

DOI: 10.5846/stxb202003160553

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. 生态学报, 2021, 41(12): 4776-4785.

Xia P H, Lin T. Spatio-temporal variation in the abundance and structure of aerobic methane-oxidizing bacteria in the littoral wetland, Yunnan-Guizhou Plateau lake. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(12): 4776-4785.

## 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

夏品华, 林陶\*

贵州师范大学贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳 550001

**摘要:** 湖泊生态系统排放的甲烷(CH<sub>4</sub>)大部分来自湖滨湿地, 好氧甲烷氧化细菌(methane-oxidizing bacteria, MOB)在减轻CH<sub>4</sub>从湖泊系统向大气的排放中起着至关重要的作用。湖滨湿地好氧 MOB 群落分布及其影响因素尚不清楚。采用 qPCR、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)等方法, 分四季对贵州草海湖滨湿地宽敞水域至落干区沉积物中好氧 MOB 群落组成和数量进行了研究。草海湖滨湿地沉积物中甲烷氧化单加氧酶功能基因(*pomA*)丰度较高, 在  $1.78 \times 10^7$ — $2.73 \times 10^8$  拷贝数/g 干沉积物之间, 好氧 MOB 由 I 型(*Methylococcus* and *Methylobacter*)和 II 型(*Methylosinus*)组成, I 型主要分布在宽敞水域(长期淹水区), 而干湿过渡区和偶尔积水区主要为 II 型, 呈现出明显的空间变化, 推测湖滨湿地长期淹水区甲烷的氧化由 I 型主导, 而相对于干旱的区域 II 型主导, 而这种差异可能是导致湖滨湿地甲烷排放高度异质性的一个重要因素。研究结果对揭示湖滨湿地甲烷排放时空异质性的微生物生态机制奠定了基础。

**关键词:** 甲烷氧化菌; *pomA* 基因; 甲烷氧化; 湖滨湿地

## Spatio-temporal variation in the abundance and structure of aerobic methane-oxidizing bacteria in the littoral wetland, Yunnan-Guizhou Plateau lake

XIA Pinhua, LIN Tao\*

Guizhou Key Laboratory for Mountainous Environmental Information and Ecological Protection, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

**Abstract:** Methane (CH<sub>4</sub>) is the second largest greenhouse gas in the atmosphere after CO<sub>2</sub>, contributing 30%—40% of the global greenhouse effect. CH<sub>4</sub> in the atmosphere mainly comes from human activities and natural ecosystem release. In lake ecosystems, a major proportion of CH<sub>4</sub> emissions originates from the littoral wetland, which has a great deal of spatial variability in hydrology, sediment quality and vegetation. Methanotrophs play a crucial role in mitigating CH<sub>4</sub> emissions from lake systems to the atmosphere. However, the distribution of the aerobic methane-oxidizing bacteria (MOB) community in the littoral wetland and their driving factors are less understood. In this article, we investigated the MOB communities in habitats ranging from an open water area (permanently flooded) to an occasionally flooded area in the littoral wetland of Caohai in Guizhou in four different seasons. The MOB communities were characterized by quantitative PCR, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), and sequencing of *pomA* genes encoding the  $\alpha$  subunit of the particulate methane monooxygenase. The abundance and structure of the sediment methanotrophic community showed a remarkable spatial variation. The littoral sediment methanotrophic communities were composed of *Methylococcus* and *Methylobacter* (type I methanotrophs) and *Methylosinus* (type II methanotrophs). Type I methanotrophs were most abundant

**基金项目:** 国家自然科学基金(41867056); 国家自然科学基金委员会-贵州省人民政府喀斯特科学研究中心项目(U1812401); 贵州省科技计划项目“黔科合平台人才[2018年]5069-24); 十二五国家科技支撑计划项目(2011BAC02B02)

收稿日期: 2020-03-16; 网络出版日期: 2021-04-21

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lintao1113@163.com

in the permanently flooded area whereas type II methanotrophs were most abundant in the dry-wet transition zone and the occasionally flooded area. An explanation for this distribution pattern is that type I MOB usually have a lower affinity for  $\text{CH}_4$  than type II MOB, therefore, type I MOB have a strong competitive advantage in places with high  $\text{CH}_4$  levels. In addition, type II MOB are considered to be *K*-strategists and have a better ability to endure drought than type I MOB. This suggests that different types of methanotrophs may participate in  $\text{CH}_4$  oxidation under different water levels in the littoral wetland. Our study gives an in-depth insight into the spatio-temporal heterogeneity of MOB community composition in the littoral wetland of Yunnan-Guizhou Plateau lake. The hydrological conditions are important factors determining the spatio-temporal heterogeneity of MOB communities in littoral wetlands that directly, or indirectly affect the spatio-temporal distribution of MOB communities through regulating physicochemical conditions and plant communities in sediments. However, further studies are still needed to understand the role of type I and type II MOB in  $\text{CH}_4$  oxidation in the littoral wetland community and to clarify the effect of sediment pH and plant community on the littoral wetland MOB community distribution regulation mechanisms.

**Key Words:** methanotrophs; *pmoA* gene; methane oxidization; littoral wetland

甲烷( $\text{CH}_4$ )是大气中仅次于  $\text{CO}_2$  的第二大温室气体,对全球温室效应的贡献率达 30%—40%<sup>[1]</sup>。 $\text{CH}_4$  在大气中的浓度已经从工业化以前的体数分数为  $7.15 \times 10^{-6}$  增长到现在的体数分数为  $1.77 \times 10^{-5}$ 。大气中增加的  $\text{CH}_4$  主要来自人类的生产活动和自然生态系统释放<sup>[2]</sup>。湖泊生态系统是大气  $\text{CH}_4$  的重要源,贡献了自然排放总量的 16%<sup>[3]</sup>。通常情况下,厌氧土层产甲烷菌产生的  $\text{CH}_4$  约 30%—90% 在释放到大气之前被甲烷氧化菌(Methanotrophs)消耗掉<sup>[4-5]</sup>,甲烷氧化菌以  $\text{CH}_4$  作为唯一碳源和能源,在环境中起着  $\text{CH}_4$  生物过滤器的作用<sup>[6-7]</sup>。

环境中存在两类截然不同的甲烷氧化菌,好氧甲烷氧化细菌(methane-oxidizing bacteria, MOB)和厌氧 MOB。其中,好氧 MOB 是甲基营养细菌(Methylotrophic bacteria)的一个分支<sup>[8]</sup>,它们属于变形菌门、疣微菌门和 NC10 门<sup>[9]</sup>。好氧 MOB 的生理和多样性已经得到了很好研究<sup>[10]</sup>。目前自然湿地中仅发现变形菌门的分布,可分为 I 型和 II 型<sup>[11]</sup>,其中 I 型属于  $\gamma$ -变形菌纲的甲基球菌科,现已发现了 15 个属,II 型属于  $\alpha$ -变形菌纲,包括 Methylocystaceae 和 Beijerinckiaceae 两个科,前者有 *Methylocystis* 和 *Methylosinus* 属,后者有 *Methylocapsa*、*Methylocella* 和 *Methyloferula* 属<sup>[12]</sup>。通常以甲烷氧化单加氧酶功能基因(*pmoA*)为生物标志物,结合 RFLP、测序等技术,对湖泊、沼泽等各种环境中好氧 MOB 群落组成进行了大量卓有成效的研究<sup>[13-15]</sup>。

湖滨湿地是湖泊生态系统重要组成部分,是湖泊  $\text{CH}_4$  排放的热区<sup>[16-17]</sup>。湖滨湿地急剧变化的水文、植被和土壤理化<sup>[18,19]</sup>对好氧 MOB 群落数量和组成、结构势必会产生深刻的影响,进而影响  $\text{CH}_4$  的产生、氧化、传输和排放,致使湖滨湿地  $\text{CH}_4$  排放呈现高度的时空异质性。然而,对高原湖泊湖滨带的关注较少,以往的研究大多集中在开放水域<sup>[20-22]</sup>。湖滨湿地沉积物好氧 MOB 群落与环境因素之间的联系仍然不清楚,云贵高原湖滨湿地好氧 MOB 群落组成及分布鲜见报道。

云贵高原湖泊资源丰富,是我国三大高原湿地之一。虽然云贵高原湖泊沉积物中好氧 MOB 的分布最近几年已有少量报道<sup>[13,22]</sup>,但尚不清楚湖滨湿地沉积物的好氧 MOB 群落如何随季节和环境变化而变化。该研究的主要目的是揭示湖滨带好氧 MOB 群落时空动态及其与环境的关系。本文以云贵高原湖泊湿地的典型代表——草海为研究对象,以 *pmoA* 为标记物,运用 q-PCR、T-RFLP、和基因文库构建等方法对贵州草海湖滨带好氧 MOB 数量和群落结构进行了研究,分析了驱动好氧 MOB 群落时空动态的关键因子,研究结果丰富了人们对高原湖滨湿地好氧 MOB 群落生态学的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 样点描述与采样

贵州草海国家级自然保护区位于贵州省威宁彝族回族苗族自治县县城西南侧,地处云贵高原乌蒙山区腹

地<sup>[23]</sup>。其地理坐标介于 26°47'35"—26°52'10"N 和 104°9'23"—104°20'10"E 之间。海拔 2171.7 m, 属亚热带高原季风气候, 冬暖夏凉、冬干夏湿的气候特征, 年均气温 10.6 °C, 年均降水量 950.9 mm, 相对湿度 79%。最深处为 5 m。物种丰富, 水生维管束植物 68 种, 共记录鸟类 246 种<sup>[24]</sup>。

根据草海湖滨湿地水文和植被分布格局, 从湖滨宽敞水域至湖岸设置了四个采样梯度, 即长期淹水宽敞水域区沉水植被眼子菜(P)湿地(104°15.255'E, 26°50.899'N)、长期淹水浅水区挺水植被水葱(E)湿地(104°15.910'E, 26°50.697'N)、干湿过渡区蘆草(T)湿地(104°16.504'E, 26°50.610'N)和偶尔积水区灯芯草(V)湿地(104°16.805'E, 26°50.451'N), 分别在 2 月、5 月、7 月和 11 月进行采样, 设置 3—4 个重复, 分 0—10 cm、10—20 cm 和 20—30 cm 三层, 记录水深、温度、植被高度等; 土壤低温保存带回实验室后, 一部分风干测定理化指标, 土壤理化指标参照《土壤农业化学分析方法》测定。另一部分置于-80°C 冰箱用于好氧 MOB 分子分析。

### 1.2 DNA 提取与 *pmoA* 基因扩增及纯化

采用土壤 DNA 提取试剂盒(Bio 101 Inc., Calif., USA), 取 0.5 g 土壤鲜样, 按照说明书步骤进行操作。DNA 含量用 NanoDrop® ND-1000 核酸定量仪(Nanodrop technologies)测定, 在-80 °C 贮存。采用好氧 MOB 的特异性引物 A189f (5'-GGN GAC TGG GAC TTC TGG-3') 和 mb661r (5'-CCG GMG CAA CGT CYT TACC-3')<sup>[16]</sup>。PCR 扩增程序如下: 94 °C 预变性 5 min; 接着 35 个扩增循环: 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min; 最后 72 °C 延伸 5 min。扩增的 PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒 Agarose Gel DNA Purification kit (Promega, USA), 按说明书进行 *pmoA* 基因的回收纯化。

### 1.3 实时荧光定量

*pmoA* 基因定量分析引物同上, 反应体系为 10 μL, 包括 1 μL DNA 模板、5 μL SYBR Premix Ex Taq™, 上、下游引物各 0.1 μL (20 μmol/L) 和 3.8 μL 的灭菌双蒸水, 扩增条件同上。标准曲线相关系数  $R^2$  为 0.999, 满足绝对定量要求。

### 1.4 *pmoA* 基因克隆文库构建及 RFLP 分析

纯化后的 *pmoA* 基因片段按说明书的方法与 pMD 18-Tvector (Takara, Japan) 连接。16 °C 过夜连接后, 转化入 E.coli DHS 感受态细胞。转化产物涂布到含有氨苄青霉素 (Ampicillin)/IPTG/X-Gal 的 LB 固体培养基上, 37 °C 下培养 24 h, 通过蓝白斑筛选方法筛选重组子。挑取白色阳性转化子构建克隆文库, 克隆文库用 LB (Amp+) 平板 4 °C 保藏, 测序由北京六合华大基因公司进行, 测序引物为载体通用引物 T7。

为检查整个克隆文库的有效性, 在所构建的各个克隆文库中随机挑取 100 个白色克隆子进行菌落 PCR 验证。按照厂家说明书的方法对阳性克隆的 PCR 产物进行 MspI (Takara, Japan) 酶切。酶切消化产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段。用 ABI3730 遗传分析仪中进行毛细管电泳; 取荧光强度 50RFU 为基线, 用 Genemapper 软件 (Version 3.7 Applied Biosystems Incorporated, USA) 计算大于基线的峰高和出峰处的 T-RF (末端标记限制性片段) 长度。将 T-RF 介于 50 bp 和 550 bp 之间的峰面积进行标准化处理, 计算相对应的丰度。

### 1.5 基因的序列分析和系统发育树的构建

将克隆对应的每一个 *pmoA* 基因序列与 GenBank 数据库中已知序列进行 BLAST 比较, 鉴定与克隆序列亲缘关系最近的种属。并从数据库中获取相关的 *pmoA* 基因序列, 采用 Clustal X1.83 软件进行多重比对, 用 MEGA 6 软件包中的 Neighbor-Joining 法, 设自展值为 1000 次, 构建系统发育树<sup>[25]</sup>。

### 1.6 数据处理与分析

PCoA、相关性及蒙特卡洛检验用 R (3.5) 进行分析, 制图软件采用 Origin 9.0。

## 2 结果

### 2.1 水文、植被和土壤特征

湖滨湿地是水生和陆生之间过渡带, 具有高度异质的水文情势、土壤理化和植被分布格局。草海湖滨湿

地深水区眼子菜湿地水深 7 月高达 160 cm,浅水区水葱湿地水深在 26—67 cm 之间波动,而干湿过渡区蘆草湿地在 5 月份不淹水,其他季节水深在 5—23 cm 之间,偶尔淹水区灯芯草湿地仅在 7 月丰水期积水(11.7 cm),其它季节地表无积水。土壤温度在 2 月最低(约 7 ℃),7 月最高(约 20 ℃)。土壤 pH 在 6.1—7.4 之间变化,含水量在 490%—53%之间(表 1)。NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量沿着水位降低先增加后降低的趋势,且各采样点最大值均出现在 11 月,DOC 和 Fe<sup>2+</sup> 从宽敞水域至偶尔淹水区逐渐降低。

表 1 环境因子

Table 1 Environmental factors

采样点 Sample site	水深 Water level	含水率 Moisture content/%	温度 Temperature/℃	pH	硝态氮 Nitrate nitrogen/ (mg/kg)	可溶性有机碳 DOC/ (mg/kg)	Fe <sup>2+</sup>
P(104°15.255'E;26°50.899'N)	120—162	490	19.98	6.4	50.06	801.15	2163.11
V(104°15.910'E;26°50.697'N)	30—47	179	13.93	6.1	97.06	253.18	945.07
T(104°16.504'E;26°50.610'N)	ns—23	68	13.89	7.4	93.54	50.12	223.80
E(104°16.805'E;26°50.451'N)	ns—12	53	14.25	7.3	76.18	46.51	23.26

ns 表示无积水; P: 眼子菜湿地 Potamogeton; V: 灯芯草湿地 Validus; T: 蘆草湿地 Triquetet; E: 水葱湿地 Effusus

2.2 pmoA 功能基因数量的时空分布

草海湖滨湿地好氧 MOB pmoA 功能基因数量丰富,在 1.78×10<sup>7</sup>—2.73×10<sup>8</sup> 拷贝数/g 干沉积物之间(图 1),具有明显的时空异质性。宽敞水域深水区 and 干湿交替区高,而浅水区和偶尔积水区低;在 0—30 cm 垂直剖面上,干湿交替区具有明显的从表层至底层逐渐减低外,其它无明显变化规律和趋势。季节变化明显,大小依次为 7 月>5 月>11 月>2 月。pmoA 功能基因数量与温度极显著正相关(P<0.01),与其它因子如水深、NO<sub>3</sub>-N 等相关性不显著(P>0.05)。

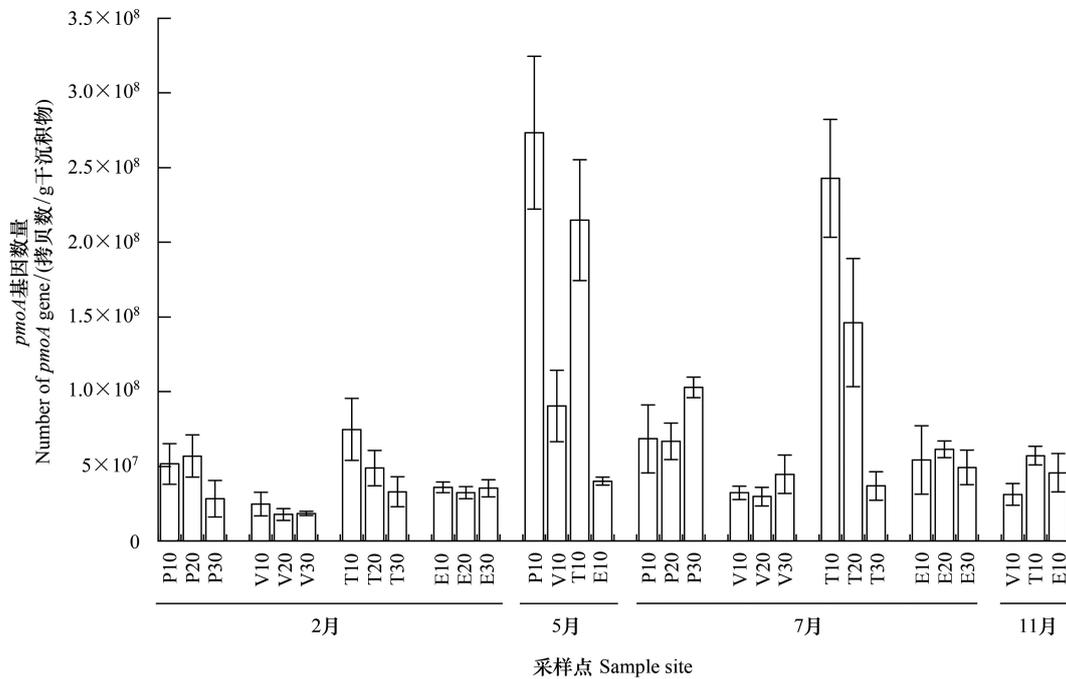


图 1 pmoA 基因时空分布特征  
Fig.1 Spatio-temporal distribution of pmoA gene abundance

P: 眼子菜湿地 Potamogeton; V: 灯芯草湿地 Validus; T: 蘆草湿地 Triquetet; E: 水葱湿地 Effusus

### 2.3 酶切片段 T-RFs 的分布及甲烷氧化细菌鉴定

采用 T-RFLP 方法,对 4 种水位梯度下好氧 MOB 群落进行分析,共检测到 10 个 T-RFs(图 2)。在 10 个 T-RFs 中以 75 bp、241 bp、243 bp 和 348 bp 为主,其中 75 bp 的 T-RFs 主要分布在宽敞水域眼子菜湿地和浅水区水葱湿地,随着水位的降低而减少( $P < 0.01$ ),与之相反,241 bp 和 348 bp 的 T-RFs 主要分布在干湿交替区蘆草湿地和偶尔集水区灯芯草湿地,随着水位的降低而升高;243 bp 的 T-RFs 在不同水位梯度都有分布,且比较均匀;不过一些 T-RFs 对水文条件具有强烈的选择性,如 59 bp、140 bp 和 188 bp 的 T-RFs 只分布在宽敞水域眼子菜和浅水区水葱湿地,而 234 bp 的 T-RFs 只分布在干湿交替区蘆草湿地和偶尔集水区灯芯草湿地。这表明草海湖滨湿地好氧 MOB 群落组成具有空间异质性。

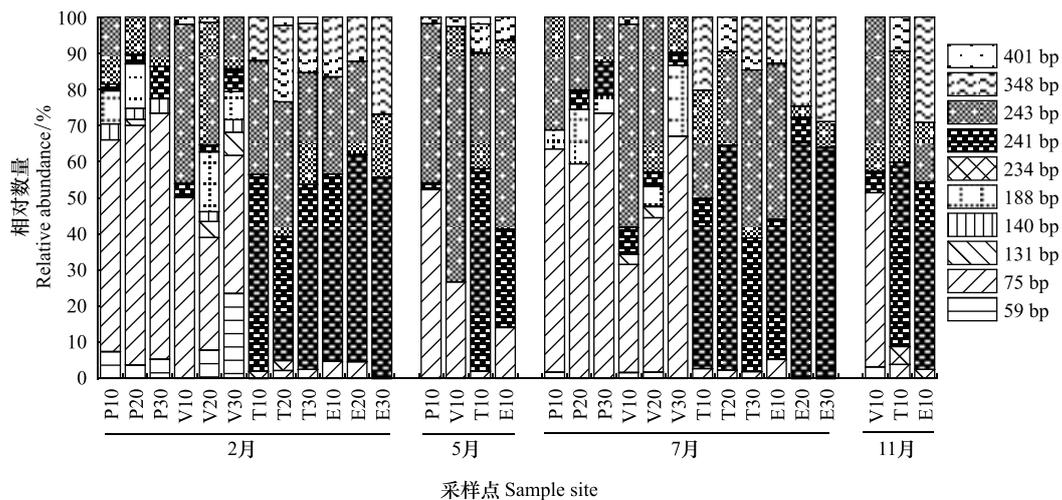


图 2 *pmoA* T-RFs 相对数量

Fig.2 Relative abundanc of *pmoA* T-RFs

选择具有不同 T-RF 片段的沉积物样品构建克隆文库,进行测序分析,构建系统发育树。该序列在系统发育上与 I 型和 II 型相关(图 3)。I 型好氧 MOB 属于  $\gamma$ -变形菌纲的 Methylococcaceae 科,II 属于  $\alpha$ -变形菌纲的 Methylocystaceae。75 bp 的 T-RF 片段代表 Methylococcaceae (*Methylococcus*, *Methylocaldum*)。241 bp 的 T-RF 片段代表 Methylocystaceae (*Methylocystis* and *Methylosinus*),2413 bp 的 T-RF 片段代表 Methylocystaceae (*Methylosinus*)。

### 2.4 好氧 MOB 群落时空动态

好氧 MOB 的主坐标分析结果见图 4。草海湖滨湿地 4 个水位梯度的 31 个样品可以聚为 4 类,表明不同水位梯度下好氧 MOB 群落组成不同。基本上是深水区样品聚为一组,而浅水区组成另一组,干湿交替区和偶尔积水区的样品也各自成簇,但也存在一些交叉,如深水区的 MP10 与浅水区的聚在一组,干湿交替区 JT20 与落干区的聚为一组,呈现出明显的过渡性分布特征。此外,我们还发现在季节上却不能很好地进行分组,好氧 MOB 群落组成的分布不随季节变化而改变。表明草海湖滨湿地好氧 MOB 具有显著的空间变化。好氧 MOB 群落与环境因子的相关性分析和蒙特卡洛检验见图 5。pH 是最主要的环境因子,其次是含水量(SWC)和溶解性有机碳(DOC),水深的影响也很显著,但温度、硝态氮和二价铁的影响不显著。

## 3 讨论

高原湖泊湿地是我国湿地重要组成,主要分布在青藏高原、云贵高原和蒙新高原等高原区,是我国甲烷排放的重要源<sup>[26]</sup>。湖滨湿地是湖泊生态系统的重要组成部分,是湖泊甲烷排放的热区<sup>[16]</sup>。以往研究表明高原湖滨湿地甲烷排放具有高度的时空异质性,但关于高原湖滨湿地好氧 MOB 群落组成及其时空动态缺乏了解。

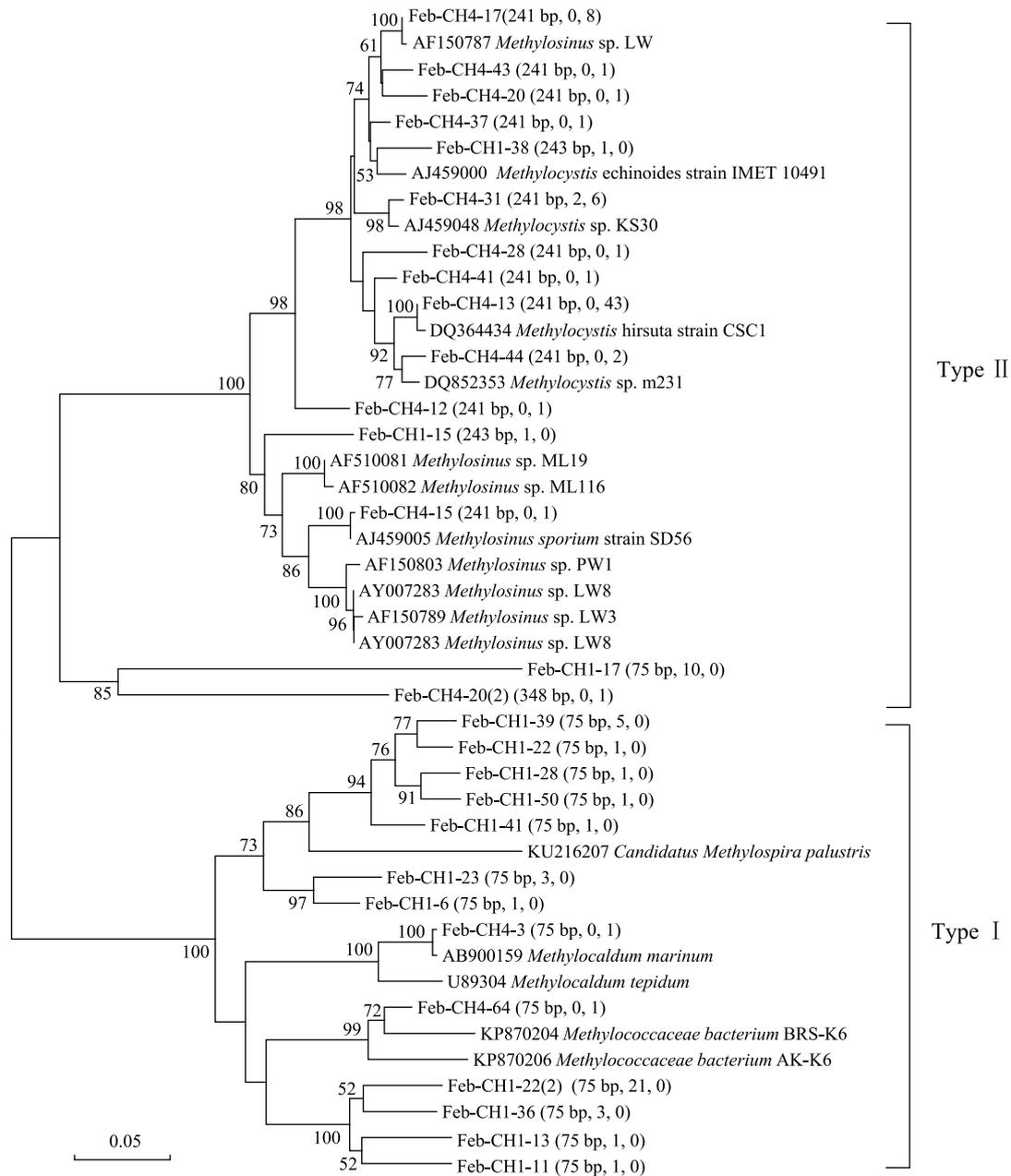


图 3 *pmoA* 基因序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of *pmoA* gene sequences

本文采用实时荧光定量 PCR 和克隆测序,以云贵高原典型湖滨湿地草海为代表,研究了 4 种不同水文条件下沉积物中好氧 MOB 丰度和群落组成时空动态。研究结果对了解湖滨湿地甲烷温室气体排放的微生物作用机制具有重要意义。

### 3.1 好氧 MOB 数量与群落组成的时空动态

沉积物中好氧 MOB 数量的研究已有许多报道,但目前对不同区域不同类型湿地沉积物中的数量分布格局了解不够。本研究中草海湖滨湿地 *pmoA* 功能基因数量在  $1.78 \times 10^7$ — $2.73 \times 10^8$  拷贝数/g 干沉积物之间,与我国青藏高原若尔盖湿地 ( $10^7$ — $10^8$  拷贝数/g 干沉积物) [27,28] 以及云贵高原的其它湿地如拉市海、海西湖、长桥湖、天池等近 10 个湖泊湿地 [22] 相似;但略低于我国三江平原湿地 ( $10^8$ — $10^9$  拷贝数/g 干沉积物) [29],以及云贵高原部分浅水和富营养化的湖泊,如剑湖湿地  $1.67 \times 10^{10}$  和普者黑湿地  $3.05 \times 10^9$  [22];高于北方湖泊 (boreal

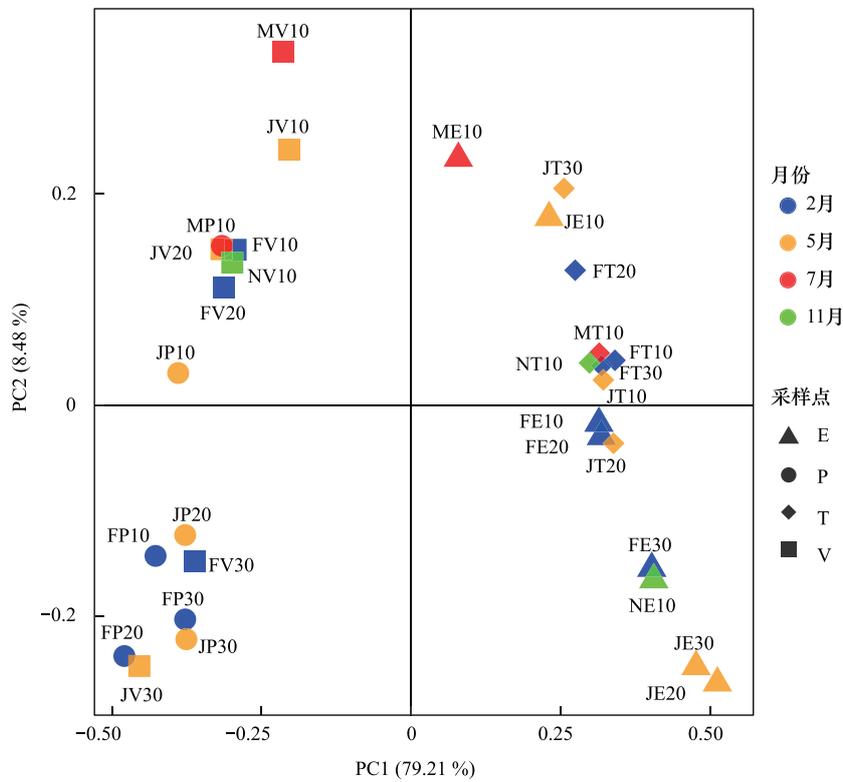


图4 好氧 MOB 群落的主坐标分析 (PCoA)

Fig.4 Principal coordinate analysis (PCoA) for MOB

F:2月;M:5月;J:7月;N:11月

lake) 岸边带湿地  $10^{5[20]}$  和滇池沉积物  $10^4-10^7$  拷贝数/g 干沉积物<sup>[15]</sup> 和日本琵琶湖沉积物中 MOP 数量 ( $8.8 \times 10^6-5.8 \times 10^7$ )<sup>[30]</sup>。高原湖泊较高的好氧 MOB 数量与其相当高的甲烷量有关<sup>[13]</sup>, 因为好氧 MOB 的生长依靠甲烷提供碳源和能源。

草海湖滨湿地沉积物中好氧 MOB 数量具有明显的时空异质性。这与以往的一些研究一致, 滇池沉积物中好氧 MOB 数量在 ( $8.71 \times 10^4-2.07 \times 10^7$ ) 之间变化<sup>[13]</sup>; 然而, Rahalkar<sup>[14]</sup> 对 Constance 湖的研究表明, 沉积物中好氧 MOB 数量在空间上没有差异 ( $2.07 \times 10^7-4 \times 10^7$ )。本研究中从宽敞水域至偶尔积水区沿着水位的降低好氧 MOB 数量先降低后增加再降低的波浪式分布, 其在浅水区最低, 干湿交替区最高。干湿交替区由于干湿交替营造了好氧缺氧环境, 为好氧 MOB 生提供适宜生长条件。季节上呈现出春夏季节高于秋冬季节的趋势, 这可能是由于春夏季节较高的温度更适宜于好氧 MOB 生长的缘故。湖滨湿地沉积物中好氧 MOB 数量变化可能是其甲烷通量高度时空异质性的一个重要成因。

湖泊沉积物中好氧 MOB 群落具有明显的时空异质

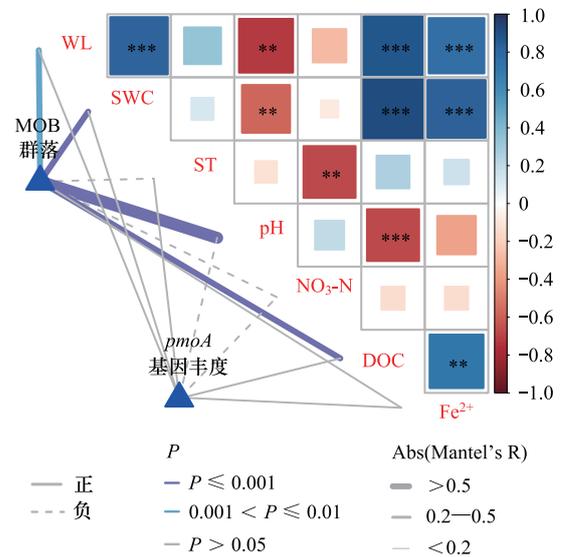


图5 好氧 MOB 群落与环境因子的相关性及其蒙特卡洛检验

Fig.5 Correlations between MOB community and environmental factors and montel test

WL: 水深; SWC: 土壤含水量; ST: 土壤温度; DOC: 可溶性有机碳

性<sup>[20,21,32]</sup>。本研究也证实了这一点,草海湖滨湿地沿着水位梯度的变化好氧 MOB 群落组成和结构显著不同,从宽敞水域至偶尔积水区甲烷菌由 type I 好氧 MOB 向 type II 好氧 MOB 演替。宽敞水域深水区和浅水区沉积物中 type I 和 type II 好氧 MOB 都有分布,其中宽敞水域深水区中 type I 型 methanotrophs (*Methylococcus*, *Methylocaldum*) 主导,而浅水区沉积物中 type I 和 type II 好氧 MOB 数量相当。这与以往的研究结果一致,长期积水湿地环境中, I 型好氧 MOB 通常超过 II 型好氧 MOB<sup>[13,20]</sup>。Constance 湖沉积物中 I 型好氧 MOB 是 II 型的 4 倍<sup>[14]</sup>。与 II 型好氧 MOB 相比, I 型好氧 MOB 通常对 CH<sub>4</sub> 的亲合力较低<sup>[28]</sup>,且在 CH<sub>4</sub> 较高的地方具有较强的竞争优势<sup>[13]</sup>。宽敞水域深水区沉积物中有机质、氮等营养物质丰富,且其厌氧环境有利于 CH<sub>4</sub> 的产生,这为低甲烷亲和力的 I 型好氧 MOB 提供了物质保障。因此,淹水和富营养环境的沉积物中,就形成 I 型好氧 MOB 为优势的分布格局。

干湿交替区蘆草湿地和偶尔集水区灯芯草湿地好氧 MOB 群落由 II 好氧 MOB (*Methylocystis*, *Methylosinus* and *Methylosinus*) 主导。在干旱环境中 Type II 好氧 MOB 能很好生长并常常占据主导地位<sup>[28]</sup>。可以从以下两个方面解释较干环境利于 II 型好氧 MOB。首先, II 型好氧 MOB 对 CH<sub>4</sub> 的亲合力比 I 型好氧 MOB 高<sup>[31]</sup>。另一个原因是 II 型好氧 MOB 是 K 生活对策<sup>[33]</sup>, 忍耐干旱环境能力比 I 型好氧 MOB 强。II 型好氧 MOB, 例如甲基胞囊菌属, 可以形成抗旱的囊胞<sup>[34]</sup>, 可以在不利的条件下长期生存<sup>[38]</sup>。因此, II 型好氧 MOB 在湖滨湿地相对干旱的区域就形成了优势。

湖滨湿地不同水位梯度下好氧 MOB 群落组成明显不同,暗示湖滨湿地不同水位梯度下 CH<sub>4</sub> 的氧化可能由不同类型的好氧 MOB 主导。He 等人<sup>[36]</sup>采用同位素探针技术,证明了湖泊沉积物中甲烷的氧化主要由 I 型好氧 MOB 驱动。据此推测,好氧 MOB 群落空间分布差异可能是导致湖滨湿地较高的甲烷排放及其高度的时空异质性一个重要原因。

### 3.2 好氧 MOB 群落时空变化的影响因素

湖滨湿地具有各种不同水文条件,沉积物质量,植物群落,CH<sub>4</sub> 氧化率和好氧 MOB 群落。然而,主导湖滨湿地好氧 MOB 群落分布的因素仍不清楚。本研究发现草海湖滨湿地从宽敞水域至湖岸随着水位降低 type I 群落向 type II 演替,这与湖滨湿地高度异质环境条件密切相关。

水文条件是驱动湖滨湿地好氧 MOB 群落空间分布的根本动力。水深梯度一方面可以直接影响好氧 MOB 群落分布。水深梯度控制了氧和 CH<sub>4</sub> 的可利用性,进而影响好氧 MOB 群落组成及活性空间分布<sup>[20]</sup>。长期积水的样点有利于 CH<sub>4</sub> 的产生,从而增加了底物的利用率并维持好氧 MOB 活性。因此,长期积水的样点形成较高的 CH<sub>4</sub> 氧化速率,较高的 I 型好氧 MOB 物种多样性和丰富度。此外,水深梯度还可以改变沉积物的理化,进而间接的影响着好氧 MOB 群落。土壤理化特性如 pH 值等对土壤好氧 MOB 群落分布具有重要的调控作用。本研究从宽敞水域至湖岸随着水位降低沉积物 pH 值逐渐增大。有证据表明,高 pH 值有利于一般细菌物种的丰富性和 CH<sub>4</sub> 的氧化潜力<sup>[37]</sup>。本研究中沉积物 pH 在长期积水的样点最低,可能对好氧 MOB 群落分布产生了影响。沉积物中的氮对好氧 MOB 群落也有重要影响。水深梯度还可通过调控植物群落的分布来影响着好氧 MOB 群落的分布。地上植被对地下微生物多样性具有重要影响。淹水湿地植物通过向根际传输氧而对好氧 MOB 群落产生特殊影响。草海湖滨湿地植被分布受到水位严格控制,从宽敞水域至偶尔积水区,植被从沉水-挺水-湿生-中生演替,呈明显的带状性,植被的这种变化在草海湖滨湿地好氧 MOB 群落时空分布动态中可能起到了重要的调控作用。

## 4 结论

本研究发现云贵高原草海湖滨湿地好氧 MOB 群落在数量和组成上表现出巨大的时空变化。草海湿地好氧 MOB 属于变形菌门(Proteobacteria), I 型和 II 型都有分布,沿着水位降低 I 型好氧 MOB 数量逐渐降低,而 II 型好氧 MOB 数量逐渐增加,不同水位梯度下主导甲烷氧化的菌群可能不同。水文条件是决定湖滨湿地好氧 MOB 群落时空异质性重要因素,其直接或通过调控沉积物中理化和植物群落来影响好氧 MOB 群落的时空

分布。下一步还需深入研究湖滨湿地中 I 型和 II 型好氧 MOB 群落在甲烷氧化中的作用,并明确沉积物 pH 及植物群落对草海湖滨湿地好氧 MOB 群落分布的调控机制。

参考文献(References):

- [ 1 ] Wik M, Varner R K, Anthony K W, MacIntyre S, Bastviken D. Climate-sensitive northern lakes and ponds are critical components of methane release. *Nature Geoscience*, 2016, 9(2): 99-105.
- [ 2 ] Blake D R, Rowland F S. Continuing worldwide increase in tropospheric methane, 1978 to 1987. *Science*, 1988, 239(4844): 1129-1131.
- [ 3 ] Bastviken D, Cole J, Pace M, Tranvik L. Methane emissions from lakes: dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global Biogeochemical Cycles*, 2004, 18(4): GB4009.
- [ 4 ] Kludze H K, Delaune R D. Straw Application effects on methane and oxygen exchange and growth in rice. *Soil Science Society of America Journal*, 1995, 59(3): 824-830.
- [ 5 ] Hornibrook E R C, Bowes H L, Culbert A, Gallego-Sala A V. Methanotrophy potential versus methane supply by pore water diffusion in peatlands. *Biogeosciences*, 2009, 6(8): 1491-1504.
- [ 6 ] Le Mer J, Roger P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review. *European Journal of Soil Biology*, 2001, 37(1): 25-50.
- [ 7 ] Yun J L, Zhang H X, Deng Y C, Wang Y F. Aerobic methanotroph diversity in Sanjiang Wetland, Northeast China. *Microbial Ecology*, 2015, 69(3): 567-576.
- [ 8 ] Costello A M, Lidstrom M E. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(11): 5066-5074.
- [ 9 ] 邓永翠, 车荣晓, 吴伊波, 王艳芬, 崔骁勇. 好氧甲烷氧化菌生理生态特征及其在自然湿地中的群落多样性研究进展. *生态学报*, 2015, 35(14): 4579-4591.
- [ 10 ] Lüke C, Frenzel P. Potential of *pmoA* amplicon pyrosequencing for methanotroph diversity studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(17): 6305-6309.
- [ 11 ] Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60(2): 439-471.
- [ 12 ] Semrau J D, DiSpirito A A, Yoon S. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(4): 496-531.
- [ 13 ] Yang Y Y, Zhao Q, Cui Y H, Wang Y L, Xie S G, Liu Y. Spatio-temporal variation of sediment methanotrophic microorganisms in a large eutrophic lake. *Microbial Ecology*, 2016, 71(1): 9-17.
- [ 14 ] Rahalkar M, Deutzmann J, Schink B, Bussmann I. Abundance and activity of methanotrophic bacteria in littoral and profundal sediments of lake Constance (Germany). *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(1): 119-126.
- [ 15 ] Graef C, Hestnes A G, Svenning M M, Frenzel P. The active methanotrophic community in a wetland from the High Arctic. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(4): 466-472.
- [ 16 ] Juutinen S, Alm J, Larmola T, Huttunen J T, Morero M, Saarnio S, Martikainen P J, Silvola J. Methane (CH<sub>4</sub>) release from littoral wetlands of Boreal lakes during an extended flooding period. *Global Change Biology*, 2003, 9(3): 413-424.
- [ 17 ] Chen H, Wu N, Yao S P, Gao Y H, Zhu D, Wang Y F, Xiong W, Yuan X Z. High methane emissions from a littoral zone on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Atmospheric Environment*, 2009, 43(32): 4995-5000.
- [ 18 ] Hirota M, Tang Y H, Hu Q W, Hirata S, Kato T, Mo W H, Cao G M, Mariko S. Methane emissions from different vegetation zones in a Qinghai-Tibetan Plateau wetland. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(5): 737-748.
- [ 19 ] Wang H J, Lu J W, Wang W D, Yang L Y, Yin C Q. Methane fluxes from the littoral zone of hypereutrophic Taihu Lake, China. *Journal of Geophysical Research*, 2006, 111(D17): D17109.
- [ 20 ] Siljanen H M P, Saari A, Krause S, Lensu A, Abell G C J, Bodrossy L, Bodelier P L E, Martikainen P J. Hydrology is reflected in the functioning and community composition of methanotrophs in the littoral wetland of a boreal lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 75(3): 430-445.
- [ 21 ] Siljanen H M P, Saari A, Bodrossy L, Martikainen P J. Seasonal variation in the function and diversity of methanotrophs in the littoral wetland of a boreal eutrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 80(3): 548-555.
- [ 22 ] Liu Y, Zhang J X, Zhao L, Li Y Z, Yang Y Y, Xie S G. Aerobic and nitrite-dependent methane-oxidizing microorganisms in sediments of freshwater lakes on the Yunnan Plateau. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(5): 2371-2381.
- [ 23 ] Xia P H, Yan D B, Sun R G, Song X, Lin T, Yi Y. Community composition and correlations between bacteria and algae within epiphytic biofilms on submerged macrophytes in a Plateau Lake, Southwest China. *Science of the Total Environment*, 2020, 727: 138398.

- [24] Xia P H, Ma L, Sun R G, Yang Y, Tang X C, Yan D B, Lin T, Zhang Y T, Yi Y. Evaluation of potential ecological risk, possible sources and controlling factors of heavy metals in surface sediment of Caohai Wetland, China. *Science of the Total Environment*, 2020, 740: 140231.
- [25] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [26] Yang H, Xie P, Ni L Y, Flower R J. Underestimation of CH<sub>4</sub> emission from freshwater Lakes in China. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(10): 4203-4204.
- [27] Yun J L, Ma A Z, Li Y M, Zhuang G Q, Wang Y F, Zhang H X. Diversity of methanotrophs in Zoige wetland soils under both anaerobic and aerobic conditions. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22(8): 1232-1238.
- [28] Deng Y C, Cui X Y, Lüke C, Dumont M G. Aerobic methanotroph diversity in Riganqiao peatlands on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5(4): 566-574.
- [29] Yun J L, Zhuang G P, Ma A Z, Guo H G, Wang Y F, Zhang H X. Community structure, abundance, and activity of methanotrophs in the Zoige wetland of the Tibetan plateau. *Microbial Ecology*, 2012, 63(4): 835-843.
- [30] Tsutsumi M, Kojima H, Fukui M. Vertical profiles of abundance and potential activity of methane-oxidizing bacteria in sediment of lake Biwa, Japan. *Microbes and Environments*, 2012, 27(1): 67-71.
- [31] Siljanen H M P, Saari A, Bodrossy L, Martikainen P J. Effects of nitrogen load on the function and diversity of methanotrophs in the littoral wetland of a Boreal Lake. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 39.
- [32] Deutzmann J S, Wörner S, Schink B. Activity and diversity of methanotrophic bacteria at methane seeps in Eastern Lake Constance sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(8): 2573-2581.
- [33] Steenbergh A K, Meima M M, Kamst M, Bodelier P L E. Biphasic kinetics of a methanotrophic community is a combination of growth and increased activity per cell. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 71(1): 12-22.
- [34] Whittenbury R, Davies S L, Davey J F. Exospores and cysts formed by methane-utilizing bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1970, 61(2): 219-226.
- [35] Rothfuss F, Bender M, Conrad R. Survival and activity of bacteria in a deep, aged lake sediment (Lake Constance). *Microbial Ecology*, 1997, 33(1): 69-77.
- [36] He R, Wooller M J, Pohlman J W, Catranis C, Quensen J, Tiedje J M, Leigh M B. Identification of functionally active aerobic methanotrophs in sediments from an arctic lake using stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(6): 1403-1419.
- [37] Lin X W, Wang S P, Ma X Z, Xu G P, Luo C Y, Li Y N, Jiang G M, Xie Z B. Fluxes of CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, and N<sub>2</sub>O in an alpine meadow affected by yak excreta on the Qinghai-Tibetan plateau during summer grazing periods. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(4): 718-725.