

丁酸驯化及氢胁迫对厌氧污泥菌群及生物强化的影响

邵享文, 黄心昊, 陈尧, 张婷婷, 艾翠玲
(福州大学 土木工程学院, 福建 福州 350108)

摘要: 为解决厌氧反应器的酸化问题,采用丁酸辅以氢分压控制驯化培养两类分别以产氢产乙酸菌与产甲酸产乙酸菌为产乙酸优势菌群的中温互营丁酸氧化产甲烷菌群 B-H、B-F。试验结果表明,驯化后丁酸氧化菌得到明显富集,而丙酸氧化菌出现不同程度下降,菌群 B-H、B-F 中丁酸氧化菌属 *Syntrophomonas* 的基因相对丰度分别由 $(0.43 \pm 0.01)\%$ 、 $(1.05 \pm 0.06)\%$ 显著提升至 $(18.84 \pm 1.68)\%$ 、 $(14.13 \pm 0.47)\%$,成为产乙酸菌中的优势菌属。产甲烷菌中甲烷杆菌目 *Methanobacteriales* 与产甲烷丝状菌属 *Methanosaeta* spp. 分别成为氢营养型与乙酸营养型产甲烷菌中的优势菌属(目),在氢胁迫下,甲烷微菌目 *Methanomicrobiales* 的生长更优。B-H、B-F 以丁酸为基质的比产甲烷活性(SMA)分别由 0.453、0.438 gCOD/(gVSS·d)提升至 3.510、2.855 gCOD/(gVSS·d),而氢胁迫下 B-F 以甲酸为基质的 SMA 由 0.290 gCOD/(gVSS·d)提升至 1.540 gCOD/(gVSS·d)。此外,考察了两类菌群对厌氧序批式反应器(ASBR)恢复的生物强化作用,投加 B-H 与 B-F(投加量为 MLVSS 的 10%)的生物强化反应器相比非生物强化反应器恢复时间分别缩短了 70 d 与 25 d。

关键词: 厌氧消化; 污泥驯化; 丁酸氧化菌; 氢胁迫; 生物强化

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2019)19-0012-08

Effects of Butyric Acid Tolerant Acclimation and Hydrogen Stress on Microbial Community Structure and Biological Enhancement of Anaerobic Sludge

SHAO Xiang-wen, HUANG Xin-hao, CHEN Yao, ZHANG Ting-ting, AI Cui-ling
(College of Civil Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: To resolve the problem of acid inhibition in anaerobic digestion, anaerobic sludge was gradually acclimated by butyric acid and regulated hydrogen partial pressure to enrich two different mesophilic syntrophic butyric acid-oxidizing genera B-H and B-F whose dominant acetogens were hydrogen-producing acetogens and formic acid-producing acetogens, respectively. The results showed that the butyric acid-oxidizing acetogens were significantly enriched. The relative abundance of *Syntrophomonas* in B-H and B-F increased from $(0.43 \pm 0.01)\%$ and $(1.05 \pm 0.06)\%$ to $(18.84 \pm 1.68)\%$ and $(14.13 \pm 0.47)\%$, respectively, which became the dominant genus of the acetogens. However, relative abundance of the propionate-degrading acetogens was decreased in different degrees during the acclimation process. The dominant microbial community shifted from propionate-degrading acetogens to butyric acid-degrading acetogens. In methanogens, *Methanobacteriales* and *Methanosaeta* spp. were the dominant genera (at order level) of the hydrogenotrophic methanogens and the acetotrophic

methanogens, respectively. *Methanomicrobiales* grew better under high hydrogen stress. The specific methanogenic activity (SMA) of B-H and B-F degrading butyric acid increased from 0.453 gCOD/(gVSS · d) and 0.438 gCOD/(gVSS · d) to 3.510 gCOD/(gVSS · d) and 2.855 gCOD/(gVSS · d), respectively, and the SMA of B-F for formic acid degradation increased from 0.290 gCOD/(gVSS · d) to 1.540 gCOD/(gVSS · d). Furthermore, biological enhancement effect of the two kinds of microbial communities on the recovery of an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) was investigated. Compared with non-enhanced reactor, the recovery time of the enhanced reactors (adding 10% of MLVSS with B-H and B-F respectively) was reduced by 70 days and 25 days, respectively.

Key words: anaerobic digestion; sludge acclimation; butyric acid-oxidizing bacteria; hydrogen stress; biological enhancement

有机废水的厌氧生物处理过程中,有机物经水解、产酸发酵,然后被乙酸化,最终转化为甲烷和 CO_2 ,从而达到去除COD的目的,参与这一过程的微生物有产酸发酵菌、互营产乙酸菌和产甲烷菌三大菌群。在正常运行的厌氧反应器中,非产甲烷菌与产甲烷菌处于代谢平衡^[1],产甲烷菌能够及时有效地利用水解发酵阶段产生的挥发性脂肪酸(VFAs),并将其转化为甲烷,否则,反应器内VFAs将大量积累,导致系统内pH值逐渐降低。产甲烷菌仅在pH值为6.7~7.4这个较窄区间内有效生长^[2],过低的pH值会抑制产甲烷菌活性,进而导致厌氧消化过程无法进行,这就是我们常说的反应器“酸化”现象。长期以来,厌氧反应器的酸化现象已成为限制厌氧生物技术推广应用的重要因素,常用的酸化遏制措施仅为降低有机负荷或提高进水碱度^[3],即使在比较顺利的情况下,过度酸化的反应器恢复正常运行也需要60 d以上^[4],仅略低于反应器重新接种启动时间。生物强化是加快酸化厌氧系统恢复的有效途径之一^[5-6],由于产甲烷菌在厌氧生物处理过程中不可替代的重要性,目前酸化恢复的生物强化研究对象主要是产甲烷菌^[7-8],而往往忽略了处于代谢过程前端的产酸发酵菌及产乙酸菌所起的作用。

传统理论认为厌氧条件下VFAs的甲烷化主要沿袭产氢产乙酸途径,即丙酸、丁酸和戊酸等VFAs首先被产氢产乙酸菌转化为乙酸和 H_2 ,然后分别被乙酸营养型产甲烷菌和氢营养型产甲烷菌甲烷化。实际上,除 H_2 以外,甲酸亦为VFAs降解过程中的重要种间电子载体,其在水中的溶解度远高于 H_2 ,可形成1 000倍于 H_2 的高浓度差^[9],推测甲酸对长距离种间电子转移有重要作用^[10]。在丙酸和丁酸

氧化互营细菌中均检测到了甲酸脱氢酶的编码^[11-12],可见产甲酸产乙酸途径对丙酸、丁酸等短链脂肪酸的高效降解有重要意义。

鉴于此,笔者以稳定运行的厌氧序批式反应器(ASBR)中的厌氧活性污泥为初始菌群,以丁酸为碳源进行驯化,并通过调控氢分压构建两类(分别以产氢产乙酸菌和产甲酸产乙酸菌为产乙酸优势菌群)丁酸氧化互营产甲烷菌群,利用qPCR技术对驯化过程中污泥微生物群落结构的变化进行了分析,并比较两类培养物对酸化ASBR恢复的生物强化效果,以期构建酸化污泥产甲烷活性的快速恢复方法,解决ASBR易酸化的问题,从而推动该技术的工程应用。

1 材料与方法

1.1 试验装置

试验装置如图1所示,采用有效容积为900 mL的血清瓶,通过水浴将反应温度控制在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。采用磁力搅拌方式,每12 h搅拌30 min,频率为200 r/min,产气量采用液体置换法测定。

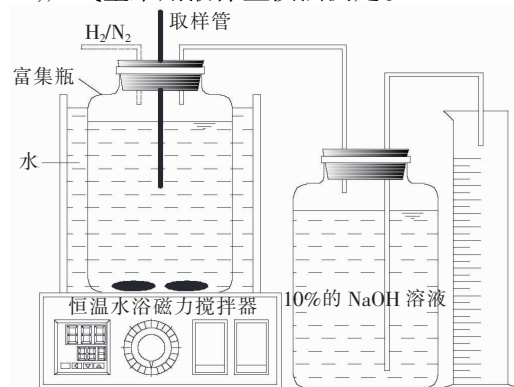


图1 试验装置

Fig.1 Schematics of experimental setup

1.2 种泥及驯化方式

接种污泥取自稳定运行的 ASBR。采用丁酸对污泥进行驯化,并通过控制氢分压培养分别以产氢产乙酸菌和产甲酸产乙酸菌为产乙酸优势菌群的中温互营丁酸氧化产甲烷菌群 B-H 和 B-F。B-H 培养基成分为:丁酸,7.0 g/L; NH_4Cl , 1.5 g/L; KH_2PO_4 , 0.4 g/L; NaHCO_3 , 4.0 g/L; 微量元素液, 1 mL/L。B-F 培养基除采用更高碱度(NaHCO_3 为 6.0 g/L)外,其余成分均与 B-H 培养基相同。其中,微量元素液成分如下: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 9 mg/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg/L; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.03 mg/L; ZnCl_2 , 0.05 mg/L; H_3BO_3 , 0.05 mg/L; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05 mg/L; 36% (质量分数)的盐酸, 0.001 mL/L。均采用 NaOH 溶液调节体系 pH 值为 6.8~7.2。丁酸被消耗 95% 以上时更换培养液 500 mL。

种间间接电子转移需要在代谢产物浓度处于较低水平时才能正向进行,以产氢产乙酸菌生长时进行的种间氢转移为例, H_2 需要维持在一个相对较低的分压($< 10 \text{ Pa}$),产氢产乙酸菌才能正常代谢 VFAs 和乙醇^[13]。因此在菌群 B-F 的驯化过程中,以 H_2 : N_2 为 1:9 的混合气体置换血清瓶内的气体,控制氢分压始终大于 100 Pa,以抑制产氢产乙酸菌的正常生长,从而达到选择性富集产甲酸产乙酸菌群的目的。

1.3 生物强化试验

将 3 组稳定运行的 ASBR (控制组 R1、试验组 R2 和 R3,进水 COD 为 4 000 mg/L) 通过提升进水 COD 至 8 000 mg/L,负荷翻倍历时 8 d,使反应器酸化。其中控制组反应器 R1 自然恢复,试验组反应器 R2 与 R3 一次性分别投加菌群 B-H 与 B-F,投加量为污泥 MLVSS 的 10%,考察其 COD 及 VFAs 恢复情况,当反应器对 COD 的去除率稳定在 85% 以上时,视为系统恢复。

1.4 DNA 提取及 qPCR 分析

于培养过程的不同时间点从血清瓶中取 10 mL 污泥置于无菌离心管并去除上清液,在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。采用康为世纪公司生产的土壤基因组 DNA 提取试剂盒 (Soil Genomic DNA Kit) 进行 DNA 提取,按手册说明进行操作。

采用实时荧光定量 PCR 仪 (ABI7500Fast) 进行

检测,反应体系:总体积为 25 μL ,其中 DNA 模板为 10 ng、引物各 500 nmol/L、UltraSYBR Mixture (Low ROX) 1 \times ; 反应程序如下: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 10 min、40 个循环; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s、 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min,采集数据;各目标物种的引物及其序列参见文献[14-17]。

1.5 分析项目及方法

COD 采用分光光度法测定; pH 值采用玻璃电极法测定; MLSS、MLVSS 采用重量法测定; 比产甲烷活性 (SMA) 采用血清瓶法测定; 甲酸、乙酸、丙酸、丁酸均采用液相色谱分析法测定; H_2 采用气相色谱分析法测定。

2 结果与讨论

2.1 比产甲烷活性

表 1 为两类菌群驯化前后分别以甲酸、乙酸、丙酸、丁酸为代谢基质的 SMA。可见,在丁酸的驯化作用下,菌群 B-H 与 B-F 对应 4 种 VFAs 的 SMA 获得了不同程度的提高,其中以丁酸和乙酸为基质时的 SMA 提升尤为显著,分别提升了 675%、134% 与 552%、106%。同时,菌群 B-F 在氢胁迫下,以甲酸为基质的 SMA 提升了约 4 倍。Thiele 等人^[18]通过增大氢分压抑制产氢产乙酸作用,此时丁酸降解并未停止,但在加入氯仿抑制产甲烷菌群活性后,甲酸开始积累。这说明产甲酸产乙酸途径本身存在,或者是产氢产乙酸途径受到抑制时,产氢产乙酸菌选择性改变其代谢途径的结果。菌群 B-F 甲酸代谢活性的提升说明了系统中产甲酸产乙酸代谢途径的增强。

表 1 两类菌群驯化前后的 SMA

Tab. 1 SMA of two types of microflora before and after acclimation $\text{gCOD} \cdot \text{g}^{-1} \text{VSS} \cdot \text{d}^{-1}$

项 目	甲酸	乙酸	丙酸	丁酸
B-H 驯化前	0.327	1.088	0.840	0.453
B-H 驯化后	0.441	2.546	1.125	3.510
B-F 驯化前	0.290	0.985	0.821	0.438
B-F 驯化后	1.540	2.031	1.137	2.855

2.2 微生物群落分析

采用 qPCR 技术,在培养过程中的不同时间点对两类菌群驯化过程中涉及的丙酸氧化菌、丁酸氧化菌、同型产乙酸菌和产甲烷菌进行基于总细菌或总古菌的 16S rRNA 基因相对丰度估测,平行测定 3 组进行对比,以期产甲酸产乙酸优势菌群在驯化过程中的演替规律分析提供参考。

2.2.1 产乙酸菌

试验中考察了主要的挥发性脂肪酸氧化功能菌 *Syntrophomonas*、*Syntrophobacter*、*Smithella* 在驯化过程中相对总细菌的基因相对丰度的变化情况,结果见图2。

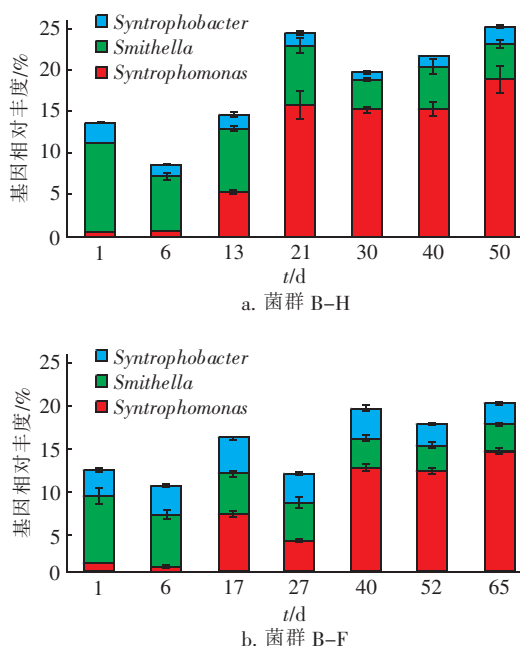


图2 菌群B-H与B-F中 *Syntrophobacter*、*Smithella* 与 *Syntrophomonas* 基因相对丰度的变化

Fig. 2 Alterations in the relative abundance of *Syntrophobacter*, *Smithella* and *Syntrophomonas* in microflora B-H and B-F

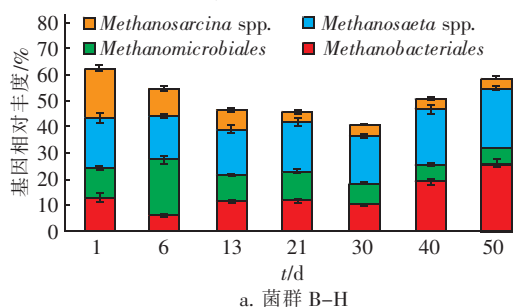
在种泥中,两类丙酸氧化菌属 *Syntrophobacter* 与 *Smithella* 为优势菌群,这是因为种泥取自 ASBR, 为典型的丙酸发酵型反应器^[19]。*Syntrophomonas* 包含了8种以丁酸及其他高级脂肪酸为主要营养基质的嗜中温菌属^[20],在丁酸驯化下得到富集。在菌群B-H、B-F中,*Syntrophomonas* 的基因相对丰度分别由 $(0.43 \pm 0.01)\%$ 、 $(1.05 \pm 0.06)\%$ 显著提升至 $(18.84 \pm 1.68)\%$ 、 $(14.13 \pm 0.47)\%$,在细菌中占主导地位,但其在菌群B-F中增幅不如B-H。此外,B-F以丁酸为基质的SMA较B-H小。由于一般条件下丁酸盐的降解通过种间氢转移进行,高浓度 H_2 的存在将会抑制丁酸盐的降解,可见在氢胁迫下,培养物对丁酸的代谢速率受到抑制^[21],*Syntrophomonas* 的丰度因而受到一定程度的影响。虽然菌群B-F中 *Syntrophomonas* 丰度比B-H低,但其代谢甲酸活性远高于B-H。有研究发现,在丁酸互营细菌中存在着甲酸脱氢酶的编码基因^[12],

因此在氢胁迫条件下氧化丁酸产甲酸产乙酸菌群有可能是由 *Syntrophomonas* 中部分具有选择性代谢功能的菌属,或者是 *Syntrophomonas* 中专门的产甲酸产乙酸菌属富集而来。由于目前暂无产甲酸产乙酸菌的生物分子检测方法,因此还需进一步研究才能探清产甲酸产乙酸菌的具体情况。两类菌群中丙酸氧化菌属均出现了不同程度的下降,在菌群B-H中,*Syntrophobacter* 与 *Smithella* 的基因相对丰度分别由 $(2.34 \pm 0.14)\%$ 、 $(10.76 \pm 1.41)\%$ 降至 $(2.01 \pm 0.14)\%$ 、 $(4.30 \pm 0.58)\%$,在菌群B-F中 *Syntrophobacter* 与 *Smithella* 的基因相对丰度分别由 $(3.01 \pm 0.19)\%$ 与 $(7.87 \pm 1.03)\%$ 降至 $(2.38 \pm 0.19)\%$ 与 $(3.23 \pm 0.04)\%$ 。*Syntrophobacter* 亦能够以丁酸为基质进行增殖^[22],其相对丰度在两类培养物中均仅有小幅度下降。有报道指出,*Smithella* 的共培养物利用丙酸盐生长,以丁酸盐为基质时生长缓慢^[23]。此外,*Smithella* 的基因相对丰度在菌群B-F中略低于B-H,推测高氢分压亦对其代谢存在抑制作用。

本研究同时对同型产乙酸菌 *Homoacetogens* 和丙酸氧化菌属 *Pelotomaculum* 的基因相对丰度进行了检测(数据未显示)。其中 *Pelotomaculum* 未检出,而 *Homoacetogens* 的基因相对丰度在0.002%左右,同型产乙酸作用不明显。综上可知,在丁酸的驯化作用下,两类培养物的发酵类型均由丙酸型发酵转变为丁酸型发酵,丁酸氧化菌成为产氢产乙酸菌中的优势菌群。

2.2.2 产甲烷菌

考察了甲烷杆菌目 *Methanobacteriales*、甲烷微菌目 *Methanomicrobiales*、甲烷球菌目 *Methanococcales* 及甲烷八叠球菌目 *Methanosarcinales* 中产甲烷八叠球菌属 *Methanosarcina* spp. 和产甲烷丝状菌属 *Methanosaeta* spp. 在驯化过程中相对总古菌的基因相对丰度的变化情况,结果见图3。



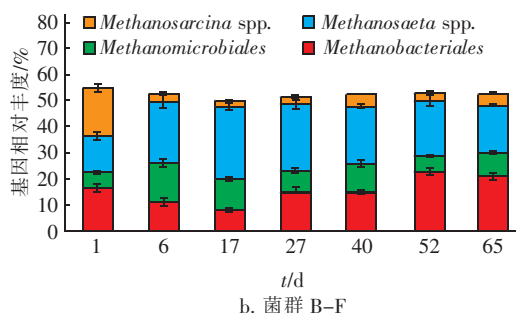


图3 菌群 B-H 与 B-F 中 *Methanosarcina* spp.、*Methanosaeta* spp.、*Methanomicrobiales* 与 *Methanobacteriales* 基因相对丰度的变化

Fig. 3 Alterations in the relative abundance of *Methanosarcina* spp., *Methanosaeta* spp., *Methanomicrobiales* and *Methanobacteriales* in microflora B-H and B-F

Methanosarcina spp. 和 *Methanosaeta* spp. 是目前已发现的仅有的两个乙酸营养型产甲烷菌属^[8]。菌群 B-H 种泥中 *Methanosarcina* spp. 和 *Methanosaeta* spp. 的基因相对丰度分别为 $(19.15 \pm 1.01)\%$ 和 $(19.17 \pm 1.79)\%$, 驯化结束后降至 $(4.02 \pm 0.40)\%$ 与 $(17.30 \pm 0.52)\%$ 。菌群 B-F 中, *Methanosarcina* spp. 与 *Methanosaeta* spp. 的基因相对丰度分别由驯化前的 $(18.28 \pm 1.55)\%$ 、 $(14.14 \pm 1.59)\%$ 变为 $(4.39 \pm 0.42)\%$ 、 $(18.24 \pm 0.31)\%$ 。可见通过丁酸驯化, 相比于 *Methanosarcina* spp. 基因相对丰度的不断下降, *Methanosaeta* spp. 的基因相对丰度则始终较为稳定, 最终成为乙酸营养型细菌中的优势菌群。钱泽澍等以丁酸盐为基质富集丁酸盐降解细菌时也产生了产甲烷丝状菌大量生长的现象^[24]。根据 Monod 方程, *Methanosarcina* spp. 在高乙酸浓度时有优势, 当乙酸浓度 < 70 mg/L 时, 则是 *Methanosaeta* spp. 占优势。但本试验在乙酸浓度始终大于 70 mg/L 时, *Methanosaeta* spp. 成为优势菌属, 推测原因为培养环境存在着浓度高低不断变化的乙酸条件, 丝状菌利用其相对球菌更大的比表面积成为该不利环境下的优势菌属。有研究表明, 在相同的负荷下, 每小时换水的反应器与每天换水的反应器相比, *Methanosaeta* spp. 更有优势^[25]。另外, 如果缺乏某些微量金属元素, 如 Fe、Co、Ni 等, 尽管乙酸浓度很高, *Methanosaeta* spp. 的丝状生长仍会占优势^[26]。Angenent 等^[27]发现 AMBR 一些格室的颗粒污泥中, 虽然乙酸浓度高达 600 mg/L, 仍然发现其中颗粒污泥的产甲烷菌以 *Methanosaeta* spp. 为主, 利用 FISH

技术检测其基因相对表达量为 $(52.2 \pm 11.4)\%$ 。总之, *Methanosarcina* spp. 与 *Methanosaeta* spp. 的竞争结果成因复杂, 不由某种单一因素决定, 学界对此尚无定论。

甲烷杆菌目 *Methanobacteriales*、甲烷微菌目 *Methanomicrobiales*、甲烷球菌目 *Methanococcales* 是主要的 3 类氢营养型产甲烷菌目^[8]。在种泥中, 氢营养型产甲烷菌在产甲烷古菌中占比较乙酸营养型更低, 在丁酸驯化下, B-H 和 B-F 菌群中, *Methanobacteriales* 的基因相对丰度分别由 $(13.21 \pm 1.86)\%$ 、 $(16.51 \pm 1.65)\%$ 升至 $(26.28 \pm 1.74)\%$ 、 $(20.97 \pm 1.32)\%$; *Methanomicrobiales* 的基因相对丰度分别由 $(11.31 \pm 0.65)\%$ 、 $(5.75 \pm 0.27)\%$ 变为 $(6.03 \pm 0.23)\%$ 、 $(9.02 \pm 0.47)\%$ 。可见两类培养物中氢营养型产甲烷菌比例逐渐增加, 成为产甲烷古菌中的优势菌群。以葡萄糖为碳源时, 42% 的葡萄糖经水解和产酸发酵被直接转化为乙酸, 而仅有 15% 被转化为 H_2 ^[28], 因此形成比以丁酸为唯一碳源培养时更高的乙酸浓度, 利于乙酸营养型产甲烷菌的生长, 因而乙酸营养型产甲烷菌的占比下降, 氢营养型产甲烷菌在对底物的竞争中获得优势。*Methanomicrobiales* 在 B-F 中的生长优于 B-H, 原因可能是在氢胁迫下更多的丁酸通过产甲酸产乙酸代谢途径降解, 系统中存在更多的甲酸, *Methanomicrobiales* 中大部分菌属均可以利用甲酸盐进行增殖^[29], 因此在氢胁迫下其生长更优, 推测 *Methanomicrobiales* 在整个产甲酸产乙酸体系中起了重要作用。*Methanococcales* 大多存在于海底沉积物和温泉中, 厌氧消化反应器中较少^[29], 在菌群 B-H 与 B-F 驯化结束后基因相对丰度分别为 $(0.07 \pm 0.01)\%$ 与 $(0.18 \pm 0.01)\%$, 在培养物中含量较小 (图中未显示)。

2.3 酸化 ASBR 的生物强化恢复

利用菌群 B-H、B-F 对酸化 ASBR 进行生物强化, 图 4 显示了 3 组反应器的出水 COD 浓度变化情况 (S: 稳定阶段; O: 负荷冲击阶段; R: 酸化恢复阶段)。在负荷冲击阶段, 随着进水 COD 浓度的增加, R1、R2、R3 的出水 COD 浓度迅速上升, 其 COD 去除率分别由第 12 天的 94.9%、97.3% 和 97.3% 下降至第 20 天的 43.9%、43.9% 和 44.9%, 同时系统内 VFAs 积累。第 20 天时, 3 组反应器出水丙酸和乙酸浓度分别达到 2 317、2 275、2 354 mg/L 和 1 195、

1 059、1 163 mg/L,出水 pH 值维持在 5.3 左右。出水丁酸浓度均在 70 mg/L 左右,这有可能是因为在 ASBR 中丁酸代谢并不是主要的葡萄糖代谢途径。

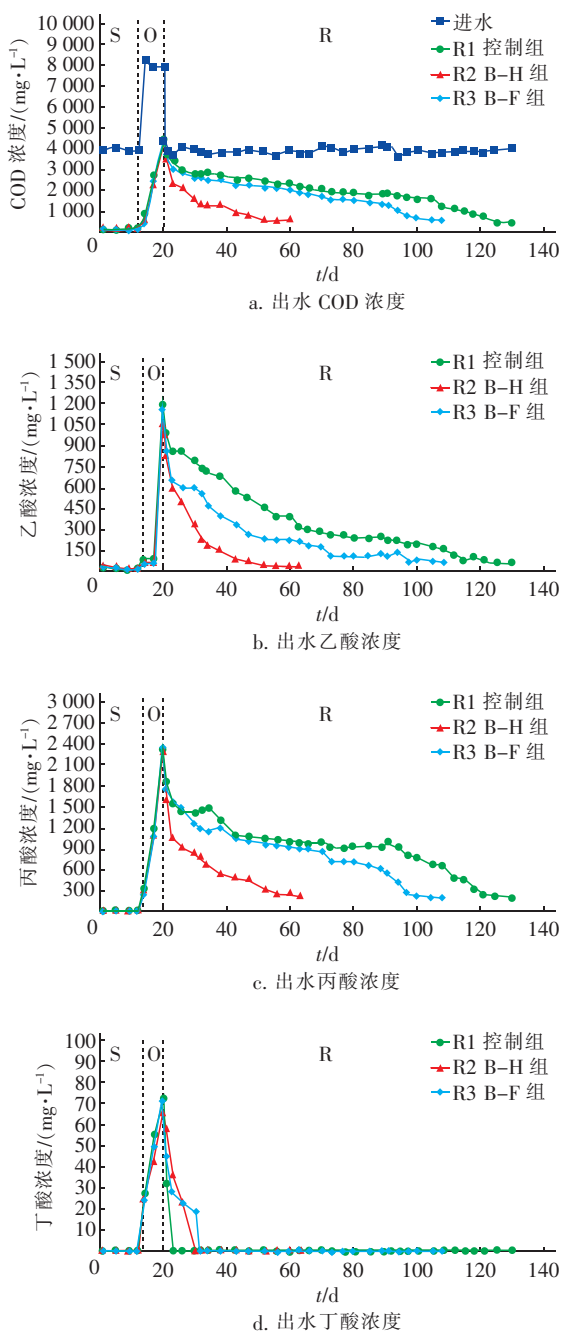


图4 生物强化对酸化 ASBR 出水水质的影响

Fig.4 Effect of biological enhancement on effluent quality of acidified ASBR

乙酸相对丙酸积累呈现滞后性(第17天时丙酸积累为1 200、1 087、1 071 mg/L,乙酸浓度均低于100 mg/L),可能是由于系统受到冲击负荷,使丙酸

代谢产生的大量 H_2 来不及被耗氢产甲烷菌利用而造成氢分压上升,使得丙酸氧化菌较产甲烷菌率先受到抑制,大量丙酸积累致使体系 pH 值下降,进而产甲烷菌活性受到影响造成乙酸浓度的升高。同时丙酸浓度的提高也降低了产甲烷菌活性,有研究认为丙酸浓度在 1 500 ~ 2 220 mg/L 时会严重抑制产甲烷菌的活性^[30],因此冲击负荷造成了3组反应器相似的酸化程度。第20天时3组反应器恢复正常进水负荷后,R1、R2、R3 对 COD 的去除率恢复到85%以上时分别历时110、40、85 d。生物强化对 VFAs 的恢复影响与 COD 相似,两个强化组均优于控制组,可见对于酸化 ASBR 系统,投加菌群 B-H 和 B-F 均可有效加速反应器中 COD 的降解,促进酸化系统的恢复。

在酸化恢复阶段,3组反应器内均是乙酸积累解除先于丙酸,即产甲烷菌活性恢复早于产氢产乙酸菌。产氢产乙酸菌活性恢复后促使丙酸积累解除,进而使得酸化系统恢复。生物强化组恢复更快是因为菌群 B-H 与 B-F 强化了反应器 R2 和 R3 中乙酸和氢产甲烷的代谢过程,加快了乙酸积累解除和氢分压下降,进而促进了丙酸氧化产氢产乙酸菌活性的恢复。相比菌群 B-F, B-H 中氢营养型产甲烷菌的基因相对丰度更大[B-H 与 B-F 中 *Methanobacteriales* 的基因相对丰度分别为 $(26.28 \pm 1.74)\%$ 、 $(20.97 \pm 1.32)\%$],氢分压的快速下降明显,促进了丙酸产氢产乙酸菌活性更快恢复。B-F 中氢营养型产甲烷菌的基因相对丰度比 B-H 低,可能是由于在氢胁迫条件下,其 VFAs 的降解向产甲酸途径转变,促进了利用甲酸的产甲烷菌生长,使得 B-F 中利用氢的细菌产甲烷菌丰度不如 B-H。菌群 B-F 对 COD 降解的强化作用未能达到预期效果,推测原因为本试验条件下对 COD 的厌氧消化以种间氢转移为主,单次投加菌群 B-F 无法使体系内的种间电子转移方式发生显著改变。

3 结论

利用以丁酸为唯一碳源的培养基与氢分压调控进行驯化,成功构建了两类互营丁酸氧化产甲烷菌群 B-H、B-F。通过驯化,B-H 与 B-F 以乙酸、丁酸为基质的 SMA 分别提升了134%、675%与106%、552%,B-F 以甲酸为基质的 SMA 提升了431%。两类培养物基于甲酸、乙酸、丙酸、丁酸的 SMA 分别为 0.441、2.546、1.125、3.510 gCOD/

(gVSS · d) 与 1.540、2.031、1.137、2.855 gCOD/(gVSS · d)。可见通过增大氢分压可以诱导氧化丁酸过程以产甲酸产乙酸途径进行。以菌群 B-H 与 B-F 进行单次投加生物强化的酸化 ASBR 通过强化产乙酸步骤诱导丙酸积累的解除提前,使恢复时间相比控制组分别缩短了 70 d 和 25 d。

对两类培养物中主要菌群的 qPCR 分析结果显示,丁酸氧化菌属 *Syntrophomonas* 成为产乙酸菌中的优势菌属,甲烷杆菌目 *Methanobacteriales* 与产甲烷丝状菌属 *Methanosaeta* spp. 分别成为氢营养型与乙酸营养型产甲烷菌中的优势菌属(目),且氢营养型产甲烷菌在产甲烷古菌中成为优势菌属。在氢胁迫下,甲烷微菌目 *Methanomicrobiales* 的生长更优。

参考文献:

- [1] Demirel B, Yenigün O. Two-phase anaerobic digestion processes: a review [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2002, 77(7): 743-755.
- [2] Rosenberg E, DeLong E F, Lory S, et al. The Prokaryotes [M]. Berlin: Springer, 2014.
- [3] 于雷, 彭剑峰, 宋永会, 等. 厌氧反应器的酸化及其恢复研究进展[J]. 工业水处理, 2011, 31(8): 1-4.
Yu Lei, Peng Jianfeng, Song Yonghui, et al. Research progress in the acidification of highly efficient anaerobic reactor and its recovery[J]. Industrial Water Treatment, 2011, 31(8): 1-4 (in Chinese).
- [4] 王立军, 郑文华, 史绪盛, 等. IC 反应器酸化原因分析及重新启动[J]. 中国给水排水, 2007, 23(24): 95-97.
Wang Lijun, Zheng Wenhua, Shi Xusheng, et al. Analysis on acidification reason of IC reactor and restart [J]. China Water & Wastewater, 2007, 23(24): 95-97 (in Chinese).
- [5] Lins P, Malin C, Wagner A O, et al. Reduction of accumulated volatile fatty acids by an acetate-degrading enrichment culture[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2010, 71(3): 469-478.
- [6] Liu C, Li J, Wang S, et al. A syntrophic propionate-oxidizing microflora and its bioaugmentation on anaerobic wastewater treatment for enhancing methane production and COD removal [J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 2016, 10(4): 147-155.
- [7] Lange M, Ahring B K. A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic archaea[J]. FEMS Microbiol Rev, 2001, 25(5): 553-571.
- [8] Liu Y, Whitman W B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea [J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1125: 171-189.
- [9] 刘鹏飞, 陆雅海. 水稻土中脂肪酸互营氧化的研究进展[J]. 微生物通报, 2013, 40(1): 109-122.
Liu Pengfei, Lu Yahai. A review of syntrophic fatty acids oxidation in anoxic paddy soil [J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 109-122 (in Chinese).
- [10] de Bok F A, Plugge C M, Stams A J. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia [J]. Water Res, 2004, 38(6): 1368-1375.
- [11] Kosaka T, Kato S, Shimoyama T, et al. The genome of *Pelotomaculum thermopropionicum* reveals niche-associated evolution in anaerobic microbiota [J]. Genome Res, 2008, 18(3): 442-448.
- [12] McInerney M J, Rohlin L, Mouttaki H, et al. The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(18): 7600-7605.
- [13] Madigan M T, Martinko J M, Bender K S, et al. Brock Biology of Microorganisms [M]. New York: Pearson Education Inc., 2014.
- [14] Yu Y, Lee C, Kim J, et al. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 89(6): 670-679.
- [15] Sawayama S, Tsukahara K, Yagishita T. Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester [J]. Bioresour Technol, 2006, 97(1): 69-76.
- [16] Mathai P P, Zitomer D H, Maki J S. Quantitative detection of syntrophic fatty acid-degrading bacterial communities in methanogenic environments [J]. Microbiology, 2015, 161(6): 1189-1197.
- [17] Lovell C R, Leaphart A B. Community-level analysis: key genes of CO₂-reductive acetogenesis [J]. Methods Enzymol, 2005, 397: 454-469.
- [18] Thiele J H, Zeikus J G. Control of interspecies electron flow during anaerobic-digestion: significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs [J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54(1): 20-29.
- [19] 李凌云. 厌氧条件下的生物储存、氢分压与微生物类群研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2011.
Li Lingyun. Study on Microbial Storage, Hydrogen

- Partial Pressure and Microbial Group in Anaerobic Biological Treatment [D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2011 (in Chinese).
- [20] Mcinerney M J, Struchtemeyer C G, Sieber J, *et al.* Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1125: 58 – 72.
- [21] 马晓航, 钱泽澍. 丁酸盐降解菌与氢营养菌的互营联合条件 [J]. *浙江农业大学学报*, 1989, 15 (4): 403 – 408.
- Ma Xiaohang, Qian Zeshu. Studies on the requirements of syntrophic association between butyrate-degrading bacterium and hydrogenotrophs [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Zhejiangensis*, 1989, 15 (4): 403 – 408 (in Chinese).
- [22] Muller N, Worm P, Schink B, *et al.* Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms [J]. *Environ Microbiol Rep*, 2010, 2 (4): 489 – 499.
- [23] Liu Y, Balkwill D L, Aldrich H C, *et al.* Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii* [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49 (Pt 2): 545 – 556.
- [24] 钱泽澍, 马晓航. 丁酸盐降解菌和氢营养菌共培养物的研究 [J]. *微生物学报*, 1989, 29 (5): 321 – 329.
- Qian Zeshu, Ma Xiaohang. Studies on butyrate-degrading bacterium in co-culture with hydrogenotrophs [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1989, 29 (5): 321 – 329 (in Chinese).
- [25] Conklin A, Stensel H D, Ferguson J. Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion [J]. *Water Environ Res*, 2006, 78 (5): 486 – 496.
- [26] Takashima M. Nutrient Requirements for High Rate Conversion of Acetate to Methane [D]. Philadelphia: Drexel University, 1987.
- [27] Angenent L T, Sung S, Raskin L. Formation of granules and *Methanosaeta* fibres in an anaerobic migrating blanket reactor (AMBR) [J]. *Environ Microbiol*, 2004, 6 (4): 315 – 322.
- [28] 李圭白, 张杰. 水质工程学 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2013.
- Li Guibai, Zhang Jie. *Water Quality Engineering* [M]. Beijing: China Architecture & Building Press, 2013 (in Chinese).
- [29] Garcia J L, Patel B K, Ollivier B. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic *Archaea* [J]. *Anaerobe*, 2000, 6 (4): 205 – 226.
- [30] Barredo M S, Evison L M. Effect of propionate toxicity on methanogen-enriched sludge, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospirillum hungatii* at different pH values [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57 (6): 1764 – 1769.



作者简介:邵享文(1978 –),男,福建厦门人,博士,副教授,研究方向为水处理理论与技术以及水与废水消毒机理。

E-mail: xwshao@fzu.edu.cn

收稿日期:2019-04-11