
 研究论文

猪粪原料沼气工程系统中的原核微生物群落结构

芮俊鹏¹, 李吉进², 李家宝¹, 王远鹏³, 柯蓝婷³, 张时恒¹, 李香真¹

(¹中国科学院成都生物研究所, 中国科学院环境与应用微生物重点实验室, 环境微生物四川省重点实验室, 四川 成都 610041; ²北京市农林科学院植物营养与资源研究所, 北京 100097; ³厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 福建 厦门 361005)

摘要: 采集了中国不同地区的 13 个猪粪原料沼气工程系统的沼液, 利用 16S rRNA 基因扩增子高通量测序技术研究了原核微生物群落组成及多样性。结果表明, Firmicutes 是猪粪原料沼气工程系统中的主导微生物, 其次为 Bacteroidetes、Proteobacteria 和 Chloroflexi。在相似的温度条件下, 铵态氮与磷酸盐的比例是影响猪粪原料沼气工程系统原核微生物群落结构及多样性的主要因素。较高的铵磷比会富集 Firmicutes 门的菌群, 尤其是 *Clostridium sensu stricto* 属; 而较低的铵磷比则有利于 Bacteroidetes 和 Proteobacteria。不同营养类型产甲烷菌对高浓度铵态氮耐受程度不同 (氢营养型产甲烷菌 > *Methanosarcina* > *Methanosaeta*), 影响着产甲烷菌群落组成。产甲烷菌和互营菌的群落组成是影响沼气发酵产气效率的重要生物因素, 高比例的氢型产甲烷菌和丙酸互营菌更有利于提高产甲烷效率。

关键词: 沼气工程; 猪粪; 16S rRNA 扩增子高通量测序; 原核微生物群落; 生物反应器; 发酵; 甲烷

DOI: 10.3969/j.issn.0438-1157.2014.05.044

中图分类号: Q 939.97

文献标志码: A

文章编号: 0438—1157 (2014) 05—1868—08

Prokaryotic community structures in biogas plants with swine manure

RUI Junpeng¹, LI Jijin², LI Jiabao¹, WANG Yuanpeng³, KE Lanting³, ZHANG Shiheng¹, LI Xiangzhen¹

(¹Key Laboratory of Environmental and Applied Microbiology, CAS, Environmental Microbiology Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, Sichuan, China; ²Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; ³Department of Chemical and Biochemical Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: Slurry samples from 13 industrial biogas plants using swine manure as raw substrate were collected from different regions in China. The prokaryotic community compositions were investigated using 16S rRNA amplicon high-throughput sequencing technique. The results showed that Firmicutes was the most abundant phylum in these biogas plants, followed by Bacteroidetes, Proteobacteria and Chloroflexi. The ratio of ammonium to phosphate was the main factor affecting prokaryotic community structure and diversity for similar temperatures and substrates. A high ratio of ammonium to phosphate enriched Firmicutes, especially the genus *Clostridium sensu stricto*, while Bacteroidetes and Proteobacteria preferred a low ratio. Ammonium influenced the compositions of methanogens since their tolerance degrees to ammonium were different (hydrogenotrophic methanogenes > *Methanosarcina* > *Methanosaeta*). Community compositions of methanogens and syntrophs were the most important biotic factors affecting biogas production rate. Biogas production rate could be increased by

2013-12-25 收到初稿, 2014-01-28 收到修改稿。

联系人: 李香真。第一作者: 芮俊鹏 (1984—), 男, 博士, 助理研究员。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2013CB733502); 国家自然科学基金项目 (41301271, 41271260)。

Received date: 2013-12-25.

Corresponding author: Prof. LI Xiangzhen, lixz@cib.ac.cn

Foundation item: supported by the National Basic Research Program of China (2013CB733502) and the National Natural Science Foundation of China (41301271, 41271260).

increasing the abundances of hydrogenotrophic methanogenes and syntrophic propionate-oxidizing bacteria.

Key words :biogas plants ;swine manure ;16S rRNA amplicon high-throughput sequencing ;prokaryotic community ;bioreactors ; fermentation ; methane

引 言

我国是世界公认的养猪大国，养猪场遍布全国各地，由此导致的猪粪污染问题日益严重。将猪粪作为原料进行沼气发酵，既治理了环境污染，又缓解了能源危机，因此，我国的沼气工程建设发展迅速。沼气发酵是有机质在厌氧条件下被各类微生物分解转化，最终产生甲烷的过程。该过程具体可分为水解、产酸、产甲烷 3 步。有 4 类微生物参与：初级发酵菌（水解菌）、次级发酵菌（互营菌）、产乙酸菌、产甲烷菌^[1]。关于沼气发酵系统中的微生物群落结构的研究已有很多报道，由于发酵条件不同，不同研究报道的沼气发酵系统微生物群落结构也不同^[2-4]。一般认为底物类型和运行温度是影响微生物群落结构的主要因素^[4]。国内的沼气工程以中温发酵为主，猪粪是最主要的畜禽粪便原料。本文采集了中国不同地区的 13 个猪粪原料沼气工程系统的沼液，利用 16S rRNA 基因扩增子高通量测序技术研究了它们的原核微生物群落结构，并分析了群落结构与环境因子的关系，以期揭示影响中温猪粪原料沼气工程系统原核微生物群落结构的环境因子及影响产甲烷效率的生物因素。

1 实验材料和方法

1.1 沼液样品理化性状的测定

本实验的沼液样品采集于全国 7 个省市的 13 个以猪粪为主要原料的沼气工程发酵罐，均为从出液管流出的新鲜发酵液。发酵罐的日均产气量、温度、水力停留期（HRT）等数据由所属沼气站提供。沼液的 pH 用 pH 计检测。参照废水监测分析方法^[5]，沼液中的化学需氧量（COD）用重铬酸钾消解法，氨氮用纳氏试剂分光光度法，磷酸盐用钼锑抗分光光度法进行测定。

1.2 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增和高通量测序

沼液于 13000 g 离心 5 min，弃上清，沉淀放入无菌离心管，储存于 -20 备用。

DNA 提取方法见文献^[6]，略有改动。样品中的微生物经磁珠研磨破碎，2.5 mg · ml⁻¹ 溶菌酶、0.1 mg · ml⁻¹ 蛋白酶 K、2% SDS 处理各 1 h，提取

的 DNA 用 CTAB 方法纯化^[7]。

PCR 所用引物为覆盖 16S rRNA 基因 V4 区域的细菌、古菌通用引物 515F（5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3'）和 806R（5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'），这对引物对细菌和古菌的覆盖率很高^[8]，可准确反映微生物的比例和分类地位^[9-10]。PCR 下游引物引入标签序列（barcode），PCR 条件见文献^[11]。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳，试剂盒回收，用 NanoDrop 测定 DNA 浓度，最后按等摩尔比例混合成测序文库，混合好的 16S rRNA 扩增子文库用 Miseq 测序仪测序（Illumina Inc., San Diego, CA）。

1.3 高通量数据前处理以及数据的统计分析

通过 QIIME 平台去除原始序列中的低质量序列^[12]，根据标签序列分开来自不同样品的序列。利用 Uchime 软件去除在 PCR 过程中形成的嵌合体^[13]，获得的高质量序列用 Usearch 方法进行聚类^[14]，以 16S rRNA 序列 97% 相似度作为分类操作单元（operational taxonomic units, OTUs）的划分标准。Goods 覆盖度、Chao1 和 Shannon 多样性指数的计算利用 QIIME 平台完成，通过 RDP Classifier 鉴定 OTU 代表性序列的微生物分类地位（80% 置信水平）。用主坐标分析（principal coordinates analysis, PCoA）方法分析样品之间的微生物群落结构差异。Pearson 相关性分析用 SPSS Statistics 21.0 进行，Mantel test 分析用 PASSaGE 2 进行（<http://www.passagesoftware.net/>），方差分解分析（variation partition analysis, VPA）分析用 R 语言 vegan 程序包的 varpart 程序进行^[15]。

2 实验结果与讨论

2.1 猪粪原料沼气工程系统的概况

如表 1 所示，本实验的沼液样品采集于北京、江苏东台、上海崇明、浙江浦江、宁夏银川、四川资中、广东惠州 7 个省市的 13 个猪粪原料沼气工程发酵罐，发酵罐的容积为 60 ~ 10000 m³ 不等。除了浦江和惠州的运行温度较低之外，其他发酵系统的运行温度在 35 左右。各个系统的沼液 pH 为 6.99 ~ 7.75。

表 1 猪粪原料沼气工程系统的沼液样品特性

Table 1 Slurry properties in samples from biogas plants with swine manure

Sample	Sampling site	Fermentor volume /m ³	Biogas production /m ³ · d ⁻¹	HRT/d	Temperature/	pH	COD/mg · L ⁻¹	NH ₄ ⁺ /mg · L ⁻¹	Phosphate /mg · L ⁻¹
BJ1	Beijing	500	400	30	35	7.16	7244	419	79.40
BJ2	Beijing	300	230	10—15	36.5	7.55	5640	2482	67.64
BJ3	Beijing	500	350		33	7.71	3622	2007	17.85
DT	Dongtai	10000	6000	17	35	7.75	1027	1125	16.86
SH1	Shanghai	400			35	7.6	6848	3474	92.39
SH2	Shanghai	500	400	30	35	7.35	1912	1766	29.60
SH3	Shanghai	70	8-10	20	35	7.51	2054	1799	31.45
PJ1	Pujiang	300			25	7.25	346	838	49.51
PJ2	Pujiang	60			25	6.99	331	552	58.20
YC	Yinchuan	700	450	18	35	7.02	695	828	32.30
ZZ	Zizhong	500	500	18	36	7.64	1217	603	7.67
HZ1	Huizhou	1000	400	< 5	30	7.64	802	1475	7.21
HZ2	Huizhou	1000	400	< 5	30	7.07	315	588	48.43

Note: Biogas production from SH1, PJ1 and PJ2 are not measured.

北京和上海的 6 个发酵系统的 COD 和铵态氮浓度都较高,而浦江的两个系统由于其猪粪原料来自生态养殖场,其 COD、铵态氮浓度及铵磷比都较低。惠州的样品 HZ2 也有着较低的 COD 和铵态氮浓度。

2.2 猪粪原料沼气工程系统中原核微生物群落多样性及其影响因素

本实验利用 Miseq 高通量测序方法对不同地区猪粪原料沼气工程系统中的原核微生物菌群进行了研究。经数据前处理,从 13 个样本中获得 284249 条高质量 16S rRNA 基因序列,测序覆盖度 95.4% ~ 98.7%。根据序列相似性 97% 水平划分得到的 OTU 总数为 7744 个,其中有 3891 个 OTU 仅含一条序列。

主坐标分析 (PCoA) 的结果见图 1, 41.28% 和

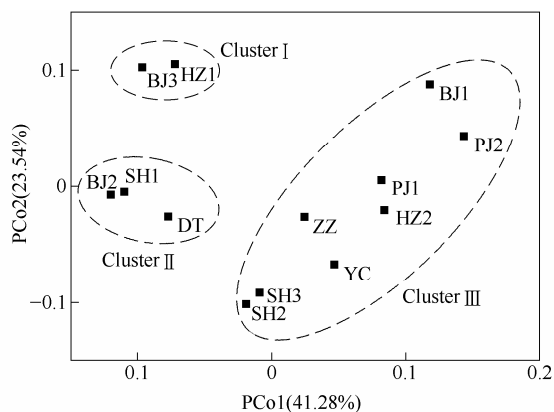


图 1 沼气工程系统中原核微生物群落的主坐标分析

Fig.1 Principal coordinates analysis (PCoA) of prokaryotic communities in biogas plants (values on axes indicate percentages of total variation explained by each axis)

23.54% 的微生物群落差异可以由 PCo1 轴和 PCo2 轴解释。图中的样品点大致聚类成 3 个 cluster: Cluster I 由 BJ3 和 HZ1 构成; Cluster II 由 BJ2、SH1 和 DT 构成; 剩下的 8 个样品构成 Cluster III。单因素方差分析结果表明, Cluster III 的铵磷比极显著高于其他两个 cluster ($p < 0.005$)。具有相似铵磷比的样品,在 PCoA 图中一般距离很近,例如 SH2 和 SH3, BJ2 和 SH1; 而其他单一的因子,如 COD、铵态氮、磷酸盐浓度对群落结构差异的影响并不显著。

多样性的结果见表 2。总体上 Chao1 丰富度指数和 Shannon 多样性指数都表现出地域规律性,多样性由高到低依次为: 浦江 > 上海 > 惠州和北京 (不包括 BJ1, 其生物多样性远高于 BJ2 和 BJ3)。上述 3 个 cluster 的 Shannon 多样性指数也存在极显著差异 ($p < 0.001$), 由高到低依次为 Cluster III > Cluster I > Cluster II。Shannon 多样性指数与铵磷比呈极显著负相关 (Pearson $r = -0.771$, $p < 0.002$)。

用 OTU 相对丰度数据做的 Mantel test 结果表明,铵磷比与原核微生物群落呈极显著正相关 ($r = 0.620$, $p < 0.002$), 而单独计算铵态氮和磷酸盐浓度与原核微生物群落的相关性却不显著。此外, pH 与原核微生物群落显著正相关 ($r = 0.314$, $p < 0.05$), pH 与铵磷比呈显著正相关 ($r = 0.658$, $p < 0.05$)。VPA 分析表明,铵磷比和 pH 分别能解释 13 个沼气工程样品原核微生物群落差异的 40% 和 36%, 其中有 26% 的差异为两者共同解释的部分。

表 2 原核微生物群落多样性指数（序列相似性 97%水平）与铵磷比

Table 2 Prokaryotic diversity indices at 97% 16S rRNA gene sequence similarity and ratio of NH₄⁺ to phosphate

Sample	Number of sequences	Chao1 estimator of richness	Observed OTUs	Shannon's diversity index	NH ₄ ⁺ /phosphate	Cluster
BJ1	16462	2266	1188	7.38	5.3	
BJ2	22375	1463	731	5.495	36.7	
BJ3	23991	1256	605	4.398	112.5	
DT	23831	2099	1082	6.807	66.7	
SH1	11080	1952	794	5.652	37.6	
SH2	18177	1882	925	6.426	59.7	
SH3	23084	2000	979	6.573	57.2	
PJ1	19638	2084	929	6.632	16.9	
PJ2	24724	3009	1311	7.732	9.5	
YC	32553	1618	958	7.069	25.6	
ZZ	19651	1983	1084	6.442	78.7	
HZ1	25054	1420	683	4.297	204.6	
HZ2	23629	1197	771	6.263	12.1	

All sequence datasets were re-sampled to ensure equal number of reads (11080 reads) for diversity indices analysis.

因此，铵磷比显著影响了 pH，两者对微生物群落的影响有很大一部分是重叠的。

上述结果说明铵磷比是影响沼气工程系统微生物群落差异的主要环境因素。

2.3 猪粪原料沼气工程系统中原核微生物群落组成及其影响因素

2.3.1 在门分类水平上的原核微生物群落组成 如图 2 所示，猪粪原料沼气工程系统中原核微生物主要来自于厚壁菌门（Firmicutes）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、变形菌门（Proteobacteria）和绿弯菌门（Chloroflexi）。其中 Firmicutes 的比例在 3

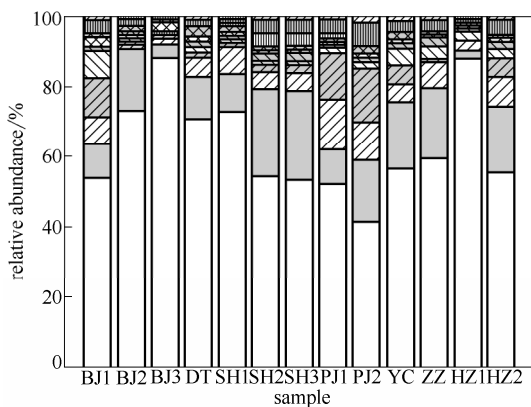
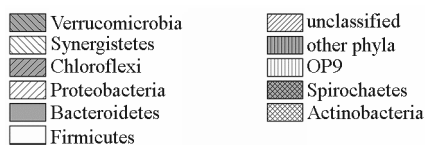


图 2 沼气工程系统中原核微生物在门分类水平上的群落结构

Fig.2 Prokaryotic community structure at phylum level in biogas plants



个 cluster 中存在极显著差异 ($p < 0.005$): 在 Cluster 中约占 88%, 在 Cluster 中约占 72%, 在 Cluster 中约占 53%。Bacteroidetes 在 Cluster 中的比例要极显著高于其他两个 cluster ($p < 0.005$), Proteobacteria 在 Cluster 中的比例也显著高于其他两个 cluster ($p < 0.05$)。Pearson 相关性分析结果表明，铵磷比与 Firmicutes 的比例呈极显著正相关 ($p < 0.005$), 与 Bacteroidetes 和 Proteobacteria 的比例呈显著负相关 ($p < 0.05$) (图 3)。

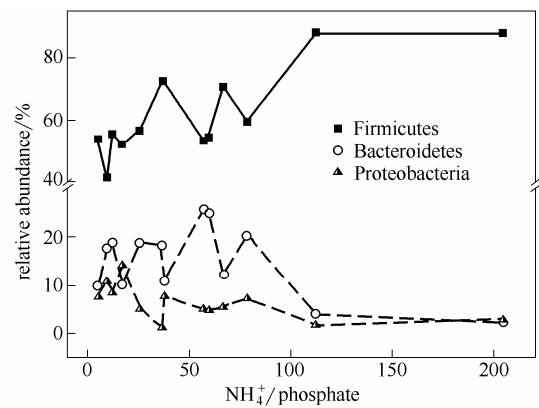


图 3 优势原核微生物菌群与铵磷比的关系

Fig.3 Relationship between dominant prokaryotic phyla and ratio of ammonium to phosphate

此外，平均相对丰度大于 0.5% 的门还有互营菌门（Synergistetes）、疣微菌门（Verrucomicrobia）、放线菌门（Actinobacteria）、螺旋菌门（Spirochaetes）和 OP9 等。

2.3.2 在属的分类水平上的微生物群落组成 如图 4 所示，在猪粪原料沼气工程系统中，梭菌属

(*Clostridium sensu stricto*) 是最主要的属，它的比例在 3 个 cluster 中存在极显著差异 ($p < 0.005$): 在 Cluster 中约占 54%，在 Cluster 中约占 31%，在 Cluster 中分为两种情况：在 BJ1 和 PJ2 中比例很低 约占 3%，而在剩下的 6 个样品中约占 18%。此外，平均相对丰度大于 0.5% 的属还有 *Clostridium*、*Turicibacter*、*Saccharofermentans*、*Sedimentibacter*、*Syntrophomonas*、*Corynebacterium*、*Smithella*、*Mogibacterium* 和 *Desulfobulbus* 等。其中 *Clostridium sensu stricto* 和 *Turicibacter* 的比例与铵磷比呈极显著正相关 ($p < 0.005$)

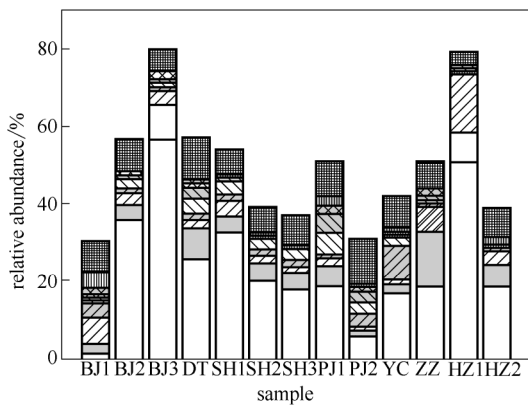
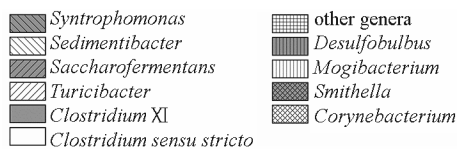


图 4 沼气工程系统中原核微生物在属分类水平上的群落结构

Fig.4 Prokaryotic community structure at genus level in biogas plants



2.4 影响猪粪原料沼气工程系统产甲烷效率的因素

2.4.1 影响猪粪原料沼气工程系统产甲烷效率的非生物因素

在上述 13 个发酵系统中，有 3 个系统的产甲烷速率是未知的 (SH1、PJ1 和 PJ2)，其余 10 个系统可以计算其容积产气率 (图 5)。惠州的两个发酵系统的原料为猪粪稀液，因此其水力滞留期比其他猪粪发酵系统短，而且发酵效果欠佳。因此料液中猪粪的浓度是影响产甲烷效率的一个重要因素。

Pearson 相关性分析结果表明，在已有的环境因素数据中 (表 1)，仅温度与容积产气率呈极显著正相关 ($p < 0.01$)。然而，这一结果实际上可能是由于惠州系统的料液过稀造成的。除去惠州的两个系统，剩下 8 个系统的运行温度差别不大，因此在本实验中，温度对产甲烷效率的影响无法

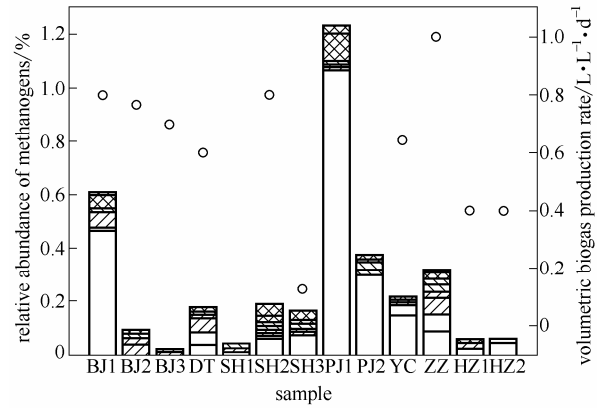
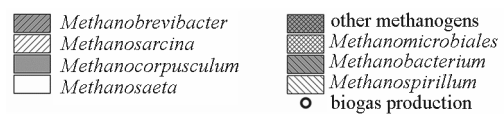


图 5 产甲烷菌的群落结构及容积产气率

Fig.5 Community structure of methanogens and volumetric biogas production rate (biogas production from SH1, PJ1 and PJ2 are not measured)



判断。

2.4.2 影响猪粪原料沼气工程系统产甲烷效率的生物因素

在沼气发酵过程的 3 个步骤中，产甲烷这一步是由产甲烷古菌完成的。本实验的产甲烷菌群落结构如图 4 所示，其比例在原核微生物群落中相对较小。铵态氮浓度可能是影响不同营养类型产甲烷菌比例的主要因素，对高浓度铵态氮的耐受程度依次为氢营养型产甲烷菌 > 氢和乙酸兼性营养型的甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina*) > 乙酸营养型的甲烷鬃菌 (*Methanosaeta*) [16-17]。在本实验中，当铵态氮浓度较低时 (例如 Cluster)，*Methanosaeta* 是主要的产甲烷菌；随着铵态氮浓度的提高，*Methanosaeta* 逐渐被 *Methanosarcina* 取代；当铵态氮浓度达到 $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 (BJ2 和 BJ3)，已经检测不到 *Methanosaeta*；当铵态氮浓度上升到 $3474 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 (样品 SH1)，两种乙酸营养型产甲烷菌都被抑制，仅检测到氢营养型产甲烷菌的存在 (图 6)。

本实验中检测到的氢型产甲烷菌主要有甲烷粒菌 (*Methanocorpusculum*)、甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter*)、甲烷螺菌 (*Methanospirillum*) 和甲烷杆菌 (*Methanobacterium*) 等。Pearson 相关性分析结果显示，在上述几种产甲烷菌中，仅 *Methanospirillum* 的比例与容积产气率呈显著正相关 ($p < 0.05$)。因此，产甲烷菌的群落组成是影响沼气工程系统产甲烷效率的一个重要生物因素。

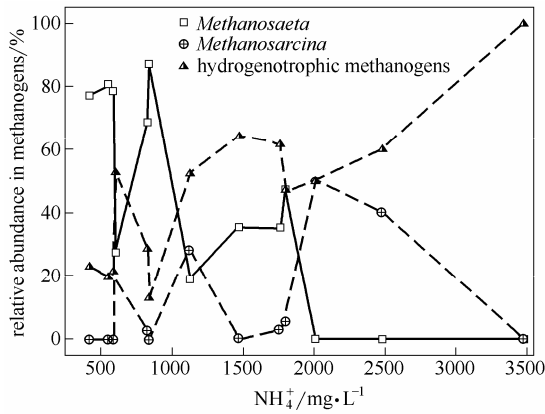


图 6 铵态氮浓度对产甲烷菌相对丰度的影响

Fig.6 Impact of ammonium concentration on relative abundances of methanogens

在沼气发酵过程中，丙酸、丁酸、酚类等小分子的分解需要通过互营菌与氢型产甲烷菌的互营代谢过程实现^[1]，由于互营降解在热力学上较为不利，因此是整个沼气发酵过程的限速步骤。本实验检测到的主要互营菌群落结构如图 7 所示，主要包括 *Syntrophomonas*、*Smithella*、*Syntrophorhabdus*、*Pelotomaculum*、*Syntrophaceticus* 和 *Syntrophus* 等。丁酸互营菌 *Syntrophomonas* 通过与氢型产甲烷菌互营代谢能将丁酸降解为乙酸和甲烷^[18]，是本实验中比例最高的互营菌。丙酸互营菌 *Pelotomaculum* 通过互营代谢能将丙酸降解为乙酸和甲烷^[19]，在个别样品中比例较高，例如容积产气率最高的 ZZ。*Syntrophorhabdus* 和 *Syntrophus* 能互营降解苯甲酸等芳香族化合物，乙酸是其产物之一^[20-21]，它们在浦江的两个样品中比例较高。*Syntrophaceticus* 兼具乙酸互营代谢及同型产乙酸能力^[22]，在 Cluster 和 的部分样品中有少量分布，尚不清楚该属在这些样品中扮演的是乙酸利用者还是产生者。*Smithella* 可将 2 分子丙酸转化为 1 分子丁酸和 1 分子乙酸，丁酸再被进一步互营降解产生丁酸和

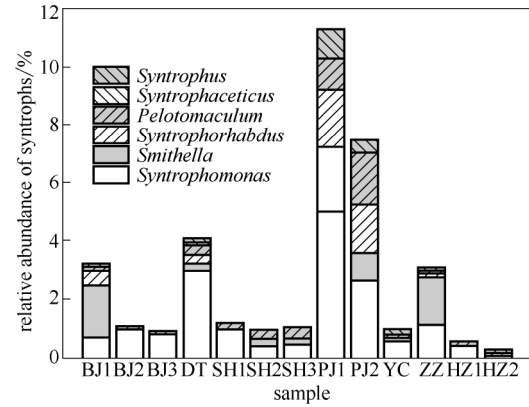


图 7 沼气工程系统主要互营菌的群落结构

Fig.7 Community structure of syntrophs in biogas plants

甲烷^[23]，该属在浦江的两个样品以及 BJ1 和 ZZ 中比例较高。

Pearson 相关性分析结果显示 (表 3)，*Syntrophomonas*、*Smithella*、*Syntrophorhabdus* 和 *Syntrophus* 都与 *Methanosaeta* 呈极显著正相关 ($p < 0.01$)，说明它们都参与了互营代谢，从而为 *Methanosaeta* 提供产甲烷的底物乙酸；尽管 *Pelotomaculum* 与 *Methanosaeta* 的正相关性不显著，但它与 *Methanobacterium* 呈极显著正相关 ($p < 0.01$)，这意味着这类丙酸互营菌可能需要和特定的氢型产甲烷菌相偶联才能执行丙酸互营功能，该特异性可能和丙酸互营过程需要更低的氢分压有关^[24]。从图 5 可以看出，与几乎普遍存在的丁酸互营菌 (如 *Syntrophomonas*) 相比，高比例的丙酸互营菌 (如 *Pelotomaculum* 和 *Smithella*) 对提高沼气工程系统的产甲烷效率更为重要，互营菌的群落组成是影响沼气工程系统产甲烷效率的另一个重要生物因素。

以 *Clostridium sensu stricto* 为代表的初级发酵菌 (或者称之为水解菌) 尽管在原核微生物群落中所占的比例很高，却并不是决定产甲烷效率的因素。

表 3 主要互营菌与产甲烷菌间的 Pearson 相关性分析

Table 3 Pearson's correlation coefficients between dominant syntrophs and methanogens

Methanogens	Dominant systrophs				
	<i>Syntrophomonas</i>	<i>Smithella</i>	<i>Syntrophorhabdus</i>	<i>Pelotomaculum</i>	<i>Syntrophus</i>
<i>Methanosaeta</i>	0.748	0.825	0.853	0.531	0.916
<i>Methanocorpusculum</i>	0.069	0.135	-0.199	-0.242	-0.129
<i>Methanosarcina</i>	0.109	0.078	-0.244	-0.231	-0.215
<i>Methanobrevibacter</i>	-0.159	0.432	-0.104	-0.289	-0.225
<i>Methanospirillum</i>	0.017	0.160	-0.064	0.074	-0.179
<i>Methanobacterium</i>	0.330	0.457	0.533	0.689	0.396

Correlation is significant at $p < 0.01$ level.

以 Cluster 的两个样品为例, 虽然它们含有相似比例的 *Clostridium sensu stricto*, 其容积产气率却相差甚远; 而 BJ1 的 *Clostridium sensu stricto* 比例很低, 却有着较高的容积产气率。

3 结 论

综上所述, Firmicutes 是猪粪原料沼气工程系统中的优势原核微生物, 其次为 Bacteroidetes、Proteobacteria 和 Chloroflexi。在相似的运行温度条件下, 铵磷比是影响该系统原核微生物群落结构及多样性的主要因素。较高的铵磷比会富集 Firmicutes 门的菌群, 尤其是 *Clostridium sensu stricto* 属; 而较低的铵磷比则有利于 Bacteroidetes 和 Proteobacteria。不同营养类型产甲烷菌对高浓度铵态氮耐受程度的不同 (氢营养型产甲烷菌 > *Methanosarcina* > *Methanosaeta*), 影响着产甲烷菌群落组成。产甲烷菌和互营菌的群落组成是影响沼气工程系统产甲烷效率的重要生物因素, 高比例的氢型产甲烷菌和丙酸互营菌更有利于提高产甲烷效率。

References

- [1] Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, **61**(2): 262-280
- [2] Hanreich A, Schimpf U, Zakrzewski M, Schluter A, Benndorf D, Heyer R, Rapp E, Puhler A, Reichl U, Klocke M. Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, **36**(5): 330-338
- [3] Nelson M C, Morrison M, Yu Z T. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters[J]. *Bioresour Technol*, 2011, **102**(4): 3730-3739
- [4] Sundberg C, Al-Soud W A, Larsson M, Alm E, Yekta S S, Svensson B H, Sorensen S J, Karlsson A. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, **85**(3): 612-626
- [5] State Environmental Protection Administration of Water and Wastewater Monitoring Analysis Method Editorial Board(国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会). Water and Wastewater Monitoring and Analysis Methods(水和废水监测分析方法)[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002
- [6] Rademacher A, Zakrzewski M, Schluter A, Schonberg M, Szczepanowski R, Goesmann A, Puhler A, Klocke M. Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing[J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2012, **79**(3): 785-799
- [7] Zhu D, Chen H A, Wu N, Wang Y F, Luo P. Winter methane emission from an alpine open fen on Tibetan Plateau[J]. *Polish Journal of Ecology*, 2011, **59**(1): 93-100
- [8] Walters W A, Caporaso J G, Lauber C L, Berg-Lyons D, Fierer N, Knight R. Primer prospector: de novo design and taxonomic analysis of barcoded polymerase chain reaction primers[J]. *Bioinformatics*, 2011, **27**(8): 1159-1161
- [9] Liu Z Z, Lozupone C, Hamady M, Bushman F D, Knight R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, **35**(18): e120
- [10] Peiffer J A, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe S G, Dangl J L, Buckler E S, Ley R E. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, **110**(16): 6548-6553
- [11] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, Berg-Lyons D, Lozupone C A, Turnbaugh P J, Fierer N, Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**: 4516-4522
- [12] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F D, Costello E K, Fierer N, Pena A G, Goodrich J K, Gordon J I, Huttley G A, Kelley S T, Knights D, Koenig J E, Ley R E, Lozupone C A, McDonald D, Muegge B D, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky J R, Turnbaugh P J, Walters W A, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, **7**(5): 335-336
- [13] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, **27**(16): 2194-2000
- [14] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, **26**(19): 2460-2461
- [15] Borcard D, Legendre P, Drapeau P. Partialling out the spatial component of ecological variation[J]. *Ecology*, 1992, **73**(3): 1045-1055
- [16] Karakashev D, Batstone D J, Angelidaki I. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(1): 331-338
- [17] Sprott G D, Patel G B. Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1986, **7**(2/3): 358-363
- [18] Mcinerney M J, Bryant M P, Hespell R B, Costerton J W. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty-acid oxidizing bacterium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, **41**(4): 1029-1039
- [19] Imachi H, Sekiguchi Y, Kamagata Y, Hanada S, Ohashi A, Harada H. *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, **52**: 1729-1735
- [20] Mountfort D O, Brulla W J, Krumholz L R, Bryant M P. *Syntrophus buswellii* gen. nov., sp. nov.: a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1984, **34**(2): 216-217
- [21] Qiu Y L, Hanada S, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y, Sekiguchi Y. *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first

- cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**(7): 2051-2058
- [22] Westerholm M, Roos S, Schnurer A. *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, **309**(1): 100-104
- [23] De Bok Fa M, Stams A J M, Dijkema C, Boone D R. Pathway of propionate oxidation by a syntrophic culture of *Smithella propionica* and *Methanospirillum hungatei*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(4): 1800-1804
- [24] Stams A J M. Metabolic interactions between anaerobic-bacteria in methanogenic environments[J]. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1994, **66**(1/2/3): 271-294