

甲烷短杆菌 HX 菌株的分离和特性

许宝孝 奚明权 金秀其

(上海师范学院分院,上海)

本文描述了从上海沼气池污泥中分离出一株产甲烷菌。细胞为柳叶刀状到卵圆状的短杆菌,革兰氏阳性,0.5—0.8×1.0—1.2 μ m,单个或成对存在。滚管菌落很小,半透明,灰白色,近似圆形,边缘完整。反射荧光显微镜检查呈鲜艳的蓝绿色荧光。分离物利用 H₂/CO₂或者甲酸生长和产甲烷。不需要外加 2-甲基丁酸(2-methylbutyrate)、辅酶M或者氨基酸。细胞生长不需要酵母膏、胰解酪蛋白、瘤胃液和乙酸。但是,酵母膏、胰解酪蛋白和瘤胃液对生长和产甲烷有刺激作用。分离物在有胆盐存在的情况下不生长。生长和产甲烷的最适温度均为 40℃。最适 pH 为 7.6,生长和产甲烷的 pH 范围为 6.9—8.6。在含 0.25% 甲酸、0.2% 酵母膏和胰解酪蛋白的培养液中,最低倍增时间为 10 小时。DNA 的 G + C 含量为 31.13mol%。该菌株具有甲烷短杆菌所特有的形态和 DNA 的 G + C 含量。因此,暂将它定为史氏甲烷短杆菌 HX 菌株 (*Methanobrevibacter smithii* strain HX)。其真正的分类地位,需根据与已确定的(代表不同物种的)不同菌株产甲烷菌的抗血清发生的间接免疫荧光反应来决定。

关键词 甲烷短杆菌

1979 年 Balch 等提出的产甲烷菌新分类表中,产甲烷菌被分为 3 个目,4 个科,7 个属和 13 个种。其中有 4 个种是短杆菌。它们分别属于甲烷短杆菌属和甲烷微菌属^[1,2]。甲烷短杆菌属现已确定的有 3 个种,瘤胃甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter ruminantium*)、史氏甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter smithii*) 和嗜树木甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter arboriphilus*)^[1,2],它们是分别从牛的瘤胃内含物^[3]、污水污泥和入粪^[4-6],以及活树的湿木、水沉积物和消化污泥^[7-9]中分离出来的。甲烷微菌属只有运动甲烷微菌(*Methanomicrobium mobile*)这一个成员,它是从牛的瘤胃中分离出来的^[1,2,10]。

最近,在产甲烷的短杆菌中又增加了一个新的成员。这一成员的细胞为小杆菌,单个存在,不成丝状,而且, DNA 碱基组成为 44.9mol% G + C, 所以属甲烷微菌

属^[11]。本文叙述城市沼气池中甲烷短杆菌 HX 菌株的分离和特性。

材料与方 法

(一) 接种物来源

接种物取自上海科学技术协会沼气池污泥。

(二) 培养基

分离、生长和保存均用 Balch 1 号培养基^[11]。纯度试验培养基采用肉汁蛋白胨琼脂培养基、葡萄糖琼脂培养基^[5,7]和无产甲烷基质的 Balch 1 号培养基^[5,11]。

生理特性试验所用磷酸盐缓冲培养液的组分为(%) : KH₂PO₄ 0.15, K₂HPO₄ 0.22, NH₄Cl 0.1, MgCl₂ 0.01, NaCl 0.09, 酵母膏 0.2 和半胱氨酸 0.05^[7,9]。

测验胆盐敏感性用的胆盐培养基是在 Balch

本文于 1985 年 2 月 24 日收到。

复旦大学遗传研究所电镜室协助拍摄电镜照片;该所周自强、洪肾慷同志协助测定 DNA 中 G + C 含量;华东师范大学生物系顾福康同志协助拍摄相差和荧光显微照片,在此一并致谢。

1 号培养基中,外加下列组分(%): NH_4Cl 0.1, 瘤胃液 10, 牛胆汁 2 和脱氧胆酸钠 0.1 配制的^[15]。

所有培养基的配制和分装都是在充氮的严格厌氧条件下,按改良的 Hungate 厌氧操作步骤进行^[11,12,13]。121℃ 高压蒸汽灭菌 20 分钟,加入 0.05% Na_2S 和 0.5% NaHCO_3 后,培养基的 pH 为 7.5。

(三) 富集分离

在盛有 50ml Balch 1 号培养液的 100ml 血清瓶中接入 2.5ml 沼气池污泥。通入 1 个大气压的 $\text{H}_2/\text{CO}_2(4:1 \text{ V/V})$, 37℃ 培养, 2 星期后, 用气相色谱分析瓶内上面空间中的气体。选取产甲烷的污泥富集物, 在装有 4.5ml 2% 琼脂的 Balch 1 号培养基的厌氧试管中作 10 倍系列稀释, 滚管。再通入 1 个大气压的 $\text{H}_2/\text{CO}_2(4:1, \text{V/V})$ 作为气相, 37℃ 培养。2 星期后, 分析管内空间中的气体。选取稀释度最高的含甲烷滚管。挑取单菌落, 再作系列稀释, 滚管。重复这一过程, 一直到获得纯培养为止。

(四) 气相色谱分析

所产甲烷用 100 型气相色谱仪(上海分析仪器厂出品)检测。以 N_2 为载体(30ml/分), 通过 15% D. N. P 60—80 目 102 白色担体柱, 用氢焰离子化鉴定器检测。检测温度为 100℃, 柱温与气化温度均为室温。所有数据均为厌氧试管或血清瓶内上面空间中的甲烷总量($\mu\text{molc}/\text{管或瓶}$)。

(五) 分光光度测定

用 721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂出品)测定细菌生长。生长的情况用光径为 1cm 的方形比色杯于 660nm 处测得的光吸收 ($A_{660\text{nm}}$) 值表示。

(六) 光学显微镜检查

用 Leitz Orthoplan 万能显微镜分别在可见光和 420nm 的紫外光下进行相差和荧光观察。在显微镜上装上 Vario-Orthomat 照相机显微照相。

(七) 电子显微镜检查

细胞用 2% 磷钨酸负染 1 分钟, 置于载有 Plodion 膜的铜网上, 用日立牌 H500-H 型电子显微镜观察照相。

(八) DNA 碱基组成分析

将离心所得菌体与氧化铝粉末混合, 放入 Flvehjem 匀浆器中^[14], 于冰浴中研磨破壁。用 Marmur 法获得 DNA^[15]。用纸层析法测 G + Cmol%^[16]。以大肠杆菌 DNA (取自上海复旦大学遗传研究所)作为对照菌。

结 果

(一) 甲烷短杆菌的分离

经过反复的滚管分离后, 从富集物得到以短杆菌占优势的原分离物。用青霉素和克林达霉素处理原分离物^[17], 再滚管。培养 2 星期左右, 只出现近似圆形的灰白色小菌落, 同时有甲烷形成。这样重复多次, 结果均相同。挑取单菌落到肉汁蛋白胨琼脂培养基、葡萄糖琼脂培养基和无产甲烷基质的 Balch 1 号培养基中均不生长。相差和电子显微镜检查表明, 全部细胞都是短杆状(图 1、2)。在 420nm 的紫外光激发下, 全部菌体呈鲜艳的蓝绿色荧光(图版 I)。

(二) 形态特征

细胞为柳叶刀状到卵圆状的短杆菌, 0.5—0.8 × 1.0—1.5 μm , 单个或成对存在(图 1、2), 革兰氏阳性。菌体呈鲜艳的蓝绿色荧光(图版 I)。从电子显微镜照片可以清晰地看到, 菌体细胞大多处于分裂阶段(图 2)。菌体细胞分裂如图 3 所示。

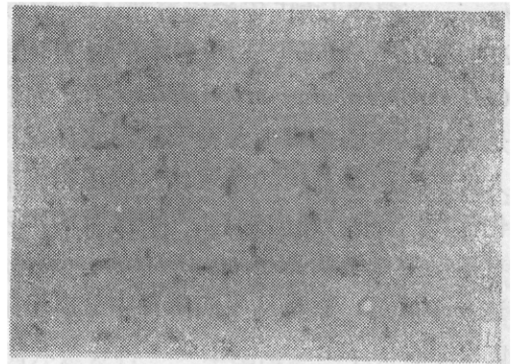


图 1 甲烷短杆菌 HX 菌株活细胞的相差显微照片 ($\times 600$)

Fig. 1 Phase-contrast photomicrograph of living cells of *Methanobrevibacter* strain HX

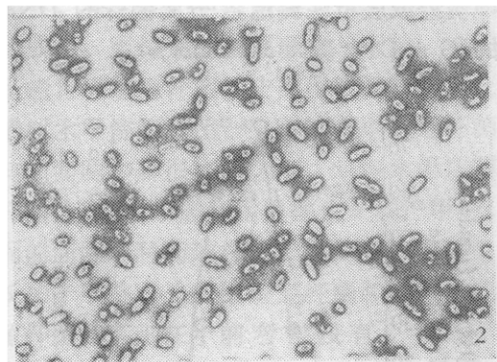


图2 甲烷短杆菌 HX 菌株细胞的电子显微镜照片($\times 1,500$)

Fig. 2 Electron photomicrograph of cells of *Methanobrevibacter* strain HX

滚管菌落很小(直径 $<0.5\text{mm}$), 半透明, 灰白色, 近似圆形, 边缘完整。

(三) 基质利用

测验了分离菌株利用各种基质生长与产甲烷的能力。在装有 20ml 磷酸缓冲液培养液的血清瓶中分别加入下列基质中的

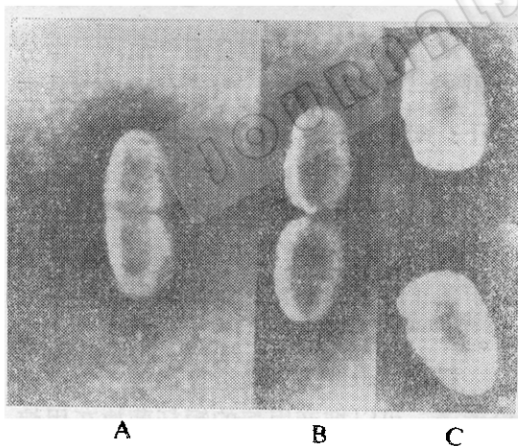


图3 菌体细胞分裂的电子显微镜照片

A: 尚未分开的两个细胞($\times 11,250$);
B: 开始分开的两个细胞($\times 11,250$);
C: 完全分开的两个细胞($\times 15,000$)。

Fig. 3 Electron photomicrographs of cells of *Methanobrevibacter* strain HX undergoing dividing

A: Two non-separated cells;
B: Two separating cells;
C: Two completely separated cells.

一种: H_2/CO_2 (4:1, V/V)、0.5% 甲酸钠、0.5% 乙酸钠、0.5% 甲醇、0.5% 甲胺。接入 1 ml 菌液, 37°C 培养。2 星期后测定生长和甲烷产量。结果表明, 分离菌株可以 H_2/CO_2 或者甲酸钠作为生长和产甲烷基质。但不利用甲醇, 甲胺和乙酸钠生长和产甲烷(表 1)。

表 1 分离菌株利用各种基质生长和产甲烷的情况

Table 1 Utilization of various substrates for growth and methanogenesis by isolate

基 质	$A_{660\text{nm}}$	甲烷总量($\mu\text{mol}/\text{瓶}$)
无	0	0
H_2/CO_2	0.062	69.54
甲酸钠	0.352	395.25
乙酸钠	0	0
甲 醇	0	0
甲 胺	0	0

(四) 酵母膏、胰解酪蛋白和瘤胃液对生长和产甲烷的刺激作用

在 20 ml 除去酵母膏、胰解酪蛋白和乙酸钠的 Balch 1 号培养基中分别加入 0.2% 的酵母膏、胰解酪蛋白或瘤胃液。接入 1 ml 菌液, 37°C 培养。2 星期后测定生长和甲烷产量, 结果见表 2。

表 2 酵母膏、胰解酪蛋白和瘤胃液对分离菌株生长和产甲烷的影响

Table 2 Effect of yeast extract, trypticase, and rumen fluid on growth and methanogenesis of the isolate

培 养 基	$A_{660\text{nm}}$	甲烷产量($\mu\text{mol}/\text{瓶}$)
对照*	0.114	128.00
对照+0.2%酵母膏	0.201	225.28
对照+0.2%胰解酪蛋白	0.183	204.80
对照+0.2%瘤胃液	0.153	171.80

* 不含酵母膏、胰解酪蛋白和乙酸钠的 Balch 1 号培养基。

在加有酵母膏、胰解酪蛋白和瘤胃液的培养基中, 生长和产甲烷量都有增加。这表明, 酵母膏、胰解酪蛋白和瘤胃液对分离

菌株的生长和产甲烷有刺激作用。刺激作用大小为酵母膏>胰解酪蛋白>瘤胃液。

(五) 胆盐敏感性

在装有 5ml 胆盐培养基的厌氧试管中接入 0.25ml 菌液。37℃培养 2 星期后,测定生长和产甲烷量。分离物在胆盐培养基中既不生长,也不产甲烷,而在 Balch 1 号培养基中的 A_{660nm} 值和甲烷产量分别为 0.034 和 38.4 $\mu\text{mole}/\text{管}$ 。

(六) 生长和产甲烷的温度

在内装 5ml Balch 1 号培养基的厌氧试管中接种 0.25ml 菌液,置于 4—55℃ 培养。2 星期后测定生长与产甲烷量。从图 4 可以看出,660nm 处光吸收与产甲烷量相互平行。生长和产甲烷的最适温度均为 40℃。

(七) 生长与产甲烷的 pH

分离菌株生长和产甲烷的 pH 范围及最适 pH 见图 5。实验是在加有 0.5% 甲酸钠的磷酸缓冲液中的进行的。分离物在起始 pH 为 6.9—8.6 的范围内都生长,最适 pH 为 7.6。

(八) DNA 的 G + C 含量

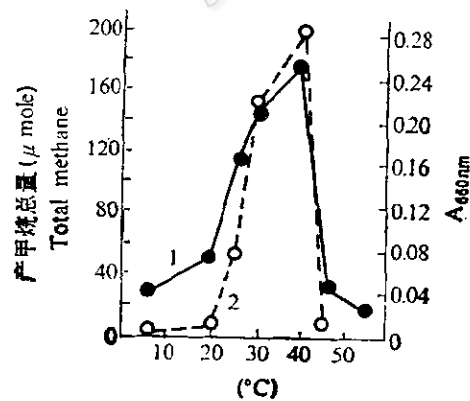


图 4 生长与产甲烷的温度范围及最适温度
1. 660nm 处的光吸收; 2. 甲烷总微克分子数

Fig. 4 Temperature range and its optimum for growth and methanogenesis

1. Absorption at 660nm;
2. Total μmole methane

经纸层析法测定,分离菌株的 DNA 的 G + C 含量为 31.13mol%。

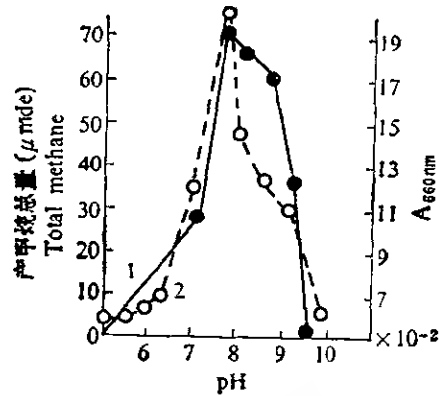


图 5 生长与产甲烷的 pH 范围及最适 pH
1. 660nm 处的光吸收; 2. 甲烷总微克分子数

Fig. 5 pH range and its optimum for growth and methanogenesis

1. Absorption at 660 nm;
2. Total μmole methane

讨 论

从上海科学技术协会沼气池污泥中分离出了一株产甲烷菌。它的主要表型特征如下:细胞为柳叶刀状到卵圆状的革兰氏阳性短杆菌,单个或成对存在。细胞利用 H_2/CO_2 或者甲酸作为生长和产甲烷的基质。不需要乙酸作为唯一碳源。不需要 2-甲基丁酸、辅酶 M 和氨基酸作为生长因子。

根据 Balch 等人最近提出的产甲烷菌检索表,可以把产甲烷的短杆菌放在甲烷短杆菌属或者甲烷微菌属中^[1]。我们分离的菌株的分类地位,主要是根据其形态、生理以及 DNA 的 G + C 含量来确定的^[1,2]。分离物的一些主要特征与甲烷短杆菌属相同。例如,细胞为规则的柳叶刀状到卵圆状的球杆菌,革兰氏阳性,常成对存在,以及 DNA 的 G + C 含量在甲烷短杆菌属 (27.5—32mol%) 的范围内^[1,2]。所以,我们

建议, 将这种产甲烷菌定为甲烷短杆菌属的成员。甲烷短杆菌属现有 3 个种, 它们是瘤胃甲烷短杆菌、史氏甲烷短杆菌以及嗜树木甲烷短杆菌^[1,2]。嗜树木甲烷短杆菌与前面两个种很容易区别, 嗜树木甲烷短杆菌为杆状, 不能利用甲酸生长和产甲烷, 而前面两个种为球杆状, 都能利用甲酸生长和产甲烷。史氏甲烷短杆菌和瘤胃甲烷短杆菌的区别在于前者在没有 2-甲基丁酸、氨基酸和辅酶 M 的情况下也能生长, 而瘤胃甲烷短杆菌则必需有这些物质才能生长^[1,3-9]。

我们分离到的菌株与史氏甲烷短杆菌的模式菌株 PS 的特征基本一样^[1,2,5]。但是, 史氏甲烷短杆菌需要乙酸作为主要碳源^[1,2], 而我们分离的菌株能够在无乙酸的培养基中生长。人粪中分离出的史氏甲烷短杆菌在有胆盐存在的条件下生长^[5]。而我们分离的菌株在胆盐培养基中既不生长, 也不产甲烷。此外, 我们分离的产甲烷菌菌落很小, 近似圆形。史氏甲烷短杆菌有一根极生鞭毛, 但是, 在湿装片中观察时却不运动^[1,5], 而我们分离的菌株在湿装片中观察时运动很活跃。

根据上述描述, 我们暂将分离菌株定为史氏甲烷短杆菌 HX 菌株。但是, 其真正的分类地位需根据与已确定的(代表不同物种的)不同菌株产甲烷菌的抗血清发生的间接免疫荧光反应来决定^[18]。

参 考 文 献

- [1] Balch, W. E. et al.: *Microbiol. Rev.*, 43: 260—296, 1979.
- [2] Mah, R. A. and M. R. Smith: *The Methanogenic Bacteria*. In *The Prokaryotes*. Vol. I. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. pp. 948—977, 1981.
- [3] Smith, P. H. and R. E. Hungate: *J. Bacteriol.*, 75: 713—718, 1958.
- [4] Bryant, M. P. et al.: *Adv. Chem. Ser.*, 105: 23—40, 1971.
- [5] Miller, T. J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 227—232, 1982.
- [6] Nottingham, P. M. and R. E. Hungate: *J. Bacteriol.*, 96: 2176—2179, 1968.
- [7] 钱泽澍: *微生物学报*, 24: 105—110, 1984.
- [8] Zehnder, A. J. B. and K. Wuhrmann: *Arch. Microbiol.*, 111: 195—205, 1977.
- [9] Zeikus, J. G. and D. L. Henning: *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 41: 543—552, 1975.
- [10] Paynter, M. J. B. and R. E. Hungate: *J. Bacteriol.*, 95: 1943—1951, 1968.
- [11] Rivard, C. J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 484—490, 1983.
- [12] Bryant, M. P.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 25: 1324—1328, 1972.
- [13] Hungate, R. E.: A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In *Method of Microbiology*, Vol. 3B. Academic Press Inc., New York, pp. 117—132, 1969.
- [14] Copper, T. C.: *Protein Purification*. In *The Tool of Biochemistry*, John Wiley and Sons Inc., New York. pp. 359—360 1977.
- [15] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.
- [16] 朱俭等: 《生物化学实验》, 上海科学技术出版社, 上海, 第 124—132 页, 1981.
- [17] Godsy, E. M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 1074—1075, 1980.
- [18] Macario, A. J. L. and Conway de Macario, E.: *Syst. Appl. Microbiol.*, 4: 451—458, 1984.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *METHANOBREVIBACTER* STRAIN HX

Xu Baoxiao Xi Mingquan Jin Xiuqi

(Branch of Shanghai Teacher's College, Shanghai)

A methanogenic bacterial strain isolated from the sewage digester sludge of The Shanghai Association for Science and Technology is described. Cells are short, lancet-shaped to oval rods, 0.5—0.8 μm in width, and 1.0—1.2 μm in length. Cells frequently occur singly or in pairs. They are gram positive. Colonies on roll-tube medium are small, translucent, off-white in color, and roughly circular with entire edge. They show bright blue-green fluorescence by epifluorescence microscopy. The isolate can utilize H_2/CO_2 or formate for growth and methanogenesis. Cells do not require added 2-methylbutyrate, CoM, or amino acids for growth. Cells have no requirement for yeast extract, trypticase, rumen fluid, and acetate for growth. However, yeast extract, trypticase, and rumen fluid show a stimulatory effect on growth and methanogenesis. The isolate does not grow in the presence of bile salts. The temperature for optimum growth and methanogenesis is 40°C. The pH optimum

is 7.6, with growth and methane formation over the pH range of 6.9—8.6. In the medium containing 0.25% formate, 0.2% yeast extract and trypticase, the minimum generation time is 10 hr. The DNA base composition is 31.13 mol% G + C. Our isolate has morphological characteristics and DNA G + C content of the genus *Methanobrevibacter*. Judging from above descriptions, it is considered to be a member of genus *Methanobrevibacter*, to which the name *Methanobrevibacter smithii* strain HX is proposed for the time being. The exact taxonomic placement of this methanogenic bacterium has to be determined by its indirect immunofluorescence reaction with antimethanogen antisera against currently established different strains (representing different species) of methanogens.

Key words

Methanobrevibacter