

# 汽爆玉米秸秆产沼气及其古菌群落解析

刘丽英<sup>1</sup>, 李显耀<sup>2</sup>, 刘珂欣<sup>1</sup>

(1. 山东农业大学生命科学学院, 山东泰安 271018;  
2. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

**摘要:** 为研究汽爆玉米秸秆产沼气及其发酵过程中古菌群落的变化, 以汽爆玉米秸秆为原料在总固体 (total solids, TS) 含量为 3% 的条件下进行批式中温发酵产沼气, 检测发酵过程中 pH 值、挥发性脂肪酸 (volatile fatty acids, VFAs) 及沼气产量的变化, 同时取样, 利用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 法研究发酵过程中古菌群落的变化情况。结果表明, 该系统启动迅速, 料液在起始 4 d 内产气量较大, 但随着有机酸的累积造成料液酸化, 中间段的产气量减小, 料液总产气量达到 9 075 mL。甲烷含量稳步上升, 在第 19 天达到最高值, 占总气体量的 65.3%。DGGE 分析表明, 系统中古菌多样性丰富, 汽爆样品与对照样品间产甲烷菌种类多样性区别明显。甲烷粒菌属 (*Methanocorpusculum*) 是贯穿整个厌氧发酵过程中最主要的产甲烷菌。其中, 在厌氧发酵产气前期, 发酵体系中主要以甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*) 为主, 而在厌氧发酵中后期则主要以甲烷球菌属 (*Methanococcus*) 和甲烷粒菌属为主。汽爆玉米秸秆沼气系统古菌群落结构的阐明可为秸秆沼气工程的调控提供科学数据。

**关键词:** 生物能; 汽爆玉米秸秆; 沼气; 古菌群落; 梯度凝胶电泳

中图分类号: TK6 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2017)18-2042-06

## Biogas production using steam exploded cornstalks and its archaea community composition study

LIU Liying<sup>1</sup>, LI Xianyao<sup>2</sup>, LIU Kexin<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China;  
2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

**Abstract:** With steam exploded cornstalks as raw material [total solids (TS) content of 3%], a mesophilic batch fermentation study was carried out to investigate archaea composition, biogas production rate, pH value and volatile fatty acids (VFAs). Archaea composition was studied using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Fermentation started rapidly, and biogas production rate of feed liquid was large within 4 d. However, the gas production decreased in the middle stage of fermentation because of the acidification of material liquid caused by VFAs accumulation and the largest gas production could reach 9 075 mL. Methane in the biogas increased stably and could be 65.3% of the total amount of gas in the nineteenth day. DGGE analysis showed that archaea diversity was rich. Archaea diversity of the steam exploded cornstalks treatment group was different from that of the control group. *Methanocorpusculum* dominated in the whole fermentation period; *Methanobacterium* dominated in the early stage of fermentation period; *Methanococcus* and *Methanocorpusculum* dominated in the middle and later periods of the fermentation. This research provides implications on the regulation of archaea composition for biogas production using steam exploded cornstalks.

**Key words:** bioenergy; steam exploded cornstalks; biogas; archaea composition; gradient gel electrophoresis

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (新教师基金) (20133702120005); 山东省自然科学基金 (ZR2013BQ007)

作者简介: 刘丽英 (1976—), 女, 副教授, 主要研究方向: 农业废弃物资源化利用. E-mail: lilyxy@163.com

## 0 引言

沼气发酵是一个复杂的生化转化过程,转化效率与发酵原料、发酵系统中微生物的关系十分密切,而发酵原料的变化会影响微生物的组成<sup>[1]</sup>。为揭示沼气发酵机理,提高发酵效率,人们对发酵原料和沼气微生物进行大量研究<sup>[2-4]</sup>发现,汽爆处理能够显著提高木质纤维类原料的沼气发酵效率<sup>[5-7]</sup>,而对汽爆玉米秸秆发酵系统中的微生物群落结构研究较少。沼气发酵微生物主要包括水解发酵微生物、产氢产乙酸细菌和产甲烷古菌三大类,至少涵盖了 20 个门的真细菌和 5 个纲的古菌<sup>[8]</sup>。但由于条件限制,目前实验室获得的纯培养微生物所占比例极低 (<1%)<sup>[9]</sup>。随着生物技术的发展,人们开始从分子水平研究厌氧发酵过程中微生物的变化情况。TRAVERSI 等<sup>[10]</sup>利用实时定量 PCR (quantification real-time PCR, qRT-PCR) 技术测定厌氧消化罐内产甲烷菌的浓度,对 50 个样品统计分析发现,沼气产率和产甲烷菌的丰度呈正相关 ( $r=0.579, P<0.001$ )。袁月祥等<sup>[11]</sup>通过高通量测序研究发现,在玉米秸秆沼气发酵过程中的优势菌群为拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes)。在以猪粪为主要原料的沼气池中,厚壁菌门、拟杆菌属和螺旋体属在纤维素分解、蛋白质分解、水解酸化和发酵产酸中起主要作用,产甲烷菌主要为氢营养型或氢营养/解乙酸型<sup>[12]</sup>。不同发酵原料的沼气池中产甲烷菌的优势类群存在差异性,又有一定相似性<sup>[1]</sup>。本研究旨在通过研究汽爆玉米秸秆厌氧发酵产生的沼气情况,并采用 qRT-PCR 变性 DGGE 技术研究系统中产甲烷古菌群落的组成变化,为秸秆沼气发酵机理的认识提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

玉米秸秆切短至 3.5 cm 左右,按原料质量比 1:1 加水浸润 5~10 min 后,将原料放入汽爆罐(中国科学院过程工程研究所自制)中,密闭后通入饱和水蒸气,使压力迅速升至 1.5 MPa,维持 5 min 后迅速释压,原料从出料口喷出并被爆碎即制得汽爆玉米秸秆。沼液 [TS 含量为 2.0%;挥发性固体 (volatile solid, VS) 含量为 1.39%],取自泰安农户;牛粪,取自山东农业大学动物实验基地。汽爆后秸秆和牛粪的 TS 含量、含碳量(C)、含氮量(N)如表 1 所示。

表 1 发酵原料中 TS、C 和 N 的含量 (%)

Tab. 1 Contents of TS, C and N in the fermentation materials (%)

物料	TS	C	N
汽爆后秸秆	21.70	33.51	1.25
牛粪	12.67	27.60	1.23

### 1.2 试验方法

试验前测定各原料的含碳量、含氮量和 TS 含量,试验中用牛粪调节各发酵料液的碳氮比(C:N)=25:1,沼液接种量为 30%,各发酵组根据所需 TS 含量计算各原料所需质量,发酵料液质量以占发酵罐体积的 80%左右为标准,各组均做 1 组平行试验。将各发酵原料装入发酵罐中并置于恒温培养箱中,恒温 35℃进行厌氧发酵。试验过程中,每日测定发酵液的 pH 值、发酵产气量及产气中甲烷的含量,并在测定数据时适量摇晃发酵罐起到搅拌作用。

### 1.3 常规分析方法

原料的碳质量分数:重铬酸钾外热源法;氮质量分数:凯氏定氮法;发酵液的 pH 值:pH 计(上海雷磁);发酵液 TS 含量:(105±5)℃的恒温箱中烘至恒重;VS 含量:(550±20)℃马弗炉中灼烧至恒重;产气量:排水集气法;甲烷含量:气相色谱法,采用热传导检测仪(thermal conductivity detector, TCD)测

定, Porapak N 色谱柱, 250  $\mu$ L 的气体定量进气环, 检测器温度为 150 $^{\circ}$ C, 柱温为 80 $^{\circ}$ C, 进气温度为 60 $^{\circ}$ C.

#### 1.4 DNA 提取与纯化

取 2 mL 样品在 14 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃上清液, 加入 500 mg 玻璃珠和 1 mL SLX Mlus 缓冲液, 用最大速度涡旋 3~5 min, 再使用 OMEGAE.Z.N.A. Soil DNA Kit 试剂盒抽提与纯化样品基因组 DNA. 为避免偏差, 每个样品进行 3 次重复, 同一样品混合后用 2%琼脂糖 (质量/体积, 下同) 凝胶电泳, 切胶回收。提取的 DNA 贮存在-20 $^{\circ}$ C 备用。

#### 1.5 产甲烷菌 16S rDNA 序列扩增与纯化

产甲烷菌 16S rDNA 的 PCR 扩增引物: 0357F, 5'-CCCTACGGGGCGCAGCAG-3'; 0691R, 5'-GGATTACARGATTTCAC-3'. GC clamp: CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG. 将 GC “夹子” 加到引物 0357F 的 5'端以提高 DGGE 的灵敏度。反应采用降落 PCR 策略。反应体系总体积为 50  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 41.25  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer (含 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 5  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, Taq 酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, 模板 DNA 0.5  $\mu$ L. 热循环参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 63~53 $^{\circ}$ C 1 min (退火温度每 2 个循环降低 1 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 1 min; 20 个循环后 53 $^{\circ}$ C 扩增 15 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min. PCR 产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.6 变性 DGGE 分析

采用 D-Code 突变检测系统 (Bio-Rad, USA) 对样品进行分析。用 8%的聚丙烯酰胺凝胶分离, 变性梯度为 35%~55%. 在 60 V 电压下, 60 $^{\circ}$ C 恒温, 1 $\times$ TAE 中电泳 16 h. 电泳完毕后用 SYBR green I (1:10 000 稀释) 染色 20 min 后, 凝胶成像系统进行拍照。

DGGE 图谱用 Quantity One 软件进行分析, 利用香农多样性指数、丰度、均匀度对各样品古菌的多样性进行评价<sup>[13]</sup>。

#### 1.7 DGGE 条带的测序与序列分析

选取较有代表性的条带, 用洁净的手术刀片将目标 DGGE 条带完整切下并装入 1.5 mL 离心管中, 用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (上海生工) 的方法进行回收。取适量做模板进行 PCR 扩增, 除引物不带 GC “夹板” 外, 扩增条件及步骤同 1.5 节。产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 按照 pEASY-T1 Cloning Kit 的说明构建各回收条带的克隆文库, 经蓝白斑筛选并鉴定阳性克隆, 选择含有正确插入片段的克隆送至上海生物工程技术服务有限公司测序。序列测序后去除载体序列, 测序结果在 GenBank 中进行序列同源性比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 汽爆玉米秸秆在 TS 含量 3%条件下的发酵效果

以汽爆玉米秸秆 (1.5 MPa, 5 min) 为发酵原料, 在料液 TS 含量为 3%的条件下进行中温 (35 $^{\circ}$ C) 厌氧发酵。发酵料液 pH 值呈现先降后升的趋势<sup>[6]</sup>, 系统 pH 值很快降低至 6.00 以下, 但随着发酵过程的进行, 料液的 pH 值又开始逐渐升高, 在第 20 天时达到 6.55 (如图 1 所示)。对系统中的 VFAs 进行检测, 发现在发酵前期乙酸含量基本呈现上升趋势, 丙酸和丁酸的含量波动性上升且在第 8 天时 VFAs 含量达到最高点 (如图 2 所示), 说明随着有机酸的积累, 料液开始酸化, 宏观表现为料液的 pH 值降低 (如图 1 所示)。随着发酵的进行, 有机物又被微生物大量分解, 产生以甲烷和二氧化碳为主的气体, 料液中

乙酸、丁酸的含量逐渐波动性降低（如图 2 所示），pH 值随之上升。这一现象说明，发酵系统中的微生物具有自我调节 pH 值的能力，但如果系统酸化超过调节能力范围，则会造成不产气。

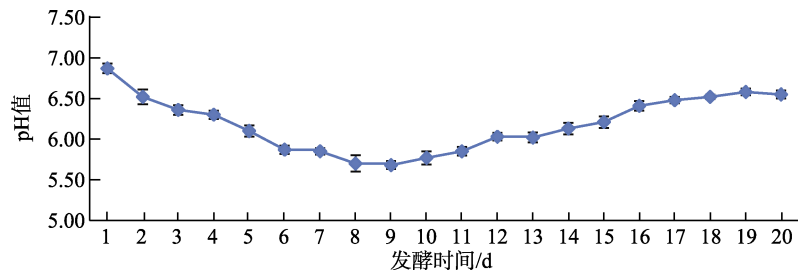


图 1 发酵过程中料液 pH 值的变化

Fig. 1 pH value changes of feed liquid during fermentation

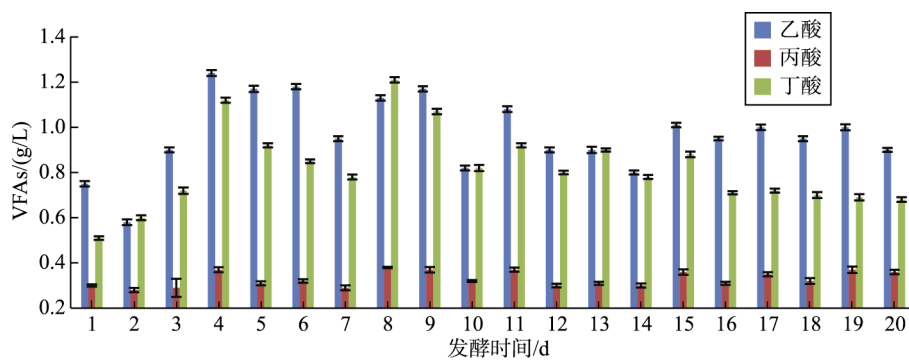


图 2 发酵过程中料液 VFAs 含量的变化

Fig. 2 VFAs changes of feed liquid during fermentation

汽爆玉米秸秆在 TS 含量为 3% 下厌氧发酵的产气情况与甲烷含量如图 3、图 4 所示。料液在起始 4 d 内产气量较大，但随着有机酸的累积造成了料液酸化，在中间段产气量减小，整个发酵过程中，料液总产气量达到 9 075 mL（如图 3 所示）。利用气相色谱仪对产气中的甲烷含量进行分析，如图 4 所示。随着发酵的进行，甲烷的含量稳步上升，在第 19 天达到最高值 65.3%。

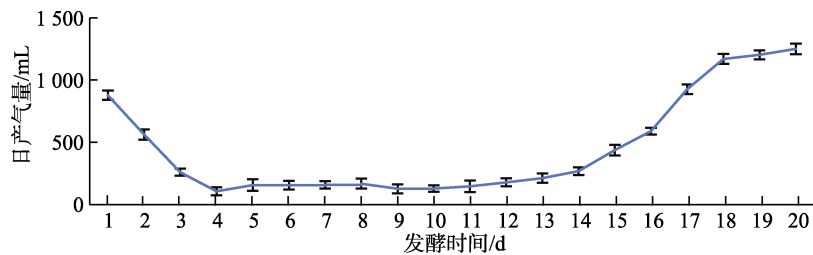


图 3 产气量变化

Fig. 3 Changes of biogas production

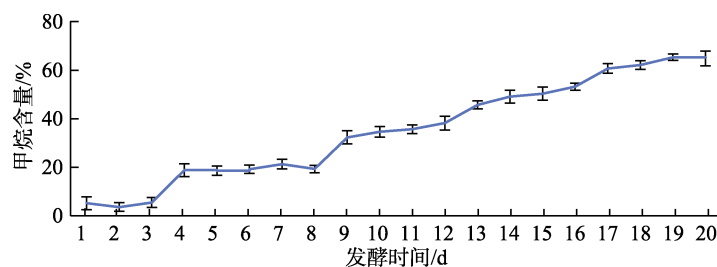


图 4 甲烷含量变化

Fig. 4 Changes of methane production

## 2.2 厌氧发酵体系中产甲烷菌群落结构分析

从厌氧发酵瓶中采集 TS 含量为 3%，蒸汽爆破条件为 1.5 MPa、5 min 下各个发酵时期的样品，4℃ 保存备用。分析样品采集时间分别为发酵第 4、9、15、20 天。采用 DGGE 技术分析发酵体系中产甲烷菌的多样性。产甲烷菌高变区目的片段的变性 DGGE 图如图 5 所示。条带 1、2、3、4 分别代表厌氧发酵第 4、9、15、20 天的样品，第 5 条带代表未汽爆秸秆发酵 4 d 的样品。

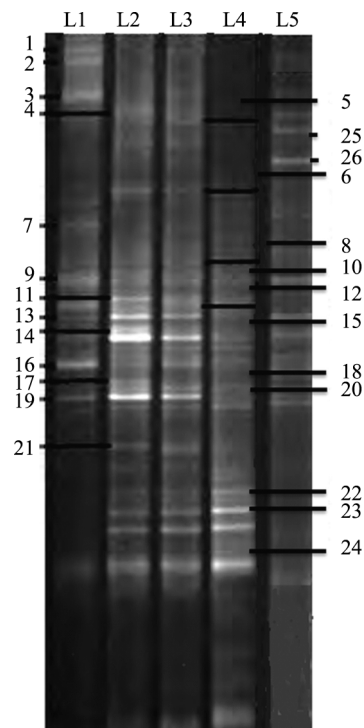
古菌的 DGGE 图谱（如图 5 所示）条带清晰。图谱中条带的数目、强度及迁移位置反映了样品中微生物类群的多样性及丰度。不同位置的条带代表不同的微生物类群，而同一水平位置的条带则代表同种微生物菌群，其条带的明暗程度则反映该微生物类群在不同样品中的相对丰度，得到的条带越多说明样品的多样性越高。由图 5 和表 2 可知，每个样品 DGGE 图谱中的条带总数均为 16 条以上，均匀度指数也在 0.910 以上，说明样品中古菌种类十分丰富<sup>[14]</sup>。但发酵时间不同的样品的条带数不同，对照与处理也存在差异<sup>[1]</sup>。在发酵初期条带较多，其中汽爆样品为 20 条，对照未汽爆样品为 19 条。随着发酵的进行，在中后期古菌的条带数稳定在 17 条，这些都说明了不同原料、不同发酵时间均会对古菌群落结构产生影响<sup>[11]</sup>。

测序结果显示，在厌氧发酵前期，发酵系统中以甲烷杆菌属（*Methanobacterium*）居多（条带 2、3），甲烷球菌属（*Methanococcus*）和甲烷杆菌属（*Methanobacterium*）在厌氧发酵的不同时期分别出现，而在厌氧发酵的整个过程中产甲烷菌群主要以甲烷球菌属（*Methanococcus*）和甲烷粒菌属（*Methanocorpusculum*）为主（条带 9~20）。

汽爆处理后的样品与未处理对照样品相比，产甲烷菌种类的多样性有明显区别。发酵启动时期即第 4 天的 DGGE 条带结果显示，甲烷杆菌属（*Methanobacterium*）条带 25 和条带 26 在未处理的样品中含量丰富，而在汽爆样品中含量很少，可能是由于秸秆经过汽爆之后，结构疏松，其中大分子物质易于被发酵效率高的发酵型细菌和产酸菌分解，明显缩短了厌氧发酵启动时间，在厌氧发酵的前 4 d 已开始正常产气，发酵液的 pH 值偏向酸性，而甲烷杆菌属（*Methanobacterium*）的一些菌株（条带 25 和条带 26）对发酵液的 pH 值较为敏感。

## 3 结论

以汽爆玉米秸秆（1.5 MPa，5 min）为发酵原料，在料液 TS 含量为 3% 的条件下进行中温（35℃）厌氧发酵，发酵料液 pH 值呈先降后升的趋势，而 VFAs 则呈先升后降的趋势，甲烷含量不断增加，至发



注：L1~L4 为不同发酵时间样品；L5 为对照

图 5 产甲烷菌的变性 DGGE 图片

Fig. 5 DGGE fingerprint of *Methanogens*

表 2 不同样品间古菌多样性指数

Tab. 2 Archaeal diversity indices of different samples

样品	香农指数	丰度	均匀度指数
1	3.08	20	0.953
2	2.78	16	0.915
3	2.96	17	0.923
4	3.02	17	0.924
5	3.06	19	0.936

酵第 19 天达到最高。

发酵系统中古菌多样性丰富，汽爆样品与对照样品间产甲烷菌种类多样性区别明显。甲烷粒菌属 (*Methanocorpusculum*) 是贯穿整个厌氧发酵过程的最主要的产甲烷菌。其中，在厌氧发酵产气前期，发酵体系中主要以甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*) 为主，而在厌氧发酵中后期则主要以甲烷球菌属 (*Methanococcus*) 和甲烷粒菌属 (*Methanocorpusculum*) 为主。

#### [参考文献] (References)

- [1] 徐彦胜, 阮志勇, 刘小飞, 等. 应用 RFLP 和 DGGE 技术对沼气池中产甲烷菌多样性的研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23 (4): 1319-1324.  
XU Y S, RUAN Z Y, LIU X F, et al. Study on methanogen diversity in biogas digesters using RFLP and DGGE[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2010, 23(4): 1319-1324. (in Chinese)
- [2] BAUER A, BÖSCH P, FRIEDL A, et al. Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 142(1): 50-55.
- [3] BRUNI E, JENSEN A P, ANGELIDAKI I. Steam treatment of digested biofibers for increasing biogas production[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(19): 7668-7671.
- [4] SANDERSON K. Lignocellulose: a chewy problem[J]. Nature, 2011, 474(7352): S12-S14.
- [5] TEGHAMMAR A, YNGVESSON J, LUNDIN M, et al. Pretreatment of paper tube residuals for improved biogas production[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(4): 1206-1212.
- [6] HORN S J, ESTEVEZ M M, NIELSEN H K, et al. Biogas production and saccharification of *Salix* pretreated at different steam explosion conditions[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 7932-7936.
- [7] 徐桂转, 范帅尧, 王新锋, 等. 汽爆预处理青玉米秸秆厌氧发酵特性[J]. 农业工程学报, 2012, 28 (13): 205-210.  
XU G Z, FAN S Y, WANG X F, et al. Anaerobic fermentation characteristic of green corn straw pretreated by steam explosion[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(13): 205-210. (in Chinese)
- [8] AHRING B K. Perspectives for anaerobic digestion[J]. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2003, 81: 1-30.
- [9] KAEBERLEIN T, LEWIS K, EPSTEIN S S. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. Science, 2002, 296(5570): 1127-1129.
- [10] TRAVERSI D, VILLA S, LORENZI E, et al. Application of a real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity[J]. Journal of Environmental Management, 2012, 111(7): 173-177.
- [11] 袁月祥, 文昊深, 黄显波, 等. 玉米秸秆产生物燃气及其微生物群落解析[J]. 化工学报, 2014 (5): 1784-1891.  
YUAN Y X, WEN H S, HUANG X B, et al. Biogas production using cornstalks and prokaryotic community composition[J]. CIESC Journal, 2014(5): 1784-1891. (in Chinese)
- [12] LIU F H, WANG S B, ZHANG J S, et al. The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106: 952-966.
- [13] SHANNON C E, WEAVER W. The mathematical theory of communication[M]. Urbana: University of Illinois Press, 1963.
- [14] 韩睿, 陈来生, 李莉, 等. PCR-DGGE 研究青海农村户用沼气池微生物群落结构[J]. 中国环境科学, 2015, 35 (6): 1794-1804.  
HAN R, CHEN L S, LI L, et al. Microbial community of rural household biogas digesters in Qinghai by PCR-DGGE[J]. China Environmental Science, 2015, 35(6): 1794-1804. (in Chinese)