

利用氢和二氧化碳生长的一个泥杆菌 新种——嗜氢泥杆菌

东秀珠 屠雄海 苏京军 程光胜

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 从降解有机物产生甲烷的富集培养物中分离到一株利用巴豆酸的严格厌氧革兰氏阴性杆菌。此菌利用氢和二氧化碳或甲酸合成乙酸,发酵巴豆酸产生丁酸和乙酸,发酵葡萄糖、果糖、麦芽糖和半乳糖产生乙酸、乙醇和氢或甲酸,不利用延胡索酸、酒石酸和柠檬酸生长。该菌不产生芽孢,不还原硫酸盐,触酶反应阴性,DNA的G+C含量为 $30.7 \pm 1 \text{ mol}\%$,是泥杆菌属中的一个新种,定名为嗜氢泥杆菌(*Ilyobacter hydrogenotrophicus* nov. sp.)。

关键词 H₂/CO₂ 生长,巴豆酸发酵,嗜氢泥杆菌

有机物厌氧降解的中间产物短链脂肪酸(如丙酸、丁酸)的进一步降解,是由一群叫作产氢产乙酸细菌与产甲烷菌或其它耗氢细菌共同完成的。原因是这些脂肪酸的降解在热力学上难发生的反应,只有当产物(如氢)被去除后,反应才能进行。故这类产氢产乙酸细菌不能利用这些脂肪酸作底物得到纯培养物。1987年 Beaty 等^[1]及1990年 Zhao 等^[2]用巴豆酸作底物分别纯化了降解丁酸的产氢产乙酸细菌沃氏互营单胞菌(*Syntrophomonas wolfei*)和布氏互营生胞菌(*Syntrophospora bryantii*)。我们也试验了用巴豆酸作底物直接从降解丁酸的富集培养物中分离这类细菌。纯化的菌株116可将巴豆酸转化为丁酸和乙酸,但与各种耗氢细菌组成的共培养物都不再降解丁酸。经鉴定,该菌株应归属于由 Stieb 和 Schink^[3]1984年建立的新属——泥杆菌属(*Ilyobacter*)中的新种,定名为嗜氢泥杆菌(*Ilyobacter hydrogenotrophicus* nov. sp.)。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

菌株116分离自清华大学环境工程系污水处理反应器中的一个降解丁酸的富集培养物;亨氏甲烷螺菌(*Methanospirillum hungatei*)JF-1、甲酸甲烷杆菌(*Methanobacterium formicicum*)DSM1535、嗜木甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter arboriphilicus*)DSM1125来源于德国菌种保藏中心(DSM),前二者既可利用氢和二氧化碳,又可利用甲酸合成甲烷,后者只利用氢和二氧化碳合成甲烷;脱硫弧菌(*Desulfovibrio* sp.)来自德国GOTTINGEN大学微生物学系,它利用乙醇、乳酸、氢或甲酸还原硫酸盐,但不能降解含两个以上碳原子的脂肪酸。

本文于1993年2月9日收到。

1.2 菌株的培养和鉴定

菌株 116 的富集和分离采用 Houwen 等^[4]的基础培养基,但不加 Na_2SeO_3 和 Na_2WO_4 , 20mmol/L 的巴豆酸为碳源,最终 pH 为 7.0—7.2。采用 Hungate 技术将培养基预还原后取 20ml 装入容积为 70ml 的厌氧瓶中,加盖丁酰橡胶塞,瓶内以高纯氮气作为气相。用注射器接种后置 37℃ 培养。菌株 116 的好氧培养采用与厌氧培养相同的培养基,但不加还原剂 Na_2S 和半胱氨酸。

产甲烷菌和脱硫弧菌的培养采用同样的基础培养基和同样的培养方法,只是用分别含 80% 和 20% 的氢气和二氧化碳的混合气体作为底物,培养脱硫弧菌时另加 20mmol/L 的硫酸盐。

硫酸盐还原试验采用钱泽澍^[5]的方法;革兰氏染色、形态观察和触酶测定采用常规方法^[6]。

1.3 分析测定方法

底物利用试验采用与分离所用相同的培养基,只是用不同的待测底物代替巴豆酸,用分别含 80% 和 20% 的氢气和二氧化碳的混合气体作底物时,气体浓度为 1.4 个大气压。

巴豆酸、丁酸和乙酸等挥发酸用岛津 GC-7AG 气相色谱仪测定,填充柱 $3 \times 1000\text{mm}$, 固定相为 GDX-40(60—80 目),高纯氮气为载气,流速 60ml/min,柱温 210℃,氢焰检测器温度为 220℃;醇类的测定用同样方法,只是载气流速为 25ml/min,柱温为 150℃,氢焰检测器温度为 100℃。

全细胞蛋白测定用 Lowry 的方法^[7]。

DNA 的 G+C 含量测定用热变性法^[8],DNA 的提取采用 Marmurd 方法^[9]。

2 结果

2.1 富集和分离

将取自污水处理反应器中的降解丁酸产甲烷的富集物经 0.04% 的氯仿处理后,不再产生甲烷,同时也不再降解丁酸,但它可降解巴豆酸产生丁酸和乙酸。用 20mmol/L 的巴豆酸作为底物,反复转接并用同样成份的固体培养基滚管后,得到单菌落,菌落为规则圆形,低凸,半透明,无色,直径 1—1.5mm。在厌氧手套箱内将单菌落挑入液体培养基内,得到纯化菌株 116。

2.2 菌株 116 的形态和细胞特征

菌株 116 以巴豆酸为底物生长的细胞为短杆状,端圆, $0.7 \times 1.5—3\mu\text{m}$, 单生或成对,周生鞭毛运动(图 1)。革兰氏染色阴性或弱阳性,老龄细胞呈阳性反应,但 3%KOH 反应表明革兰氏反应为阴性。未发现芽孢,经巴斯德灭菌后的培养物以巴豆酸作底物时不再生长。

2.3 菌株 116 的营养要求和生长特征

菌株 116 为严格厌氧菌,不还原硫酸盐,不产生触酶。生长要求酵母粉。发酵巴豆酸产生丁酸和乙酸。利用氢气和二氧化碳或利用甲酸可合成乙酸;发酵葡萄糖、果糖、麦芽糖和半乳糖产生乙酸、乙醇及甲酸或氢气,利用乳酸、甘油和丙酮酸生长并产生乙酸,但不利用延胡索酸、酒石酸和柠檬酸生长(表 1)。

表1 菌株116及有关种的底物利用情况

Table 1 Substrates utilized by strain 116

产物 Product	菌株 Strain	多营养型泥杆菌 <i>Ilyobacter polytropus</i>	德氏泥杆菌 <i>Ilyobacter delafieldii</i>	酒石酸泥杆菌 <i>Ilyobacter tartaricus</i>	菌株116 Strain 116
巴豆酸 Crotonate		丁酸、乙酸 butyrate, acetate	丁酸、乙酸、H ₂ butyrate, acetate, H ₂	ND	丁酸、乙酸 butyrate, acetate
3-羟基丁酸 3-Hydroxybutyrate		丁酸、乙酸 butyrate, acetate	丁酸、乙酸 butyrate, acetate	ND	ND
葡萄糖 Glucose		乙酸、甲酸、乙醇 acetate, formate, ethanol	—	乙酸、甲酸、乙醇 acetate, formate, ethanol	乙酸、乙醇 acetate, ethanol
果糖 Fructose		乙酸、甲酸、乙醇 acetate, formate, ethanol	—	乙酸、甲酸、乙醇 acetate, formate, ethanol	乙酸、乙醇 acetate, ethanol
麦芽糖 Maltose		—	—	—	乙酸、乙醇 acetate, ethanol
半乳糖 Galactose		—	—	—	乙酸、乙醇 acetate, ethanol
延胡索酸 Fumalate		乙酸、丙酸、甲酸 acetate, propionate, formate	—	—	—
H ₂ /CO ₂		ND	—	ND	乙酸 acetate
甲酸 Formate		—	—	—	乙酸 acetate
乳酸 Lactate		ND	乙酸、丙酸 acetate, propionate	—	乙酸 acetate
甘油 Glycerol		1,3-丙二醇 3-羟基丁酸 1,3-propanediol 3-hydroxybutyrate	—	++	乙酸 acetate
丙酮酸 Pyruvate		乙酸、甲酸 acetate, formate	丁酸、乙酸 butyrate, acetate	乙酸、甲酸 acetate, formate	乙酸 acetate
L-酒石酸 L-Tartrate		ND	ND	乙酸、甲酸 acetate, formate	—
柠檬酸 Citrate		乙酸、甲酸 acetate, formate	ND	乙酸、甲酸 acetate, formate	—
聚羟基丁醇 Poly-β-hydroxybutyrate		ND	丁酸、乙酸 butyrate, acetate	ND	ND
酵母粉 Yeast extract		ND	弱生长 weak growth	—	+

* 不生长 No growth; ** 生长良好 Good growth; ND: 未测定 Not determined

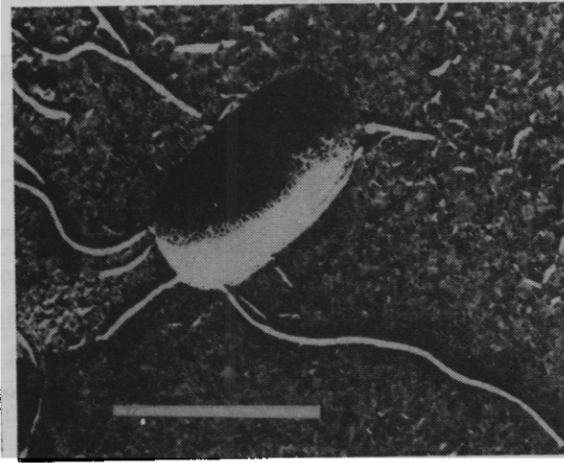


图1 菌株116超薄切片的电子显微镜照片(标尺:1μm)

Fig.1 Electron micrographs of ultrathin sections of strain 116

菌株116生长的温度范围是10—40℃,最适生长温度为37℃,最适生长pH为7.4—8.0,在淡水培养基和含1%及2.1%NaCl的培养基中均能生长,但在含NaCl淡水培养基中生长最好。以巴豆酸为底物的比生长速率是 $\mu = 0.094h^{-1}$,倍增时间是7.4小时(图2)。

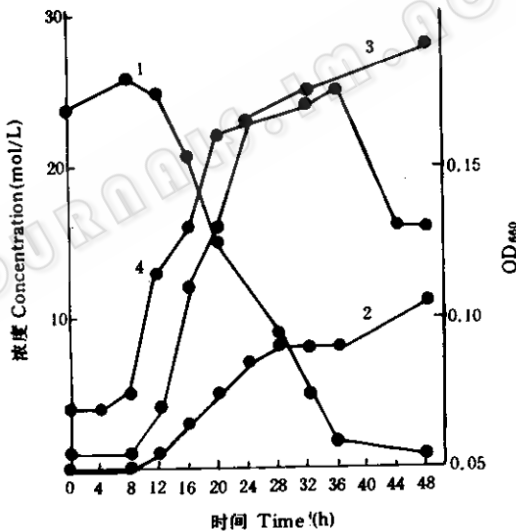
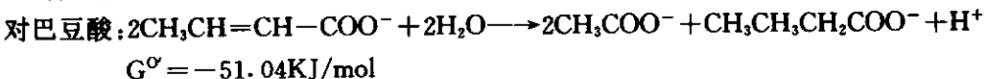


图2 菌株116的生长曲线及巴豆酸代谢

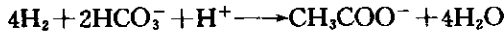
Fig.2 Growth curve and crotonate metabolism of strain 116

1. 巴豆酸 Crotonate; 2. 丁酸 Butyrate; 3. 乙酸 Acetate; 4. 光密度(OD₆₆₀)。

由表2可知,菌株116对巴豆酸和H₂/CO₂的代谢符合以下反应式:



对H₂/CO₂:



$$G^\circ = -104.6 \text{ KJ/mol}$$

对于葡萄糖和果糖, 其代谢不符合以下反应式, 主要由于甲酸的产量很少, 难以检测。

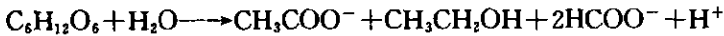


表 2 菌株 116 对不同底物的降解情况

Table 2 Degradation of substrates by strain 116

底物 Substrate (mmol/L)	底物 降解量 Amount of substrate degraded (mmol/L)	产 物 Products formed (mmol/L)				细胞蛋白 Cell protein (mg)
		乙 酸 Acetate	丁 酸 Butyrate	乙 醇 Ethanol	甲 酸 Formate	
巴豆酸 Crotonate	24.5	27.30	10.8	ND*	ND	0.51
葡萄糖 Glucose	20.0	25.10	0	120.0	8.00	0.44
果 糖 Fructose	20.0	26.70	0	160.7	ND	0.63
H ₂ /CO ₂	2.3	0.49	ND	ND	ND	0.11

* ND: 未测定 Not determined

2.4 氢和甲酸对菌株 116 代谢的影响

在用巴豆酸培养的菌株 116 培养物中分别加入氢和甲酸时, 巴豆酸的代谢方式不变。菌株 116 分别与亨氏甲烷螺菌 JF-1、甲酸甲烷杆菌 DSM1535、嗜木甲烷短杆菌及脱硫弧菌组成的共培养物都不降解丁酸产生甲烷或硫化氢。

菌株 116 与亨氏甲烷螺菌 JF-1 共同以葡萄糖为底物进行培养时, 可产生乙酸、乙醇和甲烷, 这表明菌株 116 降解葡萄糖时有氢或甲酸产生。乙酸的产量与单独培养菌株 116 时的产量相近, 只是乙醇的产量明显降低(表 3)。

表 3 菌株 116 与产甲烷菌共培养时对葡萄糖的降解

Table 3 Degradation of glucose by strain 116 cultivated with methanogen

菌 株 Strain	葡萄糖降解量 Amount of glucose degraded	降解产物 (mmol)		
		乙 酸 Acetate	乙 醇 Ethanol	甲 烷 Methane
116	20.0	25.1	9.1	0
116+JF-1	20.0	23.5	3.4	2

3 讨论

从污水处理反应器中分离的菌株 116 是严格厌氧革兰氏阴性杆菌。可发酵两分子的巴豆酸产生两分子的乙酸和一分子丁酸; 该菌株发酵葡萄糖、果糖、麦芽糖和半乳糖产生乙酸、乙醇和氢或甲酸, 不还原硫酸盐; 菌株 116 以周生鞭毛运动, 不产生芽孢, DNA 的 G

+C 含量为 $30.7 \pm 1 \text{ mol}\%$, 与由 Stieb 和 Schink^[3] 建立的新属——泥杆菌属的属特征相符。但是, 菌株 116 可利用氢和二氧化碳或甲酸合成乙酸, 发酵麦芽糖和半乳糖而不利用柠檬酸和延胡索酸, 因而明显地有别于建立新属时描述的新种——多营养型泥杆菌 (*Ilyobacter polytropus*), 同时, 菌株 116 因能利用氢和二氧化碳、葡萄糖、果糖、麦芽糖、半乳糖、乳酸和甘油而区别于德氏泥杆菌 (*Ilyobacter delafieldii*)^[10], 也因为不利用酒石酸和柠檬酸而区别于酒石酸泥杆菌 (*Ilyobacter tartaricus*)^[11]。菌株 116 的特征是能利用氢和二氧化碳自营生长。为此, 我们认为菌株 116 是泥杆菌的一个新种, 将其定名为嗜氢泥杆菌 (*Ilyobacter hydrogenotrophicus* nov. sp.)。菌株 116 作为该新种的模式种, 保藏于中国科学院微生物研究所, 编号为 AS 1. 1788。

致谢 电子显微镜观察由本所技术室刘如臻、谢家仪等同志协助完成, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Beaty P S, McInerney M J. *Arch Microbiol*, 1987, **147**: 389—393.
- [2] Zhao Hongxue, Yang Decheng, Wiese C R et al. *Inter J Syst Bacteriol*, 1990, **40**: 40—44.
- [3] Stieb M, Schink B. *Arch Microbiol*, 1984, **140**: 139—146.
- [4] Houwen F P, Dijkema C, Schoenmakers C H H et al. *FEMS Microbiol Letters*, 1987, **41**: 269—274.
- [5] 钱泽澍. 沼气发酵微生物学, 杭州: 浙江科学技术出版社, 1986. 257.
- [6] 中国科学院微生物研究所细菌组. 一般细菌常用鉴定方法, 北京: 科学出版社, 1978.
- [7] Lowry O H. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265—275.
- [8] De. Ley J. *J Bacteriol*, 1970, **101**: 738—754.
- [9] Marmur J. *J Mol Biol*, 1961, **3**: 208—218.
- [10] Jansen P H, Harfoot C G. *Arch Microbiol*, 1990, **154**: 253—259.
- [11] Schink B. *Arch Microbiol*, 1984, **139**: 409—414.

A NEW ANAEROBE UTILIZING HYDROGEN AND CARBON DIOXIDE——*ILYOBACTER HYDROGENOTROPHICUS* SP. NOV.

Dong Xiuzhu Tu Xionghai Su Jingjun Cheng Guangsheng
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract From a methanogenic organic-degrading enrichment, a new strictly anaerobic Gram-negative non-sporoforming bacterium, strain 116 was isolated with crotonate as substrat. Hydrogen and carbon dioxide or formate were utilized to synthese acetate and crotonate was fermented to acetate and butyrate. Glucose, fructose, maltose and galactose were fermented to acetate, ethanol and hydrogen or formate. Neither fumarate, tartrate nor citrite was utilized. No sulfate was reduced. The G+C mmol/L was $30.7 \pm 1\%$. The strain is described as a new species, *Ilyobacter hydrogenotrophicus* sp. nov. and strain 116(AS 1. 1788) is designated as the type strain.

Key words Growth on H/CO₂, Crotonate fermentation, *Ilyobacter hydrogenotrophicus*