

厌氧消化器中微生物生态学的研究

凌代文 刘聿太 乐华爱 梁家骥 程光胜 苏京军 王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

应用一套自行设计的以豆腐废水为原料实验性的半连续化的厌氧消化器可将甲烷发酵的各个阶段分开。从中分离到占优势和重要的水解和发酵性细菌、产氢产乙酸细菌和产甲烷细菌。水解和发酵性细菌经鉴定是乳杆菌属、链球菌属、双歧杆菌属、梭状芽孢杆菌属、丙酸杆菌属和螺旋体等属的细菌, 其中有些菌株是上述属中的新种。产氢产乙酸细菌是氧化丁酸盐菌, 初始分离时与氧化丁酸盐菌相配合的利用氢的细菌是消化器中的一种特有的产甲烷球菌。分离到的产甲烷细菌中有 4 个已知的种, 还发现一个新种。本文还对上述细菌利用豆腐废水生成甲烷的一系列生化反应进行了归纳小结。从豆腐废水厌氧消化器中发现了一些未报道过的细菌新种, 说明这样的微生物生态系是前人未曾研究过的。

关键词 微生物生态学; 厌氧消化器

厌氧降解有机物生成甲烷的过程是由多样不同营养型的微生物类群完成的。各类群微生物各具有其特殊的功能, 进行着特殊的生化反应。厌氧降解生物转化有机物的过程一般可分为三个阶段, 其中起作用的微生物也可按阶段分为三个类群^[1,2]。第一阶段是有机物质(包括碳水化合物、蛋白质和脂类等)经水解和发酵性细菌作用生成有机酸、醇类、氢和二氧化碳; 第二阶段是由专性质子还原产乙酸细菌降解第一阶段生成的产物, 将其转化成氢和乙酸, 因此这类菌又称为产氢产乙酸细菌, 但这类细菌产生的氢也抑制其本身的生长, 必须有其它细菌利用这些氢, 使氢的分压降低到相当低, 才能使第一阶段生成的产物顺利降解。此过程主要是由可利用氢的产甲烷细菌与之协同作用进行的; 第三阶段是将氢和乙酸转化成甲烷, 这一阶段分别由利用氢和乙酸的产甲烷细菌来完成^[1-4]。

我们实验室近几年应用一套自行设计的多级厌氧消化器降解豆腐废水生成甲烷^[5]。这种实验性的半连续化厌氧消化器

可将甲烷发酵的各个阶段分开, 便于研究参与厌氧降解有机物生成甲烷各阶段的细菌, 也为我们研究以豆腐废水为原料的厌氧消化器这样的生态系统中各类群微生物及其生化反应提供了有利的条件。本文是对此类厌氧消化器的微生物生态学研究结果的报道。

材料和方法

(一) 样品来源

样品取自实验室正常运转的豆腐废水厌氧消化器。

(二) 培养基的制备和细菌的分离纯化方法

主要采用 Hungate 厌氧技术制备实验用的培养基, 取发酵液稀释滚管分离菌种^[6]。

(三) 培养基的组分及生化特性的测定

主要参照 Holdeman 等^[7]、McInerney

本文于 1990 年 12 月 15 日收到。

本项目为国家自然科学基金资助项目。

等^[8,9]、Bulch 等^[10]的方法及其所述的培养基组分。

(四) 脂肪酸、醇类及甲烷、氢、二氧化碳气体的分析

挥发性和非挥发性脂肪酸的测定是使用 SHIMADZU GC-7AG 气相色谱仪, 氢火焰离子化检测器。以 SHIMADZU CHROMATOPAC C-RIB 积分仪作记录仪。不锈钢色谱柱, 内径 3mm, 长 1m, 填充 GDX-401 (60—80 目, 涂 3% 的磷酸), 柱温 210℃, 进样温度 220℃, 氢气流速 50 ml/min。

醇类的测定, 柱温 150℃, 其它条件同上。

气体的分析, 使用 SHIMADZU GC-7AG 气相色谱仪, 上海分析仪器厂生产的 103 型气相色谱仪和北京分析仪器厂生产的 2304A 型气相色谱仪, 热导检测器。以高纯氮作载气, 流速 60—70ml/min, 热导池温度 80℃, 柱温 60℃, 桥流 75mA 或 100mA。

(五) 鉴定方法

主要参考 Bergey 氏细菌学手册^[11-13]及近年来有关属种的文献报道资料进行鉴定分类工作。

结果与讨论

(一) 豆腐废水厌氧消化器中有关的细菌

从豆腐废水厌氧消化器中已分离到, 并已鉴定的菌种, 按甲烷发酵过程中各阶段起作用的细菌所属类别分述如后。

1. 水解和发酵细菌:

(1) 乳酸细菌:

从豆腐废水厌氧消化器中已分离到一些产乳酸的革兰氏阳性球菌和杆菌的菌株。经鉴定为粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)、屎链球菌 (*Streptococcus fa-*

ecium)、乳链球菌 (*Streptococcus lactis*) 和德氏乳杆菌德氏亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)、德氏乳杆菌乳亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) 以及植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。

粪链球菌、屎链球菌及乳链球菌的菌株在形态和生理生化特性方面, 与各个种的典型菌株无明显差异^[11,13]。

分离到的乳杆菌的主要特征如下:

德氏乳杆菌德氏亚种为革兰氏阳性无芽孢杆菌, 0.5 × 1—15 μm, 单个或成短链, 在 45℃ 生长, 15℃ 不生长, 同型发酵产生 D(-)乳酸。

德氏乳杆菌乳亚种为革兰氏阳性杆菌, 宽度 0.8 μm, 个体形态常倾向于形成长丝状。产生 D(-)乳酸。与德氏乳杆菌德氏亚种的差别表现在前者能发酵海藻糖和乳糖产酸。

植物乳杆菌产生 DL-乳酸。45℃ 不生长, 15℃ 能生长。分离到的菌株特别表现出在厌氧条件下, 菌体形态倾向于形成长丝状。

(2) 双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 的细菌:

从厌氧消化器中分离到一些能产乙酸和乳酸的菌株, 它们是革兰氏阳性、不形成芽孢、不运动的多形态的杆菌。它们的形态多变, 有时为不规则的杆状, 有时为短杆状, 或分支成 Y 形乃至多分叉。它们是属于双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 的细菌。对其中的 Bw12 和 Bw38 两株菌研究较多。上述多形态特征在初始分离出时表现得更为明显。从葡萄糖产生乙酸和乳酸的比例分别为 3:1(Bw12)和 2:1(Bw38)。它们均可在 46.5℃ 下生长。DNA 中 G + C 的含量分别为 57.3mol% (Bw12) 和 58.8 mol% (Bw38)^[14]。

在生长温度和 DNA 中 G + C 的含量方面, 以上两株菌分别与假长双歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudolongum*) 和嗜热双歧杆菌 (*Bifidobacterium thermophilum*) 很相近, 然而在碳水化合物发酵方面却有差异。例如 Bw12 和 Bw38 两株菌可以发酵纤维二糖、七叶灵、松三糖、海藻糖和甘露糖等, 而假长双歧杆菌和嗜热双歧杆菌不发酵以上碳水化合物产酸。菌株 Bw12 也不同于 Bw38, Bw12 必须有可发酵的碳水化合物才能生长, 且利用肌醇产酸, 从乳糖和核糖产酸的能力也较弱。它们可能是双歧杆菌属的两个新种。

(3) 梭状芽孢杆菌属的一个新种——产气梭状芽孢杆菌 (*Clostridium aerogenes* nov. sp.)^[15];

分离到两株厌氧生芽孢的杆菌, 革兰氏染色通常为阴性, 以周生鞭毛运动, 直杆或稍弯杆形, $0.6-0.8 \times 3.0-8.0 \mu\text{m}$, 芽孢扁圆或卵圆形, 通常次端生; 最适生长温度为 $30-37^\circ\text{C}$, 在 45°C 不生长; 在 pH4.5 以下或 9.0 以上不生长, 6.5% NaCl 抑制其生长。能发酵多种碳水化合物。以 PYG 为培养液从葡萄糖产生大量的 H_2 和 CO_2 、中量的乳酸和少量的乙酸、丁酸、乙醇和丁醇。不利用柠檬酸和丙酮酸盐。DNA 中 G + C 含量为 41.2mol%。以上特征表明该菌株应属于梭状芽孢杆菌属, 但与现已报道的种有较大的差异, 鉴定为一个新种, 命名为产气梭状芽孢杆菌。

(4) 丙酸杆菌属的一个新种——北京丙酸杆菌 (*Propionibacterium beijingense* nov. sp.)^[16];

从豆腐废水厌氧消化器中分离出了几株丙酸细菌, 它们是革兰氏阳性、不形成芽孢的兼性厌氧菌, 其细胞形态依生长条件成为杆状或球形, 厌氧培养在 BPY (含葡萄糖) 培养基上为杆状; 在 BPYL (含乳酸

盐) 培养基上为球形。能广泛地利用多种糖、醇类和乳酸盐产酸, 产生丙酸和少量的乙酸, 接触酶阳性, 能水解七叶苷, 还原硝酸盐, 不液化明胶, 不产生吲哚, 不利用 D-阿拉伯糖和木糖产酸。该菌株属于丙酸杆菌属的一个新种, 定名为北京丙酸杆菌 (*Propionibacterium beijingense* nov. sp.)。

(5) 螺旋体属的一个新种——产红螺旋体 (*Spirochaeta rhodogenes* nov. sp.)^[17];

分离到的这种能产红色素的专性厌氧菌, 细胞呈可弯曲的螺旋状, $0.3-0.4 \times 3.0-15 \mu\text{m}$ 或更长。革兰氏染色阴性。能活跃地运动。能发酵多种碳水化合物, 主要产生乙酸盐、乙醇、氢和二氧化碳, 还产生丁醇。生长需要酵母膏, 可利用 NH_4Cl 和蛋白胨为氮源生长。DNA 中 G + C 含量为 49mol%。它是螺旋体属的一个新种, 定名为产红螺旋体。

(6) 己酸细菌:

富集了一些产己酸的细菌, 它们利用乙醇生成己酸外, 还有丁酸、氢和二氧化碳。

以上所述的细菌均属水解和发酵性细菌, 在厌氧消化器的微生物生态系统中, 它们是第一类群细菌。

2. 产氢产乙酸细菌:

氧化丁酸盐的细菌属于产氢产乙酸细菌类群。从豆腐废水厌氧消化器中分离到的氧化丁酸盐与产甲烷的互养培养物, 与氧化丁酸盐细菌相伴的利用氢的细菌是消化器中的一种特有的产甲烷球菌^[18]。互养培养物中的丁酸盐氧化菌与已报道的沃氏互养单胞菌 (*Syntrophomonas wolfei*) 相似^[19], 该菌不但可降解丁酸盐, 且可降解直链的戊酸和己酸盐生成乙酸和氢, 降解戊酸尚能产生丙酸。该菌经过适应性培养后, 可获得能用巴豆酸盐 (crotonate) 作

为底物生长的氧化丁酸盐的单菌培养物。

3. 产甲烷细菌:

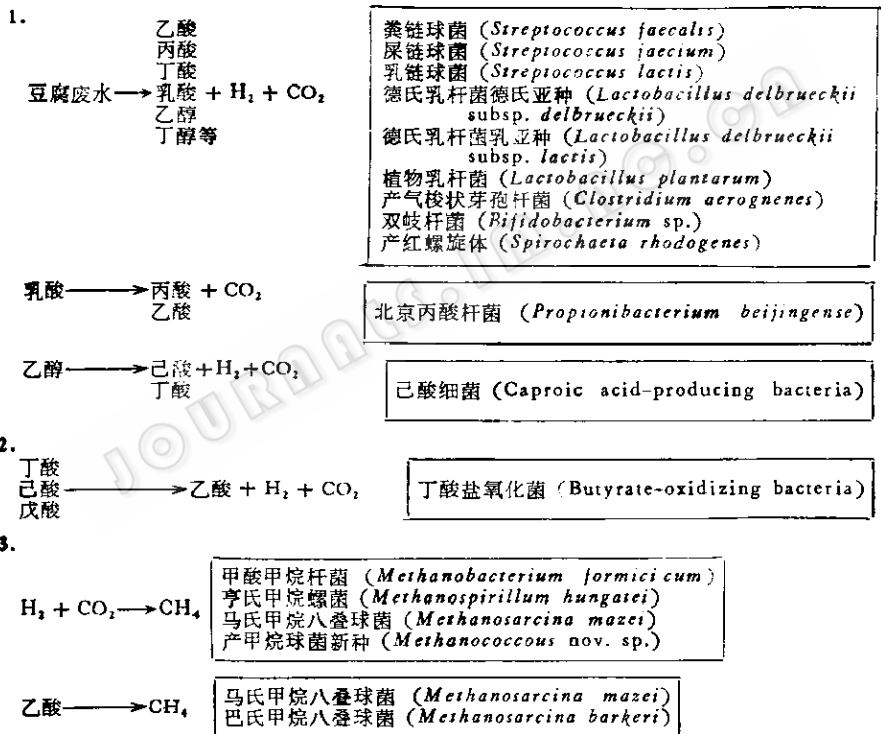
从豆腐废水厌氧消化器中分离到优势的产甲烷细菌。经鉴定其中 4 株菌为已知种。即甲酸甲烷杆菌 (*Methanobacterium formicicum*), 亨氏甲烷螺菌 (*Methanospirillum hungatei*), 马氏甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina mazei*) 和巴氏甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina barkeri*)。另一株在此消化器中的计数最高, 鉴定其特征, 与已报道的产甲烷细菌有明显差异, 是一

个新种^[20]。

此新种为不规则球形, 直径 0.5—1.0 μm, 不运动, 利用氢和二氧化碳生长产生甲烷。该菌生长需要乙酸盐和酵母膏或乙酸盐加酪蛋白水解物。DNA 中 G + C 含量为 53mol%。

(二) 豆腐废水厌氧消化器中微生物的生理生化反应

厌氧消化器中的微生物利用豆腐废水生成甲烷的过程是一系列复杂的生理生化反应, 组成了一个食物链(见下列示意图)。



在第一阶段, 由包括链球菌属、乳杆菌属、双歧杆菌属细菌在内的细菌, 以及梭状芽孢杆菌、螺旋体等类群细菌降解豆腐废水中的有机物质生成乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、乙醇、丁醇和氢、二氧化碳等。丙酸杆菌和产己酸细菌则分别作用于乳酸盐和乙醇生成丙酸、丁酸、己酸和氢、二氧化碳。

第二阶段有氧化丁酸盐的细菌作用于

丁酸、戊酸和己酸生成乙酸、氢、二氧化碳。

第三阶段则由包括甲酸甲烷杆菌、亨氏甲烷螺菌、马氏甲烷八叠球菌、巴氏甲烷八叠球菌和产甲烷球菌新种在内的产甲烷细菌分别利用氢、二氧化碳和乙酸盐生成甲烷。

以上微生物的生理生化反应分析的归纳与我们从厌氧消化器分段取样测定的结

果进行比较, 两者是相吻合的^[9]。豆腐废水在多级厌氧消化器中按反应罐的顺序逐级降解生成甲烷。经检测, 在消化器的第 1、2 罐中产生有大量的乳酸、乙酸、丁酸、己酸、乙醇和丁醇等, 这些产物主要是由于乳酸细菌和其它水解和发酵性细菌作用的结果。在第 3 反应罐中乳酸和乙醇已不能检出, 而丙酸量增加。丁酸和己酸在第 2 反应罐中的含量很高, 在第 3 罐中仍有不少。这是因为产丙酸细菌和产己酸细菌的生理活动所致。到第 3、4 反应罐后, 丁酸、丙酸、己酸和戊酸的含量逐渐减少, 是由于丁酸盐氧化菌及有关细菌在其中起作用。随着有机酸在第 4、5 罐的减少至消失, 甲烷量增加。在其中富集了较大量的产甲烷细菌。从分析归纳的有关微生物的生化反应产物与厌氧消化器按反应罐顺序取样检测结果的相符性, 也说明了我们的分离到的细菌是厌氧消化豆腐废水过程中的优势细菌, 并在其中起着主导作用。

结 论

从豆腐废水厌氧消化器中已分离到多样的兼性和专性厌氧细菌。它们分别属于厌氧降解有机物生成甲烷过程中起作用的微生物生态系中的三个类群的细菌。在其中我们发现了一些未报道过的细菌新种, 说明这样的微生物生态系是前人未曾研究过的。

豆腐废水代表了一类含有一定组分的有机物质, 因而可以设想: 如果用已分离出纯培养的上述微生物混合起来作为接种物, 使豆腐废水进行沼气发酵, 其过程当更

易人为地控制, 效率也可能更高。

参 考 文 献

- [1] Bryant, M. P.: *J. Animal Sci.*, **48**(1): 193—201, 1979.
- [2] Zehnder, A. J. B.: Ecology of Methane formation, In «Water Pollution Microbiology (ed. by R. Mitchell), Vol. 2, pp. 349—376, 1978.
- [3] McInerney, M. J. et al.: *Arch. Microbiol.*, **122**: 129—135, 1979.
- [4] 钱泽澍, 闵航: 沼气发酵微生物学, 浙江科学技术出版社, 杭州, 1986.
- [5] 梁家源等: 生物工程学报, **7**(4): 365—371, 1991.
- [6] Hungate, R. E.: A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In "Methods in Microbiology" (ed. by Norris, J. R. and D. W. Ribbons), Vol. 3B, pp. 117—132, 1969.
- [7] Holdeman, L. V. et al.: *Anaerobe Laboratory Manual 4th Ed.*, Southern Printing Co., Virginia, 1977.
- [8] McInerney, M. J. et al.: *Arch. Microbiol.*, **122**: 129—135, 1979.
- [9] McInerney, M. J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**: 826—828, 1981.
- [10] Bulch, W. F. et al.: *Microbiol. Rev.*, **43**: 260—295, 1979.
- [11] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams & Wilkins Company/Baltimore, 1974.
- [12] Krieger, N. R. and J. G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins Co., Baltimore/London, 1984.
- [13] Peter, H. et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1986.
- [14] 凌代文等: 中国沼气, **6**(1): 4—9, 1988.
- [15] 凌代文等: 微生物学报(待发表).
- [16] 乐华爱等: 微生物学报, **27**(2): 105—109, 1987.
- [17] 刘聿太等: 微生物学报, **28**(2): 97—101, 1988.
- [18] 刘聿太等: 中国沼气, **5**(3): 8—11, 1987.
- [19] McInerney, M. J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**: 1029—1039, 1981.
- [20] 刘聿太等: 中国沼气, **4**(1): 3—7, 1986.

A STUDY OF MICROBIAL ECOLOGY IN AN ANAEROBIC DIGESTER

Ling Daiwen Liu Yitai Yue Huaai Liang Jiayuan

Cheng Guangsheng Su Jingjun Wang Dasi

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

An experimental semicontinuous anaerobic digester fed on soybean cake waste water has been studied. Different stages of methanogenic fermentation could be distinguished with this digester. The main and important hydrolysing and fermentative bacteria, hydrogen and acetic acid producing bacteria and methanogenic bacteria in this digester have been isolated. The hydrolysing and fermentative bacteria belonged to the genera of *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Propionibacterium* and *Spirochaeta*, etc. Some of these bacteria were the new species of these genera. The hydrogen and acetic acid producing bacteria were a butyrate oxidizer using a new methanogen as the syntrophic partner in the primary isolate. Now this butyrate

oxidizer can be cultivated alone. Several kinds of methanogenic bacteria including *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri*, *M. mazei*, *Methanospirillum hungatei* and a new methanogenic coccus were isolated.

The biochemical reactions—a microbial food chain for the biomethanation in this anaerobic digester have been summarized in this paper. A number of new bacteria isolated from the anaerobic digester were the dominant microbes in this ecosystem. The anaerobic digester is such a habitat which was not studied before.

Key words

Microbial ecology; Anaerobic digester