

从豆制品废水厌氧发酵液分离的一株新的产甲烷球菌

刘丰太 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中分离到一株细胞直径为 $0.5-1.2\mu\text{m}$ 的球形产甲烷细菌, 编号 8508。该菌株利用 H_2/CO_2 和甲酸盐生长产甲烷。生长要求乙酸盐、酵母膏和酪素水解物。最佳生长要求 $0.5-1.0\%$ 的 NaCl 或 MgCl_2 。生长的最适温度为 35°C , 最适 pH $7.0-7.3$ 。DNA 的 G + C 含量为 $41\text{mol}\%$ 。菌株 8508 可能是甲烷球菌属 (*Methanococcus*) 中的一个新种, 但还要通过 DNA 杂交、荧光抗体等测定证实。

关键词 产甲烷球菌; 产甲烷菌

由于产甲烷细菌特殊的生物学特性和产生沼气直接有关, 人们对这群菌的研究极为重视。产甲烷菌的纯菌研究只是本世纪五十年代 Hungate 厌氧技术^[1]问世之后才真正得以发展。近二十年, 甲烷菌新菌的分离报道迅速增长。至今, 已报道的新种有 30 多个。对它们的研究为阐明甲烷发酵微生物学奠定了基础。我们在豆制品废水厌氧发酵液优势产甲烷菌的研究^[2]中, 分离到 5 株产甲烷细菌, 其中一株为利用 H_2/CO_2 和甲酸盐生长产甲烷的球菌, 其特征与已报道的甲烷菌明显不同, 是一株新的产甲烷球菌。

材料和方法

(一) 样品及分离方法

样品为实验室运转两年的豆制品废水厌氧发酵液。用注射器无氧操作取样, 注入无氧无菌试管(气相 N_2), 立即(4 小时内)用装有液体培养基的试管(25ml 的试管装培养基 5ml) 10 倍系列稀释作为接种物, 用 Hungate 滚管技术^[1,3]直接滚管分离, 滚管几次, 直到获得纯培养物。菌落及细胞形态一致, 在含糖营养培养基中不生长。

(二) 培养基

1. 分离用培养基: NH_4Cl 1g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2g ; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.4g ; 酵母膏 (yeast extract)

2g; 胰酪酪素水解物 (trypticase) 2g; 瘤胃液 20ml; 发酵上清液 20ml; 微量元素溶液 10ml; 维生素溶液 10ml; 乙酸钠 1g; 半胱氨酸盐酸盐 0.5g ; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.5g ; Na_2CO_3 2g; 刃天青 0.001g , 蒸馏水 1000ml。固体培养基加入 18g 琼脂。气相为 1.5 大气压的 H_2/CO_2 ($\text{H}_2:\text{CO}_2$ 为 $3:1$)。

2. 常规实验及保存用培养基无瘤胃液和发酵上清液; 营养要求试验所用培养基不含有被测定物, 其他成份同分离用培养基。

3. 瘤胃液和发酵上清液的制备: 瘤胃内食物和豆制品废水厌氧发酵液经纱布过滤、高压灭菌, 离心 (5000r/min) 去掉沉淀。有氧或无氧操作分装小瓶, 灭菌备用。

4. 微量元素溶液 (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 ; NaCl 1.0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 ; CoSO_4 (或 CoCl_2) 0.1 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 ; H_3BO_3 0.01 ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 。

5. 维生素溶液 (mg/L): 硫胺素 5.0; 泛酸钙 5.0; 核黄素 5.0; 吡哆醇 10.0; 生物素 2.0; 叶酸 2.0; 维生素 B_{12} 0.10 ; 烟酸 5.0; 硫辛酸 5.0; 对氨基苯甲酸 5.0。

6. 培养基制备过程: 将培养基各组份 (Na_2CO_3 , Na_2S 和半胱氨酸除外) 加入到已放好蒸馏水的烧瓶中, 通入无氧 N_2 , 煮沸 20—30 分

本文于 1986 年 9 月 6 日收到。

承本所赵玉峰、苏京军、陈宇同志协助, 在此一并致谢。

国家自然科学基金资助项目。

钟,停止加热,加入半胱氨酸,待凉至 50°C 以下,无氧分装试管或培养瓶。 121°C 灭菌 30 分钟。接种或滚管前,加入 Na_2S 、 Na_2CO_3 的无氧无菌贮液、 H_2 和 CO_2 ,使最终 pH 为 7.0。

(三) 最适 pH 和 pH 范围的测定

首先进行 pH 预调,其步骤:向液体试管培养基中加入所有补加物并接种,然后加不同量的 HCl (2%) 和 Na_2CO_3 (10%) 的无氧无菌贮液,震荡 20—30 分钟,使其充分平衡。将培养基倒入小烧杯中,用 pH 计迅速测定 pH ,得到从 pH 5.0—8.5,间隔 0.3—0.5 的一系列 HCl 和 Na_2CO_3 溶液的加入量。然后每个 pH 值取 6 支试管,按预调所得到的量加入 HCl 和 Na_2CO_3 溶液,加入补加物并接种,震荡平衡,每个 pH 值取两管测 pH,其平均值为培养前 pH 。其余试管 37°C 摇床培养 1—3 天,测甲烷产量(少数 pH 值的培养物明显生长,但仍处于对数生长前期为好)。每个 pH 值取两支试管测 pH,与培养前 pH 比较。pH 变化不应超过 0.2,否则表明培养时间过长。将测得的甲烷产量为纵坐标,培养前 pH 为横坐标划曲线,甲烷产量最高的 pH 为生长的最适 pH。其余的试管培养两周以上,测定甲烷产量,明显产生甲烷的 pH 值为生长的 pH 范围。

(四) DNA 碱基组成 (G + C) 含量的测定

DNA 的提取及 G + C 含量的测定用林万明等^[4]的方法。参比菌株为大肠杆菌 K_{12} (中国科学院微生物研究所,保藏号 AS 1.365)。

(五) 气体分析

用北京分析仪器厂生产的 2304A 型气相色谱仪,热导,载体 TDX-02,碳分子筛 60—80 目,载气 H_2 。上海分析仪器厂生产的 103 型气相色谱仪,热导,载体 TDX-02,载气 H_2 。

用带有密闭阀的注射器注射 0.5ml 的样品气体,与标准气的峰高比较计算甲烷产量。

结 果

用系列稀释的豆制品废水厌氧发酵液作为接种物,用 Hungate 厌氧技术直接滚管, $35-37^{\circ}\text{C}$ 培养 10 天左右,用荧光显微镜观察,在高稀释度($10^{-6}-10^{-7}$)的滚管中可看到产荧光的圆型菌落,表面菌落直径

约 1mm,光滑、透明、灰白色,两周直径可达 2mm;琼脂内菌落圆型、半透明、淡黄、稍暗。共分离出 3 株菌落和细胞形态相同的纯菌(菌株 8508,8509,8510),选择菌株 8508 进一步测定生理生化特性。

个体为不规则的球形细胞(图 1),直径平均 $0.7-0.8\mu\text{m}$,范围是 $0.5-1.2\mu\text{m}$ 。液体培养物可看到由几个到上百个细胞组成的不紧密的聚集体,多数单生,未见运动,有纤毛,革兰氏染色阴性。

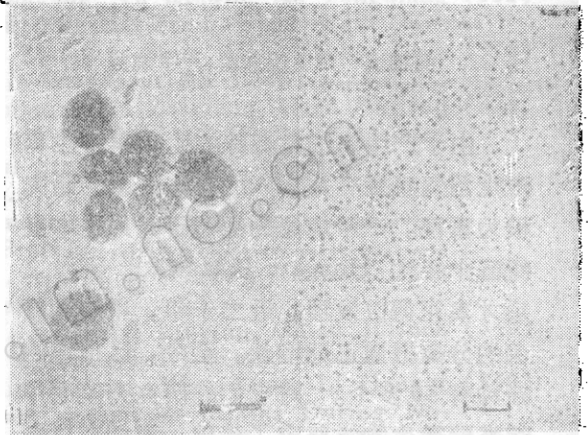


图 1 菌株 8508 的细胞形态

Fig. 1 Cell morphology of strain 8508

1. 标尺 = $1\mu\text{m}$; 2. 标尺 = $5\mu\text{m}$

利用 H_2/CO_2 和甲酸盐作为能源生长产甲烷,不利用甲醇、甲胺、三甲胺和乙酸盐等产甲烷底物生长。生长要求乙酸盐 (0.1%) 加酵母膏 (0.2%) 或乙酸盐 (0.1%) 加胰酶酪素水解物 (0.2%) (表 1)。生长的最适温度为 $35-37^{\circ}\text{C}$, 45°C 不生长 (两周);生长的最适 pH 为 7.0—7.3,范围为 5.8—7.9, 5.5 和 8.2 不生长 (两周) (图 2)。以 H_2/CO_2 为底物的增倍时间约 8 小时。在 1% 的十二烷基磺酸钠溶液中细胞很易溶解。浓度高达 1600 单位的青霉素 G 盐对生长毫无影响。DNA 的 G + C 含量为 41mol%。对氧极为敏感,试管培养物中注入 1ml 空气严重抑制生长,2ml 空气

完全抑制生长。

表 1 菌株 8508 的营养要求

Table 1 Nutrition requirement of strain 8508

基础培养基+(%) Basic medium	CH ₄ μmol
	0
Ac (0.1)	0
Y (0.2)	0
T (0.2)	0
Ac(0.1) + Y(0.1)	288
Ac(0.1) + Y(0.2)	405
Ac(0.1) + T(0.1)	286
Ac(0.1) + T(0.2)	359
Ac(0.1) + Rf(2.0)	119
Ac(0.1) + Slu(2.0)	30

注：培养两周 (Two weeks incubation)。Ac：乙酸盐 (Acetate)；Y：酵母膏 (Yeast extract)；T：胰酶酪素水解物 (Trypticase)；Rf：瘤胃液 (Rumen fluid)；Slu：发酵上清液 (Sludge supernatant)。

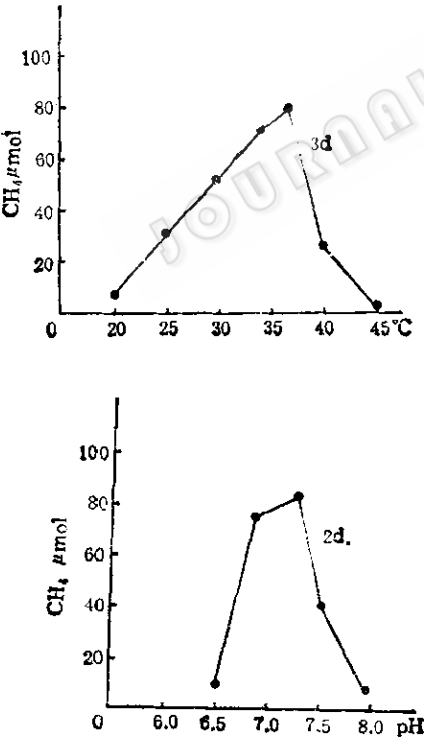


图 2 菌株 8508 生长的最适温度和最适 pH
Fig. 2 The optimum temperature and pH for strain 8508

实验结果表明,菌株 8508 的正常生长要求一定浓度的 NaCl 或 MgCl₂ (图 3)。用 (NH₄)₂SO₄ 代替 NH₄Cl, MgSO₄ 代替 MgCl₂, KOH 代替 Na₂CO₃, 乙酸钾代替乙酸钠的无 NaCl 的基础培养基,加入不同量的 NaCl,接种培养,测定 CH₄ 产量。结果表明,培养物的生长情况,不仅受培养基 NaCl 浓度的影响,而且与接种物 NaCl 的浓度有关(图 3)。接种物 NaCl 浓度为 0.5% 时,在 NaCl 为 0.5--1.0% 的培养基中生长迅速,在 NaCl 为 1.5% 的培养基中生长迟缓;接种物 NaCl 浓度为 2% 时,即使培养基的 NaCl 浓度高达 2%,也生长良好。延长培养 10 天,没加 NaCl 的对照瓶 (Na⁺ 为 4 mM, Cl⁻ 为 2 mM, 来自 Na₂S 和微量元素)产少量 CH₄。3.0% 的 NaCl 明显抑制生长。MgCl₂ 的试验结果与 NaCl 类似,0.5—1.0% 的 MgCl₂ 培养物生长良好,3.0% 的 MgCl₂ 抑制生长。然而菌株 8508 可在很宽的 MgSO₄ 浓度范围内生长,即使高达 10%,也不严重抑制生长。

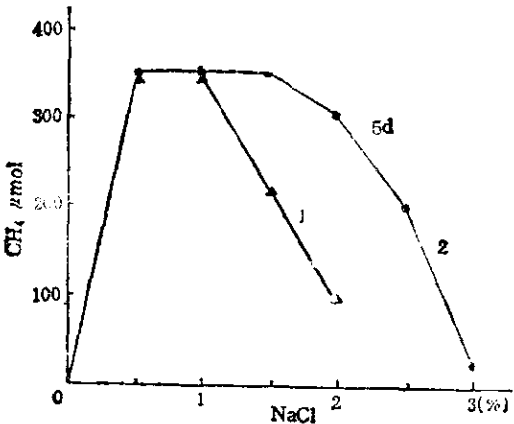


图 3 NaCl 浓度对菌株 8508 生长的影响

Fig. 3 Effect of NaCl concentration on growth of strain 8508

- 1. 接种物含 0.5% NaCl
0.5% NaCl contained in inoculum medium
- 2. 接种物含 2.0% NaCl
2.0% NaCl contained in inoculum medium

表 2 利用 H_2/CO_2 和甲酸盐的中温产甲烷球菌的特征
Table 2 Characteristics of methophilicly methanogenic cocci using H_2/CO_2 and formate as substrates

菌种(株)	生长底物	细胞直径 (μm)	运 动	最近 pH	最适温度 ($^{\circ}C$)	最高温度 ($^{\circ}C$)	最适 NaCl (%)	NaCl 范围 (%)	对 SDS 敏感	要求 乙酸盐	要求 酵母膏	要求酪素 水解物	G + C mol%
范尼氏甲烷球菌 <i>Mt. vannielii</i>	H_2/CO_2 甲酸盐	1—4	+	6.5—7.5	36—40		2.4		—	—	—	—	31.1
沃氏甲烷球菌 <i>Mt. voltae</i>	H_2/CO_2 甲酸盐	0.5—3.0	+	6.7—7.4	32—40		4.0	0.5—5.0		—	—		30.7
海沼甲烷球菌 <i>Mt. maripaludis</i>	H_2/CO_2 甲酸盐	1.0—1.3	+	6.8—7.2	35—39	47	>0.6	0—5.0	—	—	—		37
三角州甲烷球菌 <i>Mt. deltae</i>	H_2/CO_2 甲酸盐	1.0—1.5	—		37	45	3.5—4.0		+	—	—	—	40.5
卡列阿科产甲烷菌 <i>Mt. cariaci</i>	H_2/CO_2 甲酸盐	2—6	+	6.8—7.3	20—25		3.2		+	+	+	—	51.6
黑海产甲烷菌 <i>Mt. marisnigri</i>	H_2/CO_2	<1.3	+	6.2—6.6	20—25		1.1		+	—	—	+	61
奥林塔河产甲烷菌 <i>Mt. olentangyi</i>	H_2/CO_2	1.0—1.5	—		37	45	1.0		+	+	—	—	54.4
塔条山产甲烷菌 <i>Mt. tarsi</i>	H_2/CO_2 甲酸盐	3.0	+	7.0	40		0.8—1.2	0—7	+	—	—	—	54
聚集产甲烷菌 <i>Mt. aggregans</i>	H_2/CO_2 甲酸盐	0.5—2.0	—	6.5—7.0	35		<0.1	<3.0	+	+	+	+	51
鲍尔产甲烷菌 <i>Mt. bourgenis</i>	H_2/CO_2 甲酸盐	1—2	—	6.7	37	50	<0.2		+	+	—	—	59
菌株 8508	H_2/CO_2 甲酸盐	0.5—1.2	—	7.0—7.3	35—37	40	0.5—1.0	0—3	+	+	+	+	+1

讨 论

菌株 8508 是利用 H_2/CO_2 和甲酸盐常温下生长产甲烷的球菌。已报道的常温利用 H_2/CO_2 和甲酸盐生长产甲烷、细胞为球形的甲烷菌, 属于甲烷球菌属 (*Methanococcus*) 和产甲烷菌属 (*Methanogenium*)。甲烷球菌属中有 4 个种, 它们是范尼氏甲烷球菌 (*Mc. vonnili*)^[5]、沃氏甲烷球菌 (*Mc. voltae*)^[6]、海沼甲烷球菌 (*Mc. maripaludis*)^[7] 和三角州甲烷球菌 (*Mc. deltae*)^[8]。产甲烷菌属中有 6 个种, 它们是卡列阿科产甲烷菌 (*Mg. cariaci*)^[9]、黑海产甲烷菌 (*Mg. marisnigri*)^[9]、奥林塔河产甲烷菌 (*Mg. oleniangyi*)^[8]、塔条山产甲烷菌 (*Mg. tatti*)^[10]、聚集产甲烷菌 (*Mg. aggregans*)^[11] 和鲍尔产甲烷菌 (*Mg. bourgense*)^[12]。表 2 列出以上 10 个种以及菌株 8508 的主要特征, 从表 2 中各个种的遗传学特征 ($G + C$ 含量) 比较可以看出, 甲烷球菌属的 $G + C$ mol% 范围从 31—40.5, 产甲烷菌是 51—61。从 $G + C$ 含量看, 菌株 8508 可能属于甲烷球菌属。进一步与甲烷球菌属各个种比较, 其 $G + C$ 含量与三角州甲烷球菌近似, 但营养要求悬殊, 菌株 8508 要求乙酸盐以及酵母膏或胰

酶酪素水解物, 三角州甲烷球菌则完全不要求。另外, 最高生长温度、运动性、细胞直径也不同。与甲烷球菌属其他几个种的差别更大。因此, 认为菌株 8508 可能是甲烷球菌属中的一个新种 (*Methanococcus* sp.)。由于此结论仅根据 DNA 的 $G + C$ 含量及一般形态及生理特征的分析比较得出的, 其分类位置还要通过 DNA 杂交、荧光抗体探针等方法与已知属种进行比较才能最后确定。

参 考 文 献

- [1] Hungate, R. E.: *Bacteriol. Rev.*, 14: 1—49, 1950.
- [2] 刘聿太、王大相: 中国沼气, 16(4): 3—8, 1986.
- [3] Hungate, R. E.: *Methods in Microbiology*, Vol. 3B. Academic Press Inc., New York, 1969.
- [4] 林万明等: 微生物学通报, 8: 245—247, 1981.
- [5] Stadtman, T. C. and H. A. Barker.: *J. Bacteriol.*, 62: 269—280, 1951.
- [6] Balch, W. F. et al.: *Microbiol. Rev.*, 43: 260—296, 1979.
- [7] Jones, W. J. et al.: *Arch. Microbiol.*, 135: 91—97, 1983.
- [8] Corder, R. E. et al.: *ibid.*, 134: 28—32, 1983.
- [9] Romesser, J. A. et al.: *ibid.*, 121: 147—153, 1979.
- [10] Zabel, H. P. et al.: *ibid.*, 137: 308—315, 1984.
- [11] Ollivier, B. M. and R. A. Mah: *Int. J. Bacteriol.*, 35: 127—130, 1985.
- [12] Ollivier, B. M. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36: 297—301, 1986.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NEW METHANOGENIC COCCUS FROM SOYBEAN CAKE WASTE WATER

Liu Yitai Wang Dasi

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

Methane-producing bacterium strain 8508 was isolated from soybean cake waste digester. This methanogen was a non-motile, irregular coccoid organism (0.5—1.2 μm in diameter), which used $\text{H}_2\text{-CO}_2$ and formate as methanogenic substrates. Acetate plus yeast extract or acetate plus trypticase were required for growth. Optimum growth required 0.5—1.0% NaCl which can be substituted with 0.5—1.0% MgCl_2 . Optimum temperature for

growth was 35—37°C. Optimum growth occurred at pH 7.0—7.3. The deoxyribonucleic acid base composition was 41% guanine plus cytosine. Methanogen strain 8508 may be a new species of *Methanococcus*, but it should be fixed with DNA-DNA hybridization or fluorescent antibody method.

Key words

Methanococcus; Methanogen