



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Environmental Engineering—Article

## 长期培养和宏组学分析揭示了烃污染环境中的甲基营养型产甲烷途径

刘一凡<sup>a,d,e,#</sup>, 陈静<sup>a,e,#</sup>, 刘忠林<sup>a</sup>, 侯兆伟<sup>b</sup>, 梁波<sup>a,e</sup>, 王立影<sup>a,e</sup>, 周蕾<sup>a,e</sup>, 寿利斌<sup>a,e</sup>, 林丹丹<sup>a,e</sup>, 杨世忠<sup>a,e</sup>, 刘金峰<sup>a,e</sup>, 伍晓林<sup>b,\*</sup>, 顾继东<sup>c</sup>, 牟伯中<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> State Key Laboratory of Bioreactor Engineering and School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

<sup>b</sup> Exploration and Development Research Institute of Daqing Oilfield Company Limited, PetroChina, Daqing 163712, China

<sup>c</sup> Environmental Engineering and Engineering Group, Guangdong Technion Israel Institute of Technology, Shantou 515063, China

<sup>d</sup> Shanghai Institute of Pollution Control and Ecological Security, Shanghai 200092, China

<sup>e</sup> Engineering Research Center of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR), East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 April 2021

Revised 14 July 2021

Accepted 4 August 2021

Available online 10 January 2022

#### 关键词

烃降解产甲烷

含油污泥

生物修复

烷烃

### 摘要

针对石油烃污染的厌氧环境,利用微生物的代谢作用将石油烃转化为甲烷是一种潜在的生物修复策略。然而,目前对于微生物厌氧降解产甲烷的机制尚不清楚。经过10年的持续富集和转接培养,获得了一种能够降解正构烷烃( $C_{15}$ ~ $C_{20}$ )并且产甲烷富集培养体系。经过转接培养后,该培养物甲烷生产的动力学特性得到了持续的提高。综合宏基因组和宏转录组的结果,发现正构烷烃主要通过 Desulfosarcinaceae、Firmicutes 和 Synergistetes 菌,利用富马酸加成的方式进行起始活化,然后在 *Tepidiphilus* 菌的协同作用下进一步降解。同时,体系中含量较多的 Anaerolineaceae 菌主要负责死细胞生物物质的回收。根据宏转录组学分析结果,甲烷主要通过  $H_2$  依赖的甲基营养型产甲烷途径产生,主要由候选门 Verstraetearchaeta 内的 Methanomethyliaceae 利用死细胞生物物质回收代谢过程中产生的三甲胺来产生甲烷。这些发现表明,依赖  $H_2$  的甲基营养产甲烷菌以及甲基营养产甲烷菌可能在含石油烃的地下生态系统的碳循环过程中发挥着重要的作用。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

原油的全球性分布以及原油衍生产品的广泛应用导致了不同环境中都存在着石油烃污染的情况[1]。烷烃是原油的主要成分之一,也是烃污染环境中的主要污染物[2]。在有机物含量高的污染环境内部往往会形成缺氧环境,在这种缺少氧气或硝酸盐、铁(III)和硫酸盐等电子受体的情况下,烷烃可以由微生物降解转化为甲烷[3–4]。尽管

从最早报道的正十六烷降解产甲烷的富集培养体系开始[5],关于微生物降解石油烃产生甲烷的研究已经进行了二十多年,但是对于烷烃降解产甲烷的机制尚未得到充分的认识。

目前的多项研究表明,烷烃降解产甲烷需要不同类型微生物的共同代谢作用来完成[6],包括由共生/发酵菌对烷烃化合物中的惰性 C–H 键进行起始活化作用,接着逐步降解转化为产甲烷菌的代谢底物(如甲酸盐、 $H_2$  和乙

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [wuxldq@petrochina.com.cn](mailto:wuxldq@petrochina.com.cn) (X.-L. Wu), [bzmu@ecust.edu.cn](mailto:bzmu@ecust.edu.cn) (B.-Z. Mu).

# These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2023, 24(5): 264–275

引用本文: Yi-Fan Liu, Jing Chen, Zhong-Lin Liu, Zhao-Wei Hou, Bo Liang, Li-Ying Wang, Lei Zhou, Li-Bin Shou, Dan-Dan Lin, Shi-Zhong Yang, Jin-Feng Liu, Xiao-Lin Wu, Ji-Dong Gu, Bo-Zhong Mu. Long-Term Cultivation and Meta-Omics Reveal Methylo-trophic Methanogenesis in Hydrocarbon-Impacted Habitats. *Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.08.027>

酸盐等), 下游的产甲烷菌会不断消耗这些底物并保持在极低的浓度水平上, 从而使得整个降解反应在热力学上变得可行[7]。

在细菌群落组成中, Deltaproteobacteria (特别是 *Smithella* 菌属) 经常在不同来源的低温和高温烃降解产甲烷富集培养体系中被检测到, 有时甚至占主要地位[5,8-12]。同时, 越来越多的基于单细胞和宏基因组测序的研究显示, *Smithella* 菌的基因组中含有编码烷基琥珀酸合成酶 (ASS) 的基因[9-10], 该酶通过富马酸加成反应的方式对烷烃进行起始活化。与此同时, 基于宏转录组和逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 分析的研究也已经证明了 *Smithella* 菌的 *assA* 基因在烃降解产甲烷的过程中得到了表达[9-10]。基于以上研究, 目前认为 *Smithella* 菌是主要的“烷烃厌氧降解菌”之一[11-12]。

另外, 烃降解产甲烷培养体系中的古菌群落通常由氢营养型产甲烷菌 (如 *Methanocalculus* 和 *Methanoculleus*) 和乙酸裂解型产甲烷菌 (如 *Methanosaeta*) 组成[6,10,13]。此前一项烃降解产甲烷的富集培养实验[5]证明了, 超过 2/3 的甲烷是由乙酸转化而来的, 而相关的热力学计算结果也表明体系中的乙酸产甲烷途径更有优势[14]。与此同时, 通过收集高度降解的中温 Peace River 油砂中的 CO<sub>2</sub> 和甲烷气体, 并针对其中的同位素特征建模, 发现氢营养型产甲烷途径在地下环境的烃厌氧降解过程中占主导地位, 其中最容易降解的烃类化合物为直链烷烃[15]。另一项研究使用了稳定同位素核酸探针技术 (DNA-SIP), 在培养体系中添加了 <sup>14</sup>C 标记的碳酸盐和乙酸盐作为底物, 结果揭示了氢营养型产甲烷的生成速率是乙酸裂解产甲烷生成速率的 42~68 倍[16]。此外, 对油藏的产出水样品[18]和烷烃降解培养体系[9,17]的宏转录组的分析表明, 氢营养型和乙酸甲烷生成是烷烃厌氧降解转化为甲烷的主要途径。这些结果都表明, 在缺氧环境中, 氢营养型和乙酸裂解型产甲烷途径是烷烃厌氧降解转化为甲烷途径[8]。然而, 尽管在不同的含烃环境中也能够检测到甲基营养型产甲烷古菌 (如 *Methanohalophilus*、*Methanobulbus* 和 *Methanosarcina*), 但在烃降解产甲烷过程中利用甲基化合物的产甲烷途径, 如甲基营养型和 H<sub>2</sub> 依赖的甲基营养型产甲烷途径往往被人们所忽略[19-20]。此外, 尽管从甲基化合物转化为甲烷是可能实现的, 但是目前还没有研究明确证明烃降解过程会产生此类甲基化合物[21]。

在早先的研究中, Wang 等[22]从油泥中获得了产甲烷的富集培养物, 并且在转接培养体系中加入了正构烷烃 (C<sub>15</sub>~C<sub>20</sub>) 作为唯一的碳源和能源来源。随后, Liang 等[19]通过第二次转接, 在培养了超过 1300 天后获得了稳

定的烃降解产甲烷富集培养体系。基于 16S 核糖体 RNA (rRNA) 基因和甲基辅酶 M 还原酶基因 (*mcrA*) 扩增子克隆文库的系统发育分析结果, 发现 Anaerolineaceae 和 *Methanosaeta* 分别是细菌和古菌群落中的主要组成[19]。因此, Anaerolineaceae 被认为在烷烃厌氧氧化中发挥重要作用, 而 *Methanosaeta* 在体系中主要利用乙酸来产生甲烷[19]。然而, 由于缺乏纯培养单菌和基因组信息, Anaerolineaceae 和其他微生物在体系中的确切功能仍然不明确。

为了研究烷烃降解产甲烷的机理并阐明群落中不同微生物的作用, 从上述长期培养的烷烃 (C<sub>15</sub>~C<sub>20</sub>) 降解产甲烷富集培养物中进行了第三次转接培养。在甲烷生产的对数生长末期收获细胞, 并通过结合宏基因组学和宏转录组学方法研究了体系中的微生物代谢潜力和转录活性。

## 2. 方法与材料

### 2.1. 富集培养体系的建立

在此前的研究中, 以上海炼油厂的油泥 (OS) 样品为接种源建立了最初的烃降解产甲烷富集培养体系[22]。本研究中的富集培养物 (第三次转移) 是按照之前的方法[23-24], 接种了第二次转移的培养物中的 10 mL 培养基 (20% V/V), 并添加了正构烷烃混合物 (C<sub>15</sub>~C<sub>20</sub>)。具体为在 120 mL 高压灭菌的血清瓶中, 加入 40 mL 的无菌基础培养液 (0.20 g·L<sup>-1</sup> NaCl、1.20 g·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、0.10 g·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.25 g·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl、0.20 g·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.30 g·L<sup>-1</sup> KCl、2.50 g·L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>、0.0001 g·L<sup>-1</sup> 刃天青), 以及 1.0 mL 维生素和微量元素预混液[20]。添加 0.50 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O 还原基础培养液, 并调节最终 pH 值为 7.2, 之后用丁基橡胶塞和铝卡箍 (Bellco Glass, Inc., 美国) 密封瓶口。每个样品做三个重复组, 添加每种正构烷烃 (C<sub>15</sub>、C<sub>16</sub>、C<sub>17</sub>、C<sub>18</sub>、C<sub>19</sub> 和 C<sub>20</sub>) 15 μmol [23], 避光在 37 °C 条件下培养。

### 2.2. 顶空气体检测

通过气相色谱 (GC; Agilent 6890, Agilent Technologies, Inc., 美国) 定期检测甲烷的积累, 采用前期建立的甲烷标准曲线 ( $R^2 = 0.994, n = 6$ )。具体操作为, 使用无菌微型注射器将 200 μL 的样品顶空气体注入 GC 检测口。GC 升温程序如下: 初始柱温设置为 60 °C, 持续 12 min, 以 15 °C·min<sup>-1</sup> 的速率升至 200 °C, 并在 200 °C 下保持 24 min。保持进样口、火焰电离检测器和热导检测器的温度为 200 °C。

### 2.3. 甲烷产生的动力学模型

根据文献可知, Gompertz 模型的修正方程[方程(1)]是最适用于拟合微生物生长的模型之一[25]。假设甲烷产生速率与微生物生长速率成比例, 采用修正的 Gompertz 模型计算得到甲烷产生的延滞期、最大甲烷产生速率和最大甲烷产量潜力等数据。改进的 Gompertz 模型如下:

$$Y = A_m \times \left\{ -\exp \left[ \frac{V_m \times e}{A} (t_{\text{lag}} - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

式中,  $Y$  表示累计培养时间  $t$  (单位为 d) 时反应器中累计的生物气体产量 ( $\mu\text{mol}$ );  $A_m$  是最大甲烷产量潜力 ( $\mu\text{mol}$ );  $V_m$  是最大甲烷产生速率 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{d}^{-1}$ );  $t_{\text{lag}}$  是延滞期 (d);  $e$  是自然常数 (2.7183)。其中,  $A_m$ 、 $V_m$  和  $t_{\text{lag}}$  数值是使用 Origin8.0 (Originlab Corporation, 美国) 软件, 对三个平行样品的数据进行估算得到的。

### 2.4. PCR 扩增

本文使用的 *assA* 基因的 PCR 引物是根据前文报道[19]合成的。PCR 条件如下: 首先在  $95^\circ\text{C}$  下反应 5 min; 随后进行 38 次循环, 每次循环都在  $95^\circ\text{C}$  条件下反应 30 s; 在  $52\sim 58^\circ\text{C}$  下反应 45 s; 在  $72^\circ\text{C}$  下反应 60~90 s; 最后在  $72^\circ\text{C}$  下反应 10 min。具体的引物退火温度和延伸时间参照制造商的说明书 (见附录 A 中的表 S1)。

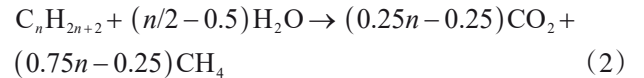
### 2.5. 化学成分分析

在培养末期, 使用具有 HP-5MS 毛细管柱 ( $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ ) 的气相色谱-质谱仪 (GC-MS; Agilent 6890 GC) 检测富集培养物中残留的烷烃和中间代谢产物脂肪酸, 其中 5975 质谱检测器采用全扫描模式 (Agilent Technologies, Inc.) [19]。为了提取降解残留的烷烃, 向血清瓶中加入  $50.0\text{ }\mu\text{L}$  十六烷基氯化物作为内参标准品, 然后使用正己烷进行提取, 随后用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  进行干燥。将有机相移入新的小瓶中, 用氮气吹扫进行浓缩。随后, 使用以下程序设置将萃取产物注入 GC-MS: 在  $120^\circ\text{C}$  的初始柱温下保持 3 min, 然后以  $8^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率升至  $260^\circ\text{C}$  并保持 10 min。针对内参标准品 (十六烷基氯化物) 和  $\text{C}_{15}\sim\text{C}_{20}$  范围内的烷烃的 GC 峰面积进行积分, 以获得烷烃/标准的峰面积比值。最后, 根据峰面积比确定每种烷烃的数量。

从三个平行样品中分别取 5 mL 的培养基, 加入氨水将 pH 值调节到 12 以上, 检测长链脂肪酸 (LCFA) 和挥发性脂肪酸 (VFA)。接着在  $110^\circ\text{C}$  的烘箱中干燥, 然后添加 0.5 mL 10% 丁醇/硫酸盐溶液, 在  $90^\circ\text{C}$  下酯化 60 min。接着采用 0.5 mL 正己烷和 0.5 mL 正十二烷提取酯化衍生物, 并注入 GC-MS 进行检测。对于 LCFA 分析,

将柱温保持在  $120^\circ\text{C}$ , 持续 3 min, 并以  $8^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率升高至  $260^\circ\text{C}$  并保持 10 min。相反, 对于 VFA 分析, 将柱温保持在  $60^\circ\text{C}$ , 持续 1 min, 然后以  $15^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率升至  $130^\circ\text{C}$ 。

使用 Buswell 方程[25]计算理论甲烷产量, 该方程代表了烷烃完全氧化成甲烷和  $\text{CO}_2$  的降解反应[公式(2)]。针对该方程进行修改, 以考虑烷烃不完全氧化的中间代谢产物或末端产物[公式(3)] [23]。



$$\text{Carbon}'_{\text{consumed alkanes}} = \text{Carbon}_{\text{consumed alkanes}} - \sum \text{Carbon}_{\text{intermediates}} \quad (3)$$

为了测量培养基中的阳离子和阴离子, 在三个平行样品中分别取 2 mL 培养基并离心, 取上清液并进一步过滤以除去细胞。使用配备了 IonPac AS11-HC (Thermo Scientific, 美国) 柱的 ICS-1100 型离子色谱分析仪 (Dionex, 美国) (温度:  $30^\circ\text{C}$ ; 溶剂: KOH 洗脱; 检测器: 电导检测器和安培检测器; 抑制剂: 负离子抑制剂 SHY-A-6; Shine Technology, 中国) 来检测  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  和  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  的阴离子浓度。同时, 使用配备了 IonPac CS17 (Thermo Scientific, 美国) 柱的离子色谱仪模型 IC25A (Dionex, 美国) (温度:  $35^\circ\text{C}$ ; 溶剂:  $20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甲烷磺酸异构洗脱; 检测器: 电导检测器; 抑制剂: 阳离子抑制剂 CERS-500 Thermo Scientific) 测量  $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、甲基胺、二甲基胺和三甲基胺的阳离子浓度。使用配有 SH-CC 3 (Shine Technology, 中国) 柱的离子色谱分析仪模型 CIC-D120 (Shine Technology, 中国) 检测  $\text{Na}^+$  离子和氨根离子浓度。

### 2.6. DNA/RNA 提取和 16S rRNA 高通量测序

在厌氧培养超过 1400 天后, 使用 PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo BIO, 美国) 和 PowerMicrobiome™ RNA Isolation Kit (MO BIO) 试剂盒分别从三个平行样品的离心沉淀物中提取总 DNA 和 RNA。为了富集得到信使 RNA (mRNA), 使用 Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) (Illumina®, 美国) 试剂盒从总 RNA 中除去 rRNA。采用前文所述的方法[9]合成互补 DNA (cDNA)。使用 PCR 引物 515F/907R [26] 和 344F/915R [27] 分别扩增细菌和古菌的 16S rRNA 基因。将 16S rRNA 基因扩增子文库在 Illumina HiSeq 2500 平台上进行测序, 生成 250 bp (碱基对) 的末端配对读序。经过质控和过滤等处理手段后, 将末端配对的读序合并, 并进一步去除接头和引物序列 [11]。最后, 将获得的高质量序列在 97% 的相似性水平上

聚类, 并比对 SILVA 数据库 (版本 123; 德国) [28] 分别进行物种分类注释。

## 2.7. 宏基因组和宏转录组测序

采用 NEB Next<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> DNA Library Prep Kit for Illumina<sup>®</sup> (New England Biolabs, 美国) 试剂盒, 按照制造商的手册构建宏基因组测序和宏转录组测序文库, 并添加索引代码。使用 Qubit 3.0 荧光计 (Life Technologies, 美国) 和 Agilent 4200 (Agilent Technologies, Inc.) 系统评估测序文库质量。最后, 在 Illumina HiSeq X-ten 平台上进行测序, 生成 150 bp 的末端配对读序。

## 2.8. 宏基因组拼接和分箱操作

采用默认设置下的 Trim\_galore ([http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)) 软件对宏基因组的原始读序进行质控和过滤, 同时去除接头和引物序列。采用 metaSPAdes v3.7.0 软件, 在 ' $k\text{-mer} = 127$ ' 条件下对宏基因组读序进行组装 [29], 并移除所有长度小于 500 bp 的拼接序列片段 (contigs)。使用 Bowtie 2 [30] 进行读序比对, 删除比对结果质量小于 3 的读序 [31], 过滤模糊的比对结果。最终的序列比对结果 (SAM) 文件使用 SAMtools v1.6 [32] 进行排序并转换成二进制的比对文件 (BAM)。运用三种基于不同聚类算法的分箱工具将得到的 contigs 分箱为单个基因组, 包括: ① 基于期望最大化算法的 MaxBin 2 v2.2.3 [33], 分别使用细菌和古菌的 107 个和 40 个管家基因集合, 根据测序覆盖度和四核苷酸频率的不同来区分属于不同基因组的 contigs。② MetaBAT2 v0.32.4 [34], 利用四核苷酸频率和测序覆盖度差异进行  $k\text{-medoid}$  聚类。③ CONCOCT v0.4.0 [35] 基于高斯混合模型, 根据四核苷酸频率和测序覆盖度差异进行聚类。将不同软件生成的基因组输入到 DAS Tool (v1.1.1) 进行合并和去冗余, 生成优化的宏基因组组装基因组 (MAG) [36]。进一步在 RefineM v0.0.23 软件 [37] 中, 根据不同鸟嘌呤和胞嘧啶含量 (GC-content)、测序覆盖度和四核苷酸频率三个参数, 在 95% 置信度区间内剔除污染序列。之后, 使用 Anvi'o v5 [38] 进行人工检查。简要地说, MAG 根据其测序覆盖度和 GC 含量来聚类。如果被聚类的相近的基因组具有互补性, 并且没有重复序列, 那么这些基因组将被合并。

## 2.9. 物种分类和功能注释

对处理后的基因组采用 Prodigal v2.6 软件 [39], 以 meta 模式生成蛋白编码序列 (CDS)。然后, 将蛋白编码序列文件提交到 GhostKOALA 服务器 [40], 在原核物种数据

库中注释得到 KEGG (KO) 号。此外, 使用 dbCAN web 服务器 [41] 识别其中的碳水化合物酶基因 [42] (覆盖度大于 0.40;  $E\text{-value} < 1 \times 10^{-18}$ ; 相似度高于 30%)。此外使用 Blastp 软件识别参与厌氧碳氢化合物降解的基因 (覆盖度大于 0.40;  $E\text{-value} < 1 \times 10^{-20}$ ; 相似度高于 30%) [42]。针对氢酶的注释, 首先使用 HMMER (v3) 软件 [43] ( $E\text{-value} < 1 \times 10^{-20}$ ), 以前期建立的氢酶的 HMM 模型进行氢酶序列的识别, 将疑似序列提交到 HydDB web 服务器 [44] 中, 进一步分类为不同的氢酶家族。同时还将基因组序列上传至 RAST 服务器, 进行功能注释 [45]。对于没有分装到基因组的序列, 使用 Kaiju 软件 [46] 以 '贪婪' 算法模式 ('Greedy' mode) 在 NCBI 的 *nr\_euk* 数据库 (2018-7-20) 中进行分类。最后, 对于基因组的物种分类注释主要是基于 GTDBtk (版本 86) 软件的预测 (<https://github.com/Ecogenomics/GTDBtk>), 该软件采用相对进化距离度量来预测分类 [47]。同时, 将以上得到的基因组物种注释结果同 16S rRNA 基因序列的物种注释结果相互比较以验证准确性。

## 2.10. 基因组测序覆盖和基因 FPKM 计算

为了估算基因组的测序覆盖, 将前期得到的序列拼接文件、宏基因组数据比对结果文件和宏转录组比对结果文件导入至 Anvi'o v5 [38] 软件中, 估算每个基因组的内四分位数 (Q2 和 Q3) 的平均测序覆盖度。同时, 使用 eXpress v1.5.1 [48] 软件计算单个基因的转录组 FPKM 值 (每百万个比对读序外显子模型的每千碱基片段数)。

## 2.11. 系统发育分析

使用 checkM v1.0.16 [37] 中的 'ssu\_finder' 功能, 得到基因组中的小亚基 rRNA 基因, 并保留长度大于 400 bp 的序列进行系统发育分析。所选序列使用 MAFFT [49] 软件的迭代细化方法 'G-INS-i' 进行对齐, 随后手动优化 (保留低于 10% 空缺的列)。将所有参考基因组 (在附录 A 的表 S2 中列出) 和本研究得到的基因组汇总到 PhyloPhlAn v0.99 中来构建基因组系统发育进化树。该软件通过提取和对齐 400 个保守的蛋白质序列 [50], 然后串联对齐后的蛋白质氨基酸序列以构建进化树。使用 IQ-tree v1.6.7 软件进行最大似然树的构建, 在标准模型选项下通过超快速 'bootstrap' 条件构建了 1000 个树文件, 并得到代表性树文件。树还使用 Inkscape v0.92.3 (<https://inkscape.org/>) 进行装饰, 并使用 iTOL 进行可视化 [51]。

## 2.12. 数据可用性

本研究所涉及的所有原始序列数据均已提交到 NCBI

数据库的PRJNA792315项目下。

### 3. 结果

#### 3.1. 连续10年富集培养

在本研究中,使用OS样品作为接种源,以正构烷烃的混合物( $C_{15}\sim C_{20}$ )作为唯一的碳源和能源建立了富集培养基[19,22]。经过10年的培养和三次连续转接后,发现该培养体系的产甲烷动力学参数(延滞期、最大甲烷产生速率和最大甲烷产量潜力)得到了改进(见图1和附录A中的图S1)。在第三次转移后,培养体系在延滞期267.1天后的1413天内总共产生了352  $\mu\text{mol}$ 甲烷(通过将数据拟合到修正的Gompertz模型[24,52]中进行预测)(见图1和附录A中的图S1)。培养结束后,几乎所有的烷烃都被降解了(见附录A中的表S3),同时在培养基中检测到了疑似降解的中间代谢产物,包括十八烷酸酯、十六烷酸酯、四十二烷酸、十二酸、丁酸、丙酸、乙酸和甲酸(见附录A中的表S4)。经过计算发现,第三次转接培养体系中检测到的甲烷占理论产量的63.4%~71.5%。

#### 3.2. 微生物群落演替

在第三次转接培养的甲烷生产末期,收集了培养体系中的菌体进行核酸测序(图1)。根据16S rRNA基因测序分析结果,微生物群落结构在培养期间变化很大(图2)。与第二次转接相比,4个主要的细菌谱系(Enterobacteria-

ceae、Unclassified\_Cloacimonadales、Ignavibacteriaceae和Leptospiraceae)的相对丰度在第三次转接体系中减少了50%以上(图2)。在第三次转接体系中,Hydrogenophila-ceae、Anaerolineaceae和Desulfosarcinaceae成为优势菌,共计占细菌群落组成的80%以上(图2)。同时还发现,Syntrophaceae、Synergistaceae、Thermodesulfobionaceae和Kosmotogaceae等细菌谱系在OS样品、初始培养体系和第一次转接体系中都可以被检测到,但是到了第二次转接就低于检测限以下,然而在第三次转移中又以较低丰度被检测到(图2)。这个现象说明这些细菌在样品中的相对丰度较低,在以往的低通量测序手段中可能会被忽略[19]。

在所有样品中,古菌群落都主要由产甲烷菌组成,包括Methanomicrobiaceae、Methanosactaceae、Methanosarcinaceae、Methanoregulaceae和Methanocorpusculaceae。然而,与第二次转接样品相比,第三次转接样品中的优势古菌从Methanosactaceae(在第二次转接中为95.9%)变成了Methanosarcinaceae(51.2%)。在第三次转接样品中,检测到了Methanomethyliaceae(22.4%)菌,这是第一次在样品中检测到候选门Verstraetearchaeota。需要注意的是,因为研究的时间跨度较大,不同转接样品在16S rRNA基因扩增测序中使用的PCR引物和测序技术都不同,这也可能引入扩增偏好性,从而引起微生物组成结果的误差[19,22]。

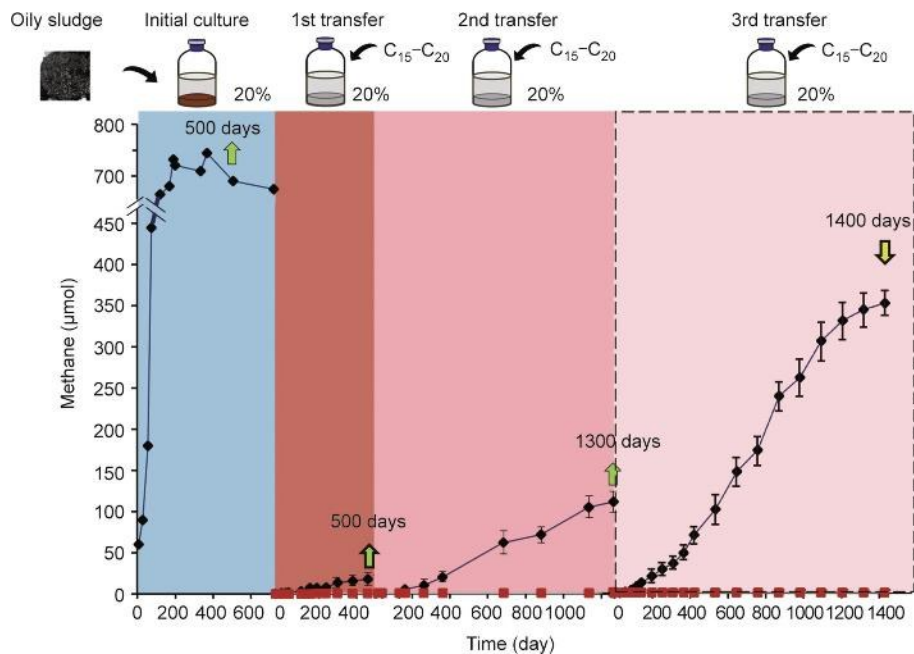


图1. 烃降解产甲烷富集的三次转接培养物中的甲烷累积图。其中第三次转接的甲烷数据用虚线标出。黑色方块曲线表示添加了正构烷烃混合物( $C_{15}\sim C_{20}$ )的培养体系,红色方块曲线表示不含正构烷烃的对照组。误差条表示三组平行样品的平均值的标准误差。转接时间点用绿色箭头标出,宏基因组和宏转录组测序的时间点用黄色箭头标出。

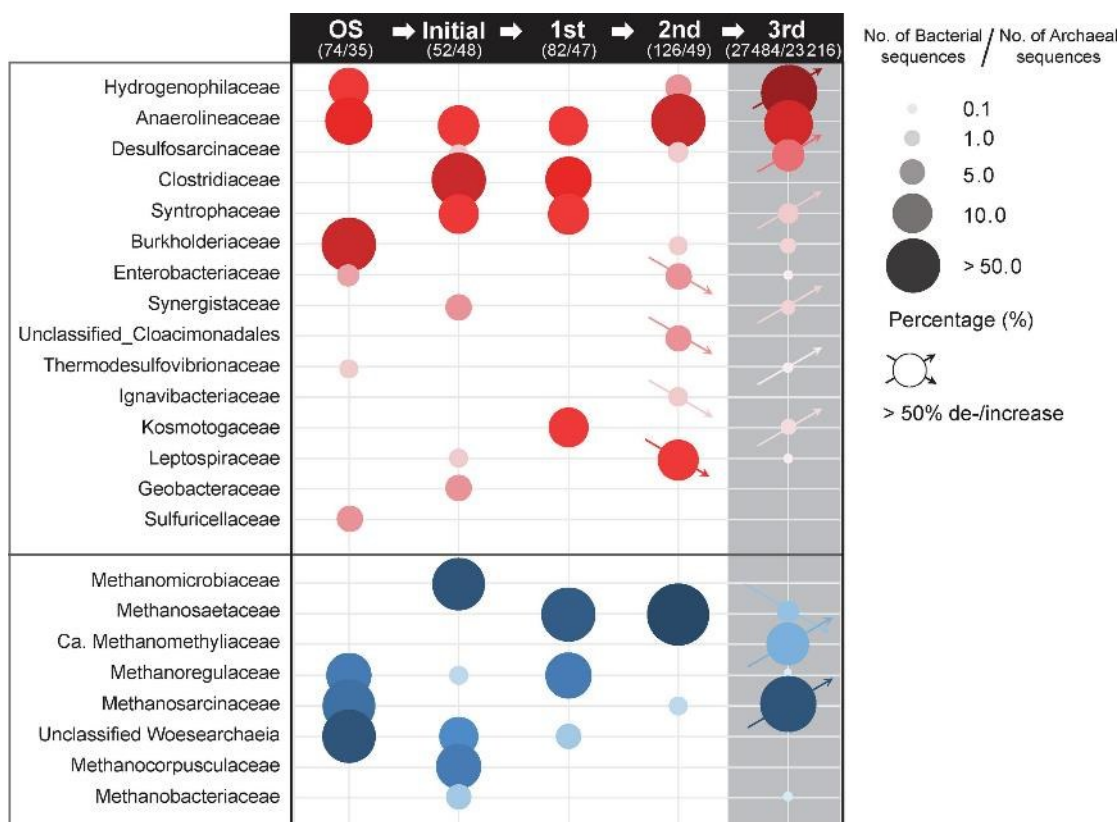


图2. OS样品和富集培养物中的微生物群落组成（展示的细菌谱系至少在一个样品中的相对丰度>5%）。其中OS、初始培养（Initial）和两次转接样品的群落组成数据是引用此前的16S rRNA基因序列克隆文库数据[19,22]，而第三次转接样品的微生物组成是基于高通量16S rRNA基因测序得到的，用灰色标出。样品名下方的括号中的数据为细菌和古菌文库中的总序列数（细菌文库中的全序列/古菌文库的全序列）。Ca.: Candidatus。

通过分箱操作，从宏基因组序列数据中得到了总计23个完整度高于50%、污染度低于10%的MAG（通过CheckM [37]估算得到）（见附录A中的表S5）。这些MAG根据分类学化分，分别属于13个细菌和两个古生菌门（见图3 [50]和附录A中的表S5）。细菌中的Chloroflexi门的成员，尤其是Anaerolineae纲，是样品中的主要组成（23个MAG中有6个都是属于Anaerolineae纲下的成员，分别有7.8~198.5×的测序覆盖度，相比较而言所有MAG的平均测序覆盖度仅有58.2×；详见附录A中的图S2）。在古菌中，代表Methanosarcinaceae科的两个MAG具有中到高的测序覆盖度（Methanosarcinaceae archaeon bin5和Methanosarcina sp. bin9的测序覆盖度分别为54.9×和102.9×；详见附录A中的图S2）。研究还发现了一个代表候选门Verstraetearchaeota下Methanomethyliaceae科的MAG，其测序覆盖度相对较低（46.7×）。整体上来说，MAG测序覆盖度和基于16S rRNA基因扩增子数据的微生物组成结果比较吻合。总共有18个MAG分别代表三个纲水平、四个目水平、三个科水平和六个属水平上的未培养谱系（见图3和附录A中的表S5）。

### 3.3. 厌氧烃降解

为了研究第三次转接体系中的微生物的代谢潜力，分析了MAG中和未分箱到MAG中的基因序列所编码的蛋白酶功能（见第2节）。以FPKM值来代表宏基因组中基因序列的相对丰度，其中FPKM值排名前10%（即FPKM > 13.0）的基因被认为丰度相对较高。

在当前培养条件下，体系的有机碳源主要来自于添加的正构烷烃（C<sub>15</sub>~C<sub>20</sub>）和微生物死细胞的生物质[42]。为了分析微生物厌氧降解烃类的潜力，本研究搜索了编码具有厌氧活化烃分子C-H键功能的酶的基因[53]。宏基因组结果显示体系中可能存在一种甘氨酸自由基酶，能够通过加成富马酸分子来活化烃类化合物次末端的C-H键（该反应称为富马酸加成反应）[54]。在4个MAG（Desulfosarcinaceae bacterium bin16、Chloroflexi bacterium bin26、Phycisphaerae bacterium bin27和Spirochaetes bacterium bin3）以及多个未分箱的序列片段（分别代表Chloroflexi、Deltaproteobacteria、Alphaproteobacteria、Synergistetes、Firmicutes、Spirochaetes、Actinobacteria和Candidatus Aminicenantes菌的成员）中发现了可能介导正构烷烃富马酸加成反应的烷基琥珀酸合成酶基因（*assA*）

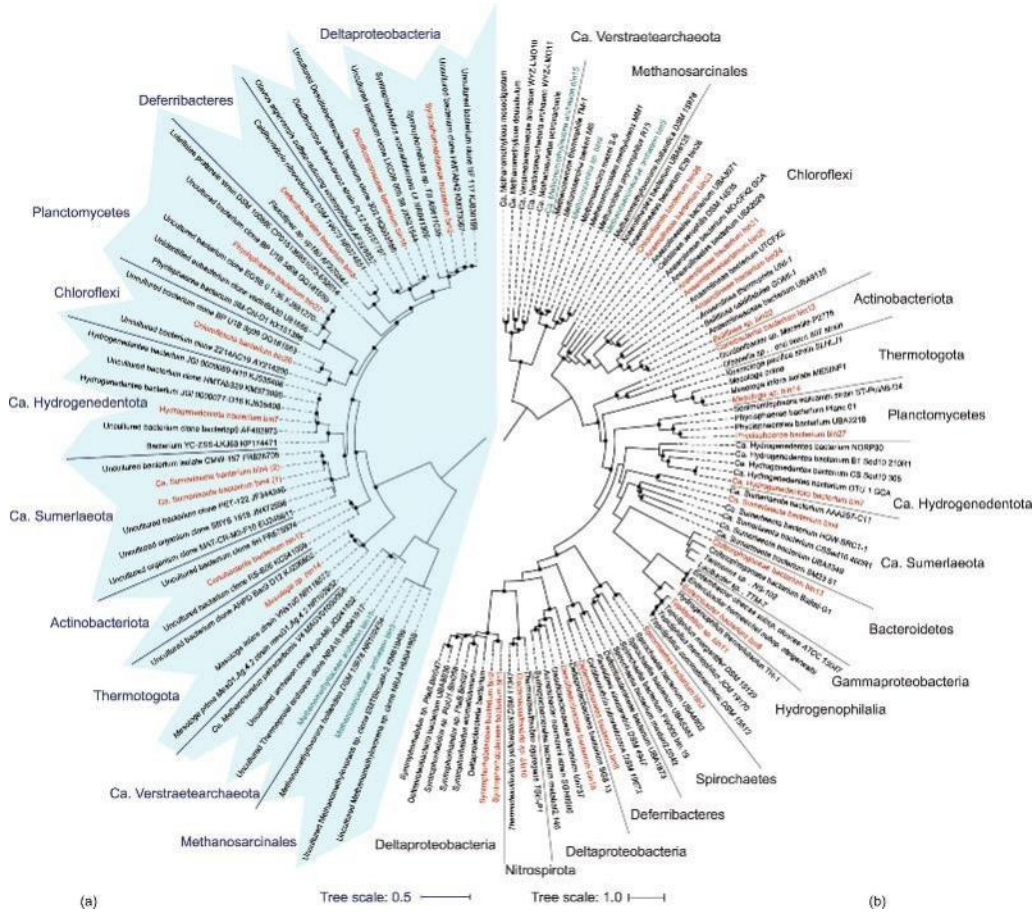


图3. MAG系统发育进化树。左图：基于16S rRNA基因构建的系统发育进化树，用蓝色背景标出。右图：基于400个保守蛋白质序列的系统发育进化树[50]。两个进化树的序列比对都是基于MAFFT软件，然后剔除包含90%以上空缺的列。这些进化树是IQ Tree软件在标准模型选择条件下构建的，并设置了1000个bootstrap重复。进化树骨架节点上的圆点符号表示该分支结果的bootstrap值高于80%。其中MAG标记为红色的表示细菌，绿色的表示古菌。比例尺表示替换/位点的平均数量。

(见附录A中的图S3)，并且这些基因占有较高的相对丰度（大多数FPKM值高于13.0；见图4和附录A中的表S6）。这些*assA*类似序列与此前研究发现的厌氧烃降解共生菌*Smithella*中的烷基琥珀酸合成酶的序列[55]有非常低的氨基酸相似度（<45%），但与被认为有厌氧烷烃降解功能的*Vallitalea guaymasensis* L81 [56]、*Thermococcus sibiricus* MM 739 [57]和*Archaeoglobus fulgidus* VC-16 [18, 58]菌中*assA*基因亲缘关系较近（见附录A中的图S3）。此外，在宏基因组和16S rRNA基因克隆文库中均没有发现*Smithella*菌的基因组序列或相关的16SrRNA基因代表序列（操作分类单元，OUT）。进一步，通过使用先前设计的*assA/bssA* PCR引物进行PCR扩增，也验证了样品中确实缺乏*Smithella*类的*assA*基因。

在烷烃加成了富马酸分子完成起始活化反应后，生成的烷基琥珀酸盐通过多个反应步骤，包括乙酰辅酶A（CoA）的激活、碳骨架重排和脱羧反应[59]，转化为脂肪酸。在多个MAG中检测到了参与这些步骤的基因，即

CoA合成酶/连接酶（*assK*）、烷基丙酰-CoA异构酶（*mcmLS*）和丙酰CoA羧化酶（*pccAB*）。但是这些编码了*assA*基因的MAG都不含有完整的烷烃厌氧降解的代谢通路，尽管有些MAG具有较高的完整度（例如，*Desulfosarcinaceae bacterium bin16*的完整度为96%；见附录A中的表S7），这就意味着这些基因的缺失不太可能是由于基因组的残缺造成的。然而，在几个不含有*assA*基因的MAG中发现了与烷烃富马酸加成反应相关的下游降解途径的基因（见附录A中的表S7），这表明在降解烷烃时，这些MAG所代表的微生物和含有*assA*的MAG代表的微生物之间存在协同降解的作用。

### 3.4. 死细胞生物质回收和发酵代谢

另一方面，作为潜在有机碳源的死细胞生物质主要由复杂碳水化合物、蛋白质和脂质组成[42]。因此，本研究搜寻了与肽/氨基酸降解、复杂碳水化合物降解和脂肪酸降解相关的功能基因。大多数MAG（23个中有19个，具体见图5和附录A中的表S7）都含有胞外碳水化合物水解

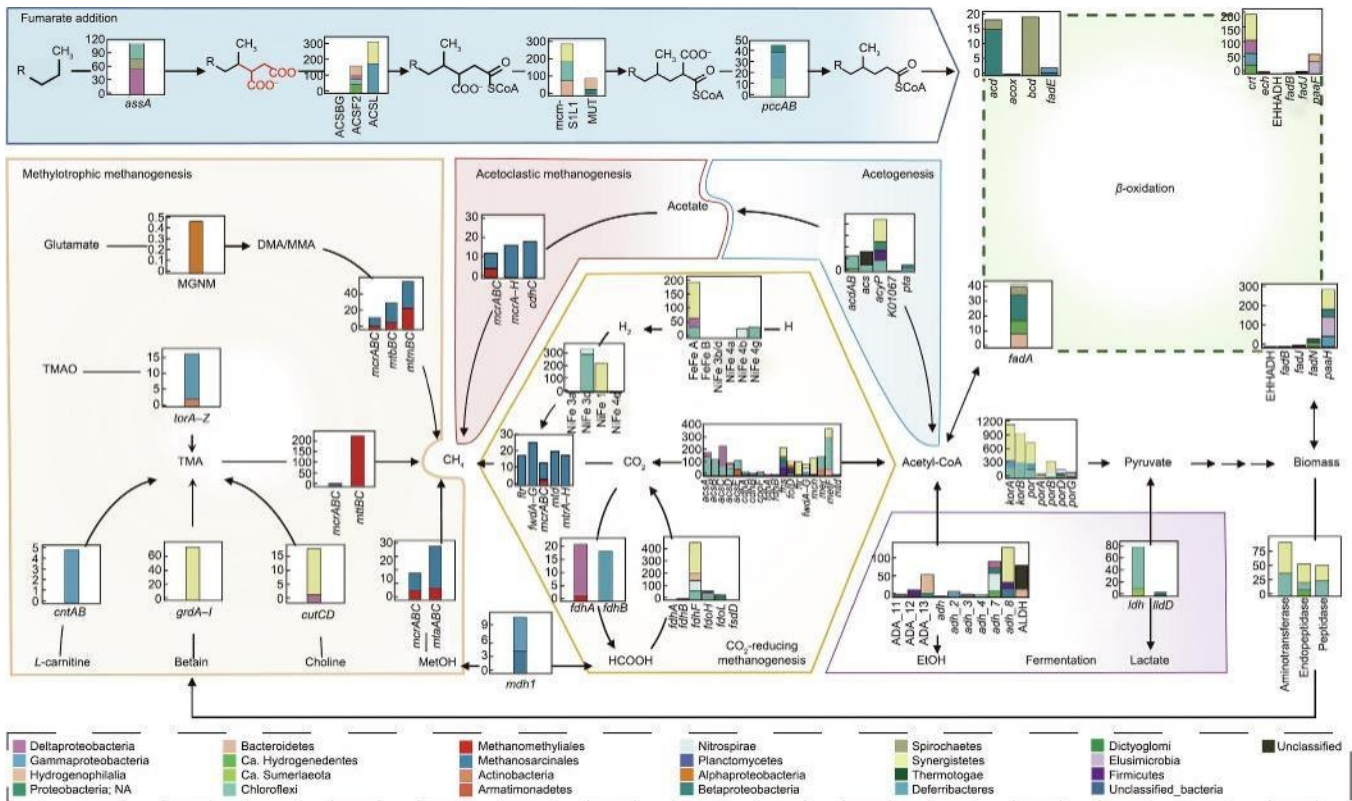


图4. 第三次转接体系中潜在的微生物碳循环过程。根据基因的物种分类，将按相同物种分类的基因的FPKM值进行相加。基因名称：*fwd*: 甲酰甲吡喃脱氢酶；*ptr*: 甲酰基甲酰吡喃-四氢甲烷蝶呤-N-甲酰转移酶；*mer*: 5,10-亚甲基四氢蝶呤还原酶；*mtd*: 亚甲基四氢蝶呤脱氢酶；*mch*: 甲基四氢甲烷蝶呤环水解酶；*mcr*: 甲基辅酶M还原酶；*mtr*: 甲基转移酶；*acs*: 乙酰辅酶A合成酶 (EC: 6.2.1.1)；*acd*: 乙酰辅酶A连接酶[形成二磷酸腺苷(ADP)]；*cdh*: 乙酰辅酶A脱羧酶/合酶；*mta*: 甲醇-5-羟苯基咪唑基钴胺共甲基转移酶；*mtm*: 甲胺腐蚀蛋白Co甲基转移酶；*mtb*: 二甲胺腐蚀钴甲基转移酶；*mtt*: 三甲胺腐蚀蛋白-甲基转移酶；*acox/fadE/acd/bcd*: 酰基载体蛋白(ACP)脱氢酶；*paaF/crt/fadJ/fadB/ech*: 烯酰辅酶A水合酶；*fadJ/fadB/fadN/ech/paaH/EHHADH*: 3-羟基酰基-CoA脱氢酶；*fadA*: 乙酰辅酶A酰基转移酶。TMA: 三甲胺；*cut*: 胆碱三甲胺裂解酶；*tor*: 三甲胺-N-氧化物还原酶(细胞色素c)；*grd*: 甜菜碱还原酶；肉碱单加氧酶亚单位；*mgnm*: 甲胺谷氨酸N-甲基转移酶；*mdh*: 甲醇脱氢酶；*aldh*: 乙醛脱氢酶；CoA: 辅酶A；*por*: 丙酮酸-铁氧还蛋白氧化还原酶；*metF*: 亚甲基四氢叶酸还原酶；*mut*: 甲基丙二酰辅酶A突变酶；*acyP*: 酰基磷酸酶；ADA: 乙醛脱氢酶；*kor*: 2-氧代戊二酸-2-氧代酸铁氧还蛋白氧化还原酶；*ldh*: 乳酸脱氢酶；*fol*: 叶酸四氢叶酸环水解酶；*fhs*: 甲酸盐——四氢叶酸连接酶；*cooF*: 厌氧一氧化碳脱氢酶铁硫亚基。图中省略了Emden-Meyerhof通路，详细内容可见附录A中的表S6。

酶和一个接近完整的Emden-Meyerhof途径(糖酵解途径)，表明这些菌能够降解细胞碎片中的复杂碳水化合物。同时，在11个MAG中发现了编码ABC型肽转运蛋白和氨基酸转运蛋白的基因(见图5和附录A中的表S7)。这些MAG中还检测到了编码肽酶、氨基转移酶、2-氧酸-铁硫蛋白氧化还原酶和醛基-铁硫蛋白氧化还原酶的基因。因此，推测这些MAG能够分步地将肽降解为氨基酸，再将其降解为2-酮酸，最终降解为乙酰CoA[60]。此外，宏基因组数据中有丰富的编码脂肪酸降解( $\beta$ 氧化)所需的基因(图4)，并在7个细菌MAG中找到了完整的 $\beta$ 氧化通路(图5)。

由于富集培养中没有提供外源电子受体(如氧气、氧化的金属阳离子、硫化物或氮化合物)，异养微生物通常通过产氢气或发酵的方式来消耗有机碳源氧化降解过程中产生的还原当量。在17个MAG中发现了编码产氢酶的基因([FeFe] A/B和[NiFe] 4a/b/d/g)，而在13个MAG中

发现了氧化氢气的氢化酶基因(图5)。宏基因组未分箱序列和MAG中有含有发酵产乳酸(6个MAG)和产乙醇(12个MAG)的基因(图4和图5)。此外，还原 $\text{CO}_2$ 产乙酸的Wood-Ljungdahl途径也可以消耗有机物降解中产生的电子[61–62]。几乎所有的细菌MAG都包含产乙酸的功能基因。然而，仅在4个细菌的MAG中发现了完整的Wood-Ljungdahl途径基因(图5)，其中在代表Methanosarcinales的MAG中发现了Wood-Ljungdahl途径可能与产甲烷有关[63]。

### 3.5. 产甲烷

为了在缺乏外部电子受体的情况下获得有机物降解的最大自由能，微生物群落中的碳代谢通常会达到热力学最稳定状态，即产生甲烷和 $\text{CO}_2$ [64]。催化甲烷生成的功能基因仅在Methanosarcinales(Methanosarcinaceae archaeon bin5和Methanosarcina sp. bin9)和Methanomethy-



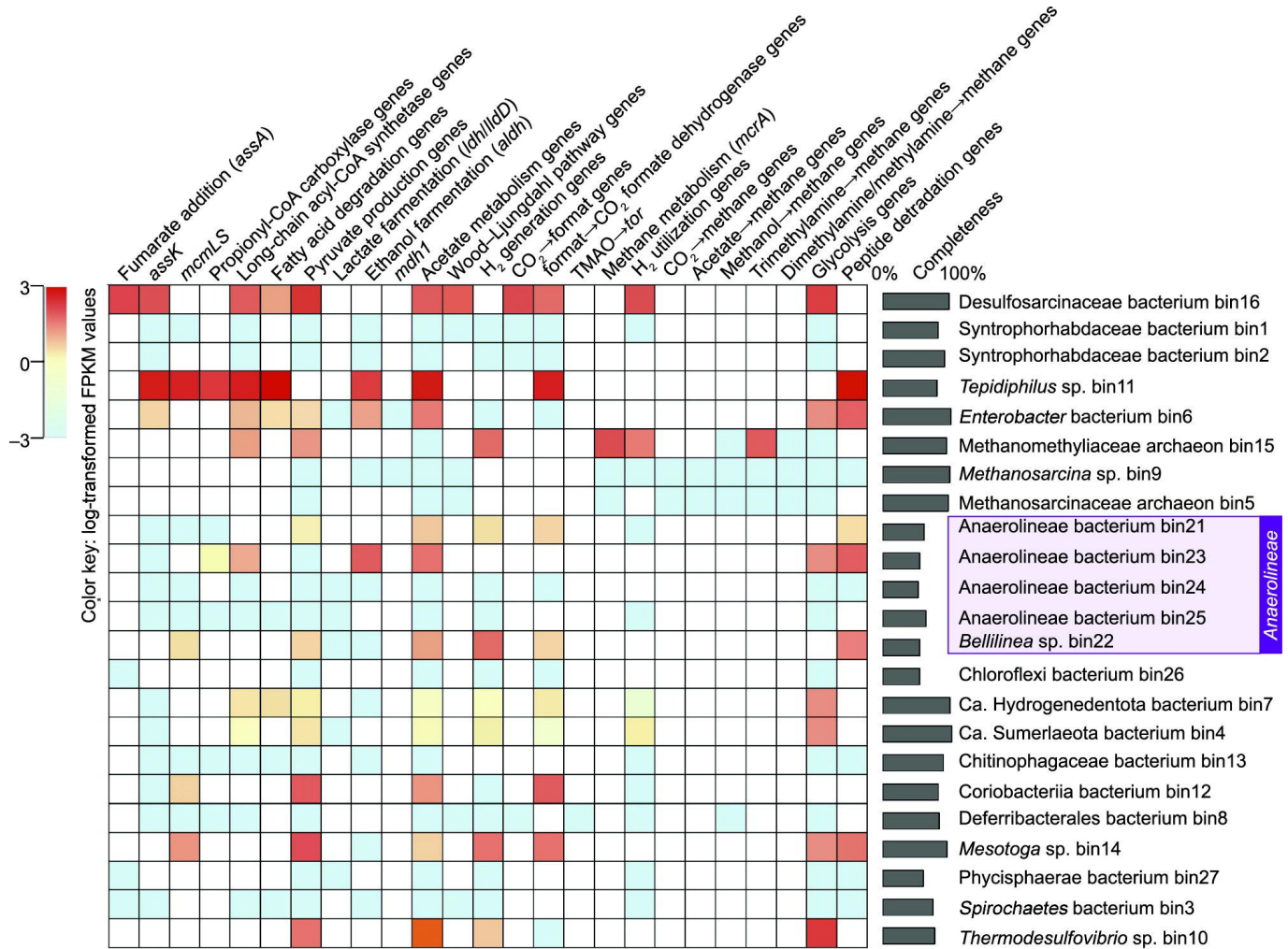


图5. MAG中功能基因转录水平热图。其中转录水平以FPKM的对数值或通路中所有检测到的基因的FPKM平均值的对数值来显示。如果基因组中存在75%以上的基因，则表明存在该通路。TMAO：三甲胺N-氧化物。

liales (Methanomethyliaceae archaeon bin15) 的基因组中发现 (图4)。这些MAG中的甲基辅酶M还原酶基因与催化甲烷生成的MCR酶簇集在一起，而不是与厌氧甲烷/烷烃氧化相关的类MCR复合物簇集在一起 (见附录A中的S4图) [65–66]。因此，这些微生物被认为可能具有产甲烷的潜力。由于所有这些产甲烷功能基因都具有很高的丰度 (FPKM > 13.0) (图4)，因此样品中具有较大的产甲烷潜力。此外，在 *Methanosarcina* sp. bin9 和 *Methanosarcinaceae* archaeon bin5 的MAG中发现了氢营养型、乙酸营养型和甲基营养型产甲烷途径，能够具有将氢气和CO<sub>2</sub>、乙酸和甲基化合物转化为甲烷的代谢潜能 (图5)，表明这些菌具有多重的产甲烷能力。相反，基因组分析显示 *Methanomethyliaceae* archaeon bin15 菌是一个严格依赖于氢气的甲基营养型产甲烷菌[67] (图5)。

鉴于三个古菌MAG中都包含有甲基营养型产甲烷的代谢能力，本研究搜寻催化生成甲基化合物的功能基因。

在宏基因组数据中发现了转化胆碱、三甲胺N-氧化物、甜菜碱和L-肉碱 (*cut*、*tor*、*grd* 和 *cnt*) 生成三甲胺的功能基因，以及转化谷氨酸 (*mgnm*) 和产生甲醇 (*mdh1*) 的基因 (图4)。这一结果说明体系中是存在产生此类甲基化合物的可能的。

### 3.6. 宏转录组测序覆盖度

基于宏转录组测序覆盖度发现，23个MAG中有10个在采样时没有任何转录活性 (见附录A中的图S2)。同时，除了 *Methanosarcina* sp. bin9 和 *Syntrophorhabdaceae* bacterium bin2 以外，所有具有较高宏基因组测序覆盖度 (超过中位数) 的MAG都有转录活性。其中，*Tepidiphilus* sp. bin11 具有最高的宏转录组测序覆盖度 (43.2×)，其次是 *Mesotoga* sp. bin14 (8.8×)、*Methanomethyliaceae* archaeon bin15 (8.4×)、*Anaerolineaceae* bacterium bin23 (7.2×)、*Anaerolineaceae* bacterium bin21 (5.5×)、*Desulfosarcinaceae* bacterium bin16 (4.8×)、*Ca. Hydrogeneden-*

tota bacterium bin7 (4.1×)、*Bellilinea* sp. bin22 (3.4×)、*Enterobacter* bacterium bin6 (2.8×)、*Thermodesulfovibrio* sp. bin10 (2.6×)、*Coriobacteriia* bacterium bin12 (1.2×)、*Deferribacterales* bacterium bin8 (0.6×) 和 *Ca. Sumerlaeota* bacterium bin4 (0.6×) (见附录 A 中的图 S2)。

### 3.7. 基因转录水平

为了分析转接体系中的功能基因的转录水平, 将宏转录组数据比对到基因序列上并计算获得 FPKM 值。发现只有不到 5% 的基因具有转录活性, 因此将 FPKM 值大于所有基因 FPKM 值中位数 (即  $FPKM > 10.2$ ) 的基因定义为高转录基因。

尽管前文提到在几个 MAG 中和未分箱的基因片段中检测到了类 *assA* 基因序列, 但是其中仅有 *Desulfosarcinaceae* bacterium bin16 (FPKM = 38.0) 和属于 *Synergistetes* 和 *Firmicutes* 微生物的几个基因片段 (分别为 FPKM = 3.3 和 8.1) 在采样时有转录活性 (见图 5 和附录 A 中的表 S8)。这表明 *Deltaproteobacteria* (*Desulfosarcinaceae* bacterium bin16)、*Synergistetes* 和 *Firmicutes* 的成员在体系中主要负责中烷烃的厌氧活化和降解。除了 *assA* 外, *Desulfosarcinaceae* bacterium bin16 基因组中的 *assK* 基因也具有较高的转录水平 (FPKM = 28.1)。此外, 在 *Tepidiphilus* sp. bin11 中涉及烷烃降解下游代谢通路的相关基因也具有较高的转录活性。

在死细胞生物质回收代谢方面, *Tepidiphilus* sp. bin11、*Enterobacter* bacterium bin6、*Anaerolineaceae* bacterium bin21 和 *Anaerolineaceae* bacterium bin23、*Bellilinea* sp. bin22 和 *Mesotoga* sp. bin14 中与蛋白质运输和降解有关的基因具有较高转录活性 (图 5)。同时, 在 *Desulfosarcinaceae* bacterium bin16、*Enterobacter* bacterium bin6、*Anaerolineaceae* bacterium bin23 和 *Ca. Hydrogenedentota* bacterium bin7 中的脂肪酸代谢相关基因具有较高转录水平。

此外, *Methanosarcina* sp. bin9 和 *Methanosarcinaceae* archaeon bin5 中的产甲烷相关基因均低于检测限 (见附录 A 中的图 S2), 表明这些产甲烷菌可能处于休眠状态。相反, *Methanomethylia* archaeon bin15 中的产甲烷相关基因、三甲胺 (TMA) 甲基转移酶基因和  $H_2$  氧化的基因都具有高转录活性 (例如, *mcrA* 和 *mttB* 的 FPKM 值分别为 20.3 和 13.7)。这表明该类微生物具有依赖  $H_2$  的甲基营养型产甲烷代谢活性。另外, 与 TMA 产生相关的基因, 包括 *cut* 和 *grd* 基因都表现出一定的转录活性 (FPKM 值分别为 3.2 和 14.9), 而产生其他甲基化合物 [甲基/二甲基胺 (M/DMA) 和甲醇] 的基因在转录组中没有活性。

## 4. 讨论

在长期培养过程中, 本体系微生物群落的演替被认为是适应培养环境的结果。因此, 微生物群落的变化可能有助于富集培养物中甲烷生产动力学特性的持续性改善。本培养中的主要微生物类型同样也是烃污染的环境中广泛存在的类型, 比如在石油污染的土壤[68]、烃污染含水层[1]和油田[69]中。由此可见, 烃污染环境原位微生物也具有转化石油烃为甲烷从而起到生物修复作用的潜力。只不过可能需要添加外源营养物质 (如磷酸盐) 来激活这样的原位烃降解产甲烷群落, 因为通常来说这类烃污染环境是寡营养的[70]。

在本研究中, 宏基因组数据显示在第三次转接体系中有其他环境中没有的丰富的未培养微生物, 针对这些微生物的代谢功能值得进一步的分析和研究。结合宏基因组和宏转录组分析发现, 作为体系中的主要有机碳源和能源, 烷烃主要通过富马酸加成途径被 *Deltaproteobacteria*、*Firmicutes* 和 *Synergistetes* 中的微生物厌氧降解。此外, 宏基因组数据显示 *Desulfosarcinaceae* bacterium bin1 中的厌氧烃降解代谢通路不完整, 结合宏转录组分析结果, 本研究认为完成厌氧烃降解代谢可能需要 *Desulfosarcinaceae* bacterium bin16 和 *Tepidiphilus* sp. bin11 来共同完成。本研究拓展了先前认为 *Smithella* 菌是低温到高温烃降解体系中的主要烃降解菌的认识[9,11–12,71–72]。除了正构烷烃外, 在三次转接体系中微生物还通过回收代谢死细胞碎片、肽/氨基酸、碳水化合物和脂肪酸作为碳源和能源。此外, 体系中的微生物群主要通过发酵 (乙醇) 和产氢协同相互作用 ( $H_2$ ) 来消耗/传递氧化过程中产生的电子, 同时也加强了微生物之间的相互作用。据文献报道, 在产甲烷培养物中一直能检测到属于 *Anaerolineaceae* 科的菌 [10,71–73], 在先前的第二次转接样品中 *Anaerolineaceae* 菌也是优势细菌[19]。然而, 由于缺乏相关基因组, 这些菌在烃降解体系中的功能作用仍是未知的[19,74]。同过本研究, 以及利用相同接种源同时开展的另一项  $^{13}C$  稳定同位素标记研究显示, *Anaerolineaceae* 中的成员, 包括 *Anaerolinea* 和 *Tepidiphilus* 主要负责死细胞生物质的回收和利用[75–76]。

在先前的报道中, 氢气和乙酸营养型产甲烷途径一直被认为是烃降解产甲烷的主要途径[5–6,20,77]。然而, 在本研究中, 宏转录组分析显示了样品中只有甲基营养型产甲烷的转录活性。已经有研究证明, 在甲基化合物丰富的地方, 如海洋沉积物等, 甲基营养型产甲烷过程是普遍存在的[78–79]。在本研究中, 转化为甲烷的三甲胺被推测

主要是从死细胞生物体中转化而来的。体系中的 *Methanosarcinales* MAG 也编码了利用氢和甲基化合物产生甲烷的代谢潜力 (图4), 但它们在宏转录组中的转录水平较低。这可能是由于没有细胞色素的产甲烷菌 (如 *Methanomethyliaceae*) 相比于有细胞色素的产甲烷菌 (如 *Methanosarcinales*), 在竞争利用  $H_2$  时更有优势, 因为它们能够利用更低浓度的  $H_2$  [63]。然而, *Methanomethyliaceae* 成员与 *Methanosarcinales* 成员之间的确切关系只有通过纯培养的研究来揭示。

总的来说, 本研究并不打算排除氢气和乙酸营养型产甲烷途径在烃降解产甲烷过程的重要贡献, 因为它们已经被反复证明参与了富集培养物和环境样品中的烃降解过程。然而, 本研究提供了一种新的认识, 即至少在培养的对数生长末期, 当死细胞生物物质回收开始产生甲基化合物的时候, 甲基营养型和依赖  $H_2$  的甲基营养型产甲烷过程可能也在烃降解产甲烷过程中发挥重要作用。因为之前的富集培养物往往是在对数生长末期之前采样分析, 所以这些甲基营养型和依赖  $H_2$  的甲基营养型产甲烷过程可能被忽略了[19–20,23]。此外需要注意的是, 通常烃降解产甲烷培养物的接种源主要来自于油藏产出水和沟槽沉积物, 与本研究使用的炼油厂污泥来源环境不同[5,23], 这也可能导致菌群结构和代谢途径的差异。根据本研究的结果, 以及严格的甲基营养型产甲烷菌 (如 *Methanohalophilus* 和 *Methanolobulus*) 和非严格的甲基营养型产甲烷菌 (如 *Methanosarcina*) 在石油烃相关环境中广泛存在的事实[21,69], 可以推测这些微生物在环境中可能扮演着将死细胞生物物质来源的甲基化合物转化为甲烷的生态角色。

本研究还发现, 尽管有些 MAG 在宏基因组中的相对丰度很高, 但是在转录组中的活性低于检测限。在其他烃降解产甲烷体系中也有过类似的报道[18]。这可能是由于烃降解产甲烷培养物的生长速率极低, 因此基因表达水平也很低。宏基因组分析表明, 转录活性较低的微生物也具有与烃降解产甲烷代谢相关的功能基因, 猜测可能在培养的前期参与了烃降解代谢过程。值得注意的是, 本研究的转录组分析结果只针对在产甲烷对数增长后期的样品研究。在未来的研究中, 需要增加采样时间, 以捕获不同阶段的整体微生物活动情况, 包括延滞期、对数生长前期、对数生长中期、对数生长后期和稳定期。此外, 需要通过 DNA-SIP 标记技术来进一步验证厌氧烃降解过程中依赖  $H_2$  的甲基营养型产甲烷菌的作用。

## 5. 结论

本工作主要研究微生物降解产甲烷的机制, 揭示了依赖氢气的甲基营养型产甲烷菌和传统的甲基营养型产甲烷菌在烃相关环境下的碳循环过程中扮演着重要的生态角色。此外, 通过多次转接富集培养提高了烃降解产甲烷体系的产甲烷动力学性质, 体现了在厌氧环境下治理修复石油烃类环境污染的潜力。总体来说, 本研究为后续的生物残余油气化开采技术的开发提供理论依据, 有望将枯竭油藏中约30%的残余油转化为甲烷气来开采回收。

## 致谢

在这项工作中, 刘一凡、寿利斌、杨世忠、刘金峰和牟伯中得到了国家自然科学基金(42061134011、52074129、42173076)、上海市自然科学基金(21ZR1417400)、上海国际协作计划(18230743300)和中央高校基本科研业务费(JKJ012016028)的资助, 顾继东获得了国家自然科学基金委/香港研究资助局联合研究基金(41161160560)的资助。

## Authors' contribution

Zhao-Wei Hou and Xiao-Lin Wu provided the samples. Li-Ying Wang, Bo Liang and Jing Chen set up the enrichment cultures. Jing Chen monitors the methane production during incubation. Zhong-Lin Liu performed the PCR experiments. Dan-Dan Lin and Li-Bin Shou were committed to all the experiments. Yi-Fan Liu performed the statistic and metagenomic and metatranscriptomic analysis. Yi-Fan Liu, Ji-Dong Gu, Lei Zhou, and Bo-Zhong Mu wrote the paper. Bo-Zhong Mu oversaw this project. All authors read and approved the final manuscript.

## Compliance with ethics guidelines

Yi-Fan Liu, Jing Chen, Zhong-Lin Liu, Zhao-Wei Hou, Bo Liang, Li-Ying Wang, Lei Zhou, Li-Bin Shou, Dan-Dan Lin, Shi-Zhong Yang, Jin-Feng Liu, Xiao-Lin Wu, Ji-Dong Gu, and Bo-Zhong Mu declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.08.027>.

## References

- [1] Kleinstuber S, Schleinitz KM, Vogt C. Key players and team play: anaerobic microbial communities in hydrocarbon-contaminated aquifers. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;94(4):851–73.
- [2] Ghattas AK, Fischer F, Wick A, Ternes TA. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. *Water Res* 2017; 116:268–95.
- [3] Gieg LM, Kolhatkar RV, McInerney MJ, Tanner RS, Harris SH, Sublette KL, et al. Intrinsic bioremediation of petroleum hydrocarbons in a gas condensate-contaminated aquifer. *Environ Sci Technol* 1999;33(15):2550–60.
- [4] An D, Caffrey SM, Soh J, Agrawal A, Brown D, Budwill K, et al. Metagenomics of hydrocarbon resource environments indicates aerobic taxa and genes to be unexpectedly common. *Environ Sci Technol* 2013;47(18): 10708–17.
- [5] Zengler K, Richnow HH, Rosselló-Mora R, Michaelis W, Widdel F. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* 1999; 401(6750):266–9.
- [6] Mbadanga SM, Wang LY, Zhou L, Liu JF, Gu JD, Mu BZ. Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes. *Int Biodeterior Biodegradation* 2011;65(1):1–13.
- [7] Gieg LM, Fowler SJ, Berdugo-Clavijo C. Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. *Curr Opin Biotechnol* 2014;27:21–9.
- [8] Siddique T, Penner T, Sempke K, Foght JM. Anaerobic biodegradation of longer-chain *n*-alkanes coupled to methane production in oil sands tailings. *Environ Sci Technol* 2011;45(13):5892–9.
- [9] 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. *ISME J* 2014;8(4):757–67.
- [10] Wawrik B, Marks CR, Davidova IA, McInerney MJ, Pruitt S, Duncan KE, et al. Methanogenic paraffin degradation proceeds via alkane addition to fumarate by ‘*Smithella*’ spp. mediated by a syntrophic coupling with hydrogenotrophic methanogens. *Environ Microbiol* 2016;18(8):2604–19.
- [11] Oberding LK, Gieg LM. Methanogenic paraffin biodegradation: alkylsuccinate synthase gene quantification and dicarboxylic acid production. *Appl Environ Microbiol* 2017;84(1):e01773-17.
- [12] Chen J, Liu YF, Zhou L, Mbadanga SM, Yang T, Zhou J, et al. Methanogenic degradation of branched alkanes in enrichment cultures of production water from a high-temperature petroleum reservoir. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019; 103(5):2391–401.
- [13] Gieg LM, Duncan KE, Suflita JM. Bioenergy production via microbial conversion of residual oil to natural gas. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(10): 3022–9.
- [14] Dolfing J, Larter SR, Head IM. Thermodynamic constraints on methanogenic crude oil biodegradation. *ISME J* 2008;2(4):442–52.
- [15] Jones DM, Head IM, Gray ND, Adams JJ, Rowan AK, Aitken CM, et al. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature* 2008;451(7175):176–80.
- [16] 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):e66784.
- [17] Embree M, Liu JK, Al-Bassam MM, Zengler K. Networks of energetic and metabolic interactions define dynamics in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(50):15450–5.
- [18] Liu YF, Galzerani DD, Mbadanga SM, Zaramela LS, Gu JD, Mu BZ, et al. Metabolic capability and in situ activity of microorganisms in an oil reservoir. *Microbiome* 2018;6(1):5.
- [19] Meslé M, Dromart G, Oger P. Microbial methanogenesis in subsurface oil and coal. *Res Microbiol* 2013;164(9):959–72.
- [20] Wang LY, Gao CX, Mbadanga SM, Zhou L, Liu JF, Gu JD, et al. Characterization of an alkane-degrading methanogenic enrichment culture from production water of an oil reservoir after 274 days of incubation. *Int Biodeterior Biodegradation* 2011;65(3):444–50.
- [21] Liang B, Wang LY, Mbadanga SM, Liu JF, Yang SZ, Gu JD, et al. Anaerolineaceae and Methanosaeta turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation. *AMB Express* 2015;5(1):37.
- [22] Wang LY, Li W, Mbadanga SM, Liu JF, Gu JD, Mu BZ. Methanogenic microbial community composition of oily sludge and its enrichment amended with alkanes incubated for over 500 days. *Geomicrobiol J* 2012;29(8):716–26.
- [23] Liu YF, Chen J, Liu ZL, Shou LB, Lin DD, Zhou L, et al. Anaerobic degradation of paraffins by thermophilic actinobacteria under methanogenic conditions. *Environ Sci Technol* 2020;54(17):10610–20.
- [24] Gu JD. More than simply microbial growth curves. *Appl Environ Biotechnol* 2017;2(1):63–5.
- [25] Symons BGE, Buswell AM. The methane fermentation of carbohydrates. *J Am Chem Soc* 1933;55(5):2028–36.
- [26] Ren G, Zhang H, Lin X, Zhu J, Jia Z. Response of phyllosphere bacterial communities to elevated CO<sub>2</sub> during rice growing season. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98(22):9459–71.
- [27] Ohene-Adjei S, Teather RM, Ivan M, Forster RJ. Postinoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(14):4609–18.
- [28] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013;41(D1):D590–6.
- [29] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19(5):455–77.
- [30] Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012;9(4):357–9.
- [31] Lan F, Demaree B, Ahmed N, Abate AR. Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding. *Nat Biotechnol* 2017;35(7):640–6.
- [32] Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al.; the 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25(16):2078–9.
- [33] Wu YW, Simmons BA, Singer SW. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2016;32(4):605–7.
- [34] Kang DD, Froula J, Egan R, Wang Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ* 2015;3:e1165.
- [35] Aleshin J, Bjarnason BS, de Bruijn I, Schirmer M, Quick J, Ijaz UZ, et al. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nat Methods* 2014; 11(11):1144–6.
- [36] Sieber CMK, Probst AJ, Sharrar A, Thomas BC, Hess M, Tringe SG, et al. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy. *Nat Microbiol* 2018;3(7):836–43.
- [37] Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 2015;25(7):1043–1055.
- [38] Eren AM, Esen ÖC, Quince C, Vineis JH, Morrison HG, Sogin ML, et al. Anvi’o: an advanced analysis and visualization platform for ‘omics data. *PeerJ* 2015;3:e1319.
- [39] Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 2010;11(1):119.
- [40] Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J Mol Biol* 2016;428(4):726–31.
- [41] Yin Y, Mao X, Yang J, Chen X, Mao F, Xu Y. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(W1):W445–51.
- [42] Dong X, Greening C, Rattray JE, Chakraborty A, Chuvochina M, Mayumi D, et al. Metabolic potential of uncultured bacteria and archaea associated with petroleum seepage in deep-sea sediments. *Nat Commun* 2019;10(1):1816.
- [43] Eddy SR. Accelerated profile HMM searches. *PLOS Comput Biol* 2011;7(10): e1002195.
- [44] Søndergaard D, Pedersen CNS, Greening C. HydDB: A web tool for hydrogenase classification and analysis. *Sci Rep* 2016;6(1):34212.
- [45] Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 2008;9(1):75.

- [46] Menzel P, Ng KL, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat Commun* 2016;7:11257.
- [47] Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarshewski A, Chaumeil PA, et al. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol* 2018;36 (10):996–1004.
- [48] Roberts A, Pachter L. Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nat Methods* 2013;10 (1):71–3.
- [49] Yamada KD, Tomii K, Katoh K. Application of the MAFFT sequence alignment program to large data-reexamination of the usefulness of chained guide trees. *Bioinformatics* 2016;32 (21):3246–51.
- [50] Segata N, Börnigen D, Morgan XC, Huttenhower C. PhyloPhlAn is a new method for improved phylogenetic and taxonomic placement of microbes. *Nat Commun* 2013;4 (1):2304.
- [51] Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 2007;23 (1):127–8.
- [52] Xu D, Zhang K, Li BG, Mbadinga SM, Zhou L, Liu JF, et al. Simulation of in situ oil reservoir conditions in a laboratory bioreactor testing for methanogenic conversion of crude oil and analysis of the microbial community. *Int Biodeterior Biodegradation* 2019;136:24–33.
- [53] Callaghan AV. Enzymes involved in the anaerobic oxidation of n-alkanes: from methane to long-chain paraffins. *Front Microbiol* 2013;4:89.
- [54] Rabus R, Wilkes H, Behrends A, Armstroff A, Fischer T, Pierik AJ, et al. Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl) succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism. *J Bacteriol* 2001;183 (5):1707–15.
- [55] Liu YF, Qi ZZ, Shou LB, Liu JF, Yang SZ, Gu JD, et al. Anaerobic hydrocarbon degradation in candidate phylum 'Atribacteria' (JS1) inferred from genomics. *ISME J* 2019;13 (9):2377–90.
- [56] Schouw A, Leiknes Eide T, Stokke R, Pedersen RB, Steen IH, Bødtker G. *Abyssivirga alkaniphila* gen. nov., sp. nov., an alkane-degrading, anaerobic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent system, and emended descriptions of *Natranaerovirga pectinivora* and *Natranaerovirga hydrolytica*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66 (4):1724–34.
- [57] Mardanov AV, Ravin NV, Svetlitchnyi VA, Beletsky AV, Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA, et al. Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a siberian oil reservoir, as revealed by genome analysis. *Appl Environ Microbiol* 2009;75 (13):4580–8.
- [58] Khelifi N, Amin Ali O, Roche P, Grossi V, Brochier-Armanet C, Valette O, et al. Anaerobic oxidation of long-chain n-alkanes by the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon, *Archaeoglobus fulgidus*. *ISME J* 2014;8(11):2153–66.
- [59] Callaghan AV, Morris BEL, Pereira IAC, McInerney MJ, Austin RN, Groves JT, et al. The genome sequence of *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01: a blueprint for anaerobic alkane oxidation. *Environ Microbiol* 2012; 14(1): 101–13.
- [60] Lloyd KG, Schreiber L, Petersen DG, Kjeldsen KU, Lever MA, Steen AD, et al. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature* 2013;496 (7444):215–8.
- [61] Ragsdale SW, Pierce E. Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784 (12):1873–98.
- [62] Schuchmann K, Müller V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2014; 12:09–21.
- [63] Thauer RK, Kaster AK, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol* 2008;6 (8):579–91.
- [64] Widdel F, Rabus R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12 (3):259–76.
- [65] Laso-Pérez R, Wegener G, Knittel K, Widdel F, Harding KJ, Krukenberg V, et al. Thermophilic archaea activate butane via alkyl-coenzyme M formation. *Nature* 2016;539 (7629):396–401.
- [66] Wang Y, Wegener G, Hou J, Wang F, Xiao X. Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of Archaea. *Nat Microbiol* 2019;4 (4):595–602.
- [67] Vanwonterghem I, Evans PN, Parks DH, Jensen PD, Woodcroft BJ, Hugenholtz P, et al. Methylotrophic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nat Microbiol* 2016;1:16170.
- [68] Krzmarzick MJ, Taylor DK, Fu X, McCutchan AL. Diversity and niche of archaea in bioremediation. *Archaea* 2018;2018:3194108.
- [69] Li XX, Mbadinga SM, Liu JF, Zhou L, Yang SZ, Gu JD, et al. Microbiota and their affiliation with physicochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs. *Int Biodeterior Biodegradation* 2017;120:170–85.
- [70] Wang LY, Duan RY, Liu JF, Gu SZ, Yang JD, Mu BZ. Molecular analysis of the microbial community structures in water-flooding petroleum reservoirs with different temperatures. *Biogeosciences* 2012;9 (11):4645–59.
- [71] 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 Microbiol Ecol* 2013;83 (3):757–66.
- [72] Ji JH, Liu YF, Zhou L, Mbadinga SM, Pan P, Chen J, et al. Methanogenic degradation of long n-alkanes requires fumarate-dependent activation. *Appl Environ Microbiol* 2019;85 (16):1–10.
- [73] Savage KN, Krumholz LR, Gieg LM, Parisi VA, Suflita JM, Allen J, et al. Biodegradation of low-molecular-weight alkanes under mesophilic, sulfate-reducing conditions: metabolic intermediates and community patterns. *FEMS Microbiol Ecol* 2010;72 (3):485–95.
- [74] Liang B, Wang LY, Zhou Z, Mbadinga SM, Zhou L, Liu JF, et al. High frequency of *Thermodesulfobivrio* spp. and Anaerolineaceae in association with *Methanoculleus* spp. in a long-term incubation of n-alkanes-degrading methanogenic enrichment culture. *Front Microbiol* 2016;7:1431.
- [75] Liu JF, Zhang K, Liang B, Zhou ZC, Yang SZ, Li W, et al. Key players in the methanogenic biodegradation of n-hexadecane identified by DNA-stable isotope probing. *Int Biodeterior Biodegradation* 2019;143:104709.
- [76] Neufeld JD, Dumont MG, Vohra J, Murrell JC. Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microb Ecol* 2007; 53(3):435–42.
- [77] Mbadinga SM, Li KP, Zhou L, Wang LY, Yang SZ, Liu JF, et al. Analysis of alkane-dependent methanogenic community derived from production water of a high-temperature petroleum reservoir. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;96 (2): 531–42.
- [78] Whitman WB, Bowen TL, Boone DR. The methanogenic bacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes*. New York: Springer; 2006. p. 165–207.
- [79] Orsi WD. Ecology and evolution of seafloor and subsurface microbial communities. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:671–83.