

嗜树木甲烷短杆菌和甲酸甲烷杆菌的分离和特性

钱 泽 澍

(浙江农业大学,杭州)

从我国沼气池污泥样品中,采用改良的亨氏操作技术,分离出 TC713 和 TC708 两株不运动、革兰氏染色阴性、不形成芽孢的杆菌*。TC713 菌株呈短杆状,往往两个相连成双杆菌,个别呈链杆状,菌落圆形透明。TC708 菌株培养后期呈长杆状,弯曲,菌落圆形,周边呈现丝状。两菌株均只能利用 H_2/CO_2 作为碳源和能源,不能利用 CH_3COONa 、 CH_3NH_2 、 CH_3OH 。利用甲酸较慢,且利用率不高。在培养液中分别加入酵母膏、瘤胃液或酪素水解物均能刺激 TC713 菌株的生长,但该菌株不需要外源辅酶 M。TC713 和 TC708 菌株生长最适温度分别为 $35^\circ C$ 和 $35-40^\circ C$,在 $45^\circ C$ 生长不良。适宜生长的 pH 值分别为 6.5—8.5 和 6.8—9.2。在含有 0.1% 酵母膏的培养液中,以 H_2/CO_2 为碳源和能源, $37^\circ C$ 下振荡培养,其菌数倍增时间分别为 6—7 小时和 8—10.5 小时。TC713 菌株经荧光免疫测定,仅对甲酸甲烷杆菌抗体有微弱的反应。DNA 中 G + C 克分子含量为 $27.83 \pm 0.26\%$ 。根据 TC713 和 TC708 两菌株的性状,分别确定为嗜树木甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter arboriphilus*) 和甲酸甲烷杆菌 (*Methanobacterium formicicum*)。

关键词 嗜树木甲烷短杆菌;甲酸甲烷杆菌

沼气发酵过程中,产甲烷细菌的研究,国外已有不少报道^[1,2],但对我国广大农村沼气池中产甲烷细菌的研究,还刚开始,缺少对这类细菌的分离和性状进行系统的研究。本文报道从我国农村沼气池污泥中分离出的两株甲烷杆菌的性状。

材料与方 法

(一) 培养基

培养基除另有说明外,本试验采用下列成份 (g/l): NH_4Cl 1, K_2HPO_4 0.4, KH_2PO_4 0.4, $MgCl_2$ 0.1, 半胱氨酸 0.5, 酵母膏 1, 刃天青 (0.1%) 1ml。调节 pH 至 6.0 灭菌,使用前每 5ml 培养液中加入 1% Na_2S 和 5% $NaHCO_3$, 各 0.1ml。培养液 pH 为 7.0。固体培养基,加入 2% 琼脂。

培养基的制备采用改良的 Hungate 操作技术^[3,4],在充氮气的专性厌氧条件下进行。

(二) 富集培养和分离

采用厌氧操作^[4],将少许样品加入含有 50ml

培养液的 100ml 玻璃瓶中,加入青霉素(使最后培养液为 3,000 单位/ml)。能源和碳源分别采用甲醇 (0.5%) 和 $H_2 + CO_2$ (70:30 体积比),该混合气体在 2 个大气压下充气^[5],在 $37^\circ C$ 下富集培养。采用气相色谱仪分析有 CH_4 形成后,以十倍稀释法进行滚管分离培养。培养液中加入 Na_2S 、 $NaHCO_3$ 及青霉素,浓度和富集培养相同。在琼脂融化后加入甲醇,滚管后通氢和二氧化碳混合气,换气一分钟。待滚管中形成菌落后,测定试管中形成的 CH_4 ,并在荧光显微镜下观察产生荧光的菌落。利用厌氧技术,将菌落再行稀释分离,直至获得纯菌为止。在获得纯菌后,采用肉汁蛋白

本文于 1982 年 8 月 18 日收到。

本试验在美国加利福尼亚大学洛杉矶分校进行。承 Ida Yu 博士和 Robert A. Mah 教授的指导;纽约州卫生部公共卫生局 E. Conway de Macario 博士进行荧光免疫测定;加利福尼亚大学戴维斯分校食品科学系 Phaff 博士进行 DNA 中 G + C 克分子含量的测定,在此一并致谢。

* 该两菌株保存于浙江农业大学微生物教研组。

琼脂培养基和葡萄糖琼脂培养基,在厌氧和有氧条件下培养,并在显微镜下分别检查其纯度。

(三) 气体成份的分析

CH₄含量的测定,采用 Varian Aerograph 920 型气相色谱仪,层析柱中以酸性活性碳为担体,He 为载气,热导池法测定^[6]。以下试验数据均以每只试管或每瓶中甲烷的总含量微克分子数表示。

(四) 碳源利用试验

将 20ml 培养液装入 50ml 玻璃瓶中,接种培养 48 小时的菌液 2%,培养液中分别加入下列碳源: CO₂/H₂, CH₃COONa, CH₃NH₂, HCOONa, CH₃OH。CH₃COONa 及 CH₃NH₂ 浓度为 0.05M, HCOONa 及 CH₃OH 浓度为 0.5%, CO₂/H₂ 为 2 个大气压,重复一次。在 37℃ 下振荡培养一周后,测定 CH₄ 形成量。

(五) H₂ 存在下对 CH₃COONa 利用的测定

方法和碳源利用试验相同。但采用磷酸盐缓冲液,其成份为(g/l): NH₄Cl 1, KH₂PO₄ 1.5, K₂HPO₄ 2.2, MgCl₂ 0.1, NaCl 0.9, 酵母膏 2, 半胱氨酸 0.5, 刃天青(0.1%) 1ml, 调节 pH 为 7.5。灭菌后每瓶中加入 1%Na₂S 0.4ml, 接种 TC713 菌液 2%, 分成五个处理: 即分别加入 CH₃·COONa, CH₃COONa + H₂, H₂, CO₂ + H₂ + CH₃COONa 和 CO₂ + H₂。每个处理重复三次。H₂ 及 CO₂/H₂ 各为 2 个大气压, CH₃COONa 浓度为 0.5%。37℃ 下振荡培养 2.5 天,测定 CH₄ 形成量。

(六) 温度试验

在试管中分别装入 5ml 培养液,接入菌液 2%。温度为 25、30、35、40、45、50、55、60℃, 重复三次。培养 3 天后测定 CH₄ 和菌体形成量(用吸光度表示)。

(七) pH 试验

在 50ml 小玻璃瓶内装 pH7.5 的磷酸缓冲液 20ml, 灭菌后加入 1%Na₂S 0.4ml。再用 1% HCl 及 10% NaOH 调节 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0。分别接种 2% 菌液。通入 2 个大气压的 H₂/CO₂ 混合气。在 37℃ 下 TC713 菌株静止培养 2 天, TC708 菌株培养 3 天, 分别测定 CH₄ 形成量和发酵液的 pH 值。

(八) 细菌生长速率和产气量的测定

试管内装入含有 0.1% 酵母膏的培养液 10 ml, pH 值为 4.0—4.5, 灭菌后加入 NaHCO₃ 10% 0.5ml 和 1%Na₂S 0.2ml, pH 值为 8.0, 再通入 2 个大气压 H₂/CO₂ 后, pH 为 7.0。接种菌液 2%, 在 37℃ 下振荡培养, 测定菌数及 CH₄ 形成量, 重复三次。

结 果

(一) 富集培养和分离

从浙江农业大学沼气池以奶牛粪为原料的污泥中, 分离出产甲烷细菌 TC713 菌株; 从四季青人民公社沼气池以猪粪及人粪尿为原料的污泥中分离出产甲烷细菌 TC708 菌株。

(二) 形态和培养特征

TC713 菌株为不运动和不形成芽孢的短杆菌, 一般两个相连成双杆菌, 菌体大小为 0.4×1.5—2.5μm, 个别菌体出现链状

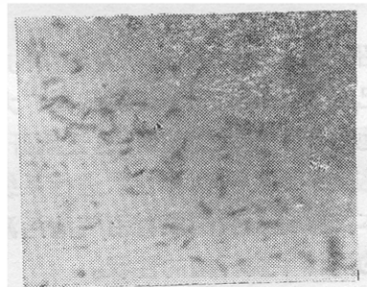


图 1 TC713 菌株(×5,000)

Fig. 1 Strain TC713

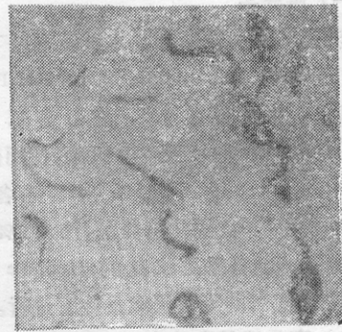


图 2 TC708 菌株(×5,000)

Fig. 2 Strain TC708

(图1)。革兰氏染色阴性。菌落圆形,透明。菌落及菌体在荧光显微镜下呈现荧光时间较长,不易消失。

TC708 菌株为不运动和不形成芽孢的杆菌,大小为 $0.4 \times 0.2 - 5.0 \mu\text{m}$, 有长杆状,个别长达 $10 \mu\text{m}$ 以上,弯曲(图2)。革兰氏染色阴性。菌落圆形,周边呈现丝状,菌落及菌体在荧光显微镜下,呈现荧光时间较短,很易消失。

(三) 生理和营养性状

1. 碳源利用: 结果见表1。

表1 TC713 和 TC708 菌株对碳源的利用

Table 1 Utilization of carbon sources by strain TC713 and TC708

基 质	产气量(微克分子 CH_4 /瓶)	
	TC713 菌株	TC708 菌株
H_2/CO_2	589.46	303.96
CH_3OH	0	0
HCOONa	0.3146*	21.37**
CH_3COONa	0	0
CH_3NH_2	0	0

* 一周测定有少量 CH_4 形成。此数据为二周后测定的结果。

** 一周测定没有 CH_4 形成,此数据为二周后测定的结果。

表1结果表明, TC713、TC708 菌株不能利用 CH_3OH 、 CH_3COONa 和 CH_3NH_2 , 只能利用 H_2/CO_2 为能源和组成细胞的碳源。而对甲酸的利用较慢,且利用率不高, TC708 菌株利用甲酸较 TC713 菌株为高。

据 Zeikus 等人的报道^[7,8], 甲烷杆菌不能单独利用 CH_3COONa , 但有 H_2 存在下, 可以利用 CH_3COONa 为电子受体, 还原成 CH_4 。

但表2结果表明, TC713 菌株在 H_2 存在下, 不能利用 CH_3COONa 作为电子受体。在处理2中有少量 CH_4 形成, 而在处理3中, 单独 H_2 存在下也有同样数量的 CH_4 形成。说明二者于接种菌液中有少量

表2 有氢存在下 TC713 菌株利用 CH_3COONa 的情况

Table 2 In the presence of hydrogen, utilization of CH_3COONa by strain TC713

处 理	CH_4 形成量 (微克分子/瓶)
1. CH_3COONa	0
2. $\text{CH}_3\text{COONa} + \text{H}_2$	16.85
3. H_2	16.18
4. $\text{CO}_2 + \text{H}_2$	560.98
5. $\text{CH}_3\text{COONa} + \text{CO}_2 + \text{H}_2$	558.33

CO_2 存在, CO_2 和 H_2 形成 CH_4 。另一方面, 处理4和5相比较, 处理5中 CH_3COONa 的存在也不能增加 CH_4 的量。

2. 对其他营养物质的利用: 以除去酵母膏的培养液作为对照, 分别加入 0.2% 酵母膏、酪素水解物和瘤胃液。接入 2% TC713 菌株的菌液, 在 37°C 下振荡培养 2.5 天, 测定 CH_4 形成量(表3)。

表3 不同营养物质对 TC713 菌株生长的影响

Table 3 Effect of yeast extract, trypticase and rumen fluid on growth of strain TC713

营 养 物 质	CH_4 (微克分子/瓶)
对 照	5.21
酵 母 膏	314.03
瘤 胃 液	281.75
酪素水解物	294.83

表3结果表明, TC713 菌株在没有酵母膏、瘤胃液和酪素水解物存在下, 生长很差, 形成甲烷量极微。这三种物质均刺激其生长, 刺激作用在三者之间没有差异, 说明 TC713 菌株所要求的某种生长刺激物, 在以上三种物质中均有存在, 而且也说明该菌株不需要外源辅酶 M, 能自身合成, 因为除瘤胃液外, 其他二者均不含有辅酶 M。

另外采用不同浓度的酵母膏和在 1% 的酵母膏中加入酪素水解物或瘤胃液, 观

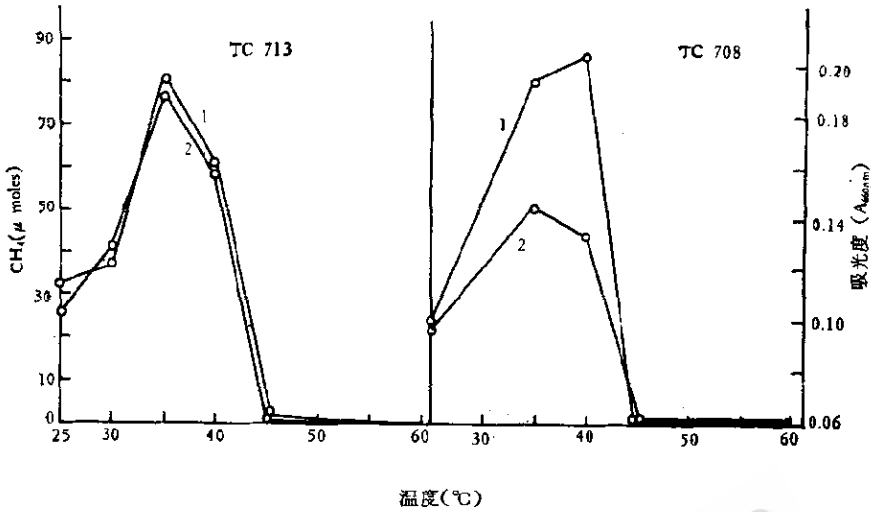


图3 温度对 TC713 和 TC708 菌株的甲烷产量和菌体生长的影响

Fig. 3 Effect of temperature for growth and methane production of strain TC713 and TC708

1. 甲烷(CH_4) 2. 吸光度 (Optical absorption)

察是否有进一步刺激作用。结果表明, 培养液中分别加入 0.1%、0.2%、0.3% 三种浓度的酵母膏, 与加入 0.1% 酵母膏和 0.2% 酪素水解物及瘤胃液者的 CH_4 形成量无明显差异。因此, 采用 0.1% 酵母膏就能满足其生长的需要。在 TC708 菌株的培养液中加入 0.2% 酵母膏则生长更好。

3. 温度试验:

图 3 表明, TC713 菌株最适生长温度为 35°C 左右。TC708 菌株最适生长温度为 35—40°C。此二菌株在 30—40°C 均能生长。在 45°C 下生长不良。由于产气量和菌体生长量成正相关, 因此测定其中一项, 就可表示生长和温度的关系, CH_4 形成量能更灵敏地表明温度对其生长的影响。

4. pH 试验:

表 4 表明, TC713 菌株生长适应 pH 范围为 6.5—8.75 (培养液最终 pH 值), pH 值在 6.46—8.5 产气量最高。TC708 菌株生长适应 pH 值为 6.8—9.2 (最高 pH 值), 在 pH 7.0—8.4 时产气量较高, 说明此

表 4 pH 值对 TC713 和 TC708 菌株生长的影响

Table 4 Effect of pH on growth of strain TC713 and TC708

TC713 菌株			TC708 菌株		
初始 pH	最终 pH	CH_4 微克分子/瓶	初始 pH	最终 pH	CH_4 微克分子/瓶
5.0	4.95	0.60	5.0		0
5.5	5.25	3.36	5.5		0
6.0	5.45	12.25	6.0	5.9	0.44
6.5	5.85	71.83	6.5	6.1	1.36
7.0	6.46	305.09	7.0	6.8	257.62
7.5	6.80	305.96	7.5	7.0	305.22
8.0	7.30	306.59	8.0	7.08	305.22
8.5	7.40	297.50	8.5	7.1	305.22
9.0	7.70	297.50	9.0	7.6	312.24
9.5	8.50	283.43	9.5	8.4	329.04
10.0	8.75	237.50	10.0	9.2	286.40

二菌株对酸敏感, 尤以 TC708 为甚。对碱适应性较强。

(四) 细菌生长曲线和产气量

图 4 表明, 菌数和产气量成正相关。TC713 菌株的菌数倍增时间为 6—7 小时, TC708 菌株为 8—10.5 小时 (注: 图 4 系采用显微镜下直接计数法测定菌数)。

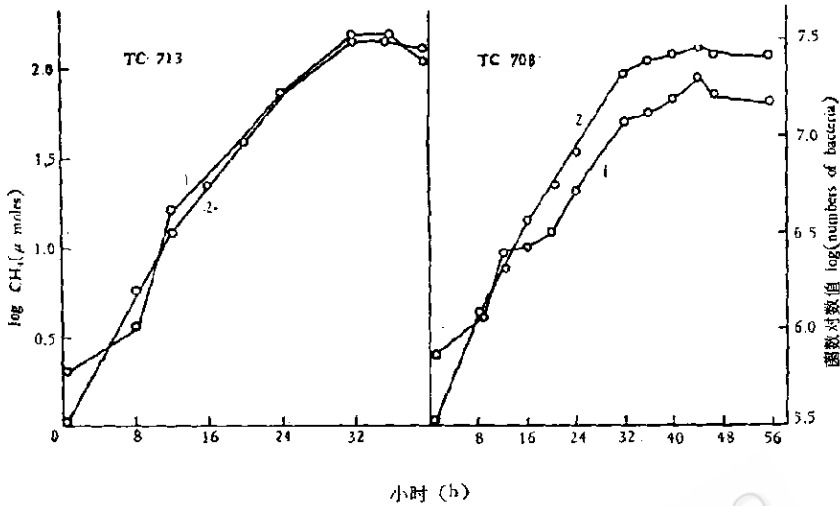


图4 TC713 和 TC708 菌株生长速率和产气量的关系

Fig. 4 Growth rate and gas production of strain TC713 and TC708

1. 细菌数 (Numbers of bacteria) 2. 甲烷 (CH_4)

讨 论

TC713 菌株的形态和反刍甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter ruminantium*)、斯氏甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter smithii*) 相似^[2,9]。但 TC713 菌株生长不需要外源辅酶 M, 不能利用醋酸钠作为组成细胞的碳源物质, 革兰氏染色阴性, 这又和瘤胃产甲烷短杆菌^[5,10,11]、斯氏产甲烷短杆菌不同。TC708 菌株的形态和甲酸甲烷杆菌 (*Methanobacterium formicicum*)、布氏甲烷杆菌 (*Methanobacterium bryanii*) 相似, 后者不能利用甲酸。而 TC708 菌株革兰氏染色阴性, 而且利用甲酸的能力比甲酸甲烷杆菌弱。对 23 个已知的产甲烷细菌菌株的纯培养的抗体进行荧光免疫鉴定, TC713 菌株仅对甲酸甲烷杆菌 MF 菌株有微弱的反应, 但它的 DNA 中 G + C 克分子含量 ($27.83 \pm 0.26\%$) 和嗜树木甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter arboriphilus*) 相同。因此确定 TC708 菌株为甲酸产甲烷杆菌

(*Methanobacterium formicicum*), TC713 菌株为嗜树木甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter arboriphilus*)。

参 考 文 献

- [1] Barker, H. A.: *Archiv für Mikrobiologie*, 7: 420—438, 1936.
- [2] Balch, W. E. et al.: *Microbiol. Rev.*, 43: 260—293, 1979.
- [3] Hungate, R. E.: *Methods in Microbiol.*, 3B: 117—132, 1969.
- [4] Bryant, M. P.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 25: 1324—1328, 1972.
- [5] Balch, W. E. and R. S. Wolfe: *Appl. and Enviro. Microbiol.*, 32: 781—791, 1976.
- [6] Baresi, L. et al.: *Appl. and Enviro. Microbiol.* 36: 186—197, 1978.
- [7] Zeikus, J. G. et al.: *Arch. Microbiol.*, 104: 129—134, 1975.
- [8] Zeikus, J. G. and L. Henning: *Antonie Van Leeuwenhoek*, 41: 543—552, 1975.
- [9] Bryant, M. P.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [10] Smith, P. H. and R. E. Hungate: *J. Bacteriol.*, 75: 715—718, 1953.
- [11] Taylor, C. D. et al.: *J. Bacteriol.*, 120: 974—975, 1974.

ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF *METHANOBREVIBACTER ARBORIPHILUS* AND *METHANOBACTERIUM FORMICICUM*

Qian Zeshu*

(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou)

Two digested sludge samples were taken from the digesters in China and two strains, *i.e.*, strain TC713 and TC708 characterized by Gram negative, non-motile rods and spore absent were isolated from the samples by Hungate technique. Strain TC713 was short rods, most of them occurred in pairs, only a few in chains. Its colonies were translucent, convex, circular with entire margins. Strain TC708 occurred singly in the shape of long, curved rods and long filaments at old age. Its colonies were roughly round, diffuse, and somewhat filamentous. H_2/CO_2 was the only carbon and energy source for strain TC713 and TC708, and they could not utilize CH_3COONa , CH_3OH , CH_3NH_2 . Formic acid was utilized at a slow rate, organic compounds such as yeast extract, trypticase and rumen fluid could greatly stimulate the growth of strain TC713, coenzyme M was not needed. The optimum temperatures for the growth of strain TC713 and TC708 were 35°C and 35—40°C respectively. Growth would be suspended at 45°C. The optimum pH for

growth of strain TC713 ranged 6.5—8.5, and TC708 6.8—9.2. The generation times in shaking culture with H_2/CO_2 as carbon and energy source in medium containing 0.1% yeast extract at 37°C, were 6—7 and 8—10.5 hours respectively. When compared with known species of methanogens on the basis of immunological properties, the result of indirect immunofluorescence (IIF) technique applied to strain TC713 showed a weak reaction (1+) with anti-*Methanobacterium formicicum* MF. The DNA base composition of strain TC713 amounted to 27.83 ± 0.26 moles% G+C. On the basis of cellular morphology, physiology and methanogenesis, the two strains fell into the genus *Methanobrevibacter* and *Methanobacterium* respectively. The names of *Methanobrevibacter arboriphilus* TC713 and *Methanobacterium formicicum* TC708 were proposed.

Key words

Methanobrevibacter arboriphilus; *Methanobacterium formicicum*

* *i. e.* Chien Tseshu.