

# 厌氧发酵系统中的微量元素及其生物利用度的研究综述

蔡亚凡 崔宗均 王小芬\*

(中国农业大学农学院/有机废弃物资源再利用研究中心,北京 100193)

**摘要** 针对微量元素对厌氧发酵系统影响进行综述。一方面归纳了不同发酵底物和接种物中微量元素的组成,微量元素和酶之间的关系,不同的发酵条件下微量元素对发酵体系性能及微生物群落演替的影响;另一方面对顺序提取法的应用,微量元素的化学形态与生物利用度的关系,影响生物利用度的因素(配体和 pH),提高生物利用度的策略等做了介绍,以期对沼气工程的高效稳定运行起到借鉴指导的作用。

**关键词** 沼气;厌氧发酵;微量元素;生物利用度;顺序提取法

中图分类号 TK6

文章编号 1007-4333(2017)09-0001-11

文献标志码 A

## A critical review on trace elements and bioavailability in anaerobic digestion system

CAI Yafan, CUI Zongjun, WANG Xiaofen\*

(College of Agronomy and Biotechnology/The Center of Biomass Recycling Utilization, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** The effects of trace elements on anaerobic digestion system were reviewed in this paper. On one hand, the composition of trace element in different fermented raw materials, the relationship between trace elements and enzymes, the effects of trace elements on the performance of the digestion system and microbial community succession were summarized. On the other hand, the application of sequential extraction method, the relationship between the chemical fraction and bioavailability, the factors affecting the bioavailability (ligands and pH), and the strategies for stabilizing bioavailability were introduced. This review would provide guidance for efficient and stable operation of biogas project.

**Keywords** biogas; anaerobic fermentation; trace elements; bioavailability; sequential extraction process

沼气的产生是复杂的微生物活动过程,影响此过程的因素包括温度、水力停留时间(HRT)、混合及搅拌、pH、碱度、挥发性脂肪酸(VFAs)和营养物质等。而在此过程微生物对营养物质需求方面的研究大部分集中在 C、N 和 P 等大量元素上<sup>[1-6]</sup>,而对微量元素的相关研究非常有限。随着人们对沼气发酵过程研究的不断深入,越来越多的学者认识到了微量元素在厌氧发酵系统中的重要性<sup>[7-12]</sup>。厌氧发酵产沼气的底物往往是畜禽粪便、农业废弃物、工业有机废水和餐厨垃圾等。Speece 等<sup>[13]</sup>指出微量元素能够影响微生物的活性,缺少其中的一种就会严重影响生物代谢过程。另外,微量元素在发酵系统

中的生物利用度也是不可忽视的部分,其生物利用度随发酵条件的变化而变化。目前,对微量元素在发酵系统中的生物利用度的研究仍处于初级阶段。

对于微量元素的研究,大多集中在以餐厨垃圾、酒糟和废水等易分解原料,而针对以能源作物、动物粪便、农业废弃物和市政垃圾等较难分解的物料为底物的沼气工程中微量元素需求的研究较少<sup>[14]</sup>。由于发酵系统的复杂性,添加微量元素后的作用效果不同。对不同的底物,微量元素的添加量、添加种类和生物利用度等说法不一。微量元素生物利用度动态变化、微量元素的不同形态与其利用度的关系、以及测定微量元素利用度的方法、影响微量元素利

收稿日期:2016-08-07

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201503137/201303080);教育部新世纪优秀人才项目支持(2014FG039)

第一作者:蔡亚凡,博士研究生,E-mail:caiyafan@cau.edu.cn

通讯作者:王小芬,副教授,主要从事微生物群体功能和纤维素分解转化研究,E-mail:wxiaofen@cau.edu.cn

用度的因素等缺少统一的认识。本研究归纳总结了国内外的相关研究,对上述问题进行综述。以期为沼气工程的稳定运行提供理论支撑。

## 1 微量元素在不同底物及接种物中的含量

底物和接种物的性质(C/N、总固体(TS)、挥发性固体、木质纤维素含量、pH、微量元素含量、菌群及活性等)会影响到厌氧发酵系统性能。研究微量元素在沼气生产中的作用常用底物是餐厨垃圾<sup>[8,12,15]</sup>、高浓度有机废水<sup>[9,16]</sup>、酒糟<sup>[17]</sup>和青贮物料<sup>[18]</sup>等易分解的物质,也有以纤维素类底物<sup>[19]</sup>,如农业废弃物中的农作物秸秆和能源草等。底物和接种泥中微量元素的含量直接影响着微量元素添加后的效果,所以对发酵底物和接种泥中微量元素含量要有清晰的认识。本研究总结了餐厨垃圾、纤维素类物质、接种泥及动物粪便中微量元素含量的差异。从表1、2和3中可以看出不同来源的底物以及接种泥中微量元素的差别较大,若以TS为8%计算,大

部分情况下餐厨垃圾中微量元素含量要少于纤维素类物质中微量元素的量,特别是Co、Mo、Se和Mn等元素的含量。有研究表明,向以餐厨垃圾为底物的发酵罐中加入微量元素是提高反应器发酵性能的重要策略<sup>[9,12,20-22]</sup>。Alexander等<sup>[30]</sup>研究了欧洲不同地区的10个沼气罐中微量元素的含量,发现不同沼气罐中的元素含量存在1~2个数量级的差别(如图1),说明当底物和接种物不同时,发酵系统中微量元素含量有较大差异。

即使相同类型的物质,微量元素含量差异仍较大,从表1中可以看出餐厨垃圾中的Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Mo和Mn的浓度范围为1.35~766.00、0.012~0.080、0.252~3.551、0.17~31.00、0.36~76.00、0.01~0.36和0.12~20.00 mg/L,浓度相差几倍到几百倍,同样的现象在纤维素类物质、粪便和接种泥中也能发现。粪便能提高反应体系缓冲能力,含有丰富的厌氧微生物,能调节厌氧发酵合适的碳氮比<sup>[6]</sup>。粪便和其他底物共发酵能够提高发酵性

表1 餐厨垃圾中微量元素含量

Table 1 The concentration of trace elements in food waste mg/L

文献号 Ref	微量元素						
	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Mn
[20]	1.35			0.17	0.36	0.01	0.12
[21]	766±402			31±1	76±22		
[22]	38.91	0.041	3.6	1.86	13.03	0.36	3.17
[9]	7.17		0.43	6.92	18.71	0.06	2.17
[23]	54	<0.06	1.7±0.7	1.7±0.2	7.8±2.6	0.1±0.01	20±3
[24]	9.52	0.01	0.25	2.06	4.83	0.1	4.69

表2 纤维素类物质中微量元素含量

Table 2 Concentrations of trace elements in lignocellulosic materials mg/kg

文献号 Ref	物料类型 Type of substrate	微量元素							
		Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Se	Mn
[19]	青贮草 Grass silage	277	<0.25	3.6	5.7	23.5	13.6	10.3	38.4
[25]	玉米秸秆 Cornstore	380~759	3~12	5~15		49~136		12~35	30~110
[26]	玉米秸秆 Cornstore	624.59±12.85	0.39±0.01	7.45±0.12					

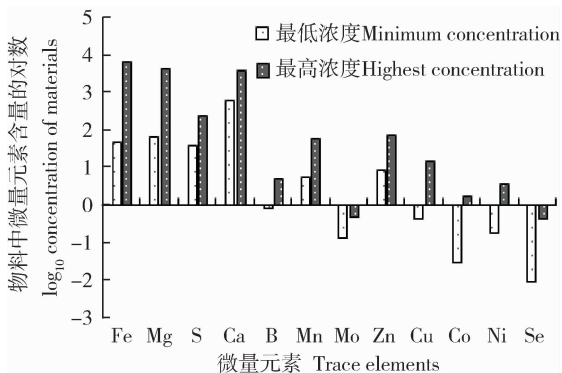
表 3 接种泥和动物粪便中微量元素的含量

Table 3 The concentration of trace elements in inoculum and manure

mg/kg

文献号 Ref	物料类型 Type of substrate	微量元素							
		Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Se	Mn
[27]	接种泥-1 Inoculum-1	803.4	16.6	38.5	348.0	421.7	17.2	2.8	14.8
[19]	泥浆 Slurry	3 278	25	5.3	59.9	304	2.0	1.6	250
[28]	泥浆 Slurry	2 500±100			590±12	1 507±18			629±26
[29]	接种泥-1 Inoculum-1			47±2	7.4±2		15.9±2	9.1±1	
[33]	接种泥-2 Inoculum-2			24.2±2	2.9±2		4.0±2	<1	
[31]	接种泥-2 Inoculum-2	2 586.2	31	29.9	149	104.0	48.9	1.9	101.9
[9]	猪舍废水 Piggery Wastewater	177.6		0.6	13.7	133.2			45.1

注：为了便于比较，文献[9]中的猪舍废水的密度按照 1 kg/L 进行了换算。文献[27]和[29]中的接种泥-1 和接种泥-2 是来源不同的接种泥。  
 Note: The density of Piggery Wastewater was calculated according to 1 kg/L in [9]. Inoculation-1 and inoculation-2 were taken from different source in [27] and [29].



图表中数据来源于 Schattauer Alexander<sup>[23]</sup>  
 Date from reference Schattauer Alexander<sup>[23]</sup>

图 1 不同厌氧发酵罐中微量元素浓度

Fig. 1 Concentration of trace elements in different anaerobic reactors

素较少时，用含量较丰富的物质与其共发酵可以解决此类问题。表 1 中某一种餐厨垃圾 Fe 和 Mn 浓度分别为 7.172 和 2.172 mg/L，浓度过低无法满足微生物的生长需求。表中，猪舍废水的 Fe 和 Mn 的浓度达到 177.6 和 45.1 mg/L，单发酵进行到第 60 天时反应器已出现明显的酸化现象从而导致发酵罐无法正常运行，而与餐厨垃圾单发酵作对比，加入猪舍废水的反应器发酵过程稳定<sup>[9]</sup>，但是在实际沼气生产中稳定的粪便供给很难达到，可以通过添加适量的微量元素来提高反应器性能。也有研究证明，粪便的添加量达到 50% 时，再额外加入微量元素仍然能够提高沼气产量<sup>[31]</sup>，这可能与粪便中微量元素的生物利用度有关。

## 2 微量元素与甲烷生成阶段相关的酶

有机物厌氧发酵产甲烷需要不同类群的微生物参与，普遍被人们接受的 Bryant 等<sup>[34]</sup>提出的水解

能的重要原因是粪便提供了较丰富的微量元素<sup>[31-33]</sup>。因此，当某些有机废弃物中含有的微量元

发酵、产氢产乙酸和产甲烷三阶段理论,在此过程中有多种酶的参与。Zerkle 等<sup>[35]</sup>指出甲烷生成阶段是生物学中有最多金属酶参与的反应之一。这些与微量元素相关的酶有氢化酶、甲酰基甲基呋喃脱氢酶、甲基辅酶还原酶、甲基转移酶、一氧化碳脱氢酶和甲酸盐脱氢酶等。

氢化酶是自然界厌氧微生物体内存在的一种金属酶,它能催化氢气的氧化,质子的还原这一可逆化学反应,在氢气的形成阶段有重要的作用,而氢气是形成甲烷的原料之一。镍铁氢化酶具有分裂重组氢分子的功能<sup>[36]</sup>。甲酰基甲基呋喃脱氢酶<sup>[37]</sup>主要是催化 CO<sub>2</sub> 合成甲烷,此酶的合成需要 Mo 的参与。甲基辅酶还原酶是含有 Ni 的酶,甲基辅酶还原酶能催化甲基辅酶生成甲烷<sup>[38-39]</sup>。Co 和 Zn 参与组成辅酶 M 甲基转移酶<sup>[40]</sup>,此酶是甲基转移酶的一种,在次甲基八叠蝶呤甲基辅酶 M 还原酶的作用下生成甲烷<sup>[41]</sup>。一氧化碳脱氢酶是一种含有 Mo、Co、Fe 和 Ni 的金属酶不仅能催化乙酸产生甲烷,而且可以催化 H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 生成甲烷<sup>[42]</sup>。Se 与甲烷生成没有直接的联系,但是 Se 参与组成甲酸盐脱氢酶<sup>[43]</sup>,甲酸盐脱氢酶能氧化甲酸盐生成 CO<sub>2</sub>,为甲烷的生成提供原料。

综上,微量元素与甲烷的生成有密切的联系,是组成这些具有特殊功能酶的关键因子。

### 3 微量元素对发酵体系性能及微生物演替的影响

#### 3.1 微量元素对发酵体系性能的影响

微量元素对厌氧发酵产沼气的研究始于 20 世纪 70 年代<sup>[11]</sup>,开始主要以组成简单的单一底物(甲酸、乙酸、丙酸和葡萄糖等)为研究对象,现今研究的底物趋向于多样化,复杂化(粪便、废水、餐厨和农业废弃物等),研究最多的微量元素是 Fe、Co 和 Ni<sup>[44]</sup>。

近 5 年的关于微量元素作为添加剂的研究较多。Shailendra 等<sup>[45]</sup>研究表明,当以玉米秸秆为原料时,用 NaOH 溶液前处理时,加入的 Fe 离子浓度为 200~1 000 mg/L 时,沼气和甲烷产量最大提高了 57% 和 56%,这与 Yang 等<sup>[46]</sup>提出的磁性粒子可以加速乙酸向甲烷转化的理论吻合。Beyza 等<sup>[20]</sup>、Herbert 等<sup>[47]</sup>、Anna 等<sup>[48]</sup>、Zhang 等<sup>[49]</sup>和 Veronica 等<sup>[29]</sup>分别以玉米秸秆和餐厨垃圾为底物也发现加入微量元素可以使甲烷的产量提高。

微量元素能提高化学需氧量(COD)去除率,

Zhang 等<sup>[23]</sup>以有机废水为底物,加入 Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Mn 元素的混合液,出料中 COD 的去除率提高了 16%,COD 较高时系统中的负荷也相对较大,负荷不同时系统对微量元素的需求量不同<sup>[50]</sup>。Liu 等<sup>[26]</sup>研究在以 NaOH 作为前处理,系统中加入微量元素,当 Fe、Co 和 Ni 的浓度分别为 1.0、0.4 和 0.4 mg/(L·d) 时累积甲烷产量最高,与只有 NaOH 预处理和未处理对照相比 TS 转化率提高了 41.8% 和 62.2%。COD 及 TS 转化效率的提高可能与微量元素的加入提高了发酵系统中微生物的量及酶的活性有关。

在沼气发酵过程中,系统的稳定性尤为重要,VFAs 的积累会影响系统稳定,张万钦等<sup>[51]</sup>、张磊等<sup>[52]</sup>和 Veronica 等<sup>[53]</sup>发现微量元素能起到缓解 VFAs 积累的作用,从而提高了系统的稳定性。除了经常研究的 VFAs 因素外,毒性物质对反应系统稳定的影响不可忽视,H<sub>2</sub>S 和高浓度的氨等。当用厌氧发酵的方式处理富含蛋白质的废弃物时会产生较多的毒性气体 H<sub>2</sub>S,这种物质会对发酵系统产生毒害作用<sup>[54-55]</sup>,导致发酵系统不稳定,常用的处理方式是通入 2%~5% 的空气以达到部分脱硫的目的,但是可能会降低产甲烷菌的活性从而使甲烷含量降低,有研究表明,发酵系统中加入一定量的微量元素,也可以达到降低 H<sub>2</sub>S 的目的。Bayr 等<sup>[56]</sup>以猪舍废水为底物,加入 Fe 离子后产生的气体中 H<sub>2</sub>S 含量为 0.5 mg/L,而对照组 H<sub>2</sub>S 含量达 1 900 mg/L 所以适量的 Fe 对于提高沼气的质量有一定作用。Charles 等<sup>[23]</sup>研究了以餐厨垃圾为底物,当系统中氨浓度较高时,丙酸就会大量积累而导致系统不稳定,而 Co 和 Se 元素的加入能够通过调节电子转移,缓解丙酸积累,进而提高了系统的稳定性。李秀芬<sup>[57]</sup>等的研究也得到类似结果。

发酵体系中加入多种微量元素往往优于只添加 1 种微量元素,这可能和微量元素之间的协同作用有关,Pobeheim 等<sup>[47,58-59]</sup>以青贮玉米为原料证实了微量元素间有协同效应。Zhang 等<sup>[48]</sup>以餐厨垃圾为底物,也发现加入 Fe 和 Co 的混合液时比单独加入 Fe 或 Ni 产气分别提高 11.3% 和 12.4%,当加入 Fe、Co 和 Mo 混合液时效果优于加入其中的 1 种或 2 种微量元素。但是协同机理并不清楚,还需更深入的研究。

#### 3.2 微量元素对厌氧发酵系统微生物的影响

微量元素提高沼气产量是因为微量元素对厌氧

发酵系统微生物的生长产生了影响。Maria 等<sup>[60]</sup>指出在 37 和 42 °C 的情况下,微量元素对菌群的影响不一致,37 °C 下微量元素对菌群结构影响更大。Bernhard 等<sup>[61]</sup>研究表明微量元素的加入提高了甲烷八叠球菌的活性。Anna 等<sup>[48]</sup>以餐厨垃圾为底物,当加入 Fe、Co 和 Ni 后产甲烷菌群结构发生变化,在反应末期试验组中的甲烷八叠球菌的拷贝数明显多于对照组。王健等<sup>[62]</sup>通过末端限制性片段长度多样性技术证明,投加微量元素混合液能丰富产酸微生物菌群结构,同时也使得厌氧产酸菌菌种的多样性增加。Feng 等<sup>[63]</sup>以餐厨垃圾为原料研究了 Co、Se、W、Ni、Mo 和 B 等微量元素的加入对微生物群落的影响,发现微量元素对细菌菌群的影响有限,Ni/Mo/B 的加入对细菌有刺激作用,而 Ni/Mo/B 和 Se/W 的加入对古菌菌群均有影响,并表现出了一定的相关性,但是并没有发现微生物群落的组成与甲烷产量有相关性。Milan 等<sup>[64]</sup>用改性天然沸石为添加剂,发现经过 Co、Ni 和 Mn 改性过的天然沸石能够提高系统的产甲烷活性,当含有 Ni 和 Co 的改性沸石存在时能刺激甲烷鬃毛菌的生长,而含有锰的沸石对甲烷八叠球菌及硫酸盐还原菌刺激效果明显。Neumann 等<sup>[65]</sup>以能源草为底物,加入微量元素混合液后,微生物群落结构发生了变化,特别是嗜氢产甲烷菌从占甲烷菌 72% 增加到了 92%。因此,在厌氧发酵中微量元素具有刺激甲烷菌的生长和丰富微生物群落结构的功能。蔡亚凡等<sup>[32]</sup>以水稻干秸秆为底物进行研究时发现,产甲烷古菌对微量元素的敏感性要大于细菌,添加微量元素使甲烷鬃毛菌的量最大可提高 12.4%,与对照组相比,古菌群落多样性也呈增加的趋势。

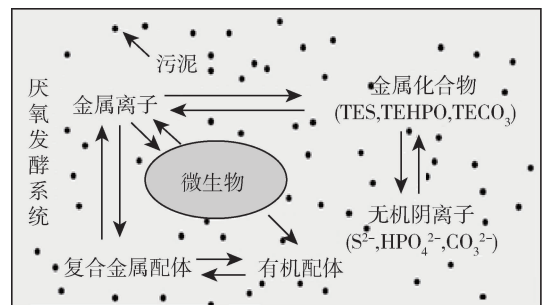
#### 4 微量元素的生物利用度

ISO 11074 把生物利用度定义为生物系统中元素可以被利用的程度<sup>[66]</sup>。有学者指出,即使系统中微量元素充足,而在生物利用度较低的情况下,微生物也不能有效吸收利用微量元素,用于生物代谢的酶和辅酶的合成会受阻,进而降低反应系统性能<sup>[67]</sup>,所以了解系统中微量元素的生物利用度的变化规律,才能采取有效的稳定发酵性能的策略。由于生物利用度不能直接被测定,通常用微量元素的化学组分来评价生物利用度,不同的化学组分的生物利用度不同。常用的测定化学组分的方法是顺序提取法,顺序提取法类型较多,大致原理是将系统中

的微量元素根据微生物能利用的难易程度分为不同的组分来代表不同的生物利用度。以 Tessier 等<sup>[68]</sup>顺序提取法为例,把微量元素组分分为水溶性组分、可交换组分、碳酸盐组分、有机/硫化物组分和残留物组分 5 种。其中水溶性组分可以直接被微生物利用,可交换组分和碳酸盐组分只有转化成水溶性组分才能被微生物直接利用,残留物组分是不可溶的,不能被微生物利用。生物利用度是厌氧发酵系统的重要指标,合适的生物利用度是发酵系统高效率运作的基础。

##### 4.1 微量元素的化学组分

发酵系统中的自由金属离子对微生物的生长是必要的,有学者提出自由金属离子通过细胞膜被微生物利用是微生物利用金属元素的最主要的方式<sup>[69]</sup>,但是在厌氧反应器中微量元素并不是全部以自由离子的形式存在<sup>[44,69]</sup>,还以硫化物,磷酸盐和碳酸盐等形式出现,而这些物质往往受发酵系统参数包括 pH<sup>[70-71]</sup>、氧化还原电位、碱度及磷和硫浓度的影响<sup>[72]</sup>。微量元素的生物利用度和微量元素的化学组分相关<sup>[73-74]</sup>,因此相应的测定微量元素化学组分的方法在不断发展改进<sup>[27,68,72,75-77]</sup>,这些测定结果表明在厌氧发酵系统中对于某种微量元素有 30%~70% 是很难被生物利用<sup>[68,78]</sup>,Oleszkiewicz 等<sup>[79]</sup>指出在发酵系统中只有 0.5%~4.0% 的微量元素是生物可利用的,这少量可利用的微量元素在实际中也不会全部被微生物利用,所以用厌氧发酵系统中微量元素的总浓度去预测其利用度或毒性是不科学的<sup>[80]</sup>。Pinto 等<sup>[81]</sup>阐述了微量元素在厌氧发酵系统中的吸收与转化,图 3 为示意图。微量元素的转化主要涉及金属螯合,吸附/解吸附,溶解平



TE 代表微量元素。

TE represents trace element in the figure.

图 3 微量元素的吸收与转化

Fig. 3 Diagrammatic sketch of trace elements absorption and transformation

衡等过程<sup>[38,43]</sup>。微生物产生的有机配体(溶解性微生物产物和胞外聚合物等)可与微量元素形成复合金属配体,这个过程称为螯合作用。受溶解平衡规律影响,金属沉淀物和阴离子及金属阳离子之间相互转变。吸附/解吸附主要存在于微量元素与载体或微生物膜之间。可见金属离子不仅能与无机阴离子结合,还可以与胞外聚合物,溶解性微生物产物等配体结合,形成复杂的螯合物,进而影响到微量元素的生物利用度<sup>[82]</sup>。

#### 4.2 测定厌氧发酵系统中微量元素化学组分的重要技术及其应用

虽然在系统中微量元素的总量很容易测得,但是微量元素的生物利用度仍无法直接测定<sup>[69]</sup>。微量元素以不同组分存在于厌氧发酵体系中,其被微生物利用的难易程度不同<sup>[83]</sup>,即不同的化学组分有不同的生物利用度,所以通过顺序提取法测定微量元素的化学形态,能够间接反应微量元素生物利用度。针对不同底物,不同条件下相应的方法应得到优化。

常用的顺序提取法包括 BCR(欧洲标准物质局)和 Tessier 等<sup>[75]</sup>提出的 2 种。Filgueiras 等<sup>[84]</sup>对这些顺序提取法进行了综述,涉及环境样品包括土壤、沉积物、污泥和飞尘等。本研究以 BCR 和 Tessier 为例进行说明,2 种顺序提取法第一步所用洗脱液的性质较温和,BCR 采用乙酸为洗脱液,Tessier 采用  $Mg_2Cl$  溶液,得到的组分均为较易被利用的组分,在第三步中 BCR 温度略低于 Tessier,这部分得到的组分可能比 Tessier 方法中得到的更大。最后一步中均用强酸作为消解介质,目的是完全溶解沉淀物得到生物利用度较低的部分。我们可以得出,这些方法主要步骤相似,不同的是提取试剂、提取条件以及最后组分构成的划分。近些年来这些方法逐渐被应用到厌氧发酵中<sup>[77,80,85-86]</sup>。考虑到厌氧污泥的特殊性质及时间成本,在应用时会对顺序提取法有所优化,Ortner 等<sup>[68]</sup>发现样品的烘干过程可能会导致测得的不溶性组分比实际值偏高,并对方法做了改进。Arain 等<sup>[87]</sup>对复杂的 BCR 方法进行优化,在原来的基础上找到更省时的方法。Rao 等<sup>[88]</sup>对比了一步测定法和顺序提取法,提出顺序提取法是测定微量元素化学形态的有效方法,但是也存在一定的缺陷,首先是耗时,由于需要多种缓冲液逐步进行提取,每个步骤短则数小时,长则数天、样品的均一性很难保证、试剂用量及浓度没有统

一标准、提取过程的参数(温度、摇匀和 pH 等)等均会影响结果。所以用顺序提取测定时要保证操作的一致性<sup>[69,89-90]</sup>,才能得到能反应实际情况的结果。

#### 4.3 微量元素生物利用度的影响因素及稳定策略

影响生物利用度常见的因素是配体和 pH,主要是通过影响金属元素的化学形态,溶解度等进而影响利用度及稳定性。配体分为羧酸类和生物配体两大类,羧酸类主要包括 NTA(氨三乙酸)<sup>[91]</sup>、EDTA(乙二胺四乙酸)<sup>[67]</sup>、[S,S]-EDDS(Ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid)<sup>[49]</sup>和 CA(柠檬酸)<sup>[92]</sup>等。生物配体包括 SMPs(溶解性微生物产物)、EPS(胞外聚合物)和酵母提取物<sup>[93]</sup>等。

胡庆昊等<sup>[91]</sup>研究表明,在污水中当硫化物含量分别是 0.25、0.5 和 1 mM 时,加入 10  $\mu M$  NTA,沼气量分别提高了 10%、30%和 48%,碳酸盐和硫化物沉淀分别减少了 28.8%、58%,NTA 的加入增强了微量元素的生物利用度是沼气产量提高的原因之一。但当体系中含有的金属离子浓度较高时会对系统产生毒性,NTA 加入后会和自由金属离子形成复合物,减小重金属对系统的毒害<sup>[94]</sup>。EDTA 是六齿配体,可与多种金属离子组成螯合物并且较稳定,形成的螯合物可溶于水。Anca 等<sup>[67]</sup>在发酵系统中加入 EDTA 也证明了能提高微量元素的利用度,并提出 EDTA 的加入可以减少 75%的微量元素加入量,但是值得注意的是 EDTA 较难被生物降解,有潜在的环境风险<sup>[95]</sup>。[S,S]-EDDS 与 EDTA 结构相似,但[S,S]-EDDS 有较好的生物降解性,环境风险较小,被认为是绿色配体。Zhang 等<sup>[49]</sup>证明了[S,S]-EDDS 的加入可以减少 50%微量元素加入量,证明了在实际应用中[S,S]-EDDS 对于提高金属元素的生物利用度是有效的。柠檬酸及其盐在酸性范围内就有较强的螯合能力,合适的 pH 范围是 4~8,胡庆昊等<sup>[92]</sup>以 CA 为二价 Ni 离子的螯合剂,发现 CA 的加入可以提高沼气产量 34.1%,但是作用效果小于 NTA 和 EDTA,这可能与 CA 对二价 Ni 离子的螯合稳定常数小于 NTA 和 EDTA 有关。

SMPs(溶解性微生物产物)和 EPS(胞外聚合物)都是污泥中存在的复杂有机质,SMPs 主要存在于发酵系统的液相中,与 SMPs 不同的是,EPS 与细胞表面强烈黏附作用,主要成分是多糖和蛋白质。SMPs 中有多种功能基团,包括羧酸、羟基、酚、巯基(-SH)和胺等<sup>[96]</sup>,而这些基团可与厌氧系统中的微量元素形成复合物<sup>[69]</sup>,稳定系统生物利用度。



Patidar 等<sup>[97]</sup>用 UASB(上流式)、ABR(折流)和 HABR(混合折流)3种反应器研究了金属的利用度和 SMP 产生的关系,发现当硫化物的浓度增加时 SMP 也增加,说明微生物对硫化物的毒性产生了应激反应,通过增加 SMP 的方式使系统产生更多的可溶性复合物增加微量元素的利用度,降低硫化物对系统产生的毒性<sup>[97]</sup>。EPS 中存在磷酸盐、羧基、羟基和氨基等功能基团,也有类似的性质,并且有研究者证明不同的微量元素和 EPS 的结合能力不同<sup>[81]</sup>。酵母提取物也有很强的与金属离子结合的能力,有利于不溶物(如硫化物)的溶解<sup>[93]</sup>,但是考虑到经济成本,在实际生产中应用较少。

以上这些配体加入反应体系后会起到改善发酵系统性能的作用,其主要原因是配体的加入可以和微量元素形成溶解性较好,更容易被微生物利用的复合物<sup>[69]</sup>,但也有研究得出相反结果,Sérgio 等<sup>[94]</sup>在发酵系统中加入 1 mmol/L EDTA,结果导致甲烷产率降低。可见配体的加入能否起到效果是和发酵系统中的环境条件相关的,所以不同种类的配体在不同条件下的实际作用还有待进一步验证,另外配体加入后对沼渣的环境风险也要充分考虑。

pH 也是影响微量元素生物利用度的重要参数之一。Marcat 等<sup>[98]</sup>研究表明  $\text{pH} > 6.5$ ,牲畜废水中的 Cu 和 Zn 大部分以不溶状态存在,当  $\text{pH} 2.0 \sim 3.0$  时 Zn 的可溶部分可达 40%,并且 Zn 比 Cu 对于 pH 的变化更加敏感。Gonzalez 等<sup>[99]</sup>在较低的 pH 下发现 Ni 和 Co 的化学形式主要是可交换形态以及与碳酸根结合形态,不存在沉淀。Marcel 等<sup>[70]</sup>将 UASB(上流式厌氧污泥床)pH 调节为 5,反应时间 30 h,用顺序提取法测得 Co、Ni 和 Fe 的有机/硫化物组分分别增加了 34%、47%和 109%,而这些增加的组分来自于残渣部分。Lopes 等<sup>[71]</sup>将 UASB 反应器的 pH 调节到 4、5、6,发现随着 pH 的降低,UASB 反应器中的 Co、Ni、Fe、Zn 和 Al 的可溶性组分增多,pH 为 5~6 差别较小。pH 对微量元素利用度影响较大<sup>[98]</sup>,pH 较低时系统的微量元素生物利用度较高<sup>[71]</sup>,但这还局限于试验性研究,产甲烷古菌的发酵最适 pH 为 6.2~7.5,在实际生产中极端 pH 很难达到,pH 过低虽然微量元素利用度较高,但不适宜微生物生存,pH 过高微量元素的生物利用度较低,微生物的生长代谢会受到阻碍,适宜的微量元素生物利用度是发酵罐高效运行的必要条件。

## 5 结 论

发酵底物不同时,微量元素的含量差异很大,底物不同时需要额外加入的微量元素量也不同,找出不同底物发酵合适的微量元素需求范围能避免微量元素添加过量对系统产生的毒害作用。当其他参数适宜但发酵系统出现不稳定,产气效率低等现象时,应首先考虑系统中是否缺乏微量元素。随着分子生物学和生物信息学的发展,更先进的技术可以应用到探究微量元素影响微生物生长代谢的规律上。

微量元素生物利用度是厌氧发酵系统的重要参数,顺序提取法应被利用到厌氧发酵中评估系统中微量元素的生物利用度,但顺序提取法种类繁多,造成了不同文献中数据的不可比,应对此类方法进行标准化。掌握发酵过程不同阶段中微量元素生物利用度变化规律能为确定合理的微量元素添加及生物利用度的调节起到指导作用。在众多的影响生物利用度的因素中,容易控制的是配体和发酵系统的 pH,如何通过调节这些参数达到合理的生物利用度需进一步研究。在未来的研究中厌氧发酵系统中生物利用度的研究是沼气工程中一个重要研究方向。

## 参考文献 References

- [1] Silvestre G, Fernández B, Bonmati A. Addition of crude glycerine as strategy to balance the C/N ratio on sewage sludge thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 193: 377-385
- [2] Wu X, Yao W, Zhu J, Miller C. Biogas and  $\text{CH}_4$  productivity by co-digesting swine manure with three crop residues as an external carbon source [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (11): 4042-4047
- [3] Wang X W, Zhang L Y, Xi B D, Sun W J, Xia X F, Zhu C W, He X S, Li M X, Yang T X, Wang P F, Zhang Z L. Biogas production improvement and C/N control by natural clinoptilolite addition into anaerobic co-digestion of *Phragmites australis*, feces and kitchen waste [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 180: 192-199
- [4] Lei Z, Chen J, Zhang Z, Sugiura N. Methane production from rice straw with acclimated anaerobic sludge: Effect of phosphate supplementation [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(12): 4343-4348
- [5] Yan Z Y, Song Z L, Li D, Yuan Y X, Liu X F, Zheng T. The effects of initial substrate concentration, C/N ratio, and temperature on solid-state anaerobic digestion from composting ricestraw [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 177: 266-273

- [6] Hassan M, Ding W M, Shi Z D, Zhao S Q. Methane enhancement through co-digestion of chicken manure and thermo-oxidative cleaved wheat straw with waste activated sludge: A C/N optimization case [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 211: 534-541
- [7] 胡纪萃. 废水厌氧生物处理理论与技术 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2003  
Hu J C. *Anaerobic Biological Treatment Theory and Technology* [M]. Beijing: China Architecture & Building Press, 2003 (in Chinese)
- [8] Bożym M, Florczak I, Zdanowska P, Wojdalski J, Klimkiewicz M. An analysis of metal concentrations in food wastes for biogas production [J]. *Renewable Energy*, 2015, 77: 467-472
- [9] Zhang L, Lee Y W, Jahng D. Anaerobic co-digestion of food waste and piggery wastewater: Focusing on the role of trace elements [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (8): 5048-5059
- [10] Bayr S, Pakarinen O, Korppoo A, Liuksia S, Vaisanen A, Kaparaju P, Rintala J. Effect of additives on process stability of mesophilic anaerobic mono-digestion of pig slaughterhouse waste [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 120: 106-113
- [11] Hoban D, Vandenberg L. Effect of iron on conversion of acetic acid to methane during methanogenic fermentations [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1979, 47(1): 153-159
- [12] Facchin V, Cavinato C, Fatone F, Pavan P, Cecchi F, Bolzonella D. Effect of trace element supplementation on the mesophilic anaerobic digestion of food waste in batch trials: the influence of inoculum origin [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 70: 71-77
- [13] 斯皮斯. 工业废水的厌氧生物技术 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2001: 228-256  
Speece R E. *Anaerobic Biotechnology of Industrial Wastewater* [M]. Beijing: China Architecture & Building Press, 2001: 228-256 (in Chinese)
- [14] Demirel B, Scherer P. Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35(3): 992-998
- [15] Qiang H, Lang D L, Li Y Y. High-solid mesophilic methane fermentation of food waste with an emphasis on Iron, Cobalt, and Nickel requirements [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 103(1): 21-27
- [16] Zhang W J, Zhang X H, Wang D Q, Koga Y, Rouse J D, Furukawa K. Trace elements enhance biofilm formation in UASB reactor for solo simple molecule waste water treatment [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19): 9296-9299
- [17] Schmidt T, Nelles M, Scholwin F, Proter J. Trace element supplementation in the biogas production from wheat stillage: Optimization of metal dosing [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 168: 80-85
- [18] Evranos B, Demirel B. The impact of Ni, Co and Mo supplementation on methane yield from anaerobic mono-digestion of maize silage [J]. *Environmental Technology*, 2015, 36(9-12): 1556-1562
- [19] Wall D M, Allen E, Straccialini B, O'Kiely P, Murphy J D. The effect of trace element addition to mono-digestion of grass silage at high organic loading rates [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 172: 349-355
- [20] Zhu H G, Parker W, Basnar R, Proracki A, Falletta P, Beland M, Seto P. Biohydrogen production by anaerobic co-digestion of municipal food waste and sewage sludges [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33(14): 3651-3659
- [21] Zhang R H, EL-Mashad H M, Hartman K, Wang F Y, Liu G Q, Choate C, Gamble P. Characterization of food waste as feedstock for anaerobic digestion [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(4): 929-935
- [22] Zhang W L, Zhang L, Li A M. Anaerobic co-digestion of food waste with MSW incineration plant fresh leachate: Process performance and synergistic effects [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 259: 795-805
- [23] Banks C J, Zhang Y, Jiang Y, Heaven S. Trace element requirements for stable food waste digestion at elevated ammonia concentrations [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 104: 127-135
- [24] De Vrieze J, De Lathouwer L, Verstraete W, Boon N. High-rate iron-rich activated sludge as stabilizing agent for the anaerobic digestion of kitchen waste [J]. *Water Research*, 2013, 47(11): 3732-3741
- [25] 孙勇, 杨刚, 张金平, 李佐虎. ICP-AES法测定玉米秸秆中的微量元素含量 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007(2): 371-373  
Sun Y, Yang G, Zhang J P, Li Z H. Analysis of trace elements in cornstover by ICP-AES [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007(2): 371-373 (in Chinese)
- [26] Liu C M, Yuan H R, Zou D X, Liu Y P, Zhu B N, Li X J. Improving biomethane production and mass bioconversion of corn stover anaerobic digestion by adding NaOH pretreatment and trace elements [J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 1-8
- [27] Osuna M B, van Hullebusch E D, Zandvoort M H, Iza J, Lens P N L. Effect of cobalt sorption on metal fractionation in anaerobic granular sludge [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33(4): 1256-1270
- [28] Marcató C E, Pinelli E, Pouech P, Winterton P, Guisresse M. Particle size and metal distributions in anaerobically digested pig slurry [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(7): 2340-2348
- [29] Facchin V, Cavinato C, Fatone F, Pavan P, Cecchi F, Bolzonella D. Effect of trace element supplementation on the mesophilic anaerobic digestion of food waste in batch trials: the influence of inoculum origin [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 70: 71-77
- [30] Schattauer A, Abdoun E, Weiland P, Plochl M, Heiermann M. Abundance of trace elements in demonstration biogas plants



- [J]. *Biosystems Engineering*, 2011, 108(1): 57-65
- [31] Nordell E, Nilsson B, Paledal S N, Karisalmi K, Moestedt J. Co-digestion of manure and industrial waste: The effects of trace element addition[J]. *Waste Management*, 2016, 47: 21-27
- [32] Cai Y F, Hua B B, Gao L J, Hu Y G, Yuan X F, Cui Z J, Zhu W B, Wang X F. Effects of adding trace elements on rice straw anaerobic mono-digestion: Focus on changes in microbial communities using high-throughput sequencing[J]. *Bioresource Technology*, (2017-04-21) Doi: 10. 1016/j. biortech. 2017. 04. 071
- [33] hang Y, Banks C J, Heaven S. Co-digestion of source segregated domestic food waste to improve process stability [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 114: 168-178
- [34] Bryant M P. Microbial methane production-theoretical aspects [J]. *Journal of Animal Science*, 1979, 48(1): 193-201
- [35] Aubrey L, Zerkle C H H, Susan L B. Biogeochemical signatures through time as inferred from whole microbial genomes[J]. *American Journal of Science*, 2005, 305(6-8): 467-502
- [36] 赵斌, 程鹏. 镍铁氢化酶活性中心的结构、催化机理及化学模拟 [J]. *无机化学学报*, 2002(1): 8-16  
Zhao B, Cheng P. Active site structure, catalytic mechanism and chemical mimic of [Ni Fe] hydrogenase [J]. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, 2002(1): 8-16 (in Chinese)
- [37] Bertram P A, Schmitz R A, Linder D, Thauer R K. Tungstate can substitute for molybdate in sustaining growth of methanobacterium-thermoautotrophicum-identification and characterization of tungsten isoenzyme of for myl-methanofuran dehydrogenase[J]. *Archives of Microbiology*, 1994, 161(3): 220-228
- [38] Zandvoort M H, vanHullebusch E D, Feroso F G, Lens P N L. Trace metals in anaerobic granular sludge reactors: bioavailability and dosing strategies[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2006, 6(3): 293-301
- [39] Diekert G, Jaenchen R, Thauer R K. Biosynthetic evidence for a nickel therapy role structure of factor F430 from methanobacterium thermo autitrophicum[J]. *Acta Crystallographica*, 1980, 119(1): 118-120
- [40] Thauer R K. Biochemistry of methanogenesis: A tribute to majory stephenson[J]. *Microbiology*, 1998, 144(9): 2377-2406
- [41] 张万钦, 吴树彪, 郎乾乾, 董仁杰. 微量元素对沼气厌氧发酵的影响[J]. *农业工程学报*, 2013(10): 1-11  
Zhang W Q, Wu S B, Lang QQ, Dong R J. Trace elements on influence of anaerobic fermentation in biogas projects [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2013, 29(10): 1-11 (in Chinese)
- [42] Bainotti A E, Nishio N. Growth kinetics of *Acetobacterium* sp on methanol-formate in continuous culture [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(2): 191-201
- [43] Feroso F G, Bartacek J, Jansen S, Lens P N L. Metal supplementation to UASB bioreactors: from cell-metal interactions to full-scale application[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(12): 3652-3667
- [44] Choong Y Y, Norli I, Abdullah A Z, Yhaya M F. Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 209: 369-379
- [45] Khatri S, Wu S, Kizito S, Zhang W Q, Li J X, Dong R J. Synergistic effect of alkaline pretreatment and Fe dosing on batch anaerobic digestion of maize straw[J]. *Applied Energy*, 2015, 158: 55-64
- [46] Yang Z M, Xu X H, Guo R B, Fan X L, Zhao X X. Accelerated methanogenesis from effluents of hydrogen-producing stage in anaerobic digestion by mixed cultures enriched with acetate and nano-sized magnetite particles [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 190: 132-139
- [47] Pobeheim H, Munk B, Johansson J, Guebitz G M. Influence of trace elements on methane formation from a synthetic model substrate for maize silage[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(2): 836-839
- [48] Karlsson A, Einarsson P, Schnurer A, Sundberg C, Ejlertsson J, Svensson B H. Impact of trace element addition on degradation efficiency of volatile fatty acids, oleic acid and phenyl acetate and on microbial populations in a biogas digester [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 114(4): 446-452
- [49] Zhang W L, Zhang L, Li A M. Enhanced anaerobic digestion of food waste by trace metal elements supplementation and reduced metals dosage by green chelating agent [S, S]-EDDS via improving metals bioavailability[J]. *Water Research*, 2015, 84: 266-277
- [50] Ketheesan B, Thanh P M, Stuckey D C. Iron deficiency and bioavailability in anaerobic batch and submerged membrane bioreactors (SAMBR) during organic shock loads [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 211: 136-145
- [51] Zhang W Q, Wu S B, Guo J B, Zhou J, Dong R J. Performance and kinetic evaluation of semi-continuously fed anaerobic digesters treating food waste: Role of trace elements [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 178: 297-305
- [52] Zhang L, Jahng D. Long-term anaerobic digestion of food waste stabilized by trace elements[J]. *Waste Management*, 2012, 32(8): 1509-1515
- [53] Facchin V, Cristina C, Pavan P, Bolzonella D. Batch and continuous mesophilic anaerobic digestion of food waste: effect of trace elements supplementation[J]. *Chemical Engineering Transactions*, 2013, 32: 457-462
- [54] Fierro J, Martinez E J, Rosas J G, Fernandez R A, Lopez R, Gomez X. Co-digestion of swine manure and crude glycerine: increasing glycerine ratio results in preferential degradation of labile compounds[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2016, 227(3): 168-178
- [55] Du W W, Parker W. Modeling volatile organic sulfur compounds in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion

- of methionine[J]. *Water Research*, 2012, 46(2): 539-546
- [56] Bayr S, Pakarinen O, Korppoo A, Liuksia S, Vaisanen A, Kaparaju P, Rintala J. Effect of additives on process stability of mesophilic anaerobic mono-digestion of pig slaughterhouse waste[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 120: 106-113
- [57] 李秀芬, 胡庆昊, 陈坚. 微量金属元素及其螯合剂对厌氧消化产甲烷过程的影响[J]. 安全与环境学报, 2009, 9(2): 66-68  
Li X F, Hu Q H, Cheng J. Effect of trace metal and its chelating agent on anaerobic digestion[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2009, 9(2): 66-68 (in Chinese)
- [58] Pobeheim H, Munk B, Lindorfer H, Guebitz G M. Impact of nickel and cobalt on biogas production and process stability during semi-continuous anaerobic fermentation of a model substrate for maize silage[J]. *Water Research*, 2011, 45(2): 781-787
- [59] Pobeheim H, Munk B, Muller H, Berg G, Guebitz G M. Characterization of an anaerobic population digesting a model substrate for maize in the presence of trace metals [J]. *Chemosphere*, 2010, 80(8): 829-836
- [60] Westerholm M, Muller B, Isaksson S, Schnurer A. Trace element and temperature effects on microbial communities and links to biogas digester performance at high ammonia levels [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 1-19
- [61] Munk B, Leubhn M. Process diagnosis using methanogenic archaea in maize-fed, trace element depleted fermenters [J]. *Anaerobe*, 2014, 29: 22-28
- [62] 王健. 微量元素对厌氧污泥发酵产酸影响研究[D]. 北京: 中国地质大学, 2013  
Wang J. Effects of trace metal elements on the production of volatile fatty acids from anaerobic sludgefermentation [D]. Beijing: China University of Geosciences, 2013 (in Chinese)
- [63] Feng X M, Karlsson A, Svensson B H, Bertilsson S. Impact of trace element addition on biogas production from food industrial waste linking process to microbial communities [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(1): 226-240
- [64] Milan Z, Montalvo S, Ruiz-Tagle N, Urrutia H, Chamy R, Sanchez E, Borja R. Influence of heavy metal supplementation on specific methanogenic activity and microbial communities detected in batch anaerobic digesters [J]. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2010, 45(11): 1307-1314
- [65] Neumann L, Scherer P. Impact of bioaugmentation by compost on the performance and ecology of an anaerobic digester fed with energy crops [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 2931-2935
- [66] Marcato C E, Pinelli E, Cecchi M, Winterton P, Guiesse M. Bioavailability of Cu and Zn in raw and anaerobically digested pig slurry [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(5): 1538-1544
- [67] Vintiloiu A, Boxriker M, Lemmer A, Oechsner H, Jungbluth T, Mathies E, Ramhold D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on the bioavailability of trace elements during anaerobic digestion [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 223: 436-441
- [68] Ortner M, Rachbauer L, Somitsch W, Fuchs W. Can bioavailability of trace nutrients be measured in anaerobic digestion? [J]. *Applied Energy*, 2014, 126: 190-198
- [69] Thanh P M, Ketheesan B, Yan Z, Stuckey D C. Trace metal speciation and bioavailability in anaerobic digestion: A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(2): 122-136
- [70] Zandvoort M H, van Hullebusch E D, Peerbolte A, Golubnic S, Lettinga G, Lens P N L. Influence of pH shocks on trace metal dynamics and performance of methanol fed granular sludge bioreactors [J]. *Biodegradation*, 2005, 16(6): 549-567
- [71] Lopes, S I C, Capela, M I, van Hullebusch E D, van der Veen A, Lens P N L. Influence of low pH (6.5 and 4) on nutrient dynamics and characteristics of acidifying sulfate reducing granular sludge [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(11): 1227-1238
- [72] van Hullebusch E D, Utomo S, Zandvoort M H, Lens P N L. Comparison of three sequential extraction procedures to describe metal fractionation in anaerobic granular sludges [J]. *Talanta*, 2005, 65(2): 549-558
- [73] Worms I, Simon D F, Hassler C S, Wilkinson K J. Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake [J]. *Biochimie*, 2006, 88(11): 1721-1731
- [74] Gustavsson J. Potential bioavailability and chemical forms of Co and Ni in the biogas process: An evaluation based on sequential and acid volatile sulfide extractions [J]. *Engineering in life science*, 2013, 13(6): 572-579
- [75] Tessier A, Campbell P G C, Bisson I M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals [J]. *Analytical Chemistry*, 1979, 7(51): 844-851
- [76] Mossop K F, Davidson C M. Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 478(1): 111-118
- [77] Zhang Q, Zhang L, Sang W J, Li M, Cheng W H. Chemical speciation of heavy metals in excess sludge treatment by thermal hydrolysis and anaerobic digestion process [J]. *Desalination and Water Treatment*, 2016, 57(27): 12770-12776
- [78] Ortner M, Rameder M, Rachbauer L, Bochmann G, Fuchs W. Bioavailability of essential trace elements and their impact on anaerobic digestion of slaughterhouse waste [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 99: 107-113
- [79] Oleszkiewicz J A, Sharma V K. Stimulation and inhibition of anaerobic processes by heavy metals: A review [J]. *Biological Wastes*, 1990, 31(1): 45-67

- [80] Amir S, Hafidi M, Merlina G, Revel J C. Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge [J]. *Chemosphere*, 2005, 59(6): 801-810
- [81] Pinto-Ibieta F, Serrano A, Jeison D, Borja R, Feroso F G. Effect of cobalt supplementation and fractionation on the biological response in the biomethanization of olive mill solid waste [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 211: 58-64
- [82] Liu Y, Chang S, Defersha F M. Characterization of the proton binding sites of extracellular polymeric substances in an anaerobic membrane bioreactor [J]. *Water Research*, 2015, 78: 133-143
- [83] Sterritt R M, Lester J N. Significance and behavior of heavy metals in waste water treatment processes. 2. sludge treatment and disposal [J]. *Science of the Total Environment*, 1983, 30 (S): 45-83
- [84] Filgueiras A V, Lavilla I, Bendicho C. Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2002, 4(6): 823-857
- [85] Van Hullebusch E D, Utomo S, Zandvoort M H, Lens P N L. Comparison of three sequential extraction procedures to describe metal fractionation in anaerobic granular sludges [J]. *Talanta*, 2005, 65(2): 549-558
- [86] Osuna M B, Van Hullebusch E D, Zandvoort M H, Iza J, Lens P N L. Effect of cobalt sorption on metal fractionation in anaerobic granular sludge [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33(4): 1256-1270
- [87] Arain M B, Kazi T G, Jamali M K, Afridi H I, Jalbani N, Sarfraz R A, Baig J A, Kandhro G A, Memon M A. Time saving modified BCR sequential extraction procedure for the fraction of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in sediment samples of polluted lake [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 160 (1): 235-239
- [88] Rao C R M, Sahuquillo A, Sanchez J F L. A review of the different methods applied in environmental geochemistry for single and sequential extraction of trace elements in soils and related materials [J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2008, 189 (1-4): 291-333
- [89] Hsu L C, Liu Y T, Tzou Y M. Comparison of the spectroscopic speciation and chemical fractionation of chromium in contaminated paddy soils [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 296: 230-238
- [90] Gleyzes C, Tellier S, Astruc M. Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments; a review of sequential extraction procedures [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21(6-7): 451-467
- [91] Hu Q H, Li X F, Du G C, Chen J. Effect of nitrilotriacetic acid on bioavailability of nickel during methane fermentation [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2008, 143(1-3): 111-116
- [92] 胡庆昊. 镍及其螯合物对甲烷发酵的影响及机理研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2008
- Hu Q H. Effects of Ni and Ni complexes on methane fermentation and their mechanism [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008 (in Chinese)
- [93] Gonzalez-Gil G, Jansen S, Zandvoort M H, van Leeuwen H P. Effect of yeast extract on speciation and bioavailability of nickel and cobalt in anaerobic bioreactors [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 82(2): 134-142
- [94] Aquino S F, Stuckey D C. Bioavailability and toxicity of metal nutrients during anaerobic digestion [J]. *Journal of Environmental Engineering-ASCE*, 2007, 133(1): 28-35
- [95] Satyro S, Marotta R, Clarizia L, Vitiello G, Dezotti M, Pinto G, Dantas R F, Andreozzi R. Removal of EDDS and copper from waters by TiO<sub>2</sub> photocatalysis under simulated UV-solar conditions [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2014, 251: 257-268
- [96] Kuo W C, Parkin G F. Characterization of soluble microbial products from anaerobic treatment by molecular weight distribution and nickel-chelating properties [J]. *Water Research*, 1996, 30(4): 915-922
- [97] Patidar S K, Tare V. Soluble microbial products formation and their effect on trace metal availability during anaerobic degradation of sulfate laden organics [J]. *Water Science & Technology*, 2008, 58(4): 749-755
- [98] Marcato C E, Pinelli E, Cecchi M, Winterton P, Guirese M. Bioavailability of Cu and Zn in raw and anaerobically digested pig slurry [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(5): 1538-1544
- [99] Gonzalez-Gil G, Lopes S I C, Saikaly P E, Lens P N L. Leaching and accumulation of trace elements in sulfate reducing granular sludge under concomitant thermophilic and low pH conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 126: 238-246

责任编辑：吕晓梅