

木质纤维素燃料乙醇蒸馏废水的高温厌氧处理及 菌群结构分析

谢春雨^{1,2} 邱春生^{1,2*} 孙力平^{1,2} 张丹丹^{1,2}

(1. 天津城建大学 环境与市政工程学院 天津 300384)

(2. 天津市水质科学与技术重点实验室 天津 300384)

摘要:【目的】为开发高效的高浓度木质纤维素燃料乙醇蒸馏废水厌氧处理及资源化利用工艺,以活性炭为载体,在实验室规模上对高温厌氧流化床反应器处理木质纤维素燃料乙醇蒸馏废水进行研究。【方法】反应器经 65 d 梯度驯化后启动,对工艺参数进行一系列优化,并通过基于 16S rRNA 基因的分子生态学技术分析厌氧污泥中的优势菌群。【结果】实验获得了最优的反应条件和处理效果:厌氧流化床反应器(Anaerobic fluidized bed reactor, AFBR)在温度 55 ± 1 °C、有机负荷率(OLR) 13.8 g COD/(L·d)及水力停留时间(HRT) 48 h 操作时, COD 去除率达到 90% 以上,同时甲烷产率达到 290 mL/g COD; 菌群鉴定分析结果显示高温厌氧活性污泥中 *Clostridia* 所占比例最大,产甲烷菌属以 *Methanoculleus* 和 *Methanosarcina* 为主,其它功能菌群主要为 *Alphaproteobacteria* 等。【结论】AFBR 反应器可高效降解木质纤维素燃料乙醇蒸馏废水并产生生物能源甲烷,其反应体系内微生物种类丰富。

关键词: 燃料乙醇蒸馏废水, 厌氧流化床, RFLP, 菌群结构

Thermophilic anaerobic treatment of wastewater from lignocellulosic bioethanol distillation with microbial community analysis

XIE Chun-Yu^{1,2} QIU Chun-Sheng^{1,2*} SUN Li-Ping^{1,2} ZHANG Dan-Dan^{1,2}

(1. School of Environmental and Municipal Engineering, Tianjin Chengjian University, Tianjin 300384, China)

(2. Tianjin Key Laboratory of Water Quality Science and Technology, Tianjin 300384, China)

Abstract: [Objective] To develop efficient anaerobic treatment of wastewater from lignocellulosic bioethanol production, a laboratory-scale thermophilic anaerobic digestion in a fluidized bed reactor with activated carbon was developed. [Methods] After gradient domestication for 65 days, the operating parameters of the reactor have been optimized and dominant bacteria of the thermophilic anaerobic sludge were investigated based on 16S rRNA. [Results] The COD removal rate of 90% and methane yield of 290 mL/g COD were obtained at 55 ± 1 °C, organic loading rate (OLR) of 13.8 g COD/(L·d) and hydraulic retention time (HRT) of 48 h in the anaerobic fluidized bed reactor (AFBR). The identification and analysis of bacteria showed that *Clostridia* accounts for the largest

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21206106); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(No. 2012ZX07308002)

*通讯作者: Tel: 86-22-23085117; ✉: qcs254@163.com

收稿日期: 2013-09-20; 接受日期: 2013-10-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-28

proportion of all microorganism and methanogen were dominated by *Methanoculleus* and *Methanosarcina* in thermophilic anaerobic sludge. **[Conclusion]** Bioethanol distilled wastewater can be degraded efficiently by abundant microbial species with methane production in AFBR.

Keywords: Bioethanol distilled wastewater, Anaerobic, RFLP, Community structure

近年来,木质纤维素由于其来源广泛、价格低廉等特点在工业生产中得到广泛应用。木质纤维素是生产燃料乙醇最具潜力的原料,纤维素基燃料乙醇产业近年来在国内外得到飞速发展,对解决能源紧缺问题具有重要意义。燃料乙醇的生产过程主要有原料预处理、发酵、蒸馏和精制 4 个步骤^[1-2]。其中,发酵液乙醇蒸馏阶段会产生大量的工艺废水,是燃料乙醇生产过程中最主要的废水来源。该废水具有较高浓度的生化需氧量(BOD)、化学需氧量(COD)和氮、磷等物质,不经处理直接排放会对环境造成污染^[3]。高浓度的有机废水一般采用厌氧生物技术进行处理,可有效去除废水中的有机物并产生甲烷和二氧化碳等气体^[4]。因木质纤维素原料不同于传统粮食(淀粉基)作物原料,废水中含有大量的纤维素及其分解产物、半纤维素、木质素和五碳糖类等可生化性较差的物质,需强化厌氧处理过程。

本研究中采用厌氧流化床反应器(AFBR)在高温条件下对燃料乙醇蒸馏废水进行处理,温度控制在 55 °C,添加活性炭作为载体增大反应器生物量,优化反应条件,获得最优的处理工况,降解有机污染物转化为可利用资源——甲烷,并采用限制性内切酶片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法对厌氧活性污泥中的主要功能菌群进行分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 接种物及菌种: AFBR 生物反应器接种物为本实验室驯化的高温厌氧活性污泥;PCR-RFLP 分析所用大肠杆菌 *E. coli* DH5α 为实验室保藏菌株。

1.1.2 废水: 实验采用的蒸馏废水取自天津某厂燃料乙醇中试生产工艺的蒸馏废水(-20 °C 保存)。蒸馏废水理化性质如表 1 所示。

1.2 实验装置

实验所用的厌氧流化床生物反应器(AFBR),高 560 mm,内径 70 mm,有效容积 2.05 L,实验装置示意图如图 1 所示。

表 1 蒸馏废水理化性质 Table 1 Characteristics of distilled wastewater	
参数 Parameter	蒸馏废水 Distilled wastewater
pH	5.30±0.30
BOD ₅ (mg/L)	20 150±1 050
COD _{cr} (mg/L)	31 500±1 850
氨氮 Ammonia (mg/L)	53.5±5.5
悬浮性固体 Suspended solids (SS, mg/L)	5 150±150

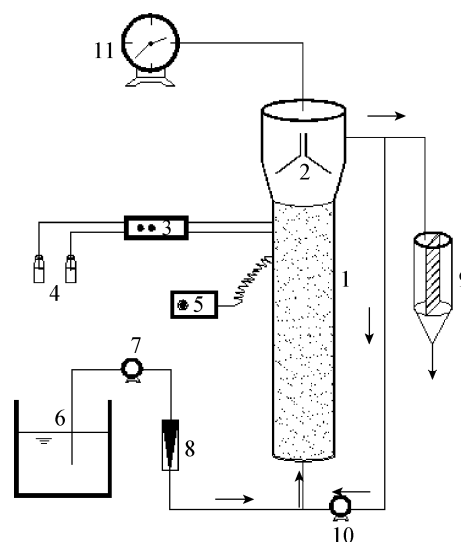


图 1 厌氧流化床反应器示意图

Figure 1 Schematic diagram of the anaerobic fluidized bed reactor

注: 1: 反应器主体; 2: 三相分离区; 3: pH 控制器; 4: HCl/NaOH; 5: 温度控制器; 6: 进水槽; 7: 进水泵; 8: 流量计; 9: 沉淀器; 10: 回流泵; 11: 气体流量计。

Note: 1: Reactor; 2: Phase separation zone; 3: pH control unit; 4: HCl/NaOH; 5: Temperature control unit; 6: Wastewater tank; 7: Influent pump; 8: Flowmeter; 9: Desilter; 10: Reflux pump; 11: Gas flowmeter.

来自储水槽 6 的废水经蠕动泵进入 AFBR 反应器底部, 反应器用夹套加热, 温度设定在 55 °C。一部分出水通过循环泵以 32.7 L/h 的速率循环进入 AFBR 反应器底部, 相应的液体上流速率为 9.5 m/h, 一部分出水进入 2 L 的沉降器内, 自然沉降固液分离后, 多余污泥定期排出, 上清液排出后进入后续处理工艺。

1.3 PCR-RFLP 实验方法

1.3.1 活性污泥样品 16S rRNA 基因获取: 活性污泥总 DNA 的提取采用土壤 DNA 提取试剂盒(天根生物技术有限公司)。

16S rRNA 基因的 PCR 扩增实验采用的引物为细菌和古细菌的通用引物 27F/1492R (5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3'/5'-GGTTACCTTGTTAC GACTT-3') 和 109F/915R (5'-ACKGCTCAGTAA CACGT-3'/5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCTT-3')。50 μ L PCR 反应体系包括: 25 μ L Taq 聚合酶 (TaKaRa TaqTM), 两种引物各 3 μ L, 模板 DNA 3 μ L, 加入超纯水至 50 μ L。PCR 扩增条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 53 °C 90 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min^[5-6]。PCR 产物采用 DNA 纯化试剂盒纯化。提取的总 DNA 及 PCR 产物采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。用 1 \times TAE 作为电泳缓冲液, 将 5 μ L DNA 样品与 1 μ L Loading buffer 混合, 在 100 V 恒压下, 电泳 40 min 后取出, 用凝胶成像仪观察并分析形成的 DNA 区带。

1.3.2 RFLP 分析: 采用 CaCl₂ 法制备大肠杆菌的感受态细胞。将纯化后的 16S rRNA 基因片段连接到 pMD19-T 载体, 并转化进入大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞内, 在 16 °C 条件下连接 1 h; 然后进行转化操作, 加入 LB 培养基后, 37 °C 摇床培养 1 h; 将培养后收集到的菌体涂布于预先涂布均匀 IPTG 20 μ L+X-Gal 40 μ L 的平板上。37 °C 培养 12 h, 随机挑取阳性菌落。

将随机挑取的阳性菌落在 LB 培养基中 37 °C 培养 12 h, 收集 1.5 mL 菌液, 采用高纯度质粒小量快速提取试剂盒提取质粒。将获得的质粒采用

1.3.1 所述方法扩增 16S rRNA 基因并进行琼脂糖凝胶电泳纯化。

将 16S rRNA 基因 PCR 纯化产物进行限制性内切酶长度多态性分析。加入限制性内切酶 *Hae* III 和 *Hinf* I 在 37 °C 酶切过夜。酶切产物采用 3% 琼脂糖凝胶电泳分析, 把具有相同 RFLP 类型的克隆进行测序后, 将得到的序列在 GenBank 数据库中查找最相似序列。进行文库内序列比对, 各文库中序列的遗传相似性大于 97% 被归为同一类操作单元类型(OTUs)。

1.4 反应器的启动

将高温厌氧活性污泥接种至 AFBR 反应器中, 接种量 30%, 并加入 10% (体积比) 活性炭载体。反应器初始进水 COD 5 500–6 100 mg/L, 温度保持在 55 \pm 1 °C, 反应器内混合液体通过循环泵保持反应器液体呈流化状态, pH 通过添加 NaOH 或 HCl 保持在 6.8–7.5 之间, 定期取样, 4 000 r/min 离心 10 min, 测定上清液 COD, COD 去除率 80% 后提高进水浓度, 至原水直接进水。经过 65 d 的梯度驯化启动, 蒸馏废水原水可以直接进入 AFBR 反应器, 在 HRT 为 72 h、温度 55 \pm 1 °C 的条件下, 废水 COD 去除率达 90% 以上, 镜检显示活性污泥附着在活性炭载体上, 反应器启动完成。

2 结果与讨论

2.1 出水回流速率对 COD 去除率的影响

以 COD 去除率为指标考察液体上流速率 (Upflow rate, UFR) 对 AFBR 反应器厌氧生物处理效果的影响。反应器温度设定在 55 °C, HRT 保持在 72 h, 蒸馏废水原水直接进水。结果如图 2 所示。

从图 2 可以看出 UFR 为 9.5 \pm 0.5 m/h 时反应器 COD 去除率趋于稳定, 达到 90.5%。进一步增大 UFR 至 14 m/h, COD 去除率升高了 1%, 但反应器能耗相应加大, 因此选择 UFR 9.5 \pm 0.5 m/h 作为 AFBR 的最佳液体上流速率。

2.2 进水 pH 值对 COD 去除率的影响

实验中通过改变蒸馏废水进水的 pH 来考察

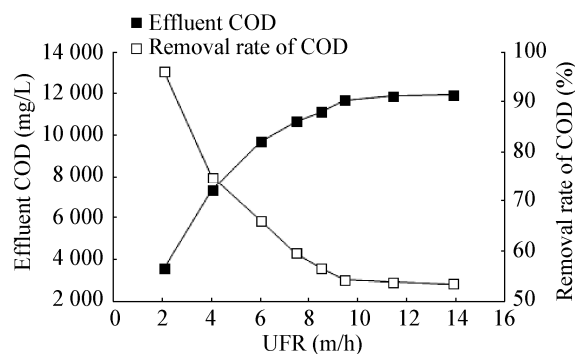


图2 液体上流速率对 COD 去除率的影响

Figure 2 Influence of the UFR on the removal rate of COD

pH 对 COD 去除效果的影响。反应器在 55 °C、HRT 72 h 及 UFR 9.5 m/h 下操作,实验结果如图 3 所示。

由图 3 可以看出,COD 去除率始终保持在 90% 以上,进水 pH 波动对 COD 去除率影响不大。当进水 pH 介于 3.5–5.0 时,反应器内部液体的 pH 稳定保持在 7.1–7.3。因此,在进行厌氧生物处理时,蒸馏废水 pH 无需进行调整即可直接进水。

2.3 温度对厌氧处理 COD 去除率的影响

AFBR 在 UFR 为 9.5 m/h 及 HRT 72 h 下操作,考察不同温度对 COD 去除率的影响,结果如图 4 所示。

从图 4 可以看出,COD 去除率随温度变化较大,反应器温度的变化会对活性污泥中微生物的代谢活动产生较大影响。温度在 54–56 °C 时,COD 去除率保持在 90% 以上,温度过高或过低都会引

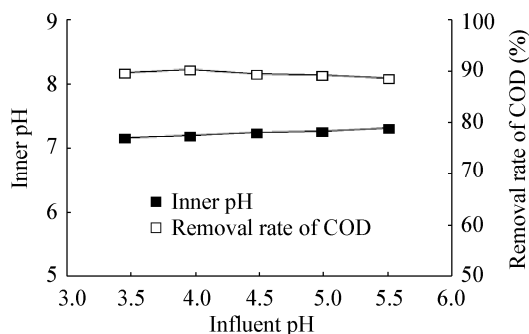


图3 进水 pH 对 COD 去除率的影响

Figure 3 Influence of the influent pH on the removal rate of COD

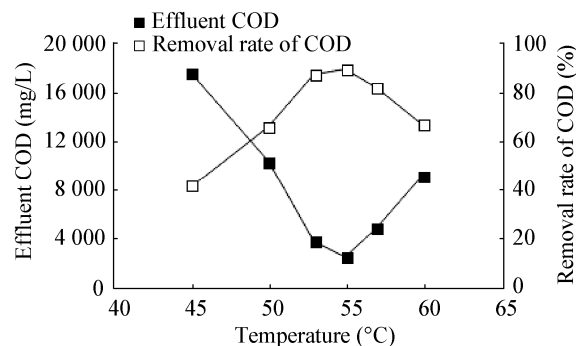


图4 温度对 COD 去除率的影响

Figure 4 Influence of the temperature on the removal rate of COD

起出水 COD 明显上升,高温厌氧过程对温度的变化比较敏感。因此,反应器温度宜控制在 55±1 °C 以维持反应器的稳定运行。

2.4 AFBR 反应器最佳环境条件下长期运行及最优 HRT 确定

AFBR 液体上流速率通过出水回流控制在 9.5±0.5 m/h,温度保持在 55±1 °C,进水 pH 不作调整,重新启动反应器考察反应器长期运行的性能。AFBR 连续运行实验结果与具体数据如表 2 和图 5 所示。

用自来水稀释至不同浓度的燃料乙醇蒸馏废水作为厌氧进水泵入反应器内,进水 pH 不做调整。反应器初始进水 COD 为 5 500 mg/L, HRT 设定为 48 h。从开始启动到第 107 天期间,进水 COD 从 5 500 mg/L 经过 5 个阶段逐步提升到 31 200 mg/L,相应的有机负荷从 2.2 g/(L·d)提高到 13.8 g/(L·d),期间 COD 去除率稳定在 90% 以上。稳定运行期间 (87–107 d),反应器 pH 稳定,无挥发性脂肪酸 (Volatile fatty acid, VFA) 积累现象发生,pH 和 VFA 可以作为反应器运行有效的监测指标。同时,实验结果显示 Biogas 单位时间产量随着 OLR 的提高而增长,甲烷单位产率略有下降,这主要是由于部分有机物在厌氧过程中参与合成了菌体生物质和其他代谢产物^[7]。在连续实验中,最大的甲烷产率在进水浓度为 30%、OLR 为 4.1 g COD/(L·d)时达到 308 mL/g COD,这个数值与前期文

表 2 AFBR 处理蒸馏废水长期运行操作策略及运行性能考察						
Table 2 Operating conditions and process performance of AFBR during continuous anaerobic digestion of distillery wastewater						
时间 Time (d)	进水浓度 Influent concentration (%)	HRT (h)	有机负荷 Organic loading [g COD/(L·d)]	COD 去除率 Removal rate of COD (%)	甲烷产率 Methane production rate (mL/g COD)	甲烷含量 Methane content (%)
0-14	16	48	2.20±0.21	90.8±2.1	295.0±11.2	62.2±5.2
15-26	30	48	4.10±0.55	90.7±3.2	308.0±11.2	62.5±3.6
27-47	50	48	6.70±0.32	89.9±5.2	305.0±16.9	63.7±5.2
48-68	65	48	9.60±0.31	89.5±2.1	288.0±10.2	61.3±4.1
69-86	80	48	11.40±0.45	90.1±6.8	285.0±18.8	61.8±3.8
87-107	100	48	13.80±0.35	89.0±1.9	290.0±10.3	61.2±2.4
108-122	100	42	16.00±0.78	85.1±2.1	235.0±12.9	55.8±2.8
123-134	100	36	17.50±1.12	74.2±5.6	162.0±9.5	47.3±3.9
135-140	100	30	18.70±0.45	47.5±11.2	56.0±15.2	38.0±6.6
141-150	100	48	14.00±0.36	88.4±2.3	275.0±13.9	61.2±2.9

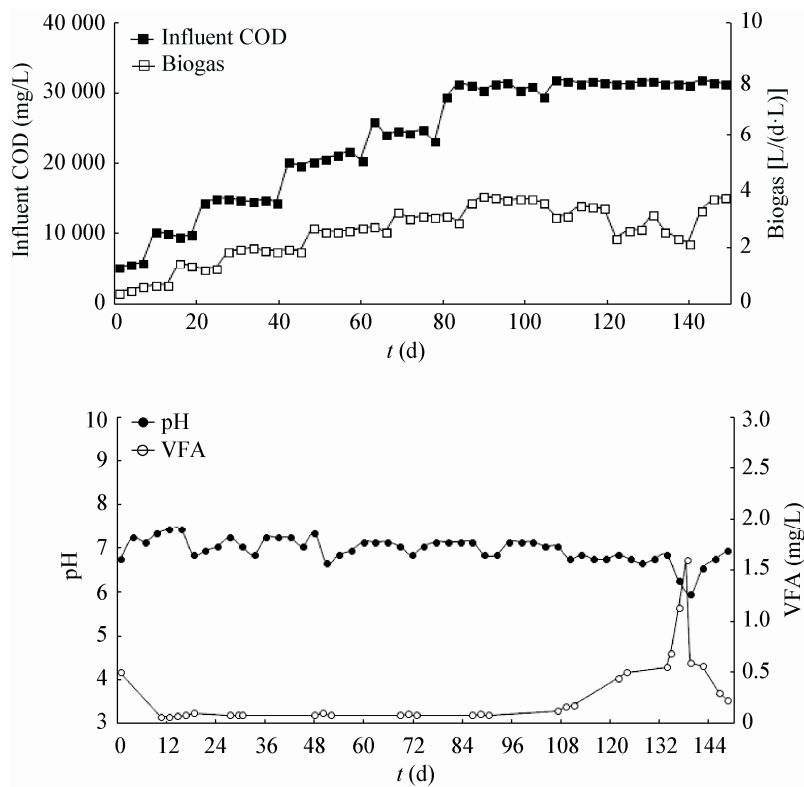


图 5 AFBR 长期连续运行实验结果

Figure 5 Process performance during continuous anaerobic digestion of bioethanol effluent in AFBR

献报道一致^[7-8]。此外,在各个阶段的稳定运行期间,产生的 Biogas 主要为甲烷和二氧化碳(CH_4 61%, CO_2 38%, 其他气体含量 1%, 包括少量的 H_2S 、 N_2 和 CO 等)。操作条件发生变化时,甲烷和二氧化碳所占比例始终比较稳定,说明反应器内产甲烷菌的活性和数量相对比较稳定,此条件有利于反应器稳定运行。把 HRT 从 48 h 分别缩短到 42 h 和 36 h,进一步提高 OLR,数据显示 VFA 在反应器内有一定积累(图 5),相应的 COD 去除率也分别降至 85.7%和 74.2%,Biogas 产量和甲烷含量也有一定下降(表 2)。而且,当 OLR 高于 17.5 g COD/(L·d) 时(HRT 36 h)产气量和 pH 值由于 VFA 的积累有剧烈下降。通过把 HRT 延长至 48 h,大约需要 7 d 的时间才能将反应器恢复至较高的 COD 降解水平(90%)。由此得出,反应器需要在 HRT 为 48 h 左右操作才可以保持较高的 COD 去除率和甲烷产量。

实验表明 AFBR 在 OLR 为 13.8 g COD/(L·d) 及 HRT 48 h 操作时可达到超过 90%的 COD 去除率,同时甲烷产率达到 290 mL/g COD,此工艺是一种有效的处理燃料乙醇蒸馏废水的一级处理方法。

2.5 微生物功能菌群结构研究

取稳定运行阶段的 AFBR 高活性厌氧污泥,提取污泥样品总 DNA,采用细菌通用引物扩增包含样品中细菌遗传信息的 16S rRNA 基因,进行 RFLP 分析。

2.5.1 微生物总 DNA 的提取和细菌 16S rRNA 基因片段的扩增:采用土壤总 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA,0.8%琼脂糖电泳图谱见图 6。

由图 6 可见,粗略估计该方法提取的微生物基因组 DNA 长度大部分介于 20 kb 左右,较好地保证了微生物基因组的完整性,同时可以看出 16S rRNA 基因扩增产物长度位于 1 500 bp 附近。将获得的 16S rRNA 基因扩增产物纯化后进行 T-A 克隆。

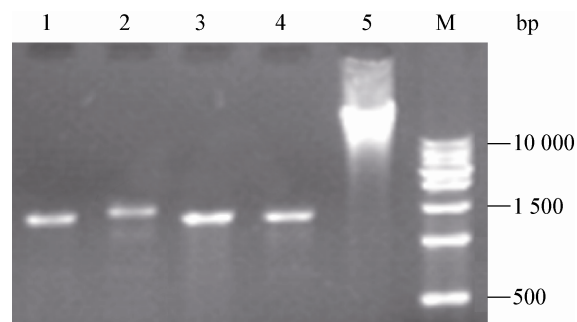


图 6 厌氧活性污泥总 DNA 及 16S rRNA 基因片段扩增产物电泳图

Figure 6 Electrophoretogram of total DNA extracted from anaerobic sludge and 16S rRNA gene amplification product

注: M: 1 kb marker; 1-4: 16S rRNA 基因片段; 5: 总 DNA.
Note: M: 1 kb marker; 1-4: 16S rRNA gene; 5: Total DNA.

2.5.2 RFLP 分析:随机挑选 96 个阳性克隆分别利用限制性内切酶 *Hae* III 和 *Hinf* I 酶切后经 RFLP 图谱分析(图 7),将具有相同 RFLP 类型的片段归为一类,获得 16 个不同的 RFLP 类型,实验结果初步显示厌氧活性污泥中微生物种类较为丰富。

2.5.3 16S rRNA 基因测序及序列分析:将 16 种具有相同 RFLP 类型的克隆进行测序后,根据得到的测序结果进行文库内序列比对,结果如表 3 所示。

由表 3 可以看出,筛选出的 16 种 RFLP 基因片段在当前序列数据库中均能找到与之相似的基因序列,且相似性大于 97%,共得到 5 种不同类型的菌属。其中 *Clostridia* 是所有检出菌属中所占比例最大的一种,包括 10 个 RFLP 序列,包含克隆 36 个,占 96 个总克隆数的 37.5%,数量非常丰富。*Clostridia* 是厌氧发酵系统中产酸产氢作用的主要功能菌群,可以在高温(55 °C)条件下降解纤维素、葡萄糖、木糖等糖类基质,其代谢产物主要为乙酸、乙醇、乳酸、丁酸和氢^[9-10],在某些条件下,代谢产物为丁醇和丙酮^[11]。*Clostridia* 在水解燃料乙醇蒸馏废水的过程中起着重要作用,尤其是在高温厌氧发酵系统中,监测和控制 *Clostridia* 对于稳定和提高燃料乙醇蒸馏废水的降解十分重要。*Methanoculleus* 和 *Methanosarcina* 各包括一个

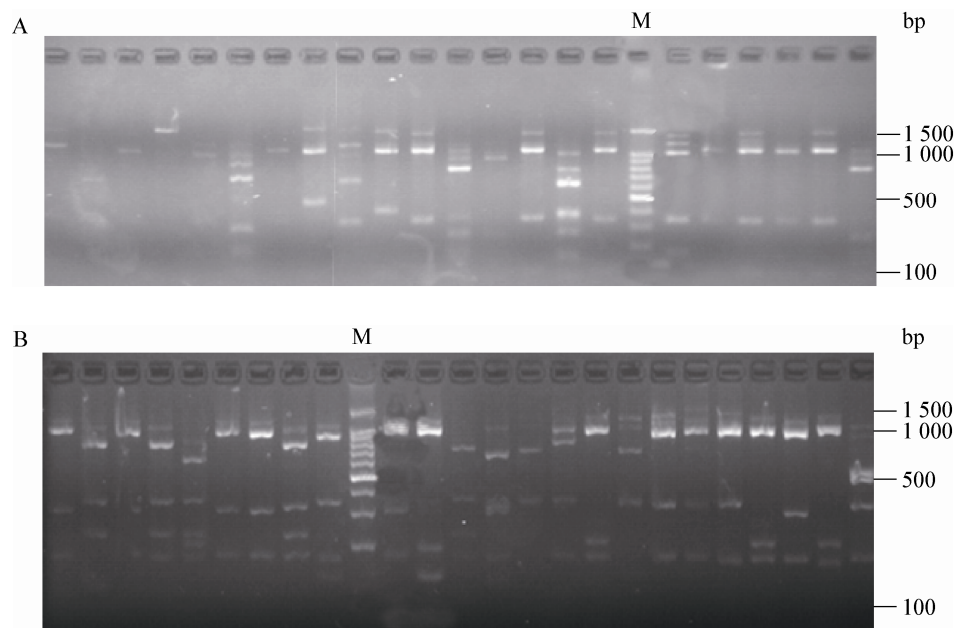


图 7 16S rRNA 基因的部分酶切结果

Figure 7 Partial results of bacterial 16S rRNA gene fragments by digested enzyme

Note: A-*Hae* III; B-*Hinf* I . M: 100 bp marker.

RFLP 序列，分别占总克隆数的 22.9%和 7.3%。*Methanoculleus* 与 *Methanosarcina* 都是厌氧发酵系统中较为常见的产甲烷菌属^[12-14]，*Methanoculleus* 适宜在 pH 7.0–7.5 条件下生长，对甲酸、乙酸、乙二醇基质的利用率最高，不能利用甲醇和甲基胺，对青霉素等抗生素具有一定的抗性^[15]；*Methanosarcina* 是已知的唯一能够利用所有已知产甲烷途径(乙酸营养途径、氢营养途径和甲基营养途径)的产甲烷微生物菌属，能够利用乙酸、甲醇、甲胺、甲基硫化物等为底物产生甲烷^[16-18]。两

种产甲烷菌属在 AFBR 系统中的数量呈现明显差异，可能是由于其对于可利用底物的差别，燃料乙醇蒸馏废水水解后的产物较适宜 *Methanoculleus* 的代谢和生长。*Thermoprotei* 是一类极端嗜热的细菌，可以利用碳水化合物，适应不同的盐浓度和含氧量，对烷烃类有机物和硫酸盐具有较好的去除效果^[19-20]。*Alphaproteobacteria* 中包括一大类反硝化菌，在系统中主要起除氮的作用，对于含盐工业废水中嗜盐的反硝化菌研究表明，*Alphaproteobacteria* 为系统脱氮的主要功能菌群^[21]。

表 3 序列比对结果			
Table 3 Results of gene sequence BLAST			
OTUs	最相似菌属 Most similar genus	包含 RFLP 类型数量 The number of RFLP types	所含克隆数量/比例 The number/proportion of clones (%)
1	<i>Methanoculleus</i>	1	22/22.9
2	<i>Methanosarcina</i>	1	7/7.3
3	<i>Thermoprotei</i>	2	12/12.5
4	<i>Clostridia</i>	10	36/37.5
5	<i>Alphaproteobacteria</i>	2	19/19.8

3 结论

(1) 在 AFBR 反应器内培养出高活性高温厌氧活性污泥,添加活性炭作为载体,以燃料乙醇蒸馏废水为进水,研究得出 AFBR 反应器处理燃料乙醇蒸馏废水的最佳工况为 UFR 9.5 ± 0.5 m/h、温度 55 ± 1 °C、HRT 48 h,进水 pH 对反应器运行的影响不明显。

(2) 通过连续实验考察操作参数对反应器处理高浓度蒸馏废水的影响,得出 AFBR 反应器在最佳操作条件下操作,有机负荷(OLR)可以达到 13.8 g COD/(L·d),COD 去除率达到 90%以上,甲烷产率为 290 mL/g COD;

(3) 基于 16S rRNA 基因的分子生态学分析显示 AFBR 系统高温厌氧活性污泥中 *Clostridia* 所占比例最大,产甲烷菌属以 *Methanoculleus* 和 *Methanosarcina* 为主,其它功能菌群主要为 *Alphaproteobacteria* 等。

参考文献

- [1] Guragain YN, De Coninck J, Husson F, et al. Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(6): 4416-4424.
- [2] Satyawali Y, Balakrishnan M. Wastewater treatment in molasses based alcohol distilleries for COD and color removal: a review[J]. Journal of Environmental Management, 2008, 86(3): 481-497.
- [3] Kumar V, Wati L, FitzGibbon F, et al. Bioremediation and decolorization of anaerobically digested distillery spent wash[J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(4): 311-313.
- [4] Mohana S, Acharya BK, Madamwar D. Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 163(1): 12-25.
- [5] Lane DJ, Stackebrandt E, Goodfellow M. 16S/23S rRNA sequencing[M]. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1991: 115-175.
- [6] Leclerc M, Delgenes JP, Godon JJ. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing[J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(8): 809-819.
- [7] Kongjan P, Min B, Angelidaki I. Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70 °C) by mixed culture fermentation[J]. Water Research, 2008, 43(5): 1414-1424.
- [8] Torry-Smith M, Sommer P, Ahring BK. Purification of bioethanol effluent in an UASB reactor system with simultaneous biogas formation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 84(1): 7-12.
- [9] Liu Siqing, Bischoff Kenneth M, Leathers Timothy D, et al. Butyric acid from anaerobic fermentation of lignocellulosic biomass hydrolysates by *Clostridium tyrobutyricum* strain RPT-4213[J]. Bioresource Technology, 2013, 143: 322-329.
- [10] K Syutsubo, Y Nagaya, S Sakai, 等. 纤维素降解菌在高温厌氧消化过程中的作用[J]. 张敏, 译. 中国沼气, 2009, 27(5): 18-20.
- [11] Xue C, Zhao XQ, Liu CG, et al. Prospective and development of butanol as an advanced biofuel[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(8): 1575-1584.
- [12] Zielinska M, Cydzik-Kwiatkowska A, Zielinski M, et al. Impact of temperature, microwave radiation and organic loading rate on methanogenic community and biogas production during fermentation of dairy wastewater[J]. Bioresource Technology, 2012, 129: 308-314.
- [13] Tian Zhuoli, Chauliac D, Pullammanappallil P. Comparison of non-agitated and agitated batch, thermophilic anaerobic digestion of sugarbeet tailings[J]. Bioresource Technology, 2012, 129: 411-420.
- [14] Lerm S, Kleybocker A, Miethling-Graff R, et al. Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload[J]. Waste Management, 2012, 32(3): 389-399.
- [15] 马金亮, 张丽萍, 程辉彩, 等. 污水处理厂活性污泥中甲烷袋状菌的分离与鉴定[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(6): 28-31.
- [16] Galagan JE, Nusbaum C, Roy A, et al. The genome of *Macetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity[J]. Genome Research, 2002, 12(4): 532-542.
- [17] Benedict MN, Gonnerman MC, Metcalf WW, et al. Genomescale metabolic reconstruction and hypothesis testing in the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans* C2A[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(4): 855-865.
- [18] 杨冰, 卢向阳, 田云. 甲烷八叠球菌研究进展[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(12): 7-11.
- [19] Li W, Wang LY, Duan RY, et al. Microbial community characteristics of petroleum reservoir production water amended with n-alkanes and incubated under nitrate-, sulfate-reducing and methanogenic conditions[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012(69): 87-96.
- [20] Gupta R, Bhandari V. Phylogeny and molecular signatures for the phylum thermozogae and its subgroups[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 100(1): 1-34.
- [21] Sachiko Yoshine, Hiroshi Makno, Hidenobu Hirose. Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 72(1): 182-189.