

嗜热甲酸甲烷杆菌 602B₃ 与拟杆菌 5G-102 的混合培养

王修垣 龚 革*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 研究了嗜热甲酸甲烷杆菌 (*Methanobacterium thermoformicicum*) 602B₃ 与发酵糖蜜产生 CO₂ 和 H₂ 的拟杆菌 (*Bacteroides* sp.) 5G-102 的人工可配伍性。确定了它们混合培养的适宜培养基组分为 (g/L): CaCO₃ 50.0, NaHCO₃ 4.0, Na₂S 0.16, NH₄Cl 1.07, K₂HPO₄ 1.04, MgCl₂ 0.19, 糖蜜 40 (V/V), 自来水 1L, 起始 pH 6.8~7.2。混合培养物在 60℃ 培养 48h, 甲烷产量达到最高, 约 45mmol/L。人工混合培养成功为进一步研究其在提高石油采收率工艺中的可用性提供了前提。

关键词 混合培养, 嗜热甲酸甲烷杆菌, 拟杆菌, 甲烷产生

在微生物提高石油采收率的基础和应用的研究中, 发酵碳水化合物产气菌和产甲烷菌占有重要地位^[1~3]。前苏联 Kuznetsev^[4] 和 Ivanov 等^[5] 以油层中存在着烃氧化菌和产甲烷菌的代谢偶联为基础, 拟定了提高石油采收率的生物地球化学工艺; 而厌氧发酵糖蜜的菌群则是一些微生物采油工艺的主要参加者^[6, 7]。若能将发酵碳水化合物的细菌与产甲烷菌人工配伍、形成代谢偶联, 将可为不存在这两类细菌的油藏提供可用的菌种、进一步改善有关工艺的增产效率。本文报道将非油田来源的这两类菌株人工配伍的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

三株发酵糖蜜的拟杆菌 (*Bacteroides* sp.) 5G-100、5G-101 和 5G-102 分离自豆腐厂污泥^[7], 9 株产甲烷菌分离自处理生活废水的上流式厌氧污泥床。

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 培养基: A. 产甲烷无机培养基: 按文献 [8] 制备。B. 甲酸钠产甲烷培养基: 向培养基 A 中加入甲酸钠, 使终浓度达到 40mmol/L。C. 4% 糖蜜培养基。D. CaCO₃ 糖蜜培养基: 培养基 C 10ml + CaCO₃ 0.5g。E. 糖蜜产甲烷培养基: 在培养基 D 中再加入 A 的各种成分。起始 pH 均为 6.8~7.2, 厌氧管中的装量为 10ml, 0.55kg/cm² 或 1kg/cm² 灭菌 30min。

1.2.2 培养条件: 除特别提及者外, 均在 60℃ 静止培养。

1.3 分析测定方法

产气量、CH₄、CO₂、H₂ 和生物量的分析测定, 以及厌氧操作和所用仪器另文报道。

* 现在中国科学院成都生物研究所工作。

本文于 1996 年 6 月 25 日收到。

甲酸的定量测定按文献 [9]进行。

2 结果

2.1 配伍菌的选择

2.1.1 原油对产甲烷菌的影响: 应用于采油的菌株必需具有抵抗原油毒性的能力。由于准备用于配伍的三株发酵糖蜜的细菌已成功地应用于油田采油^[7], 本实验只测定了原油对产甲烷菌的影响。

实验是在加有 0.5ml 大庆原油的甲酸钠产甲烷培养基中进行的, 接入生长对数期菌液 0.2ml/管(下同), 培养 40h。甲烷产量的测定结果(表 1)表明, 受试的 9 株产甲烷菌均具有不同程度抵抗原油毒性的能力; 菌株 602B₃几乎不受原油毒性的影响, 为以下的实验所采用。

2.1.2 温度对发酵糖蜜产气菌的影响: 产甲烷菌 602B₃的最适生长温度为 60℃, 因此, 需要测定温度对与其配伍的拟杆菌的影响。将三株拟杆菌分别接种到 4% 糖蜜培养基和

表1 原油对各菌株产甲烷的影响
Table 1 Effects of crude oil on methane production

培养基 Media	菌株 Strains								
	602B ₁	602B ₂	602B ₃	602B ₄	602B ₅	603A ₂	603A ₃	604A ₁	604A ₂
	甲烷产量 Methane production (μmol)								
B	327.4	315.0	296.9	203.7	285.5	256.7	287.4	247.0	325.5
B+原油 B+crude oil	268.2	292.5	295.0	161.9	294.0	211.6	310.9	222.6	300.3

CaCO₃糖蜜培养基中, 置 55℃ 和 60℃ 下培养, 定时测定其产气量。在实验结束时(120h), 用气相色谱定性分析气体组成, 并按文献 [9]测定甲酸产量。结果表明, 三株 *Bacteroides* 降解糖蜜所产气体主要是 H₂和 CO₂, 不含甲烷, 也不产甲酸; 在 CaCO₃糖蜜培养基中的产气量均高于 4% 糖蜜培养基中的; 在 60℃ 时的产气量又高于 55℃ 时的; 而以菌株 5G-102为最好(表 2), 被用于混合培养研究。

表2 *Bacteroides* sp. 5G-102在不同条件下的产气动态
Table 2 Time course of gas production of *Bacteroides* sp. 5G-102 under different conditions

培 养 基 Media	温度 (℃) Temp.	产气量 Gas production (ml)						
		4	12	24	48	72	96	120
		(h)						
糖蜜 Molasses	55	0	0	1.7	6.1	7.5	8	8.2
	60	0	0	3.8	6.6	7.6	7.6	7.6
CaCO ₃ + Molasses	55	0.5	1.8	7.5	15.3	19.9	23.2	27.3
	60	1.3	4.8	12.7	21.0	27.6	32.0	35.3

2.2 菌株 5G-102和菌株 602B₃的可配伍性

分别取这两株菌的菌液各 0.2ml, 单独并混合(1:1 V/V)接入糖蜜产甲烷培养基中, 60℃ 培养 5d。气体产量的测定及其成分的气相色谱分析指出, 单接菌株 5G-102虽产气不少, 但不含甲烷; 单接菌株 602B₃, 几乎无气体产生。而这两株菌的混合培养物不仅产生了大量气体, 而且甲烷产量达 495.2μmol(表 3)。将此混合培养物再传接两代, 第三

表3 单独和混合培养的产气量

Table 3 Gas production by single or mixed cultures

菌株 Strains	产气量 (ml) Gas production	甲烷产量 (μmol) Methane production
5G-102	34	0
602B ₃	0.02	0.013
5G-102+602B ₃	28	495.2

代培养两天后, 测得其甲烷产量在 200μmol 以上, 说明这两株菌具有良好、稳定的配伍性。它们在混合培养物中的细胞形态见图 1。

2.3 混合培养的适宜条件

为确定混合培养物的适宜条件, 以糖蜜产甲烷培养基为基础, 改变各成分的浓度,

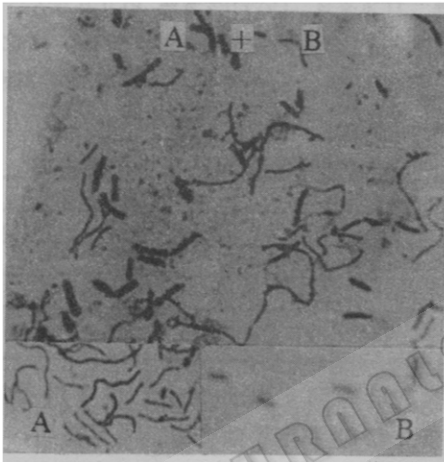


图1 混合培养物的显微摄影(×2000)

A. 嗜热甲酸甲烷杆菌 602B₃; B. 拟杆菌菌株 5G-102; A+B. 混合培养物。

Fig. 1 Microphotographs of mixed culture

A. *M. thermoformicum* 602B₃; B. *Bacteroides* sp. 5G-102; A+B. Mixed culture.

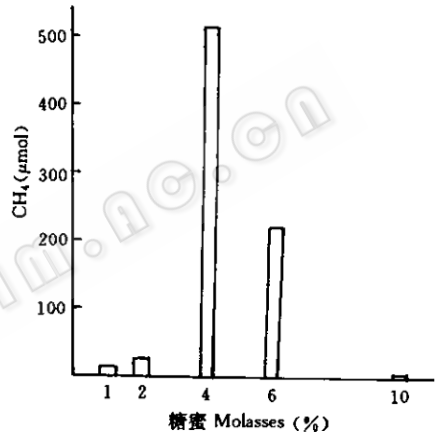


图2 糖蜜对混合菌株甲烷产量的影响

Fig. 2 Effects of molasses concentrations on methane production by the mixed culture

培养 5d, 测产气量和甲烷产量。

2.3.1 糖蜜浓度: 从图 2 可以看出, 糖蜜的用量以 4% (V/V) 为宜。低于此浓度, 菌株 5G-102 用于产生 CO₂ 和 H₂ 的基质不足; 高于此浓度, 糖蜜中的杂质抑制该菌合成甲烷的活性。

2.3.2 NH₄Cl 和 MgCl₂ 浓度: 分别比较在其含量不同的培养中甲烷的产量(表 4)可见, 其适宜用量依次为 1.07g/L 和 0.19g/L。加不加 CaCl₂ 对甲烷产量无明显影响, 与培养基中含有足够的 Ca²⁺ (CaCO₃ 50g/L) 有关。

2.3.3 其它组分的适宜浓度: 混合培养物的产气量和甲烷产量的分析测定结果(表 5)表明, NaHCO₃、K₂HPO₄ 和 Na₂S 在培养基中的适宜浓度依次为 4.0g/L、1.04g/L 和 0.16g/L, 高于或低于此浓度均不利于甲烷的合成。

表4 NH₄Cl和MgCl₂的影响
Table 4 Effects of NH₄Cl or MgCl₂

NH ₄ Cl	含量 (g/L) Content	0	0.54	1.07	2.14	3.21	5.35
	甲烷产量 (μmol) Methane production	128.7	419.6	535.7	434.7	355.7	235.9
MgCl ₂	含量 (g/L) Content	0	0.10	0.19	0.38	0.57	0.85
	甲烷产量 (μmol) Methane production	321.2	367.9	443.5	267.6	295.8	257.8

表5 其它组分的影响
Table 5 Effects of other components

NaHCO ₃	含量 (g/L) Content	0	1.0	2.0	4.0	6.0
	产气量 (ml) Gas production	47.0	40.0	38.0	33.0	7.0
	甲烷产量 (μmol) Methane production	13.5	14.7	19.0	302.7	44.0
K ₂ HPO ₄	含量 (g/L) Content	0	0.52	1.04	2.08	3.12
	产气量 (ml) Gas production	36.0	38.0	35.0	2.5	1.0
	甲烷产量 (μmol) Methane production	435.6	440.5	487.6	42.5	36.9
Na ₂ S	含量 (g/L) Content	0	0.08	0.16	0.32	0.48
	产气量 (ml) Gas production	28.0	26.0	23.0	2.0	1.5
	甲烷产量 (μmol) Methane production	0.46	36.3	444.1	33.2	32.5

2.4 混合培养物的产甲烷动态

根据以上结果确定,混合培养物产甲烷的适宜培养基成分 (g/L) 为: CaCO₃ 50, NaHCO₃ 4.0, NH₄Cl 1.07, N₂HPO₄ 1.04, MgCl₂ 0.19, Na₂S 0.16; 糖蜜 4% (V/V), 自来水 1L, 起始 pH 6.8~7.2.

混合培养物在此培养基中生长和产甲烷(图 3)基本上平行发生。甲烷的产生速度相当快, 至 48h 即达 45.0mmol/L。此后, 气体产量虽然仍在增加, 甲烷产量则不明显。在此过程中, 培养基的 pH 由起始的 7.1 降至 5.7 左右。

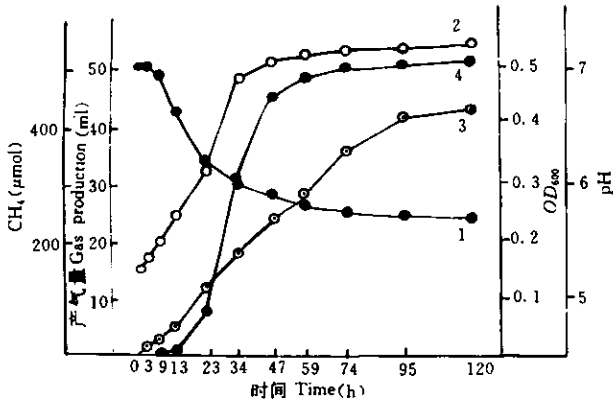


图 3 混合菌株的生长和产气产态
1. pH; 2. OD₆₀₀; 3. 产气量; 4. 甲烷气量。

Fig. 3 Time course of growth and gas production of the mixed culture
1. pH; 2. OD₆₀₀; 3. Gas production; 4. Methane production.

3 讨论

厌氧降解是有机物降解的重要组成部分,其中的沼气发酵是由三类营养群细菌通过三个不同阶段有序的共同作用,将含碳有机物转化成甲烷和 CO_2 的过程^[10]。第一阶段由水解发酵菌将纤维素、淀粉、蛋白质和脂类水解成有机酸、氨、 CO_2 和 H_2 。第二阶段由产氢产乙酸菌将有机酸降解生成乙酸、 H_2 和 CO_2 。第三阶段由产甲烷菌将 H_2 、 CO_2 、甲酸、乙酸等转化为甲烷,同时还有 CO_2 。

水解发酵菌单独降解有机物时形成多种产物。质子还原是多种电子处理方式中的一种。与产甲烷菌协作,质子还原产氢成为主要的电子处理方式,从而使发酵产物发生变化,产生甲烷。

我们将嗜热甲酸甲烷杆菌和发酵糖蜜的拟杆菌混合培养,就是通过氢代谢把这两类菌联系起来,将降解糖蜜产生的侵蚀性不稳定气体—— CO_2 变成与石油烃类同系的稳定气体—— CH_4 。在此混合培养体系中,发酵糖蜜的 *Bacteroides* sp. 5G-102 和 *M. thermoformicicum* 602B₃ 形成代谢偶联,前者为后者提供了生长和产甲烷所需的碳源,并创造了适宜的氧化还原条件,而后者则为前者解除了产氢生化反应的反馈抑制,提高了糖蜜的利用率。

这两株菌的生长和代谢均不受原油毒性的影响,能构成稳定的人工混合培养物,在确定的适宜培养条件下 60°C 培养 2d, 甲烷产量达 45.0mmol/L , 比实验前的 20.5mmol/L 提高了一倍多。菌株 5G-102 发酵糖蜜产生的有机酸主要是乙酸和丁酸^[7]。若能选出降解丁酸的产氢和产乙酸菌和利用乙酸产甲烷的细菌与该菌配伍,甲烷产量可望进一步提高。

培养基中加入 CaCO_3 可促进混合培养物的生长和代谢,与它具有中和酸类的作用有关。油层多半含有一定量的 CaCO_3 , 对它们的应用显然是有利的。

M. thermoformicicum 602B₃ 和 *Bacteroides* sp. 5G-102 都是非油田菌株。这类菌株只要能适应油层的条件,即可作为微生物采油的菌种^[7,11]。因此,可针对温度 60°C 左右、油层水 NaCl 含量低于 1.0% 的油层,研究其应用的可能性。

参 考 文 献

- [1] Hitzman D O. Review of microbial enhanced oil recovery field tests. In: Donaldson E C *et al* ed. *Proc of the Internat Conf on Microbial Enhancement of Oil Recovery*. Springfield: Nat Tech Inf Serv. 1983. 162~218.
- [2] Hitzman D O. Review of microbial enhanced oil recovery field tests. In: Burchfield T B *et al* ed. *Proc of the Symp on Appl of Microorganisms to Petro Techn*, Aug 12~13, Bartlesville: OK, US DOE, 1988. VI-1~VI-41.
- [3] Lazar I. MEOR field trials carried out over the world during the last 35 years. In: Donaldson E C ed. *MEOR-Recent Advances*, Amsterdam: Elsevier, 1991, 485~530.
- [4] 库兹涅佐夫 S I. 为了强化采油和增加石油采收率,微生物学对油层影响方法的制定. 见: 莫吉列夫斯基等著(王修垣译). 微生物学在油气田勘探中的应用. 北京: 科学出版社, 1958. 151~158.
- [5] Ivanov M V, Belyaev S S, Borzenkov I A *et al*. Additional oil production during field trials in Russia. In: Premuzic E *et al* ed. *MEOR-Recent Advances*. Amsterdam: Elsevier, 1993. 373~382.
- [6] Karaskiewicz J. *Izv Akad Nauk SSSR, Ser Biol*, 1976, 5: 790~794.

- [7] Xiu-yuan Wang, Yan-fen Xue, Shu-hua Xie. Characteristic of enriched cultures and their appl to MEOR field tests. In: Premuzic E *et al* ed. MEOR-Recent Advances. Amsterdam: Elsevier, 1993. 335~348.
- [8] Houwen F P, Dijkema C, Schoenmakers C H H *et al*. *FEMS Microbiol Letters*, 1987, **41**: 269~274.
- [9] Bricknell K S. Gas-liquid chromatography. In: Sutter V L *et al* ed. *Wadsworth Anaerobic Bacteriol Manual*, St Louis: C V Mosby Co, 1980. 55, 59~60.
- [10] Bryant M P. *Anim Sci*, 1979, **48**: 193~201.
- [11] Xiu-yuan Wang, Yan-fen Xue, Gang Dai *et al*. Appl of biohuff-n'-puff techn at Jilin oil field. In Bryant R *et al* ed. *Procs of the Fifth Intern Conf on MEOR and Related Biotechn for Solving Environm Problems*. Springfield: Nat Tech Inf Serv, 1995. 115~128.

A MIXED CULTIVATION OF *METHANOBACTERIUM THERMOFORMICICUM* 602B₃ WITH *BACTEROIDES* SP. 5G-102

Wang Xiuyuan Gong Ge

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract An artificial compatibility of *Methanobacterium thermoformicicum* 602B₃ with molasses-fermented *Bacteroides* sp. 5G-102 was studied. A suitable medium for their mixed cultivation was established and composed of (g/L): CaCO₃ 50.0, NaHCO₃ 4.0, Na₂S 0.16, NH₄Cl 1.07, K₂HPO₄ 1.04, MgCl₂ 0.19, molasses 40 (V/V), H₂O 1L; initial pH 6.8~7.2; optimum temperature 60℃. Cultivating 48h under these conditions, its methane production reached to maximum, about 45.0 mmol/L. The success of artificially mixed culture provides a promise for further studying its applicability to enhanced oil recovery.

Key words Mixed culture, *Methanobacterium thermoformicicum*, *Bacteroides* sp., Methane production