

氨胁迫对猪粪厌氧消化性能的影响

高文萱¹, 张克强¹, 梁军锋¹, 宋香育¹, 韩冰雅^{1,2}, 杜连柱^{1*}

(1.农业部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2.沈阳农业大学土地环境学院, 沈阳 100161)

摘要:以猪粪为原料, 采用批式试验方法, 研究不同氨氮添加量(0、400、800、1600、2400、3200、4000 mg·L⁻¹)对厌氧消化产气效果的影响。结果表明:随着氨氮添加量的增加, 总产气量和 CH₄ 产率均呈现先升高后降低的变化趋势, 氨氮添加量 ≥ 2400 mg·L⁻¹ 时, 厌氧消化过程受到显著抑制; 不同处理中猪粪挥发性固体(VS)的 CH₄ 产率分别为 328.5、338.1、323.2、304.9、276.2、124.9、56.1 mL·g⁻¹。氨氮添加量为 0~800 mg·L⁻¹ 时, 最大 VS 产 CH₄ 速率分别为 18.3、18.4、17.1 mL·g⁻¹·d⁻¹; 氨氮添加量为 2400 mg·L⁻¹ 时, 产气高峰推迟, 产 CH₄ 速率明显降低; 氨氮添加量 ≥ 400 mg·L⁻¹ 时, 厌氧消化 30 d 底物的生物转化产 CH₄ 效率随氨氮添加量的增加逐渐降低, 分别为 56.7%、54.5%、52.4%、30.6%、1.6% 和 1.3%; 氨氮添加量为 400~2400 mg·L⁻¹ 时, 乙酸利用型产甲烷菌 *Methanosaeta* 的相对丰度总体随氨氮质量浓度的增加而降低, 而氢利用型产甲烷菌 *Methanosarcina* 和 *Methanococcus* 具有相反的变化规律。

关键词:厌氧消化; 氨氮; 猪粪; 末端限制性酶切片长度多态性; 产甲烷菌

中图分类号: X713 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2015)10-1997-07 doi:10.11654/jaes.2015.10.023

Effects of Ammonia Stresses on Anaerobic Digestion of Swine Manure

GAO Wen-xuan¹, ZHANG Ke-qiang¹, LIANG Jun-feng¹, SONG Xiang-yu¹, HAN Bing-ya^{1,2}, DU Lian-zhu^{1*}

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; 2. College of Land and Environment, Shenyang Agriculture University, Shenyang 100161, China)

Abstract: Anaerobic digestion is a commonly used technique for treating livestock manure and producing biogas. However, ammonia generated during the digestion may reduce the efficiency of an anaerobic digestion system. Here a batch experiment was carried out to investigate the effect of ammonia on anaerobic digestion of swine manure by adding ammonia at 0, 400, 800, 1600, 2400, 3200 mg·L⁻¹ and 4000 mg·L⁻¹ under mesophilic conditions (35 °C). Cumulative biogas production had no obvious differences at 0~800 mg·L⁻¹ of ammonia concentrations. However, the lag phase appeared and cumulative biogas decreased when ammonia was higher than 2400 mg·L⁻¹. Yields of CH₄ were 328.5, 338.1, 323.2, 304.9, 276.2, 124.9 mL·g⁻¹ VS for 0, 400, 800, 1600, 2400, 3200 mg N·L⁻¹ and 4000 mg N·L⁻¹, respectively. The maximum CH₄ yield rates were 18.3, 18.4, 17.1 mL·g⁻¹·d⁻¹ at 0, 400 mg N·L⁻¹, and 800 mg N·L⁻¹ of ammonia added, respectively. Increasing ammonia from 3200 mg·L⁻¹ to 4000 mg·L⁻¹ sharply decreased the CH₄ yield rates and greatly delayed the peaks. The biodegradability (BAD) of VS at 30 d was 55.6%, 56.7%, 54.5%, 52.4%, 30.6%, 1.6% and 1.3% for 0, 400, 800, 1600, 2400, 3200 mg N·L⁻¹ and 4000 mg N·L⁻¹, respectively. The results from terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and clone library showed that the relative abundance of acetate-utilizing *Methanosaeta* decreased with increases in ammonia concentrations, but the abundance of hydrogen-utilizing *Methanosarcina* and *Methanococcus* had an opposite tendency at ammonia range of 400~2400 mg·L⁻¹.

Keywords: anaerobic digestion; ammonia; swine manure; terminal-restriction fragment length polymorphism; methanogens

近年来, 养殖废弃物的产生量逐年增加, 同时由于无害化处理和资源化利用率低, 引发了严重的环境

问题。厌氧消化技术能够降解养殖废弃物, 生产清洁能源沼气, 运行费用相对较低, 是被广泛接受、优先选择的方法^[1], 已逐渐成为粪污处理的主要技术手段。但在厌氧消化过程中, 猪粪等高含氮原料中大部分有机氮被转化成氨氮, 而氨氮质量浓度的增加易产生氨抑制作用, 降低厌氧消化效率, 甚至导致厌氧发酵系统崩溃。国外学者对氨抑制进行了较为深入的研究, 但由于原料和试验条件(有机负荷、pH、温度等)的差异, 研究

收稿日期: 2015-04-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51008163); “十二五”国家科技支撑计划课题(2012BAD15B02)

作者简介: 高文萱(1986—), 女, 甘肃兰州人, 在读博士, 助理研究员, 主要从事农业废弃物资源化处理与利用研究。

E-mail: wenxuangaohotmail.com

* 通信作者: 杜连柱 E-mail: dulianzhu99@163.com

结果差异较大,甚至得到了相反的结论^[2-5]。国内针对猪粪厌氧消化氨抑制的研究相对较少。王悦超^[6]的研究结果显示,总固体分数 TS>15.6%的中温发酵和 TS>7.4%的高温发酵均可能发生氨抑制,初始抑制质量浓度约为 1100 mg·L⁻¹。陈闯等^[1]的猪粪连续干式发酵试验结果表明,氨氮质量浓度从 2250 mg·L⁻¹ 增加到 3800 mg·L⁻¹,产气速率降低 74.1%。

本文针对猪粪厌氧消化过程中的氨抑制现象,研究不同氨氮质量浓度下消化体系产沼气性能,明确猪场粪污厌氧消化的氨抑制浓度及影响程度,并通过末端限制性酶切片段长度多态性(Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP) 和克隆文库,分析不同氨氮添加量下产甲烷微生物的变化规律,以期预防和缓解猪场粪污厌氧消化氨抑制提供理论依据和数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

发酵原料猪粪取自天津市西青区某规模化养殖基地,接种物取自实验室长期运行的猪粪厌氧消化反应器(Continuous Stirred Tank Reactor, CSTR)。猪粪及接种物基本性质见表 1。

表 1 发酵原料特征

Table 1 Basic characteristics of manure and inoculum

指标 Factor	猪粪 Swine manure	接种物 Inoculum
总固体质量分数 Total solid/%	30.1	2.1
挥发性固体质量分数 Volatile solid/%	78.2	52.6
碳含量 Carbon content/%	36.8	28.3
氮含量 Nitrogen content/%	2.7	3.9

1.2 试验装置及主要设备

批次厌氧消化试验装置为 500 mL 厌氧瓶;微量气体压力测量仪(GWH3111,德国);恒温摇床;气相色谱仪(GC-5890)。

1.3 试验方法

1.3.1 厌氧消化试验设计

称取 15.0 g 猪粪至厌氧瓶中,接入 100 g 接种物,按 400、800、1600、2400、3200、4000 mg·L⁻¹(以 N 计)6 个 NH₄⁺-N 质量浓度梯度,加入相应量的 NH₄OH,以不添加氨氮为对照,用蒸馏水调整总质量为 200 g。顶空氮气吹脱 2 min 后密封摇匀,置于 37 ℃ 水浴槽内进行厌氧消化,每天定时手动振荡。每个处理设 3 个重复,初始 pH 分别为 6.83、7.15、7.52、8.07、

8.49、8.75、8.94。试验开始后定期测量厌氧瓶中气体的压力,并取气体样品测定其中 CH₄ 和 CO₂ 的体积分数,每次测压及取气样后将厌氧瓶内气体排出;试验结束后称量厌氧瓶质量,取消化后样品测量 pH、氨氮质量浓度、TS 和 VS;计算标准状况下(1 atm, 0 ℃)两次测压时间间隔内产生的气体体积。

1.3.2 基因组 DNA 提取

参考 Feng 等^[7]方法,厌氧消化完成后取每个处理中 3 个重复的混合样 2 mL,14 000×g 低温冷冻离心 10 min,弃上清液,采用 FastDNA[®] Spin Kit for soil 试剂盒(Mpbio, USA)提取基因组 DNA。

1.3.3 T-RFLP

产甲烷古菌 PCR 扩增采用通用引物 A109f (ACKGCTCAGTAACACGT) 和 A912r (CTCCCCCGC-CAATTCCTTTA)^[8-9],反向引物末端用 6-carboxyfluorescein (FAM) 荧光素标记。PCR 条件:94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 1 min, 56 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 共 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物纯化后用限制性内切酶 *Hha*I 酶切,酶切产物用毛细管电泳分离,选取 50~600 bp 的 DNA 片段进行分析,舍去 T-RFs 相对丰度小于 1% 的片段。

1.3.4 克隆文库构建

用非荧光标记的引物(A109f 和 A912r)对基因组 DNA 样品中的古菌 16S rDNA 进行 PCR 扩增。扩增产物纯化后与 pGEM-T Easy 载体(Promega, 美国)连接,转化到 JM109 感受态细胞中,通过蓝白斑筛选,选取阳性克隆子进行测序。测序结果与 NCBI 数据库中已知菌属的 16S rDNA 进行比对,确定样品中古菌的种属^[10]。

1.4 测试项目与方法

猪粪和接种物的 TS、VS 采用称量法测定^[11];总氮采用凯氏定氮法测定,总碳采用重铬酸钾氧化法测定,氨氮采用纳氏试剂法测定^[11];CH₄ 和 CO₂ 的体积分数采用气相色谱法,色谱柱长 2 m、内径 3 mm, Porapak Q 柱,柱温 40 ℃;热导检测器(TCD),温度 180 ℃;载气(氮气)流速 21 mL·min⁻¹;进样口温度 100 ℃,进样量 500 μL^[12]。

1.5 消化底物转化效率

通过下式计算厌氧消化底物的生物转化产 CH₄ 效率(Biodegradability, BDA)^[13]:

$$BDA(\%) = \frac{Y_e}{Y_t} \times 100\% \quad (1)$$

式中:Y_e 为实际 VS 的 CH₄ 产率, mL·g⁻¹; Y_t 为 VS 的

理论 CH_4 产率, $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.6 氨氮质量浓度与游离氨

根据厌氧消化温度、氨氮质量浓度和 pH, 通过公式(2)计算游离氨(FAN)的质量浓度^[14]:

$$\text{FAN}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{[\text{TAN}] \times 10^{\text{pH}}}{\exp[6334/(273+T)] + 10^{\text{pH}}} \times 100 \quad (2)$$

式中:[TAN]为总氨氮质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; T 为温度, $^{\circ}\text{C}$ 。

1.7 数据分析

采用 SPSS 17.0 进行差异显著性分析, 用 Duncan 新复极差法在 0.05 水平上检验。

2 结果与讨论

2.1 厌氧消化产气特征

不同氨氮质量浓度胁迫下累积沼气产量见图 1。氨氮添加量为 400、800 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 沼气累积产量与对照无明显差异, 添加量为 1600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 沼气累积产量较对照下降 11.1%, 表明氨氮添加量小于 800 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对厌氧消化无不利影响, 其添加量为 1600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对厌氧消化存在弱抑制; 氨氮添加量达到或超过

2400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 累积沼气产量明显降低, 而且添加量为 2400、3200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时迟滞期分别延长到 20 d 和 60 d 左右, 表明厌氧消化过程发生明显抑制, 与 Procházka 等^[15]的研究结果相似。试验结束时, 对照和不同处理的 VS 沼气产率分别为 502.4、517.9、491.7、460.6、388.9、181.3、92.7 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$, VS 的 CH_4 产率分别为 328.5、338.1、323.2、304.9、276.2、124.9、56.1 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 与对照相比, 氨氮添加量为 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时增加了 2.9%, 其他处理分别降低了 1.6%、7.2%、15.9%、62.0%和 82.9%。

图 2 为不同氨氮添加量下产 CH_4 速率曲线。对照和氨氮添加量为 400~2400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理中均有两个产气速率峰值, 与 Zhang 等^[16]的研究结果相符, 其中第一个产气高峰对应溶解性有机质的快速降解, 第二个产气高峰来自粗蛋白、粗脂肪和粗纤维等大分子不溶性物质的降解。氨氮添加量为 0~800 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理中, 第一个产气高峰出现在第 4~6 d, 最大 VS 产 CH_4 速率分别为 18.3、18.4、17.1 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 第二个产气高峰出现在第 28 d 左右, 最大 VS 产 CH_4 速率分别为

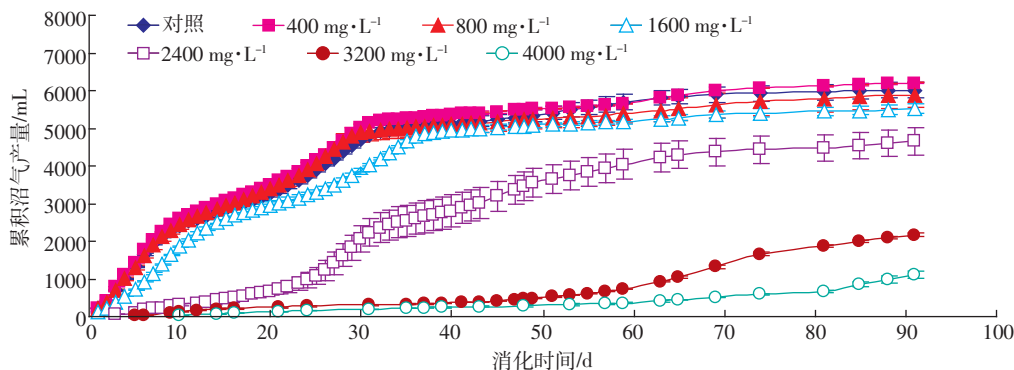


图 1 累积沼气产率曲线

Figure 1 Dynamics of cumulative biogas production during anaerobic digestion

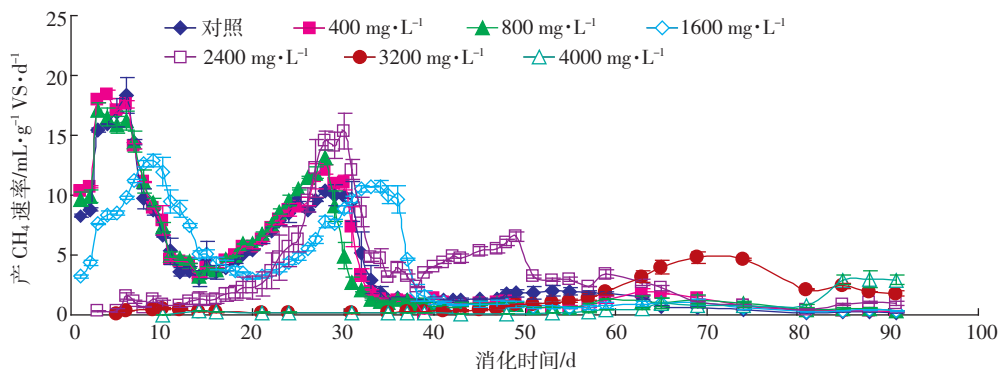


图 2 消化过程产 CH_4 速率曲线

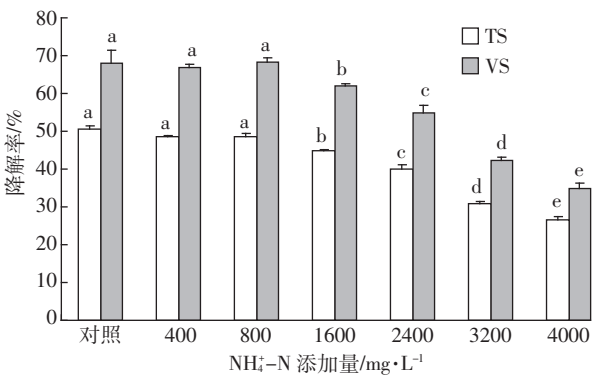
Figure 2 Dynamic curves of CH_4 production rates during anaerobic digestion

10.4、12.1、13.1 mL·g⁻¹·d⁻¹; 当氨氮添加量为 1600、2400 mg·L⁻¹ 时, 第一个产气高峰分别推迟至第 9 d 和第 28 d, 最大 VS 产 CH₄ 速率分别为 12.9、14.5 mL·g⁻¹·d⁻¹; 而氨氮添加量为 3200、4000 mg·L⁻¹ 时, 只有一个产 CH₄ 高峰, 分别出现在第 69 d 和 88 d, 最大 VS 产 CH₄ 速率分别为 4.8、2.9 mL·g⁻¹·d⁻¹。这是因为初始阶段消化体系中 FAN 的质量浓度随氨氮添加量的增加而升高, 当氨氮添加量为 2400 mg·L⁻¹ 时, 对产甲烷菌的活性产生抑制作用, 导致产 CH₄ 高峰推迟、产 CH₄ 速率降低, 当添加量为 3200 mg·L⁻¹ 时, 产 CH₄ 反应在 60 d 左右逐渐恢复, 但速率仍很低。

图 3 为不同处理沼气中 CH₄ 的体积分数曲线。氨氮添加量低于 2400 mg·L⁻¹ 的处理中, CH₄ 的体积分数变化趋势一致, 第二个产气高峰期 CH₄ 的体积分数在 77.0%~85.3% 之间, 相比第一个产气高峰有所升高, 主要原因是转化生成 CH₄ 的底物不同, 第一个产气高峰主要来自底物中碳水化合物为主的溶解性小分子有机物的降解, 第二个产气高峰来自蛋白、脂肪和纤维等的进一步降解, 而蛋白、脂肪等降解产生的沼气中 CH₄ 的体积分数通常较高。在氨氮添加量为 3200、4000 mg·L⁻¹ 时, 随着厌氧消化时间的延长, CH₄ 体积分数逐渐升高, 主要是因为试验开始时氨氮对产甲烷菌具有显著的抑制作用, 随着试验的进行, 在氨氮耐受微生物的作用下抑制作用逐渐减弱, 使 CH₄ 的体积分数逐渐增加。

2.2 底物 TS、VS 去除率

图 4 为不同处理厌氧消化后 TS 和 VS 的降解率。氨氮添加量为 0~800 mg·L⁻¹ 的处理中, TS 的降解率高于 48.5%, VS 的降解率高于 67.0%; 氨氮添加量为 1600 mg·L⁻¹ 及以上时, TS 和 VS 的降解率随氨氮添加量的增加而降低, TS 的降解率分别为 44.9%、39.9%、30.8% 和 27.0%, VS 的降解率分别为 62.0%、



不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平

图 4 不同氨氮添加量下 TS 和 VS 降解率

Figure 4 Degradation rates of TS and VS at different ammonia additions

55.0%、42.1% 和 35.4%, 与沼气产率的变化规律相符。

2.3 生物转化产 CH₄ 效率

表 2 为不同氨氮添加量胁迫下厌氧消化不同时期的 BDA。根据消化原料理论 CH₄ 产率计算公式^[17-18], 试验中猪粪的理论 CH₄ 产率为 474 mL·g⁻¹ VS。由表 2 可知, 氨氮添加量为 400 mg·L⁻¹, 消化结束时的 CH₄ 产率为 338 mL·g⁻¹ VS, 为理论产率的 71.3%, 当氨氮

表 2 不同消化时间 VS 产 CH₄ 效率(BDA)对比

Table 2 CH₄ yields and biodegradability(BDA) of VS over digestion time

NH ₄ -N 添加量 addition	Ammonia NH ₄ -N/mg·L ⁻¹	CH ₄ 产率 Methane yield/mL·g ⁻¹	BDA/%			
			20 d	30 d	60 d	90 d
对照		328.5	36.3	55.6	65.9	69.3
400		338.1	39.2	59.4	65.6	71.3
800		323.2	38.2	57.1	63.0	68.2
1600		304.9	31.3	44.5	60.5	64.3
2400		276.2	5.2	26.0	50.6	58.3
3200		124.9	1.1	1.4	5.5	26.3
4000		56.1	0.7	1.1	2.2	11.8

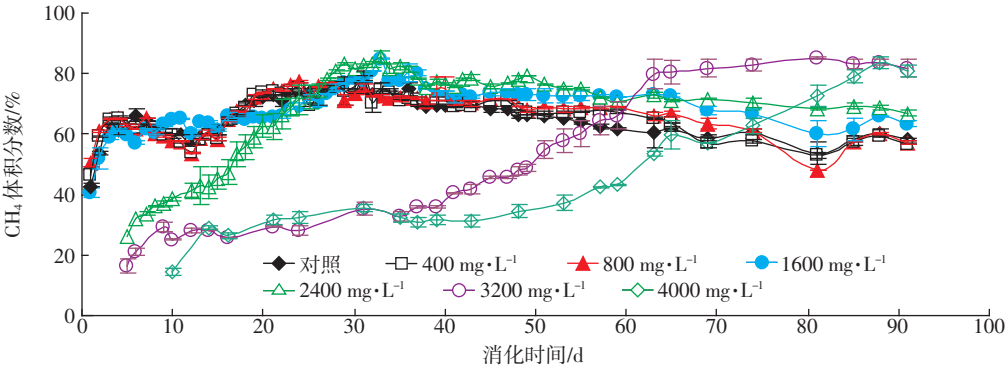


图 3 沼气中 CH₄ 体积分数变化曲线

Figure 3 Dynamics of CH₄ fraction in biogas

添加量高于 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, CH_4 产率和 BDA 逐渐减小, 氨氮添加量为 $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, CH_4 产率仅为 $56 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \text{ VS}$, 消化体系总 CH_4 产生量占理论产量的 11.8%。

2.4 厌氧消化 TAN 和 FAN 变化

厌氧消化中 FAN 是引发氨抑制的主要原因^[19-20]。 CH_4 产率与 FAN 的质量浓度、氨氮初始添加量关系见图 5, 消化前后 pH 及 FAN 见表 3。由图 5 和表 3 可知, 消化后 TAN 的质量浓度随氨氮添加量的增加而

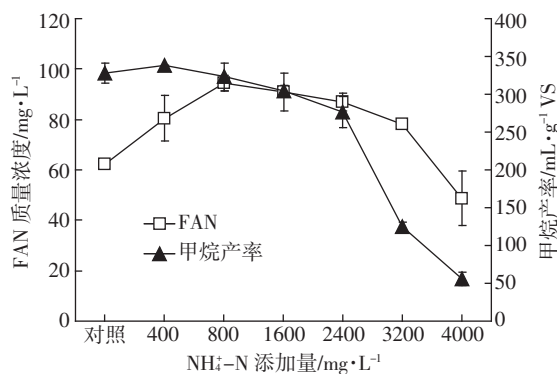


图 5 不同氨氮添加量与消化后 CH_4 产率、FAN 关系

Figure 5 Methane yields and FAN under different ammonia stresses

表 3 不同氨氮添加量消化前后 pH 及 FAN

Table 3 pH and FAN values before and after anaerobic digestion

NH ₄ -N 添加量 Ammonia addition NH ₄ -N/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	消化前 Before digestion		消化后 After digestion		
	pH	FAN/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	pH	TAN/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	FAN/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	6.83	3.4	7.32	2 597.5	62.1
400	7.15	13.6	7.43	2 658.6	80.4
800	7.52	46.2	7.43	3 089.0	94.4
1600	8.07	246.6	7.34	3 635.0	90.8
2400	8.49	754.4	7.30	3 809.4	87.0
3200	8.75	1 444.9	7.24	3 918.2	78.2
4000	8.94	2 241.4	7.01	4 108.4	48.7

升高, CH_4 产率随氨氮添加量的增加先升高后降低。

FAN 对厌氧消化抑制的浓度范围较宽, 同时受原料种类、温度、pH 和接种物等影响, 不同学者研究结果 ($80 \sim 1200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ [21-24]) 相差较大, 如 Baris 等^[22] 的研究表明, 经高浓度氨氮驯化的接种物中, 乙酸利用型产甲烷菌对 FAN 的耐受浓度为 $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 H_2 利用型产甲烷菌对 FAN 的耐受浓度达到 $1200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。试验中, 氨氮添加量为 $0 \sim 1600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对 CH_4 产率影响不显著, 表明 FAN 初始质量浓度低于 $246.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对厌氧消化无明显影响。初始 FAN 质量浓度为 $754.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (氨氮添加量为 $2400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 产 CH_4 迟滞期达到 20 d, 累积沼气产量比对照降低 22.6%, 产沼气过程发生明显抑制; 当氨氮添加量为 3200、4000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 消化前 FAN 的质量浓度在 $1400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, 迟滞期长于 60 d, CH_4 产率与对照相比分别降低了 62.0% 和 82.9%。值得注意的是, 消化后虽然 TAN 在 $3900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, 但 FAN 质量浓度却低于 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 主要是因为产 CH_4 过程受到抑制, 在水解产酸作用下 pH 降低, 导致 FAN 质量浓度远低于 $754.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 但厌氧消化仍处于抑制状态^[25-26]。

2.5 氨氮添加量对产甲烷古菌群落影响

将每个处理中提取的基因组 DNA 等浓度混合, 进行克隆文库构建。根据构建的古菌 16S rDNA 基因文库及模拟酶切结果, 将测得的序列分为 9 个操作分类单元 (OTU), 每个 OTU 代表一种古菌。测得序列与 GenBank 中公布的序列相似性在 81%~100% 之间不等, 比对结果见表 4。

利用限制性内切酶 *Hha*I 酶切带荧光标记的产甲烷古菌 PCR 扩增产物得出 T-RFLP 特征片段 (T-RFs)。在 GenBank 中 16S rDNA 比对结果显示 (表 4), T-RF 93 为甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*), T-RF

表 4 古菌 16S rDNA 基因文库克隆子在数据库中的相似性比对结果

Table 4 Operational taxonomic units and BLAST results according to GeneBank

OTU	已知菌种 Description of closest relatives	登录号 Accession No.	相似度 Identities	T-RF
OTU1	<i>Methanoculleus chikugoensis</i> MG62	NR_028152.1	100%	T-RF 114 T-RF 204
OTU2	<i>Methanoculleus bourgensis</i> strain MS2	NR_042786.1	99%	T-RF 114 T-RF 204
OTU3	<i>Methanoculleus palmolei</i> strain DSM 4273	NR_028253.1	98%	T-RF 114 T-RF 204
OTU4	<i>Methanosarcina mazei</i> Go1 strain Go1	NR_074221.1	99%	T-RF 93
OTU5	<i>Methanosarcina siciliae</i> strain T4/M	NR_104757.1	98%	T-RF 93
OTU6	<i>Methanosarcina thermophila</i> strain DSM 1825	NR_044725.1	99%	T-RF 93
OTU7	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	NR_102903.1	99%	T-RF 536
OTU8	<i>Methanococcus aeolicus</i> Nankai-3	NR_029140.1	96%	T-RF 159 T-RF 534
OTU9	<i>Aciduliprofundum boonei</i> T469 strain T469	NR_043512.1	81%	

114 和 T-RF 204 为甲烷囊菌属 (*Methanoculleus*), T-RF 159 和 T-RF 534 为甲烷球菌属 (*Methanococcus*), T-RF 536 为甲烷鬃菌属 (*Methanosaeta*), T-RF 545 为未知产甲烷古菌, “其他”为相对丰度低于 1% 的产甲烷古菌。图 6 为不同处理中产 CH_4 古菌特征片段 (T-RFs) 及相对丰度。由图 6 可知, $2400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氨氮添加量是产甲烷古菌群落变化的拐点, 添加量在 $0 \sim 2400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 随添加氨氮质量浓度的增加, *Methanosaeta* 的相对丰度总体逐渐降低, 由对照的 39.7% 降至 28.1%, *Methanosarcina* 的相对丰度从对照的 8.7% 升到 12.8%, *Methanococcus* 的相对丰度从 6.2% 升到 17.8%; 当氨氮添加量从 $2400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增至 $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, *Methanosaeta* 的相对丰度明显升高, 达到 40.9%, 与对照相近, *Methanosarcina* 的相对丰度升到 24.6%, *Methanococcus* 相对丰度急剧下降至 4.1%, *Methanoculleus* 的变化趋势则与 *Methanococcus* 相似。

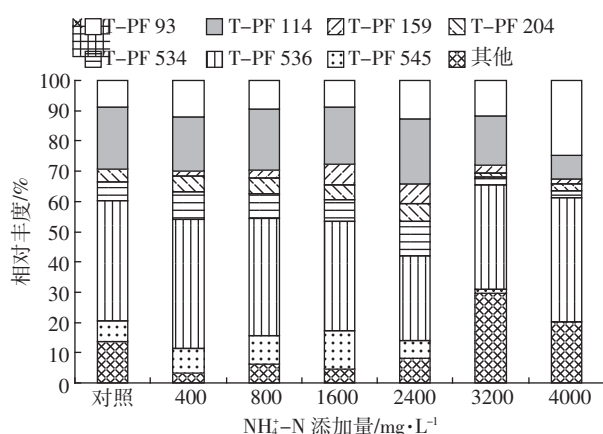


图 6 不同氨氮添加量厌氧消化后产甲烷古菌 T-RFs 变化
Figure 6 Change of T-RFs in methanogenic communities under different ammonia stresses

一般情况下, 厌氧消化产甲烷以代谢乙酸为主要途径, 占总 CH_4 产生量的 60% 以上, 对应的产甲烷菌主要为乙酸营养型的 *Methanosaeta*^[27]。由上述结果可知, 随氨氮质量浓度升高, 产甲烷古菌属发生明显的变化, 氨氮添加量在 $2400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、FAN 质量浓度为 $754.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时, 对氨氮相对敏感的乙酸营养型产甲烷菌 *Methanosaeta* (T-RF 536) 的相对丰度随氨氮质量浓度的增加而逐渐降低, 以 H_2 营养型产甲烷菌属 *Methanococcus* (T-RF 534) 和 *Methanoculleus* (T-RF 114, T-RF 204) 的相对丰度呈明显升高趋势。 *Methanosarcina* 可以 H_2 和乙酸等为底物生成 CH_4 , 相对丰度随氨氮质量浓度的增加呈逐渐升高趋势。由于

H_2 营养型产甲烷菌代谢速率明显低于乙酸营养型产甲烷菌, 乙酸营养型产甲烷菌受到抑制将严重影响厌氧消化效率^[28-29], 与试验中产气量的结果相吻合。当氨氮添加量为 3200 、 $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, *Methanosaeta* 的相对丰度逐渐升高, 而 *Methanoculleus* 和 *Methanococcus* 的相对丰度则呈下降的趋势。其原因可能是消化初始时 FAN 的质量浓度高于 $1400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对乙酸营养型甲烷菌和 H_2 营养型甲烷菌的生长繁殖和代谢均有较强的抑制作用, 同时消化体系中相对丰度低于 1% 的甲烷菌有所增加, 从而使 *Methanosaeta*、*Methanoculleus* 和 *Methanococcus* 的相对丰度表现出上述变化规律。

3 结论

(1) 氨氮添加量为 $0 \sim 800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、初始 FAN 质量浓度低于 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对猪粪厌氧消化无明显影响, 氨氮添加量为 $2400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、初始 FAN 质量浓度为 $754.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对厌氧消化具有显著影响。

(2) 氨氮添加量在 $0 \sim 2400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时, 乙酸营养型产甲烷菌的相对丰度总体随氨氮质量浓度的增加而降低, 氨营养型产甲烷菌相反, 说明产气量的降低可能是由不同营养型产甲烷菌群落结构的改变造成的。

参考文献:

- [1] 陈 闯, 邓良伟, 信 欣, 等. 上推流厌氧反应器连续干发酵猪粪产沼气试验研究[J]. 环境科学, 2012, 33(3): 1033-1040.
CHEN Chuang, DENG Liang-wei, XIN Xin, et al. Continuous dry fermentation of pig manure using up plug-flow type anaerobic reactor[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(3): 1033-1040.
- [2] Lay J J, Li Y Y, Noike T, et al. Analysis of environmental factors affecting methane production from high-solids organic waste[J]. *Water Science & Technology*, 1997, 36(6/7): 493-501.
- [3] Chen Y, Cheng J J, Creamer K S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(10): 4044-4064.
- [4] 杜连柱, 杨继东, 张克强, 等. 厌氧消化过程氨抑制研究进展[J]. 可再生能源, 2012, 30(4): 70-74.
DU Lian-zhu, YANG Ji-dong, ZHANG Ke-qiang, et al. A review on research of ammonia inhibition in anaerobic digestion[J]. *Renewable Energy Resources*, 2012, 30(4): 70-74.
- [5] 唐崇俭, 郑 平, 金仁村, 等. 猪场废水厌氧生物处理 FAN 抑制及其调控对策的研究[J]. 高校化学工程学报, 2008, 22(4): 697-702.
TANG Chong-jian, ZHENG Ping, JIN Ren-cun, et al. Inhibition of anaerobic digestion of swine wastewater caused by free ammonia nitrogen and its control strategies[J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2008, 22(4): 697-702.
- [6] 王悦超. 高固体浓度猪粪的厌氧发酵特性研究[D]. 上海: 复旦大学,

- 2011.
- WANG Yue -chao. Fermentation property of high solid digestion of swine manure[D]. Fudan University, Shanghai, 2011.
- [7] Feng X M, Karlsson A, Svensson B H, et al. Impact of trace element addition on biogas production from food industrial waste—linking process to microbial communities[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2010, 74(1): 226–240.
- [8] McGarvey J A, Miller W G, Zhang R, et al. Bacterial population dynamics in dairy waste during aerobic and anaerobic treatment and subsequent storage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(1): 193–202.
- [9] Ike M, Inoue D, Miyano T, et al. Microbial population dynamics during startup of a full-scale anaerobic digester treating industrial food waste in Kyoto eco-energy project[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(11): 3952–3957.
- [10] Xu K, Liu H, Du G, et al. Real-time PCR assays targeting formyltetrahydrofolate synthetase gene to enumerate acetogens in natural and engineered environments[J]. *Anaerobe*, 2009, 15(5): 204–213.
- [11] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 211–281.
- The State Environmental Protection Administration. Determination methods for examination of water and wastewater[M]. The fourth edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 211–281.
- [12] Zhang Y Y, Han X L. Determination of methane component in biogas by gas chromatography[J]. *Environmental Engineering*, 2010, 28(3): 113–114.
- [13] Sosnowski P, Wiczorek A, Ledakowicz S. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes[J]. *Advances in Environmental Research*, 2003, 7(3): 609–616.
- [14] Niu Q G, Hojo T, Qiao W, et al. Characterization of methanogenesis, acidogenesis and hydrolysis in thermophilic methane fermentation of chicken manure[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2014, 244: 587–596.
- [15] Procházka J, Dolejš P, Máca J, et al. Stability and inhibition of anaerobic processes caused by insufficiency or excess of ammonia nitrogen [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1): 439–447.
- [16] Zhang W Q, Lang Q Q, Wu S B, et al. Anaerobic digestion characteristics of pig manures depending on various growth stages and initial substrate concentrations in a scaled pig farm in Southern China[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 156: 63–69.
- [17] 田 梦, 刘晓玲, 李十中, 等. 香蕉秸秆与牲畜粪便固体联合厌氧发酵产沼气的特性[J]. 农业工程学报, 2013, 29(7): 177–184.
- TIAN Meng, LIU Xiao -ling, LI Shi -zhong, et al. Biogas production characteristics of solid-state anaerobic co-digestion of banana stalks and manure[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2013, 29(7): 177–184.
- [18] Møller H B, Sommer S G, Ahring B K. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2004, 26(5): 485–495.
- [19] Ho L, Ho G. Mitigating ammonia inhibition of thermophilic anaerobic treatment of digested piggery wastewater: Use of pH reduction, zeolite, biomass and humic acid[J]. *Water Research*, 2012, 46(14): 4339–4350.
- [20] Fernandes T V, Keesman K J, Zeeman G, et al. Effect of ammonia on the anaerobic hydrolysis of cellulose and tributyrin[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2012, 47: 316–323.
- [21] Katherine S, Manuel A, Estrella A, et al. Effect of ammonia on the methanogenic activity of methylaminotrophic methane producing archaea enriched biofilm[J]. *Anaerobe*, 2004, 10(1): 13–18.
- [22] Baris C, Bulent M, Bulent I, et al. Methanogenic diversity in anaerobic bioreactors under extremely high ammonia levels[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37(4): 448–455.
- [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] Lu F, Chen M, He P J, et al. Effects of ammonia on acidogenesis of protein-rich organic wastes [J]. *Environmental Engineering Science*, 2008, 25(1): 114–122.
- [25] Niu Q G, Qiao W, Qiang H, et al. Mesophilic methane fermentation of chicken manure at a wide range of ammonia concentration: Stability, inhibition and recovery[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 137: 358–367.
- [26] Rajagopal R, Massé D I, Singh G. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 632–641.
- [27] Liu Y, Whitman W B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125(1): 171–189.
- [28] Xu K W, Liu H, Chen J. Effect of classic methanogenic inhibitors on the quantity and diversity of archaeal community and the reductive homoacetogenic activity during the process of anaerobic sludge digestion [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 2600–2607.
- [29] Song M, Shin S G, Hwang S. Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 23–28.