

# 淡水生态系统中反硝化型厌氧甲烷氧化微生物的研究进展\*

王瑞飞<sup>1,2</sup> 王亚利<sup>1</sup> 杨清香<sup>1,2#</sup>

(1.河南师范大学生命科学学院,河南 新乡 453007;

2.资源微生物与功能分子河南省高校重点实验室培育基地,河南 新乡 453007)

**摘要** 反硝化型厌氧甲烷氧化(DAMO)是在淡水生态系统中发现的一种全新的厌氧甲烷氧化途径,偶联了全球碳循环和氮循环,与 NC10 门细菌、DAMO 古菌及厌氧氨氧化菌密切相关。首先介绍 DAMO 途径在淡水生态系统中的发现及其功能微生物。其次,重点阐述 DAMO 功能微生物在湖泊、湿地和河流等淡水环境中的研究进展,并对聚合酶链式反应(PCR)、荧光原位杂交(FISH)及高通量测序技术在 DAMO 功能微生物检测中的应用及发展进行总结与分析。最后,展望 DAMO 在淡水生态系统中的研究前景。

**关键词** 反硝化型厌氧甲烷氧化 NC10 门细菌 厌氧氨氧化菌 反硝化型厌氧甲烷氧化古菌

DOI:10.15985/j.cnki.1001-3865.2018.12.023

**Research progress of denitrifying anaerobic methane oxidation microbes in freshwater ecosystems** WANG Ruifei<sup>1,2</sup>, WANG Yali<sup>1</sup>, YANG Qingxiang<sup>1,2</sup>. (1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang Henan 453007; 2. Key Laboratory for Microorganisms and Functional Molecules (Henan Normal University), University of Henan Province, Xinxiang Henan 453007)

**Abstract:** Denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) as a novel pathway of anaerobic methane connects the global carbon and nitrogen cycles in freshwater ecosystems. It has intimate relationships with NC10 bacteria, DAMO archaea and anaerobic ammonium oxidation bacteria. The discovery of DAMO and its relating functional microbes were introduced in this paper, and the research progress of DAMO functional microbes in various freshwater ecosystems was reviewed. Then, the application and development of polymerase chain reaction (PCR), fluorescent in situ hybridization (FISH) and high-throughput sequencing technology in the detection of DAMO functional microbes were analyzed and summarized. Finally, the prospects of further research of DAMO in freshwater environments were discussed.

**Keywords:** DAMO; NC10 bacteria; anaerobic ammonium oxidation bacteria; DAMO archaea

甲烷不仅是最简单的碳氢化合物,而且是仅次于二氧化碳的第二大温室效应气体,其作用大约是等摩尔二氧化碳的 15~30 倍<sup>[1]</sup>。海洋沉积层每年产生高达 0.85 亿~3.00 亿 t 的甲烷,约占全球甲烷产生总量的 30%,但是,其对大气甲烷的贡献仅为 2%。已有研究证明,海洋沉积层产生的绝大部分甲烷在缺氧层中被厌氧甲烷氧化古菌和硫酸盐还原细菌共同介导的以硫酸盐为电子受体的厌氧甲烷氧化途径所消耗<sup>[2]</sup>。早在 1977 年,已有科学家根据化学热力学反应推测硝酸根和亚硝酸根作为电子受体推动厌氧甲烷氧化比硫酸根更具优势,且这种反硝化型厌氧甲烷氧化(DAMO)途径应该更倾向于发生在硝酸盐浓度远高于硫酸盐的淡水水体<sup>[3]</sup>。但是,淡

水环境中存在有氧和缺氧转换带在空间上极为接近,这使厌氧甲烷氧化很可能被好氧甲烷氧化所掩盖<sup>[4]18273</sup>。除此之外,执行 DAMO 所需的严格厌氧条件也极大限制了相应微生物的富集培养。因此,DAMO 被提出后,并未获得相应实验数据的支撑。直至 2006 年,RAGHOEBARSING 等<sup>[5]920</sup>才首次利用厌氧反应器证实 DAMO 在淡水运河底泥富集物中的存在。

由于有效偶联了地球两大营养循环——碳循环和氮循环,DAMO 及其功能微生物的存在一经证实就引起国内外许多研究者的关注。以 DAMO 作为关键词,在 Google scholar 中检索的结果显示,2006—2017 年共有 213 条记录,其中 2012—2017

第一作者:王瑞飞,男,1983 年生,博士,讲师,主要从事资源与环境微生物学研究。# 通讯作者。

\* 国家自然科学基金资助项目(No.U1504301, No.21477035);河南省高等学校重点科研项目(No.15A180016)。

年有194条,占总数的91.07%;在中国知网检索的结果显示,2006—2017年共有157条记录,其中2012—2017年有107条,占总数的68.2%。

这些已有的研究显示,DAMO古菌和NC10门的*M.oxkyfera*类细菌是与DAMO直接相关的主要功能微生物。前者属于厌氧甲烷氧化古菌ANME-2d,主要在以硝酸根为底物的厌氧甲烷氧化过程中起关键作用,通过反向产甲烷途径将甲烷氧化,产生二氧化碳,并将电子传给硝酸根,生成亚硝酸根,实现部分反硝化过程。后者则是以亚硝酸盐为底物执行厌氧甲烷氧化的主要优势类群,其通过将亚硝酸盐转化为氮气和氧气完成对甲烷的氧化,并从中获得电子<sup>[6]</sup>。值得关注的是,2013年,HAROON等<sup>[7]569</sup>发现,在连续补充硝酸盐、甲烷及氮气的生物反应器中,厌氧氨氧化菌和*M.oxkyfera*类细菌竞争由ANME-2d还原硝酸盐所产生的亚硝酸盐,生成氮气;以此为基础,提出了3种微生物在DAMO中的相互作用模型。近年来,研究者对3种微生物在各种淡水生态系统中的存在及变化规律进行了研究,取得了很好的进展。本研究对不同淡水生态系统中DAMO功能微生物的分布特性及影响因素进行系统总结,并进一步探讨了这些功能微生物的检测方法。

## 1 DAMO功能微生物在淡水生态系统中的分布及影响因素

### 1.1 湖泊

DEUTZMANN等<sup>[8]</sup>在2011年首次证实DAMO在康士坦茨湖底泥中的存在,其研究结果显示,深水沉积物和沿岸沉积物中的NC10门细菌16S rRNA基因序列分别形成3个和5个分类操作单元(OTUs),但是,厌氧甲烷氧化的关键功能基因(甲烷单加氧酶*pmoA*基因)则只存在于深水(80~120 m)底泥中;因此认为深水湖泊更适合NC10门细菌的生长。KOJIMA等<sup>[9]</sup>的研究也获得了相似的结果。但是,朱群等<sup>[10]</sup>的研究显示,西湖(约3 m深)底泥中*M.oxkyfera*的16S rRNA基因和*pmoA*功能基因分别包含2个和5个OTUs,从而证实NC10门细菌在浅水湖泊表层底泥中同样存在。LIU等<sup>[11]</sup>的研究显示,在云南省水深1.3~20 m的13个湖泊的表层底泥(0~5 cm)中,NC10门细菌广泛存在,其16S rRNA基因丰度在 $2.29 \times 10^5 \sim 8.45 \times 10^6$ 拷贝数/g(以干样计,下同)之间变动。而且,这些细菌的丰富度与地理区域和底泥理化性质之间没有明

显的关系,但其多样性与底泥C/N之间显著正相关。DEUTZMANN等<sup>[4]18274</sup>在2014年发现,康士坦茨湖底泥中的NC10门细菌16S rRNA基因丰度随深度增加而增加,在水深70~90 m的底泥中丰度为 $10^8 \sim 10^9$ 拷贝数/cm<sup>3</sup>,但在水深0~4 m的底泥中,该基因却未被检出。中外学者研究结果的差异,可能与所用引物及样品来源密切相关。

值得注意的是,KOJIMA等<sup>[12]</sup>在2014年对台湾翡翠水库水体中的浮游甲烷氧化菌进行16S rRNA基因克隆文库检测,结果显示,浅水区甲烷氧化微生物的32个克隆中,18个属于Methylococcaceae科,14个属于Methylocystaceae科,然而深水区所有36个克隆与*M.oxkyfera*亲缘关系密切,序列相似性达到了96%。这一研究首次提出深水水体也是DAMO菌的主要栖息地,极大扩展了研究者对DAMO功能微生物分布范围的认识。

### 1.2 湿地

湿地是一个巨大的甲烷气体产生源。许多研究者已围绕DAMO及其功能微生物在湿地中的存在和特征展开研究。水稻田是一种特殊的湿地,其独特的干湿转换非常适合DAMO功能微生物的生存。2012年,WANG等<sup>[13]</sup>报道了NC10门细菌在水稻田中的存在。随后,多个研究表明,水稻田中NC10门细菌的丰度大多处于 $10^3 \sim 10^8$ 拷贝数/g之间且随深度增加而明显下降<sup>[14]43, [15-16], [17]349, [18]4495</sup>。其中,HU等<sup>[18]4497</sup>首先利用同位素示踪实验证实我国东南部3个不同类型淡水湿地中DAMO的发生。在下渚湖湿地和西溪湿地中,NC10门细菌的16S rRNA基因序列包含5个不同的OTUs,但是,水稻田中的该基因包含9个不同的OTUs,展示出更高的多样性。在3种湿地中,NC10门细菌的16S rRNA基因丰度均达到 $1.5 \times 10^5 \sim 3.2 \times 10^7$ 拷贝数/g,且其拷贝数随着深度变化而变化。2015年,该团队对下渚湖湿地的NC10门细菌的垂直分布进行研究,发现该类细菌的功能基因*pmoA*只存在于50~60 cm和90~100 cm的深层土壤中。因此,湿地深层土壤很可能是DAMO发生的主要位点,这与深层土壤相对稳定的厌氧状态密切相关<sup>[17]355</sup>。

### 1.3 河流

河流及河口环境(尤其是受到农业径流污染的土地)的厌氧和好氧交界面具有甲烷和硝酸盐含量高的特点,很可能是DAMO功能生物的栖息地。但是,这一方面的报道较为少见。2014年,SHEN

等<sup>[19]</sup>首次对钱塘江底泥中 NC10 门细菌进行调查,发现其 16S rRNA 基因的多样性高于已报道的湿地和湖泊,丰度在 $(1.32 \times 10^6 \pm 1.60 \times 10^5) \sim (1.03 \times 10^7 \pm 1.20 \times 10^6)$ 拷贝数/g 之间变动,且底泥中的无机氮、铵根和有机碳含量是影响 NC10 门细菌分布的最重要环境因子。2015 年, YAN 等<sup>[20]</sup>对黄河河口沉积物进行分析,发现 NC10 门细菌 16S rRNA 基因和 *pmoA* 基因的丰度分别介于 $(9.28 \times 10^3 \pm 1.10 \times 10^2) \sim (2.10 \times 10^5 \pm 1.30 \times 10^4)$ 拷贝数/g 和 $(8.63 \times 10^3 \pm 5.00 \times 10^2) \sim (1.83 \times 10^5 \pm 1.80 \times 10^4)$ 拷贝数/g 之间,且总碳、铵根和总磷/总氮比率极大影响了 NC10 门细菌在沉积物中的分布。

#### 1.4 NC10 门细菌、DAMO 古菌和厌氧氨氧化菌在环境中的共存

2013 年, HAROON 等<sup>[7]567</sup>在连续补充硝酸盐、甲烷及氮气的实验室生物反应器中检测到厌氧氨氧化菌、*M. oxyfera* 类细菌和 DAMO 古菌的共存。此后,不同的研究者围绕非实验室淡水生态环境中 3 种微生物的共存特征进行了调查。有研究在水稻田和城市湿地系统中检测到了厌氧氨氧化菌和 NC10 门细菌的共存,但厌氧氨氧化菌在表层(0~10 cm 和 20~30 cm)的丰度及活性最高,而 NC10 门细菌在深层(50~60 cm 和 90~100 cm)的丰度及活性最高<sup>[11]43, [17]32</sup>。本研究组此前的研究表明, NC10 门细菌和厌氧氨氧化菌共存于三峡库区消落带及附近水稻田中。但是,在消落带 0~30 cm 深度范围内, *M. oxyfera* 类细菌的丰度为 $(1.15 \times 10^5 \pm 2.00 \times 10^4) \sim (1.48 \times 10^7 \pm 1.60 \times 10^6)$ 拷贝数/g,显著高于厌氧氨氧化菌的丰度 $((1.07 \times 10^3 \pm 4.20 \times 10^2) \sim (7.77 \times 10^4 \pm 8.70 \times 10^3)$ 拷贝数/g),而水稻田中则显示出相反的变化趋势<sup>[21]</sup>。2017 年, CAI 等<sup>[22]</sup>发现,厌氧氨氧化菌和 NC10 门细菌共生于小麦和水稻轮作的土壤中。厌氧氨氧化菌的群落结构受土壤总有机氮、总氮及铵根浓度的显著影响,而 NC10 门细菌的群落结构则受硝酸根、铵根及 pH 的调节。以上不同环境中的研究表明,厌氧氨氧化菌和 NC10 门细菌的共存特性与土壤深度、理化性质等环境条件密切相关。值得关注的是,2016 年, DING 等<sup>[23]</sup>在水稻田土壤中同时检测到了 NC10 门细菌、DAMO 古菌和厌氧氨氧化菌,这是 3 种微生物在自然生态环境中共存的首次报道。但是,这 3 种微生物在其他淡水生态环境中能否共存及其影响因素尚需要进一步的研究。

## 2 DAMO 功能微生物的检测方法

### 2.1 聚合酶链式反应(PCR)相关技术

目前, NC10 门细菌尚未获得纯培养,但是,借助 PCR 相关技术,它们在不同淡水生态环境中的分布不断被证实。16S rRNA 基因是最常用于分析环境中低丰度 NC10 门细菌的生物标志物之一。2009 年, ETTWIG 等<sup>[24]</sup>设计了针对 NC10 门细菌的 PCR 引物 202F 和 qP1F。此后,研究者普遍采用该引物开展相关研究,但是,该引物所产生的碱基错配和非专一性扩增降低了检测的敏感性。因此, HE 等<sup>[25]</sup>在 2016 年设计新的引物 1051F/qP2R,并发展了新的巢式 PCR 方法(第一轮引物 qP1mF/1492R,第二轮引物 1051F/qP2R)对不同环境来源的 5 个厌氧样品和 3 个好氧样品进行检测。结果显示,只有 5 个厌氧样品的 DNA 扩增产生了明显条带,且产物属于 NC10 门细菌。新的巢式 PCR 方法检测限能够达到 $10^3$ 拷贝数/g,比之前的巢式 PCR 方法检测灵敏度高出约 100 倍。因此,该引物具有很好的专一性、敏感性和普适性。

另外一种常用的检测 NC10 门细菌的生物标志物是 *pmoA* 基因,该基因能编码将甲烷氧化为甲醇的单加氧酶 PMMO 的高度保守的 $\alpha$ 亚基。因此,其引物已成为分析环境样品中甲烷氧化菌的关键工具。早期针对该基因的常用引物有正向引物 A189,反向引物 A682、mb661 和 A650<sup>[26-29]</sup>。但是,这些引物存在关键碱基的错配问题而无法用于具有完整 *pmoA* 基因簇的 NC10 门细菌的分析,这引起许多研究者的关注。2011 年, LUESKEN 等<sup>[30]</sup>利用新引物 A189\_b/cmo682、cmo182/cmo568 对已证实有 NC10 门细菌存在的多个环境样品进行巢式 PCR 检测,并获得了特异性条带。2013 年, HAN 等<sup>[31]</sup>设计了新引物 HP3F1 和 HP3R1,其扩增条件与以前报道的引物扩增条件明显不同,且其目的条带更短,更利于样品中低丰度 NC10 门细菌的检出,但是,也有可能对 *pmoA* 基因的多样性和遗传信息的分析造成障碍。2017 年, WANG 等<sup>[32]</sup>在 *M. oxyfera* 的 PMMO 氨基酸序列和不同甲烷氧化菌 PMMO 相似序列的基础上,设计并发展新的引物 cmo182/cmo682 和 cmo208/cmo568 对东昌湖和东平湖底泥样品进行巢式 PCR 扩增。结果显示,扩增序列的 93% 归属于 NC10 门细菌,证明该引物具有很高的专一性和扩增效率。相比之下,以前多个 *pmoA* 引物却无法从这些样品中扩增出特异性序列,这可能

与不同 PCR 引物间的通用性差异有关。一方面,这些引物的设计所依据的序列来源不同,导致它们对不同环境中主要 NC10 门细菌成员扩增的专一性不同。另一方面,已有引物的碱基错配、一些关键碱基的缺失及发夹结构的形成,也可能造成序列扩增的失败。因此,为了更加全面地理解和认识 NC10 门细菌的分布特征,研究者需要从不同环境中富集这些微生物,以它们的序列为基础开发新的专一性引物,同时也可以利用多种专一性引物对同一样品进行扩增,综合比较确定 NC10 门细菌的存在状态。

除了 *pmoA* 和 16S rRNA 基因之外,目前尚未有其他针对 NC10 门细菌的引物被报道。值得注意的是,2012 年, WU 等<sup>[33]</sup>报道在 NC10 门细菌细胞内很可能存在将 NO 转化为氮气和氧气的特殊酶系统,这为设计新的检测 NC10 门细菌的引物提供了靶点和方向。

## 2.2 荧光原位杂交(FISH)相关技术

在 DAMO 得到实验证实之前, FISH 技术已经被认为是初步发现和描述厌氧甲烷氧化微生物的特殊技术手段<sup>[34]</sup>。目前,研究者利用不同的 FISH 探针(见表 1)对 DAMO 相关微生物的存在、形态、分布特点或富集程度进行探讨。例如, RAGHOE-BARSING 等<sup>[5]320</sup>利用特异性探针证实,在荷兰运河底泥富集物中 NC10 门细菌将成簇的 DAMO 古菌包围在中间,形成厌氧甲烷氧化微生物的共生体。 KOOL 等<sup>[35]</sup>将来自泥炭地的样品接种于反应器中,利用 FISH 探针监测发现,在 11、14、17 个月后, NC10 门细菌在反应器富集微生物中的相对丰富度分别达到 15%~25%、25%~50%、65%~75%。 HAROON 等<sup>[7]367</sup>用 FISH 技术发现,接种淡水底泥样品同时饲喂甲烷、铵根和硝酸根的厌氧反应器中, DAMO 古菌、NC10 门细菌和厌氧氨氧化菌共同存在且 DAMO 古菌占据优势地位。值得注意的是,这些探针中的 0193 探针和 PCR 引物中的 202F 序列具有高度的一致性,因此,该探针也可能存在像

202F 与其他位点错误结合的问题。

## 2.3 高通量测序技术

高通量测序是目前最为常用的阐明各种环境中微生物物种及其多样性的工具。但是,该技术所需的 PCR 引物高度依赖于已知微生物 16S rRNA 基因的保守序列,这对于特殊的包含新物种的环境样品中微生物种类的分析极其不利。 NC10 门细菌和厌氧氨氧化菌是近几年才被发现的微生物类群。部分研究者试图用已有的 16S rRNA 基因通用引物检测 DAMO 相关功能微生物,但是,效果并不令人满意<sup>[40]</sup>。值得关注的是, LU 等<sup>[41]</sup>将适用于 Illumina MiSeq PE300 测序的 4 对引物与已有 NC10 门细菌的 16S rRNA 基因引物进行比对,将错配碱基转换为简并碱基,获得多对新引物,并检测了这些引物对苏州淡水河底泥等样品中 NC10 门细菌、DAMO 古菌和厌氧氨氧化菌的扩增效果。结果显示,引物 PS5 (341b4\_F CTAYGGRBGCWGCAG/806\_R GGACTACNNGGGTATCTAAT)对 3 种微生物均有很高的覆盖度,且能有效排除假阳性结果。但是,它能否广泛应用于不同淡水环境样品的检测仍需更多研究来支撑。

除了以上几种基于基因分析的方法以外,常用于微生物群落分析的一些技术方法也正在被尝试用于 DAMO 功能微生物的含量和多样性分析中。例如,利用独特脂肪酸生物标志物对泥炭地环境样品中 NC10 门细菌的含量进行分析和阐明<sup>[36]</sup>。新的分子生物学技术手段的发展将极大推动对 DAMO 功能微生物在各种自然生态环境中分布特征的理解。

## 3 结论与展望

DAMO 有效连接了全球碳循环和氮循环,对于厌氧环境中甲烷的消除具有十分重要的生态意义。环境中 DAMO 微生物的研究最早在湖泊中展开,且主要关注 NC10 门细菌的存在、分布和丰度。此后的研究快速扩展到湿地、河流甚至是近海岸带和农

表 1 不同 FISH 探针的序列信息  
Table 1 Serial information of different FISH probe

| FISH 探针                              | 专一性       | 序列信息                                                                                         | 参考文献 |
|--------------------------------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| EUB338mix<br>(I: II: III 摩尔比为 1:1:1) | 多数细菌      | I: 5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'<br>II: 5'-GCAGCCACCCGTAGGTGT-3'<br>III: 5'-GCTGCCACCCGTAGGTGT-3' | [35] |
| S-D-ARCH-0915-a-A-20                 | 多数古菌      | 5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3'                                                                   | [36] |
| S-* -DBACT-0193-a-A-18               | NC10 细菌   | 5'-CGCTCGCCCCCTTTGGTC-3'                                                                     | [5]  |
| S-* -NC10-1162-a-A-18                | NC10 细菌   | 5'-GCCTTCCTCCAGCTTGACGCTG-3'                                                                 | [37] |
| S-* -Amx-0820-a-A-22                 | 厌氧氨氧化菌    | 5'-AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC-3'                                                                 | [38] |
| S-* -DARCH-0872-a-A-18               | ANME-2 古菌 | 5'-GGCTCCACCCGTTGTAGT-3'                                                                     | [5]  |

田土壤环境,而且对 NC10 门细菌、DAMO 古菌及厌氧氨氧化菌的共存和相互关系及其影响因子的分析也逐渐深入。尽管如此,DAMO 在淡水系统中被首次证实到现在只有 12 a,尚有许多问题需要进一步的探讨。例如,在一些极端环境中 DAMO 功能微生物是否存在?这些功能微生物与厌氧氨氧化菌甚至是好氧甲烷氧化微生物之间存在何种关系?这些功能微生物之间及其与环境因素间存在着何种关联关系?目前,对 DAMO 功能微生物的大部分研究主要借助分子生物学手段来进行。针对 16S rRNA 或 *pmoA* 基因的特异性引物往往来自于环境样品的富集培养物,这不利于对环境中 DAMO 功能微生物的全面分析。高通量测序及其他检测技术的发展将有利于更为准确地理解和认识环境中 DAMO 相关功能微生物的分布、丰度及多样性。

#### 参考文献:

- [1] 陈槐,周舜,吴宁,等.湿地甲烷的产生、氧化及排放通量研究进展[J].应用与环境生物学报,2006,12(5):726-733.
- [2] REEBURGH W S.Oceanic methane biogeochemistry[J].Chemical Reviews,2007,107(2):486-513.
- [3] MASON I.Methane as a carbon source in biological denitrification[J].Journal,1977,49(5):855-857.
- [4] DEUTZMANN J S,STIEF P,BRANDES J,et al.Anaerobic methane oxidation coupled to denitrification is the dominant methane sink in a deep lake[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2014,111(51).
- [5] RAGHOEBARSING A A,POL A,SMOLDER A J P,et al.A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification[J].Nature,2006,440(7086).
- [6] ETTWING K F,BUTLER M K,PASLIAR D L,et al.Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J].Nature,2010,464(25):543-548.
- [7] HAROON M F,HU S,SHI Y,et al.Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage[J].Nature,2013,500(7464).
- [8] DEUTZMANN J S,SCHINK B.Anaerobic oxidation of methane in sediments of Lake Constance,an oligotrophic freshwater lake[J].Applied and Environmental Microbiology,2011,77(13):4429-4436.
- [9] KOJIMA H,TSUTSUMI M,ISHIWAKA K,et al.Distribution of putative denitrifying methane oxidizing bacteria in sediment of a freshwater lake,Lake Biwa[J].Systematic and Applied Microbiology,2012,35(4):233-238.
- [10] 朱群,沈李东,胡宝兰,等.西湖底泥中的反硝化型甲烷厌氧氧化菌的分子生物学检测[J].环境科学学报,2013,33(5):1321-1325.
- [11] LIU Y,ZHANG J,ZHAO L,et al.Aerobic and nitrite-dependent methane-oxidizing microorganisms in sediments of freshwater lakes on the Yunnan Plateau[J].Applied Microbiology and Biotechnology,2015,99(5):2371-2381.
- [12] KOJIMA H,TOKIZAWA R,KOGURE K,et al.Community structure of planktonic methane-oxidizing bacteria in a subtropical reservoir characterized by dominance of phylotype closely related to nitrite reducer[J].Scientific Reports,2014,4:5728.
- [13] WANG Y,ZHU G B,HARHANGI H R,et al.Co-occurrence and distribution of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in a paddy soil[J].FEMS Microbiology Letters,2012,336(2):79-88.
- [14] SHEN L D,LIU S,HE Z F,et al.Depth-specific distribution and importance of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in an urban wetland[J].Soil Biology and Biochemistry,2015,83.
- [15] SHEN L D,LIU S,HUANG Q,et al.Evidence for the co-occurrence of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane oxidation processes in a flooded paddy field[J].Applied and Environmental Microbiology,2014,80(24):7611-7619.
- [16] ZHOU L L,WANG Y,LONG X E,et al.High abundance and diversity of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria in a paddy field profile[J].FEMS Microbiology Letters,2014,360(1):33-41.
- [17] SHEN L D,HUANG Q,HE Z F,et al.Vertical distribution of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria in natural freshwater wetland soils[J].Applied Microbiology and Biotechnology,2015,99(1).
- [18] HU B L,SHEN L D,LIAN X,et al.Evidence for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation as a previously overlooked microbial methane sink in wetlands[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2014,111(12).
- [19] SHEN L D,LIU S,CAI C,et al.Distribution and diversity of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria in the sediments of the Qiantang River[J].Microbial Ecology,2014,67(2):341-349.
- [20] YAN P Z,LI M C,WEI G S,et al.Molecular fingerprint and dominant environmental factors of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria in sediments from the Yellow River Estuary,China[J].Plos One,2015,10(9):e0137996.
- [21] WANG R F,HAN X K,YANG Q X,et al.Co-occurrence and diversity of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing and anaerobic ammonium oxidizing bacteria in the water-level-fluctuation zone of the Three Gorges Reservoir China[J].Fresenius Environment Bulletin,2016,25:5080-5095.
- [22] CAI H,GUO X X,SUN P F,et al.Depth-specific distribution and diversity of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in upland-cropping soil under different fertilizer treatments[J].Applied Soil Ecology,2017,113:117-126.
- [23] DING J,FU L,DING Z W,et al.Environmental evaluation of coexistence of denitrifying anaerobic methane-oxidizing archaea and bacteria in a paddy field[J].Applied Microbiology and Biotechnology,2016,100(1):439-446.

- [24] ETTWIG K F, VAN A T, JETTEN M S M, et al. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3656-3662.
- [25] HE Z F, WANG J Q, HU J J, et al. Improved PCR primers to amplify 16S rRNA genes from NC10 bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(11): 5099-5108.
- [26] MCDONALD I R, BODROSSY L, CHEN Y, et al. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1305-1315.
- [27] HOLMES A J, COSTELLO A, LIDSTROM M E, et al. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 132(3): 203-208.
- [28] COSTELLO A M, LIDSTROM M E. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(11): 5066-5074.
- [29] BOURNE D G, MCDONALD I R, MURRELL J C. Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 3802-3809.
- [30] LUESKEN F A, ZHU B L, ALEN T A V, et al. *PmoA* primers for detection of anaerobic methanotrophs[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(11): 3877-3880.
- [31] HAN P, GUO 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[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(23): 10155-10162.
- [32] WANG S H, LIU Y J, LIU G F, et al. A new primer to amplify *pmoA* gene from NC10 bacteria in the sediments of Dongchang Lake and Dongping Lake[J]. Current Microbiology, 2017, 74(8): 908-914.
- [33] WU M L, ALEN T A V, DONSELAAR E G V, et al. Co-localization of particulate methane monooxygenase and *cd*: nitrite reductase in the denitrifying methanotroph 'Candidatus *Methyloirabilis oxyfera*'[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 334(1): 49-56.
- [34] CALDWELL S L, LAIDLER J R, BREWER E A, et al. Anaerobic oxidation of methane: mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms[J]. Environmental Science and Technology, 2008, 42(18): 6791-6799.
- [35] DAIMS H, BRUHL A, AMANN R, et al. The domain specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1999, 22(3): 434-444.
- [36] SEKIGUCHI Y, KAMAGATA Y, NAKAMURA K, et al. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 1280-1288.
- [37] HU S H, ZENG R J, BUROW L C, et al. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms[J]. Environmental Microbiology Reports, 2009, 1(5): 377-384.
- [38] SCHMID M, SCHMITZ ESSER S, JETTEN M, et al. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection[J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(7): 450-459.
- [39] KOOL D M, ZHU B L, RIJSTRA W I C, et al. Rare branched fatty acids characterize the lipid composition of the intra-aerobic methane oxidizer 'Candidatus *Methyloirabilis oxyfera*'[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(24): 8650-8656.
- [40] DING J, LU Y Z, FU L, et al. Decoupling of DAMO archaea from DAMO bacteria in a methane driven microbial fuel cell[J]. Water Research, 2017, 110: 112-119.
- [41] LU Y Z, DING Z W, DING J, et al. Design and evaluation of universal 16S rRNA gene primers for high-throughput sequencing to simultaneously detect DAMO microbes and anaerobic bacteria[J]. Water Research, 2015, 87: 385-394.

编辑:胡翠娟 (收稿日期:2018-06-13)

(上接第1442页)

- [16] 中国环境监测总站. 中国土壤元素背景值[M]. 北京: 中国环境科学出版, 1990.
- [17] 魏复盛, 杨国治, 蒋德珍, 等. 中国土壤元素背景值基本统计量及其特征[J]. 中国环境监测, 1991, 7(1): 1-6.
- [18] 吴家前, 孔德超, 吴烈善. 广西涉重金属企业分布特征及污染防治对策[J]. 矿产与地质, 2015, 29(6): 814-817.
- [19] 张云霞, 宋波, 陈同斌, 等. 广西西江流域土壤铅空间分布与污染评价[J]. 环境科学, 2018, 39(5): 1-15.
- [20] DOMINGUEZ M T, ALEGRE J M, MADEJON P, et al. River banks and channels as hotspots of soil pollution after large-scale remediation of a river basin[J]. Geoderma, 2016, 261: 133-140.
- [21] MAYES W M, JARVIS A P, BURKE I T, et al. Dispersal and attenuation of trace contaminants downstream of the Ajka bauxite residue (red mud) depository failure, Hungary[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(12): 5147-5155.
- [22] ZHAO Y C, XU X H, HUANG B, et al. Using robust Kriging and sequential Gaussian simulation to delineate the copper- and lead-contaminated areas of a rapidly industrialized city in Yangtze River Delta, China[J]. Environmental Geology, 2007, 52(7): 1423-1433.
- [23] RIEUWERTS J S, MIGHANETARA K, BRAUNGARDT C B, et al. Geochemistry and mineralogy of arsenic in mine wastes and stream sediments in a historic metal mining area in the UK[J]. Science of the Total Environment, 2014, 472: 226-234.

编辑:丁 怀 (收稿日期:2017-10-31)