

微生物群落对厌氧干发酵挥发性脂肪酸抑制的响应

王思淇, 张克强, 孔德望, 高文萱, 韦红, 梁军锋, 李佳佳, 杜连柱

引用本文:

王思淇, 张克强, 孔德望, 等. 微生物群落对厌氧干发酵挥发性脂肪酸抑制的响应[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(1): 171–182.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0529>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

三种添加剂对猪粪厌氧干发酵的影响

李丹妮, 张克强, 梁军锋, 高文萱, 孔德望, 杜连柱

农业环境科学学报. 2019, 38(8): 1777–1785 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0587>

猪粪厌氧发酵消化液回流体系微生物群落结构特征与产气关系研究

孔德望, 张克强, 房芳, 高文萱, 梁军锋, 梁雨, 杜连柱

农业环境科学学报. 2018, 37(3): 559–566 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1241>

醋糟与猪粪、鸡粪不同配比的厌氧共消化产气潜力研究

周冠男, 陈琳, 郑涛, 周政忠, 袁浩然

农业环境科学学报. 2019, 38(6): 1357–1364 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-1329>

生物质飞灰对餐厨垃圾两相厌氧消化的影响

黄红辉, 王德汉, 罗子锋, 尚卫辉

农业环境科学学报. 2018, 37(6): 1277–1283 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1518>

蒸汽爆破/氧化钙联合预处理对水稻秸秆厌氧干发酵影响研究

王星, 李强, 周正, 贺静, 邓雅月, 张敏, 尹小波

农业环境科学学报. 2017, 36(2): 394–400 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1387>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王思淇, 张克强, 孔德望, 等. 微生物群落对厌氧干发酵挥发性脂肪酸抑制的响应[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(1): 171–182.
WANG S Q, ZHANG K Q, KONG D W, et al. Microbial community response to volatile fatty acid inhibition in dry anaerobic fermentation [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2022, 41(1): 171–182.



开放科学 OSID

微生物群落对厌氧干发酵挥发性脂肪酸抑制的响应

王思淇¹, 张克强¹, 孔德望², 高文萱¹, 韦红³, 梁军锋¹, 李佳佳¹, 杜连柱^{1*}

(1. 农业农村部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2. 杭州能源环境工程有限公司, 杭州 310020; 3. 华标(天津)科技有限责任公司, 天津 300392)

摘要:为研究挥发性脂肪酸(Volatile fatty acid, VFA)抑制对厌氧干发酵体系微生物的影响,在接种率25%[以挥发性固体(VS)计]条件下以猪粪(P组)、猪粪秸秆混合物(VS比1:1, M组)为原料开展厌氧干发酵实验,结合体系中产气性能、理化指标,分析微生物群落对VFA抑制的响应。结果表明,两组发酵体系均出现VFA抑制,且M组抑制效应更明显,体现在日甲烷产量(以VS计)一直低于0.99 mL·g⁻¹。高通量测序结果显示,VFA抑制下,2种发酵体系中细菌门以Firmicutes为主,主要优势菌属为*Clostridium sensu stricto*;优势古菌门为Euryarchaeota,氢营养型产甲烷菌*Methanosphaerula*和乙酸营养型产甲烷菌*Methanothrix*为主要优势菌属。混合发酵体系中以氢营养型产甲烷途径为主。2组发酵体系中产生的主要酸抑制种类不同,P组中酸抑制主体为丙酸,而M组中为乙酸。本实验中,猪粪秸秆混合原料比猪粪单独发酵的酸抑制作用更强,并且细菌和古菌协同作用受到阻碍,严重影响了体系的产气性能,酸抑制的发生对菌群结构的演替有很大影响。

关键词:厌氧干发酵;挥发性脂肪酸抑制;猪粪;秸秆;微生物群落

中图分类号:TQ920.1 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2022)01-0171-12 doi:10.11654/jaes.2021-0529

Microbial community response to volatile fatty acid inhibition in dry anaerobic fermentation

WANG Siqi¹, ZHANG Keqiang¹, KONG Dewang², GAO Wenxuan¹, WEI Hong³, LIANG Junfeng¹, LI Jiajia¹, DU Lianzhu^{1*}

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China; 2. Hangzhou Energy Environmental Engineering Co, Ltd, Hangzhou 310020, China; 3. Huabiao(Tianjin) Technology Co, Ltd, Tianjin 300392, China)

Abstract: This study investigated the effect of volatile fatty acid (VFA) inhibition on microorganisms in a dry anaerobic fermentation system. Pig manure (group P) and a mixture of pig manure and straw (volatile solid ratio 1:1, group M) were used as raw materials for this experiment. The microbial community response to VFA inhibition was analyzed by combining gas production performance and physical and chemical indicators. The results showed that both fermentation systems were significantly inhibited by VFA, where the inhibitory effect of group M was more obvious; this was reflected by its specific methane yield, which was <0.99 mL·g⁻¹. The results from high-throughput sequencing showed that under VFA inhibition, Firmicutes was the main bacterial phylum in the two fermentation systems, and the most abundant genus was *Clostridium sensu stricto*. Euryarchaeota dominated the archaeal community, whereas the hydrogenotrophic methanogen, *Methanosphaerula*, and the acetoclastic methanogen, *Methanothrix*, were the dominant genera. Hydrogenotrophic methanogenesis was the principle pathway for methane formation in the co-digestion system. The main acid inhibitors produced in the two

收稿日期:2021-05-06 录用日期:2021-06-28

作者简介:王思淇(1998—),硕士研究生,从事农业废弃物资源化利用研究。E-mail:sqwang1020@163.com

*通信作者:杜连柱 E-mail:dulianzhu99@163.com

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFD0800800);中国农业科学院协同创新任务(CAAS-XTX2016015);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2021-jbkyyw-dlz)

Project supported: The National Key Research and Development Program of China (2017YFD0800800); The Cooperative Innovation Task of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-XTX2016015); The Special for Fundamental Scientific Research Operation of Central-level Public Welfare Scientific Research Institutes (2021-jbkyyw-dlz)

systems differed; in group P it was propionic acid, whereas it was acetic acid for group M. In this experiment, the mixture of pig manure and straw had a stronger acid inhibitory effect than pig manure alone. Additionally, the synergistic effect of bacteria and archaea was hindered, seriously affecting the gas production performance of the system. The occurrence of acid suppression greatly influenced the succession of bacterial flora.

Keywords: dry anaerobic fermentation; volatile fatty acid inhibition; pig manure; straw; microbial community

厌氧干发酵具有节水、低能耗、低污染负荷、反应器体积小以及产气效率高等优势,是有机固体废弃物转化为生物能源的重要手段^[1]。2010—2015年,欧洲厌氧干发酵处理能力增长了50%,处理量占厌氧发酵总量的35%^[2]。在我国,厌氧干发酵逐渐引起重视,有望成为畜禽养殖粪便、作物秸秆等有机废弃物处理和资源化利用的主流工艺^[3]。厌氧干发酵按照发酵温度可分为中温(30~40℃)、嗜热(50~60℃)发酵,按照发酵过程可分为一阶段、两阶段或多阶段消化。LIAO等^[4]在厌氧消化反应器中采用改进的搅拌方式,与传统的低固厌氧消化(总固体含量为4.2%±0.4%)相比,高固厌氧消化(总固体含量为15.7%±0.4%)沼气产量提高了1.85倍。VOELKEIN等^[5]的研究结果表明,55℃、高有机负荷率[挥发性固体(VS)含量3~4 kg·L⁻¹·d⁻¹]下,单位质量VS的日甲烷产率高达405 L·kg⁻¹。ZHANG等^[6]评估餐厨垃圾与园艺废物的三阶段高温厌氧共消化产气性能,结果表明三级嗜热反应器中的平均甲烷产率分别比一级、二级高约45%和31%。

然而,厌氧干发酵由于有机负荷高、传质效率低,常常导致启动慢、效率低、周期长^[1]等问题,其中,挥发性脂肪酸(Volatile fatty acid, VFA)的积累引起的对产甲烷菌的抑制是主要原因之一^[7]。如何解除酸抑制是国内外研究的重点,目前已开发出了添加外源物质(如碱性试剂、微量元素等)、生物强化(添加或富集某种特定的菌)和消化液循环等多种技术。如WEI等^[8]的研究结果表明,加入微量元素可以缓解酸抑制作用,产甲烷量从0.13 L·g⁻¹增加至0.44 L·g⁻¹。ZHANG等^[9]的研究表明,添加NaOH调节初始pH至7.5,足以抵消厌氧消化系统pH值的下降,确保微生物的最适生长范围,从而有效缓解酸抑制效应。李丹妮等^[10]研究了蛭石、海泡石和生物炭对混合厌氧发酵过程中酸抑制的缓解效应,结果显示添加剂比例达到20%时可获得最大累积甲烷产量,并且生物炭的效果最优。LU等^[11]在接种物中添加乙酸溶液以富集耐酸性产甲烷菌,试验结果表明,在适应酸40 d后,接种抗酸接种物使得启动阶段产甲烷量显著提升。XUE等^[12]在玉米秸秆的厌氧消化中将50%

的消化液再循环,该反应器产沼气量比对照组高33.3%,平均沼气产量和甲烷产量分别比对照组高58.4%和61.5%。同时,已有大量文献报道微生物群落在厌氧共消化过程中的作用,如WANG等^[13]在对比玉米秸秆和猪粪共消化与单独消化微生物群落动态变化的实验中,采用16S rRNA测序技术,阐明共消化系统获得高甲烷产量的内在原因。本课题组前期研究结果表明,分层接种能促进系统内乙酸和丁酸的分解转化,即使在较低接种比下,仍能缩短厌氧干发酵迟滞期,提高甲烷产率,体系中较好的产甲烷性能是由于氢营养型产甲烷途径占主导地位^[14]。上述研究为缓解酸抑制、提高厌氧干发酵产气性能提供了有益借鉴。由于对酸抑制发生过程及与酸抑制密切相关的细菌、古菌的结构及功能缺乏深入研究,导致酸抑制解除技术措施缺乏足够的理论依据,效果尚有待进一步提升。

本研究以猪粪为主要原料,开展批式厌氧干发酵实验,对比酸抑制下猪粪秸秆混合发酵、猪粪单独发酵产气性能。采用MiSeq高通量测序技术并结合生物信息学,分析酸抑制下细菌和产甲烷古菌群落多样性,阐明群落结构组成和变化特征,明晰引起细菌和产甲烷古菌群落变化的主控环境因子,揭示酸抑制对厌氧干发酵体系中微观结构的影响,以期揭示厌氧干发酵酸抑制机理、开发酸抑制防控技术提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验装置与样品采集

本实验装置和所取样品与文献[14]一致。实验装置为有机玻璃材质的自制立式厌氧反应器,其有效高度为750 mm,有效内径为20 mm。装置侧面于垂直方向上设多个直径为15 mm的取样口,并用橡胶塞密封。装置顶部设有阀门控制的排气口并接铝制集气袋。猪粪和玉米秸秆均取自天津市西青区某规模化养殖场,新鲜猪粪当日采集后置于冰箱冷藏[(4±1)℃]存放,玉米秸秆自然风干后粉碎至1 mm,置于通风处干燥;接种物取自实验室上一批次实验剩余物。相关理化性质见表1。

表1 底物和接种物的理化指标

Table 1 Characteristics of substrates and inoculum

发酵原料 Material	总固体 TS/%	挥发性固体 VS/%	C/%	N/%	C/N
猪粪 Pig manure	27.5±0.7	22.0±0.3	39.4±0.2	3.9±0.3	10.1
秸秆 Corn straw	90.0±0.2	81.3±0.1	77.0±0.8	1.3±0.0	59.2
接种物 Inoculum	20.9±0.1	10.4±0.2	32.0±0.4	3.5±0.0	9.3

1.2 实验设计

本实验以猪粪为主要原料,以酸抑制下的厌氧干发酵系统为研究对象。设置猪粪单独发酵(P)、猪粪秸秆混合发酵(M)两组发酵系统。每组发酵原料的总进料量均为 10.22 kg,总固体(TS)为 20.3%,接种比为 25%(以 VS 计),其中 M 发酵组中粪料比为 1:1(以 VS 计)。每组发酵方式设 3 组平行。装料后检测气密性,向各反应器中通入氮气以创造厌氧环境,室温 [(25~35)℃]下进行发酵。

1.3 理化参数测定

采用集气袋法收集气体,每 1~2 d 测定沼气产量和甲烷百分含量;每 2~3 d 从反应器侧面取样冷藏以供理化指标测定;并根据产气情况及理化指标变化,在发酵过程中的 0 d(初始阶段)、13 d(I 阶段)、33 d(II 阶段)、45 d(III 阶段)和 78 d(IV 阶段)从反应器侧面取发酵样品冷冻保存以供微生物分析。TS 和 VS 含量、沼气产量、沼气组分和发酵体系 VFA 质量分数分析测量方法见文献[14],将取回的固体样品稀释 10 倍,振荡混匀后用 pH 计测定 pH 值。

1.4 DNA 提取与 PCR 扩增

采用 E.Z.N.A™ Mag-Bind Soil DNA Kit(OMEGA bio-tek, USA)试剂盒提取样品 DNA,利用琼脂糖凝胶检测 DNA 完整性,并用 Nanodrop 2000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific,美国)测定 DNA 含量。

针对细菌和古菌 16S rRNA 基因的 V3~V4 高变区序列^[15],分别进行 PCR 扩增。利用 Qubit3.0 DNA 检测试剂盒对基因组 DNA 精确定量,以确定 PCR 反应加入的 DNA 量。细菌第一轮扩增引物为 341F(CCCTA-CACGACGCTCTTCCGATCTG (barcode) CCTAC-GGGNGGCWGCAG) 和 805R(GACTGGAGTTCCTTG-GCACCCGAGAATTCCAGACTACHVGGGTATCTAA-TCC),第二轮扩增引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物。古菌引用槽式 PCR 扩增三轮,第一轮使用扩增引物 M-340F(CCCTAYGGGGYGCASCAG) 和 GU1ST-1000R(GGCCATGCACYWCYTCTC);第二轮使用第一轮 PCR 产物进行扩增,扩增引物为 349F(CCCTA-

CACGACGCTCTTCCGATCTN (barcode) GYGCASCAG-KCGMGA AW) 和 806R(GACTGGAGTTCCTTG-GCACCCGAGAATTCCAGACTACVSGGGTATCT-AAT);第三轮扩增中引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物。对于细菌和古菌扩增的 PCR 产物和正常扩增片段在 400 bp 以上的 PCR 产物,选用 0.6 倍的磁珠(Agencourt AMPure XP)进行 DNA 纯化回收。利用 Qubit3.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量,按照 1:1 的等量混合后测序,测序平台为 MiSeq 2×300。

1.5 数据分析

使用 Excel 2020 和 Origin 8.5 进行理化指标统计并绘制图表。在 QIIME 中调用 Uclust(1.1.579)软件,设置 97% 相似性,对有效 DNA 序列数据进行 OTU 分类,并对测序序列随机抽样,将抽到的序列数与其代表的 OTU 数目构建稀释曲线。采用 Mothur 软件进行 Alpha 多样性分析,计算 Chao、ACE、Shannon、Simpson 和 Coverage 指数。利用 RDP 软件比对 Silva 数据库进行物种分类,在门和属水平上统计样本中物种的相对丰度。选取属水平 OTU 丰度前 50 的代表性序列与数据库中与其种属信息一致的序列,使用 MUSCLE 进行多序列比对后,采用 FastTree 根据最大似然法(Approximately-maximum-likelihood phylogenetic trees)构建系统进化树,推测未被分类菌属在发酵体系中的作用。利用 Canoco 5.0 软件进行冗余分析(Redundancy analysis, RDA),评价发酵系统中环境因子对主要微生物群落结构的影响。

2 结果与讨论

2.1 酸抑制下厌氧干发酵的产气性能

图 1 为日甲烷产量(以 VS 计,下同)和沼气中甲烷含量随发酵时间的变化图。P 组的产甲烷性能在 70 d 前要优于 M 组。由图可知,P 组的启动时间长,前 28 d 日甲烷产量低于 0.59 mL·g⁻¹,之后明显升高,47 d 时达到 3.32 mL·g⁻¹,但峰值出现时间短,峰谷差较大,产气性能不稳定。与 P 组相比,10~70 d 内 M 组的日甲烷产量相近,但在 28~70 d 内明显低于 P 组。

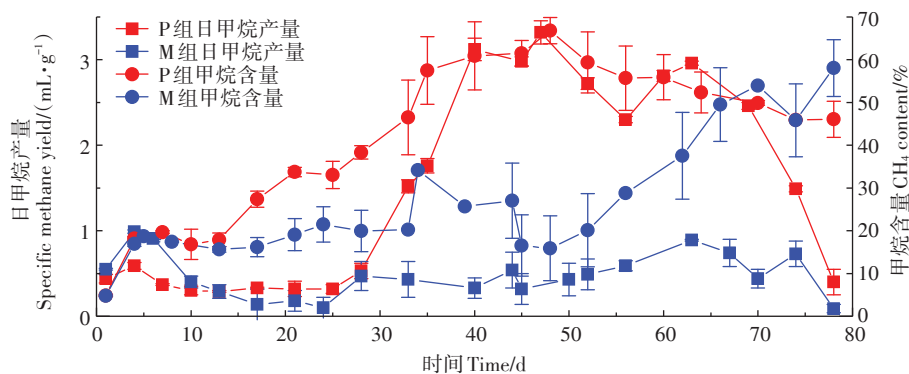


图1 P组和M组产甲烷性能比较

Figure 1 Comparison of methane production performance between P and M systems

与日甲烷产量相对应,P组的甲烷含量在28~48 d内逐渐升高至66.80%,M组甲烷含量56 d前低于30%,之后明显上升,70 d时高于50%。这表明P组和M组发酵产气受到明显抑制,M组抑制作用更强。KAIN-THOLA等^[16]的研究结果表明,厌氧共消化可以减小甲烷产生速率的峰谷差,从而确保稳定的甲烷产量。但本实验中M组产甲烷性能明显较P组差,日甲烷产量一直处于低水平状态,这可能是由于M组体系中酸化作用显著,产气效率受到影响。56 d后M组甲烷含量明显升高,表明共消化体系中的产甲烷作用得到恢复,与JIANG等^[17]研究结果相似。

2.2 厌氧干发酵酸抑制过程中pH与VFA的变化

两组发酵体系过程中pH变化如图2所示。反应初期,有机物被水解型细菌水解为VFA,而产甲烷古菌对有机固废有一定的适应期^[18],推测此时水解型细菌生长速率大于产甲烷古菌,出现酸积累,pH值相应降低。随着发酵过程的进行,产甲烷古菌能及时将体系内VFA转变为甲烷,P组的pH值于30 d后开始升高,结合图1,此时P组产甲烷速率和甲烷产量均呈上

升趋势。而M组的pH值总体上无明显升高趋势,并且体系中产气性能较差。虽然稀释固态样品测得的pH值会有一定偏差,但总体变化趋势仍能反映体系中总挥发性有机酸(TVFAs)的大致情况,以便后续对体系中VFA的变化进行深入分析。

两组发酵体系过程中VFA质量分数变化如图3所示。第8 d起,M组VFA质量分数开始高于P组,之后两组间的VFA质量分数差呈现递增趋势,并至61 d质量分数差最大,达17.23 mg·g⁻¹。8~78 d M组与P组的VFA质量分数差主要来源于丁酸,丁酸质量分数差介于2.14~11.97 mg·g⁻¹。DEMIREL等^[19]得出结论,当丙酸质量浓度超过951 mg·L⁻¹时会抑制产甲烷菌的生长,而此时加入丁酸可在一定程度上改善其抑制作用。WANG等^[20]的研究中,丁酸质量浓度最高至1 800 mg·L⁻¹时对产甲烷菌的活性没有明显抑制。本实验中P组丁酸质量分数自第45 d起开始下降,并至54 d消耗完全;M组丁酸质量分数自第15 d起直至发酵结束一直保持在9.49~12.68 mg·g⁻¹,结合图1可知,本实验中丁酸可能不是引起酸抑制效应的原因。

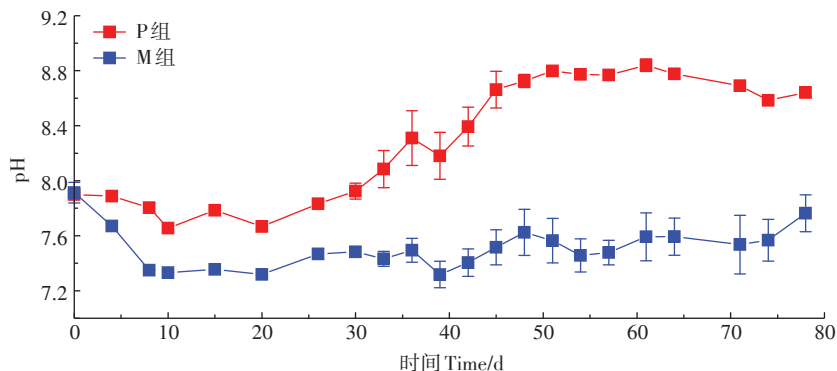


图2 厌氧干发酵过程中pH变化

Figure 2 Variations of pH during the experiment

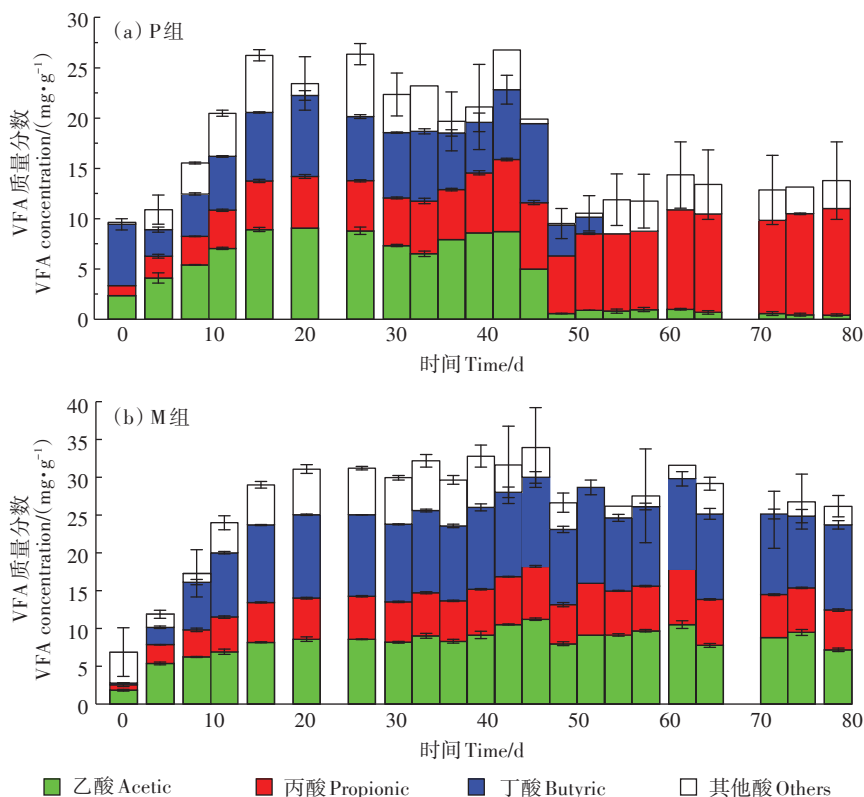


图3 厌氧干发酵过程中VFA质量分数变化

Figure 3 Variations of concentration of VFA during the experiment

由于高质量浓度的丙酸积累意味着消化失衡,在P组消化过程的后期(48 d后),丙酸作为体系中VFA的主要组成成分,会破坏厌氧消化的性能^[21],使得产气性能大幅度下降。前期研究表明,厌氧发酵体系中最适的丙酸质量浓度范围在 $800\sim3\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,超过此范围不利于产甲烷菌降解利用^[14]。本实验中,P组的丙酸质量分数在10~78 d超出抑制质量浓度($3\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),且P组丙酸质量分数在第61 d时迅速增加至 $9.89\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,发酵结束时到达峰值 $10.58\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。而在45 d后,P组乙酸质量分数从 $5.01\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 骤降至 $0.58\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,结合图1,说明本实验中P组酸抑制的主体可能是高质量分数的丙酸。M组的丙酸质量分数虽然在8~78 d超出抑制质量浓度,但在15 d至发酵结束时丙酸质量分数在 $5.18\sim7.33\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 范围内波动,而乙酸质量分数却在第48 d时下降了28.88%,结合图1,说明本实验中M组酸抑制的主体可能是高质量分数的乙酸。M组前期酸化严重,阻碍了产甲烷菌的生长,而水解产酸菌对pH的耐受范围更广^[22],对VFA耐受能力更强,因此M组前期水解过程未受到明显抑制,从而加重了混合发酵体系中的酸抑制效应。有研究报道,相比于单独消化,共消化具有多种

优势,可以改善C/N并丰富微生物群落^[23],但本研究中M组酸抑制效应更强。可能是系统有机负荷过高,水解产酸菌会产生大量VFA,而产甲烷古菌代谢速率较为缓慢,无法在短时间内快速利用产生的VFA,而造成酸抑制现象^[24],因此仍需从微生物角度分析本实验产生酸抑制效应的原因。结合前期的研究,分层接种的发酵方式可以促进体系内乙酸和丁酸的分解转化,缩短发酵迟滞期^[14],进一步证实本实验中M组发酵启动困难与体系中VFA的积累有关。

2.3 古菌和细菌多样性分析

在OTU为97%的相似性水平下,对2组发酵体系中古菌群落的多样性进行分析。由表2可见,所有样本均有99%的覆盖率,Shannon指数稀释曲线(图4a)随着序列数的增加迅速趋于平缓,表明每个样品中的主要微生物种群均具有可靠的测序深度^[25]。Chao指数和ACE指数与微生物群落的丰富度呈正相关,第I阶段两组发酵体系的菌群丰富度都有一定的下降,可能是由于体系中VFA质量分数突然增加使得物种仍处在适应期。随着发酵时间的延长,P组的物种丰富度基本呈现逐渐升高的趋势,而M组末期(第IV阶段)群落丰富度显著下降。Shannon指数与Simpson

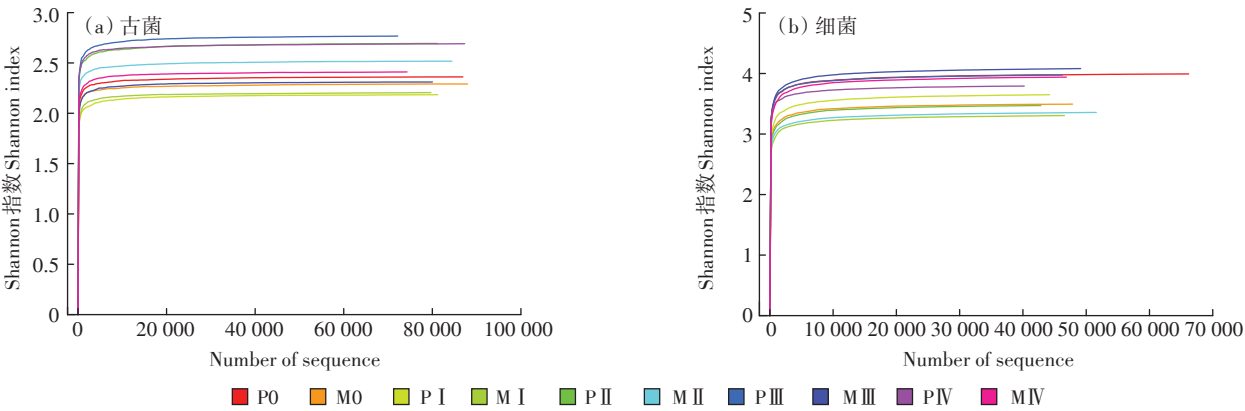


图4 古菌和细菌的Shannon指数稀释曲线图

Figure 4 Shannon rarefaction plot of archaeal and bacterial communities

指数体现了局域均匀环境下的微生物群落的多样性,Shannon指数与多样性呈正相关,Simpson指数与之相反^[26];前者强调丰富性,后者侧重于均匀性。总体上,M组的物种多样性不如P组,且发酵中后期(Ⅲ~Ⅳ阶段)OTU分布的均匀度显著降低。上述结果表明,混合发酵体系中古菌群落结构发生显著变化,物种多样性和分布均匀度都明显下降。表明VFA积累抑制了产甲烷过程,使古菌多样性下降^[27]。

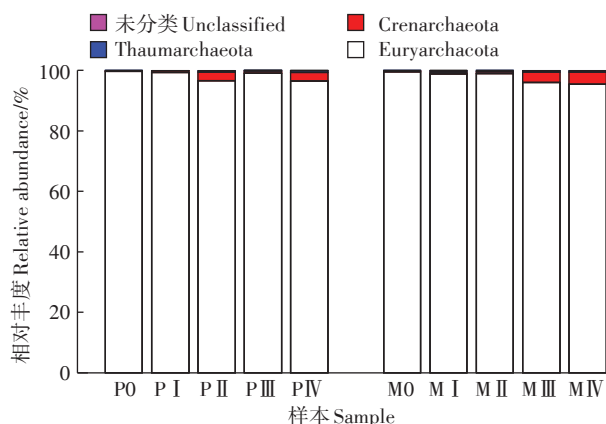
P组与M组发酵体系中古菌群落在门、属水平上的分布结果如图5所示。在门水平上主要有2种优势菌门,其中广古菌门(Euryarchaeota)占绝对优势,相对丰度在95.41%~99.66%,泉古菌门(Crenarchaeota)约占0.23%~4.08%。目前已知的产甲烷古菌主要属于Euryarchaeota,能将厌氧消化过程中分解大分子有机物产生的乙酸、H₂、CO₂和甲基类小分子物质转变成甲烷^[28]。在属水平上,专性乙酸营养型的甲烷丝菌属(*Methanothrix*)与氢营养型的甲烷微菌属(*Methanosphaerula*)、甲烷球形菌属(*Methanosphaera*)以及甲烷

短杆菌属(*Methanobrevibacter*)是2个体系中的优势菌属。其中,*Methanosphaerula*在P I中升高至45.48%后保持相对稳定,而在M组中从M0的43.04%降低至M I、M II中的28.23%和21.49%。HINSBY等^[29]的研究表明,当*Methanosphaerula*相对丰度增加时,能够促进厌氧干发酵产甲烷过程,结合图1,M组中期甲烷含量较低,且该菌的相对丰度与日甲烷产量呈正相关,这与前期的研究结果一致^[14]。*Methanothrix*相对丰度在2个发酵组中随着时间的延长呈现先增加后减少的趋势,结合图2可知,阶段I~II中VFA质量分数处于较高水平(P组:22.35~26.34 mg·g⁻¹;M组:24.58~32.17 mg·g⁻¹),此时对应的该菌相对丰度较大(P组:21.96%~22.97%;M组:37.06%~38.32%),可见*Methanothrix*相对丰度与VFA质量分数呈正相关。*Methanosphaera*只能专性利用H₂/甲醇产甲烷,无法利用乙酸和H₂/CO₂等物质^[30],因此随着发酵过程中VFA的积累,2个体系中该菌的相对丰度均呈现降低趋势。*Methanosarcina*对酸性不敏感且代谢类型多样^[16,31],因

表2 古菌群落多样性指数

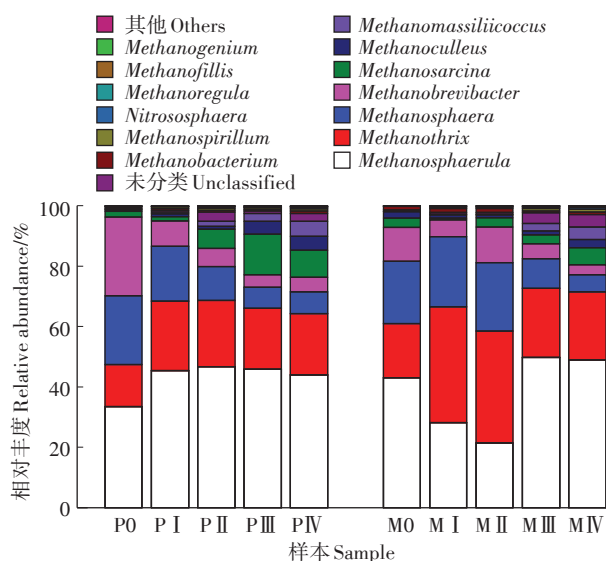
Table 2 Richness and diversity of archaeal communities

样品 Sample	Chao	ACE	Shannon	Simpson	Coverage	Seq_num	OTU_num
P0	2 795.26	4 305.79	2.36	0.19	0.99	86 891	1 209
P I	2 704.45	4 104.63	2.18	0.26	0.99	81 212	1 304
P II	3 180.51	4 629.41	2.69	0.21	0.99	81 080	1 482
P III	2 947.00	4 559.17	2.77	0.21	0.99	72 194	1 523
P IV	3 198.94	5 370.91	2.69	0.21	0.99	87 303	1 533
M0	2 680.01	4 199.22	2.29	0.23	0.99	87 979	1 246
M I	2 389.52	3 560.63	2.21	0.23	0.99	79 662	1 172
M II	2 542.02	3 997.93	2.52	0.19	0.99	84 407	1 216
M III	3 137.98	5 093.48	2.31	0.27	0.99	80 022	1 294
M IV	2 524.88	4 106.56	2.41	0.26	0.99	74 281	1 145



(a) 门水平古菌多样性分析

(a) Analysis of archaeal diversity at phylum level



(b) 属水平古菌多样性分析

(b) Analysis of archaeal diversity at genus level

图5 古菌在门水平和属水平上群落结构多样性分析

Figure 5 Analysis of archaeal diversities at the phylum and genus level

此在2个体系的发酵后期均逐渐富集,其在厌氧发酵过程中相对丰度的变化没有特定的规律可循^[32],仍需进一步的研究。此外,随着消化过程的进行,M组群落中氢营养型产甲烷菌(*Methanospaerula*、*Methanospaera*、*Methanobrevibacter*、*Methanoculleus*和*Methanomassiliicoccus*)总体相对丰度范围在57.09%~77.19%,这表明M组发酵体系中以氢营养型产甲烷途径为主。有研究表明,氢营养型产甲烷菌比乙酸营养型产甲烷菌有更高的活性^[33],且在高VFA环境压力下大多数产甲烷菌会经历氢营养型产甲烷途径^[34],推测在酸抑制环境下氢营养型产甲烷菌的占比与厌氧干发酵系统的产气性能密不可分。

同古菌分析方法一致,细菌群落多样性指数见表3,Shannon指数稀释曲线(图4b)表明测序深度可靠。随着发酵时间的延长,M组中细菌丰富度逐渐增加并高于P组,可见混合原料发酵可以改善发酵系统中C/N,平衡营养,给予微生物充足的微量元素^[23]。总体上来说,较低的Simpson指数表明单独发酵的OTU分布更均匀。在厌氧发酵体系中,微生物群落多样性越高,产气性能越好。M0~II阶段Shannon指数均分别低于P0~II,可见M组前期的水解酸化阶段加重了体系内酸抑制效应。对比表2和表3,无论是单独发酵还是混合发酵体系,细菌群落多样性和丰富度均明显高于古菌。

P组与M组发酵体系中细菌群落在门、属水平上的分布结果如图6所示。厚壁菌门(Firmicutes)是主要的优势菌门,相对丰度均在73%以上,最高达92%。其次是拟杆菌门(Bacteroidetes),占0.99%~16.51%,变形菌门(Proteobacteria)最高也有6.76%的占比。Firmicutes门多为水解型细菌,主要功能是将

表3 细菌群落多样性指数

Table 3 Richness and diversity of bacterial communities

样品 Sample	Chao	ACE	Shannon	Simpson	Coverage	Seq_num	OTU_num
P0	4 305.63	5 848.91	3.99	0.10	0.98	66 189	2 613
P I	4 753.13	7 095.21	3.65	0.15	0.99	44 216	2 345
P II	4 299.56	6 995.58	3.47	0.18	0.97	42 835	2 105
P III	4 862.72	7 221.84	3.98	0.10	0.97	46 242	2 392
P IV	3 630.85	6 105.42	3.79	0.10	0.97	40 209	1 730
M0	3 847.85	5 540.56	3.49	0.13	0.98	47 846	1 943
M I	4 309.93	6 371.60	3.31	0.19	0.97	46 557	2 027
M II	4 554.15	6 697.89	3.36	0.16	0.98	51 596	2 124
M III	6 024.85	9 141.25	4.08	0.12	0.97	49 124	2 842
M IV	4 966.34	7 152.92	3.94	0.13	0.97	46 867	2 507

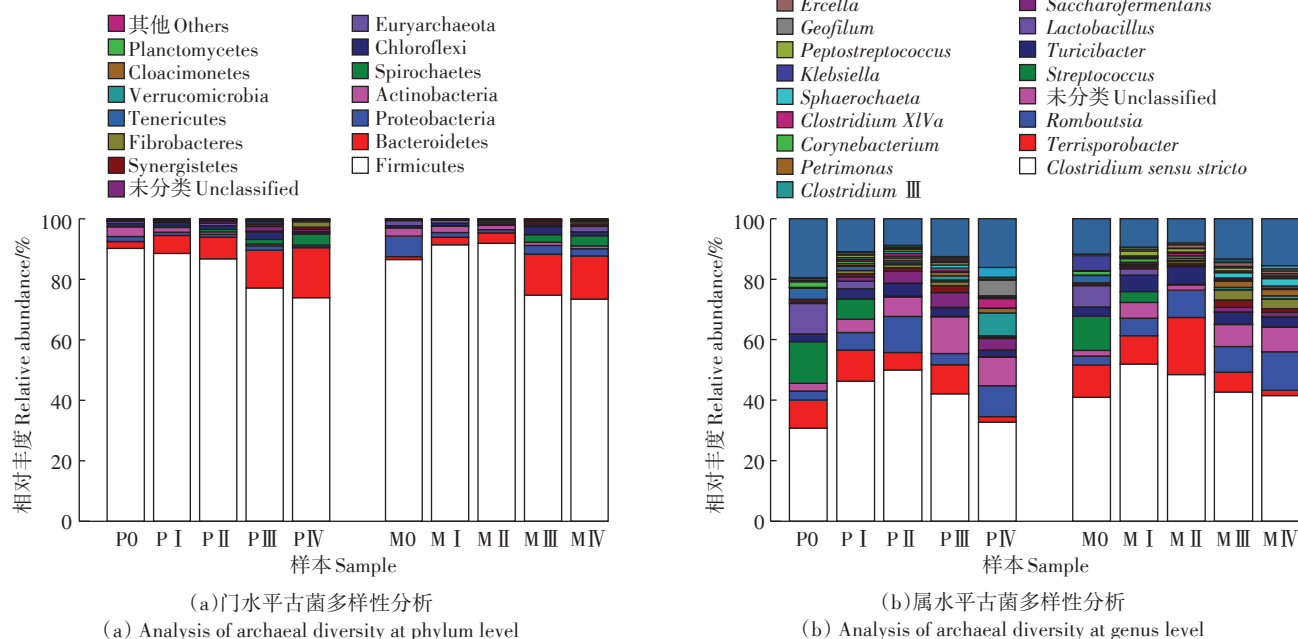


图6 细菌在门水平和属水平上群落结构多样性分析

Figure 6 Analysis of bacterial diversities at the phylum and genus level

纤维素、木质素以及脂肪和蛋白质水解成为小分子酸^[35]; Bacteroidetes 则可以将蛋白质等水解酸化为小分子有机酸。Firmicutes 在 M0~II 的相对丰度逐渐增加,说明玉米秸秆、粪便被较好地分解利用,秸秆的加入增加了接种物中潜在的电子供体含量,极大地刺激了微生物活性^[36]。此外,有研究报道 Firmicutes 能够形成内生孢子以抵御不良环境^[37],因此即使在酸化严重的环境下该菌门的相对丰度依然很高。两个体系中,发酵末期(第IV阶段)Firmicutes 相对丰度最低,而 Bacteroidetes 明显升高,这可能与大分子底物被分解消耗、小分子有机酸逐渐积累有关。Proteobacteria 和绿弯菌门(Chloroflexi)常见于厌氧发酵体系,能够水解一定的有机大分子化合物^[38],2 菌门相对丰度在 M 组的发酵前期(I~II 阶段)均呈现下降趋势(前者较初始阶段减少约 588%,后者减少约 113%),而在第 III 阶段有一定程度回升(前者较第 II 阶段增加 2.50 倍,后者增加 4.20 倍)。螺旋体门(Spirochaetes)能够水解利用半纤维素,M 组末期(第IV阶段)该菌门相对丰度较前期(第 I 阶段)增加约 18.78 倍。互养菌门(Synergistetes)在厌氧发酵中也起到促进有机物的水解和酸化作用^[6]。有研究表明,在产酸阶段 Synergistetes 门的许多菌属可以与产甲烷菌共培养,将含 4~8 个 C 的直链脂肪酸降解为丙酸酯、乙酸盐和甲烷,同时可以

通过与产甲烷菌的协同作用,将蛋白质降解成所需底物^[39]。而本研究中 M 组前期(I~II 阶段)Synergistetes 的相对丰度与 M0 时基本一致,仅占 0.13% 左右,而 PII 阶段该菌相对丰度比 P0 时增加约 1.56 倍。在 AKYOL 等^[40]的研究中,对照厌氧消化池中前 20 d VFA 质量分数比经真菌预处理组高,此时对照组中 Synergistetes 相对丰度仅占 0.1%,而在预处理组中占 6.4%~7.5%。因此推测高 VFA 环境不利于 Synergistetes 生长代谢,阻碍了与产甲烷菌的协同作用,造成产气困难。

在 2 个发酵体系中,狭义梭菌属 *Clostridium sensu stricto* 是绝对优势菌属,占 32.74%~51.98%。该属不仅能够水解多糖促进产酸^[14],还可以分泌降解复杂碳水化合物所需的酶^[25]。在 2 个体系中随着发酵时间的延长,*Clostridium sensu stricto* 的相对丰度均呈现先增加后减少的趋势。这是因为随着时间延长,该属生长代谢所利用的多糖被大量消耗,导致 PIII 阶段菌群减少,水解速率降低,而乙酸又被产甲烷古菌大量利用,结合图 3,可以解释 48 d 乙酸质量分数显著降低。由于 M 组底物中添加了玉米秸秆,增加了纤维素含量,所以 M 组各时期该菌的相对丰度均高于 P 组。*Romboutsia* 可以利用发酵体系中的葡萄糖产生氢,主要的代谢产物包括乙酸盐、甲酸盐和乳酸盐^[41]。在 M

组中,随着纤维素等多糖类被水解为葡萄糖,使得该菌在第Ⅳ阶段相对丰度最高,达12.68%。随着P组发酵后期丙酸质量分数的升高,*Turicibater*相对丰度明显降低;同样,M组中也能观察到类似的现象,推测高质量分数丙酸对*Turicibater*的生长代谢起抑制作用。*Streptococcus*因其参与初期的蛋白质水解代谢^[42],在2个体系中发酵初期丰富度最高,占11.34%~13.69%,而PⅠ阶段下该菌相对丰度为6.68%,是MⅠ阶段下的1.87倍,可见高VFA环境会加速其失活。值得注意的是,unclassified菌属相对丰度最高可达12.11%(PⅢ样本中),因此仍需通过系统进化进一步分析其在发酵过程中的作用。

2.4 微生物系统进化分析

图7为前50个OTU代表性序列与数据库序列系统发生进化树环状图。根据分支情况和树枝长短情况来看,图a中,OTU为4、12、13的unclassified菌属与亚硝化球菌属(*Nitrososphaera*)亲缘关系较近,对发酵体系的产甲烷性能没有明显的贡献。图b中,OTU45的unclassified菌属与可利用糖类产酸的*Turicibacter*、可分泌脲酶降解尿素的*Sporosarcina*^[43]以及可参与初期蛋白质水解代谢的*Streptococcus*等菌同属一个分支,可见细菌属中检测出的这些未被分类的菌可能具有分解底物中有机物、加速水解酸化的作用。值得注意的是,

的是,*Sedimentibacter*被证实厌氧消化中积极参与产酸过程,并转移电子给产甲烷古菌^[44],可以增加甲烷产量;OTU38的unclassified菌属与*Sedimentibacter*同属一个分支,表明它可能具有增加甲烷产量的作用。

2.5 冗余分析

采用冗余分析对P组和M组的微观群落结构和宏观环境因子进行相关性研究,选取pH、SCOD、总酸、丙酸和乙酸5个理化指标(总酸、丙酸和乙酸均为质量分数,其中总酸指TVFA)。剔除不显著因素后,RDA模型结果见图8。对于P组,轴1和轴2分别解释了66.45%和25.97%的变异性,总体上微生物群落演变解释度为丙酸>SCOD>pH>总酸,因此影响P组微观生态的主要环境因子为丙酸。从样方分布来看,稳定产气阶段分布在二、三象限,且发酵第45 d与第78 d群落结构相似度较高。环境因子间的相关性表明,丙酸与pH的相关度较高,这与P组后期丙酸积累过多有关。物种与环境因子的相关性表明,*Clostridium sensu stricto*和*Turicibacter*与TVFA和乙酸均呈极显著正相关,说明它们的存在促进体系中乙酸的增加,是分解纤维素产酸的主要贡献者。*Methanospaera*与丙酸呈极显著负相关,说明P组环境中逐渐积累的丙酸会抑制该菌的生长,进而影响体系的产气性能。丙酸的积累同样对*Streptococcus*和*Lactobacil-*

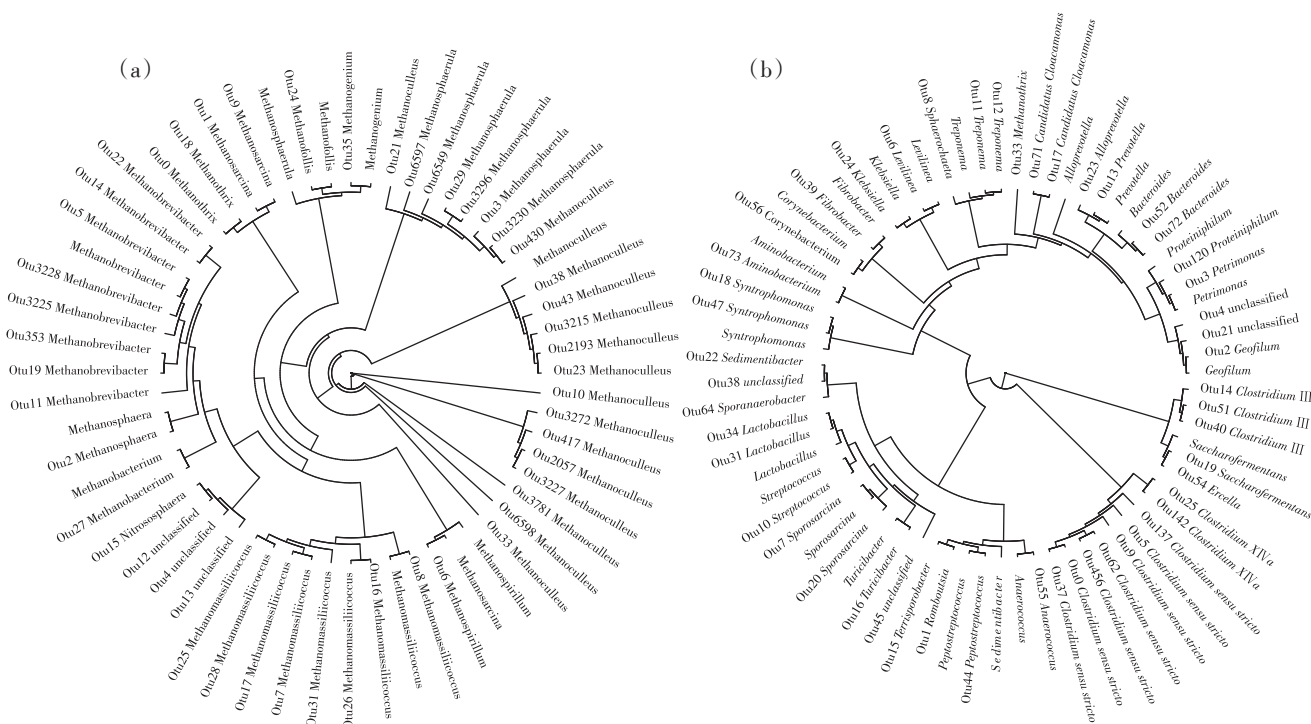


图7 古菌与细菌的系统发生进化树环状图

Figure 7 Ring diagram of phylogenetic tree of archaea and bacteria

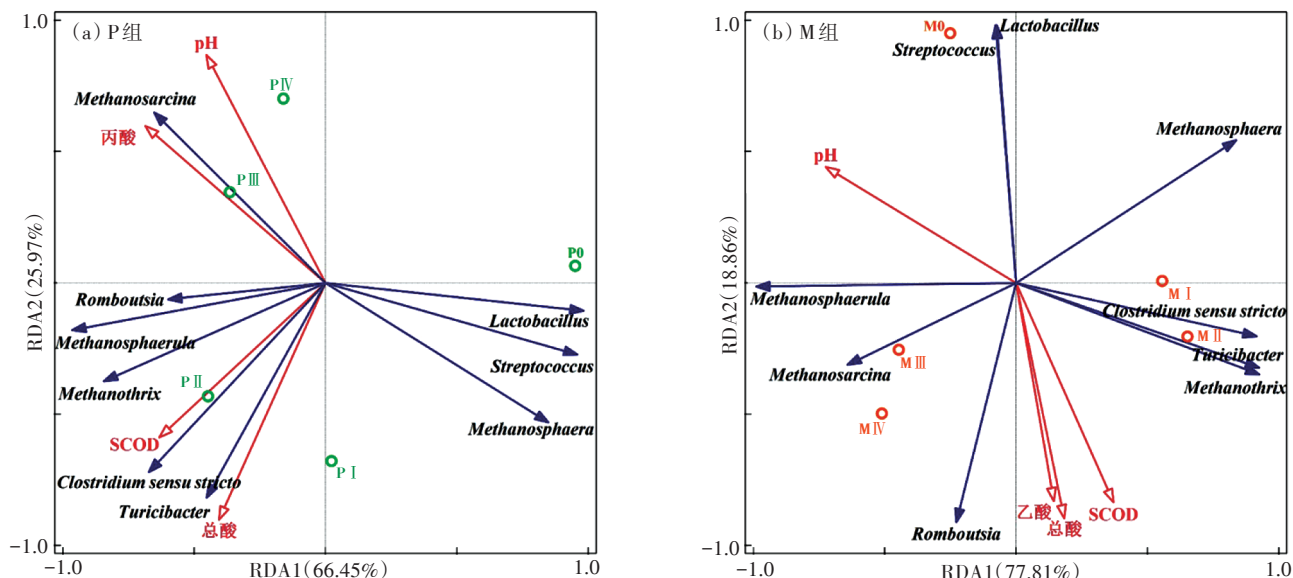


图8 单独发酵与混合发酵系统的冗余分析

Figure 8 Redundancy analysis of mono-fermentation and co-fermentation systems

lus 产生负面作用。对于 M 组, 轴 1 和轴 2 分别解释了 77.81% 和 18.86% 的变异性。环境因子对 M 组微生物群落演变的解释度为 pH>SCOD>总酸>乙酸, 并且随着发酵的进行, 样品从横轴的正端向负端移动, pH 为该体系微生物结构变化的主要驱动因子, 其解释度为 45.3%。在轴 2 方向上, 总酸、SCOD 和乙酸对微生物群落结构的影响均较大, 证明 M 组酸抑制作用明显, 且体系中酸抑制主体为乙酸。对比 P 组, M 组中 *Methanosphaerula* 和 *Methanosphaera* 与乙酸呈负相关, 说明酸抑制环境下乙酸质量分数的升高会对氢营养型产甲烷途径产生抑制作用。在轴 1 方向上, pH 更多地解释了厌氧发酵过程中主要微生物菌群的变化。随着发酵时间的延长, M 组中古菌主要优势菌属发生了演替, 由 *Methanoxithrix* 转变为 *Methanosphaerula* 和 *Methanosarcina*。体系中的产甲烷途径从以乙酸营养型为主转变为氢营养型与乙酸营养型相结合的方式。结合图 8a 与图 8b 可知, 厌氧干发酵过程中酸抑制的主体总是与体系中初始阶段的优势菌群呈负相关, 因此酸抑制的发生对菌群结构的演替有很大影响。

3 结论

(1) 混合发酵体系中酸抑制效应严重, M 组(猪粪秸秆混合发酵)前期产气性能明显较差, 甲烷含量在 56 d 后呈明显上升趋势, 表明体系中产甲烷菌可能在高 VFA 质量分数下逐渐恢复活力。

(2) *Methanosphaerula* 可以促进厌氧干发酵体系

产生甲烷, 其相对丰度与日甲烷产量呈正相关; 而 *Methanoxithrix* 相对丰度与 VFA 质量分数呈正相关。M 组发酵体系中以氢营养型产甲烷途径为主。

(3) 古菌中 OTU 为 4、12、13 的 unclassified 菌属, 对发酵体系的产甲烷性能没有明显的贡献。而细菌中未被分类的 OTU45 和 OTU38 菌属应引起重视。

(4) 影响 2 组发酵体系的主要酸抑制种类不同, 逐渐积累的丙酸会影响 P 组(猪粪单独发酵)的产气性能, M 组中酸抑制的主体为乙酸。酸抑制的发生对菌群结构的演替有很大影响, 可见如何避免酸抑制是提高厌氧干发酵产气性能的关键。

参考文献:

- [1] ZHU Q, LI X G, LI G W, et al. Enhanced bioenergy production in rural areas: Synthetic urine as a pre-treatment for dry anaerobic fermentation of wheat straw[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 260: 121164.
- [2] CAZIER E A, TRABLY E, STEYER J P, et al. Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 190: 106-113.
- [3] FU Y, LUO T, MEI Z, et al. Dry anaerobic digestion technologies for agricultural straw and acceptability in China[J]. *Sustainability*, 2018, 10:4588.
- [4] LIAO X C, LI H. Biogas production from low-organic-content sludge using a high-solids anaerobic digester with improved agitation[J]. *Applied Energy*, 2015, 148:252-259.
- [5] VOELKLEIN M A, RUSMANIS D, MURPHY J D. Increased loading rates and specific methane yields facilitated by digesting grass silage at

- thermophilic rather than mesophilic temperatures[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 216:486–493.
- [6] ZHANG L, KUROKI A, LOH K, et al. Highly efficient anaerobic co-digestion of food waste and horticultural waste using a three-stage thermophilic bioreactor: Performance evaluation, microbial community analysis, and energy balance assessment[J]. *Energy Conversion and Management*, 2020, 223:113290.
- [7] JHA A K, LI J, NIES L, et al. Research advances in dry anaerobic digestion process of solid organic wastes[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(65):14242–14253.
- [8] WEI Q Y, ZHANG W Q, GUO J B, et al. Performance and kinetic evaluation of a semi-continuously fed anaerobic digester treating food waste: Effect of trace elements on the digester recovery and stability[J]. *Chemosphere*, 2014, 117:477–485.
- [9] ZHANG W L, LI L T, XING W L, et al. Dynamic behaviors of batch anaerobic systems of food waste for methane production under different organic loads, substrate to inoculum ratios and initial pH[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(6):733–743.
- [10] 李丹妮, 张克强, 梁军锋, 等. 三种添加剂对猪粪厌氧干发酵的影响[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(8):1777–1785. LI D N, ZHANG K Q, LIANG J F, et al. Solid-state anaerobic digestion of pig manure with three kinds of additives[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(8):1777–1785.
- [11] LU Y, ZHANG Q, WANG X Y, et al. Effects of initial microbial community structure on the performance of solid-state anaerobic digestion of corn stover[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 260:121007.
- [12] XUE S X, QIU L, GUO X H, et al. Effect of liquid digestate recirculation on biogas production and enzyme activities for anaerobic digestion of corn straw[J]. *Water Science & Technology*, 2020, 82(1):144–156.
- [13] WANG M, ZHANG X Y, ZHOU J, et al. The dynamic changes and interactional networks of prokaryotic community between co-digestion and mono-digestions of corn stalk and pig manure[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 225:23–33.
- [14] 李丹妮, 高文萱, 张克强, 等. 分层接种对猪粪厌氧干发酵产气性能及微生物群落结构的影响[J]. 农业工程学报, 2021, 37(1):251–258. LI D N, GAO W X, ZHANG K Q, et al. Influences of layer inoculation on biogas production and microbial community in solid-state anaerobic fermentation of pig manure[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2021, 37(1):251–258.
- [15] 吴宪, 王蕊, 胡荷, 等. 潮土细菌及真菌群落对化肥减量配施有机肥和秸秆的响应[J]. 环境科学, 2020, 41(10):4669–4681. WU X, WANG R, HU H, et al. Response of bacterial and fungal communities to chemical fertilizer reduction combined with organic fertilizer and straw in fluvo-aquic soil[J]. *Environmental Science*, 2020, 41(10):4669–4681.
- [16] KAINTHOLA J, KALAMDHAD A S, GOUD V V. Enhanced methane production from anaerobic co-digestion of rice straw and hydrilla verticillata and its kinetic analysis[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2019, 125(6):8–16.
- [17] JIANG Y, DENNEHY C, LAWLOR P G, et al. Inhibition of volatile fatty acids on methane production kinetics during dry co-digestion of food waste and pig manure[J]. *Waste Management*, 2018, 79(9):302–311.
- [18] 冯磊, BERNHARD R, 李润东, 等. 有机垃圾单级高固体厌氧消化的中试实验[J]. 环境科学学报, 2009, 29(3):584–588. FENG L, BERNHARD R, LI R D, et al. A pilot-scale single phase anaerobic reactor for treatment of high solid organic waste[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(3):584–588.
- [19] DEMIREL B, YENIGÜN O. The effects of change in volatile fatty acid (VFA) composition on methanogenic upflow filter reactor (UFAF) performance[J]. *Environmental Technology Letters*, 2002, 23(10):1179–1187.
- [20] WANG Y Y, ZHANG Y L, WANG J B, et al. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria[J]. *Biomass & Bioenergy*, 2009, 33(5):848–853.
- [21] STEHEL V, MAROUŠKOVÁ A, KOLÁŘ L, et al. Advances in dry fermentation extends biowaste management possibilities[J]. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 2020, 42(2):212–218.
- [22] XU Y, LU Y Q, ZHENG L K, et al. Perspective on enhancing the anaerobic digestion of waste activated sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 389:121847.
- [23] KOUGIAS P G, ANGELIDAKI I. Biogas and its opportunities: A review[J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2018, 12(3):1–12.
- [24] 赵维鑫, 黄志勇, 黄津辉, 等. 厌氧消化酸抑制研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10):3442–3450. ZHAO W X, HUANG Z Y, HUANG J H, et al. Research progress of acid inhibition in anaerobic digestion[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(10):3442–3450.
- [25] YANG G, WANG J L. Changes in microbial community structure during dark fermentative hydrogen production[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2019, 44(47):25542–25550.
- [26] YANG G, YIN Y N, WANG J L. Microbial community diversity during fermentative hydrogen production inoculating various pretreated cultures[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2019, 44(26):13147–13156.
- [27] GUO X H, WANG C, SUN F Q, et al. A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 152:420–428.
- [28] 吴麒, 陈颖, 邱凯瑞, 等. 产甲烷条件下岩溶湿地沉积物中古菌群落的变化规律[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12):3193–3204. WU Q, CHEN Y, QIU K R, et al. Characterization of archaeal communities in a Karst wetland under methanogenic conditions[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(12):3193–3204.
- [29] HINSBY C, JOSEPH B, STEPHEN H. *Methanospaerula palustris* gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peatland[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59:928–935.
- [30] 承磊, 郑珍珍, 王聪, 等. 产甲烷古菌研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12):3193–3204.

- 2016, 43(5):1143–1164. CHENG L, ZHENG Z Z, WANG C, et al. Recent advances in methanogens[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5):1143–1164.
- [31] ROS M, OLIVEIRA FILHO J D S, PEREZ MURCIA M D, 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(10):757–765.
- [32] TONG J, FANG P, ZHANG J Y, et al. Microbial community evolution and fate of antibiotic resistance genes during sludge treatment in two full-scale anaerobic digestion plants with thermal hydrolysis pretreatment[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 288:121575.
- [33] ZHOU M, YANG H N, ZHENG D, et al. Methanogenic activity and microbial communities characteristics in dry and wet anaerobic digestion sludges from swine manure[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 152:107390.
- [34] LI K, WANG K J, WANG J Y, et al. Performance assessment and metagenomic analysis of full-scale innovative two-stage anaerobic digestion biogas plant for food wastes treatment[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 264:121646.
- [35] DAREIOTI M A, KORNAROS M. Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 167:407–415.
- [36] LI J, LI X, YANG Z, et al. Effects of cellulose on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and microbial community structure variation during anaerobic digestion of sewage sludge[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 2020, 55(9):1104–1110.
- [37] XU R, YANG Z H, ZHENG Y, et al. Depth-resolved microbial community analyses in the anaerobic co-digester of dewatered sewage sludge with food waste[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244(1):824–835.
- [38] 闫晶, 陆冰圆, 席华悦, 等. 外源添加剂对黄贮小麦秸秆产甲烷潜力及微生物群落的影响[J]. *农业工程学报*, 2020, 36(15):252–260.
- YAN J, LU B Y, XI H Y, et al. Effects of yellow silage additives on methane production and microbial community dynamics during anaerobic digestion of wheat straw[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2020, 36(15):252–260.
- [39] CASTELLANO-HINOJOSA A, ARMATO C, POZO C, et al. New concepts in anaerobic digestion processes: Recent advances and biological aspects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(12):5065–5076.
- [40] AKYOL A, INCE O, BOZAN M, et al. Biological pretreatment with *Trametes versicolor* to enhance methane production from lignocellulosic biomass: A metagenomic approach[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 140:111659.
- [41] GERRITSEN J, FUENTES S, GRIEVINK W, et al. Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asaccharospora* gen. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(5):1600–1616.
- [42] 杨斌. 低温沼气发酵系统中细菌和古菌的群落结构与多样性[D]. 昆明: 云南师范大学, 2017:39. YANG B. Community structures and diversity of bacteria and archaea in low temperature biogas systems[D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2017:39.
- [43] 裴迪, 刘志明, 胡碧茹, 等. 巴氏芽孢杆菌矿化作用机理及应用研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2020, 47(6):467–482. PEI D, LIU Z M, HU B R, et al. Progress on mineralization mechanism and application research of *Sporosarcina pasteurii*[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2020, 47(6):467–482.
- [44] SALAMA E S, JEON B H, KURADE M B, et al. Enhanced anaerobic co-digestion of fat, oil, and grease by calcium addition: Boost of biomethane production and microbial community shift[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 296:122353.