

高温嫌气纤维素分解细菌的研究

I. 纯种分离*

丁 鑑 王义甫 王基选

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

高温嫌气纤维素分解细菌由于对纤维素具有很强的转化能力,并在发酵过程中累积许多有价值的产物,曾引起不少人研究它在工业上应用的可能性。但是这类细菌纯化困难,许多工作都用集殖培养进行。以后菌株成分复杂,发酵不稳定,条件不易掌握,在实际应用中很难控制。同时,由于研究工作者的材料来源条件不同,所累积资料无法比较与分析。

纤维素分解细菌获得纯种困难的原因,一方面由于与伴生菌的关系甚为复杂,在分离时不易将其淘汰;另一方面由于培养基的不适合,不能长出单菌落。近年来这方面的研究已有很大进展。麦克比(R. H. McBee)在纤维素平板和纤维二糖平板上得到了高温嫌气纤维素分解细菌的菌落。亨埃布(L. Enebo)在纤维素糊精平板上也得到了纯种。到目前为止,通过单个菌落的方法得到纯种的也仅此两个报告。伊姆歇涅茨基虽曾长期系统地进行了高温嫌气纤维素分解菌的研究,但其纯种是在牛肉汁琼脂固体培养基上得到的。因而引起后来研究者的怀疑,认为此项纯种出现有其偶然性。而用以验证纯度的根据,并不足以证明已为纯种。

一、分离方法评论

嫌气性纤维素分解细菌分离的困难,首先在于菌株的纯化。现将前人纯化嫌气性纤维素分解细菌的方法作一比较,以便研究出较为可靠的分离办法。

稀释法 此法首先为奥姆梁斯基所应用。后也为铁多尔(Tetrault)和库文(Khouvine)等所采用。在纤维素细菌较伴生菌为多的情况下,应用此法理论上有可能得到纯种。但是这两位作者用此法均未得到纯种。

热处理法 纤维素芽孢杆菌有耐热性,可用热处理除去伴生菌。但是在集殖培养中总是含有许多耐热性的芽孢伴生菌。因而加热法也很难期望成功。威勒尔(Werner)、铁多尔等的工作也都证实了此点。斯涅什柯(Sniezko)考虑到纤维素分解细菌在沒有纤维素的肉汁培养基中并不生长,而伴生菌的芽孢在通气条件下很易萌发,因而在此条件下用热处理法获得了纯种。但后来伊姆歇涅茨基指出斯涅什柯方法仅考虑到好气性芽孢杆菌的除去,而在培养基中可能还有嫌气性芽孢伴生菌的存在。

阴性菌落法 亦称空白法。利用伴生菌能在牛肉汁琼脂上生长而纤维素细菌不能生

* 本工作承张宪武先生指导,特此表示感谢。
本文1963年2月4日收到。

长的差异,将“无菌区”接入含纤维素的培养基中,可能得到纯种。伊姆歇涅茨基也是用此法得到纯种。但是此法带有很大盲目性。伊姆歇涅茨基在重复十多次后才淘汰了伴生菌。

单细胞分离法 应用显微操作器进行单细胞分离在实际应用上也有许多困难。第一,从单细胞来的材料很难发育,成活率极低;第二,在形态上,也有许多伴生菌与纤维素分解菌很相似,在显微镜下很难区别,铁多尔用此法分出了104个单细胞,其中100个完全不发育,仅有4个生长,但此4个经进一步鉴定,都是杂菌,罗特米斯特罗夫(M. H. Ротмистров)报导用此法得到了纯种,但从菌株的易变性看来,也并非纯种。

纤维素琼脂平板法 麦克比用此法得到了高温嫌气纤维素分解细菌的纤维素溶解区。再将此溶解区接种到纤维二糖平板上而得到单菌落。但是纤维二糖的选择性很低,在此培养基上伴生菌也能生长,因而缺少鉴别作用。

纤维素糊精平板法 亨埃布应用此法得到高温嫌气纤维素分解细菌的单菌落。菌落周围出现透明的溶解区。此法虽较为理想,但据我们的经验,所谓水溶性纤维素糊精,经高压灭菌后,也同样发生凝聚现象。这是它的缺点。

综上所述,菌种的分离方法,以纤维素平板和纤维素糊精平板法较佳。伊姆歇涅茨基的空白法亦不失为淘汰伴生菌的好方法。其他各法虽然均具有很大的缺点,但若周密考虑菌株的性质,选用各法中的优点,亦可找出分离纯种的可靠途径。

二、实验部分

1. 集殖培养 集殖菌种时,原则上应采用选择性培养基,但对高温嫌气纤维素分解细菌来说,利用选择性甚强的培养基时,纤维素分解细菌生长很缓慢,甚或完全不发育。添加了某些天然的有机氮源,则纤维素分解细菌发育良好,反而容易得到集殖培养。我们在集殖培养时,采用了伊姆歇涅茨基VL含马粪浸液的培养基。

2. 分离方法 将VL培养基注入33×1.5厘米的试管中,液层高约25厘米。灭菌后,接种试料如堆肥、厩粪、土壤或塘泥等约2克。在60℃培养2—3日,是时即开始旺盛发酵。表面浮现一层泡沫,滤纸发黄。再经24小时,滤纸断裂,成黄色粘性残渣,随着气体上升集于液表,形成所谓发酵头(head)。5,6天后,发酵头复沉积于试管底部。移植几次后即获得活性强的集殖培养。

3. 菌株纯化 在集殖培养中伴生菌的组成很复杂,可归为:无芽孢菌、好气性芽孢菌和嫌气性芽孢菌三类。

将得到的集殖培养在100℃热处理15分钟,将无芽孢菌完全杀死。剩下的仅是芽孢菌。

高温嫌气纤维素分解细菌为严格的嫌气菌。为创造严格的嫌气条件,将培养物移入普通短试管中,放入抽气瓶内,用抽气泵抽至 10^{-2} 大气压,并在瓶中加入焦性没食子酸及碳酸钠,以吸尽残余的氧,并保持一定的二氧化碳分压。在此条件下,好气性菌不能发育,而纤维素分解细菌繁殖很好。这样经过3—4次移植后,好气性菌已大大减少,纤维素分解细菌已占优势。将此发酵旺盛的培养物涂抹在牛肉汁琼脂平板上,于60℃好气状态下,培养24小时。用无菌刀切去长出的菌落,以免扩展蔓延,并继续培养48小时,观察是否还有杂菌出现。然后将“无菌区”接入VL发酵培养基中。发酵后再用牛肉汁复查有无好气性伴

生菌存在。如此反复操作几次,就能淘汰掉好气性伴生菌。

嫌气性伴生芽孢菌的除去较为困难,但利用嫌气性伴生菌在牛肉汁蛋白胨培养基中很快萌发,而纤维素菌在不含纤维素的培养基中不能发育,仍保持休眠状态的特性,用热处理很有可能将此伴生菌完全除去。

将已除去好气性伴生菌的培养物,用吸管吸取少许,接种到肉汁蛋白胨试管中,于 60°C 严格嫌气状态下培养。每隔 4—5 小时,100°C 热处理 15 分钟,连续 5—6 次。然后将此培养液接入牛肉汁蛋白胨琼脂中,充分混合后,再吸入细长玻璃管内,用火焰将细管两端熔封,于 60°C 培养 48 小时后,检查有无菌落生长。然后将“无菌区”接种入发酵培养基中,于 60°C 严格嫌气状态下培养,经 2—3 天后开始发酵,再经两天,滤纸变黄断裂。用牛肉汁培养基检查发酵液有无嫌气性伴生菌的存在,如牛肉汁不混浊,表明已得到无伴生菌混杂的培养。

简言之,我们获得纯培养的步骤是:利用热处理除去无芽孢菌;在嫌气培养条件下多次移种和在牛肉汁平板上淘汰好气性芽孢菌;在牛肉汁液体培养基中多次热处理,杀死嫌气性芽孢菌;最后在牛肉汁蛋白胨琼脂滚管中,完全淘汰嫌气性伴生菌,从而得到无伴生菌混杂的培养。我们应用此法从堆肥、土壤、塘泥等试料中得到了不含伴生菌的纤维素细菌培养物。计 16 号、20 号、23 号 3 个菌株。

将所得的不含伴生菌的纤维素细菌培养物,按伊姆歌涅茨基验证纯种的指标加以检查,结果概括如下:

培养特征 在牛肉汁蛋白胨培养基,麦芽汁培养基,马铃薯培养基,牛乳培养基,含纤维素无机氮的合成培养基中,无论在好气状态或嫌气状态均不生长。

形态特征 革兰氏阴性菌,刘歌氏碘液染色呈亮黄色,典型端生芽孢杆菌,菌体细小,0.4—0.5 × 2.8—4.8 μ,芽孢 1.0—1.2 μ。

发酵特征 在 VL 培养基中发酵后,滤纸变黄,碎烂,成粘性状物。发酵无腐败气味,产酸,有大量还原糖累积。

根据以上特征,与伊姆歌涅茨基的描述极相符合。但是从微生物学观点看来,菌种非来自单菌落或单细胞,其纯度总难使人信服。为此,我们进一步研究单菌落形成的条件。

4. 单菌落的形成 嫌气性纤维素分解细菌很难形成表面菌落,到现在还没有一个确有把握而且比较简便的方法。正如亨盖特 (Hungate, 1950) 在评论中所指出,在以往几十年中,只有少数工作者获得了嫌气性纤维素分解细菌的纯培养。最近斯肯纳尔 (Skinner, 1960) 报导了分离嫌气性纤维素分解细菌的方法。他在培养基中除加还原剂外,在配剂、装瓶、灭菌过程中,还用氮气流冲洗。在充满 10% 氩气和 90% 二氧化碳的气流中培养的纤维素细菌,所长出的菌落还是非常细小。

显然,培养基的成分和还原条件是形成单菌落的关键。我们为了确定一个适合于单

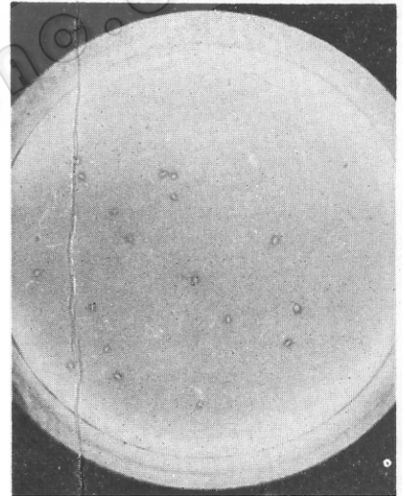


图 1 高温嫌气纤维素分解菌在充满 CO₂ 气流的气罐中,于 60°C 培养 6 天后在纤维素平板上长出的单菌落

菌落形成的培养基,暫不考虑还原条件,采用滾管的办法。将 VL 培养基中的滤纸条改用机械研磨的纖維素。研磨必須很細,呈浆糊状。这样制成的琼脂固体培养基,化学性質并未改变,而纖維素又处在較均一的状态。将发酵旺盛的新鮮培养液稀释1/10,1/50,1/100倍,先接入纖維素培养基中,再吸入玻璃管内,然后将玻璃管两端烙封。60°C培养6—7天后,在滾管中即出現纖維素分解細菌的单菌落。所出現的菌落数随稀释度的增大而减少,菌落出現的数目,以稀释1/50倍較易观察。菌落小(0.6毫米),淡黄色,沿菌落周围,有纖維素被分解后所呈現的溶解圈,透明可見。培养基底板仍保持不透明的乳白色。培养基中含有少量碳酸鈣,纖維素被分解后所产生的酸与碳酸鈣作用后也是产生溶解圈的一个原因。在不加碳酸鈣的条件下,也同样得到具有溶解圈的单菌落,表明此菌落确具有分解纖維素的能力。将此菌落取出,接种入发酵培养基中,滤纸条也发黄,碎烂,变成粘性状物,具有此菌发酵纖維素时的典型特征。此外,我們还在水解纖維素的培养基(用HCl, H₂SO₄, H₃PO₄水解的纖維素)上得到了此菌的单菌落。

在由滾管获得单菌落的基础上,我們更进行了形成表面菌落的研究。显然平板中能否出現表面菌落,与培养中还原条件密切相关。我們用硫代甘醇鈉作还原剂,用量为0.02%。經过滤灭菌后,于接种时加入二重皿中。将前述稀释液用混悬法接种。二重皿接种后放于培养罐中。用真空泵抽气至10⁻²大气压,罐中放入碱性焦性沒食子酸溶液,以吸尽残余的氧。为保持培养罐内具有一定气体分压,抽掉的空气以二氧化碳补足。罐中并放清水少許,以避免培养过程中培养基发生干裂。

培养6—7天后,在研磨纖維素和水解纖維素的平板上,都出現了高温嫌气纖維素分解細菌的单菌落。菌落圓形(0.6毫米),如图1。沉沒于培养基中的菌落凸透鏡形,呈淡黄色,沿菌落周围有极明显的溶解圈。将此菌落接入发酵培养基中,滤纸条发黄、碎烂、变成粘性状物,具有高温嫌气纖維素分解菌的典型特征。

同样在利用硫化鈉为还原剂时,也得到了此菌的表面菌落。硫化鈉的浓度以0.01%为宜。

为进一步验证此分离方法的可靠性,我們將所有从空白法得到的菌株,在研磨纖維素平板和水解纖維素平板上試驗,都得到了此纖維素分解細菌的表面菌落。

三、結 論

1. 用含有机氮丰富的纖維素培养基,从堆肥、土壤、塘泥等試料中得到了活性很強的高温嫌气纖維素分解細菌的集殖培养。

2. 纖維素分解細菌的集殖培养中含有許多好气性和嫌气性伴生菌。利用纖維素分解細菌与好气性、嫌气性伴生菌生理間的差异,用热处理和空白法能将伴生菌完全除去。

3. 除去了伴生菌的纖維素分解細菌的培养物,在有还原剂的条件下,在纖維素和水解纖維素平板上能形成带有溶解圈的表面单菌落。这些菌落具有发酵纖維素的能力。

参 考 文 献

- [1] Имшенецкий А. А.: *Микробиология*, 8(2): 129, 1939.
[2] Имшенецкий А. А.: *Микробиология целлюлозы*. М., 1953.
[3] Ротмистров М. Н.: Брожение целлюлозы и изменчивость его возбудителей. 1958.
[4] Enebo L.: *Physiologia Plantarum*, 4: 653, 1951.
[5] Hungate R. E.: *Bact. review*, 14, I, 1950.
[6] McBee R.: *Bact. Rev.*, 14, 51, 1950.
[7] Skinner F. A.: *Jour. gen. Microbiol.*, 22(2):539, 1960.

ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМОФИЛЬНЫХ АНАЭРОБНО-
ЦЕЛЛЮЛОЗОРАРУШАЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Дин Цзянь Ван Юй-фу Ван Цзи-сюань

(Институт лесоводства и почвоведения АН КНР, Мукден)

1. Из компоста, навоза и ила получен ряд накопительных культур бактерий, сбрасывающих клетчатку при высоких температурах в анаэробных условиях. Пептон и конский навоз являются хорошим источником азота для накопления этих бактерий.

2. Обогащенная культура термофильных целлюлозных бактерий содержит различные аэробные и анаэробные сопутствующие виды, не разлагающие клетчатку.

3. Разработанный метод выделения чистых целлюлозных бактерий основан на последовательном освобождении культуры от аэробных и анаэробных бактерий-спутников по принципу использования физиологических различий между ними.

4. Культуры, освобожденные от аэробных и анаэробных бактерий-спутников, на целлюлозной или гидроцеллюлозной среде при наличии восстановителя, образуют отдельные колонии, которые обладают яркими прозрачными зонами. Отдельные колонии обладают способностью разлагать клетчатку.