

硬脂酸降解菌与产甲烷球菌共培养物的研究*

赵宇华 钱泽澍

(浙江农业大学, 杭州)

采用 Hungate 厌氧技术, 从处理柠檬酸生产废水的管道消化器中分离到产氢产乙酸的硬脂酸降解菌与产甲烷球菌的共培养物 (LDB1-M1), LDB1 菌株为专性厌氧, 呈弧状, 不产芽孢, 革兰氏反应阴性。该共培养物能降解 C₁₈-C₂₀ 直链脂肪酸, 但必须加一定量的 CaCl₂。经初步研究认为 LDB1 菌株可能是互营单胞菌属的一个新种。

关键词 互营单胞菌属; 共培养物; 产甲烷细菌

两个或多个相互作用的厌氧细菌通过“种间氢转移”联合起来的氧化还原反应, 在厌氧消化过程中具有特殊重要的地位。Bryant (1967) 指出, 丙酸以上脂肪酸的彻底分解生成 CH₄ 和 CO₂ 是依靠产氢产乙酸细菌之间的互营代谢。^[1] 产氢产乙酸细菌分解脂肪酸需要维持环境中极低的氢分压,^[2] 否则对其本身的生长有抑制作用。McInerney (1979) 在分离时加入氢营养的脱硫弧菌为伴生菌,^[3] 首次纯化到分解丁酸盐的产氢产乙酸菌。此后, 人们相继采用相似的方法, 或加入氢营养的产甲烷细菌作为伴生菌, 分离到多种分解脂肪酸的产氢产乙酸细菌。^[2,4,5] 但是, 迄今为止, 在分离过程中无不例外地加伴生菌, 这就不能反映自然状态下两种互营细菌之间的关系。此外, 以前分离到的菌株都不能分解 C₁₈ 以上的长链脂肪酸。

我们从处理柠檬酸生产废水的管道消化器中, 直接分离到能分解 C₁₈-C₂₀ 脂肪酸的产氢产乙酸细菌与产甲烷球菌的共培养物 LDB1-M1, 并对其部分性状作了初步研究。

材料与方 法

(一) 样品及富集培养

分离样品为稳定运行已达两年的杭州柠檬酸厂废水管道厌氧消化污泥, 取样后立即接种到含硬脂酸的基础培养基中 (60 ml 厌氧瓶装 20ml 培养基), 连续转代富集物, 同时定时测定气相中的甲烷含量以及取培养液涂片观察菌体形态, 以便了解富集情况。

(二) 培养基

1. 基础培养基 (1L): 微量元素液^[6] 1.0 ml, 维生素溶液^[6] 5.0ml, 瘤胃液 20ml, 酵母膏 2.0g, 4% K₂HPO₄ 10ml, 4% KH₂PO₄ 10ml, 半胱氨酸 0.5g, 0.1% 刃天青 1.0ml, pH7.2。

2. 保存培养基 (1L): 消化器发酵液 100ml, 其他成分与基础培养基相同。

3. 硬脂酸降解菌-甲烷球菌共培养物培养基 (1L): 硬脂酸钠 10mmol, CaCl₂ 5.0 mmol, 其他成分与基础培养基相同。配制培养基时先用 NaHCO₃ 皂化硬脂酸, 培养基装瓶灭菌后加入一定量的无菌 CaCl₂ 溶液, 接种前每 20ml 培养基中加入 1% Na₂S 和 5% NaHCO₃ 混合液 0.4ml、气相为 N₂/CO₂ (70/30, V/V)。有些试验以丁酸或其他脂

本文于 1990 年 2 月 24 日收到。

* 国家自然科学基金资助的课题。

防酸为基质。

4. 产甲烷菌培养基 (1L): 乙酸 30 mmol 的基础培养基, 气相为 H_2/CO_2 (70/30, V/V)。

(三) 分离及纯化

将稳定富集物进行 10 倍系列稀释, 采用适当浓度的稀释液接种滚管, 35℃ 恒温培养 2 个月后, 挑取具有能激发荧光的菌落至液体培养基中并且涂片显微镜观察, 培养以后重复滚管多次。后来改用丁酸为基质, 液体稀释纯化与滚管交替进行, 直至获得能稳定分解硬脂酸的两种细菌的共培养物, 历时近两年。

(四) 分析测定

气体成分测定用 102 G 型气相色谱仪, 热导, 外标法; 脂肪酸测定用 103G 型气相色谱仪, 氢焰离子检测器, 外标法; 日产 Olympus 落射荧光显微镜观察菌落及菌体。

结 果

(一) LDB1-M1 共培养物的分离及一般特性

取样后立即以硬脂酸为基质进行富集培养, 连续转接富集 5 次左右, 富集物分解硬脂酸比较稳定后进行滚管培养, 35℃ 恒温培养 2 个月后才出现菌落。将具有能激发荧光的菌落挑至液体培养基, 几次重复上述步骤, 培养物仍含两种以上不同形态的菌体, 占优势的是弧菌和球菌。由于在滚管中形成菌落时间很长, 以及硬脂酸培养基呈乳白色, 并且为颗粒状沉淀, 因此难以辨别菌落。后改用以丁酸为基质的液体培养基多次系列稀释纯化共培养物, 并与滚管交替进行, 才获得两种细菌的共培养物, 工作号为 LDB1-M1。为了证明共培养物的纯度, 显微镜下观察到培养液中只含两种形态的菌体, 将培养物分别接种到

葡萄糖培养基和牛肉汁蛋白胨培养基中, 经有氧和无氧培养, 无任何细菌生长。

LDB1: 菌体呈弧状, 两端钝圆, 平均大小为 $0.8-1.0 \times 2.5-3.5 \mu m$, 微弱运动, 不形成芽孢, 革兰氏阴性(图 1)。

为了分离 M1, 将其培养转接至含多种基质的产甲烷菌培养基中, 气相为 H_2/CO_2 (70/30, V/V), 同时加入无菌青霉素溶液, 使每毫升培养基中达 3000 单位。35℃ 下培养 10 天后进行滚管, 培养 20 天后在滚管中形成浅黄色、激发荧光较强的小菌落。挑取菌落用液体培养基进行稀释后, 立即滚管。如此交叉反复几次, 获得 M1 纯培养物。该菌体呈球状, 直径 $0.8-1.0 \mu m$ 。产甲烷基质以 H_2/CO_2 为主, 也能微弱利用甲酸, 不能利用乙酸为产甲烷基质, 但乙酸能刺激其生长。在温度 30—40℃, pH7.0—

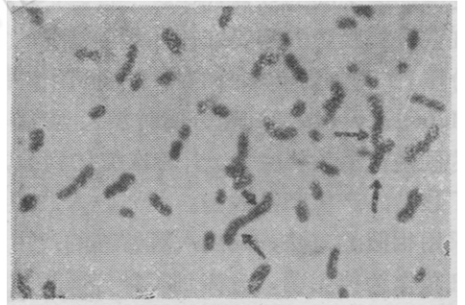


图 1 LDB1-M1 共培养物(1,200×)
Fig. 1 Strain LDB1 in association with strain M1

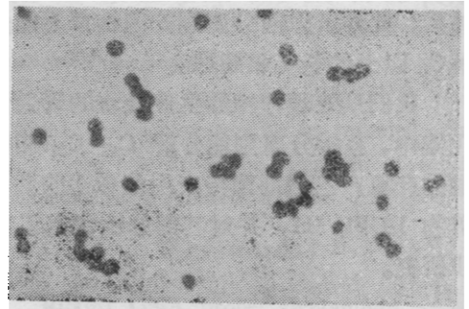


图 2 菌株 M1 细胞(1,750×)
Fig. 2 The cells of strain M1

表 1 LDB1-M1 共培养物的生长基质

Table 1 Substrates used by the coculture of LDB1-M1

基 质 Substrate	初始浓度 Initial substrate concentration (mmol/L)	产 物 Products			培养时间 Incubation time (d)
		CH ₄ (μ mol/瓶) (μ mol/vial)	乙酸 Acetate (mmol/L)	丙酸 Propionate (mmol/L)	
丁酸 Butyrate	30	365	45.0	0	30
戊酸 Valerate	20	205	17.2	13.1	30
异戊酸 Isovalerate	20	249	21.3	4.3	30
癸酸 Caprate	15	261	58.7	0	30
十一酸 Undecanoate	15	195	52.4	10.8	30
十六酸 Palmitate	10	278	58.6	0	40
十七酸 Margarate	10	125	12.5	5.1	40
硬脂酸 Stearate	10	231	15.7	0	40
油酸 Oleate	10	278	35.7	0	40
十九酸 Nonadecanoate	10	101	9.5	3.9	40
二十酸 Arachidate	10	123	10.3	0	40

7.8 范围内生长良好(图 2)。

(二) LDB1-M1 共培养物的基质谱

采用无机培养基,以 C₄-C₂₀ 脂肪酸作为 LDB1-M1 的生长基质,并在大于 C₁₀ 脂肪酸的培养基中加入一定量的 CaCl₂,使脂肪酸形成脂肪酸钙沉淀。培养过程中定时测定各厌氧瓶中的 CH₄、乙酸和丙酸,结果见表 1。基质试验结果表明,该共培养物能降解 C₄-C₂₀ 脂肪酸,包括饱和脂肪酸以及部分支链脂肪酸,但随着脂肪酸碳链的延长,其降解力有所减弱。

(三) 气相中 H₂ 对硬脂酸降解的影响

LDB1-M1 共培养物分解硬脂酸时,其产物 H₂ 和 CH₄ 动态变化见图 3。从图 3

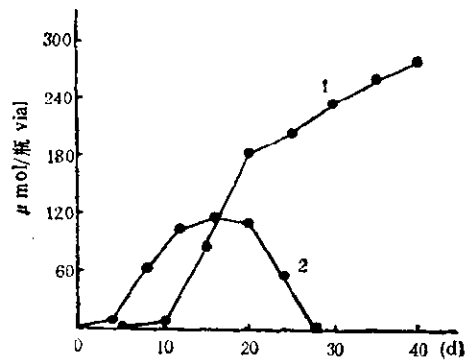


图 3 硬脂酸降解产物 H₂ 和 CH₄ 的动态变化
Fig. 3 Formation of H₂ and CH₄ during growth of the LDB1-M1 coculture on stearate (10mmol/L)

1. CH₄, 2. H₂

可见 LDB1 生长速率比 M1 快，彻底分解硬脂酸的慢反应是 H_2 的去除。当 M1 开始利用 H_2 还原 CO_2 形成 CH_4 时，气相中 H_2 含量逐渐下降，培养 1 个月左右，气相中测不到 H_2 存在。

当 LDB1-M1 恒温培养 20 天时，用 70/30(V/V) 的 H_2/CO_2 置换厌氧瓶中的气相，培养 7 天后以 70/30(V/V) 的 N_2/CO_2 取代 H_2/CO_2 ，继续培养，同时对气相变换前后的细菌进行计数。试验结果(图 4)表明，气相中 H_2 几乎不抑制乙酸的形成，尤其培养基中含较高浓度的硬脂酸时，即使存在 H_2 的 7 天中，乙酸形成量也不受影响，还能增加 CH_4 形成量。但是，当共培养物以丁酸为基质时，气相中的 H_2 会

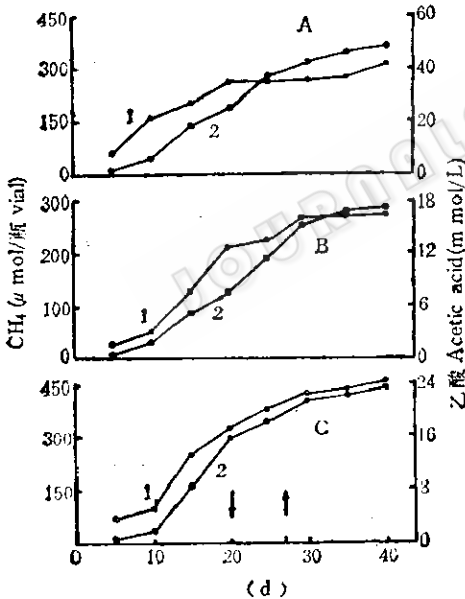


图 4 氢对脂肪酸分解的影响

Fig. 4 The influence of the fatty acid degradation by H_2 added to the coculture of LDB1-M1

- A. 丁酸 Butyrate (20mmol/L)
- B. 硬脂酸 Stearate (10mmol/L)
- C. 硬脂酸 Stearate (20mmol/L)
- 1. 乙酸 Acetate 2. CH_4
- ↓ 加氢 H_2 was added to the coculture
- ↑ 去氢 H_2 was removed from the coculture

抑制丁酸的分解。细胞计数结果表明： N_2/CO_2 被 H_2/CO_2 短时间(7天)取代，共培养物的细胞数不受影响。

(四) 钙对硬脂酸降解的影响

当含 10mmol/L 硬脂酸的培养基中，不加 $CaCl_2$ ，接种 LDB1-M1 培养 2 个月，测不到乙酸和 CH_4 的产生，镜检观察到培养基中菌数少，菌体形态不规则。当在其他含不同浓度硬脂酸的培养基中，加入一定量的 $CaCl_2$ 后，即使硬脂酸浓度高达 35mmol/L，LDB1-M1 共培养物也能很好生长，并有效分解硬脂酸(图 5)。

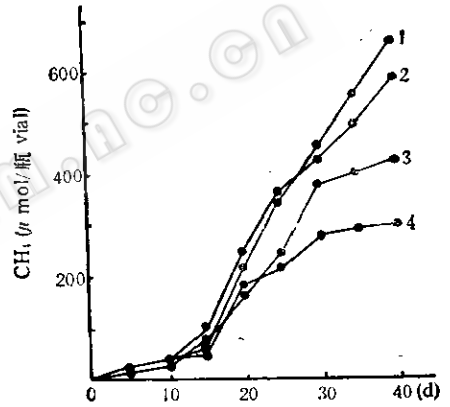


图 5 钙对硬脂酸降解的影响

Fig. 5 Effect of calcium on stearate degradation

- 1. 35mmol/L 2. 30mmol/L 3. 20mmol/L
- 4. 10mmol/L

讨 论

1. Bryant 和 McInerney 等指出^[1,2,4] 脂肪酸降解菌除了对氧极为敏感外，还要求环境中氢分压极低，否则降解反应在热力学上是需能的。此外，较低浓度的高级脂肪酸也能抑制其生长。因此，分离纯化脂肪酸降解菌相当困难。我们的试验也证实了这一点。我们在分离过程中，没有沿用已报道的加氢营养菌作为伴生菌，而是

直接分离共培养物,这样它们的组合符合实际情况。

闵航等(1987)报道,在柠檬酸生产废水的管道厌氧消化器中甲酸甲烷杆菌(*Methanobacterium formicicum*)和亨氏甲烷螺菌(*Methanospirillum hungatei*)为优势产甲烷菌。^[7]这两种菌能以 H_2/CO_2 作为生长和产甲烷基质,这表明它们能与硬脂酸降解菌互营生长,我们也分离到甲酸甲烷杆菌与LDB1的共培养物。

2. LDB1 菌株的基质范围较广,以10碳以下的脂肪酸为基质时,它的生长速率较快。也能分解二十酸,但生长不良。因此,要分离高级脂肪酸降解菌,在富集和纯化两个过程中,可以分别采用不同基质、富集阶段,以高级脂肪酸为基质,纯化阶段,应采用相应的挥发性脂肪酸为基质,这样可以缩短分离过程。

从LDB1菌株的一般性状来看,它很像Roy等(1986)分离到的食长链脂肪酸互营单胞菌(*Syntrophomonas sapovorans*)^[4,8]。但是食长链脂肪酸互营单胞菌不能分解二十酸,因此,确定LDB1菌株的分类地位尚需对其特性深入研究。

3. LDB1 菌株属于严格质子还原产乙酸细菌,它的生态环境中必须维持比较稳定的低氢分压。本试验结果表明,在加一定量 $CaCl_2$ 的培养基中,气相中的 H_2 对硬脂酸降解影响不明显,但是严重抑制可溶性丁酸盐的降解。这是因为加 $CaCl_2$ 后,培养基中形成颗粒状沉淀物——硬脂酸

钙,直径为0.1—0.2mm,这些颗粒为共培养物提供附着界面,而形成高密度的细胞群体,这种构造对位于内部的LDB1菌株起屏蔽作用。此外,由于大部分菌体附着在颗粒表面,随着颗粒下沉,而气相中的 H_2 在培养基中的扩散呈一定的浓度梯度,由液面至底部 H_2 浓度渐减。因此,气相中 H_2 短时间(7天)存在,对静置培养的共培养物影响不大。

4. Roy等(1985)研究结果表明,长链脂肪酸对其降解菌具有强烈的抑制作用,抑制程度随着碳链的延长和不饱和键数的增加而加剧。我们的试验结果也表明,游离高级脂肪酸浓度不到10 mmol/L就完全抑制共培养物的生长,在分离过程中必须加入浓度相当于高级脂肪酸摩尔浓度一半的 $CaCl_2$,使之形成难溶性的高级脂肪酸钙。

参 考 文 献

- [1] Bryant, M. P. et al.: *Arch. Microbiol.*, 59: 20—31, 1967.
- [2] Boone, D. R. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 626—632, 1980.
- [3] McInerney, M. J. et al.: *Arch. Microbiol.*, 122: 129—135, 1979.
- [4] Roy, F. et al.: *ibid.*, 145: 142—147, 1986.
- [5] 马晓筑等: 浙江农业大学学报, 15(4): 402—408, 1989.
- [6] 钱泽澍等: 沼气发酵微生物学, 浙江科技出版社, 杭州, 1986.
- [7] 闵航等: 中国沼气, 5(4): 1—5, 1987.
- [8] Roy, F. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 702—705, 1985.

STUDY ON HIGHLY PURIFIED SYNTROPHIC CULTURE DEGRADING LONG-CHAIN FATTY ACIDS

Zhao Yuhua Qian Zeshu

(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou)

An anaerobic obligately syntrophic fatty acid degrading acetogenic bacterium (strain LDB1) was isolated with a non-fatty acid-degrading, H_2 -utilizing *Methanococcus* sp. This organism is a slightly curved Gram-negative rod which can only use protons as electron acceptor. It fermented all linear saturated fatty acid with 4 to 20 carbon atoms in coculture with a H_2 -utilizing methanogen.

During growth on long-chain fatty acid supplementation of the culture media with calcium chloride is an absolute requirement. The strain LDB1 is possibly a new species of *Syntrophomonas* because of its broaden substrate range.

Key words

Syntrophomonas; Coculture; Methanogen

JOURNALS.IM.AC.CN