

一株分离自高海拔土壤的梭菌的鉴定及代谢产物

刘全全, 刘海昌, 邓宇, 胡国全, 张辉*

(农业部沼气科学研究所, 农业部能源微生物与利用重点开放实验室, 成都 610041)

摘要:【目的】了解土壤环境中细菌的生理生化特性及代谢产物。【方法】采用厌氧操作技术从西藏纳木错分离到一株厌氧梭状芽孢杆菌 P4-1。采用生理生化鉴定结合 16S rDNA 序列的系统发育学分析确定该菌株的系统发育地位, 用气相色谱分析其代谢产物【结果】菌株 P4-1 为严格厌氧革兰氏阳性菌, 菌体大小为 $0.3 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} - 3 \mu\text{m}$, 单生或成对生长, 产生芽孢。生长温度范围是 $13 - 40^\circ\text{C}$ (最适温度 37°C); NaCl 浓度 $0\% - 5\%$ (最适为 $0.5\% - 1\%$); pH 范围 $5.0 - 10.0$ (最适生长 pH 为 $7.5 - 8.0$)。能够利用葡萄糖、密二糖、甘露糖醇等多种碳水化合物, 发酵葡萄糖的产物是乙酸, 丙酸, 丁酸, CO_2 , H_2 。菌株 P4-1 的 (G + C) mol% 含为 30.9% , 与 *Clostridium lituseburense* DSM 797 (M59107) 的相似性达 98.7% 。菌株 P4-1 能够降解对甲苯磺酸盐, 并且在有酵母粉的情况下能明显提高其降解能力【结论】菌株 P4-1 是从土壤中分离出的一株耐低温, 耐盐的厌氧菌, 其发酵葡萄糖产生的代谢产物有利于改善土壤中的微环境, 而且能够降解对甲苯磺酸盐, 在废水处理中有重要意义。

关键词: 象牙海岸梭菌; 鉴定; 对甲苯磺酸盐

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1135-06

土壤是一个特殊的厌氧环境, 不同的土层具有不同的氧化还原电势, 伴随着有机物含量的不同, 因此土壤中的微生物的种群分布也是千差万别^[1]。分子生态学研究表明, 土壤中有丰富的发酵型细菌。梭菌属作为土壤中的优势种群, 土壤生物代谢途径中都能够找到它的身影^[2]。梭菌属细菌是活性污泥以及 UASB 反应器中的优势菌群^[3], 同时也是目前厌氧发酵制氢的主要菌群^[4]。形态呈杆状, 严格厌氧, 生成芽孢是梭菌属的共同特征^[5]。

近年来对梭菌属细菌研究表明, 梭菌属细菌具有超强的分解有机化合物的能力。对甲苯磺酸盐在我国环境标准中把它列为第二类污染物质, 作为化工, 农药, 印染等废水中的主要成分, 性质稳定, 具有

毒性, 并可以通过食物链在人的身体中富集, 排放到废水中难以降解^[6], 造成水体起泡, 降低水中的复氧速率和充氧程度, 使水质变坏, 影响水生生物的生存, 使水体自净受阻。此外它还能乳化水体中其他的污染物质, 增大污染物质的浓度, 造成间接污染。国内有关自然界中能降解对甲苯磺酸盐的细菌的报道较少, 主要是硫酸盐还原菌, 以对甲苯磺酸盐作为电子受体^[7], 梭状芽孢杆菌属中能降解对甲苯磺酸盐的种类比较少^[8]。本文报道了从高海拔纳木错湖边泥土中分离的一株能够降解对甲苯磺酸盐的梭状芽孢杆菌, 为微生物降解有机污染物提供了新的菌源和基础材料。

基金项目: 国家科技支撑计划 (2008BAD4B04); 国家“863 计划” (2007AA100705)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-28-85258573; E-mail: zhanghuits@yahoo.com.cn

作者简介: 刘全全 (1984—), 男, 山东东营人, 硕士研究生, 从事厌氧微生物研究。E-mail: luckilylq@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-02-15; 修回日期: 2010-04-19

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集:样品取自西藏纳木错湖边泥土表层下 5–15 cm 处,纳木错地理坐标为 E89°30′–91°25′,N30°00′–31°10′,海拔 4718 米,全湖东西长 81.5 公里,南北宽 30 公里,总面积为 1920 平方公里,年平均气温 0℃,为我国第二大咸水湖,也是世界上最高的咸水湖。采集的样品立即放入密封瓶中运至实验室 4℃ 保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:酵母粉购于 OXOID 试剂公司,葡萄糖购于天津科密欧化学试剂有限公司,DNA Extraction Kit Ver. 2.0 和 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒购于上海生工生物工程技术有限公司。BH-2 光学显微镜购于 OLYMPUS 公司,721 型分光光度计购于上海第三分析仪器厂。

1.2 分离纯化

采用严格厌氧操作技术分离纯化,富集培养基 Medium 141 (DSMZ),分离培养基采用 Medium 141 (DSMZ),纯化培养基采用 Medium 110(DSMZ)。

1.3 形态鉴定

采用相差显微镜和扫描电子显微镜观察菌体形态,电镜照片样品制备参照文献[12]所述方法。

1.4 生理生化特性

所有生理生化实验均采用葡萄糖(0.2%)做生长基质,pH 实验采用灭菌后的 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 溶液调至所需 pH 值,7.0–8.5 采用 Tris 碱-盐酸缓冲体系^[9]。最适生长条件下菌株的倍增时间以对数生长早期菌体密度 OD_{600} 值作非线性回归,计算得到倍增时间。底物实验用各种不同的碳源代替葡萄糖(终浓度 0.02 mol/L)。培养基灭菌后加入不同的抗生素(终浓度 200 mg/L),测定菌体密度以确定具体对不同抗生素的抗性。

1.5 16S rRNA 基因扩增测序及系统发育树构建

采用方法参照文献[10]所述方法。

1.6 (G + C) mol% 含量的测定

根据热变性温度法(T_m 值法)测定基因组(G + C) mol%。测定菌株 DNA 的热变性温度(T_m 值),同时测定 *E. coli* K12 的 T_m 值。根据公式 $(G + C) \text{ mol\%} = 51.2 + 2.08 \times [T_m(X) - T_m(K12)]$ 计算出 (G + C) mol%^[10]。

1.7 菌株 P4-1 对对甲苯磺酸盐的降解以及耐受程度

分别配制含有 0–40 g/L 对甲苯磺酸钠的培养基(pH7.0),接种(接种量 3%)于 37℃ 培养 3 d 后测定 OD_{600} 以确定 P4-1 对对甲苯磺酸钠的耐受能力。

2 结果

2.1 形态特征

菌株 P4-1 呈革兰氏染色阳性,有鞭毛,能够运动,芽孢卵圆形,单生,成对,未见聚团或连成长丝状(图 1-A),直径 0.3 μm–0.5 μm,长度 1 μm–3 μm,在固体培养基上菌落呈白色光滑半透明状。当菌体刚接入液体培养基时,培养基中的菌体呈现梭形(图 1-B),37℃ 条件下,这种菌体形态会持续 1–2 h,15℃ 条件下,这种菌体形态会持续 4–6 h。此后,菌体快速增殖,液体培养基呈白色。当细菌增殖速度开始减慢的时候,液体培养基逐渐清澈透明,菌体逐渐沉降在培养基底部。

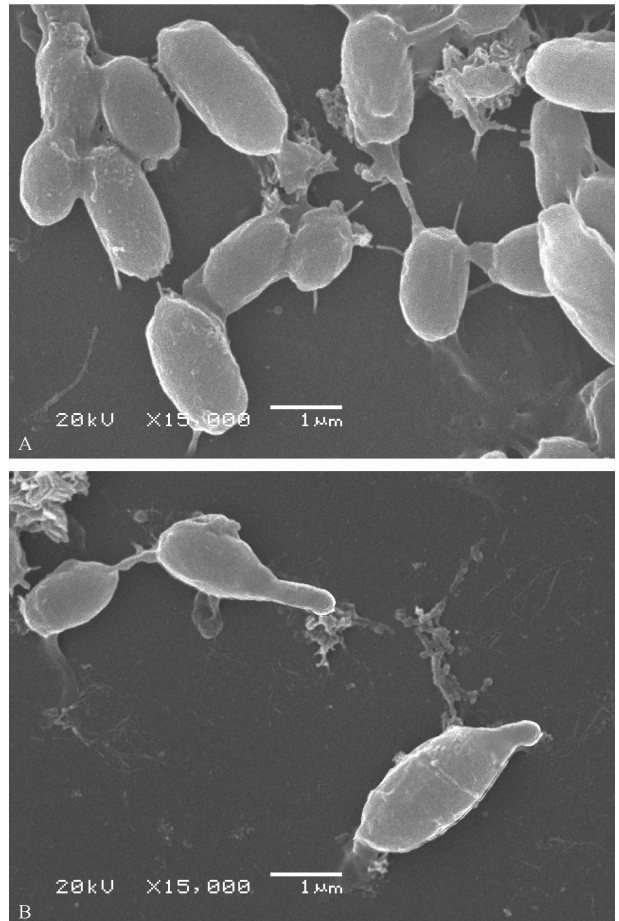


图 1 菌株 P4-1 的扫描电镜照片 (15000 ×)

Fig. 1 Electron micrograph of stain P4-1 (15000 ×).

2.2 生理生化特征

2.2.1 生理特征:菌株 P4-1 的生长温度范围是 13℃ - 40℃,最适 37℃;NaCl 浓度小于 5%,最适为 0.5% - 1%;由 pH 实验得出,菌株 P4-1 生长 pH 5.0 - 10.0,最适生长 pH 为 7.5 - 8.0。倍增时间为 70 min(pH7.5,37℃)。

2.2.2 生化特征:抗生素实验的结果表明,菌株 P4-1 对氨苄青霉素有抗性,对硫酸新霉素,红霉素,硫酸卡那霉素,硫酸链霉素,乳糖红霉素,青霉素,氯霉素,利福平,盐酸四环素等敏感。

底物实验结果表明,菌株 P4-1 能利用的底物包括山梨糖醇、乳糖、L-鼠李糖、阿拉伯糖、核糖、蜜二糖、纤维二糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖、D-半乳糖、甘露糖、松三糖、棉子糖、蔗糖、淀粉、酵母粉、酪蛋白胨。不能利用延胡索酸、菊糖、木糖、L-山梨糖、甘油、羧甲基纤维素钠、木聚糖。

2.2.3 系统发育学分析:P4-1 的 16S rDNA 部分序列长 1310 bp,在 GenBank 核酸登录号为 GU085092 (图 2)。

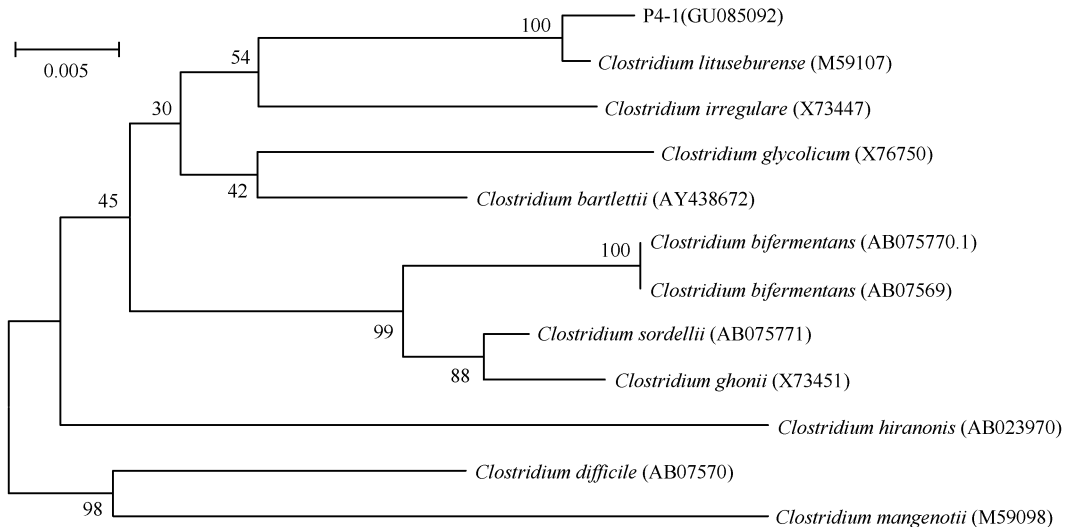


图 2 菌株 P4-1 基于 16S rDNA 的系统发育分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of strain P4-1 based on 16S rDNA gene sequences. P4-1 refers to the stain isolated. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.5% sequence divergence.

2.2.4 菌株 P4-1 产物分析和几种物质代谢产物对其生长代谢的影响:菌株 P4-1 当以葡萄糖为碳源,培养(pH7.5,37℃)72 h 后,检测得到代谢产物主要

为 CO₂、乙酸、丙酸、丁酸以及少量的 H₂。分别对 CO₂、乙酸、丙酸、丁酸进行定量检测,实验结果如表 1。

表 1 菌株 P4-1 发酵葡萄糖的产物

Table 1 Products of fermentation of glucose by strain P4-1

c(H ₂)/(mol/L)	c(CO ₂)/(mol/L)	c(acetate)/(g/L)	c(propionate)/(g/L)	c(butyrate)/(g/L)
0.001	0.0148	0.36	0.003	0.001

2.2.5 菌株 P4-1 对对甲苯磺酸盐的降解能力以及酵母粉的刺激作用:从图 3 可以看出,菌株 P4-1 能够降解对甲苯磺酸盐,无酵母粉条件下产生乙酸,丙酸,丁酸,在有酵母粉存在的条件下,降解对甲苯磺酸盐不产生丙酸。在无酵母粉存在的条件下,伴有乙酸,丙酸和丁酸的积累,特别是接种 6 d 后,挥发酸的异常积累,导致培养基的 pH 急剧降低,在 pH 和反馈抑制的双重作用下生长代谢活动受到抑制。在有酵母粉存在的条件下,菌株 P4-1 的代谢活动旺

盛,说明酵母粉对菌体生长有刺激作用,可能起到了刺激因子了作用,OD 值可以达到 0.248,随着乙酸和丁酸的产生和积累,对菌株产生反馈抑制以及降低了培养基的 pH,导致菌株生长代谢活动降低,接种 14 d 后生长停止。从图 3 - B 中可以看出酵母粉可以促进菌株的代谢活动以及对甲苯磺酸盐的降解,但是并不能延长菌株的代谢时间。图 4 可以看出,菌株 P4-1 可以耐受高浓度的对甲苯磺酸盐,当对甲苯磺酸盐的浓度达到 30 g/L 的时候,菌体依然

可以生长,此时菌体浓度为初始浓度的 50%。

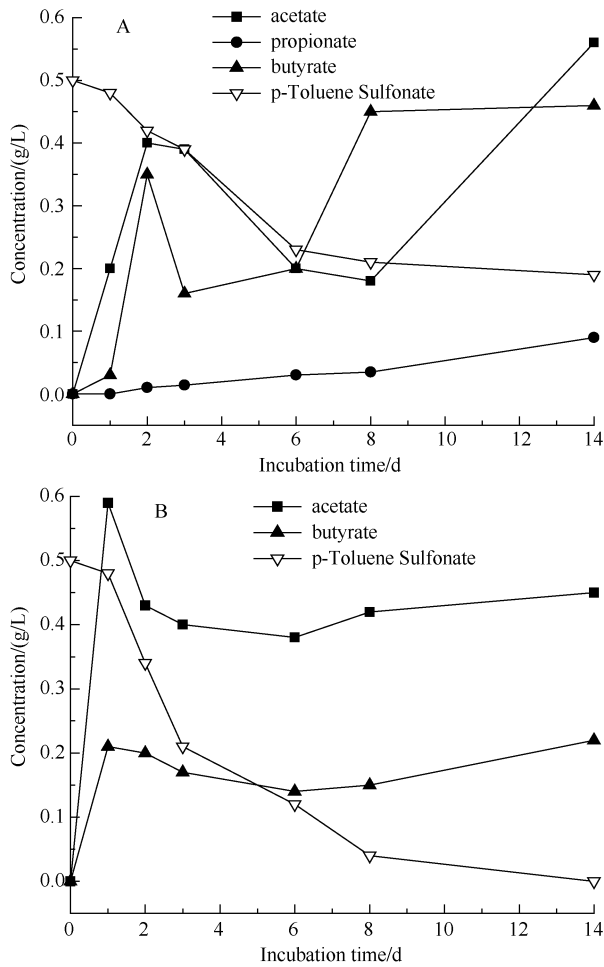


图3 菌株 P4-1 降解对甲苯磺酸盐产生的挥发酸

Fig. 3 Volatile fatty acid produced by strain P4-1 during degrading p-toluene sulfonate. Figure A represents strain P4-1 degrades p-toluene sulfonate in the absence of yeast. Figure B represents strain P4-1 degrades p-toluene sulfonate in the presence of yeast.

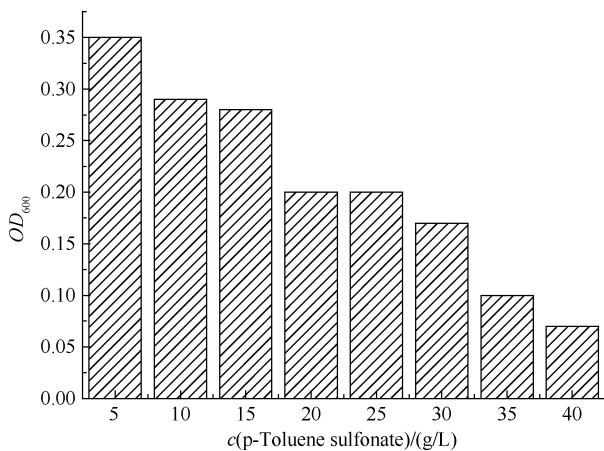


图4 P4-1 对对甲苯磺酸盐的耐受能力

Fig. 4 The tolerance capacity of stain P4-1 to p-toluene sulfonate.

3 讨论

本研究从西藏纳木错湖边的泥土中,分离出一株象牙海岸梭菌 P4-1,并对此菌株的形态特征,生理生化,系统发育等方面进行了研究。主要结论如下:

(1) 菌株 P4-1 与 *Clostridium lituseburense* 的模式菌株 M59107 的相似性达 98.7%。由于 M59107 并未公开发表,无法获得其生理生化指标,所以本论文并未对这两株菌进行比较。菌株 P4-1 与其他几株亲缘关系密切的梭菌属菌株的最适 pH,最适温度,(G + C) mol% 等进行了比较(表 2)。进一步的分类地位的确定需通过 DNA 杂交试验完成。生理生化实验表明,菌株 P4-1 适低温耐高盐,与纳木错地区高海拔高寒高盐的地理属性相适应。菌株 P4-1 革兰氏染色呈现阳性,有芽孢生成,严格厌氧,不能利用硫酸盐和硝酸盐作为电子受体,能够发酵葡萄糖,麦芽糖,甘露糖醇等多种碳水化合物。

(2) 菌株 P4-1 可以降解对甲苯磺酸盐。加入微量的酵母粉即能显著地提高菌株 P4-1 的降解对甲苯磺酸盐的能力。Shcherbakova 从 UASB 活性污泥中同时分离筛选出 *Clostridium lituseburense* 和产甲烷菌,以对甲苯磺酸盐作为 *Clostridium lituseburense* 的发酵底物,揭示了 *Clostridium lituseburense* 能够耐受高浓度对甲苯磺酸盐,并能够降解对甲苯磺酸盐推动产甲烷菌产生甲烷的关系,说明 *Clostridium lituseburense* 具有降解有机物的强大能力^[11],对生物处理有机废水的研究具有积极的意义。菌株 P4-1 能利用葡萄糖产生乙酸和二氧化碳。乙酸等酸性物质在地层中可溶解碳酸盐生成二氧化碳,也有利于污染物降解^[10]。

(3) *Clostridium lituseburense* 作为严格的厌氧发酵菌,近年来与产甲烷菌的关系的研究越来越成为研究的热点。*Clostridium lituseburense* 具有较强的分解芳香族化合物的能力,伴随产生的挥发酸,许多都是产甲烷菌产甲烷的底物。纳木错湖地区属于典型的寒带泥炭地貌,具有丰富的产甲烷菌群,是近年研究产甲烷菌的热点地区^[1],此次分离出 *Clostridium lituseburense* P4-1,进一步说明 *Clostridium lituseburense* 与产甲烷菌有密不可分的关系。所以本株菌的研究无论对于产甲烷代谢途径功能菌群的

研究,还是对于土壤微生物资源的收集都有一定的意义。

表 2 菌株 P4-1 与亲缘关系密切梭菌属菌株的比较

Table 2 Comparison between strain P4-1 and other most closely strains of *Clostridium*

Characteristics	P4-1	<i>C. ghonii</i> DSM 15049	<i>C. bifermentans</i> DSM 14991	<i>C. sordellii</i> DSM 2141
Gram staining	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+
Optimum pH for growth	7.5 - 8.0	7.8 - 8.0	7.8 - 9.0	7.8 - 8.6
pH range for growth	5.0 - 10.0	5.0 - 10.0	5.0 - 10.0	5.0 - 9.0
Optimum growth temperature	37	37	37	37
Temperature range for growth	13 - 40	13 - 40	13 - 45	ND
Products*	Acetate, butyrate, propionate, CO ₂ , H ₂	Acetate, isobutyrate, propionate, CO ₂ , H ₂	Acetate, isobutyrate, CO ₂ , H ₂	Acetate, butyrate, isobutyrate, propionate, valerate
Degrade <i>p</i> -toluene sulfonate	+	+	+	-
Autotrophy	-	-	-	-
Growth factors	Yeast extract	Yeast extract	Yeast extract	Yeast extract, peptone
G + C content, mol %	30.9	30.3	27.9	36.1

参考文献

- [1] Cavicchioli R. Cold-adapted archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4:331-343.
- [2] Svensson BH, Dubourguier HC, Prensier G, Zehnder AJB. *Clostridium quinii* sp. nov., a new saccharolytic anaerobic bacterium isolated from granular sludge. *Archives of Microbiology*, 1992, 157:97-103.
- [3] Kuhnert P, Capaul SE, Nicolet J, Frey J. Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1996, 46:1174.
- [4] 马诗淳, 罗辉, 尹小波, 张辉, 邓宇. 厌氧产氢微生物研究进展. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2009; 1244-1252.
- [5] Sleat R, Mah RA, Robinson R. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov.. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48:88.
- [6] 洪铭媛, 李清彪, 邓旭. 废水厌氧(水解)-好氧生物组合处理工艺研究进展. *化工环保 (Environmental Protection of Chemical Industry)*, 2005, 25:104-109.
- [7] Lens PNL, Visser A, Janssen AJH, Pol LWH, Lettinga G. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1998, 28:41-88.
- [8] Lens PN, De Poorter MP, Cronenberg CC, Verstraete WH. Sulfate reducing and methane producing bacteria in aerobic wastewater treatment systems. *Water Research*, 1995, 29:871-880.
- [9] Feng Y, Cheng L, Zhang X, Li X, Deng Y, Zhang H. *Thermococcoides sheng liensis* gen. nov., sp. nov., representing a novel genus of the order *Thermotogales* from oil-production fluid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 77:55-58.
- [10] 黎霞, 承磊, 汪卫东, 邓宇, 尹小波, 张辉. 一株油藏嗜热厌氧杆菌的分离, 鉴定及代谢产物特征. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48:995-1000.
- [11] Shcherbakova VA, Chuvil'skaya NA, Golovchenko NP, Suzina NE, Lysenko AM, Laurinavichyus KS, Akimenko VK. Analysis of the Anaerobic Microbial Community Capable of Degrading *p*-Toluene Sulfonate. *Microbiology*, 2003, 72:666-671.

Identification and metabolism characterization of a *Clostridium lituseburense* strain isolated from high-altitude soil

Quanquan Liu, Haichang Liu, Yu Deng, Guoquan Hu, Hui Zhang*

(Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Energy Microbiology and Application, Chengdu 610041, China)

Abstract: [**Objective**] We studied the physiological, biochemical properties and metabolism of *Clostridium lituseburense* P4-1 from soil in Namucuo. [**Methods**] We adopted Hungate anaerobic technique to get Strain P4-1 from soil in Namucuo. Through physiological, biochemical and phylogenetic analysis, we identified the strain P4-1. [**Results**] Cells were Gram-positive and spore-forming. It grew between 13 and 40°C (optimum at 37°C), between pH value 5.0 and 10.0 (optimum at 7.5 – 8.0), and with the presence of NaCl between 0% – 5%. Strain P4-1 could metabolize many carbon sources including glucose, melibiose and mannitol. Metabolites of glucose were acetate, butyrate, propionate, CO₂, and little H₂. Based on 16S rDNA studies, strain P4-1 was most close to *Clostridium lituseburense* DSM 797 (M59107) with 98.7% similarity. Strain P4-1 could degrade *p*-toluene sulfonate. [**Conclusion**] Strain P4-1 tolerated low temperature, salt and could degrade *p*-toluene sulfonate. Its metabolites produced by fermentation of glucose could improve the soil micro-environment. It was significant for strain P4-1 to be utilized in the wastewater treatment.

Keywords: *Clostridium lituseburense*; identification; *p*-toluene sulfonate

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Key Technology R&D Program(2008BAD4B04) and the Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2007AA100705)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-28-85258573; E-mail: zhanghuits@yahoo.com.cn

Received: 15 February 2010/ Revised: 19 April 2010

《微生物学报》投稿方式

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执:编辑部看到远程投稿后,当日或者次日给作者发“收稿回执”,通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审:编辑看到远程投稿后,还要对稿件进行内审。内审会有2个结果,直退或受理,请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 邮寄纸样:为了保护知识产权,务必请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板);为了核实文中的图、表等内容,还需要提供一份纸质稿件。
- (5) 受理费:100元审稿费。按照“稿件受理通知”中提供的详细地址办理,务必通过邮局汇款,切忌夹在纸样材料中随信邮寄!【为了便于查找,请在汇款单上注明“稿件编号”。】