

# 秸秆沼气发酵厌氧菌群的培养及应用

方玉美，赫玲玲，王品胜，程顺利，马磊，肖进彬

(河南省高新技术实业有限公司，郑州450002)

**摘要：**秸秆沼气发酵厌氧菌群是一个复杂的菌系，针对分离纯培养周期长、菌剂制备过程比较复杂等难点，提供了一种简便的秸秆沼气发酵厌氧菌群的培养方式——原位混合培养。小试试验表明：接种50%培养后的厌氧菌泥，厌氧发酵原料总固体(TS)12%，在37℃下，试验B组能快速适应厌氧发酵新环境，厌氧发酵21d时，累积产气量较试验A组高出28.39%；中试试验结果显示：第三阶段的发酵原料中接种物的50%替换为培养后的厌氧菌泥，37℃厌氧发酵10d，沼气池容产气率平均达到1.1L/(L·d)，累积产气量较前两个阶段的平均值高出32.46%。该方法适用于连续性沼气发酵工程，以增加沼气发酵系统中的厌氧微生物数量，增强微生物代谢活动，改善沼气发酵系统，使其保持连续稳定的产气。

秸秆沼气发酵厌氧菌群是一个复杂的菌系，包括水解发酵菌、产氢产乙酸菌和产甲烷菌[1-2]，厌氧菌的分离、培养操作需要严苛的条件，从分离到制备菌剂需要经历鉴定、生理生化试验、降解试验、扩增试验、复壮与保存等多个步骤，制备周期长且制备过程比较复杂，普通单位和个人难以实现。所采用的分离纯培养技术手段决定了该方法仅仅能够获得现有技术条件下可纯培养的厌氧菌，不能获得以共生、共代谢等方式存在于厌氧环境中的厌氧微生物，而这部分微生物在环境中占绝大多数。菌剂的微生物构成比较简单，往往只有一种或几种厌氧菌，难以适应成分复杂的发酵原料的生化处理。

王旭辉等对玉米秸秆与牛粪联合发酵产气中微生物多样性做了大量实验工作，为新疆地区牛粪秸秆沼气发酵菌剂制备提供了科学依据[3]，但其具有一定的局限性，在工程上的应用性能尚不可知。张云茹等从污水处理厂污泥中筛选出3个产甲烷优势菌群，但由于产甲烷菌生境的特殊性，目前在实验室能纯培养出的产甲烷菌种类是有限的，另外沼气池内菌群结构复杂、微生态环境的不可控性等因素都制约着沼气工程的规模化发展[4-6]。

在长期的实验和生产实践中发现，利用微生物提高沼气产量，重要的不是产甲烷菌的继续富集，而是提高不产甲烷菌对有机物的水解速度，尤其是对纤维素物质的分解速度。蒙杰筛选出具有厌氧特性的水解细菌混合菌和纤维素分解菌混合菌，制备成混合菌剂，并进行了小试应用[7]。马超认为产氢产乙酸菌群在功能生态位上起到承上启下的重要作用，进行了产氢产乙酸优势菌群的富集选育[8]。

秸秆沼气发酵厌氧菌群是一个复杂的菌系，沼气的产生是多种菌群协作共生的产物。目前制备的沼气发酵微生物菌剂，多数不能适应环境多变特点和规模化应用需要。本文提供了一种简便的秸秆沼气发酵厌氧菌群的培养方式——原位混合培养。根据秸秆沼气发酵厌氧菌群的生长代谢特征和有机物降解特征，模拟和强化秸秆沼气发酵厌氧菌群的生存环境特点，不采用分离纯培养的方法，直接通过混合培养的方式，构建一个由不同种类、不同功能的厌氧微生物种群构成的复合微生物生态系统，使得那些不能通过分离纯培养的微生物也能够生长繁殖而获得富集培养[9]。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与装置

- 1) 稻草：试验用稻草取自花卉市场废弃物。稻草原料总固体(TS)88.7%。
- 2) N素：试验用N素为市购尿素。
- 3) 接种物：试验用接种物取自实验室秸秆沼气发酵产物，TS14.5%，pH为7.2。
- 4) 秸秆降解菌剂：由中国科学院合肥物质科学研究院提供。
- 5) 厌氧富集培养基：处理后秸秆10g/L，乙酸钠2.0g/L，葡萄糖2.0g/L， $\text{NH}_4\text{Cl}$ 1.0g/L， $\text{MgCl}_2$ 0.1g/L， $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.4g/L， $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.2g/L，酵母膏2.0g/L，半胱氨酸0.5g/L，生物炭4.0g/L。
- 6) 小试试验装置：自行设计的小型厌氧发酵装置，见图1[10]。采用1000mL广口瓶作为厌氧发酵瓶，集气瓶为1000mL的广口瓶，集水器为1000mL的锥形瓶。

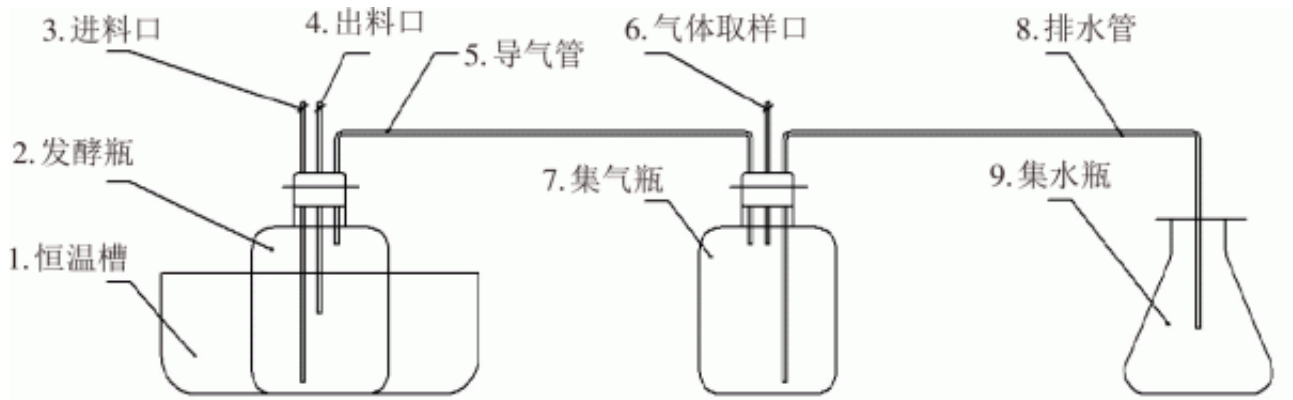


图1 厌氧发酵试验装置示意图

Fig.1 The illustration of anaerobic fermentation test device

7) 中试试验装置：自行设计的100L的厌氧发酵装置，见图2。厌氧发酵装置用于秸秆干式厌氧发酵产沼气连续性试验。设计分三个部件，进出料口，50L罐体，100L罐体。进出料口径为200mm，方便进出料。50L罐体属预处理罐/缓冲罐，其中有螺旋盘管，用于加热；100L罐体为厌氧发酵主罐，采用外循环水夹套加热方式；出料口设计成锥体型，便于出料，进出料阀门采用闸板阀。



图2 中试厌氧发酵装置图

Fig.2 Diagram of the pilot-scale experimental anaerobic fermentation device

1.2方法

1.2.1沼气发酵厌氧菌群的培养方法 厌氧菌群培养试验：发酵瓶中装入50%的接种物，对照组补加蒸馏水；实验组补

加同等量的富集培养基，把各种原料配制成总重800g，在 $(37 \pm 1)$ ℃下恒温发酵。每次同一时间利用蠕动泵从出料口抽出250mL发酵上清液，再从进料口补入等量新鲜的厌氧富集培养基保持发酵罐中料液总体积不变。每个梯度循环一次，葡萄糖和乙酸钠的梯度补入量分别为2, 4, 6, 8g/L。培养时间约20d，产气中甲烷含量稳定，获得培养后厌氧菌泥。

1.2.2 沼气发酵厌氧菌群的小试应用试验 稻草预处理[11-16]：按原料干基的1.5%添加N素[17]，按2%接种秸秆降解菌剂，补水至原料含水率达70%，30℃发酵48h。

厌氧发酵试验[18]：厌氧菌泥与处理后稻草干基比1:1，配制成总重800g，TS12%的发酵原料。 $(37 \pm 1)$ ℃下恒温发酵。总试验时间为21d。试验过程中，每天定时测系统的产气量和甲烷含量。试验设非培养厌氧菌泥发酵组（A组），培养厌氧菌泥发酵组（B组）。每组实验设两组平行试验。

1.2.3 沼气发酵厌氧菌群的中试应用试验[19] 反应装置改为100L中试厌氧发酵罐，厌氧菌泥与处理后稻草干基比1:1，发酵原料TS12%，装料量为罐体的80%， $(37 \pm 1)$ ℃下恒温发酵。试验时间为30d。每天定时测系统的产气量和甲烷含量。该实验设两批次平行试验。

#### 1.2.4 分析测试方法

pH值测定：采用雷磁PHS-25数显pH计测量。

原料总固体TS测定：对试验原料采用烘干法测定TS，取一定量原料在烘箱中 $(105 \pm 2)$ ℃下干燥至恒重，干燥后原料与干燥前原料重量比即为原料TS。

产气量测定：利用图1所示的厌氧发酵试验装置，采用排水集气法收集气体，测量集气瓶中排出水的体积，就是产气量。中试厌氧发酵装置产气量由湿式防腐气体流量计监测。

沼气成分分析测定：利用天谱GC-900C气相色谱仪分析测试沼气中各成分的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 小试试验产气特性

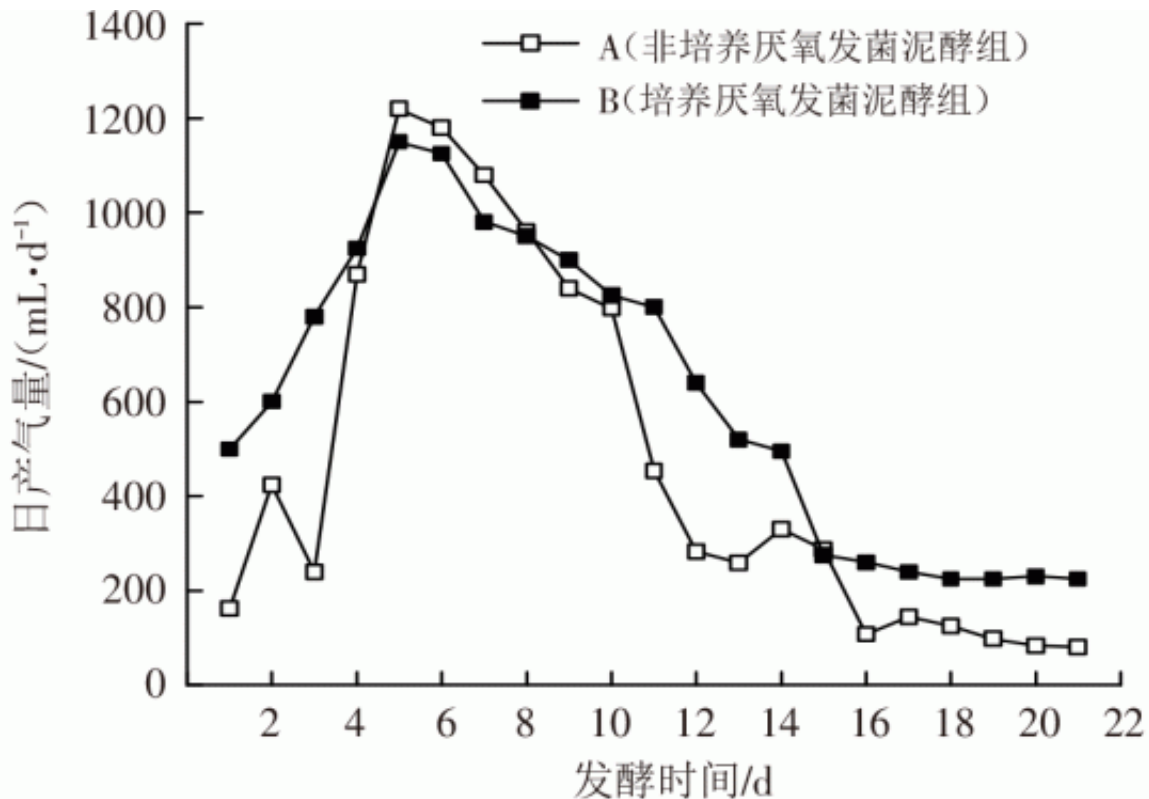


图 3 厌氧发酵过程中日产气量随时间的变化曲线

Fig.3 Curve of daily gas production over time during anaerobic fermentation

各个试验组的日产气量随厌氧发酵时间的变化见图3。由图3可以看出，B组能迅速适应厌氧发酵环境，日产气量逐步升高，产气高峰出现在第5天，此后日产气量逐步下降，厌氧发酵21d时日产气225mL左右；A组在厌氧发酵第3天日产气量有所下降，但第4天很快适应新环境，第5天达到产气高峰，此后日产气量逐步下降，厌氧发酵21d时日产气低于100mL。B组较A组快速适应厌氧发酵新环境，产气高峰后日产气量下降较慢；A组厌氧发酵21d时累积产气量达10024mL，B组累积产气量达12870mL，较A组高出28.39%。两组产气稳定后的甲烷含量均在62%左右。

由实验数据推测出，培养后的厌氧菌泥能增强厌氧发酵系统的厌氧菌的代谢活动，提高了原料的利用率和利用效率。

### 2.2中试试验产气特性分析

利用100L厌氧发酵罐进行中试试验，试验组的日产气量随厌氧发酵时间的变化见图4，可分为三个阶段。在第一阶段厌氧发酵10d，日产气量下降到70.8L，并呈现逐步下降的趋势时，罐中出料一半，补入等量新料，第二阶段的发酵原料与第一阶段保持一致，第三阶段的发酵原料将其中接种物的50%替换为培养后的厌氧菌泥，进行第三阶段厌氧发酵。第二阶段补料后继续厌氧发酵10d，在厌氧发酵7d时，日产气量低于80L，沼气池容产气率平均达到0.81L/(L·d)。第三阶段补料后继续厌氧发酵10d，日产气量维持在80L以上，沼气池容产气率平均达到1.1L/(L·d)。第一阶段累积产气量863.8L，第二阶段累积产气量810.3L，第三阶段累积产气量1108.8L，较前两个阶段的平均值高出32.46%。整个中试试验产气中甲烷含量较小试验低，甲烷含量在53%左右，推测是由于批次进料带入空气造成产气中甲烷含量较低。

由实验数据推测出，在连续性秸秆沼气发酵过程中，适当地加入培养后的厌氧菌泥，可改善整个厌氧发酵系统的稳定性，解决了秸秆沼气发酵工程后期产气量低、不产气等不良情况，保证了沼气发酵工程的正常运行。中试试验数据为秸秆沼气工程提供了可参考性依据。

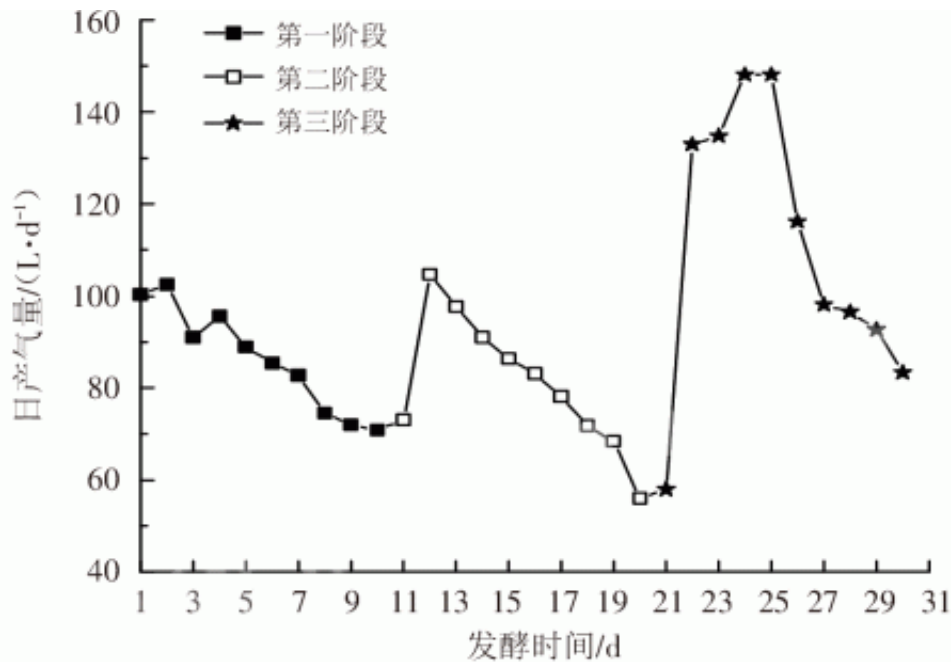


图4 中试厌氧发酵过程中日产气量随时间的变化曲线

Fig.4 Curve of daily gas production over time in the anaerobic fermentation process of the pilot test

### 3结论与讨论

1) 本文提供一种简便的秸秆沼气发酵厌氧菌群的培养方式，不采用分离纯培养的方法，直接通过混合培养的方式，构建一个由不同种类、不同功能的厌氧微生物种群构成的复合微生物生态系统，使得那些不能通过分离纯培养的微生物也能够生长繁殖而得到富集培养[20]。

2) 秸秆沼气发酵原料经预处理后，能有效提高沼气产率。接种50%培养后的厌氧菌泥，厌氧发酵原料总固体(TS) 12%，在37℃下，接种培养后的秸秆沼气厌氧发酵菌泥能快速适应厌氧发酵新环境，厌氧发酵21d时，累积产气量高出28.39%。

3) 在连续厌氧发酵中试试验[21]中，随着发酵时间的延长及新料的加入，原有发酵系统中沼气厌氧发酵菌群代谢活动较弱，适时接种经原位混合培养后沼气厌氧发酵菌泥，能够保持系统的产气稳定性，在一定程度上提高沼气产量。

### 参考文献：

[1]刘荣厚.生物质能工程[M].北京：化学工业出版社，2013.

[2]李海滨，袁振宏，马晓茜.现代生物质能利用技术[M].北京：化学工业出版社，2012.

[3]王旭辉，徐鑫，宝哲，等.高通量测序分析玉米秸秆与牛粪联合发酵阶段微生物多样性变化[J].食品与发酵工业，2019(3)：47-55.

[4]张云茹，周健民，张丽杰，等.产甲烷优势菌群的筛选及产甲烷规律[J].重庆理工大学学报，2011，25(8)：30-33.

[5]庞德公，杨红建.产甲烷菌的分离纯化培养及其培养基对于菌株的选择作用[J].中国畜牧兽医，2010，37(6)：32-35.

[6]杜洋，曹广丽，张军政，等.低温沼气发酵高效菌系的筛选及微生物群落解析[J].中国沼气，2017，35(2)：9-14.

- [7]蒙杰.混合菌剂的筛选及在沼气发酵中的应用研究[D].桂林：桂林工学院，2008.
- [8]马超.产氢产乙酸优势菌群的选育及其生理生态特性研究[D].哈尔滨：哈尔滨工业大学，2008.
- [9]徐军，王开春，董自斌，等.一种制备耐盐微生物菌剂的方法：CN103540555A[P].2013-11-05.
- [10]肖进彬，陈红，刘红云，等.木醋液对玉米秸秆厌氧发酵的促进作用研究[J].中国沼气，2013，31（1）：13-15.
- [11]廖银章，刘晓风，袁月祥，等.复合菌剂预处理秸秆产沼气研究[C]//四川省农村固体废弃物循环再生利用论文集.成都：四川省环境科学学会，2006：52-54.
- [12]李砚飞，黄亚丽，代树智，等.复合微生物预处理玉米秸秆产沼气的试验研究[J].可再生能源，2013，31（5）：80-83.
- [13]李文哲，丁清华，罗丽娜，等.接种菌剂对稻秸好氧厌氧两相发酵产气影响[J].东北农业大学学报，2016，47（5）：98-105.
- [14]覃遵镜.微生物预处理秸秆对沼气产量的影响研究[J].农业工程与能源，2017（1）：143-144.
- [15]黄开明，赵立欣，冯晶，等.复合微生物预处理玉米秸秆提高其厌氧消化产甲烷性能[J].农业工程学报，2018，34（16）：184-189.
- [16]MUSTAFA A M，POULSEN T G，XIA Y，et al. Combinations of fungal and milling pretreatments for enhancing rice straw biogas production during solid-state anaerobic digestion [J]. Bioresource Technology，2017，224：174-182.
- [17]马如霞，赵一全，李家威，等.玉米秸秆厌氧发酵过程中氮源优化[J].可再生能源，2018，36（11）：1593-1599.
- [18]刘杨，闫志英，姬高升，等.水稻秸秆序批式干发酵产沼气的中试及其动力学研究[J].农业工程学报，2018，34（23）：221-226.
- [19]杨旭，常春，李洪亮，等.干玉米秸秆与废弃物混合微贮及半连续发酵产沼气能力分析[J].高校化学工程学报，2017，31（4）：899-905.
- [20]罗辉.高效厌氧纤维素降解菌的筛选，复合菌系的构建及应用研究[D].北京：中国农业科学院，2008.
- [21]王渝昆，袁月祥，李东，等.产甲烷复合菌剂的性能评价及中试试验产气效果[J].农业工程学报，2014，30（16）：247-255.

原文地址：<http://www.china-nengyuan.com/tech/168665.html>