

# 厌氧消化器中的甲烷氧化菌

梁家骥 程光胜 陈子英 王大帮

(中国科学院微生物研究所,北京)

**摘要** 自产沼气的厌氧消化器中分离到两株甲烷氧化菌。对这类菌在厌氧消化器中的数量变化及其对产甲烷菌生成甲烷活性的影响作了初步探讨。

**关键词** 甲烷氧化菌;厌氧消化器

产甲烷菌主要分布在河流和湖泊的淤泥、阴沟污水等富含有机物的厌氧环境中,而以甲烷作为生长的主要碳源和能源的甲烷利用细菌也往往分布在这些地方<sup>[1,2]</sup>。产沼气的厌氧消化器中存在着一个复杂的微生物区系,在各类菌共同作用下<sup>[3]</sup>,主要是把一部份复杂的有机物转化为甲烷。有人曾报道在厌氧状态下甲烷氧化菌的存在和同化甲烷的作用<sup>[4]</sup>,但这类菌在产甲烷的厌氧消化器中的活动尚未见报道。本文报道自产沼气的厌氧消化器中包括已分离到的两株甲烷氧化菌在内的数量变化及其对产甲烷菌生成甲烷的影响。

## 材料和方法

### (一) 菌种和培养基

产甲烷菌:洪氏产甲烷菌 *Methanospirillum hungatii* (由本所刘聿太提供),以下简称产甲烷菌、培养基见文献<sup>[5]</sup>。

甲烷氧化菌:淡橙黄甲烷氧化杆菌 *Methylobacter luteolo-croceus* P1, *Methylomonas* sp. (P2) (以下简称甲烷氧化菌 P1, 甲烷氧化菌 P2)。这两种菌是用分离甲烷氧化菌方法从厌氧消化器装置中分离到的<sup>[6]</sup>,并根据其利用甲烷作为生长唯一碳源和能源、具有复杂内膜结构等特征、按照 Whittenbury 对甲烷氧化

菌的分类<sup>[7]</sup>进行鉴定而定名的,详见文献<sup>[8]</sup>。

硫酸盐还原菌: *Desulfovibrio* sp. (由本所吕人豪提供),所用培养基见文献<sup>[9]</sup>。

### (二) 甲烷氧化菌的计数

从实验室产沼气的厌氧消化装置中<sup>[10]</sup>,取 1 克污泥用无菌生理盐水稀释至  $10^{-1}$ — $10^{-4}$ ,然后从每一个浓度吸取 1 毫升接种到装有 9 毫升 9 号无碳无机盐培养基的小盖杯中<sup>[6]</sup>,置于一干燥器中,每个稀释度重复三份,按空气:甲烷 = 380:380Hgmm,抽出空气;补入相应的甲烷,置  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  温室中培养,20 天后用 MPN 法计数,计数方法详见文献<sup>[11]</sup>。我们用镜检及消耗甲烷的专门试验,确认甲烷氧化菌的存在和含量,验证计数的准确性。

### (三) 厌氧消化器

以 1:3 的比例混合猪粪和玉米秸(粉碎为 1 厘米长短),加水搅匀装入 500 毫升三角瓶中,总固体的浓度为 100%,接种 20% 的农村沼气池内污泥,用带有橡皮管接头的橡皮塞塞紧,厌氧下于  $36^\circ\text{C}$  温室中进行发酵。或用豆腐废水作原料。发酵过程中按时取样,测定甲烷氧化菌菌数和瓶中所产甲烷的生成量。

**(四) 甲烷氧化菌对产甲烷菌生成甲烷的影响**

用 Hungate<sup>[12]</sup> 方法配制产甲烷菌所用培

培养基<sup>[1]</sup>,在15×1厘米试管中装5毫升培养基,1kg/cm<sup>2</sup>灭菌30分钟,用无菌注射器注入1毫升生长好的产甲烷菌的种子液和1毫升甲烷氧化菌的种子液,同时作对照,每管重复5支,36℃静止培养7天和15天后,用气相色谱测定每支试管的甲烷生成量。

### (五) 氧对产甲烷菌生成甲烷的影响

用 Hungate<sup>[12]</sup> 方法配制产甲烷菌培养基,在15×1厘米试管中装5毫升,1kg/cm<sup>2</sup> 30分钟灭菌,用无菌注射器注入1毫升生长好的产甲烷菌的种子液和0.5毫升氧,同时作对照,每管重复5支、静止培养7天和15天后,用气相色谱测定每支试管中的甲烷生成量。

### (六) 甲烷氧化菌在厌氧状态下与硫酸盐还原菌混合培养消耗甲烷的对比试验

用 Hungate<sup>[12]</sup> 方法将9号无碳无机盐培养基分装在15×1厘米试管中,每管装5毫升,1kg/cm<sup>2</sup>灭菌30分钟,在不同组的试管中分别用注射器注入1毫升甲烷氧化菌种子液和10毫升甲烷,1毫升硫酸盐还原菌种子液,每管重复5支,40±1℃静止培养7天和15天后、用气相色谱测定甲烷含量的增减变化。

### (七) 气体成份的分析

用上海分析仪器厂生产的103型气相色谱仪,不锈钢柱长2米,内径4毫米,内部装填TDX—02(天津第二化学试剂厂生产),60—80筛目,柱温140℃,氢气为载气,流速为45ml/min,检测室温度140℃,桥流180毫安,每次进样量50微升。用已知含量百分比的标准气作外标,测定样品试管气相中甲烷的百分比含量。

## 结果和讨论

在进行甲烷发酵试验中,尤其是在后期遇到厌氧消化器产生气体中甲烷含量降低的现象,我们怀疑可能是由于甲烷氧化菌活动所致。为此我们进行上述一系列试验。试验结果如下。

### (一) 不同发酵原料的厌氧消化器中甲烷氧化菌的数量

在用三种不同原料作底物发酵产沼气的厌

氧消化器污泥中,都存在一定数量的甲烷氧化菌(表1),说明甲烷氧化菌在厌氧消化器中可能不是偶而出现的,而是这个复杂菌群中一个成员。为了确认甲烷氧化菌,我们进行了纯种分离,试验表明,我们的厌氧消化器中确实存在甲烷氧化菌<sup>[8]</sup>(图1,2)。

表1 不同发酵原料的厌氧消化器污泥中甲烷氧化菌的数量

菌数(个/克干重)	原 料		
	玉米秸	豆腐废水	猪粪+玉米秸
测 次			
1	1100	1950	4190
2	1400	1970	4490



图1 淡澄黄甲烷氧化杆菌 P1  
(*Methylobacter luteocroceus* P1, ×1500)



图2 甲烷氧化菌 P2  
(*Methylomonas* sp. P2, ×1500)

### (二) 产沼气过程中甲烷氧化菌数量变化

在以猪粪、玉米秸作原料时,发酵液中甲烷氧化菌数量虽不多,但在整个发酵过程中都存在,在其数量上变化不大(表2)。

### (三) 甲烷氧化菌与产甲烷菌混合培养对产甲烷菌生成甲烷的影响

表2 产沼气过程中用烷氧化菌数量变化

结果 产气时期	项目	菌数
	甲烷含量	
初期	50%	$4.5 \times 10 - 9 \times 10$
旺盛期	60%	$4.5 \times 10 - 9.5 \times 10$
停止期	45%	$2.5 \times 10 - 4.5 \times 10$

表3说明甲烷氧化菌与产甲烷菌混合培养时甲烷生成量高于产甲烷菌单独培养下甲烷生成量,这是因为在厌氧状态下,某些甲烷氧化菌

表3 甲烷氧化菌与产甲烷菌混合培养对产甲烷菌生成甲烷的影响

测定结果 菌组合	培养时间 测定项目	培养前		培养7天		培养15天	
		甲烷含量 (%)	甲烷生成量 (ml)	甲烷含量 (%)	甲烷生成量 (ml)	甲烷含量 (%)	甲烷生成量 (ml)
		甲烷氧化菌 P1 产甲烷菌	0	0	28	5.04	27
甲烷氧化菌 P2 产甲烷菌	0	0	32.6	5.868	32.1	5.778	
产甲烷菌	0	0	21.3	4.047	18.3	3.477	
甲烷氧化菌 P1	0	0	0	0	0	0	
甲烷氧化菌 P2	0	0	0	0	0	0	

表4 氧对产甲烷菌生成甲烷的影响

测定结果 测试菌株	培养时间 测定项目	培养前		培养7天		培养15天	
		甲烷含量 (%)	甲烷生成量 (ml)	甲烷含量 (%)	甲烷生成量 (ml)	甲烷含量 (%)	甲烷生成量 (ml)
		产甲烷菌	0	0	21.3	4.047	18.3
产甲烷菌 + 0.5 毫氧 (25%)	0	0	19.1	3.629	17.8	3.382	

表5 甲烷氧化菌 P1、P2 在无氧状态下对甲烷的同化作用

测定结果 测试菌株	培养时间 测定项目	培养前		培养15天		
		甲烷含量 (%)	甲烷生成量 (ml)	甲烷含量 (%)	甲烷生成量 (ml)	甲烷减少量 (ml)
		甲烷氧化菌 P1 + 10ml 甲烷(45%)	23.1	4.4	23	4.37
甲烷氧化菌 P1 + 10ml 甲烷(45%) 1ml 氧(25%)	23	4.4	22.2	4.218	0.182	
甲烷氧化菌 P1 硫酸盐还原菌 + 10ml 甲烷(45%)	23	4.4	22.1	4.199	0.201	

从表5可看出甲烷氧化菌在有氧或有硫酸盐还原菌作用下会利用甲烷,这与 Panganibam 等人<sup>[4]</sup>的分析是一致的。在无氧或无硫酸盐还

还可利用甲酸盐,乙酸盐等产生氢<sup>[12]</sup>。氢又是某些产甲烷菌生成甲烷所需要的前体,本试验利用的洪氏产甲烷菌生成甲烷需要氢,一旦这些氢被产甲烷菌所利用,就会增加甲烷的生成量。

#### (四) 氧对产甲烷菌生成甲烷的影响

在有氧状态下产甲烷菌受到不利影响,甲烷生成量减少(表4)。

#### (五) 甲烷氧化菌、P1、P2在无氧状态下对甲烷的同化作用

原菌的作用下,甲烷氧化菌不能利用甲烷。至于在有硫酸盐还原菌作用下在无氧状态中甲烷氧化菌可以利用甲烷,其能力除决定于甲烷氧

化菌本身外,还决定于培养基中硫酸盐浓度和硫酸盐还原菌的多少,它们之间的关系还需进一步做试验证明。

总之甲烷氧化菌在生成甲烷的厌氧消化器中是存在的。在厌氧状态下甲烷氧化菌对产甲烷菌生成甲烷不会起有害作用,反而可能为产甲烷菌提供生成甲烷所需的氢,促进产甲烷菌的活动。在有氧状态下产甲烷菌受到不利影响,而甲烷氧化菌则可迅速利用甲烷。所以当厌氧消化器漏气时,甲烷会出现迅速消失或逐步降低。必须指出的是,虽然在厌氧条件下有甲烷氧化菌生长,但其数量太少,不足以影响甲烷的明显消长。

### 参 考 文 献

- [1] Hanson, R.S.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **26**:3-38,1980.
- [2] Patt, T. E. et al.: *J. Bacteriol.*, **120**:955-964, 1974.
- [3] Nagase, M. and T. Matsuo: *Biotech & Bioengineering*, **24**:2227-2237,1982.
- [4] Panganibam, A.T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**:303-309,1979
- [5] Ferry, J.G. et al.: *International of Systematic Bacteriology*, **24**(4):465-469,1974.
- [6] 陈子英等: *微生物学报* **20**(4): 339-344, 1980.
- [7] Whittenbury, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.* **61**: 205-218, 1970.
- [8] 梁家骥等: *微生物学报* **27**(1): 6-9, 1987.
- [9] Starkey, R. L.: *Arch. Microbiol.*, **9**:268-304, 1983.
- [10] 程光胜等: 第四届国际厌氧消化沼气讨论会文集, 第128-129页,中国沼气协会编, 1985.
- [11] 中国科学院土壤研究所土壤微生物组编著: 《土壤微生物数量计算手册》,科学出版社,1961,北京。
- [12] Hungate R.E.: A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. in *Methods in Microbiology*. J. R. Norris; D. W. Ribbons vol. 3B.1969.
- [13] Sugio Kawamura, et al.: *J. Ferment. Technol.*, **61**(2),151-156,1983.