

## 自沼气池中分离的一株甲烷利用菌

梁家驷 程光胜 陈子英

(中国科学院微生物研究所, 北京)

自沼气池中分离到一株甲烷利用菌,其主要生理特性是利用甲烷或甲醇作碳源和能源,生活史中具有休眠体,形成固氮菌型的孢囊,在利用甲烷的生长中不被乙酸盐、苹果酸、琥珀酸盐抑制,应是甲基杆菌属 (*Methylobacter*) 中的一新种,定名为淡橙黄色甲烷氧化杆菌 (*Methylobacter luteolo-croceus* sp. nov.)。

**关键词** 甲基杆菌属;淡橙黄色甲烷氧化杆菌

自从 Söhngen<sup>[1]</sup> 1906 年发现了甲烷利用菌以来,直到 1970 年,只报道了 3 个纯种: 甲烷甲基单胞菌 (*Pseudomonas methanica*)<sup>[2]</sup>, 氧化甲烷甲基单胞菌 (*Methanomonas methanoxidaus*)<sup>[3]</sup>, 荚膜甲基球菌 (*Methylococcus capsulatus*)<sup>[4]</sup>。其后, Whittenbury<sup>[5]</sup> 等改进了分离方法,共分离到了一百多株甲烷氧化菌的纯种,并根据其形态特征、生理生化特性划分为 5 群(相当于属),即: *Methylobacter*, *Methylosinus*, *Methylocystis* 和 *Methylobacter*。甲烷氧化菌分离工作有了很大进展,但是 Leadbeter<sup>[6]</sup> 在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版中只建立了两个属,即: 甲基单胞菌属 (*Methylobacter*) 和甲基球菌属 (*Methylococcus*)。Patt 等<sup>[7]</sup>在 1976 年对他们分离的兼性甲烷氧化菌也定为 *Methylobacterium*。作者曾对具有特殊形态、生理特性的甲烷氧化菌建立了两个属,即: 多孢子菌属 (*Polysporobacterium*)<sup>[8]</sup>、刺孢杆菌属 (*Echisporobacterium*)<sup>[9]</sup>。本文报道自沼气池分离的一株甲烷利用菌,根据其形态特征、生化特性应属于甲基杆菌属 (*Methylobacter*) 中的一个新种。

## 材料和方法

### (一) 样品来源

沼气池中发酵后内含物。

### (二) 培养基

9 号无碳无机盐培养基<sup>[10]</sup>。

### (三) 分离与培养

取 1g 样品,用无菌生理盐水稀释 10 倍,吸取 0.5ml 涂布在 9 号无碳无机盐培养基的琼脂平板上,置于干燥器中按空气: 甲烷=380:380mm Hg 比例抽取一半空气,补入相应的甲烷,在 30°—32℃ 静止培养 7—10 天,待长出薄薄一层菌膜后,挑取一环菌苔,在平板上划线分离,重复多次,直至分离到甲烷氧化菌的纯菌株 P1。

### (四) 细胞超薄切片

制备方法详见梁家驷等的报道<sup>[11]</sup>。

### (五) DNA 中 G+C mol 含量测定 (T<sub>m</sub> 值法)

DNA 的提取和测定按林万明等<sup>[12]</sup>的方法。

### (六) 营养与生理试验

1. 糖的同化试验: 在 9 号无碳无机盐培养基中,分别按 0.1% 和 0.5% 的含量加入葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、蜜二糖、淀粉、柠檬酸钠、甲酸钠、苹果酸、草酸、甲醇,制成固体平板,

本文于 1985 年 11 月 13 日收到。

接种后不再通甲烷,  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  静止培养。

2. 氮源的利用: 按梁家骥等的方法<sup>[9]</sup>。

3. pH 与温度对生长的影响: 按梁家骥等的方法<sup>[9]</sup>。

4. 染色与酶的测定: 革兰氏染色、类脂粒染色、鞭毛染色和氧化酶、接触酶测定主要依据《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[11]</sup>进行。

## 结 果

### (一) 菌落特征

在 9 号培养基平板上, 菌落圆形, 直径 1 mm 左右, 边缘整齐, 刚长出的菌落略带紫色, 后逐渐转为淡橙黄色, 不透明, 质地不粘, 用接种针不易挑起, 凸出或隆起。

### (二) 细胞特征

杆状或梨形, 大小  $0.7-4.5 \times 0.7-1.1 \mu\text{m}$  (图版 I-1), 单个或成双, 有时数个细胞聚集在一起。革兰氏染色阴性, 有荚膜, 无类脂粒, 无芽孢。电镜下观察细胞的超薄切片, 胞内有明显的膜囊结构, 根据膜囊形状和排列, 应属于甲烷氧化菌的 I 型细胞质内膜结构 (图版 I-5)。单鞭毛 (图版 I-6), 运动。

### (三) 营养与生理生化特征

1. 利用甲烷或甲醇作为生长的碳源和能源, 不利用葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、蜜二糖、淀粉、柠檬酸钠、苹果酸、草酸。利用硝酸盐、铵盐、尿素及空气中的自由分子氮为氮源。不利用肉汁、胨。

2. 好气, 但在氧气的含量仅占大气含量的 3% 时, 菌株仍能生长。

3. 生长温度范围为  $29^\circ-48^\circ\text{C}$ , 最适生长温度为  $35^\circ-40^\circ\text{C}$ 。生长 pH 范围为 5—9.5, 最适生长 pH 为 7—8。

4. 接触酶和氧化酶阳性。

5. DNA 中的 G+C mol 含量 63.7%。

### (四) 固氮菌型孢囊

接菌在 9 号无碳无机盐琼脂平板上,

细胞即开始生长分裂 (图版 I-1), 但生长进入静止期后, 细胞不再分裂而开始变圆, 形成固氮菌型的静息孢囊 (图版 I-2—4)。该菌株在培养 72 小时后, 就出现孢囊, 随着培养时间的延长, 形成的孢囊数愈多, 其数量可达整个细胞的 90% 以上。成熟的孢囊在光学显微镜下观察有折光性, 用结晶紫染色不易着色。孢囊单个、成双或几个聚集在一起。在试验中发现孢囊形成和菌落色素有关, 菌落为紫色时的细胞为杆状, 淡橙黄色和上凸时, 细胞多已转变成孢囊, 菌落也由粘、软变为稍硬。用接种针不易挑起, 当孢囊转接到新鲜培养基时, 萌发生长为杆状细胞并继续分裂。

## 讨 论

菌株 P1 能以甲烷或甲醇作为生长的碳源和能源, 不利用糖、淀粉等有机物, 是一株专性的甲烷氧化菌。此外, 它还具有专性甲烷氧化菌的一些基本特征, 如革兰氏染色阴性, 细胞内具有复杂的细胞质内膜的膜囊结构等。该菌株细胞表面无刺状物, 不能产生多孢子孢囊, 因此不能归属于刺孢杆菌属 (*Echinosporeobacterium*) 和多孢子菌属 (*Polysporobacterium*); 细胞为杆状, 不能归于甲基球菌属 (*Methylococcus*); 不产生外孢子, 不能归于 *Methylosinus*; 细胞具有单鞭毛运动, 不能归于 *Methylocystis*; 该菌有一最主要特征是在生活史中具有休眠体, 形成固氮菌型的孢囊, 所以它也不能归于甲基单胞菌属 (*Methylomonas*), 而只能归于 *Methylobacter*。

在 *Methylobacter* 中, 至今已报道过 4 个种<sup>[5]</sup>, 现将菌株 P1 同他们的异同进行比较, 结果见表 1。

从表 1 可以看出, P1 菌株不同于 *Methylobacter* 中的 4 个已知种, 因此认为 P1 菌株为一新种, 定名为淡橙黄色甲烷氧

表1 P1菌株与甲基杆菌属中四个种的比较<sup>[5]</sup>Table 1 Comparison of strain P1 and four species of *Methylobacter*

菌株和菌种 Strain and species	生长温度 Growth at (°C)		生长在甲醇 Growth on methanol (0.1% W/V)	生长在甲烷中添加下列化合物 Growth on CH <sub>4</sub> enhanced (0.1% W/V)				运动和鞭毛 Motility and flagellation	菌落颜色 Colony colour
	37	45		酵母汁 Yeast extract	苹果酸 Malate	乙酸 Acetate	琥珀酸 Succinate		
<i>M. chroococcus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	浅粉色 pale pink
<i>M. bovis</i>	+	—	—	—	—	+	—	—	白-褐色 white to brown
<i>M. capsulatus</i>	—	—	—	—	—	—	—	极生单鞭毛 polar flagellum	白-褐色 white to brown
<i>M. vinelandii</i>	+	+	—	—	—	—	—	极生单鞭毛 polar flagellum	白-褐色 white to brown
P1	+	+	+	+	+	+	+	极生单鞭毛 polar flagellum	紫-黄橙色 luteolo-croceus

化杆菌 *Methylobacter luteolo-croceus* sp. nov.

## 参 考 文 献

- [1] Söhngen, N. L.: *Z. Bakteriologie Parasitenkunde*, 2(15): 513—518, 1906.
- [2] Dworkin, M. and J. W. Foster: *J. Bacteriol.*, 72: 646—659, 1956.
- [3] Brown, L. R. et al.: *Cand. J. Microbiol.*, 10: 791—799, 1964.
- [4] Foster, J. W. and R. H. Davis: *J. Bacteriol.*, 91: 1924—1931, 1956.
- [5] Whittenbury, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 61: 205—218, 1970.
- [6] Leadbetter, E. R.: *Methylomonaceae*, in "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", (eds. R. E. Buchanan and N. E. Gibbons), 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 267—268, 1974.
- [7] Patt, T. E. et al.: *J. Syst. Bacteriol.*, 26: 226—229, 1976.
- [8] 陈子英等: *微生物学报*, 20 (4): 339—344, 1980.
- [9] 梁家骥等: *微生物学报*, 23 (3): 193—196, 1983.
- [10] 梁家骥等: *微生物学通报*, 10(1): 22—23, 1983.
- [11] 林万明等: *微生物学通报*, 8(5): 215—216, 1981.
- [12] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: 《一般细菌常用鉴定方法》, 科学出版社, 北京, 1978.

## A NEW SPECIES OF *METHYLOBACTER* ISOLATED FROM METHANE-PRODUCING ANAEROBIC DIGESTER

Liang Jiayuan    Cheng Guangsheng    Chen Ziyang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

This paper describes a new methane-utilizing bacterium isolated from a methane-producing anaerobic digester. The isolate P1 utilizes methane or methanol as carbon and energy source and has membrane of type I. It formed azotobacter-type cyst in their growth cycle and did not inhibit growth on  $\text{CH}_4$  with 0.1% W/V yeast extract, malate, acetate

and succinate. It was obviously differentiated from any described species in *Methylobacter*, therefore was designated as ***Methylobacter luteolo-croceus*** sp. nov.

### Key words

*Methylobacter*; *Methylobacter luteolo-croceus*

### 图 版 说 明

#### Explanation of plate

淡橙黄色甲烷氧化杆菌（在无机盐琼脂上）：1. 生长 3 天的营养细胞（1,500 $\times$ ）；2. 生长 5 天的类固氮菌型的孢囊（1,500 $\times$ ）；3. 生长 8 天的类固氮菌型孢囊和营养细胞（1,500 $\times$ ）；4. 生长 8 天的类固氮菌型孢囊超薄切片（30,000 $\times$ ）；5. 生长 3 天的营养细胞超薄切片（42,000 $\times$ ）；6. 生长 3 天的营养细胞（14,000 $\times$ ）。

*Methylobacter luteolo-croceus* grown on mineral agar: 1. Vegetative cell, three days; 2. Azotobacter-type cyst, five days; 3. Azotobacter-type cyst and vegetative cell, eight days; 4. A section of azotobacter-type membrane system, three days; 6. Vegetative cell, three days.