

# 梯度有机负荷下农业废弃物厌氧发酵特性及微生物群落

勒系意<sup>1</sup>, 黄运红<sup>1</sup>, 任雨涵<sup>1</sup>, 陈柳萌<sup>2\*</sup>

(1. 江西师范大学生命科学院, 南昌 330022; 2. 江西省农业科学院农业应用微生物研究所, 南昌 330200)

**摘要:** 为了解梯度负荷对不同 C/N 农业废弃物厌氧发酵特性及微生物群落的影响, 该试验以猪粪、金针菇菌包、稻秆和甘蔗叶等 C/N 差异较大的废弃物作为原料, 通过逐渐提高全混合厌氧反应器 (continuous stirred tank reactor, CSTR) 的有机负荷率 (organic loading rate, OLR), 研究物料在 4 个 OLR (1.11、1.67、2.22 和 2.78 g/(L·d), 以可挥发性固体计) 下的产甲烷特性和微生物群落结构变化。结果表明: 4 种物料的日甲烷产量均随 OLR 递增而增加, 但单位物料甲烷产率与微生物菌群结构则因物料 C/N 差异而表现出不同的变化趋势。其中: 猪粪的日甲烷产量最高, 细菌和古菌的菌群结构与对照组相比变化不大; 多样性指数先增后减, 甲烷产率也在 OLR 达到 1.67 g/(L·d) 后逐渐下降。金针菇菌包甲烷产率相对稳定, 细菌和古菌的多样性指数随 OLR 递增而增长。稻秆和甘蔗叶同属于碳质量分数高的秸秆类物料, 二者的细菌和古菌的菌群结构变化明显; 但在 OLR 达到 2.78g/(L·d) 时, 稻秆受系统酸化 (VFA/TIC>0.8) 影响, 甲烷产率下降明显, 细菌和古菌的多样性指数也出现下降; 而甘蔗叶则因 VFA/TIC<0.8, 其甲烷产率在发酵过程中未出现明显下降。此外, 不同 C/N 物料对优势菌的形成存在影响。其中: *Methanobolus zinderi* 为猪粪物料特有的优势古菌; *Proteiniphilum acetatigenes*, *Acetivibrio cellulolyticus* 为金针菇菌包、甘蔗叶特有的优势细菌; *Methanospirillum hungatei* 为稻秆物料独有的优势古菌。

**关键词:** 废弃物; 发酵; 沼气; C/N; 产甲烷特性; 菌群结构

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2017.17.032

中图分类号: S216.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2017)-17-0239-09

勒系意, 黄运红, 任雨涵, 陈柳萌. 梯度有机负荷下农业废弃物厌氧发酵特性及微生物群落[J]. 农业工程学报, 2017, 33(17): 239-247. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2017.17.032 <http://www.tcsae.org>

Le Xiyi, Huang Yunhong, Ren Yuhan, Chen Liუმeng. Anaerobic digestion characteristics and microbial structure of agricultural wastes under gradient organic loadings[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2017, 33(17): 239-247. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2017.17.032 <http://www.tcsae.org>

## 0 引言

近年来, 随着现代农业规模化、集约化的快速发展, 废弃物产量呈爆发式快速增长趋势。相对发展滞后的资源利用技术和装备, 以及废弃物产权属性、政府监管困难等客观原因, 导致农业废弃物循环利用方式粗放, 甚至直接燃烧或随意堆弃, 严重危害到我国农村生态环境、农业生产环境和农民生活环境<sup>[1]</sup>。

当前, 厌氧发酵制备沼气是农业废弃物能源化利用中工程化程度最高的一种技术, 其厌氧微生物作为发酵过程中生命活性的主体<sup>[2]</sup>, 其数量、种类、活性以及与物料之间的传质是影响沼气发酵效率的关键因素。C/N 作为发酵物料的一个重要特性, 可直接影响微生物的新陈

代谢, 并通过影响有机物中碳的转化进而影响沼气产量, 是近年来相关研究的焦点<sup>[3-4]</sup>。通常具有较佳产气性能的发 酵物料一般都具有适宜沼气发酵的 C/N (10~30:1)<sup>[5]</sup>。例如, 猪粪的 C/N 约为 12~14:1, 甲烷产率可达 390 mL/g (OLR=1.36 g/(L·d))<sup>[7]</sup>; 玉米粉的 C/N 约为 30:1, 甲烷产率可达 361 mL/g (OLR=1.70 g/(L·d))<sup>[6]</sup>; 餐厨垃圾因组成多样, 其结果各有差异, 但均表现出较高的甲烷产率 (537 mL/g, C/N=22:1, OLR=1.46 g/(L·d))<sup>[6]</sup>; 401 mL/g, C/N=13:1, OLR=2.50 g/(L·d))<sup>[8]</sup>。而当 C/N 偏高时, 因发酵系统面临酸抑制风险以及低氮质量分数对菌群繁殖的影响, 物料的产气性能表现不佳。以稻秆 (C/N=44:1)、木薯渣 (C/N=67:1)、玉米秆 (C/N=43:1) 为例, 其甲烷产率较差, 分别仅为 134 mL/g (OLR=1.48 g/(L·d))<sup>[7]</sup>、246 mL/g (OLR=1.49 g/(L·d))<sup>[7]</sup>、186 mL/g (OLR=1.64 g/(L·d))<sup>[7]</sup>。当氮质量分数偏高, 如以鸡粪 (4:1)<sup>[8]</sup> 为发酵物料, 其甲烷产率较低, 为 277 mL/g (OLR=1.62 g/(L·d))。相应的菌群结构研究也表现出类似的变化趋势: 适宜的 C/N 有助于发酵微生物的生长繁殖, 发酵系统的菌群结构组成也更加丰富; C/N 过高、过低均会引起发酵菌群活性的降低。此外, 李东

收稿日期: 2017-04-05 修订日期: 2017-08-09

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2014BAC04B02); 江西省重大项目(20152ACF60023); 江西省协同创新专项 (JXXTCX201600304)。

作者简介: 勒系意, 江西南昌人, 主要从事农村能源方面的研究。南昌 江西师范大学生命科学院, 330022。Email: 1542885948@qq.com。

\*通信作者: 陈柳萌, 江西赣州人, 主要从事农业废弃物的厌氧发酵技术研究。南昌 江西省农业科学院农业应用微生物研究所, 330200。

Email: 13931409@qq.com

等<sup>[9]</sup>通过鸡粪混合稻草方式调节物料 C/N, 以此获得更佳的厌氧产气性能。由此可见, 无论是单一物料、还是混合物料, C/N 均是一个调控厌氧发酵过程的关键参数, 不仅影响着厌氧产气性能, 而且对微生物的菌群结构、数量及变化规律存在较大影响。但是, 上述研究多为固定有机负荷下的连续厌氧发酵; 缺乏梯度有机负荷条件下的厌氧产气特性及微生物群落结构的变化规律研究, 以及不同 C/N 物料之间差异性分析。

为此, 本研究选择猪粪、金针菇菌包、稻秆和甘蔗叶等 4 种 C/N 差异较大的废弃物作为发酵物料, 分别进行单一物料连续厌氧发酵试验, 在梯度有机负荷条件下, 考察不同 C/N 物料的日产甲烷量、单位甲烷产率、pH、氨氮 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) 浓度、挥发性脂肪酸 (volatile fatty acids, VFAs) 浓度、碳酸氢盐 (TIC) 碱度和 VFA/TIC 等指标的变化趋势; 分析不同负荷阶段的优势菌群及菌群变化规律。以此, 为提高不同类型物料的产气效率及优化多原料混合发酵提供理论依据和试验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 发酵原料与接种物

甘蔗叶取自广东省湛江市甘蔗园, 阴干后粉碎至 1 mm 备用; 金针菇菌包取自江西省农业科学院农业应用微生物研究所金针菇示范基地, 阴干后粉碎至 1 mm 备用; 水稻秸秆取自江西省农业科学院水稻研究所试验田, 阴干后粉碎至 1 mm 备用; 新鲜猪粪取自江西省农业科学院畜牧兽医研究所猪场, 经简单手工剔除动物毛发和大块石子等杂物后置于 4 °C 冰柜内备用; 4 种发酵物料的基本特性如表 1 所示; 接种物取自江西省新余市罗坊镇沼气站正常运行的沼气工程发酵罐 (以猪粪为原料), 基本特性如表 2 所示。

表 1 发酵物料的基本特性

物料 Raw materials	总固形物 Total solids, TS/%	挥发性固体 Volite solids,VS/%	C/%	N/%	碳氮比 C/N
猪粪 Swine manure	20.86±2.07	14.53±1.75	7.80	0.60	13.0
金针菇菌包 Fungi bag of <i>Flammulina velutipes</i>	73.33±2.13	63.33±1.89	43.34	1.83	23.7
稻秆 Rice straw	78.00±2.15	73.00±1.93	39.57	0.60	66.0
甘蔗叶 Sugarcane top	88.57±2.26	73.76±1.98	38.81	0.32	121.3

注: 实验数据以平均值±标准差表示, 下同。

Note: Experimental data are expressed as Mean±SD, same as below.

表 2 接种物的基本特性

检测指标 Parameter	总固形物 Total solids, TS/%	挥发性固体 Volatile solid, VS/%	碳氮比 C/N	pH 值 pH value	TIC/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	VFA/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
	5.34±0.98	3.21±0.88	10:1	7.94±0.06	3 413±232	230±34

注: TIC 代表碳酸氢盐碱度, VFA 代表的挥发性脂肪酸浓度。

Note: TIC is bicarbonate alkalinity; VFA is volatile fatty acid.

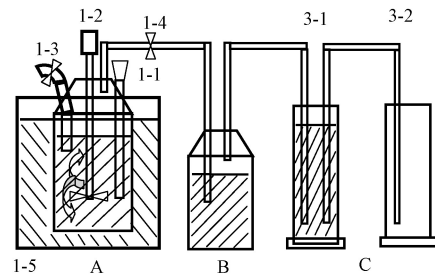
### 1.2 接种物的活化

接种物的活化方法<sup>[10]</sup>: 首先将厌氧污泥调总固形物质量分数 (TS) 为 6%, 加入质量分数 1% 的活性炭, 然后以猪粪为原料在厌氧反应器中进行厌氧发酵

(OLR=0.5 g/(L·d), 以挥发性固体计), 待产气稳定后 (日产气量无显著性差异) 的罐内发酵物即为本实验所需的接种物。

### 1.3 试验装置与设计

试验装置采用自行改装的厌氧发酵反应器, 该装置分 A (发酵单元)、B (酸性气体吸附) 和 C (甲烷体积测量) 3 个单元。其中 A 单元是购自瑞典碧普 (Sweden Bioprocess) 的 2 L 装厌氧发酵罐 (有效容积 1.8 L), 每个发酵瓶配有可调转速的机械搅拌系统; B 单元配有 3 mol/L 氢氧化钠溶液以吸附沼气中的酸性气体 ( $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{S}$  等, 溴百里酚酞指示剂显示吸收容量上限); C 单元采用排水法收集甲烷并测量其体积 (图 1)。



注: A 为发酵单元 (1-1: 进料斗, 1-2: 搅拌轴, 1-3: 出料阀, 1-4: 出气阀, 1-5: 水浴锅); B 为  $\text{CO}_2$  吸收单元; C 为测气单元 (3-1: 集气瓶, 3-2: 集水瓶)

Note: A: Fermentation unit (including 1-1: feed hopper, 1-2: stirring shaft, 1-3: bleeder valve, 1-4: biogas outlet valve, 1-5: water bath); B:  $\text{CO}_2$  absorption unit; C: Gas measurement (including 3-1: gas collecting bottle, 3-2: water collecting bottle)

图 1 厌氧发酵反应器的示意图

Fig.1 Sketch map of anaerobic fermentation reactor

分别向 4 个厌氧发酵反应器中, 按  $\text{VS}_{\text{接种物}}:\text{VS}_{\text{物料}}=2:1$  的比例加入接种物和物料 (总质量为 1.8 kg, TS 质量分数约 6%); 按图 1 所示组装厌氧发酵反应器装置, 关闭出料阀 (1-3), 打开出气阀 (1-4), 通过进料口 (1-1) 向反应器中鼓吹氮气 30~45 s, 以排空反应器内部空气, 确保发酵的厌氧环境; 然后将发酵单元 (A) 置于水浴锅 (1-5) 内; 待 37 °C 厌氧发酵至日产甲烷量低于 100 mL/d 后, 开始进入连续厌氧发酵阶段, 即分别投加 4 种发酵物料 (甘蔗叶、金针菇菌包、稻秆和猪粪), 进行中温 (37±1 °C) 连续厌氧发酵。设计 OLR 分别为 1.11、1.67、2.22 和 2.78 g/(L·d), 以可挥发性固体计; 水力停留时间为 30 d, 日进料总量为 60 g (各物料添加量详见表 3, 由蒸馏水补足至 60 g)。每天进料 6 h 后按每隔 3 h 搅拌 10 min 的频率进行定时搅拌; 每天上午 9:00 记录甲烷体积; 每隔 3d 对发酵出料检测 pH、碳酸氢盐 (TIC) 碱度、氨氮 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) 浓度和挥发性脂肪酸 (VFAs) 浓度。

表 3 发酵物料的添加量

有机负荷率 Organic loading rate/ $\text{g}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$	猪粪 Swine manure/g	金针菇菌包 Fungi bag of <i>Flammulina velutipes</i> /g	稻秆 Rice straw/g	甘蔗叶 Sugarcane top/g
1.11	13.76	3.16	2.74	2.71
1.67	20.65	4.74	4.11	4.07
2.22	27.53	6.32	5.48	5.42
2.78	34.41	7.90	6.85	6.78

## 1.4 分析方法

总固形物 (TS) 浓度和挥发性固体 (VS) 浓度采用称质量法测定<sup>[11]</sup>。甲烷产量采用沼气通过氢氧化钠溶液后采用排水法测定。发酵液 pH 值在取样后立即采用上海雷磁 PHS-3C 型酸度计测定。发酵液的挥发酸 (VFAs) 浓度和碳酸氢盐 (TIC) 碱度采用 Nordmann 联合滴定法<sup>[12]</sup>测定, 样品在 4 °C 条件下 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行指标测定。氨氮 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) 浓度采用纳氏试剂分光光度法<sup>[13]</sup>, 并通过公式 (1) 折算游离氨浓度, 其中 pH 指 pH 值。发酵物料的产甲烷潜力 (biochemical methane potential, BMP, 即发酵物料的每克可挥发性固体组所产生甲烷标准体积) 采用瑞典 BioProcess 公司研发的全自动产甲烷潜力分析测试系统 (AMPTS II) 进行测定<sup>[14]</sup>。

$$\text{pH} = 9.26 + \lg \frac{[\text{NH}_3]}{[\text{NH}_4^+]} \quad (1)$$

## 1.5 群落结构分析方法

### 1.5.1 基因组总 DNA 的提取

为保证条件的均一稳定, 在发酵物料的 4 个 OLR 中取甲烷产率稳定期的出料为样品, 即从当日的出料中取 6-8 mL 发酵液存于 10 mL 的离心管中, -80 °C 保存, 实验结束后统一进行基因组 DNA 提取。其中, 对照组的取样时间为各物料进入连续厌氧发酵阶段的前 1 d。采用蛋白酶 K 法进行基因组 DNA 提取, 具体方法参见文献<sup>[15]</sup>。

### 1.5.2 PCR 扩增

扩增对象为细菌 16s rDNA 的 V3 可变区; 引物为 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 和 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'); 对于古菌, 引物为 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 和 109F (5'-ACGGCTCAGTAACACGT-3'); 为提高变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分辨率, 在 518R 的 5'端加 GC 夹子 (-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG-) <sup>[16-18]</sup>。

反应体系: 天根 Mastermix 12.5 μL, 引物各 1 μL, 模板 2 μL, 加无菌水至 25 μL。产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

反应条件: 对于细菌, 94 °C 预变性 4 min, 然后 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 45 s, 最后 72 °C 保温 7 min, 30 个循环; 对于古菌, 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 37 s, 72 °C 延伸 1 min, 最后 72 °C 保温 10 min, 35 个循环。

### 1.5.3 变性梯度凝胶电泳

在 INGENY phorU- 2Dcode Universal Mutation system 上进行 DGGE 分析, 聚丙烯酰胺凝胶质量分数为 8%, 细菌和古菌的变性剂浓度范围分别是 35%~65% 和 35%~50%, 在 1×TAE 缓冲液 (称量三羟甲基氨基甲烷 242 g 和乙二胺四乙酸 18.612 g 于 1 L 烧杯中, 用 800 mL 去离子水溶解; 加入 57.1 mL 的冰乙酸; 用 NaOH 调 pH 值至 8.3, 加去离子水定容至 1 L 后, 室温保存) 中, 以 220 V 电压, 60 °C 预电泳 10 min, 然后以 140 V 电压, 60 °C 恒温电泳 8 h。电泳结束后, 进行硝酸银染色<sup>[19]</sup>并拍

照。用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱进行分析。

### 1.5.4 DGGE 条带回收及序列分析

选择 DGGE 图谱中清晰的优势条带, 切胶并溶于 30 μL 灭菌水中, 4 °C 过夜, 然后取 1 μL 做模板进行 PCR 反应, 引物不带 GC “夹子” 外, 反应条件同上。将重新扩增的 DNA 片段切胶回收和纯化后, 连接到 pMD18-T 载体上, 并转化至 DH5α 感受态细胞中, 筛选阳性克隆, 进行 16sRNA 测序, 登陆 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), 将测序结果与数据库中的已知序列进行比对分析。Shannon-Wiener 指数 (H) 采用公式 (2) 计算。

$$H = -\sum_{i=1}^S pi + \ln(pi) \quad (2)$$

式中 S 为丰富度, pi 为第 i 条带的灰度值与该泳道所有条带灰度值总和的比值。

## 2 结果分析

### 2.1 4 种物料产甲烷潜力

试验结果表明: 4 种物料 (猪粪、金针菇菌包、稻秆、甘蔗叶) 的产甲烷潜力分别为 387.4±8.6、210.2±12.0、269.0±8.8 和 152.4±16.7 mL/g (以挥发性固体计), 按大小排序依次分别为: 猪粪>稻秆>金针菇菌包>甘蔗叶。其中: 猪粪因氮质量分数高, 在产甲烷潜力测试中表现最好。稻秆和甘蔗叶的纤维结构致密复杂, 且纤维素和半纤维素等可甲烷化的物质组成被木质素包裹, 很难被酶水解成可发酵性糖, 加之较高的 C/N, 导致它们的产甲烷潜力远低于猪粪物料。金针菇菌包为食用菌栽培后的废弃物 (以木屑、棉籽壳、麦麸等为主), 虽然拥有适宜厌氧发酵的 C/N (23.7:1), 但子实体在生长过程中消耗了大量的纤维素和半纤维素, 致使其产甲烷潜力低于 C/N (66:1) 更高的稻秆。这表明: 除 C/N 外, 物料的产甲烷潜力还受物料组成、物理结构等因素影响。

### 2.2 单一物料连续厌氧发酵特性

#### 2.2.1 4 种不同 C/N 物料的产甲烷特性变化

日产甲烷量是连续厌氧发酵过程中一个重要监测指标, 能够直观反映发酵物料的产气性能。如图 2a 可知, 在连续厌氧发酵反应器中, 4 种物料的日产甲烷量均随 OLR 的递增而增加; 按大小排序依次为猪粪>稻秆>金针菇菌包>甘蔗叶。其中: 猪粪的厌氧产气表现最好, 对 OLR 增加响应迅速; 其余 3 种物料的日产甲烷量随 OLR 的增加而响应滞后、且增速较缓。

甲烷产率通常用于分析物料在某一发酵条件下的产甲烷能力, 其产甲烷潜力转化率 (简称 BMP 转化率) 可反映在当前发酵条件下对产甲烷潜力的释放程度。如图 2b 所示, 4 种物料的甲烷产率按大小排序依次为猪粪>稻秆>金针菇菌包>甘蔗叶。通过 SPASS 软件对 4 种物料在不同 OLR 阶段的甲烷产率进行差异性分析可知 (见表 4), 随 OLR 递增, 不同 C/N 物料的产甲烷特性变化趋势各有差异; 其中: 猪粪的甲烷产率在 2~4 个 OLR 中表现出较为明显的下降趋势, BMP 转化率由 94.48% 降至 85.83%; 稻秆在前 3 个 OLR 的甲烷产率无显著性变化,

但在第4个OLR时,甲烷产率下降明显,BMP转化率也由79.78%降至65.24%;而金针菇菌包与甘蔗叶在整个发

酵期间,甲烷产率的变化无显著性差异,但BMP转化率不高,均未超过70%。

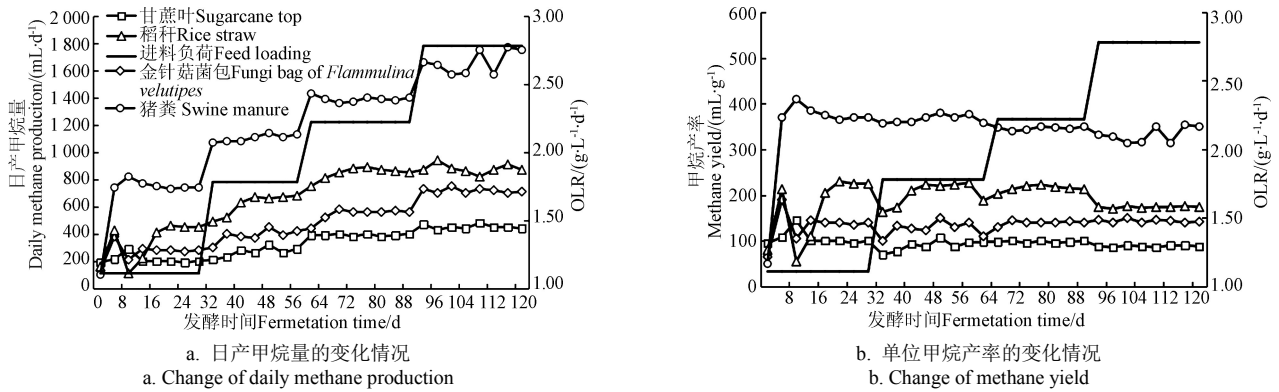


图2 不同C/N物料日产甲烷量和单位甲烷产率随时间的变化

Fig.2 Change with time of daily methane produciton and methane yield from different C/N-contained material

表4 不同C/N物料的平均甲烷产率\*和BMP转化率\*\*

Table 4 Changes of average methane yield and BMP conversion rate from different C/N-contained materials

物料 Materials		OLR/(g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )			
		1.11	1.67	2.22	2.78
猪粪 Swine manure	平均甲烷产率 Average methane yield/(mL·g <sup>-1</sup> )	377.8±15.5 <sup>a</sup>	366.0±9.0 <sup>a</sup>	346.1±3.8 <sup>b</sup>	332.5±17.1 <sup>c</sup>
	BMP转化率 BMP conversion rate/%	97.52	94.48	89.34	85.83
金针菇菌包 Fungi bag of <i>Flammulina velutipes</i>	平均甲烷产率 Average methane yield/(mL·g <sup>-1</sup> )	142.1±24.9 <sup>a</sup>	131.2±15.7 <sup>a</sup>	139.6±4.7 <sup>a</sup>	143.5±3.7 <sup>a</sup>
	BMP转化率 BMP conversion rate/%	67.60	62.42	66.41	68.27
稻秆 Rice straw	平均甲烷产率 Average methane yield/(mL·g <sup>-1</sup> )	219.5±10.3 <sup>a</sup>	211.2±28.9 <sup>a</sup>	214.6±6.5 <sup>a</sup>	175.5±7.07 <sup>b</sup>
	BMP转化率 BMP conversion rate/%	81.60	78.51	79.78	65.24
甘蔗叶 Sugarcane top	平均甲烷产率 average methane yield/(mL·g <sup>-1</sup> )	106.1±17.7 <sup>a</sup>	89.6±12.1 <sup>a</sup>	102.14±12.5 <sup>a</sup>	91.8±4.6 <sup>a</sup>
	BMP转化率 BMP conversion rate/%	69.62	58.79	67.02	60.24

注: 显著性水平为0.05, “\*”平均甲烷产率为物料在不同OLR下的甲烷产率的平均值, “\*\*\*”BMP转化率为物料在不同OLR下的平均单位甲烷产率与其甲烷潜力的比值(以百分比计), 表中相同字母表示无显著性差异。

Note: Significant difference value is 0.05, “\*” average methane yield is the average of daily methane yield under different OLR, “\*\*\*” BMP conversion rate is defined as average methane yield of material under different OLR against its methane potential (in percentage terms), the same letter in the table shows no significant difference.

2.2.2 不同C/N物料的pH值、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、VFAs和VFA/TIC变化  
pH值、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、VFAs和VFA/TIC等参数与厌氧微

生物的物质代谢和发酵活动密切相关。根据已报道文献提出的稳定参考限值如表5所示。

表5 厌氧发酵参数的稳定性限值<sup>[5,20-21]</sup>

Table 5 Stability limits of anaerobic digestion parameters

参数 Parameters	参数范围 Range of parameter	备注说明 Illustration
pH value	<6.5 (不稳定) 6.5~8.0 (稳定) >8.0 (不稳定)	-
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/(mg·L <sup>-1</sup> )	<3 000 (稳定) 3 000~5 000 >5 000 (受到抑制)	在3 000~5 000 mg·L <sup>-1</sup> 时, 发酵过程稳定与不稳定皆有可能。即: 一般情况下, 在此范围内是能够引起发酵系统的不稳定; 但如果微生物的繁殖能够适应氮素含量的增长, 或者接种物已经适应了高氨氮浓度环境, 那么发酵系统也可以处于稳定状态的。
VFAs/(mg·L <sup>-1</sup> )	<1 000 (稳定) 1 000~4 000 >4 000 (不稳定)	在1 000~4 000 mg·L <sup>-1</sup> 时, 发酵过程稳定与不稳定皆有可能, 具体依据发酵原料的种类与进料浓度有关。
VFA/TIC	<0.3 (稳定) 0.3~0.8 >0.8 (不稳定)	VFA/TIC的稳定限值取决于沼气工程采用的工艺、装备及原料等因素, 因而具有唯一性; 这使得稳定限值在不同沼气工程之间缺乏可比性而难以进行归纳总结; 0.3~0.8是已报道文献中VFA/TIC最大稳定值出现的范围。

如图3所示, 不同物料之间的发酵特性存在较大差异, 其C/N差异直接影响4个参数的变化趋势。除pH值在7.5~8.0间波动外, 猪粪发酵液的VFAs和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N浓度均随OLR递增而增加, 其中: VFAs浓度和VFA/TIC均在稳定范围内变化; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N浓度则是在第79d(第3个OLR)时达到5 235 mg/L, 突破了5 000 mg/L的稳定参考限值。经公式(1)折算, 此时的游离氨浓度约为

308 mg/L, 是200 mg/L (Liu等<sup>[22]</sup>认为低于200 mg/L的游离氨浓度有利于厌氧发酵)的1.54倍, 使得第3、4个OLR下的氨抑制作用显著增强, 这与其甲烷产率的逐步下降趋势一致; 但由于接种物源自以猪粪为主要原料的沼气工程, 发酵菌群对高浓度的氨氮具有一定的耐受性<sup>[23]</sup>, 使其在第4个OLR下仍可释放85.83%的产甲烷潜力。金针菇菌包的VFAs浓度和VFA/TIC随OLR递增而增加,

pH 值和  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度则随 OLR 递增呈下降趋势，但 4 个参数均处于稳定范围内，推测这是甲烷产率保持相对稳定的主要原因。稻秆和甘蔗叶的 VFAs 浓度及 VFA/TIC 随 OLR 递增均呈现增加趋势；而 pH 值则逐渐下降，并

且在第 4 个 OLR 时均小于 6.5 的稳定值下限，表明 VFA 的累积超出了发酵系统的缓冲能力，发酵系统面临酸化风险，这也是稻秆的甲烷产率在 VFA/TIC 超过 0.8 后明显下降的主要原因。

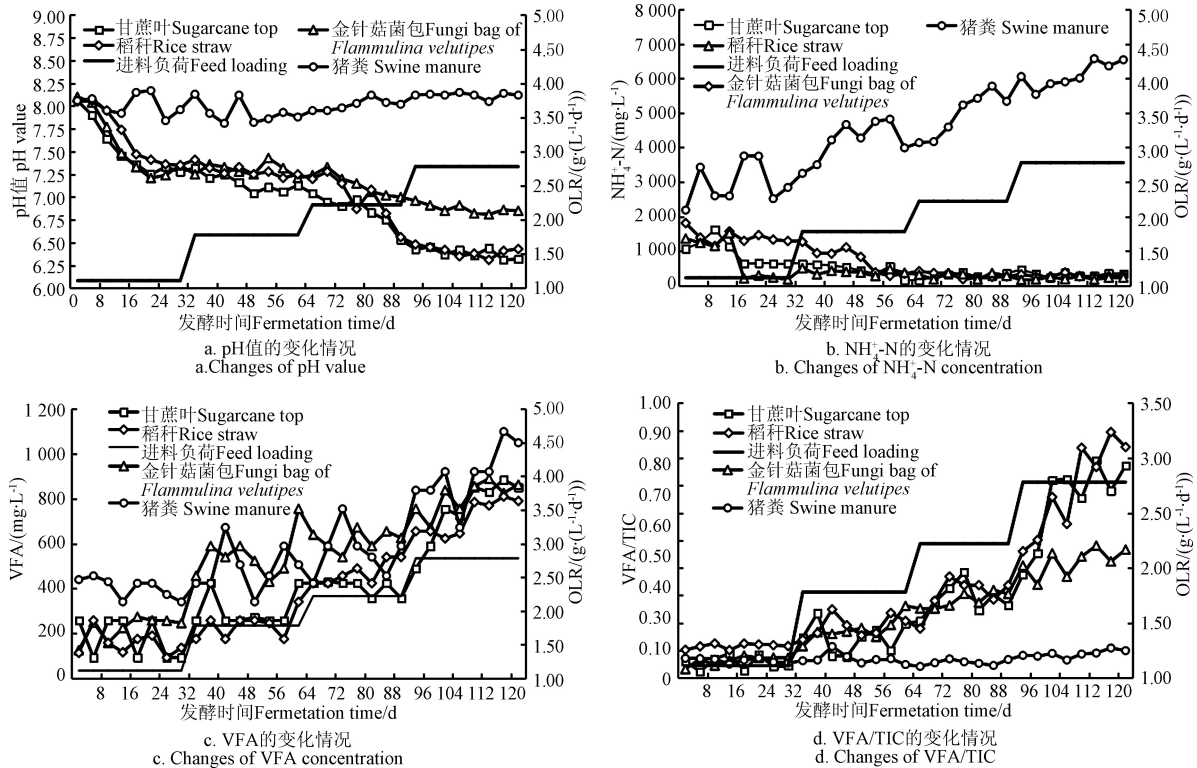


图 3 不同 C/N 物料的厌氧发酵特性参数随时间变化

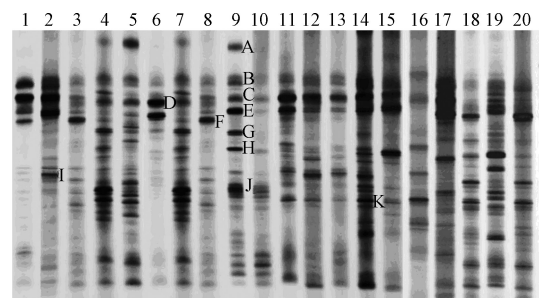
Fig.3 Changes with time of anaerobic digestion characteristic parameters with different C/N-contained materials

### 2.3 细菌菌群结构分析

#### 2.3.1 细菌 DGGE 电泳图谱及特征条带序列分析

DGGE 图谱中条带的数目、强度及迁移位置反映了样品中微生物种群的多样性。理论上图谱中每一个条带代表某个微生物优势菌群，条带数目及强度与微生物的种类及相对含量成正比，通过测序和序列比对，可以得出此优势菌群的种类。

如图 4 所示，4 种物料细菌的菌群结构在连续厌氧发酵过程中的表现各有不同。与对照组相比，猪粪的菌落结构在发酵过程中保持相对稳定，推测其原因是接种物取自以猪粪为原料的沼气工程，菌群结构已经适应了氮素丰富的猪粪物料；仅靠 OLR 的增加无法引起菌群结构上的明显变化，但会引起主要优势细菌在种类和相对含量上的变化，特别是在氨氮浓度大幅超过稳定限值后（第 4 个 OLR）的变化最为明显，这表明主要优势细菌为应对氨抑制的增强正在作出适应性调整。其余 3 种物料的菌群结构在发酵过程中变化明显，OLR 的增加不仅产生了新的条带，而且主要优势细菌的种类和相对含量也随之变化，其中：金针菇菌包的主要优势细菌在第 3 个 OLR 后的变化不大，而甘蔗叶和稻秆的主要优势细菌则在种类和相对含量不断改变以适应物料 OLR 的增加。



注：编号 1~5 为金针菇菌包、6~10 为甘蔗叶、11~15 为猪粪、16~20 为稻秆；横坐标中 2,7,12,17 为 1.11 g·(L·d)<sup>-1</sup> 负荷；3,8,13,18 为 1.67 g·(L·d)<sup>-1</sup> 负荷；4,9,14,19 为 2.22 g·(L·d)<sup>-1</sup> 负荷；5,10,15,20 为 2.78 g·(L·d)<sup>-1</sup> 负荷；1,6,11,16 为对照组，下同。A~K 为条带编号。

Note: 1-5 are samples of fungi bag of *Flammulina velutipes*, 6-10 are samples of sugarcane top, 11-15 are samples of swine manure, 16-20 are samples of rice straw. In abscissa 2, 7, 12, 17 are 1.11 g·(L·d)<sup>-1</sup> load, 3, 8, 13, 18 are 1.67 g·(L·d)<sup>-1</sup> load; 4, 9, 14, 19 are 2.22 g·(L·d)<sup>-1</sup> load; 5, 10, 15, 20 are 2.78 g·(L·d)<sup>-1</sup> load; 1, 6, 11, 16 are control group; same as below. A-K is number of band.

图 4 细菌 PCR-DGGE 电泳图谱

Fig.4 PCR-DGGE electropherogram of bacteria

从图 4 中选取 11 个条带进行割胶克隆，送上海生工测序，测序结果经 Blast 程序与 GenBank 数据库中序列进行局部同源性比较，比对结果如表 6 所示，主要为水解和发酵类细菌。条带 A, B, K 属拟杆菌属(*Bacteroides*)，专性厌氧，有降解蛋白胨或葡萄糖等产酸的功能<sup>[24]</sup>，为

甲烷转化提供前体。条带 C 属于梭菌属(*Clostridium*), 专性厌氧, 可以分解淀粉、纤维二糖、葡萄糖为碳源和能量, 生产氢、乙酸等, 但不能利用纤维素<sup>[25]</sup>; 推测这是在猪粪发酵液中条带亮度较强的主要原因。条带 D 属脱硫硫酸盐弧菌属(*Dethiosulfovibrio*), 严格厌氧, 主要发酵终产物为乙酸盐和琥珀酸盐<sup>[26]</sup>, 是甘蔗叶对照组中的优势细菌, 但在进入连续发酵后逐渐消失。条带 E 是拟杆菌门一个新属, 首次是从海洋沉积物中的分离获得, 兼性厌氧, 具有产酸功能<sup>[27]</sup>; 在猪粪发酵液中的条带亮度最高。条带 F 属于普雷沃菌属(*Prevotella*), 可降解蛋白产生乙酸, 在金针菇菌包、甘蔗叶和稻秆的发酵液中均有发现, 这与史伟宏<sup>[8]</sup>等在果蔬、麦秸等富含纤维物料的发现普雷沃菌属(*Prevotella*)的结论一致。条带 G 为解纤维素醋弧菌, 属于醋弧菌属(*Acetivibrio*)<sup>[4]</sup>, 严格厌氧, 降解纤维素类物质产酸, 并对发酵液中的酸性环境有较好的耐受和调节能力。条带 H 和条带 I 分别属于羧酸利用杆菌属(*Carboxylicivirga*)和密螺旋体属(*Treponema*), 这 2 类菌的作用相似, 促进物料中的多糖、单糖等水解和产酸<sup>[8]</sup>。

表 6 DGGE 图谱中不同条带的序列比对结果

Table 6 Sequence alignment analysis of DGGE spectrums bands

条带 Band	相似菌株 Similar strains	登录号 Accession number	相似度 Similarity/%
A	<i>Bacteroides gallinarum</i>	NR_041448.1	92
B	<i>Bacteroides finegoldi</i>	NR_041313.1	92
C	<i>Clostridium caenicola</i>	NR_126170.1	95
D	<i>Dethiosulfovibrio salsuginis</i>	NR_116429.1	94
E	<i>Sunxiuqinia rutila</i>	NR_134207.1	93
F	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	NR_043154.1	95
G	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	NR_025917.1	98
H	<i>Carboxylicivirga taeanensis</i>	NR_133715.1	90
I	<i>Treponema azotonutricium</i>	NR_074168.1	94
J	<i>Anaerobacterium chartisolvens</i>	NR_125464.1	94
K	<i>Bacteroides clarus</i>	NR_113065.1	93

### 2.3.2 细菌菌群多样性分析

Shannon-Wiener 指数 ( $H'$ ) 是反映了细菌菌群多样性高低的常见方法。如图 5 所示: 稻秆的指数介于 2.671~3.396, 猪粪的指数介于 2.668~3.198, 甘蔗叶的指数介于 2.147~3.020, 金针菇菌包的指数介于 1.922~3.394。猪粪的多样性指数较对照组相比均有不同程度的下降, 且随 OLR 递增呈现先增后减的现象; 这表明在第 1 个 OLR 时, 细菌就因游离氨的细胞毒性 (氨氮浓度超过 3 000 mg/L) 出现减少, 多样性指数大幅下跌, 但由于氨氮浓度的增长处于细菌菌群的耐受范围, 细菌逐渐适应, 其种类逐渐恢复, 多样性指数回升; 直至第 4 个 OLR 时, 因氨氮浓度大幅超过稳定限值, 细菌菌群重新受到抑制, 多样性指数又出现回落。金针菇菌包的多样性指数随着 OLR 递增而增加, 这表明适宜的 C/N 不仅有助于发酵系统的稳定, 也为细菌的增殖提供了良好的生长环境。甘蔗叶和稻秆的多样性指数随着 OLR 递增而增加, 但在第 4 个 OLR 后, 细菌因酸累积抑制导致指数递减。

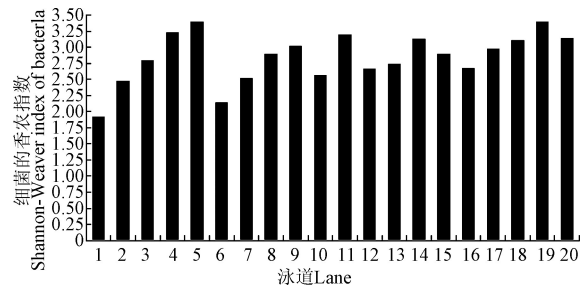
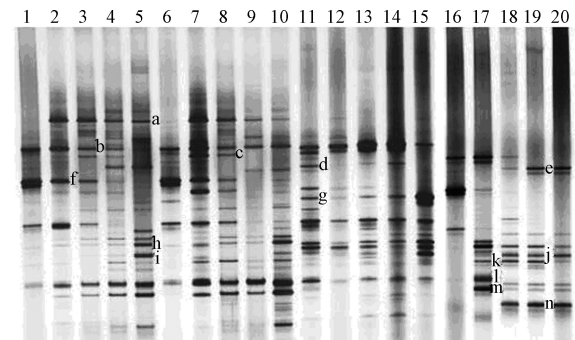


图 5 细菌的 Shannon-Weaver 指数  
Fig.5 Shannon-Weaver Index of bacteria

### 2.4 古菌菌群变化

#### 2.4.1 古菌 DGGE 图谱及特征条带序列分析

如图 6 所示: 与对照组相比, 猪粪物料中的菌群结构无明显变化, 只是代表主要优势古菌的条带亮度在逐渐增强; 直至第 4 个 OLR 时, 主要优势古菌的种类和相对含量从出现较大的改变, 推测这是古菌菌群在氨氮浓度大幅超过 5 000 mg/L 后作出的适应性调整。金针菇菌包和甘蔗叶在发酵过程中的菌群结构变化较大, 其条带数量与对照组相比明显增多, 而且主要优势古菌的种类和相对含量也发生了较大变化, 表明古菌菌群正在不断适应物料 OLR 的递增。稻秆物料的古菌结构与对照组相比变化最大, 不仅形成了新的优势古菌, 而且对照组中的主要优势古菌在连续发酵过程中逐渐消失。



注: a~n 为条带编号  
Note: a-n is number of band

图 6 古菌 PCR-DGGE 电泳图谱  
Fig.6 PCR-DGGE electrophorogram of archaea

从图 6 中选取 14 个条带进行割胶克隆, 送上海生工测序, 测序结果经 Blast 程序与 GenBank 数据库中序列进行局部同源性比较, 比对结果如表 7 所示。1) 条带 a, b, i, j, l 属于甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*), 极端严格厌氧, 为氢营养型产甲烷古菌, 利用甲酸盐、 $H_2$  等电子供体还原  $CO_2$  为  $CH_4$ <sup>[28]</sup>。其中: 条带 a 在金针菇菌包、甘蔗叶的发酵期间随 OLR 的递增逐渐减弱; 条带 b 在金针菇菌包、甘蔗叶和猪粪发酵液中均有发现; 条带 i, j, l 在 4 种发酵物料的所均有发现。2) 条带 c 属于甲烷热球菌属 (*Methanothermococcus*), 极端严格厌氧, 为氢营养型产甲烷菌<sup>[28-29]</sup>, 在金针菇菌包、甘蔗叶和猪粪发酵液中均有发现。3) 条带 e, f, k 分别属于甲烷球菌属 (*Methanococcus*)、甲烷短杆菌属 (*Methanobrevibacter*) 和甲烷囊菌属 (*Methanoculleus*), 极端严格厌氧, 为氢营养型

产甲烷古菌<sup>[30-31]</sup>, 其中: 条带 e 在稻秆和甘蔗叶的发酵液中均有发现; 条带 f 在金针菇、甘蔗叶和稻秆的发酵液中均有发现, 且在金针菇和甘蔗叶的发酵中表现出随 OLR 递增逐渐减弱的趋势; 条带 k 尽管在 4 种物料的发酵液中均有发现, 但在甘蔗叶和稻秆中的条带清晰、相对含量较高。JOBLIN 等<sup>[30]</sup>在反刍动物瘤胃内发现上述 3 个属的大部分古菌, 推测这 3 种古菌比较适宜于纤维类物料的厌氧发酵。4) 条带 n 属于甲烷螺菌属(*Methanospirillum*), 极端严格厌氧, 为氢营养型产甲烷菌<sup>[28,29]</sup>, 仅在稻秆发酵液中发现。5) 条带 m 属于甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*), 极端严格厌氧, 为乙酸营养型产甲烷古菌, 以乙酸为唯一能源, 代谢产物为 CH<sub>4</sub> 和 CO<sub>2</sub>, 乙酸和 CO<sub>2</sub> 是其生长的碳源<sup>[31]</sup>; 为金针菇菌包、甘蔗叶和稻秆等富含纤维物料发酵液中所共有; 在果蔬废弃物<sup>[32]</sup>、秸秆<sup>[24,33]</sup>、青贮饲用甜菜<sup>[34]</sup>、造纸废水<sup>[35]</sup>等为原料的厌氧发酵罐及反刍动物瘤胃中均能检测到甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*), 推测其在富含纤维物料的厌氧消化过程中发挥重要作用。6) 条带 g 属于甲烷叶菌属 (*Methanobacterium*), 极端严格厌氧, 最适 pH 为 6.50~6.80, 为甲基营养型产甲烷古菌<sup>[28-29]</sup>, 利用甲基类化合物 (如甲醇)、甲胺类化合物 (如甲胺、二甲胺、三甲胺) 和甲基硫化物 (如甲硫醇、二甲基硫) 进行生产 CH<sub>4</sub>, 逐渐成为猪粪发酵的主要优势古菌。7) 条带 d 为 *Methanomassiliicoccus luminyensis*, 是从人体粪便分离出的第 3 个产甲烷古菌新种, 只能在 H<sub>2</sub>/甲醇条件下生产 CH<sub>4</sub>, 现被归到产甲烷古菌的第 7 个目中<sup>[36-37]</sup>, 是猪粪和金针菇菌包发酵液中的优势古菌, 而在稻秆和甘蔗叶的发酵过程中逐渐丢失。

表 7 DGGE 图谱中不同条带的序列比对结果

条带 Band	相似菌株 Similar strains	登录号 Accession number	相似度 Similarity/%
a	<i>Methanobacterium palustre</i>	NR_041713.1	95
b	<i>Methanobacterium petrolearium</i>	NR_113044.1	75
c	<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	NR_044720.1	75
d	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	NR_118098.1	85
e	<i>Methanococcus maripaludis</i>	NR_118369.1	83
f	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	NR_074235.1	77
g	<i>Methanobacterium zindleri</i>	NR_044558.1	78
h	<i>Geoglobus acetivorans</i>	NR_116582.1	78
i	<i>Methanobacterium subterraneum</i>	NR_028247.1	99
j	<i>Methanobacterium ferruginis</i>	NR_113045.1	95
k	<i>Methanoculleus hydrogenitrophicus</i>	NR_116881.1	86
l	<i>Methanobacterium kanagiense</i>	NR_112749.1	98
m	<i>Methanosaeta concilii</i>	NR_102903.1	99
n	<i>Methanospirillum hungatei</i>	NR_112982.1	99

#### 2.4.2 古细菌菌群多样性分析

如图 7 所示: 金针菇菌包的指数介于 2.254~3.139, 甘蔗叶的指数介于 2.589~3.394, 猪粪的指数介于 2.400~3.070, 稻草秸秆的指数介于 1.763~2.860。其中: 猪粪的古菌多样性指数, 较对照组相比均出现不同程度的下降, 且随 OLR 的递增呈先增后减的趋势, 这与细菌的多样性指数的变化趋势类似, 表明古菌菌群在连续发酵过程中同样受到了游离氨的抑制。金针菇菌包的多样性指数随着 OLR 递增而增加。稻草的多样性指数在发酵

过程中表现出随 OLR 递增而增加, 但在第 4 个 OLR 时, 因系统酸累积影响, 其多样性指数出现下降现象。甘蔗叶的多样性指数的呈先增后减再增, 表明古菌菌群的种类变化比较剧烈, 这说明发酵系统的不稳定直接影响了古菌菌群结构的稳定。

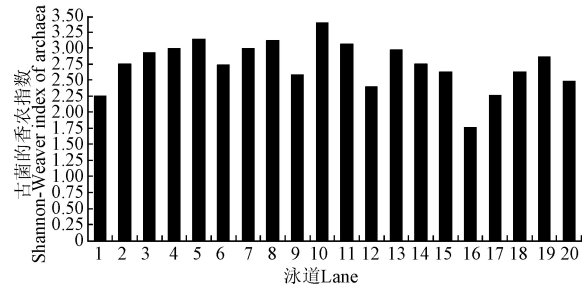


图 7 古菌的 Shannon-Weaver 指数  
Fig.7 Shannon-Weaver Index of archaea

### 3 结论

1) 受物料 C/N 的差异影响, 4 种物料在发酵特性与微生物菌群结构上表现出不同的变化趋势。猪粪的氮素丰富, 日产甲烷量最高, 且随 OLR 递增而响应迅速, 细菌和古菌的菌群结构在连续发酵过程中与对照组相比变化不大; 但受 OLR 递增以及氨抑制不断增强的影响, 主要优势菌在种类和相对含量上作出适应性改变, 细菌和古菌的多样性指数呈现先增后减的变化趋势, 甲烷产率在第 2 个 OLR 后也逐渐下降, 相应的 BMP 转化率也由 94.48% 逐渐降至 85.32%。金针菇菌包含有适宜厌氧发酵的 C/N (约 23.7:1), 甲烷产率相对稳定, 日产甲烷量随 OLR 递增而稳步增长, 但 BMP 转化率不高, 介于 62.42~68.27% 之间; 由于物料组成变化和 OLR 增加, 细菌和古菌的菌群结构与对照组相比变化明显, 主要优势菌的种类和相对含量也发生明显改变, 细菌和古菌的多样性指数稳步升高。稻草和甘蔗叶同属于碳质量分数较高 (66:1, 121:1) 的秸秆类物料, 它们的日产甲烷量均随 OLR 递增而增加, 细菌和古菌的菌群结构也在发酵过程中发生了明显变化; 但稻草在第 4 个 OLR 时受系统酸化 (VFA/TIC>0.8) 影响, 甲烷产率下降明显, BMP 转化率仅为 65.24%, 细菌和古菌的多样性指数也出现下降; 而甘蔗叶则因 VFA/TIC<0.8, 其甲烷产率在发酵过程中未出现明显下降。

2) 不同 C/N 物料对发酵菌群中主要优势菌的形成存在影响。在鉴定的优势细菌中, *Proteiniphilum acetatigenes* 可降解蛋白产生乙酸, 在金针菇菌包、甘蔗叶和稻草等物料发酵液中发现; *Acetivibrio cellulolyticus* 可降解纤维素产酸, 并对酸性环境有较好的耐受和调节能力, 在甘蔗叶和金针菇菌包的发酵液中发现。鉴定的优势古菌包括乙酸营养型、氢营养型以及甲基营养型等 3 类产甲烷古菌。*Methanococcus maripaludis*、*Methanobrevibacter smithii*、*Methanoculleus hydrogenitrophicus*、*Methanospirillum hungatei* 和 *Methanosaeta concilii* 在富含纤维物料 (金针菇菌包、甘蔗叶和稻草) 的发酵过程中均有发现, 其中

*Methanospirillum hungatei* 为稻秆独有的优势古菌；*Methanobolus zinderi* (甲烷叶菌属，甲基营养型)是在猪粪厌氧发酵过程中独有的优势菌。

#### [参 考 文 献]

- [1] 李鹏. 农业废弃物循环利用的绩效评价及产业发展机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [2] 邓良伟. 沼气工程[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [3] 王欣, 苏小红, 郭广亮, 等. 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术在畜禽粪便厌氧发酵液中的研究进展[J]. 黑龙江科学, 2015(1): 12—13.  
Wang Xin, Su Xiaohong, Guo Guangliang, et al. Advances in anaerobic fermentation broth denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique in animal feces[J]. Hei Long Jiang Science, 2015(1): 12—13. (in Chinese with English abstract)
- [4] 夏吉庆, 马添翼, 郑国香, 等. PCR-DGGE 法解析牛粪厌氧发酵稳定期微生物多样性[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(2): 146—150.  
Xia Jiqing, Ma Tianyi, Zhang Guoxiang, et al. Analysis of microbial diversity during the stationary phase in cattle manure anaerobic fermentation with PCR-DGGE[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(2): 146—150. (in Chinese with English abstract)
- [5] 董仁杰, 伯恩哈特·蓝宁阁. 沼气工程与技术沼气指南: 从生产到使用 (第四卷) [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2013.
- [6] 王明. 生物质组成成分对厌氧发酵产甲烷的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
- [7] 李海红, 巴琦玥, 闫志英, 等. 不同原料厌氧发酵及其微生物种群的研究[J]. 中国环境科学, 2015, 35(5): 1449—1457.  
Li Haihong, Ba Qiyue, Yan Zhiying, et al. Studies on microbial community of different materials and anaerobic fermentation[J]. China Environment Science, 2015, 35(5): 1449—1457. (in Chinese with English abstract)
- [8] 史宏伟, 邹德勋, 左剑恶, 等. 原料差异对厌氧消化微生物群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(8): 1675—1682.  
Shi Hongwei, Zuo Dexun, Zuo Jian'e, et al. The effect of feedstocks on microbial communities in anaerobic digesters[J]. Journal of agro-environment Science, 2011, 30(8): 1675—1682. (in Chinese with English abstract)
- [9] 李东, 叶景清, 甄峰, 等. 稻草与鸡粪配比对混合厌氧消化产气率的影响[J]. 农业工程学报, 2013, 29(2): 232—238.  
Li Dong, Ye Jingqing, Zhen Feng, et al. Effects of anaerobic co-digestion of different proportions between rice straw and chicken manure on biogas yield rate[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(2): 232—238. (in Chinese with English abstract)
- [10] 陈柳萌, 勒系意, 聂红, 等. 4℃冷藏对厌氧发酵接种物活性的影响[J]. 江西农业学报, 2017, 29(1): 102—106.  
Chen Liუმeng, Le Xiyi, Nie Hong, et al. Effect of cold storage at 4℃ on activity of inoculum for anaerobic fermentation[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2017, 29(1): 102—106. (in Chinese with English abstract)
- [11] 贺延龄. 废水的厌氧生物处理[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [12] 刘芳, 张万钦, 吴树彪, 等. 厌氧发酵中挥发酸含量与碳酸氢盐碱度的滴定法修正[J]. 农业机械学报, 2013, 44(9): 91—96.  
Liu Fang, Zhang Wanqin, Wu Shubiao, et al. Titration method for total inorganic carbon and volatile fatty acids determination in anaerobic digestion[J]. Transactions of The Chinese Society of Agricultural Machinery, 2013, 44(9): 91—96. (in Chinese with English abstract)
- [13] 魏复盛. 水和废水监测分析方法 (第四版) [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [14] Operation and Maintenance Manual of Automatic Methane Potential Test System[Z]. 2014.
- [15] 刘飞. PCR-DGGE 技术分析多菌态混合样品中微生物群落结构[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [16] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG, et al. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695—700.
- [17] Ovreås L, Forney L, Daae F L, et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saellen, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1997, 63(3): 3367—3373.
- [18] Regine Grobkopf, Peter H. Janssen, Werner Liesack, et al. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1998, 64(3): 960—969.
- [19] Sanguinetti C J, Dias Neto E, Simpson A J, et al. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels[J]. Biotechniques, 1994, 17(5): 914—921.
- [20] 邓良伟. 沼气工程[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [21] Bernhard DROSG. Process Monitoring in Biogas Plants[Z]. IEA Bioenergy, 2013.
- [22] Liu T, Sung S. Ammonia inhibition on thermophilic aceticlasticmethanogens[J]. Water Science & Technology, 2002, 45(10): 113—120.
- [23] Hansen K H, Angelidaki I, Ahring B K. Anaerobic digestion of swine manure:inhibition by ammonia[J]. Water Research, 1998, 32(1): 5—12.
- [24] 张蕾, 梁军锋, 崔文文, 等. 规模化秸秆沼气发酵反应器中微生物群落特征[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(3): 584—592.  
Zhang Lei, Lang Junfeng, Cui Wenwen, et al. Characteristics of microbial communities in full-scale biogas digesters with straw as substrate[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(3): 584—592. (in Chinese with English abstract)
- [25] Hatsumi Shiratori, Kinuyo Sasaya, Hitomi Ohiwa, et al. *Clostridium clariflavum* sp. nov. and *Clostridium caenicola* sp. nov., moderately thermophilic, cellulose/cellobiose-digesting bacteria isolated from methanogenic sludge[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009(59): 1764—1770.
- [26] Diaz Cardenas C, Lopez G, Patel G K C, et al. *Dethiosulfovibrio salsuginis* sp. nov, an anaerobic,slightly halophilic bacterium isolated from a saline spring[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010(60): 850—853.
- [27] Jaewoo Yoon, Hiroaki Kasai. *Sumxiuqinia rutila* sp. nov., a new member of the phylum Bacteroidetes isolated from marine sediment[J]. J. Gen. Appl. Microbiol., 2014(60): 28—32.
- [28] 承磊, 郑珍珍, 王聪, 等. 产甲烷古菌研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 1143—1164.  
Cheng Lei, Zhang Zhenzhen, Wang Cong, et al. Recent advances in methanogens[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 1143—1164. (in Chinese with English abstract)



- [29] 方晓瑜, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 产甲烷生化代谢途径研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(1): 1—9.  
Fang Xiaoyu, Li Jiabao, Rui Junpeng, et al. Research progress in biochemical pathways of methanogenesis[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2015, 21(1): 1—9. (in Chinese with English abstract)
- [30] Joblin K N. Methanogenic archaea[M]. Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants. The Netherlands: Kluwer Academic, 2005.
- [31] 祝金星. 甲烷鬃菌基因组学及其碳代谢途径新功能研究[D]. 北京: 中国科学院, 2012.
- [32] 史宏伟, 邹德勋, 左剑恶, 等. 梯度负荷下果蔬垃圾厌氧消化性能及微生物群落结构的研究[J]. 环境科学学报 2012, 32(1): 232—240.  
Shi Hongwei, Zou Dexun, Zou Jian'e, et al. Investigation on anaerobic digestion performance and microbial structure of vegetable wastes under gradient organic loadings[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2012, 32(1): 232—240. (in Chinese with English abstract)
- [33] 朱文秀, 黄振兴, 任洪艳, 等. IC 反应器处理啤酒废水的效能及其微生物群落动态分析[J]. 环境科学, 2012, 33(8): 2715—2722.  
Zhu Wenxiu, Huang Zhenxing, Ren Hongyan, et al. Performance and microbial community dynamic characteristics of an internal circulation reactor treating brewery wastewater[J]. Environmental Science, 2012, 33(8): 2715—2722. (in Chinese with English abstract)
- [34] Klocke M, Mahnert P, Mundt K, et al. Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2007, 30(2): 139—151.
- [35] 尹礎. 高浓度造纸废水厌氧处理中颗粒污泥的微生物群落结构及形成的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2008.
- [36] Borrel G, Parisot N, Harris H M B, et al. Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliicoccales*, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine[J]. BMC Genomics, 2014, 15(679): 1—23.
- [37] Paul K, Nonoh J O, Mik ulski L, et al. "Methanoplasmatales", Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(23): 8245—8253.

## Anaerobic digestion characteristics and microbial structure of agricultural wastes under gradient organic loadings

Le Xiyi<sup>1</sup>, Huang Yunhong<sup>1</sup>, Ren Yuhan<sup>1</sup>, Chen Liუმeng<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; 2. Institute of Applied Agricultural Microorganism, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China)

**Abstract:** In recent years, along with the rapid development of modern large-scale and intensive agriculture in China, the output of agricultural wastes shows a rapid increasing trend. Some objective reasons (the lagged development of resource utilization technology and equipment, the attributes of property rights of agricultural wastes, the difficult government regulatory, and so on) lead to the extensive cyclic utilization and even direct combustion or arbitrary discard of agricultural wastes, which has caused serious harms to the rural ecological environment, agricultural production environment and farmers' living environment in China. The preparation of biogas through anaerobic fermentation is a high-engineering technology for the energy-oriented use of agricultural wastes, and the quantity, species and activity of anaerobic microorganisms for anaerobic fermentation, as well as the fermented substance are the key factors affecting the efficiency of biogas production. C/N, an important character of the fermented substance, can directly affect the metabolism of microorganisms, and also can affect the methane yield through influencing the transformation of carbon in organic matters. In order to understand the effects of gradient organic loadings on the anaerobic digestion characteristics and microbial community structure of greatly different C/N-containing agricultural wastes, the author investigated the performance of methane production and the changes in microbial community structure of anaerobically-digested swine manure, *Flammulina velutipes* fungal bag, rice straw, and sugarcane top in continuous stirred tank reactor (CSTR) under gradient organic loading rates (OLRs) [1.11, 1.67, 2.22 and 2.78 g/(L·d), being counted as volatile solid]. The results showed that the daily methane yield of the above four substrates all increased with the increase in OLR, but their methane productive rate and microbial community structure revealed different variation trends due to different C/N ratios of substrates. Among four substrates, swine manure with C/N of 13:1 had the highest daily methane yield, and its bacterial and archaea community structure was similar to that in the control group; whereas due to the increase in OLR and the enhancement of ammonia inhibition, the diversity index of bacteria and archaea increased firstly and then decreased, and the methane productive rate decreased gradually when the OLR reached 1.67 g/(L·d). Because *Flammulina velutipes* fungal bag contained a suitable C/N (about 23.7:1) for anaerobic digestion, it had a relatively stable methane productive rate, and its diversity index of bacteria and archaea increased with the increase in OLR, but its microbial community structure was obviously different from that in the control group. Rice straw and sugarcane top had a higher carbon content, with C/N as 66:1 and 121:1 respectively, and their community structure of bacteria and archaea changed obviously in the anaerobic digestion process. When OLR reached 2.78 g/(L·d), due to the acid accumulation and VFA/TIC above 0.8, the methane productive rate of rice straw decreased obviously, and its diversity index of bacteria and archaea also reduced. However, the methane productive rate of sugarcane top did not decrease obviously in the course of anaerobic digestion, because its VFA/TIC was less than 0.8. Furthermore, the substrate with different C/N had effects on the formation of specific dominant microbial species, and it was found that: *Methanobrevibacter smithii* was the specific dominant archaea species in the digested swine manure; *Proteiniphilum acetatigenes* and *Acetivibrio cellulolyticus* were the specific dominant bacterial species in the digested *Flammulina velutipes* fungal bag and sugarcane top, respectively; *Methanospirillum hungatei* was the specific dominant archaea species in the digested rice straw.

**Keywords:** wastes; fermentation; biogas; C/N; methane production characteristic; microbial structure