

泸州老窖泥中布氏甲烷杆菌的分离和特性

刘光烨 赵一章 吴衍庸

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

摘要 自酿酒老窖窖泥中分离出一株革兰氏阳性的产甲烷菌。菌体为长杆状, $0.5 \times 2-5.5 \mu\text{m}$, 单个或少数成对, 有时连成长链。滚管菌落丝状, 黄褐色。细胞对青霉素、红霉素、卡那霉素和四环素具有抗性。该菌株不能利用甲酸、甲醇、乙酸和三甲胺, 只能以 $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 作为生长和产甲烷的基质。窖泥浸出液和微量元素维生素复合液显著刺激生长, 酵母膏无刺激作用。生长最适温度 35°C 、最适 pH7。在最适条件下振荡培养, 最短增代时间约 6 小时, 该菌鉴定为布氏甲烷杆菌, 名称为 CS 菌株 (*Methanobacterium bryantii* CS)。

关键词 布氏甲烷杆菌; 泸州曲酒; 老窖泥

酿酒老窖是一特殊的生态环境, 泸州酒的浓香型与老窖泥中栖息的大量厌氧细菌有密切的关系^[1]。1936 年 Barker^[6] 等人研究甲烷发酵时, 偶然发现产己酸的细菌。后北原觉雄^[4] 研究己酸发酵, 发现发酵液同时产生甲烷。1964 年, 原西南生物研究所在研究己酸菌富集培养时也观察到类似现象, 但未作进一步研究。近期内, 我们采用改进的 Hungate 厌氧技术和荧光显微镜快速镜检, 确认泸州老窖泥中存在有多种杆状、小球状和八叠状的产甲烷细菌, 并分离纯化出产甲烷杆菌 CS 菌株。初步研究还发现产甲烷菌对于己酸菌生长和提高酿酒质量均有一定作用。本文仅报道布氏甲烷杆菌 CS 菌株的分离及其生理特性。

材料和方法

1. 样品采集: 采样点是泸州大曲酒厂一车间十号窖, 窖龄已近百年。采样时窖内酒糟刚起出一半。用 25ml 无氧管采取窖泥, 密封后注入 2% Na_2S , 10% NaHCO_3 各 0.1ml, 以保证样品的厌氧状态。

2. 培养基: 基础培养基成份为 (g/l): K_2HPO_4 0.4, KH_2PO_4 0.4, NH_4Cl 1, MgCl_2 0.1, 酵母膏 2, 胰酶解酪蛋白 2, 盐酸半胱氨酸 0.5, 复合微量元素溶液 10ml, 复合维生素

本所连莉文、王晓莉等测定氢化酶, 中国科学院成都分院测试中心郑中华协助拍摄透射电镜照片, 清华大学环境工程教研组协助拍摄扫描电镜照片, 在此一并致谢。

溶液 10ml^[6], 刃天青 (0.1%) 1ml。120℃ 灭菌 20 分钟。接种前数小时加入 5% NaHCO_3 , 2% $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 无氧贮备液, 以此调 pH 至 7.0—7.2。在上述培养基中加入 2% 琼脂即为分离滚管培养基。用于富集培养时添加 (g/l) 窖泥浸出液 20ml, 甲酸钠 2, 乙酸钠 2。

3. 厌氧操作: 采用 Hungate 严格厌氧技术^[8], 所有气体使用前均通过灼热还原铜柱去氧, 培养基制备和试剂配制均在 100% N_2 下进行。试剂、菌种的加入采用无氧气体换气后的注射器完成。

4. 富集培养和分离: 在样品管中加入富集培养基, 配成 1:1 (W/V) 悬浊液, 以此作为接种样品液。盛富集培养基 18ml 的血清瓶 (容积 60ml) 中接种样品液 2ml, 通入 1 个大气压的 $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 混合气体 (4:1, 下同), 置 35℃ 培养。连续富集过程中用青霉素 G (终浓度 2800 单位/ml) 处理富集液。经几次连续富集后, 在荧光显微镜下观察到大量发蓝绿色荧光的细胞。即转入滚管培养基中进行分离, 稀释系列为 10^{-1} — 10^{-8} 。滚管后充入 $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 混合气。培养至出现菌落后, 选取稀释度高, 产甲烷的试管, 厌氧挑取荧光菌落转移至液体培养基中。根据甲烷含量的增加, 在指数生长中期再转入分离培养基作滚管稀释。以上程序反复进行, 直到滚管中菌落都发荧光且形态一致为止。菌株经显微镜检查和革兰氏染色符合纯度标准后, 再转入纯度鉴定培养基作进一步检查。

5. 观察、测试仪器和标准分析条件: 用 Leitz 荧光和相差显微镜作形态观察和显微摄影。JEM-100CX 型电子显微镜用作磷钨酸负染和超薄切片观察, 采用 JEM-35C 扫描电镜作电子扫描。甲烷含量测定系用 SC-6 型气相色谱仪, Porapak Q 作柱填充剂, N_2 作载气, 测试柱温 40℃, 热导池法检测。用带活塞的注射器每次抽取培养液上端气体 0.5ml 注入分析。所得数据均为血清瓶或试管中液面上部有效空间中的甲烷总量 (μmol /瓶或管)。

结 果

(一) 菌株形态和生长特征

在滚管形成的菌落中, CS 菌株呈长杆状, 一端不规则弯曲; 单独存在或少数成对存在, 液体培养中常数个或数十个细胞连成长链; 有时也形成菌丛。细胞宽约 $0.5\mu\text{m}$, 长 $2\text{—}5.5\mu\text{m}$, 端部钝圆并略显膨大。革兰氏染色阳性; 芽孢染色阴性, 不能耐受热处理 (80℃, 10 分); 湿装片暗视野观察菌体不运动, 鞭毛染色阴性, 电镜观察也未见到鞭毛。滚管培养一周后, 出现针头大菌落, 稀释度较高试管中直径可达 0.1—0.25 mm, 补充基质后也不再增大; 菌落丝状, 黄褐色, 中部较致密, 边缘扩散, 表面常有不规则突起。菌落荧光明亮、持久; 菌体荧光强度随培养条件和生长时期而异。液体培养初期出现云雾状生长, 时间较长则形成絮状沉淀。CS 菌株菌体形态示于图 1。磷钨酸负染电镜照片显示菌体有深色小斑点 (图 2), 可能是细胞质内含物。



图 1 扫描电镜下观察 CS 菌体

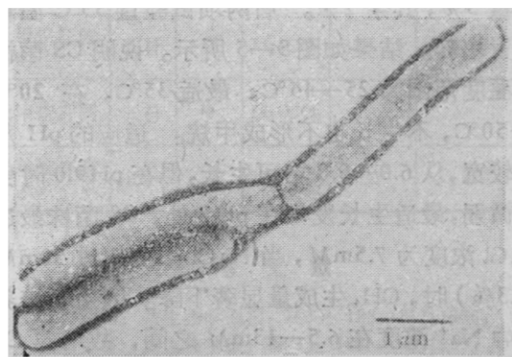


图 2 磷钨酸负染, 菌体表面有斑点

超薄切片示 CS 菌株有一层薄而平滑的细胞壁, 有的菌体可观察到内膜结构。

(二) CS 菌株对抗生素的抗性

产甲烷细菌属于古细菌, 细胞壁组成与真细菌不同, 对多种抗生素均不敏感。曾试验 CS 菌株对青霉素、红霉素、卡那霉素和四环素的反应, 青霉素 G 用量增加到 5600 单位/ml, 红霉素用量 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 对细菌生长仍无明显影响。卡那霉素浓度 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或四环素浓度 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 也不影响细菌生长, 但浓度增加到 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 则有明显抑制作用。

(三) 基质利用能力

试验的基质是 HCOONa , CH_3COONa , CH_3OH , $\text{N}(\text{CH}_3)_3$, 浓度均为 0.05 M, $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 1 大气压。接种量 10%, 35 $^\circ\text{C}$ 静置培养。结果表明 CS 菌株不能利用甲酸、甲醇、乙酸和三甲基胺; 以上基质培养 2 月未出现生长迹象, 只能利用 $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 作为生长和产甲烷的基质。甲烷产量第 7 天和第 14 天分别为 65.17 和 224.26 $\mu\text{mol}/\text{管}$ 。

(四) 最适生长参数

生长参数分析均采用 26ml 铝封试管进行。温度试验范围 20—55 $^\circ\text{C}$, 水浴恒温培养。pH 试验时, 用微量注射器加入 4N HCl 或 10% NaOH 调节 pH 值, 试验范围 4.0—10.0, 间隔 0.5 个 pH 单位。NaCl 需要试验是从生长培养基中去除 NaHCO_3 , 用 10% KOH 调节 pH 到 7; 培养基中基底 Na^+ 浓度为 1.7mM, 试验 NaCl 浓度为 (mM): 2.5、5、7.5、10、15、20、50 和 100。上述试验均用 5ml 培养液, pH 试验接种量 3%, 其余 2%。后两项试验置 35 $^\circ\text{C}$ 温箱静置培养。结果如图 3—5 所示。说明 CS 菌株的温度范围为 25—45 $^\circ\text{C}$, 最适 35 $^\circ\text{C}$, 在 20 $^\circ\text{C}$ 和 50 $^\circ\text{C}$, 不生长也不形成甲烷。适应的 pH 范围较宽, 从 6.0—9.0 均可生长, 但在 pH 9.0 时生长微弱, 最适生长发生在 pH 7 处, CS 菌株最适 NaCl 浓度为 7.5mM, 当 NaCl 浓度超过 50mM (0.3%) 时, CH_4 生成量显著下降。因生长培养基中 Na^+ 浓度在 6.5—13mM 之间, 故培养 CS 菌株不需添加 NaCl。

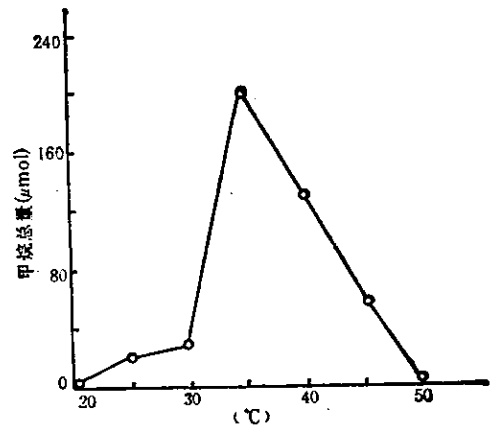


图 3 温度对 CS 菌株生长的影响

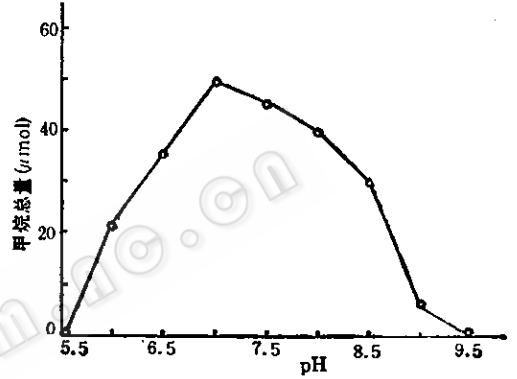


图 4 pH 对 CS 菌株生长的影响

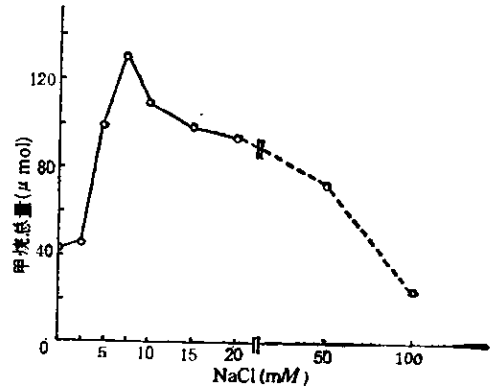


图 5 NaCl 浓度对 CS 菌株生长的影响

(五) 添加物的影响

试验采用磷酸盐缓冲液, 培养基中有机物仅保存盐酸半胱氨酸, 接种量 2%, 35 $^\circ\text{C}$ 静置培养。表 1 为培养 13 天的甲烷生成量和生长情况。从表中说明 CS 菌株以 H_2 作能源, CO_2 作碳源在简单矿质盐培养基上即可生长。添加窖

泥浸出液、胰酶解酪蛋白、硫酸镍与乙酸钠有不同程度的刺激作用。复合微量元素刺激生长，与维生素溶液合用时作用可进一步增强，但维生素溶液单独使用时没有刺激作用。酵母膏则完全没有刺激作用。

表1 添加物对CS菌株生长的影响

添 加 物	A _{460nm}	甲烷产量 (μmol/管)
—	0.07	68.67
0.2%酵母膏	0.07	60.06
0.2%酵母膏+0.2%胰酶解酪蛋白	0.12	102.9
1%窖泥浸出液	0.14	185.01
0.16%CH ₃ COONa	0.09	81.9
0.0001%NiSO ₄	0.11	95.34
1%微量元素溶液	0.12	132.3
1%微量元素+1%维生素溶液	0.15	194.46

(六) 氢化酶活性和甲烷形成的关系

CS菌株以H₂/CO₂作为生长基质，静置培养时生长较慢，在35℃作振荡培养(100r/min)，细菌生长迅速，约经两天迟缓生长期后进入指数生长期，到第6天甲烷产量和光吸收值均达高峰。氢化酶活性高峰提前一天到达，以后迅速下降，其变化与史氏甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter smithii*)相似^[2]。光吸收值随后也下降，可能是细胞自溶和形成原生质体造成的^[7]。三者的关系如图6所示。

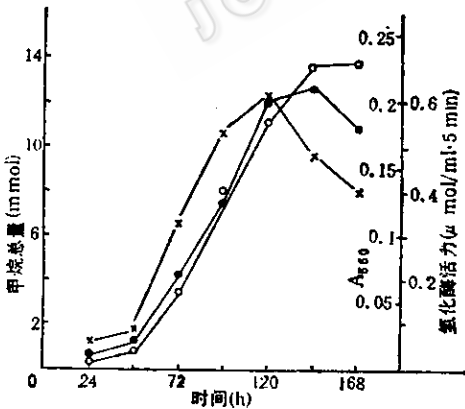


图6 CS菌株氢化酶活性和生长的关系

x——氢化酶活力 o——甲烷 •——光吸收值

讨 论

依据细胞形态和生理特征,CS菌株属于甲

烷杆菌属。在1979年发表的Balch分类系统中^[2],该属包括三个种,其中中温菌二个种,即甲酸甲烷杆菌(*M. formicicum* MF)和布氏甲烷杆菌(*M. bryantii* M. O. H)。近二年又有六个种见诸文献,且均以H₂和CO₂为唯一生长基质,但均属于嗜热或嗜碱的甲烷杆菌,仅淤泥甲烷杆菌(*M. uliginosum*)是一般的中温生长菌^[10]。CS菌株和该属的三种中温菌的主要特征列于表2,表中包括钱泽澍^[3]从沼气池分离出的甲酸甲烷杆菌TC708菌株和Godsey^[9]从200米深地下水层中得到的布氏甲烷杆菌。甲酸甲烷杆菌细胞细长,两端尖圆,以H₂-CO₂和甲酸作生长基质,可和CS菌株区分开。淤泥甲烷杆菌最明显的特征是从细胞端部释放出小球状细胞,最低生长温度达15℃,显然与CS菌株不同。CS菌株与布氏甲烷杆菌特征相似,均为两端钝圆的圆柱状细胞,大多单独存在,液体培养常连接成链或成丛;菌落丝状;以H₂-CO₂为唯一碳能源;其它营养和生理特征也很相似。不同处是模式株菌落灰色到淡灰绿色,CS菌株菌落为黄褐色,可能是生长于酒窖这一特殊生态环境所致。因此,CS菌株应归入布氏甲烷杆菌,名称为:布氏甲烷杆菌CS菌株。

表2 甲烷杆菌属中温菌株主要特征比较

菌株名称	形态	革兰氏	基质	最适生长温度	最适 pH 或 pH 范围
甲酸甲烷杆菌 MF	长杆	+	H ₂ -CO ₂ 甲酸	37—45	6.7—7.8
甲酸甲烷杆菌 TC708	长杆	—	H ₂ -CO ₂ 甲酸	35—40	7.0—8.4
淤泥甲烷杆菌	长杆	+	H ₂ -CO ₂	40	6.0—8.5
布氏甲烷杆菌 MOH	长杆	±	H ₂ -CO ₂	37—39	6.9—7.2
布氏甲烷杆菌	长杆	+	H ₂ -CO ₂		
布氏甲烷杆菌 CS	长杆	+	H ₂ -CO ₂	35	7.0

参 考 文 献

[1] 吴衍庸等:微生物学通报,7(3): 108—112,1980。
[2] 赵一章等:微生物学报,25(3): 187—193,1985。
[3] 钱泽澍:微生物学报,24(2): 105—110,1984。

- [4] 朝井勇宜,北原觉雄: 细菌利用工业, 平安译, 轻工出版社, pp.147—156, 1956.
- [5] Balch, W. E. et al: *Microbiological Review.*, **43**: 260—293, 1979.
- [6] Barker, H. A: Bacterial Fermentation, John. Wiley & Sons Inc New York, pp. 1—95, 1956.
- [7] Colvin, J. R: *J. Bacteriol.*, **149**: 346—353, 1980.
- [8] Hungate, R. E: A Roll tube method for cultivation of strict anaerobes In *Methods of Microbiology*, vol. 3B, Academic Press Inc., New York, pp. 117—132, 1969.
- [9] Godsey, E. M: *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 1079—1081, 1980.
- [10] Konig, H: *Can. J. Microbiol.*, **30**: 1477—1481, 1984.