

芦苇秸秆厌氧联产氢气甲烷过程中细菌群落演替规律

贾璇¹, 任连海¹, 李鸣晓^{2*}, 席北斗², 祝超伟², 赵由才³

(1.北京工商大学环境科学与工程系, 北京 100048; 2.中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室, 北京 100012;
3.同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 基于 PCR-DGGE 技术研究芦苇秸秆氢气-甲烷厌氧联产过程中, 细菌微生物群落结构特征和演替规律。结果表明, 厌氧联产过程中细菌群落结构分布存在明显的阶段性差异。产氢阶段初期, 细菌群落相似性较小, 随着厌氧联产的进行, 细菌种类逐渐增多并在产氢高峰期保持稳定, 群落相似性较高, 戴斯系数(Cs)为 83.6% (第 12、24 小时, 泳道 H3 和 H4)。产甲烷高峰期 Cs 值达到 87.4% (第 210、258 小时, 泳道 M6, M7), 群落结构稳定, 产甲烷末期 Cs 值降低至 51.5% (第 210、432 小时, 泳道 M6, M9)。序列分析表明, *Enterobacter aerogenes* 产气肠杆菌是具有高效产氢潜力的兼性厌氧细菌, *Sedimentibacter* 产氢产乙酸菌是产氢阶段的优势微生物。*Clostridium thermocellum* 嗜热纤维素菌是厌氧联产过程的优势微生物, 具有降解纤维素功能, 对芦苇秸秆的能量化利用起到重要作用。

关键词: 秸秆; 细菌; 氢气; 甲烷; 芦苇; 群落演替

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.04.028

中图分类号: X705

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2016)-04-0199-06

贾璇, 任连海, 李鸣晓, 席北斗, 祝超伟, 赵由才. 芦苇秸秆厌氧联产氢气甲烷过程中细菌群落演替规律[J]. 农业工程学报, 2016, 32(4): 199—204. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.04.028 http://www.tcsae.org
Jia Xuan, Ren Lianhai, Li Mingxiao, Xi Beidou, Zhu Chaowei, Zhao Youcai. Bacterial community structure succession in fermentative biohydrogen with methanogenesis integration from reed straw[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(4): 199—204. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.04.028 http://www.tcsae.org

0 引言

芦苇是湿地生态系统中主要植物之一, 在水质净化过程中起到重要的作用^[1]。其生长后期除部分用作饲料、燃料外, 大部分残体在水中腐解, 对水环境系统造成严重的二次污染, 加速了湿地沼泽化和水质恶化, 芦苇秸秆的资源化利用成为亟待解决的环境问题^[2]。芦苇秸秆中富含有机质和氮磷等营养元素, 粗纤维含量高, 是生物质能源化的理想原料, 利用厌氧生物处理技术联产氢气和甲烷是实现芦苇秸秆资源化利用的重要途径^[3-4]。厌氧联产是依据相分离原理, 将产氢阶段和产甲烷阶段分离, 获得氢气和甲烷 2 种能源, 能源转化效率最高可达 89%, 该工艺不仅避免了氢分压和酸化反馈抑制作用, 还解决了单相厌氧发酵底物利用效率低的难题^[5-7]。笔者近年来以水生植物等有机废弃物为对象, 研究了酸、碱、酶等不同预处理方法对氢气-甲烷联产的影响^[8-9]。但由于厌氧联产过程是由众多不同功能的微生物协同参与完成, 微生物群落结构复杂, 使微生物相互作用机制不清, 厌氧联产运行调控困难。

微生物群落结构的组成决定其所具有的生态功能, 对参与某一特定生物化学转化作用的微生物菌群的定性和定量研究, 对阐明反应机理及关键限速步骤具有重要意义^[10]。聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 技术为揭示厌氧发酵体系的微生物多样性提供了可能^[11-12]。由于该方法可在不改变样品环境的情况下, 同时对多个样品进行分析, 比较研究细菌群落在时间和空间上的动态变化, 还可以通过序列分析或探针杂交确定其中的种群组成, 因此被用于海洋、厌氧污泥、污水处理等环境微生物多样性的研究中^[13-16]。目前, 采用 PCR-DGGE 技术研究厌氧发酵过程中微生物群落变化主要集中在传统化粪池、单相厌氧消化工艺, 针对芦苇秸秆厌氧联产氢气-甲烷不同阶段, 细菌微生物群落结构和演替规律的研究鲜有报道。

本研究以芦苇秸秆为研究对象, 采用 PCR-DGGE 技术分析氢气-甲烷联产工艺不同阶段细菌群落结构特征, 探讨联产过程中细菌群落的演替规律, 以期厌氧发酵联产的微生物作用机理和生物强化研究提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 样品采集

芦苇样品采集自内蒙古乌梁素海, 将芦苇清洗后干燥, 破碎至 1~2 mm 备用, 芦苇干样含碳量 33.77%, 含氮量 0.57%, 总固体 (TS) 质量分数 98.68%, 挥发性固体 (VS) 质量分数 91.39%, 灰分质量分数 7.28%。接种污泥

收稿日期: 2015-06-09 修订日期: 2015-12-29

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划 (2014BAL02B05)

作者简介: 贾璇, 女, 河北石家庄人, 讲师, 博士, 主要从事固体废物资源化利用研究。北京 北京工商大学环境科学与工程系, 100048。

Email: jiaxuan@btbu.edu.cn

※通信作者: 李鸣晓, 男, 辽宁鞍山人, 副研究员, 博士, 主要从事固体废物资源化与二次污染控制研究。北京 中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室, 100012。Email: limingxiao8122@163.com

取自猪粪厌氧消化罐的厌氧消化污泥, 污泥去除大块杂物后过 30 目筛备用, 污泥含碳量 35.2%, 含氮量 3.06%, TS 质量分数 16.69%, VS 质量分数 11.97%, 灰分质量分数 4.72%。

将 32 g 芦苇干样经纤维素酶预处理 48 h 后, 接入 200 mL 厌氧消化污泥, 污泥添加量为发酵总体积的 12.5%, 调节初始 pH 值为 5, 37℃, 150 r/min 条件下进行氢气-甲烷联产。产氢阶段发酵周期为 4 d, 分别于 0、6、12、24、36、60、96 h 采集样品, 编号为 H1-H7; 产甲烷阶段发酵周期为 18 d, 分别于 42、66、90、114、162、210、258、306、432 h 采集样品, 编号为 M1~M9。

1.2 总 DNA 提取

采用 BIOTEKE 淤泥基因组 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA, 置于 -20℃ 保存备用。

1.3 细菌目的片段扩增

将纯化后的基因组 DNA 作为聚合酶链式反应的模板, 采用细菌特异性引物对 GC-F341 和 R534, 引物序列分别为 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' 和 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', GC 夹子结构 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCG GG-3'。

PCR 体系: 10×Buffer 5 μL、dNTP 4 μL、引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、模板 DNA 20~50 ng、Tag 聚合酶 (Takara, 大连) 1.5 U、灭菌高纯水补齐至 50 μL。

扩增条件: 采用 Touch Down PCR, 以增加产物的特异性。反应条件如下: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 56~65℃ 退火 1 min (退火温度从 65℃ 降到 56℃, 每个循环降低 1℃, 经 10 个循环后, 退火温度降至 56℃), 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 20 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.4 PCR-DGGE 分析

1) PCR 产物凝胶电泳及 DGGE

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测片段大小和浓度。取 20 μL PCR 产物 (约 200 ng) 与 10 μL 5×Loading buffer 混匀后进行电泳, 以去离子甲酰胺和尿素为变性剂, 其中细菌变性梯度为 40%~70%, 聚丙烯酰胺胶质量分数为 8%, 电压 20 V 预电泳 10 min, 电压 130 V 电泳 6 h, 温度恒定为 60℃。电泳结束后, 凝胶以 Gel-Red 染色剂染色 30 min, 洗涤数次后于 Bio-Rad USA 上扫描成像分析。

2) 条带回收及纯化

在 345 nm 波长下将优势差异条带和共性条带切下, 洗净后浸泡于装有高纯水的 2 mL 无菌离心管中, 捣碎后加入 60 μL TE 缓冲溶液, 4℃ 放置 24 h。取 5 μL 回收产物作为模板, 选用无 GC 夹子的上述 PCR 引物, 按 1.3 方法再次扩增。选用 TaKaRa Mini BEST DNA Fragment Purification Kit 进行 PCR 产物回收纯化。

3) 克隆测序

DNA 溶液全量为 10 μL, 加入 100 μL JM109 感受态细胞中, 再加入 890 μL SOC 培养基, 37℃ 振荡培养 60 min。于含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 平板培养基上培养, 形成单菌落。挑取克隆平板中的白色单菌落, 放入加相应抗性的 LB 培养液中, 37℃, 250 r/min, 培养 10~14 h。进行质粒提取, 采用 3730xl 测序仪测序。测

序结果提交 GenBank 并获得接受号。利用 BLASTN 程序对测序结果进行同源性分析, 获得相关种属的序列信息。

1.5 DGGE 图谱相似性分析

结合 ImageJ, Mathworks Matlab v7.1 以及 PAST 软件对 DGGE 图谱进行分析。首先用 ImageJ 软件对 DGGE 图谱数字化, 再以 Mathworks Matlab v7.1 软件对数字化凝胶进行补点处理, 最后用 PAST 软件选取欧几里德距离作为参数进行聚类分析。

1.6 分析方法

VS、TS、灰分采用称量法测定。累积产气量采用排水法测定, 氢气和甲烷含量采用 SP-6890 型气相色谱仪测定。挥发性脂肪酸 (VFAs) 采用 Clarus 500 型气相色谱仪, GC-FID 直接进样法测定。

2 结果与分析

2.1 累积产气量及中间产物变化情况

芦苇秸秆经纤维素酶预处理后进行厌氧联产氢气和甲烷, 图 1a 表示累积产气量随时间的变化规律, 酶解预处理组产氢阶段 0~12 h, 累积产气量迅速上升, 12 h 后产气量增速放缓, 产氢阶段最大累积产气量达到 42.5 mL/g, 是对照组的 3 倍, H₂ 体积分数 12 h 时最大, 达到 52.1%。在产甲烷阶段, 酶解预处理组累积产气量随时间稳定上升, 353 h 累积产气量最高, 达到 137.5 mL/g, 是对照组的 5 倍, CH₄ 体积分数最高为 68.4%。可见, 芦苇经纤维素酶预处理后氢气和甲烷产量显著提高。

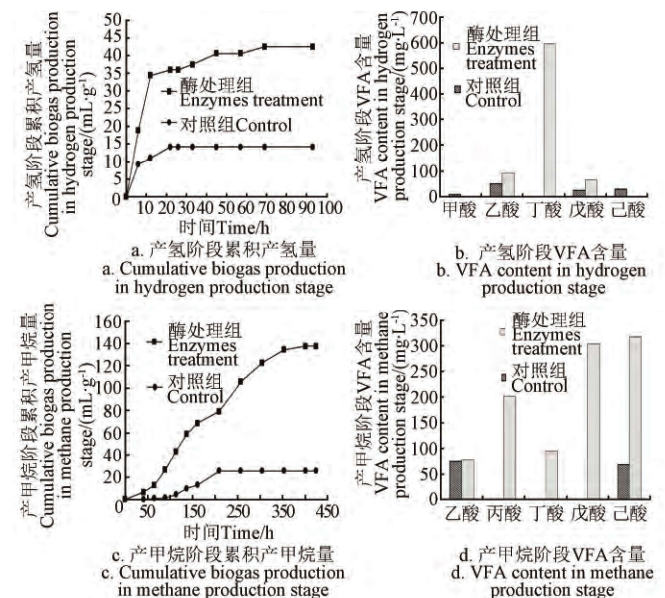


图 1 累积产气量和 VFAs 变化情况

Fig.1 Cumulative biogas production and VFAs concentrations

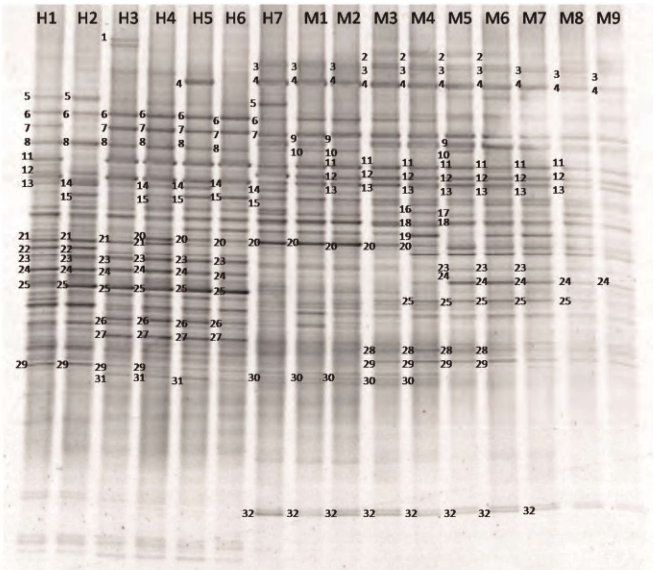
VFAs 是芦苇厌氧发酵联产过程重要的中间代谢产物, 图 1b、1d 所示, 经酶解预处理后 VFAs 含量显著提高, 产甲烷阶段的 VFAs 含量高于产氢气阶段, 且挥发酸种类丰富。产氢阶段, 中间代谢产物中主要以丁酸为主, 含有少量乙酸和戊酸, 属于典型的丁酸型发酵。产甲烷阶段, 随着产甲烷的进行丁酸被微生物利用迅速减少, 丙酸和戊酸含量提高。由于发酵初期底物中的微生物将不溶解性有机

物水解酸化生成 VFAs，发酵后期丁酸、乙酸、甲酸被进一步利用，代谢转化为甲烷和二氧化碳，使部分有机酸含量下降，同时部分难溶大分子继续分解为丙酸、戊酸等。

2.2 细菌 DGGE 图谱分析

微生物基因组 DNA 经过 PCR 扩增后的产物片段分别在 230 bp 左右，经 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收后的各个样品均适宜进行后续 DGGE 分析。

DGGE 图谱中条带的数目、强度及迁移位置反映了样品中微生物群落的多样性及丰度，理论上图谱中每一个条带代表一种微生物，条带数目及强度与微生物的种类及相对含量成正比^[17]。由细菌 DGGE 图谱可知（图 2），厌氧联产两阶段细菌种类丰富，条带数量在 30 以上。厌氧发酵过程复杂，微生物对底物的降解具有阶段性，细菌群落结构出现更替现象，表现出丰富的多样性及优势微生物。



注：H1~H7表示产氢阶段样品，M1~M9表示产甲烷阶段样品，数字为条带编号。下同。
Note: H1-H7 represent samples in the hydrogen production stage and M1-M9 represent samples in the methane production stage, the number is the number of band. The same as below.

图 2 细菌 DGGE 凝胶电泳图像
Fig.2 DGGE profile of bacteria produced from different sample

图 2 可知，厌氧发酵不同阶段的 DGGE 条带种类和分布有明显差异性，产氢阶段的细菌种类和数目高于产甲烷阶段。条带 4、6、7、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、23、25、28、29、30、31 为 2 个阶段的共有条带，其中，条带 6、7、14、15、23、24、25、31 在产氢阶段中后期（泳道 H4-H6）亮度高、宽度大，条带 4、11、12、13、16、17、18、19、20、30 在产甲烷阶段较为显著，不同厌氧微环境造成了细菌菌群的差异性。

条带 24、28、29 在产氢阶段和产甲烷中期亮度高，可能由于产氢阶段向产甲烷阶段过渡时发酵微环境不适合此类微生物生长，环境耐受性较差。条带 1、5、8、21、22、26、27 是产氢阶段的特有条带，其中条带 1 仅出现在产氢阶段上升期（泳道 H3），随着厌氧反应进行，该菌种消失^[18]。条带 2、3、9、10、32 均出现在产甲烷阶段，是产甲烷阶段的特征微生物。泳道 H7、M1 和 M2 是产氢阶段向产甲烷阶段过渡时期的微生物群落，此阶段条带 20 亮度最高，条带 24、25 与其他阶段相比亮度降低，条带 23、26、27 亮度较产氢阶段降低，可见，从产氢阶段到产甲烷阶段微生物群落发生了显著的演替变化。

2.3 细菌群落相似性分析

利用 BIO-RAD QUANTITY ONE 4.6.2 软件处理得到图谱，用戴斯系数(Dice coefficient, Cs)计算微生物群落的相似性。

$$Cs=2j/(a+b),$$

式中 j 为样品 A 和 B 共有的条带，a 和 b 分别为样品 A 和 B 中各自的条带数。戴斯系数为 0（没有相同条带）-1（所有的条带相同）。依据 Complete Linkage 算法对 DGGE 条带进行聚类分析。

厌氧发酵不同阶段细菌群落的相似性 Cs（表 1）和聚类分析（图 3）表明，相邻时间的图谱相似性较高，聚为一类，Cs 较低，细菌群落相似性较小，说明厌氧联产过程中细菌群落经历了明显的时序动态和更替。

表 1 基于戴斯系数（Cs）的相似性矩阵

Table 1 Similarity matrix based on Dice coefficient for DGGE patterns																%
	M9	M8	M7	M6	M5	M4	M3	M2	M1	H7	H6	H5	H4	H3	H2	H1
M9	100.0	44.6	45.7	51.5	56.2	49.1	52.6	30.7	45.6	53.4	40.6	48.7	44.2	43.7	36.7	42.8
M8		100.0	71.5	69.9	56.8	52.8	47.1	38.3	47.9	49.8	40.0	46.6	46.1	44.5	33.6	37.5
M7			100.0	87.4	73.0	70.8	62.2	41.3	56.4	54.5	52.7	54.0	57.2	56.9	42.1	39.2
M6				100.0	77.7	72.0	65.6	42.6	57.0	61.2	53.7	58.1	61.6	57.5	44.5	44.2
M5					100.0	71.7	76.8	43.7	63.1	66.4	57.5	62.1	62.9	63.8	50.6	50.1
M4						100.0	83.2	43.7	63.9	65.4	56.1	53.1	55.4	58.5	48.1	43.7
M3							100.0	56.1	73.4	71.9	57.4	62.9	59.2	60.7	49.1	50.0
M2								100.0	65.6	61.3	40.9	47.8	40.6	40.0	36.7	49.6
M1									100.0	77.1	52.3	59.3	52.9	58.8	50.8	54.9
H7										100.0	61.3	66.9	60.1	58.4	62.8	61.2
H6											100.0	81.4	80.5	80.5	61.1	57.0
H5												100.0	82.9	82.1	63.6	63.9
H4													100.0	83.6	66.0	55.0
H3														100.0	61.8	57.5
H2															100.0	63.3
H1																100.0

注：M9~M1 表示产甲烷阶段样品，H7~H1 表示产氢阶段样品。
Note: M9-M1 represent samples in the methane production stage and H7-H1 represent samples in the hydrogen production stage.

在产氢高峰期，细菌群落结构稳定，Cs 值为 83.6%（泳道 H3，H4）。产氢阶段中后期，Cs 相对较高，分别

为 82.1%（泳道 H3，H5）、80.5%（泳道 H3，H6），细菌种类基本保持不变。产甲烷高峰期，群落结构的 Cs 值

较高, 为 87.4% (泳道 M6, M7), 产甲烷后期 Cs 值显著下降至 69.9% (泳道 M6, M8), 可见, 产甲烷高峰期细菌微生物群落结构稳定, 保证了产甲烷的高效进行, 随着厌氧发酵时间的延长, 微环境的变化, 微生物多样性增强, 产甲烷末期 Cs 值仅为 51.5% (泳道 M6, M9)。结果表明, 产氢阶段前期, 细菌群落结构相似性较小、细菌种类较少, 随着反应时间的延长, 微生物多样性增加, 群落分别在产氢高峰期和产甲烷高峰期保持稳定, 此时相似性较高, 到产甲烷末期, 相似性再次降低。可见, 厌氧联产不同阶段的微环境变化是细菌群落结构演替的重要原因之一^[19]。

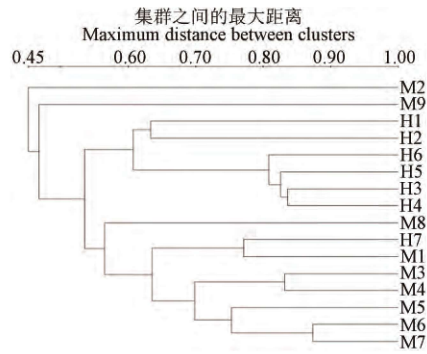


图 3 细菌 DGGE 图谱的聚类分析图
Fig.3 Clustering analysis for DGGE profile of bacteria

2.4 细菌群落结构分析

对厌氧发酵联产不同阶段的特征条带进行测序, 将测序结果提交 Genbank 进行比对后获得比对结果见表 2。结果发现, 32 个序列中, 28 个与 GenBank 中已登录的序列同源性高于 98%, 其中 6 个目前尚未获得纯培养, 2 个同源性仅为 94%, 可能是这 2 类微生物对应属中的新物种。

厌氧联产系统中检测到的细菌主要有 *Sedimentibacter*、*Roseburia*、*Methanogenic*、*Pseudomonas*、*Eubacteriaceae*、*Clostridium*、*Anaerostipes*、*Enterococcus*、*Chloroflexi bacterium* 和传统方法不可培养微生物。其中 *Clostridium thermocellum* (条带 20) 属于嗜热纤维素菌, 具有降解纤维素产生氢气的功能, 是整个厌氧联产过程的优势细菌^[20]。*Enterobacter aerogenes* (条带 28) 属于产气肠杆菌, 是一种具有高效产氢潜力的兼性厌氧细菌, 能够利用纤维素、葡萄糖、淀粉等厌氧产氢^[21]。*Sedimentibacter* (条带 29) 属于产氢产乙酸菌, 与耗氢菌互营共生, 在产氢阶段到产甲烷阶段过程中起着承上启下的作用^[22]。

结合 DGGE 图谱分析, 产氢阶段和产甲烷阶段的细菌微生物群落结构特征呈现显著的演替。*Clostridium clostridioforme* (条带 1) 仅出现在产氢高峰期 (泳道 H3), 是产氢阶段的优势微生物。*Methanogenic prokaryote* (条带 5、8), *Clostridium aminovalericum* (条带 10), *Bacillus* (条带 26), *Clostridium beijerinckii* (条带 27) 是产氢阶段的特有微生物, 在产氢阶段丰度较高。随着产氢结束, *Uncultured Synergistetes* (条带 2), *Roseburia* (条带 15), *Enterococcus faecium* (条带 9), *Clostridium aminovalericum* (条带 21) 在产甲烷阶段出现, 是产甲烷阶段的特征微生物。

表 2 细菌 DGGE 条带序列的比对结果
Table 2 Blast results of band sequences of bacteria

条带	相似性最大的种属	条带	相似性最大的种属
1	<i>Clostridium clostridioforme</i>	17	<i>Bacterium</i>
2	<i>Uncultured Synergistetes bacterium</i>	18	<i>Anaerostipes</i>
3	<i>Roseburia</i> sp. 1120 gene	19	<i>Uncultured bacterium clone</i>
4	<i>Anaerostipes</i> sp. 992a	20	<i>Clostridium thermocellum</i> strain CTL-6
5	<i>Methanogenic prokaryote</i> B19_149	21	<i>Clostridium aminovalericum</i> strain
6	<i>Pseudomonas</i> sp. UA-JF2901	22	<i>Chloroflexi bacterium</i>
7	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> strain Tk21R	23	<i>Bacterium enrichment culture clone</i>
8	<i>Methanogenic prokaryote</i>	24	<i>Clostridium xylanovorans</i> strain HESP1
9	<i>Enterococcus faecium</i>	25	<i>Comamonas</i> sp.01xTSA12A_H10
10	<i>Clostridium aminovalericum</i>	26	<i>Bacillus</i> sp. JCA partial
11	<i>Pseudomonas</i>	27	<i>Clostridium beijerinckii</i>
12	<i>Clostridium fimetarium</i> strain	28	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain P5
13	<i>Uncultured bacterium clone</i>	29	<i>Sedimentibacter</i> sp. NP2
14	<i>Uncultured bacterium clone</i>	30	<i>Clostridium</i> sp. BIP1
15	<i>Roseburia</i>	31	<i>Eubacteriaceae bacterium</i> DY1
16	<i>Uncultured bacterium clone</i>	32	<i>Uncultured bacterium</i>

3 讨论

芦苇秸秆的氢气-甲烷联产是通过多种微生物相互作用, 将大分子有机物降解为氢气和甲烷等生物质能源的过程。微生物群落结构的组成和发酵微环境, 决定了其具有的特定生态功能。本研究采用 PCR-DGGE 技术, 分析了芦苇秸秆联产不同阶段样品中细菌群落组成, 比较了细菌群落在时间和空间上的动态变化。细菌 DGGE 谱图分析发现, 产氢阶段细菌种类、数量和丰富均高于产甲烷阶段, 表现出了丰富的微生物多样性。大多数细菌始终存在于厌氧联产过程中, 随着系统微环境的改变其丰度和活性表现出规律性变化。

对 DGGE 条带进行相似性分析, 计算 Cs 系数, 并依据 Complete Linkage 算法进行聚类分析, 阐述了厌氧联产不同阶段样品中细菌群落的演替规律。产氢阶段初期, 细菌群落相似性较小、微生物种类较少, 随着厌氧发酵的进行, 细菌逐渐增多, 产氢阶段累积产气量达到最高 42.5 mL/g 时群落相似性较高, Cs 值为 83.6% (泳道 H3, H4)。可见, 厌氧联产初期, 接种活性污泥微生物种类丰富、群落相似性小, 随着反应的进行, 适应产氢微环境的细菌生存并大量繁殖, 群落相似性提高, 出现了产氢阶段的优势微生物^[23-24]。产甲烷初期, 细菌群落相似性较低, 随着产甲烷的进行, 当累积产气量最高为 137.5 mL/g 时, Cs 值达到 87.4% (泳道 M6, M7), 群落结构稳定, 产甲烷末期 Cs 值降低至 51.5% (泳道 M6, M9)。产甲烷阶段, 随着代谢产物和微环境的变化, 细菌群落结构和功能发生了显著变化, 与产甲烷相关的细菌大量繁殖, 形成新的优势微生物。据文献报道^[25-26], 产甲烷阶段参与一碳代谢生成甲烷的微生物主要为古菌, 细菌通过与古菌的协同作用共同保证产甲烷阶段的稳定运行。

采用序列分析, 对本研究 DGGE 谱图中不同阶段亮度高、丰度大的条带进行分析, 结合上述群落演替规律发现, *Clostridium thermocellum* (条带 20) 是一类具有降解纤维素降解功能的嗜热纤维素菌, 对芦苇秸秆的纤维素降解起到重要作用^[20]。*Clostridium beijerinckii* (条带 27)

属于拜氏梭菌属, 在产氢阶段丰度较高, 是产氢阶段的优势微生物, Trevor 等^[27-28]研究发现, 采用磁性纳米粒子固定 *Clostridium beijerinckii* 可有效提高厌氧发酵的氢气产量。Enterobacter aerogenes (条带 28) 产气肠杆菌具有高效的产氢潜力, Batista 等^[29]通过接种 Enterobacter aerogenes 将微藻转化为氢气。Hu 等^[30]比较了 *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium beijerinckii* 和 Enterobacter aerogenes 等 4 种产氢菌的厌氧产氢潜力。产氢产乙酸菌是在营养生态位上位于产氢菌群和产甲烷菌群之间, 功能上起着承上启下作用的一类微生物, 本研究中条带 29 *Sedimentibacter* 属于此类优势微生物, 具有与耗氢菌互营共生的特性。产甲烷阶段参与一碳代谢合成甲烷的主要为古菌, 但是由不同生态位的多种微生物经过复杂的相互作用实现的, Enterococcus Faecium (条带 9) 属于屎肠球菌属, 能抑制菌氨的产生, 保证产甲烷阶段 pH 值的稳定^[31]。

通过研究芦苇秸秆厌氧联产过程中细菌微生物群落演替变化规律, 分析产氢和产甲烷阶段优势微生物, 可以为厌氧联产的微生物强化提供重要的理论依据, 从分子水平提出秸秆高效能源化与稳定运行的工艺优化调控策略。

4 结 论

本研究采用 PCR-DGGE 技术分析芦苇秸秆厌氧发酵联产氢气-甲烷过程中, 细菌微生物群落结构和演替规律。从厌氧联产不同阶段 DGGE 图谱和条带相关性分析可知, 联产两阶段细菌种类丰富, 条带总数在 30 以上, 相邻时间的图谱相似性较高, 聚为一类, 整体上戴斯系数 Cs 不高, 说明厌氧发酵过程中细菌经历了明显的时序动态和更替。其中, 产氢阶段前期微生物的相似性较小、种类较少, 随着反应时间的延长, 微生物种类逐渐增多并在产氢和产甲烷高峰期保持稳定, 此时相似性较高, 到产甲烷末期, 相似性再次降低。测序结果表明, 在厌氧联产过程中, *Clostridium thermocellum* 嗜热纤维素菌具有降解芦苇秸秆纤维素的功能, Enterobacter aerogenes 属于产气肠杆菌, 是具有高效产氢潜力的兼性厌氧细菌, *Sedimentibacter*, 具有与耗氢菌互营共生的产氢产乙酸菌, 在功能上起着承上启下的重要作用。

参 考 文 献

- [1] 王萌, 王玉彬, 陈章和. 芦苇的种质资源及在人工湿地中的应用[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(4): 590—595. Wang Meng, Wang Yubin, Chen Zhanghe. Germplasm resource of phragmites adans and its application in constructed wetlands[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2010, 16(4): 590—595. (in Chinese with English abstract)
- [2] 曹培培, 刘茂松, 唐金艳, 等. 几种水生植物腐解过程的比较研究[J]. 生态学报, 2014, 34(14): 3848—3858. Cao Peipei, Liu Maosong, Tang Jinyan, et al. A comparative study on the decomposition processes among some aquatic plants[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(14): 3848—3858. (in Chinese with English abstract)
- [3] 朱静, 吴亦红, 李洪波, 等. 白洋淀芦苇资源化利用技术及示范研究[J]. 环境科学与技术, 2014, 37(120): 92—94. Zhu Jing, Wu Yihong, Li Hongbo, et al. Study on the technology and demonstration of Baiyangdian reed resources utilization[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 37(120): 92—94. (in Chinese with English abstract)

- [4] Xie B F, Cheng J, Zhou J H, et al. Cogeneration of hydrogen and methane from glucose to improve energy conversion efficiency[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(19): 5006—5011.
- [5] Zhao M X, Ruan W Q. Biogas performance from co-digestion of Taihu algae and kitchen wastes[J]. Energy Conversion and Management, 2013, 75: 21—24.
- [6] Zhao M X, Ruan W Q. Improving hydrogen generation from kitchen wastes by microbial acetate tolerance response[J]. Energy Conversion and Management, 2014, 77: 419—423.
- [7] Guwy A J, Dinsdale R M, Kim J R. Fermentative biohydrogen production systems integration [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(18): 8534—8542.
- [8] Li M X, Xia T M, Zhu C W, et al. Effect of short-time hydrothermal pretreatment of kitchen waste on biohydrogen production: Fluorescence spectroscopy coupled with parallel factor analysis[J]. Bioresource Technology, 2014, 172: 382—390.
- [9] Jia X, Li M X, Xi B D, et al. Integration of fermentative biohydrogen with methanogenesis from fruit-vegetable waste using different pre-treatments[J]. Energy Conversion and Management, 2014, 88: 1219—1227.
- [10] Birgitte K Ahring, Angelidaki I, E Conway de Macario, et al. Biomethanation I [M]. Berlin: Springer Heidelberg, 2003: 1—30.
- [11] Giovannoni S J, Britschgi T B, Moyer C L, et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton[J]. Nature, 1990, 345(6270): 60—63.
- [12] Kim J, Lee S, Lee C. Comparative study of changes in reaction profile and microbial community structure in two anaerobic repeated-batch reactors started up with different seed sludges[J]. Bioresource Technology, 2013, 129: 495—505.
- [13] 陈法霖, 张凯, 郑华, 等. PCR-DGGE 技术解析针叶和阔叶凋落物混合分解对土壤微生物群落结构的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(2): 145—150. Chen Falin, Zhang Kai, Zheng Hua, et al. Analyzing the effect of mixed decomposition of conifer and broadleaf litters on soil microbial communities by using PCR-DGGE[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2011, 17(2): 145—150. (in Chinese with English abstract)
- [14] 张振冬, 王淑芬, 曹宇. DGGE 技术及其在海洋环境微生物多样性研究中的应用[J]. 海洋环境科学, 2008, 27(3): 297—300. Zhang Zhendong, Wang Shufen, Cao Yu. DGGE technique and its application in study on microbial diversity in marine environment[J]. Marine Environmental Science, 2008, 27(3): 297—300. (in Chinese with English abstract)
- [15] Hyun Min Jang, Sang Kyu Park, Jeong Hyub Ha, et al. Microbial community structure in a thermophilic aerobic digester used as a sludge pretreatment process for the mesophilic anaerobic digestion and the enhancement of methane production[J]. Bioresource Technology, 2013, 145: 80—89.
- [16] Richard M Myers, Stuart G Fischer, Leonard S Lerman, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Nucleic Acids Research, 1985, 13(9): 3131—3145.
- [17] 张珍妮, 吴晓芙, 陈永华, 等. DGGE 技术在环境微生物多样性研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2009(12): 48—52. Zhang Zhenni, Wu Xiaofu, Chen Yonghua, et al. Application in research on microbial diversity of environment by DGGE technique[J]. Biotechnology Bulletin, 2009(12): 48—52. (in Chinese with English abstract)
- [18] 邢德峰, 任南琪, 宋业颖, 等. DG-DGGE 分析产氢发酵系统微生物群落动态及种群多样性[J]. 生态学报, 2005, 25(7): 1818—1823. Xing Defeng, Ren Nanqi, Song Yeying, et al. Application of DG-DGGE to analyze microbial community diversity and population dynamics in fermentative hydrogen-producing system[J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(7): 1818—1823. (in Chinese with English abstract)
- [19] 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用[J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 843—848. Gong Manli, Ren Nanqi, Xing Defeng. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis in microbial molecular ecology[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(6): 843—848. (in Chinese with English abstract)

- [20] Daniela E Koeck, Vladimir V Zverlov, Wolfgang Liebl. Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: Genetic markers and characterization of cellulolytic potential[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2014, 37: 311–319.
- [21] 王瑞兴, 钱春香, 袁晓明. 产气肠杆菌发酵产氢的批次放大试验研究[J]. *环境科学与技术*, 2013, 36(11): 12–30. Wang Ruixing, Qian Chunxiang, Yuan Xiaoming. Scale-up batch fermentation of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 36(11): 12–30. (in Chinese with English abstract)
- [22] 李建政, 孙倩, 刘枫, 等. 一种产氢产乙酸菌互营共培养体的筛选及其群落结构解析[J]. *科技导报*, 2009, 27(16): 78–82.
- [23] Juli an Carrillo-Reyes, Lourdes B. Celis, Felipe Alatríste-Mondragon. Strategies to cope with methanogens in hydrogen producing UASB reactors: Community dynamics[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014, 39: 11423–11432.
- [24] Sandra I Maintinguer, Isabel K Sakamoto, M Angela T. Adorno. Bacterial diversity from environmental sample applied to bio-hydrogen production[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2015, 40: 3180–3190.
- [25] Nakakihara E, Ikemoto-Yamamoto R, Honda R. Effect of the addition of rice straw on microbial community in a sewage sludge digester[J]. *Water Science and Technology*, 2014, 70(5): 819–827.
- [26] Joonyeob Lee, Byungchul Hwang, Taewoan Koo. Temporal variation in methanogen communities of four different full-scale anaerobic digesters treating food[J]. *Waste-recycling Wastewater, Bioresource Technology* 2014, 168: 59–63.
- [27] Fumiaki Taguchi, Jun Danchang, Naoki Mizukami, et al. Isolation of a hydrogen-producing bacterium, *Clostridium beijerinckii* strain AM21B, from termites[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1993, 39(7): 726–730.
- [28] Trevor Seelert, Dipankar Ghosh, Viviane Yargeau. Improving biohydrogen production using *Clostridium beijerinckii* immobilized with magnetite nanoparticles[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(9): 4107–4116.
- [29] Ana Paula Batista, Patrícia Moura, Paula A S S Marques, et al. *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*[J]. *Fuel*, 2014, 117: 537–543.
- [30] Hu C C, Giannis A, Chen C L, et al. Comparative study of biohydrogen production by four dark fermentative bacteria[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2013, 38: 15686–15692.
- [31] 夏玉, 郑华, 林捷, 等. 屎肠球菌发酵特性及其功能性研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(12): 123–132. Xia Y, Zhen H, Lin J, et al. Study on the fermentation and function characteristics of *Enterococcus Faecium*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(12): 123–132. (in Chinese with English abstract)

Bacterial community structure succession in fermentative biohydrogen with methanogenesis integration from reed straw

Jia Xuan¹, Ren Lianhai¹, Li Mingxiao^{2*}, Xi Beidou², Zhu Chaowei², Zhao Youcai³

(1. Department of Environmental Science and Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2. State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China; 3. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: The two-stage coproduction of hydrogen and methane using cellulosic biomass, such as reed straw, is a promising technology for achieving energy saving and emission reduction and developing a circular economy. The enhancement of hydrogen and methane coproduction from reed straw under enzyme pretreatment was evaluated during anaerobic fermentation. The effects of cellulase pretreatment on biogas production performance and intermediate metabolites' characteristics were investigated in this study. In addition, the combination of polymerase chain reaction (PCR) amplification of 16S rRNA genes with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis was used to study the composition and succession of bacterial community in fermentative biohydrogen with methanogenesis integration system. The results showed that the maximum accumulative biogas production and hydrogen proportion were 42.5 mL/g and 52.1% respectively in hydrogenogenic stage. And the maximum accumulative biogas production of 137.5 mL/g was 5.36 times higher than the control in methane production stage. However, the highest methane proportion of 68.4% in control test was similar to those under cellulase pretreatment. Therefore, the cellulase pretreatment has the benefit of structural damage on refractory organics while improving the hydrogen production potential in this study. Usually, hydrogen and methane formation is accompanied by volatile fatty acids (VFAs) generation during anaerobic digestion process. Hence, the composition and concentration of soluble metabolites produced were useful indicators for monitoring the hydrogenogenic process. The investigation of the soluble metabolites at the end of each stage showed that the main VFAs were distributed under cellulase pretreatment compared with the control. The composition of VFAs in hydrogenogenic stage was butyric acid and acetic acid, indicating that butyric-acid type fermentation was established. During the methanogenic stage, the butyric acid was consumed and the propionic and valeric acid were produced more. These results showed that cellulase pretreatment might be attributed to the diversity of microbial populations in 2 stages after enrichment. The sequences of 16S rDNA DGGE predominant band fragments were determined by comparison with NCBI database. The DGGE patterns showed that the 2 stages experienced different microbial community structure changes during the period. Early in hydrogenogenic stage, the low similarity of bacterial communities was observed. And then the high similarity with Deiss coefficient of 83.6% (lane: H3, H4) and 87.4% (lane: M6, M7) was obtained in peak production period of hydrogen and methane, respectively. The Cs value was reduced to 51.5 at the end of methane production stage (lane: M6, M9). The majority of the sequences obtained were affiliated with *Clostridium thermocellum* (Band 20), *Enterobacter aerogenes* (Band 28) and *Sedimentibacter* (Band 29). In hydrogenogenic stage, the dominant microorganism was *Enterobacter aerogenes* (Band 28), which can produce hydrogen and dramatically enhance the hydrogen production performance. A hydrogen-producing acetogenic bacterium of *Sedimentibacter* (Band 29) was also the dominant bacterium, which can produce hydrogen and acetic acid in hydrogen and methane coproduction process. The dominant microorganism of *Clostridium thermocellum* (Band 20) existed in 2 stages, which can degrade cellulose and play an important role in reed straw utilization process. Hence, the maximum cumulative biogas yield and proportion were increased dramatically under the cellulase pretreatment, which directly impacted the hydrogen and methane production ability. The result provides an important microbiology theoretical basis for the biofortification in biogas coproduction process from cellulosic biomass.

Keywords: straw; bacteria; hydrogen; methane; reed; community succession