

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54 (11):1369–1377; 4 November 2014

ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.015

互营烃降解菌系 M82 的脂肪酸降解特性

丁晨, 承磊, 何乔, 张辉*

农业部沼气科学研究所, 农业部农村可再生能源开发利用重点实验室, 四川 成都 610041

摘要:【目的】通过分子生态学手段筛选适合互营烃降解菌 *Syntrophus* sp. 生长的非烃碳源。【方法】利用实验室驯化获得的正十六烷降解产甲烷菌系 M82 为接种物, 添加不同碳源 (正十二烷二元酸、正十四烷二元酸、正十六烷烃、十六烷酸钠、乳酸钠和丙酸钠) 传代培养, 通过 PCR-DGGE 和 qPCR 技术研究不同碳源条件下 *Syntrophaceae* 科细菌的丰度与变化趋势; 利用 T-RFLP 方法分析古菌群落结构。【结果】菌系 M82 可以利用多种脂肪酸生长并产生甲烷, 但是细菌群落结构发生了变化, 只在添加正十二烷二元酸和正十四烷二元酸的培养液中检测到了代表 *Syntrophaceae* 细菌的条带, 并且每毫升菌液中 *Syntrophaceae* 细菌的 log 丰度分别达到 7.4 和 7.6, 比添加其它几种非烃碳源的实验组丰度高 2–3 个单位。古菌群落结构主要由乙酸营养型产甲烷古菌 (*Methanosaeta*) 和氢营养型产甲烷古菌 (*Methanoculleus*) 组成。【结论】*Syntrophus* sp. 细菌可以利用正十二烷二元酸和正十四烷二元酸这两种非烃碳源生长, 这为我们定向分离互营烃降解菌和研究起始烃降解机制和代谢机理提供了依据。

关键词: 互营烃降解, 甲烷, 脂肪酸, *Syntrophaceae*

中图分类号: Q938 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 11-1369-09

石油烃主要由碳和氢组成的饱和烷烃或不饱和的芳香烃。20 世纪初, 人们就已认识到了有氧条件下细菌和真菌对烃的生物降解; 直到 20 世纪 80 年代末, 科学家才先后发现了降解饱和烃和芳香烃的厌氧微生物^[1-2], 1999 年 Zengler 等首次证实了正十六烷烃可以被厌氧生物降解, 并产生甲烷^[3]。热力学分析表明石油烃降解产甲烷过程至少需要两类关键微生物通过互营代谢作用降解石油烃产生甲烷^[3]。首先是互营烃降解菌降解石油烃产生乙酸和/或氢气, 然后是产甲烷古菌分别消耗乙酸和/或氢气, 并产生甲烷, 这样会保持氢分压处于极低浓度, 从而保证互营烃降解菌可以源源不断的降解石

油烃^[3]。由于“互营”关系是相互依存、难以分割的合作关系, 此外、互营细菌通常生长缓慢, 这使得互营细菌的分离难度非常大。

Widdel 小组首次报道了正十六烷降解产甲烷的微生物学过程, 发现 *Syntrophus* spp. 是主要的细菌类群^[4]; Gray 小组发现一类 *Syntrophus* sp. 和产甲烷趋势呈显著正相关^[5], 推测 *Syntrophus* sp 是参与石油烃降解产甲烷过程的关键细菌类群; 其它小组从油污土、油藏采出液等环境中获得了降解石油烃的产甲烷富集物, 并发现 *Syntrophaceae* 相关的细菌广泛存在于这些富集物中^[6-9]。我们课题组通过 DNA-SIP 发现一类新的 *Syntrophaceae* 细菌在产

基金项目: 国家自然科学基金 (31370060, 41173088)

* 通信作者。Tel: +86-28-85258573; Fax: +86-28-85215106; E-mail: zhanghuits@aliyun.com

作者简介: 丁晨 (1988–), 江西南昌人, 硕士研究生, 主要研究方向为石油烃厌氧微生物降解。E-mail: dingchen19881024@126.com

收稿日期: 2014-01-23; **修回日期:** 2014-07-09

甲烷条件下正十六烷烃的厌氧降解中起关键作用^[10]。虽然大量的研究表明 Syntrophaceae 相关的微生物类群在石油烃降解产甲烷过程中起着重要的作用,但是由于互营细菌生长缓慢,相对丰度低,迄今为止,尚未见到互营烃降解菌 Syntrophaceae 的分离报道。

国外研究发现以硝酸盐、硫酸盐和三价铁作为电子受体条件下,研究微生物降解石油烃生物起始代谢机制主要有延胡索酸结合、羧化反应、羟基化反应和甲基化反应^[11-14],其中延胡索酸结合和羧化反应是目前已发现的厌氧烷烃代谢的主要起始降解机制,然而产甲烷条件下石油烃厌氧代谢机理进展缓慢,产甲烷条件下石油烃降解的分子机理研究进展缓慢。有科学家从石油烃降解产甲烷菌系中检测到了编码羟基琥珀酸合成酶的关键功能基因(如 *bssA* 或 *assA*),推测可能通过延胡索酸盐激活反应来降解石油烃^[15-16]。其他科学家虽然检测到了 *assA* 基因,但是没有发现相应的中间代谢产物——烷基琥珀酸盐^[9, 17]。英国科学家 Head 教授小组通过中间代谢产物分析,认为其中一类 *Syntrophus* sp. 石油烃的机制与以往不同^[18]。其它科学家通过宏基因组和单细胞测序技术,并结合生物信息学方法,也认为 *Syntrophus* spp. 是通过一种新的未知机制来降解饱和烃的^[19-20]。但是迄今为止,尚未有关于互营烃降解菌 Syntrophaceae 的分离报道,这限制了人们对互营烃降解产甲烷分子机理的认识。

本研究通过添加非烃碳源作为底物,采用 PCR-DGGE、T-RFLP 和荧光定量 PCR 技术,解析互营烃降解菌系 M82 在不同碳源条件下的关键微生物 Syntrophaceae 的丰度,寻找适合 Syntrophaceae 细菌快速生长的碳源,这将为我们定向分离互营烃降解微生物提供指导,同时也为我们揭示产甲烷条件下互营烃降解的分子机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 接种物:实验室获得的互营正十六烷烃降解产甲烷菌系 M82^[21]。

1.1.2 仪器及试剂:Hungate 厌氧铜柱系统、气相色谱仪(Shimadzu, 日本)、细胞破碎仪(MP, 美国)、冷冻离心机(Thermo, 美国)、蛋白核酸微量分析仪

(GE, 美国)、PCR 仪(Bio-Rad, 美国)、凝胶成像仪(Bio-Rad, 美国)、变性梯度凝胶电泳仪(Bio-Rad, 美国)、荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, 美国);基因组 DNA 纯化试剂盒(Promega, 美国)、质粒小提试剂盒(Tiagen, 中国)、PCR 扩增体系(TaKaRa, 日本)。

1.1.3 培养基:

无机盐培养基^[22]:1 L 蒸馏水、0.5 g NaCl、0.5 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、0.1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.3 g NH_4Cl 、0.5 g KCl、0.2 g KH_2PO_4 、0.5 g 半胱氨酸盐、2 mL 微量元素 284 和土壤浸提液(5 mL/L), 121 °C 灭菌 30 min;接种前向培养基中加入 $Na_2S \cdot 9H_2O$ (0.003 g/L)、 $NaHCO_3$ (0.025 g/L)、维生素 B1 (2 mL/L)、维生素 B12 (2 mL/L)、维生素 284 (2 mL/L),调 pH 7.0-7.2。

土壤浸提液:取 100 g 油污土,加入 350 mL 无氧水,震荡混匀(121 °C 1 h),取上层液体,于 16000 × g 离心 5 min,取上清,通 N_2 30 min,厌氧过滤灭菌(0.22 μm), -20 °C 保存。

1.2 富集培养

无机盐培养基 270 mL 分装于 600 mL 培养瓶中,接种量为 20% (V/V),实验组中分别添加 200 μL 正十六烷烃(Hex)、0.09 g 正十四烷二元酸(M14)、0.09 g 正十二烷二元酸(M12)、0.09 g 十六烷酸钠(Hex-Na)、4 mL 乳酸钠(0.5 mol/L) (Lac) 和 4 mL 丙酸钠(0.5 mol/L) (Pro),对照组中不加任何碳源,每组 3 个重复,于 35 °C 静止培养。

1.3 甲烷含量的测定

采用气相色谱测定气体组分中甲烷含量^[21]。进样口、柱箱和检测器的温度分别是 50 °C、50 °C 和 70 °C,载气为高纯氢(99.999%),流速为 50 mL/min,进样量为 0.2 mL。以氮气、甲烷和二氧化碳混合气作为标气(N_2 : CH_4 : CO_2 = 29.96% : 39.99% : 30.05%),采用面积归一化测定甲烷相对百分含量,根据理想气体状态方程式($PV = nRT$)换算成气体物质的量。

1.4 基因组总 DNA 的提取

将 2 mL 菌液加入 2 mL 螺盖管中,16000 × g 离心 5 min,弃上清,向螺盖管中加 0.7 g beads、750 μL PB 和 250 μL TNS; Fastprep 45 s, 6.5 m/s, 离心 5 min,将上清转移至新的离心管中,加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)震荡混匀,16000 × g 离心 5 min,将上清转入另一离心管中;加入等体积氯仿/

异戊醇(24:1)抽提上清,离心 5 min 后,在上清中加入 0.7 体积的冷异丙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 1 h, $16000\times g$ 离心 30 min, 弃上清, 70% 乙醇清洗 2 次, 无菌风吹干, 用 50 μL ddH_2O 溶解沉淀得到总 DNA 的粗提液, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存^[21]。

1.5 基因组总 DNA 的纯化及浓度测定

采用 Promega 试剂盒(抽真空法)对样品的基因组总 DNA 粗提液进行纯化, 然后用蛋白核酸微量分析仪对提取的基因组总 DNA 进行浓度测定。

1.6 DGGE 变性梯度凝胶电泳分析

1.6.1 细菌 V3 可变区扩增: 将纯化后的基因组 DNA 作为模板, 用 P2、P3 通用引物进行 16S rRNA V3 可变区片段的扩增, 扩增产物片段长约 200 bp。P2: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'; P3: 5'-CGCCC GCCGCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGG GGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'^[23]。PCR 反应体系包括 3 μL 10 \times PCR buffer (不含 MgCl_2)、2.4 μL dNTP (2.5 mmol/L)、1.8 μL MgCl_2 (各 2.5 mmol/L)、0.8 μL 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)、50 ng 模板 DNA、0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 和适量的 ddH_2O 补足至 30 μL 。PCR 反应采用 Touchdown 降落 PCR 策略, 即: 预变性条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, 前 22 个循环为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, $58-48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min 和 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min (其中每 2 个循环退火温度下降 $1\text{ }^{\circ}\text{C}$), 后 10 个循环为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min 和 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 最后在 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下延伸 7 min。

1.6.2 变性梯度凝胶电泳 (DGGE): 基因组总 DNA 16S rRNA V3 区扩增片段通过 DGGE (Bio-Rad Dcode mutation detection system) 进行分离。丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性剂为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺, PCR 产物上样量为 200 ng。DGGE 凝胶变性梯度为 28% - 58%, 电压 200 V, 电泳温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 电泳时间 4 h。电泳完毕后用 SYBR green I (1 \times TAE, 1:10000) 染色 45 min, 采用 Quantity One 软件 (Bio-Rad) 分析不同碳源培养条件下的电泳条带的数目和亮度, 以评估其微生物群落的多样性和丰富度。

1.6.3 DGGE 条带的回收、扩增与测序: 用灭菌刀片切割 DGGE 胶上比较亮的条带, 将条带挤碎, 浸泡在 30 μL 的 ddH_2O 中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 取 2 μL 作为模板按 16S rDNA 扩增体系和扩增程序再次扩增, 引物为 P2/P1^[23], 将 PCR 扩增产物送上海英俊生物技

术有限公司测序, 由于我们以正十六烷烃为碳源的互营烃降解菌系 M82 已经做了 16S rRNA 克隆文库分析^[10,21], 切胶后的条带没有做 TA 克隆就直接测序, 因此将所测得的序列在 GenBank 数据库中和我们课题组获得的 16S rRNA 克隆文库中用 BLAST 进行检索和同源性比较, 同时将所得的序列提交至日本 DDBJ 数据库。

1.7 荧光定量 PCR

定量分析 *Syntrophaceae* (特别是 *Smithella* 属和 *Syntrophus* 属) 细菌的引物为采用 Syn827f / Syn1263r^[5], 均采用 10 μL 的反应体系, 其中 5 μL SsoFast EvaGreen supermix、0.25 μL 正反向引物 (20 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL DNA 模板和 3.5 μL ddH_2O 。扩增 *Syntrophaceae* 细菌的 PCR 反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 然后 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s、共 40 个循环; 最后做溶解曲线, 从 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 开始, 温度以 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 每个循环递增, 每个循环 5 s, 至 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 结束。所有 DNA 样品稀释 5 倍, 与标准曲线样品同时测定, 每个样品重复 3 次。

1.8 T-RFLP 分析

1.8.1 古菌 16S rDNA 扩增及纯化: 将纯化后的基因组 DNA 作为模板, 古菌引物 Arc109F/Arc934R-FAM^[10], PCR 反应体系包括 3 μL 10 \times PCR buffer (不含 MgCl_2)、2.4 μL dNTP (2.5 mmol/L)、1.8 μL MgCl_2 (各 2.5 mmol/L)、0.8 μL 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)、50 ng 模板 DNA、0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 和适量的 ddH_2O 补足至 30 μL 。PCR 反应程序: 预变性条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 4 min, 变性 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 退火 $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min 和 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 30 个循环, 最后延伸 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 min。用试剂盒纯化 PCR 产物。

1.8.2 酶切 PCR 产物及纯化: 采用限制性内切酶 *Taq* I (酶切位点 A \downarrow TCG) 酶切古菌 PCR 产物, 20 μL 体系, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 酶切 3.5 h, 电泳检测酶切效果。向酶切产物中加入 3 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 NaAc (pH 5.2, 3 mol/L), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜; $20000\times g$ 离心 30 min; 弃上清, 加入 200 μL 冷的 70% 乙醇, $20000\times g$ 离心 5 min; 弃上清, 通风橱中风干 10 min, 用 10 μL 灭菌高纯水溶解。

1.8.3 T-RFLP 分析切 PCR 产物及纯化: 将 1 - 2 μL 上述纯化产物和 0.2 μL ROX1200 与 9 μL 去离子甲酰胺混合; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热变性 3 min, 然后迅速转移

到冰中放置 10 min; 消化产物在测序仪上进行聚丙烯酰胺凝胶电泳; 采用 Peak scanner 分析并计算 T-RF 片段及相对丰度。

2 结果分析和讨论

2.1 M82 降解脂肪酸产生甲烷的趋势

添加乳酸钠和丙酸钠后, M82 从第 7 天开始, 就不断的产生甲烷, 培养 29 天后, 甲烷产量分别为 3.0 ± 0.3 mmol 和 3.9 ± 0.009 mmol, 而不添加任何碳源的对照组中, 甲烷累积量最大不超过 1 mmol (图 1)。但是添加十六烷酸钠, M82 在 30 天后才开始明显的产生甲烷, 到 68 天, 甲烷产量为 2.21 ± 0.1 mmol, 直到 187 天, 甲烷累积产量达到 4.3 mmol (图 2), M82 利用正十六烷烃产甲烷的延滞期明显高于十六烷酸钠, 直到 79 天后才开始累积甲烷, 培养 187 天后, 甲烷产量达到 4.33 ± 0.15 mmol (图 2), M82 利用正十二烷二元酸和正十四烷二元酸的产甲烷趋势相似, 从 30 天开始显著累积甲烷, 到 68 天达到稳定, 甲烷产量分别达到 3.5 ± 0.04 mmol 和 3.6 ± 0.12 mmol (图 2)。从图 1 和图 2 中我们可以看出, M82 可以利用乳酸钠、丙酸钠、十六烷酸钠、正十二烷二元酸、正十四烷二元酸和正十六烷烃生长产生甲烷, 并且它利用这几组碳源的速率由高到低依次是乳酸钠、丙酸钠、正十四烷二元酸和正十二烷二元酸、十六烷酸钠和正十六烷烃。

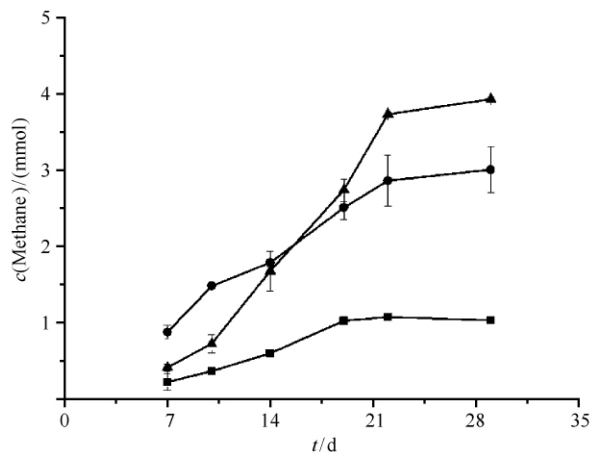


图 1. M82 利用乳酸钠和丙酸钠的产甲烷趋势

Figure 1. Time course of methane production with propionate (▲), with lactate (●) and without carbon source (■)

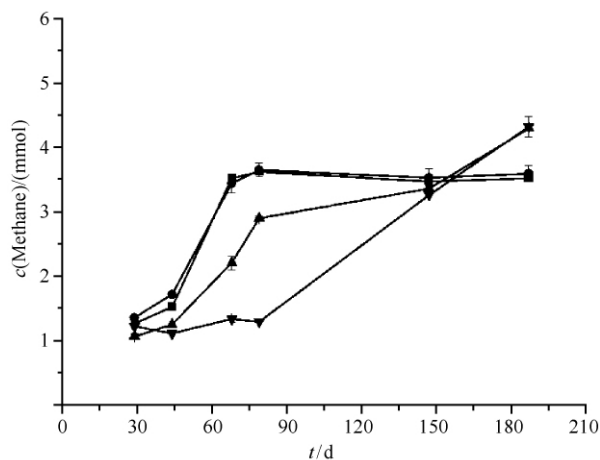


图 2. M82 利用正十二烷二元酸、正十四烷二元酸、十六烷酸钠和正十六烷烃的产甲烷趋势

Figure 2. Time course of methane production with dodecanedioic acid (■), with tetradecanedioic acid (●), with hexadecanoic acid (▲) and with hexadecane (▼)

2.2 群落结构多样性分析

分别收集微生物菌体, 第 29 天降解乳酸钠和丙酸钠, 第 147 天降解十六烷酸钠, 第 68 天降解正十二烷二元酸、正十四烷二元酸和正十六烷烃, 并提取基因组 DNA, PCR 扩增细菌 16S rRNA V3 区基因序列, 并进行 DGGE, 结果表明, 添加不同碳源后菌系 M82 的群落结构发生了改变, 在添加正十六烷烃的菌系中, 细菌类群主要由条带 A、B、C 和 D 组成, 经切胶测序比对后, 这 4 个条带分别代表未培养物 WWE1、*Thermotogaceae*、*Syntrophaceae* 和 *Spirochaetaceae* (图 3, 表 1), 这与我们之前的研究结果类似^[10 24]。当利用乳酸钠、丙酸钠和十六烷酸钠作为碳源时, 代表 *Syntrophaceae* 细菌的条带变的非常微弱, 与正十六烷烃为碳源的细菌图谱比较, 出现了多个不同的条带, 这表明群落结构发生了改变 (图 3 和图 4)。在正十二烷二元酸、正十四烷二元酸和正十六烷烃为碳源的细菌 DGGE 图谱中 (图 5), 发现这 3 种碳源条件下的细菌群落结构类似, 并且在以正十二烷二元酸和正十四烷二元酸为碳源的富集物中发现了代表 *Syntrophaceae* 细菌的条带, 由于采集正十六烷烃降解产甲烷菌液的时间比较早 (68 d), 正十六烷烃没有明显的降解, 可能 *Syntrophaceae* 细菌还没有明显的生长起来。

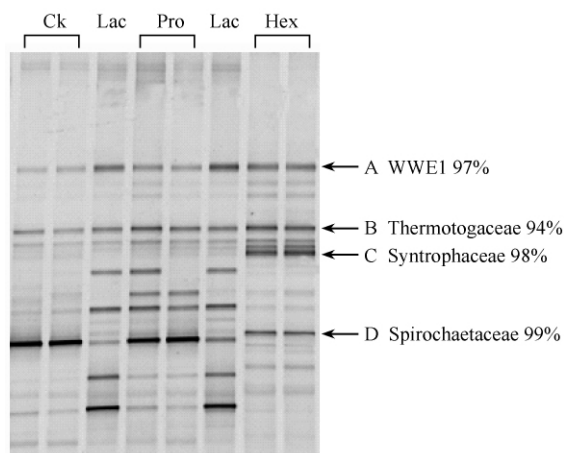


图 3. 不同碳源条件下细菌群落 DGGE 图谱

Figure 3. DGGE profiles of bacterial 16S rRNA V3 regions.
Ck: Control; Lac: Sodium lactate; Pro: Sodium propionate;
Hex: Hexadecane.

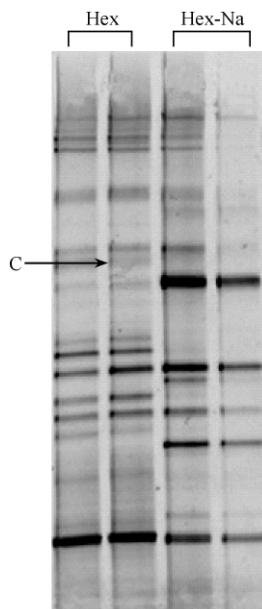


图 4. 不同碳源条件下细菌群落 DGGE 图谱

Figure 4. DGGE profiles of bacterial 16S rRNA V3 regions.
Hex-Na: Hexadecanoic acid sodium.

2.3 不同碳源条件下互营菌科 (*Syntrophaceae*) 的定量检测

对不同碳源条件下的 *Syntrophaceae* 细菌相对定量检测结果如图 6。从图中看出,以正十六烷烃为碳源的富集物的相对定量值 $\text{Log}(\text{Syntrophaceae}) / \text{mL}$ 为 5.2 (由于以正十六烷烃为碳源的富集物在 68 天时产甲烷量低,菌体量还很低,因此以正十六烷烃为碳源的富集物中 *Syntrophaceae* 细菌含量较低),

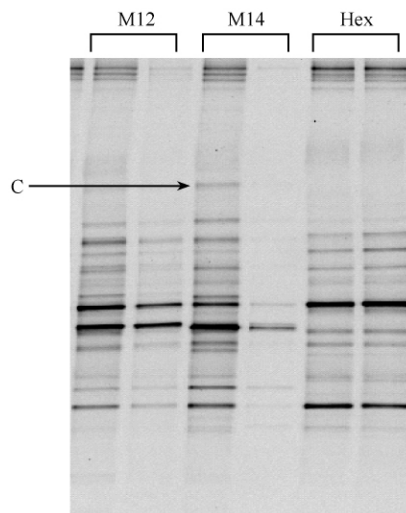


图 5. 不同碳源条件下细菌群落 DGGE 图谱

Figure 5. DGGE profiles of bacterial 16S rRNA V3 regions.
M12: Dodecanedioic acid; M14: Tetradecanedioic acid.

同时在添加正十二烷二元酸和正十四烷二元酸为碳源的富集物中相对定量值分别达到 7.4 和 7.6,而以乙酸钠、丙酸钠和十六烷酸为碳源的实验组和不加任何碳源的对照组中, $\text{Log}(\text{Syntrophaceae}) / \text{mL}$ 的相对定量值分别为 4.6、4.7、5.6 和 4.4,则比正十二烷二元酸和正十四烷二元酸为碳源的富集物的相对定量值低,说明了细菌 *Syntrophaceae* 在以正十二烷二元酸和正十四烷二元酸为碳源的厌氧降解富集物中的相对含量高,丰度高,比不加任何碳源的对照组和以乳酸、丙酸和十六烷酸钠作为碳源的厌氧降解富集物中丰度的对数值均高 2-3 个单位,这与 DGGE 图谱结果相一致 (乳酸、丙酸和十六烷酸钠作为碳源的厌氧降解富集物中丰度低,在 DGGE 图谱上没有条带),因此, *Syntrophaceae* 细菌在以正十二烷二元酸和正十四烷二元酸为碳源的富集物中生长并且丰度比添加其他碳源富集物和对照组的丰度值高 2-3 个单位,推测 *Syntrophaceae* 细菌可以利用正十二烷二元酸、正十四烷二元酸或其中间代谢产物快速生长。

2.4 不同碳源条件下菌系 M82 的古菌群落结构

古菌群落结构的检测基于古菌的 16S rRNA 基因的 T-RFLP 分析,主要得到了 5 个末端限制性片段 (T-RF, 图 7),包括 T-RFs 186、228、284、393 和 495 bp。T-RFLP 结果显示添加不同碳源的菌系 M82 的古菌群落结构相似,但是每类微生物的各自相对丰度不同。在对照组和添加正十二烷二元酸、

正十四烷二元酸、正十六烷烃为碳源的实验组中，主要的优势片段为 186、228、284 和 495 bp，然而在添加乳酸钠、丙酸钠和十六烷酸钠为碳源的富集物中，主要优势片段为 186 bp 和 495 bp。结合我们小组之前的研究克隆文库结果^[10, 21]，发现 T-RF 186 bp 代表的克隆属于氢营养型产甲烷古菌 *Methanoculleus*^[25]；T-RFs 228、284 和 495 bp 代表的微生物类群属于乙酸营养型产甲烷古菌 *M. concilii*

或 *M. harundinacea*（相似性大于 99%）^[26-27]。T-RF 393 bp 代表 *Methanomicrobia* 中的未培养类群，已有的研究表明 *Methanomicrobia* 都是氢营养型产甲烷古菌^[28]。这表明菌系 M82 在降解脂肪酸产甲烷过程中，同时存在氢营养型和乙酸营养型产甲烷古菌，它们共同参与了产甲烷过程，但是在不同的碳源条件下，这两种类型的产甲烷古菌的相对含量也会发生变化。

表 1. DGGE 优势条带的基因片段序列的比对结果

Table 1. Comparison of genomic sequences in dominant DGGE bands by sequencing and BLAST analysis

Band	Most closely related hit in GenBank and Similarity	Most closely related hit in 16S clone library and Similarity	Phylogenetic group	Accession
A	Candidatus <i>Cloacamonas acidaminovorans</i> (CU466930.1) (97%)	Clone HB1_30 (JX088335.1) (97%)	WWE1	AB898928
B	Thermotogaceae bacterium 30bM (GU129117.1) (94%)	Clone B6_46 (HQ689254.1) (94%)	Thermotogaceae	AB898929
C	<i>Syntrophus buswellii</i> strain DM-2 (JQ346736.1) (95%)	Clone B6_4 (HQ689231.1) (98%)	Syntrophaceae	AB898930
D	<i>Spirochaetes</i> bacterium SA-10 (AY695841.1) (91%)	Clone HB_79 (JN202684.1) (99%)	Spirochaetaceae	AB898931

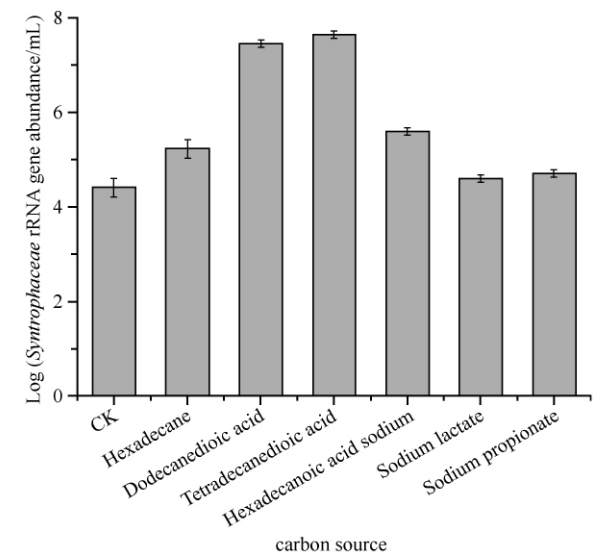


图 6. 不同碳源条件下 *Syntrophaceae* rRNA 丰度值

Figure 6. Log *Syntrophaceae* rRNA gene abundance of samples (log gene abundance per mL)

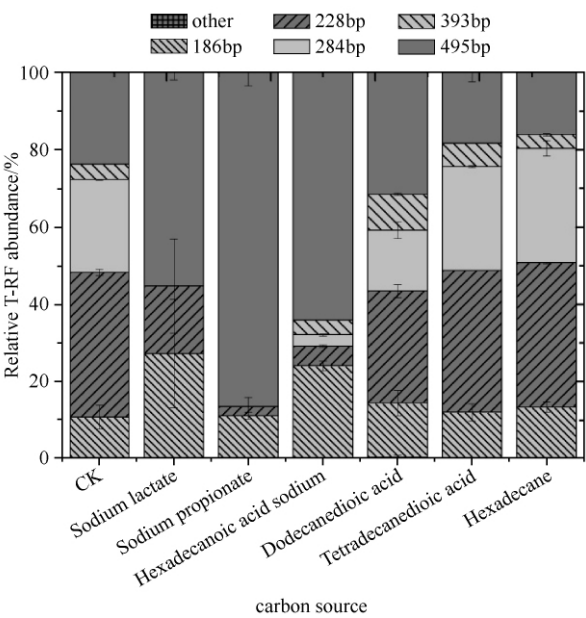


图 7. 不同碳源条件下产甲烷古菌 T-RF 相对丰度的变化

Figure 7. Relative abundance of archaeal T-RF of samples (log gene abundance per mL)

3 讨论

互营烃降解菌系 M82 可以降解长链脂肪酸正十六烷烃、正十二烷二元酸、正十四烷二元酸和十六烷酸钠产生甲烷，同时也可以利用短链脂肪酸乳酸

钠和丙酸钠生长产生甲烷。在不同碳源条件下（正十二烷二元酸、正十四烷二元酸、正十六烷烃、十六烷酸钠、乳酸钠和丙酸钠），其古菌群落结构相似，主要分为两类，一类是氢营养型产甲烷菌（T-RF186

和 393 bp), 另一类是乙酸营养型产甲烷菌 (T-RF 228、284 和 495 bp)。在以正十二烷二元酸、正十四烷二元酸和正十六烷烃为碳源的富集物中, 大量存在着片段 284 bp, 然而 *Methanosaetaceae* (284 bp) 最有可能代表的菌株为 *Methanosaeta concilii*, 乙酸为该菌唯一的能源物质, 乙酸和 CO_2 可以作为其碳源^[29]。在古菌群落结构中, 主要以乙酸营养型的产甲烷菌为主, 但也存在着氢营养型产甲烷古菌, 因此菌系 M82 在产甲烷条件下厌氧降解长链烷烃产生甲烷的过程可能通过乙酸裂解和二氧化碳还原两种代谢途径协调完成。

在不同的碳源条件下, 其细菌群落结构差异较大, 但主要由未培养物 WWE1、*Thermotogaceae*、*Syntrophaceae* 和 *Spirochaetaceae* 组成, 其中 uncultured WWE1 bacterium 在正十六烷烃降解产 CH_4 占主导地位的, 这类微生物可能具有将丙酸氧化为乙酸和 CO_2 的能力^[30]; *Thermotogaceae* 相关的细菌类群在硫酸盐还原条件下可能通过互营作用参与了烃的降解^[31], 也有可能耦联氢营养型产甲烷古菌参与乙酸互营氧化过程^[32], 但是迄今为止还没有这类微生物直接参与烃降解产甲烷过程的报道, 甚至都不能在产甲烷条件下降解长链脂肪酸^[33-34]; *Spirochaetaceae* 可能会与菌系 M82 中的氢营养型古菌竞争性利用 H_2/CO_2 生长; 相关的互营菌 *Syntrophaceae* 已经被检测出大量存在于烷烃和原油的厌氧降解过程中, 并显示出这类微生物在碳氢化合物厌氧降解过程中存在作用, 并发现 *Syntrophaceae* 是互营烃降解过程中的关键细菌类群^[5 10], 可能通过一种新的起始降解机制来完成石油烃的降解转化过程^[19-20], 但是迄今为止, 尚未获得这类互营烃降解菌的纯培养物, 这限制了人们对互营烃降解机理的认识, 然而在互营降解体系中可以通过额外添加电子受体或添加替代碳源的方法来提高富集物中的 *Syntrophaceae* 细菌的丰度, 同时缩短富集的时间, 这为互营菌的分离提供了基础。本研究发现 *Syntrophaceae* 细菌可以利用长链二元酸快速生长, 缩短了 *Syntrophaceae* 细菌富集培养时间, 因此可以通过添加长链二元酸富集培养, 提高培养物中 *Syntrophaceae* 细菌的丰度, 这为分离 *Syntrophaceae* 细菌提供新的碳源。目前我们课题组正在应用宏基因组技术, 拼接出核心微生物 *Syntrophaceae* 细菌的全基因组序列, 期望通过生物

信息学方法推测他们可能具有的遗传学功能, 并结合定向分离培养技术进行分离鉴定。同时正十二烷二元酸和正十四烷二元酸可能是正十六烷烃厌氧代谢的中间代谢产物, 利用这两种二元酸作为对照碳源进行富集培养, 采用蛋白质组学的手段分析不同碳源条件下的差异蛋白, 从而揭示起始厌氧石油烃降解的功能蛋白, 为阐明产甲烷条件下的正十六烷烃降解代谢途径提供理论依据。

参考文献

- [1] Aeckersberg F, Bak F, Widdel F. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO_2 by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology*, 1991, 156 (1): 5-14.
- [2] Lovley DR, Lonergan DJ. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-45. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56 (6): 1858-1864.
- [3] Dolfing J, Larter SR, Head IM. Thermodynamic constraints on methanogenic crude oil biodegradation. *The ISME Journal*, 2007, 2 (4): 442-452.
- [4] Zengler K, Richnow HH, Rosselló-Mora R, Michaelis W, Widdel F. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature*, 1999, 401 (6750): 266-269.
- [5] Gray N, Sherry A, Grant R, Rowan A, Hubert C, Callbeck C, Aitken C, Jones D, Adams J, Larter S. The quantitative significance of *Syntrophaceae* and syntrophic partnerships in methanogenic degradation of crude oil alkanes. *Environmental Microbiology*, 2011, 13 (11): 2957-2975.
- [6] Jones D, Head I, Gray N, Adams J, Rowan A, Aitken C, Bennett B, Huang H, Brown A, Bowler B. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature*, 2007, 451 (7175): 176-180.
- [7] Tischer K, Kleinstaub S, Schleinitz KM, Fetzer I, Spott O, Stange F, Lohse U, Franz J, Neumann F, Gerling S. Microbial communities along biogeochemical gradients in a hydrocarbon - contaminated aquifer. *Environmental Microbiology*, 2013, 15 (9): 2603-2615.
- [8] Siddique T, Penner T, Semple K, Foght JM. Anaerobic biodegradation of longer-chain n-alkanes coupled to methane production in oil sands tailings. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45 (13): 5892-5899.
- [9] Callaghan AV, Davidova IA, Savage-Ashlock K, Parisi

- VA, Gieg LM, Suflita JM, Kukor JJ, Wawrik B. Diversity of benzyl- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon-impacted environments and enrichment cultures. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44 (19) : 7287-7294.
- [10] Cheng L, Ding C, Li Q, He Q, Dai L, Zhang H. DNA-SIP reveals that Syntrophaceae play an important role in methanogenic hexadecane degradation. *PLoS One*, 2013, 8 (7) : e66784.
- [11] So CM, Young L. Initial reactions in anaerobic alkane degradation by a sulfate reducer, strain AK-01. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (12) : 5532-5540.
- [12] Callaghan AV, Gieg LM, Kropp KG, Suflita JM, Young LY. Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (6) : 4274-4282.
- [13] Safinowski M, Meckenstock RU. Methylation is the initial reaction in anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 (2) : 347-352.
- [14] Ball HA, Johnson HA, Reinhard M, Spormann AM. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178 (19) : 5755-5761.
- [15] Washer CE, Edwards EA. Identification and expression of benzylsuccinate synthase genes in a toluene-degrading methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (4) : 1367-1369.
- [16] Fowler SJ, Dong X, Sensen CW, Suflita JM, Gieg LM. Methanogenic toluene metabolism: community structure and intermediates. *Environmental Microbiology*, 2012, 14 (3) : 754-764.
- [17] Morris BE, Herbst FA, Bastida F, Seifert J, von Bergen M, Richnow HH, Suflita JM. Microbial interactions during residual oil and n - fatty acid metabolism by a methanogenic consortium. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4 (3) : 297-306.
- [18] Aitken CM, Jones DM, Maguire MJ, Gray ND, Sherry A, Bowler BFJ, Ditchfield AK, Larter SR, Head IM. Evidence that crude oil alkane activation proceeds by different mechanisms under sulfate-reducing and methanogenic conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2013, 109 (15) : 162-174.
- [19] Embree M, Nagarajan H, Movahedi N, Chitsaz H, Zengler K. Single-cell genome and metatranscriptome sequencing reveal metabolic interactions of an alkane-degrading methanogenic community. *The ISME Journal*, 2013.
- [20] Tan B, Dong X, Sensen CW, Foght J, Scherer S. Metagenomic analysis of an anaerobic alkane-degrading microbial culture: potential hydrocarbon-activating pathways and inferred roles of community members 1. *Genome*, 2013, 56 (10) : 599-611.
- [21] Cheng L, Rui J, Li Q, Zhang H, Lu Y. Enrichment and dynamics of novel syntrophs in a methanogenic hexadecane - degrading culture from a Chinese oilfield. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83 (3) : 757-766.
- [22] Widdel F, Rabus R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12 (3) : 259-276.
- [23] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59 (3) : 695-700.
- [24] Cheng L, Qiu TL, Li X, Wang WD, Deng Y, Yin XB, Zhang H. Isolation and characterization of *Methanoculleus receptaculi* sp. nov. from Shengli oil field, China. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 285 (1) : 65-71.
- [25] Ma K, Liu X, Dong X. *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56 (1) : 127-131.
- [26] PATEL GB, SPROTT GD. *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("Methanothrix concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1990, 40 (1) : 79-82.
- [27] Liu Y, Whitman WB. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125 (1) : 171-189.
- [28] Patel GB, Sprott GD. *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("Methanothrix concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1990, 40 (1) : 79-82.
- [29] Pelletier E, Kreimeyer A, Bocs S, Rouy Z, Gyapay G, Chouari R, Rivière D, Ganesan A, Daegelen P, Sghir A. "Candidatus Cloacamonas acidaminovorans": genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new

- bacterial division. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (7) : 2572-2579.
- [30] Berlendis S, Lascourreges J-F, Schraauwers B, Sivadon P, Magot M. Anaerobic biodegradation of BTEX by original bacterial communities from an underground gas storage aquifer. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44 (9) : 3621-3628.
- [31] Callaghan AV, Tierney M, Phelps CD, Young L. Anaerobic biodegradation of n-hexadecane by a nitrate-reducing consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (5) : 1339-1344.
- [32] Balk M, Weijma J, Stams AJ. *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52 (4) : 1361-1368.
- [33] Ben Hania W, Ghodbane R, Postec A, Brochier-Armanet C, Hamdi M, Fardeau M-L, Ollivier B. Cultivation of the first mesophilic representative ("mesotoga") within the order *Thermotogales*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34 (8) : 581-585.
- [34] Sousa DZ, Smidt H, Alves MM, Stams AJ. Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long - chain fatty acids. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 68 (3) : 257-272.

Degradation of fatty acid by syntrophic hydrocarbon-degrading consortium M82

Chen Ding, Lei Cheng, Qiao He, Hui Zhang*

Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Development and Application of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] Using molecular ecology methods, we screened non-hydrocarbon carbon sources suitable for growth of syntrophic hydrocarbon-degrading *Syntrophus* sp. [Methods] The acclimated methanogenic hexadecane-degrading consortium M82 was subcultured with dodecanedioic acid, tetradecanedioic acid, hexadecanoic acid, propionate and lactate. PCR-DGGE and qPCR were used to analyze the abundance and quantity of *syntrophaceae* using different carbon sources. The T-RFLP was applied to analyze archaeal community. [Results] The consortium M82 could grow and produce methane using a variety of fatty acids that also resulted in the change in bacterial microbial community structure. *Syntrophaceae* bacterial stripe was obviously detected in the culture added additional dodecanedioic acid and tetradecanedioic acid. Furthermore, the results show that the logarithmic abundance of *Syntrophaceae* was 7.4 and 7.6 in per milliliter culture in the two enrichment cultures respectively, which were 2 - 3 units higher than these in other cultures. The archaeal community structure was mainly composed of acetoclastic methanogens *Methanosaeta* and hydrogenotrophic methanogens *Methanoculleus* in all culture. [Conclusion] *Syntrophus* sp. can use non-hydrocarbon carbon source (dodecanedioic acid and tetradecanedioic acid) as substrate to grow, which provides valuable information to isolate syntrophic hydrocarbon bacteria, and reveal the molecular mechanism of syntrophic hydrocarbon degradation.

Keywords: Syntrophic alkane degradation, Methane, fatty acid, *Syntrophaceae*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (31370060, 41173088)

* Corresponding author. Tel: +86-28-85258573; Fax: +86-28-85215106; E-mail: zhanghuits@aliyun.com

Received: 23 January 2014 / Revised: 9 July 2014