

# 原料差异对厌氧消化微生物群落的影响

史宏伟<sup>1</sup>, 邹德勋<sup>1</sup>, 左剑恶<sup>2</sup>, 朱保宁<sup>1</sup>, 刘研萍<sup>1</sup>, 李秀金<sup>1\*</sup>

(1. 北京化工大学环境科学与工程系, 北京 100029; 2. 清华大学环境学院, 北京 100084)

**摘要:**以餐厨垃圾、果蔬垃圾、麦秸 3 种不同原料分别进行厌氧消化, 研究了各反应器在最佳运行条件下的消化特性和微生物群落组成。结果表明:VS 产气率由高到低依次为餐厨垃圾(756.4 mL·g<sup>-1</sup>VS<sup>-1</sup>)、麦秸(696.5 mL·g<sup>-1</sup>VS<sup>-1</sup>)和果蔬垃圾(433.5 mL·g<sup>-1</sup>VS<sup>-1</sup>), 甲烷含量在 51.5%~55.1% 之间。利用 PCR-DGGE 技术系统地分析了不同原料消化系统内细菌和古菌的群落结构构成及差异。结果表明, 虽然 3 组样品中细菌和古菌的群落存在相同的优势微生物, 但其数量和群落结构差异也较为明显, 细菌中以拟杆菌(*Bacteroidetes*)以及古菌中甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)和甲烷螺菌属(*Methanospirillum*)均为样品共有的优势微生物。

**关键词:**餐厨垃圾; 果蔬垃圾; 麦秸; 厌氧消化; 微生物多样性; PCR-DGGE

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2011)08-1675-08

## The Effect of Feedstocks on Microbial Communities in Anaerobic Digesters

SHI Hong-wei<sup>1</sup>, ZOU De-xun<sup>1</sup>, ZUO Jian-e<sup>2</sup>, ZHU Bao-ning<sup>1</sup>, LIU Yan-ping<sup>1</sup>, LI Xiu-jin<sup>1\*</sup>

(1. Department of Environmental Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 2. School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** Food waste, vegetable residue, and wheat stalk were anaerobically digested for biogas production, and the digestate were analyzed by PCR-DGGE to identify anaerobic micro-organism strains and compare the differences in microorganism communities among three feedstocks. Three hydraulic retention times(HRT) of 30 d, 20 d and 50 d for all digesters were used at the same temperature of 35±1 °C. The digestion parameters and microbial communities were analyzed in the experiments under optimal conditions. The daily biogas yields were 756 mL·g<sup>-1</sup>VS<sup>-1</sup>, 696 mL·g<sup>-1</sup>VS<sup>-1</sup> and 433 mL·g<sup>-1</sup>VS<sup>-1</sup> for kitchen waste, vegetable residue, and wheat straw, respectively. The methane contents in the biogas ranged between 51.5%~55.1%. The microbial communities and the variations of bacteria and archaea in three digesters were investigated by PCR-DGGE techniques. The Shannon-Wiener index of bacteria and archaea were 3.14±0.17 and 2.11±0.45, respectively. The Simpson index of bacteria and archaea were 0.94±0.02 and 0.83±0.09, respectively. Although the bacteria species of *Bacteroidetes* and the archaea species of *Methanosaeta* and *Methanospirillum* were found to be dominant in the digesters, the quantity and community strains were different for three feedstocks investigated. The findings could provide useful information for the future studies.

**Keywords:** kitchen waste; fruit and vegetable residues; wheat straw; anaerobic digestion; microbial community; PCR-DGGE

厌氧消化作为一种处理有机废弃物的手段, 具有很多优势<sup>[1-2]</sup>。厌氧消化在处理纤维素类物质<sup>[3]</sup>、餐厨垃圾<sup>[4]</sup>、牛粪<sup>[5]</sup>等多种生物质废物时表现出较大的潜力,

但是原料的季节性及多样性直接影响了厌氧消化处理工艺, 成分组成的不同也使得降解消化过程存在较大的差异。

目前, 已有部分以餐厨垃圾、果蔬垃圾或麦秸为原料进行厌氧消化研究的报道<sup>[6-7]</sup>, 但针对于 3 种物料之间的差异而造成的消化性能和微生物群落结构差别, 目前国内还未见报道; 国外也大都停留在对单一原料厌氧消化研究阶段<sup>[8]</sup>, 未对多种不同原料进行对比分析。本文利用 PCR-DGGE 技术分别对 3 种原料

收稿日期: 2011-01-05

基金项目: 国家高技术研究发展(863)计划(2008AA062401); “十一五”科技支撑计划(2008BAD4B13); 国家科技支撑计划(2007BAD87B12-3A); 中央高校基本科研业务费(QN0901)

作者简介: 史宏伟(1985—)男, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生。

E-mail: shi-hongwei@hotmail.com

\* 通讯作者: 李秀金 E-mail: xjli@mail.buct.edu.cn

各自厌氧消化系统内细菌和古菌的群落结构进行了分析,同时在最佳运行条件下,研究了3种原料的产气特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 厌氧消化原料及其理化性质

餐厨垃圾(以下简称餐厨)取自北京化工大学食堂泔水池,剔除骨头、塑料袋等杂物;果蔬垃圾(以下简称果蔬)取自北京化工大学食堂,进行简单分拣,均匀切碎至粒径1~2 cm左右,分别将二者用食品粉碎机(WasteKing USA)粉碎为均匀颗粒,放入冰箱-20℃储存备用;烘试麦秸取自北京市顺义郊区,自然风干,经粉碎后过20目筛,备用。以上原料的主要理化指标如表1所示。

对于高纤维素含量难以被微生物直接利用的麦秸,室温下用6%的NaOH进行预处理<sup>[9]</sup>后再进行接种,针对于不同的原料,分别选取特定的接种污泥,其中餐厨和果蔬厌氧反应器的接种污泥取自北京市小红门污水处理厂连续多年稳定运行的厌氧消化罐,麦秸厌氧反应器接种污泥取自山东德州秸秆生物气化工厂以纯麦秸厌氧消化产生的污泥。

### 1.2 厌氧消化反应器运行及样品采集

本研究分别采集各类生物质废物厌氧消化最佳运行时期的样品进行分析,用以更真实反映反应器最大处理能力及相对稳定情况下微生物群落结构的内在规律。同时由于各类样品间的差异使其达到最佳运行条件的控制参数有所差异,依据本课题组前期批式试验研究结果,对餐厨、果蔬、麦秸厌氧消化均采用完全混合反应器(CSTR),水力停留时间分别

为30、20、50 d,采用机械搅拌,反应器内温度均控制在(35±1)℃。

餐厨、果蔬厌氧反应器初始有机负荷率均为1.0 gVS·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,依据各物料的性质,并结合进料有机容积负荷计算每日所需加入的原料量。每日固定时间进出料,当系统达到稳定状态(产气量、甲烷含量稳定,pH值、碱度、氨氮等未出现明显波动)并运行1周后开始提高有机负荷,负荷提升间隔0.25 gVS·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。监测不同负荷下的产气量、甲烷含量、pH、VFA;当二者分别运行到最高负荷2.50 gVS·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(运行110 d)和3.25 gVS·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(运行140 d)时,搅拌均匀后采集样品,并测定其相关指标。

麦秸厌氧反应器初始有机负荷率为1.0 gVS·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,稳定运行后将负荷调至1.30 gVS·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(运行100 d),回流比为30%(质量分数),反应器运行15 d后,测搅拌均匀后采集样品,并测定其相关指标。以上样品经无菌采样瓶收集后迅速置于-20℃冷冻。

### 1.3 样品预处理及总DNA提取

首先使用低温冷冻高速离心机15 000 r·min<sup>-1</sup>,处理20 min,使样品初步脱水以便于最大限度的富集样品中的微生物。DNA提取采用FastDNA<sup>®</sup> Spin Kit for Soil提取试剂盒(MP USA)进行提取,产物经ND-2000微量紫外可见分光光度计(Nano Drop USA)测量提取的DNA浓度和纯度,当A260/A280在1.8±0.1之间即可用于后续实验。

### 1.4 PCR扩增

分别扩增细菌V3区域和古菌区域,依据文献选用引物如表2所示。

以提取的基因组DNA为模板,细菌PCR反应体系为50 μL,组成如下:10×Buffer 5 μL,dNTP 4 μL,引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各1 μL,模板DNA 20 ng,Ex Tag(Takara 大连)1.5 U,灭菌超纯水补齐至50 μL。采用Touch Down PCR(见表2)。古菌16S rDNA V3区域采用巢式PCR(Nested PCR)进行扩增。第一轮50 μL扩增体系与细菌体系相同;以第一轮PCR产物100倍稀释为模板进行第二轮PCR,除更换新引物外,反应体系与第一轮相同(见表2)。

### 1.5 DGGE及条带回收序列分析

应用Dcode<sup>™</sup>基因突变检测系统(Bio-Rad USA)对PCR扩增产物进行电泳分离。以去离子甲酰胺和尿素为变性剂,聚丙烯酰胺胶浓度为8%,其中细菌变性梯度为35%~70%;古菌变性梯度为50%~75%,将20 μL PCR产物(约200 ng)与10 μL 5×Loading buffer

表1 餐厨、果蔬、麦秸理化性质

Table 1 Characteristics of food waste, vegetable waste, wheat straw

理化指标	餐厨垃圾	果蔬垃圾	麦秸
碳/%	29.31	37.24	46.02
氮/%	2.31	2.15	0.51
C:N	12.69:1	17.32:1	90.24:1
木质纤维类/%	4.01	37.10	75.70
粗脂肪/%	24.11	4.99	—
粗蛋白/%	14.42	12.90	—
总糖/%	35.47	9.86	—
全盐/%	22.11	2.51	—
灰分/%	5.11	1.25	18.07
TS/%	23.45	13.59	92.19
VS/%	18.34	12.34	74.12

注:表中含量为干物质的百分含量(TS、VS除外);“—”表示未测定。

表2 细菌和古菌引物序列

Table 2 Primers of bacteria and archaea for PCR operations

目标微生物	引物	序列(5'-3')	退火条件及总循环数	参考文献
细菌	341F-GC	CCTACGGGAGGCAGCAG	55 °C 1 min 25 个循环	[10]
	534R	ATTACCGCGCTGCTGG		[11]
古菌	ARCH46F	YTAAGCCATGCRAGT	52 °C 1.5 min 25 个循环	[12]
	ARCH1017R	GGCCATGCACCWCCTCT		[13]
	PARCH344F-GC	HGCAGCAGGCGCGA	52 °C 1 min 25 个循环	[14]
	UNIV 522R	GWATTACCGCGGCKGCTG		[15]

注 GC-clamp(40 bp)为 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGGGGGGGCACGGGGGG-3'。

混匀后加样,电泳条件均为 60 °C 20 V 预电泳 10 min, 130 V 电泳 6 h。使用 Gel-Red 染色剂染色 30 min 然后在凝胶成像系统(Bio-Rad USA)进行拍照分析。

切取胶中的代表性条带和优势条带,捣碎置于 30  $\mu$ L 的灭菌 TE 缓冲液中,置于 4 °C 冰箱隔夜保存。以溶出的 DNA 为模板,以不含 GC-clamp 的引物进行第二次 PCR 扩增,反应体系及条件不变。将 PCR 产物切胶经纯化试剂盒纯化后送于北京诺赛公司测序。

### 1.6 DGGE 图谱及条带序列分析

使用仪器自带软件 Quantity One 对 DGGE 图谱进行自动优化处理,去除背景噪音,确定图谱中条带的位置及亮度,依据公式计算 Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数<sup>[10]</sup>,用以表征样品中微生物的丰富度和均匀度。测出的序列与 GenBank 数据库中已有序列进行比对分析,使用软件 MEGA4 绘制系统发育树图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 厌氧反应器运行性能

3 个反应器最高进料负荷最终分别稳定在 2.50、3.25  $\text{gVS}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  和 1.30  $\text{gVS}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,运行参数如表 3 所示。

由表 3 可知,3 个反应器在 35 °C 下运行均良好,pH 均略呈碱性,维持在厌氧消化最佳的 pH 范围内(6.8~7.5)。果蔬反应器中氨氮含量偏高,达到 1 865.21  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,研究表明<sup>[16]</sup>,当氨氮含量达到 1 500  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时表现出对产甲烷菌的毒性作用,果蔬反应器中氨氮抑制可能是其甲烷含量及 VS 产气率偏低的原因,餐厨

反应器的容积产气率和 VS 产气率明显高出果蔬和麦秸反应器,分别为 1.89  $\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  和 756.4  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ;麦秸反应器容积产气率最低,仅为 0.73  $\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,这与麦秸中纤维素、木质素难以被微生物降解有很大的关系,但其甲烷含量和 VFA 均高出其余二者。

### 2.2 细菌和古菌 DGGE 图谱及其分析

经 Gel doc 2000 凝胶成像系统获得电泳图如图 1 所示。同时,利用 Quantity One 对电泳图进行了多样性指数分析,并对电泳图谱中优势条带进行了切胶测序分析,其结果如下。

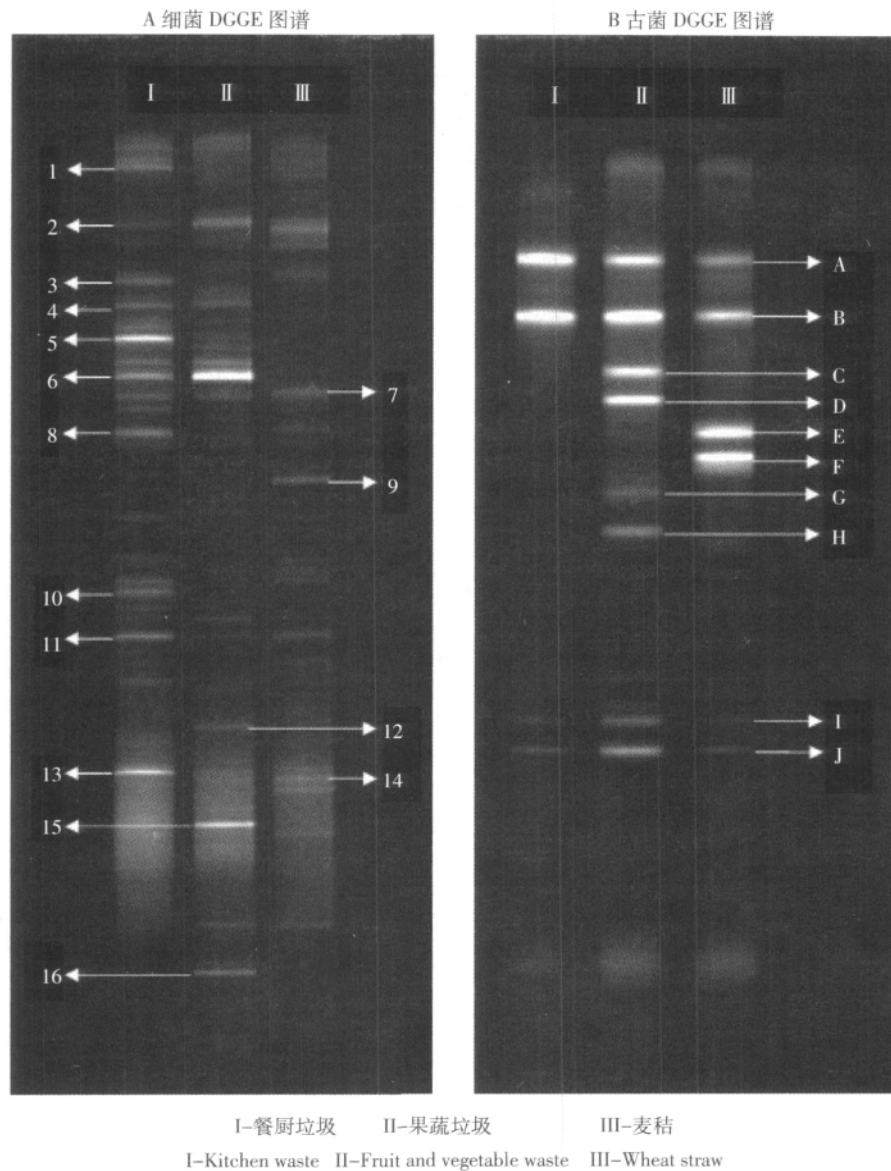
#### 2.2.1 厌氧反应器中细菌多样性分析

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种群的多样性及丰度。理论上图谱中每 1 个条带代表 1 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<sup>[17-18]</sup>。由细菌 DGGE 图谱可知(图 1A) 3 个样品中的条带总数均在 40 以上,Simpson 指数显示三者均在 0.90 以上(表 4),表明样品中微生物种类十分丰富。3 个样品共有条带 11 条,餐厨、果蔬样品共有条带 22 条,果蔬、麦秸共有条带 18 条,餐厨、麦秸样品共有条带 15 条,这表明在厌氧反应器中,微生物的种类与原料理化性质相似程度呈正比关系,原料成分越接近,相同微生物越多。另外,三者种群结构上存在着明显的差异,各有优势条带存在,其中餐厨样品和麦秸样品的相对明显,果蔬样品较差,餐厨样品的 Shannon-Wiener 指数为 3.28(表 4),这略高于麦秸的 3.11 和果蔬的 3.04,这表明其丰富度和均匀程度要略好于后者。

表3 餐厨、果蔬、麦秸厌氧反应器运行参数

Table 3 Operational parameters of various anaerobic digesters

取样时间/d	进料负荷/ $\text{gVS}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	pH	容积产气率/ $\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	VS 产气率/ $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\text{VS}^{-1}$	甲烷含量/%	VFA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	氨氮/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
餐厨	110	2.50	7.22	1.89	756.41	53.03	1 051.82	1 420.42
果蔬	140	3.25	7.37	1.31	433.52	51.65	963.15	1 865.21
麦秸	115	1.30	7.42	0.73	696.54	55.31	1 898.66	798.63



I-Kitchen waste II-Fruit and vegetable waste III-Wheat straw

图1 细菌及古菌 DGGE 图

Figure 1 DGGE pictures of bacteria and archaea

表4 餐厨、果蔬及麦秸样品中细菌和古菌的两种多样性指数  
Table 4 Diversity index of bacteria and archaea in various digesters

项目	餐厨		果蔬		麦秸	
	细菌	古菌	细菌	古菌	细菌	古菌
Shannon-Weiner 指数(H)	3.28	1.76	3.04	2.38	3.11	2.19
Simpson 多样性指数(D)	0.96	0.76	0.93	0.89	0.94	0.85

测序结果如表5所示,3种样品中共有的条带为7、11、13,其中7号条带与拟杆菌门(*Bacteroidetes*)相似度达到99%,13号与螺旋体属(*Spirochaetes*)相似度达到98%;餐厨和果蔬样品中共有的条带分别为2、4、5、6,其中2号条带与拟杆菌属(*Bacteroides*)相

似度达到100%。A号与Wang H.等<sup>[19]</sup>在35℃利用上流式厌氧污泥床反应器,进行产甲烷的厌氧水解处理青草中发现的微生物十分的接近,达到100%。5号条带与普雷沃氏菌属(*Prevotella*)相似性为100%;餐厨样品中特有的优势条带为1、3、8、10,其中8号条带与链球菌属(*Streptococcus*)相似性达到100%,10号与拟杆菌门(*Bacteroidetes*)相似性达到100%;果蔬样品中特有的条带为12、15、16,其中15号与Egrave D R等<sup>[20]</sup>在厌氧消化污泥中发现的细菌相似程度更是达到100%;麦秸样品中特有的条带为9、14,其中9号条带与拟杆菌门(*Bacteroidetes*)相似度达到96%。

餐厨垃圾组分十分复杂,由蔬菜、肉类以及谷物

表5 餐厨、果蔬、麦秸样品细菌 DGGE 图谱优势条带测序结果

Table 5 Sequencing result of bacteria DGGE preponderance bands in various digesters

条带编号	最高相似度菌株名称	相似度/%	登录号
1	<i>Uncultured WWE1 bacterium</i>	100	CU921669.1
2	<i>Bacteroides graminisolvens</i> gene	100	AB547643.1
3	<i>Uncultured bacterium</i> clone UC-11	100	FJ228426.1
4	<i>Uncultured bacterium</i> isolate DGGE gel band b5	100	GU584032.1
5	<i>Bacteroides suis</i> gene	100	AB542771.1
6	<i>Uncultured bacterium</i> gene	99	AB425282.1
7	<i>Uncultured Bacteroidetes bacterium</i> clone 1946 1	99	EF188796.1
8	<i>Streptococcus macedonicus</i> strain ChF-II-str93	100	HM462406.1
9	<i>Uncultured Bacteroidetes bacterium</i> clone F07CT_ControlDay15	96	GQ243099.1
10	<i>Uncultured Bacteroidetes bacterium</i>	100	CU918786.1
11	<i>Uncultured bacterium</i> clone 67c	99	FJ462097.1
12	<i>Uncultured bacterium</i> partial	100	CT573933.1
13	<i>Uncultured Spirochaetes bacterium</i>	98	CU922012.1
14	<i>Uncultured bacterium</i> partial	98	CT574045.1
15	<i>Uncultured bacterium</i> gene	100	AB494300.1
16	<i>Uncultured bacterium</i> clone GN01-8.177	87	DQ154877.1

等组成,总糖、粗蛋白和粗脂肪含量高,对不同组分降解利用的微生物不同,对底物的分解消化具有阶段性,微生物群落结构出现更替现象,从而造成微生物差异性较大,表现出丰富的多样性及明显的优势微生物,麦秸中纤维素、半纤维素和木质素成分结构复杂、含量偏高,对其进行降解利用需要多种微生物协同作用,种类也十分复杂<sup>[21]</sup>,同时也由于其成分的单一性及难降解性,微生物群落结构不会发生明显的变化,表现出各种微生物数量相差不大,含量相对稳定,没有特别明显的优势条带,这与细菌 DGGE 图谱和多样性指数所反映出来的结论相符。

### 2.2.2 厌氧反应器中古菌多样性分析

由古菌 DGGE 图谱(图 1B)可知,3 个样品中的条带清晰明亮,条带总数减少,在 4~10 之间,三者共有的条带占总条带的 40%,果蔬和麦秸的优势条带较为突出,分别达到 8 条和 6 条。由于产甲烷菌种类相对较少,且利用的基质大部分相同(如二氧化碳、甲酸、乙酸等)<sup>[22]</sup>,故表现出较高的相似性;Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数相对于细菌均减小,且果蔬样品要高于餐厨和麦秸样品,分别达到 2.38 和 0.89,麦秸样品的为 2.19 和 0.85,同样高于餐厨样品,二者的木质素含量相对偏高(见表 1),对其降解利用可能需要特殊的产甲烷菌,这或许是其出现特殊优势条带的原因。

由表 6 和图 2 表明,餐厨、果蔬、麦秸 3 种样品

中共有的优势条带为 A、B、I、J,测序结果显示,A 与甲烷鬃菌属(*Methanoseta*)相似度为 100%,B 与甲烷八叠球菌(*Methanosarcinales*)相似度为 99%,其中 A 与 Klocke M<sup>[23]</sup>研究的以生物质原料进行两相 LBR 反应器中的产沼气微生物极为相似,而 J 与甲烷螺菌属(*Methanospirillum*)相似度为 98%,这与 Trzcinski A P<sup>[24]</sup>使用 DGGE 法在 35 °C 条件下膜生物处理市政固体废弃物所发现的产甲烷微生物达到 99%的结果相似;果蔬样品特有的优势条带为 C、D、G、H,其中 G 与甲烷囊菌属(*Methanoculleus*)相似度达到 99%;麦秸样品中特有的优势条带为 E、F,二者均为未培养的古菌,其中 F 与 Grabowski A<sup>[25]</sup>研究的低温生物降解水库中的油类所发现的产甲烷微生物相似度达到 100%。

由图 3 所示,果蔬特有优势条带 D 与麦秸特有优势条带 E 亲缘关系达到 99%,同时 C 与 F 达到 100%,由于餐厨和麦秸中都含有大量的木质素物质,这有可能是导致其出现相似性较高的产甲烷菌的原因。果蔬样品中特有的优势条带 G、H 与甲烷囊菌属(*Methanoculleus*)十分相似,而其大部分发现于反刍动物瘤胃内<sup>[26]</sup>,这同样表明 G、H 与高含量的木质素物质的降解甲烷化利用有很大的关系。

研究表明,虽然 3 个反应器接种污泥及运行工艺存在差异,但经过长时间的运行后均趋于稳定,较为开放的体系使得物料性质的差异对微生物的选择性

更为明显, DGGE 结果表明, 细菌多样性指数越高, 反应器 VS 产气率越高, 这表明多种的细菌共同作用更利于原料的降解。3 种物料在高负荷的厌氧消化过程

中, 拟杆菌(*Bacteroidetes*)、甲烷鬃菌属(*Methanosae-ta*)和甲烷螺菌属(*Methanospirillum*)均为相同的优势微生物, 说明这几种微生物对不同的物料均有很强的

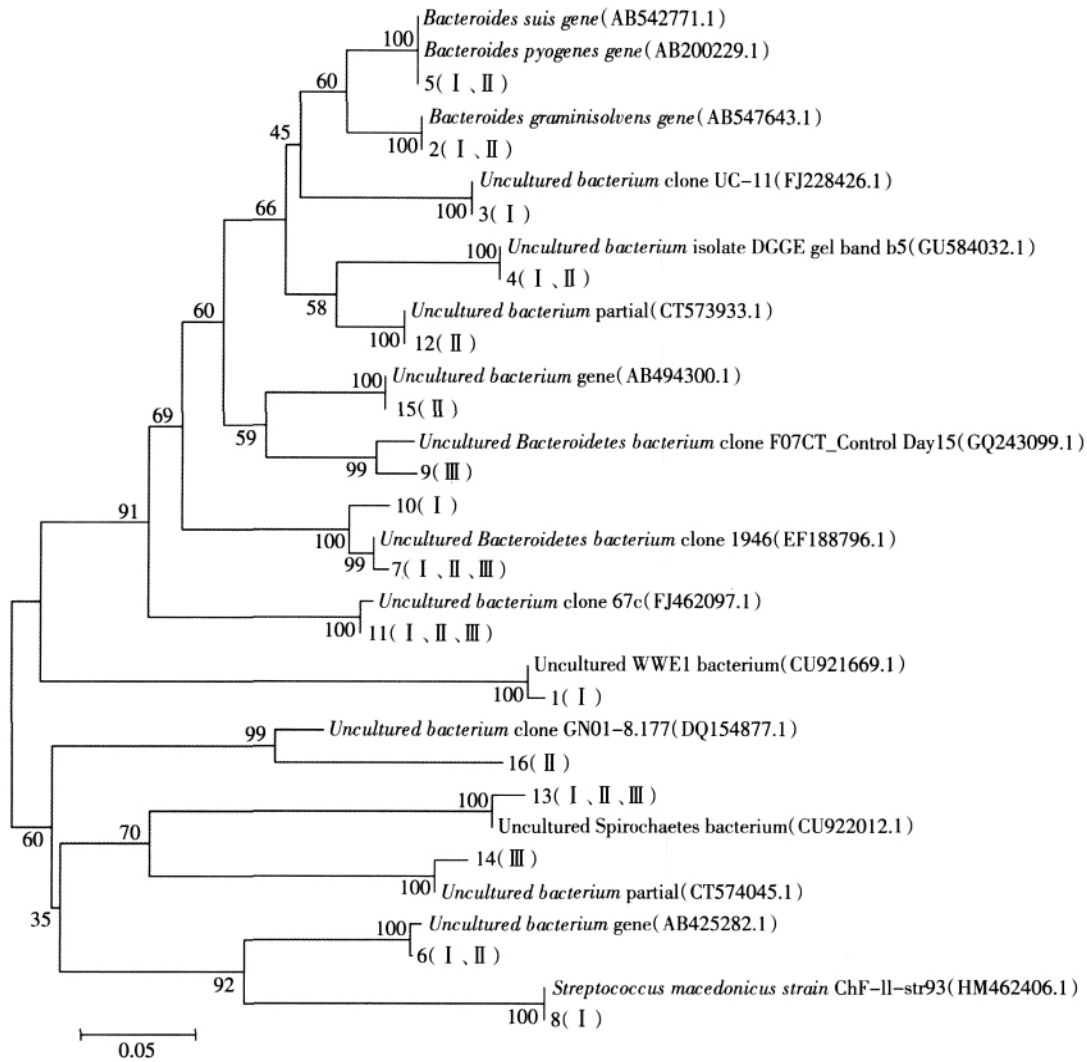


图 2 餐厨、果蔬、麦秸样品中细菌系统发育树图

Figure 2 Phylogenetic tree based on the sequences of bacteria in various digesters

表 6 餐厨、果蔬、麦秸样品古菌 DGGE 图谱优势菌种测序结果

Table 6 Sequencing result of archaea DGGE preponderance bands in various digesters

条带编号	最高相似度菌株名称	相似度/%	登录号
A	<i>Uncultured Methanosae-ta</i> sp. clone DI_G06	100	AY454766.1
B	<i>Uncultured Methanosarcinales</i> archaeon	99	FN646492.1
C	<i>Uncultured archaeon</i> clone arch6	99	GQ369771.1
D	<i>Archaeon enrichment culture</i> clone C4-54C-A	99	GU196192.1
E	<i>Uncultured archaeon</i> clone SB-BN31	100	EF639575.1
F	<i>Uncultured methanogenic archaeon</i> gene	100	AB491299.1
G	<i>Uncultured Methanoculleus</i> sp. clone C65	99	GU475175.1
H	<i>Uncultured archaeon</i> clone F5T20L533	99	DQ262575.1
I	<i>Archaeon enrichment culture</i> clone C4-46C-A	99	GU196185.1
J	<i>Uncultured Methanospirillum</i> sp. clone ARK2_26	98	GQ995121.1

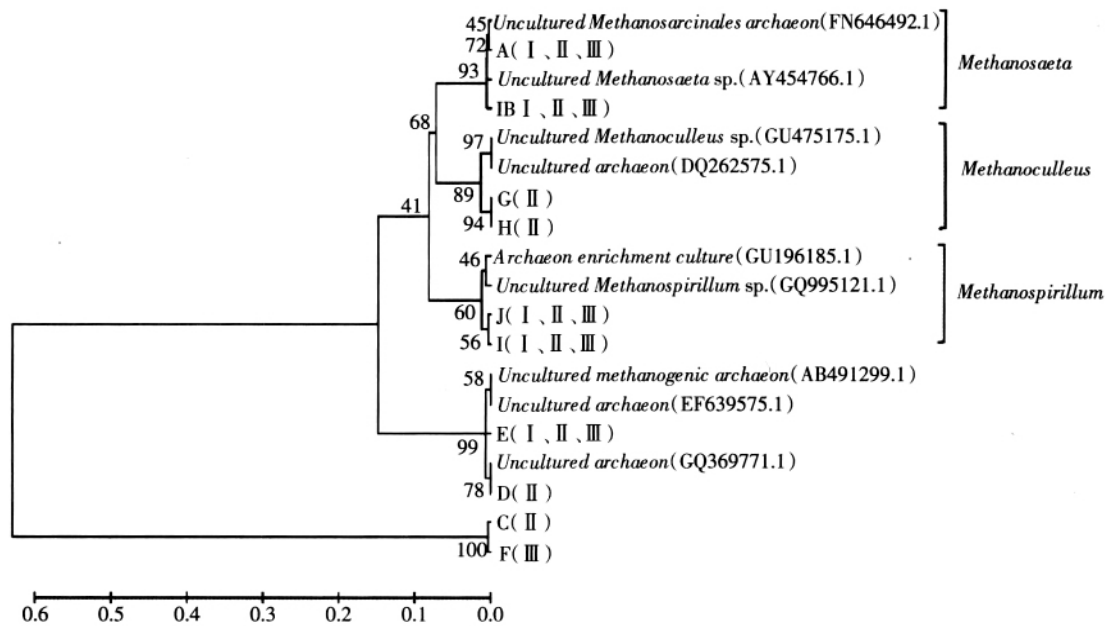


图3 餐厨、果蔬、麦秸样品中古菌系统发育树图

Figure 3 Phylogenetic tree based on the sequences of archaea in various digesters

降解性,研究其最佳的培养条件并在反应器调控中加以应用,将有助于提高厌氧反应器的处理能力。

### 3 结论

(1)35℃时,餐厨垃圾、果蔬垃圾和麦秸在进料负荷分别为2.5、3.25 g VS·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>和1.3 g VS·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的条件下,均能良好地进行厌氧消化过程,但3者的VS产气率存在差异,由高到低依次为餐厨垃圾(756.4 mL·g<sup>-1</sup>VS<sup>-1</sup>)、麦秸(696.5 mL·g<sup>-1</sup>VS<sup>-1</sup>)和果蔬垃圾(433.5 mL·g<sup>-1</sup>VS<sup>-1</sup>)。

(2)样品中,细菌 Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数分别为 3.14±0.17 和 0.94±0.02,古菌分别为 2.11±0.45 和 0.83±0.09,较高的多样性指数体现了微生物的整体活力,间接反映了消化工艺的优劣程度;在种类和数量上,细菌相对于古菌均处于优势,3个样品均以拟杆菌(*Bacteroidetes*)为主,古菌中的优势产甲烷菌主要表现为甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)和甲烷螺菌属(*Methanospirillum*),其中果蔬垃圾中特有的古菌为甲烷囊菌属(*Methanoculleus*),对相同的优势微生物进行深入的研究更有利于厌氧工艺的优化。

(3)3种样品的细菌共有条带为22%,古菌为40%,表明水解酸化阶段3种样品中的微生物差异很大,而产甲烷阶段差异相对较低且产甲烷含量差异不大,说明加强水解酸化过程的调控更利于降低原料成分差异、提高消化效率以及降低不同原料共消化的难度。

同时测序分析结果显示,厌氧消化体系内未培养微生物所占比例较大(细菌为56%,古菌为40%),表明厌氧消化体系中的微生物需要进一步深入的研究。

### 参考文献:

- [1] Lettinga G. Anaerobic-digestion and waste-water treatment systems[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1995, 67(1): 3-28.
- [2] Narihiro T, Sekiguchi Y. Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: A microbiological update[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(3): 273-278.
- [3] Hendriks ATWM, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(1): 10-18.
- [4] 吴云,张代钧,杨钢.餐厨垃圾厌氧消化水解机理及动力学模型研究[J]. *环境科学学报*, 2010, 30(1): 142-147.  
WU Yun, ZHANG Dai-jun, YANG Gang. The mechanism and kinetics of hydrolysis in the anaerobic digestion of kitchen wastes[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(1): 142-147.
- [5] 夏吉庆,李文哲,李惠强.牛粪厌氧发酵的载体筛选试验研究[J]. *环境工程学报*, 2008, 2(10): 1393-1397.  
XIA Ji-qing, LI Wen-zhe, LI Hui-qiang. Experimental study on screening of carriers for cattle manure anaerobic fermentation[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2008, 2(10): 1393-1397.
- [6] 吴云.餐厨垃圾厌氧消化影响因素及动力学研究[D].重庆:重庆大学,2009.  
WU Yun. Study on influence factors and kinetics in anaerobic digestion of kitchen wastes[D]. Chongqing: Chongqing University, 2009.
- [7] 董永亮.果蔬废弃物厌氧处理产能实验研究[D].哈尔滨:哈尔滨工程大学,2008.

- DONG Yong-liang. Study on energy production by anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes[D]. Harbin: Harbin Engineering University, 2008.
- [8] Wang Q, Yamabe K, Narita J, et al. Suppression of growth of putrefactive and food poisoning bacteria by lactic acid fermentation of kitchen waste[J]. *Process Biochemistry*, 2001, 37(4): 351-357.
- [9] 康佳丽, 李秀金, 朱保宁, 等. NaOH 固态化学预处理对麦秸沼气发酵效率的影响研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(5): 1973-1976. KANG Jia-li, LI Xiu-jin, ZHU Bao-ning, et al. Effect of solid state pretreatment with sodium hydroxide on biogasification efficiency of wheat straw[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(5): 1973-1976.
- [10] Zwieler J, Liszt K, Handschur M, et al. Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of Bacteroides, bifidobacteria and Clostridium cluster IV in institutionalized elderly[J]. *Experimental Gerontology*, 2009, 44(6-7): 440-446.
- [11] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [12] Ovreas L, Forney L, Daae F L, et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saalenannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9): 3367-3373.
- [13] Barns S M, Fundyga R E, Jeffries M W, et al. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(5): 1609-1613.
- [14] Raskin L, Poulsen L K, Noguera D R, et al. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization[J]. *Applied and environmental microbiology*, 1994, 60(4): 1241-1248.
- [15] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1995, 59(1): 143-169.
- [16] 于芳芳, 伍健东. 氨氮对厌氧颗粒污泥产甲烷菌的毒性研究[J]. *化学与生物工程*, 2008, 25(4): 75-78. YU Fang-fang, WU Jian-dong. Toxicity study of ammonium on methanogenic bacteria in anaerobic granular sludge[J]. *Chemistry and Bioengineering*, 2008, 25(4): 75-79.
- [17] Konstantinov S R, Zhu W Y, Williams B A, et al. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(2): 225-235.
- [18] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis(TGGE) in microbial ecology[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1): 127-141.
- [19] Wang H, Lehtomi A, Tolvanen K, et al. Impact of crop species on bacterial community structure during anaerobic co-digestion of crops and cow manure[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(7): 2311-2315.
- [20] Egrave D R, Desvignes V, et al. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge [J]. *The ISME Journal*, 2009, 3.
- [21] 张伟力, 吴宏忠, 丁晓娟, 等. 瘤胃微生物不同种群对小麦秸秆外降解的研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2003, 30(3): 285-288. ZHANG Wei-li, WU Hong-zhong, DING Xiao-juan, et al. Character of in vitro wheat straw degradation by different microbiology populations in rumen[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2003, 30(3): 285-288.
- [22] 公维佳, 李文哲, 刘建禹. 厌氧消化中的产甲烷菌研究进展[J]. *东北农业大学学报*, 2006, 37(6): 838-841. GONG Wei-jia, LI Wen-zhe, LIU Jian-yu. Progress of research on methanogens bacteria in anaerobic digestion [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2006, 37(6): 838-841.
- [23] Klocke M, Nettmann E, Bergmann I, et al. Characterization of the methanogenic archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2008, 31(3): 190-205.
- [24] Trzcinski A P, Ray M J, Stuckey D C. Performance of a three-stage membrane bioprocess treating the Organic Fraction of Municipal Solid Waste and evolution of its archaeal and bacterial ecology[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(6): 1652-1661.
- [25] Grabowski A, Nercessian O, Fayolle F, et al. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 54(3): 427-443.
- [26] 王剑飞, 申之义. 反刍动物瘤胃内古菌的研究进展[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(2): 14-17. WANG Jian-fei, SHEN Zhi-yi. Research advance in rumen archaea[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2010, 31(2): 14-17.