

分层接种对猪粪厌氧干发酵产气性能及微生物群落结构的影响

李丹妮¹, 高文萱¹, 张克强¹, 孔德望², 王思淇¹, 杜连柱^{1*}

(1. 农业农村部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2. 杭州能源环境工程有限公司, 杭州 310020)

摘要: 为避免厌氧干发酵酸抑制, 提高产气效率, 以猪粪和玉米秸秆为发酵原料, 采用中温批式试验, 在总固体 (Total Solid, TS) 为 20%、接种比为 25% 的条件下研究分层接种和混合接种对猪粪干发酵厌氧消化性能的影响。结果表明: 2 种接种方式下的发酵体系内挥发性脂肪酸 (Volatile Fatty Acids, VFAs) 均发生明显积累, 其中, 分层接种在第 15 天的 TVFAs 质量浓度达到 33.0 mg/g, 之后明显降低, 至发酵结束时 VFAs 消耗殆尽。混合接种从第 15 天至发酵结束, TVFAs 质量浓度维持在 29.2~38.5 mg/g 高水平范围内。分层接种的累积挥发性固体甲烷产率为 211.5 mL/g。高通量测序结果显示, 氢营养型产甲烷途径在 2 种接种方式下均占主导, 但分层接种增加了发酵体系中微生物的丰富度和多样性, 且群落结构更加稳定。进一步分析表明, 乙酸和 pH 值是影响厌氧干发酵中微生态结构的主要环境因子。该研究结果为解除畜禽养殖废弃物酸抑制、提高产气效率提供理论依据与有益借鉴。

关键词: 发酵; 粪; 微生物群落; 分层接种; 混合接种

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.01.030

中图分类号: X705

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2021)-01-0251-08

李丹妮, 高文萱, 张克强, 等. 分层接种对猪粪厌氧干发酵产气性能及微生物群落结构的影响[J]. 农业工程学报, 2021, 37(1): 251-258. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.01.030 http://www.tcsae.org

Li Danni, Gao Wenxuan, Zhang Keqiang, et al. Influences of layer inoculation on biogas production and microbial community in solid-state anaerobic fermentation of pig manure[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2021, 37(1): 251-258. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.01.030 http://www.tcsae.org

0 引言

近年来, 中国的沼气产业发展迅速, 已经成为最大的生物质能源产业之一^[1], 随着畜禽养殖向集约化、规模化发展方式转变, 沼气发酵成为消纳养殖废弃物应用最广泛的有效措施之一^[2]。厌氧干发酵具有有机负荷高、能耗低、消化残余物易处理等优势, 逐渐引起重视, 有望成为畜禽养殖粪污、农作物秸秆等农业废弃物资源化处理和利用的主流工艺^[3]。

尽管厌氧干发酵具有诸多优点, 但 VFAs (Volatile Fatty Acids) 等发酵中间产物的抑制作用, 常常导致发酵启动慢、周期长、产气效率低。为解决以上问题, 学者们开展了大量的试验研究。田梦等^[4]通过猪粪和香蕉秸秆混合发酵, 在 TS (Total Solid) 为 20% 条件下, 累积甲烷产率达 138.0 mL/g, 较秸秆单独发酵提高了 3.1 倍。江皓等^[5]在通过鸡粪和秸秆混合发酵的同时通过沼液回流改善发酵性能, 结果显示累积甲烷产率为 184.3 mL/g, 较不回流组提高了 1.4 倍。猪粪中添加生物炭也能够缓解猪粪厌氧干发酵的酸抑制, 提高甲烷产率, 其中添加 20%

生物炭发酵组的累积 VS 甲烷产率较不添加组提高了 2.0 倍^[6]。于佳动等^[7]研究发现, 在发酵初期通过微曝气可使丙酸累积量较非曝气组下降了 82.6%, 甲烷质量分数提高了 41.8%。接种物对中间代谢产物的耐受能力、厌氧发酵启动时间具有重要影响, 研究主要集中在预混合接种方式 (接种物与底物混匀后发酵) 下接种物驯化和接种比等方面^[8-10], 而对厌氧干发酵不同接种方式的探索及微生物群落结构的动态变化规律与代谢产物 (如 VFAs) 的关联性尚待深入研究。

因此, 本试验以猪粪和玉米秸秆为发酵底物, 通过批式试验对比分层接种和混合接种方式下厌氧干发酵产气性能, 采用高通量测序技术分析 2 种接种方式下厌氧干发酵体系的微生物群落结构及演替规律, 同时利用生态因子综合分析法, 揭示微生物群落结构与环境因子的内在联系, 研究结果有望为解决厌氧干发酵酸抑制, 改善产气性能提供技术支撑与数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用猪粪和玉米秸秆取自天津市西青区某规模化养殖场, 日产鲜猪粪储存于 (4±1)℃ 冰箱中。玉米秸秆粉碎至 1.0~3.0 mm, 存放于干燥通风处。接种物取自实验室前一批次厌氧干发酵后的剩余物。底物与接种物的理化指标见表 1。

1.2 试验装置

试验装置为自制立式厌氧发酵罐, 有机玻璃材质,

收稿日期: 2020-08-25 修订日期: 2020-12-18

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0800800); 中国农业科学院协同创新任务 (CAAS-XTCX2016015)

作者简介: 李丹妮, 研究方向为农业废弃物资源化利用。

Email: 18788857190@163.com

*通信作者: 杜连柱, 研究员, 研究方向为农业废弃物资源化利用。

Email: dulianzhu99@163.com

内径 200 mm，高度 750 mm，有效容积 11 L。发酵罐侧面的垂直方向设置多个取样口，取样口直径 15 mm，顶部设置取气口和排气口，其中排气口连接集气袋。

表 1 底物和接种物的理化指标
Table 1 Characteristics of substrates and inoculum

原料 Materials	总固体 Total Solid TS/%	挥发性固体 Volatile solid VS/%	总碳 Total Carbon TC/%	总氮 Total Nitrogen TN/%	C/N
猪粪 Pig manure	27.5±0.7	22.0±0.3	39.4±0.2	3.9±0.3	10.1
秸秆 Maize stover	90.0±0.2	81.3±0.1	77.0±0.8	1.3±0.0	59.2
接种物 Inoculum	20.9±0.1	10.4±0.2	32.0±0.4	3.5±0.0	9.3

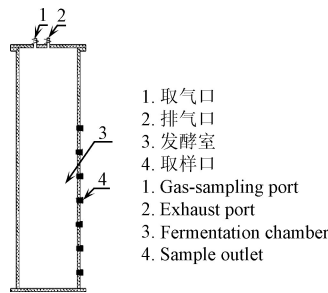


图 1 发酵装置结构简图
Fig.1 Structural diagram of fermentation equipment

1.3 试验设计

以猪粪和玉米秸秆为发酵底物（VS 质量比为 1:1），接种比为 25%（以 VS 计）。按接种方式分为 L 组和 M 组共 2 组处理。其中 L 组为分层接种，首先分别将接种物和底物均分 3 份（按质量计），然后取 1 份接种物平铺至反应器底部，再将 1 份底物均匀铺至接种物层上方（不搅拌），重复上述操作共 3 次，最后形成接种物层位于底物层下方共 3 层。M 组为混合接种，将接种物和底物按比例混匀，称质量后填装至反应器。每组处理 3 个重复，每个反应器的总进料质量为 10.2 kg，发酵体系 TS 为 20%，装料后向各发酵罐内充入氮气创造厌氧环境，室温下发酵。

发酵产生的沼气收集于 20 L 集气袋中，每 1~2 d 测定沼气产量及沼气中 CH₄ 含量；每 2~3 d 从发酵罐侧面上中下取样口采集发酵样品，用于测量 pH 值、溶解性化学需氧量（Solible Chemical Oxygen Demand, SCOD）、VFAs 和氨氮的理化指标。依据产气情况及理化指标的变化，在 0 d（发酵前）、13 d（I 阶段）、33 d（II 阶段）、45 d（III 阶段）和 78 d（IV 阶段）取发酵样品用于微生物群落结构分析。

1.4 分析方法

TS、VS 含量采用标准方法测定^[11]。C、N 含量采用 Vario EL cube 元素分析仪进行测定。将所取上中下 3 个固态样品等质量混匀后用纯净水稀释 10 倍，Mettler-toledo pH 计测定 pH 值。

沼气产量用湿式气体流量计配蠕动泵进行测量。沼气组分和固态样品的 TVFAs 质量浓度采用 Thermo-trace-1300 气相色谱仪测定^[6]。

发酵样品 DNA 采用 Fast DNAs Spin Kit（Mpbio，美国）试剂盒提取，通过超微量分光光度计（Nano Drop 2000，Thermo Scientific，Wilmington，美国）测定 DNA 浓度。根据 DNA 的浓度，以等质量 DNA 混匀平行样品、上中下层样品^[12]，将混合样品送生工生物工程（上海）股份有限公司进行微生物分类测序（Miseq 2×300），测序类群为细菌和古菌，其中细菌扩增引物为 341F-805R，产甲烷古菌扩增引物为 349F-806R。

1.5 动力学模型

试验采用修正的 Gompertz 模型模拟两种接种方式发酵过程中的累积 VS 甲烷产率^[13]，具体模型方程见式（1）。

$$P = P_{\max} \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{\max} e}{P_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

式中 P 为 t 时刻对应的累积 VS 甲烷产率，mL/g； P_{\max} 为最终累积 VS 甲烷产率，mL/g； R_{\max} 为最大 VS 产甲烷速率，mL/(g·d)； λ 为迟滞期，d； t 为时间，d； e 为 2.718 3。根据模型拟合结果预测发酵过程中最大 VS 产甲烷速率 R_{\max} 和迟滞期 λ 。

2 结果与讨论

2.1 产甲烷性能

甲烷产率反映了物料的生物可降解性和转化率，是衡量当前发酵条件下产甲烷能力的一个重要参数^[14]。图 2 为日 VS 甲烷产率和甲烷含量随发酵时间变化情况，L 组的产甲烷性能优于 M 组。由图 2a 可知，L 组的日挥发性固体甲烷产率在发酵前期快速升高，至第 11 天时达到相对稳定状态（3.1 mL/g）。而 M 组日挥发性固体甲烷产率在第 2 天达到 1.0 mL/g 后明显降低，之后呈现缓慢升高趋势，在发酵的第 74 天达到 0.7 mL/g。相较于 L 组，M 组的甲烷产率较低且稳定时间较短，这表明产气受到严重抑制。在厌氧发酵过程中，产甲烷菌的繁殖周期（10~15 d）比水解菌（24~36 h）和产酸菌（80~90 h）的周期长^[15]，混合接种方式下接种物与底物完全混合，产甲烷菌不能及时转化利用体系内的有机酸，因此更易受酸抑制的影响，进而影响产气效率。

沼气中甲烷含量达到最高水平所经历的时间可以反映底物被产甲烷菌群利用的难易程度^[16]。图 2 中 2 试验组的最高甲烷质量分数均在 59% 附近，但经历的时间有明显的差异。L 组在第 20 天达到 59.0%，而后甲烷质量分数在 54.0%~66.0% 范围内波动。而 M 组的甲烷质量分数在前 58 d 低于 34.9%，至发酵结束（第 78 天）时 M 组的甲烷质量分数为 58.1%，较 L 组延迟了 58 d。该差异表明分层接种能够促进微生物对发酵底物的碳素利用程度，从而提高甲烷产率。

表 2 为不同接种方式下采用修正的 Gompertz 模型对累积 VS 甲烷产率的拟合结果。从表可知，L 组和 M 组的 R^2 分别为 0.998 和 0.991，表明拟合度较好。L 组的迟滞期为 10.9 d，较 M 组迟滞期减少了 86.3%，这表明分层接种不仅可实现猪粪厌氧干发酵的快速启动，还能够有效减少发酵时间^[17]。在产甲烷速率方面，L 组的最大挥发性固体产甲烷速率和实际

累积挥发性固体甲烷产率分别为 3.8 和 211.5 mL/g，分别是 M 组的 2.5 倍和 6.1 倍。其中，累积挥发性固体甲烷产率高于齐利格娃等的研究结果^[18]（198.1 mL/g）。本试验为常温

发酵，且接种比仅为 25%，低于上述研究^[18]中 40%的接种比，由此可见，分层接种即使在较低的接种比下，仍能缩短厌氧干发酵的迟滞期，提高甲烷产率。

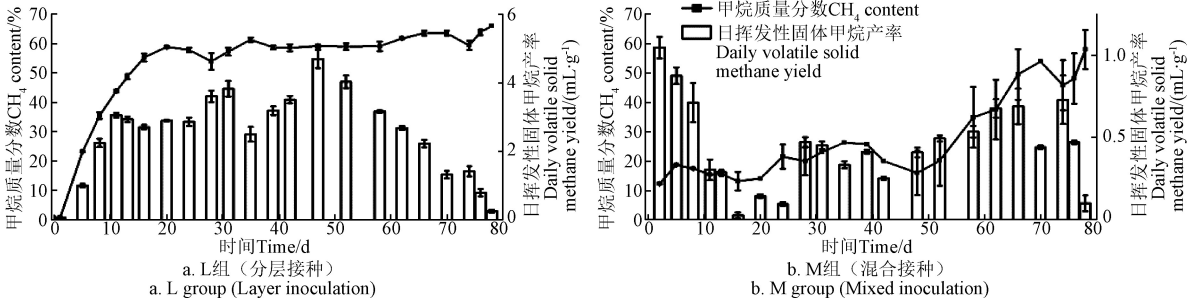


图 2 产甲烷性能的变化情况
Fig.2 Variations of methane characteristics during CH₄ production performance experiment

表 2 修正的 Gompertz 方程参数
Table 2 Parameters of modified Gompertz model

发酵组 Treatments	R^2	预测最大日甲烷产率 Predicted maximum daily methane yield $R_{max}/(mL\cdot g^{-1})$	迟滞期 Lag phase λ/d	预测累积甲烷产率 Predicted cumulative methane yield/ ($mL\cdot g^{-1}$)	实际累积甲烷产率 Measured cumulative methane yield/ ($mL\cdot g^{-1}$)
L	0.998	3.8	10.9	217.7	211.5
M	0.991	1.5	79.5	36.0	34.8

2.2 发酵过程 VFAs 变化情况

VFAs 是发酵体系中 C 源的主要存在形式，也是甲烷形成的前体物质，其质量浓度变化动态反映了原料水解酸化与消耗程度^[19]。如图 3 所示反应初期，发酵底物中易降解的大分子有机物，比如蛋白质和脂类等，在水解产酸菌作用下不断降解，体系中的 VFAs 质量浓度不断升高。L 组在第 15 天达到第一个 TVFAs 质量浓度峰值（33.0 mg/g）后明显降低，在 51 d 后趋于平稳，至结束时（第 78 天）体系内的 VFAs 基本被消耗完。而 M 组在第 15 天时 TVFAs 质量浓度为 29.2 mg/g，此后不断升高并在 29.2~38.5 mg/g 范围内波动。通常，发酵体系内 VFAs 浓度超过 10 000 mg/L 时，会导致体系内 pH 值降低，当 pH 值低于 5.5 时，产甲烷菌的活性将完全受抑制^[20]。本试验中，L 组和 M 组的 TVFAs 质量浓度分别在发酵的 4~36 和 4~78 d 超过文献中的抑制浓度（10 000 mg/L），但 L 组产甲烷过程未受明显抑制。这是因为，分层接种方式使局部产甲烷微生物占绝对优势，分层处的接种物可迅速消耗底物层产生的 VFAs。

乙酸、丙酸和丁酸是 VFAs 中 3 种典型的挥发性脂肪

酸，其质量浓度变化情况见图 3。由图 3a 可知，L 组的乙酸和丁酸的变化趋势与 TVFAs 相似，在第 15 天达到质量浓度峰值（6.9 和 12.0 mg/g）后不断降低，表明分层接种能够促进乙酸和丁酸的分解转化，降低其质量浓度。在发酵的 4~45 d，L 组的丙酸质量浓度维持在 3.3~6.1 mg/g，其后迅速降低，至发酵结束时基本转化完全（0.2 mg/g）。M 组的丙酸质量浓度在 10 d 后一直维持在 4.6~7.3 mg/g，表明发生了较严重的丙酸积累。在厌氧发酵中，丙酸转化速率慢，易发生积累，最适浓度范围为 800~3 000 mg/L，超过此范围不利于产甲烷菌降解利用^[21]。本试验中，L 组和 M 组的丙酸质量浓度分别在发酵的 4~45 和 10~78 d 超出文献中报道的抑制浓度（3 000 mg/L），但只有 M 组产气受到明显抑制（图 2b）。这可能是因为，分层接种方式在加快有机物水解酸化进程的同时，能够提高体系内产甲烷菌的丙酸耐受浓度，在高丙酸质量浓度下依然可正常产气。这进一步表明在本研究中酸抑制的主体可能是乙酸，而并非更高质量浓度的丙酸，即使丙酸对产甲烷菌更具毒性，也解释了 L 组在高丙酸浓度、低乙酸浓度下情况下产气效率较好（图 2a）。

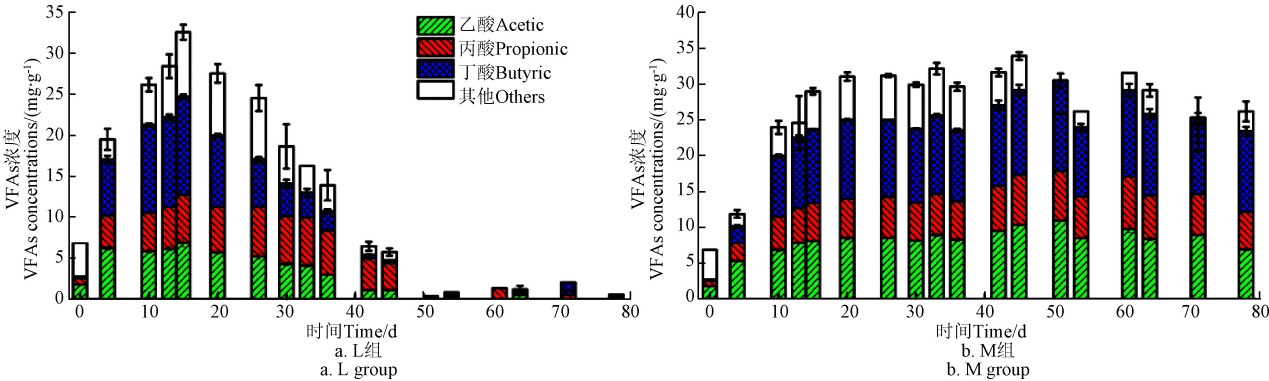


图 3 厌氧干发酵过程 VFAs 质量浓度变化
Fig.3 Variations of concentration of VFAs during the experiment

2.3 发酵过程中微生物群落多样性与结构的变化

2.3.1 微生物群落多样性

不同接种方式下细菌和古菌的丰富度及多样性指数如表 3 所示。由 Chao 和 ACE 指数可知, 2 组发酵体系中细菌群落的丰富度随着发酵的进行均呈先增加后减少的趋势。L 组的古菌群落丰富度呈增加的趋势, 这可能是由于分层接种发酵体系内, 接种物(种子体区)和底物(底物区)接触处提供了较多的营养物质, 使得分层处微生物生长速率较快, 进而促进了该组细菌和古菌的丰富度提高^[12]。M 组由于体系内酸积累严重, 细菌在前期(I~II 阶段)的生长活动受到抑制, 丰富度较少, 后期(III~IV 阶段)随着微生物逐渐适应体系内的环境, 丰富度逐渐升高, 这也是图 3a 中 M 组的

TVFAs 质量浓度处于较高水平的原因。而 M 组的古菌丰富度在整个发酵过程中变化不明显, 值得注意的是在 I~III 阶段内古菌的丰富度有小幅度上升, 这是由于酸化期能够促进古菌的丰富度提高^[22]。Shannon 指数反映的是群落多样性。总体来看, 两组的细菌多样性均呈升高的趋势, 其中 L 组的细菌多样性较高。L 组的古菌多样性与细菌呈现相同的变化趋势。在厌氧发酵体系中, 微生物群落多样性越高, 产沼气性能越好。本试验中分层接种方式增加了细菌的多样性, 使群落的复杂程度整体升高, 加快有机物水解酸化的进程。由此可得, 分层接种能提高发酵体系内微生物的丰富度和多样性, 促进水解酸化速率, 为提高甲烷产率创造有利条件, 这也与图 2a 的结果一致。

表 3 细菌和古菌的丰富度和多样性指数
Table 3 Richness and diversity of bacterial and archaeal communities

样品 Sample	细菌 Bacteria				古菌 Archaea			
	Chao	ACE	Shannon	Simpson	Chao	ACE	Shannon	Simpson
0	3 848	5 541	3.49	0.13	2 680	4 199	2.29	0.23
LI	4 688	7 231	3.42	0.19	2 864	4 413	2.32	0.31
LII	5 675	8 242	3.80	0.14	3 126	5 377	2.23	0.30
LIII	5 486	8 001	4.51	0.08	3 091	4916	3.10	0.12
LIV	4 386	5 797	4.49	0.07	3 861	6146	3.17	0.12
MI	4 310	6 372	3.31	0.19	2 390	3561	2.21	0.23
MII	4 554	6 698	3.36	0.16	2 542	3998	2.52	0.19
MIII	6 025	9 141	4.08	0.12	3 138	5093	2.31	0.27
MIV	4 966	7 153	3.94	0.13	2 525	4107	2.41	0.26

注: 0 表示的 L 组与 M 组第 0 天的发酵样品, CK。罗马数字代表发酵阶段。下同。
Note: 0 represents the fermentation samples of group L and group M on the day 0, CK, the Roman number behind capital is digestion stage. The same as below.

2.3.2 微生物群落结构变化

发酵过程中微生物群落结构变化见图 4。在门分类水平上, 发酵系统中细菌主要以厚壁菌门 *Firmicutes* (56.2%~91.5%) 和拟杆菌门 *Bacteroidetes* (1.0%~20.6%) 为主(图 4a)。2 组的 *Firmicutes* 相对丰度在 0~II 阶段内较高且变化不明显(82.6%~92.0%), 主要因为 *Firmicutes* 是有机物厌氧发酵水解酸化阶段的主要菌群, 对不利环境的耐受能力较强^[23]。随着发酵的进行 *Firmicutes* 相对丰度逐渐减少, L 组和 M 组的 *Firmicutes* 相对丰度从 86.6%(阶段 0)分别降低至 56.2%和 73.5%(阶段 IV), 则是因为发酵后期水解酸化作用减弱所致。试验中 M 组在 I~II 阶段内乙酸浓度整体处于较高的质量浓度(7.5~9.0 mg/g), 对应的 *Firmicutes* 相对丰度 91.5%~92%, 表明 *Firmicutes* 高丰度期与高水平的乙酸质量浓度相对应, 这与蒋滔等^[20]在玉米秸秆厌氧发酵中的结果相似。*Bacteroidetes* 是富氮底物厌氧发酵的关键菌, 能够加速分解畜禽粪便中不易降解的有机物^[24], 在两种接种方式的发酵系统中, *Bacteroidetes* 相对丰度随发酵的进行呈上升的趋势。与细菌相比, 产甲烷古菌在门水平上群落结构较单一, 广古菌门 *Euryarchaeota* 占绝对优势, 相对丰度在 86.3%~99.5%范围内变化(图 4b)。

在属分类水平上的细菌群落结构如图 4c 所示, 主要由狭义梭菌属 *Clostridium sensu stricto* (25.5%~55.4%)、

荧光甲烷球菌属 *Romboutsia* (2.4%~15.0%) 和未分类的细菌(1.8%~22.7%)等构成。*Clostridium sensu stricto* 是一类典型的纤维素分解菌, 能够促进体系内有机酸的生成^[25]。2 组的 *Clostridium sensu stricto* 相对丰度呈先增加后降低的趋势, 其中 L 组下降幅度更大(从阶段 0: 41.0%减少至阶段 IV: 25.5%)。*Romboutsia* 的相对丰度在两试验组呈现不同的变化趋势, M 组 *Romboutsia* 的相对丰度随着发酵进行从 3.1%(阶段 0)逐渐上升到 12.7%(阶段 IV), 而在 L 组中则呈现先增加后减少的变化过程。随着发酵的进行, L 组 *Unclassified* 菌属相对丰度逐渐增加, 阶段 IV 达到 22.7%, 而且明显高于 M 组(8.2%), 值得后续深入研究。

2 种接种方式的发酵系统中古菌在属水平(图 4d)上的差异较明显, 甲烷微菌属 *Methanosphaerula* (21.5%~60.1%)、甲烷丝菌属 *Methanothrix* (12.7%~38.3%) 和甲烷球形菌属 *Methanosphaera* (2.0%~23.2%) 为优势菌群。L 组 *Methanosphaerula* 的相对丰度随着发酵时间增加呈先增加后减少的趋势, 而 M 组相反。Hinsby 等^[26]研究发现当 *Methanosphaerula* 相对丰度增加时, 能够促进厌氧干发酵产甲烷过程, 结合图 2 可知, *Methanosphaerula* 相对丰度与日 VS 甲烷产率呈正相关的关系。两发酵组 *Methanothrix* 的相对丰度随发酵时间增加均呈先增加后减少的趋势, 与 *Clostridium sensu stricto* 相对丰度变化相

一致,这是由于 *Methanothrix* 可将体系内乙酸转化为甲烷^[27]。结合图 3 可知,阶段 I~II 对应的 TVFAs 质量浓度处于较高水平范围内 (L 组: 17.4~33.0 mg/g; M 组: 27.0~32.3 mg/g), 此时对应的 *Methanothrix* 相对丰度处于较高的占比 (L 组: 17.6%~23.2%; M 组: 37.1%~38.3%), 表明 *Methanothrix* 的相对丰度与 TVFAs 质量浓度呈正相关。L 组和 M 组的 *Methanosphaera* 相对丰度从 20.7% (阶段 0) 分别降低至 2.0% 和 5.6% (阶段 IV), 表明随着发酵时间的延长 *Methanosphaera* 的相对丰度逐渐降低。甲烷八叠球菌属 *Methanosarcina* 是已知的唯一能够利用所有产甲烷途径的产甲烷菌, Zhi 等^[28]研究发现 *Methanosarcina* 与甲烷产量有密切关系。L 组 *Methanosarcina* 的相对丰度在整个发酵过程中处于较高的占比, 其中阶段 II 的相对丰度最高 (15.5%), 与第

33 d 的日 VS 甲烷产率 3.2 mL/g 相对应; 而 M 组 *Methanosarcina* 的相对丰度在整个发酵过程中处于较低的范围 (0.7%~5.7%), 这与该组的累积 VS 甲烷产率 (表 2) 较低相一致。

在本研究中发现, L 组和 M 组中氢营养型产甲烷菌 (*Methanosphaerula*, *Methanosphaera*, 甲烷短杆菌属 *Methanobrevibacter*, 甲烷囊菌属 *Methanoculleus* 和第七产甲烷古菌属 *Methanomassiliicoccus*) 占比由 78.4% (阶段 0) 分别降低至 68.9% 和 66.6% (阶段 IV), 这表明 2 种接种方式下产甲烷途径菌以氢营养型为主, 且分层接种发酵体系中群落结构更加稳定。Zhou 等^[29]研究发现在猪粪厌氧干发酵中, 较乙酸营养型产甲烷而言, 氢营养型产甲烷菌是主导的产甲烷途径, 具有较高的活性, 这可能是导致 L 组产甲烷性能较好的主要原因。

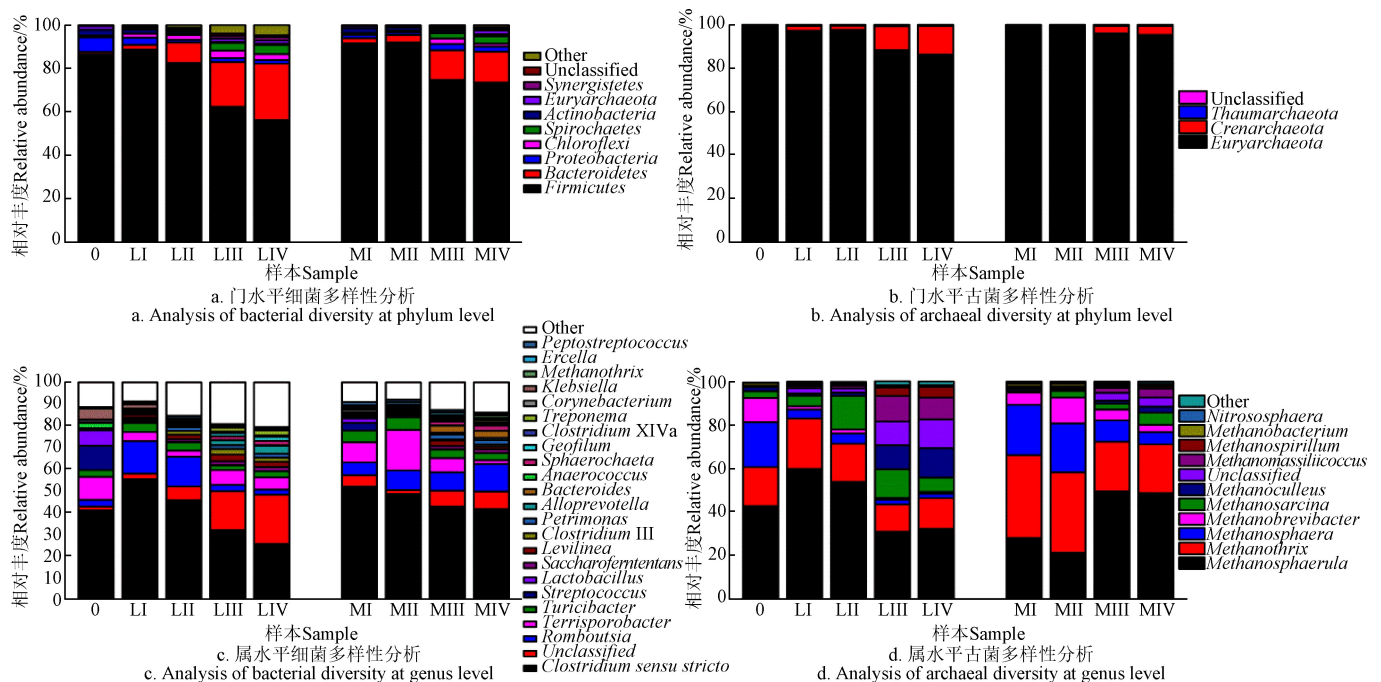


图 4 细菌和古菌在门和属分类水平上的群落结构多样性分析

Fig.4 Analysis of bacterial and archaeal diversities at the phylum and genus levels

2. 3. 3 微生物群落结构的差异性分析

图 5 为 2 种接种方式下的各发酵阶段细菌和古菌样品的物种丰度热图。对于细菌群落, *Clostridium sensu stricto* 在不同样品中占绝对优势。而在古菌群落中, *Methanosphaerula* 在 L 组 (I 和 II 阶段) 和 M 组 (0, III 和 IV 阶段) 占绝对优势, *Methanothrix* 在 M 组 (I 和 II 阶段) 占绝对优势。另外在热图中对样本做了聚类分析可得, 2 组在阶段 I~II 和阶段 III~IV 的细菌和古菌样品中均表现出较好的相似度。

2. 4 冗余分析

采用冗余分析分别对 2 种接种方式发酵体系的环境因子与微生物群落结构进行分析, 结果见图 6。对于 L 组发酵体系 (图 6a), Axis1 轴和 Axis2 轴分别解释了 72.3% 和 17.3% 的变异性, 总体上微生物群落演解释度由大到小分别是乙酸、pH 值、丙酸, 影响分层接种微生态结构

的主要环境因子为乙酸, 其对微生物群落结构演替的解解释度为 69.1%。物种与环境因子的相关性表明, *Romboutsia*、*Clostridium sensu stricto* 与乙酸、丙酸呈明显正相关, 说明 *Romboutsia* 和 *Clostridium sensu stricto* 是该发酵体系内参与水解、产酸和乙酸化的关键微生物。乙酸营养型产甲烷菌 *Methanothrix*、氢营养产甲烷菌 *Methanosphaerula* 与乙酸质量浓度呈正相关、与 pH 值呈负相关, 表明正常产气下适当范围内的乙酸和较低的 pH 值促进了 *Methanothrix* 和 *Methanosphaerula* 生长代谢。

在 M 组体系内 (图 6b), Axis1 轴和 Axis2 轴分别解释了 65.1% 和 12.4% 的变异性, 总体上微生物群落演解释度由大到小分别是 pH 值、丙酸、乙酸, 影响混合接种微生态结构的主要环境因子为 pH 值, 其对微生物群落结构演替的解解释度为 45.9%。M 组产甲烷优势菌中只有 *Methanothrix* 与乙酸呈正相关, 但相关性系数为 0.477 8

低于 L 组 ($r=0.9199$), 表明即使在酸抑制情况下 *Methanothrix* 仍能发挥代谢乙酸产甲烷功能, 但相对丰度

较低。 *Methanospaera* 与乙酸、丙酸呈负相关, 表明 *Methanospaera* 对酸积累耐受能力较弱。

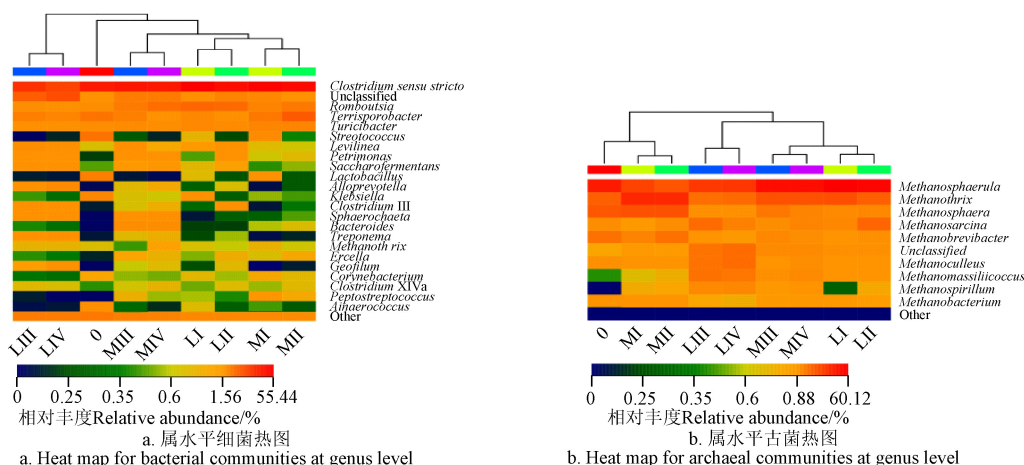


图 5 细菌和古菌在属分类水平上的物种丰度热图

Fig.5 Heat maps for bacterial and archaeal communities at genus level

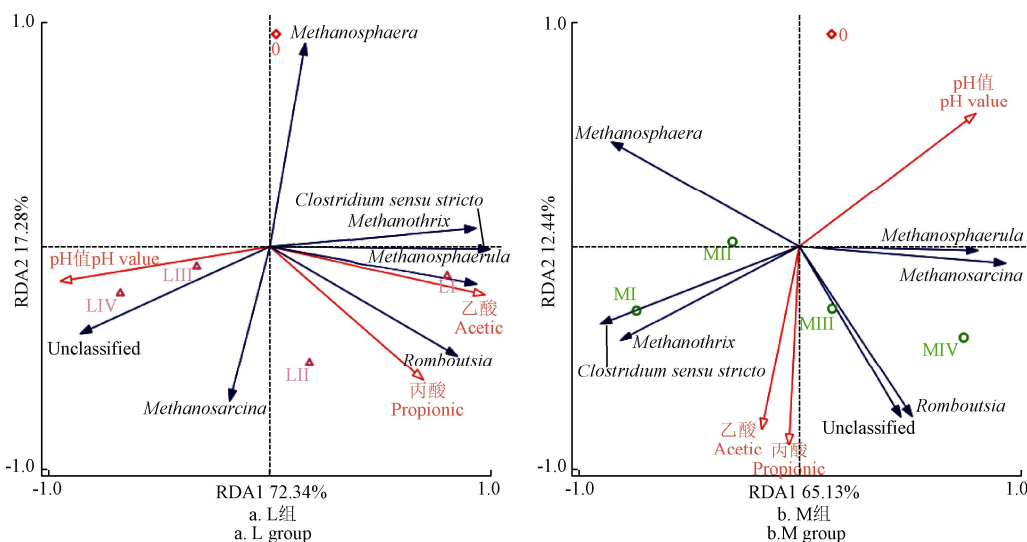


图 6 分层接种及混合接种发酵系统的冗余分析

Fig.6 Redundancy analysis of layer inoculation and premixing inoculation systems

3 结论

本文以猪粪和玉米秸秆为发酵底物, 对比分层接种和混合接种方式下厌氧干发酵产气性能, 结合高通量测序技术分析发酵系统的微生物群落多样性及演替规律, 得出如下结论。

1) 分层接种累积甲烷产率达到 211.5 mL/g, 较混合接种提高, 迟滞期缩短至 10.9 d。

2) 混合接种发酵体系内挥发性脂肪酸积累严重, 挥发性脂肪酸质量浓度维持在 29.2~38.5 mg/g (15~78 d), 抑制产甲烷作用。分层接种中即使挥发性脂肪酸发生积累, 但表现出较高的转化效率, 对产甲烷过程未构成抑制。

3) 氢营养型产甲烷途径在厌氧干发酵中占主导 (66.6%~78.4%), 但分层接种能够增加发酵体系内的微生物的丰富度和多样性。

4) *Methanothrix* 与 *Clostridium sensu stricto* 两种菌相对丰度呈正相关, *Clostridium sensu stricto* 的相对丰度提高加

快了挥发性脂肪酸生成, *Methanothrix* 为乙酸营养型产甲烷菌, 可进一步促进发酵体系内底物分解转化效率的提高。

【参考文献】

- [1] 彭锦星, 杨磊, 鲍振博. 中国沼气产业链现状分析及对策[J]. 天津农学院学报, 2016, 23(2): 53-56.
Peng Jinxing, Yang Lei, Bao Zhenbo. Analysis and countermeasure discussion on biogas industry chain in China[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2016, 23(2): 53-56. (in Chinese with English abstract)
- [2] Li K, Liu R H, Cui S H, et al. Anaerobic co-digestion of animal manures with corn stover or apple pulp for enhanced biogas production[J]. Renewable Energy, 2018, 118: 335-342.
- [3] Fu Y R, Tao L, Mei Z L, et al. Dry anaerobic digestion technologies for agricultural straw and acceptability in China[J]. Sustainability, 2018, 10(12): 4588.
- [4] 田梦, 刘晓玲, 李十中, 等. 香蕉秸秆与牲畜粪便固体联合厌氧发酵产沼气的特性[J]. 农业工程学报, 2013, 29(7): 177-184.
Tian Meng, Liu Xiaoling, Li Shizhong, et al. Biogas production characteristics of solid-state anaerobic

- co-digestion of banana stalks and manure[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(7): 177-184. (in Chinese with English abstract)
- [5] 江皓, 沈怡, 聂红, 等. 鸡粪与玉米秸秆的干式厌氧发酵实验研究[J]. 可再生能源, 2018, 36(5): 639-643.
Jiang Hao, Shen Yi, Nie Hong, et al. Study on dry anaerobic fermentation of chicken manure and corn straw[J]. Renewable Energy Resources, 2018, 36(5): 639-643. (in Chinese with English abstract)
- [6] 李丹妮, 张克强, 梁军锋, 等. 三种添加剂对猪粪厌氧干发酵的影响[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(8): 1777-1785.
Li Danni, Zhang Keqiang, Liang Junfeng, et al. Solid-state anaerobic digestion of pig manure with three kinds of additives[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(8): 1777-1785. (in Chinese with English abstract)
- [7] 于佳动, 刘新鑫, 赵立欣, 等. 基于微好氧同步预升温的序批式厌氧干发酵特性[J]. 农业工程学报, 2020, 36(10): 213-219.
Yu Jiadong, Liu Xinxin, Zhao Lixin, et al. Characteristics of sequencing batch dry anaerobic fermentation with microaerobic preheating[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2020, 36(10): 213-219. (in Chinese with English abstract)
- [8] 朱继英, 钟慧, 陆玉, 等. 接种物耐酸驯化对菌糠厌氧干发酵产气的影响[J]. 农业工程学报, 2020, 36(5): 249-254.
Zhu Jiying, Zhong Hui, Lu Yu, et al. Effects of acid-acclimated inoculum on solid-state anaerobic digestion of spent mushroom substrate[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2020, 36(5): 249-254. (in Chinese with English abstract)
- [9] 陈智远, 田硕, 谭婧, 等. 接种量对醋渣干发酵的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(16): 76-79.
Chen Zhiyuan, Tian Shuo, Tan Jing, et al. Effect of inoculum concentration on dry fermentation for vinegar residue[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(16): 76-79. (in Chinese with English abstract)
- [10] 朱继英, 钟慧, 陆玉, 等. 接种物耐酸驯化对菌糠厌氧干发酵产气的影响[J]. 农业工程学报, 2020, 36(5): 249-254.
Zhu Jiying, Zhong Hui, Lu Yu, et al. Effects of acid-acclimated inoculum on solid-state anaerobic digestion of spent mushroom substrate[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2020, 36(5): 249-254. (in Chinese with English abstract)
- [11] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [12] 孔德望. 猪粪厌氧干发酵产气性能与微生物群落结构研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
Kong Dewang. Biogas Production and Microbial Community in Solid-state Anaerobic Digestion of Swine Manure[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018. (in Chinese with English abstract)
- [13] Zhang S T, Guo H G, Du L Z, et al. Influence of NaOH and thermal pretreatment on dewatered activated sludge solubilisation and subsequent anaerobic digestion: Focused on high-solid state[J]. Bioresource Technology, 2015, 185: 171-177.
- [14] 勒系意, 黄运红, 任雨涵, 等. 梯度有机负荷下农业废弃物厌氧发酵特性及微生物群落[J]. 农业工程学报, 2017, 33(17): 239-247.
Le Xiyi, Huang Yunhong, Ren Yuhuan, et al. Anaerobic digestion characteristics and microbial structure of agricultural wastes under gradient organic loadings[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2017, 33(17): 239-247. (in Chinese with English abstract)
- [15] Deublein D, Steinhauser A. Biogas from Waste and Renewable Resources[M]. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- [16] Cai Y, Wang J, Zhao Y, et al. A new perspective of using sequential extraction: To predict the deficiency of trace elements during anaerobic digestion[J]. Water Research, 2018, 140: 335-343.
- [17] 宋香育, 张克强, 房芳, 等. 工艺措施对猪粪秸秆混合厌氧干发酵产气性能的影响[J]. 农业工程学报, 2017, 33(11): 233-239.
Song Xiangyu, Zhang Keqiang, Fang Fang, et al. Influences of different technological strategies on performance of anaerobic co-digestion of pig manure with straw in solid-state[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2017, 33(11): 233-239. (in Chinese with English abstract)
- [18] 齐利格娃, 高文萱, 杜连柱, 等. 粪草比对猪粪与稻草干发酵产沼气及古菌群落的影响[J]. 农业工程学报, 2018, 34(23): 232-238.
Qi Ligewa, Gao Wenxuan, Du Lianzhu, et al. Influence of pig manure and rice straw mass ratio on its biogas production and archaeal communities in dry anaerobic co-digestion system[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2018, 34(23): 232-238. (in Chinese with English abstract)
- [19] 毛春兰. 小麦秸秆与猪粪混合物料厌氧发酵特征及微生物调控机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
Mao Chunlan. Anaerobic Co-digestion Characteristics and Microbial Regulatory Mechanism of Wheat Straw and Swine Manure[D]. Yangling: North West Agriculture and Forestry University, 2018. (in Chinese with English abstract)
- [20] 蒋滔, 韦秀丽, 肖璐, 等. 玉米秸秆固态和液态厌氧发酵产气性能与微生物种类比较研究[J]. 农业工程学报, 2020, 36(3): 227-235.
Jiang Tao, Wei Xiuli, Xiao Lu, et al. Comparison of biogas production and microbial species of corn straw in solid-state anaerobic digestion (SS-AD) and liquid anaerobic digestion (L-AD)[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2020, 36(3): 227-235. (in Chinese with English abstract)
- [21] Felchner-Zwirello M, Winter J, Gallert C. Interspecies distances between propionic acid degraders and methanogens in syntrophic consortia for optimal hydrogen transfer[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2013, 97(20): 9193-9205.
- [22] Wang H P, Li J W, Zhao Y Q, et al. Establishing practical strategies to run high loading corn stover anaerobic digestion: Methane production performance and microbial responses[J]. Bioresource Technology, 2020, 310: 123364.
- [23] Rojas-Sossa J P, Zhong Y, Valenti F, et al. Effects of Ammonia Fiber EXpansion (AFEX) treated corn stover on anaerobic microbes and corresponding digestion performance[J]. Biomass and Bioenergy, 2019, 127: 1052-1063.
- [24] Wang Y Y, Li G X, Chi M H, et al. Effects of co-digestion of cucumber residues to corn stover and pig manure ratio on methane production in solid state anaerobic digestion[J]. Bioresource Technology, 2018, 250: 328-336.
- [25] Lawson P A. 梭菌属分类研究进展: 现状和展望[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 1070-1074.
Lawson P A. The taxonomy of the genus Clostridium: Current status and future perspectives[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 1070-1074. (in Chinese with English abstract)
- [26] Hinsby C, Joseph B, Stephen H. *Methanosphaerulapalustris* gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from

- a minerotrophic fen peatland[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 928–935.
- [27] Li Y, Sun Y M, Li L H, et al. Acclimation of acid-tolerant methanogenic propionate-utilizing culture and microbial community dissecting[J]. *Bioresour Technol*, 2018, 250: 117–123.
- [28] Zhi S L, Li Q, Yang F X, et al. How methane yield, crucial parameters and microbial communities respond to the stimulating effect of antibiotics during high solid anaerobic digestion[J]. *Bioresour Technol*, 2019, 283: 286–296.
- [29] Zhou M, Yang H N, Zheng D, et al. Methanogenic activity and microbial communities characteristics in dry and wet anaerobic digestion sludges from swine manure[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 152: 1073–1090.

Influences of layer inoculation on biogas production and microbial community in solid-state anaerobic fermentation of pig manure

Li Danni¹, Gao Wenxuan¹, Zhang Keqiang¹, Kong Dewang², Wang Siqi¹, Du Lianzhu^{1*}

(1. *Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China;*

2. *Hangzhou Energy Environmental Engineering Ltd Co., Hangzhou 310020, China)*

Abstract: China is a large agricultural country, livestock manure is both agricultural waste and resources. Among the many treatment processes, Solid-State Anaerobic Digestion to produce biogas is one of the effective measures to realize its resource utilization and solve environmental pollution. While high Total Solid (TS) content causing a reduction of methane yields or failure of digestion process because the accumulation of Volatile Fatty Acids (VFAs) resulted in the inhibition of methanogens. At present, the research on VFAs mainly focuses on the aspects of co-substrate for digestion, leachate recirculation and external buffer material to increase biogas production. The inoculum has an important impact on the tolerance of intermediate metabolites and the start-up time of anaerobic fermentation. Previous research mainly focuses on microbial acclimation and feedstock/inoculum ratio under the premixing inoculation method (fermentation after mixing the inoculum and substrate), while the exploration of different inoculation methods for SS-AD and the correlation between the dynamic changes of microbial community structure and metabolites (such as VFAs) need to be studied in depth. In this paper, the biogas production performance and micro-ecological succession law of pig manure and maize straw in layer inoculation and premixing inoculation fermentation were compared. A pilot-scale laboratory experiment was performed in a self-made vertical plexiglass reactor with a total volume of 11 L under feedstock/inoculum ratio=25% in SS-AD process (TS=20%). The result showed that, the first peak of TVFAs mass concentration in layer inoculation system reached 33.0 mg/g on the day 15, and had a greater decline until the end of fermentation. The mass concentration of TVFAs in premixing inoculation system was varied in the range of 29.2–38.5 mg/g on days 15–78. The cumulative Specific Methane Yield of layer inoculation fermentation reached 211.5 mL/g is the highest. CH₄ yield in layer inoculation system was much higher than in premixing inoculation even with the same substrate, which indicated that layer inoculation can lead to the consumption of VFAs over time, make the process run effectively, and reduce the startup time. The SMY of premixing inoculation was under 1.0 mL/g-VS during the whole experiment. In layer inoculation system, the biogas CH₄ content ranged from 54.0% to 66.0% after day 20. The CH₄ content in premixing inoculation fermentation showed a rapid increase after 52 days of digestion and reached 58.1% on day 78. High-throughput sequencing results showed that hydrogenotrophic methanogen was the dominant methane production pathway during SS-AD of different inoculation methods. Layer inoculation can increase the richness and diversity of microorganisms in the fermentation system, and the community structure is more stable than premixing inoculation. The results of cluster analysis on microbial diversity showed that the difference both layer inoculation and premixing inoculation system showed good similarity in the bacteria and archaea samples of stage I~II and stage III~IV. Further analysis showed that the main environmental factor affecting layer inoculation and premixing inoculation are acetic acid and pH value, respectively. The results of this study provide a scientific basis for alleviating the VFAs inhibition of SS-AD of livestock and poultry farming waste and increasing methane yield.

Keywords: fermentation; manure; microbial community; layer inoculation; premixing inoculation