

一个甲烷杆菌新种的描述和系统分类学研究*

孙 征 周宇光 东秀珠**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:从清华大学环境科学系处理北京啤酒厂污水的厌氧消化器中分离到一株产甲烷菌菌株 Px1。其菌体形态为弯曲杆状,淡黄色菌落,只利用 $H_2 + CO_2$ 产生甲烷。通过生理、形态、结构特征与 16SrDNA 序列的同源性分析,表明菌株 Px1 是甲烷杆菌属中一个与其它成员不同的新种,命名为弯曲甲烷杆菌(*Methanobacterium curvum* sp. nov.)。

关键词:弯曲甲烷杆菌, 16S rDNA, 系统发育树, G + Cmol%

中图分类号:939.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 03-0265-05

产甲烷菌是一类特殊的原核微生物,其最重要的特点是产生大量的甲烷气作为能量代谢的最终产物,为极端严格厌氧生物,广泛存在于地球上各类厌氧极端环境中。1977 年 Woese 等^[1]通过比较 60 多种不同细菌的 16SrRNA 的序列后发现,产甲烷菌是区别于普通细菌的特殊原核生物,属于地球上的“第三生命形式”,由产甲烷菌和其它古菌共同组成的古菌域(Archaea),与细菌域(Bacteria)和真核生物域(Eucarya)共同构成了地球上的三域生命。

甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)是产甲烷菌中种类最多的属,到目前已有 16 个种被描述。菌株在自然界的分布也较为广泛,它们的细胞形态为杆状,无运动性是此属的鉴别性特征^[2]。

目前产甲烷菌的分类主要依靠生理、形态、结构特征及系统发育学的数据^[3]。我们从处理北京啤酒厂污水的厌氧消化器中分离到一株产甲烷菌菌株 Px1,对其进行了多相分类研究,结果表明它是一个区别于甲烷杆菌属其它种的新成员。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养条件

菌株 Px1 分离自清华大学环境科学系厌氧污水消化器,其污水来源为北京啤酒厂。分离和培养按照 Hungate 所描述的厌氧操作方法^[4]。产甲烷菌培养基参照了 Zehnder^[5]所用的配方,但不加钛离子溶液和瘤胃液。滚管纯化所用培养基中需加入 1.5% 的琼脂(USB, Amersham international)。于 60mL 厌氧瓶内装 25mL 培养基,上部气相抽真空后充入 20% CO_2 和 80% H_2 ,压力为 0.126MPa,高压灭菌。接种后,37℃静置培养 10d。菌株 Px1 已经保存在中国普通微生物保藏中心,保藏号为 AS 1.2671。

* 本项研究由中国科学院微生物所所长基金和中国科学院生命科学创新青年基金支持

** 通讯作者

作者简介:孙征(1973-),男,浙江嘉兴人,中国科学院微生物研究所硕士研究生,2000.7 通过硕士论文答辩后赴美国西部保留地医学院攻读博士。

收稿日期:2000-06-16,修回日期:2000-08-23

1.2 生理与形态特征

生长条件测定包括最适 pH 值、最适生长温度和最适 NaCl 浓度试验^[6],用 Shimadzu GC-7AG 气相色谱仪测定不同培养条件下菌株产甲烷气量作为生长指标。

生长代时测定采用分光光度法,用上海第三分析仪器厂的 752 分光光度计测定波长为 600nm 时培养物吸光度(OD 值)来测定生长速率。

底物利用试验选用了各种产甲烷菌可能利用的底物加入到培养基,同样以气相色谱法测定甲烷气量以确定生长。

1.3 G + C mol% 含量测定

收集对数生长期菌体,用 French 冲击仪破碎菌体,按 Marmur 的方法^[7]提取染色体 DNA,溶于 $0.1 \times \text{SSC}$ 标准溶液,用紫外分光光度计测定 DNA 的热变性温度(T_m),根据公式 $\text{GC mol\%} = 2.44(T_m - 53.5)$ 计算其 G + C 含量^[8]。

1.4 16SrRNA 扩增与测序

用染色体 DNA 作为 PCR 的模板扩增 16S rDNA。依据 GenBank 现有的产甲烷菌 16S rDNA 序列,设计了正向引物 M4F:5' - TCCGTTGATCCYGCCGG - 3' (Y = C + T),反向引物采用细菌 16S rDNA 通用引物 1541R:5' - CGGGATCCAAGGAGGTGATCCAGCC - 3'。PCR 扩增条件:94℃ 变性 1min,55℃ 复性 1.5min,72℃ 延伸 1.5min,35 个循环。经切胶纯化的 PCR 产物连接到 T-Vectro P^{UCm-T}(生工公司)上,转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒并测序,序列分析由 Takara 六合通公司完成。

1.5 系统发育树的构建

将菌株 Px1 的 16S rDNA 序列输入 EMBL 核酸序列数据库进行序列比较,将与之同源性最高的 7 种共 10 株甲烷杆菌的 16S rDNA 序列(表 1),采用 DNAMAN V4.0 软件的 Multiple Sequence Alignment 进行 16S rDNA 同源性分析,并构建系统发育树,发育树的构型和稳定性用 DNAMAN V4.0 软件取样分析 1000 次,进行 Bootstrap 值分析和评价。

1.6 数据库注册号 (Accession number)

菌株 Px1 的 16S rDNA 序列号已经在 EMBL 核酸序列数据库中注册,其注册号为 AF276958。

表 1 16S rDNA 序列来源和数据库注册号

Table 1 16S rDNA sources and accession number

Abbreviation code	Scientific name	Strain	Accession number
<i>M. formicicum</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>	DSM 1312	M36508
<i>M. formicicum</i> FCam	<i>Methanobacterium formicicum</i>	DSM 10111	AF028689
<i>M. bryantii</i> RiH2	<i>Methanobacterium bryantii</i>	DSM 10113	AF028688
<i>M. bryantii</i>	<i>Methanobacterium bryantii</i>	DSM 863	M59124
<i>M. sub</i> C2BBIS	<i>Methanobacterium subterraneum</i>	DSM 11075	X99045
<i>M. sub</i> A8p	<i>Methanobacterium subterraneum</i>	DSM 11074	X99044
<i>M. palustre</i>	<i>Methanobacterium palustre</i>	DSM 3108; F	AF095261
<i>M. ivanovii</i>	<i>Methanobacterium ivanovii</i>	OCM140	AF095261
<i>M. uliginosum</i>	<i>Methanobacterium uliginosum</i>	Kf1-F1	AF095265
<i>M. thermoauto</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	KHT-21	AB020530
<i>M. smithii</i>	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	DSM 11975	U55235

2 结果

2.1 形态特征

菌株 Px1 革兰氏染色为阴性,长杆状并呈不同程度的弯曲,菌体表面光滑,无鞭毛。菌落呈圆形,淡黄色,边缘光滑整齐,15~20d 可长至直径 1.0~1.5mm。菌落在 420nm 波长光照射下发出绿色荧光。Px1 的菌体形态见图 1。

2.2 生长条件

菌株 Px1 为中温嗜中性产甲烷菌,最佳条件下的代时约为 8h。最适生长温度为 37℃,低于 27℃或高于 45℃则无明显生长;最佳生长 pH 值为 7.0,生长范围 pH6.5~pH7.5。生长随 NaCl 浓度的增加而减缓,当 NaCl 浓度达到 0.5mol/L 时停止生长。

2.3 生理生化特征

菌株 Px1 利用 $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ 为唯一碳源底物,但不能利用甲酸盐、乙酸盐、醇类和甲基化合物;对四环素、新霉素、庆大霉素和氯霉素敏感,而对青霉素、卡那霉素、红霉素、链霉素和万古霉素耐受;对 SDS 与蛋白酶 K 破壁不敏感。Px1 与 16S rRNA 序列同源性最相近的几种甲烷杆菌的特征比较如表 2。

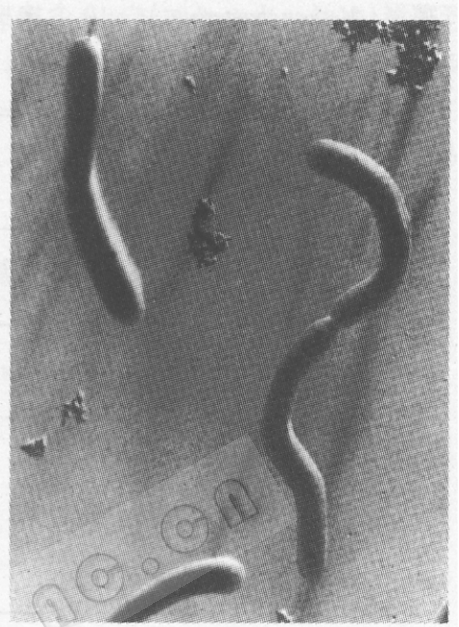


图 1 菌株 Px1 的透射电镜照片(8000×)

Fig.1 Transmission electron micrograph of strain Px1(8000×)

表 2 Px1 与 16S rDNA 序列同源性相近的几种甲烷杆菌的特征比较

Table 2 Comparison of phenotypic features of Px1 and some members of genus *Methanobacterium*

Feature	Px1	<i>M. formicicum</i> DSM 1312	<i>M. bryantii</i> DSM 863	<i>M. subterraneum</i> DSM 11074	<i>M. palustre</i> DSM 3108;F	<i>M. ivanovii</i> OCM 140
Cell shape	Curved rod	Long rod	Long rod	Short rod	Rod	Rod
Cell size/ μm	0.3~0.4 \times 2.0~20	0.4~0.8 \times 2.0~15	0.5~1.0 \times 10~15	0.1~0.15 \times 0.6~1.2	0.5 \times 0.8~1.2	0.2~0.8 \times 1.2
Gram stain	-	+	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-	-	-
Colony color	Light yellow	Pale	Grey	Colorless	nd	nd
Optimum temp/ $^{\circ}\text{C}$	37	37~45	37~39	20~40	37	45
Optimum pH	6.5~7.5	6.6~7.8	6.9~7.2	7.8~8.8	7.0	7.0~7.4
Optimum con. of NaCl/(mol/L)	<0.5	Nd	Nd	0.18~0.25	<0.3	nd
G + Cmol%	61.7	38~42	33~38	54.5	34	36.6
Substrate	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$ Formate	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$ Formate, Alcohol	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$

2.4 G + Cmol%

菌株 Px1 DNA 的 T_m 值为 78.8℃,由公式计算得 DNA 中的 G + Cmol% 为 61.7。

2.5 系统发育学

以 16S rDNA 同源性为基础所构建的包括 10 株甲烷杆菌、菌株 Px1 和一株甲烷短杆菌的系统发育树见图 2。发育树以 *Methanobrevibacter smithii* 作为外群种,其中 Px1 与甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*) 内 10 个株株亲缘关系最密切,形成一个簇群。

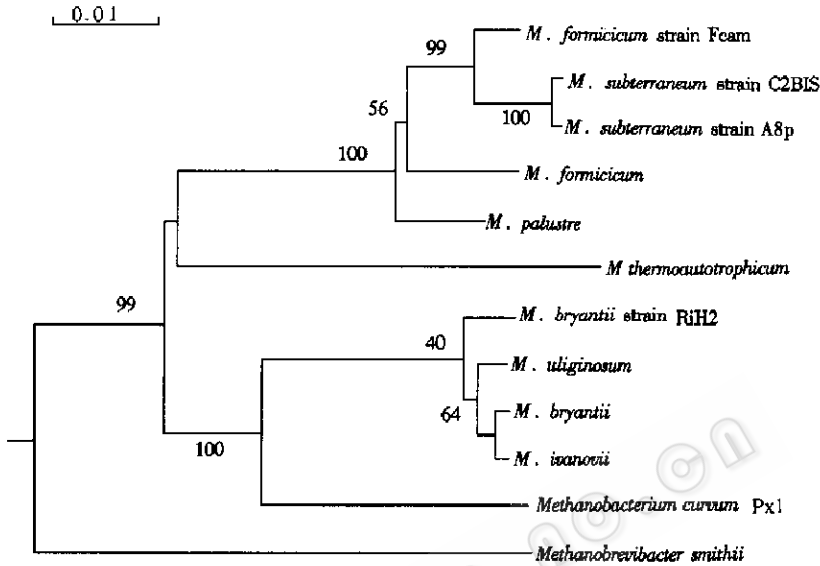


图 2 根据 16S rDNA 序列同源性构建的甲烷杆菌属的系统发育树

Fig.2 Dendrogram of *Methanobacterium* based on 16S rDNA sequence homology

The scale bar indicates the 0.05 evolutionary distance unit

Px1 与 *M. formicicum*、*M. formicicum* Feam、*M. bryantii* RiH2、*M. bryantii*、*M. subterraneum* C2BIS、*M. subterraneum* A8p 和 *M. palustre* 的 16S rDNA 序列同源性最高,均为 94%,与 *M. ivanovii* 的为 93%,与 *M. thermoautotrophicum* 的为 92%,而与 *M. uliginosum* 的为 91%。

3 讨论

1998 年,Boone 在国际系统细菌分类学杂志上发表了产甲烷菌分类鉴定的基本标准^[2],产甲烷菌分类委员会建议:确定一个种的分类位置时,系统发育学上的数据和标准应当优于生理学和形态学的特征。由于产甲烷菌所能利用的底物非常有限,染色、形态特征也比真细菌易变和不易确定,因此,系统发育学的数据在产甲烷菌的分类和鉴定上所占的地位就更加重要。菌株 Px1 的 16S rDNA 序列在 GenBank 中比较得出的最为接近的种皆为甲烷杆菌属的成员,且同源性最高为 94%。细菌分类学家普遍认为当 16S rDNA 序列同源性低于 97%,可以认为是属内的不同种,低于 93%~95% 则可能为属外成员^[9]。菌株 Px1 同其它甲烷杆菌的 16S rDNA 序列同源性支持将其定为甲烷杆菌属的新种。与菌株 Px1 16S rDNA 序列同源性仅低于甲烷杆菌属的是甲烷短杆菌属 (*Methanobrevibacter*) 的一些成员,因而在本项研究的系统发育树构建中采用了甲烷短杆菌属的一个种 *Methanobrevibacter smithii* 作为外群,结果如图所示,*Methanobrevibacter smithii* 与 Px1 的亲缘关系明显远于甲烷杆菌属内各个种。因此,我们确定菌株 Px1 为甲烷杆菌属的一个新种,由于其常

呈不规则弯曲状,故取名为弯曲甲烷杆菌(*Methanobacterium curvum* sp. nov.)。

菌株 Px1 符合产甲烷菌的一般特征,具有不规则弯曲长杆状形态,为严格厌氧菌,在产甲烷菌专用的简单培养基中生长,以 $H_2 + CO_2$ 为底物,产生大量的甲烷气作为代谢产物;但在普通的丰富培养基中不生长。菌落在 420nm 波长光激发下发出绿色荧光,表明存在产甲烷菌特有的辅酶 F420。根据表 2 所列出的菌株 Px1 与甲烷杆菌属各个种生理生化和结构的比较,Px1 与属中其它成员有显著差异,同时在试验中发现 Px1 对 SDS 和蛋白酶 K 不敏感,在细胞破壁时需采用机械方法的特点,明显区别于 *M. formicicum* 与 *M. subterraneum* 等。

参 考 文 献

- [1] Woese C R, Fox G E. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**:5088.
- [2] 赵一章主编. 产甲烷细菌及研究方法. 成都:成都科技大学出版社, 1997.
- [3] Boone D R, Whitman W B. *Int J Syst Bacteriol*, 1988, **38**:212 ~ 219.
- [4] Hungate R E. *Method Microbio*, 1969, **3b**:117 ~ 132.
- [5] Zehnder A J B, Wuhermann K. *Arch Microbiol*, 1977, **111**:199 ~ 205.
- [6] Kotelnikova S, Macario J L, Pederson K. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, **40**:357 ~ 367.
- [7] Marmur J. *J Mol Biol*, 1961, **3**:208 ~ 218.
- [8] Marmur J, Doty P. *J Mol Biol*, 1962, **5**:109 ~ 118.
- [9] Fry N K, Warwick S, Saunders N A, et al. *J Gen Microbiol*, 1991, **137**:1215 ~ 1222.

CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETICS OF A NEW SPECIES OF GENUS METHANOBACTERIUM

Sun Zheng Zhou Yuguang Dong Xiuzhu

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

Abstract: A strain of methanogenic bacterium Px1 was isolated from an anaerobic digester in the department of environmental sciences, TsingHua University, which treated the wastewater from Beijing Beer Factory. The isolate is curved rod, light-yellow colony, uses only $H_2 + CO_2$ as the substrate for CH_4 formation. On the basis of physiology, morphology, structural characteristics and phylogenetic analysis, it is turned out that strain Px1 is a new species of the genus *Methanobacterium*, the name *Methanobacterium curvum* sp. nov. is proposed.

Key words: *Methanobacterium curvum* sp. nov., Characterization, 16S rDNA, Phylogenetic tree, G + C mol%