

一个水解纤维素的嗜热厌氧菌新种

贺延龄* 丁友昉 隆言泉

(天津轻工业学院, 天津)

本文报告了一株分解纤维素的嗜热厌氧菌。该菌株细胞革兰氏阴性, 直或微弯杆状, 大小 $0.3-0.6 \times 1.5-9.0 \mu\text{m}$, 以单端丛生鞭毛游动, 形成端生膨大芽孢。可利用多种碳水化合物。在纤维素培养基中产生黄色。发酵纤维素的主要产物为乙醇、乙酸、 CO_2 和 H_2 。最适生长温度 60°C , 生长温度范围 $40-70^\circ\text{C}$; 最适生长 $\text{pH} 7.3-7.5$ 。DNA 中 G+C 含量为 34mol%。经鉴定, 它与已知的嗜热纤维素水解菌均有较大差别, 定名为产黄纤维素梭菌 (*Clostridium celluloflavum* sp. nov.)。

关键词 梭状芽孢杆菌; 产黄纤维素梭菌

在纤维素生物降解的研究中, 热纤梭菌^[1] (*Clostridium thermocellum*) 已引起普遍重视。其原因除了它在纤维素中生长活跃、降解纤维素速率高以外, 还因它能发酵纤维素产生乙醇, 从而显示出某种应用前景。对这一菌种的研究, 进一步引起了人们对类似的嗜热纤维素水解菌的兴趣。自 1983 年至今, Madden^[2]、Ruyet^[3]、Jin^[4] 等人又分别报道了嗜粪梭菌 (*Clostridium stercorarium*)、嗜热乳酸梭菌 (*Clostridium thermolacticum*) 和嗜热粪生梭菌 (*Clostridium thermocopriac*)。以上四种菌, 是目前已报道的仅有的嗜热纤维素水解梭菌。本文介绍一个与以上四种菌有明显区别的嗜热厌氧纤维素水解菌新种。

材料和方法

(一) 培养基

基础培养基每 100ml 含有: 酵母粉 (Sigma) 2.0g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0g; KH_2PO_4 1.5g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2.5g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0g; CaCl_2 0.15g; 0.1% FeSO_4 12.5ml; 0.2% 刃天青 1.0ml; L-半胱氨酸 0.5g;

$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.5g; 以 8mol/L NaOH 调至 $\text{pH} 7.3-7.5$ 。

液体培养基以滤纸条为碳源, 固体培养基则以球磨浆为碳源并加入 2.5% 琼脂 (胨力强度 $600\text{g}/\text{cm}^2$)。球磨浆系以纤维素粉 (Whatman CF-II) 经球磨机处理 72 小时制得。

(二) 厌氧培养方法

试验全过程使用 Hungate^[5] 方法。于 60°C 下培养。

(三) 分离过程

取自奶牛场堆肥的上样, 在放有滤纸条的培养基中进行 3—5 次增殖培养后, 滚管分离, 检取透明圈中央的菌落再次滚管, 重复进行 5 次, 观察菌落形态一致, 并以镜检再次确认。

(四) 生化试验

以 Holdeman 方法^[6]进行生化试验, 并以 Holdeman 介绍的预还原 PY 培养基

本文于 1990 年 3 月 23 日收到。

* 通讯处: 陕西省咸阳市西北轻工业学院一系。
承蒙中国科学院微生物研究所王大粗、凌代文、谭蓓英、刘聿太、赵玉峰等同志的指导帮助, 特此致谢。

作为底物利用及其它生化试验用基础培养基,底物利用试验以不含底物的预还原PY培养基作为对照。以于PY纤维二糖培养基中生长48小时的培养物为接种物,接种量1%。以525nm下的吸光度及以精确至0.03个pH单位的酸度计测得的pH值确定生长状况。

(五) 发酵产物分析

见文献[7]。

(六) 细胞形态学方法

以 JEOL · JEM-100X 透射电镜观察鞭毛及芽孢。电镜制样方法为: 取在PY纤维二糖液体培养基中生长过夜的培养物离心、洗涤, 点样于福尔马膜, 40℃ 下干燥, 20—25° 角铬投影。

(七) 生长温度与 pH

在 35—75℃ 间每隔 5℃ 取一个点, 用PY纤维二糖培养基培养; 在 pH6—9 间大约每间隔 0.3 个 pH 单位测生长状况, 以确定最适生长温度与 pH。

(八) DNA 中 G + C 含量测定

以热变性温度法进行^[6]。以 *E. coli* K12 作为对照菌株。所用仪器为带温度控制器的 Porkin Elmer Lambda 7 型紫外分光光度仪。

结 果

分离菌株革兰氏染色为阴性, 系严格厌氧的游动杆菌, 细胞直或微弯曲, 大小约 $0.3-0.6 \times 1.5-9.0 \mu\text{m}$ 。虽然幼龄细胞长度多在 $1.5-4.0 \mu\text{m}$ 之间, 但在较长时间的培养物中也常观察到大于 $4.0 \mu\text{m}$ 的细胞, 带有芽孢的细胞往往较营养细胞更长(图1)。细胞单生、双生、也可呈连杆状生长。以单端丛生鞭毛游动(图2), 产生端生的膨大芽孢, 椭圆形芽孢大小约 $0.8-1.2 \times 1.0-2.0 \mu\text{m}$ (图3)。

在培养过夜的滤纸条液体培养基中,

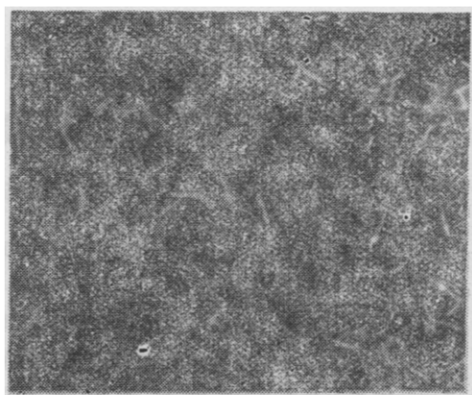


图1 分离菌株在PY纤维二糖培养基中培养4天的细胞
(相差显微照片, $\times 1500$)

Fig. 1 Phase-contrast photomicrographs of cells after 4 days of incubation in PY cello-biose broth



图2 分离菌株的细胞及其鞭毛
(电镜照片, $\times 8000$)

Fig. 2 Electron photomicrographs of cells and flagella



图3 分离菌株的芽孢(电镜照片, $\times 22000$)
Fig. 3 Electron photomicrograph depicting a spore

滤纸条明显变黄,并常出现深黄色斑点,生长旺盛时滤纸条全部变黄,似染过色的黄纸。继续培养,滤纸条出现孔眼,并逐渐变薄而溃散,整个培养液全部变黄。但在以纤维二糖为碳源的培养基中,没有黄色产生。1% 纤维素发酵至 120 小时,约有 53.5% 纤维素被水解。

在纤维素固体培养基滚管中培养 36—48 小时,可观察到因纤维素水解而出现的透明圈,继续培养则透明圈变大,中央菌落也逐渐增大。菌落黄色。深层菌落呈圆形,边缘齐整,黄色较深;表面菌落呈流动粥样(图 4)。

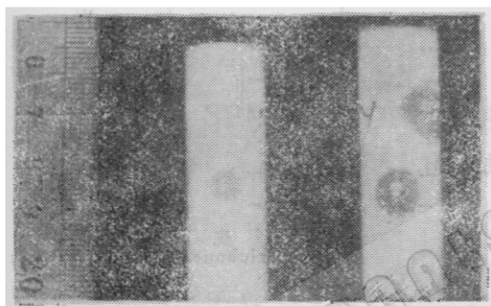


图 4 分离菌株在纤维素固体滚管培养基上的透明圈及菌落
(标尺数字单位为 cm)

Fig. 4 Clear zones and colonies on cellulose agar roll tubes

最适生长温度 60℃, 生长温度范围 45—70℃, 40 与 75℃ 不生长。最适生长 pH 为 7.3—7.5, 在 pH 6.5—8.5 均可生长。煮沸 20 分钟仍可存活。

在没有可发酵的碳水化合物 PY 培养基中几乎不生长。可利用纤维二糖、纤维素、七叶苷、果糖、葡萄糖、肌醇、菊糖、甘露醇、甘露糖、蜜二糖、鼠李糖、水杨苷、山梨醇、山梨糖、蔗糖、海藻糖、聚木糖和木糖;不能利用阿拉伯糖、赤藓糖醇、半乳糖、甘油、糖原、乳糖、麦芽糖、松三糖、棉子糖。在纤维二糖中生长最为旺盛, 终点 pH 值也较低, 一般为 4.8—5.0, 而其它碳水化合

物发酵终点 pH 多在 5.5—6.2。

过氧化氢酶阴性, 不还原硫酸盐和硝酸盐, 不液化明胶, 不水解淀粉, 不利用牛奶, VP 试验阴性, 可产生吲哚。

发酵纤维素的终产物为乙醇、乙酸、氢气、二氧化碳以及少量丙醇与丙酸。

DNA 中 G + C 含量为 34mol%。

讨 论

分离菌株为严格厌氧的生芽孢杆菌, 过氧化氢酶阴性, 且不还原硫酸盐, 所以应归于梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium*)。

如上所述, 迄今为止所报道过的分解纤维素的嗜热厌氧菌只有热纤梭菌 (*C. thermocellum*)、嗜粪梭菌 (*C. stercorarium*)、嗜热乳酸梭菌 (*C. thermolacticum*) 和嗜热粪生梭菌 (*C. thermocopriae*) 四个种。

其中 *C. thermolacticum* 与分离菌株区别较大, 文献中报道它的两个菌株 TC21 与 TX41 中, 仅 TC21 可微弱利用纤维素, 其 DNA 中 G + C 含量高达 42.3mol%, 它的重要特性是高产乳酸。而分离菌株 DNA 中 G + C 含量只有 34mol%, 且发酵液中不含乳酸, 在底物利用上两者也差别较多。

表 1 列出了分离菌株与其余 3 株菌在碳水化合物利用及部分分类特征的对照。

C. thermocellum 是近年来研究最多的纤维素分解菌, 在底物利用方面, 它有一个重要特性。即除了纤维素及其衍生物或降解产物外, 很少利用其它碳水化合物。表 1 列举的 20 余种碳水化合物里, 它只能利用纤维素、纤维二糖、葡萄糖、七叶苷与水杨苷。即使在葡萄糖中, 生长也十分微弱, 以致早期的报告认为它不利用葡萄糖。不能利用木糖也被认为是该菌株的重要特性, 有人以能否在木糖中生长来检验该菌

表 1 分离菌株区别于其它有关菌株的主要特征
Table 1 Differential characteristics of the isolate and the related species

特 征 Characters	分离菌株 Isolate	<i>C. thermocellum</i> ^[1]	<i>C. stercorarium</i> ^[2]	<i>C. thermocopriac</i> JT3-3 ^[3]
阿拉伯糖 Arabinose	—	—	+	W
果 糖 Fructose	+	—	—	+
半 乳 糖 Galactose	—	—	+	W
糖 原 Glycogen	—	—	+	W
肌 醇 Inositol	+	—	—	—
菊 糖 Inulin	+	—	—	—
乳 糖 Lactose	—	—	+	W
麦 芽 糖 Maltose	—	—	+	W
甘露醇 Mannitol	+	—	—	—
甘露糖 Mannose	+	—	+	+
蜜 二 糖 Melibiose	+	—	+	—
鼠 李 糖 Rhamnose	+	—	+	—
棉 子 糖 Raffinose	—	—	—	W
山 梨 醇 Sorbitol	+	—	—	W
山 梨 糖 Sorbose	+	—	—	—
蔗 糖 Sucrose	+	—	—	W
海 藻 糖 Trehalose	+	—	—	W
木 聚 糖 Xylan	+	—	+	W
木 糖 Xylose	+	—	+	—
产黄色 Yellow pigment produced	+	+	—	—
鞭 毛 Flagellum	单端丛生 lophotrichous	—	周 生 peritrichous	+
淀粉水解 Starch hydrolyzed	—	—	—	—
产 吲 哚 Indole produced	+	—	—	—
牛乳反应 Milk reaction	—	—	—	凝 固 curdled
明胶水解 Gelatin Hydrolyzed	—	—	—	—
G + C mol%	34	38—39	39	37.2

注：四株菌均利用纤维素、纤维二糖、水杨苷、葡萄糖、七叶苷；均不利用赤藓糖醇、甘油、松三糖。W表示微弱利用。

Note: All of the strains ferment cellulose, cellobiose, esculin, glucose, and salisin; no strains ferment erythritol, glycerol and melezitose.

株是否被污染^[9]。相反，分离菌株可以利用多种碳水化合物，在木糖中生长十分旺盛。G + C 含量两者差别也较大。此外，产生吲哚、水解明胶等生化试验结果两者也不同。

分离菌株与 *C. stercorarium* 的区别是明显的。后者在纤维素培养基中不产黄色，菌落为白色；而分离菌株产生黄色，菌落也为黄色。另外，*C. stercorarium* 为

周生鞭毛，而分离菌株为单端丛生鞭毛。G + C 含量两者分别为 34 和 39mol%。其余区别见表 1。

C. thermocopriac 是又一分解纤维素的梭菌，表 1 所列的 JT3-3 菌株是其模式菌株。从表中可以看到，在多达 9 种碳水化合物的利用上，分离菌株与 *C. thermocopriac* 的结果是不同的。此外，分离菌株产生吲哚，不水解淀粉，不利用牛奶。而

C. thermocopriac 则不产生明胶, 但水解淀粉且凝固牛奶。两菌株的另一重大差别是发酵产物, *C. thermocopriac* 的主要发酵产物中包括丁酸、乳酸和硫化氢, 而分离菌株的发酵产物中则没有这几种物质。

据以上分析, 可以认为分离菌株是梭状芽孢杆菌属中的一个新种, 定名为产黄纤维素梭菌 (*Clostridium celluloflavum* sp. nov.)。

参 考 文 献

- [1] Cate, E. P. et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., Vol. 2. Sneath, P. H. A. et al. ed., The Williams and Wilkins Co.,

Baltimore, pp. 1141—1200, 1986.

- [2] Madden, R. H.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**: 837—840, 1983.
 [3] Ruyet, P. L. et al.: *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**: 196—202, 1985.
 [4] Jin, F. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**: 279—281, 1988.
 [5] Hungate, R. E.: *Methods in Microbiology*, Vol. 3B, Academic Press, Norris, J. R. and D. W. Ribbons ed., New York, pp. 117—132, 1969.
 [6] Holdeman, L. V. et al.: *Anaerobe laboratory manual*, 4th ed., Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.
 [7] 谭蓓英, 王大稻: *微生物学报*, **27**(3): 211—216, 1987.
 [8] 林万明等: *微生物学通报*, **8**(5): 245—247, 1981.
 [9] Bender, J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 475—477, 1985.

A NEW SPECIES OF THERMOPHILIC, CELLULOLYTIC, ANAEROBIC BACTERIUM

He Yanling* Ding Youfang Long Yanquan

(Tianjin Institute of Light Industry, Tianjin)

A new thermophilic, cellulolytic, spore-forming anaerobe was isolated and characterized. The cells are gram-negative, straight or slightly curved rods 0.3 to 0.6 μm wide by 1.5 to 9.0 μm long and motile by means of lophochichous flagella. They formed oval, terminal spores which swell the cells. The optimum growth temperature is about 60°C, with a range of 45 to 70°C. The optimum pH for growth is 7.3 to 7.5. In cellulose medium, yellow pigment is produced. A variety of carbohydrates are fermented. The major fermentation products from cellulose

are carbon dioxide, hydrogen, ethanol and acetic acid. The DNA composition is 34 mol % guanine plus cytosine. The name *Clostridium celluloflavum* sp. nov. is proposed.

Key words

Clostridium; *Clostridium celluloflavum*

* Corresponding author. The present address: Department No.1, Northwest Institute of Light Industry, Xianyang, Shaanxi, P. R. China, 712081.