

沼 气

(资料汇编)

第一集

科学技术文献出版社重庆分社

先 得

（一）

一

一

一

沼 气 (资料汇编)

中国科学技术情报研究所重庆分所 编辑
四川省生物研究所
科学技术文献出版社重庆分社 出版
(重庆市市中区胜利路91号)
新华书店重庆发行所 发行
重庆印制第一厂 印刷

开本: 787×1092毫米 1/16 印张: 5.25
字数: 14万 印数: 60000
1975年10月第1版 1975年10月第1次印刷

统一书号: 16178·12 定价: 0.40元

前 言

在毛主席关于群众办沼气“这要好好地推广”的号召下，全国农村兴起了大办沼气的群众运动。

沼气是一种取之不尽、用之不竭的生物能源。人工造沼气代替柴、煤是解决农村燃料问题的一项创举。大办沼气不仅可以解决燃料、照明，还可以扩大肥源，实现秸秆还田，改良土壤，促进农、林、牧、副业生产；还可以改善农村环境卫生，除害灭病；还可以代替柴油、汽油开动机器，进行农副产品加工、排灌和发电。总之，农村办沼气对巩固和发展集体经济，改善社员生活，缩小三大差别，建设社会主义新农村都有重要意义。是落实毛主席“备战、备荒、为人民”伟大指示的重要措施。

为配合沼气生产和科学试验活动，我们选编了这本资料，供从事沼气生产、科研的同志参考。

由于我们水平所限，不当之处欢迎批评指正。

四川省生物研究所
中国科技情报所重庆分所

目 录

全国沼气利用发展简况.....	(1)
微生物形成的甲烷.....	(5)
厌氧消化的微生物学.....	(20)
厌氧处理法和甲烷生产.....	(36)
有机性废水的厌氧处理和沼气的回收.....	(39)
把沼气生产作为废物循环系统的一部分.....	(46)
持久的沼气回收系统.....	(52)
加进农产废料提高牛粪的沼气产量.....	(54)
生物法处理禽粪减少污染.....	(57)
家庭用的甲烷发生器.....	(59)
微生物和固体废物处理.....	(61)
从鸡粪消化作用中回收甲烷.....	(61)
在含分子氢的培养基中计算产甲烷细菌数量的方法.....	(63)
短期温度变化对甲烷产生的影响.....	(64)
名 词 解 释.....	(60)
附：有关沼气的资料题录.....	(65)

全国沼气利用发展简况

四川省生物研究所沼气组

人工造沼气是一九五八年在三面红旗的光辉照耀下，出现的新生事物。我们伟大领袖毛主席视察武汉地方工业产品展览会时，参观了沼气，并指示说：“这要好好地推广”。在毛主席指示的鼓舞下，沼气的推广和利用工作取得了很大的进展。当时在湖北、安徽、广东、湖南、四川、浙江、河北等省，都曾掀起了群众性的大办沼气的高潮，并创造发明了不少先进技术和先进方法。如安徽阜阳县创造了浮动气罩式沼气池；湖北省工业厅设计了水压式沼气池；湖北沙阳农场等单位用沼气发电；武汉市公用汽车公司用沼气开汽车；中国科学院北京微生物研究所作了沼气发酵条件试验；原中国农业科学院沼气研究所在安徽等地作了沼气池型结构及沼气发酵条件的试验；湖北省生物能源利用研究组与有关单位协作，将沼气中含有30—40%的二氧化碳制成干冰；青岛市污水处理厂利用沼气发酵对杀卵灭病进行了试验等等。一九五八年下半年，农林部在广东鹤山县召开了全国沼气现场会，大办沼气的群众运动更加蓬蓬勃勃地开展。后来，由于刘少奇反革命修正主义路线的干扰和破坏。在办沼气的过程中不搞小、土、群，搞大、洋、专，用群众迫切希望解决的燃料问题结合不紧密，再加上有些技术问题没有得到及时、科学地解决，因此，沼气的推广和利用没有得到应有的发展。无产阶级文化大革命摧毁了刘少奇、林彪两个资产阶级司令部，批判了他们的反革命修正主义路线，调动了广大群众的社会主义积极性。在毛主席革命路线指引下，农村办沼气的群众运动又蓬蓬勃勃地开展起来。

一九七二年十一月，中国科学院和农林部在四川省中江县召开了全国沼气现场经验交流会；今年四月，国家计委、中国科学院、农林部又在四川绵阳县召开了全国沼气推广利用经验交流会。现全国已有三分之二以上的省、市、自治区进行了沼气的推广和利用工作，并取得了可喜的成绩。据一九七五年三月份统计，全国建池总数达到四十六万三千多个。其中，四川发展较快，已达四十一万多个。湖南、河北、河南等省的试点工作也有一定的进展，建池数量都在五

千以上。推广较好的地区，已开始由零星试点向集中成片推广的方向发展。全国已有三十三个公社，二百多个生产大队，二千多个生产队基本实现了沼气化（百分之七十以上的农户使用沼气烧饭、点灯）。黑龙江省桦南县试办沼气的成功，为我国北方寒冷地区推广沼气作出了样板。

随着大办沼气的群众运动蓬勃发展。各省、市、自治区相应地建立了三结合的科学实验网。大办沼气的科研队伍迅速地成长起来。广大干部和群众创造发明了许多先进技术和先进经验。专业研究人员深入生产实际，向广大干部和群众学习，总结他们的好经验，并和他们一起进行科学实验及推广和利用。为巩固和发展大办沼气群众运动打下了良好的基础。

沼气不仅应用于农村，还广泛应用于城市。西安，抚顺，青岛，成都和南阳酒精厂等，利用沼气发酵处理城市的生活污水、废渣及工业废水，废渣，减少城市的环境污染，改善环境卫生，又可变废为宝，为人民造福。

沼气还是很重要的化工原料。河南省南阳酒精厂和西安污水处理厂等单位，利用沼气制取一氯甲烷，二氯甲烷，三氯甲烷，四氯化碳，沼气发酵液还可提取维生素B₁₂。

大办沼气，是一件有利于国家，有利于集体，有利于社员，是一举数得的大好事。它为农村解决燃料来源开辟了新的途径；而且可以扩大肥源，为农业生产提供大量的优质有机肥料；可以节约大量的劳动力，充实加强农业生产第一线；可以扩大饲料来源，促进养猪事业的发展；可以保护林木资源，发展植树造林；可以改善农村的卫生条件，有利于除害灭病，巩固血防成果；可以节约大量的煤炭，支援国家工业建设；可以提供新的动力资源，加速农村“四化”（机械化，电气化，水利化，化学化）的步伐；可以促进农村的文化教育事业的发展等等。总之，大办沼气，是自然界取之不尽，用之不竭的生物能源，是解决农村燃料问题的一项创举，它有利于进一步发展安定团结的大好形势，有利于巩固和发展集体经济，有利于缩小三大差别（城乡差别、工农差别、脑力劳动和体力劳动之间的差别），对建设社会主义新农村具有重要意义。

一九七五年四月，国家计委、中国科学院、农林部在四川召开了全国沼气推广利用经验交流会，不少单位介绍了大办沼气的经验。大致有以下几方面：

（一）根本在路线，关键在领导。

沼气要发展，根本在路线，关键在领导。毛主席教导我们：“思想上政治上的路线正确与否是决定一切的。”路线不端正沼气就推不开，就是暂时搞起来了也难以巩固。路线端正了领导就是关键。所以必须首先解决各级领导对大办沼气重大意义的认识。根据各地的实践，在开始推广沼气的时候，一般遇到这样三种思想认识问题：“过去搞过没有成功，现在又怕搞不成”；“办沼气是生活小事，怕方向不对头”；“农业要大干快上，搞沼气怕影响农业生产”等等。群众办沼气，一九五八年各地曾经搞过并取得了一些成绩。后来之所以没有巩固发展下来，主要是由于刘少奇的修正主义路线的干扰和破坏。经过无产阶级文化大革命和批林批孔运动，广大干部和群众从路线斗争的高度总结了过去办沼气的经验教训，明确了方向，提高了执行毛主席革命路线的自觉性，群众办沼气又蓬勃发展起来。事实证明，只要坚持党的基本路线，用马列主义、毛泽东思想宣传发动群众，沼气推广工作就一定能搞好。

毛主席教导我们：“我们应该深刻地注意群众生活的问题，从土地、劳动问题，到柴米油盐问题。”农村办沼气，解决缺柴问题决不是生活小事，而是关心群众生活，促进农业生产的大事。如果不去解决，就会影响群众生活的安定，影响集体生产，还会给农村资本主义势力以可乘之机。所以办沼气不是生活小事而是大事。

群众办沼气是需要安排一定的人力、物力，但只要发动群众，在工作上安排得当，不仅不会影响农田基本建设，相反，由于解决了燃料、饲料、肥料的矛盾，进一步解决了农村劳动力，能促进农业大干快上，加快“农业学大寨”群众运动的步伐。

（二）抓好典型，放手发动群众。

农村办沼气，是一个新生事物。广大群众对它有一个认识过程。群众思想上存在的问题，主要是怀疑沼气是否真正能煮饭、点灯，能不能办得起来。解决这个问题，最有效的方法是认真抓好典型。用典型引路，使广大干部和群众真正尝到办沼气的甜头。喊破嗓子，不如做出样子。办成一个沼气池，就是一个宣

传站。搞好一个点，影响一大片。一些实现沼汽化的公社和大队，一般都经过试点、推广，普及三个阶段，这是一个成功的经验。

群众一旦看到办沼气的益处，就对办沼气产生强烈的愿望和很大的积极性、创造性。实践证明，只要依靠群众，充分发动群众，建池所需的资金、材料和劳动力就不难解决，就能多快好省办沼气。四川省实现沼汽化的生产队、大队、公社，从试点成功到基本普及沼汽化的时间，有的生产队只用了二十多天，有的大队只用了五十多天，有的公社不到半年。

（三）坚持自力更生、土法上马、因地制宜就地取材。

坚持自力更生，因地制宜，采取“以小为主，以土为主，以社员自办为主，国家、集体扶持为辅”的建池方针，沼气的推广和发展就快。

各地区为了解决物资材料问题。广大干部和群众发扬敢想、敢干、敢创造的革命精神，因地制宜，就地取材，闯出了一条新路子。例如用当地乱石、片石、卵石建池；用三合土节约代用水泥；利用各种废旧材料制出了简易适用的灯具、炉具，深受群众欢迎。

（四）正确处理办沼气中的政策问题。

落实党的政策，解决具体问题，有利于充分调动群众建池的积极性及巩固和提高沼气的推广。农村办沼气，牵涉到一系列政策问题。如建池用工、用地、资金、投料、用肥等，都关系到社员个人和生产队的利益，必须按照党的方针政策正确处理。

四川省在办沼气的过程，根据实际情况制定了一些政策，对于调动广大贫下中农的积极性。打击资本主义自发势力，起了好的作用。如建池次序：优先照顾贫下中农困难户、烈军属、知识青年；建池资金：以社员自筹为主，对确有困难的贫下中农，由集体适当补助、借支或由信用社贷款；建池用地：要统筹安排，一般不占用集体用地；建池用工：实行“自办为主，定额补助，节约归己，超出自付”的办法；肥料管理：实行“集体用肥，社员用气”。社员投入沼气池的人畜粪便、青杂草由集体按质按量评记工分。

（五）大力培训技术骨干，搞好管理使用。

大力培训技术骨干是保证沼气发展和提高的重要条件。培训技术队伍要坚持政治挂帅，思想领先：做到组织上有人抓，政治上严格要求，技术上帮助提高；在于中学，学中干，采取“滚雪球”的办法培训技术队伍。在普及沼气的地区，一般每个生产队要有

二至三个不脱产的沼气技术员，负责解决建池、维修、管理使用中的技术问题。

在普及推广沼气的同时，必须十分重视抓巩固提高工作。如果只顾发展，不抓巩固，已经建起的沼气池也不能正常产气，就会挫伤群众的积极性，影响沼气的进一步推广。沼气推广好的地区，必须十分重视抓管理使用，不断总结和推广群众中管理使用沼气池的先进经验，制订管理使用条例，大力宣传普及科学知识，加强安全使用沼气的教育等，作到发展一批巩固一批。

三

大办沼气群众运动的发展，给科学研究工作提出了迫切需要解决的问题。一九七三年中国科学院把农村沼气的研究，列为全国重点项目，并下达了农村沼气的制取和利用的研究项目。这两年多来，各地在沼气科研工作中，大搞群众运动，作了大量的工作，并取得了一定的成果。

中国科学院南京古生物研究所、广州地下热能研究所等单位，在池型结构和发酵条件方面作了很多研究。浙江、四川等省有关科研单位和学校，结合农村办沼气开展了沼气菌种、除害灭病和肥效对比等方面的研究，取得了一定的进展。

(一) 池型结构的研究

群众说：“有气无气在于建。”说明建池的重要。那末什么样的池型结构，既省工、省料又有利于沼气的发酵呢？我们应当按照毛主席关于：“人民群众有无限的创造力。他们可以组织起来，向一切可以发挥自己力量的地方和部门进军，向生产的深度和广度进军，替自己创造日益增多的福利事业。”的教导。充分发动群众，依靠群众，发挥群众的智慧。我国是一个地大，地形复杂，气候差异大的国家，广大干部和群众，根据当地的地质结构，气候条件，就地取材，因地制宜，创造发明了很多不同类型池型结构的沼气池。就池型来说：过去多采用长方形，目前趋向于圆形（椭圆形、坛子形）。圆形是在长方形发展而来的。根据群众的反映：圆形池有以下几个优点：1.省工、省料；2.有利于保温；3.受力均匀，较牢固；4.没有死角，有利于搅拌。还有一种沼气池是拱顶隧道式的，农村社员的沼气池的容积一般在10立方米左右。四川省蓬溪县星花公社星花大队为解决用气和用肥的矛盾，修建了集体沼气池。池容在100立方米左右。平时将从社员的沼气池挑出的粪水（沼气发酵液）储存在集体沼气池中。当农业大量需用肥料季

节，取用集体沼气池的粪水，不影响社员用气，并且集体沼气池产生的沼气供作动力用。从结构来说：在丘陵地区多采用连山石（在整块石头上挖沼气池）。这种沼气池牢固、成本低；还有用条石、片石等建池的。平坝地区一般采用卵石、三合土、砖或干打垒结构。现在不仅在地形、土质等自然条件好的地方，取得了丰富的建池经验，并且在自然条件不好的地方，如流沙土层、地下水位高等地方也能因地制宜，就地取材，成批地修建沼气池。在水泥上，找到了节约代用的途径。一个10立方米的沼气池水泥用量降至一、二百市斤。四川省南部等县将砖头、瓦块、炭渣用粉碎机粉碎，加进适当的石灰（按三或四比一配制），最后用卤水抹。这样建成的沼气池成本低，群众很欢迎。

实践证明，将厕所、猪圈修在沼气池上面，并连通起来的“三结合”的沼气池。这样，有利于加强粪便管理，杀灭或沉降寄生虫卵。粪便在密闭的条件下发酵，氨态氮不致损失，比敞粪坑有利于造肥。同时可以节约给沼气池加料的劳力及有利于保温，提高产气率。这种“三结合”的沼气池，将产沼气、造肥、粪管三者结合起来，好处多，应该大力提倡。

目前较普遍将沼气池盖板修成活动盖（俗名印盒子），活动盖的优点是便于沼气池检修、管理（例如进出料、搅拌和打破结壳等）和安全。

在北方地区，一般将沼气池修在冰冻线以下和采取除了在沼气池上面加泥土、稻草秆等覆盖物保温外，还创造了多种方式保温或加温。例如黑龙江省桦南县冬天气温降至零下30℃，将沼气池建在火坑下面，仍能正常产气。河南省南阳市红旗公社潘庄一队，修建堆肥加温沼气池。在一个圆柱体内堆肥发酵达65℃左右，产生的热量传给周围的同心圆环形沼气池，在初冬时这种沼气池比一般沼气池的池温高5℃左右。

(二) 沼气优良菌种的筛选

沼气发酵分腐败阶段和甲烷产生阶段。前者为腐败菌的作用，后者为甲烷菌的作用。这两类菌统称为沼气发酵菌。

在优良菌种的筛选上，根据农村沼气发酵的条件和产沼气是甲烷菌代谢结果的特点，进行了活性污泥混合菌种和混合甲烷菌种的筛选工作，将筛选出的菌种经农村沼气池作了比较试验。实验室试验结果：筛选出的菌种在常温（26℃左右）下进行发酵。日产气量达到0.47—0.48立方米沼气/立方米沼气发酵池，甲烷含量达到71—79.4%。而一般农村管理得好的沼气池的日产气量，冬天大约为0.06—0.1立方米沼气/立方米沼气发酵池，夏季大约达到0.1—0.4立方米沼气/立方米沼气发酵池，甲烷含量达50—65%左右。不论是

在实验室，还是在农村沼气池，加了菌种的总比不加菌种产气要快，产气要多，气体质量要高。所以，一般新建沼气池第一次装料时，必须事先将发酵料进行堆沤之后，再装料进池，这样作的好处是：（1）堆沤的过程也是沼气细菌增殖的过程，增加了沼气细菌；（2）有利于沼气细菌对营养的吸收利用；（3）防止发酵料在水面结壳。有条件的地方，可从老沼气池中担几十挑沼气池底脚污泥或沼气发酵液，也可从粪坑、屠宰场、酒精厂等取阴沟污泥，它们中间有很多沼气细菌，可以作为菌种用。老沼气池每次大换料时，不要把沼气池底脚污泥担完，至少要保留三分之一的底脚污泥作菌种用。因绝大部分沼气菌种在沼气池底脚污泥中。

沼气发酵与温度有密切的关系。在一定范围内，温度越高，产气量也越高。根据这一特点，将采集的活性污泥放在恒温箱进行培养，温度由常温逐步上升，一直升到55—56℃。当pH值稳定即表示高温菌种已经培养成功。目前高温沼气发酵在工业上采用得比较多。

（三）农村沼气池的科学管理

群众说得好：“三分建池，七分管理。”说明建池之后，装料管理非常重要。沼气池的建成，为贮藏发酵原料，产生和贮藏沼气创造了条件。但产生沼气的内因是多种厌氧性细菌在适宜生活环境中，发酵分解有机物质的结果。为了保证沼气池发酵的正常进行，满足一年四季用气的需要，必须加强沼气池的科学管理。特别是冬季，由于气温低，甲烷细菌生命活动缓慢。必须采取有效措施，保证甲烷细菌有适宜的生活环境，加速它们的代谢活动，提高产气量。冬季的各项措施不仅适用于冬季，同样适用于其它任何季节。只要管理得好，一年四季都能满足社员用气的需要。

群众的经验和试验结果，概括为：

三勤：勤出料、勤进料、勤搅拌，三勤是一项关键性措施。勤出料是出掉旧料。勤进料是补足新料，满足沼气细菌所需的养料。勤搅拌是防止或打散沼气池上层结壳，使沼气发酵物均匀，有利于产生的气体释放出来。

二配：合理配料，配精料。沼气发酵的最适干物质含量为百分之八至十，最适含水量为百分之九十至九十二。所谓精料就是好料如稻草、麦草、青杂草、玉米秆和一些热性原料，还有三合粪（牛粪、猪粪、人粪）。

二保：保持发酵液的酸碱度，保持发酵池气箱大小。沼气发酵要求酸碱度的pH值为七至八。保持发

酵池气箱大小，主要是冬季，因气温低，产气慢，保持一定气箱大小，贮存适当量的沼气，便于使用。当然气箱不宜太大，也不宜太小，要合适。一般气箱的高度，长方形的沼气池为1/5左右，圆形沼气池为1/4左右。

一提：提高沼气发酵池的温度。沼气发酵在一定的温度范围内，随着温度升高，产气量也升高。冬季气温低，必须设法保持和提高沼气池的温度，以利沼气细菌的生命活动，提高产气量。

（四）沼气池肥效的研究

群众说得好：“沼气肥看起来象清水，用起来如氨水”。沼气肥是优质的有机肥料。实验室和田间试验的结果是：沼气肥比敞粪坑肥的含氮多百分之十四，氨态氮多百分之十九点三，有效磷增加百分之三十八点八。沼气肥在不同的作物上均有不同程度的增产效果。旱地作物的增产效果较显著。

（五）沼气池对沉卵、灭菌的研究

沼气池中的血吸虫和钩虫卵，经八至一百天都全部或绝大部份死亡。部份病原微生物很快死亡（钩端螺旋体及痢疾杆菌），大肠杆菌指数下降非常显著。

使用粪液在静止状态下，沉卵效果良好（虫卵数减少百分之九十三点六至九十九点九）。舀粪时分层取样，舀至二米深时，舀出粪液的虫卵数只占出料池全部粪液中虫卵总数的百分之二十一点一至百分之二十四，与进口粪液相比较，虫卵仍然减少百分之九十一一点六至百分之九十一一点七。未曾从中孵化出血吸虫毛蚴。检查出的钩虫卵（蚴）也很少。表明沼气池密封发酵确有一定的沉卵灭菌效果。

但由于虫卵大部分积存于粪渣、粪皮中，舀出粪液超过二米（浅池1米时），搅动了下层粪渣、粪液中的虫卵数迅速增加。因经常有鲜粪入池，加料半年后，蛔虫卵平均存活率尚高达百分之五十三点五。还不能加速伤寒杆菌的死亡，出口粪液中的大肠杆菌指数，尚未达到无害的要求。

（六）综合利用

甲烷发酵目前已广泛应用于废水废渣的处理，成为保护环境的一个重要手段，日益受到人们的重视。

城市的污水处理厂利用沼气池发酵进行处理。酒精厂、丙酮丁醇厂、糖厂、屠宰厂、味精厂、制药厂及一些有机化工厂等，易于腐败的高浓度的有机物质的废水、废渣，BOD（生化需氧量）为5000—10000ppm，都可以利用沼气池发酵进行处理。本法的优点是成本低，节约电力，可以回收甲烷。但必须注意，

有些工业废水、废渣，经沼气池消化后的水中仍含有较高的BOD时，还必须再进行活化污泥或生物滤池法处理。一般BOD在2000 ppm以下的废水、废渣适用于活性污泥或生物滤池为宜。这样处理的废水、废渣才能用来灌溉或排入江河。

经沼气池发酵所产生的沼气，不仅作燃料，作动力，还可做有机化工原料。所以通过沼气处理，既可净化污水，处理废水废渣，改善环境卫生，又可变害为利，化废为宝，大搞综合利用，为人民造福。

微生物形成的甲烷

I. 甲烷细菌生态学概述

甲烷的形成是一小群细菌所特有的一种生物过程。对这类细菌了解得不多，而且难于取得纯培养菌。然而在自然界中甲烷的生物形成是普遍的，在有机物急剧分解的无氧环境中容易找到甲烷细菌。在这种环境下，这类细菌是微生物食物链中的最终微生物。如图1所示，有机聚合物（如纤维素）被胞外纤维素酶水解为糖类，再经过发酵成为各种化合物：脂肪酸，乙醇，二氧化碳和氢。其中有些化合物，例如醋酸盐，甲醇，或二氧化碳和氢是甲烷细菌最好的底物。烃类化合物中最简单的一员——甲烷是不易于溶解的，在无氧条件下基本上是惰性的，并易于挥发。因而，这种最终还原产物具有无毒的性质，易于从无氧环境中逸出。在湖沼的黑污泥中，这种厌氧微生物食物链活动良好，因在这些地方，纤维素易于分解。在煤矿也会有甲烷的聚积，认为是在煤炭形成时截留的。石炭纪沼泽一定也是甲烷细菌理想的环境。

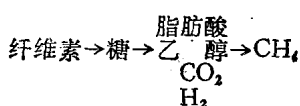


图1. 纤维素通过厌氧微生物食物链转化为甲烷

甲烷在动物消化道中一般都能产生，在这里类似的厌氧微生物食物链对于食物的降解是重要的。在所有产生大量甲烷的动物当中，研究得最多的是牛。一头大乳牛的瘤胃中含有100升发酵的植物产物。从这100升的发酵“桶”中，每天可以产生200多升甲烷。产生的这些气体在嗝气时逸出。每年来认为牛瘤胃生成的甲烷是一个浪费过程，大约丧失了8—10%的能量。在非反刍动物中，盲肠看来是一个进行纤维素厌氧消化的器官。盲肠中的微生物类型与瘤胃中的近似，盲肠类似恒化器的性质也与瘤胃相似。有人研究过人肠道中肠胃气体的形成，和食物成分与产气量的关系。有一种猿猴的食物是由叶子组成的，这种动物的胃内

有一小囊，其pH值保持在中性以下，纤维素大部分在此分解，实际上也是产甲烷发酵过程。

甲烷发酵做为动力的例子是在污水处理工厂污泥发酵产生的。已经设计出一种无氧环境，可使污水需氧处理部分中的污泥在厌氧条件下进行消化。新式的发酵池可以盛100,000立方英尺的发酵污泥。用这种污泥消化设备产生的大量甲烷，可供发动柴油机用，产生的动力可用于抽提污泥，或供污水工厂的需氧处理阶段鼓风之用。也可用于发电。许多这类设备、柴油机冷却用水流经发酵池不断循环，借以保持消化器的温度在38°C左右。虽然氢是无氧环境中各类微生物对糖类降解的主要产物，但实际上氢的量是不易测出的。

II. 甲烷细菌的分离

A. 富集

富集氢-氧化的厌氧微生物时，一般多采用Bryant(1968)所述的200毫升培养瓶。接种体置于含有所需培养基的瓶中，培养瓶在旋转摇床上振动时通入氢和二氧化碳混合气体(80:20)。所培养的微生物分离到密封的管内，管内含有固体培养基和氢-二氧化碳混合气体(80:20)，详见下文。管子在保温时，如产生负压，可能就含有使氢氧化的厌氧微生物。

污泥，瘤胃液或肠道内含物可以认为是天然的甲烷细菌的富集体，可以直接划线培养或是经过适当稀释然后在琼脂卷管(agar roll tube)内划线或“制平板”，如下文所述。检查含有分离菌落的管子是否有甲烷存在。将有甲烷的试管中的菌落挑出后，在新鲜培养基上划线接种；保温后，取样测定气体中的甲烷。

B. 洪格特(Hungate)氏技术

洪格特氏技术既是分离甲烷细菌为纯培养菌的选择方法，同时也是保存原种菌株的方法。这一方法的优点在于能利用一般实验室设备即可进行。近十几年

来对洪格特氏法已有种种改良，但是这一技术的基本部分主要是在完全无氧的条件下制备培养基和培养基灭菌。图2是洪格特技术改良法之一。在一个500毫升普通圆底烧瓶内装入200毫升水，再加入培养基的各种组份。用一个2毫升注射器和一18号针头先制成一打气探头。针头弯曲如图所示，针尖锉平，取下活塞，针筒内用棉花填充。安装好后全部进行灭菌。灭菌后，与一橡皮管联接，输入混合气体，气体要先通过一灼热的铜柱，以除去气体中微量的氧。这样处理过的无氧气体或混合气体通入烧瓶，排除空气。当气体通过煮沸的培养基表面时，培养基轻轻沸腾。当培养基完全还原（可在培养基中加入还原作用刃天青指示剂显示），即可移入试管内。移入时可用嘴管与一吸管相联，或用吸管球均可，如图2A所示。不论采

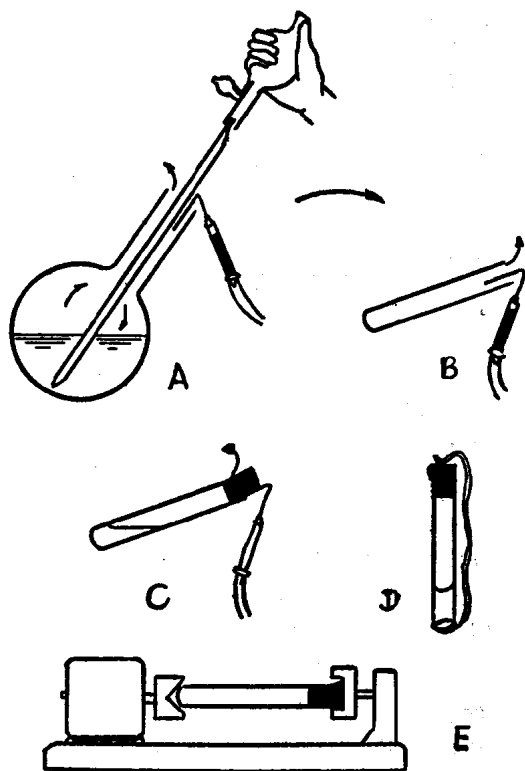


图2. 洪格特技术示意图

用何种方法，吸管必须先用培养基上面的气体冲洗、填充，然后插入培养基的下层。这样，当培养基移入试管时，培养基就处于无氧气体层的下面。另一打气探头置于一空试管内（见图2B），将吸入培养基的吸管迅速移入此试管中，同时在不断打气的情况下，放出培养基。硬质黑橡皮塞置于试管口部时仍继续打气（见图2C），然后取出打气探头，塞紧橡皮塞，这是洪格特技术最关键的地方。此项操作必须熟练利落才不致有空气截留。在用蒸汽压灭菌时，橡皮塞必

须夹住。单支试管的夹子可用衣架铁丝制成（图2D），如果是一架试管可以夹于两块板之间。塞有橡皮塞的试管可反复进行蒸汽灭菌。经过灭菌后的试管冷却至50℃，取下夹具，在室温下可保存数月。琼脂培养基的卷管是将试管在水龙头下的冷水中不断转动制成的，或者将琼脂管置于旋转器上使其凝固（见图2E）。当琼脂围绕管壁完全凝固后，琼脂卷管即可垂直放置储存，并可使少量水分集中在管底。近来卷管用途颇广，对厌氧划线平板有不少优点。灭菌卷管接种时，橡皮塞按常规在火焰上烧片刻。稍冷后，用指头捏住塞子的末端，松动瓶口。在取下瓶塞之前，针筒打气探头对着喷灯火焰，当喷出的气流对准火焰时，气流调节到正好能稳定地改变火焰形状。于是探头的针头迅速通过火焰灭菌。这一操作的时间要配合好，当橡皮塞一取下，灭菌的打气探头迅即通入管内。近年来出现了一种电动机带动的试管划线器，图3即为其中一种。当试管在同步电动机（60转/分）旋转时，接种环上的接种体越过打气探头伸至管底。接种环轻轻靠近琼脂表面，慢慢向管口方向划动。此操作完成后，捏住置于无尘环境下的橡皮塞大的一端在火焰上烧一烧，接着打气探头塞住管口。在针头快速取下前，要通气15—20秒。管口一端在火焰上烧片刻，旋紧管塞。划线后的卷管直立保温，如图4所示。这一技术的优点在于分离的一个个菌落多出现在管口附近，因为在划线过程，接种体已逐渐稀释。

洪格特技术已开始受到注意，它可以说是最严格的厌氧技术。至于改良技术还可参考其它有关资料。洪格特本人却愿意使用灭菌的皮下注射器，在无菌状态下加入接种体或取出样品。这种改良方法是将注射器针头穿入橡皮塞，而不需将管塞取下。Bryant认为培养基在圆底烧瓶中灭菌较好，然后分装在无氧试管中。

如使用100%二氧化碳或 $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ (90:1)，洪格特技术最易完成。因为二氧化碳比空气重，启开管塞不致有空气截留。如使用100%氢，在技术上最为困难，

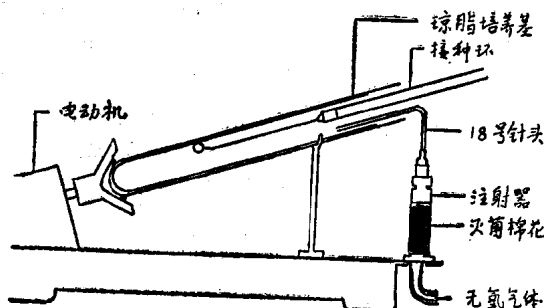


图3. 洪格特技术卷管划线接种的装置

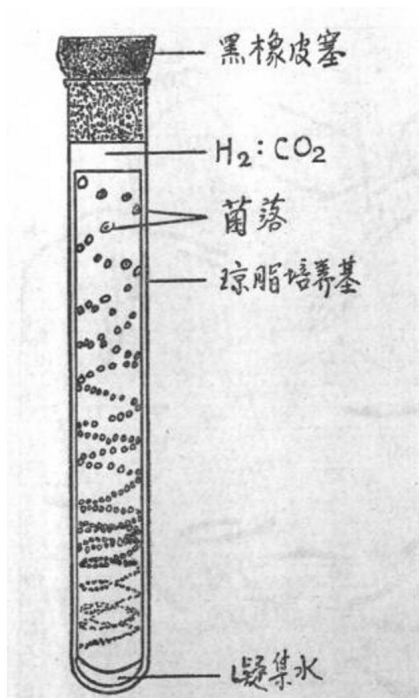


图4. 划线接种的洪格特卷管保温后的外观。
分散的菌落多在管口附近。

因氢冲出管口时，空气也随之而入。 $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ (50:

50) 混合气体困难较小；有的使用80:20混合气体获得成功。对于不需氢的细菌，氩(其密度与空气相近)是通常使用的一种气体。

甲烷细菌的储备培养可用洪格特技术保存。琼脂深层培养或斜面培养可用穿刺接种，保温后置于 -70°C 下。

Ⅲ. 甲烷细菌的特征

A. 形态学类型

现今纯培养的甲烷细菌具有各种各样的细菌形态类型。近年来Paul H. Smith曾从污泥中分离出甲烷细菌。从他分离出的细菌的相差显微照相说明了甲烷细菌的形态类型。图5所示的甲烷球菌(*Methanococcus*)表明其球菌形态。图6为反刍甲烷杆菌(*Methanobacterium ruminantium*)，串链中的球菌；图7为同样的球菌但细胞较小；图8为巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*)的八叠球菌。图10为甲酸甲烷杆菌(*Methanobacterium formicicum*)的杆状菌。图9和11为一种甲酸甲烷杆菌的类型和甲烷杆菌(*Methanobacterium M. o. H.*)。图12为甲烷螺旋菌(*Methanospirillum*)的长波浪螺旋体。图13为甲烷螺旋菌更为明显的螺旋形态。

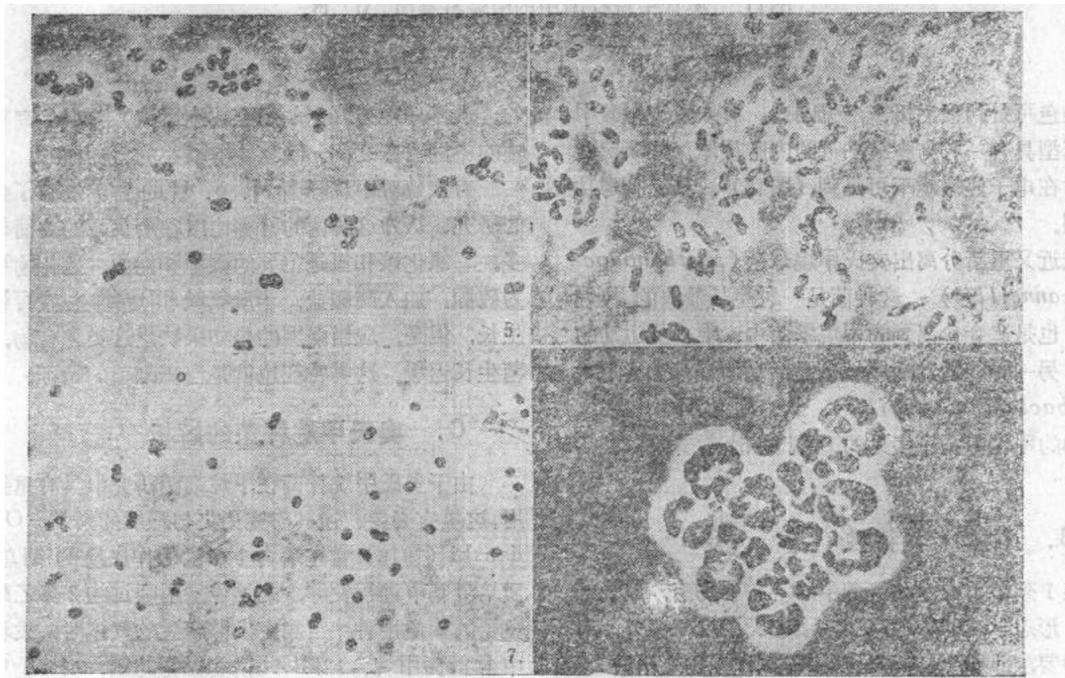


图5—8

图5. 甲烷球菌相差显微照相。

图7. 瘤胃甲烷杆菌。此培养菌的细胞的大小仅及其它菌株的一半。

图6. 反刍甲烷杆菌。

图8. 巴氏甲烷八叠球菌。

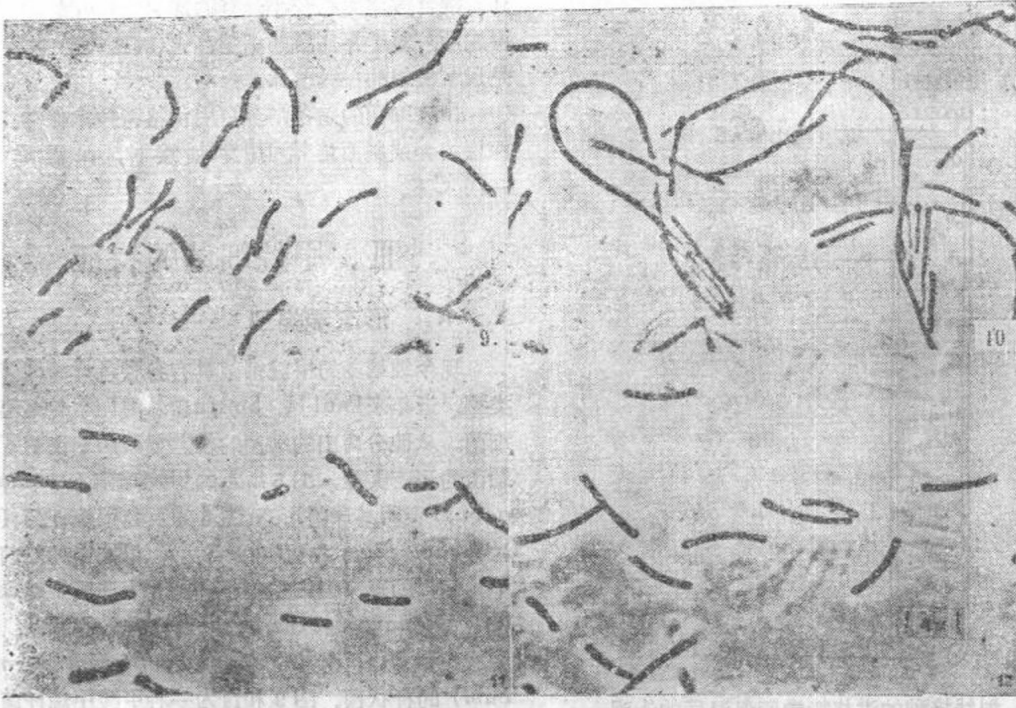


图9—12

图9. 与甲烷杆菌 *M. o. H* 相近的甲烷杆菌。

图10. 甲酸甲烷杆菌。

图11. 奥氏甲烷杆菌中的甲烷杆菌 *M. o. H*。

图12. 甲烷螺旋菌属。

鞭毛染色可看到鞭毛极簇，见图14。有人发现甲酸甲烷杆菌型具有一种与胞膜贴近的内胞质体，经磷钨酸染色后在电子显微镜下可见到（图15），其结构与功能不明。

最近又重新分离出文氏甲烷球菌 (*Methanococcus vanneillii*)，这种菌是一种生长最快的甲烷细菌，也是迄今分离到的甲烷细菌中，唯一能运动的球菌。另一种能运动的甲烷菌是活动甲烷杆菌 (*Methanobacterium mobilis*)，从牛瘤胃分离出来。能活动的甲烷菌是不多见的，观察时看来都不活泼。

B. 种类及其特性

表1列举了现今纯培养中的各种甲烷菌，以及栖息地，形态学，营养和底物。除巴氏甲烷杆菌外，对底物的要求都很严格，不是氢和二氧化碳就是甲酸盐。而甲酸盐又可转变为氢和二氧化碳。作为这类细菌的主要氮源是铵离子，有的菌种需要存在反刍胃液中的未知生长因子。醋酸盐对许多的菌种有高度刺激作用，而2-甲基丁酸盐对于有的细菌形成支链碳架是需要

的。从不同地方（例如污泥或瘤胃液）分离的同种细菌的不同菌株之间，观察到有很小的营养差异。

有人曾对甲烷杆菌 *M. o. H* 的营养进行了全面的研究，认为这种菌的营养比以往所设想的要简单得多。二氧化碳和氢是主要的碳源和能源。硫化物可作为硫源。加入醋酸盐，半胱氨酸和B族维生素可刺激生长，但是，应当强调的是如果缺乏这类化合物，细菌生长迟缓。这种特征也就是自养细菌的特征。

C. 奥氏甲烷杆菌的解析

由于奥氏甲烷杆菌在甲烷细菌研究中具有重要作用，这里有必要叙述其研究历史与最后的解析。Omelianski (1916) 曾在含1%乙醇作底物的简单矿物质培养基中进行发酵，此培养基用喂过约2%乙醇的兔子的粪便接种。当测定发酵产生的气体时，发现其中含88%甲烷，12%CO₂，和微量的氢。培养物中有大量长形弯曲的杆状菌。Barker (1936, 1940) 使用一种加入充分的乙醇和碳酸盐的培养基，从一地区的泥浆中获得一株，与 Omelianski 所述的近似。以后Barker又从旧金山海湾泥浆中分离到同样的菌

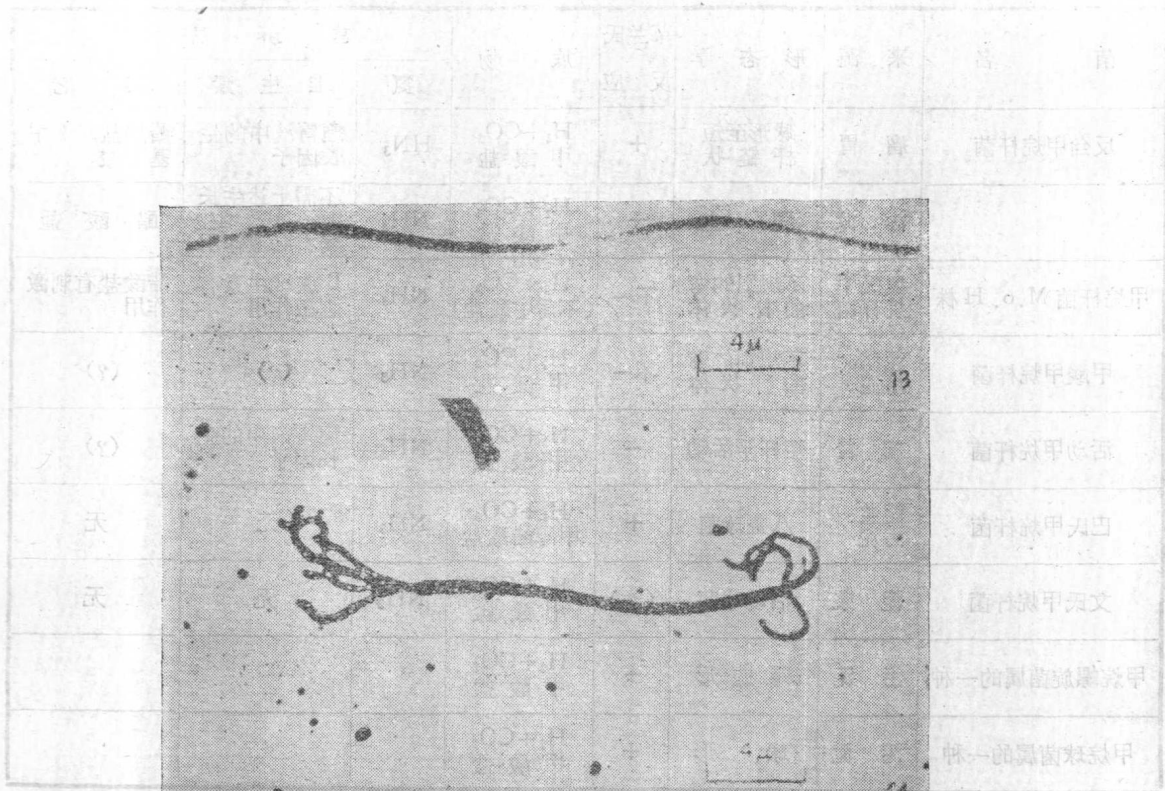


图13. 甲烷螺旋菌属。

图14. 甲烷螺旋菌属的鞭毛染色。

图15. 甲烷杆菌M. o. H磷钨酸染色后的电子显微照相

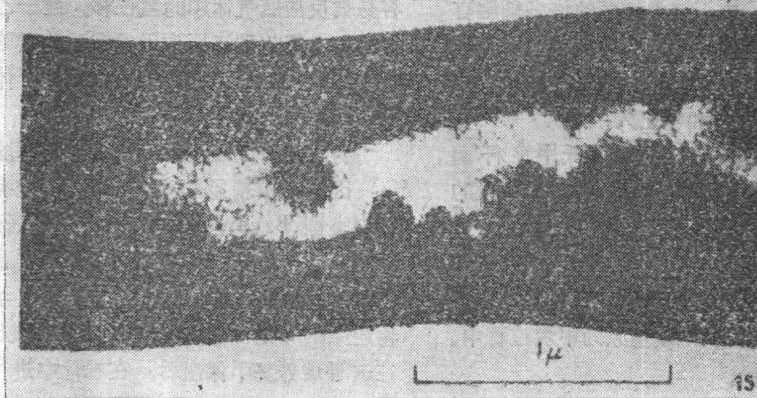


表1. 1970年甲烷纯培养菌的类型

菌名	来源	形态学	革兰氏反应	底物	营 养 需 要		
					氮	维 生 素	其 它
反刍甲烷杆菌	瘤胃	球形至短杆链状	+	H ₂ +CO ₂ 甲 酸 盐	HN ₃	瘤胃液中的生长因子	醋酸盐; 2 甲基丁酸
	污泥	同 上	+	H ₂ +CO ₂ 甲 酸 盐	NH ₃	不需上述生长因子, B族维生素有刺激作用	醋 酸 盐
甲烷杆菌 M.o. H 株	奥氏甲烷杆菌	不规则的弯曲杆状体	不一	H ₂ +CO ₂ (不需甲酸盐)	NH ₃	B族维生素有刺激作用	醋酸盐有刺激作用
甲酸甲烷杆菌	泥浆、污泥	不规则的弯曲杆状体	不一	H ₂ +CO ₂ 甲 酸 盐	NH ₃	(?)	(?)
活动甲烷杆菌	瘤胃	短杆形活动	-	H ₂ +CO ₂ 甲 酸 盐	NH ₃	瘤胃液中的生长因子	(?)
巴氏甲烷杆菌	泥浆、污泥	八叠球菌	+	H ₂ +CO ₂ 甲醇醋酸盐	NH ₃	无	无
文氏甲烷杆菌	泥 浆	活动球菌	(?)	H ₂ +CO ₂ 甲 酸 盐	NH ₃	无	无
甲烷螺旋菌属的一种	污 泥	螺旋形	+	H ₂ +CO ₂ 甲 酸 盐			
甲烷球菌属的一种	污 泥	球 形	+	H ₂ +CO ₂ 甲 酸 盐			

株。奥氏甲烷杆菌就是指能在乙醇-碳酸盐矿质培养基中能形成甲烷的细菌。由于这类细菌的许多细胞有一膨大区, 类似芽孢, Barker称此菌为奥氏甲烷芽孢杆菌 (*Methanobacillus omelianskii*)。原种菌株保存在Barker实验室已有30年之久。

van Niel 二氧化碳还原理论已由奥氏甲烷杆菌得到证实。当以未标记的乙醇作为底物时, 所产生的甲烷比活性与加入的¹⁴C-二氧化碳比活性相等。奥氏甲烷杆菌的乙醇厌氧氧化和二氧化碳还原作用的经典概念见图16所示。两个分子的乙醇氧化成醋酸盐, 氧化作用中的8个电子传至二氧化碳还原为甲烷过程中。伯醇和仲醇均可作为底物。

Schnellen (1947) 发现奥氏甲烷杆菌的细胞悬浮液, 在有氢和二氧化碳提供时, 能形成甲烷。Johns和Barker (1960) 曾指出细胞悬浮液在无二氧化碳利用时, 能将乙醇氧化成醋酸盐和氢。他们还观察到氢气主要是抑制乙醇的氧化作用。Wolin等(1964)发现当细胞悬浮液有乙醇和二氧化碳提供时, 低浓度的Viologen染料能抑制甲烷形成。甲烷形成抑制后, 此时氢的形成大大增多, 但是如无二氧化碳存在, 加入Viologen并不能刺激乙醇生成氢。因而, 各个实验室都证明了分子氢可以被细胞悬浮液产生并利用, 同

时还证明细胞悬浮液对乙醇氧化为醋酸盐和氢的平衡容易被反应瓶气体中的氢位移。至于乙醇氧化作用的实质和二氧化碳还原作用的实质的实验证据, 用细胞悬浮体是很难获得的, 因为细胞悬浮体对氧的抑制作用极其敏感。

有人还研究过严格厌氧菌的氨基酸合成。

因为在相差显微镜下观察活细胞有可能出现两种细胞类型, Bryant等人用洪格特技术研究了奥氏甲烷杆菌。采用了一种丰富培养基, 其中含瘤胃液, 蛋白胨, 酵母膏, 乙醇, 挥发性脂肪酸, 半胱氨酸-硫化物还原剂和无机盐类(在氢-二氧化碳气体中)。细菌在这种培养基中保温后, 在卷管中进行连续稀释, 从高稀释度的管中取出一分离的菌落, 检验其甲烷也出现阳性结果。当再接种到原来培养基中时, 细胞生长良好并产甲烷。但接种体转移到Barker乙醇-碳酸盐培养基时, 不能生长。以后, 试验了在丰富培养基上保温几个月后的培养菌的活力。密封的试管表现出强烈的负压, 说明气体已被利用。此时Bryant进行了一系列细致的实验, 以确定此菌的特征。此菌不能氧化乙醇, 以二氧化碳还原为甲烷; 但是, 氢在二氧化碳还原成甲烷时确被氧化。为了解决原始菌何如利用乙醇的问题, Bryant在丰富培养基卷管中以乙醇作

底物，在不含氢的条件下，对此菌进行稀释。在这些条件下，分离出一种细菌，它能氧化乙醇但不能氧化氢。

对这个菌的解析如图17所示。在(A)图上的所见长形弯曲杆菌为产甲烷菌细胞，(C)图的短杆状体为乙醇氧化菌。乙醇-碳酸盐矿质培养基上生长的奥氏甲烷杆菌典型培养菌细胞见图(B)。可见通常所称的奥氏甲烷芽孢杆菌并不存在，而是两种菌的共生联合，这两种菌都不能在Barker乙醇-碳酸盐矿质培养基上明显生长。产甲烷细菌定名为甲烷杆菌 (*Methanobacterium*) M. o. H 株，看来与甲酸甲烷杆菌关系密切，不同的是前者不能利用甲酸盐。乙醇-氧化菌曾称为“S”菌，是以往未描述的种。“S”菌为一革兰氏阴性，能活动的厌氧杆菌，它能氧化醇乙为醋酸盐和氢；也能被它产生的氢抑制，同时在乙醇-碳

酸盐矿质培养基上，“S”菌需要甲烷杆菌 M. o. H，利用后者所积累的氢。于是在示意图(图16)上有两种菌在起作用，分子氢是两种菌的中间产物。

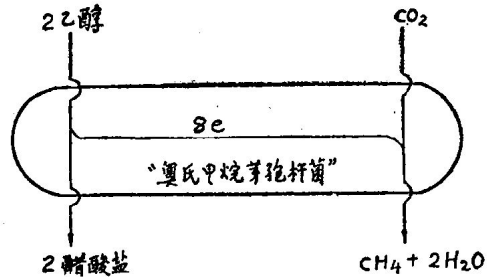


图16. 奥氏甲烷芽孢杆菌转化乙醇和二氧化碳为醋酸盐和甲烷的经典图解

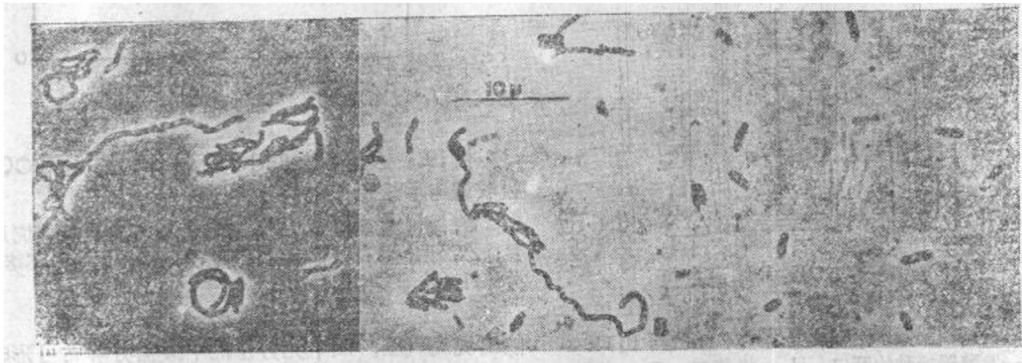


图17. 从奥氏甲烷杆菌中分离出的两种菌的显微照相。

A. 产甲烷的细菌，在充有 1:1 H_2 - CO_2 气体的瘤胃液培养基中生长 4 天。B. 产甲烷的细菌和 S 细菌的组合培养菌，在乙醇-酵母膏-蛋白胨琼脂上生长。C. S 细菌，在乙醇-酵母膏-蛋白胨琼脂斜面上生长 4 天。

奥氏甲烷杆菌的解析已开辟了新的境界。在自然界中分子氢作为甲烷形成的主要底物的作用是显而易见的。除了甲烷细菌氧化甲醇或醋酸盐之外，高级醇类和脂肪酸的可能的直接氧化作用现在必须仔细的研究，以确立这种氧化作用是由单一菌种进行的。另一方面，培养菌解析所提出的在厌氧生态场所不同菌种之间底物偶联的证据并不完全都是合适的，特别是作为中间产物的分子氢的作用。例如“S”菌易于与反刍甲烷杆菌偶联，全部氧化乙醇为醋酸盐，并还原二氧化碳为甲烷。此外，氧化氢的甲烷细菌在以丙酮酸盐为底物时，在没有硫酸盐情况下能与去磺弧菌偶联。

IV 大量培养技术

A. 在氢和二氧化碳上的生长

有人提出一种在严格厌氧条件下，于氢和二氧化碳混合气体中培养大量氢-氧化的甲烷菌的系统。虽然在这些条件下生长的甲烷菌，最初研究的结果并不稳定，最终还是可以得出重要的参数的。这项技术包括在一流量计-配置器混合气体的简单装置，气体混合后通过一灼热的铜屑柱以排除氧，为了避免产生一氧化碳，铜的温度维持在 $350^\circ C$ 以下。仪器与一14升发酵罐联接的图解如图18所示。发酵罐以200—400毫

升培养菌接种后，通入混合气体，流速每分钟 200 毫升，搅拌速率每分钟 400 转。随着培养菌的生长，输入气体的速率不断增加，当细胞生长至最大值时，每分钟加入的气体为 500—600 毫升。每 12 升培养基可得湿菌体 50—60 克。与大肠杆菌在营养肉汤中相比，生长是缓慢的，大约需要三天才能达到最大生长值。甲烷杆菌在氢-二氧化碳混合气体上的生长速率比甲烷八叠球菌在甲醇上生长快，但最后的细胞产量并不高。

甲烷杆菌在 12 升发酵罐中进行的氢-氧化作用和二氧化碳还原作用的化学计量关系见图 19。耗用的二氧化碳的量与形成甲烷的量是完全相等，而氢氧化为甲烷的比率为 3.7:1。在实验条件下没有得到理论的

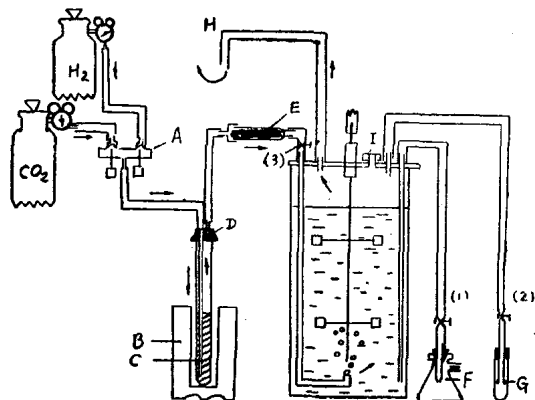


图 18. 12 升发酵罐 H_2 与 CO_2 气体混合仪

A. 气体配器; B. 电炉; C. 还原铜; D. 固定的橡皮塞; E. 灭菌过滤器不锈钢支架; F. 样品排出口; G. 接受另一发酵器接种的开口; H. 排气口; I. 接种口; (1, 2, 和 3) 螺丝夹阀门。

4:1 的比率，这些结果被认为一小部分的还原力可从生长培养基成分中获得。应该说明的是，虽然甲烷杆菌的生长速度和细胞产量远远低于许多细菌，对甲烷细菌来说所获得的细胞产量还是很好的，而且比其它许多严格厌氧的细菌好得多。大量培养已成功地发展到 250 升的规模，这种发酵罐单批发酵就可以获得一公斤的湿菌体。

B. 在甲酸盐上生长

在以甲酸盐为底物时甲烷细菌的生长是困难的。首先一个问题牵涉到 pH 值，开始时培养基内加有缓冲液缓冲，甲酸盐是以钠盐或钾盐形式加入的。甲酸盐经甲烷菌的代谢作用产生了二氧化碳和甲烷。培养基变成硷性，加入适量的甲酸调整 pH 值，同时也提供了新的底物。在大量培养氧化甲酸盐的甲烷细菌加入底物时，要使用 pH 稳定器。其次的问题是试管或烧瓶的耐压问题，即利用甲酸盐时，在生长器皿中可

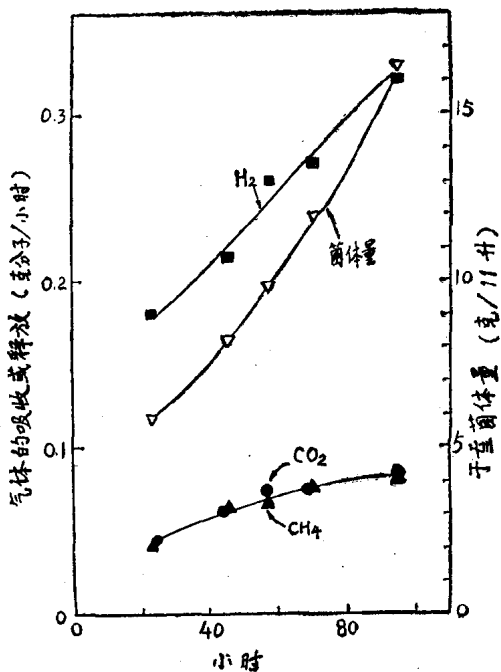


图 19. 生长 24—96 小时后菌体量、 H_2 和 CO_2 的吸收量与甲烷形成的关系。

■, 氢吸收量; ●, 二氧化碳吸收量; ▲, 甲烷形成量; △, 菌体量, 液体容量 11 升。开始的菌体量和不可溶性成分每 11 升培养基中约 4.7 克。

能出现高压。四个克分子的甲酸盐分解后可形成一个克分子的甲烷和三个克分子的二氧化碳。特别是在 pH 值升高时，二氧化碳大量溶解，而甲烷却难于溶解，于是器皿中压力加大。在取下管塞加入新鲜底物时要注意；管塞可能冲出管口，在压力下溶解的二氧化碳释出，引起培养基出现大量泡沫。同样，在加入灭菌甲酸时，应当慢慢加入，使溶解的碳酸盐在不致发生大量泡沫的情况下转化为二氧化碳。

C. 在甲醇上生长

巴氏甲烷八叠球菌已由 Blaylock 等人在 200 升甲醇肉汤培养基中培养成功。培养菌生长时，有甲烷和二氧化碳的产生，加入甲醇的量为保持在生长培养基中有 0.5% 的浓度，可获得 1400 克湿菌体。虽然生长缓慢（7—14 天），但细胞产量可以说是甲烷细菌大量培养所开创的最高水平。如在醋酸盐上生长十分缓慢。

现在这项技术已经可以应用于大量培养这类严格厌氧菌，因而这类微生物酶学的研究不再受菌体缺少的限制了。