

互营氧化产甲烷微生物种间电子传递研究进展

张杰* 陆雅海

(北京大学 城市与环境学院 北京 100871)

摘要: 甲烷是重要的温室气体,也是典型的可再生性生物质能源。目前约70%的大气甲烷排放来源于产甲烷微生物过程。在产甲烷环境中,产甲烷菌与互营细菌形成互营关系,从而克服有机质厌氧分解反应的热力学能垒,实现短链脂肪酸和醇类物质的互营氧化产甲烷过程。该过程中,种间电子传递是关键步骤。本文首先概述了甲烷的研究意义及微生物互营降解有机质产甲烷的过程,然后分别综述了种间H₂转移、种间甲酸转移和种间直接电子传递这3种种间电子传递机制的起源、发展、研究现状和未来所需要解决的研究问题。

关键词: 互营产甲烷, 种间H₂转移, 种间甲酸转移, 种间直接电子传递

A review of interspecies electron transfer in syntrophic-methanogenic associations

ZHANG Jie* LU Ya-Hai

(College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Methane is a crucial green-house gas as well as a typical renewable biomass energy. About 70% of the current CH₄ emission into the atmosphere is originated from methanogenic microbial processes. In methanogenic environments, the close coupling of methanogens with syntrophic bacteria overcomes the energetic barriers for the anaerobic oxidation of short-chain fatty acids and alcohols with CH₄ and CO₂ as end products. Interspecies electron transfer is a critical step of this process. Here we firstly overviewed the research significance of methane and the microbial processes of syntrophic methanogenesis by degrading organic matters. And secondly summarized the origins, developments, research status and questions to be solved of the three interspecies electron transfer mechanisms, which is interspecies hydrogen transfer (IHT), interspecies formate transfer (IFT) and direct interspecies electron transfer (DIET).

Keywords: Syntrophic methanogenesis, Interspecies hydrogen transfer (IHT), Interspecies formate transfer (IFT), Direct interspecies electron transfer (DIET)

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(No. 41130527)

*通讯作者: Tel: 86-10-62745939; 信箱: zhangjie2014@pku.edu.cn

收稿日期: 2015-01-22; 接受日期: 2015-03-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-04

1 甲烷的重要性及其产生过程

甲烷虽然是大气痕量组分气体,但却是一种重要的温室气体,甲烷的增温潜势是 CO_2 的 21 倍^[1],根据政府间气候变化专门委员会(IPCC)报告,每年约有 535 Tg 的甲烷排放到大气中^[2],截止 2011 年,大气中甲烷含量与工业化之前的水平相比增加了 150%^[3]。甲烷的来源主要有湿地、江河湖海和白蚁等自然排放源,以及煤、石油、天然气的开采,牛等反刍动物的肠道发酵,水稻田排放,秸秆等生物质的燃烧,垃圾填埋,动物粪便和生活污水等人类活动排放源,而人类活动排放约占近 70%^[4]。因此减少甲烷排放对于减缓全球气候变暖至关重要。除此之外,甲烷是碳的最高还原态,标准状态下 1 mol 甲烷完全燃烧可释放高达 890 kJ 的能量^[5],是一种典型的可再生性生物质能源,有学者曾预测,在太阳能和风能实现大规模经济可观的生产力之前,生物能将始终是最重要的可再生能源^[6],因此甲烷在缓解人类能源危机方面也有着重大意义。总而言之,人类需要同时实现甲烷的减排和其能源的合理利用。才能更好地应对环境问题和能源危机。而这一切有赖于对甲烷产生过程和微观机制的深入了解。

排放到大气中的甲烷约有 70%源于厌氧条件下微生物对有机质的降解作用^[7]。在产甲烷环境中,由于缺乏无机电子受体(如 O_2 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、S、 Fe^{3+} 和 Mn^{4+} 等),有机物只能以质子和 HCO_3^- 作为电子受体进行发酵降解过程^[8]。这个过程大致如下^[9-10]:大分子有机质先在初级发酵菌所分泌的胞外水解酶的作用下被分解为单糖、氨基酸、核苷酸和脂肪酸等单体,然后这些单体又被继续发酵产生短链脂肪酸、醇类和 H_2 等小分子;短链脂肪酸和醇类在次级发酵菌的作用下分解为乙酸、 CO_2 、甲酸和 H_2 等产甲烷前体;乙酸型产甲烷菌将乙酸分解释放出甲烷和 CO_2 ,氢型产甲烷菌则利用 H_2 和 CO_2 生成甲烷和水,其中某些产甲烷菌可利用甲酸生成甲烷。同型产乙酸细菌也可利用 H_2 和 CO_2 形成乙酸,乙酸再由乙酸型产甲烷菌分解成甲烷

和 CO_2 。

产甲烷过程是由发酵菌和产甲烷菌两大类微生物在协同合作的机制下完成的。这种合作并不仅仅是在食物链上的简单依附关系,而且在热力学上有其更重要的意义:由于发酵菌介导的有机物降解过程中的中间产物——短链脂肪酸的进一步分解在标准状态下是吸热过程而不能自发进行,而产甲烷菌的存在,可以消耗其降解产物 H_2 而拉动其化学平衡向产物方向进行;而另一方面,脂肪酸降解产物作为产甲烷的前体,也可在热力学上推动产甲烷过程更加高效的进行。这种合作关系称为“互营”。在互营氧化产甲烷过程中,种间电子传递(Interspecies electron transfer, IET)是关键环节,它决定了有机物降解和产甲烷过程能否高效有序地进行,同时也是互营细菌和产甲烷菌相互依赖共同突破热力学能垒维持生长的重要手段。多年来,人们所认识的互营氧化产甲烷过程主要涉及种间 H_2 转移(Interspecies hydrogen transfer, IHT)和种间甲酸转移(Interspecies formate transfer, IFT),但最近研究表明互营氧化产甲烷过程中存在种间直接电子传递(Direct interspecies electron transfer, DIET)过程^[11-12]。

2 互营氧化产甲烷的种间 H_2 /甲酸转移

种间 H_2 转移理论的发展源自 19 世纪 90 代,当时俄国微生物学家 Omelianski 在研究微生物发酵产甲烷过程中,分离得到了与产 H_2 、乙酸和丁酸相关的微生物,并指出甲烷可能是由基于微生物调控的 H_2 和 CO_2 之间的反应所生成的^[13-15]。后来分离得到的这株菌被称为奥氏甲烷杆菌(*Methanobacillus omelianskii*),并发现它可通过将乙醇氧化为乙酸来获得自身生长所需能量,产生的电子用于还原 CO_2 产生甲烷,也可以氧化 H_2 同时还原 CO_2 产生甲烷。然而 1967 年, Bryant 等^[16]的研究却发现该菌实际上是由氧化乙醇产 H_2 和乙酸的 S 菌株与一株利用 H_2 产甲烷菌(后来被命名为布氏产甲烷杆菌, *Methanobacterium bryantii*)所构成的共培养体系。且 S 菌株氧化乙醇释放出的 H_2 会抑制自

身生长, 而 *M. bryantii* 则可利用 H_2 还原 CO_2 产生甲烷。可见在这个共培养体系降解乙醇产甲烷的过程中, H_2 很可能起着重要的作用。1979 年, Bryant 提出了微生物产甲烷的三步理论^[17], 即前述的发酵、产 H_2 产乙酸和产甲烷三步, 随后 Wolin 提出了种间 H_2 转移理论^[18], 从理论上解释了 H_2 及其种间转移在产甲烷过程中的重要作用。

互营产甲烷过程往往有两种及以上的微生物参与且各有分工, 必然存在代谢中间产物在种间的转移。由于 H_2 是氢型产甲烷菌还原 CO_2 生成甲烷的直接电子供体, 因此, 在产甲烷环境中, 由互营细菌到产甲烷菌的种间 H_2 转移过程十分普遍。这也有赖于 H_2 分子小、易扩散的特点, 而且许多厌氧微生物细胞内都含有氢化酶。互营细菌在氧化有机物的同时, 以质子为电子受体产生 H_2 。互营氧化产甲烷的体系中, 互营细菌的产 H_2 往往与 $NAD^+/NADH$ 、 $FAD/FADH_2$ 以及 $Fd_{(ox)}/Fd_{(red)}$ (Ferredoxins, 铁氧化还原蛋白) 等氧化还原中间体的相互转化相偶联, 由于 H^+/H_2 的氧化还原电位较低

($E^{\circ}=-414\text{ mV}$), 导致这些偶联反应在标准状态下的自由能变化为正值, 因而无法进行, 只有当体系中 H_2 分压降低时, 这些反应方可进行。表 1 显示了当 H_2 分压低至 1 Pa 时各反应的自由能变化。因此这些反应是互营产甲烷能否顺利进行的关键。产甲烷菌对 H_2 的消耗能够降低 H_2 分压, 从而拉动互营细菌产 H_2 反应的进行。产甲烷菌的耗 H_2 过程主要与 $Fd_{(ox)}/Fd_{(red)}$ 或辅酶 $F_{420}/F_{420}-H_2$ 相偶联, 但不同菌维持其产甲烷所需的最低 H_2 分压临界值有所不同, 对于含细胞色素 c 的产甲烷菌而言, 其临界 H_2 分压大于 10 Pa, 而不含细胞色素 c 的临界 H_2 分压则小于 10 Pa^[19]。所以在整个互营产甲烷体系中, 当 H_2 分压过高时, 互营细菌的产 H_2 过程受抑制, 而产甲烷菌的耗氢过程被激活, 相反, 当 H_2 分压过低时, 产 H_2 过程被激活, 而耗 H_2 过程被抑制。互营细菌和产甲烷古菌之间通过调节种间的 H_2 转移来实现降解有机质产甲烷过程。

除了 H_2 以外, 甲酸也是互营氧化产甲烷过程中一种重要的种间电子载体。Thiele 和 Zeikus 于 1988 年的研究发现, 在 *Desulfovibrio vulgaris* 和 *Methanobacterium formicicum* 分解乙醇产甲烷的互营体系中, 种间甲酸转移占到 90% 以上, 而种间 H_2 转移则不到 10%^[22]。1989 年, Boone 等通过扩散模型计算发现, 在沃氏互营单胞菌 (*Syntrophomonas wolfei*) 和甲酸甲烷杆菌 (*Methanobacterium formicicum*) 的互营体系中, 在自然界的 H_2 浓度下, H_2 的扩散速率不足以解释甲烷的合成速率, 而甲酸的扩散速率却能解释。而且这两株菌胞内都含有甲酸脱氢酶, 由此证明了种间甲酸转移的存在^[23]。此外, 对 *Syntrophobacter fumaroxidans* 的研究发现, 它可以与能利用 H_2 /甲酸的产甲烷菌互营, 却不能与只利用 H_2 的产甲烷菌互营^[24-25], 而且其胞内的甲酸脱氢酶有较高的甲酸氧化活性和 CO_2 还原活性^[26-27]。近些年基因组学的发展及其与传统技术的结合也为种间甲酸转移提供了新的证据: 丙酸和丁酸互营细菌中都检测到了甲酸脱氢酶的编码基因^[28-29], 而由丙酸和丁酸降解

表 1 互营氧化产甲烷中 H_2 /甲酸相关反应能量变化^[20-21]

Table 1 Energetics of hydrogen/formate-related reactions in syntrophic methanogenesis^[20-21]

反应 Reaction	$\Delta G^{\circ'}$ (kJ/mol)	$\Delta G'$ (kJ/mol)
互营细菌 Syntrophic bacteria		
$2Fd_{(red)}+2H^+\rightarrow 2Fd_{(ox)}+H_2$	+3	-26
$Formate^-+H^+\rightarrow CO_2+H_2$	-3	-32
$NADH+H^+\rightarrow NAD^++H_2$	+18	-11
$FADH_2\rightarrow FAD+H_2$	+37	+8
产甲烷菌 Methanogens		
$H_2+F_{420}\rightarrow F_{420}-H_2$	-11	+18
$H_2+2Fd_{(ox)}\rightarrow 2Fd_{(red)}$	-3	+26
$4HCOO^-+4H^+\rightarrow CH_4+3CO_2+2H_2O$	-119.5	-

注: 反应方程式中 H_2 、 CH_4 和 CO_2 皆为气态, H_2O 为液态; $\Delta G^{\circ'}$ 为标准状态下的吉布斯自由能变化, $\Delta G'$ 为当 H_2 分压为 1 Pa 时的吉布斯自由能变化。

Note: H_2 , CH_4 and CO_2 are all in the gaseous state, and H_2O in liquid state. $\Delta G^{\circ'}$ is calculated at standard state and $\Delta G'$ at a 1 Pa pressure of H_2 .

所产生的甲烷分别占到全部甲烷生成量的 35%和 8%^[30],互营氧化产甲烷过程中以甲酸为载体的种间电子传递重要性可见一斑。

种间 H₂/甲酸转移遵循 Fick 扩散定律:

$$F = \frac{A \times D \times C}{d}$$

,即 H₂/甲酸的扩散速率 F (mol/s)与产 H₂/甲酸菌的细胞表面积 A 、分子扩散常数 D 、产 H₂/甲酸菌和耗 H₂/甲酸菌的 H₂/甲酸浓度差 C 以及它们之间的距离 d 有关。H₂ 的扩散速率是甲酸的 30 倍,但甲酸的溶解度远高于 H₂,易形成较高的浓度差,约比 H₂ 的高 1 000 倍^[9],据此推测在达到相同扩散速率的前提下,H₂ 可能主要参与短距离种间转移,甲酸则可参与长距离种间转移^[31]。有研究表明,通过细胞团聚缩短种间距离可以增加种间 H₂ 转移的通量^[32]。

甲酸/CO₂ 的氧化还原电位(-432 mV)与 H⁺/H₂ 的(-432 mV)相差很小,这是它们在互营氧化和甲烷体系中同为重要的种间电子传递载体的原因之一。甲酸不仅可以直接参与 CH₄ 的产生(表 1),也可以参与 H₂ 的产生,膜结合的甲酸氢解酶复合体能够将甲酸裂解产生 H₂ 和 CO₂^[33]。虽然经过了长达近半个世纪的研究探索,但目前对于互营氧化产甲烷过程中种间 H₂ 转移和种间甲酸转移二者谁占主导还是没有定论,因为目前还没有能够可靠地测定 H₂ 和甲酸转换率的方法^[11]。有研究表明,在与专性 H₂ 型产甲烷菌的互营体系中,丙酸降解菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* 存在多种甲酸脱氢酶编码基因并且其液体培养物中有甲酸生成,推测甲酸可能是一种临时性电子载体^[28],而另外一株嗜热丙酸互营菌在与既能利用 H₂ 也能利用甲酸的产甲烷菌共培养时,会表现出更好的生长状况^[34],说明种间 H₂ 转移和种间甲酸转移也可以同时存在。而这两种种间电子传递途径在互营氧化产甲烷过程中相对贡献的大小仍需进一步研究揭示。

3 互营氧化产甲烷的种间直接电子传递

除了以 H₂/甲酸为载体的种间电子传递方式

外,近年来研究发现互营氧化产甲烷过程还存在种间直接电子传递(DIET)^[35-38]。这种种间直接电子传递的机制最早可以追溯到 20 世纪 80 年代。Lovely 等在 1986 和 1987 年先后发表的两项研究结果揭示了厌氧沉积物中,微生物在进行有机质氧化的过程中释放电子到胞外,以 Fe(III)为电子受体,并可产生超细粒磁铁矿^[39-40]。此后,也有较多文献报道这种微生物利用胞外不可溶性电子受体完成胞内有机物等电子供体的氧化,并获取能量的胞外呼吸电子传递机制^[41-43]。对于这种胞外电子传递的机理,目前有 4 种理论(图 1): (1) 通过细胞膜上的细胞色素 c ^[44-46]直接将电子传递给受体(图 1 中 I)。2010 年,Summers 等^[47]报道了 *Geobacter metallireducens* 和 *Geobacter sulfurreducens* 在其乙醇互营氧化体系中能够形成具有导电性的团聚体实现种间电子传递,并且这种种间传递是藉由 *G. sulfurreducens* 的导电性细胞色素 c 实现的。最新研究表明低铁培养基上生长的 *G. sulfurreducens* 会导致因细胞色素 c 含量下降而不能进行胞外电子传递,从而直接证明了细胞色素 c 在胞外电子传递中的必需性^[48]; (2) 通过 Pili (菌毛)等细胞附属物^[49-51]实现胞外电子传递(图 1 中 II)。2005 年,Reguera 等^[52]利用导电探针原子力显微镜证明 *G. sulfurreducens* 的 Pili 具有很强的导电性,能够作为生物纳米导线将细胞表面的电子传递到胞外的 Fe(III)氧化物,并预测细胞之间也可通过 Pili 实现电子传递。最近,Malvankar 等利用环境原子静电力显微镜发现 *G. sulfurreducens* 的 Pili 蛋白作为分子导线通过非定域化电荷转运实现电子传递^[53]; (3) 通过氧化还原电子穿梭体实现胞外电子传递,氧化态的电子穿梭体在胞内接受电子变为还原态,然后到胞外将电子传递给胞外受体又变回氧化态返回胞内,如此往返于细胞内外介导电子传递(图 1 中 III)。常见的氧化还原电子穿梭体主要有吩嗪类色素(Phenazine)^[54]、核黄素(Flavin)^[55-56]和醌类(Quinones)^[57]等; (4) 通过

应电运动(Electrokinesis)实现胞外电子传递,是 Harris 等^[58]对 *Shewanella* 的研究中发现的,大致过程是,微生物先将氧化有机物产生的电子储存在细胞表面形成“生物电容器”,然后通过“Touch-and-go”的方式将电子传递给其靠近的胞外受体(图 1 中IV)^[59]。

对于互营氧化产甲烷而言,目前的研究表明,种间的直接电子传递主要依赖于前两种机制,即 Pili 和细胞色素 c 的直接电子传递机制。2011 年,美国 Lovley 课题组的 Marita 等^[35]在啤酒废水产甲烷反应器的研究中发现产甲烷团聚体具有导电性,反应器中的团聚体细菌以 *Geobacter* 为最多(25%),古菌以 *Methanosaeta* (90%)占主导,而且团聚体中甲酸产甲烷的速率远远低于乙醇降解速率,这些结果首次证明了产甲烷团聚体具有导电性,而且种间直接电子传递很可能是产甲烷系统重要的电子转移机制。该课题组的 Rotaru 等^[11]综合利用转录组学、放射示踪和基因分析等手段,对啤酒废水产甲烷反应器进行了更为深入的研究,结果发现 *Methanosaeta harundinacea* 确实是通过 DIET 机制接受电子从而还原 CO_2 产甲烷,由于 *Methanosaeta* 菌属在产甲烷环境中分布广泛,因此作者推断该菌属的 DIET 机制不只存在于厌氧反应器中,而是在全球甲烷产生都起着重要作用。Ishii 等在其构建的丙

酸互营产甲烷体系中,发现 *Pelotomaculum thermopropionicum* 和 *Methanothermobacter thermautotrophicus* 会通过前者产生的鞭毛状细丝形成接触并进一步实现细胞团聚^[60-61],后续研究显示这种基于鞭毛状细丝的接触能够缩短该互营体系的产甲烷延滞期并上调了产甲烷基因的表达式^[62]。

Rotaru 等分别用 *G. metallireducens* 和 *Pelobacter carbinolicus* 与 *Methanosarcina barkeri* 构建纯菌共培养体系,用来评估 *M. barkeri* 参与 DIET 的能力^[63],证明了 *M. barkeri* 既能以 DIET 机制与 *G. metallireducens* 互营降解乙醇产甲烷,也能以种间 H_2 转移机制与 *P. carbinolicus* 互营产甲烷。此外,*G. metallireducens* 的 Pilin (菌毛蛋白)缺陷型菌株无法与 *M. barkeri* 启动互营,但加入 GAC (Granular activated carbon, 颗粒活性炭)后可以恢复互营和 DIET,说明导电性物质能够代替 Pili 来促使 DIET 机制的构建。事实上,有关导电性材料能促进互营氧化产甲烷 DIET 的报道已经有很多,除 GAC^[37,63]外,还包括(半)导体氧化铁矿物^[38,64]、磁铁矿颗粒^[65]、Biochar (生物炭)^[36]和碳布^[66]等多种材料,它们的共同特点是都具有良好的导电性,因此在研究中常会通过互营体系中添加这些促进 DIET 的材料来间接验证相应互营体系中是否存在 DIET 机制。

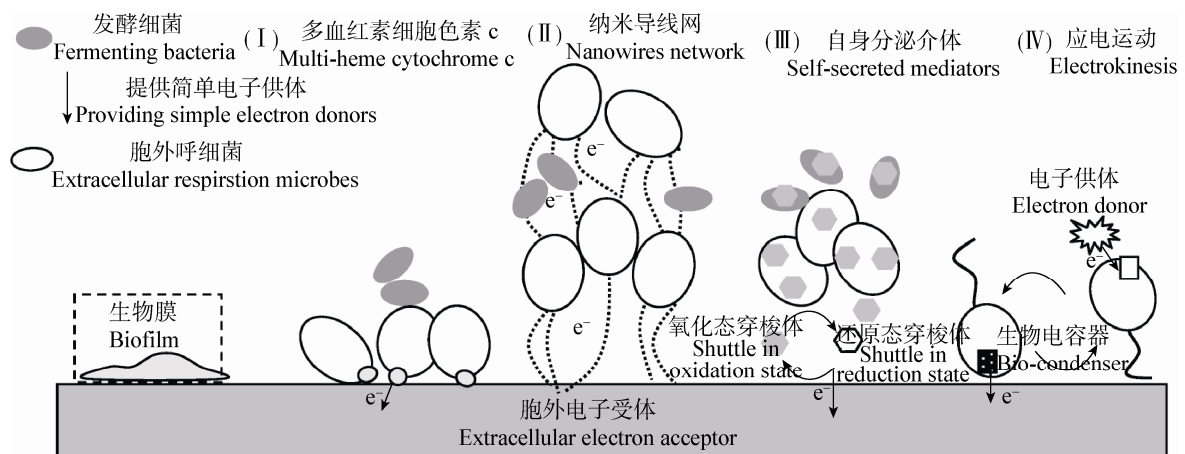


图 1 胞外电子传递机理示意图^[59]

Figure 1 Mechanisms of extracellular electron transfer^[59]

DIET 的研究开展至今已有 10 年时间, 虽然有大量研究成果, 但是关于互营氧化产甲烷体系的 DIET 研究并不是很多, 已有的报道均是针对实验室中人为构建的互营体系, 鲜见针对自然系统中互营产甲烷体系 DIET 机制的探索。我们课题组利用富集培养的方法对水稻土壤中丁酸互营氧化产甲烷体系进行了研究^[12], 结果发现在富集得到的互营体系中添加 nanoFe₃O₄ 能够显著促进产甲烷过程, 而 SiO₂ 包被绝缘处理的 nanoFe₃O₄ 却没有促进作用, 扫描电镜观察显示 nanoFe₃O₄ 紧密附着在不同形态的细胞表面且将各细胞桥接起来, 这些结果首次证明了在自然系统互营氧化产甲烷体系中存在 DIET 过程。进一步的 DNA-SIP 结果揭示参与这一 DIET 过程的细菌主要包括 Syntrophomonadaceae 和 Geobacteraceae, 古菌则是 Methanosarcinaceae、Methanocellales 和 Methanobacteriales。其中 Geobacteraceae 与 DIET 过程关系最为密切。虽然我们的研究首次证实了 DIET 在自然界互营体系中的存在, 但是还有许多方面需要补充和进一步探索验证: (1) 该体系中参与 DIET 过程的具体菌尚不明确, 还需要进一步分离鉴定; (2) 能否利用纯培养的产甲烷菌和互营细菌构建脂肪酸互营氧化产甲烷体系或者利用抑制剂对现有富集培养体系进行“菌株敲除”处理来证明 DIET 的存在; (3) 目前关于该 DIET 过程只是定性的较为模糊的认识, 缺乏对其单细胞水平乃至分子水平上微观机理的深入解读, 对于电子在上述相关微生物(地杆菌、丁酸氧化菌和产甲烷古菌)之间的传递方向和路径是未来深入了解互营氧化产甲烷过程 DIET 的重要研究内容; (4) 除丁酸以外, 其他种类有机酸的互营氧化产甲烷过程是否也存在类似的 DIET 过程, 即 DIET 在自然产甲烷环境中是否普遍存在。

4 小结与展望

种间电子传递是互营氧化产甲烷过程的关键环节, 它是互营细菌和产甲烷古菌突破热力学能垒, 获得维持各自生长所需能量的重要途径。对于该过程的研究, 有助于深入了解微生物产甲烷过程

的微观机理, 为更科学地利用甲烷这一可再生性生物质能源并治理甲烷的温室效应提供依据。今后关于种间电子传递的研究可能主要集中于微观机理的解读方面, 关于种间 H₂ 转移和种间甲酸转移相对主导地位的确, 以及关于 DIET 在自然环境中存在的广泛性的探究。近年来, 一系列技术和研究思路的更新发展为今后研究互营氧化产甲烷过程种间电子传递提供了有力的支撑, 例如: 借助元基因组学分析及其与 SIP 技术的结合可以鉴定介导特定底物代谢的微生物^[67-68]; 利用 NanoSIMS 技术(纳米次级离子质谱)及其与 FISH (荧光原位杂交)等技术的联用可以通过成像分析在单细胞水平上直观地提供样本中代谢活跃微生物的生理生态特征^[69]; 采取 Single-cell 转录组分析手段对特定物种的基因表达水平在单细胞水平上进行高灵敏度的分析^[70-71]; 通过系统生物学建模分析对微生物的代谢网络以及种间相互关系和系统功能进行系统研究^[72-73]; 使用超分辨率荧光显微技术突破衍射极限, 实现对活体原核细胞甚至细胞中细微结构的清晰观察和三维成像^[74]。除此之外, 微生物燃料电池等电化学方法也不失为研究互营氧化产甲烷种间电子传递的可行方法。

参考文献

- [1] Houghton JT, Jenkins GJ, Ephraums JJ. Climate change: the IPCC scientific assessment. Intergovernmental panel on climate change, World Meteorological Organization, United Nations Environmental Program[R]. New York: Cambridge University Press, 1990
- [2] Houghton JT, Filho MLG, Bruce J, et al. Climate change 1994: radiative forcing of climate change and an evaluation of the IPCC IS92 emission scenarios[R]. New York: Cambridge University Press, 1995
- [3] Stocker TF, Qin D, Plattner GK, et al. Climate change 2013: the physical science basis. Intergovernmental panel on climate change, working group I Contribution to the IPCC fifth assessment report (AR5)[R]. New York: Cambridge University Press, 2013
- [4] Neue HU. Methane emission from rice fields[J]. Bioscience, 1993: 466-474
- [5] Ebner R, Ellis S, Golunski S. Deactivation and durability of the catalyst for HotSpot natural gas processing[R]. ETSU Report No. F/02/00173, Energy Technology well, U.K., 2000
- [6] Gunaseelan VN. Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review[J]. Biomass and Bioenergy, 1997, 13(1):

- 83-114
- [7] Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5): 285-292
- [8] Stams AJM. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1994, 66(1/3): 271-294
- [9] Liu PF, Lu YH. A review of syntrophic fatty acids oxidation in anoxic paddy soil[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 109-122 (in Chinese)
刘鹏飞, 陆雅海. 水稻土中脂肪酸互氧化的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 109-122
- [10] Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(2): 262-280
- [11] Rotaru AE, Shrestha PM, Liu F, 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
- [12] Li H, Chang J, Liu P, et al. Direct interspecies electron transfer accelerates syntrophic oxidation of butyrate in paddy soil enrichments[J]. *Environmental Microbiology*, 2014. DOI: 10.1111/1462-2920.12576
- [13] Omelianski W. Ueber die gÄrung der zellulose[J]. *Zentralblatt fuÈr Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten Abteilung*, 1902, 2(8): 193
- [14] Omelianski W. Über die trennung der wasserstoff-und methangärung der zellulose[J]. *Zentralblatt fuÈr Bakteriologie III*, 1904, 369
- [15] Omelianski W. Über methanbildung in der natur bei biologischen prozessen[J]. *Zentralblatt fuÈr Bakteriologie Parasitenkunde II*, 1906, 15: 673-687
- [16] Bryant MP, Wolin EA, Wolin MJ, et al. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria[J]. *Archiv für Mikrobiologie*, 1967, 59(1/3): 20-31
- [17] Bryant MP. Microbial methane production-theoretical aspects[J]. *Journal of Animal Science*, 1979, 48(1): 193-201
- [18] Wolin MJ. Hydrogen transfer in microbial communities[J]. *Microbial Interactions and Communities*, 1982, 1: 323-356
- [19] 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
- [20] Stams AJM, Plugge CM. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(8): 568-577
- [21] Keltjens JT. Coenzymes of methanogenesis from hydrogen and carbon dioxide[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1984, 50(4): 383-396
- [22] Thiele JH, Zeikus JG. Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(1): 20-29
- [23] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(7): 1735-1741
- [24] Dong X, Stams AJM. Evidence for H₂ and formate formation during syntrophic butyrate and propionate degradation[J]. *Anaerobe*, 1995, 1(1): 35-39
- [25] Stams AJM, Dong X. Role of formate and hydrogen in the degradation of propionate and butyrate by defined suspended cocultures of acetogenic and methanogenic bacteria[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1995, 68(4): 281-284
- [26] de Bok FAM, Luijten MLGC, Stams AJM. Biochemical evidence for formate transfer in syntrophic propionate-oxidizing cocultures of *Syntrophobacter fumaroxidans* and *Methanospirillum hungatei*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4247-4252
- [27] de Bok FAM, Hagedoorn PL, Silva PJ, et al. Two W-containing formate dehydrogenases (CO₂-reductases) involved in syntrophic propionate oxidation by *Syntrophobacter fumaroxidans*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(11): 2476-2485
- [28] Kosaka T, Kato S, Shimoyama T, et al. The genome of *Pelotomaculum thermopropionicum* reveals niche-associated evolution in anaerobic microbiota[J]. *Genome Research*, 2008, 18(3): 442-448
- [29] McInerney MJ, Rohlin L, Mouttaki H, et al. The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(18): 7600-7605
- [30] Bélaich, JP, Bruschi M, Garcia JL. *Microbiology and Biochemistry of Strict Anaerobes Involved in Interspecies Hydrogen Transfer*[M]. New York: Spring, 1990
- [31] de Bok FAM, Plugge CM, Stams AJM. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia[J]. *Water Research*, 2004, 38(6): 1368-1375
- [32] Felchner-Zwirello M, Winter J, Gallert C. Interspecies distances between propionic acid degraders and methanogens in syntrophic consortia for optimal hydrogen transfer[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(20): 9193-9205
- [33] Sawers RG. Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2005, 33(1): 42-46
- [34] Plugge CM, Balk M, Stams AJM. *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. thermosyntrophicum subsp. nov., a thermophilic, syntrophic, propionate-oxidizing, spore-forming bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(2): 391-399
- [35] Morita M, Malvankar NS, Franks AE, et al. Potential for direct interspecies electron transfer in methanogenic wastewater digester aggregates[J]. *mBio*, 2011, 2(4): e00159-11
- [36] Chen S, Rotaru AE, Shrestha PM, et al. Promoting interspecies electron transfer with biochar[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5019
- [37] Liu F, Rotaru AE, Shrestha PM, et al. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon[J]. *Energy & Environmental Science*, 2012, 5(10): 8982-8989
- [38] Kato S, Hashimoto K, Watanabe K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(7): 1646-1654
- [39] Lovley DR, Phillips EJP. Availability of ferric iron for microbial reduction in bottom sediments of the freshwater tidal Potomac River[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52(4): 751-757
- [40] Lovley DR, Stolz JF, Nord GL, et al. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism[J]. *Nature*, 1987, 330(6145): 252-254

- [41] Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, et al. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration[J]. *Nature*, 1996, 382(6590): 445-448
- [42] Hernandez ME, Newman DK. Extracellular electron transfer[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2001, 58(11): 1562-1571
- [43] Gralnick JA, Newman DK. Extracellular respiration[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(1): 1-11
- [44] Mehta T, Coppi MV, Childers SE, et al. Outer membrane c-type cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8634-8641
- [45] Leang C, Coppi MV, Lovley DR. OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(7): 2096-2103
- [46] Leang C, Qian X, Mester T, et al. Alignment of the c-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(12): 4080-4084
- [47] Summers ZM, Fogarty HE, Leang C, et al. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria[J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1413-1415
- [48] Estevez-Canales M, Kuzume A, Borjas Z, et al. A severe reduction in the cytochrome C content of *Geobacter sulfurreducens* eliminates its capacity for extracellular electron transfer[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2014. DOI: 10.1111/1758-2229.12230
- [49] Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2004, 49: 219-286
- [50] Weber KA, Achenbach LA, Coates JD. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(10): 752-764
- [51] Lovley DR. Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination[J]. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4(12): 4896-4906
- [52] Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, et al. Extracellular electron transfer via microbial nanowires[J]. *Nature*, 2005, 435(7045): 1098-1101
- [53] Malvankar NS, Yalcin SE, Tuominen MT, et al. Visualization of charge propagation along individual pili proteins using ambient electrostatic force microscopy[J]. *Nature Nanotechnology*, 2014, 9(12): 1012-1017
- [54] Rabaey K, Boon N, Höfte M, et al. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(9): 3401-3408
- [55] Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, et al. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(10): 3968-3973
- [56] Okamoto A, Hashimoto K, Neelson KH, et al. Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(19): 7856-7861
- [57] Newman DK, Kolter R. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer[J]. *Nature*, 2000, 405(6782): 94-97
- [58] Harris HW, El-Naggar MY, Bretschger O, et al. Electrokinesis is a microbial behavior that requires extracellular electron transport[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(1): 326-331
- [59] Ma C, Zhou SG, Zhuang L, et al. Electron transfer mechanism of extracellular respiration: a review[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(7): 2008-2018 (in Chinese)
马晨, 周顺桂, 庄莉, 等. 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
- [60] Ishii S, Kosaka T, Hori K, et al. Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7838-7845
- [61] Ishii S, Kosaka T, Hotta Y, et al. Simulating the contribution of coaggregation to interspecies hydrogen fluxes in syntrophic methanogenic consortia[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 5093-5096
- [62] Shimoyama T, Kato S, Ishii S, et al. Flagellum mediates symbiosis[J]. *Science*, 2009, 323(5921): 1574
- [63] Rotaru AE, Shrestha PM, Liu F, et al. Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(15): 4599-4605
- [64] Yamada C, Kato S, Ueno Y, et al. Conductive iron oxides accelerate thermophilic methanogenesis from acetate and propionate[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.11.001
- [65] Cruz Viggli C, Rossetti S, Fazi S, et al. Magnetite particles trigger a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(13): 7536-7543
- [66] Chen S, Rotaru AE, Liu F, et al. Carbon cloth stimulates direct interspecies electron transfer in syntrophic co-cultures[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 173: 82-86
- [67] Rui J, Qiu Q, Lu Y. Syntrophic acetate oxidation under thermophilic methanogenic condition in Chinese paddy field soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 77(2): 264-273
- [68] Sieber JR, McInerney MJ, Gunsalus RP. Genomic insights into syntrophy: the paradigm for anaerobic metabolic cooperation[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66: 429-452
- [69] Wagner M. Single-cell ecophysiology of microbes as revealed by Raman microspectroscopy or secondary ion mass spectrometry imaging[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 411-429
- [70] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 377-382
- [71] Yu Z, Lu S, Huang Y. Microfluidic whole genome amplification device for single cell sequencing[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(19): 9386-9390
- [72] Nagarajan H, Embree M, Rotaru AE, et al. Characterization and modelling of interspecies electron transfer mechanisms and microbial community dynamics of a syntrophic association[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2809
- [73] Stolyar S, Van Dien S, Hillesland KL, et al. Metabolic modeling of a mutualistic microbial community[J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3(1): 92
- [74] Babcock H, Sigal YM, Zhuang X. A high-density 3D localization algorithm for stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Optical Nanoscopy*, 2012, 1(1): 1-10