

嗜热甲烷八叠球菌的分离和生理特性

张 辉 赵一章

(农牧渔业部成都沼气科学研究所, 成都)

采用严格的 Hungate 厌氧技术, 从成都市郊区常温沼气池污泥中分离到嗜热甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina thermophila*) CB 菌株。CB 菌株能够利用甲醇、甲胺和醋酸生长并产生甲烷, 不能利用 H_2/CO_2 、甲酸作为碳源和能源。该菌株的最适生长温度为 $50^\circ C$, 最适生长 pH 为 7.0, 最适合生长的 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 NH_4^+ 的浓度分别为 $20mM$ 、 $50mM$ 和 $300mg/L$ 。青霉素和低浓度的乳糖酸红霉素 ($50\mu g/ml$) 对 CB 菌株的生长无抑制, 这有利于 CB 菌株的分离和纯化。酵母膏和污泥上清液都对该菌株的生长有一定的刺激作用, 同时在生长过程中, 酵母膏、胰化酪蛋白和维生素均可代替污泥上清液, 这一点又不同于嗜热甲烷八叠球菌 TM1 菌株。

关键词 嗜热甲烷八叠球菌

自 Zeikus 在 1972 年首次报道了嗜热自养产甲烷杆菌 (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) 的分离及生理特征后^[1], 近年来, 国外一些学者又从不同的生态环境中分离到几株嗜热产甲烷细菌^[2,3]。在这些嗜热产甲烷细菌中能够利用醋酸作为碳源和能源的只有 3 株^[4-6]。而这 3 株中, 仅有一株属于产甲烷球菌属, 即嗜热甲烷八叠球菌 TM1 菌株 (*Ms. thermophila* TM1)。TM1 菌株分离自实验室的高温 ($55^\circ C$) 厌氧污泥反应器。我们采用醋酸连续富集, 从常温沼气池污泥样品中分离到了嗜热甲烷八叠球菌 CB 菌株。本文报道 CB 菌株的分离和生理生化特性, 并讨论了 CB 菌株和 TM1 菌株的异同。

材料和方法

(一) 菌株来源

嗜热甲烷八叠球菌 CB 菌株, 分离自成都市郊区常温沼气池的沉积污泥中。分离样品通过厌氧的方式采集^[7]。本试验中的培养基制备、分离纯化过程, 全部采用 Hungate 厌氧技术^[8]。

(二) 培养基

培养基中除另有说明者外, 本试验的富集培养和分离纯化均采用下列培养基 (g/L): NH_4Cl , KH_2PO_4 0.4, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.4, $MgSO_4$ 0.5, 酵母膏 2, 胰化酪蛋白 2, 盐酸半胱氨酸 0.5, 刃天青 0.0001, 复合维生素溶液 10ml, 微量元素溶液 10ml^[7], 固体培养基加入 2% 的琼脂。无氧操作下分装培养基^[9], 灭菌备用。接种前加入 2% $Na_2S \cdot 9H_2O$, 和 5% $NaHCO_3$, 调节培养基 pH 至 6.8—7.0。

(三) 富集培养和分离

采用厌氧操作, 将少许样品加入装有 20ml 培养基的 60ml 血清瓶中^[9,10], 加入青霉素 ($3200\mu g/ml$) 或乳糖酸红霉素 ($50\mu g/ml$), 加入 2M 醋酸钠 0.4ml 作为富集培养的唯一碳源, $55^\circ C$ 培养。经过一个月的富集培养, 取富集液进行 10 倍稀释滚管分离^[7-9]。分离过程中, 用甲醇或醋酸钠作碳源, 并交叉使用青霉素和乳糖酸红霉素除去非产甲烷菌。获得纯培养后, 采用纯度鉴定培养基鉴定其纯度^[7,9]。

本文于 1985 年 11 月 29 日收到。

中国科学院成都分院测试中心郑中华拍摄电镜照片, 在此致谢。

(四) 形态观察和甲烷测定

采用 Leitz 荧光显微镜和 JSM-35C 扫描电镜观察 CB 菌株的菌体荧光及菌体形态。JEM-100X 电镜观察 CB 菌株的超微结构。SC-6 型气相色谱仪用于分析测定甲烷含量^[9]。本实验中的 CH_4 数据均为重复样品的平均数。

结 果

(一) 富集培养和分离

从成都市郊区常温沼气池的沉积污泥中, 分离到嗜热甲烷八叠球菌 CB 菌株。该菌株的纯培养物保存在农牧渔业部成都沼气科学研究所厌氧微生物室。

(二) 形态和培养特征

CB 菌株如以甲醇或甲胺类为碳源, 在液体培养中生长 2—3 天后即可形成肉眼可见、大小不等的细胞团。细胞团全部沉淀在培养液底部, 培养液则不出现混浊。此时在荧光显微镜下, 可观察到菌体所发出的较强的荧光(图 1)。扫描电镜的观察结果说明, CB 菌株按 3 个相互垂直的平面进行分裂, 分裂后每 8 个球菌在一起形成一立方体, 而细胞团则由数目不等的立方体堆积而成(图 2)。CB 菌株的单个细胞的直径为 $0.8—3\mu m$ 。CB 菌株为革兰氏阳性细胞壁结构, 细胞壁厚度为 $20—50nm$, 细胞内出现中体类内膜结构, 并能观察到电子致密的细胞内含物(图 3)。CB 菌株的菌落在以甲醇为碳源的固体培养基上似桑子状, 菌落呈淡黄色, 表面凸起, 边缘不规则, 由于 CH_4 和 CO_2 的形成, 菌落周围常出现囊状气泡。

(三) 生理生化特性

1. 碳源利用: 表 1 结果说明 CB 菌株能够利用甲醇、甲胺和醋酸作为碳源并生成甲烷, 而不能利用 H_2/CO_2 和甲酸。CB 菌株的生长最适基质是甲醇和甲胺, 而以醋酸为基质时则生长缓慢。



图 1 紫外光激发下的 CB 菌株 ($1,500\times$)
Fig. 1 Strain CB (under the violet light)

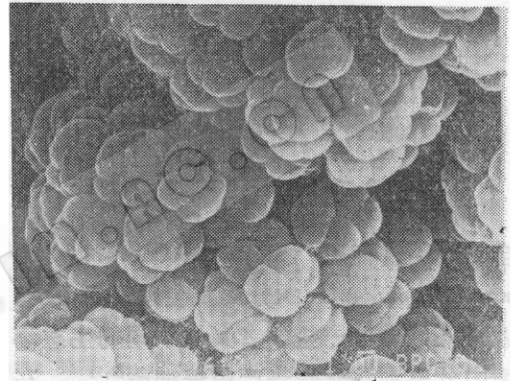


图 2 CB 菌株的扫描电镜照片 ($4,300\times$)
Fig. 2 Scanning electron micrograph of strain CB

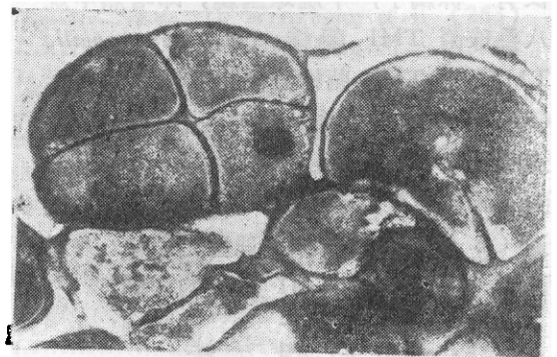


图 3 CB 菌株的超微结构 ($27,000\times$)
Fig. 3 Fine structure of strain CB

2. 温度和 pH 对生长的影响: CB 菌株的最适生长温度为 $50^\circ C$, 低于 $45^\circ C$ 时生长缓慢, 低于 $35^\circ C$ 或高于 $60^\circ C$ 时不生

表 1 CB 菌株对碳源的利用

Table 1 Utilization of carbon sources of strain CB

基 质 Substrate	CH ₄ μmol		
	24h	48h	102h
CH ₃ OH	20	63	190
(CH ₃) ₂ N	2	37	140
CH ₃ COONa	0	0	30
HCOONa	0	0	0
H ₂ /CO ₂	0	0	0

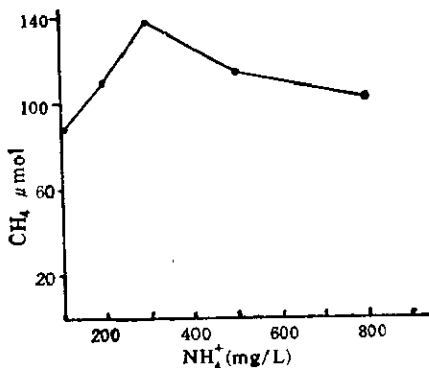


图 6 NH₄⁺ 对 CB 菌株生长的影响

Fig. 6 Effect of NH₄⁺ on growth of strain CB

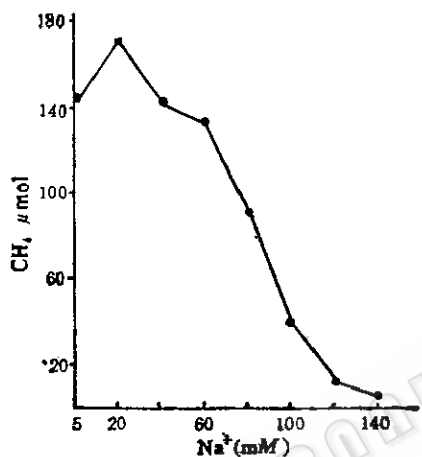


图 4 Na⁺ 对 CB 菌株生长的影响

Fig. 4 Effect of Na⁺ on growth of strain CB

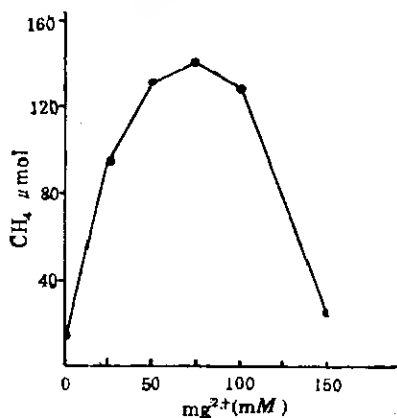


图 5 Mg²⁺ 对 CB 菌株生长的影响

Fig. 5 Effect of Mg²⁺ on growth of strain CB

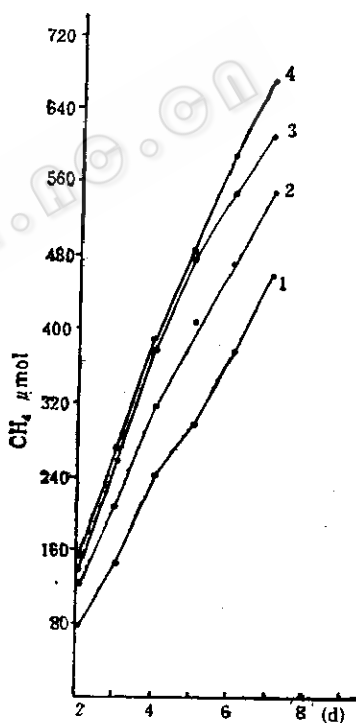


图 7 酵母膏浓度对 CB 菌株生长的影响

Fig. 7 Methanogenesis by strain CB in the presence of various concentrations of yeast extract

1. 对照 (control) 0%; 2. 0.05%; 3. 0.10%; 4. 0.20%

pH 在 6.5—7.0 之间, pH 低于 6.0 或高于 8.0 时不生长, 也不产生甲烷。

3. Na⁺、Mg²⁺、NH₄⁺ 对生长的影响:

长, 也无甲烷生成。CB 菌株的最适生长

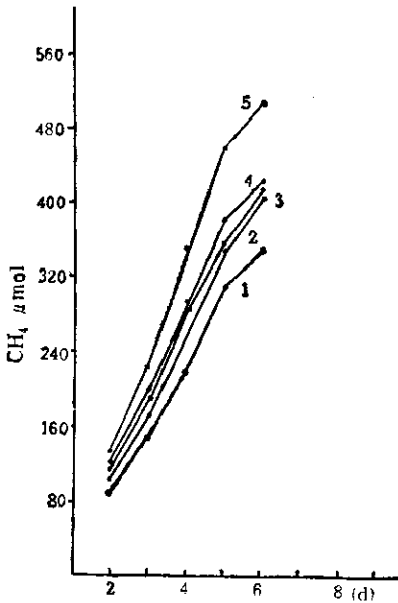


图8 污泥上清液浓度对CB菌株生长的影响
Fig. 8 Methanogenesis by strain CB in the presence of various concentrations of sludge supernatant

1. 对照 (control) 0%; 2. 1%; 3. 2%;
4. 4%; 5. 8%

实验均采用60ml血清瓶进行,各分装20ml液体培养基。 NaCl 和 MgSO_4 经烘干恒重后称取。图4表明CB菌株的最适 Na^+ 浓度为5—20mM,当 Na^+ 浓度高于80mM时,生长即受到抑制,如果 Na^+ 浓度超过140mM,CB菌株不能生长。因培养基中加有 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 作还原剂,所以培养基 Na^+ 的起始浓度较高(5mM)。实验中 Na^+ 浓度是 NaCl 和 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 浓度的总和。图5结果说明CB菌株的最适 Mg^{2+} 浓度为50—75mM,如 Mg^{2+} 浓度高于150mM,CB菌株的生长就会受到强烈的抑制。实验中 MgSO_4 也可用 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 代替。图6表明CB菌株的最适 NH_4^+ 浓度为200—300mg/L,但当 NH_4^+ 浓度高达800mg/L时,对该菌株的生长也无明显的抑制,这说明CB菌株对 NH_4^+ 浓度的变化有较强的适应性。

4. 酵母膏和污泥上清液对菌株生长的刺激作用:图7、图8表明,不同含量的酵母膏或污泥上清液对CB菌株的生长均有一定的刺激作用,尽管CB菌株在不含酵母膏或污泥上清液的培养基中同样能够生长,但该菌株的生长速率还是随着培养基中酵母膏或污泥上清液的含量的增加而明显加快。此外,酵母膏的刺激作用比污泥上清液更明显,在不含酵母膏或污泥上清液的培养基中,胰化酪蛋白、复合维生素和复合微量元素可起到生长因子作用。实验中的酵母膏和污泥上清液均按厌氧的方式制备^[9]。

讨 论

大多数嗜热产甲烷细菌或是分离自自然界的高温生态环境中^[11-13],或是分离自高温厌氧消化器的沉积污泥^[4,9]。CB菌株的分离源既不同于大多数嗜热产甲烷细菌,也不同于嗜热甲烷八叠球菌TM1菌株。甲烷八叠球菌属中的巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*)和马氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina mazei*)都能够利用 H_2/CO_2 作为碳源和能源,而嗜热甲烷八叠球菌却不能利用 H_2/CO_2 生成甲烷,这是嗜热甲烷八叠球菌区别于其它甲烷八叠球菌的特征之一^[4,14]。嗜热甲烷八叠球菌TM1菌株和CB菌株都能够利用甲醇、甲胺类或醋酸作为生长的能源和碳源,但是二者在不同基质的利用速率上却有较大的差异。TM1菌株的最适生长基质为甲醇+醋酸,而且在醋酸作为唯一的碳源时,也能较快地将醋酸转化成 CH_4 和 CO_2 ^[4]。CB菌株的最适生长基质为甲醇,以醋酸作为唯一碳源时,则生长缓慢。TM1菌株和CB菌株均为中度专性嗜热菌,尽管它们的分离源不同,但生长温度却是一致的^[4]。比较二者的生长pH,可以看到

较明显的差异, TM1 菌株的最适生长 pH 为 6.0, 而 CB 菌株为 7.0, 说明前者对酸的适应性强于后者。Na⁺、Mg²⁺、NH₄⁺、等阳离子的浓度均对 CB 菌株生成甲烷的速率有一定的影响, 在阳离子浓度较低时, 增加阳离子浓度对 CB 菌株的生长具有刺激性的作用。如果阳离子浓度超过生长的最适浓度值时, 对 CB 菌株的生长则产生抑制作用, 导致甲烷生成速率的下降。阳离子对 CB 菌株的抑制程度的大小取决于阳离子浓度超过最佳值的程度。Na⁺、Mg²⁺、NH₄⁺ 等阳离子对 CB 菌株的甲烷生成速率的影响与 McCarty 的有关报道相似^[15]。CB 菌株与 TM1 菌株的最大差异表现在二者对生长因子的需求上。TM1 菌株的生长速率取决于培养基中污泥上清液的浓度, 如果培养基中不添加污泥上清液, TM1 菌株则完全不能生长。在 TM1 菌株的生长过程中, 污泥上清液既是必需的生长因子, 也是酵母膏、胰化酪蛋白和牛肉膏等有机添加物所不能代替的唯一的生长因子。污泥上清液对 CB 菌株也具有一定的刺激作用, 但是在分离纯化过程中, 污泥上清液并非必需的生长因子, 酵母膏和胰化酪蛋白均能取代污泥上清液, 并起到比前者更佳刺激作用。

通过比较 CB 菌株和 TM1 菌株的异同, 可以看到 CB 菌株的形态和一些生理特性均与嗜热甲烷八叠球菌 TM1 菌株基本相似。经鉴定, CB 菌株为嗜热甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina thermophila*)。

参 考 文 献

- [1] Zeikus, J. G. and R. S. Wolfe: *J. Bacteriol.*, 109: 707—713, 1972.
- [2] Blotvogel, K. H. et al.: *Arch. Microbiol.*, 142: 211—217, 1985.
- [3] Blotvogel, K. H. and U. Fischer: *Arch. Microbiol.*, 142: 218—222, 1985.
- [4] Zinder, S. H. and R. A. Mah: *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 996—1008, 1979.
- [5] Ahring, B. K. and P. Westermann: *FEMS Microbiol. Lett.*, 25: 47—52, 1984.
- [6] Zinder, S. H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 796—807, 1984.
- [7] 张 辉、赵一章: 中国沼气, (3): 7—12, 1985.
- [8] 赵一章、张 辉: 微生物学报, 25(3): 187—193, 1985.
- [9] 赵一章、尤爱达: 微生物学报, 24(2): 99—104, 1984.
- [10] 钱泽澍: 微生物学报, 24(2): 105—110, 1984.
- [11] Jones, W. J. et al.: *Arch. Microbiol.*, 136: 254—261, 1983.
- [12] Stetter, K. O. et al.: *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C2*: 166—178, 1981.
- [13] Huber, H. et al.: *Arch. Microbiol.*, 132: 47—50, 1982.
- [14] Mah, R. A. and D. A. Kuhn: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 263—265, 1984.
- [15] McCarty, P. L.: *Public. Works*, 95(11): 91—94, 1964.

ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF *METHANOSARCINA THERMOPHILIA* CB

Zhang Hui Zhao Yizhang

(Chengdu Biogas Scientific Institute Ministry of Agriculture,
Animal Husbandry and Fishery China, Chengdu)

Methanosarcina thermophila strain CB was isolated from a biogas plant in Chengdu by the Hungate roll-tube technique. Methanol, methylamine and sodium acetate were substrates for growth and methanogenesis; H_2/CO_2 and sodium formate were not. The optimal growth temperature was 50°C. The optimal pH range was 7.0. Na^+ , Mg^{2+} , and NH_4^+ were required for growth, with maximum growth rates at 20 mM Na^+ , 50 mM Mg^{2+} and 300 mg/L NH_4^+ . Penicillin and erythromycin (50 μ g/ml), inhibitors of pep-

tidoglycan synthesis, were used as selective agents to eliminate contaminating nonmethanogens. Methane production was stimulated by yeast extract, sludge supernatant, and trypticase. Because sludge supernatant could be replaced with yeast extract, trypticase and other common cofactors, strain CB differs from *Methanosarcina thermophila* TMI.

Key word

Methanosarcina thermophila