



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105624083 B

(45)授权公告日 2019.03.29

(21)申请号 201410611895.2

WO 2011017292 A, 2011.02.10, 参见全文.

(22)申请日 2014.11.04

陈娟等.餐厨垃圾发酵高温产甲烷菌种的驯化方法研究.《甘肃科学学报》.2014, 第26卷(第3期), 参见第46页左栏第三段-第47页左栏第一段.

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105624083 A

(43)申请公布日 2016.06.01

Kotsyurbenko O R等.Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems.《FEMS Microbiology Ecology》.2005, 第53卷(第3期), 第3-13页.

(73)专利权人 甘肃新德燃气有限公司

裴占江等.温度对产甲烷菌群发酵性能的影响.《黑龙江农业科学》.2009,(第5期), 第128-129页.

地址 743000 甘肃省定西市安定区循环经济产业园区8#

(72)发明人 卢新社

审查员 于娜

(51)Int.Cl.

C12N 1/36(2006.01)

(56)对比文件

KR 20020011268 A, 2002.02.08, 参见全文.

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

CN 101724595 A, 2010.06.09, 参见全文.

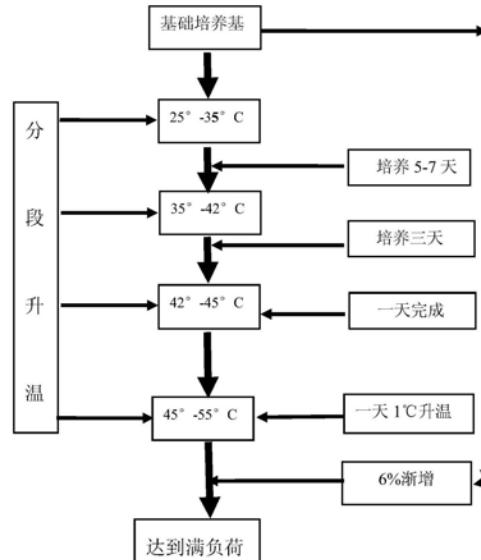
CN 101768562 A, 2010.07.07, 参见全文.

(54)发明名称

一种高温甲烷菌驯化培养方法

(57)摘要

本发明公开了一种高温甲烷菌驯化培养方法, 属于微生物培养技术领域。该方法的基本工艺流程为: 基础培养基—升温至25℃—接种甲烷菌—升温至35℃—恒温培养—升温至42℃—恒温培养—升温至45℃—升温至55℃—恒温培养。本发明采用四阶段升温, 三阶段恒温培养的方法, 得到高温驯化培养的甲烷菌; 有利于提高高温甲烷菌的数量和活性。直接应用于高温发酵甲烷制备过程中, 减少高温发酵的步骤和发酵所用时间, 解决了目前高温发酵工程运行耗能高、产气效率低的问题。



1.一种高温甲烷菌驯化培养方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1)在取自河道底层含有甲烷菌的厌氧污泥中加入蛋白胨、葡萄糖、乙酸钠,加入醋酸调节pH为7.0-7.2,在温度为25℃-32℃条件下,厌氧恒稳培养2-4天;其按重量比为:厌氧污泥:蛋白胨:葡萄糖:乙酸钠=3:1:0.5:0.5;

(2)根据培养箱容积的1/5-1/4加入基础培养基,培养基pH为6.5-7.5,接着在培养箱中通入氮气排净空气,加热培养基升温至25℃,按照培养基质量的10%接种步骤(1)培养后的含有甲烷菌的混合物,与基础培养基搅拌混合均匀,其中,所述基础培养基组成为:黑色经驯化的厌氧污泥、家禽粪便和土豆渣按照1-1000:1-1500:1-2000的比例混合;

(3)将接种甲烷菌的培养基分步加热升温,首先将处于25℃培养基加热按照1天1℃升温培养10天至温度达到35℃,增加培养基同时在35℃条件下恒温厌氧培养5-7天;接着加热按照1天1℃升温培养7天至温度到达42℃,增加培养基并在42℃条件下恒温厌氧培养3-4天;继续加热在一天内升温至45℃,在45℃条件下,增加培养基按照1天1℃升温培养10天,至温度达到55℃,停止升温,并保持55℃恒温条件,增加培养基培养5-8天,至进料量达到满负荷,得到驯化培养的高温甲烷菌,直接接种于 高温发酵液,进行高温发酵甲烷的制备过程。

2.根据权利要求1所述一种高温甲烷菌驯化培养方法,其特征在于:所述基础培养基pH为7.2。

3.根据权利要求1所述一种高温甲烷菌驯化培养方法,其特征在于:所述每次增加培养基的量为基础培养基和接种甲烷菌污泥总质量的4%-8%。

4.根据权利要求3所述一种高温甲烷菌驯化培养方法,其特征在于:所述每次增加培养基的量为基础培养基和接种甲烷菌污泥总质量的6%。

5.根据权利要求1所述一种高温甲烷菌驯化培养方法,其特征在于:所述分步加热升温培养过程中以30-50r/min转速连续搅拌。

## 一种高温甲烷菌驯化培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物培养技术领域,具体是一种高温甲烷菌驯化培养方法。

### 背景技术

[0002] 沼气发酵过程是一个由多种微生物联合,交替作用的复杂生化过程。在发酵过程中,各种微生物进行一系列耦联生化反应,不产甲烷菌和产甲烷菌之间,相互依赖,又互相制约,在发酵过程中处于平衡状态。一般来讲,微生物生长条件不能发生骤然的变化,常规讲要有一个适应过程,驯化过程应当与原生长条件尽量一致,因此,为了维持一个良好的平衡状态,提高沼气发酵的产气速度和产气量,必须在温度、原料、水分、酸碱度以及发酵系统的密闭性能等方面,为沼气发酵微生物创造一个适宜的环境,提高发酵的效率。其中,温度是影响沼气发酵的一个重要因素,研究高温甲烷菌的培养控制方法,这对于有效地控制发酵过程,了解发酵进行的阶段,优化发酵条件,提高产气效率,具有十分重要的意义。

[0003] 根据厌氧微生物处理有机物的温度,沼气发酵一般分为三种类型:运行温度为45℃-60℃的高温发酵、运行温度为25℃-45℃的中温发酵、运行温度小于25℃的低温发酵。目前主要研究和应用的是中温和高温发酵,而且对于高温甲烷菌制备沼气,虽然产气高,但是所需耗能大,过程复杂,国内尚无成熟的工艺技术。所以国内大部分沼气工程是处在中温及常温的环境条件下运行。

[0004] 本发明根据现有技术,对甲烷菌进行高温富集培养,得到培养后的甲烷菌直接接种于沼气发酵液中进行高温发酵,该方法降低菌种培养费用,并保持并激活微生物菌群的活性。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种高温甲烷菌的驯化培养方法,利用分步加热升温的培养方法得到高温甲烷菌种;该方法可减少高温发酵制备沼气的步骤,解决高温发酵制备沼气过程中工程运行耗能高、产气效率低的问题。

[0006] 根据上述目的提出具体的技术方案:

[0007] 一种高温甲烷菌的扩增培养方法,其基本工艺流程为:基础培养基—升温至25℃—接种甲烷菌—升温至35℃—恒温培养—升温至42℃—恒温培养—升温至45℃—升温至55℃—恒温培养,其具体步骤为:

[0008] (1) 在取自河道底层含有甲烷菌的厌氧污泥中加入蛋白胨、葡萄糖、乙酸钠,加入醋酸调节PH为7.0-7.2,在温度为25℃-32℃条件下,厌氧恒温培养2-4天;其按重量比为:厌氧污泥:蛋白胨:葡萄糖:乙酸钠=3:1:0.5:0.5;

[0009] (2) 根据培养箱容积的1/5-1/4加入基础培养基,培养基PH为6.5-7.5,接着在培养箱中通入氮气排净空气,加热培养基升温至25℃,按照培养基质量的10%接种步骤(1)培养后的含有甲烷菌的混合物,与基础培养基搅拌混合均匀;

[0010] (3) 将接种甲烷菌的培养基分步加热升温,首先将处于25℃培养基加热按照1天1

℃升温培养10天至温度达到35℃，增加培养基同时在35℃条件下恒温厌氧培养5-7天；接着加热按照1天1℃升温培养7天至温度到达42℃，增加培养基并在42℃条件下恒温厌氧培养3-4天；继续加热在一天内升温至45℃，在45℃条件下，增加培养基按照1天1℃升温培养10天，至温度达到55℃，停止升温，并保持55℃恒温条件，增加培养基培养5-8天，至进料量达到满负荷，得到驯化培养的高温甲烷菌，直接接种与高温发酵液，进行高温发酵甲烷的制备过程。

[0011] 所述基础培养基组成为：污泥、家禽粪便和土豆渣按照1-1000:1-1500:1-2000的比例混合。

[0012] 所述的污泥为黑色经驯化的厌氧污泥。

[0013] 所述基础培养基PH优选为7.2。

[0014] 所述每次增加培养基的量为基础培养基和接种甲烷菌污泥总质量的4%-8%，优选6%。

[0015] 所述分步加热升温培养过程中以30-50r/min转速连续搅拌。

[0016] 本发明有益效果在于：(1) 本发明首先将菌种逐渐升温至35℃，并进行低温扩增培养，得到低温甲烷菌；再将低温甲烷菌逐渐升温至42℃，进行中温扩增培养，得到中温甲烷菌；接着将中温甲烷菌快速升温至45℃，并继续逐渐升温至55℃，驯化得到高温甲烷菌，同时进行高温培养，得到菌种数量大的高温甲烷菌；(2) 与现有技术相比，本发明利用四阶段升温，三阶段恒温培养的方法，得到高温驯化培养的甲烷菌；采用逐渐缓慢升温，有利于提高高温甲烷菌的数量和活性；(3) 将驯化好的高温甲烷菌直接应用与高温发酵制备沼气过程中，减少了高温发酵的步骤和发酵所用时间，解决了目前高温发酵工程运行耗能高、产气效率低的问题；(4) 本发明步骤简单，操作方便，含菌量大，可提高产气率。

## 附图说明

[0017] 图1驯化工序流程图

[0018] 图2驯化过程中PH值的变化

[0019] 图3测定驯化过程中总VFA浓度的变化

## 具体实施方式

[0020] 实例1、根据本发明内容，下面提出详细的操作步骤

[0021] (1) 在取自河道底层含有甲烷菌的厌氧污泥中加入蛋白胨、葡萄糖、乙酸钠加入醋酸调节PH为7.2，在温度为32℃条件下，进行厌氧恒稳培养2天；其按重量比为：厌氧污泥：蛋白胨：葡萄糖：乙酸钠=3:1:0.5:0.5。

[0022] (2) 根据培养箱体积的1/4加入基础培养基，培养基PH为7.2；接着在培养箱中通入氮气排净空气，加热培养基升温至25℃，按照培养基体积的10%接种步骤(1)培养后的含有甲烷菌的混合物，与基础培养基搅拌混合均匀；

[0023] 所述基础培养基组成为：污泥、家禽粪便和土豆渣按照500:1500:2000的比例混合；

[0024] 所述的污泥为黑色经驯化的厌氧污泥；

[0025] (3) 将接种甲烷菌的培养基分步加热升温，首先将处于25℃培养基加热按照1天1

℃升温培养10天至温度达到35℃,增加培养基同时在35℃条件下恒温厌氧培养5-7天;接着加热按照1天1℃升温培养7天至温度到达42℃,增加培养基并在42℃条件下恒温厌氧培养4天;继续加热一天内升温至45℃,在45℃条件下,增加培养基按照1天1℃升温培养10天,至温度达到55℃,停止升温,并保持55℃恒温条件,增加培养基培养8天,至进料量达到满负荷,得到驯化培养的高温甲烷菌,直接接种与高温发酵液,进行高温发酵甲烷的制备过程;

[0026] 所述每次增加培养基的量为基础培养基和接种甲烷菌污泥总质量的6%;

[0027] 所述分步加热升温培养过程中以50r/min转速连续搅拌。

[0028] 实例2、

[0029] (1) 在取自河道底层含有甲烷菌的厌氧污泥中加入蛋白胨、葡萄糖、乙酸 钠,加入醋酸调节PH为7.2,在温度为32℃条件下,进行厌氧恒稳培养4天。其按重量比为:厌氧污泥:蛋白胨:葡萄糖:乙酸钠=3:1:0.5:0.5;

[0030] (2) 根据培养箱体积的1/4加入污泥、家禽粪便和土豆渣按照1000:500:500的比例混合基础培养基,培养基PH为7.2;接着在培养箱中通入氮气排净空气,加热培养基升温至25℃,按照培养基体积的10%接种步骤(1) 培养后的含有甲烷菌的混合物,与基础培养基搅拌混合均匀;

[0031] (3) 将接种甲烷菌的培养基分步加热升温,首先将处于25℃培养基加热按照1天1℃升温培养10天至温度达到35℃,增加培养基同时在35℃条件下恒温厌氧培养5-7天;接着加热按照1天1℃升温培养7天至温度到达42℃,增加培养基并在42℃条件下恒温厌氧培养4天;继续加热一天内升温至45℃,在45℃条件下,增加培养基按照1天1℃升温培养10天,至温度达到55℃,停止升温,并保持55℃恒温条件,增加培养基培养8天,至进料量达到满负荷,得到驯化培养的高温甲烷菌,直接接种与高温发酵液,进行高温发酵甲烷的制备过程;

[0032] 所述每次增加培养基的量为基础培养基和接种甲烷菌污泥总质量的6%;

[0033] 所述分步加热升温培养过程中以50r/min转速连续搅拌。

[0034] 试验例

[0035] 根据实例2驯化方法,在驯化过程中测定PH值和总VFA浓度的变化

[0036] (1) 测定驯化过程中PH值的变化

[0037] 如附图说明图2所示,在分步加热升温驯化过程PH值处于6.8-7.3;其PH值的变化趋势是:开始最低为6.8左右,随着时间的推移,PH值会稳定在7.3左右摆动,不再发生变化,PH值的变化曲线越平稳,说明运行越成功。

[0038] (2) 测定驯化过程中总VFA浓度的变化

[0039] 如附图说明图3所示:在驯化过程中,VFA的变化趋势是:开始最低为 1000-2000之间,随着时间的推移,VFA值会稳定在3500-4500之间,不再发生变化,曲线越平稳,说明运行越成功。

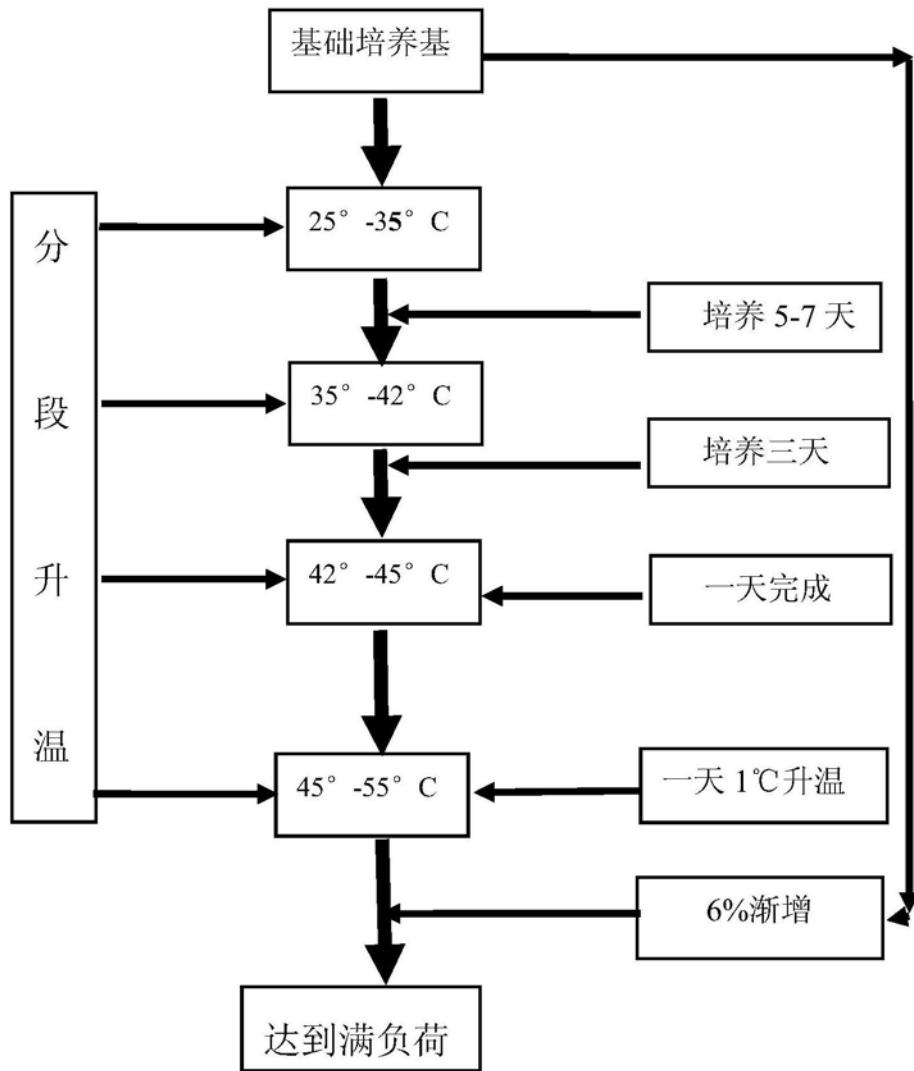


图1

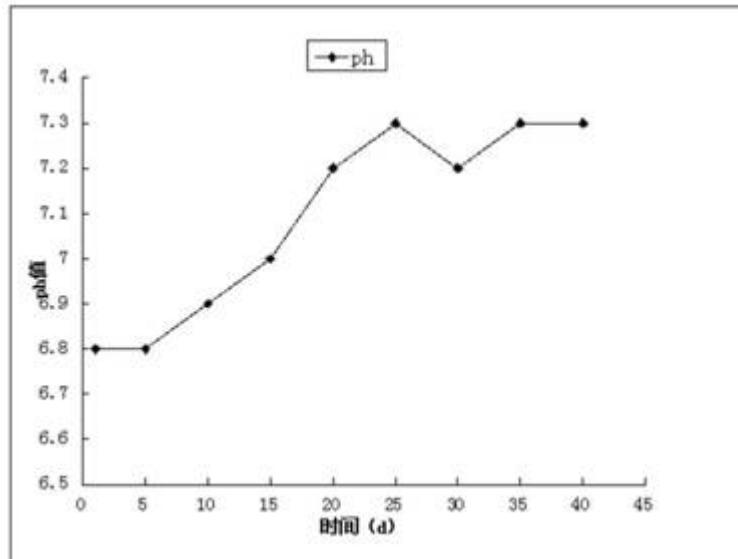


图2

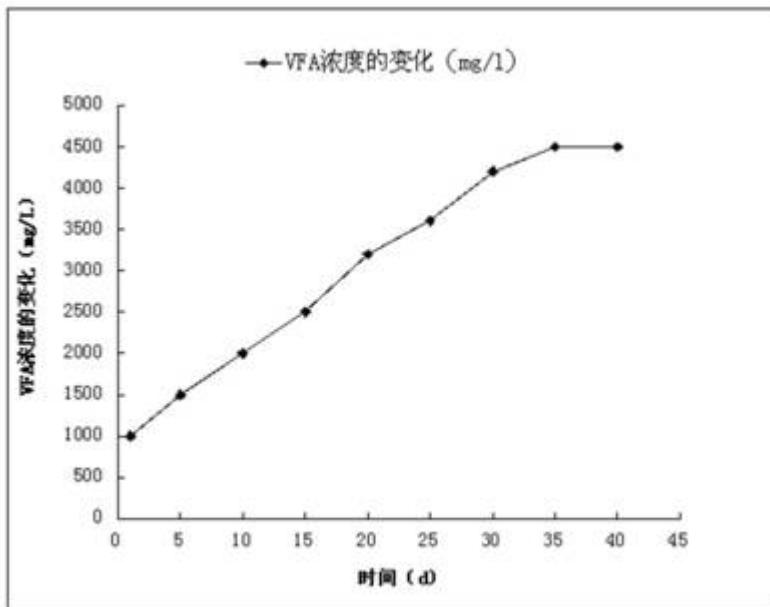


图3