

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202002015

基于荧光定量 PCR 技术分析滇池沉积物产 甲烷菌空间分布特征*

陈悦^{1,2}, 罗明设^{1,2}, 李尚磷¹, 李春艳¹, 冉玉芳¹, 李玮^{1,2**}, 胡斌^{1**}

(1. 云南大学生态与环境学院, 高原湖泊生态与治理研究院, 云南昆明 650091;

2. 云南省高原山地生态与退化环境修复重点实验室, 云南昆明 650091)

摘要:【目的】研究滇池沉积物产甲烷菌的空间分布特征。【方法】采集滇池草海和外海的 4 个不同面源污染区域沉积物, 通过沉积物 DNA 提取、PCR 扩增及产物纯化、质粒构建及阳性验证、标准曲线制作和荧光定量 PCR 方法, 定量研究基于 *mcrA* 基因的产甲烷菌丰度及其分布特征。【结果】滇池沉积物产甲烷菌丰度范围为 $5.91 \times 10^7 \sim 7.74 \times 10^8$ copies/g。产甲烷菌的拷贝数在各个采样区域差异显著 ($F=10.3006$, $P=0.0012$), 并具有空间分布特征, 即外海中>外海南>草海>外海北, 且外海南部和中部的产甲烷菌丰度与草海和外海北部的产甲烷菌丰度具有显著差异 ($P<0.05$)。【结论】滇池沉积物具有较高的产甲烷丰度, 且产甲烷菌在滇池的分布空间异质性很大, 临近农业面源污染区域的外海中部和临近磷、钾厂的外海南部比草海和外海北部水华密集区具有较高的产甲烷菌丰度。

关键词: 产甲烷菌; 高原湖泊; 荧光定量 PCR; 沉积物; *mcrA*

中图分类号: Q 939.9

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 01-0132-08

The Spatial Distribution Characteristics of Methanogens in the Sediments of Dianchi Lake by Fluorescence Quantitative PCR

CHEN Yue^{1,2}, LUO Mingmo^{1,2}, LI Shanglin¹, LI Chunyan¹, RAN Yufang¹, LI Wei^{1,2}, HU Bin¹

(1. School of Ecology and Environment, Yunnan University, Key Laboratory of Plateau Ecology and Restoration of Degraded Environment, Kunming 650091, China; 2. Key Laboratory of Plateau Mountain Ecology and Degradation Environmental Remediation of Yunnan Province, Kunming 650091, China)

Abstract: [Purpose] To study the abundance and distribution characteristics of methanogens abundance in the sediments of Dianchi. [Method] The sediments were collected from 4 different non-point source contaminated areas in Caohai and Waihai of Dianchi Lake. The distribution characteristics of methanogen abundance was detected by fluorescence quantitative PCR procedure, of which included the sediment DNA extraction, PCR amplification and product purification, plasmid construction and positive verification, and production of standard curve. [Results] The abundance of methanogenes in the sediments of Dianchi Lake ranged from $5.91 \times 10^7 \sim 7.74 \times 10^8$ copies/g. The copy number of methanogenic was significantly different in each sampling area ($F=10.3006$, $P=0.0012$),

收稿日期: 2020-02-17

修回日期: 2020-08-26

网络首发时间: 2020-12-21 09:23:10

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31700411); 云南省应用基础研究计划项目 (2018FD007)。

作者简介: 陈悦 (1996—), 女, 云南楚雄人, 在读硕士研究生, 主要从事甲烷循环相关功能微生物研究。

E-mail: chen Yue4646@foxmail.com

**通信作者 Corresponding authors: 李玮 (1988—), 女, 青海门源人, 博士, 讲师, 主要从事高原湖泊和微生物生态相关研究。E-mail: liweismiling@ynu.edu.cn; 胡斌 (1967—), 男, 云南昆明人, 硕士, 高级实验师, 主要从事污染生态学和恢复生态学研究。E-mail: hubin@ynu.edu.cn

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20201218.0927.001.html>



and their spatial distribution characteristics, that is, the central part of Waihai>southern part of Waihai>Caohai>northern part of Waihai ($P<0.05$). [**Conclusion**] Dianchi Lake sediments had a high methaneogen abundance and spatital heterogeneous, the abundances of methanogens in the middle part (adjacent to the agricultural non-point source pollution area) and south part (adjacent to the phosphorus and potassium plant) of the Waihai were significantly higher than that in the Caohai and north of Waihai (algae enriched area).

Keywords: methanogens; plateau lakes; fluorescence quantitative PCR; sediment; *mcrA*

甲烷是重要的温室气体,对全球变暖有重要的作用,其变暖潜力是 CO_2 的25倍,同时会导致平流层臭氧层破坏加剧^[1-2]。自工业革命以来,大气中的甲烷浓度已经增加了1倍,并且在持续增加。许多生态系统中都有甲烷排放,如泥炭地^[3-5]、垃圾填埋场^[6]、水稻土^[7-8]、湖泊沉积物^[9]和内陆湖泊^[10-11]等。净甲烷产生通常来自于沉积物以及底部水体中,沉积物中大部分甲烷排放可能是由于产甲烷菌利用 H_2 产生,即利用 H_2/CO_2 的氢营养型途径^[12-13]。产甲烷菌在甲烷的循环中起主导作用,是唯一已知主要利用 H_2/CO_2 、甲酸盐和乙酸作为底物、并将其分解代谢得到甲烷的生物^[14-15]。产甲烷菌的所有底物代谢途径都是为了使初级底物转化为甲基或甲基化化合物,接着将甲基转移至辅酶M,形成中间甲基辅酶M(甲基-COM),然后由产甲烷古菌中特有的关键酶——甲基辅酶M还原酶(methyl-coenzyme M reductase, MCR)催化产甲烷最终步骤^[16-18]。产甲烷古菌跨越了广古菌门7个目^[19],即甲烷杆菌目(Methanobacteriales)、甲烷球菌目(Methanococcales)、甲烷微菌目(Methanomicrobiales)、甲烷八叠球菌目(Methanosarcinales)、甲烷火菌目(Methanopyrales)、甲烷胞菌目(Methanocellales)和马赛球菌目(Methanomassiliicoccales)^[20]。这些目都含有种类繁多的类群,它们在形态和生理特征上有很大的差异,所需底物不同,生存环境各异,但都含有催化产甲烷最终步骤的特征酶——MCR,且都具有厌氧产甲烷的功能^[17, 21-22]。因此在鉴定产甲烷菌的过程中,利用*mcrA*基因进行PCR检测是稳定且有效的方法^[23]。

滇池是中国西南云贵高原的40个湖泊之一,也是第六大淡水湖,位于亚热带或温带气候区,在为邻近的城市和农村地区提供淡水资源和发展水产养殖方面发挥着非常重要的作用,具有

很高的生态经济价值;随着人口增长对清洁水的需求日益增长,其水质变化越来越受到政府及公众的关注^[24]。滇池作为高原湖泊,与其他湖泊相对隔离,极易富营养化^[25]。由于地处城市边缘,人口密集,工业和生活污水未经处理就向滇池及其支流排放,有机碳、氮磷负荷大,富营养化已成为滇池最大的威胁,是制约周边城市经济发展的首要问题^[26]。在全球变暖的背景下,湖泊富营养化程度会影响湖泊碳平衡,严重富营养化可能还会加剧湖泊 CH_4 排放^[27]。湖泊沉积物是富营养化水体大量营养素的来源及其储存空间,且厌氧产甲烷主要来源于湖泊沉积物中的厌氧产甲烷菌,因此,研究沉积物产甲烷菌对于富营养化湖泊碳循环研究具有重要的理论指导意义。微生物群落丰度与样地的物理化学性质和甲烷产量显著相关,而湖泊营养状态、沉积物基质的物理和化学特性,如土壤水分、温度、海拔、pH和盐度等对产甲烷菌群落丰度有影响^[28-33]。研究表明:滇池的产甲烷潜力变化以及甲烷菌的丰度和群落结构与沉积物层深度相关^[34],但对产甲烷菌空间水平的分布特征缺乏探讨。本研究以滇池沉积物为对象,采用荧光定量PCR方法研究产甲烷菌丰度及分布特征,以期为高原富营养化湖泊生物甲烷排放潜力估算提供一定的理论指导作用。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

滇池位于云南省昆明市区,沿湖全长308.6 km,平均水深5.03 m,最大水深11.35 m。水温变化范围为 $9.8\sim 24.5\text{ }^\circ\text{C}$,年平均水温 $16\text{ }^\circ\text{C}$ ^[35]。随着城市化进程,大量的生活与工业污水排放逐年增加,导致滇池成为典型的高原富营养化湖泊。滇池分为草海与外海两部分,其污染程度各不相同,草海富营养化程度明显高于外海^[26]。本研究

在滇池草海和外海选取存在明显环境差异的 4 个代表性区域采样, 分别为 A1: 草海, 滇池北部排污密集区; A2: 外海北, 水华严重区; A3: 外海中, 农业污染排放密集区; A4: 外海南, 靠近磷矿和钾肥厂区, 磷钾污染排放密集区 (图 1)。

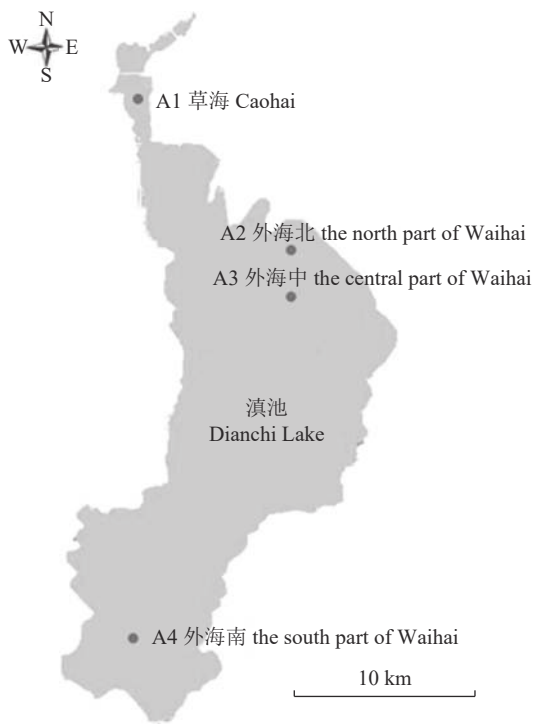


图 1 滇池采样点 (A1~A4) 分布
Fig. 1 The distribution of sampling sites (A1-A4) in Dianchi Lake

1.2 样品采集与保存

分别在采样点 A1~A4 用沉积物采样器采集深度 0~10 cm 的沉积物底泥, 每个样点 4 个重复, 共 16 个样品。采集后立即将沉积物转移至厌氧瓶中, 用硅胶塞塞住, 迅速转移至 4 ℃ 便携式恒温箱中。带回实验室后立即存放于-20 ℃ 冰箱, 用于后续荧光定量 PCR 分析。

1.3 产甲烷菌丰度检测

用 Omega 试剂盒提取 16 个沉积物样品中的 DNA, 然后通过 1% 凝胶电泳来检测提取效果后放于-20 ℃ 冰箱中保存, 以备后续使用。以提取

沉积物中的总 DNA 为模板, 利用 *mcrA* 基因特异性引物进行 PCR, 同时设置阴性空白对照 (CK, 不加 DNA 模板)。扩增体系为 25 μL: Master Mix 12.5 μL, DNA 1 μL, 10 μmol/L 引物 F 1 μL, 10 μmol/L 引物 R 1 μL, ddH₂O 9.5 μL。扩增引物和程序^[36]见表 1。

扩增完成后采用天根 DP219 试剂盒进行目的片段回收纯化。纯化 PCR 产物与 pGM-T Fast Vector 载体连接, 取部分连接产物加至 50~100 μL DH5α 感受态细胞中。在预先制备预热的含有氨苄青霉素终质量浓度为 100 μg/mL 的 LB 琼脂糖平板进行涂布培养, 37 ℃ 培养过夜, 直至可观察到菌落。

将得到的白色菌落接种至 1~5 mL LB (含有终质量浓度为 50~100 μg/mL 的氨苄青霉素) 培养基, 37 ℃ 摇床振荡培养过夜, 保存菌种后提取质粒 (采用 TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒提取)。以原有的引物对质粒进行 PCR 扩增, 初步验证阳性克隆。菌液 PCR 扩增后, 有目的条带的样品送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 通过一代测序的方法验证确认阳性, 阳性克隆菌液测序结果在 GenBank 上利用 BLAST 进行序列的同源性分析。用 Nandrop 2000 测定提取的质粒质量浓度后, 将质粒质量浓度进行 10 倍梯度稀释, 然后在罗氏 LC96 仪器进行荧光定量 PCR 扩增, 建立荧光定量标准曲线。

在获得稳定和可信度高的标准曲线后, 为确定荧光定量 PCR 扩增的特异性情况, 以标准质粒为阳性对照, 以无菌蒸馏水为阴性对照 (CK), 对 16 个样品 DNA 的荧光定量 PCR 的扩增曲线及熔解曲线进行特异性评价。最终将待测样品和标准质粒同时扩增, 根据建立的标准曲线计算样品产甲烷菌的拷贝数, 并对荧光定量结果进行分析, 揭示滇池的产甲烷菌丰度及分布特征。荧光定量 PCR 扩增体系为 20 μL: 2×SybrGreen qPCR Master Mix 10 μL, DNA 0.5 μL, 10 μmol/L 引物 F 0.5 μL, 10 μmol/L 引物 R 0.5 μL, ddH₂O 8.5 μL, 扩增引物和程序^[36]见表 1。

表 1 引物序列与扩增程序
Tab. 1 Primer sequence and amplification program

引物 primer	序列 (5'→3') sequence	扩增程序 amplification program
<i>mcrA</i> -F	CGTGGTGTMGGATTACACARTAYGCWACAGC	94 ℃ (10 min), 95 ℃ (30 s), 55 ℃ (30 s), 72 ℃ (30 s), 40 cycles
<i>mcrA</i> -R	TGTGCAAGGAGCAGGGAC	

1.4 数据分析

(1) 绝对荧光定量分析完成后, 用 Light Cycler® 96 SW 1.1 软件分析数据。

(2) 按照以下公式计算 *mcrA* 基因的拷贝数和土样中产甲烷菌的拷贝数:

标准样品质粒的 *mcrA* 基因的拷贝数 (copies/ μL) = $(6.02 \times 10^{23}) \times (\text{质粒质量浓度} \times 10^{-9}) / [(\text{T 载体长度} + \text{mcrA 基因长度}) \times 660]$;

土样中产甲烷菌的拷贝数 (copies/g) = (样品中 DNA 的拷贝数 $\times$ 总 DNA 稀释倍数 $\times$ 总 DNA 体积) / 土壤质量。

式中, 质粒质量浓度单位为 $\text{ng}/\mu\text{L}$; T 载体长度为 3031 bp, 来自天根 DP219 试剂盒的 pGM-T Fast Vector 载体; 因本试验的目的条带接近 500 bp, 故计算时 *mcrA* 基因长度取标准范围 464~491 bp

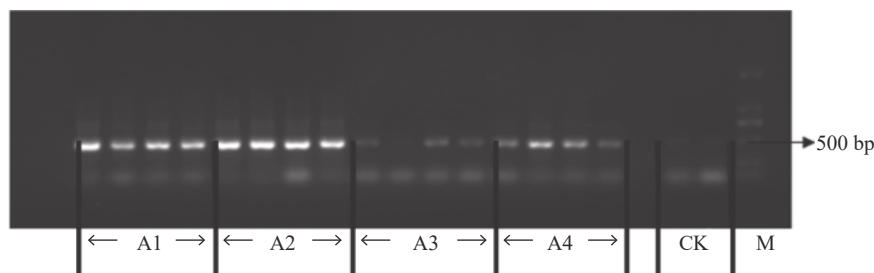
中的 491 bp; 样品中 DNA 的拷贝数单位为 copies/ μL ; 总 DNA 体积单位为 μL ; 土壤质量根据 Omega 试剂盒说明书称取 0.3 g。

(3) 用 Excel 软件进行数据预处理, 计算平均值和标准差。采用 SPSS 进行单因素方差分析, 比较不同采样区域间沉积物产甲烷菌丰度的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 目的片段扩增

以样品总 DNA 为模板, 运用 *mcrA* 基因引物 PCR 扩增的条带接近 500 bp (图 2), 产甲烷菌目的条带位于 464~491 bp, 基本吻合。可初步判定: 试验条件满足扩增产甲烷菌特异性片段的要求。



注: M. 标准条带; CK. 阴性对照。

Note: M. Marker; CK. negative control.

图 2 沉积物 *mcrA* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results of sediment *mcrA* gene

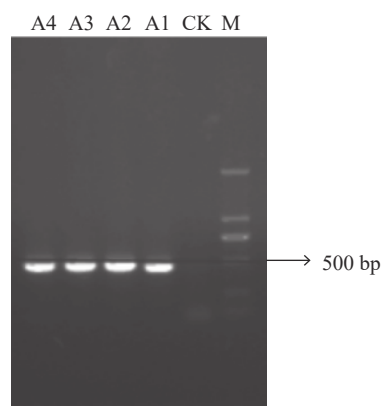
2.2 重组质粒扩增、测序

将目的片段扩增后的目标条带回收, 连接转化涂布出的菌液提取质粒后, 进行 PCR 扩增的目标条带清晰明亮, 接近 500 bp (图 3), 初步证明目的基因成功克隆。阳性克隆菌液测序结果在 GenBank 上利用 BLAST 进行序列的同源性分析, 结果表明: 产甲烷菌 *mcrA* 基因的阳性克隆序列与 GenBank 上的已知产甲烷菌的菌种相似性为 97%。

2.3 荧光定量 PCR 标准曲线及可信度分析

测定的质粒质量浓度为 $25.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。将标准质粒进行 10 倍梯度稀释后, 选取 5 个稀释梯度的稀释质粒作为模板进行荧光定量 PCR 反应。标准曲线 (表 2、图 4) 显示: 每个稀释梯度点的 3 个重复变化不大, 变异系数很小, 说明标准曲线具有一致的重复反应、高的线性 ($R^2=1$)、高的扩增率 ($E=92\%$) 以及斜率 ($S=-3.5250$), 是合格

的标准曲线, 满足绝对定量的要求, 具有很高的可信度与良好的重复性。



注: M. 标准条带; CK. 阴性对照。

Note: M. Marker; CK. negative control.

图 3 重组质粒的 *mcrA* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification results of recombinant plasmid *mcrA* gene

表 2 不同稀释倍数的标准质粒 real-time PCR 检测精度

Tab. 2 Precision of standard plasmids of different dilution times detected by real-time PCR

稀释倍数/ dilution times	拷贝数 copy number	荧光阈值(mean±SD) fluorescent threshold	变异系数/% coefficient of variation
1.00×10^{-5}	6.07×10^4	20.29 ± 0.26	1.28
1.00×10^{-4}	6.07×10^5	16.45 ± 0.07	0.43
1.00×10^{-3}	6.07×10^6	13.49 ± 0.30	2.22
1.00×10^{-2}	6.07×10^7	9.57 ± 0.17	1.78
1.00×10^{-1}	6.07×10^8	6.10 ± 0.17	2.79

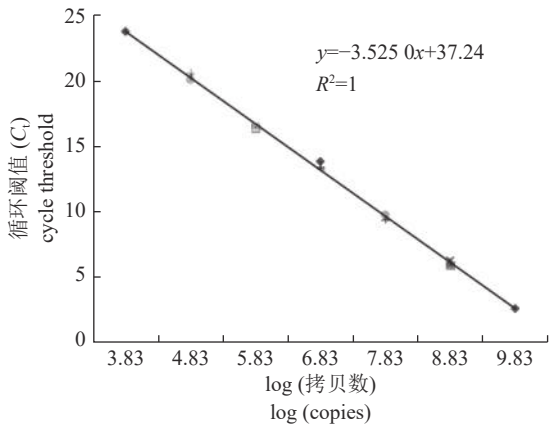


图 4 荧光标准曲线

Fig. 4 Fluorescence standard curve

2.4 特异性扩增评价

由图 5 可知：标准质粒与滇池沉积物土壤 DNA 均呈 S 型扩增曲线，显示阳性。标准质粒 DNA 浓度从 6.07×10^4 至 6.07×10^8 copies/ μL 范围内扩增曲线的线形均很好。从整体上看，重复性都很高。由溶解曲线 (图 6) 可见：目的产物溶解温度为 90~92 $^{\circ}\text{C}$ ，A1-1 和 A2-3 引物二聚体溶解温度为 76~78 $^{\circ}\text{C}$ 。阴性对照无检出目的产物峰值，说明扩增体系无污染。目的基因峰值接近，扩增产物基本一致，除 A1-1 和 A2-3 外，基本上无非特异性峰的出现。

2.5 荧光定量 PCR 结果

由于拷贝数对数与 C_t 值呈线性关系，线性方程为 $y=-3.5250x-37.24$ ($R^2=1$ ， x 为拷贝数的对数值， y 为 C_t 值)，所以 C_t 值越大，拷贝数越小。由表 3 可知：样品的 C_t 值范围在 17.753~31.823 之间，产甲烷菌 DNA 拷贝数范围在 $3.07\times10^3\sim1.04\times10^9$ copies/g 之间。总体来说，A2 (外海北部) 样品中 C_t 值普遍较大，所以 DNA 拷贝数值很低；A3 (外海中) 样品则反之， C_t 值整体都较

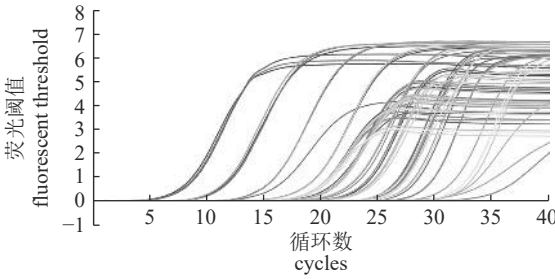


图 5 扩增曲线

Fig. 5 Amplification curve

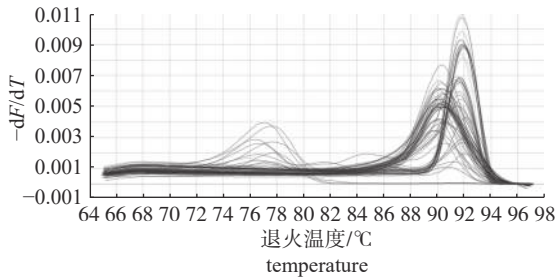


图 6 溶解曲线

Fig. 6 Melting curve

小，所以 DNA 拷贝数较高。 C_t 值的变化趋势为 $A2>A1>A4>A3$ ，拷贝数反之为 $A3>A4>A1>A2$ ，即沉积物产甲烷菌丰度表现为：外海中>外海南>草海>外海北。此外，产甲烷菌的拷贝数在各个采样区域差异显著 ($F=10.3006$ ， $P=0.0012<0.05$)，相同采样点 4 个重复之间产甲烷菌拷贝数差异比较大，说明空间异质性很大，且 A3 (外海中) 和 A4 (外海南部) 与 A1 (草海) 和 A2 (外海北部) 有显著性差异 ($P<0.05$)。

3 讨论

本研究通过运用荧光定量 PCR 技术成功扩增出滇池沉积物中产甲烷菌的特异性条带，并测定出产甲烷菌丰度结果为外海中>外海南>草海>外海北，证实了高原淡水湖泊滇池中存在产甲烷菌，且产甲烷菌丰度在草海和外海 4 个采样区域有显著差异性。BAI 等^[35]研究表明：外海的沉积物细菌群落比草海更容易受到环境因素的影响，且样本的空间区域位置是细菌群落结构变化的主要原因。本研究也发现：产甲烷丰度存在空间分布特征，可能是环境因素影响了其分布。外海中部接近农业面源污染即氮磷负荷超标的地区，微生物生长旺盛，产甲烷菌含量最为丰富，而外海南接近磷、钾矿排污富集区域，这 2 个区域产甲

表 3 滇池沉积物样品 *mcrA* 基因的循环阈值 (C_t) 与基因拷贝数Tab. 3 Cycle threshold (C_t) and copy number of *mcrA* gene in the sediments of Dianchi Lake

采样点 sampling sites	编号 No.	C_t	产甲烷菌拷贝数/(copies·g ⁻¹) copy number of methanogens	mean±SD/ (copies·g ⁻¹)
A1	A1-1	3.18×10	3.07×10 ³	5.91×10 ⁷ ±5.15×10 ⁷ b
	A1-2	2.20×10	9.13×10 ⁷	
	A1-3	2.42×10	1.92×10 ⁷	
	A1-4	2.15×10	1.26×10 ⁸	
A2	A2-1	2.49×10	1.11×10 ⁷	5.52×10 ⁶ ±3.98×10 ⁶ b
	A2-2	2.54×10	7.31×10 ⁶	
	A2-3	2.79×10	6.82×10 ⁵	
	A2-4	2.64×10	3.03×10 ⁶	
A3	A3-1	1.91×10	5.21×10 ⁸	7.74×10 ⁸ ±2.67×10 ⁸ a
	A3-2	1.92×10	4.93×10 ⁸	
	A3-3	1.78×10	1.04×10 ⁹	
	A3-4	1.78×10	1.04×10 ⁹	
A4	A4-1	1.92×10	4.93×10 ⁸	6.52×10 ⁸ ±2.27×10 ⁸ a
	A4-2	1.92×10	4.93×10 ⁸	
	A4-3	1.89×10	5.81×10 ⁸	
	A4-4	1.78×10	1.04×10 ⁹	

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。Note: Different small letters indicate significant difference ($P<0.05$).

烷菌含量丰度与草海富营养严重区域有显著差异。分析其原因主要有以下 2 个方面。

(1) 化学氮肥和有机氮肥联合施用能够改善土壤碳基质和产甲烷菌的活性, 提高产甲烷菌的 *mcrA* 的丰度, 从而提高甲烷的产量及通量, 平衡的碳氮比有利于甲烷的产生^[37-38], 故可推断农田施肥灌溉污水中的氮素及矿厂工业废水的磷、钾等流入滇池, 使产甲烷菌的生长基质发生变化, 明显促进了产甲烷菌的生长。

(2) 有机质来源会影响产甲烷菌的丰度和活性。产甲烷菌利用溶解有机质和固体有机质的能力不同^[39], 甚至溶解有机质会抑制甲烷的产生^[40]。本研究草海区域有机质含量高于外海^[41], 但产甲烷菌含量低于外海平均, 且与外海南部和中部差异显著。说明外海有机质来源可能更适合于产甲烷菌的生长, 特别是外海南部和中部。滇池水华密集区域, 产甲烷菌的含量最低, 可能是由于全球变暖的背景下, 温室气体促进有害藻类的光合作用和生长繁殖, 有害水华向周围生物释放有害的毒素, 抑制了产甲烷菌的生长^[42]。

4 结论

本研究仅是基于 *mcrA* 基因采用荧光定量

PCR 的方法揭示产甲烷菌丰度的空间分布特征, 主要结论为高原湖泊滇池沉积物存在较高产甲烷菌丰度, 且产甲烷菌空间分布特征为外海中>外海南>草海>外海北。有关面源污染对滇池产甲烷菌影响机制和水华富集区藻类如何影响产甲烷菌等问题有待后续探讨研究。

[参考文献]

- [1] HANSEN J, SATO M, RUEDY R, et al. Global warming in the twenty-first century: an alternative scenario[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(18): 9875. DOI: 10.1073/pnas.170278997.
- [2] BRIMBLECOMBE P. Air composition and chemistry[M]. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- [3] FEDOROV Y A, GAR'KUSHA D N, SHIPKOVA G V. Methane emission from peat deposits of raised bogs in Pskov oblast[J]. Geography and Natural Resources, 2015, 36(1): 70. DOI: 10.1134/S1875372815010102.
- [4] INUBUSHI K, OTAKE S, FURUKAWA Y, et al. Factors influencing methane emission from peat soils: comparison of tropical and temperate wetlands[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2005, 71: 93. DOI: 10.1007/s10705-004-5283-8.
- [5] BASILIKO N, HENRY K, GUPTA V, et al. Controls on bacterial and archaeal community structure and greenhouse gas production in natural, mined, and restored Ca-

- nadian peatlands[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 215. DOI: [10.3389/fmicb.2013.00215](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00215).
- [6] JONES H A, NEDWELL D B. Methane emission and methane oxidation in land-fill cover soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 102(3/4): 185. DOI: [10.1111/j.1574-6968.1993.tb05809.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05809.x).
- [7] HOLZAPFEL-PSCHORN A, SEILER W. Methane emission during a cultivation period from an Italian rice paddy[J]. *Journal of Geophysical Research*, 1986, 91(D11): 11803. DOI: [10.1029/JD091iD11p11803](https://doi.org/10.1029/JD091iD11p11803).
- [8] GROSSKOPF R, JANSSEN P H, LIESACK W. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(3): 960. DOI: [10.1128/AEM.64.3.960-969.1998](https://doi.org/10.1128/AEM.64.3.960-969.1998).
- [9] ANTONY C P, MURRELL J C, SHOUCHE Y S. Molecular diversity of methanogens and identification of *Methanobolus* sp. as active methylotrophic *Archaea* in Lonar Crater Lake sediments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 81(1): 43. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2011.01274.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01274.x).
- [10] HOLGERSON M A, RAYMOND P A. Large contribution to inland water CO₂ and CH₄ emissions from very small ponds[J]. *Nature Geoscience*, 2016, 9: 222. DOI: [10.1038/ngeo2654](https://doi.org/10.1038/ngeo2654).
- [11] BASTVIKEN D, TRANVIK L J, DOWNING J A, et al. Freshwater methane emissions offset the continental carbon sink[J]. *Science*, 2011, 331(6013): 50. DOI: [10.1126/science.1196808](https://doi.org/10.1126/science.1196808).
- [12] CONRAD R, PHELPS T J, ZEIKUS J G. Gas metabolism evidence in support of the juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50(3): 595. DOI: [10.1016/0141-4607\(85\)90029-0](https://doi.org/10.1016/0141-4607(85)90029-0).
- [13] CROWE S A, KATSEV S, LESLIE K, et al. The methane cycle in ferruginous Lake Matano[J]. *Geobiology*, 2011, 9: 61. DOI: [10.1111/j.1472-4669.2010.00257.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2010.00257.x).
- [14] EARL J, HALL G, PICKUP R W, et al. Analysis of methanogen diversity in a hypereutrophic lake using PCR-RFLP analysis of *mcr* sequences[J]. *Microbial Ecology*, 2003, 46(2): 270. DOI: [10.1007/s00248-003-2003-x](https://doi.org/10.1007/s00248-003-2003-x).
- [15] BOONE D R, WHITMAN W B. Proposal of minimal standards for describing new taxa of methanogenic bacteria[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1988, 38(2): 212. DOI: [10.1099/00207713-38-2-212](https://doi.org/10.1099/00207713-38-2-212).
- [16] FERRY J G. Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry and genetics[M]. London: Chapman & Hall, 1993.
- [17] GUO J H, PENG Y Z, NI B J, et al. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 33. DOI: [10.1186/s12934-015-0218-4](https://doi.org/10.1186/s12934-015-0218-4).
- [18] 方晓瑜, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 产甲烷生化代谢途径研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(1): 1. DOI: [10.3724/sp.j.1145.2014.08019](https://doi.org/10.3724/sp.j.1145.2014.08019).
- [19] BALCH W E, FOX G E, MAGRUM L J, et al. Methanogens: reevaluation of a unique biological group[J]. *Microbiological Research*, 1979, 43(2): 260. DOI: [10.1128/MMBR.43.2.260-296.1979](https://doi.org/10.1128/MMBR.43.2.260-296.1979).
- [20] PAUL K, NONOH J O, MIKULSKI L, et al. “*Methanoplasmatales*,” *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8245. DOI: [10.1128/AEM.02193-12](https://doi.org/10.1128/AEM.02193-12).
- [21] FAYYAZ A S, QAISAR M, MOHAMMAD M S, et al. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis[J]. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 183752. DOI: [10.1155/2014/183752](https://doi.org/10.1155/2014/183752).
- [22] 傅霖, 辛明秀. 产甲烷菌的生态多样性及工业应用[J]. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(4): 574. DOI: [10.3724/SP.J.1145.2009.00574](https://doi.org/10.3724/SP.J.1145.2009.00574).
- [23] NUNOURA T, OIDA H, MIYAZAKI J, et al. Quantification of *mcrA* by fluorescent PCR in methanogenic and methanotrophic microbial communities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(2): 240. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2008.00451.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00451.x).
- [24] LI R Q, DONG M, ZHAO Y, et al. Assessment of water quality and identification of pollution sources of plateau lakes in Yunnan (China)[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2007, 36(1): 291. DOI: [10.2134/jeq2006.0165](https://doi.org/10.2134/jeq2006.0165).
- [25] LIU Y Q, PRISCU J C, XIONG J B, et al. Salinity drives archaeal distribution patterns in high altitude lake sediments on the Tibetan Plateau[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(3): fiw033. DOI: [10.1093/femsec/fiw033](https://doi.org/10.1093/femsec/fiw033).
- [26] ZHANG T, ZENG W H, WANG S R, et al. Temporal and spatial changes of water quality and management strategies of Dianchi Lake in southwest China[J]. *Hydrology and Earth System Sciences*, 2014, 18(4): 1493. DOI: [10.5194/hess-18-1493-2014](https://doi.org/10.5194/hess-18-1493-2014).
- [27] SEPULVEDA-JAUREGUI A, HOYOS-SANTILLAN J, MARTINEZ-CRUZ K, et al. Eutrophication exacerbates the impact of climate warming on lake methane emission[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 636: 411. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2018.04.283](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.283).
- [28] CHAUDHARY P P, RULÍK M, BLASER M. Is the methanogenic community reflecting the methane emissions of river sediments?-Comparison of two study sites[J]. *MicrobiologyOpen*, 2017, 6(4): e00454. DOI: [10.1002/mbo3.454](https://doi.org/10.1002/mbo3.454).
- [29] HOFMANN K, PAULI H, PRAEG N, et al. Methane-cycling microorganisms in soils of a high-alpine altitudinal gradient[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(3): fiw009. DOI: [10.1093/femsec/fiw009](https://doi.org/10.1093/femsec/fiw009).
- [30] KOTSYURBENKO O R. Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 53(1): 3. DOI: [10.1016/j.femsec.2004.12.009](https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.12.009).

- [31] LAZAR C S, PARKES R J, CRAGG B A, et al. Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the centre of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 2078. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2011.02425.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02425.x).
- [32] LIU D Y, TAGO K, HAYATSU M, et al. Effect of elevated CO₂ concentration, elevated temperature and no nitrogen fertilization on methanogenic archaeal and methane-oxidizing bacterial community structures in paddy soil[J]. *Microbes and Environments*, 2016, 31(3): 349. DOI: [10.1264/jisme2.ME16066](https://doi.org/10.1264/jisme2.ME16066).
- [33] LIU J N, XU H S, JIANG Y, et al. Methane emissions and microbial communities as influenced by dual cropping of *Azolla* along with early rice[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40635. DOI: [10.1038/srep40635](https://doi.org/10.1038/srep40635).
- [34] YANG Y Y, LI N N, WANG W, et al. Vertical profiles of sediment methanogenic potential and communities in two plateau freshwater lakes[J]. *Biogeosciences*, 2017, 14(2): 341. DOI: [10.5194/bg-14-341-2017](https://doi.org/10.5194/bg-14-341-2017).
- [35] BAI Y H, SHI Q, WEN D H, et al. Bacterial communities in the sediments of Dianchi Lake, a partitioned eutrophic waterbody in China[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37796. DOI: [10.1371/journal.pone.0037796](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037796).
- [36] LUTON P E, WAYNE J M, SHARP R J, et al. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill[J]. *Microbiology*, 2002, 148: 3521. DOI: [10.1099/00221287-148-11-3521](https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3521).
- [37] KONG D L, LI S Q, JIN Y G, et al. Linking methane emissions to methanogenic and methanotrophic communities under different fertilization strategies in rice paddies[J]. *Geoderma*, 2019, 347: 233. DOI: [10.1016/j.geoderma.2019.04.008](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.04.008).
- [38] ZHANG W Z, SHENG R, ZHANG M M, et al. 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. DOI: [10.1016/j.agee.2018.02.018](https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.02.018).
- [39] BERBERICH M E, BEAULIEU J J, HAMILTON T L, et al. Spatial variability of sediment methane production and methanogen communities within a eutrophic reservoir: importance of organic matter source and quantity[J]. *Limnology and Oceanography*, 2020, 65(6): 1336. DOI: [10.1002/lno.11392](https://doi.org/10.1002/lno.11392).
- [40] WANG J J, LIU C Y, GONG X F, et al. Trimethylamine stimulated and dissolved organic matter inhibited methane production in sediment from the Poyang Lake, China[J]. *Environmental Technology*, 2016, 37(20): 2545. DOI: [10.1080/09593330.2016.1155649](https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1155649).
- [41] LIU W B, WANG S R, ZHANG L, et al. Water pollution characteristics of Dianchi Lake and the course of protection and pollution management[J]. *Environmental Earth Sciences*, 2015, 74(5): 3767. DOI: [10.1007/s12665-015-4152-x](https://doi.org/10.1007/s12665-015-4152-x).
- [42] BRANDENBURG K M, VELTHUIS M, VAN DE WAAL D B. Meta-analysis reveals enhanced growth of marine harmful algae from temperate regions with warming and elevated CO₂ levels[J]. *Global Change Biology*, 2019, 25(8): 2607. DOI: [10.1111/gcb.14678](https://doi.org/10.1111/gcb.14678).

责任编辑: 何馨成

(上接第 59 页)

- [14] SCHNEIDER D. Insect antennae[J]. *The Annual Review of Entomology*, 1964, 9(1): 103. DOI: [10.1146/annurev.en.09.010164.000535](https://doi.org/10.1146/annurev.en.09.010164.000535).
- [15] 章玉苹, 范一霖, 郑苑, 等. 桔小实蝇本地寄生蜂长尾全裂茧蜂雌成虫产卵器传感器的扫描电镜观察[J]. *环境昆虫学报*, 2012, 34(4): 466. DOI: [10.3969/j.issn.1674-0858.2012.04.11](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-0858.2012.04.11).
- [16] 赵海燕, 陆永跃, 曾玲, 等. 蝇蛹金小蜂雌虫触角、产卵器及腹部感受器的扫描电镜观察[J]. *华南农业大学学报*, 2013, 34(4): 499. DOI: [10.7671/j.issn.1001-411X.2013.04.010](https://doi.org/10.7671/j.issn.1001-411X.2013.04.010).
- [17] 高宇, 王志英, 赵红盈, 等. 白蜡吉丁啮小蜂产卵器、复眼和口器感受器的扫描电镜观察[J]. *北方园艺*, 2014(6): 122.
- [18] 谷小红, 蔡普默, 杨燕川, 等. 橘小实蝇4种寄生蜂腹部和产卵器传感器的扫描电镜观察[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2017, 46(6): 601. DOI: [10.13323/j.cnki.j.fafu\(nat.sci.\).2017.06.001](https://doi.org/10.13323/j.cnki.j.fafu(nat.sci.).2017.06.001).
- [19] 高倩, 周淑辉, 张龙. 群居型东亚飞蝗后足外侧传感器的初步研究[J]. *北京农学院学报*, 2008, 23(3): 26. DOI: [10.13473/j.cnki.issn.1002-3186.2008.03.005](https://doi.org/10.13473/j.cnki.issn.1002-3186.2008.03.005).
- [20] 王洪亮, 王丙丽, 田雪亮, 等. 黄粉虫成虫足感受器超微结构的研究[J]. *贵州农业科学*, 2010, 38(12): 109. DOI: [10.3969/j.issn.1001-3601.2010.12.034](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-3601.2010.12.034).
- [21] 王争艳, 莫建初. 雌家蝇产卵器和足上感受器的形态学研究[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2010, 21(2): 115.

责任编辑: 何承刚