

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2018020702

苏建聪, 何青山, 李秀芬, 等. 含硫酸根的高碳氮比废水产甲烷强化技术及酶学机制[J]. 环境化学, 2019, 38(1): 217-223.

SU Jiancong, HE Qingshan, LI Xiufen, et al. Enhancement of methane production from high C/N ratio wastewater containing sulfate and its enzymatic mechanism[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(1): 217-223.

含硫酸根的高碳氮比废水产甲烷强化技术及酶学机制*

苏建聪^{1,2} 何青山^{1,2} 李秀芬^{1,2**} 王新华^{1,2} 任月萍^{1,2}

(1. 江南大学环境科学与工程学院, 无锡, 214122; 2. 江苏省厌氧生物技术重点实验室, 无锡, 214122)

摘要 污泥蛋白质回收已成为剩余污泥资源化的有效途径之一, 研究其提取残液的产甲烷强化技术不仅可助力剩余污泥蛋白质提取技术的应用进程, 也可为化工、食品行业高硫酸根和高碳氮比废水的厌氧生物处理提供有益参考. 结果表明, 铁及其螯合物添加不仅可有效促进水解酸化与产甲烷过程关键酶的活性, 还可显著抑制亚硫酸盐还原酶的活性, 产气效果得到明显提高. 当添加 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨三乙酸与 $40 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 零价铁时, 累积产气率达 $196.2 \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\text{COD}$, 与对照实验相比, 提高了 123.97%. 多糖是含硫酸根的高碳氮比废水产甲烷的主要底物. 结合关键酶活性的变化发现, 与酸化过程相比, 多糖与蛋白质水解是提高产甲烷效果的限速步骤.

关键词 碳氮比, SO_4^{2-} , 甲烷, 铁, 酶, 污泥.

Enhancement of methane production from high C/N ratio wastewater containing sulfate and its enzymatic mechanism

SU Jiancong^{1,2} HE Qingshan^{1,2} LI Xiufen^{1,2**} WANG Xinhua^{1,2} REN Yueping^{1,2}

(1. School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China;

2. Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, Wuxi, 214122, China)

Abstract: Recovery of sludge protein has become one of the most efficient routes for utilizing waste activated sludge (WAS). It is helpful for the application of WAS protein recovery and will provide useful information for high C/N ratio wastewater containing sulfate from chemical and food industries to study the enhancement of methane production from wastewater of protein recovery. The results showed that the addition of iron and its chelate efficiently enhanced methane production via promoting the activities of key enzymes of hydrolytic acidification and inhibiting those of sulfate reductase. When $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrilotriacetic acid (NTA) and $40 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{Fe}^0$ were added, the cumulative biogas production rate reached $196.2 \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\text{COD}$. It increased by 123.97%, compared with the control. The polysaccharides were the main substrate for methane production from high C/N ratio wastewater containing sulfate. The hydrolysis of polysaccharides and proteins was the limiting step to improve methane production, compared with the acidification process, by integrating the variations in the activities of key enzymes.

Keywords: C/N ratio, SO_4^{2-} , methane, iron, enzyme, sludge.

2018年2月7日收稿 (Received: February 7, 2018).

* 国家水体污染控制与治理科技重大专项子课题 (2015ZX07306001-5), 国家重点研发计划课题 (2016YFC0400707) 和江苏省“六大人才高峰”项目 (2011-JNHB-004) 资助.

Supported by the National Water Pollution Control and Control Science (2015ZX07306001-5), National Key R & D Program Project (2016YFC0400707) and Province "Six Talents Peak" Project of Jiangsu Province (2011-JNHB-004).

** 通讯联系人, Tel: 0510-85326516, E-mail: xfli@jiangnan.edu.cn

Corresponding author, Tel: 0510-85326516, E-mail: xfli@jiangnan.edu.cn

据报道,我国每年产生约 3000—4000 万吨的污水处理厂剩余污泥,大多简单堆放后,定期运送到垃圾填埋场填埋,或自然风干脱水后焚烧供热,这些处理处置方式成本较高,且易导致土壤及大气环境的二次污染^[1].剩余污泥含有丰富的可利用有机物,以蛋白质为例,我国污水处理厂剩余污泥中粗蛋白含量约为 28.7%—40.9%,如能回收利用则可变废为宝.污泥蛋白质主要来自微生物胞内^[2],需先采用物理法、化学法或生物法等方法破胞^[3],然后,再采用浓缩法或沉淀法进行分离纯化,进而获得污泥蛋白质粗品^[4].采用酶解技术水解剩余污泥后,可有效回收污泥蛋白质,所得蛋白质粗品含有 7 种必需氨基酸,其重金属含量也满足我国饲料相关标准^[3].剩余污泥热碱水解后,采用等电点沉淀法回收污泥蛋白质,所得蛋白质产品的粗蛋白及必需氨基酸含量均较高,分别为 49.5%和 12.37%,与原剩余污泥相比,重金属削减率在 90%以上,所得蛋白质粗品不存在重金属污染风险^[4].可见,回收污泥蛋白质已成为实现剩余污泥资源化的有效途径之一.

然而,等电点沉淀提取蛋白质的过程中,需采用硫酸调节 pH 值至 3.5—5.5,以使蛋白质沉淀分离,这就导致提取残液的硫酸根含量较高^[5],对厌氧产甲烷过程不利;另一方面,蛋白质的分离提取导致残液氮素缺失,碳氮比升高到 80—100^[5],而厌氧产甲烷的最佳碳氮比为 20—25^[6].因此,尽管蛋白质提取残液的 COD 浓度较高,但较难直接进行高效的厌氧生物处理,更不能随意排放.寻找含硫酸根的高碳氮比废水的高效厌氧生物处理技术可为剩余污泥资源化提供有力保障.

本研究以含硫酸根、高碳氮比的剩余污泥蛋白质提取残液为研究对象,研究铁及螯合剂添加强化其厌氧产甲烷的效果,并通过产甲烷过程中关键酶活性的变化研究,分析强化机理,不仅可助力剩余污泥蛋白质提取技术的应用进程,也可为化工、食品行业高硫酸根和高碳氮比废水的厌氧生物处理提供有益参考.

1 材料与方法 (Material and methods)

1.1 实验材料

实验用剩余污泥蛋白提取残液取自本课题组污泥蛋白质提取小组,其组成如表 1 所示.由表 1 可见,提取残液的碳氮比为 118.95,硫酸根浓度为 1242.10 mg·L⁻¹,pH 值为 3.5.

表 1 蛋白提取残液的组成

Table 1 Constituent of wastewater from protein recovery

组成成分 Constituent	浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)	组成成分 Constituent	浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)
COD	6346.15±611.23	氨氮	53.35±2.74
硫酸根	1242.10±174.43	总磷	143.41±9.99
多糖	1765.30±13.21	蛋白质	1172.48±17.30
VFAs	653.74±32.48	Fe	9.71±1.12
As	0.30±0.03	Hg	0.25±0.03
Pb	≤ 0.01	Cd	≤ 0.01
Cr	0.37±0.05	Cu	0.72±0.06
pH	3.5	C/N	118.95

厌氧产甲烷用接种污泥取自无锡市太湖新城污水处理厂厌氧池,污泥 pH 7.2,VSS/TSS 为 0.70.接种前,采用模拟有机废水恒温(35±1 °C)驯化培养,模拟废水组成如表 2 所示.模拟废水 pH 值为 7.0,厌氧产甲烷过程的水力停留时间为 5 d,驯化时间约 1 个月.当废水 COD 去除率和产气量稳定时,驯化结束.

1.2 实验方法

在 4 个 250 mL 的反应瓶中,分别加入适量蛋白质提取残液,同时接种驯化好的厌氧污泥,接种污泥浓度为 30 g·L⁻¹,混合均匀后,调节体系初始 pH 值至 7.0.参照已有研究报道^[7-10],铁以零价铁(Fe⁰)的形式添加,螯合剂选用氨三乙酸(nitriilotriacetic acid, NTA),分别设置对照实验、10 μmol·L⁻¹ NTA、

40 mg·L⁻¹ Fe⁰和 10 μmol·L⁻¹ NTA+40 mg·L⁻¹ Fe⁰,研究铁及其螯合剂添加强化含硫酸根的高碳氮比废水厌氧产甲烷的效果.混匀后,用橡胶塞密封反应瓶,置于 35±1 °C 恒温室中厌氧产甲烷.期间,每天振荡反应瓶 1 次.当累积产气量不再增加时(16 d),结束实验.每个实验设置 3 平行.

表 2 模拟有机废水的组成

Table 2 Constituent of simulated organic wastewater

组成成分 Constituent	浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)	组成成分 Constituent	浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)
葡萄糖	6000	氯化铵	0.2
碳酸氢钠	0.4	七水合硫酸镁	0.2
六水合氯化钴	0.04	磷酸二氢钾	0.04
六水合氯化镍	0.09	无水氯化钙	0.02
硫酸锌	0.02	酵母膏	0.6
七水合硫酸亚铁	0.02	五水合硫酸铜	0.002

1.3 分析测试项目与方法

产气量采用碱液吸收法测定^[11].多糖浓度采用苯酚-硫酸法测定^[11],蛋白质浓度采用考马斯亮蓝法测定^[11],硫酸根浓度采用铬酸钼分光光度法测定^[11].

β -葡萄糖苷酶活性采用 β -葡萄糖苷底物法测定^[12].BAA-蛋白水解酶活性采用 BAA(N- α -benzoyl-L-argininamide)底物法测定^[13].乙酸激酶(acetate kinase, AK)与磷酸转乙酰酶(phosphotransacetylase, PTA)活性的测定分别采用 Rose 和 Andersch 法^[14].辅酶 F₄₂₀活性的测定采用 Eirich 法^[15].氢化酶活性的测定采用甲基紫晶分光光度法^[16].亚硫酸盐还原酶与磷酸腺苷硫酸(adenosine phosphosulfate, APS)还原酶的活性分别采用 Ostrowski 法和高铁氰化钾还原法测定^[17].

其他分析项目均采用国家标准方法测定^[11].

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 铁及其螯合剂对体系累积产气率的影响

本研究的处理对象为等电点沉淀蛋白质后的污泥水解残液,含有较高的硫酸根.含硫酸根废水厌氧产甲烷过程中,硫酸盐还原菌(sulfate reducing bacteria, SRB)易占主导地位,产生较多的 S²⁻,不仅抑制产甲烷菌(methane production bacteria, MPB)的活性,也会导致产甲烷菌必须的微量金属元素沉淀,降低产甲烷效率^[18].同时,因蛋白质的提取导致废液碳氮比失调,高达 118.95,较高的碳氮比影响有机物的发酵类型,不利于产甲烷过程的进行^[14].此外,由于蛋白质提取前,采用热碱法水解剩余污泥,大部分金属离子通过氢氧化物沉淀随水解残渣废弃,提取残液中金属元素缺失,同样不利于体系产甲烷.鉴于此,本研究重点考察铁及其螯合剂添加对蛋白质提取残液产甲烷的强化效果.

结果表明,铁及其螯合剂的添加可显著促进高碳氮比的蛋白质提取残液的产甲烷过程,这说明蛋白质提取残液中微量金属元素十分缺乏,适量补充有利于产甲烷活性的提高.与对照试验相比,添加 10 μmol·L⁻¹ NTA、40 mg·L⁻¹ Fe⁰和 10 μmol·L⁻¹ NTA+40 mg·L⁻¹ Fe⁰的累积产气率分别提高了 69.18%、102.85%和 123.97%,其中,铁及其螯合剂联合添加的促进效果最为明显,当添加 10 μmol·L⁻¹ NTA+40 mg·L⁻¹ Fe⁰时,累积产气率最高,达 196.2 mL·g⁻¹COD(表 3).铁的添加可有效补充体系中的微量金属元素,而 NTA 是金属离子的螯合剂,其添加可有效提高铁对体系中微量金属元素的补充效果,在一定程度上缓解氮源相对缺乏给产甲烷(CH₄)带来的不利影响,同时,抑制硫酸根还原过程,强化产甲烷效果.

2.2 铁及其螯合剂对多糖与蛋白质降解率的影响

铁及其螯合剂的添加在促进产甲烷的同时,提高了底物的降解率,且其促进效果与产气率的变化趋势一致.对照体系的多糖与蛋白质降解率分别为 43.10%和 39.49%(图 1),添加 10 μmol·L⁻¹ NTA、40 mg·L⁻¹ Fe⁰和 10 μmol·L⁻¹ NTA+40 mg·L⁻¹ Fe⁰后,体系多糖与蛋白质降解率分别提高到 66.37%和 53.74%、66.77%和 58.62%、77.29%和 69.34%,多糖的降解率始终高于蛋白质.本研究中,由于处理对象

为提取蛋白质后的残液,氮素较为缺乏,多糖是产甲烷的重要底物.当添加 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NTA+ $40 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe^0 时,多糖与蛋白质降解率高于 NTA 和零价铁单独添加的情况,联合添加具有协同促进效果.这是否与铁及其螯合剂促进多糖与蛋白质降解关键酶的活性有关,有待进一步研究.

表 3 铁及其螯合剂对体系累积产气率的影响

Table 3 Effect of Fe and chelant on cumulative gas production rate

	对照实验 Control	$10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NTA	$40 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe^0	$10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NTA+ $40 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe^0
累积产气率 Cumulative gas production rate/($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\text{COD}$)	87.6 ± 5.4	148.2 ± 3.5	177.7 ± 3.1	196.2 ± 3.7

2.3 铁及其螯合剂对体系水解酸化关键酶活性的影响

高效的水解酸化过程是产甲烷的必要前提,该过程可将大分子有机物及颗粒转化为小分子有机物,进而转化为产甲烷菌易利用的挥发性脂肪酸,提高产甲烷效果,而上述过程均是在酶的催化作用下完成的.因此,研究铁及其螯合剂对体系水解酸化关键酶活性的影响,有利于深入理解其促进机理.

(1) 多糖与蛋白质水解酶活性的变化

β -葡萄糖苷酶,又名 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶,能够水解末端的 β -葡萄糖苷键,释放 β -D-葡萄糖和与之对应的配基,其活性的提高有利于多糖降解^[19].BAA-蛋白水解酶可催化多肽或蛋白质水解,并将大分子的蛋白质水解为小分子氨基酸^[19].

与体系产气率及底物降解率的变化趋势一致,铁及其螯合剂的添加使得 β -葡萄糖苷酶及 BAA-蛋白水解酶活性显著提高(图 2).当添加 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NTA+ $40 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe^0 时, β -葡萄糖苷酶活性最高,为 $3.11\times 10^4 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}$,比空白对照实验提高了 2.53 倍,而 BAA-蛋白水解酶活性提高了 0.46 倍,铁及其螯合剂的添加对后者的促进效果不如 β -葡萄糖苷酶显著,这与多糖和蛋白质降解率的变化相符(图 1).根据 β -葡萄糖苷酶的催化机理,催化多糖水解反应是通过酶的亲核基团与底物中糖苷键 O 原子结合完成的,同时,该过程需 H^+ 参与,而零价铁可腐蚀提供 H^+ ,因此,其添加可提高多糖的水解及降解效果^[20].BAA-蛋白水解酶与 β -葡萄糖苷酶的结构不同,其活性中心由一种或者几种金属元素以及氨基酸构成,催化蛋白质水解反应时,仅提高微量金属元素溶解度及其可生物利用性存在一定局限,蛋白质降解的促进效果不明显.NTA 可通过螯合作用提高体系中微量金属元素的溶解度,进而在一定程度上提高相关酶活性.

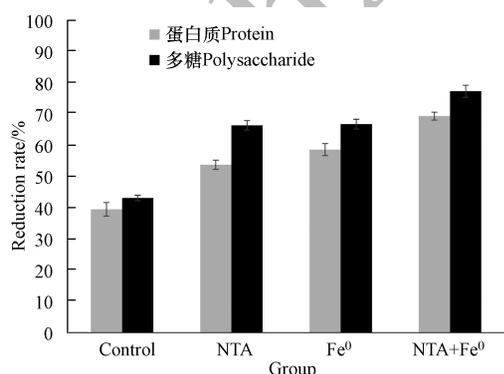


图 1 铁及其螯合剂对多糖与蛋白质降解率的影响

Fig.1 Effect of Fe and chelant on reduction rate of protein and polysaccharide

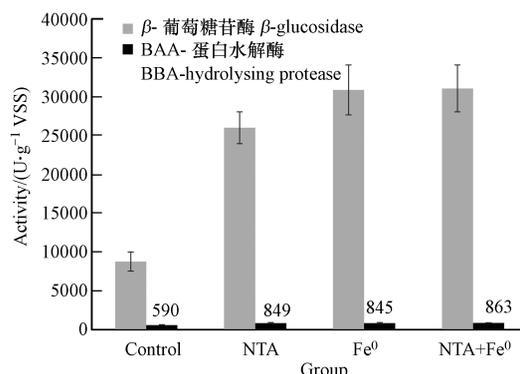


图 2 铁及其螯合剂对 β -葡萄糖苷酶与 BAA-蛋白水解酶活性的影响

Fig.2 Effect of Fe and chelant on activity of β -glucosidase and BAA-hydrolysing protease

(2) 产乙酸关键酶活性的变化

乙酸是产甲烷的优良底物,乙酸形成过程中,AK 和 PTA 起着重要作用.已有研究表明,高碳氮比条件下,底物的发酵类型发生改变,不利于体系产乙酸^[14],进而影响产甲烷效率.适量的零价铁可促进污

泥的水解酸化,提高蛋白质和纤维素转化为有机酸特别是乙酸的效率,同时,提高蛋白酶、纤维素酶、AK 和 PTA 的活性^[20-21].废铁屑能够促进厌氧发酵反应器水解酸化过程中丙酸的转化,进而提高产气效率,AK 和 PTA 等关键酶活性也得以显著提高^[22].然而,以上研究均是在传统厌氧体系中完成的,其对高硫酸根、高碳氮比废水的促进作用有待进一步探究.

结果表明,铁及其螯合剂添加有利于体系产乙酸关键酶活性的提高,进而为产甲烷菌提供更多的可利用底物(图 3).与对照实验相比,添加 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NTA、 $40 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe^0 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NTA+ $40 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe^0 , AK 和 PTA 活性分别提高了 74.23% 和 200.00%、426.80% 和 433.33%、416.49% 和 400.00%,铁及其螯合剂对乙酸形成的促进效果明显高于其对多糖及蛋白质降解的促进效果,说明多糖和蛋白质降解是产甲烷过程的限速步骤.此外,单独添加零价铁时,AK 与 PTA 活性最高,分别为 5.11 、 $0.16 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}$,其促进效果远高于 NTA,说明污泥蛋白质提取残液中微量金属元素较为缺乏,适量补充金属元素对水解酸化过程十分必要.

2.4 铁及其螯合剂对体系产甲烷关键酶活性的影响

本质上,有机物厌氧产甲烷过程是产甲烷菌利用一系列生化反应将 CO_2 或甲基化合物中的甲基还原为甲烷的过程,而这一系列生化反应是在不同酶的催化作用下完成的^[23].而这些酶大多以某种微量金属元素作为活性中心,因此,微量金属元素浓度及其生物可用性在产甲烷过程中十分关键.辅酶 F_{420} 广泛存在于 MPB 中,作为一种低电位的电子载体,在产甲烷过程中起着重要作用^[19].通常,氧化态辅酶 F_{420} 作为电子受体被氢化酶催化还原,而还原态的辅酶 F_{420} 则以 H_2 作为电子供体,把电子传递给产甲烷过程中需要电子还原的反应,因此,氢化酶与辅酶 F_{420} 在产甲烷过程中起着不可忽视的作用^[16].这里,采用氢化酶与辅酶 F_{420} 活性的变化表征铁及其螯合剂对产氢过程的影响.

可见,当零价铁与 NTA 联合添加时,体系氢化酶活性最高,为 $84.7 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}$,与对照实验相比,提高了 6.12 倍(图 4),辅酶 F_{420} 活性则由对照实验的 $0.20 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}$ 提高至 $1.11 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}$,提高了 4.55 倍.一方面,零价铁作为电子供体,具有较强的还原性,利于腐蚀产氢,有利于产甲烷.另一方面,氢化酶的活性中心由 Fe-S 簇构成^[24],铁的添加有利于提高氢化酶的活性,促进产甲烷.

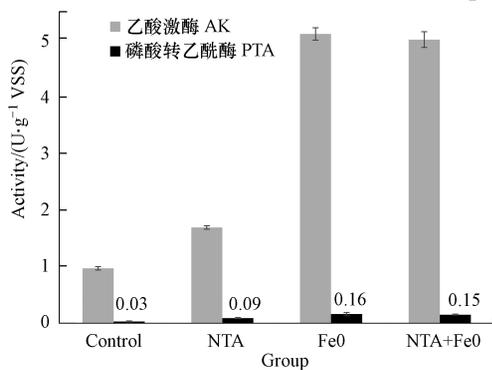


图 3 铁及其螯合剂对乙酸激酶和磷酸转乙酰酶活性的影响

Fig.3 Effect of Fe and chelant on activity of AK and PTA BAA-hydrolysing protease

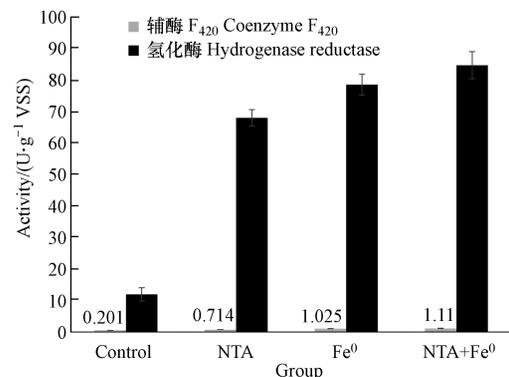


图 4 铁及其螯合剂对产甲烷菌关键酶活性的影响

Fig.4 Effect of Fe and chelant on activity of key enzymes of MPB BAA-hydrolysing protease

2.5 铁及其螯合剂对体系硫酸盐还原关键酶活性的影响

APS 还原酶是硫同化途径中的一种关键酶,其对硫酸盐的还原及硫化物的氧化具有重要的调节作用,亚硫酸盐还原酶则可催化亚硫酸盐还原为硫化物,因此,二者活性的变化可反映铁及其螯合剂对体系硫酸盐还原及产甲烷过程的影响.由图 5 可知,铁及其螯合剂的添加对 APS 还原酶的活性没有显著影响,但对亚硫酸盐还原酶的活性抑制作用则十分显著.当添加 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NTA+ $40 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe^0 时,亚硫酸盐还原酶的活性最低,为 $87.7 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}$,与对照实验相比下降了 210.33%.已有研究也发现,添加铁可抑制亚硫酸盐还原酶的活性,但具体机理尚不明确^[25].结合表 2 和图 4 结果可知,在高碳氮比条件下,铁及其螯合剂可显著提高产甲烷活性,硫酸盐还原过程失去竞争底物方面的优势,导致亚硫酸盐还原酶活

性降低,硫酸盐还原过程受到抑制.

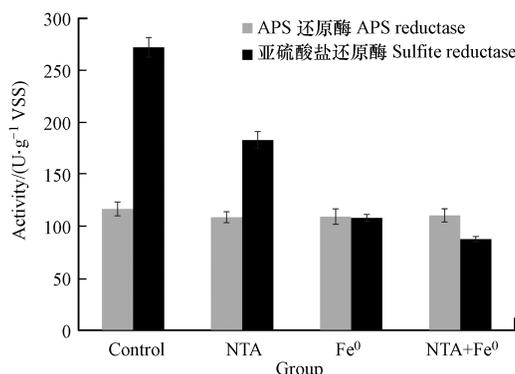


图5 铁及其螯合剂对硫酸盐还原关键酶活性的影响

Fig.5 Effect of Fe and chelant on activity of key enzymes of SRB BAA-hydrolysing protease

3 结论 (Conclusion)

铁及其螯合物可显著提高含硫酸根的高碳氮比废水的厌氧产气效果,当联合添加 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NTA 与 $40 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe^0 时,累积产气率达 $196.2 \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\text{COD}$,与对照实验相比,提高了 123.97%.相应地,体系水解酸化过程的关键酶与产甲烷过程关键酶活性明显提高,而亚硫酸盐还原酶的活性却受到显著抑制.铁的添加可有效补充体系中的微量金属元素,而 NTA 是金属离子的螯合剂,其添加可有效提高铁对体系微量金属元素的补充效果,在一定程度上缓解氮源相对缺乏给产甲烷带来的不利影响,同时,抑制硫酸根还原过程,强化产甲烷效果.

参考文献 (References)

- [1] 陈冠宏,陈旭婷. 浅谈污泥处理处置工艺[J]. 广东化工,2016,43(13):170-172.
CHEN G H, CHEN X T. Introduction to sludge treatment and disposal technology [J]. Guangdong Chemical Industry, 2016, 43(13): 170-172 (in Chinese).
- [2] 金鹏康,陈飞,章佳昕,等. 活性污泥胞外聚合物的分层组分及溶解性微生物代谢产物的特性[J]. 环境化学, 2015, 34(7): 1323-1328.
JIN P K, CHEN F, ZHANG J X, et al. Characteristics of the stratification components of extracellular polymeric substances and soluble microbial products in activated sludge [J]. Environmental Chemistry, 2015, 34(7):1323-1328 (in Chinese).
- [3] 苏景瑞. 剩余污泥酶法水解制备蛋白质氨基酸及其机理研究[D]. 上海:东华大学,2013.
SU J R. Mechanism research on extraction protein and animal acids from the excess sludge by enzymatic hydrolysis [D]. Shanghai: Donghua University, 2013 (in Chinese).
- [4] 施正华,李秀芬,宋小莉,等. 采用等电点沉淀法回收市政污泥水解液中的蛋白质[J]. 环境工程学报, 2016, 10(10): 367-371.
SHI Z H, LI X F, SONG X L, et al. Protein recovery from hydrolysis solution of municipal sludge by isoelectric point precipitation [J]. Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(10): 367-371 (in Chinese).
- [5] 施正华. 剩余污泥热碱水解液中蛋白质的分离提取技术研究 [D]. 无锡:江南大学,2017.
SHI Z H. Study on separation of protein from alkaline thermal hydrolysate of waste activated sludge [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017 (in Chinese).
- [6] 高廷耀,顾国维,周琪,等. 水污染控制工程 [M]. 第三版. 北京:高等教育出版社,2007.
GAO T Y, GU G W, ZHOU Q, et al. Environmental engineering Specialty [M]: Third edition. Beijing: Higher Education Press, 2007 (in Chinese).
- [7] 胡庆昊. 镍及其螯合物对甲烷发酵的影响及机理研究 [D]. 无锡:江南大学,2008.
HU Q H. The effect of trace metal nickel in methane fermentation [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008 (in Chinese).
- [8] 张万钦,吴树彪,郎乾乾,等. 微量元素对沼气厌氧发酵的影响 [J]. 农业工程学报,2013,29(10):1-11.
ZHANG W Q, WU S B, LANG Q Q, et al. Trace elements on influence of anaerobic fermentation in biogas projects [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2013, 29(10): 1-11 (in Chinese).
- [9] HU Q H, LI X F, CHEN J, et al. Effect of nitrilotriacetic acid on batch methane fermentation of sulfate-containing wastewater [J]. Process

- Biochemistry, 2008, 43: 553-558.
- [10] HU Q H, LI X F, DU G C, et al. Enhancement of methane fermentation in the presence of Ni^{2+} chelators [J]. Engineering Journal, 2008, 38: 98-104.
- [11] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
State Environmental Protection Administration. Methods for Monitoring and Analysis of Water and Wastewater [M]. Fourth Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002 (in Chinese).
- [12] LI Y, RYSZARD J. Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006 (39): 568-572.
- [13] LU S G, TSUYOSHI I, MASAO U, et al. Start-up performances of dry anaerobic mesophilic and thermophilic digestions of organic solid wastes [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19: 416-420.
- [14] 刘和, 刘晓玲, 邱坚, 等. C/N 对污泥厌氧发酵产酸类型及代谢途径的影响 [J]. 环境科学学报, 2010, 30(2): 340-346.
LIU H, LIU X L, QIU J, et al. The effects of C/N ratio on the production of volatile fatty acids and the metabolic pathway of anaerobic fermentation of sewage sludge [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(2): 340-346 (in Chinese).
- [15] LE C Q, JOSEPH E, NGUYEN T, et al. Optimization of expression and purification of recombinant archeoglobus fulgidus F_{420}H_2 : NADP^+ oxidoreductase, an F_{420} cofactor dependent enzyme [J]. Protein Journal. 2015, 34: 391-397.
- [16] 尹小波, 连莉文, 徐洁泉, 等. 产甲烷过程的独特酶类及生化监测方法 [J]. 中国沼气, 1998(3): 8-13.
YIN X B, LIAN L W, XU J Q, et al. Unique Enzymes and Biochemical Monitoring Methods in Methanogenesis [J]. China Biogas, 1998 (3): 8-13 (in Chinese).
- [17] 常磊峰. 硫酸盐还原分离菌 APS 还原酶和亚硫酸盐还原酶的纯化及性质研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2008.
CHANG L F. Isolation, purification and properties of APS reductase and sulfate reductase from sulfate-reducing bacterium [D]. Huhehot: Inner Mongol Normal University, 2008 (in Chinese).
- [18] 蔡靖, 郑平, 张蕾. 硫酸盐还原菌及其代谢途径 [J]. 科技通报, 2009, 25(4): 427-431.
CAI J, ZHENG P, ZHANG L. Sulfate-reducing bacteria and their metabolic pathway [J]. Bulletin of Science and Technology, 2009, 25 (4): 427-431 (in Chinese).
- [19] 马素丽, 刘浩, 严群. Fe^{2+} 对太湖蓝藻厌氧发酵产甲烷过程中关键酶的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(2): 306-310.
MA S L, LIU H, YAN Q. Effect of Fe^{2+} concentration on the enzymes during methane production from Taihu blue algae by anaerobic digestion [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(2): 306-310 (in Chinese).
- [20] FENG Y H, ZHANG Y B, XIE Q, et al. Enhanced anaerobic digestion of waste activated sludge digestion by the addition of zero valent iron [J]. Water Research, 2014, 52: 242-250.
- [21] ZHANG H Y, TIAN Y, WANG L, et al. Effect of ferrous chloride on biogas production and enzymatic activities during anaerobic fermentation of cow dung and Phragmites straw [J]. Biodegradation, 2016, 27: 69-82.
- [22] MENG X S, ZHANG Y B, LI Q, et al. Adding Fe^0 powder to enhance the anaerobic conversion of propionate to acetate [J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 73: 80-85.
- [23] 方晓瑜, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 产甲烷生化代谢途径研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(1): 1-9.
FANG X Y, LI J B, RUI J P, et al. Research progress in biochemical pathways of methanogenesis [J]. Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21(1): 1-9 (in Chinese).
- [24] 李朝正. [Fe]-氢化酶活性中心模拟物结构的理论研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2015.
LI C Z. Theoretical study on the structural mimic of the active site of [Fe]-hydrogenase [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2015 (in Chinese).
- [25] 刘晓华. 硫酸盐还原菌亚硫酸盐还原酶的初步研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006.
LIU X H. Pilot study on sulphate reducing bacteria- sulfite reductase [D]. Chengdu: Sichuan University, 2006 (in Chinese).