

沼气池中产氢细菌的研究

刘克鑫 徐浩泉 廖多群 孙国朝 邵廷杰*

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

1. 在沼气发酵污泥的富集培养物中加入薯蓣粉可以旺盛地产氢。这是富集培养沼气发酵污泥中的产氢细菌的较好方法。

2. 我们采用这一方法从沼气池中分离出 24 株产氢细菌, 其产氢量因菌株的种类和发酵基质的不同而异。根据它们的分类特征分别属肠杆菌科 (Enterbacteriaceae) 和芽孢杆菌科 (Bacillaceae)。肠杆菌科中有五个种: 阴沟肠杆菌 (*Enterbacter cloacae*), 大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*), 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*), 弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*), 和蜂房哈夫尼菌 (*Hafnia alvei*) (暂定)。芽孢杆菌科中仅有一个种, 即丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)。

3. 各类菌的相对数量以肠杆菌占优势, 占总数的 58.3%。其次是粘质沙雷氏菌, 占 16.7%。丙酮丁醇梭菌占 12.5%。其他各菌数量较少。

4. 将这些产氢菌与甲烷菌的富集培养物进行混合培养, 可大大提高甲烷产量, 而二氧化碳显著降低, 以至检测不到。

已知所有的产甲烷菌都能利用氢还原二氧化碳成甲烷^[1]。沼气中一般 CO_2 含量为 30—40%, 而氢不易检测到。这表明沼气发酵中形成的氢是不足的。Winfrey 等 (1976 年) 在湖泊沉积物的沼气发酵试验中通入氢气, 使甲烷产量成倍地提高^[2]。McCarty 等人 (1962, 1964) 提出, 沼气发酵中可能存在中间微生物群落——产氢菌, 并认为弄清这一群落数量、种类和代谢是非常重要的。Bryant 等 (1967) 的研究证明奥氏甲烷杆菌 (*Methanobacillus omelianskii*) 实际上是产甲烷菌 MOH 菌株和“S”有机体 (利用乙醇产氢的细菌) 的共生体, 说明了产氢菌的存在^[3]。Holmes 等分离鉴定了消化污泥中的产氢细菌, 均属肠杆菌, 其中柠檬酸细菌 (*Citrobacter*) 占优势^[4]。

我们的目的是研究沼气池中产氢微生物的种类及其在沼气发酵中的作用, 这对

提高甲烷产量和研究甲烷发酵机理具有重要意义。

材料和方法

(一) 样品来源

沼气池污泥、发酵液。

(二) 培养基

1. 产甲烷菌培养基 (%) : $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 2, NH_4Cl 0.075, MgCl_2 0.01, K_2HPO_4 0.04。加 3% 的去氧剂: Na_2S 1%, Na_2CO_3 5%。

2. 产氢细菌分离培养基

(1) 蛋白胨 10 克, 酵母膏 5 克, NaCl 5 克, 琼脂 15 克, 水 1000 毫升。

(2) 玉米粉 5 克, 加水 100 毫升, 煮一小时, 用纱布过滤。滤液中加蛋白胨 0.1%, 葡萄糖 1%, 琼脂 2%。

本文于 1979 年 6 月 29 日收到。

* 王孝玲、郭平、王云飞、郭莉和周密同志参加部分工作, 菌种鉴定由王大粗同志指导, 特此感谢。

(三) 产氢菌的富集与分离

沼气发酵污泥中加入作物秸秆和粪便进行甲烷发酵。当大量甲烷产生后加入 4—6% 的薯芋粉, 停止产生甲烷, 很快大量产氢。此时取富集培养物进行稀释分离, 置 30—35℃ 真空干燥箱中进行厌氧培养。为了防止培养基干枯, 用 CO_2 充满真空干燥箱。

(四) 混合培养

将沼气池污泥用产甲烷菌培养基富集培养一个月左右, 与产氢菌的扩大培养物等量混合, 在 30℃ 培养。发酵装置如图 1。

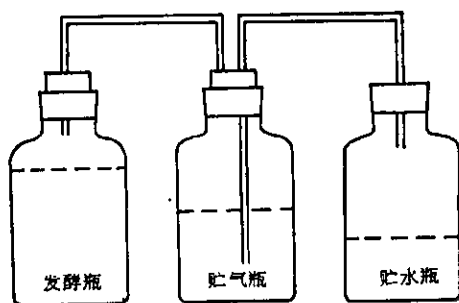


图1 混合培养装置

(五) 产氢细菌的鉴定

采用王大粗《细菌分类基础》和 V. B. D. Skermen《细菌属的鉴定指导》描述的方法。按照《伯杰氏鉴定细菌学手册》进行鉴定^[9-11]。

(六) 甲烷、氢气和二氧化碳的测定

采用 SP-2302 气相色谱仪测定。产气量用排水集气法排出的水量计算。

结果与讨论

(一) 产氢细菌的富集

甲烷发酵污泥的富集培养物中加入一定量的薯芋粉, 可使甲烷发酵完全停止, 而进行旺盛的产氢发酵, 以达到富集培养产氢菌的目的。

多次重复试验证明, 沼气发酵污泥中加入自然或人工培养基, 能富集培养产甲烷细菌, 提高甲烷产量。在此情况下加入 4—6% 薯芋粉可完全抑制产甲烷, 很快大量产氢, 氢的含量为 50—58%, 其余主

要为 CO_2 。这种彻底的取代, 说明沼气池污泥中含有较大数量的产氢菌, 而薯芋中的某种成份可能对产氢菌有强烈刺激作用, 或对产甲烷菌有抑制作用。

(二) 产氢细菌的分离和产氢发酵

从沼气池污泥的富集培养物中分离出 51 株细菌, 其中产氢细菌 24 株, 占 47%。

各菌株的产气量和所产生气体中的氢含量有很大差异, 而且随发酵基质的不同产气量相差很大。所产气体中的氢含量(表 1)多在 40% 以上。

在产氢发酵过程中, pH 值很快下降至 4.5—6.0。随着 pH 的持续下降, 产气量也逐渐降低。pH 降至 4.5 时产气停止。

(三) 产氢细菌的种类

根据 24 株产氢细菌的形态、培养特征, 分别属于六个类型。对其代表株的形态、培养及生理生化特征进行了测定, 确定它们属肠杆菌科和芽孢杆菌科^[4-7]。肠杆菌科中有五个种, 芽孢杆菌科中只有一个种。它们是:

阴沟肠杆菌: 革兰氏阴性杆菌, 运动, 周鞭毛。利用醋酸盐作为唯一碳源, 氨作为唯一氮源。V. P. 试验阳性, 甲基红试验阴性。发酵葡萄糖产酸产气, 并发酵大多数碳水化合物产气, 但发酵肌醇不产气。

大肠埃希氏菌: 革兰氏阴性球菌。M. R. 试验阳性, V. P. 试验阴性。还原硝酸盐, 不产生吡嗪。苯丙氨酸脱氨酶阴性。能利用醋酸盐作为唯一碳源, 不利用柠檬酸盐。不液化明胶, 不利用丙二酸盐。

弗氏柠檬酸杆菌: 革兰氏阴性杆菌, 运动。能利用柠檬酸盐和醋酸盐。M. R. 试验阳性, V. P. 试验阴性。产生 H_2S , 不产生吡嗪。苯丙氨酸脱氢酶阴性。在 KCN 培养基上生长。发酵葡萄糖产气。

蜂房哈夫尼菌(暂定): 革兰氏阴性杆菌, 运动, 周鞭毛。M. R. 试验阴性, V. P.

表 1 各菌株所产气体中的氢含量

菌株 H ₂ 含量(%)	6-1 20	H-1 R	H-1 W	6-2 28	6-2 33	6-2 30	1-2 30	6-1 25	1-2 1	污-2 27	1-2 32	6-2 34
平均 H ₂ 含量	52.9	55.6	46.8	41.8	49.8	47.0	23.5	57.6	15.4	51.8	49.7	53.7
最高 H ₂ 含量	75.5	69.9	69.9	66.1	63.8	63.8	63.0	63.9	25.1	65.0	53.2	63.9

菌株 H ₂ 含量(%)	6-1 50	T ₁ -2 100	1-1 4	6-2 54	6-2 27	6-2 49	6-1 31	6-2 29	6-2 55	6-2 48	6-2 53	6-2 32
平均 H ₂ 含量	27.7	36.7	16.3	51.9	44.4	46.6	46.5	47.9	39.7	46.3	30.9	51.5
最高 H ₂ 含量	61.8	63.0	49.5	63.0	53.9	52.4	51.5	53.9	52.0	47.9	47.5	63.8

试验阳性。不产生 H₂S 和吲哚。还原硝酸盐。苯丙氨酸脱氢酶阳性。发酵葡萄糖产气。

粘质沙雷氏菌: 革兰氏阴性杆菌, 运动, 周鞭毛。在肉膏蛋白胨和马铃薯培养基上产生红色色素, 色素不渗入培养基中。M. R. 试验阴性, V. P. 试验阳性。还原硝酸盐, 不利用丙二酸盐, 液化明胶。发酵葡萄糖产酸不产气。

丙酮丁醇梭菌: 革兰氏阳性长杆菌,

芽孢椭圆形。产生 H₂S, 液化明胶, 不还原硝酸盐。发酵碳水化合物产酸产气, 并产生丙酮、丁醇和乙醇。

(四) 沼气池中各类产氢菌的比例

从表 2 可以看出, 沼气池中的产氢菌以肠杆菌科占绝对优势, 占总数的 87.5%。肠杆菌科中又以阴沟肠杆菌为主, 占总数的 58.3%。其次是粘质沙雷氏菌。芽孢杆菌科中的丙酮丁醇梭菌在数量上居第三位。

表 2 各类产氢菌的相对数量

科	肠 杆 菌 科					芽孢杆菌科
种	阴沟肠杆菌	大肠埃希氏菌	粘质沙雷氏菌	弗氏柠檬酸杆菌	蜂房哈夫尼菌	丙酮丁醇梭菌
菌株数	14	1	4	1	1	3
占总数的百分数 (%)	58.3	4.2	16.7	4.2	4.2	12.5

(五) 产氢细菌与甲烷菌富集培养物混合培养

1. 从表 3 可见, 产氢菌与甲烷菌富集培养物进行混合培养可大大提高沼气中甲烷的含量。

发酵初期甲烷含量基本一致, 五天后对照组的甲烷含量基本恒定, 变化不大。而混合培养组在七天之后甲烷含量急剧上升, 达 90% 以上。这样的甲烷含量已经接近天然气, 大大超过了沼气中甲烷的含量。

2. 从表 4 可以看出, 产氢菌与甲烷菌

富集培养物进行混合培养, 可以大大降低 CO₂ 的含量。发酵五天之后 CO₂ 含量大幅度下降, 第 9 天后一直检测不出。而对照组的 CO₂ 上升, 第 16 天达 34.0%, 与一般沼气中的 CO₂ 含量相当。这一对比可以明显地看出, 将产氢菌与产甲烷菌富集培养物进行混合培养可以发挥两类菌的协同作用。产氢菌所产的氢被产甲烷菌利用去还原 CO₂, 从而使沼气中的 CO₂ 得到充分利用, 大大提高沼气中甲烷含量。

3. 产气量(按纯甲烷计算)的比较

表 3 甲烷含量的变化

CH ₄ 含量 (%) 发酵天数 组 别	2	5	7	9	12	16
混合培养组	77.0	69.5	69.2	90.3	94.5	90.5
对 照 组	77.5	66.2	72.0	64.5	66.3	58.5

表 4 CO₂ 含量的变化

CO ₂ 含量 (%) 发酵天数 组 别	2	5	7	9	12	16	19
混合培养组	8.5	17.3	1.1	0	0	0	0
对 照 组	11.6	16.4	18.0	23.6	23.8	34.0	11.7

发酵初期(七天之内)两组的产气量差异不大,对照组略高于混合培养组。七天之后混合培养组的产气量迅速上升,与对照组形成鲜明的差异,产气量提高 34.3%。(表 5)

表 5 产 CH₄ 量的比较

CH ₄ 产量 (毫升) 发酵天数 组 别	2	5	7	9	12	16	19
混合培养组	2695	4398	5028	6789	10664	11252	11931
对 照 组	2635	4491	5377	5442	1033	8788	8989

参 考 文 献

- [1] Zeikus, J. G.: *Bacteriological Reviews*, 41 (2): 514—541, 1978.
- [2] Winfrey, M. R. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 312—318, 1976.
- [3] Bryant, M. P. et al.: *Arch. Mikrobiol.*, 59: 20—31, 1967.
- [4] Holmes, P. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(2): 394—395, 1978.

- [5] 王大相编著《细菌分类基础》, 科学出版社, 1977 年。
- [6] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著:《一般细菌常用鉴定方法》, 科学出版社, 1978 年。
- [7] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbon: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eighth edition, The Williams & Wilkins Company Baltimore, 1974.
- [8] Skerman V. B. D.: *A Guide to the Identification of the Bacteria* The Williams & Wilkins Company Baltimore, 1959.

A STUDY OF HYDROGEN PRODUCING BACTERIA IN ANAEROBIC DIGESTER

Liu Ke-xing Xu Jie-quan Liao Duo-qun

Sun Guo-chao Shao Ting-jie

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu)

Hydrogen is produced vigorously by adding tuber mill of *Dioscorea zingiberensis* to enrichment culture of biogas sludge. Hydrogen producing bacteria are able to be enriched by this way. Twenty four strains of hydrogen producing bacteria were isolated. The amount of hydrogen produced may be varied with the species of bacteria and the media used. These bacteria have been identified as *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* and *Clostridium acetobuty-*

licum. *E. cloacae* may be the major organism. Its relative number is about 58.3% of the total number of bacteria isolated, and *S. marcescens*, about 16.7% and *C. acetobutylicum*, about 12.5%. The numbers of other bacteria are less than the above mentioned numbers. The methane content in biogas has been greatly increased by adding mixed culture of hydrogen producing bacteria to enriched culture of biogas sludge and the carbon dioxide content in it has been reduced obviously, even undetectable.