

文章编号: 1003-8701(2015)01-0109-04

玉米秸秆分解微生物复合菌剂群落组成及提高沼气产量的研究

凤 鹏, 赵新宇, 郝登宝, 赵新颖, 刘海燕,
黄 泉, 解 娇, 张永锋*, 高星爱*

(吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘 要: 为提高农业废弃物混合厌氧发酵中沼气产率, 以牛粪、秸秆等固态物料为发酵原料, 采用自行设计沼气发酵装置, 研究不同菌剂投量(0, 100 mL, 200 mL, 300 mL)对沼气产量变化的影响。结果表明, 与未添加菌剂的对照(T_1)相比, 处理组(T_2 、 T_3 、 T_4)总产气量分别提高 6.6%、19.6%、16.6%。有效证实添加微生物菌剂有助于提高沼气产量。利用变形梯度凝胶电泳(DGGE), 分析复合菌剂群落, 结果表明, 其中的 9 个条带的近缘种, 只有 1 株为未可培养菌外, 其余已知菌分别归属 6 个属, 从系统发育树可见该复合系有丰富的菌种组成多样性。

关键词: 微生物复合菌剂; 生物质降解; 产气量; 甲烷含量

中图分类号: S216.4

文献标识码: A

DOI: 10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.01.025

Community composition of biological diversity in microbial inoculum for maize straw decomposition and their effect in methane gas production

FENG Peng, ZHAO Xin-yu, XI Deng-bao, ZHAO Xin-ying, LIU Hai-yan,

HUANG Xiao, XIE Jiao, ZHANG Yong-feng*, GAO Xing-ai*

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, 130033 China)

Abstract: In order to rise up the gas production in process of anaerobic fermentation of agricultural waste, a set of microbial inoculum (CPB) which can degrade maize straw was build up and inoculated into the fermentation system filled with cow dung and straws to investigate the effects in gas production. Different amounts of microbial inoculum 0 (T_1), 100 mL(T_2), 200 mL(T_3) and 300 mL(T_4) were inoculated and the gas production was measured. The gas production was increased by 6.6%, 19.6% and 16.6% compared to no-CPB inoculated control, respectively. Degradation of cellulose-riched materials may be correlated with the lytic ability of microbial inoculum. As well as, DGGE results shows that 6 strains were indentified and incubated except 1 strain which can not be incubated.

Keywords: Microbial inoculants; Biomass degradation; Gas production; Methane content

吉林省是我国重要的粮食大省和畜牧业基地, 农作物秸秆和畜禽粪便等种养废弃物逐年增

加, 数量巨大。但是秸秆和畜禽粪便资源化利用技术水平低, 难以形成规模化的可再生能源产业链, 成为制约农业整体效益的原因^[1]。将这些废弃物转化为电力、燃气和液体燃料等多种能源, 是解决上述污染物质的有效措施。庞凤梅等^[2]曾报道, 每千克秸秆产气量为 0.27 m³, 相当于 1.2 ~ 1.9 kg 秸秆的直接燃烧效果。但秸秆发酵产沼气池中, 因人工构建的纯菌株, 在自然条件下难以培养和存在抵抗力弱等缺点, 需要混合发酵的方法^[3-4]提高沼气产量。纤维素降解微生物复合系研究方面, 很多学者进一步利用 DGGE 等分析技

收稿日期: 2014-10-16

基金项目: 吉林省科技厅科技支撑计划项目(20130206053NY); 2013 年吉林省农业科技创新工程项目(20121072); 吉林省科技厅国际合作项目(20120755); 国家科技支撑计划项目(2012BAD14B05)

作者简介: 凤 鹏(1963-), 男, 高级工, 研究方向: 能源微生物的利用与应用研究。

通讯作者: 张永峰, 男, 博士, 研究员, E-mail: nkyzhyf@126.com

高星爱, 女, 博士, 副研究员, E-mail: gao3598@163.com

术,对厌氧反应器中微生物群落结构及多样性分析提供了有效手段^[5-8]。

本研究利用实验室构建的微生物复合菌剂,实验室状态下模拟沼气发酵池,以牛粪、秸秆等固态物料为发酵原料,投入微生物复合菌剂,分析菌剂对产气量的影响效果,揭示沼气发酵原料的产气规律。

1 材料与方法

表1 牛粪、玉米秸秆等发酵原料的理化性质

检测项目	含水率(%)	总固体(TS%)	粗灰分(%)	挥发性固体(VS)	总C(%)	总N(%)	C/N
牛粪	76	24		41.1	31.6	1.43	22.16
玉米秸秆	49.1	50.9		7.7	43.4	0.94	46.37

1.2 变性梯度凝胶电泳及鉴定纤维素分解菌复合系

取样品各400 ng的V3区PCR产物,采用D-Code突变检测系统对样品进行DGGE分析。使用上海生工质粒提取试剂盒SK1191 UNIQ-10柱式质粒小量抽提试剂盒提取质粒DNA(上海生工提供数据)。

1.3 气体成分的测定

气体成分测定利用型号为gasboard-3200L便捷式红外沼气分析仪(武汉四方光电科技有限公司)。

1.4 试验装置及方法

本试验采用高星爱等^[9]提供的自制沼气发酵装置。试验共有T₁、T₂、T₃、T₄等4组处理,将粉碎好的玉米秸秆与牛粪混合,其中T₁组为牛粪200 g加秸秆100 g,C/N为24.9;T₂组为牛粪200 g加秸秆100 g,另加了100 mL复合菌剂发酵液;T₃组为牛粪200 g加秸秆100 g,另加了200 mL复合菌剂发酵液;T₄组为牛粪200 g加秸秆100 g,另加了300 mL复合菌剂发酵液。加沼渣、沼液与水,使发酵料液水分含量保持在70%左右。每组试验做了3次重复。所有发酵试验装置置于35℃恒温水浴锅中。

2 结果与分析

2.1 微生物复合菌剂群落组成分析

2.1.1 微生物复合菌剂菌群DGGE分析

提取细菌总DNA,利用16S rDNA V3高变区引物F357-GC-1和R518-1进行PCR扩增,结果获得230 bp左右PCR扩增条带,取样品各400 ng的

1.1 试验材料及发酵原料理化性质

秸秆降解微生物复合菌剂JLN1为我院构建菌剂。供试牛粪、秸秆取自长春市朝阳区永春镇义和村,并采用粉碎机将秸秆粉碎成2~4 cm,沼渣和沼液取自于正在运行良好的公主岭市刘房子镇农户沼气池,不同发酵原料的理化性质检测为吉林省农科院农业质量标准与检测技术研究所,试验材料的理化性质见表1。

V3区PCR产物,采用D-Code突变检测系统对样品进行DGGE分析,从条带颜色深浅变化可见,菌群内菌种组成,JLN1复合系共有9个较为清晰的条带(图1)。



图1 JLN1微生物复合系菌群的DGGE分析

2.1.2 目的片段TA克隆与测序

为了进一步了解复合系的系统发育地位,将DGGE图谱中出现的条带进行测序,将所得序列输入NCBI网站将同源性较高的序列下载。从系统树可见该复合系有丰富的菌种组成多样性,在JLN1复合系中9个条带的近缘种中除了1株为未可培养菌外,其余已知菌分别归属6个属。回收目的片段,利用TA克隆方法连接到pUC57载体,提取质粒DNA进行测序(上海生工),结果见图2、图3。

2.2 微生物复合菌剂不同对比对牛粪与玉米秸秆混合发酵中产气量的影响

牛粪的添加为沼气池内微生物种群提供足够的氮源,在牛粪与秸秆添加比例保持不变的情况下,采用实验室自制的沼气发酵装置,加入不同配比微生物复合菌剂,检测日产气量随时间的变化(图4-a)。长达60 d的厌氧消化周期内,所有

处理组的日产气变化均呈现初期逐渐升高,达到一定的产气高峰后,又逐渐降低的趋势。在气体产生的日产气量中发酵6 d,牛粪添加15%菌剂的T₃处理组产气量达到最高1200 mL,然后有逐渐下降的趋势,是因为刚开始投入原料时的沼渣沼液发酵之后产气的结果。然后日产气量波动几天之后开始下降,到第16 d开始上升,到达另一个峰值1500 mL左右。从整个过程来看,在4个处理组

中添加15%菌剂的T₃组产气量达到255.6 mL/g,明显高于其他处理区,由此可见,菌剂的添加可以使粪便、秸秆发酵产气量增加。

图4-b是累计产气量随时间的变化图。可以看出,处理组的总产气量与对照组相比均有所增加,其中牛粪加15%菌剂的处理组产气量为最高,比对照增加27.5%的产气量。

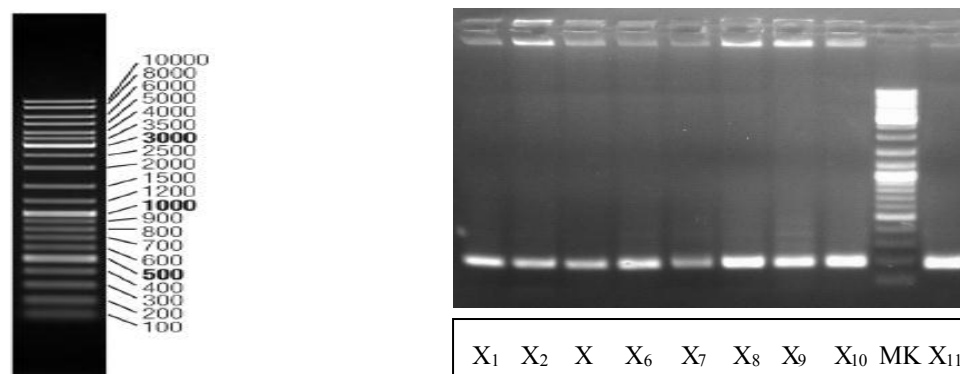


图2 条带近源种PCR电泳图

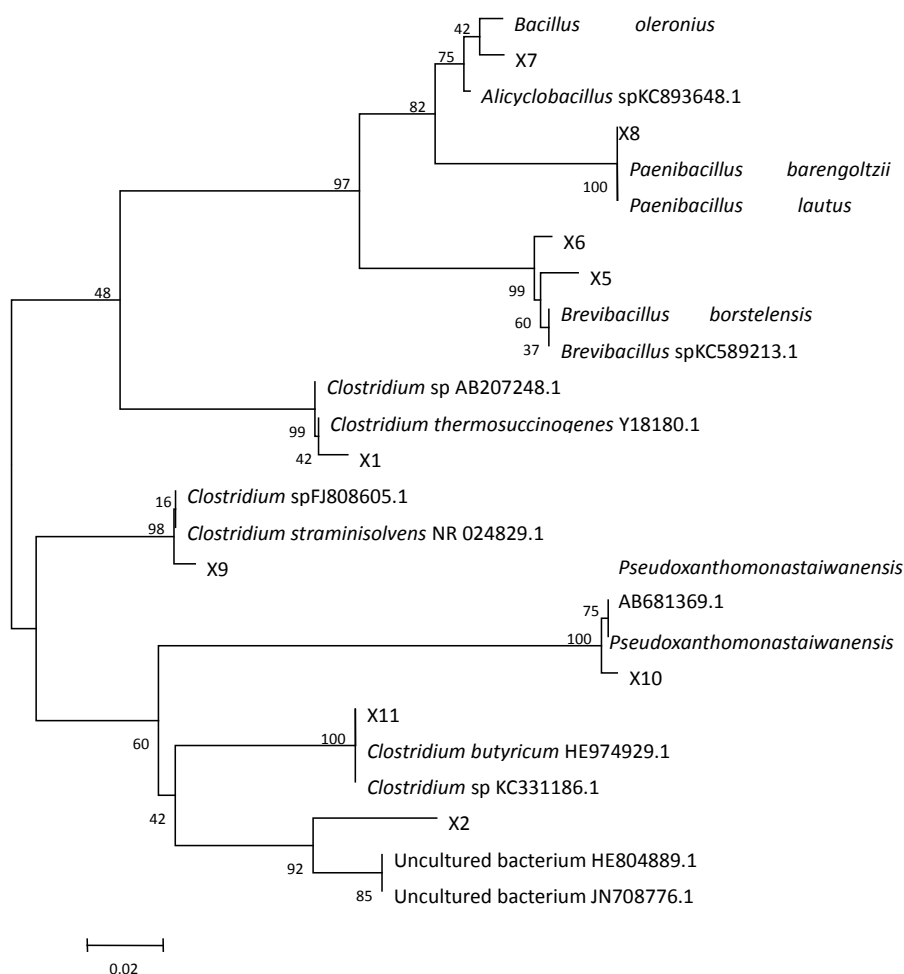


图3 JLN1复合系的16S rDNA系统发育树

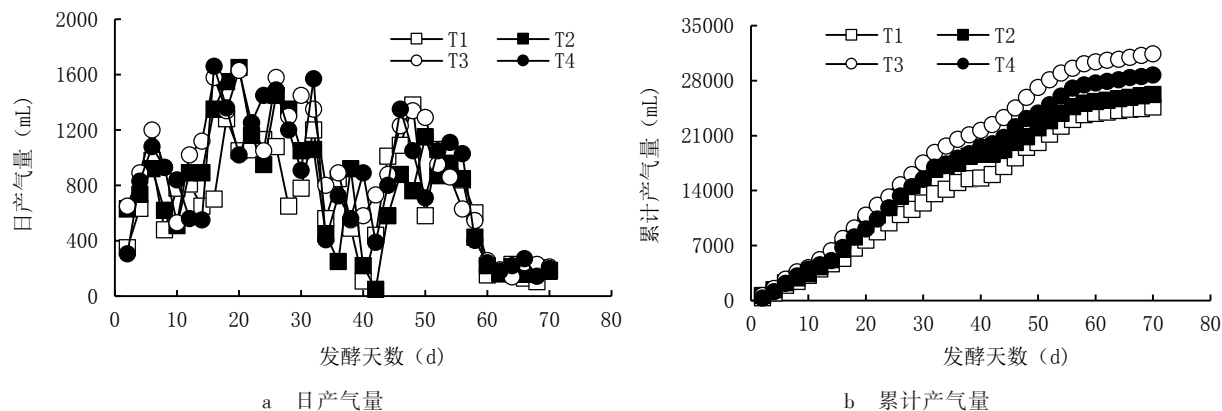


图4 微生物复合菌剂不同配比对混合发酵中日产气量(a)和累计产气量(b)的影响

2.3 不同微生物复合菌剂配比对牛粪与玉米秸秆混合发酵中甲烷含量的影响

图5显示,在发酵开始阶段每处理组甲烷体积百分数很快达到产气高峰,发酵第12 d的时候T₄达到第一个产气高峰为54.1%,最低T₁为34.5%。与覃国栋^[10]等研究结果一致,表明随着反应的进行接种物中产酸菌和产甲烷菌迅速生长繁殖,产甲烷菌有充足的原料反应,之后由于底物浓度减小,产酸菌生长繁殖速率下降,造成甲烷含量逐步上升;当产酸菌和产甲烷菌的生长繁殖趋于稳定平衡时,气体中甲烷的含量也基本稳定。总的来看T₂和T₄两处理组的产甲烷量增加值达到60%。

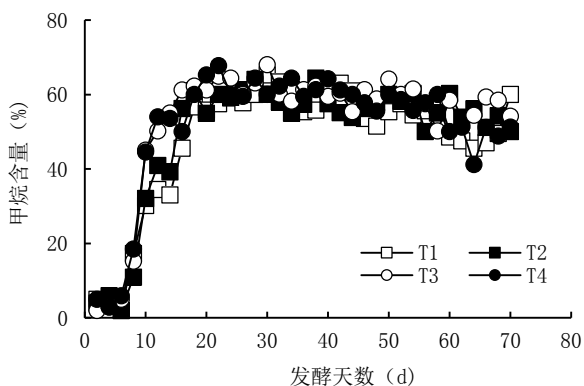


图5 甲烷气体含量变化图

3 讨论与结论

利用实验室自行设计的沼气厌氧发酵装置,以牛粪、秸秆固态物料为发酵原料,研究投入不同菌剂量(0、100 mL、200 mL、300 mL)条件下,产气量变化特征。结果表明,厌氧发酵第6 d,T₃处理组(15%的菌剂投入量)的日产气量最高;与未添加菌剂的对照相比,T₂、T₃、T₄处理组总产气量分别提高了6.6%、19.6%、16.6%,表明微生物菌剂

的添加促进了沼气发酵中纤维素原料的分解,提高了沼气产气率。日产气量和累计产气量均增加,添加15%菌剂处理组产气量的增加值和产甲烷量增加值高于其他处理组,今后需要进一步进行菌剂优化产气试验。利用变形梯度凝胶电泳(DGGE)及系统发育树可见该复合系有丰富的菌种组成,综合以上实验数据,微生物复合菌剂的研制为实现沼气发酵从自然发酵到可控性发酵提供了理论支持。

参考文献:

- [1] 那伟,刘鹏,张永锋,等.吉林省主要农作物秸秆可利用资源分析评价[J].吉林农业大学学报,2010,32(4):413-418.
- [2] 庞凤梅,李玉浸,杨殿林,等.农作物秸秆沼气发酵与直接利用效益比较[J].中国沼气,2008,26(2):34-37.
- [3] Martinez A T, SPernan M, Ruiz-Duenas F J, et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin[J]. Int Microb, 2005, 8(3):195-204.
- [4] Choi H, Jeong S W, Chung Y J. Enhanced anaerobic gas production of waste activated sludge pretreated by pulse power technique[J]. Bio.Technol, 2006(97): 198-203.
- [5] 高丽娟,王小芬,杨洪岩,等.秸秆发酵乳酸菌复合系SFC-2的构建及其组成多样性研究[J].环境科学,2007,28(5):1089-1094.
- [6] 王涛,柴丽红,崔晓龙,等.免培养法对一热泉细菌多样性的初步研究[J].微生物学报,2003,43(5):541-546.
- [7] Chin K J, Lukow T, Conrad R. Effect of Temperature on Structure and Function of the Methanogenic Archaeal Community in an Anoxic Rice Field Soil[J]. App.Environ. Microb, 1999, 65(6):2341.
- [8] Fernandez A S, Hashsham S A, Dollhopf S L, et al. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose[J]. App.Environ. Microb, 2000, 66(9):4058-4067.
- [9] 高星爱,赵新颖,凤鹏,等.分离筛选低温发酵功能菌及促进沼气产量的研究[J].中国沼气,2014,32(3):14-17.
- [10] 覃国栋,刘荣厚,孙辰. NaOH预处理对水稻秸秆沼气发酵的影响[A].全国农村清洁能源与低碳技术学术研讨会论文集[C].中国农业工程协会,2011:11-15.