

颗粒污泥的产甲烷细菌及结构模型初探

竺建荣 胡纪革 顾夏声

(清华大学环境工程系, 北京 100084)

本文报道了颗粒污泥中不同形态的产甲烷细菌及其分布特征。电镜观察表明, 颗粒表层主要是氢营养型产甲烷菌, 如产甲烷短杆菌、产甲烷螺菌等。细菌的分布具有一定的“区位化”。颗粒内层则主要是乙酸营养型产甲烷菌, 其中产甲烷丝菌是优势种群, 并且与产氢产乙酸细菌之间存在互营共生关系。根据对产甲烷细菌的观察研究结果, 作者提出了一个颗粒污泥的初步结构模型, 同时对此进行了分析讨论。

关键词 产甲烷细菌; 颗粒污泥; 结构模型

UASB 反应器的最大特征是形成沉降性能好、产甲烷活性高的颗粒污泥, 这也是生产性应用的关键^[1]。但是, 迄今为止, 有关颗粒污泥的形成机理仍不十分清楚, 对污泥的微生物分布和颗粒结构也了解甚少^[2]。从本质上来说, 颗粒污泥是多种微生物组成的聚集体, 其中产甲烷细菌是重要的微生物类群, 在废水的生化降解和稳定化过程中起主导作用。Dubourgier 等对颗粒污泥的化学组成、细菌数量、颗粒结构、代谢活性等已有的研究进行了综述, 指出颗粒污泥的形成和生长仍是一个尚未明确的问题^[3]。为了更好进行有效的控制和克服 UASB 处理过程中存在的某些限制, 有必要对颗粒化过程的微生物学基础开展深入的研究。产甲烷细菌在颗粒污泥中的作用非常重要, 而对它的系统观察研究又较少, 因此, 探讨它在颗粒污泥中的组成和存在方式已是一个热门课题。本文报道采用生物学电镜技术, 观察和分析颗粒污泥中产甲烷细菌的试验结果, 并提出了一个颗粒污泥的初步结构模型, 同时对此进行了分析讨论。

材 料 和 方 法

(一) 样品

所有污泥观察样品均取自实验室小试单相和二相 UASB 工艺。反应器装置及工艺运行特性见另报。成熟的颗粒污泥直径 1—3mm, 沉降性能良好, 污泥活性很高, 最大比 COD 去除率约 $1.92\text{kg COD} \cdot \text{g}^{-1}\text{VSS} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

(二) 样品制备和观察

取新鲜颗粒污泥, 先用 2.5% 戊二醛溶液固定过夜, 然后用 1% 锇酸溶液后固定 2 小时^[4]。冲洗后用丙酮系列溶液梯度脱水 (10、30、50、70、90、95、100%)。再经 CO_2 临界点干燥、喷金处理, 最后用 JSM 35 型扫描电镜观察和照相。透射电镜的制样固定和脱水操作同上, 脱水后用 Epon 812 包埋, 聚合 48 小时, 然后用超薄切片机切片。

本文于 1992 年 5 月 9 日收到。

本课题承国家青年自然科学基金资助。

得到的超薄切片再用醋酸双氧铀-柠檬酸铅染色。最后用 Hitachi 700 型透射电镜观察并照相。产甲烷细菌的形态及种类根据各标准菌株的电镜形态、细胞结构、细胞质、内含物等特性进行鉴定^[6]。

结 果

(一) 颗粒表层的产甲烷细菌

图 1-a 是颗粒污泥整体的扫描电镜 (SEM) 照片, 图 1-b-e 分别是观察到的不同形态的产甲烷细菌 SEM 照片。从图 1 可以看出, 存在于表层的产甲烷细菌主要是氢营养型

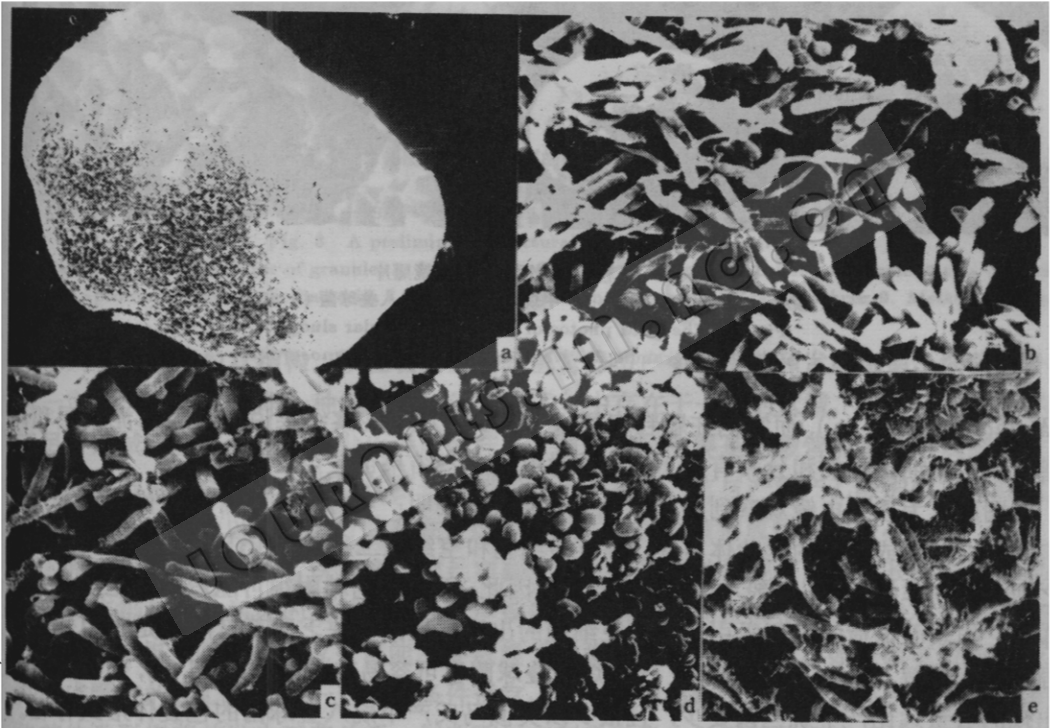


图 1 颗粒污泥表层的扫描电镜照片

- a. 颗粒外观 ($\times 110$); b. 产甲烷短杆菌 ($\times 4000$);
c. 产甲烷杆菌 ($\times 5400$); d. 产甲烷球菌 ($\times 4000$);
e. 产甲烷螺菌 ($\times 7800$)。

Fig. 1 The photos of outer layer of granular sludge

- a. Apperance of granule; b. *Methanobrevibacter* sp.;
c. *Methanobacterium* sp.; d. *Methanococcus* sp.;
e. *Methanospirillum* sp.

类群, 有产甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter* sp.), 产甲烷杆菌 (*Methanobacteriam* sp.), 产甲烷球菌 (*Methanococcus* sp.), 产甲烷螺菌 (*Methanospirillum* sp.) 等。这种结果说明了氢营养型产甲烷细菌的多样性。同时还注意到, 表层细菌的分布有一定的“区位化”, 即一种产甲烷菌以成簇或成团的方式存在于一定的区域, 而在另外的区域则分布着另一种产甲烷菌

或发酵细菌(照片没有表示)。这种分布模式类似“微菌落”结构。另一个特点是在表层很少见到乙酸营养型类群,包括产甲烷八叠球菌或产甲烷丝菌等。

(二) 颗粒内层的产甲烷细菌

图2是颗粒污泥剖面的扫描电镜照片,可观察到颗粒内层的产甲烷细菌。从照片可以看出,颗粒内部存在一个很大的空洞(图2-a)。它的存在意义及生理作用尚不清楚。也许这一空洞是制样过程中产生的假象。观察到的一个重要特征是颗粒内部存在大量乙酸营养型产甲烷菌(图2-b),既有产甲烷丝菌(*Methanothrix* sp.),也有产甲烷八叠球菌

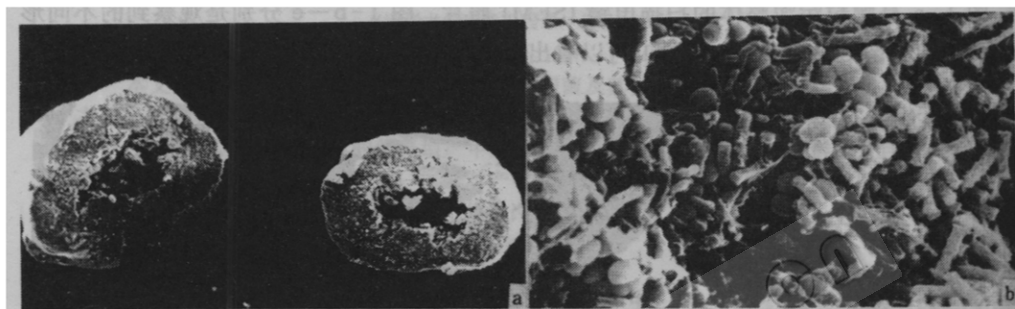


图2 颗粒污泥剖面的扫描电镜照片

a. 颗粒污泥切面($\times 40$); b. 产甲烷丝菌和产甲烷八叠球菌($\times 4000$)

Fig. 2 The SEM photos of section of granular sludge

a. a section of granule; b. *Methanothrix* and *Methanosarcina*

(*Methanosarcina* sp.),而它们在颗粒表层很少见到。这一观察结果说明颗粒污泥表层和内层的产甲烷细菌种类和分布有所不同。透射电镜观察结果也支持这一结论。

图版I为透射电镜观察到的产甲烷细菌照片,表明产甲烷丝菌是常见的优势种群,它们通常以成束或成捆的丝状体存在,并有活细胞和空细胞二种类型(图版I-a、b)。细胞之间的排列非常紧密。一般小于几十毫微米。因此,细菌间的粘附很可能借助细胞壁的直接作用,如表面电荷的互相吸引。至于空细胞的出现,是由于缺乏营养自溶还是噬菌体感染导致细胞裂解,尚待进一步研究。产甲烷八叠球菌也可容易地看到(图版I-c),但在视野中出现的数量远比产甲烷丝菌要少,且很少以类似马氏产甲烷八叠球菌的包裹体形式存在。除了乙酸营养型产甲烷菌外,也观察到存在氢营养型产甲烷细菌,如产甲烷短杆菌和产甲烷螺菌等(照片没有表示)。

内层中的优势产甲烷细菌——产甲烷丝菌,另一个重要特征是与产氢产乙酸细菌紧密结合在一起(图版I-d),这种分布模式很可能是二者间存在互营共生关系的证明。迄今为止,已报道的产氢产乙酸细菌的互营共生菌均为氢营养型产甲烷菌,本试验观察到乙酸营养型产甲烷菌也能发生互营共生作用,这种现象尚属新的发现。作者认为,这种结构方式在颗粒污泥的形成及维持高产甲烷活性方面起着重要作用,因为厌氧消化中约70%的甲烷来自乙酸盐代谢。同时也说明,颗粒污泥中活性细菌的分布不是随意的,而是有一定的排列结构。不过,进水基质不同,颗粒污泥的细菌组成及存在方式也会有所差异。

讨 论

根据试验观察结果，作者提出了一个颗粒污泥的初步结构模型(图 3)。其要点是：颗粒污泥是由产甲烷细菌和其它细菌(如发酵细菌、产氢产乙酸细菌等)组成的，具有一定排

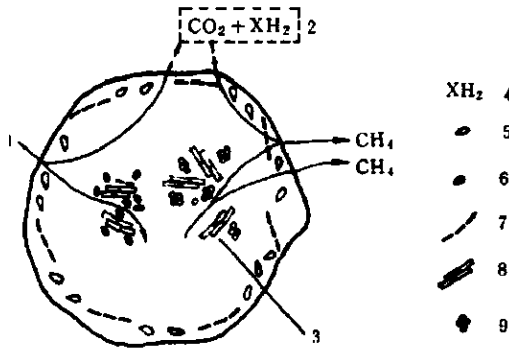


图 3 颗粒污泥的初步结构模型

1. 基质；2. 颗粒表层；3. 颗粒内层；4. 氢载体；5. 发酵细菌；6. 产氢产乙酸细菌；7. 氢营养型产甲烷细菌；8. 产甲烷丝菌；9. 产甲烷八叠球菌。

Fig. 3 A preliminary structural model of granular sludge

1. Substrate; 2. Outer layer of granule; 3. Inner layer of granule; 4. Hydrogen carrier; 5. Fermentative bacteria; 6. H₂-producing acetogenic bacteria; 7. Hydrogenotrophic methanogens; 8. Methanotrix; 9. Methanosarcina

列分布的团粒状结构。颗粒表层主要是氢营养型产甲烷细菌和发酵细菌，细菌的分布有一定的“区位化”，即一种细菌以成簇的方式集中存在于一定的区域，而另一种细菌存在于另一区域，相互之间可能发生种间氢转移。颗粒内层主要是乙酸营养型产甲烷细菌、产氢产乙酸细菌等，其中产甲烷丝菌是优势产甲烷菌种群，它与产氢产乙酸细菌之间存在互营共生关系，通常以成束的方式存在。这种束状产甲烷丝菌构成颗粒的核心。

按照这一模型，作者认为产甲烷丝菌构成的核心是颗粒污泥形成和生长的关键。核心的形成直接与颗粒污泥的培养有关。产甲烷丝菌的细胞之间距离很近，一般小于几十微米，因此，相互间的连接成束可能主要依赖于细胞表面的直接作用，如表面电荷的吸引，并构成颗粒的核心骨架。一旦培养条件适宜，这一骨架类似结晶过程的晶核一样，迅速网罗其他类群细菌并发生互营关系，创造更加有利于自身生长繁殖的环境条件，短时间内使核心很快扩增并转化成为肉眼明显可见、粒径比较均一的颗粒污泥，大小一般在 0.5mm 以上。在颗粒污泥的培养过程中观察到，颗粒化转变发生在很短的时间内(约 1—2 周)，其结果也证实这一解释。随着负荷的提高，颗粒逐渐长大，最后发育为成熟的颗粒污泥。

产甲烷丝菌在颗粒污泥中的重要性还表现在与产氢产乙酸细菌的互营共生方面。这种关系是新的发现，并有利于基质的降解。迄今为止，已报道的参与互营共生关系的产甲烷细菌均为氢营养型类群，如产甲烷短杆菌和产甲烷螺菌，因为它们利用 H₂ 的能力较强，生长速率较快。根据 Archer 等的报道^[6]，认为产甲烷短杆菌在互营关系中起主要作用。Dubourguier 等则提出^[7]，产甲烷短杆菌和产甲烷螺菌是互营共生菌，但都没有说明和提到产甲烷丝菌。作者所观察到的产甲烷丝菌的这种新现象，既扩大和丰富了厌氧消化微生物学的基础理论知识，也有助于解释颗粒污泥具有的高代谢活性，对指导颗粒污泥培养有实际意义。通常乙酸营养型产甲烷菌比氢营养型计数值要低^[3,7]，但测定活性时颗粒污泥却表

现出很高的乙酸盐或葡萄糖降解能力。这种代谢活性与计数值的反差,其原因一方面是由于乙酸营养型产甲烷丝菌生长速率较慢且细胞交联成束,另一方面是由于存在互营共生关系,可以维持较高的代谢降解速率。这也说明细菌的计数值并不能完全反映细菌的生理代谢活性。如果提供产甲烷丝菌的适宜生长工艺条件,则会有利于颗粒污泥的培养,这在生产上已有实际应用。

参 考 文 献

- [1] Lettinga, G. et al.: Proc. 4th Int. Symp. on Anaerobic Digestion, pp.279—301, Guanzhou, China, 1985.
- [2] Dolfing, J.: Wat. Sci. Technol., 18(12): 15—25, 1986.
- [3] Dubourguiet, H. C., et al.: Proc. 5th Int. Symp. on Anaerobic Digestion, pp.13—24, Bologna, Italy, 1988.
- [4] 朱丽霞等: 生物学中的电子显微镜技术, 北京大学出版社, 北京, 1983 年。
- [5] Zehnder, A. J. B. et al.: Anaerobic Digestion, pp.45—68, Elsevier Biochemical Press B. V., 1982.
- [6] Archer, C. B. and G. E. Powell: Arch. Microbiol., 14(1): 133—137, 1985.
- [7] Dubourguiet, H. C. et al.: Granular Anaerobic Sludge: Microbiology and Technology, pp. 18—33, Pudou Wageningen, The Netherlands, 1988.

AN OBSERVATION OF METHANOGENIC BACTERIA AND ELUCIDATION OF STRUCTURAL MODEL FOR GRANULAR SLUDGE

Zhu Jianrong Hu Jicui Gu Xiasheng

(Department of Environmental Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

This paper describes the characteristics of composition and distribution of methanogenic bacteria for granular sludge. The observations show that the methanogens at outer layer of granule are mainly hydrogenotrophic, e.g. *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, and the distribution of bacteria exhibits to some extent compartmentation. The methanogenic bacterial populations in inner layer of granule are mainly acetotrophic, and *Methanothrix* is the predominant species. There exists a syntrophic association between *Methanothrix* and H_2 -producing acetogenic bacteria. Based on these observations, the authors propose a preliminary structural model of granular sludge, and have a discussion for it.

Key words Methanogenic bacteria; Granular sludge; Structural model

图 版 说 明

Explanation of plate

颗粒污泥的透射电镜照片: a. 产甲烷丝菌(活细胞, $\times 13000$); b. 产甲烷丝菌(空细胞, $\times 10000$); c. 产甲烷八叠球菌($\times 13000$); d. 产甲烷丝菌和产氢产乙酸细菌的互营共生($\times 10000$).

The photos of transission electronic microscopy of granular sludge: a. *Methanothrix* sp. (active cells); b. *Methanothrix* sp. (empty cells); c. *Methanosarcina* sp.; d. Syntrophic association between *Methanothrix* and H_2 -producing acetogenic bacteria.