

甲烷八叠球菌的纯培养、分离和鉴定*

周孟津 杨秀山

(北京师范大学生物系)

M.P. Bryant 首先提出产甲烷菌 (*Methanogens*) 一词^[1], 目的是为了与另一群在好氧条件下以利用甲烷为生的细菌相区别。产甲烷菌是一小群形态多样的生物类群, 然而在生理上它们都是严格的专性厌氧菌, 并且都具有产生甲烷的代谢功能。这些特性把这一群细菌紧密地联系在一起^[2]。1974年 Bryant 在伯杰氏细菌鉴定手册里把产甲烷菌定为一个科, 其中包括三个属^[3]。近来随着研究工作的深入, W.E. Balch 又提出把它们定为一个纲并分成四个科七个属^[4]。产甲烷菌只要短接触氧气, 其死亡率就极高^[5]。近几年我们根据产甲烷菌的生理特性, 按照 Hungate 氏厌氧技术的基本原理和方法^[6], 在严格厌氧条件下, 制备了以甲醇或乙酸钠为唯一碳源的合成培养基, 并在该培养基中富集出了甲烷八叠球菌, 获得了稳定的培养物。经过多代分离培养后, 获得了纯培养的甲烷八叠球菌, 经鉴定为甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina* sp.)^[3,4]。

材料和方法

1. 富集培养的起始接种物: 用实验室内以猪粪进行沼气发酵实验的培养物。

2. 富集培养基的制备: 采用了甲醇或乙酸钠为唯一碳源的合成培养基, 成分如下^[7] (g): $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.75, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.45, NH_4Cl 0.9, $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2, 盐酸-半胱氨酸 0.5; 液体 (ml): 微量元素溶液 (成分见后) 9, 维生素溶液 (成分见后) 5, 0.2% 刃天青溶液 1, 蒸馏水 1000; 1% 甲醇或乙酸钠做碳源, 用 5% Na_2CO_3 调节 pH 至 7.4。维生素溶液、盐酸-半胱氨酸及甲醇溶液, 采用过滤除菌后于接种

前加入培养基内。

3. 微量元素溶液成分如下^[8] (g): 氨基乙酸 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 1.0, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 0.01, H_3BO_3 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 0.01$ 。蒸馏水 1000 ml。

4. 维生素溶液成分如下 (mg): 生物素 2, 叶酸 2, 盐酸吡哆醇 10, 核黄素 5, 硫胺素 5, 烟酸 5, 泛酸 5, 维生素 B_{12} 0.1, 对氨基苯甲酸 5。蒸馏水 1000ml。

5. 驱避氧气: 产甲烷菌是一群严格的专性厌氧微生物。环境中的氧化还原电位 (以下简称 Eh) 的高低对产甲烷菌的生长有明显的影 响。Eh 值与氧分压有关, 也受 pH 的影响。在 pH 为 7 时的氧化还原电位以 Eh' 表示。自然环境中氧化还原电位的上限是 $\text{Eh}' = +820\text{mv}$, 下限是 $\text{Eh}' = -420\text{mv}$ ^[9]。Smith 等人认为产甲烷菌在氧化还原电位大于 -330mv 时不能生长, 在这种氧化还原电位时培养基中氧的浓度为 1.48×10^{-56} 个氧分子/L^[6]。所以在制备培养基时要驱避氧气并在培养基中加入还原剂。培养基灭菌后, 通过插在棉塞上的注射针头向培养基瓶内充二氧化碳立即进行封闭, 同时将培养基放入冷水中冷却至 45°C 以下, 然后取下棉塞换用钩状针头继续向瓶内充二氧化碳, 并将经过滤除菌的碳源。维生素、盐酸-半胱氨酸溶液加入培养基中。在有二氧化碳封闭的情况下, 分装培养基于试管中, 每管装 15ml, 管口用翻口塞封紧。 CO_2 输出气压为 $0.3-0.4 \text{ kg/cm}^2$, 采用焦性没食子酸碱性溶液吸收二氧化碳中氧的方法除氧, 再经过滤除菌后使用。

6. 接种方法及产气量的测定: 为保持培养基处于厌氧状态, 接种过程均采用 1ml 注射器, 富集培养用猪粪沼气发酵液接种, 接种量为 1ml。接种后培养于 35℃ 温箱中, 培养 4—5 周后即可转接。转管前先用 20ml 注射器测定管内产气量, 再用注射器抽出少量培养液镜检, 选产气量大或产甲烷八叠球菌数量较多的试管为种管转接。

7. 分离培养基的制备: 培养基成分与富集培养基相同, 只是增加 1.5—2.0% 琼脂和 0.02% $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。培养基灭菌后立即取出, 瓶内充入二氧化碳并换上无菌胶塞。最后将培养基置 45℃ 恒温水浴箱内, 待培养基温度至 45℃ 时, 即可在驱避氧气条件下分装。分装时向培养基内加入无菌甲醇; 维生素溶液和还原剂, 必要时加入青霉素 G 钾盐, 最终含量为 2000u/ml^[10]。混匀后在 CO_2 封闭的条件下将培养基分装入试管, 每管 15ml。最后用翻口塞塞好试管。试管放入 45℃ 恒温水浴箱内, 稀释分离所用液体培养基的制备过程与富集培养基相同。恒温保持 45℃, 2—3 小时, 其目的是使还原剂发挥作用, 培养基中指示剂由红变为无色后, 该培养基方可使用。

8. 纯培养的分离接种: 首次接种的富集培养物应选用甲烷八叠球菌含量高的培养物。用注射器取培养物于稀释液内进行稀释至 10^{-1} — 10^{-3} 。将不同稀释度的培养物, 用注射器接种于固体培养基试管内, 接种量 0.2—0.5 ml。我们多采用 4 号针头接种, 针头过粗易引起针孔漏气。接种后混匀, 35℃ 培养。

9. 固体培养物内单菌落的获得: 在 CO_2 封闭的条件下, 用接种铲从种管中选取生长好的单菌落挖出, 将菌落捣碎, 分散于稀释液试管中, 每管放一个培养一个月的菌落。最后用无菌注射器抽取稀释液镜检, 选用含杂菌少的菌落作分离接种用。

10. 镜检培养物: 首先检查培养物的革兰氏染色反应。用石碳酸复红染色检查有无杂菌效果较好。观察细胞结构和拍摄显微照片, 采用番红花红染色液或美蓝染色液染色效果较

好。

11. 生理测定: 用深层固体培养基的纯培养物进行。其中包括甲烷八叠球菌生长和利用发酵底物的情况; 不同底物的测定: $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ 、甲醇、乙醇、正丙醇、正丁醇、甲酸钠、乙酸钠、正丙酸、正丁酸、甲胺、葡萄糖、胰蛋白胨。底物浓度为 1%。 $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ 作底物是在管内充入 CO_2 , 接种后再注入 H_2 , 每管 15ml, 以后每周向管内按 $\text{H}_2 : \text{CO}_2 = 4 : 1$ 的量注入。其他试管均充氮气。

12. 气体分析: 采用 Sigma III 型气相色谱仪, 对培养物所产生的气体进行测定。

13. 氧化还原电位的测定: 使用 25 型酸度计 (上海甘泉五金厂生产), 铂金电极接正极, 银-氯化银电极接负极进行测定。所测直接读数加上 222mV (银-氯化银电极于 25℃ 时的电极电位), 为被测物质的氧化还原电位。

结果与讨论

富集培养基第一次用猪粪发酵液接种后, 经过 4—5 周培养会有大量气体产生, 但镜检几乎看不到甲烷八叠球菌。从第二次转接开始, 首先在以甲醇为唯一碳源的培养基内能看到甲烷八叠球菌。在乙酸钠培养基内第三次转接后甲烷八叠球菌才逐渐增多。到 5—6 次转接后则形成了稳定的培养物, 甲烷八叠球菌明显增多, 其他菌主要是革兰氏染色阴性杆菌, 其大小为 $0.5—1 \times 1.0—2.5 \mu\text{m}$, 未见形成芽孢。见图版 I-1。

制备好的固体培养基, 氧化还原电位为 -220mv 。接种富集培养物 10 天后, 则可看到甲烷八叠球菌的菌落。开始菌落为白色至淡黄色, 呈圆形透镜状, 穿插生长在黑色菌落之间, 直径为 0.2—0.3mm。5—6 周后菌落直径可达 1—2mm。颜色也逐渐加深为橙黄色, 到生长后期菌落常呈立方体或不规则的多角体状。

经多次单菌落选育和生长后期在培养基内加入青霉素 G 钾盐, 即可获得纯培养的甲烷八叠球菌。

甲烷八叠球菌在固体培养基里生长很慢,

一般5天时可见到气体裂缝,10天时形成能看到的浅色菌落,一个月后菌落可生长至1—2mm。生长前期菌落颜色浅,无色或淡黄色、透明、呈透镜状。后期菌落变大、颜色变深、呈橙黄色、不透明,为立方体或不规则的多角状体(见图版I-2)。若接种量过大,菌落常生长成云雾状小菌落。

在菌落生长过程中有大量气体产生,使培养基出现气体裂缝,把培养基撕裂并分割成数段(见图版I-3),同时管内出现正压力,这时应注意适当放气,否则会使管口胶塞冲开,甲烷八叠球菌死亡。

经显微镜观察,该纯培养物细胞为不规则的球型,直径为2—28 μm 。通常为八个或更多个细胞出现于一个立方体或不规则形状的包囊内。但包囊大小差别很大,长轴可达4.2—21 μm ,生长前期大型包囊较多,后期为八个细胞形成的包囊,从未观察到呈单细胞状态存在。细胞革兰氏染色阳性,经磷钨酸负染电镜照像未见到鞭毛。见图版1-4,其中a为培养前期,b为后期。

纯培养物可以生长在以甲醇或乙酸盐为唯一碳源的培养基内,在甲醇培养基上比在乙酸盐培养基上生长快。前次培养生长底物对转接后的生长影响很大。转接前后生长底物相同时,菌落生长较快,菌落数量也较多。转接前后生长在不同底物上,则菌落生长慢,菌落也较少。这可能是和该菌诱导酶的产生有关。转接前的生长底物对转接后生长在不同底物上产生的诱导酶有抑制作用^[11]。

经生理测定,该纯培养物可以生长在以甲醇或乙酸盐为唯一碳源的培养基上并可发酵甲醇或乙酸形成甲烷。在甲醇培养基管内甲烷含

量平均为66.15%,乙酸盐培养基管内平均为59.05%。纯培养物还可以利用 H_2+CO_2 和甲胺,不利用乙醇、丙醇、丁醇、甲酸、丙酸、丁酸、葡萄糖和蛋白胨。

在pH7.4,温度为35 $^{\circ}\text{C}$ 时菌生长良好。25 $^{\circ}\text{C}$ 时菌生长慢。

根据以上形态和生理特征,参照伯杰氏细菌鉴定手册及Balch等人所提出的分类原则^[3,4],我们认为该纯培养物为产甲烷菌,属于甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)的一个种(*Methanosarcina* sp.)。

参 考 文 献

- [1] Zeikus, J. G.: *Bacteriol. Rev.* 41: 514—541, 1977.
- [2] Barker, H. A.: *Bacterial Fermentations* John Wiley and Sons, Inc., 1—95, New York, 1956.
- [3] Bryant, M. P.: Part 13, Methane-producing Bacteria, 472—477, In R. E. Buchanan, and N. E. Gibbons (ed.) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th. ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore., 1974.
- [4] Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum et al.: *Microbiol. Rev.*, Vol. 43(2): 260—296, 1979.
- [5] Smith, P. H.: *Pure Culture Studies of Methanogenic Bacteria* Proc. 20th. Purdies Waste Conference, 583, 1965.
- [6] Hungate, R. E.: A Roll Method for Cultivation of Strict Anaerobes, 117—132. In J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed), *Methods in Microbiology*, Vol. 3B, Academic Press Inc., New York, 1969.
- [7] Zeikus, J. G.: 甲烷产生菌的生物学, 陈光谦译自 (*Bacteriological Reviews*), 1977, 41(2): 514—541.
- [8] Wolin, E. A., M. J. Wolin and R. S. Wolfe: *J. Biol. Chem.*: 23B: 2882—2866, 1963.
- [9] 武汉大学, 复旦大学微生物系微生物学教研室编: 微生物学, 132, 人民教育出版社, 北京, 1980.
- [10] Zinder, S. H. and R. A. Mah: *Appl. and Environ. Microbiol.* Vol. 38, No. 5, 996—1008, 1979.
- [11] Mah, R. A., M. R. Smith, and L. Baresi: *Appl. and Environ. Microbiol.* 35: 1174—1184, 1978.

* 参加工作的有高亚同志。