

生物强化技术在生物质沼气制备过程中的应用及研究进展

李建安 陈乐 左然然 杜济良 田沈*

(首都师范大学生命科学学院 北京 100048)

摘要: 生物强化技术通过为特定的生物过程“设计”微生物,进而作为一种提升反应系统活力和性能的手段被应用于生物质沼气制备过程,以便加快发酵系统启动时间、增加原料利用率、缩短酸败系统的恢复时间、降低高有机负荷的抑制作用等。本文针对以木质纤维素为原料的沼气制备中的生物强化技术,从生物强化菌剂的构建及标准、生物强化作用的影响因素、生物强化作用机制的探究等几个方面来阐述目前国内外生物强化技术在生物质沼气制备过程中的应用与研究进展,以及存在的问题和解决方案。

关键词: 生物强化, 生物质沼气, 厌氧消化, 功能菌剂

Progress in bioaugmentation technology research for biogas production from biomass feedstocks

LI Jian-An CHEN Le ZUO Ran-Ran DU Ji-Liang TIAN Shen*

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: Bioaugmentation, the process of adding designed microbial strains or mixed cultures to anaerobic digestion reaction system is a promising technique to increase biogas production yield, accelerate the start-up time of fermentation, enhance the utilization efficiency of raw material, shorten the recovery time of deteriorative system and improve the capacity of the reactor resistant to organic shock loading. Bioaugmentation focuses on taking advantage of functional microorganism for the specific physico-chemical properties of the bioprocess. In this review, research works about microbial breeding, influence factors of bioaugmentation and bioaugmentation mechanism, which carried out on the biogas production process have been summarized. In additional, some strategies that could be used or exploited to improve the success of this approach have also been discussed.

Keywords: Bioaugmentation, Biomass biogas production, Anaerobic digestion, Functional microorganism

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31570790)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-68902330; E-mail: cnu_tianshen@sina.com

Received: October 10, 2017; **Accepted:** February 01, 2018; **Published online** (www.cnki.net): April 26, 2018
基金项目: 国家自然科学基金(31570790)

***通信作者:** Tel: 86-10-68902330; E-mail: cnu_tianshen@sina.com

收稿日期: 2017-10-10; **接受日期:** 2018-02-01; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-04-26

木质纤维素沼气化是生物质能源领域最具潜力的技术之一。随着社会经济的发展,农业、林业、工业等领域也制造了大量废弃物。在我国,富含纤维素的农林废物成为制取生物质能源的廉价且易于获得的主要原料来源之一,每年产生农业秸秆 8 亿 t,林业剩余物 8 000 万 t^[1]。将这些木质纤维素生物质通过厌氧消化进行资源化利用,已成为近年来国内外学者研究固废处理的热点之一。世界上许多国家正在采用这种能源发展战略进行生物燃气生产。例如,欧盟 25% 的能源需求可以通过厌氧消化过程来满足,德国作为欧洲生产燃气最多的国家,估计有 1 000 多个厌氧消化单位,每年能产生近 4 万吉瓦时的能源,占德国能源年消费量的 5%。在中国,有超过 4 500 万个沼气池,沼气年产量超过 3 000 m³^[2]。虽然生物燃气技术已经达到产业化水平,但是在提高生物燃气发酵效率和降低运行成本方面,还存在着一些亟待解决的问题,尽管研究者在不断突破一些技术瓶颈,但是却很难整合、优化所有生物转化环节。

厌氧消化过程十分复杂,涉及到水解、酸化、产乙酸、产氢、产甲烷等诸多生物反应阶段,而微生物菌群是厌氧发酵产甲烷的关键,各种不同种类的微生物间相互协同作用是保证甲烷产率的前提。在此背景下,生物强化技术(Bioaugmentation)通过为特定的生物过程“设计”微生物群落,进而作为一种提升反应系统活力和性能的手段被应用于生物质沼气制备过程,以便加快发酵系统启动时间、增加原料利用率、缩短酸败系统的恢复时间、降低毒性物质的抑制作用等^[3-4](表 1)。众所周知,生物强化最早被实施于环境治理和污水处理领域,曾有大量研究对其作用进行了深入而广泛的分析论证,但是有关其在生物质沼气领域作用的综合论述较少。本文针对以木质纤维素为原料的沼气制备中的生物强化技术,从功能微生物菌种的选育、生物强化作用的影响因素、生物强化机制的探究等方面阐述目前国内外生物强化技术在生物质沼气制备过程中的研究进展及存在问题和解决方案。

1 生物强化菌剂的构建及标准

1.1 定向驯化

生物强化技术关注于向厌氧消化系统中投加特定功能的微生物来达到提高生物质甲烷产率的目的。特定功能微生物是生物强化的基础资源,也是强化效果的保证,它可以来源于原有的反应系统,也可以是外源微生物,可以是纯培养菌株,也可以是菌群。基于生物质沼气厌氧发酵的复杂性,以及微生物种间、种内存在的互营互利和代谢协同关系所导致的群体感应和基因水平转移时常发生,人们通常会考虑将“未分离纯化的微生物群体”直接作为执行特定功能的候选^[15-18]。因此,利用原有体系中筛选获得的微生物菌群进行定向驯化,通过富集反应器扩大化的自适应培养实现有效的生物强化,能够克服其他外源菌所面临的存活力较弱、与土著微生物之间可能存在竞争关系等一系列问题,因而具有较广阔的应用前景。Li 等以丙酸为底物,对厌氧反应器中的活性污泥进行半连续驯化,获得了高效降解丙酸产甲烷菌群,容积产气量比生物强化前提高 30%–50%^[19]。Weiss 等以木聚糖为唯一底物,对青贮预处理反应器中分解半纤维素的微生物菌群进行定向驯化后的甲烷产量相较于生物强化前增加了 53%^[20]。

1.2 人工组配

为了建立高效的生物反应系统,也可以有针对性地“量身定制”,将具有明确功能的特殊接种物进行人工富集和组配后额外添加到反应器内。这种根据生态位进行微生物移植的方法也为开发生物强化菌剂提供了机会,且由于其菌种来源广泛、操作简单、易培养等特点而被普遍采用。Nielsen 等在一个由 0.9 L 和 4.5 L 连续搅拌釜反应器(Continuous stirred tank reactor, CSTR)组成的两相厌氧消化系统中,通过强化产乳酸乙酸热解纤维素菌(*Caldicellulosiruptor lactoaceticus*)来提高富含纤维素牛粪的水解效率,进而使生物甲烷产量增加了 9%–10%^[6]。Peng 等利用解纤维梭菌(*Clostridium cellulolyticum*)制成的单一菌剂提高小

表 1 生物质沼气厌氧发酵中的生物强化方案

Table 1 Examples of bioaugmentation procedures used in biogas or biomethane production

生物强化类型 Bioaugmentation type	厌氧消化系统 Anaerobic digestion system	菌剂 Functional microorganism	底物 Substrate	增加的产量 (沼气或甲烷) Increased production (biogas or biomethane) (%)	文献 Reference
Hydrolysis	Batch reactor (BR) [0.12 L]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Hansenula anomala</i> ; <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pleurotus florida</i> , <i>Lactobacillus deiliehii</i>	Pretreated corn straw (by aerobic microorganisms)	76	[5]
	Two stage-continuously stirred tank reactor (CSTR) [4.5 L+0.9 L]	<i>Caldicellulosiruptor lactoaceticus</i>	Cellulose	9-10	[6]
	Use of automatic methane potential test system (AMPTS II)	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Pretreated wheat straw or cellobiose	8-13	[7]
	BR [1 L]	(1) <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5T (2) <i>Fibrobacter succinogenes</i> S85 (3) <i>Clostridium cellulovorans</i> (4) <i>Ruminococcus-Flavefaciens</i> 007C	Brewery spent grain	(1) 17.8 (3) 3.9 (1+2) 6.9 (2+3) 4.9	[8]
H ₂ formation	CSTR [5 L]	<i>Enterobacter cloaca</i>	Corn straw Pig slurry and sweet sorghum Same as above	50	[9]
	BR [0.5 L]	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Dried green biomass and dried tubers of Jerusalem artichoke	60	[10]
	CSTR [1 L]	<i>Enterobacter cloaca</i>	Maize silage	21	[11]
Increase of methanogenic activity	CSTR [2.3 L]	<i>Methanoculleus bourgens</i>	Pig and cow manure	31	[12]
	BR [0.125 L]	(1) <i>Clostridium</i> sp. PXYL1 (2) <i>Methanosarcina</i> sp. PMET1	Xylose	(1) 70 (2) 140	[13]
	BR [2x1 L]	Use of plant litter compost containing methanogenic bacteria	Beet silage	6	[14]

麦秸秆的水解效率，从而使甲烷产率提高了13%^[7]。瑞典学者尝试在氨浓度较高的厌氧发酵系统中添加互营乙酸氧化途径(Syntrophic acetate oxidation, SAO)微生物，强化系统对氨抑制的耐受，然而结果表明，SAO 途径微生物的生物强化

对系统产气性能并没有明显的促进^[21]。Goud 等在一个实验室规模的 2 L 厌氧分批反应器中试图通过由枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)和纺锤形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*)所组配的产乙酸混合强

化菌剂来提高反应系统所能够承载的有机负荷。但研究结果表明,由于额外投加的产酸菌生长导致了系统内甲烷菌数量下降,从而使反应系统在高有机负荷条件下并没有出现甲烷产率的提高^[22]。

1.3 基因工程改造

基因工程技术因其可直接定向改变生物性能的优势已被用于构建生物质沼气的生物强化菌剂,以提高厌氧消化产的生物转化效率。例如,携带假单胞菌甲基酯酶基因的质粒在乙酸甲烷八叠球菌(*Methanosarcina acetivorans*) C2A 中表达,该工程菌株可以利用乙酸甲酯和甲基丙酮作为唯一碳源,加快乙酸合成并促进甲烷生产^[23]。另外,酿酒酵母菌株通过基因改造可被赋予直接水解纤维素的能力^[24-26],它可以作为复合强化菌剂的组成成分应用于木质纤维素原料的水解强化过程。这些研究结果表明,基因工程能够使微生物更擅于利用木质纤维素生物质产甲烷,同时在一定程度上提高了水解和发酵效率,但是目前鲜有关于构建木质纤维素酸化、产氢等阶段基因工程菌剂报道。迄今为止,基因工程菌剂这一概念只有在实验室研究背景下的生物甲烷制备过程中得以检验。

综上,从这些生物强化技术的实际操作中,我们不难发现,反应系统中投加的微生物与其新的生物和非生物环境无论是在代谢、生存竞争还是基因迁移等方面的相互作用是决定一个生物强化策略成功与否的关键要素。因此,生物强化菌剂的构建标准是:选择引入的功能强化菌剂应该尽量减少对原有生态环境造成不平衡,要不仅能够在生物系统中持续稳定地保持生物持有量及代谢活性,还可以与土著微生物菌群保持兼容性。

2 生物强化作用的影响因素

2.1 接种及投加策略

研究者们通过变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)对反应器中所引入生物强化菌剂的 16S rRNA 基因进行群落结构

分析发现,即使是源自本土生态系统并能够在反应器中有效生长的菌株,生物强化作用也不是永久性的^[27]。在前面提到的驯化过程中,富集生物反应器可能有助于保证足够的细胞连续或间歇地投加到主反应器。通过这种策略,不仅可以使细胞的富集驯化过程与主反应器在不同条件下运行,而且可以将微生物扩大化的适应阶段与厌氧消化阶段的繁殖分开,从而确保高细胞密度接种^[28]。另外,为了保持功能菌剂在反应系统中的生物净持有量,促进其能够与土著菌群形成适应性和稳定性都更好的微生物群落,连续或定期多次投加的方式被认为是有效的。Martin-Ryals 向两相厌氧反应器的酸化相中定期连续投加生物强化菌剂来水解玉米秸秆,其原料的水解率比一次性投加增加了 22%–25%,甲烷产率提高了 15%^[29]。

荧光原位杂交(Fluorescent in situ hybridization, FISH)结果显示,初次接种引入的功能菌株很容易被土著菌群吞噬或在竞争中被消耗淘汰,然而后续的大量接种又很可能导致生态系统不平衡^[30]。固定化的投加方式可以较理想地解决这一问题,提高生物强化菌剂的有效性。“附着固定化”常使用活性炭颗粒、沸石或海泡石等载体,通过帮助吸附底物可促进附着于载体上的功能微生物的物质传递和代谢活性;而“包埋固定化”则利用海藻酸盐在接种之前将菌剂包裹在胶珠中,不仅可以对投加初期的尚未适应生态系统的菌剂起到缓冲和保护作用,减少土著微生物对其冲击而造成的流失,而且当海藻酸盐珠子最终分解后,还可以成为菌群利用的基质^[31-32]。Cavaleiro 等使用海泡石为载体固定化互营单胞菌(*Syntrophomonas zehnderi*),作为利用脂质产乙酸的强化菌剂投加到装有酒厂废水污泥的间歇式反应器(BR)中,甲烷产量较没有固定化投加的对照增加了 200%^[33-34]。

大量的生物强化作用的实施方案表明,为了增强投加菌剂在反应器中的稳定性和持续性,包括反应器设计、投加方式等在内的应对策略是必

要的,尤其是对于一个连续厌氧消化系统,在物料连续流动的冲击以及与土著菌群的竞争压力下,投加微生物很难维持和发挥作用。此外,一些学者尝试对反应器进行“区室化”改造设计,例如厌氧挡板反应器(Anaerobic baffled reactor, ABR)可以分割成若干个相对独立的室,每个室中的生物质之间几乎没有混合,从而允许将敏感的厌氧产甲烷菌从反应器前面不利生长的空间迁移到更加受保护的后隔室^[35]。同时,在反应器内采用“生物膜”也被作为将功能菌剂保持在反应系统内的方式^[36]。例如,以高效产氢产乙酸的产醋杆菌(*Acetobacteroides hydrogenigenes*)为生物强化菌剂,加入以玉米秸秆为原料的生物膜反应器(Moving bed biofilm reactor, MBBR)中,生物质沼气产量提高了 23%^[37]。由于膜的存在有利于增加细胞之间的接触、降低基质传递限制,因此生物膜系统的细胞密度更大。

2.2 额外电子受体的添加

在生物质沼气制备过程中,水解细菌、酸化细菌、产氢产乙酸菌和甲烷生成菌(乙酸型产甲烷菌和氢型产甲烷菌)协同作用,产甲烷菌与互营细菌形成互营关系,从而使生物反应器内的微生物群落保持平衡。研究发现,在互营氧化产甲烷过程中,直接种间电子传递(Direct interspecies electron transfer, DIET)是决定有机物降解和产甲烷过程能否高效有序进行的关键环节。事实上,有关导电材料能促进互营氧化产甲烷的直接种间电子传递的报道屡见不鲜,除了颗粒活性炭(Granular activated carbon)外,还包括(半)导体氧化铁矿物、磁铁矿颗粒、生物炭和碳布等多种材料,它们的共同特点是都具有良好的导电性,因此常被作为额外电子受体,添加在互营氧化产甲烷反应体系中以促进直接种间电子传递,进而提高甲烷产率^[38]。Rao 等通过向牛粪和家禽废弃物厌氧消化器中添加纳米氧化铁(Fe_3O_4),使生物燃气产量和甲烷含量都有显著提升^[39]。Zhao 等发现,通过向上流式厌氧污泥反应器(UASB)中添加生物炭(Biochar),可促进种间

电子转移,加速代谢丙酸甲烷化过程的发生,解决了由于丙酸积累而导致反应器酸败的问题^[40]。Lin 等通过向厌氧反应器中添加高导电性石墨来刺激 DIET,从而实现了提高以乙醇为底物的生物甲烷产量和产率^[41]。因此,在厌氧系统中额外添加适量的外源电子受体作为一种辅助手段来促进产甲烷菌与互营细菌的种间电子传递,从而克服有机物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^[38],进而实现提高生物强化效率的目标。

3 生物强化机制的探究

3.1 群落结构及演替分析

目前国内外有关生物强化机制的探究,多是借助 PCR(如 RT-PCR、Q-PCR)或高通量测序等技术对反应系统强化前后的群落结构多样性及其演替规律进行分析。例如:Ács 等分析了一株产氢细菌——阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)作为强化菌剂投加到生物质沼气厌氧反应器后的存活数量及系统群落组成^[11],结果表明,生物强化菌剂在投加 2 周后仍可保持数量稳定,群落中的乳杆菌目(*Lactobacillales*)被淘汰,但梭菌目(*Clostridiales*)则可与阴沟肠杆菌之间形成了共生关系。Goud 等研究了由 3 株酸化细菌:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)、纺锤形赖氨酸芽孢杆菌(*L. fusiformis*)所构建的强化菌剂对提高厌氧消化有机负荷的作用,并跟踪分析了强化菌剂在系统中的稳定性以及菌剂投加后对菌群结构多样性产生的影响,结果显示,枯草芽孢杆菌相较于其他酸化细菌能够在较高有机复合下显示出更强更稳定的产氢能力^[22]。中国农业大学董仁杰团队深入研究了丙酸降解产甲烷复合菌剂对恢复高氨氮和高丙酸抑制下的 CSTR 反应器的生物强化作用,揭示了定期投加的强化菌剂在系统群落中的数量变化^[19],研究显示,生物强化的作用在于使反应器中产甲

烷菌群的多样性得到了增加,特别是甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)的群落丰度有了明显的提升。Aydin小组在研究瘤胃厌氧真菌促进微藻生物质沼气发酵的生物强化过程中,分析了厌氧系统中菌群的基因丰度和多样性,这一结果为评估反刍动物瘤胃微生物作为迄今为止已知的降解转化植物纤维素类物质效率最高的天然体系,应用于生物质沼气厌氧发酵的生物强化能力提供了重要依据^[42]。Xing等利用高通量测序研究了不同碳源对厌氧微生物的种间直接电子传递、群落结构以及产甲烷活性的影响,结果显示,利用不同碳源驯化或富集得到的微生物体系在群落组成上具有明显差异^[43]。Aydin在研究热纤维梭菌(*Clostridium thermocellum*)作为水解强化菌剂对提高雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)厌氧消化产甲烷的促进作用时发现,热纤维梭菌的投加使反应系统中细菌和古生菌的多样性都得到了增加,其中参与降解微藻细胞壁的微生物类群主要属于厚壁菌门和拟杆菌门^[44]。

3.2 群落结构与功能的关系

高通量测序和基因芯片等高通量宏基因组学(Metagenomics)技术为生物强化机制研究提供了极大的数据量,它们将系统中全部微生物的遗传信息看作一个整体,自上而下地研究微生物与生态环境或生物体之间的关系^[45]。这些技术不仅为研究者们乐此不疲地从群落结构水平上全面认识微生物的生态特征和功能提供了新的途径,而且为探究投加功能菌剂对发酵系统中生态环境、代谢途径的影响和作用拓展了新的思路和方法。如Xing等^[43]在揭示了不同碳源对于微生物菌群结构的影响后,进一步深入探究了在序批式反应器中参与厌氧消化各个阶段主要微生物的甲烷合成代谢途径以及最终的甲烷产率,他们发现当以胰蛋白胨或乙酸或丙酸为唯一碳源时,甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)成为群落优势产甲烷菌的主要原因是碳源所介导的乙酸型产甲烷途径的发生;而以葡萄糖或乙醇为唯一碳源时,甲烷八叠

球菌属与甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)共同成为反应器中主流产甲烷菌的原因也是由于消化底物所导致的乙酸型和氢型产甲烷代谢途径在反应体系中同时发生。Aydin发现,当以不同接种浓度的热纤维梭菌为生物强化菌剂投加时,不仅可以使反应系统的微生物群落结构发生改变,而且随着强化之后的古生菌菌群结构的变化,最终导致了反应器中的氢型产甲烷作用和乙酸型产甲烷作用之间达到动态平衡。这些研究都为生物强化机理的探究提供了很好的理论基础^[44]。此外,Ye等利用宏基因组测序技术有效揭示了活性污泥中的优势微生物种群^[46],并在研究活性污泥微生物群落结构的基础上,进一步揭示了不同反应器中微生物整体新陈代谢路径相似,但参与特定糖类代谢和膜运输的基因显著不同^[47],从而为生物强化机制探究提供了背景信息。

总之,厌氧消化系统功能的发挥与该系统中菌群的种类和数量有着密切的关系,生物反应器中的群落组成既是一个半开放或开放的复杂的生态系统,也是一个动态平衡的微生态环境,各种微生物之间互营互利,通过群体感应和水平基因转移等不同类型的细胞信号传导来相互作用^[48-49]。因此,在对生物质沼气生物强化的研究中,除了可以用底物利用率、水解产酸率、甲烷产率等发酵参数来评价强化系统以外,更应该对微生物群落的系统和分类结构、种群动态演替及功能、微生物与环境之间相互作用等方面进行深入的探究。这些数据将为生物强化菌剂性能的改进、工艺条件的优化提供理论依据,进而推动生物强化技术在生物质沼气工程中的实际应用。

4 展望

生物强化作为一个具有良好前景的技术,已被实施于生物质沼气制备过程中的每一个关键环节,并且充分体现了与微生物生态学、分子生物学、生物化学、固定化技术、生物反应器设计等先进理念结合的成果。然而,由于厌氧消化系统十分复杂,

有机负荷的波动、工艺条件的改变以及强化菌与土著微生物间相互作用等都会给强化系统的处理效果带来不可预测的影响,因此也会出现失败的结果^[21-22,50-51]。揭示生物强化作用机制,在为实际应用提供数据及模式参照的基础上,通过合理的生物反应器设计以及逐级适应性放大,提高生物强化规模化应用的可行性,是目前及今后强化技术在生物质沼气制备过程中的研究重点和方向。

众所周知,厌氧消化最后也是最关键的一步是产甲烷古生菌利用乙酸或 H₂ 产生甲烷,但是由于其极度厌氧,对系统中的氧化还原电势变化非常敏感,从而使众多涉及产甲烷菌的生物强化实验都是以克服反应器低温、高氨氮浓度和氢分压等抑制作为目标。实际上,在厌氧反应器中发现大多数产甲烷菌是属于甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)和甲烷鬃菌属(*Methanoseata*),而且已经证明甲烷八叠球菌的抗压能力更强、生长更迅速、产甲烷效率也更高^[32,52-53]。因此,我们可以考虑生物强化甲烷八叠球菌作为增加生物质甲烷产量的策略。另外,磁铁矿纳米颗粒作为外源电子受体能够促进产甲烷菌与互营细菌的种间电子传递和提高生物强化效率的作用已经被广泛证明,且考虑到纳米材料所具有的超大比表面积以及螯合的特点^[54],可以开展相应的研究让它在生物强化领域发挥更大的潜力。

相信随着研究者们对生物强化过程中涉及群落结构及其功能、反应系统生态学、微生物动力学等诸多科学问题进行深入而广泛的探究,终将会突破现存的局限性,并在结合功能强化菌剂、消化底物、反应器类型、运行参数、效果对比等一系列指标的基础上建立生物强化技术的综合评价体系,实现其在生物质沼气工程中的规模化应用和相关技术工艺的选择。

REFERENCES

- [1] Jia JD, Ma LL, Jiang DP, et al. Development Strategy for the Science and Technology Innovation of Biomass Energy Industry[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2014 (in Chinese) 贾敬敦, 马隆隆, 蒋丹平, 等. 生物质能源产业科技创新发展战略[M]. 北京: 化学工业出版社, 2014
- [2] Nzila A. Mini review: Update on bioaugmentation in anaerobic processes for biogas production[J]. *Anaerobe*, 2017, 46: 3-12
- [3] Ritmann BE, Whiteman R. Bioaugmentation: a coming of age[J]. *Water Quality International*, 1994, 1: 12-16
- [4] Saravanane R, Murthy DVS, Krishnaiah K. Bioaugmentation and anaerobic treatment of pharmaceutical effluent in fluidized bed reactor[J]. *Journal of Environmental Science & Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2001, 36(5): 779-791
- [5] Zhong WZ, Zhang ZZ, Luo YJ, et al. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(24): 11177-11182
- [6] Nielsen HB, Mladenovska Z, Ahring BK. Bioaugmentation of a two-stage thermophilic (68 °C/55 °C) anaerobic digestion concept for improvement of the methane yield from cattle manure[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(6): 1638-1643
- [7] Peng XW, Börner RA, Nges IA, et al. Impact of bioaugmentation on biochemical methane potential for wheat straw with addition of *Clostridium cellulolyticum*[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 152: 567-571
- [8] Čater M, Fanel L, Malovrh Š, et al. Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 186: 261-269
- [9] Kovács KL, Ács N, Kovács E, et al. Improvement of biogas production by bioaugmentation[J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013: Article ID 482653
- [10] Bagi Z, Ács N, Bálint B, et al. Biotechnological intensification of biogas production[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2007, 76(2): 473-482
- [11] Ács N, Bagi Z, Rákhely G, et al. Bioaugmentation of biogas production by a hydrogen-producing bacterium[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 186: 286-293
- [12] Fotidis IA, Wang H, Fiedel NR, et al. Bioaugmentation as a solution to increase methane production from an ammonia-rich substrate[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(13): 7669-7676
- [13] Akila G, Chandra TS. Stimulation of biomethanation by *Clostridium* sp. PXYL1 in coculture with a *Methanosarcina* strain PMET1 at psychrophilic temperatures[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(1): 204-213
- [14] Neumann L, Scherer P. Impact of bioaugmentation by compost on the performance and ecology of an anaerobic digester fed with energy crops[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 2931-2935
- [15] El Fantroussi S, Agathos SN. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(3): 268-275
- [16] Mo CL, Chen N, Lv T, et al. Direct ethanol production from steam-exploded corn stover using a synthetic diploid cellulase-displaying yeast consortium[J]. *BioResources*, 2015, 10(3): 4460-4472
- [17] Chen N, Mo CL, Du JL, et al. Research advances on yeast co-displaying multi-enzyme system in consolidated bioprocessing

- of cellulosic ethanol[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(7): 1384-1390 (in Chinese)
- 陈宁, 莫春玲, 杜济良, 等. 纤维素乙醇统合加工过程中的酵母多酶共展示体系研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(7): 1384-1390
- [18] Yang F, Jin Y, Mo CL, et al. Construction of cell surface engineered *Saccharomyces cerevisiae* consortium systems and optimization of cellulose ethanol production[J]. *Acta Energetica Solaris Sinica*, 2015, 36(3): 696-702 (in Chinese)
- 杨非, 金怡, 莫春玲, 等. 纤维素酶细胞表面展示酵母菌群的构建及纤维素乙醇的发酵优化研究[J]. *太阳能学报*, 2015, 36(3): 696-702
- [19] Li Y, Zhang Y, Sun YM, et al. The performance efficiency of bioaugmentation to prevent anaerobic digestion failure from ammonia and propionate inhibition[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 231: 94-100
- [20] Weiss S, Tauber M, Somitsch W, et al. Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite[J]. *Water Research*, 2010, 44(6): 1970-1980
- [21] Westerholm M, Levén L, Schnürer A. Bioaugmentation of syntrophic acetate-oxidizing culture in biogas reactors exposed to increasing levels of ammonia[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7619-7625
- [22] Goud RK, Sarkar O, Chiranjeevi P, et al. Bioaugmentation of potent acidogenic isolates: a strategy for enhancing biohydrogen production at elevated organic load[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 165: 223-232
- [23] Lessner DJ, Lhu L, Wahal CS, et al. An engineered methanogenic pathway derived from the domains *Bacteria* and *Archaea*[J]. *Microbiology*, 2010, 1(5): e00243-10
- [24] Sedlak M, Ho NWY. Production of ethanol from cellulosic biomass hydrolysates using genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of cofermenting glucose and xylose[A]/Finkelstein M, McMillan JD, Davison BH, et al. Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals[C]. Totowa, NJ: Humana Press, 2004: 403-416
- [25] Tian S, Zhou GX, Fei Y, et al. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(5): 656-660
- [26] Tian S, Luo XL, Yang XS, et al. Robust cellulosic ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine using an adapted strain *Saccharomyces cerevisiae* without detoxification[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(22): 8678-8685
- [27] Boon N, Goris J, De Vos P, et al. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 2906-2913
- [28] Wang Z, Lv Z, Du JL, et al. Combined process for ethanol fermentation at high-solids loading and biogas digestion from unwashed steam-exploded corn stover[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 166: 282-287
- [29] Martin-Ryals AD. Evaluating the potential for improving anaerobic digestion of cellulosic waste via routine bioaugmentation and alkaline pretreatment[D]. Urbana: Master's Thesis of University of Illinois at Urbana-Champaign, 2012
- [30] Bouchez T, Patureau D, Dabert P, et al. Ecological study of a bioaugmentation failure[J]. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(2): 179-190
- [31] Tian S, Wang J, Chen XF, et al. Ethanol production of immobilized *Zymomonas mobilis*[J]. *Acta Energetica Solaris Sinica*, 2005, 26(2): 219-223 (in Chinese)
- 田沈, 王菊, 陈新芳, 等. 固定化运动发酵单胞菌乙醇发酵研究[J]. *太阳能学报*, 2005, 26(2): 219-223
- [32] Tian S, Zhao J, Cao YL, et al. A new method for methanogen immobilization and its characteristics of methanization[J]. *Acta Energetica Solaris Sinica*, 2002, 23(6): 778-781 (in Chinese)
- 田沈, 赵军, 曹亚莉, 等. 产甲烷菌固定化新方法及其甲烷化特性[J]. *太阳能学报*, 2002, 23(6): 778-781
- [33] Cavaleiro AJ, Salvador AF, Alves JI, et al. Continuous high rate anaerobic treatment of oleic acid based wastewater is possible after a step feeding start-up[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(8): 2931-2936
- [34] Cavaleiro AJ, Sousa DZ, Alves MM. Methane production from oleate: assessing the bioaugmentation potential of *Syntrophomonas zehnderi*[J]. *Water Research*, 2010, 44(17): 4940-4947
- [35] McClure NC, Fry JC, Weightman AJ. Genetic engineering for wastewater treatment[J]. *Water & Environment Journal*, 1991, 5(6): 608-616
- [36] Tian S, Qian C, Liu Y, et al. Biodegradation of biomass gasification wastewater with biofilm reactor[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(2): 281-285 (in Chinese)
- 田沈, 钱城, 刘莹, 等. 生物膜反应器降解生物质气化洗焦废水[J]. *环境科学学报*, 2004, 24(2): 281-285
- [37] Zhang J, Guo RB, Qiu YL, et al. Bioaugmentation with an acetate-type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 306-313
- [38] Zhang J, Lu YH. A review of interspecies electron transfer in syntrophic-methanogenic associations[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(5): 920-927 (in Chinese)
- 张杰, 陆雅海. 互营氧化产甲烷微生物种间电子传递研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(5): 920-927
- [39] Rao PP, Seenayya G. Improvement of methanogenesis from cow dung and poultry litter waste digesters by addition of iron[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1994, 10(2): 211-214
- [40] Zhao ZQ, Zhang YB, Holmes DE, 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[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 209: 148-156
- [41] Lin RC, Cheng J, Zhang JB, et al. Boosting biomethane yield and production rate with graphene: The potential of direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 239: 345-352
- [42] Aydin S, Yildirim E, Ince O, et al. Rumen anaerobic fungi create

- new opportunities for enhanced methane production from microalgae biomass[J]. *Algal Research*, 2017, 23: 150-160
- [43] Xing LZ, Yang S, Yin QD, et al. Effects of carbon source on methanogenic activities and pathways incorporating metagenomic analysis of microbial community[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244: 982-988
- [44] Aydin S. Enhancement of microbial diversity and methane yield by bacterial bioaugmentation through the anaerobic digestion of *Haematococcus pluvialis*[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 100(12): 5631-5637
- [45] Zengler K, Palsson BO. A road map for the development of community systems (CoSy) biology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(5): 366-372
- [46] Ye L, Zhang T, Wang TT, et al. Microbial structures, functions, and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(24): 13244-13252
- [47] Ye L, Zhang T. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2013, 97(6): 2681-2690
- [48] Morris JG. The physiology of obligate anaerobiosis[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1975, 12: 169-246
- [49] Verstraete W. Microbial ecology and environmental biotechnology[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(1): 4-8
- [50] Costa JC, Barbosa SG, Sousa DZ. Effects of pre-treatment and bioaugmentation strategies on the anaerobic digestion of chicken feathers[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 120: 114-119
- [51] Nkemka VN, Gilroyed B, Yanke J, et al. Bioaugmentation with an anaerobic fungus in a two-stage process for biohydrogen and biogas production using corn silage and cattail[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 185: 79-88
- [52] de Vrieze J, Hennebel T, Boon N, et al. *Methanosarcina*: there discovered methanogen for heavy duty biomethanation[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 112: 1-9
- [53] Tian S, Yang J, Zhang W, et al. Increasing methanization by immobilized *Methanosarcina*[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 1999, 5(suppl.): 80-83 (in Chinese)
田沈, 杨静, 张伟, 等. 固定化甲烷八叠球菌提高甲烷化作用研究[J]. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(增刊): 80-83
- [54] Brar SK, Verma M, Tyagi RD, et al. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge-evidence and impacts[J]. *Waste Management*, 2010, 30(3): 504-520

(上接 p.1478)

征 稿 简 则

3.5 参考文献：参考文献按文内引用的先后顺序排序编码，未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出，多于 3 人时列出前 3 人，后加“等”或“et al.”，作者姓前、名后，名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整，不用缩写，不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例：

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

(下转 p.1602)