

贾璇,任连海,李鸣晓,等. 芦苇酶解对氢气-甲烷联产过程微生物群落演替规律的影响[J]. 环境科学研究, 2016, 29(1): 138-145.

JIA Xuan, REN Lianhai, LI Mingxiao, *et al.* Effects of enzymatic pretreatment on microbial community succession in hydrogen and methane coproduction from reed straw [J]. Research of Environmental Sciences, 2016, 29(1): 138-145.

## 芦苇酶解对氢气-甲烷联产过程微生物群落演替规律的影响

贾璇<sup>1</sup>, 任连海<sup>1</sup>, 李鸣晓<sup>2\*</sup>, 席北斗<sup>2</sup>, 祝超伟<sup>2</sup>

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

**摘要:** 采用 10 mg/g 纤维素酶 R-40 预处理芦苇秸秆, 研究了酶解预处理对芦苇厌氧产气潜力的影响, 分析了氢气-甲烷联产过程中微生物群落结构演替规律. 结果表明: 酶解预处理后, 芦苇秸秆在产氢阶段的累积产气量和  $\varphi(\text{H}_2)$  分别达到 42.5 mL/g 和 52.1%; 在产甲烷阶段, 累积产气量稳定上升, 最高值可达 137.5 mL/g, 是对照组产气量的 5 倍. 由扫描电镜 (SEM) 观察可知, 产氢阶段以短杆状和梭状菌为主, 产甲烷阶段以长杆菌为主. PCR-DGGE (聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳) 分析表明, 芦苇在酶解预处理后, 其厌氧联产过程中微生物群落呈规律性演替, 产氢阶段的优势微生物分别为具有降解纤维素产氢气功能的嗜热纤维素菌 *Clostridium thermocellum* (条带 B20)、具有高效产氢潜力的兼性厌氧产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes* (条带 B28); 在产甲烷阶段, 其优势微生物为可利用氢营养途径合成甲烷的产甲烷古菌 *Methanoculleus bourgensis* (条带 A3)、*Methanoculleus horonobensis* (条带 A13). 经纤维素酶预处理后, 芦苇秸秆厌氧联产的累积产气量、 $\varphi(\text{H}_2)$  提高显著, 具有纤维素降解功能的细菌和可利用氢营养途径合成甲烷的古菌为主要优势微生物.

**关键词:** 纤维素酶预处理; 芦苇; 氢气-甲烷联产; 微生物; 群落演替

中图分类号: X705

文章编号: 1001-6929(2016)01-0138-08

文献标志码: A

DOI: 10.13198/j.issn.1001-6929.2016.01.18

## Effects of Enzymatic Pretreatment on Microbial Community Succession in Hydrogen and Methane Coproduction from Reed Straw

JIA Xuan<sup>1</sup>, REN Lianhai<sup>1</sup>, LI Mingxiao<sup>2\*</sup>, XI Beidou<sup>2</sup>, ZHU Chaowei<sup>2</sup>

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

**Abstract:** The efficiency of hydrogen and methane coproduction was investigated under enzyme pretreatment for reed straw during anaerobic fermentation. The combination of PCR amplification of 16S rDNA genes with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis was used to reveal the composition and succession of microbial community in coproduction process. The results showed that the maximum hydrogen production yield and proportion were 42.5 mL/g and 52.1% respectively at the hydrogenogenic stage. At the methanogenic stage, the maximum methane production of 137.5 mL/g was 5 times higher than that of the control. SEM analysis indicated that the pretreatment induced significant morphological changes. The sequences of 16S rDNA DGGE predominant bands fragments were determined by comparison with the NCBI database. At the hydrogenogenic stage, the dominant microorganism was *Clostridium thermocellum* (Band B20) and *Enterobacter aerogenes* (Band B28), which can degrade cellulose and play an important role in reed straw utilization. At the methanogenic stage, the dominant microorganism was *Methanoculleus bourgensis* (Band A3) and *Methanoculleus horonobensis* (Band A13), which can use hydrogen to synthesize methane and play an important role during the coproduction system.

收稿日期: 2015-06-09

修订日期: 2015-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21406213, 51408572)

作者简介: 贾璇 (1982-), 女, 河北石家庄人, 讲师, 博士, 主要从事有机废物资源化技术研究, jiaxuan75710@163.com.

\* 责任作者, 李鸣晓 (1981-), 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, limingxiao8122@163.com

Hence, the maximum cumulative biogas yield and proportion were increased dramatically under 10 mg/g cellulase R-40 pretreatment. This provides an important theoretical basis for the biofortification in biogas coproduction process.

**Keywords:** cellulase pretreatment; reed; hydrogen and methane coproduction; microbial; community succession

芦苇是我国湿地、草型湖泊生态系统的重要组成部分,其生长过程能吸收降解水中氮、磷等营养物质,但芦苇生长末期除部分用作饲料、燃料外,大部分残体在水中腐解,对水环境系统造成了严重的二次污染<sup>[1-2]</sup>。芦苇秸秆中富含有机质和氮、磷等营养物质,粗纤维含量高,是厌氧发酵的理想原料<sup>[3-4]</sup>。氢气-甲烷联产工艺是依据相分离原理,将产氢阶段和产甲烷阶段分离,获得更高的能源转化效率,同时也有效避免了氢分压和酸化的反馈抑制作用,是芦苇秸秆能源化利用的有效途径<sup>[5-6]</sup>。

芦苇秸秆中纤维素、半纤维素和木质素的含量均高,但其表面蜡质层结构及超分子结构中高度结晶区存在着大量的氢键使微生物利用困难。纤维素的酶解糖化是秸秆能源化转化过程中的限制性步骤,木质纤维素通过酶解作用转化为葡萄糖、木糖等单糖后,才能通过厌氧微生物的相互作用转化为生物能源<sup>[7]</sup>。石亚中等<sup>[8]</sup>采用响应曲面法优化了纤维素酶解提取工艺。陈洪章等<sup>[9]</sup>研究了麦草在纤维素酶解过程中的吸附过程及主要影响因素,初步探讨了纤维素酶解机制。氢气-甲烷联产过程是复杂的微生物相互作用的结果,但由于微生物群落组成和作用机理不

清晰,使厌氧发酵难以稳定运行。因此,研究酶解预处理对芦苇秸秆厌氧联产生物气的影响,分析氢气-甲烷联产过程中微生物群落结构演替规律,对阐明厌氧联产过程的微生物作用机理,提出生物强化的调控策略具有重要意义。目前,国内外针对秸秆厌氧发酵过程中微生物群落特征的研究已有报道<sup>[10-13]</sup>,但采用 PCR-DGGE(聚后酶链式反应-变性梯度凝胶电泳)分子生物学方法,研究酶解预处理后秸秆厌氧联产过程中微生物群落组成和演替规律的研究还鲜见报道。

该研究采用厌氧联产工艺,分析酶解预处理对产氢、产甲烷潜力的影响,通过 SEM(扫描电镜)和 PCR-DGGE 方法,解析厌氧联产不同阶段细菌和古菌群落的构成及演替规律,以期为秸秆厌氧能源化利用和优化调控提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 样品采集

芦苇采自内蒙古自治区乌梁素海,干燥后破碎至 1~2 cm 备用。接种污泥取自猪粪厌氧发酵的厌氧消化污泥,污泥去除大块杂物后过 50 目(270 μm)筛,置于 4℃ 冰箱备用。处理后芦苇和接种污泥的主要成分如表 1 所示。

表 1 芦苇和接种污泥的主要成分  
Table 1 Characterisation of the reed and inoculation sludge

| 原料 | w/%   |      |       |       |      |       |       |       | C/N   |
|----|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
|    | C     | N    | TS    | VS    | 灰分   | 纤维素   | 半纤维素  | 木质素   |       |
| 芦苇 | 33.77 | 0.57 | 98.68 | 91.39 | 7.28 | 28.04 | 16.77 | 14.65 | 59.25 |
| 污泥 | 35.20 | 3.06 | 16.69 | 11.97 | 4.72 | —     | —     | —     | 11.50 |

注:TS 为总固体;VS 为挥发性固体;C/N 为  $w(\text{TC})/w(\text{TN})$ 。

1.2 试验设计

采用自制的 2 L 三口血清瓶进行厌氧联产试验,其中一端与排水集气瓶相连,测定生物气产量;一端与恒温磁力搅拌器相连,控制发酵温度;一端为样品采集口。32 g 芦苇干样与 10 mg/g 纤维素酶 R-10 混合后在 48℃ 条件下预处理 48 h。预处理后的样品接种 200 mL 厌氧消化污泥,污泥添加量为发酵总体积的 12.5%,采用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节初始 pH 至 5,培养体积 1.6 L,通入高纯氮气 5 min 以排除反应瓶中的空气保证厌氧环境,37℃ 中温发酵,搅拌速率为 150 r/min,进行氢气-甲烷联产试验。产氢阶段发酵周期为 4 d,产甲烷阶段发酵周期为 18 d,每隔 6 h 采集气体样品并计算累积产气量。累积产气量采用排水法测定。

1.3 PCR-DGGE

1.3.1 总 DNA 提取

采用 BIOTEKE 淤泥基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型)提取基因组 DNA,置于 -20℃ 保存备用。

1.3.2 样品扩增

PCR 体系:10×Buffer 5 μL、dNTP 4 μL、引物 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。采用 Touch Down PCR 进行扩增,以增加产物的特异性,扩增引物如表 2 所示。

细菌扩增程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,

表 2 用于 PCR 扩增的引物  
Table 2 Primers used for PCR amplification

| 项目   | 引物      | 位置      | 序列                                            |
|------|---------|---------|-----------------------------------------------|
| 细菌   | 341F-GC | 341-357 | 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'                       |
|      | 534R    | 518-534 | 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'                       |
| 古菌   | 344F-GC | 344-361 | 5'-GACCGGCHGCAGCAGCCGCA-3'                    |
|      | 522R    | 522-539 | 5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'                      |
| GC 夹 |         |         | 5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGG<br>GGCGGGGCACGGGG-3' |

48 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃延伸 10 min. 古菌扩增程序: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 58 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃延伸 5 min.

### 1.3.3 PCR 产物凝胶电泳与 DGGE

用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物片段大小和浓度. 取 20  $\mu\text{L}$  PCR 产物 (约 200 ng) 与 10  $\mu\text{L}$  上样缓冲液混匀后进行电泳, 以去离子甲酰胺和尿素为变性剂, 其中细菌及古菌变性梯度均为 40% ~ 70%, 聚丙烯酰胺胶浓度 (以  $w$  计) 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.

### 1.3.4 条带回收与克隆测序

在 345 nm 波长下分别将差异条带和共性条带切下, 取 5  $\mu\text{L}$  回收产物作为模板, 选用无 GC 夹子的上述 PCR 引物, 按 1.3.2 节方法再次扩增. 选用 TaKaRa MiniBEST DNA 试剂盒进行 PCR 产物回收纯化后进行克隆测序. 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.

## 1.4 分析方法

挥发性固体、总固体、灰分的质量分数采用称量法测定<sup>[14]</sup>. 半纤维素、纤维素及木质素含量采用 VanSoest 法测定<sup>[15]</sup>. 生物气组成和含量采用 SP-6890 型气相色谱仪测定. 色谱条件: 氢火焰离子化检测器,

色谱柱为 3 mm 内径不锈钢填充柱 (TDx-01 高分子小球), 柱室、汽化室和检测室的温度分别为 120、150 和 150 ℃, 载气为氩气, 纯度  $\geq 99.999\%$ , 流速为 40 mL/min. 厌氧联产过程中物料和微生物形态采用 S-570 SEM (HITA CHI, Japan) 进行观察, 扫描电压 15 kV.

## 2 结果与讨论

### 2.1 纤维素酶预处理对芦苇产气的影响

#### 2.1.1 累积产气量的变化规律

芦苇秸秆经纤维素酶 R-40 预处理后进行厌氧联产, 累积产气量随时间的变化规律如图 1 所示. 由图 1 可知, 在产氢阶段 (0 ~ 12 h), 酶解预处理组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. 未经酶解预处理的对照组在 22 h 时可得最大累积产气量 (15.4 mL/g). 可见, 经酶预处理后的芦苇最大累积产气量是对照组的 3 倍, 提高显著. 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 累积产气量达到最高, 为 137.5 mL/g; 而对照组产气量上升趋势缓慢, 直到 209 h 时累积产气量才达到最大值 (25.6 mL/g). 在产甲烷阶段, 酶解预处理组的累积产气量是对照组的 5 倍. 经酶解预处理后芦苇的氢气和甲烷产量均有显著提高. 研究<sup>[16-17]</sup>指出, 纤维素酶可特异性地吸附在秸秆的纤维素结构上, 在降解纤维素、半纤维素的同时还可促进植物细胞壁的溶解, 使更多细胞内物质溶解出来, 并将大分子多糖、蛋白质和脂类降解成小分子物质, 提高了产气量和底物利用效率.

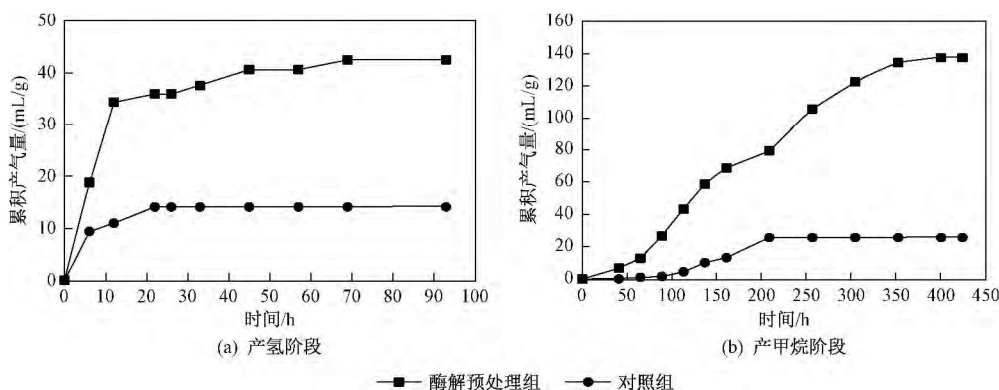


图 1 纤维素酶预处理芦苇对累积产气量的影响

Fig. 1 The maximum cumulative biogas production from reed using cellulase pretreatment

#### 2.1.2 $\varphi(\text{H}_2)$ 、 $\varphi(\text{CH}_4)$ 的变化

由图 2 可知, 芦苇经纤维素酶 R-40 处理后, 在产氢阶段,  $\varphi(\text{H}_2)$  与对照组相比有显著提高, 12 h 时  $\varphi(\text{H}_2)$  最大, 达到 52.1%; 随反应进行和产气量的减少,  $\varphi(\text{H}_2)$  逐渐降低. 对照组在 26 h 时  $\varphi(\text{H}_2)$  达到最

高, 但仅为 36.1%, 33 h 后急剧下降. 在产甲烷阶段, 酶解预处理组与对照组的  $\varphi(\text{CH}_4)$  随时间均显著上升, 最大  $\varphi(\text{CH}_4)$  分别为 68.4% 和 70.0%, 变化趋势没有明显差异. 研究结果表明, 经纤维素酶预处理后, 芦苇的  $\varphi(\text{H}_2)$  有显著提高, 但  $\varphi(\text{CH}_4)$  与对照组相

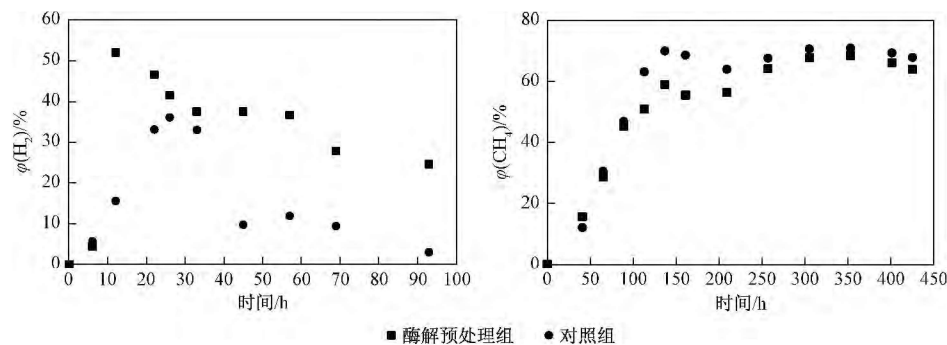


图 2 纤维素酶预处理后芦苇厌氧联产过程  $\varphi(\text{H}_2)$ 、 $\varphi(\text{CH}_4)$  的变化

Fig. 2 The maximum hydrogen and methane proportion from reed using cellulase pretreatment

比变化不大. 杨洋等<sup>[14]</sup>分析采用酸、碱、酶对香蒲秸秆预处理后厌氧发酵发现, 经 1.0 mol/L NaOH 预处理后  $\varphi(\text{H}_2)$  最高为 30.1%, 而经 10 mg/g 纤维素酶预处理后的  $\varphi(\text{CH}_4)$  最高为 71.4%.

2.2 纤维素酶预处理后 SEM 微观解析

采用 SEM 对芦苇秸秆酶解预处理前后及不同阶段微生物群落的微观形态进行解析, 结果如图 3 所示. 由图3(a)可知, 预处理前芦苇秸秆表面平整、纹

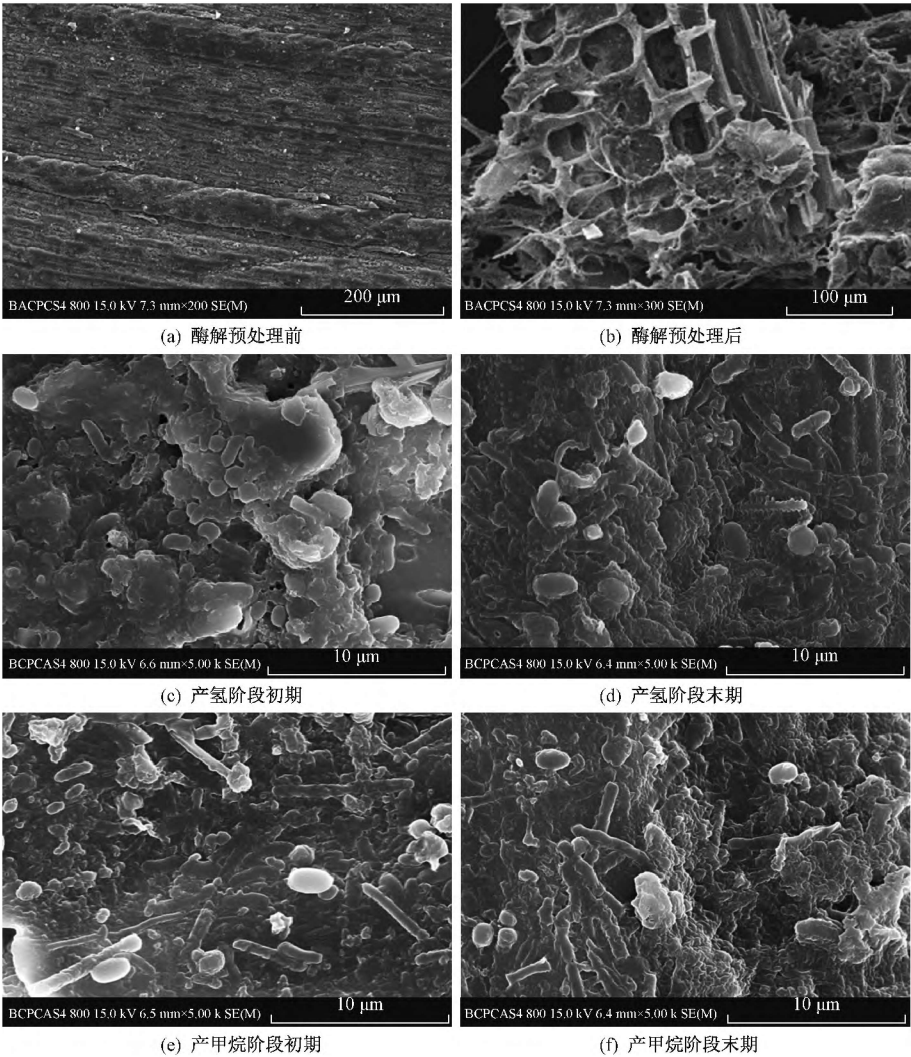


图 3 纤维素酶预处理后芦苇和微生物群落的扫描电镜图

Fig. 3 SEM images of reeds after cellulase pretreatment and microbial community during the two-stage fermentation

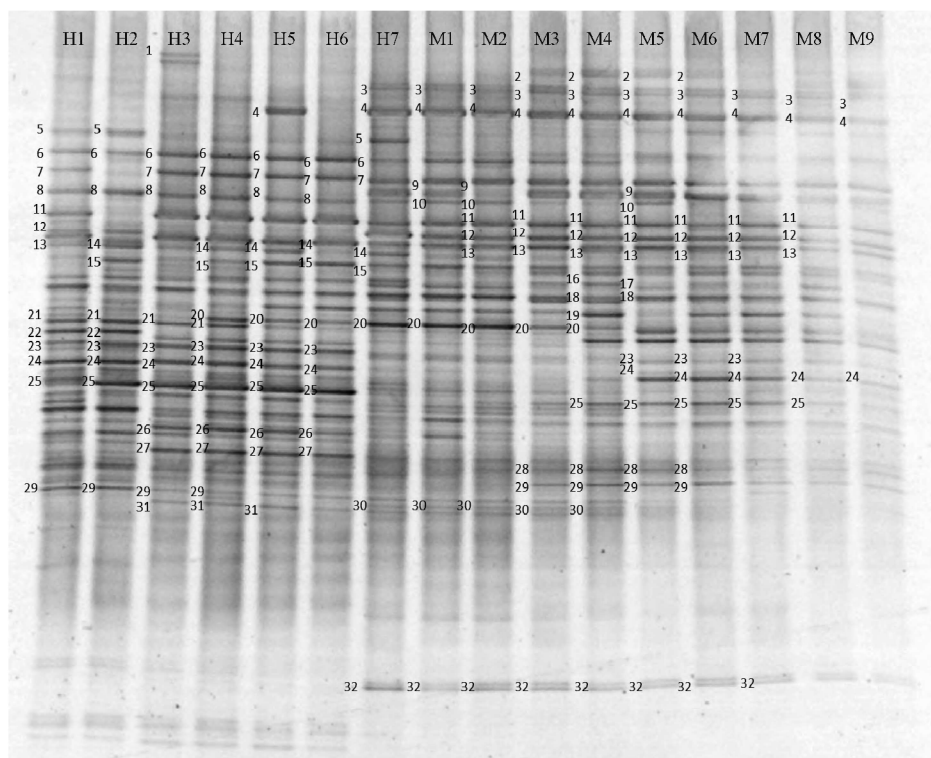
理紧凑,并且有一层蜡质膜结构.经纤维素酶预处理后,其物理结构发生了较大变化,虽外观依然保持杆状结构,但其表面出现大量空穴、多孔结构且凹凸不平,呈现出深度腐蚀状(见图3(b)).由于酶解预处理可以显著破坏芦苇秸秆的半纤维素和木质素,使物理结构发生改变,微小纤维充分暴露,提高了外表面积和多孔性,增大了厌氧反应过程中底物与微生物的接触面积,有利于其相互作用,促进芦苇秸秆的厌氧联产能源化利用<sup>[18-19]</sup>.

对微生物群落形态的观察可知,厌氧联产不同阶段微生物群落组成丰富,并有明显的更替现象.由图3(c)可知,在芦苇秸秆产氢阶段初期,微生物群落形

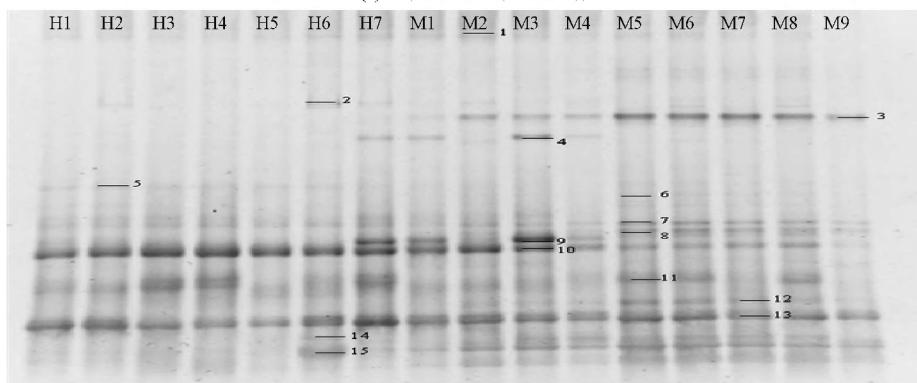
态以短杆状和球状微生物为主,随着厌氧联产的进行,在产氢阶段末期,生物相中短杆状的微生物增多,其次是梭状杆菌(见图3(d)).Maintinguer等<sup>[20]</sup>研究表明,在产氢阶段,变形菌、杆菌、梭菌、绿弯菌相对较多;而在产甲烷阶段,微生物相中长杆状微生物增多,伴有梭状杆菌,球菌很少(见图3(e)(f)),可能以变形菌和产甲烷杆菌为主<sup>[21]</sup>.

### 2.3 纤维素酶预处理后微生物群落 PCR-DGGE 分析

采用 PCR-DGGE 研究经酶解预处理后芦苇在厌氧联产不同阶段微生物群落变化和演替规律.由图4可见,泳道 H1 ~ H7 分别代表产氢阶段第 0、6、12、24、36、60、96 h 的代谢产物;泳道 M1 ~ M9 分别代表在



(a) 细菌DGGE凝胶电泳图像



(b) 古菌DGGE凝胶电泳图像

图 4 DGGE 凝胶电泳图像

Fig. 4 Bacterial and archaea DGGE band patterns

厌氧发酵产甲烷阶段第 42、66、90、114、162、210、258、306、426 h 的代谢产物。

采用序列分析,对该研究 DGGE 谱图中不同阶段亮度高、丰度大的条带进行分析。结果表明,厌氧联产系统中检测到的细菌种类众多,主要有 *Methanogenic prokaryote* (条带 B5、B8)、*Clostridium beijerinckii* (条带 B27)、*Chloroflexi bacterium* (条带 B22)、*Enterobacter aerogenes* (条带 B28) 和传统方法不可培养微生物等。其中, *Clostridium thermocellum* (条带 B20) 是一类具有降解纤维素降解功能的嗜热纤维素菌<sup>[22]</sup>,对芦苇秸秆的纤维素降解起到了重要作用,在产氢阶段和产甲烷初期亮度大、丰度高。*Clostridium beijerinckii* (条带 B27) 属于拜氏梭菌属<sup>[23-24]</sup>,在产氢阶段丰度较高,是该阶段的优势微生物。*Enterobacter aerogenes* (条带 B28) 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、半乳糖、淀粉等进行厌氧发酵制氢<sup>[25-26]</sup>。HU 等<sup>[27]</sup>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,结果表明,采用葡萄糖为底物厌氧发酵, *Clostridium butyricum* 的产氢效率最高。*Sedimentibacter* (条带 B29) 属于产氢产乙酸菌,它具有与耗氢菌互营共生的特性,在营养生态位上位于产酸发酵菌群和产甲烷菌群之间,在功能上起着承上启下的重要作用<sup>[28]</sup>。

在产甲烷阶段,产甲烷古菌为优势微生物,这类微生物位于厌氧消化食物链的最末端,是厌氧生物处理工艺中最重要限速步骤,其群落组成和数量变化直接影响沼气发酵速率和产气量<sup>[29]</sup>。图 4 和表 4 的条带序列比对分析表明, *Methanoculleus bourgensis* (条带 A3)、*Methanobacterium formicicum* (条带 A8)、*Methanogenic archaeon* (条带 A6、7、9、14) 等是产甲烷阶段主要存在的古菌,主要通过氢营养途径合成甲烷。其中, *Methanoculleus bourgensis* 所在条带 A3 亮度大而宽、丰度高,是产甲烷阶段的优势微生物。*Uncultured Methanosarcinales archaeon* (条带 A10) 是 DGGE 图谱中产氢阶段和产甲烷初期的优势条带,属于不可培养微生物,能够利用乙酸途径产甲烷,它们通过裂解乙酸,还原甲基碳产 CH<sub>4</sub>,同时氧化其羧基碳产生 CO<sub>2</sub><sup>[30]</sup>。*Methanoculleus horonobensis* (条带 A13) 甲烷囊菌属在芦苇秸秆厌氧联产过程中条带亮度、丰度均较高,是厌氧联产全过程始终存在的优势微生物<sup>[31]</sup>。

表 3 细菌 DGGE 条带序列的比对结果

Table 3 Blast results of the band sequences of bacteria

| 条带编号    | 登录号         | 相似性最大的种属                                                     | 相似性/<br>% |
|---------|-------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
| B1      | NR044715. 2 | <i>Clostridium clostridioforme</i>                           | 100       |
| B2      | KC747801. 1 | Uncultured <i>Synergistetes bacterium</i>                    | 100       |
| B3、B15  | GQ137071. 1 | <i>Roseburia</i>                                             | 100       |
| B4      | JX839741. 1 | <i>Anaerostipes</i> sp. 992a                                 | 100       |
| B5      | KC821403. 1 | <i>Methanogenic prokaryote</i> B19_149                       | 99        |
| B6      | JX543561. 1 | <i>Pseudomonas</i> sp. UA-JF2901                             | 94        |
| B7      | KF735064. 1 | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> strain Tk21R | 100       |
| B8      | GU584042. 1 | <i>Methanogenic prokaryote</i>                               | 99        |
| B9      | JF136507. 1 | <i>Enterococcus faecium</i>                                  | 98        |
| B10     | JX843651. 1 | <i>Clostridium aminovalericum</i>                            | 100       |
| B11     | KC747773. 1 | <i>Pseudomonas</i>                                           | 100       |
| B12     | HQ176078. 1 | <i>Clostridium fimetarium</i> strain                         | 100       |
| B13     | HQ792941. 1 | Uncultured bacterium clone                                   | 98        |
| B14     | DQ800469. 1 | Uncultured bacterium clone                                   | 100       |
| B16、B32 | JQ188658. 1 | Uncultured bacterium clone                                   | 99        |
| B17     | JX271035. 1 | Bacterium                                                    | 99        |
| B18     | EF096618. 1 | <i>Anaerostipes</i>                                          | 99        |
| B19     | JQ207450. 1 | Uncultured bacterium clone                                   | 99        |
| B20     | FJ599513. 1 | <i>clostridium thermocellum</i> strain CTL-6                 | 100       |
| B21     | JQ798417. 1 | <i>Clostridium aminovalericum</i> strain                     | 100       |
| B22     | FQ659799. 1 | <i>Chloroflexi bacterium</i>                                 | 94        |
| B23     | JN688022. 1 | Bacterium enrichment culture clone                           | 100       |
| B24     | AB481168. 1 | <i>Clostridium xylanovorans</i> strain HESPI                 | 96        |
| B25     | EU464704. 1 | <i>Comamonas</i> sp. 01xTSA12A_H10                           | 98        |
| B26     | HG726037. 1 | <i>Bacillus</i> sp. JCA partial                              | 97        |
| B27     | KF581587. 1 | <i>Clostridium beijerinckii</i>                              | 98        |
| B28     | KF465841. 1 | <i>Enterobacter aerogenes</i> strain P5                      | 99        |
| B29     | JQ087164. 1 | <i>Sedimentibacter</i> sp. NP2                               | 100       |
| B30     | HQ698167. 1 | <i>Clostridium</i> sp. BIP1                                  | 100       |
| B31     | JQ208467. 1 | <i>Eubacteriaceae bacterium</i> DY1                          | 100       |

表 4 古菌 DGGE 条带序列的比对结果

Table 4 Blast results of the band sequences of archae

| 条带编号       | 登录号         | 相似性最大的种属                                       | 相似性/<br>% |
|------------|-------------|------------------------------------------------|-----------|
| A1、A5、A13  | AB436897. 2 | <i>Methanoculleus horonobensis</i> gene        | 99        |
| A2、A11、A12 | NR074174. 1 | <i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1           | 99        |
| A3         | HE964772. 1 | <i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2           | 99        |
| A4         | GU196158. 1 | Archaeon enrichment culture clone C4-10C-A     | 99        |
| A6         | DQ513417. 1 | <i>Methanogenic archaeon</i> CH42              | 99        |
| A7、A14     | DQ513416. 1 | <i>Methanogenic archaeon</i> CH71              | 99        |
| A8         | DQ649317. 1 | <i>Methanobacterium formicicum</i> strain 20-2 | 99        |
| A9         | AJ244289. 1 | <i>Anaerobic methanogenic archaeon</i> E15-3   | 99        |
| A10        | CU916832. 1 | Uncultured <i>Methanosarcinales</i> archaeon   | 99        |

综上,芦苇秸秆经 10 mg/g 纤维素酶 R-10 预处理后,具有纤维素降解功能的细菌和可利用氢营养途径合成甲烷的古菌为厌氧联产过程中的主要优势微生物,研究结果为芦苇厌氧联产的生物强化提供了理论依据。

### 3 结 论

a) 芦苇秸秆经纤维素酶解预处理后,其在产氢阶段的累积产气量和  $\varphi(\text{H}_2)$  均有显著升高,可分别达到 42.5 mL/g 和 52.1%。在产甲烷阶段,累积产气量稳定上升,最高达 137.5 mL/g,是对照组的 5 倍;其最大  $\varphi(\text{CH}_4)$  与对照组相近,分别为 68.4% 和 70.0%。

b) 芦苇秸秆经酶解预处理后,表面出现大量空穴、多孔结构且凹凸不平,呈现出深度腐蚀状。对微生物群落形态的观察可知,产氢初期以短杆状和球状微生物为主,随着厌氧联产的进行,生物相中杆菌增多,产甲烷末期主要以长杆菌为主,球菌很少。

c) PCR-DGGE 分析表明,厌氧联产是由多种细菌、古菌等微生物经复杂的协同作用实现的。芦苇秸秆经 10 mg/g 纤维素酶 R-10 预处理后,厌氧联产的累积产气量、 $\varphi(\text{H}_2)$  显著提高,具有纤维素降解功能的嗜热纤维素菌 *Clostridium thermocellum* (条带 B20) 和氢营养途径产甲烷的甲烷囊菌 *Methanoculleus horonobensis* (条带 A13) 为主要优势微生物。

#### 参考文献 (References):

- [1] 唐金艳,曹培培,徐驰,等.水生植物腐烂分解对水质的影响[J].应用生态学报,2013,24(1):83-89.  
TANG Jinyan, CAO Peipei, XU Chi, et al. Effects of aquatic plants during their decay and decomposition on water quality [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(1): 83-89.
- [2] 付为国,尹淇淋,李萍萍,等.镇江滨江湿地芦苇腐解物化感作用对藨草生长指标的影响[J].湿地科学,2015,13(1):118-123.  
FU Weiguo, YIN Qilin, LI Pingping, et al. Effects on growth indexes of *Phalaris arundinacea* by allelopathy of *Phragmites australis* decaying substance in riverside wetlands in Zhenjiang [J]. Wetland Science, 2015, 13(1): 118-123.
- [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(S2):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 (China), 2014, 37(S2): 92-94.
- [4] XIE Binfei, CHENG Jun, ZHOU Junhu, 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] JIA Xuan, LI Mingxiao, XI Beidou, 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.
- [6] GUWY A J, DINSDALE R M, KIM J R. Fermentative biohydrogen production systems integration [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(18): 8534-8542.
- [7] 王永忠,冉尧,陈蓉,等.不同预处理方法对稻草秸秆固态酶解特性的影响[J].农业工程学报,2013,29(1):225-231.  
WANG Yongzhong, RAN Rao, CHEN Rong, et al. Effects of different pretreatment methods on enzymolysis characteristics of rice straw stalk in solid state [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2013, 29(1): 225-231.
- [8] 石亚中,方娇龙,钱时权,等.响应曲面法优化纤维素酶酶解提取工艺[J].食品科学,2013,34(4):75-79.  
SHI Yazhong, FANG Jiaolong, QIAN Shiquan, et al. Response surface methodology for the optimization of enzymatic extraction of resveratrol grape pomace with cellulase [J]. Food Science, 2013, 34(4): 75-79.
- [9] 陈洪章,李佐虎.影响纤维素酶解的因素和纤维素酶被吸附性能的研究[J].化学反应工程与工艺,2000,16(1):30-35.  
CHEN Hongzhang, LI Zuohu. Factors of enzymatic hydrolysis for cellulose and adsorption of cellulase [J]. Chemical Reaction Engineering and Technology, 2000, 16(1): 30-35.
- [10] HESHAM A E, QI Rong, YANG Min. Comparison of bacterial community structures in two systems of a sewage treatment plant using PCR-DGGE analysis [J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(12): 2049-2054.
- [11] KARADAG D, PUHAKKA J A. Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an open-mixed culture bioreactor [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35: 10954-10959.
- [12] KUNDU K, SHARMA S, SREEKRISHNAN T R. Effect of operating temperatures on the microbial community profiles in a high cell density hybrid anaerobic bioreactor [J]. Bioresource Technology, 2012, 118: 502-511.
- [13] 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.
- [14] 杨洋,夏天明,祝超伟,等.预处理方法对香蒲厌氧发酵联产  $\text{H}_2$ - $\text{CH}_4$  效能的影响[J].环境科学研究,2014,27(2):164-171.  
YANG Yang, XIA Tianming, ZHU Chaowei, et al. Effect of different pre-treatment on hydrogen and methane coproduction during typha anaerobic fermentation process [J]. Research of Environmental Sciences, 2014, 27(2): 164-171.
- [15] 熊素敏,左秀凤,朱永义.稻壳中纤维素、半纤维素和木质素的测定[J].粮食与饲料工业,2005(8):40-41.  
XIONG Sumin, ZUO Xiufeng, ZHU Yongyi. Determination of

- cellulose, hemi-cellulose and lignin in rice hull [J]. Cereal & Feed Industry, 2005 (8) :40-41.
- [16] KAPOOR M, RAJ T, VIJAYARAJ M. Structural features of dilute acid, steam exploded, and alkali pretreated mustard stalk and their impact on enzymatic hydrolysis [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 124:265-273.
- [17] 李婧婧, 黄俊华, 谢树成. 植物蜡质及其与环境的关系 [J]. 生态学报, 2011, 31 (2) :565-574.
- LI Jingjing, HUANG Junhua, XIE Shucheng. Plantwax and its response to environmental conditions: an overview [J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31 (2) :565-574.
- [18] XU Zhong, WANG Qunhui, JIANG Zhaohua, et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw [J]. Biomass and Bioenergy, 2007, 31 (6) :2-7.
- [19] KIM T H, LEE Y Y. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process [J]. Bioresource Technology, 2005, 96 (2) :7-13.
- [20] MAINTINGUER S I, SAKAMOTO I K, ADORNO M A. Bacterial diversity from environmental sample applied to bio-hydrogen production [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2015, 40:3180-3190.
- [21] SONG Zilin, ZHANG Chao. Anaerobic codigestion of pretreated wheat straw with cattle manure and analysis of the microbial community [J]. Bioresource Technology, 2015, 186:128-135.
- [22] KOECK D E, ZVERLOV V V, LIEBL W. 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.
- [23] ZHAO Xin, XING Defeng, FU Na. Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* RZF-1108 [J]. Bioresource Technology, 2011, 102:8432-8436.
- [24] AN D, LI Q, WANG X Q, et al. Characterization on hydrogen production performance of a newly isolated *Clostridium beijerinckii* YA001 using xylose [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2014, 39:19928-19936.
- [25] 王瑞兴, 钱春香, 袁晓明. 产气肠杆菌发酵产氢的批式放大试验研究 [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 (China), 2013, 36 (11) :12-30.
- [26] BATISTA A P, MOURA P, MARQUES P A, et al. *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum* [J]. Fuel, 2014, 117:537-543.
- [27] HU Chengcheng, 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.
- [28] 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.
- LI Jianzheng, SUN Qian, LIU Feng, et al. Selection and community structure analysis of two new syntrophic acetogen cocultures [J]. Science & Technology Review, 2009, 27 (16) :78-82.
- [29] LEE J, HWANG B, KOO T. Temporal variation in methanogen communities of four different full-scale anaerobic digesters treating food waste-recycling wastewater [J]. Bioresource Technology, 2014, 168:59-63.
- [30] AYDIN S, INCE B, INCE O. Application of real-time PCR to determination of combined effect of antibiotics on Bacteria, Methanogenic Archaea, Archaea in anaerobic sequencing batch reactors [J]. Water Research, 2015, 76:88-98.
- [31] 王庆, 阮志勇, 高立洪, 等. 基于 mcrA 克隆文库和 PCR-DGGE 技术对牛粪为原料的农村户用沼气池产甲烷古菌的多样性研究 [J]. 中国沼气, 2012, 30 (3) :3-13.
- WANG Qing, RUAN Zhiyong, GAO Lihong, et al. Methanogenic Archaea diversity in rural cow manure biogas digester determined by mcrA clone library and DGGE analysis [J]. China Biogas, 2012, 30 (3) :3-13.

(责任编辑:孙彩萍)