

DOI: 10.5846/stxb202101160171

沈李东, 金靖昊, 刘心. 内陆湿地与水体甲烷厌氧氧化功能微生物研究进展. 生态学报, 2022, 42(9): 3842-3855.

Shen L D, Jin J H, Liu X. Research progress on anaerobic methanotrophs in inland wetlands and freshwater aquatic systems. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(9): 3842-3855.

内陆湿地与水体甲烷厌氧氧化功能微生物研究进展

沈李东*, 金靖昊, 刘心

南京信息工程大学生态系, 南京 210044

摘要: 内陆湿地与水体(如湖泊、河流、水库等)是温室气体甲烷的重要排放源。微生物介导的甲烷厌氧氧化(anaerobic oxidation of methane, AOM)反应在控制内陆湿地与水体甲烷排放中起着不可忽视的作用,对缓解全球温室效应具有重要意义。内陆湿地与水体易形成缺氧环境,且电子受体的种类和数量繁多,是发生 AOM 反应的理想生境。近年来,不断有研究表明,内陆湿地与水体中存在多种电子受体(NO_2^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Fe(III) 等)驱动的 AOM 途径。NC10 门细菌和甲烷厌氧氧化古菌(anaerobic methanotrophic archaea, ANME)的一新分支 ANME-2d 主导了湿地和水体环境中的 AOM 反应,其中 ANME-2d 具有根据环境条件选择不同电子受体的潜力。研究系统综述了内陆湿地与水体中不同电子受体驱动的 AOM 途径及其参与的主要功能微生物类群;分析了 AOM 反应在控制温室气体甲烷排放中的作用及其环境影响因素;总结了相关功能微生物的分子生物学检测方法以及甲烷厌氧氧化活性测定的同位素示踪技术。最后,对未来相关研究方向进行了展望。

关键词: 甲烷;内陆湿地与水体;甲烷厌氧氧化;NC10 门细菌;ANME-2d

Research progress on anaerobic methanotrophs in inland wetlands and freshwater aquatic systems

SHEN Lidong*, JIN Jinghao, LIU Xin

Department of Ecology, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanning 210044, China

Abstract: Methane is an important greenhouse gas, and the global warming potential of methane is about 20–30 folds greater than carbon dioxide on a per-molecule basis. Inland wetlands and freshwater aquatic systems (like lakes, rivers and reservoirs) are important sources of methane emissions. It is estimated that the annual flux of methane from inland wetlands is approximately 100–200 Tg, accounting for 30% of the global annual methane emissions. The annual fluxes of methane from lakes, rivers and reservoirs are estimated to be 8–48, 1.5–26.8 and 8.9–22.2 Tg, respectively. Microbial-mediated anaerobic oxidation of methane (AOM) plays an important role in reducing methane emissions from these ecosystems, which can greatly alleviate global warming. The anoxic conditions can develop easily in inland wetlands, lakes, rivers and reservoirs. In the meantime, these environments contain a great variety of electron acceptors. Such conditions provide an ideal environment for AOM. In recent years, there has been an increasing evidence showing the occurrence of AOM driven by different electron acceptors, including NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} and Fe(III) in inland wetlands and freshwater aquatic systems. The nitrite-dependent AOM is performed by the NC10 phylum bacteria, which can produce oxygen intracellularly from two NO molecules for methane oxidation and respiration. Under anoxic conditions, these bacteria can transcribe and express the entire biochemical pathway of aerobic methane oxidation catalyzed by particulate methane monooxygenase. The nitrate-dependent AOM is catalyzed by a new cluster of anaerobic methanotrophic archaea (ANME)—ANME-2d, which is capable

基金项目: 国家自然科学基金项目(41977037);江苏省自然科学基金项目(BK20190092);江苏省大学生创新创业训练计划项目(202110300110Y)

收稿日期: 2021-01-16; **网络出版日期:** 2022-01-06

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: shenld@nuist.edu.cn

of performing AOM through reverse methanogenesis coupling with the reduction of NO_3^- to NO_2^- . But these archaea cannot reduce the produced NO_2^- further to NO , N_2O or N_2 . The ANME-2d also has the potential to use Fe(III) , Mn(IV) , Cr(VI) and SO_4^{2-} as electron acceptors for methane oxidation. It has been reported that the ANME-2d could oxidize methane solely and transfer electrons directly to metal compound. These archaea may also be involved in metal-dependent AOM together with metal-reducing bacteria. Similarly, the ANME-2d can conduct AOM couple to the conversion of SO_4^{2-} to S^{2-} , in collaboration with sulfate-reducing bacteria. Due to the presence of diverse electron acceptors in inland wetlands and freshwater aquatic systems, they may support a greater variety of AOM pathways. This work systematically reviewed the AOM pathways driven by different electron acceptors and the responsible microorganisms, and analyzed the importance and environmental regulation of these AOM pathways in reducing methane emissions from inland wetlands and freshwater aquatic systems. Further, the methods for molecular detection of anaerobic methanotrophs and the stable isotope technology for determination of the activity of anaerobic methane oxidation were summarized. Finally, some future research directions were suggested.

Key Words: methane; inland wetland and freshwater systems; anaerobic oxidation of methane; NC10 phylum bacteria; ANME-2d

甲烷作为大气中重要的温室气体之一,其浓度仍以每年 1.0%—1.2% 的速度增加,对当前全球气候变暖的贡献率达 20%^[1]。内陆湿地是甲烷的重要排放源之一,其每年向大气中排放的甲烷量高达 100—200 Tg,约占全球年排放总量的三分之一^[2]。全球湖泊甲烷年释放量为 8—48 Tg,为自然源甲烷释放总量的 6%—16%^[3],且湖泊甲烷排放量呈逐年增加趋势^[4]。全球河流甲烷年排放量为 1.5—26.8 Tg,相当于湖泊甲烷年排放总量的 40%^[5-6]。河流甲烷排放对全球变暖较为敏感,在温度增加 2 °C 的情景下,河流甲烷排放量将增加 8%^[7]。水库碳排放日益受到国内外研究者的关注,据估计全球水库甲烷年排放量为 8.9—22.2 Tg,其单位面积甲烷排放量远高于其他水生生态系统^[8]。

如何有效控制湿地,以及湖泊、河流和水库等水体环境的甲烷排放,对缓解全球温室效应具有重要意义。甲烷好氧氧化在减少内陆湿地和水体甲烷排放中发挥着关键作用^[9-11]。与此同时,由于长期或间歇性淹水,淡水沉积物/土壤亦是发生甲烷厌氧氧化(anaerobic oxidation of methane, AOM)反应的合适生境^[12]。水体环境中甲烷的产生与排放过程十分复杂,甲烷在途经沉积物/土壤和水层的过程中可能与各种电子受体(如 NO_2^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Fe(III) 等)的还原耦合,实现甲烷氧化。

早期研究表明,AOM 反应均由广古菌门的甲烷厌氧氧化古菌(anaerobic methanotrophic archaea, ANME)催化完成。但后期研究发现,NC10 门细菌(*Candidatus Methyloirabialis oxyfera*)可催化亚硝酸盐型 AOM 反应,其利用 NO_2^- 为电子受体对甲烷进行氧化,同时将 NO_2^- 还原为 N_2 (图 1)^[13-14]。越来越多的研究证实,亚硝酸盐型 AOM 反应及 NC10 门细菌存在于天然湿地^[15-17]、人工湿地^[18-20]、湖泊^[21-23]、河流^[24-26]、水库^[27-29] 等各种内陆湿地与水体中。此外,Haroon 等^[30]富集培养到了一类可催化硝酸盐型 AOM 反应的微生物,其隶属于 ANME 的一个新分支(ANME-2d),被命名为 *Candidatus Methanoperedens nitroreducens*。此类古菌的系统发育地位与海洋环境中发现的 ANMEs(ANME-1, ANME-2a, 2b, 2c 和 ANME-3)差异较大。ANME-2d 通过逆甲烷生成途径将甲烷氧化成二氧化碳,同时将 NO_3^- 还原为 NO_2^- (不能将 NO_2^- 进一步还原)^[30]。进一步富集培养后发现,ANME-2d 还具有催化 Fe(III) 、 Mn(IV) 等金属还原型及硫酸盐型 AOM 反应的能力^[31-33]。最新研究表明,ANME-2d 很可能介导了湿地,以及湖泊、河流、水库等水生生态系统中硝酸盐型^[25, 29, 34]、金属还原型^[25, 35-36]和硫酸盐型 AOM 反应^[35, 37](图 1)。

本文系统综述了各种内陆湿地与水体环境中不同电子受体(NO_2^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Fe(III) 等)驱动的 AOM 途径及其参与的主要功能微生物类群;分析了 AOM 反应在温室气体甲烷减排中的作用及其环境影响因素;总结了相关功能微生物的分子生物学检测方法及甲烷厌氧氧化活性测定的同位素示踪技术。最后,本文针对当

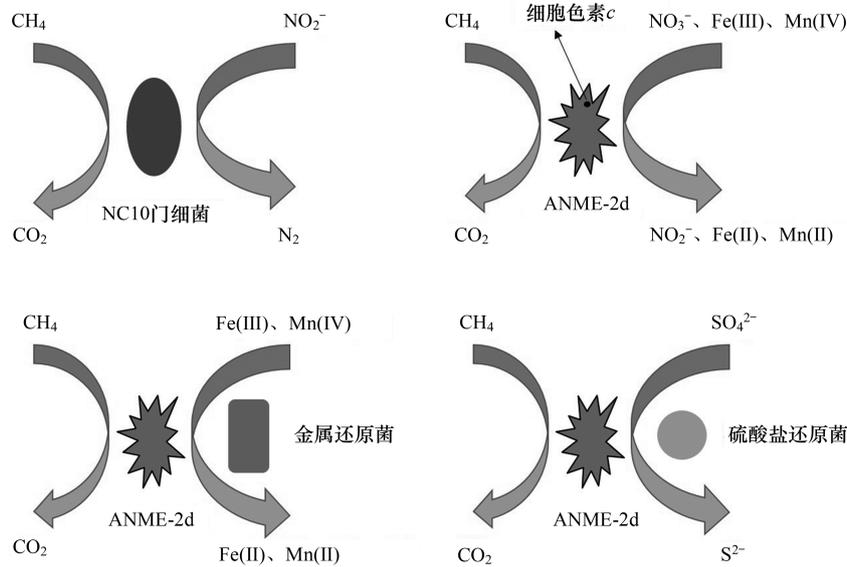


图1 NC10 门细菌主导的亚硝酸盐型 AOM 反应及 ANME-2d 主导的硝酸盐型、金属还原型和硫酸盐型 AOM 反应

Fig.1 NC10 phylum bacteria-mediated nitrite-dependent AOM pathway and ANME-2d-mediated nitrate-, metal- and sulfate-dependent AOM pathways

ANME: 甲烷厌氧氧化古菌 Anaerobic methanotrophic archaea; AOM: 甲烷厌氧氧化 Anaerobic oxidation of methane

前相关研究工作中存在的主要问题进行了讨论,并对未来研究方向进行了展望。

1 NC10 门细菌介导的甲烷厌氧氧化

由于受人类活动(如农田径流、生活污水排放等)的影响,内陆湿地与水体往往受到不同程度的氮素污染,这为亚硝酸盐型 AOM 反应的发生提供了有利条件^[38]。至今,已有大量研究发现,亚硝酸盐型 AOM 反应及其功能微生物 NC10 门细菌存在于内陆湿地,以及湖泊、河流、水库等各种淡水水生生态系统中(表 1)。

内陆湿地作为全球最重要的碳库之一,其甲烷排放通量与微生物控制机制备受关注^[63]。长期以来,甲烷好氧化被认为是控制湿地系统甲烷排放的唯一重要生物途径^[64]。近年来,亚硝酸盐型 AOM 反应作为湿地甲烷汇的贡献受到了国际、国内学术界的广泛关注。Hu 等^[15]利用¹³CH₄稳定性同位素示踪和分子生物学手段,首次报道了淡水湿地系统中存在亚硝酸盐型 AOM 反应及其功能微生物 NC10 门细菌。据估算,由此类 AOM 反应所致的甲烷氧化量为 4.1—6.1 Tg/a,约占全球湿地甲烷年排放通量的 2%—6%^[15]。随后,不断有证据表明,不同天然淡水湿地^[16—17, 34, 39],以及潮汐流湿地^[20]、垂直流湿地^[44—45]、表面流湿地^[46]和城市湿地^[42—43]中均存在亚硝酸盐型 AOM 反应,以及 NC10 门细菌的分布。不同类型湿地中亚硝酸盐型 AOM 的甲烷氧化活性较为接近,NC10 门细菌的绝对丰度多数为 10⁵—10⁷ 拷贝/g(土壤)(表 1)。Zhang 等^[20]研究表明,潮汐流湿地中亚硝酸盐型 AOM 反应对土壤甲烷氧化的贡献率为 9.5%—26.3%,暗示了该类甲烷氧化反应在控制湿地甲烷排放中起了重要作用。最近,亚硝酸盐型 AOM 反应在氮素转化中的作用开始受到关注^[20, 45]。如有研究发现,此类 AOM 反应在湿地土壤氮气产生中的贡献率高达 20.7%—40.1%^[20]。此外,湿地土壤中亚硝酸盐型 AOM 的甲烷氧化活性及 NC10 门细菌的分布存在空间异质性。多数研究表明,深层土壤(20—60 cm)是亚硝酸盐型 AOM 反应的活跃区,亦是其功能微生物分布的峰值区^[15—16, 39, 42, 44]。这是由于深层土壤相对稳定的缺氧条件和高浓度甲烷,更有利于 NC10 门细菌的生长和代谢^[39]。湿地中亚硝酸盐型 AOM 反应作用强度的空间变异还受土壤无机氮、有机碳等水平的影响^[16, 20, 34]。但目前,针对湿地中亚硝酸盐型 AOM 的时间变异性研究较少^[16]。多时空尺度下亚硝酸盐型 AOM 反应及其功能微生物的研究,将有助于更好地评估此类生物过程在湿地甲烷减排中的贡献及其环境调控机制。

表 1 内陆湿地与水体中不同电子受体驱动的 AOM 途径及潜在功能微生物

Table 1 Diverse AOM pathways driven by different electron acceptors and the responsible microorganisms in inland wetlands and freshwater aquatic systems

生态系统 Ecosystems	电子受体 Electron acceptors	甲烷厌氧氧化活性 Activity of anaerobic methane oxidation /(nmol CO ₂ g ⁻¹ d ⁻¹)	功能微生物 Functional microbes	甲烷厌氧氧化微生物丰度 Abundance of anaerobic methanotrophs/(拷贝/g)	参考文献 References
下渚湖湿地 Xiazhuhu Wetland	NO ₂ ⁻	0.2—14.5	NC10	1.8×10 ⁶ —5.1×10 ⁷ (16S rRNA)	[15, 39]
绿水湾湿地 Green Bay Wetland	NO ₂ ⁻	2.1—5.1	NC10	6.1×10 ⁶ —3.2×10 ⁷ (16S rRNA)	[34]
	NO ₃ ⁻	0.4—1.2	ANME-2d	1.4×10 ³ —3.2×10 ⁴ (16S rRNA)	[34]
泥炭地 Peatland	NO ₂ ⁻	ND	NC10	5.7×10 ² (16S rRNA)	[40]
天然湿地 Natural wetland	NO ₂ ⁻	ND	NC10	10 ⁴ —10 ⁵ (16S rRNA)	[17]
	NO ₂ ⁻	0.4—5.1	NC10	6.3×10 ⁴ —5.0×10 ⁵ (16S rRNA); 1.4×10 ⁴ —1.2×10 ⁶ (<i>nod</i>)	[16]
高寒湿地 Alpine wetland	NO ₃ ⁻	0.7—9.5	ANME-2d	8.0×10 ⁵ —1.8×10 ⁷ (16S rRNA)	[16]
	SO ₄ ²⁻	20 nmol cm ⁻³ d ⁻¹	ND	ND	[41]
天然湿地 Natural wetland	As (V)	2.61 μM/d	ANME-1/—2	7.3×10 ⁵ —5.2×10 ⁸ (<i>mcra</i>)	[36]
	NO ₂ ⁻	ND	NC10	10 ⁴ —10 ⁶ (16S rRNA)	[17]
人工湿地 Constructed wetland	NO ₂ ⁻	3.5—8.7	NC10	1.6×10 ⁶ —1.3×10 ⁷ (16S rRNA)	[42]
	NO ₂ ⁻	ND	NC10	8.7×10 ⁵ —4.8×10 ⁶ (16S rRNA)	[43]
潮汐流人工湿地 Tidal flow constructed wetland	NO ₂ ⁻	8.5—23.5	NC10	5.9×10 ⁵ —2.7×10 ⁶ (<i>pmoA</i>)	[20]
	NO ₂ ⁻	ND	NC10	3.8×10 ⁷ —2.4×10 ⁹ (16S rRNA)	[44]
垂直流人工湿地 Integrated vertical constructed wetland	NO ₂ ⁻	ND	NC10	8.2×10 ² —8.9×10 ³ (16S rRNA)	[45]
	NO ₃ ⁻	ND	ANME-2d	8.9×10 ³ —3.6×10 ⁴ (<i>mcra</i>)	[45]
表面流人工湿地 Surface flow constructed wetland	NO ₂ ⁻	ND	NC10	9.0×10 ⁵ —4.3×10 ⁶ (16S rRNA)	[46]
	NO ₂ ⁻	ND	NC10	3.8×10 ⁵ —6.1×10 ⁶ (16S rRNA)	[15, 19]
稻田(嘉兴) Paddy field (Jiaxing)	NO ₂ ⁻	ND	NC10	3.8×10 ⁵ —6.1×10 ⁶ (16S rRNA)	[15, 19]
稻田(杭州) Paddy field (Hangzhou)	NO ₂ ⁻	0.2—2.1	NC10	3.8×10 ⁵ —6.1×10 ⁶ (16S rRNA)	[15, 19]
稻田(无锡) Paddy field (Wuxi)	NO ₂ ⁻	ND	NC10	2.6×10 ⁵ —1.0×10 ⁸ (16S rRNA)	[48]
稻田(金坛) Paddy field (Jintan)	NO ₂ ⁻	ND	NC10	2.0×10 ³ —3.1×10 ³ (<i>pmoA</i>)	[49]
稻田(南京) Paddy field (Nanjing)	NO ₂ ⁻	ND	NC10	3.8×10 ⁶ —9.3×10 ⁶ (16S rRNA)	[50]
稻田型泥炭地 Paddy-peatland	NO ₂ ⁻	ND	NC10	5.9×10 ² (16S rRNA)	[40]
稻田(意大利) Paddy field (Italy)	NO ₂ ⁻	55 (最大值)	NC10	1.5×10 ⁴ —2.3×10 ⁵ (16S rRNA)	[18, 51]
	NO ₃ ⁻	79.9 (最大值)	ANME-2d	2.5×10 ⁵ —3.9×10 ⁶ (16S rRNA);	[18, 51]
	Fe(III)	56 (最大值)	ANME-2d	7.2×10 ³ —1.8×10 ⁷ (<i>mcra</i>)	[18, 51]
康斯坦茨湖(德国) Lake Constance (Germany)	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻	1.8—3.6 nmol ml ⁻¹ d ⁻¹	NC10	ND	[21]
	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻	31—437 μmol CH ₄ m ⁻² d ⁻¹	NC10	6.0×10 ⁵ —8.1×10 ⁸ (16S rRNA); 4.3×10 ⁸ —3.8×10 ⁹ (<i>pmoA</i>)	[22]
琵琶湖(日本) Lake Biwa (Japan)	NO ₂ ⁻	ND	NC10	10 ⁵ —10 ⁶ (16S rRNA)	[52]
洱海湖、滇池 Lake Erhai, Lake Dianchi	NO ₂ ⁻	0.05—0.33 μmol g ⁻¹ d ⁻¹	NC10	3.2×10 ⁶ —1.8×10 ⁸ (16S rRNA)	[53]
Kinneret 湖(以色列) Lake Kinneret (Israel)	Fe(III)/ Mn(IV)	3.5 nmol cm ⁻³ d ⁻¹	ND	ND	[54]
Baikal 湖(西伯利亚) Lake Baikal (Siberia)	Fe(III)	ND	ND	ND	[55]

续表

生态系统 Ecosystems	电子受体 Electron acceptors	甲烷厌氧氧化活性 Activity of anaerobic methane oxidation /(nmol CO ₂ g ⁻¹ d ⁻¹)	功能微生物 Functional microbes	甲烷厌氧氧化微生物丰度 Abundance of anaerobic methanotrophs/(拷贝/g)	参考文献 References
Cadagno 湖(瑞士) Lake Cadagno (Switzerland)	SO ₄ ²⁻	ND	ANME-2d	ND	[37]
Ørn 湖(丹麦) Lake Ørn (Denmark)	Fe(III)	1.8 nmol cm ⁻³ d ⁻¹	ND	ND	[56]
	Fe(III)/ SO ₄ ²⁻	ND	ANME-2d	ND	[35]
钱塘江 Qiantang River	NO ₂ ⁻	ND	NC10	1.3×10 ⁶ —1.0×10 ⁷ (16S rRNA)	[26]
东江 Dongjiang River	NO ₂ ⁻	ND	NC10	9.1×10 ⁴ —3.0×10 ⁶ (<i>pmoA</i>)	[57]
浑河 Hunhe River	NO ₂ ⁻	ND	NC10	ND	[58]
北运河(北京) North Canal (Beijing)	NO ₂ ⁻	ND	NC10	ND	[59]
英格兰内陆河流 Inland rivers in England	NO ₂ ⁻	0.4—61.0	NC10		
	NO ₃ ⁻	0.5—5.7	ANME-2d	3.7×10 ⁶ —1.5×10 ⁷ (16S rRNA)	[25]
	Fe ³⁺	1.5—8.1	ANME-2d	2.1×10 ⁴ —2.5×10 ⁵ (16S rRNA)	[25]
三峡水库 Three Gorges Reservoir	NO ₂ ⁻	ND	NC10	4.7×10 ² —1.8×10 ⁵ (16S rRNA)	[60—61]
	NO ₂ ⁻	ND	NC10	8.0×10 ⁴ —1.0×10 ⁶ (16S rRNA)	[62]
	NO ₂ ⁻	ND	NC10	ND	[28]
九龙湖水库 Jinglonghu Reservoir	NO ₂ ⁻	4.7—14.1	NC10	8.6×10 ⁷ —2.8×10 ⁸ (16S rRNA)	[29]
	NO ₃ ⁻	0.8—2.6	ANME-2d	3.7×10 ⁵ —4.8×10 ⁵ (16S rRNA)	[29]

ANME: 甲烷厌氧氧化古菌 Anaerobic methanotrophic archaea; ND: 无数据 No data; *pmoA*: 颗粒性甲烷单加氧酶编码基因 α subunit of particulate methane monooxygenase; *mcrA*: 甲基辅酶 M 还原酶编码基因 α subunit of methyl coenzyme M reductase; *nod*: NO 歧化酶编码基因 Nitric oxide dismutase

稻田作为一类特殊的人工湿地,其频繁的干湿交替使得土壤中电子受体的种类和数量处于动态变化。受氮肥施用的影响,NO₂⁻可能成为稻田甲烷氧化的主要电子受体^[65]。现有不少研究者提供了稻田土壤中 NC10 门细菌的分子生物学证据,但有关其甲烷氧化活性的报道还非常有限(表 1)。早期利用¹³CH₄稳定性同位素示踪手段发现,我国南方稻田土壤中存在亚硝酸盐型 AOM 反应^[19],但其甲烷氧化活性略低于天然淡水湿地和其他人工湿地中的报道值(表 1)。该研究还发现,亚硝酸盐型 AOM 反应的主要活跃区是稻田深层土壤(50—100 cm),其在表层土壤(0—10 cm)中无明显活性^[19]。其他相关研究也表明,稻田深层土壤是 NC10 门细菌的主要分布区域^[47—50]。氮肥施用是增加水稻产量的一项必要而有效的措施,同时该措施能不同程度地影响土壤微生物群落结构与功能。例如,短期或长期施加氮肥可以显著改变土壤中甲烷好氧氧化能力,进而影响稻田甲烷排放^[66—68]。氮肥的输入不仅会改变土壤中原有的氮素水平及其它理化性质(如 pH 和 C/N 比等),还将影响相关微生物氮循环过程,进而对亚硝酸盐型 AOM 反应产生促进或抑制效应。Hui 等^[49]研究发现,无机和有机肥的输入会降低水旱轮作下稻田土壤中 NC10 门细菌的丰度。Shi 等^[40]研究却表明,氮肥的输入显著促进了稻田型泥炭地亚硝酸盐型 AOM 反应,其甲烷氧化活性与不施肥的对照相比增加了 200% 以上。由于缺乏足够的研究,有关不同施肥措施是如何影响稻田土壤中亚硝酸盐型 AOM 过程及其影响机理尚不清楚。理论上,铵态氮肥或尿素的施加,一方面会刺激硝化活性,导致土壤耗氧量增加,降低土壤氧化还原电位,营造更多的缺氧环境,还可增加土壤中 NO₂⁻的可获得性,因而可能促进亚硝酸盐型 AOM 反应。另一方面,铵态氮肥或尿素的施加很可能会增强土壤中厌氧氨氧化(以 NO₂⁻为电子受体氧化 NH₄⁺的生物反应)活性^[69],导致其与亚硝酸盐型 AOM 反应竞争电子受体 NO₂⁻。有机肥的施加则会促进反硝化菌在内的各类异养微生物的生长和代谢。反硝化活性的增强会加速土壤中 NO₃⁻的还原,又为亚硝酸盐型 AOM 反应提供更多

的 NO_2^- 。

湖泊、河流、水库等水生生态系统作为被忽视的甲烷排放源日益受到重视^[4, 6, 8]。因长期淹水,以及受陆源活性氮(如农业面源污染)输入的影响,这些沉积物往往是发生亚硝酸盐型 AOM 反应的适宜生境(表 1)。Deutzmann 和 Schink^[21]以及 Kojima 等^[52]分别在德国康斯坦茨湖(Lake Constance)和日本琵琶湖(Lake Biwa)沉积物中检测到了 NC10 门细菌的存在。Deutzmann 和 Schink^[21]还通过¹⁴CH₄同位素示踪手段发现,湖泊沉积物中存在 AOM 反应^[21]。相较于浅水沉积物,湖泊深水沉积物更适合 NC10 门细菌的分布^[21, 52]。这是由于深水沉积物受氧气的扰动较小,拥有相对稳定的缺氧环境。随后,Deutzmann 等^[22]和 Graf 等^[23]进一步揭示了亚硝酸盐型 AOM 是深水湖泊中一类重要的甲烷汇:前者发现其甲烷氧化速率高达 31—437 $\mu\text{mol CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$,可几乎完全氧化沉积物厌氧区产生的甲烷;后者发现一类新的 NC10 门细菌占总细菌群落的比例高达 27%,且通过宏转录组检测到了该类细菌 16S rRNA 和功能基因(*pmoA* 和 *nod*)的高度表达。河流和水库沉积物中也存在相当数量的 NC10 门细菌(表 1)^[17, 26, 29, 57, 62]。前期研究工作表明,砂型河流沉积物中存在多电子受体(NO_2^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 和 Fe^{3+})共驱动的 AOM 反应,其中亚硝酸盐型 AOM 的甲烷氧化活性最高^[25],比湿地和稻田高一个数量级(表 1)。这很可能是由于砂型沉积物的渗透性较强,具有较快的营养物质和甲烷交换速率^[25]。根据沉积物中亚硝酸盐型 AOM 的甲烷氧化活性及孔隙水甲烷浓度的剖面变化特征,估算出此类 AOM 反应可减少沉积物 35%的甲烷排放(与甲烷好氧氧化的贡献相当)^[25]。这说明亚硝酸盐型 AOM 在河流甲烷减排中起着关键作用。该研究还发现,反硝化是提供亚硝酸盐型 AOM 电子受体 NO_2^- 的主要途径^[25]。Naqvi 等^[28]和 Shen 等^[29]研究表明,亚硝酸盐型 AOM 反应在水库甲烷氧化及氮素污染物消减方面也起了一定作用。水体沉积物中亚硝酸盐型 AOM 的甲烷氧化活性,以及 NC10 门细菌的群落结构很大程度上受无机氮水平(水体富营养化状态)的影响^[29, 53, 57, 62]。如 Shen 等^[29]对比研究了水库(该水库从上游至下游氮素污染负荷呈梯度增加)上游和下游沉积物中亚硝酸盐型 AOM 的甲烷氧化活性,及其功能微生物群落组成和丰度的空间变异。结果发现,下游沉积物中该类反应的甲烷氧化活性,以及 NC10 门细菌丰度均显著高于上游^[29]。

2 ANME-2d 介导的甲烷厌氧氧化

2.1 硝酸盐型甲烷厌氧氧化

NO_3^- 是环境中比 NO_2^- 更为常见的电子受体,但内陆湿地与水体中有关硝酸盐型 AOM 的研究相对滞后(表 1)。硝酸盐型与亚硝酸盐型 AOM 反应的发生条件极为相似,且后者的 NO_3^- 还原产物可为前者提供电子受体 NO_2^- ,因此这两类 AOM 反应在环境中很可能是共存的。Shen 等^[34]比较了沼泽湿地系统中亚硝酸盐型和硝酸盐型 AOM 反应在甲烷氧化中的相对作用大小,发现后者在控制湿地甲烷排放中的贡献相对较小。不过,Xie 等^[16]研究发现,高寒湿地中 ANME-2d 的 *mcrA* 基因丰度显著高于 NC10 门细菌的 16S rRNA 和 *nod* 基因丰度,且硝酸盐型 AOM 的甲烷氧化活性高于亚硝酸盐型 AOM。

Vaksmas 等^[18]根据同位素示踪结果表明,稻田土壤中存在高活性的硝酸盐型 AOM 反应,其最大甲烷氧化速率约为最大产甲烷速率的 25%,暗示了此类 AOM 反应在控制稻田甲烷排放中的重要地位。但需注意的是,他们在泥浆同位素培养试验中,将¹³CH₄+ NO_3^- 培养体系中测得的甲烷氧化活性均归结于硝酸盐型 AOM,未考虑 NO_3^- 被还原为 NO_2^- 后,亚硝酸盐型 AOM 可能利用产生的 NO_2^- 对甲烷进行氧化。最近,Shen 等^[25]结合反转录实时荧光定量 PCR,对¹³CH₄+ NO_3^- 泥浆培养体系中亚硝酸盐型和硝酸盐型 AOM 微生物关键功能基因(分别为 NC10 门细菌的 *pmoA* 基因和 ANME-2d 的 *mcrA* 基因)转录活性进行了比较分析。结果发现,*pmoA* 基因的转录活性显著高于 *mcrA* 基因,说明¹³CH₄+ NO_3^- 培养体系中的甲烷氧化活性大部分是由亚硝酸盐型 AOM 反应贡献。该结果阐明了亚硝酸盐型 AOM 反应在河流甲烷氧化中的作用大于硝酸盐型 AOM^[25]。两者甲烷氧化作用大小的差异可能是由于亚硝酸盐型 AOM 反应(-928 kJ/mol)产生的自由能高于硝酸盐型 AOM (-519.8 kJ/mol)所致^[25]。针对水库沉积物中 AOM 的研究也发现,硝酸盐型 AOM 的甲烷氧化活性与 ANME-

2d 的丰度分别显著低于亚硝酸盐型 AOM 的甲烷氧化活性与 NC10 门细菌的丰度^[29]。湿地、河流和水库沉积物中硝酸盐型 AOM 过程主要受硝酸盐和甲烷等浓度的影响^[16, 25, 29]。现尚未有直接证据表明,湖泊生态系统中存在 ANME-2d 介导的硝酸盐型 AOM 反应。总体而言,当前对于亚硝酸盐型和硝酸盐型 AOM 在控制内陆湿地与水体甲烷排放中的相对作用大小及其环境影响因素仍不明确。

2.2 金属还原型甲烷厌氧氧化

铁(Fe)、锰(Mn)等是地壳中丰富的金属元素,是甲烷氧化的理想电子受体,其作为氧化剂氧化甲烷的吉布斯自由能分别为-454.6 kJ/mol 和-556 kJ/mol,与亚硝酸盐型和硝酸盐型 AOM 反应的自由能相当。早在 1980 年,Zehnder 等^[70]就推测 AOM 反应可能与铁、锰等金属循环有关。2009 年,Beal 等^[71]在海洋沉积物中首次揭示了微生物介导的 Fe(III) 和 Mn(IV) 还原型 AOM 反应,并推测 ANME-1 和 ANME-3 主导了反应。2016 年,Ettwig 等^[72]报道了一种富集培养物,其含 40%—50% 的 ANME-2d (*M. nitroreducens* MPEBLZ) 和 40% 的 NC10 门细菌,但不含任何其它 ANMEs 和铁还原菌。通过向培养物中分别添加柠檬酸铁、水铁矿和水钠锰矿,在无 NO₃⁻ 的情况下,他们观察到培养物中发生了明显的 Fe(III) 还原型或 Mn(IV) 还原型 AOM 反应。同时,他们在仅有 NC10 门细菌但无 ANME-2d 的富集培养物中添加铁、锰电子受体,并未检测到任何甲烷氧化活性,排除了 NC10 门细菌参与金属还原型 AOM 反应的可能。随后,Cai 等^[31]和 Leu 等^[32]相继报道了可催化 Fe(III) 和 Mn(IV) 还原型 AOM 反应的 ANME-2d 富集培养物,其功能微生物分别被命名为 *Candidatus Methanoperedens ferrireducens* 和 *Candidatus Methanoperedens manganicus*。

目前对于 ANME-2d 是如何利用铁、锰等难溶的金属电子受体,其电子转移机制是什么,尚存在争论。从现有研究来看,主要的电子转移机制可能存在以下两种。一种为胞外电子直接转移(图 1)。Ettwig 等^[72]通过宏基因组发现,富集培养物中的 ANME-2d 含有大量编码细胞色素 *c* 的基因。细胞色素 *c* 在电子从胞内传至胞外以及细胞间传递过程中起着至关重要的作用。但有关 ANME-2d 的细胞色素 *c* 在不同金属电子受体存在条件下的表达仍需进一步验证。另一种电子转移途径为种间电子转移机制(图 1)。Fu 等^[73]向 ANME-2d 富集培养物中添加异化铁还原菌 *Shewanella oneidensis* MR-1,发现 ANME-2d 和铁还原菌的丰度在培养过程中均有增加。他们认为 ANME-2d 和铁还原菌可能是通过电子穿梭体、细胞色素蛋白载体、纳米导线等方式协同完成电子转移过程^[73]。此外,Lu 等^[74]通过向 ANME-2d 富集培养物中加入 Cr(VI),观察到甲烷氧化伴随 Cr(VI) 还原的现象。这可能是 ANME-2d 和一种未知的 Cr(VI) 还原微生物共同完成了 AOM 耦合 Cr(VI) 还原过程^[74]。

虽然富集培养物中的 ANME-2d 能催化铁、锰等(无论是可溶性金属离子还是不溶性金属氧化物)金属还原型 AOM 反应,但有关天然水体中 ANME-2d 介导的金属还原型 AOM 的研究还相当匮乏(表 1)。内陆水体(特别是湖泊、河流等)沉积物容纳了来自流域自然风化及人为排放的包括铁、锰在内的各种金属元素,这为金属还原型 AOM 反应提供了电子受体来源。早期研究者依据元素的生物地球化学和同位素特征判断,湖泊生态系统中存在铁还原型或锰还原型 AOM 反应,但未涉及相关功能微生物的研究^[54—56]。Weber 等^[35]在丹麦低硫高铁沉积物中检测到了 AOM 反应,且通过稳定性同位素核酸探针技术(RNA-based stable isotope probing, RNA-SIP)揭示了 ANME-2d 介导了 Fe(III) 还原型和(或)硫酸盐型 AOM 反应。Shen 等^[25]通过反转录实时荧光定量 PCR 发现,在¹³CH₄+Fe³⁺泥浆培养体系中 ANME-2d 的 *mcrA* 基因显著表达,证明了此类古菌可催化河流沉积物中 Fe(III) 还原型 AOM 反应。但目前,有关内陆湿地与水体中是否普遍存在 ANME-2d 介导的 Fe(III) 和 Mn(IV) 还原型 AOM 反应,及其主要功能微生物类群有待更深入的研究。

最近,Shi 等^[36]揭示了天然湿地土壤中存在 AOM 耦合砷(V)还原的现象。他们利用同位素标记实验发现,湿地环境中 AOM 反应会促进土壤结合态砷酸盐向水溶性更高的亚砷酸盐转化,其中 26.4%—49.2% 的砷释放被认为是由 AOM 反应所致。但砷还原型 AOM 反应在减少湿地甲烷排放中贡献率较低,最高仅约 0.7%。Shi 等^[36]还通过荧光定量 PCR 和宏基因组测序等分子生物学手段,分析了参与砷还原型 AOM 反应的功能微生物,并初步构建了 AOM 耦合砷还原的代谢通路。结果表明,ANME(ANME-1 与 ANME-2)首先通过逆甲烷

生成途径活化甲烷并获得电子,随后将电子传递给细胞周质中的砷还原酶或者共生的砷还原菌中,进一步实现砷的还原^[36]。

2.3 硫酸盐型甲烷厌氧氧化

一般认为,硫酸盐型 AOM 反应在淡水环境中不易发生,其原因是淡水水体中硫酸盐浓度较低(通常为海洋环境的 1%不到)。但有研究表明,硫酸盐浓度似乎并不是制约硫酸盐型 AOM 反应发生与否的决定性因素,即使在低硫酸盐环境中亦可发生此类甲烷氧化反应。其发生机制可能是在缺氧环境下硫酸盐可同时进行氧化和还原反应,比如硫酸盐被还原成硫化物后又可在溶解性有机物或金属氧化物存在的情况下被重新氧化,从而构成了硫酸盐与硫化物的循环体系^[75-76]。

不同于 NC10 门细菌,ANME-2d 是一类多功能的甲烷代谢菌,它们除了可以催化硝酸盐型 AOM 及 Fe(III)、Mn(IV)、Cr(VI) 等金属还原型 AOM 反应外,还能催化硫酸盐型 AOM 反应^[33]。由于 ANME-2d 基因组中缺少异化硫酸盐还原酶编码基因,此类古菌被认为不能独立催化完成硫酸盐型 AOM 反应,需与其它菌协同完成^[77]。Nie 等^[33]研究发现,ANME-2d 富集培养物中存在 AOM 耦合硫酸盐还原的现象,并认为 ANME-2d 和硫酸盐还原菌协同完成了硫酸盐型 AOM 反应。他们利用扫描电子显微镜观察到培养物中存在纳米网络结构,并通过宏转录组发现,ANME-2d *flaB* 基因(编码古菌鞭毛合成的基因)以及脱硫球菌 *pilA* 基因(编码菌毛合成的基因)的表达均显著上调。由此认为,该纳米网络结构主要由 ANME-2d 的鞭毛和脱硫球菌的菌毛形成。ANME-2d 在执行 AOM 反应的同时,通过纳米网络将电子传递给脱硫球菌实现硫酸盐的还原^[33](图 1)。

Segarra 等^[41]报道了内陆湿地中存在高活性的 AOM 反应(与海洋中的甲烷厌氧氧化活性相当),其可减少湿地 50%的甲烷排放。同时,他们在所研究的湿地中检测到了高活性的硫酸盐还原反应。结合生物地球化学分析认为,AOM 反应很可能耦合了硫酸盐的还原^[41]。Schubert 等^[37]在低 NO₃⁻浓度的湖泊沉积物中观察到 AOM 耦合硫酸盐还原的现象,并且 ANME-2d 是唯一被检测到的甲烷厌氧氧化古菌,从而推测 ANME-2d 具有催化硫酸盐型 AOM 反应的潜力。另外,湖泊沉积物中发生 Fe(III) 还原型 AOM 的同时很可能伴随硫酸盐型 AOM 反应的发生^[54-55]。如前所述,Weber 等^[35]通过 RNA-SIP 手段,揭示了湖泊沉积物中 ANME-2d 具有催化硫酸盐型和(或)Fe(III) 还原型 AOM 反应的能力。Shen 等^[25]研究表明,在缺氧砂型河流沉积物中存在硫酸盐型 AOM 反应,ANME-2d 同样是唯一被检测出的甲烷厌氧氧化古菌,且其 16S rRNA 基因与 Weber 等^[35]报道的 ANME-2d 16S rRNA 基因同源性较高(相似度为 96%—99%)。这暗示了 ANME-2d 很可能参与了河流沉积物中硫酸盐型 AOM 反应^[25]。但对于内陆湿地与水体中硫酸盐型 AOM 反应仍缺乏足够的直接证据,其功能微生物与电子转移机制也有待进一步探明。

3 甲烷厌氧氧化功能微生物的分子生物学检测方法

由于尚未获得纯培养,对自然生境中 NC10 门细菌和 ANME-2d 等 AOM 功能微生物的检测主要依赖分子生物学手段,如聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)等^[78-79]。表 2 总结了当前用于测定环境中 NC10 门细菌和 ANME-2d 常用的 PCR 引物,其主要是针对它们的 16S rRNA 或功能基因。近年来,高通量测序已被广泛应用于微生物生态学研究。目前,有不少研究者采用高通量测序技术(如 Illumina Miseq)对环境样品中 NC10 门细菌和 ANME-2d 群落进行分析^[16, 29, 34, 87]。此外,Graf 等^[23]利用宏转录组手段分析了深水湖泊中 NC10 门细菌相关基因的转录水平,并结合宏基因组手段获得了一新的 NC10 门菌株的全基因组序列。另有研究者利用独特的脂肪酸生物标志物,对泥炭地环境样品中 NC10 门细菌进行了检测^[88]。新的分子生物学手段的不断发展,将极大地推动对内陆湿地和水体环境中 AOM 功能微生物分布特征的理解。

表 2 用于检测 NC10 门细菌和 ANME-2d 常用的 PCR 引物

Table 2 PCR primers commonly used for detection of NC10 phylum bacteria and ANME-2d

引物 Primers	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	特异性 Speciality	参考文献 References
202F	GACCAAAGGGGGCGAGCG	NC10 16S rRNA	[79]
1545R	CAKAAAGGAGGTGATCC	细菌 16S rRNA	[80]
qP1F	GGGCTTGACATCCCACGAACCTG	NC10 16S rRNA	[79]
qP1R	CGCCTTCTCCAGCTTGACGC	NC10 6S rRNA	[79]
qP2F	GGGAACTGCCAGCGTCAAG	NC10 16S rRNA	[79]
qP2R	CTCAGCGACTTCGAGTACAG	NC10 16S rRNA	[79]
XS-F	TCGTGTCGTGAG RTGTTG	NC10 16S rRNA	[81]
XS-R	RCGATTACTAGCGATTCCD	NC10 16S rRNA	[81]
NC10-202Fdeg	RACCAAAGGRGGCGAGCG	NC10 16S rRNA	[21]
NC10-1043Rdeg	TCTCCRCGYTCCCTTGCG	NC10 16S rRNA	[21]
A189_b	GGNGACTGGGACTTYTGG	NC10 <i>pmoA</i>	[82]
cmo682	AAAYCCGGCRAAGAACGA	NC10 <i>pmoA</i>	[82]
cmo182	TCACGTTGACGCCGATCC	NC10 <i>pmoA</i>	[82]
cmo568	GCACATACCCATCCCCATC	NC10 <i>pmoA</i>	[82]
A189	GGNGACTGGGACTTCTGG	<i>pmoA</i>	[83]
682_NC10	AAATCCGGCGAAGAACGA	NC10 <i>pmoA</i>	[52]
NA638Rdeg	RAATGTTCCGRAGCGTVCCBC	NC10 <i>pmoA</i>	[21]
NA720R	TCCCCATCCACCCCACCAG	NC10 <i>pmoA</i>	[21]
HP3F1	CCCAGTACTTCATGTGGGARAARAT	NC10 <i>pmoA</i>	[84]
HP3R1	GGGGCCAGCCANRYCCARTT	NC10 <i>pmoA</i>	[84]
DP397F	TGGCTGTCCAGCTRTYC	ANME-2d 16S rRNA	[85]
DP569R	GRACGCCTGACGATTRAG	ANME-2d 16S rRNA	[85]
DP142F	TAATACYGGATAGATCAAAG	ANME-2d 16S rRNA	[85]
DP779R	GCACCCGACCTGACACCT	ANME-2d 16S rRNA	[85]
641F	ACTGDTAGGCTTGGGACC	ANME-2d 16S rRNA	[37]
834R	ATGCGGTGCGACCCGACCTG	ANME-2d 16S rRNA	[37]
McrA169F	GCAGCAATCACCAAGAAGAGAGG	ANME-2d <i>mcrA</i>	[86]
McrA1360R	TGCCTCTTTGTGGAGGTACATGGA	ANME-2d <i>mcrA</i>	[86]
McrA159F	AAAGTGGGAGCAGCAATCACC	ANME-2d <i>mcrA</i>	[86]
McrA345R	TCGTCCATTCTGCTGCATTGC	ANME-2d <i>mcrA</i>	[86]
McrA997F	ATCTGGCTCGGYGGCTACATGT	ANME-2d <i>mcrA</i>	[87]
McrA1360R	TGCCTCTTTGTGGAGGTACATGGA	ANME-2d <i>mcrA</i>	[86]

4 甲烷厌氧氧化活性测定的同位素示踪技术

自然生境中不同电子受体驱动的甲烷厌氧氧化活性的测定,主要通过室内泥浆培养结合 $^{13}\text{C}\text{H}_4$ 稳定性同位素示踪技术实现。该测定方法主要涉及以下几个流程^[15-16, 25, 29, 34]。1) 在厌氧手套箱中,将适量沉积物或土壤与灭菌后的蒸馏水(或培养基)在厌氧玻璃瓶中制成泥浆。2) 将玻璃瓶放置在振荡器中进行预培养,以进一步消耗瓶中残留的氧气和相关电子受体。3) 向不同玻璃瓶内加入相应的示踪剂 $^{13}\text{C}\text{H}_4$ 及 NO_2^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Fe(III) 或 Mn(IV) 等电子受体(同时设置对照组,以蒸馏水替代电子受体),继续将玻璃瓶放置在振荡器中培养。4) 在培养期间,定期利用同位素质谱仪联合气相色谱仪,测定不同处理组玻璃瓶顶空气中相 $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ 的值和 CO_2 的总产生量,计算顶空 $^{13}\text{CO}_2$ 的产生量。5) 考虑到 CO_2 在液相中溶解度较大,顶空 $^{13}\text{CO}_2$ 测定结束后,通常还需将原玻璃瓶中上清液转移至新的玻璃瓶;用盐酸对上清液进行酸化后,采用同样的方法测

定由液相释放到顶空的 $^{13}\text{CO}_2$ 量。6)最后,根据瓶中顶空和液相中 $^{13}\text{CO}_2$ 的产量之和计算不同电子受体驱动的甲烷厌氧氧化活性。此外,Shen 等^[25]结合 $^{13}\text{CH}_4$ 同位素示踪和功能基因反转录荧光定量 PCR,将各 AOM 途径与参与的微生物类群进行了关联。

5 问题与展望

5.1 不同 AOM 途径的功能微生物

对于内陆湿地与水体中亚硝酸盐型 AOM 反应的功能微生物 NC10 门细菌已开展了大量研究工作,基本明确了其代谢途径与特定的催化功能。虽然富集培养物中的 ANME-2d 能利用多种电子受体,但有关其在自然环境中的生态功能尚未被清楚的认识。例如,ANME-2d 是否可以催化湿地与水体环境中 Fe(III)、Mn(IV) 和 SO_4^{2-} 驱动型 AOM 反应仍缺少充分的证据。另外,催化不同 AOM 途径的 ANME-2d 类群的生态位特征仍不清楚。

5.2 不同 AOM 途径在甲烷减排中的相对贡献

由于内陆湿地,以及河流、湖泊和水库等水体环境复杂多变,是碳、氮、硫、铁等元素转化的重要场所^[89]。这使得这些环境中存在多种电子受体(NO_2^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、Fe(III) 等)驱动的 AOM 途径。但目前对于 ANME-2d 在复杂多变的环境中是如何选择不同电子受体,电子受体浓度又是如何影响 AOM 过程等仍不清楚。且当前缺乏在同一生境中,同时开展不同电子受体驱动的 AOM 途径的研究工作。为更好地认识各 AOM 途径在控制甲烷排放中的相对贡献及其环境调控机制,未来有必要对同一生境中不同甲烷氧化途径的相对作用强度进行比较研究,同时结合环境因子(特别是电子受体浓度)特征,分析对各 AOM 途径的关键控制因素。

5.3 不同 AOM 途径在相关物质循环中的作用

现有的研究更多的是关注 AOM 反应在内陆湿地与水体甲烷减排中的贡献,很少量化其在其它物质循环中的作用^[20, 45, 53]。事实上,亚硝酸盐型和硝酸盐型 AOM 反应在消减水体氮素污染物,以及金属还原型 AOM 反应在调节铁、锰等元素沉积方面的作用也不容忽视。采用稳定性同位素示踪与组学相结合的手段,有助于认识不同 AOM 途径在相关物质循环中的作用。

5.4 不同 AOM 途径的主要影响因素

当前关于内陆湿地与水体中不同 AOM 途径影响因素的研究,很少涉及宏观环境因子和人类活动等对 AOM 的影响。例如气候变化(大气 CO_2 浓度升高和气候变暖等)对 AOM 过程会产生何种影响不得而知。研究表明,大气 CO_2 浓度升高或气候变暖可通过促进植物光合作用,增加植物根系生物量,增强根系分泌物代谢,以及改变土壤理化性质等间接影响甲烷好氧氧化过程^[90-91]。同样,气候变化很可能也会对 AOM 过程产生影响。开展气候变化背景下 AOM 的研究,将有利于更好地评价相关微生物在减缓气候变化中的作用。另外,人为活性氮排放亦会对 AOM 过程产生影响^[29],尤其会对河流、湖泊、水库等水生生态系统中亚硝酸盐型和硝酸盐型 AOM 过程产生影响。对于稻田系统中的 AOM 过程,其会受各种农业管理措施(如施肥、水分管理方式、耕作制度等)的影响。探明不同管理措施对 AOM 过程的影响,可以更好地评估 AOM 在稻田甲烷氧化中的贡献,同时为稻田甲烷减排提供科学依据。

参考文献 (References):

- [1] Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5): 285-292.
- [2] Bridgman S D, Cadillo-Quiroz H, Keller J K, Zhuang Q L. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Global Change Biology*, 2013, 19(5): 1325-1346.
- [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] 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.
- [5] Bastviken D, Tranvik L J, Downing J A, Crill P M, Enrich-Prast A. Freshwater methane emissions offset the continental carbon sink. *Science*, 2011, 331(6013): 50-50.
- [6] Stanley E H, Casson N J, Christel S T, Crawford J T, Loken L C, Oliver S K. The ecology of methane in streams and rivers: patterns, controls, and global significance. *Ecological Monographs*, 2016, 86(2): 146-171.
- [7] Shelley F, Abdullahi F, Grey J, Trimmer M. Microbial methane cycling in the bed of a chalk river: oxidation has the potential to match methanogenesis enhanced by warming. *Freshwater Biology*, 2015, 60(1): 150-160.
- [8] Deemer B R, Harrison J A, Li S Y, Beaulieu J J, DelSontro T, Barros N, Bezerra-Neto J F, Powers S M, dos Santos M A, Vonk J A. Greenhouse gas emissions from reservoir water surfaces: a new global synthesis. *BioScience*, 2016, 66(11): 949-964.
- [9] Ricão Canelhas M, Denfeld B A, Weyhenmeyer G A, Bastviken D, Bertilsson S. Methane oxidation at the water-ice interface of an ice-covered lake. *Limnology and Oceanography*, 2016, 61(S1): S78-S90.
- [10] Trimmer M, Shelley F C, Purdy K J, Maanoja S T, Chronopoulou P M, Grey J. Riverbed methanotrophy sustained by high carbon conversion efficiency. *The ISME Journal*, 2015, 9(10): 2304-2314.
- [11] Liu L X, Xu M, Li R Q, Shao R. Timescale dependence of environmental controls on methane efflux from Poyang Hu, China. *Biogeosciences*, 2017, 14(8): 2019-2032.
- [12] Smemo K A, Yavitt J B. Evidence for anaerobic CH₄ oxidation in freshwater peatlands. *Geomicrobiology Journal*, 2007, 24(7/8): 583-597.
- [13] Raghoebarsing A A, Pol A, van de Pas-Schoonen K T, Smolders A J P, Ettwig K F, Rijpstra W I C, Schouten S, Damsté J S S, Op den Camp H J M, Jetten M S M, Strous M. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, 2006, 440(7086): 918-921.
- [14] Ettwig K F, Butler M K, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers M M M, Schreiber F, Dutilh B E, Zedelius J, de Beer D, Gloerich J, Wessels H J C T, van Alen T, Luesken F, Wu M L, van de Pas-Schoonen K T, Op den Camp H J M, Janssen-Megens E M, Francoijs K J, Stunnenberg H, Weissenbach J, Jetten M S M, Strous M. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 2010, 464(7288): 543-548.
- [15] Hu B L, Shen L D, Lian X, Zhu Q, Liu S, Huang Q, He Z F, Geng S, Cheng D Q, Lou L P, Xu X Y, Zheng P, He Y F. Evidence for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation as a previously overlooked microbial methane sink in wetlands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(12): 4495-4500.
- [16] Xie F, Ma A Z, Zhou H C, Liang Y, Yin J, Ma K, Zhuang X L, Zhuang G Q. Niche differentiation of denitrifying anaerobic methane oxidizing bacteria and archaea leads to effective methane filtration in a Tibetan alpine wetland. *Environment International*, 2020, 140: 105764.
- [17] Zhu G B, Zhou L L, Wang Y, Wang S Y, Guo J H, Long X E, Sun X B, Jiang B, Hou Q Y, Jetten M S M, Yin C Q. Biogeographical distribution of denitrifying anaerobic methane oxidizing bacteria in Chinese wetland ecosystems. *Environmental Microbiology Reports*, 2015, 7(1): 128-138.
- [18] Vaksmaa A, Lüke C, van Alen T, Valè G, Lupotto E, Jetten M S M, Ettwig K F. Distribution and activity of the anaerobic methanotrophic community in a nitrogen-fertilized Italian paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(12): fiv181.
- [19] Shen L D, Liu S, Huang Q, Lian X, He Z F, Geng S, Jin R C, He Y F, Lou L P, Xu X Y, Zheng P, Hu B L. Evidence for the cooccurrence of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane oxidation processes in a flooded paddy field. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7611-7619.
- [20] Zhang M P, Huang J C, Sun S S, Rehman M M U, He S B. Depth-specific distribution and significance of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process in tidal flow constructed wetlands used for treating river water. *Science of the Total Environment*, 2020, 716: 137054.
- [21] Deutzmann J S, Schink B. Anaerobic oxidation of methane in sediments of Lake Constance, an oligotrophic freshwater lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(13): 4429-4436.
- [22] Deutzmann J S, Stief P, Brandes J, Schink B. Anaerobic methane oxidation coupled to denitrification is the dominant methane sink in a deep lake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(51): 18273-18278.
- [23] Graf J S, Mayr M J, Marchant H K, Tienken D, Hach P F, Brand A, Schubert C J, Kuypers M M M, Milucka J. Bloom of a denitrifying methanotroph, '*Candidatus Methyloirababilis limnetica*', in a deep stratified lake. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(7): 2598-2614.
- [24] Shen L D, Ouyang L, Zhu Y Z, Trimmer M. Spatial separation of anaerobic ammonium oxidation and nitrite-dependent anaerobic methane oxidation in permeable riverbeds. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(4): 1185-1195.
- [25] Shen L D, Ouyang L, Zhu Y Z, Trimmer M. Active pathways of anaerobic methane oxidation across contrasting riverbeds. *The ISME Journal*, 2019, 13(3): 752-766.
- [26] Shen L D, Liu S, Zhu Q, Li X Y, Cai C, Cheng D Q, Lou L P, Xu X Y, Zheng P, Hu B L. Distribution and diversity of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidising bacteria in the sediments of the Qiantang River. *Microbial Ecology*, 2014, 67(2): 341-349.

- [27] Kojima H, Tokizawa R, Kogure K, Kobayashi Y, Itoh M, Shiah F K, Okuda N, Fukui M. Community structure of planktonic methane-oxidizing bacteria in a subtropical reservoir characterized by dominance of phylotype closely related to nitrite reducer. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5728.
- [28] Naqvi S W A, Lam P, Narvenkar G, Sarkar A, Naik H, Pratihary A, Shenoy D M, Gauns M, Kurian S, Damare S, Duret M, Lavik G, Kuypers M M M. Methane stimulates massive nitrogen loss from freshwater reservoirs in India. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1265.
- [29] Shen L D, Tian M H, Cheng H X, Liu X, Yang Y L, Liu J Q, Xu J B, Kong Y, Li J H, Liu Y. Different responses of nitrite- and nitrate-dependent anaerobic methanotrophs to increasing nitrogen loading in a freshwater reservoir. *Environmental Pollution*, 2020, 263: 114623.
- [30] Haroon M F, Hu S H, Shi Y, Imelfort M, Keller J, Hugenholz P, Yuan Z G, Tyson G W. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature*, 2013, 500(7464): 567-570.
- [31] Cai C, Leu A O, Xie G J, Guo J H, Feng Y X, Zhao J X, Tyson G W, Yuan Z G, Hu S H. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction. *The ISME Journal*, 2018, 12(8): 1929-1939.
- [32] Leu A O, Cai C, McIlroy S J, Southam G, Orphan V J, Yuan Z G, Hu S H, Tyson G W. Anaerobic methane oxidation coupled to manganese reduction by members of the *Methanoperedenaceae*. *The ISME Journal*, 2020, 14(4): 1030-1041.
- [33] Nie W B, Ding J, Xie G J, Tan X, Lu Y, Peng L, Liu B F, Xing D F, Yuan Z G, Ren N Q. Simultaneous nitrate and sulfate dependent anaerobic oxidation of methane linking carbon, nitrogen and sulfur cycles. *Water Research*, 2021, 194: 116928.
- [34] Shen L D, Wu H S, Liu X, Li J. Cooccurrence and potential role of nitrite- and nitrate-dependent methanotrophs in freshwater marsh sediments. *Water Research*, 2017, 123: 162-172.
- [35] Weber H S, Habicht K S, Thamdrup B. Anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-2d cluster are active in a low-sulfate, iron-rich freshwater sediment. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 619.
- [36] Shi L D, Guo T, Lv P L, Niu Z F, Zhou Y J, Tang X J, Zheng P, Zhu L Z, Zhu Y G, Kappler A, Zhao H P. Coupled anaerobic methane oxidation and reductive arsenic mobilization in wetland soils. *Nature Geoscience*, 2020, 13(12): 799-805.
- [37] Schubert C J, 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). *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 76(1): 26-38.
- [38] 沈李东. 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化微生物生态学研究进展. *土壤学报*, 2015, 52(4): 713-722.
- [39] Shen L D, Huang Q, He Z F, Lian X, Liu S, He Y F, Lou L P, Xu X Y, Zheng P, Hu B L. Vertical distribution of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidising bacteria in natural freshwater wetland soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(1): 349-357.
- [40] Shi Y, Zhang X Y, Wang Z C, Xu Z W, He C G, Sheng L X, Liu H Y, Wang Z Q. Shift in nitrogen transformation in peatland soil by nitrogen inputs. *Science of the Total Environment*, 2021, 764: 142924.
- [41] Segarra K E A, Schubotz F, Samarkin V, Yoshinaga M Y, Hinrichs K U, Joye S B. High rates of anaerobic methane oxidation in freshwater wetlands reduce potential atmospheric methane emissions. *Nature Communications*, 2015, 6: 7477.
- [42] Shen L D, Liu S, He Z F, Lian X, Huang Q, He Y F, Lou L P, Xu X Y, Zheng P, Hu B L. Depth-specific distribution and importance of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidising bacteria in an urban wetland. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 83: 43-51.
- [43] Chen S L, Chen J F, Chang S, Yi H, Huang D W, Xie S G, Guo Q W. Aerobic and anaerobic methanotrophic communities in urban landscape wetland. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(1): 433-445.
- [44] Yang M X, Guo Q W, Tong T L, Li N N, Xie S G, Long Y. Vegetation type and layer depth influence nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria in constructed wetland. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(3): 505-511.
- [45] Huang T, Liu W, Zhang Y, Zhou Q H, Wu Z B, He F. A stable simultaneous anammox, denitrifying anaerobic methane oxidation and denitrification process in integrated vertical constructed wetlands for slightly polluted wastewater. *Environmental Pollution*, 2020, 262: 114363.
- [46] Xu Y N, Tong T L, Chen J F, Li B X, Xie S G. Nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria seasonally and spatially shift in a constructed wetland used for treating river water. *Ecological Engineering*, 2018, 110: 48-53.
- [47] Wang Y, Zhu G B, Harhangi H R, Zhu B L, Jetten M S M, Yin C Q, Op den Camp H J M. Co-occurrence and distribution of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in a paddy soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 336(2): 79-88.
- [48] 周蓉, 祝贵兵, 周磊榴, 邹雨璇, 王春荣. 稻田土壤反硝化厌氧甲烷氧化菌的时空分布与群落结构分析. *环境科学学报*, 2015, 35(3): 729-737.
- [49] Hui C, Guo X X, Sun P F, Lin H, Zhang Q C, Liang Y C, Zhao Y H. Depth-specific distribution and diversity of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in upland-cropping soil under different fertilizer treatments. *Applied Soil Ecology*, 2017, 113: 117-126.
- [50] Shen L D, Wu H S, Gao Z Q, Li J, Liu X. Presence of diverse *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*-like bacteria of NC10 phylum in agricultural soils. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(6): 1552-1560.
- [51] Vaksmaa A, van Alen T A, Eitwig K F, Lupotto E, Valè G, Jetten M S M, Lüke C. Stratification of diversity and activity of methanogenic and methanotrophic microorganisms in a nitrogen-fertilized Italian paddy soil. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2127.

- [52] Kojima H, Tsutsumi M, Ishikawa K, Iwata T, Mußmann M, Fukui M. Distribution of putative denitrifying methane oxidizing bacteria in sediment of a freshwater lake, Lake Biwa. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35(4): 233-238.
- [53] Yang Y Y, Chen J F, Li B Q, Liu Y, Xie S G. Anaerobic methane oxidation potential and bacteria in freshwater lakes: seasonal changes and the influence of trophic status. *Systematic and Applied Microbiology*, 2018, 41(6): 650-657.
- [54] Sivan O, Adler M, Pearson A, Gelman F, Bar-Or I, John S G, Eckert W. Geochemical evidence for iron-mediated anaerobic oxidation of methane. *Limnology and Oceanography*, 2011, 56(4): 1536-1544.
- [55] Torres N T, Och L M, Hauser P C, Furrer G, Brandl H, Vologina E, Sturm M, Bürgmann H, Müller B. Early diagenetic processes generate iron and manganese oxide layers in the sediments of Lake Baikal, Siberia. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2014, 16(4): 879-889.
- [56] Norði K À, Thamdrup B, Schubert C J. Anaerobic oxidation of methane in an iron-rich Danish freshwater lake sediment. *Limnology and Oceanography*, 2013, 58(2): 546-554.
- [57] Long Y, Jiang X J, Guo Q W, Li B X, Xie S G. Sediment nitrite-dependent methane-oxidizing microorganisms temporally and spatially shift in the Dongjiang River. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(1): 401-410.
- [58] 张亚迪, 宋永会, 彭剑峰, 张剑桥, 张盼月, 刘瑞霞, 石国强. 浑河底泥反硝化厌氧甲烷氧化菌群落多样性的时空分布特征及其与环境因子关系分析. *环境科学*, 2018, 39(8): 3670-3676.
- [59] 刘洋, 陈永娟, 王晓燕, 许康利. 人类活动对河流沉积物中反硝化厌氧甲烷氧化菌群落特征的影响. *环境科学*, 2018, 39(8): 3677-3688.
- [60] 叶飞, 吴胜军, 姜毅, 吴晓冰, 李垒, 邓占勇, 王雨. 人类活动对三峡消落带土壤亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化菌群落的影响. *环境科学学报*, 2018, 38(8): 3266-3277.
- [61] Wang Y, Huang P, Ye F, Jiang Y, Song L Y, Op den Camp H J M, Zhu G B, Wu S J. Nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria along the water level fluctuation zone of the Three Gorges Reservoir. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(4): 1977-1986.
- [62] Long Y, Guo Q W, Li N N, Li B X, Tong T L, Xie S G. Spatial change of reservoir nitrite-dependent methane-oxidizing microorganisms. *Annals of Microbiology*, 2017, 67(2): 165-174.
- [63] 顾航, 肖凡书, 贺志理, 颜庆云. 湿地微生物介导的甲烷排放机制. *微生物学报*, 2018, 58(4): 618-632.
- [64] Bodelier P L E. Interactions between nitrogenous fertilizers and methane cycling in wetland and upland soils. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2011, 3(5): 379-388.
- [65] 沈李东, 胡宝兰, 郑平. 甲烷厌氧氧化微生物的研究进展. *土壤学报*, 2011, 48(3): 619-628.
- [66] Alam M S, Jia Z J. Inhibition of methane oxidation by nitrogenous fertilizers in a paddy soil. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 246.
- [67] Mohanty S R, Bodelier P L E, Floris V, Conrad R. Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1346-1354.
- [68] 郑聚锋, 张平究, 潘根兴, 李恋卿, 张旭辉. 长期不同施肥下水稻土甲烷氧化能力及甲烷氧化菌多样性的变化. *生态学报*, 2008, 28(10): 4864-4872.
- [69] Nie S A, Lei X M, Zhao L X, Wang Y, Wang F, Li H, Yang W Y, Xing S H. Response of activity, abundance, and composition of anammox bacterial community to different fertilization in a paddy soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, 54(8): 977-984.
- [70] Zehnder A J B, Brock T D. Anaerobic methane oxidation: occurrence and ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 39(1): 194-204.
- [71] Beal E J, House C H, Orphan V J. Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science*, 2009, 325(5937): 184-187.
- [72] Ettwig K F, Zhu B L, Speth D, Keltjens J T, Jetten M S M, Kartal B. Archaea catalyze iron-dependent anaerobic oxidation of methane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(45): 12792-12796.
- [73] Fu L, Li S W, Ding Z W, Ding J, Lu Y Z, Zeng R J. Iron reduction in the DAMO/*Shewanella oneidensis* MR-1 coculture system and the fate of Fe (II). *Water Research*, 2016, 88: 808-815.
- [74] Lu Y Z, Fu L, Ding J, Ding Z W, Li N, Zeng R J. Cr(VI) reduction coupled with anaerobic oxidation of methane in a laboratory reactor. *Water Research*, 2016, 102: 445-452.
- [75] Heitmann T, Blodau C. Oxidation and incorporation of hydrogen sulfide by dissolved organic matter. *Chemical Geology*, 2006, 235(1/2): 12-20.
- [76] King G M. Effects of added manganic and ferric oxides on sulfate reduction and sulfide oxidation in intertidal sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 1990, 6(2): 131-138.
- [77] Yu H, Susanti D, McGlynn S E, Skennerton C T, Chourey K, Iyer R, Scheller S, Tavormina P L, Hettich R L, Mukhopadhyay B, Orphan V J. Comparative genomics and proteomic analysis of assimilatory sulfate reduction pathways in anaerobic methanotrophic archaea. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2917.
- [78] Welte C U, Rasigraf O, Vaksmaa A, Versantvoort W, Arshad A, Op den Camp H J M, Jetten M S M, Lüke C, Reimann J. Nitrate- and nitrite-dependent anaerobic oxidation of methane. *Environmental Microbiology Reports*, 2016, 8(6): 941-955.

- [79] Ettwig K F, van Alen T, van de Pas-Schoonen K T, Jetten M S M, Strous M. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3656-3662.
- [80] Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, Schleifer K H, Pommerening-Röser A, Koops H P, Wagner M. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(8): 3042-3051.
- [81] Xu S, Lu W J, Muhammad F M, Liu Y T, Guo H W, Meng R H, Wang H T. New molecular method to detect denitrifying anaerobic methane oxidation bacteria from different environmental niches. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 65: 367-374.
- [82] Luesken F A, Zhu B L, van Alen T A, Butler M K, Diaz M R, Song B, Op den Camp H J M, Jetten M S M, Ettwig K F. *pmoA* primers for detection of anaerobic methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(11): 3877-3880.
- [83] Holmes A J, Costello A, Lidstrom M E, Murrell J C. Evidence that participate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 132(3): 203-208.
- [84] Han P, Gu J D. A newly designed degenerate PCR primer based on *pmoA* gene for detection of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria from different ecological niches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(23): 10155-10162.
- [85] Ding J, Ding Z W, Fu L, Lu Y Z, Cheng S H, Zeng R J. New primers for detecting and quantifying denitrifying anaerobic methane oxidation archaea in different ecological niches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(22): 9805-9812.
- [86] Vaksmaa A, Jetten M S M, Ettwig K F, Lüke C. *McrA* primers for the detection and quantification of the anaerobic archaeal methanotroph '*Candidatus Methanoperedens nitroreducens*'. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(4): 1631-1641.
- [87] Xu S, Cai C, Guo J H, Lu W J, Yuan Z G, Hu S H. Different clusters of '*Candidatus Methanoperedens nitroreducens*'-like archaea as revealed by high-throughput sequencing with new primers. *Scientific Reports*, 8(1): 7695.
- [88] Smit N T, Rush D, Sahonero-Canavesi D X, Verweij M, Rasigraf O, Cruz S G, Jetten M S M, Damsté J S S, Schouten S. Demethylated hopanoids in '*Ca. Methylomirabilis oxyfera*' as biomarkers for environmental nitrite-dependent methane oxidation. *Organic Geochemistry*, 2019, 137: 103899.
- [89] 黄力, 冯雪莲, 杜全生, 东秀珠, 刘双江, 温明章, 戴欣. 水圈微生物重大研究计划: 聚焦水圈微生物组研究的核心科学问题. *中国科学院院刊*, 2017, 32(3): 266-272.
- [90] Liu Y, Liu X Y, Cheng K, Li L Q, Zhang X H, Zheng J F, Zheng J W, Pan G X. Responses of methanogenic and methanotrophic communities to elevated atmospheric CO₂ and temperature in a paddy field. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1895.
- [91] 严陈, 许静, 钟文辉, 林毅, 林先贵, 朱建国, 贾仲君. 大气 CO₂ 浓度升高对稻田根际土壤甲烷氧化细菌丰度的影响. *生态学报*, 2013, 33(6): 1881-1888.