

马氏甲烷球菌的分离及其生理性状的研究

赵一章

尤爱达

(中国科学院成都生物研究所, 成都) (美国加利福尼亚大学洛杉矶分校)

从四川省成都市狮子山污水厂的污泥中, 分离出马氏甲烷球菌 (*Methanococcus mazei*) C-44 菌株。这是继 Mah (1980) 首先获得纯培养物后, 又获得的另一纯培养物。我们对其生理学性状进行了初步研究, 并对其在滚管及液体培养中的形态学特征进行了观察。此菌株可以利用甲醇、醋酸、三甲胺生长并产生甲烷。利用甲醇生长最快。利用 H_2/CO_2 生长很慢, 而且菌体在 H_2/CO_2 上生长较弱。不利用甲酸、乙醇、丙醇和丁醇。革兰氏染色阴性到可变。

关键词 马氏甲烷球菌

Barker 1936 年在以醋酸钙为碳源的富集培养物中, 首先观察并较完整的描述了马氏甲烷球菌 (*Methanococcus mazei*)。尽管他当时未能获得纯培养物, 但却较详细地描述了这个菌在不同生长阶段所具有的不同形态特征。在《伯杰氏鉴定细菌学手册》(第 8 版)中, 将此菌归入甲烷球菌属, 但无纯培养的记载^[2]。1980 年 Mah 首先从实验室连续醋酸富集培养中获得此菌的纯培养物, 并对其一些性状进行了研究^[3]。

我们在利用 H_2/CO_2 和醋酸钠富集培养成都市狮子山污泥试验中, 也获得了此菌的纯培养物。并对此菌的形态和生理学性状进行了研究, 现将结果报告如下。

材料和方法

(一) 样品来源及富集方式

马氏甲烷球菌 C-44 菌株分离自四川省成都市狮子山污水处理厂污泥。该厂处理半数以上的成都市工业及家庭生活污水。此污泥已被用作接种某些沼气池。在接入沼气池前, 常用猪粪常温富集培养两周左右。从污水来源上看, 菌种种类相当复杂。中温沼气发酵, 最高产气量可达 $2.3M^3/M^3 \cdot 日$, 是较好的沼气池接种源之一。我们对此样进行了以醋酸钠为基质的 4 次连续富集培养, 分加青霉素与不加青霉素两种, 加青霉素富

集培养及滚管分离过程与不加青霉素的(图 1)基本相同, 只是在每次富集培养及滚管分离中加入青霉素。

(二) 厌氧操作

整个富集培养和滚管分离采用了 Hungate 严格厌氧技术^[4,5]。所有试剂配制、培养基制作以及接种操作等均在 100% N_2 下进行。试剂加入和接种均用换气排氧后的无氧注射器进行^[6]。

(三) 培养基

1. 富集培养基(MA): 采用修改的 Barker 培养基, 其组分为(%): NH_4Cl 0.1, $MgCl_2$ 0.01, K_2HPO_4 0.04, 酵母膏 0.1, 胰脲酶 0.1, 刃天青 0.0001, 半胱氨酸 0.05, $NaHCO_3$ 0.05, $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.01。煮沸前调 pH 至 6.6—6.8。无氧操作下分装 50ml 培养基至带丁烯胶塞的 120ml 血清瓶中, 120℃ 灭菌 18 分钟。接种前加入 $Na_2S \cdot 9H_2O$ 、 $NaHCO_3$ 和醋酸钠, 终点 pH 要求在 7.15。

2. 分离滚管培养基: 是在 MA 基础上配制的, 其组分为(%): NH_4Cl 0.1, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.04, KH_2PO_4 0.02, $MgCl_2$ 0.01, 酵母膏 0.2, 胰脲酶 0.2。按上述方法加入还原指示剂、半胱氨酸、 $NaHCO_3$ 、 $Na_2S \cdot 9H_2O$ 。另外加入 10% 的污泥抽提液。污泥抽提液的制备过程为: 将富集培养液先用粗布过滤, 然后在 ECB-20 离心机上以

本文于 1982 年 10 月 18 日收到。

本实验得到罗伯特·马教授的热情帮助, 特此致谢。

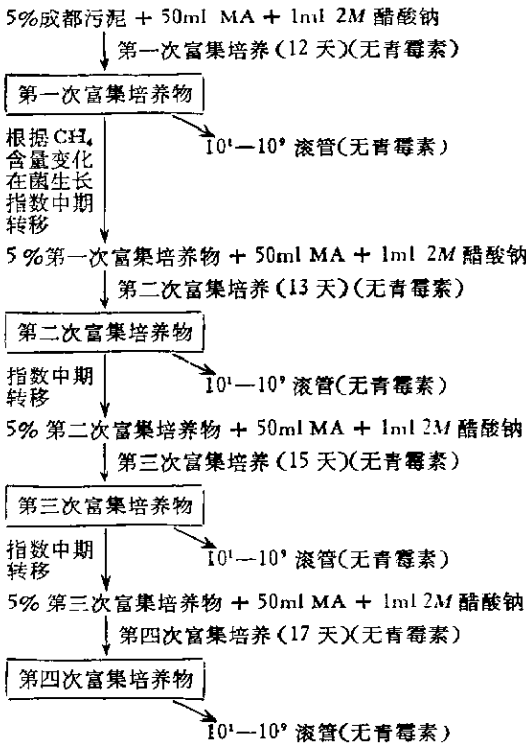


图1 不加青霉素连续富集培养与滚管分离过程

Fig. 1 The procedure of continual enrichment and isolation without penicillin

7,000 × g 离心 20 分钟, 上清液再经过细菌过滤膜真空抽滤, 灭菌后置冰箱备用。

3. 纯度鉴定培养基: 采用以下 3 种培养基, 在不加任何一种碳源的情况下, 应不生长任何菌。同时, 以分别加入 H₂/CO₂、甲醇和醋酸者作为对照。

(1) 丰富营养培养基(%): 牛肉膏 0.3, 蛋白胨 0.5, NaCl 0.8, 半胱氨酸 0.05, 琼脂 1.8。

(2) 无甲烷菌可利用的碳源的分离培养基: 与分离培养基相同, 只是无任何甲烷菌可以利用的碳源。

(3) 追加 2% 葡萄糖的分离培养基: 在分离培养基中追加 2% 葡萄糖。

其它氧化还原剂, Na₂S · 9H₂O 及 NaHCO₃ 的加法同上。接种前调 pH 到 7.15。

4. 低酵母含量培养基(%): 与富集培养基相同, 酵母膏含量仅为 0.005, 胰脲酶含量为 0.02。

(四) 分离及纯化过程

将加青霉素与不加青霉素 4 次连续富集培养物分别及时进行滚管分离。按照常规系列稀释

法, 置 46℃ 水浴中进行 10 倍稀释滚管 (10¹-10⁹)。各次所滚之分离管置于 37℃ 培养 7-25 天, 在此期间进行显微镜下荧光观察。为了使菌体易于挑出纯化, 利用醋酸钠作基质, 检查记载有荧光的菌落。为了除去马氏甲烷球菌包囊体中存在的其他杂菌, 以青霉素钾盐及环丝氨酸复合抗生素处理^[17-19], 再经过连续 4 次单菌落分离, 获得了马氏甲烷球菌 C-44 菌株的纯培养物。采用 3 种纯度鉴定培养基证明无任何杂菌存在。

(五) 其它方法

研究过程中采用 Carl 蔡氏相差显微镜进行观察。马氏甲烷球菌在 420nm 波长紫外光激发下具有明显的荧光^[9-10], 这是目前鉴别甲烷菌的快速方法。甲烷含量测定利用 920 型气相色谱仪进行。气体组成的分离采用气相层析用活性炭, 检测器温度为 70℃, 柱温为 185℃, 氦气为载气, 流速为 60ml/分。检测器电流为 280mA。测定时, 用配有活塞的注射器准确收集 0.5ml 气样注入, 用以检测。按标准曲线所得之方程 Y = a + bx 进行计算。式中 x 为峰高 (mm), a = -0.05749, b = 0.0015847, Y 为甲烷含量 (μ moles), r² = 0.99941。

结果与讨论

无论滚管或液体培养物, 马氏甲烷球菌在形态上的变化可以在荧光显微镜下观察到。7 天以内的幼龄菌落, 在甲醇为基质的滚管中似桑子状, 菌落浅黄色, 表面突出, 边缘不整齐。要分散这些菌落是较困难的。用盖玻片轻轻挤压这些放在载片上的挑出的菌落, 只能看到压散开的包囊状分隔体(图 2)。而 7-15 天以上的成熟菌落颜色仍为浅黄色。菌落表面逐渐变为不规则圆形, 具有较完整的边缘, 常常在菌落周围由于甲烷和 CO₂ 的形成出现囊状气泡。图 3 为一典型的成熟的菌落挑至载片上, 经挤压盖片后可以看到的分散后的球菌体。图中可看到 1-3 μm 单个的具有荧光的球菌体。在由幼龄菌落向成熟菌落发

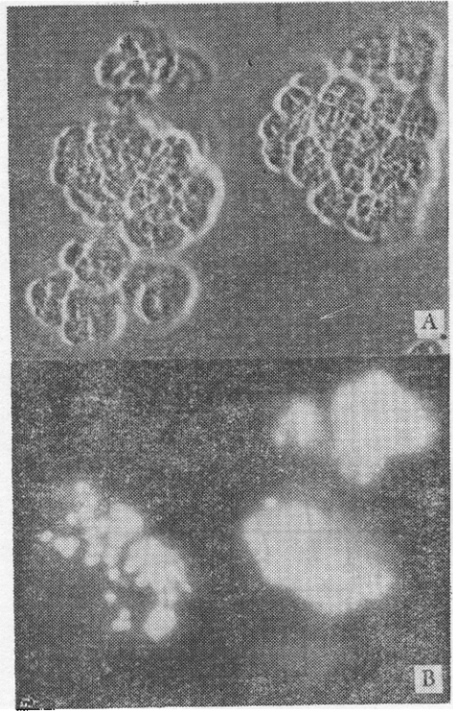


图2 马氏甲烷球菌 C-44 菌株的包裹状分隔体(1,750×)

Fig. 2 Cyst separator of *Methanococcus mazei* C-44

A. 可见光下 Under the visible light B. 紫外光激发下 Under the violet light

展的过程中,可能有一中间类型的时期。此时,菌落形态的变化特点是由较粗糙的表面向较光滑的表面过渡,较强力量的挤压仍不能形成单个的球菌体。纯化菌应掌握在易分散成单菌落的时期进行。用高稀释度单菌体分离,易获得无任何杂菌的马氏甲烷球菌的菌落。Mah 曾描述了马氏甲烷球菌在发育时期中,不同阶段的形态变化^[3]。我们在培养中也观察到这种变化。我们着重观察了在甲醇培养基上的变化,在滚管中如果采用 0.1% 酵母膏和胰脲酶的滚管培养基,出现中间类型菌落的阶段较长,约有 10—15 天。如果利用追加富集培养液的上清液和酵母含量高的培养基,则这个阶段明显缩短,甚至不易发现。

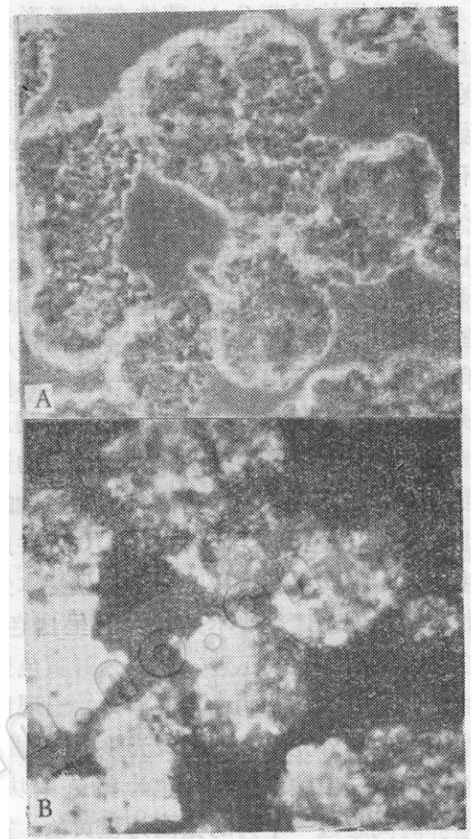


图3 挤压后的马氏甲烷球菌 C-44 菌株的成熟包裹(1,750×)

Fig. 3 Mature cyst of *Methanococcus mazei* C-44 after repeated pressure on cover slip

A. 可见光下 Under the visible light B. 紫外光激发下 Under the violet light

在液体培养基中,我们同样观察到马氏甲烷球菌发育期中的三个不同阶段的形态变化。甲醇培养基上的观察结果表明,幼龄期在液体培养中生长的时间比在滚管中生长要长些,有时超过 5—10 天才开始迅速生长,一旦出现小絮块状菌团时,小絮块迅速长成大的包裹体。有时包裹体的轴可生长成超过 $1,500\mu\text{m}$ 的絮块大菌团。将培养 20—30 天的成熟的包裹体从液体培养基中取出,置于载玻片上,经盖片挤压时,同样出现单个的球菌体,此球菌大小不等,直径约为 $1.0—3.0\mu\text{m}$ 。

马氏甲烷球菌 C-44 菌株在菌落形态上的变化与甲烷八叠球菌明显不同,后者为大小略有差异的规则八叠细胞,没有发育过程中明显的阶段变化。而且它极不易形成单个的球菌体,但常常形成不同大小的包裹体。二者的生理特性较为相似^[11-13],可以利用甲醇、醋酸、三甲胺以及 H_2/CO_2 , 并生成甲烷。不能利用乙醇、丙醇、丁醇生成甲烷。前者具有不同的基质利用率。碳源利用试验是在同一生长基质诱导培养一代后进行。对不同基质的利用情况见图 4。图 4 中表明,利用甲醇的速度最快,利用三甲胺次之,而利用醋酸钠的速度较慢。它虽然可以利用 H_2/CO_2 并产生甲烷,但产甲烷过程明显延迟且菌体生长较弱,包裹体絮块不是黄色而呈白色。在甲醇上菌体生长迅速,菌团为鲜黄色絮块,在室温下放置两个星期后开始出现自溶现象,紫外光激发下的荧光明显减弱。在醋酸及三甲胺培养基上也为黄色絮块,培养时间超过一个月的菌团为橙黄色。室温下 (23°C) 可以保存很长时间,两个月以上的培养物仍具有较强的荧光。

马氏甲烷球菌 C-44 菌株生长温度范围较广(图 5), 30—40°C 均生长良好。它的生长 pH 范围也较广,最适 pH 仍在 7.0

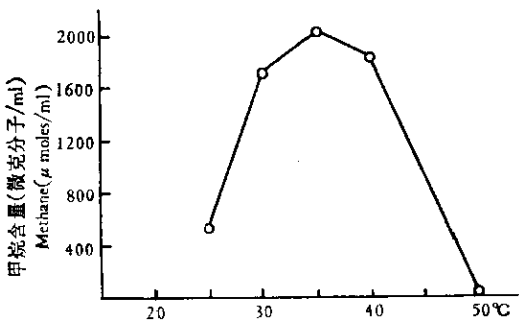


图 5 温度对马氏产甲烷球菌 C-44 菌株生长的影响

Fig. 5 Effect of temperature on growth of *Methanococcus mazei* C-44

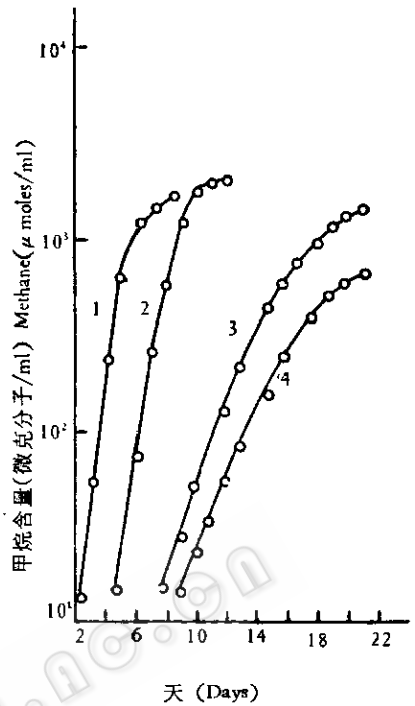


图 4 马氏甲烷球菌 C-44 菌株对不同基质的利用情况

Fig. 4 The utilization of varying substrates by *Methanococcus mazei* C-44

1. 甲醇 methanol 2. 三甲胺 trimethylamine 3. 醋酸钠 sodium acetate 4. H_2/CO_2 (70:30)

左右(图 6)。我们用缓冲能力较强的培养基,接种前 pH 值为 7.15, 接种后生长迅速,终点 pH 值变化不大。

因为它所生成的甲烷含量与其细胞数

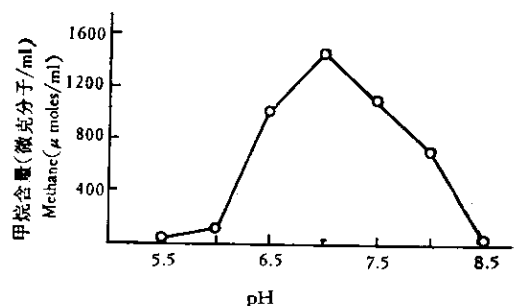


图 6 不同 pH 值对马氏甲烷球菌 C-44 菌株生长的影响

Fig. 6 Effect of pH on growth of *Methanococcus mazei* C-44

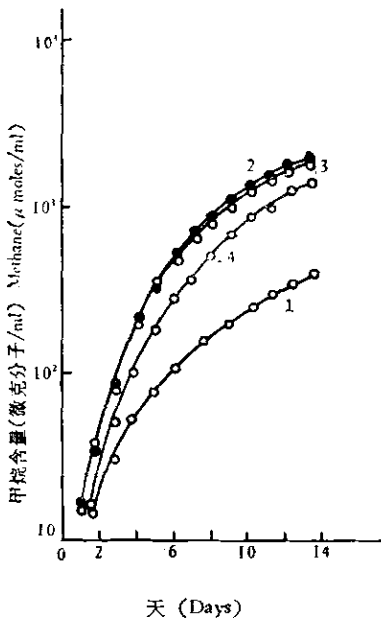


图7 酵母膏含量对马氏甲烷球菌 C-44 菌株生长的影响

Fig. 7 Effect of yeast extract on growth of *Methanococcus mazei* C-44

酵母膏含量 Yeast extract was added at the following concentrations (%):

1. 0.005; 2. 0.3; 3. 0.2; 4. 0.05

量在一定时期内为正相关关系, 可以按甲烷生成动力学关系推算出世代时间为 20 小时, 而在醋酸培养基上为 39.2 小时。

酵母膏对其生长刺激作用非常明显(图 7)。在以甲醇为基质的培养基上, 酵母膏含量为 0.05% 时, 就有明显的刺激作用。其含量在 0.2% 和 0.3% 时, 刺激作用略有增加。在酵母膏含量较低 (0.005%) 时, 生长速度则很慢, 甲烷产量也很低。胰凝酶对该菌的生长刺激作用不甚明显。

综上所述, 从形态学上看, 马氏甲烷球菌 C-44 菌株和甲烷八叠球菌的菌落形态及细胞单体的排列完全不同。前者为粘成一团的包裹体, 但生长的后期可在外力挤压下分散成单个的球菌, 且在发育时期的不同阶段具有不同的形态, 而后者总是以规则的八叠出现, 不分散成单个球菌体。

但在幼龄菌落时期, 由于都呈包裹体形状, 必须仔细观察才能鉴别他们在形态上的区别。从生理学特性看, 特别是从底物的利用来看, 两者非常相似, 都可以利用醋酸、甲醇、三甲胺、 H_2/CO_2 生长, 并生成甲烷, 都有较广的基质利用范围。除此之外, 最适生长温度、最适生长 pH 以及营养要求等生理特性也较相似。目前, 对于 Mah 等人提出的关于马氏甲烷球菌归属问题的讨论意见^[14]值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Barker, H. A.: *Archiv fur Mikrobiologie*, 7: 420—438, 1936.
- [2] Bryant, M. P.: Part 13 Methane-producing bacteria in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, pp. 472—477, 1974.
- [3] Mah, R. A.: *Current Microbiology*, 3: 321—326, 1980.
- [4] Hungate, R. E.: A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In *Methods of Microbiology*, Vol. 3B Academic Press Inc., New York, pp. 117—132, 1969.
- [5] Bryant, M. P.: *Am. J. Clin. Nutri.*, 25: 1324—1328, 1972.
- [6] Macy, T. M. and R. E. Hungate: *ibid.*, 25: 1318—1323, 1972.
- [7] Hilpert, R. and J. Winter: The sensitivity of Archaeobacteria to Antibiotics *Zbl. Bakt/Hyg.*, I. Abt. Orig. C2, 11—20, 1981.
- [8] Mah, R. A. and M. R. Smith: *The Methanogenic Bacteria in the Prokaryotes*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, pp. 948—977, 1981.
- [9] Doddema, H. J. and G. D. Vogels: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 714—717, 1978.
- [10] Edwards, T. and B. C. McBride: *Appl. Microbiol.*, 27: 540—545, 1975.
- [11] Mah, R. A. and M. R. Smuth: *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 1174—1184, 1978.
- [12] Zinder, S. H. and R. A. Mah: *ibid.*, 38: 996—1008, 1979.
- [13] Zhillina, T. N.: *On the Taxonomy of Methanosarcina Microbiology (USSR)*, 43: 620—621, 1974.
- [14] Mah, R. A. et al.: 1980 (manuscripts unpublished).

THE ISOLATION AND THE PHYSIOLOGY OF *METHANOCOCCUS MAZEI* C-44

Zhao Yizhang

(Chengdu Institute of Chinese Academy of Sciences, Chengdu)

Ida Yu

(University of California, Los Angeles, U. S. A.)

Methanococcus mazei strain C-44 was isolated from sludge of waste treatment facility in Chengdu. In roll tube and liquid culture, three forms of *M. mazei* C-44 could be found. The cells were nonmotile and measured 1.0—3.0 μm in diameter. The generation time on methanol and sodium acetate was 20.3 and 28.7 hr respectively. *M. mazei* strain C-44 can use methanol, acetate, trimethylamine for growth and me-

thanogenesis. It used methanol fast and H_2/CO_2 slowly. It grew poorly on H_2/CO_2 . It can not use formate, ethanol, propionate and butyrate. The range of optimum pH is 6.5—7.5, the range of optimum growth temperature is 35—40°C. It was Gram negative to Gram variable.

Key word

Methanococcus mazei