

中高温鸡粪厌氧消化微生物调节机制对比及耐热机理研究

王晓鑫¹, 王建¹, 马峰², 张延平², 王志鹏², 党小燕², 姚赛², 朱彤², 王有昭², 李旭²

(1. 包头市再生资源及污水处理有限责任公司, 包头 014000;
2. 东北大学机械工程与自动化学院, 沈阳 110168)

摘要: 温度对厌氧消化系统内微生物调节机制的影响尚不清楚, 通过对比中高温厌氧消化实验, 分析了其各自微生物调节机制以及高温厌氧消化耐热机理。结果表明, 在底物浓度相同的情况下高温厌氧消化比中温提前6天达到产甲烷峰值, 高温条件能够缩短厌氧消化反应周期, 更有利于有机物的水解酸化和甲烷的生成; *Defluviitoga* 作为高温厌氧消化过程水解阶段优势菌种, 对高温环境具有较好的抗逆性, 可将大部分多糖类物质当作电子受体, 并降解为醋酸盐、H₂和CO₂; *Methanosarcina* 作为中高温厌氧消化产甲烷阶段优势菌种, 能够适应中温高温两种不同环境, 且可利用所有甲烷代谢途径(食乙酸、食氢、食甲基化合物), 产甲烷潜力巨大。

关键词: 消化温度; 厌氧消化; 菌群丰度; 微生物多样性; 耐热机制

中图分类号: X705

文献标志码: A

DOI: 10.16803/j.cnki.issn.1004-6216.202303048

Comparison of microbial regulation mechanisms and heat-resistant mechanism of anaerobic digestion of chicken manure at medium and high temperature

WANG Xiaoxin¹, WANG Jian¹, MA Feng², ZHANG Yanping², WANG Zhipeng²,
DANG Xiaoyan², YAO Sai², ZHU Tong², WANG Youzhao², LI Xu²

(1. Baotou Renewable Water Resources and Sewage Treatment Co., LTD, Baotou 110168, China; 2. School of Mechanical Engineering and Automation, Northeastern University, Shenyang 110819, China)

Abstract: The influence of temperature on the microbial regulation mechanism in the anaerobic digestion system is unclear. The microbial regulation mechanisms and the mechanism of heat resistance of high-temperature anaerobic digestion by comparing the anaerobic digestion experiments at medium and high temperatures were analyzed. The results showed that under the condition of the same substrate concentration, high-temperature anaerobic digestion reached the peak of methane production 6 days earlier than medium-temperature, and high-temperature conditions could shorten the reaction cycle, which was more conducive to the hydrolysis and acidification of organic matter and the formation of methane. *Defluviitoga*, as the dominant strain in the hydrolysis stage of the high-temperature anaerobic digestion process, had good stress resistance to high-temperature and could use most polysaccharides as electron acceptors and degrade them into acetate, H₂ and CO₂. *Methanosarcina*, as the dominant strain in the methanogenic stage of medium-high temperature anaerobic digestion, could adapt to two different environments, use all methane metabolic pathways (eating acetic acid, hydrogen, and methyl compounds), and has great potential for methane production.

Keywords: digestion temperature; anaerobic digestion; flora abundance; microbial diversity; heat-resistant mechanism

CLC number: X705

生物质能作为世界能源消费体系中的第四大能源, 仅次于煤炭、石油和天然气, 近年来得到了国家的重点鼓励和扶持, 在未来能源结构中, 生物质

能作为可再生能源将发挥不可替代的作用^[1-2]。近十年来, 我国畜禽粪便年产量基本稳定在37亿吨, 畜禽粪便中含有丰富的水分(50.5%)、有机质(25.5%)、

收稿日期: 2023-03-18

录用日期: 2023-05-19

基金项目: 国家重点研发计划课题(2020YFC1806402); 沈阳市重大关键核心技术攻关项目(20-202-4-37)

作者简介: 王晓鑫(1975—), 男, 本科、高级工程师。研究方向: 从事污水处理、固体废弃物处理处置科研和管理。E-mail: 517892956@qq.com

通信作者: 李旭(1996—), 男, 博士研究生。研究方向: 固废处理与循环经济。E-mail: lixu_one@163.com

引用格式: 王晓鑫, 王建, 马峰, 等. 中高温鸡粪厌氧消化微生物调节机制对比及耐热机理研究[J]. 环境保护科学, 2023, 49(4): 74-84.

氮(1.63%)、磷(1.54%)、硫化氢以及大量的病原菌等,由于产量巨大且综合利用率不足,是造成环境污染的主要污染源之一^[3],主要表现为易产生面源污染、粪便中病原体释放、气味恶劣等^[4-5],存在分散性、累积性和模糊性等特点,控制难度较大^[6]。然而其作为一种生物质能,得到有效利用可以缓解能源紧张带来的压力并减少其对环境造成的污染。厌氧消化作为畜禽粪便等有机污染物的处置方法之一,可以将有机物转化为 CH_4 、 CO_2 和各类小分子脂肪酸,实现资源的进一步利用^[7]。

温度作为厌氧消化的主要影响因素之一,将厌氧消化划分为常温厌氧消化(15~25℃)、中温厌氧消化(30~40℃)和高温厌氧消化(50~60℃)^[8],由于常温厌氧消化甲烷产量和有机物降解效率较低,中高温厌氧消化目前应用较为广泛。近年来很多研究表明,在高温厌氧消化过程中,有机物的降解效率、甲烷产量以及挥发性脂肪酸(VFAs)的去除率均高于中温厌氧消化^[9-10]。KJERSTADIUS et al^[11]通过在35、55和60℃下进行厌氧消化实验发现高温能够很好地减少沙门氏菌及大肠杆菌等病原体的释放。FERNÁNDEZ-RODRIGUEZ et al^[12]利用 Romero 模型对中高温厌氧消化微生物最大生长速率($\mu(\text{MAX})$)进行拟合,结果表明高温过程生长速率较中温过程提高27%~60%,并在更短时间内实现相同水平有机物的降解;同时 WANG et al^[13]指出通过改变温度进而改变水解酸化细菌和产甲烷菌相对丰度来提高厌氧消化工艺性能。但高温厌氧消化中的菌群易受外部环境的影响,其在厌氧消化过程中的耐热机理及微生物调节机制还有待进一步研究。所以本研究通过对比中高温厌氧消化产气特性及微生物群落结构变化,从分子生物学角度分析其各自微生物调节机制以及高温厌氧消化耐热机理,为实际沼气工程提供理论指导,实现能源高效回收。

1 材料与方法

1.1 实验材料

原材料鸡粪取自沈阳市某养鸡场,接种污泥取自沈阳市北部污水处理厂污泥浓缩池,取回后利用鸡粪进行驯化处理,保持接种污泥中微生物活性,鸡粪与接种污泥特性,见表1。

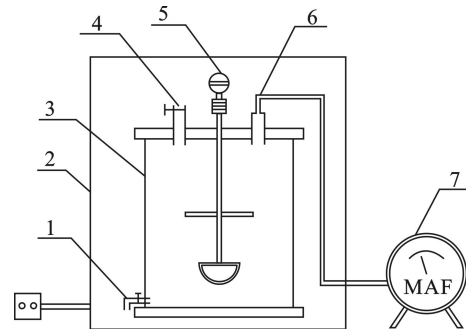
表1 鸡粪与接种污泥的性质

Table 1 Properties of chicken manure and inoculated sludge

实验材料	TS	VS	pH	C	N	粗蛋白	粗脂肪	粗纤维	钙
鸡粪	27.29	23.33	-	46.07	4.73	22.34	2.44	10.72	10.00
接种污泥	18.12	8.36	6.41	-	-	-	-	-	-

1.2 实验设计

本实验采用自行设计的4个3L独立厌氧消化反应器,见图1。



1.取料口; 2.恒温培养箱; 3.厌氧消化反应罐; 4.进料口; 5.搅拌器; 6.排气口; 7.湿式气体流量计

图1 厌氧消化实验装置

Fig. 1 Diagram of anaerobic digestion experiment device

罐体容积为3L,反应有效容积为2.5L,反应器设置2组,每组反应器内一次性添加鸡粪150g、接种污泥500mL,后用去离子水定容至2.5L,启动前通过向其通入氮气,保证其严格厌氧的环境。温度分别设置为37和55℃,每组实验设置一组平行实验,实验结果取其平均值。实验过程中每隔6h搅拌一次,每次2min,待测样品由取料口取出,产生沼气通过湿式气体流量计实时监测,并定期检测pH、SCOD、氨氮、VFAs、菌群多样性等参数变化。

1.3 分析方法

沼气产量通过湿式气体流量计(LMF-1)测得,甲烷产量通过甲烷气体检测仪(JK60-CH4)测量并计算测得,物料初始TS和VS通过重量法(GB/T 28731—2012)测得,溶解性化学需氧量(SCOD)采用重铬酸钾法进行测量(GB/T32208—2015),利用纳氏试剂分光光度法测量氨氮(TAN)(HJ535—2009),利用比色法测量总挥发性脂肪酸(VFAs)。

采用16S rRNA基因测序来分析微生物多样性,首先将样品中的DNA采用CATB方法进行提取^[14],并用琼脂糖电泳检测DNA的纯度和浓度。

选用特异引物分别对细菌和古菌进行 PCR 扩增。PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 后进行文库的构建和上机测序。并利用 PICRCUt 进行基因代谢功能预测, 将本实验的基因测序数据与代谢功能已知的菌群全谱系基因功能预测谱数据库进行对比, 从而实现对基因代谢功能的预测。其中中高温微生物群落样本分别用 M (Medium) 和 H (High) 表示, M1—M8 与 H1—H8 分别代表中高温序批式厌氧消化实验随时间变化的 8 次测量结果。

2 结果与讨论

2.1 中高温厌氧消化产甲烷性能对比

温度是影响厌氧消化过程有机物降解效率的关键因素, 中高温厌氧消化过程中甲烷产量、pH、SCOD、氨氮等常规参数的变化, 见图 2。

图 2(a) 可知, 在实验前期底物基质相同的情况下, 中高温甲烷日产量变化趋势大致相同, 在实验中期高温组甲烷日产量于第 19 天率先达到峰值, 产量为 39.77 mL/gVS, 中温组于第 25 d 达到峰值, 产量为 43.18 mL/gVS, 结果表明高温对厌氧消化中有机物具有更高的降解效率^[15], 但倘若反应系统内有机质含量过高, 高温厌氧消化内会出现较高的碱度和氨氮水平, 从而对微生物活性产生抑制。图 2(b) 可知, 中高温厌氧消化累计产甲烷量分别为 734.75 和 699.50 mL/gVS, 由于底物中有机质含量较高, 首先在高温条件下嗜热菌群对温度具有较高耐受性展现出强大的活性, 其他菌群在高温环境下会通过提高自身新陈代谢来提高自身耐受性, 使系统产生更多的 VFAs, 从而影响有机质的降解效率^[16]; 但与中温组相比, 高温组累计产甲烷量曲线能够较快增长并趋于平缓, 同样表明高温下有机物降解率更高, 能够有效缩短厌氧消化反应周期。

厌氧消化系统内最适 pH 为 6.8 ~ 7.2, 过高或过低的 pH 均会对水解酸化细菌和产甲烷菌等微生物产生不同程度的抑制效果。图 2(c) 反映了 pH 和 VFAs 的变化关系, 研究发现中高温实验组 pH 均呈现出前期较低对着反应进行逐渐升高的变化趋势, VFAs 也整体呈现出先上升后下降的变化趋势。这是由于大分子有机物在水解酸化细菌的作用下降解为脂肪酸等小分子有机物, 从而使 VFAs 含量逐步上升, 其间同时产生大量游离 H^+ 导致 pH 下降。随着反应进行, 产甲烷菌逐渐适应了

环境并开始利用系统中游离的 H^+ 与 VFAs 合成 CH_4 , VFAs 含量开始下降, pH 值升高, 这与 YANG et al^[17] 的研究结果相似。通过对比发现高温组在整个实验过程中的 pH 均高于中温组, 且 VFAs 也率先达到峰值, 原因是底物中含有较多粗蛋白, 蛋白质在高温条件下的转化速率更快, 从而提高了系统内的总碱度, 对 VFAs 起到了一定的中和作用^[8,18]。ALMEIDA et al^[19] 发现高温厌氧消化在不需要人为干预的情况下能够使 pH 稳定在 7.0 左右, 而中温厌氧消化则需要加碱来维持反应系统 pH 的稳定。

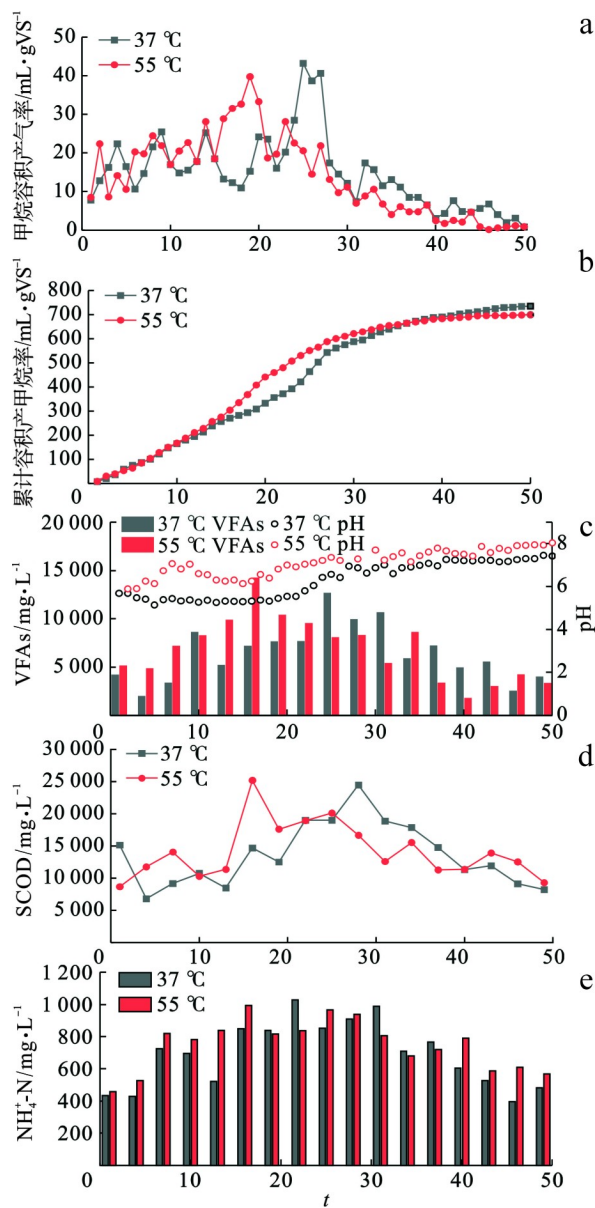


图 2 中高温厌氧消化常规参数对比

Fig. 2 Comparison of conventional parameters of medium and high temperature anaerobic digestion

SCOD 的含量能够直观地反映出厌氧消化系统内有机质的含量, 图 2(d) 可以看出 SCOD 随有机

质水解呈现出先上升后下降的变化趋势,且高温组在第16 d率先达到峰值(25 170 mg/L),中温组在28 d达到峰值(24 470 mg/L),在序批式实验中底物浓度保持不变,SCOD浓度会随着产甲烷菌对有机质的利用而逐渐降低,产甲烷古菌 OTU 数目明显上升。在反应结束时,中高温 SCOD 去除率分别达到66%和63%,SCOD含量的变化能够从侧面反映出系统中的有机物得到有效降解^[20]。DUAN et al^[21]研究发现 TAN 浓度会对厌氧消化系统产生不同的抑制效果,当 TAN 浓度在0~3 000 mg/L时不会对系统产生抑制现象,高温产甲烷菌对氨氮的耐受性阈值为8 000 mg/L,中温产甲烷菌为16 000 mg/L,

所以温度的升高会增加氨氮抑制的风险^[22-23]。本研究中高温厌氧消化实验氨氮浓度变化如图2(e)所示,由于底物浓度较低,氨氮浓度均在3 000 mg/L以下,不会产生明显的氨抑制现象。由于高温厌氧消化比中温厌氧消化更易受到氨氮抑制,所以在实际工程中尤其在高温厌氧消化工艺中,应避免氨氮浓度过高,使厌氧微生物处于可承受范围之内,保障系统稳定运行。

2.2 中高温厌氧消化细菌菌群丰度变化

本研究基于16S rRNA测序所得的有效数据进行 OTUs 物种聚类分析,分别得到1 717和1 941个细菌的 OTU,中高温细菌样本群落变化,见图3。

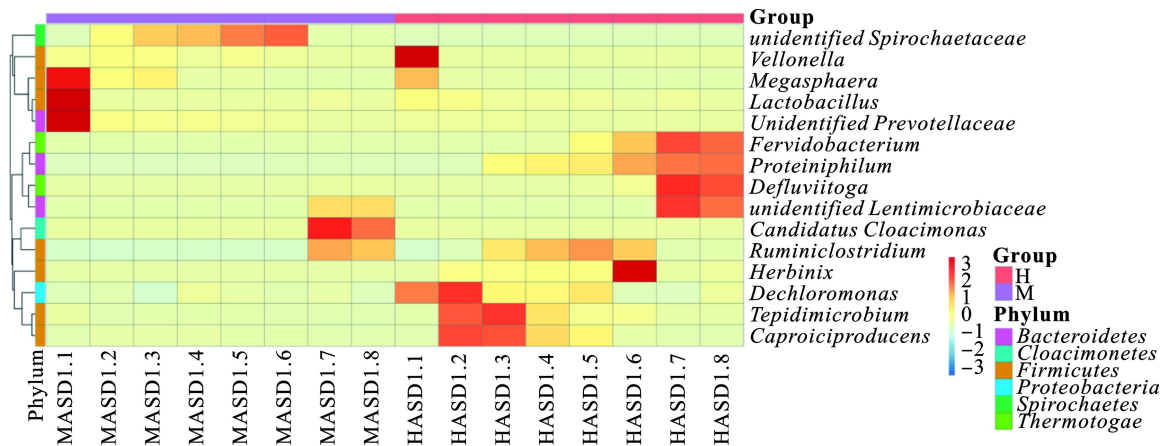


图3 中高温细菌样本群落热图

Fig. 3 Heat map of bacterial community in medium and high temperature samples

中温厌氧消化在门水平上优势菌种主要为 *Firmicutes*、*Spirochaetes*、*Bacteroidetes* 和 *Proteobacteria*, 相对丰度最高分别为69.11%、45.83%、36.30%、17.84%。这4种细菌门下的大部分微生物均可对有机质进行降解并转化为丙酮酸进而产生VFAs和乙醇等代谢产物^[24]。*Firmicutes*中含有众多功能性微生物,在实验前期对大部分有机物(蛋白质、纤维素类、碳水化合物等)进行降解^[25],随着有机质不断被消耗,菌群相对丰度逐渐降低。*Bacteroidetes*和 *Proteobacteria* 作为肠道菌群的优势菌种,主要作用于蛋白质,将其水解为氨基酸,并为自身及其他微生物提供维生素、乳酸和短链脂肪酸等营养物质^[20,26]。高温厌氧消化在门水平上的优势菌种主要为 *Firmicutes*、*Thermotogae*、*Bacteroidetes* 和 *Proteobacteria*, 相对丰度最高分别可以达到72.61%、33.39%、35.15%、39.95%。其中 *Thermotogae* 是一类嗜热或超嗜热菌群,如热袍菌等细胞内具有错配修复机制(MMR),在受到热损伤后会使得DNA片段

发生碱基对错位配对,导致遗传信息发生改变,MMR会切除错误的碱基对,然后通过DNA聚合酶和连接酶的作用,合成配对正确的双链DNA分子。因此嗜热菌在DNA重组反应中发挥介导作用,细胞内部含有识别损伤、启动修复的重组介导功能的蛋白以提高细菌的耐热性。中温(左)和高温(右)温厌氧消化细菌菌群相对丰度柱形,见图4。

图4(左)可知,中温厌氧消化过程中属水平上优势菌属主要有 *unidentified_Spirochaetaceae*、*Lactobacillus*、*Megasphaera* 和 *unidentified_Lentimicrobiaceae*, 其中 *unidentified_Spirochaetaceae* 和 *Lactobacillus* 相对丰度最高可达43.08%和20.19%, *unidentified_Spirochaetaceae* 属于螺旋体科(*Spirochaetaceae*),是一种常见的人畜共患病的病原体,大多存在于被污染的水体及其他环境中,可利用糖类、氨基酸及长链脂肪酸等以维持自身能量需求^[27]。*Lactobacillus* 隶属于乳杆菌科,可产生乳酸及多种

脂肪酶,可将有机质主要转化为丁酸等脂肪酸类物质,通过 PENG et al^[28] 研究发现其在酸性环境中仍然具有较高活性,能够为其他细菌提供可利用的有机硒等微量元素,这些微量元素在一定程度上可减缓细胞凋亡,但 *Lactobacillus* 与其他细菌的互营共生关系还有待进一步研究^[29]。*Lactobacillus* 随着反应进行丰度逐渐下降,这与底物浓度及反应系统内的 pH 变化有关。*Megasphaera* 属于实验前期优势

菌种,主要利用 *Lactobacillus* 产生的乳酸及果糖^[30],其丰度会随着 *Lactobacillus* 变化而变化。*unidentified_Lentimicrobiaceae* 是一种严格厌氧、短棒状革兰氏阴性细菌,最适 pH 为 7.0 左右,由于实验后期 pH 升高致使其丰度主要体现在中温厌氧消化后期;SUN et al^[31] 指出 *Lentimicrobiaceae* 主要作用于碳水化合物,发酵终产物是乙酸盐、苹果酸盐、丙酸盐、甲酸盐和氢离子。

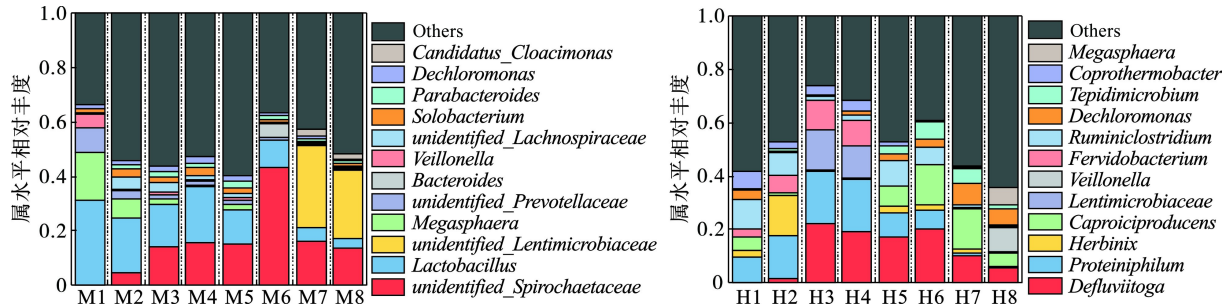


图 4 中温(左)和高温(右)温厌氧消化细菌菌群相对丰度柱形图

Fig. 4 Histogram of relative abundance of bacterial flora in anaerobic digestion at medium (left) and high (right) temperatures

高温厌氧消化属水平优势菌种主要为 *Defluviitoga*、*Proteiniphilum*、*Herbinix*、*Caproiciproducens* 等,相对丰度最高分别可达 22.14%、16.68%、15.39%、15.34%。图 4(右)可知,值得注意的是高温厌氧消化中发现的菌群对温度耐受性较高。*Defluviitoga* 作为高温厌氧消化优势菌种,属于 *Thermotogae* 门,是一种嗜热微嗜盐厌氧的化学有机营养型细菌,最适温度为 55 °C,最适 pH 为 6.5 ~ 7.9,具有发酵广谱碳水化合物和酵母提取物的能力,可将大部分的多糖类物质(如葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖等)用作电子供体,降解并转化为醋酸盐、 H_2 和 CO_2 ,还可将硫代硫酸盐和元素硫还原为 H_2S ^[32-33]。*Proteiniphilum* 是一种嗜蛋白质嗜纤维素的功能性细菌,最终产物为乙酸,其在高温厌氧消化反应前中期丰度较高,并随着反应进行丰度逐渐下降,这与系统内底物浓度变化有关。WU et al^[34] 检索并筛选了该属四个基因组是否存在碳水化合物活性酶,结果表明所有分析的基因组都包含多种参与逐步水解的酶,包括糖苷水解酶(GH)、碳水化合物酯酶(CE),并验证了其功能性。*Herbinix* 和 *Caproiciproducens* 的最适温度范围为 40 ~ 65 °C,为高温厌氧消化过程中的次优势菌种,其中 *Herbinix* 主要作用于纤维素,将纤维二糖降解为乙酸、乙醇、丁酸和

氢气等产物^[35]。*Caproiciproducens* 可将果糖作为底物,转化为乳酸、乙酸、正丁酸、正己酸、 H_2 和 CO_2 ,ESQUIVEL-ELIZONDO et al^[36] 将其全基因组和反向 β 氧化基因与其他细菌进行了比较,同样验证了这一观点。

通过对中高温 16S rRNA 测序结果细菌群落基因功能预测,分析中高温细菌群落在基因功能上的差异,见图 5。

细菌结构域中注释的序列主要分为 6 个功能组:细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、新陈代谢和有机系统,其中细胞之间的膜运输、遗传信息的复制与修复、碳水化合物和氨基酸的代谢所占基因数量最高,可作为细菌基因的主要功能表达。通过对比中高温细菌群落功能预测可以看出,高温厌氧消化细菌基因表达在 6 个功能组中均高于中温组。造成这种现象的原因是高温会促进细胞的新陈代谢,提高细胞与环境之间的物质交换效率,促进细胞内遗传信息的表达。TIAN et al^[37] 也指出随着温度的升高,水解酸化细菌代谢明显增多,且涉及水解、产酸阶段的细菌多样性明显增加,细菌在高温环境的刺激下,通过提高新陈代谢,促进肽链中二硫键的形成,增加双链 DNA 分子的空间位阻,来保证其在高温下的活性。

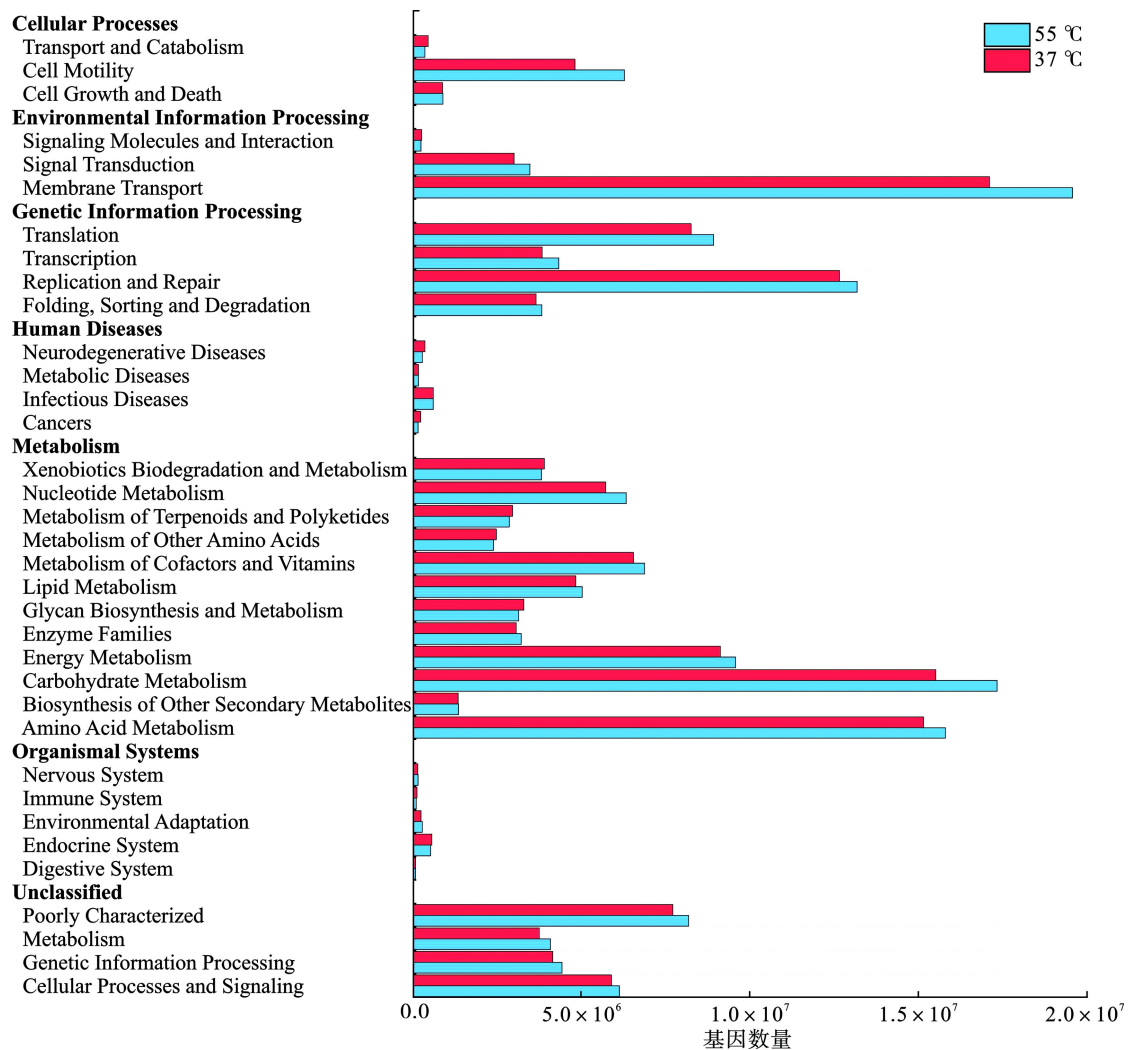


图 5 中高温细菌群落功能预测

Fig. 5 Prediction of bacterial community function at medium and high temperatures

2.3 中高温厌氧消化古菌菌群丰度变化

中高温厌氧消化古菌门水平优势菌种主要为 *Euryarchaeota*, *Euryarchaeota* 在 16S rRNA 物种进化树上属于一个单系群, 包含了古菌中大部分群落, 产甲烷阶段的产甲烷菌以及嗜热、嗜盐的厌氧菌等均来自 *Euryarchaeota* 门。中高温厌氧消化古菌菌群相对丰度, 见图 6。

图 6(a) 可知, 中温厌氧消化属水平优势菌种主要为: *Methanosarcina*、*Methanosaeta*、*Methanospaera*、*Methanospirillum*、*Methanoregula*, 相对丰度最高分别可达到 45.38%、24.73%、29.68%、21.50% 和 18.24%, 其中 *Methanosaeta* 属于食乙酸产甲烷古菌, 主要将乙酸和 H_2 转化为 CH_4 , 在厌氧消化过程中, 也可在一定程度上利用其他类型底物, 例如将甲基胺或甲醇歧化为 CH_4 和 CO_2 ^[38]。在中温厌氧消化实验中由于底物逐渐被降解, 其丰度随着反

应进行逐渐降低, 符合微生物生态学变化规律。*Methanosarcina* 是已知的唯一一种可利用所有甲烷代谢途径的菌群, 最适 pH 为 6.5 ~ 8, 由于受 pH 影响, 主要作为在实验后期优势菌种, *Methanosarcina* 的第一种代谢途径为利用乙酸, 并转化为 H_2 和 CO_2 , 然后将 H_2 和 CO_2 作为原料合成 CH_4 ; 第二种代谢途径是在甲基转移酶的作用下将甲醇、甲胺等化合物转化成甲烷^[39]。值得注意的是, *Methanosarcina* 是厌氧消化过程中最重要的产甲烷菌群, 还可根据环境温度划分为嗜温甲烷八叠球菌和嗜热甲烷八叠球菌^[39]。

高温厌氧消化产甲烷古菌属水平优势菌种相对丰度如图 6(b), 可以看出其在属水平上的优势菌种主要为 *Methanosarcina*、*Methanothermobacter*、*Methanospirillum*、*Methanosaeta* 和 *Methanoregula*, 由于高温厌氧消化 pH 一直处于 6.5 以上, 所以

Methanosarcina 在实验前期即表现出较大的优势, 并且丰度随着有机底物消耗而逐渐下降。*Methanothermobacter* 是一种热自养氢营养型甲烷嗜热杆菌, 最适生长温度为 65 ~ 70 °C, 为实验前期优势菌种, 可以将 H₂、甲醇等物质转化为 CH₄ 和 CO₂, 以提供自身细胞生理活动需求^[40], 麻婷婷等^[41] 同样发现 *Methanothermobacter* 是高温条件下石油烃降解产甲烷的优势古菌之一。在实验后期优势菌种主要为 *Methanospirillum* 和 *Methanosaeta*, 通过对比可以看出中温厌氧消化大部分产甲烷优势菌种同样出现在高温厌氧消化过程中, 造成这种现象的原

因是这些产甲烷菌对高温具有较好的耐受性, 细胞中的 DNA 在高温条件下触发损伤诱导反应(DDR), 激活修复蛋白, 修复 DNA 损伤, 维护细菌基因组的稳定性^[42]。SUTER^[43] 指出 DDR 是多层次、多水平调控, 与损伤信号转导和 DNA 修复有关的基因多达 500 多个; 当 DNA 受到外界环境胁迫造成损伤时 MRN (X)、ATRIP、Rad17 等损伤识别蛋白会通过 ATM、ATR 等蛋白酶将信号传递给效应蛋白, 进而影响 DNA 合成、细胞周期、细胞凋亡、衰老以及 DNA 修复等细胞进程^[44]。中高温古菌群落功能预测, 见图 7。

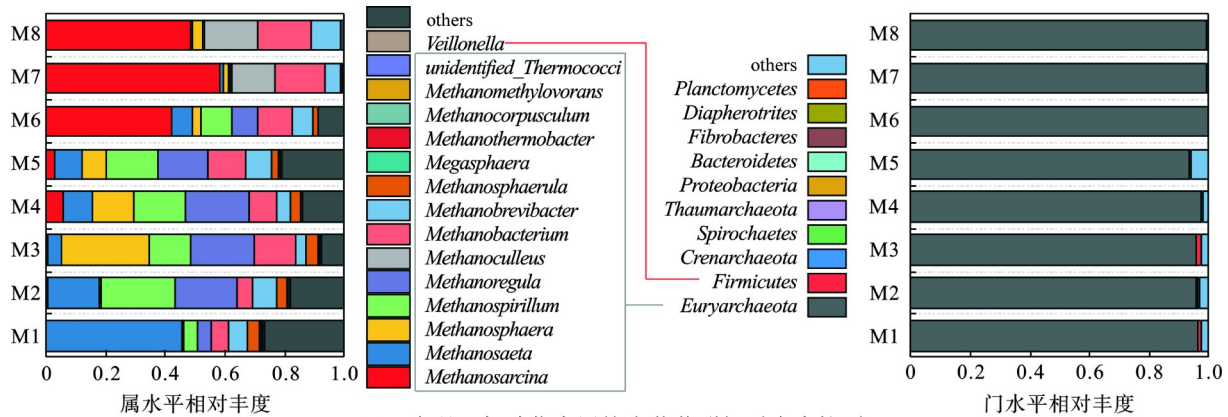


Fig.6(a)Column chart of relative abundance of methanogenic archaea in mesophilic anaerobic digestion

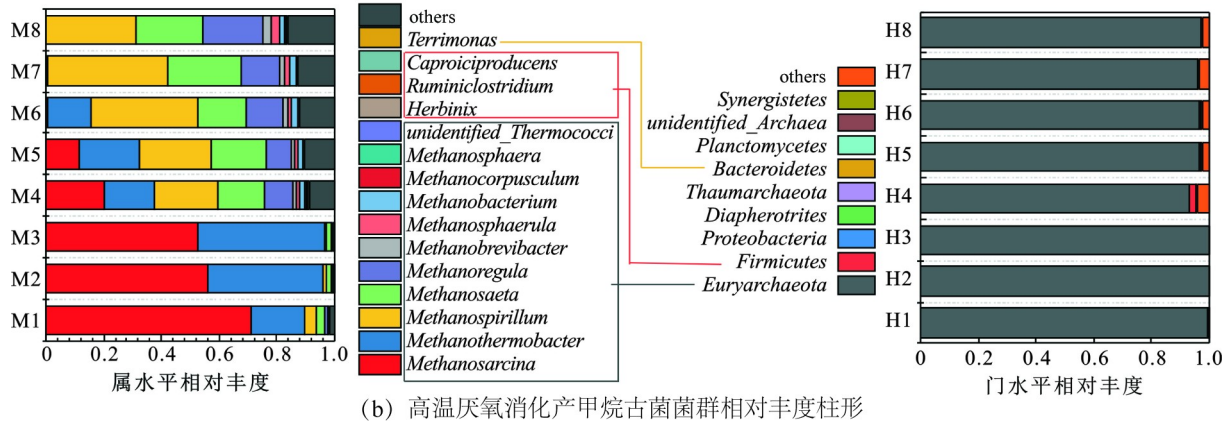


Fig.6(b)Column chart of relative abundance of methanogenic archaea by high temperature anaerobic digestion

图 6 中高温厌氧消化古菌群相对丰度

Fig. 6 Histogram of relative abundance of archaea in mid-high temperature anaerobic digestion

通过利用 16S rRNA 基因测序数据与代谢功能已知的微生物基因组数据库进行对比, 实现了中高温产甲烷古菌基因的功能预测, 见图 7, 古菌结构域中注释的序列同样分为六个功能组: 细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、新陈代谢

和有机系统, 其代谢通路主要为能量代谢、碳水化合物代谢、氨基酸代谢、膜运输、遗传信息翻译与表达, KUNDU et al^[45] 在中高温连续式厌氧消化实验中发现, 与在 55 °C 下运行的反应器相比, 37 °C 下的反应器能够承受更高的有机负荷且微生物群

落更加多样化,这与本实验研究一致。中温厌氧消化过程中基因的代谢通路均高于高温厌氧消化,造成这种现象的原因是高温阻断了部分乙酸营养型

产甲烷菌的代谢通路,主要以氢营养型产甲烷代谢通路为主,并得到了其他属明确定义的共生产氢细菌的支持,这与 GAO et al^[46] 研究结果一致。

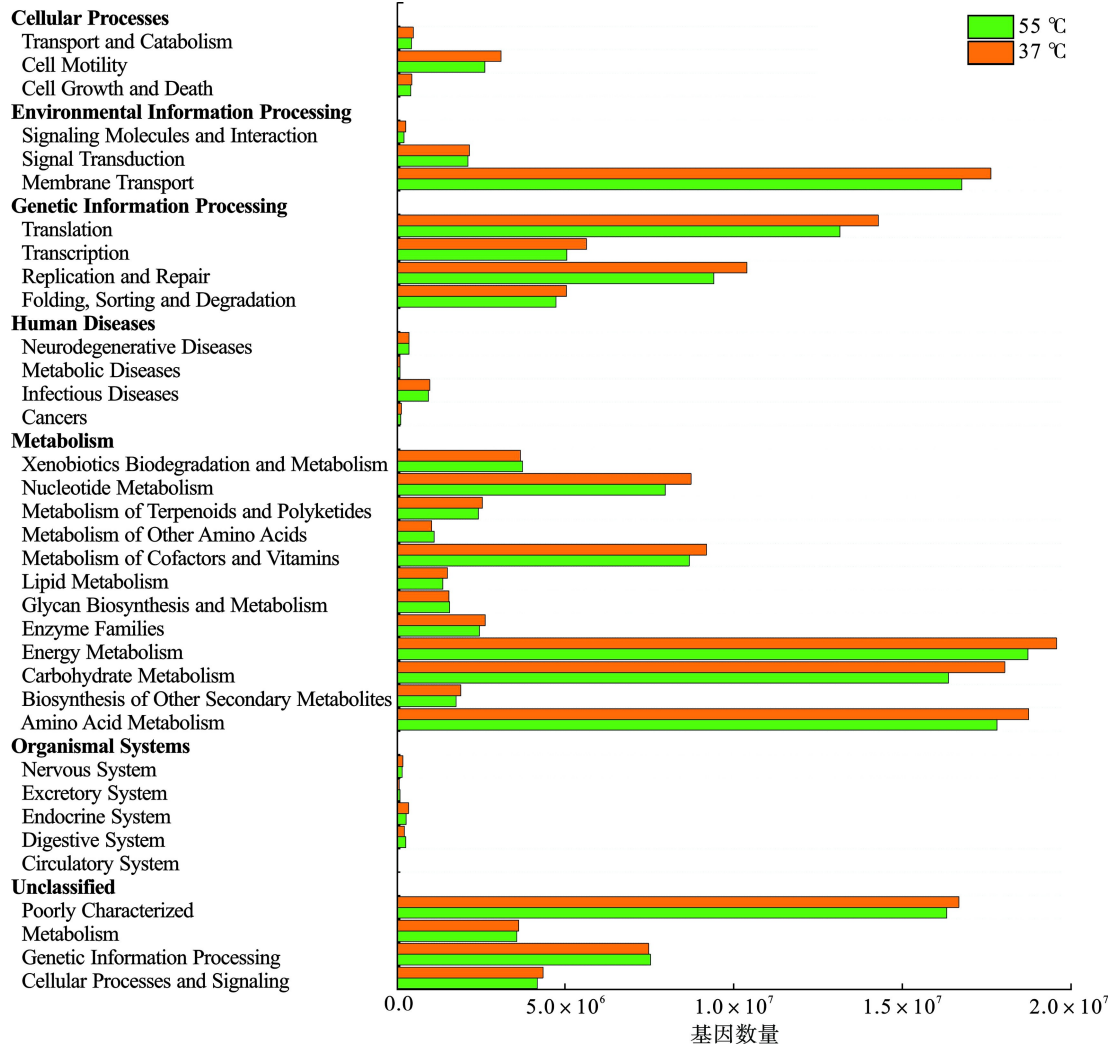


图 7 中高温古菌群落功能预测

Fig. 7 Prediction of archaea community function at medium and high temperatures

2.4 中高温厌氧消化 α 多样性变化

为了进一步探究微生物群落结构,基于 16S rRNA 数据集对中高温厌氧消化 α 多样性指数进行评估^[47],细菌和古菌的 α 多样性见表 2 与表 3,本研究每组样品生物覆盖率均在 0.99 以上,可以认为测序深度已基本覆盖样品中的所有物种。

表 2 可知,高温厌氧消化过程中样品 observed species 指数较高,所含物种较为丰富,且其自身丰富度变化与厌氧消化系统内的底物浓度呈正相关变化,与 WITTEBOLLE 的研究结果一致^[48]。Shannon 和 Simpson 能够评估物种的均匀度,值越大表示各物种分配越均匀^[49-50],可用来评估优势菌群在反应

系统中的地位和作用,可以看出中高温各组样品均匀度指数相差不大,物种分配较为均匀。Chao1 和 ACE 的作用与物种数指数类似,数值越大表示物种丰富度和多样性越高^[51],通过对比中高温多样性指数发现,在细菌域中高温厌氧消化的 Chao1 和 ACE 指数整体高于中温厌氧消化,而在古菌域中高温厌氧消化的 Chao1 和 ACE 指数整体较低,造成这种现象的原因是水解酸化细菌所覆盖的菌群数量远比产甲烷古菌多,样本中的 OUT 数目即可验证这一观点,温度的变化使水解酸化阶段衍生出更多细菌,产甲烷古菌在受到温度的影响后,在底物充足的情况下,尚且可以通过调节自身代谢来适应

环境胁迫,但随着底物浓度不断被消耗,没有足够能量来维持自身生理活动,多样性指数开始下降,这与前文的研究可以形成呼应。

表 2 中高温厌氧消化水解酸化细菌 α 多样性变化

Table 2 Changes in the α diversity of acidified bacteria during mid-high temperature anaerobic digestion

组数	物种数/个	均匀度指数		多样性指数		生物覆盖率
		Shannon	Simpson	Chao1	ACE	
M1	1593	6.432	0.934	1816.911	1898.458	0.993
M2	1742	7.819	0.987	1946.074	2056.014	0.993
M3	1293	7.341	0.984	1460.754	1564.026	0.994
M4	1848	7.876	0.983	2075.346	2171.558	0.992
M5	1758	7.461	0.970	2013.739	2124.699	0.992
M6	1857	7.474	0.968	2108.730	2193.657	0.992
M7	1756	6.936	0.962	2059.034	2163.817	0.991
M8	1869	7.331	0.973	2125.733	2238.300	0.992
H1	2245	8.053	0.979	2538.160	2607.659	0.991
H2	2056	7.666	0.980	2365.965	2487.267	0.990
H3	1921	7.275	0.976	2232.204	02382.96	0.990
H4	2391	8.597	0.991	2650.590	2772.402	0.990
H5	1897	6.837	0.961	2194.613	2335.348	0.990
H6	1615	7.161	0.978	1880.154	2005.092	0.992
H7	1769	6.784	0.898	1964.061	2037.415	0.992
H8	1634	6.802	0.968	1905.350	2043.547	0.991

表 3 中高温厌氧消化产甲烷古菌 α 多样性变化

Table 3 Variation of alpha diversity of methanogenic archaea during mid-high temperature anaerobic digestion

组数	物种数/个	均匀度指数		多样性指数		生物覆盖率
		Shannon	Simpson	Chao1	ACE	
M1	533	4.109	0.822	602.843	620.164	0.998
M2	584	5.413	0.946	631.616	644.214	0.999
M3	544	5.315	0.947	602.235	611.049	0.999
M4	514	5.456	0.951	569.836	573.337	0.999
M5	624	5.742	0.962	669.764	685.770	0.999
M6	316	4.421	0.854	341.161	339.959	0.999
M7	191	3.617	0.812	217.400	218.061	1.000
M8	189	3.780	0.847	204.750	209.107	1.000
H1	446	5.027	0.932	497.679	528.585	0.999
H2	553	5.184	0.939	613.061	633.953	0.998
H3	483	5.244	0.946	516.514	527.499	0.999
H4	664	5.414	0.943	758.897	757.104	0.998
H5	530	5.322	0.941	587.554	588.961	0.999
H6	276	2.899	0.681	298.000	308.641	0.999
H7	162	2.984	0.786	193.231	183.107	1.000
H8	191	3.153	0.805	204.034	211.344	1.000

3 结论

(1) 高温厌氧消化比中温厌氧消化提前 6 d 达到产甲烷峰值, 由于底物浓度相同, 中高温累计产甲烷量相差不大, 高温组 pH 始终高于中温组, 能够在更短时间达到相对稳定的 pH, 系统不易产生酸化现象, 且 VFAs 与 SCOD 的变化与甲烷产量变化相似, 说明高温条件更有利于有机物的水解酸化和甲烷的生成。

(2) 中温厌氧消化水解酸化阶段优势菌种为 *unidentified_Spirochaetaceae*、*Lactobacillus* 和 *Megasphaera*, 对酸性环境具有较好的抗逆性, 产物为乙酸和丁酸等脂肪酸类物质; 高温水解阶段的优势菌种主要为 *Defluviitoga*、*Proteiniphilum*、*Herbinix* 和 *Caproiciproducens* 等, 其对高温环境具有较好的抗逆性, 其中 *Defluviitoga* 可将大部分多糖类物质当做电子受体, 并降解为醋酸盐、 H_2 和 CO_2 , 提高了水解酸化效率, 使厌氧消化反应周期缩短 12%, 同时高温环境减少了病原体的产生。中高温厌氧消化产甲烷优势菌群也存在较大差异, 且分别属于不同的功能性产甲烷菌。

参考文献

- [1] 袁惊柱, 朱彤. 生物质能利用技术与政策研究综述[J]. 中国能源, 2018, 40(6): 16 – 20.
- [2] ZHANG LB, YANG T. The Evaluation and Selection of Renewable Energy Technologies in China[J]. *Energy Procedia*, 2014, 61: 2554 – 2557.
- [3] YAO Y, HUANG G, AN C, et al. Anaerobic digestion of livestock manure in cold regions: Technological advancements and global impacts[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2020, 119: 109494.
- [4] LIU WR, ZENG D, SHE L, et al. Comparisons of pollution characteristics, emission situations, and mass loads for heavy metals in the manures of different livestock and poultry in China[J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 734: 139023.
- [5] 唐涛涛, 李江, 杨爱江, 等. 秸秆类型及配比变化对污泥厌氧消化中微生物群落的影响[J]. *化工进展*, 2020, 39(2): 667 – 678.
- [6] 李霞. 当前我国畜牧养殖对生态环境的影响[J]. 农业与技术, 2016, 36(14): 239.
- [7] PONSÁ S, FERRER I, VAZQUEZ F, et al. Optimization of the hydrolytic-acidogenic anaerobic digestion stage (55°C) of sewage sludge: Influence of pH and solid content[J]. *Water Research*, 2008, 42(14): 3972 – 3980.
- [8] 张文哲, 陈静, 刘玉, 等. 中温和高温厌氧消化的比较[J]. *化工进展*, 2018, 37(12): 4853 – 4861.
- [9] 曲艺源, 张景新, 何义亮. 铁电极辅助餐厨垃圾高温厌氧消化及微生物的耐盐机理[J]. *化工进展*, 2022, 41(4): 8.
- [10] MICOLUCCI F, GOTTARDO M, PAVAN P, et al. Pilot scale comparison of single and double-stage thermophilic anaerobic digestion of food waste[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2017: 1376 – 1385.
- [11] KJERSTADIUS. H, JANSEN JL, DE V, et al. Hygienization of sludge through anaerobic digestion at 35, 55 and 60 degrees C[J]. *Water Science and Technology*, 2013, 68(10): 2234 – 2239.
- [12] FERNANDEZRODRIGUEZ J, PEREZ M, ROMERO LI, et al. Comparison of mesophilic and thermophilic dry anaerobic digestion of OFMSW: Kinetic analysis[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013(232): 59 – 64.
- [13] WANG Z, MA T, XING L. Process performance and microbial interaction in two-stage continuously stirred tank reactors for sludge anaerobic digestion operated at different temperatures[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 161: 107682.
- [14] 李金璐, 王硕, 于婧, 等. 2013. 一种改良的植物 DNA 提取方法[J]. 植物学报, 2013, 48(1): 72 – 78.
- [15] KIM M S, KIM D H, YUN Y M. Effect of operation temperature on anaerobic digestion of food waste: performance and microbial analysis[J]. *Fuel*, 2017, 209: 598 – 605.
- [16] NGES I A, JING L. Effects of solid retention time on anaerobic digestion of dewatered-sewage sludge in mesophilic and thermophilic conditions[J]. *Renewable Energy*, 2010, 35(10): 2200 – 2206.
- [17] YANG Z Y, WANG W, ZHANG SY, et al. Comparison of the methane production potential and biodegradability of kitchen waste from different sources under mesophilic and thermophilic conditions[J]. *Water Science And Technology*. 2017, 75(7), 1607 – 1616.
- [18] FOUNTOULAKIS M S, DRAKOPOULOU S, TERZAKIS S, et al. Potential for methane production from typical Mediterranean agro-industrial by-products[J]. *Biomass & Bioenergy*, 2008, 32(2): 155 – 161.
- [19] ALMEIDA S D. Comparison of the anaerobic digestion at the mesophilic and thermophilic temperature regime of organic wastes from the agribusiness[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 241: 985.
- [20] ZHAO Y, SUN F, YU J, et al. Co-digestion of oat straw and cow manure during anaerobic digestion: Stimulative and inhibitory effects on fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 269: 143 – 152.
- [21] DUAN N, ZHANG D J, LIN C, et al. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of pig manure: Methane production, mass flow, reactor scale and heating scenarios[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 231: 646 – 652.
- [22] HIDAKA T, WANG F, TOGARI T, et al. Comparative performance of mesophilic and thermophilic anaerobic digestion for high-solid sewage sludge[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 149(12): 177 – 183.
- [23] GARCIA M L, ANGENENT L T. Interaction between temperature and ammonia in mesophilic digesters for animal waste treatment[J]. *Water Research*, 2009, 43(9): 2373 – 2382.
- [24] 郭香麟, 左剑恶, 史绪川, 等. 餐厨垃圾与秸秆混合中温和高温

- 厌氧消化对比[J]. *环境科学*, 2017, 38(7): 3070 – 3077.
- [25] 宋壮壮, 吕爽, 刘哲, 等. 厌氧氨氧化耦合反硝化工艺的启动及微生物群落变化特征[J]. *环境科学*, 2019, 40(11): 5057 – 5065.
- [26] BAKER A B, TAWABINI B, NAZAL M, et al. Efficiency of Thermophilic Bacteria in Wastewater Treatment[J]. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2021, 46(1): 123 – 128.
- [27] HE C., ZHANG BG, YAN WY, et al. Enhanced Microbial Chromate Reduction Using Hydrogen and Methane as Joint Electron Donors[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020(395): 122648.
- [28] PENG X, ZHANG S, LI L, et al. Long-term high-solids anaerobic digestion of food waste: Effects of ammonia on process performance and microbial community[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 262: 148 – 158.
- [29] 李旭, 冯磊, 甄箫斐, 等. 基于 CSTR 反应器鸡粪秸秆共消化产甲烷特性及菌群变化研究[J]. *环境科学学报*, 2021, 41(08): 3312 – 3323.
- [30] LIN L, YU Z, LI Y. Sequential batch thermophilic solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass via recirculating digestate as inoculum – Part II: Microbial diversity and succession[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 241: 1027 – 1035.
- [31] SUN LW, TOYONAGA M, OHASHI A, et al. Lentimicrobium saccharophilum gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium representing a new family in the phylum Bacteroidetes, and proposal of Lentimicrobiaceae fam. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(7): 2635 – 2642.
- [32] HANIA W B, GODBANE R, POSTEC A, et al. Defluviitoga tunisiensis gen. nov. sp. nov. a thermophilic bacterium isolated from a mesothermic and anaerobic whey digester[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62: 1377 – 1382.
- [33] MAUS I., KOECK D. E., CIBIS K. G., et al. Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 171.
- [34] WU ZY., NGUYEN D., LAM TY., et al. Synergistic association between cytochrome bd-enSCODed Proteiniphilum and reactive oxygen species (ROS)-scavenging methanogens in microaerobic-anaerobic digestion of lignocellulosic biomass[J]. *Water Research*, 2021, 190: 116721.
- [35] KOECK D E., HAHNKE S., ZVERLOV VV. Herbinix luporum sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(10): 4132 – 4137.
- [36] ESQUIVEL-ELIZONDO S., BAGIC C., TEMOVSKA M., et al. The Isolate Caproiciproducens sp. 7D4C2 Produces n-Caproate at Mildly Acidic Conditions From Hexoses: Genome and rBOX Comparison With Related Strains and Chain-Elongating Bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 594524.
- [37] TIAN GL, YANG B, DONG MH, et al. The effect of temperature on the microbial communities of peak biogas production in batch biogas reactors[J]. *Renewable Energy*, 2018, 123: 15 – 25.
- [38] KRAUSE L., DIAZ N N, EDWARDS R A, et al. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor[J]. *Journal and Biotechnology*, 2008, 136(1-2): 91 – 101.
- [39] 杨冰, 卢向阳, 田云. 甲烷八叠球菌研究进展[J]. *化学与生物工程*, 2012, 29(12): 7 – 11.
- [40] MBADINGA SM., LI KP., ZHOU L. Analysis of alkane-dependent methanogenic community derived from production water of a high-temperature petroleum reservoir[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(2): 531 – 542.
- [41] 麻婷婷, 承磊, 刘来雁, 等. 不同抑制剂对乙酸降解产甲烷及产甲烷菌群结构的影响[J]. *微生物学报*, 2015, 55(5): 587 – 597.
- [42] 盛多红. 嗜嗜热古菌基因组的热稳定性[J]. *生命科学*, 2014, 26(1): 64 – 71.
- [43] SUTER B, GRAHAM C, STAGLJAR I. Exploring protein phosphorylation in response to DNA damage using differentially tagged yeast arrays[J]. *Biotechniques*, 2008, 45(5): 581 – 584.
- [44] DAI Y, GRANT S. New insights into checkpoint kinase 1 (Chk1) in the DNA damage response (DDR) signaling network: Rationale for employing Chk1 inhibitors in cancer therapeutics[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(2): 376 – 383.
- [45] KUNDU K, SHARMA S, SREEKRISHNAN T R. Changes in microbial communities in a hybrid anaerobic reactor with organic loading rate and temperature[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 129(2): 538 – 547.
- [46] GAO W J, LEUNG K T, QIN W S, et al. Effects of temperature and temperature shock on the performance and microbial community structure of a submerged anaerobic membrane bioreactor[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19): 8733 – 8740.
- [47] LIN Q, HE GH, RUI JP., et al. Microorganism-regulated mechanisms of temperature effects on the performance of anaerobic digestion[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 96.
- [48] WITTEBOLLE L, MARZORA TI M, CLEMENT L, et al. Initial community evenness favours functionality under selective stress[J]. *Nature*, 2009, 458(7238): 623.
- [49] 潘婧冉, 高苏, 赵国柱, 等. 餐厨垃圾厌氧消化处理主要过程的微生物群落结构分析[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(11): 2886 – 2899.
- [50] ROS M., OLIVEIRA JD., MURCIA MDP, et al. Mesophilic anaerobic digestion of pig slurry and fruit and vegetable waste: Dissection of the microbial community structure[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2017, 156: 757 – 765.
- [51] GUO X, CHENG W, SUN F, et al. A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 152: 420.