

扎龙盐碱湿地芦苇根际土的优势产甲烷途径分析

李慧菊^{1,2}, 李凌燕^{3,4}, 梁红^{1,2}, 高大文^{*1,2}, 东秀珠^{*3,4}

1 北京建筑大学城市环境修复技术研究中心, 北京 100044

2 北京建筑大学北京节能减排与城乡可持续发展省部共建国家协同创新中心, 北京 100044

3 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

4 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

李慧菊, 李凌燕, 梁红, 高大文, 东秀珠. 扎龙盐碱湿地芦苇根际土的优势产甲烷途径分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1511-1524.

LI Huiju, LI Lingyan, LIANG Hong, GAO Dawen, DONG Xiuzhu. Predominant methanogenic pathway in the rhizosphere soil of reed in saline-alkaline Zhalong wetland[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1511-1524.

摘要:【背景】芦苇湿地是甲烷主要的排放源之一, 产甲烷古菌是唯一产生大量甲烷的生物, 而盐碱湿地芦苇根际土优势甲烷途径鲜有研究。【目的】调查扎龙低温盐碱湿地芦苇根际土中的优势产甲烷途径。【方法】通过 16S rRNA 基因扩增子测序, 分析扎龙湿地芦苇生长季根际土壤深度 0–20 cm 的产甲烷古菌和细菌组成。用已知的产甲烷底物三甲胺、甲醇、乙酸和 H₂/CO₂, 以及高盐环境植物和细菌的相似相容物质——甜菜碱(被细菌还原成三甲胺)在 pH 8.0 培养获得芦苇根际土的产甲烷富集物。测定各种富集物的产甲烷速率鉴定芦苇根际土的优势产甲烷途径; 测定甜菜碱富集物中的 16S rRNA 基因多样性, 并用 RT-qPCR 定量优势细菌和古菌的物种组成, 从而推测协同代谢甜菜碱产甲烷的细菌和古菌类群。【结果】扎龙盐碱湿地芦苇根际土含有氢营养型的甲烷杆菌属(*Methanobacterium*, 36.42%)、偏好低氢的 Rice Cluster II (11.55%)、乙酸营养型的甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*, 11.29%)、甲基营养型的甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*, 6.53%)、H₂ 还原甲基物质的甲烷马赛球菌属(*Methanomassiliicoccus*, 4.05%)和高比例的未培养厌氧甲烷氧化古菌-噬甲烷菌属(*Candidatus Methanoperedens*, 35.06%)。优势细菌包括绿弯菌门(*Chloroflexi*, 21.55%)、变形杆菌门(*Proteobacteria*, 16.88%)、放线菌门(*Actinobacteria*, 13.37%)和酸杆菌门(*Acidobacteria*, 10.0%)。扎龙湿地的三甲胺和甜菜碱富集物产甲烷速率最高, 富集物中代谢甜菜碱的优势细菌包括鼠胞菌科(*Sporomusaceae*)、沉积杆菌科(*Sedimentibacteraceae*)、亨氏梭菌科(*Hungateiclostridiaceae*)和梭菌科(*Clostridiaceae*)。从三甲胺产甲烷的优势古菌包括甲基营养型的甲烷八叠球菌属和 H₂ 还原甲基物质产甲烷的甲烷马赛球菌属。【结论】以相似相容物质甜菜碱的还原产物三甲胺为前体的甲烷代谢途径是扎龙低温盐碱湿地芦苇根际土的优势产甲烷途径。

关键词: 扎龙芦苇湿地; 盐碱湿地; 甜菜碱; 优势产甲烷途径; 优势产甲烷菌

资助项目: 国家自然科学基金(31971468, 32070061, 92251302)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31971468, 32070061, 92251302).

*Corresponding authors. E-mail: GAO Dawen, gaodawen@bucea.edu.cn; DONG Xiuzhu, dongxz@im.ac.cn

Received: 2022-11-29; Accepted: 2023-01-20; Published online: 2023-02-20

Predominant methanogenic pathway in the rhizosphere soil of reed in saline-alkaline Zhalong wetland

LI Huiju^{1,2}, LI Lingyan^{3,4}, LIANG Hong^{1,2}, GAO Dawen^{*1,2}, DONG Xiuzhu^{*3,4}

1 Centre for Urban Environmental Remediation, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing 100044, China

2 Beijing Energy Conservation & Sustainable Urban and Rural Development Provincial and Ministry Co-construction Collaboration Innovation Center, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing 100044, China

3 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Reed wetland is one of the main methane emission sources, and methanogenic archaea are the only known organisms producing ample methane. Whereas, the dominant methane-production pathways in the rhizosphere soil of reed in saline-alkali wetland are unknown. [Objective] To reveal the dominant methanogenic pathway in the saline-alkaline Zhalong wetland. [Methods] High-throughput sequencing of 16S rRNA gene was employed to study the diversity of methanogenic archaea and bacteria in the rhizosphere soil (0–20 cm depth) of reed in Zhalong wetland. The known methanogenic substrates including trimethylamine (TMA), methanol, betaine, acetate, and H₂/CO₂ were used to enrich the methanogenic microorganisms in the wetland soil. The methanogenic rate of each microorganism was measured to determine the predominant methanogenic pathway in the rhizosphere soil, and qPCR was employed to quantify the bacterial and archaeal groups and further predict the bacteria and archaea that jointly convert betaine to CH₄. [Results] The dominant methanoarchaea were determined to be the CO₂-reducing *Methanobacterium* (36.42%) and Rice Cluster II (11.55%), the methane anaerobic oxidizer *Candidatus Methanoperedens* (35.06%), the aceticlastic methanogen *Methanosaeta* (11.29%), methylotrophic *Methanosarcina* (6.53%), and the H₂-dependent methylotrophic methanogen *Methanomassiliicoccus* (4.05%). The predominant bacteria were *Chloroflexi* (21.55%), *Proteobacteria* (16.88%), *Actinobacteria* (13.37%), and *Acidobacteria* (10.00%). The highest methane-producing rate was observed in the media with the addition of TMA and betaine. The dominant bacteria reducing betaine to TMA included *Sporomusaceae*, *Sedimentibacteraceae*, *Hungateiclostridiaceae*, and *Clostridiaceae* and the dominant archaea producing CH₄ from TMA included *Methanosarcina* and *Methanomassiliicoccus*. [Conclusion] Methylotrophic methanogenesis based on the TMA from betaine reduction is the dominant methanogenic pathway in the rhizosphere soil of reed in the low-temperature Zhalong wetland.

Keywords: Zhalong wetland; saline-alkaline wetland; betaine; dominant methanogenic pathway; dominant methanogens

甲烷(CH₄)贡献了约 25%的温室效应^[1]。尽管大气中 CH₄ 的含量比 CO₂ 低许多,但其温室效应是 CO₂ 的 28 倍,而且在大气中的寿命只有 12 年,比 CO₂ (300–1 000 年)短很多,因此,控制 CH₄ 排放被认为是控制全球变暖最快和最有效的措施之一^[2]。天然湿地虽然仅占陆地面积的 5%–8%,但储藏了陆地 20%–30%的碳,是甲烷的主要排放源之一^[3]。随着全球变暖,陆地碳有可能成为重要的碳源。湿地的甲烷年排放量估计为 100–200 Tg,相当于全球排放总量的 20%^[4]。

位于黑龙江省西部乌裕尔河下游的扎龙国家级自然保护区的扎龙湿地是典型的内陆盐碱湿地,面积 21 万 hm²,也是世界上最大的芦苇湿地^[5]。扎龙盐碱湿地芦苇根际土的 pH 值为 8.34–8.58^[6]。通常认为中性和碱性湿地的 CH₄ 排放通量显著高于酸性土壤的湿地,如土壤 pH 值为 7.7 的碱性湿地的 CH₄ 平均排放量为 14.81 mg/(m²·h)^[7],而酸性泥炭泽的 CH₄ 平均排放量仅为 0.06 mg/(m²·h)^[8]。Liu 等^[9]测定扎龙湿地的 CH₄ 排放量时发现,不收割芦苇的湿地甲烷排放量是(7.89±1.35) mg/(m²·h),而收割芦苇的湿地甲烷排放只有(2.35±0.55) mg/(m²·h)。全川等^[10]发现芦苇生长季比非生长季的甲烷量高,在芦苇生长期的 8–9 月,湿地的平均 CH₄ 排放量为(10.72±5.10) mg/(m²·h),进入冻结期后显著降低至(3.94±2.25) mg/(m²·h) ($P<0.05$)。Liu 等^[11]发现在表面覆水融化的过程中,扎龙湿地平均的 CH₄ 排放量降至(1.96±2.50) mg/(m²·h)。这些现象说明生长中的芦苇与湿地的甲烷排放有关,但内在原因目前尚未可知。

甲烷古菌是目前已知的唯一产生大量甲烷的生物,它们是严格的厌氧微生物,在无氧的湿地中大量存在。目前已知有 6 条甲烷古菌产甲烷途径:(1) 由氢营养型产甲烷菌以 H₂ 还原

CO₂ 产甲烷的途径^[12];(2) 乙酸营养型产甲烷古菌进行的乙酸裂解产甲烷途径^[13];(3) 由甲基营养型产甲烷古菌将甲醇、甲胺或甲基硫等还原成甲烷的甲基产甲烷途径^[14];(4) H₂ 还原甲基物质产甲烷途径^[15];(5) 苯甲酸代谢产甲烷途径^[16];(6) 长链烷烃代谢产甲烷途径^[17]。Achnich 等^[18]和 Conrad^[19]研究发现低温湿地和水稻田中乙酸产甲烷是优势途径;H₂ 还原 CO₂ 产甲烷途径在中高温和酸性泥炭地中占主导,如热带和温带淡水沉积物^[20–21];而甲基产甲烷途径主要存在海洋中,在淡水环境中少见^[22]。Liu 等^[23]对青藏高原数个低温盐碱湖沉积物的高通量测序显示,乙酸营养型的甲烷鬃菌和甲基营养型的甲烷叶菌占优势。Sorokin 等^[24]对西伯利亚西南部地区盐碱湖产甲烷菌群的调查发现,盐浓度影响产甲烷古菌的分布,当盐浓度低于 3 mol/L 时,乙酸型产甲烷菌甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)占优势;而盐浓度高于 3 mol/L 时,甲基产甲烷古菌占优势,主要由甲烷叶菌属(*Methanolobus*)组成。任秘坊等^[25]前期调查发现植被是影响青藏高原盐碱湖甲烷排放的主要因素。三甲胺产甲烷是海湾沉积物中的优势产甲烷途径,厌氧细菌可还原抗高渗物质甜菜碱或胆碱产生三甲胺,再被甲烷古菌还原为甲烷^[26]。甜菜碱是一种相似相容物质,在细胞中积累有助于提高植物在干旱和盐渍环境中的生长^[27]。Hanson 等^[28]的工作表明,盐芦叶中脯氨酸和甜菜碱的含量较高。扎龙湿地芦苇分布广泛,甜菜碱代谢产甲烷是否是扎龙湿地的优势产甲烷途径有待研究。

本研究以扎龙盐碱湿地的水生芦苇根际土为研究对象,通过 16S rRNA 基因多样性分析、不同底物产甲烷速率分析、RT-qPCR 定量等方法,探究扎龙盐碱湿地的优势产甲烷菌及优势产甲烷途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

研究所用芦苇根际土壤样品采集于我国东北扎龙湿地自然保护区内(N46°52′-47°32′, E123°47′-124°37′), 该区的年平均气温 3.5 °C。采样时间为 2021 年 6 月 9 日, 采样地的平均水位为 19.3 cm, 土壤 pH 8.2-8.6, 采样时空气和土壤平均温度分别为 25.3 °C 和 17.5 °C。使用内径 38 mm 的土钻在每个样方采集原状土壤(深度 0-20 cm), 将 5 个重复样品去除表面的芦苇根叶后等量混合, 装入无菌自封袋中, 4 °C 保存运回实验室, 保藏于-80 °C 备用。

1.1.2 产甲烷培养基

分别以终浓度为 20 mmol/L 的产甲烷底物甲醇(methanol)、三甲胺(trimethylamine, TMA)、甜菜碱(glycine betaine, GBT)、乙酸(acetate)和 1.01×10^5 Pa H_2/CO_2 ($H_2:CO_2$ 体积比为 80:20) 添加到产甲烷基础培养基中, 产甲烷基础培养基参考 Zhang 等^[29] 配制, 并使用 NaCl 和 NaOH 调至与原位环境相同的盐度和 pH, 抽换气去除氧气后 1.01×10^5 Pa 灭菌 20 min, 备用。

1.1.3 主要试剂和仪器

Fast DNA SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 美基生物科技有限公司; *Ex Taq* PCR 体系、pMD19-T Vector, TaKaRa 公司; SYBR[®] qPCR Mix, TOYOBO 公司; 2.0 mL 样品瓶套装, Agilent 公司。PCR 及 RT-qPCR 所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 常规试剂主要购于中国国药集团和上海生物工程技术有限公司。

厌氧操作箱和 NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher 公司; 隔水式恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司; 气相色谱, Shimadzu 公司; 气密

性采样针, 上海佳安分析仪器厂; 多功能样品均质器, Bertin 公司; PCR 扩增仪, 杭州朗基科学仪器公司; 电泳仪, Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Eppendorf 公司。

1.2 芦苇根际土释放甲烷测定

1.2.1 不同底物土样富集物的产甲烷速率测定

在厌氧手套箱中称取 0-20 cm 深扎龙湿地芦苇根际土壤样品各 1 g, 加入到 5 mL 已分别添加终浓度为 20 mmol/L 的甲醇、三甲胺、甜菜碱、乙酸和 H_2/CO_2 (1.01×10^5 Pa, $H_2:CO_2$ 体积比为 80:20) 底物的厌氧产甲烷培养基中, 每种培养物设 4 个平行, 分别于 18 °C 和 30 °C 培养, 使用 50 μ L 进样针准确量取 40 μ L 顶空气体, 用气相色谱仪测定甲烷浓度, 并在甲烷浓度增加的线性范围内计算最大产甲烷速率。

1.2.2 气相色谱仪 GC-14B 测定甲烷

采用配备 C18 极性填充柱和氢焰离子检测器(flame ionization detector, FID)的气相色谱仪测定甲烷。检测条件为: 柱温 50 °C, 进样口温度 80 °C, 检测器温度 130 °C。

1.3 DNA 的提取

称取 0.5 g 芦苇根际土土壤样品, 按照 Fast DNA SPIN Kit for Soil 说明书提取土壤样品基因组 DNA。用 NanoDrop ND-1000 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和纯度, 保存于 -20 °C 待用。

1.4 PCR 扩增及 RT-qPCR 定量分析

1.4.1 PCR 扩增

分别采用古菌的 16S rRNA 基因引物 Arc-F/Arc-R 及细菌的 16S rRNA 基因引物 Bac-27F/Bac-1492R (表 1) 扩增古菌和细菌的 16S rRNA 基因。用表 1 列出的甲烷八叠球菌科(*Methanosarcinaceae*) 特异 16S rRNA 基因引物^[25] 和甲烷马赛球菌科(*Methanomassiliicoccaceae*) 特异的 *mtaB* 基因引物扩增它们的 16S rRNA 基因和 *mtaB* 基因。

表 1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

目的基因	引物名称	引物序列	退火温度	目的
Target gene	Primer name	Sequence (5'→3')	<i>T_m</i> (°C)	Purpose
Archaeal 16S rRNA gene	Arc-F	AGGAATTGGCGGGGAGCAC	53	Amplification of 16S rRNA
	Arc-R	GCCATGCACCWCCTCT		
Bacterial 16S rRNA gene	Bac-27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	48	Amplification of 16S rRNA
	Bac-1492R	GGTTACCTTGTACGACTT		
<i>Methanosarcinaceae</i> 16S rRNA gene	MSC-F	TTAGCAAGGGCCGGGCAA	55	Quantification of <i>Methanosarcinaceae</i> 16S rRNA
	MSC-R	TAGCGARCATCGTTTACG		
<i>Methanomassiliicoccaceae</i> <i>mtaB</i> gene	MtaB-F	GCTGATGCAGAAGTACCRYGA	55	Quantification of 16S rRNA
	MtaB-R	GTADCCRATRCCGAACAGCCA		
Archaeal 16S rRNA V4-V5	Arch-519F	CAGCCGCCGCGGTAA	55	Amplification for Illumina sequencing
	Arch-915R	GTGCTCCCCGCCAATTCCT		
Bacterial 16S rRNA V3-V4	Bac-341F	CCTAYGGGRBGCASCAG	55	Amplification for Illumina sequencing
	Bac-806R	GGACTACNNGGTATCTAAT		

PCR 反应体系(25 μ L): 10 \times *Ex Taq* buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture (2.5 μ mol/L) 1 μ L, *Ex Taq* (5 U/ μ L) 0.25 μ L, Primer F (10 μ mol/L) 1 μ L, Primer R (10 μ mol/L) 1 μ L, 模板(20 ng/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 引物 *T_m* 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增后使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒按照说明书回收目标条带。

1.4.2 T-载体连接及 16S rRNA 基因拷贝数的标准曲线绘制

将胶回收的目标条带纯化回收, 回收后目的片段连接到 pMD19-T 载体并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 抽提阳性单克隆的质粒并线性化作为模板, 稀释模板为 10⁻¹-10⁻⁸, 绘制 RT-qPCR 标准曲线。

1.4.3 RT-qPCR 定量分析

采用表 1 列出的甲烷八叠球菌科 (*Methanosarcinaceae*) 特异 16S rRNA 基因引物

和甲烷马赛球菌科 (*Methanomassiliicoccaceae*) 特异的 *mtaB* 基因引物, RT-qPCR 定量分析它们的 16S rRNA 基因和 *mtaB* 基因拷贝数。RT-qPCR 反应体系(25 μ L): 1 \times SYBR qPCR Mix 12.5 μ L, 50 \times ROX 0.5 μ L, Primer F (10 μ mol/L) 0.5 μ L, Primer R (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 模板(20 ng/ μ L) 5 μ L, ddH₂O 补足 6 μ L。RT-qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 引物 *T_m* 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环。

1.5 细菌和古菌 16S rRNA 基因测序

提取样品基因组 DNA, 检验浓度和纯度确保符合实验要求。PCR 扩增样品基因组 DNA 中细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区和古菌 16S rRNA 基因的 V4-V5 区, 细菌的引物为 Bac-341F/Bac-806R, 古菌的引物为 Arch-519F/Arch-915R (表 1)。PCR 反应体系(20 μ L): 5 \times *FastPfu* buffer 4 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 上、下游引物(5 μ mol/L)各 0.8 μ L, *FastPfu* Polymerase (2.5 U/ μ L) 0.4 μ L, 模板 DNA

(10 ng/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s; 引物 *T_m* 退火 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增、高通量测序均由上海凌恩生物科技有限公司在 Illumina 平台进行 PE250 模式建库测序完成。

1.6 统计分析

使用 Excel 进行数据的统计分析, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行图片绘制。

2 结果与分析

2.1 扎龙湿地原位土壤中的优势产甲烷古菌和细菌组成

对扎龙湿地芦苇根际深 0–20 cm 的土壤进行 16S rRNA 基因扩增子测序和 OTU 聚类分析, 共检测到 3 786 个古菌的 OTU, 已知分类地位的古菌科占测定总古菌的 81.70%。图 1 为不同产甲烷古菌科的丰度堆积图, 其中氢营养型的甲烷杆菌科 (*Methanobacteriaceae*, 32.8%) 丰度最高, 其次是厌氧氧化甲烷的噬甲烷菌科 (*Methanoperedenaceae*, 31.52%)、氢营养型的 Rice Cluster II (11.55%)、乙酸型的甲烷鬃菌科 (*Methanosaetaceae*, 10.14%)、甲基型的甲烷八叠球菌科 (*Methanosarcinaceae*, 5.88%) 及 H₂ 还原甲基物质产甲烷的甲烷马赛球菌科 (*Methanomassiliococcaceae*, 3.64%) (图 1A)。共检测到产甲烷古菌属 25 个, 相对丰度最高的是氢营养型的甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*, 36.42%), 其次为厌氧氧化甲烷的噬甲烷菌属 (*Candidatus Methanoperedens*, 35.06%)、乙酸型的甲烷鬃菌属 (*Methanosaeta*, 11.29%)、甲基型的甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*, 6.53%) 及 H₂ 还原甲基型的甲烷马赛球菌属 (*Methanomassiliococcus*, 4.05%) (图 1A)。

16S rRNA 基因多样性分析共检测到 6 523 个细菌的 OTU, 已知分类地位的细菌门占检测到

的芦苇根际土总细菌的 64.31%。优势细菌是绿弯菌门 (*Chloroflexi*, 21.55%), 其次为变形杆菌门 (*Proteobacteria*, 16.88%)、放线菌门 (*Actinobacteria*, 13.37%)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*, 10.00%)、拟杆菌门 (*Bacteroidota*, 7.42%)、脱硫杆菌门 (*Desulfobacterota*, 7.77%) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*, 5.18%) (图 1B)。已知高盐环境中的芦苇细胞积累甜菜碱和脯氨酸抗高渗胁迫^[27-28], 而厚壁菌门中的一些细菌可还原甜菜碱为三甲胺, 后者可被甲基型的甲烷古菌转化为甲烷^[30]。因此我们进一步分析厚壁菌门的细菌类群, 结果发现具有还原甜菜碱产三甲胺潜力的细菌包括梭菌科 (*Clostridiaceae*, 46.19%)、真杆菌科 (*Eubacteriaceae*, 3.12%) 和鼠胞菌科 (*Sporomusaceae*, 1.36%) (图 1B)。

综上所述, 扎龙湿地芦苇根际土的优势产甲烷古菌为氢营养型的甲烷杆菌、乙酸型的甲烷鬃菌及乙酸/甲基型的甲烷八叠球菌, 并含有与还原甜菜碱产三甲胺能力的细菌相似性较高的菌群, 如厚壁菌门内的梭菌科、真杆菌科和鼠胞菌科, 它们具有还原甜菜碱产生三甲胺的潜力, 后者可被甲基型产甲烷古菌转化为甲烷。

2.2 扎龙湿地芦苇根际土中甜菜碱和三甲胺产甲烷最活跃

为进一步确定扎龙湿地芦苇根际土中活跃的产甲烷途径, 我们在芦苇根际土壤样品中分别加入已知的产甲烷底物甲醇、三甲胺、甜菜碱、乙酸和 H₂/CO₂, 并在模拟原位环境 pH 8.0 于 18 °C 和 30 °C 培养 4 周; 每 2 天测定富集物的产甲烷量, 计算扎龙湿地土壤不同底物的产甲烷速率。结果显示, 甜菜碱和三甲胺的土壤富集物产甲烷速率最高, 而 H₂/CO₂ 富集物的产甲烷速率与无底物添加土壤的产甲烷速率相同 (图 2)。这说明甜菜碱和三甲胺产甲烷是扎龙湿

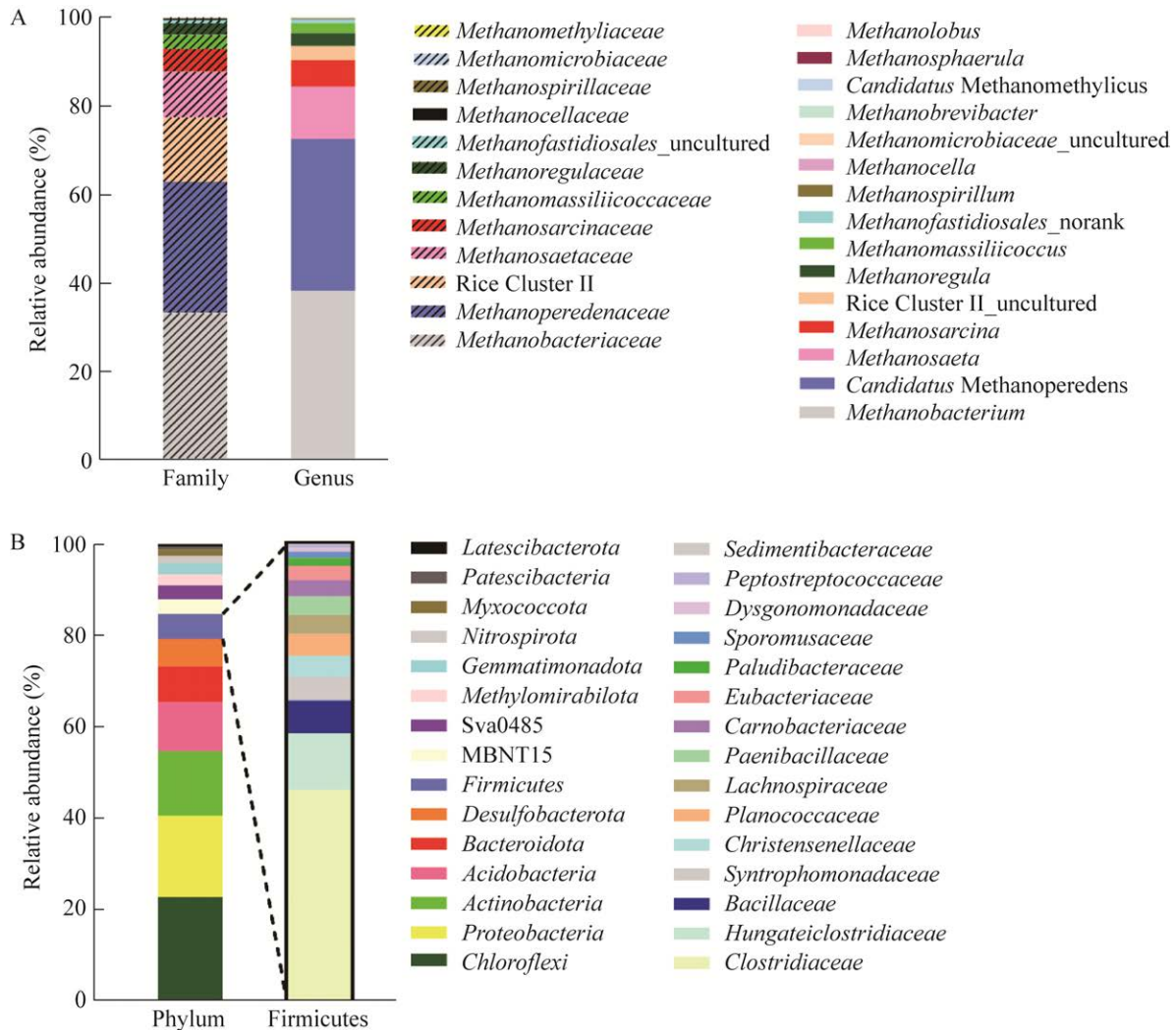


图 1 扎龙湿地芦苇根际土中产甲烷古菌(A)及细菌(B)的相对丰度

Figure 1 Relative abundances of methanogenic archaea (A) and bacteria (B) in the reed rhizosphere of Zhalong wetland.

地芦苇根际土中主要的产甲烷途径，甲醇和乙酸产甲烷途径的活力中等。尽管 16S rRNA 基因序列分析显示氢营养型的甲烷杆菌相对含量最高，但 H_2 还原 CO_2 产甲烷途径的活力很低，说明这些古菌在湿地中并不活跃。

由于扎龙湿地常年处于低温，我们进一步分析该湿地是否存在耐低温的产甲烷途径。通过比较 18 °C 和 30 °C 不同富集物的产甲烷速率，发现

18 °C 的也是三甲胺 [2.89 mmol $CH_4/(L \cdot d \cdot g \cdot soil)$] 和甜菜碱 [1.64 mmol $CH_4/(L \cdot d \cdot g \cdot soil)$] 产甲烷速率最高，但比 30 °C 同样富集物的产甲烷速率 [三甲胺: 3.14 mmol $CH_4/(L \cdot d \cdot g \cdot soil)$; 甜菜碱: 3.44 mmol $CH_4/(L \cdot d \cdot g \cdot soil)$] 低，其中甜菜碱的产甲烷速率约为 30 °C 同样富集物的 1/2。而且比较 2 个温度下富集物开始产甲烷时间发现，18 °C 的富集物在培养 10 d 后才开始产甲烷(图 2B)，而

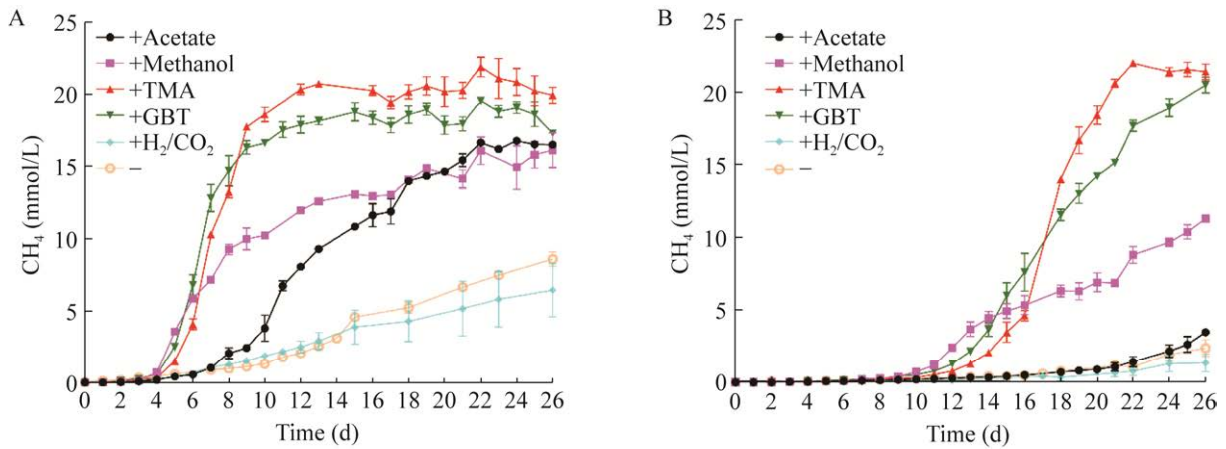


图 2 扎龙湿地芦苇根际土样品在 30 °C (A)和 18 °C (B)时不同底物培养的产甲烷速率

Figure 2 Methane production of the Zhalong wetland soil enrichments with different substrates at 30 °C (A) and 18 °C (B).

30 °C的培养物在 4 d 时即开始产甲烷(图 2B), 但 18 °C的富集物在 26 d 时的产甲烷量与 30 °C的相当。这说明湿地土中可能存在耐低温的甲基产甲烷菌。

2.3 富集到扎龙湿地的优势甲基产甲烷古菌和还原甜菜碱的细菌

为分析甲基型产甲烷古菌及还原甜菜碱的细菌菌群, 我们提取 30 °C厌氧培养 26 d 的三甲胺、甜菜碱和甲醇富集物的 DNA, 测定其 16S rRNA 基因扩增子的序列。结果鉴定了 388 个古菌的 OTU 和 383 个细菌的 OTU。三甲胺、甜菜碱和甲醇富集物中已知分类地位的古菌科分别占测定总古菌的 98.22%、92.30%和 91.55%; 已知分类地位的细菌门分别占测定总细菌的 44.51%、45.2%和 86.19%。图 3 和图 4 分别为产甲烷古菌科和属、细菌科和属的组成及其相对丰度。与原位土壤相比, 三甲胺富集物中甲基型的甲烷八叠球菌科(*Methanosarcinaceae*)和 H₂ 还原甲基型的甲烷马赛球菌科(*Methanomassiliicoccaceae*)显著富集, 分别提高 6.7 倍和 2.7 倍, 甜菜碱富集物中分别提高 4.4 倍和 2.4 倍, 甲醇富集物中分别提高 4.8 倍和 1.8 倍(图 3A); 甲烷八叠球菌属在

三甲胺、甜菜碱和甲醇富集物中分别提高了 13.7、11.9 和 12.8 倍(图 3B)。上述结果说明扎龙湿地芦苇根际土中主要的甲基产甲烷古菌包含甲烷八叠球菌属和甲烷马赛球菌科。

16S rRNA 基因多样性及相对丰度分析发现, 湿地土壤的甜菜碱富集物中的细菌以厚壁菌门(*Fimicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidota*)为主, 分别占 63.93%和 27.89%; 厚壁菌门中的鼠胞菌科(*Sporomusaceae*)、沉积杆菌科(*Sedimentibacteraceae*)和亨盖特梭菌科(*Hungateiclostridiaceae*)比原位湿地分别提高了 173、308 和 187 倍(图 4); 而梭菌科(*Clostridiaceae*)和真杆菌科(*Eubacteriaceae*)丰度分别比原位土提高了 1.4 倍和 1.5 倍, 暗示它们可能是代谢甜菜碱的主要细菌, 还原甜菜碱产生三甲胺, 提供产甲烷的底物。对富集物的宏基因组分析也发现, 细菌代谢甜菜碱的相关功能基因 *grdH* 和产甲烷菌代谢三甲胺的功能基因 *mttB* 丰度均提高(未展示结果)。

2.4 定量分析甲基物质富集的优势产甲烷古菌

16S rRNA 基因序列分析表明, 扎龙湿地甲

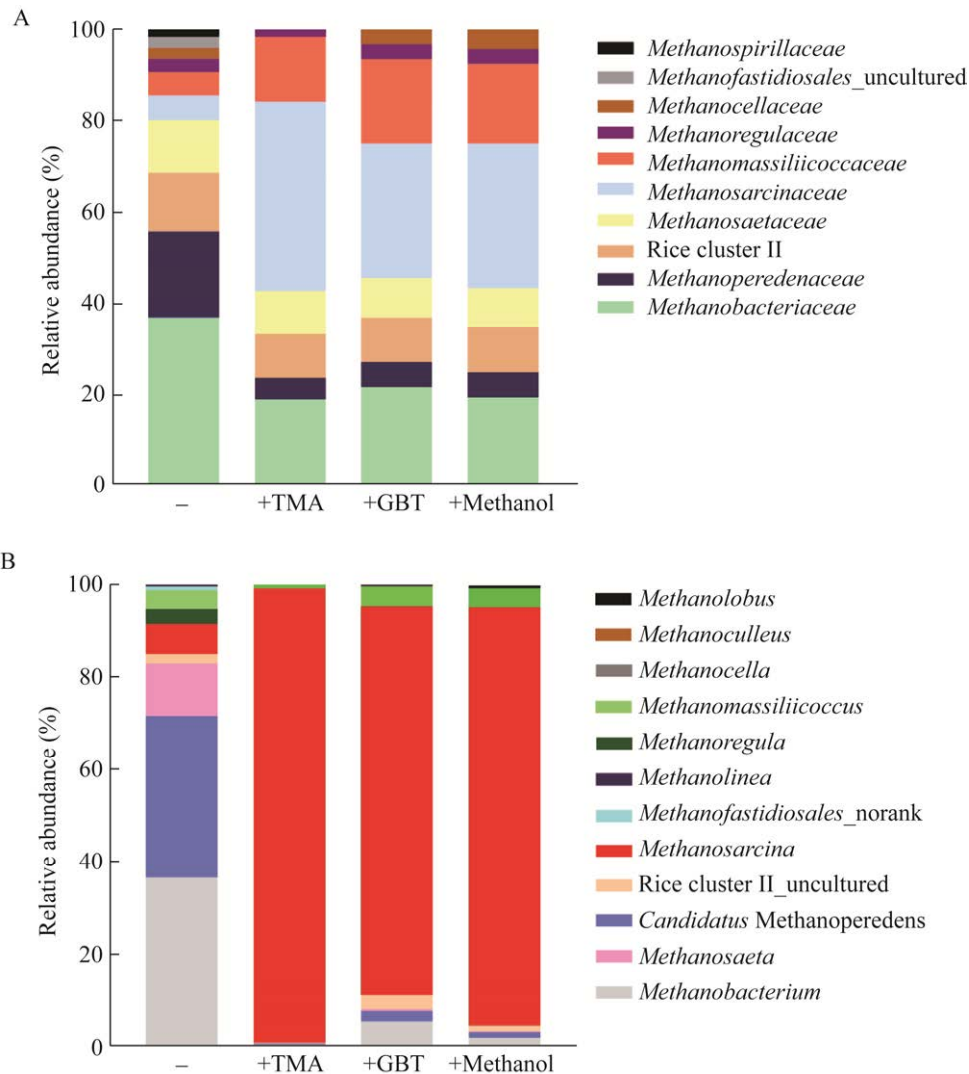


图3 甲基物质 30 °C富集的扎龙湿地土壤样品中的产甲烷古菌相对丰度 A: 产甲烷古菌科. B: 产甲烷古菌属

Figure 3 Relative abundances of the methanogenic in the methyl substance-enriched Zhalong wetland at 30 °C. A: Compositions of methanogenic archaea at family taxonomic ranks. B: Compositions of methanogenic archaea at genera taxonomic ranks.

基物质富集物中的优势产甲烷古菌为甲烷八叠球菌和甲烷马赛球菌,为了确定这两类古菌被富集,我们采用 RT-qPCR 方法,定量分析了甲烷八叠球菌特异的 16S rRNA 基因和甲烷马赛球菌特异的甲基转移酶基因 *mtaB*。结果发现,产甲烷八叠球菌科在三甲胺富集物(1.02×10^8 copies/g)

中比在原位土壤(9.02×10^6 copies/g)提高了 10.27 倍,在甜菜碱富集物(6.90×10^7 copies/g)中提高了 6.8 倍,在甲醇富集物(5.24×10^7 copies/g)中提高了 6.64 倍(图 5A)。同样,甲烷马赛球菌科在甜菜碱富集物中(1.64×10^7 copies/g)比原位土壤(1×10^6 copies/g)提高了 13.39 倍,在甲醇

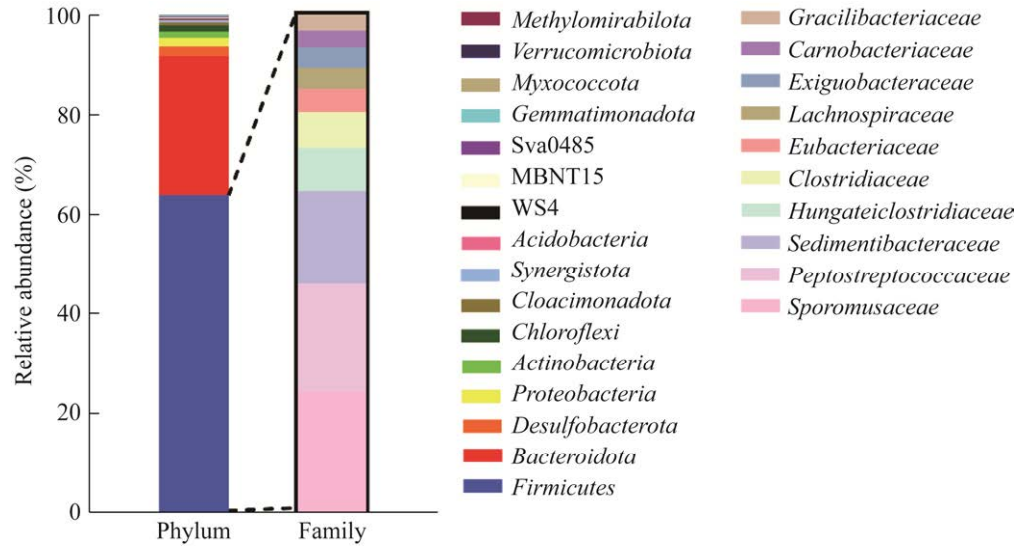


图 4 扎龙湿地土壤样品的甜菜碱 30 °C富集物中细菌相对丰度 Phylum: 细菌门; Family: 厚壁菌门中细菌科

Figure 4 Relative abundances of bacteria in the betaine substance-enriched Zhalong wetland soil at 30 °C. Phylum: Bacterial phyla composition; Family: *Firmicutes*.

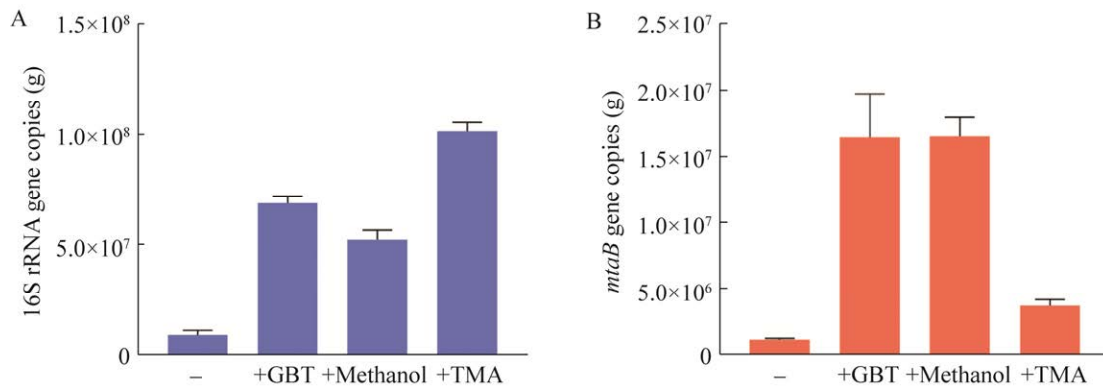


图 5 RT-qPCR 定量甲基物质富集的扎龙芦苇土壤优势产甲烷古菌 A: 甲烷八叠球菌科. B: 甲烷马赛球菌科

Figure 5 Quantification of methylotrophic methanogens of the betaine substance-enriched Zhalong wetland soil. A: RT-qPCR was used to quantify *Methanosarcinaceae* specific 16S rRNA gene. B: RT-qPCR was used to quantify *Methanomassiliicoccaceae* specific 16S rRNA gene.

(1.65×10^7 copies/g)和三甲胺富集物(3.72×10^6 copies/g)中分别提高了 13.34 倍和 2.25 倍(图 5B)。进一步证明湿地土壤中从三甲胺产甲烷的优势菌为甲烷八叠球菌,甲烷马赛球菌也发挥重要作用。

3 讨论与结论

Liu 等^[9]研究发现芦苇收割是影响扎龙低温高碱湿地甲烷排放的主要因素,不收割芦苇的湿地甲烷排放量高达(7.89 ± 1.35) mg/(m²·h)。

我们通过 16S rRNA 基因扩增子测序发现, 扎龙湿地芦苇根际土的优势产甲烷古菌是甲烷杆菌、噬甲烷菌、甲烷鬃菌、甲烷八叠球菌和甲烷马赛球菌, 优势细菌为绿弯菌门、变形菌门、酸杆菌门和拟杆菌门。通过富集实验发现甜菜碱来源的三甲胺产甲烷途径是扎龙湿地芦苇根际土的优势产甲烷途径, 其中代谢甜菜碱的优势细菌为厚壁菌门的鼠胞菌科、沉积杆菌科和亨盖特梭菌科。RT-qPCR 定量分析表明, 代谢三甲胺的优势产甲烷古菌是甲基营养型的甲烷八叠球菌和 H_2 还原甲基物质的甲烷马赛球菌。

与海洋及滨海盐沼湿地相似, 扎龙湿地高盐环境中的甲基物质是三甲胺, 其主要来自于细菌转化抗高渗物质甜菜碱或胆碱产生, 被产甲烷古菌进一步代谢产甲烷^[26]。甜菜碱是一种相似相容物质, 能稳定细胞结构, 保持酶、蛋白质复合物的活性和细胞膜的完整性, 因此帮助细胞抵御环境中的盐碱、高低温胁迫^[31]。生活在高盐环境的一些生物细胞中的甜菜碱浓度可高达 1 mol/L ^[32]。Jameson 等^[33]通过对滨海盐沼沉积物 16S rRNA 基因多样性分析和碳同位素示踪技术及宏基因组学分析发现, 暗杆菌 (*Pelobacter*) 和甲烷拟球菌 (*Methanococcoides*) 协同代谢胆碱产甲烷。另外, 未获得纯培养的甜菜碱菌科 *Ca. "Betainaceae"* 可代谢甜菜碱产生三甲胺^[34]。

与其他盐碱生境不同, 扎龙低温湿地的优势甲基产甲烷古菌主要为甲烷八叠球菌和甲烷马赛球菌, 而海洋中主要的甲基产甲烷古菌为甲烷拟球菌^[31]。扎龙低温湿地中代谢甜菜碱产生三甲胺的优势细菌为厚壁菌门的鼠胞菌科和梭菌科, 这与海洋生境中代谢甜菜碱的优势细菌为梭菌科较为相似, 暗示梭菌科中代谢甜菜碱产生三甲胺的细菌具有生态分布的广泛性。扎龙湿地最热的 7 月平均温度为 $22.9 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[35], 我

们通过不同温度富集实验发现, 扎龙湿地代谢三甲胺产甲烷古菌为耐低温产甲烷古菌, 扎龙湿地代谢甜菜碱产甲烷主要发生在芦苇生长季, 在寒冷的非生长季代谢甜菜碱产三甲胺的细菌活力降低, 导致甲烷排放减少。黄璞祎等^[36]研究了扎龙湿地生长季甲烷通量, 观测期内平均甲烷通量为 $7.67 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$, 估计扎龙芦苇湿地每年生长季向大气释放 $3.88 \times 10^5 \text{ t}$ 甲烷。而 Liu 等^[9]研究发现在芦苇生长期 8–9 月, 平均甲烷排放量为 $(10.72 \pm 5.10) \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$, 进入冻结期降低至 $(3.94 \pm 2.25) \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$; 在湿地表面覆水融化的过程中, 扎龙湿地土壤平均原位甲烷排放通量继续降低至 $(1.96 \pm 2.50) \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 。

甲烷厌氧氧化 (anaerobic oxidation of methane, AOM) 是缺氧环境中甲烷营养古菌的生物学过程^[33], 不同的生态系统中, 甲烷营养古菌利用不同的电子受体氧化甲烷^[37–39]; Timmers 等^[40]发现海洋中厌氧甲烷氧化古菌 (anaerobic methanotrophic archaea, ANMEs) 和硫酸盐还原菌 (sulfate-reducing bacteria, SRB) 协同降解甲烷, 后来发现也能以硝酸盐为电子受体厌氧氧化甲烷^[41]。Haroon 等^[42]报道了淡水环境中的 *Ca. Methanoperedens nitroreducens* 和 *Methylomirabilis oxyfera* 介导的耦联硝酸盐还原的甲烷厌氧氧化。Chen 等^[37]发现青藏高原若尔盖湿地中含有 *Ca. Methanoperedens*。本研究也发现扎龙低温盐碱湿地存在丰富的 *Ca. Methanoperedens*, 可能是芦苇根际土产生的大量甲烷为其提供充足的底物。铁是地壳中分布含量第二高的金属, 以三价铁为电子受体的甲烷厌氧氧化广泛存在。前期研究测得扎龙湿地土壤中硝酸盐含量 $0.09–0.25 \text{ mg/kg}$, 总铁元素含量约为 $6.494–28.256 \text{ mg/kg}$ ^[43], 因此扎龙湿地也可能存在偶联三价铁还原的甲烷厌氧氧化过程, 但不排除偶联硝酸盐还原的厌氧甲烷氧化过程。

综上所述, 本研究证明扎龙盐碱湿地芦苇根际土中的三甲胺产甲烷是优势途径, 三甲胺来自细菌转化生物抗高渗的甜菜碱, 优势的产甲烷古菌是甲烷八叠球菌和甲烷马赛球菌。

REFERENCES

- [1] FENG X, JIANG L, LI D, TIAN S, ZHU X, WANG H, HE C, LI K. Progress and key challenges in catalytic combustion of lean methane[J]. *Journal of Energy Chemistry*, 2022, 75: 173-215.
- [2] ALEXANDER L, ALLEN S, BINDOFF N, BREON FM, CHURCH J, CUBASCH U, EMORI S, FORSTER P, FRIEDLINGSTEIN P, GILLETT N, GREGORY J, HARTMANN D, JANSEN E, KIRTMAN B, KNUTTI R, KANIKICHARLA K, LEMKE P, MAROTZKE J, MASSON-DELMOTTE V, XIE SP. Climate Change 2013: the Physical Science Basis, in Contribution of Working Group I (WGI) to the Fifth Assessment Report (AR5) of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)[M]. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, Cambridge University Press, 2013.
- [3] HERNÁNDEZ ME, MARÍN-MUNIZ JL, OLGUÍN EJ. Effect of flooding frequency and nutrient addition on plant growth and total petroleum hydrocarbons removal in mangrove microcosms[J]. *Journal of Water Resource and Protection*, 2014, 6(18): 1716-1730.
- [4] MATTHEWS E, FUNG I. Methane emission from natural wetlands: global distribution, area, and environmental characteristics of sources[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 1987, 1(1): 61-86.
- [5] 秦喜文, 张树清, 李晓峰, 那晓东, 潘欣. 扎龙国家级自然保护区丹顶鹤巢址的空间分布格局分析[J]. *湿地科学*, 2009, 7(2): 106-111.
QIN XW, ZHANG SQ, LI XF, NA XD, PAN X. Spatial pattern of nest-site of *Grus japonensis* in Zhalong National Nature Reserve[J]. *Wetland Science*, 2009, 7(2): 106-111 (in Chinese).
- [6] 陈泓硕, 马大龙, 姜雪薇, 刘梦洋, 臧淑英. 季节性冻融对扎龙湿地土壤微生物群落结构和胞外酶活性的影响[J]. *环境科学学报*, 2020, 40(4): 1443-1451.
CHEN HS, MA DL, JIANG XW, LIU MY, ZANG SY. Effects of seasonal freeze-thaw on soil microbial community structures and extracellular enzyme activities in Zhalong wetland[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2020, 40(4): 1443-1451 (in Chinese).
- [7] 周文昌, 崔丽娟, 王义飞, 李伟, 康晓明. 2014 年若尔盖泥炭沼泽中草丘和洼地 CO₂ 和 CH₄ 排放通量[J]. *湿地科学*, 2018, 16(6): 693-699.
ZHOU WC, CUI LJ, WANG YF, LI W, KANG XM. CO₂ and CH₄ emission fluxes from hummock and hollow in Fen in zoigê plateau in 2014[J]. *Wetland Science*, 2018, 16(6): 693-699 (in Chinese).
- [8] HAYES DJ, KICKLIGHTER DW, DAVID MCGUIRE A, CHEN M, ZHUANG QL, YUAN FM, MELILLO JM, WULLSCHLEGER SD. The impacts of recent permafrost thaw on land-atmosphere greenhouse gas exchange[J]. *Environmental Research Letters*, 2014, 9(4): 045005.
- [9] LIU FQ, ZHANG YP, LIANG H, GAO DW. Long-term harvesting of reeds affects greenhouse gas emissions and microbial functional genes in alkaline wetlands[J]. *Water Research*, 2019, 164: 114936.
- [10] 全川, 曾从盛, 王维奇, 闫宗平, 杨红玉. 闽江河口芦苇潮汐湿地甲烷通量及主要影响因子[J]. *环境科学学报*, 2009, 29(1): 207-216.
TONG C, ZENG CS, WANG WQ, YAN ZP, YANG HY. Main factors influencing CH₄ flux from a *Phragmites australis* wetland in the Min River Estuary[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(1): 207-216 (in Chinese).
- [11] LIU FQ, ZHANG YP, LIANG H, GAO DW. Resilience of methane cycle and microbial functional genes to drought and flood in an alkaline wetland: a metagenomic analysis[J]. *Chemosphere*, 2021, 265: 129034.
- [12] LEADBETTER JR, BREZNAK JA. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62(10): 3620-3631.
- [13] FERRY JG. Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, 23(1): 13-38.
- [14] BRÄUER SL, BASILIKO N, SILJANEN HMP, ZINDER SH. Methanogenic archaea in peatlands[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2020, 367(20): fnaa172.
- [15] LANG K, SCHULDES J, KLINGL A, POEHLIN A, DANIEL R, BRUNEA A. New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of "*Candidatus methanoplasma termitum*"[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(4): 1338-1352.

- [16] MAYUMI D, MOCHIMARU H, TAMAKI H, YAMAMOTO K, YOSHIOKA H, SUZUKI Y, KAMAGATA Y, SAKATA S. Methane production from coal by a single methanogen[J]. *Science*, 2016, 354(6309): 222-225.
- [17] ZHOU Z, ZHANG CJ, LIU PF, FU L, LASO-PÉREZ R, YANG L, BAI LP, LI J, YANG M, LIN JZ, WANG WD, WEGENER G, LI M, CHENG L. Non-syntrophic methanogenic hydrocarbon degradation by an archaeal species[J]. *Nature*, 2022, 601(7892): 257-262.
- [18] ACHTNICH C, SCHUHMANN A, WIND T, CONRAD R. Role of interspecies H₂ transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 16(1): 61-69.
- [19] CONRAD R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 28(3): 193-202.
- [20] CONRAD R, JI Y, NOLL M, KLOSE M, CLAUS P, ENRICH-PRAST A. Response of the methanogenic microbial communities in Amazonian oxbow lake sediments to desiccation stress[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(6): 1682-1694.
- [21] METJE M, FRENZEL P. Effect of temperature on anaerobic ethanol oxidation and methanogenesis in acidic peat from a northern wetland[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8191-8200.
- [22] LOVLEY DR, KLUG MJ. Methanogenesis from methanol and methylamines and acetogenesis from hydrogen and carbon dioxide in the sediments of a eutrophic lake[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45(4): 1310-1315.
- [23] LIU YQ, YAO TD, GLEIXNER G, CLAUS P, CONRAD R. Methanogenic pathways, ¹³C isotope fractionation, and archaeal community composition in lake sediments and wetland soils on the Tibetan Plateau[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2013, 118(2): 650-664.
- [24] SOROKIN DY, ABBAS B, GELEIJNSE M, PIMENOV NV, SUKHACHEVA MV, van LOOSDRECHT MCM. Methanogenesis at extremely haloalkaline conditions in the soda lakes of Kulunda Steppe (Altai, Russia)[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(4): fiv016.
- [25] 任秘坊, 李凌燕, 陈琳, 邢婷婷, 刘勇勤, 东秀珠. 青藏高原三个盐碱湖的产甲烷菌群和产甲烷代谢途径分析[J]. *微生物学报*, 2020, 60(1): 161-171.
- REN MF, LI LY, CHEN L, XING TT, LIU YQ, DONG XZ. Methanogen communities and predominant methanogenic pathways in three saline-alkaline lakes on the Tibetan Plateau[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(1): 161-171 (in Chinese).
- [26] KING GM. Metabolism of trimethylamine, choline, and glycine betaine by sulfate-reducing and methanogenic bacteria in marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48(4): 719-725.
- [27] RHODES D, HANSON AD. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1993, 44: 357-384.
- [28] HANSON AD, WYSE R. Biosynthesis, translocation, and accumulation of betaine in sugar beet and its progenitors in relation to salinity[J]. *Plant Physiology*, 1982, 70(4): 1191-1198.
- [29] ZHANG GS, JIANG N, LIU XL, DONG XZ. Methanogenesis from methanol at low temperatures by a novel psychrophilic methanogen, *Methanobolus psychrophilus* sp. nov., prevalent in Zoige wetland of the Tibetan Plateau[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(19): 6114-6120.
- [30] FENNEMA D, PHILLIPS IR, SHEPHARD EA. Trimethylamine and trimethylamine N-oxide, a flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3)-mediated host-microbiome metabolic axis implicated in health and disease[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2016, 44(11): 1839-1850.
- [31] WADITEE R, TANAKA Y, AOKI K, HIBINO T, JIKUYA H, TAKANO J, TAKABE T, TAKABE T. Isolation and functional characterization of *N*-methyltransferases that catalyze betaine synthesis from *Glycine* in a halotolerant photosynthetic organism *Aphanothece halophytica*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(7): 4932-4942.
- [32] OREN A. Formation and breakdown of glycine betaine and trimethylamine in hypersaline environments[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1990, 58(4): 291-298.
- [33] JAMESON E, STEPHENSON J, JONES H, MILLARD A, KASTER AK, PURDY KJ, AIRS R, MURRELL JC, CHEN Y. Deltaproteobacteria (*Pelobacter*) and *Methanococcoides* are responsible for choline-dependent methanogenesis in a coastal saltmarsh sediment[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(2): 277-289.
- [34] JONES HJ, KRÖBER E, STEPHENSON J, MAUSZ MA, JAMESON E, MILLARD A, PURDY KJ, CHEN Y. A new family of uncultivated bacteria involved in

- methanogenesis from the ubiquitous osmolyte glycine betaine in coastal saltmarsh sediments[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 120.
- [35] 焦德志, 闫秋月, 姜秋旭, 曹瑞, 杨允菲. 黑龙江扎龙湿地芦苇种群构件数量特征及其相关性[J]. *生态学杂志*, 2018, 37(7): 1983-1989.
- JIAO DZ, YAN QY, JIANG QX, CAO R, YANG YF. E quantitative characteristics and interrelation of module of *Phragmites australis* popula-in Zhalong Wetland in Heilongjiang[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(7): 1983-1989 (in Chinese).
- [36] 黄璞祎, 于洪贤, 柴龙会, 柴方营, 张万峰. 扎龙芦苇湿地生长季的甲烷排放通量[J]. *应用生态学报*, 2011, 22(5): 1219-1224.
- HUANG PY, YU HX, CHAI LH, CHAI FY, ZHANG WF. Methane emission flux of Zhalong *Phragmites australis* wetlands in growth season[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(5): 1219-1224 (in Chinese).
- [37] CHEN L, LI LY, ZHANG SJ, ZHANG WT, XUE K, WANG YF, DONG XZ. Anaerobic methane oxidation linked to Fe(III) reduction in a *Candidatus Methanoperedens*-enriched consortium from the cold Zoige wetland at Tibetan Plateau[J]. *Environmental Microbiology*, 2022, 24(2): 614-625.
- [38] GUPTA V, SMEMO KA, YAVITT JB, FOWLE D, BRANFIREUN B, BASILIKO N. Stable isotopes reveal widespread anaerobic methane oxidation across latitude and peatland type[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(15): 8273-8279.
- [39] McGLYNN SE, CHADWICK GL, KEMPES CP, ORPHAN VJ. Single cell activity reveals direct electron transfer in methanotrophic consortia[J]. *Nature*, 2015, 526(7574): 531-535.
- [40] TIMMERS PH, SUAREZ-ZULUAGA DA, van ROSSEM M, DIENDER M, STAMS AJ, PLUGGE CM. Anaerobic oxidation of methane associated with sulfate reduction in a natural freshwater gas source[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(6): 1400-1412.
- [41] WEGENER G, KRUKENBERG V, RIEDEL D, TEGETMEYER HE, BOETIUS A. Intercellular wiring enables electron transfer between methanotrophic Archaea and bacteria[J]. *Nature*, 2015, 526(7574): 587-590.
- [42] HAROON MF, HU SH, SHI Y, IMELFORT M, KELLER J, HUGENHOLTZ P, YUAN ZG, TYSON GW. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage[J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 567-570.
- [43] 金忠民, 郝宇, 刘丽杰, 张艳馥, 朱坤, 李丹. 扎龙湿地土壤重金属对土壤化学性质和电导率的影响[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(8): 333-336.
- JIN ZM, HAO Y, LIU LJ, ZHANG YF, ZHU K, LI D. Effects of heavy metals in Zhalong wetland soil on soil chemical properties and electrical conductivity[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43(8): 333-336 (in Chinese).