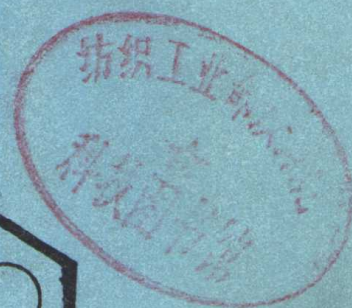
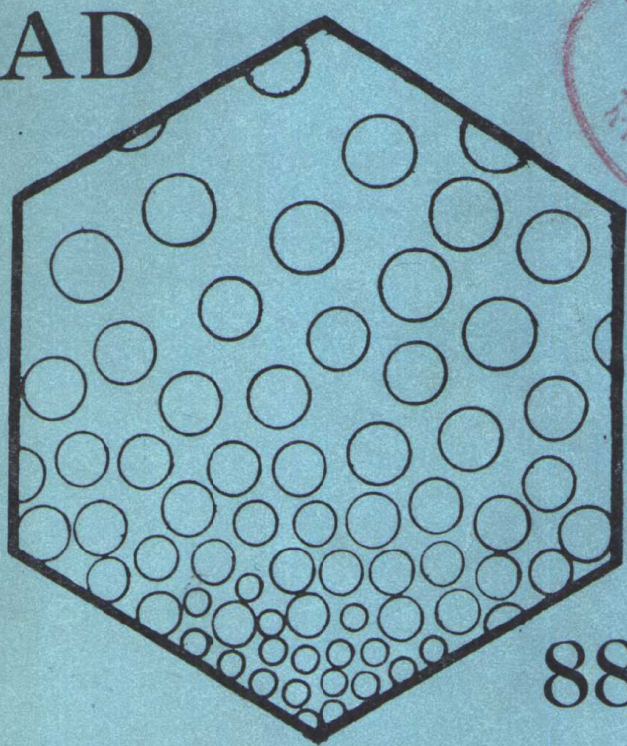


X520.5-53/1

12935

第五届国际厌氧消化讨论会 论文集

AD



88

意大利

波罗尼亚

一九八八年五月

厌氧消化——1988

第五届国际厌氧消化讨论会论文集

意大利 波罗尼亚 5.22—26

编 者

E.R. 霍尔

P.N. 霍布森

翻 译

闵 航	郑 平	倪水松	赵宇华	徐向阳
付德龙	陈美慈	陈声明	俞秀娥	周恭明
贾小明	陈中云	佟树声		

校 阅

钱泽澍 闵 航 郑 平 沈瑞芝

责 任 编 辑

钱泽澍 闵 航

编 译 说 明

第五届国际厌氧消化讨论会于1988年5月22—26日在意大利波罗尼亚召开。讨论会印发了论文集和摘要(墙报)集。论文集包括了厌氧消化基本原理进展,废水厌氧处理,后处理和难分解化合物的去除,厌氧消化回收资源,大型沼气池存在的问题及其解决,化学有毒废水的厌氧处理等内容。论文集不仅包括了第五届国际厌氧消化讨论会上也包括由欧洲共同体委员会主办的两个专题讨论会上介绍的各种论文。这些论文无论在深度上还是在广度上无疑都代表了近年国际上厌氧消化领域中的最新技术和最新成果以及目前的研究动向。

鉴于客观实际情况,将此论文集翻译出版成中文本,对于推动我国厌氧消化、环境保护和农村能源等方面的教学、科研和生产具有十分重要的意义。为此,我室受农业部能源环保局的委托,组织翻译出版第五届国际厌氧消化讨论会论文集中译本。中译本除包括论文集的所有论文外,还收进了摘要集目录和摘要集中内容较为丰富又具有一定参考价值的论文摘要以及附加部分的二篇论文。每篇文章后的参考文献和致谢等均从略。作者姓名和地址仍按原文便于读者联系。

在论文集中由我国研究者发表的论文,由作者提供原文付印;其中一篇法文论文系请佟树声同志翻译;在编译工作中承蒙沈瑞芝同志的热情支持和有关文章的审校。在此一并致以谢意。

限于编译者水平和时间,译文中难免有不少未能达到信、准、达、顺之处,敬请读者批评指正。

浙江农业大学生物质能研究室

杭州 1988.10.

VAG 07/94

水污染控制进展

国际水污染研究和控制学会 (IAWPRC) 主办的系列讨论会

厌氧消化——1988

第五届国际厌氧消化讨论会论文集

意大利 波罗尼亚 5.22—26

本系列讨论会对于传播相当新的工艺方面的信息已产生重要影响。第一届讨论会1979年在英国加的夫 (Cardiff) 召开, 随后的讨论会相继在特兰蒙德 (Travemunde) (1981)、波斯顿 (Boston) (1983) 和广州 (1985) 召开。1979年首先报导的富有革新精神的厌氧处理设计和科学发现正继续进一步精益求精和发展, 厌氧消化现在被认为是可对许多废物处理应用的传统处理方法。

这些论文对最近的技艺状态提供了洞察之斑; 在厌氧消化基础的认识方面, 在厌氧处理的应用方面——特别是对于难分解化合物和有毒废水方面。一些论文描述了提高厌氧系统流出液质量的方法, 也探讨了厌氧消化在资源回收方面的作用。

大量的论文记述了发展中国家厌氧处理市政废水的最近经验。除了在 IAWPRC 会议上介绍的论文外, 也包括了欧洲共同体委员会 (CEC) 主办的两个专题讨论会上介绍的论文。

闵 航译 钱泽澍校

前 言

在七十年代早期能源成本急剧上升后不久,厌氧消化工艺便成为一种成本低廉的废物处理和环境保护的可靠选择对象。在那刚开始形成其特点的时期里,有助于厌氧消化工艺的世界范围的研究和发展努力规模是相当有限的。其后的十年对厌氧处理的兴趣迅速增加。1979年时很显然已有充分的条件建立厌氧研究团体以保证唯一贡献于厌氧消化的第一次重要国际会议的组织。结果第一届国际厌氧消化讨论会1979年在加的夫召开,一些新的科学发现和富有革新精神的厌氧处理设计被报导。其中许多发表物有助于激发气氛,这种气氛在八十年代厌氧消化广泛范围的商业性发展中达到高潮。由第一届讨论会产生的冲击势头一直贯穿到随后的特兰蒙德(1981)、波斯顿(1983)和广州(1985)讨论会。

此书的内容是1988年5月22—26日在意大利波罗尼亚召开的第五届国际厌氧消化讨论会厌氧消化—88论文汇编。与1979年的流行观点相反,今天厌氧消化作为一种许多废物处理应用的可靠工艺已被广泛接受。在早期的讨论会上介绍的论文常论述似乎相应直接了当的主题。回顾起来早期研究的许多废物是易于生物降解的和无毒的。对新的反应器设计具有极大的兴趣,因为在许多情形中它们正是首先被商业性应用。

1988年,厌氧消化已被认为是许多应用的传统处理工艺。不管这种认可如何,阅读这论文汇编的内容将会指出在我们对厌氧消化基本原理的理解方面仍在作出许多进展。然而工艺发展正集中应用于难分解化合物和有毒废水如在纸浆造纸和石油—化学工业中产生的废水。众多的论文也记述了发展中国家厌氧处理市政废水的最近经验。提高厌氧系统流出液质量的探讨和处理是另外一些研究的主题。最后,从组成成分腐蚀到用于资源回收和再利用的综合系统设计范围内的问题正被许多研究者调查和研究。

在波罗尼亚介绍的科学和工艺计划是两个组织努力的结果。国际水污染研究和控制学会厌氧消化专家组的一些成员参与了厌氧消化—88计划委员会。专家组的任务之一是促进和增加在厌氧消化处理工艺和它的应用方面有所进展的行家之间的通讯联络。另外欧洲共同体委员会(CEC)主办了两个与IAWPRC讨论会平行召开的专题讨论会。这两个专题讨论会由CEC的科学研究和发展总理事会和CEC的能源总理事会联合组织的。讨论会的安排也为与会者提供了参加庆祝波罗尼亚大学900周年的机会。

E.R.霍尔

加拿大 安大略 伯灵顿

闵 航译 钱泽澍校

序 言

在能源总理事会的研究项目和科学 研究和发展总理事会的研究和发展项目的组织计划中，许多活动是关于农业—工业废水厌氧消化部分中的事情。然而，关于厌氧消化处理的许多问题依然仍在，且应该对这个领域中进一步活动的需要性作出估价。这两个专题讨论会将给委员会提供选择必须进一步研究和发展或大规模研究活动所需的信息。我们相信，在这些专题讨论会期间将被介绍的论文将给所有与会者一个在 EEC 水平上取得的结果的总概况，并将使国家和CEC在这个领域的决策者朝着以解决余留问题为目标进行综合性和补充的探讨。

P.L.赫密特

G.L.弗莱罗

闵 航译 钱泽澍校

目 录

封底的话

前言

CEC专题讨论会序言

厌氧消化基本原理进展

- 嗜热性细菌转换乙酸为甲烷.....S. H. Zinder (1)
- 产甲烷微生物密集体的结构和代谢
.....H.C. Dubourgier, D.B. Archer, G. Albagnac和G. Prensier (8)
- 由产甲烷细菌纯培养物生成乙烷、乙烯和乙炔
.....Negash Belay和Lacy Daniels (17)
- 恒化器中最优化的选择重点..... A. Aivasidis, K.-H. Bastin和C.Wandrey (26)
- 有助于上流式厌氧污泥床滤器(UBF)反应器启动期间微生物聚集化的营养和环境
因子.....S.R.Guiot, S.S.Gorur 和 K.J.Kennedy (33)
- 上流式厌氧污泥床反应器中的球团形成
.....P.A.L.N.S.Sam-Soon, R.E.Loewenthal, P.L.Dold
和G.V.R.Marais (40)
- 厌氧细菌对惰性支持物的粘附和产甲烷生物膜的发育
..... D.Verrier, B.Mortier, H.C.Dubourguier和G.Albagnac (45)
- 产乙酸、乙酸裂解和嗜氢种群的pH抑制机理
..... A.Attal, F.Ehlinger, J.M.Audic和G.M.Faup (51)
- 在处理软饮料废水的填充床反应器中基质利用的模式
.....Stephen R.Harper和Frederick G.Pohland (57)

厌氧废水处理

- 好氧与厌氧废水处理.....P.Vochten, D.Schowaneck和W.Verstraete (69)
- 美国的好氧与厌氧处理
..... W.W.Eckenfelder, J.B.Patoczka和G.W.Pullian (78)
- 橄榄油厂废水的高效厌氧处理
.....Stelios P. Tsonis和Sotirios G.Grigoropoulos (87)
- 结合型反应器对农产品加工废水的产甲烷生物转化
..... J.F.Calzada, C. Rolz, M.C.de Arriola, C.Porres
和J.Valladares (97)

食品加工废水厌氧消化处理的可靠性

..... A.D.Wheatley, K.A.Johnson和C.I.Winstanley (103)

上流式和下流式固定床反应器厌氧处理酒精废醪的中试研究

..... P.Weiland和K.Wulfert (112)

厌氧流化床反应器 (AFBR) : 性能与水力学行为

.....J.Iza, P.A.Garcia, I.Sanz, S.Hernando和F.Fdz-Polanco (117)

高效生物产甲烷的基质往复工艺

..... Jurgen H.Thiele和J.Gregory Zeikus (123)

中国沼气发展概况及展望 (原题目为: 中国生活污水的厌氧处理)

.....赵一章 吴力斌 (130)

巴西生活污水厌氧处理——研究结果与工业化应用经验.....Sonia M.M.Vieira (136)

在8—30℃温度范围内用EGSB和UASB厌氧系统处理低浓度可溶性废水和复杂废

水..... A.W.A.de Man, A.R.M.van der Last和G.Lettinga (145)

后处理和难降解性化合物的去除

难降解性化合物的厌氧降解..... C.Holliger, A.J.M.Stans和A.J.B.Zehnder (157)

厌氧性予处理流出物的处理.....H. Odegaard (169)

抗微生物剂和饲料添加剂对养猪场废物厌氧处理效能的影响

.....M.Camprubi, J.M.Paris和C.Casas (182)

厌氧膨胀床GAC反应器对煤和石油蒸馏中所产生的生物抑制性废物的厌氧处理

..... M.T.Suidan, J.T.Pfeffer和G.E.Nakhla (188)

以厌氧消化控制病原菌.....J.C.H. Shih (195)

有毒木材加工业废水的厌氧处理..... T.Welander, Å.Malmqvist和P.Yu (200)

生物处理橄榄厂出水中的单宁类化合物的去向

..... V.Balice, C.Carrier, O.Cera和B.Rindone (207)

产甲烷细菌的伴生菌厌氧分解茶叶废物和某些芳香族化合物

..... K.G.Gollakota和R.Sarada (212)

丙烯酸的厌氧分解..... M.Dohányos, J.Zábranska和P.Grau (216)

厌氧消化回收资源

发展沼气在改善农村能源、环境、生态中的综合作用

.....邓可蕴 赵一章 吴力斌 (223)

组合型系统处理和利用种植园废水: 棕榈油工厂废水作为具体实例

..... Lim Kim Huan (229)

厌氧废水处理的收益: 一种浓的农村工业流出液的情况.....B.G.Yeoh (238)

猪粪厌氧消化中营养物的回收和再利用..... D.M.Prairie和A.R.Stickney (247)

城市固体废弃物有机成分在批量过程中的干消化	 E.ten Brummeler, I.W.Koster和J.A.Zeevalkink (255)
厌氧固体状态发酵 (SSF) 微生物群体的降解性	 P.Van Meenen, J.Vermeulen和W.Verstraete (264)
成都常乐能源示范村.....孙国朝、邵廷杰、沙士津、周绍英、钟顺向、刘克鑫 (273)	
固体物质的厌氧消化动力学..... S.Ghosh和U.Lall (279)	
城市固体废弃物经新型予处理后的中试规模厌氧消化	 G.Szikriszt, B.Frostell, J.Norrman和R.Bergström (287)
欧洲共同体委员会 (CEC) 专题讨论会	
序言 (见前)	

大型沼气池的问题和解决

工业化处理工厂中的厌氧微生物腐蚀..... W. Allan Hamilton (297)	
意大利的经验: 大型沼气池中的化学和生物学问题	 F.De Poli, M.Gamboni和A.Tilche (302)
粪便低温消化的启动	 G.Zeeman, T.J.M.Vens, M.E.Koster-Treffers和G.Lettinga (308)
固定膜静止床厌氧反应器的启动..... Claude Camilleri (315)	
把沼气技术和社会的一体化纳入农场经营管理中	 A.Wellinger, K.Sutter和K.Egger (321)
集中供气沼气池: 有关问题和解决途径..... W.J.van Nes和R.C.Poppen (327)	
大型沼气池进料和溢流物的有关问题及其解决方法..... P.N.Hobson (330)	
利用来源于废物的沼气的小型组合式电厂的发电	 M.Deqli, K.-O.Luik和B.Reinicke (338)
猪粪集中供气沼气池溢流物的后处理..... A.Poletti, E.Vincenti和M.Giombini (345)	
沼渣的堆肥处置和处理..... F.Schuchardt (348)	

化学性有毒废水的厌氧处理

含氮脂肪族和芳香族化合物的发酵降解..... B.Schink (357)	
厌氧处理含化学有害物的废水..... Margareta Glancer和S.N.Ban (361)	
工业废液和污泥厌氧处理过程中生物降解的评价	 Francois Colin和Nils Munk-Koefoed (366)
厌氧消化处理化工废水..... Michel Henry和Christine Varaldo (373)	
意大利厌氧处理化工有机废弃物的研究概况..... P.Sanna (379)	

利用固定化细胞厌氧处理纸浆漂白厂废水

..... Imre Pascik和Hans-Jürgen Henzler (382)

厌氧处理亚硫酸纸浆厂蒸发器中的冷凝液

..... J. Saslawsky, Y. Liziard和E. Chave (388)

填埋沼气中的有毒成分..... H. C. Willumsen, P. Burian-Hansen和P. E. Jensen (394)

第五届国际厌氧消化讨论会墙报集

目录..... (403)

第五届国际厌氧消化讨论会墙报集选篇

全混合连续搅拌反应器 (CSTR) 中氢分压对乙醇和丙酸盐产甲烷的影响

..... D. P. Smith和P. L. McCarty (413)

富集培养物中丙酸盐产乙酸的途径

..... J. L. Tholozan, E. Samain, J. P. Grivet和G. Albagnac (418)

串联的渗滤填充床厌氧消化器的运行

..... S. Hall, A. Thomas, F. Hawkes和D. Hawkes (423)

上流式污泥床滤器 (UBF) 内定位填料对固体滞留的影响

..... K. J. Kennedy, S. S. Gorur, C. A. Elliot, E. Andras和S. R. Guiot (428)

颗粒活性炭 (GAC) 对上流式厌氧污泥床 (UASB) 反应器运行的影响

..... Hang-Sik Shin和Sae-Eun Oh (433)

废水厌氧处理中的中和问题..... K. Svardal和H. Kroiss (437)

污泥床滤器和厌氧折流板反应器之间处理可溶性废物的工艺差异

..... Yang Xiu-Shan, G. Garuti, R. Farina, V. Parisi和A. Tilche (441)

大型氧化塘法处理养猪场废物..... J. L. Garcia-Heras和L. Sancho (447)

卧式沼气池设计中的一些问题..... D. R. Pande, F. De Poli和A. Tilche (453)

应用改良的UASB厌氧处理甜菜糖蜜

..... Hong Yucai, Gatzke Lettinga和H. Willers (457)

固定床和固定床结合污泥床反应器厌氧消化乳酪乳清的比较

..... E. Killilea和E. Colleran (464)

石油化学废水中苯酚和苯甲酚的厌氧降解..... P. Vogel和J. Winter (468)

论文集附加部分

在处理不同废水的UASB反应器中颗粒污泥的高效性能及其相关特性

..... H. Harada, G. Endo, Y. Tohya和K. Momonoi (475)

厌氧消化综合工艺处理养猪场废物

..... S. Kimchie, R. E. Lumbroso, Z. Geller,
D. Abramovitch和G. Shelef (485)

嗜热性细菌转换乙酸为甲烷

S.H. Zinder

Department of Microbiology, Cornell University, Stocking Hall, Ithaca,
NY14853, U.S.A

摘 要

在利用高温性厌氧消化(45—65℃)转换有机废物为甲烷方面的兴趣已日益增加。如同在中温性消化器中那样,乙酸是在高温性消化器中产生的三分之二甲烷的前体。乙酸营养型产甲烷菌属甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)和甲烷丝菌属(*Methanothrix*)的嗜热性菌株已被分离。它们的特性除了能以2—4倍更迅速的速率生长外,一般类似于中温性同类菌株的特性。这种较快地生长可以解释在高温消化器中可能出现的较高的反应速率和较短的滞留时间。高温性能经种间氢转移转换乙酸为甲烷的两成员互营共培养物和尚未鉴定的称为TAM菌的乙酸营养型细菌也已被分离到。这些乙酸营养型细菌的数量和活性可利用显微镜技术,培养技术和放射示踪技术进行确定。如果能发现可在70℃以上温度生长的乙酸营养型产甲烷菌的话,目前厌氧消化的温度上限65℃极可能会有提高。

关 键 词

甲烷, 乙酸, 产甲烷菌, 乙酸营养菌, 嗜热微生物。

引 言

由高温性微生物转换有机废物为甲烷的可能性,早已在50多年前为Rudolfe和Heukelekian(1930)所证实。自那时起直至70年代,对于高温(45—65℃)范围内厌氧消化的研究和大规模应用仅仅是零星的,且已为Buhr和Andrews(1977)所评论。然而,由于与中温消化处理相比,在高温消化中大大提高了所进行的反应速率和减少水力滞留时间的潜力,已导致了最近日益增加的兴趣。大规模的高温消化器已应用于处理污水污泥,动物粪便和造纸废水。广为不同的废水,包括市政废水,棕榈油废水,纤维素,糖类,有机酸和各种其他有机废水已在实验室规模的生物反应器中转化为甲烷(已为Zinder评论,1986)。最近已经证实,根据生物质滞留情况设计的较新的反应器结构如膨胀床反应器和污泥床反应器在高温范围内是可行的。在后者的研究中报导了产甲烷速率,每天每升反应器容积产生的甲烷高达2.5moles(约56升CH₄)。

高温性厌氧消化的首要优点之一是与中温性厌氧消化相比较常能减少水力滞留时间，这显然是由于嗜热性耗酸微生物的较快生长（参见下面）可防止被洗出。例如，Rimkus等（1982）在对芝加哥地区运转的大规模污水污泥消化器的研究中发现，当他们把运转温度从37℃提高到52—55℃时能缩短滞留时间14至7天而不降低效率。消化器能量自足有余（产生的甲烷多于加热和混合所需）。这种反应器的双重能力在建设一个新的消化器时可体现出十分重要的节省成本。

高温消化的其他优点包括病原菌的摧毁和减少污泥粘滞性。高温性厌氧消化的缺点是增加能量输入如加热，较差的消化稳定性和上清液质量。对参与高温反应器中转换废物为甲烷的微生物的日益了解，将会增加它们的利用潜力。但这种了解比对中温性消化的了解来说更是初步的。

厌氧消化器中流向甲烷的碳流

已知产甲烷细菌只利用有限种类的基质，一般一碳化合物（例如 CO_2 ，甲酸和甲胺物），和少数其他简单的化合物如乙酸，乙醇或异丙醇。因此复杂化合物转换为甲烷需要产甲烷细菌和非产甲烷细菌之间的互惠作用。图1是厌氧消化器中形成甲烷的碳流的一个典型图式。

不溶性有机物质如多糖，蛋白质、脂类，必须被水解为可溶性单位如寡糖和糖，多肽和氨基酸以及游离氨基酸。这受发酵性细菌（类群1）所作用，然后发酵性细菌将这些可溶性基质发酵为主要是有机酸、氢和 CO_2 的混合物。高于乙酸的脂肪酸，以及某些其他有机酸和醇类，由产氢（还原质子）产乙酸细菌（类群2）转换为乙酸、氢和 CO_2 。其中许多反应，除非氢分压由耗氢细菌如氢营养型产甲烷细菌维持在 10^{-3} 大气压以下，否则在热力学上是不利的。

这两个类群的净效应是转换复杂有机物质为甲烷的前体基质， H_2 — CO_2 为氢营养型产甲烷细菌（类群3）所消耗；乙酸为乙酸营养型产甲烷细菌（类群5）裂解为 CH_4 和 CO_2 。由 H_2 — CO_2 形成乙酸（类群4）的耗氢产乙酸菌的重要性还没有被广泛地研究，但Mackie和Bryant（1981）估计由此形成的乙酸在一个40℃的牛粪便消化器中只占总乙酸合成的1—2%，在一个60℃的同样消化器中占3—4%。利用标记基质的转换研究已表明，约有三分之二的甲烷是由乙酸裂解形成的，而其余的大多数是来自 CO_2 还原。这是按照列于表1的各种有机物质裂解反应的化学计量获得的结果。表1列出了由来自不同基质的乙酸形成的甲烷数量。

因此乙酸是中温性厌氧消化器中数量上最重要的产甲烷基质。撇开多聚体水解不说，一般认为脂肪酸尤其是乙酸的降解限制了基质向甲烷转换的整个速率。已知中温性产甲烷细菌裂解乙酸的有甲烷八叠球菌属和甲烷丝菌属。甲烷八叠球菌典型地形成由球状细胞组成的大封套，并利用包括乙酸、甲醇、甲胺，和有时 H_2/CO_2 在内的几种产甲烷基质。甲烷八叠球

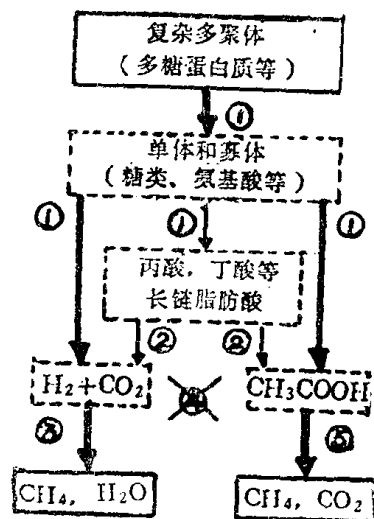


图1 一个典型厌氧消化器中形成甲烷的碳流

表1

不同基质产生乙酸和氢

反 应 物	产 物	予期由乙酸形成的%CH ₄
葡萄糖+4H ₂ O	2乙酸 ⁻ +2HCO ₃ ⁻ +4H ⁺ +4H ₂	67
缬氨酸+3H ₂ O (异丁酸 ⁻ +2H ₂ O)	(异丁酸 ⁻ +HCO ₃ ⁻ +NH ₄ ⁺ +H ⁺ +2H ₂) 2乙酸 ⁻ +H ⁺ +2H ₂	67
棕榈酸 ⁻ +7H ₂ O	8乙酸 ⁻ +7H ⁺ +14H ₂	70
苯甲酸 ⁻ +7H ₂ O	3乙酸 ⁻ +HCO ₃ ⁻ +3H ⁺ +3H ₂	80

菌在乙酸上生长时典型地具有1—2天的倍增时间(t_d)。甲烷丝菌是一种包鞘的丝状体,已知只生长于乙酸, t_d 为4—9天。甲烷八叠球菌具有比甲烷丝菌较快的生长速率,甲烷丝菌对乙酸吸收的表观 K_m 约为0.7mM,而甲烷八叠球菌的乙酸吸收表观 K_m 值为3—10mM。相对于其他细菌来说,乙酸营养型产甲烷细菌缓慢的代谢和生长速率可能限制了反应的整个速率和导致乙酸积累至抑制水平。

在高温消化器中乙酸被裂解并呈现出如同在中温消化器中那样作为一种重要的甲烷前体。只是在过去少数几年里,嗜热性乙酸营养型产甲烷细菌才被分离到。如同可以预期的那样,它们比中温性同类细菌生长更快,因此对于进行以乙酸为基质的微生物产甲烷的生理学基础研究是良好的细菌,以及具有明显的意义。下面我将描述以我们实验室所做的工作为重点的嗜热性乙酸营养型产甲烷培养物。

嗜热性甲烷八叠球菌属

一个嗜热性甲烷八叠球菌首次分离是由Zinder和Mah(1979)所描述。这个培养物,起初命名为甲烷八叠球菌TM-1菌株,现已命名为嗜热甲烷八叠球菌(*Ms. thermophila*)。TM-1菌株适宜于50℃左右生长,在这个温度生长于乙酸的 t_d 约为12小时,而在作为辅基质的乙酸存在生长于甲醇时 t_d 仅为4.5小时之短,差不多比中温性菌株生长快2倍。这个培养物被报道是不能利用H₂—CO₂的,但最近我们已获得一个能缓慢生长于H₂—CO₂的TM-1的稳定变异菌株。菌株TM-1需要污泥上清液和酵母浸出物作为营养供给物,但随后发现这些复杂的营养物可为包括镍和钙的微量元素、维生素,对-氨基苯甲酸和CO₂/碳酸盐缓冲体系所代替。乙酸营养型产甲烷细菌的培养物常被生长于培养基中缺乏碳酸氢盐和上部空间为N₂的乙酸盐上。如果接种物不携带有足够的CO₂,则可能会出现长的延滞期,因为产甲烷菌需要CO₂用于生物合成。嗜热甲烷八叠球菌的其他菌株已被分离到,包括CHTI55和CALS-1菌株。两个菌株都适宜生长于55℃,且能生长于TM-1不能生长的60℃。最近由Touzel和同事进行的DNA—DNA杂交分析结果指出,这两个菌株都与菌株TM-1非常密切相关。

嗜热性甲烷丝菌属

嗜热性甲烷丝菌属首次描述的是由Nozhevnikova和Yagodina(1983)描述的获自俄国一个高温性厌氧消化器、生长于60℃的一个乙酸盐富集培养物。富集物中的细胞是一种形态学上类似于中温性索琴氏甲烷丝菌(*Mth. soehngenei*)的具有鞘的杆菌,且含有气泡。此

富集物适宜生长于65℃,他们随后命名这个优势菌为嗜热乙酸甲烷丝菌 (*Mth.thermoacetoc-phila*)。

我们在一个58℃厌氧生物反应器中观察到一个类似的菌体,接着富集并分离到了它,给它名字为甲烷丝菌CALS-1菌株。它是一个有鞘的杆菌且含有气泡。跟索琴氏甲烷丝菌一样,此菌只利用乙酸,不含有足够的F₄₂₀来产生萤光,乙酸利用的表观K_m低于1mM。生长温度为45—68℃,倍增时间在它适宜生长温度60℃时为24小时左右,比索琴氏甲烷丝菌生长快得多。菌株CALS-1生长pH为6.0—8.0,适宜生长pH为6.5左右。所需的唯一有机微量营养物为生物素,尽管加入酵母浸提物会导致较大的生长量。菌株CALS-1受约1mM硫化物的抑制,用HS—CoM比用半胱氨酸作附加还原剂时它生长更为迅速。利用一种复杂生长培养基和通过乙酸的间歇饲喂,我们已成功地使生长物在600nm处的光密度超过1.0。此菌的迅速生长和只能生长于乙酸的特性使得甲烷丝菌菌株CALS-1成为进行由乙酸产甲烷的生物化学研究的良好菌株。

氧化乙酸的共培养物

能分解代谢乙酸为甲烷的乙酸营养型产甲烷细菌基本上是脱羧进行的,有时称作乙酸裂解反应。然而,Barker和van Niel最初提出了由乙酸产甲烷的两步机制,认为乙酸首先被氧化为H₂和CO₂,随后H₂和CO₂转换为甲烷。这两步反应机理介绍如下:

表2 由乙酸产甲烷的反应机理

机 理	反 应 物	产 物	ΔG°' (KJ/反应)
I	CH ₃ COO ⁻ + H ₂ O	CH ₄ + HCO ₃ ⁻	-31
I (a)	CH ₃ COO ⁻ + 4H ₂ O	2HCO ₃ ⁻ + 4H ₂ + H ⁺	+105
I (b)	4H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺	CH ₄ + 3H ₂ O	-136
I (a+b)	CH ₃ COO ⁻ + H ₂ O	CH ₄ + HCO ₃ ⁻	-31

甲烷八叠球菌属和甲烷丝菌属利用机理 I,即加入培养物的¹⁴CH₃COO⁻被主要代谢为¹⁴CH₄,而CH₃¹⁴COO⁻被转换为¹⁴CO₂。然而,我们发现一个嗜热性富集物利用机理 II,即¹⁴CH₃COO⁻和CH₃¹⁴COO⁻都被转换为¹⁴CO₂,随后¹⁴CO₂被还原为¹⁴CH₄。由于反应 II a是吸能的,除非H₂被有效地维持在低氢分压,因此人们不能单独分离它为纯培养。所以我们利用 McInerney 等(1977)描述的技术从富集物中分离到了一个两成员的共培养物,其中一个氢营养型的产甲烷细菌被用于形成此专性互营菌的共分离物菌落。

我们利用的氢营养型甲烷细菌分离自富集培养物。它是一个能利用H₂-CO₂或甲酸产甲烷的嗜热性杆菌,命名为甲烷杆菌THF菌株。此共分离的两成员培养物能以化学计量地转换乙酸为甲烷,在适宜温度60℃时的倍增时间为36小时左右。根据热力学知识,Zinder 和 Koch(1984)曾预言,如果两种细菌都能获得能量,氢分压预期值为3Pa左右(约3×10⁻⁵大气压)。最近我们测定了活跃地转换乙酸为甲烷的共培养物中的氢分压,发现它们为20—40Pa,比原来预言的高一个数量级。对于这种差异的部分解释包括了在60℃反应时自由能的熵效应。

我们最近利用乙烯甘油作为生长基质从这两成员培养物中分离到了这氧化乙酸的细菌。已发现此纯培养物只利用包括丙酮酸, 甘氨酸-甜菜碱, 甲酸和 H_2 - CO_2 在内的有限种类的其他基质。令人惊奇的是, 它转换 H_2 - CO_2 为乙酸, 这个由同型产乙酸菌进行的、与由互营培养物生长于乙酸上进行的反应相反的反应(反应IIa)。这个乙酸氧化菌很可能作为一个新属分类, 它的16SrRNA顺序表明它是革兰氏阳性细菌。

在厌氧消化器中乙酸互营氧化的重要性仍不清楚。在大多数研究中乙酸的甲基基团几乎完全转换为甲烷。Weber等(1984)报导, 在一个中温反应器中, 加入的 $^{14}CH_3COO^-$ 的30%左右被转换为 $^{14}CO_2$ 。令人惊奇的是也观察到 $^{14}CH_3^{14}COO^-$ 的类似转换, 对此人们早已预期应有更多的 $^{14}CO_2$ 产生。而且Phelps等(1985)发现, 当巴氏甲烷八叠球菌在硫酸盐存在下与一种氢营养型硫酸盐还原细菌共培养时能明显地氧化较多的 $^{14}CH_3COO^-$ 为 $^{14}CO_2$, 这指出乙酸裂解产甲烷细菌可以在低 H_2 条件下氧化乙酸。

TAM 菌

Ahring和Westermann(1984, 1985)描述了一种嗜热性杆状乙酸营养型甲烷细菌, 他们称之为TAM菌(嗜热性利用乙酸产甲烷细菌, Thermophilic Acetate-utilizing Methanogen)。他们曾认为它类似于甲烷丝菌, 但培养物显示出某些差异。它生长于乙酸时的倍增时间为3天, 比甲烷丝菌CALS-1菌株的倍增时间长得多, 且能生长于 H_2/CO_2 和甲酸上。而且甲烷丝菌属培养物的鞘是刚硬的和具有不变的直径, 而TAM菌的外层是波形的, 近分化阶段时被收缩。因此TAM菌可能是一个新属。复杂营养如酵母抽提液或澄清瘤胃液的加入不能提高TAM菌的生长速率, 但可减少培养物生长的延滞时间3星期至1星期。TAM菌适宜于60℃生长, 并能在70℃生长。

表3 现在已知的嗜热性乙酸营养型甲烷细菌培养物的特征概要

培 养 物	形 态 学	适宜温度 (°C)	生长于乙酸时的 最小倍增时间 (小时)	能利用的其他基质
甲烷八叠球菌	大封包状	50—55	12	甲醇, 甲胺类, H_2 - CO_2 (±)
甲烷丝菌	鞘化丝状体	60	24	未知
氧化乙酸两种菌的共培养物	两种杆菌	60	36	乙醇, 乙烯甘油, 甜菜碱等,
TAM菌	杆菌	60	60	H_2/CO_2 , 甲酸

厌氧消化器中嗜热性乙酸营养产甲烷细菌的生态学

基本上有三种类型的方法适用于测定乙酸营养型甲烷细菌的数量和活性。(1)显微镜方法(包括光学的, 荧光的和电子显微镜); (2)培养方法; (3)放射示踪方法。

甲烷八叠球菌常由于它独特的成簇状形态学而易于用显微镜识别。这种实验性鉴定可用落射荧光显微镜所确证, 因为甲烷八叠球菌含有相当数量的荧光辅因子 F_{420} , 而当受到420nm左右波长的光激发时会产生典型的兰-蓝色荧光。嗜热性消化器中甲烷八叠球菌的显微镜鉴定已为一些研究者所报导, 包括Brune等(1982)利用糠醛和乙酸的一个60℃反应器, Wiegmt和de Man(1986)在一个55℃上流式污泥床反应器中和Zinder等(1984)在一个58℃木质纤维素消化器中。甲烷八叠球菌属也被利用透射电子显微镜和扫描电个显微镜进行

实验性鉴定。甲烷丝菌属也具有独特的形态学,尤其是有液泡的嗜热性细菌,但由于甲烷丝菌属特征性地所含 F_{420} 的水平太低以致不能使细胞产生自发荧光。落射荧光显微镜这有用的方法不能利用于鉴定甲烷丝菌属。最近抗甲烷丝菌CALS-1菌株的抗体已获得。这些抗体在利用荧光技术和酶联免疫分析方法鉴定自然生境中的细菌方面可能是有用的。对菌株CALS-1的抗体对索琴氏甲烷丝菌或其他产甲烷细菌是不起反应的。但是,在它们对于自然生境中细菌的可用性被确定之前,必须弄清楚它们对于甲烷丝菌属其他嗜热性菌株的反应性。利用相差显微镜和扫描显微镜已检测到高温消化器中的象甲烷丝菌属样的细胞。

活菌计数,包括厌氧琼脂菌落计数和液体培养基中最大概率数(MPN)法测定,在测定高温消化器中乙酸产甲烷细菌数量方面的应用受到限制。甲烷八叠球菌在乙酸琼脂上会迅速形成易于识别的菌落,生长培养基中加入甲醇促进菌落形成。MPN法应该被用于计数甲烷丝菌,因为由甲烷丝菌在琼脂中形成菌落是难以获得的,除非存在着其他微生物的严重污染。在计数乙酸营养型产甲烷细菌时,由于它们缓慢而无规律的生长和它们形成大团聚体的倾向,因而使活菌数的数据阐明复杂化。甲烷八叠球菌能形成肉眼可见的相当于 $10-100\mu m$ 直径的球状聚集物,因此含有比一个 $1\mu m$ 直径的细胞多 $1,000-1,000,000$ 倍的生物质。相类似地,Zinder等(1984)观察到一个高温消化器中甲烷丝菌的菌落团聚物。甲烷丝菌在某种生长条件下也能形成几百个细胞长的丝状体,它相当于计数时一个活细胞。

$^{14}CH_3COO^-$ 转换为 $^{14}CH_4$,既可用Nelson和Zeikus(1974)的气相色谱—比例计数方法,也可用Zehnder等(1979)的闪烁小井方法进行简便地测定。从乙酸形成甲烷的速率可通过分析库池大小和转换速率来加以测定。通过改变乙酸的库池大小,Zinder等(1984)获得了高温消化器污泥由乙酸产甲烷的表观 K_m 值为 $0.3mM$,这个数值与从甲烷丝菌纯培养获得的数值十分一致。同样,各种环境干扰对这些速率的影响也可被测定。例如,已表明 $1mM$ 2-溴乙烷磺酸(BES),一种产甲烷抑制剂,能完全抑制短期培养的高温污泥中的 $^{14}CH_3COO^-$ 转换为 $^{14}CH_4$,而需要 $50mM$ BES来抑制 $^{14}CO_2$ 的还原。这些结果与长期研究的结果相十分一致。长期研究表明用 $1mM$ BES培养能引起乙酸积累,而 $50mM$ BES能引起乙酸和 H_2 的积累。

在 $55^\circ C$,甲烷八叠球菌培养物的倍增时间近 $12-15$ 小时,而甲烷丝菌约 30 小时。这显示出甲烷八叠球菌具有明显的优点。然而,嗜热甲烷八叠球菌生长的表观 K_m 为 $5-9mM$ 乙酸,而一种嗜热甲烷丝菌乙酸利用的 K_m 值低于 $1mM$,类似于中温性索琴氏甲烷丝菌。根据生长速率和亲和力,人们可以预料在高浓度乙酸条件下甲烷八叠球菌占优势,如在启动时期或高转换系统中,而甲烷丝菌在低浓度乙酸条件下占优势,如在一个具有长的生物质滞留时间的稳定运转系统中。Zinder等(1984)发现在一个 $58^\circ C$ 消化器的启动期间,甲烷八叠球菌的数量每 ml 超过 10^5 活单位,但运转几个月后,这些数量降低了3个数量级而甲烷丝菌检测却超过 $10^7/ml$ 。相类似地,Wiegant和de Man(1986)在对一个 $55^\circ C$ 饲喂乙酸的上流式厌氧污泥床反应器的研究中,能够通过调节进料速率维持流出液中的高浓度乙酸而选择甲烷八叠球菌,使乙酸降低为低水平时可选择甲烷丝菌。甲烷丝菌颗粒由于它们较紧密而且较少洗出反应器的趋势而被认为优于甲烷八叠球菌颗粒。这些结果与根据动力学所作的预言是相一致的。应该记住,这仅仅代表为这两个属之间的竞争的一个方面,许多其他因子也可能证明是重要的。

温度影响

已经发现高温厌氧消化的适宜温度范围在50—60℃, 超过60℃时速率相当慢。现有的嗜热甲烷八叠球菌培养物表明生长适宜温度为50—57℃, 在60℃的生长是亚适宜的。由作者利用不同消化器污泥和黄石国家公园藻丛材料的检测, 并没发现能适宜生长在60℃或60℃以上的甲烷八叠球菌培养物。相反甲烷丝菌菌株CALS—1能适宜生长于60℃, 65℃时生长良好, 但在70℃时不能生长。嗜热性甲烷丝菌富集物在70℃时可获得微弱生长。嗜热自养甲烷杆菌 (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) 常是高温消化器中还原CO₂的优势产甲烷菌, 生长适宜温度为65—70℃, 最高生长温度为75℃左右。从同一个58℃消化器中分离的三种细菌的温度反应表明于图2。

类似的温度反应在取自一个58℃消化器和在短期实验中用¹⁴C 标记乙酸培养的污泥种群中观察到。当甲烷八叠球菌大量存在时, 由乙酸产甲烷在58℃左右是最适宜的, 略高于甲烷八叠球菌CALS—1菌株的适宜生长温度, 且在65℃时被完全抑制。当甲烷丝菌大量存在时, 由乙酸产甲烷在65℃左右是最适宜的, 稍高于从这消化器中分离的甲烷丝菌CALS—1菌株的适宜生长温度。由¹⁴CO₂还原为¹⁴CH₄在65℃左右最适宜, 类似于CO₂还原产甲烷的优势菌嗜热自养甲烷杆菌的生长适宜温度。

由于许多发酵性细菌能够在60℃以上生长, 这些结果指出, 甲烷八叠球菌是最可能受60℃以上温度改变而抑制的细菌。这个论断受到作者实验室中一个未计划的实验的支持, 当甲烷八叠球菌成为乙酸裂解产甲烷优势菌时, 消化器温度事故性地从58℃增高至64℃约24小时, 随后整个产甲烷降低和乙酸浓度明显增加。这指出乙酸裂解产甲烷细菌是最易受温度影响的种群。当甲烷丝菌占优势时, 进行小瓶实验, 污泥培养于65℃不引起乙酸积累。这些实验表明以甲烷八叠球菌占优势的消化器对温度上升改变比以甲烷丝菌占优势的消化器更敏感。55℃对于防止甲烷八叠球菌受潜在抑制来说, 是运转的谨慎温度。

厌氧消化的上限温度还不清楚。还原CO₂的产甲烷细菌如嗜热自养甲烷杆菌和灼热嗜热甲烷菌 (*Methanothermobacter fervidus*) 能在70℃以上的温度生长, 也有一些极端嗜热的发酵性厌氧微生物, 包括最近描述的从新西兰热温泉分离的纤维分解菌, 此菌能在75℃适宜生长。至今所知还没有乙酸营养型的产甲烷菌能生长于70℃以上的温度。发现这样一个细菌, 尤其是一个淡水种, 能使在70℃以上温度进行厌氧消化成为一种现实。地热区域比其他陆地生境更加可能是极端嗜热乙酸营养型甲烷细菌的来源。

(闵 航译 钱泽澍校)

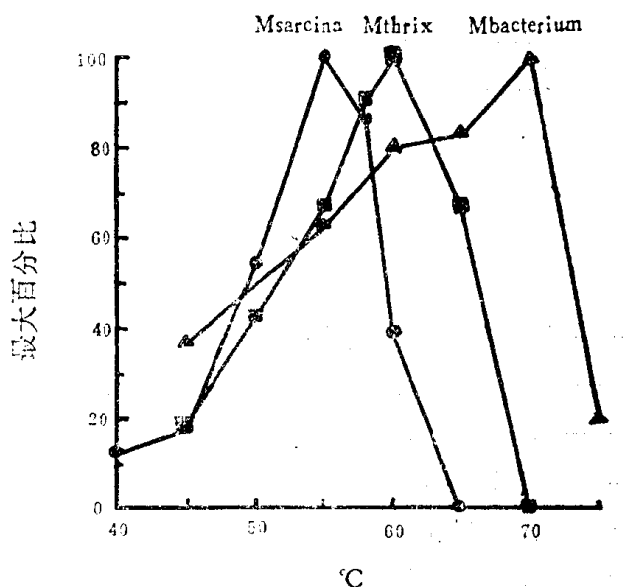


图2 甲烷八叠球菌CALS-1菌株, 甲烷丝菌CALS-1菌株和甲烷杆菌CALS-1菌株的温度反应。甲烷八叠球菌和甲烷丝菌的数据表示生长速率, 甲烷杆菌的数据是培养物培养48小时的O.D. 600nm。资料来自Zinder等(1986, 1987)。