



贵州阿哈湖水库沉积物中甲烷氧化菌分布与功能

赵若男¹, 艾佳^{1,3}, 李彦澄^{1,2*}, 王乐乐¹, 李江^{1,2}

1 贵州大学资源与环境工程学院 喀斯特地质资源与环境教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

2 贵州喀斯特环境生态系统教育部野外科学观测研究站, 贵州 贵阳 550025

3 黔南生态环境监测中心, 贵州 都匀 558013

赵若男, 艾佳, 李彦澄, 王乐乐, 李江. 贵州阿哈湖水库沉积物中甲烷氧化菌分布与功能[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 809-825.

ZHAO Ruonan, AI Jia, LI Yancheng, WANG Lele, LI Jiang. Distribution and functions of methanotrophs in the sediments of Aha Lake Reservoir, Guizhou Province[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 809-825.

摘要: 甲烷氧化菌是一类能够以甲烷作为唯一碳源和能量维持生存的微生物, 其活动与生态系统中物质循环及能量流动密切相关。【目的】了解阿哈湖水库沉积物中甲烷氧化菌群落结构及代谢功能。【方法】采用宏基因组技术对环湖沉积物和湖心沉积物进行研究。【结果】水库沉积物中主要的好氧甲烷氧化菌是甲基杆菌属(*Methylobacter*) (0.37%)和甲基单胞菌属(*Methylomonas*) (0.12%), 主要的厌氧甲烷氧化菌是 *Candidatus_Methylomirabilis* (0.12%), 属于 NC10 门细菌中的亚硝酸盐反硝化型厌氧甲烷氧化菌, 其中好氧甲烷氧化菌的 *pmoA* 基因为 6.16×10^7 copies/g, 反硝化型厌氧甲烷氧化菌的 16S rRNA 基因为 2.84×10^7 copies/g。4 种代谢的功能基因多样性表现为氮代谢>碳代谢>硫代谢>甲烷代谢, 基于京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)基因库进行注释得到 6 大类功能, 发现 18 条与碳(包括甲烷)、氮、硫代谢有关的完整代谢途径。主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)显示环湖沉积物与湖心沉积物之间的甲烷氧化菌种类和功能存在显著差异。影响甲烷氧化菌分布的主要环境因子为氧化还原电位、电导率和硫酸根。【结论】阿哈湖水库甲烷氧化菌以 I 型好氧甲烷氧化菌为主, 甲烷氧化菌群落代谢途径丰富, I 型和 II 型甲烷氧化菌在对 O₂ 的适应性上有显著差异。相关研究可为湖泊水生态环境的保护和微生物资源的开发利用等方面提供一定的理论支撑。

关键词: 甲烷氧化菌; 阿哈湖; 群落结构; 功能基因; 代谢途径

资助项目: 国家自然科学基金(42267064); 贵州省科技计划(黔科中引地[2022] 4022); 贵州省教育厅高等学校科技创新团队(黔教技[2023] 056)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42267064), the Guizhou Provincial Science and Technology Development Project (QKZYD [2022] 4022), and the Science and Technology Innovation Team of Education Agency of Guizhou Province (Qian Jiao Ji [2023] 056).

*Corresponding author. E-mail: ycli3@gzu.edu.cn

Received: 2023-08-17; Accepted: 2023-12-11; Published online: 2023-12-14

Distribution and functions of methanotrophs in the sediments of Aha Lake Reservoir, Guizhou Province

ZHAO Ruonan¹, AI Jia^{1,3}, LI Yancheng^{1,2*}, WANG Lele¹, LI Jiang^{1,2}

1 Key Laboratory of Karst Georesources and Environment, Ministry of Education, College of Resources and Environmental Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 Guizhou Karst Environment Ecosystems Observation and Research Station, Ministry of Education, Guiyang 550025, Guizhou, China

3 Qiannan Ecological Environment Monitoring Center, Duyun 558013, Guizhou, China

Abstract: Methanotrophs can utilize methane as the only carbon source and energy, and they can survive and participate in material circulation and energy flow in ecosystems. **[Objective]** To unveil the structure and functions of methanotrophs community in the sediments from the Aha Lake Reservoir (referred to as the Reservoir), a typical karst lake reservoir in Guiyang City, Guizhou Province. **[Methods]** We used metagenomics to analyze the sediments collected from the edge and the center of the Reservoir. **[Results]** The dominant aerobic methanotrophs were *Methylobacter* (0.37%) and *Methylomonas* (0.12%), and the dominant anaerobic methanotrophs were *Candidatus_Methylomirabilis* (0.12%), being NC10 denitrifying anaerobic methanotrophs. The gene *pmoA* encoding particulate methane monooxygenase of aerobic methanotrophs had the relative abundance of 6.16×10^7 copies/g and the 16S rRNA gene had the relative abundance of 2.84×10^7 copies/g in denitrifying anaerobic methanotrophs. The diversity of four metabolic functional genes followed a trend of nitrogen metabolism>carbon metabolism>sulfur metabolism>methane metabolism. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) annotation revealed six functions and 18 complete pathways involving carbon (including methane), nitrogen, and sulfur metabolism. The results of principal coordinate analysis (PCoA) showed huge discrepancies in the distribution and functions of methanotrophs between sediments from the edge and the center of the Reservoir. Moreover, redox potential, conductivity, and sulfate were primary environmental factors affecting methanotroph distribution. **[Conclusion]** Type I aerobic methanotrophs dominated the Reservoir with abundant metabolic pathways. Types I and II methanotrophs exhibited huge discrepancies in terms of their adaptability to O₂. All these findings are expected to provide theoretical support for lake water environment conservation and microbial utilization.

Keywords: methanotrophs; Aha Lake; community structure; functional gene; metabolic pathway

甲烷是一种温室气体，造成的温室效应约为二氧化碳的 25 倍^[1]，对全球变暖的贡献率约为 22%^[2]。据统计，全球每年向大气释放的甲烷总量约 600 Tg^[3]。甲烷氧化是抵消甲烷向大气

排放的关键过程^[4]，甲烷氧化菌是该过程中最为关键的微生物。甲烷氧化菌是一种革兰氏阴性细菌，能够利用甲烷作为唯一的碳源和能量来源^[5]，是生态系统中甲烷排放的天然消减器，

可利用氧气作为电子受体的是好氧甲烷氧化菌,不可利用氧气作为电子受体的就是厌氧甲烷氧化菌,按系统发育好氧甲烷氧化菌可分为I、II、III这3种类型^[6]。

据估计,湖泊产生且排放的甲烷有30%–99%能被甲烷氧化菌氧化消耗掉^[7],这表明甲烷氧化菌对降低自然源中的甲烷浓度具有十分重要的作用。Mayr等^[8]、Gentzel^[9]、Khmelenina等^[10]和Thomas等^[11]不同国家的研究者均对湖泊甲烷氧化菌有深入研究。虽然我国对湖泊中甲烷氧化菌的研究起步较晚,但是近年来国内对湖泊甲烷氧化菌的研究取得了较大进展。例如,Zhang等^[12]探究了内蒙古高原湖泊中不同类型甲烷氧化菌的影响因素,发现II型和I型甲烷氧化菌分别在高盐度和低盐度水体中占优势。Deng等^[13]研究发现青藏高原湖泊沉积物中以I型甲烷氧化菌为主,在淡水湖中相对多样化。有研究发现三峡库区万州段中II型甲烷氧化菌甲基胞囊菌属(*Methylocystis*)和I型甲烷氧化菌甲基杆菌属(*Methylobacter*)是优势菌属^[14]。Liu等^[15]利用宏基因组学方法揭示了*nxrAB*、*narGHI*、*nasAB*、*pmo-amoABC*和*mmo*基因的协同作用具有完整的甲烷和氮代谢途径。由此可知,目前对湖泊中甲烷氧化菌的研究主要集中在环境因素对甲烷氧化菌群落多样性和丰度的影响等方面,而针对甲烷氧化菌的代谢功能的研究相对较少。

因此,本研究选择贵州省贵阳市阿哈湖水库沉积物作为研究对象,采集环湖沉积物、湖心沉积物及上覆水,分析基本理化性质,利用宏基因组学技术和实时荧光定量PCR研究沉积物中的甲烷氧化菌的群落结构,分析与碳(包括甲烷)、氮、硫代谢有关的代谢途径,为该类型湖泊在水生态安全、水资源利用和水环境保护等方面提供理论支撑,并对后续甲烷氧化菌的利用提供数据支撑。

1 材料与方 法

1.1 研究区域概况以及样品采集

阿哈湖水库位于贵阳市南明河支流小车河上游,属长江流域乌江水系,正常水位1110 m,最大水深24 m,平均水深13 m,水面面积4.31 km²,流域面积190 km²,库容0.54亿 m³,湖水寄居时间为0.44年^[16]。阿哈湖水库是贵阳市重要的水源保护地,与人们日常生活息息相关,由于受到人类活动的影响,导致阿哈湖水库环湖沉积物和湖心沉积物中的微生物存在较大差异,因此本研究分别采集了环湖和湖心的沉积物进行分析,在研究沉积物中微生物的分布特征的同时,对比分析环湖和湖心沉积物中微生物之间的差异。

采样阿哈湖水库环湖和湖心沉积物,每个样点选取0.5 m×0.5 m作为1个样方,每个样方内随机选择1–2个点样品,所有的沉积物均为0–10 cm的表层沉积物,然后将其混合,共采集7个样品,其中环湖沉积物样品5个(AH1–AH5),湖心样品2个(AH6–AH7)(图1)。每个样品分装为2份,一份装入50 mL灭菌离心管后立即放入干冰桶(–80 °C)中,用于宏基因组学分析;另一份装入自封袋中,冷藏(4 °C)带回实验室,用于理化指标分析。

1.2 理化指标分析

上覆水的酸碱度(pH)、氧化还原电位(oxidation-reduction potential, ORP)使用便携式多参数测定仪(哈希公司)进行现场测定。沉积物的pH值以及电导率(electrical conductivity, EC)则按照贺蓓等^[17]的方法进行测定分析,将冷冻干燥之后的沉积物过2 mm的土壤筛,然后和去离子水按照1:5的质量比混合提取5 h,采用便携式多参数测定仪进行测定。总氮(total nitrogen, TN)参考《土壤质量全氮的测定凯氏法

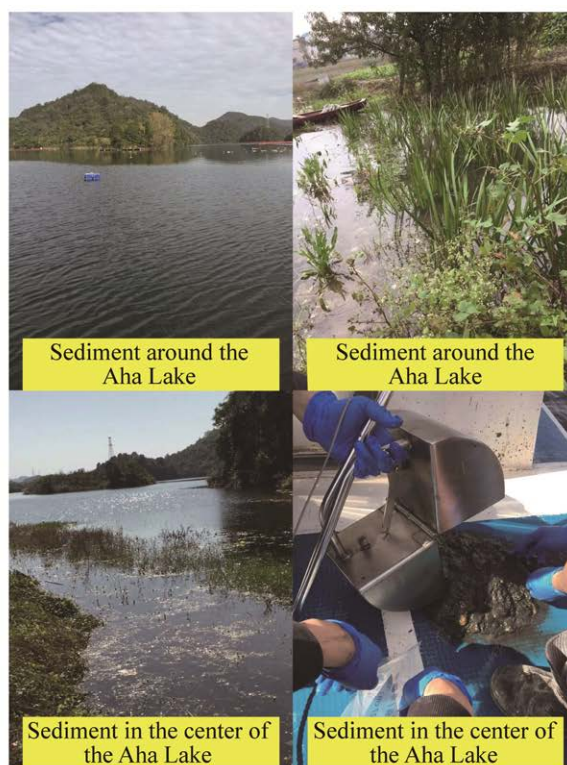
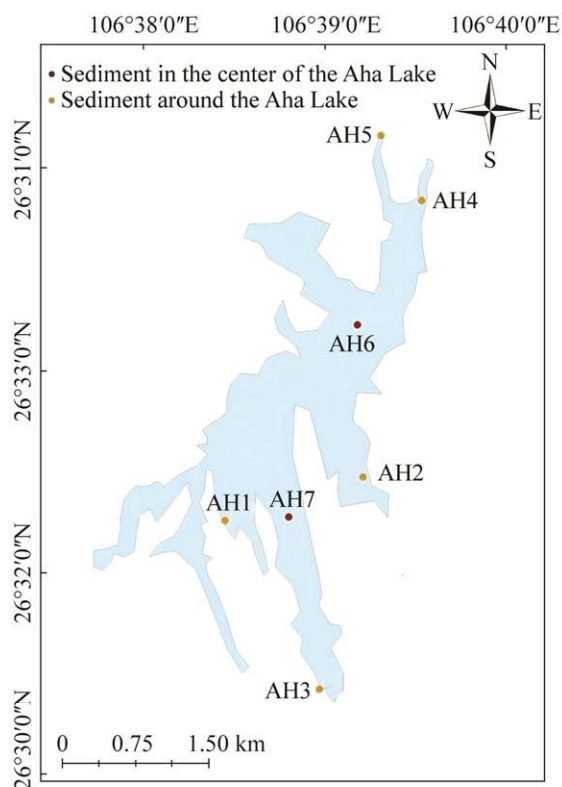


图 1 阿哈湖采样点分布

Figure 1 Distribution of sampling sites in Aha Lake.

(HJ 717—2014)》^[18]进行分析；总磷(total phosphorus, TP)参考《土壤总磷的测定碱熔-钼锑抗分光光度法(HJ 632—2011)》^[19]进行分析。有机质参考鲍士旦《土壤农化分析(第3版)》^[20]重铬酸钾法进行分析。阴离子根据杨叶琴等^[21]的方法利用离子色谱(ICS-1100)对阴离子种类和浓度进行分析。

1.3 实时荧光定量 PCR 测定方法

将采集到的沉积物送至上海美吉生物医药科技有限公司,通过实时荧光定量 PCR 分析好氧甲烷氧化菌 *pmoA* 基因和反硝化型厌氧甲烷氧化菌 16S rRNA 基因,引物分别为 A189F/mb661R^[22]和 p1F/p1R^[23],测试过程中采用荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems)。

1.4 宏基因组学分析

将采集到的沉积物送至上海美吉生物医药

科技有限公司,使用 FastDNATM Spin Kit For Soil 试剂盒(MP Bio)提取样品的总 DNA,并利用 NanoDrop 2000 法和 Quantus Fluorometer (Picogreen)法分别检验 DNA 的纯度和浓度,利用 1%的琼脂糖胶对适量样品的 DNA 的完整性进行检测,然后对检测合格并且纯化后的片段进行大约 400 bp 的剪切,然后进行接头连接,使用磁珠筛选去除接头自连片段,利用 PCR 扩增进行文库模板的富集,磁珠回收 PCR 产物得到最终的文库,文库构建之后就进行桥式 PCR 和高通量测序(测序平台: Illumina NovaSeq 6000 平台)。测序后得到的数据使用 fastp 进行质量控制,获得高质量的质控数据,然后使用 Megahit 软件^[24]针对不同测序深度序列进行拼接组装,对拼接结果中的 contigs 使用 MetaGene^[25]进行开放阅读框(open reading

frame, ORF)预测, 将其翻译为氨基酸序列。使用 CD-HIT 软件对所有样品中预测出来的基因序列进行聚类(默认参数值为: 90% identity, 90% coverage), 构建非冗余基因集。然后使用 DIAMOND^[26-27] 将非冗余基因集与非冗余 (non-redundant, NR)数据库、京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库进行比对(BLAST 比对参数设置期望值 e-value 为 $1e-5$), 以获得各个分类学水平上物种在各个样本中的丰度; 使用 KOBAS 2.0^[28]进行 KEGG 功能注释, 然后基于 KEGG 直系同源(KEGG orthology, KO)、pathway、酶通路(enzyme pathways, EC)、Module 对应的基因丰度综合计算该功能类别的丰度。

1.5 数据分析

基于物种类型建立两个基因集, 第一个是阿哈湖水库沉积物细菌基因集, 该基因集包括本研究样本中所有细菌基因, 用于分析阿哈湖水库沉积物整体细菌群落结构。另一个是阿哈湖水库沉积物甲烷氧化菌基因集, 该基因集仅包含本研究样本中所有甲烷氧化菌基因, 用于分析阿哈湖水库沉积物中甲烷氧化菌的群落结构及其功能。基于 R 语言对样本进行主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA), 用于分析不同采样点之间甲烷氧化菌群落和功能之

间的差异; 利用 IBM SPSS Statistic 软件对甲烷氧化菌基因丰度与环境因子进行 Spearman 相关性分析, 环境因子对甲烷氧化菌的物种和功能进行 Mental 相关性分析, 用于分析对甲烷氧化菌群落有显著影响的环境因子。

2 结果与分析

2.1 上覆水及沉积物理化性质分析

阿哈湖水库上覆水及沉积物的理化性质如表 1 所示, 上覆水的 pH 平均值为 8.46, ORP 平均值为 0.59, 各采样点相差不大。环湖沉积物的 pH、EC、TN、TP、有机质(soil organic matter, SOM)、硝酸盐(nitrate, NO_3^-)和硫酸盐(sulfate, SO_4^{2-})的平均值分别为 8.02、143.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 、1 948.72 mg/kg、389.86 mg/kg、55.72 g/kg、0.26 mg/L 和 3.18 mg/L。湖心沉积物的 pH、EC、TN、TP、SOM、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 的平均值分别为 7.33、243.7 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 、1 636.41 mg/kg、387.14 mg/kg、42.11 g/kg、0.27 mg/L 和 37.78 mg/L。由此可知, 湖心沉积物的 SO_4^{2-} 浓度高于环湖沉积物, 而湖心沉积物的 SOM 低于环湖沉积物。湖心沉积物的 SO_4^{2-} 浓度明显高于环湖沉积物的原因可能有: (1) 湖心处水深大于湖边, 厌氧程度高于湖边; (2) 湖边的硫酸盐随着水流汇入湖心, 在湖心处沉降于湖心沉积物处; (3) 湖心沉水植物的

表 1 阿哈湖不同采样点上覆水以及沉积物的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of overlying water and sediments of different types in Aha Lake

Sites	Altitude (m)	Overlying water		Sediments						
		pH	ORP (mV)	pH	EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	TN (mg/kg)	TP (mg/kg)	SOM (g/kg)	NO_3^- (mg/L)	SO_4^{2-} (mg/L)
AH1	1 120	8.43	0.60	8.00	218.0	1 717.06	313.38	58.97	0.61	5.86
AH2	1 090	8.43	0.58	7.93	85.0	1 837.08	377.51	45.87	0.13	3.32
AH3	1 110	8.59	0.57	8.13	79.2	1 832.46	420.86	64.80	0.17	3.46
AH4	1 100	8.41	0.59	8.18	118.3	2 173.48	358.57	44.85	0.19	1.95
AH5	1 099	9.00	0.57	7.87	219.0	2 183.54	478.97	64.13	0.21	1.30
AH6	1 100	8.10	0.60	6.92	179.4	2 152.88	410.63	37.25	0.09	29.63
AH7	1 120	8.28	0.62	7.74	308.0	1 119.94	363.65	46.97	0.44	45.93

微生物厌氧降解时间比湖边长，导致硫酸盐积累更多。

2.2 甲烷氧化菌的丰度

针对好氧甲烷氧化菌的 *pmoA* 基因和反硝化型甲烷氧化菌的 16S rRNA 基因进行定量 PCR 分析，以表征两类甲烷氧化菌的丰度。结果显示(图 2)，阿哈湖水库沉积物中好氧甲烷氧化菌的丰度范围为 1.89×10^6 – 2.80×10^8 copies/g，环湖沉积物中基因丰度最大的是 AH1 (2.80×10^8 copies/g)，湖心沉积物中基因丰度最大的是 AH7 (4.57×10^7 copies/g)，丰度平均值为 6.16×10^7 copies/g。反硝化型厌氧甲烷氧化菌的丰度范围为 1.53×10^6 – 6.96×10^7 copies/g，环湖沉积物中基因丰度最大的是 AH5 (6.96×10^7 copies/g)，湖心沉积物中基因丰度最大的是 AH7 (2.53×10^6 copies/g)，丰度平均值为 2.84×10^7 copies/g。

2.3 微生物群落结构

沉积物样品(AH1–AH7)的 reads 经过过滤处

理后，共获得了 319 140 648 条 clean reads，每个样品的 reads 数目范围为 41 523 508–48 567 300。质控之后的 reads 占原始数据 reads 的平均百分比为 98.7%。对 contigs 进行评估发现，contigs 平均 N50 和 N90 分别为 498 bp 和 332 bp，说明组装结果及序列长度可用。

基于阿哈湖水库沉积物细菌基因集，将阿哈湖水库不同类型水体沉积物中的微生物进行物种注释。结果显示，注释到的细菌分为 124 门 166 纲 422 目 804 科 2 206 属 12 474 种。在属水平上(图 3A)，环湖沉积物中的优势菌属为脱氯单胞菌属(*Dechloromonas*, 1.85%)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*, 1.72%)、类固醇杆菌属(*Steroidobacter*, 1.43%)和土壤红色杆形菌属(*Solirubrobacter*, 1.02%)。湖心沉积物中的优势菌属为不动杆菌(*Acinetobacter*, 1.29%)、脱氯单胞菌属(*Dechloromonas*, 0.94%)和类固醇杆菌属(*Steroidobacter*, 0.69%)。

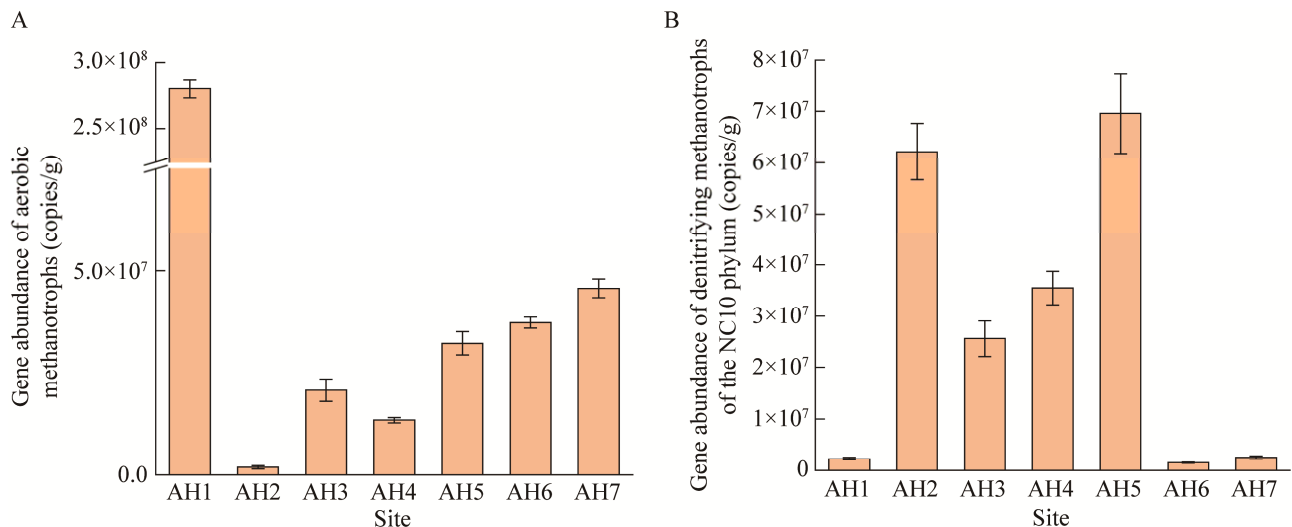


图 2 阿哈湖好氧甲烷氧化菌 *pmoA* (A)和反硝化型厌氧甲烷氧化菌 16S rRNA 基因(B)的丰度

Figure 2 Gene abundance of methanotrophs in Aha Lake. A: Aerobic methanotrophs. B: Denitrifying methanotrophs of the NC10 phylum. The standard deviation in the figure reflects the dispersion of methanotrophs genes in Aha Lake.

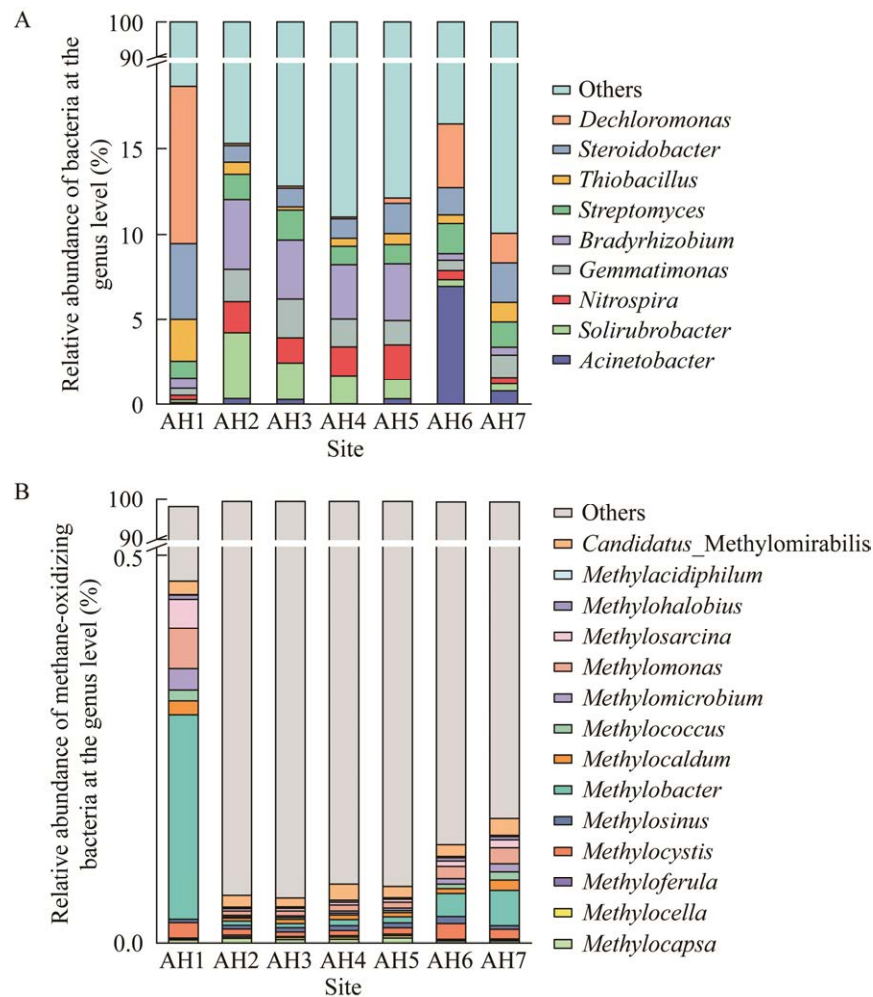


图 3 阿哈湖中细菌和甲烷氧化菌的群落结构特征 A: 细菌. B: 甲烷氧化菌

Figure 3 Community structure of bacteria and methanotrophs in Aha Lake. A: Bacteria. B: Methanotrophs.

基于阿哈湖水库沉积物甲烷氧化菌基因集, 阿哈湖水库沉积物中的甲烷氧化菌在 AH1-AH7 中的占比分别为 2.42%、0.56%、0.55%、0.63%、0.58%、0.76%和 0.87%。对于甲烷氧化菌来说, 环湖沉积物中 AH1 的甲烷氧化菌的相对丰度较大, 其余几个样本的相对丰度相差不大。将阿哈湖水库不同类型水体沉积物中的甲烷氧化菌进行物种注释。结果显示, 注释到的甲烷氧化菌分为 3 门 4 纲 4 目 6 科 14 属 52 种。由于 AH1 点的特殊性, 将其单独列出计算。在属水平下 (图 3B), AH1 的优势甲烷氧化菌为甲基杆菌属

(*Methylobacter*, 0.26%), 甲基单胞菌属 (*Methylomonas*, 0.05%) 和甲烷八叠球菌属 (*Methylosarcina*, 0.04%)。环湖沉积物(除 AH1 点位外的 AH2、AH3、AH4 和 AH5)中的优势甲烷氧化菌为反硝化型厌氧甲烷氧化菌 (*Candidatus_Methylomirabilis*, 0.06%)、甲基孢囊菌属 (*Methylocystis*, 0.03%) 和甲基单胞菌属 (*Methylomonas*, 0.03%)。湖心沉积物中的优势甲烷氧化菌为甲基杆菌属 (*Methylobacter*, 0.07%)、甲基单胞菌属 (*Methylomonas*, 0.04%) 和反硝化型厌氧甲烷氧化菌 (*Candidatus_Methylomirabilis*,

0.04%), 丰度较小。水库沉积物中主要的好氧甲烷氧化菌是甲基杆菌属(*Methylobacter*) (0.37%) 和甲基单胞菌属(*Methylomonas*) (0.12%), 主要的厌氧甲烷氧化菌是 *Candidatus_Methylomirabilis* (0.12%)。上述结果说明阿哈湖水库沉积物中甲烷氧化菌主要是I型甲烷氧化菌, 其氧化甲烷的过程主要是好氧氧化。

2.4 阿哈湖水库生境中甲烷氧化菌的碳、甲烷、氮和硫代谢功能基因

基于阿哈湖水库生境甲烷氧化菌基因集, 将其与 KEGG 的基因数据库进行比对, BLAST 比对参数设置期望值(e-value)为 $1e^{-5}$ 。结果显示, 阿哈湖水库生境甲烷氧化菌基因集中, 与甲烷代谢相关的功能基因共 2 种, 分别为甲醇脱氢酶(细胞色素)亚基 *mxoF* (K14028)和甲烷/氨单加氧酶亚基 A *pmoA* (K10944); 与碳代谢相关的功能基因共 10 种, 分别为乙酰辅酶 A 羧化酶羧基转移酶 α 亚基 *accA* (K01962)、乌头酸水合酶基因 *acnA* (K01681)、二氢硫辛酰胺脱氢酶基因 *pdhD* (K00382)、I类富马酸水合酶基因 *fumA* (K01676)、II类富马酸水合酶基因 *fumC* (K01679)、异柠檬酸脱氢酶(NAD⁺)基因 *IDH3* (K00030)、苹果酸脱氢酶基因 *mdh* (K00024)、2-氧戊二酸脱氢酶基因 *sucA* (K00164)、核酮糖-1,5-二磷酸羧(化)酶I大亚基 *rbcL* (K01601)、富马酸还原酶基因 *frdA* (K00239); 与氮代谢相关的功能基因共 19 种, 分别为羟胺氧化酶亚基 *hao* (K10535), 周质异化硝酸盐还原酶亚基 A *napA* (K02567), 膜结合硝酸盐还原酶 α 、 β 、 γ 亚基 *narG*、*narH*、*narI* (K00370、K00371、K00374), 硝酸盐还原酶 2, α 、 β 、 γ 亚基 *narZ*、*narY*、*narV* (K00370、K00371、K00374), 亚硝酸盐氧化还原酶 α 、 β 亚基 *nxA*、*nxB* (K00370、K00371), 同化硝酸还原酶催化亚基 *nasA* (K00372), 固氮酶钼铁蛋白 α 、 β 亚基 *nifD*、*nifH*

(K02586、K02588), 固氮酶铁蛋白亚基 *nifK* (K02591), 亚硝酸盐还原酶(NADH)亚基 B、D *nirB*、*nirD* (K00362、K00363), 含铜亚硝酸盐还原酶基因 *nirK* (K00368), 一氧化氮还原酶亚基 B、C *norB*、*norC* (K04561、K02305); 与硫代谢相关的功能基因共 5 种, 分别为亚硫酸盐还原酶基因 *cysJ* (K00380)、腺苷硫酸盐合成酶基因 *cysC* (K00860)、硫酸腺苷酸转移酶基因 *cysD* (K00957)、硫酸盐转运系统 ATP 结合蛋白酶基因 *cysA* (K02045)和硫醌氧化还原酶 *sqr* (K17218)。以上结果说明阿哈湖湿地甲烷氧化菌基因集中, 甲烷代谢功能基因主要与甲烷氧化有关, 碳代谢功能基因主要与三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)、卡尔文循环(Calvin cycle)有关, 氮代谢功能基因与固氮、硝化、反硝化和同化硝酸盐还原过程有关, 硫代谢功能基因与同化硫酸盐还原、硫酸盐运输和硫酸盐异化还原有关。

2.5 阿哈湖水库生境不同类型水体中甲烷氧化菌的功能

基于 KEGG 数据库对阿哈湖水库生境甲烷氧化菌基因集进行注释(图 4), 结果显示阿哈湖水库生境甲烷氧化菌基因集共注释到 6 大类功能。其中, 丰度最大的功能是代谢(67.51%), 其次是遗传信息处理(9.83%)、环境信息处理(9.45%)、人类疾病(5.89%)、细胞过程(4.91%)和组织系统(2.42%)。对于代谢中的甲烷代谢、碳代谢、氮代谢和硫代谢的完整途径进行了进一步分析, 发现存在 2 条与甲烷代谢相关的完整路径, 分别为丝氨酸途径同化甲醛(M00346)和单磷酸核酮糖途径同化甲醛(M00345); 存在 11 条与碳代谢相关的完整途径, 分别为糖酵解(Embden-Meyerhof 途径) (M00001)、涉及三碳化合物核心模块的糖酵解(M00002)、丙酮酸氧化(M00307)、柠檬酸盐循环(citrate cycle)

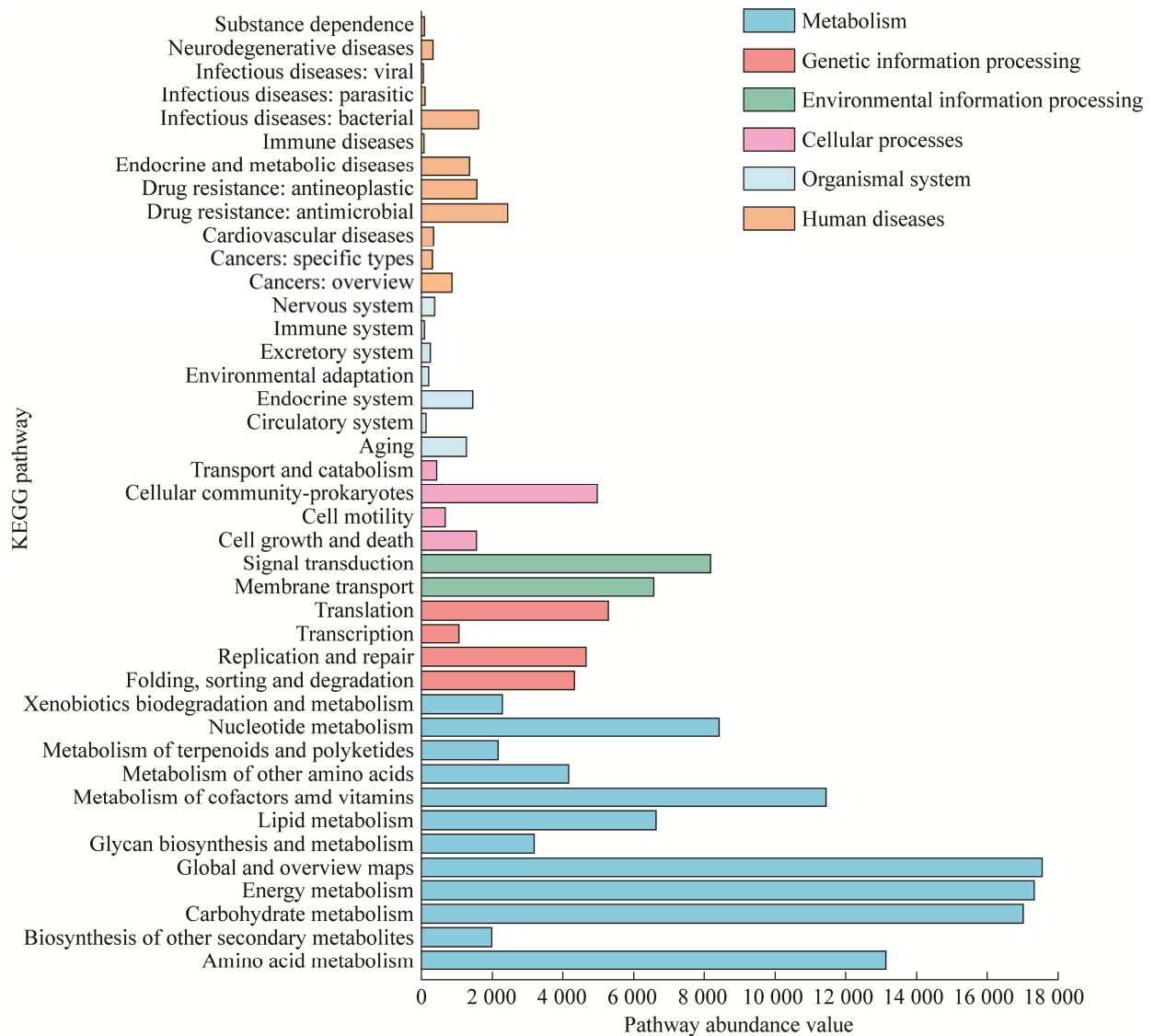


图 4 基于 KEGG 下阿哈湖甲烷氧化菌功能类型及丰度

Figure 4 Based on the functional categories and abundance of Aha Lake methanotrophs under KEGG.

(M00009)、第一次碳氧化的柠檬酸盐氧化 (M00010)、第二次碳氧化的柠檬酸盐氧化 (M00011)、磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway) (M00004) 氧化相的磷酸戊糖通路 (M00006)、非氧化相的磷酸戊糖通路 (M00007)、Entner-Doudoroff 途径 (M00008); 存在 4 条与氮代谢相关的完整途径, 分别为固氮 (M00175)、二同化硝酸盐还原 (M00530)、硝化 (M00528)、

完全硝化和共混 (M00804); 存在 1 条与硫代谢相关的完整途径, 为同化硫酸盐还原 (M00176)。

2.6 沉积物中物种及功能的 PCoA 分析

在属水平下, 利用 Bray Curtis 算法对阿哈湖水库沉积物中的甲烷氧化菌进行物种 (图 5A) 和功能 (图 5B) 的 PCoA 分析。采样点在 PCoA 图上空间距离越近, 意味着其微生物群落结构越相似^[29]。AH1 和湖心沉积物 AH6、AH7 与其

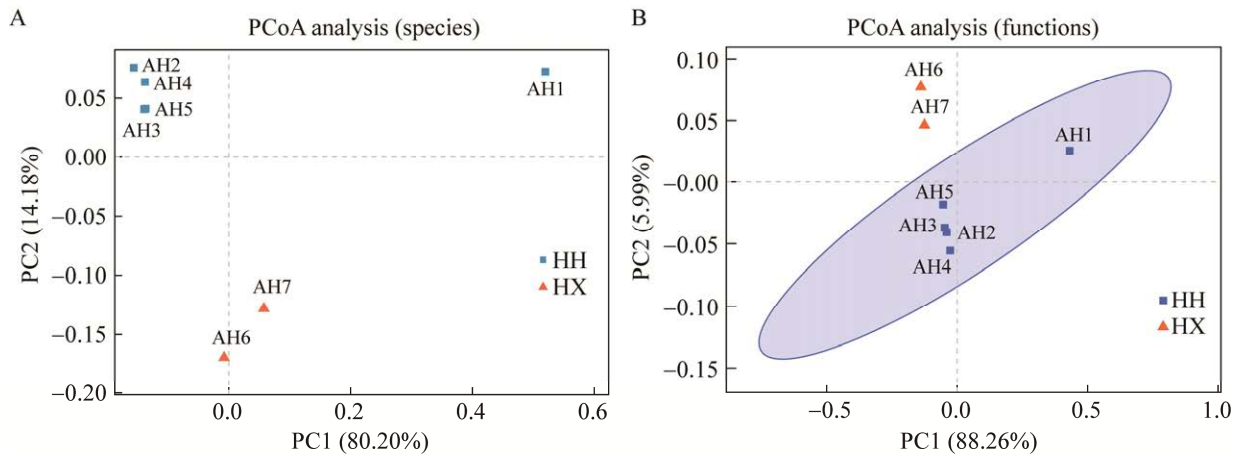


图 5 阿哈湖沉积物中物种(A)和功能(B)的 PCoA 分析 HH: 环湖沉积物; HX: 湖心沉积物

Figure 5 PCoA analysis of species (A) and functions (B) in sediments in Aha Lake. HH: Sediments around the lake; HX: Sediments in the center of lake.

余 4 个点在物种与功能图上均相距甚远, 说明这 3 个点与其余采样点在甲烷氧化菌群落结构与功能上都存在显著差异。AH2–AH5 这 4 个点在物种与功能图上距离较近, 并且在物种图上 AH3 与 AH5 几近完全重叠, 在功能图上 AH2 与 AH3 几近完全重叠, 说明 AH3 与 AH5 的甲烷氧化菌群落结构相似度高, AH2 与 AH3 的甲烷氧化菌功能相似度高。

2.7 甲烷氧化菌与环境因子关联分析

在属水平下, 进一步分析阿哈湖水库沉积物中甲烷氧化菌的相对丰度与环境因子(ORP、pH、EC、TP、TN、SOM、NO₃⁻、SO₄²⁻)之间的关系(图 6)。由图 6 可知 pH、EC、TN 和 SOM 与甲烷氧化菌种类之间的相关性较低, ORP、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 均与 I 型甲烷氧化菌: 甲基杆菌属 (*Methylobacter*)、甲基单胞菌属 (*Methylomonas*)、甲基八叠球菌属 (*Methylosarcina*)、甲基嗜热菌属 (*Methylocaldum*)、甲基需盐菌属 (*Methylomicrobium*)、甲基球菌属 (*Merthylococcus*)、甲基盐菌属 (*Methylolalobius*)、厌氧甲烷氧化菌

Candidatua_Methylomirabilis 和疣微菌门甲烷氧化菌 (*Methylacidiphilum*) 呈正相关, 与部分 II 型甲烷氧化菌: 甲基弯曲菌属 (*Methylosinus*)、甲基荚膜菌属 (*Methylocapsa*)、甲基胞菌属 (*Methylocella*)、*Methyloferula* 呈负相关。TP 与 I 型甲烷氧化菌呈正相关, NO₃⁻ 仅与 I 型甲烷氧化菌呈显著正相关, ORP 和 SO₄²⁻ 与疣微菌门甲烷氧化菌呈显著正相关。因此, 显著影响阿哈湖水库沉积物中甲烷氧化菌分布的主要环境因子为 ORP、TP、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻。

由表 2 可知, 好氧甲烷氧化菌的丰度与 SOM、TP 相关性较低, 与 ORP、EC、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 呈正相关, 与 pH、TN 呈负相关; 厌氧甲烷氧化菌与 EC 相关性较低, 与 NO₃⁻ 无相关性, 与 pH、TP、TN 和 SOM 呈正相关, 与 ORP 呈负相关, 与 SO₄²⁻ 呈显著负相关。

由表 3 可知, ORP、EC、TP、TN、NO₃⁻、SO₄²⁻、SOM 与物种相关性较低, pH 与物种呈负相关; ORP、pH、TP、NO₃⁻、SO₄²⁻、SOM 与功能相关性较低, TN 与功能呈正相关, EC 功能呈负相关。

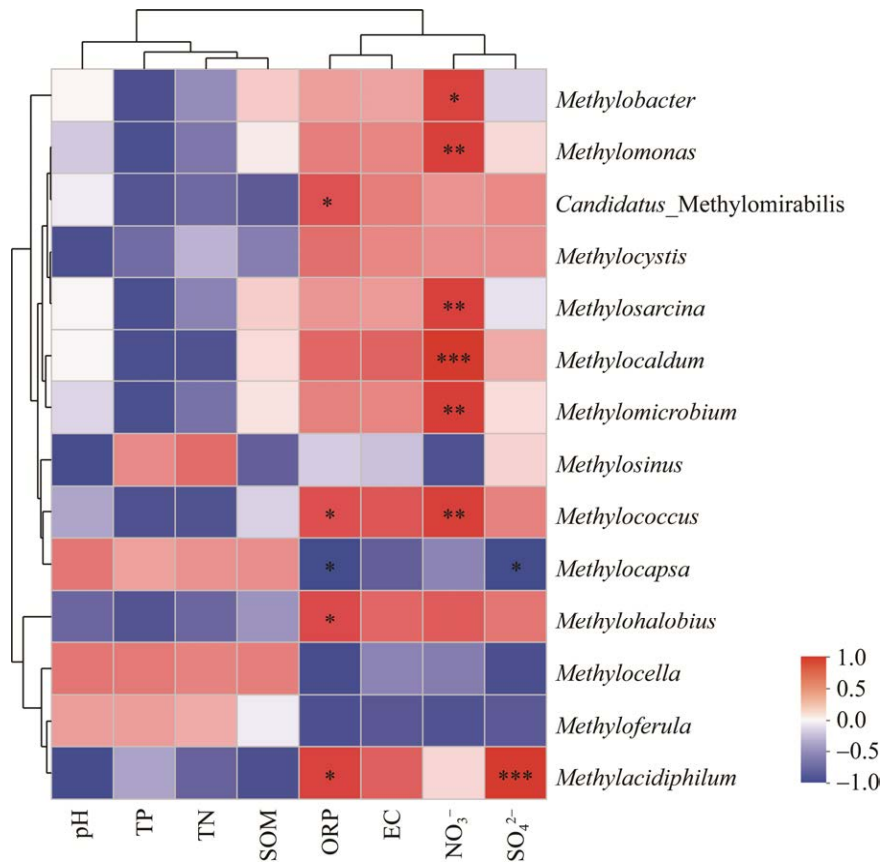


图 6 阿哈湖沉积物中甲烷氧化菌种类与环境因子的相关性

Figure 6 Correlation between the types of methanotrophs in the sediments of Aha Lake and the environment factors. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

表 2 环境因子与甲烷氧化菌基因丰度的 Spearman 相关性

Table 2 Spearman correlation between environmental factors and methanotrophs gene abundance

Functional gene	Coefficient	ORP	pH	EC	TP	TN	SOM	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
<i>pmoA</i>	Correlation coefficient	0.636	-0.429	0.714	-0.286	-0.500	0.143	0.607	0.643
	Significance (two-tailed)	0.124	0.337	0.071	0.535	0.253	0.760	0.148	0.119
16S rRNA of NC10 methanotrophs	Correlation coefficient	-0.727	0.321	-0.143	0.393	0.536	0.321	0.000	-0.857*
	Significance (two-tailed)	0.064	0.482	0.760	0.383	0.215	0.482	1.000	0.014

*: The correlation was significant at level 0.05 (two-tailed).

表 3 环境因子对物种和功能的 Mental 相关性

Table 3 Mental correlation of environmental factors to species and function

Type	Coefficient	ORP	pH	EC	TP	TN	SOM	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
Species	r	0.164	-0.347	-0.109	0.141	0.158	0.042	0.158	0.001
	p	0.531	0.887	0.542	0.163	0.159	0.266	0.200	0.358
Function	r	-0.025	-0.239	-0.451	0.030	0.316	0.106	-0.005	0.045
	p	0.302	0.792	0.921	0.179	0.057	0.166	0.312	0.174

3 讨论

3.1 阿哈湖水库沉积物中甲烷氧化菌种类

好氧甲烷氧化菌氧化甲烷的主要过程是利用细胞中的甲烷单加氧酶催化大气中的甲烷化成甲醇,然后甲醇被甲醇脱氢酶氧化生成甲醛,最后通过丝氨酸途径(II型)或单磷酸核酮糖途径(I型)将甲醛转化成细胞物质^[30]。好氧甲烷氧化菌可分成3类,I型、II型以及其他(极端嗜甲酸菌)^[31]。本研究发现阿哈湖水库沉积物中好氧甲烷氧化菌的丰度为0.90%,以I型为主。据研究报道,在许多淡水湖泊沉积物中I型甲烷氧化菌占主导地位,如Mårn湖[甲基单胞菌属(*Methylomonas*)]、Illersjön湖[甲基微菌属(*Methylomicrobium*)]和Lillsjön湖[甲基八叠球菌属(*Methylosarcina*)]^[32],布歇尔湖[深水区是甲基杆菌属(*Methylobacter*),浅水区是甲基球菌属(*Methylococcus*)]^[33],Alinen-Mustajärvi湖和Mekkojärvi湖[甲基杆菌属(*Methylobacter*)]^[34]。亚北极解冻湖泊I型甲烷氧化菌特别是甲基杆菌属(*Methylobacter*)占主导地位^[35]。贫营养淡水湖(Lake Constance, Germany)中甲基杆菌属(*Methylobacter*)占主导地位^[36];富营养化湖泊中占主导地位的是I型(*Methylococcus*)和II型甲烷氧化菌^[37],芬兰一个富营养化淡水湖也存在类似的甲烷氧化菌群落组成^[38]。贝加尔湖滨海温泉沉积物中以II型甲烷氧化菌(*Methylocystis*和*Methylosinus*)为优势菌属^[39]。综上所述,本文的研究结果进一步证明了I型甲烷氧化菌是淡水湖泊的优势好氧甲烷氧化菌。

反硝化型厌氧甲烷氧化菌甲烷氧化的主要过程是在厌氧条件下以 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 为电子受体,将 CH_4 氧化成 CO_2 的同时完成脱氮^[40]。在阿哈湖水库沉积物中均检测出了反硝化型厌氧甲烷氧化菌的存在。这种菌因为生长缓慢、细胞倍

增时间长,很难获得纯培养物,但是随着微生物学及分子检测技术的发展,发现并证实了在湖泊^[41]、河流^[42]、稻田^[43]和深海冷泉^[44]等环境中反硝化型厌氧甲烷氧化菌的广泛存在。反硝化型厌氧甲烷氧化菌不仅能消耗 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 和甲烷,还能参与生态系统中的碳、氮和硫循环,说明反硝化型厌氧甲烷氧化菌是参与物质循环和微生物消耗 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 与甲烷的一种重要微生物。

阿哈湖水库沉积物好氧甲烷氧化菌丰度平均值为 6.16×10^7 copies/g,与内蒙古湖泊沉积物中好氧甲烷氧化菌的丰度大致相同^[45],反硝化型厌氧甲烷氧化菌的丰度平均值为 2.84×10^7 copies/g,该丰度远高于三峡库区消落带反硝化型厌氧甲烷氧化菌的丰度^[46]。除去AH1这个采样点是好氧甲烷氧化菌的丰度远高于反硝化型甲烷氧化菌的丰度外,环湖沉积物的其余四点都是反硝化型高于好氧型,这可能是因为AH2-AH5这4个采样点靠近附近居民的菜地,受到了一些人为污染,而AH1这个采样点附近少居民居住,基本上没有人为污染。

3.2 阿哈湖水库沉积物中甲烷氧化菌的功能

经过对阿哈湖水库沉积物中甲烷氧化菌的功能注释,发现存在的代谢途径包括甲烷代谢(2条)、碳代谢(11条)、氮代谢(4条)和硫代谢(1条)。有研究发现深层沉积物中甲烷的厌氧氧化可能由厌氧甲烷氧化古菌与硫酸盐还原细菌联合的硫酸盐型厌氧甲烷氧化过程实现,同时还能对硫酸盐进行还原^[47-48],证实了甲烷氧化菌有参与硫代谢的潜力。Chistoserdova等^[49]和Yang等^[50]的研究中提到甲烷氧化菌参与碳同化,证实了甲烷氧化菌有参加碳循环并起着重要作用。疣微菌门甲烷氧化菌*Methyloacidiphilum*菌株SolV具有固氮作用^[51]并参与氨氧化和亚硝酸盐还原过程^[52],都与氮循环有关。本研究

中对 PCoA 结果分析发现, 环湖沉积物中甲烷氧化菌的物种和功能代谢与湖心沉积物存在很大差异, 其原因是沿湖的人为活动会对水体中的甲烷循环以及与其相关的微生物群落造成影响。此外, 湖心沉积物中甲烷氧化菌的物种和功能代谢也可能受到了氧浓度的影响^[33,53]。例如, 比利时 Dendre 石坑湖在春冬两季(水中溶解氧浓度较高)就是以好氧氧化为主, 而到了夏秋两季(水中溶解氧浓度较低)则几乎完全是厌氧氧化^[54], 夏品华等^[55]研究发现水位梯度的变化会对好氧甲烷氧化菌的群落结构造成一定的影响。相关研究结论进一步证实甲烷氧化菌参与了各类微生物代谢, 并与代谢过程联系紧密。

3.3 阿哈湖水库沉积物中影响甲烷氧化菌分布的环境因子

通过阿哈湖水库沉积物中甲烷氧化菌与环境因子的相关性分析, 可以发现 ORP、TP、NO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 显著影响甲烷氧化菌的分布。阿哈湖水库是一个与人类生活区域紧密联系的湖泊, 附近居民日常生活产生的人为污染流入湖泊中, 水体受到污染影响水中溶解氧浓度, 使水体的 ORP 受到影响。在氧跃层底部氧浓度低的地方好氧氧化菌的活性最高^[56], Chowdhury 等^[57] 研究中提到专性好氧甲烷氧化菌的活性受到强氧化土壤中有效氧的限制。相较于 II 型甲烷氧化菌而言, I 型甲烷氧化菌在同化甲醛的过程中需要较多磷, 所以磷浓度增加时 I 型甲烷氧化菌的相对丰度也会增加, 因此总磷会影响 I 型甲烷氧化菌的群落结构^[58-59]。有研究表明, 硝酸盐会抑制甲烷氧化菌氧化甲烷速率^[60], II 型甲烷氧化菌具有固定分子氮的能力, 在氮浓度较高的情况, II 型甲烷氧化菌生长速率较 I 型甲烷氧化菌慢, 因此 NO₃⁻ 含量是影响甲烷氧化菌的重要环境因素。湖泊沉积物中甲烷的厌氧氧化存在电子受体 SO₄²⁻^[61-63], 缺氧条件下, 硫酸盐(SO₄²⁻)

依赖的厌氧甲烷氧化(SO₄²⁻-AOM)^[64]可以消耗甲烷^[65], 硫酸盐浓度显著影响了甲烷氧化菌活性^[66]及其氧化速率^[61], 并且一定浓度的硫酸盐可以显著影响硝酸盐-反硝化甲烷厌氧氧化(硝酸盐-DAMO)的反硝化速率^[67]。

4 结论

(1) 阿哈湖水库沉积物的 AH1、环湖沉积物与湖心沉积物中的好氧甲烷氧化菌以 I 型甲烷氧化菌中的甲基杆菌属(*Methylobacter*) (AH1: 0.26%、湖心: 0.07%) 和甲基单胞菌属(*Methylomonas*) (AH1: 0.05%、环湖: 0.03%、湖心: 0.04%) 为主。

(2) 在阿哈湖水库沉积物的甲烷氧化菌基因集中, 共注释到 6 大类功能, 其中甲烷代谢、碳代谢、氮代谢和硫代谢的完整途径和功能基因的数量分别为 2、11、4 和 1 条以及 2、10、19 和 5 种。

(3) 阿哈湖水库沉积物中 I 型甲烷氧化菌和疣微菌门甲烷氧化菌与 ORP 呈显著正相关, II 型甲烷氧化菌与 ORP 呈负相关, 说明阿哈湖水库生境中 I 型甲烷氧化菌与 II 型甲烷氧化菌在对 O₂ 的适应性上有显著差异。

参考文献

- [1] ZHANG WZ, SHENG R, ZHANG MM, XIONG GY, HOU HJ, LI SL, WEI WX. Effects of continuous manure application on methanogenic and methanotrophic communities and methane production potentials in rice paddy soil[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2018, 258: 121-128.
- [2] ZHENG YL, HOU LJ, CHEN FY, ZHOU J, LIU M, YIN GY, GAO J, HAN P. Denitrifying anaerobic methane oxidation in intertidal marsh soils: occurrence and environmental significance[J]. *Geoderma*, 2020, 357: 113943.
- [3] CALABRESE S, GARCIA A, WILMOTH JL, ZHANG XN, PORPORATO A. Critical inundation level for

- methane emissions from wetlands[J]. *Environmental Research Letters*, 2021, 16(4): 044038.
- [4] BRINDHA RK, VASUDEVAN N. Methane oxidation capacity of methanotrophs isolated from different soil ecosystems[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2018, 15(9): 1931-1940.
- [5] SILJANEN HMP, SAARI A, BODROSSY L, MARTIKAINEN PJ. Effects of nitrogen load on the function and diversity of methanotrophs in the littoral wetland of a boreal lake[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 39.
- [6] 蔡朝阳, 何焜飞, 胡宝兰. 甲烷氧化菌分类及代谢途径研究进展[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2016, 42(3): 273-281.
- CAI CY, HE ZF, HU BL. Progresses in the classification and mechanism of methane-oxidizing bacteria[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences Edition)*, 2016, 42(3): 273-281 (in Chinese).
- [7] MARTIN G, RISSANEN AJ, GARCIA SL, MEHRSHAD M, BUCK M, PEURA S. *Candidatus Methyllumidiphilus* drives peaks in methanotrophic relative abundance in stratified lakes and ponds across northern landscapes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 669937.
- [8] MAYR MJ, ZIMMERMANN M, DEY J, WEHRLI B, BÜRGMANN H. Lake mixing regime selects apparent methane oxidation kinetics of the methanotroph assemblage[J]. *Biogeosciences*, 2020, 17(16): 4247-4259.
- [9] GENTZEL T. Net sediment production of methane, distribution of methanogens and methane-oxidizing bacteria, and utilization of methane-derived carbon in an Arctic Lake[J]. *Inland Waters*, 2012, 2(2): 77-88.
- [10] KHEMELENINA VN, SHCHUKIN VN, RESHETNIKOV AS, MUSTAKHIMOV II, SUZINA NE, TS ESHINIMAEV B, TROTSSENKO YA. Structural and functional features of methanotrophs from hypersaline and alkaline lakes[J]. *Microbiology*, 2010, 79(4): 472-482.
- [11] THOMAS C, FROSSARD V, PERGA ME, TOFIELD-PASCHE N, HOFMANN H, DUBOIS N, BELKINA N, ZOBKOVA M, ROBERT S, LYAUTEY E. Lateral variations and vertical structure of the microbial methane cycle in the sediment of Lake Onego (*Russia*)[J]. *Inland Waters*, 2019, 9(2): 205-226.
- [12] ZHANG SH, YAN L, CAO JH, WANG KX, LUO Y, HU HY, WANG LX, YU RH, PAN BZ, YU K, ZHAO J, BAO ZH. Salinity significantly affects methane oxidation and methanotrophic community in Inner Mongolia Lake sediments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 13: 1067017.
- [13] DENG YC, LIU YQ, DUMONT M, CONRAD R. Salinity affects the composition of the aerobic methanotroph community in alkaline lake sediments from the Tibetan Plateau[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 73(1): 101-110.
- [14] 彭兴意, 秦宇, 舒钰清, 李银波, 张曦. 三峡库区夏季万州段底泥甲烷功能菌群落对甲烷排放的影响[J]. *环境工程学报*, 2022, 16(3): 1028-1038.
- PENG XY, QIN Y, SHU YQ, LI YB, ZHANG X. Effects of functional methane community in sediments of Wanzhou section of the Three Gorges Reservoir on methane emissions in summer[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2022, 16(3): 1028-1038 (in Chinese).
- [15] LIU DP, YANG YN, AI J, LI YC, XING Y, LI J. Research on microbial structures, functions and metabolic pathways in an advanced denitrification system coupled with aerobic methane oxidation based on metagenomics[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 332: 125047.
- [16] 费志军, 王柱红, 唐杨. 阿哈湖水体丰枯水期重金属含量特征与来源解析[J]. *地球与环境*, 2021, 49(1): 42-50.
- FEI ZJ, WANG ZH, TANG Y. Characteristics and source analysis of heavy metals in water of aha lake during the rain and dry seasons[J]. *Earth and Environment*, 2021, 49(1): 42-50 (in Chinese).
- [17] 贺蓓, 李瑞利, 柴民伟, 邱国玉, 沈小雪. 深圳湾红树林沉积物-植物体系汞的分布规律和形态分配特征[J]. *生态环境学报*, 2015, 24(3): 469-475.
- HE B, LI RL, CHAI MW, QIU GY, SHEN XX. Distribution and speciation of mercury (Hg) in Futian mangrove wetland, Shenzhen Bay[J]. *Ecology and Environment Sciences*, 2015, 24(3): 469-475 (in Chinese).
- [18] 中华人民共和国生态环境部. 土壤质量全氮的测定凯式法: HJ 717—2014[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2015.
- Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Soil quality-determination of total nitrogen-modified Kjeldahl method: HJ 717—2014[S]. Beijing: China Environment Science Press, 2015 (in Chinese).
- [19] 中华人民共和国生态环境部. 土壤总磷的测定碱熔-

- 钼锑抗分光光度法: HJ 632—2011[S]. 北京: 中国环境科学出版, 2012.
- Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Soil-determination of total phosphorus by alkali fusion-Mo-Sb anti spectrophotometric method: HJ 632—2011[S]. Beijing: China Environment Science Press, 2012 (in Chinese).
- [20] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- BAO SD. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2000 (in Chinese).
- [21] 杨叶琴, 赵昌平, 赵杰. 离子色谱法测定土壤中的 3 种阴离子[J]. 理化检验-化学分册, 2018, 54(3): 293-296.
- YANG YQ, ZHAO CP, ZHAO J. Determination of 3 anions in soil by ion chromatography[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B (Chemical Analysis), 2018, 54(3): 293-296 (in Chinese).
- [22] COSTELLO AM, LIDSTROM ME. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(11): 5066-5074.
- [23] ETTWIG KF, van ALEN T, van de PAS-SCHOONEN KT, JETTEN MSM, STROUS M. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3656-3662.
- [24] LI DH, LIU CM, LUO RB, SADAKANE K, LAM TW. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly *via* succinct de Bruijn graph[J]. Bioinformatics, 2015, 31(10): 1674-1676.
- [25] NOGUCHI H, PARK J, TAKAGI T. MetaGene: prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(19): 5623-5630.
- [26] BUCHFINK B, XIE C, HUSON DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 59-60.
- [27] BUCHFINK B, REUTER K, DROST HG. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND[J]. Nature Methods, 2021, 18(4): 366-368.
- [28] KANEHISA M, FURUMICHI M, SATO Y, KAWASHIMA M, ISHIGURO-WATANABE M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D587-D592.
- [29] 刘晓丹, 黄毅, 王永花, 汪贝贝, 吴兵, 陆光华. 西藏尼洋河沉积物中微生物群落结构特征分析[J]. 环境科学, 2020, 41(7): 3249-3256.
- LIU XD, HUANG Y, WANG YH, WANG BB, WU B, LU GH. Structural characteristics of microbial communities in the sediments of the niyang river in Tibet[J]. Environmental Science, 2020, 41(7): 3249-3256 (in Chinese).
- [30] 负娟莉, 王艳芬, 张洪勋. 好氧甲烷氧化菌生态学研究进展[J]. 生态学报, 2013, 33(21): 6774-6785.
- YUN JL, WANG YF, ZHANG HX. Ecology of aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs)[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(21): 6774-6785 (in Chinese).
- [31] 严程, 梅娟, 赵由才. 好氧甲烷氧化菌及其工程应用进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1322-1338.
- YAN C, MEI J, ZHAO YC. Engineering application of aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs): a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1322-1338 (in Chinese).
- [32] SUNDH I, BASTVIKEN D, TRANVIK LJ. Abundance, activity, and community structure of pelagic methane-oxidizing bacteria in temperate lakes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6746-6752.
- [33] LYAUTEY E, BILLARD E, TISSOT N, JACQUET S, DOMAIZON I. Seasonal dynamics of abundance, structure, and diversity of methanogens and methanotrophs in lake sediments[J]. Microbial Ecology, 2021, 82(3): 559-571.
- [34] RISSANEN AJ, SAARENHEIMO J, TIROLA M, PEURA S, AALTO SL, KARVINEN A, NYKÄNEN H. Gammaproteobacterial methanotrophs dominate methanotrophy in aerobic and anaerobic layers of boreal lake waters[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2018, 81(3): 257-276.
- [35] CREVECOEUR S, VINCENT WF, COMTE J, MATVEEV A, LOVEJOY C. Diversity and potential activity of methanotrophs in high methane-emitting permafrost thaw ponds[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0188223.
- [36] DEUTZMANN JS, WÖRNER S, SCHINK B. Activity and diversity of methanotrophic bacteria at methane seeps in eastern Lake Constance sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(8): 2573-2581.
- [37] YANG YY, CHEN JF, TONG TL, LI BQ, HE T, LIU

- Y, XIE SG. Eutrophication influences methanotrophic activity, abundance and community structure in freshwater lakes[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 662: 863-872.
- [38] SILJANEN HMP, SAARI A, BODROSSY L, MARTIKAINEN PJ. Seasonal variation in the function and diversity of methanotrophs in the littoral wetland of a boreal eutrophic lake[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 80(3): 548-555.
- [39] ZELENKINA TS, TS ESHINIMAYEV B, DAGUROVA OP, SUZINA NE, NAMSARAYEV BB, TROTSSENKO YA. Aerobic methanotrophs from the coastal thermal springs of Lake Baikal[J]. *Microbiology*, 2009, 78(4): 492-497.
- [40] 王佳, 宋永会, 彭剑峰, 袁林江. 浑河底泥反硝化厌氧甲烷氧化菌群落结构时空特征[J]. *环境科学研究*, 2015, 28(11): 1670-1676.
- WANG J, SONG YH, PENG JF, YUAN LJ. Spatial-temporal distribution and community structure analysis of nitrite dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria in the sediments of the Hun river[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2015, 28(11): 1670-1676 (in Chinese).
- [41] GRAF JS, MAYR MJ, MARCHANT HK, TIENKEN D, HACH PF, BRAND A, SCHUBERT CJ, KUYPERS MMM, MILUCKA J. Bloom of a denitrifying methanotroph, ‘*Candidatus* Methyloirabilis limnetica’, in a deep stratified lake[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(7): 2598-2614.
- [42] KNOWLES R. Denitrifiers associated with methanotrophs and their potential impact on the nitrogen cycle[J]. *Ecological Engineering*, 2005, 24(5): 441-446.
- [43] RAHALKAR MC, PANDIT P. Genome-based insights into a putative novel *Methylomonas* species (strain Kb3), isolated from an Indian rice field[J]. *Gene Reports*, 2018, 13: 9-13.
- [44] JING HM, WANG RN, JIANG QY, ZHANG Y, PENG XT. Anaerobic methane oxidation coupled to denitrification is an important potential methane sink in deep-sea cold seeps[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 748: 142459.
- [45] 阎磊. 内蒙古湖泊湿地沉积物甲烷氧化菌群落多样性及环境驱动因素研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2022.
- YAN L. Study on community diversity and environmental driving factors of methane oxidizing bacteria in lake wetland sediments in Inner Mongolia[D]. Hohhot: Master’s Thesis of Inner Mongolia University, 2022 (in Chinese).
- [46] 黄培. 三峡库区消落带湿地反硝化型厌氧甲烷氧化菌的存在与分布特征[D]. 武汉: 武汉纺织大学硕士学位论文, 2015.
- HUANG P. Occurrence and distribution of nitrate/nitrite-dependent anaerobic methane oxidation (n-damo) in water-level fluctuation zone of the Three Gorges Reservoir[D]. Wuhan: Master’s Thesis of Wuhan Textile University, 2015 (in Chinese).
- [47] EGMATOV S, SAVVICHEV AS, KADNIKOV VV, BELETSKY AV, RUSANOV II, KLYUVITKIN AA, NOVICHKOVA EA, MARDANOV AV, PIMENOV NV, RAVIN NV. Microbial communities involved in methane, sulfur, and nitrogen cycling in the sediments of the Barents Sea[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(11): 2362.
- [48] BOETIUS A, RAVENSCHLAG K, SCHUBERT CJ, RICKERT D, WIDDEL F, GIESEKE A, AMANN R, JØRGENSEN BB, WITTE U, PFANNKUCHE O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane[J]. *Nature*, 2000, 407(6804): 623-626.
- [49] CHISTOSERDOVA L, KALYUZHNYAYA MG, LIDSTROM ME. The expanding world of methylotrophic metabolism[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 477-499.
- [50] YANG YY, CHEN JF, JENNIFER P, XIE SG. DNA-SIP reveals an overlooked methanotroph, *Crenothrix* sp., involved in methane consumption in shallow lake sediments[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 814: 152742.
- [51] KHADEM AF, POL A, JETTEN MSM, OP den CAMP HJM. Nitrogen fixation by the verrucomicrobial methanotroph ‘*Methylacidiphilum fumariolicum*’ SolV[J]. *Microbiology*, 2010, 156(4): 1052-1059.
- [52] MOHAMMADI SS, POL A, van ALLEN T, JETTEN MSM, OP den CAMP HJM. Ammonia oxidation and nitrite reduction in the verrucomicrobial methanotroph *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1901.
- [53] MARTINEZ-CRUZ K, SEPULVEDA-JAUREGUI A, WALTER ANTHONY K, THALASSO F. Geographic and seasonal variation of dissolved methane and aerobic methane oxidation in Alaskan Lakes[J]. *Biogeosciences*, 2015, 12(15): 4595-4606.
- [54] ROLAND FAE, DARCHAMBEAU F, MORANA C, BOUILLON S, BORGES AV. Emission and oxidation of methane in a meromictic, eutrophic and temperate

- lake (Dendre, Belgium)[J]. *Chemosphere*, 2017, 168: 756-764.
- [55] 夏品华, 林陶. 云贵高原典型湖滨湿地好氧甲烷氧化细菌群落结构和数量的时空动态[J]. *生态学报*, 2021, 41(12): 4776-4785.
- XIA PH, LIN T. Spatio-temporal variability in the abundance and structure of aerobic methane-oxidizing bacteria in the littoral wetland, Yunnan-Guizhou Plateau lake[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2021, 41(12): 4776-4785 (in Chinese).
- [56] BORREL G, JÉZÉQUEL D, BIDERRE-PETIT C, MOREL-DESROSIERS N, MOREL JP, PEYRET P, FONTY G, LEHOURS AC. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems[J]. *Research in Microbiology*, 2011, 162(9): 832-847.
- [57] CHOWDHURY TR, DICK R. Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands[J]. *Applied Soil Ecology*, 2013, 65: 8-22.
- [58] ZHANG T, ZHU W, MO J, LIU L, DONG S. Increased phosphorus availability mitigates the inhibition of nitrogen deposition on CH₄ uptake in an old-growth tropical forest, southern China[J]. *Biogeosciences*, 2011, 8(9): 2805-2813.
- [59] GAO DD, SHENG R, WHITELEY AS, MOREIRA-GREZ B, QIN HL, ZHANG WZ, ZHAN Y, WEI WX. Effect of phosphorus amendments on rice rhizospheric methanogens and methanotrophs in a phosphorus deficient soil[J]. *Geoderma*, 2020, 368: 114312.
- [60] SHUKLA PN, PANDEY KD, MISHRA VK. Environmental determinants of soil methane oxidation and methanotrophs[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2013, 43(18): 1945-2011.
- [61] SCHUBERT CJ, VAZQUEZ F, LÖSEKANN-BEHRENS T, KNITTEL K, TONOLLA M, BOETIUS A. Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno)[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 76(1): 26-38.
- [62] BLAZEWCZ SJ, PETERSEN DG, WALDROP MP, FIRESTONE MK. Anaerobic oxidation of methane in tropical and boreal soils: ecological significance in terrestrial methane cycling[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2012, 117(G2): 1-9.
- [63] SMEMO KA, YAVITT JB. Anaerobic oxidation of methane: an underappreciated aspect of methane cycling in peatland ecosystems?[J]. *Biogeosciences*, 2011, 8(3): 779-793.
- [64] LI HZ, YANG QH, ZHOU HY. Niche differentiation of sulfate- and iron-dependent anaerobic methane oxidation and methylotrophic methanogenesis in deep sea methane seeps[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1409.
- [65] HALLAM SJ, PUTNAM N, PRESTON CM, DETTER JC, ROKHSAR D, RICHARDSON PM, DeLONG EF. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics[J]. *Science*, 2004, 305(5689): 1457-1462.
- [66] HE Z, SHEN J, ZHU Y, FENG J, PAN X. Enhanced anaerobic oxidation of methane with the coexistence of iron oxides and sulfate fertilizer in paddy soil[J]. *Chemosphere*, 2023, 329: 138623.
- [67] LOU JQ, JIN H, LI JP, LV J, XU F, WANG RY. The mechanism of sulfate on a nitrate denitrifying anaerobic methane oxidation system[J]. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2022, 8(12): 2884-2894.