

复合菌系 CN6 生长特性及在沼气发酵中的应用*

程辉彩^{1,2} 张丽萍² 左 壮¹ 张 宁² 吴树彪³ 董仁杰³

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193; 2. 河北省科学院生物研究所, 石家庄 050081;

3. 中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要: 为有效提高纤维素类原料厌氧发酵水解效率, 根据不同菌株利用底物差异和产酶互补性, 人工构建产纤维素酶复合菌系 CN6。通过检测滤纸酶活和纤维素降解率, 确定了复合菌系 CN6 的最适培养温度为 30 ~ 37℃, 最佳培养初始 pH 值为 7.0, 菌系 CN6 遗传性能稳定。复合菌系 CN6 应用于以牛粪为原料的室内沼气厌氧发酵, 发酵 0 ~ 15 d 时, 挥发性脂肪酸质量浓度比对照提高 26.5% ~ 30.6%, 发酵结束时, 纤维素降解率比对照提高 6.8%, 沼气总产量比对照提高 18.4%。

关键词: 沼气发酵 纤维素酶产生菌 复合菌系 CN6 混合培养

中图分类号: S216.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2013)05-0143-05

Growth Characteristics of Complex Strains CN6 and Its Application in Biogas Production

Cheng Huicai^{1,2} Zhang Liping² Zuo Zhuang¹ Zhang Ning² Wu Shubiao³ Dong Renjie³

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

2. Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050081, China

3. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to improve the hydrolysis efficiency of cellulose materials, an artificial composite system CN6 was constructed by using different substrates and complementary enzymes. By detecting the filter paper enzyme activity and cellulose degradation rate, the optimum fermentation conditions of CN6 were determined as follows: culture temperature of 30 ~ 37℃ and initial pH value of 7.0. The metabolic process of CN6 was proved to be stable. The complex strains CN6 was applied to biogas fermentation of cow dung as raw material in a laboratory scale reactors. The results showed that the volatile fatty acid (VFA) was increased by 26.5% ~ 30.6% in 0 ~ 15 d of fermentation. At the end of fermentation, the cellulose degradation rate and cumulative biogas production were increased by 6.8% and 18.4% compared with that of the control.

Key words: Biogas fermentation Cellulase-producing bacteria Complex strains CN6 Mixed culture

引言

随着能源危机和环境污染加剧, 纤维素类物质的开发利用成为国内外研究热点。但其结构复杂、难于水解酸化, 阻碍着其高效利用进程。大量研究表明, 纤维素降解是由多种酶系协同作用的结果, 单

一微生物菌种很难产生全的复合酶系, 复合菌系或多菌种联合培养对纤维素的降解能力显著高于单一菌, 利用复合菌系进行纤维素降解成为解决该问题的重要手段之一^[1~3]。

目前, 对复合菌系的研究主要表现在 2 个方面^[4~9]: 一是直接从自然界中筛选具有高效纤维素

收稿日期: 2012-11-26 修回日期: 2012-12-06

* “十二五”国家科技支撑计划资助项目(2012BAD14B03, 2011BAD15B04)和河北省财政预算项目(13334)

作者简介: 程辉彩, 博士生, 河北省科学院副研究员, 主要从事厌氧微生物和生物质能源研究, E-mail: huicaicheng@163.com

通讯作者: 董仁杰, 教授, 博士生导师, 主要从事生物质工程及可再生资源利用研究, E-mail: rjdong@cau.edu.cn

降解作用的天然复合微生物菌系;另一种是先筛选纤维素降解效果好的菌株,然后再根据各菌株生长及产酶互补特性等进行混合培养,人工构建高效复合菌系。利用菌株之间的互利互惠、协同作用进行混合发酵,可以克服单菌种发酵的缺点,是微生物发酵的总体趋势之一^[10]。研究室根据菌株利用不同底物差异和产酶互补性等,分别将 LDD-2、CJT-3、N14 和 ZQ-1 四株菌进行两两、三三及四种菌混合培养筛选,构建了产纤维素酶复合菌系 CN6。在此基础上,本文通过检测发酵过程中滤纸酶活和纤维素降解率,进一步探讨该菌系的适宜生长温度、pH 值及代谢稳定性,并将其应用于以牛粪为原料的沼气厌氧发酵,验证 CN6 对纤维类原料水解效率和产甲烷的影响,为其在厌氧发酵中的开发应用提供指导。

1 材料与方法

1.1 菌株

复合菌系 CN6,由 LDD-2 (*Clostridium cellobioparum*)、CJT-3 (*Clostridium papyrosolvens*)、N14 (*Cellulomonas. sp.*) 和 ZQ-1 (*Clostridium butyricum*) 4 种菌按一定比例混合培养构建,LDD-2 和 CJT-3 来源于农业部沼气科学研究所,N14 和 ZQ-1 来源于河北省科学院生物研究所。

1.2 培养基

PB 培养基:NaCl 5.0 g,牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,水 1 000 mL,pH 值 7.2~7.4。抽真空,充氮气,保持厌氧环境。于 121℃ 高压灭菌 20 min。

PCS 厌氧发酵培养基:蛋白胨 1.5 g,CMC-Na 5 g,微晶纤维素粉 5 g,秸秆粉 5 g,NaCl 1.5 g,KH₂PO₄ 1.0 g,MgSO₄ 0.5 g,水 1 000 mL,pH 值 7.2~7.4。用 250 mL 的厌氧瓶分装,每瓶装 200 mL,每瓶加入 0.6 g 的滤纸条作为指示底物,抽真空,充氮气,保持厌氧环境。于 121℃ 高压灭菌 20 min。

1.3 复合菌系生长特性试验

1.3.1 生长曲线及酶活、纤维素降解率变化

将 CN6 接种于 PB 培养基,培养 36 h 至对数生长期,作为种子液,按体积分数 10% 的接种量接入 PCS 培养基中,30℃ 培养,每隔 12 h 取样一次,在 600 nm 处测吸光度,分别在培养 1、3、5、7、9 d 时,测滤纸酶活和纤维素降解率。

1.3.2 温度对复合菌系的影响

将 CN6 种子液以体积分数 10% 的接种量接入 PCS 培养基中,分别放到 15、25、30、37、45、50、60℃ 培养箱中培养,培养 3 d 时测滤纸酶活,7 d 时测纤维素降解率。

1.3.3 培养初始 pH 值对复合菌系的影响

将 PCS 培养基的 pH 值分别调至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0,将 CN6 种子液以体积分数 10% 的接种量接入 PCS 培养基中,30℃ 静置培养,培养 3 d 时测滤纸酶活,培养 7 d 时测纤维素降解率。

1.4 代谢稳定性测定

将复合菌系 CN6 连续传代 10 次,30℃ 培养 3 d 时测其滤纸酶活,7 d 时测纤维素降解率,确定其遗传稳定性。

1.5 沼气厌氧发酵试验

采用中温批式发酵,发酵周期 30 d,原料为新鲜牛粪,取自石家庄市郊区奶牛养殖场(总固体质量分数为 18.0%,挥发性固体质量分数为 14.1%,灰分质量分数为 3.9%),接种沼液取自正常发酵户用沼气池(总固体质量分数为 3.8%,挥发性固体质量分数为 2.7%,灰分质量分数为 1.1%)。试验采用排水集气法,设 6 个处理(见表 1,其中 C 为 CJT-3、L 为 LDD-2、N 为 N14、Z 为 ZQ-1),发酵料液总固体质量分数 6.1%,初始 pH 值 7.5,恒温(36±1)℃。反应器为 250 mL 厌氧瓶,每处理 5 个平行。每天记录产气量,定期检测挥发性脂肪酸(VFA)、甲烷含量,试验起始和结束时测定反应器内纤维素降解率等。

表 1 试验设计

Tab.1 Experimental design

处理 序号	牛粪 质量/g	沼液 体积/mL	空白 PCS 培养 基体积/mL	菌液 体积/mL	总体积 /mL
CK(对照)	50	50	30	-	180
C	50	50		30	180
L	50	50		30	180
N	50	50		30	180
Z	50	50		30	180
CN6	50	50	-	30	180

1.6 各项指标的测定方法

1.6.1 滤纸酶活

粗酶液提取:取 10 mL 发酵液,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为粗酶液。

滤纸酶活测定:以滤纸为底物,在试管中加入尺寸约 1 cm×6 cm 的滤纸条,再加入 1.0 mL pH 值 7.0 的磷酸-磷酸钠缓冲液,使其浸没滤纸条,加入 1 mL 的酶液,50℃ 水浴 1 h。

按照国际理论应用化学协会(IUPAC)推荐的国际标准方法测定:每 1 min 由底物生成 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量定义为一个酶活单位。

1.6.2 纤维素降解率

纤维素降解率采用失重法^[11],以纤维素类成分

的失重率来表示。将发酵液于 8 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,蒸馏水洗涤,8 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,用盐酸(150 mL,质量分数为 80%)和浓硝酸(15 mL)的混合液消除菌体,离心,弃上清液,105℃干燥至质量恒定,计算失重率。

1.6.3 其他

pH 值采用酸度计测量(sartorius PB-10 pH 计);挥发性脂肪酸含量:采用滴定法测定^[12];甲烷含量:采用气相色谱仪分析法测量(Agilent 7890A)^[13]。

2 结果与分析

2.1 生长曲线及酶活、纤维素降解率变化

为确定复合菌系的纤维素降解规律和最佳产酶时间,在其生长过程中定期对纤维素降解率和滤纸酶活进行监测。如图 1 所示,0~0.5 d 为复合菌系 CN6 生长延滞期;0.5~2 d 为对数生长期,2~7 d 为稳定期,之后进入微生物生长衰退期。CN6 复合菌系在对数生长期开始产酶,迅速增长,3 d 时滤纸酶活性最高(1.21 U),即在稳定初期达最高值,之后酶活呈下降趋势。CN6 发酵过程中,纤维素降解率在 0~5 d 内迅速增加,达到 57.8%,此后降解速率明显下降,发酵结束时纤维素降解率达到 60.6%,其中发酵 7 d 和 9 d 的纤维素降解率没有显著差异。

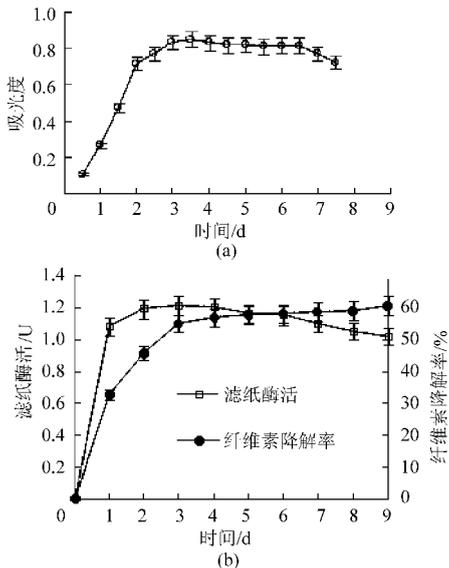


图 1 CN6 生长曲线及滤纸酶活和纤维素降解率变化

Fig. 1 Growth curves of CN6 and changes of filter paper activity and cellulose degradation rate

(a) CN6 生长曲线 (b) 滤纸酶活和纤维素降解率变化

2.2 温度对复合菌系的影响

温度是影响有机体生长与存活的重要因素之一。研究微生物在生长或积累代谢产物时的最适温度,对提高发酵生产效率具有重要意义。由图 2 可

知,复合菌系 CN6 在 30℃ 时,纤维素降解率和滤纸酶活均达最大值,滤纸酶活达 1.29 U,纤维素降解率为 58.3%。37℃ 纤维素降解率和滤纸酶活略有下降,分别为 56.9% 和 1.15 U,与 30℃ 时的纤维素降解率和滤纸酶活没有显著差异。低于 25℃,高于 45℃,纤维素降解率和滤纸酶活均显著下降。说明该菌系为嗜中温微生物,低温或高温均不利于其生长,适用于中温厌氧发酵。

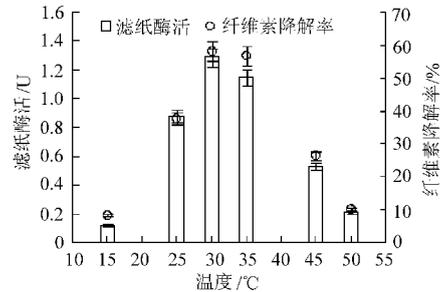


图 2 温度对 CN6 滤纸酶活和纤维素降解率的影响

Fig. 2 Effects of temperature on filter paper activity and cellulose degradation rate

2.3 初始 pH 值对复合菌系的影响

由图 3 可知,复合菌系 CN6 在培养初始 pH 值为 7.0 时,滤纸酶活和纤维素降解率分别为 1.39 U 和 56.2%;高于或低于 7.0,纤维素降解率和滤纸酶活均显著下降。在 pH 值 6.0 时滤纸酶活为 0.96 U,是 pH 值 7.0 的 69.1%;纤维素降解率为 46.2%,是 pH 值 7.0 的 82.2%。pH 值 8.0 时滤纸酶活为 1.10 U,是 pH 值 7.0 的 79.1%;纤维素降解率为 41.6%,是 pH 值 7.0 的 74.0%。因此,该菌系适合在中性条件下生长、产酶,酸性或碱性环境均不利于其产酶和纤维素降解。

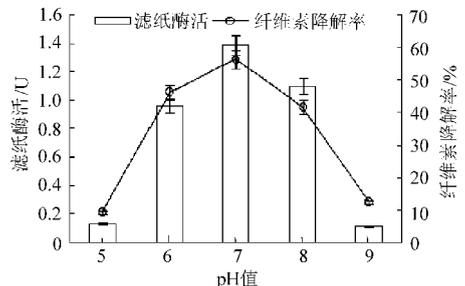


图 3 初始 pH 值对 CN6 滤纸酶活和纤维素降解率的影响

Fig. 3 Effects of pH value on filter paper activity and cellulose degradation rate

2.4 代谢稳定性测定

将 CN6 连续 10 次传代,显微镜定时观察菌体形态和数量变化,以确定发酵过程是否正常进行。每代培养 3 d 时取样检测滤纸酶活,培养 7 d 时测纤维素降解率。结果表明,在连续培养过程中,每代纤维素复合菌系 CN6 的滤纸酶活和纤维素降解率间没有显著差异,结果见表 2。将所得结果进行方差

分析, P 值大于 0.05, 可见遗传性能稳定。

表 2 代谢稳定性

Tab. 2 Metabolic stability

传代次数	滤纸酶活/U	纤维素降解率/%
1	1.29 ± 0.18	55.4 ± 3.3
2	1.28 ± 0.15	56.0 ± 2.8
3	1.33 ± 0.14	55.8 ± 3.0
4	1.29 ± 0.21	56.2 ± 2.2
5	1.31 ± 0.17	55.5 ± 3.1
6	1.30 ± 0.11	57.0 ± 2.8
7	1.27 ± 0.21	54.7 ± 3.7
8	1.29 ± 0.22	55.5 ± 4.0
9	1.31 ± 0.16	54.3 ± 2.9
10	1.30 ± 0.19	53.8 ± 3.1

2.5 沼气厌氧发酵试验

2.5.1 不同处理沼气总产气量

将纤维素复合菌系 CN6 及其组成的各单一菌株分别用于以牛粪为原料的厌氧发酵试验, 结果见图 4, 添加 CN6 的处理沼气产量显著高于其他几个处理, 比对照沼气产量提高了 18.4%。添加 LDD-2、N14 和 ZQ-1 菌液的 3 个处理沼气产气量与对照相比没有显著差异, 添加 CJT-3 菌液的处理沼气产气量显著高于对照、低于添加复合菌系 CN6 的处理, 比对照提高了 9.3%。说明在厌氧发酵过程中添加复合菌系, 对促进沼气生产效果显著优于添加其组成的各单一菌株。

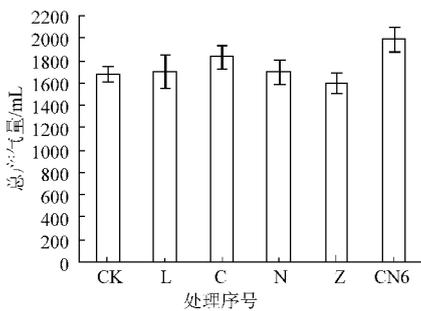


图 4 不同处理沼气总产气量

Fig. 4 Total biogas production of different treatments

2.5.2 甲烷含量

由图 5 可知, 各处理甲烷含量变化趋势相同。起始阶段, 对照组甲烷含量略高于添加菌液的处理组, 其中添加单一菌株处理甲烷含量与对照没有显著差异, 添加复合菌系 CN6 的处理前 3 d 检测的甲烷含量显著低于对照, 但是随着时间的延长, 6 d 以后两者的甲烷含量没有显著差异, 甲烷体积分数在 60% ~ 70% 之间变化。分析原因, 主要是由于在发酵起始阶段, 添加复合菌系后, 甲烷菌含量相对较少, 水解菌群尤其是纤维素降解菌占优势, 水解过程产生的 CO_2 、 H_2 等含量明显增加, 随着甲烷菌的富

集、增长, 水解产生的大量底物被利用, 甲烷含量迅速上升, 6 d 时两者间甲烷含量没有差异。

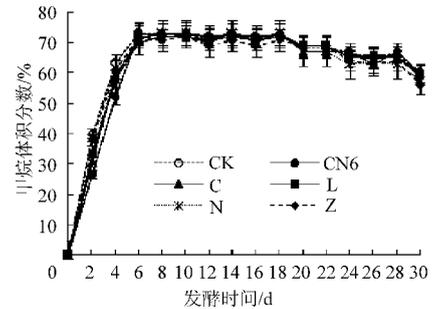


图 5 发酵过程中甲烷含量变化

Fig. 5 Changes of methane content in biogas fermentation

2.5.3 日产气量

由图 6 可知, 添加复合菌 CN6, 2 ~ 3 d 时, 日产气量达高峰, 而在发酵 5 d 时对照日产气量才高于 90 mL, 间接说明添加复合菌 CN6, 可相对缩短发酵启动时间 2 ~ 3 d。发酵 1 ~ 14 d, 添加 CN6 的处理沼气日产气量比对照提高了 24.3%, 15 d 后 2 个处理的日均产气量没有显著差异。18 d 后 2 个处理的日均产气量均显著下降。

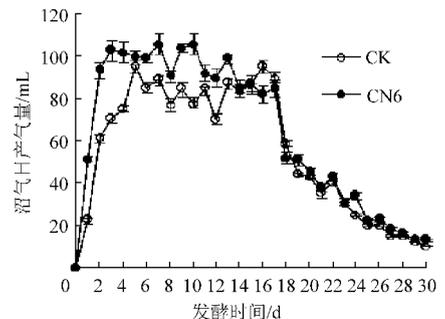


图 6 沼气日产气量变化曲线

Fig. 6 Daily production curves of biogas

在厌氧发酵过程中添加功能微生物, 是提高有机物分解利用率和沼气产量的一项重要措施^[14]。当前大部分微生物菌剂, 尤其是施入复杂环境(如: 土壤、污泥等)系统中, 菌种数量与活性容易发生变化, 需要定期连续添加强化, 才能有好的应用效果^[15]。沼气发酵是由多种微生物在厌氧条件下共同参与的复杂生化过程, 一次添加菌系, 短期内应用效果明显, 说明该菌系有应用潜力, 但随着发酵时间的延长, 微生物菌群间竞争加剧, 致使效果逐渐不明显, 因此, 需要对菌系的投加方式, 如连续投加、固定化细胞投加, 以及其添加量、添加频率和添加时间等进行深入研究。

2.5.4 挥发性脂肪酸含量、pH 值和纤维素含量

pH 值是反应器运行的重要工程控制参数, 也是影响不同发酵类型优势种群形成的限制因子。发酵过程中实时监测 pH 值, 对厌氧反应的正常进行具

有指导作用^[16]。2组试验 pH 值变化趋势一致,先快速下降,然后恢复到 7.0~7.5。尽管产酸发酵菌群可以在较低的 pH 值条件下生存并发挥作用,然而其最适 pH 值与其他细菌一样,大都集中在中性范围。发酵前 10 d,加菌组的 pH 值略低于对照组,但差异不显著,之后两者趋于一致(图 7)。最终 pH 值稳定在 7.0~7.5 之间。

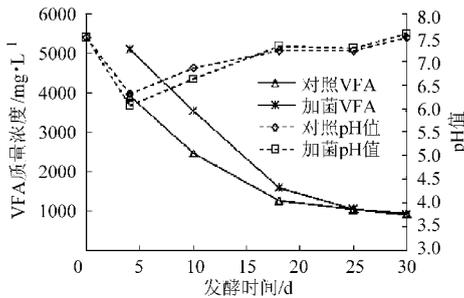


图7 发酵过程中 VFA 和 pH 值变化

Fig. 7 Changes of VFA and pH value in biogas fermentation

挥发性脂肪酸(VFA)是厌氧消化过程中的重要中间产物,其组成和含量可间接反映厌氧反应运行情况的稳定性,通过对 VFA 的监测可以很好了解有机物质的降解进程^[12]。从图 7 可知,添加复合菌系 CN6 的 VFA 质量浓度,在发酵前 15 d 均显著高

于对照,比对照提高了 26.5%~30.6%。20 d 后,两试验组 VFA 质量浓度没有显著差异。间接说明添加复合菌系,可有效提高原料水解效率。

另外,发酵结束时通过测定纤维素含量,添加菌系 CN6 的处理组比对照纤维素降解率提高了 6.8%,进一步说明,添加复合菌系 CN6 确实可有效提高牛粪厌氧发酵水解效率。

3 结论

(1)通过检测滤纸酶活和纤维素降解率,确定了复合菌系 CN6 的适宜培养温度为 30~37℃,初始培养 pH 值为 7.0,菌系 CN6 连续传代 10 次,遗传性能稳定。

(2)将复合菌系 CN6 用于以牛粪为原料的室内沼气厌氧发酵,结果表明,发酵前 15 d,挥发性脂肪酸 VFA 质量浓度比对照提高了 26.5%~30.6%,纤维素降解率比对照提高了 6.8%,显著增强了原料水解效率。复合菌系在促进沼气产气方面显著优于单一菌株,沼气总产量比对照提高了 18.4%,甲烷含量仅在发酵初期略低于对照组,之后与对照没有显著差异。进一步说明该复合菌系在提高纤维类物质的厌氧发酵水解效率方面有一定的应用价值。

参 考 文 献

- 1 Wongwilaiwalina Sarunyou, Rattanachomsria Ukrit, Laothanachareon Thanaporn, et al. Analysis of a thermophilic lignocelluloses degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 47(6): 283~290.
- 2 罗辉. 高效厌氧纤维素降解菌的筛选,复合菌系的构建及应用研究[D]. 成都:农业部沼气科学研究所,2008.
Luo Hui. Isolation of effective cellulytic anaerobic bacteria, construction and application of mix culture[D]. Chengdu: Biogas Institute of Ministry of Agriculture, 2008. (in Chinese)
- 3 Wang Weidong, Yan Lei, Cui Zongjun, et al. Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19): 9321~9324.
- 4 Yan Lei, Gao Yamei, Wang Yanjie, et al. Diversity of a mesophilic lignocellulolytic microbial consortium which is useful for enhancement of biogas production[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 111: 49~54.
- 5 Weiß S, Tauber M, Somitsch W, et al. Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite [J]. *Water Research*, 2010, 44(6): 1970~1980.
- 6 Kato Souichiro, Shin Haruta, Cui Zongjun, et al. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 7099~7106.
- 7 刘爽,李文哲,王春影,等. 高效木质纤维素分解复合菌系降解稻草特性的研究[J]. *环境工程学报*, 2010, 4(3): 700~704.
Liu Shuang, Li Wenzhe, Wang Chunying, et al. Research on characteristics of degrading straw by high efficient lignocelluloses degrading microbial community[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2010, 4(3): 700~704. (in Chinese)
- 8 郭夏丽,程小平,杨小丽,等. 高效玉米秸秆降解菌复合系的构建[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(7): 261~266.
Guo Xiali, Cheng Xiaoping, Yang Xiaoli, et al. Construction of composite consortia with high capacity of lignocellulose degradation [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(7): 261~266. (in Chinese)
- 9 Yadav K S, Naseeruddin S, Prashanthi G S, et al. Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(11): 6473~6478.
- 10 袁旭峰,高瑞芳,李培培,等. 复合菌系 MC1 预处理对玉米秸秆厌氧发酵产甲烷效率的提高[J]. *农业工程学报*, 2011, 27(9): 266~270.
Yuan Xufeng, Gao Ruifang, Li Peipei, et al. Improvement of anaerobic biogasification efficiency by pretreatment of corn straw with composite microbial system of MC1 [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2011, 27(9): 266~270. (in Chinese)

- Xu Xiao, Ye Xiaomei, Chang Zhizhou, et al. Technique on recycle of leachate in biogas production from rice straw with dry anaerobic digestion [J]. *Journal of Agro-environment Science*, 2009, 28(6): 1 273 ~ 1 278. (in Chinese)
- 3 Li L H, Li D, Sun Y M, et al. Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in south China [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(13): 7 261 ~ 7 266.
- 4 朱德文, 曹成茂, 陈永生, 等. 秸秆厌氧干发酵产沼气关键技术及问题探讨[J]. *中国农机化*, 2011(4): 56 ~ 59.
Zhu Dewen, Cao Chengmao, Chen Yongsheng, et al. Key technologies and discussion of the straw dry-anaerobic fermentation [J]. *Chinese Agricultural Mechanization*, 2011(4): 56 ~ 59. (in Chinese)
- 5 朱圣权, 张衍林, 张文倩, 等. 厌氧干发酵技术研究进展[J]. *可再生能源*, 2009, 27(2): 46 ~ 50.
Zhu Shengquan, Zhang Yanlin, Zhang Wenqian, et al. The progress of dry anaerobic fermentation technology [J]. *Renewable Energy Resources*, 2009, 27(2): 46 ~ 50. (in Chinese)
- 6 边炳鑫, 赵由才, 康文泽. 农业固体废弃物的处理与综合利用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- 7 夏吉庆, 马添翼, 毕经毅, 等. 牛粪厌氧发酵污泥回流试验[J]. *农业机械学报*, 2011, 42(4): 105 ~ 109.
Xia Jiqing, Ma Tianyi, Bi Jingyi, et al. Sludge recycle trial of cattle manure anaerobic fermentation [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2011, 42(4): 105 ~ 109. (in Chinese)
- 8 张全国. 沼气技术及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- 9 Sun J X, Yuan X Z, Shi X S, et al. Fermentation of *Chlorella* sp. for anaerobic bio-hydrogen production: influences of inoculum-substrate ratio, volatile fatty acids and NADH [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(22): 10 480 ~ 10 485.
- 10 赵洪, 邓功成, 高礼安, 等. 接种物数量对沼气产气量的影响[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(13): 6 278 ~ 6 280.
Zhao Hong, Deng Gongcheng, Gao Li'an, et al. Research on the effect of inoculated amount for biogas producing volume [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(13): 6 278 ~ 6 280. (in Chinese)
- 11 马磊, 王德汉, 谢锡龙, 等. 接种量对餐厨垃圾高温厌氧消化的影响[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(12): 178 ~ 182.
Ma Lei, Wang Dehan, Xie Xilong, et al. Influence of inoculum on thermophilic anaerobic digestion of food waste [J]. *Transactions of the CSAE*, 2008, 24(12): 178 ~ 182. (in Chinese)
- 12 Cui Z F, Shi J, Li Y B. Solid-state anaerobic digestion of spent wheat straw from horse stall [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(20): 9 432 ~ 9 437.
- 13 Kusch S, Oechsner H, Jungbluth T. Biogas production with horse dung in solid-phase digestion systems [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(5): 1 280 ~ 1 292.
- 14 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 环境科学出版社, 1989.
- 15 周孟津, 张榕林, 蔺金印. 沼气实用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- 16 傅国志. 搅拌和沼液回流对麦秸序批式厌氧消化性能影响的试验研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2010.
Fu Guozhi. Investigation on effect of mixing and biogas slurry reflux on sequencing batch anaerobic digestion performance of wheat [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2010. (in Chinese)

(上接第 147 页)

- 11 刘爽. 中低温秸秆降解菌的筛选及其秸秆降解效果研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
Liu Shuang. Screening of straw degradation strains under medium-low temperature and their degradation effects on crop straw [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011. (in Chinese)
- 12 Rieger C, Weiland P. Prozessstörungen frühzeitig erkennen [J]. *Biogas Journal*, 2006(4): 18 ~ 20.
- 13 习彦花, 程辉彩, 张丽萍, 等. 产氢产乙酸菌 ZR-1 的分离鉴定及产酸特性[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(2): 181 ~ 186.
Xi Yanhua, Cheng Huicai, Zhang Liping, et al. Separation and identification of a hydrogen-producing acetogens strain ZR-1 and its acetic production characters [J]. *Microbiology*, 2011, 38(2): 181 ~ 186. (in Chinese)
- 14 文娅, 赵国柱, 周传斌, 等. 生态工程领域微生物菌剂研究进展[J]. *生态学报*, 2011, 31(20): 6 287 ~ 6 294.
Wen Ya, Zhao Guozhu, Zhou Chuanbin, et al. Research progress of microbial agents in ecological engineering [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(20): 6 287 ~ 6 294. (in Chinese)
- 15 郭静波. 生物菌剂的构建及其在污水处理中的生物强化效能[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2010.
Guo Jingbo. Construction of bacterial agent and its bioaugmentation efficiency in the wastewater treatment [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2010. (in Chinese)
- 16 朱葛夫. 厌氧折流板反应器应用技术及微生物群落生态学研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2007.
Zhi Gefu. Practical technology and microbial community ecology of anaerobic baffled reactor [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2007. (in Chinese)