

初始发酵 pH 对秸秆酒精醪液沼气发酵及其系统内微生物群落的影响

朱浩然¹, 李珂^{1,2}, 张雅洁^{1,2}, 张洪勋^{1*}

(1. 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 101408; 2. 华北水利水电大学水务研究院, 河南郑州 450045)

摘要 [目的]探究初始 pH 对秸秆酒精醪液厌氧发酵产甲烷的影响。[方法]利用秸秆酒精醪液作为唯一发酵底物, 并将初始发酵 pH 分别设置为 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, 采用序批式厌氧发酵 30 d。[结果]在 150 mL 的发酵体积下最终的甲烷积累量依次为 17、24、227、289、246、257、234 和 143 mL。当初始发酵 pH 升高时, 发酵液中残留的挥发性脂肪酸(VFA)中的乙酸所占比例逐渐升高, pH 为 5.0 时乙酸占 12.8%, pH 为 8.5 时乙酸占 43.9%。通过比较初始 pH 为 4.0、6.5 和 8.5 时, VFAs 在发酵过程中的动态变化, 发现初始 pH 为 6.5 时, 乙酸的含量在第 1.5 天达到峰值, 为 3 753.6 mg/L 占总量 71.6%, 最终乙酸被减少了 72.4%; 初始 pH 为 8.5 时, 乙酸的含量在第 10 天时增至峰值, 为 1 322.9 mg/L (53.8%), 最终乙酸减少了 36.0%。初始 pH 为 4.0 时, VFAs 的总量和组成都没有明显的变化。当初始发酵 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5 时, 发酵系统内的优势细菌为梭菌属(*Clostridium*), 相对丰度为 40%~47%; 优势古菌为甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)和甲烷鬃毛菌属(*Methanosaeta*), 其相对丰度之和为 85%~88%。当初始 pH 为 8.5 时, 系统内的优势细菌为普雷沃氏菌(*Prevotella*)和互养单胞菌属(*Syntrophomonas*), 相对丰度分别为 36.8% 和 14.7%; 优势古菌为甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)和甲烷热杆菌属(*Methanothermobacter*), 在其全古菌序列中分别占 62.3% 和 11.4%。[结论]当初始发酵 pH 为 6.5 时, 甲烷的产气积累量最高; 当初始发酵 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5 时, 为乙酸营养型型甲烷发酵; 当初始 pH 为 8.0 和 8.5 时, 为氢营养型甲烷发酵。

关键词 酒精醪液; 初始 pH; 厌氧发酵; 微生物群落

中图分类号 S216.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)20-0065-05

Effect of Initial pH on Methane Production from Waste Liquor of Alcohol from Stalk and Microbial Community

ZHU Hao-ran¹, LI Ke^{1,2}, ZHANG Ya-jie¹, ZHANG Hong-xun^{1*} (1. College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408; 2. Water Affairs Research Institute, North China University of Water Resources and Electric Power, Zhengzhou, Henan 450045)

Abstract [Objective] Exploring the impact of initial pH on anaerobic fermentative production of methane from waste liquor of alcohol from stalk. [Method] As the waste liquor of alcohol from stalk was the only fermentation substrate, sequencing batch reactor was utilized for 30 days when the initial pH was 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 respectively. [Result] In the fermentation volume of 150 mL, the final methane accumulates to 17, 24, 227, 289, 246, 257, 234 and 143 mL respectively. When the initial pH was rising, the proportion of acetic acid in VFAs-volatile fatty acids remaining fermentation liquor was also increasing. Acetic acid was 12.8% in proportion when pH was 5.0 and acetic acid is 43.9% in proportion when pH was 8.5. Comparing the dynamic changes of VFAs during fermentation when the initial pH was 4.0, 6.5 and 8.5, it turned out that the content of acetic acid reaches to the peak-3 753.6 mg/L (71.6% of the total amount) 1.5 days later, and the final consumption of acetic acid was 72.4% when the initial pH was 6.5. Moreover, when the initial pH was 8.5, content of acetic acid reaches to the peak-1 322.9 mg/L (53.8% of the total amount) 10 days later, and the final consumption of acetic acid was 36%. There was no obvious change of the total amount or composition of VFAs when the initial pH was 4.0. When the initial pH was 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, the dominant bacteria was *Clostridium* in fermentation system, and the relative abundance was 40%~47%; dominant archaeal was *Methanosarcina* and *Methanosaeta*, and the relative abundance was 85%~88%. However, the dominant bacteria was *Prevotella* and *Syntrophomonas* in fermentation system, and the relative abundance was 36.8% and 14.7% respectively; dominant archaeal was *Methanobacterium* and *Methanothermobacter*, and the relative abundance was 62.3% and 11.4% respectively when the initial pH was 8.5. [Conclusion] The gas from methane accumulates to the highest when the initial pH is 6.5; the dominating methanogenic substrates are acetate when the initial pH is 6.0, 6.5, 7.0 and 7.5; the dominating methanogenic substrates are H₂-CO₂ when the initial pH is 8.0 and 8.5.

Key words Alcohol mash; Initial pH; Anaerobic fermentation; Microbial community

自 20 世纪能源危机爆发以来, 生物质可再生能源便得到越来越多的关注。其中利用农作物秸秆发酵生产生物质乙醇技术得到了快速发展^[1]。由于秸秆发酵乙醇在环境问题、粮食问题和能源问题上的重要意义, 使其在全球得到了广泛的认可与重视。秸秆发酵乙醇的工艺主要是预处理(气爆、酶解), 酵母发酵, 蒸馏提纯; 生产过程中会产生大量的高浓度有机醪液(化学需氧量高达 20 000~60 000 mg/L), 并且呈酸性(pH 2~5), 有机悬浮物浓度高(悬浮固体高达 10 000~40 000 mg/L)^[2]。醪液直接排入环境中, 不仅会对环境造成严重破坏, 也不利于资源与能源的高效利用。目前国内外针对酒精醪液已有多种处理方法, 例如 DDGS 法、浓缩燃烧法、浓缩制肥法、稀释农灌法以及生物处理法等^[3]。

利用厌氧发酵原理对酒精醪液进行厌氧消化最终产生甲烷, 这一技术不仅符合废水资源化回收利用的清洁生产性质, 也会给厂家带来一定的经济效益。

厌氧发酵是一种复杂的物理化学与微生物活动过程。厌氧消化过程产生的有机小分子酸主要包括乙酸、丙酸、丁酸、乳酸等。不同的发酵途径会产生多种特定的末端产物, 起作用的微生物的种类不同。王晋^[4]在文献综述中总结了能够以挥发性脂肪酸(VFA)为末端代谢产物的 3 类功能菌群: 水解发酵产酸菌、产氢产乙酸菌和同型产乙酸菌。水解发酵产酸细菌可以将底物中复杂有机物(纤维素、蛋白质和脂类等)水解, 再经过各自的产酸代谢途径将水解后的小分子转化为乙酸、丙酸等 VFA。完成水解作用的细菌主要是严格厌氧的拟杆菌、梭菌及兼性厌氧的真杆菌等, 而产酸发酵细菌则是产酸效率较高的产芽孢细菌, 如梭菌科、链球菌科、芽孢乳杆菌科、毛螺菌科等。产甲烷菌是一类以甲烷为最终

作者简介 朱浩然(1990—), 男, 安徽肥东人, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物学。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事环境微生物研究。

收稿日期 2017-05-12

产物的微生物,该过程也是厌氧消化产甲烷的最终过程,因此被认为是直接影响甲烷产量的微生物。产甲烷菌一词是在 1974 年由 Bryant 首次提出的,将产甲烷菌同嗜甲烷菌区别开。所有的产甲烷菌都有 3 个共同特征:①都能够产甲烷,并通过产甲烷获得生长所需要的大部分能量。②都属于古菌域中的广古菌门。③都是严格的厌氧菌。根据厌氧发酵产甲烷的原理,产甲烷菌和与之相关的功能性微生物在发酵过程中起到了重要作用^[5]。而影响微生物生长的因素有很多,其中 pH 是一个重要因素^[6]。相关文献表明,厌氧发酵的适合 pH 应该在 6.0~8.3^[7];6.5~7.5 时产气最好^[8];pH 在 6.8~7.2 时启动速度最快^[9]。目前针对酒精醪液厌氧发酵产甲烷的研究大多集中于木薯、玉米等淀粉类物质产酒精后的醪液,而以纯纤维素类物质如玉米秸秆或稻草等发酵后醪液的厌氧发酵研究还很少见。因此,笔者选用秸秆酒精醪液作为生物厌氧发酵产甲烷的底物,以 39℃ 发酵,研究不同初始 pH 对厌氧发酵的积累甲烷产量、发酵产物 VFAs 的分布的影响,分析并探讨初始 pH 对秸秆酒精醪液厌氧发酵产甲烷及反应体系中微生物生长的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酒精醪液。该试验中的酒精醪液取自吉林长春某秸秆酒精发酵厂的废水厌氧发酵系统中反应器的中部,取样时系统运转良好。醪液水质呈酸性,总化学需氧量(TCOD)和总悬浮固体物质浓度(TS)较高,分别为 7.4×10^4 和 6.1×10^4 mg/L。同时具有较高的可生化性,五日生化需氧量(BOD_5)为 1.5×10^4 mg/L,其他如溶解性化学需氧量(SCOD)、总氮(TN)、总磷(TP)、氨氮($NH_4^+ - N$)检测结果详见表 1。为保证醪液水质的稳定性,将醪液储存于 4℃ 的冰箱中备用。

表 1 秸秆酒精醪液的水质指标

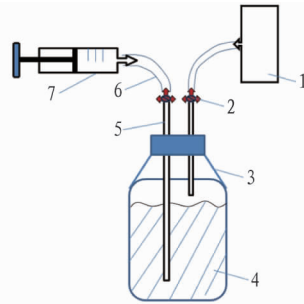
Table 1 Characteristics of straw ethanol waste mash

指标编号 Index No.	检测项 Test items	检测结果 Test results//mg/L
1	总化学需氧量(TCOD)	$(7.4 \pm 0.7) \times 10^4$
2	溶解性化学需氧量(SCOD)	$(4.7 \pm 0.5) \times 10^4$
3	五日生化需氧量(BOD_5)	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^4$
4	总氮(TN)	965 ± 50
5	总磷(TP)	136 ± 10
6	氨氮($NH_4^+ - N$)	17.1 ± 0.8
7	总固体质量浓度(TS)	$(6.1 \pm 0.4) \times 10^4$
8	pH	4.2 ± 0.1

1.1.2 接种污泥。接种污泥分别取自原发酵厂的厌氧污泥床(UASB)反应器中的厌氧颗粒污泥。为保持污泥活性,将其保存于 4℃ 冰箱内。接种前 6 h 将污泥置于 35℃ 摇床,振荡培养 12 h 使其恢复活性^[9]。

1.2 方法 所有的发酵试验均在自制的 250 mL 厌氧反应器(图 1)中进行,向其中添加 135 mL 酒精醪液,15 mL 活性污泥,并且使用 0.1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 将混合液的 pH 调节为 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5。利用

厌氧反应器上通入发酵液中的橡胶管向其中通入 99.99% 的氮气,10 min。之后,确保关闭反应器上所有的三通阀,用凡士林密封瓶盖,放入恒温培养箱内(上海一恒 MGC-450BP-2)培养,设置培养温度为 $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$,振荡速率为 150 r/min,厌氧发酵的周期为 30 d。



注:1. 集气袋;2. 三通阀;3. 厌氧反应瓶;4. 发酵液;5. 导管;6. 橡皮管;7. 注射器

Note:1. gas collecting bag;2. three-way valve;3. anaerobic reaction bottle;4. fermentation broth;5. catheter;6. rubber tube;7. syringe

图 1 反应器结构示意图

Fig. 1 The reactor structure diagram

1.3 分析方法 该试验中的 TCOD、SCOD、TN、TP、 $NH_4^+ - N$ 、TS 及 VS 等常规指标均采用国标法测定。醪液、接种物和发酵液的 pH 通过 pH 计(梅特勒-托利多)测定。气体组分使用气相色谱仪(北京京科瑞达)测定,热导检测器(TCD),色谱柱为 PropoR-Q(2 m × 3 m)柱,载气采用氮气,其流速为 25 mL/min,气体进样量为 1 mL,定量方法为外标法。VFA(乙酸、丙酸、正丁酸之和)通过高效液相色谱仪(日本岛津)测定,缓冲液为 0.1% 的磷酸缓冲液;色谱柱为 C_{18} 反相柱;检测器为紫外可见光检测器,进样量为 20 μL ,流速为 1.0 mL/min。底泥总 DNA 的提取采用试剂盒(Fast DNA SPIN kit for soil),提取过程按试剂盒说明书进行。测序平台为 MiSeq 测序平台(上海美吉),PCR 扩增引物对于细菌是 338F(5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R(5' - GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3');对于古菌是 519F(5' - CAGC-MGCCGCGGTAA-3') 和 915R(5' - GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3')。PCR 采用 Trans Gen AP221-02:Trans Start Fastpfu DNA Polymerase,20 μL 反应体系。细菌 PCR 反应条件:95℃ 预变性 3 min;然后 95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,27 个循环。古菌 PCR 反应条件:95℃ 预变性 3 min;然后 95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,32 个循环。

高通量测序所得的序列通过 QIIME (<http://qiime.org/tutorials/index.html>) 和 RDP Classifier^[10] (version 2.2 <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>,置信度阈值为 0.7) 进行处理,比对数据库为 Silva^[11] (Release119 <http://www.arb-silva.de>)。

2 结果与分析

2.1 不同初始发酵 pH 条件下各反应器的甲烷发酵规律 在控制除 pH 以外的所有条件下,经 30 d 的序批式厌氧发酵,8 组反应器内的发酵系统基本处于稳定。根据图 2,所

有反应器在 150 mL 的发酵体积下最终甲烷积累量由高至低依次是 pH 6.5(289 mL)、pH 7.5(257 mL)、pH 7.0(246 mL)、pH 8.0(234 mL)、pH 6.0(227 mL)、pH 8.5(143 mL)、pH 5.0(24 mL)、pH 4.0(17 mL)。在发酵后 12 h 就已启动的反应器共有 5 组,分别是 pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5 和 pH 8.0,产气量依次是 28、53、46、44、8 mL。pH 4.0 和 pH 5.0 在发酵开始后,基本没有太明显的发酵活动,产气也极其微弱。而 pH 8.5 在发酵开始后第 4 天才有明显的产气活动。根据图 3,pH 8.5 发酵第 1 天到第 4 天的日产气量分别是 4.0、9.0、1.5、11.5 mL,而发酵启动最快的 pH 6.5 发酵开始 4 d 内的日产气量分别为 88.0、78.0、7.5、6.5 mL。pH 6.0、pH 7.0、pH 7.5 的产气规律较为相似。同时分析发现,所有反应器在发酵开始 20 d 后,日产气量均低于 5 mL。综上,当 pH 接近于中性时有利于厌氧发酵的启动;pH 偏碱性时厌氧发酵会滞后,pH 过低时厌氧发酵不能正常启动。

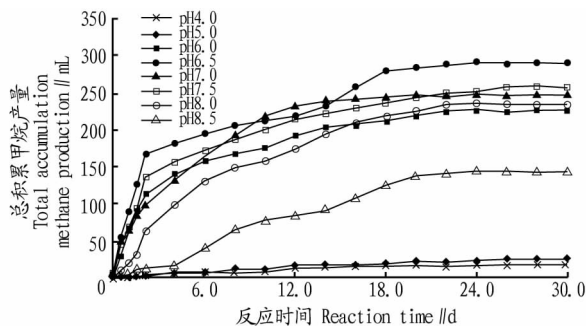


图 2 不同反应器中积累甲烷产量

Fig. 2 Cumulative methane production in different reactors

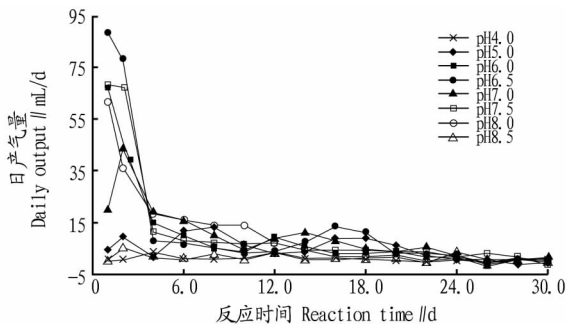


图 3 不同反应器中日产甲烷含量的变化

Fig. 3 Change of daily biogas yield production in different reactors

2.2 不同初始发酵 pH 条件下各反应器内发酵过程中 VFA 含量的变化 根据图 4 可知,当初始发酵 pH 不同时,各反应器内的 VFA 积累曲线具有一定的差异性。当初始 pH 为 4.0 和 5.0 时,系统内的 VFA 含量变化不明显。当初始 pH 为 6.5 时,系统内的 VFA 含量以最快的速度达到所有反应器内的峰值,即发酵开始后 1.5 d 达到 4 386 mg/L。当初始 pH 低于或者高于 6.5 时,其系统内的 VFA 含量出现的峰值都要小于反应器 pH 6.5 内的峰值,各反应器内 VFA 的含量最高时为 pH 6.0(4 058 mg/L)、pH 7.0(4 041 mg/L)、pH 7.5(3 998 mg/L)、pH 8.0(3 259 mg/L)、pH 8.5(2 459 mg/L)、pH 5.0(1 299 mg/L)、pH 4.0(1 178 mg/L)。其中当初始 pH

为 8.5 时,反应器在发酵开始后的第 10 天才达到 VFA 含量的峰值,同甲烷产气的积累曲线一样出现了滞后现象。以上说明甲烷发酵的启动速度与 VFA 的积累速度有直接关系。所有反应器发酵结束后,最终的 VFA 含量由高至低依次为 pH 8.5(1 936 mg/L)、pH 7.0(1 659 mg/L)、pH 6.5(1 630 mg/L)、pH 6.0(1 516 mg/L)、pH 8.0(1 425 mg/L)、pH 7.5(1 382 mg/L)、pH 5.0(1 257 mg/L) 和 pH 4.0(1 146 mg/L)。

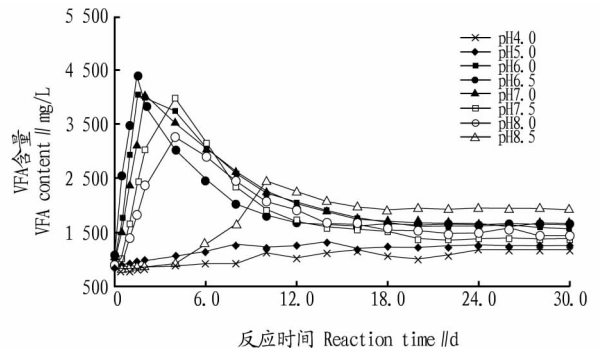
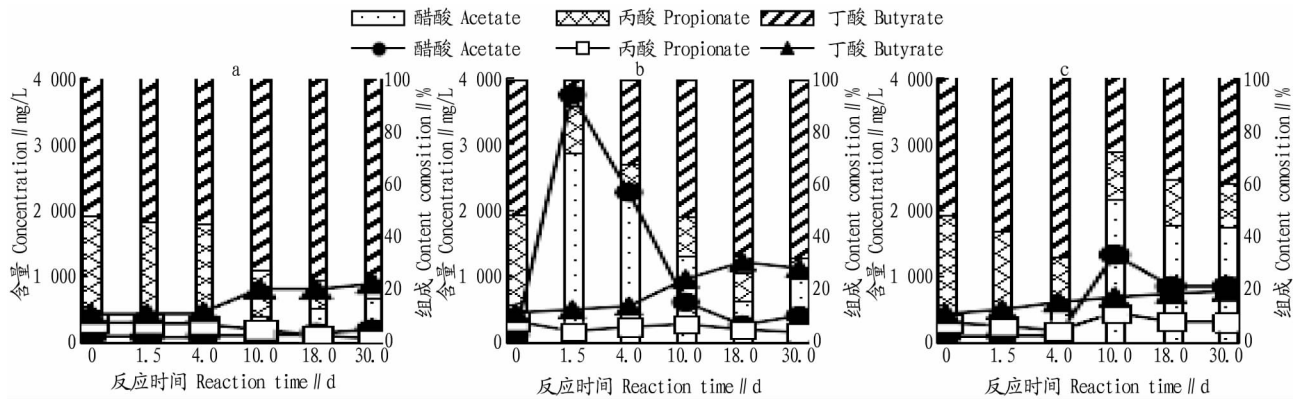


图 4 不同反应器的 VFA 的含量变化

Fig. 4 The change of VFAs concentration in different reactors

2.3 初始 pH 为 4.0、6.5 和 8.5 时系统内 VFA 组成的动态变化 图 5 为初始 pH 4.0、6.5、8.5 时,发酵开始 1.5、4.0、10.0、18.0 和 30.0 d 时发酵系统内 VFA 的组成情况。在发酵开始初期,3 组反应器内的 VFA 组成情况为乙酸 11.7% (97.30 mg/L)、丙酸 36.3% (302.00 mg/L)、丁酸 52.0% (432.64 mg/L)。当初始 pH 为 4.0 时,发酵过程中主要变化的成分是丙酸和丁酸,乙酸的含量从发酵开始后缓慢增长,最终为 198.3 mg/L(17.3%),丙酸和丁酸最终的含量分别为 58.4 mg/L(5.1%) 和 889.3 mg/L(77.6%),这说明系统内的乙酸菌被严重抑制,丁酸菌成为了优势菌。在初始 pH 为 6.5 的反应器内,乙酸含量变化起伏较大,在发酵开始后 1.5 d,乙酸的含量由 97.3 mg/L(11.7%) 激增至 3 753.6 mg/L(71.6%),之后乙酸的含量又持续较低,最终为 386.3 mg/L(2.4%),而丙酸和丁酸最终的含量分别为 133.6 mg/L(8.2%) 和 1 110.0 mg/L(6.8%)。这可能是因为在反应器 pH 6.5 内,乙酸菌在发酵前期大量繁殖,所以乙酸的含量迅速升高,随着发酵的持续发酵基质减少以及乙酸型产甲烷菌的存在,乙酸的含量又迅速减少。当发酵 pH 为 8.5 时,系统内丙酸和丁酸含量的变化与 pH 为 6.5 时相似,最终的含量分别为 311.7 mg/L(1.6%) 和 774.4 mg/L(40.0%)。乙酸的含量自发酵开始后变化缓慢,但发酵时间持续到第 10 天时乙酸的含量增至 1 322.9 mg/L(53.8%),最终消耗至 849.9 mg/L(43.9%),相较于反应器 pH 6.5,反应器 pH 8.5 内最终的乙酸含量比峰值减少了 36.0%,而 pH 6.5 内却减少了 72.4%。以上说明当初始发酵 pH 为 8.5 时,系统的产乙酸菌生长缓慢,且系统内没有优势的乙酸型产甲烷菌,从而造成了 pH 8.5 内乙酸的堆积。

2.4 发酵系统内中的微生物群落 在历经 30 d 的厌氧发酵后,8 组不同初始发酵 pH 的发酵系统已基本停止产生甲烷。提取发酵液中的 DNA,通过 Miseq 高通量测序分析其中的细



注:a. pH 4.0;b. pH 6.5;c. pH 8.5

Note:a. pH 4.0;b. pH 6.5;c. pH 8.5

图5 初始 pH 为 4.0、6.5 和 8.5 时 VFAs 的组成变化

Fig.5 Change of the VFAs at initial pH 4.0,6.5 and 8.5

菌和古菌菌落的结构特征。测序共得到有效的细菌序列 157 107 条以及有效的古菌序列 87 228 条,所有反应器内的细菌覆盖度超过 99%,所有反应器内古菌的覆盖度超过了 99.9%,所以此次测序所得的序列深度能够充分代表各反应器内的细菌和古菌种类。

2.4.1 不同初始发酵 pH 反应器内细菌菌落的结构。所得全部序列在经过一系列的质量控制后,按照 97% 相似性进行 OTU 的聚类,并且合并相对丰度低于 1% 的细菌菌属之后,得图 6。如图 6 所示,不同初始发酵 pH 的反应器内细菌菌落在属水平上结构差异性较为明显。明显地,反应器 pH 4.0 和 pH 5.0 的细菌菌属结构相似,它们的优势菌属为拟杆菌门的拟杆菌属,其相对丰度分别是 35.7% 和 37.3%。而梭菌属在反应器 pH 6.0、6.5、7.0 和 7.5 中有着绝对的优势,其相对丰度依次为 40.5%、46.7%、42.3% 和 40.4%,梭菌属是一类同型产乙酸菌,因此还可能利用 H_2 和 CO_2 产生乙酸,供乙酸利用型的产甲烷菌如甲烷鬃毛菌属或甲烷八叠球菌作为底物产甲烷^[12]。同时隶属于厚壁菌门的毛螺旋菌属和属于互养菌门的互养单胞菌属也有较高的分布,其在全菌序列中所占比例分别为 13%~22% 和 8%~15%。当初始发酵 pH 变为 8.0 和 8.5 时,发酵系统内的细菌菌落分布又有了较大的变化,具体表现为,原本在中性或者酸性的初始发酵环境中的优势菌梭菌属的相对丰度大幅减少,其在 pH 8.0 和 8.5 中的相对丰度分别为 12.8% 和 8.9%,优势菌变化为普雷沃氏菌和互养单胞菌属,它们能与氢营养型的产甲烷菌,例如甲烷杆菌属,合作共生将长链脂肪酸降解转化乙酸和氢^[13]。它们的相对丰度分别为 25.3%、36.8% 和 13.9%、14.7%。同时发现,隶属于螺旋体门的密螺旋菌属在初始发酵 pH 接近中性时有着较为丰富的含量,其在 pH 6.0、6.5、7.0 和 7.5 中的相对丰度依次为 7.3%、5.9%、7.8% 和 3.2%,而在其他反应器内的含量均小于 2%,并且该菌同样是一类同型产乙酸菌。并且在各反应器内还发现了硝化螺旋菌属、共养杆菌属、脱硫弧菌属、绿湾菌属和一些含量较少的菌属。以上结果说明,当初始 pH 接近中性时有利于产乙酸菌得生长,当初始 pH 偏碱性时则会抑制产乙酸菌而造成产氢菌的大量

繁殖。

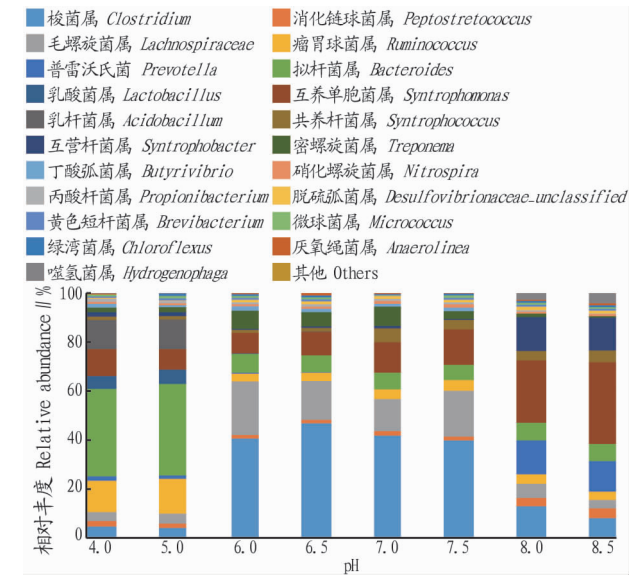


图6 不同反应器中细菌在属水平上的相对丰度分布

Fig.6 The relative abundance of the bacteria at genus level in different reactors distribution

2.4.2 不同初始发酵 pH 反应器内古菌菌落的结构。在全部的反应器中,广古菌门是绝对的优势菌,其在反应器 pH 4.0 中的相对丰度依次为 94.3%、94.7%、96.8%、97.4%、98.2%、97.3%、96.9% 和 98.3%,并且还有少部分的古菌属于奇古菌门和泉古菌门。对所有反应器中的全古菌库在属的水平上进行分析,根据图 7,各反应器的古菌菌落差异较为明显,其中 pH 4.0 和 5.0 的古菌菌落结构较为相似,且优势菌的分布也较为均匀,具体的优势菌为甲烷杆菌属、甲烷八叠球菌属以及甲烷热杆菌属,该 3 类产甲烷菌在 pH 4.0 中的相对丰度依次为 33.8%、19.7% 和 23.5%,在 pH 5.0 中的相对丰度依次为 29.1%、19.3% 和 26.4%。而反应器 pH 6.0、6.5、7.0、7.5 的古菌菌落的结构相似度较高,该 4 组反应器的优势菌均为隶属于甲烷八叠球菌目的甲烷鬃毛菌属和甲烷八叠球菌属,这是 2 类乙酸营养型产甲烷菌。两者所占全古菌库之和依次为 85.1%、87.9%、85.4% 以及

86.8%。其中 pH 6.5 的甲烷八叠球菌属含量最高,为50.8%; pH 6.0 的甲烷鬃毛菌属含量最高为 46.3%。同样地,甲烷八叠球菌属和甲烷鬃毛菌属在 pH 8.5 中的相对丰度仅为 9.4%与9.9%,其发酵系统内的优势古菌为隶属于甲烷杆菌目的甲烷杆菌属和甲烷热杆菌属,其在反应器 pH 8.5 中的全古菌序列中分别占 62.3%和 11.4%,而甲烷杆菌属和甲烷热杆菌属是 2 类氢营养型的产甲烷菌。造成上述现象的原因可能是,当初始发酵 pH 接近中性时,系统内存在大量产乙酸细菌,如梭菌属、密螺旋菌属,促进了乙酸型产甲烷菌的生长如甲烷鬃毛菌属和甲烷八叠球菌属。相反地,当初始 pH 偏碱性时,系统内产乙酸菌的生长会受到抑制产氢细菌大量繁殖,从而促使了氢营养型产甲烷菌的繁殖。而一个良好的沼气反应器中产甲烷的主要途径应该是乙酸型的产甲烷途径^[14-15],所以这可能就是反应器 pH 8.5 产气不良的主要原因。

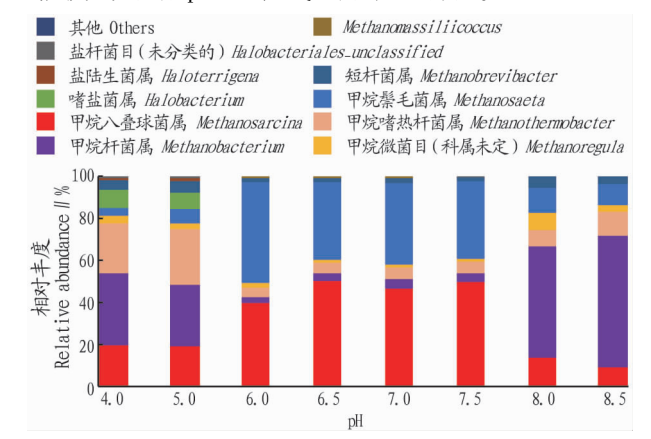


图7 不同反应器中古菌在属水平上的相对丰度

Fig.7 The relative abundance of archaeal at genus level in different reactors

3 结论与展望

当初始发酵 pH 为 6.5 时,甲烷的产气最高。过低的 pH 会抑制参与水解了大分子有机物的微生物和产甲烷菌的生长,造成发酵系统不能正常启动;过高的 pH 则会阻碍产乙酸菌的生长,从而导致产氢菌的繁殖,最终导致氢营养型的

甲烷菌成为优势菌,从而造成不良产气效果。该研究还缺乏对整个发酵阶段的微生物动态变化进行系统性的研究,结论的数据支持还不够完整,最后希望能够通过该研究给酒精醪液发酵产业及研究带来一定的技术支持。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家发展和改革委员会基础产业发展司. 中国新能源与可再生能源 1999 白皮书[M]. 北京:中国计划出版社,2000.

[2] 杨霞. 糖蜜酒精废液的厌氧生物处理及反应器中微生物群落结构分析[D]. 南宁:广西大学,2012.

[3] 石智慧. 纤维素乙醇废水生物处理技术研究[D]. 武汉:武汉理工大学,2010.

[4] 王晋. 厌氧发酵产酸微生物种群生态及互营关系研究[D]. 无锡:江南大学,2013.

[5] SHIN S G, LEE S, LEE C, et al. Qualitative and quantitative assessment of microbial community in batch anaerobic digestion of secondary sludge[J]. Bioresource technology, 2010, 101(24): 9461-9470.

[6] WANG X J, YANG G H, FENG Y Z, et al. Optimizing feeding composition and carbon-nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw[J]. Bioresource technology, 2012, 120(8): 78-83.

[7] 王晓娇. 混合原料沼气厌氧发酵影响因素分析及工艺优化[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013.

[8] GU Y, CHEN X H, LIU Z G, et al. Effect of inoculum sources on the anaerobic digestion of rice straw[J]. Bioresource technology, 2014, 158(4): 149-155.

[9] KAWAI M, NAGAO N, TAJIMA N, et al. The effect of the labile organic fraction in food waste and the substrate/inoculum ratio on anaerobic digestion for a reliable methane yield[J]. Bioresource technology, 2014, 157(1): 174-180.

[10] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and environmental microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.

[11] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic acids research, 2013, 41: 590-596.

[12] ZHANG S, BANASZAK J E, PARAMESWARAN P, et al. Focused-pulsed sludge pre-treatment increases the bacterial diversity and relative abundance of acetoclastic methanogens in a full-scale anaerobic digester[J]. Water research, 2009, 43(18): 4517-4526.

[13] ZENED A, COMBES S, CAUQUIL L, et al. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets[J]. FEMS microbiology ecology, 2013, 83(2): 504-514.

[14] LIU Y C, 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.

[15] VALCKE D, VERSTRAETE W. A practical method to estimate the acetoclastic methanogenic biomass in anaerobic sludges[J]. Journal (Water pollution control federation), 1983, 55(9): 1191-1195.

(上接第 64 页)

[4] 吴雨华. 欧美国家地下水硝酸盐污染防治研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(8): 284-290.

[5] BANGE H W. New directions: The importance of oceanic nitrous oxide emissions[J]. Atmospheric environment, 2006, 40(1): 198-199.

[6] PUNSHON S, MOORE R M. Nitrous oxide production and consumption in a eutrophic coastal embayment[J]. Marine chemistry, 2004, 91(1/2/3/4): 37-51.

[7] 高洋. 生活污水排放现状及改进策略探究[J]. 资源节约与环保, 2014(2): 116.

[8] 梁康, 王启烁, 王飞华, 等. 人工湿地处理生活污水的研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(3): 422-428.

[9] 孙瑞敏. 我国农村生活污水排水现状分析[J]. 能源与环境, 2010(5): 33-34, 42.

[10] 彭举威, 汪诚文, 付宏祥, 等. 我国农村水污染现状及治理措施[J]. 中国资源综合利用, 2010, 28(2): 44-45.

[11] PARASTAR S, NASSERI S, BORJI S H, et al. Application of Ag-doped TiO₂ nanoparticle prepared by photodeposition method for nitrate photocatalytic removal from aqueous solutions[J]. Desalination & water treatment, 2013, 51(37/38/39): 7137-7144.

[12] 杜勇立, 黄向京, 戚芳方, 等. 煤矸石作路基材料对地下水硝酸盐污染数值模拟分析[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2014, 43(3):

297-303.

[13] 吴雅丽, 许海, 杨桂军, 等. 太湖水体氮素污染状况研究进展[J]. 湖泊科学, 2014, 26(1): 19-28.

[14] 毕晶晶, 彭昌盛, 胥慧真. 地下水硝酸盐污染与治理研究进展综述[J]. 地下水, 2010, 32(1): 97-102.

[15] 甘一萍. 污水处理厂深度处理与再生利用技术[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2010.

[16] 张立辉, 曹国民, 盛梅, 等. 地下水硝酸盐去除技术进展[J]. 净水技术, 2010, 29(5): 4-10.

[17] 赵群. 废水中硝态氮来源、转化及去除方法[J]. 山东理工大学学报(自然科学版), 2014, 28(4): 53-56.

[18] 冯锦霞, 朱建军, 陈立. 我国地下水硝酸盐污染防治及评估预测方法[J]. 地下水, 2006, 28(4): 58-62.

[19] 迟峰. 反渗透法脱除地下水中硝酸盐的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.

[20] 王弘宇, 马放, 苏俊峰, 等. 不同碳源和碳氮比对一株好氧反硝化细菌脱氮性能的影响[J]. 环境科学学报, 2007, 27(6): 968-972.

[21] 巩有奎, 彭登瑶, 王淑莹, 等. 流量分配对短程生物脱氮过程中 N₂O 产生的影响[J]. 环境科学学报, 2014, 34(7): 1668-1673.

[22] 夏国围, 贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价[J]. 微生物学报, 2014, 54(12): 1489-1499.