

金霉素浓度对鸡粪中温厌氧消化特性及抗生素降解的影响

强 虹¹, 杨祎楠¹, 李 娜¹, 宋亚楠¹, 李玉友²

(1. 西北农林科技大学资源环境学院, 杨凌 712100; 2. 日本东北大学工学部, 仙台 980-8579)

摘 要: 针对抗生素污染对鸡粪厌氧消化影响不明的问题, 该文利用批次试验探究了不同质量浓度金霉素(chlortetracycline, CTC) (4~200 mg/L) 对鸡粪中温厌氧消化过程、产气效率及抗生素降解的影响。结果表明, 低浓度的 CTC (质量浓度≤20 mg/L) 促进了鸡粪中温厌氧消化作用, 其对累积水解、酸化、乙酸化及甲烷化的最大促进率较对照(质量浓度 0 mg/L) 分别提高了 12.69%, 11.55%, 11.31% 和 9.82%, 厌氧消化有效降解了鸡粪中的 CTC, 降解率为 59.87%~71.95%, 这是因为厌氧污泥胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS) 由结合态(松散结合态(loosely bound EPS, LB-EPS) 和紧密结合态(tightly bound EPS, TB-EPS)) 转化为黏液态(slime EPS, S-EPS) 促进了水解作用, 另外, CTC 降解提供的碳源进一步促进了甲烷的生成。高浓度 CTC (质量浓度≥60 mg/L) 抑制了鸡粪中温厌氧消化作用, 且抑制率随 CTC 质量浓度的增大而升高, 对累积水解、酸化、乙酸化及甲烷化的最大抑制率分别为 16.48%, 18.54%, 18.96% 和 19.94%, CTC 的降解率为 43.4%~51.44%; 在此条件下污泥 EPS 较对照提高了 13.81%~39.23%, 其中 EPS 蛋白浓度由 943.01 mg/L 增加为 1 083.69~1 338.20 mg/L。中温条件下 CTC 对鸡粪厌氧消化抑制阈值为 22.16 mg/L。消化结束后, 沼液和沼渣中的 CTC 分别占总量的 0.46%~3.13% 和 96.87%~99.54%, 表明 CTC 绝大部分残留在沼渣中, 存在较大环境风险, 所以应对沼渣进一步无害化处理后才可还田使用。

关键词: 厌氧消化; 抗生素; 粪; 甲烷产量; 金霉素; 胞外聚合物

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.10.023

中图分类号: S216.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2019)-10-0181-10

强 虹, 杨祎楠, 李 娜, 宋亚楠, 李玉友. 金霉素浓度对鸡粪中温厌氧消化特性及抗生素降解的影响[J]. 农业工程学报, 2019, 35(10): 181—190. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.10.023 <http://www.tcsae.org>

Qiang Hong, Yang Yinan, Li Na, Song Yanan, Li Yuyou. Effect of chlortetracycline concentration on mesophilic anaerobic digestion characteristics and antibiotic degradation of chicken manure[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2019, 35(10): 181—190. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.10.023 <http://www.tcsae.org>

0 引 言

随着中国肉鸡、蛋鸡集约化养殖的发展, 鸡粪产量不断增加。据不完全统计, 2015 年全国鸡粪(包括尿液量)排放量高达 3.93 亿 t^[1]。大量未经处理的鸡粪直接排放, 对水体、土壤、大气等环境造成严重污染^[2]。目前, 畜禽粪便处理处置主要有 3 种方式: 存储后集中利用、堆肥处理、厌氧消化处理。在畜禽养殖业, 厌氧发酵技术被认为是合乎环境可持续发展要求、最具有前景的发展技术之一, 目前被普遍应用于养殖场的粪污处理^[3]。尤其中温条件下的厌氧消化因节能与稳定而具有良好的工程应用前景。截至 2012 年末全国大中型猪场沼气工程的覆盖率已达 52.6%(约为 1.28 万处)^[4]。国务院印发的《“十二五”时期国家战略性新兴产业发展规划》有关生物能产业的发展目标中, 到 2020 年, 沼气产量将提高到 500 亿 m³^[5]。

厌氧消化的核心是实现鸡粪中富含的有机质的高效能源化^[6]。据估算, 2015 年鸡粪产沼潜力为 275 亿 m³,

折标天然气达 172 亿 m³^[7]。同时发酵产生的沼液营养成分速缓兼备, 养分可利用率高, 是多元、卫生的速效复合肥料和生物农药, 可以增加产量、提高品质、增强抗性、抑制病害、改良土壤, 具有较高的应用价值。沼液作为肥料在农田施用是一种传统的、经济有效的处置方式^[8], 另外, 基于无害化处理达标排放与高附加值产品开发的沼液资源的回收利用, 将对中国资源不足问题起到一定的缓解作用^[9]。所以, 产生的沼液经过合理处理与处置后不仅不会造成二次污染, 而且还会从中回收有用的资源。

但规模化养鸡中普遍采用添加抗生素来促进生长、预防和治疗疾病^[10-11]。据报道, 中国各种类型的兽用抗生素的残留浓度均高于世界其他国家, 特别是四环素类抗生素^[12]。中国北方地区一只鸡的金霉素(chlortetracycline, CTC) 年使用量为磺胺类、大环内酯类等其他抗生素的 5~500 倍^[13], 加之鸡的消化道较短, 约有 80%~95% 的药物通过粪便和尿液排出体外^[14], 导致鸡粪中 CTC 残留浓度高(563.8 mg/kg^[15])。伴随着施肥 CTC 会造成土壤污染^[16], 影响农作物生长; 经过富集、吸附和淋溶后被作物吸收或迁移至地表水和地下水^[17]。此外, 由抗生素诱导产生的抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)在各介质中累积和传播^[3], 严重威胁公共健康和生态平衡。向农田施用未经无害化处理的粪肥会引起动

收稿日期: 2018-12-17 修订日期: 2019-04-15

基金项目: 陕西省重点研发计划项目资助(2018NY-004); 国家自然科学基金资助项目(51308460)

作者简介: 强 虹, 副教授, 主要研究方向为废弃物以及污水资源化处理和利用。Email: qiangh2003@hotmail.com

植物的生态毒性, 集约化畜禽养殖造成的兽用抗生素严重污染已经引起人们的广泛关注^[18]。国际兽药协调委员会 (veterinary international conference on harmonization, VICH) 规定, 抗生素在土壤中的生态安全触发值为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[19], 而中国约有 50% 施用鸡粪肥的农田土壤样品中 CTC 残留量高于触发值^[15,20], 存在一定潜在风险。

厌氧消化不仅是畜禽粪便资源化利用的有效方式, 其对抗生素的削减作用也很显著^[21]。但这种削减作用除与抗生素种类、浓度有关外, 也受发酵基质类型的影响。如牛粪中的泰乐菌素经过 4 d 的厌氧发酵几乎能够全部去除, 但其在猪粪中却难以降解^[22-23]。中温条件下 (35 $^{\circ}\text{C}$) 猪粪中 CTC 在厌氧消化 21 d 后的去除率高达 92.5%^[24], 而相同温度条件下牛粪经 33 d 厌氧消化后 CTC 的去除率仅为 75%^[25]。

尽管在厌氧条件下 CTC 能部分降解, 但由于其本身的抗菌特性影响着消化系统中的厌氧微生物, 从而抑制有机物的生物降解和发酵效率。Stone 等^[26]研究发现, 猪粪中的 CTC 降低了两种乙酸型产甲烷菌的相对丰度, 抑制了甲烷的产生。Sanz 等^[27]报道 CTC 是古细菌的有效抑制剂, 高浓度的 CTC 可显著抑制嗜乙酸甲烷菌的活性, 使产甲烷受到一定抑制。牛粪中 20 mg/L CTC、泰乐菌素和磺胺二甲嘧啶联合可在消化初期导致产甲烷下降了 35.6%^[28]; 但也有仅 CTC 质量浓度高于 80 mg/kg 时才会降低猪粪甲烷产量^[29]的报道。

沼气工程基本成为中国规模养殖场的“标配”, 但 CTC 对鸡粪厌氧产气的影响和厌氧消化对鸡粪中 CTC 的生物降解还不清楚, 制约了畜禽粪污中抗生素在厌氧生物处理系统中迁移转化规律的研究和强化去除方法的开发; 再者, 尽管许多研究表明抗生素对厌氧消化具有明显抑制作用, 但是 CTC 对鸡粪厌氧消化抑制规律还少见报道。目前发酵残留物 (即沼液和沼渣) 总量超过 $1.30 \times 10^9 \text{ t}$, 大部分未经处理就直接还田或排放^[4], 明确消化液中 CTC 残留水平, 以及固/液相中的分布特征对深入无害化处理工艺的选择和控制抗生素向环境的输出具有重要意义。

本研究采用批次试验探究不同浓度 CTC 对鸡粪中温厌氧消化产气效率和消化过程的影响, 明确 CTC 对厌氧消化促进/抑制、厌氧消化对 CTC 的生物降解规律, 以及消化液中 CTC 固液分布特征, 研究结果将有助于排除抗生素对厌氧生物处理的障碍, 避免和消除抗生素在厌氧消化中的抑制作用, 以期对鸡粪厌氧消化工程中抗生素去除提供理论支撑, 并对沼渣、沼液处置风险评估提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗生素

抗生素为金霉素盐酸盐 (CTC) 粉剂, 购于北京百灵威科技有限公司, 化学式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_8 \cdot \text{HCl}$, 相对分子质量为 515.34, 纯度 $\geq 97\%$, 配制成 0.1 g/L 的金霉素标准溶液备用。

1.1.2 基质

试验所用新鲜鸡粪取自陕西省杨凌示范区某养鸡场, 使用时拣出鸡毛、石子等杂物, 利用高速粉碎机将

其粉碎成匀浆状, 为避免高固体鸡粪发酵过程中可能产生的氨氮抑制问题, 加水调配至总固体 (total solid, TS) 为 4% 的基质。

1.1.3 接种污泥

接种污泥取自实验室连续稳定运行 120 d 的鸡粪中温厌氧发酵罐。基质和接种污泥的理化性质如表 1 所示。选择的鸡粪是没有受到 CTC 污染的。

表 1 基质和接种污泥特性
Table 1 Characteristics of substrate and seed sludge

指标 Parameters	基质 Substrate	接种污泥 Seed sludge
pH 值 pH value	7.17 $\pm$ 0.06	7.73 $\pm$ 0.01
总固体 TS/%	4.05 $\pm$ 0.05	1.12 $\pm$ 0.03
挥发性固体 VS/%	3.49 $\pm$ 0.04	0.68 $\pm$ 0.02
总化学需氧量 TCOD/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	38.47 $\pm$ 1.59	15.70 $\pm$ 3.73
蛋白质 Protein/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	17.17 $\pm$ 0.97	8.93 $\pm$ 1.56
多糖 Polysaccharide/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	10.96 $\pm$ 0.62	2.55 $\pm$ 0.28
氨氮 $\text{NH}_4^+-\text{N}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0.90 $\pm$ 0.01	1.44 $\pm$ 0.28
CTC/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	—

1.2 试验方法

先通过预试验掌握了 CTC 在低浓度和高浓度下对鸡粪厌氧消化的影响规律。为了研究不同 CTC 质量浓度对鸡粪厌氧消化作用的影响 (包括促进和抑制作用), 本试验中将研究报道中已有鸡粪中的 CTC 残留浓度 (563.8 mg/kg ^[15]) 包含其间, 试验添加的 CTC 质量分数为 0、100、200、500、1 500、3 000、5 000 mg/kg (相对应的基质中的质量浓度为 0、4、8、20、60、120、200 mg/L)。因为许多研究表明 CTC 对厌氧消化具有抑制作用^[5], 但 CTC 对鸡粪厌氧消化的抑制规律还未见报道。所以设置 CTC 为 1 500、3 000、5 000 mg/kg 较高浓度条件是为了研究 CTC 对鸡粪厌氧消化的抑制规律。试验设计如表 2 所示。通过添加 CTC 于基质中, 配置不同 CTC 浓度的 7 组处理 R1~R7, 其中 R1 为对照组。为扣除接种污泥产气的影响, 空白处理 R8 仅添加接种污泥。试验采用 250 mL 血清瓶, 有效容积为 200 mL。基质与接种污泥按照 1:3 质量比混合, 立即充氮气约 1 min, 排去瓶中顶空部分氧气后, 迅速塞上橡胶塞, 扣上铝盖, 用封口钳封紧瓶口, 放入 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡槽中振荡, 定期测定瓶中产气量及气体含量。各处理分别设置 3 组平行, 每组平行设置 3 个重复。其中 1 组平行用于气体测量, 另外 2 组平行样用于发酵中间破坏性取样, 分别在发酵 2、4、7、10、14、20 d 采用注射针取样, 测定消化液 pH 值、溶解性有机物 (soluble chemical oxygen demand, SCOD)、碱度、挥发性脂肪酸 (volatile fatty acid, VFAs) 浓度, 在消化第 2 天和第 20 天时测定消化液胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 浓度, 试验反应完全结束后, 开启瓶盖, 测定消化液中 CTC 浓度。

1.3 指标测定方法

总固体 (total solid, TS), 挥发性固体 (volatile solid, VS) 采用重量法测定^[30]。pH 值采用 pH 计测定 (赛多利斯 PB-10, 德国)。化学需氧量 (chemical oxygen demand,

COD) 采用 APHA (1995) 标准方法测定^[31]。SCOD, VFAs: 消化液在 15 000 g, 4 °C 高速冷冻离心机中离心 20 min, 取上清液, 过 0.45 μm 玻璃纤维滤膜后测定。VFAs 和 CH₄ 含量采用气相色谱仪测定(岛津 GC-2014, stablilwax-DA 色谱柱, 30 m×0.32 mm×0.50 μm, FID 检测器; P-Q 填充柱, 2 m×2 mm, TCD 检测器)^[32]。产气量采用注射针筒测量。蛋白质和多糖分别采用 Lowry 法和苯酚-硫酸法测定^[33]。

表 2 批次试验设计
Table 2 Batch experiment design

指标 Index	试验序号 Experiment No.							
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
接种泥 Seed sludge/g	150	150	150	150	150	150	150	150
基质 Substrate/g	50	50	50	50	50	50	50	0
金霉素质量浓度 CTC mass concentration/(mg·L ⁻¹)	0	4	8	20	60	120	200	0
金霉素质量分数 CTC mass fraction/(mg·kg ⁻¹)	0	100	200	500	1 500	3 000	5 000	0

厌氧污泥黏液态 (slime EPS, S-EPS)、松散结合态 (loosely bound EPS, LB-EPS)、紧密结合态 (tightly bound EPS, TB-EPS) 污泥胞外聚合物 (EPS) 的提取参照文献[34], 以 S-EPS (或 LB-EPS 和 TB-EPS) 中蛋白质和多糖之和表示 S-EPS (或 LB-EPS 和 TB-EPS) 总量。

残留 CTC 浓度 (T-CTC 浓度) 测定采用固相萃取-超高液相色谱法^[35-36]: 消化液加入 8 mL EDTA-McIlvaine 缓冲液, 旋振 30 s, 40 kHz, 300 W 下超声 30 min, 于 4 °C 下 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用, 反复提取 2 次, 将上清液混合, 取 5 mL 进行固相萃取净化。

固相萃取柱采用 HLB 小柱 (3 mL/60 mg, Biocomma)。依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 超纯水将 HLB 柱活化, 然后取 5 mL 样品提取液以约 1 mL/min 的速度过柱, 以 5 mL 超纯水进行淋洗, 以 5 mL 甲醇缓慢洗脱。收集洗脱液经氮气吹干后, 用 1.5 mL 流动相来溶解残留物, 经 0.22 μm 有机滤膜过滤, 保存于棕色自动进样瓶待测。

色谱条件: 采用日本岛津 Nexera UHPLC LC-30A 色谱仪, Shim-Pack XR-ODS 色谱柱 (50 mm×2.0 mm, 1.6 μm) 和光电二极管阵列紫外可见光检测器进行分析。柱温 40 °C, 样品室温度 15 °C, 进样量 5 μL。流动相 A 相为 0.1% 的甲酸, B 相为 V (甲醇):V (乙腈)=2:3, V (A):V (B)=2:1 进行洗脱, 共运行 4 min。流速均为 0.2 mL/min, 紫外检测波长为 375 nm。

液相 CTC 浓度 (L-CTC 浓度) 测定方法为: 消化液在 15 000 g, 4 °C 高速冷冻离心机中离心 20 min, 取上清液过 0.22 μm 玻璃纤维滤膜, 采用上述方法分别测定。

固相 CTC 浓度 (S-CTC 浓度)=T-CTC 浓度-L-CTC 浓度。

1.4 数据分析方法

1.4.1 甲烷生成量计算

相邻 2 次测定间隔产生的甲烷体积按式 (1) 计算^[37]。

$$V_{CH_4} = V_H \cdot \Delta C_{CH_4} + V_S \cdot C_{CH_4} \quad (1)$$

式中 V_{CH_4} 为相邻 2 次测定间隔产生甲烷体积, mL; V_H

为血清瓶顶空体积, 为 50 mL; ΔC_{CH_4} 指相邻 2 次测定间隔甲烷浓度的变化, %; V_S 为 2 次测定间隔生成的生物气量, mL; C_{CH_4} 为生物气甲烷体积分数, %。累积甲烷生成量计算方法为各处理累积甲烷产量减去接种污泥累积甲烷产量。

1.4.2 累积水解、酸化、乙酸化和甲烷化计算

厌氧消化过程中有机物依次经过水解、酸化、乙酸化最终转化为甲烷。在完全混合体系中这 4 个阶段是无法实现过程分离的, 但在该过程中有机物依次转化为 SCOD、VFAs 和乙酸, 并最终转化为甲烷, 所以可以通过公式 (2) ~ (5) 分别计算出厌氧消化过程中累积水解、酸化、乙酸化及甲烷化的总量。厌氧消化过程中累积水解 (cumulative hydrolysis, C_{Hydr} , g/g)、酸化 (cumulative acidogenesis, C_{Acid} , g/g)、乙酸化 (cumulative acetogenesis, C_{Acet} , g/g) 和甲烷化 (cumulative methanogenesis, C_{Meth} , g/g) 量由各过程以 SCOD 为基准的累积曲线表示。具体计算方法如式 (2) ~ (5) 所示^[37]。

$$C_{Hydr} = (V_{CH_4}/350 + C_{SCOD} \cdot V) \cdot COD_{add}^{-1} \quad (2)$$

$$C_{Acid} = (V_{CH_4}/350 + C_{VFAs} \cdot V) \cdot COD_{add}^{-1} \quad (3)$$

$$C_{Acet} = (V_{CH_4}/350 + C_{acetate} \cdot V) \cdot COD_{add}^{-1} \quad (4)$$

$$C_{Meth} = V_{CH_4}/350 \cdot COD_{add}^{-1} \quad (5)$$

式中 V_{CH_4} 为累积产甲烷体积, mL; 350 为 V_{CH_4} 体积转化为 SCOD 质量的换算系数; C_{SCOD} 为 SCOD 的质量浓度, g/L; V 为消化液的体积, mL; C_{VFAs} 为总挥发性脂肪酸的质量浓度, g/L (各有机酸统一折算为 SCOD 浓度); $C_{acetate}$ 为乙酸的质量浓度, g/L (折算为 SCOD 浓度); COD_{add} 为投加基质的 COD, g。

1.4.3 累积曲线动力学参数分析

为进一步探讨 CTC 对鸡粪中温厌氧消化的影响机制, 利用修正的 Gompertz 公式 (6) ^[38], 对不同 CTC 浓度下鸡粪厌氧消化 C_{Hydr} , C_{Acid} , C_{Acet} 和 C_{Meth} 曲线进行动力学拟合。采用 Origin 8.0 非线性拟合获得厌氧消化 C_{Hydr} , C_{Acid} , C_{Acet} 和 C_{Meth} 曲线动力学参数。

$$P = P_0 \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{max} \cdot e}{P_0} \cdot (t_0 - t) + 1 \right] \right\} \quad (6)$$

式中 P 为底物的转化率, g/g; P_0 为转化潜力, g/g; R_{max} 为最大转化速率, g/(g·d); t_0 为滞留时间, d; t 为发酵时间, d; e 为 2.718。

1.4.4 降解率、L-CTC 残留率和 S-CTC 残留率的计算

$$\text{降解率} = \frac{C \cdot V_1 - (T\text{-CTC 浓度}) \cdot V_2}{C \cdot V_1} \times 100\% \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \text{L-CTC 残留率} = \\ \frac{(\text{L-CTC 浓度}) \cdot V_2 \cdot (1 - TS) \cdot 10^{-3}}{(T\text{-CTC 浓度}) \cdot V_2} \times 100\% \end{aligned} \quad (8)$$

$$\text{S-CTC 残留率} = 1 - (\text{L-CTC 残留率}) \quad (9)$$

式中 C 为 CTC 添加质量浓度, mg/L; V_1 为加入基质的体积, 50×10⁻³ L; V_2 为血清瓶有效容积, 200×10⁻³ L; TS

为消化液总固体质量分数, %。

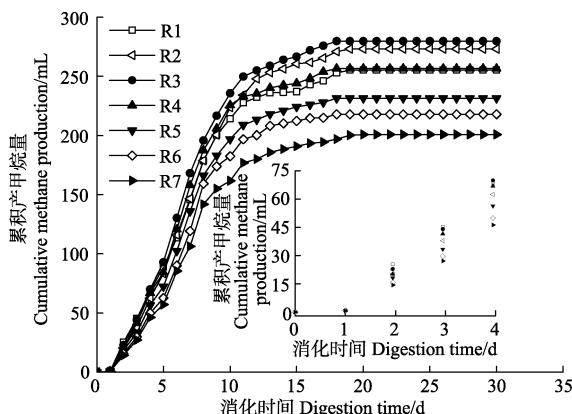
1.4.5 数据统计与分析

不同 CTC 浓度条件下累积甲烷产量、EPS 浓度和 CTC 降解率、以及 CTC 液、固相分布之间的差异显著性通过 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析 ($P < 0.05$); 采用 Origin 8.0 作图。

2 结果与分析

2.1 CTC 对鸡粪中温厌氧消化产甲烷潜能的影响

本试验中不同 CTC 浓度鸡粪中温厌氧消化累积产甲烷量变化如图 1 所示。从图 1 可知, 消化前期 (0~3 d), R1 累积产甲烷量始终高于 R2~R7, 4d 后 R2~R3 累积产甲烷量逐渐超过 R1, 消化结束时累积产甲烷量分别为 273.14 和 279.72 mL, 比 R1 累积产甲烷量 255.26 mL 分别显著增加了 7.01% 和 9.58% ($P < 0.05$), 表明 CTC 质量浓度 ≤ 8 mg/L 时, 在消化前期具有轻微抑制作用, 随着消化的进行, 微生物经过适应性驯化后活性不但逐渐恢复, 而且得到增强, 随着 CTC 浓度的增加, 对消化的促进作用增加。Wang 等^[39]针对 CTC 污染猪粪的厌氧消化研究也发现, 经过 21 d 的适应期, 厌氧消化功能菌潜力被激发, 使总产气量提高了 21.6%。



注: R1~R7 含义见表 2, 下同, R1~R7 的累积产甲烷量为扣除污泥背景 (R8) 后的值。

Note: R1~R7 refer to Table 2 (the same as below), the cumulative methane production for R1~R7 is measured on the basis of its value minus the value of the background (R8).

图 1 不同 CTC 浓度鸡粪中温厌氧消化累积产甲烷量变化
Fig.1 Variation of cumulative methane production at different CTC concentrations during mesophilic anaerobic digestion of chicken manure

消化结束时 R4 的累积产甲烷量为 256.64 mL, 仅比 R1 提高了 0.54%。R5~R7 累积产甲烷量分别为 231.50、217.86 和 200.80 mL, 比 R1 分别显著减少了 9.31%、14.65% 和 21.34% ($P < 0.05$), 表明 CTC 质量浓度高于 60 mg/L 时累积产甲烷受到抑制, 且对消化的抑制率随 CTC 浓度的升高而增大, 这是由于 CTC 可对部分革兰氏阴性的厌氧消化产甲烷菌产生抑制作用所致。随着 CTC 浓度的增加, 细菌丰富度值逐渐降低^[5], 因而对产气的抑制作用增大。Yin 等^[29]对含 CTC 猪粪中温厌氧消化的研究也表明, 较高浓度 CTC 对产甲烷具有抑制作用。CTC 对鸡粪高温厌氧消化的毒性抑制质量浓度为 0.4 mg/L^[40], 对

抑制率或促进率随 CTC 浓度变化曲线的数值拟合表明, 中温条件下 CTC 的抑制阈值为 22.16 mg/L (图 2), 表明中温条件下微生物对 CTC 的毒性抗性更强。这是由于中温条件下微生物种群更为丰富, 所以系统更稳定所致^[21]。

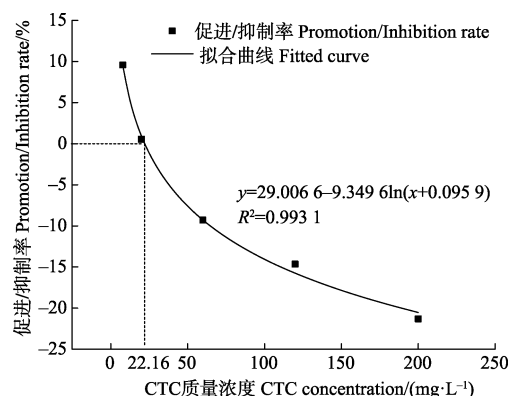


图 2 不同 CTC 质量浓度条件下产甲烷促进/抑制率变化
Fig.2 Variation of promotion/inhibition rate of cumulative methane production at different CTC mass concentrations

2.2 CTC 对鸡粪中温厌氧消化进程的影响

水解, 酸化, 乙酸化和甲烷化是有机物质厌氧分解要经历的 4 个主要阶段, 其相对独立, 又相互制约, 对厌氧消化起着至关重要的作用。为了进一步明确不同 CTC 浓度对鸡粪中温厌氧消化各个阶段的影响, 采用修正的 Gompertz 方程对厌氧消化 C_{Hydr} , C_{Acid} , C_{Acet} 和 C_{Meth} 曲线进行拟合, 结果如图 3 所示。

由图 3 可知, 在厌氧消化前期 (0~3 d), R2~R7 促进了水解, 但抑制了酸化、乙酸化和甲烷化, 表明水解产物向酸和乙酸转化过程受阻, 可能是由于消化前期产乙酸菌和乙酸型产甲烷菌对 CTC 的暂时性不适应而导致的微生物活性不强所致^[41]。

不同 CTC 浓度下鸡粪中温厌氧消化 C_{Hydr} , C_{Acid} , C_{Acet} 和 C_{Meth} 曲线动力学参数如表 3 所示, 在 R1~R7 中, $R_{max}(C_{Hydr}) > R_{max}(C_{Acid}) > R_{max}(C_{Acet}) = R_{max}(C_{Meth})$, 表明鸡粪中固态有机物很容易水解为溶解性的有机物, 而后者酸化过程较慢, 这可能与鸡粪富含的蛋白质类物质 (表 1) 转化较慢有关。由于各 CTC 浓度下酸化过程发生较为明显的滞后现象 (1.6~2.1 d) (表 3 C_{Acid} 的 R1~R7 中的 t_0 范围), 造成水解产物的累积, 累积水解产物的最终集中酸化导致酸化速率 ($R_{max}(C_{Acid})$) 大于乙酸化 ($R_{max}(C_{Acet})$) 和甲烷化速率 ($R_{max}(C_{Meth})$)。R2~R7 中 $R_{max}(C_{Hydr})$ 和 $R_{max}(C_{Acid})$ 大于 R1 中的相应值; R2~R4 中 $R_{max}(C_{Acet})$ 和 $R_{max}(C_{Meth})$ 大于 R1 中的, 表明 CTC 促进了鸡粪的水解和酸化, 并且当 CTC 质量浓度 ≤ 20 mg/L 时, 同样促进了鸡粪厌氧消化中的乙酸化和甲烷化作用。

R1~R7 条件下, 在 C_{Hydr} , C_{Acid} , C_{Acet} 和 C_{Meth} 各过程中 $P_0(R2~R4) > P_0(R1) > P_0(R5~R7)$, 表明 CTC 质量浓度 ≤ 20 mg/L 时, 对鸡粪厌氧消化各过程均产生促进作用, 较对照 R1 的促进率为 1.23%~12.69%, 其中 R3 对 C_{Hydr} , C_{Acid} , C_{Acet} 和 C_{Meth} 的促进作用最大, 分别为 12.69%, 11.55%, 11.31% 和 9.82%。与此不同, 当 CTC 浓度高于 60 mg/L 时, 对厌氧消化各过程均产生抑

制作用, 且抑制程度随 CTC 浓度的提高而增大, 抑制率为 5.12%~19.94%, 其中 R7 对 C_{Hydr} , C_{Acid} , C_{Acet} 和 C_{Meth} 抑制率最大, 分别为 16.48%, 18.54%, 18.96% 和 19.94%。R1~R7 条件下, $P_0(C_{\text{Hydr}}) > P_0(C_{\text{Acid}}) \approx$

$P_0(C_{\text{Acet}}) \approx P_0(C_{\text{Meth}})$, 表明厌氧消化过程中只有约 72% 的水解产物转化为有机酸, 而有机酸最终几乎全部转化为乙酸, 进而转化为甲烷, 说明各 CTC 浓度条件下酸化是限制鸡粪厌氧消化的关键步骤。

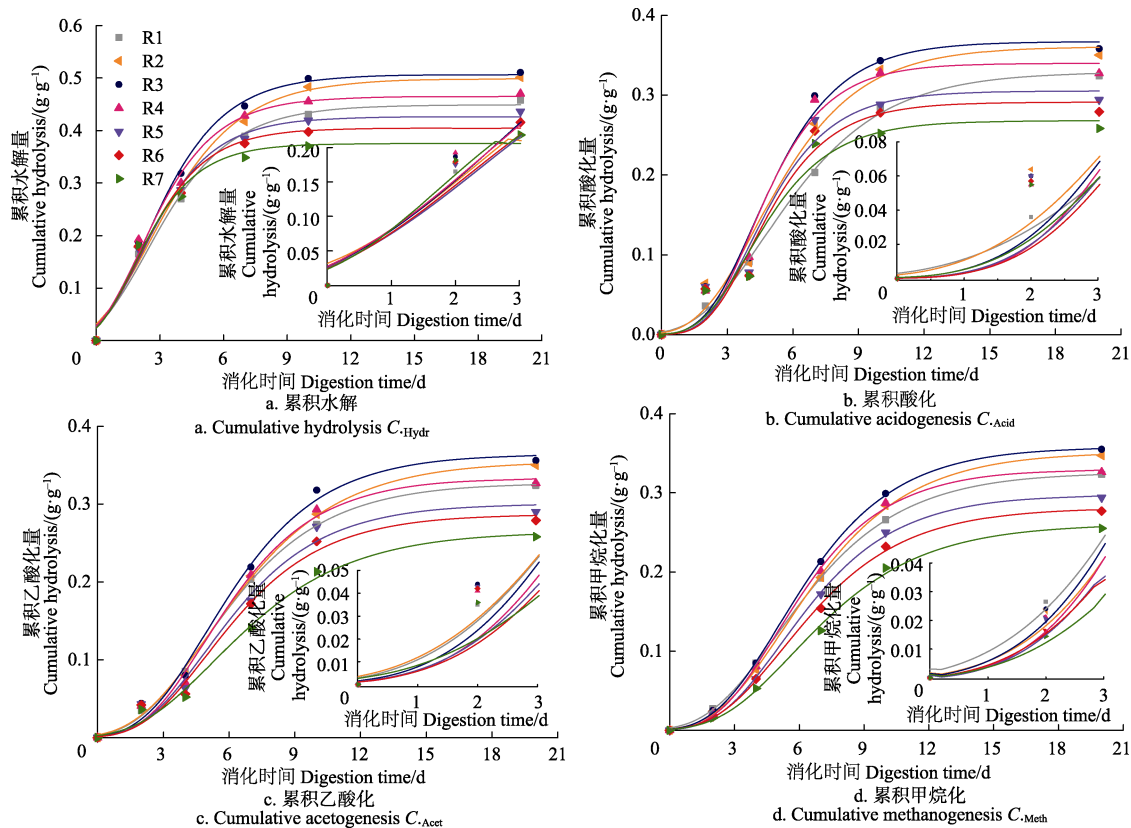


图 3 利用修正的高斯方程对不同 CTC 浓度鸡粪中温厌氧消化累积水解 C_{Hydr} , 酸化 C_{Acid} , 乙酸化 C_{Acet} 和甲烷化 C_{Meth} 曲线拟合
Fig.3 Fitted curves of C_{Hydr} , C_{Acid} , C_{Acet} and C_{Meth} by modified Gompertz model at different CTC concentrations during mesophilic anaerobic digestion of chicken manure

表 3 不同 CTC 浓度下鸡粪中温厌氧消化 C_{Hydr} , C_{Acid} , C_{Acet} 和 C_{Meth} 曲线动力学参数
Table 3 Kinetic parameters of C_{Hydr} , C_{Acid} , C_{Acet} and C_{Meth} from modified Gompertz model in mesophilic anaerobic digestion of chicken manure

阶段 Phase	动力学参数 Kinetic parameters	组别 Groups						
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
累积水解 C_{Hydr}	P_0	0.449±0.018	0.499±0.022	0.506±0.017	0.465±0.018	0.426±0.015	0.405±0.015	0.375±0.015
	R_{max}	0.073±0.011	0.076±0.011	0.088±0.011	0.086±0.014	0.080±0.012	0.081±0.014	0.081±0.016
	t_0	0.047±0.435	0.022±0.475	0.137±0.368	0.063±0.435	0.074±0.401	0.055±0.420	0.024±0.462
	R^2	0.984	0.982	0.988	0.982	0.984	0.982	0.976
累积酸化 C_{Acid}	P_0	0.329±0.007	0.361±0.025	0.367±0.026	0.340±0.025	0.305±0.029	0.291±0.028	0.268±0.026
	R_{max}	0.040±0.002	0.051±0.010	0.062±0.015	0.064±0.018	0.055±0.019	0.053±0.019	0.047±0.016
	t_0	1.647±0.213	1.671±0.678	1.968±0.666	2.085±0.679	1.999±0.906	2.044±0.897	1.778±0.923
	R^2	0.997	0.969	0.966	0.962	0.934	0.935	0.933
累积乙酸化 C_{Acet}	P_0	0.327±0.006	0.355±0.011	0.364±0.016	0.334±0.016	0.301±0.020	0.287±0.019	0.265±0.014
	R_{max}	0.039±0.002	0.040±0.003	0.046±0.005	0.044±0.006	0.038±0.007	0.036±0.006	0.028±0.003
	t_0	1.692±0.179	1.731±0.317	2.009±0.447	2.087±0.461	2.014±0.677	2.048±0.649	1.815±0.534
	R^2	0.998	0.995	0.989	0.987	0.974	0.976	0.986
累积甲烷化 C_{Meth}	P_0	0.326±0.002	0.352±0.004	0.358±0.003	0.330±0.005	0.298±0.005	0.281±0.004	0.261±0.007
	R_{max}	0.038±0.001	0.040±0.001	0.045±0.001	0.044±0.002	0.037±0.002	0.034±0.002	0.028±0.002
	t_0	1.751±0.062	2.138±0.112	2.080±0.073	2.160±0.149	2.237±0.158	2.153±0.181	2.308±0.279
	R^2	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.996

注: P_0 为转化潜力, $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, R_{max} 为最大转化速率, $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; t_0 为滞留时间, d; R^2 为决定系数

Note: P_0 is the conversion potential, $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; R_{max} is the maximum conversion rate, $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; t_0 is the lag time, d; R^2 is the coefficients of determination.

2.3 CTC对厌氧污泥EPS的影响

EPS作为活性污泥的重要组成部分,是由微生物在一定条件下分泌、附着在污泥细胞表面的有机物质,是功能微生物应对有毒物质潜在威胁的第一道屏障^[42],因此明确CTC对厌氧污泥EPS的影响对探究厌氧菌对CTC的毒性响应机制具有重要意义。

图4为CTC浓度对鸡粪厌氧消化EPS的影响。由图4a可知,消化前期(第2天),CTC添加导致厌氧污泥EPS浓度较对照(0)显著提高了99.41%~128.16% ($P<0.05$),这可能是消化前期微生物对CTC的耐受性较差,CTC刺激微生物分泌出更多的生物高聚体,并形成网状结构以吸附或延缓CTC的扩散来保护自身的正常生理活动^[43]。张微^[44]针对四环素与EPS相互作用的研究中证明了反应器中好氧活性污泥EPS随四环素浓度的升高而迅速增加。通过对EPS构成的分析,发现CTC添加条件下EPS蛋白在厌氧污泥EPS中的比例高达92.13%~93.73%,较对照显著增加了12.59%~14.19% ($P<0.05$),表明CTC的添加促进了厌氧污泥中胞外蛋白的释放。蛋白质是保护细胞的主要物质,其变化主要受微生物代谢活性影响^[45]。Wang等^[46]采用荧光光谱技术,在活性污泥EPS与头孢噻肟(cloxacillin)的相互作用机理研究中指出,头孢噻肟对EPS中2个蛋白峰在所有温度下均具有静态淬灭作用,说明抗生素与EPS产生了不发荧光的络合物,由此推测本研究中厌氧微生物增加蛋白质的分泌有可能与金霉素发生了络合,以防止细胞受到CTC迫害。

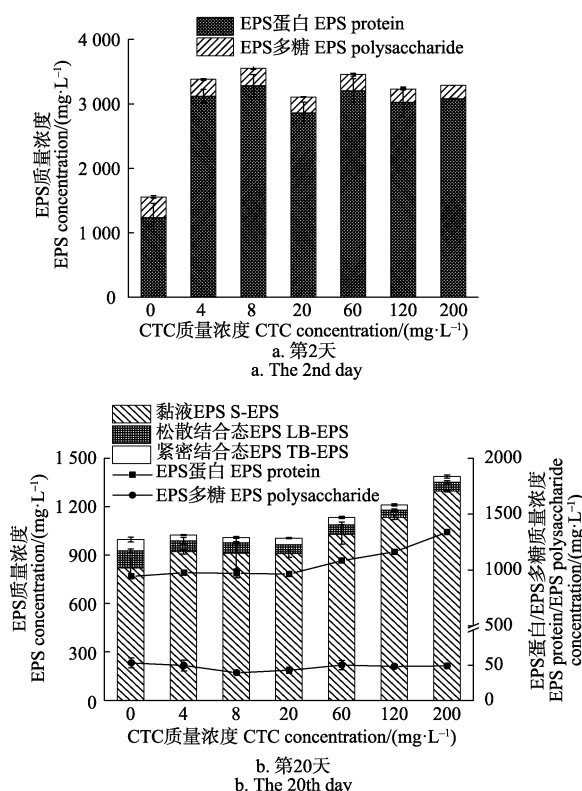


图4 CTC浓度对鸡粪中温厌氧消化胞外聚合物的影响

Fig.4 Effect of CTC on extracellular polymeric substances (EPS) concentration of mesophilic anaerobic digestion of chicken manure

图4b为消化结束时(第20天)添加不同CTC的厌氧污泥中EPS变化情况。由图可知,CTC质量浓度高于60 mg/L时,厌氧污泥EPS质量浓度较对照显著增加了13.81%~39.23% ($P<0.05$),由于在该条件下产甲烷受到抑制(图1),说明EPS质量浓度的增加是由于厌氧微生物为应对环境毒性而产生的自我保护,也有可能是长期暴露于高浓度抗生素下的细胞发生了大量裂解和死亡所致^[43]。进一步分析发现EPS蛋白质量浓度由943.01 mg/L增加为1083.69~1338.20 mg/L,表明抑制条件下微生物通过增加胞外聚合物分泌来增强对CTC的生物毒性抵抗力,很有可能通过胞外蛋白与CTC的络合来降低其毒性伤害。当CTC质量浓度低于20 mg/L时,厌氧污泥EPS浓度与对照无显著性差异 ($P>0.05$);但对EPS形态的分析发现,LB-EPS和TB-EPS在EPS中的比例分别显著下降了4.10%~5.28%和2.88%~3.48% ($P<0.05$),而S-EPS在EPS中所占的比例显著上升了7.58%~8.16% ($P<0.05$),说明3种形态EPS分布发生了变化。黏液态(S-EPS)和结合态(LB-EPS和TB-EPS)EPS的层层包裹维持着微生物活性,表明该条件下EPS由结合态向黏液态的转化在一定程度上促进了水解及消化,这与R2~R4对累积产甲烷量的促进作用相一致(图1)。

2.4 厌氧消化对CTC的削减及其在消化液中的分布

消化结束时不同CTC浓度鸡粪中温厌氧消化CTC的降解率及消化液中CTC固、液相残留分布如图5所示。CTC降解率随添加浓度增加而降低(图5a)。当CTC浓度 ≤ 20 mg/L时,厌氧消化对CTC的降解率为59.87%~71.95%。已有研究表明CTC结构中的氨基、羟基等活性基团提供了接枝点,使其易于生物降解^[47]或者被非特异性分解酶以共代谢作用去除^[48],降解的CTC可为微生物的生长提供碳源和能量^[43],从而促进了R2~R4的甲烷产量。

本研究虽然对厌氧消化中CTC代谢产物的浓度未做测定,但是已经有研究表明CTC在厌氧发酵中可能生成异构金霉素(ICTC)和或差向金霉素(ECTC)等产物,ECTC在体系中能很快被降解^[25]。由此可见,厌氧发酵能在一定程度上消减母体药物,形成毒性更低的产物,从而实现药物解毒。

消化结束时,随CTC添加浓度的增大,L-CTC和S-CTC提高,CTC在液相中的残留浓度为18.13~143.82 $\mu\text{g/L}$,在固相中的残留浓度为18.42~2026.08 mg/kg(图5b),L-CTC残留率由3.13%降低为0.46%,而S-CTC残留率由96.87%增加为99.54%(图5c)。表明CTC绝大部分残留于固相中,这是由于高浓度CTC条件下EPS分泌增加,增强了厌氧污泥对残留CTC的吸附作用所致。所以CTC浓度 ≥ 60 mg/L时,CTC的降解率显著减小为43.4%~51.44% ($P<0.05$),这意味着高浓度CTC条件下沼渣中残留的高浓度CTC对环境存在较大风险。

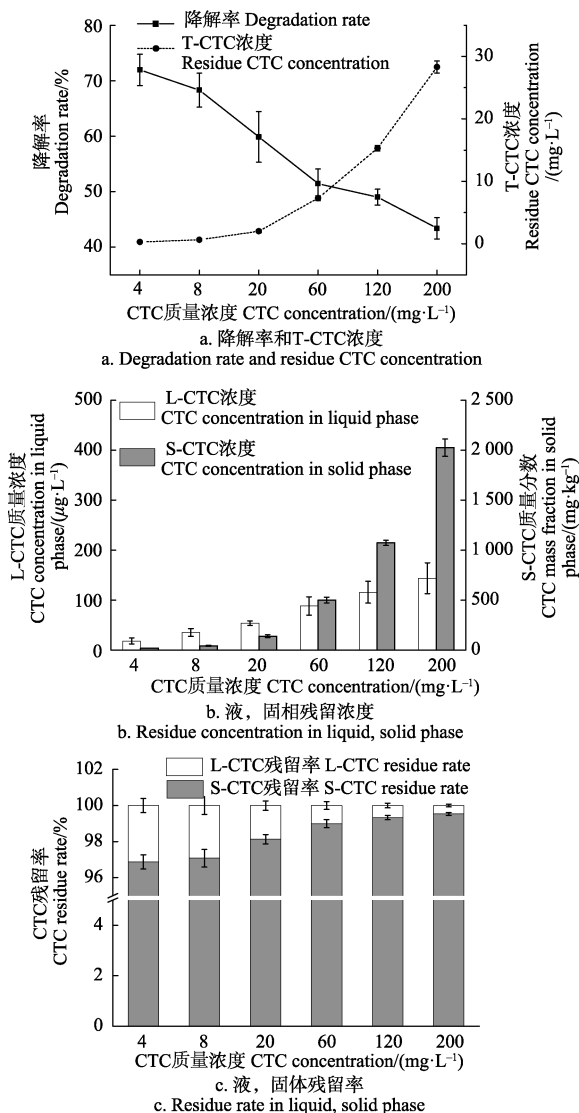


图 5 不同 CTC 浓度鸡粪中温厌氧消化 CTC 的降解率及液、固残留分布

Fig.5 Degradation rate and residue concentration in liquid and solid phases of CTC at 30th day of mesophilic anaerobic digestion of chicken manure at different CTC concentrations

3 结论

1) 当金霉素 (chlortetracycline, CTC) 浓度 ≤ 20 mg/L 时, 厌氧微生物在消化前期受到短暂抑制, 随后活性逐渐恢复并增强。累积甲烷产量随 CTC 浓度增加而增加 (0.54%~9.58%), 这是由于厌氧污泥胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 由松散结合态 EPS (loosely bound EPS, LB-EPS) 和紧密结合态 EPS (tightly bound EPS, TB-EPS) 向黏液态 EPS (slime EPS, S-EPS) 的转化, 对水解的促进作用及 CTC 降解提供的碳源所致。厌氧消化对 CTC 的降解率较高 (59.87%~71.95%)。

2) CTC 浓度 ≥ 60 mg/L 时产气受抑制, 且抑制率随 CTC 浓度升高而增大, 对累积水解、酸化、乙酸化以及甲烷化过程最大抑制率分别为 16.48%, 18.54%, 18.96% 和 19.94%。CTC 降解率为 43.4%~51.44%。EPS 蛋白由

943.01 mg/L 增加为 1 083.69~1 338.20 mg/L。表明抑制条件下微生物通过增加胞外聚合物分泌来增强对 CTC 的生物毒性抵抗力。

3) 发酵结束后 0.46%~3.13% 的 CTC 残留在沼液中, 而 96.87%~99.54% 的 CTC 残留在沼渣中。表明沼渣对环境存在较大威胁, 需进一步无害化处理后才可作为有机肥还田使用。

4) 各 CTC 浓度条件下酸化是限制鸡粪厌氧消化的关键步骤。中温条件下 CTC 对鸡粪厌氧消化抑制阈值为 22.16 mg/L。

[参 考 文 献]

- [1] 刘茹飞, 陈刚, 王明超, 等. 我国典型禽畜粪便资源化技术研究[J]. 再生资源与循环经济, 2017, 10(3): 37—40. Liu Rufe, Chen Gang, Wang Mingchao, et al. Research on resource utilization technology of livestock and poultry manure in China[J]. Recyclable Resources and Circular Economy, 2017, 10(3): 37—40. (in Chinese with English abstract)
- [2] 潘君廷, 马俊怡, 郜天磊, 等. 膨润土改善鸡粪厌氧消化产酸产甲烷特性[J]. 农业工程学报, 2016, 32(8): 246—252. Pan Junting, Ma Junyi, Gao Tianlei, et al. Improving production characteristics of methane and organic acid during anaerobic batch digestion of poultry manure by adding bentonite[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(8): 246—252. (in Chinese with English abstract)
- [3] 支苏丽, 周婧, 赵润, 等. 畜禽粪便厌氧发酵过程抗生素抗性基因趋归及驱动因子分析[J]. 农业工程学报, 2019, 35(1): 195—202. Zhi Suli, Zhou Jing, Zhao Run, et al. Analysis of antibiotic resistance genes fate and its drivers during anaerobic digestion of animal manure[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2019, 35(1): 195—202. (in Chinese with English abstract)
- [4] 许彩云, 靳红梅, 杜静, 等. 水力停留时间对猪粪厌氧发酵残留物中磺胺类抗生素分布的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(11): 2187—2194. Xu Caiyun, Jin Hongmei, Du Jing, et al. Effects of hydraulic retention time on sulfonamides distributions in anaerobic digestates of swine manure[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2016, 35(11): 2187—2194. (in Chinese with English abstract)
- [5] 尹福斌, 季超, 董红敏, 等. 畜禽粪便中残留抗生素对厌氧消化影响的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(5): 171—177. Yin Fubin, Ji Chao, Dong Hongmin, et al. Research progress on effect of antibiotic on anaerobic digestion treatment in animal manure[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, 18(5): 171—177. (in Chinese with English abstract)

- [6] 马旭光, 江滔, 唐琼, 等. 油菜秸秆和鸡粪比例及含固率对其发酵产甲烷特性的影响[J]. 农业工程学报, 2018, 34(12): 236—244.
Ma Xuguang, Jiang Tao, Tang Qiong, et al. Effect of total solid content on biogas production from rape stalk and chicken manure with different mixing ratios[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2018, 34(12): 236—244. (in Chinese with English abstract)
- [7] 张心如, 毛长青, 杜干英, 等. 成都市农村有机废弃污染物沼气潜力测算[J]. 畜禽业, 2017, 28(5): 69—71.
- [8] 李伟, 吴树彪, Hamidou Bah, 等. 沼气工程高效稳定运行技术现状及展望[J]. 农业机械学报, 2015, 46(7): 187—196, 202.
Li Wei, Wu Shubiao, Hamidou Bah, et al. Status analysis and development prospect of biogas engineering technology[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(7): 187—196, 202 (in Chinese with English abstract)
- [9] 张春, 郑利兵, 郁达伟, 等. 沼液处理与资源化利用现状与展望[J]. 中国沼气, 2018, 36(5): 36—46.
Zhang Chun, Zheng Libing, Yu Dawei, et al. Current situation and prospect of biogas slurry treatment and its resource utilization[J]. China Biogas, 2018, 36(5): 36—46. (in Chinese with English abstract)
- [10] Elmund G K, Morrison S M, Grant D W, et al. Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste[J]. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology, 1971, 6(2): 129—132.
- [11] Zhang M, He L Y, Liu Y S, et al. Fate of veterinary antibiotics during animal manure composting[J]. Science of the Total Environment, 2019, 650: 1363—1370.
- [12] 曾巧云, 丁丹, 檀笑. 中国农业土壤中四环素类抗生素污染现状及来源研究进展[J]. 生态环境学报, 2018, 27(9): 1774—1782.
Zeng Qiaoyun, Ding dan, Tan Xiao. Pollution status and sources of tetracycline antibiotics in agricultural soil in China: A review[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2018, 27(9): 1774—1782. (in Chinese with English abstract)
- [13] 凌文翠, 范玉梅, 方瑶瑶, 等. 京津冀地区畜禽养殖业抗生素污染现状分析[J]. 环境工程技术学报, 2018, 8(4): 390—397.
Ling Wencui, Fan Yumei, Fang Yaoyao, et al. Antibiotics pollution of livestock and poultry breeding in Beijing-Tianjin-Hebei region[J]. Journal of Environmental Engineering Technology, 2018, 8(4): 390—397. (in Chinese with English abstract)
- [14] Peng P C, Wang Y, Liu L Y, et al. The excretion and environmental effects of amoxicillin, ciprofloxacin, and doxycycline residues in layer chicken manure[J]. Poultry Science, 2016, 95(5): 1033—1041.
- [15] 张志强. 设施菜田土壤四环素类抗生素污染与有机肥安全施用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
Zhang Zhiqiang. Study on Soil Tetracyclines Antibiotics Pollution and Safe Application of Manure in Greenhouse Vegetable Field[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013. (in Chinese with English abstract)
- [16] 王攀攀, 袁巧霞, 周文兵. 光催化降解沼液中四环素类抗生素效果及反应动力学研究[J]. 农业工程学报, 2018, 34(23): 193—198.
Wang Panpan, Yuan Qiaoxia, Zhou Wenbing. Study on photocatalytic degradation and reaction kinetics of tetracycline antibiotics in biogas slurry [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2018, 34(23): 193—198. (in Chinese with English abstract)
- [17] Cheng D, Liu X, Wang L, et al. Seasonal variation and sediment-water exchange of antibiotics in a shallower large lake in North China[J]. Science of The Total Environment, 2014, 476: 266—275.
- [18] Karina Y, Ekaterina P, Fernando P, et al. Assessment of three antimicrobial residue concentrations in broiler chicken droppings as a potential risk factor for public health and environment[J]. Environmental Research and Public Health, 2019, 16(1): 24—36.
- [19] Karcý A, Balçýođlu I A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey[J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(16): 4652—4664.
- [20] 王良, 刘思路, 代光胜, 等. 洱海流域畜禽饲料·粪便·土壤中四环素类抗生素残留分析[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(18): 70—72, 76.
Wang Liang, Liu Silu, Dai Guangsheng, et al. Analysis of residue of tetracyclines antibiotics in livestock manures and soil in Erhai-Lake Basin[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(18): 70—72, 76. (in Chinese with English abstract)
- [21] 郑佳伦, 刘超翔, 刘琳, 等. 畜禽养殖业主要废弃物处理工艺消除抗生素研究进展[J]. 环境化学, 2017, 36(1): 37—47.
Zheng Jialun, Liu Chaoxiang, Liu Lin, et al. Removal of antibiotics in waste and wastewater treatment facilities of animal breeding industry: A review[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(1): 37—47. (in Chinese with English abstract)
- [22] Mitchell S M, Ullman J L, Teel A L, et al. The effects of the antibiotics ampicillin, florfenicol, sulfamethazine, and tylosin on biogas production and their degradation efficiency during anaerobic digestion[J]. Bioresource Technology, 2013, 149: 244—252.
- [23] Kolz A C, Moorman T B, Ong S K, et al. Degradation and metabolite production of tylosin in anaerobic and aerobic swine-manure lagoons[J]. Water Environment Research, 2005, 77(1): 49—56.
- [24] Alvarez J A, Otero L, Lema J M, et al. The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(22): 8581—8586.
- [25] Arikani O A. Degradation and metabolization of chlortetracycline during the anaerobic digestion of manure

- from medicated calves[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 158(2): 485—490.
- [26] Stone J J, Clay S A, Zhu Z, et al. Effect of antimicrobial compounds tylosin and chlortetracycline during batch anaerobic swine manure digestion[J]. *Water Research*, 2009, 43(18): 4740—4750.
- [27] Sanz J L, Rodríguez N, Amils R. The action of antibiotics on the anaerobic digestion process[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 1997, 46: 587—592.
- [28] Withey J M, Mugo S M, Zhou T, et al. Depletion of hormones and antimicrobials in cattle manure using thermophilic anaerobic digestion[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2016, 91(9): 2404—2411.
- [29] Yin F, Dong H, Chao J, et al. Effects of anaerobic digestion on chlortetracycline and oxytetracycline degradation efficiency for swine manure[J]. *Waste Management*, 2016, 56: 540—546.
- [30] 乔玮, 熊林鹏, 毕少杰, 等. 梯度提高进料浓度对鸡粪连续中温发酵产甲烷的影响[J]. *农业工程学报*, 2018, 34(9): 233—239.
- Qiao Wei, Xiong Linpeng, Bi Shaojie, et al. Effect of gradually raising feeding total solid on methane production during continuous mesophilic fermentation of chicken manures[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2018, 34(9): 233—239. (in Chinese with English abstract)
- [31] APHA. Standard methods for the examination of water and waste water[S]. Washington DC: American Public Health Association, 1995.
- [32] 强虹, 李玉友, 裴梦富. COD/SO₄²⁻对青霉素菌渣厌氧消化影响[J]. *环境科学*, 2018, 39(7): 3443—3451.
- Qiang Hong, Li Yuyou, Pei Mengfu. Effect of COD/SO₄²⁻ ratio on anaerobic digestion of penicillin bacterial residue[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(7): 3443—3451. (in Chinese with English abstract)
- [33] Frolund B, Palmgren R, Keiding K, et al. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin[J]. *Water Research*, 1996, 30(8): 1749—1758.
- [34] Zhen G Y, Lu X Q, Li Y Y, et al. Innovative combination of electrolysis and Fe(II)-activated persulfate oxidation for improving the dewaterability of waste activated sludge[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 136(3): 654—663.
- [35] 罗庆, 孙丽娜, 胡筱敏. 固相萃取-高效液相色谱法测定畜禽粪便中罗红霉素和 3 种四环素类抗生素[J]. *分析试验室*, 2014, 33(8): 885—888.
- Luo Qing, Sun Lina, Hu Xiaomin. Simultaneous determination of roxithromycin and three tetracyclines in manure by high-performance liquid chromatography with a diode-array detector[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2014, 33(8): 885—888. (in Chinese with English abstract)
- [36] 张惠艳, 李艳菊, 顾金刚, 等. 高效液相色谱法测定药渣中残留金霉素[J]. *分析试验室*, 2014, 33(10): 1130—1134.
- Zhang Huiyan, Li Yanju, Gu Jingang, et al. Residual chlortetracycline measurement by high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2014, 33(10): 1130—1134. (in Chinese with English abstract)
- [37] Li Q, Qiao W, Wang X, et al. Kinetic characterization of thermophilic and mesophilic anaerobic digestion for coffee grounds and waste activated sludge[J]. *Waste Management*, 2015, 36: 77—85.
- [38] Lay J J, Li Y Y, Noike T. Mathematical model for methane production from landfill bioreactor[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 1998, 124(8): 730—736.
- [39] Wang R, Zhang J, Liu J, et al. Effects of chlortetracycline, Cu and their combination on the performance and microbial community dynamics in swine manure anaerobic digestion[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 67(5): 206—215.
- [40] 范超, 王欣, 刘伟, 等. 抗生素对鸡粪厌氧发酵过程影响的实验研究[J]. *黑龙江科学*, 2016, 7(22): 1—3, 19.
- Fan Chao, Wang Xin, Liu Wei, et al. Study on the impact of the antibiotics on fowl manure anaerobic fermentation[J]. *Heilongjiang Science*, 2016, 7(22): 1—3, 19. (in Chinese with English abstract)
- [41] Reyes-Contreras C, Vidal G. Methanogenic toxicity evaluation of chlortetracycline hydrochloride[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2015, 18(6): 445—450.
- [42] 宋悦, 魏亮亮, 赵庆良, 等. 活性污泥胞外聚合物的组成与结构特点及环境行为[J]. *环境保护科学*, 2017, 43(2): 35—40.
- Song Yue, Wei Liangliang, Zhao Qingliang, et al. Chemical structure and environmental behavior of extracellular polymeric substances in Sludge: A review[J]. *Environmental Protection Science*, 2017, 43(2): 35—40. (in Chinese with English abstract)
- [43] Lu X, Zhen G, Liu Y, et al. Long-term effect of the antibiotic cefalexin on methane production during waste activated sludge anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 169(5): 644—651.
- [44] 张微. 四环素与胞外聚合物的相互作用及其对污泥耐药性的影响[D]. 上海: 东华大学, 2014.
- Zhang Wei. Interaction between Tetracycline and Extracellular Polymers Substance(EPS) and its Effect on Activated Sludge Drug Resistance[D]. Shanghai: Donghua University, 2014. (in Chinese with English abstract)
- [45] 李冬, 吴青, 梁瑜海, 等. 不同基质条件对亚硝化污泥胞外聚合物的影响[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2015, 47(4): 81—86.
- Li Dong, Wu Qing, Liang Yuhai, et al. Effect of substrate concentration and type on the content of extracellular polymeric substances in the nitrification sludge[J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2015, 47(4): 81—86. (in Chinese with English abstract)
- [46] Wang Q, Li J J, Yu H G, et al. Interaction mechanism between stratified extracellular polymeric substances (EPS) from activated sludge and claforan in domestic wastewater[J]. *Desalination and Water Treatment*. 2018, 125: 271—277.
- [47] Qi X, Gunawan P, Xu R, et al. Cefalexin-immobilized multi-walled carbon nanotubes show strong antimicrobial and

anti-adhesion properties[J]. Chemical Engineering Science, 2012, 84(52): 552–556.

[48] 张翔宇, 李茹莹, 季民. 污水生物处理中抗生素的去除机制及影响因素[J]. 环境科学, 2018, 39(11): 5276–5288.

Zhang Xiangyu, Li Ruying, Ji Min. Mechanisms and influencing factors of antibiotic removal in sewage biological treatment[J]. Environmental Science, 2018, 39(11): 5276–5288. (in Chinese with English abstract)

Effect of chlortetracycline concentration on mesophilic anaerobic digestion characteristics and antibiotic degradation of chicken manure

Qiang Hong¹, Yang Yinan¹, Li Na¹, Song Yanan¹, Li Yuyou²

(1. College of Resource and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. School of Engineering, Tohoku University, Sendai 980-8579, Japan)

Abstract: Anaerobic digestion is a promising robust technology, which can not only reduce pollution of chicken manure but also produce energy, especially mesophilic anaerobic digestion of chicken manure has been widely used due to energy saving and long-term stability. In recent years, excess amount of antibiotics has been used in raising broilers to promote fast growth and prevent from diseases. The antibiotics residues problem in China rising day by day as compared to other countries, of which tetracycline antibiotic residues has been considered dangerous for living organisms. In China, it is reported that chlortetracycline residues especially in chicken manure was 563.8 mg/kg. Although, the toxicity threshold of antibiotics in soil regulated by Veterinary International Conference on Harmonization is 100 $\mu\text{g/kg}$, it has been found that, the chlortetracycline residues more than 50% of the soil sample in China has been found higher than the threshold. Anaerobic digestion technology plays an important role in degrading antibiotics residues, this process not only was affected by the antibiotics concentration and category, but also more importantly by substrate category. Chicken manure has greatly potential to produce higher biogas production per organic matter than swine and cattle manure, but the effect of chlortetracycline contamination on biogas production of mesophilic anaerobic digestion of that is still unclear, removal of chlortetracycline during anaerobic digestion of chicken manure also unknown. The effect of chlortetracycline on hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis during anaerobic digestion of chicken manure has not been deeply studied yet. Therefore, this study aimed to explore the effects of antibiotics on mesophilic anaerobic digestion of chicken manure. Influence of a wide range of chlortetracycline concentrations (4–200 mg/L CTC) on anaerobic digestion of chicken manure were investigated by batch experiments. The obtained results indicated that mesophilic methane production was increased when CTC concentration was less than 20 mg/L. More specifically, the ultimate increase rates of hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis for methane production were 12.69%, 11.55%, 11.31% and 9.82%, respectively. Indeed, the removal efficiency of CTC was increased from 59.87% to 71.95%. Further analysis showed that methane production was increased as a result of the transformation of extracellular polymer substances (EPS) from bound EPS (LB-EPS and TB-EPS) to slime EPS (S-EPS), which promoted the hydrolysis. In addition, the degradation of CTC produced the carbon sources for microorganisms. However, mesophilic methane production was inhibited when CTC concentration was higher than 60 mg/L. Moreover, the inhibition rate was increased with raising CTC concentration, among them the inhibitory effect of 200 mg/L CTC concentration was the strongest than others, the largest inhibition rate of 200 mg/L CTC concentration for hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis was 16.48%, 18.54%, 18.96% and 19.94%, respectively, and the removal efficiency of CTC reduced up to 43.4%–51.44%. EPS increased by 13.81%–39.23% compared with control, of which the concentration of EPS protein increased from 943.01 mg/L to 1 083.69–1 338.20 mg/L, it is assumed that bacterial resistance for CTC was increased by stimulating EPS secretion. Analysis of the distribution of residual CTC within the digester indicated that 0.46%–3.13% of CTC was existed in liquid digester, while 96.87%–99.54% of CTC was found in solid digester, which posed a significant threat to the environment. Further safe treatment was needed before solid digester used as organic fertilizer into field.

Keywords: anaerobic digestion; antibiotic; manure; methane production; chlortetracycline; extracellular polymeric substances