

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(11):1437-1444; 4 November 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150177

两株低温沼气产酸细菌的分离鉴定及产酸特性

万永青¹, 张伟^{1,2}, 满都拉¹, 田瑞华¹, 王瑞刚¹, 段开红^{1*}

¹内蒙古农业大学生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018

²金宇保灵生物制品有限公司, 内蒙古 呼和浩特 010030

摘要:【目的】分离筛选低温沼气产酸细菌并研究其发酵特性。【方法】利用筛选培养基分离产酸细菌;通过形态学观察、16S rRNA 进行鉴定;利用糖发酵、淀粉水解、明胶液化、过氧化氢酶等实验考察发酵特性;采用气相色谱法测定挥发性脂肪酸(Volatile fatty acid, VFA),对菌株的产酸特性进行研究。【结果】从霍林河市户用沼液中分离出两株在 4 °C 产酸较高的菌株 FJ-8 和 FJ-15,经 16S rRNA 系统发育树分析分别属于 *Pseudomonas* sp. 和 *Shewanella* sp.。两株菌均能够水解淀粉、液化明胶,且过氧化氢酶反应均呈阳性。它们最适的产酸温度分别是 15 °C 和 20 °C,在 4 °C 液体发酵 10 d 后所产总 VFAs 分别为 2593 mg/L 和 2687 mg/L。其中乙酸含量分别为 792 mg/L 和 966 mg/L。另外,相同条件下 5 L 模拟发酵结果显示处理组(添加所筛两株菌混合发酵液)的周产气量比对照组高出 59%。【结论】分离出的两株产酸细菌 FJ-8 和 FJ-15 在低温条件下具有较好的产酸性能,在提高低温条件下沼气产气量方面具有很强的应用前景。

关键词:产酸,鉴定,挥发性脂肪酸,低温,沼气发酵

中图分类号:Q935 **文章编号:**0001-6209(2015)11-1437-08

沼气是一种生物质清洁能源,具有绿色环保、可分散生产、就地使用、成本低廉、污染少、能够提高农村废弃物利用和提供清洁能源及优质肥料等诸多优势。然而低温成为沼气广泛应用的一个主要问题^[1],制约着沼气应用的发展速度。地球上有 75% 的生物圈处于永久的低温环境中^[2],在这些环境中,生活着大量的微生物菌群,成为低温生境中的主角。近年来低温微生物已成为世界极端环境微生物学领域的研究热点,其中就包括低温的沼气发酵。目前,沼气发酵四个阶段理论早已被研究者广泛接受^[3-4]。在发酵的前三个阶段产酸细菌发挥着重要

的功能。沼气发酵中的产酸细菌主要有水解发酵产酸细菌、产氢产乙酸菌和同型产乙酸菌^[5], Vieitez^[6] 等和 Refai^[3] 等研究均表明,厌氧发酵中固体有机物的水解产酸速率低于产甲烷速率,是固体有机物厌氧发酵的限速反应。这说明产酸细菌在沼气发酵过程中的地位至关重要。同时有研究显示,乙酸型产甲烷途径是甲烷的主要来源,约占全部甲烷产量的 67%^[7]。我国北方地区为大陆性气候,冬季漫长寒冷,户用沼气池产气率低限制了户用沼气广泛应用的速度^[8-9]。针对以上问题,本研究从低温沼气发酵液中分离筛选细菌,从产酸细菌入手,研究其产酸

基金项目:内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY12076);内蒙古自治区科技计划项目(201101512);内蒙古自治区科技计划项目(20100701)

* 通信作者。Tel: +86-471-4317635; E-mail: 15947117755@163.com

作者简介:万永青(1974-),男,湖北黄梅,讲师,硕士,微生物发酵及应用。E-mail: livgreen176@163.com

收稿日期:2015-04-14; **修回日期:**2015-06-11

特性,对进一步提高低温条件下沼气的产气量具有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品:低温沼气发酵液取自内蒙古自治区东北部霍林河市某户用沼气池。

1.1.2 主要试剂和仪器:细菌基因组 DNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司], *Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa), 甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异戊酸、戊酸等标样; Thermal PCR 仪(Applied Biosystems), DYY-5 型电泳仪(北京六一仪器厂), 450 型气相色谱仪(Varian), DM500 型普通光学显微镜(Leica)。

1.1.3 主要培养基:(1)富集培养基(发酵型产酸细菌培养基, g/L)^[10]: 葡萄糖 8.00, 蛋白胨 1.50, 磷酸二氢钾 0.40, 硫酸铵 0.50, 七水硫酸镁 0.05, 氯化铁 0.01, 氯化镁 0.10, 氯化钙 0.10, 酵母膏 1.50, 氯化钠 3.00, L-半胱氨酸 0.50, 加蒸馏水至 1 L。(2)筛选固体培养基: 在富集培养基中添加 0.1% (W/V) 的甲基红指示剂及 1.7% (W/V) 的琼脂。(3)筛选液体培养基: 在富集培养基中添加 0.1% (W/V) 的甲基红指示剂。(4)固体发酵培养基: 在富集培养基中加入 1.7% (W/V) 的琼脂。(5)淀粉水解培养基(g/L)^[11]: 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 5.0, 氯化钠 5.0, 可溶性淀粉 2.0, 蒸馏水 1 L, 琼脂 17.0, 调 pH 值 7.4 - 7.6。(6)明胶水解培养基(g/L)^[12]: 蛋白胨 5.0, 明胶 120.0, 蒸馏水 1 L, 调 pH 7.2 - 7.4。(7)糖发酵培养基(g/L)^[11-12]: 磷酸氢二铵 4.0, 七水硫酸镁 0.2, 氯化钾 0.2, 酵母膏 0.2, 糖 10.0, 琼脂 18.0, 0.04% 溴甲酚紫酒精溶液 20 mL, 调 pH 7.0 - 7.2。(糖包括葡萄糖、D-木糖、D-半乳糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇等)

1.2 低温发酵产酸细菌的分离筛选

取低温样品 1 mL, 接种于富集培养基中, 4 °C 下富集培养 18 d 左右, 用无菌生理盐水以 10 倍梯度稀释至 10^{-7} , 吸取 100 μ L 在筛选固体培养基上均匀涂布, 封口后放入 4 °C 的低温培养箱培养。培养 7 d 后, 挑取周围是红色的菌落, 划线分离纯化后, 于筛选液体培养基中 4 °C 培养 7 d 进行验证。进行菌落特征及显微镜细胞形态观察。

1.3 分离菌株 DNA 的提取及 16S rRNA 鉴定

分离菌株培养至 OD_{600} 为 0.8 左右, 用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取总 DNA, 以细菌鉴定通用引物(7F: 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3' 和 1540R: 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ L: 5 \times buffer (with Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1 μ L, *Taq* 酶 0.2 μ L, 引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 加双蒸水至 25 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 1 min。PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果在 GenBank 核酸数据库中 BLAST 比对, 选取相似性高的序列, 利用 MEGA 5.1 软件, 由 Clustal W 进行 alignment, 然后用 Neighbour-Joining 分析方法进行分子系统学分析, 并进行 1000 次 bootstrap 统计学检验, 构建系统发育树, 进行系统发育分析。

1.4 分离菌株发酵特性试验

1.4.1 糖发酵试验:将分离菌株接入糖发酵培养基, 于 4 °C 的低温培养箱培养 10 d 后观察, 若培养基颜色仍为紫色, 说明糖发酵没有发生, 为阴性; 若颜色变黄, 说明糖发酵产酸, 为阳性。

1.4.2 过氧化氢酶试验:将分离菌株接入筛选固体培养基中, 于 4 °C 的低温培养箱培养 10 d。在菌落周围的培养基上直接滴加 4% 的双氧水, 观察产气泡情况。有气泡产生为接触酶阳性, 反之为阴性。

1.4.3 淀粉水解试验:将分离菌株接到淀粉水解培养基上, 于 4 °C 的低温培养箱培养 10 d。然后将碘液滴加在培养基上, 观察表面颜色变化情况。若菌落周围出现非蓝色透明圈, 则为阳性; 若菌落周围仍然是蓝色, 则为阴性。

1.4.4 明胶液化试验:将分离菌株采用穿刺接种法接入明胶水解培养基中, 在 4 °C 培养 14 d 后观察明胶液化情况。有液化现象为阳性, 否则为阴性。

1.5 初始 pH 值对分离菌株生长的影响

配制固体发酵培养基后, 用 1 mol/L 盐酸及氢氧化钠溶液调节 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0, 灭菌后待用。将待测菌液稀释至 10^{-6} , 均匀涂布于不同 pH 值的固体发酵培养基上, 在 4 °C 培养, 观察其菌落生长情况。所有处理均重复 3 次, 取平均值。

1.6 分离菌株最适产酸温度的测定

将分离菌株接种于配制好的发酵型产酸细菌培

培养基上,分别放于 0、4、10、15、20、25、30、35 °C 条件下培养 2 d 后,用气相色谱仪测定其菌液中挥发性脂肪酸(VFA)的含量,确定最适产酸温度。所有处理均重复 3 次,取平均值。

1.7 气相色谱法测定发酵样品中的 VFA 含量

1.7.1 液体发酵样品的处理:分离菌株在 4 °C 条件下进行液体发酵(发酵型产酸培养基)10 d。用移液器取液体发酵液 1 mL 放于表面皿上,加 0.5 mL 的丙酮,用四甲基氢氧化铵滴定至碱性(pH8-9),记录滴定体积;将表面皿置于 80 °C 水浴上蒸干,用 N,N-二甲基乙酰胺将表面皿上的残渣洗入试管中并至 2 mL;根据四甲基氢氧化铵滴定体积加入所需量的碘甲烷进行 VFA 的甲酯化,静置 30 min 后用气相色谱仪测定 VFA 的含量。

1.7.2 固体发酵样品的处理:分离菌株在 4 °C 条件下进行固体发酵(发酵型产酸固体培养基)10 d,将菌体连同培养基一起刮下来,放入 50 mL 的离心管中,加蒸馏水到 40 mL,浸泡 24 h,离心,取 1 mL 上清液同 1.7.1 方法处理后用气相色谱仪测定。

1.7.3 色谱条件:Varian 450-GC 气相色谱仪,30 m × 0.32 mm 52CB 极性色谱柱,FID 检测器。色谱柱温度程序:起始温度为 50 °C,保持 2 min,以 24 °C/min 的升温速率升至 230 °C,保持 9 min。气室温度 240 °C,检测器温度 260 °C。载气为氮气,流速为 1 mL/min;进样量 1 μL。

1.8 低温沼气模拟发酵产气量变化

采用 5 L 下口瓶作为模拟发酵瓶,按照排水法设计沼气模拟发酵装置。以牛粪和甜高粱秸秆(质量比 2:1)为底物原料,发酵液(TS)浓度为 10%^[13],低温沼液为菌种。试验设计分为 2 组(试验组 A 和对照组 B),每组 3 个模拟装置。试验组 A

为加入 15% 的低温沼液作为菌种,另加 1% 分离筛选的低温发酵产酸细菌等量混合菌液;对照组 B 为加入 16% 的低温沼液,作为对照。其他条件均相同。将模拟发酵装置同时放入 4 °C 低温培养箱内,每周记录一次产气量,分批发酵 98 d(共 14 周),分析周产气量随时间的变化。

2 结果和分析

2.1 低温发酵产酸细菌的分离与筛选

将低温样品富集培养后,用筛选固体培养基进行快速筛选,根据菌落周围呈红色变色圈的大小初步判断菌株的产酸能力。挑选 3 株变色圈直径较大的菌株于筛选液体培养基中验证,最终获得两株产酸细菌(菌株 FJ-8、FJ-15)。菌株 FJ-8 菌落呈乳黄色,圆形,饱满,边缘整齐;细胞形态为短杆菌;革兰氏染色为阴性。菌株 FJ-15 菌落呈白色,透明,圆形,边缘整齐;细胞形态为球菌,单个或两个对生;革兰氏染色为阳性。

2.2 分离菌株 16S rRNA 鉴定

经测序后,结果上传至 GenBank(登录号为 KR065416 和 KR065417),序列大小分别为 1411 bp 和 1423 bp。序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对,选取相近的菌株,再利用 MEGA 5.1 软件,构建系统发育树(图 1)。从比对结果来看,菌株 FJ-8 与模式种 *Pseudomonas extremorientalis* (AF405328) 的相似性达 98.9%,菌株 FJ-15 与 *Shewanella* sp. (GQ869649) 的相似性达 98%。另外,从系统进化树上看,FJ-8 与 *Pseudomonas extremorientalis* (AF405328) 在同一分支上且 Bootstrap value 等于 99,说明其与 *Pseudomonas extremorientalis* (AF405328) 有很高的相似性。FJ-15

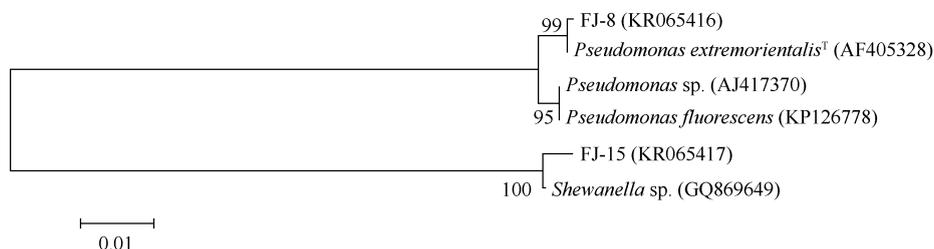


图 1. 基于 16S rRNA 序列和 Neighbor-Joining 构建的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences and Neighbor-joining analysis. FJ-8 and FJ-15 are experimental strains. Number in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bootstrap = 1000. Bar, 1% sequence divergence.

与 *Shewanella* sp. (GQ869649) 在同一分支上,且 Bootstrap value 等于 100。因此,在细菌系统发育分类学上,将菌株 FJ-8 鉴定为 *Pseudomonas extremorientalis*,命名为 *Pseudomonas extremorientalis* FJ-8;将菌株 FJ-15 鉴定为 *Shewanella* sp.,命名为 *Shewanella* sp. FJ-15。

2.3 分离菌株的发酵特性

菌株 FJ-8 和 FJ-15 对 7 种糖(葡萄糖、D-木糖、D-半乳糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖和甘露醇)均为阳性,同时可以水解淀粉和液化明胶,在过氧化氢酶试验结果中也显示阳性。说明菌株 FJ-8 和 FJ-15 对大分子淀粉和蛋白质具有降解作用,同时在 7 种糖分别作为唯一碳源的培养基上生长良好。

2.4 初始 pH 值对分离菌株生长的影响

4 °C 下培养 10 d 后,记录不同初始 pH 值平板上的菌落个数,分析菌落个数与初始 pH 值的关系,如图所示(图 2)培养基初始 pH 值过高或过低都会影响菌株的生长。菌株 FJ-8 和 FJ-15 最适 pH 在 7.0 左右。沼气发酵过程适宜的 pH 值范围是 6.5 - 7.5^[14]。这样的 pH 环境正好适合筛选出的低温沼气发酵产酸细菌的生长。从图 2 还可以看出,在 pH 5 - 9 范围内,菌株都能生长,说明产酸细菌耐受 pH 范围很宽。

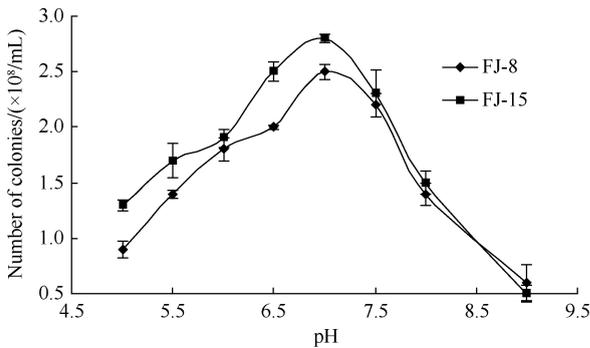


图 2. 初始 pH 值对分离菌株生长的影响

Figure 2. Effect of original pH on growth of the two strains.

2.5 分离菌株最适产酸温度的测定

菌株 FJ-8 和 FJ-15 在不同温度下培养 2 d 后,发酵型产酸细菌培养基中 VFA 的含量变化如图 3 所示。说明不同温度影响菌株的产酸量,随着温度的升高产酸量呈先逐步增加后又逐步下降的态势。菌株 FJ-8 在 15 °C 时产酸量最多,达 2.52 g/L,而 FJ-15 在 20 °C 时产酸量最多,达到 2.58 g/L。在 4 °C 时,菌株 FJ-8 和 FJ-15 的产酸量分别为 1.44 g/L 和

1.08 g/L。在 0 - 15 °C 区间内,菌株 FJ-8 产酸量随着温度呈线性增加;而菌株 FJ-15 在 4 - 20 °C 区间内呈线性增加,增加幅度与菌株 FJ-8 类似,但在 0 - 4 °C 产酸量随温度变化不明显。

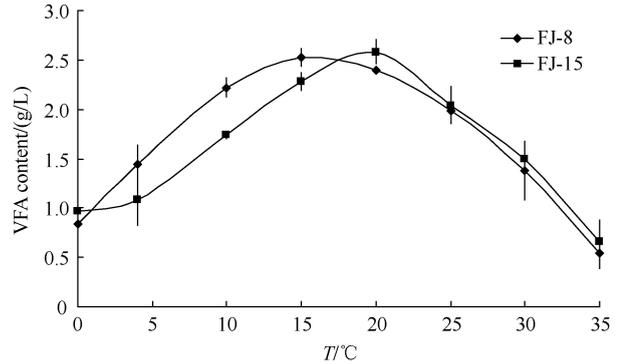


图 3. 分离菌株产酸能力与温度的关系

Figure 3. Effect of temperature on acid-producing abilities of the two strains.

2.6 分离菌株发酵产酸特性的初步分析

菌株 FJ-8 和 FJ-15 在液态发酵和固体发酵过程中 VFA 的气相色谱测定结果如图 4 所示。从图中可以看出,两株菌发酵液中 VFA 的种类大体相同,相对含量稍有不同。菌株 FJ-8 产生的 VFA 种类主要有甲酸、乙酸和乳酸,丁酸和丙酸含量较少。而菌株 FJ-15 产生的 VFA 种类主要有乙酸、乳酸和丁酸,没有检测到丙酸,而甲酸在固态和液态发酵中产生 VFA 的差别较大,在固态发酵中含量达到 20%,而在液态中没有检出。两株菌均没有戊酸和异戊酸产生,这与赵学强^[15]等研究的水解产酸特性有点不同,可能是由于低温沼气发酵过程中产甲烷菌主要利用乙酸和丁酸的缘故。菌株 FJ-8 产生的乙酸和丁酸之和占到总 VFAs 的 37% 以上;菌株 FJ-15 产生的乙酸和丁酸之和占总 VFA 的比例高达 65%。在 4 °C 发酵 10 d,菌株 FJ-8 液态发酵液中含总 VFAs 量达到 2593 mg/L,而菌株 FJ-15 则达到了 2687 mg/L;而固态发酵与液体发酵相比,菌株 FJ-8 液体发酵产酸性能高出了 44%,菌株 FJ-15 液体发酵产酸性能高出了 23.8%。整体来看,乙酸和乳酸的比例相对较高,通常表现出乙酸比乳酸高。从绝对含量来看,虽然菌株 FJ-8 在液体发酵中乙酸的组成含量比固体发酵稍低(33% → 40%),但绝对含量仍然提升了 20% (792 mg/L → 660 mg/L)。两株菌液体发酵互补合并后,主要是乙酸和乳酸,其次是甲酸和丁酸,含有少量的丙酸,但没有检测到戊酸和异戊酸。

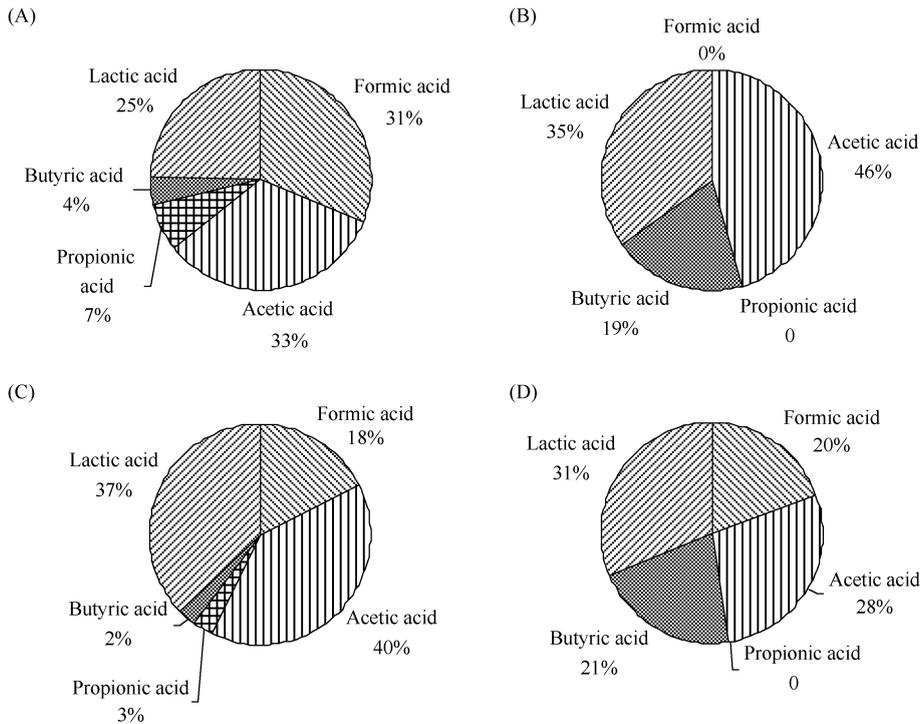


图 4. 不同条件下两株菌产 VFA 的变化

Figure 4. The variation of components of VFA in different condition of the two strains. A: Components of VFA in liquid fermentation of FJ-8; B: Components of VFA in liquid fermentation of FJ-15; C: Components of VFA in solid fermentation of FJ-8; D: Components of VFA in solid fermentation of FJ-15.

2.7 低温沼气模拟发酵总产气量变化

试验组 A 和对照组 B 同时放入 4 °C 低温培养箱内,记录周产气量,分别取 3 个重复的平均值,结果如图 5 所示。在整个模拟发酵过程中可以看出,周产气量都是先增加后减少。试验组 A 平均在 35 d 达到最大周产气量,产气量为 43 mL;而对照组 B 达到最大产气时间大约需要 49 d,峰值较试验组推后了 2 周时间,最大产气量也比试验组少,只有 39 mL。这说明试验组 A 加入的 1% 低温产酸细菌起到了一定的作用,可能是加速了小分子有机酸的形成,为后期细菌代谢提供了充足的营养物质及适宜的 pH 环境,缩短了沼气发酵的启动期。特别是分离筛选出的两株产酸细菌所产的 VFAs 中,乙酸的含量相对较高(见结果 2.6),有利于在低温条件下沼气的产生。在发酵到第 5 周时,试验组 A 比对照组 B 高出 16 mL,提高了 59%,而最大周产气量也比对照组 B 高出 4 mL,提高了 10.3%。据此可以认为添加这两株产酸细菌能够提高低温条件下沼气的产量,同时能够提高

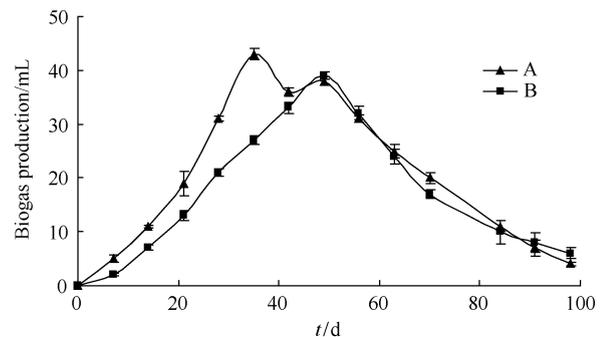


图 5 周产气量随时间的变化

Figure 5. Temporal change of gas production in treatment group (A) and control group (B).

底物的转化率。在进行模拟发酵试验中,本研究还对总产气量进行了统计(见表 1)。从结果可以看出,试验组 A 的启动时间比对照组要早,同时产气量明显高于对照组 B。发酵 42 d 时,试验组 A 比对照组 B 的产气量多 126 mL,随后两者的差距几乎保持不变。这可能是由于在整个发酵过程中没有进行补料,营养物质不足所致,或者由于低温

沼气发酵过程中某些限制因子起了作用。但从整体来看,可以说明加入的低温产酸混合菌确实起

了一定的作用,缩短了整个发酵过程的启动期,并提前达到最大产气量。

表 1. 模拟发酵总产气量实验结果

Table 1. The production of total biogas in simulated fermentation

| Group | The volume of biogas/mL* | | | | | | | | | | | | | |
|-------|--------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 d | 7 d | 14 d | 21 d | 28 d | 35 d | 42 d | 49 d | 56 d | 63 d | 70 d | 84 d | 91 d | 98 d |
| A | 0 | 15 | 48 | 105 | 198 | 327 | 435 | 549 | 642 | 717 | 777 | 810 | 831 | 843 |
| B | 0 | 6 | 27 | 66 | 129 | 210 | 309 | 426 | 522 | 594 | 645 | 675 | 699 | 717 |

*: The sum of three parallel experiments; A: treatment group; B: control group.

3 讨论

沼气发酵是个复杂的微生物发酵过程,不产甲烷菌和产甲烷菌之间既相互依赖,又相互制约。二者相互为对方提供适宜的环境和生长条件,使沼气发酵这个复杂的系统处于平衡状态。本研究通过对从低温户用沼液中分离出的两株产酸细菌发酵产酸性能的研究发现,菌株 FJ-8 在 4 ℃ 进行液体发酵 10 d 可产生总 VFAs 2593 mg/L,其中乙酸 792 mg/L,乳酸 889 mg/L,甲酸 575 mg/L,还含有少量的丙酸和丁酸;菌株 FJ-15 在 4 ℃ 进行液体发酵 10 d 可产生总 VFAs 2687 mg/L,其中乙酸 966 mg/L,乳酸 1116 mg/L,丁酸 605 mg/L,没有检测出甲酸和丙酸。

目前发现有 3 种甲烷的生物合成途径,分别为以乙酸为原料,以氢、二氧化碳为原料和以甲基化合物为原料的甲烷生物合成。其中以乙酸为原料是甲烷生物合成的主要合成途径^[16]。因此产酸细菌形成的高乙酸环境将有利于甲烷的形成。习彦花等^[17]在废水污泥中分离的产氢产乙酸菌株 ZR-1,在 16 ℃ 发酵 10 d,乙酸的含量达到 1125.6 mg/L,其最适温度是 37 ℃。而本研究中分离的菌株 FJ-8 产酸的最适温度是 15 ℃,菌株 FJ-15 产酸的最适温度是 20 ℃。它们在 4 ℃ 条件下发酵 10 d 的乙酸含量比习彦花等^[17]的产氢产乙酸菌株 ZR-1 在 16 ℃ 发酵 10 d 稍低,产生的乙酸分别为 792 mg/L 和 966 mg/L。赵学强等^[15]在研究牛粪的沼气发酵中发现,在 37 ℃ 下发酵 7 d,乙酸、丙酸和异丁酸浓度均达到最大,分别为 3.41、1.11 和 0.91 g/L,这个结果比本研究中的两株菌的产酸量高出很多。但是,本研究的主要目的是解决北方用户用沼气池过冬问题,只探讨了低温条件下,尤其是 4 ℃ 下菌株的产酸

特性。其中在中温条件下的产酸特性还有待进一步深入研究。从模拟发酵试验结果看,与对照组相比,处理组产气量提高了 59%,同时原料转化率提高了 10.3%。这可能与两菌株(FJ-8 和 FJ-15)能够在低温(4 ℃)条件下产生较高的乙酸有关外,其具有的水解淀粉、液化明胶的能力以及过氧化氢酶反应上呈阳性,为严格厌氧的产甲烷菌提供了良好的厌氧环境等有关。可以得出在以乙酸作为底物的产甲烷途径中,菌株 FJ-8 和 FJ-15 是较好的低温沼气产酸细菌。

然而,从模拟发酵的产气量来看,单周的最大产气量只有 43 mL,容积产气率为 1.54 mL/(L·d)。王淦昆^[18]等采用产甲烷菌混合菌剂,发酵温度 20 ℃,接种量为 10% 组的容积产气率为 0.136 mL/(mL·d);孙维涛等^[19]进行 16 - 5 ℃ 的降温模拟沼气发酵,在 16 ℃ 的容积产气率为 0.0509 mL/(mL·d),而在 5 ℃ 时容积产气率约为 0.001 mL/(mL·d)。正如丁维新等^[20]综述的温度对产甲烷菌的产甲烷能力有很大影响,提高温度可以显著地提高甲烷的产量。在本研究中,4 ℃ 条件下的产气量也非常低,可能是在模拟发酵体系中产甲烷菌的产甲烷速度低导致。下一步工作将进一步完善 4 ℃ 条件下产酸细菌与产甲烷菌在工艺过程中的优化,以期提高在 4 ℃ 条件下沼气的产量。

4 结论

本试验从内蒙古东北部霍林河的农户家的沼气池中分离得到了两株低温产酸细菌 *Pseudomonas extremorientalis* FJ-8 和 *Shewanella* sp. FJ-15,这两株菌不仅能够水解淀粉、液化明胶,而且过氧化氢酶呈阳性。它们的最适温度分别是 15 ℃ 和 20 ℃,但在 4 ℃ 液体发酵 10 d,可分别产生总 VFAs 2593 mg/L

和 2687 mg/L, 其中分别含乙酸 792 mg/L 和 966 mg/L。在 5 L 的模拟发酵过程中, 试验组启动快, 产气量大。与对照组相比, 试验组的周产气量在相同时间内可高出 59%。该菌株的发现为将来在低温条件下应用于厌氧发酵, 提高原料转化率和沼气产气量提供了可能, 有极高的潜在应用价值。

参考文献

- [1] Zhao G, Ma F, Wei L, Cai H, Wang Z. Research and prospects of low temperature biogas digestion technology in North. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2011, 43(6): 29-33. (in Chinese)
赵光, 马放, 魏利, 蔡宏, 王哲. 北方低温沼气发酵技术研究及展望. 哈尔滨工业大学学报, 2011, 43(6): 29-33.
- [2] Simankova MV, Kotsyurbenko OR, Lueders T, Nozhevnikova AN, Wagner B, Conrad R, Friedrich MW. Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26(2): 312-318.
- [3] Refai S, Wassmann K, van Helmont S, Berger S, Deppenmeier U. Increase of methane formation by ethanol addition during continuous fermentation of biogas sludge. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(12): 1763-1772.
- [4] Refai S, Wassmann K, Deppenmeier U. Short-term effect of acetate and ethanol on methane formation in biogas sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(16): 7271-7280.
- [5] 王晋. 厌氧发酵产酸微生物种群生态及互营关系研究. 江南大学博士学位论文, 2013.
- [6] Vi éitez ER, Mosquera J, Ghosh S. Kinetics of accelerated solid-state fermentation of organic-rich municipal solid waste. *Water Science and Technology*, 2000, 41(3): 231-238.
- [7] Chin KJ, Conrad R. Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 18(2): 85-102.
- [8] Wang WL, Zhao X, Li J. Isolation, identification and optimal biogas fermentation conditions of a psychrotolerant strain. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2013, 27(10): 1588-1596. (in Chinese)
王文丽, 赵旭, 李娟. 一株耐低温沼气促进菌的分离鉴定及最适沼气发酵条件研究. 核农学报, 2013, 27(10): 1588-1596.
- [9] Wei SZ, Huang QS. Advances in fermentation techniques for household biogas under low temperature. *Journal of Southern Agriculture*, 2012, 43(6): 792-796. (in Chinese)
魏素珍, 黄青松. 低温条件下户用沼气发酵技术研究进展. 南方农业学报, 2012, 43(6): 792-796.
- [10] Deng GC, Li J, Zhao H, Gao LA, Ma Y, Li YB, Li JL, Feng CJ, Zhang L, Yang SK. Research on cold acclimation of microorganism of biogas fermentation. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(27): 12894-12895. (in Chinese)
邓功成, 李静, 赵洪, 高礼安, 马媛, 李永波, 黎娇凌, 俸才军, 张林, 杨世凯. 沼气发酵微生物低温驯化研究. 安徽农业科学, 2009, 37(27): 12894-12895.
- [11] Wang GL, Song JM, Qu JR. Identification for a strain of acid-producing bacteria separated from Suanjiang. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2006, 27(1): 77-81. (in Chinese)
王国良, 宋俊梅, 曲静然. 从酸浆中分离出的一株产酸菌的鉴定. 河南工业大学学报(自然科学版), 2006, 27(1): 77-81.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] Kanwar SS, Kalia AK. Anaerobic fermentation of sheep droppings for biogas production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1993, 9(2): 174-175.
- [14] Qian ZS, Wu JP. Research on biogas fermentation on rural biogas digester in China. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1979, 5(1): 53-62. (in Chinese)
钱泽澍, 吴金鹏. 中国农村沼气池沼气发酵的研究. 浙江农业大学学报, 1979, 5(1): 53-62.
- [15] Zhao XQ, Chen GY, Chang ZZ, Du J, Ye XM. Characteristics of hydrolysis and acidification of different organic solid wastes. *China Biogas*, 2013, 31(3): 12-17. (in Chinese)
赵学强, 陈广银, 常志州, 杜静, 叶小梅. 不同有机固体废物水解产酸特性研究. 中国沼气, 2013, 31(3): 12-17.
- [16] Zeikus JG. The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriology Reviews*, 1977, 41(2): 514-541.
- [17] Xi YH, Cheng HC, Zhang LP, Cui GH, Ma JL. Separation and identification of a hydrogen-producing acetogens strain ZR-1 and its acetic production characters. *Microbiology China*, 2011, 38(2): 181-186. (in Chinese)

习彦花, 程辉彩, 张丽萍, 崔冠慧, 马金亮. 产氢产乙酸菌 ZR-1 的分离鉴定及产酸特性. *微生物学通报*, 2011, 38(2): 181-186.

- [18] Wang YK, Yuan YX, Li D, Hu YD, Huang XB, Wen HS, Liu XF, Peng XY, Yan ZY. Performance of evaluation of methanogenic microbial inoculant and its effect of biogas production in pilot scale test. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2014, 30(16): 247-255. (in Chinese)
王渝昆, 袁月祥, 李东, 胡亚东, 黄显波, 文昊深, 刘晓风, 彭绪亚, 闫志英. 产甲烷复合菌剂的性能评价及中试试验产气效果. *农业工程学报*, 2014, 30(16): 247-255.

- [19] Kong WT, Hu D, Ma FM, Jia N, Zhang CM, Qi YM, Wang ZW. Screening and dominant population analysis of microbial strains in biogas fermentation under the low temperature. *Microbiology China*, 2013, 40(9): 1590-1598. (in Chinese)
孔维涛, 胡栋, 马福民, 贾楠, 张翠棉, 齐永敏, 王占武. 低温沼气发酵优良菌系筛选及优势菌群分析. *微生物学通报*, 2013, 40(9): 1590-1598.
- [20] Ding WX, Cai ZC. Effect of temperature on methane production and oxidation in soils. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(4): 604-608. (in Chinese)
丁维新, 蔡祖聪. 温度对甲烷产生和氧化的影响. *应用生态学报*, 2003, 14(4): 604-608.

Isolation, identification and characterization of acid-producing strains from psychrotolerant biogas fermentation

Yongqing Wan¹, Wei Zhang^{1,2}, Mandlaa¹, Ruihua Tian¹, Ruigang Wang¹, Kaihong Duan^{1*}

¹College of Life Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, Inner Mongolia Autonomous Region, China

²The Spirit Jinyu Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Huhhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Abstract: [**Objective**] The aim of this study was to screen acid-producing strains from the broth of psychrotolerant biogas fermentation and evaluate the acid-producing character of them. [**Methods**] Acid-producing strains were isolated by a medium with methyl red at 4 °C in Petri dishes and identified by morphology observation and 16S rRNA sequencing. Moreover, the ability of hydrolysis of starch, fermentation of carbohydrates, liquefaction of gelatin and production of catalase were studied. [**Results**] Two acid-producing strains (FJ-8 and FJ-15) were isolated. The result of the 16S rRNA phylogenetic tree shows that FJ-8 and FJ-15 belong to *Pseudomonas* sp. and *Shewanella* sp., respectively. Both FJ-8 and FJ-15 could hydrolyze starch, liquidize gelatin and produce catalase. The optimum temperature for acid-producing of FJ-8 and FJ-15 is 15 °C and 20 °C, respectively. After 10 days cultivation at 4 °C, the concentration of acetic acid was 792 mg/L and 966 mg/L of FJ-8 and FJ-15, respectively. [**Conclusion**] The selected strains, FJ-8 and FJ-15, have the potential to produce acids at low temperature.

Keywords: acid-producing, identification, volatile fatty acid, low temperature, biogas fermentation

(本文责编:李磊)

Supported by Scientific Research Program of the Higher Education Institution of Inner Mongolia (NJZY12076), Inner Mongolia Science & Technology Plan (201101512), and by Inner Mongolia Science & Technology Plan (20100701)

* Corresponding author. Tel: +86-471-4317635; E-mail: 15947117755@163.com

Received: 14 April 2015/Revised: 11 June 2015