

# 混合添加生物炭和 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 的青稞秸秆厌氧消化产甲烷工艺及微生物功能优化

张智伟<sup>1</sup>, 刘海林<sup>2</sup>, 李屹<sup>1</sup>, 杜中平<sup>1</sup>, 韩睿<sup>1\*</sup>

1 青海大学 农林科学院, 青海省蔬菜遗传与生理重点实验室, 青海 西宁

2 青海大学 科技处, 青海 西宁

张智伟, 刘海林, 李屹, 杜中平, 韩睿. 混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的青稞秸秆厌氧消化产甲烷工艺及微生物功能优化[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1742-1757.

ZHANG Zhiwei, LIU Hailin, LI Yi, DU Zhongping, HAN Rui. Optimization of anaerobic digestion process for methane production and microbial functions of hulless barley straw with mixed addition of biochar and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(4): 1742-1757.

**摘要:** 【目的】明确混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  介导的青稞秸秆厌氧消化产甲烷的最优工艺参数, 并探究混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  在木质纤维素类废弃物厌氧消化应用中的可行性。【方法】以青稞秸秆为原料, 通过单因素试验和响应面法对混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  介导的青稞秸秆厌氧消化产甲烷工艺进行优化。利用宏基因组技术分析消化过程中的微生物群落结构和甲烷代谢途径。【结果】经响应面模型验证试验得到最优工艺条件为: 总固体含量 6.32%、生物炭与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  混合比 6.83:3.17、接种比(接种污泥与青稞秸秆挥发性固体量的比值) 2.51。在该条件下, 基于挥发性固体计算的累积甲烷产量实测值为 269.04 mL/g, 与预测值(265.95 mL/g)的相对误差小于 5%, 验证了模型的有效性。该优化条件下的混合添加处理能显著提高青稞秸秆的产甲烷能力( $P<0.05$ ), 效果与化学预处理相当, 同时提升了乙酸含量, 并减少了丙酸和丁酸的积累。宏基因组分析显示, 拟杆菌门未分类属(*unclassified\_Bacteroidota*)、未分类细菌(*unclassified\_Bacteria*)、梭菌属(*Clostridium*)、丝状杆菌属(*Fibrobacter*)等细菌类群, 以及甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷丝菌属(*Methanothrix*)等乙酸营养型产甲烷菌的相对丰度增加, 促进了乙酸的利用并强化了微生物间的种间直接电子传递(direct interspecies electron transfer, DIET)。甲烷代谢途径分析表明, 混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的消化系统强化了乙酸营养型产甲烷途径, 从而提升了甲烷产量。【结论】响应面法能较好地优化混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  介导的青稞秸秆厌氧消化产甲烷工艺。混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  是一种高效且环境友好的木质纤维素类废弃物处理方法, 有助于提升生物甲烷的产量。

资助项目: 青海省应用基础研究计划(2024-ZJ-778)

This work was supported by the Applied Basic Research Program of Qinghai Province (2024-ZJ-778).

\*Corresponding author. E-mail: hanrui11473@163.com

Received: 2024-11-14; Accepted: 2024-12-11; Published online: 2025-01-22

**关键词：**青稞秸秆；厌氧消化；生物炭； $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ；响应面法；宏基因组；微生物群落；甲烷代谢途径

## Optimization of anaerobic digestion process for methane production and microbial functions of hulless barley straw with mixed addition of biochar and $\text{Fe}_3\text{O}_4$

ZHANG Zhiwei<sup>1</sup>, LIU Hailin<sup>2</sup>, LI Yi<sup>1</sup>, DU Zhongping<sup>1</sup>, HAN Rui<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Qinghai Key Laboratory of Vegetable Genetics and Physiology, Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai, China

<sup>2</sup> Science and Technology Department, Qinghai University, Xining, Qinghai, China

**Abstract:** **[Objective]** To optimize the anaerobic digestion process for methane production of hulless barley straw with mixed addition of biochar and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and investigate the feasibility of mixed addition of biochar and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  in the anaerobic digestion of lignocellulosic waste. **[Methods]** We employed single factor and response surface experiments to optimize the anaerobic digestion process for methane production of hulless barley straw with mixed addition of biochar and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Metagenomics was employed to analyze the microbial community structure and methane production pathway during digestion. **[Results]** The optimal digestion conditions were 6.32% total solids, biochar-to- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ratio of 6.83:3.17, and inoculation ratio (volatile solids ratio of inoculum to hulless barley straw) of 2.51. Under these conditions, the measured value of cumulative methane production based on volatile solids was 269.04 mL/g, with a relative error of less than 5% from the predicted value (265.95 mL/g), which indicated that the model was effective. The mixed addition treatment under the optimized conditions increased the methane production of hulless barley straw ( $P < 0.05$ ), with the effect comparable to that of the chemical pre-treatment. Meanwhile, the treatment increased the acetic acid content while reducing the accumulation of propionic and butyric acids. Metagenomic analysis showed increases in the relative abundance of bacterial taxa such as unclassified\_*Bacteroidota*, unclassified\_*Bacteria*, *Clostridium*, and *Fibrobacter*, as well as acetotrophic methanogens such as *Methanosarcina* and *Methanothrix*, which promoted the utilization of acetic acid and enhanced the direct interspecies electron transfer (DIET) between microorganisms. The mixed addition of biochar and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  in the anaerobic digestion system enhanced the acetotrophic methanogenic pathway, thereby enhancing methane production. **[Conclusion]** The response surface methodology can optimize the anaerobic digestion process for methane production of hulless barley straw with mixed addition of biochar and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . The mixed addition of biochar and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  enables efficient production of biomethane and environmentally friendly treatment of lignocellulosic waste.

**Keywords:** hulless barley straw; anaerobic digestion; biochar;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; response surface methodology; metagenome; microbial community; methane production pathway

随着能源危机的加剧和环境污染问题的日益严峻,寻求可持续且环境友好的解决方案变得至关重要。厌氧消化作为一种能够将有机固废进行生物转化的技术,不仅能够减轻有机固废对环境的压力,还能产生清洁能源<sup>[1]</sup>。青稞秸秆作为青海省储量丰富且分布广泛的废弃物资源,富含有机物质,是通过厌氧消化制备甲烷的优质原料<sup>[2-3]</sup>。然而,秸秆等废弃物特有的木质纤维素结构会阻碍底物的水解速度,从而影响厌氧消化的效率<sup>[4]</sup>。因此,在消化之前通常需要进行适当的预处理。虽然化学预处理是一种常见选择,但可能引发环境污染,并增加回收预处理试剂的成本<sup>[5]</sup>。因此,寻找一种经济环保且高效的处理方法,以提升青稞秸秆的厌氧消化效率成为当前研究的热点。

现阶段,导电材料因其成本低廉、易于获取以及对环境的友好性,在提升厌氧消化性能方面引起了广泛关注,尤其是碳基和铁基材料。生物炭、活性炭等碳基材料,凭借其高比表面积和多孔结构,能够有效吸附有机物,促进微生物代谢活动,并增强微生物间的种间直接电子传递(direct interspecies electron transfer, DIET),但其性能受热解温度的影响,进而影响甲烷产率<sup>[6-8]</sup>。零价铁、氧化铁等铁基材料,则通过加速有机物的分解、缓解系统抑制以及强化微生物间的 DIET 等机制,提升厌氧消化性能<sup>[9-10]</sup>。然而,铁基材料的高密度和潜在环境毒性可能限制其在厌氧消化领域的广泛应用<sup>[11]</sup>。将碳基和铁基材料混合使用,既能发挥两者各自优势,又能减轻负面效应,从而进一步提高消化效率。此外,这种混合策略还能减少导电材料的用量,降低成本。Wang 等<sup>[12]</sup>研究表明,生物炭负载纳米零价铁能显著提升食物垃圾厌氧消化的甲烷产量,并避免丙酸的抑制效应。王欣姿等<sup>[13]</sup>发现,生物炭负载纳米零价铁能提升厨余垃圾的

厌氧发酵性能并缩短延滞期。在食品垃圾厌氧消化系统中添加纳米零价铁和改性生物炭,不仅能有效解除系统抑制,还能避免纳米颗粒可能带来的不利影响,同时减少添加剂用量<sup>[14]</sup>。尽管如此,上述研究主要集中在混合添加量对厌氧消化的影响上,而对于碳基和铁基材料混合比的探讨仍不充分。Li 等<sup>[15]</sup>研究表明,混合比对产甲烷性能也有一定影响,但这一重要因素是否同样适用于青稞秸秆的厌氧消化过程,目前尚不明确。

响应面法作为一种统计优化工具,在厌氧消化领域得到了广泛应用,有助于探究不同参数对甲烷产量的综合影响。除了碳基和铁基材料混合比外,总固体含量和接种比等参数也是影响甲烷产量的重要因素<sup>[16-17]</sup>。基于此,本研究采用生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  作为添加剂,通过响应面法优化试验设计,系统地研究了不同生物炭与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  混合比、总固体含量和接种比对青稞秸秆累积甲烷产量的交互影响,从而优化混合添加的工艺条件。同时,利用宏基因组技术探讨混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  对厌氧消化过程中微生物群落和代谢途径的影响,以期为青稞秸秆等木质纤维素类废弃物厌氧消化的稳定高效运行提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

青稞秸秆取自青海大学农林科学院实验地。自然风干后,剪碎至 0.5 cm 左右,并于阴凉通风处保存备用。接种污泥取自青海知源特色农业开发有限责任公司以羊粪为原料稳定运行的农用沼气池。污泥取回后,经  $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  厌氧培养 1-2 周,直至不再产气,以减小背景甲烷产量。发酵原料及接种污泥的特性见表 1。

生物炭购自上海谱智环境科技有限公司,

表1 原料与接种污泥特性

Table 1 Characteristics of raw materials and inoculum

| Materials            | Total solids (%) | Volatile solids (%) | pH        | Lignocellulose (%) |
|----------------------|------------------|---------------------|-----------|--------------------|
| Hulless barley straw | 93.97±0.11       | 92.64±0.27          | –         | 75.42±0.91         |
| Inoculum             | 7.38±0.16        | 2.97±0.26           | 7.48±0.42 | –                  |

纯度约为 90%；Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 购自上海麦克林生化科技有限公司，纯度在 99% 以上。

## 1.2 试验设计

厌氧消化试验采用全自动甲烷潜力测试仪 MultiTalent 203 进行。该仪器主要由 3 部分组成：发酵反应器、酸性气体吸附装置和多通道微压超低流量测试装置。发酵反应器包括恒温水浴锅、15 个 500 mL 发酵瓶和机械搅拌系统，主要作用是样品发酵提供受控环境，并实现均匀混合。酸性气体吸附装置内装有 3 mol/L 的 NaOH 溶液，用于吸收消化过程中产生的 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>S 等酸性气体，仅允许 CH<sub>4</sub> 通过，并加入 pH 指示剂监控溶液的酸结合能力。多通道微压超低流量测试装置基于液体位移和浮力原理监测 CH<sub>4</sub> 体积，气体流经时产生数字脉冲，由嵌入式数据采集系统记录和分析结果。在设定温度为(37±0.5) °C 的恒温条件下，通过机械搅拌系统每 3 min 自动搅拌 1 次，每次搅拌持续 0.5 min，以确保反应器内物料均匀混合。各处理的物料添加总量为 400 g，并根据处理要求添加接种污泥、青稞秸秆以及相应比例的生物炭和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>。整个发酵周期设定为 19 d，每个处理均设置 3 组，记录数据。

### 1.2.1 单因素试验

在生物炭和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 混合添加量为 8% (基于总固体) 的基础上，固定生物炭与 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 混合比为 5:5、总固体含量为 6% 以及接种比(接种污泥与青稞秸秆挥发性固体量的比值)为 2.5，设计 5 组不同生物炭与 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 混合比，分别为 1:9、3:7、5:5、7:3 和 9:1。同时，分别设置不同总固

体含量(2%、4%、6%、8%、10%)和不同接种比(1.5、2.0、2.5、3.0、3.5)。

### 1.2.2 响应面试验

结合单因素试验结果确定中心值，以生物炭与 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 混合比、总固体含量和接种比 3 个因素作为自变量，以青稞秸秆厌氧消化累积甲烷产量为响应值，采用 Box-Behnken 法设计三因素三水平的响应面优化试验。对应物料的添加量见表 2。

### 1.2.3 对比验证试验

响应面优化完成后，对优化后的混合添加生物炭和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 处理(记为 ZT)、单独添加生物炭(Z)、单独添加 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (T)和未加任何导电材料的处理(CK)进行对比验证试验，并采集各处理不同时间的发酵液进行挥发性脂肪酸(volatile fatty acids, VFAs)测定。

## 1.3 试验指标测定

总固体(total solid, TS)和挥发性固体(volatile solid, VS)分别采用烘干法和灼烧法<sup>[18]</sup>测定；pH 采用 pH 计[华志(福建)电子科技有限公司]测定；木质纤维素含量由纤维洗涤剂法<sup>[19]</sup>测定；VFAs 浓度采用气相色谱法<sup>[20]</sup>测定。在厌氧消化阶段，利用全自动甲烷潜力测试仪以 24 h 为单位记录甲烷产生量(以 VS 计)。

## 1.4 宏基因组分析

选取对比验证试验中的 ZT、Z、T 和 CK 4 个处理作为研究对象，分别采集各处理消化前期(第 4 天)和末期(第 19 天)的样品，共 8 个，于 -80 °C 保存备用。样品的基因组 DNA 采用的磁珠法粪便基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克



表2 各处理物料添加量

Table 2 Additions for each processed material

| Treatment group | Inoculum addition (mL) | Hulless barley straw addition (g) | Biochar addition (g) | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> addition (g) | Distilled water addition (mL) |
|-----------------|------------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|
| 1               | 179.92                 | 2.89                              | 0.90                 | 0.38                                        | 217.20                        |
| 2               | 359.84                 | 5.78                              | 1.79                 | 0.77                                        | 34.38                         |
| 3               | 190.70                 | 2.04                              | 0.90                 | 0.38                                        | 207.26                        |
| 4               | 381.41                 | 4.08                              | 1.79                 | 0.77                                        | 14.51                         |
| 5               | 186.24                 | 2.39                              | 0.64                 | 0.64                                        | 211.37                        |
| 6               | 372.48                 | 4.78                              | 1.28                 | 1.28                                        | 22.73                         |
| 7               | 186.24                 | 2.39                              | 1.15                 | 0.13                                        | 211.37                        |
| 8               | 372.48                 | 4.78                              | 2.30                 | 0.26                                        | 22.73                         |
| 9               | 269.88                 | 4.33                              | 0.96                 | 0.96                                        | 125.79                        |
| 10              | 286.05                 | 3.06                              | 0.96                 | 0.96                                        | 110.88                        |
| 11              | 269.88                 | 4.33                              | 1.73                 | 0.19                                        | 125.79                        |
| 12              | 286.05                 | 3.06                              | 1.73                 | 0.19                                        | 110.88                        |
| 13              | 279.36                 | 3.59                              | 1.34                 | 0.58                                        | 117.05                        |
| 14              | 279.36                 | 3.59                              | 1.34                 | 0.58                                        | 117.05                        |
| 15              | 279.36                 | 3.59                              | 1.34                 | 0.58                                        | 117.05                        |
| 16              | 279.36                 | 3.59                              | 1.34                 | 0.58                                        | 117.05                        |
| 17              | 279.36                 | 3.59                              | 1.34                 | 0.58                                        | 117.05                        |

生物技术有限公司)进行提取。宏基因组测序工作由杭州联川生物技术股份有限公司完成,采用 Illumina NovaSeq 6000 PE150 测序平台进行高通量测序。测序数据经拼接、过滤、质量剪切等优化处理后,得到的 reads 使用 MEGAHIT 进行组装成 contig 序列,通过 MetaGeneMark 预测编码区域,形成 Unigenes 集。Unigenes 的蛋白序列通过 Diamond 软件与 NR 数据库(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)比对,进行物种注释,并与 KEGG 数据库(<http://www.kegg.jp/>)进行比对,获取功能注释信息。

## 2 结果与讨论

### 2.1 混合添加生物炭和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的单因素试验结果

由图 1A 可知,当总固体含量和接种比保持不变时,青稞秸秆的累积甲烷产量随着混合添

加中生物炭占比的增加,呈现出先升高后降低的趋势。在混合比达到 7:3 时,累积甲烷产量达到峰值,为 229.93 mL/g。当生物炭与 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 混合比及接种比保持不变时,累积甲烷产量随着总固体含量的增加,同样呈现出先升高后降低的趋势。在总固体含量为 6% 时,累积甲烷产量达到最高值,为 239.55 mL/g (图 1B)。此外,在生物炭与 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 混合比和总固体含量保持不变的情况下,累积甲烷产量在接种比为 2.5 时达到最大值,为 216.65 mL/g (图 1C)。基于上述结果,进一步明确了响应面的设计区间:生物炭与 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 混合比(5:5、7:3、9:1)、总固体含量(4%、6%、8%)和接种比(2.0、2.5、3.0)。

### 2.2 混合添加生物炭和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的响应面模型及方差分析

Box-Behnken 试验设计及其结果如表 3 所示。将青稞秸秆厌氧消化累积甲烷产量( $Y$ )设定

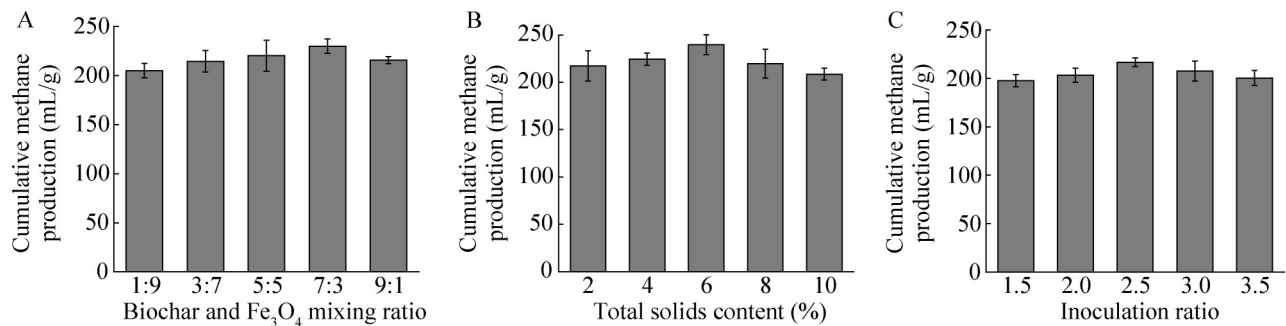


图1 不同因素对累积甲烷产量的影响。A: 生物炭与Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>混合比; B: 总固体含量; C: 接种比。

Figure 1 Effect of different factors on cumulative methane production. A: Biochar and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> mixing ratio; B: Total solids content; C: Inoculation ratio.

表3 Box-Behnken试验设计及结果

Table 3 Box-Behnken design and test results

| Runs | Factors                                                 |                          |                   | Cumulative methane production (mL/g) |
|------|---------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------------------|
|      | Biochar and Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> mixing ratio | Total solids content (%) | Inoculation ratio |                                      |
| 1    | 7:3                                                     | 4                        | 2.0               | 179.42                               |
| 2    | 7:3                                                     | 8                        | 2.0               | 227.65                               |
| 3    | 7:3                                                     | 4                        | 3.0               | 218.84                               |
| 4    | 7:3                                                     | 8                        | 3.0               | 195.81                               |
| 5    | 5:5                                                     | 4                        | 2.5               | 190.28                               |
| 6    | 5:5                                                     | 8                        | 2.5               | 225.18                               |
| 7    | 9:1                                                     | 4                        | 2.5               | 195.89                               |
| 8    | 9:1                                                     | 8                        | 2.5               | 202.86                               |
| 9    | 5:5                                                     | 6                        | 2.0               | 189.54                               |
| 10   | 5:5                                                     | 6                        | 3.0               | 216.56                               |
| 11   | 9:1                                                     | 6                        | 2.0               | 197.26                               |
| 12   | 9:1                                                     | 6                        | 3.0               | 189.92                               |
| 13   | 7:3                                                     | 6                        | 2.5               | 268.06                               |
| 14   | 7:3                                                     | 6                        | 2.5               | 261.95                               |
| 15   | 7:3                                                     | 6                        | 2.5               | 261.98                               |
| 16   | 7:3                                                     | 6                        | 2.5               | 270.48                               |
| 17   | 7:3                                                     | 6                        | 2.5               | 262.85                               |

为响应值, 生物炭与 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 混合比(A)、总固体含量(B)和接种比(C)作为自变量, 建立拟合方程。通过 Design-Expert 12 软件得到的二次回归方程如下:

$$Y=265.06-4.45A+8.38B+3.41C-6.98AB-8.59AC-17.81BC-34.31A^2-27.20B^2-32.43C^2。$$

如表 4 所示, 响应面模型极显著( $P<0.0001$ ), 失拟项不显著( $P=0.4323>0.05$ ),  $R^2=0.9930$ ,  $F=110.74$ , 表明该模型能够对青稞秸秆的累积甲烷产量进行有效分析与预测, 并能反映各参数与响应值之间的关系。由各因素的  $P$  值可知,  $A$ 、 $B$ 、 $C$  均为显著影响因素;  $AB$ 、 $AC$  交互效应显

表4 响应面模型的方差分析

Table 4 Variance analysis for the response surface model

| Source of variation | Sum of squares | Degress of freedom | Mean squared | F-value | P-value  | Significance |
|---------------------|----------------|--------------------|--------------|---------|----------|--------------|
| Model               | 16 526.26      | 9                  | 1 836.25     | 110.74  | <0.000 1 | **           |
| A                   | 158.69         | 1                  | 158.69       | 9.57    | 0.017 5  | *            |
| B                   | 562.30         | 1                  | 562.30       | 33.91   | 0.000 6  | **           |
| C                   | 92.89          | 1                  | 92.89        | 5.60    | 0.049 8  | *            |
| AB                  | 195.02         | 1                  | 195.02       | 11.76   | 0.011 0  | *            |
| AC                  | 295.15         | 1                  | 295.15       | 17.80   | 0.003 9  | **           |
| BC                  | 1 269.50       | 1                  | 1 269.50     | 76.56   | <0.000 1 | **           |
| A <sup>2</sup>      | 4 956.75       | 1                  | 4 956.75     | 298.94  | <0.000 1 | **           |
| B <sup>2</sup>      | 3 115.29       | 1                  | 3 115.29     | 187.88  | <0.000 1 | **           |
| C <sup>2</sup>      | 4 429.12       | 1                  | 4 429.12     | 267.12  | <0.000 1 | **           |
| Residual            | 116.07         | 7                  | 16.58        |         |          |              |
| Lack of fit         | 53.65          | 3                  | 17.88        | 1.15    | 0.432 3  |              |
| Pure error          | 62.42          | 4                  | 15.60        |         |          |              |
| Cor total           | 16 642.32      | 16                 |              |         |          |              |

$R^2=0.993\ 0$ ; \*: Significant influence ( $P<0.05$ ); \*\*: Extremely significant influence ( $P<0.01$ ).

著,  $BC$  交互效应极显著;  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  的曲面效应均极显著。由各参数的  $F$  值可知, 各因素对累积甲烷产量的整体影响程度依次为: 总固体含量>生物炭与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  混合比>接种比。

### 2.3 混合添加生物炭和 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 的响应面优化分析

如图 2A 所示, 当接种比保持不变时, 累积甲烷产量随着生物炭与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  混合比及总固体含量的增加呈现出先升高后降低的趋势。生物炭与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  混合比对甲烷产量具有显著的调节效应。在生物炭占比较高的情况下, 其高比表面积和多孔结构有利于微生物的附着以及反应界面的扩展, 从而促进甲烷的生成<sup>[6]</sup>; 而总固体含量作为一个关键的影响因素, 直接关系到反应体系中底物的浓度和微生物的代谢活动<sup>[17]</sup>。同时, 接种比与生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  混合比之间存在交互作用, 共同影响甲烷产量(图 2B)。当总固体含量保持不变时, 接种比和生物炭与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的混合比共同决定了甲烷产量, 这说明在优化厌氧消化工艺时, 接种比也是一个不可忽视的因素。

此外, 当生物炭与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  混合比固定时, 累积甲烷产量会随着总固体含量和接种比的增加而变化, 且总固体含量的变化对甲烷产量的影响更为显著(图 2C)。

综上所述, 总固体含量对累积甲烷产量的影响较大, 而生物炭与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  混合比在调节甲烷产量方面起到了关键作用, 这与表 4 的方差分析结果一致。经响应面法优化后获得的青稞秸秆厌氧消化最优工艺条件为: 总固体含量 6.32%、生物炭与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  混合比 6.83:3.17、接种比 2.51。

### 2.4 混合添加生物炭和 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 的对比验证结果

#### 2.4.1 日产甲烷量和累积甲烷量

如图 3A 所示, 在 19 d 的厌氧消化过程中, 各处理的日产甲烷量均呈现先升高后降低的趋势, 并在第 3–5 天出现产甲烷峰值。CK 处理的产甲烷峰值出现在第 5 天, 而添加导电材料的各处理峰值均提前至第 3–4 天。特别是 ZT 处理, 其产甲烷峰值最早出现, 且数值最高, 达

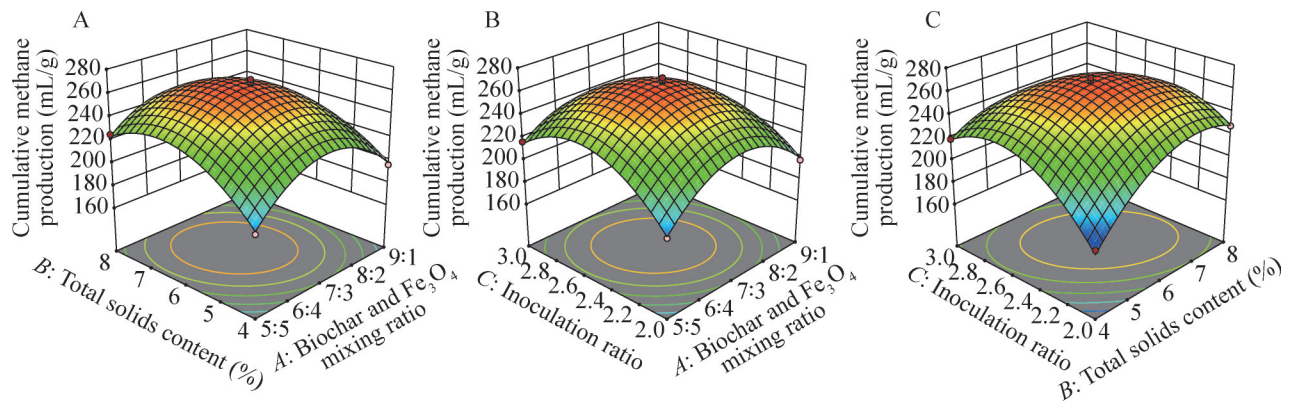


图2 各因素交互作用的响应面图。A: 生物炭与 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 混合比和总固体含量; B: 生物炭与 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 混合比和接种比; C: 总固体含量和接种比。

Figure 2 Response surface plots of factor interactions. A: Biochar and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mixing ratio and total solids content; B: Biochar and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mixing ratio and inoculation ratio; C: Total solids content and inoculation ratio.

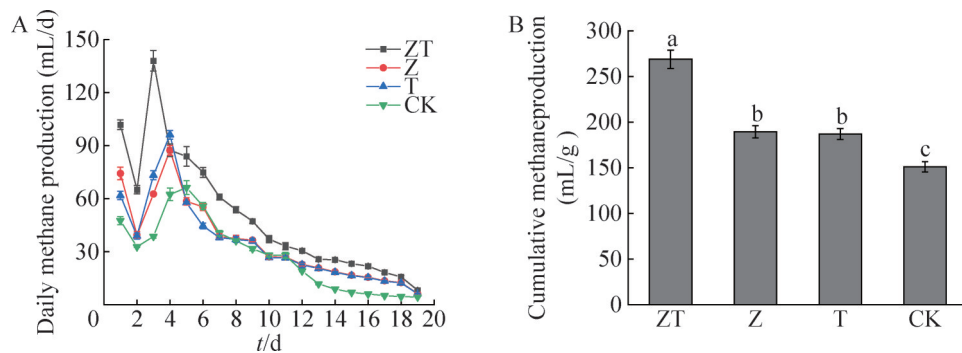


图3 不同处理的甲烷产量。A: 日产甲烷量; B: 累积甲烷产量(不同小写字母代表组间显著差异,  $P < 0.05$ )。

Figure 3 Methane production in the different treatments. A: Daily methane production; B: Cumulative methane production (different lowercase letters indicate significant differences between treatments,  $P < 0.05$ ).

到 137.94 mL/d, 较 CK 处理提升了 108.37%。如图 3B 所示, ZT 处理的累积甲烷产量平均值为 269.04 mL/g, 与预测值(265.95 mL/g)非常接近, 相对误差小于 5%, 说明响应面模型有效。同时, ZT 处理的累积甲烷产量显著高于 Z、T 和 CK 处理 ( $P < 0.05$ ), 分别提高了 41.94%、43.89% 和 78.10%。这说明混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  具有明显的协同促进作用, 有效提升了青稞秸秆的甲烷产量。Luo 等<sup>[21]</sup>也发现, 在食物垃圾和污泥共消化系统中同时添加生物炭和

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ , 甲烷产量比单独添加提高了 5.4% 以上。Di 等<sup>[22]</sup>同样发现, 生物炭负载纳米  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  能有效减轻鸡粪厌氧消化过程中高浓度氨氮的抑制作用。此外, 生物炭与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的协同效应还体现在增强系统电子传递能力方面<sup>[23]</sup>。

秸秆等木质纤维素类废弃物由于其复杂的结构, 在通过生物转化生成甲烷时可能会遇到阻碍<sup>[24]</sup>。柳丽等<sup>[2]</sup>研究发现, 使用 NaOH 处理青稞秸秆可以显著提升其甲烷产量 ( $P < 0.05$ )。当 NaOH 浓度为 5%, 预处理时间为 12 h, 处理 35 d



时, 获得了最高累积甲烷产量, 为 250.03 mL/g。同时, 使用 KOH 和  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  联合预处理青稞秸秆, 在第 19 天时的累积甲烷产量为 268.43 mL/g<sup>[25]</sup>。这些结果与本研究混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  获得的累积甲烷产量相当, 还能有效避免使用化学试剂处理可能引起的环境污染问题。此外, 同时添加  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粉末和活性炭粉末能够提升玉米秸秆的甲烷产量, 并缩短发酵周期<sup>[26]</sup>。Li 等<sup>[15]</sup>在研究混合添加  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  和生物炭对玉米秸秆与城市污泥共消化性能的影响时也发现, 混合添加不仅能够改善产甲烷性能, 还能减少添加剂的使用量, 从而降低成本。因此, 混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  提供了一种高效环保的木质纤维素类废弃物厌氧消化的处理方法。

#### 2.4.2 不同处理 VFAs 的动态变化

在厌氧消化的不同阶段, VFAs 的组成和浓度会发生变化。在厌氧过程的初期, 由于水解和酸化作用的增强, 系统中的大分子有机物被分解并转化为乙酸、丙酸和丁酸等 VFAs。随着消化过程的深入, 产甲烷菌的活性逐渐提升, 消耗部分 VFAs, 导致其浓度逐渐降低<sup>[27]</sup>。乙酸

作为 VFAs 中最主要的成分, 是产甲烷菌的主要碳源, 其浓度对维持厌氧消化系统的稳定以及提高甲烷产量具有决定性作用<sup>[28]</sup>。如图 4 所示, 4 个处理中, 乙酸浓度随消化时间的变化呈现出先增加后减少的趋势, 并在第 4 天达到峰值。其中, ZT 处理在整个消化过程中的乙酸含量均较高, 其次是 Z 和 T 处理, 这 3 个处理的乙酸含量均高于 CK 处理, 说明添加导电材料, 尤其是将生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  混合添加, 可以提高底物的转化效率, 增加乙酸的产量, 进而提高甲烷的产率<sup>[21,29]</sup>。通常, 丙酸与丁酸的积累可能会对甲烷的生成产生负面影响, 导致甲烷产量下降<sup>[30]</sup>。本研究中, 各处理丙酸与丁酸浓度的变化趋势与乙酸浓度相反。其中, CK 处理在整个消化过程中丙酸与丁酸的浓度均较高, 而 ZT 处理浓度最低, 表明混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  能够降低体系中丙酸与丁酸的积累速率, 有效避免酸抑制; 同时, 这可能也促进了水解产物向乙酸的转化过程, 从而提升了甲烷产量<sup>[31]</sup>。此外, 异丁酸、异己酸、异戊酸、己酸、戊酸等其他 VFAs 在整个过程中浓度较低, 且导电材料对其浓度变化的影响不大(图 4)。

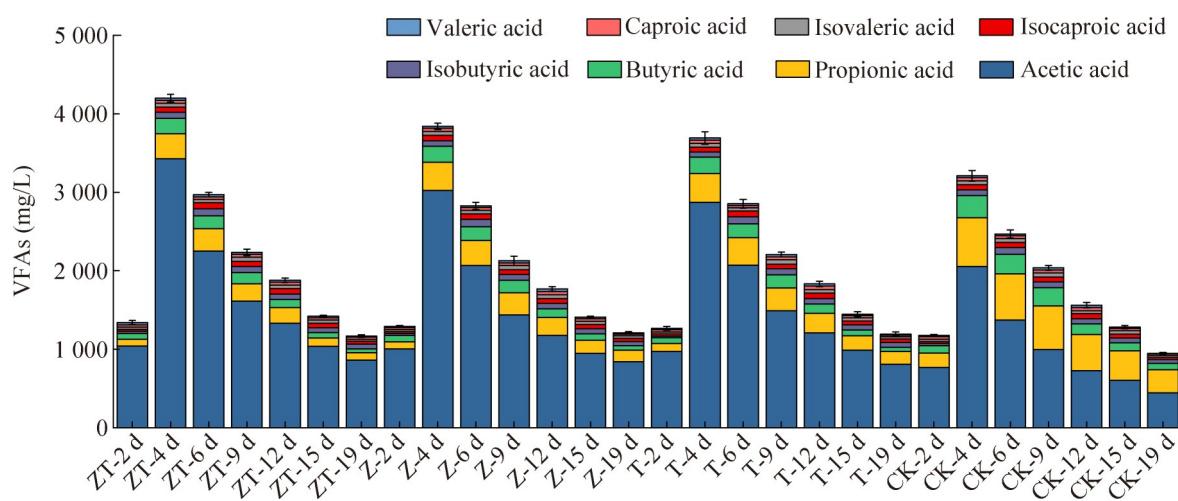


图4 不同处理VFAs的动态变化

Figure 4 Variation of VFAs in the different treatments.

## 2.5 混合添加生物炭和 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 对微生物群落的影响

如表 5 所示, 宏基因组测序得到的原始序列经过质控和修正后, 混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  介导的青稞秸秆厌氧消化系统的 8 个样品共获得约 5.41 亿条 reads 用于操作分类和功能分析。微生物宏基因组共获得 2 352 411 条组装序列 (contigs)。根据宏基因组测序结果, 细菌和古菌构成了系统中主要的微生物类群, 因此对细菌和古菌在属水平上以相对丰度大于 1% 划分为优势类群进行分析。除 others 外, 细菌共获得 16 个类群, 且群落分布在第 4 天的相对丰度比第 19 天更高 (图 5A)。拟杆菌门未分类属 (unclassified\_Bacteroidota) 和未分类细菌 (unclassified\_Bacteria) 为最优势类群, 相对丰度总和超过了 20.83%, 在 ZT 处理样品中更高。两者均在有机物的分解中扮演重要角色, 能够参与分解多糖 (如纤维素)、蛋白质和脂肪等有机物转化为 VFAs 的过程<sup>[32-33]</sup>。芽孢杆菌门未分类属 (unclassified\_Bacillota) 和梭菌属 (*Clostridium*) 为次优势类群, 平均相对丰度分别为 4.40% 和 4.18%, 在 ZT 处理样品中最高。两者均为芽孢杆菌门成员, 同样能将复杂有机物转化为 VFAs<sup>[34-35]</sup>。梭菌属还能通过 DIET 与产甲烷菌相互作用, 促进甲烷的产生<sup>[36]</sup>。在 ZT 处理样品中, 其平均相对丰度较 CK 提升了 149.07%。此外, 丝状杆菌属 (*Fibrobacter*) 作为专性厌氧的纤维素分解菌, 能够将纤维素分解为葡萄糖, 并进一步转化为 VFAs<sup>[37]</sup>。其在 ZT 处理样品中的相对丰度同样最高。这说明混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  可以促进分解纤维素等复杂有机物的细菌类群的富集, 加快 VFAs 的生成速率并促进 DIET。

与细菌类似, 古菌获得了 9 个类群 (除 others 外), 且在第 4 天的相对丰度较高 (图 5B)。

其中, 甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*) 和甲烷丝菌属 (*Methanothrix*) 为最优势类群, 两者丰度总和占到了所有古菌类群的 36.96% 以上, 在 ZT 和 Z 处理样品中相对丰度较高, 尤其在 ZT 样品中达到最高, 其在 ZT 中的平均相对丰度较 CK 提升了 26.19%。这 2 种古菌均为乙酸营养型产甲烷菌, 也参与 DIET<sup>[38-39]</sup>。通过向系统中添加生物炭, 特别是混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , 可以促进乙酸营养型产甲烷菌的富集, 并强化 DIET, 从而加速甲烷的生成<sup>[15,22]</sup>。然而, 在 T 处理样品中, 这 2 种古菌的相对丰度总和较 CK 有所下降, 表明单独添加  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  并未富集乙酸营养型产甲烷菌。同时, 甲烷袋状菌属 (*Methanoculleus*) 和甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*) 的平均相对丰度分别仅为 3.24% 和 1.13%, 尽管不高, 但在 T 处理样品中达到最高, 较 CK 分别提升了 106.53% 和 95.46%; 而在 ZT 和 Z 处理样品中相对丰度均有所下降。这 2 种古菌均为氢营养型产甲烷菌, 反映出混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  并未富集氢营养型产甲烷菌, 而单独添加  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  促进了氢营养型产甲烷菌的富集<sup>[40]</sup>。综上所述, 在青稞秸秆厌氧消化系统中, 混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  能够促进水解纤维素的细菌类群和利用乙酸的产甲烷菌的富集, 加速了乙酸的利用并强化微生物间的 DIET, 进而提高了甲烷产量。

## 2.6 混合添加生物炭和 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 对甲烷代谢途径的影响

在厌氧消化前期, 丙酮酸的转化过程对有机物的水解酸化至关重要。如图 6A 所示, 乙酰辅酶 A 羧化酶 (EC: 6.4.1.2) 是这一过程中的关键酶, 能够将丙酮酸转化为乙酰辅酶 A, 这一中间产物在厌氧消化过程中扮演着核心角色。乙酰辅酶 A 通过乙酸激酶 (EC: 2.7.2.1) 的催化作用直接转化为乙酸, 这是厌氧消化过程中产生甲

表5 宏基因组测序数据质控及组装结果

Table 5 Quality control and assembly results of metagenomic sequencing data

| Samples | Number of clean reads | Contigs total | N50 length (bp) | Q20 (%) | Q30 (%) | G+C content (%) |
|---------|-----------------------|---------------|-----------------|---------|---------|-----------------|
| ZT-4    | 67 785 818            | 307 135       | 2 583           | 98.49   | 95.11   | 45.96           |
| Z-4     | 65 872 418            | 265 595       | 2 721           | 98.56   | 95.31   | 45.07           |
| T-4     | 67 890 442            | 314 295       | 2 660           | 98.49   | 95.11   | 45.94           |
| CK-4    | 68 331 462            | 305 864       | 2 386           | 98.50   | 95.14   | 46.28           |
| ZT-19   | 65 265 230            | 278 625       | 2 529           | 98.44   | 94.97   | 48.34           |
| Z-19    | 67 738 036            | 262 914       | 2 832           | 98.60   | 95.45   | 48.19           |
| T-19    | 68 664 516            | 302 205       | 2 578           | 98.50   | 95.16   | 48.98           |
| CK-19   | 69 662 246            | 315 778       | 2 507           | 98.68   | 95.69   | 49.13           |

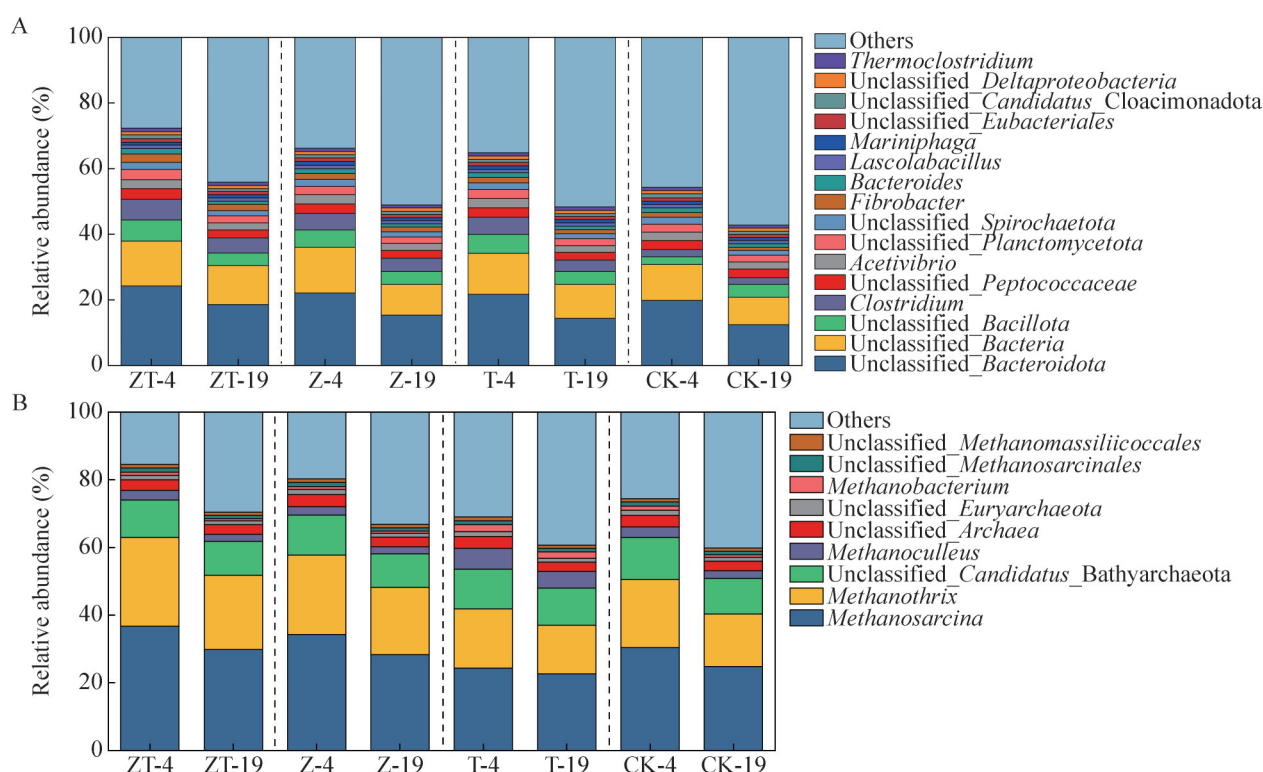


图5 不同处理微生物属水平上的组成。A: 细菌; B: 古菌。

Figure 5 Composition at the microbial genus level in the different treatments. A: Bacteria; B: Archaea.

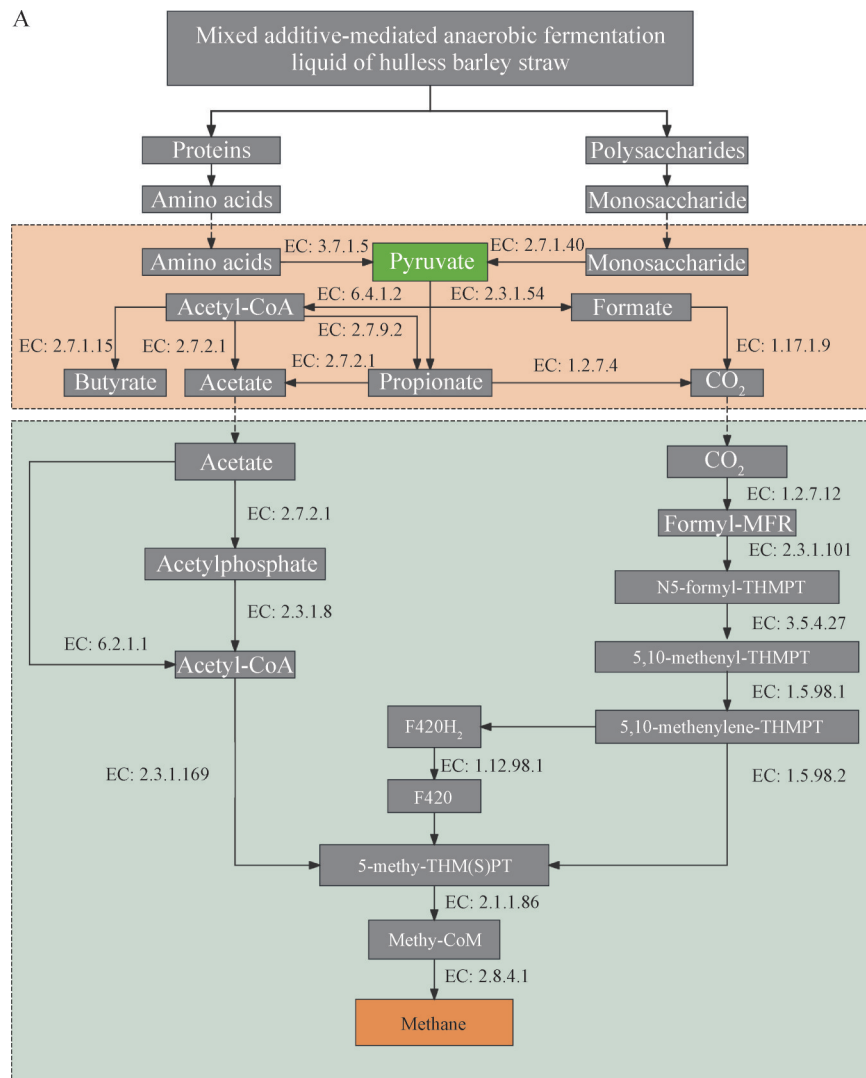
烷的主要途径之一。同时, 乙酰辅酶 A 也可以在丁酸激酶(EC: 2.7.2.15)和丙酸激酶(EC: 2.7.9.2)的催化下转化为丁酸和丙酸。如图 6B 所示, 上述酶基因在第 19 天的丰度较第 4 天均有不同程度的下降, 这与消化前期起主要作用的细菌类群的相对丰度和 VFAs 组分的变化趋势相吻合(图 4、图 5A)。其中, 与 CK 相比, 在 ZT 样品

中 EC: 6.4.1.2 和 EC: 2.7.2.1 酶基因的丰度均有所提高, 而 EC: 2.7.2.15 和 EC: 2.7.9.2 酶基因丰度均有所下降。前两者的平均丰度较 CK 分别提升了 40.08% 和 15.61%, 而后两者的平均丰度较 CK 分别降低了 28.46% 和 28.65%。这表明混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  有效地推动了水解酸化过程, 促进了丙酮酸向乙酸的转化, 同时抑制了

丙酸和丁酸的积累。

甲烷的生成主要通过 2 种机制进行：乙酸脱羧和二氧化碳还原。在甲烷生成过程中，与产甲烷途径相关的酶基因丰度较高。乙酸营养型产甲烷途径是甲烷生成的关键途径之一。在此过程中，乙酸通过乙酸激酶(EC: 2.7.2.1)和磷酸乙酰转移酶(EC: 2.3.1.8)的催化作用转化为乙酰辅酶 A，或者通过乙酰辅酶 A 合成酶(EC: 6.2.1.1)直接生成乙酰辅酶 A。随后，乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 羧化酶(EC: 2.3.1.169)的作用下转化为 5-甲基四氢甲烷蝶呤，并通过一系列反应最终生成甲烷。如图 6B 所示，EC: 2.3.1.8、

EC: 6.2.1.1 和 EC: 2.3.1.169 酶基因的丰度在消化第 4 天较高，在 ZT 样品中达到峰值，与 CK 相比分别增加了 9.04%、18.74% 和 27.64%。这说明混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  促进了乙酸的转化利用。该结果与本研究中能够贡献上述功能酶基因的甲烷八叠球菌属和甲烷丝菌属的相对丰度变化一致(图 5B)。此外，在 Z 样品中上述功能酶基因的丰度相较于 CK 也有一定提升，说明仅添加生物炭也能增强乙酸营养型产甲烷途径，Li 等<sup>[41]</sup>和 Wang 等<sup>[42]</sup>的研究也得出了类似结论。然而，在 T 样品中，上述 3 个酶基因的丰度均低于 CK，降幅在 5.83%–14.07%，反映出该样





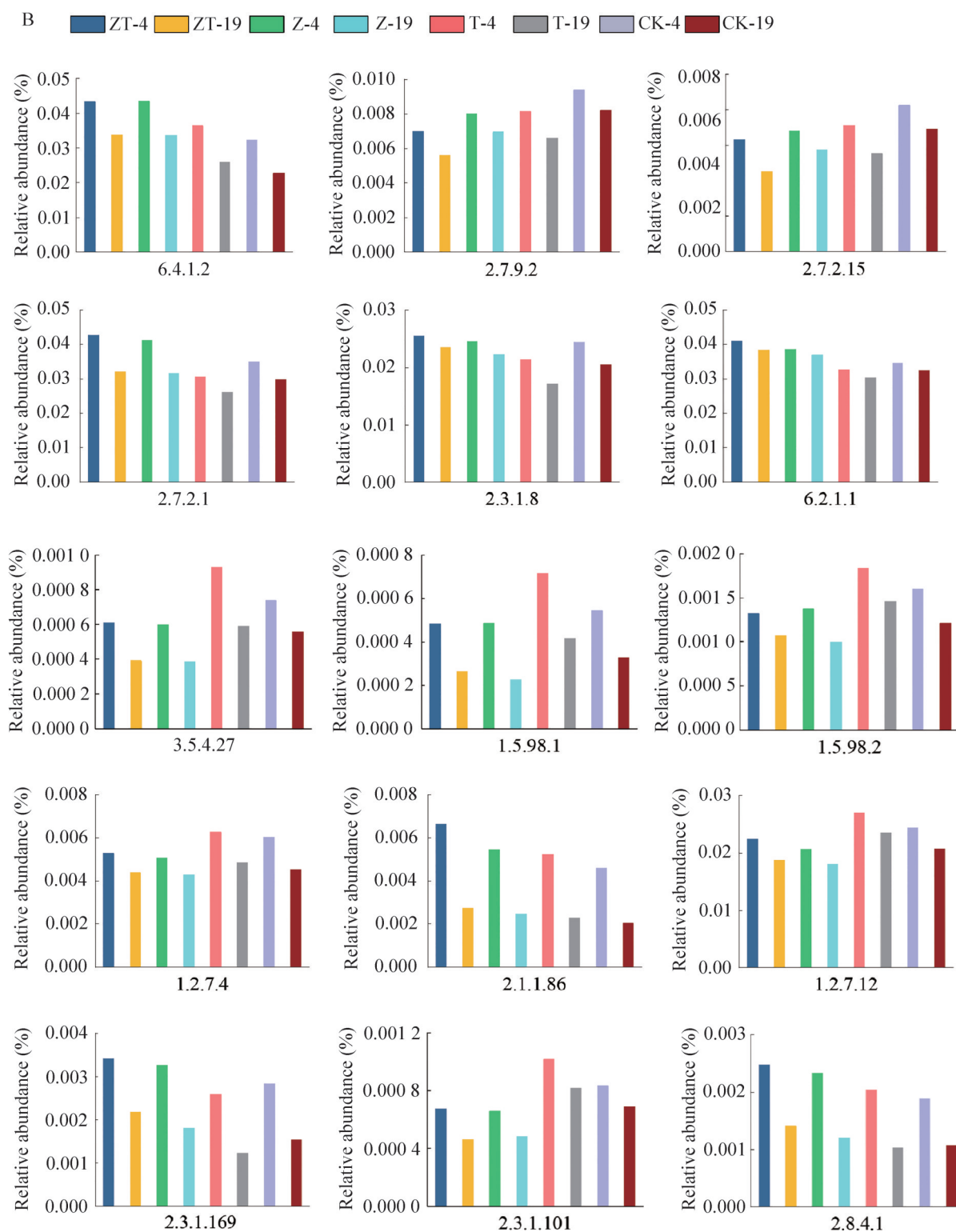


图6 不同处理对甲烷代谢途径的影响。A: 主要代谢途径; B: 相关酶基因丰度。

Figure 6 Effect of different treatments on methane metabolism pathways. A: Major metabolic pathways; B: Related enzyme gene abundance.

品中乙酸营养型产甲烷途径受到了抑制。

氢营养型产甲烷途径同样是一条重要的甲烷生成途径。在此途径中, 甲酰甲烷呋喃脱氢酶(EC: 1.2.7.12)能够催化  $\text{CO}_2$  生成甲酰甲烷呋喃。随后, 甲酰甲烷呋喃依次在四氢甲烷蝶呤甲酰转移酶(EC: 2.3.1.101)、次甲基甲酰四氢甲烷蝶呤环化水解酶(EC: 3.5.4.27)、亚甲基四氢甲烷蝶呤脱氢酶(EC: 1.5.98.1)、亚甲基四氢甲烷蝶呤还原酶(EC: 1.5.98.2)以及辅酶  $\text{F}_{420}$  氢化酶(EC: 1.12.98.1)的作用下转化为 5-甲基四氢甲烷蝶呤(图 6A)。如图 6B 所示, 上述功能酶基因的丰度在第 4 天更高。同时, 与 CK 相比, 在 ZT 样品中, 上述功能酶基因的丰度均降低, 降幅为 8.77%–25.23%。这说明混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的厌氧消化系统中氢营养型产甲烷途径受到了抑制, 与本研究能够贡献上述功能酶基因的甲烷袋状菌属和甲烷杆菌属的相对丰度变化一致(图 5B)。然而, 在 T 样品中, 这些酶基因丰度均增加, 增幅为 3.40%–30.20%, 同样与图 5B 中甲烷袋状菌属和甲烷杆菌属的相对丰度变化一致。这表明单独添加  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  能够强化氢营养型产甲烷途径, 与 Kuar 等<sup>[40]</sup>的研究结论相符。

四氢甲烷蝶呤 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)是甲烷生成途径中的关键功能酶, 同样在第 4 天丰度更高。与 CK 相比, 这两种酶基因在添加导电材料的样品中的丰度均升高, 其中在 ZT 样品中增幅更为明显, 分别为 41.46% 和 31.50% (图 6B)。综合宏基因组分析结果可知, 混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  加速了厌氧消化过程中乙酸的生成效率, 增强了乙酸营养型产甲烷途径的代谢活性, 从而促进了甲烷的产生。

### 3 结论

响应面法可用于优化混合添加生物炭和

$\text{Fe}_3\text{O}_4$  的青稞秸秆厌氧消化产甲烷工艺。通过响应面模型验证试验, 确定的最佳工艺条件为: 总固体含量 6.32%、生物炭与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  混合比 6.83:3.17、接种比 2.51。在该条件下, 累积甲烷产量达到 269.04 mL/g, 与采用化学预处理方法相当, 同时促进了有机物向乙酸的转化。此外, 在混合添加处理中, 与水解酸化功能相关的细菌类群以及与产甲烷菌存在互营关系的细菌类群的相对丰度增加, 并且富集了乙酸营养型产甲烷菌(如甲烷八叠球菌属和甲烷丝菌属)。甲烷代谢途径分析表明, 混合添加处理增强了乙酸营养型产甲烷途径, 从而提升了甲烷产量。本研究表明, 混合添加生物炭和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  是一种高效且环境友好的木质纤维素类废弃物处理方法, 可用于生物甲烷的高效生产。

### 作者贡献声明

张智伟: 样品采集、实验操作、数据分析、论文撰写; 刘海林: 数据分析、论文指导与修改; 李屹: 数据分析、论文修改; 杜中平: 样品采集; 韩睿: 实验构思与设计、数据分析、论文指导与修改。

### 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

### 参考文献

- [1] KARKI R, CHUENHART W, SURENDRA KC, SHRESTHA S, RASKIN L, SUNG S, HASHIMOTO A, KUMAR KHANAL S. Anaerobic co-digestion: current status and perspectives[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 330: 125001.
- [2] 柳丽, 杜中平, 李屹, 陈来生, 韩睿. NaOH 预处理对青稞秸秆厌氧发酵特性的影响[J]. *中国农业科技导报*, 2022, 24(8): 192-200.  
LIU L, DU ZP, LI Y, CHEN LS, HAN R. Effect of NaOH pretreatment on anaerobic fermentation characteristics of hulless barley straw[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2022, 24(8): 192-200 (in Chinese).

- [3] LIU L, DU ZP, LI Y, HAN R. Effects of urea addition on anaerobic digestion characteristics of hullless barley straw pretreated with KOH[J]. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 2023, 25(1): 479-489.
- [4] 孙嘉臣, 李子富, 朱立新. NaOH 和沼液浸泡预处理对麦糠厌氧发酵的强化作用比较[J]. *环境工程技术学报*, 2019, 9(5): 603-608.  
SUN JC, LI ZF, ZHU LX. Comparison of enhancements of NaOH and liquid digestate soaking pretreatments for the anaerobic digestion of wheat husk[J]. *Journal of Environmental Engineering Technology*, 2019, 9(5): 603-608 (in Chinese).
- [5] 赵烁, 李莹, 王震, 陈丽. 木质纤维素预处理方法的研究进展[J]. *中国造纸*, 2024, 43(8): 29-38.  
ZHAO S, LI Y, WANG Z, CHEN L. Research progress of lignocellulose pretreatment methods[J]. *China Pulp & Paper*, 2024, 43(8): 29-38 (in Chinese).
- [6] BOLAN S, HOU DY, WANG LW, HALE L, EGAMBERDIEVA D, TAMMEORG P, LI R, WANG B, XU JP, WANG T, SUN HW, PADHYE LP, WANG HL, SIDDIQUE KHM, RINKLEBE J, KIRKHAM MB, BOLAN N. The potential of biochar as a microbial carrier for agricultural and environmental applications[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 886: 163968.
- [7] VALENTIN MT, LUO G, ZHANG SC, BIAŁOWIEC A. Direct interspecies electron transfer mechanisms of a biochar-amended anaerobic digestion: a review[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 146.
- [8] AMBAYE TG, VACCARI M, van HULLEBUSCH ED, AMRANE A, RTIMI S. Mechanisms and adsorption capacities of biochar for the removal of organic and inorganic pollutants from industrial wastewater[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2021, 18(10): 3273-3294.
- [9] ZHENG S, YANG F, HUANG W, LEI Z, ZHANG Z, HUANG W. Combined effects of zero valent iron and magnetite on semi-dry anaerobic digestion of swine manure[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 346: 126438.
- [10] ZHAO ZS, LI Y, YU QL, ZHANG YB. Ferroferric oxide triggered possible direct interspecies electron transfer between *Syntrophomonas* and *Methanosaeta* to enhance waste activated sludge anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 79-85.
- [11] 朱剑锋, 王艳琼, 王红武. 铁氧化物促进微生物直接种间电子传递的机理及其研究现状[J]. *环境化学*, 2022, 41(6): 1856-1868.  
ZHU JF, WANG YQ, WANG HW. A review on enhancement of direct interspecies electron transfer induced by iron oxides and its mechanism[J]. *Environmental Chemistry*, 2022, 41(6): 1856-1868 (in Chinese).
- [12] WANG P, YU M, LIN PR, ZHENG Y, REN LH. Effects of biochar supported nano zero-valent iron with different carbon/iron ratios on two-phase anaerobic digestion of food waste[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 382: 129158.
- [13] 王欣姿, 王攀, 杨鑫玉, 李英男, 任连海. 生物炭负载纳米零价铁对厨余垃圾厌氧发酵性能的影响[J]. *环境工程*, 2023, 41(8): 154-161.  
WANG XZ, WANG P, YANG XY, LI YN, REN LH. Effect of biochar-nZVI on performance of food waste anaerobic digestion[J]. *Environmental Engineering*, 2023, 41(8): 154-161 (in Chinese).
- [14] LIM EY, LEE JTE, ZHANG L, TIAN HL, ONG KC, TIO ZK, ZHANG JX, TONG YW. Abrogating the inhibitory effects of volatile fatty acids and ammonia in overloaded food waste anaerobic digesters via the supplementation of nano-zero valent iron modified biochar[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 817: 152968.
- [15] LI PF, WANG Q, HE XM, YU R, HE C, SHEN DK, JIAO YZ. Investigation on the effect of different additives on anaerobic co-digestion of corn straw and sewage sludge: comparison of biochar,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , and magnetic biochar[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 345: 126532.
- [16] ZHANG H, KHALID H, LI W, HE Y, LIU G, CHEN C. Employing response surface methodology (RSM) to improve methane production from cotton stalk[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018, 25(8): 7618-7624.
- [17] DENG YF, QIU L, SHAO YQ, YAO YQ. Process modeling and optimization of anaerobic co-digestion of peanut hulls and swine manure using response surface methodology[J]. *Energy & Fuels*, 2019, 33(11): 11021-11033.
- [18] 刘荣厚. 秸秆预处理及添加剂对玉米秸秆与鸡粪混合厌氧发酵产沼气特性的影响[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2020.  
LIU RH. Effects of straw pretreatment and additives on biogas production by mixed anaerobic fermentation of corn straw and chicken manure[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2020 (in Chinese).
- [19] 李屹, 姚百伦, 孟艳, 韩睿. HCl 预处理对蔬菜秸秆厌氧消化性能的影响[J]. *中国蔬菜*, 2023(6): 53-59.  
LI Y, YAO BL, MENG Y, HAN R. Effect of HCl pretreatment on anaerobic digestion of vegetable straws[J]. *China Vegetables*, 2023(6): 53-59 (in Chinese).
- [20] 丁岩, 王娟, 张迪. 气相色谱法测定发酵乳中的 7 种短链脂肪酸[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(2): 202-206.  
DING Y, WANG J, ZHANG D. Determination of 7 short-chain fatty acids in fermented milk by gas chromatography[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(2): 202-206 (in Chinese).
- [21] LUO LW, KARIMIRAD R, WONG JWC. Enhanced anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge by co-application of biochar and nano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ [J]. *Journal of Environmental Management*, 2024, 370: 122859.
- [22] DI L, WANG F, LI SY, WANG H, ZHANG DL, YI WM, SHEN XL. Influence of nano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  biochar on the methanation pathway during anaerobic digestion of chicken manure[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 377: 128979.
- [23] HE Y, WANG SL, SHEN CH, WANG Z, LIU YY, MENG XY, LI XY, ZHAO XL, CHEN JM, XU JL, YU JD, CAI YF, YING HJ. Biochar accelerates methane production efficiency from Baijiu wastewater: some viewpoints considering direct interspecies electron

- transfer[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 497: 154527.
- [24] 王旭辉, 徐鑫, 山其米克, 王卉, 叶凯, 李冠, 邓宇. 玉米秸秆厌氧消化预处理方法及工艺优化[J]. 农业工程学报, 2018, 34(23): 246-253.
- WANG XH, XU X, SHAN QMK, WANG H, YE K, LI G, DENG Y. Optimization of pretreatment process for corn straw anaerobic digest[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2018, 34(23): 246-253 (in Chinese).
- [25] 柳丽, 李洁, 白羿雄, 杜中平, 李屹, 陈来生, 韩睿. KOH和 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 联合固态预处理对青稞秸秆厌氧发酵特性的影响[J]. 环境科学研究, 2022, 35(8): 1966-1973.
- LIU L, LI J, BAI YX, DU ZP, LI Y, CHEN LS, HAN R. Effect of combined solid-state pretreatment with KOH and  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  on the anaerobic fermentation characteristics of hulless barley straw[J]. Environmental Science Research, 2022, 35(8): 1966-1973 (in Chinese).
- [26] 石思慧, 郭荣欣, 张良, 左晓宇, 李秀金, 袁海荣. 添加铁氧化物和活性炭对玉米秸秆两相厌氧消化性能和微生物学特性影响研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2020, 47(5): 89-96.
- SHI SH, GUO RX, ZHANG L, ZUO XY, LI XJ, YUAN HR. Effects of adding iron oxide and activated carbon on the two-phase anaerobic digestibility and microbiological characteristics of corn stover[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2020, 47(5): 89-96 (in Chinese).
- [27] WANG QH, KUNINOBU M, OGAWA HI, KATO Y. Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion[J]. Biomass and Bioenergy, 1999, 16(6): 407-416.
- [28] WANG SJ, HOU XC, SU HJ. Exploration of the relationship between biogas production and microbial community under high salinity conditions[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1149.
- [29] HOANG AT, GOLDFARB JL, FOLEY AM, LICHTFOUSE E, KUMAR M, XIAO LL, AHMED SF, SAID Z, LUQUE R, BUI VG, NGUYEN XP. Production of biochar from crop residues and its application for anaerobic digestion[J]. Bioresource Technology, 2022, 363: 127970.
- [30] WANG YY, ZHANG YL, WANG JB, MENG L. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria[J]. Biomass and Bioenergy, 2009, 33(5): 848-853.
- [31] MA JY, YAO ZL, ZHAO LX. Comprehensive study of the combined effects of biochar and iron-based conductive materials on alleviating long chain fatty acids inhibition in anaerobic digestion[J]. Environmental Research, 2023, 239: 117446.
- [32] SINGH RP. Glycan utilisation system in *Bacteroides* and bifidobacteria and their roles in gut stability and health[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(18): 7287-7315.
- [33] LAPÉBIE P, LOMBARD V, DRULA E, TERRAPON N, HENRISSAT B. Bacteroidetes use thousands of enzyme combinations to break down glycans[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 2043.
- [34] WAN JJ, ZHANG LJ, JIA BY, YANG B, LUO ZL, YANG JK, BOGUTA P, SU XT. Effects of enzymes on organic matter conversion in anaerobic fermentation of sludge to produce volatile fatty acids[J]. Bioresource Technology, 2022, 366: 128227.
- [35] HU YS, HAO XD, WANG JM, CAO YL. Enhancing anaerobic digestion of lignocellulosic materials in excess sludge by bioaugmentation and pre-treatment[J]. Waste Management, 2016, 49: 55-63.
- [36] YU JF, LIU J, SENTHIL KUMAR P, WEI YW, ZHOU M, VO DV N, XIAO LL. Promotion of methane production by magnetite *via* increasing acetogenesis revealed by metagenome-assembled genomes[J]. Bioresource Technology, 2022, 345: 126521.
- [37] LIANG JS, ZHENG WG, ZHANG HB, ZHANG PY, CAI YJ, WANG QY, ZHOU ZY, DING YR. Transformation of bacterial community structure in rumen liquid anaerobic digestion of rice straw[J]. Environmental Pollution, 2021, 269: 116130.
- [38] YANG S, CHEN ZQ, WEN QX. Impacts of biochar on anaerobic digestion of swine manure: methanogenesis and antibiotic resistance genes dissemination[J]. Bioresource Technology, 2021, 324: 124679.
- [39] MORITA M, MALVANKAR NS, FRANKS AE, SUMMERS ZM, GILTEAUX L, ROTARU AE, ROTARU C, LOVLEY DR. Potential for direct interspecies electron transfer in methanogenic wastewater digester aggregates[J]. mBio, 2011, 2(4): e00159-11.
- [40] KAUR M, SAHOO PC, KUMAR M, SACHDEVA S, PURI SK. Effect of metal nanoparticles on microbial community shift and syntrophic metabolism during anaerobic digestion of *Azolla microphylla*[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021, 9(5): 105841.
- [41] LI Q, XU MJ, WANG GJ, CHEN R, QIAO W, WANG XC. Biochar assisted thermophilic co-digestion of food waste and waste activated sludge under high feedstock to seed sludge ratio in batch experiment[J]. Bioresource Technology, 2018, 249: 1009-1016.
- [42] WANG GJ, LI Q, GAO X, WANG XC. Synergetic promotion of syntrophic methane production from anaerobic digestion of complex organic wastes by biochar: performance and associated mechanisms[J]. Bioresource Technology, 2018, 250: 812-820.