

微生物互营产甲烷研究进展*

张小元^{1,2,3} 李香真^{1,2} 李家宝^{1,2**}

¹中国科学院环境与应用微生物重点实验室 成都 610041

²四川省环境微生物重点实验室 成都 610041

³中国科学院大学 北京 100049

摘要 甲烷是仅次于二氧化碳的第二大温室气体,也是典型的可再生资源。目前大气中的甲烷约有74%来自微生物互营产甲烷过程。研究微生物互营产甲烷对于控制全球气候变暖和发展清洁能源都具有重要意义。本文主要对产甲烷菌的类型、互营产甲烷的过程、电子传递等方面进行综述。典型的有机物厌氧互营氧化要经历3个步骤,主要由3种不同的菌群完成,即发酵菌、互营菌和产甲烷菌。互营产甲烷过程释放的能量很低。在互营产甲烷过程中存在互营菌的种内电子传递和互营菌与产甲烷菌的种间电子传递。反向电子传递是互营菌种内电子传递的一种方式,表现为电子歧化和电子聚合,都需要消耗能量使得热力学上不利的氧化还原反应得以发生。种间电子传递包括种间氢气转移、种间甲酸转移和种间直接电子传递3种方式。未来人们可以利用基因敲除、高通量测序、计算生物学等方法研究互营微生物间底物和电子的传递,以及互营菌群对环境变化的响应机制,以便将互营产甲烷过程应用于实际生产。(图4 表1 参77)

关键词 互营代谢; 产甲烷菌; 电子传递; 种间氢气转移; 种间甲酸转移; 直接电子传递

CLC Q939.9

Microbial syntrophic methanogenesis: a review*

ZHANG Xiaoyuan^{1,2,3}, LI Xiangzhen^{1,2} & LI Jiabao^{1,2**}

¹Key Laboratory of Environmental and Applied Microbiology, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;

²Environmental Microbiology Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610041, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Methane is the second most important greenhouse gas as well as a typical renewable biomass energy. Currently, about 74% of the methane in the atmosphere originates from the microbial syntrophic methanogenesis process. Research on microbial syntrophic methanogenesis is therefore very important for controlling global warming and developing clean energy. This paper mainly reviews the types of methanogens, the process of syntrophic methanogenesis and its electron transfer. The typical anaerobic syntrophic oxidation of organic matters consists of three steps that are mainly conducted by fermenting bacteria, syntrophic bacteria, and methanogens. The energy released during syntrophic methanogenesis is extremely low. The syntrophic methanogenesis process contains intraspecies electron transfer in syntrophic bacteria and interspecies electron transfer between syntrophic bacteria and methanogens. Reverse electron transfer exists in intraspecies electron transfer in syntrophic bacteria and displays as electron bifurcation and electron confurcation which both require energy input to drive critical redox reactions. Interspecies electron transfer includes three types: interspecies hydrogen transfer (IHT), interspecies formate transfer (IFT) and direct interspecies electron transfer (DIET). In the future, in order to apply the process of syntrophic methanogenesis into practice, methods of gene knockout, high through-put sequencing and computational biology could be utilized for the study of substrate and electron transfer between syntrophic microbes and the response of syntrophic microbes to the environmental changes.

Keywords syntrophic metabolism; methanogen; electron transfer; interspecies hydrogen transfer; interspecies formate transfer; direct interspecies electron transfer

微生物间的厌氧互营现象在自然界中广泛存在^[1]。互营最早是用来描述光能营养型的绿色硫细菌和化能营养型的硫还原细菌之间的硫化物的交换^[2-3]。后来互营主要用于描述

厌氧环境中互营菌和产甲烷菌间乙酸和氢气的交换^[2]。互营菌和产甲烷菌广泛存在于厌氧环境,如水稻田、垃圾堆及厌氧消化反应器等^[4-6],在地球碳氮循环过程中起重要作用^[7-8],它们紧密协作将有机物最终转化成甲烷。一方面,甲烷是导致全球变暖的第二大温室气体,其温室效应是二氧化碳的20-30倍^[9],大气中甲烷的浓度由2004年的 1.7×10^{-6} 上升到2012年的 1.8×10^{-6} ^[10-11]。另一方面,甲烷是碳的最高还原态,作为清洁能源,在标准状态下1 mol甲烷完全燃烧可释放高达890

收稿日期 Received: 2015-07-20 接受日期 Accepted: 2015-09-21

*国家重点基础研究发展规划项目(973项目,2013CB733502)和国家自然科学基金项目(31300447,41371268)资助 Supported by the State Key Basic R & D Program of China (973 Program, 2013CB733502), and the National Natural Science Foundation of China (31300447, 41371268)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: lijib@cib.ac.cn)

kJ的能量^[12]。所以,对微生物互营产甲烷过程的深入了解,有助于同时实现甲烷的减排和其能源的合理利用。本文首先介绍互营的定义及产甲烷菌的类型,接着就互营产甲烷的代谢过程、电子传递等内容进行综述,最后对未来互营产甲烷过程的研究方向进行展望。

1 互营及产甲烷菌

微生物间的厌氧互营是指在厌氧条件下,不同种类的微生物间紧密合作、协同代谢、互利共生的一种物种关系。在协同代谢过程中,下游微生物能够不断消耗上游微生物的代谢产物使得在标准条件下热力学上不利的反应能够释放少许能量供互营微生物菌群生存^[1, 12-15]。例如,有机质降解过程中产生的丙酸和丁酸,在标准条件下将这些代谢物转化为乙酸、甲酸、氢气和二氧化碳是吸收能量的,因而无法自发进行。只有产甲烷菌不断消耗乙酸、甲酸、氢气和二氧化碳,使它们的浓度降到很低时,转化反应才会发生^[16-18]。

产甲烷菌在各种环境中广泛存在,这些环境包括地下水、水稻田、淤泥、垃圾堆、地热温泉、洋脊热液喷口、厌氧消化反应器^[7-9, 19-23],以及动物的瘤胃、盲肠、大肠等^[7, 9, 13, 16, 20, 24]。根据对底物的选择性,可以把产甲烷菌分为3类:还原二氧化碳营养型产甲烷菌(利用氢气或者甲酸),甲基营养型产甲烷菌(利用甲醇、甲胺等甲基化合物)和乙酸营养型产甲烷菌(利用乙酸)^[5, 9]。产甲烷菌属于古菌门(Euryarchaeota),分布在7个目中:甲烷杆菌目(Methanobacteriales)、甲烷微菌目(Methanomicrobiales)、甲烷八叠球菌目(Methanosarcinales)、甲烷球菌目(Methanococcales)、甲烷火球菌目(Methanopyrales)、甲烷胞菌目(Methanocellales)和Methanomassiliicoccales^[9, 25-26]。甲烷胞菌目是Sakai等于2008年在水稻田中分离的一种新的产甲烷菌^[27],这类产甲烷菌在水稻土产甲烷中起重要作用^[4]。Methanomassiliicoccales是近来发现的第七类产甲烷菌^[26, 28],关于这类产甲烷菌的报道比较少。目前分离鉴定的产甲烷菌已有200多种^[19, 29-30],有6个目的产甲烷菌基因组信息被阐明(表1)。根据已有的数据,产甲烷菌基因组大小一般介于 1.6×10^6 - 5.7×10^6 bp之间,GC含量在30%-65%之间^[25]。

在不同的环境中,不同的产甲烷菌参与分解有机物。在生物反应器中,分解对苯二甲酸盐(TA)的产甲烷菌主要是乙酸营养型的甲烷鬃毛菌属(Methanosaeta)和还原二氧化碳营养型的甲烷微菌目^[31]。甲烷冷泉碳酸盐岩和淤泥中主要的产甲烷菌是甲烷鬃毛菌属^[32-33]。分解链烃的产甲烷菌主要是还原二氧化碳营养型^[34-35],高温条件下的产甲烷菌主要是还原二氧化碳营养型和甲基营养型^[25]。

2 互营产甲烷过程及互营代谢举例

2.1 互营产甲烷过程及影响因素

从19世纪30年代开始,人们认为甲烷发酵包括产酸和产甲烷两个阶段,由发酵菌和产甲烷菌完成,但是一直没有发现纯培养的产甲烷菌能够利用脂肪酸产甲烷。1967年Bryant等人的实验证明利用脂肪酸产甲烷的微生物有两种,即互营

菌和产甲烷菌,从而将厌氧产甲烷分为3个阶段^[16, 36]。相应地有3个主要的菌群,即发酵菌、互营菌和产甲烷菌^[16, 36]。

微生物厌氧互营产甲烷过程可以分为3个阶段:(I)水解过程,大分子有机物(如多糖、蛋白质等)在发酵菌作用下分解为小分子有机物(如丁酸、丙酸等);(II)产酸产气过程,小分子有机物在互营菌作用下进一步分解为甲酸、乙酸、氢气和二氧化碳等底物供产甲烷菌利用;(III)产甲烷过程,产甲烷菌利用还原二氧化碳营养途径、乙酸营养途径、甲基营养途径中的一种或多种途径将过程(II)中的底物转化为甲烷^[4, 9, 37-38]。值得注意的是,同型产乙酸细菌(一种互营菌)可以将氢气和二氧化碳转化为乙酸^[4, 7, 13, 33-34, 39-40],一方面它可以产生乙酸供乙酸营养型产甲烷菌利用,另一方面,它可以与还原二氧化碳营养型产甲烷菌竞争氢气。此外,某些互营菌还可以催化甲酸和氢气相互转化^[4, 41-43],Wu等人利用¹⁴C标记甲酸,分析其转化为甲烷的过程,发现甲酸首先被互营菌的甲酸脱氢酶裂解为氢气和二氧化碳,然后氢气和二氧化碳再被产甲烷菌利用合成甲烷^[42]。

由葡萄糖转化为甲烷的化学式如下:



理论上由乙酸形成的甲烷占微生物产甲烷总量的67%^[16, 35, 37, 44-45]。因为1分子葡萄糖产生2分子乙酸和4分子氢气,产生1分子甲烷需要4分子氢气或者1分子乙酸,所以在厌氧降解碳水化合物形成甲烷的过程中,通过氢气产生的甲烷最多占总甲烷的33%。这个值与很多产甲烷的环境中测得的数值^[5, 30, 37]一致。

产甲烷菌利用底物产甲烷存在一定的阈值,当底物浓度低于一定的程度时,不发生产甲烷过程^[37, 44, 46-47]。在一般的自然条件下,其阈值分别是氢气10 Pa,甲酸和乙酸10 μ mol/L^[41]。阈值的大小与环境条件有关。Kotsyurbenko等通过实验发现当温度下降时,巴克醋酸杆菌(*Acetobacterium bakii*)、嗜冷醋酸杆菌(*Acetobacterium tundrae*)和一株产甲烷菌菌株MSB的共培养物利用氢气的阈值下降^[39]。此结果与很多其他研究的结论^[21, 23, 47-50]一致。Boone提出了微环境的概念,即互营菌群可以使氢气在微环境内的浓度高于外界的浓度,这样产甲烷菌就可以利用低浓度的氢气产甲烷^[44]。此外,产甲烷菌产甲烷的速率与环境中的pH有关,产甲烷的最适pH范围是6.7-7.4, pH低于6和高于8都不利于甲烷的产生^[16]。温度对产甲烷菌的影响很大,根据最适生长温度(T_{opt})的不同,研究者将产甲烷菌分为嗜冷(T_{opt} 低于25 $^{\circ}$ C)、嗜温(T_{opt} 为35 $^{\circ}$ C左右)、嗜热(T_{opt} 为55 $^{\circ}$ C左右)和极端嗜热(T_{opt} 高于80 $^{\circ}$ C)4个类群^[19]。温度过高或者过低都对产甲烷菌生长不利,甚至导致产甲烷菌死亡^[19]。由于互营降解有机物依赖于代谢产物的转移,互营菌和产甲烷菌间的距离越近,代谢产物转移越容易,甲烷产生越快^[4]。此外,环境有机物的类型和降解产物也会对互营产甲烷过程进行调节和控制^[4]。

2.2 互营代谢举例

2.2.1 互营菌的种类及互营代谢的多样性 在微生物分类系统中,互营菌并不限定在某一种特定的遗传发育种群中,而是遍布于微生物的各个分支。厚壁菌门(Firmicutes)、 δ -变形

表1 部分产甲烷菌基因组信息^[20, 25]
Table 1 The genome information of partial methanogenic bacteria^[20, 25]

分类单元 (目) Taxon (Order)	典型属 Typical genus	典型种 Typical species	基因组大小 Genome size (N/bp)	G+C (r/%)	基因数目 No. of gene
甲烷杆菌目 Methanobacteriales	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanosphaera</i> , <i>Methanothermobacter</i>	热自养甲烷热杆菌 <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> str. Delta H	1751377	49.5	1921
甲烷球菌目 Methanococcales	<i>Methanococcus</i> , <i>Methanocaldococcus</i> , <i>Methanotorris</i> , <i>Methanothermococcus</i>	詹氏甲烷球菌 <i>Methanococcus jannaschii</i> DSM2661	1739933	31.3	1823
甲烷火菌目 Methanopyrales	<i>Methanopyrus</i>	坎氏甲烷火菌 <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19	1694969	61.2	1729
甲烷微菌目 Methanomicrobiales	<i>Methanomicrobium</i> , <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanofollis</i> , <i>Methanospirillum</i>	亨氏甲烷螺菌 <i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	3544738	45.1	3294
甲烷八叠球菌目 Methanosarcinales	<i>Methanosarcina</i> , <i>Methanococcoides</i> , <i>Methanohalobium</i> , <i>Methanohalophilus</i>	噻乙酸甲烷八叠球菌 <i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	5751492	42.7	4721
甲烷胞菌目 Methanocellales	<i>Methanocella</i>	稻田甲烷胞菌 <i>Methanocella arvoryzae</i> MRE50	3179916	54.6	3170

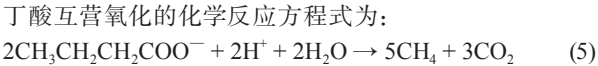
菌纲 (Deltaproteobacteria)、互营菌门 (Synergistetes) 中的部分细菌均能参与互营产甲烷过程^[38]。在厚壁菌门中有3类细菌进行互营代谢, 它们分别属于互营单胞菌科 (Syntrophomonadaceae)、脱硫肠状菌属 (*Desulfotomaculum*) 和热厌氧杆菌科 (Thermoanaerobacteraceae)。互营单胞菌科中的部分细菌能和还原二氧化碳营养型的产甲烷菌互营分解脂肪酸, 脱硫肠状菌属中的部分细菌可以分解丙酸、苯甲酸、乙醇和芳香族化合物, 热厌氧杆菌科中的部分细菌能够分解乙酸。在δ-变形菌纲中, 脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 中的一些细菌能够互营代谢乳酸和乙醇, 地杆菌属 (*Geobacter*) 中的一些细菌能够互营氧化乙酸和乙醇, 暗杆菌属 (*Pelobacter*) 中的一些细菌能够互营代谢醇类物质。在互营菌门中, 氨基杆菌 (*Aminobacterium colombiense*)、少食氨基单胞菌 (*Aminomonas paucivorans*) 和嗜酸嗜氨基热厌氧弧菌 (*Thermoanaerovibrio acidaminovorans*) 能够互营代谢氨基酸^[38]。

厌氧微生物在它们生存的氧化还原环境中经常改变代谢方式, 以应对环境中氢气浓度的改变。例如, 在低浓度硫酸盐和低浓度氢气的条件下, 一些硫酸盐还原细菌可以改变代谢途径产生氢气并可以扮演互营菌的角色。即使环境中的硫酸盐还原细菌能够裂解氢气和乙酸^[51], 一些产甲烷菌可以利用不具有竞争性的底物, 例如甲胺, 来维持生长。嗜中温丙酸氧化菌株MPOB在缺少产甲烷菌时可以利用琥珀酸, 嗜中温丙酸氧化菌株KOPROP1在没有产甲烷菌时可以利用硫酸盐^[52]。微生物代谢的多样性及其相互作用十分复杂^[53], 以下将通过几个有机物互营代谢的例子进行阐述。

2.2.2 乳酸的互营代谢 乳酸的互营代谢通路如图2a所示。乳酸脱氢酶氧化乳酸形成丙酮酸时会产生电子, 这些电子将形成氢气和甲酸, 在这个过程中涉及到反向电子传递。基因组分析表明, 脱硫弧菌Hildenborough (*Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough) 和阿拉斯脱硫弧菌G20 (*D. alaskensis*

G20) 有与细胞膜结合的氢化酶和甲酸脱氢酶基因以及参与反向电子传递的与膜结合的NAD⁺氧化还原酶基因。相对于利用硫酸盐呼吸的纯培养, 脱硫弧菌Hildenborough利用乳酸进行互营生长时有169个基因表达上调。敲除脱硫弧菌Hildenborough细胞膜上的转运离子的氢化酶基因*coo*和该菌株的c型细胞色素复合物基因*hmc*将严重影响乳酸或者丙酮酸的互营氧化, 说明这两个基因参与反向电子传递^[38]。在含有乳酸的培养基上分别互营培养不同突变的阿拉斯脱硫弧菌G20和亨氏甲烷螺菌 (*Methanospirillum hungatei*), 实验结果证明阿拉斯脱硫弧菌G20至少有20个基因参与互营氧化乳酸。其中基因*qrcB*、*cycA*、*bydA*参与氢气的形成^[38]。

2.2.3 丁酸的互营代谢 丁酸的互营代谢通路如图2b所示。氧化丁酸的细菌有两类, 即互营单胞菌科 (Syntrophomonadaceae) 和互营杆菌目 (Syntrophobacteriales)^[18]。在丁酸的互营氧化过程中, 关键步骤是丁酰辅酶A的氧化, 它是由丁酰辅酶A脱氢酶/电子传递黄素蛋白复合物 (Bcd/EtfAB) 催化的, 这个过程涉及到反向电子传递^[18, 38]。丁酰辅酶A ($E^{0'} = -10 \text{ mV}$) 还原NAD⁺ ($E^{0'} = -320 \text{ mV}$) 时能量不足的部分可以通过还原性的铁氧还蛋白 ($E^{0'} = -410 \text{ mV}$) 还原NAD⁺弥补^[38]。



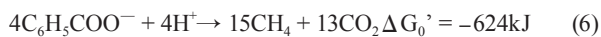
在自然条件下 (丁酸10 μmol/L, 甲烷70 kPa, 二氧化碳30 kPa), 上述反应的吉布斯自由能变为-140 kJ/2分子丁酸。互营氧化1分子丁酸通过底物水平磷酸化形成1分子ATP, 其中2/3分子ATP用于反向电子传递, 剩余1/3分子ATP用于互营菌和产甲烷菌的生长^[3, 13, 23]。

2.2.4 苯甲酸的互营代谢 目前, 芳香族化合物中仅有苯甲酸、龙胆酸和氢醌能够作为底物进行互营产甲烷, 其中

以苯甲酸的研究最为详细,许多芳香族化合物的厌氧氧化都要先转化为苯甲酸^[3, 13, 23]。目前已经分离并鉴定了一些能够互营氧化苯甲酸的细菌,例如巴斯韦互营菌(*Syntrophus buswellii*)能够与产甲烷菌或者一种脱硫弧菌(*Desulfovibrio* sp.)互营氧化苯甲酸^[23]。

苯甲酸的互营代谢通路如图2c所示。首先,乙酰辅酶A合成酶消耗2分子ATP将苯甲酸活化成为苯甲酰辅酶A,接着是苯环的加氢饱和,然后是以类似脂肪酸 β 氧化的形式开环。形成的含7个碳原子的二羧酸进一步经过 β 氧化形成3分子乙酸和1分子 CO_2 ^[3, 23]。

苯甲酸互营氧化要经历19步反应,总的化学反应方程式为:



每代谢1分子苯甲酸大约净形成1/3到2/3分子ATP^[3, 13, 54]。

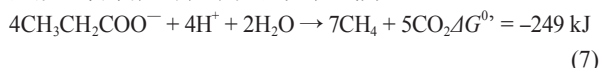
互营降解苯甲酸时,苯甲酸到了阈值10 $\mu\text{mol/L}$ 时就不再分解,乙酸能够阻止苯甲酸降解。Warikoo等通过实验证明,乙酸是作为一种反竞争抑制剂抑制苯甲酸的降解,其抑制常数 K_i 为10 mmol/L。所以在苯甲酸的互营降解过程中,要控制乙酸的含量以加快苯甲酸的降解,这对于污水治理极具参考价值^[3, 54-55]。

2.2.5 丙酸的互营代谢 一些细菌能与产甲烷菌互营氧化丙酸,例如甲酸氧化互营杆菌(*S. fumaroxidans*)、嗜热丙酸降解菌(*P. thermopropionicum*)、丙酸降解菌(*P. propionicum*)等细菌。这些细菌属于 δ -变形菌纲(Deltaproteobacteria)和互营杆菌目(Syntrophobacteriales)^[18]。Harmsen等人通过16S rRNA基因进化树分析,发现从不同实验室分离到的丙酸氧化菌系统进化关系很近^[52]。

丙酸的互营代谢通路如图2d所示。丙酸的厌氧互营降解主要利用甲基丙二酰辅酶A途径(MMC途径)^[8, 22-23, 46]。MMC途径将丙酸分解为乙酸。主要的氧化还原反应为琥珀酸氧化为延胡索酸,苹果酸氧化为草酰乙酸,丙酮酸氧化为乙酰辅酶A和 CO_2 ^[18, 38]。

由丙酮酸转化而来的乙酰辅酶A和二氧化碳可以很容易与质子的还原反应相耦合($E^0 = -414\text{ mV}$)或者与二氧化碳的还原反应相耦合($E^0 = -432\text{ mV}$)^[18],而琥珀酸氧化为延胡索酸($E^0 = +30\text{ mV}$)和苹果酸氧化为草酰乙酸($E^0 = -176\text{ mV}$)要伴随氢气或者甲酸的生成,需要消耗能量进行反向电子传递^[13, 18, 38],琥珀酸氧化为延胡索酸伴随着甲基萘醌($E^0 = -70\text{ mV}$)的还原,甲基萘醌的氧化涉及到细胞膜上的氢化酶或者是甲酸脱氢酶^[38]。延胡索酸的氧化需要通过水解2/3分子的ATP把两个质子泵出膜外,该反应才能进行^[18]。

丙酸互营氧化的化学反应方程式为:

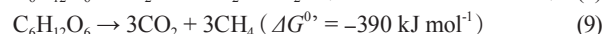
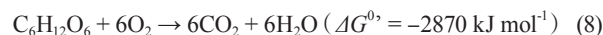


互营氧化1分子丙酸约形成1分子ATP,其中2/3分子ATP用于反向电子传递,剩余1/3分子ATP用于互营菌体的生长^[13, 18, 23]。

Dong等人的实验发现布氏共养生孢菌(*Syntrophosporobryantii*)降解丙酸形成甲酸和氢气与碳酸氢盐的浓度有关。碳酸氢盐的浓度升高时,甲酸浓度升高,氢气浓度略微下降^[46]。

2.3 互营产甲烷释放的能量

有机质厌氧互营氧化形成甲烷释放的能量很低。将六碳糖转化为甲烷和二氧化碳所释放的能量只相当于六碳糖有氧分解的15%,大部分能量都储存在甲烷中^[13](见反应式8, 9)。互营的菌群通过代谢途径获得的能量在热力学上几乎达到平衡($\Delta G \approx 0\text{ kJ mol}^{-1}$)^[43],而且不同微生物间的作用极其复杂。这也是很难培养互营微生物的主要原因,因为人工的操作破坏了菌落的平衡。低的能量产出意味着生长速率和微生物的生物量都很低^[14]。这也是微生物互营关系研究困难的原因之一。



2.4 互营微生物基因表达的变化

互营微生物间的长期相互作用为它们之间的基因交流提供了机会。基因水平转移发生在互营菌之间,也发生在互营菌和产甲烷菌之间^[2, 8]。

嗜酸互营菌(*Syntrophus aciditrophicus*)缺少乙酸激酶基因,但是仍然可以利用乙酰辅酶A形成乙酸。基因组分析表明,与嗜酸互营菌互营生长的古菌为其提供了9个基因用于将乙酰辅酶A转化为乙酸,嗜酸互营菌基因组中检测到的几个异二硫化物还原酶的基因和几个与氧化还原有关的基因最初也是来自古菌^[2]。Kato等人通过比较发酵菌、互营菌(包括喜温丙酸发酵菌)、产甲烷菌中与产甲烷有关的基因的序列时发现,喜温丙酸发酵菌(*Pelotomaculum thermopropionicum*)与古菌接近而不是与细菌接近。可能古菌与细菌间存在基因水平转移,互营微生物可能是共同进化的^[8]。

另一方面,微生物间的互营作用也可以使微生物某些基因的表达量发生变化以适应新的环境。例如,当脱硫弧菌(*D. vulgaris*)从硫酸盐呼吸转变为互营代谢时,一个由3个基因组成的基因簇(其中两个基因编码铁硫簇/ATP酶结构域蛋白,一个基因编码类似于MTH1175结构域家族蛋白质)和一个由5个基因组成的基因簇(编码一些脂蛋白和膜结合蛋白)的表达均提高。喜温丙酸发酵菌在纯培养时需要酵母浸出液,但是在互营培养时不需要。转录组的分析表明,喜温丙酸发酵菌中运输和代谢氨基酸的基因,特别是与谷氨酰胺和谷氨酸的合成有关的基因在互营生长时表达更多,这表明互营微生物间可能存在氨基酸的传递。同时喜温丙酸发酵菌的趋化基因和16个假定蛋白基因的表达发生改变,以适应产甲烷菌的存在^[38]。

现在还不清楚互营菌群如何调节它们的代谢途径以形成一个协调的催化系统。一个可能性是微生物的密度信号(群体效应分子),其他的可能性包括外界环境的变化导致细胞受体组分的变化等情况^[2, 38]。

3 互营产甲烷过程的电子传递

微生物互营生长过程中的电子传递极为重要。以下就两种形式的电子传递进行讨论:一是互营菌的种内电子传递(以下简称种内电子传递),即互营菌利用简单有机物产生氢气和甲酸过程的电子传递;另一种是互营菌和产甲烷菌的

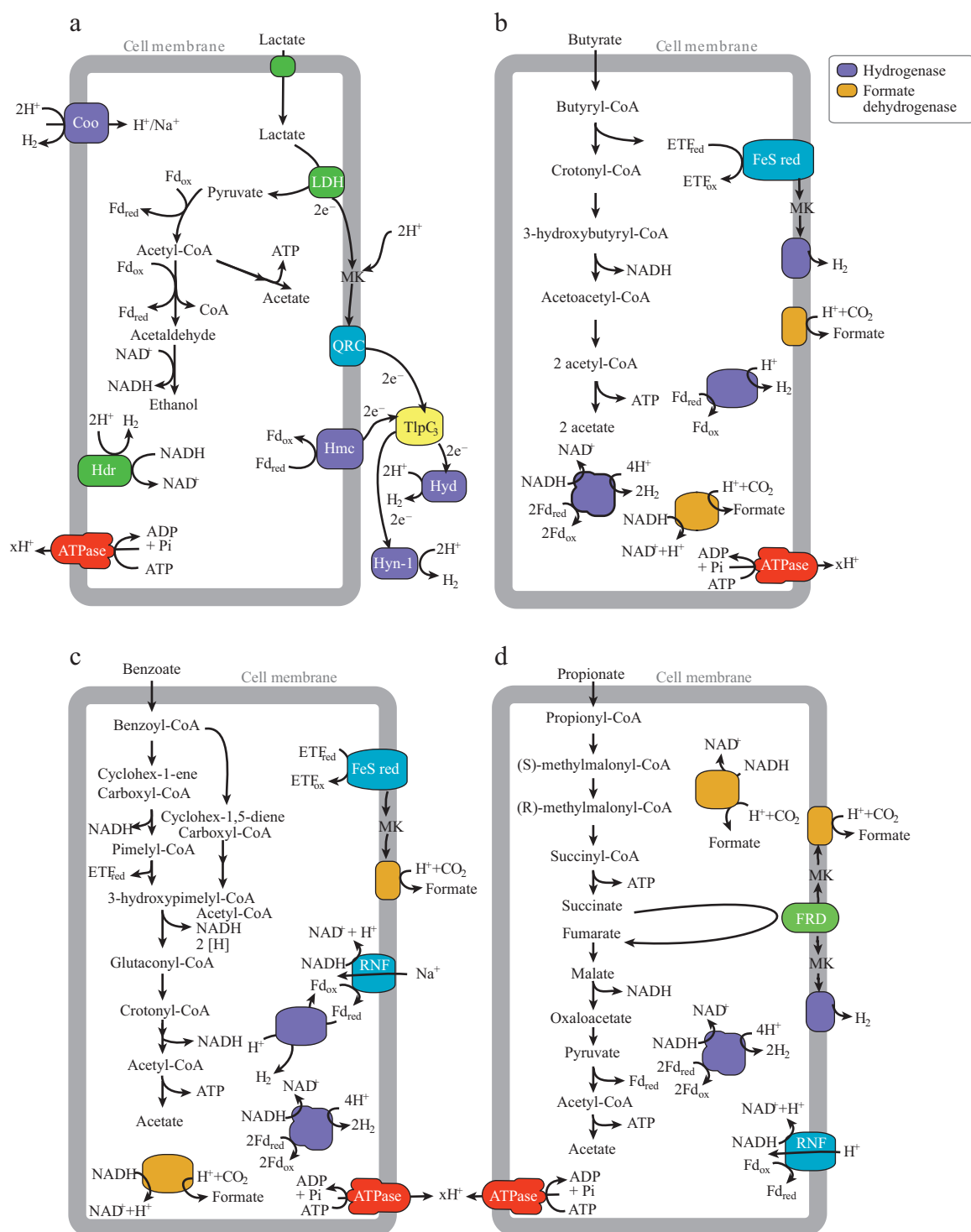


图1 几种典型有机物的互营代谢途径^[38]。(a) 一些脱硫弧菌 (*Desulfovibrio* species) 互营代谢乳酸。(b) 沃尔夫氏互营单胞菌 (*Syntrophomonas wolfei*) 互营代谢丁酸。(c) 噬酸互营菌 (*Syntrophus aciditrophicus*) 互营代谢苯甲酸。(d) 甲酸氧化互营杆菌 (*Syntrophobacter fumaroxidans*) 互营代谢丙酸。缩写: CoA, 辅酶A; Co, 细胞膜上转运离子的氢化酶; ETF, 电子传递黄素蛋白; Fd, 铁氧还蛋白; FeS red, 铁硫氧化还原酶; FRD, 延胡索酸还原酶; Hdr, 异二硫化物还原酶; LDH, 乳酸脱氢酶; MK, 甲基萘醌; ox, 氧化的; QRC, 醌还原酶复合物; red, 还原的; RNF (*Rhodobacter nitrogen fixation*), 细胞膜上转运离子的铁氧还蛋白; NAD⁺氧化还原酶; TplC3, I型细胞色素c3。

Fig. 1 Syntrophic metabolism pathways for several typical organic compounds^[38]. (a) Syntrophic lactate metabolism by *Desulfovibrio* species. (b) Syntrophic butyrate metabolism by *Syntrophomonas wolfei*. (c) Syntrophic benzoate metabolism by *Syntrophus aciditrophicus*. (d) Syntrophic propionate metabolism by *Syntrophobacter fumaroxidans*. Abbreviations: CoA, coenzyme A; Co, membrane-bound, ion-translocating hydrogenase; ETF, electron transfer flavoprotein; Fd, ferredoxin; FeS red, iron-sulfur oxidoreductase; FRD, fumarate reductase; Hdr, heterodisulfide reductase; Hyn, hydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; MK, menaquinone; ox, oxidized; QRC, quinone reductase complex; red, reduced; RNF (*Rhodobacter nitrogen fixation*), membrane-bound, ion-translocating ferredoxin; NAD⁺ oxidoreductase; TplC3, type I, cytochrome c3.

种间电子传递(以下简称种间电子传递),即互营菌把电子传递给产甲烷菌。电子在产甲烷菌细胞内的种内电子传递也很重要,它直接涉及到甲烷的产生,有专门针对甲烷菌产甲烷过程的综述^[5,9],本文不介绍电子在产甲烷菌细胞内的种内电子传递。

3.1 种内电子传递

3.1.1 互营菌催化的氧化还原反应 大部分由互营菌氧化小分子有机物形成的产物(如氧化丙酸形成琥珀酸,氧化苯甲酸形成脂酰辅酶A)的标准氧化还原电势比氢气和甲酸的高(图2)。产甲烷菌可以不断消耗氢气和甲酸使得它们的标准氧化还原电势有所升高。当环境中甲酸的浓度由1 mol/L降为10 μ mol/L时,甲酸的标准氧化还原电势由-432 mV升高到-290 mV,当环境中氢气的浓度由100 kPa降为1 Pa时,氢气的标准氧化还原电势由-414 mV升高到-260 mV,而NADH的标准氧化还原电势是-320 mV,比甲酸和氢气的都低,所以电子可以顺利地由NADH流向 H^+ 或者 H^+/CO_2 。但是琥珀酸、脂酰辅酶A等产物的标准氧化还原电势依然比降低浓度后的氢气和甲酸的标准氧化还原电势高,而且当氢气和甲酸的浓度低到一定的程度时,氢气和甲酸就不能被产甲烷菌利用。互营菌采用耗能的反向电子传递方式使电子从琥珀酸、脂酰辅酶A等产物传递到 H^+ 或者 H^+/CO_2 上,促使这些产物的进一步

分解^[1,7,38,56]。

3.1.2 电子聚合和电子歧化 在一般情况下的电子传递中,电子从标准氧化还原电势低的电子供体流向标准氧化还原电势高的电子受体,这个过程释放的化学能可以被生物体储存为生物能(ATP)^[7]。反向电子传递是一种特殊的电子传递方式,它需要消耗能量推动热力学上不利的氧化还原反应发生,使电子从标准氧化还原电势高的电子供体流向标准氧化还原电势低的电子受体^[7,38]。消耗的能量可以通过水解ATP提供,也可以通过电子歧化或者电子聚合提供^[13,57-58]。

电子歧化是指一种电子供体将电子传递给两种不同的电子受体的电子传递方式^[7,38]。在电子歧化过程中,电子供体的标准氧化还原电势介于两种电子受体之间,两种电子受体接受电子后形成两种不同的产物^[7,38]。在电子歧化过程中铁氧还蛋白起着重要作用^[59]。铁氧还蛋白作为低电势电子受体吸收能量接受高电势电子供体的电子,同时电子供体将电子传给电势更高的电子受体释放能量。这个过程中有黄素蛋白的参与,所以被称作黄素蛋白依赖型的电子歧化,这是除了底物水平磷酸化和氧化磷酸化以外的第3种储存能量的方式^[59]。例如下面的电子歧化反应所释放的自由能可以合成近2/3分子ATP。还原性的铁氧还蛋白的氧化还原电势很低,可以很容易地把电子传递给质子氢^[59]。这样,还原性的铁氧还蛋白又

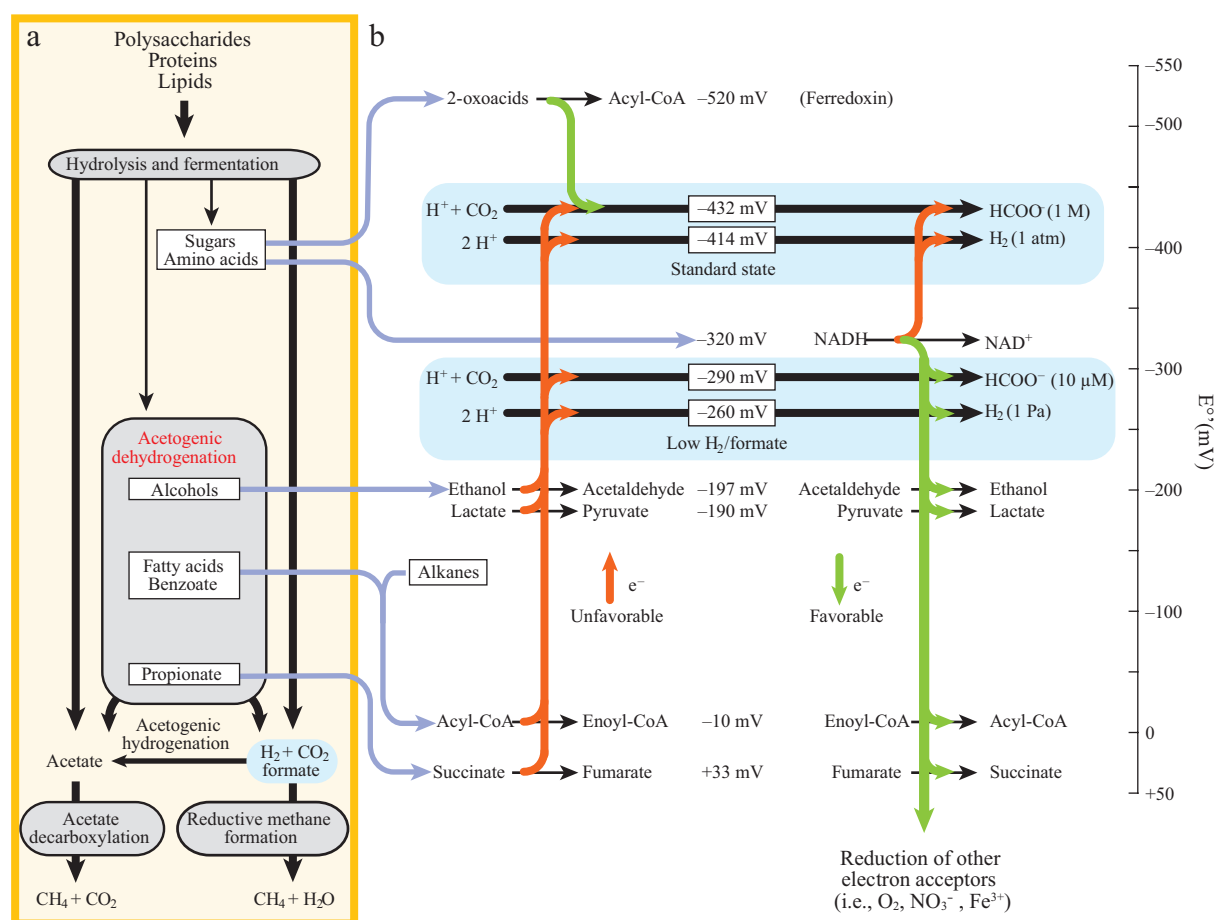
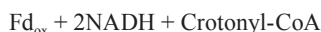


图2 产甲烷的过程和反向电子传递^[38]。(a) 有机物转化为甲烷的主要步骤;(b) 互营代谢中主要的氧化还原步骤。

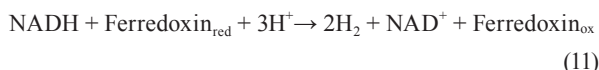
Fig. 2 Process of methanogenesis and reverse electron transfer^[38]. (a) Major metabolic reaction in the transformation of organic matter into methane; (b) main redox reactions involved in syntrophic metabolism.

被氧化,可以继续接受电子还原质子氢,从而形成氢气。



电子歧化要能进行需要满足3个条件。一是电子供体的标准氧化还原电势比铁氧还蛋白的高 ($E^0_{\text{donor}} - E^0_{\text{ferredoxin}} = \Delta E_1 > 0$), 二是另一个电子受体的标准氧化还原电势比电子供体的高 ($E^0_{\text{acceptor}} - E^0_{\text{donor}} = \Delta E_2 > 0$), 三是 $\Delta E_2 > \Delta E_1$, 这样黄素蛋白依赖型的电子歧化才能进行^[59]。

电子聚合则与电子歧化相反,它是指两种不同的电子供体将电子传递给同一种电子受体的电子传递方式^[38]。在电子聚合过程中,电子受体的标准氧化还原电势介于两种电子供体之间,电子受体接受电子后形成一种产物^[38]。例如,当氢气和甲酸的浓度比较高时(图2),电子从NADH流向 H^+ 或者 H^+/CO_2 在热力学上是不利的,但是电子从还原性的铁氧还蛋白流向 H^+ 或者 H^+/CO_2 是释放能量的。电子从还原性的铁氧还蛋白流向 H^+ 或者 H^+/CO_2 过程释放的能量可以推动电子从NADH流向 H^+ 或者 H^+/CO_2 ^[38]。



在活体细胞内,生成1mol的ATP至少需要60 kJ的自由能,每生成1分子ATP有3个质子穿过细胞膜^[7, 23, 49]。所以最少的代谢能量的单位是1个离子穿过细胞膜,相当于1/3的ATP单位,这意味着细菌代谢底物至少产生20 kJ的自由能才可以供细胞生长^[7, 23, 49]。对于许多物质的代谢,例如丙酸、乙醇、琥珀酸等,互营菌进行反向电子传递要消耗2/3分子ATP,初看起来这是一种能量的浪费,但是这允许氢气和甲酸的浓度在更大范围内变化,使得互营产甲烷过程能够进行^[7, 13, 22, 40, 48, 56]。图3展示的是互营菌通过反向电子传递氧化琥珀酸形成延胡索酸的可能步骤。

3.2 种间电子传递

互营菌与产甲烷菌的种间电子传递包括种间氢气转移、

种间甲酸转移和种间直接电子传递3种方式。种间电子传递在不同微生物中的情况不同,对于确定物种的互营菌群,可能存在多种电子传递方式。

3.2.1 种间氢气/甲酸转移 种间氢气转移是产甲烷系统中第一个被揭示的电子传递机制^[60]。种间氢气转移可能很重要,因为在种间距离比较近时,氢气比较容易穿过细菌的磷脂膜,很快地从互营菌传到产甲烷菌^[23]。如果氢气积累将阻碍发酵过程^[13]。

甲酸作为电子载体是在研究甲酸氧化互营杆菌(*Syntrophobacter fumaroxidans*)时发现的。人们发现,在有乳清和丁酸作为培养基的反应器中进行互营氧化丁酸,测到的甲烷形成速率仅用种间氢气转移无法解释,推测甲酸也可能是一种电子载体^[7]。在互营生长的微生物中甲酸脱氢酶活性的改变也是种间甲酸转移的一个证据^[21]。在扩散动力学上,氢气比甲酸容易扩散^[12]。有研究推测在单细胞的悬浮培养物中甲酸是更好的电子载体,因为在水中电子载体分子需要扩散很长的距离,但在厌氧发酵池这样密集的微生物细胞的团聚体中氢气作为电子载体可能更有效^[13, 21, 44, 49, 61]。

究竟是氢气还是甲酸作为主要的种间电子载体依不同互营系统和培养条件而异。当硫还原地杆菌(*Geobacter sulfurreducens*)和甲醇降解菌(*Pelobacter carbinolicus*)共培养时,虽然氢气与甲酸都参与种间电子传递,但是氢气的作用更大^[62]。氧化丁酸的沃尔夫氏互营单胞菌(*Syntrophomonas wolfei*)、氧化乙醇酸的乙酸互营香肠样杆菌(*Syntrophobotulus glycolicus*)和嗜中温的互营乙酸发酵菌株AOR,当它们共培养时,这些细菌都表现出高氢化酶活性,而甲酸脱氢酶活性很弱^[13]。在甲酸氧化互营杆菌(*Syntrophobacter fumaroxidans*)和亨氏甲烷螺菌(*Methanospirillum hungatei*)互营氧化丙酸过程中,甲酸是优先的电子载体^[21]。乙酸氧化细菌PB和利用甲酸/氢气的产甲烷菌TM共培养体系中氢气和甲酸都能作为电子载体,且两者

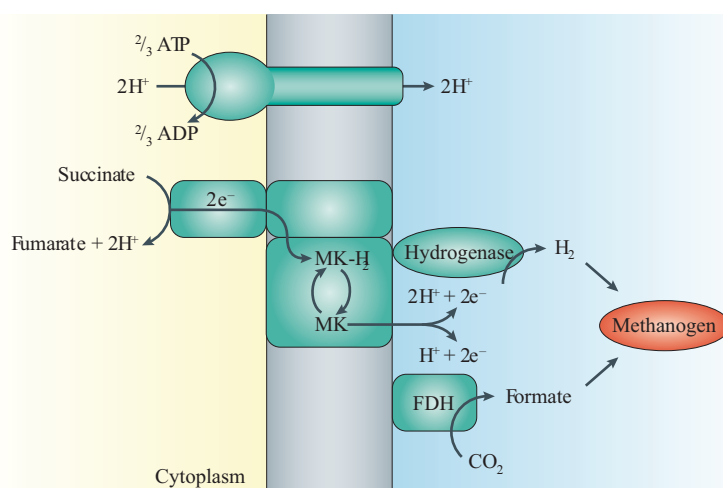


图3 反向电子传递驱动耗能的琥珀酸转化为延胡索酸的可能过程^[7]。在这个过程中可能存在一个酶复合体消耗ATP形成 H_2 和甲酸。催化琥珀酸氧化的酶含有膜融合蛋白MK, MK把电子传递给氢化酶和FDH。FDH: 甲酸脱氢酶; MK: 甲基萘醌。

Fig. 3 Possible pathway of reverse electron transport to drive the endergonic conversion of succinate into fumarate^[7]. The enzyme complex is proposed to couple the investment of ATP and producing H_2 and formate. Succinate oxidation is catalyzed by an enzyme that consists of membrane integrated MK that shuttle electrons to the hydrogenase and FDH. FDH: formate dehydrogenase; MK, menaquinone.

重要性相当^[63]。

除了氢气和甲酸两种主要的电子载体外,其他的一些分子也能作为电子穿梭载体,例如乙酸、胱氨酸、半胱氨酸等^[1],但是也有研究指出乙酸、胱氨酸、半胱氨酸等物质不能作为电子载体^[1]。在不同环境条件下,哪种底物能够被产甲烷菌单独利用或者被互营菌群利用还有待深入研究^[1,43]。

3.2.2 种间直接电子传递 种间直接电子传递是随着电子显微镜、菌毛染色等实验技术的发展而发现的第3种种间电子传递方式。但是并不是所有能够互营生长的菌群都能进行直接电子传递,而且即使亲缘关系近的微生物也可能利用不同的策略进行电子传递^[62]。

种间直接电子传递是指互营菌将电子传递到细胞外,胞外电子再通过特定的方式传递到产甲烷菌^[12]。微生物的胞外呼吸也涉及到微生物把电子传递到细胞外,不过胞外呼吸的电子受体多为固体(如铁/锰氧化物、石墨电极)或者大分子有机物^[64]。微生物将电子转移到胞外后,可通过以下3种方式将电子转移到电子受体(图4)。(I)直接接触机制(图4, I&II)。胞外呼吸细菌直接利用细胞外膜上的c型细胞色素或细胞表面附属物(菌毛)或导电介质将电子传递至受体^[12,15,64]。Summer等人发现硫还原地杆菌(*G. sulfurreducens*)和金属还原地杆菌(*G. metallireducens*)在其乙醇互营氧化体系中能够形成团聚体,硫还原地杆菌的导电性的c型细胞色素将电子传递到金属还原地杆菌^[65]。Reguera等人借助原子力显微镜观察在含有三价铁离子的培养基中生长的细菌时发现,地杆菌属细菌的菌毛是高度导电的^[66]。Kato等人发现在硫还原地杆菌和脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)互营氧化乙酸还原硝酸的过程中,磁铁矿纳米颗粒可以促进电子从硫还原地杆菌转移到脱氮硫杆菌^[67]。(II)电子穿梭体机制(图4, III)。氧化态的电子穿梭体在胞外呼吸细菌体内接受电子变成还原态,还原态的电子穿梭体被胞外呼吸细菌分泌到胞外并将电子转移至电子受体形成氧化态,氧化态的电子穿梭体回到胞外呼吸细菌体内。如此循环下去,将电子由胞外呼吸细菌转移到胞外受体^[12,64,68]。常见的氧化还原电子穿梭体主要有吩嗪类色素^[69]、核黄素^[70]和醌类^[71]等。(III)应电运动机制(图4, IV)。这是Harris等在对希瓦氏菌属(*Shewanella*)的研究中发现的一种新型胞外电子传递机制,胞外呼吸细菌先将电子储存在细胞表面形成“生物电容器”,然后通过“touch-and-go”的方式将电子传递其靠近

的胞外受体^[68]。这种电子传递不涉及电子穿梭体,由胞外呼吸细菌快速运动撞击受体表面释放电子而实现电子转移^[64]。

互营菌和产甲烷菌的种间直接电子传递主要依赖于直接接触机制,即互营菌利用细胞外膜上的c型细胞色素或细胞表面附属物(菌毛)将电子传递给产甲烷菌。Rotaru等发现^[72],巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*)和金属还原地杆菌(*G. metallireducens*)的共培养物会形成团聚体,通过直接电子传递途径分解乙醇。当巴氏甲烷八叠球菌和突变的金属还原地杆菌(没有菌毛蛋白)共培养时,乙醇不能被分解。但加入颗粒活性炭后巴氏甲烷八叠球菌和突变的金属还原地杆菌能够互营分解乙醇。说明颗粒活性炭能够取代菌毛蛋白参与种间直接电子传递。当巴氏甲烷八叠球菌和甲醇降解菌(*Pelobacter carbinolicus*)共培养时,种间电子传递利用种间氢气转移途径,而且和种间直接电子传递不同,巴氏甲烷八叠球菌和甲醇降解菌并不形成团聚体。Liu等人也发现在巴氏甲烷八叠球菌和金属还原地杆菌的共培养物种加入活性碳促进了乙醇的分解和甲烷的产生^[73]。Li等通过水稻土培养实验发现,在互营分解丁酸产甲烷过程中,磁铁矿纳米颗粒以不同的形态附着在微生物细胞表面,使细胞紧密相连,促进互营菌和产甲烷菌的种间直接电子传递^[74]。参与直接电子传递的细菌主要有互营单胞菌科(Syntrophomonadaceae)和地杆菌科(Geobacteraceae),产甲烷菌主要有甲烷八叠球菌科(Methanosarcinaceae)、甲烷胞菌目(Methanocellales)和甲烷微菌目(Methanomicrobiales)^[12]。

3.2.3 菌体团聚 Shimoyama等人的实验发现,在互营产甲烷的共培养物中不能分离到互营菌的鞭毛,可能是鞭毛粘附在产甲烷菌细胞上的缘故^[75]。鞭毛中的FliD蛋白质附着到产甲烷的表面,促进形成生物膜,使不同微生物形成团聚体,促进产甲烷过程发生^[8,75-76]。微生物团聚有利于互营菌群间的物质传递,特别是种间电子传递。因为氢气的扩散能力差,细胞聚集也提高了种间氢气转移的作用^[7,60,76-77]。

4 研究展望

由于互营微生物难于纯培养且互营微生物间的关系复杂等原因,互营微生物的研究进展一直很缓慢。电子显微镜、基因组测序、转录组分析、基因突变、核酸探针等生物

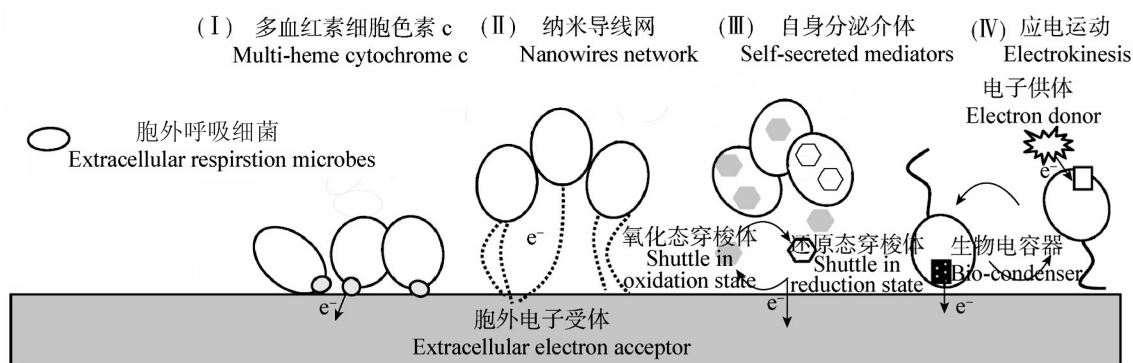


图4 胞外电子传递机制^[12,64]。

Fig. 4 Mechanisms of extracellular electron transfer^[12,64]。

技术的发展为研究互营微生物提供了新的手段。今后对互营微生物的研究可以集中在以下几个方面：(1) 产甲烷过程微生物群落的生态学研究，利用高通量测序技术、芯片技术等研究互营微生物菌群对环境变化的响应，从群落的角度研究互营菌群的动态变化和相互关系，探索通过改变互营菌群的方法控制甲烷排放的可能性；(2) 产甲烷菌纯化和改造的研究，分离新的产甲烷菌或者利用基因工程的方法改造已分离的产甲烷菌，制成菌剂，施加到低温沼气池、厌氧消化反应器等以促进有机物的降解及甲烷的产生；(3) 互营菌与产甲烷菌的种间直接电子传递的研究，种间直接电子传递目前主要局限在实验室模拟阶段，仅有少数几种底物能被为数不多的几种微生物以直接电子传递的方式代谢，人们对于种间直接电子传递的机制知之甚少，这方面的研究将有助于深入了解互营产甲烷过程，并为微生物燃料电池的发展提供理论支持。

参考文献 [References]

- Morris BEL, Henneberger R, Huber H, Eichinger CM. Microbial syntrophy: interaction for the common good [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2013, **37**: 384-406
- McInerney MJ, Sieber JR, Gunsalus RP. Microbial syntrophy ecosystem level biochemical cooperation - genomic sequences reveal systems required to produce hydrogen and formate, plus other hallmarks of the syntrophic lifestyle [J]. *Microbe*, 2011, **6** (11): 479-485
- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The Prokaryotes [M]. 3rd ed. New York: Springer, 2006: 309-335
- 刘鹏飞, 陆雅海. 水稻土中脂肪酸互营氧化的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, **40** (1): 109-122 [Liu PF, Lu YH. A review of syntrophic fatty acids oxidation in anoxic paddy soil [J]. *Microbiol China*, 2013, **40** (1): 109-122]
- 李煜珊, 李耀明, 欧阳志云. 产甲烷微生物研究概况[J]. 环境科学, 2014, **35** (5): 2025-2030 [Li YS, Li YM, Ouyang ZY. A research overview of methanogens [J]. *Environ Sci*, 2014, **35** (5): 2025-2030]
- 许惠青. 大气甲烷研究现状及进展[J]. 内蒙古科技与经济, 2010, **11** (213): 41-42 [Xu HQ. Current status and development of atmospheric methane [J]. *Inner Mongolia Sci Tech Econ*, 2010, **11** (213): 41-42]
- Stams AJM, Plugge CM. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, **7** (8): 568-577
- Kato S, Watanabe K. Ecological and evolutionary interactions in syntrophic methanogenic consortia [J]. *Microbes Environ*, 2010, **25** (3): 145-151
- 方晓瑜, 李家宝, 瑞俊鹏, 李香真. 产甲烷菌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]
- 张秀君. 大气甲烷源和汇的研究[J]. 沈阳教育学院学报, 2004, **6** (1): 132-134 [Zhang XJ. The major sources and sinks for atmospheric methane [J]. *J Shenyang Coll Educ*, 2004, **6** (1): 132-134]
- 张定媛, 廖宏. 大气甲烷的源和汇及其浓度的观测模拟研究进展[J]. 气象科技进展, 2015, **5** (1): 40-47 [Zhang DY, Liao H. Advances in the research on sources and sinks of CH₄ and observations and simulations of CH₄ concentrations [J]. *Adv Met Sci Technol*, 2015, **5** (1): 40-47]
- 张杰, 陆雅海. 互营氧化产甲烷微生物种间电子传递研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, **42** (5): 920-927 [Zhang J, Lu YH. A review of interspecies electron transfer in syntrophic-methanogenic associations [J]. *Microbiol China*, 2015, **42** (5): 920-927]
- Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation [J]. *Microbiol Mol Biol R*, 1997, **61** (2): 262-280
- McInerney MJ, Sieber JR, Gunsalus RP. Syntrophy in anaerobic global carbon cycles [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, **20**: 623-632
- Kouzuma A, Kato S, Watanabe K. Microbial interspecies interactions: recent findings in syntrophic consortia [J]. *Front Microbiol*, 2015, **6**: 1-8
- Sofer SS. Biomass Conversion Processes for Energy and Fuels [M]. New York: Plenum Press, 1981: 277-296
- Gieg LM, Fowler SJ, Berdugo-Clavijo C. Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, **27**: 21-29
- Muller N, Worm P, Schink B, Stams AJ, Plugge CM. Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms [J]. *Environ Microbiol Rep*, 2010, **2** (4): 489-499
- 李美群, 邓洁红, 熊兴耀, 谭兴和, 周红丽, 李清明, 苏小军, 张喻, 唐艳红, 彭丹, 张艳艳. 产甲烷菌的研究进展[J]. 酿酒科技, 2009, **5**: 90-93 [Li MQ, Deng JH, Xiong XY, Tan XH, Zhou HL, Li QM, Su XJ, Zhang Y, Tang YH, Peng D, Zhang YY. Research progress in psychrophilic methanogenic bacteria [J]. *Liquor-making Sci Technol*, 2009, **5**: 90-93]
- 傅霖, 辛明秀. 产甲烷菌的生态多样性及工业应用[J]. 应用与环境生物学报, 2009, **15** (2): 574-578 [Fu L, Xin MX. Ecological diversity and industrial application of methanogens [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, **15** (2): 574-578]
- Debok FA, Luijten MLGC, Stams AJM. Biochemical evidence for formate transfer in syntrophic propionate-oxidizing cocultures of *Syntrophobacter fumaroxidans* and *Methanospirillum hungatei* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (9): 4247-4252
- Stams AJ, De Bok FA, Plugge CM, Van Eekert MH, Dolfing J, Schraa G. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities [J]. *Environ Microbiol*, 2006, **8** (3): 371-382
- Stams AJM. Metabolic interaction between anaerobic bacteria in methanogenic environments [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1994, **66**: 271-294
- Morgavi DP, Forano E, Martin C, Newbold CJ. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants [J]. *Animal*, 2010, **4** (7): 1024-1036
- 王保玉, 刘建民, 韩作颖, 刘健, 胡斌. 产甲烷菌的分类及研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, **33** (2): 418-425 [Wang BY, Liu JM, Han ZY, Liu J, Hu B. Recent progress and classification of methanogens [J]. *Genom App Biol*, 2014, **33** (2): 418-425]
- Borrel G, Parisot N, Harris HMB, Peyretailade E, Gaci N, Tottey W, baradot O, Raymann K, Gribaldo S, Peyret P, O'toole PW, Brugere JF. Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine [J]. *BMC Genomics*, 2014, **15** (679): 1-23
- Sakai S, Imachi H, Hanada S, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y. *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 [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, **58** (4): 929-936
- Paul K, Nonoh JO, Mikulski L, Brune A. "Methanoplasmatales",

- Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, **78** (23): 8245-8253
- 29 张瑞, 雍晓雨, 周俊, 吴美容, 王舒雅, 闫志英, 陈怡露, 郑涛. 分子生物学技术在产甲烷古菌多样性研究中的应用[J]. 江苏农业科学, 2015, **43** (1): 16-20 [Zhang R, Yong XY, Zhou J, Wu MR, Wang SY, Yan ZY, Chegn YL, Zheng T. Application of molecular biological technology in the study of the diversity of methanogens [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2015, **43** (1): 16-20]
- 30 朱晨光, 许政璇, 宋任涛. 产甲烷古菌[J]. 生命的化学, 2009, **29** (1): 129-133 [Zhu CG, Xu ZK, Song RT. Progress in research of methanogens [J]. *Chem Life*, 2009, **29** (1): 129-133]
- 31 Lykidis A, Chen CL, Tringe SG, McHardy AC, Copeland A, Kyrpides NC, Hugenholtz P, Macarie H, Olmos A, Monroy O, Liu WT. Multiple syntrophic interactions in a terephthalate-degrading methanogenic consortium [J]. *ISME J*, 2011, **5** (1): 122-130
- 32 Elferink SJWHO, Vorstman WJC, Sopjes A, Stams AJM. Characterization of the sulfate-reducing and syntrophic population in granular sludge from a full-scale anaerobic reactor treating papermill wastewater [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1998, **27**: 185-194
- 33 Valentine DL, Reeburgh WS. New perspectives on anaerobic methane oxidation [J]. *Environ Microbiol*, 2000, **2** (5): 477-484
- 34 麻婷婷, 承磊, 刘来雁, 代莉蓉, 周正, 张辉. 不同抑制剂对乙酸降解产甲烷及产甲烷菌群结构的影响[J]. 微生物学报, 2015, **55** (5): 587-597 [Ma TT, Cheng L, Liu LY, Dai LR, Zhou Z, Zhang H. Effects of selective methanogenic inhibitors on methanogenesis and methanogenic communities in acetate degrading cultures [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2015, **55** (5): 587-597]
- 35 Gray ND, Sherry A, Grant RJ, Rowan AK, Hubert CR, Callbeck CM, Aitken CM, Jones DM, Adams JJ, Larter SR, Head IM. The quantitative significance of Syntrophaceae and syntrophic partnerships in methanogenic degradation of crude oil alkanes [J]. *Environ Microbiol*, 2011, **13** (11): 2957-2975
- 36 Mcinerney MJ, Bryant MP, Pfennig N. Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens [J]. *Arch Microbiol*, 1979, **122**: 129-135
- 37 Conrad R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1999, **28**: 193-202
- 38 Sieber JR, Mcinerney MJ, Gunsalus RP. Genomic insights into syntrophy: the paradigm for anaerobic metabolic cooperation [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2012, **66**: 429-452
- 39 Kotsyurbenko OR, Glagolev MV, Nozhevnikova AN, Conrad R. Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **38**: 153-159
- 40 Kemp MB, Quayle JR. Microbial Growth on C1 Compounds [J]. *Biochem J*, 1996, **102**: 94-102
- 41 Bleicher K, Winter J. Formate production and utilization by methanogens and by sewage sludge consortia-interference with the concept of interspecies formate transfer [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **40**: 910-915
- 42 Wu WM, Hickey RF, Jain MK, Zeikus JG. Energetics and regulations of formate and hydrogen metabolism by *Methanobacterium formicicum* [J]. *Arch Microbiol*, 1993, **159**: 57-65
- 43 Dolfing J, Jiang B, Henstra AM, Stams AJ, Plugge CM. Syntrophic growth on formate: a new microbial niche in anoxic environments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74** (19): 6126-6131
- 44 Boone DR, Johnson RL, Liu Y. Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K_m for H₂ or formate uptake [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55** (7): 1735-1741
- 45 Schonheit P, Kristjansson JK, Thauer RK. Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out-compete methanogens for acetate [J]. *Arch Microbiol*, 1982, **132**: 285-288
- 46 Dong X, Stams AJM. Evidence for H₂ and formate formation during syntrophic butyrate and propionate degradation [J]. *Anaerobe*, 1995, **1**: 35-39
- 47 Lee MJ, Zinder SH. Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54** (6): 1457-1461
- 48 Valentine DL, Reeburgh WS, Blanton DC. A culture apparatus for maintaining H₂ at sub-nanomolar concentrations [J]. *J Microbiol Meth*, 2000, **39**: 243-251
- 49 De Bok FA, Plugge CM, Stams AJ. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia [J]. *Water Res*, 2004, **38** (6): 1368-1375
- 50 Hoehler TM, Alperin MJ, Albert DB, Martens CS. Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 1998, **62** (10): 1745-1756
- 51 Valentine DL, Blanton DC, Reeburgh WS. Hydrogen production by methanogens under low-hydrogen conditions [J]. *Arch Microbiol*, 2000, **174** (6): 415-421
- 52 Harmsen HJM, Kengen HMP, Akkermans ADL, Stams AJM. Phylogenetic analysis of two syntrophic propionate-oxidizing bacteria in enrichments cultures [J]. *Syst Appl Microbiol*, 1995, **18**: 67-73
- 53 Weiner A, Schopf S, Gerhard W, Alexander P, Wirth. Positive, neutral and negative interactions in cocultures between *Pyrococcus furiosus* and different methanogenic archaea [J]. *Microbiol Insights*, 2012, **5**: 1-10
- 54 Schocke L, Schink B. Energetics of methanogenic benzoate degradation by *Syntrophus gentianae* in syntrophic coculture [J]. *Microbiology*, 1997, **143**: 2245-2251
- 55 Warikoo V, Mcinerney MJ, Robinson JA, Suflita JM. Interspecies acetate transfer influences the extent of anaerobic benzoate degradation by syntrophic consortia [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (1): 26-32
- 56 Sieber JR, Sims DR, Han C, Kim E, Lykidis A, Lapidus AL, McDonnald E, Rohlin L, Culley DE, Gunsalus R, Mcinerney MJ. The genome of *Syntrophomonas wolfei*: new insights into syntrophic metabolism and biohydrogen production [J]. *Environ Microbiol*, 2010, **12** (8): 2289-2301
- 57 Schink CWB. Evidence of reversed electron transport in syntrophic butyrate or benzoate oxidation by *Syntrophomonas wolfei* and *Syntrophus buswellii* [J]. *Arch Microbiol*, 1994, **162**: 136-142
- 58 Dong X, Stams AJM. Localization of the enzymes involved in H₂ and formate metabolism in *Syntrophospora bryantii* [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1995, **67**: 345-350
- 59 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
- 60 Morita M, Malvankar NS, Franks AE, Summers ZM, Giloteaux L, Rotaru AE, Rotaru C, Lovley DR. Potential for direct interspecies

- electron transfer in methanogenic wastewater digester aggregates [J]. *mBio*, 2011, **2** (4): 1-8
- 61 Bok FaMD, Hagedoorn P-L, Silva PJ, Hagen WR, Schiltz E, Fritsche K, Stams AJM. Two W-containing formate dehydrogenases (CO₂-reductases) involved in syntrophic propionate oxidation by *Syntrophobacter fumaroxidans* [J]. *Eur J Biochem*, 2003, **270**: 2476-2485
 - 62 Rotaru AE, Shrestha PM, Liu F, Ueki T, Nevin K, Summers ZM, Lovley DR. Interspecies electron transfer via hydrogen and formate rather than direct electrical connections in cocultures of *Pelobacter carbinolicus* and *Geobacter sulfurreducens* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, **78** (21): 7645-7651
 - 63 Hattori S, Luo H, Shoun H, Kamagata Y. Involvement of formate as an interspecies electron carrier in a syntrophic acetate-oxidizing anaerobic microorganism in coculture with methanogens [J]. *J Biosci Bioeng*, 2001, **91** (3): 294-298
 - 64 马晨, 周顺桂, 庄莉, 武春媛. 微生物胞外呼吸电子传递机制研究进展[J]. *生态学报*, 2011, **31** (7): 2008-2018 [Ma C, Zhou SG, Zhuang L, Wu CY. Electron transfer mechanism of extracellular respiration: a review [J]. *Acta Ecol Sin*, 2011, **31** (7): 2008-2018]
 - 65 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** (3): 1413-1415
 - 66 Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, Lovley DR. Extracellular electron transfer via microbial nanowires [J]. *Nature*, 2005, **435** (7045): 1098-1101
 - 67 Kato S, Hashimoto K, Watanabe K. Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals [J]. *PNAS*, 2012, **109** (25): 10042-10046
 - 68 Harris HW, El-Naggar MY, Bretschger O, Ward MJ, Romine MF, Obraztsova AY, Nealson KH. Electrokinesis is a microbial behavior that requires extracellular electron transport [J]. *PNAS*, 2010, **107** (1): 326-331
 - 69 Rabaey K, Boon N, Hofte M, Verstraete W. Microbial Phenazine Production enhances electron transfer in biofuel cells [J]. *Environ Sci Technol*, 2005, **39** (9): 3401-3408
 - 70 Marsili E, baron DB, Shikhare ID, Coursolle D, Gralnick JA, Bond DR. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer [J]. *PNAS*, 2008, **105** (10): 3968-3973
 - 71 Smith JA, Nevin KP, Lovley DR. Syntrophic growth via quinone-mediated interspecies electron transfer [J]. *Front Microbiol*, 2015, **6**: 1-8
 - 72 Rotaru AE, Shrestha PM, Liu F, Markovait 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
 - 73 Liu F, Rotaru A-E, Shrestha PM, Malvankar NS, Nevin KP, Lovley DR. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon [J]. *Energ Environ Sci*, 2012, **5** (10): 8982
 - 74 Li H, Chang J, Liu P, Fu L, Ding D, Lu Y. Direct interspecies electron transfer accelerates syntrophic oxidation of butyrate in paddy soil enrichments [J]. *Environ Microbiol*, 2015, **17** (5): 1533-1547
 - 75 Shimoyama T, Kato S, Ishii S, Watanabe K. Flagellum mediates symbiosis [J]. *Science*, 2009, **323**: 1574
 - 76 Ishii S, Kosaka T, Hori K, Hotta Y, Watanabe K. Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71** (12): 7838-7845
 - 77 Ishii S, Kosaka T, Hotta Y, Watanabe K. Simulating the contribution of coaggregation to interspecies hydrogen fluxes in syntrophic methanogenic consortia [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72** (7): 5093-5096