

# 嗜热自养甲烷杆菌的分离和生理特性的初步研究

王仪梅 黄秀琴 罗 平 杨颐康

(华东师范大学生物系, 上海)

嗜热自养甲烷杆菌(*Methanobacterium thermoautotrophicum*)是从上海市科学会堂沼气池取样,在 65°C 条件下经过富集分离而得到的一株产甲烷杆菌。该菌能利用  $H_2$  和  $CO_2$  作为生长基质,不能利用甲醇、乙醇、甲酸钠、乙酸钠、丙酸钠等作为供氢体。氮源主要来自  $NH_4^+$ 。少量的酵母膏等有机物和一定量的污泥上清液对

生长有促进作用。在适合的环境条件下,嗜热自养甲烷杆菌无论在固体培养基上或液体培养基中均产生甲烷。

## 材 料 和 方 法

1. 富集培养基<sup>[1]</sup>: 见文献[1]
2. 分离培养基<sup>[2]</sup>: 见文献[2]

3. 应用 Olympus 牌显微镜观察培养物的形态, 测量菌体大小并照相。以 Olympus 牌荧光显微镜在 420nm 波长下观察培养物所产生的荧光。

4. 气相色谱: 以用意大利 CARLO ERBA 公司 Model-D 气相色谱仪和上海分析仪器厂生产的 103 型气相色谱仪测量甲烷的含量。

5. 厌氧装置<sup>[4]</sup>: 包括 N<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> 高压钢瓶, H<sub>2</sub> 来自氢气发生器。在操作过程中为了彻底排除氧, 我们对 Hungate 厌氧技术进行了一些改进。利用带有玻璃嘴的蒸馏烧瓶, 待培养基煮沸后通入 N<sub>2</sub>, 用盐水瓶塞子将瓶口封住。在玻璃嘴处接一段乳胶管和玻璃管, 通过加热和通入 N<sub>2</sub> 不断驱赶瓶内的 O<sub>2</sub>, 瓶内显示正压, 迫使 O<sub>2</sub> 和 N<sub>2</sub> 只能从玻璃嘴处逸出, 指示剂刃天青显示无色。在分装培养基时不用水浴锅, 也不用移液管, 而只要在分装培养基前将带有玻璃管的乳胶管通入厌氧试管, 将其中的 O<sub>2</sub> 完全赶出, 接着可将配制好的培养基根据所需要的量倾入厌氧试管中, 立即加塞封住, 高压灭菌后备用。

6. 富集和分离: 将已配制好的液体富集培养基在无氧条件下装入 500ml 盐水瓶中, 每瓶装 400ml, 灭菌后接入沼气发酵池菌液 80ml, 于 65℃ 恒温水浴中培养, 所产生的气体可通过集气袋收集。经过两天培养后当产气量达到高峰时, 用无菌无氧注射器将富集物转接到厌氧试管装的新鲜培养基中。如此反复 3—4 次即可进行滚管分离, 直到单菌落出现。

## 结 果

### (一) 菌落形态

嗜热自养甲烷杆菌在 65—70℃ 条件下, 在滚管中 10 天后可形成肉眼可见的菌落, 一般出现在培养基的深层, 呈灰白色, 大小为 1—5mm, 圆形、粗糙甚至形成丝状体<sup>[2,5]</sup>。经气相色谱分析结果证明确有甲烷生成, 产气量为 630.25 μmol/ml。经显微镜观察, 该菌为不规则的杆状体, 常形成丝状体<sup>[2,5,6]</sup>。菌体宽 0.37—0.7 μm, 长 3—7 μm, 丝状体长 10—100 μm 以上。革兰氏染色

阳性, 不运动, 不产芽孢。在波长为 420nm 的紫外光下, 菌体可发出蓝-绿色荧光。该菌绝对厌氧, 专性嗜高温, 在 65—70℃ 条件下在固体培养基或液体培养基中均生长良好(图 1)。



图 1 嗜热自养甲烷杆菌相差显微镜照片(×1,760)

### (二) 基质的利用<sup>[2]</sup>

分别以 1.5% 的下列各种有机物作为基质: 甲醇、甲酸钠、乙酸钠、乙醇、丙酮酸钠等, 进行液体发酵, 接种量为 5%, 培养四天后测量甲烷含量。从实验结果来看, 嗜热自养甲烷杆菌是一株自养菌, 只能利用无机物以及 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub> 作为生长基质。不能单独利用上述有机物作为基质。但是以 H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 作为气相的前提下, 在分离培养基中单独加入下列各种单因子有机物对生长有刺激作用(表 1)。

表 1 几种单因子有机物对嗜热自养甲烷杆菌生长的刺激作用

有 机 物	气 相	CH <sub>4</sub> 产量 (μmol/ml)
对 照	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> (80:20)	174.51
1% 酵母膏	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	215.32
10% 污泥上清液	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	237.32
1.5% 甲酸钠	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	193.2
1% 乙酸钠	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	243.21

### (三) pH 对生长和产甲烷的影响<sup>[2,8]</sup>

配制不同 pH 值的液体分离培养基分装于厌氧试管中, 灭菌后, 接种量为 5%, 在 65—70℃ 条件下培养 4 天后测量甲烷含量, 结果见表 2。

根据试验结果, 我们认为 pH 值是一个重

表 2 不同的 pH 值对嗜热自养甲烷杆菌生长和产甲烷的影响

气 相	pH 值	CH <sub>4</sub> 产量 ( $\mu\text{mol/ml}$ )
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> (80:20)	6.0	0
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	6.5	0
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	7.0	70.5
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	7.2	156.2
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	7.5	212.51
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	7.8	131.23
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	8.5	31.41
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	9.0	0

要的环境因子,适合于嗜热自养甲烷杆菌生长的 pH 值范围是 7.2—7.8(图 2)。

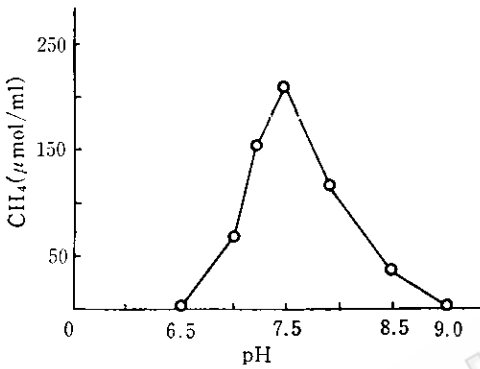


图 2 嗜热自养甲烷杆菌的生长适宜 pH 范围

#### (四) 温度的影响<sup>[2,3,8]</sup>

最适生长温度为 65—70℃, 低于 45℃、高于 80℃ 不能生长也不能产生甲烷, 试验结果如表 3。

表 3 温度对嗜热自养甲烷杆菌生长和产甲烷的影响

气 相	温 度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	CH <sub>4</sub> 产量 ( $\mu\text{mol/ml}$ )
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> (80:20)	40	0
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	50	31.2
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	60	175.1
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	65	650.31
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	70	641.4
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	75	56.35
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	80	0
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	85	0

#### (五) 重金属的影响<sup>[9]</sup>

根据有关资料报道, 金属离子只有当浓度较高时才抑制产甲烷细菌的生长和产甲烷。从

我们的试验结果来看, 当浓度为 100ppm 时几乎没有什么影响。而只有当浓度达 1000ppm 时, 才有较明显的抑制作用。我们用分离培养基分别单独加入 1000ppm 的 HgCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> 以及 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 溶液 0.05ml, 于 65℃ 恒温水浴中培养 4 天, 测量甲烷含量, 见表 4。

表 4 重金属对嗜热自养甲烷杆菌的影响

重 金 属	气 相	CH <sub>4</sub> 产量 ( $\mu\text{mol/ml}$ )
HgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> (80:20)	24.55
PbCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	162.1
FeCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	106.23
CdCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	46.21
CuCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	143.3
CrCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	155.31
ZnCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	194.4
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	151.2
对 照	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	212.35

## 讨 论

根据上述试验结果及参考有关文献资料, 认为分离到的产甲烷杆菌是一株嗜热自养甲烷杆菌<sup>[7]</sup>。Zeikus 和 Wolfe 的报道指出<sup>[5]</sup>: 生长温度低于 45℃ 或高于 75℃ 时, 可导致该菌形态结构的改变即由杆状变成球形, 甚至影响细胞壁和 DNA 的合成。该菌以 CO<sub>2</sub> 为碳源, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 作为氮源, 以 Na<sub>2</sub>S 和盐酸半胱氨酸作为硫源, 尤其是半胱氨酸对生长有促进作用又是良好的还原剂。不能利用甲醇、乙醇、甲酸钠、乙酸钠、丙酮酸钠等作为电子供体和碳源。但 Fuschs 等 1978 年的报道指出乙酸盐也可被同化<sup>[10]</sup>。Hughes 等在厌氧消化一书中提出酵母膏对嗜热自养甲烷杆菌的生长和产甲烷有促进作用。并发现酵母膏里含有相当数量的镍, 是该菌所需要的<sup>[5]</sup>。

利用 Olympus 荧光显微镜在 420nm 波长的紫外线照射下, 嗜热自养甲烷杆菌能发蓝-绿色荧光。Edwards 等 1975 年提出, 生产甲烷细菌中有一种特殊的发光物质——荧光色素即 F420 因子<sup>[11]</sup>。这种色素是一种低分子量的化

合物,其氧化型在 420nm 波长有一明显的吸收峰而发出荧光。

重金属对嗜热自养甲烷杆菌的影响还有待于进一步探讨。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Zeikus, J. G.: *Bacteria Rev.*, 41: 514—541, 1977.
- [ 2 ] Zeikus, J. G. and R. S. Wolfe: *J. Bact.*, 109: 707—713, 1972.
- [ 3 ] Daddema, H. J. and D. Vogels: *Applied and Enviro Microbial.*, 33:714—717, 1978.
- [ 4 ] Hungate, R. E.: Aroll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes, In J. K. Norris and D. W. Ribbans (ed.) *Methods in Microbiology*, Val. 3B, 117—132, 1969.
- [ 5 ] Zeikus, J. G. and R. S. Wolfe.: *J. Bact.*, 113: 461—467, 1973.
- [ 6 ] Balch, W. E. et al.: *Microbial Rev.*, 43: 261—292, 1979.
- [ 7 ] Bryant, M. P. Methane Producing Bacteria in *Bergey's Nomal of Determinative Bacteriology* 8th ed., 472—477, 1974.
- [ 8 ] Hughes, D. E. et al.: *Anaerobic Digestion*, Elsevier Biomedical press. New York., pp. 39, 1981.
- [ 9 ] Capone, D. G. et al.: *Appl. and Enviro Microbial.*, 45: 1586—1591, 1983.
- [ 10 ] Fuchs, G. et al.: *Arch Microbial.*, 117: 61—66, 1978.
- [ 11 ] Edwards, T. and B. C. McBride.: *Appl. Microbial.*, 27: 540—545, 1975.