

从豆制品废水厌氧发酵液分离的一个螺旋体新种

刘聿太 白文响 王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用 Hungate 厌氧技术, 从豆制品废水厌氧发酵液分离到一株厌氧生长、细胞柔软、活跃运动、产红色素的螺旋体细菌。能发酵多种碳水化合物, 主要产物是乙酸盐、乙醇、 H_2 和 CO_2 。生长要求酵母膏, 可利用 NH_4Cl 和蛋白胨为氮源生长。不要求 $NaCl$ 。最适生长温度为 $30-35^\circ C$ 。DNA 的 G + C 含量为 49 mol%。按照《伯杰氏细菌学手册》(1984 年版), 此菌属于螺旋体属中的一个新种, 命名为产红螺旋体 (*Spirochaeta rhodogenes* n. sp.)。

关键词 螺旋体; 厌氧菌

沼气发酵微生物的研究表明, 有机物降解形成甲烷的过程是在厌氧条件下由多种细菌共同完成的。我们在豆制品废水厌氧发酵液产甲烷菌计数的滚管中, 发现 10^{-1} 和 10^{-2} 的滚管培养后呈桔红色, 10^{-3} 和 10^{-4} 滚管中可看到橙色的单个菌落。其特征的测定结果表明, 它是一种新的专性厌氧的螺旋体。因其旺盛生长物产生红色素, 我们把它命名为产红螺旋体——*Spirochaeta rhodogenes* sp. nov.。其分离过程及特征报道如下。

材料和方法

(一) 样品及分离

样品来自实验室正常运转两年的豆制品废水厌氧发酵液, 用 Hungate 厌氧技术^[1]操作。在用于分离产甲烷菌的氢和二氧化碳为底物、含有 0.2% 酵母膏和酪素水解物的滚管中, $37^\circ C$ 培养, 5—6 天后, 在 10^{-1} 和 10^{-2} 的滚管中可看到生长很差的橙色菌落。将此菌落挑出、稀释, 用含有葡萄糖的培养基滚管, 3—4 天后出现生长良好的红色菌落。滚管几次, 得到纯培养物, 工作号为 8603。

(二) 培养基

分离用培养基成份如下: NH_4Cl 1g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.4g; 酵母膏 2g; 胰

酪素水解物 (trypticase) 2g; 微量元素溶液^[2] 10ml; 维生素溶液^[2] 10ml; 半胱氨酸盐酸盐 0.5g; $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.5g; $NaHCO_3$ 1g; 刃天青 0.0001g; 葡萄糖 5g; 蒸馏水 1000ml; 气相 N_2 ; 最终 pH 7.0—7.2。

供试培养基用等量的蛋白胨代替酪素水解物。

培养基制备过程: 首先在圆底烧瓶中加入适量的蒸馏水, 将以上成份 ($NaHCO_3$ 、 Na_2S 、半胱氨酸盐酸盐及葡萄糖除外) 加入烧瓶中, 插入无氧的氮气针头, 煮沸 20—30 分钟, 停止加热, 加入半胱氨酸, 凉至 $50^\circ C$ 以下分装, $121^\circ C$ 30 分钟灭菌备用。接种前加入 $NaHCO_3$ 、 Na_2S 和葡萄糖的无氧无菌贮液, 最终 pH 为 7.0—7.2。

(三) 产物分析

气体分析: 北京分析仪器厂生产的 2304 A 型气相色谱仪, 热导, 载体 TDX-02, 碳分子筛 60—80 目, 载气 N_2 。

用带有密闭阀的注射器注射 0.5 ml 气体样品, 所得峰高与标准气峰高比较, 计算各种气体含量。

酸和醇的分析: 用 Shimadzu GC-7 AG 气相色谱仪, 氢火焰离子化检测器, Shimadzu Chroma-

本文于 1986 年 12 月 25 日收到。

承本所赵玉峰、苏京军、陈宇同志的协助, 在此一并致谢。

国家自然科学基金资助项目。

topac C-RIB 积分仪。色谱柱: 3 mm × 2 m 的不锈钢柱填充 80—100 目的 GDX-401; 柱温 210℃。进样器温 220℃; 载气 N₂, 90 ml/min; 空气 500 ml/min; 氢气 50 ml/min。

样品处理: 取培养液 1 ml, 注入 2.5 ml 的塑料离心管中, 加入 50% 的硫酸 0.02 ml, 塞紧摇匀, 10,000 r/min 离心 3 分钟。取 1 μl 上清液进样。

(四) 培养物生长测定

用上海第三分析仪器厂生产的 721 型分光光度计, 厚度为 1 cm 的比色杯, 波长 660 nm, 测定吸光度 (A)。

(五) DNA 中 G + C 含量的测定

DNA 的提取及 G + C 含量的测定用林万明等^[3]的方法。参比菌株为大肠杆菌 K₁₂ (中国科学院微生物研究所保藏号 AS 1.365)。

(六) 厌氧特性的测定

向已接种的液体培养基试管中注入不同量的无菌空气, 35℃ 培养, 测定生长。

结 果

此螺旋体的旺盛生长物产生红色素, 因此极易与其他细菌相区别。3—4 天可在滚管中形成圆形、光滑、稍扩展的红色菌落, 其直径约 1 mm。个体为 0.3—0.4 × 3—15 μm 或更长的螺旋体, 革兰氏染色阴性。幼龄培养物, 在相差显微镜下可观察到活跃游动的以及柔软的细胞所具有的曲

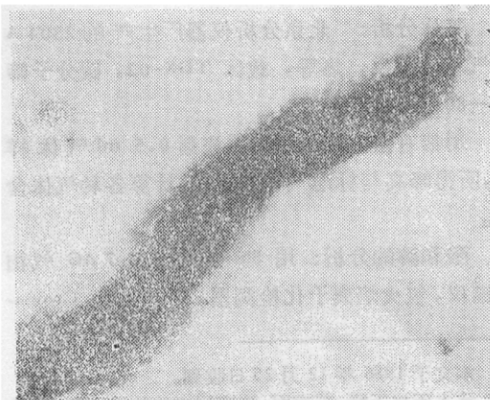


图 1 菌株 8603 (40,000 ×)
Fig. 1 Strain 8603

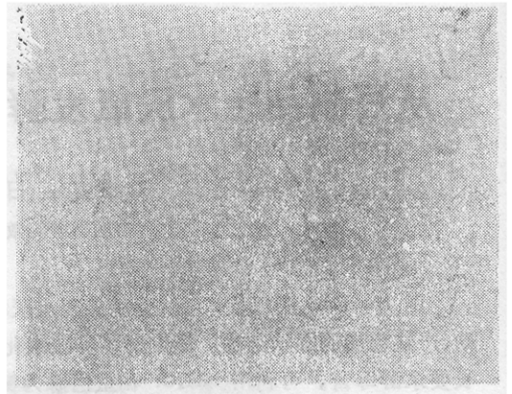


图 2 菌株 8603 (1,000 ×)
Fig. 2 Strain 8603

表 1 氧对菌株 8603 生长的影响

Table 1 Effect of oxygen on growth of strain 8603

空气 Air (ml)	A	产甲烷球菌 (<i>Methanococcus</i> sp.) CH ₄ %
0	0.45	2.3
1	0.45	1.5
2	0.43	0
3	0.25	0
5	0.25	0
对 照 Control	0.25	0

注: 培养 1 周, 对照为未接种的培养基。

绕运动。在严格的厌氧培养基中生长良好, 暴露于空气中则停止生长。于容量为 25 ml, 盛有 5 ml 无氧液体培养基的试管中注入 3 ml 空气, 完全抑制生长, 2 ml 空气无明显影响, 比产甲烷菌有较强的耐氧性 (表 1)。最适生长温度 30—35℃, 最高生长温度 40℃, 45℃ 不生长。最适生长的 NaCl 浓度是 0—1%, 2.5% 抑制生长。此螺旋体生长要求酵母膏。在有酵母膏的情况下, 可利用无机氮 (NH₄Cl) 和有机氮 (蛋白胨) 为氮源, 葡萄糖为碳源生长。能利用多种碳水化合物 (表 2)。该菌株的发酵产物以及与已知种^[4]的特征比较分别列于表 3 和表 4。

表 2 碳水化合物利用
Table 2 Carbohydrates using

底 物 Substrates	菌株 8603	紧卷螺旋体 <i>S. stenostrepta</i>	朱氏螺旋体 <i>S. zuehlingerii</i>	海滨螺旋体 <i>S. littoralis</i>	橙黄螺旋体 <i>S. aurantia</i>	嗜盐螺旋体 <i>S. halophila</i>
L-阿拉伯糖 (L-Arabinose)	+	+	+	+	+	+
纤维二糖 (Cellulose)	+	+	+	+	+	+
糊精 (Dextrin)	+	+	+	+	+	+
卫矛醇 (Dulcitol)	-	-	-	-	-	-
D-果糖 (D-Fructose)	+	+	-	+	+	+
D-半乳糖 (D-Galactose)	+	+	+	+	+	+
D-葡萄糖 (D-Glucose)	+	+	+	+	+	+
菊粉 (Inulin)	+	+	-	+	+	+
乳糖 (Lactose)	+	+	-	+	+	+
麦芽糖 (Maltose)	+	+	+	+	+	+
甘露醇 (Mannitol)	+	+	-	+	+	-
D-甘露糖 (D-Mannose)	+	+	+	+	+	+
棉子糖 (Raffinose)	-	-	-	+	-	+
D-核糖 (D-Ribose)	-	+	-	-	-	-
山梨糖醇 (Sorbitol)	-	-	-	-	-	-
蔗糖 (Sucrose)	+	+	-	+	+	+
海藻糖 (Trehalose)	+	+	+	+	+	+
D-木糖 (D-Xylose)	+	+	+	+	+	+
L-鼠李糖 (L-Rhamnose)	-	-	-	+	+	+

表 3 发酵产物 ($\mu\text{mol}/100 \mu\text{mol}$ 葡萄糖)

Table 3 Fermentation products

底 物 Substrates	菌株 8603	紧卷螺旋体 <i>S. stenostrepta</i>		朱氏螺旋体 <i>S. zuehlingerii</i>	海滨螺旋体 <i>S. littoralis</i>		橙黄螺旋体 <i>S. aurantia</i>		嗜盐螺旋体 <i>S. halophila</i>
		A	B		A	B	A	B	
乙酸盐 Acetate	52.2	93	20.4	82	37.5	57.0	69.2	50.3	52.4
乙醇 Alcohol	94.5	84	146.2	ND	129.5	140.5	151.0	78.4	132.0
CO ₂	51	140	187.5	68	127.5	201.8	165.3	128.2	176.1
H ₂	58	180	27.2	164	74	74.4	107.2	79.5	130.3
乳酸盐 Lactate	TR	10	8.2	87	6.5	TR	1.0	17.2	1.8
丁醇 Butanol	31	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
丙二酸盐 Malonate	TR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

注: ND 未测定; NR 未报道; TR 微量。

结 论

螺旋体是化能异养细菌中一个小的解
体,它与其他细菌的主要区别是细胞细长,

具有柔软的细胞壁,所以菌体能伸曲,甚至
盘绕。菌株 8603 的显微镜观察表明,与螺
旋体的特征完全吻合。根据《伯杰氏细菌
学手册》(1984 年版),螺旋体目 (*Spirocha-*

表 4 种的特征
Table 4 Characteristics of the species of *Spirochaeta*

特 征 Characteristics	菌株 8603	折叠螺旋体 <i>S. plicatilis</i>	紧捲螺旋体 <i>S. stenostrepta</i>	朱氏螺旋体 <i>S. zuelzeri</i>	海滨螺旋体 <i>S. littoralis</i>	橙黄螺旋体 <i>S. aurantis</i>	嗜盐螺旋体 <i>S. halophila</i>
纯培养 Pure culture	+	-	+	+	+	+	+
细胞直径 (μm) Cell diameter	0.3—0.4	0.75	0.2—0.3	0.2—0.3	0.4—0.5	0.3	0.4
2 根鞭毛 Two flagella	+	-	+	+	+	+	+
多根鞭毛 Many flagella	-	+	-	-	-	-	-
专性厌氧 Obligate anaerobe	+	+	+	+	+	-	-
兼性厌氧 Facultative anaerobe	-	-	-	-	-	+	+
生长要求高浓度 NaCl High NaCl concentration required for growth	-	-	-	-	+	-	+
形成乙醇 Ethanol formed	+	-	+	-	+	+	+
形成琥珀酸盐 Succinate formed	-	-	-	+	-	-	-
最适生长温度($^{\circ}\text{C}$) Optimum growth T	30—35		30—37	37—39	30	25—30	35—40
产橙黄色素 Yellow-orange pigment formed	-	-	-	-	-	+	-
产红色素 Red pigment formed	+	-	-	-	-	-	+
mol G + C%	49		60	56	51	61—65	62

etales) 下有两科: 螺旋体科 (*Spirochaetaeae*) 和钩端螺旋体科 (*Leptospiraceae*)。钩端螺旋体科细胞直径仅 $0.1 \mu\text{m}$, 并且都是好氧生长, 所以菌株 8603 显然属于螺旋体科。螺旋体科下设 4 属: 螺旋体属 (*Spirochaeta*)、脊螺旋体属 (*Cristispira*)、密螺旋体属 (*Treponema*) 和包柔氏螺旋体 (*Borrelia*)。其中只有螺旋体属的成员是自由生活的, 其他 3 属的成员必须生活在宿主体内, 因此菌株 8603 属于螺旋体属。

《伯杰氏细菌学手册》(1984年版)螺旋体属列出了 6 个种。实验结果表明, 菌株 8603 与这 6 个种差别明显。橙黄螺旋体和嗜盐螺旋体与菌株 8603 有类似之处, 即均产色素, 但它们都是兼性厌氧菌, 而菌株 8603 是专性厌氧菌。产色素的嗜盐螺旋体要求高浓度 NaCl, 菌株 8603 不要求; DNA 的 G + C 含量差别也很大。海滨螺

旋体的 G + C 克分子含量 (51%) 与菌株 8603 (49%) 接近, 但前者要求高浓度 NaCl, 并且不产色素。另外, 碳水化合物的利用及代谢产物也有差别。因此, 菌株 8603 可定为螺旋体属中的一个新种, 命名为产红螺旋体——*Spirochaeta rhodogenes* sp. nov.

参 考 文 献

- [1] Hungate, R. E.: Methods in Microbiology, Vol. 3B, J. R. Norris and D. W. Riblins (Eds), Academic Press Inc., New York, pp. 117—132, 1969.
- [2] 钱泽树、敏 航: 《沼气发酵微生物学》, 浙江科学技术出版社, 杭州, 第 81 页, 1985 年。
- [3] 林万明等: 微生物学通报, 8: 245—247, 1981。
- [4] Krige, N. R. and J. G. Holt (Eds): Berg-ey's Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore, London, Vol. 1, pp. 38—47, 1984.

A NEW SPECIES OF *SPIROCHAETA* ISOLATED FROM ANAEROBIC DIGESTER FEEDING WITH SOYBEAN CAKE WASTE WATER

Liu Yitai Bai Wenxiang Wang Dasi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A red pigment producing, helically shaped, obligate anaerobic bacterium was isolated from soybean cake waste digester with the Hungate anaerobic technique. In liquid medium cells actively locomote in straight lines or nearly straight lines, and sometimes flexes. Many carbohydrates can be fermented with the mainly products of acetate, alcohol, CO₂ and H₂. Yeast extract was required for growth. Both NH₄Cl and peptone can be used as nitrogen source. Optimum temperature was 30—35°C for growth. Optimum NaCl concentration was 0—1.0% with the maximum

concentration of 2.0%. The G+C mol% of DNA was 49. According to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol 1, 1984), this bacterium obviously belong to the genus of *Spirochaeta*, but it differed from the species of *Spirochaeta* listed in the Bergey's manual in several respects. It is designed as a new species of *Spirochaeta*, *Spirochaeta rhodogenes* sp. nov.

Key words

Spirochaeta; Anaerobe