

温度对厨余垃圾高温厌氧消化及微生物群落的影响

杨璐 张影 汤岳琴* 孙照勇 黄玉莲 木田建次

四川大学建筑与环境学院 成都 610065

摘要 使用全混流反应器(CSTR),研究53℃和60℃条件下厨余垃圾的处理效果,同时利用T-RFLP(末端限制性片段长度多态性)以及16S rRNA基因克隆文库的方法,对微生物群落结构进行跟踪解析。结果表明,在温度为53℃、挥发性总固体(VTS)负荷为4 g L⁻¹ d⁻¹时,处理性能稳定,有机酸积累少,产气率约为900 mL/g VTS;当温度升高至60℃时,TOC和有机酸积累,产气率显著下降。微生物群落分析结果表明,当温度从53℃升高至60℃后,细菌群落从以发酵产酸菌群为主转变为以各类发酵菌和有机酸氧化菌为主,产甲烷菌群中乙酸营养型产甲烷菌比例下降,而氢营养型产甲烷菌比例升高。运行温度从53℃升高至60℃后厌氧处理能力下降的主要原因是乙酸营养型产甲烷菌比例下降,乙酸的消耗需要通过乙酸氧化菌和氢营养型的产甲烷菌的协同作用,产甲烷速率降低,从而导致处理能力下降。图3 表3 参50

关键词 厨余垃圾; 高温厌氧消化; 产甲烷微生物群落; T-RFLP分析; 克隆文库分析
CLC X172

Effect of temperature on performance and microbial community of thermophilic methane fermentation of kitchen waste

YANG Lu, ZHANG Ying, TANG Yueqin*, SUN Zhaoyong, HUANG Yulian & KIDA Kenji

Architecture and Environment College, Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstract The study aimed to investigate the effect of temperature on performance and microbial community of thermophilic methane fermentation of kitchen waste. Kitchen waste was treated using a completely stirred tank reactor (CSTR) at 53 °C and 60 °C. Microbial community structure during treatment was analyzed using T-RFLP and 16S rRNA clone library methods. At the temperature of 53 °C and a VTS loading rate of 4 g/L/d, the treatment was stable without accumulation of VFA, with gas production approximately 900 mL/g-VTS. When the temperature was raised to 60 °C, TOC and VFA accumulated sharply and the gas production decreased, with changes in both bacterial community and archaeal community. At 53 °C, the acid-producing fermenting bacteria were dominant. When the temperature was increased to 60 °C, however, the population of fatty acid-oxidizing, especially acetate-oxidizing bacteria increased significantly. The population of aceticlastic methanogen *Methanosarcina* decreased while hydrogenotrophic methanogen *Methanothermobacter* increased at 60 °C. The main pathway of methane production from acetate at 60 °C was through the acetate oxidation followed by hydrogenotrophic methanogenesis, which needs syntrophism of acetate-oxidizing bacteria and hydrogenotrophic methanogens. The results showed that the operational temperature of 53 °C is suitable for thermophilic methane fermentation of kitchen waste. Increase of operational temperature to 60 °C would result in decrease of methane production through aceticlastic methanogenesis pathway, leading to accumulation of VFAs and deterioration of treatment.

Keywords kitchen waste; thermophilic anaerobic digestion; methanogenic community; T-RFLP; 16S rRNA gene clone library

随着我国社会的发展,人口密集增长,城市化进程加快,城市生活垃圾的排放量逐年增加。在城市生活垃圾中,厨余垃圾所占比重较大,为40%-60%^[1]。与其它垃圾相比,厨余垃圾具有含水率高、有机物含量高、盐分及油脂含量高、营养丰富、易腐败等特点^[1-3],一方面具有很好的资源利用价值,另一方面若处理不当,会造成严重的环境污染,给居民健康带来危害^[1-2]。厌氧消化处理不仅能够将有机废弃物转化成气体能源甲烷,而且具有处理成本低等优点,成为处理厨

余垃圾的首选技术^[4]。

厌氧消化过程通常包括水解发酵、产氢产乙酸和甲烷发酵3个阶段,参与的主要微生物类群包括发酵菌群、产氢产乙酸菌群、同型产乙酸菌群和产甲烷菌群等,有机物在它们依次降解和转化作用下,最终被转化为CH₄、CO₂和H₂O^[5]。厌氧消化过程受温度、pH、废水种类及其组成等因素的影响。其中,温度是厌氧消化过程中非常重要的影响因素。在厌氧消化过程中,温度每升高10℃,反应速率增加2-4倍^[6]。高温消化反应速率比中温高,高温厌氧消化停留时间短,反应器容积较小,同时对病原菌的杀灭更有效^[7-8],比较适合高浓度的

收稿日期 Received: 2014-02-10 接受日期 Accepted: 2014-04-03

*通讯作者 Corresponding author (E-mail: tangyq@scu.edu.cn)

有机废水的处理^[9]。目前高温厌氧消化的温度多控制在53-55℃,在此温度以上的研究比较少。有研究报道55℃以上的厌氧消化处理,希望通过提高温度提高消化速率和病原菌灭菌效果^[10]。同时也有研究结果表明,随着温度的升高,处理系统稳定性降低,耐受环境冲击力的能力减弱,越难以控制^[11-12]。

我们采用全混流反应器(Completely stirred tank reactor, CSTR),研究了53℃和60℃条件下厨余垃圾的处理效果,同时利用T-RFLP(末端限制性片段长度多态性)以及16S rRNA基因克隆文库的方法,对微生物群落结构进行了跟踪解析,从微生物群落水平解释温度对反应器运行情况的影响,以期厨余垃圾高温厌氧消化提供基础参考。

1 材料与方法

1.1 接种污泥

接种污泥为酒精厂蒸馏废液厌氧消化池中的污泥。

1.2 厨余垃圾

厨余垃圾取自四川大学江安校区食堂。厨余垃圾去除塑料、纸巾、蛋壳等杂物后,用高速粉碎机将其粉碎,置于4℃冰箱保存备用。厨余垃圾的组成如表1所示。

表1 厨余垃圾的特性 (N=3)

Table 1 Characteristics of kitchen waste (N=3)

成分 Component	结果 Result
水分 Moisture (w%)	76.3 ± 0.14
有机物 Organic content (w%, DW)	94.4 ± 0.66
灰分 Ash content (dry weight) (w%, DW)	5.6 ± 0.66
总糖 Total sugar (w%, DW)	51.4 ± 1.60
蛋白质 Protein (w%, DW)	15 ± 1.31
油脂 Lipid (w%, DW)	24.0 ± 0.19
C (w%, DW)	56.5 ± 1.31
H (w%, DW)	7.8 ± 0.08
N (w%, DW)	2.4 ± 0.21
C/N比 C/N ratio	23.3 ± 0.41
丙酸 Propionate (ρ/mg L ⁻¹)	1.7 ± 0.53
乙酸 Acetate (ρ/mg L ⁻¹)	1117.6 ± 27.83
乳酸 Lactate (ρ/mg L ⁻¹)	3646.9 ± 48.90
VFA (ρ/mg L ⁻¹)	4764.5 ± 76.70
TS (w%)	24.9 ± 0.50
VTS (w%)	23.7 ± 0.28
SS (w%)	13.6 ± 0.06
VSS (w%)	13.4 ± 0.03
S-TOC (ρ/mg L ⁻¹)	41429.2 ± 272.2
NH ₄ ⁺ (ρ/mg L ⁻¹)	36.5 ± 0.64
SO ₄ ²⁻ (ρ/mg L ⁻¹)	295.1 ± 6.44
pH	5.37 ± 0.06

VFA: 挥发性有机酸; TS: 总固体; VTS: 挥发性总固体; SS: 悬浮固体; VSS: 挥发性悬浮固体; S-TOC: 可溶性总有机碳。
VFA, volatile fatty acid; TS, total solid; VTS, volatile total solid; SS, suspended solid; VSS, volatile suspended solid; S-TOC, soluble total organic carbon.

1.3 厌氧消化处理

采用完全混合反应器(CSTR)作为厌氧消化处理反应器,有效容积8L,内设轮三级六叶涡轮搅拌装置,搅拌速度控制在85 r/min。系统启动时,将8L厌氧消化污泥直接装入反应器中,用氮气吹脱10 min后开始进行厌氧消化处理。起始进

料负荷为2 g L⁻¹ d⁻¹,每天一次手动加料。记录产气量,定时取样分析消化液pH、TOC、VFA和NH₄⁺浓度。

1.4 分析方法

气体体积用湿式流量计测定(W-NK-5, Shinagawa, 东京, 日本)。TS、VTS、SS和VSS采用日本污水工程协会制定的标准方法^[13]。TOC利用TOC分析仪(TOC-V CSH, 岛津, 日本)测定。有机酸浓度用高效液相色谱(HPLC SCL-10A VP, 岛津)测定,分离柱为Shim-pack SCR-101H。NH₄⁺浓度用离子色谱仪(ICS-1500, 戴安, 美国)测定,分离柱为CG20A。元素成分采用元素分析仪(Vario EL cube, Elementar, 德国)测定。

1.5 微生物群落分析

1.5.1 DNA提取 离心收集消化液污泥,使用FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, OH, 美国)提取总DNA。

1.5.2 末端限制性长度多态性分析(T-RFLP) 用引物Eu27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'带Cy5)和1490R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')扩增细菌16S rRNA基因。PCR产物纯化后用限制性内切酶AfaI进行处理,与内标Liz-600 (Beckman, USA)混合,变性处理后用遗传分析仪(CEQ8800, BECKMAN, 美国)进行片断分析。用IBM SPSS Statistics (version 19.0)对样品进行聚类分析。

1.5.3 16S rRNA基因克隆文库的构建和分析 分别用引物Eu27F和1490R,和Ar109F (5'-ACAGCTCAGTAACACGT-3')和Ar915R (5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3')分别扩增细菌和古菌的16S rRNA基因。将纯化后的PCR产物和pMD™ 19-T载体进行连接,使用大肠杆菌DH5α感受态细胞进行连接产物转化,用引物M13-47和RV-M对阳性克隆进行PCR验证,用限制性内切酶AfaI和MspI酶处理PCR产物,根据酶切片断分布对克隆子进行分类,挑取代表克隆进行序列分析。利用Mothur软件^[14]对细菌文库进行分析。序列相似性≥97%的克隆定义为同一个系统分类单元(OTU)。利用GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)对OTU进行BLAST同源检索,使用MEGA5.0软件,以邻位相连法(Neighbour-joining analysis)构建系统发育树^[15],对OTU进行系统进化分析。

2 结果与讨论

2.1 厨余垃圾厌氧消化处理

处理系统共运行了80 d,可为3个阶段:第一个阶段(1-31 d)发酵温度控制在60℃,在负荷(VTS)2 g L⁻¹ d⁻¹和4 g L⁻¹ d⁻¹条件下运行;第二个阶段(32-50 d)温度控制在53℃,在负荷2 g L⁻¹ d⁻¹和4 g L⁻¹ d⁻¹条件下运行;第三个阶段(51-80 d)温度控制在60℃,在负荷4 g L⁻¹ d⁻¹条件下运行。消化液pH、TOC、VFA、NH₄⁺浓度和产气率随时间的变化如图1所示。

在VTS负荷2 g L⁻¹ d⁻¹条件下启动反应器,在温度60℃的条件下运行了21 d,从第9天(d 9)开始产气率、pH、TOC、VFA和NH₄⁺浓度趋于稳定。此阶段pH为7.8-7.9,TOC浓度为1 300-1 500 mg/L, VFA浓度低于1 600 mg/L, NH₄⁺浓度低于345 mg/L。产气率稳定在900-950 mL/g VTS,是理论产气量的80%左右(根据CHON元素分析结果计算理论产气量)。将VTS负荷提高到4 g L⁻¹ d⁻¹后,产气率有所下降,在860-890

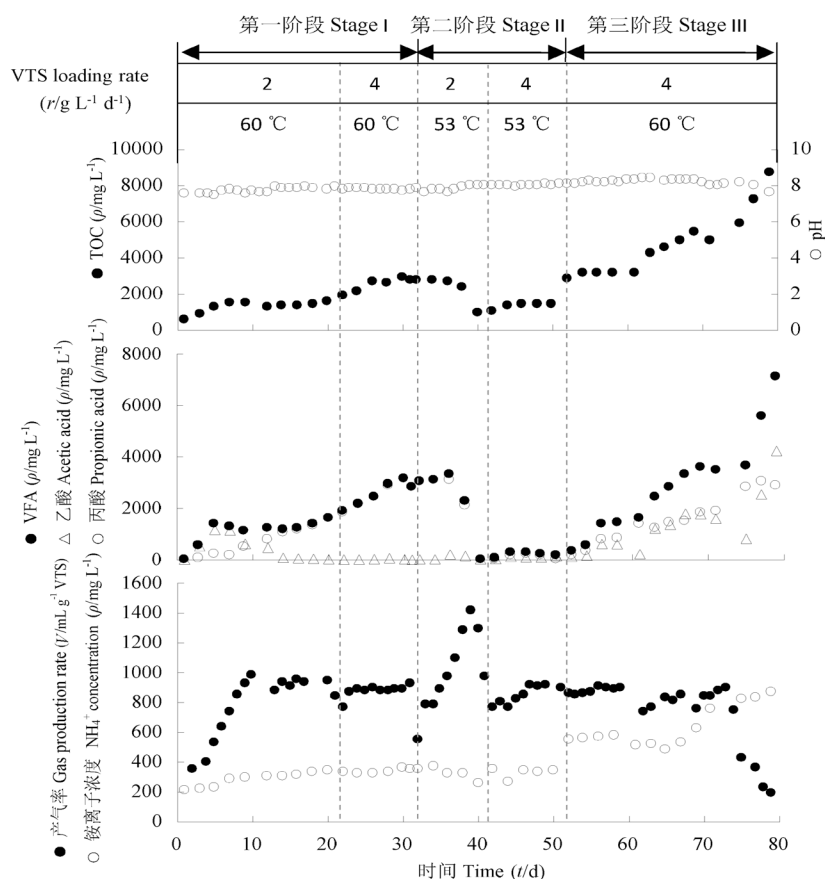


图1 厨余垃圾高温厌氧消化处理过程中pH、TOC、VFA、 NH_4^+ 浓度及产气率变化。

Fig. 1 Change of pH, concentrations of TOC, VFA, NH_4^+ and gas production during thermophilic anaerobic treatment of kitchen waste.

mL/g VTS之间波动, NH_4^+ 浓度没有太大的变化, pH维持在7.7-7.8, TOC浓度逐渐升高到2 900 mg/L, VFA浓度逐渐增加到3 000 mg/L, 主要是丙酸的累积。从d 32起, 将温度降至53 °C, VTS负荷降至2 g L⁻¹ d⁻¹。运行至d 40, TOC降至1 000 mg/L左右, 基本没有有机酸的积累。将VTS负荷提高至4 g L⁻¹ d⁻¹运行, TOC和VFA未有明显积累, 产气率维持在900-920 mL/g VTS。

从d 50起, 将处理温度提高至60 °C, VTS负荷维持在4 g L⁻¹ d⁻¹。随运行天数增加, TOC逐渐增加, 在d 79时TOC达到为8 700 mg/L左右。在TOC升高的同时, VFA也逐渐积累, 而且是乙酸和丙酸同步增加, 在d 79时乙酸和丙酸分别达到为4 230 mg/L和2 860 mg/L。 NH_4^+ 浓度也逐渐增加到867 mg/L。在d 79时, 产气率降至187 mL/g VTS。

从整个运行情况来看, 发酵温度在53 °C时, 厨余垃圾的处理效果比较稳定, 在VTS负荷为4 g L⁻¹ d⁻¹条件下能稳定运行, 这与吴满昌等的研究^[6]相符。而在60 °C进行厌氧处理时, 在VTS负荷为4 g L⁻¹ d⁻¹条件下难以达到稳定处理, 有机酸大量积累。整个处理过程中消化液中 NH_4^+ 浓度低于900 mg/L, 因此有机酸的积累不是由于氨抑制导致^[17]。处理温度是导致有机酸积累的主要原因。丙酸的积累表明丙酸氧化和后续产甲烷过程受到抑制, 而乙酸积累表明利用乙酸产甲烷过程受到抑制。温度从53 °C升高至60 °C可能影响了产甲烷微生物

群落, 利用乙酸产甲烷的产甲烷菌数量或活性下降会造成乙酸积累, 乙酸的积累进一步导致丙酸的积累。

2.2 细菌和古菌的群落结构

2.2.1 T-RFLP分析 利用T-RFLP跟踪了第二和第三阶段53 °C和60 °C发酵过程中细菌群落结构的变化。对d 44 (53 °C; TOC, 1 364 mg/L; VFA, 306 mg/L)、d 48 (53 °C; TOC, 1 459 mg/L; VFA, 237 mg/L)和d 58 (60 °C; TOC, 3 181 mg/L; VFA, 1 450 mg/L)、d 65 (60 °C; TOC, 4 553 mg/L; VFA, 2 805 mg/L)、d 71 (60 °C; TOC, 4 933 mg/L; VFA, 3 474 mg/L)的反应器内的细菌群落进行了比较, 结果如图2所示。d 44、d 48、d 58、d 65和d 71样品在图2中名称依此为53-1、53-2、60-1、60-2和60-3。从聚类结果可以看出, 53-1、53-2和60-1相对更接近, 60-2和60-3比较接近。在53-1、53-2和60-1中, 53-1和53-2更接近, 60-1处于外分枝。该结果表明, 温度升高到60 °C后, 细菌群落逐渐发生变化, 偏离53 °C时的细菌群落, 在58天后趋于相对稳定。

2.2.2 克隆文库分析 对d 48 (53-2)和d 65 (60-2)反应器中细菌和古菌群落进行了克隆文库分析。53-2和60-2两个样品的细菌文库分别命名为B-1号库和B-2号库, 古菌文库分别命名为A-1号库和A-2号库。细菌的两个文库分别获得50条和49条有效序列。古菌的两个文库分别获得5条和4条有效序列。

表2 B-1和B-2克隆文库的统计分析

Table 2 Statistical analysis of B-1 and B-2 bacterial 16S rRNA gene clone libraries

文库 Library	克隆数 Number of clone	OTU数 Number of OTU	Chao	Ace	Shannon	Simpson	Coverage	Boneh
B-1	73	16	25.33	41.27	2.30	0.13	0.84	2.56
B-2	73	19	30.25	43.64	2.62	0.08	0.80	3.20

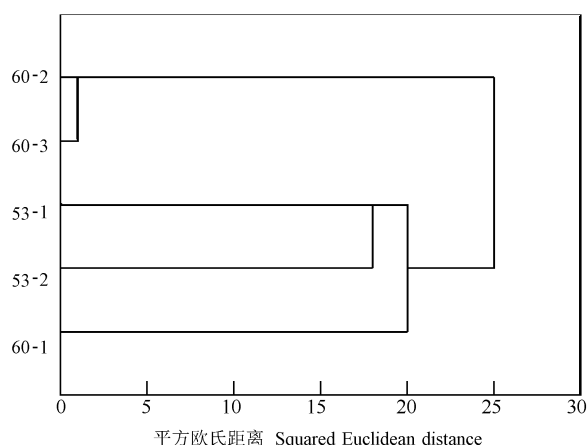


图2 基于细菌T-RFLP结果的聚类分析。

Fig. 2 Cluster analysis of bacterial community based on T-RFLP results.

表2为利用Mothur对B-1和B-2两个细菌文库的统计分析结果。B-1号库中OTU为16个,文库覆盖率为84%, Shannon指数为2.30, Simpson指数为0.13。2号库OTU为19个,文库覆盖率为80%, Shannon指数为2.62, Simpson指数为0.08。两个细菌文库的多样性差异不显著, B-2文库的多样性稍高。

如表3所示,两个古菌文库的多样性均较低,都只检测到2个OTU。A-1和A-2中有1个OTU和乙酸营养型高温产甲烷菌*Methanosarcina thermophila*^[18]具有99%的相似性,分别占文库的21%和7%左右;另一个OTU和氢营养型高温产甲烷菌*Methanothermobacter crinale*^[19]具有99%的相似性,分别占文库的79%和93%左右。上述两种产甲烷菌在高温厌氧消化反应器中常被检测到^[9, 20]。

对两个细菌文库的OTU建立了系统发育树(图3)。B-1号库16个OTU分为6个门,分别为厚壁菌门(Firmicutes)、互养菌门(Synergistetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、网团菌门(Dictyoglomi)和candidate division OP9。B-2号库19个OTU分为4个门,分别为厚壁菌门、candidate division OP9、拟杆菌门和互养菌门。两个库中,厚壁菌门克隆数所占比例最大,是绝对的优势菌群(表3)。

B-1号库中,厚壁菌门有11个OTU, 61个克隆,占总克隆数的84%。11个OTU分属于4个目,分别为Clostridiales、Thermoanaerobacterales、Bacillales Family XII和Lactobacillales。属于Clostridiales目的有5个OTU,各1个克隆。OTU B-1-2与产氢产酸菌*Clostridium clariflavum* (NR_102987)相似性为98%^[21]。OTU B-1-6和B-1-13分别与clone B35_F_B_F08 (EF559074)^[22]和clone 140_BE1_16 (FJ825462)相似性均为99%、与产酸菌*Clostridium* sp. BS-1 (FJ805840)^[23]相似性分别为88%和90%。OTU B-1-14与clone

CK29 (GU320663)^[24]相似性为99%,与能利用蛋白质和糖类发酵产酸的菌株*Clostridium* sp. PML14 (EF522948)^[25]相似性为95%。OTU B-1-9与*Bacillus* sp. clone De247 (HQ183761)^[26]相似性为99%,与利用糖发酵产酸的菌株*Defluviitalea saccharophila* (HQ020487)^[27]的相似性为93%。

表3 细菌和古菌落的克隆系统分类

Table 3 Classification of bacterial and archaeal clones

分类 Taxon	53 °C		60 °C	
	No. of OTU	No. of clone	No. of OTU	No. of clone
细菌 Bacteria	B-1 library		B-2 library	
Firmicutes	11	61	14	47
Clostridiales	5	5	5	10
Thermoanaerobacterales	2	28	6	27
Bacillales Family XII	1	20	-	-
Lactobacillales	3	8	3	10
Synergistetes	1	4	1	4
candidate division OP9	1	4	1	18
Bacteroidetes	1	1	3	4
Planctomycetes	1	1	-	-
Dictyoglomi	1	2	-	-
古菌 Archaea	A-1 library		A-2 library	
<i>Methanosarcina</i>	1	6	1	2
<i>Methanothermobacter</i>	1	22	1	26

属于Thermoanaerobacterales目的OTU有2个。OTU B-1-4 (25个克隆,占厚壁菌门的41%),与*Coprothermobacter proteolyticus* (NR_029236)的相似性为99%。*Coprothermobacter proteolyticus*能发酵蛋白质和糖类产生有机酸、H₂和CO₂^[28]。Lee等在处理厨余垃圾的高温厌氧消化槽中检测到此类菌株^[29]。OTU B-1-11 (3个克隆子)与高温乙酸氧化菌克隆*Thermacetogenium* sp. clone De217 (HQ183800)^[26]相似性为99%,与*Syntrophaceticus schinkii* (EU386162)相似性为94%。*Syntrophaceticus schinkii*是一种乙酸氧化菌,能够将乙醇、乙酸、乳酸等氧化成H₂和CO₂^[30]。

OTU B-1-1 (20个克隆,占厚壁菌门的33%)属于Bacillales Family XII目,与能够发酵糖类产酸菌株*Exiguobacterium aurantiacum* (NR_043478)^[31]相似性为99%。OTU B-1-3, B-1-5和B-1-8均属于Lactobacillales目,分别为5个、1个和2个克隆,分别与*Vagococcus elongatus* (NR_041883)、*Lactobacillus sakei* (AB601167)、*Enterococcus gallinarum* (JF915769)相似性为99%。上述3株相似菌株均能利用糖类物质发酵,产生大量乳酸和少量的乙酸、乙醇等物质^[32-34]。

互养菌门有1个OTU, 4个克隆,与*Anaerobaculum mobile* (NR_102954)相似性为99%。该相似菌株能够发酵蛋白质和糖类产生有机酸、H₂和CO₂^[35]。candidate division OP9有1个OTU, 4个克隆,与clone A35_D28_L_B_F07 (EF559204)^[22]相

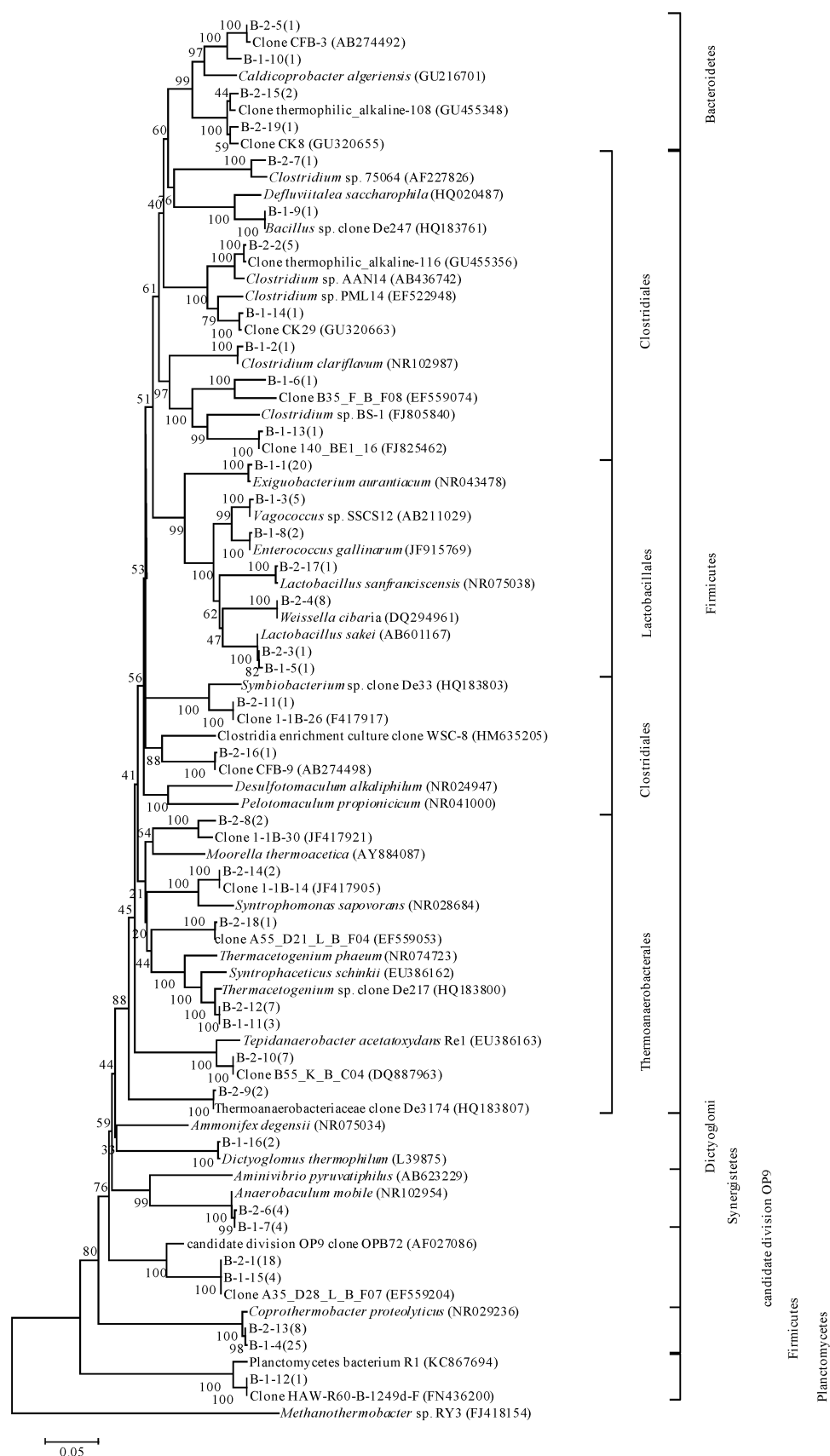


图3 细菌16S rRNA基因克隆的系统发育树.

Fig. 3 Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA gene clone.

似性为99%。网团菌门有1个OTU, 2个克隆, 与木质纤维素降解菌*Dictyoglomus thermophilum* (L39875) 相似度为99%^[36]。浮霉菌门和拟杆菌门在克隆文库中所占比例甚少, 各有1个克隆。OTU B-1-12与*Planctomycetes bacterium R1* (KC867694) 相似度98%, 该相似菌株能够发酵糖类产生有机酸、H₂和CO₂^[37]。OTU B-1-10与clone CFB-3 (AB274492)^[38]相似性为95%, 与产酸菌*Caldicoprobacter algeriensis* (GU216701)^[39]相似性为93%。

可以看出, B-1号文库中以各类利用糖类和蛋白质类物质发酵产酸菌为主, 检测到有乙酸氧化菌存在, 但比例相对较低。

在B-2号文库中, 厚壁菌门有14个OTU, 共47个克隆, 占总克隆数的64%。OTU分属于3个目, 分别为Thermoanaerobacterales、Clostridiales和Lactobacillales。属于Thermoanaerobacterales目的OTU有6个。OTU B-2-13 (8个克隆) 与*Coprothermobacter proteolyticus* (NR_029236)^[28]相似性为99%, OTU B-2-12 (7个克隆) 与*Thermacetogenium* sp. clone De217 (HQ183800)^[26]相似性为99%。OTU B-2-10 (7个克隆) 与clone B55_K_B_C04 (DQ887963)^[20]相似性为99%, 与乙酸氧化菌*Tepidanaerobacter acetatoxydans* (EU386163)^[40]相似性为95%。OTU B-2-8 (2个克隆) 与clone 1-1B-30 (JF417921)^[41]相似性为99%, 与*Moorella thermoacetica* (AY884087) 相似性为89%, 该相似菌株能够发酵糖类生成乙酸^[42]。OTU B-2-9 (2个克隆) 与Thermoanaerobacteriaceae bacterium clone De3174 (HQ183807)^[26]相似性为99%, 与*Thermoanaerobacter yonseiensis* 相似性为86%。*Thermoanaerobacter yonseiensis*能利用木糖等糖类物质产生有机酸^[43]。OTU B-2-18 (1个克隆) 与clone A55_D21_L_B_F04 (EF559053) 相似性为99%, 与乙酸氧化菌*Thermacetogenium phaeum* DSM 12270 (NR_074723)^[44]相似性为88%。

属于Clostridiales有5个OTU。OTU B-2-2 (5个克隆) 和B-2-7 (1个克隆) 与*Clostridium* sp. AAN14 (AB436742.1)^[41]和*Clostridium* sp. 75064 (AF227826)^[45]相似性均为97%。OTU B-2-11 (1个克隆) 与clone 1-1B-26 (F417917)^[46]相似性为99%, 与*Symbiobacterium* sp. clone De33 (HQ183803)^[26]的相似性为94%。OTU B-2-14 (2个克隆) 与clone 1-1B-14 (JF417905)^[41]相似性99%, 与有机酸氧化菌*Syntrophomonas sapovorans* (NR_028684) 相似性为93%, 该相似菌株能够降解长链脂肪酸^[46]。OTU B-2-16 (1个克隆) 与clone CFB-9 (AB274498) 相似性为99%^[38], 与可降解蛋白质和糖类的菌株*Caloranaerobacter* sp. H363 (JQ405072)^[47]的相似性为86%。属于Lactobacillales目OTU有3个, 分别与乳酸菌*Lactobacillus sakei* (AB601167)^[34]、*Weissella cibaria* (DQ294961)^[48]、*Lactobacillus sanfranciscensis* (NR_075038)^[49]相似性为99%。

拟杆菌门有3个OTU, 分别与clone CFB-3 (AB274492)^[38]、clone thermophilic_alkaline-108 (GU455348)^[50]、clone CK8 (GU320655)^[24]相似性分别为99%、98%和98%, 与*Caldicoprobacter algeriensis* (GU216701)^[41]相似性分别为92%、89%和89%。互养菌门有1个OTU, 和B-1文库的OTU B-1-7相同, 与发酵菌*Anaerobaculum mobile* (NR_102954)^[36]相似性为99%。

可以看出, 和B-1文库相比, B-2文库中各类发酵菌的种类和数量明显下降, 而有机酸氧化降解菌特别是乙酸氧化菌的种类和数量明显上升。

结合反应器的运行情况 and 微生物群落分析结果可以看出, 在53 ℃条件下 (VTS 4 g L⁻¹ d⁻¹), 厨余垃圾中的各种有机物被各类发酵菌利用产酸产氢, 产生的小分子有机酸被进一步降解产生乙酸和氢, 乙酸和氢分别在乙酸营养型产甲烷菌*Methanosarcina thermophila*和氢营养型产甲烷菌*Methanothermobacter crinale*的作用下最终生成甲烷和二氧化碳。由于产甲烷途径通畅, 反应器中基本没有有机酸的积累, 有机酸一旦产生很快被分解消耗, 因此反应器中有机酸氧化菌的比例相对较低, 而大量被检测到的是水解发酵菌群。在同一VTS负荷条件下, 将温度从53 ℃升高至60 ℃以后, 利用乙酸产甲烷的产甲烷菌*Methanosarcina thermophila*比例明显下降, 将乙酸直接甲烷化的产甲烷途径受阻, 造成乙酸积累。一般认为甲烷发酵过程中有70%的甲烷是通过乙酸营养型产甲烷菌产生的^[8]。丙酸的降解产物乙酸的积累必然导致丙酸在反应器中的积累。60 ℃条件下乙酸氧化菌的比例显著升高, 表明乙酸的消耗主要是通过乙酸氧化途径进行, 也就是说乙酸氧化菌和氢营养型的产甲烷菌*Methanothermobacter crinale*的协同作用将乙酸转化成甲烷。由于乙酸氧化菌的代谢速度比较慢^[9, 40], 因此在60 ℃条件下产甲烷速率比较低, 很难获得高的处理负荷。

由以上结果可以认为, 高温厌氧消化处理厨余垃圾的适合温度为53 ℃左右, 升高运行温度到60 ℃左右会导致乙酸营养型产甲烷菌比例下降, 有机酸积累, 从而导致处理能力下降。

3 结论

(1) 温度对厨余垃圾的高温厌氧消化影响显著。运行温度从53 ℃升高至60 ℃会导致有机酸积累, 产气能力显著下降。

(2) 53 ℃条件下, 细菌群落以发酵产酸菌群为主, 检测到有乙酸氧化菌存在, 但比例相对较低; 产甲烷菌中乙酸营养型产甲烷菌和氢营养型产甲烷菌共存。60 ℃条件下, 细菌群落中以各类发酵菌和有机酸氧化菌为主, 但发酵菌的种类和数量明显下降, 乙酸氧化菌的种类和数量明显上升; 氢营养型产甲烷菌是主要的产甲烷菌。

(3) 运行温度从53 ℃升高至60 ℃后处理能力下降的主要原因是乙酸营养型产甲烷菌比例显著下降, 乙酸的消耗需要通过乙酸氧化菌和氢营养型的产甲烷菌的协同作用, 转化速率低, 导致有机酸积累。

参考文献 [References]

- 1 张玉静, 蒋建国, 王佳明. pH值对餐厨垃圾厌氧发酵产挥发性脂肪酸的影响[J]. 中国环境科学, 2013, 33 (4): 680-684 [Zhang YJ, Jiang JG, Wang JM. Effect of pH value on VFA concentration and composition during anaerobic fermentation of kitchen waste [J]. *China Environ Sci*, 2013, 33 (4): 680-684]
- 2 许杰龙, 张国霞, 许玫英, 吴泳标, 吴晓玉, 孙国萍. 餐厨废弃物资源化

- 利用的微生物技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2011, **38** (6): 928-933 [Xu JL, Zhang GX, Xu JY, Wu YB, Wu XY, Sun GP. Research progress on reuse of food waste with microbial technology[J]. *Microbiol China*, 2011, **38** (6): 928-933]
- 3 袁玉玉, 曹先艳, 牛冬杰, 赵由才. 餐厨垃圾特性及处理技术[J]. 环境卫生工程, 2006, **1** (6): 46-49 [Yuan YY, Cao XY, Niu DJ, Zhao YC. Characteristics and treatment technologies of food waste [J]. *Environ San Eng*, 2006, **1** (6): 46-49]
 - 4 杜连柱, 杨继东, 张克强, 梁军锋, 崔文文. 厌氧消化过程氨抑制研究进展[J]. 可再生能源, 2012, **30** (4): 70-74 [Du LZ, Yang JD, Zhang KQ, Liang JF, Cui WW. A review on research of ammonia inhibition in anaerobic digestion [J]. *Renew Energ Resour*, 2012, **30** (4): 70-74]
 - 5 李建政, 叶菁菁, 王卫娜, 马超, 昌盛. 制糖废水CSTR甲烷发酵系统的污泥驯化与运行特征[J]. 科技导报, 2008, **26** (10): 70-74 [Li JZ, Ye QQ, Wang WN, Ma C, Chang S. Acclimation of methane-fermenting anaerobic flocs in a continuous flow stirred tank reactor for treating beet-sugar processing wastewater [J]. *Sci Technol Rev*, 2008, **26** (10): 70-74]
 - 6 董蕾, 占美丽, 孙英杰, 张奇, 李成立, 封琳. 餐厨垃圾高温厌氧消化[J]. 环境工程学报, 2013, **7** (6): 2355-2360 [Dong L, Zhan ML, Sun YJ, Zhang Q, Li CL, Feng L. Thermophilic anaerobic digestion of food waste [J]. *China J Environ Eng*, 2013, **7** (6): 2355-2360]
 - 7 徐葳, 冯磊, Raninger B, 李润东, 李延吉. 厨余垃圾厌氧消化制取甲烷的影响因素研究[J]. 可再生能源, 2008, **26** (6): 66-71 [Xu W, Feng L, Raninger B, Li RD, Li YJ. Study on the influential factors for CH₄ production from kitchen residue anaerobic digestion [J]. *Renew Energ Res*, 2008, **26** (6): 66-71]
 - 8 Niu QG, Qiao W, Qiang H, Li YY. Microbial community shifts and biogas conversion computation during steady, inhibited and recovered stages of thermophilic methane fermentation on chicken manure with a wide variation of ammonia [J]. *Bioresour Technol*, 2013, **146**: 223-233
 - 9 Tang YQ, Matsui T, Morimura S, Wu XL, Kida K. Effect of temperature on microbial community of a glucose-degrading methanogenic consortium under hyperthermophilic chemostat cultivation [J]. *J Biosci Bioeng*, 2008, **106** (2): 180-187
 - 10 马磊, 王德汉, 谢锡龙, 李亮, 王梦男. 餐厨垃圾的高温厌氧消化处理研究[J]. 环境工程学报, 2009, **3** (8): 1509-1512 [Ma L, Wang DH, Xie XL, Li L, Wang MN. Study on treatment of food waste by thermophilic anaerobic digestion [J]. *China J Environ Eng*, 2009, **3** (8): 1509-1512]
 - 11 Kim M, Ahn YH, Speece RE. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic [J]. *Water Res*, 2002, **36** (17): 4369-4385
 - 12 Lee M, Hidaka T, Tsuno H. Effect of temperature on performance and microbial diversity in hyperthermophilic digester system fed with kitchen garbage [J]. *Bioresour Technol*, 2008, **99**: 6852-6860
 - 13 JSWA. Japanese Standard Methods of the Examination of Wastewater. Japan Sewage Works Association [S]. Tokyo, Japan, 1997
 - 14 Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75** (23): 7537-7541
 - 15 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGAS: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, **28** (10): 2731-273
 - 16 吴满昌, 孙可伟, 李如燕, 孙艳, 张海东. 不同反应温度的城市生活垃圾厌氧发酵研究[J]. 化学与生物工程, 2005, **22** (9): 28-30 [Wu MC, Sun KW, Li RY, Sun Y, Zhang HD. Study on performance of anaerobic digestion for treating municipal solid waste at different temperature [J]. *Chem Bioeng*, 2005, **22** (9): 28-30]
 - 17 Varel VH, Isaacson HR, Bryant MP. Thermophilic methane production from cattle waste [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1977, **33**: 298
 - 18 Davidova IA, Duncan KE, Perez-Ibarra BM, Suffita JM. Involvement of thermophilic archaea in the biocorrosion of oil pipelines [J]. *Environ Microbiol*, 2012, **14** (7): 1762-1771
 - 19 Cheng L, Dai L, Li X, Zhang H, Lu Y. Isolation and characterization of *Methanothermobacter crinale* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from Shengli Oil fields [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77**: 5212-5219
 - 20 Tang YQ, Shigematsu T, Ikbai, Morimura S, Kida K. The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester [J]. *Water Res*, 2004, **38** (10): 2537-2550
 - 21 Shiratori H, Sasaya K, Ohiwa H, Ikeno H, Ayame S, Kataoka N, Miya A, Beppu T, Ueda K. *Clostridium clariflavum* sp. nov. and *Clostridium caenicola* sp. nov., moderately thermophilic, cellulose-/cellobiose-digesting bacteria isolated from methanogenic sludge [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, **59** (7): 1764-1770
 - 22 Li TL, Mazéas L, Sghir A, Leblon G, Bouchez T. Insights into networks of functional microbes catalysing methanization of cellulose under mesophilic conditions [J]. *Environ Microbiol*, 2009, **11** (4): 889-904
 - 23 Jeon BS, Kim BC, Um Y, Sang BI. Production of hexanoic acid from D-galactitol by a newly isolated *Clostridium* sp. [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **88** (5): 1161-1167
 - 24 Piterina AV, Bartlett J, Pembroke TJ. Molecular analysis of bacterial community DNA in sludge undergoing autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD): pitfalls and improved methodology to enhance diversity recovery [J]. *Divers*, 2010, **2** (4): 505-526
 - 25 Niu L, Song L, Liu X., Dong X. *Tepidimicrobium xylanilyticum* sp. nov., an anaerobic xylanolytic bacterium, and emended description of the genus *Tepidimicrobium* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, **59** (11): 2698-2701
 - 26 Liu J, Wu W, Chen C, Sun F, Chen Y. Prokaryotic diversity, composition structure, and phylogenetic analysis of microbial communities in leachate sediment ecosystems [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **91** (6): 1659-1675
 - 27 Jabari L, Gannoun H, Cayol JL, Hamdi M, Fauque G, Ollivier B, Fardeau ML. Characterization of *Defluviitalea saccharophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters, and proposal of Defluviitaleaceae fam. nov [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, **62** (3): 550-555

- 28 Kersters I, Maestrojuan GM, Torck U, Vancanneyt M, Kersters K, Verstraete W. Isolation of *Coprothermobacter proteolyticus* from an anaerobic digest and further characterization of the species [J]. *Syst Appl Microbiol*, 1994, **17**: 289
- 29 Lee M, Hidaka T, Tsuno H. Two-phased hyperthermophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge with kitchen garbage [J]. *J Biosci Bioeng*, 2009, **108** (5): 408-413
- 30 Westerholm M, Roos S, Schnurer A. *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, **309**: 100-104
- 31 Collins MD, Lund BM, Farrow JA, Schleifer KH. Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. [J]. *J Gen Microbiol*, 1983, **129**: 2037-2042
- 32 Wang L, Cui YS, Kwon CS, Lee ST, Lee JS, Im WT. *Vagococcus acidifermentans* sp. nov., isolated from an acidogenic fermentation bioreactor [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2011, **61** (5): 1123-1126
- 33 Tohno M, Kobayashi H, Nomura M, Kitahara M, Ohkuma M, Uegaki R, Cai Y. Genotypic and phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian ryegrass silage [J]. *Anim Sci J*, 2012, **83** (2): 111-120
- 34 Sayel H, Bahafid W, Tahri-Joutey N, Derraz K, Fikri-Benbrahim K, Ibensouda-Koraichi S, El Ghachtouli N. Cr(VI) reduction by *Enterococcus gallinarum* isolated from tannery waste-contaminated soil [J]. *Ann Microbiol*, 2012, **62** (3): 1269-1277
- 35 Menes RJ, Muxi L. *Anaerobaculum mobile* sp. nov., a novel anaerobic, moderately thermophilic, peptide-fermenting bacterium that uses crotonate as an electron acceptor, and emended description of the genus *Anaerobaculum* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, **52** (1): 157-164
- 36 Gibbs MD, Reeves RA, Bergquist PL. Cloning, sequencing, and expression of a xylanase gene from the extreme thermophile *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 and activity of the enzyme on fiber-bound substrate [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** (12): 4403-4408
- 37 刘冬英, 刘奕, 门学慧, 郭群群, 郭荣波, 邱艳玲. 浮霉菌门严格厌氧产氢细菌(*Thermopirellula anaerolimosa*)的分离及其生理特性[J]. 微生物学报, 2012, **52** (8): 994-1001 [Liu DY, Liu Y, Men XH, Guo QQ, Guo QB, Qiu YL. Isolation and characterization of *Thermopirellula anaerolimosa* gen. nov., sp. nov. an obligate anaerobic hydrogen-producing bacterium of the phylum Planctomycetes [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2012, **52** (8): 994-1001]
- 38 Sasaki K, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y. Microbial population in the biomass adhering to supporting material in a packed-bed reactor degrading organic solid waste [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75** (4): 941-952
- 39 Bouanane-Darenfed A, Fardeau ML, Gregoire P, Joseph M, Kebbouche-Gana S, Benayad T, Hacene H, Cayol JL, Ollivier B. *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. a new thermophilic anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from an algerian hot spring [J]. *Curr Microbiol*, 2011, **62** (3): 826-832.
- 40 Westerholm M, Roos S, Schnurer A. *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2011, **4** (4): 260-266
- 41 Tang YQ, Ji P, Hayashi J, Koike YJ, Wu XL, Kida K. Characteristic microbial community of a dry thermophilic methanogenic digester: its long-term stability and change with feeding [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **91** (5): 1447-1461
- 42 Jiang B, Henstra AM, Paulo PL, Balk M, Doesburg W, Stams AJ. Atypical one-carbon metabolism of an acetogenic and hydrogenogenic *Moorella thermoacetica* strain [J]. *Arch Microbiol*, 2009, **191** (2): 123-131
- 43 Kim BC, Grote R, Lee DW, Antranikian G, Pyun YR. *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. nov., a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85 degrees [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51** (4): 1539-1548
- 44 Oehler D, Poehlein A, Leimbach A, Muller N, Daniel R, Gottschalk G, Schink B. Genome-guided analysis of physiological and morphological traits of the fermentative acetate oxidizer *Thermacetogenium phaeum* [J]. *BMC Genom*, 2012, **13** (1): 723
- 45 Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, **38** (10): 3623-3630
- 46 Hansen KH, Ahring BK, Raskin L. Quantification of syntrophic fatty acid-beta-oxidizing bacteria in a mesophilic biogas reactor by oligonucleotide probe hybridization [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (11): 4767-4774
- 47 Wery N, Moricet JM, Cuffe V, Jean J, Pignet P, Lesongeur F, Cambon-Bonavita MA, Barbier G. *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51** (5): 1789-1796
- 48 Jin L, Tao L, Pavlova SI, So JS, Kiwanuka N, Namukwaya Z, Saberbein BA, Wawer M. Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea [J]. *J Appl Microbiol*, 2007, **102** (4): 1107-1115
- 49 Vogel RF, Pavlovic M, Ehrmann MA, Wiezer A, Liesegang H, Offschanka S, Voget S, Angelov A, Bocker G, Liebl W. Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs [J]. *Microb Cell Fact*, 2011, **10** (1): 1-6
- 50 Zhang P, Chen Y, Zhou Q, Zheng X, Zhu X, Zhao Y. Understanding short-chain fatty acids accumulation enhanced in waste activated sludge alkaline fermentation: kinetics and microbiology [J]. *Environ Sci Technol*, 2010, **44** (24): 9343-9348