Feng*

(State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: [Objective] Two-stage thermophilic and mesophilic sludge anaerobic digestion process, which combines the processes of thermophilic digestion and mesophilic digestion, is a potentially important strategy for the development of sludge anaerobic digestion. Thus, it is necessary to investigate and compare the microbial community compositions in thermophilic and mesophilic anaerobic digestion systems. [Methods] Based on high-throughput sequencing and GeoChip

Foundation item: Major Science and Technology Program for Water Pollution Control and Treatment (No. 2013ZX07315-001)

***Corresponding author:** E-mail: ZUO Jian-E: jiane.zuo@mail.tsinghua.edu.cn; YANG Yun-Feng: yangyf@tsinghua.edu.cn

Received: June 24, 2015; **Accepted:** September 09, 2015; **Published online** (www.cnki.net): September 28, 2015

基金项目: 水体污染控制与治理科技重大专项(No. 2013ZX07315-001)

***通讯作者:** E-mail: 左剑恶: jiane.zuo@mail.tsinghua.edu.cn; 杨云锋: yangyf@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2015-06-24; **接受日期:** 2015-09-09; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-09-28

techniques, we checked the 16S rRNA gene sequences of bacteria and archaea, ITS sequences of fungi and virus and virulence genes in anaerobic digestion systems, then compared the taxonomic and functional compositions between thermophilic and mesophilic microbial community. **[Results]** The taxonomic compositions of bacteria and archaea and the functional compositions of virus and virulence differed significantly between thermophilic and mesophilic anaerobic digestion systems, while the fungal taxonomic compositions were similar and the sequence reads number were relatively low. Methanogenus and unclassified bacteria and archaea were more abundant in mesophilic condition, while acid-producing and thermophilic microbes were more abundant in thermophilic condition. The relative abundance of genes associated with virus and virulence decreased after thermophilic digestion. In addition, microbial community compositions were significantly correlated with COD, TS and VS. **[Conclusion]** Microbial community compositions were significantly different between thermophilic and mesophilic anaerobic digestion, which explained functional distinction between the two ecosystems. The succession of microbial community was associated with influent parameters, revealing an important sensitivity.

Keywords: Anaerobic digestion of sludge, Microbe, High-throughput sequencing, GeoChip, Microbial ecology

近年来,宏基因组学(Metagenomics)的迅猛发展为人们充分、全面地探究微生物的物种与功能组成及其与环境之间的关系提供了强大的技术手段^[1]。高通量测序和基因芯片(GeoChip)是宏基因组学技术目前最为成熟和先进的主要技术^[2]。在环境微生物的宏基因组学研究中,高通量测序一般为对细菌、古菌的 16S rRNA 基因序列,真菌的 18S rRNA、28S rRNA 基因和内转录间隔区 ITS (Internal transcribed spacer)序列,或者基于鸟枪法(Shotgun)的全基因组进行测序。基因芯片则是使用寡核苷酸探针测定调控微生物碳、氮、磷、硫等物质循环、病原菌毒性(如抗生素抗性、病原菌侵染性)及病毒等功能基因,从而实现对环境微生物群落功能基因组组成的研究。宏基因组学以其强大的优越性,已广泛应用于土壤、水体、空气、极端环境和人体等环境中微生物的研究^[3-8]。其中宏基因组学在城镇污水处理系统中的应用有力推进了微生物在水处理过程中作用机理的研究进展,为科学而系统地调控与监测污水处理过程提供了重要依据^[9-11]。

随着我国城镇化进程的加快,全国污水处理总量以及处理能力日渐提升,城镇污水处理厂剩余污泥产量不断增加,如何安全有效地解决剩余污泥愈来愈受到重视。污泥厌氧消化作为一种较成熟的污

泥稳定化处理工艺,在实现污泥减量化、无害化和资源化的同时可回收沼气,已得到较好应用^[12]。厌氧消化常分为中温厌氧消化和高温厌氧消化,两者在运行条件、处理效率、产气量及病原菌去除等方面均存在一定差异^[13]。厌氧消化工艺虽已在国外得到较好的应用,但目前国内厌氧消化发展相对缓慢,相关技术的研究与应用还有待加强^[14]。本研究利用高通量测序和基因芯片技术检测了高温-中温两相厌氧消化工艺中各类微生物的物种组成和涉及病毒代谢和病原菌毒性的功能基因,并对比了中温和高温厌氧消化条件下微生物群落组成的异同,以为污泥厌氧消化工艺的调控与改善提供理论支持,促进污泥厌氧消化工艺的应用与发展。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

PowerSoil DNA 提取试剂盒,美国 MO BIO 公司; NanoDrop, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; MiSeq, 美国 Illumina 公司; MAUI 杂交仪, 美国 BioMicro 公司; NimbleGen MS 200 芯片扫描仪, 瑞士 Roche 公司。

1.2 采样与 DNA 的提取

污泥样品采自浙江省宁海县城北污水处理厂的污泥厌氧消化系统,该污水处理厂采用分级分相

厌氧消化工艺处理污泥及粪便的混固体废弃物, 第一级为高温反应器, 温度控制在 50 ± 1 °C, 反应时间为 3 d, 适合水解酸化菌生长; 第二级为中温反应器, 温度控制为 35 ± 1 °C, 反应时间为 14 d, 适宜产甲烷古菌生长。从 2012 年 9 月至 2013 年 10 月, 每月采集高温罐和中温罐内污泥样品各 2 L, 共得 24 个样品, 污泥样品采集后均低温保存运送到实验室。取少量样品用于测定 COD (Chemical oxygen demand)、VS (Volatile solid) 和 TS (Total solid) 等理化指标。将剩余样品 $14\ 000 \times g$ 离心 10 min 后, 取沉淀相保存于 -80 °C 用于微生物 DNA 提取。采用 PowerSoil DNA 提取试剂盒提取污泥样品的 DNA, 然后用 NanoDrop 测定其浓度和纯度, 保证每个样品的 DNA 含量大于 5 μg , 纯度满足 A_{260}/A_{280} 值在 1.8–2.0 之间, A_{260}/A_{230} 值大于 1.5。

1.3 16S rRNA 基因和 ITS 测序

测序实验通过 Illumina MiSeq 测序平台完成, 16S rRNA 基因测序所用引物为针对细菌和古菌 16S rRNA V4 高变区的通用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') 和 806R (5'-GGA CTACHVGGGTWTCTAAT-3'), ITS 测序选用引物为 gITS7 (5'-GTGARTCATCGARTCTTTG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[15]。而后在网站 <http://zhoulab5.rccc.ou.edu:8080/root> 上完成原始数据的整合, 物种信息分类, 生成 OTU (Operational taxonomic unit) 表格, 详细实验步骤和数据预处理过程可参考文献[16-17], 另 ITS 物种信息分类在 <https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp> 完成^[18]。将只在 1 个样品中出现的 OTU 删除后, 再根据最小序列条数进行 Resample, 得到每个样品 27 575 条序列; 而 ITS 最后得到 1 074 个 OTU。

1.4 基因芯片实验

研究中所用基因芯片为最新版本的 GeoChip 5.0, 包含 16 万多个参与各类生物地球化学循环过程的功能基因的探针, 覆盖 37 万条基因序列。其中, 涉及病毒和病原菌毒性的基因共有约 1 万个探

针, 调控产甲烷的 *mcrA* 基因共有 87 个探针。基因芯片的实验详细过程参考文献[19-20], 主要步骤为先将 DNA 样品用 Cy-5 荧光染料, 纯化后置于 45 °C 干燥 45 min, 而后将标记的 DNA 样品与 GeoChip 5.0 于 42 °C 在 MAUI 杂交仪上杂交 16 h, 再用 NimbleGen MS 200 芯片扫描仪检测信号强度。将得到的原始数据在网站 (<http://ieg.ou.edu/microarray/>) 上进行预处理, 首先去掉被标记“1”和“3”的点, 以及信噪比(SNR)小于 2.0 的点, 然后去掉 12 个重复中出现少于 3 次的点, 再将信号值进行 lnMR 转化, 即先求每个探针对应信号值的自然对数(ln), 然后除以该探针所在样品的所有探针信号强度的平均值(MR)^[21-22]。

1.5 数据处理

研究使用了除趋势对应分析 (Detrended correspondence analysis, DCA) 和 3 种非参数检验方法 Adonis (Permutational multivariate analysis of variance)、ANOSIM (Analysis of similarities) 和 MRPP (Multi-response permutation procedure) 来检验中温和高温条件下微生物整体群落组成的差异。使用响应比(Response ratio) 分析及双尾 *t* 检验研究了微生物物种和基因相对丰度在 90% 置信区间下的变化程度。使用 Mantel 检验研究了微生物群落与运行参数之间的关系。以上分析均通过 R 语言 vegan 程序包和 Excel 完成。

2 结果与分析

2.1 运行温度对厌氧消化微生物整体群落组成的影响

研究对比了中温和高温两种厌氧消化过程中微生物整体群落组成的异同。DCA 结果表明, 16S rRNA 基因测序所得细菌及古菌物种组成在中温和高温 2 种条件下聚类为 2 部分(图 1A), 说明细菌及古菌群落组成在中温和高温厌氧消化下有明显差异。进一步的 3 种非参数检验(Adonis, ANOSIM, MRPP)的结果证明了其差异显著(表 1)。而 ITS 测序数据的 DCA 结果表明真菌整体群落物

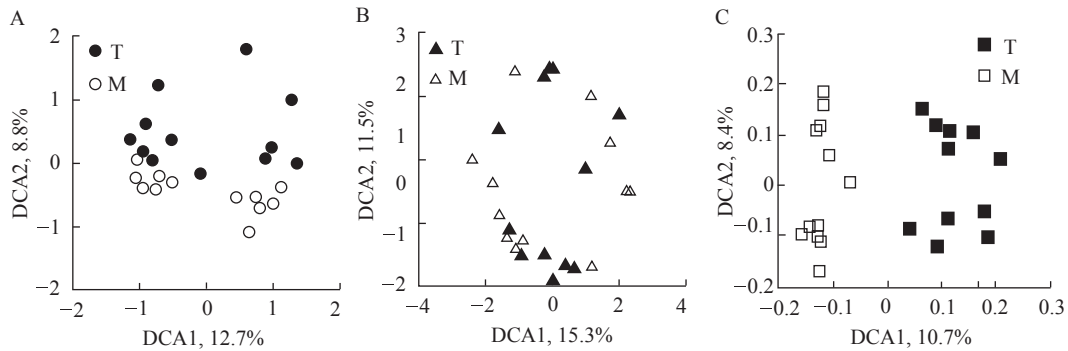


图 1 16S rRNA 基因测序所得 OTUs (A), ITS 测序所得 OTUs (B)和基因芯片所得病毒和病原菌毒性基因(C)的除趋势对应分析

Figure 1 Detrended correspondence analysis (DCA) of all detected OTUs from 16S rRNA gene sequencing (A), all detected OTUs from ITS sequencing (B) and all detected virus and virulence genes from GeoChip (C)

注: T: 高温样品; M: 中温样品.

Note: T: Thermophilic samples; M: Mesophilic samples.

表 1 中温和高温厌氧消化微生物群落组成的不相似检验

Table 1 Dissimilarity tests of microbial community composition between mesophilic and thermophilic anaerobic digestion

统计方法 Statistical approaches	统计量与 P 值 Statistic and P value	16S rRNA gene	ITS gene	Virus and virulence gene
Adonis	F	0.660	0.829	2.106
	P	0.020	0.988	0.010
ANOSIM	R	0.206	-0.074	0.199
	P	0.010	0.963	0.010
MRPP	δ	0.098	0.313	0.078
	P	0.010	0.980	0.010

注: 加粗的数字表示有显著差异的($P < 0.05$).

Note: Significantly ($P < 0.05$) changed values are shown in bold.

种组成在两种条件下相似(图 1B)。在功能基因层面上, 病毒和病原菌毒性基因的芯片数据的 DCA 结果显示中温和高温样品明显分开(图 1C), 这一结果也被 3 种非参数检验(Adonis, ANOSIM, MRPP)证实(表 1)。因此, 可见运行温度的不同显著改变了细菌及古菌群落物种组成和病毒及病原菌毒性基因的功能组成, 而对真菌的群落组成没有显著影响。

2.2 中温和高温厌氧消化微生物物种的异同

2.2.1 细菌及古菌物种组成的异同: 16S rRNA 基因测序在厌氧消化系统中共检测到了 31 个门类的细菌及古菌, 其中相对丰度大于 1% 的门类主要有

7 个, 分别为厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、热袍菌门(Thermotogae)、放线菌门(Actinobacteria)和广古菌门(Euryarchaeota)。这 7 个门类占整体测序微生物总量的 80%–85%, 为厌氧消化过程中常见门类。值得注意的是未确定分类的微生物(Unclassified)占据了 11%–16% 的比例, 说明还有相当一部分分类和功能未知的微生物有待研究。此外, 由于测序引物为通用引物, 主要针对细菌, 对古菌只有部分代表性, 所以检测到的古菌微生物较少, 主要为广古菌门。在物种重合度上, 中

温和高温条件下均存在的细菌物种占总物种的 45.78%，而中温和高温独有的细菌分别占总物种数的 26.06%和 28.16% (表 2)，而古菌的物种重合度比细菌稍高，中温和高温均存在的古菌物种比例为 59.95% (表 2)。说明 2 种温度下细菌物种的重合度不高，物种的组成存在较大差异。

中温和高温下厌氧消化整体群落组成和 OTU 重合度上虽有明显差异，但在门分类水平上没有较大变化，仅有个别门类有所改变。与高温相比，在中温消化过程中未确定分类微生物相对丰度由 11% 上升到 16% ($P<0.1$)，而拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度由 7%下降到 4% ($P<0.1$)，其他门类在中温与高温消化过程中并无显著差异。

在更低分类水平上，中温和高温厌氧消化细菌及真菌群落有着较显著的变化。图 2 所示为细菌及真菌在中温消化与高温消化条件下微生物在纲水平上(图 2A)和属(图 2B)水平上相对丰度变化的响应比，图 2 仅列出了具有显著变化的纲和显著变化且丰度较高的属。在纲分类水平上，相比高温厌氧消化，中温厌氧消化过程中未被确定的微生物(Unclassified)、甲烷杆菌纲(Methanobacteria)和酸杆菌纲(Acidobacteria_Gp3)等微生物相对丰度提高，而大部分显著变化的纲类在中温条件下下降。测序共检测到 500 多个菌属，有 89 个菌属在高温与中温条件下呈现显著变化($P<0.1$)，其中 60 个属相对丰度在中温条件下显著下降。其变化结果与纲水平

类似，如相对丰度较大的未被确定的微生物(Unclassified)在中温下丰度上升，而 *Lutispora*、*Clostridium* 和 *Tepidimicrobium* 等耐热或产酸菌属在中温消化过程中丰度下降。在 OTU 水平上，测序所检测到的 27 575 个 OTU 中，在中温条件下相对丰度显著($P<0.1$)上升的 OTU 有 1 466 个，其中有 41.47% 的属于 Clostridia，有 26.06% 的属于 Unclassified 纲。在中温条件下显著($P<0.1$)下降的 OTU 有 1 215 个，其中有 46.50% 的属于 Clostridia，其次为 Unclassified，占 10.45%。而显著下降的 OTU 中属于 *Lutispora*、*Clostridium* 和 *Tepidimicrobium* 的 OTU 分别占比为 7.41%、3.62%和 2.55%，是除 Unclassified (55.31%)外拥有显著下降 OTU 数最多的 3 个属，这也与属水平分析结果一致。此外，分析中关注了高丰度 OTU 的变化，相对丰度占比大于 0.1% 的 OTU 共有 110 个，其中 74 个为 Unclassified，其他属所含 OTU 均少于 4 个，说明微生物分类还有待进一步研究。在中温条件下相对丰度显著提高的 OTU 有 21 个，属于 *Methanobacterium*、*Bellilinea* 和 *Hyphomicrobium* 等；相对丰度显著下降的 OTU 有 14 个，属于 *Lutispora*、*Tepidimicrobium* 和 *Sporanaerobacter* 等。

2.2.2 真菌物种组成的异同：ITS 测序共检测到 5 个门，22 个纲，181 个属的真菌类群，主要门类为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、接合菌门(Zygomycota)、球囊菌门(Glomeromycota)

表 2 中温和高温厌氧消化中 OTUs 和基因探针的重合度

Table 2 The overlap of OTUs and gene probes between mesophilic and thermophilic anaerobic digestion (%)

统计项 Statistical items	中温独有 Mesophilic endemic	重合 Overlap	高温独有 Thermophilic endemic
细菌 Bacteria	26.06	45.78	28.16
古菌 Archaea	16.49	59.95	11.34
真菌 Fungi	29.61	43.32	27.07
病毒和病原菌毒性基因 Virus and virulence gene	0.76	97.02	2.22
<i>mcrA</i> 基因 <i>mcrA</i> gene	1.28	92.31	6.41

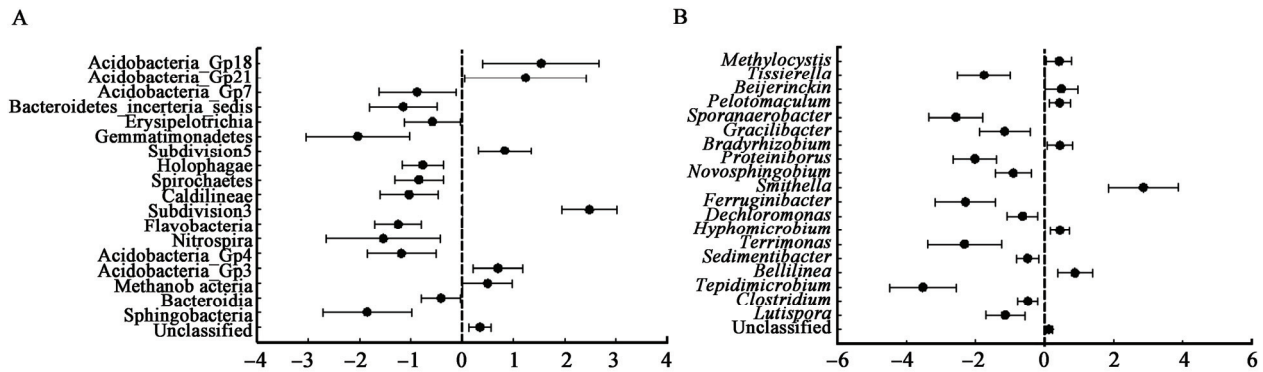


图 2 16S rRNA 基因测序所得微生物在纲(A)和属(B)分类水平上的响应比(置信度 90%)

Figure 2 Response ratio of each class (A) or genus (B) of microbial community detected by 16S rRNA gene at 90% confidence level

注: 以高温样品为对照组, 中温样品为处理组. 从下到上, 相对丰度依次递减.

Note: Thermophilic and mesophilic samples were regard as the controls and treatments, respectively. The relative abundance were decreased successively from the bottom up.

和壶菌门(Chytridiomycota)。其中有一半左右的微生物分类未被确定。与真菌的整体群落组成相似, 在门分类水平上, 中温条件下与高温条件下真菌的微生物组成并没有显著变化, 进一步在更细分类水平上(纲、属)也仅有少量丰度较低的物种受运行温度的影响, 表明厌氧消化过程中真菌对运行温度并不敏感, 也说明中高温厌氧消化反应器的差异与真菌不相关。但是, 虽然中温和高温下真菌的整体组成相似, 但物种重合度并不高, 仅为 43.32% (表 2), 这可能是由于重合的物种丰度较高, 对整体组成的影响更大。

2.2.3 特定功能基因的变化: 利用基因芯片检测了病毒基因在高温和低温厌氧消化过程中的差异, 在中高温污泥厌氧消化系统中可检测出 106 个侵染原核生物的病毒基因和 586 个侵染真核生物的病毒基因。其中, 70 个侵染原核生物的病毒基因对应的宿主在 16S rRNA 基因测序中均有检出, 两者存在较为明显的对应关系。而 586 个侵染真核生物的病毒对应的宿主主要为人类和动植物等, 在中高温污泥厌氧消化系统中不存在, 因此在 ITS 测序中只有 20 个侵染真核生物的病毒基因可检测出其对应宿主, 说明大部分侵染真核生物的病毒可能是由固体废弃物进料带入。进一步研究发现, 侵染真核生物

的病毒基因丰度在不同月份中较为稳定, 也反映了固体废弃物进料基本稳定的情况。

病原菌毒性基因共 9 415 个探针, 主要为抗生素抗性基因(Antibiotic resistance, 7 735 个探针)等。如图 3 所示, 与高温相比, 中温时抗生素抗性基因和侵染原核生物的病毒基因丰度较低, 而侵染真核生物的病毒基因没有显著变化, 其他丰度相对较低的病原菌毒性基因在中温条件下上升。在基因的重合度上, 中温和高温中均存在的基因占总基因数的 97%以上(表 2), 显示了高度的重合性。此外研究中还检验了产甲烷基因 *mcrA* 的变化, 其相对丰度在高温条件较低, 但统计结果不显著($P=0.2$), 在高低温下探针的重合度基本相同(表 2)。

2.3 微生物群落与运行负荷的关系

如图 4 所示, 研究检测了该污水处理厂每月中温和高温消化罐中 COD、TS 和 VS 的浓度变化。中温和高温条件下三者均没有显著差异($P>0.1$), 但整体上中温消化 COD 含量较低; 整个年度中, 大部分时间反应器运行平稳, 2013 年 4-8 月 COD、TS 和 VS 均有较大波动。

为检验 COD、TS 和 VS 的变化是否影响微生物群落组成的变化, 研究中用 Mantel test 计算了微生物群落组成与运行参数之间的关系。如表 3 所示,

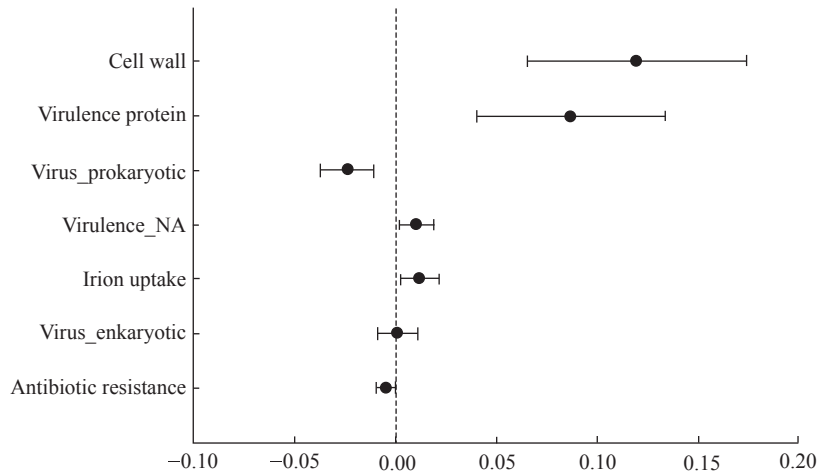


图3 病毒和病原菌毒性基因的响应比(置信度 90%)

Figure 3 Response ratio of virus and virulence genes at 90% confidence level

注: 以高温样品为对照组, 中温样品为处理组。

Note: Thermophilic and mesophilic samples were regard as the controls and treatments, respectively.

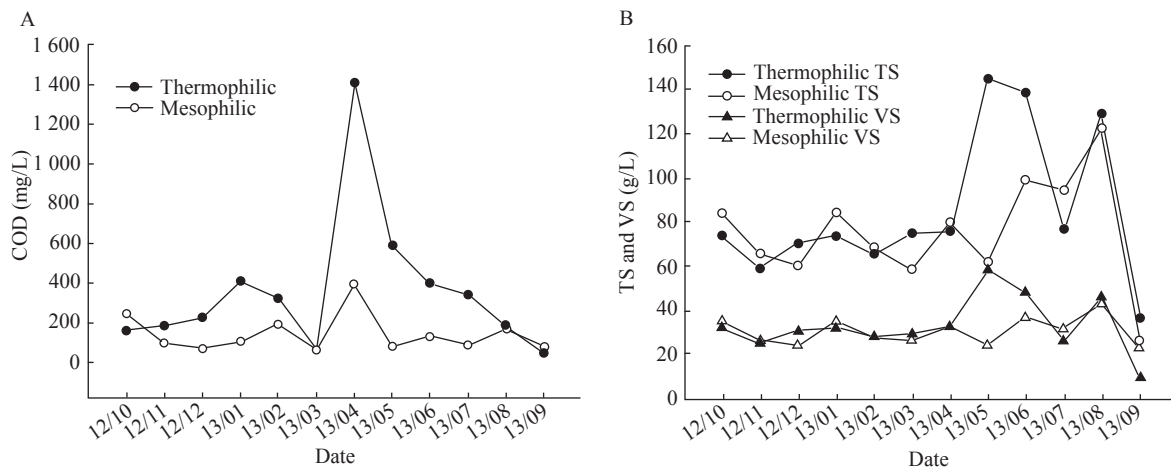


图4 厌氧消化系统中 COD、TS 和 VS 含量

Figure 4 The concentrations of COD, TS and VS in anaerobic digesters

表3 各类微生物群落组成和环境因子的 Mantel 检验
Table 3 Mantel tests of microbial community composition and operating parameters

运行参数 Operating parameters	16S rRNA gene <i>R</i>	ITS gene <i>R</i>	Virus and virulence gene <i>R</i>
TS	0.229**	0.202***	0.257
VS	0.180**	0.113**	-0.004
COD	0.317***	0.125**	0.028

Note: *: $P < 0.1$; **: $P < 0.05$; ***: $P < 0.01$.

COD、TS 和 VS 均与微生物种群落存在显著相关性, 即三者都能显著影响厌氧消化中细菌、古菌及真菌组成。而病毒和病原菌毒性基因对运行参数的响应不敏感。

3 结论与讨论

本研究主要利用高通量测序测定了中温和高温厌氧消化系统中微生物的物种信息, 同时利用基因芯片检测了病毒和病原菌毒性基因的变化。从检

测到的丰度来看,细菌与古菌在整个厌氧消化过程中作用更为重要,而真菌的丰度较低。细菌丰度较高的门类为厌氧消化中常见门类^[23],其中厚壁菌门(Firmicutes)为最优势菌群,而厚壁菌门主要分支为起水解作用的梭菌纲(Clostridia),占总物种丰度的38%,这与之前研究结果相似^[24]。实验中检测到的古菌为广古菌门菌群,该门类主要包含甲烷微菌纲(Methanomicrobia)、甲烷杆菌纲(Methanobacteria)和热原体纲(Thermoplasmata)等厌氧消化过程中常见类群^[25]。实验检测到的真菌主要为子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota),占总真菌丰度的一半左右,是具有降解纤维素能力的菌群^[26],而另一半菌群主要为未被确定分类真菌,相关分类方法和数据库还有待完善^[27]。

中温厌氧消化与高温厌氧消化在运行效果上的差异使我们重点关注了两者在群落组成与部分功能组成上的异同。DCA 和非参数检验结果及较低的物种重合比例(表 1、2,图 1A)均显示了中温和高温条件下细菌和古菌的群落组成是不同的。在门分类水平上,除未被确定菌群(Unclassified)外仅拟杆菌门(Bacteroidetes)丰度在中温条件下低于高温条件。Bacteroidetes 是一类可以水解纤维素、半纤维素和几丁质等多糖物质的菌群,在人畜粪便中也较为常见^[28],本研究在污泥中加入的粪便固废也应是其相对丰度较高的原因。Bacteroidetes 中丰度最高的 2 个纲为在纲分类水平下显著下降的 Sphingobacteria 和 Bacteroidia (图 2)。在纲分类水平上丰度最高的梭菌纲(Clostridia)虽然没有显著变化,但在更低分类水平上有显著下降。图 2B 中显著下降的 *Lutispora*、*Clostridium*、*Tepidimicrobium*、*Sedimentibacter* 和 *Proteiniborus* 等均为梭菌纲菌群,梭菌菌群为中温和高温厌氧消化过程中普遍存在的水解酸化菌群,已有文献表明该菌群能在高温条件下成为优势菌种^[29],且包含嗜热产酸菌,如 *Lutispora* 和 *Tepidimicrobium*^[30-31]。研究中以上水解产酸菌在中温条件下丰度较高温下降,表明高温条

件下水解酸化菌群更具有优势,且嗜热产酸菌群丰度较高。在中温条件下,古菌中甲烷杆菌纲(Methanobacteria)丰度较高,说明中温条件下产甲烷作用可能得到加强,这也与该厂调控中温条件下主要产甲烷的设计相符合。产甲烷基因 *mcrA* 的基因丰度在高温条件下丰度较低,而统计结果不显著则可能是由于产甲烷菌世代时间较长和污泥停留时间相对较短导致。

已有文献表明,在利用 16S rRNA 基因确定微生物物种分类时,往往会由于多拷贝数的 16S rRNA 基因的多样性导致所分类得到的 OTU 多样性被高估^[32]。由于在厌氧消化系统中作为主要优势菌群的厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)均具有较多的 16S rRNA 基因拷贝数,会导致我们所测得的 OTU 多样性有所提高。为了减少这类误差,我们测序针对 16S rRNA 基因的 V4 区序列,相对于其他区域,V4 区序列对多样性的高估程度最小。另外,由于随着分类水平的提高,16S rRNA 基因的多样性所导致的 OTU 多样性被高估情况逐渐减弱^[32],因此研究中对于种群的比较主要在属以上的精细分类水平,以增强结论的可靠性。

污泥中病原微生物及抗生素抗性基因的存在对环境 and 人类健康构成巨大的风险^[33-34],中温消化时温度与人体温度相近,对病原微生物的杀灭率较低,而高温时杀灭率较高,对大肠杆菌和寄生虫卵的杀灭率可达 99%^[34]。研究利用基因芯片检测了病毒和病原菌毒性基因的变化,虽然在中温和高温条件下基因的重合度较高,但非参数检验和 DCA 组成均显示其整体组成发生变化,说明虽然基因个数变化较小,但其丰度显著改变。与高温相比,中温条件下抗生素抗性基因和侵染原核生物的病毒基因丰度较低(图 3),这可能是由于所选污泥处理工艺为高温-中温两相反应,病原微生物先进入高温反应器,经一定消化时间后使得部分病原微生物被杀灭后再进入中温反应器,且高温反应器不断有原料进入,所以才导致中温条件下抗生素抗性基因和侵染

原核生物的病毒基因丰度较低。侵染真核生物的病毒基因没有显著变化也与真菌群落组成在中温和高温条件下相似的结果一致。总体来看高温条件更能有效降低病原微生物和抗生素抗性基因。

污水处理厂中运行参数与微生物群落组成和功能组成均有紧密联系^[9,11], 研究中检测的 COD、VS 和 TS 负荷参数均与微生物物种组成存在显著相关性, 而病毒和病原菌毒性基因与三者均无显著关联, 表明通过调控运行参数可以改变微生物的群落组成, 而病毒和病原菌毒性基因在污泥减量化过程中作用较小, 对运行负荷变化不敏感。

4 结论

中温厌氧消化和高温厌氧消化各有优势, 高温消化负荷高, 处理效率高, 病原菌去除情况也更好, 但相对中温厌氧消化运行欠稳定, 应用较不广泛。高温-中温两相厌氧消化工艺集合两者优点, 先经高温产酸再到中温产气, 效果显著而得到许多研究者的关注^[35-36]。研究利用高通量测序和基因芯片两种技术对污泥中温和高温厌氧消化系统中微生物群落进行了检测。结果表明中温和高温下细菌、古菌和病毒及病原菌毒性基因组成有显著差异, 而真菌群落组成相似。高温增强了水解酸化及嗜热菌群的丰度, 能够更好地去除病毒和抗生素抗性基因, 而中温条件下产甲烷菌丰度有所提高。中温和高温条件下微生物群落的差异为 2 个系统功能差异提供了微观解释。相关性分析显示微生物群落的形成主要与进水参数相关, 调节进水参数可以改变微生物群落组成和功能, 为优化反应器运行效果提供理论依据。

参考文献

- [1] Sun X, Gao Y, Yang YF. Recent advancement in microbial environmental research using metagenomics tools[J]. Biodiversity Science, 2013, 21(4): 393-400 (in Chinese)
孙欣, 高莹, 杨云锋. 环境微生物的宏基因组学研究新进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 393-400
- [2] Tu QC, Yu H, He ZL, et al. GeoChip 4: a functional gene-array-based high-throughput environmental technology for microbial community analysis[J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(5): 914-928
- [3] Lax S, Smith DP, Hampton-Marcell J, et al. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment[J]. Science, 2014, 345(6200): 1048-1052
- [4] Zhou JZ, Xue K, Xie JP, et al. Microbial mediation of carbon-cycle feedbacks to climate warming[J]. Nature Climate Change, 2011, 2(2): 106-110
- [5] Yergeau E, Bokhorst S, Kang S, et al. Shifts in soil microorganisms in response to warming are consistent across a range of Antarctic environments[J]. The ISME Journal, 2011, 6(3): 692-702
- [6] Gibbons SM, Caporaso JG, Pirrung M, et al. Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(12): 4651-4655
- [7] Hazen TC, Dubinsky EA, DeSantis TZ, et al. Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria[J]. Science, 2010, 330(6001): 204-208
- [8] Cao C, Jiang WJ, Wang BY, et al. Inhalable microorganisms in Beijing's PM_{2.5} and PM₁₀ pollutants during a severe smog event[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(3): 1499-1507
- [9] Sun YM, Shen YX, Liang P, et al. Linkages between microbial functional potential and wastewater constituents in large-scale membrane bioreactors for municipal wastewater treatment[J]. Water Research, 2014, 56: 162-171
- [10] Zhao J, Zuo JN, Wang XL, et al. GeoChip-based analysis of microbial community of a combined nitrification-anammox reactor treating anaerobic digestion supernatant[J]. Water Research, 2014, 67: 345-354
- [11] Ju F, Zhang T. Bacterial assembly and temporal dynamics in activated sludge of a full-scale municipal wastewater treatment plant[J]. The ISME Journal, 2015, 9(3): 683-695
- [12] Li L. Application status and trend on anaerobic digestion technology development of sludge[J]. China Environmental Protection Industry, 2013(8): 57-60 (in Chinese)
李琳. 污泥厌氧消化技术发展应用现状及趋势[J]. 中国环保产业, 2013(8): 57-60
- [13] Kim M, Ahn YH, Speece RE. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic[J]. Water Research, 2002, 36(17): 4369-4385
- [14] Zhang NL, Liu WX, Yang HJ, et al. Soil microbial responses to warming and increased precipitation and their implications for ecosystem C cycling[J]. Oecologia, 2013, 173(3): 1125-1142
- [15] Ihrmark K, Bödeker ITM, Cruz-Martinez K, et al. New primers to amplify the fungal ITS2 region-evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 82(3): 666-677
- [16] Li Y, He JZ, He ZL, et al. Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients[J]. The ISME Journal, 2014, 8(9): 1879-1891
- [17] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. The ISME Journal, 2012, 6(8): 1621-1624
- [18] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267
- [19] Yang YF, Wu LW, Lin QY, et al. Responses of the functional structure of soil microbial community to livestock grazing in the Tibetan alpine grassland[J]. Global Change Biology, 2013, 19(2): 637-648
- [20] Liu SS, Wang F, Xue K, et al. The interactive effects of soil transplant into colder regions and cropping on soil microbiology and biogeochemistry[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(3): 566-576
- [21] Yang YF, Gao Y, Wang SP, et al. The microbial gene diversity along an elevation gradient of the Tibetan grassland[J]. The ISME Journal, 2014, 8(2): 430-440

- [22] Zheng QS, Yue HW, Yang YF. Evaluation and comparison of GeoChip data pre-processing methods: LnMR and RAln[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(5): 817-825 (in Chinese)
郑乔舒, 岳洪伟, 杨云锋. 基因芯片数据预处理方法(LnMR和 RAln)的评估和比较[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(5): 817-825
- [23] Lee SH, Kang HJ, Lee YH, et al. Monitoring bacterial community structure and variability in time scale in full-scale anaerobic digesters[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, 14(7): 1893-1905
- [24] Krause L, Diaz NN, Edwards RA, et al. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 136(1/2): 91-101
- [25] Liu JH, Hu GR, Li FL, et al. Advances in the microbial flora of anaerobic digestive systems[J]. *Industrial Water Treatment*, 2011, 31(10): 10-14 (in Chinese)
刘君寒, 胡光荣, 李福利, 等. 厌氧消化系统微生物菌群的研究进展[J]. *工业水处理*, 2011, 31(10): 10-14
- [26] Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(2): 185-194
- [27] Penton CR, StLouis D, Cole JR, et al. Fungal diversity in permafrost and tallgrass prairie soils under experimental warming conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(22): 7063-7072
- [28] Girija D, Deepa K, Xavier F, et al. Analysis of cow dung microbiota-A metagenomic approach[J]. *Indian Journal of Biotechnology*, 2013, 12(3): 372-378
- [29] Han I, Congeevaram S, Ki DW, et al. Bacterial community analysis of swine manure treated with autothermal thermophilic aerobic digestion[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(3): 835-842
- [30] Shiratori H, Ohiwa H, Ikeno H, et al. *Lutispora thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming bacterium isolated from a thermophilic methanogenic bioreactor digesting municipal solid wastes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(Pt 4): 964-969
- [31] Niu LL, Song L, Liu XL, et al. *Tepidimicrobium xylanilyticum* sp. nov., an anaerobic xylanolytic bacterium, and emended description of the genus *Tepidimicrobium*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(Pt 11): 2698-2701
- [32] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969
- [33] Martínez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments[J]. *Science*, 2008, 321(5887): 365-367
- [34] Cao HQ, Zhang FF, Li J, et al. Effect of substrate concentration on pathogen indicators inactivation during thermophilic anaerobic digestion[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(3): 1016-1020 (in Chinese)
操宏庆, 章菲菲, 李健, 等. 高温厌氧消化中底物浓度对病原指示微生物杀灭的影响[J]. *环境科学*, 2014, 35(3): 1016-1020
- [35] Song YC, Kwon SJ, Woo JH. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic- and thermophilic digestion of sewage sludge[J]. *Water Research*, 2004, 38(7): 1653-1662
- [36] Jang HM, Cho HU, Park SK, et al. Influence of thermophilic aerobic digestion as a sludge pre-treatment and solids retention time of mesophilic anaerobic digestion on the methane production, sludge digestion and microbial communities in a sequential digestion process[J]. *Water Research*, 2014, 48: 1-14