

产氢产乙酸和产甲烷反应对厌氧消化的限速作用

王祥锟¹, 闵祥发², 李建政^{1*}, 张玉鹏¹ (1. 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150090; 2. 哈尔滨辰能工大环保科技股份有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150078)

摘要: 为明晰厌氧消化过程的主要限速步骤, 分别以丁酸、乙酸、 H_2/CO_2 为基质, 在 37℃ 和 pH 5.00~9.00 条件下对厌氧活性污泥进行培养, 依据 Shelford 耐受定律对食丁酸产氢产乙酸菌(SBOB)、乙酸营养型产甲烷菌(ACM)和氢营养型产甲烷菌(HTM)的 pH 值生态幅及基质转化速率进行分析。结果表明, SBOB、ACM 和 HTM 的 pH 值生态幅分别为 6.19~8.59、5.50~7.74 和 4.39~9.23, 其代谢最适 pH 值分别为 7.39、6.62 和 6.81。在最适 pH 值条件下, 厌氧活性污泥对丁酸、乙酸、 H_2/CO_2 的转化速率分别为 0.86、1.04 和 1.09 gCOD_{equ}/(gMLVSS·d)。可见, 与产甲烷菌相比, 产氢产乙酸菌的 pH 值生态幅更窄, 基质转化速率更慢, 对厌氧消化过程具有更为显著的限制作用。

关键词: 厌氧消化; 限速步骤; pH 值; 生态幅; 基质转化速率

中图分类号: X172, X703

文献标识码: A

文章编号: 1000-6923(2016)10-2997-06

Rate-limiting of hydrogen-producing acetogenesis to anaerobic digestion compared with methanogenesis. WANG Xiang-kun¹, MIN Xiang-fa², LI Jian-zheng^{1*}, ZHANG Yu-peng¹ (1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. Harbin Chenenergy Hit Environmental Technology Co, LTD, Harbin 150078, China). *China Environmental Science*, 2016, 36(10): 2997~3002

Abstract: To identify the rate-limiting degree of hydrogen-producing acetogenesis and methanogenesis in anaerobic digestion, anaerobic activated sludge sampled from an UASB was cultivated at 37℃ with a series of initial pH ranged from 5.00 to 9.00. With butyric acid, acetic acid and H_2/CO_2 as substrate, respectively, the ecological amplitude of pH and the substrate conversion rate of syntrophic butyrate-oxidizing bacteria (SBOB), aceticlastic methanogens (ACM) and hydrogenotrophic methanogens (HTM) were evaluated according to the Shelford's tolerance law. The results showed that the ecological amplitudes of pH for SBOB, ACM and HTM were 6.19~8.59, 5.50~7.74 and 4.39~9.23, with an optimal pH of 7.39, 6.62 and 6.81 for their metabolism, respectively. With the optimal metabolic pH, the specific conversion rate of butyric acid, acetic acid and H_2/CO_2 by the sludge was 0.86, 1.04 and 1.09 gCOD_{equ}/(gMLVSS·d), respectively. Obviously, the hydrogen-producing acetogens had narrower pH ecological amplitude and lower substrate conversion rate than the methanogens, indicating that hydrogen-producing acetogenesis in the anaerobic activated sludge had a stronger limitation on the anaerobic digestion.

Key words: anaerobic digestion; rate-limiting; pH; ecological amplitude; substrate conversion rate

有机物的厌氧消化是一个复杂的生物转化过程, 需要产酸发酵菌群、产氢产乙酸菌群和产甲烷菌群等多种微生物类群的协同作用共同完成^[1]。这些主要微生物类群在生理生态习性上差别悬殊, 如, 产酸发酵菌群能够在较为宽广的 pH 值生态幅内迅速增殖, 而产甲烷菌群则要求近中性的 pH 值环境, 而且增殖缓慢^[2-3]。所以, 要保证系统的稳定运行, 须维持各类菌群生长环境的协调和代谢速率的平衡^[4]。研究表明, 产甲烷菌群可利用的基质仅有乙酸和一碳化合物, 增殖和代谢

速率缓慢, 且对环境变化敏感, 其产甲烷反应被认为是厌氧消化的限速步骤^[5-6]。有越来越多的研究表明, 营养生态位居于产酸发酵菌群和产甲烷菌群之间的产氢产乙酸菌群, 其环境适应能力和增殖能力都比较差, 其低水平代谢也有可能成为厌氧消化进程的限制因素^[7-8]。然而, 产氢产乙酸

收稿日期: 2016-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51478141); 城市水资源与水环境国家重点实验室(哈尔滨工业大学)自主课题 (2016DX06)

* 责任作者, 教授, ljz6677@163.com

作用与产甲烷作用何者对厌氧消化的限速作用更显著,至今尚不明确^[9-11]。

在有机废水厌氧生物处理系统中,产酸发酵菌群代谢产生的挥发性脂肪酸(VFAs)主要有乙酸、丙酸和丁酸等^[12]。其中,丙酸和丁酸均须由产氢产乙酸菌群将其转化为乙酸和 H_2/CO_2 后才能为产甲烷菌群利用。本文采用厌氧颗粒污泥的间歇培养方法,分别以丁酸、乙酸和 H_2/CO_2 为惟一碳源,研究了食丁酸产氢产乙酸菌(SBOB)、乙酸营养型产甲烷菌(ACM)和氢营养型产甲烷菌(HTM)的 pH 值生态幅及其基质转化速率,并通过对比分析阐述了它们对厌氧消化的限速作用。

1 材料与方法

1.1 接种物

实验所用厌氧颗粒污泥,取自哈尔滨市某大豆蛋白生产企业污水处理站的升流式厌氧污泥床(UASB)反应器。其混合液悬浮固体浓度(MLSS)和挥发性悬浮固体浓度(MLVSS)分别为 63.98 和 36.79 g/L,污泥颗粒直径为 1.0~1.2 mm,发酵葡萄糖的比产甲烷速率为 83.76 mL/(g MLVSS·d)。

将原颗粒污泥用无氧水稀释,加玻璃珠震荡破碎,清洗 3 次后形成的泥水混合物即为接种物,其 MLSS、MLVSS、污泥沉降比(SV)、污泥体积指数(SVI)和 pH 值分别为 3.44 g/L、2.89 g/L、10%、29.10 mL/g 和 7.83。

1.2 静态摇瓶实验

不同基质的甲烷发酵实验,均在容积为 180 mL 的厌氧瓶中进行。每个发酵体系均包含 68 mL 营养液和 7 mL 种泥。其中,以丁酸、乙酸为碳源的发酵体系,分别加有 1.2 g/L 的丁酸和 2.4 g/L 的乙酸,连续充氮 5 min 后封瓶。以 H_2/CO_2 为惟一碳源的发酵体系,在营养液分装和污泥接种完成后,连续充入 H_2/CO_2 (v:v=80:20) 5 min,封瓶。营养液的配制参照文献进行^[13]。由于培养液中含有 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 等酸碱缓冲剂,可保证培养体系在发酵过程中的 pH 值相对稳定。对丁酸、乙酸和 H_2/CO_2 的甲烷发酵测试,均设置 5 个 pH 值梯度,分别为 5.00、6.00、7.00、8.00 和 9.00,每个 pH 值下设置 3 个平行发酵体系。所有发酵体

系构建完成后,置于 37℃、140 rpm 恒温摇床中培养。对于以 H_2/CO_2 为惟一碳源的发酵体系,每 12 h 测定发酵气成分一次;对于以丁酸或乙酸为碳源的发酵体系,每 48 h 测定发酵液中的 VFAs 及发酵气成分一次。

1.3 分析项目及方法

发酵液中的 VFAs 利用 SP6800A 型气相色谱仪(山东鲁南虹化工仪器有限公司)检测,毛细管柱 30 m× Φ 0.32 mm,填充物为 FFAP,柱室温度 160℃,气化室和检测器温度均为 210℃^[14]。发酵气组分(H_2 、 CO_2 和 CH_4)利用 SP6890 型气相色谱仪(山东鲁南虹化工仪器有限公司)测定,不锈钢填充柱 2 m× Φ 3 mm,填充物为 Porapak Q,进样室、TCD 检测器和柱室温度均为 80℃^[14]。

发酵液的 pH 值由 pH 计(DELTA320, Mettler Toledo)测量,MLSS、MLVSS 和 SV 采用标准方法测定^[15]。发酵体系的产气量通过排气法测量,累积产甲烷量按 Owen 法进行计算^[16]。

1.4 数据分析

1.4.1 污泥对基质的转化速率 为比较活性污泥对不同基质的转化速率,将基质丁酸、乙酸和 H_2 换算成当量化学需氧量(COD_{equ} , g/L)^[17]。 COD_{equ} 在线性反应阶段的基质转化速率 $[q_{COD}, gCOD_{equ}/(gMLVSS·d)]$ 由式(1)计算。

$$q_{COD} = \frac{COD_{equ} \cdot V}{\Delta t \cdot X} \quad (1)$$

式中: V 为发酵体系的体积, L; Δt 为线性反应所需时间, d; X 为反应体系的生物量 MLVSS, g。

1.4.2 活性污泥功能菌群 pH 生态幅的定量表达 根据 Shelford 耐受定律,对活性污泥功能菌群的最大基质转化速率与 pH 值之间的关系进行 Gauss Amp 非线性拟合^[18]。Gauss Amp 方程的表达式为:

$$y = A \cdot e^{-\frac{(x-x_c)^2}{2w^2}} + B \quad (2)$$

式中: y 为最大基质转化速率; x 为发酵体系的 pH 值; x_c 为功能菌群代谢的最适 pH 值; w 为功能菌群对 pH 值的耐受度; A 和 B 为常数。 x_c 和 w 可通过实验数据的拟合获得,菌群的 pH 值生态幅参数:适宜 pH 值为 $[x_c - w, x_c + w]$,耐受 pH 值为 $[x_c - 2w, x_c + 2w]$ 。

1.4.3 平行样品的数据处理 气体体积、发酵气成分和挥发酸组分等数据,均取 3 个平行测试的平均值。

2 结果与讨论

2.1 SBOB 的基质转化与产甲烷特性

在不同初始 pH 值条件下,厌氧活性污泥对丁酸的转化和产甲烷特征如图 1 所示。结果表明,当发酵体系初始 pH 值为 7.00 时,SBOB 的活性较强,发酵体系中的丁酸在 18d 内有 96%左右得到转化,在降解曲线的线性阶段(第 8~12d),污泥的丁酸转化速率达到了 $0.40\text{g}/(\text{gMLVSS}\cdot\text{d})$ 。随着丁酸的降解,发酵体系的累积产甲烷量不断增加,在第 18d 培养结束时达到了 44.34mL 。

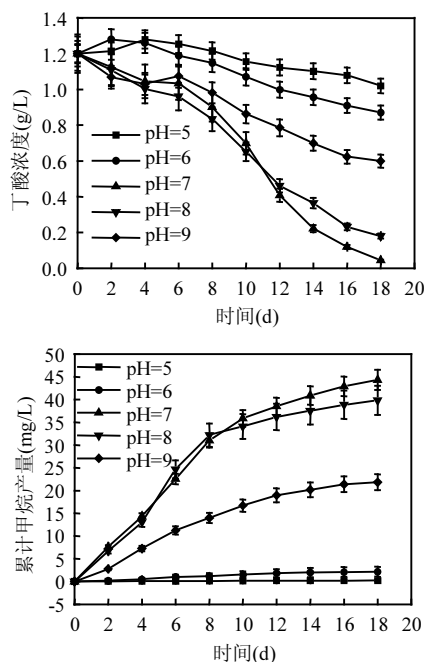


图 1 不同 pH 值条件下厌氧活性污泥的丁酸转化和产甲烷特征

Fig.1 Performance of the anaerobic activated sludge in butyric acid conversion and methane production with initial pHs

如图 1 所示,过高或过低的 pH 值对活性污泥的丁酸转化均有显著影响。初始 pH 值分别为 5.00、6.00、8.00 和 9.00 的发酵体系,在第 18d 培养结束时,其丁酸转化率分别为 15.02%、27.49%、

85.02%和 50.08%,污泥的最大丁酸转化速率分别为 0.04、0.07、0.30 和 $0.13\text{g}/(\text{gMLVSS}\cdot\text{d})$,累积产甲烷量分别为 0.22、2.15、39.84 和 21.84mL ,均显著低于初始 pH 值为 7.00 的发酵体系。

2.2 ACM 的基质转化与产甲烷特性

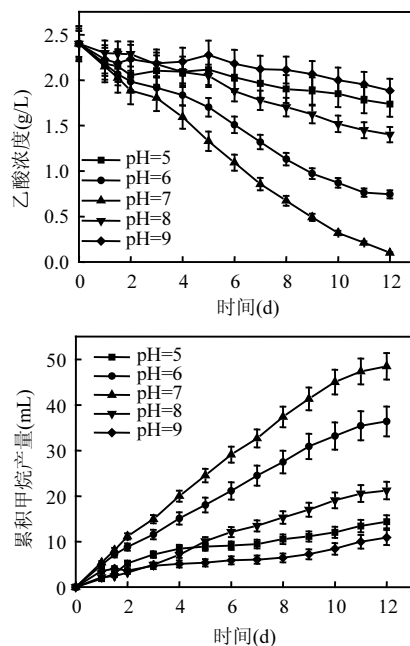


图 2 不同 pH 值条件下厌氧活性污泥的乙酸转化和产甲烷特征

Fig.2 Performance of the anaerobic activated sludge in acetic acid conversion and methane production with initial pHs

以乙酸为惟一碳源的测试结果表明,pH 值对 ACM 的代谢活性也有显著影响。如图 2 所示,在初始 pH 值为 7.00 的发酵体系中,ACM 的活性最强,在 12d 内可将 95%左右的乙酸转化。在降解曲线的线性阶段(第 4~7d),污泥的乙酸转化速率高达 $0.82\text{g}/(\text{gMLVSS}\cdot\text{d})$ 。发酵体系的累积产甲烷量随着乙酸的不断转化而增加,在第 12d 培养结束时累计 48.49mL 。过高或过低的 pH 值对活性污泥的乙酸转化和产甲烷能力也有显著影响。初始 pH 值分别为 5.00、6.00、8.00 和 9.00 的发酵体系,在培养结束时(第 12d),污泥的乙酸转化率分别为 27.66%、68.96%、41.61%和 21.54%,最大乙酸转化速率分别为 0.25、0.64、0.29 和

0.26g/(gMLVSS·d),累积产甲烷量分别为 14.37、36.40、21.22 和 10.89mL,均显著低于初始 pH 值为 7.00 的发酵体系.

2.3 HTM 的基质转化与产甲烷特性

厌氧活性污泥对 H_2/CO_2 的转化和产甲烷特征(图 3)表明,HTM 具有很强的代谢活性,在初始 pH 值为 7.00 的发酵体系中,发酵体系中的 H_2 在 4d 内几乎全部得到转化.在线性反应阶段(第 1~2d),污泥对 H_2 的转化速率达到 0.13g/(gMLVSS·d).发酵体系的累积产甲烷量随着 H_2 的不断转化而增加,在培养结束时(第 4d)达到了 19.38mL.初始 pH 值的改变, H_2 转化速率和累积产甲烷量均受到显著影响.初始 pH 值分别为 5.00、6.00、8.00 和 9.00 的发酵体系,在 4d 的发酵过程中,其 H_2 转化率分别为 61.04%、88.36%、95.38%和 30.71%,污泥的最大 H_2 转化速率分别为 0.05、0.12、0.09 和 0.04g/(gMLVSS·d),累积产甲烷量分别为 11.55、17.05、17.78 和 5.91mL,也都显著低于初始 pH 值为 7.00 的发酵体系.

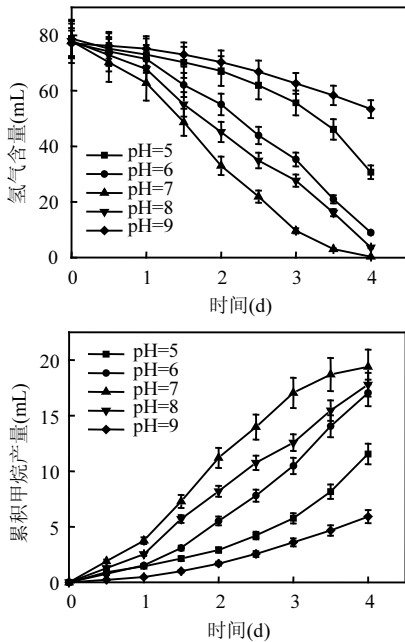


图 3 不同 pH 值条件下厌氧活性污泥的氢气转化和产甲烷特征

Fig.3 Performance of the anaerobic activated sludge in hydrogen conversion and methane production with initial pHs

2.4 活性污泥功能菌群的 pH 值生态幅解析

根据式(1)计算不同 pH 值下的最大基质转化速率 q_{COD} ,结果如图 4 所示.当发酵体系初始 pH 值为 7.00 时,活性污泥中的 SBOB、ACM 和 HTM 3 种功能菌群均表现出了最大代谢活性,其 q_{COD} 分别为 0.72、0.88 和 1.05gCOD_{equ}/(gMLVSS·d).当发酵体系初始 pH 值降低至 6.00 时,3 种功能菌群的 q_{COD} 分别比初始 pH 值为 7.00 时降低了 0.33、0.18、0.01gCOD_{equ}/(gMLVSS·d).而当初始 pH 值升高至 8.00 时,它们的 q_{COD} 分别降低了 0.10、0.53、0.04gCOD_{equ}/(gMLVSS·d).可见,3 种功能菌群的 pH 生态幅存在显著差异,其中,SBOB 的代谢在中性偏碱的条件下最好,而中性偏酸的环境更适合 ACM 和 HTM 的代谢.

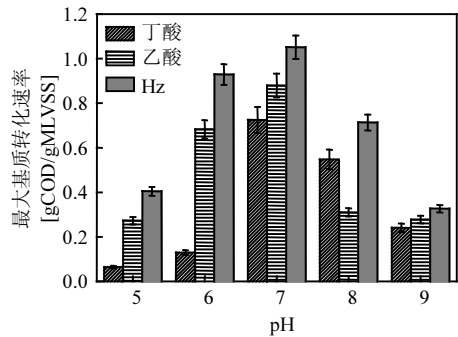


图4 不同pH值条件下厌氧活性污泥的最大基质转化速率

Fig.4 Maximum substrate conversion rates of the anaerobic activated sludge under different pH

依据 Shelford 耐受定律,利用 origin8.5 软件进行 Gauss Amp 非线性拟合(图 5),得到 3 种功能菌群 q_{COD} 与 pH 值之间的关系方程及相关参数(表 1).利用表 1 中的参数,由式(2)得到 SBOB、ACM 和 HTM 的 pH 生态幅分别为 6.19~8.59、5.50~7.74 和 4.39~9.23,pH 值适宜范围分别为 6.79~7.99、6.06~7.18 和 5.60~8.02,最适代谢 pH 值分别为 7.39、6.62 和 6.81.在最适代谢 pH 值条件下,活性污泥对丁酸、乙酸和 H_2 的最大转化速率分别为 0.86、1.04 和 1.09gCOD_{equ}/(gMLVSS·d).可见,在厌氧颗粒污泥中,SBOB 的代谢水平显著低于 ACM 和

HTM.

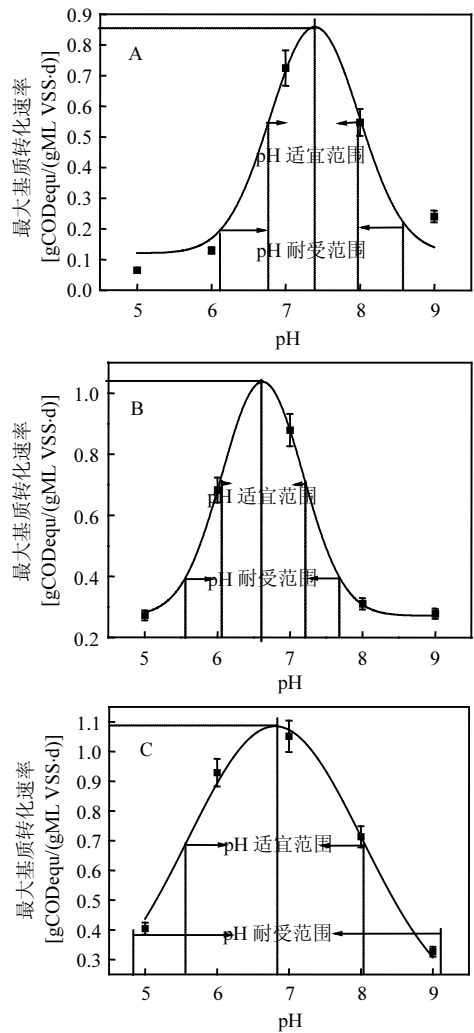


图5 厌氧活性污泥中 SBOB(A)、ACM(B)和 HTM(C) 的 pH 值生态幅

Fig.5 pH ecological amplitude of SBOB (A), ACM (B) and HTM (C) in the anaerobic activated sludge

2.5 产氢产乙酸菌群和产甲烷菌群对厌氧消化的限速作用分析

由于产甲烷菌的特殊生理生态习性,其产甲烷作用一直被认为是厌氧消化的限速步骤^[6].也有研究表明,产氢产乙酸菌对环境变化同样敏感,增殖代谢速度同样缓慢,其产氢产乙酸作用具备成为厌氧消化过程限速步骤的条件^[19].

如图 1~图 3 所示的实验结果表明,厌氧活性

污泥中的 SBOB、ACM 和 HTM 代谢活性,均会受到 pH 值改变的显著影响.而且,3 类功能菌群在 pH 值生态幅和基质转化速率方面都存在明显差异(表 1,图 4 和图 5).如图 5 所示,SBOB、ACM 和 HTM 的 pH 值生态幅分别为 6.19~8.59、5.50~7.74 和 4.39~9.23,其中以 SBOB 的最为狭窄.而表 1 所示的结果表明,SBOB 在最适代谢 pH 7.39 下的 q_{COD} 为 $0.86\text{gCOD}_{\text{equ}}/(\text{gMLVSS}\cdot\text{d})$,显著低于最适代谢 pH 值下 ACM 的 $1.04\text{gCOD}_{\text{equ}}/(\text{gMLVSS}\cdot\text{d})$ (pH 6.62)和 HTM 的 $1.09\text{gCOD}_{\text{equ}}/(\text{gMLVSS}\cdot\text{d})$ (pH 6.81).可见,与 ACM 和 HTM 相比,SBOB 具有更狭窄的 pH 值生态幅和更慢的基质转化速率,对厌氧消化过程的限速作用更加显著.

表 1 厌氧活性污泥功能菌群在不同 pH 值条件下的基质转化速率拟合方程及相关参数

Table 1 Substrate conversion rate fitting equations of functional flora in the activated sludge with pHs and the relevant parameters

菌群	方程式	相关系数(R ²)	最适代谢 pH	$q_{\text{max}}[\text{gCOD}_{\text{equ}}/(\text{gMLVSS}\cdot\text{d})]$
SBOB	$y = 0.74e^{\frac{(x-7.39)^2}{2 \times 0.60^2}} + 0.12$	0.813	7.39	0.86
ACM	$y = 0.74e^{\frac{(x-6.62)^2}{2 \times 0.56^2}} + 0.27$	0.992	6.62	1.04
HTM	$y = 0.97e^{\frac{(x-6.81)^2}{2 \times 1.21^2}} + 0.12$	0.968	6.81	1.09

注:x为发酵体系的初始pH值.

3 结论

3.1 SBOB 的 pH 值生态幅较 ACM 和 HTM 的更为狭窄. 在 37℃ 条件下, SBOB、ACM 和 HTM 代谢的 pH 值生态幅分别为 6.19~8.59、5.50~7.74 和 4.39~9.23.

3.2 最适代谢 pH 值条件下,SBOB 的最大基质转化速率明显低于 ACM 和 HTM.SBOB、ACM 和 HTM 的最大基质转化速率分别为 0.86、1.04 和 $1.09\text{gCOD}_{\text{equ}}/(\text{gMLVSS}\cdot\text{d})$.

3.3 对于厌氧颗粒污泥系统,产氢产乙酸作用对厌氧消化过程的限速作用显著高于产甲烷作用.

参考文献:

- [1] Kwietniewska E, Tys J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014,34:491-500.
- [2] 任南琪,王爱杰,马放.产酸发酵微生物生理生态学 [M]. 北京:科学出版社, 2005.
- [3] Whitman W B, Bowen T L, Boone D R. The Methanogenic Bacteria [M]//The Prokaryotes. Springer Berlin Heidelberg, 2014:123-163.
- [4] Kato S, Yoshida R, Yamaguchi T, et al. The effects of elevated CO₂ concentration on competitive interaction between acetoclastic and syntrophic methanogenesis in a model microbial consortium [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014,5:Article 575.
- [5] Ueno Y, Yamada K, Yoshida N, et al. Evidence from fluid inclusions for microbial methanogenesis in the early Archaean era [J]. *Nature*, 2006,440(7083):516-519.
- [6] Liu Y, Whitman W B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008,1125(1):171-189.
- [7] Worm P, Müller N, Plugge C M, et al. Syntrophy in methanogenic degradation [M]. (Endo) symbiotic Methanogenic Archaea. Springer. 2010:143-173.
- [8] Li J, Ban Q, Zhang L, et al. Syntrophic Propionate Degradation in Anaerobic Digestion: A Review [J]. *International Journal of Agriculture & Biology*, 2012,14(5):668-673.
- [9] Kato S, Watanabe K. Ecological and evolutionary interactions in syntrophic methanogenic consortia [J]. *Microbes and Environments*, 2010,25(3):145-151.
- [10] Tang Y Q, Shigematsu T, Morimura S, et al. Dynamics of the microbial community during continuous methane fermentation in continuously stirred tank reactors [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015,119(4):375-383.
- [11] Plugge C M, van Lier J B, Stams A J M. Syntrophic communities in methane formation from high strength wastewaters [M]//Microbes at Work. Springer Berlin Heidelberg, 2010:59-77.
- [12] 昌盛,刘枫.对比分析进水基质浓度对乙醇型和丁酸型发酵制氢系统的影响 [J]. *化工学报*, 2015,66(12):5111-5118.
- [13] Angelidaki I, Sanders W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants [J]. *Reviews in Environmental Science & Bio/Technology*, 2004,3(2):117-129.
- [14] Ai B, Li J, Chi X, et al. Effect of pH and buffer on butyric acid production and microbial community characteristics in bioconversion of rice straw with undefined mixed culture [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2014,19(4):676-686.
- [15] American Public Health Association. Water Environment Federation [M]. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1995,19.
- [16] Owen W F, Stuckey D C, Healy J B, et al. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity [J]. *Water Research*, 1979,13(6):485-492.
- [17] 施恩,李建政,马天楠.基于 VFAs 抑制系数的 ABR 基质降解与产甲烷预测模型 [J]. *化工学报*, 2016,67(7):2979-2986.
- [18] ter Braak C J F, Looman C W N. Weighted averaging, logistic regression and the Gaussian response model [J]. *Vegetatio*, 1986, 65(1):3-11.
- [19] Ban Q, Li J, Zhang L, et al. Quantitative analysis of previously identified propionate-oxidizing bacteria and methanogens at different temperatures in an UASB reactor containing propionate as a sole carbon source [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013,171(8):2129-2141.
- [20] Müller N, Worm P, Schink B, et al. Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010,2(4): 489-499.

作者简介: 王祥锬(1989-),男,黑龙江穆棱人,哈尔滨工业大学硕士研究生,主要研究方向为厌氧微生物生理生态学。