



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Environmental Engineering—Article

原生土壤的碳链延长过程——高效的正己酸生物合成性能及微生物机制

邓琳^a, 吕杨^a, 蓝天^a, 吴清莲^a, 任韦同^a, 王华哲^a, 倪丙杰^b, 郭婉茜^{a,*}

^a State Key Laboratory of Urban Water Resource and the Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

^b Centre for Technology in Water and Wastewater & School of Civil and Environmental Engineering, University of Technology Sydney, Sydney, NSW 2007, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2023

Revised 2 October 2023

Accepted 20 October 2023

Available online 10 February 2024

关键词

土壤

碳链延长

正己酸

逆β氧化

脂肪酸生物合成

宏基因组学

摘要

本文证明了原生土壤作为天然接种微生物源,利用碳链延长(CE)途径合成正己酸的可行性及有效性,这为探究土壤的厌氧过程提供了新的视角。研究选用了5种类型的土壤进行CE试验,结果表明,在高浓度乙醇和乙酸培养条件下,所有供测试的原生土壤均表现了不同的CE活性,这代表其可作为用于正己酸生产的理想的微生物来源。结果表明,与接种厌氧污泥和窖泥相比,原生土壤CE体系表现出更高的正己酸选择度(60.53%)、特异性(82.32%)、碳分布(60.00%)、电子转移效率(165.00%)和电导率($0.59 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$)。动力学分析进一步证明了土壤CE在缩短迟滞期和提高产量方面的优势。微生物分析则证明了 *Pseudomonas*、*Azotobacter*、*Clostridium* 和正己酸产量之间的正相关关系。此外,宏基因组学通过分析功能基因在关键微生物中的高丰度值表达,洞悉了土壤微生物源在合成正己酸的相关途径中的关键作用,包括 CO_2 的原位利用、乙醇氧化、脂肪酸生物合成(FAB)和逆β氧化(RBO)。其中,FAB和RBO中的功能单元与 *Pseudomonas*、*Clostridium*、*Rhodococcus*、*Stenotrophomonas* 和 *Geobacter* 等具有相关性,这表明此类微生物属可能参与或协同作用于土壤中的CE过程。综上所述,这种创新的接种策略为正己酸生产提供了高效的微生物来源,指出了在厌氧土壤微生物生态系统中考虑CE活性的重要性,并探究了土壤微生物在经济和环境效益方面的潜在作用。

© 2024 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

近年来,由于制造业的社会需求日益增长,化石燃料消耗加剧, CO_2 排放量不断增加,可再生生物基化学品已被用于取代各种化石燃料产品。其中,作为碳链延长(CE)生物过程合成的高价值平台化合物,中链脂肪酸(MCFAs, 6~12个碳原子)具有高能量密度和疏水性。并且,因其具有较高的碳减排潜力,已受到前所未有的关注[1–4]。例如,正己酸是CE平台上最具吸引力的产品之

一,作为一种环保化合物,可以加工成各种工业产品,包括防腐剂、抗菌剂和药物前体等[5–7]。

迄今为止,提高MCFAs生产效率的措施集中在关注混合培养方法上,主要考虑三个关键因素:电子供体(EDs)、电子受体(EAs)和微生物源[7–8]。多种有机化合物,如乙醇、甲醇、乳酸、甘油和葡萄糖已经成功地用作生产MCFAs的EDs[2,9–10],与短链脂肪酸(SCFAs,作为EAs)共同作为反应底物参与碳链延长过程(每次循环增加两个碳原子长度)。在这些化合物中,乙醇已被证

* Corresponding author.

E-mail address: guowanqian@126.com (W.-Q. Guo).

2095-8099/© 2024 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering*, 2024, 39(8): 262–272

引用本文: Lin Deng, Yang Lv, Tian Lan, Qing-Lian Wu, Wei-Tong Ren, Hua-Zhe Wang, Bing-Jie N, Wan-Qian Guo. Chain Elongation Using Native Soil Inocula: Exceptional *n*-Caproate Biosynthesis Performance and Microbial Mechanisms. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.10.017>

实为目前进行CE反应的最适宜底物[11-13]。然而,作为一种生长依赖型的厌氧代谢,CE过程的发生会受到微生物及环境条件的重要影响[6],因此CE体系中接种细菌的低效率会降低MCFAs的生产性能。虽然已有研究采用天然和工程微生物源(如厌氧污泥[4]、城市固体废弃物[12]、窖泥[14]等)作为CE生物反应器接种剂,但CE功能微生物需要较长的生长期才能适应培养环境条件。因此,开发优质的接种微生物源(如天然土壤[15]),可以显著提高正己酸的生物合成效能——这一课题在厌氧土壤环境中几乎未被探索。

事实上,微生物CE和土壤之间的联系可以追溯到一个多世纪以前。1868年,Béchamp就在装有乙醇和土壤微生物(取自干燥的河床)的混合溶液中观察到了高浓度的正己酸生成现象[16]。20世纪40年代,研究人员从河道底泥的浸湿的土壤样本中分离得到*Clostridium kluyveri*(*C. kluyveri*,一种CE模式微生物)并进行培养,在提供乙醇和乙酸的条件获得了产量为 $11.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的正己酸[17-18]。此外,现有研究表明,*Clostridium*、*Eubacterium*、*Pseudomonas*、*Azotobacter*和*Rhodospirillum*等特定微生物在以乙醇为底物时能够合成MCFAs[7,19-20]。由于此类功能微生物也存在于自然土壤中,原生土壤体系有望成为MCFAs生产的潜在接种微生物源。最近已有研究通过微观环境培养和添加CE基质的富集试验证明了CE在不同土壤类型中的发生和其微生物生态学[15],这也表明了利用天然土壤作为优质接种微生物资源的可能性。此外,也有相关研究表明在某些厌氧土壤中主要存在产酸发酵细菌,这为土壤微生物作为MCFAs生产的有效接种来源的假设提供了进一步的支持证据[21-24]。尽管已有研究将微生物CE途径作为一种土壤厌氧条件下的碳代谢过程[14],但其在土壤过程和接种资源方面的应用潜力尚不明晰。因此,有必要通过比较其他菌种资源,全面了解MCFAs在天然土壤中的生物合成性能及潜在的微生物作用机制。

类似于城市或农业废物,厌氧土壤除了具有上述功能微生物之外,也含有丰富的可生物降解的有机化合物,可以作为土壤发酵反应中参与CE过程的功能细菌的营养物质[25]。此外,近期研究也发现了无机矿物组分在提高电子传递效率方面的贡献。例如,导电材料和腐殖质能够作为电子穿梭体,促进天然厌氧土壤中的微生物呼吸作用,并作用于有机化合物的生物降解(包括水解、发酵和产甲烷反应等)[21,26-28]。与其他接种剂或添加剂类似,土壤也具有固有的生物稳定性,其表面含有孔隙和裂缝,这能够为微生物提供栖息环境,同时也可以为有毒化合物提

供相应的结合位点[3,29]。因此,全面探索天然土壤体系(包括微生物群和相关环境组分)作为MCFAs生产的整体接种物的潜在作用具有重要价值。

本文的主要研究内容如下:首先,我们利用不同类型的土壤作为微生物接种源进行CE可行性和潜力研究;其次,在相同的初始条件下,以厌氧污泥和窖泥为对照组,通过动态CE分析和碳通量测定,对不同接种体系下MCFAs生物合成效能进行了有效的对比分析;再次,通过高通量测序和宏基因组分析,阐明不同反应器中反应前后的微生物分类组成和功能基因丰度表达,并有效识别关键代谢途径在土壤体系和其他接种体系中的差异;最后,本研究还讨论了这种“有趣”的天然土壤性能现象,为在工业规模上进行CE生物技术,特别是在利用原生土壤作为接种微生物源生产MCFAs的过程中提供了新的见解。

2. 材料与方法

2.1. 接种菌源与基质

中国资阳市具有6000年的酿酒历史,其中包括300年的蒸馏历史。迄今为止,其酿酒工业仍然产生大量的含乙醇和乙酸的废水需要进行资源化处理。因此,本研究选择资阳市内5种不同类型的土壤作为研究对象(附录A中表S1)。每个土壤样本取自不同位置:①酿酒厂污水处理设施;②河岸;③医疗废水处理车间;④垃圾渗滤液处理设施;⑤果林。为了确保采样具有代表性,使用手铲从每个地块随机收集三个土芯,深度达到地表以下15~20 cm。每个地块的土芯均匀混合成一组复合的土壤样本,小心地包装于纸质采样袋中,并迅速运送到实验室。由于厌氧污泥和窖泥通常作为接种菌源,参与以乙醇为底物的CE试验[1,3],本文选择将其作为土壤微生物源的参照物用于进一步的比较分析。厌氧污泥来源于中国哈尔滨文昌污水处理厂二沉池,窖泥取自中国资阳某浓香型白酒酒厂酿造发酵池。关于厌氧污泥、窖泥和发酵机制的详细信息分别见附录A中表S1和表S2。

2.2. 不同接种物的MCFAs生产效能比较

为证明土壤作为CE接种物的可行性,本文首先使用容积为500 mL的玻璃血清瓶作为CE反应器,进行重复的土壤培养实验,瓶内含有相应的生长培养基(附录A中表S2)。每个反应器内的底物浓度及比例参考Wu等[30]给出的最佳底物浓度,即乙醇 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (ED),乙酸 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (EA)。使用 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl和 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH溶液调节pH至 6.0 ± 0.1 。实验开始前,所有反应瓶均通入

1 min 高纯度氮气以排除瓶内空气。随后放入恒温空气浴摇床内, 反应条件控制在 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 。为排除 MCFAs 合成过程中土壤自身内含物的影响, 设置的空白组内不添加乙醇和乙酸。根据可行性实验结果, 选择特定的土壤开展深入的研究, 并通过与接种厌氧污泥和窖泥对比, 确定接种原生土壤的 CE 效能以及不同接种物间可能存在的差异。该批次对比实验的培养条件同前述培养条件一致。具体的实验设计如表 1 所示。每天采集相同体积的发酵液样品用于成分分析。其他的实验细节见附录 A 中第 S1 节。实验的全流程取样 (从底物配置到反应结束) 均为无菌操作。

2.3. 高通量测序及微生物群落分析

通过高通量测序分析 ES、EP 和 SBS (对应标号的注释见表 1) 反应器中不同 CE 接种物反应前后的微生物群落结构。用土壤 DNA 试剂盒 (Omega Biotek, USA) 从上述样品中分别提取不同发酵接种样本的 DNA。利用能够同时获得细菌和古菌信息的通用引物 515F ($5'$ -GTGC-CAGCMGCCGCGGTAA- $3'$) 和 806R ($5'$ -GGACTACH-VGGGTWTCTAAT- $3'$) 对 16S rRNA 的 V4~V5 区域进行 PCR 扩增[3,30]。然后, 在上海美吉生物医药科技有限公司 (中国) 的 Illumina Miseq 平台进行建库比对。

2.4. 宏基因组学与 CE 途径分析

本研究利用宏基因组测序进一步分析不同接种物间的 CE 微生物作用。可行性实验的富集结果表明, 富集在固体组分上的土壤微生物对正己酸的生产性能的影响大于液体组分。因此, 在对比实验结束后, 收集 SBS、ES 和 EP

的 CE 三组反应器的固体部分, 选取正己酸产量最高组, 在 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心后, 用于宏基因组测序, 以确定参与 CE 过程的关键微生物以及功能差异。按照 Wu 等[30]描述的方法进行基因注释、分类分配和与关键通路相关的功能酶分析。关于 DNA 提取、测序和生物信息学分析的详细信息见附录 A 中第 S2 至第 S3 节。

2.5. 化学分析测试

每天从每个反应器中采集 5 mL 样品并进行成分分析。样品在分析前用 $0.45 \mu\text{m}$ 过滤器过滤。乙醇、SCFAs 和 MCFAs 成分采用配备火焰电离检测器和 $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ DB WAX 聚乙二醇毛细管柱的气相色谱仪 (7890; Agilent Technologies, USA) 进行测定[31]。进样温度设置为 $220 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测器温度设置为 $240 \text{ }^\circ\text{C}$ 。色谱柱的升温程序设置为以 $20 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率从 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 增加到 $170 \text{ }^\circ\text{C}$, 然后在 $170 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保持 5 min, 然后继续以 $20 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的梯度升温至 $240 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在上机测试之前, 液体样品用 3% (V/V) 甲酸酸化[9]。此外, 测量电子传递系统 (ETS) 活性作为微生物呼吸活性和污泥生物活性的指标[32], 详情见附录 A 中第 S4 节。使用袖珍电导率仪 (CTS1 Oakton35462-11; ColeParmer, China) 测试电导率, 以评估电子传递效率。

2.6. 数据分析

计算碳 (C) 和电子当量用以分析其从 CE 反应的底物到产物的流向与分布, 其中 C/电子平衡是用实验周期结束时每种产物的毫摩尔碳 (mmol C) 或毫电子当量 ($\text{me}^- \text{equiv.}$) 除以添加的底物消耗的总毫摩尔碳或毫电子当量来确定的[15,33]。用化学需氧量 (COD) 作为单位指

表 1 不同接种物用于中链脂肪酸生产的实验设计

Tests and experiments	Groups	Reactors	Inoculum ^a
Feasibility tests	Experimental groups	s1 ^c	Soil1 (Table S1)
		s2 ^c	Soil2 (Table S1)
		s3	Soil3 (Table S1)
		s4	Soil4 (Table S1)
		s5	Soil5 (Table S1)
Comparative experiments	Experimental groups ^b	ES	Fresh soil from distillery sewage treatment
		EP	Raw pit mud from a Chinese strong-aroma type of liquor distillery
		SBS	Anaerobic sludge from a secondary sedimentation tank
	Blank group	BS	Fresh soil (the same as ES without an ED and EA)

^a For feasibility tests, each reactor consisted of 25 g of fresh soil and 450 mL of reduced anaerobic mineral medium; for comparable tests, each reactor was inoculated with the same solid mass (=1 – moisture content) by tested solid content, and ES consisted of 25 g of fresh soil and 450 mL of reduced anaerobic mineral medium.

^b Samples of the second experimental reactors were selected for high-throughput DNA sequencing and metagenomics analysis for comparison.

^c Selected soil for enrichment in the later enrichment experiments. One of the duplicates for each soil type was made by removing half the liquid and replacing it with fresh medium with ED ($150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and EA ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); the other one was made by removing the solid components and utilizing the fermentation broth to continue enrichments with the addition of fresh medium with ED ($150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and EA ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in terms of equal volume. The total broth volume was 450 mL.

标来计算正己酸产量，记为“g COD/g COD”，表示每消耗多少克COD底物对应产生相应多少克COD的正己酸产物。在第二组对比实验中，使用改进的Gompertz模型来进一步评估MCFAs的生产浓度变化情况[34]。计算选择度来描述细菌代谢的能量流向并估计底物到产物的转化率[35]。详细分析参考附录A中第S5至第S8节。

3. 结果与讨论

3.1. 各接种物的正己酸生产效能

根据不同土壤样本的采集地点，可以推测受原生土壤的自然特征影响，未驯化和预处理的接种土壤可能表现出不同的微生物CE可行性。而在高浓度的乙醇和乙酸培养条件下，正丁酸和正己酸是该CE反应的主要代谢产物（ $p < 0.05$ ）（附录A中表S3）。在最初的批次实验中，底物中用

于合成C4-C6的最大毫摩尔碳利用率和电子当量利用率分别为10.58%~55.40%和13.46%~53.37%（附录A中表S3）。实验结果表明，不同来源的土壤的确具有不同的CE性能，具体表现为溶液中产生了不同浓度的正丁酸和正己酸。这也证明了当以原生土壤作为微生物接种源时具有明显的CE活性，这一发现与之前报道的关于土壤厌氧培养的研究结果一致[15]。在之后的富集发酵实验中（图1），正丁酸和正己酸仍是主要的代谢产物，其中富集固体组分的正己酸生成浓度（178~226 mmol C·L⁻¹）比富集发酵液组分的实验组更高（144~161 mmol C·L⁻¹）。虽然正丁酸和正己酸的浓度有偶有下降，但其浓度总体呈上升趋势，这表明原生土壤具有持续生产MCFAs的能力，并且其CE活性的增强涵盖了包括其生物和非生物成分的整个土壤体系。因此，在某种程度上也可以初步推断用于CE发酵的原生土壤具有一定的正己酸生产稳定性，这将作为我们后续研究的重

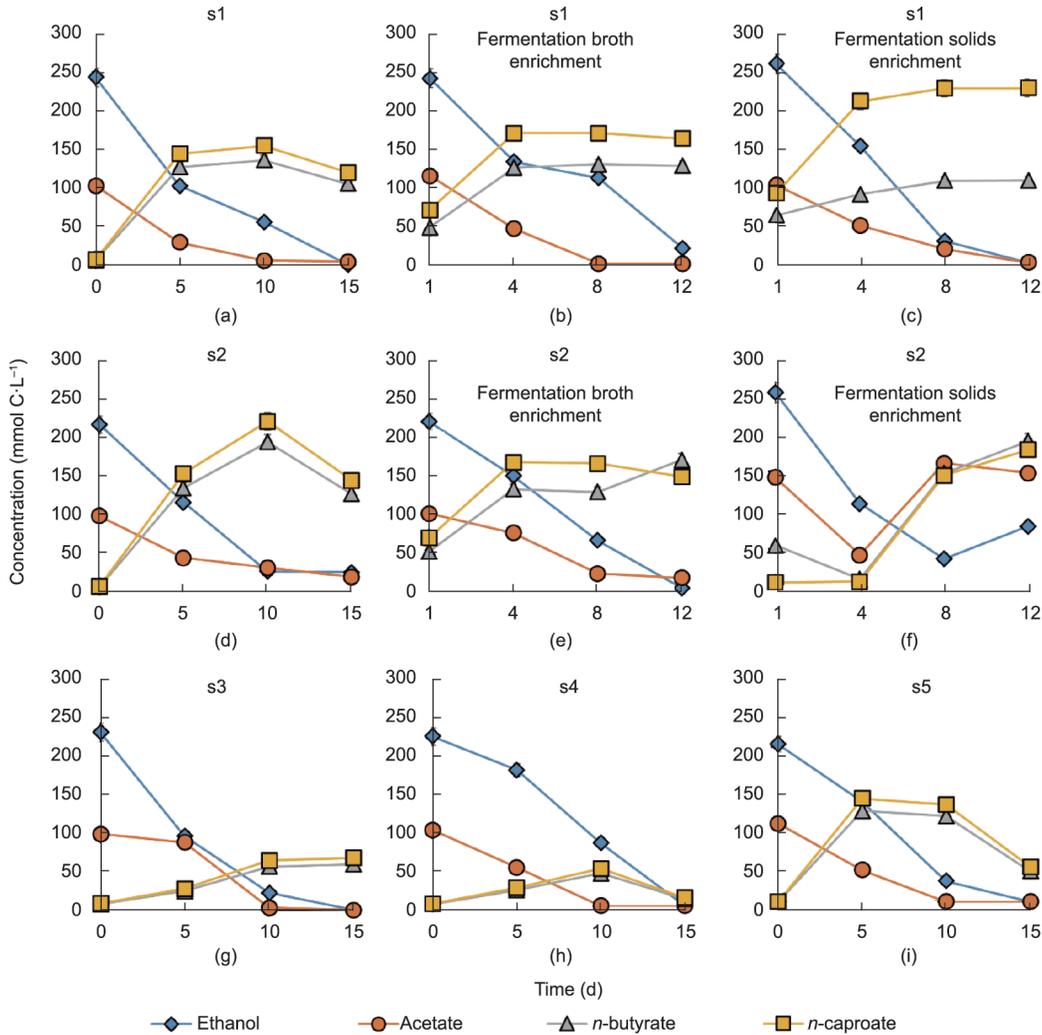


图1. 微生物链延长(CE)可行性测试及使用不同土壤接种物并添加150 mmol·L⁻¹乙醇和50 mmol·L⁻¹乙酸的富集批次的结果。s1~s5代表使用不同来源土壤接种物的实验组。(a)~(c)一家酿酒厂污水处理设施的样品；(d)~(f)靠近河流的土壤；(g)医疗废水处理车间内的土壤；(h)渗滤液处理厂的土壤；(i)果林中的土壤。

点, 以进一步探索原生土壤接种的复杂性和稳定性。

不同CE接种体系下(土壤、厌氧污泥和窖泥)的产物(正丁酸和正己酸)和底物(乙醇和乙酸)的性能分析如图2(a)~(c)所示。在反应进行到15 d后, 所有反应器的乙醇均被完全利用。此外, ES组乙酸利用率最高, 达96.0%, 高于其他组(81.8%~86.6%)。与SBS和EP组相比, 图2(b)中的浓度变化表明接种土壤的ES组具有显著的正己酸生产力, 其最大生成浓度可达249.69 mmol C·L⁻¹。此外, 在ES反应器也能观察到正丁酸作为中间产物, 在乙醇和乙酸转化后生成, 再进一步通过链延伸过程合成正己酸[36]。然而, 正丁酸的大量积累会对CE合成MCFAs产生不利影响。因此, 需要防止正丁酸的过度积累, 使其经过磷酸化进入细胞并转化为丁酰辅酶A, 以保持CE反应的活性[35]。本研究在ES反应器检测到最小的正丁酸累积浓度(54.96 mmol C·L⁻¹)。该结果表明, 与其他组相比, 原生土壤微生物在丁酸转化为正己酸的过程中效率最高。相反地, 在SBS反应器和EP反应器中观察到大量的正丁酸生成, 其最大累积浓度分别为209.67 mmol C·L⁻¹和178.85 mmol C·L⁻¹, 这表明在这两组反应器中, 有大量的正丁酸脱离了后续的CE循环, 导致其作为中间产物积累。因此可以推测, 利用原生土壤作为微生物源进行CE反应时, 可在一定程度上缓解正丁酸积累导致的碳链延伸不足的不利影响, 这从接种来源的角度, 为优化MC-

FAs生产提供了一种可行的解决方案[37]。

以往对CE的研究主要集中在以乙醇为ED和厌氧污泥为接种源的正己酸生产上[13,36], 结合已发表的文献, 将本文使用不同接种物获得的MCFAs生产结果进行对比。结果发现, 在相似的培养条件下, 以乙醇为ED, 本文中ES反应器的最大正己酸产率也超过了一些相关的报道[图2(d) [12–13,19,31–32,35,38–41]和附录A中表S5]。尽管在一些研究中采用了添加导体材料或特定药剂等强化措施[19,32,35,42–45], 但在仅考虑最大产量的情况下, 接种原生土壤在正己酸生产方面仍呈现出相对显著的优势。此外, 与其他以纯乙醇为ED的CE实验相比, 本文获得的最大正己酸生成浓度和转化率均令人满意, 接近现有较高报道值, 分别为74.2 mmol·L⁻¹和49.49%。且未经驯化的ES反应器的正己酸产率高达60.53%。上述结果均表明, 在特定的环境条件下, 天然土壤在生产正己酸方面具有相对的优势, 且原生土壤具备作为CE的优良接种潜在资源。

动力学拟合曲线表明, 在ES反应器, 产物的生成动力学具有较短的滞后期、较高的最大产率和较高的合成速率, 因此土壤微生物源具有较好的正己酸生产性能[图3(a)和附录A中表S6]。随着时间推移, ES的正己酸产量达到了最高, 为22.50 g COD/g COD, 分别比EP和SBS反应器高出2.10倍和2.90倍[图3(b)]。值得注意

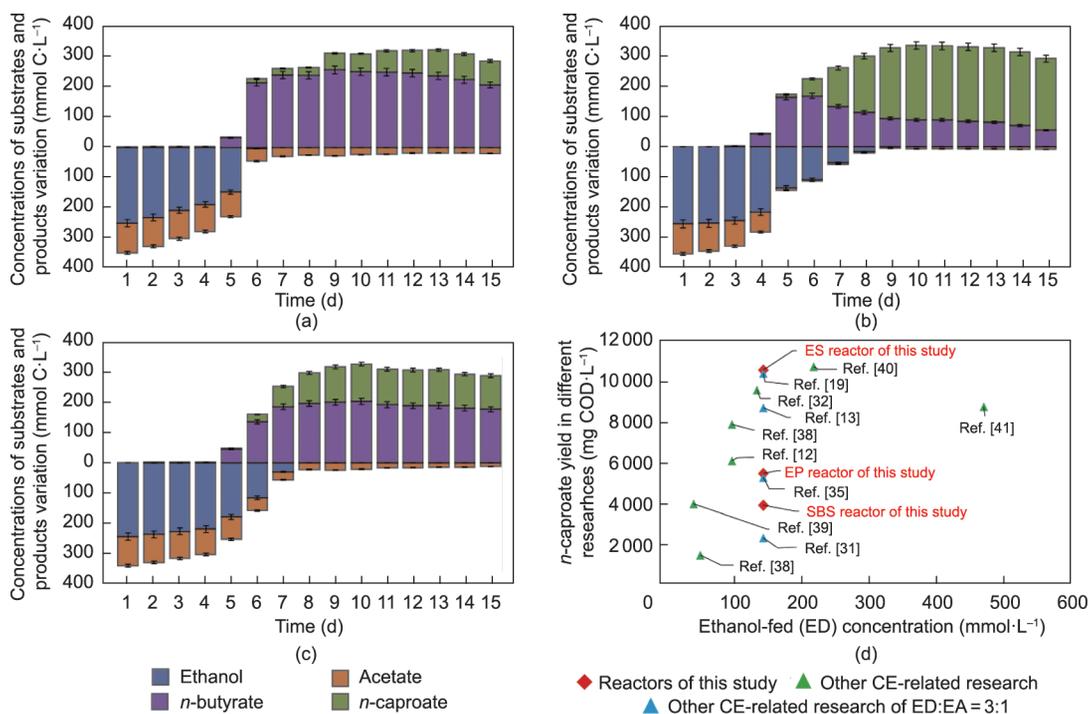


图2. SBS反应器(接种厌氧污泥)(a)、ES反应器(接种土壤)(b)和EP反应器(接种窖泥)(c)中底物与产物的浓度;(d)不同研究中正己酸产量的比较[12–13,19,31–32,35,38–41](附录A中表S6)。

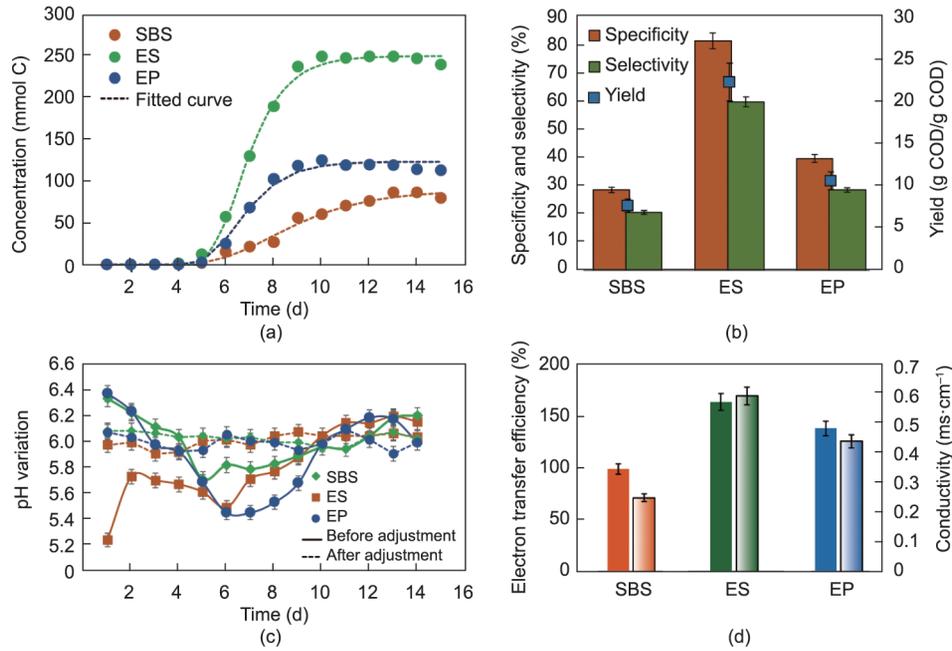


图3. (a) 动力学拟合结果; (b) 特异性、选择性和产率计算; (c) 调整前后的pH值变化; (d) ES、SBS和EP三组之间的电子传递效率和电导率。

的是, 与SBS和EP相比, ES表现出最高的选择度(60.53%)和特异性(82.32%), 这也说明了当以土壤作为接种物时, 从底物中消耗的电子更多地被用于生产正己酸而非正丁酸[19]。碳流分析进一步揭示了ES反应器中底物向产物的高效转化, 其实验结束时源于正己酸的碳分布达到60.00% (附录A中图S1)。上述分析指标均突出了ES反应器内土壤CE培养具有正己酸(CE的主要目标产物)生物合成的高效性。整个反应期间, 各反应器内每日的pH变化[图3(c)]也显示出土壤CE体系具有更大的稳定性, 这表明原生土壤中的某种特质使其具有一定的PH缓冲能力。此外, 与SBS和EP相比, ES组的电子传递效率分别提高了65.00%和25.49%, 电导率分别提高了0.35 mS·cm⁻¹和0.15 mS·cm⁻¹, 如图3(d)所示。

3.2. 不同接种物合成正己酸的微生物群落分析

为了进一步揭示不同接种物引导的CE过程的微生物机制, 本研究对ES、SBS、EP三个反应器中的微生物群落进行分析。主坐标分析(PCoA)表明, 不同接种物类型对微生物群落结构有显著影响[图4(a)]。不同的初始环境条件会塑造不同的微生物组成。因此, 我们也分析了实验前各接种源在门水平上的初始微生物群落组成(附录A中图S2)。实验开始前的原生土壤样品中绝大多数微生物属于Proteobacteria(33.1%)、Acidobacteria(13.4%)、Actinobacteria(10.0%)和Bacteroidetes(8.1%), 而SBS和EP组的初始微生物群落则以Actinobacteria(20.9%和20.9%)、Chloroflexi(11.1%和4.1%)、Bacteroidetes

(7.90%和7.92%)和Firmicutes(5.7%和3.7%)为主(附录A中图S3)。经CE培养后发现, Proteobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes和Actinobacteria是三组反应器中的优势门, 其总丰度值分别占各反应器内微生物种群的97.9%、80.6%和85.7% [图4(b)]。在厌氧发酵过程中, Firmicutes被发现常与MCFAs的合成相关[46], 本文也发现经CE过程后, 其丰度值相对较高(12.7%)。值得注意的是, 本文发现与初始微生物组成相比, Proteobacteria仍是土壤CE发酵的主要微生物群落(76.7%)。并且ES的Proteobacteria和Firmicutes较原始组成分别增加了43.54%和9.64%, 而其通常被认为是生产正己酸的关键微生物群落[11,13,47]。因此, 正如现有的关于CE实验室规模反应器的批次培养实验所报道[48,49], 尽管目前只有少数菌株可以被分离出来, 但无论在原生土壤中的门水平分布如何, 都不能忽视Proteobacteria在土壤中引导CE生物合成正己酸途径的作用。故本研究推测土壤中含有强力促进CE生物过程的功能微生物, 特别是Proteobacteria和Firmicutes门的微生物, 这从微生物源的角度促进生产正己酸有所启发。

为进一步研究不同的微生物的下属分类, 本研究使用Fisher精确检验在属水平上判定功能微生物的种群差异[图4(c)和附录A中表S7]。结果表明, 隶属于Proteobacteria门的Pseudomonas和Azotobacter在ES和其他反应器中的丰度值差异最大。Pseudomonas在生物制氢和产酸等厌氧过程中的作用已有报道[4,50-51], 但在本文中, 接种厌

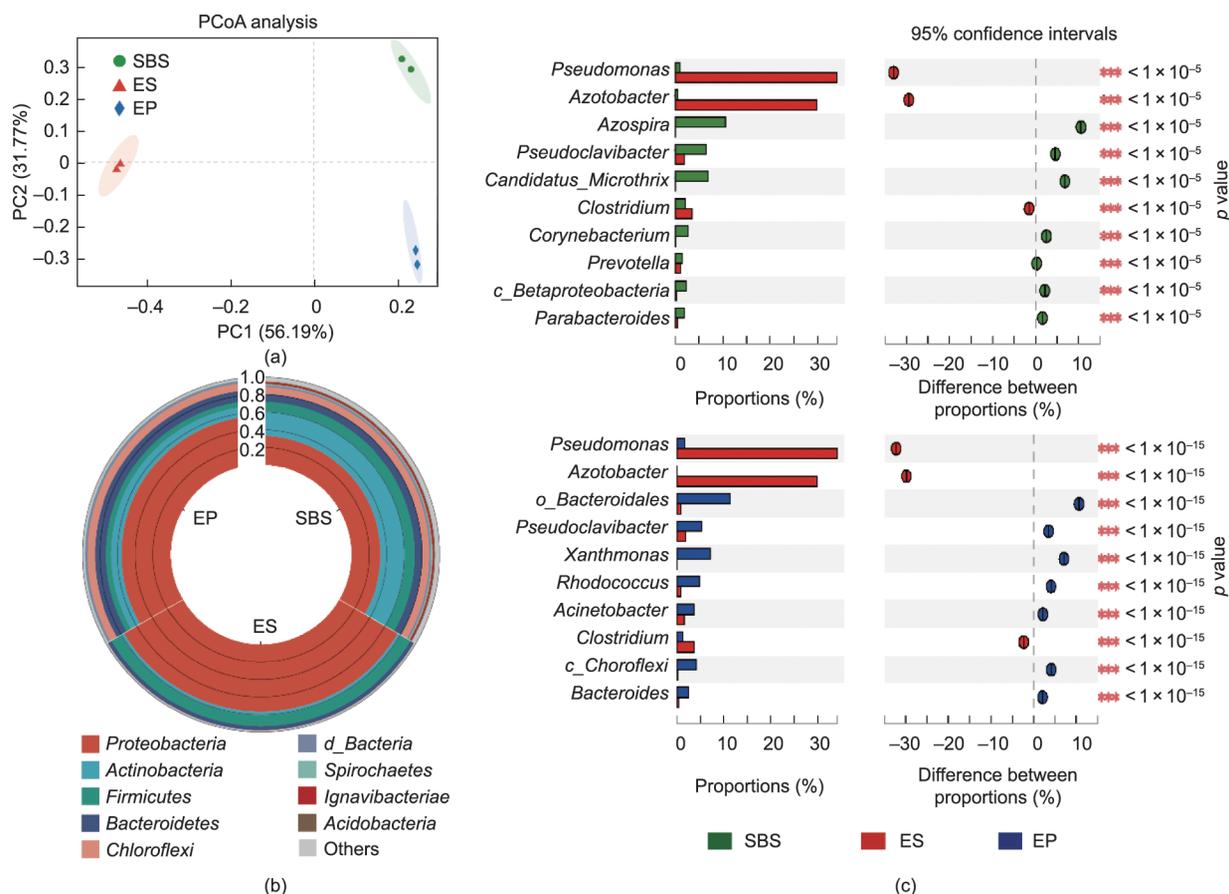


图4. 组间微生物群落差异分析。(a) 三种不同接种物微生物群落的PCoA分析 (PC1: 数据变化的主坐标成分尽可能大; PC2: 剩余变异中占比最大的主坐标成分); (b) 门水平上的微生物群落; (c) 属水平上微生物群落的差异比较。

氧污泥和窖泥的反应器中其丰度值较低; 在接种土壤的反应器中却为第一优势属 (34.1%), 这可能与具备CE功能基因有关, 并且参与了ES反应器内正己酸的生物合成。作为ES反应器中的第二优势属, *Azotobacter*可以产生低电位电子, 促进铁氧还蛋白和黄素氧还蛋白电子分叉配合物的还原, 从而参与丙酮生成和固氮[52–53], 故其在土壤的厌氧发酵过程中也可能起介导电子传递的作用, 从而促进了CE过程的发生。此外, *Clostridium*在很多研究中被报道为模式微生物进行CE反应[19,46,48], 本文同样发现, 土壤经CE发酵后, 其相对丰度也有大幅增加的现象。正如CE相关研究所报道所述 [35,54], 虽然其他属水平上的发酵细菌 (*Acinetobacter*、*Bacteroides*、*Methanogens*) 在本研究中各反应器间的差异不明显, 其也可能参与或协同作用于CE反应发生。需要注意的是, 其他微生物的丰度值大小并不能直接决定它们与CE的相关性, 因为它们可能在微生物混合发酵体系发挥其他作用。此外, 本研究的整个发酵周期相对较短 (15 d), 因此在未来的研究中需要更长时间的实验, 以提供更全面的关于利用原生土壤的CE途径, 合成正己酸的微生物方面的信息。

3.3. 基于宏基因组学的正己酸合成途径差异分析

为确定与正己酸产生相关的关键代谢途径, 在KEGG数据库中对功能基因进行注释。与脂肪酸生物合成 (FAB) 相关的基因丰度因接种微生物源的不同而呈现明显差异, 其相关丰度值在ES的总占比最高。此外, ES中关于碳水化合物代谢、氨基酸代谢和细胞活性代谢 (包括细菌分泌、丙酮酸代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢) 的基因丰度值是三组反应器中较高的 (附录A中表S8), 这表明土壤接种反应器中的微生物代谢更活跃、更多的能量用于CE途径中DNA和RNA合成、其作用相关的微生物量更多[45–46]。

本文通过典型的代谢途径和功能酶分析, 进一步阐述了三种接种物在CE过程的作用差异 (图5和附录A中表S9、表S10)。乙酰辅酶A是CE过程发生的关键中间前体, 在本研究中主要由乙醇氧化产生。在该阶段, ES中编码 *yiaY*、*adhP* 和 *yahk* 的基因丰度明显高于SBS和EP, 这为下一步乙醛的合成与氧化提供了更多的能量和还原当量[36,55]。在ES中, 编码 *mhpF* 的乙醛脱氢酶的丰度也更高, 这也代表土壤微生物在进行乙醇氧化这一阶段的效率

更高。有趣的是，虽然在整個实验过程中观察到集气袋膨胀的现象，但在CE反应结束时没有检测到CO₂的积累。此外，在ES中涉及CO₂还原为一氧化碳（CO）和CO还原为乙酰辅酶A的相关基因丰度值显著高于SBS和EP反应器。并且编码厌氧CO脱氢酶和乙酰辅酶A脱羧酶/合成酶（CODH/ACS）的基因在ES反应器中的丰度值也更高。这一发现可能表明，在土壤的厌氧CE过程中，细胞呼吸产生的CO₂可能通过原位还原生成CO（作为电子供体），再进一步还原产生乙酰辅酶A，这需要在未来的研究中进一步验证。虽然该过程的总丰度值不如乙醇氧化过程高，但无CO₂积累的现象恰好间接表明：CO₂的原位产生和利用在ES反应器中在土壤的CE过程是可能存在且作用不可忽视的。这对于利用天然土壤的CE生物途径来减少碳排

放具有积极的启示意义。虽然在以往利用厌氧污泥作为接种物和底物的研究中也发现了CO₂还原为乙酰辅酶A的现象[9,31,46]，但本文通过宏基因组学手段详细地阐述了可能潜在的作用机制，并说明了土壤微生物源相对于其他接种物在乙酰辅酶A合成中的显著优势。

在ES组中，参与逆β氧化（RBO）通路的一些关键酶的相对丰度也有明显增加。其中编码乙酰辅酶A乙酰转移酶的基因（*atoB*和*ACAT*）在ES组中比其他组表现出更高的丰度，该基因能通过将乙酰辅酶A和辅酶A衍生物偶联形成乙酰乙酰辅酶A来启动RBO的第一个循环[56]。此外，编码乙酰辅酶A酰基转移酶的基因（*fadA*和*fadI*）丰度在ES组中显著高于其他组，而这些酶起着促进丁酰辅酶A的转化，有效阻止正丁酸在ES反应器中的积累的重

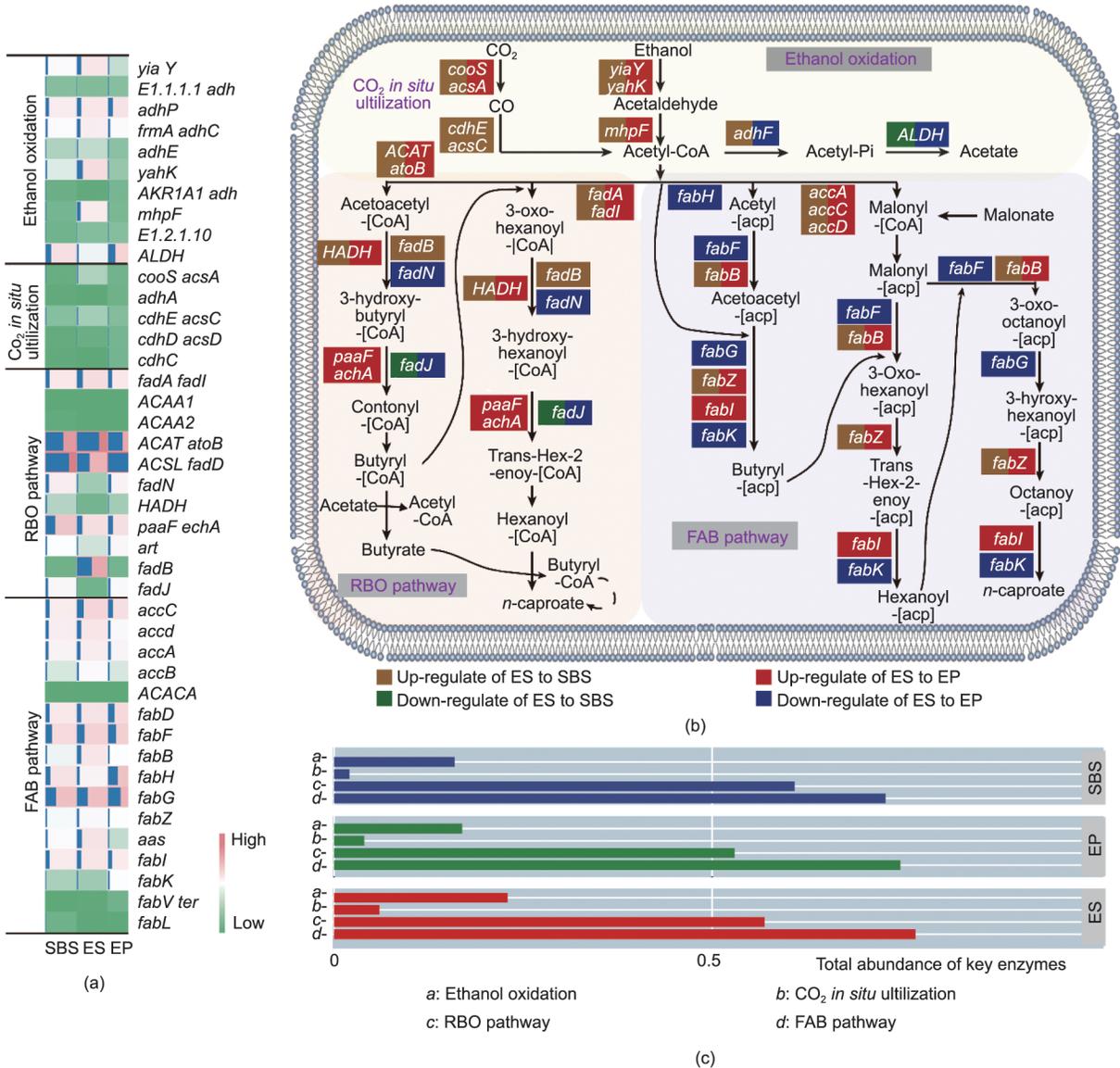


图5. 正己酸微生物合成过程及其代谢相关功能基因与酶。(a) 功能基因相对丰度的热图；(b) 基因丰度值的比较；(c) 三组中不同途径酶的总丰度。基因缩写的对应定义详见附录A中表S10。

要作用，该结果与前文关于MCFAs的生产性能讨论一致。与FAB途径相关的基因在ES组中也表现出更高的丰度，如图5(c)所示[54]。FAB途径是生物合成正己酸的另一条关键途径，起始于丙二酰辅酶A，其主要在3-C供体的作用下由乙酰辅酶A的羧化和丙二酸的转化产生。此外，编码乙酰辅酶A羧化酶的基因(*accA*、*accC*和*accD*)在ES组中显著更高。与其他组相比，ES中编码3-氧己基-*acp*(*fabB*)和反式己基-2-烯丙基-*acp*(*fabZ*)的基因丰度也更高，这表明无论酶活性如何，丁基-ACP作为关键中间体的转化效率都很高。虽然参与这一过程的其他基因没有显示出高丰度，但它们也可能在正己酸生成的过程发挥重要作用。总的来说，ES组RBO和FAB通路中相关功能酶的丰度基本高于SBS和EP组，并且相关基因的丰度增加极可能影响了CE效率，而这些丰度显著较高的基因可能是土壤微生物较其他接种源具有更好的合成正己酸效能的主要原因。

图6为ES中涉及的微生物及CE相关功能的相关性分析。在RBO和FAB途径中，*Pseudomonas*和*Clostridium*与其中某些功能单元有紧密联系，这表明其在发酵土壤体系中对CE过程起着至关重要的作用，该结果与微生物群落分析的结果一致。其他微生物如*Rhodococcus*和*Stenotrophomonas*经分析后也与这些功能基因具有相关性，这表明CE过程的发生可能是通过不同土壤微生物之间的相互作用来实现的。因此，为研究以原生土壤作为接种源的微生物作用机制，本文进一步探讨了隶属于*Pseudomonas*和*Clostridium*的优势菌种与CE功能酶的关系。如附录A中表S11所示，CE过程不能由单个菌株完成；相反，它取决于不同微生物之间的相互作用。例如，*C. Kluveri*参

与了大部分乙酰辅酶A合成途径、RBO途径和FAB途径的相关功能酶的合成和转运。*C. magnum*、*C. homopropionicum*和*C. botulinum*也被观察到与FAB途径和乙酰辅酶A合成所需的功能酶相关。因此，可以推测，在这样一个有效的土壤CE混合菌体系中，微生物的协同合作生产正己酸是值得深入研究的课题。

此外，通过上述分析可发现参与CE相关功能单元的微生物一部分属于导电细菌。已有研究提出直接种间电子传递(DIET)是一种高效的微生物种间能量传递的方式，比物质之间的电子传递更节约能量，且广泛存在于厌氧体系[57–58]。研究还表明DIET可以通过多种途径发生，如导电菌毛(e-pili)、细胞色素、生物和非生物电子传递介质(如导电材料)[59–60]。因此可推测，原生土壤微生物在适宜条件下的CE生物过程中也可能会建立基于DIET的种间协作机制。例如，作为一种典型的电活性细菌，*Pseudomonas*在ES反应器中表现出了与RBO和FAB的功能和关键基因的高度相关性，这可能与其经导电菌毛进行细胞外电子传递，并建立基于DIET的共生微生物-菌毛-微生物网络相关[61–62]。同样地，*Clostridium*、*Rhodococcus*、*Stenotrophomonas*和*Geobacter C*在RBO和FAB通路的特定功能中也显示出较高的丰度。而在ES反应体系中，上述微生物可能具备如下共同特征(附录A中图S3)：①存在e-pili作为导电结构[59]；②分泌的细胞色素可以作为导电介质[59]；③利用膜囊泡和鞭毛进行DIET[63–64]。除了微生物成分外，非生物因素也可能通过DIET来促进正己酸的生成[65]。因此，在这种伴随着较高的代谢率的土壤厌氧发酵体系中，也可能形成一种利于种间电子传递(IET)和DIET的多物种聚集结构，而这已

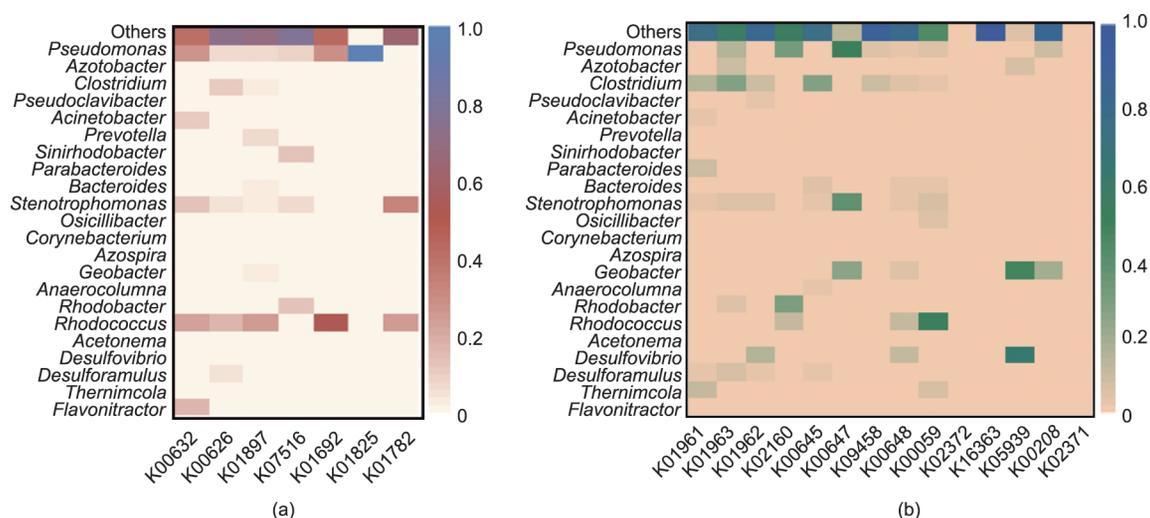


图6. 与RBO途径(a)和FAB途径(b)关键功能相关的微生物。丰度基于RPKM(即每千碱基对每百万次读取的命中率)计算,并以对数形式绘制。代表基因功能及其在代谢途径中参与的代码详见附录A中表S9、表S10。

被证实对乙醇氧化效率非常重要[62,66–67]。因此,在本文的土壤CE反应器中观察到的较高的正己酸生产,可能部分归因于此类团聚体的形成。虽然没有直接证据表明在原生土壤CE过程中DIET是否建立,或者其存在是否对CE有促进作用,但DIET可能成为促进该体系作用的关键因素。需要在后续研究中深入研究,以了解DIET在土壤CE过程中的具体情况。

3.4. 研究意义

本文利用土壤作为接种源生产正己酸,并通过与其他接种源对比,全面分析了原生土壤微生物高效合成正己酸的表现及相应的微生物机制。同其他接种源相比(厌氧污泥和窖泥),接种原生土壤显著促进了正己酸的生成,改善了底物利用与转化,并提高了产物选择度和碳流分布。此外,土壤CE体系具有不同于传统厌氧发酵菌群的独特微生物群落结构。在土壤接种反应器中,*Clostridium*、*Pseudomonas*和*Azotobacter*是参与CE过程中最主要的微生物。宏基因组学分析结果显示土壤CE体系中涉及RBO和FAB途径中的功能基因和酶的丰度值更高,这可能表明该体系中的相关微生物丰度更高或功能作用更强。值得注意的是,在该研究中,CO₂的原位利用也可能促进了土壤接种反应器中正己酸的CE生物合成过程。此外,正己酸生成也与ETS活性和电导率呈显著正相关,这可能表明土壤微生物在CE体系还建立了潜在的基于直接电子传递的电子协同作用。

为了进一步推进微生物CE合成MCFAs的进程,未来研究的挑战可能主要集中在以下几个方面:构建高效的产酸发酵体系;促进碳的定向转化;研究目标产物的可控合成策略;开发产物分离和提取技术和设备。而本文提出的开发土壤微生物资源以构建高效的CE功能微生物群落,为实现上述目标提供了有价值的参考。

本文为利用土壤作为MCFAs生产的接种源提供了新的见解,且实验结果具有可重复性和适用性。研究结果表明,在土壤微生物研究中,碳链延长作为一种节能减碳的途径也不应被忽视。土壤接种实验表明,在一定培养条件下,原生土壤作为接种源在正己酸产量、选择度和碳分布方面均表现了较高的生产效能。此外,利用二氧化碳(或可作为一种间接电子供体)也有可能增强自然土壤碳排放系统的固碳能力,而这在未来的研究中可能通过使用标记引物追踪技术来确定。

此外,考虑到原生土壤及其微生物的独特性质,本研究首次提出了在土壤CE体系中功能微生物(如*Pseudomonas*、*Azotobacter*、*Clostridium*、*Rhodococcus*、*Steno-*

*trophomonas*和*Geobacter*)可能通过DIET实现协同作用。在未来的研究中需要采用进一步的分子分析(如转录组学 and 原位光谱电化学分析),以证实DIET在土壤CE体系中的建立[68–69]。综上所述,在CE平台上探索土壤接种微生物源的技术可行性可能被认为是工业化生产MCFAs的有益思路,其中微生物CE的效能和作用及其在自然土壤条件下的动态变化,都将作成我们未来研究的相关研究重点。

4. 结论

目前,微生物合成化学品的热点已使得CE技术成为广受关注的生产MCFAs和其他生物基化学品的有前景的生物技术平台。本文不仅证明了利用不同天然原生土壤作为接种源,并以乙醇作为ED,通过CE途径生产正己酸的可行性,而且通过宏基因组学分析探讨了相应的微生物机制。本研究主要得出以下结论:

(1) 土壤接种物具有高效的正己酸生物合成效能,具体表现为较高的选择度、特异性和产率。动力学分析进一步证实了土壤接种微生物的良好CE活性,并证实其相对其他接种源具有更短的滞后期和最高的正己酸产量。

(2) *Pseudomonas*、*Clostridium*和*Azotobacter*的相对丰度随着正己酸产量的增加而增加,表明它们可能在土壤CE体系中发挥潜在作用。

(3) 土壤的CE途径主要包括RBO和FAB。其功能和基因的丰度表达主要与*Pseudomonas*和*Clostridium*有关,且其他导电细菌在介导厌氧土壤的CE过程时也存在一定的促进作用。

本研究结果强调了CE作为一种节能途径在土壤微生物研究中的重要性。研究自然土壤条件下微生物CE的发生程度及其作用将是我们后续研究的重点。

致谢

本研究由国家自然科学基金(52000132和51978201)、哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室开放课题(HC202241)以及中央高校基本科研业务费专项资金资助。

Compliance with ethics guidelines

Lin Deng, Yang Lv, Tian Lan, Qing-Lian Wu, Wei-

Tong Ren, HuaZhe Wang, Bing-Jie Ni, and Wan-Qian Guo declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.10.017>.

References

- [1] Zagrodnik R, Duber A, Lezyk M, Oleskiewicz-Popiel P. Enrichment versus bioaugmentation-microbiological production of caproate from mixed carbon sources by mixed bacterial culture and *Clostridium kluyveri*. *Environ Sci Technol* 2020;54(9):5864–73.
- [2] Xu J, Hao J, Guzman JLL, Spirito CM, Harroff LA, Angenent LT. Temperature-phased conversion of acid whey waste into medium-chain carboxylic acids via lactic acid: no external e-donor. *Joule* 2019;3(3):885–8.
- [3] Liu Y, He P, Shao L, Zhang H, Lu F. Significant enhancement by biochar of caproate production via chain elongation. *Water Res* 2017;119:150–9.
- [4] Huang X, Dong W, Wang H, Feng Y. Role of acid/alkali-treatment in primary sludge anaerobic fermentation: insights into microbial community structure, functional shifts and metabolic output by high-throughput sequencing. *Bioresour Technol* 2018;249:943–52.
- [5] Reddy MV, Hayashi S, Choi D, Cho H, Chang YC. Short chain and medium chain fatty acids production using food waste under non-augmented and bio-augmented conditions. *J Clean Prod* 2018;176:645–53.
- [6] Kucek LA, Xu J, Nguyen M, Angenent LT. Waste conversion into *n*-caprylate and *n*-caproate: resource recovery from wine lees using anaerobic reactor microbiomes and in-line extraction. *Front Microbiol* 2016;7:1892.
- [7] Wu Q, Bao X, Guo W, Wang B, Li Y, Luo H, et al. Medium chain carboxylic acids production from waste biomass: current advances and perspectives. *Biotechnol Adv* 2019;37(5):599–615.
- [8] Shi X, Wu L, Wei W, Ni B. Insights into the microbiomes for medium-chain carboxylic acids production from biowastes through chain elongation. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2022;52(21):3787–812.
- [9] Wu SL, Sun J, Chen X, Wei W, Song L, Dai X, et al. Unveiling the mechanisms of medium-chain fatty acid production from waste activated sludge alkaline fermentation liquor through physiological, thermodynamic and metagenomic investigations. *Water Res* 2020;169:115218.
- [10] Ge S, Usack JG, Spirito CM, Angenent LT. Long-term *n*-caproic acid production from yeast-fermentation beer in an anaerobic bioreactor with continuous product extraction. *Environ Sci Technol* 2015;49(13):8012–21.
- [11] Agler MT, Spirito CM, Usack JG, Werner JJ, Angenent LT. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. *Energy Environ Sci* 2012;5(8):8189–92.
- [12] Grootscholten TIM, Kinsky dal Borgo F, Hamelers HVM, Buisman CJN. Promoting chain elongation in mixed culture acidification reactors by addition of ethanol. *Biomass Bioenergy* 2013;48:10–6.
- [13] Yang P, Leng L, Tan GYA, Dong C, Leu SY, Chen WH, et al. Upgrading lignocellulosic ethanol for caproate production via chain elongation fermentation. *Int Biodeterior Biodegradation* 2018;135:103–9.
- [14] Hu X, Wang H, Wu Q, Xu Y. Development, validation and application of specific primers for analyzing the clostridial diversity in dark fermentation pit mud by per-dgge. *Bioresour Technol* 2014;163:40–7.
- [15] Joshi S, Robles A, Aguiar S, Delgado AG. The occurrence and ecology of microbial chain elongation of carboxylates in soils. *ISME J* 2021;15(7):1907–18.
- [16] Béchamp M. Lettre de m. A. Béchamp a m. Dumas. *Ann Chim Phys* 1868;4(13):103–11.
- [17] Barker HA, Taha SM. *Clostridium kluyveri*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol. *J Bacteriol* 1942;43(3):347–63.
- [18] Barker HA, Kamen MD, Bornstein BT. The synthesis of butyric and caproic acids from ethanol and acetic acid by *Clostridium kluyveri*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1945;31(12):373–81.
- [19] He J, Shi Z, Luo T, Zhang S, Liu Y, Luo G. Phenol promoted caproate production via two-stage batch anaerobic fermentation of organic substance with ethanol as electron donor for chain elongation. *Water Res* 2021;204:117601.
- [20] Angenent LT, Richter H, Buckel W, Spirito CM, Steinbusch KJJ, Plugge CM, et al. Chain elongation with reactor microbiomes: open-culture biotechnology to produce biochemicals. *Environ Sci Technol* 2016;50(6):2796–810.
- [21] Luo D, Meng X, Zheng N, Li Y, Yao H, Chapman SJ. The anaerobic oxidation of methane in paddy soil by ferric iron and nitrate, and the microbial communities involved. *Sci Total Environ* 2021;788:147773.
- [22] Yang J, Zou L, Zheng L, Yuan Z, Huang K, Gustave W, et al. Iron-based passivator mitigates the coupling process of anaerobic methane oxidation and arsenate reduction in paddy soils. *Environ Pollut* 2022;313:120182.
- [23] Fan L, Schneider D, Dippold MA, Poehlein A, Wu W, Gui H, et al. Active metabolic pathways of anaerobic methane oxidation in paddy soils. *Soil Biol Biochem* 2021;156:108215.
- [24] Tsutsuki K, Ponnampuruma FN. Behavior of anaerobic decomposition products in submerged soils—effects of organic material amendment, soil properties, and temperature. *Soil Sci Plant Nutr* 1987;33(1):13–33.
- [25] Conrad R. Importance of hydrogenotrophic, acetitrophic and methylotrophic methanogenesis for methane production in terrestrial, aquatic and other anoxic environments: a mini review. *Pedosphere* 2020;30(1):25–39.
- [26] Sivan O, Adler M, Pearson A, Gelman F, Bar-Or I, John SG, et al. Geochemical evidence for iron-mediated anaerobic oxidation of methane. *Limnol Oceanogr* 2011;56(4):1536–44.
- [27] Saquing JM, Yu YH, Chiu PC. Wood-derived black carbon (biochar) as a microbial electron donor and acceptor. *Environ Sci Technol Lett* 2016;3(2):62–6.
- [28] Keiluweit M, Nico PS, Johnson MG, Kleber M. Dynamic molecular structure of plant biomass-derived black carbon (biochar). *Environ Sci Technol* 2010;44(4):1247–53.
- [29] Cui J, Holden NM. The relationship between soil microbial activity and microbial biomass, soil structure and grassland management. *Soil Tillage Res* 2015;146:32–8.
- [30] Wu Q, Guo W, Bao X, Meng X, Yin R, Du J, et al. Upgrading liquor-making wastewater into medium chain fatty acid: insights into co-electron donors, key microflora, and energy harvest. *Water Res* 2018;145:650–9.
- [31] Wu Q, Feng X, Chen Y, Liu M, Bao X. Continuous medium chain carboxylic acids production from excess sludge by granular chain-elongation process. *J Hazard Mater* 2021;402:123471.
- [32] Luo T, Xu Q, Wei W, Sun J, Dai X, Ni BJ. Performance and mechanism of Fe₃O₄ improving biotransformation of waste activated sludge into liquid high-value products. *Environ Sci Technol* 2022;56(6):3658–68.
- [33] Chen G, Wu X, Wang D, Qin J, Wu S, Zhou Q, et al. Cluster analysis of 12 Chinese native chicken populations using microsatellite markers. *Asian-Australas J Anim Sci* 2004;17(8):1047–52.
- [34] Bao S, Zhang G, Zhang P, Wang Q, Zhou Y, Tao X, et al. Valorization of mixed volatile fatty acids by chain elongation: performances, kinetics and microbial community. *Int J Agric Biol* 2019;22(6):1613–22.
- [35] Liu Y, He P, Han W, Shao L, Lü F. Outstanding reinforcement on chain elongation through five-micrometer-sized biochar. *Renew Energy* 2020;161:230–9.
- [36] Ding HB, Tan GYA, Wang JY. Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production. *Bioresour Technol* 2010;101(24):9550–9.
- [37] Coma M, Vilchez-Vargas R, Roume H, Jauregui R, Pieper DH, Rabaey K. Product diversity linked to substrate usage in chain elongation by mixed-culture fermentation. *Environ Sci Technol* 2016;50(12):6467–76.
- [38] Liu Y, Lu F, Shao L, He P. Alcohol-to-acid ratio and substrate concentration affect product structure in chain elongation reactions initiated by unacclimatized inoculum. *Bioresour Technol* 2016;218:1140–50.
- [39] Vasudevan D, Richter H, Angenent L. Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to *n*-caproate with reactor microbiomes. *Bioresour Technol* 2014;151:378–82.
- [40] Weimer PJ, Nerdahl M, Brandl DJ. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with *Clostridium kluyveri*. *Bioresour Technol* 2015;175:97–101.
- [41] Villegas-Rodríguez S, Buitrón G. Performance of native open cultures (winery effluents, ruminal fluid, anaerobic sludge and digestate) for medium-chain carboxylic acid production using ethanol and acetate. *J Water Process Eng* 2021;40:101784.
- [42] Zhang C, Yang L, Tsapekos P, Zhang Y, Angelidaki I. Immobilization of *Clostridium kluyveri* on wheat straw to alleviate ammonia inhibition during chain elongation for *n*-caproate production. *Environ Int* 2019;127:134–41.

- [43] Yin Y, Zhang Y, Karakashev D, Wang J, Angelidaki I. Biological caproate production by *Clostridium kluyveri* from ethanol and acetate as carbon sources. *Bioresour Technol* 2017;241:638–44.
- [44] Weimer P, Stevenson D. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;94:461–6.
- [45] Hu X, Du H, Xu Y. Identification and quantification of the caproic acid-producing bacterium *Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for Chinese strong-aroma type liquor production. *Int J Food Microbiol* 2015;214:116–22.
- [46] Wu S, Wei W, Xu Q, Huang X, Sun J, Dai X, et al. Revealing the mechanism of biochar enhancing the production of medium chain fatty acids from waste activated sludge alkaline fermentation liquor. *ACS ES&T Water* 2021;1(4):1014–24.
- [47] Han W, He P, Shao L, Lu F. Road to full bioconversion of biowaste to biochemicals centering on chain elongation: a mini review. *J Environ Sci (China)* 2019;86:50–64.
- [48] Kucek LA, Spirito CM, Angenent LT. High *n*-caprylate productivities and specificities from dilute ethanol and acetate: chain elongation with microbiomes to upgrade products from syngas fermentation. *Energy Environ Sci* 2016;9(11):3482–94.
- [49] Spirito CM, Marzilli AM, Angenent LT. Higher substrate ratios of ethanol to acetate steered chain elongation toward *n*-caprylate in a bioreactor with product extraction. *Environ Sci Technol* 2018;52(22):13438–47.
- [50] Dinesh GH, Murugan RS, Mohanrasu K, Arumugam N, Basu M, Arun A. Anaerobic process for biohydrogen production using keratin degraded effluent. *J Pure Appl Microbiol* 2019;13(2):1135–43.
- [51] Gao Y, Guo L, Jin C, Zhao Y, Gao M, She Z, et al. Metagenomics and network analysis elucidating the coordination between fermentative bacteria and microalgae in a novel bacterial-algal coupling reactor (BACR) for mariculture wastewater treatment. *Water Res* 2022;215:118256.
- [52] Buckel W, Thauer RK. Flavin-based electron bifurcation, ferredoxin, flavodoxin, and anaerobic respiration with protons (Ech) or NAD⁺ (Rnf) as electron acceptors: a historical review. *Front Microbiol* 2018;9:401.
- [53] Pagliano G, Ventorino V, Panico A, Pepe O. Integrated systems for biopolymers and bioenergy production from organic waste and by-products: a review of microbial processes. *Biotechnol Biofuels* 2017;10:113.
- [54] Han W, He P, Shao L, Lu F. Metabolic interactions of a chain elongation microbiome. *Appl Environ Microbiol* 2018;84(22):e01614–e1618.
- [55] Song Y, Bae J, Shin J, Jin S, Lee JK, Kim SC, et al. Transcriptome and translatoome of CO₂ fixing acetogens under heterotrophic and autotrophic conditions. *Sci Data* 2021;8(1):51.
- [56] de Araújo CW, Leitao RC, Gehring TA, Angenent LT, Santaella ST. Anaerobic fermentation for *n*-caproic acid production: a review. *Process Biochem* 2017;54:106–19.
- [57] Stams AJM, De Bok FAM, Plugge CM, van Eekert MHA, Dolfing J, Schraa G. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environ Microbiol* 2006;8(3):371–82.
- [58] Zhang X, Xia J, Pu J, Cai C, Tyson GW, Yuan Z, et al. Biochar-mediated anaerobic oxidation of methane. *Environ Sci Technol* 2019;53(12):6660–8.
- [59] Feng L, He S, Gao Z, Zhao W, Jiang J, Zhao Q, et al. Mechanisms, performance, and the impact on microbial structure of direct interspecies electron transfer for enhancing anaerobic digestion—a review. *Sci Total Environ* 2023;862:160813.
- [60] Zhao Z, Sun C, Li Y, Peng H, Zhang Y. 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;148:523–33.
- [61] Zhao Z, Wang J, Li Y, Zhu T, Yu Q, Wang T, et al. Why do DIETers like drinking: metagenomic analysis for methane and energy metabolism during anaerobic digestion with ethanol. *Water Res* 2020;171:115425.
- [62] Summers ZM, Fogarty HE, Leang C, Franks AE, Malvankar NS, Lovley DR. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. *Science* 2010;330(6009):14135.
- [63] Liu X, Zhuo S, Jing X, Yuan Y, Rensing C, Zhou S. Flagella act as geobacter biofilm scaffolds to stabilize biofilm and facilitate extracellular electron transfer. *Biosens Bioelectron* 2019;146:111748.
- [64] Liu X, Jing X, Ye Y, Zhan J, Ye J, Zhou S. Bacterial vesicles mediate extracellular electron transfer. *Environ Sci Technol Lett* 2020;7(1):27–34.
- [65] Wang G, Li Q, Gao X, Wang X. Synergetic promotion of syntrophic methane production from anaerobic digestion of complex organic wastes by biochar: performance and associated mechanisms. *Bioresour Technol* 2018;250:812–20.
- [66] Stams AJM, Sousa DZ, Kleerebezem R, Plugge CM. Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors. *Water Sci Technol* 2012;66(2):352–62.
- [67] Ishii S, Kosaka T, Hotta Y, Watanabe K. Simulating the contribution of coaggregation to interspecies hydrogen fluxes in syntrophic methanogenic consortia. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(7):5093–6.
- [68] Wang Y, Hou J, Guo H, Zhu T, Zhang Y, Liu Y. New insight into mechanisms of ferroferric oxide enhancing medium-chain fatty acids production from waste activated sludge through anaerobic fermentation. *Bioresour Technol* 2022;360:127629.
- [69] Liu X, Zhan J, Liu L, Gan F, Ye J, Neelson KH, et al. *In situ* spectroelectrochemical characterization reveals cytochrome-mediated electric syntrophy in geobacter coculture. *Environ Sci Technol* 2021;55(14):10142–51.