

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.09.035

秸秆湿贮存过程添加剂协同调控对甲烷产量的影响

崔宪¹ 郭建斌¹ 徐艳¹ 温啸宇¹ 庞昌乐¹ 董仁杰^{1,2}

(1. 中国农业大学工学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学烟台研究院, 烟台 264670)

摘要:以干黄玉米秸秆为原料,研究可溶性糖(葡萄糖)及其与同型乳酸菌、异型乳酸菌、乙酸协同添加对原料湿贮存过程中品质及甲烷产量的影响。结果表明:单一葡萄糖添加组,贮存30 d,干物质损失率为4.7%,以乳杆菌属、片球菌属、肠球菌多种乳酸菌主导,乳酸与乙酸含量(干基质量比)分别为36 g/kg和5 g/kg,秸秆产甲烷潜力比空白组提高6.8%;葡萄糖植物乳杆菌协同(同型发酵)组,贮存30 d,干物质损失率为4.6%,乳酸含量升高至62 g/kg;葡萄糖短乳杆菌协同(异型发酵)组,贮存30 d,干物质损失率为5.5%,乳酸与乙酸含量分别达到44 g/kg和12 g/kg;两类乳酸菌的协同添加均未对产气潜力产生进一步促进作用;葡萄糖乙酸协同组,贮存30 d,干物质损失率为3.6%,乳酸与乙酸含量分别升高至75 g/kg和20 g/kg,异型乳酸发酵魏斯氏菌属丰度升高至16.87%,有效抑制肠杆菌属(腐败菌)生长,秸秆产甲烷潜力提高8.7%。综合分析本试验结果,当原料可溶性糖含量不足时,外源糖的补充是保证原料高效贮存及产气的关键,协同乙酸添加可强化以魏斯氏菌属为主导的异型发酵过程抑制腐败菌生长,强化贮存过程的稳定性。

关键词:玉米秸秆;湿贮存;添加剂;协同调控;甲烷

中图分类号:X705;S216.4 文献标识码:A 文章编号:1000-1298(2018)09-0302-09

Effect of Wet-storage Additives on Fermentation Performance and Biomethane Potential of Corn Stover

CUI Xian¹ GUO Jianbin¹ XU Yan¹ WEN Xiaoyu¹ PANG Changle¹ DONG Renjie^{1,2}

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Yantai Research Institute, China Agricultural University, Yantai 264670, China)

Abstract: Corn stover was one of important agricultural residues. Due to Chinese corn farming system, harvesting method, relativity lower mechanism and so on, the corn material for biogas industries was mostly dry-yellow corn stover. In order to improve the efficiency of dry-yellow corn stover and attain better material for wet-storage, the effect of different wet-storage additives on fermentation performance, bacterial community and biomethane potential (BMP) was focused on. Dry-yellow corn stover was stored following five additives treatments for 30 d, including Con group (without additives), Glu group (glucose addition of 3%), LP group (glucose addition of 3% and *Lactobacillus plantarum* addition of 1×10^6 CFU/g), LB group (glucose addition of 3% and *Lactobacillus brevis* addition of 1×10^6 CFU/g), AA group (glucose addition of 3% and acetic acid addition of 0.4%). In general, glucose addition 3% prior to storage attained well-preserve; *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus brevis* addition 1×10^6 CFU/g with glucose addition 3% prior to storage improved the speed of pH value decreasing in early period and water soluble carbohydrate consuming, and significantly higher ($P < 0.05$) lactic acid and acetic acid was produced, respectively. The result of bacterial community from raw material and five treatments showed the most epiphytic bacteria (at the phylum level) was Proteobacteria in raw material, after wet-storage Firmicutes became the dominant flora and Proteobacteria was reduced significantly ($P < 0.05$). The community of lactic acid bacteria showed that *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Pediococcus*

收稿日期: 2018-02-02 修回日期: 2018-03-10
基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(51608523)、“十二五”国家科技支撑计划项目(2015BAD21B04)和北京市科技计划项目(D161100006016001)
作者简介: 崔宪(1989—),男,博士生,主要从事秸秆湿贮存技术及厌氧发酵研究,E-mail: cuixiancau@163.com
通信作者: 庞昌乐(1963—),男,教授,博士生导师,主要从事废弃物处理与资源化利用研究,E-mail: pangcl@cau.edu.cn

were dominant flora when adding glucose alone, and relative abundance of *Lactobacillus* was increased to 41.07% when adding *Lactobacillus plantarum* with glucose addition. *Weissella* became the dominant flora when acetic acid was added. The result of batch test demonstrated that the biomethane potential of dry-yellow corn stover was improved by wet-storage with glucose additive. Modified Gompertz models well simulated the anaerobic digestion process of the wet-storage dry-yellow corn stover supplemented with additives. Considering the fermentation characteristics, biomethane potential, wet-storage the dry-yellow corn stover with glucose addition and acetic acid addition could achieve the well quality and high-value substance and increase the methane potential yield.

Key words: corn stover; wet-storage; addition; coordinate regulation; methane

0 引言

玉米秸秆是我国主要农业废弃物之一,据统计,2015 年其产量达 2.65 亿 t^[1]。作为一种可再生生物质资源,秸秆可作为多种生物质能源(如沼气、氢气及生物乙醇等)生产的原料^[2]。由于秸秆的生产具有季节性,有效贮存是保证规模化沼气工程全年稳定运行的前提。湿贮存技术较干贮存具有干物质损失低和可降低火灾危害等优点,在欧洲被广泛应用于沼气工程的原料贮存环节^[3],经过湿贮存的玉米秸秆产甲烷潜力可提高 3%~15%^[4-5]。然而在我国秸秆优先用于肥料化、饲料化^[6],用于沼气工程的秸秆风干程度不一,理化性质迥异,尤其当原料可溶性糖不足时,会严重影响玉米秸秆的贮存品质^[7]。研究表明原料至少含 3% 的可溶性糖才能获得优质贮存料^[7],所以调控干黄秸秆贮存过程是发展秸秆沼气工程的重要技术环节。目前,国内外主要通过补充添加剂来改善秸秆贮存品质,如营养强化剂(葡萄糖、蔗

糖)^[8-9]、发酵促进剂(乳酸菌、纤维素酶)^[10-11]和发酵抑制剂(甲酸、乙酸)^[12-13]。研究内容主要集中在青贮饲料生产领域,而关于干黄玉米秸秆沼气工程贮存领域研究较少。

本文以干黄玉米秸秆为原料,通过添加葡萄糖及其与同型乳酸菌(植物乳杆菌)、异型乳酸菌(短乳杆菌)和乙酸协同调控贮存过程,系统分析不同添加剂对原料贮存品质、细菌多样性以及产甲烷潜力的影响,为沼气工程秸秆原料的高效贮存提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验原料与菌剂

玉米秸秆于 2016 年 10 月取自河南省巩义市,品种为丰玉 2 号,为鲜食玉米品种。收获后玉米秸秆含水率较高,呈青色,在自然条件下风干 20 d 左右后呈干黄色,粉碎至 1~3 cm 的长度后运送至实验室进行后续试验。试验所用的干黄玉米秸秆理化性质见表 1。

表 1 干黄玉米秸秆与接种污泥的化学组成性质
Tab.1 Chemical composition of corn stover and inoculated sludge

原料	pH 值	总固体 质量分数/%	挥发性固体 质量分数/%	可溶性糖占总 固体质量分数/%	半纤维素占总 固体质量分数/%	纤维素占总固体 质量分数/%	木质素占总固体 质量分数/%
干黄玉米秸秆	7.5	90.1	66.8	1.6	26.3	30.2	3.9
接种污泥	7.3	5.8	3.2				

原料产气潜力测试的接种污泥取自北京城市污水处理厂,过 10 目筛除去沙粒,置于 37℃ 的恒温水浴锅中,保持污泥活性,接种污泥的性质见表 1。

同型乳酸菌(植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*))与异型乳酸菌(短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*))均购自于日本生物资源中心(NBRC),菌株编号分别为 15891 与 107147。MRS 培养基(青岛海博生物公司)用于菌种活化,MRS 琼脂培养基(青岛海博生物公司)用于活菌计数。

1.2 湿贮存原料调制与试验设计

将添加剂溶于一定量水中,均匀喷洒至准确称

取的 50 g 干黄玉米秸秆上,调整体系含水率至 65%。将调制好的各组秸秆分装至聚乙烯袋中(尺寸:250 mm×300 mm),用真空包装机抽真空并热封处理后,放置于人工气候箱(温度 28℃,无光照,相对湿度 65%)湿贮存 30 d,分别选取第 0、3、7、15、30 天时动态分析化学组分与发酵品质。

共设计 5 个试验组进行湿贮存:空白组(Con 组),无添加剂的干黄玉米秸秆;单一葡萄糖组(Glu 组),葡萄糖添加量为原料(含水率 65%)的 3%;葡萄糖植物乳杆菌协同组(LP 组),葡萄糖添加量为原料(含水率 65%)的 3%,植物乳杆菌接种量为原

料干基的 1×10^6 CFU/g; 葡萄糖短乳杆菌协同组 (LB 组), 葡萄糖添加量为原料 (含水率 65%) 的 3%, 短乳杆菌接种量为 1×10^6 CFU/g (以原料干基计); 葡萄糖乙酸协同组 (AA 组), 葡萄糖和乙酸添加量分别为原料 (含水率 65%) 的 3% 和 0.4%。

1.3 细菌多样性研究

在无菌环境下, 准备空白组贮存 0 d (Con 0) 与 30 d (Con 30) 样品以及其余 4 组湿贮存 30 d 样品 (Glu 30、LP 30、LB 30、AA 30) 各 10 g, 与 90 mL 无菌生理盐水混合, 37℃ 恒温振荡 2 h 得到微生物菌悬液, 用孔径 0.22 μm 无菌滤膜过滤得到微生物菌体。用灭菌手术剪剪碎, 将整张带有菌体的滤膜置于 2 mL 无菌离心管中, 使用 E. Z. N. A 土壤 DNA 提取试剂盒进行微生物 DNA 提取, 检测合格后送至上海美吉生物科技有限公司进行 Illumina Miseq 测序。

PCR 扩增选择扩增区域为 16S rDNA V4 - V5, 所用引物为 338F (5-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3) 和 806R (5-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3)。根据 Illumina MiSeq 测序平台的标准流程进行双端 (2×300 bp) 测序, 得到 2×300 bp 的数据。数据预处理后进行生物信息学分析、多样性分析和物种组成分析。

1.4 厌氧消化试验设计

厌氧消化试验分别选取 5 个试验组湿贮存 30 d 的样品, 共计 5 组进行试验。设计仅接种污泥处理组, 用于计算污泥产气量和秸秆产气净产量。

该批次厌氧发酵试验于带有一次性铝盖的 120 mL 玻璃发酵瓶中进行。污泥与玉米秸秆的添加量 (基于挥发性固体质量) 之比为 2:1, 将污泥与秸秆加入发酵瓶中, 充分混匀后, 充入氮气, 随后立即盖好硅胶塞, 标号后置于 37℃ 恒温水浴锅中。试验期间使用玻璃注射器测量日均产气量, 并分析计算累积产气量。产气潜能用修正的 Gompertz 模型进行拟合^[5], 公式为

$$p = p_0 \exp \left(- \exp \left(\frac{R_{\max} e}{p_0} (\lambda - t) + 1 \right) \right)$$

式中 p ——扣除空白的 t 时刻的单位挥发性固体累积气体产量, mL/g

p_0 ——单位挥发性固体最大产能潜能, mL/g

$R_{\max}$ ——单位挥发性固体最大产甲烷速率, mL/(g·d)

λ ——迟滞期, d

t ——试验持续时间, d

1.5 分析方法

总固体含量测定采用 105℃ 干燥恒重法、挥发性固体含量测定采用 550℃ 灼烧恒重法。原料湿贮

存后会产生大量有机酸, 在 105℃ 条件下进行总固体含量测定时有机酸挥发会引起测定结果偏低。因而, 本文根据 KREUGER 等^[14]报道的湿贮存原料在 100℃ 下干燥时不同有机酸的挥发系数进行修正。pH 值使用 Orin 5 - Star 型 pH 计 (梅特勒-托利多仪器有限公司) 测定。半纤维素、纤维素、木质素含量采用 Van Soest Fiber 分析方法, 使用 ANKOM A200 型纤维分析仪 (USA) 进行测定。沼气成分 (CH_4 和 CO_2) 由 SP-2100 型气相色谱仪 (北瑞利分析仪器有限公司, 中国) 测出, 挥发性脂肪酸与乙醇含量采用日本岛津公司生产的 GC-2010Plus 型气相色谱仪测定, 乳酸含量采用美国戴安公司生产的 Dionex Ultimate U3000 型高效液相色谱仪测定, 测定方法详见文献^[5]。

1.6 试验方法

数据用 Origin 8.5 软件整理制图并利用修正的 Gompertz 方程拟合累积产气曲线。利用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 代表数据存在显著性差异, $P > 0.05$ 代表数据不存在显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 湿贮存过程中理化特性及发酵产物动态分析

湿贮存过程中 pH 值、干物质损失率及可溶性碳水化合物含量的变化如图 1a ~ 1c 所示。Con 组湿贮存过程中 pH 值呈现先缓慢下降后升高的趋势, 但在贮存期间 pH 值始终维持在 6 以上。干物质损失率随贮存时间的延长而增大, 在贮存 30 d 时, 干物质损失率为 10%。初始可溶性碳水化合物占总固形物质量分数仅为 1.6%, 贮存过程中略有降低。Glu 组在贮存 3 d 时 pH 值已低至 4.8, 在贮存 30 d 时 pH 值达到 4.2, 干物质损失率为 4.7%, 与 Con 组相比, 干物质损失下降 53%。与 Glu 组相比, LP 组与 LB 组可加速发酵初期 (3 d 内) pH 值下降速率及可溶性碳水化合物消耗; 而贮存 30 d 时 pH 值和可溶性碳水化合物含量无显著变化 ($P > 0.05$), LP 组干物质损失率为 4.6%, 与 Glu 组相比无显著变化 ($P > 0.05$), LB 组干物质损失率为 5.5%, 略高于 Glu 组, 是由于接种短乳杆菌属于异型乳酸菌, 会产生二氧化碳造成少量干物质损失^[15-16]。AA 组初始 pH 值为 6.75, 贮存 30 d 时 pH 值为 4.0, 干物质损失率为 3.6%, 均显著低于其他组 ($P < 0.05$)。可溶性碳水化合物初期消耗较少, 随着贮存时间的延长, 可溶性碳水化合物含量呈线性下降趋势。pH 值是最直接表征秸秆湿贮存效果的指标。秸秆 pH 值为 4.1 ~ 4.3, 质量良好; pH 值为 4.4 ~ 5.0, 质量一般; pH 值在 5.0 以上, 质量劣

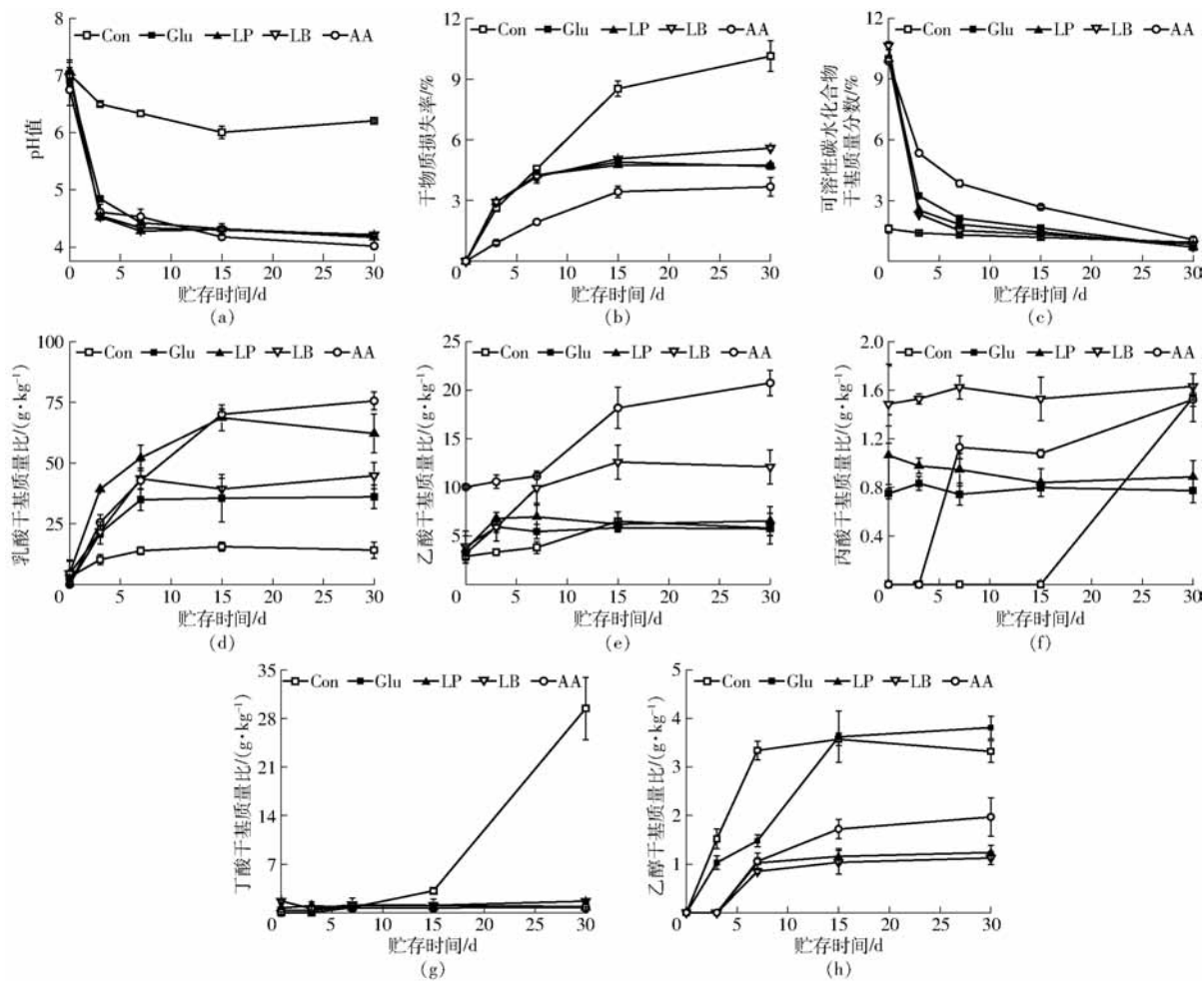


图1 秸秆湿贮存过程发酵品质的动态变化

Fig. 1 Dynamic changes of fermentation quality during wet storage

等^[17],pH 值越低秸秆湿贮存的效果越好,稳定贮存的时间越长。空白组的秸秆湿贮存品质较差,是由于其缺少可被乳酸菌直接利用的可溶性碳水化合物,导致乳酸、乙酸等有机酸含量低,pH 值偏高,不能有效地抑制腐败菌(梭菌、芽孢杆菌、酵母菌等)分解有机物,产生二氧化碳或氨气等造成大量干物质损失^[18]。其余组均添加了葡萄糖,贮存30 d 均获得质量良好的原料,干物质损失显著下降($P < 0.05$)。

湿贮存过程中木质纤维素的变化见表2。Con 组在贮存过程中,木质纤维素组分几乎没有显著变化。其余4 组纤维素和半纤维素含量在数值上均有下降趋势,Glu 组纤维素含量贮存30 d 时显著降低($P < 0.05$),LP 组、LB 组和AA 组贮存30 d 的半纤维素含量显著低于贮存0 d($P < 0.05$),所有组木质素含量均无显著变化($P > 0.05$),湿贮存过程中秸秆长时间在低 pH 值的酸性环境,促进了部分纤维素、半纤维素的降解,这与刘桂要^[7]的研究结果基本一致。与 Glu 组相比,额外添加乳酸菌与乙酸对纤维素、半纤维素含量无显著影响,HEIERMANN

等^[4]研究也表明乳酸菌对青贮玉米秸秆的中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维无显著影响。

湿贮存过程中乳酸含量的变化见图1d。Con 组乳酸含量初期略有升高,贮存15~30 d 期间干基质量比维持在14 g/kg。Glu 组乳酸含量呈现先增加后平稳的趋势,贮存至30 d 时干基质量比为36 g/kg。与 Glu 组相比,LP 组呈现初期快速增加后期略有降低趋势,贮存至30 d 时达到62 g/kg,乳酸含量显著提高($P < 0.05$),FILYA 等^[19]研究也表明接种植物乳杆菌可显著提高乳酸含量;LB 组贮存至30 d 时,乳酸含量的干基质量比达到44 g/kg;AA 组乳酸含量在发酵初期(7 d 内)并无明显增加,但发酵后期呈迅速升高趋势,发酵至30 d 时乳酸的干基质量比高达75 g/kg,显著高于其他组($P < 0.05$)。由图1c 可发现,可溶性碳水化合物在发酵7 d 后迅速被消耗,可以推测由于直接添加乙酸导致 pH 值快速降低,抑制了部分微生物活性,减少了贮存初期对可溶性碳水化合物的消耗,但随着发酵时间的延长,可在酸性环境下生长的乳酸菌大量繁殖,快速消耗可溶性碳水化合物产生大量有机酸。

表 2 秸秆湿贮存过程纤维素、半纤维素和木质素的动态变化

Tab.2 Dynamic changes of cellulose, hemicellulose and lignin during wet storage

处理组别	贮存时间/d	纤维素	半纤维素	木质素
		干基质量分数/%	干基质量分数/%	干基质量分数/%
Con	0	(33.40 ± 0.16) ^{Aa}	(23.64 ± 3.19) ^{ABa}	(5.85 ± 0.74) ^{Aab}
	3	(32.54 ± 1.10) ^{Aa}	(21.81 ± 1.56) ^{ABa}	(5.36 ± 0.33) ^{Aa}
	7	(32.97 ± 0.36) ^{Aa}	(24.32 ± 2.56) ^{BCa}	(5.15 ± 0.11) ^{Aa}
	15	(33.58 ± 1.13) ^{Ba}	(22.11 ± 0.50) ^{Aa}	(6.06 ± 0.43) ^{Aab}
	30	(32.18 ± 0.54) ^{Aa}	(22.98 ± 0.64) ^{Ba}	(6.67 ± 1.21) ^{Ab}
Glu	0	(34.40 ± 1.24) ^{Ab}	(22.89 ± 0.70) ^{Aa}	(5.83 ± 2.25) ^{Aa}
	3	(31.76 ± 2.59) ^{Aab}	(22.86 ± 4.47) ^{ABa}	(4.70 ± 1.35) ^{Aa}
	7	(32.13 ± 1.44) ^{Aab}	(21.58 ± 2.51) ^{ABCa}	(4.48 ± 0.47) ^{Aa}
	15	(32.02 ± 2.59) ^{ABab}	(21.75 ± 0.85) ^{Aa}	(7.00 ± 1.35) ^{Aa}
	30	(29.88 ± 1.42) ^{Aa}	(20.38 ± 1.26) ^{ABa}	(6.05 ± 1.74) ^{Aa}
LP	0	(33.95 ± 1.91) ^{Ab}	(24.60 ± 0.88) ^{ABb}	(5.07 ± 1.93) ^{Aa}
	3	(33.39 ± 0.93) ^{Ab}	(19.85 ± 0.70) ^{Aa}	(5.18 ± 1.88) ^{Aa}
	7	(32.08 ± 0.51) ^{Aab}	(18.45 ± 2.37) ^{Aa}	(5.46 ± 1.87) ^{Aa}
	15	(30.19 ± 0.61) ^{Aa}	(20.98 ± 0.78) ^{Aa}	(5.70 ± 1.62) ^{Aa}
	30	(31.91 ± 1.86) ^{Aab}	(21.06 ± 3.30) ^{ABa}	(6.65 ± 1.77) ^{Aa}
LB	0	(32.43 ± 1.74) ^{Aa}	(26.27 ± 1.75) ^{ABb}	(5.19 ± 0.32) ^{Aab}
	3	(30.60 ± 4.65) ^{Aa}	(21.72 ± 0.23) ^{ABa}	(5.19 ± 0.01) ^{Aab}
	7	(30.87 ± 1.52) ^{Aa}	(20.12 ± 2.97) ^{ABa}	(4.05 ± 1.05) ^{Aa}
	15	(30.17 ± 0.66) ^{Aa}	(23.47 ± 1.65) ^{Aab}	(7.81 ± 1.96) ^{Ab}
	30	(31.67 ± 0.34) ^{Aa}	(21.13 ± 2.27) ^{ABa}	(6.54 ± 2.31) ^{Aab}
AA	0	(35.29 ± 4.75) ^{Aa}	(27.41 ± 2.98) ^{Bb}	(5.50 ± 0.78) ^{Aa}
	3	(34.00 ± 5.47) ^{Aa}	(25.60 ± 0.50) ^{Bb}	(5.03 ± 1.79) ^{Aa}
	7	(31.56 ± 2.51) ^{Aa}	(25.09 ± 0.70) ^{Cb}	(5.15 ± 0.92) ^{Aa}
	15	(33.56 ± 0.44) ^{Ba}	(24.00 ± 5.56) ^{Ab}	(6.40 ± 0.93) ^{Aa}
	30	(31.70 ± 1.58) ^{Aa}	(18.02 ± 3.30) ^{Aa}	(6.71 ± 1.21) ^{Aa}

注:同列不同小写字母表示相同处理组不同时间差异显著($P < 0.05$);同列不同大写字母表示相同时间不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

湿贮存过程中乙酸含量的变化见图 1e。Glu 组与 LP 组贮存 30 d 时,乙酸的干基质量比分别为 5 g/kg 和 6 g/kg,与 Con 组相比,并未显著增加($P > 0.05$)。而 LB 组在贮存 3 d 后,乙酸含量呈现先显著升高后平稳的趋势,贮存 30 d 时,乙酸的干基质量比达到 12 g/kg,是由于短乳杆菌属于异型乳酸菌,代谢产物除了乳酸外,还有乙酸等。KLEINSCHMIT^[20]研究表明玉米青贮料接种异型乳酸菌可提高乙酸含量。AA 组在贮存 30 d 时,乙酸的干基质量比为 20 g/kg,贮存期间乙酸含量的变化与乳酸含量的变化相一致,原因也相近。

湿贮存过程中丙酸、丁酸和乙醇含量的变化见图 1f~1h。5 个湿贮存组丙酸含量的干基质量比均低于 2 g/kg。Glu 组、LP 组、LB 组和 AA 组丁酸的干基质量比均低于 2 g/kg。Con 组在贮存 15 d 后,丁酸含量迅速增长,贮存 30 d 时干基质量比已高达 29 g/kg,这是由梭状芽胞杆菌大量繁殖产生二次发酵导致的。据徐春城^[21]报道,大多数梭菌通常出现在湿贮存后期,高 pH 值、低可溶性碳水化合物含量均有助于梭菌的繁殖,其在无氧条件下能分解单糖、

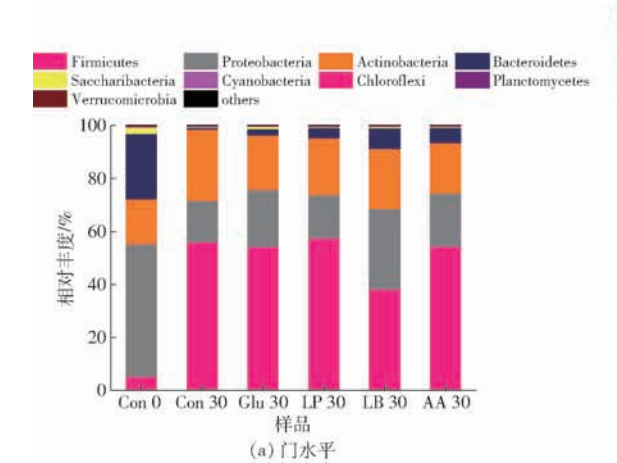
双糖、乳酸、淀粉、纤维素以及有机氮化物等产生丁酸、二氧化碳与氢气等造成营养物质大量损失。LP 组、LB 组、AA 组的乙醇含量均显著低于 Con 组与 GLu 组($P < 0.05$)。在贮存过程中,乙醇一般是乳酸菌、肠杆菌、酵母等微生物的代谢产物^[21],Con 组的 pH 值较高,乙醇可能是肠杆菌或酵母的代谢产物,Glu 组的 pH 值较低,可能是某些异型发酵乳酸菌的代谢产物。与 LP 组和 LB 组相比,AA 组贮存 7 d 后,乙醇含量显著升高($P < 0.05$),结合乳酸和乙酸含量变化,推测添加乙酸可能促进了某些异型乳酸菌的生长。

2.2 湿贮存前后细菌多样性变化分析

原料湿贮存前后化学组分及发酵品质的变化本质上是微生物菌群共同作用的结果。选取空白组贮存的 0 d 和 30 d,其余 4 组贮存 30 d 的原料进行细菌多样性分析,分别为:Con 0、Con 30、Glu 30、LP 30、LB 30、AA 30。

由图 2a 可知,干黄玉米秸秆原料主要附着变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes),丰度分别为 50.05%、

16.88%和24.66%,少量厚壁菌门(Firmicutes)和未定名 Saccharibacteria 的丰度分别为 5.32% 和 2.45%,极少量蓝藻细菌门(Cyanobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、浮霉菌门(Planctomycetes)和疣微菌门(Verrucomicrobia),四者丰度之和仅为 0.59%。其余5组均是经过湿贮存,厚壁菌门丰度显著升高($P<0.05$),成为主要优势菌群,放线菌门显著升高($P<0.05$)。变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和 Saccharibacteria 丰度显著降低($P<0.05$),这与陶莲等^[22]的研究结果一致。



由图 2b 可知,干黄玉米秸秆(Con 0 组)主要附着鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)、短状杆菌属(*Brachybacterium*)、单胞菌(*Luteimonas*)等,丰度分别为 20.54%、7.72%、6.37%、5.22%、4.99%。还有少量乳酸菌,如乳杆菌属(*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、片球菌属(*Pediococcus*)等,丰度均低于 0.5%,非乳酸菌属丰度高达 99%。

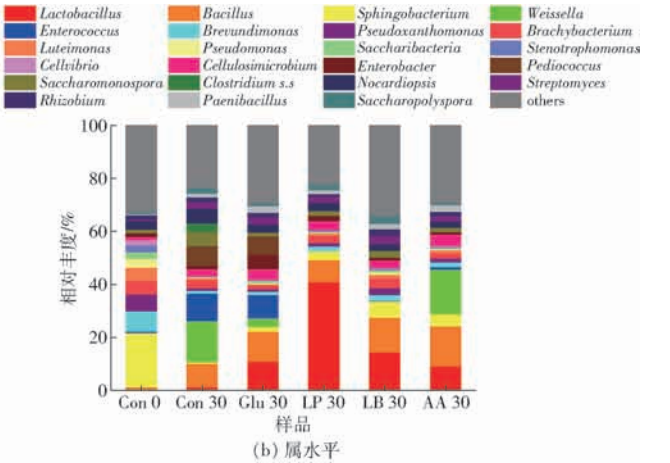


图 2 湿贮存前后门水平、属水平的细菌群落组成

Fig. 2 Composition of bacterial community at phylum and genus before and after wet storage

Con 30 组,主要附着 *Weissella*、*Bacillus*、*Enterococcus*、*Pediococcus*、*Saccharomonospora*、*Nocardiopsis*、*Clostridium s. s*,丰度分别为 15.62%、8.75%、10.42%、7.35%、5.27%、5.53%、3.34%。*Weissella*、*Enterococcus*、*Pediococcus* 等乳酸菌成为优势菌群。但对贮存更有利的 *Lactobacillus* 并未升高。KUNG^[23]表明 *Pediococcus* 比 *Lactobacillus* 更适宜在高干物质及较高 pH 值的条件下生长。同时 *Clostridium s. s* 的丰度达到 3.34%,而其余组的丰度均低于 0.1%。这表明大量的梭菌繁殖,会发生丁酸发酵,造成干物质损失。这也是图 1g 中 Con 组的丁酸含量显著高于其他组的原因。

Glu 30 组,主要优势菌群 *Lactobacillus*、*Bacillus*、*Enterococcus*、*Enterobacter*、*Pediococcus*,丰度分别为 11.11%、11.22%、9.01%、5.32%、6.88%。以乳杆菌属、肠球属、片球菌属等乳酸菌为主导产酸,这与 PAHLOW 等^[24]研究一致。一般来说杆菌比球菌更耐酸性^[21],Glu 组贮存 30 d 时 pH 值为 4.2,肠球属与片球菌已受到抑制,产酸缓慢,但乳杆菌并不占据绝对的主导地位,这也是 Glu 组的乳酸含量远低于 LP 组的原因。同时腐败菌 *Enterobacter* 丰度依然较高,会产生乙醇,这可能是 Glu 组乙醇含量高于 LP 组、LB 组与 AA 组的原因。

LP 30 组,主要优势菌群为 *Lactobacillus* 和 *Bacillus*,丰度分别为 41.07%、8.27%。乳杆菌属占乳酸菌的 99%。乳杆菌较其他乳酸菌更适宜在酸性环境下生存,产酸速率更快。与 Glu 30 组相比,乳杆菌属相对丰度显著升高($P<0.05$),结合乳酸含量变化(图 1d),推测这株同型发酵的植物乳杆菌在玉米秸秆湿贮存环境中较适宜生长,腐败菌 *Enterobacter*、*Clostridium s. s* 等相对丰度均显著下降($P<0.05$)。

LB 30 组,主要优势菌群为 *Lactobacillus* 和 *Bacillus*,丰度分别为 14.45%、13.17%,与 Glu 组相比,*Lactobacillus* 丰度仅提高 3.3%,与 LP 30 组相比,显著下降($P<0.05$),可能是接种量不足或这株短乳杆菌不适合在这种环境中生长。但腐败菌 *Enterobacter*、*Clostridium s. s* 相对丰度低于 LP 30 组,表明短乳杆菌与植物乳杆菌相比,可降低腐败菌的相对丰度,任海伟等^[25]表明接种异型乳酸菌可有效抑制腐败菌。

AA 30 组,主要优势菌群为 *Weissella*、*Bacillus* 和 *Lactobacillus*,丰度分别为 16.87%、14.97%、9.32%。与 Glu 30 组、LP 30 组和 LB 30 组相比,*Lactobacillus* 相对丰度最低,而 *Weissella* 相对丰度最高,可见添加乙酸可能促进了 *Weissella* 生长,

Weissella 属于异型发酵,主要产物有乳酸、乙酸或乙醇。这可能是 AA 组贮存 7 d 后乳酸、乙酸和乙醇含量升高的原因(图 1d ~ 1h)。同时 *Enterobacter* 与 *Clostridium s. s* 相对丰度显著低于其他组 ($P < 0.05$),表明添加乙酸强化了以 *Weissella* 为主导的异型发酵过程并抑制了腐败菌生长,增强了贮存过程稳定性。

2.3 湿贮存前后厌氧消化性能以及产气动力学分析

厌氧消化是多种微生物协同在厌氧环境下将有机物逐渐分解,产生甲烷这一能源物质的过程。已有研究表明玉米秸秆经过湿贮存可提高秸秆产气潜力^[4],为了进一步探讨复合添加剂对经过湿贮存的干黄玉米秸秆产气潜力的影响,选取了 5 组湿贮存试验贮存 30 d 的样品进行产气潜力试验,结果如图 3 所示。

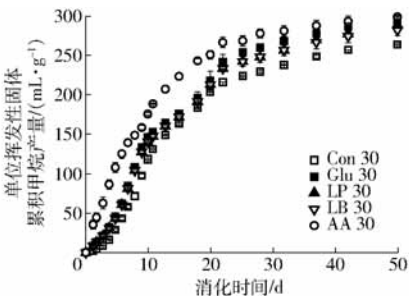


图3 干黄玉米秸秆补充添加剂湿贮存后的产气潜力分析

Fig.3 Methane production comparison of dry corn stover with additive after wet storage

Con 30 组测定单位挥发性固体累积甲烷产量 (264 ± 1) mL/g。Glu 30 组测定单位挥发性固体累积甲烷产量为 (293 ± 6) mL/g,其中每克葡萄糖理论产气量为 373 mL^[26],除去每克原料中额外添加的葡萄糖理论产气量,经过计算 Glu 组中秸秆自身理论单位挥发性固体累积甲烷产量为 (282 ± 7) mL/g (计算理论值时,均不考虑添加剂损失),与 Con 30 组相比,提高秸秆自身产甲烷潜力 6.8%。

LP 30 组测定单位挥发性固体累积甲烷产量为 (289 ± 7) mL/g,与 Glu 30 组相比,无显著变化 ($P > 0.05$),MENARDO 等^[27]研究表明全株玉米秸秆接种同型乳酸菌对甲烷产气潜力无显著影响。菌剂添加量低于 0.1 mL,对产气几乎无影响,除去葡萄糖的理论产气量,秸秆自身理论单位挥发性固体累积甲烷产量为 (274 ± 7) mL/g,与 Con 30 组相比,略有升高。

LB 30 组测定单位挥发性固体累积甲烷产量为 (282 ± 3) mL/g,与 Glu 30 组相比略有降低。ZHAO 等^[28]研究,以柳枝稷为原料接种短乳杆菌,贮存 30 d 后甲烷产量显著升高。HAAG 等^[29]研究,全株

玉米接种异型乳酸菌贮存后对甲烷产量无显著影响。这可能与原料理化特性、乳酸菌生长情况有关,短乳杆菌异型发酵会产生二氧化碳,造成部分有机物的损失,导致测定产甲烷潜力的降低。除去葡萄糖理论产气量,秸秆自身理论单位挥发性固体累积甲烷产量为 (270 ± 3) mL/g,与 Con 30 组相比,略有升高。

AA 30 组测定单位挥发性固体累积甲烷产量为 (299 ± 1) mL/g,与 Glu 30 组相比,无显著变化 ($P > 0.05$)。除去葡萄糖与乙酸理论产气量^[29],秸秆自身理论单位挥发性固体累积甲烷产量为 (287 ± 1) mL/g,与 Con 30 组相比,提高秸秆自身产甲烷潜力 8.7%。

采用修正 Gompertz 方程对 5 组玉米秸秆厌氧消化过程进行拟合预测,其中 R_{max} 、单位挥发性固体累积甲烷产量以及延滞期 λ 是反映厌氧消化效率的重要指标。结果如表 3 所示,5 组决定系数 R^2 均不小于 0.98,表明方程对 5 组试验的厌氧消化过程有较好的拟合。Con 30 组的延滞期为 2.75 d,其余 4 组的延滞期均明显缩短,主要是由于原料添加葡萄糖经过湿贮存后产生的有机酸,加速厌氧消化过程中产甲烷菌的代谢过程,缩短了启动延滞时间。AA 组的延滞期小于 0.01 d,可能是由直接添加乙酸,乙酸可作为产甲烷菌的直接底物导致的。添加剂可显著缩短湿贮存干黄玉米秸秆的延滞期,有利于提高实际沼气工程的产甲烷效率和综合效益。采用修正 Gompertz 模型得到的单位挥发性固体累积甲烷产量的预测值略低于批次实验得到测定值,差异比范围为 4% ~ 7%。这表明修正 Gompertz 模型可以较好模拟补充了添加剂的湿贮存干黄玉米秸秆的厌氧消化过程。

表3 修正 Gompertz 方程预测的玉米秸秆厌氧发酵的产甲烷动力学参数

样品	R^2	$R_{max}/$ ($\text{mL} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$)	λ/d	单位挥发性固体累积 甲烷产量(50 d)		
				预测值/	测定值/	差异
				预测值/ ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)	测定值/ ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)	差异 比/%
Con 30	0.99	14.66	2.75	249	264	6.0
Glu 30	0.99	14.89	1.30	276	293	6.1
LP 30	0.98	14.16	1.23	271	289	6.6
LB 30	0.99	15.39	1.30	268	282	5.2
AA 30	0.98	16.61	<0.01	287	299	4.1

添加剂调控玉米秸秆湿贮存过程,使得玉米秸秆产气潜力得以提高,主要归结于两方面原因,首先通过添加葡萄糖,增加了乳酸菌可利用底物浓度,快速

产生乳酸,降低了秸秆贮存过程的 pH 值,抑制了腐败菌生长,降低干物质损失,更好地保存了营养物质。其次是木质纤维素长时间在低 pH 值的酸性环境中,部分纤维素、半纤维素降解为厌氧消化过程中易水解物质,木质纤维素结构得以改变,使得秸秆的产气潜力得以改善^[30-31]。葡萄糖协同乳酸菌或乙酸添加分别起到调控有机酸分布和增强贮存过程稳定性的作用,其对进一步提高秸秆产气潜力的作用有限。

可见以干黄玉米秸秆为沼气工程原料时,外源糖的补充是保证其高效贮存及产气的关键。在实际工程应用中,为充分利用废弃物资源、降低工程运营成本,建议可结合当地实际情况,适当补充含糖量高的工业或农业废弃物进行混贮方式,例如糖蜜、苹果渣等。

3 结论

(1)以干黄玉米秸秆为原料,添加葡萄糖经过

湿贮存后,可快速降低原料 pH 值,与空白组相比,干物质损失下降 53%,并使湿贮存快速达到稳态,秸秆产气潜力提高 6.8%。

(2)葡萄糖与植物乳杆菌或短乳杆菌的协同添加,可加速贮存过程的进行,使乳酸或乙酸含量快速增加。但其对原料产气潜力并无进一步促进作用。

(3)葡萄糖与乙酸协同添加,乳酸与乙酸含量大量增多,提高了异型乳酸发酵魏斯氏菌属的相对丰度,有效抑制腐败菌的生长,秸秆产气潜力提高 8.7%。

(4)综合分析贮存品质及产气潜力,以干黄玉米秸秆为沼气工程原料时,外源糖的补充是保证其高效贮存及产气的关键,协同添加乙酸可有效改善其湿贮存品质,并抑制腐败菌生长,强化湿贮存过程稳定性。

参 考 文 献

- 徐萌. 农业秸秆资源化综合利用环境经济效益研究[D]. 杭州:浙江理工大学,2017.
XU M. Study on environmental and economic benefits of comprehensive utilization of agricultural straw[D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2017. (in Chinese)
- 柳珊,吴树彪,张万钦,等. 白腐真菌预处理对玉米秸秆厌氧发酵产甲烷影响实验[J/OL]. 农业机械学报,2013,44(增刊2):124-129,142. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=2013s224&flag=1. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2013.S2.024.
LIU S, WU S B, ZHANG W Q, et al. Effect of white-rot fungi pretreatment on methane production from anaerobic digestion of corn stover[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(Supp.2):124-129,142. (in Chinese)
- HEIERMANN M. Biogas crops grown in energy crop rotations: linking chemical composition and methane production characteristics[J]. Bioresource Technology, 2016, 206:23-35.
- HEIERMANN C, HEIERMANN M, IDLER C. Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(8):5153-5161.
- 柳珊. 不同生物预处理对芦竹和玉米秸秆及其厌氧消化性能影响研究[D]. 北京:中国农业大学,2015.
LIU S. Effect of biological pretreatments on anaerobic digestion of giant reed and corn stover[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- 王红梅,屠焰,张乃锋,等. 中国农作物秸秆资源量及其“五料化”利用现状[J]. 科技导报, 2017, 35(21):81-88.
WANG H M, TU Y, ZHANG N F, et al. Chinese crop straw resource and its utilization status[J]. Science & Technology Review, 2017, 35(21):81-88. (in Chinese)
- 刘桂要. 玉米秸秆青贮过程中微生物、营养成分及有机酸变化规律的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2009.
LIU G Y. Studies on the changes of microorganism, nutrits and organic and during ensiling for corn straw[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2009. (in Chinese)
- 焉石. 碳水化合物添加剂和不同收获期对青贮玉米青贮品质的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2010.
YAN S. The effect of carbohydrate additives and different harvest stages on corn silage quality[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2010. (in Chinese)
- HEINRITZ S N, MARTENS S D, AVILA P, et al. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability[J]. Animal Feed Science and Technology, 2012, 174(3-4):201-210.
- ADDAH W, BAAH J, GROENEWEGEN P, et al. Comparison of the fermentation characteristics, aerobic stability and nutritive value of barley and corn silages ensiled with or without a mixed bacterial inoculant[J]. Canadian Journal of Animal Science, 2016, 91(1):133-146.
- COMINO L, TABACCO E, RIGHI F, et al. Effects of an inoculant containing a *Lactobacillus buchneri* that produces ferulate-esterase on fermentation products, aerobic stability, and fibre digestibility of maize silage harvested at different stages of maturity[J]. Animal Feed Science and Technology, 2014, 198:94-106.
- 马旭光,刘晶晶,郑泽慧,等. 乙酸和乳酸对玉米秸秆青贮料有氧稳定性和甲烷产率的影响[J]. 中国农业大学学报, 2015,20(1):44-52.

- MA X G, LIU J J, ZHENG Z H, et al. Effects of acetic and lactic acid in corn stover silage on aerobic stability and methane yield rate[J]. Journal of China Agricultural University, 2015, 20(1):44–45. (in Chinese)
- 13 YUAN X, WEN A, DONG Z, et al. Effects of formic acid and potassium diformate on the fermentation quality, chemical composition and aerobic stability of alfalfa silage[J]. Grass & Forage Science, 2017, 72(4):833–839.
- 14 KREUGER E, NGES I A, BJORNSSON L. Ensiling of crops for biogas production: effects on methane yield and total solids determination[J]. Biotechnology for Biofuels, 2011, 4(1):1–8.
- 15 GHAZALI H, MOHTAR W Y W, ZAHARI M W. Effects of inoculating *Lactobacillus plantarum*, molasses and urea on the fermentation of whole crop rice silage[J]. Malaysian Journal of Animal Science, 2013, 16(2):75–82.
- 16 FILYA I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(11):3575–3581.
- 17 MCDONALD P, HENDERSON A R. Determination of water-soluble carbohydrates in grass[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1964, 15: 395–398.
- 18 MUCK R E. Silage microbiology and its control through additives[J]. Revista Brasileira de Zootecnia, 2010, 39(39):183–191.
- 19 FILYA I, SUCU E. The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage [J]. Grass & Forage Science, 2010, 65(4):446–455.
- 20 KLEINSCHMIT D H. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages[J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(10):4005.
- 21 徐春城. 现代青贮理论与技术[M]. 北京:科学出版社, 2013.
- 22 陶莲, 刁其玉. 青贮发酵对玉米秸秆品质及菌群构成的影响[J]. 动物营养学报, 2016, 28(1):198–207.
- TAO L, DIAO Q Y. Effects of ensiling on quality and bacteria composition of corn stalk[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(1): 198–207. (in Chinese)
- 23 KUNG L. A review on silage additives and enzymes[C]//Proceedings of the 59th Minneapolis Nutrition Conference, 1998: 121–135.
- 24 PAHLOW G, MUCK R E, DRIEHUIS F, et al. Microbiology of Ensiling [M]//BUXTON D R, MUCK R E, HARRISON J H. Silage science and technology. Madison, WI:ASA Inc., 2003: 31–93.
- 25 任海伟,王聪,马廷琴,等. 接种不同乳酸菌对干玉米秸秆与白菜废弃物混贮品质的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(3):547–556.
- REN H W, WANG C, MA Y Q, et al. Effects of different lactic acid bacteria inoculation on the mixed storage quality of dry maize straw and cabbage waste[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2018, 24(3):547–556. (in Chinese)
- 26 WELLINGER A, MURPHY J D, BAXTER D. The biogas handbook: science, production and application[M]. Amsterdam: Elsevier, 2013.
- 27 MENARDO S, BALSARI P, TABACCO E, et al. Effect of conservation time and the addition of lactic acid bacteria on the biogas and methane production of corn stalk silage[J]. Bioenergy Research, 2015, 8(4):1810–1823.
- 28 ZHAO X, LIU J, LIU J, et al. Effect of ensiling and silage additives on biogas production and microbial community dynamics during anaerobic digestion of switch grass[J]. Bioresource Technology, 2017, 241:349.
- 29 HAAG N L, NAGELE H J, FRITZ T, et al. Effects of ensiling treatments on lactic acid production and supplementary methane formation of maize and amaranth—an advanced green biorefining approach[J]. Bioresource Technology, 2015, 178:217.
- 30 PAKARINEN A, MAIJALA P, JAAKKOLA S, et al. Evaluation of preservation methods for improving biogas production and enzymatic conversion yields of annual crops[J]. Biotechnology for Biofuels, 2011, 4(1): 1–13.
- 31 任海伟, 王聪, 窦俊伟, 等. 玉米秸秆与废弃白菜的混合青贮品质及产沼气能力分析[J]. 农业工程学报, 2016, 32(12): 187–194.
- REN H W, WANG C, DOU J W, et al. Mixed ensiling quality of maize straw with waste cabbage and biogas production potential analysis[J]. Transactions of the CSAE, 2016, 32(12):187–194. (in Chinese)