

韩 睿,陈来生. 低温产甲烷菌厌氧消化研究进展[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):11-16.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.003

低温产甲烷菌厌氧消化研究进展

韩 睿,陈来生

(青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室/青海省蔬菜遗传与生理重点实验室,青海西宁 810016)

摘要:低温产甲烷菌对于自然界的碳素循环具有非常重要的作用,近年来引起了国内外学者的广泛关注。利用低温产甲烷菌实现低温厌氧消化过程,可从本质上突破低温厌氧工艺的技术瓶颈,进而拓展厌氧生物处理技术的应用范围,并降低处理成本。从低温产甲烷菌的资源与分布、冷适应性机制和分子生物学研究现状几个方面,对低温产甲烷菌的研究进展进行了综述,并对其在低温厌氧消化中的应用进行了分析。

关键词:低温产甲烷菌;种类;分布;冷适应性机制;分子生物学技术;低温厌氧消化;研究进展;应用现状

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0011-06

产甲烷菌是一类极端厌氧古菌,广泛存在于各类极端厌氧环境中^[1]。由于其完成的产甲烷过程通常是厌氧生物处理工艺中最重要的限速步骤,同时,产甲烷过程也是自然界中温室气体自发排放的重要过程之一,因此,产甲烷过程及产甲烷菌的研究越来越受到人们的重视^[2]。目前,研究者已经对厌氧消化进行了大量的研究,但多集中在中温和高温范围,对低温下厌氧消化的研究尚处探索阶段。然而,地球生物圈约 75% 都处于永久的低温环境,低温产甲烷菌对自然界甲烷排放的贡献最大,如果能够利用其实现低温下的高效厌氧消化,可以拓展厌氧生物处理技术的应用范围进而降低生产甲烷的成本^[3-4]。因此,对低温产甲烷菌的研究具有重要的现实意义。

1 低温产甲烷菌

低温产甲烷菌根据低温下生长存活情况和最适生长温度(T_{opt})的不同分为耐冷产甲烷菌和嗜冷产甲烷菌 2 种^[5]。耐冷产甲烷菌通常是指能够在低温下存活,但 T_{opt} 在 30~40℃ 的产甲烷菌;而嗜冷产甲烷菌是指能够在低温(0~10℃)条件下生长,且 T_{opt} 低于 25℃ 的产甲烷菌,可分为 2 类:专性嗜冷产甲烷菌和兼性嗜冷产甲烷菌^[6]。专性嗜冷产甲烷菌的 T_{opt} 比较低,在较高的温度下无法生存;而兼性嗜冷产甲烷菌的 T_{opt} 比较高,在中温条件下仍可以生长,可耐受的温度范围较宽。

2.1 低温产甲烷菌资源

由于厌氧消化过程通常在中温或高温下进行,相应地对嗜温(T_{opt} 为 35℃ 左右)和嗜热产甲烷菌(T_{opt} 为 55℃ 左右)的研究较为深入,而有关低温产甲烷菌的研究起步较晚,直到 1992 年才有第 1 株嗜冷产甲烷菌得以分离培养的报道^[7]。

收稿日期:2014-06-12

基金项目:青海省科技厅项目(编号:2015-ZJ-730);青海省蔬菜遗传与生理重点实验室项目(编号:2014-Z-Y15)。

作者简介:韩 睿(1983—),女,河南许昌人,硕士,助理研究员,从事微生物分子生物学方面的研究。E-mail:hanrui1473@163.com。

通信作者:陈来生,博士,研究员,从事设施农业等研究工作。

E-mail:chenls64@163.com。

近年来随着人们对产甲烷菌重视程度的提高,相关研究发展迅速,已经获得 9 株低温产甲烷菌资源(表 1),它们分属于 5 个产甲烷菌属,分别是甲烷拟球菌属(*Methanococcoides*)、产甲烷菌属(*Methanogenium*)、甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷叶菌属(*Methanolobus*)和甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)。表内菌株均分离自永久性低温环境,除 *Methanosarcina lacustris*^[8] 分离自淡水湖,*Methanobacterium veterum*^[9] 分离自西伯利亚冻土,*Methanolobus psychrophilus*^[10] 分离自高原湿地外,其余 6 株均分离自海洋或咸水湖,其生长的盐浓度环境大都在 300~500 mmol/L 之间^[7,11-15]。*Methanococcoides burtonii* 作为第 1 株被分离纯化的嗜冷产甲烷菌,其基因图谱已经获得,现已作为研究嗜冷产甲烷菌的模式菌株^[7,16]。*Methanolobus psychrophilus* 是从我国青藏高原若尔盖地区分离得到的,这是国内有报道的第 1 株嗜冷产甲烷菌^[10]。*Methanogenium frigidum*^[11] 是第 1 株分离的利用 H_2 和 CO_2 产甲烷的低温产甲烷菌,仅 *Methanosarcina baltica*^[12] 可以利用乙酸作为底物,而 *Methanosarcina lacustris* 是 *Methanosarcina* 少数不能利用乙酸作为分解代谢底物的菌种之一^[8]。

除了上述已命名并全面描述的低温产甲烷菌,研究者在很多低温环境中都曾分离到产甲烷菌。早在 1991 年,Zhilina 等就从沼泽中得到 *Methanosarcina* strain Z-7289,其 T_{opt} 为 15℃,生长温度范围为 5~28℃^[17];随后,Nozhevnikova 等^[6] 和 Smiankova 等^[4] 从苔原湿地、淡水沉积物、低温发酵物、低温 EGSB 反应器及苔原沼泽地、冻土带、被污染的池塘、低温粪便发酵物中先后分离出 12 株和 5 株产甲烷古菌,前者均能在 8℃ 以下生长,大多数的 T_{opt} 在 25℃ 左右,分属于甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷螺菌属(*Methanospirillum*)和一些未知类别,后者分属于甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷粒菌属(*Methanocorpusculum*)和甲烷食甲基菌属(*Methanomethylovorans*),其中有 3 株的 T_{opt} 为 25℃;Kotsyurbenko 等在俄罗斯北方泥炭中分离得到 1 株甲烷杆菌属的嗜酸菌株,其 T_{opt} 为 25℃,生存温度范围为 5~30℃^[18];农业部沼气科学研究所胡国全的研究团队在西藏林芝高寒地区厌氧消化系统中分离获得了 1 株低温产甲烷菌 LZ-6,属于甲烷粒菌属的小甲烷粒菌(*Methanocorpusculum parvum*),生长温度范围

4 ~ 40 ℃, T_{opt} 为 25 ℃^[19]。从现有的研究成果来看,目前从低温环境中得以分离培养的产甲烷菌资源相对较少,而真正的低温产甲烷菌更少,但由于低温产甲烷菌资源广泛存在与自然界中,其种类涵盖了甲烷微菌目 (*Methanomicrobiales*) 和甲烷八叠球菌目 (*Methanosarcinales*) 中很多常见的产甲烷菌属,

如产甲烷菌属 (*Methanogenium*)、甲烷粒菌属 (*Methanocorpusculum*)、甲烷螺菌属 (*Methanospirillum*)、及甲烷拟球菌属 (*Methanococcoides*)、甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*)、甲烷食甲基菌属 (*Methanomethylovorans*) 等。相信随着其得到越来越多的关注,该领域的研究必将取得更多成果^[20 ~ 21]。

表 1 从冷环境中分离得到的产甲烷菌

菌株	分离时间和地点	分离源 温度 (℃)	最适生长 温度 (℃)	生长温度 (℃)	利用底物	最适 pH 值	最适 Na ⁺ 浓 度 (mmol/L)	参考 文献
<i>Methanococcoides burtonii</i>	1992, Ace 湖, 南极洲	1 ~ 2	23	-2 ~ 28	甲胺, 甲醇	7.7	200 ~ 500	[7]
<i>Methanogenium frigidum</i>	1997, Ace 湖, 南极洲	1 ~ 2	15	0 ~ 18	H ₂ /CO ₂ , 甲醇	7.5 ~ 7.9	350 ~ 600	[11]
<i>Methanosarcina lacustris</i>	2001, Soppen 湖, 瑞士	5	25	1 ~ 35	H ₂ /CO ₂ , 甲胺, 甲醇	7.0		[8]
<i>Methanogenium marinum</i>	2002, Skan 海湾, 美国	1 ~ 4	25	5 ~ 25	H ₂ /CO ₂ , 甲酸	6.0	400 ~ 900	[13]
<i>Methanosarcina baltica</i>	2002, Gotland 海峡, 波罗的海	2 ~ 4	25	4 ~ 27	甲胺, 甲醇, 乙酸	6.5	300 ~ 650	[12]
<i>Methanococcoides alaskense</i>	2005, Skan 海湾, 美国	1 ~ 6	24 ~ 26	5 ~ 28	甲胺, 甲醇	7.2	300 ~ 400	[14]
<i>Methanogenium boonei</i>	2007, Skan 海湾, 美国	1 ~ 6	19.4	5 ~ 30	醋酸盐, 甲醇, H ₂ /CO ₂		300	[15]
<i>Methanobolus psychrophilus</i>	2008, 高原沼泽, 中国	0.6 ~ 1.2	18	0 ~ 25	甲醇, 甲胺, 甲基硫化物	7.0 ~ 7.2	200 ~ 250	[10]
<i>Methanobacterium veterum</i>	2010, 西伯利亚, 永久冻土		28		H ₂ /CO ₂ , 甲胺, 甲醇	7.0 ~ 7.2	50	[9]

2.2 低温产甲烷菌分布

自然界中,低温产甲烷菌广泛存在于深海沉积物、苔原湿地、永久冻土、冰川、沼泽地、低温厌氧水稻田泥土、淡水湖沉积物、废物厌氧反应器及低温粪便发酵物中。在各种低温生态系统中,低温产甲烷菌构成了重要的微生物群落结构,甲烷的生成由它们的相互营养作用决定^[2,5,20 ~ 23]。

深海环境有大量产甲烷菌的富集,在已知的产甲烷菌中,大约有 1/3 的类群来源于海洋这个特殊的生态区域,主要是甲烷球菌目 (*Methanococcales*) 和甲烷微菌目 (*Methanomicrobiales*),在海底沉积物的不同深度里都能发现这 2 类氢营养产甲烷菌。低温产甲烷菌主要是 ANME-2 族和少量 ANME-1 族的古菌,它们促进了甲烷水合物的构成^[24],这些甲烷水合物的含碳量是地球上所有活体生物含碳量的 4 ~ 8 倍,可能意味着这里正是甲烷产生的源头^[23,25]。研究表明,ANME-2 族古菌隶属于 *Methanosarcinales*,而 ANME-1 族古菌可能是广域古菌界的一个新目^[26 ~ 27]。虽然全球深海沉积物甲烷储量极大,由于低温产甲烷菌介导的厌氧氧化作用紧密调节着沉积物甲烷的生物地球化学循环,深海生物圈甲烷厌氧氧化微生物通过对甲烷的氧化可缓解甲烷向海水和大气的释放,因此,深海沉积物的甲烷排放对大气甲烷的贡献仅 2% 左右,尚没有对全球气候构成直接威胁^[28]。

自然湿地的甲烷排放量占全球的 15% ~ 40%,是最大的甲烷排放源。在全球自然湿地生态系统中,北半球北方湿地的甲烷排放量占了 34%,湿地土壤碳储量占全球土壤碳储量的 20% ~ 25%,全球湿地碳储量的绝大多数储存在泥炭地中,而 90% 的泥炭地分布在北半球寒冷及温带地区,因此,目前对自然湿地中低温产甲烷菌的研究得到了研究者的关注^[23,29]。中国科学院微生物研究所东秀珠课题组对青藏高原若尔盖湿地的产甲烷菌群进行研究,表明甲烷八叠球菌目 (*Methanosarcinales*) 和甲烷微球菌目 (*Methanomicrobiales*) 为主要产甲烷菌群,并从该湿地分离得到 1 株嗜冷产甲烷叶菌 (*Methanobolus psychrophilus*),其 T_{opt} 为 18 ℃^[10]; Zinder 等从泥炭中分离到 1 株新菌株 *Methanosphaerula palustris*,其 T_{opt} 为 28 ~ 30 ℃,最适 pH 值为 5.5^[30];河北省科学院程辉彩博士的

科研团队从承德塞罕坝湿地污泥中分离出 1 株耐低温的产甲烷菌 SHB,其 T_{opt} 范围为 16 ~ 40 ℃,与甲烷杆菌属 (*Methanobacterium* sp.) 的亲缘关系最近^[31]。

永久冻土中低温产甲烷菌的甲烷排放量占全球的 25%,同样含有多种低温产甲烷菌资源^[29]。高纬度冻土中低温产甲烷菌群落结构组成、丰度及产甲烷代谢途径与其生境条件、气候变化均有一定相关性,而不同冻土地带检测到的群落结构及产甲烷途径具有明显的差异^[32 ~ 33]。研究发现,永久冻土中的产甲烷菌在系统发育上大多隶属于 4 个科,即甲烷杆菌科 (*Methanobacteriaceae*)、甲烷八叠球菌科 (*Methanosarcinaceae*)、甲烷微菌科 (*Methanomicrobiaceae*) 及甲烷鬃菌科 (*Methanosaetaceae*)^[33 ~ 34]。来自西伯利亚近海岸冻土环境的 16S rRNA 基因序列可以被划分为 4 个群,其中群 I 来自于冻土活动层低温土层,与 *Methanosarcinaceae* 亲缘关系较近,群 II 和 III 与 *Methanomicrobiaceae* 关系较近^[35]。Krivushin 等从西伯利亚的永久冻土中分离得到 1 株低温产甲烷菌 MK4T,其 T_{opt} 为 28 ℃,为甲烷杆菌属的一个新种,命名为 *Methanobacterium veterum*^[9]。

低温厌氧水稻田泥土是生物合成甲烷的另一个主要场所。由于稻田的氧分压较大且相对干燥,所以含有的产甲烷菌相对其他生境来说,氧气耐受性和抗旱能力较强^[36]。水稻田泥土存在的低温产甲烷菌资源与永久冻土中的资源相似,即在系统发育上分属于 4 个科: *Methanobacteriaceae*、*Methanosarcinaceae*、*Methanomicrobiaceae*、*Methanosaetaceae*^[22],它们利用的底物一般是 H₂/CO₂ 和乙酸,氢营养产甲烷菌的种群数量随着温度升高而增大^[36]。低温下存在着 *Methanosaetaceae* 和 *Methanosarcinaceae* 的竞争选择关系^[37]。在水稻田中乙酸的积累可以促使 *Methanosarcinaceae* 的菌株更快速生长。鬃毛甲烷菌属 (*Methanosaeta*) 的菌株对乙酸的 Km 值和阈值均低于甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*) 的菌株,因此在乙酸浓度低的环境中更有利于它的生长^[38]。

在其他环境中,也有丰富的低温产甲烷菌资源。研究表明,在淡水湖沉积物中,低温产甲烷菌类群的分布随着季节的变化而变化,同时氢营养产甲烷菌的丰度和活性会随着淡水

沉积物的深度不同而发生改变。Earl 等用 PCR - TGGE 技术对已经富营养化的 Priest 湖泊底部的沉积物和水样进行研究,结果显示,在冬季沉积物中产甲烷菌的类型要比夏季的多,其优势菌是甲烷微菌目 (Methanomicrobiales)^[39]。Chan 等对德国 Dagow 湖底沉积物样品进行分析,氢营养产甲烷菌产生的甲烷量在沉积物的表面是 22%,而在 18 cm 深处则是 38%^[40]。在酸性的西伯利亚沼泽中,氢营养型甲烷菌和乙酸营养型甲烷菌是甲烷生成的主要菌群^[41];Lettinga 等对湖底深处沉积物样品分析,在低温下挥发酸降解过程中,发现了鬃毛甲烷菌属 (*Methanosaeta*) 和甲烷螺菌属 (*Methanospirillum*) 的菌株^[42]。石河子大学鲁建江教授的团队从新疆越冬沼气池分离出 1 株低温产甲烷菌株 SZ - 3,其在 5 ~ 40 °C 的温度范围均能生长, T_{opt} 为 20 °C,系统发育分析和生理生化特征研究表明此菌株为甲烷八叠球菌属湖沉积产甲烷八叠球菌种 (*Methanosarcina lacustris*)^[43]。

3 低温产甲烷菌的冷适应性机制

人们对低温产甲烷菌冷适应性机制的研究还不十分深入。根据其他微生物对低温的适应 (如改变膜的流动性及改变蛋白质翻译等) 机制,以 *Methanococcoides burtonii* 和 *Methanococcoides frigidum* 作为研究材料,对低温产甲烷菌提出了以下几种可能的适冷机制。

温度对细胞膜产生的影响首先表现为:温度降低导致细胞膜流动性降低,最终丧失功能。因此,保持低温下膜的流动性是微生物冷适应性机理中的重要组成部分,而细胞膜的流动性主要由脂肪酸的组成决定^[20]。现已证实 *Methanococcoides burtonii* 的细胞膜中含有较大比例的不饱和脂肪酸^[44]。不饱和脂肪酸含量及支链脂肪酸的比例会随温度的降低而增加,而碳链长度有所降低。通过这种改变,脂类的熔点有所降低,从而使细胞膜的功能得以维持,保持其在低温下的流动性。

低温产甲烷菌具有在低温下活性较高的酶,即冷活性酶,其在低温时具有独特的性质:高催化活性和低热稳定性。该酶对低温环境的适应机制表现为氢键和盐桥的数量有所增加,芳香环之间的相互作用有所减弱,极性氨基酸残基含量相对增加而非极性氨基酸残基含量相对降低。疏水残基的增多和较少的电荷可能使低温产甲烷菌的蛋白质表面不稳定,但是却增加了在低温条件下细胞的适应性,减少了激发底物和酶到过态态所需要的能量,同时增加了催化效率。与常温产甲烷菌所含有的酶相比,*Methanococcoides burtonii* 和 *Methanococcoides frigidum* 的冷活性酶含有更多的不带电荷氨基酸,尤其是谷氨酸 (Glu) 和苏氨酸 (Thr),有更少的疏水氨基酸,特别是亮氨酸 (Leu),较多的 Glu 和 Thr 可能用来补偿表面电荷的减少^[45]。这种改变增加了酶的亲水性,使得酶与溶剂的相互作用增强,增加了蛋白质的灵活性,减少了活化能,提高了接触反应效率。同时,Glu 和 Thr 丰度的增加也能够反映出低温产甲烷菌对低温的适应性。此外,低温产甲烷菌还可以在低温条件下大量分泌胞外脂肪酶和蛋白酶等,将环境中的生物大分子降解为小分子,更有利于通过细胞膜,在生物技术产业中具有很大的应用潜力^[20]。

低温产甲烷菌在温度突然降低时,会诱导冷休克蛋白的

高表达,产生冷休克反应。冷休克蛋白的 mRNA 具有感知冷暖的特殊能力,由于它们都含有一个下游盒,在低温条件下能增强翻译起始,所以低温条件下,它能够有效翻译,而其他蛋白质的合成则被完全阻断^[46]。冷休克蛋白的 mRNA 只有在低温的情况下才会表现稳定,即在低温下冷休克蛋白的 mRNA 能够更有效地复制低温产甲烷菌的遗传信息,帮助其生存繁衍。研究者已在 *Methanococcoides frigidum* 中鉴定出 1 种冷休克蛋白,在 *Methanococcoides burtonii* 中鉴定出 2 种冷休克蛋白。推测冷休克蛋白在低温产甲烷菌的冷适应机制中发挥着重要作用,但冷休克蛋白的功能和作用机制还有待进一步研究^[21]。另外,研究表明,低温产甲烷菌还含有一些可能的低温保护剂,包括甜菜碱、一些氨基酸及其衍生物等,能够起到防止结晶、浓缩营养物质以及防止酶冷变性等作用。中国科学院微生物研究所东秀珠课题组对 *Methanobrevibacter psychrophilus* R15 的基因组进行了全面分析,发现在 4 °C 时热聚体和 GroES/EL 这 2 种分子伴侣基因都上调^[47]。

tRNA 流动性的增加对于低温产甲烷菌适应低温具有重要的意义,主要表现为 tRNA 中 GC 含量越高,其稳定性越高,但流动性越差,反之亦然。比较极端嗜热产甲烷菌基因组发现 *Methanococcoides burtonii* tRNA 的 GC 含量并没有减少,与其在低温条件下的适应性不相符,不能通过降低 GC 含量以提高 tRNA 的流动性。所以推测二羟尿嘧啶酶能够促进二羟尿嘧啶核苷整合增加 tRNA 韧性^[45],这还需要试验的验证,但 *Methanococcoides burtonii* 中二羟尿嘧啶核苷的含量确实高于其他古菌^[48]。由于增加 tRNA 的流动性对于低温条件下其功能的实现具有十分重要的意义,这就要求低温产甲烷菌必须通过其他途径来改善 tRNA 的流动性。对 *Methanococcoides burtonii* 的研究表明,在低温条件下细胞膜趋向于变坚硬的生理状态,细胞产生的一级结构能够使细胞在低温条件下维持正常的细胞功能,其在 tRNA 转录后结合的二氢脲嘧啶增加,从而改变 tRNA 局部构象,增加 tRNA 的流动性^[49]。

4 低温产甲烷菌的分子生物学研究现状

分子生物学技术直接以生物的遗传物质为研究对象,无需富集培养微生物,在一定程度上克服了传统研究方法的缺陷,能够加快操作速度,提高分析结果的准确度,被认为是一种具有更多优势的可以研究微生物及其种群的新方法。近年来,荧光原位杂交 (FISH)、16S rRNA 基因和甲基辅酶 M 还原酶 α 亚基 (*mcrA*) 克隆文库、实时荧光定量 PCR、实时逆转录 PCR、单链构象多态性及各种指纹分析方法,如变性梯度凝胶电泳 (DGGE)、温度梯度凝胶电泳 (TGGE) 和限制性片段长度多态性 (RFLP) 等,均被广泛应用于低温环境中产甲烷菌的研究。

利用这些技术可以初步确定未知微生物的类别,可以检测微生物种群结构的差异及变化,并且能够更准确地研究微生物在环境样品中的位置及数量。在低温产甲烷菌类别确定方面,研究者已从各种不同的低温环境中分别检测到属于甲烷八叠球菌目 (*Methanosarcinales*) 和甲烷微菌目 (*Methanomicrobiales*) 中的很多产甲烷菌属,如甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*)、甲烷拟球菌属 (*Methanococcoides*)、产甲烷叶菌属 (*Methanolobus*)、产甲烷丝菌属 (*Methanosaeta*) 以及产甲烷囊

菌属 (*Methanoculleus*)、产甲烷菌属 (*Methanogenium*)、甲烷盘菌属 (*Methanoplanus*)、甲烷泡菌属 (*Methanofollis*)、甲烷粒菌属 (*Methanocorpusculum*) 等^[21]。在低温产甲烷菌种群结构差异和变化及其在环境样品中的位置和数量的研究方面,山东大学(威海)海洋学院杜宗军教授的团队利用 FISH 和 16S rRNA 基因文库研究南极普里兹湾夏季不同层次海冰及冰下海水中古菌丰度及群落组成,结果表明,古菌的平均丰度随着海冰层次的下降呈下降趋势,初步推断可能受海冰中铵离子影响所致,同时,仅在海冰底部样品中检测到古菌,且全部 16S rRNA 基因序列为泉古菌,属于泉古菌海洋类群 I,冰下海水古菌多样性较高,主要归属于泉古菌 I 和广古菌 II、III^[50]。厦门大学徐洵教授的团队通过 DGGE 技术对南极中山站排污入海口及其周围 200 m 近岸沉积物样品中古菌微生物群落结构及其多样性进行了调查,结果在调查区域检测到了广古菌的 4 个类群和泉古菌的 1 个类群^[51]。Connaughton 等发现在低温反应器的启动及运行过程中,随着有机负荷的增加及运行时间的延长,产甲烷古菌种群结构发生变化,乙酸营养型的 *Methanosarcina* 和 *Methanosaeta* 所占比例减少,而逐渐检测到氢营养型的 *Methanocorpusculum*^[52]。Falz 等利用 FISH 技术观察到 *Methanosaeta* 遍布整个污泥样品的核心^[53]。东北农业大学资源与环境学院徐凤花教授的团队分别利用 PCR-DGGE 及实时荧光定量 PCR 技术研究了不同地区低温沼气池中沼泥进行发酵前期、后期产甲烷菌群落变化。结果表明,沼气低温发酵的过程中,不同沼泥样品发酵前期、后期产甲烷菌的优势群落差异明显且数量上也存在较大差异。甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*) 在黑龙江沼泥样品发酵后期成为优势群落,甲烷鬃毛菌属 (*Methanosaeta*) 在山东发酵前期、后期样品及安徽发酵前期样品中占有绝对优势。产甲烷古菌的数量介于 $10^4 \sim 10^5$ 个/mL 之间,其中黑龙江样品中产甲烷菌数量最多,而安徽样品中产甲烷菌数量最少^[54]。此外,利用这些技术还可研究产甲烷古菌与其它功能性微生物(如发酵产酸菌、硫酸盐还原菌等)之间的关系^[55]。总之,分子生物学技术的应用使人们加深了对低温产甲烷菌的认识和了解,并在一定程度上推动了产甲烷菌的应用进程。

5 低温产甲烷菌在厌氧消化中的应用现状

近年来,低温产甲烷菌在厌氧消化中的应用越来越受到学者们的关注。在废水厌氧处理方面,Lettinga 等应用膨胀颗粒污泥床(EGSB)系统在 $5 \sim 10^\circ\text{C}$ 的条件下处理酸化废水,COD 的去除率可以达到 90%^[56]。Scully 等的研究表明,与之前的中温和嗜冷厌氧发酵相比,EGSB-AF 工艺在 $9.5 \sim 15^\circ\text{C}$ 厌氧处理含酚废水从经济上说是可行的,沼气中甲烷的含量分别是 65% 和 75%^[57]。Ndegw 等的研究也表明,厌氧序批式反应器(ASBR)比较 20°C 和 35°C 处理粪水的效果,温度不会明显影响沼气产量及沼气中的甲烷含量^[58]。此外, 20°C 处理的效果比 35°C 更好,沼液中挥发性脂肪酸的降解率更高。另外,首都师范大学生物系杨秀山教授的团队采用吸附包埋法对甲烷八叠球菌进行固定,并用人工配制的高浓度有机废水对该菌特性进行了研究^[59]。

在提高寒区用户沼气池产气率方面,目前已经做了大量研究。在关注寒区沼气池内产甲烷菌群落结构的同时,不断

选育适宜在低温条件下发酵产气的微生物,大量繁殖培养后接种到沼气池,提高沼气池的产气率。利用厌氧发酵生产沼气不仅能解决农村能源问题,也解决了环境恶化问题,改善了农村的生态环境,提高人们的生活质量,同时还能够增加优质有机肥料,改良土壤,提高农作物产量,促进了农业的可持续性发展。

在沼气发酵促进剂的开发利用方面,农业部沼气科学研究所于 2002 年启动了农业部重点成果转化项目“沼气发酵添加剂的中试及转化”,该添加剂产品将大大缩短沼气池的发酵启动时间,提高原料产气率,尤其适合在缺乏沼气接种物的推广新区使用^[60]。山东省农业科学院的姚利等在北方地区沼气池冬季耐低温技术探讨指出,低温条件下加入微生物菌剂可以提高甲烷产量,并且从秸秆堆腐物和畜禽粪便中分离筛选出多株高效菌种,复合为微生物菌剂。该菌剂在山东省开展了户用沼气池的效果试验,结果表明采用此措施的沼气池可在冬季提高产气量 50% 以上^[61]。江西省科学院生物资源研究所丁建南的科研团队通过低温野生菌群和低温厌氧颗粒污泥菌群筛选及其后续的互补复合优化,选育出了低温沼气发酵功能菌群。沼气发酵试验结果表明,该菌群采用后最高日产气量均明显高于单独采用野生菌群和厌氧颗粒污泥菌群。以此为基础研制的低温沼气发酵促进剂,在 13°C 下可使产气率平均提高 46.6%, 10°C 下产气率平均提高 41.1%。沼气池试验中,低温沼气发酵促进剂可使甲烷含量平均提高 24%^[62]。黔南民族师范学院生命科学系邓功成教授的团队在贵州进行了农村沼气池接种低温驯化沼气发酵微生物试验,产气量提升了 1~2 倍^[63]。

综上,开展低温高效厌氧生物处理技术的研究,将有助于拓展该技术的应用范围,降低处理成本,从而提高其处理率,实现低温下厌氧生物处理的高效、稳定运行。同时,低温沼气技术的开展有益于我国沼气事业的快速发展,将对我国社会主义新农村建设具有很好的经济、社会和生态效益。

6 结语

低温产甲烷菌广泛存在于各种低温生态系统中,对于自然界的碳素循环及低温厌氧消化过程均具有非常重要的意义,近年来引起了国内外研究者的广泛关注。目前得以命名并分离培养的低温产甲烷菌有 9 种,对其适冷机制的研究取得了一些初步成果,同时分子生物学研究也进一步推动了低温产甲烷菌的研究进程,但以上这些研究仍不够深入和全面。低温厌氧生物处理工艺的技术瓶颈在于温度的降低会使产甲烷菌的活性下降,从而影响厌氧消化过程。要突破该研究的瓶颈,选育低温产甲烷菌及研究其冷适应性机制显得尤为重要。应选育对环境应激能力强,适应性好,投放后能形成优势菌群且生理活性较高的低温产甲烷菌群。同时,了解其代谢途径和冷适应机制有助于利用合适的方法培养获得更多的低温产甲烷菌。此外,还应该考虑将分子生物学手段与传统的微生物学培养技术相结合,在筛选高效低温产甲烷菌的同时,全面跟踪和调控低温厌氧消化整个过程中的优势产甲烷菌与其他关键菌群的变化关系,必将更全面更准确地反映实际情况和提供更加直接的指导,更有利于低温厌氧消化的应用和发展。

参考文献:

- [1] 李美群, 邓洁红, 熊兴耀, 等. 产甲烷菌的研究进展[J]. 酿酒科技, 2009(5): 90–93.
- [2] 朱纭文. 嗜冷产甲烷菌厌氧消化研究进展[J]. 江西化工, 2013(1): 47–49.
- [3] Cavicchioli R. Cold-adapted archaea[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006(4): 331–343.
- [4] Simankova M V, Kotsyurbenko O R, Lueders T, et al. Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003, 26(2): 312–318.
- [5] 袁敏, 胡国全. 低温条件下的甲烷生成与嗜冷产甲烷古菌研究进展[J]. 中国沼气, 2009, 27(3): 8–12.
- [6] Nozhevnikova A N, Simankova M V, Parshina S N, et al. Temperature characteristics of methanogenic archaea and acetogenic bacteria isolated from cold environments[J]. Water Science and Technology, 2001, 44(8): 41–48.
- [7] Franzmann P D, Stringer N, Ludwig W, et al. A methanogenic archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1992, 15: 573–581.
- [8] Simankova M V, Parshina S N, Tourova T P, et al. *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2001, 24: 362–367.
- [9] Krivushin K V, Shcherbakova V A, Petrovskaya L E, et al. *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60: 455–459.
- [10] Zhang G S, Jiang N, Liu X L, et al. Methanogenesis from methanol at low temperatures by a novel psychrophilic methanogen, “*Methanlobus psychrophilus*” sp. nov., prevalent in Zoige wetland of the Tibetan plateau[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(19): 6114–6120.
- [11] Franzmann P D, Liu Y, Balkwill D L, et al. *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H₂-using methanogen from Ace Lake, Antarctica[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(4): 1068–1072.
- [12] Klein D V, Arab H, Völker H, et al. *Methanosarcina baltica* sp. nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic Sea[J]. Extremophiles, 2002, 6: 103–110.
- [13] Chong S C, Liu Y, Cummins M, et al. *Methanogenium marinum* sp. nov., a H₂-using methanogen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H₂ utilization[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 81: 263–270.
- [14] Singh N, Kendall M, Liu Y, et al. Isolation and characterization of methylotrophic methanogens from anoxic marine sediments in Skan Bay, Alaska; description of *Methanococcoides alaskense* sp. nov., and emended description of *Methanosarcina baltica* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(6): 2531–2538.
- [15] Melissa M K, George D W, Chin F T, et al. Diversity of archaea in marine mediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73: 407–414.
- [16] Allen M A, Lauro F M, Williams T J, et al. The genome sequence of the psychrophilic archaeon, *Methanococcoides burtonii*; the role of genome evolution in cold adaptation[J]. SME Journal, 2009, 3(9): 1012–1035.
- [17] Zhilina T N, Zavarzin G A. Low temperature methane production by a pure culture of *Methanosarcina* sp. [J]. Dokladi Akademii Nauk SSSR, 1991, 317: 1242–1245.
- [18] Kotsyurbenko O R, Friedrich M W, Simankova M V, et al. Shift from acetoclastic to H₂-dependent Methanogenesis in a west Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic *Methanobacterium* strain? [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73: 2344–2348.
- [19] 袁敏. 低温厌氧生境中产甲烷古菌的分离、鉴定及菌群结构分析[D]. 成都: 农业部沼气科学研究所, 2009: 1–64.
- [20] 张伟, 王永青, 段开红, 等. 嗜冷性产甲烷菌的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(13): 5909–5913.
- [21] 左剑恶, 邢薇. 嗜冷产甲烷菌及其在废水厌氧处理中的应用[J]. 应用生态学报, 2007, 18(9): 2127–2132.
- [22] 宋文芳. 沼气发酵低温功能微生物的分离和促进沼气低温发酵的研究[D]. 成都: 农业部沼气科学研究所, 2011: 1–59.
- [23] 裴昭君, 李军, 郑文婕. 低温沼气技术: 低温产甲烷过程及嗜冷产甲烷菌[J]. 环境科学导刊, 2013, 32(6): 11–13.
- [24] Krüger M, Treude T, Wolters H, et al. Microbial methane turnover in different marine habitats[J]. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 2005, 227(1/2/3): 6–17.
- [25] Sorensen K B, Lauer A, Teske A. Archaeal phylotypes in a metal-rich and low-activity deep subsurface sediment of the Peru Basin[J]. Geobiology, 2004, 2: 151–161.
- [26] Bertram S, Blumenberg M, Michaelis W, et al. Methanogenic capabilities of ANME-archaea deduced from ¹³C-labelling approaches[J]. Environ Microbiol, 2013, 15(8): 2384–2393.
- [27] Yanagawa K, Sunamura M, Lever M A, et al. Niche separation of methanotrophic archaea (ANME-1 and -2) in methane-seep sediments of the eastern Japan Sea Offshore Joetsu[J]. Geomicrobiology Journal, 2011, 28: 118–129.
- [28] 党宏月, 宋林生, 李铁刚, 等. 海底深部生物圈微生物的研究进展[J]. 地球科学进展, 2005, 20(12): 1306–1313.
- [29] 刘全全. 低温产甲烷条件下微生物的群落特征[D]. 成都: 农业部沼气科学研究所, 2010: 1–59.
- [30] Cadillo-Quiroz H, Yavitt J B, Zinder S H. *Methanosphaerula palustris* gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peatland[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(5): 928–935.
- [31] 马金亮, 习彦花, 张丽萍, 等. 耐低温甲烷杆菌 SHB 的分离鉴定与生长特性分析[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(5): 23–27.
- [32] Putkinen A, Juottonen H, Juutinen S, et al. Archaeal rRNA diversity and methane production in deep boreal peat[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 70(1): 87–98.
- [33] 倪永清, 史学伟, 郑晓吉, 等. 冻土甲烷循环微生物群落及其对全球变化的响应[J]. 生态学报, 2011, 31(13): 3846–3855.
- [34] Metje M, Frenzel P. Methanogenesis and methanogenic pathways in a peat from subarctic permafrost[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(4): 954–964.
- [35] Ganzert L, Jurgens G, Münster U, et al. Methanogenic communities in permafrost-affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian

- Arctic, characterized by 16S rRNA gene fingerprints [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 59(2): 476–488.
- [36] 傅霖, 辛明秀. 产甲烷菌的生态多样性及工业应用[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(4): 574–578.
- [37] Chin K J, Conrad R. Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1995, 18: 85–102.
- [38] Fey A, Conrad R. Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 4790–4797.
- [39] Earl J, Pickup R W, Ritchie D A, et al. Development of temporal temperature gradient electrophoresis for characterizing methanogen diversity [J]. Microbial Ecol, 2005, 50(3): 327–336.
- [40] Chan O C, Claus P, Casper P, et al. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment [J]. Environ Microbiol, 2005, 7(8): 1139–1149.
- [41] Kotsyurbenko O R, Chin K Jeong, Glagolev M V, et al. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West–Siberian peat bog [J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(11): 1159–1173.
- [42] Lettinga G, Salih R, Parshina S N, et al. High–rate anaerobic treatment of wastewater at low temperatures [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 1696–1702.
- [43] 张硕, 叶尔买克, 鲁建江. 一株低温产甲烷菌的筛选分离与系统发育分析研究 [J]. 石河子大学学报, 2012, 30(4): 513–517.
- [44] Nichols D S, Miller M R, Davies N W, et al. Cold adaptation in the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*, involves membrane lipid unsaturation [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(24): 8508–8515.
- [45] Saunders N F W, Thomas T, Curmi P M G, et al. Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii* [J]. Genome Research, 2003, 13(7): 1580–1588.
- [46] 辛明秀, 马延和. 微生物产生的冷休克蛋白研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2006, 6(1): 70–73.
- [47] Chen Z J, Yu H Y, Li L Y, et al. The genome and transcriptome of a newly described psychrophilic archaeon, *Methanobolus psychrophilus* R15, reveal its cold adaptive characteristics [J]. Environmental Microbiology Reports, 2012, 4(6): 633–641.
- [48] Noon K R, Guymon R, Crain P F, et al. Influence of temperature on tRNA modification in archaea: *Methanococcoides burtonii* (optimum growth temperature [T_{opt}], 23 °C) and *Stetteria hydrogenophila* (T_{opt} , 95 °C) [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185: 5483–5490.
- [49] Nichols D S, Miller M R, Davies N W, et al. Cold adaptation in the Antarctic archaeon *Methanococcoides burtonii* involves membrane lipid unsaturation [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186: 8508–8515.
- [50] 马吉飞, 杜宗军, 罗玮, 等. 南极普里兹湾夏季不同层次海冰及冰下海水古菌丰度和多样性 [J]. 极地研究, 2013, 25(2): 124–131.
- [51] 赵晶. 南极中山站沉积物中微生物多样性分析及宏基因组文库研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2007: 1–157.
- [52] Connaughton S, Collins G, O'Flaherty V. Development of microbial community structure and activity in a high–rate anaerobic bioreactor at 18 °C [J]. Water Research, 2006, 40: 1009–1017.
- [53] Falz Z, Holliger K C, Grosskopf R, et al. Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 2402–2408.
- [54] 王彦伟, 徐凤花, 阮志勇, 等. 用 DGGE 和 Real–Time PCR 对低温沼气池中产甲烷古菌群落的研究 [J]. 中国沼气, 2012, 30(1): 8–12.
- [55] Coolen M J L, Hopmans E C, Rijpstra W I C, et al. Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change [J]. Organic Geochemistry, 2004, 35: 1151–1167.
- [56] Lettinga G, Rebac S, Zeeman G. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment [J]. Trends Biotechnol, 2001, 19(9): 363–370.
- [57] Scully C, Collins G, O'Flaherty V. Anaerobic biological treatment of phenol at 9.5–15 °C in an expanded granular sludge bed (EGSB)–based bioreactor [J]. Water Research, 2006, 40: 3737–3744.
- [58] Ndegw P M, Hamilton D W, Lalman J A, et al. Effects of cycle–frequency and temperature on the performance of anaerobic sequencing batch reactors (ASBRs) treating swine waste [J]. Bio Resource Technology, 2008, 99: 1972–1980.
- [59] 赵军, 曹亚莉, 骆海鹏, 等. 固定化甲烷八叠球菌处理高浓度有机废水的研究 [J]. 可再生能源, 2002(4): 10–13.
- [60] 杨光. 低温对沼气菌群产气能力的影响以及产甲烷菌的分离 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008: 1–43.
- [61] 姚利, 刘英, 袁长波, 等. 北方地区沼气池冬季耐低温技术探讨 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(12): 6544–6545.
- [62] 黄江丽, 张国华, 丁建南, 等. 低温沼气发酵促进剂的研究 [J]. 江西科学, 2012, 30(1): 39–43.
- [63] 陆清忠, 邓功成, 赵洪, 等. 农村沼气池接种低温驯化沼气发酵微生物试验 [J]. 现代农业科技, 2009(5): 268–271.