海洋环境中甲烷的生物转化及其对气候变化的影响

牛明杨^{1,2}, 梁文悦^{1,2}, 王风平^{1,2*}

1. 上海交通大学生命科学与技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240;

2. 上海交通大学船舶海洋与建筑工程学院, 海洋工程国家重点实验室, 上海 200240

* 通讯作者, E-mail: Fengpingw@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-11-08; 收修改稿日期: 2018-06-19; 接受日期: 2018-11-07; 网络版发表日期: 2018-11-27

国家重点研发计划项目(编号: 2016YFA0601102)和国家自然科学基金项目(批准号: 41525011、91751205、31661143022、91428308)资助

摘要 甲烷是潜在的高效清洁能源, 同时也是重要的温室气体, 对全球气候的变化和调节有重要影响. 海底沉积物中蕴藏着大量的甲烷, 主要包括有机质热裂解与生物成因气两种来源, 一般以水合物的形式较为稳定地储存在深部沉积物中. 海洋每年向大气中释放的甲烷仅占大气中甲烷总量的1~5%, 海底大部分的甲烷被海洋中的甲烷代谢微生物消耗. 海洋中甲烷的生物转化(微生物代谢)影响并控制了海洋释放到大气中的甲烷通量. 在全球气候逐渐变暖的背景下, 解析海洋环境中甲烷的生物转化机制有助于理解和评估海洋-大气甲烷通量对全球气候变化的影响. 文章综述了海洋环境, 尤其是海底沉积物中甲烷生物转化机制研究的最新研究进展, 主要介绍已知甲烷代谢微生物的种类、分布和甲烷产生和氧化的代谢机制; 探讨海洋中甲烷的生物转化对全球气候变化的影响, 并且提出了甲烷代谢机制的未来研究方向和对其他科学研究的意义.

关键词 甲烷产生, 甲烷氧化, 海洋, 沉积物, 气候

1 引言

海洋占地球表面71%左右的面积, 占地球总水体量的97%, 是地球表面最大的生态系统, 主要包括水体、沉积物和洋壳三大生态圈(Orcutt等, 2011; Schrenk等, 2010). 沉积物生态系统是海洋系统中非常重要的组成部分, 起着连接水体和洋壳生态系统的作用. 海洋中的沉积物主要来自于陆源输入的矿物质颗粒、生物碎屑或者有机质和海洋水体中生物产生或者降解的颗粒状有机物质的沉降(Burdige, 2007). 沉积物

主要分布在大陆架边缘区域(包括大陆架和陆坡), 目前发现有些海域的沉积物深度超过10km(Divins, 2003). 海底包含有特殊的地质构造所形成的生态系统, 比如泥火山(Mud Volcano)、麻坑(Porkmark)、冷泉(Cold seep)、热液(Hydrothermal vent)、海山(Seamount)、海沟(Trench)等生态系统, 为各种不同的生物, 特别是微生物提供了适宜的生长环境(图1; Orcutt等, 2011).

沉积物中含有大量种类不同的微生物. 据估算全球海洋沉积物中微生物的细胞数量约为 2.9×10^{29} 个,

中文引用格式: 牛明杨, 梁文悦, 王风平. 2018. 海洋环境中甲烷的生物转化及其对气候变化的影响. 中国科学: 地球科学, 48: 1568–1588, doi: 10.1360/N072017-00379

英文引用格式: Niu M, Liang W, Wang F. 2018. Methane biotransformation in the ocean and its effects on climate change: A review. Science China Earth Sciences, 61: 1697–1773, <https://doi.org/10.1007/s11430-017-9299-4>

图1 海底不同地质构型和生态系统

白色字体表示不同的地质构型和生态系统, 包括冷泉、海沟、海山、热液

相当于4.1Pg C, 占地球活体生物总质量的~0.6%(Kallmeyer等, 2012). 不同环境的沉积物中微生物的丰度不同, 微生物的丰度与沉积速率和离岸距离有关, 一般离岸距离越近的沉积物中微生物丰度越高. 随着深度的增加, 微生物的丰度显著减少(Kallmeyer等, 2012). 沉积物中的微生物主要是以沉积物中的有机质为主要的能量和物质来源.

沉积物表层的微生物(包括真核生物和原核生物), 能够利用氧气作为电子受体降解复杂有机质, 产生二氧化碳. 相较于硫酸盐, 沉积物中氧气的含量较少, 容易被微生物利用, 在沉积物表层区域, 氧气快速被消耗殆尽. 随着深度的增加, 绝大部分沉积物处于厌氧环境, 其中的硝酸盐、铁锰等金属离子和硫酸盐可以代替氧作为微生物代谢的主要电子受体, 进行有机质厌氧氧化反应(D'Hondt等, 2002). 在厌氧条件下, 微生物初步水解复杂有机质的反应步骤是限速步骤. 微生物通过向胞外分泌水解酶(蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂酶), 将蛋白质、碳水化合物和脂类物质分解成氨基酸、糖和脂肪酸单体(Pfeffer, 1980; Weiland, 2010). 随后对不同的单体进行酸化的反应, 第一步水解反应生成的产物经过微生物发酵作用转化为一些活跃的化学物质, 例如, 挥发性脂肪酸、乙醇、氨、二氧化碳和氢气等(Na等, 2015; Orcutt等, 2010; Ozuolmez等, 2015). 在硫酸盐浓度较高的沉积物中, 硫酸盐还原菌能够氧化初级发酵代谢的产物(短链脂肪酸和醇类化合物), 产生二氧化碳(Muyzer和Stams, 2008). 在硫酸盐浓度很低的沉积物中, 第二步代谢反应中产生的挥

发性短链脂肪酸类化合物和醇类化合物经过进一步的发酵作用, 转化为乙酸、甲酸、氢气和二氧化碳(McInerney和Bryant, 1981; McInerney等, 2008; Muyzer和Stams, 2008). 最后, 产甲烷古菌在厌氧条件下利用二氧化碳、氢气、乙酸和一碳化合物产生甲烷(Lessner, 2001; 图2). 在沉积物中, 甲烷是有机质厌氧氧化的最终产物. 在高压低温(温度低于4℃, 压力高于 6×10^6 Pa)的环境中, 当沉积物中甲烷浓度达到饱和时, 甲烷可以和水聚合形成一种类似冰的晶体笼状聚合物(Clathrates)——水合物(Gas hydrate), 较为稳定地储存在沉积物中. 随着沉积物中甲烷浓度的积累, 部分气体或者溶解的甲烷通过沉积物中的孔隙扩散到表层, 在厌氧且富含硫酸盐的沉积物中, 被甲烷厌氧氧化菌与硫酸盐还原菌的协同作用氧化成二氧化碳. 部分二氧化碳与周围的钙镁离子形成自生碳酸盐, 其余的二氧化碳又可以作为无机化能合成微生物(比如: 产酸菌)的初级底物重新进入碳循环中(Lever, 2012; 图2).

微生物在生态系统的食物链的底端, 是主要的生产者和消费者. 海洋沉积物中直接参与甲烷代谢的微生物主要包括产甲烷菌, 甲烷厌氧氧化古菌和硫酸盐还原菌. 海洋沉积物中的甲烷是有机质厌氧氧化的最终产物, 在全球海洋沉积物中储量巨大. 甲烷也是一种很强的温室气体, 海洋中甲烷的代谢过程对全球气候变化有着重要的影响. 甲烷在海洋中的代谢循环受到科学家们的重视. 微生物产甲烷和甲烷厌氧氧化作用一直是海洋碳循环的研究热点. 近些年随着分子生物学技术的进步, 以及海洋生态学的发展, 海洋中甲

图2 海洋沉积物中微生物参与的有机质代谢循环

MM, 大分子macromolecules; LMM, 小分子low molecular weight molecules; SRB, 硫酸盐还原菌Sulfate Reducing Bacteria; AOM, 厌氧氧化甲烷 Anaerobic Oxidation of Methane

烷的代谢方面的研究有了长足的进展。适时总结这方面已有的研究成果和以及最新的研究方法, 能够及时梳理和更新认知, 对这方面后续的研究发展具有指导性的意义。

本文主要集中介绍和总结近些年海洋环境中参与甲烷的产生和氧化的生物多样性和代谢机制方面的研究发现和进展, 以及海洋环境中甲烷代谢对气候变化的影响。首先介绍目前已知的甲烷产生菌和甲烷氧化菌的多样性及其分布, 主要对其不同的种类和分布以及代谢机制研究方面的进展进行总结和归纳。其次介绍不同类型的产甲烷代谢途径和甲烷氧化途径, 以及全球不同海域甲烷代谢通量对气候变化的影响。最后讨论研究甲烷代谢方向的最新方法和未来研究的方向, 给出我们对本领域发展的建议。

2 甲烷产生和氧化的微生物类群

沉积物中的甲烷主要有两种生成途径, 一种是有机的热裂解产生甲烷。在厌氧高温(80~150℃)的沉积物中, 有机质通过一系列热裂解作用, 产生甲烷(Claypool和Kvenvolden, 1983); 另一种由微生物参与的产甲烷过程。主要是产甲烷菌以乙酸盐, 二氧化碳和氢气或者一碳化合物为底物, 产生甲烷(Ferry和Lessner, 2008)。微生物产甲烷途径被认为是海洋沉积物中甲烷的主要来源(Ferry和Lessner, 2008)。

2.1 产甲烷微生物类群

产甲烷菌(Methanogens)属于广古菌门(Euryarchaeota)。产甲烷菌包含四个纲, Methanomicrobia、Methanobacteria、Methanococci和Methanopyri, 共分为七个目: Methanococcales、Methanopyrales、Methanobacteriales、Methanosarcinales、Methanomicrobiales、Methanocellales和Methanomassiliicoccales(以前称为“Methanoplasmatales”)。

产甲烷菌能够利用不同的底物产甲烷, 根据利用底物的不同可分为不同的产甲烷代谢类型, 主要分为三类: 二氧化碳和氢气利用型, 乙酸盐利用型和C1化合物利用型。进化地位不同的产甲烷古菌类群可能具有相同的产甲烷代谢类型, 而进化地位相似或相同的产甲烷菌类群可能具有不同的产甲烷代谢途径。

产甲烷古菌Methanococcales、Methanopyrales、Methanocellales、Methanobacteriales和Methanomicrobiales类群的大部分物种主要是利用氢气和二氧化碳产生甲烷(Ferry和Lessner, 2008)。例如, Methanococcales类群一般利用CO₂作为电子受体, H₂或者甲酸盐作为电子供体产甲烷。这类产甲烷菌多分布在海洋环境, 它们需要海水中的盐离子为其生长提供帮助(Liu和Whitman, 2008)。Methanobacteriales中某些类群也可以利用甲酸盐、CO, 或者仲醇类化合物为电子供体产甲烷。Methanomicrobiales能够利用甲酸盐和仲醇代

替 H_2 作为电子供体产甲烷(Liu和Whitman, 2008). 它们广泛分布在不同的厌氧环境中(海洋或淡水沉积物, 污水或者动物粪便). *Methanocellales*也可以利用甲酸盐产甲烷, 对氢气浓度低的环境具有耐受性, 在此环境中仍能够利用氢气产甲烷(Lyu和Lu, 2015; Sakai等, 2008), 分布在稻田土壤, 淡水和海洋的厌氧沉积物中.

*Methanopyrales*中仅包含*Methanopyrus kandleri*, 是能够利用 CO_2 和 H_2 产甲烷的产甲烷菌, 这类产甲烷菌能够适应高温环境(84~110℃), 主要分布在海底热液生态系统中(Itävaara等, 2016; Liu, 2010; Nakagawa和Takai, 2006).

Methanomassiliicoccales(*Methanoplasmatales*)是氢气依赖型产甲烷菌, 能够在利用氢气和甲醇或者甲胺产生甲烷, 分布在各种不同的环境中, 包括垃圾填埋场、稻田、海洋热液生态系统、动物或者人消化道等环境(Egert等, 2003; Großkopf等, 1998; Huang等, 2003; Paul等, 2012; Takai和Horikoshi, 1999; Lang, 2014; Paul等, 2012; Poulsen等, 2013).

*Methanosarcinales*中包括的产甲烷菌代谢类型复杂, 即能够利用氢气和二氧化碳, 也能利用乙酸盐、一碳甲基化合物产生甲烷. 其中多数产甲烷菌能够通过歧化反应利用甲基化合物或者乙酸盐裂解的途径产甲烷. *Methanosarcinales*分为*Methanosarcinaceae*和*Methanosaetaceae*两个科, *Methanosarcinaceae*中所有的产甲烷菌都能够通过歧化反应利用甲基化合物(甲醇、单双三甲胺和甲基硫化物)产甲烷, 而*Methanosaetaceae*中的产甲烷菌仅能够利用乙酸盐裂解的途径产甲烷(Lee等, 2011; Liu和Whitman, 2008). 这类产甲烷菌多分布于海洋和淡水厌氧的沉积物、厌氧污水、牲畜肠道与粪便中(Liu和Whitman, 2008).

2.2 氧化甲烷微生物类群

甲烷能够被微生物通过有氧或者无氧方式氧化成二氧化碳. 参与甲烷有氧氧化的微生物是嗜甲烷细菌(*Methanotrophic bacteria*), 仅能以甲烷作为电子供体和唯一碳源, 以氧气作为电子受体, 将甲烷氧化成二氧化碳(Hanson和Hanson, 1996). 嗜甲烷细菌广泛分布在富含甲烷的水体、土壤或者有氧-厌氧转换区中(Cicerone和Oremland, 1988). 海洋中的嗜甲烷细菌主要存在于海水和有氧沉积物-水体交界处, 或者共生的海洋无脊椎动物体中(Cavanaugh, 1983; Childress等, 1986;

Fisher, 1990; Fisher等, 1993; Wahlen, 1993). 在厌氧和无甲烷等不利于生长的条件下, 嗜甲烷细菌能够形成囊泡或者内生孢子进入休眠期, 以抵抗不利的生长环境(Hanson和Hanson, 1996).

基于细胞内部结构, 进化地位和同化碳途径的差异, 嗜甲烷细菌主要分为两种类型——I型和II型(Green, 1992). I型嗜甲烷细菌细胞膜有很多碟状的囊泡, 能够利用核酮糖单磷酸盐(RuMP)途径进行碳同化, 主要以 γ 变形菌门的*Methanococcaceae*为代表, 包括*Methylobacter*、*Methylomonas*、*Methylomicrobium*和*Methylosphaera*(Bratina等, 1992; Hanson和Hanson, 1996). 与I型嗜甲烷细菌不同, II型嗜甲烷细菌的细胞膜系统主要由成对的膜脂组成细胞膜, 主要利用丝氨酸途径进行碳同化(Hanson和Hanson, 1996). 所有II型嗜甲烷细菌都属于Alpha-proteobacteria, 主要以*Methylocystaceae*为代表, 包括*Methylocystis*、*Methylopila*和*Methylosinus*(Bratina等, 1992; Hanson和Hanson, 1996). 新分类的嗜甲烷细菌X型也属于 γ 变形菌门, 与I型嗜甲烷细菌相似, 主要包括*Methylococcus*和*Methylocaldum*, 能够利用核酮糖单磷酸盐途径和丝氨酸途径进行碳同化(Bratina等, 1992). 主要分布在温度较高的环境中, 相较于其他I型嗜甲烷细菌, X型嗜甲烷细菌DNA中的GC含量较高(Hanson和Hanson, 1996).

厌氧甲烷氧化菌(ANaerobic Methanotroph, ANME)是能够在厌氧的环境中将甲烷氧化成二氧化碳的一类古菌, 属于广古菌门(*Euryarchaeota*)(Knittel和Boetius, 2009). 基于16S rRNA基因进化分析, 厌氧氧化甲烷菌主要分为三个不同的亚群, ANME-1、ANME-2、ANME-3(Knittel和Boetius, 2009). 其中ANME-2、ANME-3属于*Methanosarcinales*, 而ANME-1与*Methanomicrobiales*和*Methanosarcinales*进化地位较远, 被分为单独的一个类群(图3; Knittel和Boetius, 2009). ANME-1包括ANME-1a和ANME-1b两个不同的亚群, 其中ANME-1b可以进一步分为三个不同的亚群(ANME-1b I, II, III)(Niu等, 2017). ANME-1、ANME-2和ANME-3三个类群之间的亲缘关系较远, 16S rRNA基因序列同源性只有75~92%(Knittel和Boetius, 2009). ANME-1细胞呈杆状, 一般以单细胞形式, 或者以2~4个单细胞聚集成链条的形式分布在沉积物中(Reitner等, 2005). ANME-1也能够与SRB形成菌席,

图3 甲烷代谢古菌的分类和进化地位

(a) 根据*mcrA*基因构建的进化树; (b) 根据16S rRNA基因构建进化树

共同代谢甲烷(Knittel等, 2005). ANME-2被分为ANME-2a/b、ANME-2c、ANME-2d三个不同的亚群, 其中最新报道的ANME-2d被划分到一个新科(Methanoperedenaceae), ANME-2中的三个亚群之间16S rRNA基因序列同源性也很低(Haroon等, 2013). ANME-2细胞呈圆球状, 一般与硫酸盐还原菌形成细胞团(Consortia)进行甲烷厌氧氧化作用, 且细胞团的胞壁外侧有很厚的硅酸盐层包裹(Chen Y等, 2015). ANME-2a/b和ANME-2c可以通过其与SRB形成的细胞团的形态区分. 大多数情况下, ANME-2a/b与*Desulfosarcina*(DSS)聚合形成混合形式的细胞团, 而ANME-2c与*Desulfosarcina*(DSS)聚合成壳状的细胞团, 内部是ANME-2, 外部是SRB(Knittel和Boetius, 2009). ANME-3一般仅与某些属于*Desulfobulbus*(DBB)的细菌聚合成壳状的聚合体, 在某些环境中也发现有单独的ANME-3细胞(Lösekan等, 2007; Niemann等, 2006). 通过研究发现也有其他非SRB细菌, 例如, ANME-2c可以与属于 α 变形菌门的*Sphingomonas* spp.和属于 β 变形菌门的*Burkholderia* spp.和*Limnobacter* spp.共生, 聚合成细胞团(Chen Y等, 2016; Pernthaler等, 2008). 自从1999年甲烷厌氧氧化菌首次在海洋沉积物中发现, 研究者对ANME的环境分布开展了大量的研究, 发现ANME分布在各种不同的环境中(Hinrichs等, 1999). 不仅存在于陆地、淡水环境中, 还大量存在于海水、海洋的沉积物中, 尤其分布在冷泉、泥火山、麻坑等甲烷富集的环境中(Giovannelli等, 2016; Nickel等, 2012; Shu-

benkova等, 2010; Niemann等, 2006; Tu等, 2017).

有研究发现ANME也存在于热液喷口环境中的烟囱和岩石的厌氧层(Inagaki等, 2006), 溶解有甲烷的海水(Schubert等, 2006b), 海床下数千米深的深部生物圈(Roussel等, 2008), 以及陆地上的泥火山、垃圾填埋场和淡水湖泊的水体(Alain等, 2006; Ettwig等, 2008; Raghoebarsing等, 2006).

由于ANME类群中的不同亚群具有不同的进化地位和生理功能, 所以不同的ANME亚群可能具有不同的生态习性(Ecological niches)和生态功能. 不同的ANME亚群广泛地分布在富含甲烷的沉积物中, 它们在不同地化环境的沉积物中的分布差异显著(即沉积物中的ANME类群的分布具有环境特异性)(Boetius等, 2000; Hinrichs等, 1999; Ruff等, 2015). 中国南海(South China Sea, SCS)海马冷泉区的古菌分布及多样性研究中, 发现ANME-2a/b在沉积物中SMTZ的丰度非常高, 随着深度的增加ANME-2a/b的丰度显著减少, 而ANME-1b的丰度显著增加(Niu等, 2017).

随着测序技术的发展, 宏基因组学方法在非培养微生物生态研究中广泛应用. 目前通过宏基因组的方法在很多不同的环境中发现了可能具有甲烷代谢的能力新的微生物类群. Evans等人(2015)利用从苏拉特盆地(Surat Basin)煤炭床层的地层水(Formation Waters)的过滤样品中提取的环境基因组, 对环境宏基因组序列进行拼接和聚类分析, 得到两个完整度较高属于深古菌门(Bathyarchaeota)的基因组(BA1、BA2)(完整度

分别为92%和94%)。深古菌是最近新命名的古菌门,可能在海洋沉积物中有机物的降解中发挥了重要作用(He等, 2016; Lloyd等, 2013; Meng等, 2014)。令人意外的是在BA1(Bathy-3)和BA2(Bathy-8)两个基因组中都发现包含MCR编码基因(*mcrABGCD*), 还发现具有能够利用一碳底物产甲烷的相关基因(*mtsA*、*mtbA*、*mtaA*、*mttBC*、*mtbBC*), 而且这些基因与严格依赖氢气的利用一碳底物产甲烷菌Methanomassiliicoccales中相应的基因序列相似(Evans等, 2015)。广古菌门(Euryarchaeota)以外的古菌门中发现可能参与甲烷代谢的古菌暗示甲烷代谢可能有更早的起源, 在广古菌门和深古菌门分化之前, 可能有更多的其他古菌门类具有代谢甲烷的潜能。使用类似的宏基因组分析方法, Vanwonterghem等人从纤维素降解的厌氧消化池中的样品中得到了包含有*mcrA*基因的4个古菌基因组, 其中三个基因组中的*mcrA*基因与已知的产甲烷菌相似度较高, 另一个基因组中的*mcrA*基因与其他环境中的三个未知的甲烷代谢类群基因组中的*mcrA*基因相似度较高; 通过*mcrA*基因和16S rRNA基因分析发现, 这四个基因组都属于一个新的Verstraetearchaeota古菌门, 是一种严格依赖氢气的产甲烷菌类群, 在有氢气的条件下利用甲基底物产甲烷(Vanwonterghem等, 2016)。

3 甲烷产生和氧化途径

3.1 甲烷的产生途径

产甲烷菌主要利用二氧化碳和氢气、乙酸盐、一碳类化合物这三类底物产甲烷。许多产甲烷菌已能够纯培养, 其产甲烷途径研究得比较清楚。下面我们按照底物的类型, 分别详细介绍这三类产甲烷途径。

3.1.1 二氧化碳为底物的产甲烷途径

多数产甲烷菌都属于嗜氢菌, 能够利用氢气作为主要电子供体还原二氧化碳。或者利用甲酸盐代替氢气作为主要电子供体还原二氧化碳(表1, 反应式(1)和(2))。

甲烷产生途径中二氧化碳还原过程主要由七步主反应组成(图4), 另外还有一步支路反应: 异硫化物还原酶(Hdr, heterodisulfide reductase)催化的CoM-S-S-CoB还原反应(图4中红色标注步骤)。在二氧化碳还原过程中, 甲烷呋喃(Methanofuran, MFR)和四氢甲烷蝶

啉(H_4MPT)主要作为甲基的载体。二氧化碳首先转变成甲酰基与MFR结合, 然后再由MFR转移到 H_4MPT , H_4MPT 上的甲酰基依次被还原成次甲基、亚甲基, 最后还原成甲基。还原态的辅酶 $F_{420}(F_{420}H_2)$ 是第四、五步反应的电子供体, 氧化态辅酶 F_{420} 的再还原过程需要 F_{420} 依赖型氢酶以及甲酸脱氢酶氧化电子供体(氢气和甲酸盐)。接下来甲基从 H_4MPT 传递到辅酶M(S-CoM)的过程中, 甲基首先被传递到辅因子III(Factor III)是许多甲基转移酶的辅基, 其结构和细菌来源的维生素B12或类咕啉类相似)上, 然后再传递给辅酶M。产甲烷过程中的甲基转移是通过膜结合蛋白复合物(Methyl- H_4MPT :HS-CoM methyltransferase, Mtr)催化的(Lessner Daniel J, 2001)。最后在甲基辅酶M还原酶的催化下, 甲基最终还原成甲烷。在异硫化物还原酶的作用下, 异硫化物(CoM-S-S-CoB)还原成还原态的辅酶B(CoB-SH)和辅酶M(CoM-SH)(Ferry, 2010)。异硫化物还原酶在专一性还原二氧化碳的甲烷产生菌中主要是以三亚基HdrABC形式存在(Hedderich等, 1990), 而在利用乙酸盐类甲烷产生菌则是以双亚基HdrDE形式存在(Simianu等, 1998)。

3.1.2 乙酸盐为底物的产甲烷途径

乙酸是沉积物中有机质厌氧氧化过程的中间体, 也是产甲烷过程的重要底物(McInerney等, 2008; Reeburgh, 1983)。乙酸盐产甲烷的过程主要是乙酸盐的裂解反应(Acetoclastic reaction)(Liu和Whitman, 2008)。乙酸盐产甲烷的过程中乙酸盐的碳-碳键被打开, 分成两部分, 羧基部分和甲基部分。羧基氧化成二氧化碳并产生电子, 电子流向甲基, 甲基被还原成甲烷, 这个过程被称为乙酸裂解产甲烷途径(表1, 反应式(3))。首先, 在乙酸盐激酶(Ack)和磷酸转乙酰酶(Pta)共同作用下, 辅酶A连接在乙酸盐的羧基端。接着CODH/ACS(一氧化碳脱氢酶/乙酰辅酶A合成酶复合体)负责切断乙酰基和辅酶A之间的碳-硫键以及乙酸盐中的碳-碳键(Gong等, 2008), 羧基在铁氧还蛋白(Ferredoxin)参与下氧化成二氧化碳释放到细胞外, 通过Cam(碳酸脱水酶, Carbonic anhydrase)转变成碳酸盐(Fischer和Thauer, 1990)。甲基转移至辅因子四氢八叠球菌蝶啉(H_4SPT)上, MTR(N5-甲基四氢甲烷蝶啉: 辅酶M甲基转移酶, Methyltetrahydrosarcinapterin:CoM methyltransferase)甲基转移酶是膜结合蛋白复合体, 将甲基从 H_4SPT 转

表 1 甲烷产生和氧化化学方程式以及反应的吉布斯自由能^{a)}

序号	化学反应方程式	吉布斯自由能ΔG (kJ mol ⁻¹ CH ₄)
甲烷产生反应		
1	$4\text{H}_{2,\text{aq}} + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_{4,\text{aq}} + 3\text{H}_2\text{O}$	-229
2	$4\text{HCOO}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-130
3	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_{4,\text{aq}} + \text{HCO}_3^-$	-15
4	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_{4,\text{aq}} + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-223
5	$4\text{CH}_3\text{NH}_3^+ + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_{4,\text{aq}} + \text{HCO}_3^- + 4\text{NH}_4^+ + \text{H}^+$	-136
6	$\text{R-CH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RH} + \text{CO}_2 + 6\text{H}^+ + 6\text{e}^-$	
7	$3\text{R-CH}_3 + 6\text{e}^- + 6\text{H}^+ \rightarrow 3\text{CH}_4 + 3\text{RH}$	
8	$4\text{R-CH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{RH} + 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2$	
9	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-113
甲烷氧化反应		
10	$\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-858.7
11	$\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS} + \text{H}_2\text{O}$	-16.6
12	$3\text{CH}_4 + 8\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 3\text{CO}_2 + 4\text{N}_2 + 10\text{H}_2\text{O}$	-928
13	$\text{CH}_4 + 4\text{NO}_3^- \rightarrow 4\text{NO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O}$	-503
14	$5\text{CH}_4 + 8\text{MnO}_4^- + 19\text{H}^+ \rightarrow 5\text{HCO}_3^- + 8\text{Mn}^{2+} + 17\text{H}_2\text{O}$	-991.7
15	$\text{CH}_4 + 8\text{Fe}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + 8\text{Fe}^{2+} + 9\text{H}^+$	-418.3

a) 其中R代表-SH、-OH、-NH₂、-NHCH₃、-N(CH₃)₂或-N(CH₃)₃⁺, 即代表底物可以是甲醇、一甲胺、二甲胺、三甲胺等甲基化合物. Caldwell等(2008)、McInerney等(2008)和Zhuang(2014)

移到HSCoM上. 最后通过MCR酶和HS-CoB辅因子将甲基转换成甲烷并生成CoM-S-S-CoB. 羧基氧化成CO₂步骤中释放的电子通过细胞膜电子传递链将电子传递给HDR(异硫化物还原酶), 用于CoM-S-S-CoB的还原(图4; Maupin-Furlow和Ferry, 1996).

目前已知的利用乙酸盐产甲烷的产甲烷菌包括*Methanosarcina*和*Methanosaeta*两个属(Lessner, 2009). 相对于乙酸盐, *Methanosarcina*属中的产甲烷菌更倾向于利用甲醇和甲胺作为底物产甲烷, 其中有些产甲烷菌也可以利用氢气. *Methanosaeta*属的产甲烷菌仅能够利用乙酸盐产甲烷, 并且在低乙酸盐浓度的环境中仍然能利用乙酸产生甲烷. 而*Methanosarcina*属的产甲烷菌需要较高浓度的乙酸盐才能够产甲烷. 这种对

乙酸盐浓度的差异, 有可能是因为乙酸盐代谢的第一步反应中的酶(乙酸激酶-磷酸转移酶系统Acetate kinase (AK)-phosphotransacetylase(PTA) system)对乙酸盐的亲和度不同.

3.1.3 一碳化合物为底物产甲烷作用

一碳化合物主要包括甲醇, 甲基化胺盐(单甲基胺盐、二甲胺、三甲胺和四甲基胺)和甲基硫化物(甲硫醇和二甲硫醚). 一碳化合物产生甲烷的途径从总体上可以归纳为, 1摩尔底物上的甲基通过二氧化碳产甲烷的逆反应过程氧化成二氧化碳, 并产生6摩尔的电子, 提供给其余3摩尔底物上的甲基还原成甲烷的反应. 这种将氧化一部分底物获得的电子用于还原剩余部分

图4 三种不同底物产甲烷代谢途径示意图

红色部分表示三种代谢途径中相同的步骤。参与反应的酶1. Formyl-MFR dehydrogenase(Fmd)甲酰甲硫脱氢酶; 2. Formyl-MFR:H₄M(S)PT formyltransferase(Ftr)甲酰甲硫:四氢甲硫蝶呤甲酰基转移酶; 3. Methenyl-H₄M(S)PT cyclohydrolase (Mch) N5,N10-次甲基四氢甲硫蝶呤脱氢酶; 4. Methylene-H₄M(S)PT dehydrogenase(Hmd)亚甲基四氢甲硫蝶呤脱氢酶; 5. Methylene-H₄M(S)PT reductase (Mer) N5,N10-亚甲基四氢甲硫蝶呤还原酶; 6. Methyl-H₄M(S)PT:HS-CoM methyltransferase (Mtr) N5-甲基四氢甲硫蝶呤:辅酶M甲基转移酶; 7. Methyl-CoM reductase (Mcr) 甲基辅酶M还原酶; 8. Heterodisulfide reductase (Hdr) 异硫化物还原酶; 9. Formate dehydrogenase(Fdh)甲酸脱氢酶; 10. Energy-conserving hydrogenase (Ech) Ech 氢酶; 11. F420-reducing hydrogenases F420-还原脱氢酶; 12. Methyltransferase 甲基转移酶; 13. Acetate kinase (AK)-phosphotransacetylase (PTA) system in Methanosarcina(AMP-forming acetyl-CoA synthetase in Methanosarcina)乙酸激酶-磷酸转移酶系统(AMP-形成 乙酰辅酶A合成酶); 14. Co dehydrogenase/acetyl-CoA synthase (CODH/ACS) 一氧化碳脱氢酶/乙酰辅酶A合成酶

底物的反应属于歧化反应(Disproportionation)。利用一碳化合物产甲烷的类群主要包括: Methanosarcinales中绝大多数嗜甲基产甲烷菌, 还有属于Methanobacteriales的Methanospaera属的产甲烷菌。

甲醇或者甲胺的歧化作用主要是由底物特异型甲基转移酶系统催化四个分子底物的去甲基化产生甲基。其中一分子甲基从甲基辅酶M转移到H₄SPT(Tetrahydrosarcinapterin, H₄MPT的类似物), 经过多步反应氧化成二氧化碳并产生六个电子(表1, 反应式(6)), 另外三分子甲基通过上一步氧化作用产生的电子, 在甲基辅酶M还原酶和异硫化物还原酶作用下被还原成甲烷(表1, 反应式(7)), 总反应式见(表1, 反应式(8))。

还有些其他的嗜甲基产甲烷菌也能利用其他电子供体还原甲基。Methanomicrococcus blatticola和Methanospaera属的产甲烷古菌是氢气依赖型的嗜甲基产

甲烷菌, 它们是严格的嗜甲基和氢气产甲烷菌, 能够利用氢气还原甲基(表1, 反应(9); Sorokin等, 2017)。最近Sorokin对来自盐碱湖沉积物进行富集, 分离出了两株嗜甲基产甲烷菌, 根据基因组分析发现, 可以利用一碳甲基化合物作为电子受体, 甲酸或者氢气作为外部电子供体。但是与其他的嗜甲基产甲烷菌的产甲烷途径不同。两株菌的基因组中发现缺少很多参与产甲烷的酶, 都缺少Mtr复合体和Fwd复合体, 和其他的参与产甲烷中间代谢反应的酶。推测这两株嗜甲基产甲烷菌有可能利用现在还未知的生理功能代谢甲烷(Sorokin等, 2017)。

通过对三种不同产甲烷代谢途径的研究分析, 可以发现在已知的甲烷产生途径中有两个反应步骤是所有产甲烷菌共有的: 一是将甲基辅酶M(Methyl-CoM)去甲基化产生甲烷; 二是在甲基辅酶M和异硫化物还

原酶共同参与下, 将CoM-S-S-CoB还原成它的氢硫基形式的辅因子: HSCoM和HSCoB的过程(图4红色标注部分)和生成甲烷。在所有产甲烷途径中, 甲基辅酶M还原酶是产甲烷过程的关键酶。所有的产甲烷过程都是放能反应, 不同底物释放的能量有所不同。甲烷产生过程中的能量转化是通过钠离子或质子的排出产生化学浓度梯度, 然后驱动位于膜上的ATP(Adenosine triphosphate, 腺苷三磷酸)合成酶产生ATP。

通常认为以二氧化碳和氢气以及乙酸为底物的甲烷过程是海洋沉积物中甲烷产生的主要途径, 一碳甲基化合物导致的甲烷产生过程一直被忽略。但是近年来的研究发现包括甲醇, 甲胺和二甲基硫等一碳化合物广泛存在于海洋沉积物中, 以这些甲基化合物为底物的甲烷生成可能也是重要的产甲烷途径(Zhuang等, 2017, 2014, 2018)。比如在高盐环境中, 一碳化合物含量相对丰富, 在此环境中, 产甲烷菌主要是利用一碳化合物产生甲烷, 被认为是主要的产甲烷途径(Zhuang等, 2016)。另外, 在硫酸盐存在的条件下, 由于嗜甲基产甲烷菌不受硫酸盐还原菌的竞争抑制作用, 产甲烷菌可以利用一碳化合物产甲烷(Zhuang等, 2017; Mitterer, 2010; Xiao等, 2017)。

3.2 甲烷的氧化途径

3.2.1 甲烷有氧氧化途径

沉积物中的甲烷能够在微生物的作用下氧化成二氧化碳。沉积物中甲烷有氧氧化主要发生在甲烷和氧气同时存在的环境中, 比如表层沉积物中, 沉积物-水体界面或者含有氧和甲烷的水体中, 或者某些共生的动物体内(Knief等, 2003; Knief, 2015; Reeceburgh, 2007; Conrad, 2009)。参与有氧氧化甲烷的微生物包括很多不同的细菌类群, 目前已知的甲烷有氧氧化细菌包含来自 γ 变形菌门中的18个属(可以纯培养)和来自 α 变形菌门的5个属(Knief, 2015)。海洋沉积物中的甲烷主要由微生物产生, 部分来自深部沉积物中的甲烷向表层扩散, 在有氧的环境中为好氧甲烷氧化菌氧化成二氧化碳(Boetius和Wenzhöfer, 2013)。由于氧气在有机质丰富的沉积物中在表层消耗很快, 海洋沉积物主要是厌氧环境, 所以海洋沉积物中甲烷的有氧氧化占海洋中甲烷消耗总量的比例非常小(Boetius和Wenzhöfer, 2013)。

自从1906年Söhngen等人发现并分离第一株甲烷

氧化细菌至今, 科学家已经分离得到了许多可纯培养的好氧甲烷氧化菌菌株(Söhngen, 1906)。有氧氧化甲烷的代谢机制也研究的比较清楚。氧化反应中关键的酶是甲烷单加氧酶(Methane Monooxygenases, MMOs), 能够利用来自细胞色素C提供的还原力打开氧气分子的双氧键(O-O)(Dalton, 1991; Lipscomb, 1994), 其中一个氧原子还原成水(H₂O), 另外一个氧原子结合到甲烷分子上生成甲醇。在一系列脱氢酶的作用下, 甲醇进一步氧化成甲醛和甲酸, 最终甲酸被氧化成二氧化碳(表1, 反应(10))。典型的氧化还原辅因子, 例如醌(Quinones)或者NADH在氧化的过程中被还原, 进入细胞膜上的电子传递链, 电子流产生质子驱动力, 最后通过膜结合ATP合成酶产生ATP(图5; Hanson和Hanson, 1996)。

已知的甲烷单加氧酶有两种形式, 膜结合或者颗粒形式的甲烷单加氧酶(pMMO)和可溶性的甲烷单加氧酶(sMMO)(Chan等, 1993; Smith和Dalton, 1989)。在具有铜离子的环境中, 所有的甲烷氧化细菌都具有膜结合或者颗粒形式的甲烷单加氧酶(pMMO), 所以甲烷单加氧酶以及相关基因可以作为甲烷氧化细菌的目标功能基因(Dalton, 1992)。在铜离子缺乏的环境中, 有些有氧甲烷氧化细菌能够合成可溶性的甲烷单加氧酶(sMMO), sMMO能够利用NADH+H⁺作为电子供体氧化甲烷(Leak, 1992; Lipscomb, 1994)。sMMO主要存在于Type II和Type X嗜甲烷菌中, 而在Type I嗜甲烷菌中很少发现。很多Type I嗜甲烷菌比Type II和X类嗜甲烷菌需要更高浓度的铜离子生长, 有可能是因为它们需要高浓度的铜离子来激活pMMO的活性, 它们的基因组上也缺少合成sMMO的基因(Graham等, 1993; Murrell, 1994)。合成sMMO可能作为某些产甲烷菌在铜离子浓度较低的环境中一种生长机制(Hanson和Hanson, 1996)。

甲烷单加氧酶是催化好氧甲烷氧化第一步反应的酶, 能够将甲烷转化成甲醇。甲醇在脱氢酶的作用下, 氧化成甲醛。甲烷氧化的还原能主要是通过甲醛氧化成甲酸并进一步被氧化成二氧化碳的过程中所释放的。甲醛氧化成甲酸主要分为两种不同的途径, 核酮糖单磷酸途径(RuMP pathway)或者丝氨酸途径(Serine pathway)(Hanson和Hanson, 1996)。核酮糖单磷酸途径非常高效, 能够将甲醛中的碳原子作为细胞物质, 而丝氨酸途径是通过乙酰辅酶A驱动的, 乙酰辅酶A是由一

图5 好氧化甲烷代谢途径示意图

MMO, 单加氧酶(pMMO), 一般结合在细胞膜上; FP, 黄素蛋白(Flavoprotein); Q, 醌(Quinine), 电子传递体; cyt, 细胞色素(Cytochrome有不同的亚型: b、c、a型)

份子的甲醛和一份子二氧化碳合成的, 这个途径需要很多的ATP形式的能量和额外的还原力(Hanson和Hanson, 1996).

3.2.2 甲烷厌氧氧化途径

甲烷的厌氧氧化过程被普遍认为是产甲烷反应的逆反应过程(Knittel和Boetius, 2009). 相对于甲烷的有氧化, 海洋沉积物中绝大部分的甲烷主要是通过厌氧氧化作用消耗的. 在各种不同的环境中都发现有甲烷厌氧氧化作用, 比如厌氧的海洋沉积物和海水中, 厌氧淡水水体和沉积物, 以及沼泽和污水等环境(Knittel和Boetius, 2009; Knittel等, 2005).

虽然甲烷厌氧氧化作用存在于各种不同的厌氧环境中, 但参与AOM作用的微生物至今无法获得纯培养, 所以甲烷厌氧氧化机制现在还没有研究清楚. 尽管如此, 结合组学、同位素示踪、荧光原位杂交-纳米二次离子探针质谱仪联用技术(Fluorescence in situ hybridization-Nanoscale secondary ion mass spectrometry, FISH-NanoSIMS)和酶学等多方面技术来研究AOM代谢机制和ANME与SRB的相互作用关系, 已经给我们带来了惊喜的发现.

甲烷产生途径中最后一步催化产生甲烷的酶——甲基辅酶M还原酶(MCR)是一个包含镍离子(Ni^{+})的酶, 逆向甲烷产生途径中MCR的同系物被认为是催化甲烷氧化的第一步反应(Scheller等, 2010). 从黑海冷泉区沉积物菌席中分离出属于ANME-1的MCR蛋白, 并

得到了其X射线晶体衍射结构(Shima等, 2011). 与甲烷产生菌的MCR相比, ANME-1的MCR在总体结构上与之类似, 也包含有辅酶M及辅酶B, 不同之处在与ANME-1的MCR带有一个 F_{430} 的变体、一个半胱氨酸富集区域以及一个有差异的后平移氨基酸修饰机制(Shima等, 2011). 尽管酶结构和功能的关系还不是很清楚, 但是普遍认为在 F_{430} 和蛋白质表面之间的半胱氨酸富集区域可能是一个氧化还原依赖型电子/电子(或质子/电子)传递系统, 推测它可将MCR中的镍离子由无活性的正二价还原成有活动性的正一价(Shima等, 2011); 而有差异的后转录氨基酸修饰机制可能反应出不同类群ANME对环境的适应性(Krüger等, 2008). 这些推测从MCR酶反应的热动力学以及活性研究中也得到了相应证实(Scheller等, 2010; Thauer, 2011).

此外, Hallam等(2004)通过对深海沉积物的宏基因组分析, 发现除了MER酶以外几乎所有甲烷产生途径上关键酶的编码基因都在一类嗜甲烷古菌ANME-1中存在. Wang等人利用来自泥火山沉积物的AOM培养物(其中ANME-2a是参与AOM作用的主要古菌), 通过单细胞测序和宏转录组分析, 发现ANME-2a基因组中具备编码二氧化碳产甲烷途径的七步反应所需酶的基因, 并且这些基因都活跃表达(Wang等, 2014; Zhang等, 2010, 2011). 这些证据从基因组层面支持了厌氧甲烷氧化途径有可能是逆向的甲烷产生途径.

尽管人们在AOM机制的研究上获得了许多进展,

但是目前仍不清楚不同类群的ANME是否采取了相同或类似的甲烷氧化代谢机制, ANME细胞内部与甲烷氧化相关的电子传递途径如何, 以及相应地能量代谢机制等问题也都尚不清楚. 目前对ANME和SRB之间的物质能量传递体的研究有很多, 分别推测AOM反应的中间物质可能是氢气和乙酸盐, 甲基硫, 零价硫作为中间物质(Hoehler等, 1994; Meulepas等, 2010; Milucka等, 2012; Moran等, 2008; Valentine和Reeburgh, 2000). 最新的研究指出ANME与SRB之间直接的电子传递可能是一种重要的细胞间电子传递方式. McGlynn等人通过对不同ANME和SRB组成的细胞团中细胞的空间距离变化对细胞团活性影响的研究, 对传统的认知发起了挑战. 他们利用FISH和NanoSIMS相结合的方法, 检测不同的ANME和SRB组成的细胞团(ANME-2c: SEEP-SRB1a和ANME-2c或者ANME-2b: Deltaproteobacteria), 对细胞团中细胞之间的距离变化对细胞团活性的影响进行了研究. 发现距离并不能显著影响细胞团的活性. 同时提出了ANME和SRB细胞之间的直接电子传递模型. 并利用组织染色剂(3,3'-diaminobenzidine, DAB)在ANME和SRB形成的细胞团内发现了细胞色素. 其他科学家在ANME-2基因组中也发现有编码血红素细胞色素的基因, 以此推断并模拟构建了细胞团中直接电子转移的模型(图6; Haroon等, 2013; McGlynn等, 2015; Meyerdierks等, 2010; Wang等, 2014).

Wegener等人利用嗜高温的AOM细胞团(主要是ANME-1和HotSeep-1), 以氢为唯一电子供体, 进行富集培养, 结果发现甲烷氧化速率和ANME-1代谢活性受到抑制(Wegener等, 2015). 另一方面, 通过显微观测发现AOM条件下, ANME与HotSeep-1细胞之间通过微管纤维(纳米导线nanowire)连接, 推测其可能通过纳米导线实现细胞间电子的传递(Reguera等, 2005; Summers等, 2010); 而以氢气单独培养HotSeep-1的实验中, HotSeep-1却没有产生微纤毛(Wegener等, 2015). 进一步通过宏基因组和宏转录组的研究发现, ANME-1的基因组上发现有编码胞外多血红素细胞色素c蛋白的基因, 而HotSeep-1基因组中有很多编码合成组装纤毛的基因和胞外多血红素细胞色素c蛋白的基因. AOM条件下, ANME大量表达胞外细胞色素c合成基因, HotSeep-1大量表达胞外细胞色素合成基因和微纤毛合成相关基因. 而当以氢气为电子供体的条件下,

ANME中细胞色素基因的表达量和HotSeep-1中微纤毛和细胞色素基因的表达量都下调. 通过以上实验表明ANME和SRB直接通过纳米导线进行电子传递(Wegener等, 2015). 同样Scheller等(2016)以人工合成的电子受体AQDS(9,10-anthraquinone-2,6-disulfonate)代替硫酸盐, 加入 ^{13}C 标记的甲烷进行AOM培养, 整个培养体系仍然能够进行AOM反应, 甚至加入钼酸盐抑制硫酸盐还原也不影响AOM反应的进行. 利用AQDS的位置异构体, 腐殖质, 溶解性的 Fe^{3+} 复合物(Ferric citrate和Ferric-EDTA)同样能够激活甲烷厌氧氧化反应. 在沼泽湿地(wetlands)环境中发现甲烷代谢微生物能够利用天然有机物(Natural organic matter)作为电子受体进行AOM作用(Valenzuela等, 2017). 这些直接证据都表明ANME和SRB细胞团之间是以直接电子传递为主.

除了硫酸盐, 甲烷厌氧氧化还可以利用其他电子受体, 比如铁、锰、硝酸盐和亚硝酸盐来进行甲烷的厌氧氧化. 以硝酸盐或者亚硝酸盐作为电子受体进行甲烷氧化(Nitrate/nitrite-dependent AOM, n-daom)是在淡水沉积物中首次发现的(Raghoebarsing等, 2006). n-daom反应是由微生物参与的, 以硝酸盐或者亚硝酸盐为电子受体进行甲烷厌氧氧化作用的同时发生反硝化作用的反应(表1, 反应式(12)和(13); Raghoebarsing等, 2006). 有研究报道, 某种特异的反硝化细菌可以以亚硝酸盐为电子受体进行AOM途径, 命名为'*Candidatus Methylomirabilis oxyfera*'(Ettwig等, 2010). 通过基因组分析发现'*Methylomirabilis oxyfera*'具有好氧甲烷氧化途径所需的全部基因, 包括编码单加氧酶pMMO的基因(*pmoA*)和反硝化相关基因; 但是缺失催化一氧化二氮生成氮气的酶的基因*nosZDFY*(Ettwig等, 2008, 2009), 和厌氧甲烷氧化所需的编码MCR同系物的基因以及烷烃激活型甘氨酸激酶(Ettwig等, 2010). 通过同位素示踪实验结果发现'*Methylomirabilis oxyfera*'能够将亚硝酸盐还原成一氧化氮, 然后2分子一氧化氮转化成氮气和氧气. 这个过程中产生的氧气可以用来活化单加氧酶pMMO氧化甲烷(表1, 反应式(12)). 8分子的亚硝酸盐产生4分子氧气, 其中3分子氧气用于甲烷的氧化, 剩余1分子氧气是被膜结合型bo型末端氧化酶利用(Wu等, 2011).

在以亚硝酸盐进行AOM的富集物中, 除了*M. oxyfera*细菌, 还发现一类新的ANME类群ANME-2d(Ca.

图6 ANME(橙色)和硫酸盐还原菌(黄色)之间电子传递模式

胞外细胞色素C用蓝色圆点表示, 细胞间传递电子的菌毛(纳米微丝)用黑色细线表示

Methanoperedens nitroreducens)丰度显著增加. 通过添加硝酸盐、铵和甲烷对富集物进行培养, 并对培养后的富集物进行宏基因组、单细胞测序和宏转录组分析, 在拼接得到的*Methanoperedens nitroreducens*基因组中, 发现逆向产甲烷途径所必须的酶的编码基因(*mcr*基因和*mer*基因), 也是首次在*M. nitroreducens*中发现完整的逆向产甲烷途径. 与此同时, 在其基因组中也发现有硝酸盐还原途径的关键基因——编码膜结合硝酸盐还原酶(Nar)的基因, 但是没有发现后续的反硝化的基因. 宏转录组和同位素标记实验结果证明, 参与厌氧甲烷氧化的基因和硝酸盐还原的基因*narGH*大量表达. '*M. nitroreducens*'生成的亚硝酸盐进而被厌氧氨氧化菌*Kuenenia*利用产生 N_2 , 同时编码厌氧氨氧化的基因也高度表达. 代谢产生的亚硝酸盐可以作为氨氧化菌*Kuenenia*的电子受体, 亚硝酸盐进一步被用于氨氧化产生氮气(表1, 反应式(15)). 有氨的环境中, ANME-2d在氧化甲烷的同时可以将硝酸还原成亚硝酸, 生成的亚硝酸再被厌氧氨氧化细菌代谢成 N_2 . 而在没有氨的环境中, ANME-2d氧化甲烷并且将硝酸盐转化成亚硝酸盐, 同时亚硝酸盐被NC10利用生成 N_2 . 此时ANME-2d和NC10共生. 亚硝酸盐为唯一的电子受体时*M. nitroreducens*不能与NC10竞争, 致使环境中NC10是主要的微生物类群(Haroon等, 2013).

在淡水环境中, 特别是在接近氧气和硝酸盐消耗区域以及深部厌氧沉积物中, 甲烷的氧化主要依赖于n-damo作用完成(Chen J等, 2015; Deutzmann等, 2014; Ettwig等, 2010, 2009; Haroon等, 2013; Hu等, 2009; Raghoebarsing等, 2006). 目前有研究发现在海洋中低氧区(Oxygen Minimum Zone, OMZ)和沉积物中存在多种不同的NC10类群, 这说明在海洋环境可能也有n-damo作用(Chen J等, 2015; He等, 2015; Padilla等, 2016). 海洋中发生的n-damo作用机制目前还没有研究清楚, 但这一现象的发现对评估全球海洋中的甲烷氧化消耗量和甲烷的代谢循环具有重要的意义.

海洋沉积物中除了含有大量的无机盐离子, 同时也含有大量的金属离子, 这些离子作为重要的电子受体, 为沉积物中有机质的厌氧氧化提供了物质基础. 锰(Mn^{4+})和铁(Fe^{3+})是沉积物中常见的金属离子. 理论上它们可以作为甲烷厌氧氧化的电子受体, 生成二氧化碳和金属硫化物(Beal等, 2009). 冷泉区沉积物中也发现有大量的金属硫化物沉淀. 这些证据都暗示金属离子可以作为电子受体氧化甲烷. Beal等(2009)分别利用水钠锰矿(Birnessite)和水铁矿(Ferrihydrite)作为电子受体, 对冷泉区沉积物进行AOM培养实验, 结果发现这两种化合物都可以驱动AOM途径的发生, 反应式见表1, 反应式(14)和(15).

研究发现利用铁、锰进行的AOM作用释放的能量远远高于以硫酸盐为电子供体的反应, 但是反应速率却比以硫酸盐为电子受体的AOM慢. 而以羟基氧化铁(Ferric oxyhydroxide)为电子受体的实验中却没有发现AOM作用, 说明参与甲烷厌氧氧化的微生物可能对不同金属化合物具有选择性(Beal等, 2009). Baror等(2017)对淡水湖沉积物加入不同的铁离子化合物, 如磁铁矿(Magnetite)和赤铁矿(Hematite)等, 进行AOM富集培养. 发现铁离子介导的AOM反应可能由好氧甲烷氧化细菌和产甲烷菌共同参与, 而古菌没有直接参与AOM反应, 可能是作为电子传递体间接参与反应. 其具体的能量代谢机制和电子转移途径还有待于进一步的研究.

目前在海洋中发现的甲烷厌氧氧化主要是ANME和硫酸盐还原菌共同作用. 不同的ANME类群可能与不同的硫酸盐还原菌偶联进行AOM. 其中ANME-2一般与SRB形成细胞团进行甲烷厌氧氧化, 细胞团的胞壁外侧有很厚的硅酸盐层包裹. 而ANME-1可以形成

单独, 或者以多个ANME-1细胞聚集在一起进行AOM作用(Orphan等, 2002). 最近有研究发现ANME可以同 α 变形菌中的*Sphingomonas* spp.以及 β 变形菌中的*Burkholderia* spp.或者*Limnobacter* spp.形成细胞团(Consortium)(Chen等, 2016; Pernthaler等, 2008). 这些发现暗示着AOM除了和硫酸盐还原偶联外还可能和其他厌氧呼吸偶联. 近年来的研究结果也不断证实了这个假设, 例如上文提到的, 淡水环境中发现的ANME-2d可以和氨氧化菌或者反硝化细菌形成细胞团, 进行AOM反应的同时也进行反硝化或者氨氧化作用(Haroon等, 2013; Raghoebarsing等, 2006).

4 海洋甲烷代谢过程对全球气候的影响

海洋沉积物中蕴藏着大量的甲烷, 这些甲烷主要以水合物或者气态和溶解态的形式储藏在大陆架边缘的沉积物中. 评估全球海洋沉积物中甲烷的储量比较困难, 需要根据不同海域水合物区钻探的结果和不同地质条件下的物理参数结合模型进行估算(更多文献参见(Buffett和Archer, 2004; Milkov, 2004; Milkov等, 2003a; Piñero等, 2013; Wallmann等, 2012)). 根据最新的研究模型估算, 全球沉积物中水合物的储藏量大约为500~2000Gt C(Wallmann等, 2012). 随着沉积物深度的增加, 沉积物中温度逐渐升高, 由于沉积物温度和压力的变化, 固态的水合物分解, 转变成气态和溶解态的甲烷, 在周围压力的压迫下, 这些甲烷会通过沉积物的孔隙或者裂缝向上喷发, 形成甲烷渗漏或者喷发区(冷泉、泥火山、麻坑). 在甲烷渗漏区沉积物表面, 部分甲烷气体可以扩散溶解在水体中, 通过水体扩散到大气中(图7). 甲烷是一种温室效应比较强的温室气体, 其温室效应大概是二氧化碳的23倍(Ojima等, 1993). 海底甲烷释放到大气中的含量的增加会加剧全球气温升高, 气温的升高也会促使海底甲烷水合物的分解释放. 因此, 海洋中甲烷的消耗和转移过程机制以及海洋释放甲烷通量评估的研究对全球气候的变化具有重要意义.

大陆架沉积物中的大多数甲烷渗漏区是由深层水合物分解释放甲烷所形成的. 据估算全球海洋大陆架边缘沉积物渗漏区的甲烷释放量为0.01~0.05Gt C a⁻¹, 仅占全球大气中甲烷含量的1~5%(Cicerone和Orem-land, 1988; Dickens, 2003; Judd和Hovland, 2009;

Milkov等, 2003b; Reeburgh, 2007). 海底沉积物中的甲烷在扩散到水体的过程中, 有超过80%的甲烷在深部厌氧的沉积物通过甲烷厌氧氧化菌和硫酸盐还原菌共同参与的AOM作用所消耗(Reeburgh, 2007; Regnier等, 2011). 剩余部分甲烷(约0.02 Gt C a⁻¹)在沉积物-水体界面和水体中被好氧甲烷氧化或厌氧甲烷氧化菌消耗, 最后只有少量的甲烷从水体释放到大气中(图7; Boetius和Wenzhöfer, 2013; Lesniewski等, 2012; Schubert等, 2006a).

影响海底甲烷释放量的主要因素是微生物代谢甲烷的效率, 主要受到以下一些条件的影响: 渗漏区甲烷流体流速和代谢甲烷的微生物丰度以及代谢活性, 甲烷转移形式与过程等因素. 海底甲烷主要是通过微生物进行的甲烷氧化作用所消耗, 这些所有代谢甲烷的微生物被称为深部甲烷过滤系统(The benthic filter for methane), 主要的代谢反应包括好氧和厌氧的甲烷氧化(Niemann等, 2006; Sommer等, 2006).

向上的甲烷流体(upward methane flux)的流速是影响甲烷被氧化量的主要因素. 深部甲烷过滤系统消耗甲烷的量与甲烷流体的流速有关. 甲烷流体的流速过快, 微生物不能充分氧化甲烷, 大量的甲烷逃逸到水体中. 在流速较慢的地方, 甲烷过滤系统效率能够达到80%. 而在流速较快的地方, 效率则降低到20%(Boetius和Wenzhöfer, 2013). 多数大陆架沉积物中, 甲烷主要在硫酸盐甲烷转换区(Sulfate Methane Transition Zone, SMTZ)被厌氧氧化菌氧化成二氧化碳. 冷泉区的甲烷含量很高, 甲烷厌氧氧化代谢过程非常活跃. 冷泉的SMTZ中AOM速率比渗漏区SMTZ中AOM速率高很多, 冷泉沉积物中AOM的速率为3~150mmol C m⁻² d⁻¹(Boetius和Wenzhöfer, 2013). 大陆架边缘沉积物中除了冷泉等甲烷渗漏区外, 其他沉积物中甲烷主要是以渗漏的方式向沉积物表面扩散, 在渗漏区的SMTZ(Diffusion-dominated SMTZ)中, 甲烷流体流速较慢, 大量的甲烷被深部甲烷过滤系统所消耗(Boetius和Wenzhöfer, 2013). 据估算大陆架边缘沉积物中SMTZ消耗的甲烷量为0.05Gt C a⁻¹(假设全球陆坡边缘沉积物面积4.1×10⁷km², AOM的速率为0.3 mmol C m⁻² d⁻¹)(Boetius和Wenzhöfer, 2013).

沉积物中微生物的丰度也会影响深部甲烷过滤系统的效率, 在沉积物中微生物含量较低的环境, 深部甲烷过滤系统的效率可能低于10%(Boetius和Wenzhöfer,

图7 海洋环境中甲烷的产生、代谢和转移过程示意图

2013; Niemann等, 2006). 大量的甲烷从甲烷渗漏区的喷口释放, 仅有少量的甲烷经过微生物的降解, 大量的甲烷可能会在水体中通过好氧甲烷氧化作用消耗一部分, 剩余甲烷进入上层水体, 最终释放到大气中。

甲烷在沉积物和水体中转移的形式也是影响甲烷消耗效率的主要因素(Römer, 2011). 大部分甲烷一般以气体形式或者溶解态形式在海洋沉积物或者水体中转移. 一般甲烷在浓度饱和的环境中以气体形式存在, 而气泡形式的甲烷不易被微生物利用. 以释放气态甲烷为主的渗漏的区域(Gas flare), 沉积物中的微生物对气态甲烷的氧化效率很低, 绝大部分甲烷逃逸到水体中. 据估算沉积物中单个气态甲烷渗漏区每年能够释放 $10\sim 100$ 吨碳到水体中(Valentine等, 2001). 而海底单个泥火山每年释放的甲烷气体量能够达到几千吨碳. 沉积物中水合物稳定区释放的甲烷气体量大约为 $0.8\times 10^7\sim 7.2\times 10^7\text{mol/a}$ (Römer等, 2012).

在两极地区的海洋沉积物中也发现有大量的水合物存在(Enzmann等, 2018; Susanti和Mukhopadhyay, 2012; Mondav等, 2014; Blake等, 2015). 因为极地的海洋环境与其他大洋海域的环境差异较大, 在两极地区

的沉积物中的水合物分解所释放的甲烷除了受上述条件影响以外, 海面冰盖和海底冻土层的融解以及温度因素也会影响甲烷的释放量(James等, 2016).

5 展望

5.1 新的产甲烷菌或者甲烷氧化菌的发现

深海属于极端的环境, 压力较高, 不同环境温度差异较大, 不同生态系统的物理化学因子具有显著差异. 随着对海洋各种不同环境中参与甲烷代谢微生物的研究, 可能发现新的未被报道的代谢甲烷的微生物. 特别是在甲烷浓度高, 物理化学因子比较特殊的环境中更容易发现和分离出能够适应极端环境的甲烷代谢微生物. 比如Ken Takai等人在热液环境中分离得到的嗜高温产甲烷菌(Takai等, 2008). 另外随着单细胞测序、宏基因组、宏转录组和宏蛋白组技术的发展和运用, 可以结合这些非依赖于培养的微生物生态学研究手段, 可能会发现更多的其他古菌类群具有甲烷代谢潜能的微生物, 将扩大甲烷代谢微生物的范围.

5.2 厌氧甲烷氧化的机制

自1994年在海洋沉积物中发现微生物参与的甲烷厌氧氧化现象至今, 甲烷的厌氧氧化机制一直是全世界科学家研究的热点(Hoehler等, 1994). 由于当前培养技术和方法的限制, 参与甲烷厌氧氧化的微生物至今无法获得纯培养, 所以厌氧氧化甲烷古菌和硫酸盐还原菌的代谢特征和甲烷厌氧氧化机制还没有研究清楚. 已有许多研究者利用不同的设备培养富集ANME, 以研究其机制. Valentine等(2000)通过设计微生物培养装置, 研究甲烷厌氧氧化过程的中间体氢的转移, 但是这个装置只是利用纯培养物进行研究. Zhang等人设计的高压连续流动培养装置, 通过对Capt Aryutinov泥火山沉积物样品的富集研究ANME的代谢特征(Wang等, 2014; Zhang等, 2010), 能够模拟原位条件进行富集培养的装置设备的开发可以有助于人们在实验室的条件下对ANME进行培养富集. 同时还需要配合其他的研究手段可能进一步揭示AOM过程和机制, 以及ANME的生理生态功能. 近些年研究环境样品中微生物代谢作用的技术和手段更新和发展迅速. 目前能够应用到环境样品研究中的主要方法主要包括: 荧光原位杂交(FISH)、单细胞测序、宏基因组、宏转录组、蛋白组学、培养富集、显微镜观测、同位素培养、生物标记物等方法. 通过不同研究方法的结合, 可以进一步研究和揭示AOM的作用机制和代谢活性.

5.3 厌氧甲烷氧化在生物地球化学过程的意义

甲烷厌氧氧化过程是海洋中非常重要的生物地球化学过程. 甲烷的厌氧氧化会形成大量的碳酸盐和硫化物. 对其形成的自生碳酸盐和硫化物中不同元素的同位素的研究, 可以在地质时间尺度上揭示海洋的形成和地质变化过程(Feng等, 2009; Tong等, 2013). 冷泉碳酸盐中稳定碳同位素的组成能够揭示冷泉的中甲烷的来源, 氧同位素变化能够反映碳酸盐形成时甲烷流体的组分和温度(Feng等, 2009; Tong等, 2013). 充分挖掘这些自生碳酸盐和硫化物中同位素组成变化的信息, 并且结合沉积物和孔隙水中不同化学元素同位素组成的变化, 有助于推演海洋形成的地质年代和形成过程中所经历的地质活动. 对我们了解地球形成过程有重要的意义.

5.4 甲烷通量估算

海洋沉积中的水合物是一种动态的甲烷储藏库, 根据环境条件的变化可以将甲烷以固态形式储存或以气态方式释放, 对平衡地球碳循环起到重要的调节作用. 大气中的甲烷含量对全球气候变化有重要的影响, 监测和估算海洋甲烷释放的通量对预测全球气候变化有重要意义. 估算全球沉积物中的甲烷的储量和释放通量是非常具有挑战的工作. 已有一些研究利用不同的数学模型估算全球海洋沉积物中甲烷的储量, 但是由于模型参数的限制以及缺乏对全球整个冷泉系统的长时间观察和进行定量研究, 不同模型估算的甲烷储量数值偏差很大. 并且现有的海洋地质勘测方法限制, 海洋沉积物中还有大量未被发现的甲烷渗漏区和水合物区. 所以, 海底中甲烷的储量和甲烷的消耗量至今无法准确计算. 目前我们对海洋中甲烷与气候变化的相互联系和相互作用的研究非常有限. 甲烷从海底释放到大气的过程中包括了很多的反应和转移步骤, 对于这方面的研究需要发展基于不同地质环境的模型, 需要对多个冷泉的长时间观察和定量监测的数据, 特别是甲烷的好氧和厌氧氧化速率、气泡转移过程和地质特征等参数, 这些参数对甲烷消耗的影响显著, 是构建模型时的基础参数. 通过海底甲烷渗漏区气体释放的原位检测器(包括水声学 and 视觉的计算以及模型估测)进行长期大范围的观察、定量监测和不同地质环境的勘测, 最后与数学模型相结合, 通过多种参数优化数学模型, 最终可能较为准确地估算海底沉积物中甲烷的储量和海洋中甲烷的释放量.

在海洋环境中, 甲烷氧化作用最主要的电子受体是氧气和硫酸盐, 关于甲烷在海洋中消耗通量的计算都是基于氧气和硫酸盐消耗甲烷的方式计算得到的. 而以其他电子受体, 例如硝酸盐、亚硝酸盐、铁、锰离子的甲烷厌氧氧化反应在海洋环境中的活性和对全球海洋中甲烷氧化的贡献至今还不清楚. 可以推断甲烷在海洋中实际的消耗量可能远大于目前模型所计算出来的量.

致谢 感谢佐治亚大学的庄光超博士, 上海交通大学的王寅熠博士、徐雷、梁乐文在文章的撰写方面提出的宝贵建议和意见. 本论文同时还得到国际IMBER计划和深部碳观测计划(DCO)的支持.

参考文献

- Alain K, Holler T, Musat F, Elvert M, Treude T, Krüger M. 2006. Microbiological investigation of methane- and hydrocarbon-discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania. *Environ Microbiol*, 8: 574–590
- Baror I, Elvert M, Eckert W, Kushmaro A, Vigderovich H, Zhu Q, Bendov E, Sivan O. 2017. Iron-coupled anaerobic oxidation of methane performed by a mixed bacterial-archaeal community based on poorly reactive minerals. *Environ Sci Technol*, 51: 12293–12301
- Beal E J, House C H, Orphan V J. 2009. Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science*, 325: 184–187
- Blake L I, Tveit A, Øvreås L, Head I M, Gray N D. 2015. Response of methanogens in arctic sediments to temperature and methanogenic substrate availability. *PLoS One*, 10: e0129733
- Boetius A, Ravensschlag K, Schubert C J, Rickert D, Widdel F, Gieseke A, Amann R, Jørgensen B B, Witte U, Pfannkuche O. 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407: 623–626
- Boetius A, Wenzhöfer F. 2013. Seafloor oxygen consumption fuelled by methane from cold seeps. *Nat Geosci*, 6: 725–734
- Bratina B J, Brusseau G A, Hanson R S. 1992. Use of 16S rRNA analysis to investigate phylogeny of methylophilic bacteria. *Int J Syst Bacteriol*, 42: 645–648
- Buffett B, Archer D. 2004. Global inventory of methane clathrate: Sensitivity to changes in the deep ocean. *Earth Planet Sci Lett*, 227: 185–199
- Burdige D J. 2007. Preservation of organic matter in marine sediments: Controls, mechanisms, and an imbalance in sediment organic carbon budgets? *Chem Rev*, 107: 467–485
- Caldwell S L, Laidler J R, Brewer E A, Eberly J O, Sandborgh S C, Colwell F S. 2008. Anaerobic oxidation of methane: Mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms. *Environ Sci Technol*, 42: 6791–6799
- Cavanaugh C M. 1983. Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. *Nature*, 302: 58–61
- Chan S, Nguyen H, Shiemke A, Lidstrom M. 1993. Biochemical and biophysical studies toward characterization of the membrane-associated methane monooxygenase. *Microbial Growth on C1 Compounds*. Andover: Intercept Press. 93–107
- Chen J, Jiang X W, Gu J D. 2015. Existence of novel phylotypes of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria in surface and subsurface sediments of the South China Sea. *Geomicrobiol J*, 32: 1–10
- Chen Y, Feng X, He Y, Wang F. 2016. Genome analysis of a *Limnobacter* sp. identified in an anaerobic methane-consuming cell consortium. *Front Mar Sci*, 3: 257
- Chen Y, Li Y L, Zhou G T, Li H, Lin Y T, Xiao X, Wang F P. 2015. Biomineralization mediated by anaerobic methane-consuming cell consortia. *Sci Rep*, 4: 5696
- Childress J J, Fisher C R, Brooks J M, Kennicutt M C, Bidigare R, Anderson A E. 1986. A methanotrophic marine molluscan (bivalvia, mytilidae) symbiosis: Mussels fueled by gas. *Science*, 233: 1306–1308
- Cicerone R J, Oremland R S. 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Glob Biogeochem Cycle*, 2: 299–327
- Conrad R. 2009. The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ Microbiol Rep*, 1: 285–292
- D'Hondt S, Rutherford S, Spivack A J. 2002. Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science*, 295: 2067–2070
- Dalton H. 1991. Structure and mechanism of action of the enzyme (s) involved in methane oxidation. In: Kelly J W, Baldwin T O, eds. *Applications of Enzyme Biotechnology*. Industry-University Cooperative Chemistry Program Symposia. Boston: Springer. 55–68
- Dalton H. 1992. Methane oxidation by methanotrophs. In: Murrell J C, Dalton H, eds. *Methane and Methanol Utilizers*. Biotechnology Handbooks, vol 5. Boston: Springer. 85–114
- Deutzmann J S, Stief P, Brandes J, Schink B. 2014. Anaerobic methane oxidation coupled to denitrification is the dominant methane sink in a deep lake. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 18273–18278
- Dickens G R. 2003. Rethinking the global carbon cycle with a large, dynamic and microbially mediated gas hydrate capacitor. *Earth Planet Sci Lett*, 213: 169–183
- Divins D L. 2003. *Total Sediment Thickness of the World's Oceans & Marginal Seas*. Boulder: NOAA National Geophysical Data Center
- Egert M, Wagner B, Lemke T, Brune A, Friedrich M W. 2003. Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl Environ Microbiol*, 69: 6659–6668
- Enzmann F, Mayer F, Rother M, Holtmann D. 2018. Methanogens: Biochemical background and biotechnological applications. *AMB Expr*, 8: 1, <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0531-x>
- Ettwig K F, Butler M K, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers M M M, Schreiber F, Dutilh B E, Zedelius J, de Beer D, Gloerich J, Wessels H J C T, van Alen T, Luesken F, Wu M L, van de Pas-Schoonen K T, Op den Camp H J M, Janssen-Megens E M, Francoijs K J, Stunnenberg H, Weissenbach J, Jetten M S M, Strous M. 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464: 543–548
- Ettwig K F, Shima S, van de Pas-Schoonen K T, Kahnt J, Medema M

- H, Op den Camp H J M, Jetten M S M, Strous M. 2008. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of *Archaea*. *Environ Microbiol*, 10: 3164–3173
- Ettwig K F, van Alen T, van de Pas-Schoonen K T, Jetten M S M, Strous M. 2009. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Appl Environ Microbiol*, 75: 3656–3662
- Evans P N, Parks D H, Chadwick G L, Robbins S J, Orphan V J, Golding S D, Tyson G W. 2015. Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science*, 350: 434–438
- Feng D, Chen D, Roberts H H. 2009. Petrographic and geochemical characterization of seep carbonate from Bush Hill (GC 185) gas vent and hydrate site of the Gulf of Mexico. *Mar Pet Geol*, 26: 1190–1198
- Ferry J G. 2010. The chemical biology of methanogenesis. *Planet Space Sci*, 58: 1775–1783
- Ferry J G, Lessner D J. 2008. Methanogenesis in marine sediments. *Ann New York Acad Sci*, 1125: 147–157
- Fischer R, Thauer R K. 1990. Ferredoxin-dependent methane formation from acetate in cell extracts of *Methanosarcina barkeri* (strain MS). *FEBS Lett*, 269: 368–372
- Fisher C. 1990. Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Rev Aquat Sci*, 2: 399–436
- Fisher C R, Brooks J M, Vodenichar J S, Zande J M, Childress J J, Jr. R A B. 1993. The co-occurrence of methanotrophic and chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel. *Mar Ecol*, 14: 277–289
- Giovannelli D, d'Errico G, Fiorentino F, Fattorini D, Regoli F, Angeletti L, Bakran-Petricoli T, Vetriani C, Yücel M, Taviani M, Manini E. 2016. Diversity and distribution of prokaryotes within a shallow-water pockmark field. *Front Microbiol*, 7: 941
- Claypool G E, Kvenvolden K A. 1983. Methane and other hydrocarbon gases in marine sediment. *Annu Rev Earth Planet Sci*, 11: 299–327
- Gong W, Hao B, Wei Z, Ferguson Jr. D J, Tallant T, Krzycki J A, Chan M K. 2008. Structure of the $\alpha_2\epsilon_2$ Ni-dependent CO dehydrogenase component of the *Methanosarcina barkeri* acetyl-CoA decarbonylase/synthase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 9558–9563
- Graham D W, Chaudhary J A, Hanson R S, Arnold R G. 1993. Factors affecting competition between type I and type II methanotrophs in two-organism, continuous-flow reactors. *Microb Ecol*, 25: 1–27
- Green P N. 1992. Taxonomy of Methylophilic Bacteria. Methane and methanol utilizers. Boston: Springer. 23–84
- Großkopf R, Stubner S, Liesack W. 1998. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl Environ Microb*, 64: 4983–4989
- Hallam S J, Putnam N, Preston C M, Detter J C, Rokhsar D, Richardson P M, DeLong E F. 2004. Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics. *Science*, 305: 1457–1462
- Hanson R S, Hanson T E. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev*, 60: 439–471
- Haroon M F, Hu S, Shi Y, Imelfort M, Keller J, Hugenholtz P, Yuan Z, Tyson G W. 2013. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature*, 500: 567–570
- He Y, Li M, Perumal V, Feng X, Fang J, Xie J, Sievert S M, Wang F. 2016. Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments. *Nat Microbiol*, 1: 16035
- He Z, Geng S, Cai C, Liu S, Liu Y, Pan Y, Lou L, Zheng P, Xu X, Hu B. 2015. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrite reduction by halophilic marine NC10 bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 81: 5538–5545
- Hedderich R, Berkessel A, Thauer R K. 1990. Purification and properties of heterodisulfide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *Eur J Biochem*, 193: 255–261
- Hinrichs K U, Hayes J M, Sylva S P, Brewer P G, DeLong E F. 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature*, 398: 802–805
- Hoehler T M, Alperin M J, Albert D B, Martens C S. 1994. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: Evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Glob Biogeochem Cycle*, 8: 451–463
- Hu S, Zeng R J, Burow L C, Lant P, Keller J, Yuan Z. 2009. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms. *Environ Microbiol Rep*, 1: 377–384
- Huang L N, Chen Y Q, Zhou H, Luo S, Lan C Y, Qu L H. 2003. Characterization of methanogenic Archaea in the leachate of a closed municipal solid waste landfill. *Fems Microbiol Ecol*, 46: 171–177
- Inagaki F, Kuypers M M M, Tsunogai U, Ishibashi J I, Nakamura K I, Treude T, Ohkubo S, Nakaseama M, Gena K, Chiba H, Hirayama H, Nunoura T, Takai K, Jørgensen B B, Horikoshi K, Boetius A. 2006. Microbial community in a sediment-hosted CO₂ lake of the southern Okinawa Trough hydrothermal system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 14164–14169
- Itävaara M, Salavirta H, Marjamaa K, Ruskeeniemi T. 2016. Chapter one-geomicrobiology and metagenomics of terrestrial deep subsurface microbiomes. *Adv Appl Microbiol*, 94: 1–77
- James R H, Bousquet P, Bussmann I, Haeckel M, Kipfer R, Leifer I, Niemann H, Ostrovsky I, Piskozub J, Rehder G, Treude T, Vielstädte L, Greinert J. 2016. Effects of climate change on

- methane emissions from seafloor sediments in the Arctic Ocean: A review. *Limnol Oceanogr*, 61: S283–S299
- Judd A, Hovland M. 2009. Seabed Fluid Flow: The Impact on Geology, Biology and the Marine Environment. Cambridge: Cambridge University Press
- Kallmeyer J, Pockalny R, Ram Adhikari R, Smith D C, D'Hondt S. 2012. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 16213–16216
- Knief C. 2015. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker. *Front Microbiol*, 6: 1346
- Knief C, Lipski A, Dunfield P F. 2003. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl Environ Microbiol*, 69: 6703–6714
- Knittel K, Boetius A. 2009. Anaerobic oxidation of methane: Progress with an unknown process. *Annu Rev Microbiol*, 63: 311–334
- Knittel K, Lösekann T, Boetius A, Kort R, Amann R. 2005. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol*, 71: 467–479
- Krüger M, Blumenberg M, Kasten S, Wieland A, Känel L, Klock J H, Michaelis W, Seifert R. 2008. A novel, multi-layered methanotrophic microbial mat system growing on the sediment of the Black Sea. *Environ Microbiol*, 10: 1934–1947
- Lang K. 2014. Diversity, ultrastructure, and comparative genomics of “Methanoplasmatales”, the seventh order of methanogens. Doctoral Dissertation. Marburg: Universität Marburg
- Lösekann T, Knittel K, Nadalig T, Fuchs B, Niemann H, Boetius A, Amann R. 2007. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl Environ Microbiol*, 73: 3348–3362
- Leak D J. 1992. Biotechnological and applied aspects of methane and methanol utilizers. In: Murrell J C, Dalton H, eds. Methane and Methanol Utilizers. Biotechnology Handbooks, vol 5. Boston: Springer. 245–279
- Lee H S, Lee J C, Lee I K, Moon H B, Chang Y S, Jacobs D R, Lee D H. 2011. Associations among organochlorine pesticides, methanobacteriales, and obesity in Korean women. *PLoS One*, 6: e27773
- Lesniewski R A, Jain S, Anantharaman K, Schloss P D, Dick G J. 2012. The metatranscriptome of a deep-sea hydrothermal plume is dominated by water column methanotrophs and lithotrophs. *ISME J*, 6: 2257–2268
- Lessner D J. 2001. Methanogenesis Biochemistry. Hoboken: John Wiley & Sons
- Lessner D J. 2009. Methanogenesis Biochemistry. eLS. John Wiley & Sons
- Lever M A. 2012. Acetogenesis in the energy-starved deep biosphere—A paradox? *Front Microbiol*, 2: 284
- Lipscomb J D. 1994. Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Annu Rev Microbiol*, 48: 371–399
- Liu Y. 2010. Methanopyrales. In: Timmis K N, eds. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin: Springer. 605–607
- Liu Y, Whitman W B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann New York Acad Sci*, 1125: 171–189
- Lloyd K G, Schreiber L, Petersen D G, Kjeldsen K U, Lever M A, Steen A D, Stepanauskas R, Richter M, Kleindienst S, Lenk S, Schramm A, Jørgensen B B. 2013. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature*, 496: 215–218
- Lyu Z, Lu Y. 2015. Comparative genomics of three *Methanocellales* strains reveal novel taxonomic and metabolic features. *Environ Microbiol Rep*, 7: 526–537
- Maupin-Furlow J, Ferry J G. 1996. Characterization of the *cdhD* and *cdhE* genes encoding subunits of the corrinoid/iron-sulfur enzyme of the CO dehydrogenase complex from *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol*, 178: 340–346
- McGlynn S E, Chadwick G L, Kempes C P, Orphan V J. 2015. Single cell activity reveals direct electron transfer in methanotrophic consortia. *Nature*, 526: 531–535
- McInerney M J, Bryant M P. 1981. Anaerobic Degradation of Lactate by Syntrophic Associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* Species and Effect of H₂ on Acetate Degradation. *Appl Environ Microbiol*, 41: 346–354
- McInerney M J, Struchtemeyer C G, Sieber J, Mouttaki H, Stams A J M, Schink B, Rohlin L, Gunsalus R P. 2008. Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Ann New York Acad Sci*, 1125: 58–72
- Meng J, Xu J, Qin D, He Y, Xiao X, Wang F. 2014. Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. *ISME J*, 8: 650–659
- Meulepas R J W, Jagersma C G, Khadem A F, Stams A J M, Lens P N L. 2010. Effect of methanogenic substrates on anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction by an anaerobic methanotrophic enrichment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87: 1499–1506
- Meyerdierks A, Kube M, Kostadinov I, Teeling H, Glöckner F O, Reinhardt R, Amann R. 2010. Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environ Microbiol*, 12: 422–439
- Milkov A V. 2004. Global estimates of hydrate-bound gas in marine sediments: How much is really out there? *Earth-Sci Rev*, 66: 183–197
- Milkov A V, Claypool G E, Lee Y J, Xu W, Dickens G R, Borowski W S, Leg O. 2003a. *In situ* methane concentrations at Hydrate Ridge,

- offshore Oregon: New constraints on the global gas hydrate inventory from an active margin. *Geology*, 31: 833–836
- Milkov A V, Sassen R, Apanasovich T V, Dadashev F G. 2003b. Global gas flux from mud volcanoes: A significant source of fossil methane in the atmosphere and the ocean. *Geophys Res Lett*, 30: 1037
- Milucka J, Ferdelman T G, Polerecky L, Franzke D, Wegener G, Schmid M, Lieberwirth I, Wagner M, Widdel F, Kuypers M M M. 2012. Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation. *Nature*, 491: 541–546
- Mitterer R M. 2010. Methanogenesis and sulfate reduction in marine sediments: A new model. *Earth Planet Sci Lett*, 295: 358–366
- Mondav R, Woodcroft B J, Kim E H, McCalley C K, Hodgkins S B, Crill P M, Chanton J, Hurst G B, VerBerkmoes N C, Saleska S R, Hugenholtz P, Rich V I, Tyson G W. 2014. Discovery of a novel methanogen prevalent in thawing permafrost. *Nat Commun*, 5: 3212
- Moran J J, Beal E J, Ventras J M, Orphan V J, Freeman K H, House C H. 2008. Methyl sulfides as intermediates in the anaerobic oxidation of methane. *Environ Microbiol*, 10: 162–173
- Murrell J C. 1994. Molecular genetics of methane oxidation. *Biodegradation*, 5: 145–159
- Muyzer G, Stams A J M. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 6: 441–454
- Na H, Lever M A, Kjeldsen K U, Schulz F, Jørgensen B B. 2015. Uncultured *Desulfobacteraceae* and Crenarchaeotal group C3 incorporate ¹³C-acetate in coastal marine sediment. *Environ Microbiol Rep*, 7: 614–622
- Nakagawa S, Takai K. 2006. Isolation of thermophiles from deep-sea hydrothermal environments. *Method Microbiol*, 35: 55–91
- Nickel J C, di Primio R, Mangelsdorf K, Stoddart D, Kallmeyer J. 2012. Characterization of microbial activity in pockmark fields of the SW-Barents Sea. *Mar Geol*, 332–334: 152–162
- Niemann H, Lösekann T, de Beer D, Elvert M, Nadalig T, Knittel K, Amann R, Sauter E J, Schlüter M, Klages M, Foucher J P, Boetius A. 2006. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature*, 443: 854–858
- Niu M, Fan X, Zhuang G, Liang Q, Wang F. 2017. Methane metabolizing microbial communities in the sediment of Haima cold seep area, northwest slope of South China Sea. *Fems Microbiol Ecol*, 93: fix101
- Ojima D S, Valentine D W, Mosier A R, Parton W J, Schimel D S. 1993. Effect of land use change on methane oxidation in temperate forest and grassland soils. *Chemosphere*, 26: 675–685
- Orcutt B N, Joye S B, Kleindienst S, Knittel K, Ramette A, Reitz A, Samarkin V, Treude T, Boetius A. 2010. Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep-Sea Res Part II-Top Stud Oceanogr*, 57: 2008–2021
- Orcutt B N, Sylvan J B, Knab N J, Edwards K J. 2011. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75: 361–422
- Orphan V J, House C H, Hinrichs K U, McKeegan K D, DeLong E F. 2002. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 7663–7668
- Ozuolmez D, Na H, Lever M A, Kjeldsen K U, Jørgensen B B, Plugge C M. 2015. Methanogenic archaea and sulfate reducing bacteria co-cultured on acetate: Teamwork or coexistence? *Front Microbiol*, 6: 492
- Padilla C C, Bristow L A, Sarode N, Garcia-Robledo E, Gómez Ramírez E, Benson C R, Bourbonnais A, Altabet M A, Girguis P R, Thamdrup B, Stewart F J. 2016. NC10 bacteria in marine oxygen minimum zones. *ISME J*, 10: 2067–2071
- Paul K, Nonoh J O, Mikulski L, Brune A. 2012. “Methanoplasmatales,” thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol*, 78: 8245–8253
- Pernthaler A, Dekas A E, Titus Brown C, Goffredi S K, Embaye T, Orphan V J. 2008. Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 7052–7057
- Pfeffer J. 1980. Anaerobic digestion processes. In: Christensen T H, ed. *Anaerobic Digestion*. London: Applied Science Publishers Ltd. 15–35
- Piñero E, Marquardt M, Hensen C, Haeckel M, Wallmann K. 2013. Estimation of the global inventory of methane hydrates in marine sediments using transfer functions. *Biogeosciences*, 10: 959–975
- Poulsen M, Schwab C, Borg Jensen B, Engberg R M, Spang A, Canibe N, Højberg O, Milinovich G, Fagner L, Schleper C, Weckwerth W, Lund P, Schramm A, Urich T. 2013. Methylotrophic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nat Commun*, 4: 1428
- Römer M. 2011. Gas bubble emissions at continental margins: Detection, mapping, and quantification. Doctoral Dissertation. Bremen: University of Bremen
- Römer M, Sahling H, Pape T, Bohrmann G, Spieß V. 2012. Quantification of gas bubble emissions from submarine hydrocarbon seeps at the Makran continental margin (offshore Pakistan). *J Geophys Res*, 117: C10015
- Raghoebarsing A A, Pol A, van de Pas-Schoonen K T, Smolders A J P, Ettwig K F, Rijpstra W I C, Schouten S, Damsté J S S, Op den Camp H J M, Jetten M S M, Strous M. 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, 440: 918–921
- Reeburgh W S. 1983. Rates of biogeochemical processes in anoxic

- sediments. *Annu Rev Earth Planet Sci*, 11: 269–298
- Reeburgh W S. 2007. Oceanic methane biogeochemistry. *Chem Rev*, 107: 486–513
- Regnier P, Dale A W, Arndt S, LaRowe D E, Mogollón J, Van Cappellen P. 2011. Quantitative analysis of anaerobic oxidation of methane (AOM) in marine sediments: A modeling perspective. *Earth-Sci Rev*, 106: 105–130
- Reguera G, McCarthy K D, Mehta T, Nicoll J S, Tuominen M T, Lovley D R. 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435: 1098–1101
- Reitner J, Peckmann J, Blumenberg M, Michaelis W, Reimer A, Thiel V. 2005. Concretionary methane-seep carbonates and associated microbial communities in Black Sea sediments. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*, 227: 18–30
- Roussel E G, Bonavita M A C, Querellou J, Cragg B A, Webster G, Prieur D, Parkes R J. 2008. Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science*, 320: 1046
- Ruff S E, Biddle J F, Teske A P, Knittel K, Boetius A, Ramette A. 2015. Global dispersion and local diversification of the methane seep microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112: 4015–4020
- Söhngen N. 1906. Über bakterien, welche methan als kohlenstoffnahrung und energiequelle gebrauchen. *Zentrabl Bakteriöl Parasitenk Infektionskr*, 15: 513–517
- Sakai S, Imachi H, Hanada S, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y. 2008. *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. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58: 929–936
- Scheller S, Goenrich M, Boecher R, Thauer R K, Jaun B. 2010. The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 465: 606–608
- Scheller S, Yu H, Chadwick G L, McGlynn S E, Orphan V J. 2016. Artificial electron acceptors decouple archaeal methane oxidation from sulfate reduction. *Science*, 351: 703–707
- Schrenk M O, Huber J A, Edwards K J. 2010. Microbial provinces in the subseafloor. *Annu Rev Mar Sci*, 2: 279–304
- Schubert C J, Coolen M J L, Neretin L N, Schippers A, Abbas B, Durisch-Kaiser E, Wehrli B, Hopmans E C, Damsté J S S, Wakeham S, Kuypers M M M. 2006a. Aerobic and anaerobic methanotrophs in the Black Sea water column. *Environ Microbiol*, 8: 1844–1856
- Schubert C J, Durisch-Kaiser E, Holzner C P, Klauser L, Wehrli B, Schmale O, Greinert J, McGinnis D F, de Batist M, Kipfer R. 2006b. Methanotrophic microbial communities associated with bubble plumes above gas seeps in the Black Sea. *Geochem Geophys Geosyst*, 7: Q04002
- Shima S, Krueger M, Weinert T, Demmer U, Kahnt J, Thauer R K, Ermler U. 2011. Structure of a methyl-coenzyme M reductase from Black Sea mats that oxidize methane anaerobically. *Nature*, 481: 98–101
- Shubenkova O V, Likhoshvai A V, Kanapatskii T A, Pimenov N V. 2010. Microbial community of reduced pockmark sediments (Gdansk Deep, Baltic Sea). *Microbiology*, 79: 799–808
- Simianu M, Murakami E, Brewer J M, Ragsdale S W. 1998. Purification and properties of the heme- and iron-sulfur-containing heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry*, 37: 10027–10039
- Smith D D S, Dalton H. 1989. Solubilisation of methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Eur J Biochem*, 182: 667–671
- Sommer S, Pfannkuche O, Linke P, Luff R, Greinert J, Drews M, Gubsch S, Pieper M, Poser M, Viergutz T. 2006. Efficiency of the benthic filter: Biological control of the emission of dissolved methane from sediments containing shallow gas hydrates at Hydrate Ridge. *Glob Biogeochem Cycle*, 20: GB2019
- Sorokin D Y, Makarova K S, Abbas B, Ferrer M, Golyshin P N, Galinski E A, Ciordia S, Mena M C, Merkel A Y, Wolf Y I, van Loosdrecht M C M, Koonin E V. 2017. Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis. *Nat Microbiol*, 2: 17081
- Summers Z M, Fogarty H E, Leang C, Franks A E, Malvankar N S, Lovley D R. 2010. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. *Science*, 330: 1413–1415
- Susanti D, Mukhopadhyay B. 2012. An intertwined evolutionary history of methanogenic archaea and sulfate reduction. *PLoS One*, 7: e45313
- Takai K, Horikoshi K. 1999. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics*, 152: 1285–1297
- Takai K, Nakamura K, Toki T, Tsunogai U, Miyazaki M, Miyazaki J, Hirayama H, Nakagawa S, Nunoura T, Horikoshi K. 2008. Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 10949–10954
- Thauer R K. 2011. Anaerobic oxidation of methane with sulfate: On the reversibility of the reactions that are catalyzed by enzymes also involved in methanogenesis from CO₂. *Curr Opin Microbiol*, 14: 292–299
- Tong H, Feng D, Cheng H, Yang S, Wang H, Min A G, Edwards R L, Chen Z, Chen D. 2013. Authigenic carbonates from seeps on the northern continental slope of the South China Sea: New insights into fluid sources and geochronology. *Mar Pet Geol*, 43: 260–271
- Tu T H, Wu L W, Lin Y S, Imachi H, Lin L H, Wang P L. 2017.

- Microbial community composition and functional capacity in a terrestrial ferruginous, sulfate-depleted mud volcano. *Front Microbiol*, 8: 2137
- Valentine D L, Blanton D C, Reeburgh W S, Kastner M. 2001. Water column methane oxidation adjacent to an area of active hydrate dissociation, Eel river Basin. *Geochim Cosmochim Acta*, 65: 2633–2640
- Valentine D L, Reeburgh W S. 2000. New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environ Microbiol*, 2: 477–484
- Valentine D L, Reeburgh W S, Blanton D C. 2000. A culture apparatus for maintaining H₂ at sub-nanomolar concentrations. *J Microbiol Methods*, 39: 243–251
- Valenzuela E I, Prieto-Davó A, López-Lozano N E, Hernández-Eligio A, Vega-Alvarado L, Juárez K, García-González A S, López M G, Cervantes F J. 2017. Anaerobic methane oxidation driven by microbial reduction of natural organic matter in a tropical wetland. *Appl Environ Microbiol*, 83: e00645–17
- Vanwonterghem I, Evans P N, Parks D H, Jensen P D, Woodcroft B J, Hugenholtz P, Tyson G W. 2016. Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nat Microbiol*, 1: 16170
- Wahlen M. 1993. The global methane cycle. *Annu Rev Earth Planet Sci*, 21: 407–426
- Wallmann K, Pinero E, Burwicz E, Haeckel M, Hensen C, Dale A, Ruepke L. 2012. The global inventory of methane hydrate in marine sediments: A theoretical approach. *Energies*, 5: 2449–2498
- Wang F P, Zhang Y, Chen Y, He Y, Qi J, Hinrichs K U, Zhang X X, Xiao X, Boon N. 2014. Methanotrophic archaea possessing diverging methane-oxidizing and electron-transporting pathways. *Isme J*, 8: 1069–1078
- Wegener G, Krukenberg V, Riedel D, Tegetmeyer H E, Boetius A. 2015. Intercellular wiring enables electron transfer between methanotrophic archaea and bacteria. *Nature*, 526: 587–590
- Weiland P. 2010. Biogas production: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85: 849–860
- Wu M L, de Vries S, van Alen T A, Butler M K, Op den Camp H J M, Keltjens J T, Jetten M S M, Strous M. 2011. Physiological role of the respiratory quinol oxidase in the anaerobic nitrite-reducing methanotroph ‘Candidatus Methylophilus oxyfera’. *Microbiol-ogy*, 157: 890–898
- Xiao K Q, Beulig F, Kjeldsen K U, Jørgensen B B, Risgaard-Petersen N. 2017. Concurrent methane production and oxidation in surface sediment from Aarhus Bay, Denmark. *Front Microbiol*, 8: 1198
- Zhang Y, Henriot J P, Bursens J, Boon N. 2010. Stimulation of in vitro anaerobic oxidation of methane rate in a continuous high-pressure bioreactor. *Bioresour Tech*, 101: 3132–3138
- Zhang Y, Maignien L, Zhao X, Wang F, Boon N. 2011. Enrichment of a microbial community performing anaerobic oxidation of methane in a continuous high-pressure bioreactor. *BMC Microbiol*, 11: 137
- Zhuang G C, Heuer V B, Lazar C S, Goldhammer T, Wendt J, Samarkin V A, Elvert M, Teske A P, Joye S B, Hinrichs K U. 2018. Relative importance of methylophilic methanogenesis in sediments of the Western Mediterranean Sea. *Geochim Cosmochim Acta*, 224: 171–186
- Zhuang G C, Lin Y S, Bowles M W, Heuer V B, Lever M A, Elvert M, Hinrichs K U. 2017. Distribution and isotopic composition of trimethylamine, dimethylsulfide and dimethylsulfoniopropionate in marine sediments. *Mar Chem*, 196: 35–46
- Zhuang G C, Lin Y S, Elvert M, Heuer V B, Hinrichs K U. 2014. Gas chromatographic analysis of methanol and ethanol in marine sediment pore waters: Validation and implementation of three pretreatment techniques. *Mar Chem*, 160: 82–90
- Zhuang G. 2014. Methylophilic methanogenesis and potential methylated substrates in marine sediment. Doctoral Dissertation. Bremen: University of Bremen
- Zhuang G C, Elling F J, Nigro L M, Samarkin V, Joye S B, Teske A, Hinrichs K U. 2016. Multiple evidence for methylophilic methanogenesis as the dominant methanogenic pathway in hypersaline sediments from the Orca Basin, Gulf of Mexico. *Geochim Cosmochim Acta*, 187: 1–20

(责任编辑: 王晓雪)