

# 外加碳源对厌氧微生物产甲烷活性的影响

李顺义<sup>1,2</sup>, 贾晓珊<sup>2</sup>, 王岩<sup>1</sup> (1. 郑州大学化学工程学院, 河南郑州 450002; 2. 中山大学环境科学与工程学院, 广东广州 510275)

**摘要** [目的] 研究添加不同碳源对厌氧微生物产甲烷活性的影响。[方法] 以传统的连续流为培养方式, 在中温(35℃)厌氧消化条件下, 分别用有机酸(甲酸、乙酸、丙酸和丁酸)和葡萄糖为惟一碳源, 测定 SS、VSS、甲烷累积产量以及有机碳源分解的动力学, 研究添加不同碳源对厌氧微生物产甲烷活性的影响。[结果] 结果表明, 以葡萄糖为碳源, 微生物活性明显高于以有机酸为基质, 其分解基质的速度依次为: 厌氧产甲烷(Glu) > 厌氧产酸(Glu) > 丁酸甲烷菌 > 乙酸甲烷菌 > 甲酸甲烷菌。[结论] 该研究结果为高效地产甲烷提供理论依据。

**关键词** 葡萄糖; 有机酸; 基质; 厌氧微生物; 活性

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)18-08331-03

## Effect of Organic Carbon Resource on Specific Methanogenic Activity of Anaerobic Microorganism

LI Shun-yi et al (School of Chemical Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450002)

**Abstract** [Objective] The aim of this research was to study the effect of organic carbon resource on specific methanogenic activity of anaerobic microorganism. [Method] A series of sequence cultures were conducted to study the activity of anaerobic microorganism with organic acids (formic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid) and glucose as substrates. SS, VSS, accumulative methane production and kinetics of substrates degradation were measured in the anaerobic test (35℃). [Result] The results showed that activity of anaerobic microorganism with glucose was better than with organic acids; the order of substrates decomposed by anaerobic microorganism was methane (Glu) > acid (Glu) > methane bacterium (butyric acid) > methane bacterium (formic acid) > methane bacterium (propionic acid). [Conclusion] This research will provide the theoretical references for producing methanogenic efficiently.

**Key words** Glucose; Organic acid; Substrate; Anaerobic microorganism; Activity

氯苯类化合物(Chlorobenzenes, 简称 CBs)是药物、香料、染料、除草剂和杀虫剂等工业产品中的中间产物, 在石油、油脂、树脂、橡胶、纤维素、聚酯光纤和消毒剂中通常用作溶剂使用, 而且可以作为绝缘材料的绝缘剂<sup>[1]</sup>。氯苯类化合物在工业中被大量广泛使用, 已经进入环境中的氯苯类化合物也将由于其难降解性, 而长期残留在环境中, 同时, 氯苯类化合物还具有较高的毒性和强烈的“致癌、致畸、致突变”作用, 且易通过食物链在生物体内富集, 严重威胁自然生态和人类健康<sup>[2]</sup>。

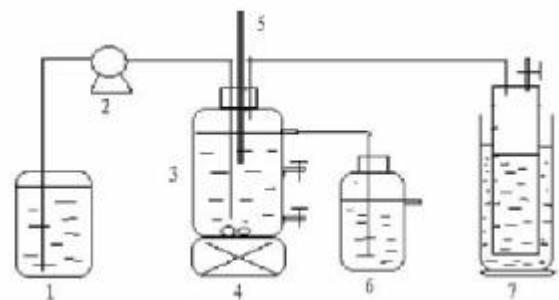
目前, 关于 CBs 的去除, 生物降解是公认的最好方法。对于 CBs 尤其是高氯代苯(氯原子数大于 4 个), 由于氯电负性很高, 在好氧条件下几乎不能降解, 只有在厌氧条件才能降解<sup>[3-5]</sup>。关于 CBs 厌氧生物降解性的研究, 尤其是对高氯代苯, 国内外文献报道很少。有关研究表明, 在厌氧生物处理过程中加入易生物降解的有机物[如葡萄糖和有机酸(Volatile Fatty Acids, 简称 VFA)等]可提高难降解有机物的生物降解性<sup>[6-7]</sup>。笔者从 CBs 降解微生物培养、驯化入手, 以传统的完全混合连续流培养方式, 用葡萄糖和有机酸(甲酸、乙酸、丙酸和丁酸)为惟一碳源进行厌氧培养, 研究添加不同碳源对厌氧微生物产甲烷活性的影响, 旨在为高效生产甲烷提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 接种污泥** 接种污泥取自广州市大坦沙污水处理厂一级厌氧消化池。

**1.2 装置与材料** 连续流试验装置示意如图 1 所示。整个试验装置、操作过程, 严格厌氧密封。将配好的营养液分装

在 6 个聚乙烯瓶中, 加入不同碳源, 并向营养液中充入氮气尽可能除去溶解氧, 然后放入 4℃ 冰箱通过恒流蠕动泵注入反应器中; 反应器体积为 3.2 L, 其中液相体积 3.0 L; 通过恒温磁力搅拌器, 使反应液完全混合, 由电接点式玻璃液体温度计控制反应温度在 35℃, 控制反应器 pH 值, 厌氧连续培养 120 d; 气体吸收装置中装有 3 mol/L 的 NaOH 溶液, 使其中的 CO<sub>2</sub> 被碱液吸收, 产生的沼气通过带刻度的 PVC 管计量。



注: 1. 培养基储瓶; 2. 恒流蠕动泵; 3. 反应瓶; 4. 恒温磁力搅拌器; 5. 电接点式玻璃液体温度计; 6. 废水瓶; 7. 气体吸收装置。

Note: 1. Medium storage bottle; 2. Permanent current creep pump; 3. Reaction bottle; 4. Permanent temperature magnetic agitator; 5. Electron contact glass-stem thermometer; 6. Waste water bottle; 7. Gas absorption device.

图 1 连续流试验装置示意

Fig. 1 Continues-flowing experimental equipment

**1.3 方法** 厌氧混合连续培养 120 d, 期间不断加大负荷, 培养过程控制条件见表 1。培养过程中连续检测水的 pH 值、葡萄糖和有机酸含量、SS 和 VSS 含量、产气量, 120 d 后厌氧微生物的活性趋于稳定。

**1.4 数据测定** pH 值用精密 pH 计测定; VSS 用重量法测定, 采用英国 Whatman 公司生产的 GF/F 玻璃微纤维滤纸; 葡萄糖采用蒽酮法测定; 甲酸采用离子色谱法测定; 乙酸、丙

**基金项目** “985”二期基金项目(2005-90004-3172000); 中山大学重点资助项目(32000-3253282)。

**作者简介** 李顺义(1976-), 男, 河南洛阳人, 博士, 讲师, 从事环境生物技术的教学与研究。

**收稿日期** 2009-03-20

酸、丁酸采用气相色谱法(岛津 GC214C, FID 检测器)测定<sup>[8-11]</sup>。

表1 厌氧培养过程控制条件

Table 1 The conditions of anaerobic culture

碳源 Carbon source	pH 值 pH value	不同培养期水力停留时间(HRT) //d HRT in different culture periods			反应温度(T) //℃ Reaction temperature	碳源浓度 //mg/L Carbon source concentration
		0~60 d	60~90 d	90~120 d		
		葡萄糖(Glu) 产酸 Acid production	4.5~5.0	15		
产甲烷 Methane production	7.2~7.5	15	10	6	35	1 000
有机酸(VFA) 甲酸 Formic acid	7.2~7.5	15	10	6	35	500
乙酸 Acetic acid	7.2~7.5	15	10	6	35	500
丙酸 Propionic acid	7.2~7.5	15	10	6	35	500
丁酸 Butyric acid	7.2~7.5	15	10	6	35	500

2 结果与分析

2.1 各厌氧培养过程中微生物的变化 表2为厌氧葡萄糖和有机酸培养微生物分别在培养第5天、第60天和第120天时SS和VSS以及VSS/SS的变化情况。由于试验装置为完全混合连续流培养,进水为营养液,因此随着培养的进行,污泥流失,经过120d的培养各个培养过程消化污泥量都明显减少,但其减少的速度不同,SS减少的速度大于VSS,因此VSS的量相对增加。VSS/SS的值不断增大,说明污泥活性不断增强,到120d污泥活性趋于稳定。

厌氧产甲烷过程SS和VSS减少量最多,由5d至培养成熟的120d,SS和VSS量分别减少93%和83%,而VSS/SS比值增加,由培养初期的0.358升高到培养成熟的0.863。厌氧培养过程中葡萄糖产甲烷培养污泥活性的增加最为明显,经过120d培养,VSS/SS的值比培养第5天增加141.1%,其次是葡萄糖产酸培养增加41.9%、丙酸培养增加35.0%、丁酸培养增加29.2%、乙酸培养增加23.4%及甲酸20.6%。

2.2 厌氧培养产甲烷活性试验 该研究厌氧消化过程中累积产沼气(甲烷气)的量间接反映了各厌氧培养过程中微生物的活性程度,试验结果见图2。

表2 不同培养时期各种培养污泥的变化

Table 2 Sludge conditions in different culture periods

培养方式 Cultivation ways	培养时间 //d Cultivation time	SS mg/L	VSS mg/L	VSS/SS
甲酸 Formic acid	5	20 090	4 872	0.243
	60	17 990	4 621	0.257
	120	14 117	4 320	0.306
乙酸 Acetic acid	5	19 800	7 346	0.371
	60	17 010	7 297	0.429
	120	15 100	6 915	0.458
丙酸 Propionic acid	5	16 800	6 574	0.391
	60	8 769	4 333	0.494
	120	3 340	1 765	0.528
丁酸 Butyric acid	5	17 600	5 720	0.325
	60	14 210	5 172	0.364
	120	9 100	3 825	0.420
葡萄糖产酸 Acid produced by glucose	5	15 600	4 696	0.301
	60	9 300	3 543	0.381
	120	7 120	3 040	0.427
葡萄糖产甲烷 Methane produced by glucose	5	16 010	5 731	0.358
	30	8 798	4 672	0.531
	60	3 332	2 642	0.793
	120	1 120	967	0.863

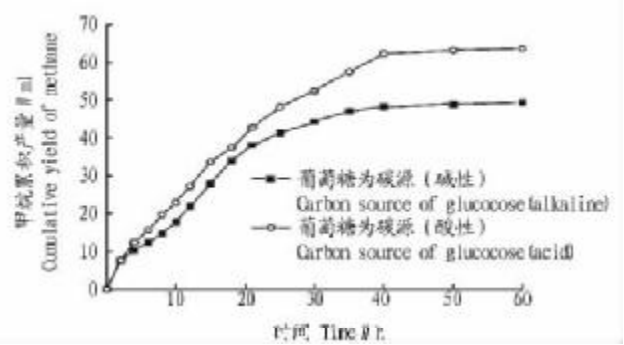
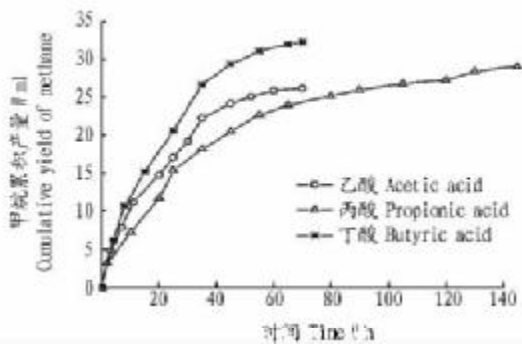


图2 各厌氧过程中甲烷累积产量

Fig. 2 The cumulative yield of methane in the anaerobic cultures

由图2可知,在有机酸为基质的厌氧活性试验中,相同的基质浓度条件下,其甲烷累积量是不同的,丁酸和乙酸培养中,到35h增长缓慢趋于稳定,丁酸甲烷产量最高为32.3ml,乙酸为26.0ml;丙酸培养中,甲烷累积含量到150h仍在上升,还没有趋于稳定,其含量在两者之间。在葡萄糖做基质的两种培养过程中,在前25h甲烷累积含量相差不是很大,趋势基本一致。厌氧产甲烷在40h时,甲烷累积产量趋于稳定,其最高累积产量为65ml;厌氧产酸在35h时,甲烷

累积产量趋于稳定,其最高累积产量为50ml。

2.3 厌氧培养过程中动力学特征 由表2可知,随着培养时间的推移,各培养过程中SS和VSS的量显著减少,而VSS/SS增加,这只能定性推断对象微生物的活性增加。表3可以定量地说明对象微生物的活性是增加的。

由表3可知,培养初期第5天微生物分解速度至第120天培养成熟时的分解速度,均增加了2倍以上。增速最快的为厌氧产甲烷过程,其利用基质的速度增加了3.25倍,利用

基质增速最慢的丙酸为 1.96 倍。

表 3 厌氧培养过程基质变化的动力学方程

Table 3 The kinetics equation of substrate changes in the anaerobic culture process

培养方式 Cultivation styles	时间//d Time	动力学方程 Kinetics equation	$k_i$	$R^2$
乙酸 Acetic acid	5 60 120	$y = -5.2549x + 480.36$ $y = -8.5128x + 502.74$ $y = -10.4970x + 503.91$	5.2549 8.5128 10.4970	0.9667** 0.9901** 0.9911**
丙酸 Propionic acid	5 60 120	$y = -1.7488x + 497.79$ $y = -3.0536x + 487.71$ $y = -3.4277x + 469.91$	1.7488 3.0536 3.4277	0.9900** 0.9904** 0.9714**
丁酸 Butyric acid	5 60 120	$y = -6.4378x + 474.23$ $y = -10.5030x + 465.98$ $y = -16.6990x + 443.21$	6.4378 10.5030 16.6990	0.9884** 0.9856** 0.9263**
厌氧产酸 Acid produced by anaerobic	5 60 120	$y = -14.7190x + 875.94$ $y = -25.0420x + 900.03$ $y = -33.7590x + 912.47$	14.7190 25.0420 33.7590	0.9355** 0.9590** 0.9597**
厌氧产甲烷 Methane produced by anaerobic	5 30 60 120	$y = -16.7410x + 980.57$ $y = -24.4060x + 922.85$ $y = -33.6210x + 920.82$ $y = -54.4070x + 968.84$	16.7410 24.4060 33.6210 54.4070	0.9958** 0.9636** 0.9543** 0.9879**

注: \*\*表示 0.01 极显著相关。

Note: \*\* means 0.01 significant correlation.

有机酸中,利用丙酸的产氢产乙酸菌分解丙酸速度最慢,至培养成熟期的 120 d 时,振荡培养 150 h,丙酸仍未完全分解,其分解速率常数最大为 3.4277;而丁酸在第 30 小时已被彻底分解完全,其分解速率常数也是最快的, $k_i$  为 16.6990,是丙酸的 4.87 倍。这是因为在产乙酸的反应中,丙酸需在比丁酸更低的氢分压下才能分解为乙酸(丙酸分解要求  $P_{H_2} < 10^{-4.0}$  atm;丁酸分解要求  $P_{H_2} < 10^{-2.5}$  atm)<sup>[12]</sup>,所以其降解较慢。利用乙酸的甲烷菌分解乙酸的速率也较慢,其分解速率常数为 10.4970,在 5 种厌氧培养过程中其分解基质的速率仅高于丙酸。

两种葡萄糖培养,微生物的活性明显高于利用有机酸培养。厌氧产酸和产甲烷分别是有机酸中分解最快的丁酸的 2.02 倍和 3.26 倍。葡萄糖产甲烷培养的微生物活性比葡萄糖产酸培养的微生物活性增加得快。在培养第 120 天的微生物活性试验中,产甲烷微生物在 15 h 就可将葡萄糖由 1 000 mg/L 降到 100 mg/L,而产酸微生物在同样的时间只能将葡萄糖由 1 000 mg/L 降到 330 mg/L,而且产甲烷利用葡萄糖的速度是产酸的 1.61 倍。

一般认为,在条件适当的情况下,厌氧培养需经过 3~6 个月才能获得成熟污泥<sup>[13-15]</sup>。该研究在消化污泥厌氧培养 4 个月后,即 120 d 开始毒性试验。

### 3 结论

(1) 以有机酸和葡萄糖为基质的厌氧连续流培养中,SS

和 VSS 均有不同程度的减少,但 VSS/SS 的值增加,说明对象微生物在增加。其 VSS/SS 值增加的大小次序为:厌氧产甲烷 > 厌氧产酸 > 丙酸甲烷菌(产氢产乙酸菌) > 丁酸甲烷菌(产氢产乙酸菌) > 乙酸甲烷菌 > 甲酸产甲烷菌。

(2) 厌氧培养过程中,以甲烷累积量间接反映微生物活性。以葡萄糖为基质,厌氧产甲烷 > 厌氧产酸;以有机酸为基质,利用丙酸的速度最慢,至 150 h 甲烷累积量仍在增加,还没有趋于稳定,利用丁酸的产氢产乙酸菌 > 乙酸的甲烷菌。

(3) 基质分解的动力学方程可定量说明各厌氧培养过程中厌氧微生物利用各自基质的速度,即微生物的活性大小,至 120 d 培养成熟期,其  $k_i$  的大小次序为:厌氧产甲烷 > 厌氧产酸 > 丁酸甲烷菌 > 乙酸甲烷菌 > 丙酸甲烷菌(产氢产乙酸菌)。

### 参考文献

- [1] VAN AGTEREN M H, KEUNING S, JANSSEN D B. Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds [M]. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998: 363 - 378.
- [2] 钱易, 汤鸿霄, 文湘华, 等. 水体颗粒物和难降解有机物的特性与控制技术原理(下卷: 难降解有机物) [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2000.
- [3] RAMMAND R, BALBA M T, DUFFY J. Reductive dehalogenation of chlorinated benzenes and toluenes under methanogenic condition [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 3266 - 3272.
- [4] HOLLIGER C, SCHRAA G, STAMS A J, et al. Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dehalogenating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene [J]. App Environ Microbiol, 1992, 58: 1636 - 1644.
- [5] MIDDELDOORP P J, JOHAN DE WOLF, ZEHNDER A J B, et al. Enrichment and properties of a 1,2,4-trichlorobenzene dechlorinating methanogenic microbial consortium [J]. App Environ Microbiol, 1997, 63: 1225 - 1229.
- [6] TAKASHI KAMEYA, TAKESHI MURAYAMA, MASARU KITANO. Testing and classification methods for the biodegradabilities of organic compounds under anaerobic conditions [J]. The Science of the Total Environment, 1995, 170: 31 - 41.
- [7] 杨晓奕, 蒋展鹏, 师绍琪. 乙二胺四乙酸(EDTA)生物降解特性 [J]. 环境科学, 2001, 22(2): 41 - 45.
- [8] JIA X S, FURUMAI H, FANG H H P. Extracellular polymers of hydrogen utilizing methanogenic and sulfate-reducing sludges [J]. Water Research, 1996, 30: 1439 - 1444.
- [9] JIA X S, FANG H H P. Methanogenic characteristics of formate utilizing sludge. Journal of environmental engineering [J]. American Society of Civil Engineers (ASCE), 1999, 125(7): 596 - 601.
- [10] REINEKE W, KNACKMUSS H J. Evaluation of cleaning strategies for removal of biofilms from Reverse-Osmosis membranes [J]. Appl Environ Microbiol, 1984, 2: 395 - 402.
- [11] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [12] 贺延龄. 废水的厌氧生物处理 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [13] 丁丽丽, 任洪强, 华照哲, 等. 内循环式厌氧反应器启动过程中颗粒污泥的特性 [J]. 环境科学, 2001, 22(3): 30 - 34.
- [14] 刘双江, 胡纪萃, 顾夏声. UASB 反应器处理含蛋白质废水颗粒污泥形成的研究 [J]. 环境科学, 1999, 12(3): 7 - 11.
- [15] 周律, 张孟青. UASB 反应器快速启动的实验研究 [J]. 环境科学, 1996, 17(2): 54 - 57.