

傅子森,李盼禹,陈靖. 高效降解纤维素产甲烷复合菌群的富集和群落结构解析[J]. 江苏农业科学,2025,53(6):272-280.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.06.035

高效降解纤维素产甲烷复合菌群的富集和群落结构解析

傅子森,李盼禹,陈靖

(四川大学化学工程学院,四川成都 610000)

摘要:纤维素是农业秸秆的主要组成部分。对降解纤维素产甲烷功能菌群的研究不够深入和缺乏高效的功能菌群,极大地制约了循环资源化利用农业秸秆来生产生物燃气的技术工艺开发。为深入解析能够高效降解纤维素产甲烷的复合菌群,实现农业废弃物的资源化利用,采用亨盖特厌氧管技术从多个环境样品中富集和筛选能够厌氧消化纤维素产甲烷的复合菌群,利用气相色谱法测定富集管中甲烷含量和挥发性脂肪酸盐含量,测定复合菌群在不同添加浓度下的纤维素降解率,以评估复合菌群产甲烷性能和纤维素降解能力。通过高通量测序技术解析不同环境样品中的微生物群落结构。结果表明,从 3 个环境样品中成功富集培养出能够降解纤维素产甲烷的复合菌群,甲烷含量最高可占气体产出的 92.2%,挥发性脂肪酸得到有效利用,只添加了乙酸盐的样品 LD-1 在厌氧消化过程中的挥发性脂肪酸盐含量降低到 726.4 mg/L。3 个环境样品富集得到的复合菌群对纤维素均表现出较高的降解能力,纤维素添加量为 10 g/L 时,最高降解率可达 32.1%,50 g/L 纤维素添加量下纤维素最高降解量为 9.05 g/L。细菌分类上厚壁菌门和变形菌门是主要优势菌门,古菌分类上广古菌门和 Halobacterota 是主要的优势门。在细菌属水平上,发挥关键功能的菌群主要有假单胞菌属、芽孢杆菌属、*Mobilitalea*、梭状芽孢杆菌属和醋弧菌属等;在古菌属水平上,厌氧消化过程中发挥关键功能的菌群主要有甲烷袋状菌属、甲烷杆菌属、*Methanoregula*、鬃毛甲烷菌属和甲烷八叠球菌属。研究结果有助于科学构建高效的复合菌剂,助力农业秸秆的循环资源化利用。

关键词:纤维素;厌氧消化;高效降解菌群;富集培养;环境菌群鉴定

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)06-0272-09

化石燃料作为不可再生能源一直在维持人类社会稳定发展上发挥着重要作用,然而全球化带来的快速工业化和城市化以及人口增长正在加速化石燃料的能源消耗,化石燃料的日渐消耗以及带来的温室气体排放正在促进利用生物质废弃物生产可再生清洁能源的研究^[1]。因此,将可生物降解的生物质原料用作生物能源的生产以替代传统能源是目前能源研究的侧重点之一。

在中国的广大农村地区,每年都会产生大量的未利用生物质能源原料,比如仅 2015 年我国就产生了约 9 亿 t 农业秸秆^[2]。农业秸秆这类农业废弃物

目前较为常规的处理方法是直接焚烧和重新耕入田地,这些处理方式可能会导致较为严重的环境问题,例如空气污染和土壤退化^[3]。事实上农业废弃物本质上是木质纤维素生物质,虽然不同类型的农业废弃物之间木质纤维素的构成会有差别,但大体上而言木质纤维素的基本结构主要由纤维素(35%~50%)、半纤维素(20%~35%)和木质素(10%~25%)以及少量其他有机和无机物质组成^[4]。对农业废弃物进行厌氧消化是一种可持续的、具有成本效益的生物燃料生产技术;厌氧消化产生的大量沼气可部分替代化石燃料,满足社会的能源需求,厌氧消化过程产生的沼渣可用作化学工业高附加值生产的原料。据我国政府的相关统计显示,有 20% 以上的农业秸秆可用于厌氧消化并且在 2016—2020 年期间我国就已经有计划要建设近 2 万个沼气项目用于处理各农村地区产生的农业秸秆^[5]。

农业废弃物的厌氧消化过程由相关微生物主导。到目前为止,三阶段和四群理论是对生物质废物利用厌氧微生物过程较为全面的描述,其中三阶段厌氧消化包括水解、酸化和产甲烷,四群理论包括可将 H_2/CO_2 转化为乙酸的同型乙酸菌^[6]。在水

收稿日期:2024-03-31

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:32270124);四川省科技厅重点研发项目(编号:2021YFS0292);成都市科技局技术创新项目(编号:2019-YF05-01962-SN)。

作者简介:傅子森(1999—),男,海南海口人,硕士研究生,主要研究方向为低碳生物技术、生物质资源转化、微生物资源利用。E-mail:fzs0209@qq.com。

通信作者:陈靖,博士,副教授,主要研究方向为绿色生物化工、环境生物技术、重金属污染生物修复、低碳生物技术等。E-mail:jing.chen@scu.edu.cn。

解阶段中,农业废弃物中顽固的木质纤维素结构被木质纤维素降解菌降解,相关的水解细菌将农业废弃物内十分复杂的有机物降解成长链脂肪酸、单糖、氨基酸和多肽等。酸化阶段在产酸细菌的作用下,水解细菌代谢的底物进一步被分解成分子结构更小的底物,例如挥发性脂肪酸和 H^2 ,并伴随着细胞物质的生成。产甲烷阶段中乙酸、甲酸、甲醇和 H_2/CO_2 等被严格厌氧的产甲烷古菌转化为甲烷^[7]。

农业废弃物虽然来源广、可持续,但木质纤维素本身结构的复杂性导致了农业废弃物的降解和沼气转化效率仍不理想,水解阶段中木质纤维素本身的降解速率限制了整个微生物厌氧发酵的生产效率^[8]。因此,在自然界中寻找高效的农业废弃物降解菌群是提高沼气产量的关键,木质纤维素厌氧消化菌群的协同合作关系十分紧密,纤维素厌氧降解菌群和产甲烷菌群完全可以通过富集的方式进行针对培养。在 1981 年就有人首次通过亨盖特厌氧管技术分离到了共生的纤维素厌氧降解菌和产甲烷菌,并且发现在液体富集的不断转接中这种菌群共生协同关系可以稳定存在^[9]。木质纤维素降解利用菌群广泛地存在于自然界的土壤、木屑堆、污水、温泉、食草动物瘤胃和昆虫肠道中^[10]。更好地了解混合培养环境中的木质纤维素降解菌群将有助于解决水解的限速现象,并最终无需相对昂贵且低效的方法来处理这些顽固的木质纤维素结构。

本研究通过对不同类型的环境样品进行针对性的富集培养来分离出不同的木质纤维素降解菌群,为农业废弃物高效降解及沼气发酵提供更多的微生物资源;并通过高通量测序手段识别并分析不同环境样品筛选出的菌群结构,为后续开发高效利用农业废弃物的厌氧消化菌群提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本试验于 2021 年 3 月至 2022 年 10 月在四川省成都市武侯区四川大学望江校区进行。本试验的环境样品主要有 4 个来源:第 1 个环境样品来源于四川省成都市某林地落叶堆积处下方的土壤,第 2 个环境样品来源于成都市河岸旁竹林密集生长处的腐殖层,第 3 个环境样品来源于实验室已有的污泥富集培养菌液^[11],第 4 个环境样品来源于成都市双流区西航港街道川大南路二段 316 号成都科雅污水处理有限公司提供的二次沉淀池的污泥。环境

样品在手动采集后立即放入无菌样品密封袋中密封保存,并立即运送回实验室中进行富集培养。试验过程中不同环境样品对应的编号分类如表 1 所示。

表 1 不同编号环境样品的碳源添加和菌群分析情况

样品编号	样品来源	是否添加 乙酸盐	是否添加 纤维素结晶	菌群分析情况
LD-1	林地	+	-	-
LD-2	林地	+	+	古菌+细菌分析
LD-3	林地	-	+	细菌分析
ZL-1	竹林腐殖层	+	-	-
ZL-2	竹林腐殖层	+	+	古菌+细菌分析
ZL-3	竹林腐殖层	-	+	细菌分析
WNC-1	污泥富集培养液	+	-	-
WNC-2	污泥富集培养液	+	+	-
WNC-3	污泥富集培养液	-	+	-
WN-1	沉淀池污泥	+	-	-
WN-2	沉淀池污泥	+	+	古菌+细菌分析
WN-3	沉淀池污泥	-	+	细菌分析

注:“+”表示添加,“-”代表未添加或未进行菌群分析。

1.2 培养基与富集培养液的配制

富集培养使用的培养液包含了 4 种基础培养基,分别为盐原液、微量金属原液、半胱氨酸盐酸盐原液和九水硫化钠原液^[12]。盐原液由以下物质组成:NaCl 2.17 g、MgCl₂·6H₂O 5.5 g、CaCl₂·2H₂O 0.14 g、KCl 0.34 g、K₂HPO₄ 0.19 g,将上述物质在 1 L 去离子水中充分溶解后高温高压灭菌(121 ℃ 20 min)储存于 4 ℃ 冰箱中备用。

矿物质基液由以下物质组成(稀释倍数 100):氨三乙酸 1.5 g、MgCl₂·6H₂O 2.48 g、MnCl₂·4H₂O 0.585 4 g、NaCl 1 g、FeCl₂·4H₂O 0.071 5 g、CoCl₂·6H₂O 0.152 4 g、CaCl₂·2H₂O 0.1 g、ZnCl₂·4H₂O 0.085 3 g、CuCl₂ 0.005 4 g、AlCl₃ 0.010 3 g、H₃BO₃ 0.01 g、Na₂MoO₄·2H₂O 0.01 g、NiCl₂·6H₂O 0.03 g、Na₂SeO₃·5H₂O 0.000 3 g、Na₂WO₄·2H₂O 0.008 g。上述物质都用精密称量仪称取,准备 1 L 的去离子水,先将氨三乙酸溶解于去离子水中并将 pH 值调到 6.5,然后再加入其余所有矿物质并使其完全溶解,最后再将溶液的 pH 值调到 7.0,高温高压灭菌后储存于 4 ℃ 冰箱备用。

半胱氨酸盐酸盐原液由 3.503 g Cysteine-HCl·H₂O 组成(100 mL/g,稀释倍数 100)。将相应重量的半胱氨酸盐酸盐配制好后单独放在干燥的小烧杯内,同时准备相应容量的去离子水,接着将两者

分别放入厌氧操作室内进行去氧过夜,第 2 天在厌氧室(型号 LAI-3 600VA)中将水与相应物质混合彻底溶解后装入血浆瓶中,最后用丁基胶塞密封后拿出进行高温高压灭菌。

硫化钠原液由 2.4 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 组成(100 mL/g,稀释倍数 100),其储存方法与半胱氨酸盐酸盐原液的制备保持一致。

富集培养液由上述配制好的原液组成,往容量为 100 mL 的蓝口瓶添加 99 mL 的盐原液,然后再添加 1 mL 的矿物质基液,最后在厌氧条件下以 5 mL 的容量分装到亨盖特厌氧管中。半胱氨酸盐酸盐原液和硫化钠原液培养基待其他培养基分装到厌氧管后再添加,两者均每 5 mL 添加 100 μL 。不同富集液中环境样品根据碳源添加的不同可以分为三大类,固体碳源分为无水乙酸钠(8.2 g/L)和纤维素结晶粉末(1 g/L),具体的碳源添加分类见表 1。

1.3 试验项目与分析方法

1.3.1 不同环境样品的富集筛选培养 准备好相应数量的厌氧管和丁基胶塞,一个环境样品要在 3 种含有不同碳源的富集培养液中进行同批富集培养。接种时除了实验室来源的污泥富集液以体积比 10% 的形式添加到厌氧管,其余都是先将环境样品中的土壤或污泥取样装到 1 mL 离心管的一半,再将离心管内的样品倒入已经分装好培养基的厌氧管中。所有密封好的厌氧管都放置在 30 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中避光培养 14 d。

1.3.2 沼气组分与甲烷产量的测定 使用气压计测定富集管中初始气压和富集培养结束后的气压,两者之间的气压变化换算为相应的甲烷产量。使用带有热导检测器的气相色谱仪(Fuli GC9720Plus,浙江福立分析仪器有限公司)分析不同环境样品富集筛选过程中富集管顶空沼气组分的变化。

1.3.3 富集培养液挥发性脂肪酸盐组成和含量的测定 用气相色谱仪配有的火焰离子化检测器和毛细管 RB-FFAP 色谱柱(30 m \times 0.5 μm \times 0.32 mm)测定厌氧管内富集培养液中挥发性脂肪酸盐的成分与含量。进行 FID 检测的样品在进样前都需要用甲酸酸化,甲酸添加量为每 100 μL 样品添加 1 μL ,然后加入与样品体积相同的内标物 4-甲基戊酸。

1.3.4 H_2/CO_2 专性培养试验 将培养了 14 d 的 LD-2、ZL-2 和 WN-2 以同样的培养方法转接到新的厌氧管,通入标准的 80% H_2 和 20% CO_2 来置换厌氧管内所有的顶空气体并进行为期 14 d 的培

养,这批培养样品分别命名为 LD-HC、ZL-HC 和 WN-HC 并各设置 3 个平行样。 H_2/CO_2 专一培养过程不添加任何其他碳源,在培养了 7 d 后同样进行气体产量、气体组分、挥发性脂肪酸组成和含量的检测。

1.3.5 纤维素降解试验 为了比较好地评价纤维素降解菌对纤维素的降解效果和酸化情况,将培养了 14 d 后的 LD-3、ZL-3 和 WN-3 以同样的培养方法和培养时间转接到新的厌氧管中转接培养 2 批,每批 14 d,以此培养后的 3 组厌氧管分别命名为 LD-C、ZL-C 和 WN-C。然后将这 3 组厌氧管中的培养液再次以体积比 10% 转接到添加了不同浓度纤维素为唯一碳源的培养液中,进行为期 7 d 的培养,纤维素添加的浓度分别为 10、50、100 g/L。纤维素降解量参照岳丹等的方法^[13]进行测定,每个添加量水平的纤维素降解试验转接样本均设置 3 个平行样。测定 7 d 时各厌氧管内培养液的 pH 值,各培养基初始 pH 值为 7.2 ± 0.1 。

1.3.6 样品微生物群落结构分析 将 LD-C、ZL-C、WN-C 以及表 1 所示的相关样品进行微生物群落分析。不同样品各取 1 mL 培养液在 14 000 r/min 下离心 15 min,倒掉上清液留下沉淀。使用 MP FastDNA™ Spin Kit for Soil(Solon, Ohio, 美国)提取试剂盒提取沉淀中的微生物 DNA。提取好的 DNA 利用 illumina NovaSeq PE250 平台(北京诺禾致源生物科技有限公司)对细菌和古细菌 16S rDNA 进行高通量测序,获得成对末端读数。细菌和古细菌的引物组分别为 16S V3-V4 和 1106F-1837R。2024 年 3 月对测序结果进行分析和整理。对测序结果的基因片段进行拼接、过滤和降噪处理,得到扩增子序列 ASV,用于接下来的物种多样性和丰度分析,以揭示特定样本之间微生物组成和群落结构的差异。

2 结果与分析

2.1 不同环境样品产气性能的比较

比较环境样品中微生物的产气性能有助于评估不同环境样品中微生物生产物质能源的潜力。由图 1 可知,不同样品均有甲烷产出,其中 WN-1、WNC-2、ZL-1 和 LD-1 分别是各自环境样品中甲烷比例最高的,甲烷占比分别是 92.2%、29.1%、79.8% 和 87.8%。在只添加了纤维素作为唯一碳源的培养条件下 LD-3、ZL-3、WNC-3 和 WN-3

的甲烷含量分别是 55.3%、60.8%、19.9% 和 68.2%。总体来说,来源于实验室污泥富集培养液的微生物产出的沼气质量最差,沉淀池污泥中富集出的微生物产出的沼气含有最高的甲烷含量,来源于林地和竹林腐殖层的环境样品同样培养条件下产出的沼气甲烷含量接近。

除了 WNC 外,其余环境来源的样品在不同培养条件下都有明显的甲烷产出。同时添加乙酸钠和纤维素作为碳源的各环境样品培养液表现出最

高的甲烷产量,LD-2、ZL-2、WN-2 的甲烷产量分别为 1.69、1.25、2.26 mL/mL。LD-3、ZL-3、WN-3 的甲烷产量分别为 0.41、0.50、1.16 mL/mL,表明纤维素在这 3 个环境来源可以被最终降解利用为生物燃气。鉴于 LD-2、ZL-2 和 WN-2 在甲烷含量和产量上的优势,后续进一步选择这 3 组环境样品进行 H_2/CO_2 专一培养以及作为产甲烷菌和细菌群落结构分析的样品。

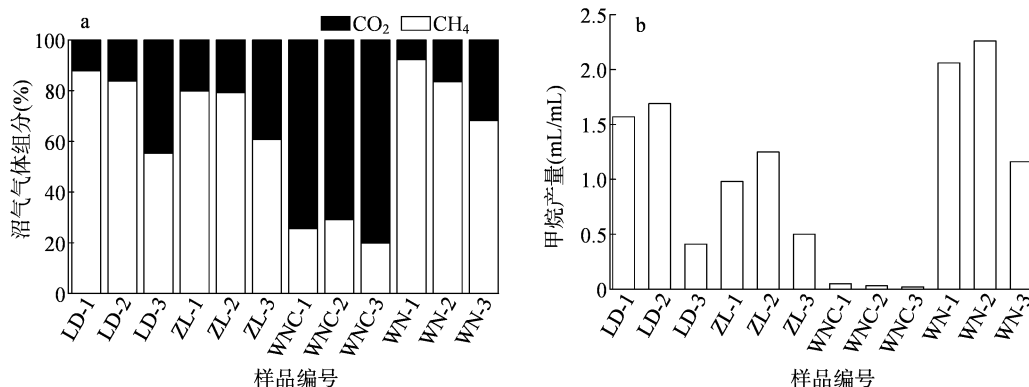


图1 不同环境样本在不同培养条件下的气体组分和甲烷产量

2.2 不同环境样品挥发性脂肪酸盐的组成和含量比较

由图 2 可知,培养 14 d 后培养液中共检测出 5 种挥发性脂肪酸盐,分别为乙酸盐、丙酸盐、异丁酸盐、丁酸盐和异戊酸盐。由表 1 可知,除了 LD-3、ZL-3、WNC-3 和 WN-3 只添加了 1 g/L 的纤维素外,其余管内培养液都添加了 8.2 g/L 的无水乙酸钠,在经过不同环境样品微生物的厌氧消化后挥发性脂肪酸盐的组成丰富了起来。WNC-1、WNC-2 样品在相同培养条件下有着较高的挥发性脂肪酸盐含量,其中 WNC-2 样品有着最高的挥发性脂肪酸盐含量(3 568.9 mg/L),而其余样品中培养液的无水乙酸钠都在被大量的消耗。只添加纤维素的 LD-3、ZL-3 和 WN-3 也各自检测出 397.1、411.9、884.4 mg/L 的挥发性脂肪酸盐含量。由图 2-b 可知,培养 14 d 后的培养液除了乙酸盐外还存在着大量丙酸盐,其中 WN 样品的丙酸盐占比要明显高于其余环境样品,LD 样品次之。WN-1、WN-2 和 WN-3 样品的丙酸盐比例持平甚至高于乙酸盐比例,三者的具体比例分别为 58.3%、44.2% 和 55.8%。纤维素作为唯一碳源培养下的样品 LD-3、ZL-3 和 WN-3 也可以产出挥发性脂肪酸盐并以乙酸盐和丙酸盐为主,从挥发性脂肪酸

盐的检测结果看,这 3 组环境样品中的微生物具有明显的将纤维素降解为小分子产物的能力,因此,选择 LD-3、ZL-3 和 WN-3 进行后续的纤维素降解试验。

2.3 不同环境样品在 H_2/CO_2 环境培养下的结果

木质纤维素在微生物降解过程中会产生 H_2/CO_2 ,而能否高效地将 H_2/CO_2 转化为甲烷是判断产甲烷菌群活力的依据之一^[14]。在去除了纤维素和无水乙酸钠作为碳源的情况下,以 80% $H_2/20\%$ CO_2 气体环境培养样品 LD-HC、ZL-HC 和 WN-HC。由图 3 和图 4 可知,3 组环境样品可以利用 H_2/CO_2 产出甲烷并产出挥发性脂肪酸。在该环境下培养 7 d 后,LD-HC、ZL-HC 和 WN-HC 的甲烷浓度分别为 35.2%、37.79% 和 27.57%,甲烷产量分别为 0.117、0.159、0.135 mL/mL(体积比为 4:1 的 H_2/CO_2 混合气产出的甲烷量)。 H_2/CO_2 环境培养 7 d 后,环境样品 LD-HC、ZL-HC 和 WN-HC 的挥发性脂肪酸盐含量分别为 58.2、44.8、62.3 mg/L,其中 LD-HC 和 ZL-HC 的丁酸盐比例要高于丙酸盐,WN-HC 的丙酸盐比例要高于丁酸盐,三者乙酸盐的比例都是其中最高的。

2.4 不同环境样品对不同添加量纤维素的降解情况

纤维素降解量有助于评估环境富集样品微生物

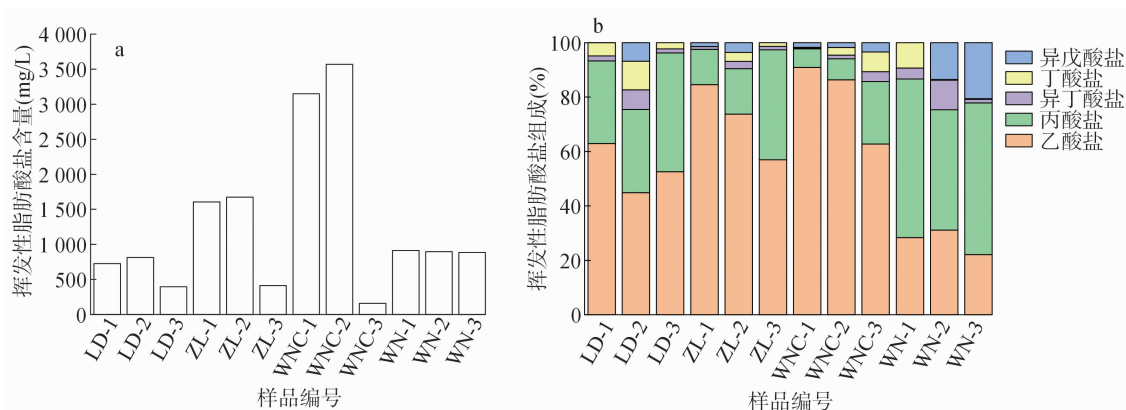
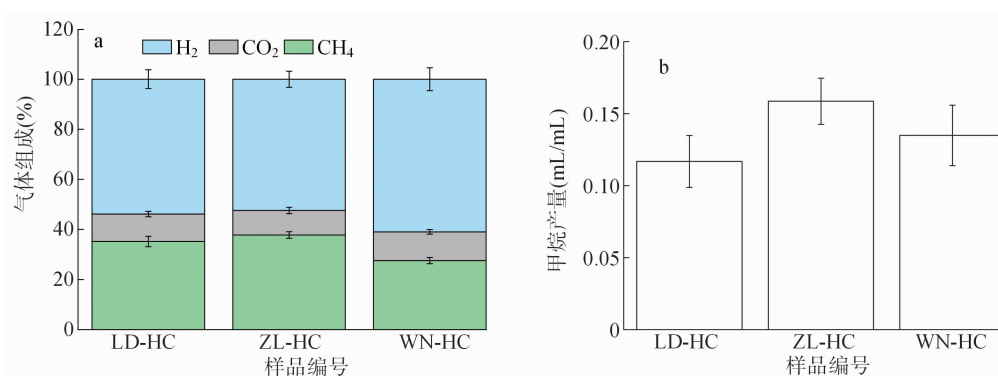
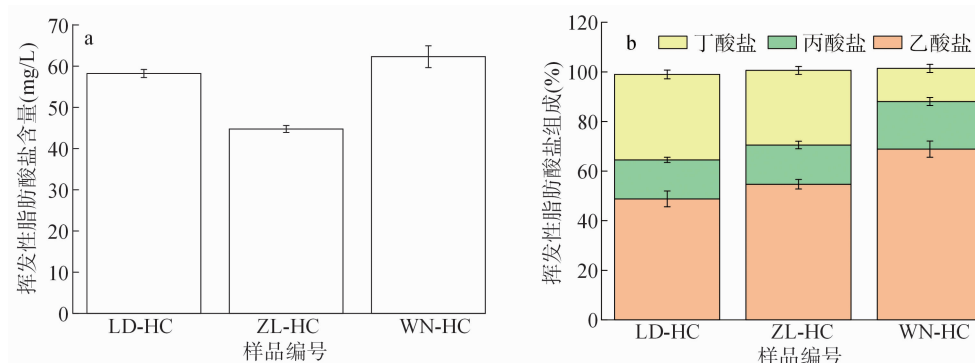


图2 不同环境样本在不同培养条件下的挥发性脂肪酸盐组成和含量

图3 不同环境样品在 H_2/CO_2 环境培养下气体组成和甲烷产量图4 不同环境样品在 H_2/CO_2 环境培养下挥发性脂肪酸盐的含量和组成

降解农业废弃物中顽固的木质纤维素结构的能力。由图 5 可知,培养 7 d 后,LD - C、ZL - C 和 WN - C 在 10 g/L 纤维素添加量下的纤维素降解率最高,分别为 28.0%、20.9% 和 32.1%。由试验得出的降解率数据可算出,在纤维素添加量为 10 g/L 的情况下,LD - C、ZL - C、WN - C 的绝对降解量分别为 2.80、2.08、3.21 g/L;添加量为 50 g/L 的情况下,绝对降解量为 9.05、5.90、8.73 g/L;在添加量为 100 g/L 的情况下,绝对降解量为 7.50、5.89、7.55 g/L。由上述可知,50 g/L 纤维素添加量处理的降解率要低于 10 g/L 处理,但纤维素的绝对降解量为最高。3 组环境富集样品在添加 100 g/L 纤维

素情况下的降解率最低。7 d 降解试验后,3 组样品管内培养液的 pH 值如图 5 - b 所示,10 g/L 纤维素添加情况下,培养液 pH 值在 7.05 ~ 7.12 之间;100 g/L 纤维素添加下除 WN - C 的 pH 值为 7.01,其余情况下 pH 值均低于 7;LD - C、ZL - C 和 WN - C 在 50 g/L 纤维素添加量下的 pH 值最低,分别为 6.83、6.88 和 6.84。

2.5 微生物群落结构分析

对试验过程中挑选出的特定环境样品进行微生物群落结构分析,结果如图 6 所示。可以看出,3 组环境样品在古菌门水平具有明显物种相对丰度优势的分别是广古菌门 (Euryarchaeota) 和盐杆菌门

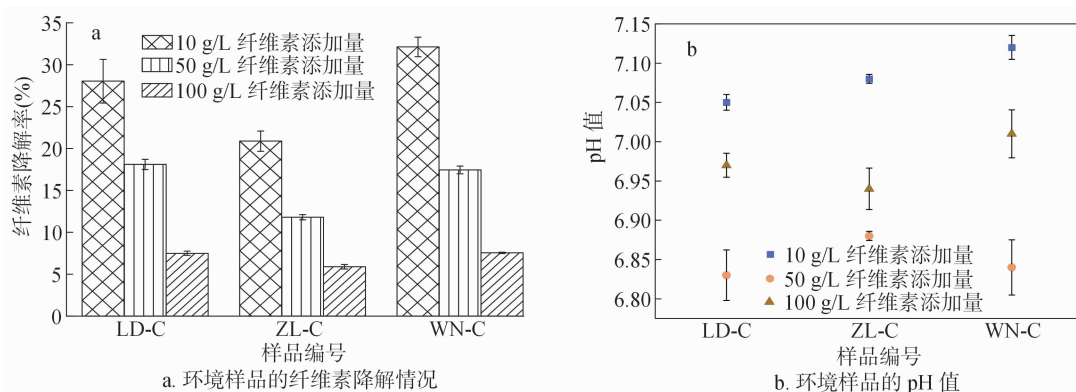


图5 不同环境样品富集液处理不同添加量纤维素的降解情况和 pH 值

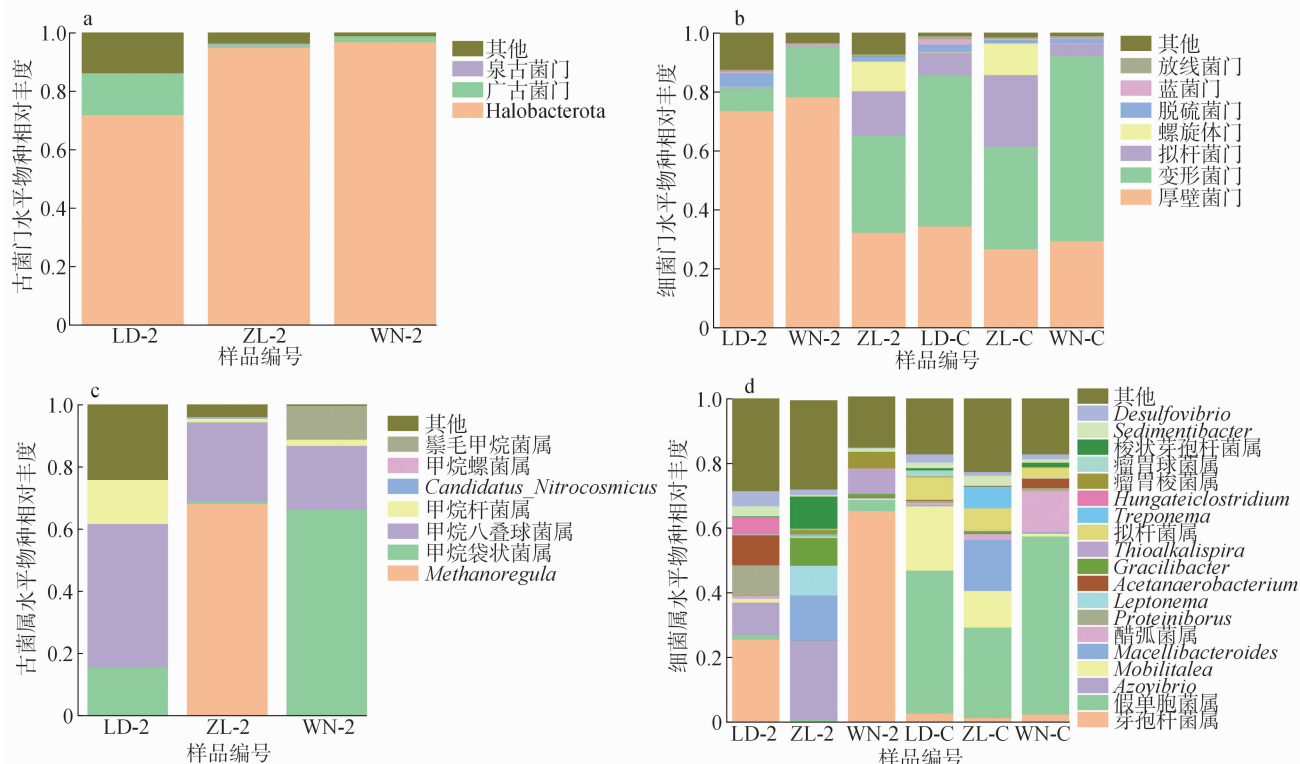


图6 不同环境样品古菌和细菌在门水平和属水平的物种相对丰度

(Halobacterota)。细菌 7 个门水平中,样品 LD-2 和 WN-2 中厚壁菌门(Firmicutes)占据绝对的物种相对丰度优势,而样品 ZL-2、LD-C、ZL-C 和 WN-C 则是以厚壁菌门、变形菌门(Proteobacteriota)和拟杆菌门(Bacteroidota)为主。各环境样品之间在属水平上的物种差异较大,古菌属水平上样品 LD-2 相对丰度最高的 3 个属分别是甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷袋状菌属(*Methanoculleus*)和甲烷杆菌属(*Methanobacterium*),ZL-2 相对丰度最高的 2 个属分别是甲烷八叠球菌属和 *Methanoregula*,WN-2 则是以甲烷八叠球菌属、甲烷袋状菌属和鬃毛甲烷菌属(*Methanosaeta*)为主。在这些物种中,甲烷八叠球菌属于多营养途径产甲

烷古菌^[15],鬃毛甲烷菌属是指利用乙酸盐的产甲烷古菌,甲烷袋状菌属、*Methanobacterium* 和 *Methanoregula* 都是已知的利用 H_2/CO_2 产甲烷的古菌^[16]。细菌属水平分类上,LD-2 和 ZL-2 的物种相对丰度的分布较为均匀,WN-2 是以芽孢杆菌属(*Bacillus*)为主。经过连续单一纤维素添加富集培养后的样品 LD-C、ZL-C 和 WN-C 在物种构成上出现了一定的趋同性,三者细菌属分类上都以假单胞菌属(*Pseudomonas*)为主,其中 LD-C 还有较高丰度的 *Mobilitalea* 和拟杆菌属(*Bacteroides*);ZL-C 也有着较高丰度的 *Mobilitalea*、拟杆菌属、密螺旋体属(*Treponema*)和 *Macellibacteroides*;WN-C 则是除了假单胞菌属外还有着较高丰度的醋弧菌属

(*Acetivibrio*)。

图 7 展示了 1 mL 培养液中不同环境样品中相对丰度排前 20 的细菌和所有古菌的 reads。由图 7-a 可知,在古菌属水平上,WN-2 的优势古菌属为甲烷袋状菌属和甲烷八叠球菌属,序列读数为 85 326.9 和 26 473.1。LD-2 在甲烷八叠球菌属上有着最高序列读数(57 881.4)。在细菌属水平上,

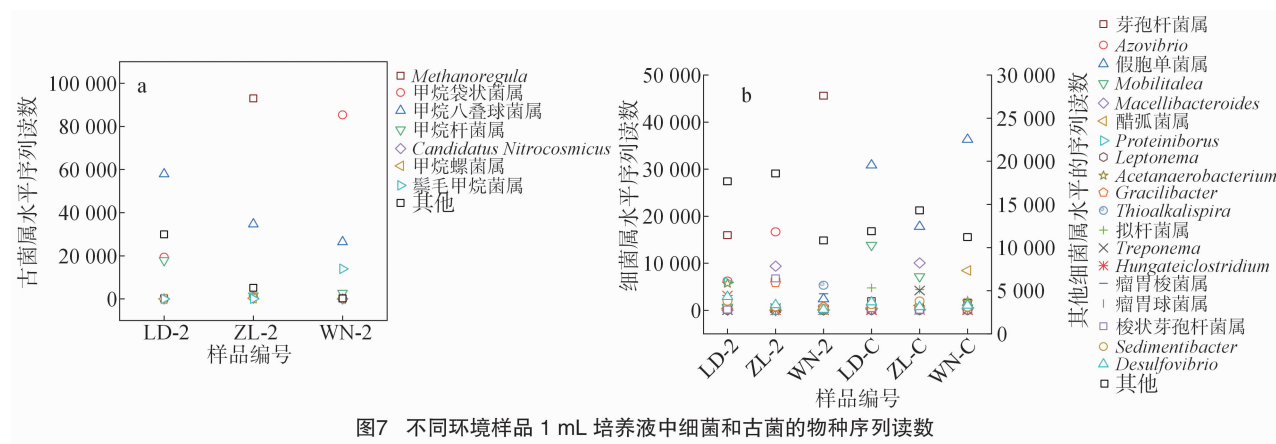


图7 不同环境样品 1 mL 培养液中细菌和古菌的物种序列读数

3 讨论

Llamas 等认为当涉及到使用包括农业废弃物在内的复杂底物进行降解利用时,单菌株的培养可能不是最佳的策略^[17-18],因此,从自然界中筛选复合菌群一起协同工作来执行木质纤维素降解这类复杂的任务能够更有效地响应环境波动和过程干扰。通过特定培养条件从 3 个不同环境来源富集出的复合菌群已表现出具有从底物到甲烷的完整代谢途径,实验室中已有的污泥培养液对比环境中富集得到的菌群而言,产甲烷的能力都要处于明显劣势,这也体现了从环境中筛选高效纤维素降解菌群的必要性。从样品 LD-2、ZL-2 和 WN-2 的甲烷产量和微生物群落结构分析来看,WN-2 因同时具有高丰度的甲烷八叠球菌属和鬃毛甲烷菌属而在产甲烷能力上处于优势,因为这 2 种产甲烷菌都属于可以利用乙酸盐产出甲烷的古菌,农业废弃物这类的木质纤维素经过微生物的降解后会产出大量的乙酸盐,而研究表明,近 70% 的甲烷是由乙酸盐产生的^[16],从挥发性脂肪酸的检测上也证明 WN 组的环境样品对乙酸盐的利用也是最为充分的。

从通入 H_2/CO_2 的培养结果来看,利用 H_2/CO_2 产甲烷菌在 3 个环境来源都明确有较高的活性。从环境富集而来的菌群具有高活性的 H_2/CO_2 利用能力是十分重要的,因为在厌氧消化过程中 H_2 应该

WN-2 的芽孢杆菌属序列读数是 45 606.7,该序列读数超过了 LD-2 除其他外其余所列的所有细菌属序列读数之和。ZL-2 的 *Azovibrio* 读数(16 682.5)是 6 个环境样品中最高的,LD-C、ZL-C 和 WN-C 共有优势细菌属(假单胞菌属)上的序列读数有着较大的差别,其中最高的是 WN-C (36 308.4),最低的是 ZL-C (17 789.6)。

被充分利用以确保厌氧消化过程中较低的氢气分压。有研究表明,厌氧消化过程在仅存在超过 10 Pa 的氢气时就可能抑制厌氧消化过程中的水解发酵微生物的活性并且会诱导挥发性脂肪酸的过量积累以至于厌氧消化体系酸化^[19]。从 LD-HC、ZL-HC 和 WN-HC 的甲烷产量来看,ZL-HC 有着最高的甲烷产量,而 3 个环境样品都有着在 H_2/CO_2 环境下产出挥发性脂肪酸的能力。从微生物群落结构上分析,ZL 的环境来源有着最高序列读数的 *Methanoregula*,已有研究报道称其是典型的氢营养产甲烷古菌^[20]。

不同浓度纤维素的降解试验表明,3 组环境来源富集得到的菌群对纤维素都有明显的降解效果。10 g/L 和 50 g/L 的纤维素添加量都有着不错的降解效果,而 100 g/L 的纤维素添加量则让降解过程受到了抑制,这是因为农业废弃物这类生物质原料本身的高固含量可能会导致微生物与原料之间的传质障碍,并间接导致甲烷产率的降低。有研究发现,当生物原料浓度从 8% 增加到 25% 时,厌氧消化过程固体介质中溶质的扩散系数降低了 3.7 倍^[21]。3 组用于纤维素降解试验的环境样品(LD-C、ZL-C 和 WN-C)的细菌群落结构分析显示,三者均具有高丰度的假单胞菌属。假单胞菌属是一类典型的具有纤维素降解功能的微生物^[22],并且许多研究报道了假单胞菌属在各类环境甚至在一些寒冷和

炎热的地区都广泛存在着^[23-24]。从纤维素总体的降解效果来看, $WN-C > LD-C > ZL-C$, 从三者的优势物种假单胞菌属的序列读数上可以看出, $WN-C$ 的假单胞菌属的丰度水平最高, 而 $ZL-C$ 的要低于其他两者。段亚冰等使用 F1 菌株对 3 g 玉米秸秆粉进行固态发酵 20 d 后, 纤维素含量的降解率为 10.5%^[25]; 安琪等研究的 8 株菌种对纤维素的降解率在 4.7% ~ 27.0% 之间^[26]。本研究中降解能力较差的 $ZL-C$ 在 50 g/L 纤维素浓度下培养 7 d 纤维素降解率为 11.8%, 降解能力较强的 $WN-C$ 在 10 g/L 纤维素添加量下纤维素降解率为 32.1%, 说明从环境中富集得到的复合菌群有更强的纤维素降解能力。

从不同环境样本在物种门水平和属水平分类下的微生物群落结构分析来看, 厚壁菌门和变形菌门是各环境样品在细菌水平上的主要优势物种。厚壁菌门在发挥对木质纤维素生物质的降解和利用方面的重要作用广为人知, 它们可以分泌多种跟木质纤维素降解有关的胞外酶, 比如纤维素酶、纤维素二糖水解酶、果胶酶和木质素酶等^[27]。变形菌门也被发现能够有效降解木质纤维素生物质; 根据 Woo 等的说法, β -变形菌中的 *Burkholderia* 能够分泌多种胞外酶来降解植物细胞壁成分, 如纤维素、半纤维素、木质素和木糖^[28], 同隶属于 β -变形菌的 *Cupriavidus basilensis* 具有代谢包括糠醛在内的木质纤维素生物质的多种有毒中间体的能力^[29]。目前, 广古菌门和盐杆菌门含有数量最大、种类最多的已培养古菌类群, 并且两者在传统上也被称为含有产甲烷古菌最大的门类^[7,30]。从细菌属水平来看, 各环境样品中占据独有优势的物种多样性较高, 比如 $ZL-2$ 中高丰度的梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium*)、 $WN-C$ 中的醋弧菌属、 $LD-1$ 中的 *Hungateiclostridium* 以及 $LD-C$ 和 $ZL-C$ 中的 *Mobilitalea* 都是已有研究证实的具有纤维素降解能力的菌种^[31-34]。

4 结论

3 个自然环境来源和 1 个实验室培养来源的微生物富集培养结果显示, 3 个环境样品成功富集培养出具有完整纤维素三阶段利用的复合菌群, 且产甲烷能力要远优于实验室来源。其中, 甲烷最高产出可占生物气的 92.2%, 只添加了乙酸盐的样品 $LD-1$ 在厌氧消化过程中的挥发性脂肪酸盐含量降

低到 726.4 mg/L。

通过特定的 H_2/CO_2 环境气体培养发现, 不同环境样品均有高活跃程度的氢营养产甲烷古菌, 3 个环境富集菌群都能够通过消耗 H_2 以维持生物质废弃物厌氧消化过程的平衡, 其中来源于竹林腐殖层的富集菌群对消耗 H_2/CO_2 产甲烷的能力最优。

从纤维素降解能力试验整体来看, 3 个环境来源富集得到的复合菌群对纤维素均表现出较高的降解能力, 在纤维素添加浓度为 50 g/L, 培养时间为 7 d 的情况下, 最低降解率有 10% 以上, 高浓度的纤维素添加可能导致原料与微生物之间传质阻碍进而影响纤维素的降解, 培养液 pH 值反映出纤维素添加浓度为 10 g/L 时不会导致菌群生长环境酸化。

利用高通量测序对不同环境样品的细菌和古菌菌群结构以及优势物种在各环境样品中的序列读数进行研究, 测序结果显示, 不同的环境样品有着不同纤维素降解菌, 且具有纤维素降解能力的菌群不止一种。各样品中产甲烷古菌种类几乎涵盖了产甲烷的各主要途径, 不同环境样品中的菌群对不同产甲烷底物的利用能力有差异优势。不同环境来源涵盖了丰富多样的纤维素降解复合菌群, 它们在应对农业废弃物这类复杂原料方面会有着良好的适应性, 后期研究中可针对不同农业废弃物特点进行针对性的设计和接种以进一步挖掘这些环境富集菌群资源的潜力。

参考文献:

- [1] Sawatdeenarunat C, Surendra K C, Takara D, et al. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: challenges and opportunities[J]. Bioresource Technology, 2015, 178: 178-186.
- [2] Ji L Q. An assessment of agricultural residue resources for liquid biofuel production in China[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2015, 44: 561-575.
- [3] Fu Y R, Luo T, Mei Z L, et al. Dry anaerobic digestion technologies for agricultural straw and acceptability in China[J]. Sustainability, 2018, 10(12): 4588.
- [4] Liu Z L, Saha B C, Slueninger P J. Lignocellulosic biomass conversion to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*[M]//Wall J D, Harwood C S, Demain A. Bioenergy. Hoboken, New Jersey, USA: Wiley Online Library, 2008: 17-36.
- [5] Zeng M, Lu C Q, Ma M J, et al. Renewable energy development thrives during China's 12th five-year plan[J]. Power, 2012, 156(12): 54-6.
- [6] Li Y, Chen Y G, Wu J. Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: a review[J]. Applied Energy, 2019, 240: 120-137.

- [7] Baker B J, De Anda V, Seitz K W, et al. Diversity, ecology and evolution of Archaea [J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5 (7) : 887 – 900.
- [8] Yang L C, Xu F Q, Ge X M, et al. Challenges and strategies for solid – state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, 44: 824 – 834.
- [9] Bauchop T, Mountfort D O. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 42 (6) : 1103 – 1110.
- [10] Azman S, Khadem A F, van Lier J B, et al. Presence and role of anaerobic hydrolytic microbes in conversion of lignocellulosic biomass for biogas production [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2015, 45 (23) : 2523 – 2564.
- [11] Zhou X Y, Du Y C, Liu D Y, et al. Enhanced bioproduction of volatile fatty acids from excess sludge by sodium alcohol ether sulphate [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 450: 138288.
- [12] Chen J, Wade M J, Doling J, et al. Increasing sulfate levels show a differential impact on synthetic communities comprising different methanogens and a sulfate reducer [J]. *Journal of the Royal Society, Interface*, 2019, 16 (154) : 20190129.
- [13] 岳 丹, 王 磊, 乔莉娟, 等. 高效纤维素降解菌株筛选及其复合微生物菌剂在有机堆肥中的应用效果 [J]. *江苏农业科学*, 2018, 46 (17) : 273 – 276.
- [14] Zhu X P, Zhou P, Chen Y C, et al. The role of endogenous and exogenous hydrogen in the microbiology of biogas production systems [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2020, 36 (6) : 79.
- [15] Wan J Y. Functions of frequently used back channels in a corpus of intercultural conversations between Hong Kong Chinese (HKC) and native English speakers (NES) [J]. *Journal of Intercultural Communication*, 2018, 18 (1) : 1 – 14.
- [16] Amin F R, Khalid H, El – Mashad H M, et al. Functions of bacteria and Archaea participating in the bioconversion of organic waste for methane production [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 763: 143007.
- [17] Llamas M, Greses S, Magdalena J A, et al. Microbial co – cultures for biochemicals production from lignocellulosic biomass: a review [J]. *Bioresource Technology*, 2023, 386: 129499.
- [18] Qian X J, Chen L, Sui Y, et al. Biotechnological potential and applications of microbial consortia [J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 40: 107500.
- [19] Liu Y C, Whitman W B. Metabolic, Incredible anaerobes: from physiology to genomics to fuels [M]. New York, USA: Annals of the New York Academy of Sciences, 2008.
- [20] Bräuer S L, Cadillo – Quiroz H, Ward R J, et al. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61: 45 – 52.
- [21] Bollon J, Le – hyaric R, Benbelkacem H, et al. Development of a kinetic model for anaerobic dry digestion processes: focus on acetate degradation and moisture content [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 56 (3) : 212 – 218.
- [22] Meyers M, Poffe R, Verachtert H. Properties of a cellulolytic *Pseudomonas* [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1984, 50 (3) : 301.
- [23] Sun S S, Zhang Y T, Liu K R, et al. Insight into biodegradation of cellulose by psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. LKR – 1 from the cold region of China: optimization of cold – active cellulase production and the associated degradation pathways [J]. *Cellulose*, 2020, 27 (1) : 315 – 333.
- [24] Rattanasuk S, Songsaeng A, Sriwarom T. *Pseudomonas stutzeri* CM1, novel thermotolerant cellulase – producing bacteria isolated from forest soil [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2020, 23 (10) : 1345 – 1350.
- [25] 段亚冰, 陈洋洋, 康业斌. F1 菌株对玉米秸秆木质素和纤维素降解能力的研究 [J]. *河南农业科学*, 2009, 38 (4) : 30 – 33.
- [26] 安 琪, 员 媛, 戴玉成, 等. 木质纤维素降解真菌菌株筛选及对玉米秸秆的生物降解研究 [J]. *菌物学报*, 2023, 42 (3) : 782 – 779.
- [27] Gavande P V, Basak A, Sen S, et al. Functional characterization of thermotolerant microbial consortium for lignocellulolytic enzymes with central role of Firmicutes in rice straw depolymerization [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11 (1) : 3032.
- [28] Woo H L, Utturkar S, Klingeman D, et al. Draft genome sequence of the lignin – degrading *Burkholderia* sp. strain LIG30, isolated from wet tropical forest soil [J]. *Genome Announcements*, 2014, 2 (3) : e00637 – 14.
- [29] Wierckx N, Koopman F, Bandounas L, et al. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate [J]. *Microbial Biotechnology*, 2010, 3 (3) : 336 – 343.
- [30] Bräuer S L, Basiliko N, Siljanen H M P, et al. Methanogenic Archaea in peatlands [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2020, 367 (20) : fnaa172.
- [31] Rettenmaier R, Gerbaulet M, Liebl W, et al. *Hungateiclostridium mesophilum* sp. nov., a mesophilic, cellulolytic and spore – forming bacterium isolated from a biogas fermenter fed with maize silage [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69 (11) : 3567 – 3573.
- [32] Podosokorskaya O A, Bonch – Osmolovskaya E A, Beskorovaynyy A V, et al. *Mobilitalea sibirica* gen. nov., sp. nov., a halotolerant polysaccharide – degrading bacterium [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64: 2657 – 2661.
- [33] Ouyang C Y, Qin Y, Fang P, et al. Methane flux at the water – gas interface is influenced by complex interactions among phytoplankton, phosphorus inputs and methane – functional bacteria: a microcosm systems study [J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 912: 169373.
- [34] Liberato V, Benevenuti C, Coelho F, et al. *Clostridium* sp. as bio – catalyst for fuels and chemicals production in a biorefinery context [J]. *Catalysts*, 2019, 9 (11) : 962.