

研究报告

以 pH 为扰动因子探究电化学厌氧消化产甲烷代谢通量与微生物的关系

刘洪周, 杨思霞, 王楠, 刘海波, 陈铁柱, 李建昌*

云南师范大学能源与环境科学学院, 云南 昆明 650500

刘洪周, 杨思霞, 王楠, 刘海波, 陈铁柱, 李建昌. 以 pH 为扰动因子探究电化学厌氧消化产甲烷代谢通量与微生物的关系[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2009-2021

Liu Hongzhou, Yang Sixia, Wang Nan, Liu Haibo, Chen Tiezhu, Li Jianchang. Exploring the relationship between methane flux and microorganisms in electrochemical anaerobic digestion system by using pH as a disturbance factor[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2009-2021

摘要:【背景】电化学厌氧消化(electrochemical anaerobic digestion, EAD)系统的代谢途径由具备不同功能的微生物所主导, 其代谢通量与功能微生物丰度、活性及群落结构相关。【目的】探究 EAD 产甲烷代谢通量与微生物的关系。【方法】采用代谢通量分析(metabolic flux analysis, MFA)方法, 以 pH 为扰动因子得到微生物群落与产甲烷通量的响应关系。【结果】pH 7.5 扰动时产甲烷通量最大为 0.3984 ± 0.0293 , 较对照组(pH 6.9)的 0.2974 ± 0.0127 和扰动组(pH 6.3)的 0.1365 ± 0.0120 分别提高了 25%和 65%。另外, 平均有 $33.8\% \pm 3.1\%$ 的氢气(通量)用于还原二氧化碳产甲烷和乙酸, 平均有 $21.0\% \pm 2.6\%$ 的乙酸(通量)转化为甲烷。此外, 产甲烷通量与 *Mariniphaga*、*Methanosaeta* 和 *Desulfomicrobium* 的丰度呈正相关, 与 *Sedimentibacter* 的丰度呈负相关且影响显著。【结论】在 EAD 产甲烷体系中产甲烷菌和产酸菌共存时, pH 值略大于 7.0 的环境有利于甲烷的生成, 改变 EAD 体系的 pH 可有效调控代谢产物的通量, 其通量大小受微生物丰度的影响较大。

关键词: 电化学厌氧消化; 代谢通量; pH; 微生物群落; 甲烷

基金项目: 国家自然科学基金(21968038)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (21968038)

*Corresponding author: E-mail: li.jianchang@aliyun.com

Received: 2021-10-06; Accepted: 2021-11-27; Published online: 2022-01-07

Exploring the relationship between methane flux and microorganisms in electrochemical anaerobic digestion system by using pH as a disturbance factor

LIU Hongzhou, YANG Sixia, WANG Nan, LIU Haibo, CHEN Tiezhu, LI Jianchang*

School of Energy and Environmental Science, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: [Background] The metabolic pathway of electrochemical anaerobic digestion (EAD) system is dominated by microorganisms with different functions, and the metabolic flux is related to the abundance, activity, and community structure of functional microorganisms. [Objective] To explore the relationship between methane flux and microorganisms in the EAD system. [Methods] We conducted the metabolic flux analysis by using pH as a disturbance factor. [Results] At pH 7.5, the maximum methane flux was 0.3984 ± 0.0293 , which was 25% and 65% higher than that 0.2974 ± 0.0127 in the control group (pH 6.9) and that 0.1365 ± 0.0120 in the disturbance group (pH 6.3), respectively. In addition, an average of $33.8\% \pm 3.1\%$ of hydrogen (flux) was used to reduce carbon dioxide to produce methane and acetic acid, and an average of $21.0\% \pm 2.6\%$ of acetic acid (flux) was converted into methane. The methane flux was positively correlated with the abundance of *Mariniphaga*, *Methanosaeta*, and *Desulfomicrobium*, while negatively correlated with that of *Sedimentibacter*. [Conclusion] In the EAD system with the coexistence of methane and acid-producing bacteria, a pH value slightly greater than 7.0 is conducive to the production of methane, and changing the pH value of the EAD system can regulate the metabolite flux by altering microbial abundance.

Keywords: electrochemical anaerobic digestion; metabolic flux; pH; microbial community; methane

电化学厌氧消化(electrochemical anaerobic digestion, EAD)的本质是电解辅助厌氧消化(anaerobic digestion, AD)产甲烷^[1],其目的是强化氢气还原二氧化碳途径,从而提高AD过程的甲烷转化率^[2],目前已成为AD领域的热点^[3-4]。在EAD代谢网络中,各代谢途径由不同功能微生物所主导,其通量值与功能微生物的丰度相关^[5],因此,可以通过代谢通量分析和微生物分析的方法明确产甲烷代谢通量与微生物之间的相互关系。

代谢通量分析(metabolic flux analysis, MFA)是分析碳通量分布模式和最大化产品产量(如有机酸、氨基酸、多糖和抗生素)的强有力

工具^[6],MFA的应用被证明有助于更好地探究微生物的新陈代谢^[7],为代谢工程分析代谢途径、优化细胞培养基及设计和优化生物过程提供分析方法。因MFA在拟稳态条件下分析,并且微生物的生化代谢反应按化学计量和质量平衡进行计算而被广泛应用^[8]。MFA技术已成功应用于细胞代谢、生物制药、系统代谢能力的分析。Huang等^[9]将MFA应用于负压发酵葡萄糖代谢的表征,结果表明降低发酵压力可将乙醇、丙酸和丁酸同时转化为乙酸,转化率分别为0.091、0.014和0.017 mol-醋酸/mol-葡萄糖。Gonzalez-Garcia等^[10]曾在混合培养体系中研究微生物降解葡萄糖制备氢气的方法,建立了较

完整的代谢网络,并计算出代谢网络的通量值。此外,赵学明等^[11]在国内首次采用 MFA 方法对厌氧消化过程进行通量研究,获得了黄原胶产胶期的通量分布并得到产率与呼吸熵之间的关系。在代谢通量研究中,MFA 技术可对体系在环境扰动后的代谢能力做出预测,能明确代谢产物的流量和流向^[12]。

pH 是保证 EAD 系统正常运行的关键因子,但不同功能的微生物仅在适合的 pH 范围内才能正常生长代谢^[13],如多数产甲烷菌适合的 pH 值范围是 7.14–8.20,并且 pH 值在 7.8 时活性最高^[14]。典型的例子是,Zhang 等^[15]证实了发酵液 pH 值为 7.0 以上时最有利于微生物的合成代谢,并且微生物对 pH 的变化较为敏感。本研究旨在以葡萄糖为底物,以 pH 为扰动因子,采用代谢通量分析的方法建立混合培养的 EAD 产甲烷代谢模型,阐释 pH 扰动对功能微生物的应激反应和关键代谢产物的净生成速率的影响,进而探究 EAD 产甲烷代谢通量与微生物之间的关系。

1 材料与方法

1.1 样品

实验采用以猪粪为底物驯化 3 个月后的

厌氧活性污泥为接种物。经测定,pH 值为 7.85,总固体为 16.11%,挥发性固体为 7.93%。

1.2 EAD 实验装置

EAD 反应器为有机玻璃制成的圆柱形单室反应器,主要由发酵瓶、排水集气装置、电极、电源、磁力搅拌器等部分组成,如图 1 所示。反应器有效容积为 400 mL,阳极为石墨电极(30 mm×30 mm×2 mm),阴极为纯铂电极(30 mm×30 mm×0.2 mm),电极间距为 3.0 cm 且对称放置,并浸没于本体溶液中,采用饱和 Ag/AgCl 为参比电极与阳极和阴极构成三电极测试体系。

1.3 实验设计

实验分为两个阶段,第一阶段为培养阶段,即 EAD 启动并达到拟稳态阶段;第二阶段为 pH 扰动阶段。

(1) 培养阶段

初始培养条件为:电解电压为 1.0 V,初始 pH 值为 7.12,温度为 30 °C。实验启动时,在反应器中接种 120 g 厌氧活性污泥、100 mL 缓冲溶液和 10 mL 微量元素液(缓冲溶液和微量元素液的配比参照文献[16])。底物葡萄糖加入量为 1.0 g,控制浓度为 2.5 g/L。培养过程中反应器均置于 30 °C 的恒温磁力搅拌器中。此后

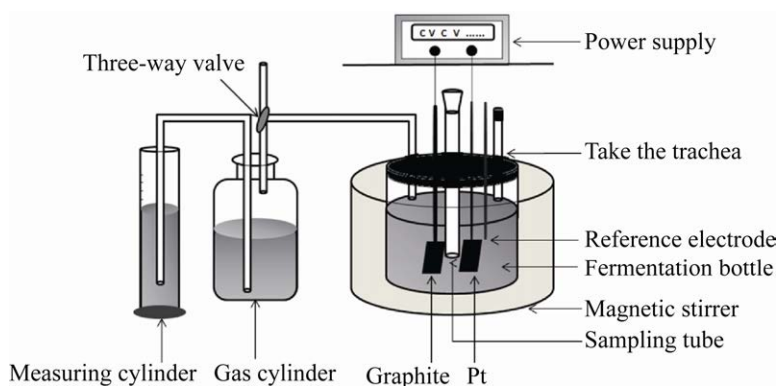


图 1 EAD 单池反应器

Figure 1 EAD single cell reactor.

每当体系的 pH>7.0 时进行补料, 每次补料量为 1.0 g 葡萄糖, 在此条件下培养至拟稳态。

(2) 扰动阶段

扰动 pH 值分别为 6.3 和 7.5, 对照组 pH 值为 6.9, 每组设置 3 个平行实验。实验中以体系达到拟稳态的各参数作为初态, 体系是否达到拟稳态通过电极电势、电流和 pH 的变化趋势来判断, 相关研究表明, 当电势差维持在 600 mV 左右, pH 值在 7.0 附近变化且有电流产生时体系已达到拟稳态^[17-19]。随后加入 1.0 g 葡萄糖运行 14 h 为终态(经 14 h 后 1.0 g 葡萄糖基本消耗殆尽); 然后根据 EAD 代谢网络模型分析检测网络中各代谢途径中的代谢产物(如甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、丙酮酸、戊酸、己酸、乙醇、丙醇、丁醇、CO₂、CH₄ 和 H₂)^[9,13]。

1.4 主要试剂和仪器

QIAamp DNA Mini Kit, 上海北诺生物科技有限公司; *Ex Taq* Enzyme、10×*Ex Taq* Buffer、dNTP Mixture、BSA 和引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司。宽屏无纸记录仪和数字万用表, 杭州联测自动化技术有限公司; 气相色谱仪、不锈钢填充色谱柱 TDX-01 (分析气体)、KB-FFAP 毛细管色谱柱(30.00 m×0.32 mm×0.25 μm) (分析有机酸)、RB-WAX 毛细管色谱柱(30.00 m×0.53 mm×1.00 μm) (分析醇), 浙江福立分析仪器有限公司; pH 计, 上海精密科学仪器有限公司。

1.5 分析方法

(1) pH、电流和电压

采用宽屏无纸记录仪记录电流和电压; 采用 pH 计, 每 24 h 测量一次 pH 值; 使用数字万用表, 每 24 h 测量一次电极电势。

(2) 气体成分

采用气相色谱仪检测气体成分。检测条件为: 检测器为热导检测器(thermal conductivity detector, TCD), TCD 温度为 200 °C, 柱温为

110 °C, 载气为高纯氮, 进样口温度为 200 °C, 进样量 200 μL。标准气体: CH₄ 55%, H₂ 3%, CO₂ 15%, N₂ 余量。

(3) 有机酸

采用气相色谱仪检测挥发酸, 检测器为氢火焰检测器。具体检测方法如文献[20]所述。

(4) 醇含量

通过气相色谱仪测定样品的醇含量。检测条件为: 宽量程火焰离子检测器, 载气为 N₂, 柱箱初始温度为 60 °C, 升温速度为 20 °C/min, 进样温度为 250 °C, 进样量为 2 μL。

(5) 构建 EAD 产甲烷代谢网络

本研究采用代谢通量分析软件(Cell Net Analyzer 2019.2)构建 EAD 产甲烷代谢模型并计算相关代谢产物的净生成速率, 表 1 为 EAD 产甲烷过程中的相关代谢反应式, 这些反应式在众多的研究中已得到证实^[9,13,21-22]。

(6) 16S rRNA 基因

扰动结束后, 使用 QIAamp DNA Mini Kit 提取微生物基因组 DNA, 委托诺禾致源基因公司进行测序分析。测序采用 Illumina MiSeq 技术进行, PCR 扩增区域为 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域, 所采用引物为 341F (5'-CCTAYG GGRBGCASCAG-3')和 806R (5'-GGACTACTAC NNGGGTATCTAAT-3')。PCR 反应体系(50 μL): *Ex Taq* Enzyme (5 U/μL) 0.3 μL, 10×*Ex Taq* Buffer 10 μL, dNTP Mixture 6 μL, BSA 0.6 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.6 μL, DNA 1 μL, 超纯水 30.9 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 27 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保持。

采用 QIIME 拼接、处理与分析测序获得的原始序列。采用 Trimmomatic-0.33 去除质量差的序列, 利用 Flash 软件合并所获得的 2 个 reads 集。最终, 任何包含 2 个及以上的错配碱基、

表 1 EAD 产甲烷代谢途径的反应式

Table 1 Reaction formula of EAD methanogenesis metabolic pathway

No.	Reaction formula	No.	Reaction formula
R1	$\text{Glu} + \text{PEP} = \text{G6P} + \text{Pyr}$	R20	$\text{Pyr} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{Ace} + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$
R2	$\text{NADH} + \text{Pyr} = \text{Lac} + \text{NAD}$	R21	$\text{But} + 2\text{H}_2\text{O} = 2\text{Ace} + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$
R3	$\text{Pyr} + \text{NADH} = \text{NAD} + \text{For} + \text{AcCoA}$	R22	$\text{Pyr} = \text{Pyr} (\text{ext})$
R4	$2\text{Fd} + \text{Pyr} + \text{CoA} = \text{CO}_2 + \text{AcCoA} + 2\text{FdH}$	R23	$\text{Eth} + \text{Pyr} = \text{Val} (\text{ext}) + \text{H}_2\text{O}$
R5	$2\text{Fd} + \text{NADH} = 2\text{FdH} + \text{NAD}$	R24	$\text{For} = \text{For} (\text{ext})$
R6	$\text{NADPH} + \text{NAD} = \text{NADH} + \text{NADP}$	R25	$\text{CO}_2 = \text{CO}_2 (\text{ext})$
R7	$2\text{NADH} = \text{H}_2 + 2\text{NAD}$	R26	$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 = \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$
R8	$2\text{FdH} = \text{H}_2 + 2\text{Fd}$	R27	$\text{H}_2 = \text{H}_2 (\text{ext})$
R9	$\text{Lac} = \text{Lac} (\text{ext})$	R28	$2\text{AcCoA} + \text{H}_2 = \text{Pro} (\text{ext}) + 2\text{CoA} + \text{CO}_2$
R10	$\text{Lac} + \text{NADH} = \text{Pyr} + \text{NAD}$	R29	$\text{Ace} = \text{CO}_2 + \text{CH}_4$
R11	$\text{For} = \text{CO}_2 + \text{H}_2$	R30	$\text{Ace} = \text{Ace} (\text{ext})$
R12	$\text{AcCoA} + \text{ADP} + \text{iP} = \text{ATP} + \text{Ace} + \text{CoA}$	R31	$\text{Eth} = \text{Eth} (\text{ext})$
R13	$\text{AcCoA} + 2\text{NADH} = \text{Eth} + \text{CoA} + 2\text{NAD}$	R32	$\text{But} + \text{Eth} = \text{Hex} (\text{ext}) + \text{H}_2\text{O}$
R14	$2\text{AcCoA} + \text{NADH} = \text{CoA} + \text{H}_2\text{O} + \text{CroCoA} + \text{NAD}$	R33	$\text{But} = \text{But} (\text{ext})$
R15	$\text{CroCoA} + 2\text{Fd} + \text{NADH} = \text{ButCoA} + 2\text{FdH} + \text{NAD}$	R34	$\text{But} + 2\text{NADH} = \text{But} (\text{ext}) + \text{CoA} + 2\text{NAD}$
R16	$\text{CroCoA} + \text{NADH} = \text{ButCoA} + \text{NAD}$	R35	$\text{Pyr} = \text{Pyr} (\text{ext})$
R17	$\text{ButCoA} + \text{ADP} + \text{iP} = \text{But} + \text{ATP} + \text{CoA}$	R36	$\text{CH}_4 = \text{CH}_4 (\text{ext})$
R18	$2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 = \text{Ace} + 2\text{H}_2\text{O}$	R37	$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- = \text{H}_2$
R19	$\text{Eth} + 2\text{H}_2\text{O} = 4\text{H}^+ + \text{Ace}$		

Note: Glu: Glucose; PEP: Phosphoenolpyruvate; G6P: Glucose 6 phosphate; Pyr: Pyruvate; NADH: Reduced coenzyme I; NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide; Lac: Lactic acid; For: Formic acid; AcCoA: Acetyl coenzyme A; CoA: Coenzyme A; Fd: Ferredoxin; NADP: Oxidized coenzyme II; Ace: Acetic acid; Eth: Ethanol; CroCoA: Crotonyl-CoA; ButCoA: Butyryl-CoA; iP: PO_4^- ; But: Butyric acid; Val: Valeric acid; Hex: Hexanoic acid; Pro: Propionic acid; ext: Means extracellular.

质量分值低于 20、包含模糊碱基、序列长度短于 200 bp 均被过滤掉。基于 OTU 来计算每个样品的丰度信息,并对相似性 97%的 OTU 进行聚类分析,采用 Mothur V.1.34.0 计算每个样本的 OTU。此外,选取丰度前 20 的微生物基于 R 语言的 Psych、Pheatmap 和 Reshape2 包计算物种相对丰度与代谢物之间的相关性和显著性,并通过 R 代码输出物种相对丰度与代谢物之间的关系热图。

2 结果与讨论

2.1 关键代谢产物的变化特征

根据 MFA 的原理实施扰动时要求体系达到拟稳态。为判断体系是否达到拟稳态,实验以电极电势、电流和 pH 的变化趋势来判断。电极电势变化如图 2A 所示,随着 EAD 体系的

培养进程,阴极电势和阳极电势逐渐降低,而电流和 pH 的变化呈锯齿形如图 2B 所示。培养至 20 d 后电势差最终维持在 (0.600 ± 0.005) V, pH 值在 6.8–7.2 范围内变化,电流平均值为 3 mA,其原因与微生物在阳极表面的附着有关^[19,23]。培养阶段的电极电势、电流和 pH 的变化均在 EAD 体系正常运行的参数范围内^[24],表明 EAD 体系中阳极生物膜基本形成且微生物的生长代谢达到动态平衡,已满足 MFA 的分析要求。

扰动 14 h 后提取本体溶液进行代谢产物检测并计算净生成速率,结果如表 2 所示。pH 扰动后丙酸、甲烷和氢气的净生成速率均发生显著变化($P < 0.01$),其中丙酸的净生成速率在 pH 值为 6.3 和 7.5 扰动时分别为 0.1348 ± 0.0146 和 0.1713 ± 0.0122 ,较对照组 (pH 6.9) 的

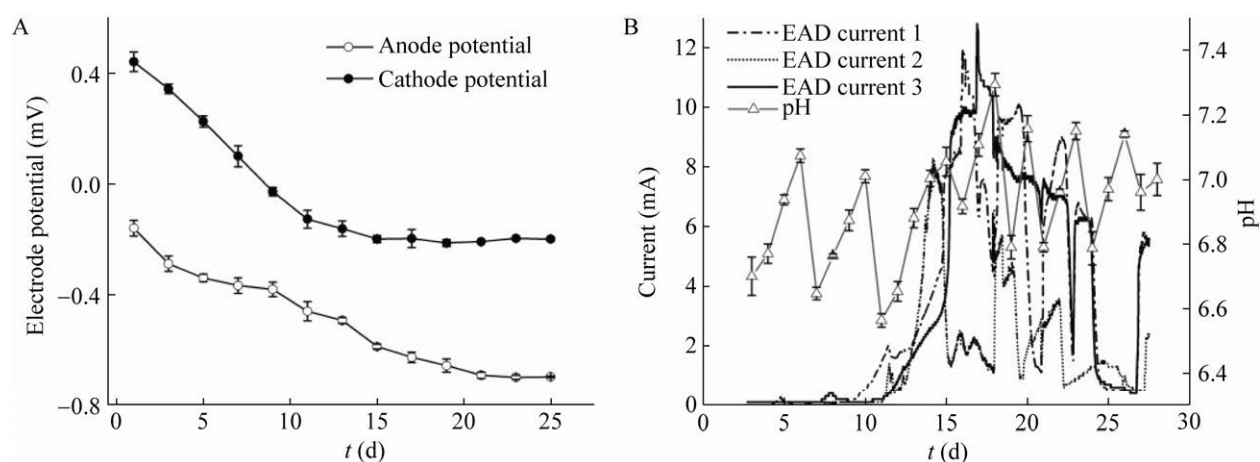


图2 培养阶段的电极电势、电流和 pH 随时间的变化曲线

Figure 2 The change curve of electrode potential, current and pH value over time in the culture stage.

表2 pH 扰动下关键代谢物净生成速率

Table 2 Net production rate of key metabolites under pH disturbance (mmol/(L·h))

Metabolites	Experimental group			<i>P</i> value
	Control group (pH 6.9)	pH 6.3 negative disturbance	pH 7.5 forward disturbance	
Glucose	1.127 4±0.015 4	1.127 4±0.007 9	1.127 4±0.001 8	
Formic acid	0.003 2±0.000 0	0.015 1±0.005 8	0.008 3±0.003 2	*
Acetic acid	0.664 0±0.195 0	0.751 1±0.144 0	0.638 3±0.078 3	
Propionic acid	0.106 1±0.009 6	0.134 8±0.014 6	0.171 3±0.012 2	**
Butyric acid	0.418 0±0.033 5	0.495 2±0.030 3	0.428 6±0.026 1	*
Lactic acid	0.010 7±0.004 6	0.018 8±0.003 1	0.014 0±0.006 7	
Pyruvate	0.015 6±0.003 7	0.037 6±0.018 6	0.028 1±0.004 2	
Valeric acid	0.023 0±0.010 7	0.026 9±0.013 9	0.021 9±0.0087	
Caproic acid	0.000 0±0.000 0	0.000 0±0.000 0	0.000 0±0.000 0	
Ethanol	0.017 3±0.001 4	0.019 7±0.006 1	0.006 3±0.001 8	*
Propanol	0.000 0±0.000 0	0.000 0±0.000 0	0.000 0±0.000 0	
Butanol	0.000 0±0.000 0	0.000 0±0.000 0	0.000 0±0.000 0	
CO ₂	0.225 8±0.022 9	0.225 8±0.037 6	0.279 6±0.007 1	
CH ₄	0.297 4±0.012 7	0.136 5±0.012 0	0.398 4±0.029 3	**
H ₂	0.028 1±0.003 1	0.000 6±0.000 4	0.004 2±0.001 4	**

Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

0.106 1±0.009 6 分别提高了 27%和 61%。甲烷的净生成速率在 pH 为 6.3 扰动时较对照组降低了 53%，在 pH 值为 7.5 扰动时较对照组提高了 35%；而氢气的净生成速率无论在 pH 正向扰动还是负向扰动均降低，分别较对照组的 0.028 1±0.003 1 降低了 97%和 85%；此外，pH

扰动后甲酸、丁酸和乙醇的净生成速率也发生了相应变化($P<0.05$)。其本质是 EAD 体系在 pH 扰动后相关微生物做出不同响应，进而导致不同功能微生物所控制的代谢途径的通量发生了变化^[25-26]，表明通过 pH 扰动可调控相关代谢物的净生成速率。

2.2 EAD 代谢通量的变化特征

根据代谢产物的净生成速率,通过代谢通量分析软件(Cell Net Analyzer 2019.2)计算 EAD 产甲烷代谢通量分布信息,结果如图 3 所示, EAD 产甲烷代谢途径包括氢还原二氧化碳途径(R26)和乙酸转化途径(R29)。在扰动组 pH 值为 6.3 和 7.5 及对照组 pH 值为 6.9 的条件下,氢还原二氧化碳产甲烷分别占 43.9%、21.0% 和 36.9%,乙酸转化产甲烷分别占 56.1%、79.0% 和 63.1%, EAD 体系中的甲烷主要由乙酸转化途径得到。此外, pH 值为 6.3 的扰动组中产甲烷途径(R36)的通量仅为 0.1365 ± 0.0120 , 较对照组的 0.2974 ± 0.0127 和 pH 7.5 扰动组的 0.3984 ± 0.0293 分别降低了 54.1% 和 65.7%。其原因可能是 pH 值超出了产甲烷菌代谢的适宜 pH 值范围 7.14–8.20^[27], 产甲烷菌活性受到酸抑制,致使产甲烷通量低至 0.1365, 乙酸通量(R30)升高至 0.7511, 有部分乙酸未被产甲烷菌代谢。

在图 3 的 EAD 产氢和产乙酸途径中, 数据显示, pH 扰动后 NAD 和 NADH 平衡调节产氢通量(R7)的平均值为 0.4077, 阴极产氢通量(R37)的平均值为 2.78, 是 R7 途径通量的 6.8 倍。因此, 平均有 85.5% 的氢气由 EAD 阴极产生。特殊的是, 释放出体系外的氢气通量(R27)却接近于零, 其原因与耗氢节点有关^[28], 产甲烷代谢节点和产乙酸代谢节点均是关键的耗氢节点, 在这两个代谢节点处, pH 值为 6.3、6.9 和 7.5 时分别有 45.2%、34.9% 和 13.0% 的氢气(通量)转化为乙酸(通量), 分别有 1.2%、4.2% 和 3.0% 的氢气(通量)转化为甲烷(通量)。因此, 在 EAD 中氢气还原二氧化碳产乙酸是主要的耗氢途径, 其通量受耗氢产乙酸菌和氢营养型产甲烷菌丰度的影响^[29]。乙酸可由 R12、R18、R19、R20 和 R21 途径得到, pH 值为 6.3、6.9 和 7.5 时分别有 9.2%、22.5% 和 33.2% 的乙酸转化为

甲烷, 仍约有 2/3 的乙酸累积在本体溶液中, 随 pH 正向扰动乙酸转化途径(R29)的通量渐增, 其原因与产甲烷菌的代谢活性增强有关^[6]。结果表明, 在 EAD 中氢气、乙酸和甲烷通量间的平衡关系受 pH 的影响, 同时氢气转化为乙酸或甲烷的再分配关系受 pH 和功能微生物代谢活性及丰度的相互制约, 因此, 调控制约因素的相互关系是控制目标产物净生成速率的重要手段。

2.3 微生物群落的变化特征

在表 3 微生物样品分组信息中, A6.3、A6.9 和 A7.5 分别为 pH 6.3、pH 6.9 和 pH 7.5 的阳极生物膜组, 它们的 OTU 数目分别为 959、2 069 和 2 066 (图 4A)。B6.3、B6.9 和 B7.5 分别为 pH 6.3、pH 6.9 和 pH 7.5 的本体溶液组, 它们的 OTU 数目分别为 1 913、1 305 和 1 147 (图 4B)。显然 pH 扰动下生物群落变化显著($P < 0.05$), 随 pH 正向扰动阳极生物膜物种越丰富, 而本体溶液中物种丰富度却减少, 这种 OTU 的独特差异归因于 EAD 中 pH 扰动对微生物群落的影响, 即“适者生存”。

属水平的相对丰度如图 5 所示。三氯单胞菌(*Trichloromonas*)、梭菌(*Clostridium*)、紫单胞菌(*Proteiniphilum*)和单胞菌(*Syntrophomonas*)为阳极生物膜中的优势菌属, 而毛球菌(*Trichococcus*)、*Clostridium*、*Proteiniphilum* 和拟杆菌(*DMER64*)为本体溶液中的优势菌属。数据显示, 阳极生物膜和本体溶液中优势菌群差异主要由 *Trichloromonas* 和 *Trichococcus* 的丰度引起。*Trichloromonas* 仅在阳极生物膜上大量富集, 而本体溶液中的相对丰度约为零。丰度的变化与代谢通量的关系如表 4 所示, 阴极产氢通量(R37)存在 pH 6.3 (2.9270) > pH 7.5 (2.7732) > pH 6.9 (2.6398) 的关系, 与 *Trichloromonas* 相对丰度的 pH 6.3 (49.3%) > pH 7.5 (38.3%) > pH 6.9 (26.6%)

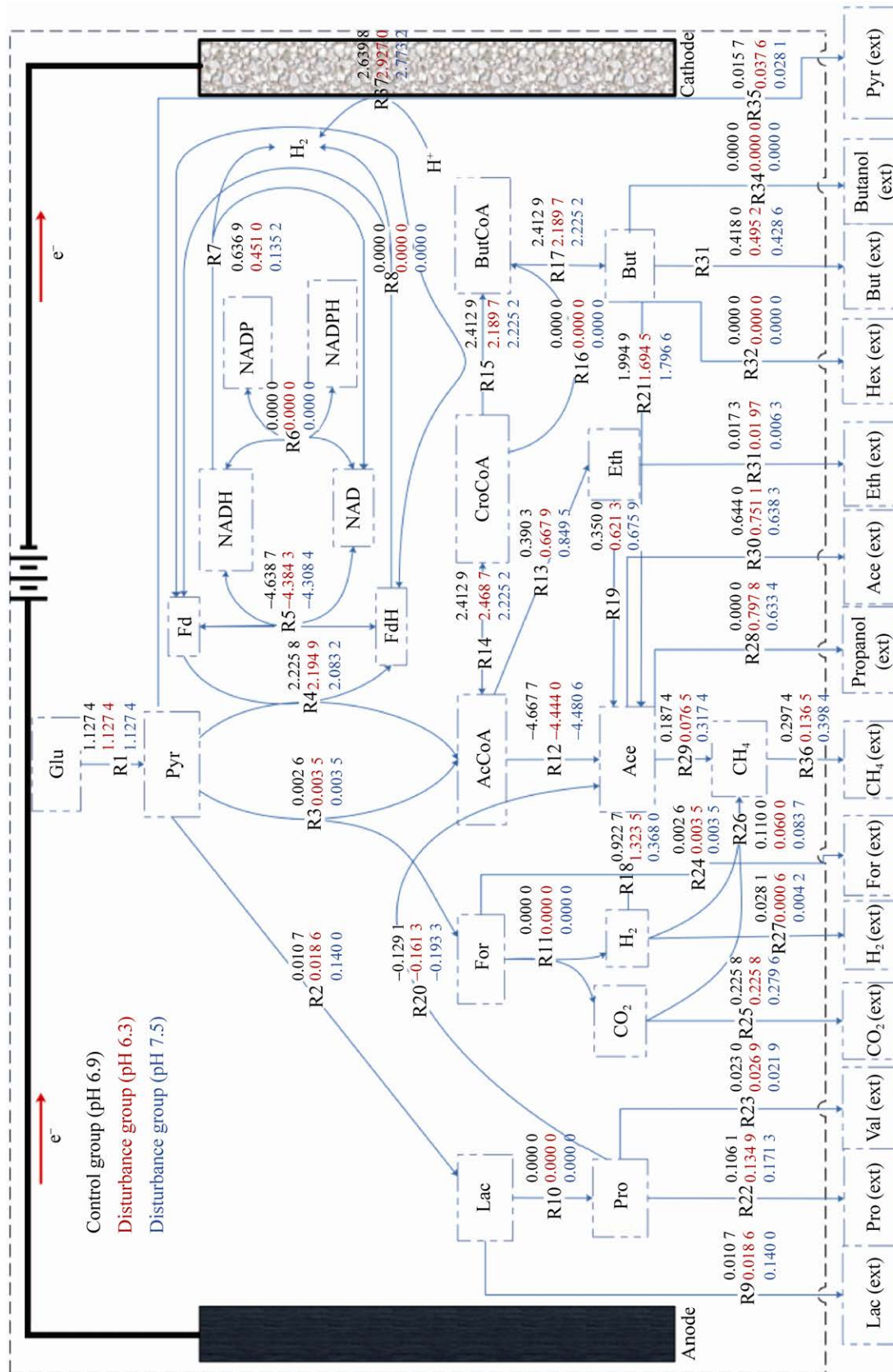


图3 pH 扰动的 EAD 产甲烷代谢通量分布图

Figure 3 Distribution diagram of EAD methanogenesis metabolic flux with pH perturbation.

表 3 微生物样品分组信息

Table 3 Grouping information of microbial samples

Sample	Anode biofilm	Bulk solution
End of training	S	BS
pH 6.9	A6.9	B6.9
pH 6.3	A6.3	B6.3
pH 7.5	A7.5	B7.5

的变化特征相一致, 表明阴极产氢通量(R37)与 *Trichloromonas* 的相对丰度密切相关, 因此推测 *Trichloromonas* 可能是与 EAD 阴极产氢通量相关的特征微生物。

乙酸是产甲烷的主要来源, 产乙酸菌相对丰度是影响产甲烷通量的关键因素^[22,30]。以乙酸为代谢节点, *Proteiniphilum*、*Clostridium* 和

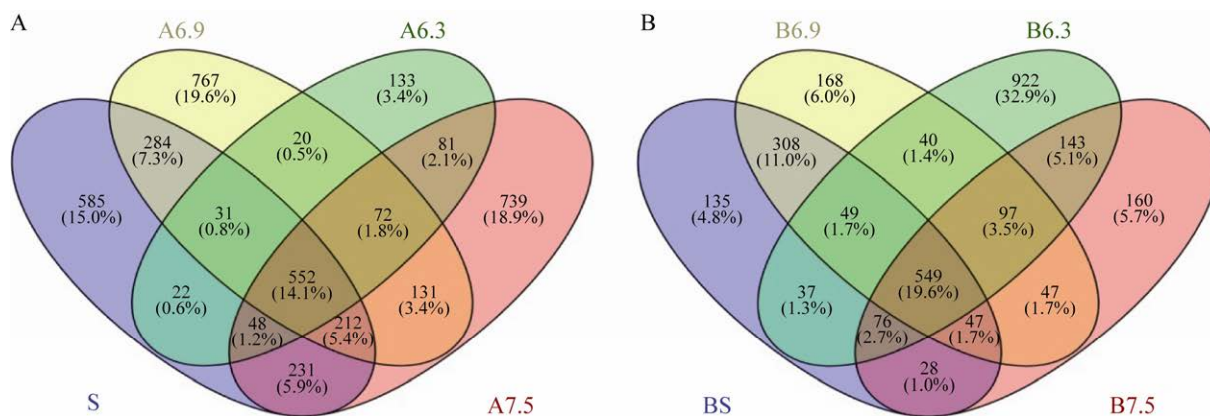


图 4 阳极生物膜微生物(A)和发酵液微生物(B)的 OTU Venn 图

Figure 4 The OTU Venn diagram of the anode biofilm microorganisms (A) and the fermentation broth microorganisms (B).

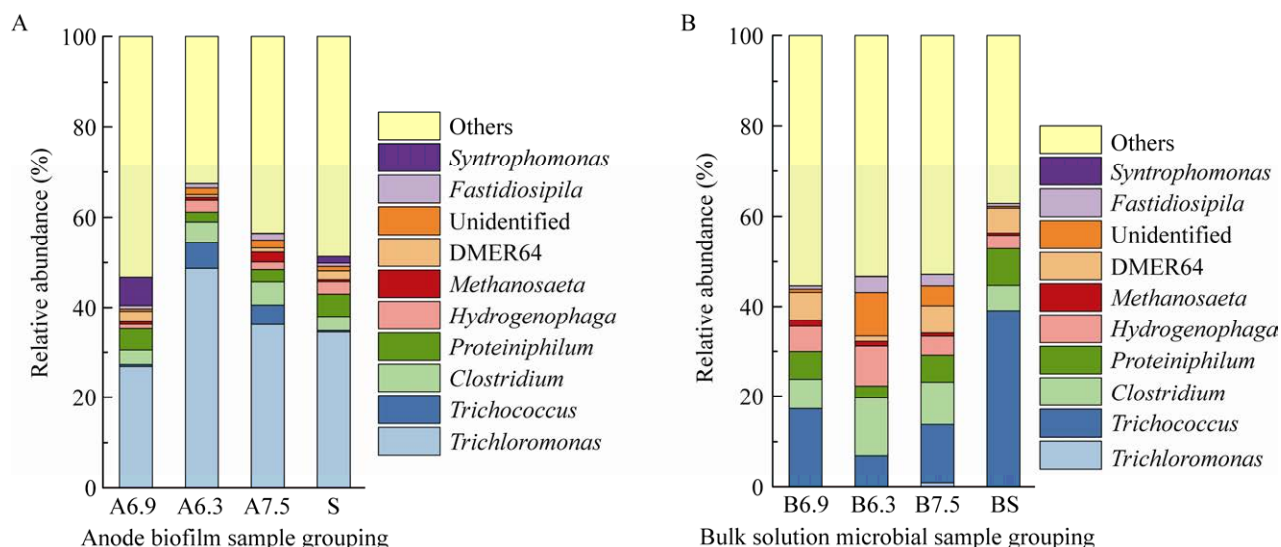


图 5 微生物属水平的相对丰度

Figure 5 Relative abundance at the level of microbial genera.

表 4 氢气通量(R37)与 *Trichloromonas* 相对丰度的变化特征

Table 4 Variation characteristics of hydrogen flux (R37) and relative abundance of *Trichloromonas*

Group	Hydrogen flux (mmol/(L·h))	<i>Trichloromonas</i> relative abundance (%)
pH 6.3	2.927 0	49.3
pH 6.9	2.639 8	26.6
pH 7.5	2.773 2	38.3

Trichococcus 是本体溶液中产乙酸相关的优势菌属, 其总相对丰度与总乙酸通量(R29+R30)的关系如表 5 所示。总乙酸通量存在 pH 6.3 (0.827 6)<pH 6.9 (0.831 4)<pH 7.5 (0.966 7)的关系, 与总相对丰度 pH 6.3 (35%)<pH 6.9 (37%)<pH 7.5 (40%)的变化特征相一致。然而在本体溶液中并未检测到大量的产甲烷菌存在, 产甲烷菌丰度较小也导致体系中转化为甲烷的乙酸通量较小, 仅占总乙酸通量的 21.6% (平均值)。此外, 无论是阳极生物膜还是本体溶液都存在梭菌属、甲烷鬃菌属、噬氢菌属和噬蛋白菌属等。

2.4 微生物丰度与代谢产物净生成速率的关系

如图 6 所示, 采用 $P<0.01$ 且相关系数大于 0.6 或小于 0.6 的数据进行讨论。甲烷鬃菌(*Methanosaeta*)、脱硫弧菌(*Desulfomicrobium*)、海藻菌(*Mariniphaga*)和沉积杆菌(*Sedimentibacter*)的相对丰度对产甲烷通量有显著影响, 其中甲烷通量与 *Methanosaeta*、*Desulfomicrobium*、*Mariniphaga* 的相对丰度呈正

表 5 乙酸通量(R29+R30)及其相关微生物

Table 5 Acetic acid flux (R29+R30) and related microorganisms

Group	Acetic acid flux (mmol/(L·h))	Relative abundance (%)
pH 6.3	0.827 6	35
pH 6.9	0.831 4	37
pH 7.5	0.966 7	40

相关, 与 *Sedimentibacter* 的丰度呈负相关。然而产甲烷通量受代谢网络中乙酸通量及氢气通量等多个代谢环节的影响^[31], 乙酸通量与 *Proteiniphilum*、发酵单胞菌(*Fermentimonas*)、理研菌(*Petrimonas*)和 *Methanosaeta* 的丰度呈正相关, 但影响不显著, 乙酸通量多受产氢产乙酸菌或同型产乙酸菌的影响。 *Trichococcus*、*Proteiniphilum*、*Fermentimonas*、*Petrimonas*、硬毛球菌(*Fastidiosipila*)、热杆菌(*Turicibacter*)、硫杆菌(*Thiobacillus*)、噬氢菌(*Hydrogenophaga*)、*Clostridium* 和梭菌(*Tuzzerella*)的丰度对氢气通量有显著影响, 其中氢气通量与 *Trichococcus*、*Proteiniphilum*、*Fermentimonas* 和 *Petrimonas* 的丰度呈正相关, 与 *Fastidiosipila*、*Turicibacter*、*Thiobacillus*、*Hydrogenophaga*、*Clostridium* 和 *Tuzzerella* 的丰度呈负相关, 与氢气通量相关的微生物多为如 *Hydrogenophaga* 和 *Clostridium* 等电活性微生物^[32-33]。数据表明不同微生物影响不同代谢物的通量, 其中影响产氢通量和产乙酸通量的物种具有相似性, 多为拟杆菌、梭菌、假单胞菌和厚壁菌。

3 结论

在 EAD 中, 甲烷的净生成速率在 pH 6.3 扰动时较对照组降低了 53%, 在 pH 7.5 扰动时较对照组提高了 35%。平均有 85.5%的氢气来源于 EAD 阴极还原反应, 而且平均有 31.0%的氢气用于还原二氧化碳产乙酸, 平均有 2.8%的氢气用于还原二氧化碳产甲烷, 平均有 66.1%的甲烷由乙酸转化途径得到。此外, pH 值为 6.3 时, 产甲烷菌活性受抑制是产甲烷通量低至 0.136 5 的原因, 而产甲烷菌的相对丰度较小致使乙酸转化为甲烷的量仅占总乙酸通量的 21.6% (平均值), *Methanosaeta*、*Desulfomicrobium*、*Mariniphaga* 和 *Sedimentibacter* 的丰度对产甲烷

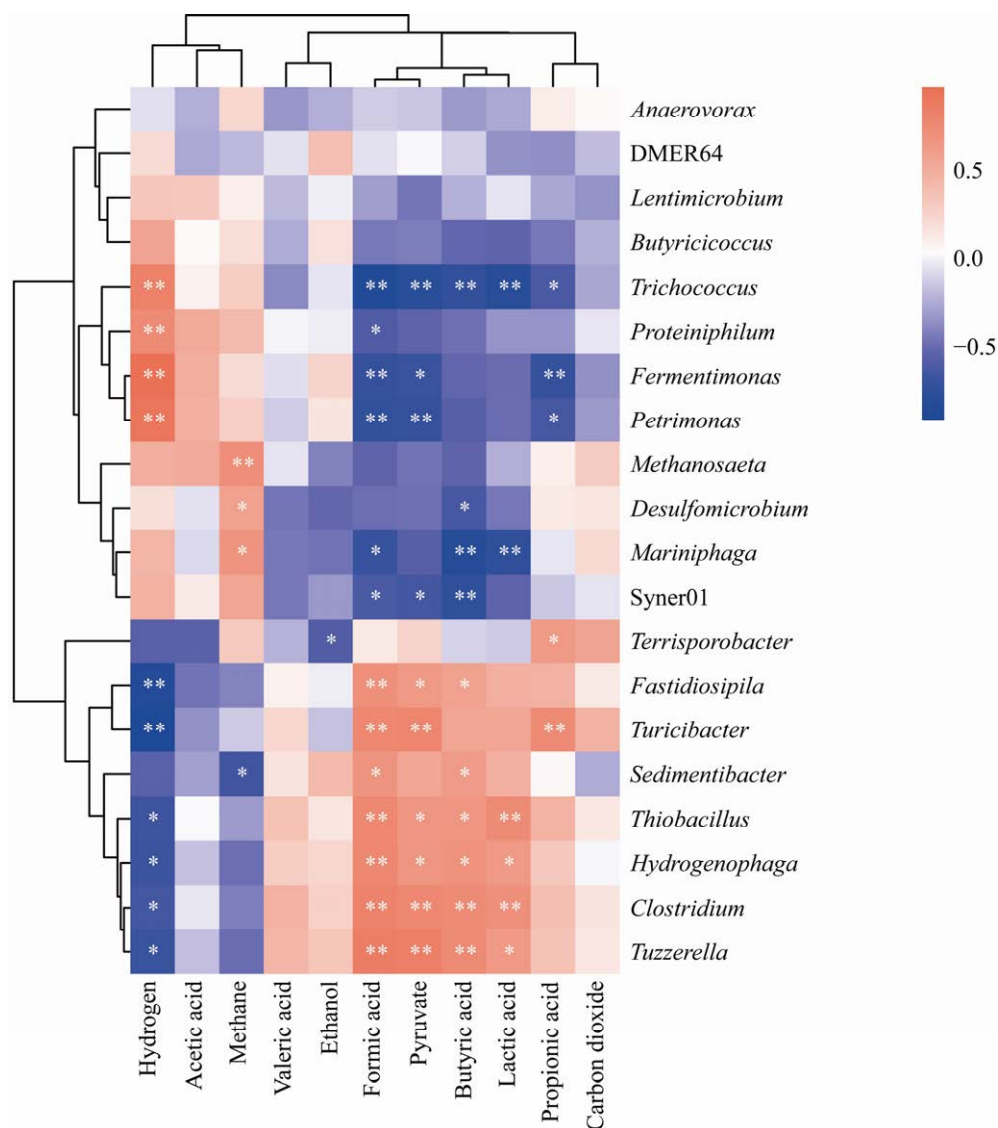


图 6 物种与代谢产物的相关性及其显著性分析热图

Figure 6 Correlation and significance analysis heatmap of species and metabolites.

通量有显著影响, 其中产甲烷通量与 *Methanosaeta*、*Desulfomicrobium* 和 *Mariniphaga* 的丰度呈正相关, 与 *Sedimentibacter* 的丰度呈负相关。然而影响产乙酸通量的微生物与影响产氢气通量的微生物具有相似性。表明 EAD 体系中产甲烷菌和产酸菌共存时 pH 值略大于 7.0 的环境有利于甲烷的生成且氢气的产生强化了氢气还原二氧化碳产乙酸的途径。

REFERENCES

- [1] 刘海波, 龙宪钢, 许坤德, 郑金柱, 李建昌. 底物浓度和水力滞留时间对电化学厌氧消化的影响[J]. 现代化工, 2021, 41(7): 149-157
Liu HB, Long XG, Xu KD, Zheng JZ, Li JC. Influence of substrate concentration and hydraulic retention time on electrochemical anaerobic digestion[J]. Modern Chemical Industry, 2021, 41(7): 149-157 (in Chinese)
- [2] 刘海波, 龙宪钢, 许坤德, 郑金柱, 李建昌. 电压和电流对连续电化学厌氧消化的影响[J]. 应用化工,

- 2021, 50(8): 2098-2107
- Liu HB, Long XG, Xu KD, Zheng JZ, Li JC. Effects of voltage and current on electrochemical anaerobic digestion[J]. Applied Chemical Industry, 2021, 50(8): 2098-2107 (in Chinese)
- [3] Jung S, Lee J, Park YK, Kwon EE. Bioelectrochemical systems for a circular bioeconomy[J]. Bioresource Technology, 2020, 300: 122748
- [4] Zou SQ, He Z. Efficiently “pumping out” value-added resources from wastewater by bioelectrochemical systems: a review from energy perspectives[J]. Water Research, 2018, 131: 62-73
- [5] Park GW, Kim I, Jung K, Seo C, Han JI, Chang HN, Kim YC. Enhancement of volatile fatty acids production from rice straw via anaerobic digestion with chemical pretreatment[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(8): 1623-1627
- [6] Chaganti SR, Kim DH, Lalman JA. Flux balance analysis of mixed anaerobic microbial communities: effects of linoleic acid (LA) and pH on biohydrogen production[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2011, 36(21): 14141-14152
- [7] Fazenda ML, Dias JML, Harvey LM, Nordon A, Edrada-Ebel R, Littlejohn D, McNeil B. Towards better understanding of an industrial cell factory: investigating the feasibility of real-time metabolic flux analysis in *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 51
- [8] Antoniewicz MR. A guide to metabolic flux analysis in metabolic, engineering: methods tools and applications[J]. Metabolic Engineering, 2021, 63: 2-12
- [9] Huang JL, Hou JY, Li LG, Wang YY. Flux balance analysis of glucose degradation by anaerobic digestion in negative pressure[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2020, 45(51): 26822-26830
- [10] Gonzalez-Garcia RA, Aispuro-Castro R, Salgado-Manjarrez E, Aranda-Barradas J, Garcia-Peña EI. Metabolic pathway and flux analysis of H₂ production by an anaerobic mixed culture[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2017, 42(7): 4069-4082
- [11] 赵学明, 马红武, 唐寅杰. 应用代谢通量法分析黄原胶发酵实验数据[J]. 高校化学工程学报, 1997, 11(4): 59-64
- Zhao XM, Ma HW, Tang YJ. Data analysis of xanthan fermentation process using metabolic flux analysis method[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 1997, 11(4): 59-64 (in Chinese)
- [12] Lauwers J, Appels L, Thompson IP, Degreè J, Van Impe JF, Dewil R. Mathematical modelling of anaerobic digestion of biomass and waste: power and limitations[J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2013, 39(4): 383-402
- [13] Callejas C, Fernández A, Passeggi M, Wenzel J, Bovio P, Borzacconi L, Etchebehere C. Microbiota adaptation after an alkaline pH perturbation in a full-scale UASB anaerobic reactor treating dairy wastewater[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, 42(12): 2035-2046
- [14] 赵维鑫, 黄志勇, 黄津辉, 杨晨, 王波, 杨莎莎. 厌氧消化酸抑制研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3442-3450
- Zhao WX, Huang ZY, Huang JH, Yang C, Wang B, Yang SS. Research progress in acid inhibition in anaerobic digestion[J]. Microbiology China, 2020, 47(10): 3442-3450 (in Chinese)
- [15] Zhang WL, Li LT, Xing WL, Chen B, Zhang L, Li AM, Li RD, Yang TH. Dynamic behaviors of batch anaerobic systems of food waste for methane production under different organic loads, substrate to inoculum ratios and initial pH[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 128(6): 733-743
- [16] 许坤德, 李建昌, 邵琼丽, 龙宪钢, 刘海波. 初始 pH 值对 MEC 阳极膜的产氢性能和微生物群落的影响[J]. 化学研究与应用, 2020, 32(12): 2224-2230
- Xu KD, Li JC, Shao QL, Long XG, Liu HB. Effect of initial pH on the performance and microbial community of MEC anode biofilms[J]. Chemical Research and Application, 2020, 32(12): 2224-2230 (in Chinese)
- [17] Hirose A, Kasai T, Aoki M, Umemura T, Watanabe K, Kouzuma A. Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways[J]. Nature Communications, 2018, 9: 1083
- [18] Hernández-García KM, Cercado B, Rivero EP, Rivera FF. Theoretical and experimental evaluation of the potential-current distribution and the recirculation flow rate effect in the performance of a porous electrode microbial electrolysis cell (MEC)[J]. Fuel, 2020, 279: 118463
- [19] Zeppilli M, Cristiani L, Dell’Armi E, Villano M. Potentiostatic vs galvanostatic operation of a microbial electrolysis cell for ammonium recovery and biogas upgrading[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 167: 107886
- [20] 杨仁灿, 李建昌, 孙和临, 杨梅宏. 气相色谱法测定 MEC 反应液中挥发性有机酸[J]. 化学研究与应用, 2017, 29(7): 962-967

- Yang RC, Li JC, Sun HL, Yang MH. Analysis of VFA contained in the reaction solution of MEC by gas chromatography[J]. Chemical Research and Application, 2017, 29(7): 962-967 (in Chinese)
- [21] Rafieenia R, Pivato A, Schievano A, Lavagnolo MC. Dark fermentation metabolic models to study strategies for hydrogen consumers inhibition[J]. Bioresource Technology, 2018, 267: 445-457
- [22] Zhou MM, Yan BH, Wong JWC, Zhang Y. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: a mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways[J]. Bioresource Technology, 2018, 248: 68-78
- [23] Zhang WL, Xing WL, Li RD. Real-time recovery strategies for volatile fatty acid-inhibited anaerobic digestion of food waste for methane production[J]. Bioresource Technology, 2018, 265: 82-92
- [24] Wang K, Sheng YX, Cao HB, Yan KP, Zhang Y. Impact of applied current on sulfate-rich wastewater treatment and microbial biodiversity in the cathode chamber of microbial electrolysis cell (MEC) reactor[J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 307: 150-158
- [25] Quirós M, Martínez-Moreno R, Albiol J, Morales P, Vázquez-Lima F, Barreiro-Vázquez A, Ferrer P, Gonzalez R. Metabolic flux analysis during the exponential growth phase of *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentations[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71909
- [26] Rafieenia R, Chaganti SR. Flux balance analysis of different carbon source fermentation with hydrogen producing *Clostridium butyricum* using cell net analyzer[J]. Bioresource Technology, 2015, 175: 613-618
- [27] Khanal SK. Anaerobic biotechnology for bioenergy production[M]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2008
- [28] Çakır T, Arga KY, Altıntaş MM, Ülgen KÖ. Flux analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G utilizing starch for optimal ethanol production[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(12): 2097-2108
- [29] Rodríguez-Abalde Á, Guivernau M, Prenafeta-Boldú FX, Flotats X, Fernández B. Characterization of microbial community dynamics during the anaerobic co-digestion of thermally pre-treated slaughterhouse wastes with glycerin addition[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, 42(7): 1175-1184
- [30] Cardeña R, Valdez-Vazquez I, Buitrón G. Effect of volatile fatty acids mixtures on the simultaneous photofermentative production of hydrogen and polyhydroxybutyrate[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2017, 40(2): 231-239
- [31] 王思祺. 微生物电化学技术处理磺胺甲恶唑和萘普生共存污染[D]. 兰州: 西北师范大学硕士学位论文, 2020
- Wang SQ. Treatment of coexistence pollution sulfamethoxazole and naproxen by microbial electrochemical technology[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Northwest Normal University, 2020 (in Chinese)
- [32] 李建昌, 张无敌, 尹芳, 徐锐, 陈玉保. 利用电化学活跃微生物协助电解发酵产氢[J]. 微生物学报, 2009, 49(6): 697-702
- Li JC, Zhang WD, Yin F, Xu R, Chen YB. Electrochemically active microorganisms and electrolytically assisted fermentative hydrogen production: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(6): 697-702 (in Chinese)
- [33] Rabaey K. Bioelectrochemical systems: from extracellular electron transfer to biotechnological application[J]. Water Intelligence Online, 2009, 8: 284-298