

污泥厌氧消化过程中产氢产乙酸/同型产乙酸协同产乙酸研究

王晋¹, 刘和^{1*}, 许科伟¹, 王爱杰², 陈坚¹

(1. 江南大学环境与土木工程学院, 环境生物技术研究室, 无锡 214122; 2. 哈尔滨工业大学市政与环境学院, 哈尔滨 150090)

摘要:应用产甲烷菌抑制剂溴乙烷磺酸盐(BES)阻断产甲烷过程,并添加丁酸盐以强化产氢产乙酸过程,研究不同条件下乙酸和气体的累积,借助于热力学分析推断污泥产酸发酵过程中的乙酸累积机制.结果表明,在抑制产甲烷体系中,反应吉布斯自由能降低至临界值($-15\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)时,乙酸累积浓度达 6 g/L ,协同作用中产氢产乙酸菌与同型产乙酸菌产生乙酸的比例为 $7:3$;在 H_2 分压为 3.2 kPa , 4 g/L 的丁酸和 6 g/L 的乙酸体系中,产氢产乙酸和同型产乙酸的协同作用不再发生.同型乙酸菌和产氢产乙酸菌可利用协同作用产生乙酸,但产氢产乙酸菌与同型产乙酸菌的互营关系是有限的.

关键词:污泥;同型产乙酸细菌;产氢产乙酸细菌;挥发性有机酸;协同作用

中图分类号:X705 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)06-1673-06

Synergistic Effect of Syntrophic Acetogenesis and Homoacetogenesis for Volatile Fatty Acids Production from Sludge by Anaerobic Digestion

WANG Jin¹, LIU He¹, XU Ke-wei¹, WANG Ai-jie², CHEN Jian¹

(1. Laboratory of Environmental Biotechnology, School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: By using metabolic inhibitor (BES) to block the methanogenesis and adding butyrate to enhance syntrophic acetogenesis, syntrophic acetogens/homoacetogens synergism during the acidification fermentation of sludge from anaerobic digestion was investigated and then the acetate accumulation mechanism was clarified. The results indicated that the acetate concentration was $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the condition of the ΔG was about $-15\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and no methanogens, and the proportion of acetate were produced by syntrophic acetogens and homoacetogens is $7:3$. However, the syntrophic acetogens/homoacetogens synergism did not occur under the condition of H_2 pressure was 3.2 kPa , the butyrate concentration was $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the acetate concentration was $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The acetate can be produced by the syntrophic acetogens/homoacetogens synergism but it is restricted.

Key words: sludge; homoacetogen; syntrophic acetogen; volatile fatty acid; synergism

污泥厌氧消化并生产甲烷作为城市污泥处理处置的重要方法之一已经得到了广泛的应用.近年来,由于甲烷的实际利用率以及甲烷生产过程中的二氧化碳排放问题,污泥厌氧消化生产挥发性短链脂肪酸受到愈来愈多的关注^[1~3].作为挥发性短链脂肪酸中最重要的乙酸不仅具有较高的附加值,而且用途也较为广泛.但是要进一步提高污泥中有机物的乙酸转化效率及其累积量,则必须对污泥厌氧消化反应器中乙酸的累积机制进行详细深入的研究.

污泥厌氧消化是一个由多种微生物相互协同、共同完成的复杂过程.目前公认有4种主要的微生物类群参与了这一过程,即水解发酵细菌、产氢产乙酸菌、同型乙酸菌、产甲烷菌.其中产氢产乙酸菌转化短链脂肪酸生成氢和乙酸的反应在热力学上是一个不可进行的反应,但由于食氢产甲烷细菌能够以 H_2/CO_2 为底物生成甲烷,使反应体系始终保持极低

的 H_2 分压,从而“拉动”了该反应的进行.而在产酸反应器中,没有了食氢产甲烷细菌,是什么在“拉动”产氢产乙酸反应?根据相关反应的吉布斯自由能分析,正常的厌氧反应器在 H_2 利用方面,产甲烷菌强于同型乙酸菌,因此同型乙酸菌常处于弱势.但从理论上讲,若氢分压保持在较高水平,同型产乙酸菌即可发挥耗氢产乙酸作用,绝大部分低碳有机物可转化为乙酸.本课题组之前研究也表明,以葡萄糖为底物的产氢产乙酸/同型产乙酸二相耦合系统可以显著提高乙酸产量^[4].

收稿日期:2010-06-29;修订日期:2010-09-13

基金项目:哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室开放基金项目(QAK200807);江苏省科技支撑计划项目(BE2008627)

作者简介:王晋(1974~),男,博士研究生,副教授,主要研究方向为固体废弃物资源化, E-mail: wangjin@jiangnan.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: liuhe@jiangnan.edu.cn

本研究采用产甲烷菌抑制剂溴乙烷磺酸盐 (BES)阻断产甲烷过程^[5],同时,添加丁酸盐强化厌氧体系的产氢产乙酸反应,通过与对照实验比较,分析反应体系中乙酸和气体的累积情况,并借助热力学分析,阐明产氢产乙酸反应与同型产乙酸反应的关系.这对完善有机酸的累积机制,实现乙酸的累积方面具有重要的理论价值.

1 材料与方法

1.1 污泥来源及种泥驯化

发酵用底物污泥取自无锡市城北污水处理厂污泥浓缩池.为富集产酸菌,加速产酸,抑制产甲烷,对种泥进行了驯化.取其中2 000 g 污泥(湿重)与250 g 葡萄糖加入到12 L UASB 反应器中,采用3 mol·L⁻¹ 盐酸调节初始pH 为7.0,在35℃下连续运行,进行驯化,驯化期间定期监测反应器内pH 变化情况.驯化2 周后,反应器出水pH 最终稳定在4.5 左右.

采用文献[6]提到的方法测定污泥的相关指标,2 种污泥的性质见表1.

表1 厌氧污泥与接种污泥性质

参数	厌氧污泥	接种污泥
总固体(TS)所占质量分数/%	87.25 ± 1.54	30.45 ± 0.72
挥发性固体(VS)所占质量分数/%	54.47 ± 2.28	85.47 ± 1.21
总蛋白占VS的质量分数/%	59.60 ± 1.47	65.32 ± 1.01
总碳水化合物占VS的质量分数/%	12.52 ± 0.81	20.84 ± 1.74
总脂类占VS的质量分数/%	1.24 ± 0.22	1.7 ± 0.28
C/N	12.22 ± 0.72	ND ¹⁾
磷所占质量分数/%	0.31 ± 0.02	ND

1)ND 表示未测定

1.2 实验装置及运行参数

设置了4 个容量为1 L 气密性能良好的三角瓶进行厌氧发酵,1 号为空白对照(简称空白),2 号添加丁酸钠(简称丁酸),3 号作为BES 抑制对照(简称BES),4 号同时添加丁酸钠和BES(简称协同),其他条件完全相同.瓶中发酵液由种泥和作为底物的污泥混合液组成,培养条件如下:取新鲜污泥250 g,接种25 g 种泥,加入适量微量元素液^[7]使培养物总体积为700 mL,用NaOH 溶液将pH 调至7.0.泵入氮气3 min 以去除顶空和液相中的氧气,然后迅速用丁基胶塞密封后置于转速为120 r/min 和温度35℃ ± 1℃ 摇床厌氧发酵.BES(纯度99.5%,溶液形式)和丁酸的终浓度分别为50 mmol/L 和90.8 mmol/L,充气完毕后由反应器进样口加入.定期采

样测气体组分、产气量,同时取5 mL 液体样品于离心管内冷藏备测.

1.3 分析方法

挥发性有机酸(VFAs):气相色谱法(岛津GC2010),毛细管柱型号PEG-20M,30 m × 0.32 mm × 0.50 μm.气化室温度250℃,FID 检测器温度250℃.采用一阶程序升温,柱箱初始温度80℃,保留2 min,升温速率15℃/min,升至190℃停留1 min,载气为高纯氮气,通过内标法(4-甲基戊酸)定量各组分.

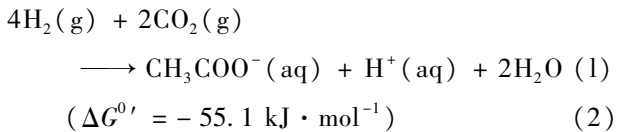
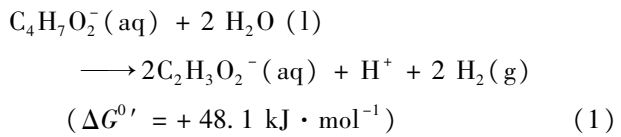
气体组分(H₂、CO₂、CH₄):气相色谱法(岛津GC2010),不锈钢填充柱型号ProParkQ,0.3 cm × 200 cm,50~80 目.进样口温度40℃,TCD 检测器温度80℃,柱温80℃,电流50 mA,载气为高纯氮气,通过外标法(标准混合气体)定量各组分.

pH 值:实验室用pH 计(梅特勒-托利多FE20).

污泥含水率、VS 均采用国家标准方法测定^[8].

1.4 热力学分析

产氢产乙酸和同型乙酸过程的实时吉布斯自由能(ΔG)由各自的标准吉布斯自由能(ΔG⁰)和实时反应物和产物浓度,结合能斯特(Nernst)方程和范德霍夫(Van't Hoff)方程计算而得.反应方程式及其标准状态下的吉布斯自由能(1 mol/L, 105 Pa, 298.14K)^[9]如下:



2 结果与分析

2.1 抑制产甲烷对丁酸降解的影响

协同实验与其对照实验中丁酸的降解曲线如图1 所示.二者初始的丁酸浓度均为8 g/L,未抑制产甲烷实验的丁酸在运行前期保持较快的降解速率,直至第26 d 完全降解至检测限以下.而协同实验在运行初期(前10 d)与对照实验趋势基本相同,但在运行至17 d 以后停止降解,浓度稳定在4 g/L 左右,降解率不到50%.这是由于产甲烷反应的阻断造成氢气和乙酸累积,而氢气和乙酸恰恰又是丁酸降解反应的终端产物,它们的累积造成的产物抑制使得丁酸不能继续降解.李建政等^[10]在以丁酸钠为唯一

碳源的选择性培养基也观察到类似现象,丁酸在经过快速降解后达到停滞期,在解除产物抵制后才恢复降解能力. 丁酸停止降解时,体系中乙酸浓度为 6 g/L(100 mmol),不同于 Ahring 等^[11]得出的乙酸浓度高于 16.4 mmol 时抑制丁酸降解的结论.

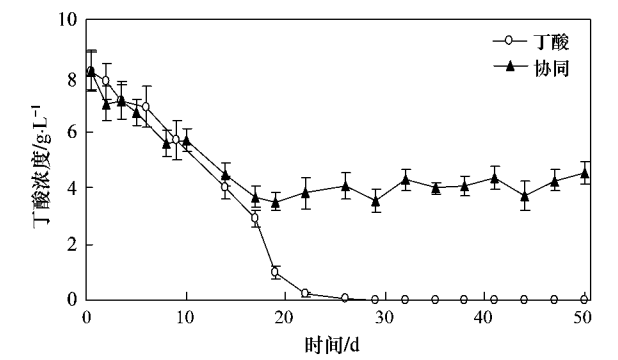
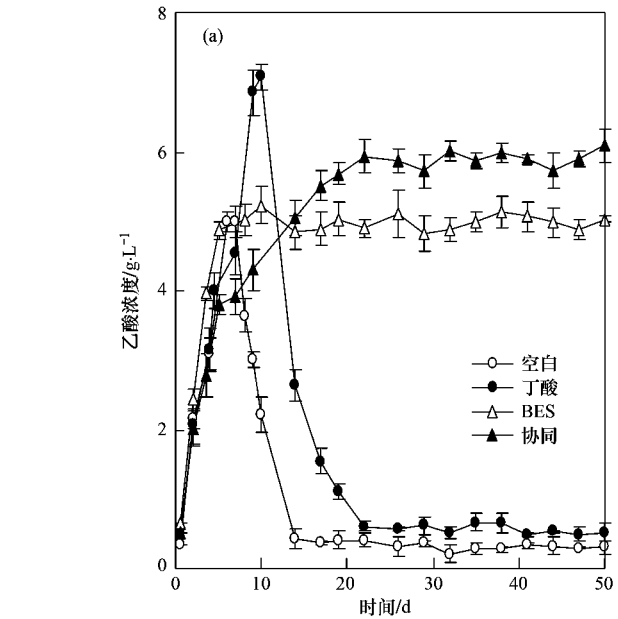


图 1 丁酸的降解曲线

Fig. 1 Profiles of butyrate (HBu) degradation in different reactors

2.2 乙酸的累积情况

各实验组乙酸累积的变化曲线如图 2 所示.



空白实验和丁酸实验在 10 d 后,产甲烷反应占据优势地位,体系中的乙酸均能迅速生成甲烷,乙酸浓度低至 0.3 g/L 以下,而丙酸、丁酸等 VFAs 未能及时转化为乙酸或甲烷,乙酸占总酸比例有所下降. 其他时间和各培养条件下的乙酸均占 VFAs 的主要成分[(图 2(b))]. 图 2(a) 中可以看出,空白实验中乙酸积累最为迅速,在第 7 d 浓度达到最高的 5 g/L,与此同时,乙酸占总酸的比例也达到最高的 77%. 丁酸实验与空白实验的趋势相似,但有所滞后,这是因为丁酸比污泥更容易被细菌利用,产酸菌群在没有可利用的丁酸时才会进行污泥产酸. 丁酸实验在第 10 d 乙酸浓度才达到最高,7 g/L 也比对照实验的最高乙酸浓度更高,乙酸占总酸比例同时达到最高的 72%. BES 实验在运行初期乙酸含量迅速增加,在第 10 d 达到最高,随后稳定在 5 g/L 左右. 协同实验同样比 BES 实验略为滞后,在第 24 d 停止增长,稳定在 6 g/L 左右,比 BES 实验的乙酸累积高 1 g/L. 这是因为协同实验除污泥发酵产生乙酸外,产氢产乙酸菌利用反应(1)降解丁酸也会产生乙酸.

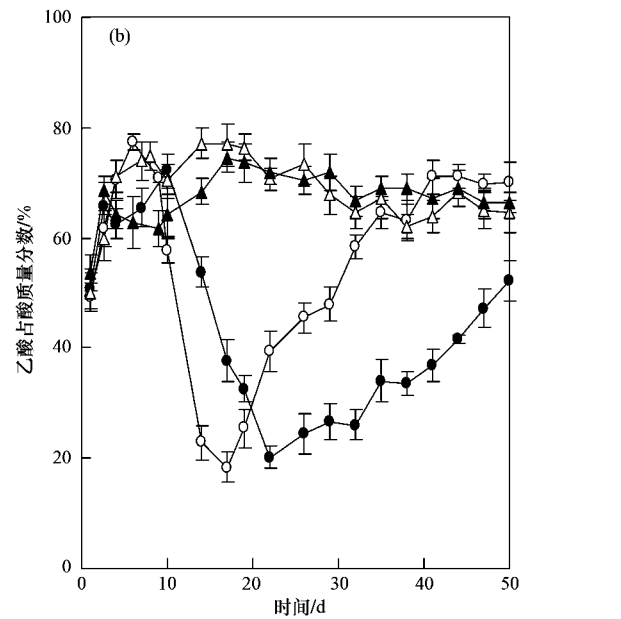


图 2 不同培养条件下乙酸累积的变化情况

Fig. 2 Accumulation of acetate (HAc) in different reactors

2.3 气体的累积

不同条件下气体产生情况如图 3 所示.

未抑制产甲烷的空白实验和丁酸实验在反应刚开始的前 2 d 产生少量氢气,丁酸实验最高氢气累积只比对照实验的高 0.3 kPa,但都在 4 d 后快速消耗至检测限以下. 抑制产甲烷的 BES 实验和协同实验

在反应初期氢气迅速积累,BES 实验 4 d 即达到稳定 2.6 kPa,协同实验在 10 d 左右稳定在 3.2 kPa 左右.

空白实验反应初期的前 4 d 没有甲烷产生,从第 4 d 开始甲烷迅速增加,到第 10 d 稳定在 50 kPa. 丁酸实验在 10 d 后还继续增加,在 26 d 左右不再增加,稳定在 60 kPa. 应注意到,图 1 中丁酸也是在第

26 d 完成降解,与甲烷产生情况相符. 丁酸实验比空白实验多产生 10 kPa 的甲烷,相当于 7.8 mmol 丁酸降解. BES 实验和协同实验均未检测到甲烷.

未抑制产甲烷的空白实验和丁酸实验在反应刚开始的前 3 d CO_2 迅速积累,并在随后分别达到稳定的 26 kPa 和 23 kPa 左右. 丁酸实验的 CO_2 累积量比空白实验略低,这是因为丁酸降解并不产生 CO_2 , CO_2 全部来自污泥发酵,而丁酸实验中因为丁酸的

大量存在导致污泥发酵效率低于空白实验. 抑制产甲烷的 BES 实验和协同实验在反应前 10 d 始终保持 CO_2 积累,随后开始下降,这可以解释为被同型产乙酸利用. BES 实验最高 CO_2 累积量为 36.7 kPa,最后稳定在 30 kPa 左右,下降了 6.7 kPa,根据反应 (2) 计算相当于 0.62 g/L 乙酸;而协同实验最高 CO_2 累积量为 39.4 kPa,最后稳定在 20 kPa 左右,下降了 19.4 kPa,相当于 1.84 g/L 乙酸.

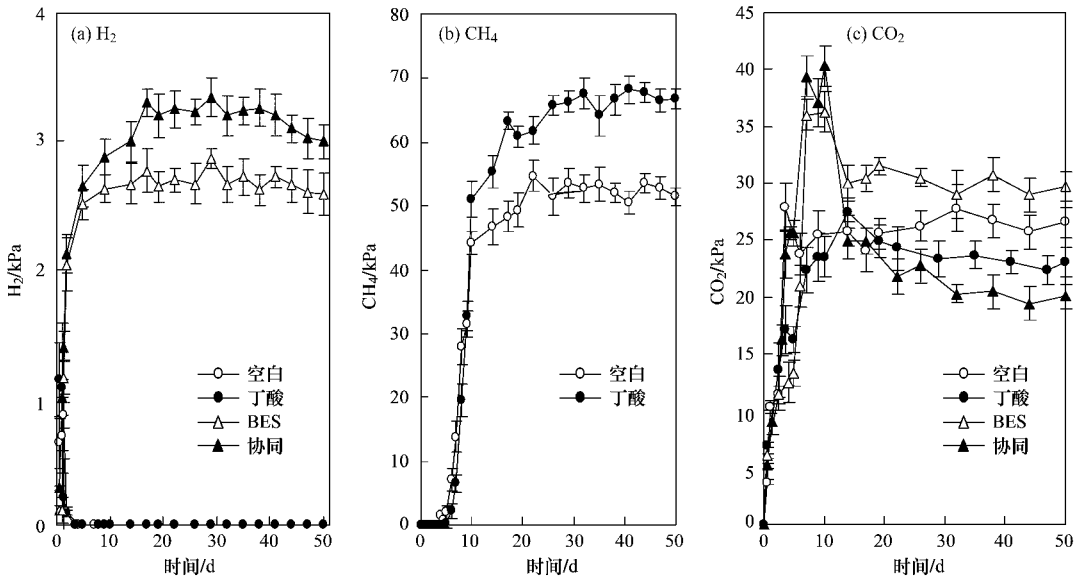


图3 不同实验条件下发酵瓶顶空气中 H_2 、 CH_4 、 CO_2 累积情况

Fig. 3 Profiles of H_2 , CH_4 , CO_2 accumulation in different reactors

2.4 吉布斯自由能

计算了 4 组实验的同型产乙酸反应以及产氢产乙酸反应的热力学 (图 4), 为阐明同型产乙酸反应和产氢产乙酸反应的关系提供理论证据.

从图 4(a) 可以看出, 产甲烷被选择性抑制后,

由于 H_2 分压的抬升, 同型产乙酸过程变得可以自发进行, 且抑制产甲烷的 BES 实验和协同实验中 ΔG 没有显著差异 ($p = 0.63$), 都低于同型乙酸菌生长的最低吉布斯自由能. 说明产物乙酸对同型产乙酸的 ΔG 影响不大. 而在正常污泥厌氧发酵过程中

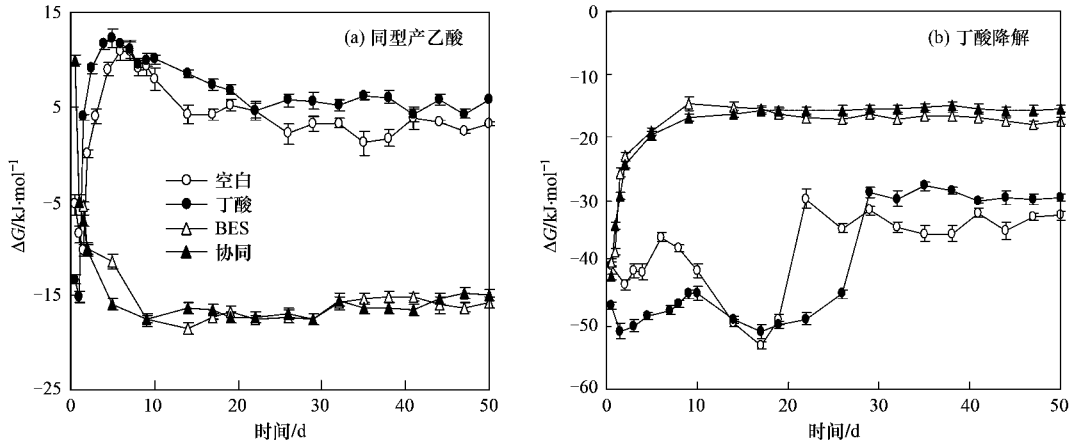


图4 同型产乙酸和丁酸降解的吉布斯自由能变化

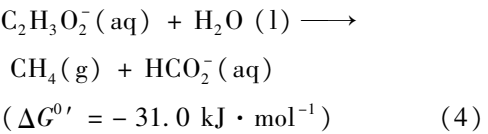
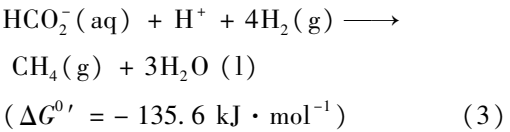
Fig. 4 Gibbs free energies of homoacetogenic H_2 consumption and syntrophic butyrate-oxidizing process calculated from different reactors

(空白实验),系统为同型产乙酸菌所提供的能量极为有限($\Delta G > -1.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).由此可以判断,在产甲烷过程占优势的生境中,同型产乙酸过程从生化反应角度并不容易发生($\Delta G > 0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).而在投加 BES 后(无论加丁酸与否), ΔG 已变得足够低($\Delta G < -15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$),此能量已足以合成 1/3 ATP,于是在热力学上变得可以自发进行^[14].图 4 (b)中,未抑制甲烷样品培养过程中,丁酸降解的吉布斯自由能始终 $< -29 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,甚至在 17 d 达到 $-53 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.说明反应始终在自发进行.而 BES 培养使污泥发酵的产氢产乙酸过程处于能否自发进行的临界水平($\Delta G \approx -15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$),协同实验的吉布斯自由比 BES 实验略大($p < 0.05$),但没有数量级的差异.

3 讨论

图 2(a)中,BES 实验在第 10 d 乙酸浓度达 5 g/L后,停止累积,说明产氢产乙酸和同型产乙酸反应都不再进行,而协同实验仍然有乙酸产生,直到第 24 d 停止,乙酸浓度达 6 g/L.而这显然不是底物降解产生的,因为图 1 中可以看到,丁酸在 17 d 时已经停止降解了.从生化反应原理上说,满足微生物生长至少需要 $1/4 \sim 1/3 \text{ mol ATP}$ ($\Delta G < -15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)^[12].从图 4 中可以看出,抑制产甲烷的 BES 实验和协同实验,无论同型产乙酸还是产氢产乙酸,其吉布斯自由能都在接近 $-15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的水平,以下讨论造成 BES 实验和协同实验中乙酸具有不同累积效应的原因.

从反应热力学角度分析,抑制产甲烷实验中乙酸的累积过程可以用以下连锁效应来说明:BES 加入后,食氢产甲烷菌[反应(3)]和食乙酸产甲烷菌[反应(4)]被抑制,产氢产乙酸菌利用反应(1)使 H_2 分压和乙酸浓度提升,使得反应(1)的吉布斯自由能增加,导致了产氢产乙酸菌活性被抑制,直至反应停止.另一方面,由于没有了产甲烷菌的竞争, H_2 分压的提升使反应(2)的吉布斯自由能降低,刺激了同型产乙酸菌的活性,这样同型产乙酸菌利用产氢产乙酸菌生成的氢气,产生乙酸,而 H_2 分压的下降又反过来解除了产氢产乙酸的热力学抑制,进而继续“拉动”产氢产乙酸作用.这就是产氢产乙酸菌与同型产乙酸菌的协同作用.



基于以上分析,协同实验中由于外源底物丁酸的加入,强化了产氢产乙酸反应,氢气产物的增加刺激了同型产乙酸反应,在产氢产乙酸反应的吉布斯自由能在临界状态下,继续拉动该反应,强化了产氢产乙酸/同型产乙酸反应,造成乙酸在 10 d 后继续累积.

根据图 3(a),未抑制产甲烷的空白实验和丁酸实验在反应开始的前 2 d 产生少量氢气,同时从图 4 (a)可知,氢气随即被产甲烷菌和同型产乙酸菌消耗,因此后期没有氢气累积,同型产乙酸反应不能发生,但产氢产乙酸在食氢产甲烷菌的拉动下能够持续进行.同型产乙酸菌生成的乙酸可通过反应(2)进行推算,协同实验中产氢产乙酸菌生成的乙酸可通过反应(1)计算.表 2 为不同条件下底物的变化及其微生物对产乙酸的贡献.结果表明,协同实验中产氢产乙酸菌与同型产乙酸菌产生乙酸的比例大约为 7:3.

表 2 不同条件下微生物底物的变化及其对产乙酸的贡献¹⁾

Table 2 Consumption of organic matter and contribution to acetate (HAc) in different reactors

指标	空白	丁酸	BES	协同
乙酸浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	5.0	7.1	5.1	6.1
丁酸降解率/%	— ²⁾	100	—	42.2
CO_2 分压/kPa	26	23	39.4	42.3
H_2 分压/kPa	0.85	1.13	2.6	3.2
产氢产乙酸/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	未知	10.9	未知	4.60
同型产乙酸/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	未知	未知	0.62	1.84
产氢产乙酸:同型产乙酸	—	—	—	7:3

1)表中数据均为累积的最高值;2)“—”表示该数据空缺

虽然协同实验在反应吉布斯自由能达到临界值时,仍能利用产氢产乙酸菌与同型产乙酸菌的协同作用继续产生乙酸,最终乙酸累积高达 6 g/L,但体系中仍有 4 g/L 的丁酸存在.这说明厌氧微生物在有互营关系存在条件下其吉布斯自由能只和连接互营关系的中间产物有关,对于产氢产乙酸和同型产乙酸来说,这种互营关系是有限的.

4 结论

(1)抑制产甲烷体系中,在反应吉布斯自由能达到临界值时,产氢产乙酸菌与同型产乙酸菌可利用协同作用产生乙酸.在人为强化产氢产乙酸反应

的情况下,协同作用中产氢产乙酸菌与同型产乙酸菌产生乙酸的比例为7:3.

(2)产氢产乙酸菌与同型产乙酸菌的互营关系是有限的. 在 H₂ 分压为 3.2 kPa,4 g/L的丁酸和 6 g/L的乙酸体系中,产氢产乙酸和同型产乙酸的协同作用不再发生.

参考文献:

[1] Jowitt Z L, Donald S M, Harlan G K. Pilot-scale operation of thermophilic aerobic digestion for volatile fatty acid production and distribution [J]. Journal of Environmental Engineer and Science, 2003, **2**(3):187-197.

[2] Lei Y F, Chen Y G, Xiong Z. Enhancement of waste activated sludge protein conversion and volatile fatty acids accumulation during waste activated sludge anaerobic fermentation by carbohydrate substrate addition; The effect of pH [J]. Environmental Science & Technology, 2009, **43**: 4373-4380.

[3] 陈志强,李云蓓,温沁雪. 利用丁酸合成 PHA 高效菌株的筛选及摇瓶发酵特性研究 [J]. 环境科学,2010, **31** (3): 828-832.

[4] Nie Y Q, Liu H, Du G C, *et al.* Acetate yield increased by gas circulation and fed-batch fermentation in a novel syntrophic acetogenesis and homoacetogenesis coupling system [J]. Bioresource Technology, 2008, **99**(8): 2989-2995.

[5] Penning H, Conrad R. Effect of inhibition of acetoclastic

methanogenesis on growth of archaeal populations in an anoxic model environment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**: 178-184.

[6] Liu X L, Liu H, Chen Y Y, *et al.* Effects of organic matters and initial carbon-nitrogen-ratio on the bioconversion of volatile fatty acids from sewage sludge [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2008, **83**(7): 1049-1055.

[7] Parawira W, Murto M, Read J S, *et al.* Volatile fatty acid production during anaerobic mesophilic digestion of solid potato waste [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2004, **79** (7):673-677.

[8] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. (第四版). 北京:中国环境科学出版社,2002. 12.

[9] Thauer R K, Jungermann K, Decker K. Energy-conservation in chemotropic anaerobic bacteria [J]. Bacteriological Reviews, 1977, **41**:100-180.

[10] 李建政,王卫娜,马超,等,丁酸甲烷发酵优势菌群的选育及其丁酸降解特性 [J]. 科技导报,2008, **26**(11):49-52.

[11] Ahring B K, Westermann P. Product inhibition of butyrate metabolism by acetate and hydrogen in a thermophilic coculture [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, **54** (10): 2393-2397.

[12] Jackson B E, McInerney M J. Anaerobic microbial metabolism can proceed close to thermodynamic limits [J]. Nature, 2002, **415**:454-456.