张孟姣,赵丛旭,原田,等.四环素胁迫下铁镁改性生物炭强化牛粪厌氧发酵研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2025,45(3):111-120.
Zhang M J, Zhao C X, Yuan T, et al. Enhanced anaerobic fermentation of cattle manure with iron-magnesium-modified biochar under tetracycline stress[J]. Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2025,45(3):111-120.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202412001

四环素胁迫下铁镁改性生物炭强化牛粪厌氧发酵研究

张孟姣[1],赵丛旭[1],原田[1],张秋贤[1],刘娜[1],王雪融[2],曹燕篆[1*],程红艳[1*]

(1.山西农业大学 资源环境学院,山西 晋中 030801;2.吉林省舒兰市农业技术推广中心,吉林 舒兰 132600)

摘　要:[目的]畜禽粪便中残留的四环素类抗生素不仅对生态环境及人类健康造成威胁,同时影响其厌氧发酵沼气产量。为了提高抗生素胁迫下畜禽粪便产甲烷效率,在畜禽粪便厌氧发酵体系中添加生物炭及铁镁改性生物炭。[方法]通过测定甲烷产量、发酵样品中的化学需氧量(SCOD)、挥发性脂肪酸(VFAs)以及微生物群落结构变化,探究生物炭添加对四环素胁迫下牛粪厌氧发酵产气特性的影响。[结果]铁镁改性生物炭能解除四环素对甲烷产生的抑制作用,累积甲烷产量比单独加抗生素处理提高21.86%。四环素虽然促进了乙酸的生成,却严重抑制丁酸的产生,铁镁改性生物炭能显著增加发酵体系中SCOD浓度和丁酸含量,从而促进甲烷的产生,累积甲烷产量达到4141 mL,比未改性生物炭处理提高16.32%。另外,四环素的存在降低了厌氧发酵体系中Firmicutes(厚壁菌门)、Bacteroidota(拟杆菌门)和氢营养型产甲烷菌Methanobacterium(甲烷杆菌属)的相对丰度,投加铁镁改性生物炭后增加了微生物群落结构丰富度和多样性。[结论]四环素对牛粪产甲烷的抑制作用主要发生在厌氧发酵前期,生物炭的投加能够起到缓解作用,且铁镁改性生物炭的效果优于未改性生物炭。

关键词:畜禽粪便;四环素;铁镁改性生物炭;厌氧发酵;微生物群落
中图分类号:X713　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2025)03-0111-10

Study on enhanced anaerobic fermentation of cattle manure with iron-magnesium-modified biochar under tetracycline stress

Zhang Mengjiao[1], Zhao Congxu[1], Yuan Tian[1], Zhang Qiuxian[1], Liu Na[1], Wang Xuerong[2], Cao Yanzhuan[1*], Cheng Hongyan[1*]

(*1.College of Resources and Environment, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China; 2.Agricultural Technology Extension Center of Shulan City, Jilin Province, Shulan 132600, China*)

Abstract: [Objective] Residual tetracycline antibiotics in livestock manure not only pose a threat to the ecological environment and human health but also affect their biogas production during anaerobic fermentation. To improve the efficiency of methane production from livestock manure under antibiotic stress, biochar and iron-magnesium modified biochar were added to the anaerobic fermentation system of cattle manure. [Methods] The effects of biochar addition on biogas production characteristics of anaerobic fermentation of cattle manure under tetracycline stress were investigated by measuring methane yield, soluble chemical oxygen demand (SCOD), volatile fatty acids (VFAs), and changes in microbial community structure in fermentation samples. [Results] The results showed that iron-magnesium modified biochar alleviated the inhibitory effect of tetracycline on methane production, increasing cumulative methane production by 21.86% compared to the treatment with antibiotics alone. Although tetracycline promoted acetic acid production, it seriously inhibited the production of butyric acid. Iron-magnesium modified bio-

收稿日期:2024-12-02　　**修回日期**:2025-03-10
基金项目:山西农业大学"特""优"农业高质量发展科技支撑工程项目(TYGC24-03);山西省重点研发计划项目(201903D211013);山西省重大科技专项(202301140601015)
作者简介:张孟姣(ORCID:0009-0000-3046-6248),硕士研究生,研究方向:农业废弃物资源化利用
*通信作者:曹燕篆(ORCID:0000-0002-4823-2834),副教授,博士,E-mail:caoyanzhuan@126.com;程红艳(ORCID:0009-0001-4281-0445),教授,硕士,E-mail:ndchenghy@163.com

char significantly increased SCOD concentration and butyric acid content in the fermentation system, which promoted the methane production, with a cumulative methane yield of 4141 mL, which was 16.32% higher than that of unmodified biochar treatment. In addition, tetracycline decreased the relative abundance of Firmicutes, Bacteroidota, and the hydrogenotrophic methanogenic bacteria Methanobacterium in the anaerobic fermentation system. The addition of iron-magnesium modified biochar increased microbial community richness and diversity. [Conclusion] The inhibitory effect of tetracycline on methane production from cattle manure mainly occurs in the early stage of anaerobic fermentation. Biochar addition mitigated this inhibition, with iron-magnesium modified biochar outperforming unmodified biochar.

Keywords: Livestock manure, Tetracycline, Iiron-magnesium-modified biochar, Anaerobic fermentation, Microbial community

由于畜禽养殖业的集约化、规模化发展,大量的兽用抗生素类药物应用于养殖业并逐年增加。近年来,我国畜禽养殖业抗生素用量已超过12万吨/年[1],目前常用的抗生素有四环素类、大环内酯类、氟喹诺酮类、磺胺类、β内酰胺类、氯霉素类等[2]。其中,四环素(TC)是最常用的抗生素之一,每年使用量超过2000吨,占比可达40%左右[3-4]。在畜禽粪便中四环素的检出率和浓度最高,浓度范围为2.52~271 200 μg/kg[5]。在养殖过程中使用的抗生素大部分不能被畜禽完全吸收,其中30%~90%会以粪尿的形式排出[6],扩散到土壤、水体和大气等各种环境中,对环境和人类的健康造成严重威胁[7]。

利用厌氧发酵(anaerobic digestion,AD)可以实现畜禽粪便的资源化循环利用,是一种备受关注的可再生可持续能源技术。然而抗生素的大量富集将会影响厌氧发酵效率,通常表现为抑制作用,即使是毫克每升的抗生素浓度水平也可观察到对厌氧消化的有害影响。例如,Liu等[8]发现,厌氧发酵系统中8 mg/L的四环素导致每日产甲烷量减少73.3%。牛琳琳[9]的研究也有类似发现,当土霉素浓度为80 mg/L时,产气抑制率达到91.44%。于此同时,四环素还可以诱导丙酸的积累,从而降低化学需氧量(SCOD)的去除[10]。研究还表明抗生素的抑制作用随着剂量浓度的升高而加强,例如5 mg/L的大观霉素使甲烷产量减少47.12%,10 mg/L浓度使甲烷产量进一步减少55.13%。抗生素会对畜禽粪便厌氧发酵的微生物产生毒性作用,抑制某些功能微生物[11],并且破坏微生物群之间的平衡[12]。

近年来,在厌氧发酵中添加碳基或铁基材料被认为是实现高效性能的策略,其中生物炭因其理化性质稳定、成本低廉而备受关注[13]。生物炭是指在缺氧或低氧条件下,通过高温(200~1000 ℃)热解和炭化形成的一种环保材料[14],与传统的添加剂如天然沸石、活性炭等相比更经济安全[15]。研究表明,在厌氧发酵系统中添加生物炭可以吸附抗生素[16],提高系统的缓冲能力和厌氧消化效率[17],介导微生物之间的直接电子转移(DIET),为微生物代谢提供良好的栖息地等,从而保证系统的稳定运行。目前已有众多研究将不同材料制作的生物炭应用于禽畜粪便的发酵体系中,可提高甲烷产量、促进水解、减轻氨抑制,增强消化系统的稳定性。Jang等[18]报道添加10 g/L的牛粪生物炭,可提高累积甲烷产量27.65%,延滞期缩短14.3%。江丽[19]研究油茶壳生物炭对污泥厌氧消化有机质降解的影响,发现生物炭的加入对水解过程有促进作用,总固体和挥发性固体去除率分别提高了72%和30%。秸秆生物炭的存在不仅增加了沼气产量,还减轻了氨的抑制[20]。此外,Li等[21]发现添加咖啡渣生物炭提高甲烷累积产量15%~29%,这可能是生物炭的加入富集了更多参与电子传递的微生物,加快了体系挥发性脂肪酸的转化与甲烷的生成过程。

本研究旨在探究四环素浓度对牛粪厌氧发酵产甲烷的影响,研究未改性生物炭和铁镁改性生物炭对四环素胁迫下牛粪厌氧发酵的调节作用,探究生物炭添加对牛粪厌氧发酵体系中微生物群落结构的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究使用的牛粪取自山西农业大学牧站,进行除杂、混匀后,分装冷冻于-24 ℃的冰箱中,使用前1 d取出待用,接种物从实验室正在运行的发酵罐中获得,底物和接种物的主要理化性质见表1。四环素购自中国上海元业生物有限公司。以玉米秸秆为原料制备原始生物炭和铁镁改性生物炭。

表1　消化底物和接种物的理化性质

Table 1　Physicochemical properties of digested substrates and inoculated sludge

类型 Types	pH	电导率/(mS/cm) Electrical conductivity	总固体/% Total solids	挥发性固体/% Volatile solids	有机碳/(g/kg) Organic carbon
牛粪 Manure	7.68±0.02	3.11±0.01	16.69±0.33	78.00±0.23	382.39±20.00
接种物 Inoculum	—	—	12.18±0.30	29.45±0.20	—

1.2　生物炭的制备

原始生物炭(BC):玉米秸秆粉碎,以瓷舟置入管式炉,氮气20 mL/min吹扫30 min后,以5 ℃/min升温至400 ℃下保持3 h,关闭电源,保持氮气流量不变,自然降温至室温后,取出焙烧固体产物得到热解原始生物炭。

铁镁改性生物炭(MBC):将烘干后的玉米秸秆研磨后,进行改性预处理:加入混合液(Mg^{2+}/Fe^{3+}=0.5即0.33 mol/L的$MgCl_2$和0.33 mol/L的$FeCl_3$),放入恒温培养摇床震荡1 h(温度为50 ℃,转速为2000 r/min),离心后进行固液分离(10 000 r/min,10 min),将固体于烘干箱80 ℃进行烘干,热解方式与上述原始生物炭制备方式相同。

能量色散X射线光谱(EDS)分析了生物炭中的元素占比(表2),铁镁改性生物炭的Fe、Mg元素占比显著高于原始生物炭,特别是Fe元素,这表明成功制备了参杂铁镁的改性生物炭。同时可以观察到MBC的O含量明显增加,这是因为在热解炭化过程中Mg以氧化物的状态负载到生物炭上[22]。

表2　EDS分析结果

Table 2　EDS analysis results

生物炭 Biochar	元素 Element	Wt/%
原始生物炭 BC	C	67.65
	O	18.65
	Mg	0.45
	Fe	0.14
铁镁改性生物炭 MBC	C	41.92
	O	36.84
	Mg	1.46
	Fe	10.48

1.3　试验方案

本研究于1 L的玻璃发酵瓶中进行,工作体积为500 mL。在反应器中加入牛粪(149.79 g)和活性污泥(50 mL)。根据不同四环素(TC:30 mg/L)和生物炭(BC:5g/L)添加策略,设置6个试验组,分别命名为TC(四环素)、BC(原始生物炭)、MBC(铁镁改性生物炭)、TBC(四环素+原始生物炭)、TMBC(四环素+铁镁改性生物炭),设置不添加四环素和生物炭的空白组作为对照,每个样品设置3个重复。使用1 mol/L NaOH或HCl溶液将初始混合物的pH值调节到7.0。所有反应器冲入高纯氮气2 min,以保证厌氧条件,反应器用橡胶隔片和塑料盖密紧密封,放入恒温培养箱(37±2) ℃中进行发酵。经过25 d的厌氧发酵,反应器中累积甲烷产量的增长速度趋于平稳,这意味着大部分牛粪的消化已经完成。发酵过程中的0、5、10、15、20、25 d从反应器中取样进行下一步的分析。

1.4　沼气的测定

发酵产气总量使用BMP-Test系统(WAL-BMP-Testsystem 3150,WAL,德国)测定,通过发酵瓶内与大气压的绝对压力差值计算日产沼气量[23]。甲烷含量使用Biogas 5000气体分析仪(Geotech,英国)测定。

$$PV = n\mathrm{RT}$$

$$V_{biogas} = \frac{\triangle P \times V_{headspace} \times \mathrm{C}}{\mathrm{R} \times \mathrm{T}}$$

式中V_{biogas}是每日沼气产量(mL),$\triangle P$是绝对压差(kPa),$V_{headspace}$是发酵瓶顶部体积(mL),C是摩尔质量(22.41 mol/L,273.15 K,101.325 kPa),R是通用体积常数(8.314 LkPa/K/mol),T是绝对温度值(K)。

1.5　分析方法

所取发酵样品经12 000 r/min,10 min离心后,获得的上清液保存于-24 ℃,用于理化指标的检测。TS(总固体)使用恒温干燥箱(GZX-9246 MBE,Boxun Industries Co.,Ltd,中国)105 ℃下测量24 h,VS(挥发性固体)在马弗炉(LX0711,labtery,中国)中600 ℃中灼烧2 h后称重进行测

定,溶解性化学需氧量(SCOD)使用COD快速检测仪,(Lovibond E799718,Berlin,德国)测定[24]。挥发性脂肪酸(VFAs)浓度利用高效液相色谱仪(TRACETM1300, Thermo Fisher Scientific, 中国)测定,测定条件为伯乐Aminex HPX-87H液相色谱柱,SPD-S20A检测器,柱温40 ℃,流动相为5 mmol/L H_2SO_4,流速为0.6 mL/min,测定时间40 min[25]。

1.6 微生物群落分析

在发酵的不同阶段(发酵0、10、25 d)从反应器中收集样品,并使用DNA分离试剂盒进行DNA的提取,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA。获得质量合格的DNA后,用引物338F (5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3′)/806R(5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′)扩增细菌16S的rRNA基因V3-V4区,利用524F(5′-TGYCAGCCGCCGCGGTAA-3′)/958R(5′-YCCGGCGTTGAVTCCAATT-3′)扩增古细菌16S rRNA基因V4-V5区。PCR产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN公司)回收PCR产物。纯化后的扩增产物使用Illumina Miseq测序平台(上海美吉生物科技有限公司,中国)进行测序。

1.7 数据分析

采用Excel 2010对数据进行分析,通过SPSS 27.0软件进行显著性分析,$P<0.05$则认为差异性显著,在Origin 2021中进行图形绘制。

2 结果与讨论

2.1 四环素和生物炭对牛粪厌氧发酵产气的影响

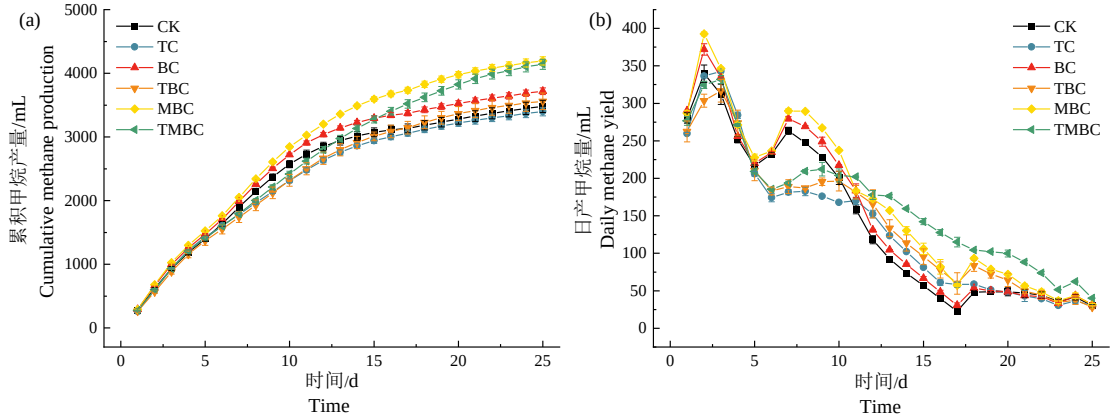
四环素和不同生物炭投加下牛粪厌氧发酵25 d的累积甲烷产量和日产甲烷量如图1所示。发酵第10天CK的累积甲烷产量为2 573.31 mL,投加四环素的TC组累积甲烷产量降低至2 311.37 mL,比CK降低了10.17%;发酵结束时,TC的累积甲烷产量比CK降低了2.32%,说明四环素对甲烷生成的抑制作用在发酵前期大于后期。Rani等[18]研究发现,发酵初期抗生素会降低系统生物多样性,但后期将会持续恢复。生物炭能缓解四环素对反应体系的抑制作用,TBC、TMBC的累积甲烷产量分别比TC提高4.76%和21.86%。从厌氧发酵的整个过程来看,生物炭的单独投加对甲烷产量有积极影响,投加BC和铁MBC反应器的累积甲烷产量与CK相比,分别增加了6.89%和20.57%,MBC显著增加了累积甲烷产量($P<0.05$)。Cui等[26]发现在厌氧发酵过程中添加的生物炭浓度大于3 g/L时,能有效促进有机物的溶解,为产甲烷过程提供充足的底物。

如图1(b)所示,单独投加生物炭的处理组,反应器中产甲烷量的趋势并未改变。相反,投加四环素和生物炭的处理组,系统从第5 d后的日产甲烷量趋势改变。CK、BC和MBC组的日产甲烷量在第2 d和第7 d达到产气高峰。TC、TBC、TMBC组却只出现了第1个产气高峰,再次反映四环素对发酵反应体系初期有较强的抑制作用。第7天CK的峰值为263.34 mL,BC和MBC的峰值为279.50 mL和289.97 mL,分别高于CK 6.14%和10.11%,这说明MBC促进系统产甲烷的效果比BC要好。据报道[27],铁镁壳聚糖改性生物炭可以提高厌氧颗粒污泥中乙酸激酶和辅酶F420酶的含量,从而促进甲烷的生成。综上所述,四环素的投加抑制了甲烷的生成,生物炭能解除这种抑制作用,且MBC作用较明显。

2.2 四环素和生物炭对牛粪厌氧发酵过程的影响

大分子有机物的降解是考察厌氧发酵效率的关键指标。可溶性化学需氧量SCOD反映牛粪中的有机物水解后溶于发酵液的情况,其主要成分为乙酸、H_2、丙酸盐、丁酸盐等[28]。各处理组SCOD浓度变化如图2a所示,SCOD浓度呈先上升后降低的趋势,发酵第5天达到峰值,其中CK组的SCOD含量为4576 mg/L,投加四环素后SCOD浓度降低至3065 mg/L,有机物的溶出效率降低了4.95%;投加生物炭后,TBC、TMBC的SCOD浓度分别上升至4405 mg/L和5260 mg/L,有机物的溶出效率分别比TC提高了1.26%和20.92%,说明生物炭能有效缓解四环素对厌氧发酵水解过程的抑制作用。单独投加生物炭的处理组BC和MBC的SCOD均值为3443 mg/L和3689 mg/L,比CK(3024 mg/L)提高了13.85%和22.00%,说明生物炭促进了有机物的溶出,提高蛋白质、多糖和脂类的水解效率[29],可为后续产甲烷过程提供充足底物。

挥发性脂肪酸(VFAs)是产甲烷反应的底物,其浓度通常用来反映发酵系统的稳定性[30]。四环



CK:四环素 0 mg/L+生物炭 0 g/L; TC:四环素 30 mg/L+生物炭 0 g/L; BC:四环素 0 mg/L+生物炭 5 g/L; TBC:四环素 30 mg/L +生物炭 5 g/L; MBC:四环素 0 mg/L+生物炭 5 g/L; TMBC:四环素 30 mg/L+生物炭 5 g/L;下同

CK:tetracycline 0 mg/L+biochar 0 g/L; TC:tetracycline 30 mg/L+biochar 0 g/L; BC:tetracycline 0 mg/L+biochar 5 g/L; TBC:tetracycline 30 mg/L +biochar 5 g/L; MBC:tetracycline 0 mg/L+biochar 5 g/L; TMBC:tetracycline 30 mg/L+biochar 5 g/L;Same below

图 1　厌氧发酵过程中累积甲烷产量(a)和日产甲烷量(b)

Fig.1　Cumulative methane production(a) and Daily methane yield(b) during AD

素和不同生物炭投加下VFAs浓度如图2b所示,与对照组相比,TC组VFAs浓度显著降低($P<0.05$),四环素抑制了VFAs的产生和转化。MBC组和BC组较CK高,TMBC组和TBC组较TC组高,说明生物炭促进了VFAs的产生,在一定程度上缓解四环素对VFAs产生的抑制作用。王高骏[31]等研究发现,0.5 mg/L和50 mg/L的四环素压力下对发酵性能均有抑制作用,生物炭通过刺激潜在的DIET通路缓解产甲烷抑制、抑制细胞外聚合物质的分泌,还可以通过调节微生物群落等方面缓解厌氧发酵性能。

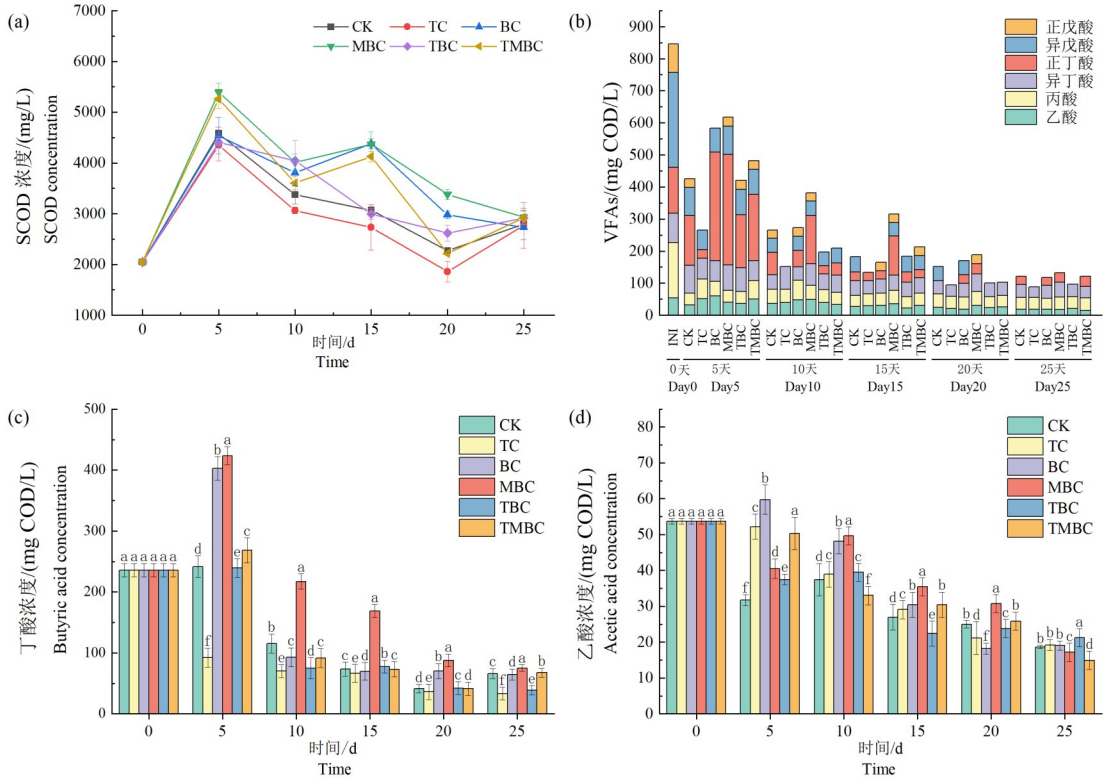
丁酸是厌氧消化过程中重要的中间代谢产物,互营丁酸氧化菌将丁酸氧化为乙酸和H_2/CO_2,随后被产甲烷菌转化为CH_4[30]。发酵体系中丁酸和乙酸的浓度如图2c和图2d所示,丁酸浓度占总的VFAs的比例为46.04%,且与乙酸浓度之和为61.42%,根据郑明月等[32]的研究属于丁酸型发酵。生物炭显著增加厌氧发酵中第5~20天的乙酸浓度,增加的乙酸为产甲烷菌提供更多可利用的底物[33]。四环素的存在促进乙酸的生成,却大大抑制了丁酸的产生。T、TBC、TMB的平均丁酸浓度分别为60、94、108 mg COD/L,可以看出生物炭和改性生物炭都能缓解四环素对丁酸的抑制作用,但MBC的效果强于BC。对照组和生物炭组的丁酸浓度差异显著,CK、BC、MBC的平均丁酸浓度分别为127、139、194 mg COD/L,MBC组高出CK 52.76%。铁镁改性生物炭增加了丁酸和SCOD浓度(图2a),因此MBC的甲烷产量最高。根据以往的研究,具有氧化还原活性的生物炭可以在不利条件下加强潜在的DIET,促进协同代谢[34-35]。

2.3　微生物多样性与群落变化

采用16s rRNA高通量测序技术对厌氧发酵混合物中微生物群落进行分析,研究了添加四环素和生物炭的发酵系统在发酵0 d(INI)、第10 d以及第25 d的微生物群落。

2.3.1　细菌多样性分析

采用Alpha多样性对不同时期发酵液中微生物群落的丰富度和多样性进行分析,物种数目数值、Chao1指数和ACE指数用于评估群落的丰富度,数值越大微生物种群丰富度越高。香农指数和辛普森指数则用来表示细菌群落的多样性,香农指数越大群落多样性越高,而辛普森指数则相反[36]。不同样本的Alpha多样性如表3所示,由ACE和Chao1指数可以看出,四环素的存在显著降低了细菌的物种丰富度,在投加生物炭后显著增加,而单独投加生物炭提升物种丰富度的效果不如同时投加四环素和生物炭的处理组。由香农指数和辛普森指数可见,BC降低了细菌多样性,欧阳创等[37]发现在发酵体系中投加生物炭后细菌均匀度也降低。MBC组中的各项指标均表明其细菌群落结构最丰富和多样化,进一步证实了MBC镁改性生物炭能富集更丰富的微生物群落,提高厌氧反应器的运行效率和稳定性。



NI代表初始发酵样品;(a)SCOD:溶解性化学需氧量;(b)VFAs:挥发性脂肪酸;(c)乙酸浓度;(d)丁酸浓度

NI represents the initial fermentation sample;(a) SCOD: Soluble Chemical Oxygen Demand; (b) VFAs: Volatile Fatty Acids;(c) acetic acid concentration; (d) Butyric acid concentration

图2 牛粪沼液中的各物质浓度

Fig.2 The concentration of different compounds in bovine manure biogas slurry

表3 细菌Alpha多样性

Table 3 Bacterial alpha diversity

时间/d Time	样品 Samples	物种数目 Number of species	香农指数 Shannon Index	辛普森指数 Simpsons Index	Chao1指数 Chao1 index	ACE指数 ACE Index
0	INI	821	4.131	0.132	825.771	838.401
10	CK	943	5.351	0.013	946.106	954.941
	TC	911	5.282	0.014	911.000	911.000
	BC	996	5.344	0.014	1 006.435	1 021.414
	MBC	1067	5.408	0.012	1 071.904	1 084.120
	TBC	1068	5.447	0.010	1 072.044	1 083.616
	TMBC	1069	5.547	0.009	1 078.073	1 096.090
25	CK	982	5.197	0.014	998.375	1 020.314
	TC	778	5.126	0.017	783.783	792.176
	BC	869	5.141	0.015	872.468	880.495
	MBC	928	5.272	0.013	930.520	937.969
	TBC	1000	5.266	0.014	1 024.553	1 050.296
	TMBC	1053	5.410	0.011	1 070.021	1 091.941

图3a显示了不同厌氧消化阶段反应器中细菌群落的门水平分布。厌氧发酵开始后反应器中的优势菌门以Firmicutes(厚壁菌门)、Bacteroidota(拟杆菌门)、Synergistota(协同菌门)为主,相对丰度为55.07%~76.78%,这些细菌在厌氧消化中主导水解和酸生成过程[38-39]。四环素的存在降低

了Firmicutes和Bacteroidota的相对丰度。发酵第10、25 d TC中的Firmicutes相对丰度比对照分别降低了5.33%、15.92%;据报道,Firmicutes分泌细胞外酶(如纤维素酶、脂肪酶和蛋白酶),将纤维素降解转化为脂质和蛋白质,再转化为VFAs[40-41]。四环素的存在延迟了有机物的水解(图2a),降低VFAs的积累量(图2b)。发酵第10、25 d,TC组与对照组相比Bacteroidota和Synergistetes的总丰度分别降低了16.72%、19.13%。王高骏等[31]的研究也有类似的发现,0.5 mg/L和50 mg/L的四环素使Bacteroidota的相对丰度分别下降了21.8%、72.2%。相关研究表明Bacteroidetes和Synergistetes可以分别将葡萄糖、纤维素二糖和氨基酸降解为VFAs、CO_2和H_2[42-44]。综上所述,四环素抑制有机物水解,降低VFAs的产生(图2b)。

添加了生物炭的反应器中,其细菌群落结构存在显著差异。在含有生物炭的反应器中,大多数细菌的相对丰度高于对照组。发酵第10 d,与CK相比BC、MBC中Firmicutes的相对丰度分别增加16.11%和41.51%;第25 dMBC中Firmicutes的相对丰度增加11.97%,而BC中则是减少。这说明MBC对Firmicutes的富集作用比BC更强。同时MBC组在第10、25天Bacteroidota的相对丰度分别为24.44%和24.74%,且都高于同时期其它处理组,一般认为Bacteroidota参与了反硝化过程,能降解更多的难降解化合物[45]。这解释了发酵过程中MBC中VFAs的大量积累(图2d)。值得注意的是,第10、25天TMBC组中的Firmicutes相对丰度分别高于TC组41.49%、5.82%,Bacteroidota和Synergistetes的总丰度高于TC组5.05%和16.24%。这说明铁镁改性生物炭能解除四环素对水解产酸细菌的抑制作用,为产甲烷过程提供充足底物,故甲烷产量高于四环素组。

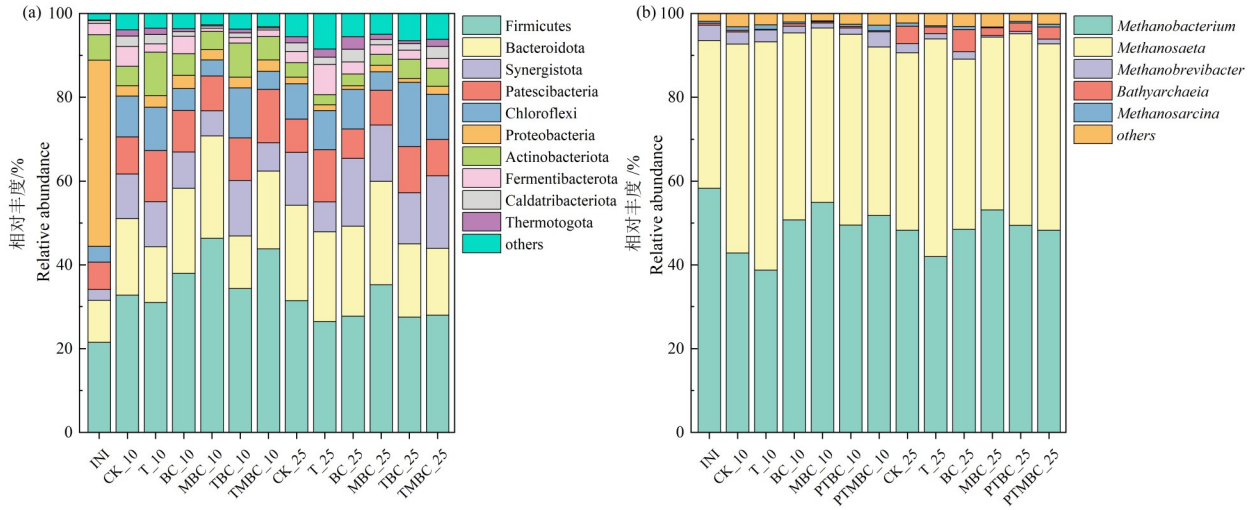


图3　细菌门水平相对丰度(a);古菌属水平相对丰度(b)

Fig.3　Relative abundance of bacteria at thephylum level(a); Relative abundance of archaea at the genus level(b)

2.3.2　古菌多样性分析

表4显示了不同处理组发酵0 d、第10 d和第25 d的古细菌Alpha多样性。原始反应器中的物种数目为68,生物炭反应器(BC、MBC)中的物种数目增加至82~90,Chao1和ACE指数也有不同程度的增加,说明生物炭的添加会增加厌氧发酵系统中古菌的丰富度。四环素反应器(TC)中的香农指数、Chao1、ACE指数都降低,四环素降低了古菌的多样性和丰富度。在含有四环素的反应器中加入生物炭(TBC、TMBC),古菌的多样性和丰富度上升。

图3b显示不同处理组中的古菌属水平群落。原始样品中的优势古菌属为Methanobacterium(甲烷杆菌属)、Methanosaeta(鬃毛甲烷菌属)、Methanobrevibacter(甲烷短杆菌属)。发酵第25 d时系统内的优势菌转变为Methanobacterium、Methanosaeta、Bathyarchaeia(深古菌属)。发酵第10、25 d TC组Methanobacterium的相对丰度分别降低

表4 古菌Alpha多样性

Table 4 Archaeal alpha diversity

时间/d Time	样品 Samples	物种数目 Number of species	香农指数 Shannon Index	辛普森指数 Simpsons Index	Chao1指数 Chao1 index	ACE指数 ACE Index
0	INI	68	1.453	0.388	70.030	62.129
10	CK	61	1.429	0.366	63.419	64.417
	TC	59	1.354	0.385	62.973	53.333
	BC	83	1.540	0.348	88.085	69.032
	MBC	84	1.589	0.337	88.262	86.389
	TBC	74	1.503	0.345	75.934	75.129
	TMBC	80	1.617	0.334	81.059	86.396
25	CK	57	1.572	0.311	61.157	54.667
	TC	56	1.406	0.368	58.228	38.000
	BC	82	1.530	0.348	83.461	59.360
	MBC	90	1.721	0.345	94.090	92.091
	TBC	64	1.561	0.340	67.534	67.360
	TMBC	75	1.473	0.343	76.837	76.256

9.47%、13.09%;Methanosaeta的相对丰度分别增加9.15%、22.8%。Methanobacterium和Methanosaeta的相对丰度变化趋势与乙酸和丁酸浓度变化相对应。据报道,Methanobacterium属于氢营养型产甲烷菌[46],Methanosaeta是只能利用乙酸作为底物进行产甲烷作用的乙酸型产甲烷菌[47]。这说明TC反应器中氢营养型产甲烷途径被抑制,从而抑制甲烷产量。在产甲烷高峰期结束的第10 d、Methanobacterium相对丰度从42.85%(CK)增加到50.77%(BC)、54.94%(MBC)、49.5%(TBC)、51.8%(TMBC),添加生物炭显著促进了Methanobacterium的丰度,这一发现与添加生物炭提高甲烷产量的结果一致(图1)。

综上所述,BC、MBC组细菌和古菌的丰富度、多样性及均匀度高于TBC、TMBC组,且TBC、TMBC组高于TC组。投加生物炭特别是改性生物炭可以促进有机物的水解(SCOD浓度的升高),促进VFAs的产生,还可富集氢营养型产甲烷菌,进而提高甲烷产量。

3 结论

四环素对牛粪厌氧发酵的抑制作用主要发生在发酵前期,发酵第10 d时累积甲烷产量比对照组减少10.17%,而发酵结束时仅降低2.32%。投加原始生物炭和铁镁改性生物炭能提高牛粪产甲烷效率,累积甲烷产量分别比对照组增加了6.89%和20.57%。

四环素严重抑制牛粪厌氧发酵体系中丁酸的产生,投加生物炭促进有机物的溶解和VFAs的生成,铁镁改性生物炭的促进效果优于原始生物炭。

生物炭的投加能够从多方面起到缓解作用,铁镁改性生物炭能够提高微生物群落的丰富度和多样性,尤其是增加Firmicutes和Methanobacterium的丰度,促进水解和氢营养型产甲烷途径,从而提高了甲烷产量。

参考文献

[1]Zhu Y G, Johnson T A, Su J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(9): 3435-3440.

[2]Rani J, Stablein M J, Patel K, et al. Monitoring effects of tetracycline and spectinomycin perturbations on biogas production and microbiome dynamics in a batch mesophilic anaerobic digester[J]. BioEnergy Research, 2024, 17(2): 1263-1276.

[3]Cha J, Carlson K H. Biodegradation of veterinary antibiotics in lagoon waters [J]. Process Safety and Environmental Protection, 2019, 127: 306-313.

[4]Gaballah M S, Guo J B, Sun H, et al. A review targeting veterinary antibiotics removal from livestock manure management systems and future outlook [J]. Bioresource Technology, 2021, 333: 125069.

[5]Chen K L, Li J L, Lin L, et al. Occurrence, fate and control strategies of heavy metals and antibiotics in livestock manure compost land application: a review [J]. Science of the Total

Environment,2024,957:177381.

[6]Qiao M, Ying G G, Singer A C, et al. Review of antibiotic resistance in China and its environment [J]. Environment International,2018,110:160-172.

[7]Oberoi A S, Jia Y Y, Zhang H Q, et al. Insights into the fate and removal of antibiotics in engineered biological treatment systems: a critical review [J]. Environmental Science & Technology,2019,53(13):7234-7264.

[8]Liu Y W, Li X, Tan Z, et al. Inhibition of tetracycline on anaerobic digestion of swine wastewater [J]. Bioresource Technology,2021,334:125253.

[9]牛琳琳. 土霉素、铜对牛粪厌氧消化过程的影响机理[D]. 沈阳:沈阳航空航天大学,2012.
Niu L L. Effect mechanism of oxytetracycline and copper on anaerobic digestion of cow dung [D]. Shenyang: Shenyang Aerospace University,2012.

[10]Long S,Liu X G,Chen J C,et al. Effect of tetracycline on bio-electrochemically assisted anaerobic methanogenic systems: process performance, microbial community structure, and functional genes[J]. Science of the Total Environment,2022, 837:155756.

[11]Amangelsin Y, Semenova Y, Dadar M, et al. The impact of tetracycline pollution on the aquatic environment and removal strategies[J]. Antibiotics,2023,12(3):440.

[12]Ji J Y, Xing Y J, Ma Z T, et al. Acute toxicity of pharmaceutical wastewaters containing antibiotics to anaerobic digestion treatment [J]. Chemosphere, 2013, 91(8): 1094-1098.

[13]Wang G J,Li Y,Sheng L,et al. A review on facilitating bio-wastes degradation and energy recovery efficiencies in anaerobic digestion systems with biochar amendment [J]. Bioresource Technology,2020,314:123777.

[14]Xue S, Zhang X B, Ngo H H, et al. Food waste based biochars for ammonia nitrogen removal from aqueous solutions [J]. Bioresource Technology,2019,292:121927.

[15]Chiappero M, Norouzi O, Hu M Y, et al. Review of biochar role as additive in anaerobic digestion processes [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2020, 131: 110037.

[16]Ye M, Sun M M, Feng Y F, et al. Effect of biochar amendment on the control of soil sulfonamides, antibiotic-resistant bacteria, and gene enrichment in lettuce tissues [J]. Journal of Hazardous Materials,2016,309:219-227.

[17]Shen Y W, Yu Y M, Zhang Y, et al. Role of redox-active biochar with distinctive electrochemical properties to promote methane production in anaerobic digestion of waste activated sludge[J]. Journal of Cleaner Production,2021,278:123212.

[18]Rani J, Stablein M J, Patel K, et al. Monitoring effects of tetracycline and spectinomycin perturbations on biogas production and microbiome dynamics in a batch mesophilic anaerobic digester [J]. BioEnergy Research, 2024, 17(2): 1263-1276.

[19]江丽. 磁性生物炭对污泥厌氧消化和微生物群落的影响研究[D]. 荆州:长江大学,2023.
Jiang L. Effect of magnetic biochar on anaerobic digestion of sludge and microbial community [D]. Jingzhou: Yangtze University,2023.

[20]Cheng Q P,Xu C X,Huang W W,et al. Improving anaerobic digestion of piggery wastewater by alleviating stress of ammonia using biochar derived from rice straw [J]. Environmental Technology & Innovation,2020,19:100948.

[21]Li Y Q, Wang Z X, Jiang Z L, et al. Bio-based carbon materials with multiple functional groups and graphene structure to boost methane production from ethanol anaerobic digestion[J]. Bioresource Technology,2022,344:126353.

[22]覃纤纤. 不同热解温度镁改性生物炭的制备及对土壤化学性质和酶活性的影响[D]. 南宁:广西大学,2021.
Qin X X. Preparation of magnesium modified biochar at different pyrolysis temperatures and its effects on soil chemical properties and enzyme activities [D]. Nanning: Guangxi University,2021.

[23]曹燕篆,张海波,苏婉,等. MC1预处理对豆秸水解特性及产甲烷效率的影响[J]. 农业环境科学学报,2020,39(9):2074-2080.
Cao Y Z, Zhang H B, Su W, et al. Effects of MC1 pretreatment on hydrolysis characteristics and methane production efficiency of soybean straw [J]. Journal of Agro-Environment Science,2020,39(9):2074-2080.

[24]Chandra R, Takeuchi H, Hasegawa T, et al. Improving biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments[J]. Energy,2012,43(1):273-282.

[25]曹燕篆,张建伟,闫双堆. MC1对碱处理及未处理谷子秸秆的分解特性比较[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2018,38(9):66-70.
Cao Y Z,Zhang J W,Yan S D. The difference of degradation rate between alkali treated and untreated millet straw by the composite microbial system of MC1[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2018, 38(9):66-70.

[26]Cui Y X,Mao F J,Zhang J X,et al. Biochar enhanced high-solid mesophilic anaerobic digestion of food waste:cell viability and methanogenic pathways [J]. Chemosphere, 2021, 272: 129863.

[27]Su C Y,Tao A F,Zhao L J,et al. Roles of modified biochar in the performance, sludge characteristics, and microbial community features of anaerobic reactor for treatment food waste [J]. Science of the Total Environment, 2021, 770: 144668.

[28]Li Y,Chen Y G,Wu J. Enhancement of methane production in anaerobic digestion process:a review[J]. Applied Energy, 2019,240:120-137.

[29]钱奕鸣, 牛欣. 生物炭强化厨余垃圾厌氧消化研究进展[J]. 环境科技, 2024, 37(03):76-80.
Qian Y M, Niu X. Research progress on biochar-enhanced anaerobic digestion of food waste [J]. Environmental Science

and Technology, 2024, 37(03):76-80.

[30]Meng X H, Cao Q, Sun Y, et al. 16S rRNA genes-and metagenome-based confirmation of syntrophic butyrate-oxidizing methanogenesis enriched in high butyrate loading[J]. Bioresource Technology,2022,345:126483.

[31]Wang G J, Chu Y X, Zhu J L, et al. Multi-faceted influences of biochar addition on swine manure digestion under tetracycline antibiotic pressure[J]. Bioresource Technology, 2022,346:126352.

[32]郑明月,郑明霞,王凯军,等. 温度、pH和负荷对果蔬垃圾厌氧酸化途径的影响[J]. 可再生能源,2012,30(4):75-79.
Zheng M Y, Zheng M X, Wang K J, et al. Effect of temperature, pH and organic loading rate on anaerobic acidification pathway of fruit and vegetable waste [J]. Renewable Energy Resources,2012,30(4):75-79.

[33]Wei W, Huang Q S, Sun J, et al. Polyvinyl chloride microplastics affect methane production from the anaerobic digestion of waste activated sludge through leaching toxic bisphenol-A[J]. Environmental Science & Technology,2019, 53(5):2509-2517.

[34]Zhao Z Q, Zhang Y B, Holmes D E, et al. Potential enhancement of direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate with biochar in up-flow anaerobic sludge blanket reactors[J]. Bioresource Technology,2016,209:148-156.

[35]Wang G J, Li Q, Li Y, et al. Redox-active biochar facilitates potential electron tranfer between syntrophic partners to enhance anaerobic digestion under high organic loading rate[J]. Bioresource Technology,2020,298:122524.

[36]李梦桐. 生物炭对富铜猪粪连续高温堆肥腐殖化及抗生素抗性基因的影响[D]. 西安:西安建筑科技大学,2023.
Li M T. Effects of biochar on humification and antibiotic resistance genes of copper-rich pig manure in continuous high-temperature composting[D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology,2023.

[37]欧阳创,张余镕,郜俊,等. 沼渣水热炭与沼渣热解炭强化餐厨垃圾厌氧消化对比研究[J]. 环境卫生工程,2024,32(3):47-53.
Ouyang C, Zhang Y R, Tai J, et al. Comparative study on anaerobic digestion of food waste enhanced by biogas residue hydrochar and biogas residue pyrochar[J]. Environmental Sanitation Engineering,2024,32(3):47-53.

[38]Dykstra C M, Pavlostathis S G. Methanogenic biocathode microbial community development and the role of bacteria[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(9): 5306-5316.

[39]Cui Y X, Mao F J, Zhang J X, et al. Biochar enhanced high-solid mesophilic anaerobic digestion of food waste: cell viability and methanogenic pathways[J]. Chemosphere, 2021, 272: 129863.

[40]Wang P, Wang H T, Qiu Y Q, et al. Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production - a review[J]. Bioresource Technology, 2018, 248:29-36.

[41]Zamanzadeh M, Hagen L H, Svensson K, et al. Anaerobic digestion of food waste - Effect of recirculation and temperature on performance and microbiology[J]. Water Research, 2016, 96:246-254.

[42]Rivière D, Desvignes V, Pelletier E, et al. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge[J]. The ISME Journal, 2009, 3(6): 700-714.

[43]Dykstra C M, Pavlostathis S G. Methanogenic biocathode microbial community development and the role of bacteria[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(9): 5306-5316.

[44]Si B C, Liu Z D, Zhang Y H, et al. Towards biohythane production from biomass: influence of operational stage on anaerobic fermentation and microbial community [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2016, 41(7): 4429-4438.

[45]Gabarró J, Hernández-del Amo E, Gich F, et al. Nitrous oxide reduction genetic potential from the microbial community of an intermittently aerated partial nitritation SBR treating mature landfill leachate[J]. Water Research, 2013, 47(19): 7066-7077.

[46]Ruan D N, Zhou Z, Pang H J, et al. Enhancing methane production of anaerobic sludge digestion by microaeration: enzyme activity stimulation, semi-continuous reactor validation and microbial community analysis [J]. Bioresource Technology,2019,289:121643.

[47]Yang G, Wang J, Zhang H W, et al. Applying bio-electric field of microbial fuel cell-upflow anaerobic sludge blanket reactor catalyzed blast furnace dusting ash for promoting anaerobic digestion[J]. Water Research,2019,149:215-224.

(编辑:韩志强)