

甲烷代谢古菌分离培养研究进展

丁吉娟^{1,2}, 刘飞^{1,2}, 顾航^{1,2}, 于晓莉^{1,2}, 贺志理^{*1,2}

1 中山大学环境科学与工程学院 环境微生物组学研究中心, 广东 广州 510006

2 南方海洋科学与工程广东省实验室(珠海), 广东 珠海 519080

丁吉娟, 刘飞, 顾航, 于晓莉, 贺志理. 甲烷代谢古菌分离培养研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2266-2280

Ding Jijuan, Liu Fei, Gu Hang, Yu Xiaoli, He Zhili. Isolation and culture of methanogenic and methanotrophic archaea: a review[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2266-2280

摘要: 全球变暖是全人类面临的一个巨大挑战, 而温室气体排放持续上升是全球变暖的关键因素, 并引发一系列生态环境问题。甲烷是第二温室气体, 对全球变暖的贡献达 20%。然而, 在甲烷代谢中发挥重要作用的产甲烷古菌和厌氧甲烷氧化古菌(anaerobic methanotroph, ANME)较难培养, 极大地限制了人们对甲烷代谢及其影响碳源-汇关系与机制的研究。本文综述了最新产甲烷古菌和 ANME 富集、分离和培养方法, 包括富集培养、原位培养、共培养、微流控技术、稀释分离和固体分离技术、ANME 反应器和培养瓶富集培养, 以及宏基因组预测和反向基因组学, 并对这些方法的优缺点进行了评估, 对未来甲烷代谢古菌的富集、分离和培养提出新的建议。

关键词: 甲烷代谢; 产甲烷古菌; 厌氧甲烷氧化古菌; 分离培养

Isolation and culture of methanogenic and methanotrophic archaea: a review

DING Jijuan^{1,2}, LIU Fei^{1,2}, GU Hang^{1,2}, YU Xiaoli^{1,2}, HE Zhili^{*1,2}

1 Environmental Microbiomics Research Center, School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2 Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhuhai), Zhuhai 519080, Guangdong, China

Abstract: Climate warming is a global challenge, and the main culprit is the continuous emission of greenhouse gases. Methane (CH₄), the second most abundant greenhouse gas, accounts for 20% of global

基金项目: 国家自然科学基金(31770539, 91951207); 南方海洋科学与工程广东省实验室(珠海)创新团队项目和自主项目(311021006, SML2020SP004)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31770539, 91951207); Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhuhai) (311021006, SML2020SP004)

*Corresponding author: E-mail: hezhili@mail.sysu.edu.cn

Received: 2021-09-27; Accepted: 2021-12-08; Published online: 2022-01-20

warming effects. However, it is difficult to culture methanogens and anaerobic methanotrophic archaea (ANME), which play an important role in methane metabolism, thus hindering the research on methane metabolism, the influence on related carbon resource-sink relationships, and the mechanism. This paper reviewed the enrichment, culture and isolation methods of methanogens and ANME, including enrichment culture, *in-situ* culture, co-culture, microfluidic technologies, dilution-extinction and solid separation technologies, ANME reactor and flask enrichment culture, metagenomic prediction, and reverse genomics. Then we evaluated these methods and put forward suggestions for the future enrichment, isolation, and culture of methane-metabolizing archaea.

Keywords: methane metabolism; methanogen; anaerobic methanotrophic archaea; isolation and culture

温室气体的持续排放导致了一系列环境问题, 包括全球变暖、降水模式的改变、地下水水位改变、海洋酸化和土壤条件的变化及一系列极端气候事件^[1]。甲烷(CH₄)是含量仅次于二氧化碳(CO₂)的第二大温室气体, 其导致全球变暖的潜力是CO₂的28倍, 对全球变暖的贡献达20%^[2], 而且其排放量逐年升高, 预计在未来的气候变化中发挥重要作用^[3]。

自然界执行甲烷代谢功能的微生物主要包括产甲烷古菌、好氧甲烷氧化菌(嗜甲烷菌)、厌氧甲烷氧化古菌(anaerobic methanotroph, ANME)和细菌(NC10)^[4]等(图1)。目前已获得大量的嗜甲烷菌纯培养物, 好氧甲烷氧化途径也较为清楚^[5], 而ANME至今仍无纯培养, 厌氧甲烷氧化(anaerobic oxidation of methane, AOM)机制和参与的微生物仍不清楚^[6], 特别是AOM过程及其与碳、氮、硫循环的耦合机制。产甲烷古菌纯培养较少, 甲烷产生机制仍不完善。

产甲烷古菌所产甲烷是主要的天然甲烷源, 随着测序技术和宏基因组学的发展, 人们在各种环境中均发现了未培养产甲烷古菌的存在, 如动物瘤胃^[7]、稻田^[8-9]、垃圾填埋场^[10]、海底沉积物^[11]、盐碱湖^[12]、红树林湿地^[13]等。然而ANME驱动的AOM过程是重要的甲烷汇。ANME利用甲烷生长, 其生物残体及生长

代谢过程中产生的一些难降解有机物可能被埋藏进一步形成碳汇^[14], 产生的二氧化碳返回到大气中形成二氧化碳碳源, 但二氧化碳的升温潜势远低于甲烷^[2], 另有研究表明ANME-2a可以厌氧氧化甲烷产生乙酸, 乙酸可以进一步被其他异养生物利用^[15], 整体上AOM过程仍是一个增加碳汇的过程。据估计, 全球产生的甲烷有超过一半在到达大气之前被好氧和厌氧甲烷氧化微生物氧化成二氧化碳, 而在深海, AOM耦合硫酸盐还原过程可能消耗高达90%的沉积物释放的甲烷^[16]。

目前已纯培养的产甲烷古菌都分布在广古菌门(*Euryarchaeota*)的6个纲, 即甲烷杆菌纲(*Methanobacteria*)、甲烷球菌纲(*Methanococci*)、甲烷火菌纲(*Methanopyri*)、甲烷微菌纲(*Methanomicrobia*)、热源体纲(*Thermoplasmata*)和*Methanonatronarchaei*, 并分为7个目, 即甲烷球菌目(*Methanococcales*)、甲烷火菌目(*Methanopyrales*)、甲烷杆菌目(*Methanobacteriales*)、甲烷八叠球菌目(*Methanosarcinales*)、甲烷微菌目(*Methanomicrobiales*)、甲烷胞菌目(*Methanocellales*)和马赛球菌目(*Methanomassiliicoccales*)^[17]。*Methanonatronarchaeia*纲目前只有从西伯利亚东南部高盐湖的沉积物中分离的2株菌^[18]。依据底物不同, 产甲烷途径可分为4类:

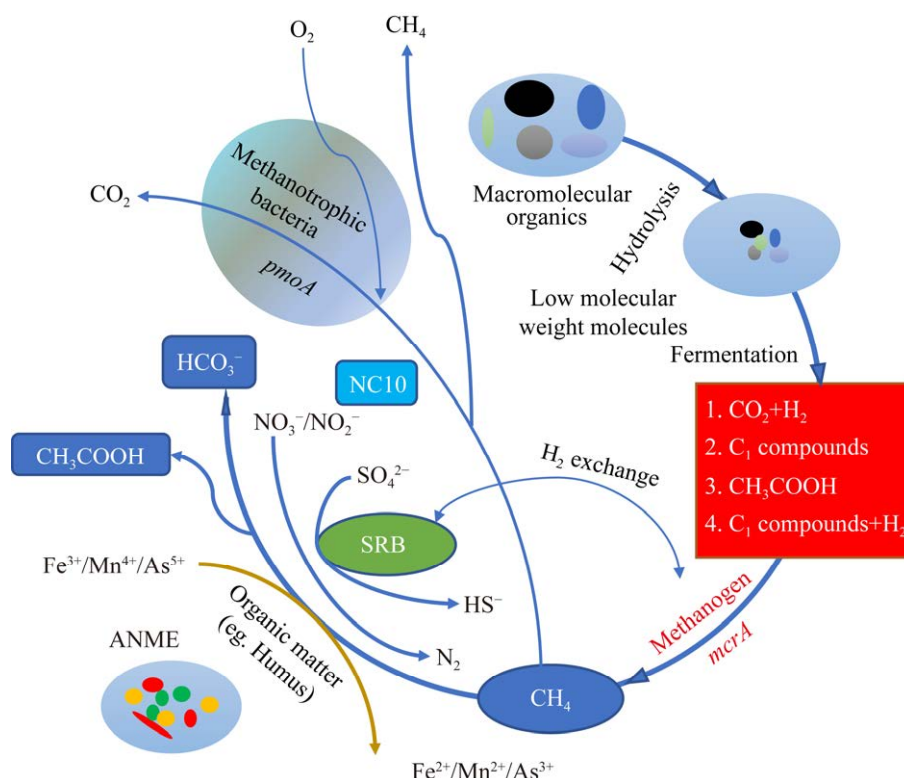


图 1 甲烷代谢途径

Figure 1 Methane metabolism pathway. ANME: Anaerobic methane oxidizing archaea; SRB: Sulfate-reducing bacteria; *mcrA*: Methyl-coenzyme M reductase α -subunit gene, methanogen marker gene; *pmoA*: Particulate methane monooxygenase β -subunit gene (aerobic methane oxidizing marker gene). Blue line: The process and the microorganisms involved are known or partially known; Brown line: The process has been reported but the microorganisms involved are unclear.

(1) H_2/CO_2 还原产甲烷途径；(2) 甲基产甲烷途径；(3) 乙酸裂解产甲烷途径；(4) H_2 还原甲基化合物产甲烷途径。Rother 等^[19]发现产甲烷古菌 *Methanosarcina Acetivorans* C2A 能够利用一氧化碳生长，但主要产物不是甲烷，而是醋酸和甲酸；甲基型产甲烷古菌能够使用甲基化合物，如甲醇、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(甲硫醇和二甲基硫醚)。Mayumi 等^[20]发现 *Methermicoccus shengliensis* 菌株 AmaM 还可利用甲氧基芳香族化合物产甲烷。产甲烷古菌生长缓慢，一般倍增时间为 4–8 d，据报道，最小的倍增时间为 24 h，但是倍增后未观察到进一步的生长^[19]。

然而 AOM 途径缺乏关键微生物的纯培养，主要基于富集物探索 AOM 过程。目前已发现 AOM 的电子受体有：(1) 硝酸盐和亚硝酸盐；(2) 金属离子，如 Mn^{4+} 、 Fe^{3+} 、 As^{5+} ^[21]；(3) 硫酸盐；(4) 有机质，如腐殖质^[22]。根据 Knittel 等^[23]对 16S rRNA 基因序列的系统发育分析，ANME 被分为 3 个不同的分支，即 ANME-1、ANME-2 和 ANME-3^[24]。AOM 活性实验估计 ANME 倍增时间为 2–7 个月，揭示了 ANME 利用 CH_4 缓慢生长^[25]。Bhattarai 等^[6]总结了介导 AOM 耦合硫酸盐还原(sulfate reduction, SR)的 ANME 培养限制：(1) 在已知电子受体的 AOM 中，AOM 耦合 SR 在标准热

力学条件下产生的能量最低; (2) ANME 生长极慢^[25]; (3) 底物甲烷在 1 个大气压下的溶解浓度有限(1.4 mmol/L); (4) SR 产物硫化物抑制 ANME 的生长。这些都给 ANME 的培养和分离带来了挑战。

产甲烷古菌和 ANME 的相互关系目前并不清楚。Soo 等将未培养的 ANME-1 编码甲基辅酶 M 还原酶(Mcr)的基因克隆到产甲烷菌 *Methanosarcina acetivorans* 中, 使其能够利用 Fe^{3+} 作为电子受体厌氧氧化甲烷生长, 并将甲烷转化为乙酸^[26], 但是目前并未有报道在自然环境中发现既能产甲烷又能氧化甲烷的微生物。所有的 ANME 都与产甲烷古菌的不同类群存在系统进化关系^[23]。复杂环境中二者如何进行厌氧甲烷代谢仍待研究。

本团队之前参与的研究通过对复杂环境中甲烷代谢功能基因和微生物群落分析来揭示不同生态系统甲烷排放机制^[13,27-30]。Bai 等利用功能基因芯片(GeoChip)分析了 4 个不同红树林沉积物微生物功能基因多样性, 检测到了甲烷代谢的关键基因, 如参与甲烷产生的甲基辅酶 M 还原酶基因(*mcrA*)及参与好氧甲烷氧化的可溶性甲烷单加氧酶基因(*mmoX*)和颗粒状甲烷单加氧酶基因(*pmoA*)^[27]。Yu 等研究发现, 红树林恢复过程中无瓣海桑的引入增加了甲烷排放, 主要原因是无瓣海桑的引入改变了沉积物的环境和养分条件, 导致沉积物中产甲烷菌群落的 α 多样性增加, 而好氧甲烷氧化菌的丰度降低^[13]。Wang 等研究易被忽视的小池塘甲烷排放, 发现高污染的池塘水中溶解甲烷含量较高, 而且对 *mcrA* 和 *pmoA* 基因的测序表明高污染池塘中沉积物产甲烷群落和水中甲烷氧化群落 α 多样性较高^[28]。顾航等综述了湿地微生物介导的甲烷排放机制, 指出不同湿地产甲烷微生物群落及甲烷产率差异主要是由于温度、底

物、植物、pH 和硫酸盐、硝酸盐、金属等环境因子的影响, 而水文条件、植物、温度、湿地类型是影响湿地甲烷总排放的环境因素^[29]。Feng 等发现短期冻土变暖刺激下产甲烷相关基因如 *mcrA*、*hdrB*、*mrtH*、*mtaB* 等丰度上升, 有利于甲烷排放^[30]。甲烷代谢是地球元素循环中极为重要的一环, 从环境中分离甲烷代谢古菌是研究其在复杂环境中功能过程及其机制的关键。

甲烷代谢古菌是复杂环境中甲烷代谢过程的关键驱动者, 也是难培养微生物的重要代表, 其分离培养至关重要。Walker 等通过对产甲烷菌和硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)的共培养, 发现二者除 H_2 外新的物质交流——种间丙氨酸转移, 这为复杂环境中的产甲烷菌与其他微生物互作提供了新的视角^[31]。大量原位荧光杂交实验表明 ANME 与 SRB 共生^[6]。大多数来自环境的微生物无法在实验室中培养, 主要原因包括缺乏适当的生长条件、生长速度低、菌落生长不良、需要其他微生物产生的代谢物、细胞处于休眠状态^[32], 或细胞离开原有环境到培养之间就已经死亡^[33]。为进一步揭示甲烷代谢机制, 本文综述了甲烷代谢古菌分离培养的方法及评价, 以期当前甲烷代谢古菌分离培养提供帮助。

1 产甲烷古菌的分离培养

Sorokin 等从盐湖和碱湖中分离到 2 株以 H_2 和甲基化合物为底物的产甲烷古菌, 为产甲烷古菌的起源提供了新的见解^[18]。Imachi 等长期富集分离获得高纯度的 Asgard 古菌和产甲烷古菌共培养物, 提出了可能的真核起源模型: 纠缠-吞噬-内生(也称为 E3)模型^[34]。目前已经纯培养的产甲烷古菌的物种近百个。随着研究的深入, 对于难培养的古菌, 富集培养、共培

养可能代替纯培养成为主流,但纯培养对微生物的形态、生态生理学和生物化学的理解是至关重要的,这是认识其在复杂环境中的功能过程及机制的关键。

一般认为产甲烷古菌在严格的厌氧条件下,即除二氧化碳外的电子受体(如硫酸盐、硝酸盐、金属氧化物等)被耗尽才会生长。然而 Khelaifia 等在有氧条件下利用产 H_2 细菌为产甲烷古菌供应 H_2 的共培养从人类粪便中分离到产甲烷古菌^[35]。此前也报道了产甲烷古菌虽然能耐受低浓度的氧气^[36],但从未在空气中生长和被分离。Khelaifia 等的新发现改变了人们对产甲烷古菌“严格厌氧”的固有认知。最近, Zhang 等通过宏基因组和宏转录组发现了红树林浅层土壤(0–30 cm)氢气还原甲基化合物类新型产甲烷菌的代谢潜力,即使在 0–2 cm 的表层土也可能存在具有代谢潜力的产甲烷古菌^[37]。

环境中的未培养微生物可以分为 3 类,即优势活性微生物、低丰度活性微生物和休眠微生物^[38]。一般最容易分离的是适应性较强的优势活性微生物。大多数未培养微生物属于低丰度活性微生物和休眠微生物^[38]。目前尚未报道产甲烷古菌存在休眠(可生存但不可培养)状态,在一些极端环境(如深海),产甲烷古菌可能属于优势活性微生物,但是在淡水或者浅层土壤,产甲烷古菌更可能属于低丰度活性微生物,甚至休眠微生物。对于复杂环境中产甲烷古菌的分离,一些现有培养思路可供参考,如富集培养^[39]、原位培养^[40]、共培养^[10]、微流控技术^[41]、基于宏基因组功能预测定向培养^[42]等,进一步的分离可考虑减绝稀释法分离^[34],固体分离和反向基因组学^[43]等。

1.1 培养方法

1.1.1 富集培养

为了培养低丰度的微生物,通常是定制不

同的合成培养基进行培养。通过控制生长培养基来提高环境样品中微生物的回收率,分离到了小部分产甲烷古菌^[18,44]。另一种分离低丰度细菌的策略是试图使它们成为优势菌。富集是一种常见的方法,通过引入特定古菌生长的营养物质或环境条件来实现增加目标古菌的数量。此法的优点是选择性高,适于分离一些难以在人工培养基上单独生长及生长缓慢的产甲烷古菌^[34,45]。

1.1.2 原位培养

Kaeberlein 等在 2002 年提出原位培养思路^[40]。他们设计了一个扩散室让未培养微生物在模拟的自然环境中生长,分离出具有代表性的海洋微生物。这些分离菌并不能单独在人工培养基上生长,而是需要在其他微生物存在时形成菌落。这一观察结果有助于解释自然界一些未培养微生物无法单独生长,必须在共生菌的存在下才能生长的现象。

Nichols 等在 2010 年发明了隔离芯片(iChip)技术,实现了高通量原位培养^[46]。单个 iChip 由 384 个微型扩散室组成,每个扩散室都接种一个环境细胞,研究表明,使用 iChip 分离的微生物超过传统培养的许多倍,并且生长的物种具有显著的系统发育新颖性^[46]。将 iChip 技术与荧光活化细胞分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)结合,简称 FACS-iChip 技术^[47],可确保培养板的每个培养室只含有一个细胞。目前 iChip 主要用于药物开发和医学研究^[48]。

原位培养的最大优点是解除了传统固体分离培养的培养基成分限制,同时其缺点也很明显——缺乏选择性,难以直接从环境中分离到目标微生物。另外 iChip 使用了琼脂、结冷胶等固定剂,不耐受这些固定剂的微生物无法在上面生长。若利用此培养思路分离环境中的产甲烷古菌,需要配合富集培养,提高产甲烷古

菌被分离的概率。同时, 原位的营养往往是复杂而不充足的, 原位培养难以确定微生物的共培养关系及生长条件, 这为进一步的研究带来了困难。

1.1.3 基于宏基因组功能预测的定向培养

基于基因组的代谢重建可能为未培养细菌和古菌的培养提供基础, 但截至目前仅有少数微生物实现了^[49]。Nagoya 等发现宏基因组组装基因组 (metagenome-assembled genome, MAG) Met2 编码了一种混合营养型甲烷菌, 该菌是嗜热固定床厌氧消化器中的主要菌群, 从 MAG Met2 基因组信息推测 Met2 仅利用 H_2/CO_2 来产甲烷以节约能源, 而以乙酸盐作为碳源, Met2 可能是一种全新的专性混合营养产甲烷古菌; 结合宏基因组预测和利用斜面划线分离, Nagoya 等最终分离到了 *Methanothermobacter* sp. 菌株 Met2-1, 其代谢途径与宏基因组预测结果一致^[42]。因此, 宏基因组和宏转录组等信息将为甲烷代谢古菌的分离提供基础。

1.1.4 共培养

Sakai 等在 2007 年提出产甲烷古菌分离的共培养思路, 向培养基中添加产氢菌和间接底物丙酸, 利用产氢菌为产甲烷古菌生长提供 H_2 ^[8]。在此之前, 几乎所有利用 H_2 的产甲烷古菌的培养和分离都是在高 H_2 浓度(例如 100 kPa)下进行的, 远高于环境 H_2 的浓度(10–100 Pa)^[10]。在这种高 H_2 浓度条件下的实验室培养导致非常有限的物种生长。共培养法弥补了富 H_2 培养的不足。Khelaifia 等也采用产氢菌和产甲烷古菌共培养的方式分离氢营养型产甲烷古菌, 与 Sakai 的共培养不同的是, Khelaifia 的共培养未严格厌氧, 仅仅在培养基中添加了还原剂和抗生素, 并未去除装置内的氧气^[35]。Sakai 等^[10]通过严格厌氧条件限制了其他菌的生长。Khelaifia 等^[35]则通过添加抗生素来抑制细菌的

生长, 此法适合低 H_2 浓度产甲烷古菌的分离。产甲烷古菌利用这些异养细菌产生的 H_2 , 而细菌从去除 H_2 中获益。这种生活方式通常被称为种间 H_2 转移。共培养法弥补了传统富营养法的不足, 为一些难培养产甲烷古菌提供了新的培养思路。共培养法的缺点在于需要一定的研究基础, 如对产甲烷古菌的代谢及微生物相互作用的研究等。对于部分可能需要共生微生物方可存活菌种的分离纯化, 分离共生或同养菌并保证在后续的纯培养过程中继续生长可能具有挑战性。二者的分离难点在于共生机制的探索, 如物质交换、电子传递等, 以便于将二者物理隔离后的进一步单独培养。宏基因组学、宏转录组学、蛋白组学和代谢组学等可以为研究二者之间的相互作用提供一些信息, 但仍需进一步实验验证。

1.1.5 微流控技术

微流控技术可以将一系列实验室操作集成到微流控芯片上, 如样品处理、反应、细胞培养和测量^[41]。基于液滴的微流控技术是微流控技术的关键, 其在微生物学方面表现出了高通量单细胞培养^[50]、微生物共培养^[51]、靶向测序^[52]和单细胞测序^[52]的优势。液滴操作的不同功能模块主要有产生液滴、液滴培养、区分液滴、液滴合并及液滴筛选。产生液滴是第一步, 通过不同管道将细胞和培养基混合分离单细胞, 使用液滴进行大量单细胞包埋, 其中表面活性剂对液滴的稳定极为重要。液滴可以为细胞分裂提供一个独立的空间, 并阻挡竞争者或捕食者的影响。这可以带来如微尺度、单细胞分辨率、高吞吐量、低成本和自动化潜力等优势。微流控技术还可以结合多种技术对液滴进行分析, 如荧光原位杂交、单细胞测序、质谱等。微流控技术和 iChip 技术类似, 最大缺点在于非选择性培养及不确定分离微生物能否

继续纯培养。该技术应用主要面临两大挑战:

(1) 微流控技术在微生物学的应用限制,虽然这项技术是为了培养而生,但是至今很少用于古菌的分离培养,大多数已发表研究都依赖于定制的设备,并遵循微流控领域科学家的协议,使得这项技术并未广泛使用;(2) 目前实际应用中的微流控技术很难达到预期效果,仍有许多需要改进的地方^[53]。对于未来的甲烷代谢古菌培养,微流控技术可能发挥重要作用,但是在厌氧古菌分离方面的应用潜力尚属未知。

1.2 分离方法

1.2.1 减绝稀释法

将环境样品富集培养之后通常要经过减绝稀释法分离微生物。稀释倍数取决于微生物的种群密度,即将培养基中的微生物连续稀释到单个细胞,减少样本内微生物物种的数量和多样性。在培养基中添加细菌特异性抗生素对分离产甲烷古菌十分有效,如卡那霉素和万古霉

素。Imachi 等利用长期减绝稀释法分离,最终获得了极难培养的 Asgard 古菌和产甲烷古菌的共培养物^[34]。Buchholz 等利用高效减绝稀释法分离了新型异养菌病毒-宿主体系,实现了病毒-宿主体系的高通量分离^[54]。某些产甲烷菌在固体培养基中不形成可见菌落,此法可用于分离这类产甲烷菌。

1.2.2 固体分离

亨盖特滚管、深琼脂斜面法和 6 孔平板法等基于琼脂等凝固剂的固体分离技术可用于产甲烷古菌的分离(表 1)。亨盖特滚管是用于分离严格厌氧菌最广泛的方法,此法不适合在较高的温度(>55 °C)培养^[55]。深琼脂斜面法也用于产甲烷古菌的菌落分离^[56],与亨盖特滚管相比,较厚的琼脂层延迟了培养基的氧化和干燥,菌落的可见性不明显,适合较长时间的培养。Nakamura 等开发了一种简单方法:使用一次性 6 孔板和厌氧塑料包来培养和分离严格

表 1 分离厌氧甲烷代谢微生物的不同方法

Table 1 Different methods to separate anaerobic methane metabolizing microorganisms

Sample source	Separation method	Classification	Metabolic pathway	References
Thermophilic fixed-bed anaerobic digesters	Metagenomic prediction	Methanogen	H ₂ reduces CO ₂ to produce methane	[42]
Methane-seep (<2 533 m)	Dilution-to-extinction	Asgard archaeon/methanogen	Amino acid metabolism (Asgard); Interspecies H ₂ transfer	[34]
Hypersaline lakes	Dilution-to-extinction	Methanogen	H ₂ reduces methyl compounds to produce methane	[18]
Human feces	Aerobic coculture	Methanogen	H ₂ reduces CO ₂ to produce methane	[35]
Paddy	Anaerobic coculture	Methanogen	H ₂ reduces CO ₂ to produce methane	[8]
Anaerobic fresh water or sea cement	Hungate roll tube	Sulfate reducing bacteria	Sulfate reduction; Oxidation of acetic acid, pyruvic acid, etc	[55]
Natural gas-bearing confined aquifers	Deep agar slant	Methanogen	Methyl compounds cleave to produce methane	[56]
Gas-water-producing well	Six-well plate	Sulfate reducing bacteria	Sulfate reduction; Oxidation of acetic acid, pyruvic acid, etc	[57]

的厌氧菌^[57]。他们使用 2 种产甲烷古菌和 2 种硫酸盐还原菌对 6 孔板法培养效率进行评估,发现此法与亨盖特滚管法相比效果相当甚至更好。此法的另一优点是便于接菌操作,也便于在显微镜下观察小菌落,在平板上的操作也比在亨盖特滚管法和深琼脂斜面法操作更简单。

1.2.3 反向基因组学

“反向基因组学”方法可用于关键微生物的定向培养^[43]。特定类群的单细胞扩增基因组(single-cell amplified genomes, SAGs)及其获得常取决于它们在群落中的丰度。Cross 等设计了一种方法,利用 SAGs 或 MAGs 序列中的信息来设计抗体,可用于选择性分离细菌或古菌^[43]。该方法的优点是不需要任何长时间的富集步骤就可以对缓慢生长的微生物进行特异性靶向选择。

该技术要求目标微生物的基因组(SAGs 或 MAGs)应包含编码特异性膜蛋白的基因;此外,这些膜蛋白应该具有作为实验动物外来抗原的细胞外区域;将此类膜蛋白注射到兔子(或任何其他合适的动物宿主)中以制造抗体,然后提取、纯化并荧光标记抗体;标记的抗体与微生物样本混合,有选择地标记目标微生物,利用荧光激活细胞分类,将标记的微生物从样品中筛选出并接种到分离培养基上培养^[43]。这一技术仍然需要解决完全未知且无相关实验验证的微生物表面蛋白结构建模等相关问题。如果荧光分选的细胞在随后的富集和分离过程中失去活力或可培养性,则有关生长培养基/条件选择的技术问题将成为主要障碍^[38]。

1.3 其他方法

难培养古菌还有一些其他可参考方法。“*Nanopusillus*”是已知最小(100–300 nm)的细胞之一,而 Wurch 等^[58]利用减绝稀释法培养和光学镊子选择,获得了 *Nanopusillus acidilobi* 古

菌和 *Acidilobus* sp. 7A 细菌的共培养物。Hu 等结合细胞提取、细胞大小分级和亨盖特滚管方法,从海洋沉积物中成功富集和分离了大量生长缓慢的古菌(如 ANME、*Bathymarchaeota* 等);此外,他们还尝试了多种富集分离方法,如在琼脂板上划线/涂布、减绝稀释法及微滴法,但均未成功,主要原因是难以长期维持厌氧培养条件,同时也发现抗生素处理对减少细菌含量并无帮助^[59]。因此,针对不同环境来源的微生物特性,还需探索合适的培养方法(图 2)。

2 厌氧甲烷氧化古菌的富集

由于当前培养方法和技术的限制,ANME 未纯培养。然而在富集的基础上,结合新兴技术,人们在研究 AOM 机制上取得了重要进展。近些年,研究环境样品中微生物代谢的技术发展迅速,目前能够应用到环境样品研究中的主要方法包括荧光原位杂交^[60]、宏基因组^[61]、宏转录组^[37]、蛋白组学^[62]、富集培养^[15]、同位素标记^[15,63]、单细胞测序^[64]、nanoSIMS^[65]和流式细胞技术^[59]等。利用这些方法可以进一步揭示 AOM 的作用机制。

研究发现,ANME-2d 可以通过“反向产甲烷”作用,以硝酸盐为末端电子受体进行 AOM^[66],介导 AOM 和亚硝酸盐还原的则是 NC10 门细菌^[4];AOM 与海洋沉积物^[67]、海岸沉积物^[68]和湖泊沉积物^[69-70]中的 Mn^{4+} 或 Fe^{3+} 的还原耦合。最新研究表明 AOM 还与湿地土壤 As^{5+} 还原耦合^[21]。AOM 与硫酸盐还原耦合作用最早在海洋沉积物中发现^[71],大量研究表明硫酸盐还原耦合 AOM 是由 ANME 与硫酸盐还原菌(SRB)协作完成的^[24,72-73]。SRB 不能直接将甲烷当作电子受体,除非与 ANME 结合进行 AOM-SR 耦合^[74]。然而在 *Korarchaeota* WYZ-LM09 基因组中,厌氧甲烷氧化基因和异

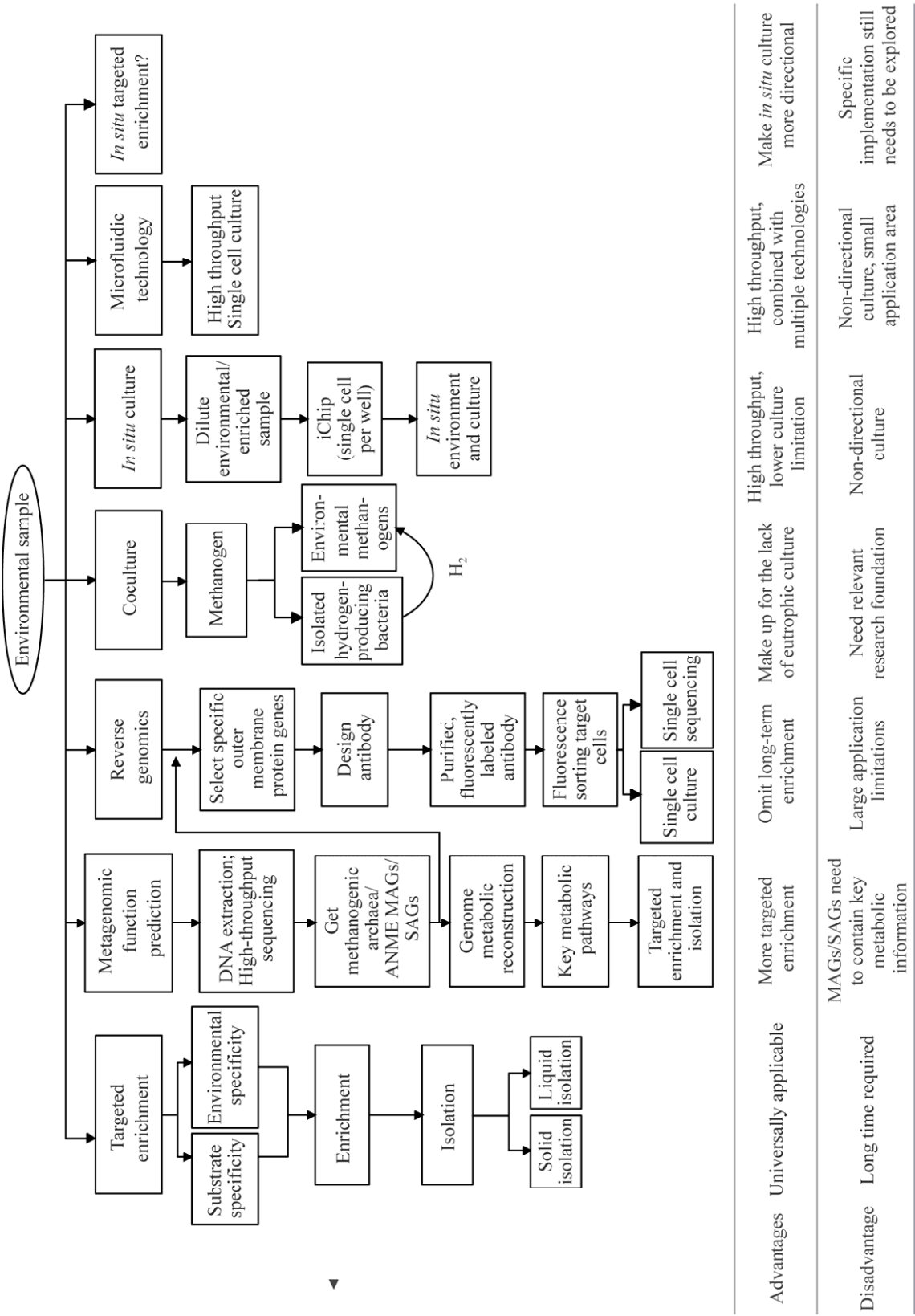


图 2 从环境样品中分离甲烷代谢古菌的方法及优缺点比较

Figure 2 Methods for isolation of methane metabolism archaea from environmental samples and comparison of advantages and disadvantages. ANME: Anaerobic methane oxidizing archaea; SRB: Sulfate reducing bacteria; iChip: Isolation chip.

化亚硫酸盐还原基因同时出现, 表明同一微生物对甲烷和亚硫酸盐的潜在利用^[61,75]。另外, 腐殖质及其结构类似物(如醌类)也可作为 AOM 的终端电子受体^[76-78]。

利用硫酸盐、硝酸盐作为电子受体的 AOM 以及所涉及的 ANME 类群已经被报道, 而利用 Mn^{4+} 、 Fe^{3+} 、 As^{5+} 和腐殖质作为电子受体的 AOM 虽被报道, 但其所涉及的微生物仍不清楚。ANME 的培养在技术上往往比其他厌氧微生物的培养更复杂。培养 ANME 必须考虑到以下几点: (1) ANME 生长非常缓慢; (2) 保持无氧环境; (3) CH_4 的水溶性很差。

ANME 富集方法主要有反应器富集和培养瓶富集。

2.1 反应器富集

连续流生物反应器的设计原理是提供营养物质, 并以环境相关的速率去除最终产物^[79]。更换培养液可以降低培养基中对 ANME 有毒害的硫离子, 但是也会带走部分生物量。聚氨酯海绵是一种多孔材料, 可以作为生物反应器填料, 从而促进生物质的附着、聚集和滞留。收集到的海洋沉积物可附着在多孔海绵中, 甲烷可通过多孔海绵有效扩散, 而含有必要营养物质和电子受体的培养液则可流经多孔海绵^[45]。Yang 等在连续高压生物反应器中富集数年获得 ANME-2a 富集物, 并证明 ANME-2a 可以通过 AOM-SR 产乙酸^[15]。Haroo 等^[66]使用连续性厌氧生物反应器进行 ANME 富集, 研究表明, ANME-2d 亚群中 *Candidatus Methanoperedens nitroreducens* 可以独自进行反硝化厌氧甲烷氧化(denitrifying anaerobic methane oxidation, DAMO), ANME-2d 产生的亚硝酸盐被厌氧氨氧化细菌还原为氮气; 同时, 该研究还发现亚硝酸还原耦合的 AOM 为细菌介导, 古菌是否能介导这一过程尚缺乏证据。Cai 等利用间歇

式生物反应器对澳大利亚昆士兰州金溪水库沉积物进行 ANME 富集, 运行约 220 d 发现了耦合铁还原的 ANME 新种^[70]。相较于使用培养瓶富集, 使用反应器进行富集的一个最大优点是可以在高压下提高 CH_4 溶解度, 从而缩短富集时间。在这种高压反应器的连续运行过程中, CH_4 的浓度很容易达到 60–65 mmol/L。

2.2 培养瓶富集

当培养压力不超过 0.25 MPa 时, 广泛使用常规血清瓶富集^[67,80-81]。Beal 等使用培养瓶培养 ANME, 研究表明, 依赖锰的 AOM 是由 ANME-1/*Methanococcoides*/ANME-3 与细菌共同进行的, 或者在这种情况下依赖锰的 AOM 不是由古菌而是由细菌进行的^[67]。Bar-Or 等使用培养瓶富集 ANME 470 d 的研究表明, 铁耦合 AOM 存在于湖泊深部甲烷沉积物中, 由产甲烷古菌和甲烷氧化菌组成的微生物群落进行^[69]。产甲烷古菌可以参与铁的还原, 产甲烷古菌还原铁氧化物的能力已经在纯培养实验中得到证实^[82-83]。Shi 等对中国 7 个地区砷污染湿地土壤进行 AOM 暗箱孵育 7–20 d, 发现厌氧甲烷氧化和砷酸盐还原的耦合途径占土壤总砷释放量的 26%–49%, 其中砷以亚砷酸盐的形式存在, 系统发育分析表明富集后的 ANME 主要为 ANME-1 和 ANME-2, 而 ANME-3 几乎未检测到^[21]。在研究腐殖质耦合的 AOM 时, Valenzuela 等针对红树林湿地沉积物采用培养瓶富集培养, 研究发现腐殖质可以催化 AOM 与金属还原过程, 也可以作为 AOM 的电子受体^[22,77,84]。批量培养瓶实验通过控制不同的环境条件如温度、盐度和碱度, 可以进行多个并行的实验。特别是对于像 ANME 这样需要严格厌氧条件且生长缓慢的微生物, 基于分批培养的实验相对容易控制和操作。

3 展望

近四十年来,人们对甲烷代谢古菌进行了广泛的探索。然而不同的甲烷代谢古菌进化支之间的生态位分化有待进一步研究。由于其主要生长在厌氧环境且倍增时间长等特点,甲烷代谢古菌的分离培养具有一定的挑战性。对于产甲烷古菌的分离培养,最短的分离时间是一年多,基于琼脂的固体分离技术极大地限制了产甲烷古菌的分离,液体稀释分离又延长了分离时间,一些传统培养方法可能不适合某些环境样品^[59]。在现有技术下,建议在分离时多方法并用,弥补单种方法的缺陷。对于ANME富集,大多数生物化学研究都是使用从自然沉积物中富集的ANME进行的,但由于ANME生物量低,需要的富集时间更长,限制了实验进展。在这种情况下,需优先考虑适当处理从自然环境到实验室的ANME生物量以及在模拟原位条件的生物反应器中富集。针对现有的甲烷代谢古菌富集培养,本文提出未来甲烷代谢古菌分离培养的3个研究方向:

(1) 未培养甲烷代谢古菌的分离培养。对于已发现的未培养甲烷代谢古菌,亟待结合宏基因组分析及新型和传统培养思路,发展适合甲烷代谢古菌培养的新思路和新方法,如利用甲烷代谢古菌的特性进行原位定向富集,提高甲烷代谢古菌分离培养效率或简化富集培养过程。

(2) 聚焦深分支甲烷代谢古菌。发现新的深分支甲烷代谢古菌类群对于理解古菌进化和真核生物起源等具有重要意义。因此,需要结合富集培养和多组学手段,在更多生境中探寻未知的深分支甲烷代谢古菌类群。

(3) 甲烷代谢群落功能。已有研究表明ANME-2b/2d可以固氮^[60,85-86],而甲烷代谢也是

耦合碳、氮、硫等元素循环的关键节点。因此,对于已分离或已富集的甲烷代谢古菌,可利用合成微生物生态学理论和方法构建合成甲烷代谢微生物群落,揭示其作用机制,为实现甲烷减排及碳中和提供理论支撑。

REFERENCES

- [1] Kumar P, Adelodun AA, Khan MF, Krisnawati H, Garcia-Menendez F. Towards an improved understanding of greenhouse gas emissions and fluxes in tropical peatlands of Southeast Asia[J]. *Sustainable Cities and Society*, 2020, 53: 101881
- [2] Kirschke S, Bousquet P, Ciais P, Saunois M, Canadell JG, Dlugokencky EJ, Bergamaschi P, Bergmann D, Blake DR, Bruhwiler L, et al. Three decades of global methane sources and sinks[J]. *Nature Geoscience*, 2013, 6(10): 813-823
- [3] Jackson RB, Saunois M, Bousquet P, Canadell JG, Poulter B, Stavert AR, Bergamaschi P, Niwa Y, Segers A, Tsuruta A. Increasing anthropogenic methane emissions arise equally from agricultural and fossil fuel sources[J]. *Environmental Research Letters*, 2020, 15(7): 071002
- [4] Ettwig KF, Van Alen T, Van De Pas-Schoonen KT, Jetten MSM, Strous M. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3656-3662
- [5] Higgins IJ, Best DJ, Hammond RC. New findings in methane-utilizing bacteria highlight their importance in the biosphere and their commercial potential[J]. *Nature*, 1980, 286(5773): 561-564
- [6] Bhattacharai S, Cassarini C, Lens PNL. Physiology and distribution of archaeal methanotrophs that couple anaerobic oxidation of methane with sulfate reduction[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2019, 83(3): e00074-18
- [7] Janssen PH, Kirs M. Structure of the archaeal community of the rumen[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(12): 3619-3625
- [8] Sakai S, Imachi H, Sekiguchi Y, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y. Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: a novel isolate affiliated with the clone cluster rice cluster I[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007,

- 73(13): 4326-4331
- [9] Vaksmaa A, Guerrero-Cruz S, Alen TA, Cremers G, Ettwig KF, Lüke C, Jetten MSM. Enrichment of anaerobic nitrate-dependent methanotrophic '*Candidatus* Methanoperedens nitroreducens' archaea from an Italian paddy field soil[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(18): 7075-7084
- [10] Sakai S, Imachi H, Sekiguchi Y, Tseng IC, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y. Cultivation of methanogens under low-hydrogen conditions by using the coculture method[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(14): 4892-4896
- [11] Mason OU, Case DH, Naehr TH, Lee RW, Thomas RB, Bailey JV, Orphan VJ. Comparison of archaeal and bacterial diversity in methane seep carbonate nodules and host sediments, eel river basin and hydrate ridge, USA[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70(3): 766-784
- [12] Sorokin DY, Abbas B, Geleijnse M, Pimenov NV, Sukhacheva MV, Van Loosdrecht MCM. Methanogenesis at extremely haloalkaline conditions in the soda lakes of Kulunda Steppe (Altai, Russia)[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(4): fiv016
- [13] Yu XL, Yang XQ, Wu YJ, Peng YS, Yang T, Xiao FS, Zhong QP, Xu K, Shu LF, He Q, et al. *Sonneratia apetala* introduction alters methane cycling microbial communities and increases methane emissions in mangrove ecosystems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 144: 107775
- [14] Jiao NZ, Herndl GJ, Hansell DA, Benner R, Kattner G, Wilhelm SW, Kirchman DL, Weinbauer MG, Luo TW, Chen F, et al. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(8): 593-599
- [15] Yang SS, Lv Y, Liu XP, Wang YZ, Fan QL, Yang ZF, Boon N, Wang FP, Xiao X, Zhang Y. Genomic and enzymatic evidence of acetogenesis by anaerobic methanotrophic archaea[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3941
- [16] Reeburgh WS. Oceanic methane biogeochemistry[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(2): 486-513
- [17] Borrel G, O'Toole PW, Harris HMB, Peyret P, Bruguère JF, Gribaldo S. Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2013, 5(10): 1769-1780
- [18] Sorokin DY, Makarova KS, Abbas B, Ferrer M, Golyshin PN, Galinski EA, Ciordia S, Mena MC, Merkel AY, Wolf YI, et al. Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing Euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17081
- [19] Rother M, Metcalf WW. Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: an unusual way of life for a methanogenic archaeon[J]. *PNAS*, 2004, 101(48): 16929-16934
- [20] Mayumi D, Mochimaru H, Tamaki H, Yamamoto K, Yoshioka H, Suzuki Y, Kamagata Y, Sakata S. Methane production from coal by a single methanogen[J]. *Science*, 2016, 354(6309): 222-225
- [21] Shi LD, Guo T, Lv PL, Niu ZF, Zhou YJ, Tang XJ, Zheng P, Zhu LZ, Zhu YG, Kappler A, et al. Coupled anaerobic methane oxidation and reductive arsenic mobilization in wetland soils[J]. *Nature Geoscience*, 2020, 13(12): 799-805
- [22] Valenzuela EI, Avendaño KA, Balagurusamy N, Arriaga S, Nieto-Delgado C, Thalasso F, Cervantes FJ. Electron shuttling mediated by humic substances fuels anaerobic methane oxidation and carbon burial in wetland sediments[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 2674-2684
- [23] Knittel K, Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 311-334
- [24] Hinrichs KU, Hayes JM, Sylva SP, Brewer PG, DeLong EF. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments[J]. *Nature*, 1999, 398(6730): 802-805
- [25] Nauhaus K, Albrecht M, Elvert M, Boetius A, Widdel F. *In vitro* cell growth of marine archaeal-bacterial consortia during anaerobic oxidation of methane with sulfate[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(1): 187-196
- [26] Soo VWC, McAnulty MJ, Tripathi A, Zhu FY, Zhang LM, Hatzakis E, Smith PB, Agrawal S, Nazem-Bokaei H, Gopalakrishnan S, et al. Reversing methanogenesis to capture methane for liquid biofuel precursors[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 11
- [27] Bai SJ, Li JW, He ZL, Nostrand JD, Tian Y, Lin GH, Zhou JZ, Zheng TL. GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of soil microbial communities of mangroves[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(15): 7035-7048
- [28] Wang BH, Stirling E, He ZL, Ma B, Zhang HJ, Zheng

- XF, Xiao FS, Yan QY. Pollution alters methanogenic and methanotrophic communities and increases dissolved methane in small ponds[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 801: 149723
- [29] 顾航, 肖凡书, 贺志理, 颜庆云. 湿地微生物介导的甲烷排放机制[J]. *微生物学报*, 2018, 58(4): 618-632
- Gu H, Xiao FS, He ZL, Yan QY. Microbial driven methane emission mechanisms in wetland ecosystems[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(4): 618-632 (in Chinese)
- [30] Feng JJ, Wang C, Lei JS, Yang YF, Yan QY, Zhou XS, Tao X, Ning DL, Yuan MM, Qin YJ, et al. Warming-induced permafrost thaw exacerbates tundra soil carbon decomposition mediated by microbial community[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 3
- [31] Walker CB, Redding-Johanson AM, Baidoo EE, Rajeev L, He ZL, Hendrickson EL, Joachimik MP, Stoliar S, Arkin AP, Leigh JA, et al. Functional responses of methanogenic archaea to syntrophic growth[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(11): 2045-2055
- [32] Cannon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3878-3885
- [33] Bellali S, Lagier JC, Million M, Anani H, Haddad G, Francis R, Kuete Yimagou E, Khelaifia S, Levasseur A, Raoult D, et al. Running after ghosts: are dead bacteria the dark matter of the human gut microbiota?[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1897208
- [34] Imachi H, Nobu MK, Nakahara N, Morono Y, Ogawara M, Takaki Y, Takano Y, Uematsu K, Ikuta T, Ito M, et al. Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface[J]. *Nature*, 2020, 577(7791): 519-525
- [35] Khelaifia S, Lagier JC, Nkanga VD, Guilhot E, Drancourt M, Raoult D. Aerobic culture of methanogenic archaea without an external source of hydrogen[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2016, 35(6): 985-991
- [36] Seedorf H, Dreisbach A, Hedderich R, Shima S, Thauer RK. $F_{420}H_2$ oxidase (FprA) from *Methanobrevibacter arborophilus*, a coenzyme F_{420} -dependent enzyme involved in O_2 detoxification[J]. *Archives of Microbiology*, 2004, 182(2/3): 126-137
- [37] Zhang CJ, Pan J, Liu Y, Duan CH, Li M. Genomic and transcriptomic insights into methanogenesis potential of novel methanogens from mangrove sediments[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 94
- [38] Mu DS, Ouyang Y, Chen GJ, Du ZJ. Strategies for culturing active/dormant marine microbes[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2021, 3(2): 121-131
- [39] Söllinger A, Urich T. Methylophilic methanogens everywhere-physiology and ecology of novel players in global methane cycling[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(6): 1895-1907
- [40] Kaerberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1127-1129
- [41] Shang LR, Cheng Y, Zhao YJ. Emerging droplet microfluidics[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(12): 7964-8040
- [42] Nagoya M, Kouzuma A, Ueno Y, Watanabe K. Isolation of an obligate mixotrophic methanogen that represents the major population in thermophilic fixed-bed anaerobic digesters[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 217
- [43] Cross KL, Campbell JH, Balachandran M, Campbell AG, Cooper CJ, Griffen A, Heaton M, Joshi S, Klingeman D, Leys E, et al. Targeted isolation and cultivation of uncultivated bacteria by reverse genomics[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(11): 1314-1321
- [44] Miller TL, Wolin MJ. *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen[J]. *Archives of Microbiology*, 1985, 141(2): 116-122
- [45] Imachi H, Aoi K, Tasumi E, Saito Y, Yamanaka Y, Saito Y, Yamaguchi T, Tomaru H, Takeuchi R, Morono Y, et al. Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(12): 1913-1925
- [46] Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, Pham L, Mehta A, Belanger A, Kanigan T, Lewis K, Epstein SS. Use of iChip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2445-2450
- [47] Liu HZ, Xue R, Wang YL, Stirling E, Ye SD, Xu JM, Ma B. FACS-iChip: a high-efficiency iChip system for microbial 'dark matter' mining[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2021, 3(2): 162-168
- [48] Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, Lim EJ, Pai V, Ozkumur E, Martel JM, Kojic N, Smith K, Chen PN, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating

- tumor cells from blood samples[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(3): 694-710
- [49] Gutleben J, Chaib De Mares M, Van Elsas JD, Smidt H, Overmann J, Sipkema D. The multi-omics promise in context: from sequence to microbial isolate[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2018, 44(2): 212-229
- [50] Huys GR, Raes J. Go with the flow or solitary confinement: a look inside the single-cell toolbox for isolation of rare and uncultured microbes[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 44: 1-8
- [51] Burmeister A, Grünberger A. Microfluidic cultivation and analysis tools for interaction studies of microbial co-cultures[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 62: 106-115
- [52] Xu P, Modavi C, Demaree B, Twigg F, Liang B, Sun C, Zhang WJ, Abate AR. Microfluidic automated plasmid library enrichment for biosynthetic gene cluster discovery[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(8): e48
- [53] Hu BY, Xu P, Ma L, Chen DW, Wang J, Dai X, Huang L, Du WB. One cell at a time: droplet-based microbial cultivation, screening and sequencing[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2021, 3(2): 169-188
- [54] Buchholz HH, Michelsen ML, Bolaños LM, Browne E, Allen MJ, Temperton B. Efficient dilution-to-extinction isolation of novel virus-host model systems for fastidious heterotrophic bacteria[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(6): 1585-1598
- [55] Hungate RE. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria[J]. *Bacteriological Reviews*, 1950, 14(1): 1-49
- [56] Katayama T, Yoshioka H, Mochimaru H, Meng XY, Muramoto Y, Usami J, Ikeda H, Kamagata Y, Sakata S. *Methanohalophilus levihalophilus* sp. nov., a slightly halophilic, methylotrophic methanogen isolated from natural gas-bearing deep aquifers, and emended description of the genus *Methanohalophilus*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64: 2089-2093
- [57] Nakamura K, Tamaki H, Kang MS, Mochimaru H, Lee ST, Nakamura K, Kamagata Y. A six-well plate method: less laborious and effective method for cultivation of obligate anaerobic microorganisms[J]. *Microbes and Environments*, 2011, 26(4): 301-306
- [58] Wurch L, Giannone RJ, Belisle BS, Swift C, Utturkar S, Hettich RL, Reysenbach AL, Podar M. Genomics-informed isolation and characterization of a symbiotic nanoarchaeota system from a terrestrial geothermal environment[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12115
- [59] Hu HN, Natarajan VP, Wang FP. Towards enriching and isolation of uncultivated archaea from marine sediments using a refined combination of conventional microbial cultivation methods[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2021, 3(2): 231-242
- [60] Metcalfe KS, Murali R, Mullin SW, Connon SA, Orphan VJ. 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
- [61] McKay LJ, Dlakić M, Fields MW, Delmont TO, Eren AM, Jay ZJ, Klingensmith KB, Rusch DB, Inskeep WP. Co-occurring genomic capacity for anaerobic methane and dissimilatory sulfur metabolisms discovered in the Korarchaeota[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(4): 614-622
- [62] Schneider T, Keiblinger KM, Schmid E, Sterflinger-Gleixner K, Ellersdorfer G, Roschitzki B, Richter A, Eberl L, Zechmeister-Boltenstern S, Riedel K. Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(9): 1749-1762
- [63] McGlynn SE, Chadwick GL, Kempes CP, Orphan VJ. Single cell activity reveals direct electron transfer in methanotrophic consortia[J]. *Nature*, 2015, 526(7574): 531-535
- [64] Lan F, Demaree B, Ahmed N, Abate AR. Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(7): 640-646
- [65] Berthelot H, Duhamel S, L'Helguen S, Maguer JF, Wang S, Cetinić I, Cassar N. NanoSIMS single cell analyses reveal the contrasting nitrogen sources for small phytoplankton[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13: 651-662
- [66] Haroon MF, Hu SH, Shi Y, Imelfort M, Keller J, Hugenholtz P, Yuan ZG, Tyson GW. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage[J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 567-570
- [67] Beal EJ, House CH, Orphan VJ. Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation[J]. *Science*, 2009, 325(5937): 184-187
- [68] Egger M, Rasigraf O, Sapart CJ, Jilbert T, Jetten MSM, Röckmann T, Van Der Veen C, Bândă N, Kartal B, Ettwig KF, et al. Iron-mediated anaerobic oxidation of

- methane in brackish coastal sediments[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(1): 277-283
- [69] Bar-Or I, Elvert M, Eckert W, Kushmaro A, Vigderovich H, Zhu QZ, Ben-Dov E, Sivan O. 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
- [70] Cai C, Leu AO, Xie GJ, Guo JH, Feng YX, Zhao JX, Tyson GW, Yuan ZG, Hu SH. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction[J]. The ISME Journal, 2018, 12(8): 1929-1939
- [71] Devol AH, Ahmed SI. Are high rates of sulphate reduction associated with anaerobic oxidation of methane?[J]. Nature, 1981, 291(5814): 407-408
- [72] Boetius A, Ravensschlag K, Schubert CJ, Rickert D, Widdel F, Gieseke A, Amann R, Jørgensen BB, Witte U, Pfannkuche O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane[J]. Nature, 2000, 407(6804): 623-626
- [73] Hoehler TM, Alperin MJ, Albert DB, Martens CS. 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
- [74] Muyzer G, Stams AJM. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(6): 441-454
- [75] Wang YZ, Wegener G, Hou JL, Wang FP, Xiao X. Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of archaea[J]. Nature Microbiology, 2019, 4(4): 595-602
- [76] Scheller S, Yu H, Chadwick GL, McGlynn SE, Orphan VJ. Artificial electron acceptors decouple archaeal methane oxidation from sulfate reduction[J]. Science, 2016, 351(6274): 703-707
- [77] Valenzuela EI, Prieto-Davó A, López-Lozano NE, Hernández-Eligio A, Vega-Alvarado L, Juárez K, García-González AS, López MG, Cervantes FJ. Anaerobic methane oxidation driven by microbial reduction of natural organic matter in a tropical wetland[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(11): e00645-17
- [78] Bai YN, Wang XN, Wu J, Lu YZ, Fu L, Zhang F, Lau TC, Zeng RJ. Humic substances as electron acceptors for anaerobic oxidation of methane driven by ANME-2d[J]. Water Research, 2019, 164: 114935
- [79] Girguis PR, Orphan VJ, Hallam SJ, DeLong EF. Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic archaea in a continuous-flow bioreactor[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5472-5482
- [80] Meulepas RJW, Jagersma CG, Khadem AF, Buisman CJN, Stams AJM, Lens PNL. Effect of environmental conditions on sulfate reduction with methane as electron donor by an Eckemförde Bay enrichment[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(17): 6553-6559
- [81] Holler T, Wegener G, Niemann H, Deusner C, Ferdelman TG, Boetius A, Brunner B, Widdel F. Carbon and sulfur back flux during anaerobic microbial oxidation of methane and coupled sulfate reduction[J]. PNAS, 2011, 108(52): E1484-E1490
- [82] Zhang J, Dong HL, Liu D, Fischer TB, Wang S, Huang LQ. Microbial reduction of Fe(III) in illite-smectite minerals by methanogen *Methanosarcina mazei*[J]. Chemical Geology, 2012, 292/293: 35-44
- [83] Yamada C, Kato S, Kimura S, Ishii M, Igarashi Y. Reduction of Fe(III) oxides by phylogenetically and physiologically diverse thermophilic methanogens[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 89(3): 637-645
- [84] Valenzuela EI, Padilla-Loma C, Gómez-Hernández N, López-Lozano NE, Casas-Flores S, Cervantes FJ. Humic substances mediate anaerobic methane oxidation linked to nitrous oxide reduction in wetland sediments[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 587
- [85] Dekas AE, Poretsky RS, Orphan VJ. Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia[J]. Science, 2009, 326(5951): 422-426
- [86] Dekas AE, Chadwick GL, Bowles MW, Joye SB, Orphan VJ. Spatial distribution of nitrogen fixation in methane seep sediment and the role of the ANME archaea[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(10): 3012-3029