



### 海洋沉积物中甲烷代谢微生物的研究进展

陈 烨, 孙治雷, 吴能友, 刘昌岭, 徐翠玲, 辛友志, 曹 红, 耿 威, 张喜林, 翟 滨, 孙运宝, 李 晶, 张 栋, 闫大伟, 吕泰衡

### Advances in the study of methane-metabolizing microbial communities in marine sediments

CHEN Ye, SUN Zhilei, WU Nengyou, LIU Changling, XU Cuiling, XIN Youzhi, CAO Hong, GENG Wei, ZHANG Xilin, ZHAI Bin, SUN Yunbao, LI Jing, ZHANG Dong, YAN Dawei, and LV Taiheng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.16562/j.cnki.0256-1492.2022021801>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### 海洋环境中甲烷好氧化过程的研究进展

A review on microbial aerobic methane oxidation in marine environment

海洋地质与第四纪地质. 2021, 41(5): 67

#### 海洋沉积物中金属依赖型甲烷厌氧氧化作用研究进展及展望

Research progress and prospects of metal-dependent anaerobic methane oxidation in marine sediments

海洋地质与第四纪地质. 2021, 41(5): 58

#### 南海南部浅表层柱状沉积物孔隙水地球化学特征对甲烷渗漏活动的指示

Pore water geochemistry of shallow surface sediments in the southern South China Sea and its implications for methane seepage activities

海洋地质与第四纪地质. 2021, 41(5): 112

#### 海洋天然气水合物储层蠕变行为的主控因素与研究展望

Controlling factors and research prospect on creeping behaviors of marine natural gas hydrate-bearing strata

海洋地质与第四纪地质. 2021, 41(5): 3

#### 基于ERT技术的含水合物沉积物可视化探测模拟实验

An experimental study on visual detection of hydrate-bearing sediments based on ERT

海洋地质与第四纪地质. 2021, 41(6): 206

#### 新西兰Hikurangi俯冲带沉积物成岩作用示踪研究：来自孔隙流体Sr同位素证据

A tracing study of sediment diagenesis in the Hikurangi subduction zone, New Zealand: Evidence from Sr isotope of pore fluid

海洋地质与第四纪地质. 2021, 41(6): 115



关注微信公众号，获得更多资讯信息

陈焯, 孙治雷, 吴能友, 等. 海洋沉积物中甲烷代谢微生物的研究进展 [J]. 海洋地质与第四纪地质, 2022, 42(6): 82-92.  
CHEN Ye, SUN Zhilei, WU Nengyou, et al. Advances in the study of methane-metabolizing microbial communities in marine sediments[J]. Marine Geology & Quaternary Geology, 2022, 42(6): 82-92.

## 海洋沉积物中甲烷代谢微生物的研究进展

陈焯<sup>1,2</sup>, 孙治雷<sup>1,2</sup>, 吴能友<sup>1,2</sup>, 刘昌岭<sup>1,2</sup>, 徐翠玲<sup>1,2</sup>, 辛友志<sup>1,2</sup>, 曹红<sup>1,2</sup>, 耿威<sup>1,2</sup>, 张喜林<sup>1,2</sup>, 翟滨<sup>1,2</sup>, 孙运宝<sup>1,2</sup>, 李晶<sup>1,2</sup>, 张栋<sup>1,2</sup>, 闫大伟<sup>1,2</sup>, 吕泰衡<sup>2</sup>

1. 自然资源部天然气水合物重点实验室, 中国地质调查局青岛海洋地质研究所, 青岛 266237  
2. 青岛海洋科学与技术国家试点海洋实验室海洋矿产资源评价与探测技术功能实验室, 青岛 266237

**摘要:** 甲烷是一种重要的温室气体, 深刻影响着全球的气候变化。同时, 甲烷还是海底潜在能源——天然气水合物的主要成分。海洋沉积物是甲烷生物转化的一个重要生态区域, 产甲烷菌主要利用 H<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> 及简单的有机物 (甲醇、甲胺、二甲基硫等) 作为底物生成甲烷, 产生的甲烷在向上迁移的过程中主要被甲烷厌氧氧化 (anaerobic oxidation of methane, AOM) 和甲烷好氧化 (aerobic oxidation of methane, AeOM) 消耗, 进而大大减少了甲烷向大气的排放量。AeOM 主要发生在含氧的沉积物及沉积物-水界面中, 由甲烷好氧化菌 (aerobic methane-oxidizing bacteria, MOB) 介导。然而, 绝大部分甲烷在穿透缺氧沉积物层之前是被 AOM 反应消耗, 甲烷厌氧氧化古菌 (anaerobic methanotrophic archaea, ANME) 是主要的参与者, 这些功能微生物耦联电子受体 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 或 Fe<sup>3+</sup> 和 Mn<sup>4+</sup> 将甲烷进行氧化。本文对产甲烷菌和甲烷氧化菌的种类、代谢途径及其在海洋沉积物中的分布特征进行了综述, 并在前人工作基础上, 对今后海洋生境中甲烷代谢过程的研究进行了展望, 以期为进一步开展海洋环境中甲烷的生物转化过程及元素耦合的研究提供理论依据。

**关键词:** 甲烷; 海洋沉积物; 产甲烷菌; 甲烷氧化菌

中图分类号: P735 文献标识码: A DOI: 10.16562/j.cnki.0256-1492.2022021801

### Advances in the study of methane-metabolizing microbial communities in marine sediments

CHEN Ye<sup>1,2</sup>, SUN Zhilei<sup>1,2</sup>, WU Nengyou<sup>1,2</sup>, LIU Changling<sup>1,2</sup>, XU Cuiling<sup>1,2</sup>, XIN Youzhi<sup>1,2</sup>, CAO Hong<sup>1,2</sup>, GENG Wei<sup>1,2</sup>, ZHANG Xilin<sup>1,2</sup>, ZHAI Bin<sup>1,2</sup>, SUN Yunbao<sup>1,2</sup>, LI Jing<sup>1,2</sup>, ZHANG Dong<sup>1,2</sup>, YAN Dawei<sup>1,2</sup>, LV Taiheng<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Gas Hydrate, Qingdao Institute of Marine Geology, Ministry of Natural Resources, Qingdao 266237, China  
2. Laboratory for Marine Mineral Resources, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China

**Abstract:** Methane is an important greenhouse gas affecting the global climate. Meanwhile, methane is a major component of natural gas hydrate which regarded as a potential energy resource below seafloor. Seafloor sediment is an important ecological region for methane biotransformation. The methanogens can use H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, and simple organic compounds (e.g. methanol, methylamines, dimethylsulfide) as substrates to produce methane. The methane produced in the bottom of the sediments would be consumed by aerobic methanotrophs and anaerobic methanotrophs during its upward migration, which reduces greatly the methane emissions to the atmosphere. Aerobic methane oxidation occurs mainly in oxygenated sediments and sediment-water interfaces, and is mediated by aerobic methane-oxidizing bacteria. However, most of the methane is consumed by anaerobic methane oxidation before it reaches the seafloor. The anaerobic methanotrophs oxidize methane coupled by SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or Fe<sup>3+</sup>/Mn<sup>4+</sup>. We reviewed the status quo and perspectives of the taxonomy, metabolic and ecological diversity of methanogens and methanotrophs in marine sediments, and emphasized deficiencies and issues need to be solved in future studies. This review provided theoretical foundation for the study of biotransformation process and element coupling of methane in marine environment.

**Key words:** methane; marine sediment; methanogen; methanotrophs

**资助项目:** 国家自然科学基金“冲绳海槽冷泉区沉积物中铁驱动的甲烷厌氧氧化活性及其微生物作用研究”(42106137), “冲绳海槽海底冷泉—热液系统相互作用及资源效应”(91858208), “海洋“甲烷拦截带”对冷泉流体的消耗研究: 来自南海东沙海域的观测与模拟”(42176057), “冲绳海槽泥火山甲烷迁移与转化的空间分布规律及其对海水碳输入的影响”(41906068); 山东省自然科学基金“冲绳海槽冷泉-热液流体溶解碳源/汇效应及对深海碳循环的影响”(ZR2021MD049); 青岛市博士后应用研究项目“冲绳海槽冷泉区和非冷泉区沉积物中微生物群落结构及功能的研究”; 中国地质调查局海洋地质调查二级项目 (DD20221707)

**作者简介:** 陈焯 (1991—), 女, 博士, 主要从事海洋微生物生态学研究, E-mail: 365527256@qq.com

**通讯作者:** 吴能友 (1965—), 男, 研究员, 主要从事海洋地质与天然气水合物研究, E-mail: wunyu@ms.giec.ac.cn

**收稿日期:** 2022-02-18; **改回日期:** 2022-03-29. 张现荣编辑

甲烷是二氧化碳之外最重要的温室气体, 在百年尺度上的增温潜能是  $\text{CO}_2$  的 28 倍(IPCC, 2014)<sup>[1]</sup>。一般认为, 甲烷的成因包括生物成因和非生物成因两种。非生物成因形成的甲烷是指在油页岩的高温加热分解或在热液系统水岩反应等过程中无机碳与氢气高温合成的热成因甲烷, 而大气中 80% 的甲烷来自生物成因甲烷, 该过程是在微生物的参与下完成的<sup>[2]</sup>。海洋占全球表面积的 70%, 每年产生的甲烷量为 85~300 Tg, 90% 的甲烷在释放到大气圈之前会被由微生物参与的 AOM 所消耗<sup>[3-4]</sup>。甲烷厌氧氧化过程分为以  $\text{SO}_4^{2-}$  为电子受体的硫酸盐还原型甲烷厌氧氧化<sup>[5]</sup>(sulfate-reduction dependent anaerobic methane oxidation, S-AOM)、以  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  为电子受体的反硝化型甲烷厌氧氧化<sup>[6]</sup>(denitrification-dependent anaerobic methane oxidation, D-AOM) 以及后来发现的以  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Mn}^{4+}$  为最终电子受体的甲烷厌氧氧化 (metal ( $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Mn}^{4+}$ )-Dependent Anaerobic Methane Oxidation, Metal-AOM)<sup>[7]</sup>。AOM 在调控全球甲烷收支平衡以及缓解因甲烷引起的温室效应等方面扮演着十分重要的角色, 已成为微生物生态学和生物地球化学领域的研究热点。

海洋沉积物是一个重要的生物地球化学反应器, 有机质在运移、沉降、降解及埋藏的过程中, 会伴随着一系列的生化反应。海洋沉积物中蕴藏着丰富的微生物, 据估计, 海洋沉积物大约含有  $2.9 \times 10^{29}$  个微生物细胞, 相当于 4.1 PgC, 占地球总活

体生物量的 0.6%<sup>[8]</sup>。栖居在沉积物表层的微生物, 利用氧气作为电子受体将复杂有机质进行降解。氧气在表层范围内被快速耗尽后, 亚硝酸盐/硝酸盐、铁锰等金属离子和硫酸根成为微生物代谢的主要电子受体, 将有机质进行厌氧降解, 产生二氧化碳或甲烷。游离甲烷气以及溶解甲烷在高压低温的条件下, 与水聚合成一种类似冰的具有笼型结构的晶体——天然气水合物, 较为稳定地储存在沉积物中。当海底温度和压力条件发生改变时, 海底水合物会发生分解, 产生的甲烷气体在向上运移的过程中, 与孔隙水中的硫酸根发生 AOM 反应, 并在沉积物中形成硫酸盐-甲烷转换带 (sulfate methane transition zone, SMTZ) (图 1)。此外, ANME 古菌还可以利用  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  以及  $\text{Mn}^{4+}$  电子受体, 将甲烷氧化成二氧化碳 (图 1)。AOM 过程将产生  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{HS}^-$ , 这两种产物和孔隙水中的  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  结合, 生成碳酸盐岩、黄铁矿、重晶石、石膏等多种矿物质。

随着分子生物学技术和海底勘探技术的不断发展和进步, 近些年来关于海洋环境中甲烷代谢过程的研究有了长足的发展, 尤其是新的甲烷代谢方式和新的甲烷代谢微生物不断的被发现, 同时, 人们对甲烷代谢微生物在海洋环境中的分布模式有了新的认识。深入了解和研究海洋生境中微生物介导的甲烷代谢过程及其机理, 对进一步理解海洋碳循环和控制甲烷气体的排放都有重要意义。本文主要对海洋环境中参与甲烷产生和氧化的微生

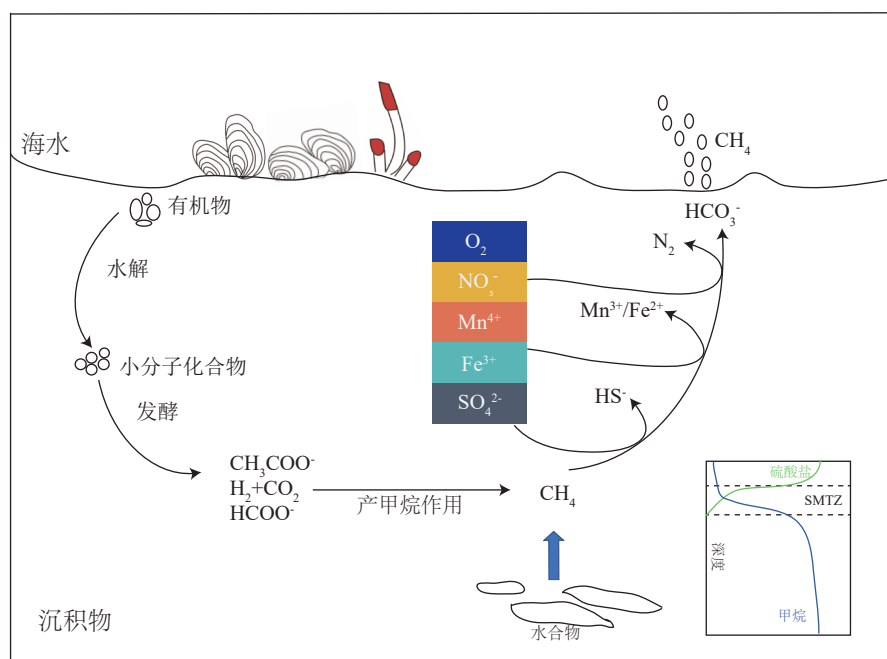


图 1 海洋沉积物中甲烷的迁移与转化过程

Fig.1 The process of methane migration and transformation in marine sediments

物的种类及其在海洋环境中的分布特征进行了总结,此外,还对不同类型的产甲烷代谢途径和甲烷氧化途径进行了梳理,最后对未来的研究方向做出了展望。

## 1 产甲烷菌及产甲烷途径

### 1.1 产甲烷菌的种类

产甲烷菌是一类严格的厌氧古菌,生成的甲烷是厌氧呼吸的最终产物<sup>[9]</sup>。传统上,科学界认为产甲烷菌只属于广古菌门,可分为2大类6大目,第1类 Class I,包括甲烷球菌目(Methanococcales)、甲烷杆菌目(Methanobacteriales)、甲烷超高温菌目(Methanopyrales);第2类 Class II 则包括甲烷胞菌目(Methanocellales)、甲烷八叠球菌目(Methanosarcinales)以及甲烷微菌目(Methanomicrobiales)<sup>[10-11]</sup>。然而,随着分子生物学技术的不断发展和进步,许多新型产甲烷古菌类群被发现。这些新型产甲烷古菌包括隶属于广古菌门的产甲烷菌马赛球菌目

(Methanomassiliicoccales)<sup>[12]</sup>、Methanofastidiosa (WSA2)<sup>[13]</sup>和Methanonatronarchaeia<sup>[14]</sup>及深古菌门(Bathyarchaeota)<sup>[15]</sup>、韦斯特古菌门(Verstraetearchaeota)<sup>[16]</sup>以及地古菌门(Geoarchaeota)<sup>[17]</sup>等。

### 1.2 产甲烷菌代谢途径

产甲烷菌依赖于其他微生物将复杂有机物质转化为简单的小分子化合物(氢、二氧化碳、乙酸盐、甲基类化合物),因而作用于厌氧氧化分解有机质的最后环节。有机质的厌氧分解需要一系列具有食物链关系的微生物群落完成。首先,水解细菌通过向胞外分泌水解酶,将蛋白质、碳水化合物和脂类物质等大分子化合物分解为简单的有机化合物如葡萄糖、脂肪酸单体。随后发酵细菌将简单有机化合物转化为一些活跃的化学物质,如脂肪酸、醇类、氨、二氧化碳、氢气和硫化氢等。最后产甲烷菌利用乙酸、氢气、二氧化碳和一碳化合物产生甲烷(图2)。传统的3种产甲烷代谢途径已被学术界广泛认可:  $H_2/CO_2$  还原型、乙酸发酵型和甲基营养型(图2)<sup>[9]</sup>。在  $H_2/CO_2$  还原途径中,  $CO_2$  首

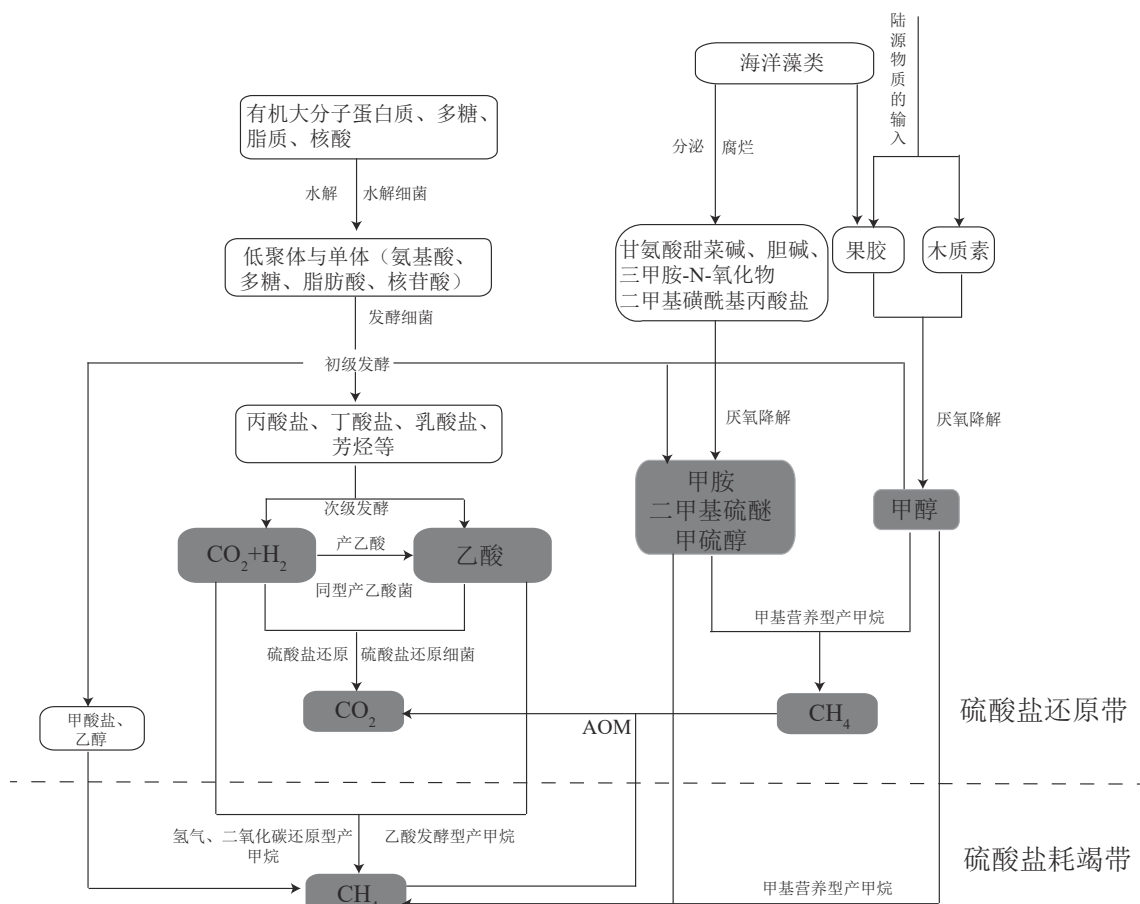


图2 海洋沉积物中低分子化合物的生成和产甲烷途径<sup>[22]</sup>

Fig.2 The generation of low-molecular-weight substrates and methanogenic pathways in marine sediments<sup>[22]</sup>



先被甲酰甲烷呋喃脱氢酶(Fdh)还原为甲酰基,随后甲酰基与甲基呋喃(MFR)结合形成甲酰基甲基呋喃(CHO-MFR),此时甲酰基转移到四氢甲烷蝶呤(H4MPT)上形成次甲基复合物,次甲基复合物再依次被还原为次甲基( $\equiv\text{CH}$ )、亚甲基( $=\text{CH}$ )和甲基( $-\text{CH}_3$ ),随后甲基在 CoM 甲基转移酶(Mtr)作用下转移至还原态的辅酶 M(HS-CoM)上,最后,在甲基辅酶 M 还原酶(MCR)催化下生成甲烷。绝大多数产甲烷菌均可以利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  还原产生甲烷。乙酸发酵型途径是乙酸盐的碳—碳键被打开,裂解为甲基基团和羧基基团,随后羧基基团被氧化成二氧化碳并产生电子供体  $\text{H}_2$ ,甲基基团被  $\text{H}_2$  还原为甲烷。目前为止只发现 *Methanosarcina* 和 *Methanosaeta* 这两个属的产甲烷菌可以利用乙酸产甲烷<sup>[9]</sup>。兼性营养型 *Methanosarcina* 利用范围比较广,除了利用乙酸盐外, $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2$ 、甲基都可以作为底物生成甲烷。*Methanosaeta* 则是专性乙酸营养型产甲烷菌,只能利用乙酸盐作为底物生成甲烷。此外,*Methanosaeta* 只能利用低浓度的乙酸,而 *Methanosarcina* 能够利用的乙酸浓度较高<sup>[18-19]</sup>。甲基营养型途径则是一种典型的歧化反应,以甲醇、含甲基的硫化物(甲硫醇和二甲基硫)、含甲基的胺类(一甲胺、二甲胺、三甲胺和四甲基胺)为底物。反应过程中,四份甲基化合物经过 Mtr 的激活,一份甲基化合物被氧化为  $\text{CO}_2$ ,这一过程产生的  $\text{H}_2$  将甲基化合物中的甲基基团还原为甲烷<sup>[9]</sup>。自然界中,只有甲烷杆菌目的 *Methanosphaera* 以及甲烷八叠球菌目能够利用甲基营养途径产甲烷<sup>[9]</sup>。随着微生物组学的快速发展,新型产甲烷途径—— $\text{H}_2$  还原甲基化合物产甲烷代谢途径和烷基型产甲烷代谢途径相继被发现。在  $\text{H}_2$  还原甲基化合物产甲烷途径中,甲基化合物以外源  $\text{H}_2$  作为电子供体,还原甲基化合物中的甲基基团产甲烷。该途径最先发现于甲烷杆菌目和甲烷微菌目,随后又相继在新型产甲烷菌马赛球菌目(*Methanomassiliicoccales*), *Methanofastidiosa*, 深古菌门(*Bathyarchaeota*)和韦斯特古菌门(*Verstraetearchaeota*)中被发现<sup>[20]</sup>。最近,研究人员在油藏的培养物中发现了一种新型产甲烷古菌 *Ca. Methanoliparum*, 并证实其可直接氧化长链烷基烃,并通过  $\beta$ -氧化、伍德-永达尔(Wood-Ljungdahl)途径进入产甲烷代谢,使得产甲烷作用不再通过多种细菌和古菌互营代谢来完成<sup>[21]</sup>。这种产甲烷途径的发现突破了产甲烷古菌只能利用简单化合物进行生长的传统认知,拓展了对产甲烷古菌碳代谢途径的认识,完善了碳素循环的生物地

球化学过程,同时为开发绿色可持续的低碳技术提供了新的路径选择。

硫酸根含量丰富的海洋生境中,硫酸盐还原菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)在与产甲烷菌竞争共同底物乙酸盐和  $\text{H}_2$  上占优势,因此传统上认为,甲烷的合成只能发生在  $\text{SO}_4^{2-}$  被“耗竭”的产甲烷带。然而,近几年越来越多的研究表明,在硫酸盐丰富的浅层沉积物中产甲烷作用也可以发生,这是因为产甲烷菌能够利用硫酸盐无法利用的甲胺类、甲硫醇类和甲醇等一碳化合物生成甲烷<sup>[23-25]</sup>。这些非竞争性基质在海洋环境中普遍存在,来源于甜菜碱、胆碱、木质素、果胶和肌酸等物质的降解或细菌还原三甲胺氧化物<sup>[25-26]</sup>。Li 等<sup>[27]</sup>在对南海福尔摩沙冷泉的研究中发现甘氨酸甜菜碱是甲烷生成的主要前体,细菌和产甲烷菌在甘氨酸甜菜碱还原产生甲烷途径中发挥着协同作用,细菌 *Oceanirhabdus* 将甜菜碱还原成三甲胺,随后产甲烷菌 *Methanococoides* 利用三甲胺产生甲烷。此外,通过种间氢转移,产甲烷菌与 SRB 可能发生互养共生,从而使硫酸盐还原区也能产生甲烷<sup>[28-29]</sup>。Xiao 等<sup>[24]</sup>利用放射性同位素  $^{14}\text{C}$  标记法对来自丹麦 Aarhus Bay 沉积物中甲烷产生速率进行测定表明,表层沉积物中产甲烷速率最高( $>200 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ),甲基营养型产甲烷作用是沉积物中甲烷产生的主要贡献方式,这暗示着在硫酸盐丰富的表层沉积物中存在一个长期被忽略的“隐形甲烷循环”。Zhuang 等<sup>[25]</sup>评估了西地中海表层和次表层沉积物中不同产甲烷底物和产甲烷途径对甲烷生成的贡献,表明表层沉积物中 98% 的甲烷来源于甲醇的代谢,而在硫酸根“耗竭”的深层沉积物中, $\text{H}_2/\text{CO}_2$  还原型是主要的产甲烷途径,占甲烷总产生速率的 67%~98%。Chen 等<sup>[30]</sup>发现,向厌氧培养的南黄海沉积物中添加三甲胺会引起大量的甲烷产生,并导致甲基营养型产甲烷菌 *Methanococoides* 迅速增加。由此可见,甲基营养型和甲基营养型微生物在  $\text{SO}_4^{2-}$  含量高的海洋沉积物中发挥着重要作用。

## 2 甲烷好氧氧化菌及好氧氧化过程

根据细胞结构功能和系统进化关系的不同,甲烷好氧氧化菌(aerobic methane-oxidizing bacteria, MOB)可分为 Type I 型和 Type II 型 2 类,分别属于变形杆菌纲(*Proteobacteria*)的  $\gamma$  亚纲和  $\alpha$  亚纲。Type I 型 MOB 利用核酮糖单磷酸(RuMP)途径同化甲醛,主要含 16-C 磷脂脂肪酸,胞内膜呈束状分

布; Type II型 MOB 则通过丝氨酸(Serine)途径同化甲醇,其占优势的磷脂脂肪酸为 18-C 脂肪酸,胞内膜沿着细胞质膜排列。X型甲烷氧化菌同时具有 I型和 II型的一些特征,代谢途径既有丝氨酸途径也具有核酮糖单磷酸途径,偶尔也存在 1,5-二磷酸核酮糖途径,磷脂脂肪酸碳的长度为 16个碳,生长温度往往高于 I型和 II型甲烷氧化菌<sup>[31]</sup>。在分子氧存在的情况下,甲烷首先在甲烷单加氧酶(methane monooxygenase, MMO)的作用下氧化成甲醇(CH<sub>3</sub>OH),甲醇在甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase, MDH)的作用下生成甲醛(HCHO),甲醛通过丝氨酸(Serine)途径或核酮糖单磷酸(RuMP)途径进入碳同化途径,同时甲醛(HCHO)在甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase, FADH)的作用下生成甲酸(HCOOH),甲酸在甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)的作用下产生二氧化碳和水<sup>[26]</sup>。图3为 AeOM 的代谢途径。其中,甲烷单加氧酶是参与 AeOM 的关键酶,可分为 2类:一种是游离在细胞质中的可溶性甲烷单加氧酶(soluble methane monooxygenase, sMMO),存在于部分 MOB 中;另一种是与细胞膜结合,颗粒性的甲烷单加氧酶(particulate methane monooxygenase, pMMO),存在于除 *Methylocella*、*Methyloferula* 以外的所有已发现的 MOB 中<sup>[32-33]</sup>。

海洋生境中 MOB 的研究主要集中在深海中的冷泉系统和富含天然气水合物的上层水体和沉积物中。区别于传统的 MOB 类型,研究者利用 *pmoA* 和 16S rRNA 基因对海洋环境中 MOB 多样性进行研究,发现新型 MOB OPU1、OPU3 和 Group-

X 是深海水体和沉积物中占主导地位的 MOB<sup>[34-36]</sup>,其中 OPU1、OPU3 与 I型 MOB(*Methylocladum* 和 *Methylococcus*)亲缘关系较近<sup>[34-36]</sup>,而 Group-X 与 I型和 II型 MOB 亲缘关系较远。

### 3 甲烷厌氧氧化古菌

#### 3.1 硫酸盐依赖型甲烷厌氧氧化 (sulphate-dependent anaerobic methane oxidation, S-AOM)

从热力学角度出发,SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、Mn<sup>4+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>都能作为电子受体将甲烷氧化(表1),其中 S-AOM 是海洋沉积物中甲烷消耗的主要途径。海洋水体中含有大量的硫酸盐,通过扩散作用,使海底浅层沉积物也富含 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>。甲烷在海底深处形成,当甲烷向上迁移至厌氧层时,与向下扩散的 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>相遇,在 ANME 古菌和 SRB 的共同作用下,发生 S-AOM。参与 S-AOM 反应的微生物包括 ANME 和 SRB,为尽可能减少能量的流失,这两类微生物通常以聚集体的形式存在<sup>[37]</sup>。ANME 古菌属于广古菌门,基于 16S rRNA 基因进化分析,可分为 3个类群:ANME-1、ANME-2 和 ANME-3(图4)。ANME-1 分为 ANME-1a、ANME-1b 2个亚群,与甲烷八叠球菌目(Methanosarcinales)和甲烷微菌目(Methanomicrobiales)有较远的亲缘关系<sup>[38]</sup>。ANME-2 划分为 ANME-2a、ANME-2b、ANME-2c 和 ANME-2d 4个亚群,其中 ANME-2a、-2b、-2c 属于甲烷八叠球菌目,ANME-2d 隶属于一个新的类群 *Methanoperedenaceae*<sup>[39]</sup>。ANME-3 则与拟甲烷球菌属(*Methanococcoides*)亲缘关系较近。3种类型的 ANME 古菌类群的 16S rRNA 基因序列差异较大,其基因同源性约为 75%~92%<sup>[40]</sup>。在 ANME-2 中,亚群 ANME-2a 和 ANME-2b 来自一个连贯的进化枝,并与 ANME-2c 进化距离较远,因此,常将 ANME-2a 和 ANME-2b 合并归为 ANME-2a/b<sup>[41]</sup>。除了 ANME 古菌以外,研究人员在南海神狐海域 A27 和 SH1 站位沉积物中发现 Bathyarchaeota 一些类群和产甲烷菌也可能参与了 AOM 反应<sup>[42]</sup>。此外,ANME 古菌的新功能不断被发现。如上海交通大学张宇团队发现在深海沉积物中,ANME(ANME-2a)在氧化 CH<sub>4</sub> 产生无机碳的同时产生乙酸,为生态系统中的异养微生物提供碳源<sup>[43]</sup>。Metcalf 等<sup>[44]</sup>则发现参与深海沉积物中 AOM 作用的 ANME 古菌(ANME-2b)和 SRB 细菌(SEEP-SRB1g)共生聚集体还具有固氮的能力。

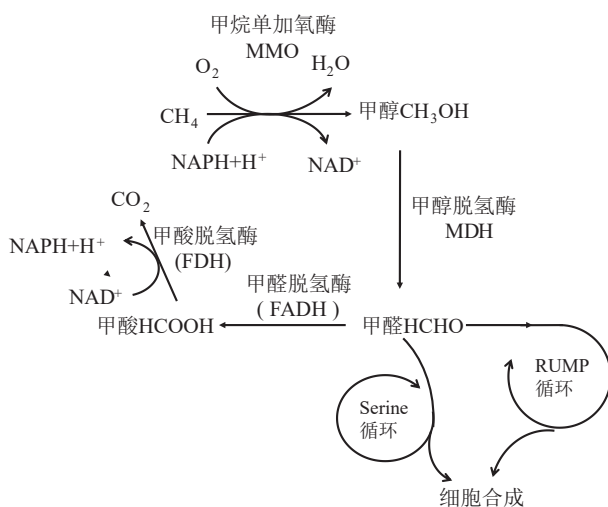
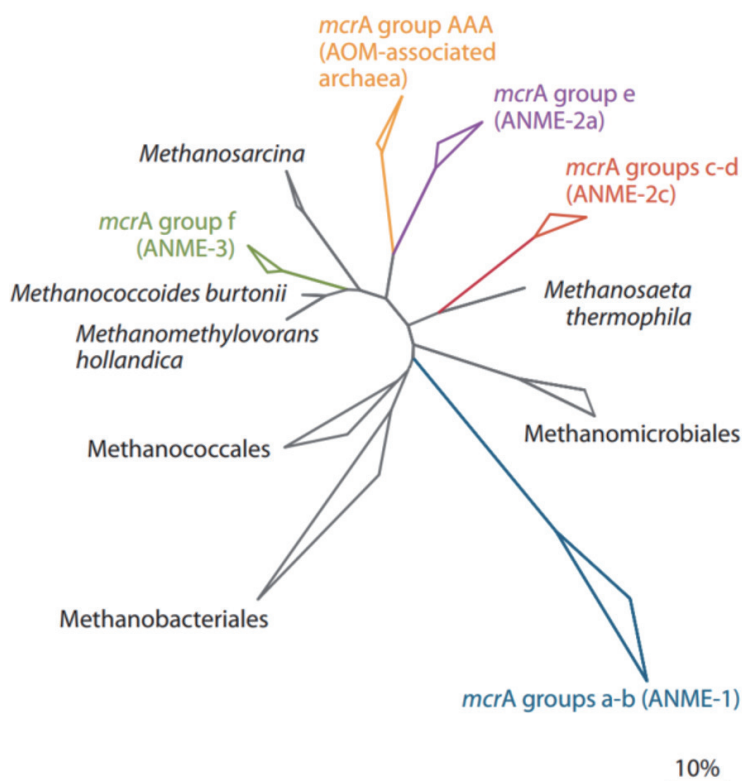


图3 MOB 的代谢途径

Fig.3 The metabolic pathway of aerobic methane-oxidizing bacteria

表 1 不同电子受体类型甲烷氧化反应的吉布斯自由能<sup>[45-46]</sup>Table 1 Standard Gibbs free energies with different electron acceptors for methane oxidation<sup>[45-46]</sup>

| 不同电子受体介导的甲烷氧化反应  | 吉布斯自由能/ (kJ·mol <sup>-1</sup> CH <sub>4</sub> ) |
|--|---|
| $\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$  | -858.7  |
| $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$                       | -33.0   |
| $\text{CH}_4 + 4\text{NO}_3^- \rightarrow \text{HCO}_3^- + 4\text{NO}_2^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$         | -483.4  |
| $3\text{CH}_4 + 8\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 4\text{N}_2 + 3\text{CO}_2 + 10\text{H}_2\text{O}$          | -928.0  |
| $\text{CH}_4 + 8\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 8\text{Fe}^{2+} + 8\text{H}^+$        | -471.0  |
| $5\text{CH}_4 + 8\text{MnO}_4^- + 19\text{H}^+ \rightarrow 5\text{HCO}_3^- + 8\text{Mn}^{2+} + 17\text{H}_2\text{O}$ | -1 008.1  |

图 4 基于 *mcrA* 序列的 ANME 古菌系统发育树<sup>[40]</sup>Fig.4 The phylogeny of *mcrA* gene in anaerobic methanotrophic archaea<sup>[40]</sup>

海底冷泉是指富含甲烷及其他富碳化合物的低温流体从海底表面喷溢的区域。其中,由 ANME 古菌和 SRB 介导的 AOM 过程,为化能合成生物群落繁衍提供了碳源和能量,成为冷泉生态系统的初级生产者。ANME 各个亚群在不同地化环境的沉积物中具有不同的分布特征。其中 ANME-1 和 ANME-2 广泛分布于各种天然冷泉环境中,而 ANME-3 分布在有大量甲烷释放的冷泉区,如水合物脊 (Hydrate Ridge)、Sonara Margin 冷泉、Haakon Mosby 泥火山<sup>[49]</sup>。垂向分布上,ANME-1 在缺氧、富含甲烷和硫酸盐含量低的深层沉积物中占优势主导地位,相比之下,ANME-2a 和 ANME-3 则出现在

硫酸盐浓度较高而溶解硫化物和甲烷浓度较低的浅层沉积物中<sup>[47-48]</sup>。ANME-1a 与 ANME-1b 的生态位分化仍存在疑问,我们在对冲绳海槽冷泉沉积物 ANME 古菌群落的研究中发现,ANME-1a 在垂向上的分布受  $\text{Fe}^{2+}$  的影响<sup>[49]</sup>。ANME 古菌亚群生态位的分化,意味着其代谢和功能的多样性<sup>[50]</sup>。在最新的研究中,研究者以连续培养十余年的深海泥火山 ANME-2a 为富集物,运用流动高压培养系统模拟冷泉系统,探究冷泉的喷发对有机碳循环和微生物群落结构的影响。研究表明,在喷发状态下,ANME 古菌和 SRB 含量降低,产甲烷古菌 *Methanobacterium* 取代 ANME-2a 成为优势古菌类群,甲基营



养型细菌 *Pseudomonas*、*Halomonas* 和 *Methylobacter* 取代 SRB 转变为优势细菌类群<sup>[51]</sup>。同时,在喷发条件下,有机物的转化途径以及群落的代谢网络变得更加复杂<sup>[51]</sup>。

甲烷的厌氧氧化过程普遍被认为是产甲烷反应的逆反应过程。1994年, Hoehler 等<sup>[52]</sup>正式提出了甲烷氧化的逆甲烷生成途径: 甲烷经 ANME 的作用通过甲烷生成的逆反应途径最终生成 CO<sub>2</sub>, 在这个过程中产生的电子传递给 SRB, 将硫酸盐还原。2004年, Hallam 等<sup>[53]</sup>应用全基因组鸟枪测序和基因组文库, 发现 ANME-1 基因组中除了缺少参与甲基和亚甲基氧化还原反应的 Mer 基因外, 包含了几乎所有甲烷产生途径所需的基因, 从而支持了逆甲烷生成途径的推测。陈颖<sup>[54]</sup>对仅由古菌 ANME-2a 构成的细胞团进行了高通量测序和序列组装分析, 发现 ANME-2a 的基因组中包含有一套经典的完整七步甲烷产生途径所需的基因, 并且转录组分析显示这些基因都是活跃表达的, 这其中包括了两套先前报道在 ANME-1 中缺失的 Mer 基因和亚甲基氧化还原反应的 mer 基因, 这一研究支持了前人关于 ANME 氧化甲烷可能采用逆向甲烷产生途径的假说, 还表明不同的甲烷氧化古菌 (ANME-1, ANME-2) 采用了不同的甲烷氧化代谢途径。除了逆甲烷生成途径外, S-AOM 发生的途径还存在 Valentine 和 Reeburgh<sup>[55]</sup>提出的乙酰化理论模型和 Moran<sup>[56]</sup>提出的甲基化理论模型。其中乙酰生成途径有 2 种方式, 一种是甲烷被水氧化生成乙酸和氢气, 生成的氢气将硫酸盐还原 (反应式(1)-(3)); 第二种途径是 CO<sub>2</sub> 和甲烷在 ANME 的作用下产生乙酸, SRB 利用乙酸将硫酸盐还原成 HS<sup>-</sup>, 同时生成 CO<sub>2</sub> (反应式(4)和(5))。甲基生成途径是甲烷和 HS<sup>-</sup> 通过 ANME 古菌生成甲硫醚, CH<sub>3</sub>SH 被 SRB 利用, 生成 HS<sup>-</sup> 和 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (反应式(6))。

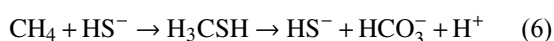
乙酰生成途径第 1 种方式:



乙酰生成途径第 2 种方式:



甲基生成途径:



### 3.2 反硝化型甲烷厌氧氧化 (denitrifying anaerobic methane oxidation, D-AOM)

从热力学的角度推断, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>比 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>更适合成为甲烷厌氧氧化的电子受体 (表 1)。直至 2004 年, Islas-Lima 等<sup>[6]</sup>首次在反硝化污泥中证明了 D-AOM 过程的存在, 但并未对其参与的功能微生物菌群进行分析。2006 年 Raghoebarsing 等<sup>[57]</sup>应用同位素标记研究发现 D-AOM 过程是由古菌和细菌共同作用完成, 16S rRNA 的系统发育表明细菌属于 NC10 门, Ettwig 等<sup>[46]</sup>将此类新发现的微生物命名为 *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* (*M. oxyfera*); 而古菌属于 ANME 古菌, 随后由 Haroon 等<sup>[39]</sup>证实其隶属于 ANME-2d, 将其命名为 “*Candidatus Methanoperedens nitroreducens* (*M. Nitroreducens*)”。Ettwig 等<sup>[58]</sup>研究发现, 以 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>为氮源的培养基继续培养后, 随着富集时间的推移, ANME 古菌数量不断减少直至完全消失, 推测 DAMO 过程可由 *M. oxyfera* 细菌独立承担完成, 而 ANME-2d 则在以 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>为基质的 DAMO 过程中起关键作用。

海洋环境中普遍存在的 AOM 是与硫酸盐相耦联的, 也是海洋沉积物中甲烷消耗的主要途径, 对其研究比较深入。但是对海洋中的 N-AOM 的研究起步较晚, Chen 等<sup>[59]</sup>在南海表层和次表层沉积物样品中检测到了 D-AOM 细菌的 16S rRNA 和 *pmoA* 基因序列, 这是首次在海洋生境中发现了 D-AOM 细菌, 进而推测海洋沉积物中可能发生 D-AOM 反应。Padilla 等<sup>[60]</sup>在墨西哥北部和哥斯达黎加以外低氧区 (OMZ) 发现了隶属于 NC10 门的细菌, 并且具有转录活性, 其丰度在亚硝酸盐和甲烷浓度升高的区域达到了最高值。表明 NC10 门的细菌对于 OMZ 地区的氮、氧、甲烷的循环发挥着重要的作用。

D-AOM 反应机理包括 *M. oxyfera* 细菌通过内部产氧机制耦合亚硝酸盐还原与甲烷的厌氧氧化, 以及 *M. Nitroreducens* 古菌通过逆向产甲烷途径耦合硝酸盐还原与甲烷的厌氧氧化<sup>[61]</sup>。Ettwig 等<sup>[46]</sup>利用宏基因组揭示了 *M. oxyfera* 的内部产氧 D-AOM 途径, 即 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>在亚硝酸盐还原酶 (Nir) 作用下生成 NO, 生成的 NO 被未知的 NO 歧化酶分解为 N<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub>, 生成的 O<sub>2</sub> 一部分用于催化 AeOM 途径, 最终生成 CO<sub>2</sub>, 剩余 O<sub>2</sub> 用于正常的呼吸作用 (图 5)。Haroon 等<sup>[39]</sup>运用宏基因组学、单细胞基因组学和宏转录组学等分子技术结合 <sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N 的同位素标记, 证实参与 D-AOM 的 ANME-2d 古菌通过反向产甲烷途径氧化甲烷, 获得的电子用于硝酸盐的部分反



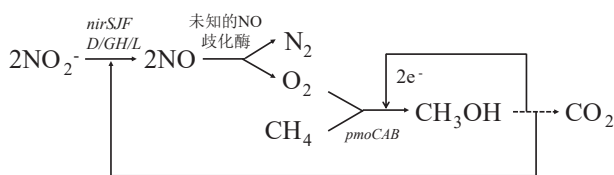


图 5 *Methyloirabilis oxyfera* 的 DAMO 理论途径<sup>[46]</sup>

Fig.5 Theoretical approach of DAMO in *Methyloirabilis oxyfera*<sup>[46]</sup>

硝化。在 *M. nitroreducens* 基因组中包含了所有编码甲基辅酶 M 还原酶的基因 (*mcrABCDG*) 和编码辅酶 F420 型甲基辅酶 M 转移酶的基因 (*mer*)。与此同时, 在其基因组中也发现了  $\text{NO}_3^-$  还原酶编码基因, 但是并未在 *M. nitroreducens* 细胞内检测到参与反硝化后续步骤的相关编码基因。因此 *M. nitroreducens* 只能完成将  $\text{NO}_3^-$  还原成  $\text{NO}_2^-$  的部分反硝化<sup>[39]</sup>。

### 3.3 铁锰依赖型甲烷厌氧氧化 ( manganese-and iron-dependent anaerobic methane oxidation, Metal-AOM )

Metal-AOM 是发现相对较晚的一种 AOM 类型。研究发现在一些海洋沉积物 SMTZ 底部或产甲烷带 (methane zone, MZ) 中, 尽管硫酸盐、氧气、 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  等电子受体被耗尽, 甲烷仍然以相当快的速度进行氧化<sup>[62-65]</sup>。此外, 在一些 AOM 与硫酸盐还原 (Sulfate reduction, SR) 共存的环境样品中, AOM 的反应活性明显高于 SR 反应活性, 表明体系中 AOM 很可能部分依赖于其他可用的电子受体<sup>[66-67]</sup>。Beal 等<sup>[7]</sup> 对加利福尼亚 Eel River 盆地甲烷渗漏区

进行了长时间的富集培养实验, 发现沉积物中的微生物在缺乏硫酸盐的条件下, 能够利用锰 (水钠锰矿) 和铁 (水铁矿) 进行甲烷氧化, 这是首次通过实验室培养微生物的方法证实海洋环境中 AOM 的发生可以以直接或间接的方式和金属化合物相耦联。已有的研究表明, 与甲烷代谢相关的微生物如 ANME-1、ANME-2a、ANME-2c、ANME-3、ANME-2d、*Candidatus Methanoperedens ferrireducens*、产甲烷古菌 (*Methanosarcina acetivorans*, *Methanobacterium*) 和 MOB 均有可能直接或间接参与了 Fe-AOM 过程<sup>[7, 68-74]</sup>。此外, 某些细菌如脱硫单胞菌属 (*Desulfuromonas*)、脱硫弧菌 (*Desulfovibrio*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、疣微菌 (Verrucomicrobia)、酸杆菌 (*Acidobacteria*)、纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*)、暗杆菌属 (*Pelobacter*)、放线纤维菌属 (*Actinotalea*) 等微生物可能作为它们的合作伙伴, 对金属还原起重要作用<sup>[7, 73]</sup>。但是, 环境样品的复杂性使得介导 Metal-AOM 发生的功能微生物类群尚未获得一致的认识, 需要进一步开展研究进行探索。

Metal-AOM 反应的具体机制尚不明确, 目前根据研究所得可能的机制有 3 种<sup>[75]</sup> (图 6): 第 1 种是 ANME 古菌 (如 ANME-2a、2c、2d) 单独负责 Metal-AOM 的整个过程<sup>[68-69]</sup>; 第 2 种反应机制类似于硫酸盐还原作用耦合甲烷厌氧氧化机制, 首先 ANME 氧化甲烷, 并将产生的电子直接传递至金属还原微生物 (Metal-reducing microorganism, MRM), 进而将金属氧化物进行还原, 是两种微生物合作进行 Metal-AOM 的模式<sup>[76]</sup>; 第 3 种是以硫化物存在为前提形成零价硫, 以 FeS 为例的反应方程为:  $\text{Fe}(\text{OH})_3 + \text{FeS} +$

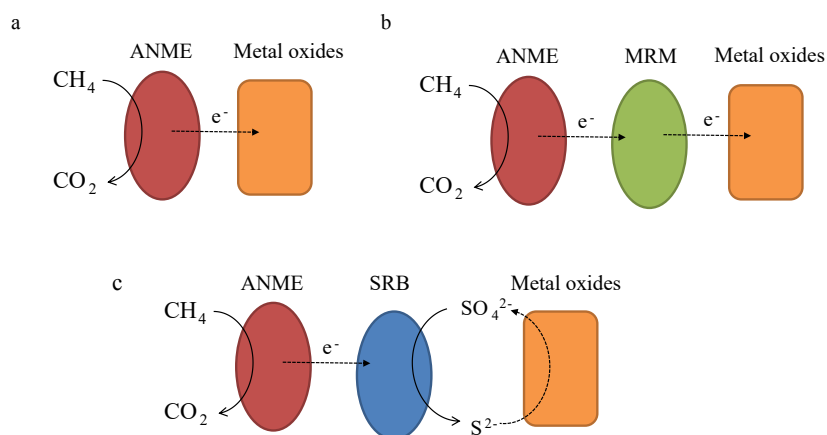


图 6 微生物介导 Metal-AOM 的不同反应机制<sup>[76]</sup>

a. ANME 单独负责 Metal-AOM, b. ANME 与合作伙伴 MRM 的合作进行 Metal-AOM, c. 金属氧化物促进 S-DAOM 的 Metal-AOM。

Fig.6 Different mechanisms of microbe-mediated metal-AOM

a. metal-AOM by ANME alone, b. metal-AOM by cooperation between ANME and partner MRM, c. apparent metal-AOM by the stimulation of metal oxides on sulfate-AOM .

$6\text{H}^+ \rightarrow 3\text{Fe}^{2+} + \text{S}^0 + 6\text{H}_2\text{O}$ 。零价硫通过一个隐藏的硫循环过程反应生成负二价硫和硫酸盐,产生的硫酸盐可以与甲烷发生 S-AOM,进而氧化甲烷,这种 AOM 的发生是以间接的方式和金属化合物相耦联<sup>[77]</sup>。

Metal-AOM(以 Fe-AOM 为例)可能是海洋生态系统中普遍存在的过程,在调节深海沉积物甲烷通量方面发挥着重要作用<sup>[78]</sup>。此外,Fe-AOM 过程的产物  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{CO}_2$  影响着硫和磷的地球化学循环以及自生矿物的形成<sup>[78]</sup>。因此,Fe-AOM 过程对全球碳、硫、磷以及金属元素的循环发挥着重要的作用<sup>[78]</sup>。

## 4 展望

(1) 深海属于极端环境,理化环境的特点是高压、黑暗、缺氧、不同环境温度差异大,在这种环境下海底深部生物圈容纳了类型多样、生物量巨大并且代谢独特的微生物。以深海不同环境中的微生物为研究对象,利用同位素标记对功能微生物进行室内富集培养,同时结合单细胞测序、宏基因组、宏转录组和宏蛋白组等分子研究手段,将会极大促进对参与甲烷代谢过程新型菌种及新代谢途径的认识。

(2) Metal-AOM 在近几年越来越吸引学者的注意,这不仅由于 Metal-AOM 可以消耗沉积物中的甲烷,而且 Metal-AOM 在生物地球化学循环和地质演化中具有重要作用。虽然不断有地球化学与分子证据显示海洋沉积物中存在微生物参与的 Metal-AOM,但对有关该过程的微生物作用机制和所涉及的微生物群落成员还应进行进一步的探索。

(3) 产甲烷和甲烷氧化联系着海洋中的碳、氮、硫、金属等循环过程,如硫酸盐的还原过程与 AOM 相结合,形成 S-AOM 反应;硝酸盐的还原过程与 AeOM 相结合,形成 N-AOM 反应;金属的还原过程与 AOM 相结合,形成 Metal-AOM 反应,但是这些过程中涉及的微生物之间的相互作用以及其中的生命代谢过程还不够明晰,揭示这些元素循环过程与甲烷代谢过程的耦合效应,是将来海洋生境生物地球化学循环的重要研究方向。

## 参考文献 (References)

- [1] IPCC. Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change[M]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2004.
- [2] Rice D D. Biogenic gas: controls, habitats, and resource potential[M]//
- Howell D G. The Future of Energy Gases. Washington: United States Government Printing Office, 1993: 583-606.
- [3] Hinrichs K U, Boetius A. The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry[M]//Wefer G, Billett D, Hebbeln D, et al. Ocean Margin Systems. Berlin: Springer, 2002: 457-477.
- [4] Reeburgh W S. Oceanic methane biogeochemistry [J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(2): 486-513.
- [5] Reeburgh W S. Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments [J]. *Earth and Planetary Science Letters*, 1976, 28(3): 337-344.
- [6] Islas-Lima S, Thalasso F, Gómez-Hernandez J. Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification [J]. *Water Research*, 2004, 38(1): 13-16.
- [7] Beal E J, House C H, Orphan V J. Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation [J]. *Science*, 2009, 325(5937): 184-187.
- [8] Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari R R, et al. Global distribution of microbial abundance and biomass in seafloor sediment [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(40): 16213-16216.
- [9] 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.
- [10] Adam P S, Borrel G, Brochier-Armanet C, et al. The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology [J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(11): 2407-2425.
- [11] Bapteste É, Brochier C, Boucher Y. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens [J]. *Archaea*, 2005, 2005: 859728.
- [12] Borrel G, Parisot N, Harris H M, et al. Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 679.
- [13] Nobu M K, Narihiro T, Kuroda K, et al. Chasing the elusive Euryarchaeota class WSA2: genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen [J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(10): 2478-2487.
- [14] Sorokin D Y, Makarova K S, Abbas B, et al. Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2(8): 17081.
- [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] Wang Y L, Hua Z S, Goh K M, et al. Further expansion of methane metabolism in the Archaea. *BioRxiv*, 2018.
- [18] Conklin A, Stensel H D, Ferguson J. Growth kinetics and competition between Methanosarcina and Methanosaeta in mesophilic anaerobic digestion [J]. *Water Environment Research*, 2006, 78(5): 486-496.
- [19] Kobayashi T, Yasuda D, Li Y Y, et al. Characterization of start-up per-

- formance and archaeal community shifts during anaerobic self-degradation of waste-activated sludge [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(21): 4981-4988.
- [20] 段昌海, 张翠景, 孙艺华, 等. 新型产甲烷古菌研究进展[J]. 微生物学报, 2019, 59(6): 981-995. [DUAN Changhai, ZHANG Cuijing, SUN Yihua, et al. Recent advances on the novel methanogens [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(6): 981-995.]
- [21] Zhou Z, Zhang C J, Liu P F, et al. Non-syntrophic methanogenic hydrocarbon degradation by an archaeal species [J]. *Nature*, 2022, 601(7892): 257-262.
- [22] Konhauser K O. Introduction to Geomicrobiology[M]. John Wiley & Sons, 2009.
- [23] Xiao K Q, Beulig F, Kjeldsen K U, et al. Concurrent methane production and oxidation in surface sediment from Aarhus Bay, Denmark [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1198.
- [24] Xiao K Q, Beulig F, Roy H, et al. Methylophilic methanogenesis fuels cryptic methane cycling in marine surface sediment [J]. *Limnology and Oceanography*, 2018, 63(4): 1519-1527.
- [25] Zhuang G C, Heuer V B, Lazar C S, et al. Relative importance of methylophilic methanogenesis in sediments of the Western Mediterranean Sea [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2018, 224: 171-186.
- [26] Oremland R S, Polcin S. Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 44(6): 1270-1276.
- [27] Li L Y, Zhang W T, Zhang S J, et al. Bacteria and archaea synergistically convert glycine betaine to biogenic methane in the Formosa cold seep of the South China sea [J]. *Msystems*, 2021, 6(5): e0070321.
- [28] Dolfing J, Larter S R, Head I M. Thermodynamic constraints on methanogenic crude oil biodegradation [J]. *The ISME Journal*, 2008, 2(4): 442-452.
- [29] Ozuolmez D, Na H, Lever M A, et al. Methanogenic archaea and sulfate reducing bacteria co-cultured on acetate: teamwork or coexistence? [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 492.
- [30] Chen Y, Wu N Y, Liu C L, et al. Methanogenesis pathways of methanogens and their responses to substrates and temperature in sediments from the South Yellow Sea [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 815: 152645.
- [31] Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria [J]. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(2): 439-471.
- [32] Dedysh S N, Knief C, Dunfield P F. Methylocella species are facultatively methanotrophic [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(13): 4665-4670.
- [33] Vorobev A V, Baani M, Doronina N V, et al. *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium that possesses only a soluble methane monooxygenase [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(10): 2456-2463.
- [34] Elsaied H E, Hayashi T, Naganuma T. Molecular analysis of deep-sea hydrothermal vent aerobic methanotrophs by targeting genes of 16S rRNA and particulate methane monooxygenase [J]. *Marine Biotechnology*, 2004, 6(5): 503-509.
- [35] Tavormina P L, Ussler III W, Orphan V J. Planktonic and sediment-associated aerobic methanotrophs in two seep systems along the North American margin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(13): 3985-3995.
- [36] Wasmund K, Kurtböke D I, Burns K A, et al. Microbial diversity in sediments associated with a shallow methane seep in the tropical Timor Sea of Australia reveals a novel aerobic methanotroph diversity [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 68(2): 142-151.
- [37] Alperin M J, Hoehler T M. Anaerobic methane oxidation by archaea/sulfate-reducing bacteria aggregates: 1. Thermodynamic and physical constraints [J]. *American Journal of Science*, 2009, 309(10): 869-957.
- [38] Knittel K, Lösekann T, Boetius A, et al. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 467-479.
- [39] Haroon M F, Hu S H, Shi Y, et al. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage [J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 567-570.
- [40] Knittel K, Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 311-334.
- [41] Timmers P H A, Widjaja-Greefkes H C A, Plugge C M, et al. Evaluation and optimization of PCR primers for selective and quantitative detection of marine ANME subclusters involved in sulfate-dependent anaerobic methane oxidation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(14): 5847-5859.
- [42] Kong Y, Lei H Y, Zhang Z L, et al. Depth profiles of geochemical features, geochemical activities and biodiversity of microbial communities in marine sediments from the Shenhu area, the northern South China Sea [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 779: 146233.
- [43] Yang S S, Lv Y X, Liu X P, et al. Genomic and enzymatic evidence of acetogenesis by anaerobic methanotrophic archaea [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3941.
- [44] Metcalfe K S, Murali R, Mullin S W, et al. Experimentally-validated correlation analysis reveals new anaerobic methane oxidation partnerships with consortium-level heterogeneity in diazotrophy [J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(2): 377-396.
- [45] 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 & Technology*, 2008, 42(18): 6791-6799.
- [46] Ettwig K F, Butler M K, Le Paslier D, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria [J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 543-548.
- [47] Roalkvam I, Jørgensen S L, Chen Y F, et al. New insight into stratification of anaerobic methanotrophs in cold seep sediments [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 78(2): 233-243.
- [48] Yanagawa K, Sunamura M, Lever M A, et al. Niche separation of methanotrophic archaea (ANME-1 and -2) in methane-seep sediments of the eastern Japan Sea offshore Joetsu [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2011, 28(2): 118-129.
- [49] Chen Y, Xu C L, Wu N Y, et al. Diversity of anaerobic methane oxid-

- izers in the cold seep sediments of the Okinawa Trough [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 819187.
- [50] Niu M Y, Fan X B, Zhuang G C, et al. Methane-metabolizing microbial communities in sediments of the Haima cold seep area, northwest slope of the South China Sea [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93 (9): fix101.
- [51] Lv Y X, Yang S S, Xiao X, et al. Stimulated organic carbon cycling and microbial community shift driven by a simulated cold-seep eruption [J]. *mBio*, 2022, 13 (2): e0008722.
- [52] Hoehler T M, Alperin M J, Albert D B, et al. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium [J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 1994, 8 (4): 451-463.
- [53] Hallam S J, Putnam N, Preston C M, et al. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics [J]. *Science*, 2004, 305 (5689): 1457-1462.
- [54] 陈颖. 厌氧甲烷氧化微生物代谢分子机制及其潜在参与矿物形成机理的研究[D]. 上海交通大学博士学位论文, 2014. [CHEN Ying. Molecular metabolism study on microbial anaerobic methane oxidation and the associated biogenic minerals[D]. Doctor Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2014.]
- [55] Valentine D L, Reeburgh W S. New perspectives on anaerobic methane oxidation: minireview [J]. *Environmental Microbiology*, 2000, 2 (5): 477-484.
- [56] Moran J J, Beal E J, Vrentas J M, et al. Methyl sulfides as intermediates in the anaerobic oxidation of methane [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (1): 162-173.
- [57] Raghoebarsing A A, Pol A, van de Pas-Schoonen K T, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification [J]. *Nature*, 2006, 440 (7086): 918-921.
- [58] Ettwig K F, Shima S, van de Pas-Schoonen K T, et al. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of *Archaea* [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (11): 3164-3173.
- [59] Chen J, Jiang X W, Gu J D. Existence of novel phylotypes of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria in surface and subsurface sediments of the South China Sea [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2015, 32 (1): 1-10.
- [60] Padilla C C, Bristow L A, Sarode N, et al. NC10 bacteria in marine oxygen minimum zones [J]. *The ISME Journal*, 2016, 10 (8): 2067-2071.
- [61] 吴忆宁, 梅娟, 沈耀良. 甲烷厌氧氧化机理及其应用研究进展[J]. *生态科学*, 2018, 37 (4): 231-240. [WU Yining, MEI Juan, SHEN Yaoliang. Research progress on microbial mechanism and application of anaerobic oxidation of methane [J]. *Ecological Science*, 2018, 37 (4): 231-240.]
- [62] Hansen L B, Finster K, Fossing H, et al. Anaerobic methane oxidation in sulfate depleted sediments: effects of sulfate and molybdate additions [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, 14 (2): 195-204.
- [63] Joye S B, Boetius A, Orcutt B N, et al. The anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction in sediments from Gulf of Mexico cold seeps [J]. *Chemical Geology*, 2004, 205 (3-4): 219-238.
- [64] Niemann H, Duarte J, Hensen C, et al. Microbial methane turnover at mud volcanoes of the Gulf of Cadiz [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2006, 70 (21): 5336-5355.
- [65] Parkes R J, Cragg B A, Banning N, et al. Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark) [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (5): 1146-1161.
- [66] Maignien L, Parkes R J, Cragg B, et al. Anaerobic oxidation of methane in hypersaline cold seep sediments [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83 (1): 214-231.
- [67] Segarra K E A, Comerford C, Slaughter J, et al. Impact of electron acceptor availability on the anaerobic oxidation of methane in coastal freshwater and brackish wetland sediments [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2013, 115: 15-30.
- [68] Ettwig K F, Zhu B L, Speth D, et al. Archaea catalyze iron-dependent anaerobic oxidation of methane [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113 (45): 12792-12796.
- [69] Scheller S, Yu H, Chadwick G L, et al. Artificial electron acceptors decouple archaeal methane oxidation from sulfate reduction [J]. *Science*, 2016, 351 (6274): 703-707.
- [70] Bar-Or I, Elvert M, Eckert W, et al. Iron-coupled anaerobic oxidation of methane performed by a mixed bacterial-archaeal community based on poorly reactive minerals [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51 (21): 12293-12301.
- [71] Cai C, Leu A O, Xie G J, et al. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction [J]. *The ISME Journal*, 2018, 12 (8): 1929-1939.
- [72] Yan Z, Joshi P, Gorski C A, et al. A biochemical framework for anaerobic oxidation of methane driven by Fe(III)-dependent respiration [J]. *Nature Communications*, 2018, 9 (1): 1642.
- [73] He Q X, Yu L P, Li J B, et al. Electron shuttles enhance anaerobic oxidation of methane coupled to iron(III) reduction [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 688: 664-672.
- [74] Liang L W, Wang Y Z, Sivan O, et al. Metal-dependent anaerobic methane oxidation in marine sediment: insights from marine settings and other systems [J]. *Science China Life Sciences*, 2019, 62 (10): 1287-1295.
- [75] He Z F, Zhang Q Y, Feng Y D, et al. Microbiological and environmental significance of metal-dependent anaerobic oxidation of methane [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 610-611: 759-768.
- [76] Fu L, Li S W, Ding Z W, et al. Iron reduction in the DAMO/*Shewanella oneidensis* MR-1 coculture system and the fate of Fe(II) [J]. *Water Research*, 2016, 88: 808-815.
- [77] Sivan O, Antler G, Turchyn A V, et al. Iron oxides stimulate sulfate-driven anaerobic methane oxidation in seeps [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111 (40): E4139-E4147.
- [78] Yang H L, Yu S, Lu H L. Iron-coupled anaerobic oxidation of methane in marine sediments: a review [J]. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2021, 9 (8): 875.