

# 外源生物强化下水稻秸秆好氧-厌氧两相发酵产甲烷特性研究

何董<sup>1,2</sup> 罗立娜<sup>2,3</sup> 徐名汉<sup>4</sup> 刘莹<sup>5</sup> 丁清华<sup>6,7</sup> 孙勇<sup>2,8</sup> 秦楠<sup>2</sup>

(1. 广东省新能源和可再生能源研究开发与应用重点实验室, 广州 510640;

2. 东北农业大学工程学院, 哈尔滨 150030;

3. 黑龙江省寒地农业可再生资源利用技术及装备重点实验室, 哈尔滨 150030;

4. 中国农业机械化科学研究院集团有限公司农业装备技术全国重点实验室, 北京 100083;

5. 黑龙江农垦管理干部学院, 哈尔滨 150090; 6. 潍坊理工学院现代农业与环境学院, 潍坊 262500;

7. 山东禄禧大盛环保科技有限公司, 潍坊 262128; 8. 农业农村部生猪养殖设施工程重点实验室, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 采用生物强化方法强化水稻秸秆好氧水解过程, 并研究绿色木霉及添加量(占总料液质量分数3%、5%、7%和9%)对其发酵特性的影响。好氧水解阶段生物强化时间为24 h, 随后在35℃条件下进行厌氧发酵产甲烷潜力测试。结果表明, 与对照组相比, 添加绿色木霉进行生物强化各组的木质纤维素降解率、挥发性脂肪酸(VFAs)产量及产气率均有不同程度的提高, VFAs均以乙酸为主。利用Modified Gompertz对累积产甲烷量进行拟合, 拟合结果较好, 绿色木霉添加量为3%、5%、7%、9%的各预处理试验组累积产甲烷量分别为198.28、211.351、228.44、234.78 mL/g, 比CK对照组产甲烷量分别提高18.89%、26.72%、36.96%、40.76%, 添加7%绿色木霉组的综合效果最好, 在此条件下半纤维素、纤维素、木质素降解率分别为36.86%、31.57%、7.43%, 甲烷产量较CK组提高36.96%。好氧水解过程中优势菌群为厚壁菌门(Firmicutes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)等, 其中厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度随水解时间的延长而减少, 绿弯菌门(Chloroflexi)和拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度增加, 表明添加菌剂能够改变菌群结构, 促进好氧水解反应的进行。

**关键词:** 水稻秸秆; 厌氧发酵; 好氧水解; 生物强化; 绿色木霉; 产甲烷特性

中图分类号: S216.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-1298(2024)08-0401-09

OSID:



## Effect of Exogenous Biological Enhancement on Methane Production Characteristics of Aerobic-anaerobic Two-phase Fermentation of Rice Straw

HE Dong<sup>1,2</sup> LUO Li'na<sup>2,3</sup> XU Minghan<sup>4</sup> LIU Ying<sup>5</sup> DING Qinghua<sup>6,7</sup> SUN Yong<sup>2,8</sup> QIN Nan<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Research, Development and Application of New and

Renewable Energy in Guangdong Province, Guangzhou 510640, China

2. School of Engineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

3. Key Laboratory of Agricultural Renewable Resources Utilization Technology and Equipment

in Cold Areas of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China

4. State Key Laboratory of Agricultural Equipment Technology,

Chinese Academy of Agricultural Mechanization Sciences Group Co., Ltd., Beijing 100083, China

5. Heilongjiang Agricultural Reclamation Management Cadre College, Harbin 150090, China

6. School of Modern Agriculture and Environment, Weifang Institute of Technology, Weifang 262500, China

7. Shandong Luxi Dasheng Environmental Protection Co., Ltd., Weifang 262128, China

8. Key Laboratory of Pig-breeding Facilities Engineering, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The aerobic hydrolysis process of rice straw was enhanced by biological reinforcement method, and the effects of green *Trichoderma* and its addition amount (3%, 5%, 7%, and 9% of the total feed

收稿日期: 2023-12-04 修回日期: 2024-01-03

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(52306228)、黑龙江省自然科学基金项目(LH2021E005)、广东省新能源和可再生能源研究与发展重点实验室开放项目(E239k0501)、黑龙江省博士后科研启动基金项目(LBH-Q21067)和黑龙江省“揭榜挂帅”科技攻关项目(2022ZXJ05C02)

**作者简介:** 何董(1999—),男,硕士生,主要从事农业废弃物资源化处理研究, E-mail: 3198709979@qq.com

**通信作者:** 罗立娜(1984—),女,副教授,博士,主要从事农业废弃物资源化处理研究, E-mail: luolina@neau.edu.cn

mass fraction) on its fermentation characteristics were studied. The biological enhancement time in the aerobic hydrolysis reactor was 24 h, followed by anaerobic fermentation methane production potential testing under 35℃ conditions. The results showed that compared with the control group, the addition of *Trichoderma viride* for biological enhancement resulted in varying degrees of improvement in the degradation rate of lignocellulose, production of volatile fatty acids (VFAs), and gas production rate in each group, with acetic acid being the main component of VFAs. The cumulative methane production was fitted by using Modified Gompertz, and the fitting results were good. The cumulative methane production of each pre-treatment experimental group with 3%, 5%, 7%, and 9% addition of *Trichoderma viride* was 198.28 mL/g, 211.351 mL/g, 228.44 mL/g, and 234.78 mL/g, respectively. Compared with that of the CK control group, the methane production was increased by 18.89%, 26.72%, 36.96%, and 40.76%, respectively. The results showed that the comprehensive effect of adding 7% *Trichoderma viride* was the best. Under these conditions, the degradation rates of hemicellulose, cellulose and lignin were 36.86%, 31.57%, and 7.43%, respectively, and the methane production was increased by 36.96%. The dominant bacterial communities during aerobic hydrolysis were Firmicutes, Chloroflexi, Proteobacteria, and Bacteroidetes. Among them, the relative abundance of Firmicutes was decreased with the prolongation of hydrolysis time, while the relative abundance of Chloroflexi and Bacteroidetes was increased, indicating that the addition of microbial agents could change the structure of bacterial communities and promote the progress of aerobic hydrolysis reaction.

**Key words:** rice straw; anaerobic fermentation; aerobic hydrolysis; biological reinforcement; green *Trichoderma*; methane production characteristics

0 引言

水稻是我国主要的粮食作物之一,每年产量约  $2 \times 10^8$  t,水稻秸秆资源综合利用率较低,其中 1/3 左右秸秆未得到有效处置<sup>[1]</sup>,存在温室气体排放和水污染等严重的环境潜在风险,高效利用秸秆资源成为当前的研究难题。目前,我国水稻秸秆处理方式主要包括焚烧、直接还田、堆肥、作为动物饲料、厌氧发酵等<sup>[2]</sup>。在众多处理方式中,厌氧发酵能够同时产生沼气和沼肥,是一种集废弃物处理以及清洁能源和高值化肥料生产于一体的资源化利用技术,具有广阔的应用前景<sup>[3]</sup>。由于水稻秸秆晶体结构复杂,木质纤维素自身分子量大且形成的高度结晶的晶体结构在自然条件下很难被打破,导致水解速度慢、消化周期长和产甲烷量低,因此通常需要在好氧水解阶段对水稻秸秆进行预处理破坏其木质纤维素结构,保障后续厌氧发酵过程的高效进行。目前,秸秆预处理方法主要有物理、化学、生物法等方法。物理预处理能耗高、对设备要求严格,而化学预处理容易产生二次污染问题,在实际应用中受到限制<sup>[4]</sup>。生物预处理是一种相对温和的处理方式,主要是利用微生物及其产生的分解酶降解木质素、纤维素、半纤维素,具有能耗低、操作简单、反应条件温和、环境友好和处理效果显著等优点,成为研究热点。生物预处理主要有直接堆沤法、真菌发酵、混合菌剂发酵和酶解法等<sup>[5]</sup>。在好氧水解阶段添加纯培养的单菌或复合菌群进行生物预处理,可有效提高底物水解率,将大分子有机物转化为可溶

性糖及挥发性脂肪酸(VFAs),为产甲烷过程提供更多营养,进而提高厌氧发酵系统的产气效率<sup>[6-7]</sup>。

黑曲霉、绿色木霉、草酸青霉、云芝栓孔菌和白腐真菌等被认为是高效的木质纤维素降解菌<sup>[8-9]</sup>。目前研究主要集中在利用单一菌剂或混合菌剂产生纤维素酶或半纤维素酶来提高木质纤维素降解率并取得了显著效果<sup>[10-12]</sup>。但复合菌系菌群结构复杂,微生物稳定性差,容易出现拮抗作用,影响预处理效果。

本文选用产纤维素酶活性最高的菌株——绿色木霉作为研究对象,探究不同添加比例的绿色木霉对水稻秸秆好氧水解效果的影响,研究生物强化前后木质纤维素降解率、pH 值、VFAs 浓度、结晶度及微生物菌群结构的变化情况,并测定生物强化后水稻秸秆的产甲烷潜力,以期为解决水稻秸秆厌氧发酵过程存在的难题探索一种高效、环保的处理方式,为实现资源化利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 绿色木霉培养

绿色木霉为东北农业大学黑龙江省寒地农业可再生资源利用技术及装备重点实验室筛选获得。扩大培养的培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。称取 46.1 g 固体培养基粉末,溶于 1 L 水中,于 121℃ 灭菌 20 min。生物强化前将培养好的菌种接入不含琼脂的液体培养基,震荡培养 48 h 后加入好氧水解酸化反应器内。

1.2 试验材料和方法

试验所用水稻秸秆取自东北农业大学试验实习基地向阳农场（东经 126° 22′ ~ 126° 50′，北纬 45°34′ ~ 45°46′）。自然风干后利用粉碎机将水稻秸秆粉碎，取样测定基本理化指标，装入密封袋储存待用。接种物取自实验室自行设计的连续厌氧发酵中试系统产甲烷反应器的沼液。发酵底物和接种物基本理化特性参数如表 1 所示。

表 1 发酵原料基本理化特性参数  
Tab.1 Basic characteristics of raw materials

| 参数          | 水稻稻秸  | 接种物   |
|-------------|-------|-------|
| 总固体质量分数/%   | 90.42 | 5.24  |
| 挥发性固体质量分数/% | 76.86 | 3.88  |
| 纤维素质量分数/%   | 41.97 |       |
| 半纤维素质量分数/%  | 35.45 |       |
| 木质素质量分数/%   | 8.24  |       |
| 含水率/%       | 9.58  | 94.76 |
| C 质量分数/%    | 40.61 | 19.68 |
| N 质量分数/%    | 1.12  | 1.24  |
| 碳氮比         | 36.26 | 15.87 |

试验采用有效容积为 2.5 L 的广口瓶为反应容器，采用中温温度 35℃ 进行好氧水解和厌氧发酵。好氧水解阶段发酵原料的总固体（TS）质量分数为 10%，在好氧水解 24 h 后加入沼液重新接种，厌氧产甲烷发酵阶段 TS 质量分数调节为 8%。在好氧水解试验过程中加入绿色木霉进行强化<sup>[13]</sup>，绿色木霉添加量（菌种占料液质量分数）分别为 3%、5%、7%、9%。5 组试验分别记为不同添加比例绿色木霉组（添加量 3%、5%、7%、9% 组别表示为 A1、A2、A3、A4）及对照组（CK）。用排水集气法收集产生的气体，且每天定时测一次气体体积，并检测好氧水解前后结晶度以及 VFAs 和木质纤维素含量。选取绿色木霉添加量 3% 和 9% 两个试验组及对照组测定好氧水解前后的菌群结构变化情况。

1.3 测定指标及方法

总固体（TS）含量、挥发性固体（VS）含量、pH 值采用标准方法进行测定<sup>[14]</sup>。将样品经过 380℃、2 h 消解后采用 Kjeltec2300 型凯氏定氮仪进行测定<sup>[15]</sup>。气体成分（氢气、氮气、甲烷和二氧化碳）以及乙醇和 VFAs 含量均采用安捷伦 6890N 型气相色谱进行测定，色谱条件详见文献[16]。气体及 VFAs 成分均采用外标法标定。

纤维素、半纤维素、木质素含量采用 ANKOM 200i 型半自动纤维分析仪测定。X 射线衍射（XRD）测量使用荷兰 X' Pert Pro X 型射线衍射仪

在 40 kV 和 200 mA 条件下操作，Cu - Kα 辐射在 1.540 60 Å 下进行。扫描区域设置为 10 ~ 90℃，步长为 0.02℃，扫描速率为 2℃/min。微生物群落多样性及其变化采用 16S rDNA 测序技术进行分析。本试验所提取样品中的 DNA 采用北京索莱宝细菌全基因组 DNA 提取试剂盒，热循环反应条件：94℃ 预变性 2 min；94℃、20 s，55℃、30 s，72℃、1 min 共计 25 个循环，然后在 72℃ 条件下延伸 10 min，最后将其置于 4℃ 条件下保存。PCR（聚合酶链式反应）产品使用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，目的条带用 DNA 切胶回收试剂盒回收，然后用 NanoDrop 2000 型分光光度计进行定量。

1.4 数学模型

1.4.1 Modified Gompertz 方程

累积产气量用 Modified Gompertz 方程进行拟合<sup>[17]</sup>，方程为

$$P(t) = P_{\infty} \exp \left( - \exp \left( \frac{R_m e}{P_{\infty}} (\lambda - t) + 1 \right) \right) \quad (1)$$

式中  $P(t)$ —— $t$  时刻累积产甲烷量，mL/g  
 $P_{\infty}$ ——整个发酵周期沼气最大生产潜力，mL/g  
 $R_m$ ——最大日产甲烷量，mL/(g·d)  
 $\lambda$ ——延迟时间，d

1.4.2 木质纤维素降解率

木质纤维素的降解直接影响到后续发酵甲烷发酵的产生，木质纤维素降解率计算公式为<sup>[18]</sup>

$$\eta = \frac{\sum_j (P_j)_r}{\sum_j (P_j)_i} \frac{M_r}{M_i} \times 100\% \quad (2)$$

式中  $M_i$ ——玉米秸秆预处理前质量，g  
 $M_r$ ——玉米秸秆预处理后质量，g  
 $P_j$ ——某组分占秸秆质量分数，%  
 $i$ ——玉米秸秆预处理前状态  
 $r$ ——玉米秸秆预处理后状态  
 $j$ ——秸秆组成成分（主要为可溶性物质和木质纤维素）

1.4.3 结晶度指数（CrI）

CrI 是评估预处理效果的关键因素，结晶度指数（CrI）计算公式为<sup>[19]</sup>

$$C_{rl} = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \times 100\% \quad (3)$$

式中  $I_{200}$ ——总纤维素（包括结晶和无定形纤维素）峰值强度（衍射角 22°）  
 $I_{am}$ ——无定形纤维素峰值强度（衍射角约 18°）

2 试验结果与分析

2.1 好氧水解阶段

2.1.1 pH 值

水解发酵阶段有机物在水解发酵细菌的作用下水解成单糖、氨基酸、脂肪酸等小分子化合物,为后续发酵菌群提供底物基质。体系 pH 值对厌氧微生物的活性有着显著影响,是厌氧发酵工艺最重要的控制参数之一。pH 值影响微生物生长、离子浓度、质子动力、膜电位和蛋白质合成,产酸菌的 pH 值适应范围较广,而产甲烷菌系最适生长的 pH 值范围为 6.5~7.2。图 1 为添加不同比例菌剂组和对照组在好氧水解阶段 pH 值变化情况,pH 值总体变化趋势与厌氧消化理论中的三阶段理论基本相符,且各试验组 pH 值变化规律相似。pH 值在水解阶段前 3 h 内略有升高,原因是水解阶段前 3 h,秸秆不断吸水浸透,纤维素溶胀致使细胞壁破裂,释放出易于降解的部分基质,如糖类和蛋白质。析出的蛋白质也为蛋白质氨化细菌提供了营养来源,致使其逐渐增殖,同时产酸微生物菌系的培养、繁殖需要经历一定时间,致使 pH 值呈现小幅度升高趋势。

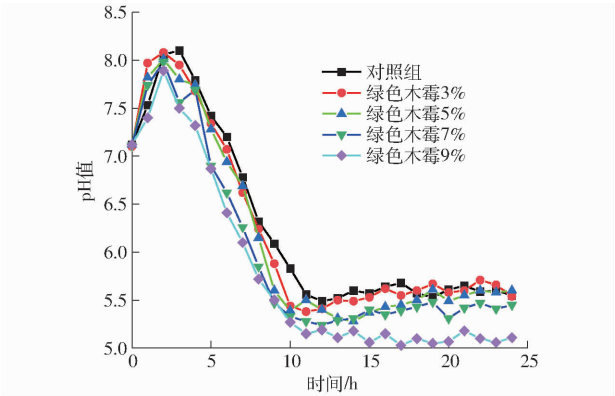


图 1 添加不同比例绿色木霉对好氧水解过程 pH 值的影响  
Fig. 1 Effect of adding different proportions of green *Trichoderma* on pH value in aerobic hydrolysis process

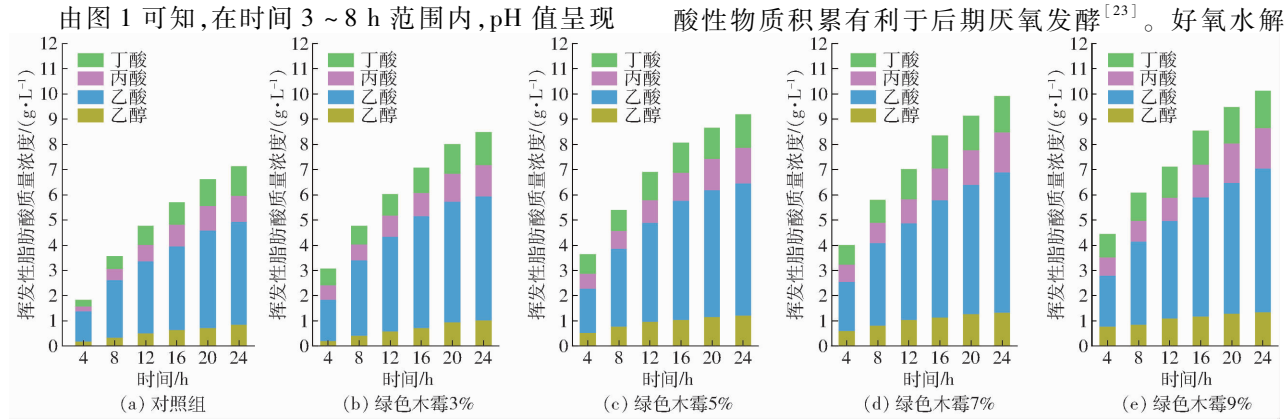


图 2 添加不同比例绿色木霉对 VFAs 含量的影响

Fig. 2 Effect of adding different proportions of green *Trichoderma* on content of VFAs

快速下降趋势,并降低至最低点后基本维持稳定。导致 pH 值急剧降低的原因是随着好氧水解反应的进行,绿色木霉的加入使得底物中微生物丰度提高,有机物被微生物充分利用<sup>[20]</sup>,也加快了底物降解速率,此过程产生大量有机酸、还原糖等小分子可溶性物质,导致 VFAs 积累,pH 值快速下降<sup>[21-22]</sup>。在时间 3~8 h 范围内,添加外源生物绿色木霉的各强化组 pH 值始终低于对照组,且添加绿色木霉预处理试验组 A1、A2、A3、A4 的 pH 值依次降低,其中 A4 试验组的 pH 值最低,说明绿色木霉对好氧水解起到了促进作用,随着外源生物添加浓度增大 pH 值下降程度也增大。10 h 后发酵体系的 pH 值降低至最低值后基本维持稳定。

2.1.2 VFAs

乙醇及 VFAs 含量是评价水解酸化和产甲烷平衡的重要指标,其作为产甲烷前体物质,VFAs 含量越高,甲烷产量越高<sup>[21]</sup>。图 2 为添加不同比例菌剂各试验组与 CK 对照组预处理 24 h 后 VFAs 含量变化情况。由图 2 可知,随着好氧发酵的进行,各组的总 VFAs 质量浓度均呈现上升趋势,原因是好氧微生物充分利用发酵底物进行降解反应,产生了大量 VFAs,随着水解时间的延长添加绿色木霉预处理强化后试验组比对照组乙酸含量均有明显提高,添加绿色木霉预处理试验组 A3、A4 提高较为明显,乙酸质量浓度分别比 CK 对照组提高 1.49 g/L 和 1.69 g/L,丙酸质量浓度分别提高 0.56 g/L 和 0.58 g/L,但乙醇、丙酸、丁酸含量提高并不显著,这一结果与赵肖玲等<sup>[22]</sup>的研究结果类似。绿色木霉能提高乙酸产量,导致乙酸增多的主要原因是在水解阶段由于有机物中可溶性物质如蛋白质、多糖、脂质等被快速水解酸化,产生的 VFAs 不能被及时消耗,产甲烷速率低于产酸速率,乙酸逐渐积累,呈现上升趋势,这也是导致体系 pH 值迅速降低的原因。在好氧水解阶段,酸性物质积累有利于后期厌氧发酵<sup>[23]</sup>。好氧水解

过程中乙酸和丙酸浓度略有升高,可能是因为绿色木霉能够将蛋白质、脂质等大分子有机物转化为乙酸和丙酸,说明水解阶段添加适宜的菌剂有利于后续的产甲烷发酵。

2.1.3 木质纤维素

木质纤维素由木质素、纤维素和半纤维素组成,木质纤维素降解率是表征生物质经预处理后生物降解特性的指标之一。提高甲烷产率的关键是提高木质纤维素降解率,因此前期预处理主要是为了打开半纤维素、纤维素及木质素之间联结的化学键。不同添加比例绿色木霉好氧水解后木质纤维素的降解情况如图 3 所示。由图 3 可知,经绿色木霉预处理后,好氧水解阶段木质纤维素的降解率由高到低依次为半纤维素、纤维素和木质素<sup>[24]</sup>。添加外源生物绿色木霉各试验组与 CK 对照组相比半纤维素、纤维素和木质素的降解率均有所提高,主要是因为绿色木霉可分泌纤维素酶,促进纤维素的降解,所以随着绿色木霉添加量的提升木质纤维素的降解率也随之提高。其中添加绿色木霉预处理试验组 A4 底物降解率最高,半纤维素降解率为 37.85%,纤维素降解率为 32.33%,分别比对照组提高 11.35、9.64 个百分点,木质素降解率比 CK 组提高 6.50 个百分点。半纤维素降解率提高幅度最大,其原因是半纤维素中糖苷键更容易水解,而纤维素和木质素的化学性质比较稳定,因此半纤维素降解率更高。添加绿色木霉预处理 A3 试验组半纤维素降解率、纤维素降解率和木质素降解率分别为 36.86%、31.57%和 7.43%,相比于 CK 对照组分别提高 10.36、8.88、6.08 个百分点。杜静等<sup>[25]</sup>研究发现水稻秸秆在好

氧水解阶段初期半纤维素降解率略高于纤维素和木质素,纤维素和半纤维素降解率分别为 22.8% 和 35.23%。表 2 为已发表文献中添加菌剂对木质纤维素降解率的影响。李砚飞等<sup>[26]</sup>向玉米秸秆好氧水解系统中添加复合菌(白腐菌和木霉菌)微生物预处理强化,研究表明纤维素降解率为 35.6%,木质素含量降低 7.8%,纤维素含量降低 11.1%。高赞<sup>[27]</sup>研究绿色木霉对玉米秸秆预处理效果,结果表明菌剂对纤维素和半纤维素体现了较高的降解能力,半纤维素和纤维素降解率分别为 37.53% 和 46.32%。屈海泳等<sup>[28]</sup>研究也证明木霉菌液体发酵对秸秆的降解具有显著效果,降解率最大达到 19.35%。张荣等<sup>[29]</sup>向麦秸中添加棘孢木霉 1285 发现接种 10 d 后,半纤维素和木质素降解率分别为 23.22% 和 18.01%,均高于对照组。以上研究结果也证明了本研究的有益效果。

表 2 已发表文献中添加菌剂对木质纤维素的影响  
Tab.2 Effects of adding microbial agents on lignocellulose in published literature

| 添加菌剂      | 处理效果                                | 文献序号 |
|-----------|-------------------------------------|------|
| 木霉和白腐菌    | 纤维素降解率为 35.6%                       | [26] |
| 木霉预处理     | 半纤维素和纤维素降解率分别为 37.53% 和 46.32%      | [27] |
| 木霉菌液体     | 对秸秆的降解具有一定的显著效果,降解率最大达到 19.35%      | [28] |
| 棘孢木霉 1285 | 半纤维素和木质素降解率分别为 23.22%、18.01%,均高于对照组 | [29] |

2.1.4 结晶度

纤维素结晶度是指纤维素结晶部分占纤维素总量的比例,它反映纤维素聚集时形成结晶的程度<sup>[30]</sup>,是主要的超分子结构参数之一,决定水解速率,结晶度过高成为水稻秸秆木质纤维素降解的主要障碍<sup>[31]</sup>。降低木质纤维素结晶度,可有效增加微生物与秸秆的接触面积,有利于微生物对秸秆分解利用<sup>[32]</sup>。通过绿色木霉预处理水稻秸秆可以打破多聚糖与木质素之间的化学键降低纤维素结晶度,以达到高效利用纤维素的目的。试验对比了不同绿色木霉添加量与 CK 组结晶度,结果表明添加绿色木霉预处理的试验组结晶度均低于 CK 组,添加绿色木霉预处理试验组 A1、A2、A3、A4 结晶度分别比对照组 CK 降低 5.73%、8.84%、26.28、33.74%,结晶度有较大幅度的下降,有利于微生物对木质纤维素的分解利用,提高了木质纤维素的降解,为后续厌氧发酵提供大量小分子有机物。

2.1.5 菌群结构变化

整个发酵过程离不开水解酸化细菌、产氢产乙酸细菌和产甲烷菌三大菌群的协同合作,表 3 为不

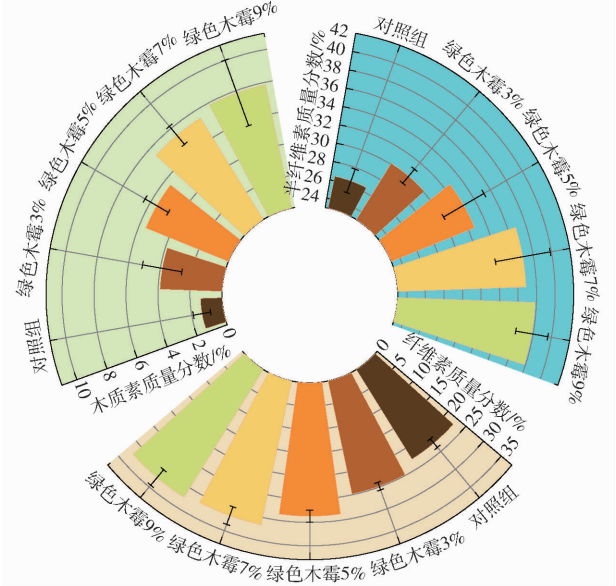


图 3 不同绿色木霉添加量好氧水解后木质纤维素的变化  
Fig.3 Changes in lignocellulose after aerobic hydrolysis with different amounts of green *Trichoderma* added

表 3 不同处理组微生物  $\alpha$  多样性分析

Tab.3 Microorganisms of different treatment groups  $\alpha$  diversity analysis

| 组别 | ACE<br>指数 | Chao1<br>指数 | Shannon<br>指数 | Coverage<br>指数 | InvSimpson<br>指数 | Simpson<br>指数 |
|----|-----------|-------------|---------------|----------------|------------------|---------------|
| A1 | 446.75    | 430.47      | 1.93          | 0.995          | 0.71             | 0.29          |
| A4 | 491.76    | 524.02      | 1.98          | 0.995          | 0.71             | 0.29          |
| CK | 659.74    | 636.01      | 3.02          | 0.995          | 0.74             | 0.26          |

同处理组对微生物多样性的影响,  $\alpha$  多样性分析是反映生态系统中物种的多样性, 包括丰富度和均匀度的综合指标。Chao1 指数常用来估计物种总数, ACE 指数常用来估计群落中物种数目的指数, Chao1 指数和 ACE 指数越大说明群落中含有的微生物数量越多、种类越丰富。通过表 3 可以看出 CK 组的菌种总数和多样性均略比添加绿色木霉预处理试验组 A1、A4 高, 导致这一现象的原因可能是在好氧水解过程中, 由于水稻秸秆的结构及有机成分含量不同, 致使水解及产酸菌活性不同, 同时绿色木霉与发酵细菌争夺营养, 形成了竞争关系, 使得水解液中菌群多样性减小。添加不同比例绿色木霉对好氧水解发酵系统中微生物群落结构影响如图 4 所示, 在门水平上, 好氧水解过程中细菌多数属于厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 等, 在 CK 组中三大优势菌群分别是厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi), 分别占到总菌群质量分数的 61.49%、9.31%、4.13%。有研究表明厚壁菌门 (Firmicutes) 在木质纤维素的水解过程中起着至关重要的作用。在 A1 试验组中三大优势菌群分别是厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、蓝藻 (Cyanobacteria), 分别占到总菌群的 44.58%、51.25%、1.05%; 在 A4 试验组中三大优势菌群分别是厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门

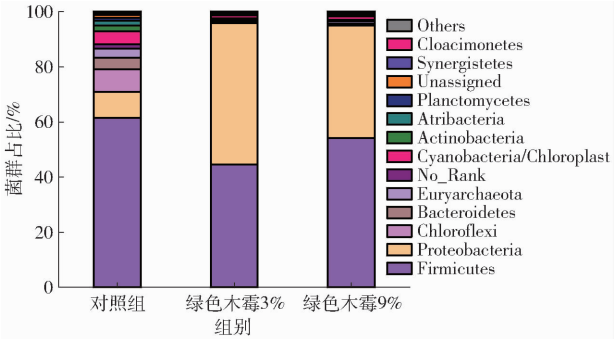


图 4 添加 3%、9% 绿色木霉组及对照组门水平微生物群落结构的变化

Fig.4 Changes in microbial community structure at phylum level with addition of 3% and 9% green *Trichoderma* and control groups

(Proteobacteria)、蓝藻 (Cyanobacteria), 分别占到总菌群的 54.20%、40.82%、1.15%。添加绿色木霉预处理试验组与 CK 试验组相比, 厚壁菌门 (Firmicutes) 丰度有不同程度的下降, 厚壁菌门 (Firmicutes) 是一类重要的厌氧微生物, 在厌氧环境中大量存在, 该菌群可以通过分泌多种酶类, 如纤维素酶、脂肪酶、蛋白酶等, 加速分解蛋白质、纤维素、半纤维素等复杂有机物质, 将其水解成小分子有机物质, 同时产生大量的有机酸。与 CK 对照组相比, 添加绿色木霉预处理试验组变形菌门 (Proteobacteria) 丰度有显著增加, 变形菌门 (Proteobacteria) 在对有机物的分解和转化中起着重要作用。在添加绿色木霉预处理试验组 A1、A4 中, 厚壁菌门 (Firmicutes) 和变形菌门 (Proteobacteria) 的数量占总细菌数量的 90% 以上, 说明反应体系中仍在进行水解酸化反应。预处理试验组 A1、A4 变形菌门 (Proteobacteria) 的数量比 CK 组分别高 41.94%、31.52 个百分点, 其原因可能是为了控制 VFAs 浓度和维持底物与产物动态平衡<sup>[16]</sup>。添加绿色木霉改变了发酵系统的微生物群落结构, 强化了好氧水解过程, 提高了木质纤维素降解率和 VFAs 产率, 从而提高甲烷产量。

2.2 厌氧发酵阶段

2.2.1 累积 VS 产甲烷量

甲烷是厌氧发酵最终产物之一, 产甲烷量也是评估水稻秸秆厌氧发酵效果的重要参数之一。利用 Modified Gompertz 方程对累积产气量进行拟合, 由表 4 可知 Modified Gompertz 模型拟合的决定系数  $R^2$  在 0.9948 ~ 0.9985 之间,  $P_{\infty}$  与实际产气量的误差均在 5% 以内, 说明 Modified Gompertz 模型能较准确地反映出发酵过程中累积产甲烷量的变化情况, 拟合结果良好。不同组累积产甲烷量随时间的变化如图 5 所示, 从图 5 中可以观察到添加绿色木霉各组与 CK 对照组累积产甲烷量的变化都呈现先快速增长后趋于平稳的趋势<sup>[33]</sup>。

与 CK 组相比, 添加绿色木霉预处理强化水稻秸秆产甲烷效果显著, 绿色木霉预处理试验组累积产甲烷量自第 2 天后均高于 CK 组, 其原因可能是在好氧水解阶段过程中, 添加不同绿色木霉比例的预处理组 VFAs 的产生速度大于产甲烷菌消耗速度, 导致 VFAs 大量积累, pH 值降低, 从而抑制了产甲烷菌活性, 之后随着 VFAs 的逐渐消耗, 抑制效果减弱, 复杂有机物逐渐被厌氧菌群消化, 产甲烷菌活性恢复, 产甲烷能力提高。添加绿色木霉预处理试验组 A4 第 2 天产甲烷量较第 1 天提高 96.6%, 表明绿色木霉预处理可有效提高水稻秸秆降解能力,

表 4 不同组 Modified Gompertz 模型拟合累积产气量的动力学参数

| Tab.4 Kinetic parameters of cumulative gas production in different groups fitted by Modified Gompertz models |                                            |                                                    |                    |         |                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------|---------|----------------------------------------|
| 组别                                                                                                           | $P_{\infty}/(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$ | $R_m/(\text{mL}\cdot(\text{g}\cdot\text{d})^{-1})$ | $\lambda/\text{d}$ | $R^2$   | 实际产气量/ $(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$ |
| A1                                                                                                           | $195.22\pm0.96$                            | $28.28\pm0.62$                                     | $0.76\pm0.08$      | 0.998 5 | 198.28                                 |
| A2                                                                                                           | $208.32\pm1.56$                            | $31.12\pm1.06$                                     | $0.78\pm0.12$      | 0.996 3 | 211.35                                 |
| A3                                                                                                           | $224.51\pm1.50$                            | $32.63\pm0.98$                                     | $0.70\pm0.11$      | 0.997 1 | 228.44                                 |
| A4                                                                                                           | $226.86\pm1.67$                            | $37.68\pm1.46$                                     | $0.52\pm0.12$      | 0.995 1 | 234.78                                 |
| CK                                                                                                           | $169.69\pm2.47$                            | $16.37\pm0.63$                                     | $0.34\pm0.19$      | 0.994 8 | 166.79                                 |

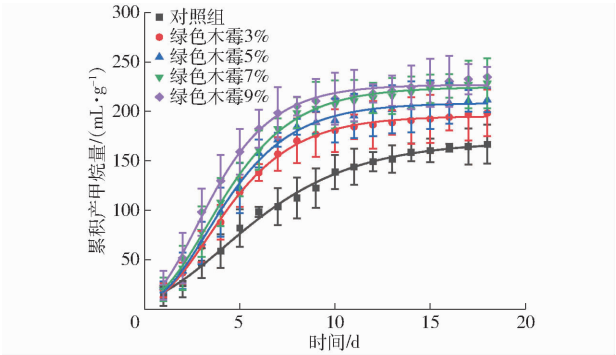


图 5 不同处理组累积产气量曲线

Fig.5 Accumulated gas production curves for different treatment groups

迅速提高甲烷产量。

到发酵周期结束添加绿色木霉预处理试验组 A1、A2、A3、A4 累积产甲烷量分别为 198.28、211.351、228.44、234.78 mL/g,分别比 CK 组产甲烷量(166.79 mL/g)提高 18.89%、26.72%、36.96%、40.76%。赵肖玲<sup>[33]</sup>向秸秆发酵系统中添加复合菌剂(黑曲霉与木霉),研究发现经过复合菌剂预处理后,累积产甲烷量比未经预处理对照组提高 10.06%。从表 4 也可以观察到不同预处理组相较于 CK 组最大日产甲烷量  $R_m$  也有显著提高,A1、A2、A3、A4 组最大日产甲烷量  $R_m$  分别比 CK 组提高 72.76%、90.10%、99.33%、130.18%,说明添加绿色木霉预处理对产甲烷的促进作用较明显,使产气高峰提前。

2.2.2 VS 降解率及显著性分析

VS 降解率可以比较直观反映厌氧消化阶段有机物的降解情况,图 6(图中 \* 表示不显著( $P\geq 0.10$ )),\*\* 表示显著性水平为  $0.05\leq P<0.10$ ,\*\*\* 表示  $0.01\leq P<0.05$ ,\*\*\*\* 表示  $P<0.01$ )为添加不同比例绿色木霉组和对照组 VS 降解率、累积产甲烷量及显著性分析。从图 6 中可以观察到,当绿色木霉的添加浓度增加时 VS 的降解率也随之增加,添加绿色木霉的预处理组 A1、A2、A3、A4 的 VS 降解率分别比 CK 组提高 11.76%、21.20%、38.22%、43.97%,说明添加绿色木霉可以促进有机物生物降解,从而提升甲烷产量。添加不同比例绿

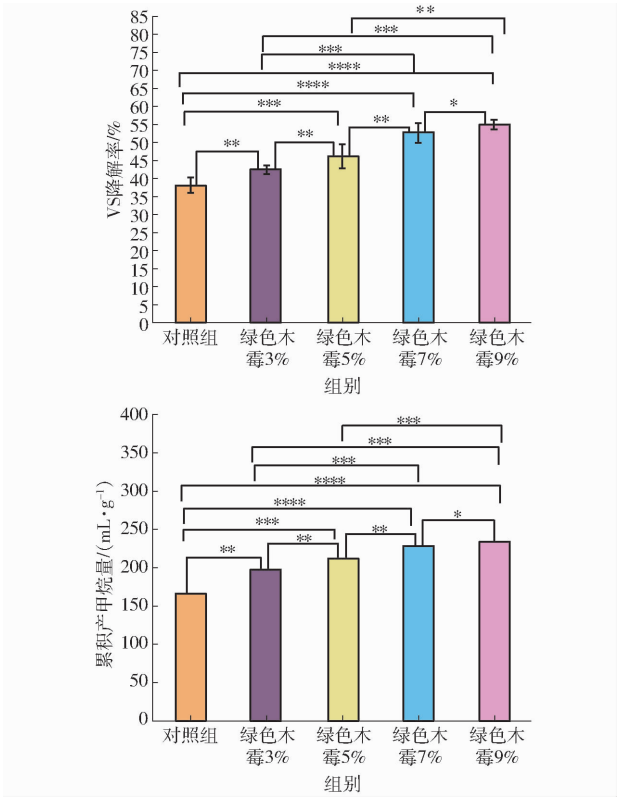


图 6 添加不同比例绿色木霉组和对照组的 VS 降解率、累积产甲烷量及显著性分析

Fig.6 Degradation rate, cumulative methane production, and significance analysis of different proportions of green *Trichoderma* groups and control groups

色木霉与 CK 组之间具有显著性差异,5% 与 7% 试验组差异显著,而当添加量从 7% 增加到 9% 时差异减小,综合考虑添加菌剂的经济性因素,建议绿色木霉添加量控制在 7%。

3 结论

- (1)添加外源生物绿色木霉强化预处理后有利于木质纤维素的降解,半纤维素、纤维素和木质素降解率分别提高 11.35、9.64、6.50 个百分点,使得有机小分子增加,从而增加 VFAs 含量,特别是乙酸含量增加最为显著,添加绿色木霉预处理后木质纤维素结晶度显著下降,使得木质纤维素降解更为充分。
- (2)生物强化后好氧水解厚壁菌门(Firmicutes)丰度略有减少,变形菌门(Proteobacteria)丰度有显

著性增加,证明添加绿色木霉能够改变群落结构组成,有利于好氧水解顺利进行。

(3)利用 Modified Gompertz 模型对累积产甲烷量拟合效果较好。绿色木霉预处理可有效提升水稻秸秆的甲烷潜力,使产气高峰提前。到发酵周期结束,绿色木霉添加量 3%、5%、7%、9% 各预处理试验组累积产甲烷量分别为 198.28、211.35、228.44、

234.78 mL/g, 分别比 CK 对照组产甲烷量(166.79 mL/g)提高 18.89%、26.72%、36.96%、40.76%。

(4)添加绿色木霉对水稻秸秆好氧-厌氧两相发酵产甲烷生物强化的最适比例建议维持在添加量 7%,在此浓度下好氧-厌氧两相发酵能够取得较好的综合效益。

参 考 文 献

[1] YAN Z Y, SONG Z L, LI D, et al. The effects of initial substrate concen-tration, C/N ratio, and temperature on solid-state anaerobic digestion from composting rice straw[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 177:266 – 273.

[2] ATELGE M R, ATABANI A E, BANU J R, et al. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery[J]. *Fuel*, 2020, 270:117494.

[3] AMIN F R, KHALID H, ZHANG H, et al. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion[J]. *AMB Express*, 2017, 72(7):1 – 12.

[4] 黎雪. 秸秆预处理厌氧发酵技术研究进展[J]. *陕西农业科学*, 2020, 66(11):46 – 49.

[5] 朱超, 李秀金, 陶盈冰, 等. 接种量对稻草厌氧消化产气性能影响[J]. *可再生能源*, 2016, 34(4):593 – 599.

ZHU Chao, LI Xiujin, TAO Yingbing, et al. Impact of inoculum amount on anaerobic digestion of rice straw[J]. *Renewable Energy Resources*, 2016, 34(4):593 – 599. (in Chinese)

[6] 吴树彪, 李颖, 董仁杰, 等. 生物强化在厌氧发酵过程中的应用进展[J]. *农业机械学报*, 2014, 45(5):145 – 154.

WU Shubiao, LI Ying, DONG Renjie, et al. Application of bioaugmentation in anaerobic digestion[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(5):145 – 154. (in Chinese)

[7] 董丽丽, 王悦宇, 韩松. 白腐菌预处理水稻秸秆产沼气的研究[J]. *中国沼气*, 2014, 32(6):33 – 35.

DONG Lili, WANG Yueyu, HAN Song. Biogas production by white-rot fungi pretreated rice straw[J]. *China Biogas*, 2014, 32(6):33 – 35. (in Chinese)

[8] 郑渊洁, 郝建宇, 侯红萍. 生物预处理秸秆降解木质素条件的优化[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(3):214 – 216.

ZHENG Yuanjie, HAO Jianyu, HOU Hongping. Optimization of lignin degradation conditions for biological pretreatment of corn straw[J]. *J. Shanxi Agric. Univ. (Natural Science Edition)*, 2017, 37(3):214 – 216. (in Chinese)

[9] 赵爽, 李婉云, 杨静雅, 等. 两种不同来源的绿色木霉降解木质纤维素研究[J]. *菌物学报*, 2020, 39(5):856 – 869.

ZHAO Shuang, LI Wanyun, YANG Jingya, et al. Degradation of lignocellulose by *Trichoderma viride* isolated from two different habitats[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(5):856 – 869. (in Chinese)

[10] 井洪晶, 孙佳正, 李文哲, 等. 生物强化水解玉米秸秆厌氧发酵特性研究[J]. *饲料研究*, 2022, 45(23):88 – 92.

JING Hongjing, SUN Jiazheng, LI Wenzhe, et al. Study on anaerobic fermentation characteristics of biostrengthen hydrolyzed corn stalk[J]. *Feed Research*, 2022, 45(23):88 – 92. (in Chinese)

[11] 胡晓明, 张无敌, 尹芳, 等. 微生物预处理稻草秸秆产沼气试验研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(23):12797 – 12799, 12801.

HU Xiaoming, ZHANG Wudi, YIN Fang, et al. Expermental study of biogas fementation with rice straw pretreated by microbe[J]. *Joumal of Anhui Agri. Sci.*, 2010, 38(23):12797 – 12799, 12801. (in Chinese)

[12] KARRAY R, HAMAZA M, SAYADI S. Evaluation of ultrasonic, acid, thermo-alkaline and enzymatic pre-treatments on anaerobic digestion of *Ulva rigida* for biogas production[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 187:205 – 213.

[13] 罗立娜, 丁清华, 刘鑫, 等. 基于 TRIZ 理论的秸秆好氧-厌氧联合发酵特性研究[J]. *农业机械学报*, 2018, 49(6):332 – 339.

LUO Li'na, DING Qinghua, LIU Xin, et al. Characteristics of aerobic – anaerobic combined digestion process based on TRIZ theory[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2018, 49(6):332 – 339. (in Chinese)

[14] LAY J J, LEE Y J, NOIKE T, et al. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste[J]. *Water Research*, 1999, 33(11):2579 – 2586.

[15] 李文哲, 丁清华, 魏东辉, 等. 稻秸好氧厌氧两相发酵工艺与产气特性研究[J]. *农业机械学报*, 2016, 47(3):150 – 157.

LI Wenzhe, DING Qinghua, WEI Donghui, et al. Aerobic and anaerobic two-phase fermentation process and biogas production characteristic of rice straw[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2016, 47(3):150 – 157. (in Chinese)

[16] LUO L, QU Y, GONG W, et al. Effect of particle size on the aerobic and anaerobic digestion characteristics of whole rice straw[J]. *Energies*, 2021, 14(13):3960.

[17] NOPHARATANA A, PULLAMMANAPPALLIL P C, CLARKE W P. Kinetics and dynamic modelling of batch anaerobic digestion of municipal solid waste in a stirred reactor[J]. *Waste Management*, 2007, 27(5):595 – 603.

- [18] 王智. 基于糠醛废水预处理的玉米秸秆厌氧发酵特性研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2021.  
WANG Zhi. Study on anaerobic fermentation of corn stalk based on furfural wastewater[D]. Harbin: Northeast Agricultural University,2021. (in Chinese)
- [19] ZHANG B, LI W, XU X, et al. Effect of aerobic hydrolysis on anaerobic fermentation characteristics of various parts of corn stover and the scum layer[J]. *Energies*, 2019, 12(3): 381.
- [20] 李玉春. 稻秸厌氧发酵工程运行技术参数研究[D]. 南京:南京农业大学,2014.  
LI Yuchun. Studies on anaerobic digestion engineering parameter of rice straw[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [21] PAN J, MA J, ZHAI L, et al. Achievements of biochar application for enhanced anaerobic digestion: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 292:122058.
- [22] 赵肖玲,郑泽慧,蔡亚凡,等. 哈茨木霉和黑曲霉粗酶液预处理改善秸秆产甲烷性能[J]. *农业工程学报*,2018,34(3): 219 – 226.  
ZHAO Xiaoling, ZHENG Zehui, CAI Yafan, et al. Pretreatment by crude enzymatic liquid from *Trichoderma harzianum* and *Aspergillus sp* improving methane production performance during anaerobic digestion of straw[J]. *Transactions of the CSAE*, 2018, 34(3): 219 – 226. (in Chinese)
- [23] 张波. 厌氧发酵过程玉米秸秆沉降及产气特性研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2020.  
ZHANG Bo. Study on the sedimentation and biogas production characteristics of corn stover in anaerobic fermentation[D]. Harbin: Northeast Agricultural University,2020. (in Chinese)
- [24] 丁清华. 稻秸好氧厌氧两相发酵工艺设计及产气特性研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2017.  
DING Qinghua. Study on aerobic and anaerobic two-phase fermentation process design and biogas production characteristic of rice straw[D]. Harbin: Northeast Agricultural University,2017. (in Chinese)
- [25] 杜静,常志州,王世梅,等. 不同底物沼气干发酵启动阶段的产酸特征研究[J]. *江苏农业科学*,2008(1):225 – 227.
- [26] 李砚飞,黄亚丽,代树智,等. 复合微生物预处理玉米秸秆产沼气的试验研究[J]. *可再生能源*,2013,31(5):80 – 83.  
LI Yanfei, HUANG Yali, DAI Shuzhi, et al. Experimental study of compound microorganism pre-treatment to enhance straw anaerobic digestion[J]. *Renewable Energy Resources*, 2013,31(5):80 – 83. (in Chinese)
- [27] 高赞. 玉米秸秆复合菌预处理降解特性研究[D]. 郑州:河南农业大学,2019.  
GAO Zan. Study on degradation characteristics of corn straw pretreated by composite microbes[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University,2019. (in Chinese)
- [28] 屈海泳,刘连妹,吴纯. 木霉菌液体发酵对秸秆的降解作用[J]. *江苏农业科学*,2014,42(7):283 – 285.
- [29] 张荣,奚永兰,叶小梅,等. 棘孢木霉 1285 对麦秸的降解及厌氧发酵的影响[J]. *江苏农业学报*,2015,31(2):328 – 333.  
ZHANG Rong, XI Yonglan, YE Xiaomei, et al. Degradation and anaerobic fermentation of wheat straw affected by *Trichoderma asperellum* 1285[J]. *Jiangsu J. of Agr. Sci.*, 2015,31(2):328 – 333. (in Chinese)
- [30] 杨淑敏,江泽慧,任海青,等. 利用 X-射线衍射法测定竹材纤维素结晶度[J]. *东北林业大学学报*,2010,38(8):75 – 77.  
YANG Shumin, JIANG Zehui, REN Haiqing, et al. Determination of cellulose crystallinity of bamboo culms with X-ray diffraction spectrum[J]. *Journal of Northeast Forestry University*,2010,38(8):75 – 77. (in Chinese)
- [31] 钟倩倩,岳艳艳,李倩,等. 改性麦草秸秆对活性艳红的吸附动力学研究[J]. *山东大学学报(工学版)*,2011,41(1): 133 – 139,150.  
ZHONG Qianqian, YUE Qinyan, LI Qian, et al. Kinetics of the adsorption of Reactive Brilliant Red K – 2BP onto modified wheat residue[J]. *Journal of Shandong University (Engineering Science)*, 2011,41(1):133 – 139,150. (in Chinese)
- [32] 杨天学. 玉米秸秆干式厌氧发酵转化机理及微生物演替规律研究[D]. 武汉:武汉大学,2015.  
YANG Tianxue. Conversional mechanism and microbial regularity analysis of corn stover during dry anaerobic digestion[D]. Wuhan:Wuhan University,2015. (in Chinese)
- [33] 赵肖玲. 产纤维素酶菌株筛选优化及对秸秆厌氧发酵的促进机制[D]. 北京:中国农业大学,2018.  
ZHAO Xiaoling. Screening and optimization of cellulase-producing strains and promotion mechanism during anaerobic digestion of straw[D]. Beijing:China Agricultural University,2018. (in Chinese)