

厌氧活性污泥发酵制氢系统中的同型产乙酸菌及耗氢作用

李建政^{1,2}, 许一平², 张立国², 班巧英²

1. 哈尔滨工业大学; 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090

2. 哈尔滨工业大学市政与环境工程学院, 哈尔滨 150090

摘要 在对连续流搅拌槽式反应器 (CSTR) 发酵产氢系统中的活性污泥进行分子生物学分析, 判断系统中有同型产乙酸菌存在的基础上, 通过活性污泥的间歇培养试验, 探讨了同型产乙酸作用对活性污泥发酵系统产氢效能的影响。结果表明, CSTR 发酵产氢系统的活性污泥中, 一种隶属真杆菌属 (*Eubacterium*) 的同型产乙酸菌在活性污泥微生物群落中达到了优势程度; 以葡萄糖为底物时, 同型产乙酸菌的耗氢代谢, 可使厌氧活性污泥对葡萄糖的氢气转化率及产氢率分别降低 31% 和 34%, 耗氢速率可达 0.33 mmol/(g·d)。

关键词 发酵; 制氢; 厌氧活性污泥; 耗氢; 同型产乙酸作用

中图分类号 X703

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.24.002

Homoacetogens and Hydrogen Consumption in Anaerobic Activated Sludge Bio-hydrogen Production System

LI Jianzheng^{1,2}, XU Yiping², ZHANG Ligu², BAN Qiaoying²

1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment; Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

Abstract The impact of homoacetogenesis on the fermentative hydrogen production of the anaerobic activated sludge in a Continuous Stirred-Tank Reactor (CSTR) is investigated by batch cultures. The predominant species in the sludge are identified with the technique of Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE), and it is indicated that the homoacetogen *Eubacterium* exists in the activated sludge in a remarkable dominance. The hydrogen conversion rate of glucose and the specific hydrogen production rate by the activated sludge in terms of Mixed Liquor Volatile Suspended Solids (MLVSS) are reduced by 31% and 34%, respectively, due to the metabolism of the homoacetogens in the activated sludge. The hydrogen consumption rate of the homoacetogens in the activated sludge reaches 0.33 mmol/(g·d).

Keywords fermentation; hydrogen production; anaerobic activated sludge; hydrogen consumption; homoacetogenesis

0 引言

发酵法生物制氢技术, 可利用废弃生物质进行清洁能源氢气的生产, 对清洁能源开发和环境保护均具有重要意义, 因而受到了广泛关注^[1], 尤其是以混合菌种 (厌氧活性污泥) 为基础的发酵法生物制氢技术进展迅速^[2], 但反应系统的产

氢效能仍然不够理想, 在很大程度上限制了该技术的产业化进程^[3]。如何进一步提高发酵系统的产氢效能成为当前发酵生物制氢研究的关键问题。针对这一关键问题的解决, 目前已在高效发酵产氢菌种的开发及其生物强化技术、反应系统控制条件的优化等方面开展了广泛研究^[4]。然而, 在在众多微

收稿日期: 2011-06-14; 修回日期: 2011-06-30

基金项目: 黑龙江省发展高新技术产业化项目 (FW09C01); 哈尔滨市科技创新人才研究专项 (2009RFXXS004)

作者简介: 李建政, 教授, 研究方向为有机废水处理与资源化技术, 电子信箱: ljz6677@163.com

生物菌群共存的活性污泥发酵生物制氢系统中,有可能存在诸如产甲烷菌、同型产乙酸菌、硫酸盐还原菌和硝酸盐还原菌等耗氢微生物。其中,产甲烷菌的耗氢代谢可显著降低发酵制氢系统的产氢效能,关于如何抑制其活性,提高系统的发酵产氢性能,已有广泛研究^[5]。有研究表明^[6],向厌氧消化系统中加入产甲烷菌抑制剂 2-溴乙烷磺酸钠(BES),可显著提高同型产乙酸菌群的数量和活性,成为代替产甲烷作用而进行耗氢的主体。但在发酵产氢系统中是否存在同型产乙酸菌,及其对系统产氢效能影响的研究,至今还少见报道^[7]。

本研究在考查连续流搅拌槽式反应器(CSTR)发酵产氢性能的基础上,对系统中的活性污泥进行了分子生物学分析,判断系统中有同型产乙酸菌的存在,并通过活性污泥的间歇培养试验,探讨了同型产乙酸作用对活性污泥发酵系统产氢效能的影响,以期对 CSTR 运行控制的优化,产氢效能的进一步提高提供指导。

1 材料与方法

1.1 污泥样品

本研究采集的厌氧活性污泥,取自本实验室正在运行的一个有机废水发酵生物制氢反应器。该反应器为有效容积为 9.6L 的 CSTR,启动时的接种污泥是取自以当地某啤酒废水处理系统中二沉池的剩余污泥为种泥,验废水由甜菜制糖厂的废糖蜜配制而成。分子生物学分析和间歇培养所用的活性污泥取自反应器运行的第 355 天,此时 CSTR 的运行状况为:水力停留时间(HRT)为 8h,进水的 COD 为 7g/L,反应区 pH=4.5,产气量为 25L/d,其氢气含量为 39%,未检测到甲烷;总液相末端产物为 2327mg/L,其中乙醇、乙酸、丙酸、丁酸分别为 1383,733,50,161mg/L,系统呈现典型的乙醇型发酵^[8]。

1.2 PCR-DGGE

本研究使用聚合酶链式反应和变性梯度凝胶电泳相结合的方法(PCR-DGGE)。污泥样品的总 DNA 提取采用 MoBio Powersoil DNA 提取试剂盒(美国 MoBio 公司)。PCR 扩增对象为 16S rDNA 的 V2—V3 区,引物为 PRBA8F 和 PRUN518R,其中在 PRUN518R 的 5'端加有 40bp 的 GC 夹。50μL 的 PCR 反应体系中包含:10×Ex Taq Buffer,5μL; dNTP,4μL;20μmol/L 的引物 PRBA8F 和 PRUN518R 各 1μL;Ex Taq DNA 聚合酶,0.6μL;模板 DNA,1μL;超纯水 37.4μL。PCR 程序为:94℃预变性 5min;94℃变性 1min、60℃退火 45s、72℃延伸 1min,循环 30 次;72℃延伸 10min。DGGE 在 Dcode 系统(美国 Bio-Rad 公司)上进行,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,变性剂浓度范围为 30%—60%,100V、60℃恒温电泳 12h。银染成像后,将 DGGE 图谱中所有条带切下,选用不加 GC 夹的上述引物,按上述的 PCR 体系和条件对回收条带 DNA 再次进行扩增,对扩增产物进行琼脂糖胶回收后,T-载体连接、转化和蓝白斑筛选之后,选择阳性克隆送上海生工测序。登陆 NCBI 的 GenBank,将测序结果与数据库中的已知序列进行比对。利用 MEGA3.1 软件,以邻接法绘制系统发育树。

1.3 同型产乙酸菌的耗氢作用

为探查同型产乙酸作用对 CSTR 发酵系统产氢效能的影响程度,采集 CSTR 发酵产氢系统的活性污泥(运行的第 355 天),以 0.20%(体积比)氯仿抑制同型产乙酸作用及产甲烷活性^[9-10],进行活性污泥的间歇培养试验。间歇培养采用厌氧微生物基础培养基,葡萄糖为底物,以 100mL 血清瓶作为反应器,利用亨盖特厌氧技术配制培养基并进行分装。试验分为对照组和投加 0.20%(体积比)氯仿组,每组设置 3 个平行反应。各反应系统中的葡萄糖浓度和污泥接种量均为 7.0g/L 和 1.16g MLVSS/L(MLVSS 为挥发性总固体),使用 NaHCO₃(2.0g/L)溶液将初始 pH 值调节为 7.2。

分装并密封后,将反应瓶置于 150r/min 下,35℃恒温,振荡培养 48h,每 8h 测定一次产气量、氢气含量、液相末端产物和葡萄糖浓度,达反应终点后,测定发酵液 pH 值和生物量。

1.4 分析项目与方法

pH 值、生物量(以挥发性悬浮固体总量 MLVSS 计)采用国家标准方法测定,葡萄糖测定采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法。发酵产气量采用 10—100mL 的玻璃注射器定时排气计量,并折算为标准状态体积数(0℃,101.325kPa)。发酵气组分和液相末端发酵产物,分别采用山东鲁南化工仪器厂的 SP-6800A 型(TCD 检测器)和 SP-6890 型(FID 检测器)气相色谱仪测定。累积产氢量参照 Owen 法进行计算。在计算污泥的比产氢速率时,生物量 MLVSS 取反应起始和终点所测值的平均值。

2 结果与讨论

2.1 活性污泥微生物组成分析

前期研究表明^[11],对于 CSTR 乙醇型发酵产氢系统,以糖蜜为底物时,其发酵气中的氢气含量应为 50%左右。而本研究污泥样品来源的 CSTR 发酵制氢反应器,在 HRT 8h、进水 COD 7g/L、pH=4.5、35℃等条件下运行稳定时,其平均产气量为 25L/d,发酵气中未检测到甲烷和硫化氢,氢气含量仅为 39%,推测该系统中存在耗氢的同型产乙酸菌。通过 16S rDNA PCR 扩增及 DGGE 分析得到活性污泥样品的 DGGE 图谱,共得到 15 个条带,对各个条带自上而下编号(Band 1—Band 15),并对各条带进行胶回收和测序。将测序结果输入 GenBank 数据库进行比对,比对结果显示(图 1),在所有的回收条带中,条带 5 与 *Eubacterium limosum*(M59120)的碱基序列相似性高达 99%,而 *Eubacterium limosum* 可利用 H₂/CO₂ 产乙酸,隶属厚壁菌门(Firmicutes)、梭菌纲(Clostridia)、真杆菌科(Eubacteriaceae)、真杆菌属(*Eubacterium*),革兰氏阳性、低(G+C)含量^[12]。因此判断,在本研究污泥样品来源的 CSTR 发酵制氢反应系统中,存在耗氢的同型产乙酸菌。有研究表明^[13],目前的同型产乙酸菌绝大多数都属于产芽孢的梭菌,有较强的耐受低 pH 的能力,较高的氢分压也会刺激同型产乙酸菌利用 H₂/CO₂ 营自养生长,这些因素为同型产乙酸菌在发酵产氢系统的增殖提供了有利条件。

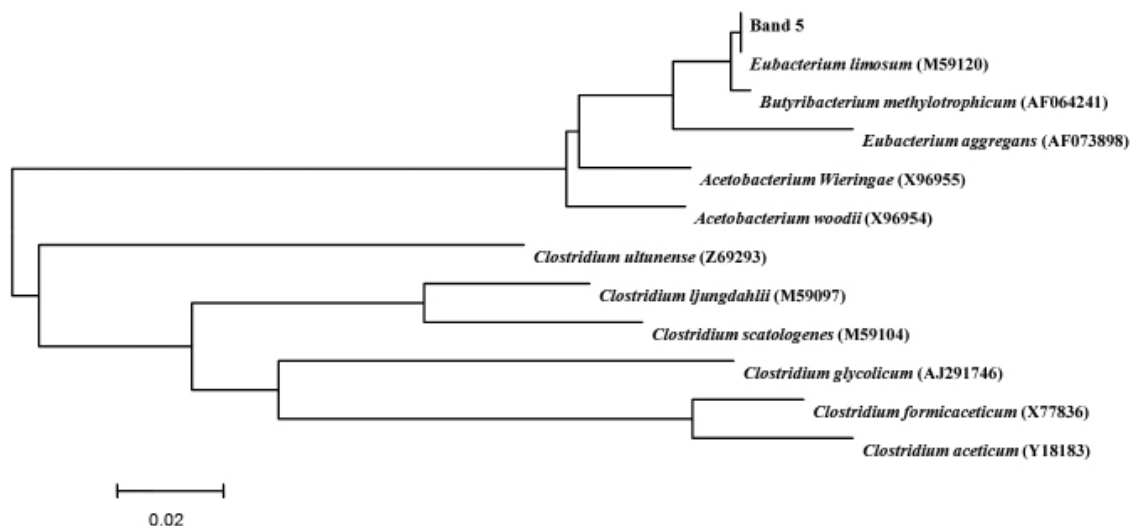


图 1 发酵产氢系统厌氧活性污泥中同型产乙酸菌的系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree of the homoacetogenic bacteria in the anaerobic activated sludge

2.2 同型产乙酸菌的耗氢作用

由于 0.20% (体积比) 氯仿可以有效抑制同型产乙酸菌和产甲烷菌的代谢活性 (整个发酵过程中所有反应系统均未检测到甲烷产生)^[9], 如果 CSTR 发酵制氢系统中存在同型产乙酸作用, 抑制剂氯仿的投加将会提高污泥的产氢活性。试验结果表明, 无论是否投加抑制剂氯仿, CSTR 发酵产氢系统的厌氧活性污泥均表现出了良好的代谢活性, 经 48h 发酵, 葡萄糖被彻底转化, 对照组和投加氯仿组的液相末端发酵产物总量相当, 分别为 2921 和 2913mg/L (图 2(a), 图 3(a))。但二

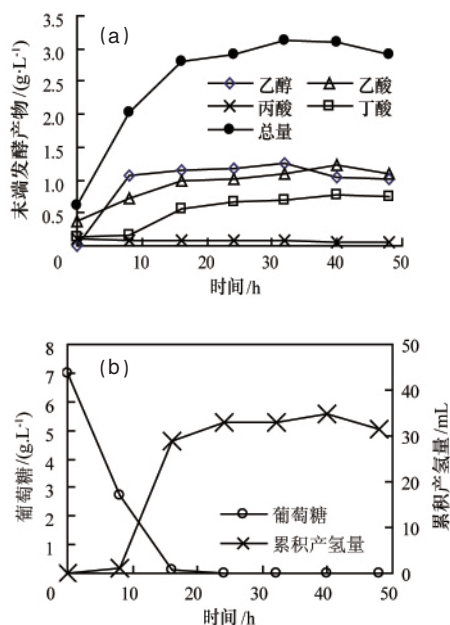


图 2 系统的液相末端发酵产物 (a) 及发酵产氢 (b) 对照
Fig. 2 Soluble products (a) and hydrogen yield (b)

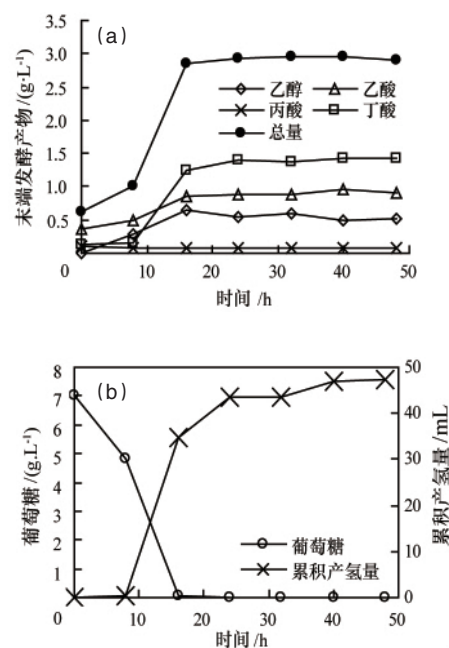


图 3 氯仿系统的液相末端发酵产物 (a) 及发酵产氢 (b) 对照
Fig. 3 Soluble products (a) and hydrogen yield (b)

者的累积产氢量却相差很大, 分别为 31.4 和 42.7mL (图 2 (b), 图 3(b))。可见, 同型产乙酸菌的存在及代谢作用, 对厌氧活性污泥发酵产氢系统的产氢效能的影响非常显著, 表 1 给出了对照发酵组和投加氯仿发酵组的主要性能参数。

无论是对照系统还是投加抑制剂的发酵系统, 其发酵产氢作用主要发生在前 24h, 随着葡萄糖的迅速降解, 产氢也逐渐趋于停止 (图 2(a), 图 3(a))。发酵 24h 时, 对照系统和投加氯仿发酵系统的葡萄糖浓度从初始的 7g/L 分别降低到 10 和 14mg/L; 发酵进行到 32h 时, 各系统中已检测不到葡萄糖的残

表 1 对照组与投加氯仿组发酵产氢特性对比
 Table 1 Fermentative hydrogen-producing characteristics of the control system and the 0.20% (V/V) chloroform system

测试项		对照组	氯仿组
pH 值	初始	7.2	7.2
	终点	5.3	5.4
葡萄糖 /(mg·L ⁻¹)	初始	7000	7000
	终点	0	0
生物量 MLVSS /(g·L ⁻¹)	初始	1.16	1.16
	终点	4.90	4.58
单位葡萄糖的污泥增长率/(g·g ⁻¹)		0.35	0.32
累积产氢量/mL		31.4	47.2
葡萄糖的氢气转化率 /(mol·mol ⁻¹)		0.81	1.17
污泥产氢率/(mmol·g ⁻¹)		4.09	6.19
液相 末端产物	总量/(mg·L ⁻¹)	2920	2913
	(乙醇+乙酸)/%	72.8	48.5
	(乙酸+丁酸)/%	62.8	79.8
发酵类型		乙醇型 [®]	丁酸型 [®]

留。从活性污泥增长情况来看(表 1),投加抑制剂氯仿的反应系统要低于对照系统,经过 48h 的培养,MLVSS 分别增长到了 3.42 和 3.74g/L。分析认为,对照组最终表现为乙醇型发酵,而投加氯仿的发酵系统则呈现出丁酸型发酵特征,说明氯仿的投加,因同型产乙酸菌群的代谢和增殖受到了抑制,从而改变了活性污泥微生物群落的代谢特征,而活性污泥微生物群落代谢特征的改变,使其在活性污泥增长量上也表现出了差异。培养结束时,对照组的单位葡萄糖的污泥增长率为 0.35g/g,高于投加氯仿发酵组的 0.32g/g。

尽管对照系统的活性污泥表现出了更好的长势,但其产氢性能却不如投加氯仿的反应系统。如表 1 所示,在培养结束时(48h),对照组反应系统表现出的基质(葡萄糖)氢气转化率和污泥产氢率分别为 0.81mol/mol 和 4.09mmol/g,远低于投加氯仿反应系统的 1.17mol/mol 和 6.19mmol/g。也即同型产乙酸菌以 0.33mmol/(g·d)的耗氢速率,使厌氧活性污泥对葡萄糖的氢气转化率及产氢率分别降低了 31%和 34%。由于对照反应系统中存在着较强的同型产乙酸作用,在产氢能力较弱的培养后期,其累积产氢量表现出了负增长现象(图 3(a)),即从 40h 的 34.9mL 降低到 48h 的 31.4mL。

总之,厌氧活性污泥发酵产氢系统中存在的同型产乙酸菌,其耗氢代谢有可能显著降低系统的产氢效能。为获得更高的产氢效能,开展抑制厌氧活性污泥发酵系统中的同型产乙酸作用的控制策略和方法研究,具有重要意义。

3 结论

(1) 利用 PCR-DGGE 分子生物学技术,通过对活性污泥

微生物群落的种群组成进行分析,证明在 CSTR 有机废水发酵产氢系统中存在同型产乙酸菌,其优势菌种隶属真杆菌属(*Eubacterium*)。

(2) 厌氧活性污泥发酵产氢系统中的同型产乙酸菌的耗氢代谢,可能达到显著影响系统产氢效能的程度。以葡萄糖为底物时,同型产乙酸菌的耗氢代谢,可使厌氧活性污泥对葡萄糖的氢气转化率及其产氢率分别降低 31%和 34%,耗氢速率可达 0.33mmol/(g·d)。

参考文献 (References)

- [1] Benemann J. Hydrogen biotechnology: Progress and prospects [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(9): 1101-1103.
- [2] Li J Z, Li B K, Zhu G F, *et al.* Hydrogen Production from diluted molasses by fermentative mixed microbe flora culture in an Anaerobic Baffled Reactor (ABR)[J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2007, 28 (6): 3274-3283.
- [3] Ren N Q, Li J Z, Li B, *et al.* Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2006, 31: 2147-2157.
- [4] Nath K, Das D. Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65(5): 520-529.
- [5] Wang C C, Chang C W, Chu C P. Producing hydrogen from wastewater sludge by clostridium bifermentans [J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 102(1): 83-92.
- [6] Siriwongrungson V, Raymond J, Angelidaki I. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis [J]. *Water Research*, 2007, 41(18): 4204-4210.
- [7] Oh S E, van Ginkel S, Logan B E. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production[J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(22): 5186-5190.
- [8] Li J Z, Zheng G C, He J G, *et al.* Hydrogen-producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(5): 573-577.
- [9] Chidthaisong A, Conrad R. Specificity of chloroform, 2-bromoethanesulfonate and fluoroacetate to inhibit methanogenesis and other anaerobic processes in anoxic rice field soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(7): 977-988.
- [10] Xu K, Liu H, Chen J. Effect of classic methanogenic inhibitors on the quantity and diversity of archaeal community and the reductive homoacetogenic activity during the process of anaerobic sludge digestion [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(8): 2600-2607.
- [11] He J G, Zhang L G, Li J Z, *et al.* Metabolic pathways of hydrogen production in anaerobic activated sludge fermentation process[C]. International Conference on Biomass Energy Technologies Proceeding, 2008, 1: 862-868.
- [12] Drake H L, Gößner A S, Daniel S L. Old acetogens, new light[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125(1): 100-128.
- [13] Phelps T J, Zeikus J G. Influence of pH on terminal carbon metabolism in anoxic sediments from a mildly acidic lake [J]. *Appl Envir Microbiol*, 1984, 48(6): 1088-1095.

(责任编辑 岳臣)