

张 瑞,雍晓雨,周 俊,等. 分子生物学技术在产甲烷古菌多样性研究中的应用[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):16-20.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.005

分子生物学技术在产甲烷古菌多样性研究中的应用

张 瑞¹,雍晓雨^{1,2},周 俊^{1,2},吴美容¹,王舒雅^{1,2},闫志英³,陈怡露¹,郑 涛^{1,2}

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院,江苏南京 211816; 2. 南京工业大学生物能源研究所,江苏南京 211816;
3. 中国科学院成都生物研究所,四川成都 610041)

摘要:产甲烷菌在自然界中分布广泛,是一类重要的严格厌氧原核微生物,其参与的产甲烷作用通常发生在厌氧发酵过程的最后一步,可将无机物或有机化合物最终转化成甲烷和二氧化碳。由于产甲烷菌独特的厌氧代谢机制,使其在自然界碳素循环过程中起着重要作用,因此对于产甲烷菌的多样性以及代谢机制的研究越来越受到人们的关注。相对于传统的培养检测方法,分子生物学技术对于产甲烷菌的多样性及其群落结构的检测更为便捷、准确和科学。介绍了产甲烷古菌的系统分类学发展,系统地阐述了产甲烷菌定性和定量的分子生物学检测方法,总结了不同技术在产甲烷菌多样性研究中的最新成果,最后提出多种技术的复合应用将成为研究的热点。

关键词:产甲烷古菌;生物多样性;分子生物学技术;检测;复合应用

中图分类号: Q939.97 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0016-05

能源和环境是制约当今世界经济可持续发展的两大关键问题,可再生生物质能源的研究显得尤为重要。沼气是最早被人们开发并获得广泛应用的一类可再生能源。沼气所产生的能量不仅能够减少化石能源的消耗,而且可以大大减少温

室气体的排放,同时具有极大的经济效益,因此关于沼气的研究在世界范围内引起广泛的关注^[1]。

微生物群落结构的组成决定其所具有的生态功能,对参与某一特定生物化学转化作用的微生物菌群的定性和定量研究对于探讨其参与反应的机理及关键步骤的解析具有重要的意义。沼气的产生是由多种微生物菌群协同参与的复杂转化过程,参与菌群可大致分为 3 类:水解和发酵细菌、专性产氢产乙酸菌和产甲烷古菌^[2]。产甲烷菌作为厌氧发酵过程最后一步的关键菌群,其群落的组成和数量的变化将直接影响沼气发酵速率和最终的产气量。

产甲烷古菌大多以甲酸、甲基化合物、乙酸、H₂/CO₂ 为底物原料。近年来,随着 Hungate 厌氧操作技术的发展,人们对于产甲烷菌的研究越来越多。产甲烷菌存在于各种极端厌氧环境中,且在不同的生态环境下,产甲烷菌的群落组成也存

收稿日期:2014-03-07

基金项目:国家“973”计划(编号:2013CB733502);国家自然科学基金(编号:21307058,21207065);中国科学院环境与应用微生物重点实验室开放基金(编号:KLCAS-2013-05);江苏省农业自主创新资金[编号:CX(13)3045];江苏省高校自然科学研究面上项目(编号:13KJB610006)。

作者简介:张 瑞(1990—),女,江苏连云港人,硕士,主要从事微生物和分子生物学的研究。E-mail:zhangrui1030@njtech.edu.cn。
通信作者:郑 涛,男,教授,主要从事生物能源、生物材料方向的研究。Tel:(025)58139929;E-mail:zhengtao@njtech.edu.cn。

- [45] Gaffney J S, Marley N A, Clark S B. Humic and fulvic acids isolation, structure and environment role [M]. Washington: Paragons Press, 1996: 378-385.
- [46] Beck A J, Hayes M B H, et al. Organic substances in soil and water: natural constituents and their influences on contaminant behavior [M]. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993: 462-465.
- [47] Wilson M A. NMR techniques and allocations in geochemistry and chemistry [M]. Washington: Paragons Press, 1987: 1251-1265.
- [48] Schulten H R, Schnitzer M. Temperature-resolved in-source pyrolysis-soft ionization mass spectrometry of soil humic acids [J]. Organic Geochemistry, 1993, 20(1): 17-25.
- [49] Cook R L, Langford C H. Environ the nuclear magnetic resonance spectrum analysis of the humus in the soil structure characteristic [J]. Sci Technol, 1998, 32: 719-725.
- [50] Lee G H, Wilson M A, Young B R. The application of the “WATERGATE” suppression technique for analyzing humic substances by nuclear magnetic resonance [J]. Organic Geochemistry, 1998, 28(9/10): 549-559.

- [51] 杨晓云, 费志平, 徐汉虹. 核磁共振技术及其在农药残留分析中的应用 [J]. 农药, 2009, 48(3): 163-166, 171.
- [52] Ian K O, Michael S, Mary T. Determination of phytate in foods by phosphorus-31 Fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Analytical Chemistry, 1980, 52(8): 1288-1291.
- [53] Eugene P M, Brian Q P, Barbara F H, et al. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of phytate in foods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1986, 34(1): 60-62.
- [54] 史全水. 核磁共振技术及其应用 [J]. 洛阳师范学院学报, 2006, 25(2): 82-84.
- [55] Wimmer M J, Smith R R, Jones J P. Analysis of diflubenzuron by gas chromatography/mass spectrometry using deuterated diflubenzuron as internal standard [J]. Journal Agriculture Food Chemistry, 1991, 39(2): 280-286.
- [56] 程晓春. 核磁共振技术在化学领域的应用 [J]. 四川化工, 2005, 8(3): 29-32.
- [57] 万近幅, 杨新洲, 袁经权. 液相核磁共振联用技术 (LC-NMR) 的研究进展 [C]. 昆明: 中国药学会论文集, 2012: 70-76.

在差异,其代谢过程也随着环境的不同而体现出多样性^[3]。自然界中甲烷主要由 3 种途径产生:乙酸发酵途径、氢营养型途径(亦称 CO₂ 还原途径)和甲基营养型途径。不同条件下,各个途径对甲烷生成的贡献率不同。近年来随着分子生物学技术的发展,如 16S rRNA 克隆文库技术、变性梯度凝胶电泳技术、限制性酶切片段长度多态性分析技术和稳定同位素核酸探针技术等多种分子生物学技术的应用,克服了传统培养方法所带来的的形态和生理的变化及不可培养微生物种群缺失的缺陷,使得人们对于产甲烷菌的群落组成及其代谢机制、动力学研究越来越深入。全面准确地了解参与沼气发酵的微生物种群结构,特别是产甲烷古菌的群落组成和结构变化规律,能够为沼气发酵过程的设计优化、微生物代谢调控等提供可靠的技术参数。

1 产甲烷古菌的系统分类学发展

1974 年,Bryant 首次提出了产甲烷菌(Methanogen)这一概念,将其与以甲烷为能量来源的嗜甲烷菌(Methanotrophs)区分开来^[4]。2001 年,《伯杰氏系统细菌学手册》将产甲烷菌放在宽广古生菌门(Euryarchaeota)中。他们广泛存在于各种厌氧环境中,如海水沉积物、湖泊沼泽及动物瘤胃、盲肠等自然生态系统环境中;也存在于废水、稻草秸秆、禽畜粪便等非自然生态环境中^[5]。产甲烷菌分类形式多样,传统的分类是基于微生物的形态结构、生理生化特性等为依据进行的,鉴于产甲烷菌生长条件苛刻,生长速率一般较低,生物量也较少,培养方法特别,其所能利用的底物种类较少,且染色、形态特征也比真细菌易变和难确定,给传统分类法带来极大的挑战。迄今为止,仅有 200 多种产甲烷菌被分离鉴定出来,归属于 3 纲 5 目 10 科 29 个属^[6]。其中 5 目分别为甲烷杆菌目(Methanobacteriales)、甲烷球菌目(Methanococcales)、甲烷微菌目(Methanomicrobiales)、甲烷八叠球菌目(Methanosarcinales)、甲烷火菌目(Methanopyrales)^[7]。随着分子生物学的发展,人们更多地利用系统发育学分类法,依据物种间小亚基核糖体核苷酸的差异性对产甲烷菌进行鉴定和分类^[8]。

2 分子生物学技术在产甲烷古菌多样性中的应用

产甲烷古菌群生活在极端厌氧环境中,对温度、pH 值、底物浓度等因素非常敏感。Hungate 厌氧操作技术的应用与发

展使得产甲烷古菌的纯培养成为可能。然而传统的培养方法较为繁琐,且无法保持微生物生态环境的一致性,而分子生物技术因其在非培养条件下对微生物遗传信息进行研究,从而被认为是产甲烷菌研究的重要且有效的手段。1996 年,伊利诺伊大学第一次完成了产甲烷菌 *Methanococcus jannaschii* 的基因组测序。近年来,人们越来越多地以基因组遗传信息为依据,并运用分子生物学技术来研究物种的种群多样性、群落结构组成、菌群功能及其代谢机理。这些分子生物学技术,例如变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)、限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、末端限制性片段长度多态性分析(terminal - restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、荧光原位杂交技术(florescence *in situ* hybridization, FISH)等的引入,将产甲烷古菌这一重要环境微生物的研究带入了一个新时代。

2.1 16S rRNA/mcrA 基因克隆文库分析

16S rRNA 基因克隆文库分析是在生物多样性研究中最常用的分子手段之一。1990 年,Giocannoni 等首次应用该方法分析马尾藻海海面的浮游微生物多样性^[9]。该方法是基于对样品总 DNA 进行 PCR 克隆获得目的基因 16S rRNA 片段,将其连入载体导入宿主菌中,挑选阳性克隆进行测序,构建克隆文库,对所获得的克隆序列进行生物信息学分析,构建系统发育树,从而获得样品微生物系统多样性。这些种系或者分类操作单元(operational taxonomic units, OTU)的数目直接反映了某一种生物类的丰富度^[10]。

甲基辅酶 M 还原酶(methyl coenzyme - M reductase, MCR)是甲烷生成过程中的关键酶,其 α 亚基(McrA,由 *mcrA* 基因编码)催化甲烷化反应中的最后一步,存在于所有产甲烷菌中^[11]。基于其催化反应的独特性,可作为检测和区分产甲烷菌的分子标记^[12]。1995 年,Springer 等成功验证了 *mcrA* 探针用于产甲烷古菌多样性分析的可行性^[13]。Nolla - Ardèvol 等利用 *mcrA* 基因序列分析中亚碱湖中产甲烷菌群,从而研究其作为高 pH 甲烷反应器接种物的适用性^[14]。*mcrA* 克隆文库技术已日趋完善,并且在产甲烷菌的研究中发挥着不可替代的作用。产甲烷古菌多样性分析中常用的引物序列可查阅文献获得(表 1)。

表 1 产甲烷古菌多样性分析中常用的引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	PCR 产物长度 (bp)	参考文献
16S rDNA	Archaeal21Fa:TTCCGGTTGATCCYGCCGGA; Archaeal958Ra:YCCGGCGTTGAMTCCAATT	900	Delong ^[15]
ME	ME1:GCMATGCGARATHGGWATGTC; ME2:TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT	760	Hales 等 ^[16]
MCR	MCRf:TAYGAYCARATHTGGYT; MCRr:ACRTTCATNGCRTARTT	500	Springer 等 ^[13]

近年来,16S rRNA/*mcrA* 基因的克隆文库分析在沼气工程中的应用越来越广泛。2008 年,Nettmann 等首先将 16S rRNA 和 *mcrA* 分析应用于利用牲畜粪便以及玉米秸秆作为底物的中温商业沼气工程产甲烷古菌多样性的研究中^[17]。研究中发现超过 70% 的古菌 OTU 都属于 *Methanomicrobiales*,即耗氢型产甲烷菌,而乙酸型产甲烷菌占了很小的比重。从而推测 CH₄ 主要由 H₂ 和 CO₂ 途径产生。然而基于

16S rRNA/*mcrA* 基因克隆测序分析的方法仍然存在其固有缺点,为了更全面地分析样品的多样性,需要构建大量的克隆,耗时较长,且成本昂贵^[18]。随着指纹识别技术的发展,通常将其二者结合起来降低测序的费用^[19]。

2.2 变性梯度凝胶电泳

变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)最早由 Fischer 等提出,是用于检测 DNA 片段点

突变的一种技术^[20]。DGGE 是根据长度相同但碱基序列不同的 DNA 片段在不同浓度梯度变性剂中解链行为不同而在电泳时迁移速率不同这一机理,从而将某一样品中不同种属菌株的 DNA 片段区分开。凝胶不同位置所形成的条带与样品中的优势菌群相关,再加以测序以及系统发育分析,进而可直接反映了样品的生物多样性。1993 年, Muyzer 等首次将其用于分析土壤环境中微生物群落结构研究中^[21]。由于其可避免培养法所带来的偏向性,在不改变样品环境的情况下,对样品微生物群落组成及其多样性进行分析,因此又被广泛应用于海洋、高温、高盐、厌氧污泥、污水处理等环境微生物多样性的研究中。然而 Hwang 等利用 DGGE 对活性污泥厌氧反应器中的产甲烷菌群多样性进行研究时发现,基于古细菌的 16S rRNA 基因扩增的 DGGE 分析不能完全反映出样品中所存在的产甲烷菌分类^[22]。这些差异性可能是由于 PCR 扩增、DNA 提取或者是菌群本身的丰富度所造成的。因而 DGGE 一般并不单独作为分析技术应用,而是辅以其他的方法,例如与原位分子杂交技术复合使用,应用于硫酸盐还原菌的研究中^[23]。Zakaria 等利用 FISH 和 DGGE 发现 *Methanosaeta concilii* 是 POME 厌氧消化中的优势菌群,它是乙酸型产甲烷的重要菌群以及属于 *Methanosaeta* 潜在新菌的存在^[24]。但当某种产甲烷菌含量较少,其 DNA 占总 DNA 量不足 1% 时,利用该技术很难检测出。

2.3 荧光原位杂交技术

荧光原位杂交技术是用已知的被荧光标记的单链核苷酸片段作为探针,按照 DNA 碱基互补的原则,与待测样品基因组 DNA 分子杂交,从而检测该特异微生物种群的存在与丰度的一种方法。探针的特异性适用于任一分类学水平的测定,甚至可以区分个体间的差异。16S rRNA 基因的寡核苷酸探针是比较常用的一类探针,其使用对微生物生态学具有重大意义。1993 年, Wagner 等率先将此技术应用于活性污泥微生物群落检测中,之后此技术在中不断得到完善^[25]。刘春等采用荧光原位杂交技术对阿维菌素废水工业化 UASB 反应器中颗粒污泥产甲烷菌群进行分析,发现产甲烷菌在不同粒径的颗粒污泥表面和内部剖面中分布形态相同但分布丰度存在差异。同时,该技术也在不断改进中,使其具有更大的适用性。Stoecker 等用双标记的寡核苷酸探针来替代单标记探针,在一定程度上加强了待测微生物种群的信号强度,同时提高了探针的有效性^[26]。

2.4 限制性酶切片段长度多态性

限制性酶切片段长度多态性(RFLP)是根据 DNA 在限制性内切酶酶切后形成特定 DNA 片段的大小不同而发展起来的一种 DNA 标记技术。然而酶切位点变异经常会受到一些因素影响而突变,从而导致 RFLP 结果的准确度降低。末端限制性酶切片段长度多态性(T-RFLP)是基于 RFLP 发展起来的一种方法,由于其利用特定的标记引物对样品 DNA 进行特异扩增,之后进行限制性内切酶酶切,利用自动 DNA 测序仪对所获荧光标记 T-RFS 的大小以及相对丰度进行测定,大大避免了 RFLP 的不足。T-RFLP 作为一种高通量指纹识别技术已经被应用于微生物群落结构以及组成的变化研究中^[27]。1997 年, Liu 等利用此技术研究复杂环境微生物多样性,之后该技术被广泛应用于各种生态系统中^[28]。Lueders

等采用 T-RFLP 和富集培养的方法研究水稻土壤中产甲烷菌的多样性,发现大部分的产甲烷菌属于 *Methanosarcinaceae*、*Methanosaetaceae* 和 *Methanobacteriaceae*,并且鉴定出未被辨别的 *mcrA* 序列属于 RC-I 古菌成员^[29]。Chin 等利用 T-RFLP 技术和克隆文库结合的方法分析了温度对水稻土壤中产甲烷古菌结构和功能的影响,发现 15℃ 和 30℃ 时,种群结构发生明显变化,*Methanosarcinaceae* 由原来的 7% 上升到 77% (30℃) 和 33% (15℃)^[30]。基于网页的一些工具的开发,大大促进了 T-RFLP 引物以及限制性内切酶的选择^[31]。如新工具 restriction endonuclease picker (REPK) 可以根据研究者提供的不同样品序列来选择合适的限制性内切酶,使得基因的选择可以是多变的,而不是局限于 16S rRNA。T-RFLP 应用也越来越广泛,包括真菌核糖体基因^[32],细菌 16S rRNA 基因^[33],古菌 16S rRNA 基因^[34]及功能基因如固氮基因^[35]、甲烷氧化基因^[36]。

2.5 实时定量 PCR 技术

实时定量 PCR (real-time quantitative PCR) 是基于 PCR 技术基础上发展起来的核酸定量技术。实时定量 PCR 是基于荧光共振能量转移的原理,在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累对整个 PCR 进程进行实时监测,最后通过标准曲线对待测未知模板进行定量分析的方法。在实时定量 PCR 中, C_t 值是一个重要的参数。研究表明,每个模板的 C_t 值与该模板起始拷贝数的对数存在线性关系。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线,从而只要获得未知样品的 C_t 值,就可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。该技术实现了 DNA 模板定量的同时,还具有灵敏度高、准确性强、能实现多重反应、无污染性和具实时性等优点。1992 年,由 Higuchi 等首次提出实时定量 PCR 技术^[37],此后该技术在很多领域广泛应用。Sawayama 等采用实时定量 PCR 技术对固定床厌氧反应器中固定化产甲烷菌系统发育进行分析,发现大部分固定化产甲烷菌属于甲烷八叠球菌属,自由存在的产甲烷菌大部分属于甲烷八叠球菌属和甲烷杆菌属,并成功实现了对固定化与自由存在产甲烷菌的定量分析^[38]。Nettmann 等利用实时定量 PCR 结合 FISH 技术分析 6 个不同底物原料农业沼气罐中产甲烷古菌群落的多样性,大大丰富了对于大型沼气反应器中产甲烷古菌的研究^[39]。王彦伟等利用实时定量 PCR 技术结合 DGGE 研究不同地区低温沼气池中前期、后期产甲烷古菌的群落变化情况,结果发现不同样品发酵前期、后期产甲烷古菌的优势群落及数量上都存在较明显的差异^[40]。实时定量 PCR 更能反映出微生物菌群的真实情况并能对目的微生物进行准确定量。

2.6 稳定同位素核酸探针技术

稳定同位素核酸探针技术 (stable isotope probing, DNA/RNA-SIP) 通过对微生物核酸进行同位素标记,从而在分子水平揭示特定元素在复杂环境中的微生物调控机制^[41]。根据探测的核酸分子不同可以分为 DNA-SIP 和 RNA-SIP^[42]。2000 年, Radajewski 等开发了 DNA-SIP 技术,并成功应用于森林土壤环境中^[43]。2002 年, Manefield 等利用 RNA-SIP 技术发现所研究的工业反应器中的苯酚降解菌主要是 *Thauera genus* 成员^[44]。常用的稳定性同位素有 ^{13}C 和 ^{15}N 等,标记原子增加了 DNA 的浮力密度,通过密度梯度

离心,选择性回收 ^{13}C 标记的 DNA,可用于微生物的鉴定和代谢功能的分析。除了 DNA 之外, RNA 和磷脂脂肪酸(PLFA)等也可被用作标记对象。由于 RNA 不依赖于细胞分裂,因此标记 RNA 相较于 DNA 更接近原位状况,灵敏度更高。目前稳定性同位素示踪技术在世界各国学者中掀起研究热潮。Nikolausz 等利用稳定同位素示踪技术评价不同底物条件下厌氧反应器中主要产甲烷途径,发现以鸡粪为底物的反应器主要通过氢营养途径产甲烷,而在以玉米饲料和烘干谷物为底物的反应器中,2 种产甲烷途径都存在,同时观察到在加入玉米饲料后,同位素数值发生了明显的改变,证实了将同位素示踪技术用作进程控制的工具是可行的^[45]。Conrad 等的研究结合了稳定同位素分馏效应和分子生物学技术,评价了不同产甲烷途径的贡献率。将稳定性同位素标记技术与分子生物学技术结合而成的稳定性同位素探测技术(SIP),为微生物群落结构、功能结构和代谢功能间关系的建立提供了新的解决方法。

Ginige 等以 $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ 标记的 DNA 作为模板进行 16S rRNA 基因序列扩增,发现与甲醇营养菌 *Methylophilales* 相关的 16S rRNA 基因在标记的 DNA 中具有较高的丰度;同时根据这些序列数据设计 FISH 探针进行原位杂交试验,结果表明活性污泥微生物群落的反硝化能力与 SIP 试验鉴定到的甲醇营养菌丰度相关;结合显微放射自显影技术,认定 SIP 试验中所鉴定的甲醇营养菌 *Methylophilales* 同时也是活性污泥中重要的反硝化菌^[46]。Ginige 等很好地证明了多种分子技术复合使用的巨大优势。然而在实际应用中,由于试验条件、技术水平等的限制,复合技术联合使用并未普及,在今后的研究中,复合技术的完善与推广将成为产甲烷菌多样性研究的热点。

3 结论

传统的微生物研究方法是以纯培养为基础的,许多研究证实,通过传统方法鉴定出来的微生物不到环境微生物总数的 10%。基于 16S rRNA 基因的现代分子生物学技术的出现,给环境微生物的研究提供了更加快速、准确的手段。除了上述列举的分子生物学技术,还有其他一些技术如单链构象多态性(single strain conformation polymorphism, SSCP)分析、实时逆转录 PCR(real-time RT-PCR)技术等,这些技术各有优势。在对产甲烷菌多样性分析中,应注意技术本身的特殊性及存在的不足,采用多种分子技术复合使用,克服操作过程中存在的不确定因素,从而使对复杂系统中产甲烷菌群的结构及代谢途径的研究更加全面、准确,从而发挥产甲烷菌在环境和能源领域中的重要作用。

参考文献:

- [1] Bauer C, Korthals M, Gronauer A, et al. Methanogens in biogas production from renewable resources—a novel molecular population analysis approach[J]. Water Science and Technology, 2008, 58(7): 1433–1439.
- [2] Ahring B K, I. Angelidaki, E. Conway de Macario, et al. Biomethanation I[M]. Berlin: Springer Heidelberg, 2003: 1–30.
- [3] 傅 霖, 辛明秀. 产甲烷菌的生态多样性及工业应用[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(4): 574–578.
- [4] 李美群, 邓洁红, 熊兴耀, 等. 产甲烷菌的研究进展[J]. 酿酒科技, 2009(5): 90–93.
- [5] 刘园园, 姜伟伟, 秦红玉, 等. PCR-DGGE 技术在水牛瘤胃产甲烷菌多样性分析中的应用[J]. 南方农业学报, 2011, 42(9): 1144–1147.
- [6] Liu Yuchen, 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.
- [7] 单丽伟, 冯贵颖, 范三红. 产甲烷菌研究进展[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(6): 42–46.
- [8] 林代炎, 林新坚, 杨 菁, 等. 产甲烷菌在厌氧消化中的应用研究进展[J]. 福建农业学报, 2008, 23(1): 106–110.
- [9] Giovannoni S J, Britschgi T B, Moyer C L, et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton[J]. Nature, 1990, 345(6270): 60–63.
- [10] Chaudhary P P, Brablcová L, 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.
- [11] Friedrich M W. Methyl-coenzyme M reductase genes; unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing Archaea[J]. Methods in Enzymology, 2005, 397: 428–442.
- [12] 徐彦胜, 阮志勇, 刘小飞, 等. 应用 RFLP 和 DGGE 技术对沼气池中产甲烷菌多样性的研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(4): 1319–1324.
- [13] Springer E, Sachs M S, Woese C R, et al. Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (mcrI) as a phylogenetic tool for the family Methanosarcinaceae[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(3): 554–559.
- [14] Nolla-Ardévol V, Strous M, Sorokin D Y, et al. Activity and diversity of haloalkaliphilic methanogens in Central Asian soda lakes[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 161(2): 167–173.
- [15] Delong E F. Archaea in coastal Marine environments[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 1992, 89(12): 5685–5689.
- [16] Hales B A, Edwards C, Ritchie D A, et al. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 668–675.
- [17] Nettmann E, Bergmann I, Mundt K, et al. Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(6): 1835–1850.
- [18] Zoetendal E G, Cheng Biao, Koike S, et al. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function[J]. Current Issues in Intestinal Microbiology, 2004, 5(2): 31–47.
- [19] Wani A A, Surakasi V P, Siddharth J, et al. Molecular analyses of microbial diversity associated with the Lonar soda lake in India: an impact crater in a basalt area[J]. Research in Microbiology, 2006, 157(10): 928–937.
- [20] Fischer S G, Lerman L S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983, 80(6):

- 1579 – 1583.
- [21] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695 – 700.
 - [22] Hwang K, Shin S G, Kim J, et al. Methanogenic profiles by denaturing gradient gel electrophoresis using order – specific primers in anaerobic sludge digestion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(2): 269 – 276.
 - [23] Sanz J L, Köchling T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment; an overview[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(2): 119 – 133.
 - [24] Tabatabaei M, Zakaria M R, Rahim R A, et al. PCR – based DGGE and FISH analysis of methanogens in an anaerobic closed digester tank for treating palm oil mill effluent[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2009, 12(3): 12 – 13.
 - [25] Wagner M, Amann R, Lemmer H, et al. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria; inadequacy of culture – dependent methods for describing microbial community structure[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(5): 1520 – 1525.
 - [26] Stoecker K, Dorninger C, Daims H, et al. Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization (DOPE – FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(3): 922 – 926.
 - [27] Schütte U E, Abdo Z, Bent S J, et al. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T – RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(3): 365 – 380.
 - [28] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(11): 4516 – 4522.
 - [29] Lueders T, Chin K J, Conrad R, et al. Molecular analyses of methyl – coenzyme M reductase alpha – subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage[J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(3): 194 – 204.
 - [30] Chin K J, Lukow T, Conrad R. Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2341 – 2349.
 - [31] Collins R E, Rocap G. REPK; an analytical web server to select restriction endonucleases for terminal restriction fragment length polymorphism analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35 (Web Server Issue): W58 – W62.
 - [32] Genney D R, Anderson I C, Alexander I J. Fine – scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium[J]. The New Phytologist, 2006, 170(2): 381 – 390.
 - [33] Disayathanoowat T, Young J P, Helgason T, et al. T – RFLP analysis of bacterial communities in the midguts of *Apis mellifera* and *Apis cerana* honey bees in Thailand[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 79(2): 273 – 281.
 - [34] Sawamura H, Yamada M, Endo K, et al. Characterization of microorganisms at different landfill depths using carbon – utilization patterns and 16S rRNA gene based T – RFLP[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 109(2): 130 – 137.
 - [35] Rösch C, Bothe H. Improved assessment of denitrifying, N₂ – fixing, and total – community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 2026 – 2035.
 - [36] Mohanty S R, Bodelier P L, Floris V, et al. Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane – consuming microbes in rice field and forest soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 1346 – 1354.
 - [37] Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences[J]. Biotechnology, 1992, 10(4): 413 – 417.
 - [38] Sawayama S, Tsukahara K, Yagishita T. Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real – time PCR in a fixed – bed anaerobic digester[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(1): 69 – 76.
 - [39] Nettmann E, Bergmann I, Pramschüfer S, et al. Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(8): 2540 – 2548.
 - [40] 王彦伟, 徐凤花, 阮志勇, 等. 用 DGGE 和 Real – Time PCR 对低温沼气池中产甲烷古菌群落的研究[J]. 中国沼气, 2012, 30(1): 8 – 12.
 - [41] 郑燕, 贾仲君. 新一代高通量测序与稳定性同位素示踪 DNA/RNA 技术研究稻田红壤甲烷氧化的微生物过程[J]. 微生物学报, 2013, 53(2): 173 – 184.
 - [42] John Parkes R, Brock F, Banning N, et al. Changes in methanogenic substrate utilization and communities with depth in a salt – marsh, creek sediment in southern England[J]. Estuarine Coastal and Shelf Science, 2012, 96: 170 – 178.
 - [43] Radajewski S, Ineson P, Parekh N R, et al. Stable – isotope probing as a tool in microbial ecology[J]. Nature, 2000, 403(6770): 646 – 649.
 - [44] Manefield M, Whiteley A S, Griffiths R I, et al. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5367 – 5373.
 - [45] Nikolausz M, Walter R F, Sträuber H, et al. Evaluation of stable isotope fingerprinting techniques for the assessment of the predominant methanogenic pathways in anaerobic digesters[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(5): 2251 – 2262.
 - [46] Ginige M P, Hugenholtz P, Daims H, et al. Use of stable – isotope probing, full – cycle rRNA analysis, and fluorescence in situ hybridization – microautoradiography to study a methanol – fed denitrifying microbial community[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 588 – 596.