

史氏甲烷短杆菌的分离和生理生化特性

赵一章 张辉

(中国科学院成都生物研究所,成都)

采用改良的 Hungate 厌氧操作技术,从成都市狮子山污泥富集样品中分离到 H-13 菌株。该菌株革兰氏反应弱阳性,不运动、不形成芽孢。H-13 菌株为两端略呈钝形的短杆菌,在 H₂/CO₂ 及甲酸基质上一般成对出现连成双杆菌,偶见链状细胞。菌落圆形,半透明,微凸起,稍带浅黄色。H-13 菌株可利用 H₂/CO₂ 和甲酸作为碳源和能源,不能利用 CH₃COONa, (CH₃)₂N 及 CH₃OH。酵母膏、胰化酪蛋白能刺激该菌株的生长。最适生长 pH 为 7.3—7.5。在含 0.2% 酵母膏、0.1% 胰化酪蛋白 MA 培养基中,以 H₂/CO₂ 作为碳源和能源,37℃、50 rpm 振荡培养,菌数倍增时间为 5.7 小时。根据电镜形态学分析及生理学性状研究,H-13 菌株与史氏甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter smithii*) 标准菌株极为相似,初步定为史氏甲烷短杆菌。

关键词 史氏甲烷短杆菌

为了提高沼气产量,加强沼气生产的科学管理,沼气生产要从目前自然发酵向可控性发酵发展,沼气科研的基础研究——沼气发酵过程的微生物学研究是重要环节之一。我们已报道了从成都市狮子山污泥样选择性连续富集分离产甲烷菌的研究^[1]。本文报道该富集物中所分离得到的 *M. smithii* H-13 菌株的分离过程和生理生化特性。

材料和方法

(一) 样品来源

史氏甲烷短杆菌 H-13 菌株分离自四川省成都市狮子山污水处理厂的污泥猪粪常温富集物,以此污泥作为种源的中温沼气发酵最高产气量可达 2.3m³/m³ 日,是较好的沼气池接种源之一^[1]。

(二) 培养基

富集和分离培养基采用修改的 Barker 的 MA 培养基。富集培养基成分 (g/L) 为: K₂HPO₄·3H₂O 0.4, KH₂PO₄ 0.2, NH₄Cl 1, MgCl₂·6H₂O 0.1, 酵母膏 0.1, 盐酸半胱氨酸 0.5, 0.1% 刀

天青 1ml, 煮沸前 pH 调至 6.6—6.8, 15 磅 18—20 分钟灭菌,使用前用 10% NaHCO₃ 和 1% Na₂S·9H₂O 调培养基 pH 至 7.1—7.2。分离滚管培养基用 MA 作基础培养基,另外加入 (g/L) 胰化酪蛋白 2, 酵母膏 1 以及 10% 污泥抽提液^[1]。

其他试验培养基另见说明。

(三) 厌氧培养分离技术

采用改良的 Hungate 技术^[2-3]。原始污泥富集样品按 5% 量加入到盛有 50ml MA 培养基的 120ml 血清瓶中,加入无氧的青霉素母液至最终浓度为 2800 单位/ml, 利用 H₂/CO₂ (V/V, 70/30), 醋酸钠 (0.04M) 和甲醇 (0.5%) 在 37℃ 下进行富集培养,培养过程中检测 CH₄ 的产生。在指数期以 10 倍稀释法进行滚管分离培养。滚管中形成菌落后,在荧光显微镜暗视野下观察能产

本文于 1984 年 8 月 15 日收到。

本实验大部分研究工作是在美国加里福尼亚大学洛杉矶分校进行的,最后在中国科学院成都生物研究所完成。承 Robert A. Mah 教授和 Ida Yu 博士指导;承王大珩先生审阅本文;中国科学院成都生物研究所连莉文、王晓力进行氢化酶测定;中国科学院成都分院测试中心电镜组郑中华拍摄电镜照片,在此一并致谢。

生蓝绿色荧光菌落并检测滚管中产生的 CH_4 ，利用这种厌氧滚管分离技术进行单菌落稀释分离，直至获得纯菌落。在初步获得纯菌后，采用纯度鉴定培养基^[2]在厌氧和有氧下进行滚管及液体培养，在显微镜下检测其纯度。

(四) 形态观察

采用 Carl Zeiss 荧光相差显微镜和 Leitz 荧光显微镜观察菌体形态和活菌体的荧光。此外还采用 JEM-100CX 电子显微镜进行观察。

(五) CH_4 含量测定

采用 VA-920 (U. S. A.) 和 SC-6 型气相色谱仪热导法测定，He 为载体，层析柱中分别以酸性活性碳和 Porapak N 型为担体。试验数据为血清瓶或试管中液体上部有效容积中总 CH_4 含量的微克分子数。

(六) 氢化酶活力测定

采用 Peck 和 Gest (1957)^[6] 的改进方法测

定氢化酶活力。

结果和讨论

史氏甲烷短杆菌 H-13 菌株为不形成芽孢，不运动的短杆菌，在固体或液体培养基中常成对出现，偶而也呈链状。菌体大小为 $0.5-0.6 \times 0.8-1.4 \mu\text{m}$ (图 1)。在 H_2/CO_2 上 4-5 天后可观察到直径为 0.3-1.0mm 的小菌落，半月后可长到 2mm 左右 (图 1)。菌落为圆形半透明，略带微黄色。菌落及活菌体在荧光显微镜下呈现蓝绿色荧光。在 H_2/CO_2 上生长的菌体在遇氧后荧光较易消失，在甲酸培养基上所呈现的荧光则维持时间较长。H-13 菌株革兰氏反应为弱阳性。

H-13 菌株能利用 $\text{H}_2/\text{CO}_2(70/30)$ 和

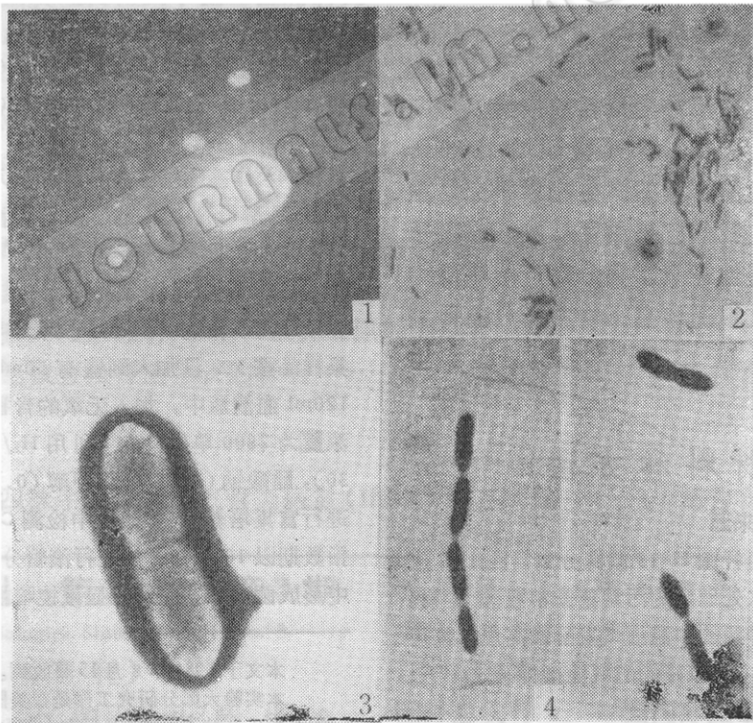


图 1 史氏甲烷短杆菌的菌落和细胞

Fig. 1 Colony and cells of *M. smithii*

1. H-13 菌株荧光菌落 ($\times 120$) Fluorescent colony of strain H-13 2. H-13 菌株细胞 ($\times 1,500$) Cells of strain H-13 3. H-13 菌株细胞 ($\times 20,000$) Electron micrograph of strain H-13 4. PS 菌株 ($\times 2,500$) Cells of *M. smithii* strain PS 5. FI 菌株 ($\times 2,500$) Cells of *M. smithii* strain FI

甲酸作为能源生长,不能利用甲醇、乙酸和甲胺类。H-13 菌株是以 H_2/CO_2 连续富集培养物分离的菌株,开始接种到甲酸培养基上对甲酸利用很慢,20 天后开始有微量 CH_4 产生,但经 1—2 代培养驯化后,再以甲酸作为唯一碳源进行试验时,产生 CH_4 的速率大大增加, CH_4 含量也明显增加。碳源利用试验结果见表 1。

表 1 H-13 菌株对碳源的利用情况

Table 1 The utilization of various substrates by *M. smithii* H-13

基 质	培养基上部所充的气体	甲烷含量 (微克分子/瓶)
H_2/CO_2	H_2/CO_2 (70/30) (2 个大气压)	360
CH_3OH	N_2 (1 个大气压)	0
CH_3COONa	N_2 (1 个大气压)	0
$(CH_3)_3N$	N_2 (1 个大气压)	0
HCOONa	未经驯化 N_2 (1 个大气压)	42
	二代驯化 N_2 (1 个大气压)	280

利用 MA 培养基,以甲酸作为唯一基质产甲烷的试验中,向 20ml 培养基中分别加入 0.3ml 3% NaCl、0.3ml 1% 醋酸钙和 0.2ml 复合微量元素液^[6],在 37℃ 培养 15 天后测定甲烷含量。结果(表 2)表明,复合微量元素和醋酸钙能促使 H-13 菌株尽快利用甲酸生成甲烷。

利用 50ml 血清瓶内装 20ml MA 培养基,以 H_2/CO_2 (70/30) 作为基质进行以酵母膏、胰化酪蛋白和醋酸钠对 H-13 菌株的生长刺激作用, H_2/CO_2 (70/30) 为 25 磅/英吋大气压, CH_3COONa 浓度为 0.5%,酵母膏和胰化酪蛋白浓度均为 0.1%。试验重复三次,在 37℃,50rpm 振荡培养两天。结果(表 3)表明,虽然醋酸钠对 H-13 菌株利用甲酸有一定的诱导作用,但醋

表 2 复合微量元素等对 H-13 菌株利用甲酸的诱导作用

Table 2 Utilization of sodium formate by strain H-13 in the presence of trace minerals and calcium acetate

处 理	CH_4 含量(微克分子/瓶)	
	11 天后	20 天后
NaCl	2.5	3.0
$Ca(CH_3COO)_2$	65.8	368
复合微量元素	313.0	361.7

表 3 醋酸钠、酵母膏、胰化酪蛋白对 H-13 菌株的生长刺激作用

Table 3 Effect of sodium acetate, yeast extract and trypticase on growth of strain H-13

处 理	培养后菌液吸光度 (A)	CH_4 含量 (微克分子/瓶)
对照 (MA)	0.061	19.2
MA + 醋酸钠	0.062	21.7
MA + 1% 酵母膏	0.142	192.4
MA + 1% 胰化酪蛋白	0.110	97.4

酸钠对 H-13 菌株在 H_2/CO_2 上的生长无明显刺激作用。酵母膏和胰化酪蛋白均有刺激生长的作用,0.1% 酵母膏的刺激作用最明显。

用 60ml 血清瓶,内装 20ml 加富 MA 培养基,以 5℃ 为间隔,对 25—60℃ 进行了 H-13 菌株最适温度试验。结果(图 2)表明 H-13 菌株最适生长温度为 35—40℃,45℃ 可产生少量 CH_4 ,50—60℃ 则不产生 CH_4 。H-13 菌株的细胞生长量(吸光度表示)与 CH_4 的产生成正相关系。

最适生长 pH 试验是采用 60ml 血清瓶进行,在 MA 加富培养基中先加 2% $Na_2S \cdot 9H_2O$ 和 10% $NaHCO_3$,调 pH 至 7.0。试验前先用 2N HCl 和 10% NaOH 调培养基 pH 至 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10。准确记下所用的 HCl 和 NaOH 量,试验时按上述 HCl、

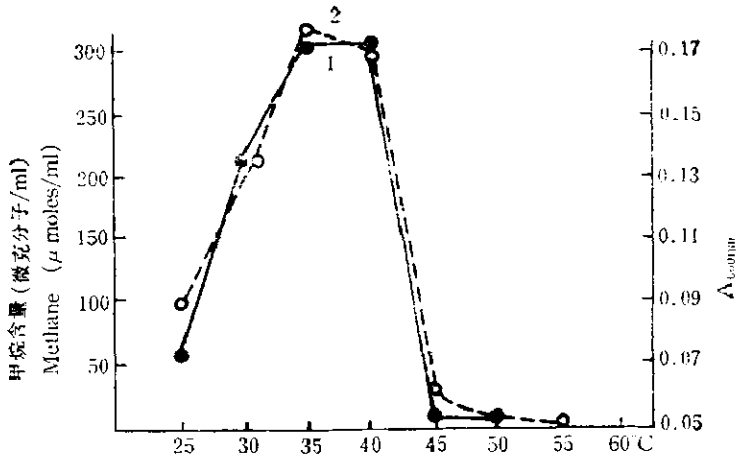


图2 温度对史氏甲烷短杆菌 H-13 菌株生长的影响

Fig. 2 Effect of temperature on growth of *M. smithii* H-13

1.吸光度 Optical absorption 2.甲烷 CH₄

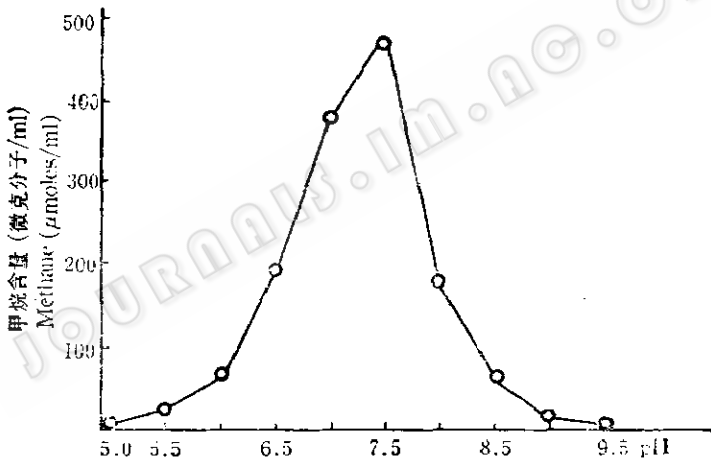


图3 pH值对史氏甲烷短杆菌 H-13 菌株生长的影响

Fig. 3 Effect of pH on growth of *M. smithii* H-13

NaOH 量调 pH 值。然后按 2.5% 接种量接种, 由于 H₂/CO₂ 对培养基 pH 值的影响, 原瓶中 N₂ 不换, 只通入 0.5 大气压 H₂/CO₂ (70/30) 至总的大气压为 1.5。然后静态培养于 37°C 温箱中, 逐日测定 CH₄ 含量, 60 小时后 CH₄ 含量在各瓶间形成明显梯度, 培养完毕测定其 pH 值, 要求终点与初始 pH 值相差 0.2—0.4。生长最适 pH 按初始生长 pH 计算, 结果见图 3。图 3 表明, H-13 菌株生长最适 pH 在 7.0—

7.5, 说明该菌株宜于生长在微弱的碱性环境中。pH6.0、9.0 情况下尚有少许 CH₄ 产生, 表明 H-13 菌株对 pH 适应范围较宽。

采用试验中最佳的生长条件, 在 MA 培养基中加入 0.2% 酵母膏, 0.1% 胰化酪蛋白和 1ml 富集液抽提液^[2], 以 H₂/CO₂ (70/30) (2 个大气压) 作为基质, 培养基 pH 调至 7.5, 接种量为 2.5%, 置于 37°C 50rpm 摇床上振荡培养。以 4 小时间隔利用血球计数器测定菌数, 并测定 CH₄ 含

量,其结果见图 4。图 4 表明, H-13 菌株随着菌数的增加, CH₄ 含量同步增加。H-13 菌株生长的倍增时间为 5.7 小时。

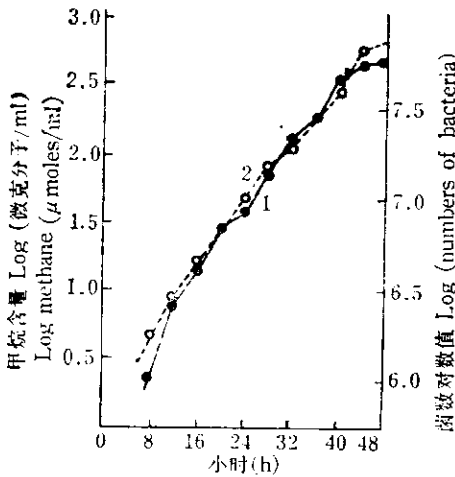


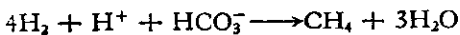
图 4 史氏甲烷短杆菌 H-13 菌株生长速率和 CH₄ 含量

Fig. 4 Growth rate and gas production of strain H-13

1. 细菌数 Numbers of bacteria 2. 甲烷 CH₄

H-13 菌株的生化特性方面,我们还进行了氢化酶活性的试验。“氢化”是甲烷发酵中的一个核心反应,在沼气发酵形成甲烷的过程中,产甲烷菌的氢化酶催化电子载体还原,还原态的电子载体促成 CO₂ 还原成 CH₄。

由 H₂/CO₂ 生成 CH₄ 的反应式为:



我们在实验中发现,氢化酶的活性与生成甲烷的速率是成正相关的。我们同样采用上述最适生长条件对 H-13 菌株纯培养的氢化酶活力、H-13 菌数和产甲烷生成速率进行了测定。氢化酶活力计量单位为 H₂ 微克分子数/ml·时间,用以表示放氢能力,结果见图 5。图 5 表明,氢化酶活力与甲烷产量随产甲烷菌数量的增加而增加,三者有密切的相关关系。这种一致性将为产甲烷菌与非产甲烷菌的氢代谢研究提供良好的实验理论基础。

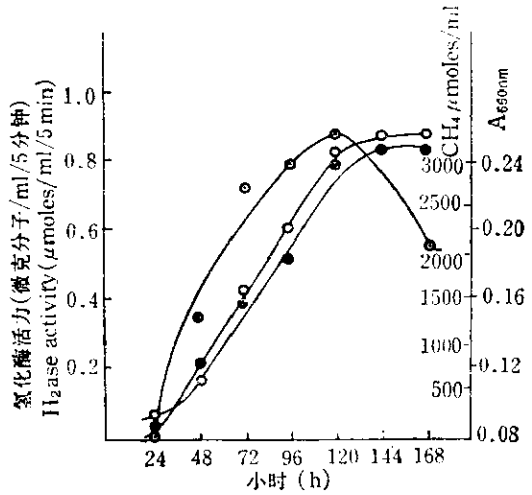


图 5 H-13 菌株氢化酶活性和菌体生长、甲烷产生的关系

Fig. 5 Hydrogenase activity (●) and optical absorption (○) and methane production (●) of strain H-13

甲烷短杆菌依据形态学及基质利用等生理学性状可分为三个种^[7,11]: 即瘤胃甲烷短杆菌 (*M. ruminatum*)、史氏甲烷短杆菌 (*M. smithii* PS)、嗜树木甲烷短杆菌 (*M. arboriphilus* DH)。比较上述三个种和 Miller 从人粪中分离的史氏甲烷短杆菌 F1 菌株^[6]以及钱泽澍分离的嗜树木甲烷短杆菌 713 菌株^[9](表 4)。H-13 菌株的形态与瘤胃甲烷短杆菌 M1 菌株和史氏甲烷短杆菌相似(图 1)。但 H-13 菌株生长不需要 CoM, 也不要求其它有机生长因子, 因此 H-13 菌株明显地区别于瘤胃甲烷短杆菌。H-13 菌株细胞大小和形态也与嗜树木甲烷短杆菌 DH 菌株和 713 菌株^[9,11]不同。前者个体较短, 两端略成尖状, 而后者细胞长宽比例较大, 底物利用情况与嗜树木短杆菌也不相同, 嗜树木甲烷短杆菌 DH 菌株和 713 菌株不能利用甲酸作为碳源和能源, 所以 H-13 菌株也不同于嗜树木甲烷短杆菌。文献^[11]中记载瘤胃甲烷短杆菌的 DNA 中 G + C 克分子量

表 4 甲烷短杆菌纯培养特性比较

Table 4 Comparison of known phenotypic properties of *Methanobrevibacter*

菌株名称	形态	革兰氏	基质	移动性	最适生长温度	最适生长 pH	对醋酸要求	对CoM要求	其它有机生长因子	DNA 中 G + C 含量(%)
瘤胃甲烷短杆菌 M1	矢状短杆菌	±	H ₂ /CO ₂ 甲酸	±	37—39	6.3—6.8	+	+	+	30.6
嗜树木甲烷短杆菌 DH	短杆菌	+	H ₂ /CO ₂	-	37—39	7.5—8.0	-	-	+	27.5—31.6
嗜树木甲烷短杆菌 713	短杆菌	-	H ₂ /CO ₂	-	37.5	7.5—8.0	-	-	+	27.83±0.26
史氏甲烷短杆菌 PS	矢状短杆菌	+	H ₂ /CO ₂ 甲酸	-	37—39	6.9—7.4	+	-	-	31—32
史氏甲烷短杆菌 F1	矢状短杆菌	+	H ₂ /CO ₂ 甲酸	-			+	-	-	
史氏甲烷短杆菌 H-13	矢状短杆菌	±	H ₂ /CO ₂ 甲酸	-	35—40	7.5 左右	+	-	-	

为 30.6%，嗜树木甲烷短杆菌为 27.5—31.6%，史氏甲烷短杆菌 PS 菌株为 31—32%。差异不显著。无论从形态学比较，底物利用，对生长因子的要求，最适生长 pH 等生理学性状的比较，H-13 菌株均相似于史氏甲烷短杆菌 PS 菌株和 F1 菌株。因此，经鉴定 H-13 菌株为史氏甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter smithii*)。

参 考 文 献

- [1] 赵一章: 中国沼气, 第 3 期, 1984。
 [2] 赵一章等: 微生物学报, 24(2): 100—104, 1984。
 [3] 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.

- [4] Bryant, M. P.: *Am. J. Clin. Nutri.*, 25: 1324—1328, 1972.
 [5] Mylorie, R. L. and R. E. Hungate: *Can. J. Microbiol.*, 1: 55—64, 1954.
 [6] Peck, H. D. and H. Gest: *J. Bacteriol.*, 71: 70—80, 1956.
 [7] Balch, W. E. and R. S. Wolfe: *Microbiol. Rev.*, 43: 260—296, 1979.
 [8] Miller, T. L. and M. J. Wolin: *Appl. Microbiol.*, 43(1): 227—232, 1982.
 [9] 钱泽澍: 微生物学报, 24(2): 105—110, 1984。
 [10] Nottingham, P. M. and R. E. Hungate: *J. Bacteriol.*, 96: 2178—2179, 1968.
 [11] Mah, R. A. and M. R. Smith: *The Methanogenic Bacteria in the Prokaryotes*, Sprilinger-Verlag Berlin Heidelberg, New York, pp. 948—977, 1981.

ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF *METHANOBREVIBACTER SMITHII* H-13

Zhao Yizhang Zhang Hui

(Chengdu Institute of Chinese Academy of Sciences, Chengdu)

A strain of methanogenic bacteria, H-13, was isolated from the sludge of waste treating facility in Chengdu by improved Hungate technique. The cells are weakly Gram-positive, non-motile and non-sporing short, lancet-shaped rods usually in pairs and occasionally in chains. Its colonies are pale yellow, round, translucent and convex.

H₂/CO₂ or formate can be used as carbon and energy source for its growth. Neither growth and methane formation occurred when H₂/CO₂ or formate was replaced by methanol, acetate, trimethylamine, propionate or butyrate. Yeast extract or trypticase stimulated greatly the growth and

methane formation.

The generation time on MA medium plus 0.2% yeast extract and 0.1% trypticase at 37.5°C in shaking flask (50 rpm) is 5.7 hours. The optimum pH for growth is 7.5 and the optimum temperatures is in the range of 35–40°C.

According to its morphological and physiological properties, this methanogenic strain is named as to *Methanobrevibacter smithii* and named as *M. smithii* H-13.

Key Word

Methanobrevibacter smithii