

## 产甲烷古菌研究进展

承磊<sup>1,2\*</sup> 郑珍珍<sup>1,2</sup> 王聪<sup>1,3</sup> 张辉<sup>1,2</sup>

(1. 农业部农村可再生能源开发利用重点实验室 四川 成都 610041)

(2. 农业部沼气科学研究所 四川 成都 610041)

(3. 四川大学轻纺与食品学院 四川 成都 610065)

**摘要:** 产甲烷古菌是一类严格厌氧的古菌, 只能利用简单的化合物进行产甲烷生长。产甲烷古菌在地球生命起源和进化、全球气候变化、碳生物地球化学循环和农业废弃物资源化利用等领域, 都起着至关重要的作用。系统了解产甲烷古菌的生物学特征, 将有助于在这些基础和应用领域的研究工作。本文主要从生理生化特征、代谢途径、能量储存和系统分类等方面介绍产甲烷古菌的研究进展。

**关键词:** 产甲烷古菌, 营养类型, 代谢途径, 系统分类, 生态学功能

## Recent advances in methanogens

CHENG Lei<sup>1,2\*</sup> ZHENG Zhen-Zhen<sup>1,2</sup> WANG Cong<sup>1,3</sup> ZHANG Hui<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Development and Application of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Chengdu, Sichuan 610041, China)

(2. Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu, Sichuan 610041, China)

(3. College of Light Industry, Textile and Food Engineering, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

**Abstract:** Methanogen is a group of strictly anaerobic archaea, which can obtain energy for growth by formation of methane from simple compounds. The archaea is most likely linked to the origins and evolution of life on Earth, and plays an important role in global climate change, carbon biogeochemical cycle and resource utilization of agricultural wastes. The comprehensive understanding of biological characteristics of methanogens will promote the basic and applied research. This review summarizes recent studies of methanogens, including the physiological and chemical properties, metabolism pathway, energy conservation and systematic taxonomy.

**Keywords:** Methanogen, Nutritional types, Metabolism pathway, Systematic taxonomy, Ecological functions

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31570009); National High Technology Research and Development Program of China (No. 2013AA064401); China Petroleum and Chemical Corporation (No. P15072)

\*Corresponding author: Tel: 86-28-85226085; E-mail: chenglei@caas.cn

**Received:** December 01, 2015; **Accepted:** January 28, 2016; **Published online** (www.cnki.net): February 03, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31570009); 国家 863 计划项目(No. 2013AA064401); 中国石油化工股份有限公司项目(No. P15072)

\*通讯作者: Tel: 86-28-85226085; E-mail: chenglei@caas.cn

收稿日期: 2015-12-01; 接受日期: 2016-01-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-02-03

产甲烷古菌是地球上最古老的生命形式之一,从 34.6 亿年前就出现在地球上<sup>[1-2]</sup>,它可能还是火星等地外星球上的土著微生物<sup>[3]</sup>。产甲烷古菌的生长代谢活动与气候变化紧密相关,也许还是 2.5 亿年前物种大灭绝的元凶<sup>[4]</sup>。现在每年排放到大气中的甲烷量约 500–600 Tg,大约 69%是微生物代谢所产生的,产甲烷古菌是其中主要的贡献者<sup>[5]</sup>。产甲烷古菌分布广泛,存在于湿地<sup>[6]</sup>、水稻田<sup>[7]</sup>、淡水和海洋沉积物<sup>[8-10]</sup>、植物根际<sup>[11]</sup>、地下油藏和煤藏<sup>[12-13]</sup>、动物瘤胃和肠道<sup>[14-15]</sup>及厌氧消化器<sup>[16]</sup>等自然和人工环境中,甚至存活在干旱的沙漠<sup>[17]</sup>和高温热泉中<sup>[18]</sup>,在地球主要元素的生物化学循环过程中起着重要作用<sup>[19]</sup>。产甲烷古菌在有机质厌氧生物降解过程的最后一个环节发挥着关键作用,是生物甲烷形成的直接贡献者,这种可再生能源的开发利用日益受到世界各国的关注<sup>[20]</sup>。因此,开展产甲烷古菌的研究具有重要的理论和现实意义。

## 1 产甲烷古菌的生理生化特征

### 1.1 产甲烷古菌的生理特征

产甲烷古菌是严格的厌氧微生物,不能利用氧气作为电子受体,只有少数产甲烷古菌在微量氧气中短时间存活<sup>[21-22]</sup>。产甲烷古菌的形态学特征与其它微生物差别并不大,但是产甲烷古菌中含有的辅酶 F<sub>420</sub> 是参与甲烷代谢途径的关键辅因子,氧化态时吸收 420 nm 左右的紫外光,激发出约 470 nm 的蓝绿色荧光<sup>[23]</sup>。利用这个光谱学特征,可以在荧光/可见光显微镜下区别产甲烷古菌和非产甲烷古菌。产甲烷古菌的生长温度范围非常宽泛<sup>[24]</sup>,最低温度接近 0 °C<sup>[25-26]</sup>,最高可达到 110 °C<sup>[18]</sup>,在 20 MPa 的高压条件下产甲烷温度可高达 122 °C<sup>[27]</sup>,它也是生长温度最高的微生物之一。pH 是影响产甲烷代谢的重要环境因子<sup>[28]</sup>,产甲烷古菌的 pH 生长范围比较窄,一般在靠近中性条件(pH 6.0–8.0)生长。只有极少数产甲烷古菌可在 pH 生长低至 4.5 左右<sup>[29-30]</sup>,少数产甲烷古菌的最适生长 pH 值达 9.0–9.5<sup>[31-32]</sup>。此外,产甲烷古菌广泛分布在海洋

和盐湖等沉积环境,具有较高的耐盐能力,耐受 Na<sup>+</sup> 的最高浓度可达到 3.3–3.5 mol/L<sup>[31-32]</sup>。

### 1.2 产甲烷古菌的生化特征

产甲烷古菌利用的底物种类非常有限,根据底物利用特征主要可分为 3 种营养类型:氢营养型产甲烷古菌、乙酸营养型产甲烷古菌和甲基营养型产甲烷古菌<sup>[33]</sup>。

**1.2.1 氢营养型产甲烷古菌:** 氢营养型产甲烷古菌利用 H<sub>2</sub>、甲酸盐等电子供体还原 CO<sub>2</sub> 产生 CH<sub>4</sub> (表 1),在产甲烷古菌的模式菌株中,3/4 以上的产甲烷古菌模式菌株能利用 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 生长。有的氢营养型产甲烷古菌可以利用二元醇、丙酮酸盐作为电子供体,如 *Methanogenium organophilum* 和 *Methanofollis ethanolicus* 可以直接利用乙醇、2-丙醇或 2-丁醇进行产 CH<sub>4</sub> 生长<sup>[34-36]</sup>。*Methanococcus* spp. 能利用丙酮酸盐作为电子供体(代替 H<sub>2</sub> 的功能)还原 CO<sub>2</sub> 产生 CH<sub>4</sub>,但是产甲烷速率只有 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 的 1%–4%,当 H<sub>2</sub> 存在条件下,可以转化丙酮酸盐生成 10%–30% 的细胞碳,但这不能完全替代其它的碳固定途径<sup>[37]</sup>。*Methanobacterium thermoautotrophicum* 生长所需要的细胞生物质,最高有 80% 可以从同化丙酮酸盐中获取<sup>[38]</sup>。少数氢营养型产甲烷古菌利用 CO 生长<sup>[39]</sup>。如 *Methanothermobacter thermoautotrophicus* 可以利用低浓度 CO (<60%) 生长并产 CH<sub>4</sub>,当 CO 浓度为 100% 时生长缓慢,其产甲烷速率只有利用 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 的 1%<sup>[40]</sup>。

**1.2.2 甲基营养型产甲烷古菌:** 甲基营养型产甲烷古菌能利用甲基类化合物(如甲醇)、甲胺类化合物(如甲胺、二甲胺、三甲胺)和甲基硫化物(如甲硫醇、二甲基硫)进行产 CH<sub>4</sub> 生长(表 1)。甲基营养型产甲烷古菌主要分布在 *Methanosarcinacea*、*Methanomassiliicoccus* 和 *Methanosphaera* 中<sup>[41-43]</sup>。*Methanosarcinacea* 中有 8 个属都是专性甲基营养型产甲烷古菌,最近研究发现 *Methanococcoides* spp. 还可以利用 N,N-二甲基乙醇胺、胆碱、甜菜碱等

表 1 不同营养类型产甲烷古菌的代谢反应和吉布斯自由能<sup>[33]</sup>  
Table 1 Free energies of methanogenesis reactions and corresponding methanogens<sup>[33]</sup>

底物利用类型和反应 Substrate utilization and reactions	标准吉布斯自由能 $\Delta G^0$ (KJ/mol CH <sub>4</sub> ) <sup>[33]</sup>	产甲烷古菌 Methanogens
Hydrogenotrophic 4H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> →CH <sub>4</sub> +2H <sub>2</sub> O	-135	Methanobacteriales : <i>Methanobacterium</i> 、 <i>Methanobrevibacter</i> 、 <i>Methanothermobacter</i> 、 <i>Methanothermus</i> Methanococcales : <i>Methanocaldococcus</i> 、 <i>Methanotorris</i> 、 <i>Methanococcus</i> 、 <i>Methanothermococcus</i> Methanocellales : <i>Methanocella</i> Methanomicrobiales : <i>Methanocalculus</i> 、 <i>Methanocorpusculum</i> 、 <i>Methanoculleus</i> 、 <i>Methanofollis</i> 、 <i>Methanogenium</i> 、 <i>Methanolacinia</i> 、 <i>Methanomicrobium</i> 、 <i>Methanoplanus</i> 、 <i>Methanolinea</i> 、 <i>Methanoregula</i> 、 <i>Methanosphaerula</i> Methanosarcinales : <i>Methanosarcina</i> Methanopyrales : <i>Methanopyrus</i>
4HCOOH→CH <sub>4</sub> +3CO <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	-130	Methanobacteriales : <i>Methanobacterium</i> 、 <i>Methanobrevibacter</i> 、 <i>Methanothermobacter</i> Methanococcales : <i>Methanococcus</i> 、 <i>Methanothermococcus</i> 、 <i>Methanotorris</i> Methanocellales : <i>Methanocella</i> Methanomicrobiales : <i>Methanocalculus</i> 、 <i>Methanocorpusculum</i> 、 <i>Methanoculleus</i> 、 <i>Methanofollis</i> 、 <i>Methanogenium</i> 、 <i>Methanolacinia</i> 、 <i>Methanolinea</i> 、 <i>Methanomicrobium</i> 、 <i>Methanoplanus</i> 、 <i>Methanoregula</i> 、 <i>Methanosphaerula</i> 、 <i>Methanospirillum</i>
2CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH+CO <sub>2</sub> →2CH <sub>3</sub> COOH+CH <sub>4</sub>	-112 <sup>[59]</sup>	Methanomicrobiales : <i>Methanogenium</i> 、 <i>Methanofollis</i>
CO <sub>2</sub> +4(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHOH→CH <sub>4</sub> +4CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> +2H <sub>2</sub> O	-37	Methanobacteriales : <i>Methanobacterium</i> Methanomicrobiales : <i>Methanocorpusculum</i> 、 <i>Methanoculleus</i> 、 <i>Methanofollis</i> 、 <i>Methanogenium</i> 、 <i>Methanolacinia</i>
4CO+2H <sub>2</sub> O→CH <sub>4</sub> +3CO <sub>2</sub>	-196	Methanobacteriales : <i>Methanothermobacter</i> Methanosarcinales : <i>Methanosarcina</i>
Methylotrophic 4CH <sub>3</sub> OH→3CH <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	-105	Methanosarcinales : <i>Halomethanococcus</i> 、 <i>Methanococcoides</i> 、 <i>Methanolobium</i> 、 <i>Methanolobus</i> 、 <i>Methanomethylovorans</i> 、 <i>Methanosalsum</i> 、 <i>Methanosarcina</i> 、 <i>Methermicoccus</i>
CH <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> →CH <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	-113	Methanobacteriales : <i>Methanobacterium</i> 、 <i>Methanosphaera</i> Methanomassiliicoccales : <i>Methanomassiliicoccus</i>
2(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S+3H <sub>2</sub> O→3CH <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> S	-49	Methanosarcinales : <i>Methanolobus</i> 、 <i>Methanomethylovorans</i> 、 <i>Methanosalsum</i> 、 <i>Methanosarcina</i>
4CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O→3CH <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub> +4NH <sub>3</sub>	-75	Methanosarcinales : <i>Methanococcoides</i> 、 <i>Methanolophilus</i> 、 <i>Methanolobus</i> 、 <i>Methanomethylovorans</i> 、 <i>Methanosalsum</i> 、 <i>Methanosarcina</i> 、 <i>Methermicoccus</i>
2(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH+2H <sub>2</sub> O→3CH <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub> +2NH <sub>3</sub>	-73	Methanosarcinales : <i>Methanococcoides</i> 、 <i>Methanolophilus</i> 、 <i>Methanolobus</i> 、 <i>Methanomethylovorans</i> 、 <i>Methanosarcina</i>

(待续)

(续表)

$4(\text{CH}_3)_3\text{N}+6\text{H}_2\text{O}\rightarrow 9\text{CH}_4+3\text{CO}_2+4\text{NH}_3$	-74	Methanosarcinales : <i>Methanococcoides</i> 、 <i>Methanohalophilus</i> 、 <i>Methanobolus</i> 、 <i>Methanomethylovorans</i> 、 <i>Methanosarcina</i> 、 <i>Methermicoccus</i>
$4(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-+2\text{H}_2\text{O}\rightarrow 4(\text{CH}_3)_2\text{NH}^+$ $\text{CH}_2\text{COO}^-+3\text{CH}_4+\text{CO}_2$	-721.7 <sup>[45]</sup>	Methanosarcinales : <i>Methanococcoides</i>
$4(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}+6\text{H}_2\text{O}\rightarrow 4\text{H}_2\text{NCH}_2$ $\text{CH}_2\text{OH}+9\text{CH}_4+3\text{CO}_2+4\text{H}^+$	-567.6 <sup>[46]</sup>	Methanosarcinales : <i>Methanococcoides</i>
$2(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}+2\text{H}_2\text{O}\rightarrow 2\text{H}_2\text{NCH}_2\text{C}$ $\text{H}_2\text{OH}+3\text{CH}_4+\text{CO}_2$	-140.8 <sup>[46]</sup>	Methanosarcinales : <i>Methanococcoides</i>
Aceticlastic		
$\text{CH}_3\text{COOH}\rightarrow \text{CH}_4+\text{CO}_2$	-33	Methanosarcinales : <i>Methanosarcina</i> 、 <i>Methanotherix</i>
$4\text{CH}_3\text{COCOOH}+2\text{H}_2\text{O}\rightarrow 5\text{CH}_4+7\text{CO}_2$	-96 <sup>[47,60]</sup>	Methanosarcinales : <i>Methanosarcina</i>

复杂的甲基类化合物生长产  $\text{CH}_4$ <sup>[44-46]</sup>。*Methanosarcina* 可以利用甲基类化合物生长，有的也利用乙酸、 $\text{H}_2/\text{CO}_2$ 、CO 甚至丙酮酸盐<sup>[42]</sup>。如 *Methanosarcina barkeri* Fusaro 可以利用丙酮酸作为碳源和能源产生  $\text{CH}_4$  和  $\text{CO}_2$ ，其细胞得率为 14 g 干重/mol  $\text{CH}_4$ ，远高于乙酸发酵产生的 3 g 干重/mol  $\text{CH}_4$ <sup>[47]</sup>。*M. barkeri* 利用 CO (100%)和甲醇(50 mmol/L)生长，也可以在浓度小于 50%的 CO 中生长产甲烷，并且伴有氢气产生<sup>[48]</sup>。*Methanospaera* 只能利用  $\text{H}_2$ /甲醇进行产甲烷代谢，不单独利用甲醇、 $\text{H}_2/\text{CO}_2$ 、乙酸或甲基胺类化合物生长<sup>[49-50]</sup>。*Methanomassiliicoccus luminyensis* 是从人体粪便分离出的第 3 个产甲烷古菌新种，只能在  $\text{H}_2$ /甲醇条件下生长产  $\text{CH}_4$ <sup>[43]</sup>。最近它被归到产甲烷古菌的第 7 个目中<sup>[14,51-52]</sup>。

**1.2.3 乙酸营养型产甲烷古菌：**乙酸营养型产甲烷古菌只利用乙酸产生  $\text{CH}_4$  和  $\text{CO}_2$  (表 1)。目前只有 *Methanosarcina* 和 *Methanotherix* (代替之前的 *Methanosaeta*)能利用乙酸产  $\text{CH}_4$ <sup>[42,53]</sup>。如上文所述，*Methanosarcina* 能利用多种不同类型底物，如  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ 、乙酸和甲基类化合物进行产  $\text{CH}_4$  生长<sup>[42]</sup>。*Methanotherix* 是专性乙酸营养型产甲烷古菌，包括 2 个有效种，另外还有 1 个同名种和 1 个待有效种<sup>[53]</sup>。*Methanosarcina* 利用乙酸的最低极限浓度为 0.2–3.0 mmol/L，与此相比，*Methanotherix* 只有 7–70  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[54-56]</sup>。这可能与 *Methanosarcina* 乙酸激酶对乙酸的亲和力比 *Methanotherix* 乙酰辅酶 A 合

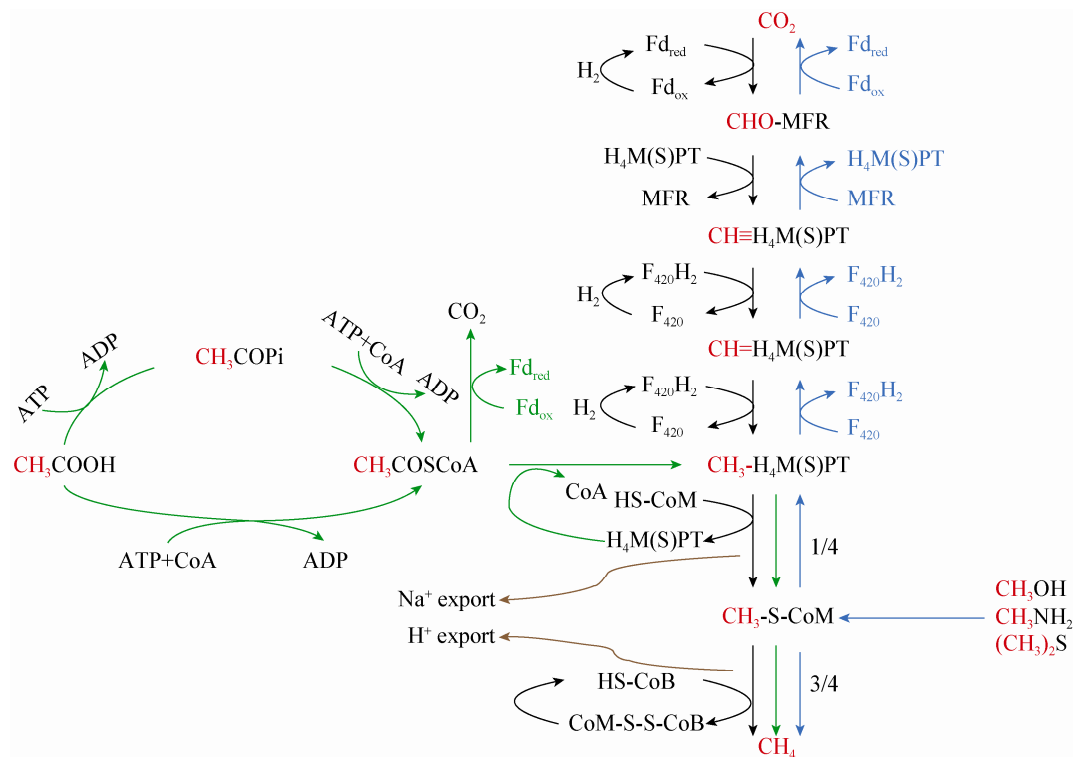
成酶的低有关<sup>[57]</sup>。去年的研究报道发现 *Methanotherix harudinacea* 可以直接利用电子还原  $\text{CO}_2$  产生  $\text{CH}_4$ <sup>[58]</sup>。

## 2 产甲烷代谢和电子传递

产甲烷古菌只能通过产甲烷代谢获取能量来生长繁殖，根据其碳代谢途径差异，可以分为 3 种 (图 1)： $\text{CO}_2$  还原途径、甲基裂解途径和乙酸发酵途径<sup>[61]</sup>。在碳代谢过程中，产甲烷古菌通过电子呼吸链来推动形成跨膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  梯度，再通过  $\text{A}_1\text{A}_0$ -ATP 酶合成 ATP<sup>[62]</sup>。其中铁氧化还原蛋白(Fd)、甲烷吩嗪(MP)、细胞色素(Cytochrome)、 $\text{H}_2$  和  $\text{F}_{420}$  是电子传递的重要载体，介导电子传递的多酶复合体是重要功能单元<sup>[63]</sup>。

### 2.1 $\text{CO}_2$ 还原途径

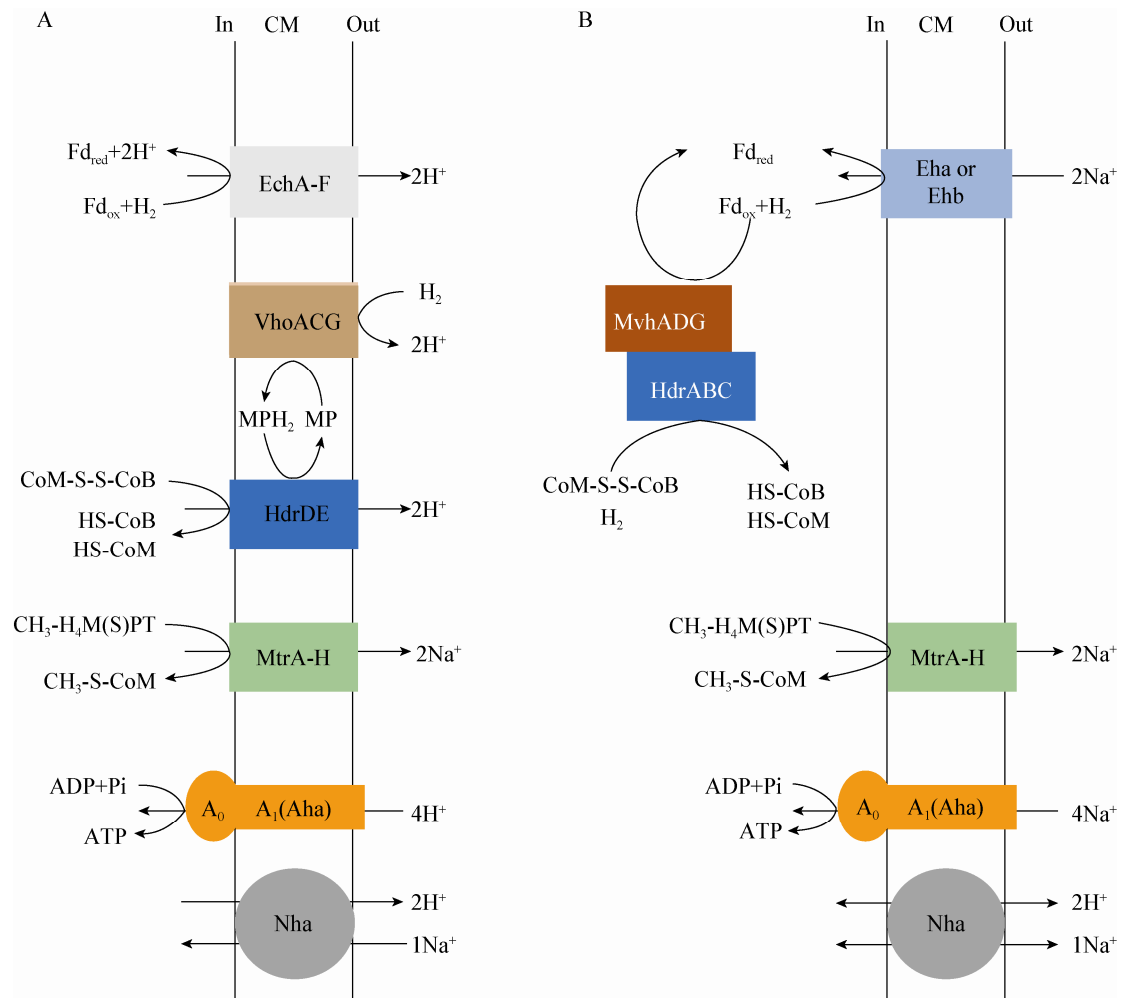
$\text{CO}_2$  首先被甲酰甲烷呋喃脱氢酶还原为甲酰基，并连接在 C1 载体甲酰呋喃(MFR)上形成 CHO-MFR，这是一个吸能反应，需要跨膜离子或质子梯度来驱动。 $-\text{CHO}$  被转移给另一个 C1 载体四氢甲酰喋呤( $\text{H}_4\text{MPT}$ )，再依次被还原为次甲基( $\equiv\text{CH}$ )、亚甲基( $=\text{CH}$ )和甲基( $-\text{CH}_3$ )，催化这些反应需要辅酶  $\text{F}_{420}$  作为电子载体。在甲基四氢甲酰喋呤：CoM 甲基转移酶(Mtr)的作用下，甲基被转移到第 3 个 C1 载体巯基辅酶 M (HS-CoM)上，这个跨膜蛋白与  $\text{Na}^+$  跨膜传输耦联，从而在还原  $\text{CO}_2$  过程中推动形成跨膜的  $\text{Na}^+$  梯度( $\Delta\mu\text{Na}^+$ )。最后一步是甲基辅酶 M 还原酶(Mcr)将其转化为甲烷 (图 1)。Mcr 是所有产甲烷代谢中的关键功能酶，



**Figure 1** Methanogenic pathway of methanogens<sup>[63,72]</sup>

原氢酶(VhoACG, 之前称为甲基紫精还原氢酶或 F<sub>420</sub>-非还原[niFe]氢酶)、甲烷吩嗪依赖型 HdrDE、EchA-F 和 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运体(Nha)。跨膜 Mtr 从 CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>MPT 上转移甲基到 HS-CoM,同时推动 Na<sup>+</sup>跨膜转运,以用于 ATP 合成<sup>[74]</sup>。VhoACG 和 HdrDE 构成了 H<sub>2</sub>-异二硫化物氧化还原酶复合体,Vho 是含有细胞色素和氢酶活性的跨膜蛋白,催化 H<sub>2</sub> 的氧化,并通过 Cytochrome *b* 传递电子给 MP<sup>[75-76]</sup>。HdrDE 普遍存在 *Methanosarcina* 中,也是一种含有 Cytochrome *b* 的膜结合蛋白<sup>[77-78]</sup>,它接受 MP 上的电子<sup>[79]</sup>,催化 CoM-S-S-CoB 还原,同时推动形成的跨膜质子梯度( $\Delta\mu\text{H}^+$ )可用于生成 ATP。*M. barkeri* 中的 Ech 是一个膜结合[NiFe]氢酶,与 NADH:醌氧化还原酶体系(Complex I,真核细胞中的电子传递系统)的序列相似,它借助 $\Delta\mu\text{H}^+$ 推动 H<sub>2</sub> 或 CO 还原 Fd<sub>ox</sub>, Fd<sub>red</sub> 可以为甲酰甲烷吩嗪脱氢酶催化 CO<sub>2</sub> 还原提供电子供体,也可以为丙酮酸合成提供还原力<sup>[80]</sup>。Nha 可能参与形成跨膜 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>梯度<sup>[73]</sup>。

根据产甲烷古菌中是否含有 Cytochrome,  $\text{CO}_2$  还原产甲烷途径可分为 2 种, 两条途径虽然其碳流向基本一致, 但是能量代谢和电子传递方式存在差异(图 2)<sup>[73]</sup>。含有 Cytochrome 的  $\text{CO}_2$  还原途径存在于 *Methanosarcina* 中(图 2A), 不含有 Cytochromes 的  $\text{CO}_2$  还原途径主要存在于另外 5 个产甲烷古菌目(图 2B)<sup>[73]</sup>。*Methanosarcina* 还原  $\text{CO}_2$  过程中有 6 个膜结合蛋白复合体与能量储存和电子传递相关(图 2A): MtrA-H、 $\text{A}_1\text{A}_0$ -ATP 合成酶(AhaA-K)、甲烷吩嗪还

图2 产甲烷古菌在  $\text{CO}_2$  还原途径中的能量储存反应<sup>[73,81]</sup>Figure 2 Energy conservation in  $\text{CO}_2$  reducing methanogens<sup>[73,81]</sup>

注：A：含有细胞色素；B：不含有细胞色素。

Note: A: With cytochrome; B: Without cytochrome.

在不含 Cytochrome 的产甲烷古菌中，其能量保存和电子传递方式不同于 *Methanosarcina*，主要是催化  $\text{CoM-S-S-CoB}$  还原的 MvhADG/HdrABC 氧化还原酶复合体是细胞质酶，也没有电子载体 MP 参与电子传递，不能直接推动形成跨膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  梯度。但是它可以通过电子歧化作用推动  $\text{H}_2$  还原  $\text{Fd}_{\text{ox}}$ <sup>[81]</sup>。另外一个差异是 Eha 利用跨膜  $\text{Na}^+$ 、而不是  $\text{H}^+$  进行电子传递，来推动  $\text{H}_2$  还原  $\text{Fd}_{\text{ox}}$ ，生成的  $\text{Fd}_{\text{red}}$  可以补充合成代谢所消耗掉的还原力<sup>[82-83]</sup>。在 *Methanococcus maripaludis* 中，甘油醛-3-磷酸:铁氧还蛋白氧化还

原酶(GAPOR)利用甘油醛-3-磷酸、或 CO 脱氢酶/乙酰辅酶 A (ACS/CODH)氧化 CO 会产生  $\text{Fd}_{\text{red}}$ ，这也能回补  $\text{CO}_2$  还原所需要的还原力<sup>[84]</sup>。鉴于 Fd 在  $\text{CO}_2$  还原的第一步和最后一步所起到的连接作用，有科学家把  $\text{CO}_2$  还原途径称为“沃夫循环”(The Wolfe cycle)<sup>[85]</sup>。

## 2.2 甲基裂解途径

首先甲基由甲基转移酶复合体激活和转运，后者包括 2 个甲基转移酶。甲基转移酶 1 (MT1)将底物上的甲基转移到 MT1 上与类咕啉蛋白结合，甲

基转移酶 2 (MT2)再转移甲基与 HS-CoM 连接产生  $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ 。其中 1 个  $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$  通过  $\text{CO}_2$  还原逆途径被氧化产生  $\text{CO}_2$ , 这个是耗能反应, 需要  $\text{Na}^+$  梯度驱动, 产生的 6 个电子用于还原  $\text{F}_{420}$ , 从而满足另外 3 个  $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$  进入与  $\text{CO}_2$  还原代谢途径所需要的  $\text{F}_{420}\text{H}_2$ <sup>[86-87]</sup>。MT1 具有底物特异性, MtaB 的底物是甲醇, MtmB 的是甲胺, MtbB 的是二甲胺, MttB 的是三甲胺, MtqB 是四甲基胺, MtsB 的是甲基硫<sup>[88-91]</sup>。MT2 蛋白序列中都含有高度保守的锌指结构, 可以与 MT1 上的类咕啉蛋白结合, 完成甲基化合物的激活和甲基的转移<sup>[92]</sup>。在 *Methanosarcina* 基因组中存在多个拷贝的甲基转移酶基因<sup>[93-95]</sup>, 不同类型的甲基类化合物诱导 *Methanosarcina mazei* 相应甲基转移酶基因 *mta*、*mtb*、*mtt* 和 *mtm* 的表达<sup>[96]</sup>。有趣的是, 编码甲基转移酶的基因阅读框中含有琥珀密码子(UAG), 说明其并没有行使终止蛋白翻译的功能, 而是编码第 22 个生物体必需氨基酸——L-吡咯赖氨酸<sup>[97-98]</sup>。

*Methanomicrococcus blatticola* 和 *Methanospaera stadtmanae* 基因组有编码甲基转移酶基因, 但是缺少还原  $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$  代谢产生  $\text{CO}_2$  的基因, 这就需要  $\text{H}_2$  作为电子供体来推动 HS-CoM 和 HS-CoB 的再生<sup>[99-100]</sup>。

*M. mazei* 有 2 套膜结合蛋白复合体:  $\text{H}_2$  依赖的异二硫化物氧化还原酶和  $\text{F}_{420}\text{H}_2$  依赖的异二硫化物氧化还原酶, 分别与 HdrDE 偶联催化 CoM-S-S-CoB 的还原, 并推动形成跨膜  $\text{H}^+$  梯度<sup>[101]</sup>。前者在  $\text{CO}_2$  还原(图 2A), 后者在甲基合成甲烷过程中起着关键的能量储存作用(图 3A)。在  $\text{F}_{420}\text{H}_2$  依赖的异二硫化物氧化还原酶复合体中,  $\text{F}_{420}\text{H}_2$  脱氢酶(Fpo)利用  $\text{F}_{420}\text{H}_2$  作为电子供体, 催化 CoM-S-S-CoB 还原(图 3A)<sup>[102]</sup>。Fpo 与细菌电子呼吸链中的 NADH 脱氢酶(NDH-1)和真核生物中的 Complex I 相似, 并通过 MP 传递  $\text{F}_{420}\text{H}_2$  氧化释放的电子<sup>[102]</sup>。但是并非所有的 *Methanosarcina* 都采用这个方式储存能量, *M. barkeri* 通过甲基裂解途径产生的电

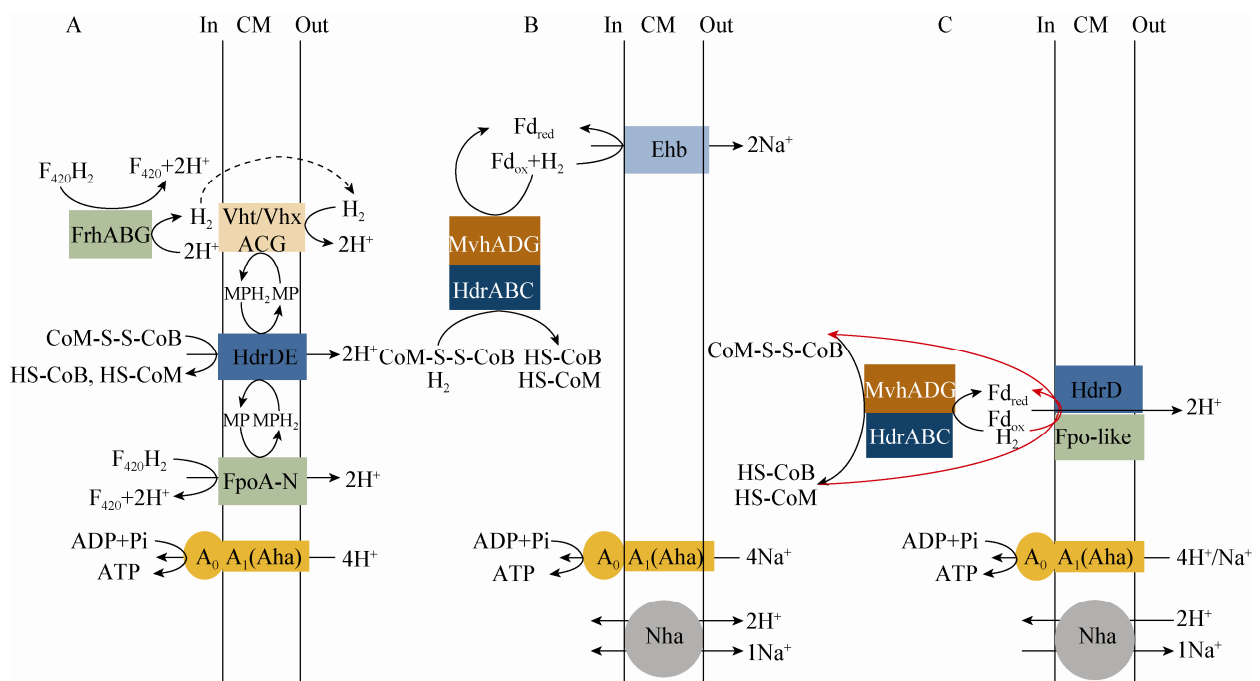


图 3 不同产甲烷古菌在甲基裂解途径中能量储存反应

Figure 3 Energy conservation in methyl-splitting methanogens

Note: A: *Methanosarcina*<sup>[103]</sup>; B: *Methanospaera stadtmanae*<sup>[73]</sup>; C: *Methanomassiliicoccus luminyensis*<sup>[105]</sup>.

子,首先被胞内  $F_{420}H_2$  脱氢酶(Frh)还原为  $H_2$ ,然后扩散到胞外后被膜结合甲烷吩嗪依赖的氢酶(Vht 或 Vhx)氧化,释放的电子传递到电子呼吸链上,通过 MP 介导推动 HdrDE 还原 CoM-S-S-CoB,从而转运与 Fpo 等量的质子,形成相同的  $\Delta\mu H^+$  (图 3A)<sup>[103]</sup>。

*Methanospaera stadtmanae* 没有 Cytochrome,无法像 *Methanosarcina* 那样利用膜结合 Vho/Hdr 或 Fpo (或 Frh)/Hdr 来催化 CoM-S-S-CoB 还原,并形成  $\Delta\mu H^+$ <sup>[101]</sup>。它利用细胞质 MvhADG/HdrABC 复合体来催化  $H_2$  还原 CoM-S-S-CoB 产生  $Fd_{red}$  (图 3B),Fricke 等推测 MvhADG/HdrABC 复合体可能通过 HdrB 锚定在细胞膜上,从而介导跨膜  $H^+$  梯度的形成<sup>[100]</sup>。Thauer 等认为跨膜储能氢酶 Ehb 执行了双重功能:氧化  $Fd_{red}$  推动形成跨膜质子梯度,反过来也可以利用跨膜钠离子电势合成 ATP<sup>[73]</sup>,这个功能类似 *Pyrococcus furiosus* 的能量储存方式<sup>[104]</sup>,但这有待试验验证。第 7 个产甲烷古菌目中的‘*Candidatus Methanoplasma termitum*’没有完整的  $CO_2$  还原途径和 Cytochrome,无法像 *M. stadtmanae* 那样储存能量,可能利用类似 *Methanosarcina* 膜结合 Fpo/HdrD 复合体(没有 HdrE 亚基,无法氧化  $F_{420}H_2$ ),通过电子歧化催化  $Fd_{red}$  的生成和 CoM-S-S-CoB 的还原<sup>[105]</sup>。*M. luminyensis* 利用 MvhADG/HdrABC 氧化 2 个  $H_2$  来还原 1 个 CoM-S-S-CoB 和 1 个  $Fd_{ox}$ ,产生的  $Fd_{red}$  被 Fpo/HdrD 用于还原另 1 个 CoM-S-S-CoB,并推动形成  $\Delta\mu H^+$  (图 3C)<sup>[106]</sup>。

### 2.3 乙酸发酵途径

乙酸发酵产甲烷途径中(图 2),*Methanosarcina* 和 *Methanothrix* 激活 1 个乙酸产生乙酰辅酶 A (Acetyl CoA)分别需要消耗 1 和 2 个 ATP<sup>[63]</sup>。*Methanosarcina* 通过乙酸激酶(AK)和磷酸转乙酰酶(PTA)生成 Acetyl CoA,*Methanothrix* 利用乙酸辅酶 A 合成酶(ACS)和焦磷酸酶(PPase)活化乙酸<sup>[107]</sup>。其中 *Methanosarcina* 和 *Methanothrix* 激活 1 个乙酸分别需要消耗 1 和 2 个 ATP。它们再通过 CO 脱氢

酶/乙酰辅酶 A 脱羧酶复合体(CODH/ACS)<sup>[108-109]</sup>,氧化乙酸上的羧基为  $CO_2$ ,转移乙酸中的甲基到辅因子四氢八叠喋呤( $H_4SPT$ )上,甲基被还原为甲烷的过程与  $CO_2$  还原途径一致<sup>[107,110]</sup>。从 *M. thermophila* 中纯化获得水化  $CO_2$  的碳酸酐酶(CA),可能通过  $CH_3CO_2^-/HCO_3^-$  反向转运系统来促进乙酸的吸收<sup>[111]</sup>。

*Methanosarcina* 和 *Methanothrix* 的乙酸发酵产甲烷代谢途径类似,都可以利用跨膜 Mtr 转移甲基( $CH_3-H_4MPT$ ),同时推动  $Na^+$  跨膜转运<sup>[74,112]</sup>,这是存在于乙酸发酵途径的第 1 个与能量储存相关的膜结合蛋白。但是它们催化 CoM-S-S-CoB 还原和电子传递机制不同<sup>[63]</sup>。其中 *M. mazei* 和 *M. barkeri* 利用 VhoACG/HdrDE 多酶复合体,以  $H_2$  作为电子供体,在 MP 介导下传递电子,同时推动形成  $\Delta\mu H^+$  (图 4A),这和 *Methanosarcina* 在  $CO_2$  还原产  $CH_4$  过程中的电子传递机制一样<sup>[63]</sup>。另外,它们也利用 Ech 氧化  $Fd_{red}$  产  $H_2$ ,并推动形成  $\Delta\mu H^+$ <sup>[63]</sup>。*M. acetivorans* 不能利用  $H_2/CO_2$  生长,也没有与能量储存相关的 Ech,无法氧化  $Fd_{red}$  产生  $H_2$ 。但是 *M. acetivorans* 含有与 Rnf 类似的膜结合复合体,具有  $Fd:MP$  氧化还原酶活性,能氧化  $Fd_{red}$  并推动形成  $\Delta\mu Na^+$ ,产生的电子通过 Cytochromec 和 MP 传递给 HdrDE,用于还原 CoM-S-S-CoB (图 4B)<sup>[113-114]</sup>。*M. thermophila* 基因组没有 *ech* 和 *rnf* 相关的基因,它可能通过不完整的  $F_{420}H_2$  脱氢酶(不含 FpoF,不能氧化  $F_{420}H_2$ )与 HdrDE 偶联形成多酶复合体,来推动  $Na^+/H^+$  的跨膜传递,并且可能是直接以  $Fd_{red}$  作为电子供体,而不需要其它电子供体(图 4C)<sup>[63]</sup>。当然,这还有待于试验验证。

### 2.4 其它代谢途径

在阳极电极上占绝对优势的 *Methanobacterium palustre* 可能直接利用电子还原  $CO_2$  产生  $CH_4$ <sup>[116]</sup>。*M. harudinacea* 和 *M. barkeri* 可以直接利用胞外电子来还原  $CO_2$  产生  $CH_4$ <sup>[58,117]</sup>。这表明不同营养类型的产甲烷古菌都可以直接接受电子产生  $CH_4$ 。



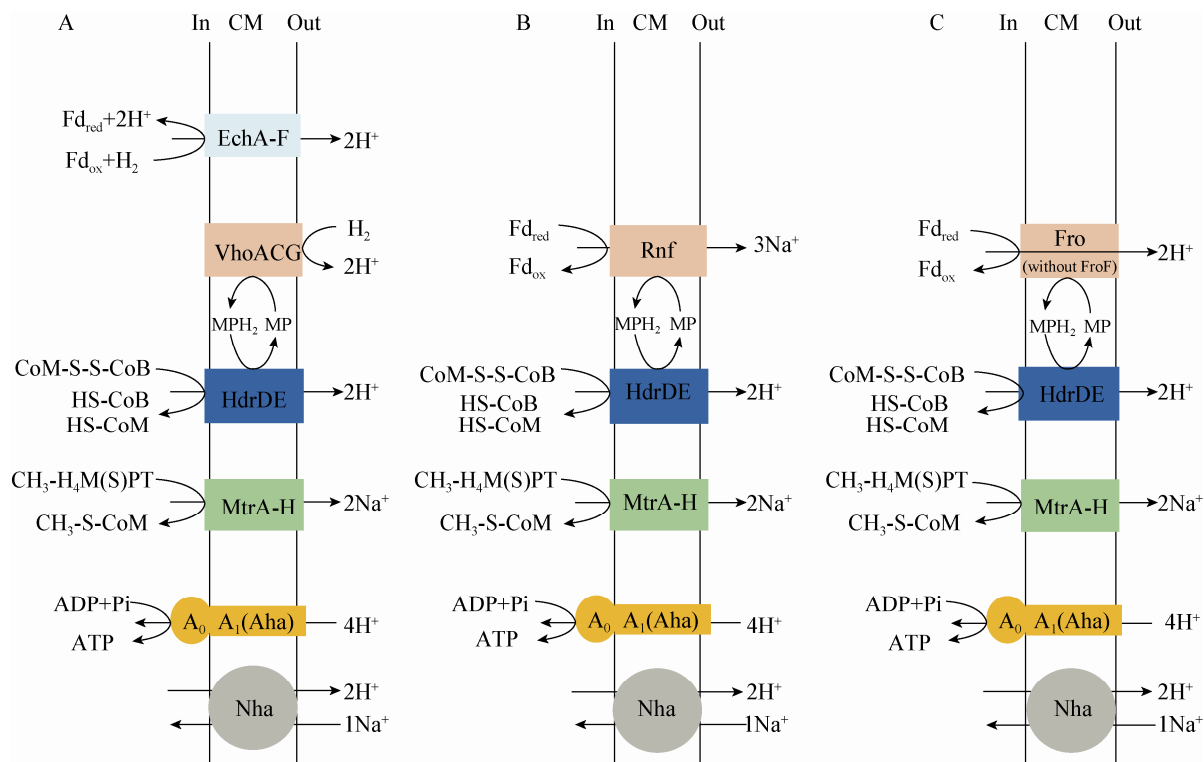


图 4 不同产甲烷古菌在乙酸发酵途径中能量储存反应

Figure 4 Energy conservation in acetate fermentation methanogens

Note: A: *M. barkeri*<sup>[103]</sup>; B: *M. acetivorans*<sup>[114]</sup>; C: *M. thermophila*<sup>[115]</sup>.

*M. acetivorans* 不利用  $H_2/CO_2$ , 但是可以利用 CO 生长产生乙酸、甲酸和  $CH_4$  (甲烷不是主要代谢产物)<sup>[118]</sup>。*M. acetivorans* 氧化 CO 产生甲基四氢甲基蝶呤( $CH_3$ -THMPT)的代谢途径与  $CO_2$  还原一样, 但是  $CH_3$ -THMPT 进一步还原产甲烷过程涉及到新的甲基转移酶和  $F_{420}H_2$ : 异二硫氧化还原酶来推动形成跨膜质子电势<sup>[119]</sup>。*M. acetivorans* 通过乙酸裂解产甲烷的反向代谢途径来转化  $CH_3$ -THMPT 产生乙酸, 并通过底物磷酸化合成 ATP<sup>[119]</sup>。

### 3 产甲烷古菌的系统分类

产甲烷古菌的生物学特性研究始于 20 世纪初期, Barker 根据细胞形态差异, 提出产甲烷古菌可分为八叠球菌、球菌、两种类型的杆菌(根据发酵底物区分杆菌)<sup>[120]</sup>。但是产甲烷古菌对氧气异常敏感, 特别难以纯化和培养, 到 1947 年 Schnellen 才首次报

道了产甲烷古菌 *Methanobacterium formicicum* 和 *M. barker* 的纯培养研究<sup>[121-122]</sup>。20 世纪中期 Hungate 厌氧操作技术的发明, 极大推动了产甲烷古菌纯培养和生理生化特性研究<sup>[121,123]</sup>, 但是依据细胞形态等传统手段对微生物分类的局限性越来越大, 甚至有知名微生物学家认为科学分类微生物是一项不可能完成的工作。1977 年 Woese 等提出了基于核糖体 rRNA 基因序列相似性的系统分类学方法, 发现产甲烷古菌不同于细菌和真核细胞, 属于独特的一个分支, 并命名为古菌<sup>[124]</sup>。这个“三域学说”彻底改变了人们对微生物多样性的认识, 是微生物分子生态学发展的基石。迄今为止生效发表的产甲烷古菌共有 6 个目(Methanobacteriales、Methanococcales、Methanocellales、Methanomicrobiales、Methanopyrales 和 Methanosarcinales)、15 科、35 属, 超过 150 个有效种(表 2) 最近发现的 Thermoplasmata

表 2 产甲烷古菌分类特征  
Table 2 Taxonomy of methanogens

目 Order	科 Family	属 Genus	有效种的数量 Number of valid published species	通用底物(特殊底物) Common substrates (special substrates)	最适生长温度的平均值和范围 Mean and range of optimum temperature (°C)	pH 的平均值和范围 Mean and range of maximum NaCl concentration (%)	最大 NaCl 生长的平均值和范围 Mean and range of maximum NaCl concentration (%)	DNA G+C mol% 的平均值和范围 Mean and range of DNA G+C mol%	分离源 Isolation sources
Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	24	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> /M, 2P, 2B)	38 (28–65)	7.1 (5.6–8.6)	0.69 (0.25–1.40)	38.1 (31.0–57.0)	厌氧反应器、水稻田、冻土层、淡水和海洋沉积物
		<i>Methanobrevibacter</i>	15	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (F/CO <sub>2</sub> )	36 (30–39)	7.1 (6.0–7.8)	0.48 (0.45–0.50)	30.8 (27.5–38.0)	哺乳动物粪便、白蚁肠道、厌氧反应器
		<i>Methanospira</i>	2	H <sub>2</sub> /M (ND)	37 (37–38)	6.8 (6.7–6.8)	ND	24.5 (23.0–26.0)	人体粪便、兔肠道
		<i>Methanothermobacter</i>	8	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (F)	63 (55–70)	7.3 (6.8–8.1)	0.56 (0.34–0.68)	50.4 (41.1–50.4)	厌氧反应器、油田
		<i>Methanothermobacter</i>	2	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (ND)	86 (83–88)	6.5 (6.5)	ND	33 (33.0)	含硫热泉和泥浆
Methanococcales	Methanococcaceae	<i>Methanocaldococcus</i>	7	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (ND)	75 (26–85)	6.4 (6.0–6.5)	0.93 (0.85–1.0)	31.5 (30.0–33.0)	深海热液和沉积物
		<i>Methanocaldococcus</i>	2	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (F)	82 (75–88)	6.2 (5.7–6.7)	1.01 (1.00–1.02)	32.2 (31.0–33.3)	深海热液和沉积物
		<i>Methanocaldococcus</i>	4	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (F)	40 (37–46)	7.3 (7.0–8.3)	1 (ND)	32.8 (32.5–33.0)	海底沉积物、泥浆
		<i>Methanocaldococcus</i>	2	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (F)	61 (60–63)	6 (5.5–6.5)	1.62 (1.60–1.64)	32.8 (32.0–33.5)	海底沉积物、热海水
		<i>Methanocaldococcus</i>	3	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (F)	45 (36–45)	6.9 (6.8–7.0)	0.13 (0.02–0.30)	54.7 (52.7–56.6)	水稻土
Methanocellulales	Methanocellulaceae	<i>Methanocellulococcus</i>	6	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , F ( )	36 (35–38)	7.9 (6.7–9.5)	1.6 (0.68–2.14)	51.6 (50.0–55.0)	油田、盐湖、海水养殖场
		<i>Methanocellulococcus</i>	4	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , F (2P, 2B)	35 (30–37)	7.0 (7.0)	0.5 (ND)	49.6 (47.7–52.0)	和垃圾厂 厌氧反应器、沉积物

(待续)

(续表)									
Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>	11	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (F, 2P, 39 (23–55) 2B, CP)	7.0 (6.5–8.1)	1.06 (0.54–1.50)	60.3 (55.2–62.9)	油田、深部沉积物、湿地和厌氧反应器		
	<i>Methanofollis</i>	5	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , F (E, 1P, 39 (37–43) 1B, 2P, 2B, CP)	6.8 (6.5–7.0)	0.55 (0.43–0.63)	58.3 (54.0–60.9)	水产养殖场、垃圾处理厂、藕塘、热硫化泥浆		
	<i>Methanogenium</i>	4	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , F (F/CO <sub>2</sub> , 2P, 2B, E, 1P)	7.0 (6.3–7.7)	0.85 (ND)	49.4 (46.7–52.0)	海洋沉积物、南极湖		
	<i>Methanolacinia</i>	2	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (F, 2P)	7.0 (7.0)	0.85 (ND)	47.5 (44.9–50.0)	油田、海洋沉积物		
	<i>Methanomicrobium</i>	1	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , F (ND)	6.5 (6.5)	ND	49 (49.0)	牛瘤胃		
Methanoregulaceae	<i>Methanoplasmus</i>	2	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , F (ND)	7 (7.0–7.1)	ND	43.1 (38.7–47.5)	钻井泥浆、海洋纤毛虫		
	<i>Methanolinea</i>	2	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , F (ND)	7.0 (7.0)	0.35 (0.26–0.43)	55 (53.6–56.4)	厌氧反应器、水稻田、冻土层、淡水和海洋沉积物		
	<i>Methanoregula</i>	2	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (F)	6.3 (5.1–7.4)	0.09 (0–0.17)	55.4 (54.5–56.2)	泥炭沼泽、沼气反应器		
	<i>Methanospira</i>	1	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , F (ND)	5.5 (5.5)	0.04 (ND)	58.9 (58.9)	矿质泥炭沼泽		
	<i>Methanospirillum</i>	4	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (ND)	7.4 (7.0–8.0)	0.2 (0.10–0.30)	43.2 (40.0–45.3)	厌氧反应器、下水污泥、湿地		
Methanosarcinales	<i>Halomethanococcus</i>	1	M, Ms (ND)	6.9 (6.9)	ND	43 (43.0)	盐湖		
	<i>Methanimitococcus</i>	1	H <sub>2</sub> /M, H <sub>2</sub> /Ms (ND)	7.5 (7.5)	0.3 (ND)	ND	蟑螂肠道		
	<i>Methanococcoides</i>	4	TMA (M, Be, Ch, DD)	7.4 (7.0–7.4)	0.81 (0.50–1.02)	41.7 (39.6–43.4)	海洋沉积物、南极湖水		
	<i>Methanohalobium</i>	1	M, Ms (ND)	7.3 (.3)	5.1 (ND)	36.4 (36.4)	湖底沉积物		
	<i>Methanohalophilus</i>	4	DMA, TMA (M)	7.2 (7.0–7.5)	2.73 (1.30–3.50)	45.1 (44.0–48.5)	沉积物、蓝藻草甸、深层地下水、盐沼		

(待续)

		(续表)					
<i>Methanolobus</i>	7	M (Ms, D, MS)	36 (25–45)	7.4 (6.5–8.6)	1.46 (1.00–2.50)	41.5 (39.0–45.9)	海洋和淡水沉积物、煤层水和深层地下水
<i>Methanome-thylovo-rans</i>	3	M, Ms (D, ME, MT)	41 (36–50)	6.5 (6.3–6.8)	0.23 (0.10–0.40)	38.4 (37.6–39.2)	厌氧反应器、湖水沉积物、湿地
<i>Methanosal-sum</i>	2	M, MMA, D (ND)	37 (37–38)	9.3 (9.1–9.5)	2.8 (2.10–3.50)	42 (39.2–42.0)	盐湖、碱水湖
<i>Methanosar-cina</i>	13	M (H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , CO, A, Ms MT, D)	35 (25–50)	6.9 (6.5–7.8)	0.85 (0.35–1.20)	41.1 (36.3–43.5)	厌氧反应器、深层地下水、海洋和淡水沉积物、冻土
<i>Methanotri-chaceae</i>	2	A (ND)	48 (38–58)	7.1 (7.0–7.3)	0.4 (ND)	57.4 (53.5–61.3)	厌氧反应器、湖底沉积物
<i>Methermicoc-caceae</i>	1	M, MMA, TMA (ND)	65 (65)	6.3 (6.3)	1.1 (ND)	56 (56.0)	油田
<i>Methanopyrales</i>	1	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (ND)	98 (98)	6.5 (6.5)	0.68 (ND)	60 (60.0)	海底热泉沉积物
<i>Methanomassili-coccales</i>	1	H <sub>2</sub> /M (ND)	37 (37)	7.6 (7.6)	ND	59.9 (59.9)	人体粪便

注：通用底物 and 特殊底物列中的字母所代表的底物如下所示，F：甲酸；M：甲醇；MMA：二甲胺；TMA：三甲胺；Ms：代表甲胺、二甲胺和三甲胺；D：二甲基硫；A：乙醇；MS：甲基硫；E：乙醇；2P：2-丙醇；1P：1-丙醇；1B：1-丁醇；2B：2-丁醇；CP：环戊醇；ME：甲硫醇；Be：甜菜碱；Ch：胆碱；DD：N,N-二甲氨基；ND：不存在特殊底物或未检测。

Note: The letters in lines of “common substrates” and “special substrates” represent the substrates as following, F: Formate; M: Methanol; MMA: Methylamine; DMA: Dimethylamine; TMA: Trimethylamine; Ms: Methylated amines (MMA, DMA, TMA); D: Dimethyl sulfide; A: Acetate; MS: Methyl sulfide; E: Ethanol; 2P: 2-Propanol; 1P: 1-Propanol; 1B: 1-Butanol; 2B: 2-Butanol; CP: Cyclopentanol; ME: Methanethiol; Be: Betaine; Ch: Choline; DD: N,N-dimethyl Eamine. ND: Special substrates were or values were not determined.

代表产甲烷古菌的第 7 个目<sup>[125]</sup>。这 7 个产甲烷古菌目都属于 Euryarchaeota。但是最新的研究发现产甲烷古菌还分布在 Bathyarchaeota 和其它非 Euryarchaeota 中<sup>[67]</sup>。下面以目为单元,扼要介绍产甲烷古菌的分类学特征(表 2)。

### 3.1 Methanobacteriales (甲烷杆菌目)

Methanobacteriales<sup>[126]</sup> (甲烷杆菌目)是典型的杆状细胞(长 0.6  $\mu\text{m}$ –15.0  $\mu\text{m}$ ),有的连接成长丝状。除了 *Methanospaera* 只利用  $\text{H}_2$ /甲醇外,其它都利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  生长,有的还能利用甲酸盐、2-丙醇/ $\text{CO}_2$ 、2-丁醇/ $\text{CO}_2$  等生长, *Methanobacterium lacus* 和 *Methanobacterium veterum* 也可以利用  $\text{H}_2$ /甲醇<sup>[127-128]</sup>。Methanobacteriales 分为 Methanobacteriaceae 和 Methanothermaceae 2 个科,共含有 5 属 53 种产甲烷古菌, Methanobacteriaceae 共有 4 个属,其中 *Methanobacterium*、*Methanobrevibacter* 和 *Methanospaera* 都是中温菌,最适生长温度平均在 37  $^{\circ}\text{C}$  左右, DNA G+C mol% 含量平均是 37.8% $\pm$ 9.4%。另外 1 个 *Methanothermobacter* 是嗜热菌,最适生长温度平均是 66  $^{\circ}\text{C}$ 。Methanothermaceae 下只有 1 属 2 种(*Methanothermus*),生理和结构特征明显不同于其它甲烷杆菌目,其最高生长温度达到了 97  $^{\circ}\text{C}$ ,但是 DNA G+C mol% 含量只有 33%,细胞壁含有假肽聚糖<sup>[129]</sup>。

### 3.2 Methanococcales (甲烷球菌目)

Methanococcales<sup>[130]</sup> 都是不规则球菌(直径 1  $\mu\text{m}$ –3  $\mu\text{m}$ )、运动,对 0.01% (质量体积比) SDS 敏感,细胞包裹有蛋白层或覆盖着 S-layer,利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ ,有的可以利用甲酸作为电子供体生长,需要利用硫化物作为硫源,可利用铵作为氮源。Methanococcales 都分离自海洋环境,生长需要 NaCl,很多也需要酵母膏、硒酸盐和钨酸盐作为生长刺激因子。Methanococcales 分为 Methanococcaceae 和 Methanocaldococcaceae 2 个科<sup>[131-132]</sup>,共含有 4 属 25 种产甲烷古菌。在 Methanococcaceae 科中, *Methanococcus* 是中温菌, *Methanothermococcus* 是高温菌,最适 NaCl 生长浓度范围在 0.3%–5.0%之

间, DNA G+C mol% 差别不大,都在 32.7% $\pm$ 2.5% 左右,它们利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  的生长速度非常快,最适条件下的倍增时间分别不超过 3 h 和 1 h<sup>[131]</sup>,因此可以作为产甲烷古菌遗传操作的优良菌种(如 *Methanococcus maripaludis*)。Methanocaldococcaceae 包含 *Methanocaldococcus* 和 *Methanotorris*,最适生长温度 75–88  $^{\circ}\text{C}$ ,最适条件下的倍增时间为 25–45 min,它们的生长环境可能与海洋热泉相关<sup>[132-133]</sup>。

### 3.3 Methanomicrobiales (甲烷微球菌目)

Methanomicrobiales<sup>[134]</sup> 细胞形态多样,有球状、杆状和鞘杆菌,细胞包裹有单层细胞壁,不含肽聚糖和假肽聚糖。Methanomicrobiales 都可以利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ ,大部分也可以利用甲酸盐作为电子供体来还原  $\text{CO}_2$ ,部分利用二级醇/ $\text{CO}_2$  生长。*Methanogenium organophilum* 和 *Methanofollis ethanolicus* 利用乙醇/ $\text{CO}_2$  生长产生甲烷和乙酸<sup>[34-35]</sup>。酵母膏和乙酸盐是大部分 Methanomicrobiales 的生长必需/刺激因子。Methanomicrobiales 分为 5 个科: Methanocalculaceae、Methanocorpusculaceae、Methanomicrobiaceae、Methanoregulaceae 和 Methanospirillaceae,在自然界中的分布非常广泛。Methanocalculaceae 含 1 个属(*Methanocalculus*)和 6 个种<sup>[32,135]</sup>, *Methanocalculus* 都是中温耐盐产甲烷古菌,在中性偏碱条件下生长最快,其中 *Methanocalculus natronophilus*<sup>[31]</sup> 和 *Methanocalculus alkaliphilus*<sup>[32]</sup> 是嗜碱能力最强的产甲烷古菌,其最适 pH 值也只有 9.0–9.5。 *Methanocalculus* 的 DNA G+C mol% 含量较高,一般在 50%–56% 之间,主要分离自盐湖、油水井、海洋沉积环境中<sup>[135]</sup>。Methanocorpusculaceae 也只含有 1 个属(*Methanocorpusculum*) 4 个种, DNA G+C mol% 含量比 *Methanocalculus* 低,在 48%–52% 之间。主要分离自厌氧反应器、淡水沉积物等低盐环境,在 35  $^{\circ}\text{C}$ 、中性 pH 和低盐条件下生长最佳<sup>[136]</sup>。Methanomicrobiaceae<sup>[137-139]</sup> 分为 6 个属 26 个种: *Methanolacinia*、*Methanomicrobium*、*Methanofollis*、*Methanoculleus*、*Methanogenium* 和

*Methanoplanus*。利用二级醇/CO<sub>2</sub>生长的产甲烷古菌也主要集中在 *Methanomicrobiaceae*，它们都是中温菌(生长温度范围：30–40 °C)，只有 *Methanoculleus receptaculi* 和 *Methanoculleus thermophilus* 的最适生长温度在 55 °C 左右。*Methanogenium frigidum* 最低生长温度可以达到 0 °C 左右<sup>[26]</sup>。*Methanomicrobiaceae* 分布比较广泛，先后从水稻田、动物瘤胃、厌氧反应器、湿地、油藏、淡水和海洋沉积环境中分离到了这个科的产甲烷古菌<sup>[137]</sup>。*Methanoregulaceae* 含有 3 个属 5 个种 *Methanoregula*、*Methanolinea* 和 *Methanosphaerula*<sup>[140]</sup>，这是 2012 年才建立的新科。它利用 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 生长，乙酸是生长必需因子，DNA G+C mol%含量在 53%–59%之间。除 *Methanolinea tarda* 是嗜热菌(最适生长温度为 50 °C)，其它都是中温菌。这个科含有最嗜酸的产甲烷古菌 *M. boonei*，最适 pH 生长条件为 5.5，另外 *M. palustris* 也可以在 pH 4.8 条件下生长<sup>[29-30,141]</sup>。*Methanospirillaceae* 通常是长弯曲杆菌，并且可以连接成长的细丝，主要分离自厌氧反应器和湿地，它们生长都不需要 NaCl，DNA G+C mol%含量在 40%–49%之间<sup>[142]</sup>。新近分离的 2 个新种 *Methanospirillum psychrodurum* 和 *Methanospirillum stamsii* 都可以在 4–5 °C 的低温条件下生长<sup>[143-144]</sup>。

### 3.4 Methanopyrales (甲烷炙热古菌)

*Methanopyrales* 自 20 世纪 90 年代从海底热泉中分离出以来，迄今只有 1 个种 *M. kandleri*，这是一个杆状、自养型产甲烷古菌，只利用 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 生长产甲烷，最适生长温度为 98 °C<sup>[18,145]</sup>，在 20 MPa 的高压条件下，*M. kandleri* 116 最高生长温度可以达到 122 °C<sup>[27]</sup>，这也是生长温度最高的产甲烷古菌。*M. kandleri* 的 NaCl 生长范围较宽(0–0.68 mol/L)，最适 pH 是 6.5<sup>[18,145]</sup>，DNA G+C mol% 为 61.2%，也是目前已知的 G+C 含量最高的产甲烷古菌之一<sup>[146]</sup>。

### 3.5 Methanosarcinales (甲烷八叠球菌目)

*Methanosarcinales*<sup>[147]</sup> 是细胞形态最多样的一个

目，有球状、杆状、鞘状、八叠状和丝状，大部分的细胞壁含有蛋白质层。这也是自然界中分布最广泛的产甲烷古菌之一。*Methanosarcinales* 包括有 3 个科：*Methanotrichaceae*、*Methermicoccaceae* 和 *Methanosarcinaceae*。*Methanotrichaceae* 只包括 1 个有效属 *Methanotrix*，之前曾用名是 *Methanosaeta*，关于哪个是有效属名这个问题，学界争论了很长时间<sup>[53,148]</sup>。*Methanotrix* 包括 2 个有效种 *Methanotrix concilii* 和 *Methanotrix thermoacetophila*，和 1 个同名种 *Methanotrix harundinacea* comb. nov.，另外 *Methanosaeta pelagica* 也是专性乙酸营养型产甲烷古菌，但用的是无效属名<sup>[148]</sup>。*Methanotrix*<sup>[53]</sup> 只能发酵乙酸产生甲烷，最近研究发现它也可以利用电子来还原 CO<sub>2</sub> 产生甲烷<sup>[58]</sup>。*Methanotrix* 生长缓慢，倍增时间需要 1–12 d，培养条件苛刻，很难在固体培养基上形成菌落。*Methanotrix* 可以在中温和高温条件下生长，但最高生长温度低于 70 °C。*M. harundinacea* 是杆状细菌，添加群感信号分子 Acyl homoserine lactones (AHLs)可以促进形成长丝状细胞<sup>[149]</sup>，这样有利于颗粒污泥的形成，可以提升沼气发酵的稳定性<sup>[150]</sup>。*Methermicoccaceae* 含 1 个种 *Methermicoccus shengliensis*，只能利用甲基类化合物生长产甲烷，最适生长温度为 65 °C，是最适生长温度最高的甲基营养型产甲烷古菌，但是从系统发育分析发现它更靠近 *Methanotrichaceae*<sup>[151]</sup>。*Methanosarcinaceae* 包括 9 属 37 种：*Halomethanococcus* (模式菌株已丢失)、*Methanimicrococcus*、*Methanococcoides*、*Methanohalobium*、*Methanohalophilus*、*Methanolobus*、*Methanomethylovorans*、*Methanosalsum* 和 *Methanosarcina*，其多样性仅次于 *Methanobacteriaceae* (49 个种)。 *Methanosarcinaceae*<sup>[42]</sup> 是生理生化特征最多样性的产甲烷古菌，其中 *Methanosarcina* 可以利用 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>、乙酸和甲醇等不同营养类型的底物生长，并利用不同电子传递方式储存能量(见第 1 和 2 部分的论述)。除 *Methanosarcina* 的其它 *Methanosarcinaceae* 只能

利用甲基类化合物生长, 并且都是革兰氏阴性菌, 很多 *Methanosarcinaceae* 生长需要添加  $\text{Na}^+$  和  $\text{Mg}^{2+}$ 。大部分 *Methanosarcinaceae* 是中温菌, 最适生长温度在 23–40 °C 之间, 最高生长温度不超过 60 °C, 如 *Methanobus zinderi*、*Methanomethylovorans thermophila* 和 *Methanosarcina thermophila* 的最适生长温度是 45–50 °C。有的可以在接近 0 °C 条件下生长产甲烷, 如 *Methanococcoides alaskense*、*Methanosarcina lacustris*、*Methanosarcina spelaei* 和 *Methanosarcina soligelidi*, 以及未有效发表的 *Methanobus psychrophilus*<sup>[9,25,152-154]</sup>, 另外 *M. spelaei* 和 *M. soligelidi* 生长温度非常宽泛, 最高生长温度可以达到 54 °C。除 *Methanosarcina zhilinae* 和 *M. natronophilum* 的最适 pH 在 9.0 左右外, 其它 *Methanosarcinaceae* 都在中性 pH 条件下生长最快。除 *Methanomethylovorans uponensis*<sup>[155]</sup>、*Methanomethylovorans hollandica*<sup>[156]</sup> 和 *Methanobus chelungpuianus* (未有效发表)<sup>[157]</sup> 最适 NaCl 生长浓度接近 0 外, 大部分 *Methanosarcinaceae* 的最适 NaCl 生长浓度都在 0.1–0.5 mol/L。*Methanohalophilus* 部分菌株耐受 NaCl 浓度可达到 2.0–2.2 mol/L。*Methanosarcinaceae* 的平均 DNA G+C mol% 在 42%±3% 之间, 从厌氧反应器、淡水和海水沉积物、盐湖、湿地等环境都可以分离这个科的产甲烷古菌。

### 3.6 *Methanocellales* (甲烷胞菌目)

*Methanocellales*<sup>[158]</sup> 有 1 属 (*Methanocella*) 3 个种, 它们呈不规则杆菌, 有的在生长后期会变成拟球菌。*Methanocella* 能利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  生长产甲烷, 有的还可以利用甲酸盐作为电子供体。*Methanocella* 全部分离自水稻土, 是水稻根际甲烷排放的主要贡献者<sup>[11]</sup>。有趣的是, 水稻田温度一般在 15–30 °C<sup>[159]</sup>, 3 个属 *Methanocella* 模式菌株的最适生长温度分别是 35、45 和 55 °C<sup>[158]</sup>, 明显高于水稻土的原位温度, 难道是因为水稻根际活跃的微生物代谢活动导致根际原位温度上升, 而 *Methanocella* 较其它产甲烷古菌能更好的适应这种温度变化/胁迫么?

*Methanocella* 广泛分布在全球不同的水稻田<sup>[7]</sup>, 可能与其对低浓度  $\text{H}_2$  的高亲和力有关<sup>[160]</sup>。*Methanocella* 基因组中存在编码超氧化物歧化酶等抗氧基因, 可能与它应对氧胁迫机制有关<sup>[161-162]</sup>。最近研究发现一类未培养的 *Methanocella* (属于 Rice cluster II) 是永久冻土层解冻过程甲烷排放的主要功能菌<sup>[163]</sup>。采用宏基因组技术获得了它的近全长基因组序列, 发现它具有  $\text{CO}_2$  还原产甲烷代谢的基因, 暂命名为 ‘*Candidatus Methanoflorens stordalenmirensis*’, 它可能代表了 *Methanocellales* 中的另一个新科<sup>[164]</sup>。

### 3.7 ‘*Methanomassiliicoccales*’ (甲烷马赛球菌目)

‘*Methanomassiliicoccales*’ 是近年来发现的一个的甲烷古菌新目。这个目中只有 1 个纯培养物 *M. luminyensis* B10<sup>T</sup>, 它是从人体粪便中分离到的一个产甲烷古菌新菌, 只能利用  $\text{H}_2$ /甲醇进行产甲烷生长, 而不能利用甲酸盐、乙酸盐、三甲胺、乙醇和二元醇<sup>[43]</sup>。分析发现它与 *Thermoplasmatales* 中的 ‘*Candidatus Aciduliprofundum boonei*’ 的 16S rRNA 基因相似性最高, 但是只有 83%, 与产甲烷古菌中的 *Methanobrevibacter smithii* 相似性最高 (只有 76%)<sup>[43]</sup>。Paul 等发现海洋沉积物、水稻土、白蚁、蟑螂和哺乳动物肠道中的未培养环境基因序列能与 *M. luminyensis* 聚成一类, 处于 Euryarchaeota 的顶部, 并远离其它产甲烷古菌, 培养实验也证实了它可以利用  $\text{H}_2$ /甲醇生长产甲烷。因此, 作者提出了第 7 个产甲烷古菌新目 ‘*Methanoplasmatales*’<sup>[14]</sup>。Borrel 等从老年人粪便中富集获得了 ‘*Candidatus Methanomethylophilus alvus*’ 的基因组序列, 发现它不仅可以利用  $\text{H}_2$ /甲醇生长产甲烷, 可能还利用甲胺类化合物, 从而提出它也属于第 7 个产甲烷古菌新目<sup>[165]</sup>。Iino 等发现从厌氧反应器中富集到的 ‘*Candidatus Methanogranum caenicola*’ 可以利用  $\text{H}_2$ /甲醇生长, 根据细菌命名准则把 ‘*Methanoplasmatales*’ 改为 ‘*Methanomassiliicoccales*’<sup>[125]</sup>。比较 ‘*Ca.*

Methanomethylophilus alvus'、'Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis' 和 *M. luminyensis* 的基因组序列,发现它们都采用相同的基因来储存能量<sup>[166]</sup>。'Ca. Methanoplasma termitum' 的能量储存机制不同于 *M. stadtmanae*,可能利用 Fpo/HdrD 复合体(没有 HdrE 亚基,无法氧化  $F_{420}H_2$ ),以电子歧化的方式来推动  $Fd_{red}$  的生成和 CoM-S-S-CoB 的还原<sup>[105]</sup>。*M. luminyensis* 利用 MvhADG/HdrABC 和 Fpo/HdrD 复合体,以 Fd 作为电子载体来分别催化 CoM-S-S-CoB 还原和形成跨膜质子电势<sup>[106]</sup>。

目前分离获得的产甲烷古菌都属于 Euryarchaeota,但是最新的研究表明产甲烷古菌还分布在非 Euryarchaeota 中。Evans 等<sup>[67]</sup>采用宏基因组技术,从地下煤层水构建获得了 2 个微生物的全基因组,系统发育分析表明它们属于 Bathyarchaeota,但是编码产甲烷代谢相关的功能基因。其中 BA1 中还含有 *mtsA*、*mtbA*、*mtaA*、*mttBC*、*mtbBC* 和 *mtrH* 等与甲基裂解途径相关的基因,这些基因与 *Methanomassiliicoccales* 的相似,表明它可能利用  $H_2$ /甲基化合物产甲烷。BA2 也编码有甲基裂解途径相关的基因,但是其能量储存和电子传递机制可能不同于 BA1。此外,还发现不属于 Euryarchaeota 的 *mcrA* 基因广泛分布在自然环境中,表明这类非 Euryarchaeota 产甲烷古菌可能在全球甲烷循环中也起着重要作用。

#### 4 产甲烷古菌的生态学功能

复杂有机质厌氧降解产生短链脂肪酸(VFA:乙、丙、丁酸)、 $H_2/CO_2$  和各种醇类化合物,当  $O_2$ 、Fe(III)、 $NO_3^-$  和  $SO_4^{2-}$  等外源电子受体供给有限的时候,细菌需要与产甲烷古菌耦联进行产甲烷代谢,才能完全厌氧降解有机质<sup>[167]</sup>。这是因为在标准热力学条件下,中间代谢产物(如丙酸、丁酸等)降解产乙酸和  $H_2$  是一个吸热反应,无法自发进行<sup>[167]</sup>。而产甲烷古菌可以利用  $H_2/CO_2$  生长产  $CH_4$ ,使得原本不利的吸热反应变成了放能反应,从而保证有机质的厌氧降解可以持续稳定进行<sup>[167]</sup>。产甲烷古

菌通过种间氢和/或甲酸转移来推动有机质厌氧降解产甲烷过程<sup>[168-169]</sup>。最近的研究发现产甲烷古菌还可以直接接受胞外电子还原  $CO_2$  并产生  $CH_4$ <sup>[58,117]</sup>。在湿地、水稻田、海洋沉积物、白蚁和瘤胃动物、厌氧反应器等缺氧环境中,产甲烷古菌虽然不是复杂有机质起始降解的参与者,但是有机质持续降解的重要推动者。

产甲烷古菌在自然界中分布非常广泛,在全球碳生物地球化学循环过程中起着重要作用。每年排放到大气中的甲烷量约 500–600 Tg,大约 69%是产甲烷古菌代谢产生的<sup>[5]</sup>。基于微生物分子生态学技术研究发现很多未培养产甲烷古菌是环境中甲烷排放的主要参与者。Lu 等采用稳定同位素示踪技术证实 Rice cluster I 是水稻田根际甲烷排放的主要贡献者<sup>[11]</sup>。后续的分离培养研究证实了这类微生物代表产甲烷古菌的第 6 个目(Methanocella)<sup>[158]</sup>。在北环极永久冻土层蕴藏的碳汇超过全球地下有机碳的 50%<sup>[170]</sup>,全球气候变暖导致永久冻土层解冻,其中一类未培养的 *Methanocella* (属于 Rice cluster II)是永久冻土层解冻过程甲烷排放的主要功能菌<sup>[163]</sup>。采用宏基因组技术获得了未培养产甲烷古菌 'Ca. Methanoflorens stordalenmirensis' 的基因组草图,它可能通过  $CO_2$  还原来进行产甲烷代谢<sup>[164]</sup>。从地下煤层水发现了 2 个属于 Bathyarchaeota 的未培养产甲烷古菌,可能是通过甲基裂解途径参与地下煤层甲烷的形成<sup>[67]</sup>。在动物瘤胃和昆虫肠道等生境中发现的第 7 个产甲烷古菌新目 'Methanoplasmales',可以利用  $H_2$ /甲醇生长产甲烷,是动物甲烷排放的一个重要贡献者<sup>[14]</sup>。当然,产甲烷古菌可能不仅参与了甲烷的产生,可能还是特殊环境条件下甲烷的消耗者<sup>[66]</sup>,限于篇幅,不在此讨论。

产甲烷古菌既是全球碳素生物地球化学的重要参与者和推动者,也可以作为可再生能源的生产者,与发酵细菌和互营菌一起合作,利用畜禽粪便和秸秆等农业废弃物,为人类社会提供清洁干净的可再生能源——甲烷。以中国为例,截止 2014 年底,共建有 4.15 千万口农村户用沼气池,



年产沼气 136.7 亿  $\text{m}^3$ , 大中型沼气工程接近 10 万座, 年产沼气 21 亿  $\text{m}^3$ <sup>[171]</sup>。在沼气发酵反应器中, 水解细菌降解非水溶性复杂有机物产生可溶性化合物, 发酵细菌再降解产生  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ 、短链脂肪酸和醇等小分子化合物, 互营细菌和产甲烷古菌通过互营代谢产生  $\text{CH}_4$ 。其中主要是通过乙酸发酵和  $\text{CO}_2$  还原途径来介导甲烷的产生。沼气发酵的物料成分复杂, 参与沼气发酵的微生物群落多变, 产甲烷古菌的生长条件比较苛刻, 容易受到环境因子(如 pH、 $\text{O}_2$ 、温度和铵)的干扰<sup>[172]</sup>, 因此控制和优化沼气发酵过程, 提升产甲烷古菌在内的沼气发酵微生物的代谢活性, 提高物料的利用率和转化率, 一直是沼气发酵微生物研究的重点。

## 5 展望

近年来, 基于高通量测序的组学技术, 揭示了大量未培养产甲烷古菌在地球碳循环中起着重要的生态学功能, 但是缺少纯培养物及其遗传操作系统限制了人们深入研究它们的生理生化 and 遗传学特性。因此, 如何应用新的厌氧培养思路和方法, 从复杂环境中定向分离生长条件苛刻、但是具有特殊生态学功能的产甲烷古菌, 将是微生物家必须面对和解决的一个关键问题。产甲烷代谢直接与产甲烷古菌的能量储存相结合, 是产甲烷古菌获取能量进行生长的直接代谢途径, 不同营养类型的产甲烷古菌可能采用的不同电子传递机制来推动能量储存, 因此, 结合比较基因组学、遗传突变和转录本分析, 研究产甲烷古菌的能量储存和电子传递过程, 将为我们深入阐明产甲烷古菌的生长特性奠定基础。产甲烷古菌在生物圈分布广泛, 具有重要的生态学功能, 但是自然环境因子(如温度、pH、溶氧、竞争性电子受体)的波动和变化会影响产甲烷古菌的种群结构和功能, 因此, 在面对这些环境胁迫时, 原位产甲烷古菌(系)响应和应答机制研究将是人们深入了解产甲烷古菌生态学功能的重要途径。

致谢: 感谢中国农业科学院农业资源与农业区划研

究所阮志勇博士为本文成稿提供的帮助。

## 参考文献

- [1] Ueno Y, Yamada K, Yoshida N, et al. Evidence from fluid inclusions for microbial methanogenesis in the early Archaean era[J]. *Nature*, 2006, 440(7083): 516-519
- [2] Battistuzzi FU, Feijao A, Hedges SB. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2004, 4(1): 44
- [3] Tung HC, Bramall NE, Price PB. Microbial origin of excess methane in glacial ice and implications for life on Mars[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(51): 18292-18296
- [4] Rothman DH, Fournier GP, French KL, et al. Methanogenic burst in the end-Permian carbon cycle[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(15): 5462-5467
- [5] Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5): 285-292
- [6] Zhang GS, Tian JQ, Jiang N, et al. Methanogen community in Zoige wetland of Tibetan plateau and phenotypic characterization of a dominant uncultured methanogen cluster ZC-I[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(7): 1850-1860
- [7] Conrad R, Erkel C, Liesack W. Rice Cluster I methanogens, an important group of *Archaea* producing greenhouse gas in soil[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(3): 262-267
- [8] Newberry CJ, Webster G, Cragg BA, et al. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(3): 274-287
- [9] Simankova MV, Parshina SN, Tourova TP, et al. *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24(3): 362-367
- [10] Ferry JG, Lessner DJ. Methanogenesis in marine sediments[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125(1): 147-157
- [11] Lu YH, Conrad R. *In situ* stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere[J]. *Science*, 2005, 309(5737): 1088-1090
- [12] Strapoč D, Mastalerz M, Dawson K, et al. Biogeochemistry of microbial coal-bed methane[J]. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 2011, 39(1): 617-656
- [13] Cheng L, Qiu TL, Deng Y, et al. Recent advances in anaerobic microbiology of petroleum reservoirs[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2006, 12(5): 740-744 (in Chinese)
- [14] 承磊, 仇天雷, 邓宇, 等. 油藏厌氧微生物研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(5): 740-744
- [15] Paul K, Nonoh JO, Mikulski L, et al. "*Methanoplasmatales*," *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8245-8253
- [16] Schulz K, Hunger S, Brown GG, et al. Methanogenic food web in the gut contents of methane-emitting earthworm *Eudrilus eugeniae* from Brazil[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(8): 1778-1792
- [17] Karakashev D, Batstone DJ, Angelidaki I. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 331-338
- [18] Angel R, Claus P, Conrad R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic

- conditions[J]. The ISME Journal, 2012, 6(4): 847-862
- [18] Huber R, Kurr M, Jannasch HW, et al. A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110 °C[J]. Nature, 1989, 342(6251): 833-834
  - [19] Offre P, Spang A, Schleper C. Archaea in biogeochemical cycles[J]. Annual Review of Microbiology, 2013, 67(1): 437-457
  - [20] Demirel B, Scherer P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review[J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2008, 7(2): 173-190
  - [21] Horne AJ, Lessner DJ. Assessment of the oxidant tolerance of *Methanosarcina acetivorans*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 343(1): 13-19
  - [22] Fetzter S, Conrad R. Effect of redox potential on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri*[J]. Archives of Microbiology, 1993, 160(2): 108-113
  - [23] Cheeseman P, Toms-Wood A, Wolfe RS. Isolation and properties of a fluorescent compound, factor<sub>420</sub>, from *Methanobacterium* strain M.o.H.[J]. Journal of Bacteriology, 1972, 112(1): 527-531
  - [24] Dong XZ, Chen ZJ. Psychrotolerant methanogenic archaea: diversity and cold adaptation mechanisms[J]. Science China Life Sciences, 2012, 55(5): 415-421
  - [25] Zhang GS, Jiang N, Liu XL, et al. Methanogenesis from methanol at low temperatures by a novel psychrophilic methanogen, "*Methanolobus psychrophilus*" sp. nov., prevalent in Zoige Wetland of the Tibetan Plateau[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(19): 6114-6120
  - [26] Franzmann PDF, Liu YT, Balkwill DL, et al. *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H<sub>2</sub>-using methanogen from Ace Lake, Antarctica[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(4): 1068-1072
  - [27] Takai K, Nakamura K, Toki T, et al. Cell proliferation at 122 °C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(31): 10949-10954
  - [28] Jabłoński S, Rodowicz P, Łukaszewicz M. Methanogenic archaea database containing physiological and biochemical characteristics[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt 4): 1360-1368
  - [29] Bräuer SL, Cadillo-Quiroz H, Yashiro E, et al. Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog[J]. Nature, 2006, 442(7099): 192-194
  - [30] Cadillo-Quiroz H, Yavitt JB, Zinder SH. *Methanosphaerula palustris* gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peatland[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(5): 928-935
  - [31] Zhilina TN, Zavarzina DG, Kevbrin VV, et al. *Methanocalculus natronophilus* sp. nov., a new alkaliphilic hydrogenotrophic methanogenic archaeon from a soda lake, and proposal of the new family *Methanocalculaceae*[J]. Microbiology, 2013, 82(6): 698-706
  - [32] Sorokin DY, Abbas B, Merkel AY, et al. *Methanosalsum natronophilum* sp. nov., and *Methanocalculus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic methanogens from hypersaline soda lakes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(10): 3739-3745
  - [33] Liu YC, Whitman WB. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1125(1): 171-189
  - [34] Widdel F, Rouvière PE, Wolfe RS. Classification of secondary alcohol-utilizing methanogens including a new thermophilic isolate[J]. Archives of Microbiology, 1988, 150(5): 477-481
  - [35] Imachi H, Sakai S, Nagai H, et al. *Methanofollis ethanolicus* sp. nov., an ethanol-utilizing methanogen isolated from a lotus field[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(4): 800-805
  - [36] Widdel F. Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51(5): 1056-1062
  - [37] Yang YL, Ladapo J, Whitman WB. Pyruvate oxidation by *Methanococcus* spp.[J]. Archives of Microbiology, 1992, 158(4): 271-275
  - [38] Hüster R, Thauer RK. Pyruvate assimilation by *Methanobacterium thermoautotrophicum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1983, 19(2/3): 207-209
  - [39] Ferry JG. CO in methanogenesis[J]. Annals of Microbiology, 2010, 60(1): 1-12
  - [40] Daniels L, Fuchs G, Thauer RK, et al. Carbon monoxide oxidation by methanogenic bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1977, 132(1): 118-126
  - [41] Oren A. The family *Methanobacteriaceae*[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 165-193
  - [42] Oren A. The family *Methanosarcinaceae*[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 259-281
  - [43] Dridi B, Fardeau ML, Ollivier B, et al. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 8): 1902-1907
  - [44] L'Haridon S, Chalopin M, Colombo D, et al. *Methanococcoides vulcani* sp. nov., a marine methylotrophic methanogen that uses betaine, choline and *N,N*-dimethylethanolamine for methanogenesis, isolated from a mud volcano, and emended description of the genus *Methanococcoides*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 6): 1978-1983
  - [45] Watkins AJ, Roussel EG, Parkes RJ, et al. Glycine betaine as a direct substrate for methanogens (*Methanococcoides* spp.)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(1): 289-293
  - [46] Watkins AJ, Roussel EG, Webster G, et al. Choline and *N,N*-dimethylethanolamine as direct substrates for methanogens[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(23): 8298-8303
  - [47] Bock AK, Prieger-Kraft A, Schönheit P. Pyruvate—a novel substrate for growth and methane formation in *Methanosarcina barkeri*[J]. Archives of Microbiology, 1994, 161(1): 33-46
  - [48] O'Brien JM, Wolkin RH, Moench TT, et al. Association of hydrogen metabolism with unithrophic or mixotrophic growth of *Methanosarcina barkeri* on carbon monoxide[J]. Journal of Bacteriology, 1984, 158(1): 373-375
  - [49] Miller TL, Wolin MJ. *Methanosphaera stadmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen[J]. Archives of Microbiology, 1985, 141(2): 116-122
  - [50] Biavati B, Vasta M, Ferry JG. Isolation and characterization of "*Methanosphaera cuniculi*" sp. nov.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(3): 768-771
  - [51] Borrel G, Harris HMB, Parisot N, et al. Genome sequence of "*Candidatus* Methanomassiliicoccus intestinalis" isoore-Mx1, a third *Thermoplasmatales*-related methanogenic archaeon from human feces[J]. Genome Announcements, 2013, 1(4): e00453-13
  - [52] Borrel G, O'Toole PW, Harris HMB, et al. 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
  - [53] Oren A. The family *Methanotrichaceae*[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 297-306
  - [54] Min H, Zinder SH. Kinetics of acetate utilization by two thermophilic acetotrophic methanogens: *Methanosarcina* sp. strain CALS-1 and *Methanotherix* sp. strain CALS-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(2): 488-491
  - [55] Westermann P, Ahring BK, Mah RA. Threshold acetate concentrations for acetate catabolism by aceticlastic methanogenic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(2): 514-515

- [56] Jetten MSM, Stams AJM, Zehnder AJB, et al. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp.[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 88(3/4): 181-198
- [57] Jetten MSM, Stams AJM, Zehnder AJB. Acetate threshold values and acetate activating enzymes in methanogenic bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1990, 73(4): 339-344
- [58] Rotaru AE, Shrestha PM, Liu FH, et al. 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 & Environmental Science, 2014, 7(1): 408-415
- [59] Schink B. Syntrophic associations in methanogenic degradation[A]//Overmann J. Molecular Basis of Symbiosis: Progress in Molecular and Subcellular Biology[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2006, 41: 1-19
- [60] López Muñoz MM, Schönheit P, Metcalf WW. Genetic, genomic, and transcriptomic studies of pyruvate metabolism in *Methanosarcina barkeri* fusaro[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(22): 3592-3600
- [61] Thauer RK. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson[J]. Microbiology, 1998, 144(9): 2377-2406
- [62] Schlegel K, Leone V, Faraldo-Gómez JD, et al. Promiscuous archaeal ATP synthase concurrently coupled to Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> translocation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(3): 947-952
- [63] Welte C, Deppenmeier U. Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of aceticlastic methanogens[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 2014, 1837(7): 1130-1147
- [64] Ermler U, Grabarse W, Shima S, et al. Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation[J]. Science, 1997, 278(5342): 1457-1462
- [65] Lueders T, Chin KJ, Conrad R, et al. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase  $\alpha$ -subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage[J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(3): 194-204
- [66] Scheller S, Goenrich M, Boecher R, et al. The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane[J]. Nature, 2010, 465(7298): 606-608
- [67] Evans PN, Parks DH, Chadwick GL, et al. Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics[J]. Science, 2015, 350(6259): 434-438
- [68] DiMarco AA, Bobik TA, Wolfe RS. Unusual coenzymes of methanogenesis[J]. Annual Review of Biochemistry, 1990, 59(1): 355-394
- [69] Chistoserdova L, Vorholt JA, Thauer RK, et al. C<sub>1</sub> transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea[J]. Science, 1998, 281(5373): 99-102
- [70] Krishnakumar AM, Sliwa D, Endrizzi JA, et al. Getting a handle on the role of coenzyme M in alkene metabolism[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008, 72(3): 445-456
- [71] Purwantini E, Mukhopadhyay B. Conversion of NO<sub>2</sub> to NO by reduced coenzyme F<sub>420</sub> protects mycobacteria from nitrosative damage[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(15): 6333-6338
- [72] Costa KC, Leigh JA. Metabolic versatility in methanogens[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 29: 70-75
- [73] Thauer RK, Kaster AK, Seedorf H, et al. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(8): 579-591
- [74] Gottschalk G, Thauer RK. The Na<sup>+</sup>-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2001, 1505(1): 28-36
- [75] Ide T, Bäumer S, Deppenmeier U. Energy conservation by the H<sub>2</sub>: heterodisulfide oxidoreductase from *Methanosarcina mazei* Gö1: identification of two proton-translocating segments[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(13): 4076-4080
- [76] Beifuss U, Tietze M, Bäumer S, et al. Methanophenazine: structure, total synthesis, and function of a new cofactor from methanogenic archaea[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2000, 39(14): 2470-2472
- [77] Heiden S, Hedderich R, Setzke E, et al. Purification of a two-subunit cytochrome-b-containing heterodisulfide reductase from methanol-grown *Methanosarcina barkeri*[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 221(2): 855-861
- [78] Buan NR, Metcalf WW. Methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves two structurally and functionally distinct classes of heterodisulfide reductase[J]. Molecular Microbiology, 2010, 75(4): 843-853
- [79] Murakami E, Deppenmeier U, Ragsdale SW. Characterization of the intramolecular electron transfer pathway from 2-hydroxyphenazine to the heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(4): 2432-2439
- [80] Meuer J, Kuettner HC, Zhang JK, et al. Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(8): 5632-5637
- [81] Kaster AK, Moll J, Parey K, et al. Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(7): 2981-2986
- [82] Lie TJ, Costa KC, Lupa B, et al. Essential anaplerotic role for the energy-converting hydrogenase Eha in hydrogenotrophic methanogenesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(38): 15473-15478
- [83] Tersteegen A, Hedderich R. *Methanobacterium thermoautotrophicum* encodes two multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases[J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 264(3): 930-943
- [84] Costa KC, Lie TJ, Jacobs MA, et al. H<sub>2</sub>-independent growth of the hydrogenotrophic methanogen *Methanococcus maripaludis*[J]. mBio, 2013, 4(2): e00062-13
- [85] Thauer RK. The Wolfe cycle comes full circle[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(38): 15084-15085
- [86] Hedderich R, Whitman WB. Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2013: 635-662
- [87] Ferry JG. Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1999, 23(1): 13-38
- [88] Ferguson Jr DJ, Gorlatova N, Grahame DA, et al. Reconstitution of dimethylamine: coenzyme M methyl transfer with a discrete corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(37): 29053-29060
- [89] Burke SA, Krzycki JA. Reconstitution of monomethylamine: coenzyme M methyl transfer with a corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(26): 16570-16577
- [90] Sauer K, Harms U, Thauer RK. Methanol: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*[J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 243(3): 670-677
- [91] Burke SA, Lo SL, Krzycki JA. Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(13): 3432-3440
- [92] Hagemeyer CH, Krüer M, Thauer RK, et al. Insight into the mechanism of biological methanol activation based on the crystal structure of the methanol-cobalamin methyltransferase

- complex[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(50): 18917-18922
- [93] Maeder DL, Anderson I, Brettin TS, et al. The *Methanosarcina barkeri* genome: comparative analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* reveals extensive rearrangement within methanosarcinal genomes[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(22): 7922-7931
- [94] Deppenmeier U, Johann A, Hartsch T, et al. The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2002, 4(4): 453-461
- [95] Galagan JE, Nusbaum C, Roy A, et al. The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity[J]. Genome Research, 2002, 12(4): 532-542
- [96] Krätzer C, Carini P, Hovey R, et al. Transcriptional profiling of methyltransferase genes during growth of *Methanosarcina mazei* on trimethylamine[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(16): 5108-5115
- [97] Hao B, Gong WM, Ferguson TK, et al. A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase[J]. Science, 2002, 296(5572): 1462-1466
- [98] Paul L, Ferguson Jr DJ, Krzycki JA. The trimethylamine methyltransferase gene and multiple dimethylamine methyltransferase genes of *Methanosarcina barkeri* contain in-frame and read-through amber codons[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(9): 2520-2529
- [99] Sprenger WW, Hackstein JHP, Keltjens JT. The energy metabolism of *Methanomicrococcus blatticola*: physiological and biochemical aspects[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2005, 87(4): 289-299
- [100] Fricke WF, Seedorf H, Henne A, et al. The genome sequence of *Methanospaera stadmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H<sub>2</sub> for methane formation and ATP synthesis[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(2): 642-658
- [101] Deppenmeier U, Lienard T, Gottschalk G. Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea[J]. FEBS Letters, 1999, 457(3): 291-297
- [102] Bäumer S, Ide T, Jacobi C, et al. The F<sub>420</sub>H<sub>2</sub> dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* is a redox-driven proton pump closely related to NADH dehydrogenases[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(24): 17968-17973
- [103] Kulkarni G, Kridelbaugh DM, Guss AM, et al. Hydrogen is a preferred intermediate in the energy-conserving electron transport chain of *Methanosarcina barkeri*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(37): 15915-15920
- [104] Sapra R, Bagramyan K, Adams MWW. A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(13): 7545-7550
- [105] Lang K, Schuldes J, Klingl A, et al. New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of "*Candidatus* Methanoplasma termitum"[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(4): 1338-1352
- [106] Kröniger L, Berger S, Welte C, et al. Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*[J]. The FEBS Journal, 2015. DOI: 10.1111/febs.13594
- [107] Smith KS, Ingram-Smith C. *Methanosaeta*, the forgotten methanogen?[J]. Trends in Microbiology, 2007, 15(4): 150-155
- [108] Grahame DA. Catalysis of acetyl-CoA cleavage and tetrahydrosarcinapterin methylation by a carbon monoxide dehydrogenase-corrinoid enzyme complex[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(33): 22227-22233
- [109] Grahame DA, DeMoll E. Partial reactions catalyzed by protein components of the acetyl-CoA decarbonylase synthase enzyme complex from *Methanosarcina barkeri*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(14): 8352-8358
- [110] Fischer R, Thauer RK. Methyltetrahydromethanopterin as an intermediate in methanogenesis from acetate in *Methanosarcina barkeri*[J]. Archives of Microbiology, 1989, 151(5): 459-465
- [111] Alber BE, Ferry JG. A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(15): 6909-6913
- [112] Schlegel K, Müller V. Evolution of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> bioenergetics in methanogenic archaea[J]. Biochemical Society Transactions, 2013, 41(1): 421-426
- [113] Schlegel K, Welte C, Deppenmeier U, et al. Electron transport during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves a sodium-translocating Rnf complex[J]. The FEBS Journal, 2012, 279(24): 4444-4452
- [114] Wang MY, Tomb JF, Ferry JG. Electron transport in acetate-grown *Methanosarcina acetivorans*[J]. BMC Microbiology, 2011, 11(1): 165
- [115] Welte C, Deppenmeier U. Membrane-bound electron transport in *Methanosaeta thermophila*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(11): 2868-2870
- [116] Cheng SA, Xing DF, Call DF, et al. Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(10): 3953-3958
- [117] Rotaru AE, Shrestha PM, Liu FH, et al. Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(15): 4599-4605
- [118] Rother M, Metcalf WW. Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: an unusual way of life for a methanogenic archaeon[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(48): 16929-16934
- [119] Lessner DJ, Li LY, Li QB, et al. An unconventional pathway for reduction of CO<sub>2</sub> to methane in CO-grown *Methanosarcina acetivorans* revealed by proteomics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(47): 17921-17926
- [120] Barker HA. Studies upon the methane-producing bacteria[J]. Archiv für Mikrobiologie, 1936, 7(1/5): 420-438
- [121] Wolfe RS. Methanogens: a surprising microbial group[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1979, 45(3): 353-364
- [122] Schnellen CGTP. Onderzoekingen over de methaangisting[D]. Delft: Doctoral Dissertation of Delft University of Technology, 1947
- [123] Hungate RE. Chapter IV a roll tube method for cultivation of strict anaerobes[J]. Methods in Microbiology, 1969, 3B: 117-132
- [124] Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977, 74(11): 5088-5090
- [125] Iino T, Tamaki H, Tamazawa S, et al. *Candidatus* Methanogranum caenicola: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class thermoplasmata[J]. Microbes and Environments, 2013, 28(2): 244-250
- [126] Liu Y. Methanobacteriales[A]//Timmis KN. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2010: 559-571
- [127] Borrel G, Joblin K, Guedon A, et al. *Methanobacterium lacus* sp. nov., isolated from the profundal sediment of a freshwater meromictic lake[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 7): 1625-1629
- [128] Krivushin KV, Shcherbakova VA, Petrovskaya LE, et al. *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(2): 455-459

- [129] Lauerer G, Kristjansson JK, Langworthy TA, et al. *Methanothermobacter sociabilis* sp. nov., a second species within the *Methanothermobacter* growing at 97 °C[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1986, 8(1/2): 100-105
- [130] Liu Y. Methanococcales[A]//Timmis KN. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2010: 573-581
- [131] Oren A. The family *Methanococcaceae*[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 215-224
- [132] Oren A. The family *Methanocaldococcaceae*[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 201-208
- [133] Stewart LC, Jung JH, Kim YT, et al. *Methanocaldococcus bathoardescens* sp. nov., a hyperthermophilic methanogen isolated from a volcanically active deep-sea hydrothermal vent[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt 4): 1280-1283
- [134] Liu Y. Methanomicrobiales[A]//Timmis KN. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2010: 583-593
- [135] Oren A. The family *Methanocalculaceae*[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 195-199
- [136] Oren A. The family *Methanocorpusculaceae*[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 225-230
- [137] Oren A. The family *Methanomicrobiaceae*[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 231-246
- [138] Weng CY, Chen SC, Lai MC, et al. *Methanoculleus taiwanensis* sp. nov., a methanogen isolated from deep marine sediment at the deformation front area near Taiwan[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt 3): 1044-1049
- [139] Chen SC, Chen MF, Lai MC, et al. *Methanoculleus sediminis* sp. nov., a methanogen from sediments near a submarine mud volcano[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(7): 2141-2147
- [140] Oren A. The family *Methanoregulaceae*[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 253-258
- [141] Bräuer SL, Cadillo-Quiroz H, Ward RJ, et al. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(1): 45-52
- [142] Oren A. The family *Methanospirillaceae*[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 283-290
- [143] Zhou LG, Liu XL, Dong XZ. *Methanospirillum psychrodurum* sp. nov., isolated from wetland soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 638-641
- [144] Parshina SN, Ermakova AV, Bomberg M, et al. *Methanospirillum stamsii* sp. nov., a psychrotolerant, hydrogenotrophic, methanogenic archaeon isolated from an anaerobic expanded granular sludge bed bioreactor operated at low temperature[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(1): 180-186
- [145] Kurr M, Huber R, König H, et al. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110 °C[J]. Archives of Microbiology, 1991, 156(4): 239-247
- [146] Slesarev AI, Mezhevaya KV, Makarova KS, et al. The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(7): 4644-4649
- [147] Liu Y. Methanosarcinales[A]//Timmis KN. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2010: 595-604
- [148] Garrity GM, Labeda DP, Oren A. Judicial commission of the international committee on systematics of prokaryotes XIIIth international (IUMS) congress of bacteriology and applied microbiology[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(11): 2775-2780
- [149] Zhang GS, Zhang F, Ding G, et al. Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in a methanogenic archaeon[J]. The ISME Journal, 2012, 6(7): 1336-1344
- [150] Li LY, Zheng MY, Ma HL, et al. Significant performance enhancement of a UASB reactor by using acyl homoserine lactones to facilitate the long filaments of *Methanosaeta harundinacea* 6Ac[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(15): 6471-6480
- [151] Cheng L, Qiu TL, Yin XB, et al. *Methermicoccus shengliensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen isolated from oil-production water, and proposal of *Methermicoccaceae* fam. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(12): 2964-2969
- [152] Wagner D, Schirmack J, Ganzert L, et al. *Methanosarcina soligelidi* sp. nov., a desiccation- and freeze-thaw-resistant methanogenic archaeon from a Siberian permafrost-affected soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(Pt 8): 2986-2991
- [153] Ganzert L, Schirmack J, Alawi M, et al. *Methanosarcina spelaei* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a floating biofilm of a subsurface sulphurous lake[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 10): 3478-3484
- [154] Singh N, Kendall MM, Liu YT, et al. Isolation and characterization of methylotrophic methanogens from anoxic marine sediments in Skan Bay, Alaska: description of *Methanococcoides alaskense* sp. nov., and emended description of *Methanosarcina baltica*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(6): 2531-2538
- [155] Cha IT, Min UG, Kim SJ, et al. *Methanomethylovorans uponensis* sp. nov., a methylotrophic methanogen isolated from wetland sediment[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2013, 104(6): 1005-1012
- [156] Lomans BP, Maas R, Luderer R, et al. Isolation and characterization of *Methanomethylovorans hollandica* gen. nov., sp. nov., isolated from freshwater sediment, a methylotrophic methanogen able to grow on dimethyl sulfide and methanethiol[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(8): 3641-3650
- [157] Wu SY, Lai MC. Methanogenic archaea isolated from Taiwan's Chelungpu fault[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(3): 830-838
- [158] Sakai S, Conrad R, Imachi H. The family *Methanocellaceae*[A]//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 209-214
- [159] Schütz H, Seiler W, Conrad R. Influence of soil temperature on methane emission from rice paddy fields[J]. Biogeochemistry, 1990, 11(2): 77-95
- [160] Sakai S, Imachi H, Sekiguchi Y, et al. 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
- [161] Erkel C, Kube M, Reinhardt R, et al. Genome of Rice Cluster I archaea—the key methane producers in the rice rhizosphere[J]. Science, 2006, 313(5785): 370-372
- [162] Lü Z, Lu YH. Complete genome sequence of a thermophilic methanogen, *Methanocella conradii* HZ254, isolated from Chinese rice field soil[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(9): 2398-2399
- [163] McCalley CK, Woodcroft BJ, Hodgkins SB, et al. Methane dynamics regulated by microbial community response to

- permafrost thaw[J]. Nature, 2014, 514(7523): 478-481
- [164] Mondav R, Woodcroft BJ, Kim EH, et al. Discovery of a novel methanogen prevalent in thawing permafrost[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3212
- [165] Borrel G, Harris HMB, Tottey W, et al. Genome sequence of “*Candidatus* Methanomethylophilus alvus” Mx1201, a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(24): 6944-6945
- [166] Borrel G, Parisot N, Harris HMB, et al. Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 679
- [167] Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(2): 262-280
- [168] Stams AJM, Plugge CM. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(8): 568-577
- [169] Sieber JR, Le HM, McInerney MJ. The importance of hydrogen and formate transfer for syntrophic fatty, aromatic and alicyclic metabolism[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(1): 177-188
- [170] Tarnocai C, Canadell JG, Schuur EAG, et al. Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region[J]. Global Biogeochemical Cycles, 2009, 23(2). DOI: 10.1029/2008GB003327
- [171] Li K, Liu RH, Sun C. A review of methane production from agricultural residues in China[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016, 54: 857-865
- [172] Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. Inhibition of anaerobic digestion process: a review[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(10): 4044-4064

## 科技信息摘录

### 科学家揭示细菌耐药性产生分子机制

2016年4月21日,国际顶级学术期刊Cell子刊Molecular Cell以长文在线发表了生物动态光学成像中心谢晓亮、白凡课题组的研究成果。在题为“Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells”的研究论文中,研究人员通过综合应用单分子荧光成像技术和高通量基因测序手段,深入探究了细菌耐药性产生的机制,揭示了在大部分生理活动都静止停滞的耐药性持留菌中外排系统却在活跃地工作,不断地排出持续涌入的药物分子,为耐药性细菌在药物处理下存活提供了双保险。

细菌的耐药性是一种现象,具有同样基因组的细菌群体通过异质性的基因表达产生了一个细胞亚群,称为持留菌(Persister),它们能耐受抗生素治疗。持留菌形成的机制一直是细菌学研究中的热点。

之前,持留菌的形成一直归因于细胞的休眠状态和生长停滞。在这些生理情况下,尽管抗生素结合到了其作用靶点,但由于细胞的代谢缓慢,抗生素无法对细菌造成伤害。在最新的研究中,谢晓亮、白凡实验组使用单分子活体荧光成像技术,发现持留菌中积累了较少的抗生素,其原因来自于增强的细菌外排活动。这项发现表明能够高效地将抗生素泵出细胞也是持留菌形成的一个重要机制。转录组基因测序进一步证实了多重药物外排泵相关基因在持留菌有着较高的表达水平。此外,研究人员进一步揭示了在众多能够导致持留菌形成的机制中,外排作用是极其关键的,其贡献等同或超过休眠状态和生长停滞。最后,通过组合使用细菌外排抑制剂和抗生素可有效地减少持留菌的数目,提供了一种新的治疗策略来克服细菌的药物耐受性。

较高的外排活动能有效降低细胞内抗生素浓度,增加持留菌生存的机会。之前的理论认为持留菌形成一般是通过“消极的被动防御战略”,最新的研究结果显示,增强外排活动将抗生素泵出从而减少细胞内药物浓度这种“积极的主动防御战略”同样起着重要的作用。这一重要发现完善了现有的关于持留菌形成的生物学机制的认识。世界著名学术期刊《自然》杂志子刊Nature Reviews Microbiology将于2016年5月3号发表题为“Persisters are under the pump”的评论文章来重点评述北京大学的这一科研成果。

——摘自《科学网》2016-04-27

<http://paper.sciencenet.cn/htmlpaper/201642716103245739360.shtm>