

瘤胃甲烷菌的分离培养与保存

Isolation and Preservation of Rumen Methanogens

金巍*, 成艳芬, 毛胜勇, 朱伟云

消化道微生物研究室, 动物科技学院, 南京农业大学, 南京, 江苏

*通讯作者邮箱: jinwei@njau.edu.cn

摘要: 反刍动物瘤胃是一个半开放的厌氧发酵系统。瘤胃中栖息着大量的甲烷菌, 这些甲烷菌对氧极为敏感, 需要严格的厌氧环境才能够生长。目前已获得的瘤胃甲烷菌纯菌株还很少。瘤胃甲烷菌主要归属于 *Methanobacteriales* 和 *Methanomassiliicoccales* 两个目。*Methanobacteriales* 目的甲烷菌主要利用氢气、二氧化碳、甲酸以及甲醇等生成甲烷; *Methanomassiliicoccales* 目甲烷菌主要利用氢气、甲醇和甲胺等生成甲烷。本文描述了瘤胃中主要甲烷菌的分离培养和保存方法。

关键词: 甲烷菌, 瘤胃, 分离培养, 保存

材料与试剂

1. 二甲亚砜
2. 甘油
3. 甲醇
4. 一甲胺盐酸盐
5. 二甲胺盐酸盐
6. 三甲胺盐酸盐
7. 高纯氢气
8. 高纯氮气
9. 高纯二氧化碳
10. 新鲜瘤胃内容物
11. 无细胞瘤胃液 (将新鲜瘤胃液 $10,000 \times g$, 4°C 离心 15 min, 取上清)
12. 酵母膏
13. 胰蛋白胨
14. 碳酸氢钠

- 31 15. 刃天青
- 32 16. 辅酶 M
- 33 17. 去离子水
- 34 18. 九水硫化钠
- 35 19. 半胱氨酸盐酸盐
- 36 20. 氢氧化钠
- 37 21. 青霉素钾
- 38 22. 硫酸链霉素
- 39 23. 林可霉素
- 40 24. 万古霉素
- 41 25. 琼脂粉
- 42 26. 氯化钠
- 43 27. 磷酸氢二钾
- 44 28. 硫酸铵
- 45 29. 二水氯化钙
- 46 30. 氯化钙
- 47 31. 七水硫酸镁
- 48 32. 一水硫酸镁
- 49 33. 一水硫酸锰
- 50 34. 三水磷酸氢二钾
- 51 35. 七水硫酸亚铁
- 52 36. 六水氯化钴
- 53 37. 七水硫酸锌
- 54 38. 五水硫酸铜
- 55 39. 十二水硫酸钾铝
- 56 40. 硼酸
- 57 41. 二水钼酸钠
- 58 42. 六水硫酸镍
- 59 43. 硒酸钠

- 60 44. 二水钨酸钠
- 61 45. 乙酸
- 62 46. 丙酸
- 63 47. 丁酸
- 64 48. 2-甲基丁酸
- 65 49. 异丁酸
- 66 50. 戊酸
- 67 51. 异戊酸
- 68 52. 盐酸吡哆醇
- 69 53. 维生素 C
- 70 54. 泛酸钙
- 71 55. 硫辛酸
- 72 56. 烟酰胺
- 73 57. 烟酸
- 74 58. 对氨基苯甲酸
- 75 59. 盐酸吡哆醛
- 76 60. 核黄素
- 77 61. 盐酸硫胺素
- 78 62. 生物素
- 79 63. 叶酸
- 80 64. 氰钴胺
- 81 65. 溶液 A (见溶液配方)
- 82 66. 溶液 B (见溶液配方)
- 83 67. 厌氧稀释液 (见溶液配方)
- 84 68. 还原剂 (见溶液配方)
- 85 69. 维生素 (见溶液配方)
- 86 70. 微量元素 (见溶液配方)
- 87 71. 抗生素 (见溶液配方)
- 88 72. 二甲亚砜 (见溶液配方)

- 89 73. 甘油 (见溶液配方)
- 90 74. 辅酶 M (见溶液配方)
- 91 75. 脂肪酸溶液 (见溶液配方)
- 92 76. 底物 (见溶液配方)
- 93 77. 培养基 (见溶液配方)
- 94 78. 琼脂培养基 (见溶液配方)

95

96 仪器设备

- 97 1. 亨氏管 (Bellco glass, Inc., NJ, USA)
- 98 2. 异丁烯塞 (Bellco glass, Inc., NJ, USA)
- 99 3. 10 ml 青霉素瓶
- 100 4. 青霉素瓶铝盖
- 101 5. 压盖器
- 102 6. 厌氧手套箱
- 103 7. 培养箱
- 104 8. 微波炉
- 105 9. 高压瓶 (500 ml 蓝口瓶)
- 106 10. 磁力搅拌器
- 107 11. 超低温冰箱
- 108 12. 高压灭菌锅
- 109 13. 水浴锅
- 110 14. 气相色谱仪
- 111 15. 荧光显微镜

112

113 实验步骤

114 本文中的厌氧操作步骤和培养技术源于 Hungate (1969), 同时参照了 Joblin (2005) 和
115 Whitman 等 (2006) 描述的方法。

116 菌的分离:

- 117 1. 通过充二氧化碳对 500 ml 高压瓶除氧, 取约 50 g 瘤胃内容物快速放入瓶中, 再加

入 150 ml 已预热的培养基，盖上瓶盖，用手用力摇晃 30s~60s。

2. 为了防止堵塞移液管口，用在火焰上灼烧过的剪子，剪去移液管尖头。在通二氧化碳的条件下（或者在厌氧手套箱中操作），取 5 ml 瘤胃内容物匀浆液，加入到含有 45 ml 培养基的血清瓶中，手摇混合均匀（10 倍稀释）。取 5 ml 混合液，加入到新的含有 45 ml 培养基的血清瓶中，手摇混合均匀，重复此稀释步骤，连续梯度稀释到 10^{-11} 。

3. 将装有 1.5%琼脂培养基的厌氧亨氏管在沸水中融化，42 °C 水浴 10 min。将 1ml 无菌注射器在氮气或二氧化碳瓶中润洗几次（后续步骤中的注射器在使用前均需经过此步骤处理），然后分别吸取 0.1 ml 维生素溶液和 0.1 ml 青霉素/链霉素溶液，注入准备好的琼脂亨氏管。

4. 用无菌注射器吸取 10^{-6} ~ 10^{-11} 稀释梯度的菌液 0.5 ml，注入琼脂管中，小心混合均匀（避免气泡产生），在冰板或冷水盘中快速滚动管子，让融化的琼脂均匀地凝固在管壁上。

5. 充气体底物(气体组成和压力详见 12.底物部分)，39 °C 垂直静置培养 2~4 个星期。

6. 在解剖显微镜下观察(或者肉眼观察)并定位独立菌落（注意不要让管底凝结的水污染菌落）。从菌落数小于 30 的管子中挑取独立的菌落，转移到装有 10 ml 液体培养基的亨氏管中。如果管中出现煎蛋型菌落污染（支原体），可在液体培养基中加入 0.1 ml 林可霉素或万古霉素。

注：挑取菌落要在通二氧化碳的条件下进行或者在厌氧手套箱中操作。

7. 充气体底物，39 °C 轻柔震荡培养 2~3 个星期。

8. 用气相色谱检测亨氏管中气体是否有甲烷生成。

9. 选取有甲烷产生的亨氏管，对管中的菌液进行梯度稀释，重复 3~8 步骤。

10. 用荧光显微镜和相差显微镜检查确认获得的甲烷菌菌液的纯度。在 420nm 激发光下，观察菌体是否有甲烷菌的特征性荧光蓝绿光激发；用相差显微镜直接观察菌液中菌体形态的一致性，也可革兰氏染色后观察。

注：最近的研究发现 *Methanomassiliicoccales* 目中的甲烷菌在 420nm 激发光下无甲烷菌特征性荧光激发。

菌的鉴别：

11. 提取菌液 DNA，用甲烷菌通用引物 86F/1340R 扩增 16S rRNA 基因 (Wright 等，2004)，克隆测序，在 NCBI 数据库上进行比对，对获得的菌株进行分类鉴定。
12. 利用培养的方法确定菌株的表型特性，如最适生长 pH、最适生长温度以及底物特异性等。

菌的保存：

13. 在菌处于对数生长期时，用无菌注射器在亨氏管中注入二甲亚砷溶液（终浓度为 5%），手摇混合均匀，充入气体底物，在 4 °C 静置 2 h，然后转移至 -80 °C 冻存。也可将菌液与 50%甘油溶液等体积混合，-80 °C 冻存。也可以在 -80 °C 过夜后，转移至液氮中长期保存(在液氮中保存需将亨氏管换成冻存管)。

注：不同种属甲烷菌的保存方法可能有所差异（包括保存温度、冻存剂的种类和浓度等），保存后要验证是否能够复活。

菌的复活：

14. 取出冻存管或亨氏管，置于温水浴中快速融化(39°C)。菌液融化后，用无菌注射器吸取 0.1~0.3 ml 菌液，注入到含有 10ml 液体培养基的亨氏管中，充气体甲烷菌底物，39 °C 轻柔震荡培养 2 周，检测是否有甲烷产生。

溶液配方

1. 溶液 A

氯化钠	6.0 g
磷酸二氢钾	3.0 g
硫酸铵	1.5 g
二水氯化钙	0.79 g
七水硫酸镁	1.2 g

溶于去离子水中，定容到 1 L，4 °C 保存

2. 溶液 B

三水磷酸氢二钾 (7.86 g) 溶于去离子水中，定容到 1L，4 °C 保存

3. 厌氧稀释液

将 85 ml 溶液 A, 85 ml 溶液 B, 2.5 g 碳酸氢钠, 0.5 ml 刃天青溶液 (0.1% w/v), 330 ml 去离子水混合于 500 ml 高压瓶中, 置于微波炉中煮沸 2 min, 然后迅速通入二氧化碳 (1.5h~2h), 冷却至室温, 添加 0.25 g 半胱氨酸盐酸盐, 手摇混合均匀, 盖紧瓶盖, 转移至厌氧手套箱中分装(或者在通二氧化碳条件下分装), 每支亨氏管分装 9 ml, 盖上塞子, 高压灭菌 (121 °C, 15 min)。

注: 在煮沸和通二氧化碳过程中会有水分蒸发损失, 加去离子水时可多加 20 ml。

4. 还原剂

将 2.5 g 半胱氨酸盐酸盐溶解于 50 ml 去离子水中, 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 10, 然后加去离子水至 200 ml, 煮沸, 通氮气, 加 2.5 g 九水硫化钠, 手摇混合均匀, 冷却 (可冰浴)。在通氮气条件下, 每支亨氏管分装 10 ml 溶液。加塞, 高压灭菌 (121 °C, 15 min), 室温储存。

5. 维生素溶液

1) 将 1,000 ml 去离子水煮沸 2 min, 通二氧化碳冷却

2) 将下列维生素分别溶解于已除氧的去离子水中:

盐酸吡哆醇 (10.0 mg)

维生素 C (5.0 mg)

泛酸钙 (5.0 mg)

硫辛酸 (5.0 mg)

烟酰胺 (5.0 mg)

烟酸 (5.0 mg)

对氨基苯甲酸 (5.0 mg)

盐酸吡哆醛 (5.0 mg)

核黄素 (5.0 mg)

盐酸硫胺素 (5.0 mg)

生物素 (2.0 mg)

叶酸 (2.0 mg)

氰钴胺 (0.1 mg)

3) 在厌氧手套箱中将维生素溶液通过 0.22 µm 无菌滤器过滤进入已灭菌的厌氧亨氏管, 每支亨氏管分装滤液 10 ml, 分装完毕后每支亨氏管用无菌注射器添

加 0.1 ml 还原剂，4 °C 避光保存。亨氏管在使用前通二氧化碳除氧，高压灭菌处理。接种前每 10 ml 培养基添加 0.1 ml 已过滤除菌的维生素溶液。

6. 微量元素溶液

将 1.5 g 次氨基三乙酸溶于 500 ml 去离子水中，用氢氧化钾调节 pH 至 6.5，加去离子水至 1 L。分别添加：

一水硫酸镁 (3 g)

一水硫酸锰 (0.5 g)

氯化钠 (1 g)

七水硫酸亚铁 (0.1 g)

六水氯化钴 (0.1 g)

氯化钙 (0.1 g)

七水硫酸锌 (0.1 g)

五水硫酸铜 (10 mg)

十二水硫酸铝钾 (10 mg)

硼酸 (10 mg)

二水钼酸钠 (10 mg)

六水硫酸镍 (30 mg)

硒酸钠 (20 mg)

二水钨酸钠 (20 mg)

混合均匀，4 °C 避光保存

7. 抗生素

1) 青霉素/链霉素

在厌氧手套箱中将 1 g 青霉素钾 (160 万单位) 和 2 g 硫酸链霉素 (200 万单位) 溶解于 10 ml 厌氧稀释液中，用 0.22 µm 无菌滤器过滤进入经除氧和灭菌处理的亨氏管，4 °C 保存。接种前每 10 ml 培养基添加 0.1 ml。

2) 林可霉素

在厌氧手套箱中将 20 mg 盐酸林可霉素溶解于 10 ml 厌氧稀释液中，用 0.22µm 无菌滤器过滤进入亨氏管，4 °C 保存。接种前每 10 ml 培养基添加 0.1 ml。

3) 万古霉素

在厌氧手套箱中将 20 mg 盐酸万古霉素溶解于 10 ml 厌氧稀释液中，用 0.22 μ m 无菌滤器过滤进入亨氏管，4 °C 保存。接种前每 10 ml 培养基添加 0.1 ml。

8. 二甲亚砜

将 5 ml 二甲亚砜用注射器注入含有 4.8 ml 无菌厌氧稀释液的亨氏管中，再加入 0.2 ml 还原剂，室温保存。

9. 甘油

在厌氧手套箱中将 50 ml 甘油与 48 ml 厌氧稀释液混合，再加入 2 ml 还原剂，混合均匀，分装到 10 ml 青霉素瓶中，每瓶装 3 ml，异丁烯塞封口，铝盖固定，高压灭菌 (121 °C，15 min)，室温保存。

10. 辅酶 M

将 0.4 g 辅酶 M 溶于 100 ml 去离子水中，4 °C 保存。1 L 培养基中加辅酶 M 溶液 10 ml。

11. 脂肪酸溶液

乙酸 6.85 ml

丙酸 3.0 ml

丁酸 1.84 ml

2-甲基丁酸 0.55 ml

异丁酸 0.47 ml

戊酸 0.55 ml

异戊酸 0.55 ml

溶于 700 ml 0.2 mol/L 的氢氧化钠溶液中，用 1 mol/L 的氢氧化钠调 pH 至 7.5，定容至 1,000 ml，4 °C 保存。1 L 培养基中添加脂肪酸溶液 50 ml。

12. 底物

瘤胃中甲烷短杆菌主要利用氢气还原二氧化碳生成甲烷，有的种还可以利用甲酸；甲烷球形菌利用氢气还原甲醇生成甲烷；*Methanomassiliicoccales* 目中的甲烷菌主要利用氢气还原甲醇、一甲胺、二甲胺和三甲胺生成甲烷。一般情况下，在亨氏管中充氢气 80 KPa 和二氧化碳 20 KPa 培养甲烷短杆菌等氢营养型甲烷菌，也可添加 0.5% (w/v) 的甲酸钠作为底物；充氢气 100 KPa，添加甲醇 60 mmol/L (终浓度) 培养甲烷球形菌；充氢气 100 KPa，添加甲醇或一甲胺、二甲胺、三甲胺 (终

浓度分别为 60 mmol/L、60 mmol/L、30 mmol/L、20 mmol/L) 培养 Methanomassiliicoccales 目中甲基营养型甲烷菌。

在厌氧手套箱中用厌氧稀释液制备甲烷菌底物母液，6 mol/L 甲醇、6 mol/L 一甲胺盐酸盐、3 mol/L 二甲胺盐酸盐和 2 mol/L 三甲胺盐酸盐溶液，用 0.22 μ m 无菌滤器过滤进入已灭菌的厌氧亨氏管，4 °C 保存。接种前每 10 ml 培养基添加 0.1 ml 底物母液。

13. 培养基

85 ml 溶液 A

85 ml 溶液 B

2.5 g 碳酸氢钠

0.5 ml 刃天青溶液 (0.1% w/v)

酵母膏 0.5 g

无细胞瘤胃液 150 ml

微量元素溶液 5 ml

180 ml 去离子

混合于 500 ml 高压瓶中，置于微波炉中煮沸 2 min，然后迅速通入二氧化碳 (1.5h~2h)，冷却至室温，用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.8，添加 0.25 g 半胱氨酸盐酸盐，混合均匀，盖紧瓶盖，转移至厌氧手套箱中分装(或者在通二氧化碳的条件下分装)，每支亨氏管分装 9 ml，盖上塞子，高压灭菌 (121 °C，15 min)。使用前每支管加维生素溶液 0.1 ml。

注：根据培养的甲烷菌不同可以补充添加辅酶 M 和脂肪酸溶液以及胰蛋白胨 0.5 g。

14. 厌氧琼脂培养基的制备

在每支亨氏管中加入 0.075 g 琼脂粉，将加有琼脂的亨氏管放入厌氧手套箱中 24 h 除氧气，或向管内通二氧化碳除氧气，每支管分装 4.3 ml 已制备好的液体培养基，加盖，高压灭菌 (121 °C，15 min)。接种菌液、维生素等溶液后琼脂的终浓度为 1.5%。

致谢

本项目由国家自然科学基金项目 (31872381) 资助。

参考文献

1. Hungate, R. E. (1969). [A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes](#). *Methods Microbiol* 3: 117-132.
2. Joblin, K. (2005). [Methanogenic archaea](#). In: *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. Makkar, H. P. S. and McSweeney, C. S. (Eds.). IAEA, Netherlands. pp 47-53.
3. Whitman, W. B., Bowen, T. L. and Boone, D. R. (2006). [The Methanogenic Bacteria](#). In: *Prokaryotes*. 3: 165-207.
4. Wright, A. D. G., Williams, A. J., Winder, B., Christophersen, C., Rodgers, S. and Smith, K. (2004) [Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia](#). *Appl Environ Microbiol* 70(3):1263-70.