

# 瘤胃微生物厌氧消化降解木质纤维素废弃物 技术研究进展

穆 兰<sup>1,2</sup>, 徐凤莲<sup>2,3</sup>, 程占军<sup>4</sup>, 王依凡<sup>2,3</sup>, 石 岩<sup>1</sup>, 陶俊宇<sup>1,2,\*</sup>, 陈冠益<sup>1,2</sup>

(1. 天津商业大学 机械工程学院, 天津 300134; 2. 天津商业大学 环境能源+X 创新实验室, 天津 300134;  
3. 天津商业大学 生物技术与食品科学学院, 天津 300134; 4. 天津大学 环境科学与工程学院, 天津 300350)

**摘要:** 木质纤维素类生物质是厌氧消化生产生物能源的重要原料。然而,其复杂的三维结构造成厌氧消化过程中底物转化率低、技术经济性差等问题。反刍动物屠宰场废弃物—瘤胃液能够针对性地强化木质纤维素类生物质的降解与转化,与厌氧消化结合有望提升总体效率。近年来,国内外学者对瘤胃微生物厌氧消化降解木质纤维素类生物质进行了大量研究,同时,基于仿生原理的人工瘤胃发酵系统逐渐兴起。综述了反刍动物瘤胃微生物和木质纤维素组分降解酶的组成、多样性及相关基因,梳理了瘤胃微生物在木质纤维素生物质降解和甲烷、挥发性脂肪酸(VFAs)、氢气及其他增值产品制备等方面的研究进展,概述了仿瘤胃厌氧消化产甲烷系统的构建原理及应用效果,对瘤胃微生物在厌氧消化资源化利用方面的研究提出展望及建议,旨在为瘤胃微生物在木质纤维素类生物质降解转化及高值化利用提供思路与方法。

**关键词:** 瘤胃微生物; 木质纤维素; 纤维素降解酶; 人工瘤胃; 厌氧消化

中图分类号: X505; X703

文献标识码: A

## Research progress on anaerobic digestion and degradation of lignocellulosic waste by rumen microorganisms

MU Lan<sup>1,2</sup>, XU Fenglian<sup>2,3</sup>, CHENG Zhanjun<sup>4</sup>, WANG Yifan<sup>2,3</sup>, SHI Yan<sup>1</sup>,  
TAO Junyu<sup>1,2,\*</sup>, CHEN Guanyi<sup>1,2</sup>

(1. School of Mechanical Engineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;  
2. Interdisciplinary Innovation Lab for Environment and Energy, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China; 3. School of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China; 4. School of Environmental Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China)

**Abstract:** Lignocellulosic biomass waste is an important raw material for anaerobic digestion to produce bioenergy. However, its complex three-dimensional structure leads to a low substrate conversion rate and poor technical economic efficiency during anaerobic digestion. Rumen fluid from ruminant slaughterhouse waste can selectively enhance the degradation and transformation of lignocellulosic biomass. When combined with anaerobic digestion, it is expected to improve the overall efficiency. In recent years, domestic and foreign scholars have conducted extensive research on the anaerobic digestion of rumen microorganisms for degrading lignocellulosic biomass. Furthermore, artificial rumen fermentation systems based on bionic principles have gradually emerged. This paper reviews the composition, diversity and related genes of rumen microorganisms and lignocellulosic component degrading enzymes in ruminants. It also summarizes the research progress of rumen microorganisms in biomass waste

收稿日期: 2024-05-06

修回日期: 2024-06-24

DOI: 10.20078/j.eep.20240707

基金项目: 国家重点研发政府间国际科技创新合作项目(2022YFE0125100); 天津市自然科学基金资助项目(22JCQNJC01410)

作者简介: 穆 兰(1992—), 女, 河南新乡人, 讲师, 主要研究方向为固体有机废弃物生物发酵能源化。E-mail: mulan@tjcu.edu.cn

通讯作者: 陶俊宇(1992—), 男, 山东威海人, 讲师, 主要研究方向为固废资源化利用。E-mail: taojunyu@tju.edu.cn 或 taojunyu@tjcu.edu.cn

degradation and the production of methane, volatile fatty acid (VFAs), hydrogen and other value-added products. Additionally, this review provides an overview of the construction principles and application effects of anaerobic digestion methane production systems in simulated rumen. It further presents prospects and suggestions for the research of rumen microorganisms in the energy and resource utilization of anaerobic digestion. The intention is to provide ideas and methods for the degradation, transformation, and high-value utilization of lignocellulosic biomass by rumen microorganisms.

**Keywords:** Rumen microorganism; Lignocellulose; Cellulose degrading enzyme; Artificial rumen digestion system; Anaerobic digestion

## 0 引言

木质纤维素生物质能源化利用不仅可以减少化石燃料的消耗,还能减少温室气体及污染物的排放量。在众多工艺中,依赖于微生物代谢活动的厌氧消化技术具有独特的优势,可以将木质纤维素生物质转化为沼气、氢气或挥发性脂肪酸(VFAs)等资源化产品,该过程绿色清洁。然而,纤维素和半纤维素被木质素包裹形成紧凑的晶体结构和天然屏障,阻碍厌氧微生物对其进行降解,导致转化效率受到限制,厌氧消化工艺经济性及市场竞争力差。目前已开发的物理(机械粉碎、微波辐射、超声辐射),化学(酸处理、碱处理、离子液体、有机溶剂、氧化剂处理),生物(细菌、真菌、放线菌、复合菌系),联合处理(物化预处理、生物联合处理)等预处理技术可以有效去除木质素、增大生物质可接触表面、降低纤维素的结晶度,提高木质纤维素生物质的厌氧消化产气性能<sup>[1-2]</sup>,但这些方法存在成本较高、能耗大、潜在二次污染或处理周期过长等限制。反刍动物(牛、羊等)的瘤胃是一个天然发酵罐,其瘤胃微生物体系具有强大的木质纤维素水解酸化能力,这些瘤胃微生物相互作用并分泌许多酶,如纤维素酶、木聚糖酶,将复杂的木质纤维素生物质转化为可溶性有机物和VFAs,通常在2 d内能够降解60%以上的纤维素<sup>[3]</sup>。同时,瘤胃液是屠宰场主要的废弃物,将其作为污水进行处理造成高昂的投资和运营成本。

本文通过对相关文献的回顾与分析,阐述了瘤胃微生物中参与木质纤维素废弃物各组分解的功能菌群以及相关降解酶,梳理了目前瘤胃微生物在有机废弃物厌氧消化利用方面的研究进展,综述了近些年新兴的仿瘤胃厌氧消化体系的构建与调控,旨在为木质纤维素生物质瘤胃微生物高效厌氧消化资源化利用提供理论指导。

## 1 瘤胃内木质纤维素降解功能菌群

瘤胃微生物主要由细菌、厌氧真菌、原虫和产甲烷菌组成,每毫升瘤胃液含细菌约 $10^{10}$ 个、真菌约 $10^3$ 个、原生动物约 $10^8$ 个及少量产甲烷菌<sup>[4-5]</sup>。在厌氧消化系统中,这些丰富的水解酸化菌能够降解木质纤维素生物质转化成挥发性脂肪酸,再通过产甲烷菌产生沼气。瘤胃微生物主要组成见表1。

表1 瘤胃微生物区系分类及优势菌  
Table 1 Classification of rumen microbiota and dominant bacteria

瘤胃微生物区系	微生物组成(优势菌)	参考文献
细菌 (Bacteria)	梭状芽孢杆菌( <i>Clostridium</i> )、瘤胃球菌( <i>Ruminococcus</i> )、纤维杆菌( <i>Fibrobacter</i> )、普雷沃特氏菌( <i>Prevotella</i> )	[6-7]
真菌 (Fungi)	新美鞭菌属( <i>Neocallimastix</i> )、盲肠鞭菌属( <i>Caecomyces</i> )、瘤胃壶菌属( <i>Piromyces</i> )、厌氧鞭菌属( <i>Anaeromyces</i> )、根囊鞭菌属( <i>Orpinomyces</i> )、枝梗鞭菌属( <i>Cyllamyces</i> )	[8-9]
原生动物 (Protozoa)	厚毛属( <i>Dasytricha</i> )、内毛属( <i>Entodinium</i> )、鞘甲属( <i>Elytrophlaston</i> )、单甲属( <i>Eremplastron</i> )、前毛属( <i>Epidinium</i> )、后毛属( <i>Metadinium</i> )	[10]
产甲烷菌 (Archaea)	甲烷八叠球菌( <i>Methanosarcina</i> )、甲烷微菌( <i>Methanomicrobium</i> )、甲烷短杆菌( <i>Methanobrevibacter</i> )、甲烷杆菌( <i>Methanobacterium</i> )	[11-12]

### 1.1 瘤胃细菌

在瘤胃微生物中,瘤胃细菌占比最大,占瘤胃微生物总量的90%以上。其中超过3/4的瘤胃细菌附着于降解底物表面,少量瘤胃细菌定殖在瘤胃上皮或黏附于原虫表面等<sup>[13]</sup>。拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和变形菌门

(*Proteobacteria*)细菌是瘤胃微生物系统中公认的木质纤维素分解细菌<sup>[14-15]</sup>。在属水平上,发挥着重要作用的瘤胃细菌主要包括普雷沃茨菌(*Prevotella*)、纤维杆菌(*Fibrobacter*)、瘤胃球菌(*Ruminococcus*)、产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)等<sup>[16]</sup>。其中,黄化瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)主要通过产生高度结构化的纤维素酶体复合物降解纤维素和半纤维素,其代谢产物主要是琥珀酸、乙酸和甲酸等;产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)主要通过产生胞外囊泡实现降解,同时,其还可以向胞外分泌能够降解纤维素的纤维黏液和纤毛蛋白<sup>[17]</sup>。宏转录组分析也证实纤维杆菌属(*Fibrobacter*)能够分泌可以降解 $\beta$ -1,4糖苷键的纤维素酶<sup>[18]</sup>。

## 1.2 瘤胃真菌

瘤胃真菌在瘤胃微生物中占比较低(<8%),但其为木质纤维素的降解,同样作出重大贡献。瘤胃液中的真菌主要包括新丽鞭菌属(*Neocallimastix*)、瘤胃壶菌属真菌(*Piromyces*)、厌氧鞭菌属(*Anaeromyces*)和根囊鞭菌属(*Orpinomyces*)等<sup>[8-9]</sup>。它们产生大量多糖水解酶,包括 $\beta$ -葡萄糖苷酶、外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶和木聚糖酶等。这些由多糖水解酶组合成的纤维小体复合物能有效降解木质纤维素<sup>[19]</sup>。相较于瘤胃细菌,瘤胃真菌对木质纤维素的降解能力更强,约20%的入胃饲料是通过真菌作用降解。在降解过程中,真菌的菌丝能够穿透秸秆、青草等植物的细胞壁,实现细胞壁木质纤维结构的破坏,促进瘤胃细菌等进一步将其降解为甲酸、乙酸、乳酸及二氧化碳等。

## 1.3 瘤胃产甲烷菌

研究表明,瘤胃微生物主要是以水解酸化细菌为主,产甲烷菌的数量占比相对较少,一般只占瘤胃微生物总量的2%~4%<sup>[10]</sup>。目前已研究分离出的瘤胃液中的产甲烷菌主要有4个属,甲烷八叠球菌(*Methanosarcina*)、甲烷微菌(*Methanomicrobium*)、甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter*)和甲烷杆菌(*Methanobacterium*)<sup>[11-12]</sup>。在体外培养试验中,这些产甲烷菌能够利用瘤胃细菌及真菌发生己糖代谢产生的 $H_2$ 、 $CO_2$ 和甲酸等生成甲烷,降低 $H_2$ 的分压,减轻 $H_2$ 累积造成的抑制,并从热力学上促进纤维素类生物质的降解<sup>[20]</sup>。

## 1.4 瘤胃原虫

瘤胃系统中还含有纤毛原虫以及少量的鞭毛

虫,最常见的瘤胃原虫包括内毛虫属(*Entodinium*)、头毛虫(*Ophryoscolex*)和前毛属(*Epidinium*)等<sup>[21]</sup>。这些瘤胃原虫属于严格厌氧真核生物,可以吞噬木质纤维素颗粒物,并将其转化为多糖,代谢蛋白质为其他瘤胃微生物提供N源,也能直接以其他瘤胃微生物(如原核微生物)为食<sup>[22]</sup>。瘤胃原虫对瘤胃细菌的捕食促进了细菌群落演替和进化,强化了系统对木质纤维素类物质的降解能力。

瘤胃原虫与真菌一起将瘤胃中难以消化的木质纤维素物质进行降解,并释放 $H_2$ ,饲料中25%~30%的纤维类组分均由有纤毛原虫降解<sup>[23]</sup>。在瘤胃系统中,瘤胃真菌、细菌与有纤毛原虫相互依存又相互竞争,瘤胃真菌及有纤毛原虫凭借其强大的破坏大颗粒及植物细胞壁的能力,为细菌提供丰富的碎片化原料,但同时原虫又能包吞细菌和真菌,分泌几丁质分解酶将两者降解<sup>[24]</sup>。厌氧真菌的存在也被证明可以刺激产甲烷菌的生长,维持产甲烷菌的多样性<sup>[25]</sup>。此外,产甲烷菌可以利用瘤胃原虫氢化酶产生的 $H_2$ 将 $CO_2$ 转化成 $CH_4$ ,同时,产甲烷菌附着在瘤胃原虫表面,保护其免受 $O_2$ 的毒害<sup>[26]</sup>。

目前,虽然有不少关于反刍动物瘤胃中微生物群落结构的研究,但其在进入厌氧消化系统后,厌氧真菌和原虫与细菌、产甲烷菌之间的共生与竞争关系随着底物改变而发生改变,摸清瘤胃微生物进入厌氧消化系统后不同群落间的复杂关系及变化规律仍是目前重要任务之一。

## 2 瘤胃微生物木质纤维素降解相关酶及基因多样性

### 2.1 纤维素酶

瘤胃微生物分泌的纤维素酶可以降解纤维素中存在的 $\beta$ -1,4糖苷键,主要包括外切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶、内切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶。其中,内切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶主要作用于纤维素晶体低结晶度区域,释放纤维素链末端;外切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶切割纤维素分子非还原端的纤维素二糖残基产生纤维素二糖; $\beta$ -1,4-葡聚糖苷酶将裂解纤维素链中两个相邻的D-葡萄糖单元之间的 $\beta$ -1,4键,并将纤维二糖水解成单个葡萄糖分子(图1)<sup>[9]</sup>。GHARECHAHI等<sup>[18]</sup>通过宏转录组分析牛、羊瘤胃内存在的纤维素降解酶,发现其主要来源于瘤胃菌属(*Ruminococcus*)和杆菌属

(*Fibrobacter*), 并且瘤胃细菌分泌的纤维素酶均来源于糖苷水解酶基因 (GH) 家族, 如 GH3、GH5、GH7、GH8、GH9、GH44、GH45、GH48 及 GH74 等<sup>[27]</sup>。WILLIAMS 等<sup>[28]</sup> 通过宏基因组学发现了一系列瘤胃原虫产生的碳水化合物活性酶 (CAZymes), 如 GH5、GH11、多糖脱乙酰酶和裂解酶等, 可高效分解纤维素。瘤胃真菌 (如新丽鞭菌属, *Neocallimastix* 和瘤胃壶菌属真菌, *Piromyces*) 能分泌内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶水解  $\beta$ -1,4 糖苷键, 将纤维晶体切割为小分子纤维素<sup>[29]</sup>。

### 2.2 半纤维素酶

半纤维素由多样性的单糖组成且结构复杂, 与纤维素酶相比较, 半纤维素酶系丰富且多样, 主

要包括  $\beta$ -木聚糖苷酶、内切木聚糖酶、乙酰木聚糖酯酶、甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶和阿拉伯呋喃糖苷酶等 (图 1)。其中内切木聚糖酶来自 GH 家族的 GH10、GH11 和 GH30, 外切木聚糖酶和侧链裂解酶是来自 GH43, 甘露聚糖酶主要来自 GH5 和 GH26, 木葡聚糖酶主要来自 GH5、GH12、GH74 等<sup>[30]</sup>。内切木聚糖酶和  $\beta$ -木聚糖苷酶主要负责水解木聚糖主链, 支链部分是由乙酰木聚糖酯酶、阿魏酸酯酶和阿拉伯呋喃糖苷酶负责降解。普雷沃特菌 (*Prevotella*) 和布氏杆菌 (*Butyrivibrio*) 等细菌, 新丽鞭菌 (*Neocallimastix*) 和普雷沃氏菌 (*Piromyces*) 等真菌含有丰富的半纤维素酶, 具有高效半纤维素降解的能力<sup>[9]</sup>。

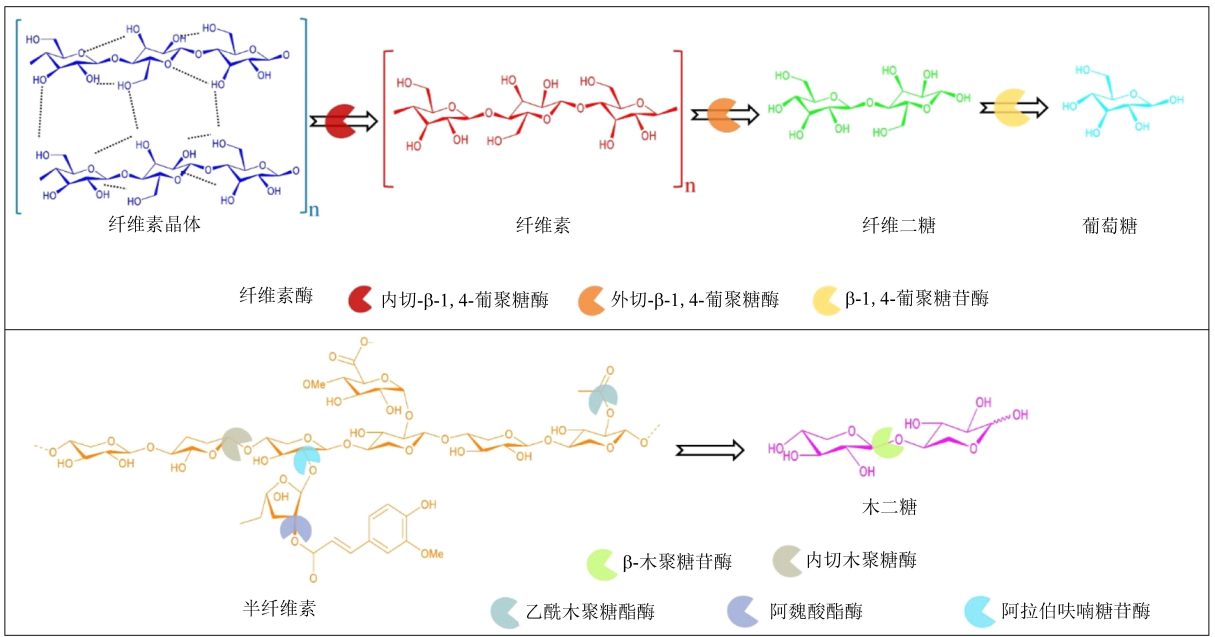


图 1 瘤胃微生物木质纤维素降解相关酶作用示意图<sup>[8, 13]</sup>

Fig. 1 Schematic diagram of enzymes involved in the degradation of lignocellulose by rumen microorganisms<sup>[8, 13]</sup>

### 2.3 木质素酶

在传统厌氧消化系统中, 木质素的降解率较低 (<10%)<sup>[31]</sup>, 而瘤胃微生物中子囊菌属 (*Ascomycota*)、担子菌属 (*Basidiomycota*)、奥赛菌属 (*Olsenella*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等被证实可以高效降解木质素, 这主要得益于真菌的菌丝对植物细胞壁的破坏作用及分泌的木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶等<sup>[32-33]</sup>。此外, 原生动物对木质素具有转化能力, 并用来满足自身的生长和繁殖。总体而言, 目前瘤胃微生物降解木质素过程中具体机制尚不清晰, 还需进一步研究。

### 2.4 其他降解酶

除了现有研究分析出的纤维素降解酶、半纤维素降解酶以及木质素降解酶外, 瘤胃中还存在

其他生物酶, 如蛋白酶、碳水化合物酯酶、淀粉酶、果胶酶等<sup>[4, 34]</sup>。韩生义等<sup>[35]</sup> 从牦牛瘤胃中分离筛选出了产脂肪酶的瘤胃微生物。碳水化合物酯酶主要来自 CE 家族, 如 CE10、CE1 和 CE4 等<sup>[25]</sup>。这些酶在一定程度上可以直观地反映出瘤胃菌的数量和活力。

## 3 瘤胃微生物体外厌氧消化

### 3.1 制取甲烷

#### 3.1.1 瘤胃液预处理

利用屠宰场瘤胃液废弃物预处理木质纤维素生物物质, 是一种具有现实和经济意义的选择。瘤胃液中大量的水解酸化菌在预处理过程中能够有效降解木质纤维素生物物质, 加速底物转化成溶解



表2 瘤胃液作为预处理技术的厌氧消化产甲烷研究

Table 2 Anaerobic digestion methane production of rumen fluid as a pretreatment technology

发酵底物	预处理参数	处理后甲烷产率(mL/g VS)	甲烷产率提高倍数	参考文献
造纸污泥	37 °C、170 r/min、6 h	231.3	3.4	[36]
油菜籽	37 °C、170 r/min、6 h 或 24 h	218.5	1.5	[37]
水稻	39 °C、120 r/min、120 h	218.5~285.1	1.4~1.8	[38]
微藻	34 °C、pH 7、24 h	108.54	1.9	[39]
水稻	39 °C、底物浓度 1.0%~10.0%	192.3~265.3	1.1~1.9	[40]
玉米秸秆	39 °C、24 h	214.3	1.2	[41]
麦秆、棉秆、芦苇和向日葵秆	2、5、10、25、20 d	—	1.2~1.4	[42]

研究表明,瘤胃液作为预处理手段可以将后续沼气产量提高 1.3~3.4 倍,对多种生物质处理效果显著,但预处理效果也随着底物不同呈现较大差异<sup>[36-38]</sup>。TAKIZAWA 等<sup>[36]</sup>采用瘤胃液对造纸污泥进行预处理,结果表明经瘤胃液预处理的造纸污泥甲烷产量(231.3 mL/g VS)是未经预处理组甲烷产量(67.9 mL/g VS)的 3.4 倍。BABA 等<sup>[37]</sup>研究发现经瘤胃液预处理后的油菜籽甲烷产量是未经预处理组的 1.5 倍。在瘤胃液预处理海藻的研究中,ZOU 等<sup>[39]</sup>发现预处理后甲烷产量达到 108.54 mL/g VS,比未经预处理组提高了 85.63%。当底物添加量在 1.0%~5.0%时,瘤胃液预处理可以提高甲烷产率,而超过 10%的底物添加量则造成甲烷产率降低<sup>[40]</sup>。此外,在瘤胃液预处理期间,预处理时间也非常关键。短时间的瘤胃液预处理无效降解木质纤维素,长时间的瘤胃液预处理可能造成高浓度的丙酸浓度,一定程度上抑制甲烷的产生。目前报道的较佳预处理时长通常介于 6~24 h 范围内<sup>[36-40]</sup>。瘤胃液作为预处理技术能瓦解木质纤维素生物质紧密的三维结构,这不仅提高厌氧消化转化效率,还可以避免目

前已存在的预处理技术的缺点。

### 3.1.2 接种物

瘤胃液含有丰富的微生物群落,可以直接用作厌氧消化的接种物。不同的生物质废弃物组分差异显著,接种瘤胃液后厌氧消化产气效果不同(表3)。在木质纤维素类生物质为底物,瘤胃液为接种物的厌氧消化体系中,体系有机酸的产量通常在 1 800~5 500 mg/g VS<sub>底物</sub>的水平<sup>[43]</sup>。苏良湖等<sup>[44]</sup>使用瘤胃液作为接种物进行水稻、小麦、高粱秸秆的厌氧消化,获得了相对较高的甲烷产率,分别为 66.3、103.8 和 76.9 mL/g,但由于瘤胃液中产甲烷菌数量少,3 个发酵体系都表现出较长的迟缓期(11.07~15.30 d)。瘤胃液与底物的添加比例也是重要的影响因素,CANDIA 等<sup>[45]</sup>研究了瘤胃液与底物的添加比(接种物/底物比为 4:5、1:2 和 3:10),发现在 4:5 的比例下获得了最大的沼气产量(410 L/kg VS),并且沼气中甲烷含量超过 70%,木质素的降解率达到 32.62%。MEYER 等<sup>[46]</sup>的研究表明,有机负荷(OLR)对大麦秸秆厌氧消化性能有显著影响,在 8.14~16.27 g VS/L 的 OLR 下,沼气产率达到 250~269 mL/g VS,

表3 瘤胃液作为接种物的厌氧消化产甲烷研究

Table 3 Anaerobic digestion of rumen fluid as inoculum for methane production

发酵底物	运行参数	最佳条件	甲烷产率	参考文献
水稻、小麦、高粱	10 g VS/L、39 °C、pH 8.33	—	130.3 mL/g(水稻)	[44]
			167.8 mL/g(小麦)	
			140.9 mL/g(高粱秸秆)	
稻草	底物添加比例:0.8、0.5、0.3	接种比=0.8	287 L/kg VS	[45]
大麦秸秆	2.04~16.27 g VS/L	最佳负荷为 16.27 g VS/L	269 mL/g VS	[46]
玉米青贮	混合比例:1:0、 7:3、3:7、0:1	牛瘤胃液:牛粪=3:7	169.6 L/kg VS	[48]
牛粪和大麦秸秆	37 °C、55 °C;接种物与 底物比例:1:2、1:1	嗜温 37 °C、 接种比=1:1	278 mL/g VS	[49]

但过高的 OLR(如 24.41 g VS/L)会导致 VFAs 积累,沼气产率下降。此外,也有尝试使用瘤胃液中纯菌微生物进行发酵的研究,CHUNG 等<sup>[47]</sup>通过将瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*)添加到松树粉末作为电子供体的微生物燃料电池中,实现了系统产能的提高,添加 1%(体积比)的瘤胃球菌可以使系统产能提高 245%,甲烷产量提高 28.6%。

产甲烷菌对生存环境较为敏感,暴露在空气中立即失活,且屠宰场取回的瘤胃液中本身含有的产甲烷菌量较少,因此,单独采用瘤胃液接种时产甲烷抑制期长达 10~40 d,甚至不产甲烷<sup>[48]</sup>。与单独添加瘤胃液接种相比,瘤胃液与牛粪、厌氧污泥等其他物质混合接种的厌氧消化系统具有更好的降解性能<sup>[50]</sup>。KONRAD 等<sup>[48]</sup>研究表明,在厌氧消化过程中,瘤胃液与牛粪的混合使用可以显著提高甲烷产量。当使用 100%瘤胃液接种时,瘤胃液中有限的甲烷菌数量不足以有效启动甲烷生成。然而,当瘤胃液与牛粪以 3:7 的比例混合时,牛粪中的微生物与瘤胃液中的微生物各自发挥优势,分工协作,甲烷产率达到最大值 169.6 mL/g VS。当以牛粪作为接种物和发酵底物时,添加瘤胃液可以使产甲烷率提升 70%,主要原因是瘤胃液中丰度较高的产琥珀酸丝状杆菌(*F. succinogenes*)能够将纤维素转化为琥珀酸,琥珀酸进一步被转化为甲烷,瘤胃球菌(*R. flavefaciens*)也可以高效分解纤维素,它们的存在显著促进了牛粪发酵过程中 VFAs 的产生(16 735 mg/L vs 8 175 mg/L)<sup>[51]</sup>。

INCE 等<sup>[49]</sup>研究揭示了瘤胃液与人工发酵系统中的厌氧污泥混合作为接种物在木质纤维素生物质的厌氧发酵过程中的积极作用。混合接种物使甲烷产率达到了 278 mL/g VS,与单独使用厌氧污泥相比,提高了 18%。这表明瘤胃液中的微生物群落与厌氧污泥中的微生物群落之间存在互补作用,共同促进了木质纤维素的降解和甲烷的生成。其中,文肯菌属(*Rikenella*)细菌在发酵过程中的含量明显增高,这类细菌能够利用乳酸盐产生乙酸和丙酸,为产甲烷菌提供更多的底物,促进甲烷产生。此外,文肯菌属(*Rikenella*)与纤维素降解菌之间的协同作用也被认为是促进甲烷产生的一个重要因素。纤维素降解菌主要负责将木质纤维素分解成可溶性糖,这些糖随后被文肯菌属(*Rikenella*)细菌转化为 VFAs,为产甲烷过程提供必要的底物。两者之间的有效配合提高了整个厌氧消化过程的效率。

对于长期运行的连续型反应器,瘤胃微生物在初期以接种物形式添加到系统,纤维杆菌(*Fibrobacter*)等瘤胃特征微生物随着出料不断流失,在系统中作用时间一般仅为数月<sup>[43]</sup>。研究证明,将瘤胃液周期性地添加到发酵系统中,可以增加体系菌群丰富度,增强厌氧发酵系统对进料量与质波动性的抵抗性<sup>[52]</sup>,提高系统产气效能。另外,也可以通过底物与富含瘤胃微生物的牛粪或瘤胃内容物进行联合厌氧消化的方式,保证系统中瘤胃微生物的长期作用<sup>[53-54]</sup>。

可见,瘤胃液在厌氧消化中的应用,无论是作为预处理手段还是作为接种物,都显示出了其在促进底物降解、增溶和甲烷化方面的优势。虽然已有大量的文献研究了瘤胃液用作预处理手段或者接种物方面的研究,但大部分集中于批次实验,关于瘤胃微生物在连续发酵过程中的应用及工艺参数优化仍缺乏大量的基础数据。

### 3.2 制取挥发性脂肪酸

挥发性脂肪酸(VFAs)是厌氧消化过程中重要的中间产物,包括乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸等,抑制甲烷菌的作用可以获得较高产量的 VFAs。VFAs 可以应用于污水处理厂反硝化阶段碳源补充,也可以用于生产可降解塑料聚羟基脂肪酸酯和生物能源等,是生物质等废弃物资源化利用的另一有效途径。瘤胃液中的微生物具有强大的水解增溶能力,能够提高 VFAs 的产量(表 4)。

研究表明,相较于其他动物,牛瘤胃液产酸能力更强,在厌氧反应器中添加牦牛瘤胃液,产生的 VFAs 浓度(1 100 mg/L)比添加羊粪泥浆提高了 175%<sup>[55]</sup>。NGUYEN 等<sup>[56]</sup>对比了瘤胃液和厌氧污泥作为接种物对 4 种富含木质纤维素生物质的原料(小麦秸秆、干草、燕麦干草、玉米青贮)发酵产酸的效果,结果表明以瘤胃液为接种物产生的 VFAs 浓度是厌氧污泥产生 VFAs 的 4 倍,这主要与消化系统中的水解细菌和产酸细菌的相对丰度增加有关。与之相似,以瘤胃液为接种物用于水稻秸秆厌氧消化产酸时, VFAs 浓度可以达到 8 000~9 000 mg/L,远高于传统厌氧污泥(3 000 mg/L)<sup>[16, 57]</sup>。在稻草降解过程中瘤胃细菌主要是普雷沃氏菌(*Piromyces*)和纤维杆菌(*Fibrobacter*)。普雷沃氏菌(*Piromyces*)是瘤胃中最丰富的属,能够将各种糖类转化为乙酸盐;纤维杆菌(*Fibrobacter*)也是常见的瘤胃纤维素降解细菌,有研究发现其在消化系统中的相对丰度

表 4 瘤胃液厌氧消化产挥发性脂肪酸的研究

Table 4 Study on the production of volatile fatty acids by anaerobic digestion of rumen fluid

底物	接种物	处理后结果	参考文献
羊粪	瘤胃液、羊粪泥浆	添加瘤胃液的水解反应器 VFAs 产量提高了 175%	[55]
小麦秸秆、干草、燕麦干草、玉米青贮	瘤胃液和厌氧污泥	添加瘤胃液反应器产 VFAs 是添加厌氧污泥反应器产 VFAs 的 4 倍	[56]
水稻	瘤胃液	5 g 秸秆发酵 3 天后 VFAs 浓度为 8 040 mg/L	[16]
玉米秸秆	瘤胃液	厌氧消化 72 h 后 VFAs 浓度为 8 990 mg/L	[57]
稻草	瘤胃液	10% 稻草产生 VFAs 浓度为 10 821.4 mg/L	[58]
草渣	瘤胃液	5 % 的草渣经 72 h 厌氧消化产 VFAs 浓度为 7 316 mg/L	[59]
小麦秸秆	瘤胃液	厌氧消化 93 d 后 VFAs 产率为 484 mg COD/g VS	[32]

从 0.69% (接种后 0.5 h) 增加到 3.21% 仅需不到 48 h<sup>[60]</sup>。尽管纤维杆菌丰度较低, 但它们在纤维素降解中的作用不容忽视<sup>[60-61]</sup>。

瘤胃液可以直接用作产酸的接种物, 这主要得益于瘤胃细菌的快速繁殖能力。较低的接种量即可获得高浓度的 VFAs 产物。以 10% 瘤胃液作为接种物, 稻草厌氧消化系统产生了 10 821.4 mg/L VFAs, 以乙酸和丙酸为主<sup>[58]</sup>。WANG 等<sup>[59]</sup> 利用瘤胃液对草渣进行厌氧消化, 发现 5% 的草渣和瘤胃液混合液经 72 h 厌氧消化产生了 7 316 mg/L VFAs, 分别约为 3% 和 1% 混合液所产 VFAs 的 1.23 倍和 2.32 倍。这些研究表明瘤胃液用于木质

纤维素物质厌氧消化产 VFAs 具有巨大的潜力, 且相较于传统厌氧污泥具有更高的转化效率, 这主要和瘤胃液中独特的微生物群落有关(图 2)。有研究证实, 瘤胃液中的毛螺菌(*Lachnospiraceae*) 和棒状杆菌(*Corynebacterium*) 也与纤维素降解有关, 这些菌能够产生纤维素酶, 将纤维素分解成小分子糖, 进而被其他菌所利用。普雷沃氏菌属(*Prevotella*) 和尿素芽孢杆菌属(*Ureibacillus*) 产生半纤维素酶可以分解半纤维素。此外, 拟杆菌属(*Bacteroides*) 也参与了半纤维素降解<sup>[62]</sup>。反刍球菌属(*Ruminococcaceae*) 和丁弧菌属(*Butyrivibrio*) 参与了瘤胃中纤维素的降解和 VFAs 的形成。

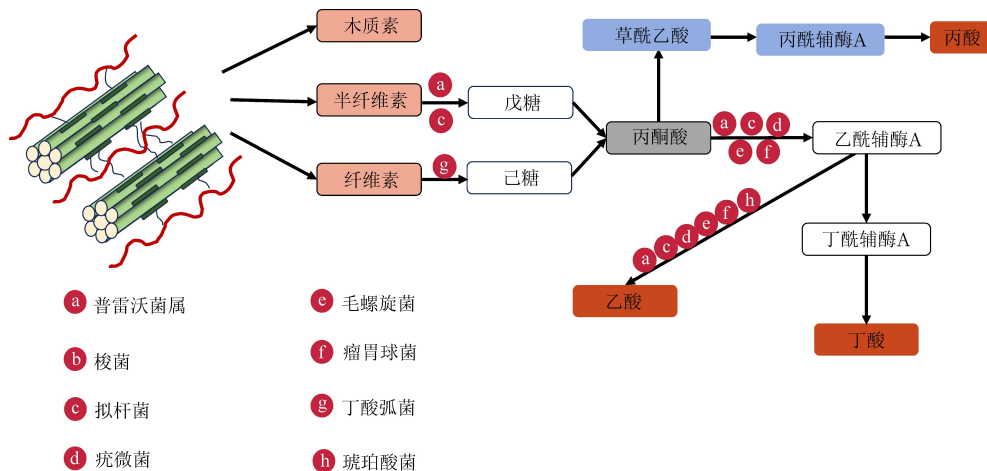


图 2 瘤胃微生物对木质纤维素水解酸化的代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathways of rumen microorganisms in the hydrolysis and acidification of lignocellulose

### 3.3 制取氢气或其他产品

瘤胃液发酵产氢是利用瘤胃液中的微生物降解生物质中的有机物产生 H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 的过程。产甲烷菌的存在会消耗 H<sub>2</sub>, 因此, 常用加热或添加抑制剂等方式来抑制产氢接种物中产甲烷菌的活性。MORALES MARTINEZ 等<sup>[62]</sup> 用瘤胃微生物对龙舌兰生物质进行预处理, 发现瘤胃液能够促进乙酰丁酸梭菌(*Clostridium acetobutylicum*) 增长, 并

且提高 H<sub>2</sub> 的产量, 在 10% 固体的负荷下发酵 11 d, 累积 H<sub>2</sub> 产量为 154 mL/g, 而采用传统的干式厌氧消化技术, 秸秆氢气产率仅为 20~100 mL/g。此外, 也有将分离的纯瘤胃微生物用于产氢的研究。如 PANG 等<sup>[63]</sup> 从瘤胃中分离出纤维水解菌株大肠杆菌 ZH-4, 用于玉米秸秆生产 H<sub>2</sub>, 结果表明玉米秸秆在发酵 7 d 后, 虽然纤维素和半纤维素降解率分别达到 14.30%、11.39%, H<sub>2</sub> 产率较低(4.71

mL/g),但系统中观察到了副产物乙醇的产生(360 mg/L)。LIU 等<sup>[64]</sup>从绵羊瘤胃中分离出的肺炎克雷伯菌 Y7-3 主要代谢产物是 H<sub>2</sub>、乳酸、乙酸和乙醇;以葡萄糖为碳源时,在 24 h 内产生高达 1 253.72 mL/L 的 H<sub>2</sub>。将该菌株加入玉米秸秆厌氧消化系统中,添加调节因子硫酸亚铁(FeSO<sub>4</sub>, 30 mg/L)、氯化镍(NiCl<sub>2</sub>, 70 mg/L)或甲酸(5 g/L),产 H<sub>2</sub>量分别提高了 25.72%、17.89%和 331.07%。关于瘤胃液在厌氧消化过程中的应用,特别是在木质纤维素降解和产甲烷方面的研究较为常见,而对于利用瘤胃液厌氧消化制取 H<sub>2</sub>及其他产物的报道则相对较少。在深入了解瘤胃微生物的功能代谢及分离纯化的基础上,使用瘤胃微生物生产高值的化学品可能是未来生物化工的可行途径之一。

### 3.4 瘤胃微生物在木质纤维素类废弃物资源化转化中的应用

木质纤维素生物质,如农业秸秆、林业残留物、微藻、食品加工工业废弃物、酒糟和纸浆等,被视为一种可再生资源,也是化石燃料的潜在替代品。研究发现,瘤胃液的添加可以使消化体系 SCOD、还原糖产量增加,提高木质纤维素生物质的转化效率<sup>[57]</sup>。朱剑豪等<sup>[65]</sup>将瘤胃菌群和厌氧污泥混合作为接种物对秸秆进行厌氧消化降解,结果发现混合接种物有效强化了水稻秸秆的降解,纤维素和半纤维素降解率高达 96%~97%,木质素降解率达到 42%,有机酸转化率超过 0.45 g COD/g VS。ZHENG 等<sup>[66]</sup>研究在白腐真菌接种前加入 3%(质量分数)瘤胃液预处理燕麦秸秆,发现瘤胃液的添加不仅有效提高了燕麦秸秆的厌氧消化降解,还为非无菌条件下的白腐真菌提供了理想环境,并增加了木质纤维素降解酶丰富度。YU 等<sup>[67]</sup>将瘤胃液与其他的绿色预处理技术(微波辅助离子液体预处理和水热辅助离子液体预处理)结合进行体外厌氧消化,结果发现小麦秸秆的木质素降解率达到 35.3%和 25.4%。LI 等<sup>[15]</sup>运用超声波结合瘤胃微生物处理纸浆和造纸厂剩余污泥,经超声波预处理后 VFAs 产量为 24 820 mg/g VSS,比未经超声波预处理组产量高了 1.92 倍。

上述研究表明,瘤胃液中的微生物群落可以显著提高有机废弃物的厌氧消化效率,尤其是在纤维素和半纤维素的降解以及 VFAs 的产量方面。然而,瘤胃液的获取和保存仍然是实际应用中需要解决的挑战,比如屠宰场与大型厌氧消化厂距

离远,有瘤胃痿管的反刍动物短缺等等。因此,瘤胃液的保存,确保瘤胃微生物的活性至关重要。大多数关于瘤胃液的研究采取收集后在短时间内(48 h~7 d)使用或者未添加保护剂冷冻保存<sup>[68-69]</sup>。有研究发现瘤胃液在添加 5%二甲基亚砜-20 ℃条件下冷冻保存 6 个月后用于厌氧消化系统接种时,其甲烷产气量与新鲜瘤胃液甲烷产气量相差无异<sup>[70]</sup>。

## 4 仿瘤胃厌氧消化系统的构建

### 4.1 仿瘤胃厌氧消化系统的原理及研究思路

反刍动物瘤胃的仿生学是一个新兴领域,构建人工瘤胃厌氧消化系统最终目标是能够拥有一个稳定降解系统,实现木质纤维素类生物质废弃物长期、高效降解。深入了解反刍动物瘤胃系统结构和功能运作机制,摸清其对木质纤维素生物质的降解机理,是建立高效、稳定运行的仿瘤胃厌氧发酵系统的重要基础,可以为木质纤维素类生物质废弃物生物能源开发提供新契机。

目前,国内外瘤胃厌氧仿生技术主要是把反刍动物的消化器官模拟成发酵反应器,即在厌氧消化装置中间歇加入消化底物,以持续的方式或通过回流的方式注入低 VFAs 浓度的消化液体,底物在仿生体系中瘤胃微生物的作用下不断发生分解、酸化及甲烷化,同时装置末端将消化产物对应连续或半连续排出。这些阶段分别是模拟反刍动物瘤胃进食、胃壁吸收和食糜排出的过程。将其等价于反应器时,则瘤胃进食及食糜排出的整个过程可以看作为连续推流式反应器,瘤胃的蠕动促使食物与微生物不断混合反应的过程可以看作是均匀搅拌的全混式厌氧消化产酸反应器(CSTR),胃壁对产生的 VFAs 的吸收可以看作是 VFAs 液体过滤分离,在仿生体系中也可以是两相发酵反应的第二相产甲烷反应器。理论上,人工仿瘤胃厌氧消化系统是一个动态平衡系统,在底物营养平衡的情况下,可以无限期运行下去。然而厌氧消化反应器不能通过简单的模拟瘤胃的结构和环境条件(pH、温度、氧化还原电位等)来开发,研究人员需要考虑物理化学特征和微生物种群间空间分布及相互作用关系来模拟反刍动物瘤胃消化系统。

### 4.2 仿瘤胃厌氧消化系统

#### 4.2.1 单相流仿瘤胃厌氧消化系统

早期的仿瘤胃厌氧消化系统以两种单相外流



方式为主,一种是瘤胃厌氧消化装置中固体及液体以相同的速率外流。该过程仅仅是利用瘤胃微生物并仿造瘤胃蠕动功能,结构上与传统全混式厌氧发酵反应器(CSTR)区别不大,并未对瘤胃胃壁吸收 VFAs 的过程进行模拟。另一种是消化装置中的液体以一定的速率连续进入和排出,而固体则始终停留在反应装置中,直至实验结束。固体的截留及其与液体的分离可以通过尼龙袋或隔离板实现。该过程基于固体考虑时更类似于生物滤池、滤床或批次厌氧消化。除此之外,直接模拟反刍动物的瘤胃消化,模拟未消化的固体分离出,再次回到消化体系进一步降解,该仿生反应体系增大了底物的降解<sup>[71]</sup>。

#### 4.2.2 两相流仿瘤胃厌氧消化系统

在单相流仿瘤胃厌氧消化系统基础上,国内外研究学者逐渐开发两相流仿瘤胃厌氧消化系统,即消化体系中的固体和液体以不同速率排出反应器,以模拟瘤胃胃壁吸收 VFAs 和食糜排出两者分开的过程,系统中辅以搅拌以模拟蠕动功能。该系统可以单独控制液体组分停留时间(HRT)和固相组分停留时间(SRT)。目前已开发的人工仿瘤胃装置有 CSTR 与厌氧序批式反应器(ASBR)、厌氧膜生物反应器(AnMBR)和升流式厌氧污泥床反应器(UASB)、上流式固相床(UASS)与厌氧过滤(AF)联用等<sup>[72-75]</sup>。

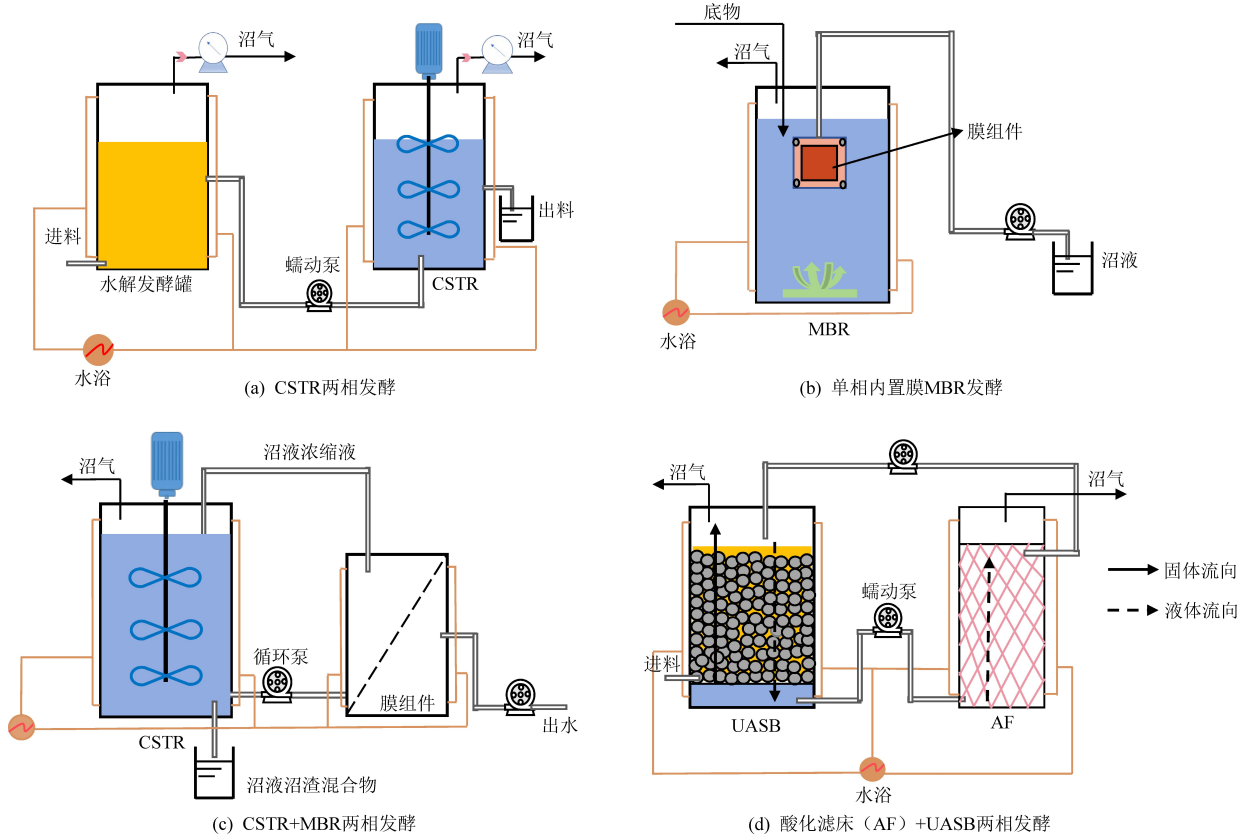


图3 目前常见的仿瘤胃发酵装置

Fig. 3 Common rumen like fermentation devices currently used

CSTR 是最早应用于仿瘤胃厌氧消化的反应器之一,但存在反应物浓度低、分层现象和微生物的流失等问题。可以在 CSTR 中内置简单的聚酰胺或聚酯纤维袋模拟瘤胃与胃壁吸收过程<sup>[76]</sup>,也可以内置专业的厌氧膜组件,将消化固体和液体分离,有利于瘤胃微生物缓慢生长和减少反应器中微生物的流失以及 VFAs 的积累。ZAMORANO LÓPEZ 等<sup>[72]</sup>在 CSTR 中添加厌氧膜组件处理微藻生产沼气,结果表明膜组件的添加利于瘤胃微

生物对微藻的降解,降解率达到 62%,并且甲烷产量可以高达 305 mL/g VS。

MBR 反应器能富集瘤胃微生物的优势菌,保持菌群数量及对木质纤维素物质降解的稳定性。NGUYEN 等<sup>[74]</sup>评估仿瘤胃厌氧膜反应器处理玉米秸秆产 VFAs 的可行性,结果发现 VFAs 平均日产量达到 438 mg/g,其中 73%±15%的 VFAs 是通过膜组件过滤所产生<sup>[53]</sup>。邢保山等<sup>[77]</sup>采用动态膜生物反应器(DMBR)进行长期仿瘤胃发酵

实验,系统中纤维素、半纤维素和木质素的降解率分别高达 78.3%、58.8% 和 47.5%。

ASBR 反应器高 SRT 可以增加反应器中的微生物密度,低 HRT 有利于缓解 VFAs 累积引起的抑制反应。BARNES 等<sup>[74]</sup>采用 ASBR 以瘤胃微生物为接种物降解木质纤维素生物质,发现 ASBR 能够富集木质纤维素分解菌,如厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌(*Bacteroidetes*)等。相较于在单相 CSTR 反应器中接种瘤胃液,采用 CSTR-SBR 两相反应器能进一步提升系统发酵性能<sup>[55]</sup>。与 ASBR 相似,UASB 反应器通过颗粒污泥的形式富集瘤胃微生物,使污泥保存较长时间且微生物活性不会消失太多。

目前而言,这些仿瘤胃厌氧消化系统虽然在秸秆、微藻、餐厨垃圾等方面均有一定探索,但大多数研究缺乏长期连续式的厌氧消化系统运行研究,缺乏大量基础数据,特别是成功案例数据。同时,分子生物学技术日新月异,但目前关于仿瘤胃厌氧消化系统中底物、工艺参数变化等各因素对瘤胃微生物群落结构变化及各类降解酶的解析却鲜有报道,研究仍然不够深入,很难达到中试规模或大规模应用的要求。

## 5 结语与展望

近些年,国内外利用瘤胃微生物在木质纤维素废弃物厌氧消化产沼气、 $H_2$ 以及 VFAs 等方面进行了一些研究,并且获得了不少经验及研究方法,但仍存在一些值得深入研究的问题:

(1)瘤胃系统复杂,各菌种间的分工协作及相互作用机制尚未完全清晰,仍需借助基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学等深入认识瘤胃系统功能运作。此外,目前还有大量的瘤胃微生物无法分离和纯培养。分离和筛选降解木质纤维素废弃物的瘤胃菌,通过体外培养、基因修饰等人为调控,对瘤胃微生物基因功能进行组装,形成低成本高效木质纤维素降解菌,仍值得进一步探索。

(2)目前已有部分研究考察了瘤胃液在造纸厂污泥、农业废弃物、餐厨垃圾等不同底物厌氧消化的特性,但针对各类废弃物瘤胃液应用条件与成效,仍需收集大量基础研究数据。实际利用中不同底物间存在交互作用,适用瘤胃液接种厌氧发酵的条件不尽相同,也需对发酵过程关键参数进行研究和优化。此外,目前研究主要集中在批次消化中,对于瘤胃液微生物在消化罐内是否可

以长期根植、生存状态与功能特性等仍需要深入研究。

(3)目前将瘤胃液应用于厌氧消化主要是利用其中的细菌,但是具有更强分解能力的厌氧真菌、原虫等在厌氧发酵系统中的存活与代谢状态尚不清晰。通过提升厌氧真菌和原虫的生存与代谢以强化体系木质纤维素生物质降解也可能是一条可以探索的途径。

(4)在用瘤胃液对木质纤维素生物质进行厌氧发酵的过程中,与其他技术的联用有望大幅提高产气能力。已有部分研究将酸碱、超声预处理等和瘤胃液接种联合运用,但处理成本或潜在二次污染高,亟须寻找适宜瘤胃微生物利用的高效廉价的预处理技术。

(5)有关仿瘤胃厌氧发酵系统的构建与尝试尚处在起步阶段,大量研究采用批次试验进行探究,少量研究报道了连续的仿瘤胃厌氧发酵系统的运行,但运行稳定性较差,瘤胃微生物难以长期在反应器中存活。虽有部分学者采用膜过程来模拟瘤胃对 VFAs 的吸收、采用挤压等模拟瘤胃收缩,但目前研究仍处在表观结构模拟阶段,仍需在摸清瘤胃微观构造及微生物种间作用关系的基础上,不断升级改造仿生反应器,为我国有机废弃物,特别是木质纤维素类废弃物厌氧消化资源化利用开辟一条高效新途径。

## 参考文献 (References):

- [1] DUTTA S, HE Mingjing, XIONG Xinni, et al. Sustainable management and recycling of food waste anaerobic digestate: A review[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125915.
- [2] 张瀚文, 陈正军, 张晨雨, 等. 木质纤维素预处理技术研究现状与展望[J]. *化工矿物与加工*, 2024, 53(4): 50-62. ZHANG Hanwen, CHEN Zhengjun, ZHANG Chenyu, et al. Research status and prospect of lignocellulose pretreatment technology[J]. *Industrial Minerals & Processing*, 2024, 53(4): 50-62.
- [3] 孙衍宁, 牛梅红, 张学金, 等. 瘤胃微生物在生物质废物资源化领域应用研究进展[J]. *中国造纸学报*, 2018, 33(1): 67-70. SUN Yanning, NIU Meihong, ZHANG Xuejin, et al. Application of rumen microorganisms in waste biomass recycling fields [J]. *Transactions of China Pulp and Paper*, 2018, 33(1): 67-70.
- [4] 杨宝钰, 王娇, 颜轶男, 等. 奶牛瘤胃 pH、消化酶活性及原虫数量的日动态变化研究[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(3): 1534-1544. YANG Baoyu, WANG Jiao, YAN Yinan, et al. Daily dynamic changes of rumen pH, digestive enzyme activities and protozoa

- number in dairy cows[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(3): 1534-1544.
- [5] 牛化欣, 胡宗福, 常杰, 等. 瘤胃微生物对反刍动物饲料效率和甲烷排放的影响及其营养调控研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(8): 50-56+62.
- NIU Huaxin, HU Zongfu, CHANG Jie, et al. Advances in effect of rumen microbiome on efficiency and methane emission of ruminants and its nutritional regulation[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2020, 56(8): 50-56+62.
- [6] CAMPANARO S, TREU L, CATTANI M, et al. *In vitro* fermentation of key dietary compounds with rumen fluid: A genome-centric perspective[J]. Science of the Total Environment, 2017, 584: 683-691.
- [7] COMTET MARRE S, PARISOT N, LEPERCQ P, et al. Metatranscriptomics reveals the active bacterial and eukaryotic fibrolytic communities in the rumen of dairy cow fed a mixed diet[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 67.
- [8] 郑娟善, 丁考仁青, 李新圃, 等. 瘤胃微生物在木质纤维素价值化利用的研究进展[J]. 草业学报, 2021, 30(9): 182-192.
- ZHENG Juanshan, DING Kaorenqing, LI Xinpu, et al. Research progress on rumen microorganisms in the utilization of lignocellulose as an energy resource[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(9): 182-192.
- [9] LIANG Jinsong, NABI M, ZHANG Panyue, et al. Promising biological conversion of lignocellulosic biomass to renewable energy with rumen microorganisms: A comprehensive review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2020, 134: 110335.
- [10] 曹家铭, 张健, 时君友, 等. 白腐菌预处理在生物质材料中的应用[J]. 林产工业, 2021, 58(3): 16-20.
- CAO Jiaming, ZHANG Jian, SHI Junyou, et al. Application of white-rot fungus pretreatment for biomass materials[J]. China Forest Products Industry, 2021, 58(3): 16-20.
- [11] 刘鑫, 姜鑫, 李洋, 等. 瘤胃微生物对甲烷生成的交互效应及减排措施[J]. 中国牛业进展, 2017, 6: 188-193.
- LIU Xin, JIANG Xin, LI Yang, et al. The interaction effect of rumen microorganisms on methane production and emission reduction measures [J]. Progress of China's Cattle Industry, 2017, 6: 188-193.
- [12] 董利锋, 付敏, 陈天宝, 等. 反刍动物瘤胃优势产甲烷菌菌群结构及多样性研究进展[J]. 动物营养学报, 2019, 31(9): 3927-3935.
- DONG Lifeng, FU Min, CHEN Tianbao, et al. Research progress on dominant methanogen composition and diversity in rumen of ruminants[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(9): 3927-3935.
- [13] BHUJBAL S K, GHOSH P, VIJAY V K, et al. Biotechnological potential of rumen microbiota for sustainable bioconversion of lignocellulosic waste to biofuels and value-added products[J]. Science of the Total Environment, 2022, 814: 152773.
- [14] 李倩, 许之扬, 周云龙, 等. 瘤胃微生物强化醋糟厌氧消化及其机制[J]. 环境科学研究, 2020, 33(10): 2370-2377.
- LI Qian, XU Zhiyang, ZHOU Yunlong, et al. Bio-augmented anaerobic digestion of vinegar residue by rumen microbes and its mechanisms [J]. Research of Environmental Sciences, 2020, 33(10): 2370-2377.
- [15] LI Na, XIAO Xi, LI Cheng, et al. Boosting VFAs production during the anaerobic acidification of lignocellulose waste pulp and paper mill excess sludge: Ultrasonic pretreatment and inoculating rumen microorganisms [J]. Industrial Crops and Products, 2022, 188: 115613.
- [16] LIANG Jinsong, ZHENG Wenge, ZHANG Haibo, et al. Transformation of bacterial community structure in rumen liquid anaerobic digestion of rice straw [J]. Environmental Pollution, 2021, 269: 116130.
- [17] ARNTZEN M Ø, VÁRNASI A, MACKIE R I, et al. Outer membrane vesicles from *Fibrobacter succinogenes* S85 contain an array of carbohydrate-active enzymes with versatile polysaccharide-degrading capacity[J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(7): 2701-2714.
- [18] GHARECHAHJI J, VAHIDI M F, SHARIFI G, et al. Lignocellulose degradation by rumen bacterial communities: New insights from metagenome analyses[J]. Environmental Research, 2023, 229: 115925.
- [19] 靳文尧. 瘤胃微生物厌氧消化农业固体有机废物技术与应用研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2018:23-27.
- JIN Wenyao. Technology and application of rumen microorganisms in anaerobic digestion of agriculture solid organic waste [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2018: 23-27.
- [20] PATRA A, PARK T, KIM M, et al. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances [J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2017, 8(1): 13.
- [21] 赵旭, 凌玉钊, 王建华, 等. 幼龄反刍动物瘤胃微生物定植及其营养调控研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(10): 3296-3304.
- ZHAO Xu, LING Yuzhao, WANG Jianhua, et al. Research progress on rumen microbial colonization and nutritional regulation of young ruminants[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2022, 53(10): 3296-3304.
- [22] 於江坤. 宏基因组学解析瘤胃微生物组成和功能特性及外源添加剂调控瘤胃微生物发酵的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021: 3-7.
- YU Jiangkun. Study on rumen microbial composition and functional profiles using metagenomics and the regulation of rumen microbial fermentation with exogenous additives[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021: 3-7.
- [23] BASAK B, AHN Y, KUMAR R, et al. Lignocellulolytic microbiomes for augmenting lignocellulose degradation in anaerobic digestion [J]. Trends in Microbiology, 2022, 30(1): 6-9.
- [24] XUE Dan, CHEN Huai, LUO Xiaolin, et al. Microbial diversity in the rumen, reticulum, omasum, and abomasum of yak on a rapid fattening regime in an agro-pastoral transition zone

- [J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 56(10): 734–743.
- [25] LI Yuqi, MENG Zhenxiang, XU Yao, et al. Interactions between anaerobic fungi and methanogens in the rumen and their biotechnological potential in biogas production from lignocellulosic materials[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 190.
- [26] NEWBOLD C J, DELA FUENTE G, BELANCHE A, et al. The role of ciliate protozoa in the rumen[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1313.
- [27] HAN Yujie, CHANG Xiao, XIANG Hai, et al. Exploring biomimetic potential of ruminant digestion strategies for lignocellulosic biomass utilization: A comprehensive review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2023, 188: 113887.
- [28] WILLIAMS C L, THOMAS B J, MCEWAN N R, et al. Rumen protozoa play a significant role in fungal predation and plant carbohydrate breakdown[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 720.
- [29] HE Bo, JIN Shuwen, CAO Jiawen, et al. Metatranscriptomics of the Hu sheep rumen microbiome reveals novel cellulases[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 153.
- [30] MORAIS S, MIZRAHI I. Islands in the stream: From individual to communal fiber degradation in the rumen ecosystem[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 43(4): 362–379.
- [31] 陈永栋. 木质纤维素类生物质厌氧消化性能研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2020: 4–7.  
CHEN Yongdong. Study on the anaerobic digestion performance of lignocellulosic biomass[D]. Chongqing: Chongqing University, 2020: 4–7.
- [32] XING Baoshan, HAN Yule, WANG X C, et al. Persistent action of cow rumen microorganisms in enhancing biodegradation of wheat straw by rumen fermentation[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 715: 136529.
- [33] XING Baoshan, HAN Yule, CAO Sifan, et al. Cosubstrate strategy for enhancing lignocellulose degradation during rumen fermentation in vitro: Characteristics and microorganism composition[J]. *Chemosphere*, 2020, 250: 126104.
- [34] 张牧州, 郝小燕, 项斌伟, 等. 玉米皮和大豆皮组合替代玉米和玉米秸秆对育肥羊生长性能和瘤胃代谢的影响[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(2): 765–774.  
ZHANG Muzhou, HAO Xiaoyan, XIANG Binwei, et al. Effects of replacing corn and corn straw with corn husk and soybean hulls combination on growth performance and rumen metabolism in fattening sheep[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(2): 765–774.
- [35] 韩生义, 刘晓丽, 张国权, 等. 牦牛瘤胃中产脂肪酶微生物的分离与鉴定[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(9): 2292–2301.  
HAN Shengyi, LIU Xiaoli, ZHANG Guoquan, et al. Isolation and identification of lipase produced by microbes in yak rumen[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(9): 2292–2301.
- [36] TAKIZAWA S, BABA Y, TADA C, et al. Pretreatment with rumen fluid improves methane production in the anaerobic digestion of paper sludge[J]. *Waste Management*, 2018, 78: 379–384.
- [37] BABA Y, MATSUKI Y, MORI Y, et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass by cattle rumen fluid for methane production: Bacterial flora and enzyme activity analysis[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 123(4): 489–496.
- [38] ZHANG Haibo, ZHANG Panyue, YE Jie, et al. Improvement of methane production from rice straw with rumen fluid pretreatment: A feasibility study[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 113: 9–16.
- [39] ZOU Yu, XU Xiaochen, LI Liang, et al. Enhancing methane production from *U. lactuca* using combined anaerobically digested sludge (ADS) and rumen fluid pre-treatment and the effect on the solubilization of microbial community structures[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 254: 83–90.
- [40] 张海波. 稻草瘤胃液预处理—甲烷和乙醇一体化转化研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2017: 49–52.  
ZHANG Haibo. Study on integrated conversion of rice straw to methane and ethanol with rumen fluid pretreatment[D]. Changsha: Hunan University, 2017: 49–52.
- [41] XU Fenglian, MU Lan, WANG Yifan, et al. Pretreatment with rumen fluid improves methane production in the anaerobic digestion of corn straw[J]. *Fuel*, 2024, 363: 130831.
- [42] KURTKARA G, DOLUK R, CIVELEK YORUKLU H, et al. Biomethane production kinetics of rumen pretreated lignocellulosic wastes[J]. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 2021, 23(10): 2941–2954.
- [43] FONOLL X, SHRESTHA S, KHANAL S K, et al. Understanding the anaerobic digestibility of lignocellulosic substrates using rumen content as a cosubstrate and an inoculum[J]. *ACS ES&T Engineering*, 2021, 1(3): 424–435.
- [44] 苏良湖, 陈梅, 孙旭, 等. 谷类秸秆接种瘤胃液的厌氧消化性能和三维荧光光谱特征[J]. *生态与农村环境学报*, 2018, 34(11): 1034–1041.  
SU Lianghu, CHEN Mei, SUN Xu, et al. The anaerobic digestion performance of cereal straw inoculated with rumen fluid and its three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopic characteristics[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2018, 34(11): 1034–1041.
- [45] CANDIA GARCÍA C, DELGADILLO MIRQUEZ L, HERNANDEZ M. Biodegradation of rice straw under anaerobic digestion[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2018, 10: 215–222.
- [46] MEYER G, OKUDOH V, VANRENSBURG E. A rumen based anaerobic digestion approach for lignocellulosic biomass using barley straw as feedstock[J]. *South African Journal of Chemical Engineering*, 2022, 41: 98–104.
- [47] CHUNG R, MOON D J, CHANG Y N, et al. The cellulolytic bacteria *R. albus* for improving the efficiency of microbial fuel cell[J]. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 2018, 8(2): 36–46.
- [48] ODORICO K, MUNIQUE M, JOICE M, et al. Digestates from the co-digestion of cattle rumen and manure improve the methane potential of maize silage[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2023, 24: 101625



- [49] INCE O, AKYOLÇ, OZBAYRAM E G, et al. Enhancing methane production from anaerobic co-digestion of cow manure and barley: Link between process parameters and microbial community dynamics[J]. Environmental Progress & Sustainable Energy, 2020, 39(1): 13292.
- [50] SICCHIERI I M, DEQUADROS T C F, BORTOLOTTI M A, et al. Selection, composition, and validation of standard inoculum for anaerobic digestion assays[J]. Biomass and Bioenergy, 2022, 164: 106558.
- [51] OZBAYRAM E G, AKYOL, INCE B, et al. Rumen bacteria at work: Bioaugmentation strategies to enhance biogas production from cow manure[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(2): 491–502.
- [52] JO Y, RHEE C, CHOI H, et al. Long-term effectiveness of bioaugmentation with rumen culture in continuous anaerobic digestion of food and vegetable wastes under feed composition fluctuations[J]. Bioresource Technology, 2021, 338: 125500.
- [53] 邢保山. 仿瘤胃厌氧发酵体系构建与调控技术研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2020: 101–102.
- XING Baoshan. Research on the construction and regulatory techniques of bionic rumen anaerobic fermentation system[D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2020: 101–102.
- [54] DENG Yuying, HUANG Zhenxing, RUAN Wenquan, et al. Co-inoculation of cellulolytic rumen bacteria with methanogenic sludge to enhance methanogenesis of rice straw[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017, 117: 224–235.
- [55] SOHAIL M, KHAN A, BADSHAH M, et al. Yak rumen fluid inoculum increases biogas production from sheep manure substrate[J]. Bioresource Technology, 2022, 362: 127801.
- [56] NGUYEN L N, NGUYEN A Q, ABU HASAN JOHIR M, et al. Application of rumen and anaerobic sludge microbes for bio harvesting from lignocellulosic biomass[J]. Chemosphere, 2019, 228: 702–708.
- [57] LIANG Jinsong, FANG Wei, WANG Qingyan, et al. Meta-genomic analysis of community, enzymes and metabolic pathways during corn straw fermentation with rumen microorganisms for volatile fatty acid production [J]. Bioresource Technology, 2021, 342: 126004.
- [58] LIANG Jinsong, ZHANG Haibo, ZHANG Panyue, et al. Effect of substrate load on anaerobic fermentation of rice straw with rumen liquid as inoculum: Hydrolysis and acidogenesis efficiency, enzymatic activities and rumen bacterial community structure[J]. Waste Management, 2021, 124: 235–243.
- [59] WANG Siqi, ZHANG Guangming, ZHANG Panyue, et al. Rumen fluid fermentation for enhancement of hydrolysis and acidification of grass clipping [J]. Journal of Environmental Management, 2018, 220: 142–148.
- [60] MIZRAHI I, JAMI E. Review: The compositional variation of the rumen microbiome and its effect on host performance and methane emission[J]. Animal, 2018, 12: s220–s232.
- [61] SESHADRI R, COLLABORATORS H P, LEAHY S C, et al. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 collection[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(4): 359–367.
- [62] MORALES MARTÍNEZ T K, MEDINA MORALES M A, ORTÍZ CRUZ A L, et al. Consolidated bioprocessing of hydrogen production from agave biomass by *Clostridium acetobutylicum* and bovine ruminal fluid[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2020, 45(26): 13707–13716.
- [63] PANG Jian, LIU Zhanying, HAO Min, et al. An isolated cellulolytic *Escherichia coli* from bovine rumen produces ethanol and hydrogen from corn straw[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 165.
- [64] LIU Wei, PANG Jian, WU Dong, et al. Hydrogen production by a novel *Klebsiella pneumoniae* strain from sheep rumen uses corn straw as substrate[J]. Energy, 2023, 282: 128210.
- [65] 朱剑豪. 瘤胃菌群结合沼渣后处理技术提升秸秆木质纤维素的厌氧消化效能[D]. 无锡: 江南大学, 2021: 16–20.
- ZHU Jianhao. Enhanced anaerobic digestion of straw lignocellulose via ruminal microbiota and digestate post-treatment [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021: 16–20.
- [66] ZHENG Menghu, LI Rongrong, WANG Yan, et al. Ensiling with rumen fluid promoted *Irpex lacteus* colonization on the non-sterile naked oat straw for enhanced lignocellulose degradation and enzymatic hydrolysis [J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 183: 108462.
- [67] YU Ziqiang, MA Hongzhi, DEN BOER E, et al. Effect of microwave/hydrothermal combined ionic liquid pretreatment on straw: Rumen anaerobic fermentation and enzyme hydrolysis [J]. Environmental Research, 2022, 205: 112453.
- [68] PRATES A C B, OLIVEIRA J D, OLIVER G D L F, et al. Validation of sheep rumen fluid frozen in liquid N as inoculum for *in vitro* gas production trials [J]. Options Méditerranéennes, 2011, 99: 141–147.
- [69] BELANCHE A, PALMA HIDALGO J M, NEJJAM I, et al. In vitro assessment of the factors that determine the activity of the rumen microbiota for further applications as inoculum [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(1): 163–172.
- [70] ZHAO Yuchao, YU Shiqiang, TAN Jian, et al. Bioconversion of citrus waste by long-term DMSO-cryopreserved rumen fluid to volatile fatty acids and biogas is feasible: A microbiome perspective [J]. Journal of Environmental Management, 2024, 351: 119693.
- [71] ZHANG Meixia, ZHANG Guangming, ZHANG Panyue, et al. Anaerobic digestion of corn stovers for methane production in a novel bionic reactor[J]. Bioresource Technology, 2014, 166: 606–609.
- [72] ZAMORANO LÓPEZ N, BORRÁS L, GIMÉNEZ J B, et al. Acclimatised rumen culture for raw microalgae conversion into biogas: Linking microbial community structure and operational parameters in anaerobic membrane bioreactors (AnMBR)[J]. Bioresource Technology, 2019, 290: 121787.
- [73] NGUYEN A Q, NGUYEN L N, ABU HASAN JOHIR M, et al.

- al. Derivation of volatile fatty acid from crop residues digestion using a rumen membrane bioreactor: A feasibility study[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 312: 123571.
- [74] BARNES S P, KELLER J. Anaerobic rumen SBR for degradation of cellulosic material[J]. *Water Science and Technology*, 2004, 50(10): 305–311.
- [75] BÖSKE J, WIRTH B, GARLIPP F, et al. Anaerobic digestion of horse dung mixed with different bedding materials in an up-flow solid-state (UASS) reactor at mesophilic conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 158: 111–118.
- [76] TAMAYAO P J, RIBEIRO G O, MCALLISTER T A, et al. Effects of post-pyrolysis treated biochars on methane production, ruminal fermentation, and rumen microbiota of a silage-based diet in an artificial rumen system (RUSITEC)[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2021, 273: 114802.
- [77] XING Baoshan, CAO Sifan, HAN Yule, et al. A comparative study of artificial cow and sheep rumen fermentation of corn straw and food waste: Batch and continuous operation[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 745: 140731.