

嗜冷产甲烷菌群的选育及产甲烷效能研究

边道林¹, 孙磊², 王爽², 郭炜³

(1. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院 土壤肥料与环境资源研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院 农村能源研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:筛选低温环境的复合产甲烷菌群更适合提高系统低温产甲烷效能, 从自然低温厌氧环境采集活性污泥, 利用人工培养基进行富集驯化, 以温度为胁迫因子研究复合菌群的产甲烷效能。同时, 运用克隆文库的分子生物学技术对复合低温产甲烷菌群的细菌和产甲烷古菌进行了解析。结果表明: 采集的自然生境的低温复合菌群细菌克隆文库共获得 80 条有效序列, 分布在 11 个细菌门, 最优势细菌属 Proteobacteria 门(72.5%), 其次是 Bacteroidetes 门(8.8%)。产甲烷菌克隆文库获得 20 条有效序列, 可鉴定的产甲烷古菌为 Methanosaetaceae 科和 Methanosarcinaceae 科。经富集驯化的低温复合菌群在 18℃ 时产气量最大, 沼气产量为 $0.25 \text{ m}^3 \cdot (\text{m}^3_{\text{reactor}} \text{ d})^{-1}$, 甲烷浓度为 56.3%。

关键词: 低温; 产甲烷菌; 克隆文库; 沼气

中图分类号: Q93; TK6

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2014)10-0044-05

近年来, 随着经济的高速发展, 各国对于能源的需求与消耗都急剧增加。然而, 可利用的一次石化能源日趋枯竭, 迫使人类不得不开发可再生能源以最大限度代替石化能源^[1-2]。目前, 应用厌氧消化技术处理各种废弃物产甲烷技术, 不仅能有效处理大量废弃物, 而且可产生可再生的沼气清洁能源, 现已受到世界各国的广泛关注及工程化应用。但绝大部分的应用集中在热带和亚热带地区, 对于大部分高寒地区仍无法规模化应用。主要原因是低温条件严重制约产甲烷微生物的代谢活性, 加上缺乏有效的调控技术和先进的配套设备, 严重制约了寒地沼气能源的应用^[3-4]。

地球上 75% 以上的地区处于低于 5℃ 的环境, 如高海拔地区、深海、冰川与极地等, 这些地区存在大量永冻土壤及沉积物等, 而产甲烷这一代谢过程是这类环境下微生物代谢的主要途径^[5]。大量研究表明, 嗜冷产甲烷菌广泛存在, 依靠其独特的代谢机制完成产甲烷过程。例如 Franzmann

等在 Ace 湖成功分离了一株产甲烷菌 *Methanogenium frigidum*, 在低温条件下活性较高, 当温度升至 18℃ 时失去活性^[6]。因此, 从低温生境分离产甲烷菌对于解析低温嗜冷机制, 研究低温代谢途径具有重要意义。然而实际应用中利用筛选的某一株嗜冷产甲烷菌无法有效提高系统低温产甲烷效能。因此, 从工程应用角度考虑, 筛选低温环境的复合产甲烷菌群更适合提高系统低温运行效率。

研究从黑龙江省齐齐哈尔扎龙湖底采集低温活性污泥, 利用培养基进行实验室人工富集驯化。通过考察复合产甲烷菌不同温度下的产甲烷效能, 确定筛选的复合产甲烷菌群的最佳生长代谢温度。此外, 利用克隆文库分子生物学技术对采集的低温活性污泥细菌和产甲烷古菌微生物多样性进行分析。研究结果为低温产甲烷菌嗜冷机制研究以及提高低温甲烷转化效率提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

活性污泥样品的采集地点位于 N 47°10', E124°12' 的扎龙湖, 取自距湖底 2 m 的污泥, 采集量大约 300 g, 用冰盒保存密封后迅速带回实验室 -20℃ 冷冻保存。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

试验首先从人工富集驯化的

收稿日期: 2014-08-05

基金项目: “十二五”科技支撑计划资助项目(2013BAD07B01); 黑龙江省科技特派员农村创新创业资助项目(GC12B711); 黑龙江省博士后基金资助项目

第一作者简介: 边道林(1978-), 男, 山东省鄄城县人, 硕士, 助理研究员, 从事科研管理和农业资源环境研究。E-mail: 330834043qq.com。

通讯作者: 王爽(1981-), 博士, 副研究员, 从事环境和微生物等方面研究。E-mail: wangshuang0726@163.com。

低温活性污泥细菌中提取细菌总 DNA,运用克隆文库分子生物学技术对采集的低温活性污泥细菌和产甲烷古菌微生物多样性进行分析。利用产甲烷菌培养基^[7], -15℃ 的 250 mL 厌氧瓶富集驯化,待甲烷产量稳定后考察不同温度下的产甲烷效能。

1.2.2 测定与分析方法 取 1 g 污泥提取基因组 DNA,使用土壤 DNA 快速提取试剂盒(Qbiogene Inc.)按说明书操作,粗提 DNA 使用纯化试剂盒进行纯化(Promega, WI, USA)。细菌 16 S rRNA 克隆文库使用通用引物对 27 F(5'-AGA GTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492 R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[8-9], 产甲烷古菌 16 S rRNA 克隆文库使用引物对 A109(T)-F 和 515 R^[10]。PCR 过程使用 9700 型 PCR 扩增仪(Applied Biosystems, CA)。序列分析使用 Clustal 3.1 和 Mega 4.0 软件构建系统发育进化树。

总固体含量(TS)、挥发性物质含量(VS)、pH、总有机碳(TOC)和总氮(TKN)的测定参照标准方法^[11]。沼气产量采用排水法进行测定,甲烷含量的测定应用气象色谱法(Agilent 6890)。

2 结果与分析

2.1 低温产甲烷细菌克隆文库系统发育分析

低温产甲烷细菌克隆文库分析表明,共获得 80 条有效序列,序列比对结果可知,覆盖了 11 个微生物类群,分别是 Acidobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes、Gemmatimonadetes、Alpha-proteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria、Deltaproteobacteria、Verrucomicrobia、Lentisphaerae 及 unknown groups。其中 Proteobacteria(58 clones)是最优势细菌门,占序列总数的 72.5%,Gammaproteobacteria 是最优势细菌纲,占细菌总数的 23.8%。研究表明,在很多生境下 Proteobacteria 都是最优势微生物类群,在地球化学物质循环过程中具有重要作用,甚至一些深海环境下也有发现 Proteobacteria 属优势微生物类群^[10]。从图 1 聚类分析结果看出,在属分类水平上覆盖了 17 个细菌属,其中 *Acinetobacter* sp. 属最优势微生物类群,占克隆文库总数

的 32.6%,其次 *Aeromonas* sp. 和 *Smithella* sp. 属均占微生物总数的 10.9%。Clone 60 与一株分离于活性污泥中的细菌 *Acinetobacter johnsonii*(AB099655)的序列相似度达 99%。

2.2 低温产甲烷古菌克隆文库系统发育分析

低温产甲烷古菌克隆文库分析表明,共获得 29 条有效序列,由稀释曲线分析可知仅覆盖了扎龙湖污泥古细菌群落多样性总量的 17%。由图 2 可看出,聚类分析结果共覆盖了两大微生物类群,分别是广古菌门(Euryarchaeota)和未确定分类地位的古菌,且以未确定分类地位的微生物类群为主。能确定分类地位的是 Clone 2 与 Methanomicrobiaceae archaeon(GU257173)序列比对相似度为 99%,而该研究中其进化分析的相似度为 96%;Clone12 与 *Methanobacterium* sp. 序列比对相似度也为 99%,其进化分析的相似度为 100%。很多研究表明,湖底沉积物中微生物在甲烷转化的过程起着很重要的作用,如 Zepp Falz 等在 Rotsee 淡水湖沉积物中发现 *Methanosaeta* sp. 是最优势古菌^[12]。该研究采集的低温活性污泥中的产甲烷古菌微生物类群可确定其分类地位的属氢营养型产甲烷古菌。

2.3 低温产甲烷菌群驯化与不同温度下的沼气产量

将扎龙湖采集的活性污泥作为低温产甲烷微生物菌源,利用人工产甲烷培养基进行富集,置于 15℃ 低温培养箱富集培养,待培养世代产气下降进行转代培养,多次转代富集直至获得产甲烷混合菌群稳定的产气量。从图 3 看出,以 30% 低温菌群接种量进行培养基富集驯化,经过 8 次转代周期的富集驯化,培养周期累计沼气产量基本稳定。在启动富集培养的第一个周期,培养周期累积沼气产量小于 80 mL,甲烷气体含量不足 5%,主要原因是部分兼性厌氧微生物消耗培养基中的少量溶解氧,进行呼吸作用所产生的 CO₂ 气体为主。随转代周期的富集驯化,低温产甲烷菌群在第 6 转代培养期累积产气量开始进入比较稳定的状态周期累积产气量达到 180 mL,相比启动期时提高 1.3 倍,沼气中的甲烷含量也显著提高为 54.5%。

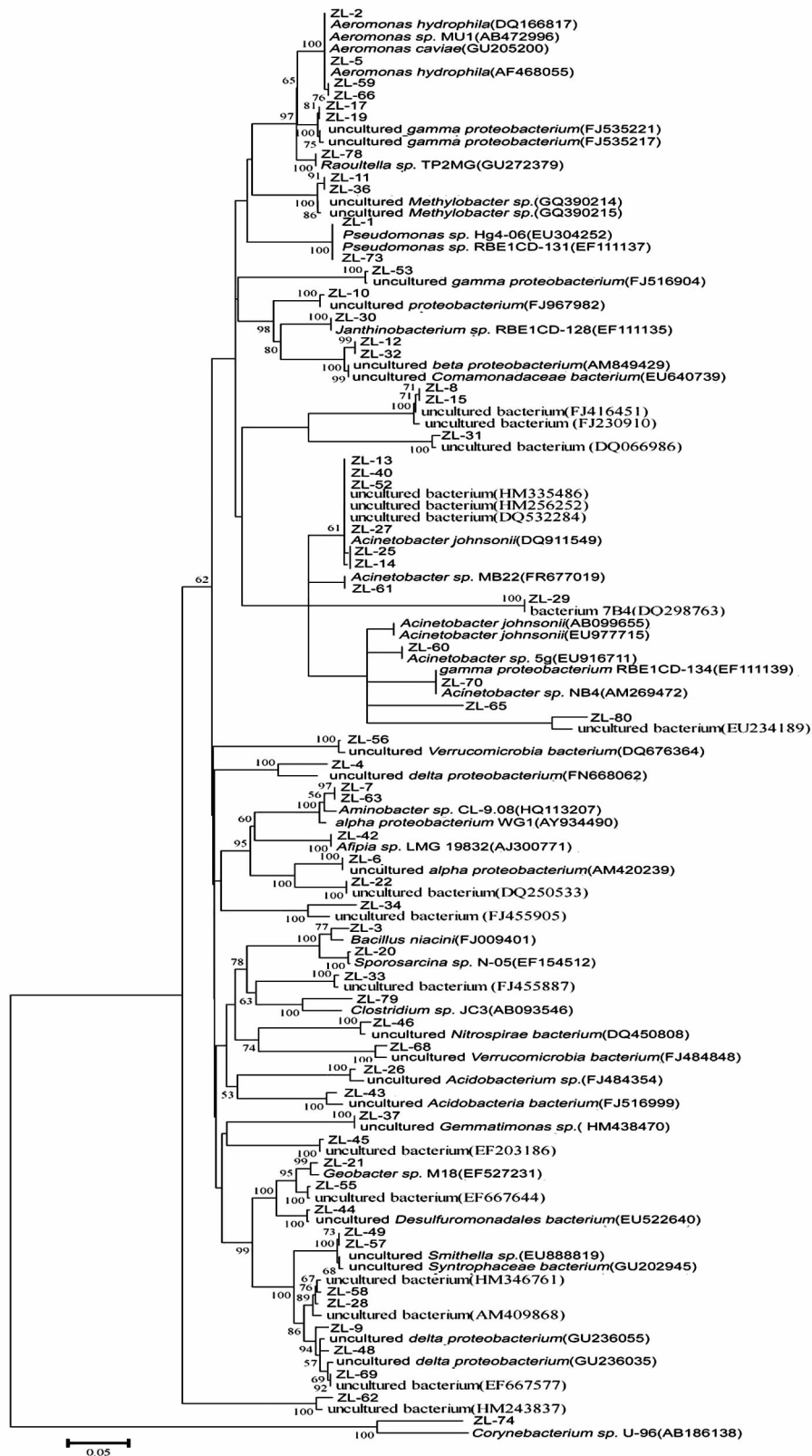


图1 活性污泥细菌 16S rDNA 序列克隆文库序列聚类分析

Fig. 1 Clustering analysis on sequence clone library of activated sludge bacterial 16S rDNA

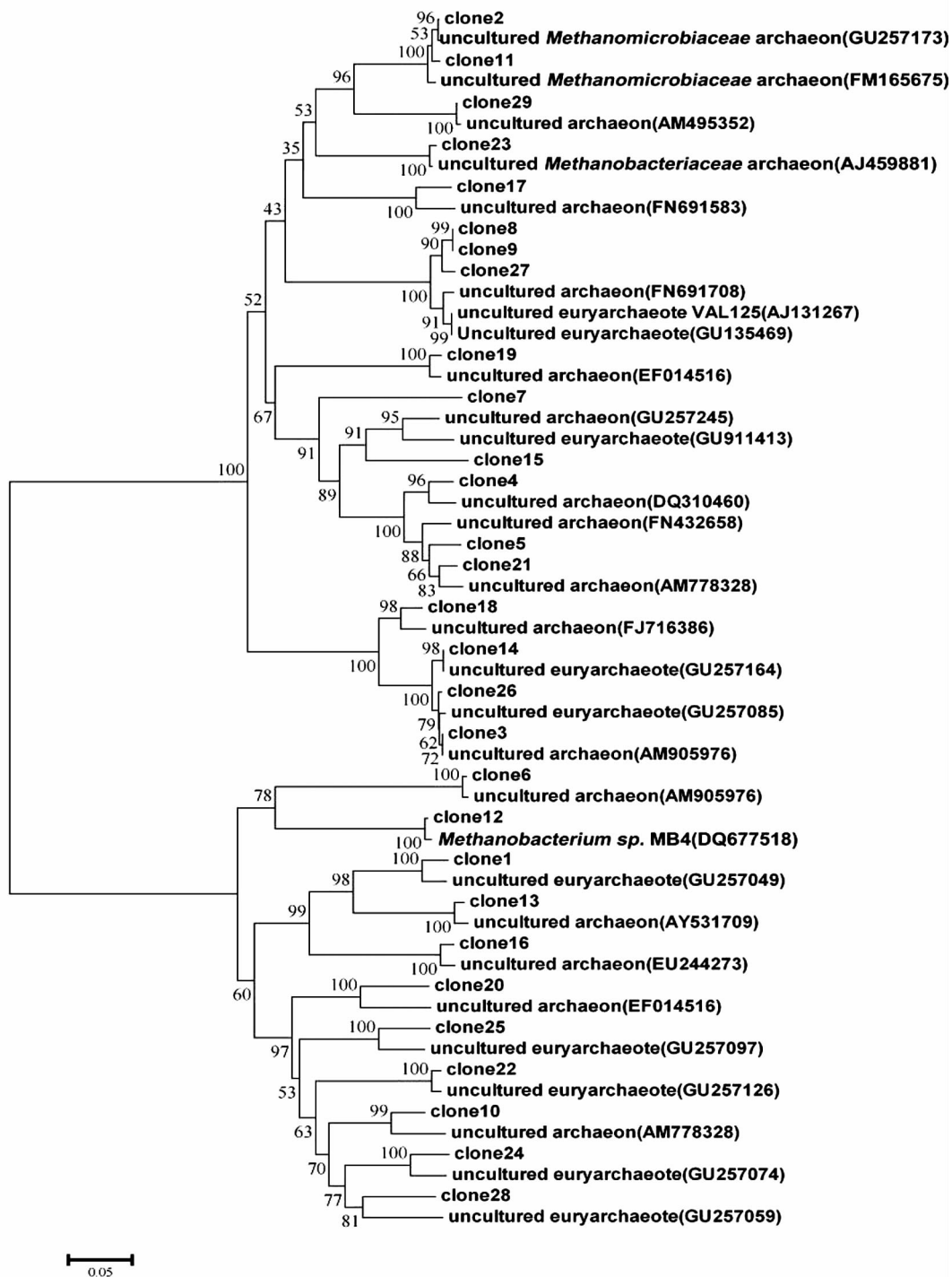


图 2 活性污泥产甲烷古菌 16S rDNA 序列克隆文库序列聚类分析

Fig. 2 Clustering analysis on sequence clone library of activated sludge bacterial 16S rDNA

研究进一步考察低温菌群在不同温度下(10、15、18、22、25 和 30℃),富集稳定产气的低温混合产甲烷菌群的甲烷转化效能。如图 4 所示,发酵温度对驯化后的低温产甲烷菌群影响十分显著,当发酵温度为 18℃时沼气产量最大,出现在启动

后 15 d 左右,最大产气量为 39 mL·d⁻¹,容积产量为 0.25 m³·(m³_{reactor} d)⁻¹,甲烷浓度为 56.3%。启动运行 30 d 时停止产气。低温产甲烷混合菌群对发酵温度升高表现敏感,在发酵温度为 30℃时基本失去活性。

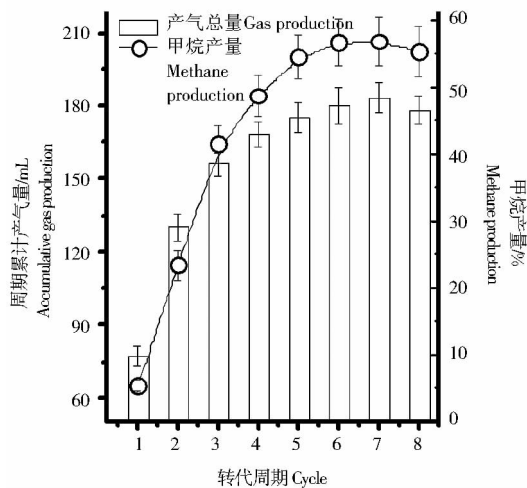


图3 低温菌群富集培养产气量

Fig. 3 Gas production of low temperature flora in enrichment

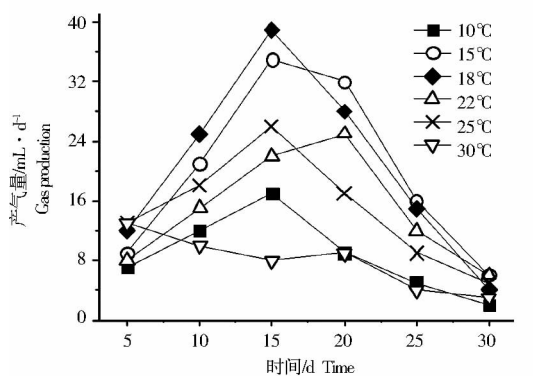


图4 低温菌群不同温度下的产气量

Fig. 4 Gas production of low temperature flora in different temperature

3 结论

低温环境下采集活性污泥进行低温产甲烷菌群的人工驯化,利用克隆文库分子生物学技术进行细菌群落分析发现共覆盖了 11 个微生物类群, Proteobacteria 是最优势细菌门,占序列总数的 72.5%, *Acinetobacter* sp. 属最优势细菌属,占克隆文库总数的 32.6%。产甲烷古菌克隆文库分析可知共获得有效序列 29 条,覆盖率不到微生物总量 20%,在细菌属的分类水平上,有 48% 以上微生物为未确定代谢类型和分类地位的产甲烷古菌,确定分离地位的 *Methanobacterium* sp. 属氢营养型产甲烷古菌。利用人工培养基富集驯化,经 8 世代富集驯化产气量稳定,周期累计产气量

达 180 mL,不同温度下对低温产甲烷菌群的产气效能影响显著,18℃ 产气量达最大值,容积产量为 $0.25 \text{ m}^3 \cdot (\text{m}^3_{\text{reactor}} \text{ d})^{-1}$,甲烷浓度为 56.3%。

参考文献:

- [1] Kelly K M, Chistoserdov A Y. Phylogenetic analysis of the succession of bacterial communities in the Great South Bay(Long Island)[J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2001, 35: 85-95.
- [2] 程辉彩, 习彦花, 郭建斌, 等. 产乙酸复合菌系 Th3 培养及其在沼气厌氧发酵中的应用[J]. 农业工程学报, 2012, 28(17): 210-216.
- [3] Heijs S K, Laverman A M, Forney L J, et al. Comparison of deep-sea sediment microbial communities in the Eastern Mediterranean [J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2008, 64: 362-377.
- [4] 孟祥博, 马放, 赵光, 等. 低温沼气厌氧消化研究进展[C]//中国环境科学学会. 中国环境科学学会学术年会论文集, 2013: 5484-5490.
- [5] Vieira R P, Gonzalez A M, Cardoso A M, et al. Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment, Rio de Janeiro [J]. Environ Microbiol., 2008(10): 189-199.
- [6] Franzmann P D, Liu Y, Balkwill D L, et al. *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H₂-Using methanogen from Ace Lake, Antarctica [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1997, 47 (4): 1068-1072.
- [7] 丁维新, 蔡祖聪. 温度对甲烷产生和氧化的影响[J]. 应用生态学报, 2003, 14(4): 604-608.
- [8] Dojka M A, Hugenholtz P, Haack S K, et al. Microbial diversity in a hydrocarbon-and chlorinated solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation [J]. Appl Environ Microbiol., 1998, 64(10): 3869-3877.
- [9] Tanner M A, Goebel B M, Dojka M A, et al. Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants [J]. Appl Environ Microbiol., 1998, 64(8): 3110-3113.
- [10] Liao L, Xu X, Wang C, et al. Bacterial and archaeal communities in the surface sediment from the northern slope of the South China Sea [J]. Journal of Zhejiang University Science, 2009, 10(12): 890-901.
- [11] APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater [M]. 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA, 1998: 128-132.
- [12] Chan O C, Claus P, Casper P, et al. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment [J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(8): 1139-1149.