

产甲烷细菌及研究方法

农业部厌氧微生物重点开放实验室

METHANOGENIC BACTERIA AND METHODOLOGY

EDITED BY
KEY-OPEN LABORATORY
OF ANAEROBIC MICROBIOLOGY
OF AGRICULTURE MINISTRY, PRC

成都科技大学出版社

产甲烷细菌及其研究方法

农业部厌氧微生物重点开放实验室

METHANOGENIC BACTERIA AND METHODOLOGY

EDITED BY
KEYLABORATORY OF ANAEROBIC MICROBIOLOGY
MINISTRY OF AGRICULTURE
PRC

成都科技大学出版社

(川)新登字 015 号

责任编辑 陈正权

封面设计 罗 光

产甲烷细菌及其研究方法

农业部厌氧微生物重点开放实验室

成都科技大学出版社出版发行

(成都市磨子桥 邮编: 610065)

冶金部西南勘查局测绘制印厂印刷

开本: 787×1092 1/16

印张: 16.25 插页 1

1997 年 9 月第 1 版

1997 年 9 月第 1 次印刷

字数: 380 千字

印数: 1—1000 册

ISBN7-5616-3549-4/S·114

定价: (精装) 40.00 元

(平装) 26.00 元

序 言

《产甲烷细菌及其研究方法》与大家见面了，我以欣喜的心情把这本书推荐给广大读者。

当今世界上厌氧微生物研究尤其是产甲烷细菌的研究得到迅猛发展，不仅是因为产甲烷细菌是一种古细菌，在地球生命系统发育中具有特殊的地位，而且由于产甲烷细菌在净化环境、回收能源的新工艺新技术中有着重要的作用和地位。因此，人们为了揭示地球生命起源和尽可能多地处理污染及回收能源，早已开始关注它在自然界地球生物化学物质循环中的作用，并对产甲烷细菌的能量与物质代谢、酶系统以及分类与生态等进行了广泛的研究。然而，由于厌氧操作技术困惑和滞后，而使产甲烷细菌研究的进展缓慢。真正开始对产甲烷细菌进行全面系统的研究是在突破了厌氧操作技术以后的最近二十多年，取得了许多研究成果，但是至今尚缺乏系统总结整理，关于产甲烷细菌的若干特征特性的专著则更少，国内对产甲烷细菌的分类仍然存在着混淆不清的现象，产甲烷菌的研究方法也缺乏系统与规范。为了促进产甲烷菌和有关领域在学术概念、命名等方面与国际接轨，以促进该领域的研究与应用，作者提出了出版《产甲烷细菌及其研究方法》的建议，得到农业部环保能源司的支持。

农业部沼气研究所始建于1979年，该所的厌氧微生物研究室是农业部首批批准的农业部重点实验室，十多年来，一直从事以产甲烷细菌为核心的资源与能源厌氧微生物、环境净化的厌氧微生物等领域的研究，取得较丰硕的研究成果，积累了较系统的研究资料。该实验室主任、本书主编赵一章研究员，曾在美国加州大学环境微生物中心进行过合作研究，系统地掌握了厌氧细菌的分离和鉴定技术。回国后负责组建厌氧微生物实验室长期从事并指导分离、纯化产甲烷菌等厌氧细菌的工作，是我国此领域造诣较深有建树的专家，1987年被邀请为国际细菌分类委员会产甲烷细菌分会委员。十多年来，他们搜集了大量的国内外有关产甲烷细菌的研究论文报告，包括美国加州大学环境微生物中心罗伯特·马教授1995年友情赠送给该实验室500余册杂志与书籍；纽约州立大学环境卫生学院马卡瑞奥教授1996年特寄来的最新出版的产甲烷菌研究材料。这些材料对本书的编写和提高本书的质量水平，无疑将起到十分重要的作用。

本书共分八章，分别对产甲烷细菌分类学、生态学、生理学、生物化学、显微形态学、分子遗传学、研究方法学以及极端环境下的厌氧细菌等进行了较系统的阐述介绍，这是我国在产甲烷细菌方面较为全面系统、水平较高的一本专著。我们相信它的出版发行，将对渴望已久的我国从事厌氧消化技术和环境保护、环境工程、沼气发酵等专业的科研、教学及应用实践工作者，提供一份极富营养的精神食粮，无疑将为推动我国沼气事业以及与产甲烷菌有关的其它事业的进一步发展起到积极的促进作用。

由于本书的编写时间仓促，书中难免有错误和不妥之处，敬请广大读者批评指正。

屠家宝

目 录

第一章 产甲烷细菌的生态学	(1)
第一节 地球上甲烷的循环	(1)
第二节 产甲烷菌的营养和生境类型	(3)
第三节 厌氧消化器中的产甲烷菌群	(5)
1. 厌氧消化污泥中的产甲烷菌群	(5)
2. UASB 颗粒污泥中的产甲烷菌群	(7)
第四节 自然界产甲烷细菌的生态环境	(9)
1. 淡水沉积物和水稻田	(9)
2. 海洋和地质深层沉积物	(10)
3. 地热生态环境	(12)
4. 动物瘤胃及肠道环境	(13)
5. 中国传统发酵酿酒窖池	(14)
6. 其它生态环境中的产甲烷细菌	(16)
第二章 产甲烷细菌的生理学	(19)
第一节 产甲烷细菌的基质范围	(19)
第二节 产甲烷细菌对环境的生理适应性	(21)
1. 盐度	(21)
2. 温度	(22)
3. pH	(24)
4. 氧	(24)
5. 遗传与调节	(25)
6. 游动性与泡囊	(26)
7. 储存物质	(27)
第三节 微生物的相互作用	(28)
1. 产甲烷细菌基质的竞争	(28)
2. H_2 的竞争	(29)
3. 乙酸的竞争	(32)
4. 其它产甲烷基质的竞争	(34)
5. 专性种间 H_2 /甲酸转移	(34)
6. 兼性种间 H_2 /甲酸转移	(38)
7. 与原生动物的共生现象	(40)
8. 种间乙酸转移	(40)
第三章 产甲烷菌的生物化学	(45)
第一节 利用氢和二氧化碳产甲烷	(45)

1. 代谢途径、 C_1 中间体和分反应	(45)
2. 分子氢的激活	(46)
2.1 还原辅酶 F_{420} (NiFe) 氢化酶	(46)
2.2 非还原辅酶 F_{420} (NiFe) 氢化酶	(48)
3. 二氧化碳还原和甲基转移	(49)
4. 甲基辅酶 M 被还原成甲烷	(52)
4.1 甲基辅酶 M 还原酶	(53)
4.2 杂二硫化物还原酶	(54)
5. 利用氢还原二氧化碳与氢还原杂二硫化物的耦合: RPG 效应	(55)
第二节 甲醇和甲胺转化成甲烷	(55)
1. 利用甲醇产甲烷	(56)
2. 利用甲胺和甲硫醇产甲烷	(68)
3. 嗜甲基代谢过程中的代谢调控	(69)
第三节 乙酸发酵	(71)
1. 生化代谢途径	(71)
2. 乙酰辅酶 A 的 C-C 和 C-S 键开裂	(72)
3. 甲基转移和脱甲基产甲烷	(74)
4. 电子转移和生物力能学	(76)
5. 其它酶活性	(77)
第四节 产甲烷菌的氧化还原酶	(77)
1. 甲酸脱氢酶	(77)
2. 氢化酶	(78)
3. 脱氮黄素连结的 $NADP^+$ 还原酶	(78)
4. 一氧化碳脱氢酶	(79)
5. 醇类脱氢酶	(82)
第四章 产甲烷细菌的显微形态学	(86)
第一节 形态学	(86)
第二节 核糖体结构	(90)
第三节 细胞外膜	(92)
第四节 细胞分裂	(100)
1. 亨氏甲烷螺菌	(100)
2. 甲烷丝菌	(100)
3. 其它产甲烷的细菌分裂	(104)
第五节 细胞质膜和原生质膜	(104)
第六节 附属物	(105)
第七节 胞内颗粒及气囊 (vesicles)	(106)
1. 储藏颗粒	(106)
2. 晶体和小管 (tubules)	(106)
3. 气泡 (气囊)	(106)
第八节 小结	(106)

第五章 极端环境下的厌氧细菌	(109)
第一节 绪论	(109)
第二节 嗜热厌氧细菌	(110)
1. 生态学及分类学	(110)
2. 生理生化特性	(114)
3. 适应机制	(117)
第三节 嗜酸和嗜碱厌氧细菌	(120)
1. 生态学	(120)
2. 生理学和代谢特性	(123)
3. 适应机制	(125)
第四节 高盐环境中的厌氧细菌	(127)
1. 高盐生态系统特性	(127)
2. 微生物多样性	(128)
3. 适应机制	(133)
第五节 脱卤和利用 CO 的厌氧微生物	(134)
1. 生态及分类学	(134)
2. 生理生化特性	(136)
3. 适应机制	(137)
第六章 产甲烷细菌遗传学及分子生物学	(142)
第一节 基因组的结构	(142)
1. DNA 复制子	(142)
2. GC 含量	(142)
3. 染色质	(144)
4. 重复序列和插入因子	(146)
5. DNA 的修复、复制及其代谢	(147)
第二节 基因结构	(148)
1. RNA 聚合酶和启动子结构	(148)
2. 转录终止子和 mRNA 结构	(148)
3. 核糖体结合位点及密码子的使用	(149)
4. 引导(信号)序列	(154)
第三节 转录翻译组份基因	(154)
1. 延伸因子、核糖体蛋白和 RNA 聚合酶	(154)
2. tRNA、rRNA 和 7SRNA 基因	(155)
3. 异亮氨酰-tRNA 合成酶	(156)
第四节 产甲烷细菌质粒	(156)
1. 质粒 pMP1	(157)
2. 质粒 pME2001	(158)
3. pUBR500	(159)
第五节 产甲烷细菌基因工程	(160)

1. DNA 分离	(160)
2. DNA 切割和重组	(160)
3. 基因载体	(160)
4. 产甲烷菌 DNA 的克隆和表达	(160)
第六节 已克隆的产甲烷菌基因	(161)
1. 氨基酸和嘌呤的生物合成途径	(162)
2. 固氮作用	(164)
3. 中间代谢	(164)
4. 产甲烷的相关基因	(165)
第七节 大分子表面结构	(169)
1. 鞭毛	(169)
2. 表层蛋白质	(169)
第八节 基因调控	(169)
第七章 产甲烷细菌分类体系	(172)
第一节 产甲烷菌分类的历史回顾	(172)
1. 早期 Barker 的分类	(172)
2. 1974 年版伯捷氏细菌鉴定手册 (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)	
第八版 (1974) 的分类	(173)
3. 国际细菌分类委员会产甲烷菌分会评定了近年产甲烷菌分类的地位	(173)
第二节 产甲烷细菌分类鉴定的基本标准	(174)
1. 纯培养物	(174)
2. 细菌形态观察	(175)
3. 细菌溶解的敏感性	(175)
4. 革兰氏染色	(175)
5. 运动性	(175)
6. 菌落形态	(175)
7. 基质范围	(176)
8. 产物形成	(176)
9. 比生长率的测定	(176)
10. 生长条件	(176)
11. 测定 DNA 的 G+C 含量	(177)
12. 重要的参考标准	(177)
第三节 Balch 的分类系统 (1979)	(177)
1. 根据 16SrRNA 的 S_{AB} 值分类	(177)
2. Balch 分类系统检索表 (表型特征)	(180)
第四节 产甲烷菌的代表种	(182)
1. 产甲烷菌的代表种	(182)
2. 我国目前所分离的产甲烷细菌及其特征描述	(199)
第五节 伯捷手册九版以后的最新分类	(200)
1. 甲烷杆菌目	(200)

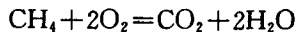
2. 甲烷球菌目	(200)
3. 甲烷微菌目	(201)
第六节 产甲烷细菌作为古细菌的研究	(202)
第八章 产 CH_4 菌的研究方法	(209)
第一节 厌氧操作系统及培养基制备	(209)
1. 厌氧方法的理论基础	(209)
2. 铜柱除氧系统	(211)
3. 厌氧箱	(212)
4. 培养基的组成	(212)
5. 培养基的制备	(218)
第二节 产甲烷细菌的分离	(219)
1. 产甲烷细菌的富集培养技术	(219)
2. 产甲烷细菌的分离纯化方法	(221)
第三节 产甲烷细菌形态观察	(222)
1. 普通形态学	(223)
2. 产甲烷细菌菌落形态和菌体荧光的检测	(223)
第四节 产甲烷细菌的保存法	(224)
第五节 产甲烷细菌的生理学特性测定	(226)
1. 产甲烷菌的碳源利用特征测定	(226)
2. 产甲烷细菌的其它生长特性测定	(228)
3. 产甲烷细菌的倍增时间测定	(229)
第六节 厌氧消化污泥产 CH_4 活性测定	(230)
1. 产甲烷细菌的氢化酶活性分析法	(230)
2. 最大比产 CH_4 速率测定	(233)
第七节 产甲烷细菌数量的 MPN 计数测定法	(239)
1. 产甲烷细菌的 MPN 稀释法测定方法的原理	(239)
2. MPN 测定的计算	(240)
3. 测定值的置信区间和差异显著性的检验	(241)
4. 产 CH_4 细菌的 MPN 测定方法	(243)

第一章 产甲烷细菌的生态学

第一节 地球上甲烷的循环

甲烷由一个碳原子和四个氢原子组成，分子式是 CH_4 ，是最简单的有机化合物。温度在负 161.4°C 以上，甲烷以气体状态存在。从太空中用天文红外光谱分析仪观测地球，可以很容易发现地球大气中波长 $3.33\mu\text{m}$ 处甲烷的特征性吸收峰。不仅是在地球，甲烷也是宇宙中比较常见的有机分子。天文学家已经观测到冥王星外壳上包有一层固态的甲烷，木星外层也有甲烷挥发物的踪迹，而在土卫六上发现了主要由甲烷构成的大气层。

甲烷在地球大气中的平均浓度很低，只有 1.7ppm 。但却是影响全球气候变化的重要气体。大气层的温室效应使全球气温升高，随之引发的多米诺效应对自然生态环境和人类社会有着深刻的影响。造成温室效应的主要气体是二氧化碳，甲烷则紧居其后，也具有强烈的温室效应。和大气中浓度为 345ppm 的二氧化碳相比，甲烷浓度仅仅为其的 0.49% ，但所造成的温室效应却为二氧化碳的 25% 。这是因为甲烷的红外吸收峰高，单位体积甲烷造成的温室效应为二氧化碳的 30 倍的缘故。甲烷还是影响地球臭氧层的重要气体，地球同温层中的甲烷可以和许多自由基发生反应。甲烷和氯自由基发生反应，可减少这种破坏臭氧的物质而有利于臭氧层的稳定。甲烷和羟自由基 ($\text{OH}^\cdot$) 的反应则具有双重作用，反应先生成 CH_3 ，随后的一系列复杂反应既可促进臭氧形成，但也会导致臭氧的破坏。此外，甲烷和氧可进行如下反应：



这一反应在氧过量时很易完成，但在地球大气层中进行得非常缓慢。据 Pearman 估计，甲烷分子在大气层中的平均寿命为 $7-11$ 年。在地球同温层进行的上述反应也会影响地球上的气候，反应生成的水在 85KM 的高空形成冰晶云，对大气太阳辐射和降雨量均会造成影响。

从上面反应式也可以计算出和大气层中氧气保持平衡的理论甲烷浓度。实际测出的大气中甲烷浓度很高，甲烷理论浓度还不到实际甲烷浓度的 $1/10^{27}$ 。显然，甲烷进入大气的速度很快，甲烷生成的速度必然也很快。地球上的甲烷来源可分为生物来源和非生物来源。甲烷可以由动物和植物释放进入大气，但归根结底，生成甲烷的生物是产甲烷细菌。甲烷的非生物来源则是油气田，煤矿和火山……。一般人也许会认为大气中的甲烷主要来自于气田、煤田泄漏和火山爆发等物理过程。实际上，这些环境中产生的甲烷只占有很小的比例。大气层中的甲烷绝大部分是由生物生成的。一些学者对各种来源的甲烷数量作了估计，Tyler 对其作了总结，列于表 1-1 中。

表 1—1 大气中甲烷来源的估计值 (Tyler, 1991)

甲烷来源	甲烷生成量 (百万吨/年)
甲烷总量	355—870
人类活动形成甲烷总量	201—441
生物来源总量	302—715
饲养动物	80—100
白蚁	25—150
水稻田	70—120
湿地、沼泽	120—200
垃圾坑埋场	5—70
海洋	1—20
苔原	1—5
非生物来源总量	48—20
煤矿逸出	10—35
油气田逸失	10—30
输气管和工业逸失	15—45
生物量燃烧生成	10—40
水合甲烷	2—4
火山	0.5
机动车	0.5

水稻田、湿地和沼泽是生成甲烷的主要生态环境,反刍动物和白蚁则是甲烷重要的动物来源。科学家对白蚁生成甲烷的数量存有较大争议。Zimmermann 测算出白蚁 *Zootermopsis angusticollis* 在 20℃ 释放甲烷的速率是 2.4μg/只·天,温度升高到 25℃ 时释放速率增加到 5.7μg/只·天。在气体流动系统中,以上两种温度下的产甲烷速率分别提高到 3.5μg/只·天和 6μg/只·天。他用另一种白蚁 *Z. nevadensis* 的实验结果则达到 7.8μg/只·天。综合各种因素后,他认为白蚁释放甲烷的平均速率是 1.7μg/只·天,估计全球白蚁的总数为 2.4×10^{17} 只,据此推算出每年白蚁释放甲烷的总量是 1.49 亿吨。但多数科学家认为此数值估计过高,原因是有的白蚁,如亚热带地区广泛分布的 *Coptotermes formosonus* 吃进大量木材(达 0.98g/kg 白蚁·hr),但未观察到有甲烷生成。不过研究者们均肯定白蚁是大气甲烷的重要来源,估计每年全球白蚁释放的甲烷数量在 1500 万吨到 3000 万吨之间较为合理。反刍动物生成的甲烷直接扩散进入大气,而白蚁生成的甲烷是否全部进入大气也存有争议。Seiler 认为部分甲烷被土壤中的微生物吸收,在土壤中存在所谓“甲烷渗坑”,特别是热带、亚热带的土壤,甲烷的年消耗量在 2100 万吨左右。水稻田、沼泽和湖底沉积层等生境中的“甲烷渗坑”作用更强烈,在厌氧层中生成的甲烷一旦扩散到厌氧/好氧界面,大部分即被甲烷氧化菌消耗利用,只有小部分进入大气。这些生境中甲烷的生成量必然远远大于其释放量。“甲烷渗坑”作用的强度可以用氟代甲烷测定。氟代甲烷 (CH_3F) 是甲烷的类似物,在培养容器上端气体中加入含量为 1% 左右的氟代甲烷即可抑制甲烷氧化,但对甲烷生成的抑制作用甚微。Oremland 用容器覆盖港湾沉积物、河滩和堆肥,并在其中加入氟代甲烷,结果释放出的甲烷数量增加了 3—400 倍不等。说明在这些生境中存在强度不同的“甲烷渗坑”作用。与白蚁的情况相似,在另一些类似生境,如旧金山湾的盐泽沉积物中没有观察到这一现象。

被奥帕林称为“第一期大气”的原始地球大气中,甲烷是其中三种主要气体之一。今天,大气中的甲烷含量已达到 16 万年以来的最高值。用测定滞留在极地冰层气泡中的甲烷含量的

方法, 可以了解不同年代大气中的甲烷含量。从公元 1600 年到 1850 年的 250 年期间, 大气中的甲烷含量相对稳定在 0.8ppm 左右。随后至今的 150 年, 大气甲烷含量逐渐增加, 达到现在的 1.7ppm。这显然是近 150 年以来, 人类活动增强对大气甲烷影响的结果。这一影响仍然在继续发挥作用, 科学家已经得出结论, 大气中的甲烷正以每年 1% 的速度递增。这也意味着温室效应的增强和全球气候的进一步恶化。从表 1-1 中可以看出, 动物养殖业的发展, 水稻种植面积的扩大, 工业发展和城市化进程加快以及随之而来的垃圾坑埋场的增多, 都极大地影响进入大气的甲烷数量。这不仅仅只是温室效应的增强, 对畜牧业来说, 一头 500 斤重的牛每天嗝出 200 多升甲烷还意味着 8—10% 的能量损失和饲料报酬的相应降低。实际上, 动物营养学家已经在使用抗生素减少反刍动物的甲烷释放量。环境保护学者也在研究如何减少稻田、沼泽的甲烷释放。由此看来, 大气中的甲烷已不只是单纯的生态学问题, 而成为涉及到政治、经济甚至国际关系的更为复杂的问题了。

第二节 产甲烷菌的营养和生境类型

产甲烷菌只能利用简单的一、二碳化合物。甲烷杆菌科 (Methanobacteriales)、甲烷球菌科 (Methanococcales)、甲烷微菌科 (Methanomicrociales)、Methanoplasmaceae 和 Methanothermaceae 是氢营养 (hydrogenotrophic) 的产甲烷菌, 除代谢 H_2/CO_2 外, 大约有一半的种还可代谢甲酸。氢营养甲烷菌利用氢气的效率高, 如嗜树木甲烷短杆菌 AZ 菌株吸收氢气的速率可达到 115mmol/g·hr。在厌氧消化器中, 氢营养混合菌群对氢气的最大吸收速率在 33°C 时可达 15mmol/L 污水·hr, 对氢气的 K_s 值可低至 0.078mmol/L, 表现出对氢气极大的亲和力。因此, 在产甲烷厌氧生境中, 存在着高效的“氢缓冲作用”, 使得生境中的氢分压始终保持在非常低的水平, 这对厌氧消化过程的正常进行是非常重要的。甲烷八叠球菌常被视作乙酸营养 (acetotrophic) 甲烷菌的代表。实际上它们是混合营养型的, 大多数菌株以氢气为主要能源, 对乙酸的亲和力相当低。如巴氏甲烷八叠球菌 227 菌株对乙酸的 K_s 值为 5mmol/L, 远远超过自然厌氧环境中的乙酸浓度。乙酸营养型甲烷菌的真正代表应该是索氏甲烷丝状菌 (Methanothrix sohngei), 它能够有效地利用乙酸, 消耗乙酸的速率可达 1.6—2mmol/g 生物量·hr, 对乙酸的 K_s 值为 0.5—0.7mmol/L, 其对乙酸的亲和力较 227 菌株几乎高出 10 倍。不仅如此, 索氏产甲烷丝状菌还能够把所吸收乙酸的 98—99% 的甲基转化成甲烷, 因此是消化污泥和淡水沉积物等生境中最为重要的乙酸营养产甲烷菌。此外, 甲烷八叠球菌还利用甲醇、甲胺等甲基类化合物, 但专一性的甲基营养菌只有少数几种, 如 Methanoceoides methy-lutens 和 Methanolobus tindarius 等, 它们只利用甲醇和甲胺生成甲烷。如后文所述, 甲基营养产甲烷菌在海底沉积物产甲烷生境中起着重要的作用。

产甲烷菌广泛分布于各种厌氧生境, 是厌氧食物链最末端的一个成员。产甲烷菌可以自由生活, 也可以和动、植物以及别的微生物结成不同程度的共生关系。自由生活的产甲烷细菌的选择性分布与生境基质碳的类型和浓度、氧浓度和氧化还原电位、温度、pH、盐浓度以及硫酸盐细菌和其它厌氧菌的活性有密切的关系。一般来说, 有机质含量丰富, 氧化还原电位低于 -200mv 的厌氧生境中都有大量的产甲烷细菌活动。从极复杂的大分子生物多聚体到简单的甲烷分子形成了一条完整的厌氧食物链。厌氧水解菌、产氢产乙酸菌、产甲烷菌, 有时还有同型产乙酸菌在这条食物链的不同部位发生作用。在一些生境中, 由于原始底物和生态条件的差异, 这条食物链是不完整的, 甲烷发酵只经历其中的 1—2 个阶段。据此可以粗略

地把产甲烷细菌的生态环境分为三类。

第一类生态环境：如我国农村式沼气池和厌氧污水处理系统，经历甲烷发酵的全部四个阶段，即：复杂有机物的水解发酵，产氢产乙酸，产甲烷和同型产乙酸阶段，如图 1 所示。

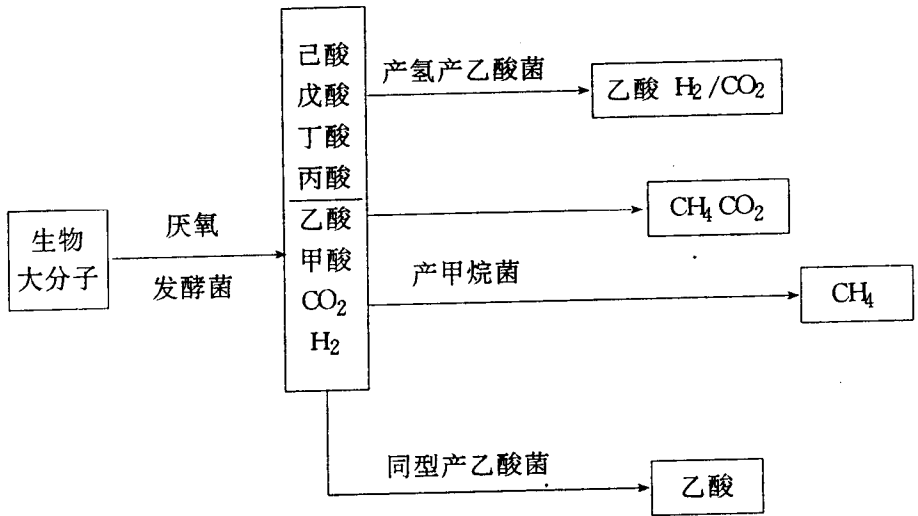


图 1-1 产甲烷菌的第一类生态环境

第二类生态环境：代表为反刍动物瘤胃，只经历水解发酵和产甲烷两个阶段。瘤胃中发酵生成的各种脂肪酸迅速为肠道内壁吸收。因此，缺乏产氢产乙酸阶段，如图 1-2 所示。

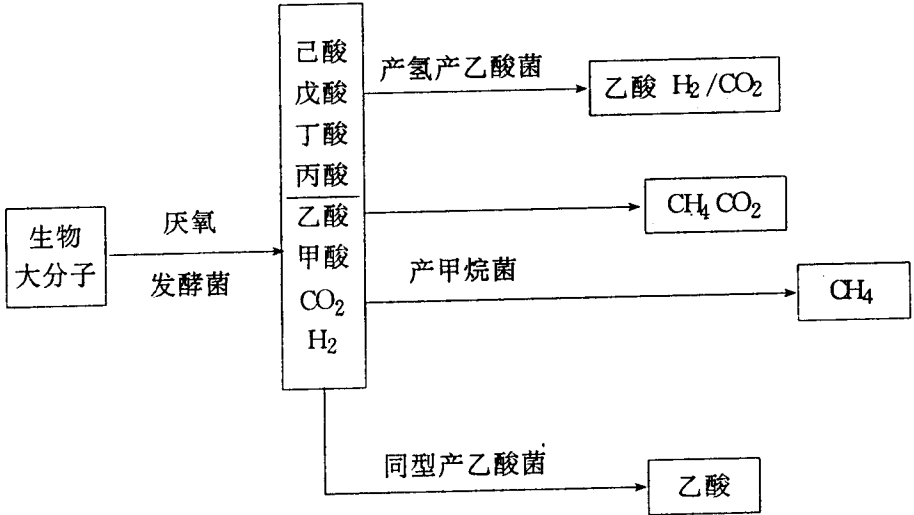


图 1-2 产甲烷菌的第二类生态环境

第三类生态环境：代表为温泉和海底火山热水口，这里主要通过地质化学过程产生 H_2 和 CO_2 。甲烷的生成只包括同型产乙酸阶段和产甲烷阶段，如图 1-3 所示。

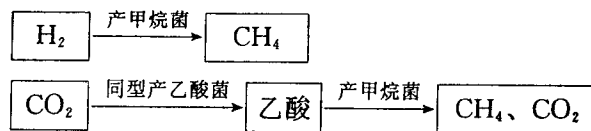


图 1-3 产甲烷菌的第三类生态环境

第三节 厌氧消化器中的产甲烷菌群

1. 厌氧消化污泥中的产甲烷菌群

人工建造的厌氧消化器包括污水处理系统和农村沼气池，其功用是为了处理污物污水和获得燃料气体—沼气。厌氧消化器是研究得较为彻底且最易操作的产甲烷生态系统，从复杂有机物到甲烷的转化包括了甲烷发酵四个阶段的全过程，是典型的产甲烷菌的第一类生态环境。

厌氧消化器有机负载高，有机物浓度在 5% 左右。城市污泥消化器中含 10%—15% 的纤维素，6%—7% 的木质素，20%—25% 的蛋白质和 15%—30% 的脂类。农村沼气池原料以动物排泄物为主，由大约 14%—25% 的纤维素，8%—15% 的木质素，5%—10% 的蛋白质和 1.5%—2.5% 的脂类组成。在厌氧消化器中，有机物有效的生物转化取决于参与各阶段发酵的多种复杂的微生物种群。这些菌群由水解菌、产氢产乙酸菌、同型产乙酸菌和产甲烷菌组成。这些不同营养类型的细菌作为一个整体协调作用，影响一个类型菌的代谢活动就可能影响整个的微生物种群。例如，如果氢营养甲烷菌发生某种混乱，就会造成氢分压升高，互营性的脂肪酸氧化不能正常进行，脂肪酸积累，又导致 pH 值下降和未离解脂肪酸的毒性增强。

国外研究者对厌氧消化器中的微生物种群和数量作了大量的调查工作。污泥消化器中产甲烷菌数量约为 10^6 — 10^8 /ml，其它厌氧菌总数约为 2×10^9 — 6×10^9 /ml。它们绝大部分是严格厌氧菌，兼性厌氧菌大约只占总数的 1%。Smith 等利用特异的含碳底物对水解菌计数研究，每 ml 下水污泥中含 10^7 数量级的蛋白水解菌， 10^5 数量级的纤维素分解菌，产氢产乙酸菌数量约为 4.2×10^6 个，同型产乙酸菌的数量也可达 10^5 — 10^6 个。赵一章报导川西平原沼气池中，产甲烷菌数量一般为 10^5 — 10^8 个/ml，产氢菌为 10^5 — 10^7 个/ml，而厌氧纤维素分解菌为 10^3 — 10^5 个/ml。钱泽澍在一个连续进料，高产沼气的奶牛场沼气池中观察到了更多数量的微生物种群，发酵水解菌达 26×10^{12} 个/ml，产氢产乙酸菌达 49.6×10^{12} 个/ml，产甲烷菌也可达到 49.8×10^{12} 个/ml。

下水污泥中厌氧发酵性细菌组成非常复杂。解蛋白的细菌大多属于梭状芽胞杆菌属，葡萄球菌属，真细菌属和类杆菌属等。分解纤维素和半纤维素细菌的知识大多来自于 Hungate 对瘤胃的研究。一般认为，存在于粪便残渣和沉积物环境中的细菌也会出现于中温消化器中。根据消化器中使用的原料，瘤胃中的优势纤维素分解菌如琥珀酸拟杆菌，生黄瘤胃球菌，溶纤维丁酸弧菌，纤维二糖梭菌等可能也存在于消化污泥中。此外，从消化污泥中还分离出分解纤维素能力强的类弧菌，并从木材生物质原料消化器中分离出三种生成芽孢的纤维素分解菌。从瘤胃中也已经分离出数种解纤维素的厌氧真菌。纤维素分解菌能够从径流水或人和动物的排泄物中进入厌氧消化器。在高温（约 60℃）的厌氧消化器中重要的纤维素分解菌是热梭菌，以及不产孢子的杆菌。

产氢产乙酸菌的典型代表是从所谓“奥氏甲烷芽孢杆菌”混合培养物中分离出的“S”有机体，在甲烷杆菌存在时，“S”有机体可以分解代谢乙醇。在此启发下，以后又陆续分离出

了代谢脂肪酸产氢的细菌，如氧化丁酸，戊酸等的沃尔夫互营单胞菌 (*Syntrophomonas wolfei*)，降解丙酸的沃林互营杆菌 (*Syntrophobacter wolinii*) 和降解苯甲酸盐的 *Syntrophus buswellii* 等。此外，部分硫酸盐还原菌，如脱硫弧菌和普通脱硫弧菌，在环境中没有硫酸盐，并有产甲烷菌存在时，也可在乙醇或乳酸盐培养基上生长，并氧化乙醇或乳酸生成乙酸和氢气。许多研究工作者已证实厌氧消化器所产生的甲烷中，大约有 70% 来自于乙酸。因而在污泥的甲烷发酵中，产氢产乙酸菌占有重要的生态位置。

同型产乙酸菌表现为混合营养类型，它既能代谢 H_2/CO_2 ，也能代谢糖类等多碳化合物，还可以进行丁酸发酵。最早分离出的同型产乙酸菌是伍氏乙酸杆菌 (*Acetobacterium woodii*)，是 Balch 在用 H_2/CO_2 富集产甲烷菌的培养物中，在甲烷形成后加入连二亚硫酸钠分离出来的。以后又分离出了乙酸梭菌 (*Clostridium aceticum*)，基维产乙酸菌 (*Acetogenium kivui*)，嗜热自养梭菌 (*Clostridium thermoautotrophicum*)，粘液真杆菌 (*Eubacterium limosum*) 等菌株。但在厌氧消化器中，以消耗氢气来生成乙酸的同型产乙酸菌的确切生态作用并不十分清楚。

产甲烷菌是唯一能够有效地利用氧化氢形成的电子，并能在没有光和游离氧， NO_3^- 和 SO_4^{2-} 等外源电子受体的条件下厌氧分解乙酸的微生物。厌氧消化中，产甲烷菌是甲烷发酵的核心。厌氧消化器下水污泥中，产甲烷菌的数量约为 10^8 个/ml，Smith 等计数甲烷杆菌属，甲烷球菌属，甲烷螺菌属和甲烷八叠球菌属的数量为 10^6-10^8 个/ml，甲烷丝状菌属的数量为 10^5-10^6 个/ml。在中国农村沼气池中，产甲烷菌的主要类型是甲酸甲烷杆菌，史密斯甲烷短杆菌，嗜树木甲烷短杆菌，甲烷八叠球菌和甲烷小球菌。嗜热产甲烷菌也同时存在于农村沼气池中，其中一种是利用 H_2/CO_2 和甲酸的杆菌，一种是包裹状球菌，形成类似于马氏甲烷球菌的包裹，另外一种是小球菌。

氢营养型甲烷菌代时短，而乙酸营养型甲烷菌繁殖速度慢。厌氧消化器中甲烷八叠球菌代时为 1—2 天，利用乙酸产甲烷的优势菌索氏甲烷丝状菌，代时超过 3.5 天。互营利用丙酸，丁酸产甲烷的共生培养物则需要更长的时间。实际上，互营脂肪酸降解菌和乙酸营养甲烷菌是有机物厌氧降解转化成甲烷的主要限制因素。由于这些微生物生长缓慢，在厌氧消化器中必须停留足够长的时间才能免于被洗脱。按照工程要求，厌氧消化器的保留时间必须大于 10 天才能够有效地和稳定地运行。因为产甲烷菌在代谢一碳化合物和乙酸时，要有对氢进行氧化的氧化还原酶参与，并要求一定的质子梯度，而较低的 pH 值有利于质子还原成氢，不会使氢氧化成质子。高质子浓度也抑制产甲烷菌和产乙酸菌的氢代谢。乙酸营养型产甲烷菌的质子调节作用可除去有毒的质子和确保各类型菌优势菌群的最适 pH 范围。一些事实说明，产甲烷菌的质子调节作用是其最重要的生态学功能，只有产甲烷菌才能够有效地代谢乙酸。产甲烷菌代谢氢而完成的电子调节作用则从热力学上为产氢产乙酸菌代谢多碳化合物（如醇，脂肪酸，芳香族化合物等）创造了最适条件，并促进水解菌对基质的利用。此外，产甲烷菌还可能具有营养调节作用，合成和分泌某些有机生长因子，有利于其它类型厌氧菌的生长。产甲烷菌表现的这三种调节机能（见表 1—2），维持了复杂微生物种群间相互联合和相互依赖的代谢联系，为厌氧消化过程的稳定和保持生物活性提供了最适条件。

表 1-2 厌氧消化中产甲烷菌的生物调节作用

功能	代谢反应	意义
质子调节	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	1. 除去有毒代谢产物
		2. 维持 pH 稳定
电子调节	$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	1. 为某些底物代谢创造条件
		2. 防止某些有毒代谢物积累
		3. 增加代谢速率
营养调节	分泌生长因子	1. 刺激异养菌生长

2. UASB 颗粒污泥中的产甲烷菌群

2.1 UASB 厌氧颗粒污泥

UASB 反应器是七十年代初 Lettinga 发明的一种性能优异的厌氧消化器。在 UASB 反应器中能够培育出具有优良理化和生物学特性, 产甲烷活性很高的厌氧颗粒污泥。这种颗粒污泥呈规则或不规则的拟圆形粒状结构, 在厌氧消化器中能截留大量微生物, 充分发挥各厌氧菌群的功能。确保厌氧消化过程的稳态运行。各种废水来源颗粒污泥的基本参数示于表 1-3。

表 1-3 几种 UASB 颗粒污泥的基本参数

基本运行参数	形成颗粒污泥的废水种类		
	人工配水	屠宰废水	丙酮丁醇废水
颗粒污泥直径 (mm)	0.7—2.0	0.5—1.0	0.5—1.0
沉降性能 (ml/g)	17	81	22
湿比重 (g/(cm) ³)	1.06	1.05	1.06
水力滞留时间 (hr)	5—7	6—8	48
试验温度 (°C)	35	常温	35
进水浓度 (CODmg/L)	3000	3000	9000—10000
COD 去除率 (%)	90	80	90

2.2 颗粒污泥的微生物相

近年来, 国内外一些学者加强了对厌氧颗粒污泥代谢特性的研究工作。颗粒污泥这种特殊的厌氧消化种泥, 其微生物相由产甲烷菌、产氢产乙酸菌和其它生理类群厌氧菌组成。刘双江等对啤酒厂废水、豆制品废水等含蛋白质废水中颗粒污泥的研究发现, 颗粒污泥中降解乙酸盐的生物量占总生物量的 19.6%, 其代谢活性较絮状污泥高一个数量级。颗粒污泥中的乙酸分解菌主要是 *Methanothrix* SP. 和 *Methanosarcina* SP.。前一种菌主要分布于颗粒污泥的中层, 后者分布在表面。研究者认为它们在反应器中的功能有所不同, *Methanothrix* SP. 主要降解颗粒污泥产生的乙酸, 而 *Methanosarcina* SP. 主要降解反应器内由悬浮细菌产生的乙酸。

赵一章等对颗粒污泥的菌相作了详细的显微观察和生理研究。借助于荧光显微镜能直观地对产甲烷菌进行特异性观察, 再配合电子显微镜观察其超微结构, 可以对颗粒污泥中的产甲烷细菌在属一级水平上作出初步的鉴定。对三种废水中形成的颗粒污泥观察的结果简介如下。

人工配水的颗粒污泥: 用工业糖, 尿素和磷酸盐配制的污水中, 形成的颗粒污泥的外表较为规则, 比表面积大, 表面可见较多孔穴。颗粒内菌群分布不均一, 存在以产甲烷丝状菌

和产甲烷球菌分别占优势的区域，但多数区域为各种菌群混栖分布。可发现甲烷八叠球菌相互叠加，形成拟八叠体。在颗粒形成的后期，表面以丝状菌占绝对优势。

屠宰废水颗粒污泥：颗粒较小，直径 0.5—1.0mm，为黑色不规则拟圆形，表面较粗糙且松散，但活力强，产气迅猛。荧光和相差显微镜下可观察到丝状、杆状、八叠球状、短杆状及球状的产甲烷细菌。各种产甲烷菌在颗粒中呈随机分布，唯表面丝状菌分布较多，故结构虽不紧密，但较为稳定。

丙酮丁醇废水颗粒污泥：颗粒为黑灰色拟圆形，表面粗糙，沉降性能较好，但未形成颗粒的絮状物质较多。显微镜下可见到丝状、杆状和球状的产甲烷细菌，产甲烷八叠球菌偶尔可见。扫描电镜下可观察到颗粒表面以丝状菌为主和以短杆菌为主的区域，有些区域则由丝状菌、短杆菌和球菌混栖。形成的颗粒中，直径 1.0—1.2mm 的较为紧密，2.0mm 以上的颗粒结构较松散，呈絮粒状。

通过上述观察以及进一步的生理实验可以认识到，颗粒污泥内的菌群是颗粒形成过程中自然选择的结果。它们在生理上存在互营共生关系。厌氧水解菌、产氢产乙酸菌和产甲烷细菌在颗粒内部生长、繁殖，形成相互交错的复杂菌丛。据刘双江等的报导，厌氧污泥颗粒化提高了厌氧污泥耐乙酸的能力，UASB 反应器中颗粒污泥的乙酸抑制浓度为 4000mg/L，较不形成颗粒污泥的普通厌氧消化器的 2000mg/L 提高了 1 倍。厌氧颗粒污泥的代谢活性也较絮状污泥提高 1 个数量级。

2.3 颗粒污泥形成的微生物学

乙酸营养甲烷细菌是颗粒污泥中的优势种群。在有机废水厌氧颗粒污泥中，很容易观察到甲烷索氏丝状菌和甲烷八叠球菌，在显微视野中常常形成主要的分布区域。氢营养甲烷杆菌在形成颗粒污泥过程中也有重要作用，这种细菌在生长时菌体可伸长，相互缠绕，并在生长后期形成明显菌团。颗粒污泥中，各种形态的菌处于有序的网状排列，其间有气体和基质分流的通道，使各种微生物群处于最佳的种间氢转移状态。

在颗粒污泥形成的过程中，除产甲烷细菌以外，发酵性细菌，产氢产乙酸菌也起着重要的作用。刘双江等报导，颗粒污泥形成过程中，乙酸营养甲烷菌、氢营养甲烷菌、发酵性细菌、丙酸分解菌和丁酸分解菌五种类型细菌的数量都有较大幅度的增加。其中氢营养型的甲烷菌增长最多，几乎达四个数量级，其余四个类群细菌数量也大致增加了 2—3 个数量级。而在颗粒污泥的稳定运行期间，污泥中仅乙酸营养甲烷菌数量增加较多，其余类群细菌的数量变化都不大。他们认为只有当污泥中各类群细菌达到一定数量并具有合适的比例后，才有可能形成颗粒污泥。而细菌类群数量上的差异可能意味着它们在颗粒污泥形成和作用的过程中功能上的不同。

赵一章等人则追踪观察了厌氧颗粒污泥形成的全过程。在酒精废水中接入活性污泥种泥，最初出现了絮状团聚物，其沉降性能差，跑泥严重。大约几天后，小颗粒大量形成，可观察到几乎全部由细菌构成的颗粒。有机负荷约 2.0kg/m³·d 时，颜色逐渐由黑变为黑灰色。随后的 20 天，颗粒逐渐变大，丝状菌增加较多。有机负荷为 6kg/m³·d 时，氢化酶的活力高达 647 (H₂μmol/mgVSS·10min)，较接种污泥高出 15 倍以上，跑泥现象此时已基本停止。50 天以后，有机负荷进一步增大到 10kg/m³·d，形成较为均匀的黑灰色颗粒 (1.2—2.0mm)，内部的微生物群已基本稳定。在实验中发现，有机负荷是形成颗粒污泥的重要因素，一般有机负荷大于 4kg/m³·d 才出现颗粒污泥。原因可能是营养丰富环境中，厌氧微生物才能大量增殖，分泌胞外多聚糖等大分子物质，形成微粒可粘结凝聚的物质基础。在颗粒污泥形成的过程中，