

文章编号:0253-9993(2012)08-1359-05

微生物增产煤层气菌种的驯化

林 海,隋梦琪,汪 涵

(北京科技大学 土木与环境工程学院,北京 100083)

摘要:采用厌氧培养方法,从厌氧污泥样品中富集出了产甲烷菌群,仅以煤为碳源对其进行驯化,得到了可以利用煤产甲烷的厌氧菌群。研究了该菌种利用煤产气的规律及常规碳源对菌种产气的影响。结果揭示:驯化后菌种对煤的利用能力显著提高,适应期由15 d缩短到6 d;产气量也显著增加。菌种产气具有规律性,产气周期共28 d,可分为3个阶段:适应期、产气期和稳定期。100 mL底物质量浓度为20 g/L的培养液总产气量达到182 mL,气体中的甲烷浓度约为16%。单日产气量呈先增加后减少的趋势,其中15~17 d的产气量最大,达到20 mL/d。菌种可以利用乙酸钠和甲醇产气,乙酸钠对菌种利用煤产气的增加效果更显著。

关键词:煤层气;产甲烷菌;增产;菌种驯化

中图分类号:P618.11 **文献标志码:**A

Domestication of microbially enhanced coalbed methane microorganism

LIN Hai, SUI Meng-qi, WANG Han

(School of Civil and Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: A methanogenic strain was obtained from anaerobic sludge. The strain was cultivated anaerobically with coal as solo carbon resource. The methanogenesis regulation of coal consumed by the strain and the influence of conventional carbonaceous substrates on gas production were investigated. It is found that adaptive phase is decreased from 15 days of original strain to 6 days of acclimated strain. The gas production is greatly raised as well. A 28 days' gas production cycle can be divided into three phases, adaptive phase, gas-producing phase and stable phase. The total amount of gas produced by 100 mL substrate is 182 mL which comprises 16% methane. Daily gas production increases at the beginning and then decreases. During 15th day to 17th day, gas production reaches the peak amount of 20 mL/day. The strain can also make use of sodium acetate and methanol to produce gas. However, sodium acetate has a better prompting effect on gas production of coal consumed by the strain.

Key words: coalbed methane; methanogen; increase production; microorganism domestication

煤层气的排放不但浪费了资源,也加重了全球气候变暖。近年来,随着世界能源局势持续紧张,人们已经认识到煤层气是一种热值高、污染少、安全性好的清洁、经济的能源,治理思路也逐渐由“抽排”转向“利用”^[1]。20世纪70年代以来,世界上一些主要产煤国家纷纷涉足这一领域,在勘探开发理论与开采应用技术方面进行了大量的研究与试验工作,取得了突出的成就,使这一产业得到了快速发展^[2]。近年来

我国井下煤层气抽采利用活跃,煤层气抽采量逐年增大,然而抽采率和利用率低的现状大大限制了我国井下煤层气工业的发展,造成每年大量煤层气资源的排空浪费^[3]。

目前国内外采取的煤层气增产技术^[4-6]主要有:水力压裂改造技术、煤中多元气体驱替技术和定向羽状水平钻井技术等。1999年,Scott就已提出了微生物增产煤层气(Microbially Enhanced Coalbed Meth-

ane)的概念,并将其定义为将厌氧微生物种群及其所需营养物质注入到煤层中^[7]。他指出,这一技术不但存在产出新煤层气的资源潜力,同时微生物的降解作用可以增加煤层的渗透性,有利于煤层气的开采。该技术在我国尚属萌芽阶段,许多学者和研究单位已经注意到此先进技术的重要性。

本实验为微生物增产煤层气技术的基础研究,对厌氧污泥中的产甲烷菌群进行富集活化和仅以煤为碳源的驯化,得到可以利用煤产甲烷的厌氧微生物菌群,并研究该菌群对常规碳源的利用情况,为该技术的后续研究提供参考。

1 试 验

1.1 样 品

煤样采自于河南某煤矿,粉末状,属软褐煤,具有富氢、富氧、富氮等基本特征,生物化学活性好,有利于微生物产气实验。菌种为采自北京小红门污水处理厂厌氧消化罐的厌氧污泥。

1.2 培养基

富集培养基: KH_2PO_4 (0.4 g/L), K_2HPO_4 (0.4 g/L), KCl (0.2 g/L), NaCl (2.0 g/L), NH_4Cl (1.0 g/L), MgCl_2 (2.0 g/L), 酵母浸入液 (1.0 g/L), 乙酸钠 (2.0 g/L), 刃天青 (0.1%) 1 mL/L, 维生素溶液 10 mL/L, 微量元素溶液 10 mL/L。培养基 pH 值调节至 7.0。

驯化培养基: KH_2PO_4 (0.4 g/L), K_2HPO_4 (0.4 g/L), KCl (0.2 g/L), NaCl (2.0 g/L), NH_4Cl (1.0 g/L), MgCl_2 (2.0 g/L), 乙酸钠 (2.0 g/L), 酵母浸入液 1.0 g, 煤 0.5 ~ 2.5 g, 刃天青 (0.1%) 1 mL/L, 维生素溶液 10 mL/L, 微量元素溶液 10 mL/L。培养基 pH 值调节至 7.0。

微量元素溶液: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3.0 g/L), NaCl (1.0 g/L), FeSO_4 (0.1 g/L), MnSO_4 (0.5 g/L), CaCl_2 (0.1 g/L), CuSO_4 (0.01 g/L), CoCl_2 (0.1 g/L), $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ (0.01 g/L), NiCl_2 (0.1 g/L), Na_2MoO_4 (0.05 g/L), ZnSO_4 (0.1 g/L), H_3BO_3 (0.05 g/L), 氨基乙酸 (1.5)^[8]。

维生素溶液: 生物素 2 mg/L, 叶酸 2 mg/L, 盐酸吡哆醇 10 mg/L, 核黄素 5 mg/L, 硫胺素 5 mg/L, 尼古酸 (烟酸) 5 mg/L, 泛酸钙 5 mg/L, 对氨基苯甲酸 5 mg/L, 硫辛酸 5 mg/L, 钴胺素 (维生素 B_{12}) 0.1 mg/L。

微量元素溶液和维生素溶液配好后用 $\phi 0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤除菌, 放入 4 °C 的冰箱中储存待用。

无氧 Na_2S (1%) 和 NaHCO_3 (5%) 混合液的配制^[9]: 在 50 mL 的厌氧瓶中配制 40 mL 溶液, 加入干燥 Na_2S 0.4 g, 无水 NaHCO_3 2.0 g, 插入高纯氮气针头, 驱除空气 5 ~ 10 min 后, 用注射器注入已除氧的蒸馏水 40 mL, 抽出氮气针头的同时塞紧胶塞, 用铝盖密封, 120 °C 灭菌 20 ~ 30 min。

培养基在接种前, 每 100 mL 的培养基加入 2 mL 的无氧 Na_2S (1%) 和 NaHCO_3 (5%) 混合液作为还原剂。

培养基的除氧及分装: 将配制好的液体培养基倒入一个平底三角烧瓶中并在电热炉上加热, 同时通入高纯氮气 (99.99%) 驱除空气, 当气体通过煮沸的培养基表面约 10 min 完全无氧时 (刃天青由紫红色变为无色), 迅速分装入血清瓶。移入时用无菌注射器, 采用平头兽用针头, 将注射器和针头放入煮沸的培养基内部, 同时用氮气吹培养基容器和瓶, 旋紧瓶塞。120 °C 灭菌 15 min。

1.3 培养方法

1.3.1 菌种的富集

为恢复产甲烷菌的产气活性, 对取回的菌种进行富集培养。采用无氧操作向血清瓶中分装 100 mL 培养基和 2 mL 的还原性溶液, 接入 10 mL 的污泥上清液, 在 35 °C, 130 r/min 下培养 15 d, 采用排水法收集气体, 然后用气相色谱检测是否有 CH_4 产生。一次富集培养完成后, 将富集培养液转入新的液体培养基中再富集, 转接 4 次。

1.3.2 富集菌种产气

为考察未经驯化菌种对煤的适应和利用情况, 将 10 mL 富集菌种接种到 100 mL 驯化培养基中, 加入粒径 < 200 目的煤样 2.5 g, 在 35 °C, 130 r/min 的条件下排水产气。与驯化后的菌种进行产气规律的对比。

1.3.3 菌种驯化

采用逐级连续传代驯化法^[10]对富集得到的混合菌株进行仅以煤为碳源的驯化。

驯化初始底物的质量浓度为 5 g/L, 以 5 g/L 的底物为浓度梯度向上递增, 每批次菌液传代转接量为 10%, 直至底物的质量浓度为 25 g/L。共分为 7 个批次, 每个批次周期为 28 d, 并采用排水法收集气体, 记录每日产气量。取最后驯化阶段的培养液进行扩大富集培养, 得到可以仅利用煤为碳源的产甲烷菌优势混合菌群。具体操作见表 1。

1.3.4 驯化菌种的产气实验

以煤为碳源进行驯化后混合菌产气规律的研究, 将 100 mL 富集培养基按无氧操作的方法分装到

125 mL 的血清瓶中,在通氮气的条件下接入 2 g 煤样(<100 目)并加入 2 mL 还原性溶液,然后接种 10 mL 菌种,在 35 ℃,140 r/min 下培养,平行两组。另取一个血清瓶不加煤作为空白。采用排水法收集气体,记录每天产气量及累计产气量,并用气相色谱测定气体中的甲烷浓度。

表 1 菌种驯化

Table 1 Microorganism domestication

驯化次数	煤样加入量/ (g · L ⁻¹)	煤样粒 径/目	驯化时 间/d
1	5	<200	28
2	5	<200	28
3	10	<200	28
4	15	<150	28
5	20	<150	28
6	25	<100	28
7	25	<100	28

1.3.5 常规碳源对菌种产气的影响实验

有研究表明,厌氧生物处理过程中加入易生物降解的有机物可提高难降解有机物的生物降解性^[11-12]。本实验旨在研究添加不同碳源对菌种利用煤产甲烷的影响。

(1) 乙酸钠对菌种产气量的影响实验。向血清瓶中加入 100 mL 培养基,分别加入煤 2 g,乙酸钠 0.5 g,再加入还原剂混合液 2 mL,并在通氮气的情况下各接入 10 mL 菌种。在 35 ℃,140 r/min 的条件下培养 28 d,采用排水法收集气体,记录每天和累计产气量。

(2) 甲醇对菌种产气量的影响实验。向血清瓶中加入 100 mL 培养基,分别加入煤 2 g,甲醇 0.4 g,然后加入还原剂混合液 2 mL,并在通氮气的情况下接入 10 mL 菌种。在 35 ℃,140 r/min 的条件下培养 28 d,采用排水法收集气体,记录每天和累计产气量。

(3) 乙酸钠投加量对菌种产气的影响实验。向血清瓶中加入 100 mL 培养基和 2 g 煤,分别加入 0.2,0.5,1.0 g 乙酸钠,再加入还原剂混合液 2 mL,并在通氮气的情况下接入 10 mL 菌种。在 35 ℃,140 r/min 的条件下培养 28 d,采用排水法收集气体,每天记录产气量。

1.4 检测方法

采用 HP6890 气相色谱仪进行气体产物的分析。载气:He 8.3 mL/min;分流比:2.5 : 1;色谱柱:30 m × 0.53 mm × 40 μm PLOT Q,30 m × 0.53 mm × 25 μm PLOT5A MS;进样器温度:150 ℃;检测器:TCD 热导

检测器;柱温:30 ℃。

2 结果与讨论

2.1 菌种的富集和驯化

由图 1 可以看出,随驯化次数的增加,菌种的累计产气量呈逐渐上升至趋于平缓的趋势。未经驯化时,菌种利用煤的产气量为 30 mL,驯化到第 7 次时,产气量已达到 260 mL。这说明驯化对提高产气量作用明显,驯化效果较好。

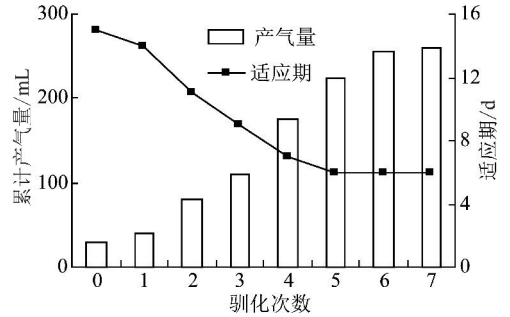


图 1 菌种的驯化结果

Fig. 1 Results of domestication efficiency

同时随着驯化次数的增加,菌种的适应期显著缩短,未经驯化时 15 d,第 5 次驯化时已缩短到 6 d,说明菌种已经可以很好地适应煤并利用其产气。继续驯化,适应期不再缩短,说明要大量产气,需经过 6 d 的适应期。

这种现象可用菌种 3 段产甲烷理论来解释:在煤层气的微生物产出过程中,产甲烷菌不具有直接分解煤颗粒的能力,要生成甲烷需有一个前期阶段,即主要依靠水解发酵菌和还原菌分解类脂化合物和大分子聚合物,如纤维素和蛋白质等;接着微生物进一步脱去长链酸中的氢而生成氢、甲酸、乙酸、二氧化碳和醇等^[13],产甲烷菌由此取得碳源和营养而生存,并以此为基质进行生物化学和新陈代谢作用产生甲烷^[14]。

2.2 驯化后菌种的累积产气及单日产气规律

由图 2 可见,产气周期内完整培养液的累计产气总量达到 182 mL,甲烷浓度约为 16%。空白的产气量为 116 mL,即说明菌种可以利用煤产气,为 66 mL。煤层气的累计产出具有规律性,可归结为 3 个阶段:第 1 阶段为 6 d 的适应阶段,称为适应期,是菌种对煤的适应和分解阶段,菌种产气量很小或基本不产气;第 2 阶段为 21 d 左右的产气阶段,称为产气期,是菌种利用分解物产气的阶段,产气量随时间逐渐增加;第 3 阶段从第 27 d 开始,为稳定阶段,称为停滞期,产气量基本稳定,不再增加,是产气逐渐终止的阶

段。这与微生物周期内的生长情况相对应,也反映出菌种活性的变化。与王爱宽等^[15]对煤中本源产甲烷菌的模拟产气研究结果是吻合的。

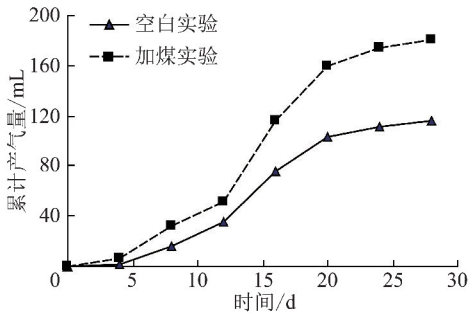


图2 驯化后菌种累积产气量曲线

Fig. 2 Curves of gas production rate after domestication

菌种的单日产气量呈先增加后减少的趋势,在一个产气周期内,15~17 d的产气量最大(图3)。在产气初期,随着产甲烷菌数量的增加、活性的增强,代谢速度加快,单日产气量也逐渐上升;但随着代谢产物和有毒物质逐渐累积,代谢速度开始逐渐降低,产气量也逐日减少。因此,单日产气量也从一定程度上反映出菌种的生长状况和活性。

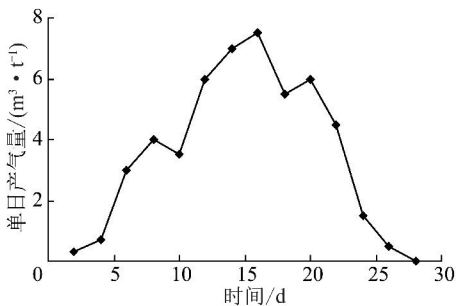


图3 菌种的单日产气规律曲线

Fig. 3 Curve of everyday gas production rate after domestication

2.3 碳源对菌种产气的影响

图4为乙酸钠对菌种产气量的影响,可以看出,菌种可利用乙酸钠产气,28 d的产气量达到170 mL,且产气规律与菌种利用煤的相似。煤和乙酸钠联合作为碳源比仅以煤为碳源的产气量显著增加。实验结束时,联合碳源的产气量达到了240 mL,比仅以煤为碳源增加了58 mL。且加入乙酸钠后,加速了前期的产甲烷速率。

分析原因可能有:首先,菌种本身可以利用乙酸钠,从而使总产气量增加;其次,乙酸钠为菌种产甲烷过程的中间产物,它的加入增加了菌种可利用的底物浓度,促进了培养基中微生物反应向甲烷生成的方向进行,使产气量大大增加;再次,乙酸钠的加入促进了菌种对煤的利用,使总产气量增加。

由图5可见,菌种可利用甲醇产气,28 d的产气

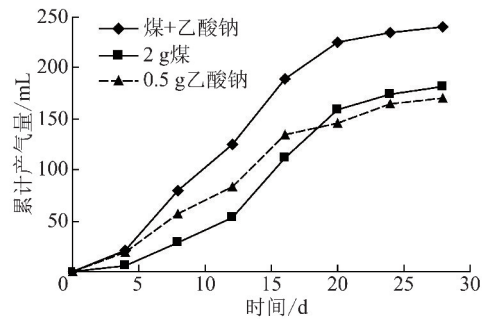


图4 乙酸钠对比产气曲线

Fig. 4 Curves of gas production rate of sodium acetate

量达到128 mL。产气规律与利用煤的相似。煤和甲醇联合作为碳源比仅以煤为碳源的产气量有所增加,但增加量不大,实验进行到28 d时,联合碳源的产气量达到了204 mL,比仅以煤为碳源增加了22 mL,促进产气效果远不如乙酸钠。

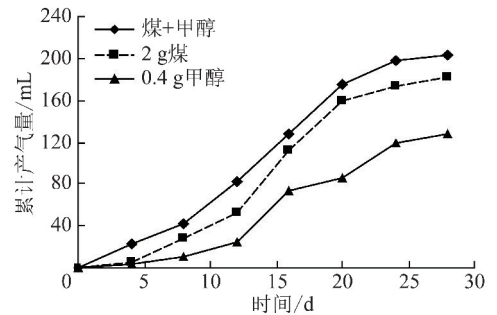


图5 甲醇对比产气曲线

Fig. 5 Curves of gas production rate of carbinol

原因可能有两方面:首先,甲基化合物是产甲烷菌可利用合成甲烷的底物,可以促进甲烷细菌的生长,故加入甲醇之后产气量有所增加;但醇类本身对菌种具有毒性作用,它的加入也会抑制菌种的生长,从而影响产气量。

由图6可见,随着乙酸钠投加量的增加,产气量也逐渐增加。投加0.2,0.5,1.0 g乙酸钠的产气量分别达到190,240,262 mL。添加0.5 g相对添加0.2 g乙酸钠的产气量增加50 mL,增幅较大;添加

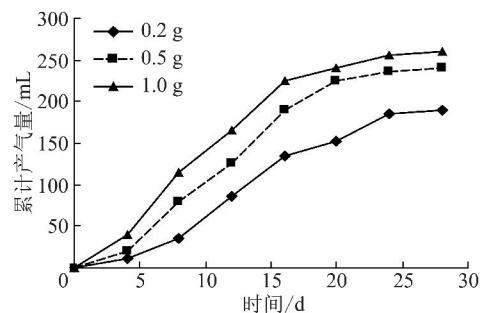


图6 乙酸钠投加量对菌种产气的影响曲线

Fig. 6 Curves of gas production rate with sodium acetate increase

1.0 g 相对添加 0.5 g 乙酸钠的培养基产气量增幅较小,为 22 mL。说明乙酸钠的投加对菌种产气量地增加并不是呈直线上升的。综合成本和产气量考虑,每 100 mL 培养基投加 0.5 g 乙酸钠是合适的,即 5 g/L。

3 结 论

(1)产甲烷菌经 7 次驯化后,对煤的利用能力显著提高,适应期由 15 d 缩短到 6 d;产气量也显著增加,由未经驯化时的 30 mL 增至 260 mL。单次驯化效率随驯化次数的增加呈现先增加后降低的趋势,第 4 次驯化效率最高,为 62 mL。

(2)产气具有规律性,产气周期共 28 d,可分为 3 个阶段:适应期、产气期和稳定期。100 mL 底物质量浓度为 20 g/L 的培养液总产气量达到 182 mL。甲烷浓度约为 16%。单日产气量呈先增加后减少的趋势,其中 15~17 d 的产气量最大,达到 8 mL。

(3)菌种可以利用乙酸钠和甲醇产气,乙酸钠对菌种利用煤产气的增加效果更显著。随着乙酸钠加入量的增加,产气量也逐渐增大,当添加量为 1.0 g/100 mL 培养基时,产气量相对于只以煤为碳源的培养基增加了 80 mL。

参考文献:

- [1] 司光耀,蔡武,张强.国内外煤层气利用现状及前景展望[J].煤,2009,18(2):23-25.
- [2] 翟成,林柏泉,王力,等.我国煤矿井下煤层气抽采利用现状及问题[J].天然气工业,2008,28(7):23-26.
- Zhai Cheng, Lin Baiquan, Wang Li, et al. Status and problems of drainage and utilization of downhole coalbed methane in coal mines in China[J]. Natural Gas Industry, 2008, 28(7): 23-26.
- [3] 严绪朝,郝鸿毅.国外煤层气的开发利用状况及其技术水平[J].石油科技论坛,2007(6):24-30.
- [4] 杨陆武,孙茂远.中国煤层气藏的特殊性及其开发技术要求[J].天然气工业,2002,21(6):17-19.
- Yang Luwu, Sun Maoyuan. Peculiarities of China CBM reservoirs and their dictation on CBM production technology[J]. Natural Gas Industry, 2002, 21(6): 17-19.
- [5] 王东浩,郭大立,计勇,等.煤层气增产措施及存在的问题[J].煤,2008,17(12):32-35.
- [6] 张亚蒲,杨正明,鲜保安.煤层气增产技术[J].特种油气藏,2006,13(1):95-99.
- Zhang Yapu, Yang Zhengming, Xian Baoan. Coalbed gas stimulation

technology[J]. Special Oil Gas Reservoirs, 2006, 13(1): 95-99.

- [7] Scott A R. Improving coal gas recovery with microbially enhanced coalbed methane[A]. Mastalerz M Glikson, M Golding S D. Coalbed Methane: Scientific, Environmental and Economic Evaluation[C]. Kluwer, Dordrecht, 1999: 89-110.
- [8] 龚建明,曹志敏,陈建文,等.沉积物产气量的模拟实验[J].中国科学(D辑:地球科学),2009,39(2):204-211.
- Gong Jianming, Cao Zhimin, Chen Jianwen, et al. Simulated experiment on gas production rate of sediment in natural gas hydrate found area[J]. Science in China (Series D: Earth Sciences), 2009, 39(2): 204-211.
- [9] 李立峰,李永峰,高大文.制药废水中产甲烷菌的分离与鉴定[J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2008,24(1):29-31.
- Li Lifeng, Li Yongfeng, Gao Dawen. Separation and identification of methanogen in pharmaceutical wastewater[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2008, 24(1): 29-31.
- [10] 李明宅,张洪年,刘华,等.生物气模拟实验的进展[J].石油与天然气地质,1996,17(2):117-122.
- [11] Takashikameya, Takeshimurayama, Masarukitano. Testing and classification methods for the biodegradabilities of organic compounds under anaerobic conditions[J]. The Science of the Total Environment, 1995, 170: 31-41.
- [12] 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.
- Yang Xiaoyi, Jiang Zhanpeng, Shi Shaoqi. Biodegradation behavior of ethylenediaminetetraethylene acid[J]. Chinese Journal of Environmental Science, 2001, 22(2): 41-45.
- [13] 丁安娜,王明明,李本亮,等.生物气的形成机理及源岩的地球化学特征——以柴达木盆地生物气为例[J].天然气地球科学,2003,14(5):402-407.
- Ding Anna, Wang Mingming, Li Benliang, et al. Biogas forming mechanism and geochemical characteristics of its source rock[J]. Natural Gas Geoscience, 2003, 14(5): 402-407.
- [14] 刘洪林,李贵中,王红岩,等.西北低煤阶盆地生物成因煤层气成藏模拟研究[J].石油实验地质,2006,28(6):600-603.
- Liu Honglin, Li Guizhong, Wang Hongyan, et al. Study on simulation of biogenic coalbed methane in the low coal rank basins in Northwestern China[J]. Petroleum Geology & Experiment, 2006, 28(6): 600-603.
- [15] 王爱宽,秦勇,林玉成,等.褐煤中天然产甲烷菌富集培养与生物气产出模拟[J].高校地质学报,2010,16(1):80-85.
- Wang Aikuan, Qin Yong, Lin Yucheng, et al. Enrichment and cultivation of natural methanogen and simulation of biogenetic gas generation from brown coal samples[J]. Geological Journal of China Universities, 2010, 16(1): 80-85.