

# 产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 的生长代谢特性

刘 枫, 李建政, 昌 盛, 陈忠林

(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, blist@126.com)

**摘 要:** 为了对产氢产乙酸互营共培养体的扩大培养和应用奠定基础, 采用静态培养实验, 考察了碳源、氮源、温度和 pH 等因素对前期分离得到的新型共培养体 7-m-2a 的生长代谢特性的影响. 结果表明, 产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 对丙酸、丁酸和苯甲酸都具有很高的转化率, 其最适宜碳源为丁酸, 不易利用葡萄糖和蔗糖; 以蛋白胨和酵母粉混合物为氮源时, 其生长代谢活动最旺盛, 适宜的 pH 和温度分别为 8.0 和 45 °C.

**关键词:** 厌氧消化; 产氢产乙酸菌; 互营共培养体; 生理生态特性

中图分类号: X703

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2010)06-0890-03

## Physioecologic and metabolic products characteristics of a new isolated syntrophic acetogenesis coculture 7-m-2a

LIU Feng, LI Jian-zheng, CHANG Sheng, CHEN Zhong-lin

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, blist@126.com)

**Abstract:** In order to culture the syntrophic acetogenesis coculture in large scale and make it be used in full-scale application, the effect of carbon source, nitrogen source, temperature and pH on the activity of a new isolated syntrophic acetogenesis coculture 7-m-2a was investigated in this study. The result of batch cultivation experiments shows that the syntrophic acetogenesis coculture 7-m-2a can utilize propionate, butyrate and benzoate as carbon source, and the most appropriate substrate is butyrate, while it almost can not degrade glucose and sucrose. The metabolic activity is the most active when using the mixture of tryptone and yeast as nitrogen source. The suitable cultivation temperature and pH are 45 °C and 8.0.

**Key words:** anaerobic digestion; syntrophic acetogenic bacteria; syntrophic coculture; physioecologic characteristics

在参与厌氧消化的各微生物类群中, 产氢产乙酸菌群在营养生态位上位于产酸发酵菌群和产甲烷菌群之间, 能将产酸发酵菌群代谢产生的丙酸、丁酸等挥发性有机酸(VFAs)和乙醇等进一步降解转化为乙酸和  $\text{CO}_2/\text{H}_2$ , 为后续的产甲烷菌群提供了可以直接利用的底物<sup>[1-4]</sup>. 研究表明, 产氢产乙酸菌群的生态位比产甲烷菌群的更加狭窄, 生长和代谢速度更慢、而且生长条件更加苛刻, 对厌氧消化进程具有显著的限制作用. 同时, 在一定

的负荷范围内, 产甲烷菌群的生物量和代谢强度是受产氢产乙酸菌群代谢产物的控制. 因此, 提高产氢产乙酸互营共培养体的功能作用, 将会有效提高厌氧生物处理系统的处理效能和运行稳定性<sup>[5]</sup>. 然而, 目前所报道的产氢产乙酸菌株很少, 对其生理生态习性的了解也不够深入和广泛<sup>[4,6-9]</sup>. 本文将对前期研究中分离筛选出的产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 进行研究, 以考察其在不同碳源、氮源和 pH 及温度等条件下的生理生态学特性, 以期在厌氧生物处理系统中富集更多的产氢产乙酸菌和工程应用提供指导.

收稿日期: 2010-03-01.

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(2009RFXXS004).

作者简介: 刘 枫(1984—)女, 博士研究生;

李建政(1965—)男, 教授, 博士生导师.

# 1 材料与方法

## 1.1 菌种来源与培养基

产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 是课题组前期以厌氧活性污泥为出发菌群选育得到的,利用 PCR-DGGE 技术对其菌群结构进行解析,结果显示此共培养体中含有专性的互营产乙酸菌 *Desulfotomaculum* sp. Iso - W2 及其伴生菌,其中的伴生菌是能利用甲酸盐和  $H_2/CO_2$  的 *Uncultured bacterium* 054E12\_B\_DI\_P58 和 *Sedimentibacter* sp. JN18\_A14\_H<sup>[10]</sup>. 实验采用的基本培养基参考文献[10]. 在进行不同碳源(有机物)转化试验时,在培养基基本成分的基础上,分别加入丙酸钠、丁酸钠、苯甲酸、葡萄糖、蔗糖,加入量均为 10.0 g. 在进行不同氮源对 7-m-2a 生长和产氢产乙酸能力影响试验时,以丁酸钠培养基为基础,更换不同氮源,1 L 培养基的加入量为 3.0 g,其他成分同基本培养基.

## 1.2 静态实验方法

向 50 mL 血清瓶中注入 30 mL 培养基,充氮脱氧,灭菌;从厌氧固体培养基上挑取少量的 7-m-2a 菌落配制成菌悬液,通过血球计数板计数为  $1.3 \times 10^8$  个/mL. 用 1 mL 无菌注射器接种,接种量为 1 mL. 接种后置于空气浴中在 35 ℃ 和 110 r/min 下培养,5 d 后,取样分析气体成分、挥发酸和细胞生长等指标. 实验分 4 组,分别考察碳源、氮源、pH 及温度对 7-m-2a 生长和产氢产乙酸代谢的影响,每组实验设置 3 个平行样,相关检测数据取平均值.

## 1.3 分析方法

发酵气体体积采用玻璃注射器计量,其组分采用气相色谱仪(SP - 6801T, 山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司)分析<sup>[11]</sup>. 液相末端发酵产物(VFAs 和乙醇)的分析,采用另一台气相色谱仪(SP - 6890, 山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司)测定<sup>[11]</sup>. 菌悬液细胞密度的测定采用分光光度法<sup>[11]</sup>. pH 的值测定采用 PHS - 25 型酸度计测,苯甲酸含量测定采用紫外分光光度法<sup>[11]</sup>.

# 2 结果与讨论

## 2.1 碳源对 7-m-2a 生长和产氢产乙酸代谢的影响

实验结果(表 1)显示,碳源的选择对互营共培养体 7-m-2a 生长的影响较大. 以丁酸为底物时,7-m-2a 生长最旺盛,培养结束时,其吸光度(OD)和乙酸产量分别高达 0.51 mg/L 和 1 644 mg/L. 适宜的碳源其次是苯甲酸和丙酸,培

养结束时,其 OD 和乙酸质量浓度分别为 0.26, 0.20, 1 383, 1 063 mg/L. 而以葡萄糖、蔗糖为底物时,7-m-2a 只呈现微弱生长,说明在 7-m-2a 中,优势菌株不易利用葡萄糖或蔗糖. 从 7-m-2a 产氢能力分析,以丁酸为碳源时,其氢气产量最高,为 217 mL/L-培养基;其次是苯甲酸和丙酸,其氢气产量分别可达 157 mL/L-培养基和 155 mL/L-培养基;在葡萄糖或蔗糖培养基中,7-m-2a 的产氢产乙酸性能最差. 以上现象表明,丁酸是最为合适的碳源,在之后的其他因素试验时,选择丁酸作为碳源物质.

表 1 碳源对产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 的影响

| 碳源  | 底物降解率/% | OD 值 | 乙酸产生量/(mg/L) | 氢气产量/(mL/L-培养基) |
|-----|---------|------|--------------|-----------------|
| 葡萄糖 | 4.64    | 0.10 | 248.60       | 11.47           |
| 蔗糖  | 5.78    | 0.11 | 126.47       | 29.54           |
| 苯甲酸 | 22.15   | 0.26 | 1383.15      | 157.28          |
| 丙酸  | 20.91   | 0.20 | 1062.92      | 154.71          |
| 丁酸  | 19.01   | 0.51 | 1643.77      | 217.37          |

## 2.2 氮源对 7-m-2a 生长和产氢产乙酸代谢的影响

氮源的性质对不同微生物的增殖和代谢会产生不同的影响<sup>[12]</sup>. 本实验设计的氮源含量是 3 g/L,如果采用 2 种氮源物质,则每一种氮源物质 1.5 g/L;如果采用 3 种氮源物质,则每一种氮源物质各为 1 g/L. 共 6 组实验:蛋白胨(P)、牛肉膏(B)、酵母粉(Y)、P + B、P + Y、P + B + Y(表 2).

表 2 氮源对产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 的影响

| 氮源        | 底物降解率/% | OD 值 | 乙酸产生量/(mg/L) | 氢气产量/(mL/L-培养基) |
|-----------|---------|------|--------------|-----------------|
| Y         | 27.45   | 0.34 | 1336.70      | 117.57          |
| B         | 7.65    | 0.70 | 1077.49      | 96.32           |
| P         | 28.24   | 1.00 | 1215.32      | 110.11          |
| P + B     | 35.76   | 1.35 | 1008.24      | 109.27          |
| P + Y     | 32.52   | 1.01 | 1509.98      | 137.88          |
| P + B + Y | 28.63   | 0.70 | 1154.15      | 113.06          |

实验结果(表 2)显示,以蛋白胨和牛肉膏组合为氮源时,7-m-2a 生长最旺盛,培养结束时,其 OD 值达到 1.35. 适宜 7-m-2a 生长的氮源其次是蛋白胨和酵母粉组合,培养结束时的 OD 值为 1.01. 而单独以酵母粉作为氮源时,7-m-2a 生长最弱,培养结束时的 OD 值仅达到 0.34. 从 7-m-2a 产氢产乙酸效能分析,以蛋白胨和酵母粉为氮源时,其乙酸产量和氢气产量分别高达 1 510 mg/L 和 138 mL/L-培养基. 其次是单独以酵母粉作为氮源时,其乙酸产量和氢气产量分别为 1 337 mg/L

和 118 mL/L-培养基. 利用蛋白胨和牛肉膏组合时,产氢产乙酸效能最差,但当在此组合基础上添加了酵母粉后,其乙酸和氢气产量稍有上涨,分别达到了 1 154 mg/L 和 113 mL/L-培养基. 以上现象表明,酵母粉最适宜 7-m-2a 发挥产氢、产乙酸性能,蛋白胨最适宜 7-m-2a 的生长繁殖;在两者形成的组合试验中,其无论是对 7-m-2a 生长繁殖的促进,还是对产氢产乙酸效能的发挥,都是综合效果最佳的.

2.3 pH 值对 7-m-2a 生长和产氢产乙酸代谢的影响

如表 3 所示,当 pH 值为 8 时,7-m-2a 的生长最旺盛、产氢产乙酸效能最高. 培养结束时,其 OD 值达到 1. 15,产乙酸量和产氢量也分别达到 1 369 mg/L和 131 mL/L-培养基.

表 3 pH 对产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 的影响

| pH   | 底物降解率/% | OD 值  | 乙酸产生量/(mg/L) | 氢气产量/(mL/L-培养基) |
|------|---------|-------|--------------|-----------------|
| 5    | 6. 48   | 0. 38 | 526. 39      | 2. 15           |
| 6    | 11. 33  | 0. 41 | 698. 18      | 25. 50          |
| 7    | 19. 54  | 0. 89 | 1075. 12     | 87. 66          |
| 7. 5 | 22. 56  | 1. 07 | 1165. 48     | 117. 44         |
| 8    | 26. 56  | 1. 15 | 1369. 08     | 131. 29         |
| 9    | 8. 51   | 0. 63 | 731. 20      | 19. 22          |

2.4 温度对 7-m-2a 生长和产氢产乙酸效能的影响

如表 4 所示,随着温度的改变,7-m-2a 的生长波动幅度较大. 在温度为 30 ℃ 时,其生长量达到第一个峰值,培养结束时的 OD 值为 1. 07,产乙酸量和产氢量也达到最大,分别为 1 527 mg/L 和 180 mL/L-培养基;随着温度的上升,7-m-2a 的生长和代谢效能都有所减弱;当温度上升到 45 ℃ 时,7-m-2a 的生长量达到第二个峰值,培养结束时其 OD 值达到 0. 99,产乙酸量和产氢量也分别达到 1 675 mg/L 和 177 mL/L-培养基;之后随着温度的继续上升,7-m-2a 的生长代谢活动几乎停止. 以上现象表明,7-m-2a 在 30 ℃ 和 45 ℃ 下均能

表 4 温度对产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 的影响

| 温度/℃ | 底物降解率/% | OD 值  | 乙酸产生量/(mg/L) | 氢气产量/(mL/L-培养基) |
|------|---------|-------|--------------|-----------------|
| 25   | 11. 81  | 0. 73 | 1166. 05     | 52. 68          |
| 30   | 12. 85  | 1. 07 | 1526. 82     | 179. 73         |
| 35   | 10. 01  | 0. 85 | 1205. 22     | 83. 17          |
| 40   | 12. 12  | 0. 93 | 1496. 34     | 173. 95         |
| 45   | 13. 93  | 0. 99 | 1675. 12     | 177. 17         |
| 50   | 5. 12   | 0. 48 | 869. 41      | 53. 10          |
| 55   | 5. 67   | 0. 48 | 749. 02      | 19. 70          |

很好的进行生长代谢活动. 由此推测,产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 中可能存在着嗜中温和中度嗜高温两类细菌. 由于高温条件下,菌体的代谢速率一般都比较快,所以选择 45 ℃ 为产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 的最佳培养温度.

3 结 论

1) 产氢产乙酸互营共培养体 7-m-2a 对于丙酸、丁酸和苯甲酸都有很高的产氢产乙酸代谢能力,其最适宜碳源为丁酸,但不易利用葡萄糖和蔗糖.

2) 以胰蛋白胨和酵母膏混合物为氮源时,互营共培养体 7-m-2a 的生长代谢活性最高,适宜的培养温度为 45 ℃ ,pH 为 8. 0.

参考文献:

[1] 刘聿太,王大粗. 产氢产乙酸菌与产甲烷菌互养培养物的分离[J]. 中国沼气,1987,5(3):8-11.

[2] 胡纪萃,周孟津,左剑恶,等. 废水厌氧生物处理理论与技术[M]. 北京:中国建筑工业出版社,2003:19-31.

[3] GARCIAJ L, PATEL K C, OLLIVER B. Taxonomic, phylogenetie and ecological diversity of methanogenic [J]. Amh Anaerobe, 2000(6):205-226.

[4] LANGE M, AHRING B K. A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic Archaea [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2001,5(12):553-571.

[5] 公维佳,李文哲,刘建禹. 厌氧消化中的产甲烷菌研究进展[J]. 东北农业大学学报,2006,37(6):838-841.

[6] PRATAP C P, DAVOD P C. Stable performance of anaerobic digestion in the presence of a high concentration of propionic acid. Bioresource Technology, 2001, 78: 165-169.

[7] 葛源,贺纪正,郑袁明,等. 稳定性同位素探测技术在微生物生态学研究中的应用. 生态学报,2006,26(5):1574-1582.

[8] 赵宇华,钱泽涛. 硬脂酸降解菌与嗜氢产甲烷杆菌共培养物的研究[J]. 浙江农业大学报,1991,17(1):75-79.

[9] 邢德峰,任南琪,宫曼丽. PCR-DGGE 技术解析生物制氢反应器微生物多样性[J]. 环境科学,2005,26(2):172-176.

[10] 李建政,孙倩,刘枫,等. 一种产氢产乙酸菌互营共培养体的筛选及其群落结构解析[J]. 科技导报,2009,27(16):78-82.

[11] 刘枫. 产氢产乙酸互营共培养体的筛选及特性研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2008:26-28.

[12] 何良菊,李培杰,魏德洲,等. 石油烃微生物降解的营养平衡及降解机理[J]. 环境科学,2004,25(1):91-94.