

# 有机酸胁迫下厌氧污泥产氢效果

黄振兴<sup>1,2</sup> 严群<sup>1,2</sup> 阮文权<sup>1,2\*</sup> 余晓斌<sup>2,3</sup>

(1. 江南大学环境与土木工程学院 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(3. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 乙酸、丙酸、乳酸及丁酸是厌氧发酵产氢过程中 4 种主要的液相末端发酵产物, 其积累对产氢过程有一定的抑制作用。实验利用多种有机酸胁迫提高污泥的酸耐受能力, 并以污泥中脱氢酶活性为生化指标, 对不同浓度酸胁迫下厌氧污泥活性变化进行了研究。通过对胁迫后污泥产氢量及末端产物进行对比。结果表明, 酸胁迫后污泥产氢量有一定增加, 其中乙酸和丁酸胁迫效果最好, 较对照组提高了近一倍; 末端产物分析研究表明, 不同的有机酸胁迫后, 其产量在发酵过程中都有一定的增加, 而乙酸含量在酸胁迫后都有不同程度的提高。

**关键词:** 厌氧发酵, 胁迫, 有机酸, 末端产物, 酸应激

## Effect of Organic Acids Stress on Biohydrogen Production by Anaerobic Granular Sludge

HUANG Zhen-Xing<sup>1,2</sup> YAN Qun<sup>1,2</sup> RUAN Wen-Quan<sup>1,2\*</sup> YU Xiao-Bin<sup>2,3</sup>

(1. School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** The major organic acids produced in the fermentative hydrogen production by mixed cultures were acetic acid, propionic acid, lactate acid and butyric acid, etc. which had negative effect on hydrogen production. The acid tolerance of mixed cultures was improved by the metabolites stress and the sludge activities under different stresses were investigated through the dehydrogenase activity (DHA) determination in the work. The results showed that certain metabolite stress could increase the hydrogen production and the metabolite yield, especially when acetic acid and butyric acid were used for stress. Importantly, the cumulative hydrogen quantity nearly doubled compared with the control. Interestingly, the acetic acid production enhanced extensively regardless of the stress method of all groups.

**Keywords:** Anaerobic fermentation, Stress, Organic acid, End products, Acid tolerance response

随着能源危机的加剧, 氢气作为一种清洁可再生能源越来越受到全世界的关注。在众多制氢方

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2009BAC52B03); 国家自然科学基金项目(No. 20976069); 江苏省科技支撑项目(No. BE2008607); 江南大学自主科研项目(No. JUSRP20906); 江南大学博士研究生科学研究基金

\* 通讯作者: Tel: 86-510-85918265; ✉ wqruan@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2010-01-25; 接受日期: 2010-02-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

法中,利用微生物厌氧发酵生物质(有机废水、秸秆类农林业废弃物、有机垃圾等)制氢,具备治污、环保和产能等多重优越性,开发前景广阔,目前已成为各国关注的研究课题。在以厌氧微生物进行发酵产氢的过程中,伴随着乙酸、丙酸、乳酸以及丁酸等液相末端产物的生成。这些代谢物的生成量受接种量、底物、pH 等因素的控制。通常来说,较高的产氢量伴随着丁酸,乙酸的积累,而丙酸、乳酸以及还原性产物的积累会导致较低的产氢<sup>[1]</sup>。厌氧细菌发酵葡萄糖主要的产酸产氢反应如表 1 所示,其最大的理论产氢量为 4 mol H<sub>2</sub>/mol glucose。

然而在发酵过程中,有机物厌氧降解所产生的这些有机酸如果积累于环境中,会导致反应体系 pH 的迅速下降。进入细胞内的有机酸可以发生解离并使得细胞质酸化(图 1),从而抑制胞内多种酶和转运系统的活性,阻碍有机物分解,对产氢过程产生抑制作用<sup>[2-4]</sup>。在以往的研究中,研究人员采用生物反应与产物分离组合技术,如氮气吹脱降低氢分压,膜技术分离有机酸等方法,选择性地从反应体系中分离出抑制性产物来消除代谢产物抑制,使平衡向有利于氢气生成的方向转移,以提高氢气的产生速率及产量。但是由于生物反应与产物分离耦合系统本身的复杂性,限制了其大规模应用。除了以上技术,驯化出抗代谢物抑制菌种以及进一步优化发酵过程,减少丙酸、乳酸以及一些还原性代谢物的产生,促进乙醇、乙酸以及丁酸的生成仍然是厌氧发酵产氢必须解决的难题。

在有机物的氧化过程中,脱氢酶是作用在代谢物上的第 1 个酶,是微生物降解有机污染物获得能量的必需酶<sup>[5]</sup>。脱氢酶是一类蛋白质,能够激活某些特殊的氢原子,使这些氢原子被适当的受氢体转移而将原来的物质氧化。污泥的脱氢酶活性(DHA)在很大程度上反应了污泥的活性状态,能直接表示其

对基质降解能力的强弱<sup>[6]</sup>。

本研究拟通过一定浓度的有机酸胁迫来提高污泥的酸耐受力,减轻代谢产物对厌氧发酵的抑制作用,并以污泥中脱氢酶活性为生化指标,对不同浓度酸胁迫下厌氧污泥活性变化进行了研究。通过对胁迫前后污泥产氢量及末端产物进行对比分析,选择出最佳的酸胁迫条件以增加厌氧污泥对基质的降解能力及氢气产量。

## 1 材料和方法

### 1.1 厌氧活性污泥来源

接种物为取自无锡市帝斯曼柠檬酸厂正在运行的 IC 反应器中的厌氧颗粒污泥。污泥的颗粒性良好,外观接近球形,色泽乌黑。污泥的 TS 为 13.24%, VS 为 86.46%。将颗粒污泥在  $1 \times 10^5$  Pa 下灭菌 10 min,这样可以完全杀死污泥里的产甲烷菌,且操作较简单。

### 1.2 实验步骤

本实验采用分批发酵的方式在容积为 500 mL 的反应瓶中进行产氢研究。产氢营养液成分如表 2 所示。

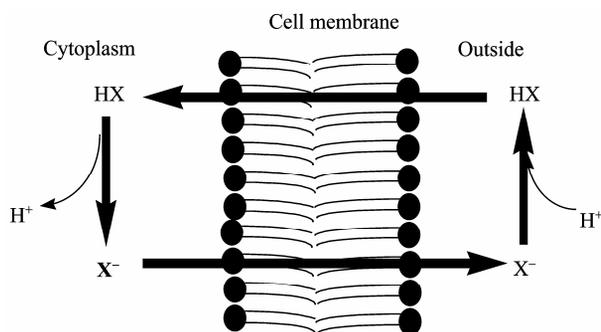


图 1 有机酸的跨膜运输机制

Fig. 1 The mechanism of organic acid transmembrane transport

表 1 细菌发酵葡萄糖主要的产酸产氢反应  
Table 1 The acid and hydrogen production from glucose in anaerobes

产酸产氢反应 The reactions	理论产氢量 Theoretical hydrogen yield
$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O + 2NAD^+ \longrightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 2NADH + 2H_2 + 6H^+$	2-4
$C_6H_{12}O_6 + 2NADH \longrightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2NAD^+$	0
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + 2HCO_3^- + 2H_2 + 3H^+$	2
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O + 2NADH \longrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2HCO_3^- + 2NAD^+ + 2H_2$	2
$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOO^- + 2H^+$	0

表 2 营养液成分  
Table 2 Nutrient composition

营养液组成 Constituents	含量 Concentration (mg/L)
NH <sub>4</sub> Cl	5000
NaHCO <sub>3</sub>	40000
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	5000
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15000
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	85
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	80
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4

厌氧颗粒污泥灭菌之后置于营养丰富的培养基中培养以促进产氢微生物孢子的萌发, 每天更换培养基, 持续培养 1 个星期后 4°C 下厌氧保藏。将保藏的颗粒污泥 120 g 培养 12 h 后洗净, 接种于含有不同浓度的乙酸钠、丙酸钠、乳酸钠以及丁酸钠的反应瓶中, 并在每个反应瓶中加入葡萄糖 5 g, 营养液 30 mL, 用去离子水加至 300 mL, 调节 pH 至 5.5 以保证一定的非解离态有机酸含量, 以期达到理想的胁迫效果。因为只有非解离态的有机酸才能进入微生物细胞内, 在细胞内发生解离, 使胞内 pH 下降, 对细胞内的代谢途径产生一定的影响。通 N<sub>2</sub> 5 min 去除反应体系中的空气, 37°C 下摇床培养 (100 r/min) 48 h, 测定有机酸胁迫过程中污泥脱氢酶活性, 并记录产氢量。

将胁迫后的污泥洗净, 接种 100 g 于反应瓶中发酵, 其它步骤同上, 记录产氢量, 并对发酵液中的有机酸变化进行分析。

### 1.3 分析方法

采用上海分析仪器厂生产的 SC-II 型气相色谱仪, 热导池检测器, 不锈钢柱, 柱长与直径 2 m × φ5, 载体 TDS-01, 60-80 目, 载气氮气, 流速 70 mL/min, 室温测定, 进样量 500 μL。液相末端发酵产物的测定: 采用上海分析仪器厂生产的 GC122 型气相色谱仪, 不锈钢柱, 柱长 2 m (内径 5 mm), 载体 GDX103, 60-80 目, 氢火焰监测器, 汽化室 200°C, 柱温 190°C, 检测室温度 240°C, 载气氮气, 流速 50 mL/min, 氢气流速 50 mL/min, 空气流速 500 mL/min。

脱氢酶的测定: 见参考文献[7]。

TS 和 VS 的测定见参考文献[8]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 有机酸胁迫对厌氧颗粒污泥活性变化的影响

在不添加任何有机酸的条件下, 将保藏在 4°C 下的颗粒污泥接种至新鲜培养基 37°C 下摇床培养 48 h, 并对整个发酵过程中脱氢酶活性以及有机酸变化进行了测定, 结果如图 2 所示。

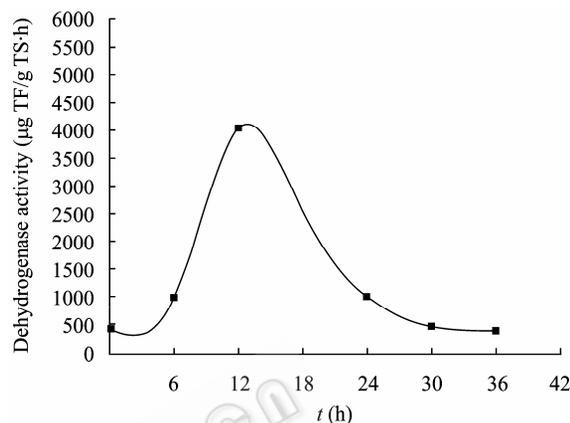


图 2 污泥中脱氢酶在发酵过程中的变化

Fig. 2 The variation of dehydrogenase activity during fermentation

经过冷藏的厌氧污泥在接种 5 h 后活性迅速增加, 在 12 h 左右时达到最大值, 但随着营养物质的消耗以及代谢产物的积累, 其生长受到抑制, 微生物活性在 14 h 左右时开始降低, 30 h 左右时下降到最低点。因此为了保证最佳的胁迫效果, 我们选择培养了 12 h, 活性最高时的颗粒污泥进行胁迫。不同浓度有机酸胁迫下微生物脱氢酶变化如图 3 所示。研究表明: 乙酸在浓度为 10 g/L 时对污泥活性有明显的抑制效果, 而丙酸和丁酸在 15 g/L 时抑制效果明显; 另外污泥在添加 5 g/L 乳酸时活性较空白有所提高, 但是在 20 g/L 时能有效抑制污泥活性。这种差异可能是由微生物细胞膜对不同有机酸通透性的差异所造成的<sup>[9]</sup>。细胞膜对小分子物质的通透性取决于它的极性和大小, 乳酸分子极性比较高, 通透性最差; 乙酸、丙酸、丁酸按照分子大小的不同, 通透性则是乙酸 > 丙酸 > 丁酸, 所以酸胁迫能力则是乙酸 > 丙酸 > 丁酸 > 乳酸。此外, 添加低浓度的乳酸可以提高污泥脱氢酶的活性, 这是因为乳酸本身也可以作为发酵底物, 在发酵初期对微生物的活性有一定的促进作用。

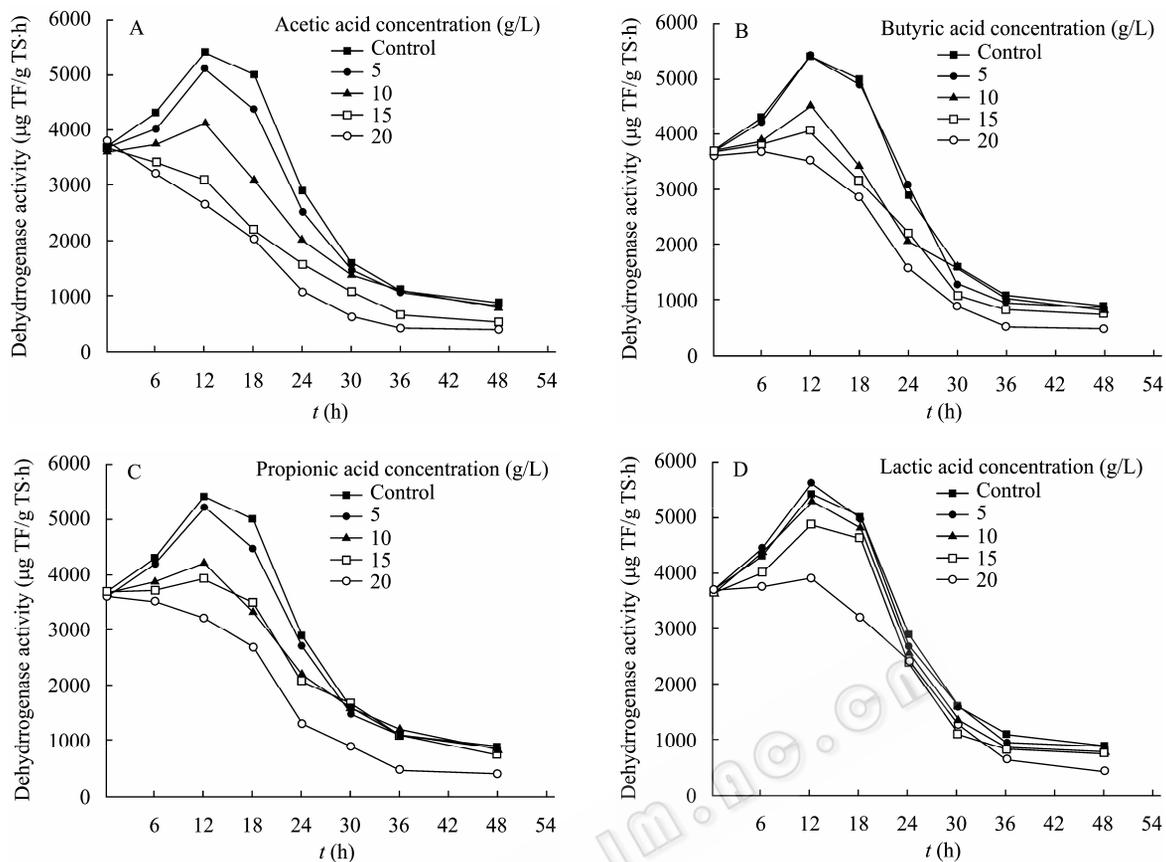


图3 不同浓度有机酸胁迫下污泥脱氢酶的变化

Fig. 3 The variation of dehydrogenase activity under different degrees of organic acid stress

## 2.2 有机酸胁迫对污泥产酸产氢的影响

实验对有机酸胁迫后污泥的产酸产氢进行了研究。研究发现,一定浓度的有机酸胁迫能够促进污泥的产酸产氢,其中乙酸和丁酸的效果最好。如图4所示:在低浓度丁酸胁迫后,污泥产酸量和氢气产量大幅度上升,在10 g/L的丁酸胁迫后,氢气产量最高,达到了225 mL H<sub>2</sub>/g Glucose。气相分析表明,乙醇、丁酸、乙酸3种产氢液相产物在低浓度丁酸胁迫后含量都有所增加,特别是丁酸,在氢气产量最高时其产量达到了564 mmol/mol Glucose,同时乙醇和乙酸的产量也增加到286 mmol/mol Glucose和206 mmol/mol Glucose。然而高浓度的丁酸胁迫后,污泥氢气产量逐渐降低,3种液相产物产量也大幅度下降。乙酸胁迫效果如图5所示:在低浓度乙酸胁迫时,情况与丁酸胁迫相似。在10 g/L乙酸胁迫后,氢气产量最高,达到了270 mL H<sub>2</sub>/g Glucose,但随着胁迫浓度的提高,污泥产氢量及3种液相产

物产量逐渐下降;但是与丁酸胁迫不同的是,乙酸产量在乙酸胁迫后得到了很大程度的提高,氢气产量最高时乙酸产量达到563 mmol/mol Glucose,同时丁酸和乙醇的产量也有一定的增加,分别达到了485 mmol/mol Glucose以及236 mmol/mol Glucose。总而言之,低浓度的乙酸、丁酸胁迫之后,氢气产量明显增高,乙酸、丁酸、乙醇3种产氢液相产物都有不同程度的增加。究其原因可能与污泥中微生物耐酸性的增加有关。低浓度的酸可以诱导一些微生物产生酸应激(Acid tolerance response, ATR)来提高对酸胁迫的耐受力<sup>[10-11]</sup>。而高浓度的有机酸会对微生物产生毒害作用。当污泥中的微生物在受到低浓度有机酸胁迫时,可能也会产生酸应激来减少有机酸的毒害作用,减轻了有机酸积累对其活性的抑制,从而增加了有机酸及氢气产量。但是微生物酸应激的机制有很多,在活性污泥中哪些机制起主导作用有待进一步研究。

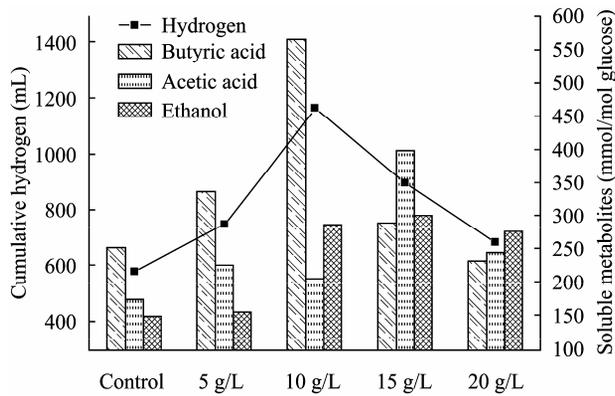


图4 丁酸胁迫后污泥的产酸产氢

Fig. 4 The results of butyric acid stress

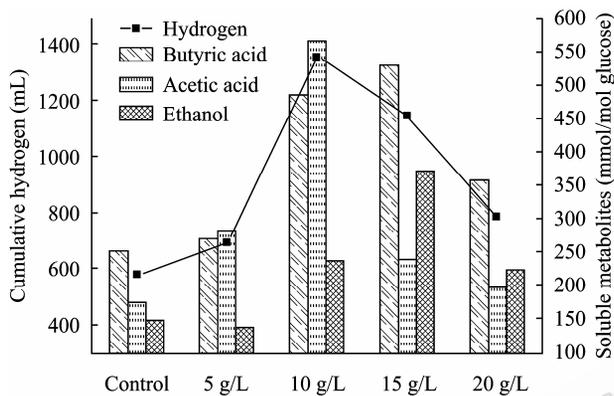


图5 乙酸胁迫后污泥的产酸产氢

Fig. 5 The results of acetic acid stress

### 3 结论

(1) 乙酸、丙酸、乳酸及丁酸是厌氧发酵产氢过程中4种主要的液相末端发酵产物,其积累对产氢过程有一定的抑制作用。污泥中脱氢酶活性作为生化指标可以用来描述有机酸对微生物的抑制作用。由于微生物细胞膜对不同有机酸的通透性不一样,所以不同的有机酸的抑制效果也不尽相同,依次是乙酸 > 丙酸 > 丁酸 > 乳酸。

(2) 对有机酸胁迫后污泥的产酸产氢进行了研究,发现一定浓度的有机酸胁迫能够促进污泥的产酸产氢,其中乙酸和丁酸的效果最好。在10 g/L的丁酸和乙酸胁迫后,氢气产量分别增加到225 mL H<sub>2</sub>/g Glucose和270 mL H<sub>2</sub>/g Glucose。但是丁酸胁迫后,丁酸的含量大幅度增加,达到了564 mmol/mol Glucose,乙醇和乙酸的含量也增加到286 mmol/mol Glucose和206 mmol/mol Glucose。乙酸胁迫后,乙

酸的产量占据了主导地位,达到了563 mmol/mol Glucose,同时丁酸和乙醇的量也有一定的增加,分别达到了485 mmol/mol Glucose以及236 mmol/mol Glucose。

(3) 活性污泥的胁迫机制较为复杂,推测低浓度的酸可以诱导一些微生物产生酸应激(Acid tolerance response, ATR)来提高对酸胁迫的耐受力,从而增加了有机酸及氢气的产量。但是具体机制有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL, *et al.* Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002(27): 1339-1347.
- [2] 赵春芳, 邝生鲁, 奚强. 以葡萄糖为基质的消化污泥厌氧发酵产氢的研究. *化学工业与工程技术*, 2001, 22(4): 4-6.
- [3] Lawford HG, Rousseau JD. Effect of pH and acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered ethanogenic *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotech*, 1993(39): 301-322.
- [4] Roe AJ, McLaggan D, Davidson I, *et al.* Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *J Bacteriol*, 1998, 180(4): 767-772.
- [5] Nielsen RH. Measurement of the inhibition of respiration in activated sludge by a modified determination of the TTC-dehydrogenase activity. *Water Research*, 1975, 9(12): 1179-1185.
- [6] Yin J, Zhou CS, Bu H. Study on the efficacy and mechanism of excess sludge by aerobic digestion treatment. *Journal of Solid Waste Technology and Management*, 1998, 25(3): 142-147.
- [7] 尹军, 周春生. TTC-脱氢酶活性常温萃取测定法及应用. *中国给水排水*, 1995, 11(4): 16-18.
- [8] 袁振宏, 吴创之, 马隆龙. 生物质能利用原理与技术. 北京: 化学工业出版社, 2005: 71-75.
- [9] 沈同, 王镜岩. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 2003: 45-60.
- [10] Eilis O, Seamus C. Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6): 2287-2293.
- [11] Paul DC, Colin H. Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(3): 429-453.