

活动甲烷菌的分离和性状

陈 革

(湖南常德农校,常德)

罗永兰

(湖南农学院常德分院,常德)

钱泽澍

(浙江农业大学,杭州)

应用改良的 Hungate 技术,从湖南省常德市酒厂下水道的污泥中分离到一株产甲烷菌 CC81。该菌株细胞短杆状 (0.6—0.8 × 1.5—2.0 μm), 两端圆钝, 具一根端生鞭毛, 能运动, 不形成芽孢, 革兰氏阴性, 通常单个存在, 从不成链状。菌落很小, 圆形, 直径 0.7—1mm, 凸起, 边缘完整, 半透明, 初为乳白色, 后中央褐黄色。菌株只能利用 H₂/CO₂ 或甲酸盐作为碳源和能源, 不能利用 CH₃OH、CH₃COONa、CH₃NH₂。在培养基中分别加入牛的瘤胃液、酵母膏、胰酶解酪蛋白均能刺激菌株的生长和产甲烷, 但不需外源辅酶 M。生长温度 25°—45℃, 最适生长温度 40℃。生长 pH 值在 5.5—7.5, 最适生长 pH7.0 左右, 菌体倍增时间为 11—12.5 小时, 根据形态和生理性状, CC81 菌株与活动甲烷菌 (*Methanocrobium mobile*) 很相似, 确定为活动甲烷菌。

关键词 活动甲烷菌

目前, 一般认为厌氧消化分成四个阶段^[1], 由四大类群细菌相互作用形成甲烷, 最后一个类群的产甲烷细菌对甲烷的形成起着决定性的作用。到 1985 年止, 国外报道已分离出的产甲烷菌纯培养物有 37 种。近年来, 我国也陆续分离出产甲烷菌的纯培养物^[2-6]。本文报道从湖南省常德市酒厂下水道污泥中分离出一株产甲烷细菌菌株 CC81。

材料与方 法

(一) 培养基

培养基: 采用 Pynter 和 Hungate 应用的培养基, 其组分 (g/L): 30%(V/V) 牛瘤胃液, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.5, (NH₄)₂SO₄ 0.5, MgSO₄ · 7H₂O 0.01, CaCl₂ · 2H₂O 0.01, NaCl 1.0, 刃天青 (0.2%) 1ml, 盐酸半胱氨酸 0.3。用 2% HCl 和 10% NaOH 调 pH 至 6.0, 121℃ 灭菌 20 分钟。接种前培养基中加入 1.5% Na₂S · 9H₂O 和 10% NaHCO₃, 使 pH 为 7.0 左右。

瘤胃液的制备: 将瘤胃液静置, 倾取上清

液, 经多层纱布过滤, 121℃ 灭菌 30 分钟, 冷却后 5000r/min 离心 30 分钟, 取上清液保存于低温冰箱。

培养基的制备系采用改良的 Hungate 厌氧技术^[7,8], 充氮厌氧条件下进行。

(二) 富集培养与分离

取自湖南省常德市酒厂下水道污泥, 用 Hungate 的厌氧技术, 取少量污泥样品加入到 100ml 血清瓶中(内装 50ml 上述组分培养液), 进行富集, 在培养液中加入进无氧青霉素, 最终浓度为 3000u/ml, 用 0.5% HCOONa 或 H₂/CO₂ (70/30) 混合气体作碳源和能源, 混合气体是在两个大气压下充气^[9]。在 37℃ 富集培养, 采用气相色谱仪测定甲烷, 甲烷形成后, 以 10 倍稀释法进行滚管分离培养, 接种前仍以上法加入 Na₂S · 9H₂O 和 NaHCO₃、HCOONa、青霉素, 若以 H₂/CO₂ 为碳源, 换气 1 分钟。滚管培养形成菌落后, 先测定试管中甲烷, 再用荧光显微镜检查荧光菌落。将荧光菌落挑出, 再度稀释滚管, 重复上法, 以得到

本文于 1986 年 3 月 1 日收到。

承浙江农业大学微生物教研组的支持; 陈美慈、冈航同志的帮助; 冯健同志和湖南医学院曾庆善同志拍摄电镜照片, 在此一并致谢。

纯菌为止。在获得纯化菌后,用纯化鉴定培养基进行培养,并在显微镜下检查其纯度。

(三) 形态观察

菌的形态观察采用 Olympus CH 相差显微镜,荧光观察采用 Olympus BH 荧光显微镜,电镜观察用 EMU-3G 和日立牌 H600 型电子显微镜。

(四) CH_4 测定

用 102G 型气相色谱仪,以 N_2 气为载气,层析柱以 GDX104 为担体,热导池法测定,测定数据均以厌氧试管或血清瓶中液体上部有效容积中甲烷总含量微摩尔数表示。

(五) 碳源利用测定

用 50ml 血清瓶装入 20ml 上述组分的培养基,在培养基中加入下列不同的碳源: H_2/CO_2 , HCOONa , CH_3COONa , CH_3NH_2 , CH_3OH , 其浓度 CH_3COONa , CH_3NH_2 为 0.05M, HCOONa 与 CH_3OH 为 0.5%, H_2/CO_2 (70/30) 用两个大气压充入,接种培养 48 小时的菌液 2%, 试验重复三次,在 37°C 振荡培养 10 天,测定甲烷含量。

(六) 温度测定

用厌氧试管各装入上述组分培养基 4.5ml,以甲酸为碳源,同法接种 2% 菌液,温度分为 25、30、35、40、45、50°C,重复三次,静止培养 10 天,测定甲烷含量。

(七) pH 值测定

用 50ml 血清瓶各装入 20ml 上述组分培养基,接种前同法将 pH 调至 7.0,再用无氧无菌的 10% Na_2CO_3 或 HCl 调 pH 为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5; 以甲酸为碳源,分别接种 2%, 在 37°C 静止培养 7 天,测定甲烷含量和终点 pH, 生长最适 pH 按初始生长 pH 计算。

(八) 生长速率测定

在 20ml 厌氧试管中各装入 10ml 上述组分培养基,内加 0.2% 酵母膏和 0.2% 胰酶解酪蛋白,以甲酸为碳源, pH 为 7.0, 接种 2% 菌液,置 37°C 静止培养,每隔 8 小时,用血球计数器在显微镜下直接计数,试验重复三次。

结果与讨论

(一) 菌落和菌体形态特征



图 1 CC81 菌株的细胞 ($\times 1,500$)

Fig. 1 Cells of strain (C81)

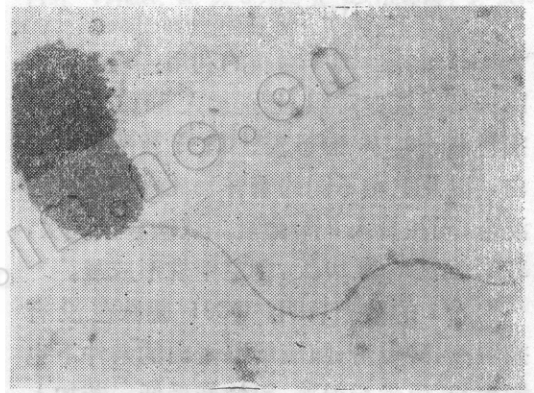


图 2 CC81 菌株的电镜照片 ($\times 10,000$)

Fig. 2 Electron micrograph of strain CC81

CC81 菌株菌体短杆状,大小为 $0.6-0.8 \times 1.5-2.0 \mu\text{m}$, 直形或稍带弯曲,两端圆钝,运动,具一根端生鞭毛,革兰氏染色阴性,不形成芽孢,通常是单个存在,从不成链,菌落圆形,边缘完整,凸镜状,培养 15 天后直径 0.7—1mm,半透明,初为乳白色,后中央呈褐黄色,菌落和活菌体在荧光显微镜下呈现蓝绿色荧光。

(二) 生理和营养性状

1. 试验结果表明,CC81 菌株不能利用 CH_3COONa 、 CH_3OH 和 CH_3NH_2 , 只能利用 H_2/CO_2 和 HCOONa 为能源和组成细胞的碳源。

表1 瘤胃液、酵母膏、胰酶解酪蛋白对 CC81 菌株生长的影响

Table 1 Effect of rumen fluid, yeast extract and trypticase on growth of strain CC81

营养物质 Nutrients	CH ₄ ($\mu\text{mol}/\text{瓶}$ bottle)
对照 Control	22.35
对照 Control + R	232.25
对照 Control + Y	320.70
对照 Control + T	221.70
对照 Control + R + Y	546.26
对照 Control + R + T	231.81
对照 Control + Y + T	544.22
对照 Control + R + Y + T	552.63

注: R; 30% 瘤胃液 (Rumen fluid); Y; 0.2% 酵母膏 (Yeast extract); T; 0.2% 胰酶解酪蛋白 (Trypticase)。

2. 对其他营养物质的利用: 培养基中除去瘤胃液作对照, 分别加入 30% (V/V) 瘤胃液、0.2% 酵母膏、0.2% 胰酶解酪蛋白, 以及三种不同的营养物质进行不同的混合, 同法接入 2% 菌液。试验重复三次, 37°C 振荡培养 10 天, 测定甲烷形成量。

表 1 的结果表明, CC81 菌株在没有瘤胃液、酵母膏、胰酶解酪蛋白的条件下也能生长, 但生长很差, 甲烷产量低。若加入 30% 瘤胃液或 0.2% 酵母膏、0.2% 胰酶解酪蛋白, 对菌株生长有明显的刺激作用, 甲烷产量高。在无瘤胃液的营养组合中生长良好, 表明 CC81 菌株不需要外源辅酶 M (只有瘤胃液含有辅酶 M)。

3. 温度测定: 图 3 表明 CC81 菌株在 25°—45°C 均能生长, 最适生长温度为 40°C, 50°C 不产甲烷, 由于甲烷产量与菌体的生长量成正比, 甲烷产量能灵敏地表明菌体生长量^[2]。

4. pH 值测定: 图 4 表明 CC81 菌株生长的 pH 范围为 5.5—7.5, 最适 pH 值为 7.0, 说明 CC81 菌株宜于生长在中性环境中。

(三) 菌株生长速率

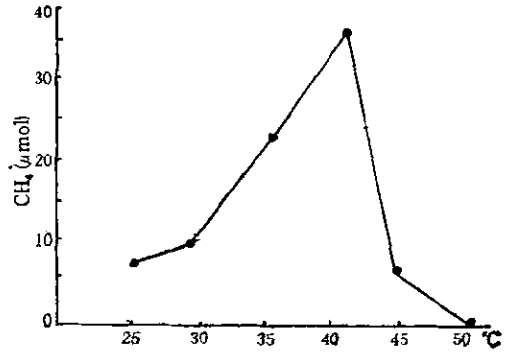


图 3 温度对 CC81 菌株生长的影响

Fig. 3 Effect of temperature on growth of strain CC81

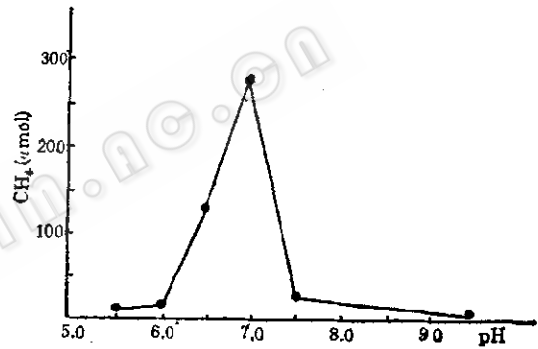


图 4 pH 值对 CC81 菌株生长的影响

Fig. 4 Effect of pH on growth of strain CC81

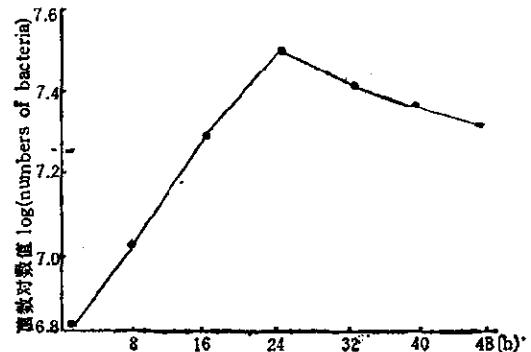


图 5 CC81 菌株生长速率

Fig. 5 Growth rate of strain CC81

图 5 表明 CC81 菌株在前述最适生长条件下, 菌数倍增时间为 11—12.5 小时,

当菌数达到高峰后,可能是菌体发生自溶,导致菌数下降。

根据 CC81 菌株革兰氏染色阴性,短杆状稍带弯曲,具一根端生鞭毛,能运动,不利用乙酸盐,也不需外源辅酶 M,它与瘤胃甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter ruminantium*)^[10]、史氏甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter smithii*)^[11] 均不相同,而与活动甲烷微生物 *Methanomicrobium mobile* CC81。

参 考 文 献

- [1] Zeikus, T. G.: *Anaerobic Digestion*, Elsevier Biomedical press, B. V., pp. 23—35, 1981.
[2] 钱泽澍: 微生物学报, 24(2): 105—110, 1984。
[3] 赵一章等: 微生物学报, 24(2): 99—104, 1984。

- [4] 赵一章等: 微生物学报, 25(3): 187—193, 1985。
[5] 许宝孝等: 微生物学报, 25(4): 283—288, 1985。
[6] Yitai Liu et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 600—613, 1985。
[7] Hungate, R. E.: *Method in Microbiol.*, 3B: 117—132, 1969。
[8] Bryant, M. P.: *Am. J. Clin.*, 25: 1324—1328, 1972。
[9] Balch, W. E. and R. E. Wolfe: *Appl. Environ. Microbiol.*, 32: 781—791, 1976。
[10] Smith, P. H. and R. E. Hungate: *J. Bacteriol.*, 75: 717—718, 1958。
[11] Balch, W. E. et al.: *Microbiol. Rev.*, 43: 260—296, 1979。
[12] Bryant, N. P.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974。
[13] Paynter, M. J. B. and R. E. Hungate: *J. Bacteriol.*, 95: 1943—1951, 1968。

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *METHANOMICROBIUM MOBILE* CC 81

Chen Ge

(Agricultural School of Changde Prefecture, Changde, Hunan)

Luo Yonglan

(Branch of Changde Agricultural College of Hunan Province, Changde)

Qian Zeshu*

(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou)

A strain CC81 of methanogenic bacteria was isolated from sewage in brewery of Changde city, Hunan province by improved Hungate technique. The cells are short rods ($0.6-0.8 \times 1.5-2.0 \mu\text{m}$) with rounded ends. They are motile by a single polar flagellum, nonsporeforming, Gram negative, and frequently occur single, never in chain. Its colonies are small, round and convex with entire edge, the color is translucent from greyish white to produce brownish yellow in the center of colony. Only formate or H_2/CO_2 can be used as carbon and energy sources for growth and methanogenesis. Neither growth and methane formation when H_2/CO_2 or formate was replaced by methanol, acetate or methylamine. Yeast extract, trypticase and rumen fluid stimulated growth and methane for-

mation, but it does not require exogenous CoM. The strain grows at temperature between 25 and 45°C with optimum at 40°C and pH values between 5.5 and 7.5 with optimal growth at 7.0. In the medium containing 0.2% yeast extract and 0.2% trypticase at temperature 37°C, the doubling time is 11-12.5 hours. The morphological and physiological properties are similar with *Methanomicrobium mobile* and named *Methanomicrobium mobile* CC81.

Key word

Methanomicrobium mobile

* i.e. Chien Tse-shu