

## 湿地变形菌门甲烷氧化菌群的缺氧能量代

谢\*

汪欢<sup>1,2</sup> 郑越<sup>2</sup> 杨焯怡<sup>2,3</sup> 陈向南<sup>2</sup> 杨帆<sup>2,4</sup> 吴雪娥<sup>3</sup>  
杨朝晖<sup>1†</sup> 赵峰<sup>2†</sup>

(1 湖南大学环境科学与工程学院, 环境生物与控制教育部重点实验室, 长沙 410082)

(2 中国科学院城市环境研究所, 中国科学院城市污染物转化重点实验室, 厦门 361021)

(3 厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 厦门 361021)

(4 中国科学院大学, 北京 10049)

**摘要** 甲烷氧化菌以甲烷作为碳源和能源, 在全球甲烷平衡和温室效应控制中扮演着重要角色。甲烷生物氧化过程跨越不同氧化还原生态位, 近年来的研究表明, 在湿地缺氧生态位下变形菌门甲烷氧化菌具有代谢潜力, 但其能量代谢机制尚不清楚。本研究基于生物电化学技术、矿物学实验及微生物组学方法, 结果表明变形菌门甲烷氧化菌主导的菌群具有直接和间接胞外电子传递潜力; 在氧气耗尽时, 甲烷氧化菌群可利用水铁矿作为电子受体完成能量代谢过程, 缺氧体系中  $\gamma$ -Proteobacteria 纲的甲烷氧化菌和非甲烷氧化微生物共同驱动铁矿还原。本研究探讨了变形菌门甲烷氧化菌主导菌群的缺氧能量代谢过程, 拓展了反硝化厌氧甲烷氧化菌及厌氧甲烷氧化古菌主导的缺氧甲烷氧化理论, 为甲烷生物控制提供了理论支持。

**关键词** 甲烷氧化菌; 变形菌门; 胞外电子传递; 缺氧生态位; 微生物组学

**中图分类号** P593      **文献标识码** A

甲烷是继二氧化碳后的第二主要温室气体<sup>[1]</sup>, 全球每年甲烷释放量为 500~600 Tg<sup>[2]</sup>, 甲烷排放源不断增加而甲烷汇却在减少<sup>[3]</sup>, 控制甲烷释放是可持续发展的必然要求。甲烷氧化菌是自然界中唯一的甲烷生物汇, 其氧化作用可消耗大气中至少 10%的甲烷<sup>[4]</sup>。湿地是甲烷的重要排放源。因土壤被水层淹没造成的缺氧环境<sup>[5]</sup>为产甲烷创造了条件, 产甲烷菌产生的部分甲烷被甲烷氧化菌氧化<sup>[6]</sup>, 甲烷氧化过程多以缺氧和厌氧代谢为主。

\* 国家自然科学基金项目 (21777155) 和国家重点研发计划项目 (2018YFC1800502) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21777155) and the National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFC1800502)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yzh@hnu.edu.cn; fzhaoy@iue.ac.cn

作者简介: 汪欢 (1994—), 女, 湖南常德人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物研究。E-mail: huanwang@iue.ac.cn

收稿日期: 2019-04-04; 收到修改稿日期: 2019-05-23; 优先数字出版日期 (www.cnki.net):

甲烷氧化菌根据进化关系可以分为四大类：变形菌门、疣微菌门、反硝化厌氧甲烷氧化菌、厌氧甲烷氧化古菌。甲烷生物氧化过程跨越“高氧-缺氧”区<sup>[7]</sup>，传统研究认为好氧区以变形菌门和疣微菌门甲烷氧化菌为主<sup>[8]</sup>，缺氧区以反硝化厌氧甲烷氧化菌<sup>[9]</sup>和厌氧甲烷氧化古菌为主<sup>[10]</sup>。在湿地环境中，变形菌门甲烷氧化菌广泛存在于水体和土壤的交界面中，可消耗产甲烷菌产生的40%~90%的甲烷<sup>[11]</sup>。近年来有研究<sup>[12-13]</sup>发现，变形菌门甲烷氧化菌也存在于多种缺氧环境中，但其缺氧代谢的替代电子受体尚不明确。

湿地土壤环境中铁矿分布广泛，已有报道<sup>[14]</sup>水铁矿驱动的甲烷氧化菌群中以厌氧甲烷氧化古菌（Anaerobic methanotrophic archaea, ANME）为主，近期研究者富集了甲烷氧化古菌（*Candidatus Methanoperedens ferrireducens*），通过同位素示踪发现其可以利用铁矿驱动甲烷氧化过程<sup>[15]</sup>。在缺氧环境下，铁矿是否可作为替代电子受体驱动变形菌门甲烷氧化菌的甲烷氧化过程尚不清晰。

本研究选取湿地为研究对象，通过富集湿地环境样品得到变形菌门甲烷氧化菌主导的菌群。基于生物电化学技术，评估菌群在缺氧条件下胞外电子传递潜力。进一步研究“氧气-铁矿”电子受体转换过程中，甲烷氧化菌群能量代谢行为的适应策略。通过评估甲烷氧化菌和非甲烷氧化菌在铁矿还原中的贡献，研究菌群中缺氧代谢的生物作用机制。基于微生物群落分析，研究甲烷氧化菌在不同能量代谢模式下群落组成的变化。本研究探究了在缺氧生态位下“变形菌门甲烷氧化菌群-矿物”的相互作用，拓展了反硝化厌氧甲烷氧化菌及厌氧甲烷氧化古菌主导的缺氧甲烷氧化理论，可为甲烷生物控制提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 湿地甲烷氧化菌群富集及培养条件

甲烷氧化菌群的富集条件：用于富集培养的接种源来自厦门市同安区莲花镇窑市村的水稻土（24°45' 22"N, 118°4' 2"E），采用铵盐无机盐（Ammonium mineral salt, AMS）培养基<sup>[16]</sup>（每升培养基包括 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.10 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.14 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.21 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.272 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.284 g, Na<sub>2</sub>·EDTA 2.0 mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.0 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.6 mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.06 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.06 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.4 mg, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.2 mg, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.04 g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 mg）。2 g 土壤分散于 5 mL 无菌水后的悬液转移至培养基中，甲烷（25%，v/v）作为电子供体，氧气（15%，v/v）作为电子受体于恒温震荡摇床培养（150 r·min<sup>-1</sup>, 30℃），培养 3 d 后在 600 nm 下的吸光度约为 0.5。转接 10%（v/v）菌液至新鲜培养基中继续培养，如此循环，经五轮序批式转接培养后得到甲烷氧化菌群。

“氧气-铁矿”电子受体共存的培养条件：以富集的甲烷氧化菌群作为接种源，甲烷（25%，v/v）作为电子供体，氧气（15%，v/v）和水铁矿（10 mmol·L<sup>-1</sup>）作为电子受体，采用 AMS

培养基培养 (150 r·min<sup>-1</sup>, 30°C)。

缺氧培养条件: 以富集的甲烷氧化菌群作为接种源, 甲烷 (25%, v/v) 作为电子供体, 水铁矿 (10 mmol·L<sup>-1</sup>) 作为电子受体, 采用 AMS 培养基培养 (150 r·min<sup>-1</sup>, 30°C), 培养体系的顶空用高纯氮曝气 5 min 制造缺氧环境。

## 1.2 水铁矿合成及扫描电子显微镜 (SEM) 表征方法

实验中所用的无定形水铁矿制备方法简述如下<sup>[17]</sup>: 在搅拌条件下, 1 mol·L<sup>-1</sup> KOH 溶液逐滴地加入 0.2 mol·L<sup>-1</sup> Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液中至 pH 为 7.3 (避免局部 pH 过高), 静置 2 h 后再滴加 1 mol·L<sup>-1</sup> KOH 最终调节 pH 至 7.5。用超纯水冲洗, 反复 6 次, 分装至厌氧瓶用高纯氮除去氧气, 密封避光 4°C 保存。使用前通过富营养培养基检验水铁矿悬浊液是否有微生物污染。

扫描电子显微镜表征: 矿物用超纯水清洗 3 遍后, 重悬于无水乙醇中的样品固定于铜导电胶上后喷金。采用扫描电子显微镜 (S-4800 FE-SEM, Hitachi, 日本) 观察铁矿形貌, X 射线能谱分析 (EDX) 元素分布, 观察电压和电流分别为 5 kV、10 μA 和 20 kV、15 μA。

X-射线衍射分析 (XRD): 矿物用超纯水清洗 3 遍, 真空冷冻干燥后于 X 射线衍射仪 (X'Pert Pro 型, 荷兰帕纳科公司) 测试, 测试条件为: Cu-Kα 辐射, 电压为 40 kV, 电流为 40 mA, 扫描范围为 5°~80°, 扫描速度为 0.082 °·s<sup>-1</sup>, 步长为 0.026°, 步长时间为 81.6 s。

## 1.3 电子受体和生物质浓度的测定

氧气的测定: 采用气相色谱仪 (GC7890, Agilent, 美国) 进行氧气检测, 仪器参数及方法如下<sup>[18]</sup>: MolSieve 5A 色谱柱, 载气为氦气, 1 mL·min<sup>-1</sup> 载气流量, 15 mL·min<sup>-1</sup> 参比气流量, 70°C 进样口温度, 40°C 柱温, 200°C 热导检测器温度。

铁矿中亚铁和总铁的测定: 采用邻二氮杂菲显色法测定亚铁和总铁浓度<sup>[19]</sup>。

生物质浓度的测定: 实验体系中用蛋白浓度表征生物质含量, 体系中培养液高速离心 (8 000 g, 5 min) 后去掉上清液, 沉淀于 -20°C 储存 24 h 后溶解于 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液中, 90°C 水浴加热 15 min 后离心 (8 000 g, 20 min, 4°C), 离心得到的上清液用 BCA 试剂盒 (博士德生物, AR0146, 美国) 测定蛋白浓度。

## 1.4 生物电化学测定

生物电化学测定使用三电极体系, 工作电极是玻碳电极 (内径为 3 mm), 对电极是铂丝电极, 参比电极是 Ag/AgCl (饱和 KCl 溶液), 电解液为磷酸盐缓冲溶液 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.272 g·L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.284 g·L<sup>-1</sup>, pH 6.8)。测试前, 电解液通过高纯氮曝气 30 min 以除去氧气, 并在测试期间一直保证氮气气氛。将培养好的甲烷氧化菌群离心 (5 500 g, 5 min, 4°C) 收

集菌体, 用磷酸盐缓冲溶液重悬菌体, 离心 (5 500 g, 5 min, 4°C) 后去掉上清液, 反复清洗 3 次以去除菌体表面的分泌物, 滴加菌体于工作电极表面至菌体表面形成膜状层, 测定菌体的电化学信号, 菌液离心获得的上清液用于测定电化学信号。微分脉冲伏安 (Differential pulse voltammetry, DPV) 测定参数: 电势范围 -0.6 V~0.4 V; 电势增量 0.004 V; 脉冲振幅 0.05 V; 脉冲宽度 0.2 s; 脉冲周期 0.5 s; 静置时间 28 s<sup>[20]</sup>。

### 1.5 微生物群落结构分析

收集水铁矿还原前后的甲烷氧化菌群的菌体, 使用土壤 DNA 提取试剂盒 (PowerSoil DNA Isolation Kit, 德国) 提取 DNA, 通过引物 CCTACGGGNGGCWGCAG (341F) 和 GGACTACHVGGGTATCTAAT (806R) 对 V4、V5 区进行扩增, 基于 Illumina Miseq 平台 PE250 测序<sup>[21]</sup>, 序列基于 data2 方法<sup>[22]</sup>进行可执行操作单元 (Operational taxonomic units, OTU) 聚类, 通过 QIIME2<sup>[23]</sup>软件进行多样性分析和物种注释: 去除低质量读数 (短于 100 bp 或质量得分低于 25 的); 按样品中最小测序深度 9 734 进行序列均一化; 通过加权矩阵距离比较样品之间的主坐标分析; OTU 代表性序列比对到 SILVA132<sup>[24]</sup>的核糖体小亚基 (SSUrRNA) 数据库<sup>[25]</sup>进行物种注释分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 湿地甲烷氧化菌群的氧化还原特征

微生物胞外还原铁矿是基于微生物的胞外电子传递。胞外电子传递是将胞内能量代谢产生的电子传递至胞外或者从胞外摄取电子传递至胞内的过程<sup>[26]</sup>。为探究甲烷氧化菌群的氧化还原基础, 采用微分脉冲伏安法, 从菌体和上清液两个方面初步分析甲烷氧化菌群的电化学活性特征。如图 1 所示, 菌体 (图 1A) 在 -85 mV 和 -23 mV 附近各有一个氧化峰, 在 -12 mV 附近有一个还原峰, 表明菌体表面存在氧化还原活性蛋白, 能与电极进行直接电子传递。甲烷氧化菌群上清液 (图 1B) 在 -0.6 V~0.2 V 范围内有多处氧化峰, 且培养基的电化学测试 (图 1C) 无明显的氧化还原峰。说明菌体能分泌一些电化学活性物质至胞外, 具有完成间接电子传递的潜力。因此, 甲烷氧化菌群中功能微生物具有胞外直接电子传递和间接电子传递共同作用的潜力。

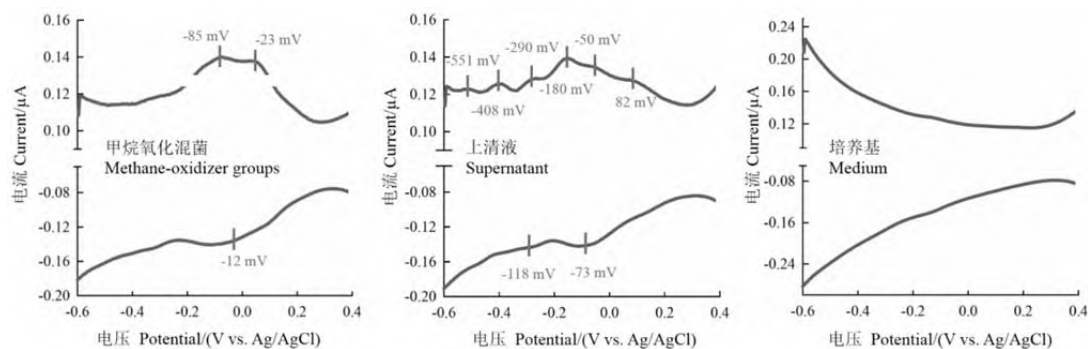
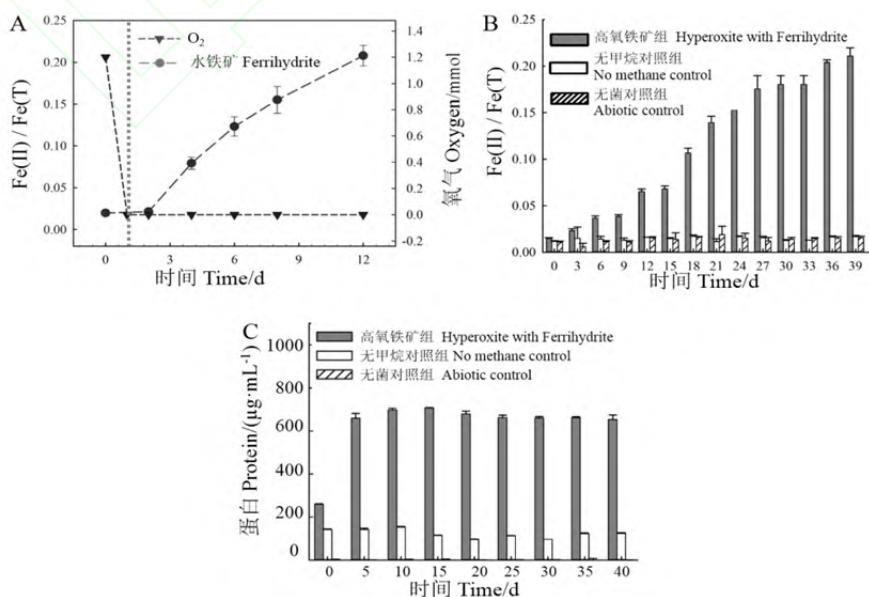


图1 甲烷氧化菌群中菌体、上清液和培养基的微脉冲伏安图

Fig.1 Differential pulse voltammetry analysis of cells, supernatant, and medium

## 2.2 铁矿可替代氧气作为甲烷氧化菌群的电子受体

本研究的研究对象是湿地变形菌门甲烷氧化菌群。根据文献<sup>[27]</sup>报道，变形菌门甲烷氧化菌通常以氧气作电子受体。本研究以水稻土为接种源，甲烷作为唯一碳源， $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  氧气富集甲烷氧化菌群，通过转接序批式培养，至群落组成稳定后（详见 2.4）将富集物转接至含有  $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  氧气和  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  水铁矿的条件培养。如图 2A 所示，甲烷氧化菌群的能量代谢分为两个阶段：第一阶段为 0~1 d，甲烷氧化菌群优先利用氧气作为电子受体；第二阶段为第 1 天以后，体系中氧气浓度降低至仪器检测线以下，甲烷氧化菌群利用水铁矿作为电子受体。因此，当甲烷氧化菌群无足够的氧气支撑其完成能量代谢时，水铁矿可替代氧气作为电子受体完成胞外呼吸过程。从图 2C 中可以看出，甲烷氧化菌群优先利用氧气作为电子受体使微生物增长，从而蛋白量增加；体系中氧气浓度降低时甲烷氧化菌群利用水铁矿作为电子受体，此过程中生物量基本未显著增加。





注: Fe(II)/Fe(T)表示二价铁与总铁的摩尔比。下同 Note: Fe(II)/Fe(T) is the molar ratio of Fe(II) to total iron. The same below

图2 甲烷氧化菌群在“氧气-铁矿”电子受体共存时氧气、铁矿和生物量的变化

Fig. 2 Variations of oxygen, ferrihydrite and biomass in the methanotroph groups in the presence of both oxygen and ferrihydrite as electron acceptors

为评估微生物自身分泌物的矿物还原作用和体系中非生物的化学还原作用, 设置了生物阴性对照组和非生物阴性对照组。如图 2B 所示, 生物阴性对照组 (无甲烷对照组) 和非生物阴性对照组 (无菌对照组) 均未发生铁矿还原, 表明微生物及其自身分泌物在缺乏电子供体的情况下无法驱动铁矿还原, 同时体系中其他化学组分不能实现铁矿的还原反应。仅在甲烷和微生物菌群同时存在的实验组中发生铁矿还原。上述结果表明, 甲烷是甲烷氧化菌群实现水铁矿还原的驱动力, 甲烷氧化菌群是水铁矿还原的基础。

第 25 天时水铁矿还原比例达到平台期, 从扫描电镜图中可以看出, 此时体系中的水铁矿从初始的不定型铁矿 (图 3A 插图), 形成了菱形片状结构 (图 3A)。EDX 能谱元素分析 (图 3B) 表明甲烷氧化菌群还原水铁矿生成的次生矿物由 Fe、O、P 三种元素组成, 其中的 P 元素来自于培养基成分。XRD 结果 (图 3C) 从晶格角度显示初始水铁矿和还原后的铁矿有所差异, 初始水铁矿无明显的衍射峰, 菌群还原后的铁矿在 13°附近出现主峰, 对应蓝铁矿 [Fe<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O] (PDF#30-0662) 的 (020) 晶面, 在其他位置出现了一些微弱的小峰, 分别对应蓝铁矿的 (130)、(031)、(231)、(051)、(080) 晶面, XRD 结果结合 EDS 能谱和 SEM 形貌特征, 初步判断体系中主要生成了蓝铁矿。

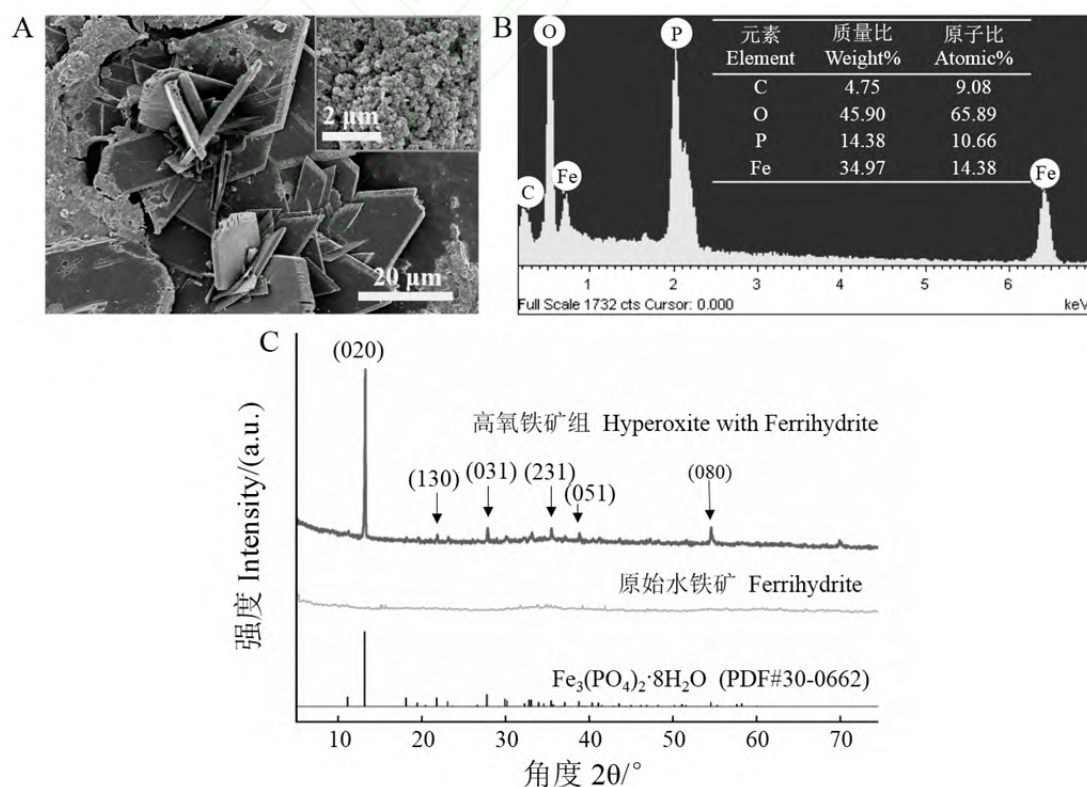


图3 甲烷氧化菌群“氧气-铁矿”电子受体共存实验组中次生铁矿形貌表征(图C中020、130、031、231、051、080代表蓝铁矿的晶面)

Fig. 3 Morphological characteristics of the secondary iron mineral in the reaction system with oxygen and ferrihydrite as electron acceptors (020, 130, 031, 231, 051 and 080 represents number of crystal planes of vivianite in figure C)

通过甲烷氧化菌群落结构分析(详见2.4)可知,菌群由甲烷氧化菌和非甲烷氧化菌组成。非甲烷氧化菌通过甲烷氧化菌的代谢产物(如甲醇<sup>[28]</sup>)维持能量输入。因此,甲烷氧化菌群中实现水铁矿还原的功能微生物存在三种可能:甲烷氧化菌、非甲烷氧化菌、甲烷氧化菌和非甲烷氧化菌共同作用。为了评估不同功能微生物在水铁矿还原中的贡献,本研究模拟图2A的第一阶段,通过收集高氧甲烷氧化过程(培养2 d)中产生的代谢产物(上清液),在无甲烷驱动的培养基中利用代谢产物驱动铁矿还原。代谢物驱动还原后的铁矿元素组成和甲烷驱动还原铁矿的元素组成一致,均由Fe、O、P组成。然而,代谢物驱动还原铁矿的形貌结构中除了部分片状结构,主要以花瓣形结构为主(图4C)。不同矿物形貌特征的差异可能源自不同电子供体驱动的还原程度。

如图4A所示,通过对比甲烷驱动铁矿还原和代谢物驱动铁矿还原过程,以甲烷为电子供体驱动水铁矿还原和代谢产物为电子供体水铁矿还原比例约为1:1.6(图4A)。当甲烷为电子供体时,由甲烷氧化菌和非甲烷氧化菌共同作用。通过铁矿还原效率核算,甲烷氧化菌在甲烷氧化菌群中胞外矿物还原贡献率达38%(图4B)。因此,后续研究跨越高氧阶段直接进入缺氧阶段,通过控制代谢物量,主要关注甲烷氧化菌在甲烷氧化菌群中的作用机制。

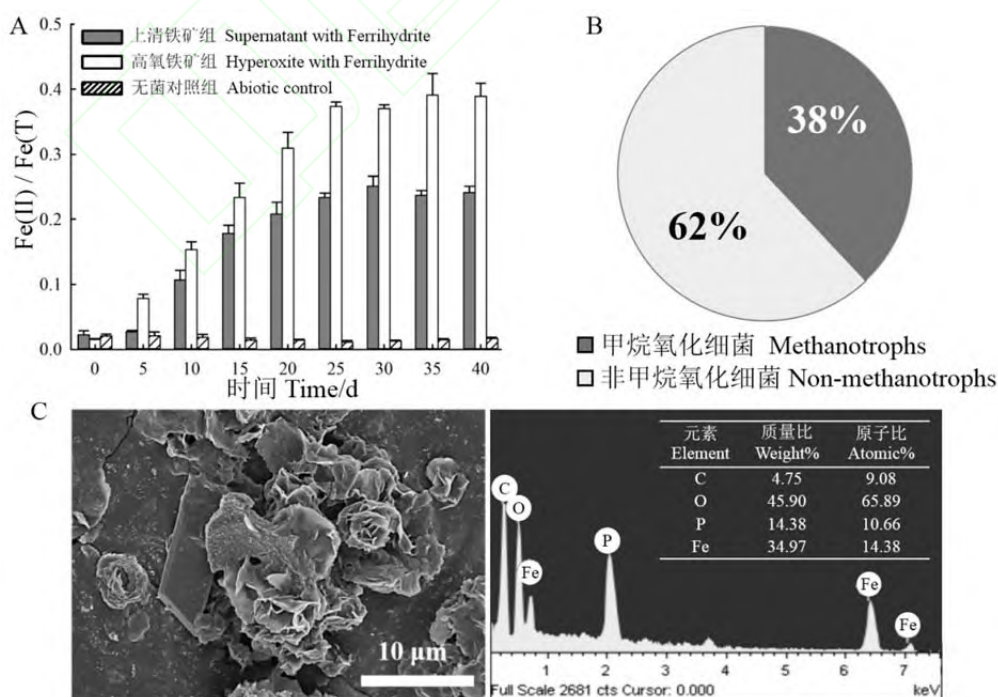


图4 含碳化合物的上清液驱动铁矿还原及次生铁矿形貌表征

Fig. 4 Iron reduction driven by supernatant containing carbon compound and morphological characteristics of the secondary iron mineral

### 2.3 缺氧环境下甲烷氧化菌群的胞外铁矿还原

如图 5A 所示, 在缺氧体系 (甲烷作为电子供体, 水铁矿作为电子受体) 中, 甲烷驱动的甲烷氧化菌群胞外铁矿还原的  $\text{Fe(II)}/\text{Fe(T)}$  (二价铁与总铁的摩尔比) 比例持续增加。缺氧体系铁矿还原速率  $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (以  $\text{Fe(II)}$  计, 下同) 虽然低于高氧体系的铁矿还原速率  $0.16 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 但是, 相比于 ANME 型缺氧甲烷氧化矿物还原速率 ( $0.001 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) [29], 本研究富集的甲烷氧化菌群速率是 ANME 型甲烷氧化菌群的 50 倍。基于扫描显微镜观察, 缺氧环境下甲烷氧化驱动形成的铁矿以菱形和花瓣形两类形貌共存 (图 5B), 其与代谢物驱动形成的铁矿形貌类似。上述结果表明甲烷氧化菌群在缺氧环境下具有驱动胞外铁矿还原能力。微生物胞外还原铁矿的生物学基础是利用微生物的胞外电子传递能力。

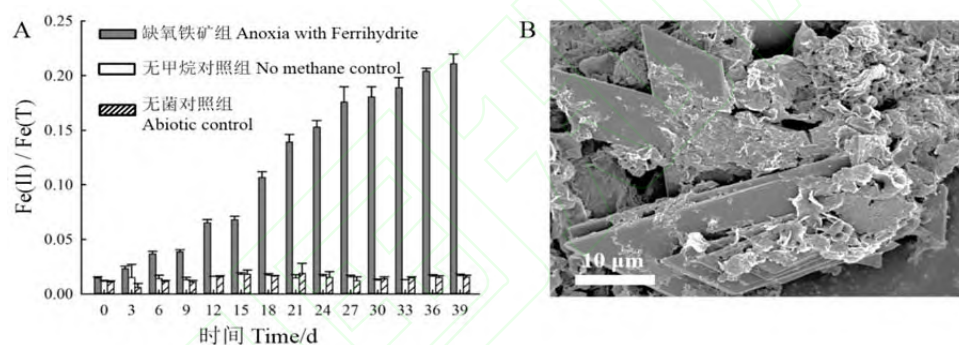


图 5 缺氧条件下甲烷氧化菌群的铁矿还原

Fig. 5 Iron reduction driven by methanotroph groups in anoxic environment

### 2.4 甲烷氧化菌群的群落组成

以上数据从水铁矿还原动力学和矿物结构两方面讨论了甲烷氧化菌群在高氧和缺氧生态位的能量代谢过程。同时, 本研究关注能量代谢过程中甲烷氧化菌群群落组成的演替过程。通过高通量扩增子测序探究群落组成变化, 基于加权距离矩阵的主成分分析显示, 甲烷氧化菌群富集物通过五轮序批式培养, 群落结构逐渐稳定 (图 6A)。同时, 纲水平群落组成分析 (图 6B) 也表明五轮序批式培养后群落组成相对稳定。将群落组成稳定后的富集物作为接种源, 启动后续高氧环境和缺氧环境的甲烷氧化菌群铁矿还原实验。

在高氧体系和缺氧体系中, 比较还原水铁矿前和还原后的微生物群落组成, 主成分分析 (图 6A) 结果显示, 高氧体系和缺氧体系还原水铁矿后的微生物群落均与还原水铁矿前的甲烷氧化菌群接种源具有显著差异, 表明缺氧环境中甲烷氧化菌群通过调整种间关系和核心



功能微生物，以适应电子受体从氧气到水铁矿的转换。对高氧体系和缺氧体系还原铁矿前后的微生物群落在纲水平上进行对比（图 6C），还原水铁矿前的接种源中主要微生物是  $\beta$ -Proteobacteria（64%），以及部分的  $\gamma$ -Proteobacteria（18%）和 Flavobacteriia（13%）。高氧体系还原水铁矿的甲烷氧化菌群中主要微生物是  $\gamma$ -Proteobacteria，其相对丰度增加至 56%， $\beta$ -Proteobacteria 的相对丰度减少至 24%。在高氧体系还原水铁矿中， $\gamma$ -Proteobacteria 的 *Methylococcales* 甲烷氧化菌是唯一甲烷氧化菌，利用甲烷代谢产生碳化合物驱动其他非甲烷氧化菌完成能量代谢。缺氧体系中的  $\gamma$ -Proteobacteria 的相对丰度（6%）较高氧体系（56%）减少， $\alpha$ -Proteobacteria（31%）的相对丰度显著增加，其中， $\alpha$ -Proteobacteria（包括 *Caulobacteriales* 等伴随菌）仅能利用甲烷氧化菌产生的碳化合物驱动铁矿还原完成能量代谢，在缺氧体系中丰度增加，说明伴随菌和甲烷氧化菌共同参与缺氧代谢。

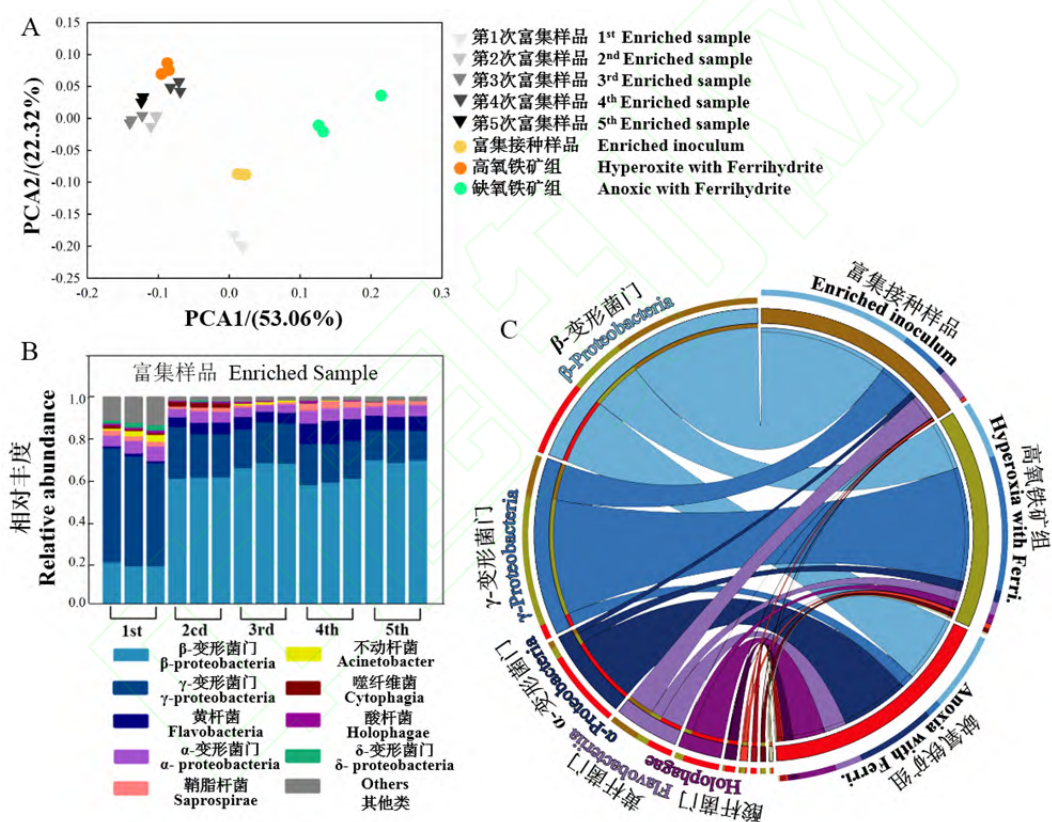


图 6 甲烷氧化菌群的群落组成分析

Fig. 6 Microbial composition analysis of the methanotroph groups

### 3 结论

从湿地中富集的以变形菌门甲烷氧化菌为主导的菌群具有直接和间接胞外电子传递潜力，甲烷氧化菌群可利用水铁矿作为电子受体在缺氧环境中完成甲烷氧化过程，其铁矿还原速率是 ANME 型厌氧甲烷氧化古菌的 50 倍，由  $\gamma$ -Proteobacteria 纲的甲烷氧化菌和非甲烷氧

化微生物共同驱动铁矿还原。

### 参 考 文 献

- [1] Griggs D J, Noguer M. Climate change 2001: The scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Weather*, 2010, 57(8): 267-269
- [2] Stocker T, Qin D, Plattner G, et al. IPCC, 2013: Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Computational Geometry*, 2013, 18(2): 95-123
- [3] Blake D R, Rowland F S. Continuing worldwide increase in tropospheric methane, 1978 to 1987. *Science*, 1988, 239(4844): 1129-1131
- [4] O'Connor F M, Boucher O, Gedney N, et al. Possible role of wetlands, permafrost, and methane hydrates in the methane cycle under future climate change: A review. *Reviews of Geophysics*, 2010, 48 (4): 1-70
- [5] 王晓婷, 陈瑞蕊, 井忠旺, 等. 水稻和小麦根际效应及细菌群落特征的比较研究. *土壤学报*, 2019, 56(2): 443-453  
Wang X T, Chen R R, Jing Z W, et al. Comparative study on rhizosphere effects and bacterial communities in the rhizospheres of rice and wheat (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56(2): 443-453
- [6] 王旭刚, 孙丽蓉, 马林娟, 等. 黄河中下游湿地土壤铁还原氧化过程的温度敏感性. *土壤学报*, 2018, 55(2): 380-389  
Wang X G, Sun L R, Ma L J, et al. Temperature sensitivity of iron redox processes in wetland soil in the middle and lower reaches of the Yellow River (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2018, 55(2): 380-389
- [7] 辛祥, 林青, 黄修东, 等. 大沽河下游农田土壤水分含量动态变化特征. *土壤*, 2019, 51(2): 390-398  
Xin X, Lin Q, Huang X D, et al. Dynamic characteristics of soil moisture in downstream farmland of Dagu River (In Chinese). *Soils*, 2019, 51(2): 390-398
- [8] Chistoserdova L, Kalyuzhnaya M G. Current trends in methylotrophy. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(8): 703-714
- [9] Murrell J C. The aerobic methane oxidizing bacteria (Methanotrophs)//Timmis K N. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Germen: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010: 1953-1966
- [10] 翟俊, 马宏璞, 陈忠礼, 等. 湿地甲烷厌氧氧化的重要性和机制综述. *中国环境科学*, 2017, 37(9): 3506-3514  
Zhai J, Ma H P, Chen Z L, et al. Review on the importance and mechanisms of anaerobic oxidation of methane in wetlands (In Chinese). *China Environmental Science*, 2017, 37(9): 3506-3514
- [11] Roslev P, King G M. Regulation of methane oxidation in a freshwater wetland by water table changes and anoxia. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 19(2): 105-115
- [12] Case D H, Ijiri A, Morono Y, et al. Aerobic and anaerobic methanotrophic communities associated with methane hydrates exposed on the seafloor: A high-pressure sampling and stable isotope-incubation experiment. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: Article 2569
- [13] Chistoserdova L. Application of omics approaches to studying methylotrophs and methylotroph communities. *Current Issues*

- in Molecular Biology, 2017, 24: 119-142
- [14] Scheller S, Yu H, Chadwick G L, et al. Artificial electron acceptors decouple archaeal methane oxidation from sulfate reduction. *Science*, 2016, 351(6274): 703-707
- [15] Chen C, Leu A O, Xie G J, et al. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction. *The ISME Journal*, 2018, 12(8): 1929-1939
- [16] Krause S M, Johnson T, Samadhi K Y, et al. Lanthanide-dependent cross-feeding of methane-derived carbon is linked by microbial community interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 114(2): 358-363
- [17] Lovley D R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiology Reviews*, 1991, 55(2): 259-287
- [18] Molstad L, Dörsch P, Bakken L R. Robotized incubation system for monitoring gases (O<sub>2</sub>, NO, N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>) in denitrifying cultures. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 71(3): 202-211
- [19] 张彬, 张媛媛, 郑艳美. 邻二氮菲法测定食品中铁元素含量研究. *石家庄学院学报*, 2016, 18(6):15-19  
Zhang B, Zhang Y Y, Zheng Y M. Phenanthroline spectrophotometric method for the determination of the content variation of the iron contents in two foods in different storage (In Chinese). *Journal of Shijiazhuang University*, 2016, 18(6):15-19
- [20] Wu S, Xiao Y, Wang L, et al. Extracellular electron transfer mediated by flavins in Gram-positive *Bacillus* sp. WS-XY1 and yeast *Pichia stipitis*. *Electrochimica Acta*, 2014, 146: 564-567
- [21] 赵帆, 赵密珍, 王珏, 等. 基于高通量测序研究草莓根际微生物群落结构和多样性. *土壤*, 2019, 51(1): 51-60  
Zhao F, Zhao M Z, Wang J, et al. Microbial community structures and diversities in strawberry rhizosphere soils based on high-throughput sequencing (In Chinese). *Soils*, 2019, 51(1): 51-60
- [22] Raue A, Steiert B, Schelker M, et al. Data2 Dynamics: A modeling environment tailored to parameter estimation in dynamical systems. *Bioinformatics*, 2015, 31(21): 3558-3560
- [23] Bokulich N A, Kaehler B D, Rideout J R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 2018, 6(1): Article 90
- [24] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 2013, 10 (10): 996-998
- [25] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267
- [26] Reguera G, McCarthy K D, Mehta T, et al. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 2005, 435(7045): 1098-1101
- [27] 贡娟莉, 王艳芬, 张洪勋. 好氧甲烷氧化菌生态学研究进展. *生态学报*, 2013, 33(21):6774-6785  
Yun J L, Wang Y F, Zhang H X. Ecology of aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs) (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(21): 6774-6785
- [28] Zheng Y, Huang J, Zhao F, et al. Physiological effect of XoxG(4) on lanthanide-dependent methanotrophy. *mBio*, 2018,

[29] Beal E J, House C H, Orphan V J. Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science*, 2009, 325(5937): 184-187

## Energy Metabolism of Community Dominated by Proteobacteria Methanotroph in Anoxic Environment of Wetland

WANG Huan<sup>1,2</sup> ZHENG Yue<sup>2</sup> YANG Yeyi<sup>2,3</sup> CHEN Xiangnan<sup>2</sup> YANG Fan<sup>2,4</sup> WU Xue'e<sup>3</sup>  
YANG Zhaohui<sup>1†</sup> ZHAO Feng<sup>2†</sup>

(1 Key Laboratory of Environmental Biology and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

(2 CAS Key Laboratory of Urban Pollutant Conversion, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China)

(3 Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361021, China)

(4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** 【Objective】 Methanotrophs, using methane as carbon and energy sources for growth, play an important role in keeping balance of global methane in balance and controlling greenhouse effects. The process of bio-oxidation of methane spans over different redox niches. Recent researches demonstrate that methanotrophs. Belonging to the phylum of Proteobacteria have the potential of methane metabolism in anoxic niches of wetland, however so far little has been reported on mechanisms of their energy metabolism. This study was to explore mechanism of the energy metabolism of the Proteobacteria dominated methanotrophs in anoxic niches from three aspects.

【Method】 Bioelectrochemical techniques were used to explore potential of extracellular electron transfer of the methanotrophs. In exploring for potential electrons of the methanotrophs, the reaction system, when aerobic, was designed to have two potential electron acceptors, i.e. oxygen and ferrihydrite and when anoxic, only one, i.e. ferrihydrite to study energy metabolism of the methanotrophs in anoxic conditions. Mineralogy analysis of the ferrihydrite in the system was performed to determine reduction dynamics of the mineral and structure of its secondary mineral. And analyses of community composition of the methanotrophs before and after reduction of the ferrihydrite were conducted to determine changes in the community. 【Result】 Results show that the methanotroph groups were able to transfer directly or indirectly extracellular electrons. Once oxygen was used up, the



methanotrophs could keep on their energy metabolism by making use of ferrihydrite as electron acceptor. In the anoxic condition, the methane-oxidizing bacteria could reduce the iron mineral 50 times as fast as the ANME (Anaerobic methanotrophic archaea) anoxic methanotrophic archaea, and the secondary mineral were tentatively found to be vivianite via SEM (Scanning electron microscope), EDS (Energy disperse spectroscopy) and XRD (X-ray diffraction) analysis. Based on the principal component analysis of the methanotroph groups, the microbial community varied in composition relative to mode of energy metabolism. Comparison of the methanotroph groups at the phylum level found that in the hyperoxic systems,  $\gamma$ -Proteobacteria in reduced ferrihydrite increased up to 56% in relative abundance, and *Methylococcales* became the only one species of methanotroph in phylum, while in the anoxic systems,  $\gamma$ -Proteobacteria decreased down to 6% in relative abundance, but  $\alpha$ -Proteobacteria increased up to 31%. **【Conclusion】** In the anoxic systems, methanotrophic bacteria ( $\gamma$ -Proteobacteria) and non-methanotrophic bacteria worked together driving iron reduction. This study has revealed the process of energy metabolism of the Proteobacteria dominated methanotroph groups, and developed the theory of methane oxidation driven by NC10 bacteria and ANME archaea in anoxic environment, and hence provide certain theoretic support to future studies on bio-control of methane production.

**Key words** Methanotrophs; Proteobacteria; Extracellular electron transfer; Anoxic niches; Microbial omics

(责任编辑: 陈荣府)