

一株厌氧纤维素分解细菌的分离和鉴定

谭蓓英 王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从猪粪、玉米秸作原料的甲烷发酵瓶中,分离到一株中温厌氧纤维素分解细菌。在纸浆纤维素琼脂滚管中的表层菌落为圆形,具有不规则边缘,深层菌落为扩散形。菌落白色或淡黄色,周围溶纤维素透明圈的直径一般可达10—30mm。细胞革兰氏染色阴性,稍弯杆状,0.6—0.8×2—5.5μm (活细胞),具有周生鞭毛,能运动。芽孢卵至球形、端生(有时次端生),直径1—1.2×1—1.5μm。最适生长温度35—40℃,最适 pH7.0—7.5。DNA的G+C含量为35mol% (热变性中点方法)。该菌利用木聚糖、纤维二糖、淀粉、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、麦芽糖和七叶苷。用纤维素或葡萄糖发酵,产物有氢、二氧化碳、乙醇、乙酸、丁醇和丙酮酸。该菌株与C菌株十分相似^[1],认为它们是同一个种。

关键词 厌氧纤维素分解菌

近几年,随着人们对纤维素废物利用(通过厌氧降解把纤维素转化为乙醇、有机酸等有价值的化工原料)的重视,对厌氧纤维素分解细菌进行了研究^[1-9]。它们主要是梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)和拟杆菌科(*Bacteroidaceae*)的一些种。

我们在测定用猪粪、玉米秸作原料的甲烷发酵瓶中厌氧纤维素分解细菌的数量(用MPN方法)时,分离到一株纤维素分解活性高的厌氧细菌。本文报道该菌株的分离和鉴定。

材料和方法

(一) 厌氧培养方法

培养基的制备和全部试验操作使用亨格特(Hungate)厌氧技术^[10,11]。以无氧N₂或N₂:CO₂=4:1为气相,用厌氧管装液体或固体培养基完成各项试验。在扩大培养细胞时(为分离DNA)使用圆底烧瓶,用橡胶塞密封。在35℃常规培养。

(二) 培养基

1. PY 纸条培养液:

精解蛋白胨(蛋粉酶解) 0.05g; 胰酶解酪素

(Trypticase, peptone, BBL) 0.05g; 酵母粉(Sigma) 0.1g; 盐溶液 I 1ml; 盐溶液 II 0.1ml; 维生素液 1ml; 刃天青(0.1%), 0.1ml; 半胱氨酸盐酸盐 0.05g; 蒸馏水 100ml; 用 NaHCO₃ 调 pH7 (约 0.1g)。分装厌氧管,每支装 4.5ml,并在管中放一条滤纸(Whatman No.1) 6×1cm, 121℃ 灭菌 30 分钟。

盐溶液 I (g/100ml): KH₂PO₄ 2; Na₂HPO₄ · 12H₂O 3; NH₄Cl 5; MgSO₄ · 7H₂O 0.5; CaCl₂ · 2H₂O 1; FeSO₄ · 7H₂O 0.2。

盐溶液 II (g/100ml): MnSO₄ · H₂O 0.5; ZnSO₄ · 7H₂O 0.1; CoCl₂ · 6H₂O 0.1; Na₂MoO₄ 0.025; CuSO₄ · 5H₂O 0.1; H₃PO₄ 0.5。

维生素液 (mg/100ml): 生物素 0.002; 叶酸 0.2; B₆ 0.01; B₂ 0.005; B₁ 0.005; 烟酸 0.005; 对氨基苯甲酸 0.005; B₁₂ 0.01; D-泛酸钙 0.005。

2. PY 纸浆培养基(液体、固体): 用纸浆代替纸条,其他组份与 PY 纸条培养液相同。固体培养基加 2% 琼脂。纸浆的制备: 用 2% (W/V) Whatman No. 1 滤纸加蒸馏水球磨三天。纸浆用量(用滤纸干重 W/V 表示): 液体培养基为

本文于 1986 年 3 月 10 日收到。

0.1%；固体培养基为 0.3%。

3. PY 纤维二糖培养液：用 1% (W/V) 纤维二糖代替纸条，其他组分与 PY 纸条培养液相同。

4. PY 培养液：不含纸条、纸浆或纤维二糖的基础培养液。

5. PYG 培养基：含量丰富的 PY 液加葡萄糖^[12]。

(三) 分离和纯化

从猪粪、玉米秸作原料的不同发酵瓶中取样，在 PY 纸条培养液中进行系列稀释。经过培养，选纸条分解快的培养液接种至 PY 纸浆固体培养基中继续进行系列稀释，并作成滚管。培养一周后，有透明圈的菌落逐渐明显和长大，用弯尖的毛细管吸取透明圈大的菌落，接种至 PY 纸浆固体培养基中，继续进行系列稀释作滚管。再分别在 PY 纸浆固体培养基和 PY 纤维二糖固体培养基上，重复以上操作若干次，以进行纯化。直至滚管中菌落均一，显微镜下细胞形态均一，才认为是纯菌株^[10]。

(四) 显微术

用显微镜检查活细胞和革兰氏染色细胞。用透射电镜 (H-500 型) 检查鞭毛。为了观察鞭毛，首先将该菌接入 PY 纤维二糖培养液培养两天或三天，然后离心 7,000r/min，20 分钟，弃上清液，用无菌蒸馏水配成菌悬液，不摇，滴至喷过碳的火棉胶铜网膜上^[13]，钨合金投影，25 度角。

(五) 生长底物和生化反应

参考 Holdeman^[12] 和 Leschine^[1] 的方法研究生长底物和生化特性。进行生长底物试验时，将所试碳源分别配成 5% 或 10% (W/V) 溶液，121℃，15 分钟灭菌。接种前按所试碳源的终浓度要求加至灭菌的 PY 培养液中，用目测浊度的方法检验生长情况。

(六) DNA 碱基组成

用 PY 纸浆培养液培养，得到的细胞不用溶菌酶而只用十二烷基磺酸钠 SDS (MERCK) 破碎细胞壁。DNA 的分离和热变性测定见林万明等的方法^[14]。用大肠杆菌 K12 (AS 1.365) 作对照菌株。

(七) 发酵产物的分析

用气相色谱法。

1. 测挥发酸和醇类：取 1ml 培养液，酸化至 pH3。离心，取上清液进样。测挥发酸柱温 210℃，测醇类 150℃。其他条件如下。

2. 测非挥发酸：取 1ml 培养液加 2ml 甲醇，0.4ml 50% H₂SO₄，于 60℃ 水浴 30 分钟进行甲酯化反应。然后加 1ml 蒸馏水和 0.5ml 氯仿，充分摇混，离心破乳，弃上清液，取氯仿层进样。以岛津 GC-7AG 色谱仪，不锈钢柱 1m 装 GDX-401 担体，60—80 目，氢焰检测器。N₂ 作载气，流速 50ml/min，H₂ 气流速 50ml/min，空气 500ml/min。汽化室温度 220℃，柱和检测器 210℃。

3. 测 H₂：使用 2304A 型色谱仪 (北京分析仪器厂出品)。用热导检测器。柱长 1m，装 TDX-02 担体，60—80 目。柱温 120℃，N₂ 作载气，流速 45ml/min。

4. 测 CO₂：使用 103 型气相色谱仪 (上海分析仪器厂出品)。用热导检测器。柱长 2m，装 TDX-02 担体，60—80 目。柱温 120℃。H₂ 作载气，流速 45ml/min。

测气体 H₂ 和 CO₂，使用带关闭阀注射器进样。

(八) 生长 pH 和温度

用 PY 纤维二糖培养液，100% N₂ 作气相进行细菌培养^[13]。在 pH 试验中，用 NaHCO₃ 调 pH，pH 值从 4.5 到 8.0，间隔约 0.5，共 8 个梯度。在温度试验中，用 NaHCO₃ 调初始 pH 值至 7.0。从 15℃ 到 55℃，间隔 5℃，共 9 个梯度。然后用 721 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂出品) 在 660nm 处测 A 值表示细菌的生长。

结 果

采用这种富集和筛选方法，从不同批次的发酵瓶中得到了三株菌，它们在菌落和细胞形态，革兰氏染色和代谢产物的色谱分析结果上均为一致。它们非常相似，仅取其中一株 (No. 1711) 进行了深入研究。

(一) 菌落和细胞形态

1711 菌株是一株纤维素分解活性高的专性厌氧细菌。它在含纸浆纤维素的滚管中 2.5 天，出现可见的透明圈和菌落。深

层菌落为圆形,具有不规则边缘,三周后菌落直径 2—3mm。解剖镜下观察像半透明的膜状体堆积成丛,表面菌落呈扩散形。菌落白色或淡黄色。其周围分解纤维素的透明圈直径 10—20mm。在菌落稀少的滚管中,透明圈直径可达 30mm (图 1),继续培

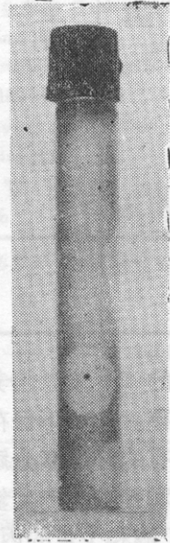


图 1 分离菌株在纤维素滚管中的菌落
(标尺为 10mm)

Fig. 1 Colonies of the isolate in cellulose roll tube

养其直径还可增大。该菌株在不同生长阶段其细胞总是染成革兰氏阴性。在 PY 纸条 (纸浆) 培养液中细胞形态和大小与在 PYG 培养基中的相近,呈稍弯的杆状,活细胞 $0.6—0.8 \times 2—5.5 \mu\text{m}$ (图 2-a),革兰氏染色细胞 $0.3—0.5 \times 2—5 \mu\text{m}$ 。在 PY 纸条 (纸浆) 培养液中 2—3 天出现端生的孢子 (图 2-b),卵形至球形,直径 $1—1.2 \times 1—1.5 \mu\text{m}$ (有时有次端生孢子)。加热试验^[12]表明,孢子在 80°C 下分别受热 10、20 和 30 分钟均能存活,甚至加热至 100°C , 20 分钟仍能存活。细胞具有周生鞭毛 (图

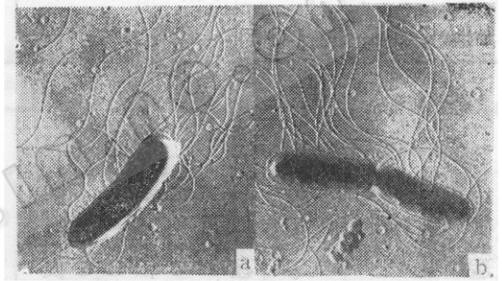


图 3 分离菌株细胞形态及鞭毛的电镜照片

a. 单细胞 ($\times 40,000$); b. 分裂细胞 ($\times 36,000$)

Fig. 3 Electron photomicrographs of cell morphology and flagella of the isolate

a. single cell; b. dividing cells.

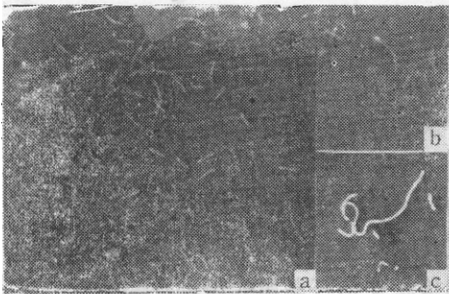


图 2 分离菌株的相差显微照片 ($\times 1,050$)

a. 在 PYG 培养基中的活细胞; b. 端生芽孢;
c. 旺盛生长的对数生长期。

Fig. 2 Phase-contrast photomicrographs of the isolate

a. living cells in PYG medium; b. terminal spore; c. vigorous growth of logarithmic phase.

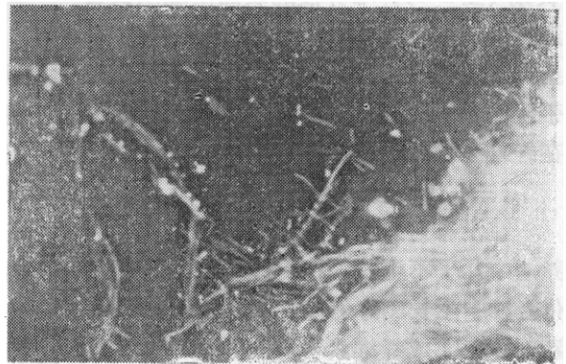


图 4 附着于纤维束的分离菌株细胞显微照片
($\times 1,050$)

Fig. 4 Photomicrograph of the isolate cells attaching to cellulose fibres

表 1 分离菌株与 C 菌株对碳水化合物利用的比较

Table 1 Comparison of isolate with C strains on utilization of some carbohydrates

碳水化合物 Carbohydrates	C 菌株 C strains	分离菌株 Isolate
纤维素 Cellulose	+	+
木聚糖 Xylan	+	+
纤维二糖 Cellobiose	+	+
D-葡萄糖 D-Glucose	+	+
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	+	+
D-木糖 D-Xylose	+	+
D-果糖 D-Fructose	-	-
D-甘露糖 D-Mannose	-	-
D-半乳糖 D-Galactose	-	-
羧甲基纤维素 Carboxymethyl cellulose	-	-
聚半乳糖醛酸盐 Popygalacturonate	-	-
乳糖 Lactose	-	-
蔗糖 Sucrose	-	-
淀粉 Starch	-	+
麦芽糖 Maltose	-	+

3), 容易观察到活跃运动。

(二) 生长特性

该菌株是在 30℃ 下分离出来的。温度试验表明生长的温度范围为 25—40℃, 最适温度 35—40℃。在 21℃ 和 45℃ 仅有微弱生长。生长的 pH 范围为 6.5—8.0, 最适生长范围为 7.0—7.5, pH6 微弱生长。发酵滤纸纤维素的终 pH 约 5.5。在 PY 纸条(纸浆)培养液中第 2—3 天进入对数生长期(图 2-c), 培养液的表面出现从试管底部升起的气泡, 纸条开始分解, 有时由旺盛升起的气泡把已分解的纤维素渣从管底带至液体表面。显微镜下观察, 细胞粘附在纤维束表面(图 4)。

(三) 生理生化特性

在没有可发酵的碳水化合物的 PY 培养液中几乎不生长。在一些可发酵的碳水化合物中生长良好(见表 1)。用微晶纤维素(Avicel)或纤维素粉 CF-11(Whatman)代替滤纸纤维素进行滚管培养, 可见该菌株也利用这两种纤维素形成明显的菌落, 但透明圈很小或无。

本试验所用的 PY 纸条培养液很适合该菌的生长和保存。5℃ 下保存 8 个月仍然存活并保持原有的纤维素分解活性。

发酵纤维素和葡萄糖产生氢、二氧化碳、乙醇、乙酸、丁醇和少量的丙酮酸。

DNA G + C 含量为 35mol%。

明胶液化试验、牛奶试验和触酶产生试验均为阴性结果。

讨 论

根据《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版^[12]的鉴定表, 分离菌株属于梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)第 III 组的成员。查阅 III 组所有种和 1980 年细菌名称表^[16]和厌氧菌实验室手册^[12]以及 1980 年以后发表的梭状芽孢杆菌属的新种, 揭示出分离菌株与 *C. papyrosolvans*^[3] 和 *C. cellobioparum*^[12, 15, 17] 相近, 与 C 菌株^[13]几乎相同。

从表 2 和表 3 可以看出该菌株与 *C. cellobioparum* 在芽孢类型等表型特征上相似, 但从偏低的 G + C 含量和产物以及发酵类型方面又不相同。该菌株与 *C. papyr-*

表 2 分离菌株的特征及其与有关菌株的比较

Table 2 The characters of isolate and its comparison with related strains

特征 Characters	<i>C. cellobio- parum</i> ^[1,2]	<i>C. papyro- vens</i> ^[3]	C 菌株 C strain	分离菌株 Isolate
细胞形态 Cell morphology				
直杆 Strait rods	+	+	-	-
弯杆 Curved rods	-	-	+	+
革兰氏染色 Gram stain	-	-	-	-
卵至球形、端生芽孢 Oval to spher- ical, terminal spores	+	+	+	+
周生鞭毛 Peritrichous flagella	+	+	+	+
运动性 Motility	+	+	+	+
生长温度 Growth temperature				
最适 Optimum °C	30—37	25—30	30—40	35—40
范围 Range °C	>25 <45	15—45	>15 <45	21—45
G + C mol%	25	30	31—33	35

* 只有球形芽孢 (spherical spores only)。

表 3 发酵产物和底物利用

Table 3 Fermentation products and substrates used

	<i>C. cellobio- parum</i> ^[1,2]	<i>C. papyro- vens</i> ^[3]	C 菌株 C strain	分离菌株 Isolate
产物 Productes				
乙酸 Acetic acid	+	+	+	+
乙醇 Ethanol		+	+	+
乳酸 Lactic acid		+	+	-
丙酮酸 Pyruvic acid		-	+	+
琥珀酸 Succinic acid		-	+	-
丁醇 Butanol		-	-	+
H ₂		+	+	+
CO ₂		+	+	+
底物 Substrates				
半乳糖醇 Dulcitol	+	-		-
甘油 Glycerol	±	+		-
甘露醇 Mannitol	±	-		-
蜜二糖 Melibiose	+	-		-
棉子糖 Raffinose	+	-		-
山梨醇 Sorbitol	+	-		-
核糖 Ribose	+	+		-
七叶苷 Esculin	-	+		+

osolvans 在 G + C 含量、底物发酵类型和产物上相近,但是细胞和孢子形态又不同。然而把该菌株与 C 菌株相比(见表 1—3),可以看出它们在弯杆形细胞、端生的卵至球形芽孢等表型特征上以及生长温度、发

酵产物、发酵的终 pH 和底物发酵类型各方面均相同或极相似。G + C 含量的测定均采用热变性方法,结果比较接近。该菌株发酵产物有丁醇,这与 C 菌株不同,丁醇含量低于乙醇和乙酸。至于 C 菌株有乳

酸,在我们的色谱分析中也有痕迹量。在底物利用方面,除了C菌株不能利用麦芽糖和淀粉以外,其他特性与C菌株相同。因此,可以认为分离菌株与C菌株是同一种。

参 考 文 献

- [1] Leschine, S. B. and E. Canale-Parola: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**(3): 728—737, 1983.
 [2] Patel, G. B. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **30**(1): 179—185, 1980.
 [3] Madden, R. H. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **32**(1): 87—91, 1982.
 [4] Madden, R. H.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**(4): 837—840, 1983.
 [5] Murray, W. D.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**: 185—187, 1984.
 [6] Sleat, R. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**(1): 88—93, 1984.
 [7] Petitdemange, E. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**: 155—159, 1984.
 [8] Sleat, R. and R. A. Mah: *Int. J. Syst. Bacte-*

- riol.*, **35**(2): 160—163, 1985.
 [9] Montgomery, L. and J. M. Macy: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 1435—1443, 1982.
 [10] Hungate, R. E.: *Bacteriol. Rev.*, **14**: 1—49, 1950.
 [11] Hungate, R. E.: *Methods in Microbiology*, Vol. 3B Academic Press. Inc., J. R. Norris and D. W. Ribbons ed., New York, pp. 117—132, 1969.
 [12] Holdeman, L. V. et al.: *Anaerobe laboratory manual*, 4th ed., Anaerobe laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.
 [13] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: «一般细菌常用鉴定方法», 科学出版社, 北京, 第180; 120页, 1978。
 [14] 林万明等: *微生物学通报*, **8**(5): 245—247, 1981。
 [15] Smith, L. D. and G. Hobbs: *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., R. F. Buchanan and N. E. Gibbons ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 551—572, 1974.
 [16] Skerman, V. B. D. et al. (ed.): *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **30**: 225—420, 1980.
 [17] Huggate, R. E.: *J. Bacteriol.*, **48**: 499—513, 1944.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANAEROBIC, CELLULOLYTIC BACTERIUM

Tan Peiyang Wang Dasi

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A strain of mesophilic cellulolytic anaerobes was isolated from a methanogenic fermenter with pig dung and corn stock as raw materials. The surface colonies of these bacteria in cellulose agar roll-tubes were round with irregular margin, deep ones were diffuse, white or yellowish. Clear zones of cellulolysis surrounding the colonies might reach generally 10—30 mm. Cells were Gram negative and slightly curved rods, $0.6—0.8 \times 2—5.5 \mu\text{m}$ (living cells) with peritrichous flagella and motile. Spores were oval to spherical, $1—1.2 \times 1—1.5 \mu\text{m}$ in diameter, terminal (sometimes subterminal). Optimal growth

occurred at $35^{\circ}—40^{\circ}\text{C}$ and pH 7.0—7.5. The guanine plus cytosine content of DNA was 35 mol% (Tm). Based on the carbon sources tested, xylan, cellobiose, starch, D-xylose, L-arabinose, D-glucose, maltose, and esculin were utilized. Fermentation products from cellulose and glucose were hydrogen, carbon dioxide, ethanol, acetate, butanol and pyruvate. The isolate was very similar to C strains. We think that they are the same species.

Key word

Anaerobic cellulolytic bacteria