

好氧活性污泥中的产甲烷菌*

吴唯民 胡纪萃 顾夏声 朱学庆

(清华大学环境工程系)

赵一章 张 辉 徐元生

(农牧渔业部成都沼气科学研究所)

摘 要

通过最可能数(MPN)计数试验,发现在四种好氧活性污泥中存在产甲烷菌,数量在 10^5 — 10^6 /gVSS,其中有利用 H_2/CO_2 的氢营养型产甲烷菌和既能利用乙酸盐、又能利用 H_2/CO_2 的混合营养型产甲烷菌,可能还有利用乙酸盐的乙酸盐营养型产甲烷菌。活性污泥中存在产甲烷菌可能与污泥絮体内存在厌氧核心和某些产甲烷菌的耐氧性有关。

关键词: 活性污泥法;产甲烷菌;厌氧消化。

一、导 言

产甲烷菌是一类在遗传学上特殊的古细菌,广泛存在于反刍动物的瘤胃和池塘、沼泽、河流、湖泊和海洋的底泥中。在农村沼气池和卵氧污泥消化池等有机废物处理装置中,也存在着大量的产甲烷菌。它们在有机物的厌氧分解中起着重要的作用。根据代谢底物的不同,产甲烷菌可以分为三个代谢群:(1)利用 H_2/CO_2 为底物形成甲烷的氢营养型产甲烷菌(hydrogenotrophic methanogens),这群菌中的许多属还可以利用甲酸盐为底物形成甲烷;(2)利用乙酸盐为唯一底物形成甲烷的乙酸盐营养型产甲烷菌(acetotrophic methanogens);(3)既能利用乙酸盐,又能利用 H_2/CO_2 的混合营养型产甲烷菌(mixed function methanogens)。产甲烷菌是严格厌氧细菌,0.01mg/L的溶解氧即可完全抑制它们的生长^[1]。

迄今为止,对天然的和人工的厌氧生态环境中的产甲烷菌已作了大量的研究,但对好氧生态环境中是否可能有产甲烷菌的活菌存在的研究很少,尤其对废水好氧生物处理系统中是否有产甲烷菌的活动的报道就更少。虽然有人已指出在好氧生物滤池的生物膜内层有甲烷形成^[2],但未见有人报道过膜内的产甲烷菌的情况。对目前应用最多的好氧废水生物处理工艺活性污泥法,尚未见有关其中是否存在产甲烷菌的研究。不过,通过对微生物脱氮的研究,一些研究者认为在活性污泥絮体中存在着缺氧区或厌氧区,在这里会发生脱氮反应^[3,4]。细菌计数试验已证实有脱氮菌存在^[5],从而表明污泥絮体内确有缺氧区甚至厌氧区。本文的目的,是通过活菌的最可能数(MPN)计数试验,确定活性污泥中是

* 中国科学院科学基金资助课题。

否存在产甲烷菌,并进行数量估计和分析它们的代谢群情况,探讨在废水生物处理研究中的意义。

二、材料和试验方法

本研究采用四种活性污泥样品进行产甲烷菌计数试验,详见表 1。它们是国内最常见的处理生活污水、印染废水和石油化工废水的装置内的活性污泥,有一定代表性。1、3 号样品是取样后放入冰箱贮存 1 个月(在 1℃下)后进行计数试验的,由于产甲烷菌在低温下生长极慢,低温贮存对 MPN 计数结果影响不大。2、4 号样品取样后即进行计数试验。

培养基的制备和样品的接种、稀释均采用严格的 Hungate 厌氧技术^[6]。培养基的制备和试剂的加入都是在用 350℃ 还原铜柱脱氧的氮气下操作的,接种和稀释均使用用脱氧氮气换气后的 1.0ml 注射器。

表 1 计数产甲烷菌数用的活性污泥样品

Table 1 Samples of activated sludge for the MPN enumeration of methanogenic bacteria

样 号	曝 气 池	处理废水	取 样 点	装置地点
1	完全混合式 机械表面曝气	印染废水	二次沉淀池 回流污泥管	常州东方红印染厂
2	推流式 鼓风曝气	生活污水	曝气池	北京高碑店污水厂
3	完全混合式 机械表面曝气	石油化工废水	曝气池	北京向阳化工厂
4	完全混合式 机械表面曝气	印染废水	二次沉淀池 回流污泥管	成都四川省棉纺一厂

培养基成分为: 每 1000ml 蒸馏水中含有 NH_4Cl 1.0g; CaCl_2 0.1g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1g; K_2HPO_4 0.4g; KH_2PO_4 0.4g; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.1g; NaHCO_3 1.0g; 酵母膏 2.0g; 胰化酪蛋白 2.0g; 盐酸半胱氨酸 0.5g; 刃天青 0.001g; 微量元素液^[7] 10ml 和维生素液^[7] 10ml。

复合底物培养基是在无底物培养基中再加入乙酸钠和甲酸钠各至 2.0g/L, 并在装入培养基的试管中补充 20265Pa(0.2atm) 的氢气。单一底物培养基分为乙酸盐培养基、甲酸盐培养基和 H_2/CO_2 培养基三种。前两种是在无底物培养基中加入乙酸钠或甲酸钠至 2.0g/L 制成; 后一种是在装有无底物培养基的试管内用无氧注射器补入 81060Pa(0.8atm) 的氢气和 20265Pa(0.2atm) 的二氧化碳。以上培养基的 pH 为 7.0 左右, 培养管为 20ml 厌氧试管, 每管装入培养基 4.5ml。补充氢气和二氧化碳的操作是在接种稀释后进行的。

接种前,将浓缩后的活性污泥 30ml 注入一个 50ml 厌氧血清瓶内,瓶内放有直径 3—4mm 的玻璃珠十余颗。用脱氧氮气驱除瓶内上部空间的空气后加盖密封。用旋涡振荡器振荡分散活性污泥絮体后,用 1.0ml 注射器抽取 0.5ml 试样给 10^{-1} 稀释度的培养管接种,然后按 10 倍稀释比逐级接种稀释至 10^{-9} ,每个稀释度采用 3 支或 5 支培养管(见表 2 和表 3)。接种后,将血清瓶内的剩余活性污泥样品按标准方法^[8]测定其挥发性悬浮固体(VSS)浓度。

表 2 复合底物培养基的产甲烷菌 MPN 值

Table 2 MPN values of methanogenic bacteria with mixed substrate media

样号	平行管数	样品浓度 gVSS/L	MPN 值		95% 置信区间估计		拟合优度 检 验
			$\times 10^6/\text{ml}$	$\times 10^3/\text{gVSS}$	$\times 10^6/\text{ml}$	$\times 10^3/\text{gVSS}$	
1	3	7.3	1.5	2.1	0.42—5.3	0.57—7.3	接受
2	3	2.7	0.48	1.7	0.10—2.0	0.38—7.5	接受
3	5	7.0	9.2	13	2.9—29	4.1—42	接受
4	5	8.9	1.7	1.9	0.65—4.6	0.73—5.2	接受

表 3 单一底物培养基的产甲烷菌 MPN 值

Table 3 MPN values of methanogenic bacteria with single substrate media

底 物	MPN 值		95% 置信区间估计		拟合优度 检 验
	$\times 10^6/\text{ml}$	$\times 10^3/\text{gVSS}$	$\times 10^6/\text{ml}$	$\times 10^3/\text{gVSS}$	
H ₂ /CO ₂	1.1	1.3	0.26—4.7	0.30—5.5	接受
乙酸钠	4.6	5.4	1.0—20	1.2—24	接受
甲酸钠	0.093	0.11	0.023—0.38	0.027—0.44	接受

注: 试样为高碑店污水厂活性污泥, 样品浓度 8.6gVSS/L, 每个稀释度用 3 支平行管。

接种后的培养管在 35℃ 的恒温箱内培养 25—40 天后, 用气相色谱法测定培养管内的上部空间的气体成分, 一周后再测一次。有甲烷的培养管为阳性管, 反之为阴性管。用所得的阳性管和阴性管数据, 在计算机上用改进的 MacDonell 程序^[9] 计算污泥样品的 MPN 值及其 95% 置信区间, 并作拟合优度检验。

微生物相的观察用 Leitz 荧光显微镜。

三、结果与讨论

1. 复合底物培养基计数

用复合底物培养基的 MPN 计数结果见表 2。这种培养基中含有 H₂/CO₂ (CO₂ 来自重碳酸盐)、甲酸盐和乙酸盐, 属于三个代谢群的产甲烷菌都可以生长。从表中看出, 四种活性污泥的产甲烷菌的 MPN 值在 10^8 — $10^9/\text{gVSS}$ 的范围内。这个数量比文献报道的厌氧

消化污泥的产甲烷菌的MPN值($10^8/\text{ml}^{[10]}$ 或 $10^9\text{--}10^{10}/\text{g VSS}$)约低1—2个数量级,比作者测得的高活性的厌氧颗粒污泥的产甲烷菌的MPN值($10^{11}/\text{g VSS}$)低2—3个数量级,但比文献报道的淡水沉积物的MPN值($10^2\text{--}10^6/\text{g SS}^{[11]}$)要大,与用作农村沼气池发酵接种物的藕塘污泥的产甲烷菌数($4\times 10^7/\text{g SS}$)^[12]相近。

以上结果表明,在好氧活性污泥中存在相当数量的产甲烷菌,其作用不可忽视。

2. 单一底物培养基计数

用单一底物培养基对2号样品计数的结果见表3,其中以 H_2/CO_2 和乙酸盐为底物的产甲烷菌的MPN值在 $10^8/\text{g VSS}$ 的水平,与2号样品用复合底物培养基的计数结果基本一致;而以甲酸盐为底物的MPN值比 H_2/CO_2 和乙酸盐的要低一个数量级。以上结果与Zeikus等人用单一底物计数厌氧消化污泥中的产甲烷菌的MPN值的趋势一致,即用甲酸盐为底物所得的MPN值比用 H_2/CO_2 和乙酸盐的低1—2个数量级^[13]。单一底物培养基的计数结果表明,活性污泥中的产甲烷菌可以在 H_2/CO_2 、甲酸盐和乙酸盐中生长,它们可能包括了产甲烷菌的三个代谢菌群。

3. 显微镜观察

氢营养型产甲烷菌和混合营养型产甲烷菌含有较多的辅酶 F_{420} 和 F_{342} 因子,在420nm的紫光下显示蓝绿色荧光,用荧光显微镜可以把它们鉴别出来^[14]。对四种活性污泥进行荧光显微镜观察都发现在污泥絮体中分散有发蓝绿色荧光的杆菌和小球菌。在35℃培养一个月以后的计数培养管的培养基中,可以清楚地检出大量发荧光的杆菌和小球菌。其中杆菌数量较多,有的甚至形成较长的丝状体,形态上类似作者等人以前分离的利用 H_2/CO_2 和甲酸盐的甲酸甲烷杆菌(*Methanobacterium formicicum*)^[15]。在 10^{-4} 以下培养一个月以上的培养管中,一般可以观察到由甲烷八叠球菌(*Methanosarcina*)形成的团块,尤其以2号样品的乙酸盐培养基中的团块为多。经镜检,多数团块(直径在0.5—1mm)中的细胞呈桑子状团聚在一起,颇似马氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina mazei*)的团块^[16]。甲烷八叠球菌一般都既能利用乙酸盐,又能利用 H_2/CO_2 ,属于混合营养型产甲烷菌。这类细菌细胞较大,通常成团聚集生长,只能在低稀释度的计数培养管中出现。以上显微镜观察表明,在活性污泥中存在氢营养型和混合营养型产甲烷菌。

乙酸营养型产甲烷菌迄今被发现的只有甲烷丝菌(*Methanothrix*)^[17, 18]。它们没有明显的荧光特性,不可能用荧光显微镜鉴别。它们的形态比较特殊,细胞呈竹杆状,可以形成很长的丝状体,也可以以2—5个细胞的杆状存在。本研究中,在2号样品的乙酸盐富集培养基中,用显微镜镜检发现了形态上类似甲烷丝菌的细胞。根据扫描电镜观察,在用常州东方红印染厂活性污泥(1号样品)和北京高碑店污水厂活性污泥(2号样品)培养出来的厌氧污泥中,都发现了大量形态上类似甲烷丝菌的细菌(图1a)以及甲烷八叠球菌的团块(图1b)。显然,这些厌氧污泥中的细菌是来自接种物活性污泥的。作者推测,在活性污泥中也可能存在乙酸盐营养的甲烷丝菌;但是还需要进一步研究证实。

4. 活性污泥中存在产甲烷菌的原因

在好氧活性污泥中存在严格厌氧菌产甲烷菌的原因之一可能是由于污泥絮体内部存在厌氧核心。一般情况下,溶解氧进入絮体后很快被外层的好氧菌和兼性菌消耗殆尽,难以贯穿整个絮体,因此容易在絮体内部形成厌氧核心。迄今已发现在活性污泥内有厌氧



图1 来自活性污泥的产甲烷菌 a. 形态上类似甲烷丝菌的细菌 b. 甲烷八叠球菌

Fig. 1 Methanogenic bacteria originated from activated sludge

a. *Methanothrix*-like bacteria.

b. *Methanosarcina*-like bacteria.

的脱氮反应和硫酸盐还原反应^[5,19],在反硝化菌和硫酸盐还原菌的作用下,可以造成产甲烷菌所需要的低氧化还原电位的生存条件.如果确有这种厌氧核心存在,在厌氧条件下生长的兼性厌氧菌和其它专性厌氧菌就会使有机物发酵,提供产甲烷菌必要的底物如 H_2 、 CO_2 和乙酸盐等.原因之二可能与某些产甲烷菌的耐氧性有关.例如,近年发现利用乙酸盐的索氏甲烷丝菌(*Methanothrix soehrgenii*)在高浓度的溶解氧下受到抑制,停止生长和产甲烷;而当它们回到厌氧环境下后,便又恢复了活性和产甲烷^[18].活性污泥法的污泥是处于循环之中的.因此,即使在溶解氧高的曝气池内这类产甲烷菌被抑制,当它们进入溶解氧低的二次沉淀池后,由于其它细菌强烈耗氧,可能提供使它们恢复活性和产甲烷的厌氧条件.

可能在上述两种原因的共同作用下,使活性污泥中积累了相当数量的产甲烷菌.

5. 对废水生物处理的影响

活性污泥中存在产甲烷菌,反映好氧活性污泥实际上是一个十分复杂的生态系统.在这个系统中好氧菌、兼性菌和厌氧菌可以在外界有氧的环境下共生在一起.这也说明了在二次沉淀池可能由于厌氧降解而引起污泥上浮.本研究中发现活性污泥中的产甲烷菌数与文献报道的活性污泥中的脱氮菌数($1.7 \times 10^8/gSS$)^[5]不相上下,说明与反硝化作用引起的二次沉淀池内污泥上浮相比,产甲烷菌的产甲烷作用的后果也不可忽视.特别在夏季水温较高时,产甲烷菌活性较强,在它们与其他产氢、产酸菌的共同作用下,活性污泥的厌氧分解产物如甲烷、氢和 CO_2 也会引起污泥上浮.因此,应尽量减少污泥在二沉池内的停留时间,在设计上尽量消灭死区.

活性污泥中拥有属于不同代谢群的产甲烷菌,而且具有相当数量,使它有可能用作厌

氧反应器的接种物。显然,与活性污泥性质相近的生物滤池污泥和好氧接触氧化池污泥也同样适用。近年来有机废水厌氧处理工艺如厌氧升流式污泥床(UASB)反应器和厌氧滤池等越来越受重视。这些装置一般采用厌氧消化污泥为接种物进行启动,但我国目前大型厌氧消化池数量很少,致使有的地区在启动大型废水厌氧反应器时难以获得足够量的接种污泥。最近,作者等人已试验成功用印染厂活性污泥和生活污水活性污泥为接种物启动小型UASB反应器,并得到了产甲烷颗粒污泥^[20]。鉴于我国不少大中城市都有活性污泥法废水处理装置可提供剩余活性污泥,利用好氧活性污泥为接种物启动厌氧反应器,在生产上是实用价值的。

四、结 论

通过MPN计数试验,发现在四种好氧活性污泥内存在产甲烷菌,数量在 10^8 — 10^9 /gVSS,它们包括了利用 H_2/CO_2 为底物产甲烷的氢营养型产甲烷菌和既能利用乙酸盐,也能利用 H_2/CO_2 的混合营养型产甲烷菌,但是否也含有利用乙酸盐的乙酸盐营养型产甲烷菌尚待试验验证。产甲烷菌在活性污泥中的存在,可能与污泥絮体中存在厌氧核心与某些产甲烷菌的耐氧性有关。

作者感谢常州东方红印染厂、常州市环境保护局、北京高碑店污水厂、北京向阳化工厂、四川省第一棉纺厂提供了本研究所用的活性污泥样品,并感谢荷兰Wageningen农业大学微生物学系主任A.Zehnder教授的宝贵意见和讨论。

参 考 文 献

- [1] Wolfe, R. S., *Adv. Microb. Physiol.*, 6, 107(1971).
- [2] Ramalho, R. S., *Introduction to Wastewater Treatment Processes*, p. 239. Academic Press, 1977.
- [3] Benefield, L. D. et al., *Biological Process Design for Wastewater Treatment*, p. 224. Prentice-Hall Inc., 1980.
- [4] Rittmann, B. E. et al., *J. WPCF*, 57, 300(1985).
- [5] 须藤隆一著, 废水处理の生物学, p. 308, p. 365. 产业用水调查会, 1977.
- [6] Bryant, M. P., *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 1324(1972).
- [7] Zeikus, J. G. et al., *J. Bacteriol.*, 113, 461(1973).
- [8] 美国公共卫生协会等编著(张曾博等译), 水和废水标准检验方法(第13版), 中国建筑工业出版社, 1978.
- [9] MacDonell, M. T. et al., *J. Microbiol. Methods*, 2, 1(1984).
- [10] Zeikus, J. G. et al., *Anaerobic Digestion*, Stafford, D. A. Eds., p. 75. A. D. Scientific Press, 1979.
- [11] Zeikus, J. G. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 99(1976).
- [12] Oi Susumi et al., 中国沼气协会等编, 第四届国际厌氧消化讨论会文集, p. 77. 中国广州, 1985.
- [13] Zeikus, J. G. et al., 中国沼气协会等编, 第四届国际厌氧消化讨论会文集, p. 241. 中国广州, 1985.
- [14] Doddema, H. J. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 752(1978).
- [15] 赵一章等, 中国沼气协会等编, 第四届国际厌氧消化讨论会文集, p. 251. 中国广州, 1985.
- [16] 赵一章等, 微生物学报, 24(2), 99(1984).
- [17] Zehnder, A. J. B. et al., *Arch. Microbiol.*, 124, 1(1980).
- [18] Huser, B. A. et al., *Arch. Microbiol.*, 132, 1(1982).
- [19] 田口广著(孙玉修等译), 活性污泥膨胀与控制对策, p. 237. 中国建筑工业出版社, 1982.
- [20] Wu Weimin et al., *Water Research*. (Submitted).

1986年5月13日收到

METHANOGENIC BACTERIA IN AEROBIC ACTIVATED SLUDGE

Wu Weimin, Hu Jicui, Gu Xiasheng, Zhu Xueqing

(Department of Environmental Engineering, Tsinghua University)

Zhao Yizhang, Zhang Hui, Xu Yuansheng

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

ABSTRACT

Methanogenic bacteria of 10^8 to 10^9 /g VSS were enumerated in four kinds of aerobic activated sludge by the Most Probable Number (MPN) technique. The bacteria were identified as hydrogenotrophic methanogens utilizing H_2/CO_2 as substrate, mixed function methanogens utilizing acetate or H_2/CO_2 and, presumably, acetotrophic methanogens utilizing acetate. The growth of the methanogenic bacteria in activated sludge is probably attributed to the existence of anaerobic nuclei in the sludge flocs and the oxygen tolerance of some methanogenic bacteria.

Keywords: activated sludge; methanogenic bacteria; anaerobic digestion.