

刁彦花,张丽萍,崔冠慧,等. 厌氧产乙酸菌株 ZY-3 的筛选、鉴定及产酸条件[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):526-528.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.155

# 厌氧产乙酸菌株 ZY-3 的筛选、鉴定及产酸条件

刁彦花<sup>1</sup>,张丽萍<sup>1</sup>,崔冠慧<sup>1</sup>,王 慧<sup>1,2</sup>,邢清朝<sup>1,2</sup>,王雅娜<sup>1,3</sup>,程辉彩<sup>1</sup>

(1. 河北省科学院生物研究所,河北石家庄 050081;2. 河北大学生命科学学院,河北保定 071002;

3. 河北师范大学,河北石家庄 050000)

**摘要:**为筛选高效厌氧水解产乙酸菌,将其应用于高浓度有机废水的厌氧生物处理,强化产乙酸菌群的产乙酸作用,提高消化效率。采用 Hungate 厌氧操作技术以及选择性培养基分离筛选高效产乙酸菌,经生态学、生理生化、16S rDNA 序列同源性分析对菌株的发酵产酸特性进行分析鉴定。结果表明,从污水处理厂活性污泥中分离出 1 株厌氧水解产乙酸菌 ZY-3,经鉴定为双酶梭状芽孢杆菌(*Clostridium bifermentans*)。该菌株在以麦芽糖为碳源、初始 pH 值为 7.5、30 ℃ 温度下培养 12 h,乙酸产量最高达 1 346.7 mg/L;在添加 0.4 mol/L NaCl 的发酵培养基中可正常生长且产酸量较 0.0.2 mol/L NaCl 处理增加,高达 1 588.7 mg/L。菌株 ZY-3 产酸能力强,发酵性能稳定,还能利用丙酸盐发酵产乙酸,对加速乙酸转化、防止丙酸积累,提高厌氧消化效率具有重要意义。

**关键词:**活性污泥;双酶梭状芽孢杆菌(*Clostridium bifermentans*);分离鉴定;产酸条件

**中图分类号:** Q939.9;X703 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0526-03

高浓度有机废水的厌氧生物处理技术因具有有效、简单、费用低廉等特点而被全世界广泛应用<sup>[1]</sup>。然而在厌氧工艺中仍有诸多不足之处,例如由于厌氧细菌增殖较慢而导致的厌氧反应器初次启动过程缓慢、出水挥发性脂肪酸(volatile fatty acid,简称 VFA)含量较高、大量丙酸积累导致系统发生酸化等<sup>[2-5]</sup>。马超等认为,产氢产乙酸菌群的产乙酸作用是厌氧消化过程的第一限速步骤,乙酸途径生成的甲烷约占甲烷生成总量的 2/3<sup>[6-8]</sup>,因此筛选能利用丙酸盐发酵产乙酸的高效菌株,强化产乙酸菌群的产乙酸作用,是防止丙酸积累、提高厌氧消化系统负荷率、提高处理效率和运行稳定性的关键。近年来,国内外学者对各类发酵产酸菌群的生理生态学研究,尤其对作为第一限速步骤的产乙酸菌的研究越来越多<sup>[9-10]</sup>。本研究通过选择性培养基从污水处理污泥中分离筛选到 1 株高效厌氧产乙酸菌,对它进行菌种鉴定以及发酵产酸特性研究,旨在为废水厌氧处理的生物强化作用提供菌种资源。通过将其人工接种到厌氧生物处理系统中,以提高厌氧反应器中生物持有量,加快产酸发酵菌群的产物——VFAs 和乙醇等转化为乙酸的速率,解除大量因丙酸积累造成系统酸化问题,并为产甲烷菌群提供更加丰富的底物——乙酸,增强代谢活性,提高厌氧生物处理效能。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

收稿日期:2015-10-28

基金项目:河北省科技支撑计划(编号:14222901D、14273801D);河北省财政预算(编号:15302);河北省青年基金(编号:C2015302018)。

作者简介:刁彦花(1986—),女,河北石家庄人,硕士,助理研究员,主要从事能源微生物及生物质资源综合利用技术研究。Tel:(0311) 83014879;E-mail:xiyanhua86@163.com。

通信作者:程辉彩,博士,副研究员,主要从事生物质能源方面的研究。E-mail:huicaicheng@163.com。

从石家庄桥东污水处理厂采集 3 份活性污泥样品、5 份水样。

### 1.2 培养基

选择性培养基:胰蛋白胨 0.25 g/L,酵母提取物 0.5 g/L,蛋白胨 0.25 g/L,L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g/L,NaCl 1.5 g/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L,MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L,0.1% 刃天青指示剂 2 滴,pH 值 7.0~7.2。

无机盐培养基:L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g/L,NaCl 1.5 g/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L,MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L,0.1% 刃天青指示剂 2 滴,pH 值 7.0~7.2。

### 1.3 菌株筛选方法

取 1 g 泥样(或 1 mL 水样)加入 10 mL 无氧灭菌的培养基中富集培养,传代稳定后采用改良 Hungate 滚管技术进行纯菌滚管分离。

### 1.4 菌种鉴定

通过形态学观察、生理生化试验<sup>[11-12]</sup>和 16S rDNA 序列比对进行菌种鉴定。

### 1.5 产酸特性

1.5.1 培养温度对菌株产酸的影响 分别测定在 4、16、25、30、37、45 ℃ 条件下,培养 12 h 菌株的生长状况及产酸情况。

1.5.2 初始 pH 值对菌株 ZY-3 产酸的影响 在最适生长温度条件下,分别测定菌株在初始 pH 值为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 培养条件下的生长及产酸情况。

1.5.3 不同碳源对菌株产酸的影响 在最适生长温度及初始 pH 值条件下,分别测定菌株在以葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、淀粉、柠檬酸、甘露醇、甘油、丙酸钠、丁酸钠为碳源的培养条件下的生长及产酸情况。

1.5.4 耐盐性研究 在培养基中分别添加 0(CK)、0.2、0.4、0.8、1.2 mol/L 的 NaCl,测定菌株的生长状况及产酸情况,并分析菌株的耐盐程度。以上试验均重复 3 次,取平均值。

## 1.6 分析方法

1.6.1 菌体浓度测定 用 751 紫外分光光度计,在 510 nm 处测定供试样品的吸光度,作为菌体浓度。

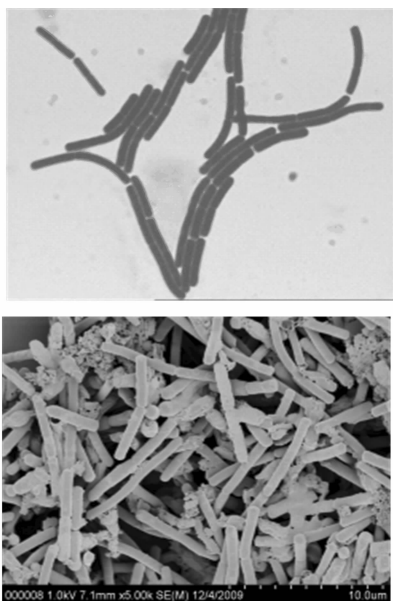
1.6.2 液相末端产物分析 乙酸含量的测定方法参考文献 [13]。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离鉴定

2.1.1 菌株的筛选 从污水处理厂活性污泥及水样中分离得到乙酸产量较高的 14 株菌株。经厌氧发酵复筛,获得 1 株高效厌氧水解产乙酸菌株 ZY-3,乙酸平均产量为 1 110.6 mg/L。

2.1.2 菌株的形态特征 菌株 ZY-3 在选择性培养基上的菌落呈现白色或乳白色,不规则圆形,不透明。经光学显微镜观察,菌体呈杆状 $[(0.5 \sim 0.6) \mu\text{m} \times (1.0 \sim 3.0) \mu\text{m}]$ ,单个或短链,偶见长链;孢子卵圆形,中到次端生(图 1)。该菌株在液体培养基中培养形成黏的沉淀。



上图光学显微结果,下图为扫描电镜结果

图1 菌株ZY-3光学显微(1 000×)及扫描电镜形态特征(15 000×)

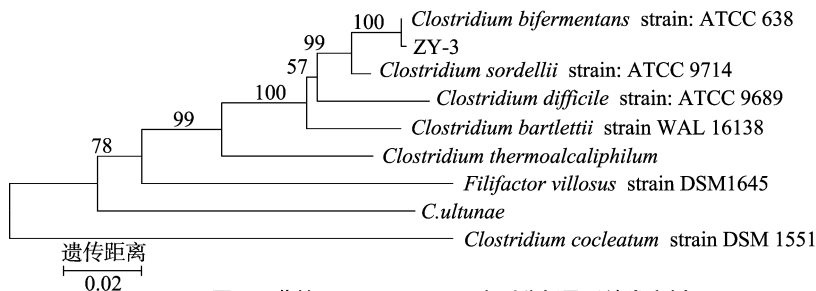


图2 菌株ZY-3 16S rDNA 序列分析及系统发育树

明显差异;菌株 ZY-3 在 pH 值 7.5 时有最大乙酸产量,为 1 256.1 mg/L,明显高于 pH 值为 7.0 时的乙酸产量;此后随着 pH 值的增加,乙酸产量降低,pH 值为 9.0 时,菌体被抑制生长。由此可见,起始 pH 值在 7.5 左右时,菌株 ZY-3 具有

### 2.2 菌株 ZY-3 生理生化特征

由表 1 可见,菌株 ZY-3 为严格厌氧菌,革兰氏染色、明胶液化、甲基红试验、吡啶试验、葡萄糖发酵产  $\text{H}_2$  试验均为阳性;淀粉水解、硝酸盐还原试验为阴性;可利用多种糖如纤维二糖、D-葡萄糖、果糖、麦芽糖等产酸,以丙酸盐、丁酸盐等为发酵底物。

表 1 菌株 ZY-3 生理生化试验结果

试验名称	试验结果
革兰氏染色	+
明胶液化	+
淀粉水解	-
甲基红试验	+
硝酸盐还原	-
吡啶试验	+
葡萄糖发酵产 $\text{H}_2$	+
纤维二糖(产酸试验)	+
D-葡萄糖(产酸试验)	+
果糖(产酸试验)	w +
麦芽糖(产酸试验)	+
丙酸盐(发酵底物)	+
丁酸盐(发酵底物)	+

注:“+”表示菌株反应阳性;“-”表示菌株反应阴性;“w”表示弱反应。

### 2.3 菌株 ZY-3 的 16S rDNA 序列测定与分析

菌株 ZY-3 经 PCR 扩增、16S rDNA 序列分析表明,其 16S rDNA 长度为 1 376 bp。将序列输入 GenBank,以 16S rDNA 同源性为基础所构建的包括亲缘关系最近的菌株比对分析表明,菌株 ZY-3 属于梭状芽孢杆菌属的双酶梭状芽孢杆菌(*Clostridium bifermentans*)(图 2)。

### 2.4 菌株 ZY-3 的生长状况及产酸特性

2.4.1 培养温度对菌株 ZY-3 生长与产乙酸的影响 由图 3 可见,菌株 ZY-3 最适培养温度为 30~37℃。随着温度升高,菌体浓度也相应增加,37℃时,菌体浓度达到最大值;30℃培养温度下,乙酸产量最大,为 1 364.3 mg/L;温度高于 37℃后菌体浓度及乙酸产量快速下降,45℃时基本无生长。在 12 h 培养过程中,乙酸产量同菌体浓度变化趋势基本一致。

### 2.4.2 不同初始 pH 值对菌株 ZY-3 生长和产酸的影响

pH 值对微生物的生理代谢影响很大。由图 4 可见,当 pH 值为 7.5 时,菌株 ZY-3 的菌体浓度最大,与 pH 值为 7.0 时无

较好的生长状态和产乙酸代谢的生理生化过程。

2.4.3 不同碳源对菌株 ZY-3 生长及产酸的影响 无机盐培养基中按 3% 质量分数分别添加葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、淀粉、柠檬酸、甘露醇、甘油、丙酸钠、丁酸钠 10 种碳源进

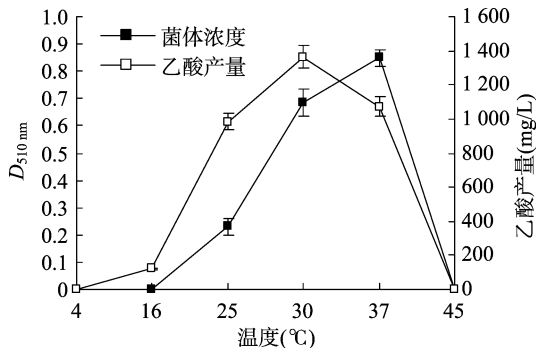


图3 不同培养温度下菌株生长和产酸情况

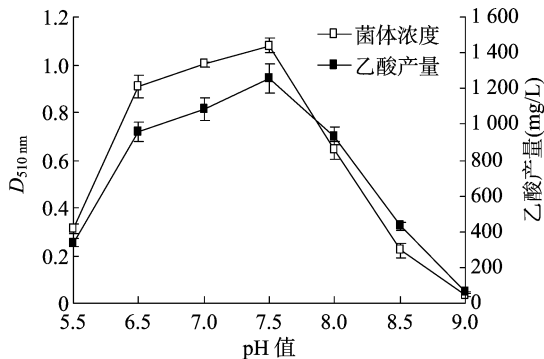


图4 初始 pH 值对菌株 ZY-3 生长产酸的影响

行发酵试验。由图 5 可见,当碳源为麦芽糖时,菌株 ZY-3 的菌体浓度最大,乙酸产量最高,为 1 346.7 mg/L;其次为葡萄糖,乙酸产量为 1 204.9 mg/L;柠檬酸、甘露醇、甘油等底物不利于菌株 ZY-3 的代谢产酸。另外菌株 ZY-3 能以丙酸钠、丁酸钠为唯一碳源发酵产乙酸,对解除厌氧消化过程中由于丙酸积累所导致的系统酸化问题具有积极意义。

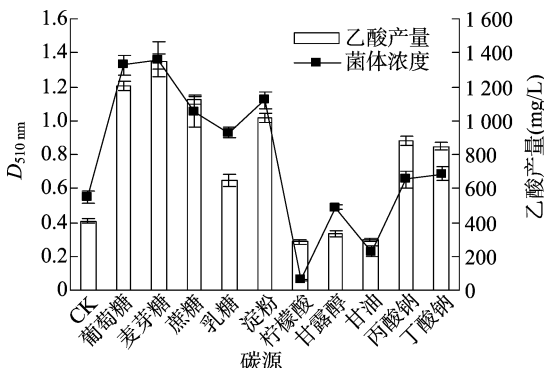
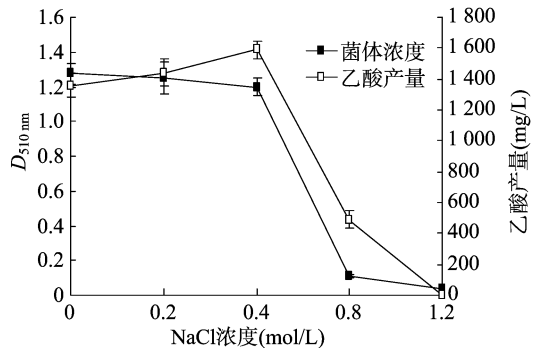


图5 不同碳源对菌株 ZY-3 生长产酸的影响

**2.4.4 耐盐性研究** 由图 6 可见,加入一定量的  $\text{Na}^+$  虽然菌体浓度有一定的降低,但是却刺激了代谢产物乙酸的产生;随着  $\text{Na}^+$  浓度的增加,菌体浓度有所下降,在 0.8 mol/L 时已经几乎被抑制;乙酸产量却在  $\text{Na}^+$  浓度为 0.4 mol/L 时达到最大值 1 588.7 mg/L,比对照提高 20.8%。说明适当浓度的  $\text{Na}^+$  可以刺激代谢产物乙酸的产生。

### 3 讨论

与好氧技术相比,高浓度有机废水的厌氧生物处理效率更高、运行成本更低、剩余污泥少,且能生成甲烷。近年来,国内外针对有机废水厌氧消化水解产酸阶段的研究越来越多。

图6  $\text{Na}^+$  浓度对菌株 ZY-3 生长产酸的影响

强化产乙酸菌群的产乙酸作用,解除大量丙酸的积累,成为目前废水厌氧处理技术的研究热点之一。本研究从污水处理厂活性污泥中分离得到的菌株 ZY-3 (双酶梭菌, *Clostridium bif fermentans*),具有较高的耐盐能力,能分解麦芽糖、蔗糖、淀粉等多种底物产乙酸。同时还能利用丙酸盐、丁酸盐等产乙酸,对解除有机废水厌氧消化过程中大量丙酸积累所造成的系统酸化有一定的积极意义。菌株 ZY-3 的发现拓宽了厌氧发酵产乙酸菌的范围,为有机废水厌氧消化处理的生物强化手段提供了宝贵的菌种资源,为进一步研制微生物强化菌剂提供了物质基础,具有较高的潜在应用价值。

### 参考文献:

- [1] 吕建国. 废水厌氧生物处理技术的发展与最新现状[J]. 环境科学与管理, 2012, 37(增刊1): 87-92.
- [2] Ryan P, Forbes C, McHugh S, et al. Enrichment of acetogenic bacteria in high rate anaerobic reactors under mesophilic and thermophilic conditions[J]. Water Research, 2010, 44(14): 4261-4269.
- [3] 胡纪萃. 废水厌氧生物处理理论与技术[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2003.
- [4] Liu M, Ren N Q, Chen Y, et al. Conversion regular pattern of acetic acid, propionic acid and butyric acid in UASB reactor[J]. Journal of Environmental Sciences, 2004, 16(3): 387-391.
- [5] 何娟, 杨红薇, 张建强, 等.  $\text{K}^+$  对肝素钠废水厌氧生物处理中污泥性能的影响[J]. 化工环保, 2013, 33(3): 244-248.
- [6] 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.
- [7] 吴美蓉, 张瑞, 周俊, 等. 温度对产甲烷菌代谢途径和优势菌群结构的影响[J]. 化工学报, 2014, 65(5): 1602-1606.
- [8] Zhang D D, Zhu W B, Tang C, et al. Bioreactor performance and methanogenic population dynamics in a low-temperature (5-18 °C) anaerobic fixed-bed reactor[J]. Bioresource Technology, 2012, 104: 136-143.
- [9] 王晋. 厌氧发酵产酸微生物种群生态及互营关系研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [10] 许科伟. 污泥厌氧消化过程中乙酸累积的微生态机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [12] 任南琪, 王爱杰, 马放. 产酸发酵微生物生理生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [13] 刁彦花, 程辉彩, 张丽萍, 等. 产氢产乙酸菌 ZR-1 的分离鉴定及产酸特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2): 181-186.