

中文核公期刊/CSCD

请通过网上投稿系统投稿 网址:http://www.aes.org.cn

纳米铁氧化物强化牛粪厌氧发酵产甲烷

李煜, 叶青青, 瞿云山, 刘子墨, 任玉莹, 于莉民, 李欣

引用本文:

李煜, 叶青青, 瞿云山, 刘子墨, 任玉莹, 于莉民, 李欣. 纳米铁氧化物强化牛粪厌氧发酵产甲烷[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(5): 1163–1170.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0828

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

UPLC-MS/MS直接进样快速测定水体中41种初级芳香胺

王璐, 贺泽英, 孙小杰, 史小萌, 何沛桥, 王策, 刘潇威 农业环境科学学报. 2020, 39(9): 2098-2104 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0082

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

碱预处理稻秆与猪粪混合厌氧发酵特性研究

付嘉琦,夏嵩,陈小平,付尹宣,晏恒,吴九九 农业环境科学学报.2018,37(6):1255-1261 https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1498

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

pH调控对瘤胃液接种稻秸厌氧消化中水解菌及产甲烷菌的影响

邓玉营, 阮文权, 郁莉, 黄一波 农业环境科学学报. 2018, 37(4): 813-819 https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1599



关注微信公众号,获得更多资讯信息

李煜, 叶青青, 瞿云山, 等. 纳米铁氧化物强化牛粪厌氧发酵产甲烷[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(5): 1163-1170. LI Y, YE Q Q, QU Y S, et al. Enhanced methane production from anaerobic digestion of cattle manure by adding iron oxide nanoparticles [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2024, 43(5): 1163-1170.



纳米铁氧化物强化牛粪厌氧发酵产甲烷

李煜,叶青青,瞿云山,刘子墨,任玉莹,于莉民,李欣

(中国农业大学工学院农业部可再生能源清洁化利用技术重点实验室,北京 100083)

摘 要:为探究金属添加剂对牛粪厌氧发酵产甲烷过程的影响,提升牛粪厌氧发酵效率,本研究以纳米铁氧化物(Iron oxide nanoparticle, INP)为典型金属添加剂,比较了添加INP的反应器和从未添加INP的对照反应器中日产甲烷量、总挥发性酸、纤维素和半纤维素等的变化,并进一步探究INP添加对微生物群落和关键酶活性的影响。结果显示,INP添加促进纤维素水解并有利于挥发性脂肪酸的降解,从而促进产甲烷过程。连续反应器每日添加625 mg·L⁻¹ INP时日甲烷产量达到173.4 mL·g⁻¹·d⁻¹,比对照组提高了38.3%;即使反应器停止添加INP,与对照组相比日产甲烷量依然显著提高(*P*<0.05)。16S rRNA分析表明,INP添加富集了乙酸氧化菌 *Mesotoga* 和嗜氢产甲烷菌 *Methanoculleus* 这一对协同互营菌。宏基因组分析表明,INP添加显著促进嗜乙酸产甲烷 途径和嗜氢产甲烷途径相关酶的活性,尤其提高了甲烷合成关键酶-甲基辅酶M还原酶(EC 2.8.4.1)的活性(*P*<0.05),这是产甲烷 效能提升的主要原因。综上,INP添加剂的施用有利于牛粪厌氧发酵产甲烷,从而提升畜禽粪污能源化利用效率。 **关键词**:厌氧发酵;牛粪;纳米铁氧化物;挥发性脂肪酸;宏基因组学

中图分类号:X713 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2024)05-1163-08 doi:10.11654/jaes.2023-0828

Enhanced methane production from anaerobic digestion of cattle manure by adding iron oxide nanoparticles

LI Yu, YE Qingqing, QU Yunshan, LIU Zimo, REN Yuying, YU Limin, LI Xin

(Key Laboratory for Clean Renewable Energy Utilization Technology, Ministry of Agriculture, College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: To investigate the influence of metal additives on the anaerobic digestion of cattle manure and enhance fermentation efficiency, this study chose iron oxide nanoparticles (INP) as a representative metal additive. We compared the changes in daily methane production, total volatile acids, cellulose, and hemicellulose between reactors with INP added and control reactors that never received INP. Additionally, the impact of INP addition on microbial communities and key enzyme activities was further explored through microbial analysis. The results demonstrated that INP addition promoted cellulose hydrolysis and facilitated the degradation of volatile fatty acids, thereby enhancing methane production. When 625 mg \cdot L⁻¹ of INP was added daily to the continuous reactor, the daily methane production reached 173.4 mL \cdot g⁻¹ \cdot d⁻¹, 38.3% higher than the control group. Even when the addition of INP ceased, methane production remained significantly higher compared with the control group(*P*<0.05). 16S rRNA analysis revealed the enrichment of a pair of syntrophic microbial guilds *Mesotoga*, which oxidizes acetic acid, and *Methanoculleus*, a hydrogenotrophic methanogen. Metagenomic analysis revealed that the addition of INP significantly enhanced the activities of enzymes associated with both acetoclastic and hydrogenotrophic methanogenesis, particularly increasing the activity of the key enzyme in methane synthesis, methyl-coenzyme M reductase (EC 2.8.4.1) (*P*<0.05). This was identified as the primary reason for the increased methane production efficiency. Thus, the application of metal additives represented by INP is beneficial for methane production in anaerobic fermentation of cattle manure, thereby improving the efficiency of livestock manure energy utilization.

Keywords: anaerobic digestion; cow manure; iron oxide nanoparticle; volatile fatty acid; metagenomic analysis

基金项目:中国博士后面上项目(2022M713393);博士后国际交流引进项目(YJ20210197)

收稿日期:2023-10-12 录用日期:2024-01-05

作者简介:李煜(1991一),男,山西太原人,博士,研究方向为有机废物资源化利用及处理处置。E-mail:BH2021013@cau.edu.cn

Project supported: China Postdoctoral Science Foundation (2022M713393); International Postdoctoral Exchange Fellowship Program (YJ20210197)

集约化养殖快速发展产生了大量畜禽粪污,以牛 粪为例,根据中国统计年鉴(http://www.stats.gov.cn/sj/ ndsi/)和农业农村部颁布的养殖畜禽粪尿产生系数 (https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2018-12/31/ content 5442613.htm)估算,2018年我国年产牛粪约 12.8亿t。若不经处理直接排放会对养殖场周围的水 体、土壤和大气环境造成严重污染。厌氧发酵通过降 解有机质产沼气,目前已广泛应用于牛粪处理^[1]。然 而,产气效率低是牛粪厌氧发酵面临的主要问题,这 是因为牛粪富含木质纤维素,其缓慢的水解效率制约 了产甲烷效率。目前,研究人员采用多种方法来提高 牛粪厌氧发酵产气性能,包括:(1)与低木质素含量底 物共发酵以减轻木质素对水解菌的生物抑制作用; (2)预处理破坏木质纤维素提高其生物降解性;(3)新 厌氧发酵体系构建(如微生物电化学);(4)外源添加 剂强化水解和产甲烷阶段印。

在上述方法中,外源添加剂在提升产气性能和经 济可行性方面具有显著优势^[1]。其中,铁及其化合物 作为多种酶(如甲酰-甲呋喃脱氢酶、氢化酶、一氧化 碳脱氢酶)的辅因子参与甲烷合成,是公认的可改善 牛粪厌氧发酵性能的添加剂之一。此外,铁还能参与 厌氧微生物能量代谢途径 Wood-Ljungdahl(WL),并 能作为最终电子受体改善厌氧发酵过程^[2-4]。

在铁化合物中,纳米铁氧化物(Iron oxide nanoparticle, INP)因其具有高比表面积、超准磁性、易跨膜运送和低生物毒性受到研究者的广泛关注^[5]。如Abdelsalam等^[5]添加20 mg·L⁻¹ INP,将牛粪厌氧发酵甲烷产量提升1.96倍。Farghali等^[6-8]开展系列实验,证实了添加INP可将牛粪甲烷产量提升10.5%~56.9%。基于作者前期文献调研发现,INP促进牛粪厌氧发酵相关研究主要集中于短期批式实验,对于更接近牛粪沼气工程实际运行情况的长周期半连续实验鲜有报道。此外,前人研究对INP强化微生物代谢途径这一核心作用缺乏深入分析^[1]。因此,本研究将开展以牛粪为底物的半连续试验,并基于16S rRNA分析和宏基因组阐明INP添加对牛粪厌氧发酵产气效率和微生物群落演替和代谢途径的影响。研究结果以期为牛粪沼气工程INP的使用和相关理论基础的完善提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与实验设计

半连续试验在两个完全相同的连续搅拌反应器 (Continuous stirred tank reactor, CSTR)中进行, CSTR 农业环境科学学报 第43卷第5期

的工作容积为2.4 L。其中R-Fe为添加INP的实验 组,R-C为对照组。表1列出了试验的基本运行状 况。牛粪理化性质如下:pH:8.59±0.03;总固体: (278±15) mg·g⁻¹;挥发性固体:(168±12) mg·g⁻¹;纤维 素:(153.1±6.1) mg·g⁻¹;半纤维素:(140.5±3.4) mg· g^{-1} ; C: (314.3±0) mg · g^{-1} ; H: (42.9±0.1) mg · g^{-1} ; N: $(22.1\pm0.7) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}; 0: (615.7\pm0.1) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}; S: (5.1\pm0.1) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 0.2) mg·g⁻¹。试验开始前,两个 CSTR 均以牛粪为唯 一底物稳定运行100d,并具有相近的日产甲烷量(P> 0.05)。本试验中有机负荷(Organic loading rate, OLR)和水力停留时间(Hydraulic retention time, HRT) 分别为1g·L⁻¹·d⁻¹(以VS计)和25d,并在整个试验中 保持不变。试验共分3个阶段(表1),第1阶段(第1~ 25天), R-Fe和R-C 仅添加牛粪。第2阶段(第26~51 天), R-Fe每天额外加入1.5g INP(Fe₃O₄, 粒径 50~ 100 nm, CAS: 1317-61-9), R-C无任何外源添加剂。 在第3阶段(第52~115天), R-Fe停止添加INP, R-C 无任何外源添加剂。CSTR运行模式为半连续进料, 即每日进出料一次,先出料后进料。反应温度为 37 ℃,转速设定为120 r·min⁻¹。

1.2 测定指标和分析方法

1.2.1 气体、液体化学组成分析

总固体含量(Total solid, TS)、挥发性固体含量 (Volatile solid, VS)、纤维素和半纤维素测定方法参考 Li等^[9]。沼气体积由气体流量计(Ritter,德国)测定, 沼气中CH4和CO2含量由微型气相色谱仪(C2V-200 Micro GC, Thermo Scientific,美国)测定^[9]。

液体样品的 pH 值由 pH 计测定。总挥发性脂肪酸(Total volatile fatty acids, TVFAs)和总碱度(Total Alkalinity, TA)由自动滴定仪(AT1000, Hach,德国)测定^[10],总化学需氧量(Total chemical oxygen demand, TCOD)用哈希试剂盒(LCK 014, Hach,德国)测定。1.2.2 16S rRNA分析

在第2阶段末期(第51天,标记为R-Fe1和R-C1)和第3阶段中期(第55天,标记为R-Fe2和R-C2),取样(每个处理取3个样品)进行16SrRNA分析。具体方法:使用FastDNA[®]Spin Kit提取样品中总DNA。提取的DNA作为后续PCR反应的模板。使用引物扩增16S-rRNA基因的V3~V4区。其中,细菌用引物338F(5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')和806R(5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3')扩增,古菌用引物524F(5'-TGY CAG CCG CCG CGG TAA-3')和958R(5'-YCC GGC GTT GAV TCC

AAT T-3′)扩增^[9]。

1.2.3 宏基因组分析

为了进一步阐明 INP 对牛粪厌氧发酵的长期影 响,在第3阶段结束时(第115天)取样(每个处理取3 个样品)进行宏基因组分析。使用 fastp(https:// github.com/OpenGene/fastp)去除适配序列(3'端和5' 端)、低质量碱基(<20个)、短长度(<50 bp)和有 N 个 碱基的读长,以获得纯净读长。然后使用 MEGAHIT (https://github.com/voutcn/megahit)对读长进行组装 (>300 bp),用于进一步的基因预测和注释。使用 BLASTP(BLAST Version 2.2.28+,http://blast.ncbi.nlm. nih.gov/Blast.cgi)分别对 EGGNOG 数据库(http://eggnog.embl.de/)和 KEGG 数据库(http://www.genome.jp/ kegg/)进行 COG(蛋白质同源群)和 KEGG 注释, e 值

1.2.4 数据处理

使用 Origin(9.4 版)对数据进行 t 检验,以 0.05 做 为显著性的阈值。

2 结果与讨论

2.1 反应器运行情况

表1总结了反应器的运行情况。在第1阶段, R-Fe和R-C的日甲烷产量(以VS计,下同)无显著差 异(P>0.05)。R-Fe为(133.4±6.9)mL·g⁻¹·d⁻¹;R-C为 (127.1±4.1)mL·g⁻¹·d⁻¹。这表明在没有外加INP的情 况下两个反应器具有相似的运行情况。在第2阶段, R-Fe中添加INP后,日甲烷产量迅速提高到173.4 mL·g⁻¹·d⁻¹,与对照相比提高了38.3%(表1)。类似 地,含铁化合物对牛粪厌氧发酵产甲烷的促进作用在 前人的批式实验中已有报道,如Abdelsalam等^[11]发现 添加10 mg·L⁻¹ FeCl₃可提升牛粪累积产气量21.2%; Yun 等^[12]发现添加铁盐[Fe2(SO4)3、Fe(NO3)3、FeCl3和 FeCl2]可以缩短反应启动时间(15~18 d),累积甲烷产 量提升2.7%~6.4%。此外,R-Fe出料残渣中纤维素 含量显著低于R-C(P<0.05),表明INP添加有利于纤 维素水解,这与Dehhaghi等^[3]的发现一致。此外,R-Fe 中的TVFAs浓度显著低于R-C(P<0.05),表明更多的 酸转化为甲烷,这也与Preeti等[13]、刘莉莉等[14]的发现 一致。上述结果表明INP添加有利于水解菌、酸氧化 菌和产甲烷菌的富集。然而,添加 INP 导致 TA 急剧 下降,这是由于发酵料液中CO₂(以CO³和HCO₃形式 存在)与INP发生矿物碳酸化形成FeCO3或Fe2(CO3)3 所致^[15],而CO₂的减少会导致碱度下降^[16]。第3阶段, 当R-Fe停止添加INP后,其对产甲烷过程的促进作 用仍然持续存在,具体表现在R-Fe中日甲烷产量仍 显著高于 R-C(P<0.05)(表1)。一个可能的原因是, INP 被微生物(如产甲烷菌)吸收并构建甲烷合成酶 的相关辅酶因子,并随着老化微生物裂解释放到环境 中,再被新生微生物利用,如此反复,从而能持续强化 产甲烷过程[3]。

2.2 16S rRNA分析

2.2.1 Alpha多样性

表 2 通过 OTUs、Shannon 指数和 Simpson 指数反映了不同样本的 Alpha 多样性。前人研究表明,优异的厌氧消化性能通常与微生物 Alpha 多样性相关,具体表现为更高的 Shannon 或 Simpson 指数^[17]。本试验

表1 连续反应器运行情况

Table 1	Operation	overview
---------	-----------	----------

处理	第1阶段Stage 1		第2阶段	Z Stage 2	第3阶段Stage 3	
Treatment	R-Fe	R-C	R-Fe	R–C	R-Fe	R-C
水力停留时间Hydraulic retention time/d	25	25	25	25	25	25
有机负荷 Organic loading rate/(g・L ⁻¹ ・d ⁻¹)	1	1	1	1	1	1
纳米磁铁氧化物(日添加量)Fe ₃ O ₄ /g	无	无	1.5	无	无	无
日甲烷产量(平均值)CH4 yield/(mL·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	133.4±6.9a	127.1±4.1a	173.4±9.7a	$125.4\pm9.1\mathrm{b}$	181.7±13.3a	$130.8 \pm 11.2 \mathrm{b}$
总挥发性脂肪酸(平均值)TVFAs/(mg·L ⁻¹)	462.5±47.4a	437.0±60.8a	$353.6\pm20.2b$	429.3±42.1a	407.7±42.1b	470.6±24.4a
总碱度(平均值)TA/(mg·L ⁻¹)	1 773.5±16.3a	1 796.5±13.4a	$1.508.0\pm 55.2 \mathrm{b}$	1 815.0±80.0a	$1.757.0 \pm 168.8 \mathrm{b}$	1 920.5±124.5a
pH(平均值)	7.18±0.01a	7.18±<0.01a	$7.26 \pm 0.09 \mathrm{b}$	7.39±0.14a	7.19±0.08a	7.33±0.16a
总化学需氧量(平均值)TCOD/(mg·L ⁻¹)	未检测	未检测	5 322.7±217.2b	6 033.2±142.5a	$5.598.5 \pm 187.8 \mathrm{b}$	6 102.9±231.8a
纤维素(平均值)/(mg·g ⁻¹ TS)	未检测	未检测	73±3b	88±4a	75±1b	86±3a
半纤维素(平均值)/(mg·g ⁻¹ TS)	未检测	未检测	50±5a	51±2a	47±3a	50±1a

注:同一阶段同行不同小写字母表示不同处理间差异显著(P<0.05)。

Note: Different lowercase letters in a row of the same stage indicate significant differences among treatments at P<0.05.

表2 样品的 Alpha 多样性 Table 2 Alpha diversity metrics of the sample

Tuble 2 Triplia diversity metrics of the sample								
微生物 Microbe	样品名 Specimen	OTUs	Shannon $index(H')$	Simpson $index(1-D)$				
细菌 Bacteria	R-Fe1	606±7a	3.97±0.01a	0.95±0.01a				
	R-Fe2	616±10a	3.95±0.05a	$0.94 \pm 0.02a$				
	R-C1	$585\pm5b$	$3.65 \pm 0.07 \mathrm{b}$	0.93±0.01a				
	R-C2	$564\pm8c$	$3.75 \pm 0.04 \mathrm{b}$	0.91±0.01a				
古菌 Archaea	R-Fe1	45±1b	1.74±0.01a	$0.75 \pm 0.08 a$				
	R-Fe2	43±3b	$1.63 \pm 0.05 \mathrm{b}$	0.72±0.11a				
	R-C1	47±2b	$1.18{\pm}0.07{\rm c}$	$0.49 \pm 0.03 \mathrm{b}$				
	R-C2	52±4a	1.20±0.11c	$0.51 \pm 0.06 \mathrm{b}$				

注:同种微生物同列不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05)。 Note: Different lowercase letters in a column in the same microbes

indicate significant differences among treatments at P<0.05.

中,R-Fe与R-C相比具有显著性更高的Alpha多样性指数(P<0.05),尤其体现在产甲烷古菌中(表2)。这也解释了R-Fe中更优异的产甲烷性能^[18]。 2.2.2 细菌

从属的层面来看,添加 INP 显著提高了 norank f Prolixibacteraceae norank f Spirochaetaceae, norank_p_Marinimicrobia, norank_f_Bacteroidales_UGG-001, Syntrophus, Mesotoga 和 norank f W27的相对丰 度(P<0.05,图1)。其中, norank_f_Prolixibacteraceae [R-Fe1: (19.7±2.8)%, R-Fe2: (25.3±4.4)%; R-C1: (16.4±2.1)%, R-C2:(17.2±1.9)%] 具备降解纤维素的 能力^[19],这与R-Fe出料中纤维素浓度显著低于R-C -致(表1)。norank f Spirochaetaceae[R-Fe1:(7.4± (1.1)%, R-Fe2: $(5.3\pm1.4)\%$; R-C1: $(3.2\pm1.0)\%$, R-C2: (3.1 ± 1.2)%]和 norank_f_W27[R-Fe1: (2.7 ± 0.8)%, R-Fe2: (1.9±0.7)%; R-C1: 低于检测限, R-C2:低于检测限)均参与酸氧化途径,并与嗜氢产甲烷 菌互利共生^[20-21]。Hassaneen等^[22]发现牛粪厌氧发酵 中添加铁锌氧化物有利于 norank f Spirochaetaceae 和 嗜氢产甲烷菌的富集,并最终提高了甲烷产量; norank p Marinimicrobia[R-Fe1: (5.5±1.3)%, R-Fe2: (7.4 ± 1.1) %; R-C1: (2.6 ± 0) %, R-C2: (4.1 ± 0.7) %]参 与蛋白质氧化产乙酸、二氧化碳和氢气,并可以分泌 酶参与氢气所携带的电子后续利用^[23];Syntro phus[R-Fe1: (2.0±0.1)%, R-Fe2: (2.0±0.2)%; R-C1: (1.1± 0.4)%, R-C2: 低于检测限] 是一种典型产氢菌, 能参 与氢气介导的种间电子传递^[24]; Mesotoga[R-Fe1: (2.3±0.6)%, R-Fe2:(3.1±0.4)%; R-C1:低于检测限, R-C2:低于检测限]可通过与嗜氢产甲烷菌的协同作

农业环境科学学报 第43卷第5期

用进行高效的糖氧化(如纤维生物糖和木糖)^[25]。此外*Mesotoga*还能参与乙酸氧化(Syntrophic acetate oxidation,SAO)途径^[26]。综上,添加INP显著提高了纤维素降解菌和酸氧化菌的相对丰度,这与表1中R-Fe中较低的纤维素浓度和TVFAs浓度一致。

2.2.3 产甲烷菌

产甲烷阶段是影响厌氧发酵效率的关键阶段,其 中产甲烷菌是关键菌群。铁是构成产甲烷菌细胞组 成的重要元素,且在所有的微量元素中,产甲烷菌对 铁的需求量远高于其他元素^[27]。

与细菌的多样性不同,产甲烷菌主要由四个属组 成。其中Bathyarchaeia在所有样本中占绝对优势。 基于作者之前的研究, Bathyarchaeia 是一种具有多种 功能的产甲烷菌,且主要分布于以牛粪为主的厌氧发 酵体系中^[9]。在本研究中,添加INP会显著降低Bathyarchaeia[R-Fe1:(77.3±4.7)%, R-Fe2:(80.1±3.4)%; R-C1:(92.0±5.2)%, R-C2:(92.4±4.4)%]的相对丰度,但 有利于 Methanoculleus 的富集[R-Fe1:(11.3±2.1)%, R-Fe2: (10.7±1.4)%; R-C1: (4.9±1.1)%, R-C2: (1.5± 0.1)%, P<0.05]。Methanoculleus 作为典型的嗜氢产甲 烷菌,可与乙酸氧化菌通过SAO途径协同产甲烷。 有研究表明,在以纤维素或蛋白质为底物的厌氧发酵 中, Methanoculleus 是产甲烷的主要贡献者[28]。此外, 在作者之前的研究中发现 Methanoculleus 富集有助于 提升牛粪厌氧发酵产气性能[29]。类似地,高铭雪[30]发现 在牛粪批式厌氧发酵中添加INP后,Methanoculleus的相 对丰度从对照的2.93%提升到4.58%,相应的甲烷产量 提升了33.6%; Preeti等113也发现添加铁化合物将产甲烷 菌浓度从4.6×10⁸个·mL⁻¹提升到1.5×10¹¹个·mL⁻¹,甲烷 产量提升40%。综合乙酸氧化菌如Mesotoga的富集,本 研究揭示了Mesotoga和Methanoculleus之间协同共生的 互营关系,这可能是INP提升甲烷产量的主要原因。

2.3 宏基因组分析

为了进一步阐明 INP 对牛粪厌氧发酵的长期影响,在第3阶段结束时进行了宏基因组分析。基于分析结果预测了参与牛粪厌氧发酵不同代谢途径的关键酶,如表3、表4所示。R-Fe中共含有19445492±674628个纯净读长,R-C中共有19286875±1145429个纯净读长。牛粪富含较难降解的木质纤维素,其中可生物降解的成分主要是纤维素和半纤维素。针对纤维素水解,首先微生物分泌脱支链酶,如乙酰木聚糖酯酶(EC 3.1.1.72)、阿拉伯糖苷酶(EC 3.2.1.185/3.2.1.55)和羧酯酶(EC 3.1.1.1),用于去除木聚糖骨架





的侧链单元,使水解酶更容易接触纤维素和半纤维素 单元。这些酶的活性在 R-Fe 和 R-C 中无显著差异 (P>0.05)。要彻底降解纤维素需要来自细胞酶相关 酶(纤维素酶、外切纤维酶和β-葡萄糖苷酶)的协同 作用,尤其是纤维素酶(EC 3.2.1.4)。宏基因组结果 表明 R-Fe 的纤维素酶活性显著高于 R-C(P<0.05), 表明添加INP强化纤维素降解,这与R-Fe中出料残 渣中更低的纤维素浓度以及前人研究一致^[3](表1、表 3)。此外,添加 INP 还显著强化了葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)的活性(P<0.05),这表明添加 INP 有利于纤 维素水解产物(如纤维二糖)的降解,从而加速水解产 物的转化。针对半纤维素水解,首先木聚糖酶(EC 3.2.1.8)随机切断β-1,4-木聚糖骨架结构中的β-1, 4-糖苷键,生成木糖和木寡糖。然后,乙酰木聚糖酯 酶(EC 3.1.1.72)、α-D-葡萄糖醛酸酶(EC 3.2.1.1)、木 聚糖1,4-β-木糖苷酶(EC 3.2.1.37)和阿拉伯糖苷酶 (EC 3.2.1.55)协同切断木糖单体和木聚糖侧链之间 的连接,方便微生物进一步利用。INP添加未显著提 升这些酶的活性(P>0.05),这与出料中接近的半纤维 素浓度相一致(表1)。这可能是因为半纤维素的高 支链结构、低结晶度和异质性本身使其很容易被水解 微生物降解^[9]。

宏基因组进一步揭示了将水解产物转化为乙酰 辅酶A(乙酸前体物质)的相关酶。从纤维素/半纤维 素降解产生的两个中间产物:β-D-果糖6-磷酸和α-D-葡萄糖6-磷酸主要通过一系列酶转化为丙酮。生 成的丙酮通过丙酮-二氢化辅酶还原酶(EC 1.2.7.1) 进一步转化为乙酰辅酶A。R-Fe中与纤维素水解中间产物利用的相关酶活性显著高于R-C(P<0.05),但与半纤维素水解中间产物利用的相关酶活性无明显差异(P>0.05)。该结果进一步表明INP添加主要促进纤维素水解及中间代谢产物利用,而对于半纤维素水解和后续利用的提升效果有限。

本质上,厌氧发酵是碳的一种生物固定过程,并 以甲烷为最终产物。Fe通过作为多种酶(甲酰-甲呋 喃脱氢酶、氢化酶、一氧化碳脱氢酶)的辅因子参与甲 烷生成。宏基因组数据表明,嗜乙酸产甲烷途径和嗜 氢产甲烷途径相关酶均参与了甲烷合成(表4)。经 过水解酸化产生的乙酰辅酶A最终通过一系列代谢 途径[磷酸乙酰转移酶(EC 2.3.1.8)、乙酸激酶(EC 2.7.2.1)、乙酸-CoA连接酶(EC 6.2.1.1)、CO-甲基化 乙酰-CoA合成酶(EC 2.3.1.169)、乙酰辅酶脱碳酶/合 成酶(EC 2.1.1.245)、四氢甲氧基蝶呤S甲基转移酶 (EC 2.1.1.86)和甲基辅酶 M 还原酶(EC 2.8.4.1)]最终 转化为甲烷。本研究中,R-Fe的磷酸乙酰转移酶 (EC 2.3.1.8)、乙酸激酶(EC 2.7.2.1)和乙酸-CoA合成 酶(EC 6.2.1.1)活性显著高于 R-C(P<0.05),表明 INP 促进了乙酰辅酶A和乙酸之间的相互转化,从而强化 了嗜乙酸产甲烷途径(表4)。对于嗜氢产甲烷途径, 其主要依赖WL途径,WL途径在产甲烷古菌的能量 产生和碳固定中起重要作用。嗜氢产甲烷菌(如 Methanoculleus) 通过WL途径的甲基支链[Methyl-Branch Pathway:包含铁元素的甲酰基甲呋喃脱氢酶 (EC 1.2.7.12)、甲酰甲呋喃-四氢氢蝶呤N-甲酰转移

www.aes.org.cn

表3 参与水解阶段和产酸阶段酶的相对丰度平均值

Table 3	Enzyr	nes invol	lved ir	hvdro	lysis and	lacetogenesis	and their	average	relative a	bundance l	based	on KEGG
rubic 5	1112.71	1100 11100	LICU II	i ii y ai O.	LYDID und	acceptineono	und thon	u orugo	ronunito u	bundanico i	ousou	on muoo

酶编号	名称	相对丰度 RA(%)			
EC Number	Name	R-Fe	R-C		
1.1.1.49	Glucose-6-phosphate dehydrogenase[NADP(+)]	0.02±0.01a	0.03±0.02a		
1.2.1.12	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.17±0.05a	0.18±0.02a		
1.2.1.59	$\label{eq:Glyceraldehyde-3-phosphate} Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[NAD(P)(+)]$	0.03±0.01a	0.02±0.01a		
1.2.7.1	Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase	0.35±0.11a	0.33±0.07a		
2.2.1.1	Transketolase	0.30±0.09a	0.31±0.11a		
2.7.1.1	Hexokinase	0.01±0.01a	0.01±0.01a		
2.7.1.11	6–phosphofructokinase	0.28±0.04a	0.27±0.02a		
2.7.1.146	ADP-specific phosphofructokinase	_	_		
2.7.1.2	Glucokinase	0.16±0.03a	0.15±0.01a		
2.7.1.40	Pyruvate kinase	0.08±0.01a	0.07±0.01a		
2.7.2.3	Phosphoglycerate kinase	0.18±0.05a	0.18±0.03a		
3.1.1.1	Carboxylesterase	0.01±0.01a	0.01±0.01a		
3.1.1.31	6-phosphogluconolactonase	0.02±0.01a	0.02±0.01a		
3.1.1.72	Acetylxylan esterase	—	_		
3.2.1.1	Alpha-amylase(Ca ²⁺)	0.21±0.06a	0.20±0.05a		
3.2.1.21	Beta-glucosidase	0.49±0.03a	$0.43\pm0.02b$		
3.2.1.37	Xylan 1,4-beta-xylosidase	0.07±0.01a	0.08±0.02a		
3.2.1.91	Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase(non-reducing end)	—	_		
3.2.1.4	Cellulase	0.34±0.01a	0.32±<0.01b		
3.2.1.55	Alpha-L-arabinofuranosidase	0.11±0.01a	0.11±0.03a		
3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	0.14±0.02a	0.13±0.03a		
4.1.2.13	Fructose–bisphosphate aldolase	0.26±0.05a	0.21±0.04a		
4.1.2.14	2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase	0.06±0.02a	0.06±0.01a		
4.2.1.11	Phosphopyruvate hydratase	0.20±0.07a	0.18±0.03a		
4.2.1.12	Phosphogluconate dehydratase	—	—		
5.1.3.1	Phosphoketolase	0.11±0.04a	0.10±0.02a		
5.3.1.6	Ribose-5-phosphate isomerase	0.09±0.02a	0.08±0.01a		
5.3.1.9	Glucose-6-phosphate isomerase	0.19±0.02a	0.19±0.03a		
5.4.2.11	Phosphoglycerate mutase	0.04±0.02a	0.03±0.01a		

注:同行不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05),"一"低于检测限。下同。

Note: Different lowercase letters in a row indicate significant differences among treatments at P<0.05, "-" indicates under detection limitation. The same below.

酶(EC 2.3.1.101)、四氢甲氧基苯甲蝶呤环氢酶(EC 3.5.4.27)、亚甲基四氢蝶呤脱氢酶(EC 1.5.98.1)和5, 10-亚甲基四氢蝶呤还原酶(EC 1.5.98.2)]逐步将二 氧化碳还原为Methyl-H4MPT。形成的Methyl-H4MPT的甲基基团通过四氢甲氧基蝶呤S甲基转移 酶(MTR; EC 2.1.1.86)催化到辅酶M,生成CH₃-S-CoM,并由甲基辅酶M还原酶(MCR; EC 2.8.4.1)将其 还原为甲烷和异二硫酸(CoM-S-S-CoB)。R-Fe中参 与嗜氢产甲烷途径相关酶,如嗜氢产甲烷途径核心 酶-辅酶F₄₂₀(EC 1.12.98.1),以及甲酰基甲呋喃脱氢 酶(EC 1.2.7.12)、甲酰甲呋喃-四氢氢蝶呤N-甲酰转

移酶(EC 2.3.1.101)和四氢甲氧基苯甲蝶呤环氢酶(EC 3.5.4.27)的活性均显著高于R-C,表明 INP添加 也促进了嗜氢产甲烷途径(P<0.05,表4)。该结果与 16S rRNA 中嗜氢产甲烷菌 Methanoculleus 的富集相一致。作为甲烷合成的最后一步,R-Fe中 MCR(EC 2.8.4.1)活性显著高于R-C(P<0.05,表4),表明添加 INP强化了甲烷合成,这与R-Fe中更高的甲烷产量 相一致(表1)。

3 结论

(1)牛粪连续厌氧发酵中添加纳米铁氧化物

2024年5月

表4 参与产甲烷阶段酶的相对丰度平均值

Table 4 Enzymes involved in methane metabolism and their average relative abundance based on KEGG

酶编号	名称	相对丰度 RA(%)			
EC Number	Name	R-Fe	R–C		
1.1.1.35	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0.03±0.01a	0.04±0.01a		
1.12.98.1	Coenzyme F420 hydrogenase	0.04±0.01a	$0.02\pm0.00b$		
1.12.98.2	5,10-methenyltetrahydromethanopterin hydrogenase	—	—		
1.17.1.10	Formate dehydrogenase	0.02±0.01a	0.02±0.01a		
10710	4Fe-4S ferredoxin	0.01±<0.01	_		
1.2.7.12	Formylmethanofuran dehydrogenase	0.06±0.01a	$0.04\pm0.01\mathrm{b}$		
1.2.7.4	Anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase	0.02±0.01a	0.02±0.01a		
1.5.1.20	Methylenetetrahydrofolate reductase(NAD(P)H)	0.10±0.02a	0.11±0.01a		
1.5.1.5	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase(NADP(+))	0.16±0.01a	0.15±0.01a		
1.5.98.1	Methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase	0.01±<0.01a	0.01±<0.01a		
1.5.98.2	5,10-methylenetetrahydromethanopterin reductase	0.01±<0.01a	0.01±<0.01a		
2.1.1.245	Acetyl-CoA decarbonylase/synthase	0.03±<0.01a	$0.02 \pm < 0.01 \mathrm{b}$		
2.1.1.247	[Methyl-Co(III) methylamine-specific corrinoid protein]: coenzyme Mmethyltransferase	0.01±<0.01a	0.01±<0.01a		
2.1.1.248	[Methylamine-corrinoid protein] Co-methyltransferase	0.01±<0.01a	0.01±<0.01a		
2.1.1.250	[Trimethylamine-corrinoid protein] Co-methyltransferase	0.01±<0.01a	0.01±<0.01a		
2.1.1.86	Tetrahydromethanopterin S methyltransferase	0.03±<0.01a	$0.01 \pm < 0.01 b$		
2.1.1.90	Methanol-corrinoid protein Co-methyltransferase	0.01±<0.01a	0.01±<0.01a		
2.3.1.101	$For mylmethan of uran-tetrahydromethan opter in \ N-for myltransferase$	0.02±<0.01a	$0.01 \pm < 0.01 b$		
2.3.1.169	CO-methylating acetyl-CoA synthase	0.02±<0.01a	$0.01 \pm < 0.01 b$		
2.3.1.8	Phosphate acetyltransferase	0.06±0.01a	$0.03 \pm 0.01 \mathrm{b}$		
2.3.1.9	Acetyl-CoA C-acetyltransferase	0.19±0.01a	0.17±0.02a		
2.7.2.1	Acetate kinase	0.10±0.01a	$0.08 \pm < 0.01 \mathrm{b}$		
2.8.3.8	Acetate CoA-transferase	0.02±0.01a	0.03±0.01a		
2.8.4.1	Methyl-coenzyme M reductase	0.02±<0.01a	$0.01 \pm < 0.01 b$		
3.5.4.27	Methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase	0.02±<0.01a	$0.01 \pm < 0.01 b$		
3.5.4.9	Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	0.16±0.01a	0.15±0.01a		
4.2.1.17	Enoyl-CoA hydratase	0.08±0.01a	0.09±0.01a		
6.2.1.1	Acetate–CoA ligase	0.07±<0.01a	$0.05 \pm < 0.01 \mathrm{b}$		
6.3.4.3	Formate-tetrahydrofolate ligase	0.13±0.01a	0.12±0.01a		

(INP)可显著提升日产甲烷量(P<0.05),与对照相比 提升38.3%。在停止添加INP后,反应器的日产甲烷 量依然显著高于对照,并持续了至少2个水力停留 时间。

(2)16S rRNA分析表明,添加 INP 富集了纤维素 水解菌 norank_f_Prolixibacteraceae,以及协同乙酸氧 化互营菌:乙酸氧化菌 Mesotoga 和嗜氢产甲烷菌 Methanoculleus,有利于挥发性脂肪酸的代谢,从而促 进产甲烷过程。

(3)宏基因组学分析表明,添加 INP 显著促进了 水解阶段、嗜乙酸产甲烷和嗜氢产甲烷阶段相关酶活 性,并显著强化了甲烷合成关键酶-甲基辅酶 M 还原 酶(EC 2.8.4.1)的活性(*P*<0.05)。

参考文献:

- [1] LI Y, ZHAO J, KROONEMAN J, et al. Strategies to boost anaerobic digestion performance of cow manure: laboratory achievements and their full-scale application potential[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 755:142940.
- [2] LIU Y, ZHANG Y, QUAN X, et al. Optimization of anaerobic acidogenesis by adding Fe0 powder to enhance anaerobic wastewater treatment
 [J]. Chemical Engineering Journal, 2012, 192:179–185.
- [3] DEHHAGHI M, TABATABAEI M, AGHBASHLO M, et al. A stateof-the-art review on the application of nanomaterials for enhancing biogas production[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 251:109597.
- [4] ROMERO-GÜIZA M S, VILA J, MATA-ALVAREZ J, et al. The role of additives on anaerobic digestion: a review[J]. Renewable & Sustain-

able Energy Reviews, 2016, 58:1486-1499.

- [5] ABDELSALAM E, SAMER M, ATTIA Y A, et al. Influence of zero valent iron nanoparticles and magnetic iron oxide nanoparticles on biogas and methane production from anaerobic digestion of manure[J]. *Energy*, 2017, 120:842–853.
- [6] FARGHALI M, ANDRIAMANOHIARISOAMANANA F J, AHMED M M, et al. Impacts of iron oxide and titanium dioxide nanoparticles on biogas production: hydrogen sulfide mitigation, process stability, and prospective challenges[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 240:160-167.
- [7] FARGHALI M, ANDRIAMANOHIARISOAMANANA F J, AHMED M M, et al. Prospects for biogas production and H₂S control from the anaerobic digestion of cattle manure: the influence of microscale waste iron powder and iron oxide nanoparticles[J]. Waste Management, 2020, 101:141-149.
- [8] FARGHALI M, AHMED M M, KOTB S, et al. Steady state of semicontinuous anaerobic digestion of cattle manure under the stress of adding iron and titanium oxide nanoparticles[J]. *Journal of Material Cycles* and Waste Management. 2021. 23:1930–1937.
- [9] LI Y, ZHAO J, ACHINAS S, et al. The biomethanation of cow manure in a continuous anaerobic digester can be boosted via a bioaugmentation culture containing Bathyarchaeota[J]. Science of the Total Environment, 2020, 745(25):141042.
- [10] KAFLE G K, KIM S H. Sludge exchange process on two serial CSTRs anaerobic digestions: process failure and recovery[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102:6815-6822.
- [11] ABDELSALAM E, SAMER M, ABDEL-HADI M A, et al. Effects of CoCl₂, NiCl₂ and FeCl₃ additives on biogas production[J]. *Misr Journal* of Agricultural Engineering, 2015, 32(2):843–862.
- [12] YUN S, ZHANG C, WANG Y, et al. Synergistic effects of Fe salts and composite additives on anaerobic digestion of dairy manure[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2019, 136:82–90.
- [13] PREETI RAO P P, SEENAYYA G. Improvement of methanogenesis from cow dung and poultry litter waste digesters by addition of iron[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1994, 10(2):211-214.
- [14] 刘莉莉,王敦球,关占良.3种添加剂对牛粪厌氧发酵的影响[J]. 江西农业学报,2007,19(5):119-120. LIULL, WANGDQ, GUANZL. Effect of three additives on anaerobic digestion of cattle manure[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2007, 19(5):119-120.
- [15] ZHANG J, QU Y, QI Q, et al. The bio-chemical cycle of iron and the function induced by ZVI addition in anaerobic digestion: a review[J]. *Water Research*, 2020, 186:116405.
- [16] ZHAO J, LI Y, DONG R, Recent progress towards *in-situ* biogas upgrading technologies[J]. Science of the Total Environment, 2021, 800: 149667.
- [17] FERGUSON R M W, COULON F, VILLA R. Understanding microbial ecology can help improve biogas production in AD[J]. Science of the Total Environment, 2018, 642:754–763.

- [18] MAO C, WANG Y, WANG X, et al. Correlations between microbial community and C: N: P stoichiometry during the anaerobic digestion process[J]. *Energy*, 2019, 174:687–695.
- [19] ZHANG K, ZHANG Y L, OUYANG X, et al. Genome-centered metagenomics analysis reveals the microbial interactions of a syntrophic consortium during methane generation in a decentralized wastewater treatment system[J]. Applied Science, 2020, 10:135.
- [20] WANG H Z, LV X M, YI Y, et al. Using DNA-based stable isotope probing to reveal novel propionate- and acetate-oxidizing bacteria in propionate-fed mesophilic anaerobic chemostats[J]. *Scientific Report*, 2019, 9:17396.
- [21] SHAKERI YEKTA S, LIU T, AXELSSON BJERG M, et al. Sulfide level in municipal sludge digesters affects microbial community response to long-chain fatty acid loads[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12:259.
- [22] HASSANEEN F Y, ABDALLAH R Z, ABDALLAH M S, et al. Impact of innovative nanoadditives on biodigesters microbiome[J]. *Microbial Biotechnology*, 2023, 16:128–138.
- [23] NOBU M K, NARIHIRO T, RINKE C, et al. Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9:1710–1722.
- [24] WALKER D J F, NEVIN K P, HOLMES D E, et al. Syntrophus conductive pili demonstrate that common hydrogen-donating syntrophs can have a direct electron transfer option[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14:837–846.
- [25] FADHLAOUI K, BEN HANIA W, ARMOUGOM F, et al. Obligate sugar oxidation in *Mesotoga* spp., phylum Thermotogae, in the presence of either elemental sulfur or hydrogenotrophic sulfate-reducers as electron acceptor[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20: 281– 292.
- [26] LIU Y, GU M, YIN Q, et al. Inhibition mitigation and ecological mechanism of mesophilic methanogenesis triggered by supplement of ferroferric oxide in sulfate-containing systems[J]. *Bioresource Technol*ogy, 2019, 288:121546.
- [27] THANH P M, KETHEESAN B, YAN Z, et al. Trace metal speciation and bioavailability in anaerobic digestion: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(2):122–136.
- [28] WAGNER A O, LINS P, MALIN C, et al. Impact of protein-, lipidand cellulose-containing complex substrates on biogas production and microbial communities in batch experiments[J]. Science of the Total Environment, 2013, 458-460; 256-266.
- [29] LI Y, ACHINAS S, ZHAO J, et al. Co-digestion of cow and sheep manure:performance evaluation and relative microbial activity[J]. *Renewable Energy*, 2020, 153:553–563.
- [30] 高铭雪.不同导电性添加剂用量对厌氧发酵特性的影响及微生物 作用机制的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2022. GAO M X. Study on the effect of different conductive additive dosages on the anaerobic digestion characteristics and microbial action mechanism[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022.

