科学通报 2020 年 第 65 卷 第 26 期: 2820 ~ 2834
专辑: 庆祝大连理工大学环境学院成立20周年 评 述
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

厌氧消化中直接种间电子传递产甲烷机理研究与技术应用

赵智强[1], 李杨[2], 张耀斌[1*]

1. 大连理工大学环境学院, 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 大连 116024;
2. 大连理工大学海洋科学与技术学院, 盘锦 124221
* 联系人, E-mail: zhangyb@dlut.edu.cn

2020-06-03 收稿, 2020-07-13 修回, 2020-07-15 接受, 2020-07-15 网络版发表
国家自然科学基金(51808097)、辽宁省重大科技专项(2019020171-JH1/103-01)和国家重点研发计划(2018YFC1900901)资助

摘要 现有厌氧消化工程的核心原理是传统的水解酸化-产甲烷途径, 该途径复杂有机物水解缓慢, 且有机物分解产乙酸受H_2分压限制, 导致产甲烷效率低及稳定性差. 2014年, 美国马萨诸塞州大学微生物学家Lovley等人提出一种新型产甲烷途径: 直接种间电子传递(DIET)产甲烷途径. DIET产甲烷途径的发现突破了半个多世纪以来研究者对厌氧消化以水解酸化-产甲烷为唯一途径及H_2为主要电子载体的认识, 开拓了产甲烷新思路. 尽管一些报道综述了DIET的基本原理、关键微生物及调控策略等, 但还没有报道阐明DIET产甲烷途径的研究进展及其在厌氧消化中的应用. 因此, 本文总结了DIET产甲烷途径的研究进展, 阐明了DIET产甲烷途径的微生物群落及其可利用的底物, 评估了DIET产甲烷途径的强化策略和及其在厌氧消化中的应用, 期待为改善现有厌氧消化工程的效率和稳定性提供支持.

关键词 厌氧消化, 直接种间电子传递, 产甲烷, 互养代谢, 导电材料

厌氧消化是实现有机废物资源化最现实、最有效的手段之一[1]. 但目前在我国的有机废物处理中, 厌氧消化的应用非常不充分. 许多高浓度有机废水的厌氧段效果不佳, 导致后续处理难度过大而超标排放. 在有机固废方面, 厌氧消化本应发挥更大作用, 但成功应用案例很少. 据统计, 我国每年产生的剩余污泥超过8000万吨, 而规模化的污泥厌氧消化工程不超过100个, 稳定运行的不足10个. 我国每年产生的餐厨垃圾超过1亿吨, 由于厌氧消化技术不稳定, 绝大部分餐厨垃圾被直接填埋或焚烧. 由于产沼气率低、运行条件苛刻等因素, 我国农村沼气池的废弃率达到99%.

现有厌氧消化工程的核心原理是传统的水解酸化-产甲烷途径, 即有机废物产甲烷需经水解、酸化、产氢产乙酸和产甲烷等过程[1]. 这其中涉及以下关键科学难题, 导致产甲烷效果不佳: (1) 有机废物(如餐厨垃圾和剩余污泥等)组分复杂, 其中的蛋白质、多糖(如淀粉和纤维素等)等复杂有机物结构稳定, 微生物水解缓慢, 是厌氧消化的限速步骤[2]; (2) 产甲烷菌可利用的底物仅限于一元碳(甲醇、甲胺、甲酸)、乙酸和H_2/CO_2, 其他有机物需经产酸发酵成乙酸, 才能被产甲烷菌利用[3]. 然而, 有机物分解产乙酸却受限于H_2分压: H^+作为电子受体氧化有机物在热力学上不能自发进行(E_{H^+/H_2}=−0.414 V, pH 7)[4]. 只有当H_2分压足够低(<10^{-4}~10^{-5} atm, 1 atm=101.325 kPa), H^+才能氧化还原

引用格式: 赵智强, 李杨, 张耀斌. 厌氧消化中直接种间电子传递产甲烷机理研究与技术应用. 科学通报, 2020, 65: 2820–2834
Zhao Z Q, Li Y, Zhang Y B. Direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: Research and technological application (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 2820–2834, doi: 10.1360/TB-2020-0661

© 2020《中国科学》杂志社

性辅酶NADH($E_{NAD+/NADH}$=−0.32 V, pH 7)和$FADH_2$($E_{FADH/FADH_2}$=−0.22 V, pH 7)、铁氧化还原蛋白($E_{Fd\text{-}ox/Fd\text{-}red}$=−0.398 V, pH 7)等重要媒介, 进行厌氧呼吸[4]. 在某些时候, 甲酸可以取代H_2成为种间电子交换的载体[4]. 耗氢(或甲酸)产甲烷菌是厌氧消化系统中消耗H_2(或甲酸)的主要微生物, 其丰度通常较低, 且对环境敏感, 极易代谢受阻, 导致H_2分压(或甲酸浓度)上升, 无法完成种间H_2(或甲酸)传递(interspecies hydrogen/formate transfer, IHT/IFT)(图1), 造成丙酸/丁酸积累, 从而导致产甲烷停滞[3]. 因此, 开辟新型产甲烷途径, 突破复杂有机物水解的速率约束及产酸的热力学屏障, 是提高有机废物厌氧消化效率和稳定性的关键.

2014年以来, 美国马萨诸塞州大学微生物学家Lovley及其团队发现, *Geobacter*可直接氧化乙醇, 并将产生的电子通过导电菌丝[5]或细胞色素OmcS[6]传递给*Methanothrix*[7]或*Methanosarcina*[8], *Methanothrix*或*Methanosarcina*接受电子并还原CO_2为甲烷(图1). 相比传统的水解酸化-产甲烷途径, 有机废物产甲烷通过这种直接种间电子传递(direct interspecies electron transfer, DIET)产甲烷途径具有以下潜在的优势: (1) 复杂有机物无需经历水解酸化, 可直接被DIET微生物互养代谢为甲烷; (2) 电子传递无需借助H_2扩散, 克服有机物分解产酸的热力学限制. DIET产甲烷途径的发现突破了半个多世纪以来研究者对厌氧消化以水解酸化-产

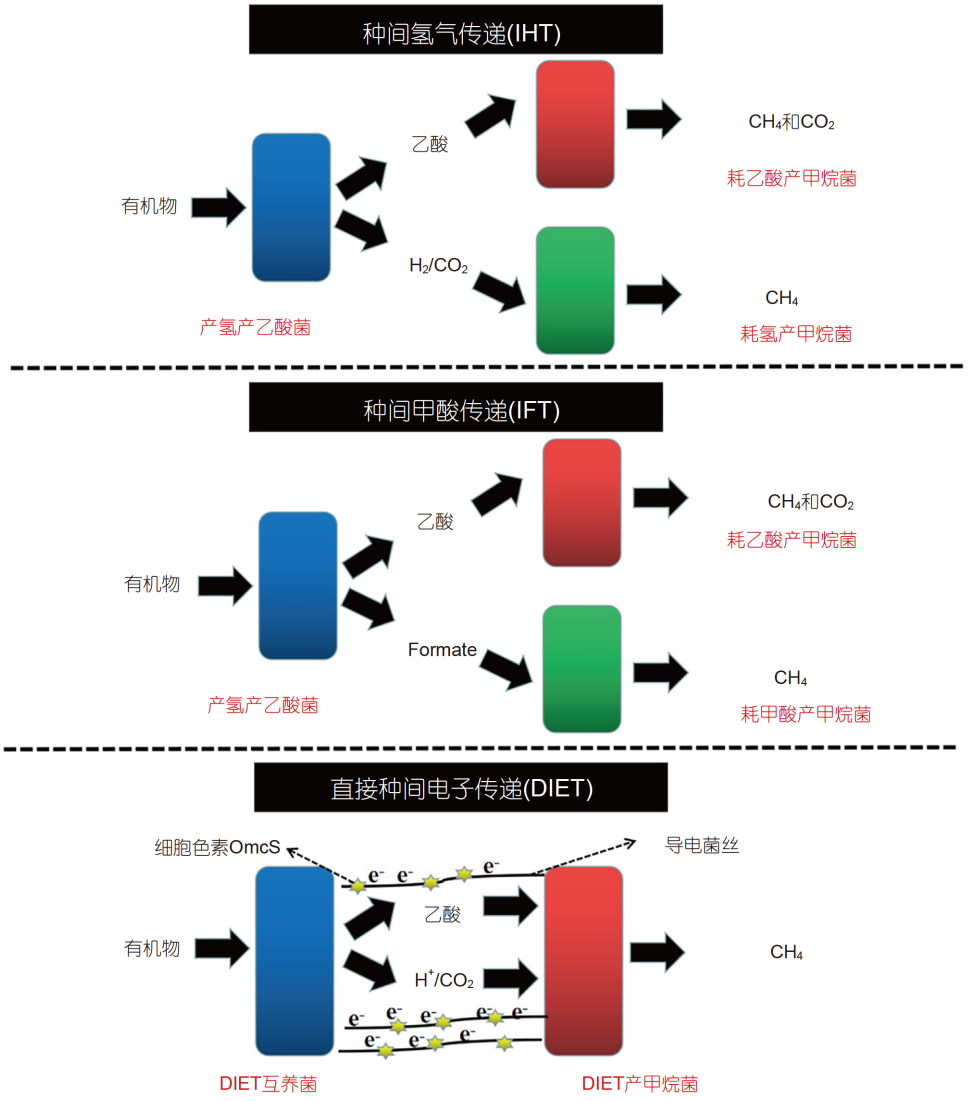


图 1 厌氧消化中IHT、IFT和直接种间电子传递(DIET)产甲烷原理
Figure 1 Methanogenic pathway of IHT, IFT and direct interspecies electron transfer (DIET) in anaerobic digestion

甲烷为唯一途径及H_2为主要的种间电子载体的认识, 开拓了产甲烷新思路, 即传统水解酸化-产甲烷途径和DIET产甲烷途径可在单一厌氧消化系统内实现“双驱”甲烷化, 共同驱动有机废物产甲烷.

目前关于DIET产甲烷的研究主要为以下两个方面, 即DIET产甲烷途径的微生物群落和调控方法. 研究微生物群落旨在发现更多能参与DIET产甲烷途径的微生物, 以及拓宽其可利用底物的认知. 研究调控方法旨在形成更多的促进互养代谢的方法, 如投加导电材料或少量乙醇刺激等. 最近, 研究者系统综述了DIET的基本原理、关键微生物及调控策略[9,10], 但我们认为, 阐明DIET产甲烷途径的研究进展及其在厌氧消化中的应用对于改善现有厌氧消化工程的效率和稳定性具有更重要的指导意义. 因此, 本文的主要目的在于: (1) 总结DIET产甲烷途径的研究进展, 指明未来的研究方向; (2) 阐明DIET产甲烷途径的微生物群落及其可利用的底物, 找出参与DIET产甲烷途径的新菌种; (3) 评估DIET产甲烷途径的强化策略和及其在厌氧消化中的应用, 展望DIET产甲烷途径未来面临的机遇和挑战.

1 DIET产甲烷的研究进展

1.1 DIET的发现

2010年, Summers等人[11]首次在*G. metallireducens*和*G. sulfurreducens*的共培养体系中证实DIET是其互养代谢乙醇并还原延胡索酸的主要工作模式. 分子生物学手段敲除*G. sulfurreducen*编码氢化酶的*hyb*基因, 导致*G. sulfurreducens*不能利用H_2, 结果发现共培养体系内*G. metallireducens*和*G. sulfurreducens*仍可互养增殖, 且其聚集形成颗粒的时间由原来的7个月缩短至21 d[11], 表明DIET可为互养微生物提供更快速的电子传输. 为进一步证明该结论, 2016年, Storck等人[12]通过反应-扩散-电化学模型计算了DIET(44.9×10^3 e^- cp^{-1} s^{-1})的电子传递速率是IHT(5.24×10^3 e^- cp^{-1} s^{-1})的8~9倍.

分子生物学手段敲除*G. sulfurreducens*编码OmcS或PilA的关键基因, 导致*G. sulfurreducens*不能分泌导电菌丝或细胞色素OmcS, 结果发现共培养体系中两种微生物都不再增殖[11]. 据此, Summers等人[11]初步推断导电菌丝和细胞色素是实现DIET的两种主要的方式. 2013年, Shrestha等人[13]利用宏转录组测序分析了共培养体系中*G. metallireducens*和*G. sulfurreducens*的基因的表达情况, 发现*G. metallireducens*高度表达编码OmcS和PilA的关键基因, 该结果进一步验证了导电菌丝和细胞色素OmcS对于实现DIET的重要性. 此外, Shrestha等人[13]提出一种推断复杂环境中微生物种间电子传递途径的方法, 即利用宏基因组或宏转录组测序分析微生物种群内涉及IHT或DIET的关键基因的丰度变化或表达情况. 例如, 2017年, Holmes等人[14]利用宏转录组测序分析稻田土壤中微生物群落发现, *Methanothrix*高度表达CO_2还原代谢涉及的基因, 且*Geobacter*在种群中占优势地位, 其高度表达编码导电菌丝的关键基因, 表明*Geobacter*和*Methanothrix*参与DIET产甲烷途径.

2018年, Ueki等人[15]在共培养体系中发现*G. metallireducens* strain Aro-5(分泌不导电菌丝且产生大量的细胞色素OmcS)不能与*G. sulfurreducens*通过DIET进行互养增殖, 表明实现DIET的必要条件是导电菌丝, 而沿着导电菌丝排布的细胞色素OmcS可能主要连接导电菌丝与其他胞外电子受体, 如Fe(III)氧化物等.

1.2 DIET产甲烷

2011年, Morita等人[16]分析了一个处理啤酒废水的上流式厌氧污泥床(UASB)消化器内颗粒污泥发现, 其具有类似金属一样的电导特性: 电导率随温度升高呈现先升后降趋势. 在此之前, *G. sulfurreducens*的导电菌丝也被证实具有类似的金属电导特性[5], 且共培养体系中*G. sulfurreducens*可与*G. metallireducens*聚集形成导电颗粒[11]. 微生物群落分析表明, *Geobacter*是细菌群落中占优势地位的互养菌, 而不能利用H_2的*Methanothrix*的丰度占到古菌群落的90%以上, 暗示*Geobacter*可能与*Methanothrix*形成DIET[16].

2014年, Rotaru等人[7]首次在*G. metallireducens*和*M. harundinacea*的共培养体系中证实DIET是其互养代谢乙醇为甲烷的主要工作模式. 按照传统水解酸化-产甲烷途径的观点, 产氢产乙酸菌分解1 mol乙醇可产生1 mol乙酸和2 mol H_2($CH_3CH_2OH+H_2O=CH_3COO^-+H^++2H_2$); 耗乙酸产甲烷菌消耗1 mol乙酸产生1 mol甲烷($CH_3COOH=CH_4+CO_2$), 耗氢产甲烷菌消耗2 mol H_2产生0.5 mol甲烷($2H_2+0.5CO_2=0.5CH_4+H_2O$). 然而, 在*G. metallireducens*和*M. harundinacea* (严格地耗乙酸型产甲烷菌)的共培养体系中, 消耗1 mol乙醇仍可产生1.5 mol甲烷, 表明*M. harundinacea*利用了*G. metallireducens*分解乙醇为乙酸过程中释放的电子[7]. 宏转录组

测序结果发现, *M. harundinacea*高度表达CO_2还原代谢涉及的基因, 表明*M. harundinacea*通过DIET直接接受电子并还原CO_2为甲烷($4H^+ + 4e^- + 0.5CO_2 = 0.5CH_4 + H_2O$)[7]. 同样在2014年, *Methanosarcina*也被证实能通过DIET直接接受电子并还原CO_2为甲烷[8]. 与*Methanothrix*不同的是, *Methanosarcina*不仅可利用乙酸产甲烷, 还可代谢H_2/CO_2为甲烷, 且*Methanosarcina*通常在高负荷厌氧消化器古菌群落中占优势地位[17]. 因此, 发现*Methanosarcina*参与DIET产甲烷途径对于维持厌氧消化的稳定具有重要意义.

1.3 导电材料促进DIET

2012年, Liu等人[18]首次在*G. metallireducens*和*G. sulfurreducens*的共培养体系中证实颗粒活性炭可促进DIET, 即加快互养代谢乙醇并还原延胡索酸. 分子生物学手段分别敲除*G. sulfurreducens*内编码氢化酶、OmcS和PilA的关键基因揭示了颗粒活性炭促进DIET的机制, 即*Geobacter*不依靠导电菌丝或细胞色素OmcS, 而直接附着在颗粒活性炭的表面, 利用其高的电导和宽阔的表面实现长距离、快速的种间电子传输. 随后, Liu等人[18]将颗粒活性炭投加至*G. metallireducens*和*M. barkeri*的共培养体系中证实颗粒活性炭同样可促进DIET产甲烷. 在此之后, 生物炭[19]和碳布[20]也相继在共培养体系中被证实能促进DIET产甲烷. 值得注意地是, 碳布不能提高依靠H_2作为电子载体的*Desulfovibrio vulgaris*和*G. sulfurreducens*的共培养体系中互养代谢速率, 表明碳基导电材料不能促进IHT[20].

同样在2012年, Kato等人[21]在*G. sulfurreducens*和*Thiobacillus denitrificans*共培养体系中证实导电磁铁矿可加快互养代谢乙酸并还原硝酸盐. 由于导电金属矿物广泛存在于自然环境(如湖泊沉积物和土壤等), 磁铁矿介导的DIET对于探索生物地球化学反应具有重要价值. 目前, 关于导电磁铁矿促进DIET的机制仍不清楚. Kato等人[21]发现半导电(如赤铁矿等)或不导电铁矿物(如水铁矿等)不能明显加快*G. sulfurreducens*和*T. denitrificans*的共培养体系中互养代谢速率, 并据此推测导电磁铁矿可充当电子管路, 其促进机制类似于碳基导电材料. 然而, Ueki等人[15]发现导电磁铁矿不能促使共培养体系中*G. metallireducens* strain Aro-5和*G. sulfurreducens* strain Aro-5形成DIET, 但投加颗粒活性炭可促使其通过DIET进行互养代谢. 此外, Liu等人[22]发现导电磁铁矿降低了*G. sulfurreducens*编码OmcS关键基因的表达, 即导电磁铁矿可能替代细胞色素OmcS.

1.4 DIET产甲烷的应用

2014年, Viggi等人[23]发现导电磁铁矿可加快厌氧污泥中互养代谢丙酸为甲烷. 该报道是首次利用导电材料促进DIET产甲烷加快互养代谢除乙醇之外的底物. 在此之前, 颗粒活性炭被证实能促进处理啤酒废物的UASB消化器内微生物互养代谢乙醇为甲烷[18], 导电磁铁矿被证实能促进稻田土壤中微生物互养代谢乙醇为甲烷[24]. 2015年, Li等人[25]证实导电磁铁矿可加快稻田土壤中微生物互养代谢丁酸为甲烷. 微生物群落分析发现, 导电磁铁矿可明显提高*Geobacteraceae*和*Methanosarcinaceae*的丰度, 暗示其可能参与DIET产甲烷途径[25]. 2016年, Wang等人[26]首次在*G. metallireducens*和*G. sulfurreducens*的共培养体系中证实丙酸/丁酸可作为DIET的底物. 然而, 当*M. harundinacea*或*M. barkeri*作为电子接受端微生物时, 丙醇/丁醇可通过DIET产甲烷途径转化为丙酸/丁酸, 却不能进一步转化为甲烷[26]. 丙酸/丁酸积累是造成厌氧消化系统产甲烷停滞的重要原因, 因此, 发现更多能代谢丙酸/丁酸的DIET互养菌对于强化厌氧消化具有重要意义. 2016年, Zhao等人[27]在处理丙酸/丁酸的UASB消化器启动初期投加少量乙醇(类似启动处理啤酒废物的UASB消化器)发现, 其内部形成高度导电的颗粒污泥, 且丙酸/丁酸降解速率明显提高. 此外, 该颗粒污泥中还富集一些能代谢丙酸/丁酸的新型DIET互养菌.

2015年, Li等人[28]投加碳纳米管至厌氧污泥中发现, 蔗糖降解和产甲烷速率明显提高. 该研究是首次利用导电材料促进DIET产甲烷强化复杂有机物厌氧消化. 同样在2015年, Zhuang等人[29]发现磁铁矿和赤铁矿均可促进稻田土壤中互养代谢苯甲酸为甲烷. 该研究是首次利用导电材料促进DIET产甲烷强化芳香族化合物厌氧消化. 考虑到苯甲酸是芳香族化合物分解过程中重要的中间产物, 因此, 发现导电材料促进互养代谢苯甲酸对于强化难降解有机废物厌氧消化具有重要意义.

2 微生物

2.1 DIET互养菌

目前, 仅有*G. metallireducens*[7,8]和*G. hydrogenophilus*[30]在共培养体系中被证实可与产甲烷菌形成

DIET. *G. sulfurreducens*可通过导电磁铁矿与*T. denitrificans*形成DIET[21]. 尽管没有报道表明*G. sulfurreducens*可参与DIET产甲烷途径, 但*G. sulfurreducens*可分泌导电菌丝[5], 而导电菌丝被证实是实现DIET的必要条件[15].

在一些复杂产甲烷环境中还检出了*Geobacter*属内其他物种, 暗示其有望参与DIET产甲烷途径. 例如, DIET被认为是处理啤酒废物的UASB消化器内微生物互养代谢的主要工作模式[16]. 16S rRNA测序发现其颗粒污泥中检出的*Geobacter*的序列与*G. daltonii*序列高度相似(相似度97%), 表明*G. daltonii*可能与*Methanothrix*形成DIET[16]. Zhao等人[27]在处理丙酸/丁酸的UASB消化器(启动阶段投加少量乙醇)的颗粒污泥中发现, *G. bemidjiensis*是除*G. sulfurreducens*之外群落中占优势地位的*Geobacter*. 进一步利用生物炭强化互养代谢发现, 生物炭表面明显富集*G. lovleyi*, *G. argillaceus*和*G. pickeringii*, 而其却没有在颗粒污泥中被检出, 暗示*G. lovleyi*, *G. argillaceus*和*G. pickeringii*可能通过生物炭与产甲烷菌形成DIET[31]. 此外, Mei等人[32]在处理果糖和聚乙二醇的UASB消化器的颗粒污泥中发现了一种新型*Geobacter*, 即bin GAC1. 宏基因组测序结果显示, bin GAC1不仅可参与IHT产甲烷途径, 还可利用颗粒活性炭参与DIET产甲烷[32].

Walker等人[33]在*Syntrophus aciditrophicus*和*G. sulfurreducens*$_{HF}$(不能利用H_2的*G. sulfurreducens*的突变株)的共培养体系中证实DIET是其互养代谢苯甲酸并还原延胡索酸的主要工作模式. *S. aciditrophicus*是目前除*Geobacter*以外被证实能参与DIET的互养菌. 值得注意的是, *Syntrophus*属于产氢产乙酸菌. 尽管没有明确报道表明*S. aciditrophicus*可与产甲烷菌形成DIET, 但*S. aciditrophicus*可分泌导电菌丝[33], 表明某些产氢产乙酸菌也具备参与DIET产甲烷途径的能力. 此外, 在一些投加导电材料的复杂产甲烷环境中也检出了*Syntrophus*. Yan等人[34]利用碳纳米管促进厌氧污泥中互养代谢苯酚发现, *Syntrophus*的丰度提高了1个数量级, 与此同时, *Methanothrix*是占优势地位的产甲烷菌, 暗示*Syntrophus*可能与*Methanothrix*通过碳纳米管形成DIET. 除*Syntrophus*之外, 丙酸/丁酸氧化型产氢产乙酸菌(如*Syntrophomonas*[25,35~37]和*Smithella*[38])也在投加导电材料的复杂环境被检出. Li等人[25]发现投加导电磁铁矿至稻田土壤中可明显提高*Syntrophomonadaceae*和*Methanosarcinaceae*的丰度, 并加快互养代谢丁酸为甲烷. 此外, Xia等人[38]发现碳纳米管和导电磁铁矿均可促使*Smithella*占优势的湖泊沉积物中互养丙酸代谢不受高H_2分压的抑制.

投加导电材料或少量乙醇可在产甲烷复杂环境中富集具备胞外电子传递能力的Fe(III)(如*Pseudomonas*[39]、*Desulfuromonas*[39]、*Desulfovibrio*[40]、*Pelobacter*[41]、*Clostridium*[42]、*Sphaerochaeta*[43]、*Thauera*[44]、*Trichococcus*[45]和*Rhodoferax*[46]等)或S^0(如*Bacillus*[47]、*Sporanaerobacter*[48]和*Petrimonas*[49]等)还原菌, 暗示其可能参与DIET产甲烷途径. 然而, 需要说明的是, 微生物具备Fe(III)或S^0还原能力与其能否形成DIET没有直接联系. 例如, *G. uraniireducens*可分泌不导电菌丝, 不能与*G. sulfurreducens*形成DIET, 但*G. uraniireducens*却具备良好的Fe(III)还原能力[30]. 此外, 某些Fe(III)或S^0还原菌(如*Pelobacter*和*Desulfovibrio*)被证实可与耗氢产甲烷菌形成IHT[20,50]. 因此, 这些富集的Fe(III)或S^0还原菌能否参与DIET产甲烷途径仍需进一步研究.

2.2 DIET产甲烷菌

目前, 仅有*M. harundinacea*[7]、*M. barkeri*[8]、*M. horonobensis*[51]和*M. mazeii*[51]在共培养体系中被证实可通过DIET接受电子并还原CO_2为甲烷. 但是, *Methanothrix*和*Methanosarcina*均不具备分泌导电菌丝和细胞色素OmcS的能力. 因此, 进一步的研究应着重考虑胞外电子进入*Methanothrix*或*Methanosarcina*细胞的机制. 在发现*M. harundinacea*从*G. metallireducens*直接接受电子并还原CO_2为甲烷之前, 乙酸脱羧甲烷化被认为是*M. harundinacea*唯一的能量代谢方式[52]. Wang等人[26]在共培养体系中发现, *G. metallireducens*和*M. harundinace*可通过互养代谢丙醇/丁醇为丙酸/丁酸进行增殖, 表明DIET也可作为*M. harundinacea*的能量代谢方式.

除了*Methanothrix*和*Methanosarcina*, 在一些投加导电材料或少量乙醇的产甲烷复杂环境中还检出了一些具备分泌导电菌丝或细胞色素OmcS的能力的产甲烷菌, 如*Methanobacterium*[53]、*Methanospirillum*[46]、*Methanococcus*[54]、*Methanoregula*[37]、*Methanolinea*[55]、*Methanosphaerula*[44]、*Methanomassiliicoccus*[41,56]、*Methanothermobacter*[41]和*Methanoculleus*[57], 表明其可能通过DIET接受电子并还原CO_2为甲烷. *Methanobacterium*被报道可从固体Fe^0表面直接获取电子并还原CO_2为甲烷[58], 而从固体金属表面接受电子的

机制与通过DIET接受电子的机制相类似. 此外, *Methanospirillum*被报道能分泌导电菌丝[59]. 然而, 这两种产甲烷菌在共培养体系中都不能与*G. metallireducens*形成DIET[7], 表明*Methanobacterium*和*Methanospirillum*不具备通过DIET接受电子并还原CO_2为甲烷的能力. *Methanococcus*被报道也可从Fe^0表面获取电子[60]. 此外, Lohner等人[61]利用分子生物学手段敲除*Methanococcus*细胞内编码氢化酶的关键基因发现, 其仍可从石墨电极表面获取电子并还原CO_2为甲烷. 需要说明的是, *Methanococcus*从固体电极表面获取电子的机制与其从碳基导电材料表面接受电子机制相类似, 暗示*Methanococcus*可能通过DIET接受电子并还原CO_2.

3 可利用的底物

3.1 乙醇和乙酸

乙醇在共培养体系中已被证实可作为DIET产甲烷途径的底物[7,8]. 在此之前, DIET被认为是处理啤酒废水的UASB反应器颗粒污泥内微生物互养代谢的主要工作模式[16], 且颗粒活性炭可明显加快该颗粒污泥中互养代谢[18]. 此外, Lin等人[56]投加石墨烯至处理乙醇的中温(35°C)和嗜热(55°C)厌氧消化器发现, 其甲烷产生速率提高20%以上. Zhao等人[27]在处理丙酸/丁酸的UASB消化器的启动初期投加少量乙醇发现, 其内部形成高度导电的颗粒污泥, 该颗粒污泥的电导率高于已报道的处理啤酒废水的UASB消化器内颗粒污泥的电导率. 微生物群落分析发现, 投加少量乙醇的颗粒污泥中明显富集*Geobacter*, 而对照组(未添加乙醇)却没有检出*Geobacter*[27]. 此外, 当乙醇不再供给, 颗粒污泥中富集的*Geobacter*逐渐被产氢产乙酸菌(*Syntrophomonas*和*Smithella*)取代, 而占优势地位的耗乙酸产甲烷菌(*Methanothrix*和*Methanosarcina*)也被耗氢产甲烷菌(*Methanobacterium*和*Methanomassiliicoccus*)取代[31]. 这些结果表明乙醇可刺激DIET互养菌的富集, 并促使其参与DIET产甲烷途径. 为进一步揭示该机制, Zhao等人[43]通过宏基因组分析了一个处理乙醇型发酵产物的厌氧消化器内微生物种群发现, 除编码Fe(III)还原菌*Sphaerochaeta*导电菌丝的基因丰度提高之外, 编码其线粒体内膜上ATP合成的重要酶: 琥珀酸脱氢酶(或延胡索酸盐还原酶)的基因丰度也明显提高. 需要说明的是, 琥珀酸脱氢酶不直接参与线粒体内膜上H^+向膜外的输送过程, 但其可驱动醌池(UQ/UQH_2)循环, 将部分电子和H^+由NADH脱氢酶转移至细胞色素, 缓解NADH脱氢酶向膜外输送H^+的堵塞, 加快H^+跨膜梯度的形成, 从而产生更多的ATP[62]. 据此, Zhao等人[43]推测添加少量乙醇可刺激DIET互养菌胞内ATP的合成代谢, 产生更多能量以分泌导电菌丝, 并与产甲烷菌形成DIET.

乙酸是厌氧消化系统中最常见的有机物. 乙酸产甲烷主要通过两种途径发生, 即乙酸脱羧甲烷化(*Methanothrix*和*Methanosarcina*代谢乙酸的主要方式)和互养乙酸氧化耦合耗氢甲烷化. 然而, 受热力学限制($CH_3COO^-+H^++2H_2O\rightarrow 2CO_2+4H_2$, $\Delta G^{0'}$=+94.9 kJ/mol, pH 7.0), 互养乙酸氧化耦合耗氢甲烷化通常较难发生[63]. 在以乙酸为电子供体的共培养体系中, *G. sulfurreducens*可通过磁铁矿与*T. denitrificans*形成DIET[21], 暗示乙酸甲烷化还可通过DIET产甲烷途径发生, 即DIET互养菌分解乙酸($CH_3COO^-+H^++2H_2O\rightarrow 2CO_2+8H^++8e^-$)并产生的电子直接传递给DIET产甲烷菌, DIET产甲烷菌接受电子并还原CO_2为甲烷($8H^++8e^-+CO_2\rightarrow CH_4+2H_2O$). 尽管, 乙酸并没有被证实可作为DIET产甲烷途经的底物, 但在一些投加导电材料的产甲烷复杂环境中发现, 乙酸产甲烷代谢明显加快. 例如, Rotaru等人[64]发现颗粒活性炭可明显提高湖泊沉积物中乙酸分解和甲烷产生速率. 微生物群落分析发现, 颗粒活性炭可明显富集*Geobacter*和*Rhodoferax*, 而*Methanosarcina*是群落中占优势地位的产甲烷菌, 暗示*Geobacter*或*Rhodoferax*可能与*Methanosarcina*形成DIET. 值得注意的是, 当利用$^{13}CH_3COOH$作为底物时, 对照组(未投加颗粒活性炭)仅检测到$^{13}CH_4$, 而在投加颗粒活性炭的沉积物中同时检测到$^{13}CH_4$和$^{13}CO_2$, 暗示乙酸甲烷化可能通过DIET产甲烷途径发生[64].

3.2 丙酸和丁酸

丙酸/丁酸积累是造成厌氧消化系统酸化的重要原因之一. 这主要是因为丙酸($CH_3CH_2COO^-+H^++2H_2O\rightarrow CH_3COO^-+H^++CO_2+3H_2$, $\Delta G^{0'}$=+76 kJ/mol, pH 7)/丁酸($CH_3CH_2CH_2COO^-+H^++2H_2O\rightarrow 2CH_3COO^-+H^++2H_2$, $\Delta G^{0'}$=+48.3 kJ/mol, pH 7)氧化在热力学上通常不能自发进行, 其需要耗氢产甲烷菌持续消耗H_2, 以维持较低的H_2分压($<10^{-4}$~10^{-5} atm), 才能使丙酸/丁酸氧化在热力学上可行. 丙酸/丁酸在共培养体系中已被证实可作为DIET底物[26]. 然而, 在共培养体系中, 丙醇/丁醇通过DIET产甲烷途径转化为丙酸/丁酸, 却不

能进一步转化为甲烷[26]. Viggi等人[23]发现磁铁矿可加快厌氧污泥中互养代谢丙酸为甲烷, 且磁铁矿介导的互养丙酸代谢可不受高H_2分压的抑制, 表明其互养代谢丙酸为甲烷的主要方式可能是DIET产甲烷途径. 此外, 研究者还在稻田土壤[52]和厌氧污泥[44]中发现, 磁铁矿可富集具备丙酸分解能力的Fe(III)还原菌(如*Thauera*等), 暗示其可能通过磁铁矿介导的DIET参与互养丙酸代谢. 例如, Jing等人[44]利用定量蛋白质组学分析厌氧污泥中微生物种群发现, *Thauera*胞内细胞色素含量显著升高, 暗示其可能利用细胞色素与磁铁矿进行电子传输. Li等人[25]发现投加导电磁铁矿至稻田土壤中可显著提高*Syntrophomonadaceae*和*Methanosarcinaceae*的丰度, 并加快互养代谢丁酸为甲烷, 表明丁酸可作为DIET产甲烷途径的底物. 除稻田土壤之外, 投加导电材料(如磁铁矿[36,37,65]、颗粒活性炭[66]、碳纳米管[65]和石墨烯[65]等)也可促进*Syntrophomonas*占优势的湖泊沉积物和厌氧污泥中互养丁酸代谢为甲烷. 为进一步证实丁酸可作为DIET产甲烷途径的底物, 研究者构建了*S. wolfei*和*M. Maripaludis*或*M. hungatei*的共培养体系并发现, 导电磁铁矿[65]或碳纳米管[35]仍可促进该共培养体系中互养丁酸代谢为甲烷. 然而, 由于没有排除共培养体系中*M. Maripaludis*或*M. hungatei*通过IHT产甲烷途径代谢丁酸的可能, 该结果不能充分证明丁酸可作为DIET产甲烷途径的底物. 此外, Salvador等人[35]还发现碳纳米管可提高耗氢产甲烷菌*M. formicicum*的纯培养体系中甲烷产生速率.

3.3 复杂有机物

丙醇/丁醇在共培养体系中被证实可通过DIET转化为丙酸/丁酸并产生甲烷[35], 暗示长链脂肪酸或醇类可作为DIET产甲烷途径的底物. 例如, Im等人[41]发现导电磁铁矿可明显促进厌氧污泥中互养代谢丙三醇为甲烷. 此外, Mostafa等人[67]发现磁铁矿/碳纳米管可强化长链脂肪酸(油酸)厌氧消化. 微生物群落分析发现, 导电磁铁矿或碳纳米管显著富集*Syntrophomonas*、*Methanothrix*和*Methanosarcina*, 表明其可能参与DIET产甲烷途径. 在一些投加导电材料(如颗粒活性炭[68]、生物炭[69]、碳毡[42]、碳纳米管[70]和石墨烯[71]等)的厌氧污泥中, 葡萄糖也被广泛报道可作为DIET产甲烷的底物. 例如, Tian等人[71]利用醌类物质(AQDS)取代石墨烯并投加至厌氧污泥中发现, 葡萄糖代谢及甲烷产生速率并没有提高, 暗示电子穿梭体不能促进葡萄糖代谢, 而石墨烯可作为电子管路, 促进DIET产甲烷途径, 加快葡萄糖代谢为甲烷. Guo等人[68]投加颗粒活性炭至处理葡萄糖的UASB消化器内发现, 颗粒活性炭表面生物膜内显著富集*Geobacter*, *Syntrophus*, *Desulfovibrio*和*Blvii28*, 而*Methanothrix*和*Methanospirillum*是该生物膜内占优势地位的产甲烷菌, 暗示其可能参与DIET产甲烷途径.

苯甲酸在共培养体系中被证实可作为DIET的底物[33]. 尽管没有明确证据表明苯甲酸可作为DIET产甲烷途径的底物, 但导电磁铁可明显促进矿稻田土壤中互养代谢苯甲酸为甲烷[29], 暗示难降解有机物(如芳香族化合物等)代谢可通过DIET产甲烷途径. Yan等人[34]报道导电磁铁矿或碳纳米管可明显强化厌氧污泥中苯酚代谢并提高产甲烷速率. 在该报道中发现, 投加导电磁铁矿或碳纳米管可促使微生物释放更多的胞外聚合物(EPS), 而EPS可作为电子穿梭体, 促进种间电子传递[34]. 需要说明的是, 目前尚不清楚EPS是否具有导电性以及电子穿梭体能否提高种间电子交换速率. 此外, DIET被证实是由导电菌丝或导电材料实现的物理性电子传输[15]. 因此, 由EPS[34]、AQDS[71]或一些具有氧化还原基团的生物炭[72]等介导的种间电子交换不能被定义为DIET.

4 强化策略

4.1 加快电子传递

共培养体系中证实导电材料(如颗粒活性炭[18]、生物炭[19]和碳布[20]等)可作为电子管路促进DIET, 该结论为提高厌氧消化的效率和稳定性提供了一个有效的策略, 即利用导电材料促进厌氧消化中DIET产甲烷. 据此, 碳基导电材料(如颗粒活性炭[73]、生物炭[74]、石墨[74]、碳布[48,74]、碳毡[48]、碳纳米管[70]和石墨烯[71]等)和金属矿物(如磁铁矿等)被广泛应用于处理各种有机废物的厌氧消化过程.

导电磁铁矿不能促使共培养体系中*G. metallireducens* strain Aro-5和*G. sulfurreducens* strain Aro-5形成DIET, 但投加颗粒活性炭可促使其通过DIET进行互养代谢[15], 表明具备较高电导性的导电材料更有利于促进DIET. 相比普通碳基导电材料(如颗粒活性炭、生物炭、石墨、碳布和碳粘等)及导电磁铁矿, 碳纳米管和石墨烯具有较高的电导性. 但碳纳米管和石墨烯造价昂贵, 限制了其规模化的应用于有机废物厌氧消化. 此

外, Salvador等人[35]发现碳纳米管可抑制*M. maripaludis*的纯培养中甲烷产生，表明过量的投加碳纳米管可造成微生物代谢抑制. 因此, 应用纳米尺寸的导电材料仍需进一步评估其安全性和稳定性.

Xu等人[66]在处理乙醇和葡萄糖的UASB消化器中比较了两种不同粒径的颗粒活性炭(10~20和80~100目)对于厌氧消化性能的影响. 在投加质量相同的条件下, 粒径相对较小的颗粒活性炭具备较宽阔的表面积，理论上更有利于促进DIET产甲烷. 然而，实验结果表明, 80~100目颗粒活性炭对于产甲烷和稳定性的促进作用要明显优于10~20目颗粒活性炭[66]. 这主要是因为，受水力冲刷和气流剪切，粒径相对较小的颗粒活性炭更容易损失. 据此，我们认为颗粒尺寸的碳基导电材料(如颗粒活性炭和生物炭等)很难被设计成填充床, 并内置于厌氧消化器永久的促进DIET产甲烷. Zhang等人[73]在餐厨垃圾厌氧消化的研究中提出一种利用颗粒活性炭的方法, 即将颗粒活性炭与进料混合, 进行半连续式厌氧共消化. 需要说明的是, 除了连续投加颗粒活性炭造成的费用问题，出料中含固率较高的废渣也导致后续处理(如填埋或焚烧)面临诸多难题.

碳布或碳粘相对更容易被设计成厌氧消化器的填充床. 考虑到碳布的造价要比碳粘更便宜, 一些报道已经利用碳布作为厌氧消化器的填充床材料[75,76]. 然而, 在这些报道中, 研究者仅观察到碳布可截留污泥, 提高厌氧消化器生物量，却忽视其可充当电子管路促进DIET产甲烷. Zhao等人[74]在UASB消化器中比较了碳布、生物炭和石墨对于微生物互养代谢乙醇为甲烷的影响发现，碳布对于强化互养代谢的效果要明显优于生物炭和石墨. 此外，Dang等人[48]投加碳布至处理餐厨垃圾的厌氧消化器中发现，碳布表面明显富集了*Sporanaerobacter*和*Methanosarcina*，暗示其可能利用碳布形成DIET.

4.2 刺激DIET互养菌

DIET产甲烷途径需借助DIET互养菌(如*Geobacter*等)及其胞外电子传递作用. 但在常规厌氧消化系统中, DIET互养菌的丰度不高，导致DIET产甲烷不明显. 一些研究尝试利用导电材料在常规厌氧消化系统中构建DIET产甲烷途径，但提高的效果甚微[77,78]. 但当Fe(III)氧化物存在时，DIET产甲烷立即明显. 例如，Peng等人[78]在处理剩余污泥的厌氧消化器中发现，投加颗粒活性炭仅提高甲烷产生速率13.1%，而同时投加导电磁铁矿和颗粒活性炭提高甲烷产生速率20%以上. 尽管导电磁铁矿可充当电子管路促进DIET，但微生物群落中检出了大量的Fe(III)还原菌, 暗示磁铁矿可促使异化铁还原过程发生，并富集Fe(III)还原菌. 为消除电导性的影响，Baek等人[79]投加不导电的针铁矿(FeOOH)至处理奶制品废物的厌氧消化器中发现，有机物的分解和产甲烷速率明显提高. 微生物群落分析表明, 投加针铁矿可富集Fe(III)还原菌(如*Trichococcus*等)，与此同时, *Methanothrix*是群落中占优势地位的产甲烷菌，暗示*Trichococcus*和*Methanothrix*可能参与DIET产甲烷途径. 然而, 需要说明的是, 一些报道[80,81]表明投加晶型结构不明显或非晶形结构的Fe(III)氧化物(如水铁矿、柠檬酸铁和次氮基三乙酸铁等)至厌氧产甲烷系统可抑制产甲烷代谢. Yamada等人[80]在不同Fe(III)氧化物(磁铁矿、赤铁矿和水铁矿)对于互养乙酸/丙酸代谢为甲烷的研究中发现，投加5 mmol/L水铁矿组的乙酸降解速率仅为对照组(未投加Fe[III]氧化物)的25%~30%，而投加10 mmol/L水铁矿组的乙酸降解和投加5 mmol/L次氮基三乙酸铁的丙酸降解代谢几乎停滞. 这主要是因为，相比于晶型结构明显的Fe(III)氧化物(磁铁矿、赤铁矿和针铁矿等)，晶型结构不明显或非晶形结构的Fe(III)氧化物在热力学上通常具备更高的Fe(III)/Fe(II)还原电势[62], 易发生异化铁还原过程, 与产甲烷菌竞争电子供体, 导致产甲烷代谢抑制. 此外, 一些Fe(III)还原菌(如*Geobacter*等)更喜欢生长在还原电势较低的固体Fe(III)氧化物或电极表面[82,83], 具备更高的Fe(III)/Fe(II)还原电势Fe(III)氧化物不利于Fe(III)还原菌的生长和代谢.

添加少量乙醇至常规厌氧消化系统中也可富集DIET互养菌，这主要是因为乙醇可刺激DIET互养菌胞内ATP的合成代谢，产生更多能量以分泌导电菌丝，并与产甲烷菌形成DIET[43]. 然而，当乙醇不再添加时，已经建立的DIET产甲烷途径可逐渐被传统的水解酸化-产甲烷途径取代[31]. 为维持DIET产甲烷持久，Zhao等人[84]在处理奶制品废物的两相厌氧消化的水解酸化段, 通过控制发酵pH为4.0~4.5, 实现奶制品废物定向发酵产乙醇，使水解酸化段出料中乙醇含量占全部进料的10%~20%. 该出料(无需pH调节)进入产甲烷段, 可明显富集DIET互养菌，并形成高度导电的颗粒污泥[84], 表明产甲烷段已建立DIET产甲烷途径. 在此之后，这种利用有机废物定向发酵产乙醇建立DIET产甲烷途径的策略被相继应用到剩余污泥[54]、秸秆[85]和蔗渣[49]等

有机废物厌氧消化.

5 厌氧消化的应用

5.1 缩短启动周期

产氢产乙酸菌与产甲烷菌在微生物生态、代谢和环境需求等方面存在较大差异，导致厌氧消化器的启动周期普遍较长. Liu等人[18]在共培养体系中发现，颗粒活性炭可明显缩短乙醇完全降解时间, 加快*G. metallireducens*和*G. sulfurreducens*的互养增殖速率，且其无需聚集形成颗粒，暗示导电材料介导的DIET产甲烷途径有望缩短厌氧消化的启动周期. Zhao等人[86]投加导电碳布至处理丁醇的半连续式厌氧消化器中发现，投加碳布的消化器的甲烷产生速率在第20~22 d即达到最大值，而对照组(投加不导电棉布)则在第38~40 d达到最大值. 此外，Yan等人[70]分别投加碳纳米管和颗粒活性炭至处理葡萄糖的间歇式厌氧消化系统中发现，对照组(未添加材料)累积甲烷产量达到最大值需要357 h, 而投加碳纳米管和颗粒活性炭的厌氧消化系统仅为270和258 h.

5.2 提高稳定性

传统水解酸化-产甲烷途径和DIET产甲烷途径可在单一厌氧消化系统内实现“双驱”甲烷化. 据此，利用导电材料或其他策略促进DIET产甲烷有望弥补传统产甲烷途径的不足, 维持厌氧消化系统的稳定.

H_2分压是影响传统水解酸化-产甲烷途径的关键因素. Viggi等人[23]发现导电磁铁矿介导的互养丙酸代谢不受高H_2分压的抑制，暗示导电材料促进的DIET产甲烷途径有望克服有机物分解产乙酸的热力学屏障. 在此之后，碳布[86]和碳毡[42]也相继被报道可强化厌氧消化系统抵抗高H_2分压的抑制，维持互养代谢的稳定.

矿山废渣、化工废水和有机固体废弃物(如餐厨垃圾等)厌氧消化极易造成系统酸化，导致产甲烷停滞. Zhao等人[86]投加导电碳布至处理丁醇的厌氧消化器中发现, 当进水pH下降至5.0时, 对照组(投加不导电棉布)几乎没有甲烷产生，而投加碳布的厌氧消化器的甲烷产生速率仍为200 mL/d. 当进水pH重新调节为7.0时, 投加碳布的厌氧消化器的性能可恢复至pH下降前的85%, 而对照组仅为23%~33%. 这些结果表明，导电材料促进DIET产甲烷可强化厌氧消化系统抵抗酸性冲击, 并加快其性能恢复. 此外, Zhao和Zhang[49]在处理蔗渣废物的工程规模UASB消化器中发现, 在乙醇型发酵预处理结束后, UASB消化器的进料pH仅为4.0~4.5, 但其出料pH却始终保持在6.5~7.5.

高负荷有机废物极易破坏厌氧的产酸与产甲烷的代谢平衡, 导致系统H_2分压升高, 使IHT无法顺利进行. 因此，抵抗高有机负荷冲击是评价厌氧消化系统稳定性的重要标志. 目前，颗粒活性炭[73]、生物炭[74]、石墨[48,74]、碳布[48,74,87]、碳粘[48]和导电磁铁矿[40]等被报道可促进DIET产甲烷强化厌氧消化系统抵抗高有机负荷冲击. 例如，Zhang等人[73]投加颗粒活性炭至处理餐厨垃圾厌氧消化器中发现, 当有机负荷提高至4.4 kgVS(挥发性固体)/(m^3 d)，对照组(未投加颗粒活性炭)的甲烷产生速率和系统pH明显下降，而投加颗粒活性炭的厌氧消化器仍保持稳定. 此外，Lei等人[87]投加碳布至处理垃圾渗滤液的UASB消化器中发现, 当有机负荷提高至49.4 kgCOD(化学需氧量)/(m^3 d)，对照组(未投加碳布)的有机物去除效率和甲烷产生速率分别降至30%和3.0 L/d，而投加碳布的厌氧消化器仍保持在80%和15.4 L/d左右.

蛋白质类有机废物(如餐厨垃圾和剩余污泥等)厌氧消化过程中通常释放出高浓度氨氮或游离氨，其极易穿透微生物细胞壁，导致pH失衡，并抑制某些酶促反应. 尽管没有报道评估高浓度氨氮或游离氨对DIET产甲烷途径的影响，但一些研究发现，导电材料(如生物炭[88]和导电磁铁矿[89]等)可强化厌氧消化系统抵抗高浓度氨氮或游离氨冲击. Lü等人[88]投加生物炭矿至处理葡萄糖的厌氧消化系统中发现，当进水氨氮浓度从0.26 gNH^{4+}-N/L提高至7.0 gNH^{4+}-N/L，相比对照组(未投加生物炭), 投加生物炭的厌氧消化系统产甲烷滞后时间缩短了24%~30%, 产甲烷速率提高了18%~23%. 此外，Zhuang等人[89]投加磁铁矿至处理乙酸的厌氧消化系统中发现，当进水氨氮浓度为5.0 gNH^{4+}-N/L，相比对照组(未投加磁铁矿), 投加导电磁铁矿的厌氧消化系统的甲烷产生速率提高了36%~58%.

5.3 强化降解

苯甲酸在共培养体系中被证实可作为DIET的底物[33]，及导电磁铁介导的DIET产甲烷途径可加快矿稻田土壤中互养代谢苯甲酸为甲烷[29]，暗示难降解复杂有机物代谢可通过DIET产甲烷途径. 除苯甲酸之外, 导电材料介导的DIET产甲烷途径还可强化厌氧消化系

统中甘油[41]、油酸[67]、蔗糖[40]、胰蛋白胨[90]和苯酚[34]等复杂有机物降解. Wang等人[91]投加磁铁矿至处理费托合成工艺有机废物(含大量烃类化合物)的厌氧消化器中发现, 磁铁矿可明显提高有机物去除效率和产甲烷速率. 宏基因组测序结果表明, 磁铁矿可明显富集*Geobacter*和*Methanothrix*, 且*Methanothrix*内CO_2还原代谢涉及基因丰度明显升高, 表明*Geobacter*和*Methanothrix*参与DIET产甲烷途径. Usman等人[92]投加颗粒活性炭至处理污泥热解液(含大量杂环化合物、苯酚、呋喃及其衍生物等)的厌氧消化器中发现, 投加颗粒活性炭的厌氧消化器的甲烷产生速率259 mL/gCOD要明显高于对照组(未投加颗粒活性炭)的202 mL/gCOD.

6 展望

本文综述了DIET产甲烷途径的研究进展、微生物群落、可利用的底物、强化策略及其在厌氧消化中的应用. 然而, 现有报道仍存在以下几点问题: (1) 缺乏足够证据表明厌氧消化系统中存在DIET产甲烷途径. 现有证据(主要包括互养代谢性能的提升和微生物群落的变化等)推断DIET产甲烷途径的是不充分的. 此外, 通过一些电化学手段定性或定量的判断微生物群落的得失电子能力也不能推测出存在DIET产甲烷途径. 笔者认为, 利用宏基因组或宏转录组测序分析微生物种群内涉及IHT或DIET的关键基因的丰度变化或表达情况是目前判断DIET产甲烷途径最有效的手段. (2) 导电磁铁矿对于DIET产甲烷途径的促进机制尚不清楚. 普遍认为, 导电磁铁矿可充当电子管路, 促进DIET. 然而, 一些研究却发现导电磁铁矿不能像颗粒活性炭一样促进具备不导电菌丝的互养菌形成DIET. 此外, 研究者还发现厌氧消化系统中导电磁铁矿的损失主要来源为微生物异化Fe(III)还原, 表明导电磁铁矿还可为Fe(III)还原菌的富集提供支持. 据此, 明晰导电磁铁矿对于DIET产甲烷途径的促进机制对于合理利用其强化厌氧消化具有重要意义. (3) 利用导电材料强化有机废物厌氧消化需考虑运行费用和操作复杂度. 利用导电材料改善现有厌氧消化工程效率和稳定性应尽量做到“一次性”投加, 即可长久促进DIET产甲烷. 因此, 将导电材料设计成填充床, 并内置于厌氧消化器应在未来研究中重点考虑.

参考文献

1 Holm-Nielsen J B, Al Seadi T, Oleskowicz-Popiel P. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. Bioresour Technol, 2009, 100: 5478–5484

2 Appels L, Baeyens J, Degrève J, et al. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. Prog Energy Combust Sci, 2008, 34: 755–781

3 Demirel B, Scherer P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. Rev Environ Sci Biotechnol, 2008, 7: 173–190

4 Stams A J M, Plugge C M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. Nat Rev Microbiol, 2009, 7: 568–577

5 Malvankar N S, Vargas M, Nevin K P, et al. Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. Nat Nanotechnol, 2011, 6: 573–579

6 Lovley D R, Ueki T, Zhang T, et al. *Geobacter*: The microbe electric’s physiology, ecology, and practical applications. In: Poole R K, ed. Advances in Microbial Physiology. London: Academic Press, 2011. 59: 1−100

7 Rotaru A E, Shrestha P M, 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. Energy Environ Sci, 2014, 7: 408–415

8 Rotaru A E, Shrestha P M, Liu F, et al. Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*. Appl Environ Microbiol, 2014, 80: 4599−4605

9 Yin Q, Wu G. Advances in direct interspecies electron transfer and conductive materials: Electron flux, organic degradation and microbial interaction. Biotechnol Adv, 2019, 37: 107443

10 Lovley D R. Syntrophy goes electric: Direct interspecies electron transfer. Annu Rev Microbiol, 2017, 71: 643–664

11 Summers Z M, Fogarty H E, Leang C, et al. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. Science, 2010, 330: 1413–1415

12 Storck T, Virdis B, Batstone D J. Modelling extracellular limitations for mediated versus direct interspecies electron transfer. ISME J, 2016, 10:

621–631
13 Shrestha P M, Rotaru A E, Summers Z M, et al. Transcriptomic and genetic analysis of direct interspecies electron transfer. Appl Environ Microbiol, 2013, 79: 2397–2404
14 Holmes D E, Shrestha P M, Walker D, et al. Metatranscriptomic evidence for direct interspecies electron transfer between *Geobacter* and *Methanothrix* species in methanogenic rice paddy soils. Appl Environ Microbiol, 2017, 83: e00223
15 Ueki T, Nevin K P, Rotaru A E, et al. *Geobacter* strains expressing poorly conductive pili reveal constraints on direct interspecies electron transfer mechanisms. mBio, 2018, 9: e01273
16 Morita M, Malvankar N S, Franks A E, et al. Potential for direct interspecies electron transfer in methanogenic wastewater digester aggregates. mBio, 2011, 2: e00159
17 De Vrieze J, Hennebel T, Boon N, et al. Methanosarcina: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. Bioresour Technol, 2012, 112: 1–9
18 Liu F, Rotaru A E, Shrestha P M, et al. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. Energy Environ Sci, 2012, 5: 8982–8989
19 Chen S, Rotaru A E, Shrestha P M, et al. Promoting interspecies electron transfer with biochar. Sci Rep, 2014, 4: 5019
20 Chen S, Rotaru A E, Liu F, et al. Carbon cloth stimulates direct interspecies electron transfer in syntrophic co-cultures. Bioresour Technol, 2014, 173: 82–86
21 Kato S, Hashimoto K, Watanabe K. Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109: 10042–10046
22 Liu F, Rotaru A E, Shrestha P M, et al. Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated *c*-type cytochrome in extracellular electron exchange. Environ Microbiol, 2015, 17: 648–655
23 Viggi C C, Rossetti S, Fazi S, et al. Magnetite particles triggering a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation. Environ Sci Technol, 2014, 48: 7536–7543
24 Kato S, Hashimoto K, Watanabe K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals. Environ Microbiol, 2012, 14: 1646–1654
25 Li H, Chang J, Liu P, et al. Direct interspecies electron transfer accelerates syntrophic oxidation of butyrate in paddy soil enrichments. Environ Microbiol, 2015, 17: 1533–1547
26 Wang L Y, Nevin K P, Woodard T L, et al. Expanding the diet for DIET: Electron donors supporting direct interspecies electron transfer (DIET) in defined co-cultures. Front Microbiol, 2016, 7: 236
27 Zhao Z, Zhang Y, Yu Q, et al. Communities stimulated with ethanol to perform direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate. Water Res, 2016, 102: 475–484
28 Li L L, Tong Z H, Fang C Y, et al. Response of anaerobic granular sludge to single-wall carbon nanotube exposure. Water Res, 2015, 70: 1–8
29 Zhuang L, Tang J, Wang Y, et al. Conductive iron oxide minerals accelerate syntrophic cooperation in methanogenic benzoate degradation. J Hazard Mater, 2015, 293: 37–45
30 Rotaru A E, Woodard T L, Nevin K P, et al. Link between capacity for current production and syntrophic growth in *Geobacter* species. Front Microbiol, 2015, 6: 744
31 Zhao Z, Zhang Y, Holmes D E, et al. Potential enhancement of direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate with biochar in up-flow anaerobic sludge blanket reactors. Bioresour Technol, 2016, 209: 148–156
32 Mei R, Nobu M K, Narihiro T, et al. Novel *Geobacter* species and diverse methanogens contribute to enhanced methane production in media-added methanogenic reactors. Water Res, 2018, 147: 403–412
33 Walker D J F, Nevin K P, Holmes D E, et al. Syntrophus conductive pili demonstrate that common hydrogen-donating syntrophs can have a direct electron transfer option. ISME J, 2020, 14: 837–846
34 Yan W, Sun F, Liu J, et al. Enhanced anaerobic phenol degradation by conductive materials via EPS and microbial community alteration. Chem Eng J, 2018, 352: 1–9
35 Salvador A F, Martins G, Melle-Franco M, et al. Carbon nanotubes accelerate methane production in pure cultures of methanogens and in a syntrophic coculture. Environ Microbiol, 2017, 19: 2727–2739
36 Fu L, Song T, Zhang W, et al. Stimulatory effect of magnetite nanoparticles on a highly enriched butyrate-oxidizing consortium. Front Microbiol, 2018, 9: 1480
37 Zhang J, Lu Y. Conductive Fe_3O_4 nanoparticles accelerate syntrophic methane production from butyrate oxidation in two different lake sediments.

Front Microbiol, 2016, 7: 1316
38 Xia X, Zhang J, Song T, et al. Stimulation of *Smithella*-dominating propionate oxidation in a sediment enrichment by magnetite and carbon nanotubes. Environ Microbiol Rep, 2019, 11: 236–248
39 Barua S, Zakaria B S, Dhar B R. Enhanced methanogenic co-degradation of propionate and butyrate by anaerobic microbiome enriched on conductive carbon fibers. Bioresour Technol, 2018, 266: 259–266
40 Wang C, Wang C, Jin L, et al. Response of syntrophic aggregates to the magnetite loss in continuous anaerobic bioreactor. Water Res, 2019, 164: 114925
41 Im S, Yun Y M, Song Y C, et al. Enhanced anaerobic digestion of glycerol by promoting DIET reaction. Biochem Eng J, 2019, 142: 18–26
42 Xu H, Wang C, Yan K, et al. Anaerobic granule-based biofilms formation reduces propionate accumulation under high H_2 partial pressure using conductive carbon felt particles. Bioresour Technol, 2016, 216: 677–683
43 Zhao Z, Wang J, Li Y, et al. Why do DIETers like drinking: Metagenomic analysis for methane and energy metabolism during anaerobic digestion with ethanol. Water Res, 2020, 171: 115425
44 Jing Y, Wan J, Angelidaki I, et al. iTRAQ quantitative proteomic analysis reveals the pathways for methanation of propionate facilitated by magnetite. Water Res, 2017, 108: 212–221
45 Baek G, Kim J, Cho K, et al. The biostimulation of anaerobic digestion with (semi)conductive ferric oxides: Their potential for enhanced biomethanation. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99: 10355–10366
46 Zhao Z, Sun C, Li Y, et al. Upgrading current method of anaerobic co-digestion of waste activated sludge for high-efficiency methanogenesis: Establishing direct interspecies electron transfer via ethanol-type fermentation. Renew Energy, 2020, 148: 523–533
47 Zhuang L, Xu J, Tang J, et al. Effect of ferrihydrite biomineralization on methanogenesis in an anaerobic incubation from paddy soil. J Geophys Res Biogeosci, 2015, 120: 876–886
48 Dang Y, Holmes D E, Zhao Z, et al. Enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with carbon-based conductive materials. Bioresour Technol, 2016, 220: 516−522
49 Zhao Z, Zhang Y. Application of ethanol-type fermentation in establishment of direct interspecies electron transfer: A practical engineering case study. Renew Energy, 2019, 136: 846–855
50 Rotaru A E, Shrestha P M, Liu F, et al. Interspecies electron transfer via hydrogen and formate rather than direct electrical connections in cocultures of *Pelobacter carbinolicus* and *Geobacter sulfurreducens*. Appl Environ Microbiol, 2012, 78: 7645–7651
51 Yee M O, Rotaru A E. Extracellular electron uptake in *Methanosarcinales* is independent of multiheme c-type cytochromes. Sci Rep, 2020, 10: 372
52 Smith K S, Ingram-Smith C. Methanosaeta, the forgotten methanogen? Trends Microbiol, 2007, 15: 150–155
53 Yang Z, Guo R, Shi X, et al. Magnetite nanoparticles enable a rapid conversion of volatile fatty acids to methane. RSC Adv, 2016, 6: 25662–25668
54 Zhao Z, Li Y, He J, et al. Establishing direct interspecies electron transfer during laboratory-scale anaerobic digestion of waste activated sludge via biological ethanol-type fermentation pretreatment. ACS Sustain Chem Eng, 2018, 6: 13066–13077
55 Lee J Y, Lee S H, Park H D. Enrichment of specific electro-active microorganisms and enhancement of methane production by adding granular activated carbon in anaerobic reactors. Bioresour Technol, 2016, 205: 205–212
56 Lin R, Cheng J, Ding L, et al. Improved efficiency of anaerobic digestion through direct interspecies electron transfer at mesophilic and thermophilic temperature ranges. Chem Eng J, 2018, 350: 681–691
57 Chowdhury B, Lin L, Dhar B R, et al. Enhanced biomethane recovery from fat, oil, and grease through co-digestion with food waste and addition of conductive materials. Chemosphere, 2019, 236: 124362
58 Dinh H T, Kuever J, Mußmann M, et al. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. Nature, 2004, 427: 829–832
59 Walker D, Martz E, Holmes D E, et al. The archaellum of methanospirillum hungatei is electrically conductive. mBio, 2019, 10: e00579
60 Uchiyama T, Ito K, Mori K, et al. Iron-corroding methanogen isolated from a crude-oil storage tank. Appl Environ Microbiol, 2010, 76: 1783–1788
61 Lohner S T, Deutzmann J S, Logan B E, et al. Hydrogenase-independent uptake and metabolism of electrons by the archaeon *Methanococcus maripaludis*. ISME J, 2014, 8: 1673–1681
62 Bird L J, Bonnefoy V, Newman D K. Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. Trends Microbiol, 2011, 19: 330–340
63 Schnürer A, Zellner G, Svensson B H. Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. FEMS Microbiol Ecol, 1999, 29: 249−261
64 Rotaru A E, Calabrese F, Stryhanyuk H, et al. Conductive particles enable syntrophic acetate oxidation between geobacter and methanosarcina from coastal sediments. mBio, 2018, 9: e00226
65 Zhang W, Zhang J, Lu Y. Stimulation of carbon nanomaterials on syntrophic oxidation of butyrate in sediment enrichments and a defined

coculture. Sci Rep, 2018, 8: 12185
66 Xu S, Han R, Zhang Y, et al. Differentiated stimulating effects of activated carbon on methanogenic degradation of acetate, propionate and butyrate. Waste Manage, 2018, 76: 394–403
67 Mostafa A, Im S, Song Y C, et al. Enhanced anaerobic digestion of long chain fatty acid by adding magnetite and carbon nanotubes. Microorganisms, 2020, 8: 333
68 Guo Z, Gao L, Wang L, et al. Enhanced methane recovery and exoelectrogen-methanogen evolution from low-strength wastewater in an up-flow biofilm reactor with conductive granular graphite fillers. Front Environ Sci Eng, 2018, 12: 1−10
69 Luo C, Lü F, Shao L, et al. Application of eco-compatible biochar in anaerobic digestion to relieve acid stress and promote the selective colonization of functional microbes. Water Res, 2015, 68: 710–718
70 Yan W, Shen N, Xiao Y, et al. The role of conductive materials in the start-up period of thermophilic anaerobic system. Bioresour Technol, 2017, 239: 336–344
71 Tian T, Qiao S, Li X, et al. Nano-graphene induced positive effects on methanogenesis in anaerobic digestion. Bioresour Technol, 2017, 224: 41–47
72 Wang G, Li Q, Li Y, et al. Redox-active biochar facilitates potential electron tranfer between syntrophic partners to enhance anaerobic digestion under high organic loading rate. Bioresour Technol, 2020, 298: 122524
73 Zhang L, Zhang J, Loh K C. Activated carbon enhanced anaerobic digestion of food waste—Laboratory-scale and Pilot-scale operation. Waste Manage, 2018, 75: 270–279
74 Zhao Z, Zhang Y, Woodard T L, et al. Enhancing syntrophic metabolism in up-flow anaerobic sludge blanket reactors with conductive carbon materials. Bioresour Technol, 2015, 191: 140–145
75 Sasaki K, Haruta S, Ueno Y, et al. Microbial population in the biomass adhering to supporting material in a packed-bed reactor degrading organic solid waste. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75: 941–952
76 Tatara M, Makiuchi T, Ueno Y, et al. Methanogenesis from acetate and propionate by thermophilic down-flow anaerobic packed-bed reactor. Bioresour Technol, 2008, 99: 4786–4795
77 Yang Y, Zhang Y, Li Z, et al. Adding granular activated carbon into anaerobic sludge digestion to promote methane production and sludge decomposition. J Clean Prod, 2017, 149: 1101–1108
78 Peng H, Zhang Y, Tan D, et al. Roles of magnetite and granular activated carbon in improvement of anaerobic sludge digestion. Bioresour Technol, 2018, 249: 666–672
79 Baek G, Kim J, Lee C. Influence of ferric oxyhydroxide addition on biomethanation of waste activated sludge in a continuous reactor. Bioresour Technol, 2014, 166: 596–601
80 Yamada C, Kato S, Ueno Y, et al. Conductive iron oxides accelerate thermophilic methanogenesis from acetate and propionate. J Biosci Bioeng, 2015, 119: 678–682
81 Zhuang L, Xu J, Tang J, et al. Effect of ferrihydrite biomineralization on methanogenesis in an anaerobic incubation from paddy soil. J Geophys Res, 2015, 120: 876−886
82 Marsili E, Rollefson J B, Baron D B, et al. Microbial biofilm voltammetry: Direct electrochemical characterization of catalytic electrode-attached biofilms. Appl Environ Microbiol, 2008, 74: 7329–7337
83 Richter H, Nevin K P, Jia H, et al. Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter* sulfurreducens on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. Energy Environ Sci, 2009, 2: 506–516
84 Zhao Z, Li Y, Quan X, et al. New application of ethanol-type fermentation: Stimulating methanogenic communities with ethanol to perform direct interspecies electron transfer. ACS Sustain Chem Eng, 2017, 5: 9441–9453
85 Zhu Y, Zhao Z, Zhang Y. Using straw as a bio-ethanol source to promote anaerobic digestion of waste activated sludge. Bioresour Technol, 2019, 286: 121388
86 Zhao Z, Zhang Y, Li Y, et al. Potentially shifting from interspecies hydrogen transfer to direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism to resist acidic impact with conductive carbon cloth. Chem Eng J, 2017, 313: 10–18
87 Lei Y, Sun D, Dang Y, et al. Stimulation of methanogenesis in anaerobic digesters treating leachate from a municipal solid waste incineration plant with carbon cloth. Bioresour Technol, 2016, 222: 270–276
88 Lü F, Luo C, Shao L, et al. Biochar alleviates combined stress of ammonium and acids by firstly enriching *Methanosaeta* and then *Methanosarcina*. Water Res, 2016, 90: 34−43
89 Zhuang L, Ma J, Yu Z, et al. Magnetite accelerates syntrophic acetate oxidation in methanogenic systems with high ammonia concentrations. Microb Biotechnol, 2018, 11: 710–720

90 Yin Q, Yang S, Wang Z, et al. Clarifying electron transfer and metagenomic analysis of microbial community in the methane production process with the addition of ferroferric oxide. Chem Eng J, 2018, 333: 216–225

91 Wang D, Han Y, Han H, et al. New insights into enhanced anaerobic degradation of Fischer-Tropsch wastewater with the assistance of magnetite. Bioresour Technol, 2018, 257: 147–156

92 Usman M, Hao S, Chen H, et al. Molecular and microbial insights towards understanding the anaerobic digestion of the wastewater from hydrothermal liquefaction of sewage sludge facilitated by granular activated carbon (GAC). Environ Int, 2019, 133: 105257

Summary for “厌氧消化中直接种间电子传递产甲烷机理研究与技术应用”

Direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: Research and technological application

Zhiqiang Zhao[1], Yang Li[2] & Yaobin Zhang[1*]

[1] *Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering (Ministry of Education), School of Environmental Science and Technology, Dalian 116024, China;*
[2]*School of Ocean Science and Technology, Dalian University of Technology, Panjin 124221, China*
* Corresponding author, E-mail: zhangyb@dlut.edu.cn

Anaerobic digestion (AD), an economical and eco-friendly strategy for renewable energy recovery, has been widely investigated and applied in the stabilization of various organic wastes. However, two major factors involved in the slow fermentation rate and low methane conversion efficiency still limit its large-scale applications around the world. Methane formation via conventional methanogenic pathway in AD undergoes the three stages: Hydrolysis/acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis. The structure of some saccharide- and protein-like organic compounds contained in complex organic waste is relatively complex and stable, limiting the rate of converting them into amino acids, fatty acids and alcohols by fermentative bacteria. Therefore, the hydrolysis/acidogenesis is widely recognized as a rate-limiting step of AD in practical applications. On the other hand, the obligate anaerobic methanogens can only utilize methanol, methylamine, formate, acetate and hydrogen/carbon dioxide as substrates. Methane formation with amino acids, fatty acids and alcohols as substrates requires the essential conversion of them into acetate and hydrogen/carbon dioxide by acetogenic bacteria, and then depends on acetate- and hydrogen-utilizing methanogens to metabolize acetate and hydrogen/carbon dioxide into methane, respectively. This working mode of syntrophic metabolism of organic compounds into methane between acetogenic bacteria and methanogens that depends on hydrogen as an interspecies electron carrier has been widely described as Interspecies Hydrogen Transfer (IHT). Formate may be also served as a substitute for hydrogen as an interspecies electron carrier (Interspecies Formate Transfer, IFT). Syntrophic metabolism of organic compounds is strictly limited by the hydrogen partial pressure, since the oxidation of organic compounds into acetate with H^+ as an electron acceptor is not feasible in thermodynamics (E_{H^+/H_2}=−0.414 V, pH 7). Syntrophic metabolism via IHT functions well as long as the hydrogen-utilizing methanogens continuously maintain the hydrogen partial pressure low enough (<10^{-4}–10^{-5} atm) that the formation of hydrogen is thermodynamically favorable. Once the metabolic activity of hydrogen-utilizing methanogens is inhibited by the environmental disturbances, such as temperature, pH or organic loading rate (OLR), they will fail to effectively consume hydrogen. Consequently, syntrophic metabolism of organic compounds will be prevented, causing the accumulation of fatty acids and alcohols that further destroys the acidic balance of system and inhibits the methanogenesis. In 2014, the researchers in University of Massachusetts, Amherst proposed a novel methanogenic pathway, direct interspecies electron transfer (DIET)-based methanogenic pathway. DIET-based methanogenic pathway can avoid the conventional hydrolysis/acidification-methanogenesis, and no longer requires H_2 as an interspecies electron carrier, which is expected to break through the rate limitation of hydrolysis of complex organics and the thermodynamic barrier of producing acetate. DIET-based methanogenic pathway challenges the long-held viewpoint that, methane formation with complex organic compounds in conventional AD requires the initial conversion of them into amino acids, fatty acids and alcohols via the slow hydrolysis/acidogenesis by fermentative bacteria, as well as syntrophic metabolism of these substrates between acetogenic bacteria and methanogens depends on H_2 as a primary electron carrier. Recently, researchers systematically illustrated the fundamental mechanisms, key microbial players and effectiveness of various conductive additives in the field of DIET. However, to our best knowledge, it is equally important to indicate the research and technological application of DIET-based methanogenic pathway in AD. Therefore, this review summarized the recent advances on DIET-based methanogenic pathway for guiding the future direction, illustrated the DIET-based methanogenic communities and their available substrates for finding more DIET-based syntrophs and methanogens, as well as evaluated the strategies of promoting DIET-based methanogenic pathway for addressing the main challenges and opportunities.

anaerobic digestion (AD), direct interspecies electron transfer (DIET), methanogenesis, syntrophic metabolism, conductive materials

doi: 10.1360/TB-2020-0661