

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (5) :587 - 597; 4 May 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140499

## 不同抑制剂对乙酸降解产甲烷及产甲烷菌群结构的影响

麻婷婷, 承磊, 刘来雁, 代莉蓉, 周正, 张辉\*

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

**摘要:** 【目的】研究不同温度条件下的石油烃降解产甲烷菌系中是否存在乙酸互营氧化产甲烷代谢途径。【方法】以 3 个不同温度条件的正十六烷烃降解产甲烷菌系 Y15 (15℃)、M82 (35℃) 和 SK (55℃) 作为接种物, 通过乙酸喂养实验、并添加乙酸营养型产甲烷古菌的选择性抑制剂  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_3\text{F}$ , 结合末端限制性片段长度多态性 (terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) 和克隆文库技术, 分析乙酸产甲烷潜力及产甲烷古菌群落的演替趋势, 推测产甲烷代谢途径的变化趋势。【结果】无论是否添加  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_3\text{F}$ , 这 3 个菌系都可以利用乙酸生长并产生甲烷, 但是添加  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_3\text{F}$  后产甲烷延滞期增加, 最大比甲烷增长速率降低; 只添加乙酸后, 3 个不同温度的菌系的古菌群落主要由乙酸营养型产甲烷古菌甲烷鬃毛菌属 (*Methanosaeta*) 组成, 其丰度分别为  $92.8 \pm 1.4\%$ 、 $97.3 \pm 2.4\%$  和  $82.8 \pm 9.0\%$ ; 当添加选择性抑制剂  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3 个菌系中的 *Methanosaeta* 的丰度分别变为  $98.5 \pm 0.7\%$ 、 $87.4 \pm 4.8\%$  和  $6.1 \pm 8.6\%$ , 中温菌系 M82 中氢营养型产甲烷古菌甲烷袋装菌属 (*Methanoculleus*) 的相对丰度增加到  $12.6 \pm 4.0\%$ , 高温菌系 SK 中另一类氢营养型产甲烷古菌甲烷热杆菌属 (*Methanothermobacter*) 增至  $84.3 \pm 1.5\%$ ; 当添加选择性抑制剂  $\text{CH}_3\text{F}$ , *Methanosaeta* 丰度分别降至  $77.1 \pm 14.5\%$ 、 $86.4 \pm 6.1\%$  和  $35.8 \pm 7.8\%$ , 低温菌系 Y15 中的甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*) 增高 ( $15.7 \pm 21\%$ ), 这类产甲烷古菌具有多种产甲烷代谢途径, M82 中 *Methanoculleus* 丰度上升到  $13.6 \pm 13.1\%$ , SK 中 *Methanothermobacter* 丰度增大到  $48.5 \pm 11.2\%$ 。【结论】在低温条件下, 菌系 Y15 可能主要通过乙酸裂解完成产甲烷代谢, 在中高温条件下, 菌系 M82 和 SK 中可能存在乙酸互营氧化产甲烷代谢途径, 并且甲烷的产生分别通过不同种群的氢营养型产甲烷古菌来完成。

**关键词:** 厌氧烃降解, 互营乙酸氧化, 产甲烷途径, 古菌群落,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_3\text{F}$

中图分类号: X172 文章编号: 0001-6209 (2015) 05-0587-11

乙酸是沼气发酵过程中重要的中间代谢产物, 其进一步转化为甲烷主要通过 2 种途径, 一是乙酸营养型产甲烷菌的直接裂解产生甲烷<sup>[1]</sup>, 这主要由乙酸营养型产甲烷古菌甲烷鬃毛菌属 (*Methanosaeta*) 和甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*)

完成<sup>[2]</sup>。另一种是通过乙酸互营氧化途径来完成, 热力学分析表明乙酸转化为  $\text{H}_2$  和  $\text{CO}_2$  在标准状况下是无法自发进行的, 因为这是吸热反应 [ $\Delta G^0 > 0$ , 表 1 中反应 (2)]<sup>[3]</sup>。但是当这个反应和产甲烷代谢偶联后, 乙酸降解产生的  $\text{H}_2$  迅速被氢营养型

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41173088, 31370060); 国家“863 计划” (2013AA064401); 中国农业科学院基本科研业务费 (2013ZL001)

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

作者简介: 麻婷婷 (1988 -), 河南周口人, 硕士研究生, 主要研究方向为烃类厌氧微生物降解。E-mail: madengtingzi@163.com

收稿日期: 2014-10-20; 修回日期: 2014-12-25

产甲烷古菌利用, 整个反应体系中保持着极低的氢分压, 那么乙酸降解产生  $H_2$  和  $CO_2$  的反应就可以连续进行 [表 1 中反应 (3)], 这也表明乙酸互营氧化产甲烷代谢需要两类不同的微生物通过互营代谢作用来完成。第一步是乙酸被互营菌氧化为  $H_2$  和  $CO_2$ , 紧接着氢营养型产甲烷菌利用  $H_2$  还原  $CO_2$  为  $CH_4$ 。目前已报道的互营乙酸氧化菌有 *Clostridium*

*ultunense*<sup>[4]</sup>、*Syntrophaceticus schinkii*<sup>[5]</sup>、*Tepidanaerobacter acetatoxydans*<sup>[6]</sup>、*Thermacetogenium phaeum*<sup>[7]</sup>、*Thermotoga lettingae*<sup>[8]</sup> 和已经丢失的 AOR 菌株<sup>[9]</sup>。基于微生物分子生态学和同位素示踪等手段发现在沼气发酵过程中普遍存在乙酸互营氧化产甲烷代谢过程<sup>[10-11]</sup>。

表 1. 乙酸转化为甲烷的代谢反应及能量特征<sup>[12]</sup>

Table 1. Reactions involved in acetate and hydrogen metabolism<sup>[12]</sup>

Process	Reaction	$\Delta G^{\circ}$ (KJ/mol)
(1) Aceticlastic methanogenesis	* $CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	- 31.0
(2) Syntrophic acetate oxidation	* $CH_3COO^- + 4H_2O \rightarrow H^+ CO_3^- + 4H_2 + HCO_3^- + H^+$	+ 104.6
(3) Hydrogenotrophic methanogenesis	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	- 135.6
(4) 2 + 3	* $CH_3COO^- + H_2O \rightarrow H^+ CO_3^- + CH_4$	- 31.0
(5) Homoacetogenesis	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$	- 104.6

\* labeled carbon

石油烃厌氧生物降解产甲烷的微生物学过程和机理研究是近年来石油微生物领域研究的热点之一, 在残余油藏开发和原位厌氧生物修复等领域具有广泛的应用前景<sup>[13-14]</sup>。乙酸也是石油烃降解产甲烷过程中的重要中间代谢产物, 以正十六烷烃为例, 热力学分析表明其降解产甲烷过程存在五种可能的产甲烷代谢过程<sup>[15]</sup>: (i) 互营降解烃产生  $H_2$  和  $CO_2$ , 再通过  $CO_2$  还原作用 (氢营养型产甲烷古菌) 产生  $CH_4$ , (ii) 互营降解烃产生  $H_2$  和乙酸, 通过  $CO_2$  还原和乙酸裂解作用产生  $CH_4$  (分别是氢营养型和乙酸营养型产甲烷古菌), (iii) 互营降解烃产生  $H_2$  和乙酸, 通过乙酸互营氧化作用, 转化乙酸产生  $H_2$  和  $CO_2$ , 最后通过  $CO_2$  还原作用产生  $CH_4$ , (iv) 互营降解烃产生乙酸, 通过乙酸裂解作用产生  $CH_4$ , (v) 互营降解烃产生乙酸, 通过乙酸互营氧化转化为  $H_2$  和  $CO_2$ , 最后通过  $CO_2$  还原作用产生  $CH_4$ 。热力学分析发现温度会影响石油烃降解产甲烷途径, 而且不同营养类型产甲烷古菌在不同温度条件下的生长动力学存在较大差异<sup>[15-16]</sup>。

目前国内外多个小组富集获得了不同温度条件下的烷烃降解产甲烷菌系<sup>[17-22]</sup>, 发现了不同的微生物群落结构组成。如 Widdel 小组发现在正十六烷烃降解产甲烷富集物 (28 - 30°C) 中古菌主要是由乙酸营养型产甲烷古菌 *Methanosaeta*、氢营养型产甲烷古菌 *Methanoculleus* 和 *Methanospirillum* 组成<sup>[13]</sup>。Larter 小组发现室温条件下富集获得的原油降解产

甲烷菌系中主要是氢营养型产甲烷古菌为主<sup>[23]</sup>, Sufflita 小组发现原油降解产甲烷富集物 (35°C) 中所有古菌克隆都属于 *Methanosaeta*<sup>[18]</sup>, 后来他们又发现在高温原油降解产甲烷条件下 (55°C) 的古菌群落主要由氢营养型产甲烷古菌 *Methanothermobacter* 组成<sup>[24]</sup>。Mbadanga 等<sup>[25]</sup> 也发现 *Methanothermobacter* 是高温饱和烃降解产甲烷富集物中的优势古菌类群之一。我们小组从胜利油田同一采集点富集获得 3 个不同温度的石油烃降解产甲烷富集物 Y15 (15°C)、M82 (35°C) 和 SK (55°C), 发现不同温度条件下的产甲烷古菌类群也是不同的<sup>[26-27]</sup> (15°C 的文章正在审稿中)。这些研究表明在石油烃降解产甲烷过程中可能存在多种不同的产甲烷代谢途径, 但是迄今为止, 还没有看到定性定量研究石油烃降解产甲烷代谢途径的研究报道。

由于沼气发酵过程的复杂性, 研究产甲烷代谢途径的方法主要有稳定同位素示踪结合微生物分子生态学技术<sup>[28]</sup>、同位素自然分馏<sup>[29]</sup> 和添加不同类型产甲烷古菌的选择性抑制剂等。其中  $NH_4Cl$ <sup>[30]</sup> 和  $CH_3F$ <sup>[31]</sup> 可以选择性抑制乙酸营养型产甲烷古菌, 以阻断或者削弱乙酸裂解产甲烷途径。本研究采用从胜利油田富集获得的 3 个不同温度条件下的正十六烷烃降解产甲烷富集物 Y15 (15°C)、M82 (35°C) 和 SK (55°C) 作为接种物, 分别添加  $NH_4Cl$  和  $CH_3F$ , 并以乙酸为唯一碳源进行传代培养。定期监测甲烷产生趋势, 并结合末端限制性片段多态性

(T-RFLP) 和 16S rRNA 基因克隆文库, 分析乙酸降解产甲烷趋势和产甲烷古菌的菌群结构, 研究不同温度条件下乙酸降解产甲烷的可能代谢途径, 这将为研究石油烃降解产甲烷途径和代谢机理提供指导, 并为开展石油微生物技术的应用提供理论支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 富集培养

本实验接种物来自课题组富集驯化的正十六烷烃降解产甲烷菌系 Y15 (15°C)、M82 (35°C) 和 SK (55°C) [22, 26-27]。利用 Hungate 厌氧操作技术配制厌氧无机盐培养基 [32-33]。共设置 5 组, 其中 Ac (+) 组只加 NaAc (820.3 mg/L), AC + NH<sub>4</sub>Cl 组加 NH<sub>4</sub>Cl (3g/L) 和 NaAc (820.3mg/L), AC + CH<sub>3</sub>F 组中加入 CH<sub>3</sub>F (1.5%) 和 NaAc (820.3mg/L), Ac (-) 组不加 NaAc 和抑制剂。接种量为 20% (V/V), 每组 3 个重复, 用 HCl (1 mol/L) 或 NaOH (1 mol/L) 调 pH 为 7.0 - 7.5, 分别于 15°C、35°C 和 55°C 条件下静置暗培养。

### 1.2 化学分析方法

采用气相色谱 GC-2010 (Shimadzu、日本) 测定气体组分与含量 [33]。

采用气相色谱 7890A (Agilent, 美国) 测定乙酸浓度 [33]。

### 1.3 微生物分子生态学分析

**1.3.1 基因组 DNA 的提取及纯化** 具体操作参见文献 [34]。

**1.3.2 PCR 扩增及纯化** 具体操作参见文献 [33]。

**1.3.3 酶切及产物纯化:** 用紫外/可见分光光度计 (Beckman、德国) 测量 PCR 产物浓度。其中 15°C 和 35°C 古菌 PCR 产物使用 *Taq* I (TaKaRa, 日本) 65°C 酶切 3.5 h; 55°C 古菌 PCR 产物使用 *Alu*I (TaKaRa, 日本) 37°C 酶切 3.5 h。其余操作参见文献 [33-34]。

**1.3.4 T-RFLP 分析** 其余操作参见文献 [33-34]。

**1.3.5 16S rRNA 基因克隆文库的构建、测序:** 除了引物没有使用荧光标记以外, PCR 体系和扩增程序和上述 T-RFLP 分析一样。切胶纯化回收 PCR 产物, 并连接到质粒 pMD<sup>TM</sup>19-T (TaKaRa、日本), 然后导入大肠杆菌感受态细胞 DH-5 $\alpha$  (Tiangen、中国)。挑出白色单克隆并涂布 LB 固体培养基上, 37°C 过

夜培养后提取质粒 DNA 后测序 (ABI、美国)。使用 greengene 数据库中的 “Chimera check with Bellerophon” 进行嵌合体检验 [35], 使用 Mothur 将相似性 97% 以上的序列作为一个分类操作单元 (OTU) 进行聚类 [36], 所有序列上传到 RDP 数据库, 采用 Classifier 程序确定克隆文库中序列的分类地位, 从每个 OTU 中选取一个代表序列, 在 RDP 数据库中使用 seqmatch 程序查找其最相似菌株 [37]。根据 Good's formula 计算构建克隆文库多样性的覆盖度 [38]。所有 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录代码为 KJ735836-KJ735838、KJ735842-KJ735843、KJ735847-KJ735848、KJ744107-KJ744147 和 KJ744170-KJ744200。

### 1.4 统计分析

不同抑制剂对乙酸降解产甲烷菌影响的甲烷最大产量和最大甲烷比生长速率采用单因素方差分析 (SPSS 16.0、美国)。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同温度条件下中抑制剂对乙酸降解产甲烷趋势的影响

添加乙酸传代培养, 菌系 Y15、M82 和 SK 都可以在对应的温度条件下产生甲烷。但是乙酸降解产甲烷速率不一样。在 15°C 条件下菌系 Y15 利用乙酸的周期约为 150d (图 1-A), 在 35°C 条件下菌系 M82 降解乙酸的周期约为 30d (图 1-B), 在 55°C 条件下菌系 SK 降解乙酸的周期约为 40d (图 1-C)。添加抑制剂 NH<sub>4</sub>Cl 和 CH<sub>3</sub>F 后, 不同温度条件下乙酸产甲烷的延滞期增加, 甲烷产生速率下降 (图 1、表 2)。其中 15°C 条件下, 不添加抑制剂的 AC (+) 组的最大比生长速率是  $0.067 \pm 0.013 \text{ d}^{-1}$ , 显著高于 AC + CH<sub>3</sub>F 组的  $0.036 \pm 0.003 \text{ d}^{-1}$  ( $p \leq 0.05$ ), 也高于 AC + NH<sub>4</sub>Cl 组的  $0.056 \pm 0.014 \text{ d}^{-1}$  ( $p > 0.05$ )。另外 AC + NH<sub>4</sub>Cl 组的最大比生长速率要高于 AC + CH<sub>3</sub>F 组 ( $p > 0.05$ )。35°C 条件下, 不添加抑制剂的 AC (+) 组最大比生长速率是  $0.376 \pm 0.011 \text{ d}^{-1}$  AC + NH<sub>4</sub>Cl 组  $0.269 \pm 0.014 \text{ d}^{-1}$  ( $p \leq 0.01$ ) 和显著高于 AC + CH<sub>3</sub>F 组  $0.113 \pm 0.035 \text{ d}^{-1}$  ( $p < 0.01$ )。另外 AC + NH<sub>4</sub>Cl 组的最大比生长速率要高于 AC + CH<sub>3</sub>F 组 ( $p < 0.01$ )。55°C 条件下, 不添加抑制剂的 AC (+) 组最大比生长速率是

$0.244 \pm 0.014 \text{ d}^{-1}$ , 显著高于 AC +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  组的  $0.226 \pm 0.041 \text{ d}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ) 和 AC +  $\text{CH}_3\text{F}$  组的  $0.121 \pm 0.012 \text{ d}^{-1}$  ( $p \leq 0.01$ )。此外 AC +  $\text{NH}_4\text{Cl}$

组的最大比生长速率要高于 AC +  $\text{CH}_3\text{F}$  组 ( $p < 0.05$ )。

表 2. 不同温度条件下乙酸降解产甲烷菌系的生长特征

Table 2. The growth characteristics of methanogenic acetate-degrading cultures at different temperatures

T/°C	Experimental group	Incubation time/d	Maximum specific growth rate ( $\text{d}^{-1}$ )	c (Acetate) / (mg/L)
15	AC (-)	300	-	ND
	AC (+)	165	$0.067 \pm 0.013$	$20.3 \pm 4.3$
	AC + $\text{NH}_4\text{Cl}$	300	$0.056 \pm 0.014$	ND
	AC + $\text{CH}_3\text{F}$	315	$0.036 \pm 0.003$	ND
35	AC (-)	48	-	ND
	AC (+)	30	$0.376 \pm 0.011$	ND
	AC + $\text{NH}_4\text{Cl}$	36	$0.269 \pm 0.014$	$67.7 \pm 15.3$
	AC + $\text{CH}_3\text{F}$	48	$0.113 \pm 0.035$	$165.6 \pm 30.5$
55	AC (-)	48	-	ND
	AC (+)	41	$0.244 \pm 0.014$	$39.5 \pm 15.6$
	AC + $\text{NH}_4\text{Cl}$	38	$0.226 \pm 0.041$	$287.9 \pm 13.8$
	AC + $\text{CH}_3\text{F}$	48	$0.121 \pm 0.012$	$115.4 \pm 42.4$

ND: Acetate concentration below the instrument detection limit ( $< 10 \text{ mg/L}$ ). AC (-): the cultures without acetate addition, AC (+): the cultures amended with acetate, AC +  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : the cultures amended with acetate and  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , AC +  $\text{CH}_3\text{F}$ : the cultures amended with acetate and  $\text{CH}_3\text{F}$ .

## 2.2 群落结构结果分析

### 2.2.1 低温条件下乙酸降解产甲烷菌系的古菌群落结构:

T-RFLP 分析发现 15°C 条件下, 添加不同抑制剂之间的古菌群落组成相似, 主要是由片段 (T-RFs) 186 bp 和 284 bp 组成 (图 2-A)。其中 T-RF 284 bp 是丰度最高的片段, 在 AC (-)、AC (+) 和 AC +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  组中丰度高达 93% - 99%, 在 AC +  $\text{CH}_3\text{F}$  组中丰度偏低, 但仍然有  $77.1 \pm 14.5\%$  (图 2-A)。T-RF 186 bp 在 AC +  $\text{CH}_3\text{F}$  组中丰度最高为  $15.7 \pm 20.1\%$ , 在 AC (+) 组中丰度为  $4.3 \pm 4.3\%$ , 在 AC (-) 组和 AC +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  组中丰度为  $1.2 \pm 2.1\%$  和  $0.2 \pm 0.4\%$ 。结合古菌 16S rRNA 基因克隆文库分析 (表 3), 发现 T-RF 284 bp 代表的克隆与 *Methanosaeta concilii* GP6<sup>T</sup> 的相似性是 100% (表 3)。*M. concilii* GP6<sup>T</sup> 只能利用乙酸作为唯一碳源并产生甲烷, 其温度生长范围在 10 - 45°C 之间, 最适生长温度 35 - 40°C [39 - 40]。T-RF 186 bp 代表的古菌克隆与 *Methanosarcina mazei* S-6<sup>T</sup> 的相似性最高也是 100% [41 - 44], 与最近从西伯利亚冻土中分离的 *Methanosarcina soligelidi* SMA-21<sup>T</sup> 的相似性也高达 99% [45]。*M. mazei* 不同菌株的生理生化特征差异较大, 如模式菌株 S-6<sup>T</sup> 可以利用乙酸和甲基类化合物, 但不利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  生长产  $\text{CH}_4$ , 最适生长范围在

30 - 40°C, 最低生长温度可能小于 20°C [41 - 44], 而菌株 LYC 除了可以甲基类化合物生长, 还可以利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , 但是不利用乙酸生长产甲烷 [46]。*M. soligelidi* SMA-21<sup>T</sup> 可以利用乙酸、甲醇和  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  等 3 种不同类型的碳源产甲烷, 并且温度生长范围宽泛 (0 - 54°C) [45]。

### 2.2.2 中温条件下乙酸降解产甲烷菌系的古菌群落结构:

T-RFLP 分析发现 35°C 条件下, 添加不同抑制剂之间的古菌群落主要是由 T-RFs 186 bp、228 bp 和 495 bp 组成 (图 2-B)。T-RF 495 bp 在所有处理组中的丰度都是最高的, 其中在 AC (+) 组中丰度高达  $95.1 \pm 2.3\%$ , 在 AC (-) 和 AC +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  组中丰度为 77 - 79%, 在 AC +  $\text{CH}_3\text{F}$  组中丰度最低, 也达到了  $44.4 \pm 11.7\%$ 。T-RF 228 bp 在 AC +  $\text{CH}_3\text{F}$  组中为优势菌群丰度为  $42.0 \pm 6.1\%$ , 在其他 3 组中的丰度范围是 2% - 8%。T-RF 186 bp 在 AC (+) 组中丰度最低为  $2.6 \pm 1\%$ , 在其他 3 组中的丰度为 11% - 14%。结合克隆文库 (表 3) 分析发现, T-RF 495 bp 代表的克隆与 *Methanosaeta harundinacea* 8Ac<sup>T</sup> 相似性最高为 96%, *M. harundinacea* 8Ac<sup>T</sup> 是一种杆状的乙酸营养型产甲烷古菌, 利用乙酸作为碳源进行生长产  $\text{CH}_4$ , 不能利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ 、甲酸、甲醇和乙醇等作为碳源进行生

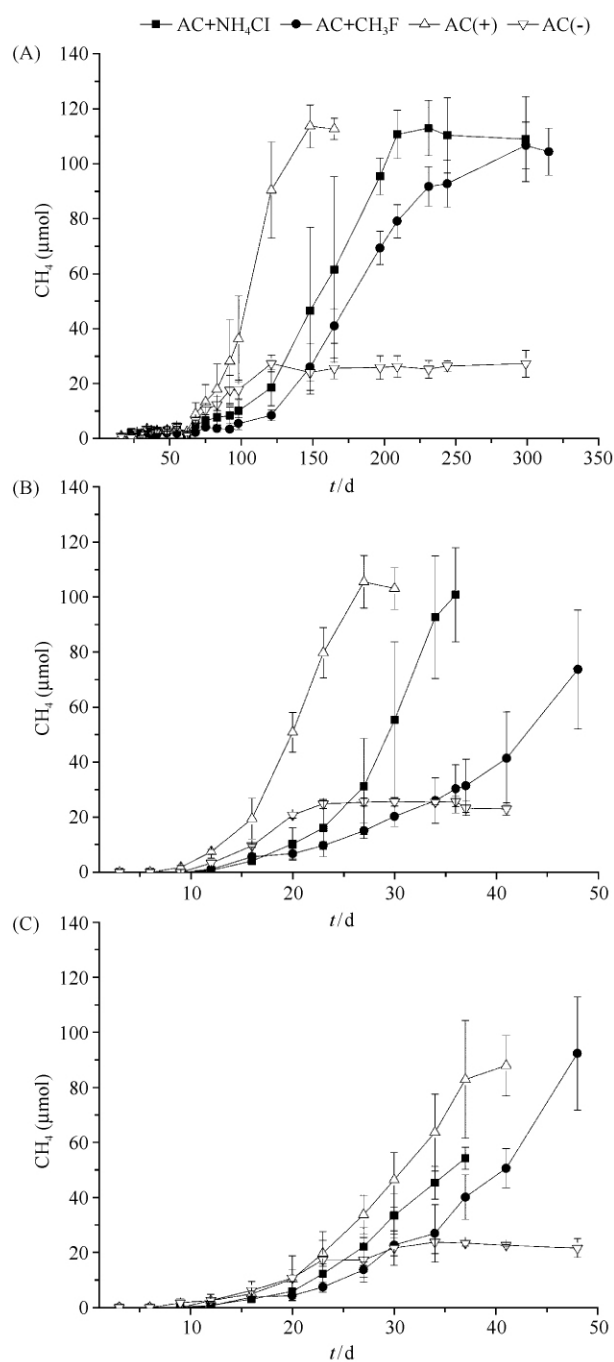


图 1. 不同温度条件下乙酸降解产甲烷趋势图

Figure 1. Time course of methane production from cultures incubated at different temperatures. A: 15°C; B: 35°C; C: 55°C.

长,其最适生长温度在 34 – 37°C<sup>[47]</sup>。T-RF 186 bp 代表的克隆与 *Methanoculleus receptaculi* ZC-2<sup>T</sup> 的相似性为 99%, *M. receptaculi* ZC-2<sup>T</sup> 分离自胜利油田,最适生长温度在 50 – 55°C,但是可在 30°C 以下生长,只能利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  产生  $\text{CH}_4$ <sup>[48]</sup>。本研究中 T-RF 228 bp 所代表的古菌类群没有检测到,但是根据我

们之前的研究发现 T-RF 228 bp 代表的是乙酸营养型产甲烷古菌 *Methanosaeta* sp.<sup>[22]</sup>。

**2.2.3 高温条件下乙酸降解产甲烷菌系的古菌群落结构:** T-RFLP 分析发现 55°C 条件下,添加不同抑制剂之间的古菌群落组成相似,主要是由 T-RFs 68 bp 和 169 bp 组成 (图 2-C),但是相对丰度差别较大。其中 T-RF 68 bp 在  $\text{AC} + \text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_3\text{F}$  组中丰度为 48.5 – 84.3%,明显高于  $\text{AC}(+)$  组的  $8.8 \pm 3.4\%$ 。T-RF 169 bp 在  $\text{AC}(+)$  组中丰度最高为

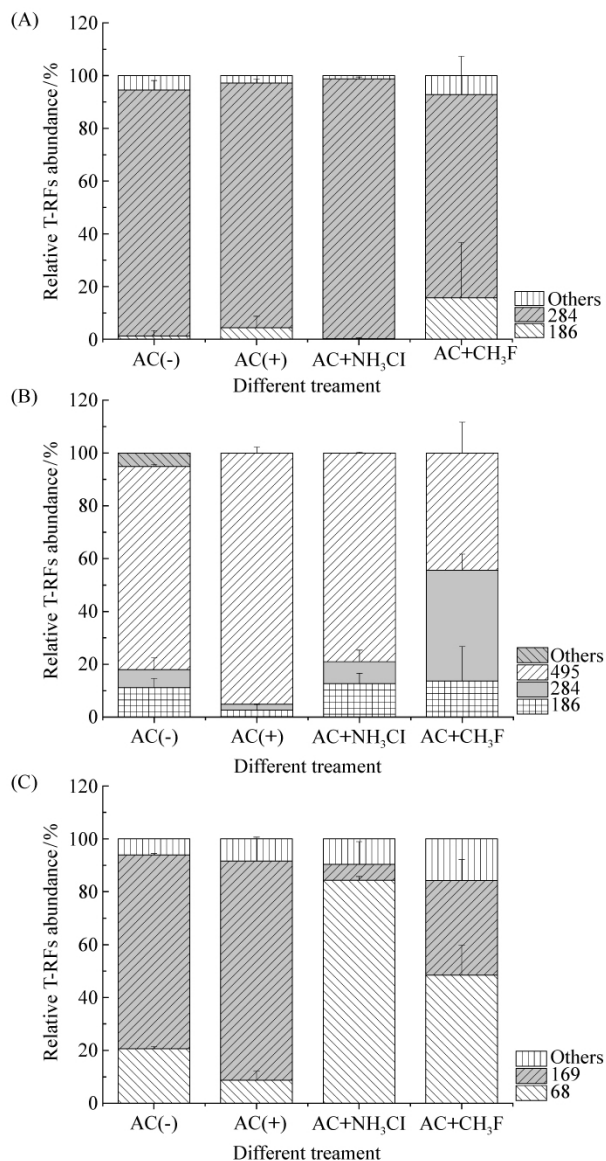


图 2. 低温 (A)、中温 (B) 和高温 (C) 条件下乙酸降解产甲烷菌系的古菌 T-RFLP 图

Figure 2. The archaeal T-RFLP profile of methanogenic acetate-degrading cultures incubated at 15°C (A), 35°C (B) and 55°C (C).

82.8 ± 9.0% ,而在 AC + CH<sub>3</sub>F 组和 AC + NH<sub>4</sub>Cl 组中丰度分别只有 35.8 ± 7.8% 和 6.1 ± 8.6% 。结合 16S rRNA 基因克隆文库分析 (表 3) ,发现 T-RF 68 bp 代表的克隆与 *Methanothermobacter crinale* Tm2<sup>T</sup> 相似度最高为 99% ,菌株 Tm2<sup>T</sup> 分离自胜利油田,只能利用 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 生长并产生甲烷,最适生长温度为

65℃<sup>[49]</sup>。T-RF 169 bp 代表的克隆与 *Methanosaeta thermophila* 的相似度最高为 98% 。*M. thermophila* 分离自厌氧反应器中,只能裂解乙酸产甲烷,而不能利用 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 和甲基类碳源生长,最适生长温度为 55 – 60℃<sup>[50]</sup>。

表 3. 古菌 16S rRNA 克隆文库

Table 3. The archaeal 16S rRNA gene libraries

Phylogenetic group	In silico T-RF (No. of clone) #					Type clone (GenBank)	The most similar species (similarity)
	15-AC	15-F	35-NH	35-AC	55-F		
	283 (1)						
	284 (10)	284 (2)				A156-4 (KJ735837)	<i>Methanosaeta concilii</i> ; NR102903 (100%)
<i>Methanosaetaceae</i>	285 (1)						
			495 (11)	495 (12)		A56-8 (KJ735843)	<i>Methanosaeta harundinacea</i> ; NR102896 (96%)
					169 (5)	A48-7 (KJ735842)	<i>Methanosaeta thermophila</i> ; NR_074214 (98%)
<i>Methanosarcinaceae</i>	186 (4)	186 (14)				A156-11 (KJ735836)	<i>Methanosarcinamazei</i> ; CP004144 (100%)
					67 (1)	A48-18 (KJ735838)	<i>Methanothermobacter crinale</i> ; HQ283273 (99%)
<i>Methanobacteriaceae</i>					68 (11)	(KJ735838)	
					473 (1)	A48-17 (KJ735848)	<i>Methanocaldococcus vulcanius</i> ; NR_074195 (76%)
<i>Thermofilaceae</i>					31 (1)	A48-11 (KJ735847)	<i>Thermofilum pendens</i> ; NR074406 (83%)
<i>Methanomicrobiaceae</i>			186 (1)	186 (2)		A44-7 (KJ744109)	<i>Methanoculleus receptaculi</i> ; DQ787475 (99%)

Remark: The clones (total 79 sequences) were assigned and grouped on the sequence similarity of 97% , each column represents different type clone OTU. Number in the parentheses indicates numbers of clones. 15-AC: clones retrieved from acetate culture incubated at 15°C ;15-F: clones retrieved from acetate culture incubated at 15°C with CH<sub>3</sub>F;35-NH: clones retrieved from acetate culture incubated at 35°C with NH<sub>4</sub>Cl;35-AC: clones retrieved from acetate culture incubated at 35°C ;55-F: clones retrieved from acetate culture incubated at 15°C with CH<sub>3</sub>F.

### 3 讨论

石油烃降解产甲烷过程存在 5 种可能的产甲烷代谢途径,其中温度是影响产甲烷代谢途径的重要因素之一<sup>[15]</sup>。石油烃降解产生 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub> 和乙酸的吉布斯自由能 (ΔG) 随温度升高而降低,这在热力学上是有利的。与此不同,石油烃降解产生乙酸的 ΔG 随温度升高呈增大趋势<sup>[15]</sup>。另外,在产甲烷过程中,虽然 CO<sub>2</sub> 还原产 CH<sub>4</sub> 和乙酸裂解产甲烷过程都是放热过程 (ΔG < 0),可以自发进行,但是利用 H<sub>2</sub> 还原 CO<sub>2</sub> 产 CH<sub>4</sub> 的反应的 ΔG 随温度上升下降,而乙酸裂解产 CH<sub>4</sub> 呈继续下降趋势<sup>[51]</sup>。此外,乙酸氧化产 H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 在标准状况下的 ΔG > 0,但是这个反应的自由能随温度上升而下降<sup>[51]</sup>。本小组之前从胜利油田某油泥沙富集获得了 3 个不同温

度条件 (15°C、35°C、55°C) 的石油烃降解产甲烷菌系 Y15、M82 和 SK。为了研究石油烃降解产甲烷的代谢途径及其产甲烷古菌菌群结构,我们直接添加乙酸并进行传代培养,结合 T-RFLP 和克隆技术这些经典的微生物群落组成与演替规律的分析方法<sup>[52]</sup>。本研究发现这 3 个菌系都可以利用乙酸生长并产生甲烷,进一步分析发现降解乙酸的古菌群落中,乙酸营养型产甲烷古菌 *Methanosaeta* 占绝对优势,这表明在石油烃降解产甲烷菌系中,可能都存在裂解乙酸产甲烷代谢途径,并且参与乙酸裂解的产甲烷古菌属于 *Methanosaeta* 属下的 3 个不同种,其中 15°C 条件下降解乙酸的是耐冷的 *M. concilii*, 35°C 条件下主要是嗜中温的 *M. harundinacea*,而在 55°C 条件下主要是嗜热的 *M. thermophila*,这也表明油泥沙中存在丰富多样的乙酸营养型产甲烷古菌。

采用选择性抑制剂 CH<sub>3</sub>F 和 NH<sub>4</sub>Cl 来特异性抑

制乙酸营养型产甲烷古菌是验证产甲烷代谢途径的重要方法之一<sup>[53-54]</sup>。Frenzel 等报道  $\text{CH}_3\text{F}$  不仅可以抑制甲烷氧化过程, 还可以选择性抑制乙酸裂解产甲烷的活性<sup>[55-56]</sup>。Conrad 等发现添加 0.01% - 1% 的  $\text{CH}_3\text{F}$  就可以抑制乙酸裂解产甲烷活性, 当  $\text{CH}_3\text{F}$  浓度过高时, 对  $\text{CO}_2$  还原产  $\text{CH}_4$  代谢也会有一定的影响<sup>[53]</sup>。他们后来还发现  $\text{CH}_3\text{F}$  不仅会抑制 *Methanosaeta* 的产甲烷活性, 还会抑制 *Methanosarcina* 的生长<sup>[57]</sup>。我们的研究发现添加  $\text{CH}_3\text{F}$  会增大 3 个菌系的产甲烷延滞期, 但是在低温条件下,  $\text{CH}_3\text{F}$  增高了 *M. mazei* 相关的古菌丰度, *M. mazei* 也可以利用乙酸生长产甲烷<sup>[41]</sup>, 这表明低温条件下添加  $\text{CH}_3\text{F}$  抑制剂后, 代谢过程可能主要还是通过直接裂解乙酸产生甲烷的。在中温条件下 *M. harundinacea* 相关的古菌丰度降低, 但是另外一类乙酸营养型产甲烷古菌的 *Methanosaeta* sp. 和氢营养型产甲烷古菌 *M. receptaculi* 丰度增加, 这表明有一部分乙酸可能被氧化为  $\text{H}_2$  和  $\text{CO}_2$ , 然后通过 *M. receptaculi* 转化为  $\text{CH}_4$ , 另外有部分乙酸通过两种不同的 *Methanosaeta* 裂解产生乙酸。这些发现也表明  $\text{CH}_3\text{F}$  对不同种属乙酸营养型产甲烷古菌活性的抑制是不同的。在高温条件下, 氢营养型产甲烷古菌 *M. crinale* 丰度相对于中低温增幅最明显, 前期研究发现 *M. crinale* 相关的古菌类群广泛分布在油藏环境中, 在高温原油降解产甲烷和油藏乙酸互营氧化中起着重要的生理生态学功能<sup>[24]</sup>。与  $\text{CH}_3\text{F}$  类似,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  也会影响产甲烷古菌, 特别是乙酸营养型产甲烷古菌的产甲烷活性<sup>[58-61]</sup>。文献报道显示氨浓度在 1.7 - 14g/L 会对产甲烷过程产生抑制, 氨主要从浓度、pH 和菌体的适应性几个方面对产甲烷过程造成影响<sup>[62]</sup>。目前推测存在多种可能的  $\text{NH}_4^+$  抑制机理, 一种认为  $\text{NH}_4^+$  溶解在水中形成的氨 ( $\text{NH}_3$ ) 会造成产甲烷古菌细胞内的钾流失, 并破坏细胞内 pH 平衡<sup>[61, 63]</sup>, 另外有学者提出  $\text{NH}_3$  会抑制胞内与产甲烷代谢相关的酶<sup>[64]</sup>, Zhang 等认为  $\text{NH}_4^+$  抑制了产甲烷代谢的转录表达活性<sup>[65]</sup>。Fotidis 等认为  $\text{NH}_4^+$  增加了维持反应进行下去的能量, 消耗细胞内的  $\text{K}^+$  而且还抑制了特定的酶反应<sup>[66]</sup>。但是  $\text{NH}_4^+$  对 *Methanosaeta* 的抑制作用要明显高于其他类型产甲烷古菌的原因还不清楚。另外, Steinhaus 等发现 *M. concilii* 利用  $\text{NH}_4\text{-N}$  最适生长浓度为

0.25 - 1.1 g/L (pH 7.6)<sup>[67]</sup>, 但 Sprott 等发现 0.56 g/L  $\text{NH}_4\text{-N}$  会完全抑制 *M. concilii* 的产甲烷活性 (pH 7.0)<sup>[59]</sup>。在不同的沼气发酵反应器中, 抑制 *Methanosaetaceae* 产甲烷活性的  $\text{NH}_4\text{-N}$  浓度波动范围也比较大 (1.5 - 7 g/L)<sup>[30, 68-70]</sup>。

在本研究中, 添加同样浓度的  $\text{NH}_4\text{-N}$  培养, 发现从低温到高温条件下, *Methanosaeta* 相对丰度明显降低, 而氢营养型产甲烷古菌丰度显著上升, 这与之前的研究发现类似<sup>[70]</sup>, 这可能和接种物、培养条件和微生物自身生理特性有关。但是无论添加  $\text{CH}_3\text{F}$  还是  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 氢营养型产甲烷古菌丰度的增加意味着产甲烷途径由乙酸裂解产甲烷向乙酸互营氧化产甲烷迁移。这表明中温和高温石油烃降解产甲烷菌系中存在乙酸互营氧化产甲烷代谢过程, 但是究竟是哪些乙酸互营氧化细菌和古菌参与了石油烃降解产甲烷过程, 其对甲烷产生的贡献率, 还有待于进一步的研究, 目前我们正在应用同位素示踪结合微生物分子生态学技术揭示这些关键的细菌微生物类群。

## 参考文献

- [1] Ferry J G. Biochemistry of methanogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, 27 (6): 473-503.
- [2] Yilmaz V, Ince-Yilmaz E, Yilmaz YD. Is acetate-oxidizing methanogen composition in full-scale anaerobic processes related to acetate utilization capacity? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98 (11): 5217-5226.
- [3] Dörfing J. Thermodynamic constraints on syntrophic acetate oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (4): 1539-1541.
- [4] Schnürer A, Schink B, Svensson BH. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46 (4): 1145-1152.
- [5] Westerholm M, Roos S, Schnürer A. *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 309 (1): 100-104.
- [6] Westerholm M, Roos S, Schnürer A. *Tepidanaerobacter acetatooxidans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-

- enriched mesophilic methanogenic processes. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34 (4) : 260-266.
- [7] Hattori S, Kamagata Y, Hanada S. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50 (4) : 1601-1609.
- [8] Balk M, Weijma J, Stams AJM. *Thermotogalettingae* 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.
- [9] Lee MJ, Zinder SH. Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54 (1) : 124-129.
- [10] Hao LP, Lü F, He PJ. Predominant contribution of syntrophic acetate oxidation to thermophilic methane formation at high acetate concentrations. *Environmental Science & Technology*, 2010, 45 (2) : 508-513.
- [11] Schnürer A, Zellner G, Svensson BH. Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29 (3) : 249-261.
- [12] Hattori S. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environments*, 2008, 23 (2) : 118-127.
- [13] Zengler K, Richnow HH, Rosselló-Mora R. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature*, 1999, 401 (6750) : 266-269.
- [14] Lovley DR. Anaerobes to the rescue. *Science*, 2001, 293 (5534) : 1444-1446.
- [15] Dolfing J, Larter SR, Head IM. Thermodynamic constraints on methanogenic crude oil biodegradation. *The ISME Journal*, 2007, 2 (4) : 442-452.
- [16] Garrity GM, Holt JG. Phylum AII. Euryarchaeotaphy. Nov//Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9<sup>th</sup> eds. New York: Springer, 2001: 211-355.
- [17] Townsend GT, Prince RC, Suflita JM. Anaerobic oxidation of crude oil hydrocarbons by the resident microorganisms of a contaminated anoxic aquifer. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37 (22) : 5213-5218.
- [18] Gieg LM, Duncan KE, Suflita JM. Bioenergy production via microbial conversion of residual oil to natural gas. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (10) : 3022-3029.
- [19] Gray ND, Sherry A, Grant RJ. The quantitative significance of Syntrophaceae and syntrophic partnerships in methanogenic degradation of crude oil alkanes. *Environmental Microbiology*, 2011, 13 (11) : 2957-2975.
- [20] Siddique T, Penner T, Semple K. Anaerobic biodegradation of longer-chain n-alkanes coupled to methane production in oil sands tailings. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45 (13) : 5892-5899.
- [21] Wang LY, Gao CX, Mbadinga SM. Characterization of an alkane-degrading methanogenic enrichment culture from production water of an oil reservoir after 274 days of incubation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65 (3) : 444-450.
- [22] Cheng L, Ding C, Li Q. DNA-SIP reveals that Syntrophaceae play an important role in methanogenic hexadecane degradation. *PLoS One*, 2013, 8 (7) : e66784.
- [23] Jones DM, Head IM, Gray ND. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature*, 2007, 451 (7175) : 176-180.
- [24] Gieg LM, Davidova IA, Duncan KE. Methanogenesis, sulfate reduction and crude oil biodegradation in hot Alaskan oilfields. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (11) : 3074-3086.
- [25] Mbadinga SM, Li KP, Zhou L. Analysis of alkane-dependent methanogenic community derived from production water of a high-temperature petroleum reservoir. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96 (2) : 531-542.
- [26] Cheng L, Rui J, Li Q. Enrichment and dynamics of novel syntrophs in a methanogenic hexadecane - degrading culture from a Chinese oilfield. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83 (3) : 757-766.
- [27] Cheng L, He Q, Ding C. Novel bacterial groups dominate in a thermophilic methanogenic hexadecane - degrading consortium. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 85 (3) : 568-577.
- [28] Schwarz JIK, Lueders T, Eckert W. Identification of acetate-utilizing Bacteria and Archaea in methanogenic profundal sediments of Lake Kinneret (Israel) by stable isotope probing of rRNA. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (1) : 223-237.
- [29] Conrad R, Klose M, Claus P. Pathway of CH<sub>4</sub> formation in anoxic rice field soil and rice roots determined by <sup>13</sup>C-



- stable isotope fractionation. *Chemosphere*, 2002, 47 (8) : 797-806.
- [30] Schnurer A, Nordberg A. Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Science & Technology*, 2008, 57: 735-740.
- [31] Janssen PH, Frenzel P. Inhibition of methanogenesis by methyl fluoride: studies of pure and defined mixed cultures of anaerobic bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (11) : 4552-4557.
- [32] Macy JM, Snellen JE, Hungate RE. Use of syringe methods for anaerobiosis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1972, 25 (12) : 1318-1323.
- [33] Ma T, Cheng L, Zheng Z, Qin Q, Dai L, Zhang H. Effects of pH on methanogenesis and methanogenic community in the cultures amended with acetate. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54 (12) : 1453 -1461. (in Chinese).
- 麻婷婷, 承磊, 郑珍珍, 覃千山, 代莉蓉, 张辉. 不同 pH 缓冲液对由乙酸产甲烷菌群结构的影响. 微生物学报, 2014, 54 (12) : 1453-1461.
- [34] Ma T, Cheng L, Zheng Z, Qin Q, Dai L, Zhang H. The difference among different methanogenic hexadecane-degrading consortium's DNA extraction method. *China Biogas*, 2014, 32 (3) : 3-7. (in Chinese).
- 麻婷婷, 承磊, 郑珍珍, 覃千山, 张辉. 石油烃降解产甲烷菌系 DNA 提取方法比较研究. 中国沼气, 2014, 32 (3) : 3-7.
- [35] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (7) : 5069-5072.
- [36] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (23) : 7537-7541.
- [37] Cole JR, Wang Q, Cardenas E. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (suppl 1) : D141-D145.
- [38] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40 (3-4) : 237-264.
- [39] Boone DR. Strain GP6 is proposed as the neotype strain of *Methanotheroxoenhengerii* VP pro synon. *Methanotheroxoenhengerii* VP and *Methanosetaoconcilii* VP request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, 41 (4) : 588-589.
- [40] Patel GB, Sprott GD. *Methanosetaoconcilii* gen. nov., sp. nov. (" *Methanotheroxoenhengerii* ") and *Methanosetaoconcilii* nom. rev., comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1990, 40 (1) : 79-82.
- [41] Mah RA. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei*. *Current Microbiology*, 1980, 3 (6) : 321-326.
- [42] Barker HA. Studies upon the methane-producing bacteria. *Archives of Microbiology*, 1936, 7 (1) : 420-438.
- [43] Maestrojuan GM, Boone JE, Mah RA. Taxonomy and halotolerance of mesophilic *Methanosarcina* strains, assignment of strains to species, and synonymy of *Methanosarcinamazei* and *Methanosarcinafrisia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992, 42 (4) : 561-567.
- [44] Mah RA, Kuhn DA. Transfer of the type species of the genus *Methanococcus* to the genus *Methanosarcina*, naming it *Methanosarcinamazei* (Barker 1936) comb. nov. et emend. and conservation of the genus *Methanococcus* (Approved Lists 1980) with *Methanococcus vannielii* (Approved Lists 1980) as the type species request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1984, 34 (2) : 263-265.
- [45] Wagner D, Schirmack J, Ganzert L. *Methanosarcinasoligelidi* sp. nov., a desiccation- and freeze-thaw-resistant methanogenic archaeon from a siberian permafrost-affected soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63 (Pt 8) : 2986-2991.
- [46] Liu Y, Boone DR, Sleat R. *Methanosarcinamazei* LYC, a new methanogenic isolate which produces a disaggregating enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49 (3) : 608-613.
- [47] Ma K, Liu X, Dong X. *Methanosetaoconcilii* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56 (1) : 127-131.
- [48] Cheng L, Qiu TL, Li X. Isolation and characterization of *Methanoculleus receptaculi* sp. nov. from Shengli Oil Field, China. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 285 (1) : 65-71.
- [49] Cheng L, Dai L, Li X. Isolation and characterization of

- Methanothermobacter crinale* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the Shengli Oil Field. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (15) : 5212-5219.
- [50] Zinder SH, Sowers KR, Ferry JG. Notes: *Methanosarcinothermophila* sp. nov., a thermophilic, acetotrophic, methane-producing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1985, 35 (4) : 522-523.
- [51] Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61 (2) : 262-280.
- [52] Liu WT, Marsh TL, Cheng H. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (11) : 4516-4522.
- [53] Conrad R, Klose M. How specific is the inhibition by methyl fluoride of acetoclastic methanogenesis in anoxic rice field soil? *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 30 (1) : 47-56.
- [54] Yenigün O, Demirel B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: a review. *Process Biochemistry*, 2013, 48 (5) : 901-911.
- [55] Frenzel P, Bosse U. Methyl fluoride, an inhibitor of methane oxidation and methane production. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, 21 (1) : 25-36.
- [56] Conrad R, Klose M. Selective inhibition of reactions involved in methanogenesis and fatty acid production on rice roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 34 (1) : 27-34.
- [57] Penning H, Conrad R. Effect of inhibition of acetoclastic methanogenesis on growth of archaeal populations in an anoxic model environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (1) : 178-184.
- [58] Hajarnis SR, Ranade DR. Revival of ammonia inhibited cultures of *Methanobacterium bryantii* and *Methanosarcinabarkeri*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993, 76 (1) : 70-72.
- [59] Sprott GD, Patel GB. Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 1986, 7 (2) : 358-363.
- [60] Hunik JH, Hamelers HVM, Koster IW. Growth-rate inhibition of acetoclastic methanogens by ammonia and pH in poultry manure digestion. *Biological Wastes*, 1990, 32 (4) : 285-297.
- [61] Kadam PC, Boone DR. Influence of pH on ammonia accumulation and toxicity in halophilic, methylotrophic methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (12) : 4486-4492.
- [62] Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*, 2008, 99 (10) : 4044-4064.
- [63] Sprott GD, Shaw KM, Jarrell KF. Ammonia/potassium exchange in methanogenic bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259 (20) : 12602-12608.
- [64] Kato S, Sasaki K, Watanabe K. Physiological and transcriptomic analyses of the thermophilic, acetoclastic methanogen *Methanosarcinothermophilus* are responding to ammonia stress. *Microbes and Environments*, 2014, 29 (2) : 162.
- [65] Zhang C, Yuan Q, Lu Y. Inhibitory effects of ammonia on methanogen mcrA transcripts in anaerobic digester sludge. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 87 (2) : 368-377.
- [66] Fotidis I A, Karakashev D, Kotsopoulos TA. Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83 (1) : 38-48.
- [67] Steinhaus B, Garcia ML, Shen AQ. A portable anaerobic microbioreactor reveals optimum growth conditions for the methanogen *Methanosarcina acetivorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (5) : 1653-1658.
- [68] Westerholm M, Dolfing J, Sherry A. Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3 (4) : 500-505.
- [69] Nettmann E, Bergmann I, Pramschüfer S. Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (8) : 2540-2548.
- [70] Fotidis IA, Karakashev D, Kotsopoulos TA. Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83 (1) : 38-48.

# Effects of selective methanogenic inhibitors on methanogenesis and methanogenic communities in acetate degrading cultures

Tingting Ma, Lei Cheng, Laiyan Liu, Lirong Dai, Zheng Zhou, Hui Zhang\*

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

**Abstract:** [Objective] We evaluated the role of syntrophic acetate oxidation coupled with hydrogenotrophic methanogens in three different methanogenic consortia. [Methods] Three methanogenic hexadecane degrading consortia named Y15, M82 and SK were taken from the same oily sludge of Shengli oil-field and enriched. They were incubated at 15, 35 and 55 °C, respectively. The consortia amended with acetate and inhibitors of NH<sub>4</sub>Cl or CH<sub>3</sub>F were further transferred and incubated at corresponding temperatures. The cultures at late logarithmic phase were collected for terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) combined with cloning and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene fragments. [Results] Gas chromatograph analysis showed that all of the consortia could grow and produce methane, but the lag phase was delayed and the growth rate was retarded in the cultures amended with inhibitor. Combination analysis of T-RFLP and clone library revealed the predominance of obligate aceticlastic *Methanosaeta* in the acetate cultures of Y15, M82 and SK. Under the mesophilic and thermophilic conditions, after add inhibitor the relative abundance of aceticlastic methanogen decreased but hydrogenotrophic methanogen increased. [Conclusion] Syntrophic acetate oxidation during methanogenic degradation of petroleum hydrocarbons occurs under mesophilic and thermophilic conditions, although the situation at low temperature seems uncertain.

**Keywords:** anaerobic degradation of petroleum hydrocarbons, syntrophic acetate oxidation, methanogenesis, archaeal community structure, NH<sub>4</sub>Cl and CH<sub>3</sub>F

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41173088, 31370060) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2013AA064401)

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

Received: 20 October 2014/ Revised: 25 December 2014