

活性污泥微生物菌群研究方法进展

朱海霞¹, 陈林海^{1,*}, 张大伟¹, 赵现方¹, 杨天佑¹, 陈洪卫¹,
闫亚娟¹, 汪杏莉¹, 秦广雍¹, 李宗义²

(1. 郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 郑州 450052; 2. 河南师范大学生命科学院, 新乡 453002)

摘要 活性污泥是活性污泥法处理污水系统的功能主体。人类对活性污泥微生物菌群的认识随着其研究方法的发展而逐步深入。传统培养方法只能检测到活性污泥中 1% ~ 15% 的微生物。随着一系列基于免培养的分子生物学技术的出现, 活性污泥中菌群的复杂性和多样性以惊人的速度被人们认识。大量依靠传统检测方法未能发现却在活性污泥中起关键作用的微生物逐渐被发现。许多模拟活性污泥菌群生存环境条件的现代培养技术开始发展, 且已成功培养了一部分传统培养方法不能培养的细菌类群, 这为研究基于免培养方法发现的大量新的微生物菌群的生理特性和作用机制提供了可能, 也无疑将把人们对活性污泥菌群的认识推向一个新的层次。主要介绍活性污泥微生物菌群研究的一系列方法, 从传统培养方法到基于免培养的现代分子生物学技术, 再到现代培养技术, 着重论述了现代分子生物学技术及其在活性污泥微生物菌群研究中的进展。

关键词 活性污泥; 菌群; 16S rRNA; PCR-DGGE; PCR-SSCP; FISH; FCM

文章编号: 1000-0933 (2007) 01-0314-09 中图分类号: Q93 文献标识码: A

Development in research methods of activated sludge bacterial community

Zhu Haixia¹, Chen Linhai^{1,*}, Zhang Dawei¹, Zhao Xianfang¹, Yang Tianyou¹, Chen Hongwei¹, Yan Yajuan¹,
Wang Xingli¹, Qin Guangyong¹, Li Zongyi²

1 Henan Provincial Key Lab of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2 College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (1) 0314 ~ 0322.

Abstract : Activated sludge is the key functional element of biological wastewater treatment plants which employ an activated sludge process. This review enhances our knowledge about activated sludge microbial community and the development of its research method. Traditional cultivation-based studies could detect only 1% to 15% of microorganisms in activated sludge, therefore causing heavily biased shifts in community composition. With the emergence of a variety of cultivation-independent molecular methods, mainly based on 16S rRNA sequences, from the 1980s to the present, the biodiversity and complexity of activated sludge microbial communities were revealed at astonishing speed, and correspondingly numerous key microorganisms in activated sludge which were not detected by traditional cultivation methods, were disclosed by culture-independent techniques. Recently, many modern cultivation procedures, based on simulation of the environment conditions that the samples existed in, were developed and have successfully cultured some previously uncultivable microorganisms, offering the possibility of further exploring the physical characteristics and

基金项目: 国家科技部 973 资助项目 (2002CB412308)

收稿日期: 2006-05-13; 修订日期: 2006-11-11

作者简介: 朱海霞 (1979 ~), 女, 河南人, 硕士生, 主要从事离子束环境微生物学研究. E-mail: zhuhaixia39@163.com

通讯作者: Corresponding author. E-mail: chenlinhai@zzu.edu.cn

Foundation item : The project was financially supported by Profile of 973 Program from the National Ministry of Science and Technology (No. 2002CB412308)

Received date 2006-05-13; **Accepted date** 2006-11-11

Biography Zhu Haixia, Master candidate, mainly engaged in environmental microbiology. E-mail: zhuhaixia39@163.com

functional mechanisms of these newly recognized microorganisms. These advances undoubtedly promote our knowledge about activated sludge microbial communities to a higher level. This review introduces a series of methods about activated sludge microbial community research, including traditional cultivation-based methods, microbial biomarkers, molecular biological technology and modern culture approaches, especially focusing on a summarization of molecular biological technology, such as PCR-DGGE, FISH, FCM, and its application for research on the activated sludge bacterial community.

Key Words: activated sludge; bacterial community; 16S rRNA; PCR-DGGE; PCR-SSCP; FISH; FCM

活性污泥是污水处理厂曝气池内有机污染物质转化的主体,其生物活性的高低从根本上决定了一个污水处理厂的污水处理能力,而活性污泥的生物活性又主要取决于其中的微生物菌群结构和功能。活性污泥中的微生物主要由细菌、放线菌、真菌以及原生动物和后生动物等构成,其中细菌是最主要成分。因此,活性污泥微生物菌群研究一直是环境科学、生态学和工程等领域的研究重点。

20 世纪 80 年代之前,活性污泥菌群的研究主要以传统分离培养法为主。该方法从活性污泥中发现的主要优势菌群有:动胶杆菌属(*Zoogloea*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、螺菌属(*Spirillum*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等^[1~3]。但是后来大量研究发现,在活性污泥中经典纯培养方法能够培养的细菌数量只占活性污泥微生物总数的 1%~15%^[4]。因此,对活性污泥菌群新研究方法的探索是 20 世纪 80 年代的当务之急。

20 世纪 80 年代后期,随着以 16S rRNA 为主要基石的细菌分子分类学的发展,PCR 技术、电泳技术、克隆文库技术、荧光原位杂交(FISH)和流式细胞术(FCM)等免培养的分子生物学技术(cultivation-independent technique)逐渐成为研究活性污泥菌群的主要手段,活性污泥中菌群的复杂性和多样性也以惊人的速度被人们认识,大量传统检测方法未能发现却在活性污泥中起关键作用的微生物陆续被发现,如:具有除磷作用的类红环菌(*Rhodocyclus*)、小月菌(*Microbunatus* spp.)、类 *Tetrasphaera* 的棒状菌、俊片菌(*Lamprospedia* spp.)等^[5~7];具有脱氮作用的反硝化生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)、固氮弧菌属(*Azoarcus*)相关菌、类硝化螺菌(*Nitrospira*)等^[8~10];与污泥泡沫有关的诺卡氏菌形放线菌(*Nocardioform actinomycetes*)、丝状菌(*Microthrix parvicella*)和 *Nostocoida limicola* 等^[11]。

免培养技术的出现和完善,使环境微生物学家能够直接使用污泥材料研究和了解活性污泥菌群的结构和丰度,活性污泥中许多建立在 16S rRNA 基础上的新的微生物类群被人类认识,这大大加深了人们对活性污泥菌群结构的认识。为了深入了解免培养法发现的大量新的菌群的生理特性和作用机制,20 世纪 90 年代后期许多模拟活性污泥菌群生存环境的现代培养技术开始发展^[12],且已成功培养了一部分传统分离培养技术不能培养的新培养物^[13,14],这无疑将把人们对活性污泥菌群的研究推向一个新的层次。

1 传统的分离培养方法

传统的分离培养法是将定量样品接种于高浓度营养物的选择性培养基中,对生长的菌落计数,并通过观察各种微生物的生理生化特性及形态构造等进行种属分类鉴定。作为微生物研究的经典手段之一,分离培养方法在研究活性污泥菌群过程中起到十分重要的作用。

1964 年 Dias 等采用平板分离法从活性污泥的 7 个样品中分离了 300 多个菌株,其中最占优势的是动胶杆菌属和丛毛单胞菌属^[1]。Benedict 等于 1971 年从实验室和城市污水处理厂的两种活性污泥样品中培养、挑取 129 个菌落,经鉴定主要有不动杆菌属、产碱杆菌属、短杆菌属、丛毛单胞菌属、黄杆菌属、假单胞菌属等^[1]。

此法要求比较简单,很适合用来分离一些具有一定功能的微生物,还常用于一些科研工作者的初步研究。但是此法有很大的局限性:①培养基对某些菌群的选择性;②某些细菌和其它细菌之间有共生现象,不能单独生长(此类细菌占至今未能培养微生物的很大一部分);③很多细菌具有难以分辨的相似形态、生理生化特

性。所以,此方法不能真实的反映活性污泥菌群结构,尤其是对那些具有重要功能仍未能培养的菌群的检测^[4]。

2 生物标记物法

生物标记物法 (biomarker) 是在分类学上通过细胞特有的脂肪酸、呼吸醌等“环境样品信号”来表征、区分和鉴定细菌属、种和株等的方法。此方法可以避免形态观察方法带来的人为误差,从而进行定性定量分析。

2.1 脂肪酸图谱分析术

常用的脂肪酸图谱法可分为两种:磷脂脂肪酸 (PLFAs) 图谱法和全细胞脂肪酸甲酯 (WCFA-FAMES) 图谱法^[5]。前者的优点是准确、可靠,而后者的优点是提取简捷,所需样品量少。脂肪酸异丙酯 (FAPEs) 图谱法是最近发展的一种脂肪酸图谱法,采用强度更低的试剂 (酸性异丙醇) 和更简便的处理方法将提取的脂肪酸异丙基化,分析的对象是脂肪酸异丙酯。脂肪酸通常具有属的特异性,不同微生物具有不同的脂肪酸种类和数量,因此,可以通过脂肪酸谱图分析来快速有效监测群落的微生物结构变化。

Werker 等同时采用 MIDI-FAME 图谱法和 FAPEs 图谱法分析了城市污水处理厂活性污泥中的菌群结构,结果发现二者相似但存在一定的差别,可期待用校正因子的方法来比较两种方法的差别,研究还说明,脂肪酸异丙酯 (FAPEs) 具有简便、灵敏、可重复的特点,对环境微生物群落结构的分析有很大的应用前景^[5]。Conrad 等对 2 个污水处理厂的活性污泥絮凝体进行脂肪酸图谱比较分析,结果发现菌群结构有所差异,但脂肪酸图谱相似^[6]。

脂肪酸图谱法虽然能够快捷有效的从环境样品中提取脂肪酸进行微生物群落结构的分析,但也有一定的局限性:①对微生物的分类水平较低,不能鉴定到种;②对标记脂肪酸有强烈的依赖性;③复杂的环境微生物样品中不同微生物种属之间脂肪酸组成的重叠和外来生物污染容易导致一定的偏差。

2.2 醌类图谱分析术

醌类图谱 (Quinone Profile) 法是以特征化合物醌为标记来解析微生物群体组成的方法。有两类主要的呼吸醌:泛醌 (ubiquinone, UQ) 即辅酶 Q 和甲基萘醌 (menaquinone, MK) 即维生素 K^[7]。不同的微生物含有不同种类和分子结构的醌,因此,醌的多样性可定量表征微生物的多样性,醌图谱的变化可表征群落结构的变化。

Hiraishi 等比较了增强型生物除磷 (EBPR) 类型或一般类型、自然污水或人工污水、处理厂规模或实验室规模不同情况下的活性污泥菌群结构的生物醌图谱,发现泛醌 (Q) 和甲基萘醌 (MK) 的摩尔比 (MK/Q) 总体上为 0.455 ~ 0.981,数据显示 EBPR 和一般活性污泥中的主要组成菌都是属于 β -变形杆菌的含 Q-8 菌种,其次是属于高 G+C 的革兰氏阳性菌 (HGC) 的放线菌门^[8]。

虽然此方法是一种可靠的分析方法,然而也存在一定的局限性,它不能反映具体某个属或种的变化。

3 现代分子生物学法

20 多年前,以 16S rRNA 为主要基础的 PCR 技术、电泳技术、克隆文库技术、荧光原位杂交和流式细胞术等免培养的分子生物学技术开始应用到活性污泥菌群的研究,真实反映了环境样品中菌群的结构和丰度,避免了传统方法在菌群检测中低丰度易培养细菌被高估的局限性,促进了活性污泥菌群高度多样性的研究。

Fuhs 和 Chen 利用传统分离培养法研究认为,属于 γ -变形杆菌 (*Proteobacteria*) 亚纲的不动杆菌是活性污泥中除磷的优势菌 (占总培养菌落的 30% ~ 60%)^[9]。但是, Wagner 等利用分子生物学方法研究发现,不动杆菌数量很少 (仅占总细菌的 1% ~ 10%), 并没有聚磷作用,只是由于其易培养性被高估了^[20],同时,发现在活性污泥中大量存在的是 β -、 α -变形杆菌和 HGC。大量研究表明, β -变形杆菌是活性污泥中丰度最大的类群,其次有 (α -、 γ -变形杆菌、HGC、黄杆菌 (*Cytophaga-Flavobacterium of Bacteroidetes*, CF) 和放线菌 (*Actinobacteria*)、绿弯菌 (*Chloroflexi*)、硝化螺旋菌 (*Nitrospira*) 和浮霉菌 (*Planctomycetes*) 等^[6, 21~26]。

3.1 PCR 及其相关技术

3.1.1 T-RFLP

末端限制性片段多态性 (Terminal-Restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) 法是由 RFLP 发展而

来的方法,又称为 16S rRNA 基因的末端限制性片段,是将 PCR 引物中的一条加以荧光标记,对扩增产物用限制性内切酶进行切割并电泳,根据片断的大小不同以及标记片断种类和数量的不同来分析群落的结构及组成。

现在很多研究人员利用 T-RFLP 来研究活性污泥的微生物菌群结构,还用来监测因环境改变而引起的菌群变化^[27]。Tsuneda 等以亚硝酸盐还原酶基因(Nitrite reductase gene, *nirS*)为基础对一个序批反应器(SBR)的反硝化聚磷菌(Denitrifying polyphosphate-accumulating organisms, DNPAOs)进行 RFLP 分析,发现一个占 70% 所有克隆的 *nirS* 克隆,其序列相似于红环菌类群的两类细菌:陶厄氏菌属(*Thauera mechernichensis*) (83% 相似性)和固氮弧菌属(*Azoarcus tolulyticus*) (83% 相似性)^[28]。

3.1.2 ERIC-PCR

ERIC-PCR 实际上是一种长引物 RAPD 技术。ERIC 序列(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence)是首先在肠道细菌基因组中发现的长为 126bp 的非编码保守重复序列,该序列在细菌染色体上分布的多态性允许设计特异引物对其进行扩增而形成具有种、属、菌株特异性的指纹图谱,已经被广泛应用于纯培养细菌的鉴别、分类、基因组多样性和系统进化等方面的研究^[29]。陈敏等人用 ERIC-PCR 指纹图谱技术检测了活性污泥菌群结构及其变化,结果表明,在缺氧池和好氧池之间,各个采样点的 ERIC-PCR 图谱差异不大,悬浮污泥在各构筑物之间交流充分,同一采样点的图谱在不同采样时期具有明显差异^[30]。

ERIC-PCR 的局限性:①不能提供关于种群组成的信息;②重现性差;③由于长度相同的 DNA 片断其序列可能不一样,可能会高估样品间的相似性。ERIC-PCR 与其他分子生物学技术相结合使用可能更加准确地反映微生物群落结构。

3.1.3 DGGE/TGGE

变性/温度梯度凝胶电泳(Denaturing/Temperature gradient gel electrophoresis, DGGE/TGGE)是依据双链 DNA 片断熔解行为的不同,分离 PCR 产物中长度相同但序列不同的 DNA 标记片断(rRNA 或 rDNA)。从理论上讲,DGGE/TGGE 指纹图上的一个条带就代表一个微生物类群(分类水平可达种)。因而,指纹图谱不但直观反映了微生物群落的结构和多样性,还可方便判断出优势菌或功能菌。

此方法已经广泛应用于活性污泥菌群的研究^[31]。Onuki 等对一个添加乙酸盐 SBR 反应器的活性污泥中除磷的菌群结构进行 PCR-DGGE 分析,发现红环菌属(属于 β -变形杆菌)相关菌是积磷菌,并利用这种 PAOs 的特异探针进行荧光原位杂交(FISH)和 DAPI 染色,研究进一步说明红环菌属-相关菌确实有聚磷作用^[32]。Limpiyakorn 等以 16S rDNA 为基础对东京 8 个污水处理厂的 12 个活性污泥样品中氨氧化细菌(AOB)的群落结构进行 DGGE 分析,结果显示,每个处理厂低氨浓度的污水中 *Nitrosomonas oligotropha* 类似细菌占优势,仅在一个相对高氯化氨浓度的 A2O 系统中恢复到 *Nitrosomonas europaea*-和 *Nitrosomonas cryotolerans*-类似序列,在每一个 A2O 和 AO 系统都发现 *Nitrosomonas communis*-类似序列,但在一个 AS 系统几乎没有发现,总之,污水特性和运行参数都会影响 AOB 群落结构^[33]。

该法回收的 DNA 片断,通过测序后与基因序列数据库中的已知序列比较,可以确定其种系发育位置,还可设计成探针,用荧光原位杂交(FISH)技术监测微生物菌群的变化。但是 DGGE 对有多个不同碱基序列差异的 DNA 片段的分离有一定局限性,可能低估了环境微生物的种群多样性。

3.1.4 SSCP

单链构象多态性研究(Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)方法,是指呈复杂空间折叠构象的单链 DNA 或 RNA 片段,当有一个碱基发生改变时,空间构象便发生改变,空间构象有差异的单链分子在聚丙烯酰胺凝胶中受排阻大小不同。因此,通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),可以非常敏锐地将构象上有差异的分子分离开。

Sabine 等用该法研究活性污泥菌群结构和演替,并同传统的培养方法比较指出 SSCP 方法避免了传统培养的费时费力以及误差大的干扰,适合对微生物群落结构和演替的分析^[34]。Dabert 等利用 SSCP 法研究

bioaugmentation 对 EBPR 实验室反应器的活性污泥除磷作用的影响,发现 PAOs 和 GAOs 的竞争是 EBPR 启动成败的关键^[55]。

3.1.5 RT-PCR

实时荧光定量 PCR (Real-time PCR ,RT-PCR)技术 ,是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团 ,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程 ,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

2005 年 Limpiyakorn 等用该法对活性污泥的氨氧化细菌进行定量检测 ,并结合使用 PCR-DGGE、16S rRNA 测序分析研究了氨氧化细菌的群落结构 ,结果表明 ,氨氧化菌总数会随季节变化 ,而菌群结构没有变化 ,检测到的主要菌群^[60]与 2004 年进行 DGGE 检测的结果基本一致。

由于该技术不仅实现了 PCR 从定性到定量的飞跃 ,而且与常规 PCR 相比 ,它具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点 ,目前已得到广泛应用^[36]。

3.1.6 16S rRNA 序列比较

尽管 PCR 产物经 DGGE 等电泳技术后的凝胶条带可以通过回收测序进行菌群分类初步分析 ,然而通过建立细菌 16S rRNA 文库的方法可以进行更为深入的分析。rRNA 序列比较是通过比较分析缓慢进化的 rRNA 分子成分 ,从而在微生物系统发育上进行分类。其主要步骤包括 :①样品中总 DNA 的提取 ;②建立基于 λ 噬菌体的 DNA 克隆文库 ;③以种类特异性的 16S rRNA 探针筛选文库 ;④测序 ;⑤序列的比较分析。

Kong 等通过利用该法在活性污泥中发现 γ -变形杆菌的一个多形球杆菌 (coccobacilli)新分支 ,并进行 FISH 研究发现此新类群广泛分布 ,在 9 个 EBPR 类型 (占总细胞数的 10% ~ 50%)和 4 个一般类型 (1% ~ 10%)中显著出现^[37]。Chouari 等对活性污泥中浮霉菌门的多样性进行 16S rRNA 序列分析 ,发现了 4 个已知菌属 *Pirellula* (32%)、*Planctomyces* (18.4%)、*Gemmata* (3.8%)和 *Isosphaera* (0.4%) ,并设计新特异探针进行 FISH 检测发现活性污泥中存在很多此类群的细菌^[38]。Liu 等通过对除磷活性污泥中的 114 个克隆进行 16S rRNA 序列分析 ,并结合 FISH 研究发现 ,污泥中的多样性类群有 :变形杆菌 (71.0%)和黄杆菌 (23.7%) ,还有新类群 *Planctomycetales* (2.6%)、*Verrucomicrobiales* (1.8%)和 *Firmicutes* (0.9%)^[25]。

3.2 荧光原位杂交技术 (FISH)及其相关技术

荧光原位杂交技术 (Fluorescent in situ hybridization ,FISH)是由 Gall 和 Pardue 最早描述 ,其间经历了放射性标记探针阶段和荧光标记探针阶段。与放射性探针相比 ,荧光探针具有以下优点 :安全、简便、灵敏、快速 ,可同时检测几种微生物。

核酸荧光原位杂交是指通过荧光标记的寡核苷酸探针特异地和互补核酸序列在完整的细胞内结合 ,用显微镜和流式细胞术等荧光检测技术进行观察和分析。核酸探针是通过比较 16S rRNA 序列和数据库中的序列进行设计 ,可在不同水平 (类群、属、种等)上进行目标细菌的原位检测。具体过程包括以下几步 :①固定标本 ;②预处理样品 ;③用相应的探针进行杂交 ;④洗掉未结合的探针 ;⑤信号的仪器 (普通荧光显微镜、共聚焦激光扫描显微镜或流式细胞仪)检测及结果分析。影响 FISH 的主要因素有 :①目标细胞的 rRNA 数量 ;②寡核苷酸的渗透能力 ;③自发荧光的干扰。

FISH 具有快速、准确、原位等诸多优点 ,避免了由于核酸抽提和 PCR 扩增产生的一定程度偏差 ,因此 ,以 rRNA 为基础的荧光原位杂交可以得到特定微生物在环境中的存在、空间分布和丰度以及整个微生物群落的组成、结构及其多样性等全面信息^[39-40]。

3.2.1 显微术

显微术所利用的显微镜有 :落射荧光显微镜 (Epifluorescence Microscopy ,EM)、激光扫描共聚焦显微镜 (Laser Scanning Confocal Microscopy ,LSCM)、双光子激发激光扫描显微镜 (Two-Photon Excitation Laser Scanning Microscopy ,TPE-LSM)。2005 年 Lopez 等以活性污泥为对象比较了 3 种显微镜各自的优缺点^[41] ,研究表明细胞密度较大的菌胶团适合用 TPE-LSM 法 ,但典型的活性污泥菌胶团适合用 EM 和 CLSM 法。这些方法虽然直观 ,但是人工计数来定量活性污泥中的菌群结构时会为实验结果带来主观性偏差。TPE-LSM 由于

其价格昂贵,使用较少。

(1) 落射荧光显微镜 (EM)

EM 是常用的普通荧光检测仪器,因为它构造简单,使用方便,一直被广泛使用^[40-42]。Manser 等以硝化菌形成的菌团数目和大小为基础,发展了一个用 EM 快速定量检测活性污泥硝化细菌的方法,结果显示,氨氧化细菌和亚硝酸氧化菌分别进行 10~15 和 6~8 个观察视野为精确检测的最佳选择^[42]。

1993 年 Wagner 等利用 EUB338、ALF1b、BET42a 和 GAM42a 等荧光探针特异性地和活性污泥原位杂交,定量检测了各类群的丰度,结果显示 3 个变形杆菌亚纲类群的总含量超过了活性污泥总细胞数的 80%^[43]。Elkelboom 等用 FISH 方法对活性污泥中丝状微生物研究,检测到 59 种丝状菌种,包括新发现的 ca. 40 菌种^[49]。Wong 等对日本的 9 个不同污水处理厂的 13 个活性污泥样品菌群进行 FISH 研究,结果显示,红环菌属-相关的聚磷菌 (PAOs) 和聚糖菌 (GAOs) 是优势菌,然而,DAPI 聚磷染色发现,一部分红环菌属-相关 PAOs 却没有聚磷作用。这进一步说明,红环菌属-相关 PAOs 和污泥磷含量有很低的相关性,这些非红环菌属-相关的 PAOs 还包括其它类群的细菌^[7]。

(2) 激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM)

LSCM 能除去焦外荧光,图像强度高,可以进行多层次的空间观察,适用于较浓稠或有较高背景值的样品,有很大的应用前景^[44-45]。Coskuner 等用 FISH 技术在种属水平原位鉴定了活性污泥中硝化细菌群落的组成和分布,发现优势菌是亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*),而不是以前认为的亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*)^[44]。Schmid 等通过 LSCM 的三维观察研究发现,活性污泥菌群结构随着活性污泥絮凝体的沉降性能而变化^[45]。

3.2.2 FCM

流式细胞术 (Flow cytometry, FCM) 是一种对处在液体中的细胞或其他生物微粒逐个进行多参数快速 (每秒 10^3 个细胞以上) 定量分析和分选的技术,具有自动而快速、客观、直接和同时检测多参数的优点,可以很好的避免显微术人工计数的主观性偏差。但是流式细胞术也有其设备昂贵、需专业操作人员、标本需前处理等局限性。FCM 快速检测和鉴定活性污泥菌群的主要影响因素是样品的细胞分散过程,因为活性污泥中细菌多是以絮凝体即菌胶团的形式存在,未能很好分散细菌会对分析结果造成很大的偏差。分散细菌的方法有:研磨法、小玻璃珠法、超声波法和均匀化法等。最近, Falcioni 等利用核酸染色后 FCM 的分析来比较超声波法和均匀化法对细菌的分散效果,结果显示,超声波法对细胞存活结果和分析速度的效果较好。但是,对于不同的样品和不同的实验要求还需要根据细胞存活结果和分析速度来选择合适的预处理方法^[46]。

许多研究者成功地结合使用 FCM 和 FISH 对简单的人工培养的微生物细胞群或诸如活性污泥等复杂的微生物自然群落进行了分析^[47-48]。Wallner 等采用 FCM 对一个城市污水处理厂的活性污泥的菌群结构进行了分析,结果显示此活性污泥中变形杆菌纲的 β -、 γ - 和 α -亚纲分别占 41%、7.7% 和 1.7%,不动杆菌属占 4.7%^[47]。Zilles 等利用 FISH 和 FCM 结合研究了 2 个 EBPR 活性污泥中除磷微生物,尽管在添加乙酸的反应器中研究发现了一种仍未能培养的 *candidatus accumulibacter phosphatis* 具有强化去磷作用,但不是主要 PAO,此研究结果表明厌氧/好氧工艺的运行的作用菌可能是多种 PAO 的菌群^[48]。

3.3 Microarray 技术

微阵列 (microarray) 或生物芯片技术的引入增强了核酸杂交技术解析微生物群落结构和多样性的能力。DNA 微阵技术含多种不同 DNA 探针,可以对于那些还没有可行探针信息的情况进行随机基因组杂交,从而检测出环境样品的复杂菌群中的特异菌种,还可测定结构和多样性已知的群落的变化,更因其高度并行性、微型性、自动化和快速检测的特点,显示出广阔的应用前景^[49-50]。

Kim 等以不同属的 13 个菌株作为目标,建立 DNA 微阵芯片对纯培养和混合培养细菌进行实验,结果显示,不需要纯培养菌株的任何种系发育水平的序列信息即可通过 DNA 微阵芯片来检测特定菌种,对活性污泥样品中的特定菌种检测也是一种快速特异的方法^[49]。Loy 等为了检测 β -变形杆菌的红环菌的数量,发展了 16S rRNA 目标的 79 个寡核苷酸探针的微阵列 (RHC-PhyloChip),直接用于活性污泥中红环菌目的多样性分

析,试验表明可以检测相对丰度不到总菌数 1% 的红环菌,另外,对未能培养的动胶杆菌-, *Ferribacterium*/脱氯单胞菌 (*Dechloromonas*)-和 *Sterolibacterium*-相关菌的分析证明 RHC-PhyloChip 确实是一个研究环境微生物菌群的新型有力工具^[50]。

4 现代培养技术

虽然免培养分子生物学技术发现了活性污泥中存在着大量的活的但未能培养 (Viable but nonculturable, VBNC) 菌群,且在一定程度上能够让让人们在原位对活性污泥菌群的分布和功能进行研究,但要深入了解这些菌群的生理特性和它们对污染物的降解机制,还需要得到纯培养物。然而传统培养方法培养基和培养条件的内在选择性大大限制了其获得纯培养物的能力。因此,迫切需要发展新的培养方法来得到 VBNC 菌群的纯培养物。

近年来已有不少科技工作者致力于新分离培养技术的研究,研究显示,在培养过程中构建类似于污泥运行环境的生长条件,有可能得到某些 VBNC 菌群的纯培养物。现代培养技术主要手段有^[12]:①单细胞操作技术(如光镊技术和激光显微解剖法);②模拟自然环境(如:降低营养物质的浓度,添加非传统的营养物,信号分子或抑制因子,延长培养时间;直接接种到自然环境);③微胶囊裹细胞法。2002 年 Zengler 等发展一种微胶囊裹细胞法,大量包裹的细胞在低营养物下同时培养,然后用流式细胞仪 (FCM) 检测含有微克隆的微滴,此方法已成功用于海水和土壤等环境样品中 VBNC 微生物的培养研究^[51],同时,2005 年他们又进一步把 FCM 分选到的目的微滴接到丰富培养基上进行大量培养,从而得到更多仍未培养或环境中丰度较低的微生物^[52]。

现代培养技术在活性污泥中新发现菌群的培养和生理功能的研究中已经有应用,目前已经成功培养了很多传统方法未能培养的培养物,如 Maszenan 等分离培养的属于 α -变形杆菌的 *Deftuvicoccus vanus* gen. nov., sp. nov.^[13]以及 Soddell 等分离培养的一个属于放线菌的 *Millisia brevis* gen. nov., sp. nov.^[14]。Heylen 等通过优化培养基培养出了活性污泥中 99 个反硝化细菌,其中大部分属于 β -变形杆菌 (50.4%) 和 α -变形杆菌 (36.8%),其次有 γ -变形杆菌 (5.6%), δ -变形杆菌 (2%), 厚壁菌门 (Firmicutes) (4%) 和一个拟杆菌门菌株,研究显示,与传统培养方法相比,现代培养技术显示活性污泥中反硝化菌群有更高的多样性^[53]。

5 展望

20 多年来,以 16S rRNA 为基础的免培养分子生物学技术的广泛使用,极大促进了土壤、海水、淡水等环境微生物菌群的研究,不断更新着微生物多样性的内涵。GenBank 文库显示,仅 2002 年就有大约 9500 个新的 16S rRNA 克隆序列被发现^[54]。人们认识的细菌类群从 1987 年 Woese 描述的 12 门已经增加到 2005 年的 53 个门,其中 26 个门没有代表培养物,如 1998 年之前发现的 OS-K、Marine GroupA、Termite Group1,随后陆续发现的 OP、SC、BRC1、ABY1、TM7 和 WS6 等^[54]。免培养技术的发展作为目前最直接最客观的一种原位检测微生物的手段,大大拓宽了微生物生态学的研究视野。

现代培养技术的发展一方面验证了人们采用免培养技术获取的研究成果,更重要的是为更加深入研究至今发现的大量 VBNC 微生物的生理功能提供了可能。2004 年 Stevenson 等采用低浓度营养物和长培养时间的培养方法,从土壤中分离培养到更多免培养技术发现的疣微菌门 (Verrucomicrobia) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 的纯培养物^[55]。2005 年 Ferrari 等采用一种新的模拟自然环境的微培养法,从土壤中分离培养出 TM7 微菌落^[56]。自现代培养技术应用于微生物的培养以来,自然环境中可培养的微生物数目日益增加。

由于土壤微生物和农业生产关系的密切性以及水生微生物样品的易处理性,免培养技术和现代培养技术在土壤和水生环境微生物,尤其是土壤微生物上的应用最为成熟,已取得了很多重要进展。相比而言,活性污泥的微生物菌群研究起步较晚,近年来由于污泥样品研究技术的发展,活性污泥菌群结构和功能的研究日益增多,目前,国外已取得了不少极有价值的研究成果,国内的研究还相对较少。所以,免培养技术和现代培养技术在国内活性污泥菌群及其他环境微生物的研究中尚有很大的应用前景。

References :

- [1] Dias F F , Bhat J V . Microbial ecology of activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. ,1964 ,12 :412 —417.
- [2] Prakasam T B S , Dondero N C . Aerobic heterotrophic populations of sewage and activated sludge. I. Enumeration. Appl. Microbiol. ,1967 ,15 :461 —467.
- [3] Benedict R G , Carlson D A . Aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge. Water. Res. ,1971 ,5 :1023 —1030.
- [4] Amann R I , Ludwig W and Schleifer K H . Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. ,1995 ,59 :143 —169.
- [5] Mudaly D D , Atkinson B W , Bux F . 16S rRNA in situ probing for the determination of the family level community structure implicated in enhanced biological nutrient removal. Water. Sci. Technol. ,2001 ,43 (1) :91 —98.
- [6] Liu W T , Nielsen A T , Wu J H , *et al.* In situ identification of polyphosphate-and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process. Environ. Microbiol. ,2001 ,3 :110 —122.
- [7] Wong M T , Mino T , Seviour R J , *et al.* In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan. Water. Res. ,2005 ,39 (13) :2901 —2914.
- [8] Layton A C , Karanth P N , Lajoie C A , *et al.* Quantification of *Hyphomicrobium* populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment system as determined by 16S rRNA analysis. Appl Environ Microbiol. ,2000 ,66 (3) :1167 —1174.
- [9] Juretschko S , Loy A , Lehner A , *et al.* The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. Syst. Appl. Microbiol. ,2002 ,25 :84 —99.
- [10] Limpiyakorn T , Shinohara Y , Kurisu F , *et al.* Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. FEMS Microbiol. Ecol. ,2005 ,54 (2) :205 —217.
- [11] Martins A M , Pagilla K , Heijnen J J , *et al.* Filamentous bulking sludge — a critical review. Water Res. ,2004 ,38 :793 —817.
- [12] Joseph S J , Hugenholtz P , Sangwan P , *et al.* Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. Appl Environ Microbiol. ,2003 ,69 (12) :7210 —7215.
- [13] Maszenan A M , Seviour R J , Patel B K , *et al.* *Deffluicoccus vanus* gen. nov. , sp. nov. , a novel Gram-negative coccus/coccobacillus in the *Alphaproteobacteria* from activated sludge. Int J Syst. Evol. Microbiol. ,2005 ,55 :2105 —2111.
- [14] Soddell J A , Stainsby F M , Eales K L , *et al.* *Millisia brevis* gen. nov. , sp. nov. , an actinomycete isolated from activated sludge foam. Int J Syst. Evol. Microbiol. ,2006 ,56 :739 —744.
- [15] Werker A G , Becker J , Huitem A C . Assessment of activated sludge microbial community analysis in full-scale biological wastewater treatment plants using patterns of fatty acid isopropyl esters (FAPEs). Water Res. ,2003 ,37 (9) :2162 —2172.
- [16] Conrad A , Suutari M K , Keinänen M M , *et al.* Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. Lipids. ,2003 ,38 (10) :1093 —1105.
- [17] Hu H Y , Tong Z H . Bacterial quinone profile for the study of microbial community structure in environmental samples. Microbiology ,2002 ,29 (4) :95 —98.
- [18] Hiraishi A , Ueda Y , Ishihara J . Quinone Profiling of Bacterial Communities in Natural and Synthetic Sewage Activated Sludge for Enhanced Phosphate Removal. Appl. Environ. Microbiol. ,1998 ,64 (3) :992 —998.
- [19] Fuhs G W , Chen M . Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. Microbiol. Ecol. ,1975 ,2 :119 —138.
- [20] Wagner M , Erhart R , Manz W , Amann R , *et al.* Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. ,1994 ,60 :792 —800.
- [21] Snaird J , Amann R , Huber I , *et al.* Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. ,1997 ,63 :2884 —2896.
- [22] Bond P L , Erhart R , Wagner M , *et al.* Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge system. Appl. Environ. Microbiol. ,1999 ,65 :4077 —4084.
- [23] Crocetti G R , Hugenholtz P , Bond P L , *et al.* Identification of polyphosphate accumulating organism and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantification. Appl. Environ. Microbiol. ,2000 ,66 :1175 —1182.
- [24] Lin C K , Katayama Y , Hosomi M , *et al.* The characteristics of the bacterial community structure and population dynamics for phosphorus removal in SBR activated sludge processes. Water Res. ,2003 ,37 (12) :2944 —2952.
- [25] Liu Y , Zhang T , Fang H H . Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated sludge. Technol. ,2005 ,96 (11) :1205 —1214.
- [26] Aktan S , Salih B A . Fluorescent in situ hybridization (FISH) for the detection of bacterial community in activated sludge from textile factories. Environ. Technol. ,2006 ,27 (1) :63 —69.
- [27] Hiraishi A , Iwasaki M , Shinjo H . Terminal restriction pattern analysis of 16S rRNA genes for the characterization of bacterial communities of activated sludge. J. Biosci. Bioeng. ,2000 ,90 (2) :148 —156.
- [28] Tsuneda S , Miyauchi R , Ohno T , *et al.* Characterization of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge based on nitrite reductase gene. J. Biosci. Bioeng. ,2005 ,99 (4) :403 —407.
- [29] Versalovic J , Koelt h T , Lupski J R . Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application finger printing of bacterial genomes. Nucl. Acids. Res. ,1991 ,19 (24) :6823 —6831.

- [30] Chen M, Wei G F, Gao P P, *et al.* Using ERIC-PCR and molecular hybridization for monitoring changes in the structure of microbial community in coking wastewater treatment system. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24 : 1330 — 1334.
- [31] Gao P P, Chao Q F, Zhang X L, *et al.* Population dynamics and community structure of bacteria in an industrial phenol-degrading process analyzed with Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE). *Acta Ecologica Sinica* 2003 23 (10) : 1963 ~ 1969.
- [32] Onuki M, Satoh H, Mino T. Analysis of microbial community that performs enhanced biological phosphorus removal in activated sludge fed with acetate. *Wat. Sci. Technol.*, 2002, 46 (1-2) : 145 — 153.
- [33] Limpiyakorn T, Shinohara Y, Kurisu F, *et al.* Distribution of ammonia-oxidizing bacteria in sewage activated sludge : analysis based on 16S rDNA sequence. *Water Sci. Technol.*, 2004, 50 (8) : 9 — 14.
- [34] Sabine P, Stefanie K, Frank S, *et al.* Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR -Single-strand-Conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66 (3) : 930 ~ 936.
- [35] Dabert P, Delgenes J P, Godon J J. Monitoring the impact of bioaugmentation on the start up of biological phosphorus removal in a laboratory scale activated sludge ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 66 (5) : 575 — 588.
- [36] Araki N, Yamaguchi T, Yamazaki S, *et al.* Quantification of *amoA* gene abundance and their *amoA* mRNA levels in activated sludge by real-time PCR. *Water Sci. Technol.*, 2004, 50 (8) : 1 — 8.
- [37] Kong Y, Ong S L, Ng W J, *et al.* Diversity and distribution of a deeply branched novel proteobacterial group found in anaerobic-aerobic activated sludge processes. *Environ. Microbiol.*, 2002, 4 (11) : 753 — 757.
- [38] Chouari R, Le Paslier D, Daegelen P, *et al.* Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69 (12) : 7354 — 7363.
- [39] Elkelboom D H, Geurkink B. Filamentous micro-organisms observed in industrial activated sludge plants. *Water Sci. Technol.*, 2002, 46 (1-2) : 535 — 542.
- [40] Hug T, Gujer W, Siegrist H. Rapid quantification of bacteria in activated sludge using fluorescence in situ hybridization and epifluorescence microscopy. *Water Res.*, 2005, 39 (16) : 3837 — 3848.
- [41] Lopez C, Pons M N, Morgenroth E. Evaluation of microscopic techniques (epifluorescence microscopy, CLSM, TPE-LSM) as a basis for the quantitative image analysis of activated sludge. *Water Res.*, 2005, 39 (2-3) : 456 — 468.
- [42] Manser R, Muche K, Gujer W, *et al.* A rapid method to quantify nitrifiers in activated sludge. *Water Res.*, 2005, 39 (8) : 1585 — 1593.
- [43] Wagner M, Amann R, Lemmer H, *et al.* Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria : inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59 (5) : 1520 — 1525.
- [44] Coskuner G, Curtis T P. In situ characterization of nitrifiers in an activated sludge plant : Detection of *Nitrobacter* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93 : 431 ~ 437.
- [45] Schmid M, Thill A, Purkhold U, *et al.* Characterization of activated sludge flocs by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Water Res.*, 2003, 37 (9) : 2043 — 2052.
- [46] Falcioni T, Manti A, Boi P, *et al.* Comparison of disruption procedures for enumeration of activated sludge floc bacteria by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2006, 70 (3) : 149 — 153.
- [47] Wallner G, Erhart R, Amann R. Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61 (5) : 1859 — 1866.
- [48] Zilles J L, Peccia J, Noguera D R. Microbiology of enhanced biological phosphorus removal in aerated-anoxic Orbal processes. *Water Environ. Res.*, 2002, 74 (5) : 428 — 436.
- [49] Kim B C, Park J H, Gu M B. Multiple and simultaneous detection of specific bacteria in enriched bacterial communities using a DNA microarray chip with randomly generated genomic DNA probes. *Anal. Chem.*, 2005, 77 (8) : 2311 — 2317.
- [50] Loy A, Schulz C, Lucker S, *et al.* 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order "Rhodocyclales". *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71 (3) : 1373 — 1386.
- [51] Zengler K, Toledo G, Rappe M, *et al.* Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad. Sci. USA.*, 2002, 99 (24) : 15681 — 15686.
- [52] Zengler K, Walcher M, *et al.* High-throughput cultivation of microorganisms using microcapsules. *Methods Enzymol.*, 2005, 397 : 124 — 130.
- [53] Heylen K, Vanparys B, Wittebolle L, *et al.* Cultivation of denitrifying bacteria : optimization of isolation conditions and diversity study. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72 (4) : 2637 — 2643.
- [54] Rappe M S, Giovannoni S J. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.*, 2003, 57 : 369 — 394.
- [55] Stevenson B S, Eichorst S A, Wertz J T, *et al.* New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol.*, 2004, 70 (8) : 4748 — 4755.
- [56] Ferrari B C, Binnerup S J. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.*, 2005, 71 (12) : 8714 — 8720.

参考文献：

- [17] 胡洪营, 童中华. 微生物脂指纹法在环境微生物群体组成研究中的应用. *微生物学通报*, 2002, 29 (4) : 95 ~ 98.
- [30] 陈敏, 魏桂芳, 高平平, 等. 用 ERIC-PCR 结合分子杂交监测焦化废水处理系统 (A2/O) 中微生物群落结构的变化. *生态学报*, 2004, 24 : 1330 ~ 1334.
- [31] 高平平, 晁群芳, 张学礼, 等. TGGE 分析焦化废水处理系统活性污泥细菌种群动态变化及多样性. *生态学报*, 2003, 10 : 1963 ~ 1969.