

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (12) :1453 – 1461; 4 December 2014  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsx.2014.12.008

## 不同 pH 缓冲液对由乙酸产甲烷菌群结构的影响

麻婷婷, 承磊, 郑珍珍, 覃千山, 代莉蓉, 张辉\*

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

**摘要:** 【目的】研究不同 pH 缓冲液对乙酸产甲烷过程及对细菌和古菌群落结构的影响。【方法】分别添加磷酸盐 (PB)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、哌嗪-1,4-二乙磺酸 (PIPES) 和  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$  缓冲液到乙酸产甲烷菌系中, 定期监测甲烷产生趋势, 到稳定期后收集菌体, 进行 16S rRNA 基因的末端限制性片段多态性分析 (T-RFLP)。【结果】发现 PB 组的乙酸产甲烷菌系延滞期约为 40d, 显著高于其他组的 20 – 24 d ( $P < 0.05$ );  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$  组乙酸转化为甲烷的比例为  $(88.3 \pm 0.5)\%$ , 显著高于其他组的 77% – 81% ( $P < 0.05$ ); 不同缓冲液组的最大甲烷比生长速率为  $0.46 - 0.57 \text{ d}^{-1}$  ( $P > 0.05$ );  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$  组的细菌群落变化最明显, 主要是未培养细菌 (unclassified bacteria)、螺旋菌科细菌 (Spirochaetaceae) 和未培养 WWE1 类群的丰度较其他组分别增加到  $(15.5 \pm 9.4)\%$ 、 $(7.3 \pm 4.6)\%$  和  $(17.6 \pm 6.3)\%$ , 而互养菌科 (Synergistaceae) 的细菌丰度降低到  $(8.9 \pm 8.1)\%$ 。AC + PB 组中的古菌类群发生了明显变化, 以竹节状甲烷鬃毛菌 (*Methanosaeta harundinacea*) 相关的产甲烷古菌占主导 ( $97 \pm 2\%$ ), 而在 HEPES、PIPES 和  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$  组和不加缓冲液组中同时存在两类乙酸营养型产甲烷古菌 *M. harundinacea* 和联合鬃毛甲烷菌 (*Methanosaeta concilii*), 以及属于甲烷杆菌目 (Methanobacteriales) 的氢营养型产甲烷古菌。【结论】在乙酸产甲烷菌系中加入 PB 增加了甲烷产生的延滞期, 加入  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$  增加了甲烷产量, 但是添加 pH 缓冲液不会影响到菌系的最大甲烷比生长速率。加入 PB 和  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$  都会显著改变微生物的菌群结构。这些研究为设计适宜的产甲烷菌系生长条件提供了参考。

**关键词:** pH 缓冲液, 乙酸, 产甲烷, 群落结构

中图分类号: Q935 文章编号: 0001-6209(2014)12-1453-09

我国已成为世界上主要的农业废弃物生产国家, 年产禽畜粪便 30 亿吨, 作物秸秆 7 亿吨。如果这些农林废弃物直接排放到环境中, 不仅造成巨大的资源浪费, 还会造成农村环境污染的蔓延与恶化。通过沼气发酵, 将农林废弃物和环境污染物降解转

化为甲烷, 不仅可以“变废为宝”, 改善农村环境污染现状, 还可以生产出可再生能源——沼气, 从而为改善我国能源结构, 降低对石油等不可再生能源的依赖<sup>[1-2]</sup>。

沼气发酵在有机废弃物的资源化利用方面的应

基金项目: 国家自然科学基金 (31370060, 41173088); 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: 2014-03-19; 修回日期: 2014-05-19

用前景广阔<sup>[3-4]</sup>。基于培养和未培养技术的研究,发现参与沼气发酵的主要是不同类型的厌氧微生物,其种群组成复杂多变<sup>[5-6]</sup>。沼气发酵过程很容易受到温度、pH、氨、挥发性脂肪酸(VFA)等环境因子的影响<sup>[7]</sup>。一般中性 pH (6.8 - 7.2) 最适宜沼气发酵, pH 过高或过低都会显著影响到沼气发酵的速率和效率。Lay 等研究发现 pH 为 6.6 - 7.8 的时候,高浓度污泥(90% - 96%)能正常发酵产生沼气,但是当 pH 低于 6.1 或者高于 8.3 时就会抑制沼气发酵, pH 在 6.8 左右时最适宜沼气发酵<sup>[8]</sup>。Hao 等将起始培养物的 pH 从 6.5 降低到 5.5 时,由乙酸产生甲烷的延滞期逐渐增长,甲烷产生的代谢途径也从以乙酸裂解为主逐渐转变为乙酸互营氧化产甲烷代谢<sup>[9]</sup>。因此,在模拟培养沼气发酵培养液时,通常会添加缓冲液来稳定 pH,如碳酸氢盐<sup>[10]</sup>、磷酸盐(PB)<sup>[11-12]</sup>、哌嗪-1,4-二乙磺酸盐(PIPES)<sup>[13]</sup>和 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)<sup>[14]</sup>。但是添加缓冲液可能会影响沼气发酵过程和微生物群落结构。Ralf 等发现添加 10 mmol/L 的 PB 浓度能提高水稻根际微生物降解乙酸产生甲烷的速率,而大于 20 mmol/L 后则会抑制产甲烷代谢<sup>[12]</sup>。Lin 等发现碳酸盐在 0.15 - 0.2 mol/L 时会降低葡萄糖降解产生甲烷的速率,而高浓度碳酸盐则有利于氢营养型产甲烷古菌的代谢<sup>[10]</sup>。蔡曼等发现碳酸氢钠虽然会抑制某些微生物的生长,但是古菌在整个体系的生命活动中的作用并未减弱,且产甲烷古菌占古菌的相对丰度明显升高<sup>[15]</sup>。Bartscht 等研究发现与 HEPES 相比, PB 会抑制化能自养细菌生长<sup>[16]</sup>。但是迄今为止,不同 pH 缓冲液对沼气发酵过程及微生物群落的研究有限,本研究以实验室驯化的正十六烷烃降解产甲烷菌系为接种源、添加乙酸钠为碳源,分别添加 PB、HEPES、PIPES 和 NaHCO<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub> 四种常见 pH 缓冲液进行产甲烷培养,采用 T-RFLP 检测微生物群落组成,从而探究不同缓冲液对产甲烷菌群群落结构的影响,为开展沼气发酵的基础和应用研究提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

**1.1.1 主要试验仪器:**紫外分光光度计(Beckman DU 800,美国)、细胞破碎仪(MP Bio Fastprep-24,美

国)、PCR 仪(Bio-RAD C100,美国)、超低温冰箱(Thermo MDF-2136,美国)、冷冻离心机(ThermoLegend Micro17R,美国)、气相色谱(ShimadzuGC-2010,日本)、气相色谱(Agilent7890A,美国)、气密性采样针(Vici,美国)、测序仪(ABI3130xl,美国)

**1.1.2 主要试剂盒:**基因组 DNA 纯化试剂盒(Promega,美国)、琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒(Tiangen,中国)、Taq<sup>TM</sup> PCR 体系(TaKaRa,日本)。

**1.1.3 主要试剂及耗材:**PB (120 mmol/L, pH 8.0), TNS (0.5 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 10% SDS, pH 8.0), Tris 饱和酚 (pH ≥ 7.8)、酚氯仿异戊醇 (25:24:1) (pH ≥ 7.8)、氯仿异戊醇 (24:1) (索莱宝,中国), ROX1200 (阅微,中国), 引物 (Invitrogen, 美国), 限制性内切酶 *Taq* I 和 *Hae* III (TaKaRa, 日本), 2 mL 螺盖管 (Sarstedt, 德国), 0.1 mm 玻璃珠 (Sigma, 美国)。其他常规试剂主要购自上海生物工程技术有限公司和中国国药集团。

### 1.2 富集培养

本实验的接种物来自于本课题组富集的正十六烷烃降解产甲烷菌系 M82<sup>[17]</sup>,该菌系不仅可以降解单一的正十六烷烃,也可以降解原油饱和烃组分,前期研究发现互营菌科(Syntrophaceae)、WWE1、热袍菌门(Thermotogae)、螺旋菌科(Spirochaetaceae)、互养菌科(Synergistaceae)等是主要细菌类群,甲烷丝状菌(Methanosaeta)和甲烷囊菌属(Methanoculleus)是主要的古菌类群,该菌系的培养温度是 35℃,培养周期通常在半年到一年半之间<sup>[18]</sup>。本实验取对数生长末期的菌液,按照 20% 的接种量(V/V)添加到以乙酸为碳源的培养基中进行传代培养。在 Hungate 厌氧装置上配置厌氧无机盐培养基<sup>[19]</sup>。其成分如下(1L): 0.5 g NaCl, 0.5 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.1 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g KCl, 1 mg 刃天青和 0.5 g L-半胱氨酸。冷却后使用 5 mol/L 的 KOH 将 pH 调至 7.0,在 N<sub>2</sub> 保护下分装培养基,121℃ 灭菌 30 min。接种前加入 Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (5%)、维生素(V<sub>B1</sub>、V<sub>B12</sub>和 V<sub>284</sub>各 2 mL/L)和微量元素(2 mL/L)<sup>[20]</sup>,NaAc 的终浓度是 20 mmol/L。HEPES、PIPES、PB 和 NaHCO<sub>3</sub> 的终浓度为 10 mmol/L。另外将 NaHCO<sub>3</sub> 组中的 N<sub>2</sub> 置换为 N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 混合气(4/1, V/V)。用 HCl (1 mol/L) 或 NaOH (1 mol/L) 调节 pH 至 7.0 - 7.5,

35℃ 静置暗培养。

### 1.3 分析方法

采用气相色谱 GC-2010 测定气体组分与含量。该色谱配备有热导检测器 (TCD) 和 Porapak Q 不锈钢填充柱, 载气为高纯氮 (99.999%)。进样口、柱箱和检测器的温度分别是 150℃、100℃ 和 200℃, 流速为 35 mL/min。用带阀门的气密性采样针采集 0.2 mL 上空气体分析。最后采用校准面积归一化法分析甲烷的含量, 应用阿伏伽德罗定律计算甲烷的摩尔量<sup>[21]</sup>。使用数据分析软件 origin8.5 拟合甲烷生长趋势, 生长曲线拟合公式 Slogistic 1:  $y = a / (1 + \exp[-k * (x - x_0)])$ , 通过微积分求得最大甲烷比生长速率。

采用气相色谱 7890A 测定乙酸浓度。取 1 mL 菌液 17000 × g, 5 min 离心后, 取上清冰浴 30 min, 过滤 (0.45 μL) 后转移至样品瓶中, 加入 5 mol/L HCl 酸化至 pH ≤ 2 后上机分析。该色谱配有氢火焰检测器 (FID) 和 FFAP 毛细管柱, 燃气为高纯氢 (99.999%), 载气为高纯氮 (99.999%)。进样口检测器的温度均是 250℃。柱箱温度 80℃, 20℃/min 升至 180℃, 保持 1 min。空气流量为 400 mL/min, H<sub>2</sub> 流量为 40 mL/min, 柱流量 1.476 mL/min。外标法定量。

### 1.4 微生物分子生态学分析

**1.4.1 基因组 DNA 的提取及纯化:** 采用 beat-beading 法提取总 DNA<sup>[22-24]</sup>。离心收集 10 mL 菌液后, 向所得菌体中加入 beads 0.5 g、PB 和 TNS 缓冲液, 在细胞破碎仪上以 6 m/s 的速度振荡 40 s 破壁。依次用 Tris 饱和酚、氯仿和异戊醇、氯仿异戊醇抽提, 最后异丙醇沉淀并收集 DNA。所得 DNA 使用 DNA 纯化试剂盒纯化, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的质量, DNA 保存于 -80℃ 待用。

**1.4.2 PCR 扩增及纯化:** 分别选择细菌引物 B27f/B907r<sup>[26]</sup> 和古菌引物 A109f/A934r<sup>[25-26]</sup> 进行扩增, 其中 Bac27f 和 Arc934r 的 5' 端使用 6-羧基荧光素 (FAM) 标记。PCR 扩增体系参考 Taq™ 扩增试剂盒的操作说明, 细菌和古菌的 PCR 程序参考我们之前的报道<sup>[18]</sup>。PCR 产物纯化参考试剂盒操作说明。

**1.4.3 酶切及产物纯化:** 用紫外/可见分光光度计 DU 800 测量 PCR 产物浓度。古菌 PCR 产物使用 Taq I 65℃ 酶切 3.5 h, 细菌 PCR 产物采用 Hae III 37℃ 酶切 3.5 h。向酶切产物中加入 3 倍体积的无

水乙醇和 1/10 体积的乙酸钠 (pH 5.2, 3 mol/L), 混匀后 -20℃ 过夜, 17000 × g, 4℃ 离心 30 min 后、弃上清, 加入 70% 冰乙醇 200 μL, 离心 5 min 弃上清, 通风橱中晾干, -20℃ 度保存。

**1.4.4 T-RFLP 分析:** 用适量 ddH<sub>2</sub>O 溶解, 取 1 - 2 μL 上述纯化产物和 0.2 μL 内标 ROX1200 与 9 μL 去离子甲酰胺混合, 在 95℃ 下变性 3 - 5 min, 冰浴 10 min。消化产物在 3130xl 测序仪上进行电泳分析。最终用软件 Gene-mapper 4.0 计算 T-RF 片段的保留时间和相对丰度。

### 1.5 统计分析

采用单因素方差分析不同 pH 缓冲液中的甲烷产量和最大甲烷比生长速率的差异性 (SPSS 16.0, 美国)。采用层级聚类法对不同缓冲液中的细菌和古菌群落进行聚类分析 (SPSS 16.0, 美国)。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同缓冲液中的乙酸产甲烷趋势

由图 1 可知, 菌系 M82 在这几种 pH 缓冲液中均能利用乙酸生长并产生甲烷, 但是产甲烷的延滞期不同。M82 在不添加缓冲液时的产甲烷延滞期约为 20 d, 添加 HEPES、NaHCO<sub>3</sub> 和 PIPES 后, 产甲烷延滞期在 20 - 24 d, 而添加 PB 的甲烷延滞期延长到 40 d 左右。分析产甲烷稳定期的乙酸浓度, 发现在不同 pH 缓冲液中的乙酸几乎都被消耗殆尽 (< 15 mg/L) (表 1), 根据添加乙酸的实验组与不添加乙酸的对照组之间的甲烷产量, 发现只添加乙酸的实验组 (AC +) 中的乙酸转化为甲烷的比例为 (81.3 ± 5.9)%, 而 AC + HEPES 组的是 (76.9 ± 0.8)%, AC + NaHCO<sub>3</sub> 组的 (88.3 ± 0.5)%, AC + PB 组的是 (80.3 ± 0.4)%, AC + PIPES 组的是 (79.3 ± 0.4)% (表 1), 统计分析发现 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组的乙酸转化为甲烷的比例极显著高于其他几组 ( $P \leq 0.01$ ), 也显著高于 AC + 组 ( $P < 0.05$ )。但是在这些不同 pH 缓冲液中, 最大甲烷比生长速率分别为 AC + 组  $0.46 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$ 、AC + HEPES 组  $0.46 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$ 、AC + NaHCO<sub>3</sub> 组  $0.47 \pm 0.05 \text{ d}^{-1}$ 、AC + PB 组  $0.57 \pm 0.11 \text{ d}^{-1}$  和 AC + PIPES 组  $0.46 \pm 0.05 \text{ d}^{-1}$  (表 1)。统计分析发现不同缓冲液中的最大甲烷比生长速率差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

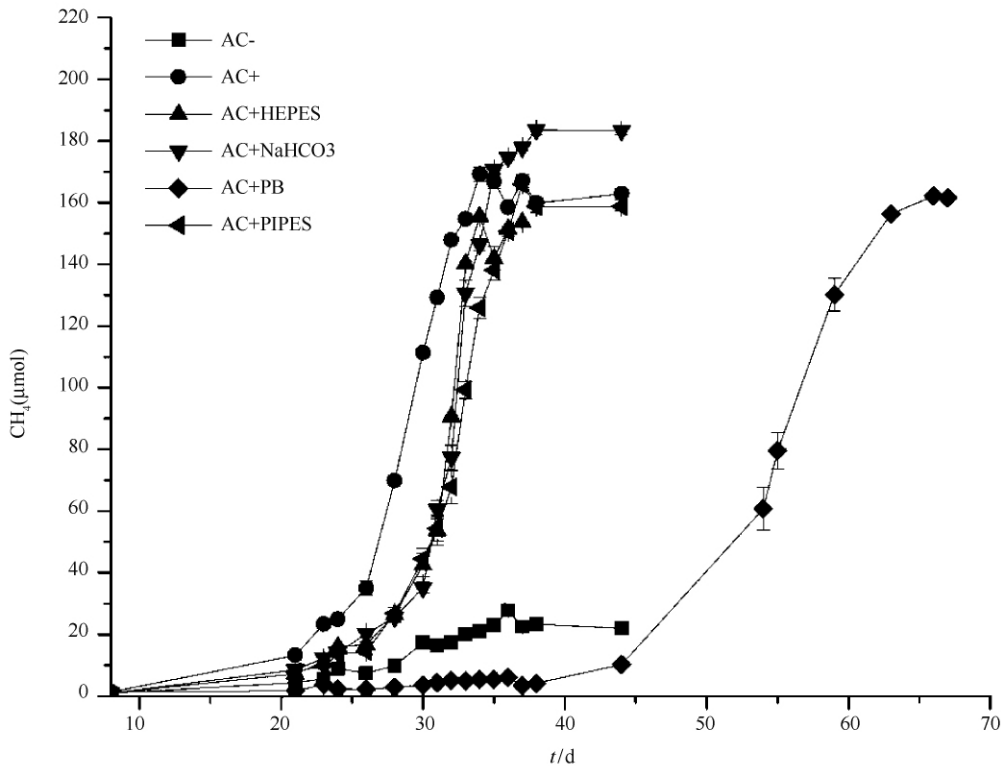


图 1. 不同缓冲液中菌系由乙酸产甲烷趋势

Figure 1. Time course of methane production in consortium of different pH buffer.

表 1. 不同 pH buffer 中的乙酸产甲烷菌系的生长参数

Table 1. The growth parameters of the acetate methanogens in different pH buffers

Buffer solution	Cultivation time/d	Maximum specific growthrate / d <sup>-1</sup>	c (acetate) / (mg/L)	Transformation rate of acetate to methane / %
AC -	44	-	ND	-
AC +	44	0.46 ± 0.08	3.74	81.3 ± 5.9
AC + HEPES	44	0.46 ± 0.04	3.52	76.9 ± 0.8
AC + NaHCO <sub>3</sub>	44	0.47 ± 0.05	14.11	88.3 ± 0.5
AC + PB	66	0.57 ± 0.11	ND	80.3 ± 0.4、
AC + PIPES	44	0.46 ± 0.05	ND	79.3 ± 0.4、

“ND” indicates the data was below the instrument’s minimum detection standard (< 1 mg/L).

## 2.2 T-RFLP 结果和分析

**2.2.1 细菌群落结构:** T-RFLP 分析发现不同缓冲液组的细菌菌群组成类似, 主要是由片段 (T-RFs) 69、77、203、215、222、231、251 和 337bp 组成。结合本课题组之前的 16S rRNA 基因克隆文库数据<sup>[17-18]</sup>, 发现这些细菌类群主要是脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae) (77bp)、热胞菌科 (Thermotogaceae) (203bp)、螺旋菌科 (Spirochaetaceae) (215bp)、厌氧绳菌科 (Anaerolineaceae) (222bp)、unclassified bacteria

(231bp)、互养菌科 (Synergistaceae) (251bp) 和 unculturedWWE1 (337bp) (图 2)。其中不同组之间的主要差异片段是 77、203、251 和 337bp。T-RF 77bp 在 AC - 组、AC + HEPES 组和 AC + PIPES 组的丰度为 32% - 38%, 在 AC + 组与 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组的丰度约为 14%, 在 AC + PB 组中丰度只有 2%。T-RF 203 bp 在 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组中丰度约为 13%, 在 AC + 组和 AC + HEPES 组中丰度约为 8%, 在 AC - 组和 AC + PIPES 组中丰度约为 4%, 在 AC + PB 组中丰度最低为 1%。T-RF 251 bp 在 AC + 组和 AC + PB 组中丰度

为 34% - 37%，在 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组和 AC + PIPES 组中丰度为 24% - 27%，在 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组和 AC - 组中相对丰度为 6% - 7%。T-RF 337 bp 在 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组中丰度最高为 18%，在其他五组中的丰度

为 5% - 10%。通过聚类分析发现 AC + HEPES 组和 AC + PIPES 组聚类最近，其次是 AC + 组和 AC + PB 组聚类较近，而 AC - 组与 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组聚类较近，AC + 组与 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组聚类最远 (图 3)。

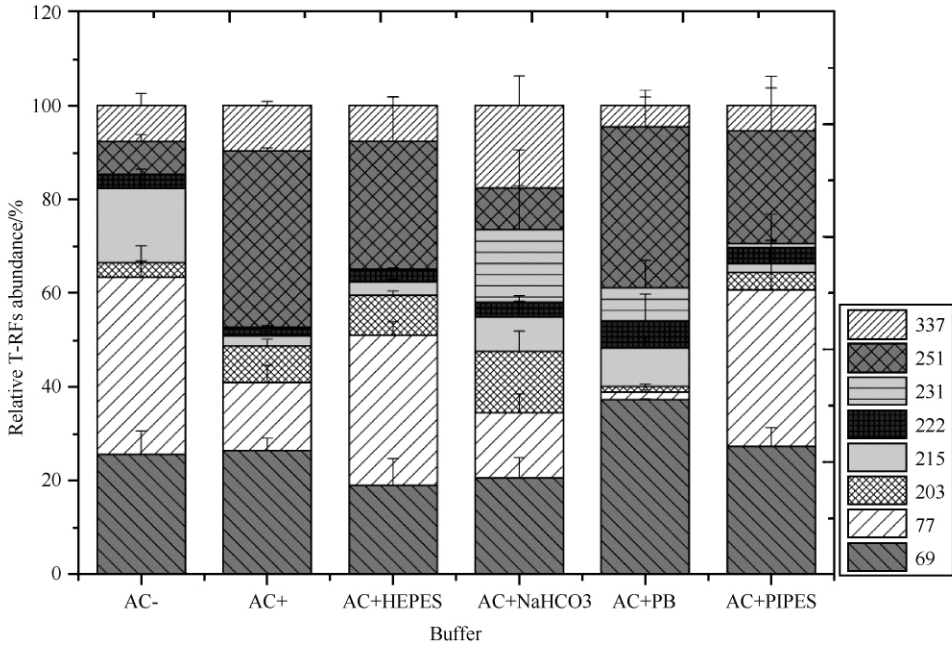


图 2. 不同 pH 缓冲液中细菌 T-RFLP 图

Figure 2. The relative abundance of bacterial T-RFLP profiles in cultures amended with pH buffers.

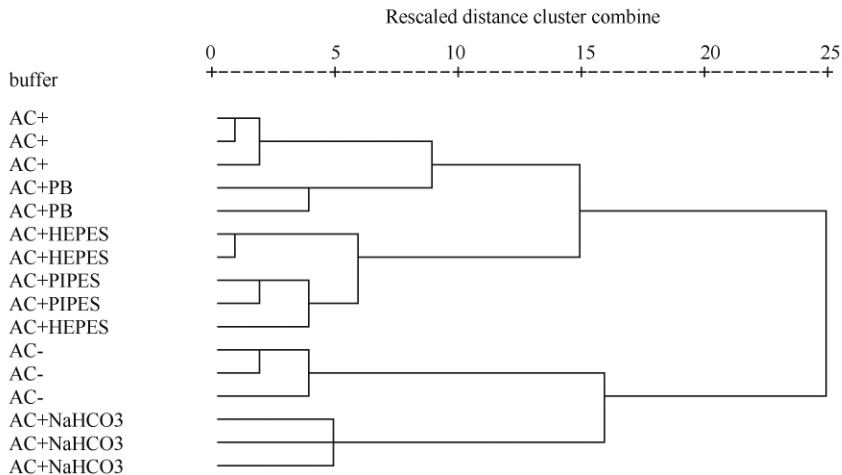


图 3. 基于细菌 T-RF 片段的聚类分析树状图

Figure 3. Clustering analysis of bacterial T-RFs. (Remark: Each group has three replicates, with exception that group AC + PB has duplicates.)

**2.2.2 古菌群落结构:**由图 4 中可以得出不同缓冲液中的古菌主要由 T-RFs 95、228、284 和 495bp 组成。同样的,根据本课题组之前的 16S rRNA 基因克隆文库数据<sup>[17-18]</sup>,发现这些古菌主要属于甲烷杆

菌 (Methanobacteriales) (95bp)、甲烷丝状菌 (Methanosaeta) (228bp)、联合甲烷鬃毛菌 (Methanosaeta concilii) (284bp) 和竹节状甲烷鬃菌 (Methanosaeta harundinacea) (495bp)。

T-RF 95 bp 在 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组中丰度最高为 13%, 在 AC + HEPES 组和 AC + PIPES 组中为 6% - 9%, 在 AC - 组和 AC + PB 组中丰度为 3%, 在 AC + 组丰度最低为 0.5%。T-RF 228 bp 在 AC + PB 组中丰度最低为 0.3%, 在其他组中的丰度为 9% - 14%, T-RF 284 bp 在 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组、AC + PIPES 组和 AC + HEPES 组中丰度范围是 42% - 62%, AC + 组和 AC - 组丰度范围在 16% - 17%, 在 AC +

PB 组中无此片段。T-RF 495 bp 在 AC + PB 组中丰度最高为 97%, 在 AC - 组、AC + 组、AC + HEPES 组、AC + PIPES 组和 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组中丰度依次为 72%、70%、36%、33% 和 16%。聚类分析表明 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组、AC + HEPES 组和 AC + PIPES 组的群落结构比较相似, 聚类在一起, AC - 组和 AC + 组的古菌群落结构类似, 聚类在另外一簇, AC + PB 组明显不同于其他几组, 单独聚为一簇 (图 5)。

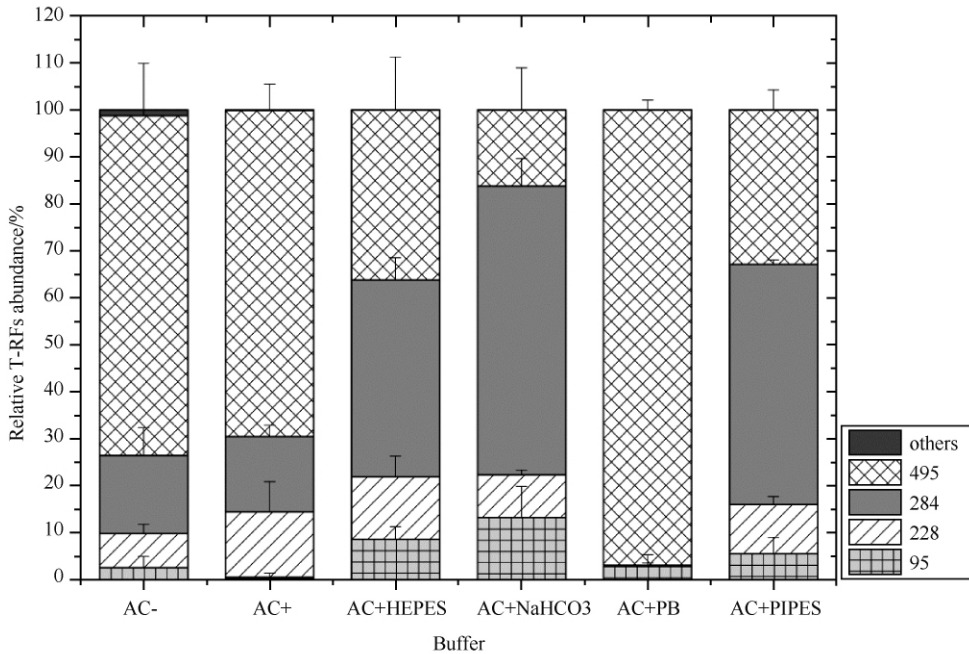


图 4. 不同 pH 缓冲液中古菌 T-RFLP 图

Figure 4. The relative abundance of archaeal T-RFLP profiles in cultures amended with pH buffers.

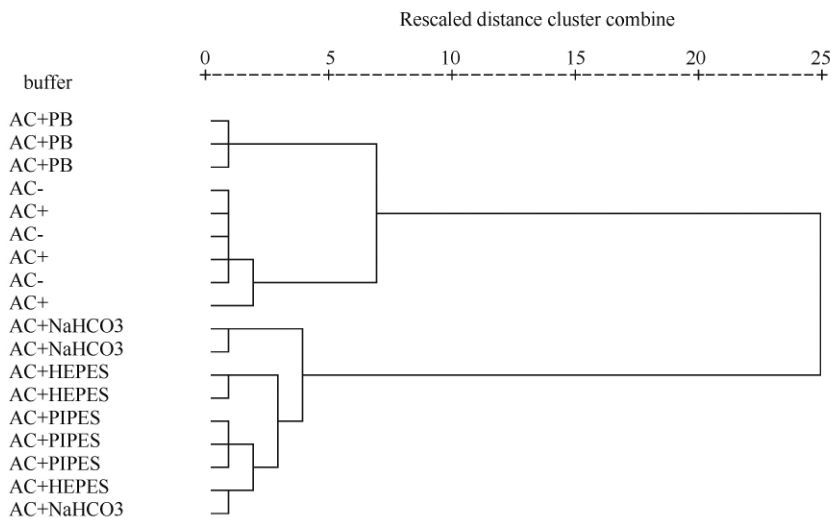


图 5. 基于古菌 T-RF 片段的聚类分析树状图

Figure 5. Clustering analysis of archaeal T-RFs. (Remark: Each group has three replicates.)

### 3 讨论和结论

本文研究发现 pH 缓冲液都不同程度地增加了产甲烷延滞期, 其中 PB 的影响最为明显。已有研究发现 PB 浓度升高会影响水稻根际、牛胃等厌氧发酵过程中的甲烷产量与产甲烷速率<sup>[11-12,27]</sup>, 并且推测 PB 选择性抑制了乙酸营养型产甲烷古菌的代谢作用。在本研究中我们发现添加 PB 组中的古菌主要是与乙酸营养型产甲烷古菌 *M. harundinacea* (T-RF 495 bp) 相近的古菌<sup>[28]</sup>, 而另外一类乙酸营养型产甲烷菌 *M. concilii* (T-RF 284 bp) 几乎完全消失, 这表明 PB 可能会选择性抑制乙酸营养型产甲烷古菌。另外, 我们发现 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组的甲烷产量显著高于其他几组, 同时我们也观察到属于 Methanobacteriales 目的产甲烷古菌的丰度较 AC + 组也明显增加, 这表明可能有更多的 CO<sub>2</sub> 通过氢营养型产甲烷古菌产生, 但是额外的还原力来自哪里呢? 传统观点认为 *Methanosaeta* 只能利用乙酸而不利用二氧化碳生长<sup>[29]</sup>。然而最新的研究表明通过种间电子传递, *Methanosaeta* 可以利用还原二氧化碳产生甲烷<sup>[30]</sup>, 那么在本文研究的乙酸产甲烷体系中, 是否也存在类似的甲烷产生机制呢? 这将有待于进一步的研究。

本研究发现添加不同 pH 缓冲液的微生物群落组成发生了不同的变化, 其中 AC + 组与 AC + NaHCO<sub>3</sub> 组的菌群差异最大, 这可能是由于其中的细菌和古菌类群参与了更多的产甲烷代谢有关。AC + HEPES 和 AC + PIPES 组的细菌和古菌群落都比较相似, 它们的细菌类群与 AC + 组较相似, 但是古菌类群与 AC + 组差异较大。虽然与其他缓冲液相比, AC + PB 组与 AC + 组最相似, 但是我们发现加入 PB 后, 细菌类群中属于 Desulfovibrionaceae 科微生物的明显降低, 而出现了一类未培养微生物 unclassified bacteria (231 bp), 如上面讨论的, 古菌类群也发生明显的演替, 这表明菌系可能通过菌群结构的变化来响应 PB 的胁迫。

本研究发现添加 NaHCO<sub>3</sub>、HEPES、PIPES 和 PB 都不会影响到由乙酸产甲烷的最大比生长速率, 但是添加 NaHCO<sub>3</sub> 会促进乙酸产甲烷量, 而添加 PB 缓冲液会增大由乙酸产甲烷的延滞期。另外添加 PB 和 NaHCO<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub> 缓冲液对微生物群落结构的影响

最大。

**致谢:**感谢中国科学院华南植物园的王俊博士和农业部沼气科学研究所的郭旭晶博士在 SPSS 统计分析软件的使用上给予的指导和帮助。

### 参考文献

- [1] Fang X, Yang W. The current status of petroleum pollution of the ocean and the prevention. *Environmental Science and Management*, 2007, 32 (9) : 78-80. (in Chinese)  
方曦, 杨文. 海洋石油污染研究现状及防治. 环境科学与管理, 2007, 32 (9) : 78-80.
- [2] Boopathy R, Shields S, Nunna S. Biodegradation of crude oil from the BP oil spill in the marsh sediments of Southeast Louisiana, USA. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 167 (6) : 1560-1568.
- [3] 农业部厌氧微生物重点开放实验室. 产甲烷菌及其研究方法. 成都: 成都电子科技大学出版社, 1997.
- [4] Lovley DR. Anaerobes to the rescue. *Science*, 2001, 293 (5534) : 1444-1446.
- [5] Fotidis IA, Karakashev D, Kotsopoulos TA, Martzopoulos GG, Angelidaki I. Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 2012, 83 (1) : 38-48.
- [6] Shigematsu T, Tang Y, Kawaguchi H, Ninomiya K, Kijima J, Kobayashi T, Morimura S, Kida K. Effect of dilution rate on structure of a mesophilic acetate-degrading methanogenic community during continuous cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96 (6) : 547-558.
- [7] Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*, 2008, 99 (10) : 4044-4064.
- [8] Lay JJ, Li YY, Noike T. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. *Water Research*, 1997, 31 (6) : 1518-1524.
- [9] Hao LP, Lü F, Li L, Shao LM, He PJ. Shift of pathways during initiation of thermophilic methanogenesis at different initial pH. *Bioresource Technology*, 2012, 126 : 418-424.
- [10] Lin Y, Lü F, Shao L, He P. Influence of bicarbonate buffer on the methanogenetic pathway during thermophilic anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 2013, 137 :

245-253.

- [11] Lu Y, Wassmann R, Neue HU, Huang C. Impact of phosphorus supply on root exudation, aerenchyma formation and methane emission of rice plants. *Biogeochemistry*, 1999, 47 (2) :203-218.
- [12] Conrad R, Klose M, Claus P. Phosphate inhibits acetotrophic methanogenesis on rice roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (2) :828-831.
- [13] 承磊. 石油烃厌氧生物降解过程中的产甲烷古菌研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2007.
- [14] 张琛. 铵影响厌氧反应器污泥丙酸和丁酸互营氧化产甲烷过程的机理. 中国农业大学博士学位论文, 2013.
- [15] Cai M, Chi C, Guan Y, Tang Y, Wu X, Li G. Methanogenesis from anaerobic crude oil degradation amended with CO methanogenesis from anaerobic crude oil degradation amended with CO<sub>2</sub>. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2012, 18 (5) : 775-779. (in Chinese)  
蔡曼, 池昌桥, 关越, 汤岳琴, 吴晓磊, 李国英, 石油厌氧降解促进 CO<sub>2</sub> 的 CH<sub>4</sub> 转化, 应用与环境生物学报, 2012, 18 (5) :775-779.
- [16] Bartscht K, Cypionka H, Overmann J. Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 1999, 28 (3) :249-259.
- [17] Cheng L, Ding C, Li Q, He Q, Dai LR, Zhang H. DNA-SIP reveals that Syntrophaceae play an important role in methanogenic hexadecane degradation. *PLoS One*, 2013, 8 (7) :1-11.
- [18] 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. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 2013, 83 (3) : 756-766.
- [19] Macy JM, Snellen JE, Hungate RE. Use of syringe methods for anaerobiosis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1972, 25 (12) :1318-1323.
- [20] Widdel F, Boetius A, Rabus R. The Prokaryotes: Ecophysiology and Biochemistry. 3<sup>rd</sup> eds. New York: Springer ScienceBusiness Media, 2006:1028-1049.
- [21] He Q, Ding C, Li G, Chen H, Cheng L, Zhang H. Methane-generating potential of coal samples with different maturity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (12) :1187-1197. (in Chinese)
- 何乔, 丁晨, 李贵中, 陈浩, 承磊, 张辉. 不同成熟度煤样产甲烷潜力, 微生物学报, 2013, 53 (12) :1187-1197.
- [22] Lueders T, Manefield M, Friedrich MW. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology*, 2004, 6 (1) :73-78.
- [23] Lu Y, Lueders T, Friedrich MW, Conrad R. Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 2005, 7 (3) :326-336.
- [24] Cheng L, He Q, Ding C, Dai LR, Li Q, Zhang H. Novel bacterial groups dominate in a thermophilic methanogenic hexadecane-degrading consortium. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 2013, 85 (3) :568-577.
- [25] Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. 2<sup>nd</sup> eds. Chichester: John Wiley and Sons, 1991:205-248.
- [26] Großkopf R, Janssen PH, Liesack W. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (3) :960-969.
- [27] Zhang DF, Yang HJ. Effects of different levels of phosphate in comparison with citrate buffer in culture media on *in vitro* ruminal fermentation and methanogenesis of a starch-rich feed mixture. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6 (38) : 6742-6747.
- [28] 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.
- [29] McGenity T, van Der Meer JR, De Lorenzo V. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. ed. Berlin Heidelberg: Springer, 2010:595-604.
- [30] Rotaru AE, Shrestha PM, Liu F, Shrestha M, Shrestha D, Embree M, Zengler K, Wardman C, Nevin KP, Lovley DR. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane. *Energy & Environmental Science*, 2014, 7 (1) : 408-415.



# Effects of pH on methanogenesis and methanogenic community in the cultures amended with acetate

Tingting Ma, Lei Cheng, Zhenzhen Zheng, Qianshan Qin, Lirong Dai, 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] To evaluate the effects of pH on methane production from acetate and the methanogenic community structures. [Methods] Solutions of phosphate (PB), 2-hydroxyethyl (HEPES),  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$  or piperazine-1, 4-bisethanesulfonic acid (PIPES) were added into the methanogenic cultures, separately. The substrate consumption was determined by monitoring cumulative methane production, the methanogenic community structures in the stationary-phase cultures were analyzed using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) of 16S rRNA gene fragments. [Results] The period of lag phase of methane production in the PB addition culture (ca. 40 d) was much longer than that in other pH buffer cultures (20 – 24 d,  $P < 0.05$ ). Approximate 88.3% of acetate was converted into methane in the  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$  addition culture, while the value decreased to 77% – 81% in other pH buffer cultures ( $P < 0.05$ ). The maximum specific methane production rate was similar between different pH buffer cultures ( $P > 0.05$ ). The relative abundance of members of unclassified bacteria, Spirochaetaceae and uncultured WWE1 increased to  $(15.5 \pm 9.4)\%$ ,  $(7.3 \pm 4.6)\%$  and  $(17.6 \pm 6.3)\%$ , respectively, in the  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$  addition culture, while synergistaceae decreased to  $(8.9 \pm 8.1)\%$ . In archaeal domain, the acetotrophic methanogen related with *Methanosaeta harundinacea* became predominant ( $97 \pm 2\%$ ) in the PB buffer culture, on the contrary, the concurrence of *M. harundinacea*, *M. concilii* and hydrogenotrophic methanogen related with Methanobacteriales were detected in the cultures amended with HEPES, PIPES and  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$ . [Conclusion] PB retarded the methane production in the acetate methanogenic culture,  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$  addition improve methane production from acetate, the pH buffers had not obvious effects on the maximum specific methane production rate of the cultures, the microbial community structures obviously changed along with PB and  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$  addition. The research would help us to design suitable condition for the growth of methanogenic culture.

**Keywords:** pH buffer, acetate, methanogenic, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370060, 41173088) and by the Chinese Academy of Agricultural Sciences Basic scientific Research Business Expenses (2013ZL001)

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

Received: 19 March 2014/ Revised: 19 May 2014