

启动模式对水稻秸秆厌氧发酵稳定性及产气效率的影响

凡慧^{1,2,3}, 马诗淳^{1,2,3,4*}, 李强^{1,2,3,4}, 黄艳^{1,2}, 王春芳¹, 邓宇^{1,2,3,4}

(1. 农业农村部沼气科学研究所, 四川 成都 610041; 2. 农村可再生能源开发与应用重点实验室, 四川 成都 610000; 3. 国家农业微生物双流观测实验站, 四川 成都 610000; 4. 三亚中国农业科学院国家南繁研究院, 海南 三亚 572024)

摘要: 秸秆厌氧发酵是实现农业废弃物资源化利用, 支撑农业固碳减排的重要途径。但是, 秸秆的高负荷发酵通常会导致系统酸化, 影响发酵稳定性。研究以驯化的厌氧污泥为接种物, 在不同物料浓度(5%、7%和9% TS)下, 研究了一步启动(OSS, one-step startup)和逐级提升启动(SIS, stepwise-increasing startup)两种模式对秸秆中温(35℃)厌氧发酵效率及稳定性的影响。结果表明, 两种启动模式均可正常启动秸秆厌氧发酵过程, 水解阶段OSS组趋向于丙酸型发酵, 但SIS组可维持稳定的乙酸型发酵, 丙酸和乙酸降解效率高, 挥发性脂肪酸最高累积浓度仅为OSS组的18.4%~40.3%。56 d发酵过程中, 所有实验组均稳定产甲烷; 与OSS组相比, 逐级提升启动对较低物料浓度(5%和7% TS)的产气率无显著影响, 但9% TS实验组的TS产气率显著提升。高通量测序结果显示, *Sphaerochaeta*, *Proteiniphilum*和*Bacteroidales*是OSS组中的优势细菌, *vadinBC27 wastewater-sludge group*和*Synergistaceae*是SIS组的优势细菌; 氢营养型产甲烷菌*Methanoculleus*秸秆厌氧消化过程中的优势古菌, SIS组存在较高丰度的脂肪酸互营氧化菌和氢营养型产甲烷菌*Methanobacterium*, 有利于促进VFAs降解产甲烷。因此, 启动方式对秸秆发酵性能和微生物群落结构具有明显的影响, 逐级提升启动可以有效缓解高浓度秸秆发酵过程中的VFAs累积, 有利于预防厌氧消化系统酸化, 维持系统稳定并提高产气率。

关键词: 水稻秸秆; 厌氧发酵; 启动模式; 逐级提升; 稳定性

中图分类号: S216.4; S39 文献标志码: A 文章编号: 1000-1166(2023)01-0021-10

DOI:10.20022/j.cnki.1000-1166.2023010021

Effects of Startup Modes on Stability and Biogas Production During Anaerobic Mesophilic Fermentation of Rice Straw / FAN Hui^{1,2,3}, MA Shichun^{1,2,3,4*}, LI Qiang^{1,2,3,4}, HUANG Yan^{1,2}, WANG Chunfang¹, DENG Yu^{1,2,3,4} / (1. Biogas Institute of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Development and Application of Rural Renewable Energy, Chengdu 610041, China; 3. National Agricultural Experimental Station for Microorganisms, Chengdu 610000, China; 4. National Nanfan Research Institute Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya 572024, China)

Abstract: Straw anaerobic digestion is an important way to achieve the energy utilization of agricultural wastes and support agricultural carbon sequestration and emission reduction. However, high-load fermentation of straw often leads to acidification, which would affect fermentation stability of anaerobic fermentation process. In this study, we analyzed the effects of one-step startup (OSS) and stepwise-increasing startup (SIS) on the efficiency and stability of mesophilic (35℃) anaerobic digestion of rice straw, with different total solids concentrations (5%, 7% and 9% TS). The domesticated anaerobic sludge was used as inoculum. Results showed that both modes could start the anaerobic digestion of rice straw normally. In the hydrolysis stage, the OSS group tended to propionate-type fermentation, while the SIS group could maintain stable acetate-type fermentation with a higher propionate degradation rate, and the highest cumulative concentration of volatile fatty acids was only 18.4%~40.3% of the OSS group. During the 56-day fermentation, all groups produced methane stably. Compared with the OSS group, the SIS had no significant effect on the biogas yield of lower TS groups (5% and 7% TS), but had a significant improvement on TS biogas yield of 9% TS group. High-throughput sequencing results showed that

收稿日期: 2022-11-19

项目来源: 海南省重点研发计划(ZDYF2021XDNY300); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2016-BIOMA); 四川省科技基础条件平台(环境微生物平台)。

作者简介: 凡慧(1989-),女,汉族,四川资中人,硕士,研究方向为厌氧微生物资源收集与保藏, E-mail: fanhui01@caas.cn

通信作者: 马诗淳, E-mail: mashichun@caas.cn

Sphaerochaeta, *Proteiniphilum* and *Bacteroidales* were the dominant bacteria of OSS groups, while vadinBC27 wastewater-sludge group and Synergistaceae dominated in the bacterial communities of SIS groups. In addition, hydrogenotrophic methanogen *Methanoculleus* was the most dominant archaea during the anaerobic digestion of rice straws. In SIS group, the presence of relatively abundant syntrophic VFA-oxidizing bacteria and hydrogenotrophic methanogen *Metanobacterium* was beneficial to promote the degradation of VFA and methanogenesis. Therefore, the startup mode had a significant impact on performance and microbial community structure of anaerobic digestion of rice straws. The stepwise-increasing startup could effectively alleviate the accumulation of VFAs in the process of high load anaerobic digestion of rice straws, which was conducive to preventing acidification, maintaining process stability and improving biogas production rate.

Key words: rice straw; anaerobic digestion; startup mode; stepwise-increasing; stability

秸秆富含纤维素、半纤维素等有机成分,是生产清洁生物能源的重要基质^[1-3]。我国秸秆年产量 8 亿吨左右,全部利用可减排 9 亿余吨 CO₂。加快推进秸秆的能源化利用,将有效支撑农业减排固碳,助力我国 2030 年实现“双碳”目标。厌氧消化是秸秆能源化利用的重要途径之一。但是,由于秸秆结构复杂、生物转化率低、碳氮比高等^[4-5],导致厌氧发酵过程不稳定、易酸化,从而限制了其在沼气发酵中的大规模应用^[6-8]。

目前,秸秆厌氧发酵主要采用湿式厌氧发酵工艺和干发酵工艺^[9]。湿式发酵通常以较低的负荷运行(<8% TS),以避免纤维和脂肪等分层、形成浮渣,但严重影响沼气产量^[10-11]。秸秆厌氧干发酵可通过提高发酵负荷(>15% TS)提升沼气产量,但是启动周期长,并且由于传质差、营养不平衡、氨氮和挥发酸易积累,容易导致纤维素降解率低等问题^[12]。多项研究证实^[13],秸秆厌氧发酵过程中,TS 含量的提高易造成挥发酸累积和 pH 值,破坏产酸和产甲烷代谢平衡,当有机酸高达 7000 mg·L⁻¹时,产甲烷代谢将被抑制,从而导致系统崩溃。研究发现,启动阶段,接种是影响秸秆厌氧消化过程的重要步骤^[14]。增加接种率可提升甲烷产量,但当底物/接种物比率(S/I) >4 时,由于接种物中的微生物缺乏足够的底物维持生长代谢,从而导致厌氧消化效率将下降,甚至启动失败。但是,接种率过高,不仅增加运行成本,还将减少反应器的有效容积和发酵原料,增强微生物之间的营养竞争,从而降低产气量^[15]。目前,高浓度物料发酵常采用沼液回流等模式进行连续接种,提高活性微生物的数量,缓解挥发性脂肪酸积累,从而缩短启动周期、维持运行的稳定性、提高沼气产量。但是,沼液回流模式容易造成氨氮积累,进而抑制厌氧降解过程^[16]。在适宜的接种率下,利用逐级提高进料浓度的方式启动厌氧发酵,可增强厌氧消化菌群的代谢活性,从而提升其降解

有机废弃物的能力。目前已利用该模式成功地进行厌氧消化处理鸡粪的启动,总固体含量(total solid, TS)去除率 60%,甲烷体积分数稳定在(65 ± 3)%左右,并避免了氨抑制的现象^[17]。

本研究围绕提升秸秆的转化效率,维持秸秆厌氧发酵过程的稳定性,在恒温 35℃ 条件下,以驯化的厌氧污泥为接种物,在不同原料浓度(5%、7% 和 9% TS)下,通过分析厌氧发酵过程中的挥发酸代谢、沼气产率、木质纤维素降解率以及微生物群落结构等差异,评估了一步启动(OSS, one-step startup)和逐级提升启动(SIS, stepwise-increasing startup)模式对水稻秸秆厌氧中温发酵性能的影响,以期对秸秆沼气工程运行提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 实验原料及接种物

1.1.1 实验原料

实验中所采用的水稻秸秆取自成都双流农田,其成分主要包括纤维素(33.55%)、半纤维素(21.46%)、木质素(17.38%)、灰分、蛋白质和糖等,组成特征见表 1。水稻秸秆使用前先烘干后粉碎,40 目过筛。称取 1.00 g,55℃ 烘干至恒重,通过失重法计算秸秆含水率。

1.1.2 接种物

接种物为实验室利用猪粪秸秆混合原料长期驯化的厌氧干发酵菌剂,接种物的理化特征见表 1。

1.1.3 培养基成分及配制方法

FSC 培养基(g·L⁻¹): NaCl 5.0, CaCO₃ 2.0, 尿素 2.0, 胰蛋白胨(BBL) 2.0, 酵母粉(YE) 1.0, 将上述试剂溶解于 1 L 自来水。配置时,先将秸秆粉加入 1.0 L 发酵瓶中,真空泵抽换氮气 3 次,每次 5 min,然后分装 0.5 L FSC 培养基于厌氧瓶中。

1.2 实验设置

本实验设置为批次实验,分别采用一步启动

(OSS, one-step startup) 和逐级提升启动(SIS, step-wise-increasing startup) 两种模式启动秸秆厌氧发酵

表1 底物和接种物理化性质

项目	秸秆	接种物
TS/(g·kg ⁻¹)	87.20 ± 0.24	20.65 ± 2.34
VS/(g·kg ⁻¹)	74.57 ± 0.26	12.11 ± 1.34
碳/(% TS)	41.43 ± 0.07	28.48 ± 0.30
氮/(% TS)	0.86 ± 0.04	1.75 ± 0.02
碳/氮	48.49 ± 0.92	16.33 ± 0.17
氢/(% TS)	5.85 ± 0.01	3.50 ± 0.07
硫/(% TS)	0.11 ± 0.02	0.81 ± 0.06
纤维素/(% TS)	33.55 ± 1.91	—
半纤维素/(% TS)	21.46 ± 0.97	—
木质素/(% TS)	17.38 ± 1.36	—

实验,原料浓度分别选择5%、7%和9% TS,累积设置6个实验组。以两种不同模式启动厌氧发酵实验。OSS组(OSS 5, OSS 7和OSS 9)以5%、7%和9% TS直接启动厌氧消化系统,SIS组(SIS 5, SIS 7和SIS 9)均先以2% TS启动厌氧消化系统,至系统稳定运行后将TS分别提高至5%、7%和9%。

采用1.0 L带有取样口和排气口的发酵瓶,实际发酵体积为0.5 L,接种量为10% (w/v)。接种后放置于(35 ± 1) °C恒温培养箱中培养,每2 d摇晃混匀1次并取样监测,直至没有明显产气时停止实验。

1.3 理化指标分析

采用标准方法分析总固体含量(total solids, TS)和总挥发性固体含量(volatile solids, VS)^[18]。采用Vario Macro Cube元素分析仪分析C、H、N和S元素。采用排饱和盐水集气的方法测定沼气产量。采用安捷伦7820A型气相色谱仪测定甲烷含量^[19]。将液体样品于室温下12000 rpm离心10 min,经0.22 μm水相滤膜过滤,用Agilent 1200 Series液相色谱仪分析挥发性脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸)^[20]。采用纳氏试剂分光光度法测定氨氮^[21]。采用范氏洗涤纤维分析法测定中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF)^[22]。纤维素降解率用以下公式计算:

$$(\text{半})\text{纤维素降解率}(\%) = (\text{降解前纤维素量} - \text{降解后纤维素量}) / \text{降解前纤维素量} \times 100\%$$

1.4 微生物群落结构分析

实验运行至稳定期,用无菌离心管从每个反应体系中收集5 mL样品,于4 °C,12000 rpm离心10

min,用PBS缓冲液清洗2~3次,菌体储存于-80 °C冰箱保存用于DNA提取。采用TIANGEN细菌基因组提取试剂盒提取、纯化基因组DNA。

采用Illumina Miseq系统进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。采用FLASH、Trimmomatic软件对测序数据进行拼接和优化;使用Usearch软件进行OTU聚类分析;基于得到的OTU-table,进行后续的分类学分析、Alpha多样性分析和Beta多样性分析以及组间差异分析。数据分析采用Qiime(Version 1.8 <http://qiime.org/>)平台在线分析,根据不同的相似度水平,对所有序列进行OTU划分,对97%的相似水平下的OTU进行生物信息统计分析。采用RDP Classifier算法(<http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>)对OTU代表序列进行比对分析,在各个水平(kingdom, phylum, class, order, family, genus, species)注释其群落的物种信息。并对样品进行了多样性分析以及分类分析。

2 结果与讨论

2.1 启动模式对挥发性脂肪酸代谢的影响

在秸秆厌氧消化过程中,所有实验组的乙酸、丙酸、丁酸和总挥发性脂肪酸(VFAs)浓度变化趋势几乎一致(见图1)。发酵前4 d为快速水解阶段,有机物水解导致VFAs迅速累积。OSS实验组的VFAs浓度且伴随TS提高而增加,发酵第4天达到最高值3072.0~6556.7 mg·L⁻¹; SIS实验组以2% TS启动时和提高至目标负荷阶段均出现VFAs快速累积,最高累积浓度分别为1209.1~1412.1 mg⁻¹(第4天)和(第22~24天)110.4~730.2 mg⁻¹,均不足OSS实验组的40.3%。同时,提升负荷阶段VFAs浓度显著低于初始启动阶段,这可能与SIS实验组处于稳定的VFAs降解状态有关(见图4)。

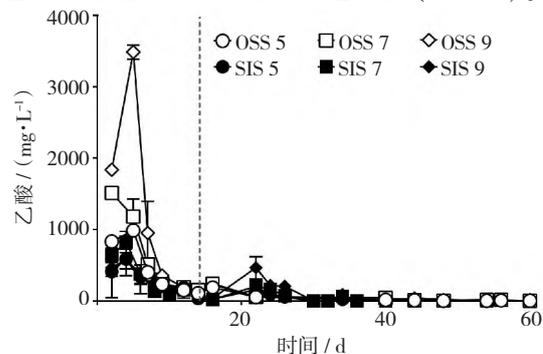


图1 秸秆厌氧发酵过程中乙酸产量变化

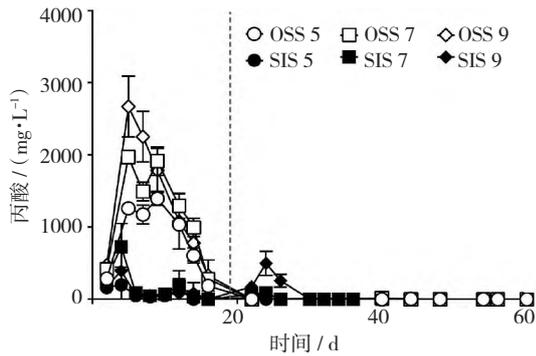


图2 秸秆厌氧发酵过程中丙酸产量变化

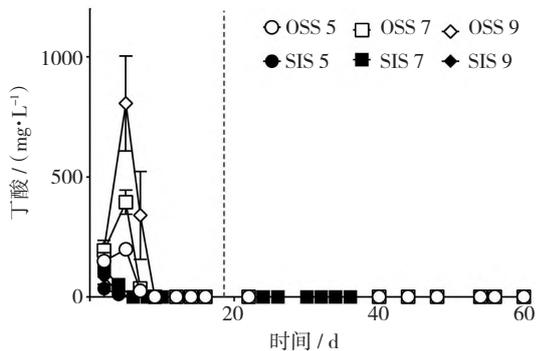
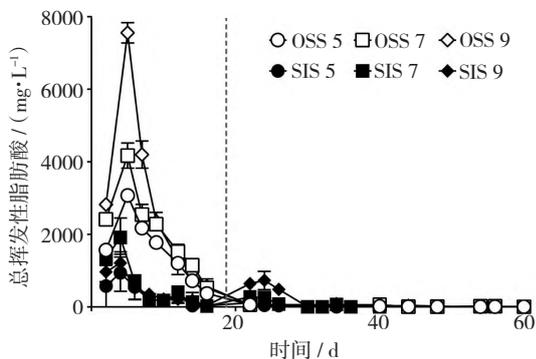


图3 秸秆厌氧发酵过程中丁酸产量变化



注:挥发性脂肪酸包括乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸
图4 秸秆厌氧发酵过程中挥发性脂肪酸的产量变化

乙酸和丙酸为水解阶段的主要代谢产物,占挥发酸总量的60.5%以上(见图5)。其中,前2天为乙酸型发酵,乙酸占VFAs的48.1%以上,乙酸/丙酸比率为2.4~3.9。第4天起,OSS实验组转换为丙酸型发酵(乙酸/丙酸比率为0.6~0.9),乙酸缓慢增加或快速降解,丙酸则迅速积累,分别是第2天的0.78~1.3倍和4.4~5.7倍;而SIS实验组在整个发酵过程中均为乙酸型发酵(乙酸/丙酸比率为1.5~2.7),发酵第4天乙酸和丙酸均缓慢提高,是第2天的1.0~1.2倍和1.2~2.2倍。发酵第6天,OSS实验组进入乙酸降解阶段,2天内乙酸降解

率超过56.7%,丙酸降解率不足15.7%;而SIS实验组则以丙酸降解为主,2天内丙酸降解率超过75.0%,乙酸降解率为33.2%~61.0%。乙酸和丙酸是有机物厌氧转化过程中的重要中间产物。由于乙酸可以直接被产甲烷菌利用,而丙酸的电离常数大,并且转化为甲烷的速率慢,因此在厌氧消化过程中,丙酸最容易积累,从而导致系统失衡^[23-25]。一般认为,厌氧发酵系统中适宜的丙酸浓度应不高于 $1500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($2.3 \text{ g HPr} \cdot \text{L}^{-1} \text{ COD}$)^[25]。当发酵体系中的丙酸浓度积累至 $>2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上,且影响正常产甲烷代谢时,将导致丙酸型酸化^[26-27]。OSS实验组中,发酵4~8 d期间,除5% TS实验组,其余实验组的丙酸浓度均大于 $1500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其中9% TS实验组丙酸浓度高于 $2254.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;在持续56 d的发酵过程中,SIS实验组丙酸浓度始终维持较低的浓度,即使在负荷提升阶段丙酸浓度均低于 $498.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此,一步启动高浓度的秸秆厌氧发酵过程具有较高的丙酸型酸化风险,而逐级提升启动模式可以建立高效的丙酸水解体系,加速VFAs转化,维持较稳定的乙酸型发酵过程,预防厌氧消化系统酸化。

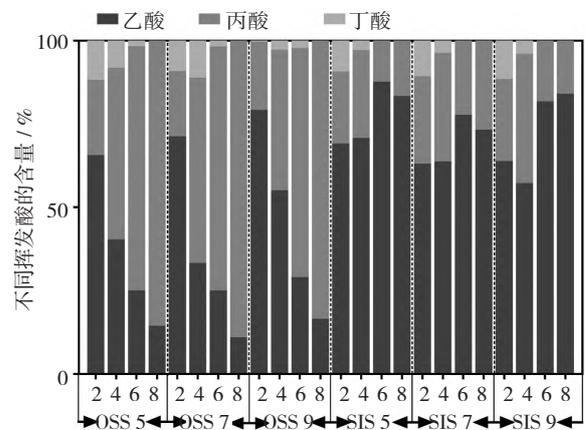


图5 水解阶段(第2~8天)乙酸、丙酸和丁酸产量的比例

2.2 启动方式对产甲烷代谢的影响

由图6和图7可知,所有实验组启动第2天即开始产甲烷,甲烷含量持续增加。发酵第4天,OSS实验组甲烷含量可达34.4%~44.0%,SIS实验组为31.7%~40.7%;OSS实验组和SIS实验组分别在发酵第18天和第16天进入产甲烷代谢稳定期,甲烷含量分别为62.8%~63.9%和58.6%~61.3%。SIS实验组于发酵第19天提升负荷后进行了顶空气体置换,但2天后(第22天)甲烷含量即达到19.9%~37.7%,5%、7%和9% TS组分别于16(第

36天)、10(第30天)和12天后(第32天)进入产甲烷代谢稳定期。在持续56天的厌氧发酵过程中,即使在VFAs迅速积累的水解阶段和丙酸浓度 $>2000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,所有实验组均可正常进行产甲烷代谢,未发生酸抑制现象,这可能与所使用的接种物中含有较高丰度的丙酸互营氧化细菌和产甲烷菌有关^[28]。

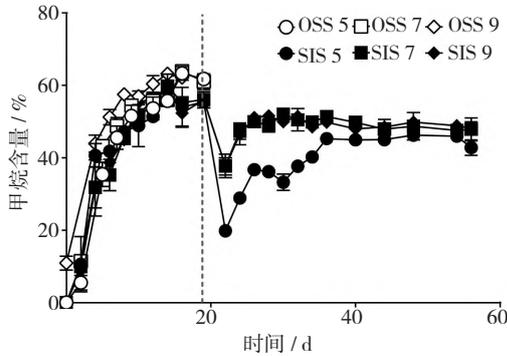


图6 秸秆厌氧发酵过程中甲烷含量

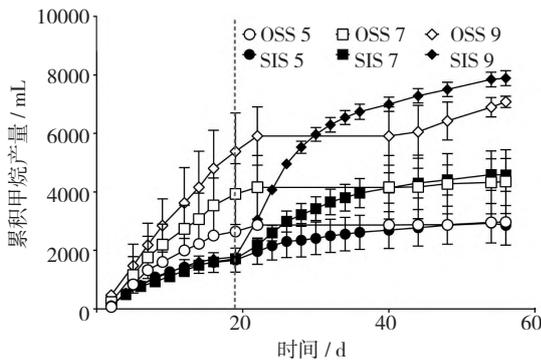
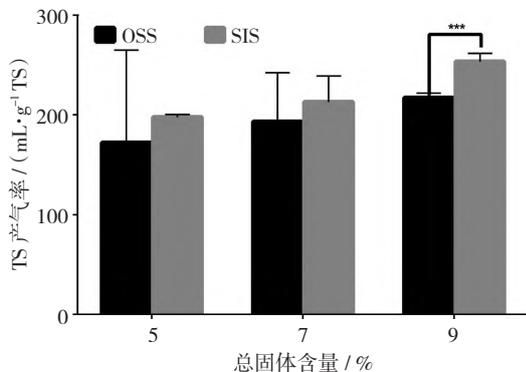


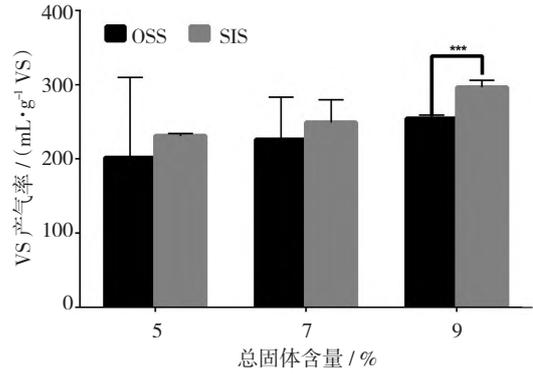
图7 秸秆厌氧发酵过程中累积产气量

发酵结束时,SIS 5、SIS 7和SIS 9实验组的TS产气率分别为 197.7 ± 2.7 、 213.0 ± 26.0 、 $253.6 \pm 8.3\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\text{TS}$ (见图8),VS产气率分别为 231.2 ± 3.2 、 249.2 ± 30.4 、 $296.6 \pm 9.7\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\text{VS}$ (见图9),



注: **,差异显著 $p < 0.05$; ***,差异极显著 $p < 0.01$

图8 不同启动模式下的总固体(TS)原料产气率



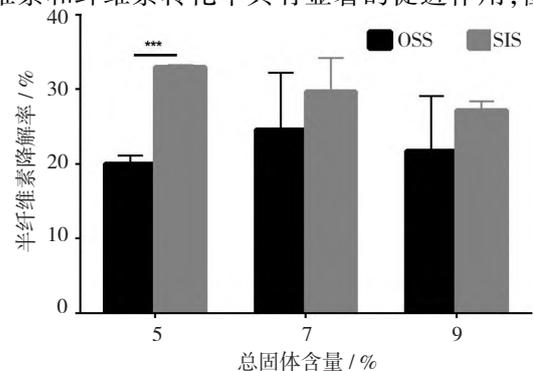
注: **,差异显著 $p < 0.05$; ***,差异极显著 $p < 0.01$

图9 不同启动模式下挥发性固体(VS)产气率

较OSS实验组分别提高14.8%、10.1%和18.0%,但仅9%TS实验组的原料产气率在两种启动模式下具有极显著差异($p < 0.01$)。

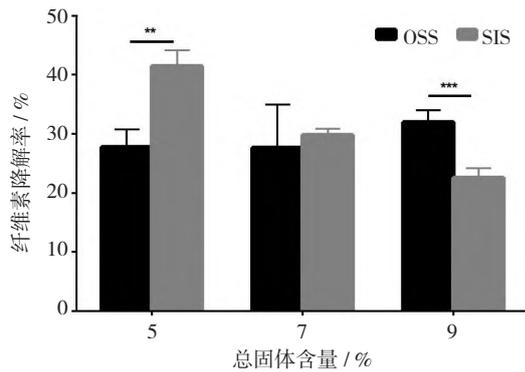
2.3 秸秆纤维素降解率

启动模式对秸秆中半纤维素、纤维素和木质素的降解具有明显的影响(见图10~图12)。当TS为5%时,SIS实验组的半纤维素与纤维素降解率分别为 $(32.9 \pm 0.3)\%$ 和 $(41.5 \pm 2.7)\%$,显著高于OSS实验组,较OSS实验组分别提高65.1%和49.3%;但木质素降解率为 $(24.4 \pm 0.3)\%$,低于OSS实验组7.2%。TS为7%时,SIS实验组的半纤维素与纤维素降解率分别为 $(28.0 \pm 4.3)\%$ 和 $(29.8 \pm 1.0)\%$,较OSS实验组分别提高14.0%和8.0%;木质素降解率为 $(18.7 \pm 3.3)\%$,低于OSS实验组27.5%。TS为9%时,SIS实验组的半纤维素与木质素降解率分别为 $(27.2 \pm 1.2)\%$ 和 $(18.6 \pm 8.6)\%$,较OSS实验组分别提高4.8%和31.8%;纤维素降解率为 $(22.5 \pm 1.6)\%$,低于OSS实验组31.1%。因此,SIS对低浓度秸秆发酵过程中的半纤维素和纤维素转化率具有显著的促进作用,但不



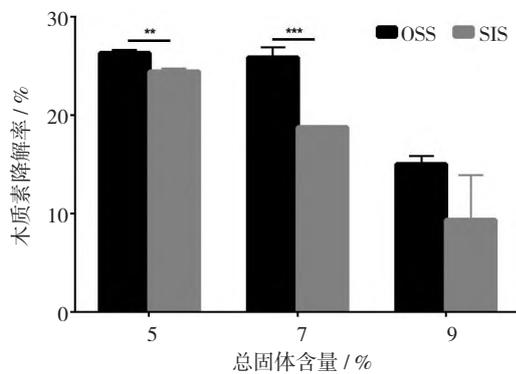
注: **,差异显著 $p < 0.05$; ***,差异极显著 $p < 0.01$

图10 不同启动模式下的秸秆半纤维素降解率



注: **, 差异显著 $p < 0.05$; ***, 差异极显著 $p < 0.01$

图 11 不同启动模式下纤维素降解率



注: **, 差异显著 $p < 0.05$; ***, 差异极显著 $p < 0.01$

图 12 不同启动模式下木质素降解率

利于木质素降解;高浓度秸秆发酵过程中,SIS可在一定程度上提高半纤维素降解率,但OSS更有利于纤维素降解。

2.4 启动模式对微生物群落结构组成的影响

发酵稳定期,5%和9%TS时,4种发酵条件下共注释到1102个OTU,其中OSS和SIS实验组分别注释到930和766个OTU,各组的特有OTU数量分别为122个和45个(见图13),占每组OTU总量的13.1%和5.9%,暗示着微生物种群在逐级提升启动模式下趋向于富集,而在一步启动模式下趋向于分化。此外,OSS5和OSS9实验组、SIS5和SIS9实验组分别注释到695、815、564和652个OTU(图14和图15),这说明OTU多样性随着秸秆发酵浓度的升高而增加。其中,各实验组共有OTU339个,占OTU总量的30.8%;OSS5、SIS5、OSS9和SIS9实验组注释到的特有OTU数量分别为59、32、155和95个,分别占各组OTU总数的8.5%、5.7%、19.0%和14.6%,因此,发酵负荷可能是推动微生物种群分化的重要影响因素,高物料浓度可驱动形

成更独特的微生物种群结构。

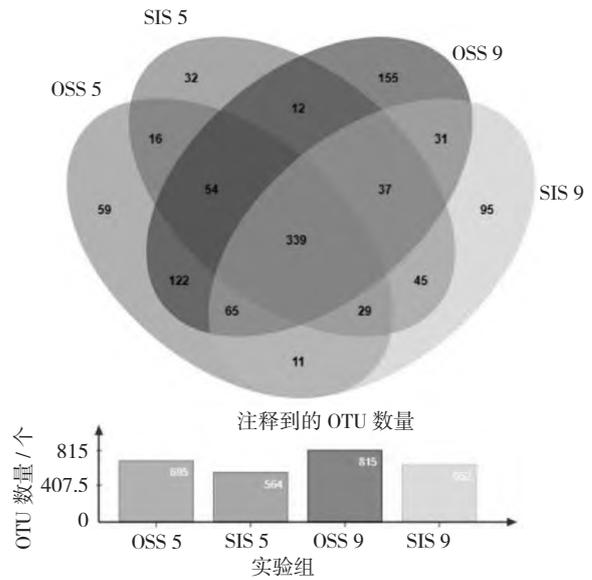


图 13 发酵稳定期微生物 OTU 组成 Venn 图

2.5 不同启动模式下微生物群落结构的差异

当发酵原料TS为5%和9%时,OSS和SIS两种启动方式分别对秸秆纤维素水解和原料产气率有显著影响。为了揭示启动方式对高浓度秸秆厌氧消化过程中微生物的影响,探究维持发酵稳定性、促进产甲烷代谢的关键微生物,采用高通量测序技术,对不同启动模式下5%和9%TS实验组在稳定产气阶段的微生物群落结构进行了分析。

细菌属水平分析结果显示,一步启动法和逐步提升启动法对细菌群落结构组成具有明显的影响(见图14)。OSS实验组的优势物种(相对丰度 $\geq 5\%$)为*Sphaerochaeta*(5%和9%TS实验组分别为16.8%和18.6%),*Proteiniphilum*(3.6%和7.8%)^[29]和*OPB54*(3.0%和5.6%)等。*Sphaerochaeta*广泛分布在白蚁肠道、以纤维素为原料的厌氧发酵系统、油藏环境^[30],已分离的纯培养物具有降解纤维二糖和核糖等纤维素、半纤维素水解产物,并产生乙酸、丙酸和丁酸的能力^[31-34]。*Proteiniphilum*是中温厌氧反应器中常见的一类水解性细菌,具有多种多聚糖水解酶活性(如 β -葡聚糖、淀粉、木聚糖、阿拉伯半乳糖、阿拉伯木聚糖、CM-纤维素和PASC),可降解纤维二糖、葡萄糖、等半纤维素和纤维素水解产物,以及蛋白胨、酵母粉和多种多肽,产生乙酸和丙酸^[35-36]。在间歇性木质纤维素微耗氧发酵过程中发现,*Proteiniphilum*可以通过交替进行好氧呼吸和厌氧发酵直接降解木质纤维素产生二氧化碳、甲酸

和乙酸^[37]。基于多组学分析推测,在厌氧发酵微生物组中,*Proteiniphilum* 和 *Petrimonas* 可能是厌氧发酵过程不稳定的代表性指标^[38-39]。OPB54 是芽孢杆菌门 (*Bacillota*, 旧名厚壁菌门, *Firmicutes*) 的一个未培养类群,在纤维素富集物、秸秆、牛粪和蔬菜废弃物的高温干发酵过程中为优势物种,也是含有高浓度乙酸的厌氧反应器中丰度最高的互营乙酸氧化菌^[40]。该类群中最近分离培养的 *Hydrogenispora* 可以降解几丁质,以及木糖、葡萄糖等多种单糖和多糖,产生乙酸、乙醇、氢气等,尚未证实具有乙酸互营氧化能力^[41-42]。SIS 实验组的优势物种为 vadin-BC27 wastewater-sludge group (5% 和 9% TS 实验组分别为 15.7% 和 25.2%), uncultured Synergistaceae (9.6% 和 12.3%) 和 OPB54 (6.0% 和 1.6%) 等。研究发现, vadinBC27 wastewater-sludge group 和 uncultured Synergistaceae 是牛粪干发酵、人工废水厌氧发酵产酸过程中的优势物种^[43-44]。其中, vadin-BC27 wastewater-sludge group 属于拟杆菌门 (*Bacteroidetes*),但功能尚不清楚。目前已分离的拟杆菌门成员多数具有降解纤维素、木聚糖、几丁质等多聚糖的能力。Synergistaceae 成员和部分 uncultured Synergistaceae 具有氨基酸、乙酸互营氧化代谢能力,有利于促进 VFAs 等厌氧发酵的中间代谢产物降解产甲烷^[45-46]。在 OSS 实验组中,优势物种的相对丰度随着 TS 的增加而提高,暗示其在纤维素厌氧降解过程中具有重要的作用,可能与 VFAs 积累有关。而 SIS 实验组中 *Sphaerochaeta* (5% 和 9% TS 实验组分别为 3.7% 和 1.6%) 和 *Proteiniphilum* (0.5% 和 0.4%) 的相对丰度显著低于 OSS 实验组,且随着 TS 浓度的增加而降低,这可能是其半纤维素、纤维素降解率低于 OSS 实验组的原因。同时, SIS 实验组中高丰度的 Synergistaceae 可能与发酵过程中维持较低的 VFAs 有关,而 OSS 实验组中,该类群仅占 1.6% ~ 3.8%。但是,所有实验组中均具有多种互营 VFAs 氧化菌,包括互营短链脂肪酸/长链脂肪酸 (C4 及以上) 氧化菌 *Syntrophomonas*^[47-48]、互营丙酸氧化菌 *Pelotomaculum*^[49-50], 以及乙酸氧化菌 *Mesotoga*^[51], 在 OSS 和 SIS 实验组的相对丰度分别为 1.8% ~ 2.0% 和 4.6% ~ 5.3%, 这可能是发酵过程中参与乙酸、丙酸和丁酸降解的关键细菌类群。

不同启动模式下,氢营养型产甲烷菌 *Methanoculleus* 是秸秆厌氧发酵过程中的优势古菌 (见图 15), 同时还包括未培养古菌 Miscellaneous Crenar-

chaotic Group (MCG)。MCG 主要发现于海洋沉积物、淡水环境,包括具有氨氧化和硫代谢等功能的多个亚群^[52], 在不同启动模式下, MCG 的相对丰度无显著差异。此外, OSS 实验组中氢营养型产甲烷菌 *Methanoculleus* (5% 和 9% TS 实验组分别为 70.1% 和 75.6%) 的相对丰度高于 SIS 实验组 (55.6% 和 60.1%)。然而, SIS 实验组的氢营养型产甲烷菌 *Methanobacterium* (13.8% 和 10.4%) 显著高于 OSS 实验组 (2.2% 和 3.0%)。在较低的氢分压下, *Methanobacterium* 对氢气具有较高的亲和力,在短链脂肪酸互营氧化过程中参与种间电子传递^[53]。由此推测, SIS 实验组中较高丰度的 *Methanobacterium* 可能与互营氧化细菌 Synergistaceae、*Syntrophomonas* 和 *Pelotomaculum* 之间存在互营代谢关系,从而维持较低浓度的 VFAs。同时,与 5% TS 实验组相比, 9% 实验组中具有较高丰度的 *Methanosarcina*, 且 SIS 实

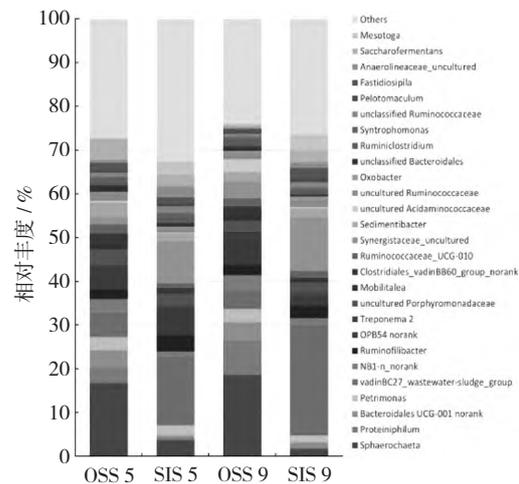


图 14 不同启动模式下细菌的群落结构和相对丰度

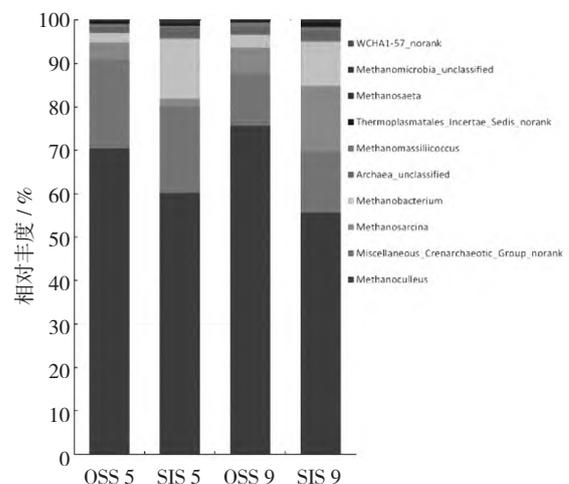


图 15 不同启动模式下古菌的群落结构和相对丰度

验组的相对丰度(15.1%)显著高于 OSS 实验组(5.9%),有利于乙酸和氢气/二氧化碳的消耗,维持发酵的稳定性。

3 结论

启动模式对水稻秸秆中温厌氧发酵性能具有显著的影响。一步启动模式有利于乙酸的快速降解,趋向于形成丙酸型发酵。逐级提升启动模式有利于促进丙酸和乙酸等 VFAs 的转化,避免 VFAs 积累,建立持续的乙酸型发酵,维持发酵系统的稳定性;同时,在较高的物料浓度下,可显著提升沼气产率。此外,逐级提升启动模式可显著提高较低浓度秸秆中的半纤维素、纤维素降解率,改善高浓度秸秆的半纤维素降解率,但不利于木质素的降解。

启动模式差异推动秸秆厌氧消化系统形成了不同的微生物群落结构。一步启动发酵系统中富集了 *Sphaerochaeta*, *Proteiniphilum* 和 OPB54 等多聚糖、糖类水解细菌,有利于秸秆纤维素快速水解产酸;逐级提升启动模式富集了 uncultured Synergistaceae 等多种互营氧化细菌。氢营养型产甲烷菌 *Methanoculleus* 是秸秆厌氧消化系统中的绝对优势古菌,逐级提升启动模式下富集的氢营养型产甲烷菌 *Methanobacterium* 可能与 uncultured Synergistaceae、*Syntrophomonas* 和 *Pelotomaculum* 等多种互营氧化细菌协同作用,促进氨基酸和 VFAs 等水解产甲烷,从而维持发酵系统的稳定性,提高沼气产率。

参考文献:

- [1] Stams A J M, Plugge C M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(8): 568 - 577.
- [2] Guangyin Chen Z C, Xiaomei Ye. Feasibility of anaerobic batch co-digestion of peat and rice straw for biogas production[J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2011, 20(10A): 2776 - 2784, Doi: 10. 1080/01490451. 2010. 517696.
- [3] 李玉春,陈广银,常志州,等. 碳氮比对稻秸厌氧发酵过程的影响[J]. *中国沼气*, 2012(04): 25 - 29.
- [4] 段娜,林聪,田海林,等. 添加尿素和无机盐土对秸秆厌氧消化的影响[J]. *农业工程学报*, 2015(z1): 254 - 260.
- [5] Zhang Y H P, Lynd L R. Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(20): 7321 - 7325.
- [6] Yu Q, Liu R, Li K, et al. A review of crop straw pretreatment methods for biogas production by anaerobic digestion in China[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2019, 107: 51 - 58.
- [7] 解恒参,赵晓倩,等. 农作物秸秆综合利用的研究进展综述[J]. *环境科学与管理*, 2015(01): 86 - 90.
- [8] Cai Y, Zheng Z, Schäfer F, et al. A review about pretreatment of lignocellulosic biomass in anaerobic digestion: Achievement and challenge in Germany and China[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 299: 126885.
- [9] Mothe S, Polisetty V R. Review on anaerobic digestion of rice straw for biogas production[J]. *Environmental science and pollution research international*, 2021, 28(19): 24455 - 24469.
- [10] Yu Z, Schanbacher F L. Production of Methane Biogas as Fuel Through Anaerobic Digestion[J]. In: Singh OV, Harvey SP, editors. *Sustainable Biotechnology*, Netherlands: Springer; 2010, P: 105 - 128.
- [11] Brown D, Shi J, Li Y. Comparison of solid-state to liquid anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks for biogas production[J]. *Bioresource technology*, 2012, 124: 379 - 386.
- [12] Xu Z, Yuan H, Li X. Anaerobic bioconversion efficiency of rice straw in continuously stirred tank reactor systems applying longer hydraulic retention time and higher load: One-stage vs. Two-stage[J]. *Bioresource technology*, 2021, 321: 124206.
- [13] Li L, Li D, Sun Y, et al. Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in South China[J]. *International journal of hydrogen energy*, 2010(13): 35.
- [14] Croce S, Wei Q, D'imporzano G, et al. Anaerobic digestion of straw and corn stover: The effect of biological process optimization and pre-treatment on total bio-methane yield and energy performance[J]. *Biotechnology advances*, 2016, 34(8): 1289 - 1304.
- [15] 马磊,王德汉,谢锡龙,等. 接种量对餐厨垃圾高温厌氧消化的影响[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(12): 5.
- [16] 李慧莉,刘鹏程,陈志强,等. 沼液回流对秸秆与污泥混合中温厌氧消化的影响[J]. *环境工程学报*, 2018, 12(10): 7.
- [17] 裴梦富,强虹,杨祎楠,等. 利用逐级提高进料浓度的方法启动完全混合反应器处理鸡粪[J]. *环境工程学报*, 2018, 12(6): 8.

- [18] Apha. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed [R]. American Public Health Association, 1998.
- [19] Ma S, Huang Y, Wang C, et al. *Defluviitalea raffinosedens* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, saccharolytic bacterium isolated from an anaerobic batch digester treating animal manure and rice straw [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2017, 67(5): 1607 – 1612.
- [20] Zhang X, Tu B, Dai L R, et al. *Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new Hungateclostridiaceae fam. nov [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2018, 68(10): 3197 – 3211.
- [21] 俞凌云, 赵欢欢, 张新申. 水样中氨氮测定方法研究 [J]. 西部皮革, 2010(05): 27 – 33.
- [22] Van Soest P U, Wine R H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents [J]. J Assoc Off Anal Chem, 1967, 50(1): 50 – 55.
- [23] Jianzheng L I, Ban Q, Zhang L, et al. Syntrophic Propionate Degradation in Anaerobic Digestion: A Review [J]. International Journal of Agriculture Biology, 2012, 14(5): 843 – 850.
- [24] Zhao Z, Zhang Y, Holmes D E, et al. Potential enhancement of direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate with biochar in up-flow anaerobic sludge blanket reactors [J]. Bioresource technology, 2016, 209: 148 – 156.
- [25] Ma J, Carballa M, Van De Caveye P, et al. Enhanced propionic acid degradation (EPAD) system: proof of principle and feasibility [J]. Water research, 2009, 43(13): 3239 – 3248.
- [26] Ahring B K, Sandberg M, Angelidaki I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43(3): 559 – 565.
- [27] Chen X, Yuan H, Zou D, et al. Improving biomethane yield by controlling fermentation type of acidogenic phase in two-phase anaerobic co-digestion of food waste and rice straw [J]. Chemical Engineering Journal, 2015, 273: 254 – 260.
- [28] 李强, 尹小波, 马诗淳, 等. 一种沼气发酵促进菌剂的制备方法; ZL 201711139304.6 [P]. 2018年2月9日.
- [29] Chen S, Dong X. *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2005, 55(Pt6): 2257 – 2261.
- [30] Ritalahti K M, Justicia Leon S D, Cusick K D, et al. *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *Sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2012, 62(Pt1): 210 – 216.
- [31] Bidzhieva S K, Sokolova D S, Grouzdev D S, et al. *Sphaerochaeta halotolerans* sp. nov., a novel spherical halotolerant spirochete from a Russian heavy oil reservoir, emended description of the genus *Sphaerochaeta*, reclassification of *Sphaerochaeta coccooides* to a new genus *Parasphaerochaeta* gen. nov. as *Parasphaerochaeta coccooides* comb. nov. and proposal of Sphaerochaetaceae fam. nov [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2020, 70(8): 4748 – 4759.
- [32] Abt B, Han C, Scheuner C, et al. Complete genome sequence of the termite hindgut bacterium *Spirochaeta coccooides* type strain (SPN1(T)), reclassification in the genus *Sphaerochaeta* as *Sphaerochaeta coccooides* comb. nov. and emendations of the family Spirochaetaceae and the genus *Sphaerochaeta* [J]. Standards in genomic sciences, 2012, 6(2): 194 – 209.
- [33] Zhang L, Loh K C, Zhang J. Food waste enhanced anaerobic digestion of biologically pretreated yard waste: Analysis of cellulose crystallinity and microbial communities [J]. Waste management, 2018, 79: 109 – 119.
- [34] Grouzdev D S, Bidzhieva S K, Sokolova D S, et al. Draft Genome Sequence of a Fermenting Bacterium, "*Sphaerochaeta halotolerans*" 4-11(T), from a Low-Temperature Petroleum Reservoir in Russia [J]. Microbiol Resour Anounc, 2018, 7(21): e01345 – 18.
- [35] Hahnke S, Langer T, Koeck D E, et al. Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov., isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum* [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2016, 66(3): 1466 – 1475.
- [36] Tomazetto G, Hahnke S, Wibberg D, et al. *Proteiniphilum saccharofermentans* str. M3/6(T) isolated from a laboratory biogas reactor is versatile in polysaccharide and oligopeptide utilization as deduced from genome-based metabolic reconstructions [J]. Biotechnology report, 2018, 18:

- e00254.
- [37] Wu Z, Nguyen D, Lam T Y C, et al. Synergistic association between cytochrome bd-encoded Proteiniphilum and reactive oxygen species (ROS)-scavenging methanogens in microaerobic-anaerobic digestion of lignocellulosic biomass[J]. *Water research*, 2021, 190:116721.
- [38] Maus I, Tubbesing T. The Role of *Petrimonas mucosa* ING2-E5A(T) in Mesophilic Biogas Reactor Systems as Deduced from Multiomics Analyses[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(12): 2024.
- [39] Maus I, Klocke M, Derenkó J, et al. Impact of process temperature and organic loading rate on cellulolytic / hydrolytic biofilm microbiomes during biomethanation of ryegrass silage revealed by genome-centered metagenomics and metatranscriptomics [J]. *Environ Microbiome*, 2020, 15(1):7.
- [40] Hao L, Lü F, Mazéas L, et al. Stable isotope probing of acetate fed anaerobic batch incubations shows a partial resistance of acetoclastic methanogenesis catalyzed by *Methanosarcina* to sudden increase of ammonia level[J]. *Water research*, 2015, 69:90–99.
- [41] Ungkulpasvich U, Uke A, Baramée S, et al. Draft genome sequence data of the anaerobic, thermophilic, chitinolytic bacterium strain UUS1-1 belonging to genus *Hydrogenispora* of the uncultured taxonomic OPB54 cluster[J]. *Data in brief*, 2020, 33:106528.
- [42] Liu Y, Qiao J T, Yuan X Z, et al. *Hydrogenispora ethanolica* gen. nov., sp. nov., an anaerobic carbohydrate-fermenting bacterium from anaerobic sludge[J]. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2014, 64(Pt5):1756–1762.
- [43] Chen R, Li Z, Feng J, et al. Effects of digestate recirculation ratios on biogas production and methane yield of continuous dry anaerobic digestion[J]. *Bioresource technology*, 2020, 316:123963.
- [44] Wang R, Lv N, Li C, et al. Novel strategy for enhancing acetic and formic acids generation in acidogenesis of anaerobic digestion via targeted adjusting environmental niches[J]. *Water research*, 2021, 193:116896.
- [45] Yi Y, Wang H, Chen Y, et al. Identification of Novel Butyrate-and Acetate-Oxidizing Bacteria in Butyrate-Fed Mesophilic Anaerobic Chemostats by DNA-Based Stable Isotope Probing[J]. *Microb Ecol*, 2020, 79(2): 285–298.
- [46] Zhu R, Zhang Y, Zou H, et al. Understanding the mechanisms behind enhanced anaerobic digestion of corn straw by humic acids [J]. *Bioresource technology*, 2022, 359:127454.
- [47] Wu C, Dong X, Liu X. *Syntrophomonas wolfei* subsp. *methylbutyratica* subsp. nov., and assignment of *Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida* to *Syntrophomonas saponavida* sp. nov. comb. nov [J]. *Systematic and applied microbiology*, 2007, 30(5):376–380.
- [48] Wu C, Liu X, Dong X. *Syntrophomonas cellicola* sp. nov., a spore-forming syntrophic bacterium isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar, and assignment of *Syntrophospora bryantii* to *Syntrophomonas bryantii* comb. nov [J]. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2006, 56(Pt10): 2331–2335.
- [49] Qiu Y L, Sekiguchi Y, Hanada S, et al. *Pelotomaculum terephthalicum* sp. nov. and *Pelotomaculum isophthalicum* sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens [J]. *Archives of microbiology*, 2006, 185(3):172–182.
- [50] Imachi H, Sakai S, Ohashi A, et al. *Pelotomaculum propionicum* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium [J]. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2007, 57(Pt7):1487–1492.
- [51] Meng X, Cao Q, Sun Y, et al. 16S rRNA genes- and metagenome-based confirmation of syntrophic butyrate-oxidizing methanogenesis enriched in high butyrate loading [J]. *Bioresource technology*, 2022, 345:126483.
- [52] Kubo K, Lloyd K G, J F B, et al. Archaea of the *Miscellaneous* Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments [J]. *The ISME journal*, 2012, 6(10):1949–1965.
- [53] Zheng S, Liu F. *Methanobacterium* Capable of Direct Interspecies Electron Transfer [J]. *Environmental Science Technology*, 2020, 54(23):15347–15354.