

# 厌氧消化微生物氢代谢活性的研究

## 1. 产甲烷菌的“MV”氢化酶活性

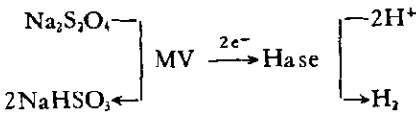
连莉文 姚蓉\* 张辉

(农牧渔业部成都沼气科学研究所, 成都)

本文介绍了产甲烷菌纯培养物 H-13、CB-12 及几种消化污泥中产甲烷菌的“MV”氢化酶活性。对利用 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>、甲酸、自然基质等不同营养类型的产甲烷菌的“MV”氢化酶活性进行了测定。试验结果表明,产甲烷菌的“MV”氢化酶活性与试样的产甲烷能力及产甲烷菌纯培养物的浓度呈现明显的正相关。研究中所使用的氢化酶分析方法不受底物浓度的影响。这些现象的揭示,对微生物厌氧消化的研究有着重要的意义。

**关键词** 甲基紫精 (MV); 氢化酶 (Hase)

氢代谢广泛地存在于厌氧生态系中,它对于产甲烷过程有着重要的生理意义<sup>[1]</sup>。Chen、Legall<sup>[2]</sup>、八木达彦<sup>[3]</sup>等人的研究指出,现已分离到的产甲烷菌中都具有氢化酶。本实验采用改进的“MV”氢化酶活性分析法<sup>[4]</sup>,研究了产甲烷菌体内的氢化酶在还原态的甲基紫精存在下,催化 H<sup>+</sup> 与电子 (e) 在常温下生成 H<sub>2</sub> 的反应,即:



以单位时间、单位试样的反应生成物(H<sub>2</sub>)的多少来表示产甲烷菌的“MV”氢化酶活力的大小。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 产甲烷短杆菌 *M. smithii* H-13。
2. 嗜热产甲烷杆菌 *M. thermoautotrophicum* CB-12。
3. 试验污泥: 取自北京、天津、西安、成都等

地污水处理厂消化污泥; 四川华阳县农村水压式沼气池试样; 猪粪两步发酵试样; UASB 消化器颗粒化污泥等。

4. 产甲烷菌纯培养条件: 使用 Barker MA 培养基, 其组分为 (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0.4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2; NH<sub>4</sub>Cl 1.0; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.1; 酵母膏 0.1; 盐酸半胱氨酸 0.5; 0.1% 刃天青 1ml; 煮沸前调节 pH 为 6.6—6.8; 于 15 磅灭菌 18—20 分钟, 再以 10% NaHCO<sub>3</sub> 及 1% Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O 调节 pH 为 7.2, 从接种当日起, 抽样进行各项指标的分析。

### (二) 方法

1. 产甲烷含量分析: 采用 SC-3 型气相色谱仪、热导检测器, 桥电流选用 180mA, 载气流速为 50 ml/分, 柱温 40℃。

2. 产甲烷菌纯培养物菌浓度分析: 测定菌培养液的吸光度 (A), 波长 620nm, 光径 5mm。

3. 产甲烷菌“MV”氢化酶活性分析: Peck 的改进法作酶反应条件; 产 H<sub>2</sub> 量采用气相色谱法

本文于 1985 年 11 月 29 日收到。

承本所赵一章同志和中国科学院上海植物生理研究所宋鸿遇、朱长喜同志帮助; 中国科学院成都生物研究所王晓力同志参加部分实验工作, 特此一并致谢。

\* 工作单位: 中国科学院成都生物研究所。

分析, 热导检测器, 柱填料 Porapak-Q, 保留值 30", 进样 500 $\mu$ l, 柱前压 0.8kg/cm<sup>2</sup>, 桥电流 100mA。

4. 试样的最大比产甲烷速率 ( $V_{max}$ ) 的测定<sup>[6]</sup>。
5. 挥发性固体 (VS) 测定: 550 $^{\circ}$ C 灼烧失重法。
6. 乙酸含量分析法<sup>[7]</sup>。

## 结果与讨论

### (一) 产甲烷菌纯培养物的“MV”氢化酶活性与产甲烷能力的相关性

将产甲烷菌纯培养物 H-13 与 CB-12 从接种之日开始, 每日测定其培养液中产甲烷菌的“MV”氢化酶活性、产甲烷量、菌浓度以及基质的消长状况等, 结果见图 1、2。

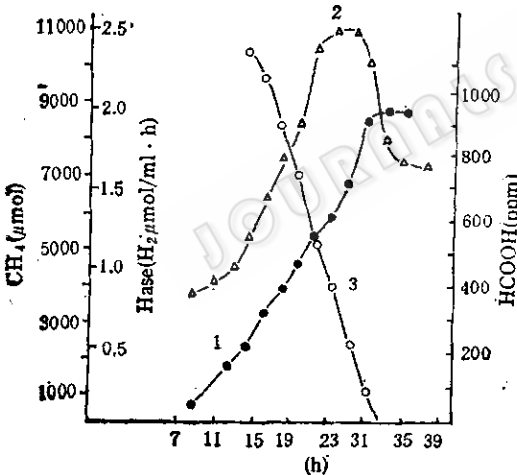


图1 产甲烷菌 CB-12 菌株的“MV”氢化酶活性与甲烷生成的关系  
Fig. 1 Relationship between “MV” hydrogenase activity of strain CB-12 and methane production  
1. CH<sub>4</sub> 2. Hase 3. HCOOH

从图 1 与图 2 的结果可知, 产甲烷菌纯培养物在对数增殖期的“MV”氢化酶活性与细胞量的变化及产甲烷量之间有显著的正相关关系。从图 1 还可看出, 基质

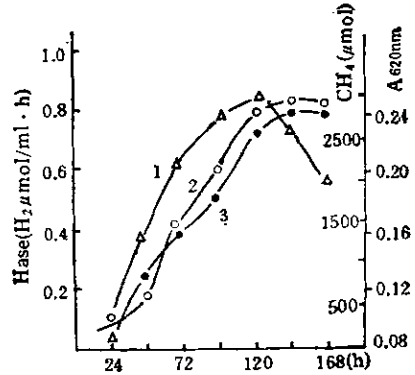


图2 产甲烷菌 H-13 菌株的“MV”氢化酶活性与菌体生长的关系  
Fig. 2 Relationship between “MV” hydrogenase activity of strain H-13 and growth of strain H-13  
1. Hase 2. A 3. CH<sub>4</sub>

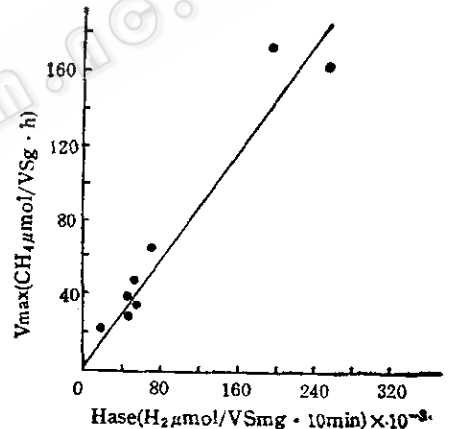


图3 “MV”氢化酶活性与 Vmax 值的相关性  
Fig. 3 Relatedness of “MV” hydrogenase activity and Vmax value

(甲酸)的消长与产甲烷菌的产甲烷能力密切相关。当基质下降到贫瘠的状况时, 产甲烷菌的菌量 (A) 与“MV”氢化酶活性随之停止增长。

### (二) 厌氧消化污泥中产甲烷菌的“MV”氢化酶活性

分别测定了不同污水处理厂的污泥试样、农村水压式沼气池不同层次的发酵试样的产甲烷菌“MV”氢化酶活性与最大

表 1 产甲烷菌的“MV”氢化酶活性与  $V_{max}$  值的关系Table 1 Relationship between “MV” hydrogenase activity and  $V_{max}$  value

样品来源 Sample source	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol CH}_4/\text{gVS} \cdot \text{h}$ )	“MV”氢化酶活性 Hydrogenase activity ( $\text{H}_2$ $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{VS} \cdot 10\text{min}$ ) $\times 10^{-3}$
鸡粪发酵试样 Chicken feces fermenter	161.38	248.30
改良式沼气池试样 Modified biogas digester	173.78	194.80
污水处理厂污泥 Waste water treatment plant	29.99	45.25
污水处理厂污泥 Waste water treatment plant	34.48	57.66
污水处理厂污泥 Waste water treatment plant	56.54	71.39
猪粪发酵试样 Pig dung fermenter	49.89	56.86
工厂厌氧消化试样 Anaerobic digester of factory	21.60	19.66

表 2 农村水压式沼气池不同层次试样的产甲烷菌“MV”氢化酶活性与  $V_{max}$ Table 2 “MV” hydrogenase activity of methanogens in rural biogas digester with water pressure and  $V_{max}$  value

取样层次 Sampling levels (cm)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol CH}_4/\text{gVS} \cdot \text{h}$ )	“MV”氢化酶活性 Hydrogenase activity ( $\text{H}_2$ $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{VS} \cdot 10\text{min}$ ) $\times 10^{-3}$
0—20	27.2	44.8
20—40	72.0	108.6
40—60	101.0	157.4
60—80	96.0	132.7
80—100	116.2	170.7

比产甲烷速率,结果见表 1、2。

表 1 与表 2 的结果表明,取自不同状态的污泥试样中产甲烷菌的“MV”氢化酶活性与其产甲烷速率之间呈现明显的相关性,其相关系数( $r$ )分别为 0.9658 与 0.9920。图 3 表达了表 1 中各组数值的函数关系。

### (三) 产甲烷菌的“MV”氢化酶活性与试样中乙酸浓度变化的关系

取厌氧消化稳定运行期不同时间的发酵试样,其发酵基质中乙酸浓度随间歇进料而起伏变化,取该消化器中溢流液作其

中产甲烷菌的“MV”氢化酶活性分析与乙酸浓度分析,结果见图 4。

图 4 表明,在稳定运行的消化器中,试样的产甲烷菌“MV”氢化酶活性与乙酸浓度的变化无关。这表明了稳定运行的发酵系统中,产甲烷菌的消长处于平衡状态。因此取不同发酵时间的试样测定,其产甲烷菌的“MV”氢化酶活性比较稳定。仅在乙酸浓度急剧下降( $<60\text{ppm}$ )时,其产甲烷菌的氢化酶活性才逐渐(两天以后)显示下降,可认为是底物(HAc)的过分贫瘠影响到产甲烷菌的正常增殖后,产甲烷菌

表 3 试样中乙酸浓度对产甲烷菌“MV”氢化酶活性的影响

Table 3 The effect of acetate concentration on “MV” hydrogenase activity of methanogens

乙酸加入量 Amount of acetic acid (ppm)	“MV” 氢化酶活性 Hydrogenase activity ( $H_2$ $\mu\text{mol/ml} \cdot 10\text{min}$ )	
	Anaerobic granular sludge	沼气池试样 Biogas digester sample
<50	2.02	0.28
300	1.90	0.22
600	1.95	0.21
1200	1.80	0.24
2000	2.01	0.24

化酶活性无明显影响。

## 讨 论

在厌氧消化产甲烷过程中，“氢化”是一个核心反应。已有的研究指出了厌氧过程中氢代谢和甲烷形成的物质与能量关系<sup>[3]</sup>，氢代谢与厌氧系统中电子、质子调节的关系<sup>[7,8]</sup>。近年来，一些学者开始将这些基础研究应用于厌氧消化的工程上。如 Zeikus<sup>[9]</sup> 以同位素  $^3H_2$  和  $^3H_2O$  交换反应对巴氏梭菌和产甲烷八叠球菌的氢化酶活性进行了分析，发现其氢化酶活性与基质中  $H_2$  的消长成正比；Zabranaska (1985)<sup>[10]</sup> 采用电化学方法测定了溶液中  $H_2$  的消长速率，以此来反映活性污泥中氢代谢状况；Zaib 等人<sup>[11]</sup> 研究了以测定酶促放氢活力来估价厌氧消化系中种间氢传递能力。这些研究都试图将氢代谢的研究用于厌氧消化工程实践中。

本研究探索了产甲烷菌的“MV”氢化酶活性，观察这种活性与产甲烷量及产甲烷速率的相关性，试图建立消化污泥产甲烷潜力的监测手段。这种方法不仅可用于评价厌氧消化接种物的优劣，而且有助于发酵工艺的设计，发酵负荷的调控等。采用测定污泥的“MV”氢化酶活性技术，有别

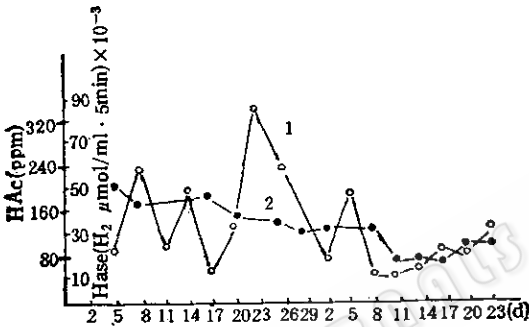


图 4 稳定运行的厌氧消化器中试样的产甲烷菌“MV”氢化酶活性与乙酸浓度的关系

Fig. 4 Relationship between “MV” hydrogenase activity of methanogens in anaerobic digester and acetate concentration

1. HAc 2. Hase

的“MV”氢化酶活性才显示明显的下降。

相类同的结果也见于另外两组实验中。以 UASB 啤酒废水厌氧消化颗粒污泥试样与农村水压式沼气池试样为材料，事先进行基质消耗培养，待其中乙酸浓度 < 50 ppm 时，于相同量的各份试样中分别加入不同浓度的乙酸，于 35℃ 作 5 小时的厌氧培养，然后测定各份试样的产甲烷菌“MV”氢化酶活性，结果见表 3。

上述结果也表明，试样中乙酸浓度在一定范围内的变化对产甲烷菌的“MV”氢

于 Delafontaine<sup>[12]</sup>、Dolfing<sup>[13]</sup>、及国内吴唯民<sup>[14]</sup>等人提出的方法, 并可显示出其独有的技术优势。

### 参 考 文 献

- [1] 连莉文等: 中国沼气, **1**: 1—7, 1986。  
 [2] Chen, J. S. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **748**: 8—20, 1985。  
 [3] Legall, J.: Hydrogenase and Other Iron-sulfur Protein, Chapter 5, 1982。  
 [4] 八木达彦: 触媒, **21**(3): 178—183, 1979。  
 [5] Peck, H. D. and H. Gest: *J. Bacteriol.*, **71**: 70—80, 1956。  
 [6] Benefield, L. D. et al.: *Biological Process De-*

*sign for Wastewater Treatment*, Prentice-Hall Inc. 1980.

- [7] Zeikus, J. G. et al.: *J. Bacteriol.*, **132**: 604, 1977。  
 [8] Doddema, H. J. et al.: *ibid.*, **136**: 19—23, 1978。  
 [9] Doddema, H. J. et al.: *ibid.*, **140**: 1081—1089, 1979。  
 [10] Zabranska, J. et al.: *Wat. Soi. Tech.*, **17**: 303—306, 1985。  
 [11] Zaib, V. et al.: *European. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**: 217—227, 1979。  
 [12] Delafontaine, M. J. et al.: *Biotech. Letters*, **1**: 71—74, 1979。  
 [13] Dolfing, J. et al.: *J. of Microbiological Methods*, **4**: 1—12, 1985。  
 [14] 吴唯民: 中国沼气, **2**: 3, 1984。

## STUDY OF HYDROGEN METABOLIC ACTIVITY OF MICROBES IN ANAEROBIC DIGESTION

### I. "MV" HYDROGENASE ACTIVITY OF METHANOGENS

Lian Liwen Yao Rong Zhang Hui

(Chengdu Biogas Institute of the Ministry of Agriculture Animal Husbandry and Fishery, Chengdu)

"MV" hydrogenase activity of methanogen culture of *M. smithii* H-13, *M. thermophilicum* CH-12 and active sewage sludge were reported in this paper. "MV" hydrogenase activity of different trophic methanogens were determined by using  $H_2/CO_2$ , formate and nature substrats. The results show that there is much better relationship among the activity of hydrogenase, capability of methane production and concentration of methanogens of pure culture. The methods

of analysis used in investigation were never limited to the concentration of different substrates. These phenomena suggest that it is of important significance for study of microbial anaerobic digestion.

#### Key words

Methylvioloten (MV); Hydrogenase (Hase)