吐温20和生物炭对水稻秸秆厌氧发酵系统产生物甲烷的微生物作用机制

刘金荣, 刘杨赟, 杨菲凡, 黄永文, 陈芳清

引用本文:
刘金荣, 刘杨赟, 杨菲凡, 等. 吐温20和生物炭对水稻秸秆厌氧发酵系统产生物甲烷的微生物作用机制[J]. 农业环境科学学报, 2025, 44(12): 3270-3281.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2024-1089

刘金荣, 刘杨赟, 杨菲凡, 等. 吐温20和生物炭对水稻秸秆厌氧发酵系统产生物甲烷的微生物作用机制[J]. 农业环境科学学报, 2025, 44(12): 3270-3281.

LIU J R, LIU Y Y, YANG F F, et al. Microbial action mechanism of Tween 20 and biochar on methane produced by rice straw anaerobic fermentation system[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2025, 44(12): 3270-3281.

开放科学 OSID

吐温20和生物炭对水稻秸秆厌氧发酵系统产生物甲烷的微生物作用机制

刘金荣[1], 刘杨赟[2], 杨菲凡[1], 黄永文[2], 陈芳清[1*]

(1.三峡大学, 湖北省三峡地区生态保护与治理国际联合研究中心, 湖北 宜昌 443002; 2.湖北正江环保科技有限公司, 湖北 宜昌 443002)

摘 要: 为研究添加剂对水稻秸秆厌氧发酵系统微生物群落的影响,在厌氧发酵系统中分别添加吐温20、生物炭以及二者的混合物作为实验处理,通过测定各处理生物甲烷产率、微生物群落多样性与结构的变化,揭示了添加剂对水稻秸秆厌氧发酵系统产生物甲烷的微生物作用机制。结果表明:添加剂能显著提升水稻秸秆厌氧发酵系统的生物甲烷产率,吐温20+生物炭(TS)、吐温20(T)和生物炭(S)处理的生物甲烷产率分别比对照(CK)提高了390.67%、182.07%和109.56%。添加剂能显著提高厌氧发酵系统细菌和古菌群落在发酵后期的多样性,TS、S和T的细菌Shannon多样性指数分别比CK高28.16%、26.45%和6.27%,Chao1丰富度指数分别高3.75%、6.24%和24.31%,S、TS和T处理厌氧发酵系统古菌群落的Shannon多样性指数分别比CK高11.58%、5.62%和2.64%。添加剂还改变了厌氧发酵系统后期细菌和古菌群落优势菌属的组成与结构,其中对古菌群落的影响最大,增加了甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*)、甲烷球形菌属(*Methanosphaera*)和甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)的相对丰度,减少了RumEn M2的相对丰度。研究表明,3种添加剂处理通过提高微生物群落在发酵后期的多样性和改善水稻秸秆厌氧发酵系统微生物群落的组成与结构,增加了厌氧发酵系统产甲烷的代谢途径和代谢效率,提高了厌氧发酵系统产生物甲烷的性能,其中吐温20和生物炭混合处理效果最好。

关键词: 水稻秸秆;厌氧发酵;添加剂;生物甲烷;微生物群落

中图分类号: S216 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2025)12-3270-12 doi:10.11654/jaes.2024-1089

Microbial action mechanism of Tween 20 and biochar on methane produced by rice straw anaerobic fermentation system

LIU Jinrong[1], LIU Yangyun[2], YANG Feifan[1], HUANG Yongwen[2], CHEN Fangqing[1*]

(1. China Three Gorges University, Hubei International Scientific and Technological Cooperation Center of Ecological Conservation and Management in Three Gorges Area, Yichang 443002, China; 2. Hubei Zhengjiang Environmental Science and Technology Co., Ltd., Yichang 443002, China)

Abstract: To investigate the effects of additives on the microbial community in rice straw anaerobic fermentation systems, this study researched the effects of additives on biogas yield of the rice straw anaerobic fermentation system by adding Tween 20, biochar and their combination, respectively. The microbiological mechanism was revealed by measuring the biomethane yield as well as the microbial community diversity and structure of each treatment and analyzing the relationship between the biomethane yield and microbial community structure. The results showed that, the additives significantly increased the biomethane yield of the rice straw anaerobic fermentation

收稿日期: 2024-12-11 **录用日期:** 2025-04-30

作者简介: 刘金荣(1999—),男,湖北宜昌人,硕士研究生,研究方向为水稻田生物甲烷生产利用。E-mail:1540509937@qq.com

***通信作者:** 陈芳清 E-mail:fqchen@ctgu.edu.cn

基金项目: 湖北省科技创新专项重点项目(2016AHB014)

Project supported: Hubei Provincial Science and Technology Innovation Special Program(2016AHB014)

system. The biomethane yield of TS(Tween 20+biochar), T(Tween 20) and S(biochar) treatments increased by 390.67%, 182.07%, and 109.56% compared to the control, respectively. The additives significantly enhanced the diversity of bacterial and archaeal communities of the anaerobic fermentation system during the later stages. The Shannon diversity index of the bacteria community in TS, S, and T treatments increased by 28.16%, 26.45%, and 6.27% compared to CK, respectively, while the Chao1 richness index increased by 3.75%, 6.24%, and 24.31%. The Shannon index of the archaeal communities in S, TS, and T treatments was 11.58%, 5.62%, and 2.64% higher than CK, respectively. The additives also altered the composition and structure of dominant genera of bacterial and archaeal communities in the anaerobic fermentation system at the later stages, especially the archaeal community by increasing the relative abundance of *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera* and *Methanosarcina* and decreasing the relative abundance of RumEn M2. In conclusion, three additive treatments enhance biomethane production in anaerobic fermentation systems by improving microbial community diversity during the late fermentation phase and optimizing the compositional structure of microbiota in rice straw digestion. This microbial remodeling reinforces methanogenic metabolic pathways and increases methane production efficiency, with the combined treatment of Tween-20 and biochar demonstrating the most significant improvement.

Keywords: rice straw; anaerobic fermentation; additives; biomethane; microbial community

水稻秸秆和农家肥田间混合厌氧发酵产生物甲烷技术在利用水稻秸秆和农家肥生产新能源的同时，还能改善土壤肥力、减少环境污染和病虫害的发生[1-2]。该技术生产的甲烷可用于发电和农家日常生活的燃气，实现资源循环利用与环境保护的双赢局面。由于该技术主要利用冬天农闲季节进行，加快厌氧发酵系统的发酵进程和提升生物甲烷产率成为该技术应用和推广的关键[3]。研究显示，在厌氧发酵系统中添加腐植酸、吐温20、生物炭等物质可以加快厌氧发酵进程，提高秸秆的降解率和生物甲烷的产率[4-6]。

本团队前期关于添加剂对水稻秸秆与农家肥田间混合厌氧发酵产生物甲烷的研究显示，吐温20和生物炭的添加能够显著促进厌氧发酵进程和提高生物甲烷的产率[5-7]。目前，添加剂对厌氧发酵系统的理化作用机制已经有所揭示。吐温20是一种表面活性剂，在厌氧发酵过程中可以促进酶与底物的扩散，提高酶解效率[8]，生物炭具有较大的比表面积和多孔结构，能够增加反应空间和促进生物膜的形成，减少厌氧发酵过程中中间产物的抑制和促进反应过程的电子传递，提高生物甲烷的产率[9-12]。

生物质厌氧发酵降解通常包含水解酸化、产氢产酸和产甲烷3个过程，每个过程都是通过由微生物主导的系列生化反应来实现的，其中水解酸化和产氢产酸过程由细菌主导，而产甲烷过程则由古菌主导[13]。水稻秸秆与农家肥混合厌氧发酵产甲烷也是一个由多种微生物共同调节的代谢过程，微生物群落的多样性和结构是影响厌氧发酵系统产生物甲烷效率的重要因素[14]。有报道称，生物炭通过富集水解细菌、提高底物浓度，从而提升了甲烷产量，同时生物炭中的官能团有助于维持厌氧发酵系统合适的pH值[15]，以减少厌氧发酵过程中的酸抑制[16]。此外，Seo等[8]的研究表明，在纤维素水解过程中，Tween 20通过提高对纤维素酶的吸附量及纤维素转化率，能显著加速糖化反应。然而，以上研究均未从微生物层面揭示添加剂促进厌氧发酵产甲烷的作用机制。添加剂是否能通过丰富水稻秸秆与农家肥混合厌氧发酵系统的微生物多样性和改变微生物群落的结构促进系统的产生物甲烷性能？为了揭示该科学问题，本研究在模拟水稻秸秆与农家肥田间厌氧发酵系统（水稻秸秆和猪粪为发酵基质，沼液和水稻田土壤浸提液为接种物[17]）的基础上，分别设置了添加吐温20、生物炭及二者混合物的实验处理，通过在发酵进程的不同时期测定与分析各处理生物甲烷产率、微生物群落的多样性和群落组成与结构，揭示添加剂对厌氧发酵系统产甲烷的微生物作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与装置

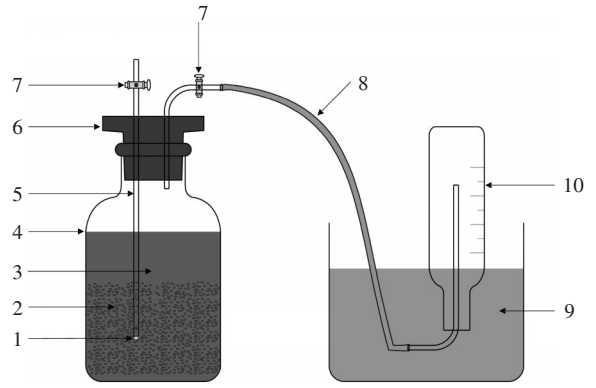
实验材料包括水稻秸秆、猪粪、沼液和水稻土，其中发酵基质为风干后的水稻秸秆和猪粪（表1），微生物接种物为沼液澄清液和水稻土浸提液。沼液澄清液是将沼液静置过滤后的上清液。水稻土浸提液是用1 L去离子水浸泡1 kg土壤，经均匀搅拌和静置过滤后所获得的液体。添加剂包括吐温20（分析纯）和生物炭（3~5 mm竹炭）。

实验用发酵装置包括一个5 L的发酵罐和一个1 L的集气瓶（图1）。发酵罐用于盛装发酵基质、接种物和添加剂，并用橡胶塞密封以形成厌氧环境。橡胶塞上钻有两孔，分别安装集气管和采样管，用于气体

表1 发酵基质的理化性质

Table 1 Physical and chemical characteristics of fermentation substrates

发酵基质 Fermentation substrate	总固体 Total solid/%	挥发性固体 Volatile solid/%	总碳 Total carbon/(g·kg^{-1})	总氮 Total nitrogen/(g·kg^{-1})
水稻秸秆	86.96	69.85	386.46	5.67
猪粪	21.58	15.52	85.70	11.28



1.海绵塞;2.发酵基质;3.发酵液;4.发酵罐;5.采样管;6.橡胶塞;7,止水阀;8.导气管;9.水槽;10.集气瓶。

1.Sponge plug; 2.Fermentation substrate; 3.Fermentation broth; 4.Fermenter; 5.Sampling tube; 6.Rubber plug; 7.Seal clamp; 8.Gas tube; 9.Water tank; 10.Gas cylinder.

图1 厌氧发酵装置示意图

Figure 1 Schematic diagram of the experimental setup for anaerobic fermentation

收集和发酵液采样。用硅胶管将集气管和集气瓶连接,使用排水法收集气体。在瓶内一端用海绵裹住采样管,防止采样时抽出固体物,每次采样后打入等体积氮气保证气压平衡。采样管在瓶外一端,平日用止水阀封闭。

1.2 实验设计

实验以吐温20和生物炭作为添加剂,分别设置吐温20(T处理)、生物炭(S处理)、吐温20+生物炭(TS处理)以及无添加剂的对照(CK)4个处理(表2)。参照本团队前期研究结果,将吐温20浓度设为0.25 g·L^{-1}[5],生物炭用量设为发酵基质质量的5%[6,18]。每个实验单元分别添加120 g水稻秸秆(以干质量计)、100 g猪粪(以干质量计)、1 000 mL沼液澄清液、1 000 mL水稻土浸提液和添加剂,并添加去离子水定容到4 L后混匀密封,然后置于室内进行厌氧发酵实验。以一个厌氧发酵装置为1个实验单元,每种处理设置4个重复,共计16个实验单元。实验开始后每5 d进行1次产气量与甲烷浓度的测定,并在实验的前期(30 d)、中期(60 d)和后期(90 d)分别从各处理采取少量的发酵液作为微生物样品,保存在-80 ℃冰箱中,最后交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行古菌和细菌的高通量测序。整个厌氧发酵共持续90 d。

1.3 产气量的测定与生物甲烷产率的计算

利用排水法测定每个实验单元的产气量,并从所产气体中采集部分样品装入铝箔采样袋中,利用气相色谱法测定生物甲烷浓度[19],根据下式计算甲烷产率。

$$P_M = \frac{P \times C}{m_s \times \omega_s + m_p \times \omega_p}$$

式中:P_M为甲烷产率,即每克挥发性固体的甲烷产量,mL·g^{-1};P为产气量,mL;C为甲烷浓度,%;m_s为水稻秸秆干质量,g;m_p为猪粪干质量,g;ω_s为秸秆挥发性固体含量,%;ω_p为猪粪挥发性固体含量,%。

1.4 微生物MiSeq高通量测序

1.4.1 DNA提取

使用E.Z.N.A™ Mag-Bind土壤DNA试剂盒(Omega,M5635-02,美国)进行总群落基因组DNA提取,并使用Qubit 4.0荧光计(Thermo,美国)测量DNA浓度,以确保提取到足够量的高质量基因组DNA。将每个时期4个重复单元的DNA样本进行充分混合并用于测序分析。

1.4.2 聚合酶链反应

提取DNA后立即开始聚合酶链反应(PCR),使用标准引物进行古菌和细菌的16S rRNA基因扩增。反应体系如下:微生物DNA(10 ng·μL^{-1})2 μL;正向引物(10 μmol·L^{-1})1 μL;反向引物(10 μmol·L^{-1})1 μL;2×Hieff® Robust PCR Master Mix(Yeasen,10105

表2 实验处理组合

Table 2 Experimental treatment combination

处理 Treatment	水稻秸秆 Rice straw/g	沼液澄清液 Biogas slurry/mL	猪粪 Pig manure/g	水稻土浸提液 Paddy soil filtrate/mL	吐温20 Tween 20/(g·L^{-1})	生物炭 Biochar/g
T	120	1 000	100	1 000	0.25	
S	120	1 000	100	1 000		11
TS	120	1 000	100	1 000	0.25	11
CK	120	1 000	100	1 000		

ES03)总计30 μL。封板后,在热循环仪(Applied Biosystems 9700,美国)中进行PCR,程序为:1个循环于95 ℃变性3 min;前5个循环分别于95 ℃变性30 s、45 ℃退火30 s、72 ℃延伸30 s;随后20个循环分别于95 ℃变性30 s、55 ℃退火30 s、72 ℃延伸30 s;最后于72 ℃延伸5 min。对PCR产物进行琼脂糖电泳,采用生工琼脂糖回收试剂盒对PCR产物进行回收,回收产物用Qubit 2.0定量。

1.4.3 MiSeq测序、OTU聚类及多样性计算

使用Qubit® 4.0 Green双链DNA测定法确定每个PCR产物的DNA浓度,并使用生物分析仪(Agilent 2100,美国)进行质量控制,使用Illumina MiSeq系统(美国)进行测序,然后利用Usearch软件(版本11.0.667)将相似度≥97%的有效序列聚类为操作分类单元(OTUs),并利用RDP数据库和UNITE真菌ITS数据库对细菌和古菌OTU代表序列进行分类。古菌和细菌的α多样性指数(包括Shannon多样性和Chao1丰富度指数)的计算利用Mothur 3.8.31软件进行。

1.5 数据分析

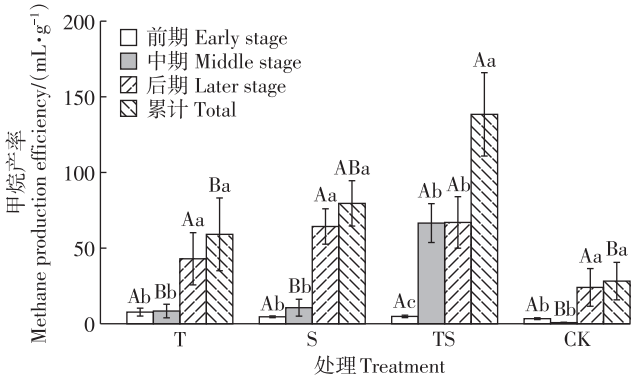
利用SPSS 27软件,以添加剂为自变量、以生物甲烷产率为因变量进行单因素方差分析,并用邓肯法进行多重比较,分析同一时期不同处理之间和同一处理不同时期之间的差异。利用R4.4.1进行古菌群落结构与生物甲烷产率的PCA分析,以揭示古菌群落结构对生物甲烷产率的影响。使用Origin 2022和R4.4.1绘图。

2 结果与分析

2.1 添加剂对厌氧发酵系统甲烷产率的影响

如图2所示,添加剂对水稻秸秆与农家肥混合厌氧发酵产甲烷具有显著的促进作用(P<0.05)。各处理厌氧发酵系统的累计甲烷产率以TS处理最高,其次依次为S处理、T处理和CK。TS处理的累计甲烷产率为138.41 mL·g^{-1},分别比S处理、T处理和CK高73.95%、134.15%和390.67%,表明吐温20和生物炭的混合添加对厌氧发酵系统产气性能的提高最为显著。

各处理厌氧发酵系统的生物甲烷产率均随着厌氧发酵进程发生显著变化,其中T处理、S处理和TS处理均呈不断增加的趋势,而CK则呈先减少后增加的趋势。在厌氧发酵前期,各处理生物甲烷产率无显著差异;在厌氧发酵中期,TS处理的甲烷产率显著高于其他处理,分别比S处理、T处理和CK高241.60%、295.45%和2 076.62%;在厌氧发酵后期,各处理之间



不同大写字母表示同一时期不同处理之间甲烷产率的差异显著,不同小写字母表示同一处理不同时期之间甲烷产率的差异显著(P<0.05)。前期为0~30 d,中期为31~60 d,后期为61~90 d。

Different uppercase letters indicate significant differences in methane production efficiency among different treatments within the same period, and different lowercase letters indicated significant differences in methane production efficiency across different periods in the same treatment (P<0.05). Early stage is 0-30 days, middle stage is 31-60 days, later stage is 61-90 days.

图2 不同添加剂处理厌氧发酵系统的生物甲烷产率

Figure 2 Methane production efficiency of anaerobic fermentation system with different additive treatments

的甲烷产率差异虽然没达到显著水平,但各添加剂处理均高于对照,高低排序为TS、S、T和CK,分别为66.98、64.31、42.96 mL·g^{-1}和24.05 mL·g^{-1}。

2.2 添加剂对厌氧发酵系统微生物群落多样性的影响

在厌氧发酵各时期,细菌的OTUs数目、Shannon多样性指数和Chao1丰富度指数均高于古菌,表明厌氧发酵系统细菌群落的物种数量和物种多样性均高于古菌群落(图3)。添加剂能提高厌氧发酵系统在发酵后期的细菌群落的物种数量和物种多样性,其中T处理的OTUs和Chao1丰富度指数最高,分别比S、TS、CK高15.62%、18.28%、21.89%和17.00%、19.81%、24.31%。TS、S和T处理的Shannon多样性指数分别比CK高28.16%、26.45%和6.27%,表明T处理对厌氧发酵系统发酵后期细菌群落物种数量的增加具有较好的促进作用,而TS、S和T处理则能提高厌氧发酵后期细菌群落的物种多样性。

添加剂还能提高厌氧发酵系统中、后期古菌群落的物种多样性。与CK相比,S、TS和T处理在厌氧发酵中期的Shannon多样性指数分别提高14.02%、13.54%和12.83%,在厌氧发酵后期则分别提高11.58%、5.62%和2.64%。T和S处理在厌氧发酵后期古菌的OTUs数目和Chao1丰富度指数也高于对照,但TS处理则低于对照,表明T和S处理对厌氧发酵系统古菌群落物种数量的增加有一定的促进作用,而

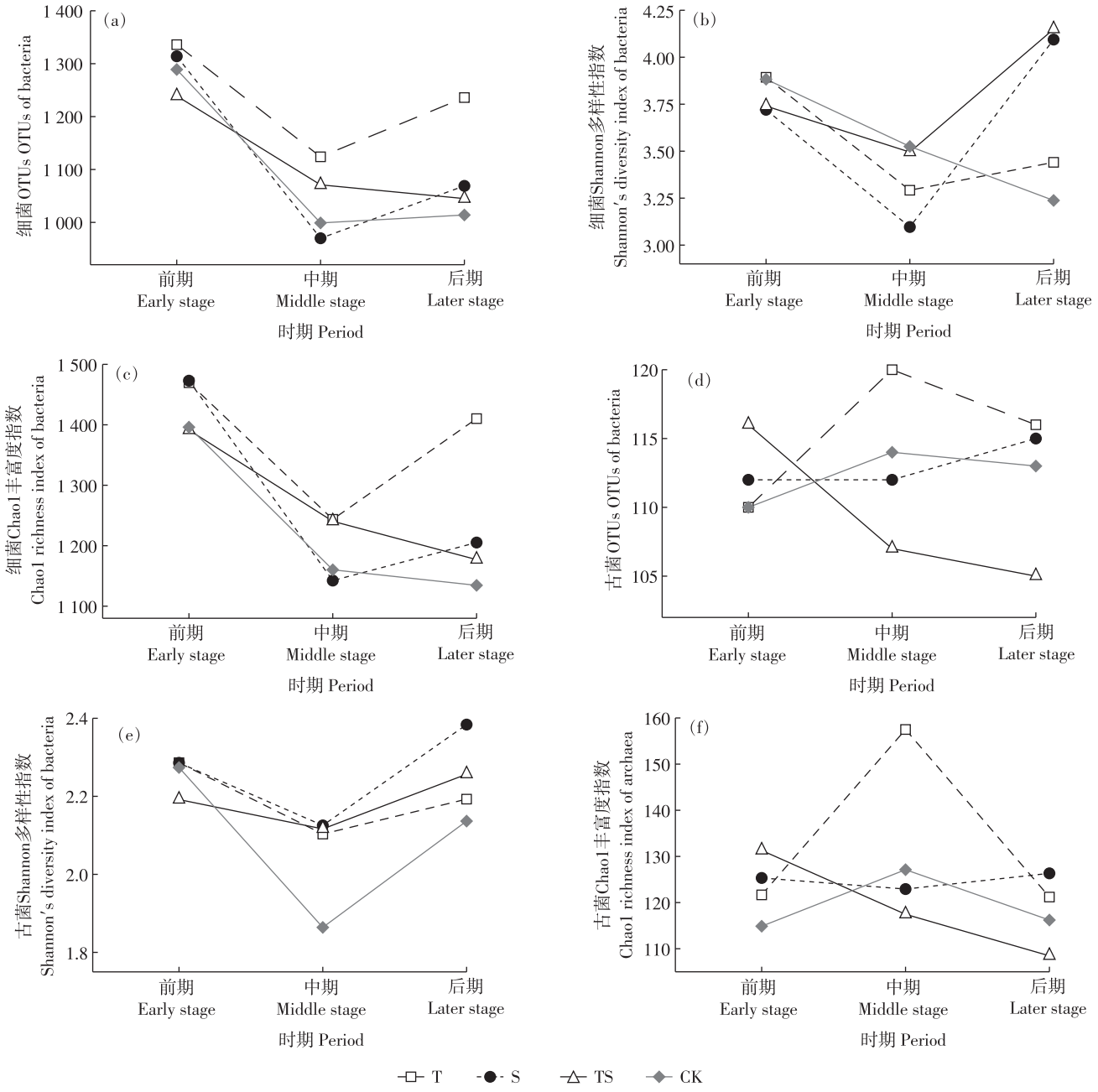


图3 不同添加剂处理厌氧发酵系统细菌和古菌群落多样性随发酵过程的变化

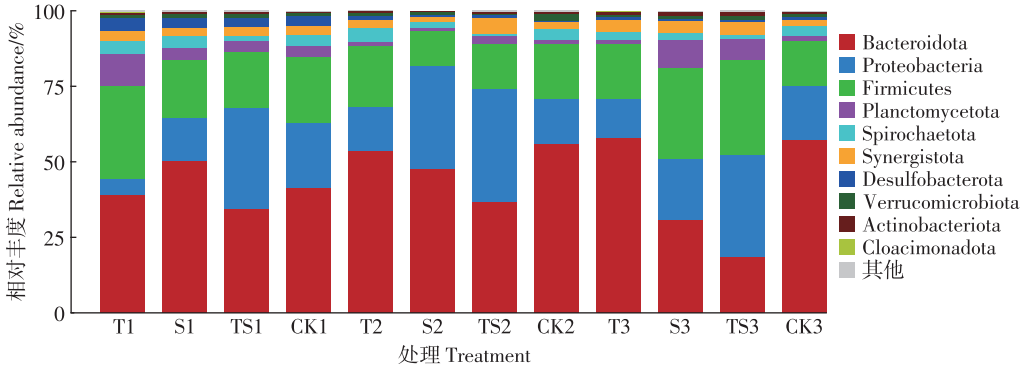
Figure 3 Changes of bacteria and archaea community biodiversity in anaerobic fermentation system treated with different additives along with fermentation process

TS处理反而有一定的抑制作用。

2.3 添加剂对厌氧发酵系统细菌群落组成与结构的影响

2.3.1 细菌群落门组成的丰度变化

各处理厌氧发酵系统的细菌群落主要由拟杆菌门(Bacteroidota)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、浮霉状菌门(Planctomycetota)、螺旋体门(Spirochaetota)、互养菌门(Synergistota)等6个优势细菌门的细菌组成(图4),它们的相对丰度分别为18.48%~57.72%、5.34%~37.46%、11.38%~31.72%、1.10%~10.39%、0.96%~4.33%、1.36%~4.97%,总相对丰度超过了90%。添加剂明显改变了厌氧发酵系统细菌群落的结构。TS处理下厌氧发酵系统在中、后期细菌群落拟杆菌门的相对丰度与CK相比减少了19.21个百分点和38.70个百分点,S处理则减少了8.25个百分点和26.64个百分点。与此同时,在厌氧



各字母后的数字表示厌氧发酵时期:1.前期;2.中期;3.后期。下同。

Number after each letter indicates the anaerobic fermentation period: 1.Early stage; 2.Middle stage; 3.Later stage. The same below.

图4 各处理厌氧发酵系统细菌群落门组成及其相对丰度

Figure 4 Composition and relative abundance of phylum in bacterial community of various anaerobic fermentation systems

发酵系统中、后期TS处理细菌群落变形菌门的相对丰度与CK相比分别增加了22.51个百分点和15.90个百分点,S处理则分别增加了19.25个百分点和2.72个百分点,TS处理浮霉状菌门的相对丰度分别增加了1.19个百分点和5.27个百分点。S处理浮霉状菌门的相对丰度与CK相比在厌氧发酵中期减少了0.12个百分点,而在后期增加了7.70个百分点。与TS和S处理相比,T处理对细菌群落门结构的影响相对较小。

2.3.2 细菌群落属组成的丰度变化

厌氧发酵系统优势细菌属(相对丰度>5%)包括拟杆菌属(*Bacteroides*,5.64%~44.24%)、鲍特氏菌属(*Bordetella*,0.23%~22.98%)、产碱菌属(*Alcaligenes*,0.12%~13.10%)、norank *Bacteroidales*(0.07%~9.75%)、小梨形菌属(*Pirellula*,0.84%~8.15%)、解琥珀酸菌属(*Succiniclasticum*,0.12%~14.49%)、屠宰场拟杆菌属(*Macellibacteroides*,0.38%~5.15%)、梭菌属(*Clostridium*,0.47%~9.46%)、克斯特氏菌属(*Kerstersia*,0.04%~13.66%)、拉梅尔氏芽孢杆菌属(*Rummeliibacillus*,0.11%~8.16%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*,0.03%~7.08%)等(图5)。添加剂能明显改变厌氧发酵系统在发酵中后期细菌群落优势属的组成及其相对丰度。在厌氧发酵中期,与CK相比,S和TS处理分别使厌氧发酵系统拟杆菌属的相对丰度减少了4.77个百分点和13.39个百分点,使假单胞菌属相对丰度分别减少了6.52个百分点和6.77个百分点,使鲍特氏菌属的相对丰度分别增加了11.43个百分点和19.36个百分点,克斯特氏菌属相对丰度分别增加了13.55个百分点和3.97百分点;与CK相比,T处理使norank *Bacillaceae*和芽孢杆菌属(*Bacillus*)的相对丰度分别减少了1.72个百分点和1.76个百分点,使拉梅尔氏芽孢杆菌属和norank *Alcaligenaceae*的相对丰度分别增加了7.11个百分点和4.14个百分点。在厌氧发酵后期,与CK相比,S和TS处理使拟杆菌属相对丰度分别减少了25.54个百分点和31.12个百分点,使产碱菌属相对丰度减少了5.11个百分点和3.63个百分点;使解琥珀酸菌属相对丰度分别增加了7.31个百分点和10.95个百分点,使小梨形菌属相对丰度分别增加了6.87个百分点和4.20个百分点,使短波单胞菌属(*Brevundimonas*)相对丰度分别增加了2.20个百分点和3.59个百分点;T处理使拟杆菌属和鲍特氏菌属的相对丰度分别增加了7.48个百分点和4.26个百分点,而使产碱菌属和*norank Bacteroidales*的相对丰度分别减少了12.98个百分点和9.57个百分点。总体来看,TS和S处理对厌氧发酵系统细菌群落的作用是减少拟杆菌属的相对丰度,增加小梨形菌属、解琥珀酸菌属等的相对丰度,并使优势属的数量得以增加。在厌氧发酵后期,CK处理厌氧发酵系统细菌群落中相对丰度>1%的属为12个,而TS和S处理分别为17个和21个,T处理为16个,以S处理优势属的数量为最多。

2.4 添加剂对厌氧发酵系统古菌群落组成与结构的影响

2.4.1 古菌群落门组成的丰度变化

厌氧发酵系统古菌群落主要由广古菌门(Euryarchaeota)、热变形菌门(Thermoplasmatota)、Halobacterota、泉古菌门(Crenarchaeota)的古菌组成,它们的相对丰度分别为37.84%~87.78%、5.38%~56.65%、1.41%~13.57%、0.07%~2.71%。各处理古菌群落广古菌门和热变形菌门的总丰度均超过85%(图6)。添加剂改变了厌氧发酵系统中后期古菌群落的结构,使广古菌门和Halobacterota的相对丰度增加,而使热变

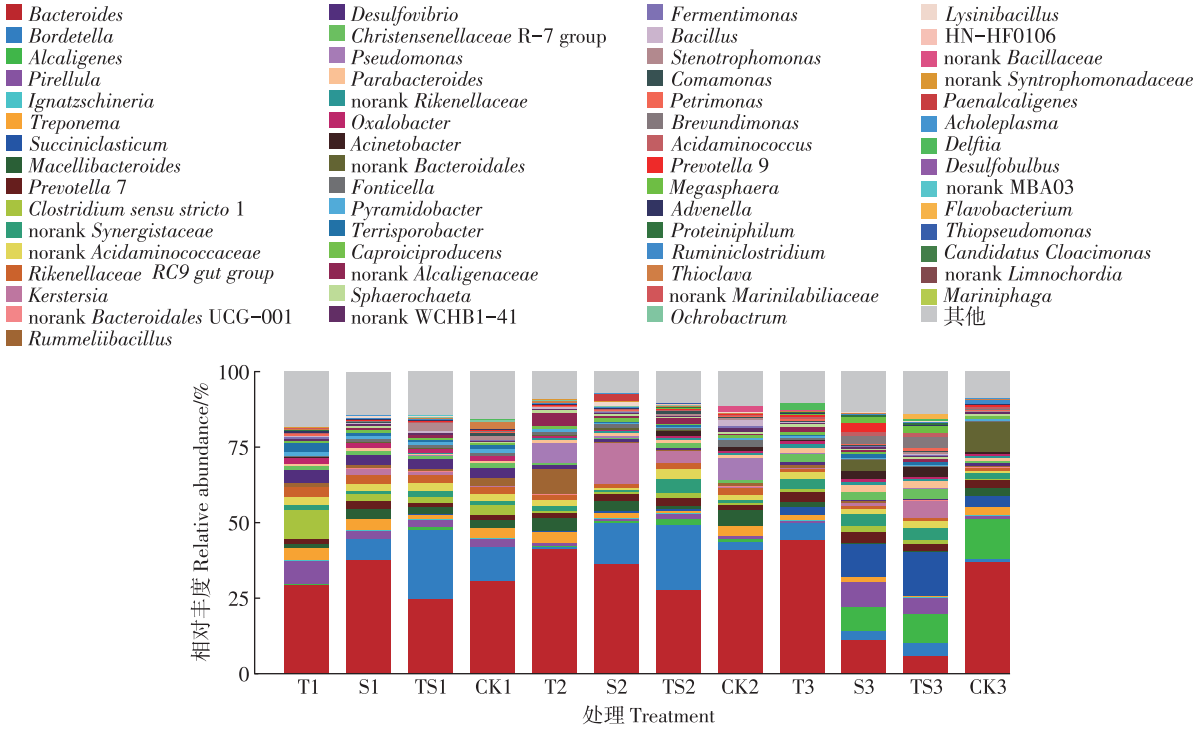


图5 各处理厌氧发酵系统细菌群落属组成及其相对丰度

Figure 5 Composition and relative abundance of genus in bacterial community of various anaerobic fermentation systems

形菌门的相对丰度降低。在厌氧发酵后期，TS、S和T处理使厌氧发酵系统广古菌门的相对丰度与CK相比分别增加了49.94个、37.35个百分点和11.21个百分点，使Halobacterota的相对丰度分别增加了0.80个、7.78个百分点和4.60个百分点，而使热变形菌门的相对丰度与CK相比分别减少了48.70个、43.27个百分点和13.81个百分点，各处理以TS的作用最为明显。

2.4.2 古菌群落属组成的丰度变化

添加剂对厌氧发酵系统古菌群落在发酵后期的优势菌属（相对丰度>4%）组成及其相对丰度有明显影响（图7）。各处理的优势菌属为甲烷短杆菌属（*Methanobrevibacter*）、RumEn M2、甲烷球形菌属（*Methanosphaera*）、甲烷八叠球菌属（*Methanosarcina*）、甲烷泡菌属（*Methanofollis*）、*Candidatus Methanogranum* 和 *Candidatus Methanoplasma*，它们的相对丰度分别为31.34%~61.39%、3.87~52.50%、3.88%~23.43%、0.07%~12.82%、0.01%~8.83%、0.56%~4.99%和0.16%~4.05%，总丰度超过90%。在厌氧发酵后期，TS和S处理使古菌群落甲烷短杆菌属的相对丰度与CK相比分别增加了30.05个百分点和23.88个百分

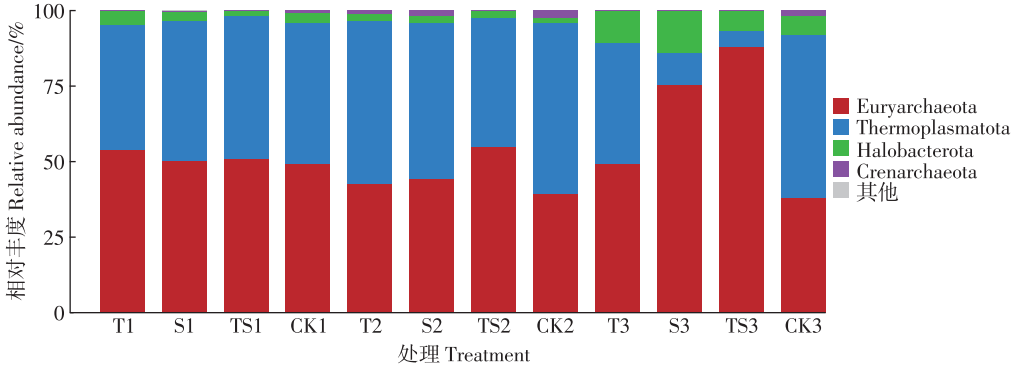


图6 各处理厌氧发酵系统古菌群落门组成及其相对丰度

Figure 6 Composition and relative abundance of phylum in archaeal community of various anaerobic fermentation systems

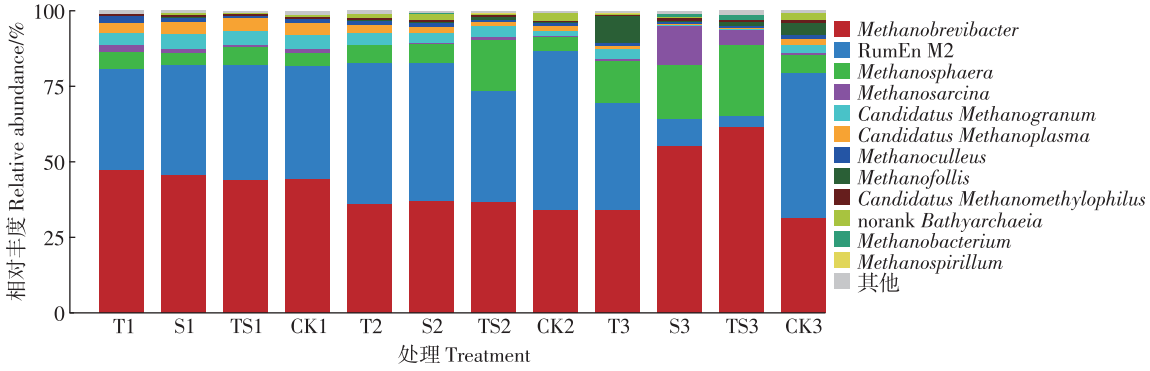


图7 各处理厌氧发酵系统古菌群落属组成及其相对丰度

Figure 7 Composition and relative abundance of genus in archaeal community of various anaerobic fermentation systems

点,使甲烷球形菌属的相对丰度分别增加了17.57个百分点和12.01个百分点,使甲烷八叠球菌属的相对丰度分别增加了4.07个百分点和12.24个百分点;与CK相比,TS和S处理下RumEn M2的相对丰度分别减少了44.25个百分点和39.24个百分点,*Candidatus Methanogranum*的相对丰度分别减少了2.27个百分点和2.26个百分点。T处理对古菌群落的影响较小,与CK相比,T处理使甲烷球形菌属的相对丰度增加了8.21个百分点,使RumEn M2的相对丰度减少了12.91个百分点。在厌氧发酵后期,T、S和TS处理厌氧发酵系统古菌群落相对丰度>1%的属分别为6个、5个和6个,CK为9个,CK优势属的数量最多。

2.5 古菌优势属与生物甲烷产率的主成分分析

各处理古菌群落优势菌属与生物甲烷产率的主成分分析(PCA)结果表明,厌氧发酵系统的生物甲烷产率与古菌群落组成密切相关,各添加剂处理通过改善古菌群落的组成与结构,有效提高了生物甲烷的产率(图8)。在厌氧发酵前期,各处理的甲烷产率均较低,厌氧发酵系统古菌群落的优势菌属主要为*Candidatus Methanoplasma*、*Candidatus Methanogranum*和甲烷袋状菌属(*Methanoculleus*)。在厌氧发酵中期,TS、T和S处理的甲烷产率有显著增加,并以TS的增加幅度最大,而CK的甲烷产率反而有显著下降。T、S处理和CK厌氧发酵系统古菌群落的优势菌属增加了RumEn M2和甲烷泡菌属,而TS处理的优势菌属转变为甲烷球形菌属、甲烷短杆菌属和甲烷八叠球菌属。在厌氧发酵后期,TS处理仍维持较高的甲烷产率,S、T处理和CK的甲烷产率均有显著增加。TS、S和T处理的优势菌属均为甲烷球形菌属、甲烷短杆菌属和甲烷八叠球菌属,T处理和CK的甲烷泡菌属仍保持较高的相对丰度。

3 讨论

3.1 添加剂对厌氧发酵系统发酵过程和生物甲烷产率的作用

厌氧发酵产生物甲烷过程一般分为水解酸化、产

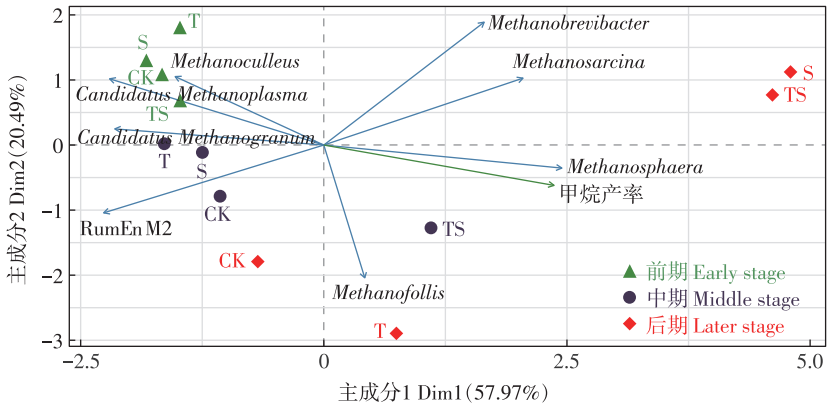


图8 厌氧发酵系统中优势古菌属与生物甲烷产率的主成分分析

Figure 8 Principal component analysis of dominant archaea genera and methane production efficiency in anaerobic fermentation systems

氢产乙酸和产甲烷3个阶段。水解酸化阶段复杂的有机物在水解菌和酸化菌的作用下先分解成可溶性有机物，并进一步分解为氨基酸、葡萄糖等小分子物质。产氢产乙酸阶段是将酸化过程中产生的挥发性脂肪酸与醇类等物质转化为乙酸，释放出氢气和二氧化碳[18]。产甲烷阶段是将乙酸或者氢气和二氧化碳转化为甲烷[20]。上述各反应过程都是在微生物的作用和参与下完成的。研究显示，生物炭具有复杂的多孔结构，能够增加厌氧发酵的生化反应微空间，从而能够促进厌氧发酵进程和提高生物甲烷的产率[21]。生物炭还能促进生物膜的形成以及与种间电子传递相关微生物的富集，达到加速分解底物、提高产甲烷能力的目的[6,22]。吐温20作为一种表面活性剂，除了能够促进反应底物的扩散和增加生化反应面积外，还可以与金属粒子形成络合物，改善细胞的通透性和提高酶的活性，以提升秸秆酶解转化率和增加葡萄糖转化率，增加厌氧发酵系统的产气性能[5,23-24]。

本研究中，各添加剂处理均能加快秸秆厌氧发酵产气进程，显著提高厌氧发酵系统的生物甲烷产率。各处理中以TS处理生物甲烷产率最高，其后依次为S处理和T处理。T处理和S处理的生物甲烷产率也都高于CK。T处理和S处理对厌氧发酵系统产甲烷性能的提升可能与上述生物炭对微反应空间的增加和吐温20对反应底物扩散的促进作用有关。此外，本研究进行的混合厌氧发酵所使用的猪粪中可能含有丰富的微量金属元素[25]，吐温20在微生物细胞对微量金属元素的吸收与利用以及对产甲烷菌生长代谢的促进作用也可能一定程度上提高了厌氧发酵系统的产气性能[23]。TS处理由于综合了生物炭和吐温20的促进效应，其厌氧发酵系统产生物甲烷的性能更为突出。

3.2 添加剂对厌氧发酵系统微生物群落多样性和结构的作用

秸秆厌氧发酵包括不同的反应阶段，每个阶段均包含很多复杂的生化反应途径与反应过程，这些反应过程由大量的微生物种类参与和催化[24]，如梭菌属、假单胞菌属、丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*)和双岐杆菌属(*Bifidobacterium*)等参与有机物质水解和酸化[20,26]，共养单胞菌属(*Syntrophomonas*)和互营杆菌属(*Syntrophobacter*)等参与产氢产乙酸[27]，甲烷八叠球菌和甲烷杆菌等古菌参与产甲烷[28]。OTUs数目一定程度上可以反映样本中微生物种类的数量，Chao1丰富度指数是一种非参数统计量，用于估计一个群落中实际存在的物种数量，两者均随着微生物群落中物种种类的增加而增加，能较为全面地反映微生物群落的丰富度[29]。Shannon多样性指数常用于衡量一个群落的物种多样性，它综合考虑了物种的数量和每个物种的相对丰度[30]。丰富的微生物群落能够保证代谢途径的多样性，以提高厌氧发酵系统对外界环境变化的应对能力[31]。添加适宜的添加剂能有效丰富厌氧发酵系统的微生物多样性，以保证厌氧发酵过程的正常进行和提高生物甲烷的产率[32]。本研究中，T、S和TS处理在厌氧发酵后期均能提高细菌和古菌群落的多样性，T、S和TS处理厌氧发酵系统细菌和古菌群落的Shannon多样性指数均明显高于CK，T和S处理细菌和古菌的OTUs、Chao1也高于CK。TS处理对细菌的OTUs、Chao1也有一定的促进作用，但对古菌的OTUs、Chao1反而有一定的抑制作用。表明吐温20和生物炭及其混合物能够促进厌氧发酵系统细菌群落和古菌群落物种多样性的增加，各添加剂处理对细菌群落物种数量的增加也有促进作用。生物炭可以增加微生物的生存空间，促进与种间电子传递相关的微生物的富集[22]。吐温20可以增加厌氧发酵系统的生化反应面积，改善细胞的通透性，提高微生物细胞的代谢性能[24,33]。生物炭和吐温20对厌氧发酵系统微生物群落物种数量和物种多样性的作用机制可能与上述原因有关。

添加剂还通过改变厌氧发酵系统中后期细菌和古菌群落优势菌属的相对丰度来改善群落的结构。在厌氧发酵后期，S和TS处理使细菌群落由拟杆菌属占优的单优属群落转变为拟杆菌属、小梨形菌属、解琥珀酸菌属和产碱菌属等属共同占优的共优属群落。S和TS处理还增加了甲烷短杆菌属、甲烷八叠球菌属和甲烷球形菌属的等古菌属相对丰度。相比而言，T处理虽然也对厌氧发酵系统细菌与古菌群落的组成与结构有一定改变，但效果没有TS和S处理显著。添加剂对细菌和古菌群落结构的影响机制目前仍不是很清楚，目前普遍认为由于不同种类微生物繁殖与扩散所喜好的环境条件(如pH、温度或底物利用率)不一样[34]，添加剂的使用可能改变了发酵系统的环境条件，从而对厌氧发酵系统细菌和古菌群落优势菌属的相对丰度产生了影响，并由此改变了群落的结构。

3.3 添加剂对厌氧发酵系统产甲烷的微生物作用机制

参与厌氧发酵水解酸化过程的细菌一般包括梭菌属、假单胞菌属、丁酸弧菌属和双岐杆菌属等[20,26]，参与产氢产乙酸过程的细菌主要包含共养单胞菌属

和互营杆菌属等细菌[27]。由于发酵基质和环境的不同,厌氧发酵系统细菌群落的物种组成和结构往往有较大变化[35]。本研究中,参与水解酸化和产氢产乙酸的优势细菌主要包括拟杆菌属、鲍特氏菌属、解琥珀酸菌属、产碱菌属和克斯特氏菌属等。在厌氧发酵后期TS和S处理减少了发酵系统的拟杆菌属和norank *Bacteroidales*等属的相对丰度,增加了小梨形菌属、解琥珀酸菌属、鲍特氏菌属和norank *Synergistaceae*等属的相对丰度。由于拟杆菌目的拟杆菌属和norank *Bacteroidales*的功能是分解纤维素、半纤维素和其他多糖以及产生短链脂肪酸[36],而鲍特氏菌属的功能是将氨基酸分解产生氨和二氧化碳并降解水解液中的醛,解琥珀酸菌属的功能是降解琥珀酸并产生乙酸和二氧化碳[37],小梨形菌属能够将简单有机物发酵成短链脂肪酸(如乙酸、丙酸和丁酸)、氢气和二氧化碳[38],norank *Synergistaceae*的功能是将乙酰辅酶A氧化为氢气和二氧化碳[39],上述变化有利于增加厌氧发酵的代谢途径,促进脂肪酸等中间产物及时分解转化为更小的化合物,降低反应系统的酸性,促进产氢产乙酸的进程。

参与厌氧发酵产生物甲烷阶段的古菌十分复杂,目前已发现7个产甲烷古菌目[40]。按照产甲烷古菌的代谢途径主要分为以甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)等为代表的氢营养型、以甲烷球形菌属等为代表的甲基营养型和以甲烷鬃毛菌属(*Methanosaeta*)等为代表的乙酸营养型3类[41],能量代谢效率依次为氢营养型>甲基营养型>乙酸营养型[42]。本研究中,秸秆厌氧发酵系统中参与厌氧发酵产甲烷过程的古菌主要包括甲烷短杆菌属、RumEn M2、甲烷球形菌属、甲烷八叠球菌属、*Candidatus Methanogranum*和*Candidatus Methanoplasma*等属。由于厌氧发酵系统的生物甲烷产率与古菌群落的组成密切相关,添加剂处理通过改善厌氧发酵后期古菌的组成与结构,有效提高了生物甲烷的产率。TS、S和T处理明显减少了RumEn M2、*Candidatus Methanogranum*和甲烷袋状菌属的相对丰度,增加了甲烷短杆菌属、甲烷八叠球菌属和甲烷球形菌属的相对丰度,T处理还增加了甲烷泡菌属的相对丰度。由于甲烷短杆菌属和甲烷球形菌属的代谢途径为氢营养型,RumEn M2、*Candidatu Methanogranum*和甲烷袋状菌属为甲基营养型[34,43],甲烷八叠球菌属和甲烷泡菌属为乙酸营养型[40-41,44],TS、S和T处理对古菌群落的改变,增加了厌氧发酵系统产甲烷的代谢途径和代谢效率,提高了厌氧发酵系统产生物甲烷的性能。

4 结论

(1)添加剂能显著提升水稻秸秆厌氧发酵系统的生物甲烷产率,吐温20与生物炭复合处理(TS)效果最好,甲烷产率较对照组提高390.67%,远超单一添加剂(吐温20:182.07%;生物炭:109.56%)。

(2)添加剂能够提高水稻秸秆厌氧发酵系统细菌和古菌群落在厌氧发酵后期的物种多样性,TS、S和T处理细菌群落的Shannon多样性指数与CK相比分别提高28.16%、26.45%和6.27%,古菌群落分别提高5.62%、11.58%和2.64%。

(3)添加剂改善了水稻秸秆厌氧发酵系统细菌群落在厌氧发酵后期的物种组成与结构,使群落由单一优势属群落转变为共优势属群落,增加了厌氧发酵水解酸化和产氢产乙酸的代谢途径,其中TS处理效果最好。

(4)添加剂改善了水稻秸秆厌氧发酵系统古菌群落在厌氧发酵后期的物种组成与结构,TS和S处理显著增加了氢营养型产甲烷菌的相对丰度,丰富了产甲烷的代谢途径,提高了产甲烷的代谢效率,从而提高了厌氧发酵系统的产甲烷性能。

参考文献:

[1] CHIAKL H, TATSUYA H, HIROTO T. GET system: establishment of renewable energy, bio-methane, production system from rice straw in fallow paddy field[J]. *Bio-Industry*, 2012, 29: 13-22.

[2] 耿启明, 黄永文, 陈芳清. GET技术应用中农家肥与水稻秸秆混合发酵对土壤肥力的影响[J]. 河南农业科学, 2019, 48(7): 68-73. GENG Q M, HUANG Y W, CHEN F Q. Effects of mixed fermentation of rice straw and livestock manure on soil fertility in GET technology application[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(7): 68-73.

[3] 张永峰. 餐厨垃圾厌氧发酵与高效产气技术试验研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014. ZHANG Y F. Study on anaerobic fermentation of kitchen waste and efficient biogas production technology[D]. Jilin: Jilin Agricultural University, 2014.

[4] PAN X H, ZHANG Y, HE C, et al. Enhancement of anaerobic fermentation with corn straw by pig bone-derived biochar[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 829: 154326.

[5] 张行. 不同添加剂对水稻秸秆混合厌氧发酵产生物甲烷的作用[D]. 宜昌: 三峡大学, 2020. ZHANG H. Effect of different additives on methane produced by mixed anaerobic fermentation of rice straw[D]. Yichang: China Three Gorges University, 2020.

[6] 朱佳琪, 陈芳清, 黄永文, 等. 活性炭对秸秆和猪粪混合厌氧发酵产生物甲烷的影响[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(11): 44-49. ZHU J Q, CHEN F Q, HUANG Y W, et al. Effect of activated carbon on

methane production in the mixed anaerobic fermentation with straw and pig manure[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2022, 61(11):44-49.

[7] 花瑞林, 陈芳清, 黄永文, 等. 生物炭复合载体对稻秸-猪粪混合厌氧发酵产甲烷的影响[J]. 可再生能源, 2024, 42(2):151-158. HUA R L, CHEN F Q, HUANG Y W, et al. Effect of biochar composite carrier on methane production from the mixed anaerobic fermentation of rice straw-pig manure[J]. *Renewable Energy Resources*, 2024, 42(2): 151-158.

[8] SEO D J, FUJITA H, SAKODA A. Effects of a non-ionic surfactant, Tween 20, on adsorption/desorption of saccharification enzymes onto/from lignocelluloses and saccharification rate[J]. *Adsorption*, 2011, 17(5):813-822.

[9] MUMME J, SROCKE F, HEEG K, et al. Use of biochars in anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 164:189-197.

[10] CHEN S S, ROTARU A E, SHRESTHA P M, et al. Promoting interspecies electron transfer with biochar[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4:5019.

[11] CODIGNOLE LUZ F, CORDINER S, MANNI A, et al. Biochar characteristics and early applications in anaerobic digestion:a review [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2018, 6(2): 2892-2909.

[12] SUNYOTO N M S, ZHU M M, ZHANG Z Z, et al. Effect of biochar addition on hydrogen and methane production in two-phase anaerobic digestion of aqueous carbohydrates food waste[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 219:29-36.

[13] RAWOOF S A A, KUMAR P S, VO D N, et al. Sequential production of hydrogen and methane by anaerobic digestion of organic wastes:a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2021, 19(2):1043-1063.

[14] YU Q, SUN C, CAO W X, et al. Rumen fluid pretreatment promotes anaerobic methane production:revealing microbial dynamics driving increased acid yield from different concentrations of corn straw[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2025, 32(37):21931-21945.

[15] 钱璟俐, 嵇华忠, 李雅婕, 等. 生物炭特性及其促进厌氧消化效率的研究进展[J]. 功能材料, 2024, 55(4):4072-4079. QIAN J L, JI H Z, LI Y J, et al. Advances in the characterization of biochar and its promotion of anaerobic digestion efficiency[J]. *Journal of Functional Materials*, 2024, 55(4):4072-4079.

[16] ZHANG L, LI F H, KUROKI A, et al. Methane yield enhancement of mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of algal biomass and food waste using algal biochar:semi-continuous operation and microbial community analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 302: 122892.

[17] 秦凯, 陈芳清, 张行, 等. 接种物对模拟田间厌氧发酵系统甲烷生产和秸秆降解的作用[J]. 环境科技, 2020, 33(4):1-5. QIN K, CHEN F Q, ZHANG H, et al. Effects of inoculum on methane production and straw degradation in a simulated field anaerobic fermentation system[J]. *Environmental Science and Technology*, 2020, 33(4):1-5.

[18] 花瑞林. 生物炭负载催化调节剂对厌氧发酵产生物甲烷的影响[D]. 宜昌:三峡大学, 2023. HUA R L. Effect of biochar loaded catalytic modifiers on methane production from anaerobic fermentation[D]. Yichang:China Three Gorges University, 2023.

[19] 中华人民共和国环境保护部. 环境空气 总烃、甲烷和非甲烷总烃的测定 直接进样-气相色谱法:HJ 604—2017[S]. 北京:中国环境科学出版社, 2018. Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. Ambient air:determination of total hydrocarbons, methane and nonmethane hydrocarbons:direct injection / gas chromatography:HJ 604—2017[S]. Beijing:China Environmental Science Press, 2018.

[20] KHAN M A, NGO H H, GUO W S, et al. Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 219:738-748.

[21] LUO C H, LÜ F, SHAO L M, et al. Application of eco-compatible biochar in anaerobic digestion to relieve acid stress and promote the selective colonization of functional microbes[J]. *Water Research*, 2015, 68:710-718.

[22] MA J Y, WEI H W, SU Y L, et al. Powdered activated carbon facilitates methane productivity of anaerobic co-digestion *via* acidification alleviating:microbial and metabolic insights[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 313:123706.

[23] 王永泽, 杨立, 张婷, 等. 金属离子及表面活性剂对秸秆发酵产沼气的影响[J]. 可再生能源, 2010, 28(2):30-32. WANG Y Z, YANG L, ZHANG T, et al. Effect of metal ions and surfactant addition on biogas production[J]. *Renewable Energy Resources*, 2010, 28(2):30-32.

[24] LIANG J S, FANG W, WANG Q Y, et al. Metagenomic analysis of community, enzymes and metabolic pathways during corn straw fermentation with rumen microorganisms for volatile fatty acid production[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342:126004.

[25] 穆虹宇, 庄重, 李彦明, 等. 我国畜禽粪便重金属含量特征及土壤累积风险分析[J]. 环境科学, 2020, 41(2):986-996. MU H Y, ZHUANG Z, LI Y M, et al. Heavy metal contents in animal manure in China and the related soil accumulation risks[J]. *Environmental Science*, 2020, 41(2):986-996.

[26] LI Y, CHEN Y G, WU J. Enhancement of methane production in anaerobic digestion process:a review[J]. *Applied Energy*, 2019, 240: 120-137.

[27] LI L H, LI Y, SUN Y M, et al. Effect of bioaugmentation on the microbial community and mono-digestion performance of *Pennisetum* hybrid[J]. *Waste Management*, 2018, 78:741-749.

[28] 易悦, 周卓, 黄艳, 等. 我国产甲烷古菌研究进展与展望[J]. 微生物学报, 2023, 63(5):1796-1814. YI Y, ZHOU Z, HUANG Y, et al. Methanogen research in China:current status and prospective[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(5):1796-1814.

[29] KEMP P F, ALLER J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments:what 16S rDNA libraries can tell us[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47(2):161-177.

[30] GOTELLI N J, COLWELL R K. Quantifying biodiversity:procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness [J]. *Ecology Letters*, 2001, 4(4):379-391.

[31] TALAVERA-CHRO A G, LIRA I O H D, CRUZ E R, et al. The Realm of microorganisms in biogas production: Microbial diversity, functional role, community interactions, and monitoring the status of biogas plant[J]. *Biogas Production*, 2020: 179-212.

[32] ZHOU X, ZHAO J L, ZHANG X T, et al. An eco-friendly biorefinery strategy for xylooligosaccharides production from sugarcane bagasse using cellulosic derived gluconic acid as efficient catalyst[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 289: 121755.

[33] KONG X X, GUI Q, LIU H Y, et al. Efficient synthesis of chiral aryl alcohol with a novel kosakonia radicincitans isolate in Tween 20/L-carnitine: lysine-containing synergistic reaction system[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2024, 196(3): 1509-1526.

[34] IINO T, TAMAKI H, TAMAZAWA S, et al. *Candidatus* Methanogranum caenicola: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata*[J]. *Microbes and Environments*, 2013, 28(2): 244-250.

[35] 李文珊, 孙诗瑶, 王燚, 等. 土壤基质影响下叶凋落物际细菌群落特征及其与分解速率的关联性[J]. 生态学报, 2024, 44(17): 7673-7687. LI W S, SUN S Y, WANG Y, et al. Characteristics of bacterial communities in the leaf detritusphere under the influence of soil and their association with decomposition rates[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2024, 44(17): 7673-7687.

[36] CHENG J B, HU J L, GENG F, et al. *Bacteroides* utilization for dietary polysaccharides and their beneficial effects on gut health[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(5): 1101-1110.

[37] LOUIS P, FLINT H J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 294(1): 1-8.

[38] CHOUARI R, LE PASLIER D, DAEGELEN P, et al. Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7354-7363.

[39] 张雪, 张辉, 承磊. 获取有机物厌氧降解产甲烷过程中关键功能类群: 互营细菌培养物[J]. 微生物学报, 2019, 59(2): 211-223. ZHANG X, ZHANG H, CHENG L. Key players involved in methanogenic degradation of organic compounds: progress on the cultivation of syntrophic bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(2): 211-223.

[40] 周阳, 黎印, 金巍, 等. 瘤胃甲烷菌第七目的研究进展[J]. 微生物学报, 2020, 60(1): 1-12. ZHOU Y, LI Y, JIN W, et al. Progress of *Methanomassiliicoccales* in the rumen[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(1): 1-12.

[41] 张坚超, 徐镱钦, 陆雅海. 陆地生态系统甲烷产生和氧化过程的微生物机理[J]. 生态学报, 2015, 35(20): 6592-6603. ZHANG J C, XU Y Q, LU Y H. Microbial mechanisms of methane production and oxidation in terrestrial ecosystems[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(20): 6592-6603.

[42] WELTE C, DEPPENMEIER U. Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of aceticlastic methanogens[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1837(7): 1130-1147.

[43] HAO L P, FAN L, CHAPLEUR O, et al. Gradual development of ammonia-induced syntrophic acetate-oxidizing activities under mesophilic and thermophilic conditions quantitatively tracked using multiple isotopic approaches[J]. *Water Research*, 2021, 204: 117586.

[44] 冷欢, 杨清, 黄钢锋, 等. 氢营养型产甲烷代谢途径研究进展[J]. 微生物学报, 2020, 60(10): 2136-2160. LENG H, YANG Q, HUANG G F, et al. Recent advances in hydrogenotrophic methanogenesis[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(10): 2136-2160.

(责任编辑:宋潇)