

DOI: 10.11835/j.issn.2096-6717.2024.113



开放科学(资源服务)标识码 OSID:



河流微生物产甲烷研究进展

吴尔寒^{1a}, 毛羽丰², 何强^{1a,1b}, 孔慈明³

(1. 重庆大学 a. 环境与生态学院; b. 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400045; 2. 重庆交通大学国家内河航道整治工程技术研究中心; 水利水运工程教育部重点实验室, 重庆 400074; 3. 曲靖市环境工程评估中心, 云南 曲靖 655000)

摘要: 甲烷(CH₄)是主要温室气体之一, 其对全球气候变化产生重要影响。河流是产甲烷的重要场所, 而河流环境的复杂性使得采用传统方法难以有效开展对河流微生物产甲烷的深入研究。综述产甲烷微生物的基本分类、在环境中的分布、甲烷产生的氢营养代谢途径、甲酸发酵途径、乙酸发酵途径以及甲基营养途径等酶促反应途径和非酶促反应途径; 从温度、pH值、氧化还原电位、流速与水位、水流剪切力、气象条件、植被类型8个方面探讨影响河流微生物产甲烷过程的环境因子; 总结PCR技术和高通量测序等分子生物学技术在河流微生物产甲烷研究中的应用现状; 指出目前河流微生物产甲烷研究在河流环境刻画的有限性、PCR和测序技术应用的局限性、数据解读与分析的复杂性3个方面存在不足; 从河流环境模型的构建与应用、分子生物学技术的更深入应用、知识共享与智能化分析3个方面对未来河流甲烷排放研究进行展望, 为河流微生物产甲烷的深入研究提供新思路和新方法。

关键词: 河流; 微生物; 甲烷; 影响因素

中图分类号: X511 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-6717(2026)01-0231-12

Research advances in methane production by river microorganisms

WU Erhan^{1a}, MAO Yufeng², HE Qiang^{1a,1b}, KONG Ciming³

(1a. College of Environment and Ecology; 1b. Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400045, P. R. China; 2. National Engineering Research Center for Inland Waterway Regulation; Key Laboratory of Hydraulic and Waterway Engineering of the Ministry of Education, Chongqing Jiaotong University, Chongqing 400074, P. R. China; 3. Qujing Environmental Engineering Evaluation Center, Qujing 655000, Yunnan, P. R. China)

Abstract: Methane (CH₄), an important greenhouse gas, exerts a substantial influence on global climate change. Rivers are crucial sites for methane production, but the complexity of environmental conditions in rivers makes it difficult to conduct in-depth research on methane generation by river microorganisms with traditional methods. This article first outlines the basic classification of methanogenic microbes, their distribution and the pathways of methane formation such as the hydrogen nutrition metabolism pathway, the formic acid

收稿日期: 2024-08-30

基金项目: 国家自然科学基金(U20A20326)

作者简介: 吴尔寒(2003-), 女, 主要从事环境综合治理研究, E-mail: 1161869276@qq.com。

何强(通信作者), 男, 教授, 博士生导师, E-mail: hq0980@126.com。

Received: 2024-08-30

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. U20A20326)

Author brief: WU Erhan (2003-), main research interest: comprehensive environmental treatment, E-mail: 1161869276@qq.com.

HE Qiang (corresponding author), PhD, professor, E-mail: hq0980@126.com.

fermentation pathway, the acetic acid fermentation pathway, the methyl nutrition pathway, and the non-enzymatic reaction pathway. Then, it explores the eight environmental factors affecting the methane production process of river microorganisms: temperature, pH value, redox potential, flow rate and water level, water flow shear force, meteorological conditions, and vegetation type. Subsequently, an overview is provided of the application of molecular biology techniques including PCR technology and high-throughput sequencing, in the study of river microbial methane production. Finally, it points out the problems in current research on methane production by river microorganisms, which are the insufficiency in characterizing river environments, limitations in the application of PCR and sequencing technology, as well as the complexity of data interpretation and analysis. Moreover, it discusses future research on river methane emissions from three directions: the construction and application of river environmental models, the deeper application of molecular biology technology, and knowledge sharing and intelligent analysis, providing new ideas and methods for the exploration on river microbial methane production.

Keywords: river; microorganisms; methane; influencing factors

作为一种最简单的有机化合物,甲烷广泛存在于自然界中。作为全球第二大温室气体,其对全球变暖的贡献率约 30%^[1]。以 20 a 为尺度,甲烷的全球变暖潜能值是二氧化碳的 84 倍^[2-3]。研究表明,每年全球甲烷排放总量约 550~594 Tg^[4]。尽管河流面积占地球表面积的比例很小,但由河流微生物介导的甲烷产生量对全球碳循环贡献巨大^[5],根据 Stanley 等^[6]的研究结果和全球河流甲烷数据库^[7]的统计,河流和溪流中的 CH₄ 浓度范围为 0~456 μmol/L,其 CH₄ 排放量大致相当于沿海和公海总排放量^[8]。因此,研究河流微生物产甲烷机制及其影响因素对于理解全球碳循环、评估气候变化风险具有重要意义。

为深入理解河流生态系统中甲烷的产生途径及其微生物学基础,笔者系统综述当前已知的产甲烷微生物种类和甲烷产生的机制;分析影响甲烷产生的环境因素以及产甲烷微生物的分子研究现状;展望尚未有文献报道的环境因素及其之间的相互作用对河流微生物产甲烷的影响,以及更多分子生物学技术在河流微生物产甲烷方面的深入应用。

1 产甲烷微生物

1.1 产甲烷菌

研究表明^[9-11],已知的产甲烷古菌只属于 Euryarchaeota 门(广古生菌门)。在该门中,产甲烷菌最初被分成 5 个目,分别是 Methanopyrales(甲烷火菌目)、Methanosarcinales(甲烷八叠球菌目)、Methanobacteriales(甲烷杆菌目)、Methanomicrobiales(甲烷微菌目)和 Methanococcales(甲烷球菌目)。在 2008—2013 年间,研究者又对 Euryarchaeota 门的系统分类进行了精细化扩展,在该门中引入了 Methanocellales 目(甲烷胞菌目)^[12]和 Methanomas-

siliicoccales 目(甲烷马赛球菌目)^[13-14]。除 Methanomassiliicoccales 外,以 H₂ 和 CO₂ 为底物的产甲烷生化途径在其余产甲烷菌目生物体内均存在,而以乙酸盐为底物的产甲烷途径仅在 Methanosarcinales 目中被发现,甲基营养型产甲烷途径在 Methanosarcinales、Methanomassiliicoccales 和 Methanobacteriales 中均存在。随后经代谢组学分析研究,研究者们在 Euryarchaeota 门的基础上新增加了 Bathyarchaeota 门(深古菌门)^[15]和 Verstraetearchaeota 门(佛斯特拉门)^[16],并对新增加的两个门进行基因组测序,在归属于这两个门的产甲烷菌体内也找到了甲基营养型产甲烷途径。产甲烷菌的分类见表 1。

产甲烷菌分布范围广泛,一些产甲烷菌甚至可以在火山口或者盐湖等极端环境中生存。Jones 等^[17]和 Kurr 等^[11]从火山口分别分离出 *Methanocaldococcus jannaschii*(詹氏甲烷球菌)和 *Methanopyrus kandleri*(甲烷嗜热菌);Mathrani 等^[18]从盐湖中分离出了 *Methanohalophilus zhilinae*(织里嗜盐产甲烷菌)。一些产甲烷菌可以与植物、动物和人类共生,从湿心材中分离出的 *Methanobacterium arboophilicum*(嗜树甲烷杆菌)能利用 *Clostridium butyricum*(丁酸梭菌)降解果胶和纤维素,产生 H₂,继而产生甲烷^[19-20];白蚁等昆虫的肠道中也有不同种类的 *Methanobrevibacter*(甲烷短杆菌)存在^[21];在人类的粪便和牙菌斑中也分别检测到了 *Methanosphaera stadtmanae*(斯氏甲烷球菌)^[13,22-23]和 *Methanobrevibacter oralis*(口腔甲烷杆菌)^[24-26]等产甲烷菌。一些产甲烷菌在稻田、泥炭沼泽或者湿地等缺氧土壤沉积物中也有分布。*Methanoregula boonei*(布尼氏甲烷规则菌)是从酸性泥炭沼泽中分离出来的^[27-28];而 *Methanosarcina mazei* TMA(梅氏甲烷八叠球菌)和

表 1 产甲烷菌的分类

Table 1 Classification of methanogens

门	目	科	属	
广古生菌门 Euryarchaeota	甲烷火菌目 Methanopyrales	甲烷火菌科 Methanopyraceae	甲烷火菌属 <i>Methanopyrus</i>	
		甲烷八叠球菌目 Methanosarcinales	甲烷八叠球菌科 Methanosarcinaceae	甲烷八叠球菌属 <i>Methanosarcina</i>
	甲烷嗜盐菌属 <i>Methanohalophilus</i>			
	甲烷喜盐菌属 <i>Methanohalobium</i>			
	甲烷盐菌属 <i>Methanosalsum</i>			
	甲烷微球菌属 <i>Methanimicrococcus</i>			
	甲烷拟球菌属 <i>Methanococcoides</i>			
	甲烷食甲基菌属 <i>Methanomethylivorans</i>			
	甲烷叶菌属 <i>Methanolobus</i>			
	鬃毛甲烷菌科 Methanosaetaceae		鬃毛甲烷菌属 <i>Methanosaeta</i>	
			甲热球菌科 Methermicoccaceae	甲热球菌属 <i>Methermicoccus</i>
	甲烷杆菌目 Methanobacteriales		甲烷杆菌科 Methanobacteriaceae	甲烷杆菌属 <i>Methanobacterium</i>
				甲烷短杆菌属 <i>Methanobrevibacter</i>
			甲烷嗜热杆菌属 <i>Methanothermobacter</i>	
		甲烷球形菌属 <i>Methanosphaera</i>		
		甲烷嗜热菌科 Methanothermaceae	甲烷嗜热菌属 <i>Methanothermaceae</i>	
			甲烷微菌目 Methanomicrobiales	甲烷微菌科 Methanomicrobiaceae
		产甲烷菌属 <i>Methanogenium</i>		
		产甲烷泡菌属 <i>Methanofollis</i>		
		甲烷囊菌属 <i>Methanoculleus</i>		
		甲烷盘菌属 <i>Methanoplanus</i>		
	叶形甲烷菌属 <i>Methanolacinia</i>			
	甲烷粒菌科 Methanocorpusculaceae	甲烷粒菌属 <i>Methanocorpusculum</i>		
		产甲烷石状菌属 <i>Methanocalculus</i>		
	甲烷螺菌科 Methanospirillaceae	甲烷螺菌属 <i>Methanospirillum</i>		
	甲烷规则菌科 Methanoregulaceae	甲烷规则菌属 <i>Methanoregula</i>		
		甲烷绳菌属 <i>Methanolinea</i>		
甲烷球菌目 Methanococcales	甲烷球菌科 Methanococcaceae	甲烷球菌属 <i>Methanococcus</i>		
		甲烷嗜热球菌属 <i>Methanothermococcus</i>		
	甲烷热球菌科 Methanocaldococcaceae	甲烷热球菌属 <i>Methanocaldococcus</i>		
甲烷干热菌属 <i>Methanotorris</i>				
甲烷胞菌目 Methanocellales	甲烷胞菌科 Methanocellaceae	甲烷胞菌属 <i>Methanocella</i>		
甲烷马赛球菌目 Methanomassiliococcales	甲烷马赛球菌科 Methanomassiliococcaceae	甲烷马赛球菌属 <i>Methanomassiliococcus</i>		
深古菌门 Bathyarchaeota				
初古菌门 Korarchaeota			初古菌属 <i>Korarchaeum</i>	
佛斯特拉门 Verstraetearchaeota	Ca. Methanomethyliales	Ca. Methanomethylaceae	Ca. <i>Methanomethylicus</i>	
			Ca. <i>Methanosuratus</i>	
	Ca. Methanohydrogenales	Ca. Methanohydrogeniaceae	Ca. <i>Methanohydrogenicus</i>	
	Ca. Methanomediales	Ca. Methanomediaceae	Ca. <i>Methanomedium</i>	
	Ca. Methanomethylivorales	Ca. Methanomethylivoraceae	Ca. <i>Methanomethylivorans</i>	
	Ca. Methanomethyloarchaeales	Ca. Methanomethyloarchaeaceae	Ca. <i>Methanomethyloarchaeum</i>	
热变形菌门 Thermoproteota	热变形菌目 Thermoproteales	热变形菌科 Thermoproteaceae	热变形菌属 <i>Thermoproteus</i>	

Methanobrevibacter arboriphilus 是从稻田中分离出来的^[29]。还有一些产甲烷菌生活在沼气厂等非天然生境中。氢营养型和乙酸盐营养型产甲烷菌是中

温沼气厂中普遍存在的两种产甲烷菌,通常以 *Methanosarcina* 和 *Methanoculleus* (甲烷囊菌) 为主^[30-33]。

1.2 其他生物

一直以来,研究者们认为甲烷只能在中性和严格厌氧的环境下产生,但近年来在一些水域中检测出水体中部甲烷含量较高的现象,虽然不排除是分布在水体中部的甲烷氧化菌数量较少、水体中部的甲烷在较短的时间内无法得到迅速扩散和氧化分解所致,但不能完全解释有氧水体中过高的甲烷通量,且同位素对比显示,水体有氧区域被氧化的碳源与 CH_4 碳同位素值差异较小(-39.4‰),而与沉积物碳源相差较大(-65‰),表明有氧水体中确实存在尚未发现的其他产甲烷途径^[34],这种现象被学界称为“甲烷悖论”。有学者发现,水体中的浮游生物尤其是藻类可以在有氧条件下产生甲烷,Bizic等^[35]对淡水、土壤和海水中存在的蓝藻门(如*Anabaena borealis*(北极念珠蓝细菌))等13种代表物种进行研究发现,蓝藻本身会在含磷的环境中产生 CH_4 ,这一过程可能与细胞胞内产生的磷酸盐在去甲基化反应中的释磷作用有关,与其他文献报道的在缺乏磷源条件下有些藻类可利用甲基磷酸酯在脱磷酸酯分子过程中产甲烷的方式并不一致^[34]。且蓝藻在光照条件下将固定的 CO_2 转化为 CH_4 的效率与光合作用过程密切相关,表明蓝藻细胞在有氧环境中产生甲烷的机制可能与光合电子传递链紧密联系,Mao等^[36]也得出了相似的结论。越来越多的研究表明,“甲烷悖论”存在多种有氧产甲烷途径,就藻类而言,富营养化引起的藻类繁殖是水中 CH_4 好氧释放的原因,贫磷环境中甲基磷酸酯脱磷酸酯也是引起好氧释放甲烷的原因^[34]。

2 产甲烷机制

2.1 酶促反应

在严格无氧的环境中,产甲烷菌以 H_2 为底物,在酶的作用下还原 CO_2 等一碳化合物,形成自身细胞物质并获得所需要的能量,在这个过程中产生 CH_4 ^[37]。甲烷产生的总反应式为 $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 = \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ 。

资料显示,在无氧环境中,产甲烷生化反应的机制已较为明确:第1步, CO_2 在甲烷呋喃(MF)的作用下被激活并与 H_2 反应,还原成甲酰基;第2步,甲酰基从MF转移至还原态活性四氢蝶呤(THMP)上,通过脱水和还原后,分别生成亚甲基和甲基化合物;第3步,在 Na^+ 泵作用下甲基被转移到辅酶M(CoM)上;第4步, $\text{CH}_3\text{-CoM}$ 以HS-HTP为电子供体,在甲基还原酶系作用下还原为甲烷,该过程中,作为甲基还原酶复合物的一部分,辅酶 F_{430} 参与反应;第5步,在HS-HTP的参与下,甲基还原酶- F_{430}

复合物催化 CoM-S-CH_3 产生 CH_4 和 CoM-S-S-HTP ,同时 H^+ 被转运至细胞膜外,由此产生的质子浓度梯度可以推动ATP合酶合成ATP,之后,由ATP合酶重新泵入细胞内的质子又使带负电的 CoM-S-S-HTP 还原回 CoM-SH 和 HS-HTP ^[37]。一些产甲烷菌也可以使用一氧化碳(CO)产甲烷,在*Methanosarcina barkeri*(巴氏甲烷八叠球菌)和*M. thermautotrophicus*(热自养甲烷热杆菌)中,4个 CO 分子被 CO 脱氢酶(CODH)氧化为 CO_2 ,然后1个 CO_2 分子以 H_2 作为电子供体被还原为 CH_4 ^[38-39]。因此,这两种产甲烷的微生物仍可以以 H_2 和 CO_2 为底物进行生长繁殖。

Methanosarcina acetivorans(噬乙酸甲烷八叠球菌)也可以使用 CO 作为底物,但由于其体内缺乏正常功能的氢化酶系统,无法以 H_2 和 CO_2 为底物进行生长繁殖。但这种微生物能够以 CO 为底物产生大量甲酸盐,在这个过程中,甲酸盐首先被甲酸脱氢酶(FDH)氧化为 CO_2 ,然后 CO_2 分子被还原为甲烷^[40-41]。*Methanosarcina*属和*Methanothrix*属(甲烷丝菌属)可以利用乙酸盐产生甲烷,首先乙酸被激活,与辅酶A(CoA)结合生成乙酰CoA,然后乙酰CoA复合物被分解。甲基被转移到THMP上,并在 CO_2 还原途径中被进一步还原成甲烷。在该反应中,羰基被氧化为 CO_2 ,从而为甲基还原提供电子^[42]。

除此之外,Lang等^[43]对*Candidatus Methanomethylophilus alvus*(嗜甲基甲烷菌)和*Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*进行研究发现,两者胞内缺乏辅酶 F_{430} ,但含有辅酶 F_{420} ,故可以使用甲醇等含甲基物质作为底物。大多数甲基营养型产甲烷菌属于*Methanosarcinales*。其产甲烷的机制:第1步,甲基化底物中的甲基通过底物特异性甲基转移酶转移至类胡萝卜素蛋白(MT_1)上;第2步,通过另一种甲基转移酶(MT_2)与 CoM-SH 反应,形成 $\text{CH}_3\text{-CoM}$ ^[44]。各酶促反应途径如图1所示。

2.2 非酶促反应

有学者^[35,45-47]研究了多种真菌、动植物细胞发现,这些生物的细胞在有氧条件下也能产生甲烷,而Ernst等^[48]通过对*B. subtilis*(枯草芽孢杆菌)和*Escherichia coli*(大肠杆菌)的研究发现了相似的现象,并进一步推测,许多生物的细胞可以将葡萄糖或丙酮酸代谢为含氮或/和硫的甲基键合物,作为活性氧(ROS)驱动生成 CH_4 的底物。在Fenton型条件下, Fe^{2+} 和 H_2O_2 反应形成 $\bullet\text{OH}$ 自由基或/ $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]^{2+}$ 复合物,这些复合物反过来氧化甲基化的含氮或/和硫化合物,产生 $\bullet\text{CH}_3$ 自由基,然后形成

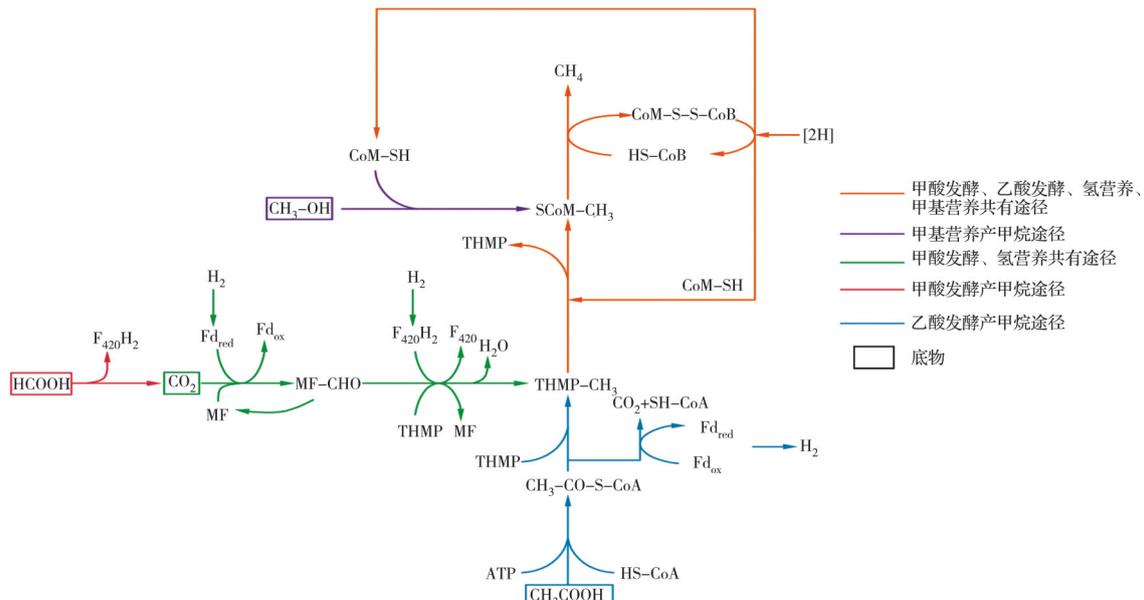


图 1 甲烷生成的酶促反应途径

Fig.1 Enzymatic reaction pathways for methane production

CH₄。

Liu 等^[49]总结了学术界对蓝细菌、藻类、真菌、紫色非硫细菌等生物细胞在含氧条件下产甲烷机制的推测,将蓝细菌产甲烷的机制归因于甲基磷酸酯的去甲基化或与光驱动的初级生产有关,将藻类产甲烷的机制归因于以含甲基硫化物为碳前体的去甲基化反应,将真菌产甲烷的机制归因于以甲硫氨酸为碳前体的氧化和去甲基化反应,将紫色非硫细菌产甲烷的机制归因于含铁固氮酶对二氧化碳的还原作用。近年来,生物细胞在有氧环境中产生甲烷的现象引发了广大学者的关注,越来越多的研究表明,一些含铁的酶类可能也参与了生物有氧产甲烷过程,但目前尚无文献明确细胞在含氧条件下产甲烷的真实机制。

3 影响河流微生物产甲烷的环境因子

3.1 水环境条件

3.1.1 温度

温度通过影响微生物体内酶活性^[50]、细胞结构完整性以及群落结构与分布改变甲烷生成速率。藻类生存的最适温度为 30~35.2 °C^[51],产甲烷菌按最适生长温度可分为嗜冷菌(最适温度不超过 25 °C)、嗜温菌(最适温度为 30~40 °C)、嗜热菌(最适温度为 50~60 °C)和极端嗜热菌(最适温度高于 80 °C)^[52]。其中嗜冷菌主要是乙酸营养型古菌^[53-56]。嗜温菌的种类较为广泛,氢营养型和乙酸营养型代谢途径在这些微生物体内均存在^[52],但氢营养型产甲烷菌占据优势^[57-58]。嗜热菌最适生存温度较高,一般只存在于氢营养型代谢途径^[52]。Wang 等^[59]对香

溪河的 CH₄ 生成速率进行了定量测定,并同步监测水温数据,数据分析结果显示,CH₄ 的溶解系数仅 0.03~0.05,但实验中检测到一定时间内水中 CH₄ 含量与温度的相关系数达 0.9,表明水中 CH₄ 生成速率与水温之间存在显著的正相关关系,与 McGinnis 等^[60]的研究结果一致。

3.1.2 pH 值

河流及周边环境中 pH 值的变化会影响产甲烷微生物的活性,进而影响河流生态系统的甲烷产量,同时,微生物的生理活动又会影响周围环境的 pH 值^[37],从而影响甲烷的产量。Wang 等^[61]对闽江岸边的土壤厌氧产甲烷潜力以及土壤 pH 值进行监测发现,土壤甲烷产量潜力与土壤 pH 值呈正相关,其线性混合模型的拟合度达 0.9。Zhang 等^[62]监测巢湖西北湾河口水体的 pH 值发现,一定范围内,藻类光合作用越强,水体溶解氧和 pH 值越高,为产甲烷微生物提供的营养物质也越多,在藻类繁殖旺盛时期,水体中的 CH₄ 浓度比饱和浓度高 2~3 个数量级。

3.1.3 氧化还原电位

产甲烷菌是严格的厌氧菌,其细胞内没有高电位的细胞色素和细胞色素氧化酶,其生长需要的相关酶类也只能在完全还原后才能发挥生物学功能,因此,这类微生物对氧化还原电位有非常严格的要求,一般需要一个低氧化还原电位环境。有文献^[63]指出,适合产甲烷菌生长和产生甲烷的氧化还原电位在 -300 mV 以下,甚至可以达到 -400 mV。若河流氧化还原电位较高,可能会抑制产甲烷菌的生长,从而影响甲烷的产生。

3.1.4 有机质

天然有机物和非天然有机物是河流中有机质的主要来源。天然有机物主要来自于动植物残体及其分解产物、土壤有机质在侵蚀和风化过程中的流失以及水生生物的分泌物,非天然有机物主要来自人类生产生活过程中排放的各类污水和农业面源污染物等。

有机质是河流中产甲烷微生物的主要营养来源,不同来源、不同类型、不同组成的有机质会对甲烷的产生造成不同影响。一般来说,河流中的有机质含量越高、种类越丰富,越有利于甲烷的产生。Wallace等^[64]对McArthur河和Tennant溪进行野外监测发现,生活在两水体中的产甲烷菌主要以CO₂和低分子量脂肪酸为碳源,在含有碳酸盐、CO₂和有机碳的地下水汇入时,甲烷产量更高。有学者^[65]研究发现,御临河中甲烷产量变化趋势与藻类衰亡过程中河流有机质含量变化趋势类似。Zhang等^[62]也根据类似的实验结果推测,在繁殖旺盛时期,藻类通过光合作用产生较多的有机物,从而对水体中CH₄的产生作出重要贡献。

3.2 水动力条件

3.2.1 流速与水位

流速可以通过影响沉积物的分布来影响甲烷的生成,当流速较慢时,沉积物容易在河道底部沉积,从而为产甲烷微生物提供丰富的底物;当流速较快时,沉积物不容易在河底沉积且容易被水流冲刷,河流中的产甲烷微生物能够利用的有机质较少,甲烷产生量相应减少。此外,流速也可以通过影响微生物的分布来影响甲烷的生成,在流速较慢的河流中,微生物有更多机会在沉积物中定居和繁殖;在流速较快的河流中,因受到水流冲刷作用的影响,微生物难以在沉积物中稳定存在,会降低甲烷的生成量。Wilkinson等^[66]对Rhine河中的沉积物含量与甲烷产量进行研究发现,在流速相对较快的上游区域,沉积物含量相对较少,水体中的甲烷含量相对较低;在中游地区,河床坡度较小,水流平缓,沉积物含量较高,甲烷含量也相对较高;下游靠近荷兰湾的出水口,地势平坦且受到潮汐的影响,流速进一步减缓,沉积物含量更高,甲烷含量也更高。毛羽丰等^[51]对三峡库区干流和支流的研究表明,干流回水减缓了支流上游来水的冲击,从而减缓了支流流速,促进了悬浮有机质的沉积,有利于产甲烷微生物的附着与生长,这是支流CH₄高通量的重要原因之一。

河流水位的高低会影响河流中甲烷的产生量。水位的变动不仅会影响有机质的分布,还会对水体

中的厌氧环境造成影响,从而间接影响甲烷的产生。Bai等^[67]检测发现,河流中CH₄含量春夏季低而秋季高,认为水位的上升可能抑制了甲烷的产生;但Shi等^[68]研究发现,CH₄的通量随着水位的上升而增加。就两者的研究结果来看,水位变化对河流中甲烷产生量的影响有待深入研究。

3.2.2 水流剪切力

河水流态的变化会产生不同的水流剪切力,而水流剪切力的大小会影响微生物的生长与繁殖、微生物的群落结构、微生物的附着与生物膜的形成。目前的研究多集中于水流剪切力对排水管道中生物膜的冲刷作用,而由于河流环境的复杂性,河流中水流剪切力对产甲烷微生物的影响还未见文献报道。

水流剪切力能够通过影响营养物质的有效滞留时间而影响产甲烷微生物的代谢速率和能量摄取;水流剪切力还能改变产甲烷微生物细胞的形态和结构,当微生物细胞受到剪切力作用时,其细胞壁和细胞膜可能因受到压力而发生形变,细胞内的蛋白质等生物大分子的分布和构象也可能发生变化,这些形变和变化可能影响细胞的分裂和代谢机制。此外,剪切力作为一种物理刺激,也可能触发微生物的应激反应,导致部分基因表达发生变化,从而改变产甲烷微生物的生理功能和遗传适应性。通过这3种方式,水流剪切力可以改变微生物的生长与繁殖方式,影响河流中产甲烷微生物的种类及数量,导致河流甲烷释放量发生变化。

不同微生物种类对水流剪切力的耐受性不同,从而在不同的水流环境中占据不同的生态位。在适度的剪切力作用下,一些能够快速适应环境并有效利用营养物质的微生物种类可能成为优势种群,占据更多的生态位空间。此外,适当的剪切力有助于促进微生物间的相互作用,防止单一微生物种群的过度繁殖,从而保持群落的多样性和稳定性,进而促进甲烷的生成。

水流剪切力对产甲烷微生物在固体表面的附着具有重要影响。适当的剪切力可以促进微生物与固体表面的接触和黏附,有利于生物膜的形成,从而增加河流生态系统中甲烷的产量。水流剪切力还会影响生物膜的内部结构和特性,较高的剪切力可以使生物膜结构更加致密和稳定,提高微生物的抗逆性和适应能力。同时还能促进水体和生物膜内部营养物质的循环和代谢产物的排出,有利于生物膜的持续生长和繁殖,增加甲烷产量。

3.3 气象条件

气象条件主要通过光照、降雨等间接影响河流

中甲烷的产量。光照主要通过影响河流中的水温和藻类等生物的活动来影响甲烷的产生。在光照充足的情况下,河流表层的藻类可以大量繁殖,以促进好氧产甲烷,这个过程中藻类细胞的呼吸作用和衰亡也会消耗水中的溶解氧,有利于在沉积物中形成厌氧环境,促进厌氧产甲烷。Bizić等^[35]发现,淡水生态系统中的藻类和产甲烷菌可以在光照、黑暗、有氧或缺氧条件下快速产生甲烷,且在有氧光合作用下产生甲烷的效果大幅增强。降水量的变化会对河岸消落带产生影响,尤其是暴雨期间,洪水挟带岸边的有机质等进入河流,从而增加水中营养盐的含量,为甲烷的产生提供更多底物。彭兴意等^[69]对三峡库区万州段的甲烷功能菌群落进行研究发现,随着夏季降水的增加,更多土壤有机质被带入河水中,从而增加了河水中甲烷的产生量。除此之外,暴雨也会造成河流流量激增,对河流水温产生影响,从而搅动水流,增加甲烷的产生。Huang等^[70]监测到澎溪河在泄水期和低水位运行期的甲烷产生量较高,推测夏季频繁的降雨搅动水体,破坏了水中温度分层,可能是造成这一现象的重要原因。

3.4 植被类型

不同类型的植被通过根系分泌不同的有机物质,这些分泌物成为水中和底泥中特定微生物的营养来源,影响河流中产甲烷微生物的群落结构。植被通过光合作用产生氧气,氧气溶于河水,影响水体和底泥的氧化还原环境,对微生物的代谢过程产生促进或抑制作用,从而影响甲烷的产量。此外,植被类型决定了其凋落物等有机物质的种类和数量。这些有机物质在河流底泥中分解时,为产甲烷微生物提供了必要的底物。不同类型的有机物质对产甲烷微生物的促进作用可能不同,从而对甲烷的产量造成的影响不同。目前有关植被类型对水体甲烷产量影响的研究多见于湿地,湖泊较为稀少,而河流几乎未见文献报道。

通过优化植被类型可以调控河流微生物产甲烷的过程。选择根系发达、分泌物丰富的植被类型,可以增加有机质含量,为产甲烷微生物提供充足的底物和营养;选择光合作用强、泌氧能力适中的植被类型,可以维持河流生态系统利于促进氧化还原反应的环境,提高产甲烷微生物的活性。合理配置不同种类的植物,形成多样化的植被群落,可以提供更丰富的有机物质和更复杂的微生物生境,有利于产甲烷微生物与其他微生物的相互作用,控制甲烷的产生。

4 河流产甲烷微生物的分子研究现状

研究微生物的传统方法是先提纯分离,然后用特定的培养基进行扩大培养,这种方法难以对生活极端环境或者生活环境十分复杂的微生物进行更加深入的研究。对于这一类微生物,使用分子生物学方法比较合适。

近年来,越来越多的分子生物学方法被用来确定河流中产甲烷古菌的群落结构,其中较为成熟的方法是基于16S rRNA和*mcr A*基因的克隆技术。此外,电泳和PCR技术也被广泛运用。与传统依赖纯培养的方法相比,这些方法和技术具有高度的敏感性、快速性和可靠性。

Chen等^[71]采用定量PCR和高通量测序对珍珠河口口的*Methanomicrobiaceae*(甲烷微菌属)等耐盐产甲烷菌的*pmo A*基因序列和*mcr A*基因序列进行测定,结果表明,产甲烷菌的生物量与河口水体中的颗粒态有机碳浓度密切相关。Chaudhary等^[72]利用基于16S rRNA和*mcr A*基因序列克隆技术研究淡水生态系统中的产甲烷古菌落,结果表明,淡水沉积物中产甲烷菌的Methanomicrobiales目和Methanosarcinales目占据主导地位。利用基于16S rRNA的系统发育分析法,Wang等^[73]检测到珠江口沉积物中与甲烷营养古菌和产甲烷古菌有关的序列较少。无独有偶,有研究人员^[51]在御临河的富氧区域反复检测到甲烷过饱和现象,且在含氧且富含甲烷的表层水中原位检测到了未曾被培养研究的产甲烷古菌。通过甲基辅酶M还原酶A的mRNA特异性PCR基因,揭示了活跃的产甲烷作用,推测可能是表层河水中的光自养生物的产氢气作用为这些产甲烷古菌营造了局部厌氧环境。与Grossart等^[74]的研究结果不谋而合。借助分子生物学方法,越来越多的研究表明,含氧水中由微生物介导的甲烷生成在河流甲烷释放中扮演着重要角色。

此外,利用分子生物学技术构建工程菌能扩大其可以利用的底物范围,进而增强其环境适应性,有助于提高后续研究的深度、精度和效率^[75]。Chelapandi等^[76]研究发现,野生型产甲烷菌能利用的底物十分有限,需要一个遗传系统对产甲烷菌的可用基因组数据进行功能分析,以确定和量化基因表达,这一点在*M. barkeri* Fusaro、*Methanosarcina acetivorans* C₂A、*M. mazei* Gol、*Methanothermobacter marburgensis*(甲烷热杆菌)和*Methanococcus Maripaludis* S5产甲烷的研究中已经得到证实^[77]。在产甲烷菌中,*M. acetivorans*能够利用底物,通过

氢营养代谢、甲酸发酵、乙酸发酵以及甲基营养4种产甲烷途径产生甲烷,且遗传稳定、不易变异^[78]。基于此特性,Lessner等^[78]采用了一种基于质粒的表达系统,将来自*Pseudomonas veronii* MEK700(维罗尼假单胞菌)体内的广谱特异性酯酶基因*mek B*与组成型*Methanosarcina acetivorans* C₂A启动子(P_{tbp})融合,使其能以乙酸甲酯和丙酸甲酯为底物,通过甲基营养型途径产生甲烷,从而扩大*Methanosarcina acetivorans* C₂A的底物范围。这些方法虽然尚未在河流微生物产甲烷的研究领域得到应用,但其具有精确性、高效性和可控制性,可以实现对河流微生物产甲烷过程的高效研究、深入解析和生态模拟,从而推动这些技术在河流微生物产甲烷领域的分子水平研究,为实际应用提供理论和技术支持。

5 存在的问题

5.1 河流环境刻画的有限性

微生物产甲烷的过程主要取决于适合在特定河流环境中生存的微生物种类,而甲烷的产量则取决于产甲烷微生物在河流环境中处于何种生理状态,因此,河流环境是微生物产甲烷研究的基础。现有文献主要集中于论述流速、水位等因素对河流微生物产甲烷过程的影响,但对河流流态、水流剪切力、岸边生长的植物类型等因素如何影响微生物产甲烷缺乏刻画。

5.2 PCR和测序技术应用的局限性

PCR反应依赖于特异性引物与目标DNA序列的结合^[79-80],但受引物与模板DNA结合效率、DNA聚合酶活性等因素的影响,某些序列可能比其他序列更容易被扩增,导致扩增结果不能反映河流微生物产甲烷的真实情况。测序技术虽然能将生物体的DNA或RNA序列完整测出,但河流产甲烷微生物群落结构复杂,对于一些丰度较低但可能在群落中起关键作用的微生物种类,更容易在测序过程中被遗漏^[81]。此外,现有资料显示,分子生物学技术在环境领域的应用仍停留在运用PCR和测序等技术对与产甲烷相关的基因进行研究,或对微生物进行检测与鉴定,以明确河流中产甲烷微生物的种类及活性,在环境领域中,利用更多分子生物学技术对河流产甲烷过程进行调控的研究尚未见文献报道。

5.3 数据解读与分析的复杂性

分子生物学技术在应用过程中会产生大量的数据,这些数据不仅包含大量的序列信息,还包含复杂的结构信息和调控信息^[82],且具有高维度的特性。虽然t检验等多种分析方法被用于在海量的数据中提取有价值的信息,但由于不同分析方法得出

的结果存在差异,加之生物本身具有复杂性、特异性和未知性,现有的分析方法无法准确且高效地对数据进行分析,也难以将不同实验数据进行合理比较、整合并与特定的生物学意义相结合,从而难以实现对所得数据的有效分析。

6 展望

随着对河流生态系统复杂性和重要性认识的加深,河流微生物产甲烷作为地球碳循环中一个关键而复杂的环节,对其研究正进入一个新的阶段。

6.1 河流环境模型的构建与应用

收集研究区域的地形图、土地利用图、数字高程模型等基础地理数据以及河流流速、流量、水位等水文数据,用于确定河流的边界、流向、坡度、流态等,并计算水流剪切力。之后,使用GIS软件对河流进行空间概化^[83],将实际河流的地理信息转化为物理模型输入数据,从而构建河流的三维模型,以模拟不同水流剪切力条件下的河流环境。

通过现场调查或遥感技术识别河流两岸及河底的植物类型,记录其分布和覆盖度。采集河流水体和底泥样本,进行微生物群落结构分析,特别是能够产甲烷的微生物的种类和数量。之后,基于微生物群落结构数据,构建产甲烷微生物的生物生长动力学模型,考虑温度、pH值、营养条件等因素对微生物活性的影响。将植物类型作为模型输入参数之一,通过文献调研或实验数据确定不同植物类型对底质、光照、营养条件等的具体影响,并将这些影响转化为对产甲烷微生物活性的间接作用。

将构建的物理模型和生物模型进行耦合,形成综合的河流环境模型。在对模型进行验证与优化后,设计不同流态、水流剪切力和植物类型的组合方案,利用构建的河流环境模型进行模拟实验,记录并分析模拟实验过程中产甲烷微生物的活性变化、甲烷产量等关键指标。最后,分析不同流态、水流剪切力和植被类型对产甲烷微生物活性和甲烷产量的影响规律,并探讨可能的机制,以解释这些影响规律。

6.2 分子生物学技术的更深入应用

对不同河流环境条件下的产甲烷微生物进行分离和扩大培养,使用CRISPER-Cas基因编辑技术敲除这些微生物体内的部分基因^[84],研究微生物产甲烷过程及效果的变化,以此明确特定基因在微生物产甲烷过程中的作用和河流产甲烷的多模态机制。此外,该技术可与高通量测序技术联用,以实现产甲烷微生物的改造:利用测序技术对目标微生物进行鉴定,确定其种类和遗传背景,分析其

基因组序列,确定与产甲烷代谢途径相关的关键基因与适合编辑的 CRISPER-Cas 位点;然后将 CRISPER-Cas 系统中的 Cas 核酸酶和 sgRNA 以及影响甲烷产生的正面或负面基因导入微生物细胞内,诱导与产甲烷代谢途径相关的关键基因的消除或替换或强化,引入基因在被改造微生物体内的表达,从而为探索调控微生物产甲烷过程提供新方法,以更好地维护河流生态系统的健康与稳定。

6.3 知识共享与智能化分析

建立和共享代谢途径、基因表达等分子生物学数据库,使研究人员能快速获取和整合信息,以提高数据分析的效率和准确性。在信息整合并形成全面的数据视图后,利用机器学习算法对数据进行分类预测,识别重要的生物标志物或功能元件,通过聚类算法将相似的数据点分组,揭示数据中的隐藏模式和结构,最后利用回归分析研究变量之间的关系,预测生物学反应或过程的结果。对于复杂的生物学数据,则通过构建卷积神经网络(CNN)和循环神经网络(RNN)等深度学习模型进行处理和分析^[82],最后利用自然语言处理(NLP),在文献和报告中自动提取信息,将数据分析结果与当前研究进展和发现进行对比,以提高数据的可靠性。

参考文献

- [1] Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Climate change 2021-The physical science basis [M]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2023.
- [2] MOON J, SHIM C, SEO J, et al. Evaluation of Korean methane emission sources with satellite retrievals by spatial correlation analysis [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2024, 196(3): 296.
- [3] DEAN J F, MIDDELBURG J J, RÖCKMANN T, et al. Methane feedbacks to the global climate system in a warmer world [J]. Reviews of Geophysics, 2018, 56(1): 207-250.
- [4] SAUNOIS M, STAVERT A R, POULTER B, et al. The global methane budget 2000-2017 [J]. Earth System Science Data, 2020, 12(3): 1561-1623.
- [5] RODRÍGUEZ-RAMOS J A, DALY R A, PURVINE S O, et al. Genome-resolved metaproteomics decodes the microbial and viral contributions to coupled carbon and nitrogen cycling in river sediments [J]. mSystems, 2022, 7(4): e0051622.
- [6] STANLEY E H, CASSON N J, CHRISTEL S T, et al. The ecology of methane in streams and rivers: Patterns, controls, and global significance [J]. Ecological Monographs, 2016, 86(2): 146-171.
- [7] STANLEY E H, LOKEN L C, CASSON N J, et al. GRiMeDB: The Global River Methane Database of concentrations and fluxes [J]. Earth System Science Data, 2023, 15(7): 2879-2926.
- [8] ROSENRETER J A, BORGES A V, DEEMER B R, et al. Half of global methane emissions come from highly variable aquatic ecosystem sources [J]. Nature Geoscience, 2021, 14: 225-230.
- [9] BALCH W E, FOX G E, MAGRUM L J, et al. Methanogens: Reevaluation of a unique biological group [J]. Microbiological Reviews, 1979, 43(2): 260-296.
- [10] STADTMAN T C, BARKER H A. Studies on the methane fermentation. X. A new formate-decomposing bacterium, *Methanococcus vannielii* [J]. Journal of Bacteriology, 1951, 62(3): 269-280.
- [11] KURR M, HUBER R, KÖNIG H, et al. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110 °C [J]. Archives of Microbiology, 1991, 156(4): 239-247.
- [12] SAKAI S, IMACHI H, HANADA S, et al. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage ‘Rice Cluster I’, and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(4): 929-936.
- [13] DRIDI B, FARDEAU M L, OLLIVIER B, et al. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 8): 1902-1907.
- [14] IINO T, TAMAKI H, TAMAZAWA S, et al. *Candidatus* methanogranum caenicola: A novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliococcaceae* fam. nov. and *Methanomassiliococcales* ord. nov., for a Methanogenic Lineage of the Class *Thermoplasmata* [J]. Microbes and Environments, 2013, 28(2): 244-250.
- [15] EVANS P N, PARKS D H, CHADWICK G L, et al. Methane metabolism in the archaeal Phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics [J]. Science, 2015, 350(6259): 434-438.
- [16] VANWONTERGHEM I, EVANS P N, PARKS D H, et al. Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal Phylum Verstraetearchaeota [J]. Nature Microbiology, 2016, 1: 16170.
- [17] JONES W J, LEIGH J A, MAYER F, et al. *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent [J]. Archives of Microbiology, 1983, 136(4): 254-261.
- [18] MATHRANI I M, BOONE D R, MAH R A, et al. *Methanohalophilus zhilinae* sp. nov., an Alkaliphilic, Halophilic, Methylophilic Methanogen [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38(2): 139-142.

- [19] SCHINK B, WARD J C, ZEIKUS J G. Microbiology of wetwood: Importance of pectin degradation and *Clostridium* species in living trees [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 42(3): 526-532.
- [20] ZEIKUS J G, HENNING D L. *Methanobacterium arbohilicum* sp. nov. An obligate anaerobe isolated from wetwood of living trees [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1975, 41(1): 543-552.
- [21] LEADBETTER J R, BREZNAK J A. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(10): 3620-3631.
- [22] DRIDI B, HENRY M, KHÉCHINE AEL, et al. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanospaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol [J]. PLoS One, 2009, 4(9): e7063.
- [23] MILLER T L, WOLIN M J, CONWAY DE MACARIO E, et al. Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(1): 227-232.
- [24] BELAY N, JOHNSON R, RAJAGOPAL B S, et al. Methanogenic bacteria from human dental plaque [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(2): 600-603.
- [25] FERRARI A, BRUSA T, RUTILI A, et al. Isolation and characterization of *Methanobrevibacter oralis* sp. nov [J]. Current Microbiology, 1994, 29(1): 7-12.
- [26] ROBICHAUX M, HOWELL M, BOOPATHY R. Methanogenic activity in human periodontal pocket [J]. Current Microbiology, 2003, 46(1): 53-58.
- [27] BRÄUER S L, CADILLO-QUIROZ H, YASHIRO E, et al. Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog [J]. Nature, 2006, 442: 192-194.
- [28] BRÄUER S L, CADILLO-QUIROZ H, WARD R J, et al. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(1): 45-52.
- [29] ASAKAWA S, AKAGAWA-MATSUSHITA M, MORII H, et al. Characterization of *Methanosarcina mazeii* TMA isolated from a paddy field soil [J]. Current Microbiology, 1995, 31(1): 34-38.
- [30] KERN T, THEISS J, RÖSKE K, et al. Assessment of hydrogen metabolism in commercial anaerobic digesters [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(10): 4699-4710.
- [31] KARAKASHEV D, BATSTONE D J, ANGELIDAKI I. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 331-338.
- [32] LUCAS R, KUCHENBUCH A, FETZER I, et al. Long-term monitoring reveals stable and remarkably similar microbial communities in parallel full-scale biogas reactors digesting energy crops [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2015, 91(3): fiv004.
- [33] SUNDBERG C, AL-SOUD W A, LARSSON M, et al. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 85(3): 612-626.
- [34] 郝晓地, 王邦彦, 刘然彬, 等. 碳中和 VS 水体甲烷超量释放/甲烷悖论 [J]. 环境科学学报, 2021, 41(5): 1593-1598.
- HAO X D, WANG B Y, LIU R B, et al. Carbon neutrality vs excess methane release from water environments/the methane paradox [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2021, 41(5): 1593-1598. (in Chinese)
- [35] BIŽIĆ M, KLINTZSCH T, IONESCU D, et al. Aquatic and terrestrial cyanobacteria produce methane [J]. Science Advances, 2020, 6(3): eaax5343.
- [36] MAO Y F, LIN T, LI H, et al. Aerobic methane production by phytoplankton as an important methane source of aquatic ecosystems: Reconsidering the global methane budget [J]. Science of the Total Environment, 2024, 907: 167864.
- [37] 周德庆. 微生物学教程[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2011: 268-271.
- ZHOU D Q. Microbiology course [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2011: 268-271. (in Chinese)
- [38] DANIELS L, FUCHS G, THAUER R K, et al. Carbon monoxide oxidation by methanogenic bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 1977, 132(1): 118-126.
- [39] O'BRIEN J M, WOLKIN R H, MOENCH T T, et al. Association of hydrogen metabolism with unitrophic or mixotrophic growth of *Methanosarcina barkeri* on carbon monoxide [J]. Journal of Bacteriology, 1984, 158(1): 373-375.
- [40] LIU Y C, WHITMAN W B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1125(1): 171-189.
- [41] ROTHER M, METCALF W W. Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: An unusual way of life for a methanogenic archaeon [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(48): 16929-16934.
- [42] WELTE C, DEPPENMEIER U. Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of acetoclastic methanogens [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2014, 1837(7): 1130-1147.
- [43] LANG K, SCHULDES J, KLINGL A, et al. 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.
- [44] BURKE S A, KRZYCKI J A. Reconstitution of mono-methylamine: Coenzyme M methyl transfer with a corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(26): 16570-16577.
- [45] LENHART K, BUNGE M, RATERING S, et al. Evidence for methane production by saprotrophic fungi [J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 1046.
- [46] KLINTZSCH T, LANGER G, NEHRKE G, et al. Methane production by three widespread marine phytoplankton species: Release rates, precursor compounds, and potential relevance for the environment [J]. *Biogeochemistry*, 2019, 16(20): 4129-4144.
- [47] POSTGATE J R. Methane as a minor product of pyruvate metabolism by sulphate-reducing and other bacteria [J]. *Journal of General Microbiology*, 1969, 57(3): 293-302.
- [48] ERNST L, STEINFELD B, BARAYEU U, et al. Methane formation driven by reactive oxygen species across all living organisms [J]. *Nature*, 2022, 603(7901): 482-487.
- [49] LIU L Y, XIE G J, DING J, et al. Microbial methane emissions from the non-methanogenesis processes: A critical review [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 806(Pt 4): 151362.
- [50] 王楠, 蔡曼莎, 李亚静, 等. 运行条件对强化生物除磷颗粒污泥系统性能及微生物群落的影响 [J]. *土木与环境工程学报(中英文)*, 2021, 43(4): 202-210.
WANG N, CAI M S, LI Y J, et al. Effect of operation conditions on the performance and microbial community of an enhanced biological phosphorus removal granular sludge system. [J]. *Journal of Civil and Environmental Engineering*, 2021, 43(4): 202-210.
- [51] 毛羽丰, 何蕊序, 李宏, 等. 三峡水库支流甲烷排放研究进展 [J]. *湖泊科学*, 2024, 36(1): 17-33.
MAO Y F, HE R X, LI H, et al. Research progress on methane emissions from tributaries of the Three Gorges Reservoir [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2024, 36(1): 17-33. (in Chinese)
- [52] 吴美容, 张瑞, 周俊, 等. 温度对产甲烷菌代谢途径和优势菌群结构的影响 [J]. *化工学报*, 2014, 65(5): 1602-1606.
WU M R, ZHANG R, ZHOU J, et al. Effect of temperature on methanogens metabolic pathway and structures of predominant bacteria [J]. *CIESC Journal*, 2014, 65(5): 1602-1606. (in Chinese)
- [53] CHIN K J, CONRAD R. Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 18(2): 85-102.
- [54] KOTSYURBENKO O R, NOZHEVNIKOVA A N, ZAVARZIN G A. Methanogenic degradation of organic matter by anaerobic bacteria at low temperature [J]. *Chemosphere*, 1993, 27(9): 1745-1761.
- [55] KOTSYURBENKO O R, NOZHEVNIKOVA A N, SOLOVIOVA T I, et al. Methanogenesis at low temperatures by microflora of tundra wetland soil [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, 69(1): 75-86.
- [56] ZHANG D D, ZHU W B, TANG C, et al. Bioreactor performance and methanogenic population dynamics in a low-temperature (5-18 °C) anaerobic fixed-bed reactor [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 104: 136-143.
- [57] 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.
- [58] CALLI B, MERTOGLU B, ROEST K, et al. Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(4): 641-647.
- [59] WANG C H, XIAO S B, LI Y C, et al. Methane formation and consumption processes in Xiangxi Bay of the Three Gorges Reservoir [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4449.
- [60] MCGINNIS D F, BILSLEY N, SCHMIDT M, et al. Deconstructing methane emissions from a small northern European River: Hydrodynamics and temperature as key drivers [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(21): 11680-11687.
- [61] WANG W, ZENG C, SARDANS J, et al. Soil methane production, anaerobic and aerobic oxidation in pore-water of wetland soils of the Minjiang River estuarine, China [J]. *Wetlands*, 2018, 38(3): 627-640.
- [62] ZHANG L, HE K, WANG T, et al. Frequent algal blooms dramatically increase methane while decrease carbon dioxide in a shallow lake bay [J]. *Environmental Pollution*, 2022, 312: 120061.
- [63] YANG K, JI H, XING Z X, et al. Influence of methanogens and methanotrophs on methane generation and oxidation in the plant-soil ecological system [J]. *Oxidation Communications*, 2016, 39(1): 8-16.
- [64] WALLACE L, SCHRODER I, DE CARITAT P, et al. Northern Australia hydrogeochemical survey: Data release, preliminary interpretation and Atlas-Tennant Creek, McArthur River and Lake Woods regions: Record 2018/48 [R]. *Geoscience Australia, Canberra*, 2018.
- [65] 刘艺, 许浩廉, 毛羽丰, 等. 铜绿微囊藻衰亡过程中产甲烷动态及关键影响因子 [J]. *土木与环境工程学报(中英文)*, 2019, 41(5): 132-140.
LIU Y, XU H L, MAO Y F, et al. Methane-producing

- dynamics and key influencing factors during the decay of *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Civil and Environmental Engineering, 2019, 41(5): 132-140. (in Chinese)
- [66] WILKINSON J, BODMER P, LORKE A. Methane dynamics and thermal response in impoundments of the Rhine River, Germany [J]. Science of the Total Environment, 2019, 659: 1045-1057.
- [67] BAI X X, XU Q, LI H, et al. Lack of methane hotspot in the upstream dam: case study in a tributary of the Three Gorges Reservoir, China [J]. Science of the Total Environment, 2021, 754: 142151.
- [68] SHI W Q, CHEN Q W, YI Q T, et al. Carbon emission from cascade reservoirs: Spatial heterogeneity and mechanisms [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(21): 12175-12181.
- [69] 彭兴意, 秦宇, 舒钰清, 等. 三峡库区夏季万州段底泥甲烷功能菌群落对甲烷排放的影响[J]. 环境工程学报, 2022, 16(3): 1028-1038.
- PENG X Y, QIN Y, SHU Y Q, et al. Effects of functional methane community in sediments of Wanzhou section of the Three Gorges Reservoir on methane emissions in summer [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(3): 1028-1038. (in Chinese)
- [70] HUANG Y, YASARER L M W, LI Z, et al. Air-water CO₂ and CH₄ fluxes along a river-reservoir continuum: Case study in the Pengxi River, a tributary of the Yangtze River in the Three Gorges Reservoir, China [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2017, 189(5): 223.
- [71] CHEN S Z, WANG P, LIU H D, et al. Population dynamics of methanogens and methanotrophs along the salinity gradient in Pearl River Estuary: Implications for methane metabolism [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(3): 1331-1346.
- [72] CHAUDHARYPP, BRABLCOVÁL, BURIÁNKOVÁ I, et al. Molecular diversity and tools for deciphering the methanogen community structure and diversity in freshwater sediments [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(17): 7553-7562.
- [73] CHEN J Q, WANG F P, JIANG L J, et al. Stratified communities of active Archaea in shallow sediments of the Pearl River Estuary, Southern China [J]. Current Microbiology, 2013, 67(1): 41-50.
- [74] GROSSART H P, FRINDTE K, DZIALLAS C, et al. Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(49): 19657-19661.
- [75] 刘汉龙. 生物建造体系与展望[J]. 土木与环境工程学报(中英文), 2024, 46(4): 1-22.
- LIU H L. Biogenic construction: System and perspectives [J]. Journal of Civil and Environmental Engineering, 2024, 46(4): 1-22. (in Chinese)
- [76] CHELLAPANDI P, SARANYA S. Biogas starter from genome-scale data for methanogenic bioprocessing of protein waste [J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2024, 4(2): 542-563.
- [77] ENZMANN F, MAYER F, ROTHER M, et al. Methanogens: Biochemical background and biotechnological applications [J]. AMB Express, 2018, 8(1): 1-22.
- [78] LESSNER D J, LHU L, WAHAL C S, et al. An engineered methanogenic pathway derived from the domains bacteria and archaea [J]. mBio, 2010, 1(5): e00243-10.
- [79] KAHSEN J, SHERWANI S K, NAQIB A, et al. Quantitating primer-template interactions using deconstructed PCR [J]. PeerJ, 2024, 12: e17787.
- [80] KIM M, RAVISANKAR V, HASSAN Y A, et al. Biochemically programmable isothermal PCR [J]. Advanced Science, 2024, 11(41): e2404688.
- [81] PINTO Y, BHATT A S. Sequencing-based analysis of microbiomes [J]. Nature Reviews Genetics, 2024, 25(12): 829-845.
- [82] SI Y D, ZOU J W, GAO Y C, et al. Foundation models in molecular biology [J]. Biophysics Reports, 2024, 10(3): 135-151.
- [83] KIM S S, MARSHALL L A, HUGHES J D, et al. Improving the statistical reliability of river model predictions via simple state adjustments [J]. Environmental Modelling & Software, 2024, 171: 105858.
- [84] SUN X M, WANG J, MOU C X, et al. Knockout of IRF3 and IRF7 genes by CRISPR/Cas9 technology enhances porcine virus replication in the swine testicular (ST) cell line [J]. Biotechnology Journal, 2024, 19(1): e2300389.