

基于卧式厌氧装置的稻秸高固态消化与甲烷菌变化研究

邓玉营^{1,2} 阮文权^{1,3} 黄振兴^{1,3} 缪恒峰^{1,3} 赵明星^{1,3} 施万胜^{1,3}

(1. 江南大学环境与土木工程学院, 无锡 214122; 2. 常州工程职业技术学院, 常州 213164;

3. 江南大学江苏省厌氧生物技术重点实验室, 无锡 214122)

摘要: 针对单一稻秸高固态厌氧消化长期运行不稳的问题, 接种瘤胃内含物和厌氧污泥, 在卧式反应装置中研究3个有机负荷(OLR)下消化特性。结果表明, 体系最高容积产气率达到了1.04 L/(L·d)。当OLR为2.26 g/(L·d)时, 甲烷体积分数均值为54.39%, 甲烷产率为280.90 mL/g, 达到了稻秸理论产值的80.29%。卧式装置中半纤维素和纤维素最高降解率分别达到了49.71%和31.25%; 纤维素酶活性显著提高, 有利于纤维素的降解。当OLR升高到2.47 g/(L·d)时, 氨氮质量浓度均值达到了1 082.63 mg/L。固体样品中嗜氢型 Methanobacteriales 数量从 1.70×10^9 拷贝数/g 下降至 1.04×10^6 拷贝数/g; 而嗜乙酸型 Methanosarcinales 数量从 7.89×10^6 拷贝数/g 增加至 9.44×10^6 拷贝数/g, 甲烷产率下降为256.54 mL/g。此时厌氧装置中丙酸质量浓度均值达到了253.32 mg/L。从而明确了稻秸高固态体系中产甲烷菌结构的变化。

关键词: 卧式反应装置; 稻秸; 高固态消化; 甲烷菌群

中图分类号: S216.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2017)07-0272-08

High Solid-state Digestion of Rice Straw and Changes of Methanogens in Horizontal Anaerobic Reactor

DENG Yuying^{1,2} RUAN Wenquan^{1,3} HUANG Zhenxing^{1,3} MIAO Hengfeng^{1,3} ZHAO Mingxing^{1,3}
SHI Wansheng^{1,3}

(1. School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. Changzhou Vocational Institute of Engineering, Changzhou 213164, China

3. Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Instability of high solid-state anaerobic digestion often happened during the long-term operation of reactor. To investigate underlying mechanism of this problem, the characteristics of semi-continuous anaerobic digestion for rice straw were studied with three organic loading rates (OLR) in a horizontal reactor, when being co-inoculated with ruminal contents and anaerobic sludge. The results indicated that the highest volume biogas production reached 1.04 L/(L·d) in the reactor. The average CH₄ productivity reached 280.90 mL/g VS with 54.39% CH₄ volume content at the OLR of 2.26 g/(L·d), which was up to 80.29% of the theoretical value of rice straw. The highest digestion rates of hemicellulose and cellulose were 49.71% and 31.25%, respectively. And the cellulase activities were increased obviously in the horizontal reactor, which was indispensable to the degradation of cellulose. At the OLR of 2.47 g/(L·d), the average concentration of ammonium nitrogen reached 1 082.63 mg/L. Especially the highest concentration reached 1 196.37 mg/L after 192 d of operation. It was indicated that the methanogens suffered different influences from ammonium nitrogen using quantitative real-time PCR (Q-PCR). Specifically, the hydrogenotrophic Methanobacteriales was decreased to 1.04×10^6 copies/g from 1.70×10^9 copies/g dominated in the solid residues and CH₄ productivity was decreased to 256.54 mL/g for being inhibited significantly. In contrast, the acetotrophic Methanosarcinales was increased to 9.44×10^6 copies/g from 7.89×10^6 copies/g. At the same time, the average propionate concentration reached 253.32 mg/L in the anaerobic reactor. Thus the study revealed the adaptive shifts of underlying methanogenic communities by ammonium nitrogen inhibition during the high solid-state digestion of rice straw.

Key words: horizontal reactor; rice straw; high solid-state digestion; methanogenic community

收稿日期: 2017-05-16 修回日期: 2017-05-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(51678279、21506076)、“十二五”国家科技支撑计划项目(2014BAC25B01)和常州工程职业技术学院校级科研基金项目(11130100116022)

作者简介: 邓玉营(1978—),男,博士生,常州工程职业技术学院讲师,主要从事秸秆厌氧发酵研究,E-mail: 8000000577@czie.edu.cn

通信作者: 阮文权(1966—),男,教授,博士生导师,主要从事大型厌氧工程设计及运行研究,E-mail: wqruanjn@gmail.com

引言

秸秆是含有纤维素、半纤维素、木质素等有机组分植物生物质的统称。CHANDRA 等^[1]分析了秸秆的多种生物转化途径,认为秸秆厌氧消化产甲烷比预处理后产酒精更具优势。而且沼气工程还可以减少秸秆焚烧、获得沼渣沼肥,综合效益显著。一般来讲,厌氧消化根据含固率的不同,分为湿式(L-AD)、半固态(S-AD)和固态(SS-AD),分别以含固率 10%、10%~20% 和大于 20% 来划分^[2]。也有研究将含固率 15% 作为划分 L-AD 和 SS-AD 的标准。传统秸秆沼气工程含固率大多在 6%~8% 之间,容积产气率在 0.8 m³/(m³·d) 左右。而高固态消化工艺缓解了湿式消化存在的结壳和分层现象,因此被认为更适合秸秆的厌氧消化^[3]。常见的有车库型工艺^[4]、高温的 Dranco 和 Kompogas 工艺^[5]及中温的 Valorga 工艺^[6]。商业化运行的高固态厌氧工艺能显著提高容积产气率 and 经济效益。

但高固态工艺影响沼液的流变状态^[7],易造成代谢物扩散障碍^[8]等问题。出现挥发性脂肪酸(VFAs)积累,从而造成体系“酸中毒”现象^[9]。研究者常通过提高接种比^[10]和沼液回流等^[11]措施强化厌氧菌群,实现厌氧消化效率的提高。但长期运行中出现有毒物质积累^[12-13]、氨氮抑制^[14-15]等问题,影响甲烷菌和产甲烷活性,导致沼气反应器运行不稳^[16]。在单一稻秸高固态体系中,厌氧消化特性研究较少;定量分析甲烷菌数量及类型是研究其适应性变化的有效手段,但未见相关报道。

为此,本研究利用卧式高固态反应装置,接种瘤胃内含物和厌氧污泥,维持含固率在(15±2)% ,考察长期运行中,稻秸高固体厌氧消化特性;并借助绝

对定量 PCR(Q-PCR)技术,揭示甲烷菌群在不同有机负荷下的适用性变化。

1 材料和方法

1.1 接种物与秸秆原料

接种用厌氧污泥来源于处理餐厨废弃物的厌氧反应器(江苏洁净环境技术有限公司,中国)。从无锡生牛屠宰场收集新鲜瘤胃内含物(包括粗料),与厌氧污泥按挥发性固体质量比 1:1 混合,以获得高效厌氧菌群。稻秸在 50℃ 干燥箱中至恒质量,用 400 型铡草粉碎机(丽丽食品机械设备,中国)粉碎后过 20 目筛保存在塑料干燥袋中备用。接种物和稻秸的主要特性如表 1 所示。

表 1 接种物和稻秸原料的总固体质量分数、挥发性固体质量分数和碳氮比

Tab.1 TS, VS and C/N ratio of inocula and rice straw

样品名称	总固体质量 分数/%	挥发性固体 质量分数/%	碳氮比
瘤胃内含物	15.15±1.72	12.13±0.12	12.48±0.01
厌氧污泥	13.90±1.32	6.90±0.43	7.36±0.03
稻秸	96.91±0.21	86.12±0.21	46.96±2.17

注:表中数据为平均值±标准差,重复数 n=3。

1.2 反应装置运行

为保证高固态进出料和沼液的均质化,本研究设计卧式高固态反应装置(图 1)。进出料采用螺旋带式,保证高固态物料的输送。通过罐体中间搅拌轴缓慢转动使沼液形成垂直混合和水平推流的复合流态。采用伴热带(北京中海华光电伴热技术公司,中国)加热,100 mm 厚的玻璃棉毡进行罐体保温,使用 LML-1 湿式气体流量计(长春汽车滤清器有限公司,中国)进行沼气体积测定。

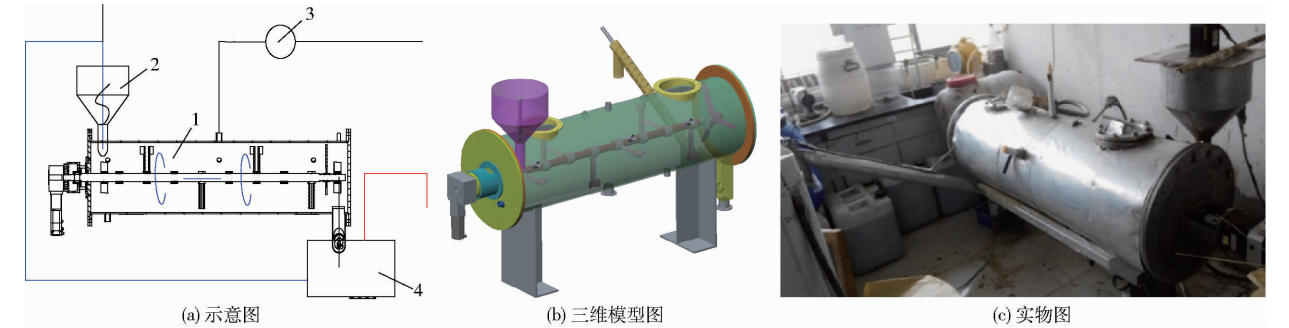


图 1 卧式反应装置
Fig.1 Horizontal reactor

1. 搅拌装置 2. 进料装置 3. 沼气测定装置 4. 出料装置

采用全接种半连续进出料的运行方式^[10],搅拌轴转速 5 r/min,料液有效体积 190 L。接种泥接入反应器后驯化 10 d,产气稳定后正式运行。根据有机负荷(OLR)的不同分为 3 个阶段,分别为 1.89、

2.26、2.47 g/(L·d),为保持体系含固率在(15±2)% 范围内波动,每两天排沼液量分别设为 2.56、3.05、3.41 kg,每个阶段运行 72 d。沼液倒入 100 目滤网袋,放入脱水装置(海尔,中国)中甩干。固渣

用于组分分析;沼液留样后,按照自来水与沼液比 0.58:1来补充损失水分,回流至反应器中。每 2 d 记录一次沼气体积,并用 Gasboard-3200L 型红外甲烷测定仪(武汉四方光电科技有限公司,中国)分析甲烷含量。

1.3 理化指标分析

沼液总固体质量分数(TS)和挥发性固体质量分数(VS)根据 APHA 规定的方法测量^[17]。沼渣于 105℃干燥后研磨过 100 目筛网,在 VarioEL 元素分析仪(Elementar,德国)中测定稻秸 C、N、H 及 S 含量,O 元素含量通过总值减去其它元素比例得到;并每 8 d 测定一次总样品碳氮比。固渣组分变化用 A2000i 型纤维分析仪(ANKOM,美国)测定,分析过程中中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)及酸不溶性木质素(ADL)残渣都在 65℃干燥箱中干燥至质量恒定;每个运行阶段测定 8 个样品。

沼液 5 000 r/min 离心 15 min,用超纯水稀释后用于氨氮、水解酶活、VFAs 浓度及总挥发性脂肪酸和碱度比(TVFA/TIC)测定,每个样品重复 3 次。氨氮浓度使用纳氏法测定^[17]。纤维素酶和木聚糖酶活性根据 SAMBUSITI 等^[18]的方法测定,单位为 U/mL。每毫升每分钟上清液释放 1 μg 葡萄糖(木糖)的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。样品在 VFAs 测定前按同体积与 0.83 g/L 4-甲基戊酸和 3 mol/L 磷酸混合后,4 800 r/min 离心 10 min;所得上清使用 GC-2010 Plus(岛津,日本)测定 VFAs 浓度,温度设定参照 LIU 等^[19]的方法。

为及时反映体系运行状况,采用两点滴定法测定 TVFA/TIC 比值^[20]:使用 0.05 mol/L 硫酸作为标准液,滴定经稀释的沼液,分别记录滴定至 pH 值 5.0 和 4.4 时的耗硫酸量。总挥发性脂肪酸质量浓度(TVFA)和碱度(TIC)计算式为

$$T = \left(\frac{20}{V} M_{VFA} \times 1.66 - 0.15 \right) \times 500 \tag{1}$$

$$C = \frac{20}{V} M_{TIC} \times 250 \tag{2}$$

式中 V——体积,为 30 mL

M_{VFA} ——pH 值从 5.0 滴定至 4.4 所耗硫酸量,mL

M_{TIC} ——pH 值滴定至 5.0 时所耗硫酸量,mL

1.4 甲烷菌绝对定量 Q-PCR

每个阶段选取 3 个样品用于 DNA 提取,提取步骤按照 Power soil® DNA 试剂盒(Mo Bio,美国)说明书操作。以表 2^[21]中引物分别对同一个样品 DNA 进行 PCR 扩增,程序为:95℃预变性 3 min,95℃变

性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,循环 40 次;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,切胶回收;直接与 pMD19-T 载体连接,热击转化并进行蓝白斑筛选。提取阳性质粒 DNA,送苏州金唯智生物有限公司(苏州,中国)测序鉴定。用紫外分光光度计测定质粒 DNA 浓度,并计算各目标甲烷菌拷贝数

$$N = \frac{6 \times 10^{23} A}{660 B} \tag{3}$$

式中 A——基因片段浓度

B——基因片段长度

表 2 绝对定量 Q-PCR 引物序列和片段长度

Tab.2 Primer sequences and fragment sizes of absolute quantitative Q-PCR

目标甲烷菌	引物	引物序列(5'-3')	碱基长度/bp
总甲烷菌	ARC787	F: ATTAGATAC CCSBGTAGTCC	273
	ARC1059	R: GCCATGCAC CWCCTCT	
	MBT857	F: CGWAGGGAA GCTGTAACT	
甲烷杆菌目 (Methanobacteriales)	MBT1196	R: TACCGTCGT CCACTCCTT	343
	MSL812	F: GTAAACGAT RYTCGCTAGGT	
球菌目 (Methanosarcinales)	MSL1159	R: GGTCCCCAC AGWGTACC	354

质粒按 10 倍梯度稀释成 10⁹~10³拷贝数/μL 系列模板,以 SYBR Premix Ex Taq™ II (大连宝生物,中国)试剂建立 10 μL 反应体系,其中正反引物(10 μmol/L)各 0.4 μL、质粒模板 2 μL。每个样品重复 3 次,反应程序参考 STEINMETZ 等^[21]的方法设定。按 Step One PCR 仪操作自动采集荧光,获得每个 PCR 反应的阈值(Ct)。建立质粒拷贝数浓度与 Ct 值的定量标准曲线。然后根据每个样品中检测的 Ct 值,计算目标甲烷菌的数量,结果用每克固体样品中甲烷菌的拷贝数来表示。

1.5 统计分析

利用 SPSS 19.0 软件(IBM,美国)单因素方差分析(ANOVA)来确定显著性差异,p=0.05 作为阈值水平;对碳氮比及氨氮浓度进行皮尔逊(Pearson's)相关性分析。计算其理论甲烷潜力(M)^[22]。

$$M = 22.4 \times \frac{\frac{a}{2} + \frac{b}{8} - \frac{c}{4} - \frac{3d}{8} - \frac{e}{4}}{12a + b + 16c + 14d + 32} \times 1\,000$$

式中 a、b、c、d、e 为稻秸分子通式 C_aH_bO_cN_dS_e下标。

2 结果与讨论

2.1 沼气及甲烷产生

沼气产量和甲烷体积分数如图 2a 所示，第 1 阶段，在 10 ~ 18 d 时，沼气产量出现了 1 个峰值，在 208 ~ 218.5 L/d 范围内变动。而甲烷体积分数在 57.13% ~ 61.38% 范围内变动。随后甲烷含量下降，在 32 d 时，达到最低值 45.26%。从第 50 天开始甲烷体积分数稳定在 51.02% ~ 55.95% 范围内。

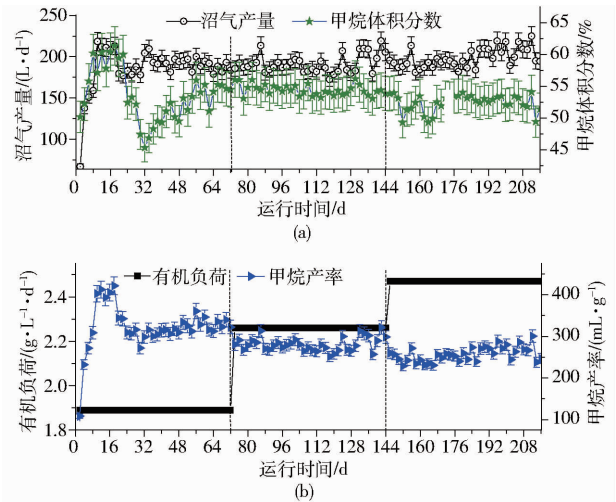


图 2 不同有机负荷下沼气产量、甲烷体积分数和甲烷产率的变化

Fig.2 Dynamic changes of biogas yields and CH₄ content, CH₄ productivities at different OLR

第 1 阶段同样在 10 ~ 18 d 时出现了产甲烷峰值(图 2b)，随后甲烷产率下降，在 32 d 附近降至 271.85 mL/g，50 d 后甲烷产率保持稳定，最终甲烷

产率均值达到了 321.88 mL/g。该阶段产甲烷的变化可以用厌氧消化底物的变化来解释。由于采用全接种，接种比例高。瘤胃接种物中包含内源蛋白、可溶性多糖等易降解物质，能首先被利用。而碳水化合物通式为(C₆H₁₀O₅)_n，蛋白质通式为(C₅H₇O₂)_n，根据 Buswell 方程^[3]，它们产生沼气的理论甲烷体积分数分别为 50% 和 60%。因此首先出现的产气峰和高比例的甲烷含量，主要来源于内源蛋白的降解。当该类物质逐渐被消耗，在 32 d 时甲烷含量和甲烷产率降至最低。从 50 d 开始，随着秸秆的水解，种间氢传递加快，产甲烷活性增强，甲烷产率维持稳定。

第 2 阶段，随着有机负荷由 1.89 g/(L·d) 提高到 2.26 g/(L·d)，甲烷体积分数在 53.01% ~ 56.16% 之间变动，稻秸水解产甲烷活性增强，甲烷产率均值稳定在 280.90 mL/g，与经过各种预处理后厌氧消化的产率(92 ~ 280 mL/g)相比，优势明显^[23]。元素分析仪测定结果表明，C、N、H、S 及 O 元素的比例分别为 0.85%、40.10%、5.94%、0.07% 及 53.03%，从而求出稻秸通式为 C_{54.88}H_{97.62}O_{54.43}NS_{0.04}。计算其理论甲烷产率为 349.86 mL/g，本阶段甲烷产率达到了理论产值的 80.29%。

第 3 阶段，随着有机负荷提高到 2.47 g/(L·d)，甲烷含量在 152 ~ 170 d 有明显的下降，最低值只有 49.25% (图 2a)，整个阶段甲烷体积分数均值为 52.36%。如图 2b 所示，甲烷产率首先下降，在 166 d 降至 230.49 mL/g，然后又有所升高，均值为 256.54 mL/g。3 个阶段容积产气率逐渐提高，分别达到了 0.98、1.01、1.04 L/(L·d) (表 3)。

表 3 卧式反应装置运行参数及水解酶活变化			
Tab.3 Changes of operational parameters and hydrolytic activities in the horizontal reactor			
运行参数	第 1 阶段	第 2 阶段	第 3 阶段
沼气产量/(L·d ⁻¹)	186.00 ± 25.96 ^c	191.26 ± 11.05 ^{ab}	198.24 ± 11.52 ^a
甲烷体积分数/%	53.59 ± 4.12 ^a	54.39 ± 0.85 ^a	52.36 ± 1.34 ^b
容积产气率/(L·(L·d) ⁻¹)	0.98 ± 0.14 ^c	1.01 ± 0.06 ^{ab}	1.04 ± 0.06 ^a
甲烷产率/(mL·g ⁻¹)	321.88 ± 53.21 ^a	280.90 ± 16.61 ^b	256.54 ± 17.54 ^c
碳氮比	17.55 ± 0.51 ^c	19.02 ± 0.23 ^b	21.65 ± 0.29 ^a
氨氮质量浓度/(mg·L ⁻¹)	877.74 ± 46.59 ^c	950.80 ± 34.63 ^b	1 082.63 ± 57.11 ^a
木聚糖酶活/(U·mL ⁻¹)	91.39 ± 19.50 ^c	191.58 ± 57.95 ^b	287.09 ± 57.21 ^a
纤维素酶活/(U·mL ⁻¹)	1 657.64 ± 106.58 ^c	2 632.18 ± 284.20 ^{ab}	2 165.19 ± 605.97 ^{ab}

注：表中数据为平均值 ± 标准差。产沼气(甲烷)数值，重复数 n = 36；碳氮比及氨氮质量浓度，重复数 n = 9；水解酶活，重复数 n = 8。同一行中不同上标字母表示显著性差异(p < 0.05)。

稻秸高固态条件下高效产甲烷可以从几方面来解释。首先，高固态消化需要更多的接种物，而本研究采用全接种方式提高了水解、产甲烷等功能菌群的数量，有利于稻秸的厌氧消化。如 FORSTER-

CARNEIRO 等^[10]在消化食品废弃物时，全接种方式同样提高了消化效率及甲烷产率。其次，稻秸复杂的结构导致其水解困难，是整个消化的限速步骤^[22]。而瘤胃内含物中含有大量的水解菌群，有利

于提高水解效率^[24]。另外,厌氧污泥的加入提高了甲烷菌的数量,加速了种间氢传递和嗜乙酸型产甲烷过程^[25]。如在稻秸瘤胃厌氧消化中,研究发现产甲烷污泥的投加能够实现产甲烷效率的提高^[26]。

2.2 TVFA/TIC 比值及 VFAs 的变化

VFAs 的积累易造成酸化,但体系中存在的碳酸盐、重碳酸盐及少量氨氮缓冲了 VFAs 的影响,这种缓冲能力可以用碱度来表示。根据 RAPOSO 等^[27]的报道,厌氧体系最理想的碱度范围为 2 500 ~ 5 000 mg/L,能缓冲 VFAs 浓度升高造成的影响,使 pH 值在小范围内变化。由此可见,pH 值对体系 VFAs 积累有一定的迟滞性;而 TVFA/TIC 比值常用于衡量体系缓冲能力,能及时预警酸化现象。当比值低于 0.4 时,表明体系产酸与产甲烷达到平衡,体系稳定;当比值高于 0.8 时,体系发生酸化现象^[28]。

如图 3 所示,本研究中前 2 个阶段,TVFA/TIC 平均比值都为 0.11,第 3 阶段比值为 0.16,表明反应运行都在稳定范围内。同时 TVFA/TIC 比还可以用于分析 OLR 的高低:比值在 0.3 ~ 0.4 之间有最佳的产甲烷效率;比值小于 0.3 或大于 0.4 表明负荷过低或过高^[28]。从 TVFA/TIC 实验数据看,本研究第 3 阶段 OLR 并不过载,不是导致甲烷产率下降的原因。

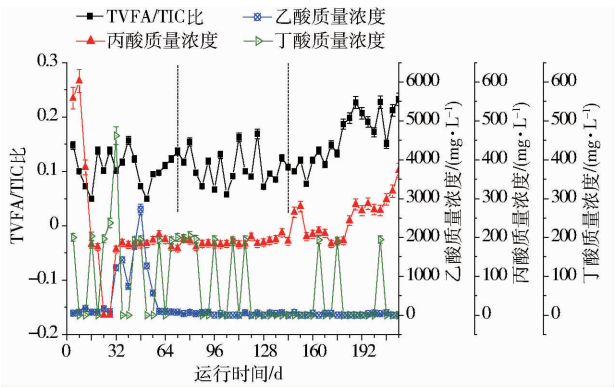


图 3 TVFA/TIC 比及 VFAs 质量浓度的变化
Fig. 3 Dynamic changes of TVFA/TIC ratio and VFAs concentrations

本研究中 VFAs 主要包括了乙酸、丙酸和丁酸。由于瘤胃接种物的影响,第 1 阶段存在 VFAs 积累现象,乙酸、丙酸和丁酸的平均质量浓度分别为 597.82、218.01、126.11 mg/L。随着产甲烷活性的提高,第 2 阶段 VFAs 积累减弱,质量浓度分别为 33.44、188.46、65.43 mg/L。但随着第 3 阶段有机负荷的提高,丙酸开始积累,平均质量浓度达到了 253.32 mg/L。尤其从第 188 天开始,浓度显著提高,在 268.7 ~ 372 mg/L 之间变动。

LERM 等^[29]在分析不同 OLR 条件下产酸代谢

途径时发现,OLR 升高会引起丁酸氧化加快,但超过了甲烷菌的代谢能力时,氢和还原性 NADH 不能及时利用,只能通过产丙酸途径获得释放。为此 AHRING 等^[30]提出 VFAs 的浓度和种类,尤其是丙酸和丁酸是产甲烷受抑制的重要指标。本研究第 3 阶段丙酸的积累同样说明产甲烷活性受到抑制,甲烷产率从第 2 阶段的 280.90 mL/g 降至 256.54 mL/g (表 3)。

2.3 碳氮比及氨氮质量浓度变化

氮是微生物重要的营养物质,根据 MUSSOLINE 等^[23]的报道,碳氮比在 25 ~ 35 之间有利于厌氧消化。而单一稻秸原料碳氮比为 46.96,含氮量低(表 1),导致其生物可降解性差。但共接种物中瘤胃内含物与厌氧泥碳氮比较高,分别为 12.48 和 7.36。采用沼液回流工艺,氮损失较少,可以满足微生物对氮源的需要^[11, 23]。如图 4 所示,3 个阶段的碳氮比分别在 16.70 ~ 19.95、17.82 ~ 20.15 及 20.27 ~ 23.93 之间变动。虽然比值显著升高($p < 0.05$),但整个过程完全能满足厌氧消化的需要。通过 Pearson's 相关性分析,碳氮比与氨氮质量浓度密切相关($p < 0.01$)。氨氮质量浓度在 3 个阶段同样逐渐升高,均值分别为 877.74、950.80、1 082.63 mg/L。尤其在第 3 阶段,装置运行 192 d 后,氨氮最高浓度达到了 1 196.37 mg/L。体系氨氮质量浓度的升高与厌氧微生物的代谢有关。由于接种物中部分微生物无法适应环境而衰亡,导致胞内有机氮分解释放到沼液中。这在厌氧消化玉米秸^[14]、混合秸秆^[15]的回流工艺中同样出现。本研究中第 3 阶段氨氮质量浓度尽管没有超过产甲烷抑制的阈值浓度 1 500 mg/L^[3, 31],但高的氨氮浓度会对嗜氢型和嗜乙酸型甲烷菌产生不同影响,并抑制产甲烷活性^[25, 32]。

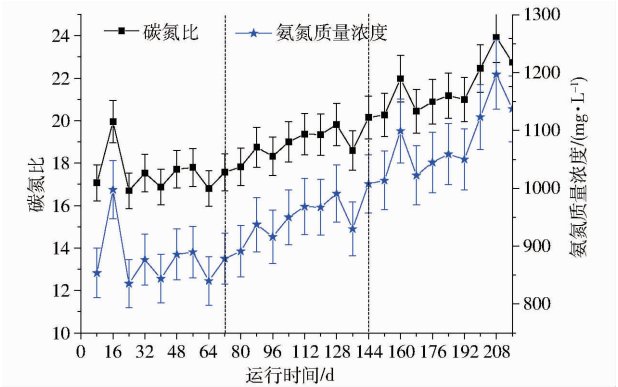


图 4 碳/氮比及氨氮质量浓度变化
Fig. 4 Changes of C/N ratio and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentrations

2.4 稻秸组分及水解酶活变化

如图 5 所示,3 个阶段中沼渣中半纤维素质量

分数分别为 9.89%、8.67%、9.69%；纤维素质量分数分别为 20.88%、17.58%、19.44%；木质素质量分数分别为 17.50%、17.69%、18.27%。和稻秸原料各组分相比,半纤维素的降解率分别为 42.62%、49.71%、43.79%,纤维素降解率分别为 18.34%、31.25%、23.99%。半纤维素的降解率比纤维素高,两者在第 2 阶段都有最高的降解率,与甲烷产率一致。这也说明了水解过程仍然是秸秆厌氧消化的限速步骤^[33],而高的降解率有利于产甲烷效率的提高。由于降解木质素的苯丙烷结构时需要底物氧,因此木质素在厌氧条件下难以降解^[1,23]。本研究各阶段中木质素含量比稻秸原料都略有升高,同样说明其不能被厌氧菌所利用。

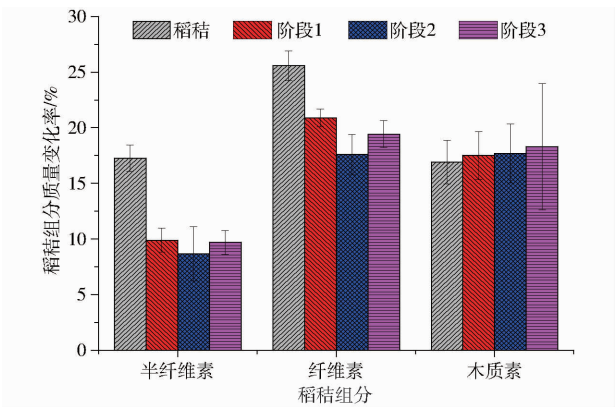


图 5 稻秸组分质量变化率

Fig. 5 Dynamic changes of rice straw components

水解酶活是表征秸秆水解特性的重要指标,在厌氧条件下主要包括了木聚糖酶和纤维素酶。如表 3 中所示,木聚糖酶活显著升高($p < 0.05$),第 3 阶段达到了最大值 287.09 U/mL。而纤维素酶在第 2 阶段有最高值 2 632.18 U/mL,第 3 阶段有所下降,和稻秸纤维素降解率一致。

从秸秆的结构来看,纤维素被木质素和半纤维

素共价形成的基质包裹,阻止了水解酶的降解^[1,23]。本研究中高半纤维素降解率有利于暴露出微纤维结构,利于水解酶对内部纤维素成分的降解^[34]。在高粱青贮饲料厌氧消化中,SAMBUSITI 等^[18]也认为木聚糖酶活峰值早于纤维素外切酶活,实现了对高粱不同组分的协同降解,加快了水解过程。另一方面,卧式反应装置的运行方式增加了未降解固渣的停留时间,同样有利于纤维素酶的水解作用,使得纤维素酶活显著高于木聚糖酶活。

2.5 不同类型甲烷菌数量的变化

3 个阳性克隆片段大小同预期结果基本一致,与 GenBank 数据库中已知的菌群序列相似性为 100%,分别利用重组质粒构建标准曲线。其中总甲烷菌拷贝数(X)与 Ct 值(Y)的回归方程为: $Y = -3.436\lg X + 41.072$,决定系数 $R^2 = 0.987$;Methanosarcinales 拷贝数(X)与 Ct 值(Y)的回归方程为: $Y = -3.135\lg X + 39.172$,决定系数 $R^2 = 0.9873$;Methanobacteriales 拷贝数(X)与 Ct 值(Y)的回归方程 $Y = -3.472\lg X + 40.885$,决定系数 $R^2 = 0.987$ 。其中 X 单位为拷贝数/ μL 。从而计算出 3 个阶段每克固体样品中甲烷菌的拷贝数。

Methanobacteriales 包括 *Methanobacterium*、*Methanobrevibacter* 及 *Methanospaera* 等嗜氢型甲烷菌,是典型瘤胃甲烷菌。而嗜乙酸型 Methanosarcinales 包含了 *Methanosarcina* 等甲烷菌菌属^[25]。通过两类不同营养型甲烷菌的变化,可以分析环境因素对产甲烷途径的影响^[21]。如表 4 所示,固体样品中总甲烷菌拷贝数逐渐降低,但在第 2、3 阶段差别不大。Methanobacteriales 拷贝数在 3 个阶段中逐渐降低,分别为 1.20×10^{10} 、 1.70×10^9 、 1.04×10^6 拷贝数/g。而 Methanosarcinales 拷贝数逐渐升高,在第 3 阶段数量高于 Methanobacteriales。

表 4 不同阶段甲烷菌数量的变化

Tab. 4 Changes of methanogens at different stages

拷贝数/g

甲烷菌类型	第 1 阶段	第 2 阶段	第 3 阶段
总甲烷菌	$(1.38 \pm 0.31) \times 10^{11a}$	$(3.62 \pm 2.95) \times 10^{10b}$	$(3.47 \pm 3.52) \times 10^{8b}$
Methanobacteriales	$(1.20 \pm 1.46) \times 10^{10a}$	$(1.70 \pm 2.33) \times 10^9a$	$(1.04 \pm 0.49) \times 10^6a$
Methanosarcinales	$(4.24 \pm 1.70) \times 10^6a$	$(7.89 \pm 10.10) \times 10^6a$	$(9.44 \pm 7.75) \times 10^6a$

注:表中数据为平均值 $\pm$ 标准差。重复数 $n = 3$ 。同一行中不同上标字母表示显著性差异($p < 0.05$)。

前两个阶段,主要甲烷菌类型为嗜氢型的 Methanobacteriales,稻秸水解产生的氢通过种间氢传递实现了产甲烷活性的提高。在稻秸瘤胃和厌氧污泥共培养研究中,同样发现体系中 *Methanobrevibacter* 成为优势菌属,与瘤胃水解菌能形成功能菌群。从而实现了水解和产甲烷活性的提

高^[26]。但厌氧消化中甲烷菌易受到环境条件的影响^[16]。Methanobacteriales 菌属大多呈杆状结构,倍增时间较长,易受到氨氮的抑制。高浓度氨氮产生的游离氨自由扩散进入细胞膜,破坏 K^+ 依赖型 ATP 离子泵的运行^[32,35],从而对微生物产生毒害。而

Methanosarcinales 结构是不规则的球菌,常形成包裹或聚合体结构,倍增时间短,对环境的适应性较强^[25]。本研究第 3 阶段,氨氮质量浓度达到 1 082.63 mg/L 时,嗜氢型的 Methanobacteriales 受到抑制,数量下降为 1.04×10^6 拷贝数/g,产甲烷活性随之降低。水解产生的还原氢不能被甲烷菌及时利用,造成丙酸积累^[29]。而嗜乙酸型的 Methanosarcinales 受到的抑制小,拷贝数反而增加至 9.44×10^6 拷贝数/g,成为主要甲烷菌类型,产甲烷途径发生变化。

3 结 论

(1)卧式厌氧装置 3 个阶段的容积产气率分别达到了 0.98、1.01、1.04 L/(L·d)。当稻秸 OLR 为 2.26 g/(L·d) 时,甲烷体积分数在 53.01% ~ 56.16% 之间变动,甲烷产率为 280.90 mL/g。

(2)第 1 阶段受到接种物的影响,VFAs 存在积累现象。当 OLR 升高到 2.47 g/(L·d)时,体系丙酸积累,平均质量浓度达到 253.32 mg/L;氨氮质量浓度升高到 1082.63 mg/L,甲烷产率降至 256.54 mL/g。

(3)3 个阶段半纤维素的降解率分别为 42.62%、49.71%、43.79%;纤维素降解率分别为 18.34%、31.25%、23.99%。木聚糖酶在第 3 阶段达到了最大值 287.09 U/mL;而纤维素酶在第 2 阶段达到了最大值 2 632.18 U/mL。

(4)3 个阶段中不同类型甲烷菌数量和比例发生了变化。固体样品中 Methanobacteriales 数量逐渐降低,分别为 1.20×10^{10} 、 1.70×10^9 、 1.04×10^6 拷贝数/g;而适应性强的 Methanosarcinales 数量逐渐增加,分别为 4.24×10^6 、 7.89×10^6 、 9.44×10^6 拷贝数/g。

参 考 文 献

1 CHANDRA R, TAKEUCHI H, HASEGAWA T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: a review in context to second generation of biofuel production[J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2012, 16(3): 1462 – 1476.

2 YANG L C. Challenges and strategies for solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass[J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2015, 44: 824 – 834.

3 KARTHIKEYAN O P, VISVANATHAN C. Bio-energy recovery from high-solid organic substrates by dry anaerobic bio-conversion processes: a review[J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2013, 12(3): 257 – 284.

4 TEN BRMMELERÉ. Full scale experience with the BIOCEL process[J]. Water Science & Technology, 2000, 41(3): 299 – 304.

5 WELLINGER A, WYDER K, METZLER A. KOMPOGAS—a new system for the anaerobic treatment of source separated waste [J]. Water Science & Technology, 1993, 27(2): 153 – 158.

6 LACLOS H F D, DESBOIS S, SAINT-JOLY C. Anaerobic digestion of municipal solid organic waste: valorga full-scale plant in Tilburg, The Netherlands[J]. Water Science & Technology, 1997, 36(6): 457 – 462.

7 吴树彪,黎佳茜,李伟,等.沼液回流对牛粪厌氧发酵产气特性及其动力学的影响[J/OL].农业机械学报,2015,46(10):241–246. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20151032&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2015.10.032.

WU Shubiao, LI Jiaxi, LI Wei, et al. Effect of liquid digestate recirculation on biogas production and fermentation kinetics for anaerobic digestion of cattle manure[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(10): 241 – 246. (in Chinese)

8 ABBASSI-GUENDOUZ A, BROCKMANN D, TRABLY E, et al. Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation[J]. Bioresource Technology, 2012, 111: 55 – 61.

9 LIOTTA F, ESPOSITO G, FABBRICINO M, et al. Methane and VFA production in anaerobic digestion of rice straw under dry, semi-dry and wet conditions during start-up phase[J]. Environmental Technology, 2016, 37(5): 505 – 512.

10 FORSTER-CARNEIRO T, PÉREZ M, ROMERO L I. Influence of total solid and inoculum contents on performance of anaerobic reactors treating food waste[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(15): 6994 – 7002.

11 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, 35(13): 7261 – 7266.

12 李东,叶景清,孙永明,等.稻草与牛粪混合连续厌氧消化制备生物燃气研究[J/OL].农业机械学报,2013,44(1):101–105,100. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20130120&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2013.01.020.

LI Dong, YE Jingqing, SUN Yongming, et al. Continuous anaerobic co-digestion of rice straw and cow manure for biogas production[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(1): 101 – 105,100. (in Chinese)

13 杜静,陈广银,黄红英,等.秸秆批式和半连续式发酵物料浓度对沼气产率的影响[J].农业工程学报,2015,31(15):201–207.

DU Jing, CHEN Guangyin, HUANG Hongying, et al. Effect of fermenting material concentration on biogas yield in batch and continuous biogas fermentation with straws[J]. Transactions of the CSAE, 2015,31(15):201 – 207. (in Chinese)

- 14 HU Y, SHEN F, YUAN H, et al. Influence of recirculation of liquid fraction of the digestate (LFD) on maize stover anaerobic digestion[J]. *Biosystems Engineering*, 2014, 127: 189 – 196.
- 15 邓玉营, 黄振兴, 阮文权, 等. 沼液回流比与有机负荷对秸秆厌氧发酵特性的影响[J/OL]. *农业机械学报*, 2016, 47(11): 198 – 206. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20161127&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2016.11.027.
- DENG Yuying, HUANG Zhenxing, RUAN Wenquan, et al. Effect of digestate recirculation ratio and organic loading rate on fermentation characteristics for anaerobic digestion of straw [J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2016, 47(11): 198 – 206. (in Chinese)
- 16 MATA-ALVAREZ J, DOSTA J, ROMERO-GÜIZA M S, et al. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2014, 36(C): 412 – 427.
- 17 APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater[M]. Washington, DC, US: American Public Health Association, 2005.
- 18 SAMBUSITI C, ROLLINI M, FICARA E, et al. Enzymatic and metabolic activities of four anaerobic sludges and their impact on methane production from ensiled sorghum forage[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 155: 122 – 128.
- 19 LIU X, LIU H, CHEN Y, et al. Effects of organic matter and initial carbon-nitrogen ratio on the bioconversion of volatile fatty acids from sewage sludge[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2008, 83(7): 1049 – 1055.
- 20 GUEBITZ G M, BAUER A, BOCHMANN G, et al. Biogas science and technology[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2015, 151: 171.
- 21 STEINMETZ R L, MEZZARI M P, DA S M, et al. Enrichment and acclimation of an anaerobic mesophilic microorganism's inoculum for standardization of BMP assays[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 219: 21 – 28.
- 22 PELLERA F M, GIDARAKOS E. Effect of substrate to inoculum ratio and inoculum type on the biochemical methane potential of solid agroindustrial waste[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2016, 4(3): 3217 – 3229.
- 23 MUSSOLINE W, ESPOSITO G, GIORDANO A, et al. The anaerobic digestion of rice straw: a review[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2013, 43(9): 895 – 915.
- 24 YUE Z B, LI W W, YU H Q. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 738 – 744.
- 25 DEMIREL B, SCHERER P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2008, 7(2): 173 – 190.
- 26 DENG Y, HUANG Z, RUAN W, et al. Co-inoculation of cellulolytic rumen bacteria with methanogenic sludge to enhance methanogenesis of rice straw[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 117: 224 – 235.
- 27 RAPOSO F, RUBIA M A D L, FERNÁNDEZ-CEGRÍ V, et al. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: an overview relating to methane yields and experimental procedures[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2012, 16(1): 861 – 877.
- 28 RAPOSO F, BORJA R, MARTÍN M, et al. Influence of inoculum-substrate ratio on the anaerobic digestion of sunflower oil cake in batch mode: process stability and kinetic evaluation[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2009, 149(1): 70 – 77.
- 29 LERM S, KLEYBÖCKER A, MIETHLING-GRAFF R, et al. Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload[J]. *Waste Management*, 2012, 32(3): 389 – 399.
- 30 AHRING B K, SANDBERG M, AGELIDAKI I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 43(3): 559 – 565.
- 31 OMIL F, MÉNDEZ R, LEMA J M. Anaerobic treatment of saline wastewaters under high sulphide and ammonia content[J]. *Bioresource Technology*, 1995, 54(3): 269 – 278.
- 32 SPROTT G D, SHAW K M, JARRELL K F. Ammonia/potassium exchange in methanogenic bacteria[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259(20): 12602 – 12608.
- 33 MONLAU F, BARAKAT A, TRABLY E, et al. Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2013, 43(3): 260 – 322.
- 34 HU J, ARANTES V, SADDLER J N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4(1): 36.
- 35 CHEN Y, CHENG J J, CREAMER K S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(10): 4044 – 4064.