

碱法纸浆黑液沼气发酵过程中 微生物区系的研究

赵玉莲

陆炎培

(食品资源科学与工程系) (食品科学与工程系)

摘要 对碱法纸浆黑液用于沼气发酵过程中的微生物区系进行了研究。根据动态跟踪分析,测定出厌氧菌的种类、数量及变化趋势。结果表明,总菌量随发酵期的延长而增长,当发酵进入主酵期,产甲烷菌成为厌氧菌中的主菌群。

主题词 纸浆废液;微生物区系;厌氧/沼气发酵

中图分类号 TS79

0 前 言

近 20 年来,工业有机废水造成的污染日趋严重,其中纸浆废液占有相当的比例。石油危机与能源的短缺,促进世界各地致力于有机废水厌氧处理研究,并取得了许多成就。我院食品科学与工程系承担的“七五”攻关科技成果——石灰法稻草纸浆浓黑液沼气发酵,得到了学术界的好评。本文着重介绍在 5L 发酵罐中,以碱法麦草浆黑液为基质,在沼气发酵过程中相关微生物的分离、培养及观察情况。

1 沼气发酵机理

沼气发酵是指在厌氧的环境中,有机物质在微生物菌群作用下,最终获得以甲烷为主体的可燃性气体的过程。就其主要菌群——产甲烷细菌,它们能利用有机化合物供给能源,但只能利用含 1 个或 2 个碳原子的有机化合物如醇和乙酸盐。因而对沼气发酵(也可以延伸到其它的厌氧发酵)而言,最初,人们按其细菌引起的生物化学过程,分为两个阶段:即不产甲烷和产甲烷阶段,或称产酸阶段和产气阶段。后来,布赖恩特根据细菌的营养群理论,把沼气发酵分成三个阶段:即水解→产酸→产甲烷;而 W. W. Eckenfelder 把沼气发酵分成四个阶段:即水解→产酸→酸性衰退→产甲烷。沼气发酵阶段之说虽有争议,但甲烷菌不是绝对专性自养菌是共识的。这是作沼气发酵过程中微生物区系研究者必须予以考虑之点。

收稿日期:1993-12-18

厌氧菌通常定义为能够在完全没有氧的条件下生存与增殖的微生物。当已经证明所有的专性厌氧细菌都能忍耐一定的游离氧结论时,Quastel 和 Stephenson 认为厌氧生长依赖于低的氧化-还原势,巴斯德曾认为,所有的发酵作用,亦即微生物对碳水化合物的产酸又产气的作用,属于厌氧作用;另一方面,有关氧抑制作用机制,包括有分子氧存在时,厌氧菌生长的抑制作用的机制,也曾有许多研究课题。大量的研究结果可以作出结论,即没有简单的理论可以解释为什么厌氧菌不能在游离氧存在下生长的全部事实。实验表明,即使培养基是暴露在空气中(如试管加塞后的培养基),其深层部分的条件也仍是厌氧的。这些理论,为分离沼气发酵过程中的厌氧微生物方案设计,提供了有益的依据。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 供试沼气发酵液 由食品科学工程系科研室提供。

2.1.2 培养基

1) 厌氧纤维素酶产生菌培养基

Na_2HPO_4 0.2 %	KH_2PO_4 0.1 %	蛋白胨 0.1 %
MgSO_4 0.05 %	CaCO_3 0.5 %	CaCl_2 0.03 %

分装前加入还原剂 L-半胱氨酸和指示剂刃天青。刃天青添加量为 1% 浓度 0.3ml/100ml。调 pH 值。每支试管插入瓦特曼滤纸 $0.5 \times 3\text{cm}^2$ 一条。

2) 厌氧产酸菌培养基

葡萄糖 0.8 %	K_2HPO_4 0.04 %	NH_4Cl 0.1 %
NaCl 0.1 %	MgCl_2 0.01 %	蛋白胨 0.1 %

每 100ml 加入 0.5ml 溴甲酚蓝指示剂,分装前加入还原剂 L-半胱氨酸和指示剂刃天青,方法同前。

3) 甲烷菌培养基

CH_3COOH 0.35 %	CH_3OH 0.35 %	K_2HPO_4 0.04 %
MgCl_2 0.01 %	NH_4Cl 0.1 %	酵母膏 0.1 %

另外加入 L-半胱氨酸和刃天青,方法同前。

2.1.3 培养方法

1) 厌氧菌的培养 本研究采用还原性化合物,如葡萄糖、甲醛化次硫酸钠和巯基乙酸钠等还原化合物加入到液体培养基中,从而使厌氧菌在不严格的厌氧条件下的生长成为可能。有大量的试验结果证明,加大接种量将更为有效。具体方法如下:

固体培养的厌氧装置是改进了的 Brewer 推荐的一种培养皿与含有巯基乙酸钠和亚甲基蓝的琼脂培养基一起,供厌氧细菌表面培养装置(图 1)。待分离样品按稀释法浇灌双层平板,将平板置

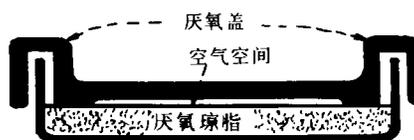


图 1 Brewer 厌氧培养装置

于点有腊烛的干燥器内,把干燥器置于培养箱中培养,待观察。

液体厌氧培养采用大气氧的隔除法。将接种后的试管棉塞用石蜡封口,若是橡皮塞也以石蜡封口。这种密封方法虽能阻止大气氧的进入,但不能完全消除试管内原来存在氧的影响,但能建立起不太挑剔的厌氧的初期生长环境。一旦生长实现以后,由微生物所积累的 CO_2 就可以形成增殖的最适条件。

2) 按试验要求将固体或液体培养物放在 $36\pm 1\text{C}$ 的培养箱中培养。一般情况下,不产生甲烷的产酸菌生长繁殖比产甲烷菌快。在培养5~6d后可观察到培养基颜色变化。凡是颜色变黄的说明有产酸菌生长,而颜色不变的则说明没有产酸菌长出;10~13d后,装有滤纸的试管,培养基内的滤纸呈不同状况:有的变软变曲,经摇动后滤纸条边缘不整齐,甚至有糊状纤维沉于试管底部,而整条纸不见了;产甲烷菌培养基试管培养18d后,用气相色谱鉴定,凡是有甲烷产生者,说明有甲烷菌生长。上述试样继而进行制片镜检,计数,摄像。

固体培养在12~18d后,通过干燥器可以看到培养皿底面有菌落长出,取出计数。

将所取沼气发酵原液稀释10倍后进行离心分离,镜检上清液与沉淀物。

2.1.4 分离与计数 分离方法为稀释法;计数用血球计数器及双层平板底面计数;染色用革兰氏法。

3 结果与讨论

本研究取的试样,沼气发酵周期为1个月(实验室恒温发酵),每天取样,观察系统pH变化及微生物区系的变化。

3.1 沼气发酵过程中的pH

采用精密pH试纸测定,试样pH值在8.5~8.0之间变化。

3.2 沼气发酵微生物观察

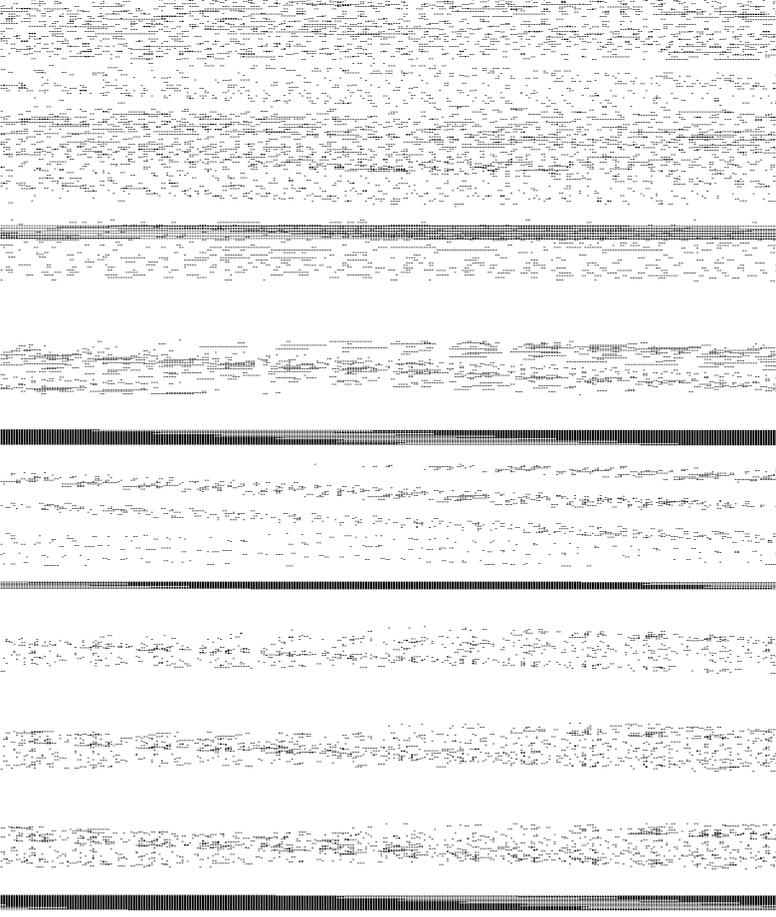
取沼气发酵液镜检,可以发现沼气发酵中的微生物种类很多,除常见的细菌外,还有菌形体(Mycoplasma),绿硫菌(Chlorobiacea)等(见图2)。随着发酵的正常进行,杆菌、球菌逐渐占绝对的优势。

革兰氏染色结果表明,原样中 G^- 菌比 G^+ 菌多。经过离心分离后,上清液中以 G^- 菌为主,沉淀物中则以 G^+ 菌为主。

3.2.1 上清液中微生物情况 随着沼气发酵的正常进行,微生物菌群的变化比较明显,前期球菌占优势,后期(发酵15d后)则转为杆菌类为优势,见图3。

3.2.2 沉淀中微生物情况 发酵开始,沉淀中的固形物形状多有规则,随着发酵进程,沉淀物趋于网络化、颗粒化。见图4。

从微生物的角度来看,所有与复杂有机物转化为甲烷、 CO_2 有关的营养菌群,均存在于颗粒污泥中,形成了一个独特的群体。颗粒结构为具有互营共生关系的各种微生物群提供了一个良好的代谢环境,代谢物的交换更为简捷。颗粒内外物理化学条件的内部梯度的形成,给产甲烷菌提供了一个缓冲层,从而使污泥有较强的适应pH值和有机酸、有毒物冲击的能力,提高了系统的稳定性。而UASA反应器主要是如何解决在短时间内使微生物全部造粒问题。本试验结果表明,污泥颗粒在沼气发酵18d时已成雏型,26d时污泥颗粒直径可达 $100\mu\text{m}$ 。



参 考 文 献

- 1 赵玉莲等. 酿造微生物学基础. 江苏省调味品科技情报站. 1988
- 2 张宽厚. 细菌生理学. 人民卫生出版社, 1963
- 3 Dolfing J. Wat. Sci. Technol, 1986, 18(12): 15~25
- 4 Dubourguier H C, et al. Proc. 5th Int. Symp. on Anaerobic Digestion, 1988. 13~24
- 5 Robinson R W. et al. Appl Environ Microbiol. 1984, 48: 127~126
- 6 Dolfing J. Phd Thesis of University of Wageningen. Netherlands. 1987. 6~56
- 7 Lettinga G, et al. Biotechnol Bioeng, 1980, 21: 699~734
- 8 Houwen E P, Plokker J, Stam A J M, et al. Arch Microbiol. 1990. 155
- 9 Chartain M, Bhalnagar, Zeikus J G. Appl Environ Microbiol. 1986. 51
- 10 Lanott E L, Kafkewitz P, Wolin M J, et al. Bacleriol. 1973. 144

The Research on the Microflora Spent Pulping Liquor Methane Fermentation with alkaline treatment

Zhao yulian

Liu Yanpei

(Dept. of Food Resources Sci. and Eng.) (Dept. of Food Sci. Eng.)

Abstract The research for the microflora in spent pulping liquor methane fermentation with alkaline treatment is reported. According to the dynamic analysis, the species, the cell count and the changing tendency of the anaerobic bacteria are determined. It shows that with the extension of the fermentation period, the overall figure of the bacteria increases, and during the dominant fermentation period, methane bacteria become the major species among the anaerobic bacteria.

Subject-words Spent pulping liquor; Microflora; Anaerobism / Methane fermentation