

一个分解纤维素的瘤胃梭菌新种

张晓华¹ 谭蓓英² 刘敏雄¹

(1 北京农业大学生物学院 北京 100094)

(2 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 报道了一个厌氧中温分解纤维素的瘤胃梭菌新种。在 RGCA 培养基中,细胞杆状、 $0.6\sim 1.0\times 4.0\sim 6.0\mu\text{m}$,单生或成对,革兰氏阳性,能运动。芽孢卵~球形,端生或次端生,使细胞膨大。菌落圆形、黄色、边缘不整齐。在纤维素琼脂滚管中培养 24~48h,菌落周围产生溶纤维透明圈。生长的最适条件是 $37\sim 40^\circ\text{C}$ 和 $\text{pH}6.5\sim 7.0$ 。所需要的生长因子为多种挥发脂肪酸(VFAs)、生物素、对氨基苯甲酸和盐酸吡哆醇。纤维素、纤维二糖、糖原、淀粉和麦芽糖等可作为生长底物。不能发酵葡萄糖、果糖、七叶灵、苦杏仁苷、阿拉伯糖、乳糖、甘露糖、核糖、蔗糖、木糖、鼠李糖、甘露醇、肌醇和山梨醇等。不能水解明胶。发酵纤维二糖产生乙酸和丁酸。DNA 的 G+C 含量为 35.9mol%(Tm)。该分离菌株与已知梭菌均有不同,故命名为瘤胃梭菌新种 (*Clostridium rumenum* sp. nov. Zhang, Tan & Liu)。保藏号为 AS 1.1862。

关键词 瘤胃梭菌,分解纤维素

1 材料和方法

1.1 菌株的分离和鉴定

本试验所采用的厌氧菌分离和鉴定方法,参看谭蓓英等以前的工作^[1~4]。

1.2 培养基

用 Holdeman^[5] 的 PY 基础培养基和 RGCA 培养基作为分类和鉴定用的基础培养基。瘤胃纤维素培养基是参考 Ogimoto^[6] 中 No. 6 培养基配制的分离培养基。在培养的配制过程中,均补加了少量 VFAs^[5]。扩大培养时采用 500ml 的输液吊瓶,每瓶装 200ml 培养基。气相为无氧 CO_2 , 121°C 30min 灭菌。

2 结果

2.1 菌落和细胞形态

在纤维素琼脂滚管中培养 24h,可出现针状菌落,周围有直径 $1\sim 1.5\text{mm}$ 透明圈。培养 72h 菌落直径可达 $1\sim 1.5\text{mm}$,透明圈直径扩大为 $6\sim 10\text{mm}$ (图 1)。菌落圆形、黄色、不透明、边缘不整齐。细胞为直杆状, $0.6\sim 1.0\times 4.0\sim 6.0\mu\text{m}$,单生或成对,年幼细胞为革兰氏阳性,后变为革兰氏阴性(图 2)。芽孢卵~球形,直径为 $0.8\sim 1.2\mu\text{m}$,端生或偶有次端生,使细胞膨大。 80°C 水浴 $10\sim 20\text{min}$,芽孢仍能存活。

2.2 生长特性和营养需要

在瘤胃液纤维素培养液中培养 2d 纸条开始软化、变烂,继而变为透明状的粘性物质。

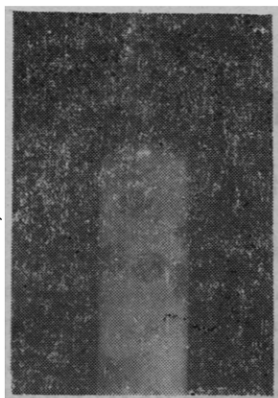


图1 分离菌株在瘤胃液纤维素琼脂滚管中培养 72h (图示黄色菌落及周围的透明圈)

Fig. 1 Showing yellow colonies and surrounding clear zones of cellulose hydrolysis of the isolate on Rumen fluid-cellulose-agar roll tube after incubating 72 h

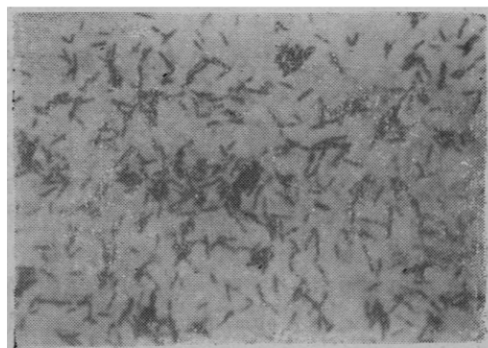


图2 分离菌株在 RGCA 斜面上培养 18h (39℃) 后的细胞形态(×330)

Fig. 2 Cell morphology of the isolate on RGCA slant after incubating at 39℃ for 18h

生长的最适温度为 37~40℃, 30℃ 和 50℃ 只有微弱生长, 55℃ 以上不生长。最适 pH 为 6.5~7.0。生长中需要生物素、对氨基苯甲酸、二盐酸吡哆醇及混合 VFAs^[9], 不需要有机氮源。能发酵纤维素、纤维二糖、糖原、可溶性淀粉和麦芽糖等, 不能利用葡萄糖、果糖、七叶灵、苦杏仁苷、阿拉伯糖、乳糖、甘露糖、核糖、蔗糖、木糖、鼠李糖、甘露醇、肌醇和山梨醇等, 不能使明胶及硝酸盐水解。在没有可发酵碳水化合物的 PY 基础培养基(含 VFAs) 中, 该菌不生长。

瘤胃液纤维素琼脂培养基很适合该菌的生长和保存, 4℃ 存放 8 个月, 该菌仍能存活并保持了良好的分解纤维素活性。

2.3 生理生化特性

在含 1% 纤维二糖的 PY 基础培养基中培养, 可产生乙酸 0.14meq/L 培养基和丁酸 0.07meq/L 培养基。DNA 的 G+C 含量为 35.9mol%(Tm)。以纤维二糖为唯一碳源培养, 可产生胞外内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶, 比活性分别为 5.57U/mg 蛋白和 0.16U/mg 蛋白; 同时产生与细胞结合的纤维二糖酶, 比活性为 1.69U/mg 蛋白。与纤维素相比, 纤维二糖对纤维素酶的产生和释放, 具有更好的诱导作用。

3 讨论

分离菌株为形成芽孢的严格厌氧杆菌, 属梭菌属。中温分解纤维素的梭菌在《伯杰氏系统细菌学手册》^[10]中收集了 3 个种, 以后又陆续报道了 9 个种^[17~19]。其中有 9 个种在 DNA 的 G+C 含量、糖发酵的底物与产物和运动性等重要特性上, 与分离菌株存在明显差异。其余的 3 个种与分离菌株特性上接近, 如细胞形态和菌落形态相似, 也都能分解纤维素和纤维二糖。但所不同的是: *C. polysaccharolyticum* 的 G+C 含量为 30mol%, 能水解七叶灵, 不能发酵麦芽糖, 水解纤维二糖主要产生丙酸; *C. aldrichii* 的 G+C 含量为 40mol%, 能水解七叶灵, 不能利用麦芽糖、糖原和淀粉; *C. chartatidum* 能发酵葡萄

糖,不能利用淀粉,能使七叶灵和明胶水解。因此,分离菌株与已知梭菌均有不同,认为是一个新种,命名为瘤胃梭菌新种 (*Clostridium rumenum* sp. nov.)该分离菌株保存在中国科学院微生物研究所菌种保藏室,保藏号为 AS1.1862。

参 考 文 献

- [1] 谭蓓英,王大粗. 微生物学报,1987,27(3): 211~216.
- [2] 谭蓓英,王大粗. 微生物学报,1992,32(3): 155~160.
- [3] 谭蓓英,贺青. 微生物学报,1991,31(6): 484~487.
- [4] Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E *et al.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Baltimore: The Williams and Wilkins Co, 1986.
- [5] Ogimoto K. Atlas of Rumen Microbiology. Tokyo: Japan Scientific Society Press, 1981.
- [6] Holdeman L V, Cato E P, Moore W E. Anaerobe Laboratory Manual. 4th ed. Blacksburg: Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.
- [7] Peridomange E, Caillet F, Giallo J *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1984, 34: 155~159.
- [8] Sleat R, Mah R A, Robinson R. Appl Environ Microbiol, 1984, 48: 88~93.
- [9] Sleat R, Mah R A. Int J Syst Bacteriol, 1985, 35: 160~163.
- [10] Murry W D, Hofman L, Campbell N L *et al.* Syst Appl Microbiol, 1986, 8: 181~184.
- [11] Sukhumavasi J, Ohmiya K, Shimizu S *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1988, 38(2): 179~182.
- [12] Yanling H, Youfan D, Yanquan L. Int J Syst Bacteriol, 1991, 41: 306~309.
- [13] Junchang C Y, Chynoeth D P, Williams D S *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1990, 40(3): 268~272.
- [14] Kelly W T, Asmundson R V, Hoperoft D H. Arch Microbiol, 1987, 147: 169~173.
- [15] Palop M L, Valles S, Pinage F *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1989, 39: 68~70.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A *CLOSTRIDIUM RUMENUM* SP. NOV. FROM RUMEN

Zhang Xiaohua¹ Tan Peiying² Liu Minxiong¹

(1 College of Biology, Beijing Agriculture University, Beijing 100094)

(2 Institute Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract A new species of anaerobic cellulolytic, mesophilic bacterium was isolated from rumen. Cells in RGCA are rod, occur singly or in pairs, 0.6~1 × 4~6 μm, gram-positive and motile. Spores are terminal or subterminal, oval~ellipsoid shaped and swelled in some cells. Colonies are round and yellow with irregular edge. Cellulose-solvent zones around colonies are formed in cellulose agar roll tubes after incubating 24~48h. Optimum conditions for growth are 37~40°C and pH 6.5~7.0. Growth factors required are VFAs, biotin, *p*-aminobenzoic acid and pyridoxine hydrochloride. Some carbohydrates, such as cellulose, cellubiose, glucogen, starch and maltose can serve as substrates for growth. They can't ferment glucose, fructose, esculin, amygdalin, arabinose, lactose, mannose, ribose, sucrose, xylose, raffinose, mannitol, inositol, sorbitol and gelatin. Acetate and butyrate are mainly produced during growth on cellobiose. The DNA base composition is 35.9mol% G + C(Tm). The name *Clostridium rumenum* sp. nov. Zhang, Tan & Liu is proposed for this new isolate.

Key words *Clostridium rumenum*, Cellulolytic