

研究报告



餐厨垃圾厌氧消化处理主要过程的微生物群落结构分析

潘婧冉¹ 高苏¹ 赵国柱^{*1} 周传斌^{*2}

1 北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083

2 中国科学院生态环境研究中心城市与区域生态国家重点实验室 北京 100085

摘要:【背景】厌氧消化是我国餐厨垃圾处理的主要方法,微生物在其处理过程中起到关键作用,但是目前对其不同工艺单元微生物群落结构的研究较少。【目的】通过分析各工艺单元的微生物多样性与群落结构,为改进餐厨垃圾资源化处理技术、提高资源利用效率提供科学依据。【方法】采集某餐厨垃圾处理厂油水分离、厌氧发酵、沼渣脱水等3个工艺单元产生的废液样品,采用16S rRNA基因高通量测序技术,研究其菌群组成、丰度、优势菌群及其与环境因子的相关性。【结果】初始油水分离样品中的微生物群落种类相对较少,而经厌氧发酵和沼渣脱水处理后样品中的微生物群落种类较丰富。在门水平上,厚壁菌门(*Firmicutes*)在各单元样品中所占平均比例最高,为81.1%,其次为拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*),分别占15.81%和4.59%;在属水平上,相对丰度较高的菌属为乳酸菌属(*Lactobacillus*)、互营单胞菌属(*Syntrophomonas*)等。餐厨垃圾处理过程中的部分菌属可能具有资源-环境双重属性,例如在沼渣脱水单元相对丰度高达32.67%的假单胞菌属(*Pseudomonas*),该菌属中既存在少部分致病菌或条件致病菌,也具有生产聚羟基脂肪酸酯的功能菌。影响各组样品微生物群落组成结构最显著的因子是pH值,其次是总糖的含量。【结论】研究明确了典型餐厨垃圾厌氧消化处理工艺单元的微生物群落结构和多样性,并提出了优化处理工艺、强化资源利用效率的建议。

关键词: 餐厨垃圾, 厌氧消化, 高通量测序, 群落结构, 微生物多样性

Microbial community structure in the main processes of anaerobic digestion of restaurant food waste

PAN Jing-Ran¹ GAO Su¹ ZHAO Guo-Zhu^{*1} ZHOU Chuan-Bin^{*2}

1 College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2 State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Abstract: [Background] Anaerobic digestion is the main method for treating restaurant food waste in China. Microorganism plays a crucial role in the anaerobic fermentation of restaurant food waste, however, there is limited study on the microbial structure and biodiversity in this field. [Objective] This work is aiming at providing scientific evidences for improving restaurant food waste treatment technologies and bio-resource

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41871206); Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (2017061)

***Corresponding authors:** E-mail: ZHAO Guo-Zhu: zhaogz@im.ac.cn; ZHOU Chuan-Bin: cbzhou@rcees.ac.cn

Received: 13-12-2018; **Accepted:** 24-04-2019; **Published online:** 21-05-2019

基金项目: 国家自然科学基金(41871206); 中国科学院青年创新促进会项目(2017061)

***通信作者:** E-mail: 赵国柱: zhaogz@im.ac.cn; 周传斌: cbzhou@rcees.ac.cn

收稿日期: 2018-12-13; **接受日期:** 2019-04-24; **网络首发日期:** 2019-05-21

recycling efficiency, by analyzing the microbial diversity and community structure for each processing unit. **[Methods]** Three waste liquid samples from typical units of oil-water separation, anaerobic fermentation, and residue dewatering were collected in a typical restaurant food waste treatment plant. The high-throughput sequencing technology of 16S rRNA gene was applied to analyze the composition, abundance, dominant microorganism, and their impacting factors. **[Results]** The microbial communities in anaerobic fermentation and residue dewatering samples showed higher microbial diversity than those in oil-water separation samples. At the phylum level, *Firmicutes* accounted for the highest proportion of 81.1% in all samples, followed by *Bacteroidetes* and *Chloroflexi*, accounting for 15.81% and 4.59% respectively, and at the genus level, *Lactobacillus*, *Syntrophomonas*, etc. had higher relative abundance. Several generic microbes had both environmental and resource properties, e.g., *Pseudomonas*, which accounts for 32.67% relative abundance in residue dewatering process, had the function of producing polyhydroxyalkanoates (PHA) but contained few pathogenic or opportunistic pathogenic bacteria. The most significant impacting factor of microbial diversity was pH, followed by the ammonia nitrogen content. **[Conclusion]** Characteristics of microbial community structure and diversity in a typical restaurant food waste treatment plant were found in this work, in addition, several recommendations for optimizing the treatment process and promoting bio-resource recycling were put forward.

Keywords: Restaurant food waste, Anaerobic digestion, High-throughput sequencing, Community structure, Microbial diversity

餐厨废弃物资源化利用和无害化处理示范工程是我国实施循环经济十大示范工程之一, 目前全国已完成 100 个餐厨垃圾处理试点城市^[1]。在已建的大型餐厨垃圾处理工程中, 约有 74.3% 采用厌氧消化技术, 该技术已成为我国餐厨垃圾处理的主导技术^[2]。餐厨垃圾中富含淀粉、糖类、蛋白质、脂类、无机盐及大量水分等, 在兼性和厌氧微生物的作用下餐厨垃圾可厌氧消化为小分子有机物, 并产生甲烷等可再生能源^[3]。然而, 原始的餐厨垃圾废液中无机盐、有机污染物、氨氮浓度普遍较高, 含盐量一般可高达 1.0%–1.5%^[4], 导致餐厨垃圾的处理成本偏高, 制约了餐厨垃圾资源转化的利用效率。微生物在餐厨垃圾厌氧消化处理过程中起到了关键作用, 相关研究表明, 真菌红紫曲霉(*Aspergillus puniceus*)能有效降解高蛋白含量餐厨垃圾^[5]。厌氧发酵过程中酸的过度积累会抑制产甲烷菌的活性, 造成甲烷产量下降, 而微生物及其分泌的脂肪酶能够促进溶解性化学需氧量 (Chemical oxygen demand, COD) 的释放, 提高生物脱氢酶的活性, 从而减少长链挥发性脂肪酸的积累, 进而提高甲烷的积累量^[6-7]。

微生物群落组成和结构是餐厨垃圾有机物降

解和甲烷等产生过程的基础, 目前在环境工程领域已有一些研究^[8-9]聚焦在厌氧发酵单元的微生物群落结构分析, 这对于提高污染治理和废弃资源利用具有一定的价值, 但是在餐厨垃圾领域此类研究较少^[10-12]。梅冰等^[8]采用 Biolog 方法分析了反应器各个运行阶段污泥中微生物群落的多样性, 结果表明反应器中各阶段微生物物种丰富度和常见物种接近, 但均一性有较大的差异且呈现出不同的微生物多样性。同时, 梅冰等^[9]采用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 技术对餐厨垃圾单相厌氧消化失衡条件下系统内古菌和产甲烷菌的变化规律进行了探析, 结果表明在厌氧消化系统从稳定期到抑制期的过程中, 古菌和产甲烷菌的基因浓度都明显降低了 70%–80%。利用变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 技术对餐厨垃圾厌氧堆肥过程中的微生物种群结构随时间的变化进行分析, 结果表明堆肥升温期的细菌种群较丰富, 高温期的优势种群较明显, 降温期的细菌种群结构基本保持稳定^[13]。餐厨垃圾厌氧消化过程包括脱油、厌氧消化、沼渣脱水等多个工艺单元, 由于各单元间的物料、环境和反应条件变化, 微生物的组成和多样性会出现较大波动, 进而影响餐厨垃圾的处理过程。

目前对于餐厨垃圾处理主要过程中的微生物多样性分析仍然不足, 加强此方面的探究和分析可以为提高废弃资源的利用效率提供科学的参考依据。本研究基于 16S rRNA 基因高通量测序技术, 全面分析餐厨垃圾处理各工艺单元的微生物种群组成和多样性变化规律、优势微生物、潜在病原微生物等, 并探究影响微生物群落的关键因子, 为优化餐厨垃圾厌氧消化处理工艺提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究案例及样品来源

研究案例为秦皇岛市某餐厨垃圾处理厂, 其采用厌氧发酵技术工艺, 日处理能力 150 t, 工艺流程如图 1 所示。餐厨垃圾首先沥水、加热进行油水分离; 固体物料破碎分离后进行除砂; 接着进入厌氧消化罐反应 30 d, 沼渣脱水后进行最终处置。考虑可能带来微生物群落环境变化的工艺节点, 在工厂处理工艺的后期, 分别于油水分离处理池、厌氧发酵罐、沼渣脱水絮凝沉淀池进行取样(图 1), 标记为 S1、S2 和 S3, 各样品均为存有少

量固体的固液混合物。每个工艺环节取 3 份重复样品, 分别标记为 S#_#, 每个样品约为 500 mL。取样瓶提前采用紫外照射 30 min 灭菌处理, 采样时间为 2018 年 4 月。部分样品在 4 °C 冰箱保存用于理化指标的测定, 其余放入 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

蒸馏水(每升水中加入 0.1 mL 浓硫酸); D-无水葡萄糖(纯度 99.8%), 北京索莱宝科技有限公司。pH 值测试仪, 上海越平科学仪器有限公司; 紫外分光光度计, 上海尤尼科仪器有限公司; 红外分光光度计, 天津天光光学仪器有限公司; 凯氏定氮仪, 山东晨拓科学仪器有限公司。

1.3 样品理化性质测定

采用 pH 值测试仪测定样品 pH 值, 全盐量采用重量法(HJ/T 51-1999)^[14], 总氮含量采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度计法(HJ 636-2012)^[15], 氨氮含量采用纳氏试剂分光光度计法(HJ 535-2009)^[16], 总糖含量采用费林氏容量法(GB/T 20977-2007)^[17], 含油量采用红外分光光度计法(HJ 637-2012)^[18], 蛋白含量采用凯氏定氮法(GB 5009.5-2016)^[19], 淀

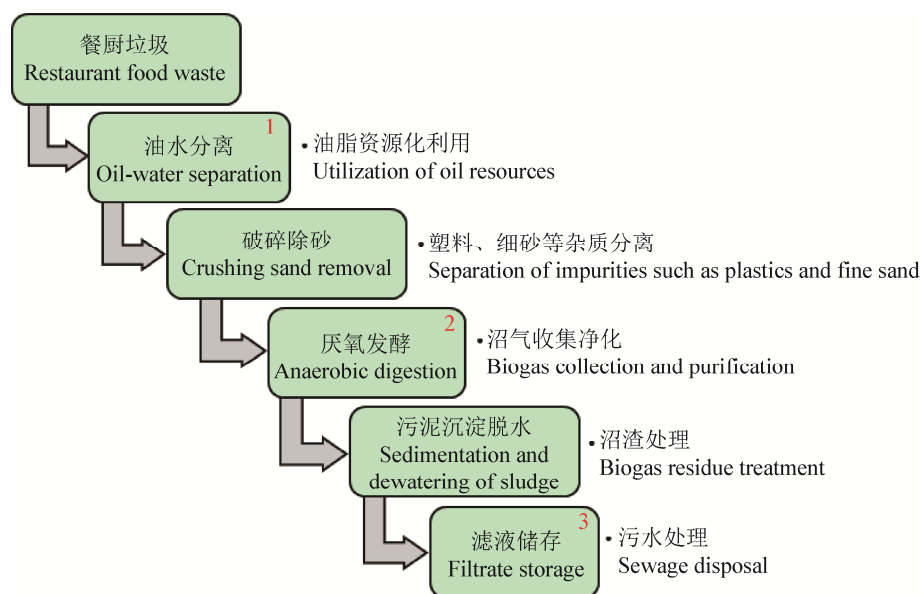


图 1 餐厨垃圾处理厂工艺流程及取样点

Figure 1 Process flow and sampling point of restaurant food waste treatment plant

注: 1: 油水分离处理池; 2: 厌氧发酵罐; 3: 沼渣脱水絮凝沉淀池。

Note: 1: Unit of oil-water separation; 2: Anaerobic fermentation tank; 3: Residue dewatering pool.

粉含量酸水解法(GB 5009.9-2016)^[20], 化学需氧量采用重铬酸盐法(HJ 828-2017)^[21]。计算每个工艺单元的 3 组平行样品理化性质均值。

1.4 高通量测序及分析

样品准备: 将 1.1 中各样品分别振荡均匀, 取 50 mL 分别装入干净的离心管中, 4 °C、4 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清液, 底部沉淀标记为 S1_1、S1_2、S1_3、S2_1、S2_2、S2_3、S3_1、S3_2 和 S3_3 共 9 份样品备测。

高通量测序: 将 9 份待测样品送往上海美吉生物医药科技有限公司, 采用 Illumina MiSeq 系统对细菌 16S rRNA 基因(V3-V4 区)进行测序。主要步骤包括: 从沉淀物中抽提细菌 DNA 并设计合成引物接头, 经 PCR 扩增后进行产物的纯化、定量与均一化, 构建 PE (Paired-end)文库, 进行测序。

测序结果分析: 测序得到的 PE reads 首先用 FLASH、Trimmomatic 软件过滤 Reads 尾部质量值 20 以下的碱基, 去除 50 bp 下含 N 碱基, 接着根据重叠区域(Overlap)关系进行拼接, 最小 Overlap 长度为 10 bp 且允许的最大错配比率为 0.2, 然后根据序列首尾两端的条形码(Barcode)和引物序列得到有效序列并校正序列方向。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97%相似水平的操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)代表序列进行分类学分析, 根据分类学结果使用 R 语言工具作图, 得到各样品在门分类水平上的群落结构组成情况, 并通过软件 Circos-0.67-7 (<http://circos.ca/>)对不同环节样本的优势物种组成比例和各优势物种在不同样本中的分布比例进行分析; 利用 LEfSe 软件对样品进行线性判别分析(Linear discriminant analysis, LDA), 得到对样本划分产生显著性差异影响的物种; 利用 R (Pheatmap package)软件计算环境因素与物种之间的斯皮尔曼(Spearman)等级相关性系数并通过 Heatmap 图展示; 使用 Networkx 网络分析工具包获得物种和样本组间的相关信息, 选取属水平总丰度前 20 的物种并计算物种之间的 Spearman 等级相关性系数, 构建物种相关性网络图。以上分析过

程皆在 I-Sanger (www.i-sanger.com)云平台完成。

多样性分析: 利用 Usearch 软件平台(<http://drive5.com/uparse/>, V7.0), 将测得的序列按照彼此间 97% 的相似性进行划分得到 OTU; 选择 97%相似度 OTU 进行多样性指数计算, 采用覆盖度(Coverage)反映微生物物种的覆盖率, 其数值越高, 则样品中序列没有被测出的概率越低; 采用香农(Shannon)指数反映物种的多样性; 采用 Chao1 指数反映群落的丰富度。

2 结果与讨论

2.1 不同工艺单元样品的理化特性

餐厨垃圾处理不同工艺单元废液的理化特性分析见表 1, 不同单元废液样品的理化特性具有明显差异。S1 的 pH 最低呈酸性, S2、S3 则呈碱性, 说明餐厨垃圾在收集、储存过程中经历了酸化水解过程, 而经厌氧发酵后废液呈碱性。总糖含量在厌氧发酵后明显降低, 说明该环境中的微生物可以利用餐厨垃圾中的糖类物质进行生命代谢等活动; 淀粉、蛋白质含量随工艺进程变化不显著, 说明在厌氧消化处理中微生物可能较难利用

表 1 餐厨垃圾处理不同工艺单元废液的理化性质
Table 1 Physicochemical characteristics of waste water from different treatment units of restaurant food waste

指标 Index	S1	S2	S3
pH	5.23±0.48	9.11±0.65	9.52±0.59
总糖 Total sugar (g/100 g)	0.90±0.08	0.10±0.07	0.10±0.07
淀粉 Starch (g/100 g)	0.899±0.040	0.884±0.030	0.855±0.040
蛋白质 Protein (g/100 g)	1.84±0.23	2.45±0.36	2.08±0.30
COD (g/L)	125.00±4.89	14.50±2.49	6.02±1.49
全盐量 Total salt content (g/L)	18.50±0.28	26.50±0.24	23.20±0.21
氨氮 Ammonia nitrogen (g/L)	0.026±0.002	1.340±0.050	1.260±0.060
总氮 Total nitrogen (g/L)	1.28±0.07	2.56±0.08	2.27±0.08
含油量 Oil content (mg/L)	1 680.00±65.75	86.80±3.87	114.00±7.26

淀粉和蛋白质。COD 浓度降低了 95.18%，说明随着厌氧发酵过程中甲烷的产生和排放，物料中的碳源有机物含量在不断降低。全盐量、氨氮、总氮含量都随着工艺进程有一定上升，这可能是由于餐厨垃圾中的固相物质经过厌氧分解后向液相中释放。盐分和氨氮都是制约微生物活性的关键因子^[22]，可能对微生物群落结构和多样性带来较大影响。油水分离工艺前，餐厨垃圾的含油量高达 $1\ 680\pm 65.75\text{ mg/L}$ ；经过脱油后餐厨垃圾废液中的油脂含量降低了 94.83%，但也维持在较高的浓度，可能对厌氧发酵过程产生影响^[23]。

2.2 不同工艺单元样品的微生物多样性及物种组成

研究中的环境样品经高通量测序共获得 322 475 条序列，平均长度为 396.19 bp，Reads 从 30 511 到 42 364 不等(表 2)。同时，各样品测得的 OTU 共计 513 个，其中 S1 的 OTU 平均数目仅为 75，与 S2、S3 相差较大，S3 的 OTU 平均数目最多可达 483。各样品的 Coverage 值均达到 99%以上且相差微小，说明本次测序结果可以反映样品的真实情况。从微生物多样性指数 Shannon (值越大说明群落的多样性越高)和 Chao1 (值越大说明群落的丰富度越高)可以看出，S1 中微生物群落的多样性和丰富度明显低于 S2、S3，且 S3 的微生物群落多样性和丰富度最高。这可能是因为 S1 为餐厨垃圾的初步滤液，其中的固相物质未能完全水解，液相中的营养物质可能还不丰富，微生物发酵时间短，尚未大量繁殖；S2 为经过厌氧发酵后的样品，其中的厌氧微生物大量繁殖，使其群落多样性和丰富度均升高；而 S3 为絮凝沉淀单元样品，发酵

液转变为好氧环境，好氧微生物同时得到大量繁殖，样品的微生物群落多样性和丰富度最高。

OTU 在门分类水平上的群落组成结果见图 2。3 个单元样品测序共检测到 7 个主要菌门，分别为厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、*Cloacimonetes*、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)。其中厚壁菌门为优势菌门，它在 S1 中的平均相对丰度为 98.54%，S2 中的平均相对丰度为 81.82%，S3 中则为 62.94%；拟杆菌门在 S2 和 S3 中的相对丰度位居第二，其在 S2 中的平均相对丰度是 9.09%，S3 中则比 S2 中更显著，为 22.52%；另外，绿弯菌门在 S2、S3 中的相对丰度也较为突出，前者的平均相对丰度为 4.74%，后者则为 4.44%；变形菌门在 S3 中的平均相对丰度为 5.17%，略高于另外 2 个样品，该门中包括属于 γ -变形菌纲的假单胞菌属(*Pseudomonas*)，该菌属内除了少部分常见的病原菌种类，大多数同时具有氧化丁酸能力^[24]，另外该菌门中属于 δ -变形菌纲的互营菌属(*Syntrophus*)具有良好的裂解芳香环能力^[24]。Centurion 等^[25]在研究动物粪便厌氧消化反应器的微生物群落结构时发现，厚壁菌门为其中的优势菌群且丰度达到 50%以上，这与本研究结果相似，该菌门多为革兰氏阳性菌，可产生芽孢并能抵抗脱水及极端环境，主要包括芽孢杆菌纲和梭菌纲^[26]。拟杆菌门主要作用于类固醇、多糖和胆汁酸的代谢^[27]，有研究发现厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度之间存在显著的负相关关系，两者与厌氧消化的部分工艺参数有关，包括有机负荷率、挥发性脂肪酸浓度和甲烷产量^[28]。

表 2 3 份样品的微生物多样性分析

Table 2 Microbial diversity analysis of three samples

样品 Sample	Reads	OTU 数目 Number of OTUs	Coverage	Shannon	Chao1
S1	38 559 \pm 3 365	75 \pm 4	0.999 6 \pm 0.000 1	1.96 \pm 0.05	64.94 \pm 7.15
S2	34 424 \pm 3 492	325 \pm 11	0.998 4 \pm 4.45E-5	3.55 \pm 0.07	303.4 \pm 1.54
S3	34 508 \pm 2 425	483 \pm 17	0.997 5 \pm 0.000 4	4.05 \pm 0.08	454.8 \pm 15.27

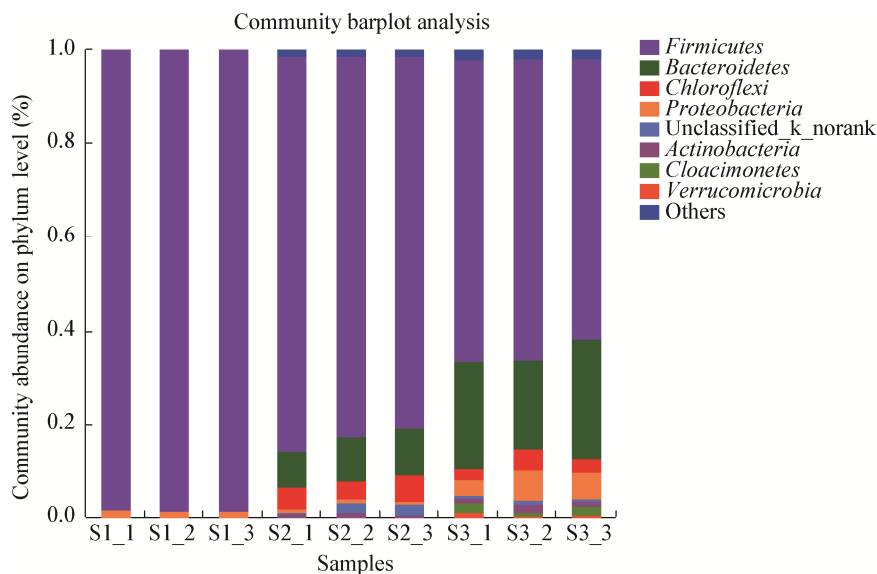


图2 各工艺单元发酵液微生物在门水平上的相对丰度

Figure 2 Relative abundance of microorganism in fermentation broth of each unit at phylum level

因此,将厚壁菌门与拟杆菌门的种群丰度比作为反应过程性能的潜在指标具有一定的参考价值,可以利用两种群之间的相互作用来预防厌氧消化过程中发生的效率波动。绿弯菌门细菌具有绿色素,为兼性厌氧生物,是消耗葡萄糖的主要类群^[29],和厚壁菌门都与碳氢化合物的降解相关^[30],且绿弯菌门的相对丰度随着餐厨垃圾比例的增加而增高^[31]。变形菌门中的许多种群与葡萄糖、丙酸盐、丁酸盐等小分子化合物的利用有关^[29,32-33],是工业污水处理厂和市政污水处理厂污泥中常见的菌群,尤其是 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*); Theuerl 等^[34]研究发现变形菌门和 *Cloacimonetes* 可以在以污泥或工业用水为原料的转化过程中占据细菌群落的主导地位。对比 S2、S3 菌群组成和结构发现,其结构特征与健康成年人的肠道菌群结构特征基本一致^[35],这可能由于微生物主要营养来源是餐厨垃圾,从营养物质构成看,同人类肠道消化的食物具有较高的相似性。

结合样品的理化指标(表 1)和群落组成(表 2,图 2)对各样品中的微生物进行分析可以发现,COD 和氨氮浓度对微生物群落的影响较显著。COD 浓度在 3 个工艺环节中逐渐降低,说明微生

物对于有机物的利用率逐渐升高,物种多样性和丰度逐步提高。随着 COD 浓度的降低,放线菌门(*Actinobacteria*)丰度在 S3 中得到升高,绿弯菌门(*Chloroflexi*)丰度在 S3 中降低,这与杨小丽等^[36]的研究结果一致,分析原因认为,在沼液处理后期 S3 为好氧期,放线菌门(*Actinobacteria*)为好氧异养菌,在与硝化细菌、氨氧化细菌对氧的竞争中处于优势,促进了有机物的转化,使 COD 的去除效果提高。氨氮浓度在 S1 中最低,S2 处于厌氧消化的主要阶段,产生了大量氨氮,因此其氨氮浓度最高,S3 为有氧阶段,此时氨氮浓度降低;3 个工艺环节的微生物多样性总体呈上升趋势,这与楼菊青等^[37]对产甲烷厌氧反应器中的微生物系统进行研究时的结果一致。另外,周莉娜等^[38]发现厌氧污泥中的氨氮浓度仅作用于革兰氏阴性菌,且对 Shannon 多样性指数无明显作用。

属水平上优势菌属与各样品的关系如图 3 所示,图 3 中左半圈表示样品的物种组成情况,外层彩带代表分组情况,内层彩带代表属物种,长度代表该物种在对应样品中的相对丰度;右半圈表示属水平下物种在不同样品中的分布比例情况,外层彩带代表物种属,内层彩带代表不同分组,

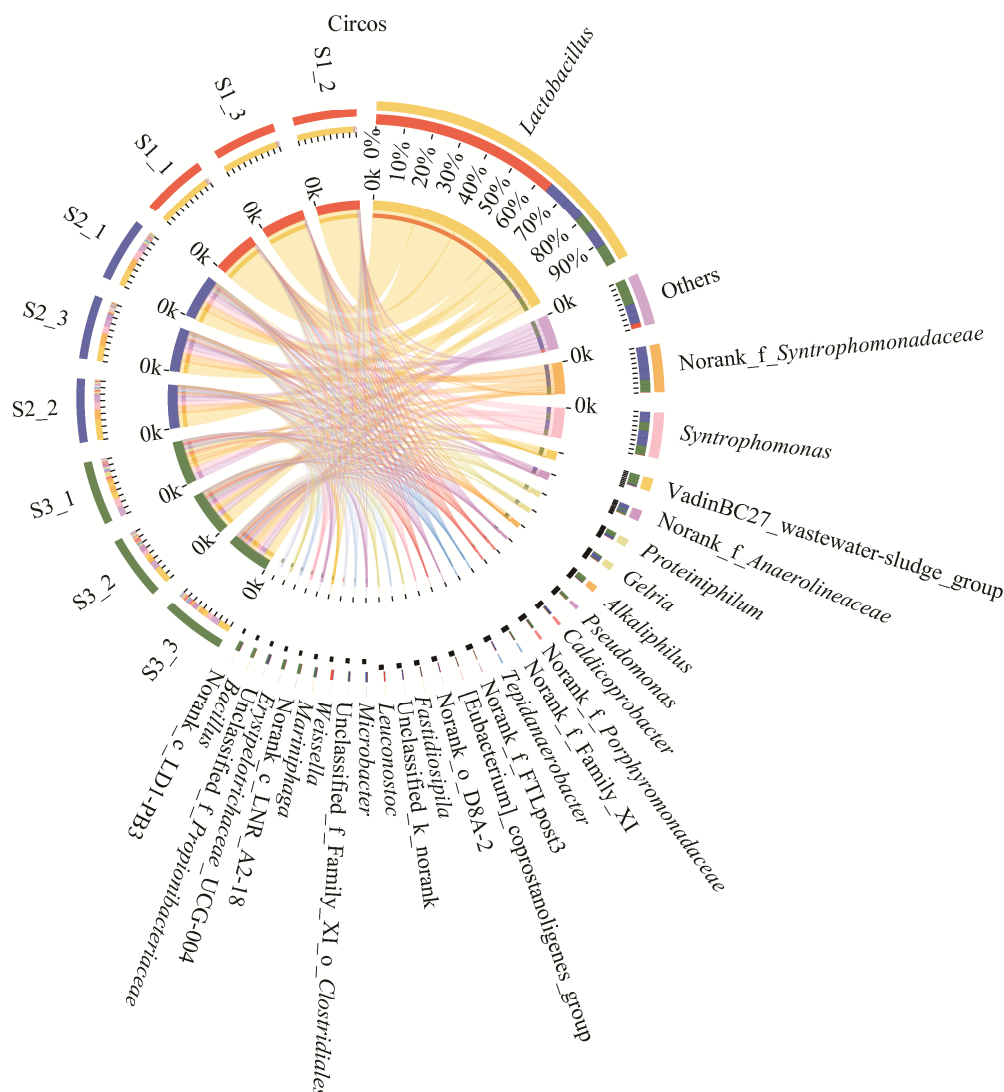


图3 微生物在属水平上物种丰度与样品之间的关系(Circos 图)

Figure 3 Relationship between species abundance and samples of microorganisms at genus level (circos)

长度代表该样本在某一属物种中的分布比例。3 个工艺环节样品中的微生物群落组成随着环境及发酵时间的改变发生了明显的变化,例如各环节的属组成中(图 3),乳酸菌属(*Lactobacillus*)因适宜在偏酸环境内生长,所以在 S1 中的比例最高,可达 66%;互营单胞菌属(*Syntrophomonas*)占据的比例也较突出,主要存在于 S2、S3 中,在 S2 中的比例为 56%;对于优势菌属 VadinBC27_wastewater-sludge_group 来说,其在 S3 中的比例高达 90%,是一类广泛存在于垃圾渗滤液、厌氧消化后污泥中

的菌群^[39]。另外,假单胞菌属(*Pseudomonas*)的含量也较高,虽然其中存在部分病原菌,但是该菌属可以将碳源转化为一类可降解生物塑料的原料——聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoates, PHA),例如嗜油假单胞菌(*P. oleovorans*)能够合成单体碳原子数大于 6 的中长链 PHA^[40],恶臭假单胞菌(*P. putida*)可利用多种底物(如糖类或脂肪酸)合成中长链 PHA,是非常适宜的 PHA 生产菌株^[41],其它种类的假单胞菌如施氏假单胞菌(*P. stutzeri*) 1317 也能够利用多种脂肪酸、醇类、二醇、葡萄

糖及葡萄糖酸盐合成 PHA^[42]。

2.3 不同工艺单元中微生物的组成特点

对 3 个单元样品在纲、目、科、属的划分上产生显著性差异影响的物种如图 4 所示。芽孢杆菌纲

(*Bacilli*) 乳酸杆菌目 (*Lactobacillales*) 乳酸杆菌科 (*Lactobacillaceae*) 乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 是油水分离前 S1 样品内的优势菌种，其在自然界分布极为广泛，具有丰富的物种多样性^[43]。

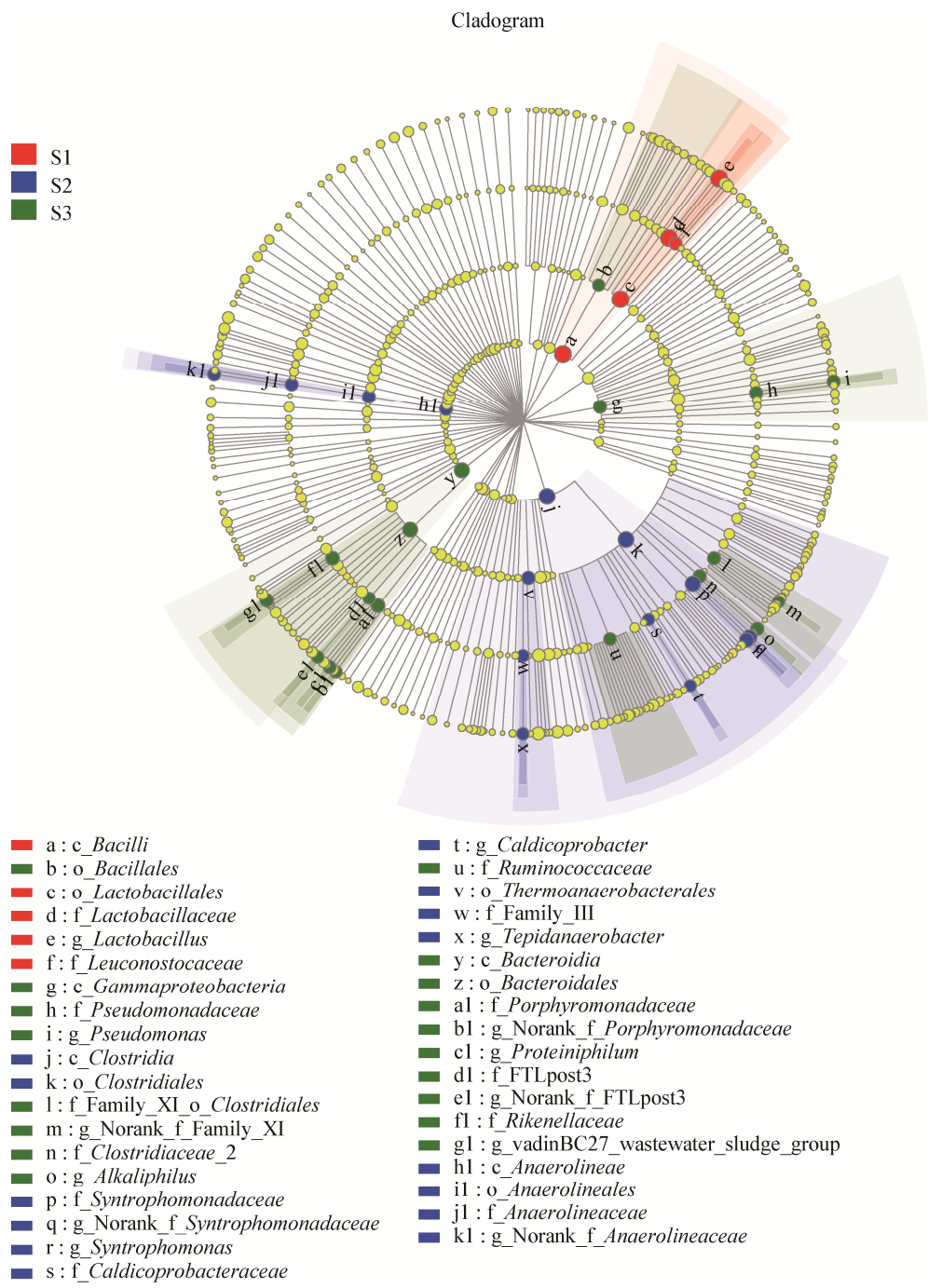


图 4 不同工艺单元样品菌群进化分支树
Figure 4 Evolutionary branch tree of microbial flora in different units

餐厨垃圾进入发酵罐后为严格厌氧环境,其携带的细菌不适应发酵罐中环境,发酵体系中发酵性细菌逐渐取代原料中原有的细菌,随着沼气发酵过程的进行,餐厨垃圾中原有的细菌菌群已经发生变化。S2 厌氧发酵体系内微生物明显区别于其他 2 组样品。S2 在纲分类水平上为梭菌纲(*Clostridia*)、厌氧绳菌纲(*Anaerolineae*),目分类水平上有厌氧绳菌目(*Anaerolineales*)、*Thermoanaerobacterales*、梭菌目(*Clostridiales*),科分类水平上有互营单胞菌科(*Syntrophomonadaceae*)、*Caldicoprobacteraceae*、厌氧绳菌科(*Anaerolineaceae*),属水平上则有互营单胞菌属(*Syntrophomonas*)、*Caldicoprobacter*、嗜热厌氧杆菌(*Tepidanaerobacter*)、*Anaerolineaceae* 分类下的未命名属。

污泥絮凝沉淀后 S3 样品的优势物种则有:拟杆菌纲(*Bacteroidia*)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、拟杆菌目(*Bacteroidales*)、芽孢杆菌目(*Bacillales*)、紫单胞菌科(*Porphyromonadaceae*)、理研菌科(*Rikenellaceae*)、瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)、梭菌科(*Clostridiaceae*)、假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)、梭菌目(*Clostridiales*)分类下的 Family_XI 科、FTLpost3 科,假单胞菌属(*Pseudomonas*)、嗜碱菌属(*Alkaliphilus*)、*Proteiniphilum*、VadinBC27_wastewater-sludge_group、FTLpost3 科分类下的未命名属、Family_XI 科分类下的未命名属。

梭菌纲微生物一直被认为是白酒窖泥中的重要功能菌群^[44],它是一类严格厌氧的细菌,在降解碳水化合物时会产生乙酸、丁酸等产物,在生物液体燃料领域具有很好的应用前景,受到广泛关注^[45];另外,梭菌还可能与乙酸氧化及苯酚类化合物的降解有关^[46-47]。在中温和高温厌氧反应器中广泛分布的厌氧绳菌,其在产甲烷生物系统中具有降解碳水化合物和其他生物大分子(如氨基酸)的重要作用^[48],并且可以产酸去毒^[49-50]。互营单胞菌科多为产乙酸菌^[51],可利用 4-18 个碳原子的脂肪酸,与产氢营养型产甲烷菌密切相关^[52-54]。

互营单胞菌是极端氨浓度下生物废物厌氧消化中的关键微生物^[55],主要消耗丁酸^[29],可以使挥发性脂肪酸快速降解为甲烷^[56],然而体系内叶酸的浓度会抑制该菌的生长,导致甲烷产生的减少并伴随着 CO₂ 含量的增加^[57]。Granada 等^[58]对屠宰场废水厌氧消化产沼气系统中的微生物组成进行了探究,发现紫单胞菌科与甲烷的高产具有一定关系。*Proteiniphilum* 可以降解焦化废水中一些生物难降解的化合物(包括苯酚、甲基苯酚、二甲基苯酚、萘酚、三苯基和吡啶),在 pH 值 8.0 的条件下有助于增强厌氧发酵的进程^[59]。

对样品所处环境条件下物种丰度前 20 的属进行属水平物种的相关性 Network 分析,结果如图 5 所示,其中不同颜色代表不同菌门,每个节点代表一个菌属。在网络图中,相关性越高的菌属节点与其他节点的连线越多,节点大小代表属内物种相对丰度的大小,节点之间连线的颜色为绿色代表两菌属间呈负相关关系,连线为红色则呈正相关关系。同时,用紧密系数(Closeness centrality)描述节点与网络中其他节点的距离,用介数中心性(Betweenness centrality)体现节点在与其他节点连接中所起的作用。

从图 5 中可以发现,梭菌目(*Clostridiales*)分类下 Family_XI 科的未知属在该网络中与其他菌属节点的连线最多为 13,意味着该属在整个网络中的重要性最高;与 *Gelria* 节点相连的节点数为 5,在网络中的重要性最低。*Fastidiosipila* 节点的紧密系数值最高为 0.52,处于网络的中心位置,它在 S3 中的相对丰度最高,为 62%;VadinBC27_wastewater-sludge_group 为污水处理中常见类群,其介数中心性值最大为 0.07,意味着该类群菌属在保持整个网络紧密连接性中的作用最重要,其在 S3 中的相对丰度高达 90%。以上分析说明 *Fastidiosipila* 和 VadinBC27_wastewater-sludge_group 与网络中的其他菌属有很强的相关性,这些菌属被称为“枢纽”,可能代表样品微生物中的“重点物种”^[60],负责微生物网络的稳定和维护,其丢失可能导致整个网

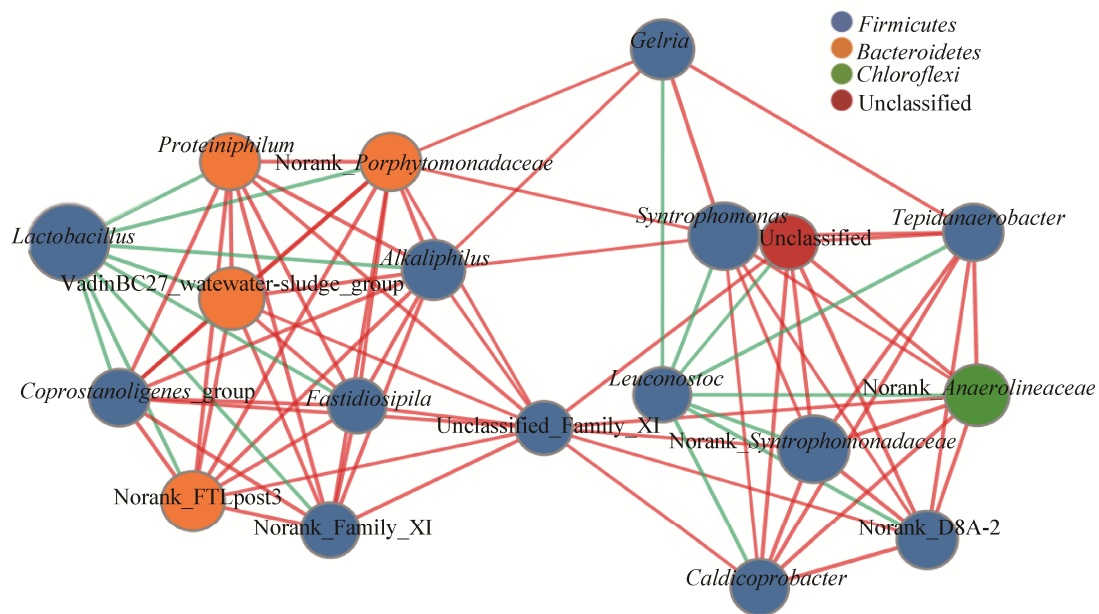


图 5 各工艺单元属水平的物种相关性 Network 分析

Figure 5 Species relevance network at genus level of each units

络的崩溃^[61]。与此结果相似的是,在处理垃圾渗滤液的厌氧动态膜生物反应器中,*Fastidiosipila* 和 *VadinBC27_wastewater-sludge_group* 也是细菌群落中较丰富的菌属^[62]。

明串珠菌属 (*Leuconostoc*) 和乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 主要存在于 S1 中,相对丰度分别为 66% 和 90%,它们与其他菌属节点的连线均为绿色,呈负相关关系;其他菌属多分布在 S2 和 S3 样品中,节点之间的连线均为红色,呈正相关关系。分析原因认为,在厨余垃圾发酵初期 S1 主要是酸化过程,明串珠菌属和乳酸杆菌属生长环境偏酸性得以大量繁殖;而发酵后期 S2 和 S3 样品偏碱性,其他菌属则大量繁殖。

2.4 不同环境因子对微生物多样性的影响

环境的改变对微生物群落的结构和功能影响较大,本研究选取测定数值具有明显变化的 6 个影响因子(pH、氨氮含量、全盐量、含油量、COD、总糖含量)进行相关性分析。由图 6 可知,影响各组样品群落组成结构最显著的因子是 pH 值,它与各菌属的相对丰度基本上呈正相关关系;总糖的

含量影响绝大部分菌属的相对丰度,随着其含量的增加,菌属的相对丰度呈下降趋势;氨氮和全盐量对群落结构与丰度的影响相似,整体上与物种的相对丰度呈正相关;含油量及 COD 与物种的相对丰度基本上呈负相关,其中 COD 影响力较强;在主要优势菌中,明串珠菌属(*Leuconostoc*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)共 4 个菌属其相对丰度和环境因子的相关性与前述情况恰恰相反。除此外,以上环境因子对小部分物种的影响程度不明显,不具备统计学意义。

微生物群落的结构与环境条件紧密关联,厌氧生物反应器中部分条件的变化会引起微生物种群的演替,这是微生物群落对外界条件变化的适应机制^[40]。若外界条件改变过于迅速和剧烈,有可能引起部分功能微生物的不适应而衰亡,而新的优势种群没有形成,表现为厌氧消化反应器的效率低下,因此在实际操作中要将注重反应器内的相关环境参数作为提高发酵效率的手段之一。

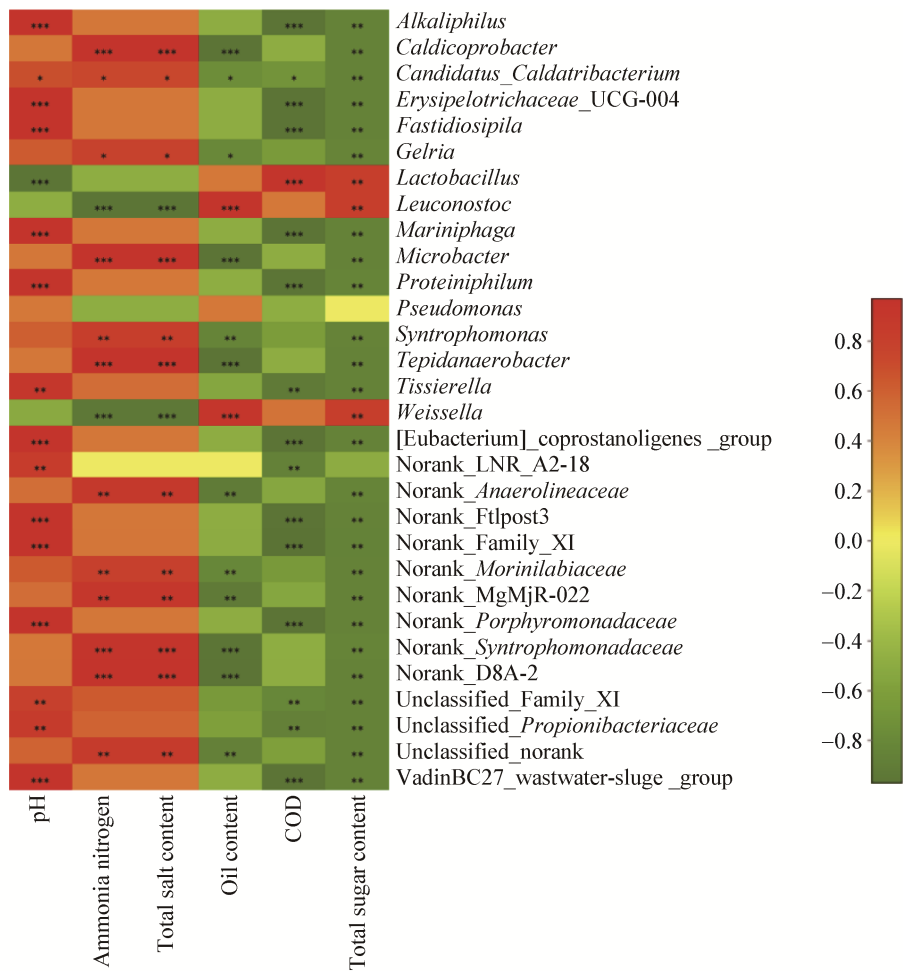


图 6 环境因子对微生物群落的影响
Figure 6 Effects of environmental factors on microbial community

3 结论与展望

本研究通过高通量测序分析获得我国典型餐厨垃圾处理工艺过程的微生物种群、数量、结构、动态变化规律及与环境因子的相关性等数据，为进一步优化餐厨垃圾处理工艺，促进厌氧反应器系统的稳定和高效运行，挖掘特定功能微生物，提高餐厨垃圾发酵产物的资源化利用效率提供科学依据。

本研究的主要结论：(1) 厌氧发酵和沼渣脱水样品中的微生物组成和相对丰度较高，而初始油水分离样品中的微生物群落种类和丰度相对较低。(2) 在门水平上，厚壁菌门(*Firmicutes*)在各环节样

品中所占平均比例最高为 81.1%，其次为拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)，分别占 15.81%和 4.59%；在属水平上，相对丰度较高的菌属为乳酸菌属(*Lactobacillus*)、互营单胞菌属(*Syntrophomonas*)等。(3) 餐厨垃圾处理过程中的部分菌属可能具有资源-环境双重属性，例如在沼渣脱水单元相对丰度高达 32.67%的假单胞菌(*Pseudomonas*)，其中既存在少部分常见的致病菌或条件致病菌，但同时大多菌也具有较强的合成聚羟基脂肪酸酯的功能。(4) 影响各组样品微生物群落组成结构最显著的因子是 pH 值，其次是总糖的含量。

基于研究结果提出以下建议:(1)餐厨垃圾厌氧消化工艺优化:厌氧消化环境的群落组成结构可为反应过程性能提供参考,如厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)两者的相互作用可提高厌氧消化过程的稳定性,降低环境因素变化对消化过程的冲击。体系中的梭菌和互营单胞菌与产甲烷菌的关系较密切,两者对于提高厌氧消化处理中甲烷的产量具有一定参考价值。另外,发酵环境的 pH 值、总糖等理化参数与群落结构之间的关系密切,可以作为调节微生物结构和多样性、促进厌氧消化过程的关键调节因子。(2)餐厨垃圾消化废液资源化利用:消化废液中存在假单胞菌属(*Pseudomonas*),该菌属已被证实具有将碳源转化为聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoates, PHA)的功能,可以利用该废液通过产 PHA 功能菌株的筛选、发酵条件探索等一系列方案进行资源的再利用和新型材料的生产。(3)餐厨垃圾消化液需要深度无害化处理,消化液中可能存在部分病原菌,例如假单胞菌属(*Pseudomonas*)中存在部分致病菌或条件致病菌,直接排放可能对环境 and 人体健康带来影响,因此需要针对具有该菌属的废水开展深度灭菌处理。

REFERENCES

- [1] State Council. Development strategy of circular economy and recent action plan[EB/OL]. (2013-01-23). http://www.gov.cn/zwgg/2013-02/05/content_2327562.htm (in Chinese)
国务院. 循环经济发展战略及近期行动计划[EB/OL]. (2013-01-23). http://www.gov.cn/zwgg/2013-02/05/content_2327562.htm
- [2] Wei XF, Sun WW, Wang GP, et al. Situation of kitchen waste treatment market in China[J]. Environmental Sanitation Engineering, 2016, 24(2): 28-30 (in Chinese)
魏小凤, 孙伟伟, 王冠平, 等. 我国餐厨垃圾处理市场现状分析[J]. 环境卫生工程, 2016, 24(2): 28-30
- [3] Hu XJ, Zhang M, Yu JF, et al. Food waste management in China: status, problems and solutions[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(14): 4575-4584 (in Chinese)
胡新军, 张敏, 余俊锋, 等. 中国餐厨垃圾处理的现状、问题 and 对策[J]. 生态学报, 2012, 32(14): 4575-4584
- [4] Chen XM, Liu CQ, Wu CS, et al. Resource-based treatment and development trend of restaurant waste[J]. Straits Science, 2016(6): 83-85 (in Chinese)
陈细妹, 刘常青, 吴春山, 等. 餐厨垃圾资源化处理及发展趋势[J]. 海峡科学, 2016(6): 83-85
- [5] Hao JW, He ZH, Zhou CF, et al. Screening and application of fungi on hydrolysis of high-concentrated protein food waste[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2018, 12(1): 286-293 (in Chinese)
郝杰威, 何再华, 周长芳, 等. 高蛋白含量餐厨垃圾水解真菌的筛选和应用[J]. 环境工程学报, 2018, 12(1): 286-293
- [6] Yang J, Yin Z, Zheng Y. Study on the fermentation types of glucose and glycerol[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(9): 4118-4123 (in Chinese)
杨瑾, 殷智, 郑寅. 葡萄糖和甘油的酸化发酵方式探究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(9): 4118-4123
- [7] Liang JJ, Su H. Effect of lipase on biogas production from kitchen waste in anaerobic digestion[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2017, 11(12): 6465-6469 (in Chinese)
梁晶晶, 苏辉. 脂肪酶对餐厨垃圾厌氧产气的影响[J]. 环境工程学报, 2017, 11(12): 6465-6469
- [8] Mei B, Peng XY, Xie Y. Microbial diversity analysis for anaerobic digestion of kitchen waste by Biolog method[J]. China Biogas, 2016, 34(1): 14-18 (in Chinese)
梅冰, 彭绪亚, 谢影. 采用 Biolog 法分析餐厨垃圾厌氧消化微生物群落多样性[J]. 中国沼气, 2016, 34(1): 14-18
- [9] Mei B, Peng XY, Xie Y. RT-PCR method for analysis of microbial diversity during the anaerobic digestion of food waste[J]. Environmental Pollution and Control, 2015, 37(8): 26-30 (in Chinese)
梅冰, 彭绪亚, 谢影. 采用 RT-PCR 法解析餐厨垃圾厌氧消化微生物群落多样性[J]. 环境污染与防治, 2015, 37(8): 26-30
- [10] Zeng Y, Zhou J, Yan ZY, et al. The key process parameters and microbial community in the wastewater treatment by simultaneous desulfurization coupled denitrification[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2018, 38(1): 173-182 (in Chinese)
曾勇, 周俊, 闫志英, 等. 废水同步脱硫脱氮关键工艺参数及微生物群落结构的研究[J]. 环境科学学报, 2018, 38(1): 173-182
- [11] Zhang ZZ, Cheng YF, Xu LZJ, et al. Evaluating the effects of metal oxide nanoparticles (TiO_2 , Al_2O_3 , SiO_2 and CeO_2) on anammox process: performance, microflora and sludge properties[J]. Bioresource Technology, 2018, 266: 11-18
- [12] Kanayev DB, Moldagulova NB, Abdrashitov AA, et al. Utilization of sewage sludge with native microflora[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 208(Suppl): S61-S62
- [13] Liu YS, Yang ZH, Zeng GM, et al. Application of PCR-DGGE to analyzing bacterial communities in culinary waste compost[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(7): 1151-1156 (in Chinese)
刘有胜, 杨朝晖, 曾光明, 等. PCR-DGGE 技术对城市餐厨垃圾堆肥中细菌种群结构分析[J]. 环境科学学报, 2007, 27(7): 1151-1156
- [14] Department of Science and Technology Standards, State Environmental Protection Administration. HJ/T 51-1999 Water quality - determination of total salt - gravimetric method[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2004 (in Chinese)
国家环境保护局科技标准司. HJ/T 51-1999 水质 全盐量的测定重量法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004
- [15] Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. HJ 636-2012 water quality-determination of total

- nitrogen-alkaline potassium persulfate digestion UV spectrophotometric method[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2012 (in Chinese)
- 中华人民共和国环境保护部. HJ 636-2012 水质 总氮的测定 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012
- [16] Ministry of Environmental Protection. HJ 535-2009 Water quality-determination of ammonia nitrogen-nessler's reagent spectrophotometry[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2010 (in Chinese)
- 环境保护部. HJ 535-2009 水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2010
- [17] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. GB/T 20977-2007 General technical requirement for the pastry[S]. Beijing: China Standard Press, 2007 (in Chinese)
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 20977-2007 糕点通则[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007
- [18] Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. HJ 637-2012 Water quality- determination of petroleum oils and animal and vegetable oils- infrared spectrophotometry[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2012 (in Chinese)
- 中华人民共和国环境保护部. HJ 637-2012 水质 石油类和动植物油的测定 红外分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012
- [19] National Health and Family Planning Commission of PRC, China Food and Drug Administration. GB 5009.5-2016 National food safety standard Determination of protein in foods[S]. Beijing: China Standard Press, 2017 (in Chinese)
- 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [20] National Health and Family Planning Commission of PRC, China Food and Drug Administration. GB 5009.9-2016 Determination of starch in foods[S]. Beijing: China Standard Press, 2017 (in Chinese)
- 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.9-2016 食品安全国家标准 食品中淀粉的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [21] Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. HJ 828-2017 Water quality-determination of the chemical oxygen demand-dichromate method[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2017 (in Chinese)
- 中华人民共和国环境保护部. HJ 828-2017 水质 化学需氧量的测定 重铬酸盐法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2017
- [22] Yan Y, Yang AL, Wei XF. Treatment technology and market situation analysis of kitchen garbage in China[J]. Environmental Sanitation Engineering, 2017, 25(1): 17-20 (in Chinese)
- 闫雨, 阳艾利, 魏小凤. 我国餐厨垃圾处理技术及市场现状分析[J]. 环境卫生工程, 2017, 25(1): 17-20
- [23] Yang GX, Chen R, Shen ZH, et al. Enhancement of lipid production by fermentation of waste activated sludge for synthesis of biodiesel[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017, 37(8): 2918-2924 (in Chinese)
- 杨高翔, 陈锐, 沈子恒, 等. 剩余污泥微生物发酵合成微生物油脂制备生物柴油技术研究[J]. 环境科学学报, 2017, 37(8): 2918-2924
- [24] Gieg LM, Fowler SJ, Berdugo-Clavijo C. Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 27: 21-29
- [25] Centurion VB, Moura AGL, Delforno T, et al. Anaerobic co-digestion of commercial laundry wastewater and domestic sewage in a pilot-scale EGSB reactor: the influence of surfactant concentration on microbial diversity[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 127: 77-86
- [26] Chen S, Cheng HC, Wyckoff KN, et al. Linkages of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* populations to methanogenic process performance[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(6): 771-781
- [27] Fisgativa H, Tremier A, Le Roux S, et al. Understanding the anaerobic biodegradability of food waste: relationship between the typological, biochemical and microbial characteristics[J]. Journal of Environmental Management, 2017, 188: 95-107
- [28] Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities[J]. Annual Review of Genetics, 2004, 38: 525-552
- [29] Ariesyady HD, Ito T, Okabe S, et al. Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester[J]. Water Research, 2007, 41(7): 1554-1568
- [30] De Lima E Silva MR, Correa RC, Sakamoto IK, et al. Microbial characterization of methanogenic and iron-reducing consortium in reactors with polychlorinated biphenyls[J]. Current Microbiology, 2018, 75(6): 666-676
- [31] Zamorano-López N, Moñino P, Borrás L, et al. Influence of food waste addition over microbial communities in an anaerobic membrane bioreactor plant treating urban wastewater[J]. Journal of Environmental Management, 2018, 217: 788-796
- [32] Juretschko S, Loy A, Lehner A, et al. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2002, 25(1): 84-99
- [33] Hiraishi A, Iwasaki M, Shinjo H. Terminal restriction pattern analysis of 16S rRNA genes for the characterization of bacterial communities of activated sludge[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(2): 148-156
- [34] Theuerl S, Klang J, Heiermann M, et al. Marker microbiome clusters are determined by operational parameters and specific key taxa combinations in anaerobic digestion[J]. Bioresource Technology, 2018, 263: 128-135
- [35] Qin JJ, Li RQ, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65
- [36] Yang XL, Zhou N, Chen M, et al. Analysis of microbial community structure in MBR with different ammonia concentrations using fluorescence *in situ* hybridization[J]. Journal of Southeast University (Natural Science Edition), 2013, 43(2): 380-385 (in Chinese)
- 杨小丽, 周娜, 陈明, 等. FISH技术解析不同氨氮浓度 MBR 中

- 的微生物群落结构[J]. 东南大学学报: 自然科学版, 2013, 43(2): 380-385
- [37] Lou JQ, Li JP, Wang XL. Effect mechanism of ammonia on denitrifying anaerobic methane oxidation bacteria[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2018, 38(8): 3036-3044 (in Chinese)
楼菊青, 李佳萍, 王析锺. 氨氮对反硝化型甲烷厌氧氧化细菌的影响机理研究[J]. 环境科学学报, 2018, 38(8): 3036-3044
- [38] Zhou LN, Su RH, Ma SJ, et al. Effects of nitrite, nitrate and ammonia nitrogen on anaerobic microbial community characterized by using phospholipid fatty acid PLFA method[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(2): 499-505 (in Chinese)
周莉娜, 苏润华, 马思佳, 等. 基于 PLFA 法分析亚硝氮、硝氮和氨氮对厌氧微生物细菌群落的影响[J]. 环境科学学报, 2016, 36(2): 499-505
- [39] Xie ZF, Wang ZW, Wang QY, et al. An anaerobic dynamic membrane bioreactor (AnDMBR) for landfill leachate treatment: performance and microbial community identification[J]. Bioresource Technology, 2014, 161: 29-39
- [40] Huisman GW, Wonink E, Meima R, et al. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(4): 2191-2198
- [41] Kraak MN, Smits TH, Kessler B, et al. Polymerase C1 levels and poly(R-3-hydroxyalkanoate) synthesis in wild-type and recombinant *Pseudomonas* strains[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(16): 4985-4991
- [42] Liu Q, Luo G, Zhou XR, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(1): 11-17
- [43] Yin SL, Du J, Xu C. Advances in the research and application of *Lactobacillus*[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(9): 25-29 (in Chinese)
尹胜利, 杜鉴, 徐晨. 乳酸菌的研究现状及其应用[J]. 食品科技, 2012, 37(9): 25-29
- [44] Hu XL. Illuminating the correlation between anaerobic clostridial community diversity and quality of pit mud used for the production of Chinese strong-flavor liquor[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)
胡晓龙. 浓香型白酒窖泥中梭菌群落多样性与窖泥质量关联性研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2015
- [45] Zhang YHP, Lynd LR. Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(20): 7321-7325
- [46] Delbès C, Moletta R, Godon JJ. Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35(1): 19-26
- [47] Zhang T, Ke SZ, Liu Y, et al. Microbial characteristics of a methanogenic phenol-degrading sludge[J]. Water Science & Technology, 2005, 52(1/2): 73-78
- [48] Yamada T, Sekiguchi Y, Imachi H, et al. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to *Chloroflexi* subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7493-7503
- [49] Yamada T, Sekiguchi Y, Hanada S, et al. *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(6): 1331-1340
- [50] Rosenkranz F, Cabrol L, Carballa M, et al. Relationship between phenol degradation efficiency and microbial community structure in an anaerobic SBR[J]. Water Research, 2013, 47(17): 6739-6749
- [51] Si BC, Li JM, Zhu ZB, et al. Continuous production of biohythane from hydrothermal liquefied cornstarch biomass via two-stage high-rate anaerobic reactors[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 254
- [52] Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes[M]. 4th ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014: 45-48
- [53] Sousa DZ, Pereira MA, Smidt H, et al. Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 60(2): 252-265
- [54] Djao ODN, Zhang XJ, Lucas S, et al. Complete genome sequence of *Syntrophothermus lipocalidus* type strain (TGB - C1T)[J]. Standards in Genomic Sciences, 2010, 3(3): 267-275
- [55] Poirier S, Desmond-Le Quémener E, Madigou C, et al. Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration: identification of key microbial phylotypes[J]. Bioresource Technology, 2016, 207: 92-101
- [56] Yang ZM, Guo RB, Xu XH, et al. Enhanced methane production via repeated batch bioaugmentation pattern of enriched microbial consortia[J]. Bioresource Technology, 2016, 216: 471-477
- [57] Dang Y, Lei YQ, Liu Z, et al. Impact of fulvic acids on bio-methanogenic treatment of municipal solid waste incineration leachate[J]. Water Research, 2016, 106: 71-78
- [58] Granada CE, Hasan C, Marder M, et al. Biogas from slaughterhouse wastewater anaerobic digestion is driven by the archaeal family *Methanobacteriaceae* and bacterial families *Porphyromonadaceae* and *Tissierellaceae*[J]. Renewable Energy, 2018, 118: 840-846
- [59] Huang Y, Hou XL, Liu ST, et al. Correspondence analysis of bio-refractory compounds degradation and microbiological community distribution in anaerobic filter for coking wastewater treatment[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 304: 864-872
- [60] Montoya JM, Pimm SL, Solé RV. Ecological networks and their fragility[J]. Nature, 2006, 442(7100): 259-264
- [61] Eiler A, Heinrich F, Bertilsson S. Coherent dynamics and association networks among lake bacterioplankton taxa[J]. The ISME Journal, 2012, 6(2): 330-342
- [62] Liu JH, Hu GR, Li FL, et al. Research progress of microbial flora in anaerobic digestive system[J]. Industrial Water Treatment, 2011, 31(10): 10-14 (in Chinese)
刘君寒, 胡光荣, 李福利, 等. 厌氧消化系统微生物菌群的研究进展[J]. 工业水处理, 2011, 31(10): 10-14