

芦竹青贮特性及其对厌氧消化性能的影响研究

柳 珊^{1,2} 张紫嘉¹ 郭建斌¹ 董仁杰¹

(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: 青贮是一种传统的青绿饲料作物贮存方法,逐渐地被应用于沼气化原料的贮存。以能源作物芦竹为原料,探讨两个不同时间收获(早收、晚收)芦竹在未添加尿素和尿素辅助青贮 90 d 过程中的化学组分变化及其后续厌氧消化产甲烷性能。结果表明:早收芦竹中水溶性碳水化合物(WSC)质量分数为 2.80% (干基),青贮干物质(DM)损失率为 8%,而尿素辅助使青贮 DM 损失降低了 28.0%,木质素降解率提高了 101.3%,且后续厌氧消化累积甲烷产量提高了 25.6%;晚收芦竹中 WSC 质量分数为 4.94% (干基),青贮与尿素辅助青贮的 DM 损失率均保持在 1% 左右,但尿素辅助使青贮 90 d 过程中乳酸累积产量增加了 237.5%,木质素降解率提高了 43.8%,厌氧消化累积甲烷产量提高了 17.4%。因此,早收芦竹 WSC 含量低而不利于青贮,尿素辅助能有效降低芦竹青贮 DM 损失和提高后续产甲烷性能。

关键词: 芦竹; 青贮; 尿素辅助; 乳酸; 厌氧消化

中图分类号: X705; S216.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2020)S1-0421-08

Ensilage Performance and Subsequent Anaerobic Digestion of Giant Reed

LIU Shan^{1,2} ZHANG Zijia¹ GUO Jianbin¹ DONG Renjie¹

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

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

Abstract: Ensilage is a traditional technology for green fodder crops storage, which is gradually used in the storage of raw materials for biogas production. The energy crop of giant reed harvested at two different times was used as material for ensilage and conducted for a period of 90 days. Changes in chemical composition and subsequent methane production of ensiled giant reed by anaerobic digestion were examined. The results showed that the difference in water soluble carbohydrate (WSC) content of giant reed caused by harvest time was the main reason for the difference in performance of giant reed ensilage. The WSC content was 2.80% of dry matter (DM) for the giant reed of early harvest (end of August). There was no accumulation of lactic acid during ensilage of early-harvested giant reed, and also urea addition reduced the DM by 28.0% and significantly enhanced by 101.3% of lignin degradation during the whole ensilage. The WSC content achieved 4.94% DM for the giant reed of late harvest (early October), and the DM loss was about 1% during 90 days' ensilage. The cumulative production of lactic acid was increased by 237.5%, and the lignin degradation was increased by 43.8% for late-harvested giant reed via urea-assisted ensilage. Compared with non-ensiled giant reed, the cumulative methane production of early-harvested and late-harvested giant reed via 90 days' urea-assisted ensilage were increased by 25.6% and 17.4% during anaerobic digestion, respectively. Therefore, early harvest led to a low content of WSC and an undesirably ensilage, whereas urea-assisted treatment can effectively reduce the ensiled DM loss and improve the subsequent methane production of giant reed.

Key words: giant reed; ensilage; urea assisted; lactic acid; anaerobic digestion

收稿日期: 2020-08-10 修回日期: 2020-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(51608523)和山东省烟台市校地融合项目(2019XDRHXMQT36)

作者简介: 柳珊(1985—),女,讲师,博士,主要从事农业废弃物沼气化利用研究,E-mail: liu610shan@cau.edu.cn

通信作者: 董仁杰(1964—),男,教授,主要从事农业废弃物处理与资源化利用研究,E-mail: rjdong@cau.edu.cn

0 引言

随着化石能源的日益枯竭,能源作物在减少对化石燃料的依赖性和温室气体排放方面发挥着重要作用。芦竹是一种多年生的根茎草,被认为是一种新的能源作物,广泛种植在中国、美国、印度、澳大利亚、南非和地中海地区^[1-2]。芦竹是一种 C3 植物,具有较高的光合能力,其生物量比典型 C4 植物(例如芒草)更高,适应性极强,能够在较为贫瘠的土地上正常生长^[3]。芦竹富含 38% 纤维素和 25% 半纤维素,极具有作为木质纤维素类生物质能源资源开发的潜力,已经被广泛地研究应用于乙醇和甲烷等生物能源生产^[4-6]。

生物质原料的贮存是可持续生物能源生产的关键环节,青贮是一种传统的青绿饲料作物贮存方法,可以保存作物中 90% 的能量^[7],该方法也适用于能源作物的贮存。典型青贮是在缺氧环境下通过乳酸菌降解原料中可溶性碳水化合物(Water soluble carbohydrates, WSC)产生乳酸、乙酸、乙醇、CO₂等发酵产物,使青贮 pH 值快速地降低至 4.0 以下,从而抑制其它真菌、细菌和酵母等微生物的生长繁殖^[7-8]。WSC 是青贮过程中的一个限制因素,主要为乳酸发酵微生物的生长代谢提供可利用的糖源^[8],WSC 占青贮干物质(DM)质量分数超过 5% 是确保良好青贮效果的关键^[9]。然而,随着作物不同收获时期(作物由青绿变干黄),作物中 WSC 含量差异较大^[10-11]。文献[12]研究发现,当芦竹中 WSC 质量分数低于 5%,容易导致青贮过程中丁酸腐败发酵和较高的 DM 损失,原料贮存稳定性较差。因此,针对 WSC 含量低的青贮原料,亟需探寻能够有效提高原料贮存稳定性的改良方法。

青贮乳酸发酵产生的酸性环境,能够降解生物质中部分半纤维素组分,但对提高原料消化性的贡献很有限。水解仍然是青贮原料后续厌氧消化过程中的限速步骤,尝试在青贮过程中辅助预处理来降低木质纤维素生物质的抗性,是提高青贮原料沼气化应用经济效益的有效途径之一。尿素处理通常被用来改良青贮饲料的质量,例如,营养价值和消化率^[13-14]。文献[15]报道,在没有任何脲酶添加的情况下,尿素在厌氧贮存 14~21 d 过程中容易水解生成氨而改变 pH 值。此外,尿素处理增加了大麻青贮过程中木质素的降解,并且提高了 46% 酶解消化性^[16]。然而,关于尿素处理对青贮过程中乳酸的发酵类型、发酵产物分布、化学组分降解变化以及随后的厌氧消化(Anaerobic digestion, AD)性能影响的相关研究还不多见。

因此,本文采用 WSC 质量分数低于 5% 的芦竹为原料,考察不同收获时间(早收和晚收)芦竹青贮和尿素辅助青贮过程中发酵产物累积、DM 损失、WSC 含量及木质纤维素降解的动态变化规律,探讨芦竹经过尿素辅助青贮后进行厌氧消化的产甲烷性能,并分析 WSC 含量、青贮发酵产物与甲烷产量间的相关性,以期为木质纤维素类生物质原料的高效贮存和沼气化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用的芦竹原料分别于 8 月底和 10 月初收获于美国俄亥俄州立大学的农场(采用“早收”表示“当年 8 月底收获”,“晚收”表示“当年 10 月初收获”)。收获后的芦竹经粉碎机粉碎至 10 mm 左右,青贮试验于收获当日下午进行。厌氧发酵试验中的接种物来自于当地污水处理厂(KB BioEnergy, Akron, OH, 美国)污水污泥处理的中温厌氧发酵罐。芦竹和厌氧消化接种物的特性参数见表 1。

表 1 芦竹生物质及 AD 接种物的特性
Tab.1 Characteristics of giant reed biomass and inoculum for AD

参数	早收芦竹	晚收芦竹	AD 接种物
DM 质量分数/%	33.76 ± 0.03	43.53 ± 0.55	6.71 ± 0.01
有机干物(ODM)占 DM 质量分数/%	90.98 ± 0.12	92.19 ± 0.10	63.85 ± 0.05
总氮(TN)占 DM 质量分数/%	0.86 ± 0.01	0.77 ± 0.03	3.83 ± 0.07
总碳(TC)占 DM 质量分数/%	49.61 ± 0.21	49.98 ± 0.03	39.06 ± 0.52
碳氮比	57.66 ± 1.14	64.55 ± 2.47	10.20 ± 0.06
pH 值	5.42 ± 0.03	5.57 ± 0.03	7.99 ± 0.01
WSC 占 DM 质量分数/%	2.80 ± 0.16	4.94 ± 0.25	0.46 ± 0.08
纤维二糖占 DM 质量分数/%	0.76 ± 0.12	1.70 ± 0.08	
葡萄糖占 DM 质量分数/%	0.34 ± 0.02	1.47 ± 0.01	
甘露糖占 DM 质量分数/%	0.82 ± 0.01	1.45 ± 0.04	
纤维素占 DM 质量分数/%	31.04 ± 0.61	27.73 ± 0.17	1.11 ± 0.05
半纤维素占 DM 质量分数/%	16.13 ± 0.52	15.65 ± 0.29	
木质素占 DM 质量分数/%	15.97 ± 0.38	16.66 ± 0.38	
粗蛋白占 DM 质量分数/%	6.97 ± 0.85	4.06 ± 0.66	
NH ₃ -N 占 DM 质量分数/%	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.02	5.25 ± 0.52
灰分占 DM 质量分数/%	9.02 ± 0.12	7.81 ± 0.09	36.15 ± 0.05

1.2 尿素辅助芦竹青贮制备

青贮试验在 3.8 L 的塑料自封袋中进行。对于尿素辅助青贮芦竹试验组,使用小喷壶向早收和晚收的芦竹中喷洒配制好的质量浓度为 0.48 g/mL 和 0.16 g/mL 的尿素溶液,使其尿素占芦竹原料湿基质量分数为 0.8%。对于不添加尿素的青贮组作为对照,使用小喷壶向对照组的芦竹中喷洒与添加尿素溶液等体积的去离子水,保持青贮起始的固形物含量与尿素辅助青贮组相同。固形物质量分数为 29% 及以上可以降低贮存 DM 损失,并避免形成渗滤液而使有机物流失^[7],本试验中早收和晚收芦竹青贮起始的固形物质量分数分别为 32.3% 和 40.6%。每组样品充分混匀后,将约 1 kg 湿基芦竹装入塑料自封袋,并采用真空泵最大限度地排出塑料袋中的空气。每个试验组制备 24 袋青贮芦竹样品,于室温(25 ± 3)℃ 下贮存不同的时间(0、3、7、15、30、45、60、90 d),不进行青贮(0 d)的芦竹原料作为空白,到达每个固定的贮存时间时,每组随机选取 3 个贮存袋,取出袋子中的芦竹物料并完全混匀,一部分样品用于成分分析,另一部分原料贮存于 -20℃ 用于厌氧消化产甲烷的试验。所有的处理和测定都进行 3 个重复。

1.3 青贮芦竹的厌氧消化试验

将尿素添加组和尿素不添加组贮存 0、30、60、90 d 的芦竹作为 AD 的原料。AD 试验在 1 L 的三角瓶中进行,工作体积为 800 mL,接种比(原料挥发性固形物与污泥挥发性固形物质量比值)为 0.5,总固形物(TS)质量分数为 5%。AD 试验制备时,将芦竹原料、污泥和适量的去离子水混合搅拌后装入反应器,用带孔(并接集气袋)的橡胶塞密封,仅接污泥的厌氧反应器作为对照。将厌氧消化瓶置于(37 ± 1)℃ 下反应 30 d,所有试验组设置 3 个平行。每个反应器的沼气收集出口外接一个 5 L 的集气袋,每隔 2~4 d 进行沼气体积和甲烷浓度测定。

1.4 分析方法

DM、ODM、TS、VS(挥发性固形物)、TKN(总凯氏氮)含量以及 pH 值参照美国 APHA(2005)标准方法进行测定^[17];TC 和 TN 含量采用元素分析仪(Elementar Vario Max CNS, Elementar Americas, Mt. Laurel, NJ, USA)进行测定,碳氮比的计算是基于 TC 和 TN 含量的比值。粗蛋白含量是通过测定总的有机氮(TKN-NH₃-N)含量乘以系数 6.25 计算所得^[12]。纤维素、半纤维素和木质素含量依据国家可再生能源实验室(NREL)的分析方法进行测定^[18]:生物质原料在一个自动提取单元(Dionex ASE 300 extraction system, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA,

USA)中通过去离子水和乙醇进行萃取,采用高效液相色谱(HPLC)测定萃取残渣经过两步酸水解生成单体糖的浓度,从而计算出纤维素和半纤维素的含量。该 HPLC(Shimadzu LC-20AB, MD, USA)配有 Biorad Aminex hpx-87 P 型分析柱和示差折光检测器(Refractive index detector, RID),分析柱和检测器的温度分别维持在 60℃ 和 55℃,采用高效液相色谱级水作为流动相,流速为 0.3 mL/min。木质素分析由两部分组成,酸溶性木质素采用紫外-可见光谱仪(BioMate 3S spectrophotometer, Waltham, MA, USA)分析测定,酸不溶性木质素通过重量分析法确定。青贮过程中的主要发酵产物乳酸、乙酸、丙酸、丁酸和乙醇的含量采用 HPLC 测定:青贮样品与去离子水以液料比 10 mg/L 于 4℃ 下浸提 10 h 后通过 0.2 μm 过滤器进行过滤,取其滤液进入 HPLC 进行色谱分析。该 HPLC 系统配有 Phenomenex Rezex RFQ-Fast Fruit H⁺ 分析柱(Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA)、一个保护柱(Catalog No. 125-0129, 30 mm × 4.6 mm)、一个 RID 和一个紫外线(Ultra violet, UV)检测器。分析柱和检测器的温度分别设定在 60℃ 和 55℃,流动相为 2.5 mmol/L H₂SO₄,流速为 0.4 mL/min。沼气的组成成分(CH₄、CO₂、N₂ 和 O₂)用 HP 6890 型气相色谱仪(Agilent, Wilmington, DE, USA)进行分析,沼气的体积通过滚筒式气体流量计(Ritter, Bochum, Germany)进行测定。

青贮过程中的 DM 损失主要是由于植物的呼吸作用和微生物转化糖产生 CO₂ 及其它发酵产物的过程中导致的有机物损失^[19]。青贮原料相对于新鲜原料含有更多的挥发性有机酸(Volatile fatty acid, VFA),如乙酸、丙酸和丁酸等。当 DM 质量分数测定采用 105℃ 干燥时,挥发性组分部分损失但并未计算在干物质组分中,导致测定 DM 质量分数比实际 DM 质量分数偏小,应该在实际的 DM 质量分数测定、DM 损失及单位质量 VS 产甲烷量计算时予以修正。根据文献[20]报道的青贮原料在 100℃ 下干燥时的有机产物挥发系数:乳酸 0.375, VFAs 0.892 和乙醇 1.000,本试验中对测定的 DM 质量分数进行修正,公式为

$$D_{CV} = D_{105^{\circ}\text{C}} + D_e + 0.375D_{AL} + 0.892(D_{AA} + D_{PA} + D_B)$$

式中

D_{CV} ——干物质质量分数修正值, %

$D_{105^{\circ}\text{C}}$ ——105℃ 时的干物质质量分数, %

D_e ——乙醇的干物质质量分数, %

D_{AL} ——乳酸的干物质质量分数, %

D_{AA} ——乙酸的干物质质量分数, %

D_{PA} ——丙酸的干物质质量分数, %

D_B ——丁酸的干物质质量分数, %

1.5 统计分析方法

数据的统计分析采用 Excel 软件进行分析;统计学差异使用 Minitab 统计软件 (Version 16, Minitab, Inc., State College, PA, USA) 进行方差分析评估 (ANOVA, $\alpha = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 DM 损失、WSC 含量及 pH 值变化

如图 1a 所示,尿素的添加最直接影响芦竹青贮过程中 pH 值的变化。对于早收和晚收的芦竹,尿素添加组青贮过程中的 pH 值呈现出先增加后降低的趋势,这主要是由于尿素在厌氧贮存的前 14 ~ 21 d 内进行水解并释放游离氨^[15],导致青贮前 30 d

内 pH 值增加,随后伴随着贮存过程中有机酸的产生与累积,pH 值又缓慢下降。添加尿素的早收芦竹在 60 ~ 90 d 贮存过程中 pH 值仍保持较高的水平,主要是由于乳酸发酵产物中未出现乳酸的累积(图 2)。青贮过程中 pH 值的变化主要归因于乳酸菌降解 WSC 转化生成有机酸。早收和晚收的芦竹中 WSC 质量分数分别为 2.80% 和 4.94% (表 1),青贮 30 d 过程中 WSC 分别消耗 2.49% DM 和 4.58% DM。表明芦竹在青贮起始的 30 d 过程中超过 90% 的 WSC 被消耗,然而添加尿素与否对 WSC 的消耗没有显著($p < 0.05$)影响,青贮过程中消耗的 WSC 来源于原料中存在的 WSC,同时也包含少量青贮过程中纤维素和半纤维素降解产生的单糖。

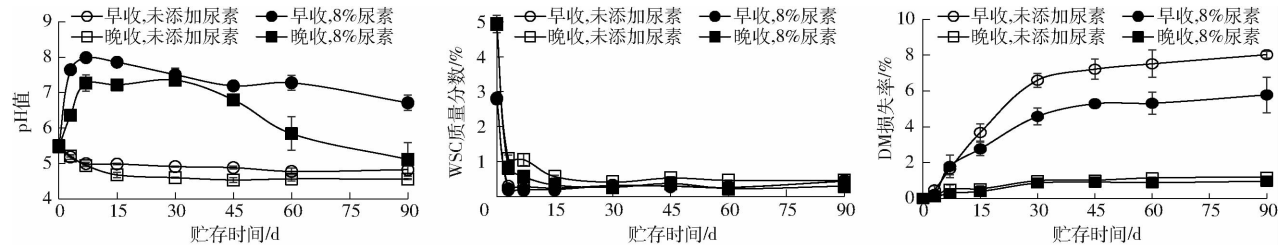


图 1 芦竹青贮过程中 pH 值、WSC 质量分数和 DM 损失率
Fig. 1 pH value, WSC content and DM loss of giant reed during ensilage

芦竹 90 d 青贮过程中的 DM 损失率如图 1c 所示。早收芦竹青贮过程中的 DM 损失显著高于晚收芦竹,主要原因是由于晚收芦竹中 WSC 的含量较高,能够为乳酸发酵过程提供充足的碳源,从而快速地积累有机酸而降低 pH 值,并抑制腐败微生物的活动。对于早收的芦竹,未添加尿素青贮组的 DM 损失率为 8%,添加尿素使青贮 90 d 的 DM 损失降低了 28.0%,提高了贮存稳定性。对于晚收的芦竹,添加或未添加尿素的芦竹经过青贮 30 d 都趋于稳定,随后 30 ~ 90 d 过程中的 DM 损失率为 0.9% ~ 1.2%,添加尿素组芦竹青贮 90 d 的 DM 损失相对于未添加尿素的青贮组降低了 18.5%。由此可见,晚收有利于芦竹中 WSC 的积累,能有效降低芦竹青贮过程中的 DM 损失。添加尿素能够进一步降低青贮 DM 损失,尤其是对于 WSC 含量较低的早收芦竹,采用尿素添加辅助青贮过程是一种提高青贮稳定性的有效手段。

2.2 发酵产物累积分布

芦竹青贮过程中附生的乳酸菌利用 WSC 进行乳酸发酵产生大量的有机酸(乳酸、乙酸、丙酸和丁酸)和乙醇(图 2)。WSC 是乳酸发酵的底物,尿素添加提高了 pH 值,从而显著地($p < 0.05$)改变了乳酸、乙酸和丙酸的累积分布。由于早收芦竹中 WSC 含量相对较低,尿素辅助组和未添加尿素组的芦竹

青贮过程中都未见乳酸累积,发酵产物主要组成为乙酸、丙酸、丁酸和乙醇,表明青贮过程为异型乳酸发酵。未添加尿素的早收芦竹青贮 30 ~ 90 d 过程中,乙酸质量比为 19.2 ~ 31.6 g/kg,当芦竹中添加尿素后,乙酸显著增加($p < 0.05$),质量比增加至 43.2 ~ 53.3 g/kg。同时,尿素添加对早收芦竹青贮过程中丙酸和乙醇累积的影响不大。丁酸是青贮发生腐败过程中通常被检测出的副产物^[9],未添加尿素青贮组中丁酸质量比达 12.7 g/kg,而尿素辅助青贮 45 ~ 90 d 过程中丁酸累积量相对降低。另外,虽然尿素添加对青贮过程中 WSC 的消耗无显著影响,但显著($p < 0.05$)增加了青贮 90 d 过程中约 50% 的总发酵产物含量(折合约 2.5% 的 DM),尤其是乙酸的浓度增加了 143.4%;尿素辅助组中早收芦竹青贮过程中发酵产物含量的增加与 DM 损失量降低的结果相一致。

对于晚收芦竹而言,青贮发酵产物含乳酸、乙酸、丙酸、丁酸和乙醇,为混合型乳酸发酵型。芦竹青贮 30 ~ 90 d 过程中,未添加尿素组中乳酸、乙酸和丙酸含量(质量比)分别分布在 7.9 ~ 10.7 g/kg、7.4 ~ 19.2 g/kg 和 22.9 ~ 35.2 g/kg 的范围内;而尿素辅助组中乳酸、乙酸和丙酸含量分别为 23.0 ~ 36.0 g/kg、16.7 ~ 21.9 g/kg 和 3.7 ~ 10.1 g/kg。尿素添加使 90 d 芦竹青贮过程中乳酸累积产量增加

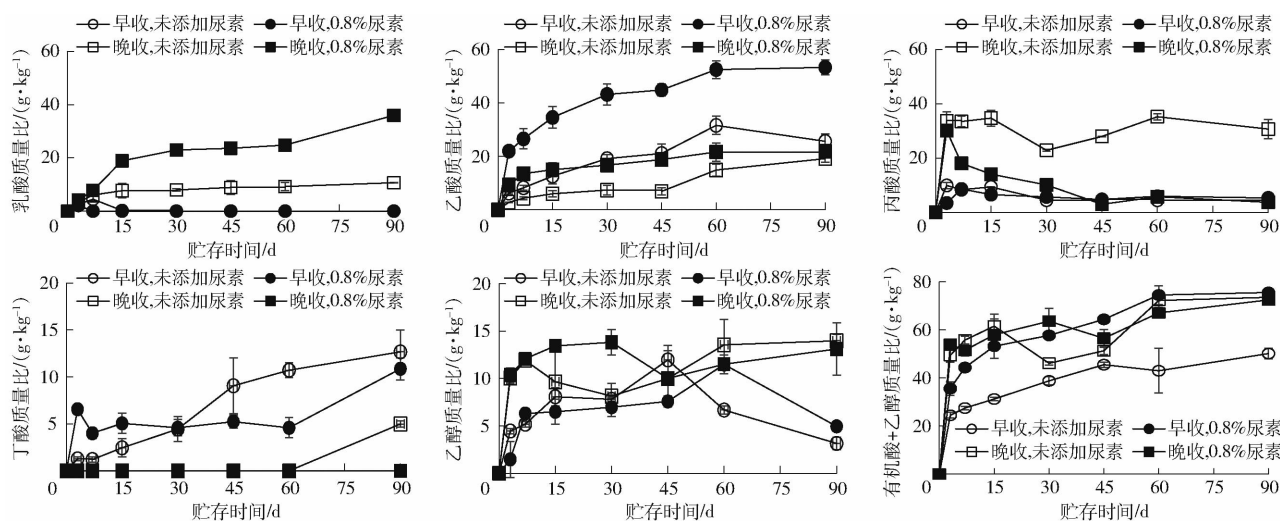


图2 芦竹青贮过程中发酵有机酸和乙醇含量变化曲线

Fig. 2 Organic acid and ethanol production during ensilage of giant reed

了 237.5%, 而丙酸的累积产量减少了 87.9%。由于乳酸的 pK_a 值为 3.86, 它是青贮有机酸中最有效降低 pH 值并保持青贮稳定性的产物^[21]。晚收芦竹青贮过程中高浓度的乳酸累积与较低青贮 DM 损失的结果相一致, 这也是晚收芦竹青贮稳定性高于早收芦竹的重要原因。

青贮过程中丙酸积累的机制可能有 2 种: 一种是通过丙酸细菌产生丙酸, 当 pH 值低于 4.8 时受到抑制^[22]; 另一种是通过异型发酵乳酸菌, 如布氏乳杆菌, 以 1,2-丙二醇作为中间体将乳酸降解为丙酸^[22-23]。本试验中芦竹青贮中丙酸的积累可能主要归因于第 2 种机制, 即乳酸被异型乳酸发酵菌降解生产丙酸。尿素辅助芦竹青贮 30 d 时的乙醇质量比增加到 13.8 g/kg, 但贮存 60~90 d 过程中乙醇含量与不添加尿素芦竹没有显著差异 ($p > 0.05$)。未添加尿素的芦竹晚收青贮 90 d 时的丁酸含量(质量比)为 5.0 g/kg, 而尿素辅助芦竹青贮组中未检测到丁酸。因此, 对于晚收的 WSC 含量相对较高的芦竹青贮过程, 尿素添加对总的发酵产物含量影响差异不大, 而尿素辅助能够提高芦竹青贮过程中同型乳酸发酵菌的活性, 促进乳酸的累积并抑制乳酸的次级代谢降解途径。

尿素辅助是通过调节青贮过程中 pH 值水平而影响贮存过程中有机酸的分布。有机酸对微生物的毒性也通常依赖于 pH 值, 在低 pH 值下, 有机酸是未离解的, 并且可以很容易地穿过细胞膜从而抑制微生物的生长。在高 pH 值下, 有机酸是以离子化化合物的形式存在, 不能通过自由扩散的形式单独进入细胞^[24]。尿素辅助芦竹青贮过程中 pH 值显著提高, 一定程度上降低了有机酸对微生物的毒性, 有利于发酵产物的积累。根据文献^[25]报道的微生

物生产乳酸的最适 pH 值范围为 5.0~7.0, 其晚收芦竹尿素辅助组青贮 30~90 d 过程中 pH 值为 5.1~7.4, 与未添加尿素的青贮芦竹 (pH 值 4.6) 相比, 更有利于乳酸的生产。根据文献报道 pH 值约 4.0 时乳酸通过布氏乳杆菌发生降解, 而 pH 值高于 5.8 时降解受到抑制^[23], 丙酸菌产丙酸途径的 pH 值为 4.0 以上^[22], 这也恰好解释晚收芦竹未添加尿素青贮组的丙酸水平显著高于尿素添加组。因此, 尿素辅助提高青贮 pH 值对不同原料的青贮乳酸发酵类型产生影响的大不相同, 对于 WSC 含量较高的芦竹青贮过程, 尿素辅助可以通过提高 pH 值提高乳酸的累积并降低丙酸的生成。过量的尿素可能由于氨的毒性和 pH 值的增加而对微生物产生抑制作用, 在工业应用之前应先确定最佳尿素添加负荷。

2.3 木质纤维素降解变化

未添加尿素的芦竹青贮过程中, 早收芦竹的纤维素降解率高于晚收芦竹, 且纤维素降解率随贮存时间的延长而增加。早收和晚收芦竹青贮 30 d 后纤维素降解率分别为 7.7% 和 1.8%, 当时间延长到 90 d 时, 纤维素降解分别增加了 20.8% 和 232.4%, 如图 3 所示, 图中不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。而相对于未添加尿素组, 尿素辅助组的早收和晚收芦竹贮存 90 d 的纤维素降解率分别降低 12.9% 和 47.5%。可见, 尿素辅助芦竹青贮过程中纤维素的降解率显著降低, 尿素辅助有利于保存青贮过程中的纤维素组分。

早收和晚收的芦竹青贮 90 d 过程中半纤维素降解率均高于纤维素和木质素的降解率, 其范围分别为 9.7%~12.9% 和 11.1%~13.6% (图 3); 这与文献报道的玉米秸秆和果园草青贮过程中半纤维素比纤维素更容易降解的结果相一致^[26-27]。尿素

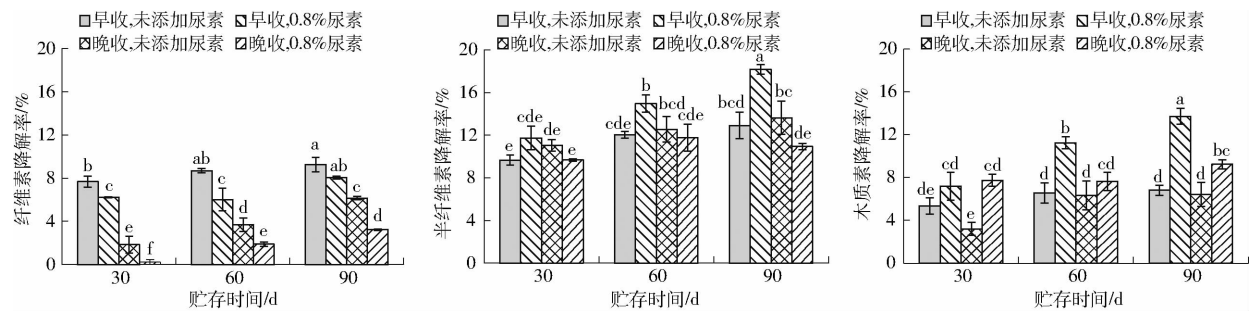


图3 芦竹青贮过程中的纤维素、半纤维素和木质素降解率

Fig. 3 Degradation of cellulose, hemicellulose and lignin of giant reed during ensilage

辅助进一步提高了早收芦竹青贮过程中半纤维素的降解率,贮存30、60、90 d后半纤维素的降解率分别显著($p < 0.05$)增加了17.6%、19.5%和40.6%。然而,尿素辅助却使晚收芦竹青贮过程中半纤维素的降解率略微降低。两次收获的芦竹在尿素辅助青贮过程中表现出的半纤维素降解的差异主要与青贮稳定性相关。早收芦竹青贮过程相对不稳定,尿素辅助一定程度上降低了芦竹青贮DM损失,但青贮过程中可能存在的酵母、霉菌、梭菌等腐败微生物的活动增加了半纤维素的降解。

早收和晚收芦竹青贮30 d时木质素的降解率分别为5.3%和3.2%,当贮存时间达到60 d时,其木质素降解率都增加到6.5%左右,并在随后的60~90 d的过程中变化不大。尿素辅助使早收芦竹中木质素降解率显著($p < 0.05$)提高,贮存30、60、90 d后木质素的降解率分别增加了34.6%、70.9%和101.3%。而尿素辅助使晚收芦竹贮存30 d的木质素降解显著增加141.6%,当贮存时间由30 d延长到90 d,其木质素降解率无显著变化($p > 0.05$),相对于未添加尿素组,木质素降解率提高了43.8%,主要是由于木质素的大幅度降解主要发生在青贮不稳定阶段,而晚收芦竹青贮30 d内基本达到稳定,抑制了微生物的活动。然而,贮存过程中木质素的降解也依赖于原料不同而呈现出较大的差异。例如,在玉米或蚕豆青贮过程中未见木质素的降解,大麻青贮4个月观察到3%~4%的木质素降解,向大麻中添加尿素的青

贮过程中也观察到木质素的降解增加^[16]。以上结果表明,尿素辅助处理有助于提高芦竹青贮过程中木质素的降解率,尤其对于青贮效果不佳的过程(例如早收芦竹)。另外,木质素的降解一定程度上破坏了细胞壁结构,从而有利于提高生物物质后续厌氧消化过程中半纤维素和半纤维素的可生化性。

2.4 尿素辅助青贮对芦竹产甲烷性能的影响

未青贮和青贮30、60、90 d的芦竹经过厌氧消化30 d后的累积甲烷量如图4所示。早收与晚收芦竹(0 d)的累积甲烷产量分别约为165.8 L/kg和147.3 L/kg。文献[28]报道芦竹经由液态厌氧消化的累积甲烷产量为150.8 L/kg,文献[29]报道夏季和秋季两次收获的芦竹的产甲烷潜力分别为148.1 L/kg和169.7 L/kg。与10月收获芦竹相比,青贮和未青贮的早收芦竹经厌氧消化的最大日产甲烷和累积产甲烷量都显著高于晚收芦竹(图4和图5)。两者厌氧消化性能的差异主要来源于不同收获时间导致的芦竹生物质组分差异,相对晚收芦竹,早收芦竹中可转化成甲烷的成分(如粗蛋白、纤维素和半纤维素)的含量较高,而木质素含量稍低,原料的可生化性相对较高(表1)。如图4所示,青贮过程显著提高了芦竹的累积甲烷产量,且甲烷产量随着青贮时间的延长而增加。与未青贮芦竹相比,早收和晚收的芦竹尿素辅助青贮90 d后进行厌氧消化的累积甲烷产量分别提高了25.6%和17.4%(图4),最大日产甲烷量相应地增加16.0%

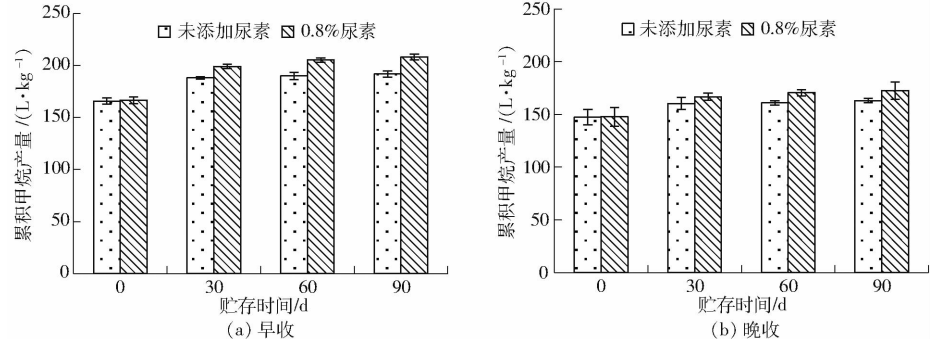


图4 尿素辅助青贮对芦竹累积甲烷产量的影响

Fig. 4 Effect of urea addition and ensilage on cumulative methane yield of giant reed

和 13.8% (图 5)。另外,尿素辅助青贮的早收和晚收芦竹厌氧消化 4~6 d 后沼气中甲烷体积分数分别保持在 71.5%~75.9% 和 64.1%~69.5% 的范

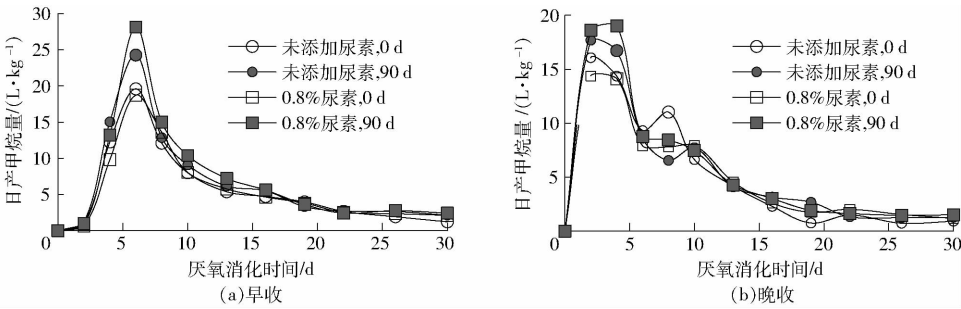


图 5 尿素辅助青贮对芦竹日产甲烷量的影响
Fig. 5 Effect of urea addition and ensilage on daily methane yield of giant reed

青贮过程对后续厌氧消化产甲烷潜力的贡献主要取决于青贮效果及其 DM 损失。文献[7]报道通过青贮可提高不同牧草(黑麦草和牧草混合,红三叶草和草地羊茅)的甲烷产量高达 19%,文献[30]研究发现青贮对海黍子马尾藻厌氧消化产甲烷量没有显著影响。然而,青贮过程控制不理想则会导致产甲烷量的降低,例如文献[31]采用沟槽和筒仓袋两种方式青贮芦竹的产甲烷潜力分别下降了 20.1% 和 7.6%。在本试验中,尿素添加辅助青贮有效地提高了厌氧消化过程中的甲烷浓度和甲烷产量,主要归因于两方面:一方面,尿素辅助青贮过程中产生的乳酸、乙酸等有机副产物,为厌氧消化过程中产甲烷微生物提供了更多的可直接利用的底物,从而有利于提高沼气中甲烷浓度;另一方面,尿素辅助提高了青贮过程中的木质素的降解,有效地降低了青贮原料的抗性^[6],其纤维素和半纤维素的部分降解产物葡萄糖等也能够为青贮乳酸菌和厌氧消化微生物所利用,从而提高了后续的甲烷转化效率。另外,尿素辅助处理所降低的芦竹青贮过程中的 DM 损失,对于提高青贮芦竹总甲烷产量的影响也

是重要的。围,且甲烷含量都略高于未青贮的芦竹(未给出图表数据)。可见,尿素辅助青贮能够有效提高原料的厌氧消化产甲烷性能。

2.5 青贮发酵产物与产甲烷相关性分析

青贮过程中典型的生物转化过程是乳酸菌利用 WSC 进行乳酸发酵产生大量的乳酸、乙酸、丙酸、丁酸、乙醇等发酵产物,这些发酵产物中的乙酸可以直接被沼气微生物利用转化成甲烷,而其他产物乳酸、丙酸、丁酸、乙醇等都能在后续 AD 过程中被乙酸菌进一步转化成乙酸再被产甲烷菌所利用。对两次收获芦竹青贮过程中的主要发酵产物与厌氧消化产甲烷量进行相关性分析(图 6),累积甲烷产量与乳酸、乙酸、乙醇质量比之间具有较强的线性正相关关系;且在累积甲烷产量与乳酸、乙酸和乙醇的混合产物质量比之间观察到了更强的线性正相关关系。考虑到丁酸和丙酸浓度低,浓度变化不稳定,可能导致较大的系统分析误差,本部分未进行丁酸和丙酸与累积甲烷产量之间的相关性分析。由相关性分析结果可知,青贮芦竹厌氧消化过程中增加的甲烷产量与青贮乳酸发酵产物的累积浓度密切相关,定向调控青贮过程中发酵产物向乳酸、乙酸和乙醇转化的方向有利用促进后续厌氧消化产甲烷。此外,尿素辅

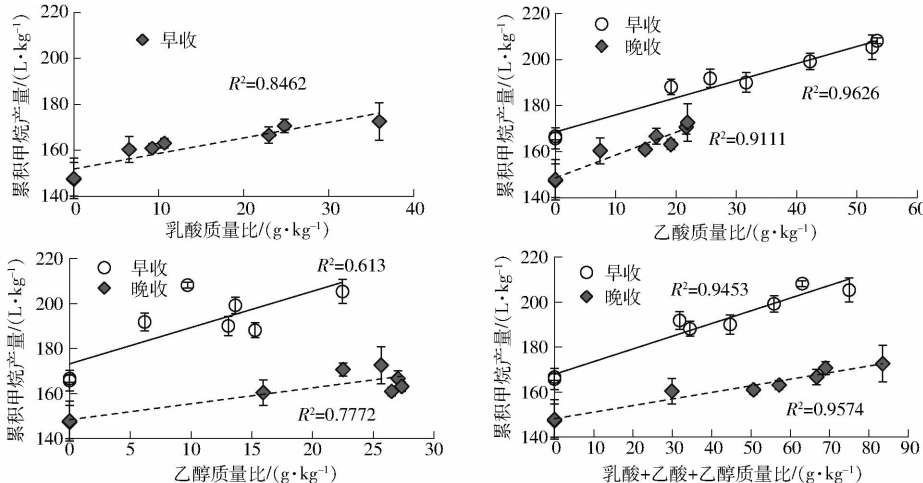


图 6 AD 中累积甲烷产量与青贮有机酸和乙醇含量之间的相关性

Fig. 6 Correlations between cumulative methane yield of AD and contents of organic acids and ethanol from ensilage

助青贮作为一种可替代的原料贮存同步预处理方法,在木质纤维素生物质的厌氧消化应用方面具有一定的潜力。

3 结论

(1)由于不同时间收获的芦竹组分中WSC含量差异较大,尿素辅助对芦竹青贮过程乳酸等发酵产物分布的影响不同。对于WSC含量较低的早收芦竹,青贮过程中未见乳酸累积,异型乳酸发酵占主导地位,尿素辅助大幅增强乙酸的累积;而WSC含量相对较高的晚收芦竹,尿素辅助使发酵产物向乳酸累积的方向进行,并抑制了乳酸的次级代谢。

(2)尿素添加有效降低了早收芦竹青贮过程中的DM损失,提高了原料的贮存稳定性。尿素添加有利于降低芦竹青贮过程中纤维素降解并增加木质素降解,从而进一步降低芦竹原料的抗性,达到原料贮存同步预处理的目的。不同时间收获的芦竹尿素辅助青贮过程中木质纤维素降解差异显著。

(3)尿素辅助青贮显著提高芦竹后续厌氧消化过程中最大日产甲烷量和累积甲烷产量。厌氧消化过程中所增加的甲烷产量,主要归因于青贮过程中所产生的乳酸发酵产物以及木质素降解所提高的原料的可生化性。尿素辅助处理在沼气原料的青贮应用上具有一定的潜力。

参 考 文 献

- [1] SGROI F, TRAPANI A M D, FODERÀ M, et al. Economic performance of biogas plants using giant reed silage biomass feedstock [J]. *Ecological Engineering*, 2015, 81: 481–487.
- [2] 侯新村, 范希峰, 朱毅, 等. 能源草沼气发酵应用潜力及应用前景[J]. *应用基础与工程科学学报*, 2014, 22(3): 426–434.
HOU Xincun, FAN Xifeng, ZHU Yi, et al. Application potential of bioenergy grass for biomethane generation via fermentation [J]. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2014, 22(3): 426–434. (in Chinese)
- [3] GE X, XU F, VASCO-CORREA V, et al. Giant reed: a competitive energy crop in comparison with miscanthus [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 54: 350–362.
- [4] LEMÕES J S, SILVA C F L, AVILA S P F, et al. Chemical pretreatment of *Arundo donax* L. for second-generation ethanol production[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2018, 31: 67–74.
- [5] ZHAO C, CAO Y, MA Z, et al. Optimization of liquid ammonia pretreatment conditions for maximizing sugar release from giant reed (*Arundo donax* L.) [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2017, 98: 61–69.
- [6] LIU S, XU F, GE X, et al. Comparison between ensilage and fungal pretreatment for storage of giant reed and subsequent methane production[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 209: 246–253.
- [7] PAKARINEN O, LEHTOMÄKI A, RISSANEN S, et al. Storing energy crops for methane production: effects of solids content and biological additive[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(15): 7074–7082.
- [8] WU P, LI L, JIANG J, et al. Effects of fermentative and non-fermentative additives on silage quality and anaerobic digestion performance of *Pennisetum purpureum* [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 297: 122425.
- [9] NI K, WANG F, ZHU B, et al. Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 238: 706–715.
- [10] RAGAGLINI G, DRAGONI F, SIMONE M, et al. Suitability of giant reed (*Arundo donax* L.) for anaerobic digestion: effect of harvest time and frequency on the biomethane yield potential[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 152: 107–115.
- [11] BORSO F D, MARZO C D, ZULIANI F, et al. Harvest time and ensilage suitability of giant reed and miscanthus for biomethane production and characterization of digestate for agronomic use[J]. *Agronomy Research*, 2018, 16(1): 22–40.
- [12] LIU S, GE X, LIU Z, et al. Effect of harvest date on *Arundo donax* L. (giant reed) composition, ensilage performance, and enzymatic digestibility[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 205: 97–103.
- [13] GUEDES C M, RODRIGUES M M, GOMES M J, et al. Urea treatment of whole-crop triticale at four growth stages: effects on chemical composition and on in vitro digestibility of cell wall[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86(6): 964–970.
- [14] SARWAR M, KHAN M A, NISA M U, Effect of organic acids or fermentable carbohydrates on digestibility and nitrogen utilisation of urea-treated wheat straw in buffalo bulls[J]. *Crop and Pasture Science*, 2004, 55(2): 223–228.
- [15] IBRAHIM M N M, WIJERATNE A M U, COSTA M J I. Effect of different sources of urease on the treatment time and digestibility of urea-ammonia treated rice straw[J]. *Agricultural wastes*, 1985, 13(3): 197–205.
- [16] 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): 20.
- [17] APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater[S]. American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA, 2005.
- [18] SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass[R]. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008.
- [19] HOLZER M, MAYRHUBER E, DANNER H, et al., The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation[J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(6): 282–287.
- [20] KREUGER E, NGES I A, BJÖRNSSON L. Ensiling of crops for biogas production: effects on methane yield and total solids determination[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4(1): 44.

[18] 周亮,慕号伟,马海蛟,等. 基于卷积神经网络的中国北方冬小麦遥感估产[J]. 农业工程学报,2019,35(15):119–128.
ZHOU Liang, MU Haowei, MA Haijiao, et al. Remote sensing estimation on yield of winter wheat in North China based on convolutional neural network[J]. Transactions of the CSAE, 2019,35(15):119–128. (in Chinese)

[19] 赵志衡,宋欢,朱江波,等. 基于卷积神经网络的花生籽粒完整性识别算法及应用[J]. 农业工程学报,2018,34(21):195–201.
ZHAO Zhiheng, SONG Huan, ZHU Jiangbo, et al. Identification algorithm and application of peanut kernel integrity based on convolution neural network[J]. Transactions of the CSAE,2018,34(21):195–201. (in Chinese)

[20] 祝诗平,卓佳鑫,黄华,等. 基于 CNN 的小麦籽粒完整性图像检测系统[J/OL]. 农业机械学报,2020,51(5)36–42.
ZHU Shiping, ZHUO Jiaxin, HUANG Hua, et al. Wheat grain integrity image detection system based on CNN[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(5)36–42. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20200504&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.05.004. (in Chinese)

[21] 谢为俊,丁洽春,王凤贺,等. 基于卷积神经网络的油茶籽完整性识别研究[J/OL]. 农业机械学报,2020,51(7):13–21.
XIE Weijun, DING Yechun, WANG Fenghe, et al. Integrity recognition of camellia oleifera seeds based on convolutional neural network[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2020,51(7):13–21. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20200702&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.07.002. (in Chinese)

[22] 张思雨,张秋菊,李可. 采用机器视觉与自适应卷积神经网络检测花生仁品质[J]. 农业工程学报,2020,36(4):269–277.
ZHANG Siyu, ZHANG Qiuju, LI Ke. Detection of peanut kernel quality based on machine vision and adaptive convolution neural network[J]. Transactions of the CSAE, 2020,36(4):269–277. (in Chinese)

[23] MICHA K, PRZEMYSAW G, PIOTR M S. Varietal classification of barley by convolutional neural networks[J]. Biosystems Engineering, 2019,184:155–165.

[24] SHANWEN Z, WENZHUN H, CHUANLEI Z. Three-channel convolutional neural networks for vegetable leaf disease recognition[J]. Cognitive Systems Research,2019,53:31–41.

[25] 赵立新,侯发东,吕正超,等. 基于迁移学习的棉花叶部病虫害图像识别[J]. 农业工程学报,2020,36(7):184–191.
ZHAO Lixin, HOU Fadong, LÜ Zhengchao, et al. Image recognition of cotton leaf diseases and pests based on transfer learning[J]. Transactions of the CSAE,2020,36(7):184–191. (in Chinese)

[26] HINTON G E, SRIVASTAVA N, KRIZHECVSKY A, et al. Improving neural networks by preventing co-adaptation of feature detectors[J]. Computer Science, 2012,3(4):212–223.

[27] SRIVASTAVA N, HINTON G, KRIZHECVSKY A, et al. Dropout: a simple way to prevent neural networks from overfitting[J]. Journal of Machine Learning Research,2014,15(1):1929–1958.

(上接第 428 页)

[21] ZHENG Y, YU C, CHENG Y, et al. Effects of ensilage on storage and enzymatic degradability of sugar beet pulp[J]. Bioresource Technology, 2011,102(2):1489–1495.

[22] DRIEHUIS F, ELFERINK S, SPOELSTRA S. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87(4):583–594.

[23] ELFERINK S, KROONEMAN J, GOTTSCHAL J C, et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1):125–132.

[24] WARNECKE T, GILL R T. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications[J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4(1):25.

[25] HOFVENDAHL K, HAHN-HÄGERDAL B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources (1) [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000,26(2):87–107.

[26] REN H, RICHARD T L, CHEN Z, et al. Ensiling corn stover: effect of feedstock preservation on particleboard performance[J]. Biotechnology Progress, 2006,22(1):78–85.

[27] YAHAYA M S, KIMURA A, HARAI J, et al. Effect of length of ensiling on silo degradation and digestibility of structural carbohydrates of lucerne and orchardgrass[J]. Animal Feed Science and Technology, 2001, 92(3):141–148.

[28] YANG L,LI Y. Anaerobic digestion of giant reed for methane production[J]. Bioresource Technology, 2014, 171:233–239.

[29] BALDINI M, BORSO F D, FERFUIA C, et al. Ensilage suitability and bio-methane yield of *Arundo donax* and *Miscanthus × giganteus*[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 95:264–275.

[30] MILLEDGE J J, HARVEY P J. Ensilage and anaerobic digestion of *Sargassum muticum*[J]. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(5):3021–3030.

[31] CORNO L, PILU R, CANTALUPPI E, et al. Giant cane (*Arundo donax* L.) for biogas production: the effect of two ensilage methods on biomass characteristics and biogas potential[J]. Biomass and Bioenergy, 2016, 93:131–136.