



移动扫码阅读

郭励奥, 赵若淇, 李司琦, 等. 纳米磁铁矿对海藻厌氧发酵产甲烷性能影响及机制探究 [J]. 能源环境保护, 2025, 39(5): 191–200.

GUO Li'ao, ZHAO Ruoqi, LI Siqi, et al. Effects and Mechanisms of Nano-Magnetite on Anaerobic Methanogenesis from Seaweed [J]. Energy Environmental Protection, 2025, 39(5): 191–200.

纳米磁铁矿对海藻厌氧发酵产甲烷性能影响及机制探究

郭励奥, 赵若淇, 李司琦, 李 杨*

(大连理工大学 化工海洋与生命学院, 辽宁 盘锦 124000)

摘要: 当前我国正处于大力发展生物天然气产业的阶段, 生物天然气的生产需要通过厌氧发酵将生物质转化为沼气, 然后进行净化提纯。我国海岸带资源丰富, 海藻产量巨大, 是潜在的生物质能源和生物天然气原料。采用厌氧发酵技术, 将以海带为例的大型海藻转化为甲烷气体, 实现我国海藻生物质的有效利用并产生能源气体甲烷。探究在纳米磁铁矿存在下, 对该过程的促进作用及影响机制。研究表明, 添加纳米磁铁矿能够促进海带中有机物质的降解和甲烷产生, 总化学需氧量(TCOD)和溶解性化学需氧量(SCOD)去除率分别提高 20% 和 12% 以上, 甲烷产量可提高 1 倍以上。同时, 纳米磁铁矿有助于使厌氧系统更加稳定, 海带发酵产酸后 pH 恢复中性的速度更快。微生物群落结构分析显示, 纳米磁铁矿对系统内电活性微生物丰度提高明显, 可以构建微生物直接种间电子传递(DIET)产甲烷的途径。此外, 纳米磁铁矿还能提高 5,10-亚甲基四氢甲烷蝶呤还原酶控制基因(*mer*)和杂二硫化物还原酶控制基因(*hdrABC*)这 2 类产甲烷菌胞内重要基因的丰度, 促进基于 DIET 产甲烷代谢通路, 为我国发展生物天然气产业提供可能方案, 助力“双碳”目标的实现。

关键词: 生物天然气; 海藻; 直接种间电子传递; 纳米磁铁矿; 生物质能源

中图分类号: X382

文献标识码: A

文章编号: 2097-4183(2025)05-0191-10

Effects and Mechanisms of Nano-Magnetite on Anaerobic Methanogenesis from Seaweed

GUO Li'ao, ZHAO Ruoqi, LI Siqi, LI Yang*

(School of Chemical Engineering, Ocean and Life Sciences, Dalian University of Technology, Panjin 124000, China)

Abstract: The bio-natural gas industry is currently experiencing rapid development in China. Bio-natural gas is purified from biogas, which is produced by anaerobic fermentation of biomass. China's coastal regions possess abundant seaweed resources, a type of biomass with great potential for biogas production. Therefore, this research investigated biogas production from seaweed through anaerobic fermentation, with the aim of effectively utilizing seaweed and recycling biogas as a renewable energy source. Nano-magnetite was added to the anaerobic reactors to explore the potential to enhance biogas production. The results showed that nano-magnetite could accelerate the degradation of biomass and the production of methane. The removal efficiencies of total chemical oxygen demand (TCOD) and soluble

收稿日期: 2024-08-20

修回日期: 2024-10-10

接受日期: 2024-10-12

DOI: 10.20078/j.eep.20241002

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2023YFD1701405-01)

第一作者: 郭励奥(2004—), 女, 河北邢台人, 主要研究方向为厌氧生物处理及资源化。E-mail: guoliao3361@qq.com

*通讯作者: 李 杨(1989—), 女, 辽宁大连人, 副教授, 主要研究方向为厌氧生物处理及资源化。E-mail: liyang1989@dlut.edu.cn

chemical oxygen demand (SCOD) in nano-magnetite reactors increased by about 20% and 12%, respectively, compared with the control reactor, which showed removal efficiencies of 51.4% and 42.5%, respectively. Methane production in nano-magnetite reactors more than doubled, with the highest methane production of 1 320 mL at a nano-magnetite concentration of 2.0 g/L. Nano-magnetite enhanced the stability of the anaerobic system and promoted a quicker recovery to neutral pH following acidogenic fermentation of kelp. The pH level in nano-magnetite reactors was always higher than 6.2 and increased gradually to 7.5, while that in the control reactor decreased below 6.0 and then recovered slowly. Analysis of the microbial community structure indicated that nano-magnetite significantly accelerated the enrichment of electroactive microorganisms and facilitated direct interspecies electron transfer (DIET) in methane production. Scanning electron microscopy (SEM) showed that microorganisms and nano-magnetite adhered to each other in nano-magnetite reactors, which was beneficial for DIET to occur among electroactive microorganisms and between electroactive microorganisms and nano-magnetite during the anaerobic methane production process. High-throughput sequencing analysis showed that the electroactive microorganisms were distinctly enriched in nano-magnetite reactors. The abundance of *norank_Anaerolineaceae* (31.3%, 43.4%, 47.0%, and 42.1% for 0.2 – 5.0 g/L nano-magnetite); *norank_Bacteroidetes_vadinHA17* (2.0%, 9.3%, 7.6%, and 7.8%); *Leptolinea* (2.6%, 7.3%, 6.7%, and 9.1%); *Longilinea* (2.9%, 4.6%, 4.8%, and 4.7%); *Dechloromonas* (2.3%, 2.0%, 1.2%, and 0.9%); and *unclassified_Anaerolineaceae* (9.2%, 8.9%, 8.5%, and 7.1%) all increased compared with the control reactor (17.3%, 1.4%, 1.6%, 3.2%, 0.6%, and 2.0%). Additionally, nano-magnetite increased the abundance of the *Methylene-H4MPT reductase* regulator gene (*mer*) and the *heterodisulfide reductase* regulator gene (*hdrABC*) in methanogens, enhancing the metabolic pathway of DIET methanogenesis. The abundance of *mer* was 4.57E-04, 5.45E-04, 5.75E-04, and 5.50E-04, and *hdrABC* was 3.69E-05, 1.06E-04, 1.04E-04, and 1.42E-04, while these values in the control reactor were 2.22E-04 and 6.48E-05, respectively. These findings suggest that nano-magnetite significantly enhances biogas production from seaweed biomass. This technology holds promise for further development to support the advancement of the biogas industry and contribute to achieving the "dual carbon" goal in China.

Keywords: Bio-natural gas; Seaweed; Direct interspecies electron transfer; Nano-magnetite; Biomass energy

0 引言

生物天然气是指以农作物秸秆、畜禽粪便、生活厨余垃圾、工业有机废水等各类有机物为原料,经厌氧发酵、净化、提纯产生的绿色低碳清洁可再生的非常规天然气^[1]。我国生物天然气工程规模较小,暂未形成完善的产业体系、技术支撑体系以及政策体系,产业处于发展起步阶段^[2-3]。从2014年开始,我国推动大型沼气转型升级工作,尝试推进一批大型沼气工程和生物天然气工程开发建设^[2-3]。2019年,国家能源局首次将生物天然气纳入能源发展战略及天然气产供储销体系,预计2030年天然气产量超过300亿m³^[4]。

生物天然气兼具促进农村经济发展、减少化

石能源消耗、改善生态环境等多重优势,但原料蕴含能量价值低、产品单一,限制其产业化发展^[5]。此外,秸秆纤维素预处理成本高;畜禽粪污含水量较高,限制其产气;餐厨垃圾易酸化,致使生产工艺中产甲烷菌群失活;城市剩余污泥组分复杂,生物可利用率低等缺陷也是限制其推广应用的重要原因^[6]。藻类,尤其是海产藻类,产量巨大,且光合作用效率高、生长周期短、环境适应能力强、易培养、脂类含量高,是优质的生物质原料^[7]。其中,有“能源新秀”之称的大型海藻,因含有丰富的产甲烷成分,备受学者重视^[8]。

关于大型海藻发酵产甲烷的研究报道较少,国内对海藻生物质的研究主要集中在微藻提取油或产氢等领域^[9-10]。我国有适于海藻养殖的广大

沿海水域,且大型海藻养殖不占用陆地、生产成本低廉、操作简单,相对于微型藻类较易获得^[11]。因此,利用我国优势生物资源——大型海藻进行厌氧发酵产甲烷,将为我国发展生物天然气事业提供技术支撑。目前,国内外对海藻厌氧发酵产甲烷的研究仍沿用 BRYANT M P 提出的沼气发酵三阶段理论,即水解酸化阶段、产氢产乙酸阶段和产甲烷阶段^[12]。在该理论中,海藻发酵伴随着中间产物氢气的产生和消耗,即以种间氢气传递(IHT)作为微生物间的电子传递途径。在厌氧反应器中,氢气作为中间电子载体,常会因为分压过高($>10^{-4}$ Pa)使有机酸积累,从而影响后续产甲烷过程^[13]。近年来,一种新型的厌氧微生物间的电子传递方式——微生物直接种间电子传递(DIET),被发现并应用于有机物厌氧发酵产甲烷相关研究^[14]。该 DIET 途径可部分或全部替代 IHT 途径,打破 IHT 途径中氢气分压过高造成的热力学限制,促进有机物发酵产甲烷过程^[15]。

由于参与 DIET 途径的微生物为电活性菌,电活性产酸菌与电活性产甲烷菌间发生互养代谢,无需经过电子载体,直接将有机酸、醇等有机物氧化为甲烷^[16]。然而在常规厌氧消化反应器中,电活性产酸菌丰度通常较低,需进行富集培养^[17]。据相关研究报道,铁氧化物可有效富集此类电活性产酸菌,其主要机制在于铁氧化物可在厌氧反应器内发生异化铁还原过程,从而富集具有电活性产酸功能的异化铁还原菌。该类菌可在厌氧反应器内充当电活性产酸菌,与反应器内原生电活性产甲烷菌(*Methanosepta*/*Methanothrix*)形成互养代谢,从而实现有机物发酵产甲烷过程^[18-19]。

综上,本研究拟将纳米磁铁矿作为铁氧化物添加至厌氧反应器中,用于强化大型海藻厌氧发酵产甲烷,探究纳米磁铁矿对海藻发酵产甲烷过程中微生物间的电子传递影响;拟构建以 DIET 为主的发酵产甲烷途径,加速发酵速率并提升甲烷产量。将海藻生物资源转化为以甲烷为主的可燃性气体,经简单提纯形成生物天然气,以期助力我国生物天然气产业发展。

1 材料与方法

1.1 海藻与引种污泥

以海带作为大型海藻代表进行实验,海带取自大连星海广场海边沙滩,采集后经清洗、粉碎、匀浆预处理,4℃冷藏保存。引种污泥取自大连

夏家河污泥处理厂厌氧消化罐,将预处理后海带与引种污泥按体积比 1:1 混合均匀,用于厌氧发酵过程。表 1 为海带与引种污泥及二者混合物的初始参数指标。

表 1 海带、引种污泥及二者混合物初始指标

Table 1 Initial indicators of kelp, inoculated sludge, and their mixture

指标	海带	引种污泥	混合物
总悬浮物 TSS/%	5.13	5.17	5.00
挥发性悬浮物 VSS/%	3.73	3.92	2.98
总化学需氧量 TCOD/(mg·L ⁻¹)	38 541	10 650	32 550
溶解性化学需氧量 SCOD/(mg·L ⁻¹)	12 080	5 765	9 161
pH	7.90	8.25	8.08

1.2 纳米磁铁矿合成

称取 1.83 g Fe₃O₄·7H₂O 和 2.00 g FeCl₃ 放入 100 mL 去离子水于烧杯中混合,搅拌均匀后将混合物水浴加热至 65℃,再搅拌冷却至 40℃。通过逐滴加入 5 mol/L NaOH 调整溶液 pH 至 10~11,使铁氧化物充分沉淀。搅拌混合物 1 h,随后于室温下静置 12 h。待沉降结束后,过滤悬浮液,并将底部的沉淀物用去离子水进行漂洗、乙醇冲洗,清洗结束后静置一段时间去除上清液,取出沉淀并于 80℃烘箱中干燥,得到纳米磁铁矿粉末^[20],密封保存备用。

1.3 实验设置

实验取 5 组厌氧发酵瓶为反应器(250 mL,有效反应体积 200 mL),设置不同纳米磁铁矿添加组(0.2、0.5、1.0、2.0 g/L)及空白对照组(纳米磁铁矿添加量为 0 g/L),每组均设置 3 个平行反应装置,以保证实验结果准确性。厌氧发酵瓶于 35℃生化培养箱(上海智诚 ZXSD-R1430)中运行,反应采用批式实验模式,启动时一次性投加引种污泥与海带混合物,发酵周期自反应启动至各厌氧发酵瓶内气体总产量稳定 5 d 以上并不再增加。

实验起始和结束时,分析测定各厌氧发酵瓶内 TSS、VSS、TCOD、SCOD、pH;反应运行过程中,每天测定各厌氧发酵瓶内产生气体体积和气体组分;周期反应结束后测定各厌氧发酵瓶内微生物形态、微生物群落结构和部分功能基因丰度。

1.4 分析方法

TSS、VSS 和 COD 均根据《水和废水监测分析方法》(第四版)测定,其中 TCOD 取样测定前需

将样品瓶内固液混合均匀后稀释一定倍数(10~50倍), SCOD取样测定前需离心(8 000 r/min, 10 min)取上清液,再稀释一定倍数(5~20倍)测定。使用 PHS-25 型 pH 计测定 pH, 测定前使用标准溶液进行校准。气体体积通过气体采集袋收集,用 100 mL 注射器进行测量。气体组分利用气相色谱仪(GC7900, TCD, 上海天美)分析测定,色谱柱型号为 TK0419, 尺寸为 2 m×3 mm, 载气为氩气,进样口温度为 150 ℃,检测器温度为 150 ℃,柱箱温度为 110 ℃。

采用美国 Nova Nano 450 型扫描电镜(SEM)配备能量色散 X 射线(EDX)光谱仪表征样品形貌和组成元素,放大倍数为 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ 倍。采用日本岛津 Lab XRD-7000s 型 X 射线衍射(XRD)表征样品晶体结构。采用英国赛默飞 ESCALAB250Xi 型 X 射线光电子能谱仪(XPS)表征元素价态和能带结构。样品在表征分析前,均需先冷冻干燥成固体粉末状。

1.5 微生物群落结构及功能基因丰度分析

首先进行样品 DNA 提取(E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit)和 DNA 浓度测定(NanoDrop ND-1 000 分光光度计),再使用引物 338F (5'-AC TCCTACGGGAGGCAGCAG-3')以及 806R (5'-GG

ACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行扩增(①95 ℃-2 min, ②95 ℃-30 s, ③重复循环 25 次 55 ℃-30 s, ④72 ℃-30 s, ⑤72 ℃-5 min)。高通量测序由上海生工生物工程有限公司在 Illumina MiSeq PE250 平台上完成,分析结果包括微生物群落结构和功能基因丰度结果。

2 结果与讨论

2.1 纳米磁铁矿合成情况分析

纳米磁铁矿合成后利用 SEM 分析样品形貌、EDX 分析样品组成元素、XRD 分析样品晶体结构、XPS 分析元素价态和能带结构,以判断纳米磁铁矿是否成功制备^[21-22],结果如图 1 所示。SEM 分析结果(图 1(a))显示,在放大倍数为 100 000 下,所合成纳米磁铁矿为颗粒状,且纳米磁铁矿颗粒呈现聚集状态,纳米磁铁矿单颗粒粒径在 36.20~61.64 nm 之间,确定所合成材料为纳米级别。图 1(b)为 EDX 面扫结果,可以观察到材料表面仅存在 Fe 和 O 等磁铁矿所具备的特征元素,表明合成材料由 Fe 和 O 元素组成。

合成纳米磁铁矿 XRD 衍射图谱如图 1(c)所示,其扫描范围为 $2\theta=10^\circ \sim 90^\circ$,结果显示所合成纳米磁铁矿的特征峰分别位于 $2\theta=35.4^\circ$ 、 56.9° 、 63.0°

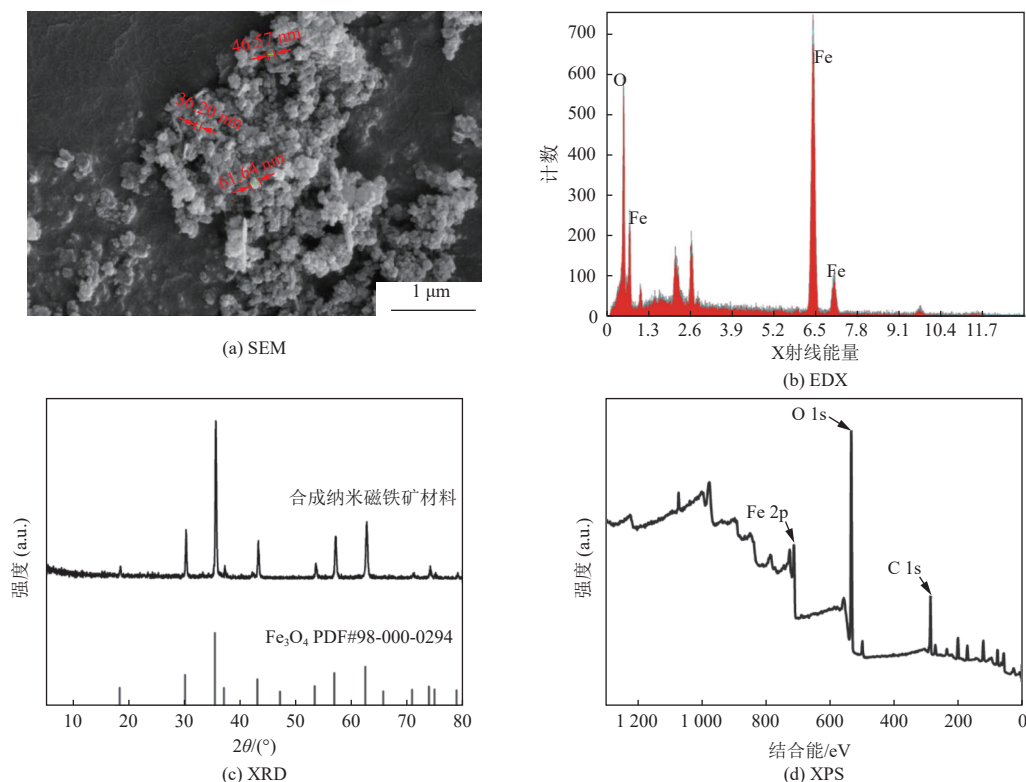


图 1 纳米磁铁矿合成表征分析结果

Fig. 1 Analysis results of synthesis of nano-magnetite

处,与 Fe_3O_4 标准卡PDF#98-000-0294上的 $\text{Fe}(311)$ 晶面、 $\text{Fe}(511)$ 晶面、 $\text{Fe}(400)$ 晶面基本吻合。同时,合成材料具有磁性,说明其主要成分为 Fe_3O_4 。图1(d)为XPS图谱,结果显示所合成纳米磁铁矿材料表面同时具有Fe、O等元素,其中Fe元素在710.9 eV以及719.4 eV的峰分别对应 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} ,进一步证实了合成纳米磁铁矿中的Fe以 Fe_3O_4 的形式存在,该结果与XRD表征结果一致。基于以上综合分析结果确认所合成材料为纳米级磁铁矿。

2.2 海藻中有机质去除及产甲烷分析

海藻中有机质资源丰富,如海藻多糖、藻酸、淀粉、脂质、蛋白质等,这些有机质经厌氧发酵后,均可在厌氧菌的代谢作用下不同程度地分解并产生甲烷。因此,本研究重点针对海藻分析测

定各反应组厌氧发酵前后的COD浓度值,探究纳米磁铁矿对海藻中有机质去除的影响,并测定了各反应组的甲烷产生情况。如图2所示,添加纳米磁铁矿各组反应器内TCOD和SCOD去除率均显著高于空白组。其中,0.5 g/L纳米磁铁矿组和2.0 g/L纳米磁铁矿组TCOD去除率较高,可达75.0%以上,空白对照组仅为51.4%。0.2 g/L纳米磁铁矿组和2.0 g/L纳米磁铁矿组SCOD去除率较高,分别为56.2%和54.6%,空白对照组仅为42.5%。这表明添加纳米磁铁矿均可显著促进海藻中有机质的厌氧分解过程,但不同纳米磁铁矿添加量对TCOD和SCOD促进效果具有一定差异,纳米磁铁矿添加量2.0 g/L对促进海藻TCOD和SCOD去除效果均较好。

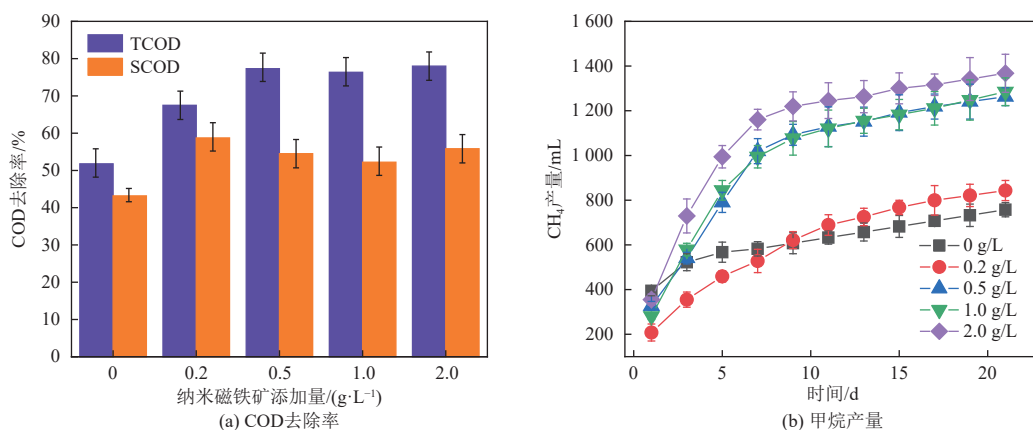


图2 各反应器内COD去除率及甲烷产量

Fig. 2 COD removal rates and CH₄ yields in each reactor

在实验运行过程中,对各反应器累计甲烷产量进行测定,结果显示添加纳米磁铁矿反应器中的甲烷产量均高于空白对照组,且0.5~2.0 g/L纳米磁铁矿组中甲烷产量约为空白对照组的2倍,2.0 g/L纳米磁铁矿组的甲烷产量最高,为1320 mL。可见甲烷产生情况与TCOD和SCOD综合产生情况相关,并非只与其中某一因素相关。这可能是由于海藻中某些不溶性大分子物质需先经过水解酸化变成可溶性有机物,随后被进一步分解产生甲烷。水解酸化阶段与产甲烷阶段均为厌氧发酵的关键步骤,也可能是厌氧发酵的限速步骤。当纳米磁铁矿浓度较低时(如0.2 g/L),其富集的异化铁还原菌优先参与溶解性有机物的互养代谢产甲烷过程,因而SCOD去除率最高;当纳米磁铁矿浓度较高,且富集的异化铁还原菌较多时,可同时

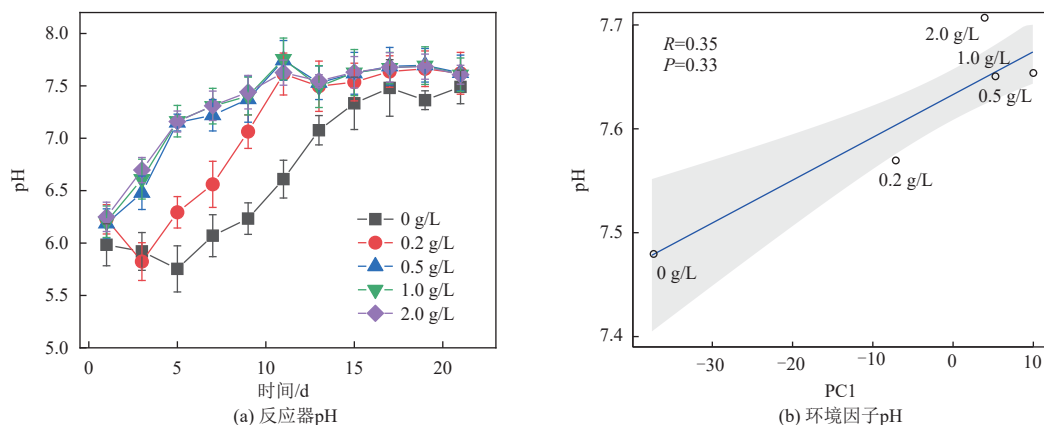
参与不溶性大分子物质的水解酸化过程,从而产生更多的SCOD,因此TCOD去除效果更佳,且同时甲烷产量也更大。

2.3 纳米磁铁矿对反应器稳定性能的影响

海藻中有机物质在进行厌氧发酵过程中,会产生中间产物——有机酸,从而使反应器内pH降低,影响产甲烷菌代谢能力,降低系统稳定性。通过添加不同浓度纳米磁铁矿于各海藻发酵厌氧反应器中,探究其对反应器稳定性影响,结果如图3所示。由图3(a)可知,随着添加纳米磁铁矿浓度提高(0~0.5 g/L),反应器内pH明显提升。该现象主要归因于纳米磁铁矿中Fe(III)具有氧化性,通过异化铁还原反应中和厌氧反应器内过多的 H^+ ,从而提高pH。当进一步提高纳米磁铁矿浓度(0.5~2.0 g/L),由于中间产物释放 H^+ 有限、后续产

甲烷过程对 H^+ 的消耗, 各反应器内的 pH 没有显著差异。添加 0.5~2.0 g/L 纳米磁铁矿反应器内的 pH 始终高于 6.2, 且自反应开始后第 1 天起, 各反应器内 pH 持续升高, 直至稳定在 7.5 左右。添加 0~0.2 g/L 纳米磁铁矿反应器内 pH 呈现先降后升的趋势, 其原因为反应器内释放的 H^+ 未得到快速消耗, 导致 pH 先下降; 当 pH 低于 6.2 时, 酸性

环境会对反应器内产甲烷菌活性产生不可逆的影响。对各反应器内污泥进行环境因子 pH 排序回归分析(图 3(b)), 探究 pH 对各反应器污泥在 PC1 维度上的差异。空白组与其他 4 组在横轴上距离最远, 即差异最大; 添加 0.5~2.0 g/L 纳米磁铁矿反应器在横轴上距离较近, 差异较小, 且 pH 也更加稳定。



注: R 为决定系数, 代表变异被回归直线解释的比例; P 代表相关性分析检验值; 蓝色线代表环境因子排序回归拟合线; 灰色区域代表环境因子排序回归拟合面。

图 3 各反应器内 pH 和环境因子 pH 排序回归分析

Fig. 3 pH values and ranking regression analysis of environmental factor pH in each reactor

2.4 纳米磁铁矿对反应器内微生物群落结构影响

实验结束后, 取各反应器内污泥进行形貌及微生物群落结构分析, 结果如图 4、图 5 所示。由图 4 可知, 各反应器内污泥形貌存在明显差异, 即空白对照组的污泥表面相对平滑, 表面微生物数量较少, 而纳米磁铁矿添加组的污泥表面粗糙且

微生物数量随纳米磁铁矿添加量大致呈增多趋势。微生物以球状、杆状和短杆状居多, 且部分微生物与颗粒状纳米磁铁矿黏附在一起, 这也进一步加速电活性微生物胞外呼吸以及细胞间的电子传递能力。

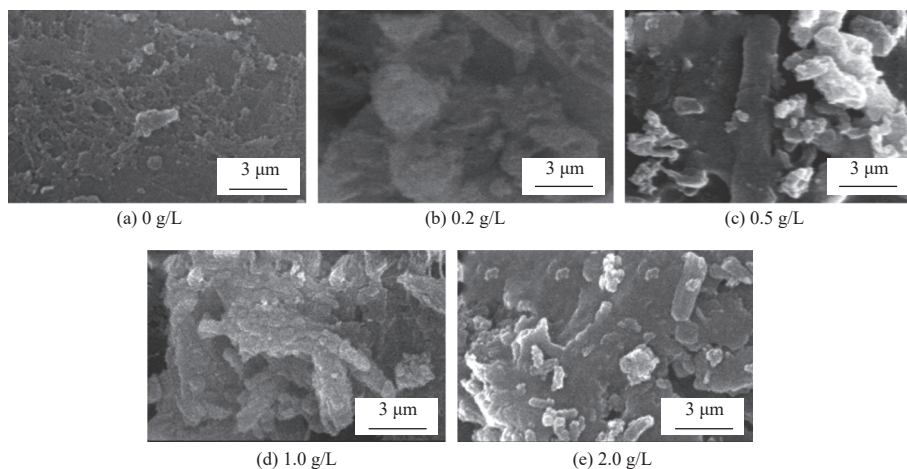


图 4 各反应器内微生物形貌分析

Fig. 4 Microbial morphology analysis in each reactor

图 5 为各反应器内污泥中微生物 16S rRNA 高通量测序分析, *norank_Anaerolineaceae* (纳米磁

铁矿添加量 0、0.2、0.5、1.0、2.0 g/L 反应器内丰度分别为 17.3%、31.3%、43.4%、47.0% 和 42.1%)、

norank_Bacteroidetes_vadinHA17 (1.4%、2.0%、9.3%、7.6% 和 7.8%)、*Leptolinea* (1.6%、2.6%、7.3%、6.7% 和 9.1%)、*Longilinea* (3.2%、2.9%、4.6%、4.8% 和 4.7%)、*Dechloromonas* (0.6%、2.3%、2.0%、1.2% 和 0.9%)、*unclassified_Anaerolineaceae* (2.0%、9.2%、8.9%、8.5% 和 7.1%) 等细菌在各反应器内的丰度均较高,尤其在纳米磁铁矿添加反应器中。其中,*norank_Anaerolineaceae* 和 *unclassified_Anaerolineaceae* 均归属于 *Anaerolineaceae* 科,据报道该科微生物中部分微生物属可参与基于生物炭强化的 DIET 过程,并可与产甲烷菌 *Methanosaeta* 进行互养代谢^[23-24]。*Bacteroidetes_vadinHA17* 和 *Longilinea* 被报道能够通过 DIET 途径进行互养代谢对硝基苯酚(PNP),*Bacteroidetes_vadinHA17* 作为电子供体端分解葡萄糖生成有机酸,将电子直接传递至 *Longilinea*,*Longilinea* 接收电子后降解 PNP^[25]。*Leptolinea* 是一类可将碳水化合物转化为乙酸、氢气的微生物,且在 DENG 等^[26] 关于杨木燃料乙醇废水的厌氧发酵处理研究中,*norank_Bacteroidetes_vadinHA17*、*Anaerolineaceae* 和 *Leptolinea* 均得到了大量富集。乙醇作为微生物参与 DIET 最适宜利用的底物,在

乙醇废水中 DIET 微生物较易得到富集和培养。因此,推测 *Leptolinea* 也具备参与 DIET 的极大潜能。*Dechloromonas* 是典型的硝酸盐还原细菌和铁还原细菌,同样被报道具备参与 DIET 的潜能^[27-28]。高通量测序分析结果表明,在添加纳米磁铁矿反应器内,DIET 相关微生物得到了有效富集,揭示了 DIET 途径发生的极大可能性。

2.5 纳米磁铁矿对微生物产甲烷代谢路径中功能基因丰度影响

对各反应器内产甲烷相关功能基因的丰度进行分析,在分别以乙酸和 CO₂ 为底物的 2 条产甲烷代谢途径中,相关代谢途径和主要功能基因类型并没有变化,但乙酰辅酶 A 合成酶编码基因(*acs*)、甲基四氢甲烷蝶呤:辅酶 M 转甲基酶编码基因(*mtr*)、5,10-亚甲基四氢甲烷蝶呤还原酶编码基因(*mer*)和杂二硫化物还原酶编码基因(*hdrABC*) 4 种功能基因的丰度在纳米磁铁矿添加组中更高(表 2)。*acs* 主要编码乙酰辅酶 A 合成酶(Acs),将乙酸根离子(CH₃COO⁻)转化为乙酰辅酶 A(CH₃CO-S-CoA),参与嗜乙酸产甲烷过程,后在一氧化碳脱氢酶/乙酰辅酶 A 合成酶(Codh/Acs, 编码基因 *codh/acs*)作用下生成甲基四氢甲烷蝶呤(CH₃-H₄MPT)^[29-30],但纳米磁铁矿添加组的 *acs* 丰度(8.47E-04 至 8.74E-04)仅略高于空白对照组(8.13E-04)。*mer* 主要编码 5,10-亚甲基四氢甲烷蝶呤还原酶(Mer),该酶将亚甲基四氢甲烷蝶呤(CH₂=H₄MPT)转化为 CH₃-H₄MPT,参与 CO₂ 还原产甲烷途径^[31-32],纳米磁铁矿添加组(4.57E-04~5.75E-04)中 *mer* 丰度约为空白对照组(2.22E-04)的 2 倍以上。分别以乙酸和 CO₂ 为底物的 2 条产甲烷代谢途径均在 *mtr* 所编码的甲基四氢甲烷蝶呤:辅酶 M 转甲基酶(Mtr)作用下由 CH₃-H₄MPT 转化为甲基辅酶 M (CH₃-CoM),进一步在甲基辅酶 M 还原酶(Mcr, 编码基因 *mcr*)作用下产生甲烷^[33-34],其中纳米磁铁矿添加组(1.37E-03~1.44E-03)中 *mtr* 丰度略高于空白对照组(1.14E-03)。可见,在本研究中,纳米磁铁矿对以乙酸和 CO₂ 为底物的产甲烷途径均有促进作用。据报道,DIET 产甲烷途径为反应底物 H⁺ 和 CO₂ 在电活性产甲烷菌的作用下直接接受电子,将 CO₂ 还原为甲烷^[35-36]。此外,参与 DIET 的电活性产甲烷菌,如甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*),其膜结合电子通过复杂的呼吸链进行传递(图 6),终端的电子受体是异质二硫化物(CoB-S-S-CoM),

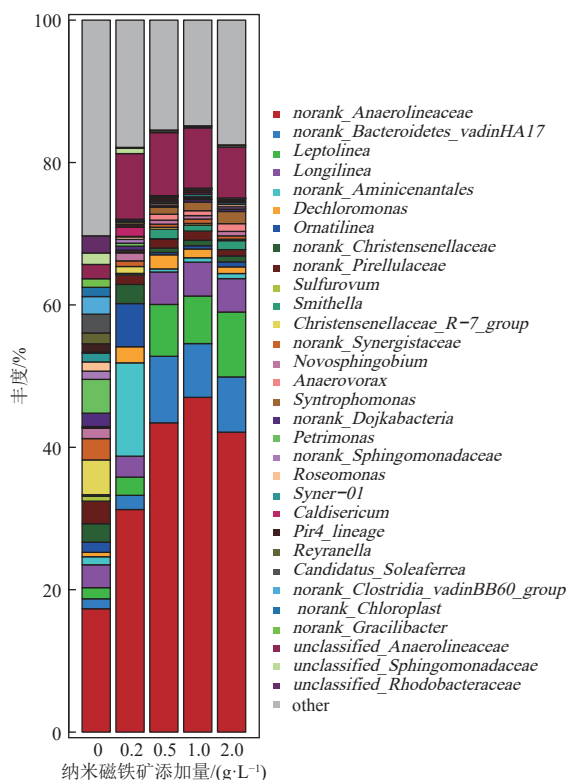


图 5 各反应器内微生物高通量测序分析

Fig. 5 High-throughput sequencing analysis of microorganisms in each reactor

表 2 各反应器内产甲烷菌胞内功能基因及丰度
Table 2 Intracellular functional genes and abundance of methanogens in each reactor

基因名称	编码蛋白质名称	酶学委员会 (EC)编号	丰度				
			0 g/L	0.2 g/L	0.5 g/L	1.0 g/L	2.0 g/L
<i>acs</i>	乙酰辅酶A合成酶(Acetyl-CoA synthetase, Acs)	6.2.1.1	8.13E-04	8.74E-04	8.47E-04	8.47E-04	8.52E-04
<i>ak</i>	乙酸激酶(Acetate kinase, Ak)	2.7.2.1	5.14E-04	3.72E-04	2.37E-04	2.20E-04	2.35E-04
<i>pta</i>	磷酸转乙酰酶(Phosphate Acetyltransferase, Pta)	2.3.1.8	2.02E-04	1.28E-04	1.53E-04	1.31E-04	1.46E-04
<i>codh/acs</i>	一氧化碳脱氢酶/乙酰辅酶A合成酶(Anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase/ Acetyl-CoA synthase, Codh/Acs)	1.2.7.4					
		2.3.1.169	4.86E-06	3.43E-06	2.95E-06	2.67E-06	2.51E-06
		2.1.1.245					
		1.8.7.3					
<i>hdrABC</i>	异质二硫化物还原酶(Heterodisulfide reductase, HdrABC)	1.8.98.4	6.48E-05	3.69E-05	1.06E-04	1.04E-04	1.42E-04
		1.8.98.5					
		1.8.98.6					
		1.12.99.-					
<i>mvhADG</i>	非还原性辅酶F420氢化酶(F420-non-reducing hydrogenase, MvhADG)	1.8.98.5	8.95E-07	1.55E-07	9.66E-07	8.79E-07	1.55E-06
		1.8.98.6					
<i>mtr</i>	甲基四氢甲烷蝶呤: 辅酶M转甲基酶(Methyl-H ₄ MPT: CoM-methyltransferase, Mtr)	7.2.1.4	1.14E-03	1.37E-03	1.41E-03	1.44E-03	1.43E-03
<i>mcr</i>	甲基辅酶M还原酶(Methyl-CoM reductase, Mcr)	2.8.4.1	6.29E-07	6.12E-07	2.90E-06	2.69E-06	3.56E-06
<i>mer</i>	5,10-亚甲基四氢甲烷蝶呤还原酶(Methylene-H ₄ MPT reductase, Mer)	1.5.98.2	2.22E-04	4.57E-04	5.45E-04	5.75E-04	5.50E-04
<i>mch</i>	亚甲基四氢甲烷蝶呤水解酶(Methenyl-H ₄ MPT cyclohydrolase, Mch)	3.5.4.27	1.63E-05	4.51E-06	3.38E-06	3.86E-06	4.90E-06
<i>mtd</i>	亚甲基四氢甲烷蝶呤脱氢酶(Methylene-H ₄ MPT dehydrogenase, Mtd)	1.5.98.1	5.61E-05	2.50E-05	2.09E-05	2.15E-05	1.44E-05
<i>ftr</i>	甲酰甲烷咪喃-四氢甲烷蝶呤: 甲酰转移酶(Formylmethanofuran: H ₄ MPT formyltransferase, Ftr)	2.3.1.101	3.67E-06	1.63E-06	8.47E-07	1.17E-06	1.38E-06
<i>fwd</i>	甲酰甲基咪喃脱氢酶(Formylmethanofuran dehydrogenase, Fwd)	1.2.7.12	5.61E-05	2.50E-05	2.09E-05	2.15E-05	1.44E-05

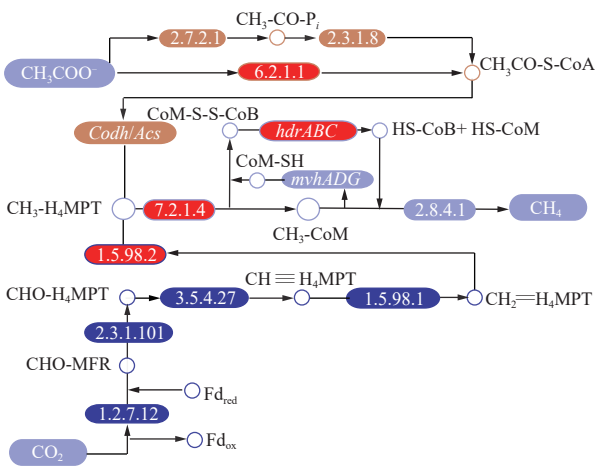


图 6 产甲烷菌胞内代谢途径

Fig. 6 Intracellular metabolic pathways of methanogens

hdrABC 编码杂二硫化物还原酶(HdrABC)参与 CoB-S-S-CoM 生成 HS-CoB 和 HS-CoM 反应^[37-38]。HS-CoB 可作为电子供体,在 *mcr* 编码的甲基辅酶 M 还原酶作用下将甲基辅酶 M 还原为 CH₄^[37],其中添加 0.5~2.0 g/L 纳米磁铁矿组 *hdrABC* 丰度(1.04E-04~1.42E-04)高于空白对照组(6.48E-05)一个数量级。因此,可以推测在本研究中,纳米磁铁矿可促进海藻 DIET 产甲烷途径,尤其对 *mer* 和 *hdrABC* 2 类功能基因的丰度促进明显。

3 结 论

我国海藻资源丰富,将海藻厌氧发酵并产甲烷是助力我国生物天然气产业发展的可行举措。通过在厌氧反应器中添加纳米磁铁矿,可显著促

进海藻厌氧发酵过程并提高甲烷产量。对其促进机制进行探究, 纳米磁铁矿主要从以下 3 方面促进该过程。

(1) 纳米磁铁矿通过改善厌氧体系 pH, 使系统更加稳定, 利于海藻发酵及产甲烷过程进行。

(2) 纳米磁铁矿可有效富集反应器内可参与 DIET 过程的电活性微生物, 如 *norank_Anaerolineaceae*、*norank_Bacteroidetes_vadinHA17*、*Leptolinea*、*Longilinea*、*Dechloromonas*、*unclassified_Anaerolineaceae* 等。

(3) 纳米磁铁矿可刺激并提高产甲烷菌细胞内 *mer* 和 *hdrABC* 功能基因丰度, 并促进胞内以 CO₂ 为底物的产甲烷过程。

参考文献 (References):

- [1] 白红春, 孙清, 葛慧, 等. 我国生物天然气产业发展现状 [J]. 中国沼气, 2017, 35(6): 33–36.
BAI Hongchun, SUN Qing, GE Hui, et al. Development of bio-methane industry in China[J]. China Biogas, 2017, 35(6): 33–36.
- [2] 刘嘉南. 我国发展生物天然气的潜力与措施 [J]. 畜牧与饲料科学, 2020, 41(2): 37–40.
LIU Jianan. Potential and measures developing biogas in China[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2020, 41(2): 37–40.
- [3] 邱灶杨, 张超, 陈海平, 等. 现阶段我国生物天然气产业发展现状及建议 [J]. 中国沼气, 2019, 37(6): 50–54.
QIU Zaoyang, ZHANG Chao, CHEN Haiping, et al. The present development situation of bio-natural gas industry in China[J]. China Biogas, 2019, 37(6): 50–54.
- [4] 杜珏, 张鸣鸣, 王惠乔. 碳中和背景下中国生物天然气产业发展与前景展望 [J]. 中国沼气, 2025, 43(2): 21–30.
DU Jue, ZHANG Mingming, WANG Huiqiao, et al. Current status and future prospects of China's biomethane industry in the context of carbon neutrality[J]. China Biogas, 2025, 43(2): 21–30.
- [5] 蔡黎, 王少楠, 王宏莉, 等. 生物天然气产品标准化现状探讨 [J]. 中国标准化, 2022(16): 104–111.
CAI Li, WANG Shaonan, WANG Hongli, et al. Discussion on standardization of bio natural gas product[J]. China Standardization, 2022(16): 104–111.
- [6] 杨兴盛, 王尚, 何晴, 等. 典型有机固废厌氧消化微生物研究现状与发展方向 [J]. 生物工程学报, 2021, 37(10): 3425–3438.
YANG Xingsheng, WANG Shang, HE Qing, et al. Microorganisms in the typical anaerobic digestion system of organic solid wastes: A review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(10): 3425–3438.
- [7] 吴爽, 丁巍巍, 刘瑞, 等. 大型海藻微波热解制氢特性研究 [J]. 低碳化学与化工, 2024, 49(1): 119–124+132.
WU Shuang, DING Weiwei, LIU Rui, et al. Study on characteristics of hydrogen production by microwave-assisted pyrolysis of macroalgae[J]. Low-Carbon Chemistry and Chemical Engineering, 2024, 49(1): 119–124+132.
- [8] 丁旻炜, 吴忆宁, MARIE M, 等. 海藻—接种液配比对海藻厌氧发酵产甲烷的影响 [J]. 环境污染与防治, 2019, 41(12): 1408–1412.
DING Minwei, WU Yining, MARIE M, et al. The effects of algae-inoculum ratios on methane production of seaweed by anaerobic fermentation[J]. Environmental Pollution & Control, 2019, 41(12): 1408–1412.
- [9] 王欣竹. 从工程微藻中提取制备生物柴油的研究进展 [J]. 当代化工研究, 2022(2): 162–164.
WANG Xinzhu. Research progress of biodiesel extraction from engineering microalgae[J]. Modern Chemical Research, 2022(2): 162–164.
- [10] 廖莎, 姚长洪, 师文静, 等. 光合微生物产氢技术研究进展 [J]. 当代石油石化, 2020, 28(11): 36–41.
LIAO Sha, YAO Changhong, SHI Wenjing, et al. Advancement of bio-hydrogen production from phototrophic microorganisms[J]. Petroleum & Petrochemical Today, 2020, 28(11): 36–41.
- [11] 张毅, 孔晓英, 孙永明, 等. 海藻资源能源转化技术研究进展 [J]. 现代化工, 2015, 35(8): 50–54.
ZHANG Yi, KONG Xiaoying, SUN Yongming, et al. Research progresses of energy conversion technologies for seaweed resources[J]. Modern Chemical Industry, 2015, 35(8): 50–54.
- [12] 王奉博. 基于水热碳化—厌氧消化的海藻资源化工工艺基础研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2021: 14–16.
WANG Fengbo. Basic research on algae resource utilization based on hydrothermal carbonization-anaerobic digestion[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2021: 14–16.
- [13] LYU Nan, ZHAO Lixin, WANG Ruming, et al. Novel strategy for relieving acid accumulation by enriching syntrophic associations of syntrophic fatty acid-oxidation bacteria and H₂/formate-scavenging methanogens in anaerobic digestion[J]. Bioresource Technology, 2020, 313: 123702.
- [14] ZHAO Zhiqiang, LI Yang, HE Jingyi, et al. Establishing direct interspecies electron transfer during laboratory-scale anaerobic digestion of waste activated sludge via biological ethanol-type fermentation pretreatment[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2018, 6(10): 13066–13077.
- [15] ZHAO Zhiqiang, LI Yang, QUAN Xie, et al. Towards engineering application: Potential mechanism for enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with different types of conductive materials[J]. Water Research, 2017, 115: 266–277.
- [16] HOLMES D E, ZHOU Jinjie, UEKI T, et al. Mechanisms for electron uptake by methanosarcina acetivorans during direct interspecies electron transfer[J]. mBio, 2021, 12(5): e02344–21.
- [17] LI Yang, LIU Meishan, CHE Xinrong, et al. Biochar stimulates growth of novel species capable of direct interspecies

- electron transfer in anaerobic digestion via ethanol-type fermentation[J]. *Environmental Research*, 2020, 189: 109983.
- [18] XU Hui, CHANG Jiali, WANG Han, et al. Enhancing direct interspecies electron transfer in syntrophic-methanogenic associations with (semi)conductive iron oxides: Effects and mechanisms[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 695: 133876.
- [19] ZHAO Zisheng, LI Yang, YU Qilin, et al. 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.
- [20] 董春雷. 铁/锰基导体材料对有机物厌氧降解的影响机制[D]. 大连: 大连理工大学, 2023: 49–50.
- DONG Chunlei. Influencing mechanism of Fe/Mn-based conductive materials on anaerobic degradation of organic matter[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2023: 49–50.
- [21] WANG Zhaokai, LIU Qinghua, YANG Zhiman. Nano magnetite-loaded biochar boosted methanogenesis through shifting microbial community composition and modulating electron transfer[J]. *Science of The Total Environment*, 2023, 861(25): 160597.
- [22] MARZIEH L, PARVANEH E A. New insights into controlling rapid combustion synthesis procedure: Shape-tailored Fe_3O_4 nanoparticles fabrication[J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2024(603): 172252.
- [23] LEE S H, KANG H J, KIM Y, et al. Different contribution of exoelectrogens in methanogenesis via direct interspecies electron transfer (DIET) by the different substrate in continuous anaerobic bioreactor[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 364: 128115.
- [24] HU Wen, JIN Hongyu, GAO Xiangyu, et al. Biochar derived from alkali-treated sludge residue regulates anaerobic digestion: Enhancement performance and potential mechanisms[J]. *Environmental Research*, 2024, 251: 118578.
- [25] FENG Yiwen, LU Jianping, SHEN Zhongjun, et al. Sequentially modified carbon felt for enhanced *p*-nitrophenol biodegradation through direct interspecific electron transfer[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 451: 131055.
- [26] DENG Pingping, YAN Xiaofan, LIU Ruixia, et al. Effect of cow dung on anaerobic digestion characteristics of poplar fuel ethanol wastewater[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2024, 14(2): 2033–2043.
- [27] LIANG Lianfu, SUN Cheng, JIN Zhen, et al. Magnetite-mediated electrically connected community for shortening startup of methane-dependent denitrification in a membrane biofilm reactor[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 428: 132004.
- [28] GUO Bing, ZHANG Yingdi, YU N, et al. Impacts of conductive materials on microbial community during syntrophic propionate oxidization for biomethane recovery[J]. *Water Environment Research*, 2021, 93(1): 84–93.
- [29] 齐全, 刘洪周, 刘海波, 等. 电化学厌氧消化关键代谢途径的通量与酶活性的相关性分析[J/OL]. 化学与生物工程: 1–7[2025-05-07]. <https://link.cnki.net/urlid/42.1710.TQ.20250122.1050.002>.
- QI Quan, LIU Hongzhou, LIU Haibo, et al. Correlation analysis between flux and enzyme activity of key metabolic pathways in electrochemical anaerobic digestion[J/OL]. *Chemistry & Bioengineering*: 1–7[2025-05-07]. <https://link.cnki.net/urlid/42.1710.TQ.20250122.1050.002>.
- [30] 陈畅, 李成. 生物化学中厌氧消化代谢途径的教学实践[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4765–4778.
- CHEN Chang, LI Cheng. Anaerobic digestion pathways in biochemistry: A teaching practice[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(12): 4765–4778.
- [31] WANG Lichen, MA Junyi, XING Wei, et al. Metagenomic insights towards understanding the role of riboflavin-loaded granular activated carbon and *Methanosarcina barkeri* co-addition in enhancing anaerobic digestion[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2025, 73: 107690.
- [32] EVANS P N, BOYD J A, LEU A O, et al. An evolving view of methane metabolism in the Archaea[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(4): 219–232.
- [33] SCHONE C, POEHLEIN A, ROTHER M. Genetic and physiological probing of cytoplasmic bypasses for the energy-converting *Methyltransferase Mtr* in *Methanosarcina acetivorans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89(7): e0216122.
- [34] 冯佳胤, 朱敏, 何艳. 土壤主要还原转化过程中微生物功能基因多样性研究进展[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2017, 43(6): 663–675.
- FENG Jiayin, ZHU Min, HE Yan. Key microbial functional genes and their diversity involved in soil typical reduction processes: A review[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2017, 43(6): 663–675.
- [35] 王宁, 李美, 李媛, 等. 乙醇发酵预处理耦合生物炭强化城镇有机固废厌氧产甲烷[J]. 能源环境保护, 2024, 38(5): 166–174.
- WANG Ning, LI Mei, LI Yuan, et al. Enhancing methane production during anaerobic digestion of municipal organic solid wastes by ethanol-type fermentation pretreatment coupled with biochar addition[J]. *Energy Environmental Protection*, 2024, 38(5): 166–174.
- [36] HOLMES D E, ROTARU A E, UEKI T, et al. Electron and proton flux for carbon dioxide reduction in *Methanosarcina barkeri* during direct interspecies electron transfer[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3109.
- [37] KHAIRUNISA B H, HERYAKUSUMA C, IKE K, et al. Evolving understanding of rumen methanogen ecophysiology[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1296008.
- [38] BRENNAN D, LIEBER D, WALTER M, et al. Mer overexpression in *Methanosarcina acetivorans* affects growth and methanogenesis during substrate adaptation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2025, 91(5): e00675–25.