

黄睿, 唐楚言, 宋元旭, 刘丽娜, 赵雅梦, 陈佳哲, 石志睿, 李晓玲, 闫震. 产甲烷古菌与电子传递体相互作用机制研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2023, 29 (2): 271-280

Huang R, Tang CY, Song YX, Liu LN, Zhao YM, Chen JZ, Shi ZR, Li XL, Yan Z. Research progress on the interaction mechanisms between methanogenic archaea and electron mediators [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2023, 29 (2): 271-280

产甲烷古菌与电子传递体相互作用机制研究进展

黄睿^{1#} 唐楚言^{1#} 宋元旭¹ 刘丽娜¹ 赵雅梦¹ 陈佳哲¹ 石志睿¹ 李晓玲² 闫震^{1,3✉}

¹山东大学环境科学与工程学院, 山东省水环境污染控制与资源化重点实验室 青岛 266237

²梧州学院食品与制药工程学院 梧州 543002

³山东大学苏州研究院 苏州 215123

摘要 厌氧消化是实现有机废弃物资源化最有效的技术之一, 实现形式是产生生物沼气. 作为一种清洁能源, 生物沼气可以有效减少化石燃料的使用, 进而减少温室气体的排放. 产甲烷古菌位于厌氧发酵链末端, 是生物沼气主要成分甲烷的直接生产者. 在厌氧消化系统中, 产甲烷古菌与发酵链前端微生物以及各种天然和人工电子传递体存在着活跃的电子互营过程, 对于维持厌氧消化系统的稳定性和改善生物沼气的生成效率具有重要作用. 本文综述近年来报道的在强化厌氧消化过程中常用的铁基与碳基电子传递体与产甲烷古菌的相互作用机制, 着重介绍两类电子传递体通过自身氧化还原反应或物理性质与产甲烷古菌细胞膜上的氢酶和细胞色素c进行电子互营的微观作用机理, 分析两类电子传递体通过参与胞外电子传递过程与产甲烷古菌能量代谢可能存在的耦合机制, 其中乙酸型产甲烷古菌基于电子歧化传递在进行胞外三价铁呼吸过程中存储能量, 从而增强产甲烷代谢, 改变了目前对甲烷生成的生化和生态学理解, 极大推进了产甲烷古菌与胞外电子传递体相互作用的研究. 产甲烷古菌胞外电子传递路径的不清晰和其细胞膜上蛋白功能的不确定是制约产甲烷古菌与电子传递体相互作用机制研究的重要因素. 因此提出利用快速发展的分子生物学如基因敲除以及荧光标记等技术进一步深入研究产甲烷古菌与电子传递体相互作用机制的可能性和新思路. (图5 表1 参102)

关键词 厌氧消化; 产甲烷古菌; 电子传递体; 胞外电子传递; 能量代谢

Research progress on the interaction mechanisms between methanogenic archaea and electron mediators

HUANG Rui^{1#}, TANG Chuyan^{1#}, SONG Yuanxu¹, LIU Lina¹, ZHAO Yameng¹, CHEN Jiazhe¹, SHI Zhirui¹, LI Xiaoling² & YAN Zhen^{1,3✉}

¹Shandong Key Laboratory of Water Pollution Control and Resource Reuse, School of Environmental Science and Engineering, Shandong University, Qingdao 266237, China

²Food and Pharmaceutical Engineering College, Wuzhou University, Wuzhou 543002, China

³Suzhou Research Institute, Shandong University, Suzhou 215123, China

Abstract Anaerobic digestion is one of the most effective technologies for recycling the organic waste in the form of biogas. Biogas is a clean energy that can effectively reduce the use of fossil fuels and thus reduce greenhouse gas emissions. Methanogenic archaea are located at the end of the anaerobic fermentation chain and are the direct producers of methane, the main component of biogas. In the anaerobic digestion system, there exists an active electronic interaction process between methanogen and microorganisms at the initial part of the fermentation chain, as well as various natural and artificial electron mediators, which play an important role in maintaining the stability of the anaerobic digestion system and improving the efficiency of biogas generation. We reviewed the interaction mechanisms between methanogenic archaea and iron-based and carbon-based electron mediators, which are two recently reported types of electron mediators commonly used in enhancing anaerobic digestion. We summarized the mechanisms of electron interaction between the two types of electron mediators and hydrogenase as well as cytochrome c on the cell membrane of methanogenic archaea through their redox reactions or physical properties and aimed to analyze the possible coupling mechanism between the two types of electron mediators and energy metabolism of methanogenic archaea through their participation in the extracellular electron transfer process. Among them, acetate-utilizing methanogens conserve energy through electron bifurcation by Fe(III)-dependent respiratory metabolism of acetate, augmenting production of methane. These results transform the ecological and biochemical understanding of methanogenesis. The unclear extracellular electron transfer pathway of methanogenic archaea

收稿日期 Received: 2022-09-01 接受日期 Accepted: 2023-03-28

国家自然科学基金青年基金项目(22008142)、江苏省自然科学基金项目(BK20200232)以及山东省生态环境厅和山东大学齐鲁青年人才计划项目资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (22008142), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20200232), and Department of Ecology and Environment of Shandong Province and the Qilu Youth Talent Program of Shandong University

共同第一作者 Co-first authors

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: yanzhen@email.sdu.edu.cn)

and the uncertain function of proteins on their cell membrane are important factors that restrict the study of the interaction mechanism between methanogenic archaea and electron mediators. The review highlights the prospects of using rapidly developing molecular biology, such as gene knockout, and fluorescent labeling techniques to further study the interaction mechanism between methanogenic archaea and electron mediators.

Keywords anaerobic digestion; methanogenic archaea; electronic mediator; extracellular electron transfer; energy metabolism

厌氧消化是实现有机废物资源化最有效的技术之一,被广泛应用于污水、畜禽粪便、工业和城市有机固废等的处理^[1-2]。有机废物经厌氧消化处理而实现资源化的主要形式是产生生物沼气,其主要成分是可燃气体甲烷。生物沼气是目前应用极为广泛的可再生能源之一,对于减少化石能源的使用、降低温室气体的排放,实现“双碳”目标具有重要的现实意义。

在厌氧消化过程中,甲烷气体由位于厌氧发酵链末端的一类严格厌氧微生物,即产甲烷古菌所产生。有机物经厌氧发酵链前端的水解细菌与酸化细菌降解为 H_2 、 CO_2 、甲酸和乙酸等产物后,产甲烷古菌可利用产甲烷代谢途径将上述产物甲烷化,而甲烷化过程可以耦合细胞膜的电子传递磷酸化,为产甲烷古菌的生长提供能量^[3]。因此,通过调控产甲烷古菌的胞外电子传递过程,进而强化产甲烷代谢途径,是提升厌氧消化工程生物沼气生成效率以及维持其稳定性最常用的手段之一。

电子传递体是一类可以介导电子传递的物质,而电子穿梭体是其中非常重要的一类,可通过自身氧化还原介导电子转移,在自然界中广泛存在^[4]。电子传递体可以加速微生物向细胞外传递电子,参与元素的环境地球化学过程,对微生物在环境中的行为影响深远^[5]。产甲烷古菌的胞外电子传递过程可分为两种类型:一种是与水解、酸化细菌之间发生的种间电子传递(interspecies electron transfer, IET),另一种是与电子传递体之间发生的直接电子传递(direct electron transfer, DET)^[6]。IET过程在20世纪80年代被提出,经过几十年的广泛研究,具体机制已被深入了解,主要由导电菌毛与细胞色素c介导实现,在Summers、Rotaru、Lovley等的文章^[7-9]中已有相关证明;近些年产甲烷古菌的DET研究也取得了长足的进步,但还鲜见有综述文章对其进行梳理。基于此,本文主要综述在强化厌氧消化过程中常用的两类电子传递体,即铁基和碳基电子传递体与产甲烷古菌的相互作用机制,总结目前报道的两类电子传递体参与产甲烷古菌胞外电子传递及其能量代谢影响机理,为基于外源投加电子传递体增强厌氧消化系统稳定性、调控自然与人工厌氧环境中甲烷的生成提供策略依据。

1 产甲烷代谢途径耦合细胞膜电子传递

产甲烷古菌是专性的甲烷生产者,意味着它们唯一的能量储存系统来源于产甲烷代谢途径。根据产甲烷古菌可利用的底物,可将其产甲烷代谢途径分为3类: H_2/CO_2 型代谢途径、乙酸型代谢途径和甲基营养型代谢途径。 H_2/CO_2 型代谢途径主要通过 H_2 还原 CO_2 来产生甲烷^[10];乙酸型代谢途径通过发酵乙酸产生甲烷^[11];甲基型代谢途径通过甲基化合物本身的歧化作用产生甲烷或者通过 H_2 还原甲基化合物中的甲基来产甲烷^[12]。

对于3种类型的产甲烷古菌来说,氢营养型产甲烷古菌极大影响了厌氧消化过程的持续进行,因为其能够以 H_2 为电子供体产生电子还原 CO_2 为甲烷(图1),该过程能有效消耗体系内的氢气。低水平的氢分压可以使水解和酸化反应在热力学上更易发生,从而保证厌氧消化过程更为顺利地进行^[13]。

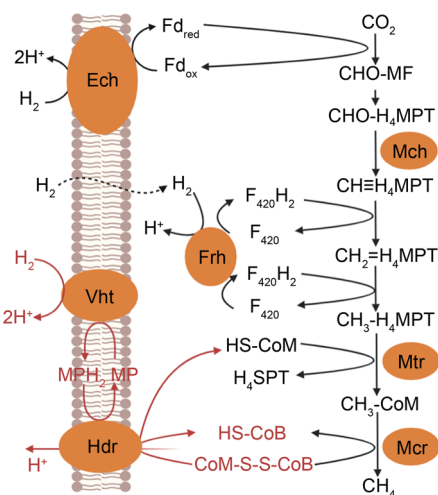


图1 H_2/CO_2 型代谢途径及电子传递链。

Fig. 1 H_2/CO_2 methanogenesis and electron transport chain.

上述过程是由一些氢酶所介导,首先还原态铁氧化还原蛋白(ferredoxin, Fd) Fd_{red} 作为能量输入参与到 CO_2 的还原过程,被用于还原 CO_2 为甲酰基($-CHO$)并共价附着于 C_1 载体甲酰呋喃(MF),形成甲酰呋喃($CHO-MF$)以及氧化态铁氧化还原蛋白 Fd_{ox} 。随后,在 H_2 为电子供体条件下,膜结合的能量转化氢酶(Ech)催化还原 Fd_{ox} 为 Fd_{red} ,此过程为耗能步骤,需要耦合反向电子流^[14]。之后甲酰基被转移到另一个 C_1 载体四氢甲酰呋喃(H_4MPT)上,并通过甲酰四氢甲酰呋喃环化水解酶(Mch)催化的缩合反应形成 $CH\equiv H_4MPT$ 。在形成 $CH\equiv H_4MPT$ 后随之而来的是两个还原步骤,该步骤均以还原态辅酶 F_{420} ($F_{420}H_2$)为电子供体,将 $CH\equiv H_4MPT$ 还原为甲基四氢甲酰呋喃(CH_3-H_4MPT)。最后, CH_3-H_4MPT 中的甲基被辅酶M甲基转移酶(Mtr)放能转移到辅酶M($HS-CoM$)的硫醇基上形成甲基辅酶M($CH_3-S-CoM$)^[15],并最终辅酶B($HS-CoB$)中的硫醇基为电子供体,被甲基辅酶M还原酶(Mcr)还原为甲烷和二硫化物 $CoB-S-S-CoM$ ^[11, 16]。

目前只发现Methanosarcina和Methanosaeta能够利用乙酸途径产甲烷^[17-18],此外,在标准条件下乙酸途径在3种已知的产甲烷代谢途径中具有最高的自由能($\Delta G^\circ_{乙酸} = -36$ kJ/mol甲烷, $\Delta G^\circ_{甲基} = -106$ kJ/mol甲烷, $\Delta G^\circ_{H_2/CO_2} = -131$ kJ/mol甲烷)^[19],最不利于甲烷的产生,因此乙酸型产甲烷古菌有自身的能量保存方式。而对于不同的乙酸型产甲烷古菌,其乙酸代谢途径大致相同(图2)。首先是乙酸在ATP的供能下被激活转化为乙酰辅酶A($CH_3CO-CoA$)^[20],随后一氧化碳脱氢酶/乙酰辅酶A合成酶复合体(Codh/Acs)进一步裂解 $CH_3CO-CoA$,剪切其中的C—C以及C—S键生成酶结合的[CO]以及甲基^[18],并且在转移甲基到四氢八叠甲酰呋喃(H_4SPT)形成甲基四氢八叠甲酰呋喃(CH_3-H_4SPT)的同时以 Fd_{ox} 为电子受体氧化[CO]生成 CO_2 和 Fd_{red} ^[14]。最后,与氢营养型产甲烷代谢途径类似,形成的 CH_3-H_4SPT 在Mtr以及Mcr的作用下转移并

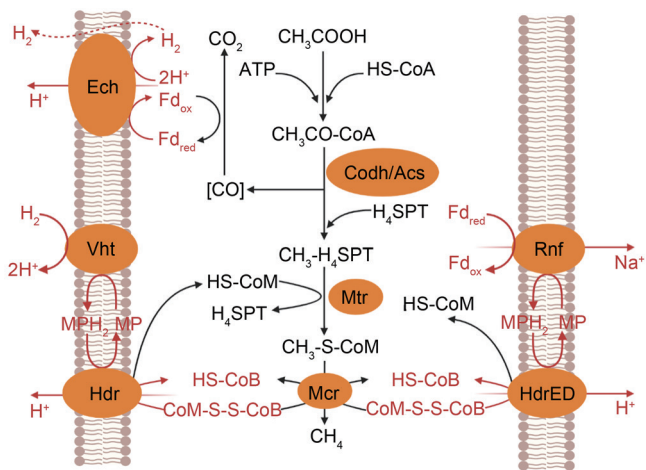


图2 乙酸型代谢途径及电子传递链。

Fig. 2 The pathways and electron transfer chains of acetogenic methanogenesis and electron transport chain.

还原甲基生成甲烷。

与绝大多数微生物类似,产甲烷古菌的生长以及细胞状态的维持需要代谢过程提供能量。然而产甲烷古菌并不能通过底物水平磷酸化产生ATP供能,其能量主要依赖于跨膜离子(氢离子和钠离子)浓度梯度驱动的ATP合成^[21]。跨膜离子浓度梯度的产生在不同的产甲烷古菌中各不相同,尤其在含有细胞色素和不含细胞色素的产甲烷古菌中差异巨大。在不含细胞色素的产甲烷古菌中,甲基的转运过程是储能关键,Mtr转移甲基到HS-CoM的过程是产甲烷代谢过程中为数不多的放能过程,可以支撑钠离子的跨膜转运形成离子动力^[22]。此外,此类不含细胞色素的产甲烷古菌还可以通过基于黄素的电子歧化路径(flavin-based electron bifurcation, FBEB)来产生钠离子浓度梯度^[23-24],这一路径由甲基紫精还原氢酶(Mvh)-异质二硫化物还原酶(Hdr)复合物共同催化,MvhADG催化H₂的氧化而HdrABC催化CoB-S-S-CoM以及Fd_{ox}的还原^[23, 25]。产生的Fd_{red}能够参与到H₂/CO₂型代谢途径第一步的CO₂还原,使FBEB路径连接整个产甲烷代谢过程,驱动Mtr转运钠离子产生跨膜离子浓度梯度。

含有细胞色素的产甲烷古菌则有着更为丰富的跨膜离子浓度梯度产生方式,可以通过膜结合的电子传递链产生跨膜氢离子浓度梯度^[24, 26]。根据是否利用H₂作为电子载体可以将电子传递链分为氢气依赖型和非氢气依赖型,两种电子传递链将各种来源的电子传递到膜醌类电子载体甲基吩嗪(MP)中形成MPH₂,最终膜结合的复合体HdrED以MPH₂为电子供体还原CoB-S-S-CoM形成产甲烷代谢途径关键底物HS-CoB和HS-CoM^[27],该过程可以直接驱动氢离子的跨膜转运,形成膜外的高能氢离子浓度梯度(图1和2)。膜结合复合体HdrED是Hdr的另一种类型,与HdrABC不同,其含有一个细胞色素,通过细胞色素和MP来传递电子^[28],HdrED的存在使得膜电子传递链和产甲烷代谢相耦合。尽管电子最终汇集到HdrED中,两种电子传递链却有着不同的电子传递路径,对于氢气依赖型电子传递链来说,含有细胞色素的氢酶是传递电子的关键组分。在H₂存在条件下,膜结合的甲基吩嗪还原氢酶(Vht)能够氧化H₂为氢离子,在形成额外氢离子浓度梯度的同时,可以将产生的电子通过含有细胞色素b的亚基(VhtC)传递到MP中并最终用于还原CoB-S-S-CoM^[27, 29](图1)。值得一提的是,一些*Methanosarcina*属的产甲烷古菌(例如*Methanosarcina barkeri*)在没有H₂作为电子供体条

件下可以利用Ech产生H₂。Ech是一种可逆酶,能够氧化Fd_{red}并导致H₂的生成以及氢离子的跨膜转运^[30],产生的H₂随后通过Vht参与到氢气依赖型电子传递链中(图2)。此外,在一些*Methanosarcina*属的产甲烷古菌中(例如*Methanosarcina acetivorans*)存在非氢气依赖型的电子传递路径:[CO]氧化成CO₂过程产生的Fd_{red}作为主要的电子供体,其中的电子被膜结合的复合体Rnf传递到MP,并最终传递到HdrED中用于还原CoB-S-S-CoM^[31],复合体Rnf在传递电子的过程中能够转运钠离子到膜外,形成离子动力并驱动ATP的合成^[31](图2)。复合体Rnf的存在是*Methanosarcina*不同于其他产甲烷古菌的主要原因,另外复合体Rnf广泛存在于细菌中,具有催化Fd_{red}: NAD⁺氧化还原酶活性的特征^[32],然而产甲烷古菌*Methanosarcina*中的复合体Rnf却不具备催化NADH/NAD⁺的活性,而是结合于细胞膜上,含有细胞色素c且能够将电子传递到电子载体MP^[33]。

2 铁基电子传递体与产甲烷古菌的相互作用机制

铁元素是地球上十分丰富的金属元素,主要以单质、矿物质或离子形式存在于水圈和岩石圈。而在海洋、沉积物等厌氧或缺氧的环境中,铁元素常常形成二价和三价的铁氧化物,包括菱铁矿、蓝铁矿、磁铁矿、水合氧化铁等。某些铁氧化物因其具有特殊的晶体性质能够接受或者传递电子,这一类铁氧化物化合物可以被称为铁基电子传递体,其中,同时具备氧化和还原两种特性的铁氧化物被称为铁基电子穿梭体。铁基电子传递体被发现能参与产甲烷古菌的胞外电子传递,影响其产甲烷代谢过程,也因此被广泛用于强化厌氧消化过程。然而因为厌氧消化过程中微生物种类复杂,微生物与微生物之间作用繁多,铁基电子传递体与产甲烷古菌的相互作用机制难以解析。为了探究其相互作用机制,许多研究者通过外源添加铁基电子传递体到产甲烷古菌纯培养体系,解析了铁基电子传递体与产甲烷古菌之间可能的作用机制。

2.1 铁基电子传递体可以作为电子受体参与产甲烷古菌胞外电子传递

2002年,Lovley等首次研究了5种中温产甲烷古菌对Fe(III)氧化物的还原能力,结果表明,以H₂为底物的*Methanosarcina barkeri*和*Methanococcus voltaei*均能显著地还原Fe(III),且在还原过程中,甲烷的生成受到抑制^[34],这证明了产甲烷过程中的电子被转移到细胞外的Fe(III)氧化物中。基于这一现象,Lovley等人首次提出了在胞外Fe(III)存在条件下,电子从产甲烷古菌流入Fe(III)的假说,在此假说中,氢酶起到了关键作用,氢酶能氧化H₂释放质子和两个电子,电子最终转移到CH₃-S-CoM中生成CH₄,这是在大多数氢营养型产甲烷古菌中普遍存在的^[35]。但当存在Fe(III)时,氧化H₂释放的电子可能会转移到胞外Fe(III),进而还原Fe(III),电子的分流最终导致甲烷产量下降。此外,他们的研究中还发现所有被试产甲烷古菌在Fe(III)还原条件下的氢分压都远低于正常生长条件,这也间接证明了氢酶在其中的重要作用。在此之后,大量研究者研究了各种产甲烷古菌以不同的电子供体还原铁氧化物的能力(表1)。与前者现象类似,当H₂作为电子供体时,几乎所有研究都观察到产甲烷古菌对Fe(III)的还原,而且*M. barkeri*和*Methanothermobacter thermautotrophicus*不但可以还原绿脱石和黏土矿物中的结构性Fe(III),H₂的消耗还与Fe(II)的产量成化学计量比^[37-38];此外,在H₂条件下*Methanosarcina*

*thermophila*的细胞可以还原水合氧化铁并在其表面产生二次矿化产物磁铁矿^[39]。以上所有的研究都表现出H₂氧化与Fe(III)还原之间的耦合作用,揭示了氢酶可能是铁基电子传递体与产甲烷古菌之间发生胞外电子传递的关键物质。

值得一提的, Divya Prakash等的研究发现水合氧化铁可以促进*M. acetivorans*的生长、醋酸盐的利用和产甲烷^[40],这与其他报道的抑制作用相反,他们将其归因于培养基氧化还原电位的增加以及来自F₄₂₀H₂的电子歧化(EB)导致Fd和CoM-S-S-CoB的还原以节省用于产甲烷过程的电子。

2.2 铁基电子传递体可能通过细胞色素c介导产甲烷古菌胞外电子传递

尽管氢酶可能在产甲烷古菌的胞外电子传递中发挥作用,但是目前并没有直接的证据证明,此外,产甲烷古菌的胞外电子传递途径仍然不明确。根据研究,电子转移到胞外Fe(III)可能有两种途径:第一种是间接方式,利用氧化还原化学物质(例如外源AQDS或者内源MP)传递电子^[34-45];第二种是直接方式,通过位于细胞膜上的氧化还原蛋白(如细胞色素c)直接介导电子传递到铁基电子传递体中^[46]。最近, Divya Prakash^[40]发现以乙酸为底物的产甲烷古菌*M. acetivorans*可以通过细胞色素c进行依赖Fe(III)的胞外呼吸,并提出了一种生物化学还原水合氧化铁的途径(图3):乙酸代谢途径和EB途径产生的F_{d,red}被膜结合的复合体Rnf氧化,然后通过Rnf结合的多血红素细胞色素c(MHC),将氧化F_{d,red}产生的电子转移到胞外的水合氧化铁,最终完成对Fe(III)的还原。这是一种新型的产甲烷古菌胞外电子传递途径,而细胞膜结合的MHC可能在这一途径中发挥了重要作用。MHC广泛分布于*Geobacter*和*Shewanella*等Fe(III)还原细菌中^[47-49],由于

血红素或铁卟啉的存在,MHC可能参与电子向不溶性或可溶性Fe(III)转移的过程^[50-51]。*M. acetivorans*与Fe(III)还原菌在MHC上的相似性支持*M. acetivorans*向胞外水合氧化铁传递电子,并随后被其体外实验证实^[47]。此外,MHC介导的胞外电子传递与钠离子的转运耦合,转运效率约为2个钠离子/还原1个Fe(III),这比解乙酸过程的转运效率更高^[31, 47],钠离子的高效转运增强了依赖钠离子/氢离子浓度梯度的ATP合成,从而加速*M. acetivorans*的生长和产甲烷。在以前的研究中,水合氧化铁的还原几乎只发生在保留氢酶的产甲烷古菌中以及在H₂条件下^[39, 42],其胞外电子传递似乎与氢酶偶联,然而上述研

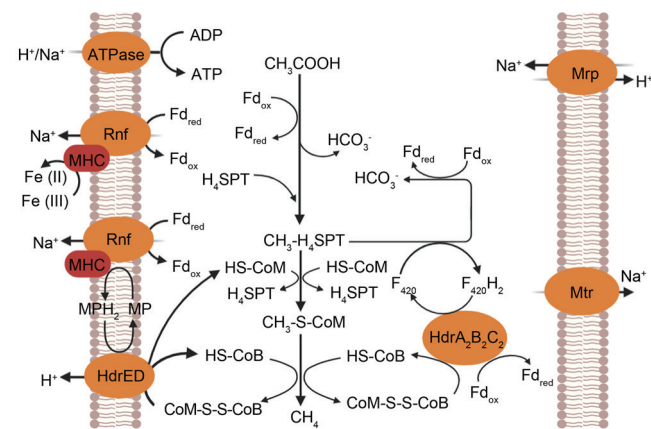


图3 *Methanosarcina acetivorans*还原水合氧化铁途径(根据文献[40]修改制作)。

Fig. 3 The pathways of ferrihydrite reduction by *Methanosarcina acetivorans* (modified from Ref [40]).

表1 产甲烷古菌对铁氧化合物的还原

Table 1 Methanogen-mediated reduction of iron oxides

产甲烷古菌 Methanogenic archaea	基质 Substrate	铁氧化合物 Ferric oxide	产甲烷影响 Effects on methanogenesis	Fe(III)还原 Fe(III) reduction	参考文献 Reference
<i>Methanosarcina barkeri</i>	H ₂ /CO ₂	赤铁矿/针铁矿/非晶氢氧化铁/绿脱石中的结构性Fe(III) Hematite/goethite/amorphous Fe(OH) ₃ /structural Fe(III) in chlorite	抑制 Inhibition	Fe(II)	[34, 37, 41]
<i>Methanosarcina barkeri</i>	乙酸盐 Acetate	非晶氢氧化铁 Amorphous Fe(OH) ₃	抑制 Inhibition	未还原 Unreduced	[41]
<i>Methanosarcina barkeri</i>	乙酸盐 Acetate	绿脱石中的结构性Fe(III) Structural Fe(III) in chlorite	/	未还原 Unreduced	[37]
<i>Methanosarcina barkeri</i>	甲醇 Methanol	绿脱石中的结构性Fe(III) Structural Fe(III) in chlorite	先抑制后促进 Inhibit first and promote later	Fe(II)	[37]
<i>Methanosarcina barkeri</i>	有机物和酵母提取物 Organic matter and yeast extract	寡晶型水合氧化铁 Poorly crystalline ferrihydrite	/	Fe(II)	[42]
<i>Methanococcus voltaei</i>	H ₂ /CO ₂	赤铁矿/针铁矿 Hematite/goethite	抑制 Inhibition	Fe(II)	[34]
<i>Methanospirillum hungatei</i>	H ₂ /CO ₂	非晶氢氧化铁 Amorphous Fe(OH) ₃	抑制 Inhibition	/	[41]
<i>Methanosaeta concilii</i>	乙酸盐 Acetate	非晶氢氧化铁 Amorphous Fe(OH) ₃	抑制 Inhibition	/	[41]
<i>Methanosarcina mazei</i>	甲醇 Methanol	伊利蒙脱石矿物中的结构铁 Fe(III) in illite-smectite minerals	抑制 Inhibition	Fe(II)	[43]
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	乙酸盐 Acetate	水合氧化铁 Ferrihydrite	促进 Promotion	Fe(II)	[40]
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	H ₂ /CO ₂	蒙脱石矿物中的结构性Fe(III)/水合氧化铁 Fe(III) in smectite minerals/ ferrihydrite	抑制 Inhibition	Fe(II)	[38-39]
<i>Methanosaeta thermophila</i>	乙酸盐 Acetate	水合氧化铁 Ferrihydrite	完全抑制 Complete inhibition	未还原 Unreduced	[39]
<i>Methanosarcina thermophila</i>	甲醇和H ₂ /CO ₂ Methanol and H ₂ /CO ₂	水合氧化铁 Ferrihydrite	轻微抑制 Mild inhibition	Fe(II)	[39]
<i>Methanosarcina thermophila</i>	H ₂ /CO ₂	水合氧化铁 Ferrihydrite	完全抑制 Complete inhibition	Fe(II)	[39]
<i>Methanosarcina thermophila</i>	乙酸盐 Acetate	水合氧化铁 Ferrihydrite	完全抑制 Complete inhibition	未还原 Unreduced	[39]
<i>Thermophilic Methanogenic Community</i>	乙酸盐 Acetate	水合氧化铁 Ferrihydrite	抑制 Inhibition	Fe(II)	[44]

究却展现出不同的结果。*M. acetivorans*不含氢酶,无法利用氢气生长^[52],只能利用细胞色素c通过非氢气依赖型电子传递路径获得能量^[53],Divya Prakash的发现肯定了细胞色素c在传递胞外电子的重要作用,揭示了基于细胞色素c的铁基电子传递体与产甲烷古菌的相互作用机制。

2.3 铁基电子传递体零价铁(ZVI)可充当产甲烷古菌代谢的电子供体,并促进其胞外电子传递

零价铁(ZVI)是一种具有强烈还原性质的铁单质,尽管不同于铁氧化物能够通过Fe的价态变化接受或者传递电子,但是研究表明其可以作为电子供体被产甲烷古菌所利用^[54],该过程同样涉及产甲烷古菌的胞外电子传递。1987年,Dinnel首次发现在厌氧环境中,产甲烷古菌利用ZVI中的电子进行产甲烷代谢活动,产生甲烷并引起铁的腐蚀^[54]。其电子传递机制可以概括为产甲烷过程偶联阴极去极化过程。简单来说,在厌氧环境中,ZVI和周围的水环境可以看成是一个电化学系统,阳极中的Fe⁰被氧化成Fe²⁺并释放电子,电子在阴极上化学还原水中的质子产生阴极氢,阴极氢气作为电子载体,胞外转移到产甲烷古菌周围并最终用于产甲烷代谢^[55]。这种间接电子传递过程广泛存在于氢营养型产甲烷古菌中,需要阴极氢气作为电子介质。然而,Dinh分离出一个新的产甲烷古菌株IM1,该菌株表现出了从Fe⁰中直接吸收电子并用于产甲烷的能力^[56]。当ZVI作为唯一的电子供体时,新菌株IM1的产甲烷能力明显优于已被鉴定的产甲烷古菌*Methanococcus maripaludis*、*Methanogenium organophilum*和*M. mazei*,且前者的产甲烷速率符合阴极氢气的二次消耗速率,这说明一定存在一种更有效的途径使IM1从Fe⁰中获得电子。他们因此提出了菌株IM1通过细胞表面的氧化还原活性成分从Fe⁰中直接摄取电子的假设。但是,该假设缺乏直接的证据支持及进一步研究。除纯培养产甲烷古菌外,ZVI还被报道可以作为厌氧污泥产甲烷的电子供体^[57]。同样,在厌氧污泥中添加ZVI产甲烷可能与产甲烷古菌利用阴极氢有关。此外,有研究发现ZVI在促进产甲烷古菌和厌氧菌间的IET中也起到了关键作用,例如ZVI增加了厌氧污泥中假单胞菌和产甲烷古菌等互养菌的相对丰度,并证明它们通过电子载体氢参与IET^[58]。硫化零价铁(S-mZVI)可富集厌氧消化中的DIET相关微生物,如*Syntrophomonas*和*Methanosarcina*^[59];ZVI可上调四氢甲基蝶呤、s-甲基转移酶等DIET相关酶的表达^[60]等等。这些研究结果都表明ZVI能够有效促进电子的传递,与产甲烷古菌有着丰富的作用机制。

2.4 磁铁矿通过充当氧化还原介质介导产甲烷古菌胞外电子传递,并促进其与共生菌的直接种间电子传递

MP是一种醌类电子载体,具有较低的电势以及氧化还原特性,能够偶联膜结合的电子传递链起到传递膜电子的作用。如产甲烷古菌*M. barkeri*可以在接近自然环境的条件(无氢气以及有限的基质)下还原水合氧化铁,添加吩嗪-1-羧酸(PCA)(亲水MP)后可以提高Fe(III)的还原速率,这表明电子传递体MP也可能在还原Fe(III)的胞外电子传递过程中起到了关键作用^[42]。然而,近年来有研究者发现磁铁矿也可能起到类似MP的作用,介导产甲烷古菌的胞外电子传递^[61]。磁铁矿含有Fe(II)和Fe(III),是一种具有较强导电性、较低电势的铁氧化物,电子在Fe的两种价态之间转移,使得磁铁矿具有了传递电子的功能^[61-62]。Wang等^[62]和Fu等^[61]研究发现当纳米磁铁矿添加到纯培养的*M. barkeri*和*Methanosarcina mazi*中,两种菌的乙酸型产甲烷过程被促进了,因为产甲烷古菌的产甲烷过程通常与膜结合的电子传递链耦合,所以磁铁矿有可能参与到产

甲烷古菌的膜电子传递链中。对于这两种产甲烷古菌,有一个共同的电子传递路径,即氢气依赖型电子传递路径^[63-64]。除此之外,*M. mazei*同时具有第二种依赖F₄₂₀H₂的电子传递途径^[62]。无论是哪一种路径电子都汇集到膜电子传递链上,电子在膜结合的氧化还原物质之间转移,使膜电量子化,成为一种“导电材料”^[65]。磁铁矿具有高导电性及高氧化还原活性,因此被推测在膜电子传递链中充当类似MP的电子载体作用或者通过细胞色素c连接膜电子传递链,促进并起到直接传递电子的作用(图4),产生更多能量从而强化产甲烷过程。

DIET在厌氧菌群中的主要作用形式是利用生物组分(细胞色素、导电菌毛)实现与细胞直接接触,从而进行细胞间的电子传递^[66]。磁铁矿作为良好的铁基电子穿梭体,不但可以参与膜电子的传递,也可以介导厌氧微生物的直接种间电子传递(DIET)^[67],无论是以乙酸、乙醇还是丙酸为底物,都有研究发现磁铁矿介导产甲烷古菌与其他厌氧微生物的DIET并促进了共培养产甲烷作用^[68-70]。磁铁矿在DIET中可能起到电子导管的作用,可以被看作是一种导电菌毛^[67-68],而另一项研究发现磁铁矿可能作为OmcS(一种细胞色素c),促进产甲烷古菌与共培养微生物之间的电接触和种间电子传递^[71]。虽然以上研究都没有直接的证据证明磁铁矿的具体作用,但这些实验结果极大地推进了铁基电子穿梭体与产甲烷古菌相互作用的研究。

3 碳基电子传递体与产甲烷古菌的相互作用机制

与铁基电子传递体类似,碳基电子传递体主要是一类能够传递电子的含碳单质或者有机物,比如人工合成的生物炭、活性炭等碳基材料以及自然界中的天然有机质腐殖质。碳基电子传递体通常十分稳定,具有较高的比表面积、吸附性能以及导电性^[72-73],因此常常被应用于厌氧消化过程。

3.1 碳基电子传递体可以促进产甲烷古菌与其他互养菌之间的直接种间电子传递

近年来,许多研究者发现碳基电子传递体能够有效强化厌氧消化过程,促进系统内基质的消耗以及甲烷的产生,例如Yuan等发现由稻草以及粪便制备的生物炭明显提高了厌氧消化的甲烷生成,其促进效率分别达到了10.7倍和12.3倍^[74];Yan等通过添加单壁碳纳米管加速稳定了高温厌氧消化的启动阶段,并发现添加碳纳米管组别的甲烷产量高出空白组近两倍^[75];Li等的研究显示导电碳布可以有效刺激乙酸型产甲烷古菌的活性,显著地促进湿地土壤的甲烷产量^[76]。当碳基电子传递体添加到厌氧消化反应器中,不可避免地会跟其中的厌氧微生物接触,而碳基电子传递体高导电的特点势必会增加微生物的活性以及之间的电联系,从而强化厌氧消化过程。因此,许多研究都表明强化机制是碳基电子传递体促进产甲烷古菌和其他互养菌之间的DIET作用。

碳基电子传递体具有较高的比表面积,可以提供更多的生存位点、更有利的细胞接触环境,能有效聚集产甲烷古菌与其他微生物,从而强化它们的DIET作用^[77]。比如导电碳布上可以附着厌氧污泥并且富集表面污泥中参与DIET的*Geobacter*和*Methanosarcina*属厌氧微生物。此外,导电碳布还可以将种间电子传递模式从种间氢气传递转化为DIET,提高反应器的抗酸能力,使之持续稳定产甲烷^[78];粒状活性炭添同样也可以提高厌氧污泥中*Geobacter*和*Methanosarcina*属的相对丰度,而且可以上调表达某些编码DIET相关蛋白(例如c型细胞色素OmcS和导电菌毛)的基因^[79]。除强化微

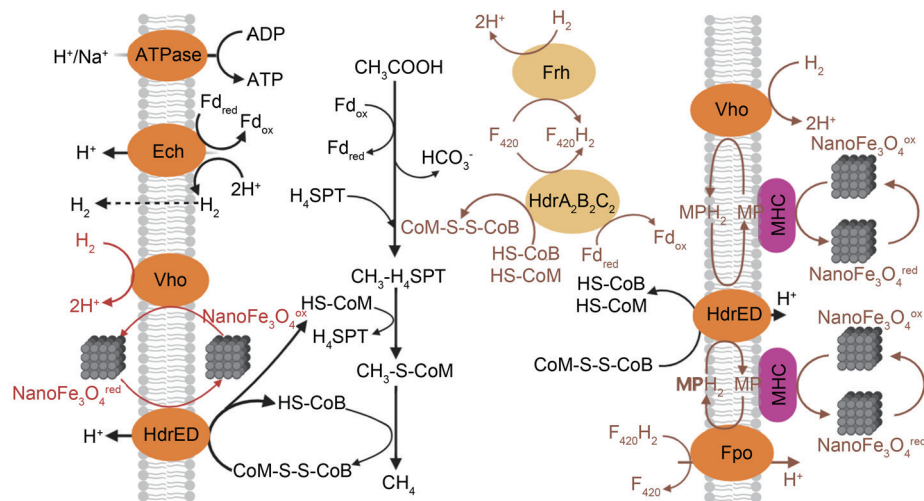


图4 纳米磁铁矿介导产甲烷古菌的电子传递途径(根据文献[61]修改制作)。

Fig. 4 The pathway of nanomagnetite-mediated electron transfer of methanogens (modified from Ref [61]).

生物间的DIET作用外,碳基电子传递体(例如生物炭、碳布、活性炭)还可以代替导电菌毛^[80-82]、OmcS等,构建非生物的导电通道来介导产甲烷古菌的DIET作用。这种作用在导电菌毛缺失的*Geobacter metallireducens*和*M. barkeri*的共培养实验中得到证实:只有在共培养物中添加导电碳布、活性炭才能消耗基质产生甲烷^[82-83],上述的结果充分说明了碳基电子传递体介导产甲烷古菌DIET的机制,相比较而言,通过碳基电子传递体构建的DIET在产甲烷过程中比生物接触建立的DIET更有效率^[84],这也同样是碳基电子传递体强化厌氧消化的主要原因之一。然而,碳基电子传递体与产甲烷古菌的作用机制研究更多停留在宏观层面,关于其对产甲烷古菌的胞外电子传递影响机制目前还存在许多的疑惑,还需要更多更深入的研究。

3.2 碳基电子穿梭体通过其表面醌基影响产甲烷古菌的胞外电子传递

最近,Yuan等的发现^[74]为探究碳基电子传递体对产甲烷古菌的胞外电子传递影响机制提供了一些新的思路。他们制备了3种生物炭(稻草RB、木屑WB以及粪便MB),发现MB极大地提高了产甲烷富集体系的甲烷产量,而WB对产甲烷影响不大。MB的导电性与WB差距不大,但是其含有大量的醌基,这说明生物炭中的醌基可能在促进甲烷产生中起到了重要的作用。生物炭是一种复杂的材料,除了高导电性外,其表面还具有多种氧化还原基团(例如醌基和氢醌)^[85]。这些氧化还原基团可以可逆地接受和给出电子形成“充放电循环”,对DIET中电子的转移过程有着极大的影响^[86-87]。一般来说,当生物炭中的O/C比例超过0.09,电子在生物炭中的转移模式就更趋向于通过氧化还原基团传递而不是通过导电作用直接传递^[87-88]。Yuan的研究中MB的O/C远远超过了0.09,说明生物炭中的醌基可能在电子传递过程中发挥着重要作用,加之MB显著地促进了甲烷产生,所以醌基可能作为电子载体参与并促进了产甲烷古菌的DIET,最终影响了产甲烷古菌的胞外电子传递过程。

除了生物炭,天然有机质腐殖质也同样含有大量的醌基^[89],能够介导微生物的胞外电子传递。有报道称腐殖质能作为电子受体被某些Fe(III)还原菌还原,该过程可以耦合能量代谢支撑微生物自身的生长^[90-91]。除此之外,产甲烷古菌也被报道可以还原腐殖质,*M. barkeri*以及*Methanosphaera cuniculi*的饥饿细胞可以在有电子供体(H_2 或者甲醇)条件下还原腐殖质,并且伴随着甲烷的产生^[34],这说明产甲烷过程中的电子可能通过胞外电子传递过程传递到腐殖质中,然而关于这一过程

以及涉及电子传递途径还存在许多疑惑,没有被完全证实。目前,只有少量腐殖质对混菌体系的产甲烷影响研究可以反映这一过程。Li等发现厌氧污泥中的腐殖质会抑制能量(甲烷)的转化效率,在添加腐殖酸VSS = 15%条件下,其厌氧消化的产甲烷效率降低了52.2%^[92];Efremenko等合成醌类(氢醌、萘醌或者甲苯对二酚)衍生物来修饰腐殖质,改变其氧化还原性质^[93]。他们研究了具有不同化学修饰的腐殖质对自由和固定化厌氧菌群的影响,发现含醌类化合物的腐殖质衍生物降低了细胞的能量状态和产甲烷效率,使生物沼气的组分产生变化,具体表现在甲烷含量降低,二氧化碳含量上升。上述结果表明腐殖质能有效降低混菌体系中甲烷的产量,尽管这可能由于腐殖质抑制了关键酶的活性^[92],但是更关键的或许是因为其电子受体的性质作用于产甲烷古菌,影响其胞外电子传递并接受产甲烷过程中的电子,最终降低了甲烷产量。

腐殖质结构十分复杂,研究起来非常困难,而许多研究者开始关注一种简单的腐殖酸类似物——蒽醌-2,6-二磺酸盐(AQDS),探究其对产甲烷古菌的影响,并以此窥探腐殖质对产甲烷古菌的作用机制。AQDS同样是碳基电子穿梭体,含有醌基基团且具有很高的氧化还原活性^[90, 94],一方面AQDS可以接受电子形成还原态(AQDSH₂),另一方面AQDSH₂也可以给出电子被氧化成AQDS。近年来,AQDS被报道可以被多种厌氧微生物还原,其中就包括产甲烷古菌。据报道,嗜热产甲烷古菌*Methanopyrus kandleri*、*Methanococcus thermolithotrophicus*和*Methanobacterium thermoautotrophicum*可以在65 °C条件下利用 H_2 还原AQDS^[95];嗜中温产甲烷古菌*Methanospirillum hungatei* JF1也可以 H_2 为电子供体还原AQDS^[96]。尽管没有证据表明AQDS的还原与产甲烷古菌的生长代谢耦合,但上述结果也能充分说明产甲烷古菌可以传递电子到AQDS中并介导其还原。除此之外,AQDS还被广泛地报道可以促进氢营养型产甲烷古菌对铁氧化化合物的还原,在其中可能充当电子穿梭体的作用^[39, 45]。基因证据显示在*Shewanella putrefaciens* MR还原AQDS的过程中,甲基萘醌起到了传递胞外电子的作用^[97],然而并没有报道产甲烷古菌含有此类物质,所以在产甲烷古菌还原AQDS过程中或许还存在其他的电子传递路径。一种可能的推测是氢酶介导胞外电子传递还原AQDS,因为几乎所有产甲烷古菌的还原过程都需要以 H_2 作为电子供体,此外,专性甲醇产甲烷古菌*Methanobolus vulcani* PL-12/IM在甲醇条件下无法还原

AQDS, 然而在H₂条件却产生了大量的还原^[34]。不过, 此类推测目前仍然缺少直接的证据, 后续还需要进行更深入的研究。

最近, Holmes等发现在产甲烷古菌*M. acetivorans*中, *MmcA*基因编码的细胞色素c在还原AQDS中起到了决定性作用^[98]。他们通过基因手段敲除掉*MmcA*基因后发现, 与野生型相比, 缺少*MmcA*基因的突变体在甲醇条件下对AQDS的还原几乎消失, 而在以甲醇为底物的纯培养中, 突变体的生长仅仅只是略微减缓, 以乙酸为底物的培养中也发现类似现象, 这说明*MmcA*虽然不是甲醇、乙酸产甲烷生长的必要成分, 却是*M. acetivorans*传递胞外电子到AQDS的关键部分。MHC是*MmcA*基因表达产物, 结合于细胞膜上的复合体Rnf, 可以将Rnf氧化F_{d_{red}}产生的电子传递到电子载体MP中^[31]。同时, 外界也广泛认为MHC的功能可能是参与胞外电子受体的末端电子转移, 与革兰氏阴性菌(如*Shewanella*和*Geobacter*)中外表面细胞色素c在胞外电子转移中的作用^[99-100]类似。Holmes的实验结果证明了这种可能性, 并且提出了*M. acetivorans*在AQDS作为胞外电子受体条件下的电子传递机制(图5): *M. acetivorans*氧化甲醇产生还原当量F₄₂₀H₂和F_{d_{red}}, 其中F_{d_{red}}被Rnf氧化, 产生的电子通过Rnf结合的MHC直接传递到AQDS中, 而F₄₂₀H₂被膜结合的复合体Fpo氧化, 产生的电子通过MP传递到MHC上, 进而用于还原AQDS。此外, 在MHC介导胞外电子传递过程中, Rnf氧化F_{d_{red}}能够耦合钠离子跨膜转运^[31, 101], MHC还原AQDS过程也可以转运质子^[102], 这两个过程产生的离子浓度梯度驱动ATP合成, 最终实现了*M. acetivorans*的胞外呼吸。然而大多数产甲烷古菌, 包括*Methanosarcina*中其他种, 都是缺少膜结合的MHC^[103], 这些缺少MHC的菌种是否还有其他的胞外电子传递机制还需要进一步的研究。尽管如此, 这些研究结果也充分揭示了碳基电子穿梭体AQDS对产甲烷古菌的作用机制, 也为探究腐殖质等醌类化合物对产甲烷古菌的作用机制提供了一定的指示作用。

4 结论与展望

产甲烷古菌的产甲烷过程耦合电子传递, 而胞外的电子传递体为产甲烷古菌的电子传递提供了一条全新的通路。根据电子传递体本身性质的不同, 其与产甲烷古菌的作用机制大体可以分为以下5种类型: (1) 电子传递体本身无变化, 仅作为导体参与胞外电子传递, 促进产甲烷古菌的IET和DET; (2) 电子传递体本身被还原, 作为电子受体与底物竞争电子, 且接受电子之后不能再次给出, 在促进产甲烷古菌生长的同时抑制了甲烷的产量; (3) 电子传递体作为电子受体, 可以通过

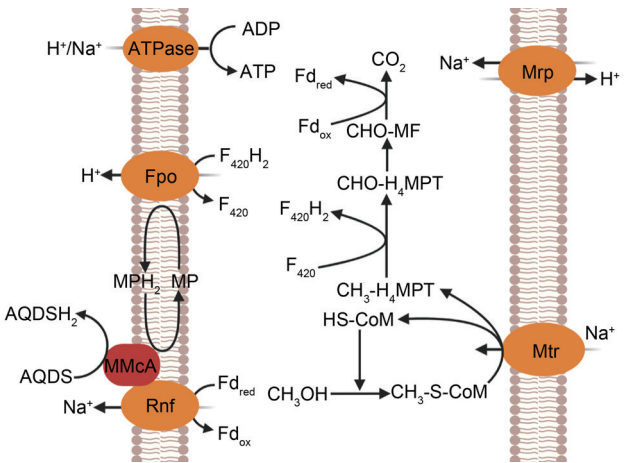


图5 *Methanosarcina acetivorans*还原AQDS途径(根据文献[98]修改制作)。 Fig. 5 The pathway of AQDS reduction by *Methanosarcina acetivorans* (modified from Ref [98]) .

电子分叉作用促进产甲烷古菌的生长和产甲烷; (4) 电子传递体作为电子供体被产甲烷古菌所利用; (5) 电子传递体通过自身或某些表面官能团(醌基等)的氧化还原传递电子, 即电子穿梭体的功能, 可以接受产甲烷古菌或其他细菌、古菌产生的电子被还原, 再将电子传递给底物产生甲烷的同时其本身氧化为原本的状态, 可以同时促进产甲烷古菌的生长和产甲烷。

在机制解析方面, 产甲烷古菌胞外电子传递路径尚不清晰, 细胞色素c、氢酶等产甲烷古菌细胞膜表面潜在的胞外电子传递介质具体功能还不确定, 这些都是制约产甲烷古菌与电子传递体相互作用机制研究和电子传递体进一步应用的因素。将某些编码氢酶和细胞色素c、控制产甲烷古菌细胞膜表面特定氧化还原物质生成的基因敲除, 可以验证探究其在胞外电子传递中的功能, 该过程需要考虑其他实验条件、基因之间的协同作用等。由于现代观测手段的欠缺, 目前很难对微生物代谢过程中电子的传递进行全过程监控, 若可以开发一种微观的电子观察方法或是运用荧光等方式对电子进行标记使电子传递过程可以被观察, 对于产甲烷古菌与电子传递体之间相互作用以及产甲烷古菌本身的生理生化性质进行更加深入、直观的研究都具有开创性意义。在工程应用方面, 绝大部分铁基、碳基电子传递体来源广泛价格低廉, 甚至可以利用固体废弃物进行转化获得。因此, 如何充分利用固体废弃物生产出稳定、高效的电子传递体, 以及如何对现有的电子传递体进行改性、修饰, 使其更适用于厌氧消化体系, 都极具研究意义。

缩略词 Abbreviations

缩略词 Abbreviation	中文全称 Chinese name	英文全称 English name
OmcS	c型细胞色素	c-type cytochrome
RB	稻草生物炭	Rice straw biochar
Rnf	红杆菌固氮复合物的同源物	Homolog of the <i>Rhodobacter</i> nitrogen fixation complex
MHC	多血红素细胞色素c	Multiheme cytochrome
AQDS	蒽醌-2,6-二磺酸盐	Anthraquinone-2,6-disulfonate
PCA	吩嗪-1-羧酸	Phenazine-1-carboxylic acid
MB	粪便生物炭	Manure biochar
HS-CoB	辅酶B	Coenzyme B
HS-CoM	辅酶M	Coenzyme M
Mtr	甲基转移酶	Methyltransferase
F ₄₂₀ H ₂	还原态辅酶F ₄₂₀	Reduced coenzyme F ₄₂₀
Fd _{red}	还原态铁氧还蛋白	Reduced ferredoxin
FBEB	基于黄素的电子歧化路径	Flavin-based electron bifurcation
MP	甲基吩嗪	Methanophenazine
Vht	甲基吩嗪还原酶	Methylphenazine reductase
MF	甲基呋喃	Methylfuran

缩略词 Abbreviations

缩略词 Abbreviation	中文全称 Chinese name	英文全称 English name
CH ₃ -S-CoM	甲基辅酶M	Methyl-coenzyme M
Mcr	甲基辅酶M还原酶	Methyl-coenzyme M reductase
CH ₃ -H ₄ SPT	甲基四氢八叠甲烷蝶呤	Methyl-tetrahydrosarcinapterin
CH ₃ -H ₄ MPT	甲基四氢甲烷蝶呤	N5-methyltetrahydromethanopterin
Mvh	甲基紫精还原氢酶	Methylviolet reductase
CHO-MF	甲酰呋喃	Formyl-methanofuran
-CHO	甲酰基	Formyl
Mch	甲酰四氢甲烷蝶呤环化水解酶	Methenyl-tetrahydromethanopterin cyclohydrolase
ZVI	零价铁	Zero-valent iron
S-mZVI	硫化零价铁	Sulfide-modified zero-valent iron
WB	木屑生物炭	Wood chips biochar
Ech	氢酶	Energy-converting hydrogenase
H ₄ SPT	四氢八叠甲烷蝶呤	Tetrahydrosarcinapterin
H ₄ MPT	四氢甲烷蝶呤	Tetrahydromethanopterin
Fd	铁氧还原蛋白	Ferredoxin
F _{dox}	氧化态铁氧还原蛋白	Oxidized ferredoxin
Codh	一氧化碳脱氢酶	Carbon monoxide dehydrogenase
CH ₃ CO-CoA	乙酰辅酶A	Acetyl coenzyme A
CoB-S-S-CoM	异质二硫化物	Heterodisulfide
Hdr	异质二硫化物还原酶	Heterodisulfide reductase
DET	直接电子传递	Direct electron transfer
DIET	直接种间电子传递	Direct interspecies electron transfer
IET	种间电子传递	Interspecies electron transfer

参考文献 [References]

- Klass DL. Methane from anaerobic fermentation [J]. *Science*, 1984, **223** (4640): 1021-1028
- Ren Y, Yu M, Wu C, Wang Q, Gao M, Huang Q, Liu Y. A comprehensive review on food waste anaerobic digestion: research updates and tendencies [J]. *Bioresour Technol*, 2018, **247**: 1069-1076
- Mand TD, Metcalf WW. Energy conservation and hydrogenase function in methanogenic archaea, in particular the genus *Methanosarcina* [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2019, **83** (4): doi 10.1128/MMBR.00020-19
- Van der Zee FP, Cervantes FJ. Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: a review [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, **27** (3): 256-277
- Ma JL, Ma C, Tang J, Zhou SG, Zhuang L. Mechanisms and applications of electron shuttle-mediated extracellular electron transfer [J]. *Process Chem*, 2015, **27** (12): 1833-1840
- Gao K, Lu Y. Putative extracellular electron transfer in methanogenic archaea [J]. *Front Microbiol*, 2021, **12**: 611739
- Summers ZM, Fogarty HE, Leang C, Franks AE, Malvankar NS, Lovley DR. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria [J]. *Science*, 2010, **330** (6009): 1413-1415
- Rotaru A-E, Shrestha PM, Liu F, Shrestha M, Shrestha D, Embree M, Zengler K, Wardman C, Nevin KP, Lovley DR. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane [J]. *Energy Environ Sci*, 2014, **7** (1): 408-415
- Lovley DR. Syntrophy goes electric: direct interspecies electron transfer [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2017, **71**: 643-664
- Leadbetter JR, Breznak JA. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (10): 3620-3631
- Ferry JG. Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, **23** (1): 13-38
- Whitman WB, Ankwarda E, Wolfe RS. Nutrition and carbon metabolism of *Methanococcus voltae* [J]. *J Bacteriol*, 1982, **149** (3): 852-863
- Batstone DJ, Picioreanu C, van Loosdrecht MCM. Multidimensional modelling to investigate interspecies hydrogen transfer in anaerobic biofilms [J]. *Water Res*, 2006, **40** (16): 3099-3108
- 方晓璐, 李家宝, 芮俊鹏, 李香真. 产甲烷生化代谢途径研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, **21** (1): 1-9 [Fang XY, Li JB, Rui JP, Li XZ. Research progress in biochemical pathways of methanogenesis [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (1): 1-9]
- Weiss DS, Gartner P, Thauer RK. The energetics and sodium-ion dependence of N5-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase studied with cob (I)alamin as methyl acceptor and methylcob (III)alamin as methyl donor [J]. *Eur J Biochem*, 1994, **226** (3): 799-809
- Ermiler U, Grabarse W, Shima S, Goubeaud M, Thauer RK. Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation [J]. *Science*, 1997, **278** (5342): 1457-1462
- Ferry JG. Enzymology of the fermentation of acetate to methane by *Methanosarcina thermophila* [J]. *Biofactors*, 1997, **6** (1): 25-35
- Ferry JG. Methane from acetate [J]. *J Bacteriol*, 1992, **174** (17): 5489-5495
- Deppenmeier U, Müller V. Life close to the thermodynamic limit: how methanogenic archaea conserve energy [J]. *Bioenergetics*, 2007, **45**: 123-152
- Jetten MSM, Stams AJM, Zehnder AJB. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotheroxoenhydrogenii* and *Methanosarcina* spp. [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, **88** (3-4): 181-198
- Blaut M, Gottschalk G. Coupling of ATP synthesis and methane formation from methanol and molecular hydrogen in *Methanosarcina barkeri* [J]. *Eur J Biochem*, 1984, **141** (1): 217-222
- Garrity GM, Labeda DP, Oren A. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes XIIth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology [J]. *Intern J Syst Evol Microbiol*, 2011, **61** (11): 2775-2780
- Buckel W, Thauer RK. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na (+) translocating ferredoxin oxidation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1827** (2): 94-113
- Thauer RK, Kaster AK, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, **6** (8): 579-591
- Kaster AK, Moll J, Parey K, Thauer RK. Coupling of ferredoxin

- and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea [J]. *PNAS*, 2011, **108** (7): 2981-2986
- 26 Bose A, Pritchett MA, Metcalf WW. Genetic analysis of the methanol- and methylamine-specific methyltransferase 2 genes of *Methanosarcina acetivorans* C2A [J]. *J Bacteriol*, 2008, **190** (11): 4017-4026
 - 27 Deppenmeier U. The membrane-bound electron transport system of *Methanosarcina* species [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2004, **36** (1): 55-64
 - 28 Heiden S, Hedderich R, Setzke E, Thauer RK. Purification of a two-subunit cytochrome-b-containing heterodisulfide reductase from methanol-grown *Methanosarcina barkeri* [J]. *Eur J Biochem*, 1994, **221** (2): 855-861
 - 29 Ide T, Baumer S, Deppenmeier U. Energy conservation by the H₂: heterodisulfide oxidoreductase from *Methanosarcina mazei* Go1: identification of two proton-translocating segments [J]. *J Bacteriol*, 1999, **181** (13): 4076-4080
 - 30 Bott M, Thauer RK. Proton translocation coupled to the oxidation of carbon monoxide to CO₂ and H₂ in *Methanosarcina barkeri* [J]. *Eur J Biochem*, 1989, **179** (2): 469-472
 - 31 Schlegel K, Welte C, Deppenmeier U, Muller V. Electron transport during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves a sodium-translocating Rnf complex [J]. *FEBS J*, 2012, **279** (24): 4444-4452
 - 32 Biegel E, Schmidt S, Gonzalez JM, Muller V. Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, **68** (4): 613-634
 - 33 Li Q, Li L, Rejtar T, Lessner DJ, Karger BL, Ferry JG. Electron transport in the pathway of acetate conversion to methane in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans* [J]. *J Bacteriol*, 2006, **188** (2): 702-710
 - 34 Bond DR, Lovley DR. Reduction of Fe (III) oxide by methanogens in the presence and absence of extracellular quinones [J]. *Environ Microbiol*, 2002, **4** (2): 115-124
 - 35 Deppenmeier U, Lienard T, Gottschalk G. Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea [J]. *FEBS Lett*, 1999, **457** (3): 291-297
 - 36 Liu D, Dong H, Bishop ME, Wang H, Agrawal A, Tritschler S, Eberl DD, Xie S. Reduction of structural Fe (III) in nontronite by methanogen *Methanosarcina barkeri* [J]. *Geoch Cosmochim Acta*, 2011, **75** (4): 1057-1071
 - 37 Zhang J, Dong H, Liu D, Agrawal A. Microbial reduction of Fe (III) in smectite minerals by thermophilic methanogen *Methanothermobacter thermautotrophicus* [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 2013, **106**: 203-215
 - 38 Yamada C, Kato S, Kimura S, Ishii M, Igarashi Y. Reduction of Fe (III) oxides by phylogenetically and physiologically diverse thermophilic methanogens [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2014, **89** (3): 637-645
 - 39 Prakash D, Chauhan SS, Ferry JG. Life on the thermodynamic edge: respiratory growth of an acetotrophic methanogen [J]. *Sci Adv*, 2019, **5** (8): eaaw9059
 - 40 Bodegom PM, Scholten JC, Stams AJ. Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, **49** (2): 261-268
 - 41 Sivan O, Shusta SS, Valentine DL. Methanogens rapidly transition from methane production to iron reduction [J]. *Geobiology*, 2016, **14** (2): 190-203
 - 42 Zhang J, Dong H, Liu D, Fischer TB, Wang S, Huang L. Microbial reduction of Fe (III) in illite-smectite minerals by methanogen *Methanosarcina mazei* [J]. *Chem Geol*, 2012, **292-293**: 35-44
 - 43 Yamada C, Kato S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y. Inhibitory effects of ferrihydrite on a thermophilic methanogenic community [J]. *Microbes Environ*, 2014, **29** (2): 227-230
 - 44 Zhou S, Xu J, Yang G, Zhuang L. Methanogenesis affected by the co-occurrence of iron (III) oxides and humic substances [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2014, **88** (1): 107-120
 - 45 Weber KA, Achenbach LA, Coates JD. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006, **4** (10): 752-764
 - 46 Yan Z, Joshi P, Gorski CA, Ferry JG. A biochemical framework for anaerobic oxidation of methane driven by Fe (III)-dependent respiration [J]. *Nat Commun*, 2018, **9** (1): 1642
 - 47 Shi L, Rosso KM, Clarke TA, Richardson DJ, Zachara JM, Fredrickson JK. Molecular underpinnings of Fe (III) oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 [J]. *Front Microbiol*, 2012, **3**: 50
 - 48 White GF, Shi Z, Shi L, Wang Z, Dohnalkova AC, Marshall MJ, Fredrickson JK, Zachara JM, Butt JN, Richardson DJ, Clarke TA. Rapid electron exchange between surface-exposed bacterial cytochromes and Fe (III) minerals [J]. *PNAS*, 2013, **110** (16): 6346-6351
 - 49 Paquette CM, Fonseca BM, Cruz DR, Pereira TM, Pacheco I, Soares CM, Louro RO. Exploring the molecular mechanisms of electron shuttling across the microbe/metal space [J]. *Front Microbiol*, 2014, **5**: 318
 - 50 Pokkuluri PR, Londer YY, Yang X, Duke NE, Erickson J, Orshonsky V, Johnson G, Schiffer M. Structural characterization of a family of cytochromes c (7) involved in Fe (III) respiration by *Geobacter sulfurreducens* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1797** (2): 222-232
 - 51 Ferry JG. *Methanosarcina acetivorans*: a model for mechanistic understanding of acetoclastic and reverse methanogenesis [J]. *Front Microbiol*, 2020, **11**: 1806
 - 52 Prakash D, Iyer PR, Suharti S, Walters KA, Santiago-Martinez MG, Golbeck JH, Murakami KS, Ferry JG. Structure and function of an unusual flavodoxin from the domain archaea [J]. *PNAS*, 2019, **116** (51): 25917-25922
 - 53 Daniels L, Belay N, Rajagopal BS, Weimer PJ. Bacterial methanogenesis and growth from CO₂ with elemental iron as the sole source of electrons [J]. *Science*, 1987, **237** (4814): 509-511
 - 54 Lorowitz WH, Nagle DP, Tanner RS. Anaerobic oxidation of elemental metals coupled to methanogenesis by *Methanobacterium thermoautotrophicum* [J]. *Environ Sci Technol*, 1992, **26** (8): 1606-1610
 - 55 Dinh HT, Kuever J, Mußmann M, Hassel AW, Stratmann M, Widdel F. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms [J]. *Nature*, 2004, **427** (6977): 829-832
 - 56 Karri S, Sierra-Alvarez R, Field JA. Zero valent iron as an electron-donor for methanogenesis and sulfate reduction in anaerobic sludge [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **92** (7): 810-819
 - 57 Yuan T, Bian S, Ko JH, Liu J, Shi X, Xu Q. Exploring the roles of zero-valent iron in two-stage food waste anaerobic digestion [J]. *Waste Manag*, 2020, **107**: 91-100
 - 58 Chen S, Tao Z, Yao F, Wu B, He L, Hou K, Pi Z, Fu J, Yin H, Huang Q, Liu Y, Wang D, Li X, Yang Q. Enhanced anaerobic co-digestion of waste activated sludge and food waste by sulfidated microscale zerovalent iron: Insights in direct interspecies electron transfer mechanism [J]. *Bioresour Technol*, 2020, **316**: 123901
 - 59 Yan W, Mukherjee M, Zhou Y. Direct interspecies electron transfer (DIET) can be suppressed under ammonia-stressed condition - reevaluate the role of conductive materials [J]. *Water Res*, 2020, **183**: 116094
 - 60 Fu L, Zhou T, Wang J, You L, Lu Y, Yu L, Zhou S. NanoFe₃O₄ as solid electron shuttles to accelerate acetotrophic methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* [J]. *Front Microbiol*, 2019, **10**: 388
 - 61 Wang H, Byrne JM, Liu P, Liu J, Dong X, Lu Y. Redox cycling of Fe (II) and Fe (III) in magnetite accelerates acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina mazei* [J]. *Environ Microbiol Rep*, 2020, **12** (1): 97-109
 - 62 Kulkarni G, Mand TD, Metcalf WW. Energy conservation via hydrogen cycling in the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri* [J]. *mBio*, 2018, **9** (4): doi 10.1128/mbio.01256-18

- 63 Lovley DR. The hydrogen economy of *Methanosarcina barkeri*: life in the fast lane [J]. *J Bacteriol*, 2018, **200** (20): e00445-18
- 64 Duszenko N, Buan NR. Physiological evidence for isopotential tunneling in the electron transport chain of methane-producing archaea [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, **83** (18): e00950-17
- 65 Zhao Z, Zhang Y, Woodard TL, Nevin KP, Lovley DR. Enhancing syntrophic metabolism in up-flow anaerobic sludge blanket reactors with conductive carbon materials [J]. *Bioresour Technol*, 2015, **191**: 140-145
- 66 Tang J, Zhuang L, Ma J, Tang Z, Yu Z, Zhou S. Secondary mineralization of ferrihydrite affects microbial methanogenesis in *Geobacter-Methanosarcina* cocultures [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, **82** (19): 5869-5877
- 67 Kato S, Hashimoto K, Watanabe K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals [J]. *Environ Microbiol*, 2012, **14** (7): 1646-1654
- 68 Yamada C, Kato S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y. Conductive iron oxides accelerate thermophilic methanogenesis from acetate and propionate [J]. *J Biosci Bioeng*, 2015, **119** (6): 678-682
- 69 Cruz Vigg C, Rossetti S, Fazi S, Paiano P, Majone M, Aulenta F. Magnetite particles triggering a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation [J]. *Environ Sci Technol*, 2014, **48** (13): 7536-7543
- 70 Liu F, Rotaru AE, Shrestha PM, Malvankar NS, Nevin KP, Lovley DR. Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated c-type cytochrome in extracellular electron exchange [J]. *Environ Microbiol*, 2015, **17** (3): 648-655
- 71 Figueiredo JL, Pereira MFR, Freitas MMA, Órfão JJM. Modification of the surface chemistry of activated carbons [J]. *Carbon*, 1999, **37** (9): 1379-1389
- 72 Pereira RA, Pereira MFR, Alves MM, Pereira L. Carbon based materials as novel redox mediators for dye wastewater biodegradation [J]. *Appl Catal B Environ*, 2014, **144**: 713-720
- 73 Yuan HY, Ding LJ, Zama EF, Liu PP, Hozzein WN, Zhu YG. Biochar modulates methanogenesis through electron syntrophy of microorganisms with ethanol as a substrate [J]. *Environ Sci Technol*, 2018, **52** (21): 12198-12207
- 74 Yan W, Shen N, Xiao Y, Chen Y, Sun F, Kumar Tyagi V, Zhou Y. The role of conductive materials in the start-up period of thermophilic anaerobic system [J]. *Bioresour Technol*, 2017, **239**: 336-344
- 75 Li J, Xiao L, Zheng S, Zhang Y, Luo M, Tong C, Xu H, Tan Y, Liu J, Wang O, Liu F. A new insight into the strategy for methane production affected by conductive carbon cloth in wetland soil: beneficial to acetoclastic methanogenesis instead of CO₂ reduction [J]. *Sci Total Environ*, 2018, **643**: 1024-1030
- 76 Wu Y, Wang S, Liang D, Li N. Conductive materials in anaerobic digestion: from mechanism to application [J]. *Bioresour Technol*, 2020, **298**: 122403
- 77 Zhao Z, Zhang Y, Li Y, Dang Y, Zhu T, Quan X. Potentially shifting from interspecies hydrogen transfer to direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism to resist acidic impact with conductive carbon cloth [J]. *Chem Eng J*, 2017, **313**: 10-18
- 78 Lei Y, Sun D, Dang Y, Feng X, Huo D, Liu C, Zheng K, Holmes DE. Metagenomic analysis reveals that activated carbon aids anaerobic digestion of raw incineration leachate by promoting direct interspecies electron transfer [J]. *Water Res*, 2019, **161**: 570-580
- 79 Liu F, Rotaru A-E, Shrestha PM, Malvankar NS, Nevin KP, Lovley DR. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon [J]. *Energy Environ Sci*, 2012, **5**: 8982-8989
- 80 Chen S, Rotaru AE, Shrestha PM, Malvankar NS, Liu F, Fan W, Nevin KP, Lovley DR. Promoting interspecies electron transfer with biochar [J]. *Sci Rep*, 2014, **4**: 5019
- 81 Chen S, Rotaru AE, Liu F, Philips J, Woodard TL, Nevin KP, Lovley DR. Carbon cloth stimulates direct interspecies electron transfer in syntrophic co-cultures [J]. *Bioresour Technol*, 2014, **173**: 82-86
- 82 Rotaru AE, Shrestha PM, Liu F, Markovaite B, Chen S, Nevin KP, Lovley DR. Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, **80** (15): 4599-4605
- 83 Cheng Q, Call DF. Hardwiring microbes via direct interspecies electron transfer: mechanisms and applications [J]. *Environ Sci Process Impacts*, 2016, **18** (8): 968-980
- 84 Kappler A, Wuestner ML, Ruecker A, Harter J, Halama M, Behrens S. Biochar as an electron shuttle between bacteria and Fe (III) minerals [J]. *Environ Sci Technol Lett*, 2014, **1** (8): 339-344
- 85 Klupfel L, Keiluweit M, Kleber M, Sander M. Redox properties of plant biomass-derived black carbon (biochar) [J]. *Environ Sci Technol*, 2014, **48** (10): 5601-5611
- 86 Sun T, Levin BD, Guzman JJ, Enders A, Muller DA, Angenent LT, Lehmann J. Rapid electron transfer by the carbon matrix in natural pyrogenic carbon [J]. *Nat Commun*, 2017, **8**: 14873
- 87 Zhang P, Zheng S, Liu J, Wang B, Liu F, Feng Y. Surface properties of activated sludge-derived biochar determine the facilitating effects on *Geobacter* co-cultures [J]. *Water Res*, 2018, **142**: 441-451
- 88 Cory RM, McKnight DM. Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter [J]. *Environ Sci Technol*, 2005, **39** (21): 8142-8149
- 89 Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP, Woodward JC. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration [J]. *Nature*, 1996, **382** (6590): 445-448
- 90 Coates JD, Bhupathiraju VK, Achenbach LA, McInerney MJ, Lovley DR. *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe (III)-reducers [J]. *Intern J System Evol Microbiol*, 2001, **51** (Pt 2): 581-588
- 91 Li J, Hao X, van Loosdrecht MCM, Luo Y, Cao D. Effect of humic acids on batch anaerobic digestion of excess sludge [J]. *Water Res*, 2019, **155**: 431-443
- 92 Efremenko E, Senko O, Stepanov N, Mareev N, Volikov A, Perminova I. Suppression of methane generation during methanogenesis by chemically modified humic compounds [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, **9** (11): 1140
- 93 Scott DT, McKnight DM, Blunt-Harris EL, Kolesar SE, Lovley DR. Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms [J]. *Environ Sci Technol*, 1998, **32** (19): 372-372
- 94 Lovley DR, Kashefi K, Vargas M, Tor JM, Blunt-Harris EL. Reduction of humic substances and Fe (III) by hyperthermophilic microorganisms [J]. *Chem Geol*, 2000, **169** (3-4): 289-298
- 95 Cervantes FJ, de Bok FA, Duong-Dac T, Stams AJ, Lettinga G, Field JA. Reduction of humic substances by haloferroplasma, sulphate-reducing and methanogenic microorganisms [J]. *Environ Microbiol*, 2002, **4** (1): 51-57
- 96 Newman DK, Kolter R. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer [J]. *Nature*, 2000, **405** (6782): 94-97
- 97 Holmes DE, Ueki T, Tang HY, Zhou J, Smith JA, Chaput G, Lovley DR. A membrane-bound cytochrome enables *Methanosarcina acetivorans* to conserve energy from extracellular electron transfer [J]. *mBio*, 2019, **10** (4): e00789-19
- 98 Shi L, Dong H, Reguera G, Beyenal H, Lu A, Liu J, Yu HQ, Fredrickson JK. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, **14** (10): 651-662
- 99 Ueki T, DiDonato LN, Lovley DR. Toward establishing minimum requirements for extracellular electron transfer in *Geobacter sulfurreducens* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2017, **364** (9): doi 10.1093/femsle/fnx093
- 100 Wang M, Tomb J-F, Ferry JG. Electron transport in acetate-grown *Methanosarcina acetivorans* [J]. *BMC Microbiol*, 2011, **11** (1): 165
- 101 Yoshikawa S, Shimada A. Reaction mechanism of cytochrome c oxidase [J]. *Chem Rev*, 2015, **115** (4): 1936-1989
- 102 Yee MO, Rotaru AE. Extracellular electron uptake in *Methanosarcinales* is independent of multiheme c-type cytochromes [J]. *Sci Rep*, 2020, **10** (1): 372