

规模化秸秆沼气发酵反应器中微生物群落特征

张 蕾¹, 梁军锋^{2*}, 崔文文², 杜连柱², 高文萱², Xinmei Feng³, Anna Schnürer⁴

(1.天津大学环境科学与工程学院, 天津 300072; 2.农业部环境保护科研监测所, 天津 300191; 3.瑞典农业与环境工程研究所, 乌普萨拉 瑞典 75007; 4.瑞典农业大学微生物系, 乌普萨拉 瑞典 75007)

摘 要:采用末端限制性多态性分析(T-RFLP)和克隆文库构建相结合的研究方法,对以秸秆为唯一或主要原料的四个沼气发酵反应器中的细菌和古菌群落特征进行分析,结果表明:(1)供试秸秆沼气反应器中细菌种类十分丰富,分属于9个门,其中厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)与拟杆菌门(Bacteroidetes)为优势种群,在四个沼气反应器中的相对丰度分别为19.3%~47.2%、4.8%~24.3%与2.5%~15.5%。水解与发酵性细菌为各反应器中的优势种群;(2)古菌种类明显少于细菌,均属于甲烷杆菌纲(Methanobacteria)和甲烷微菌纲(Methanomicrobia)。在以秸秆为唯一原料的反应器中,甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)为优势种群,相对丰度为69.2%~71.9%;而在添加猪粪的反应器中,甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)为优势种群,相对丰度为73.1%。

关键词:规模化;秸秆沼气;微生物群落;T-RFLP;克隆文库

中图分类号:X712 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)03-0584-09 doi:10.11654/jaes.2014.03.027

Characteristics of Microbial Communities in Full-scale Biogas Digesters with Straw as Substrate

ZHANG Lei¹, LIANG Jun-feng^{2*}, CUI Wen-wen², DU Lian-zhu², GAO Wen-xuan², Xinmei Feng³, Anna Schnürer⁴

(1.Department of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2.Agro-environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; 3.Swedish Institute of Agricultural and Environmental Engineering, Uppsala 75007, Sweden; 4.Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 75007, Sweden)

Abstract: In China, low biogas yield and poor system stability have seriously affected the popularization of biogas production with straw as substrate. Understanding microbial processes and their interaction in biogas digesters is a prerequisite to improving efficiency and stability of biogas production. In this study, characteristics of bacterial and archaeal community structures in full-scale biogas digesters with straw as mono or major substrates were studied using terminal restriction polymorphism analysis (T-RFLP) and cloning library construction. The diversity of bacterial community was rich, belonging to nine phyla. Among them, Firmicutes, Proteobacteria and Bacteroidetes were dominant, with the relative abundance of 19.3%~47.2%, 4.8%~24.3% and 2.5%~15.5% respectively. Hydrolytic and fermentative bacteria were dominant population. The species of archaeal population was much less than that of bacterial population, belonging to Methanobacteria and Methanomicrobi. *Methanosaeta* was the dominant population in the digesters with straw as mono-substrate, and the relative abundance was 69.2%~71.9%. However, *Methanosarcina* was the dominant population with the relative abundance of 73.1% in the digester with straw and pig manure mixture as substrates.

Keywords: full-scale; biogas production from straw; microbial community; T-RFLP; cloning library

中国是世界上秸秆资源最丰富的国家之一,2010

年中国的秸秆产量已达到7亿t^[1-2]。利用厌氧消化技术将秸秆转化为沼气,对于解决秸秆不当处理引起的资源浪费、增加常规沼气工程发酵原料供给、改善农村环境污染等问题具有重要意义。因而,近年来在我国被广泛地推广应用。据报道,截至2012年,经农业部批复并建成的规模化秸秆沼气工程已有47处,分布于我国20多个省份^[3]。然而,由于秸秆原料木质纤维素含量高、C/N失调,使得秸秆在厌氧发酵过程易

收稿日期:2013-11-27

基金项目:国家科技支撑项目(2012BAD15B02);科研院所技术开发研究专项资金(2011-2013);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2011-szjj-ljf);天津市科技支撑计划重点项目(12ZCZDNC01800)

作者简介:张 蕾(1978—),女,山西人,在读博士,主用从事农业生物质能研究。E-mail: z_lapple@126.com

* 通信作者:梁军锋 E-mail: liangjunfeng2008@126.com

出现产气率低、厌氧发酵系统稳定性差等问题^[4-6]。

有机物厌氧降解过程主要分为水解发酵、产氢产乙酸及产甲烷3个阶段。其中水解发酵与产氢产乙酸阶段主要由细菌参与,涉及一系列复杂的化学代谢过程,生成乙酸等挥发性有机酸;而产甲烷阶段主要由甲烷古菌参与,将乙酸转化为甲烷^[7]。沼气发酵过程需要不同阶段的微生物协同完成,明确沼气发酵过程中的微生物群落结构与功能,对于提高有机物沼气发酵过程的稳定性,增加产气量有着重要的指导意义。因此对于沼气发酵过程中微生物群落结构和功能的解析已经成为研究的热点^[8]。然而,目前国内外关于沼气发酵过程中的微生物群落分析的报道主要集中在生活污水^[9]、餐厨垃圾^[10-11]、畜禽粪便^[12-13]等常规原料上,对于以秸秆为单一或主要原料的沼气发酵过程鲜有报道。

本文采用T-RFLP技术和克隆文库构建相结合的方法,通过对运行良好的四个以秸秆为单一或主要原料的规模化秸秆沼气反应器中的厌氧污泥样品,进行细菌和甲烷古菌种群分析,以解析沼气发酵微生物群落结构与功能,为优化秸秆沼气发酵工艺提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验中样品取自运行良好的规模化秸秆沼气反应器中,反应器均为竖向推流式反应器,详细情况见表1。样品采集前,先排空采样管道中残余的厌氧污泥,然后再将厌氧污泥向外流动几分钟后用无菌塑料瓶采集样品,以确保采集到的样品混合均匀且具有代表性。然后立即将样品带回实验室,保存于-20℃的冰箱中,备用。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA提取

参考Feng等^[14]的方法,取2 mL采集的厌氧污泥样品,用低温冷冻离心机(Eppendorf,德国)在14 000×g下离心10 min,去掉上清液使样品初步脱水以便富

集样品中的微生物。基因组DNA的提取采用FastDNA[®] Spin Kit for soil试剂盒(Mpbio, USA)进行,具体程序参照试剂盒说明书。为了保证提取样品的基因组DNA的代表性,每个厌氧污泥样品平行提取三次。通过1%的琼脂糖凝胶电泳对基因组DNA的提取结果进行检测,显示各样品基因组DNA的长度为4~20 kb。

1.2.2 T-RFLP

用于T-RFLP分析的细菌PCR引物为27f (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和1392r (5'-GACGGGCGGTGTGTGTAC-3')^[15-16],上游引物的5'末端用6-carboxyfluorescein(FAM)荧光素标记。PCR反应体系为25 μL,反应条件如下:95℃预变性5 min,94℃变性1 min,56.5℃退火1 min,72℃延伸3 min,共30个循环;最后72℃延伸10 min;古菌的PCR扩增采用古菌通用引物A109f (ACKGCTCAGTAA-CACGT)和A912r (CTCCCCCGCCAATTCCTTTA)^[17],下游引物的末端用6-carboxyfluorescein(FAM)荧光素标记。PCR反应体系为25 μL,PCR条件如下:94℃预变性5 min,94℃变性1 min,56℃退火1 min,72℃延伸1.5 min,共30个循环;最后72℃延伸10 min。

为了降低PCR反应的偏好性和假象,每个样品重复三次。PCR扩增产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,然后将三个平行样的PCR产物混合,采用DNA纯化试剂盒(TaKaRa,大连)对混合扩增产物进行纯化。纯化后的细菌PCR产物,采用限制性内切酶(TaKaRa,大连)*Msp* I在37℃下消化5 h;纯化后的古菌PCR产物,采用限制性内切酶(TaKaRa,大连)*Taq* I在65℃消化5 h。消化后的产物中加入HiDi甲酰胺,在95℃水浴上灭活3 min。酶切产物进行脱盐纯化后,用ABI3130遗传分析仪(Applied Biosystems, CA, USA)进行毛细管电泳分离,内标为500LIZ,取荧光强度50RFU为基线,末端限制性片段(Terminal restriction fragments, TRFs)的大小和强度图采用GeneScanTm 3.7(Applied Biosystems, CA)软件进行分析处理,图谱显示的片段大小为50~600 bp。在T-RFLP图

表1 厌氧反应器基本状况

Table 1 Basic information of biogas digesters

样品	位置	容积/m ³	反应器类型	运行时间/年	发酵温度/℃	原料	产气率/m ³ ·m ⁻³ ·d ⁻¹	甲烷含量/%	pH
1#	四川成都	500	竖向推流式	2	35~38	水稻秸秆	0.8~1.2	55%	7.53
2#	河南安阳	800	竖向推流式	4	36~38	玉米秸秆	0.6~0.7	47%	7.19
3#	河南安阳	1000	竖向推流式	4	35~38	小麦秸秆	0.5~0.6	51%	7.86
4#	河南安阳	600	竖向推流式	2	34~36	80%麦秸+20%猪粪	1.0	51%	7.54

谱中,计算每个峰的峰面积与所有峰面积的比率来表征每个末端限制性片段(T-RF)的相对丰度,舍去T-RFs 相对丰度小于1%的片段。

1.2.3 克隆文库构建

用非荧光标记的引物分别对样品中的细菌与古菌进行PCR扩增,PCR反应体系与反应条件同1.2.2。扩增产物用胶回收试剂盒(TAKALA,大连)进行纯化,纯化的PCR扩增产物用pGEM-T Easy载体(Promega,美国)依操作说明进行连接。采用热激法将连接产物转化至DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中,通过蓝白斑筛选阳性克隆。对于每个克隆文库,随机挑取95个向阳克隆子,进行菌落PCR。引物采用M13F(5'-GTTTCCCAGTCACGAC-3')和M13R(5'-CAGGAACAGCTATGAC-3')。用限制性内切酶(细菌为HhaI和MspI,古菌为HhaI和TaqI)对细菌和古菌的菌落PCR扩增产物进行消化,酶切产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。每个酶切分型选取一个代表克隆,转接到含氨苄的LB液体培养基,37℃恒温培养24h,将菌液送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

获得的16S RNA基因序列与GeneBank数据库(<http://www.ncbi.com>)进行比对,并且利用Vector NTI Advance11软件进行序列分析,通过MEGA5.1软件中Neighbor-joining法构建系统进化树,Bootstran法检测系统树,自展系数为1000,利用BioEdit软件进行相似度的计算^[18]。

2 结果与分析

2.1 细菌种群特征分析

样品的T-RFLP指纹图谱见图1。由图可见,细

菌的T-RFLP特征片段(T-RFs)十分丰富,在供试的全部四个秸秆沼气发酵反应器中分别为20、35、20与23个,但仅有555bp与494bp两个片段为共有片段,表明供试的四个秸秆沼气厌氧反应器中细菌的种类较多,但不同反应器中细菌优势种群各不相同。在1#反应器中,T-RFs片段516bp和543bp所代表的细菌为优势种群,相对丰度分别为12.8%和11.4%;2#反应器中,158bp所代表的细菌为优势种群,相对丰度为10.0%;3#反应器中,494bp、496bp和543bp所代表的细菌为优势种群,他们的相对丰度分别为16.8%、16.1%和12.5%;4#反应器中,149bp、494bp和496bp所代表的细菌为优势种群,它们的相对丰度分别为10.1%、25.2%和19.0%。

为了鉴定T-RFs片段代表的微生物种类,对基因组DNA样品进行了克隆文库构建。对于细菌克隆文库,一共挑选了289个阳性克隆,通过酶切分型最终获得了91个操作分类单元(OTU),但OTUs序列与Genebank中已知的序列相似性较低。其中相似性大于等于95%的仅有30个,仅占OTUs总数的30%。通过细菌16SrRNA基因序列与NCBI数据库比对以及系统进化分析,91个OUT分属9个门(见表2),分别为厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、无壁菌门(Tenericutes)、放线菌门(Actinobacteria)、互养菌门(Synergistetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)和螺旋体门(Spirochaetes)。其中厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)与拟杆菌门(Bacteroidetes)为主要优势克隆,分别占细菌OUTs总数和克隆总数的39.6%和30.1%、23.1%和40.5%及18.7%和21.45%

通过构建克隆文库,可以识别T-RFLP中T-RFs

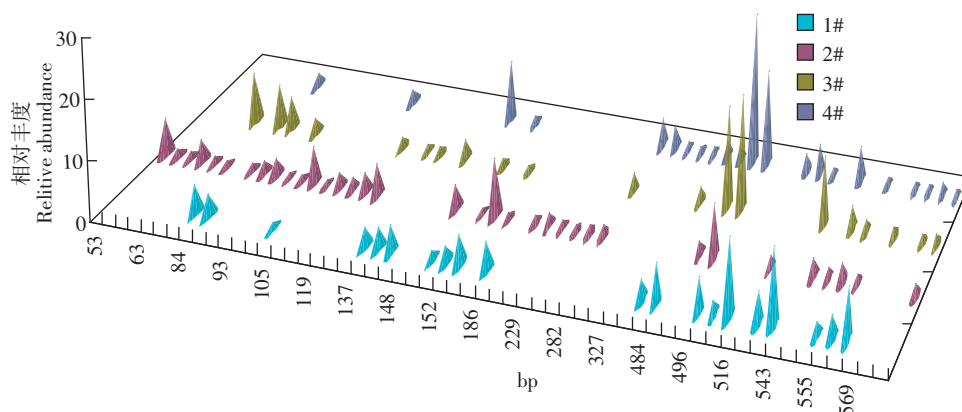


图1 细菌群落MspI酶切T-RFLP指纹图谱

Figure 1 T-RFLP fingerprint patterns of bacterium community digestion with enzyme MspI

表 2 细菌的 16S rRNA 克隆子的分布情况
Table 2 Distribution of bacterial 16S rRNA clones

微生物种类(门)	OTUs 数/OTUs 总数	克隆数/克隆总数	克隆%
Firmicutes	36/91	87/289	30.2%
Bacteroidetes	21/91	62/289	21.5%
Proteobacteria	17/91	117/289	40.5%
Chloroflexi	5/91	5/289	1.7%
Synergistetes	3/91	3/289	1.0%
Spirochaetes	3/91	5/289	1.7%
Tenericutes	2/91	5/289	1.7%
Actinobacteria	2/91	3/289	1.1%
Planctomycetes	1/91	1/289	0.4%

片段所代表的细菌及相对丰度。从图 1、表 3 可见,T-RFLP 指纹图谱中各秸秆沼气发酵反应器中的优势细菌种群,分属于厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)与拟杆菌门(Bacteroidetes),三者的相对丰度在各秸秆沼气发酵反应器中分别为 19.3%~47.2%、4.8%~24.3%与 2.5%~15.5%,这与细菌克隆文库中得到的结果一致。

细菌的 T-RFLP 指纹图谱与 OTUs 序列的模拟酶切比对结果显示(表 3),细菌的 T-RFs 优势片段 149bp(OTU48),与放线菌门(Actinobacteria)中的 *Thermopolyspora flexuosa* 近缘,相似性为 97%。*Thermopolyspora flexuosa* 为厌氧的革兰氏阳性菌,生长温度为 37~60 ℃,可水解马铃薯淀粉、燕麦等产生葡萄糖和核糖等^[19];T-RFs 片段 158bp(OTU79),与厚壁菌门(Firmicutes)中的 *Clostridium jejuense* 近缘,相似性为 94%。*Clostridium jejuense* 分离自土壤,主要生长在中温厌氧环境中,最适生长温度为 30 ℃,pH 值为 7.0,可以利用纤维素、阿拉伯糖、乳糖、木糖、葡萄糖等最终生成丙酸、醋酸、甲酸和氢^[20];T-RFs 片段 494bp(OTU27),与放线菌门(Actinobacteria)中的 *Solirubrobacter soli* 近缘,相似性为 90%。*Solirubrobacter soli* 为杆状、革兰氏阳性、不产芽孢厌氧细菌,分离自土壤。生长温度为 25~30 ℃,耐盐量为 0~1.5%(W/V)NaCl,可水解明胶、淀粉等,耐硝酸盐和亚硝酸盐^[21];T-RFs 片段 496bp(OTU28),与变形菌门(Proteobacteria)中的 *Pseu-*

表 3 细菌的 T-RFLP 与 OTUs 序列的模拟酶切比对结果
Table 3 Bacterial comparison between T-RFLP patterns and OTUs sequences

样品	T-RFs	相对丰度/%	OTUs	近缘种	登录号	相似性	所属门	功能
1#	84	4.9	OTU18	<i>Owenweeksia hongkongensis</i>	NR_074100.1	85%	Bacteroidetes	—
			OTU19	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	NR_043154.1	90%		
			OTU12	<i>Cytophaga fermentans</i>	NR_044696.1	85%	Bacteroidetes	—
	89	4.0	OTU23	<i>Pseudomonas fulva</i>	NR_040859.1	98%	Proteobacteria	—
	143	3.3	OTU40	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	NR_044607.1	97%	Proteobacteria	Acetogenic
	145	4.0	OTU60	<i>Methylocystis heyeri</i>	NR_042531.1	90%	Proteobacteria	Acidogenic
	148	4.7	OTU46	<i>Paenibacillus odorifer</i>	NR_028887.1	93%	Firmicutes	
	152	1.8	OTU64	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	NR_074520.1	100%	Synergistetes	Acidogenic
	154	2.9						
	160	5.0	OTU79	<i>Clostridium jejuense</i>	NR_025796.1	94%	Firmicutes	Cellulolytic
	200	5.0	OTU61	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	NR_074520.1	85%	Synergistetes	Acidogenic
	490	6.5	OTU26	<i>Pseudomonas xiamenensis</i>	NR_043533.1	97%	Proteobacteria	Hydrolytic
	517	12.8	OTU62	<i>Levilinea saccharolytica</i>	NR_040972.1	89%	Chloroflexi	Acidogenic
	543	12.5	OTU35	<i>Clostridium innocuum</i>	NR_029164.1	84%	Firmicutes	Hydrolytic
2#	Others	37.0%	Unknow	—	—	—	—	—
	64	3.9	OTU90	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	NR_036942.1	96%	Firmicutes	Acidogenic
	89	1.3	OTU11	<i>Fluviicola taffensis</i>	NR_074547.1	85%	Bacteroidetes	Acidogenic
			OTU12	<i>Cytophaga fermentans</i>	NR_044696.1	87%		
			OTU15	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	NR_074277.1	90%	Bacteroidetes	Acidogenic
	91	1.6	OTU16	<i>Paludibacter propionigenes</i>	NR_074577.1	84%		
			OTU17	<i>Prolixibacter bellariivorans</i>	NR_043273.1	88%		
			OTU50	<i>Cytophaga fermentans</i>	NR_044696.1	85%	Bacteroidetes	Acidogenic
	93	2.4						
	96	3.2	OTU21	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	NR_043154.1	96%	Bacteroidetes	Acidogenic
	125	1.2	OTU84	<i>Sphaerochaeta globus</i>	NR_074808.1	92%	Spirochaetes	—

续表 3 细菌的 T-RFLP 与 OTUs 序列的模拟酶切比对结果
Continuing table 3 Bacterial comparison between T-RFLP patterns and OTUs sequences

样品	T-RFs	相对丰度/%	OTUs	近缘种	登录号	相似性	所属门	功能
2#	132	3.6	OTU85	<i>Aminobacterium colombiense</i>	NR_074624.1	90%	Synergistetes	—
	150	5.3	OTU51	<i>Paucisalibacillus globulus</i>	NR_042445.1	86%	Firmicutes	Hydrolytic
			OTU52	<i>Moorella thermoacetica</i>	NR_075001.1	87%		
	154	4.4	OTU64	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	NR_074520.1	100%	Synergistetes	Acidogenic
	160	1.3	OTU79	<i>Clostridium jejuense</i>	NR_025796.1	94%	Firmicutes	Cellulolytic
	227	9.9	OTU65	<i>Alkaliphilus transvaalensis</i>	NR_024748.1	85%	Firmicutes	—
	277	2.4	OTU33	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	NR_037000.1	95%	Proteobacteria	—
	281	1.4	OTU87	<i>Sporosarcina koreensis</i>	NR_043526.1	87%	Firmicutes	Acidogenic
	300	1.7	OTU57	<i>Tissierella praeacuta</i>	NR_044860.1	95%	Firmicutes	—
	494	2.3	OTU27	<i>Solirubrobacter soli</i>	NR_041365.1	90%	Actinobacteria	Hydrolytic
	496	2.4	OTU28	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	NR_037000.1	96%	Proteobacteria	—
	524	8.8	OTU30	<i>Levilinea saccharolytica</i>	NR_040972.1	89%	Chloroflexi	Acidogenic
	543	2.4	OTU35	<i>Clostridium innocuum</i>	NR_029164.1	84%	Firmicutes	Hydrolytic
	Others	37.2	Unknown	—	—	—	—	—
3#	64	8.7	OTU90	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	NR_036942.1	96%	Firmicutes	Acidogenic
	84	7.1	OTU18	<i>Owenweeksia hongkongensis</i>	NR_074100.1	85%	Bacteroidetes	—
			OTU19	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	NR_043154.1	90%		
	89	5.6	OTU11	<i>Fluviicola taffensis</i>	NR_074547.1	85%	Bacteroidetes	Acidogenic
			OTU12	<i>Cytophaga fermentans</i>	NR_044696.1	87%		
	93	2.8	OTU50	<i>Cytophaga fermentans</i>	NR_044696.1	85%	Bacteroidetes	Acidogenic
	125	2.2	OTU84	<i>Sphaerochaeta globus</i>	NR_074808.1	92%	Spirochaetes	—
	135	1.6	OTU31	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	NR_074448.1	100%	Tenericutes	—
	143	1.7	OTU23	<i>Pseudomonas fulva</i>	NR_040859.1	98%	Proteobacteria	
	148	3.6	OTU60	<i>Methylocystis heyeri</i>	NR_042531.1	90%	Proteobacteria	Acidogenic
	152	1.6	OTU46	<i>Paenibacillus odorifer</i>	NR_028887.1	93%	Firmicutes	Hydrolytic
	160	1.2	OTU79	<i>Clostridium jejuense</i>	NR_025796.1	94%	Firmicutes	Cellulolytic
	300	3.1	OTU57	<i>Tissierella praeacuta</i>	NR_044860.1	95%	Firmicutes	—
	494	16.8	OTU27	<i>Tissierella praeacuta</i>	NR_044860.1	95%	Firmicutes	—
	496	19.0	OTU28	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	NR_037000.1	96%	Proteobacteria	—
	543	11.4	OTU35	<i>Clostridium innocuum</i>	NR_029164.1	84%	Firmicutes	Hydrolytic
	Others	13.7	Unknown	—	—	—	—	—
4#	84	2.5	OTU1	<i>Owenweeksia hongkongensis</i>	NR_074100.1	85%	Bacteroidetes	—
			OTU19	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	NR_043154.1	90%		
	149	10.1	OTU48	<i>Thermopolyspora flexuosa</i>	NR_042721.1	97%	Actinobacteridae	Hydrolytic
	152	1.7	OTU46	<i>Paenibacillus odorifer</i>	NR_028887.1	93%	Firmicutes	Hydrolytic
	300	5.1	OTU57	<i>Tissierella praeacuta</i>	NR_044860.1	95%	Firmicutes	—
	302	4.2	OTU55	<i>Syntrophothermus lipocalidus</i>	NR_040796.1	98%	Firmicutes	Acidogenic
	454	1.4	OTU25	<i>Nautilia profundicola</i>	NR_074388.1	78%	Proteobacteria	—
	490	2.5	OTU26	<i>Pseudomonas xiamenensis</i>	NR_043533.1	97%	Proteobacteria	Hydrolytic
	494	25.2	OTU27	<i>Tissierella praeacuta</i>	NR_044860.1	95%	Firmicutes	—
	496	16.1	OTU28	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	NR_037000.1	96%	Proteobacteria	—
	517	3.0	OTU62	<i>Levilinea saccharolytica</i>	NR_040972.1	89%	Chloroflexi	—
	520	5.2	OTU36	<i>Clostridium disporicum</i>	NR_026491.1	99%	Firmicutes	Acidogenic
	543	5.8	OTU35	<i>Clostridium innocuum</i>	NR_029164.1	84%	Firmicutes	Acidogenic
	571	1.4	OTU59	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	NR_037000.1	95%	Proteobacteria	—
	Others	15.9	Unknown	—	—	—	—	—

Pseudomonas pseudoalcaligenes 近缘,相似性为96%。*Pseudomonas pseudoalcaligenes* 分离自土壤,为短杆状、革兰氏阴性、好氧菌,生长温度为4~65℃。可利用葡萄糖,不能水解淀粉^[22];T-RFs片段516bp对应OTU62和OTU63,两者都属于绿弯菌门(Chloroflexi),与*Levilinea saccharolytica*相似度为89%,与*Bellilinea caldifistulae*相似度为91%。*Levilinea saccharolytica*分离自产甲烷污泥,最适生长温度为37℃,可利用葡萄糖、果糖和蔗糖等糖类^[23]。*Bellilinea caldifistulae*分离自产甲烷的丙酸盐还原反应器,生长温度为45~65℃,和氢营养型的产甲烷菌协同生长。在酵母提取物存在的情况下,可利用果糖、葡萄糖、半乳糖、果胶、蛋白胨和木糖等,不能利用醋酸盐、乳酸盐和甘油等^[24];T-RFs片段543bp(OTU35),与厚壁菌门(Firmicutes)中的*Clostridium innocuum*近缘,但相似性较低,仅为84%。*Clostridium innocuum*为厌氧、嗜中温细菌,可以利用葡萄糖、甘露醇和乳糖,但不能利用淀粉^[25]。

厚壁菌门(Firmicutes)在四个秸秆反应器中均是最优势的细菌种群(见表3),该门细菌已在厌氧消化污泥、废水处理反应器^[9]、玉米秸秆厌氧反应器^[8]、餐厨垃圾厌氧反应器中^[10-11]、粪便^[12-13]等环境中被大量发现过,主要进行纤维素降解、有机物水解、长链脂肪酸降解,生成小分子物质。变形菌门(Proteobacteria)在四个秸秆反应器中均是第二大优势的细菌种群,该门的纯培养主要分离自土壤、粪便、厌氧活性污泥等,可利用淀粉、长链脂肪酸及氨基酸等,具有水解作用,部分细菌有脱氮作用^[26]。拟杆菌门(Bacteroidetes)在四个秸秆反应器的分布为第三大优势种群,主要分离自

海底、肠道、厌氧反应器等厌氧环境,有降解大分子碳水化合物产酸的功能。乔江涛等^[8]对玉米秸秆厌氧发酵过程的细菌群落结构进行研究,结果发现厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、互养菌门(Synergistetes)及热袍菌门(Thermotogae)为优势菌群。Klock等^[27]对青贮饲用甜菜厌氧发酵过程的微生物群落结构分析,发现厚壁菌门(Firmicutes)、 δ -变形菌门(Delta-Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)为最优势的类群。史宏伟等^[28]采用DGGE方法,对以餐厨垃圾、果蔬垃圾与麦秸三种原料厌氧发酵过程中的微生物群落分析后,发现拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)为优势微生物。以上结果,表明拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)在富含纤维素的有机废弃物厌氧发酵过程中发挥着重要作用,需要结合反应器的运行参数与运行状况,进一步研究这些优势微生物在沼气发酵过程中群落演替与代谢功能。

2.2 古菌的多样性分析

样品的T-RFLP指纹图谱见图2。由图可见,供试的样品中检测出古菌的T-RFs片段分别为5条(1#反应器)、7条(2#反应器)、5条(3#反应器)和6条(4#反应器),表明古菌种类要远远少于细菌。T-RFLP特征分析片段(T-RFs)279bp和387bp为4个秸秆沼气反应器中所共有片段,且在各反应器中均为优势种群,它们在各反应器中的相对丰度分别为69.3%和18.5%(1#反应器)、69.2%和7.0%(2#反应器)、71.9%和16.8%(3#反应器)及18.2%和3.1%(4#反应器)。另外在4#反应器中T-RFs片段181bp所代表的古菌为优势种群,相对丰度达73.1%。

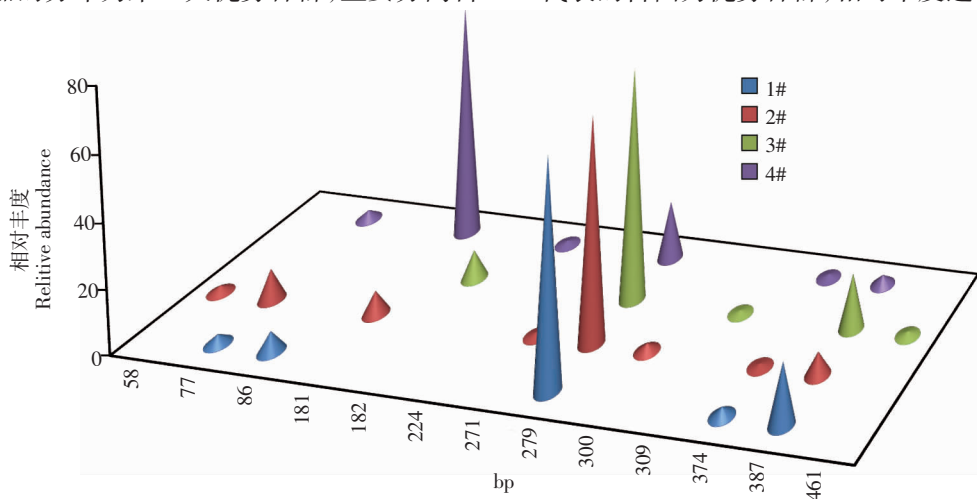


图2 古菌群落TaqI酶切T-RFLP指纹图谱

Figure 2 T-RFLP fingerprint patterns of archaeal community digestion with enzyme TaqI

对于古菌的克隆文库的构建,共挑取 181 个阳性克隆,最终获得了 12 个 OTUs,各反应器文库 OTUs 的数量在 3~7 个之间。通过古菌 16SrRNA 基因序列与 NCBI 数据库比对以及系统进化分析,各反应器中古菌的序列与 GenBank 中已知的序列同源性明显高于细菌,序列相似性大于 97%的 OTUs 占到 OUT 总数的 58.3%。将样品中古菌的克隆子序列与 Genebank 数据库进行比对,结果显示古菌序列均属于甲烷杆菌纲 (Methanobacteria) 和甲烷微菌纲 (Methanomicrobia),这与乔江涛等^[8]人在分析玉米秸秆厌氧发酵过程中得到的结果一致。

在属分类水平上(见表 4),12 个古菌 OTUs 中可分为甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*)、甲烷微菌属 (*Methanosphaerula*)、甲烷粒菌属 (*Methanocorpusculum*)、甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*)、甲烷鬃菌属 (*Methanosaeta*)、甲烷绳菌属 (*Methanolinea*)与甲烷螺菌属 (*Methanospirillum*)。其中,甲烷鬃菌属和甲烷八叠球菌属为文库中的优势克隆,分别占克隆总数的 45.9%和 38.1%。

表 4 古菌的 16S rRNA 克隆子的分布情况
Table 4 Distribution of archaeal 16S rRNA clones

微生物种类(属)	OTUs 数目	克隆子数目	克隆数/克隆总数
<i>Methanobacterium</i>	3	8	4.42%
<i>Methanosphaerula</i>	1	2	1.10%
<i>Methanocorpusculum</i>	2	5	2.76%
<i>Methanosarcina</i>	1	69	38.12%
<i>Methanosaeta</i>	1	83	45.86%
<i>Methanolinea</i>	2	2	1.65%
<i>Methanospirillum</i>	2	11	6.08%

通过构建古菌克隆文库,对测得的序列进行模拟酶切,可以识别 T-RFLP 中对应的 T-RFs 片段所代表的古菌及相对丰度,结果见表 5 和图 3。结果表明,TRFLP 指纹图谱中,在四个反应器中均为优势种群的共有条带 T-RF279bp(对应 OTU6)与 *Methanosaeta concilii* 近缘(相似性,100%)。另外一个共有 T-RF 条带 387bp(对应 OTU7 或 OTU8)与 *Methanolinea tarda* (相似性,96%)或 *Methanospirillum hungatei*(相似性,96%)近缘。4# 反应器中的优势条带 T-RF 181bp(对应 OTU4 或 OTU5)与 *Methanocorpusculum bavaricum*

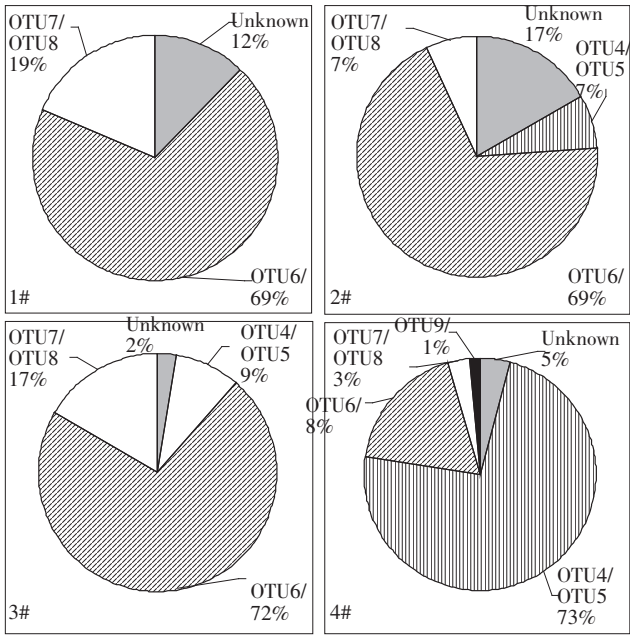


图 3 古菌 16S rRNA T-RFLP 与克隆文库结果
Figure 3 Relative abundance of each OTU based on the T-RFLP profile of archaeal 16S rRNA gene

表 5 古菌 16S rRNA 基因文库克隆子在数据库中的相似性比对结果
Table 5 Comparison between summarized clone sequences of archaeal 16S rRNA and GenBank

OTUs	T-RFs	近缘种	登录号	所属纲	相似度	功能
OTU1	86	<i>Methanobacterium beijingense</i>	NR_028202.1	Methanobacteria	98%	Hydrogenotrophic
OTU2	86	<i>Methanobacterium congolense</i>	NR_028175.1	Methanobacteria	99%	Hydrogenotrophic
OTU3	100	<i>Methanosphaerula palustris</i>	NR_074167.1	Methanomicrobia	95%	Hydrogenotrophic
OTU4	181	<i>Methanocorpusculum bavaricum</i>	NR_042787.1	Methanomicrobia	99%	Hydrogenotrophic/Aceticlastic
OTU5	181	<i>Methanosarcina thermophila</i>	NR_044725.1	Methanomicrobia	99%	Aceticlastic
OTU6	279	<i>Methanosaeta concilii</i>	NR_028242.1	Methanomicrobia	100%	Hydrogenotrophic
OTU7	387	<i>Methanolinea tarda</i>	NR_028163.1	Methanomicrobia	96%	Hydrogenotrophic
OTU8	387	<i>Methanospirillum hungatei</i>	NR_074177.1	Methanomicrobi	96%	Hydrogenotrophic
OTU9	227	<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	NR_074173.1	Methanomicrobia	99%	—
OTU10	392	<i>Methanospirillum hungatei</i>	NR_074177.1	Methanomicrobia	93%	Hydrogenotrophic
OTU11	461	<i>Methanobacterium formicicum</i>	NR_025028.1	Methanobacteria	99%	Hydrogenotrophic

(相似性,99%)或 *Methanosarcina thermophila*(相似性,99%)近缘。在 1#、2#、3# 三个以秸秆为唯一原料的沼气发酵过程中 *Methanosaeta concilii* 为优势微生物,而在添加了少量猪粪的 4# 发酵过程中, *Methanosarcina thermophila* 为优势菌种。何志刚等^[29]在研究牛粪沼气产甲烷菌多样性时, *Methanosarcina* sp.(甲烷八叠球菌)为优势微生物占总数的 42%, *Methanosaeta*(甲烷鬃毛菌)只占 25%,与本研究得到的结果一致。

Methanosaeta(甲烷鬃菌属),属于极端严格厌氧菌,最适生长温度为 40℃,可利用氢气或甲酸盐,还原二氧化碳生成甲烷,不能利用乙酸和甲基胺。在以果蔬废弃物^[10]、玉米秸秆^[8]、青贮饲用甜菜^[27]等为原料的试验室厌氧消化器及反刍动物瘤胃^[30]均检测到了 *Methanosaeta*(甲烷鬃菌属),且均属于优势微生物,表明其在富含纤维的原料厌氧消化中发挥着重要作用。

3 结论

(1) 秸秆沼气发酵反应器中细菌种类十分丰富,分属 9 个门,大部分为水解与发酵性细菌。其中厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)为主要的优势种群。

(2) 秸秆沼气反应器中,甲烷古菌种类较少,大部分属于氢营养型甲烷菌,甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)为优势种群。

(3) 添加猪粪影响秸秆沼气发酵反应器中产甲烷古菌群落。以秸秆为唯一原料时甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)为优势种群,而添加猪粪时甲烷八叠球菌(*Methanosaeta*)为优势种群。

参考文献:

- [1] 毕于运,王亚静,高春雨,等.中国主要秸秆资源数量及其区域分布[J].农机化研究,2010,3:1-7.
BI Yu-yun, WANG Ya-jing, GAO Chun-yu, et al. Straw resource quantity and its regional distribution in China[J]. *Journal of Agricultural Research*, 2010, 3:1-7.
- [2] 国家发展改革委,农业部,财政部.“十二五”农作物秸秆综合利用实施方案[R].发改环资[2011]2615号.
- [3] 崔文文,梁军锋,杜连柱,等.中国规模化秸秆沼气工程现状及存在问题[J].中国农学通报,2013,29(11):121-125.
CUI Wen-wen, LIANG Jun-feng, DU Liang-zhu, et al. The current situation and problems of the large-scale biogas plants for straw in China[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(11):121-125.
- [4] 陈小华,朱洪光.农作物秸秆产沼气研究进展与展望[J].农业工程学报,2007,23(3):279-283.
CHEN Xiao-hua, ZHU Hong-guang. Research progress and prospect on producing biogas from crop straws[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2007, 23(3):279-283.
- [5] Emiliano B, Anders P, Irini A. Steam treatment of digested biofibers for increasing biogas production[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101:7668-7671.
- [6] 张 望,李秀金,庞云芝,等.稻草中温干式厌氧发酵产甲烷的中试研究[J].农业环境科学学报,2008,27(5):2075-2079.
ZHANG Wang, LI Xiu-jin, PANG Yun-zhi, et al. A pilot study on mesophilic dry anaerobic digestion of rice straw[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(5):2075-2079.
- [7] Carina S, Waleed A, Madeleine L, et al. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters[J]. *FEMS Microbial Ecol*, 2013, 85(12):612-626.
- [8] 乔江涛,郭荣波,袁宪正,等.玉米秸秆厌氧降解复合菌系的微生物群落结构[J].环境科学,2013,34(4):1531-1539.
QIAO Jiang-tao, GUO Rong-bo, YUAN Xian-zheng, et al. Phylogenetic analysis of methanogenic corn stalk degrading microbial communities[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(4):1531-1539.
- [9] 朱文秀,黄振兴,任洪艳,等.IC反应器处理啤酒废水的效能及其微生物群落动态分析[J].环境科学,2012,33(8):2715-2722.
ZHU Wen-xiu, HUANG Zhen-xing, REN Hong-yan, et al. Performance and microbial community dynamic characteristics of an internal circulation reactor treating brewery wastewater[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(8):2715-2722.
- [10] 史宏伟,邹德勋,左剑恶,等.梯度负荷下果蔬垃圾厌氧消化性能及微生物群落结构的研究[J].环境科学学报,2012,32(1):232-240.
SHI Hong-wei, ZOU De-xun, ZUO Jian-e, et al. Investigation on anaerobic digestion performance and microbial structure of vegetable wastes under gradient organic loadings[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32(1):232-240.
- [11] Ye N F, Lü F, Shao L M, et al. Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(4):1055-1065.
- [12] Narihiro T, Terada T, Kikuchi K, et al. Comparative analysis of bacterial and archaeal communities in methanogenic sludge granules from up-flow anaerobic sludge blanket reactors treating various food-processing, high-strength organic wastewaters[J]. *Microbes and Environments*, 2008, 24(2):88-96.
- [13] Roest K, Heilig H G H J, Smidt H, et al. Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28(2):175-185.
- [14] Feng X M, Karlsson A, Svensson B H, et al. Impact of trace element addition on biogas production from food industrial waste-linking process to microbial communities[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2010, 74(1):226-240.
- [15] McGarvey J A, Miller W G, Zhang R, et al. Bacterial population dynamics in dairy waste during aerobic and anaerobic treatment and subsequent storage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73:1999-2440.
- [16] Ike M, Inoue D, Miyano T, et al. Microbial population dynamics during startup of a full-scale anaerobic digester treating industrial food waste

- in Kyoto eco-energy project[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(11): 3952–3957.
- [17] Peng J, Lü Z, Rui J, et al. Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74:2894–2901.
- [18] Xu K, Liu H, Du G, et al. Real-time PCR assays targeting formyltetrahydrofolate synthetase gene to enumerate acetogens in natural and engineered environments[J]. *Anaerobe*, 2009, 15:204–213.
- [19] Goodfellow M, Maldonado L, Quintana E. Reclassification of *Nonomuraea flexuosa* as *Thermopolyspora flexuosa* gen. nov., comb. nov., nom. Rev[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55(5): 1979–1983.
- [20] Jeong H, Yi H, Sekiguchi Y, et al. *Clostridium jejuense* sp. nov., isolated from soil[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(5): 1465–1468.
- [21] Kim M K, Na J R, Lee T H, et al. *Solirubrobacter soli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(7): 1453–1455.
- [22] 丁延芹, 黄伟红, 姚良同, 等. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* B50 铁载体合成相关基因 *pyrD* 的克隆与功能分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7):981–985.
- DING Yan-qin, HUANG Wei-Hong, YAO Liang-Tong, et al. Cloning and functional analysis of *pyrD* gene involved in siderophores biosynthesis in *pseudomonas pseudoalcaligenes* B50[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(7):981–985.
- [23] Yamada T, Sekiguchi Y, Imachi H, et al. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to Chloroflexi subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 7493–7503.
- [24] Yamada T, Imachi H, Ohashi A, et al. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(10): 2299–2306.
- [25] Whaley D N, Wiggs L S, Miller P H, et al. Use of Presumptive Plates to identify anaerobic bacteria[J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(5): 1196–1202.
- [26] Lai Q, Shao Z. *Pseudomonas xiamenensis* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from activated sludge[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58(8): 1911–1915.
- [27] Klocke M, Mahnert P, Mundt K, et al. Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30(2): 139–151.
- [28] 史宏伟, 邹德勋, 左剑恶, 等. 原料差异对厌氧消化微生物群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(8): 1675–1682.
- SHI Hong-wei, ZOU De-xun, Zuo Jian-e, et al. The effect of feedstocks on microbial communities in anaerobic digesters[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(8): 1675–1682.
- [29] 何志刚, 牛世伟, 于涛, 等. 低温条件下牛粪沼气产甲烷菌多样性初步研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(6): 189–193.
- HE Zhi-gang, NIU Shi-wei, YU Tao, et al. Methanogenic diversity in an anaerobic digester with manure feces in low temperature[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(6): 189–193.
- [30] Wright A D, Pimm C. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting[J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 55(2): 337–349.