

嗜酸产甲烷菌及其在厌氧处理中的应用*

郭晓慧 吴伟祥** 韩志英 石德智

(浙江大学环境与资源学院环境工程系, 杭州 310029)

摘要 产甲烷菌在自然界碳素循环过程中发挥着重要作用. 酸性泥炭沼泽环境中存在着多种未知的产甲烷古菌, 其中嗜酸产甲烷菌因其特殊的生长代谢特征近年来引起学者的广泛关注. 若将嗜酸产甲烷菌应用于高浓度有机废物或废水的厌氧消化过程中, 可从本质上克服因酸积累造成的产甲烷抑制, 减少运行成本, 扩展厌氧消化处理技术的应用范围. 本文综述了嗜酸产甲烷菌的富集分离培养方法、生理生化特性、代谢特征及相关分子生物学研究等内容, 并对其在厌氧处理中的应用前景进行了分析和展望, 提出了未来研究的方向.

关键词 酸积累 嗜酸产甲烷菌 生理生化特性 厌氧处理

文章编号 1001-9332(2011)02-0537-06 **中图分类号** Q142.9; X172 **文献标识码** A

Acidophilic methanogens and their applications in anaerobic digestion. GUO Xiao-hui, WU Wei-xiang, HAN Zhi-ying, SHI De-zhi (*Department of Environment Engineering, College of Environment and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2011, 22(2): 537-542.

Abstract: Methanogens play an important role in global carbon cycle. There exists a range of unknown methanogenic archaea in acidic peat lands, among which, acidophilic methanogens have attracted increasing research interests because of their special metabolic characteristics. To introduce acidophilic methanogens in the anaerobic digestion process of high concentration organic wastes or waste water could essentially overcome the inhibition of acid accumulation on the methanogens and help reduce the operation cost, broadening the industrial application of anaerobic bio-treatment technology. In this paper, we reviewed the recent researches on acidophilic methanogens, with the focus on enrichment and isolation methods, physiological and biochemical characters, metabolic characteristics, and application of molecular biology. The potential applications of acidophilic methanogens in anaerobic digestion process were analyzed and proposed, and the directions for further researches were suggested.

Key words: acid accumulation; acidophilic methanogen; physiological and biochemical characters; anaerobic digestion.

产甲烷菌是类严格厌氧的古菌, 由其完成的产甲烷过程通常是厌氧生物处理工艺中最重要限速步骤^[1]. 大多数的产甲烷菌生长 pH 范围为 6.0 ~ 8.0, 最适生长 pH 接近 7.0^[2]. 然而, 在厌氧生物处理尤其是高浓度有机废物处理过程中, 发酵产生的挥发性脂肪酸大量积累, 极易抑制产甲烷菌的活性, 造成系统运行效率不高. 在实际厌氧消化工艺中, 常通过投加大量化学碱来提高碱度以维持系统稳定, 这不仅增加了运行费用, 同时人为调节而非微生物

自身代谢调节所实现的酸碱平衡易受到外界环境因子剧变的冲击而失衡, 因此对监测控制的要求较高^[3]. 如果能够利用嗜酸产甲烷菌实现高浓度有机废物的厌氧处理, 则可大大降低厌氧处理的成本并扩展厌氧处理工艺的应用范围^[4].

在自然界中, 酸性泥炭沼泽地主要分布于地球中高纬度地区, 虽然仅占全球 3% 的陆地面积, 却拥有全球土壤环境碳储量的 1/3, 在全球碳循环过程中起着重要作用^[5]. 特殊的酸性环境孕育了大量的嗜酸产甲烷菌, 成为该环境甲烷产生的主要贡献者. 本文主要对嗜酸产甲烷菌的富集分离培养、生理代谢特征、分子生物学及其在厌氧消化处理中的应用

* 浙江大学-日本富士电机创新中心项目和国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07101-006-04)资助.

** 通讯作者. E-mail: weixiang@zju.edu.cn

2010-07-09 收稿, 2010-11-18 接受.

等方面的研究进展进行概述。

1 嗜酸产甲烷菌的界定

关于嗜酸微生物的量化分类指标至今存有争议。狭义上,将最适生长 pH 在 3.0 以下的微生物称为极端嗜酸微生物,而最适生长 pH 为 3.0 ~ 5.0 的微生物称为中度嗜酸微生物^[6]。目前研究发现的大多数嗜酸微生物主要生长在由硫磺或其化合物产生的特殊酸性环境中,这些环境多为地热环境或由此起源的采矿区及与之伴生的废弃物,主要种类有极端嗜酸的硫氧化硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*)、中度嗜酸的铁氧化硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) 等^[7]。相对而言,对厌氧环境中嗜酸微生物的研究还很少。近年来,随着全球温室效应的加剧,厌氧微生物特别是厌氧产甲烷菌在碳循环中的重要作用研究越来越引起科学家们的关注,对于嗜酸产甲烷菌的研究也随之增多。

鉴于目前关于嗜酸产甲烷菌的研究并未见之于极端酸性环境,且在废物厌氧生物处理过程中 pH 也未达到极端酸性范围,从应用角度出发,本文中讨论的嗜酸产甲烷菌是指广义上的嗜酸微生物,即将最适生长 pH 低于 6.0 的产甲烷菌归为嗜酸产甲烷菌,而将能在 pH 低于 6.0 条件下生长代谢并具有产甲烷活性的产甲烷菌称为耐酸产甲烷菌。

2 嗜酸产甲烷菌的富集分离培养及其生理特性

前苏联科学家首先发现产甲烷微生物 *Methanobacillus* 在 pH 4.0 条件下能正常生长,但关于该菌的后续研究未见报道^[8]。嗜酸产甲烷菌富集培养以及分离鉴定的报道集中于 2000 年以后。迄今文献报道过的嗜酸产甲烷菌及其代谢特征见表 1。

从现有的文献来看,目前得以分离培养和命名的嗜酸产甲烷菌种类较少,但这并不能说明其在自然界中存在的种类少。由于甲烷菌对环境因子和营养基质的高度敏感性,特别是在厌氧产甲烷过程中不同菌群间的种间互作关系,利用分离培养等传统微生物学方法对作为严格厌氧古菌的产甲烷菌进行研究本身存在一定困难^[9],嗜酸产甲烷菌的研究还处于起步阶段。除表 1 中所列的 5 株嗜酸产甲烷菌外,还有一些学者在研究中得到了嗜酸产甲烷菌的富集培养物,但往往在进一步转接纯化过程中遇到问题。如 Willams 等^[10]在明尼苏达泥炭沼泽地中分离得到嗜酸产甲烷菌的富集培养物 O-1 能在 pH 低至 3.0 的培养基中产甲烷,在 pH 大于 5.3 的培养基

中有生长现象,通过间接免疫荧光技术 (indirect immunofluorescence technique) 分析得出该菌群与产甲烷杆菌科具有较大的相似性;Sizova 等^[11]在研究西西伯利亚酸性泥炭沼泽地中的微生物种群结构时,富集得到两个含有高密度嗜酸产甲烷菌的混合菌群 '26' 和 'K',两者在短期试验时间内的最适生长 pH 为 4.9 ± 0.5 ,通过系统发育、荧光原位杂交技术 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、限制性片段长度多态性技术 (restriction fragment length polymorphisms, RFLP) 的综合应用与分析,得出富集物 '26' 中含有一种隶属于甲烷杆菌属的产甲烷古菌,'K' 中含有两种产甲烷古菌分别隶属于 RC1 (Rice cluster) 和甲烷微菌属,但经过多种尝试都未能分离得到相应的纯培养物。

表 1 所列的 5 株嗜酸产甲烷菌中,2 株分离自厌氧消化处理反应器,另 3 株分离自位于北半球的自然酸性沼泽地;其中 1 株是球形菌,其他 4 株为杆状菌,但这 5 株均为氢型产甲烷菌。在中性自然环境中,乙酸型产甲烷菌对甲烷量的贡献率约为 70%,氢型产甲烷菌的贡献率约为 30%,然而,在自然酸性泥炭沼泽环境中往往能够发现氢型产甲烷作用对甲烷气体的产生具有相对较高的贡献率。Horn 等^[12]在研究德国一个酸性贫营养沼泽地的甲烷生成途径时,发现添加 H_2 可明显促进甲烷的产生,氢气浓度随甲烷的产生而降低,但在添加乙酸、丙酸、丁酸的处理中,有机酸积累而甲烷产率与未添加氢气对照相比并未出现显著差异,得出该沼泽地生成甲烷的方式主要是通过氢裂解途径。Galand 等^[13]利用同位素示踪技术对位于芬兰中部的 3 个不同类型酸性泥炭沼泽地的产甲烷途径进行了研究,结果发现在贫营养和雨养沼泽 (ombrotrophic bog) 中氢型产甲烷途径的贡献远远大于乙酸型产甲烷途径。但也有少数不同现象,Avery 等^[14]在研究位于美国密歇根州酸性泥炭沼泽地甲烷排放规律时发现甲烷产生率随季节性变化较大,在温度较高的 5 月和 6 月甲烷产生量最大,乙酸发酵途径贡献率占 84%。Kotsyurbenko 等^[15]在研究西西伯利亚一个贫营养沼泽地时发现,随着 pH 的降低,产甲烷的途径由乙酸利用型向氢气利用型转变。该研究结果进一步表明氢型产甲烷菌更有可能具有嗜酸的生理特征。尽管乙酸型产甲烷菌在酸性沼泽环境中的作用目前还不明确,但可以肯定,氢型产甲烷菌在酸性自然环境中的作用远远大于其在中性环境中的作用。

表 1 分离得到的嗜酸产甲烷菌纯培养物的基本特征

Table 1 General characteristics of some isolated acidophilic methanogens

名称 Name	分离年份 Isolated time	分离地点 Isolated place	形态特征 Morphologic characteristics	利用底物 Substrate used	生长 pH 范围 pH range for growth	最适生长 pH Optimum pH	生长温度 Temperature for growth (°C)	最适生长温度 Optimum temperature (°C)	倍增时间 Doubling time
<i>Methanobacterium espanolae</i> sp. nov.	1990	加拿大某造纸厂废水处理污泥	单个生长, 杆菌, 革兰氏阳性, 长 6.0 μm , 直径 0.8 μm	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$ 0 ~ 25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酸促进生长	4.3 ~ 7.7	5.5 ~ 6.0	15 ~ 55	35	-
<i>Methanobrevibacter acididurans</i> sp. nov.	2002	酒糟废水处理污泥	短杆, 革兰氏阳性, 直径 0.3 ~ 0.5 μm	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$	5.0 ~ 7.5	6.0	25 ~ 40	35	-
<i>Methanoregula boonei</i>	2006	纽约 Mclean bog 泥潭沼泽	细长杆菌, 长 0.8 ~ 3.0 μm , 直径 0.2 ~ 0.3 μm	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$	4.0 ~ 5.8	5.0	10 ~ 40	37	2.0 d
<i>Methanobacterium strain</i>	2007	西西伯利亚泥炭沼泽地	长杆状菌, 单个或多个共生长, 不规则缠绕	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$, 甲酸盐	3.8 ~ 6.0	5.5 ~ 6.0	5 ~ 30	25 ~ 30	-
<i>Methanosphaerula palustris</i>	2008	纽约中部中营养沼泽	球形菌, 直径 0.5 ~ 0.8 μm , 对生, 革兰氏阳性, 有多条鞭毛, 发强蓝荧光	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$, 低浓度甲酸	4.8 ~ 6.5	5.3 ~ 5.5	7 ~ 37	30	19 h

3 嗜酸产甲烷菌富集培养基的特点

通过分析文献中有关嗜酸产甲烷菌生长代谢所需的适宜理化条件, 可以归纳总结出嗜酸产甲烷菌富集分离培养基所须具备的几个特点:

1) 模拟原位酸性环境的营养特征 美国 Cornell 大学的 Bräuer 等^[16-18] 分离得到 2 株嗜酸产甲烷菌, 在分离过程中所用的基础培养基就是模拟自然酸性泥炭沼泽地矿物营养低的条件特征而设计的低离子强度培养基 PM1. Sizova 等^[11] 通过对不同培养基反复试验, 最终利用模拟原位环境条件成功地从泥炭藓沼泽地中富集到了 2 个嗜酸产甲烷菌群, 并分别对这 2 个嗜酸菌群进行 15 次和 20 次的转移, 对其形态、生理特性、系统发育等进行了较全面的分析, 他们所用的富集培养基的特点之一是以无氮基质为基础培养基, 每种添加成分的浓度为 1 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 总离子强度小于 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2) 添加合适的抗生素 合适抗生素的添加可以抑制杂菌生长, 而对目的菌无抑制作用, 使目的菌在培养基上得到优势生长, 从而达到富集分离的目的. Bräuer 等^[16] 以酸性沼泽土壤作为接种物, 发现与对照相比在富集培养基中添加利福平后有效促进 H_2/CO_2 向甲烷转化. 推测可能是因为添加利福平抑制了乙酰化细菌的活性, 从而降低了 H_2/CO_2 向乙酸转化的速率, 避免了乙酸积累对氢型产甲烷的抑制作用. 利用该培养基, 他们成功富集到了最适生长

pH 为 5.0 的氢型产甲烷菌群. Cadillo-Quiroz 等^[19-20] 对分离得到的纯种 E1-9CT 进行了详细的生理特征研究, 发现该菌具有抗性作用的抗生素有盘尼西林、氨基青霉素、四环素、杆菌肽、卡那霉素 (Kanamycin)、奇霉素等, 而氯霉素对该菌的生长具有明显抑制作用. 然而, Sizova 等^[11] 试图通过在培养基中添加卡那霉素的方式来分离嗜酸产甲烷纯种, 却未获成功.

3) 选择合适的还原剂和 pH 缓冲液 严格厌氧微生物的生长要求很低的氧化还原条件. 因此在厌氧微生物培养基中常须添加一定量的还原剂. 常用的还原剂为 1 ~ 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{Na}_2\text{S} + \text{L}^-$ 半胱氨酸-HCl 或抗坏血酸^[21]. 传统厌氧培养基中一般使用的 $\text{Na}_2\text{S} + \text{L}^-$ 半胱氨酸-HCl 浓度会抑制环境中嗜酸产甲烷菌的活性. Cadillo-Quiroz 等^[20] 研究发现嗜酸产甲烷菌 *Methanosphaerula palustris* gen. nov., sp. nov. 对 Na_2S 的需求很低, Na_2S 浓度超过 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 就有明显的抑制效应. 嗜酸产甲烷菌的培养基中多选择柠檬酸三价钛或三乙酸胂钛 (titanium nitrilotriacetate) 作为还原剂^[10, 16, 20]. 此外, 在筛选嗜酸产甲烷菌的过程中需加 pH 缓冲液将 pH 维持在一定的酸性水平. 合适的 pH 缓冲液除须具有较强的缓冲能力外, 引入的非氢根离子不能对微生物生长代谢产生较大的抑制作用. 在嗜酸产甲烷菌富集与分离培养基中常用的 pH 缓冲液有磷酸盐缓冲液^[10]、HOMEPIPES [homopiperazine-N, N'-bis-2 (ethanesul-

fonic acid)]缓冲液^[16,19]、PIPES 缓冲液和 MES 缓冲液[2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid]^[16],以及柠檬酸-磷酸盐缓冲液^[22],且一般选用的浓度为 1 ~ 10 mmol · L⁻¹.

4 酸性环境中产甲烷菌的分子生物学研究

分子生物学技术无需富集培养微生物,而是直接以生物的遗传物质为研究对象,在一定程度上克服了传统微生物研究方法的缺陷,对微生物及其种群研究具有更多优势,特别是对实验室条件下难以培养的微生物而言更具优势. FISH、T-RFLP、16S rRNA 基因和甲基辅酶 M 还原酶 α 亚基(*mcr A*) 功能基因克隆文库(clone library),定量 PCR(quantitative PCR)等均被大量应用于酸性环境中产甲烷菌的研究.

基于 16S rRNA 分子生物学技术的研究表明,在酸性泥炭沼泽中存在多种新型产甲烷菌属或菌种. 其中有一类隶属于甲烷杆菌目科水平分支的产甲烷菌群(被称作 R10 或 fen cluster 或 E1/E2 cluster)在多个不同类型的酸性沼泽地的微生物 16S rRNA 基因克隆文库中均占很大的比例,该种群可以利用 H₂/CO₂ 产甲烷,且被证明很可能是嗜酸的产甲烷菌. Hales 等^[23]通过构建 16S rRNA 基因克隆文库发现英格兰北部的酸性沼泽地中的产甲烷古菌序列聚集于产甲烷八叠球菌目和产甲烷微杆菌目,其中以属于 R10 类群的克隆序列为主要序列. 同样 Galands 等^[13]在芬兰一个贫营养沼泽中发现的 21 个 *mcr A* 基因序列中,大约一半是属于 R10 家族,他们称之为 fen cluster. Cadillo-Quiroz 等^[24]通过构建 16S rRNA 基因克隆文库和运用 T-RFLP 技术与定量 PCR 技术详细分析比较了纽约和芝加哥 2 个酸性泥炭沼泽地产甲烷和产甲烷微生物群落结构的垂直变化,证明了产甲烷群落 E2 在酸性沼泽中的大量存在,并随取样深度加深(pH 升高)而减少,据此推测该群落很可能是专性嗜酸的产甲烷群落. Horn 等^[12]在德国一个沼泽中利用 pH 4.5 的酸性培养基富集到了嗜酸产甲烷混合菌群,通过 16S rRNA 基因序列分析,发现该富集培养物包含隶属于 R10 的 AMC1 序列. Brauer 等^[18]用酸性培养基得到了 2 个产甲烷的富集培养物 6A 和 NTA,2 个富集物均包含了一种产甲烷古菌和 2 种细菌,其中产甲烷菌的 16S rRNA 基因和 *mcrA* 序列都属于 R10 种群.

利用分子生物学技术还可为新菌种富集分离条件的优化和菌种纯化鉴定提供依据. Cadillo-Quiroz

等^[19]发现在中营养沼泽的古菌群落中有相当比例的 E1 群落分布,于是试图从该沼泽泥炭样品中分离得到嗜酸产甲烷菌,但在初期的富集培养物中,得到的却是隶属于甲烷螺旋菌科的菌群. 通过采用 T-RFLP 分析手段作为富集培养基的优化选择工具,经过转接培养,最终纯化得到了嗜酸产甲烷菌 *Methanosphaerula palustris* gen. nov. sp. nov. 同样在嗜酸产甲烷菌 *Methanoregula boonei* 的纯化鉴定过程中,分子生物学技术也起到了重要作用. Brauer 等^[17]分离培养获得了细直杆状和不规则球状两种形态的产甲烷菌培养物. 起初认为占少数的不规则球状微生物是异型型杂菌,通过克隆文库的构建发现两种形态微生物的 16S rRNA、16S ~ 23S ITS 和 23S rRNA 基因的相似度均高达 99.7%,据此得出两者可能是同种微生物表现出的不同形态.

5 嗜酸产甲烷菌的应用

目前,对于嗜酸产甲烷菌在有机废弃物或废水厌氧处理工艺中的直接应用研究较少. 唯一的报道是 Savant 等^[25-26]对比分析了分离自酿酒废水厌氧处理酸化反应污泥中的嗜酸产甲烷菌(*Methanobrevibacter acididurans*)和在厌氧消化反应器中常见的产甲烷菌(*Methanobacterium bryantii*)的厌氧消化处理效果,结果表明,在高浓度挥发性脂肪酸(VFA),尤其是高浓度乙酸存在的条件下,前者表现出明显的优势,而且,无论是在酸化反应器还是在产甲烷反应器中投加该菌种的富集物,均可提高甲烷产率并降低 VFA 在系统中的积累. 该研究结果为嗜酸产甲烷菌在厌氧处理工艺中的应用提供了理论依据.

相比之下,通过驯化富集获得耐酸产甲烷污泥以期达到降解高浓度有机物的研究相对较多. 这是因为相对于嗜酸产甲烷菌的分离而言,驯化富集耐酸产甲烷污泥比较容易. 大多数的研究都是基于厌氧反应系统中原有的微生物群落通过加酸或提高负荷逐步降低系统的 pH 进行驯化诱导,形成耐酸的微生物种群结构或是特殊分布的生态结构以形成有利于产甲烷菌生存的生境(如颗粒污泥),考察系统在低 pH 条件下是否仍能维持一定的运行效果. Jain 等^[27]将厌氧处理系统 pH 值以每次降低 0.5 个单位的速度从 7.0 降至 4.0,检测数据表明在 pH 降低过程中,当 pH 在 5.0 以上时,产甲烷速率为 pH 7.0 时的 75% 以上,pH 5.0、4.5 和 4.0 的条件下系统的产甲烷速率分别为 pH 7.0 时的 67%、37% 和 34%. 若将系统 pH 7.0 直接降低为 5.5 时,产气率接近于

零,直接降为 4.5 或 4.0 时,系统则完全停止产气。该试验证明了通过逐步降低系统 pH 驯化耐酸产甲烷菌的可行性。Taonic 等^[28]在研究乙酸溶液产甲烷时发现,初始 pH 4.5 的处理比初始 pH 7.0 甲烷产率高 30%,其原因可能是由于低 pH 条件下水溶液中以重碳酸盐形式溶解 CO₂ 的量减少,得以被自养产甲烷菌利用,即通过 H₂+CO₂ 途径使产甲烷微生物活性得以加强。该课题组在半连续厌氧发酵试验中发现,pH 长期(近 200 d)维持在 4.0~5.5 范围内,持续产生大量甲烷,推测将产甲烷菌在酸性条件下进行充分驯化,能达到与中性条件相当的产甲烷率和有机物(COD)去除率^[29]。左剑恶等^[30]和凌雪峰等^[31-32]分别以中性颗粒污泥和河底沉积物为接种物,以人工配水为进水,逐步将反应器内的 pH 从 7.2 降至 6.0,成功培养出了具有良好沉降性能和产甲烷活性的耐酸颗粒污泥。系统在 pH 5.8~6.0,有机负荷为 5.2~7.5 kg COD m⁻³·d⁻¹ 条件下连续稳定运行了 100 多天,COD 去除率达到 90% 左右。以上结论表明在低 pH、低碱度条件下实现稳定的产甲烷过程是可行的。

6 研究展望

嗜酸产甲烷菌广泛分布于自然酸性环境及厌氧处理构筑物中,对碳素循环具有重要意义。高浓度有机废弃物或废水厌氧生物处理技术的研究有助于提高废物处理效率,降低废物处理成本。若将嗜酸产甲烷菌应用于厌氧处理工艺中,则可从本质上突破高浓度有机废弃物厌氧处理工艺产甲烷过程易受酸化抑制的技术瓶颈,从而实现高浓度厌氧处理的高效稳定运行。因此,开展对嗜酸产甲烷菌的研究,不论对全球自然生态,还是对废物处理以及能源利用均具有重要意义。

目前对嗜酸产甲烷菌的研究,大多集中在对嗜酸产甲烷菌的分离驯化及系统发育分析等方面,与厌氧处理工艺相关的嗜酸产甲烷菌研究相对较少,嗜酸产甲烷菌的嗜酸机制机理研究还未见报道。总结目前的文献报道,我们提出以下展望:

1) 嗜酸产甲烷菌的富集分离培养与生长代谢研究:嗜酸产甲烷菌特殊的生长条件对培养基配制的要求较高。若要分离培养获得纯种,需通过大量实验对培养基成分与配比进行优化。应用分子生物学技术检测分析与嗜酸产甲烷菌可能相对应的基因片段的丰度可以提高培养基优化的效率。此外,对嗜酸产甲烷菌的生长条件进行更为详细的研究,并揭示

其生长代谢特征,可以为将来的应用奠定基础。

2) 嗜酸产甲烷菌嗜酸机制机理的研究:嗜酸厌氧菌的研究相对起步较晚,其中嗜酸产甲烷菌的研究由于其严格的生理生长条件更是进展缓慢。嗜酸厌氧菌的嗜酸机制机理研究也只有关注于代谢调节机制方面的少量研究^[33-34]。因此,要全面深入地了解嗜酸产甲烷菌,须从代谢途径的调节、种间互作和相应的功能基因等方面对嗜酸产甲烷菌的嗜酸机制机理进行研究。

3) 耐酸产甲烷污泥的快速培养,耐酸机理及其微生物种群结构的研究:鉴于产甲烷菌对酸度的敏感,驯化耐酸产甲烷污泥的过程中对 pH 的监控要求高,pH 降低的梯度小(0.2~0.5 个单位),驯化时间长。因此耐酸产甲烷污泥的快速培养对于其规模化应用无疑具有重要意义。此外,基于形态结构特征形成的耐酸特性对负荷冲击抵抗力弱,耐酸污泥中产甲烷微生物种群结构研究少,耐酸污泥的耐酸机制机理还有待深入研究,若能提高嗜/耐酸产甲烷菌群在耐酸特性中的作用,耐酸污泥中以真正的耐酸菌群为主,将会提高厌氧工艺运行的稳定性。

4) 嗜酸产甲烷菌在实际的厌氧消化工艺中的应用研究:现有文献对嗜酸产甲烷菌的研究多基于自然酸性环境,其富集分离纯化条件要求苛刻,生长代谢条件也与一般的产甲烷菌有所不同。厌氧消化工艺产甲烷菌常与多种发酵微生物营共生互养的关系,其中嗜酸产甲烷菌群在复杂的反应过程中发挥着怎样的作用,及将分离得到的嗜酸产甲烷菌应用于厌氧消化工艺中,是否能发挥预期的效应还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Ding W-X (丁维新), Cai Z-C (蔡祖聪). Effect of temperature on methane production and oxidation in soils. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2003, **14**(4): 604-608 (in Chinese)
- [2] Daniels L, Sparling R, Sprott GD. The bioenergetics of methanogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984, **768**: 113-163
- [3] Pfeffer JT, Khan KA. Microbial production of methane from municipal refuse. *Biotechnology and Bioengineering*, 1976, **18**: 1179-1191
- [4] Zuo JE, Ling XF. A study on characteristics of two acid-tolerant methanogenic granular sludges and their kinetics. *Transaction of 3th Workshop on Environment Simulation and Pollution Control*, Beijing, 2003: 211-217
- [5] Lai DYF. Methane dynamics in northern peatlands: A review. *Pedosphere*, 2009, **19**: 409-421
- [6] Johnson DB. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **27**:

- 307-317
- [7] Robbins EI. Bacteria and archaea in acidic environments and a key to morphological identification. *Hydrobiologia*, 2000, **433**: 61-89
- [8] Wolfe RS, Higgins IJ. Microbial biochemistry of methane—a study in contrasts. *International Reviews in Biochemistry*, 1979, **21**: 267-353
- [9] Zuo J-E (左剑恶), Xing W (邢薇). Psychrophilic methanogens and their application in anaerobic wastewater treatment. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2007, **18**(9): 2127-2132 (in Chinese)
- [10] Williams RT, Crawford RL. Methanogenic bacteria including an acid-tolerant strain from peatlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, **50**: 1542-1544
- [11] Sizova MV, Panikov NS, Tourova TP, et al. Isolation and characterization of oligotrophic acid-tolerant methanogenic consortia from a *Sphagnum* peat bog. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **45**: 301-315
- [12] Horn MA, Matthies C, Küsel K, et al. Hydrogenotrophic methanogenesis by moderately acid-tolerant methanogens of a methane-emitting acidic peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**: 74-83
- [13] Galand PE, Fritze H, Conrad R, et al. Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic archaea in three boreal peatland ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**: 2195-2198
- [14] Avery GB, Shannon RD, White JR, et al. Controls on methane production in a tidal freshwater estuary and a peatland: Methane production via acetate fermentation and CO₂ reduction. *Biogeochemistry*, 2003, **62**: 19-37
- [15] Kotsyurbenko OR, Friedrich MW, Simankova MV. Shift from acetoclastic to H₂-dependent methanogenesis in a West Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic methanobacterium strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**: 2344-2348
- [16] Bräuer SL, Yavitt JB, Zinder SH, et al. Methanogenesis in McLean bog, an acidic peat bog in upstate New York: Stimulation by H₂/CO₂ in the presence of rifampicin, or by low concentrations of acetate. *Geomicrobiology Journal*, 2004, **21**: 433-443
- [17] Bräuer SL, Cadillo-Quiroz H, Yashiro E, et al. Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog. *Nature*, 2006, **442**: 192-194
- [18] Bräuer SL, Yashiro E, Ueno NG, et al. Characterization of acid-tolerant H₂/CO₂-utilizing methanogenic enrichment cultures from an acidic peat bog in New York State. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, **57**: 206-216
- [19] Cadillo-Quiroz H, Yashiro E, Yavitt JB, et al. Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**: 2059-2068
- [20] Cadillo-Quiroz H, Yavitt JB, Zinder SH. *Methanospharula palustris* gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peatland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, **59**: 928-935
- [21] Yang X-S (杨秀山). Research Methodology and Taxonomic of Methanogenic Archaeal. Beijing: Beijing Normal College Press, 1991 (in Chinese)
- [22] Patel GB, Sprott GD, Fein JE. Isolation and characterization of *Methanobacterium espanolae* sp. nov., a mesophilic moderately acidophilic methanogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1990, **40**: 12-18
- [23] Hales BA, Edwards C, Ritchie D, et al. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**: 668-675
- [24] Cadillo-Quiroz H, Bräuer S, Yashiro E, et al. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. *Environmental Microbiology*, 2006, **8**: 1428-1440
- [25] Savant DV, Shouche YS, Prakash S, et al. *Methanobrevibacter acididurans* sp. nov., a novel methanogen from a sour anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, **52**: 1081-1087
- [26] Savant DV, Ranade DR. Application of methanobrevibacter acididurans in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 2004, **50**: 109-114
- [27] Jain SR, Mattiasson B. Acclimatization of methanogenic consortia for low pH biomethanation process. *Biotechnology Letters*, 1998, **20**: 771-775
- [28] Taconic KA, Zappi ME, French WT, et al. Feasibility of methanogenic digestion applied to a low pH acetic acid solution. *Bioresource Technology*, 2007, **98**: 1579-1585
- [29] Taconi KA, Zappi ME, French WT, et al. Methanogenesis under acidic pH conditions in a semi-continuous reactor system. *Bioresource Technology*, 2008, **99**: 8075-8081
- [30] Zuo J-E (左剑恶), Ling X-F (凌雪峰), Gu X-S (顾夏生). A study on cultivation of acid-tolerant methanogenic granular sludge under low pH values and its characteristics. *Microbiology (微生物学通报)*, 2004, **31**(5): 65-70 (in Chinese)
- [31] Ling X-F (凌雪峰), Zuo J-E (左剑恶), Gu X-S (顾夏生). Studies on cultivation of acid-tolerant methanogenic granular sludge using river sediments. *China Environmental Science (中国环境科学)*, 2003, **23**(6): 587-591 (in Chinese)
- [32] Ling X-F (凌雪峰), Zuo J-E (左剑恶), Gu X-S (顾夏生). Study on the operation of a methanogenic EGSB reactor under acid condition at pH 6.0. *Environmental Science (环境科学)*, 2004, **25**(1): 57-61 (in Chinese)
- [33] Goodwin S, Zeikus JG. Ecophysiological adaptations of anaerobic bacteria to low pH: Analysis of anaerobic digestion in acidic bog sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, **53**(1): 57-64
- [34] Goodwin S, Zeikus JG. Physiological adaptations of anaerobic bacteria to low pH: Metabolic control of proton motive force in *Sarcina ventriculi*. *Journal of Bacteriology*, 1987, **169**: 2150-2157

作者简介 郭晓慧,女,1985年生,博士研究生.主要从事有机废物厌氧生物处理技术研究. E-mail: enjoylife_house@126.com

责任编辑 肖红