

亨氏甲烷螺菌 JZ1 菌株的分离和特性

钱泽澍 竺建荣

(浙江农业大学, 杭州)

采用改良的 Hungate 厌氧操作技术, 从半连续进料的奶牛粪沼气池发酵流出液中, 分离出一株产甲烷菌菌株 JZ1。单个细胞大小为 $0.3-0.5 \times 10-18 \mu\text{m}$, 但细胞往往互相连接而以丝状体存在。革兰氏阴性, 能运动, 不产生芽孢。菌落圆形或近圆形, 浅黄色, 半透明, 表面凸起并带有特殊的“纹饰”结构。主要利用 H_2/CO_2 基质, 不利用甲醇和甲胺。酵母膏能极大地刺激菌体的生长, 并为维持菌体的生长所必需。此外, 测定了瘤胃液、消化液等因子对菌体生长的影响。生长的最适温度和 pH 分别为 30°C 和 $\text{pH}7.0$ 。在最适生长条件下测定的菌体倍增时间约 28 小时。用磷钨酸负染法观察菌体, 幼龄培养物中可见到大量可负染的代谢物; 老龄培养物中这种可负染代谢物消失, 同时细胞壁呈现出明暗相间且规则排列的“条带”结构。菌体的超薄切片清晰地显示, 丝状菌体具有特殊的细胞构造及细胞连接结构。根据以上特性, 对照已知的各种产甲烷细菌, 认为该菌株为亨氏甲烷螺菌。

关键词 亨氏甲烷螺菌

产甲烷细菌是一特殊的微生物类群^[1,2]。在厌氧消化过程中, 转化前三阶段发酵所生成的代谢产物, 如 H_2/CO_2 , 乙酸, 甲酸等, 最终生成 CH_4 和 CO_2 。迄今为止, 报道分离得到的产甲烷细菌已近四十余种。但是, 由于厌氧分离和培养技术等方面的条件所限, 我国对产甲烷细菌的研究仅在最近几年才开始。本文报道, 采用改良的 Hungate 厌氧操作技术^[1,3,4], 从奶牛粪沼气池的发酵流出液中, 分离出亨氏甲烷螺菌 JZ1 菌株。

材料和方法

(一) 样品来源

用于分离的实验样品, 系取自半连续进料的一个奶牛粪便沼气池的发酵流出液。

(二) 培养技术

1. 培养基: 富集培养基 (g/L): K_2HPO_4 0.4, KH_2PO_4 0.4, NH_4Cl 1.0, MgCl_2 0.1, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.25, NaHCO_3 1, CH_3COONa 2, 酵母膏 2, 半胱氨酸 0.25, 刃天青 0.002。

无机盐溶液培养基即基本培养基 (g/L): K_2HPO_4 0.3, KH_2PO_4 0.3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3, NaCl 0.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.13, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.008, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.25, NaHCO_3 0.2, 刃天青 0.002, 微量元素 10ml^{-1} 。营养生长培养基除了含有相同的全部无机盐溶液培养基组分外, 再分别加入 0.2% 的酵母膏和胰酶解酪蛋白。

如用于滚管分离, 在采用的上述培养基组分中再加 2% 的琼脂。

2. 分离和培养方法: 培养基的配制, 均采用改良的 Hungate 厌氧操作技术, 在除氧的纯氮气相中进行。将新鲜样品先富集培养二次, 在培养液中加入青霉素溶液 (3000 单位/ml 培养液) 以抑制其它非产甲烷细菌的生长。进行滚管, 生长二周后接种至液体营养生长培养基, 生长后再用固体营养培养基滚管, 重复移接培养, 直至获得纯培养物。

本文于 1986 年 2 月 1 日收到。

承杭州大学生物系电镜室协助电镜观察; 农牧渔业部农村能源环保局资助, 在此一并致谢。

纯培养物保存于液体营养培养基, 同时进行基本形态和培养特征的观察, 生理生化特性的测定(试验采用 60ml 血清瓶)。除特别说明者外, 每项理化测定均做三个重复, 接种量为 4%。

(三) 瘤胃液和消化液的制备

取新鲜瘤胃内含物或消化液, 先用数层纱布过滤, 然后真空抽滤。滤液在 121℃ 蒸汽灭菌 30 分钟, 冷却后再经 6000r/min 离心 20 分钟, 得到的上清液即为瘤胃液 (RF) 和消化液 (DF)。为使用方便, RF 或 DF 可批量制备, 并保存于冰箱中备用。

(四) 检测方法

菌落和菌体的形态观察分别采用 Olympus BHF 型普通和相差显微镜。所进行的各项理化试验, 均以生成的 CH_4 产量作为生长的测定指标。 CH_4 的测定采用 102G 型气相色谱仪(上海分析仪器厂产品), 热导池作检测器, N_2 为载气, 担体选用 GDX-104。

(五) 电镜观察

一般形态的电镜观察, 采用最常使用的磷钨酸负染法。取生长良好的待检菌体, 滴加于铜网上面, 吸干, 再以 2% pH7.0 的磷钨酸负染 45 秒, 吸去残存染液并稍作干燥即可进行观察。

超薄切片的制作: 先以 3000r/min 离心 10 分钟收集菌体细胞, 然后用 2.5% 戊二醛进行前固定, 冲洗三次后用 1% 锇酸进行后固定。冲洗后用丙酮系列脱水, Epon 812 包埋, LKB-V 型超薄切片机制片。观察前切片用醋酸铀和柠檬酸铅染色, 最后在 Hitachi H300 电镜下观察并拍照。

结果和讨论

(一) 形态和培养特性

分离的纯培养物——产甲烷细菌 JZ1 菌株。其菌落呈圆形或近圆形, 浅黄色, 半透明, 表面凸起且有独特的“纹饰”结构, 在低倍显微镜下观察非常清楚(图 1), 菌落直径 1—2mm。在紫外线的激发照射下, 菌落产生强烈的蓝绿色致发荧光, 持续时间约 30 秒, 以后迅速减弱消褪。

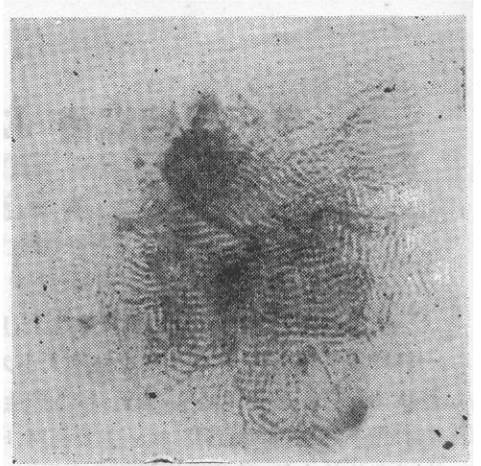


图 1 JZ1 菌株的菌落

Fig. 1 Colony of strain JZ1

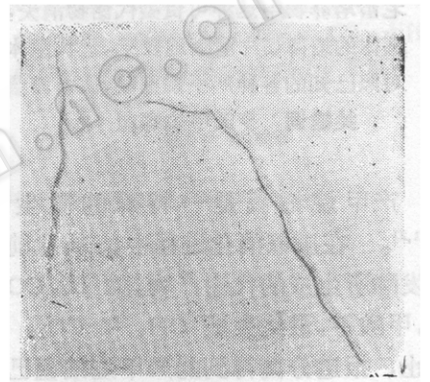


图 2 JZ1 菌株的丝状体

Fig. 2 Long filaments of strain JZ1

菌体单细胞的大小为 $0.3-0.5 \times 10-18 \mu\text{m}$, 细胞往往互相连接而形成很长的丝状体, 长度可达数十甚至上百微米。在丝状体中可观察到有规则的波浪形弯曲(图 2)。用相差显微镜观察未经染色的幼龄菌体, 发现在菌体的中间, 顶端及细胞的粘连处存在着“黑块”颗粒。革兰氏阴性, 不形成芽孢, 也未见鞭毛的存在, 但在相差显微镜下可观察到菌体的特殊运动。

电镜观察, 幼龄的丝状体细胞含有大量的可被磷钨酸负染的代谢物颗粒, 这与相差显微镜下的“黑块”颗粒相一致。老龄

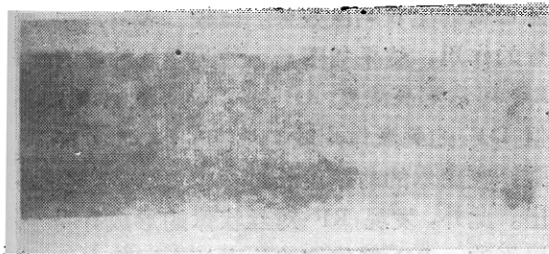


图3 JZ1 菌株老龄细胞($\times 40,000$)
Fig. 3 Old culture cell of strain JZ1

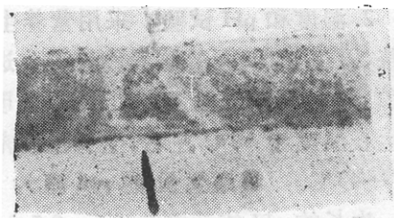


图4 JZ1 菌株的超薄切片($\times 40,000$)
Fig. 4 Ultrathinsection of strain JZ1

细胞中,可负染代谢物颗粒消失,细胞原生质明显浓缩和自溶解体。同时,细胞壁呈现明暗相间的、有规则排列的“条带”结构(图3)。菌体的超薄切片清晰地显示:丝状体细胞具有特殊的构造,长的丝状体是由许多单细胞包含于一层鞘套内连接形成,两两相邻之间存在着独特的细胞连接结构——细胞间室(cell spacer)(图4)。

(二) 生理生化特性

1. 碳源试验: 采用无机盐溶液培养基,加入各种试验基质和生长刺激物,34℃培养二周后测定生成的 CH_4 量,得到该菌的基质利用结果如表1所示。

表1表明,该菌株主要利用 H_2/CO_2 作为生长基质,不能利用甲醇和甲胺。在 N_2 气相中也不能利用甲酸和乙酸盐。为了证实利用甲酸盐和乙酸盐的基质可能性,进一步试验了 H_2/CO_2 气相中的利用情况。测定结果表明,在此条件下菌体生长可利用少量的甲酸和乙酸盐,酵母膏对生长有很大的刺激作用;胰酶解蛋白单独使用几

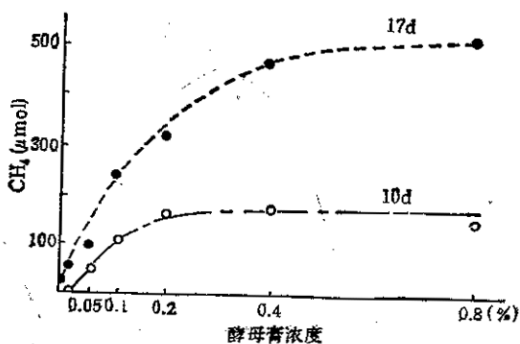
表1 JZ1 菌株对基质的利用

Table 1 Substrate utilization of strain JZ1

试验基质 Substrate	CH_4 ($\mu\text{mol}/\text{瓶}$ vial)
80% H_2 + 20% CO_2	120.72
100% H_2	0
100% CO_2	0
100% N_2	0
80% H_2 + 20% CO_2 + 0.2% 酵母膏 yeast extract	318.38
80% H_2 + 20% CO_2 + 0.2% 胰酶解 酪蛋白 trypticase	130.59
80% H_2 + 20% CO_2 + 0.2% 酵母膏 yeast extract + 0.2% 胰酶解酪蛋 白 trypticase	431.67
80% H_2 + 20% CO_2 + 33% RF	397.79
80% H_2 + 20% CO_2 + 33% DF	364.49
100% N_2 + 0.4% HCOONa	0
100% N_2 + 0.4% CH_3COONa	0
100% N_2 + 0.4% CH_3OH	0
100% N_2 + 0.4% CH_3NH_2	0

注: 所列数据为二次测定的平均值。

Duplicate average value.



Concentration of yeast extract

图5 酵母膏对 JZ1 菌株产甲烷的影响

Fig. 5 Effect of yeast extract on methane production of strain JZ1

乎没有刺激效果,但与酵母膏共同使用时则表现出明显的协同刺激作用。酵母膏对生长刺激效果的影响试验见图5。图5表明,0.05%的酵母膏即对该菌株有显著的刺激生长效果。随着浓度的提高, CH_4 产

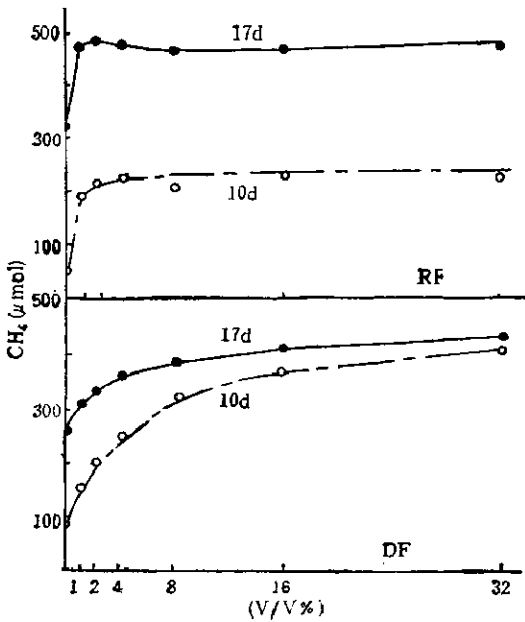


图6 RF或DF对JZ1菌株产甲烷的影响
Fig. 6 Effect of RF or DF on methane production of strain JZ1

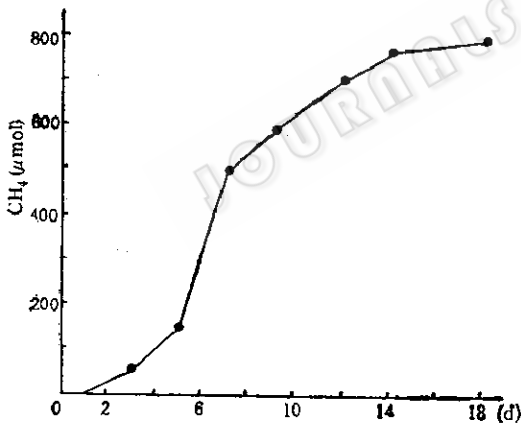


图7 JZ1菌株的生长曲线
Fig. 7 Growth curve of strain JZ1

量也急剧增加,当酵母膏为0.2%时,CH₄产量增加到对照的11倍。而且,基础培养基中移接二次后生长停止,说明酵母膏为维持菌体生长所必需。

从表1还可看出,加入体积比为33%的瘤胃液或消化液,均表现出超过0.2%

酵母膏的生长刺激效果。比较二者对产甲烷的作用,结果如图6。处于很低浓度的RF可达到高浓度RF的等同刺激效果;但DF的刺激作用随着浓度的递增而加强,在菌体的前期生长过程中更是十分突出。此外,发现RF对丝状体的形成有明显影响,RF能使培养物中单个细胞占优势。对于RF和DF刺激作用的机理,特别是RF的特殊现象,待进一步研究。

2. 温度和pH试验: 采用营养生长培养基,以生长10天的培养物接种,进行温度和pH的影响试验测定。结果表明,最适生长温度为30℃左右,生长温度范围为15°—45℃。最适生长的pH值为7.0左右,生长的pH值范围为6.5—8.5。试验表明,维持培养基的pH值在7.0—7.2,最有利于该菌株的生长。

3. 生长曲线: 根据碳源、温度和pH试验,选取各自的最佳条件,参照Zeikus等人的报道^[9],以生成的CH₄产量作为生长的测定指标,得细菌的生长曲线如图7所示。由图7的对数生长期计算得到的菌体最低倍增时间为28.13小时。

该菌落表面独特的“螺纹”结构,波浪形弯曲的丝状菌体,细胞间室的存在,基质的利用范围等特征和亨氏甲烷螺菌^[5-8]一致。迄今已报道的亨氏甲烷螺菌有: JF1菌株(标准菌株)^[1,2,9]、3-PS菌株^[8]和GPI菌株^[7,9]。对它们的特性进行比较, JZ1菌株能利用少量乙酸盐,生长最适温度为30℃,幼龄丝状体细胞含有大量可被磷钨酸负染的代谢物颗粒,表明它和其它菌株有所不同。因此认为JZ1菌株为亨氏甲烷螺菌的一个新菌株。

参 考 文 献

- [1] Balch, W. E. et al.: *Microbiol. Rev.*, 43: 260—296, 1979.

- [2] Wolfe, R. S.: *Antonie van. Leeuwenhoek*, **45**: 353—364, 1979.
- [3] Bryant, M. P.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **25**: 1324—1328, 1972.
- [4] Hungate, R. G.: *Methods in Microbiology*, Academic Press, Inc. New York, pp. 117—132, 1969.
- [5] Ferry, F. G. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **24**: 465—469, 1974.
- [6] Ferry, F. G. and R. S. Wolfe: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**: 371—376, 1977.
- [7] Patel, G. B. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **22**: 1404—1410, 1976.
- [8] Zeikus, J. G. and V. G. Bowen: *J. Bacteriol.*, **121**: 373—380, 1975.
- [9] Sprott, G. D. and R. C. Mckeller: *Can. J. Microbiol.*, **26**: 115—120, 1980.
- [10] McInerney, M. J. and M. P. Bryant: *Fuel Gas Production From Biomass*, pp. 19—45, 1980.
- [11] Patel, G. B. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **112**: 411—415, 1979.
- [12] Sprott, G. D. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **25**: 730—738, 1979.
- [13] Zeikus, J. G. and D. L. Henning: *Antonie van. Leeuwenhoek*, **41**: 543—552, 1975.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *METHANOSPIRILLUM* *HUNGATEI* JZ1

Qian Zeshu* Zhu Jianrong

(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou)

A strain JZ1 of methanogen was isolated from the effluent of a biogas plant with cow faeces as fermenting material, by use of the modification of Hungate anaerobic technique. Single cell measures 10—18 by 0.3—0.5 μm , Gram negative, motile and endospore are absent. The colonies produced by these bacteria are circular or near circular, light yellow, semitranslucent, and convex with special structure of striation-imitated. Hydrogen and carbon dioxide are the main substrate used. Do not utilize methanol and methylamine. Yeast extract stimulate greatly the growth of the organism, and is necessary for maintaining the growth of bacteria. Furthermore, the effects on bacteria growth by the factors of rumen fluid or digested fluid are also described. The temperature and pH in optimal growth are 30°C and 7.0, respectively. Doubling time is approximately 28 hours in

the conditions of experimental optimum growth. Negatively staining the whole cells with phosphotungstic acid, it may be observed that much metabolite negatively stained exist in young culture. But it disappeared in old culture, while veined structure of regular light and dark pattern is appeared on cell wall. Thin section clearly show that long filaments possesses the special structure of cells and cell connectors. Based on these characterization of the strain, compared to all methanogens known, it is considered as a new strain of *Methanospirillum hungatei*.

Key word

Methanospirillum hungatei

* i.e. Chien Tseshu