微生物学报 29 (2): 84—92, 1989
Acta Microbiologica Sinica

甲烷氧化细菌的一个新种

赵树杰 张玉英 郑坚 陈景茹
陈耀初 彭莉 李皓 蔡键
(中国科学院成都生物研究所,成都)

从沼气发酵装置中,分离出一株II型专性甲烷氧化细菌 81Z 菌株。它具有甲烷氧化细菌的一般典型性状。根据其极生单鞭毛和过氧化氢酶阴性的特征,该菌株明显地区别于已知的任何一种甲烷氧化细菌,被认为是一个新种并命名为沼气甲基弯菌(*Methylosinus methanica*)。本文还讨论了它在厌氧条件下的生命活动。

关键词 甲烷氧化细菌;沼气甲基弯菌

甲烷氧化细菌(Methanotroph)是以甲烷为唯一碳源和能源而生长的细菌。迄今为止,已得到的甲烷氧化细菌分离物都是严格好氧的。关于在厌氧条件下细菌对甲烷的消耗,仅有少量报道,尚未深入研究[1-4]。尤其是专性甲烷氧化细菌在厌氧条件下的存在与功能,更没引起人们的重视。我们曾报道过从不同类型的沼气发酵装置中分离出若干含甲烷氧化细菌的混合细菌培养物和甲烷氧化细菌的纯培养物[5,6]。我们还从酒窖这种厌氧环境中分离出甲烷氧化细菌。因此,为了深入研究其在厌氧条件下的生活,从厌氧条件下获得具有非常特性的甲烷氧化细菌新菌株是很重要的。

材料和方法

(一)培养方法

培养基组成见文献[7],补加 NH_4Cl 0.25g/L。配制固体培养基时,另加 Difco 琼脂 1.5g/100ml 或日本进口琼脂粉 1.2g/100ml。一般使用菌龄 2—4d 的液体培养物作为种子,种量为 15—25%。接种物置于含空气和甲烷的密封气罐中,在 33—34℃ 培养。

厌氧培养采用 40ml 无菌血清瓶,前述无机培养基中加入巯基乙醇酸钠盐(1g/L)和刃天青(1 ppm)。用纯氮冲洗法除去瓶内空气和培养基中的氧,直至培养基内红色消失。用注射器接入菌种后,如出现红色,再用纯氮冲洗。最后用注射器注入纯甲烷气体,并使瓶内气压与外界平衡。对照组用空气代替氮气。30℃ 静置培养。

(二)生长试验

用静止的液体培养方法观察不同条件下的菌体增殖情况,菌体增殖用 560nm 波长下的光密度(O.D.)值表示。每套试验所用的器皿规格、种量和接种后体积都严格保持一致,液层高度不超过 1.5cm。供试的氮源、碳源和添加物均先用蒸馏水配成至少为实际使用浓度的 20 倍的母液,并调整 pH 至 6.7,高压或过滤灭菌,然后按量添加到培养基中。

(三)生长细胞消耗甲烷的测定

使用 135ml 血清瓶,内装 10ml 接种物,密封后,充入甲烷气体,并使气压与外界平衡。培养后,补充氮气以消除产生的负压。用气相色谱(5A 分子筛,钙型,柱温 40℃,热导池检测器)测定培养前后的气体组成。

(四)静止细胞氧化甲烷的能力和甲烷单加氧酶的检定

本文于 1987 年 4 月 21 日收到。
本研究得到农牧渔业部和本所的资助;承本所沼气两步发酵研究小组、中国科学院成都分院电镜组和美国明尼苏达大学 R. S. Hanson 教授的协助。

用 Rank 电极检定在供给和不供给甲烷基质条件下，细胞的氧吸收速率的差异，来测定细胞氧化甲烷的能力[8]。

甲烷单加氧酶借用气相色谱分析催化乙烯氧化成环氧乙烷的速率来检定。离心收集振荡培养的对数生长期细胞，用磷酸盐缓冲液（50mmol/L，含 $MgCl_2$ 5mmol/L，pH 7.0）洗涤并重新悬浮。取 1ml 悬液加入密封的小瓶中，气圈中含 12% 乙烯，保温振荡，用气相色谱分析反应前后的环氧乙烷含量(聚乙二醇 20,000 键合固定相，柱温 35℃，检定温度 170℃，火焰离子检测器，用氮气作为载气)。

（五）过氧化氢酶的检定

检验方法见参考文献[9]，用 *Methylomonas* sp. 761M 和 *Methylobacterium organophilus* XX 作为参照菌株。

（六）电镜观察

制片程序与参考文献[10]类同，整体细胞用 2% 磷钨酸钠负染 1—2min。制作超薄切片时，使用液体培养物的对数期细胞，用 2.5% 戊二醛固定。用 JEM-100CX 电子显微镜观察。

（七）DNA中 G + C 克分子百分含量测定

DNA 抽提方法参见参考文献[11]，采用热变性温度法测定 G + C 克分子百分含量，使用 0.1 倍浓度的 SSC 缓冲溶液。

（八）污染检查

本报告所列数据均由经过检查而未发现污染的纯培养物获得的。污染检查方法见参考文献[11]。

结　　果

（一）纯培养物的分离

甲烷氧化细菌富集培养用的原始样品，取自 35 L 容积柱型沼气发酵装置。该装置经过长期运转，沼气产率为 0.5L/L·d，内容物 pH 值为 8.5。富集培养物为棕褐色。用平板分离技术[10]挑取单菌落，获得能利用甲烷作为唯一碳源和能源而生存的混合培养物。经几次平板涂布，未能获得纯培养物。遂将该混合培养物在甲烷气圈里进行厌氧培养(30℃)12d，培养基为无机培养基，并移转一次，再进行厌氧培养。此厌氧培养物仅含两种伴生菌，再用通常的平板分离技术继续纯化，得到利用甲烷的纯培养物 81Z 菌株。

（二）形态观察和细微结构

81Z 菌株为革兰氏染色阴性、抗酸染色阴性的弯曲杆菌，细胞伸长期呈香肠状。大小为 0.8 × 2—4μm。游动，具有一根极生鞭毛。无荚膜，但有粘液层包被。该菌株休眠形态为外生芽孢，由细胞一端分化而成(图 1、2)。

在无机盐琼脂平板上，培养 7—9 d 的菌落无色、圆形、全缘、突起，直径 0.5—0.7mm。无可扩散色素。

表 1　81Z 菌株生长对甲烷的依赖性

Table 1　Dependence of growth of 81Z on methane

气圈 Atmosphere	培养温度 Incubation temperature (℃)	生长（4d 后 O.D. 值）Growth 1	2	3	4	平均 On the average
空气 Air	4	0.045	0.021	0.055	0.015	0.034±0.015
空气 Air	34	0.040	0.035	0.045	0.050	0.043±0.008
空气＋甲烷 Air + CH_4	34	0.105	0.100	0.125	0.135	0.116±0.019

图1 沼气甲基弯菌

1.细胞排列(×640);2、3.鞭毛(×1500;×10000);4.胞壁花纹(×14000);5.外生芽孢(×21000)。

Fig. 1 *Methylosinus methanica*

1. Cells arrangement; 2,3. Flagellum; 4. Stripe on the surface of cell wall; 5. Exspore.

液体培养物呈无色均匀悬浮状，经离心收得的大量细胞团块微带肉红色。细胞单生或呈玫瑰花结排列，常具多态特性，包括因外生芽孢形成而出现惊叹号形状（图1-1）。

电子显微镜下观察整体细胞，可见细胞壁有花生壳类花纹。超薄切片观察，可见典型的 II 型甲烷利用细菌的内原生质

图 2　沼气甲基弯菌
1. 细胞群体(×4000)；2—4. 内原生质膜结构(×40000；×14000；×16000)。

Fig. 2　*Methylosinus methanica*
1. Cell population; 2—4. Intercellular memberanous structure.

膜结构，可分辨出单位膜结构，几层重叠周边排列(图 2)。

(三) 81Z 菌株的营养特性和生长条件

该菌株的液体培养物呈均匀混浊状，其菌量和 560nm 下的 O.D. 值成正比。所以本报告中用 O.D. 值来表示该菌的增殖强度。

表 2 81Z 菌株对氧的需求

Table 2 Requirement for oxygen by isolate 81Z

处理号 No. of treatment	含氧量(%) Oxygen content		甲烷含量(%) Methane content		生长 (O.D. 560 nm) Growth	
	培养前 Before incubation	培养后 After incubation	培养前 Before incubation	培养后 After incubation	培养前 Before incubation	培养后 After incubation
1	15	3	28	19	0.107	0.407
2	15	4	28	16	0.107	0.500
3	0	1	50	47	0.170	0.205
4	0	1	52	49	0.170	0.195

注：培养时间：20 d。
Incubation for 20 d。

表3 乙酸作为 81Z 菌株生长的碳源

Table 3 Acetate as the carbon source of 81Z growth

实验 Experiment	生长(培养后 O.D. 值 560nm) Growth (O.D. 560nm after incubation)						
	乙酸 Acetate (1g/L)					无碳源 None	甲烷 CH_4
	1	2	3	4	平均 On the average		
1	0.120	0.150	0.150	0.135	0.139±0.019	0.093±0.012	0.338±0.038
2	0.250				0.250	0.225	0.310
3	0.095	0.085	0.100	0.105	0.096±0.011	0.052±0.003	0.258±0.018
4	0.065	0.065	0.050	0.065	0.061±0.011	0.043±0.008	0.116±0.019

碳源：该菌能利用甲烷作为唯一碳源和能源生长繁殖，但在没有补充甲烷的空气气圈中，在无机盐培养基上不生长（表1）。增殖细胞对甲烷的消耗参见表2。该菌株也不能在含有0.1%(V/V)甲醇的无机培养基上生长。在含甲烷的气圈中，0.1%(V/V)的甲醇既不能促进也不能抑制该菌株的生长。

81Z 菌株不能以葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖和纤维二糖等(浓度 8g/L)；乙酸、丙酮酸、苹果酸、琥珀酸、马来酸和柠檬酸等(浓度 0.5g/L)作为唯一碳源和能源生长。当乙酸浓度提高到 1g/L 时，在无甲烷气圈中，可见 81Z 菌株的生长（表3）。而在同样浓度的琥珀酸、柠檬酸或丙酮酸作为唯一碳源时却依然不生长。

同样，复杂有机物质(包括蛋白胨、酵母膏和牛肉膏)作为唯一碳源时，81Z 菌株均不生长。

氮源：铵态氮和硝态氮均可作为 81Z 菌株生长的氮源。在 0.01mol/L 浓度氮的条件下，铵态氮优于硝态氮。在培养基中不补加任何氮源时，81Z 菌株也能有较弱的生长。在进行氮源试验时，种液细胞先经过离心和洗涤，以排除种液中氮源的干扰。所以可以推测：该菌株能固定空气中的氮。尿素不能作为氮源，并且对 81Z 菌株生长有抑制作用(表 4、5)。

将不同氮源的培养物在含有其相应氮

表 4　81Z 菌株生长的氮源

Table 4　Nitrogen source of the growth of 81Z

氮源 Nitrogen source	生长 Growth (O.D. 560nm) 培养前 Before incubation	培养 5d 后 After 5 d incubation 1	2	3	平均 On the average	pH 培养前 Before incubation	培养后 After incubation
氯化铵 NH_4Cl (0.01 mol/L)	0.340	0.730	0.740	0.750	0.740±0.010	6.7	5.8
硝酸钾 KNO_3 (0.01 mol/L)	0.340	0.500	0.580	0.560	0.547±0.033	6.7	7.1
尿素 Urea (0.05 mol/L)	0.340	0.300	0.395	0.305	0.333±0.062	6.7	7.2
无氮 None (N_2 in air)	0.340	0.365	0.375	0.480	0.405±0.075	6.7	7.1

表 5　尿素对 81Z 菌株生长的抑制作用

Table 5　Inhibition of growth of isolate 81Z by urea

氮　源 Nitrogen source	生长 Growth (O.D. 560nm) 培养前 Before incubation	培养 5d 后 After 5 d incubation 1	2	3	平均 On the average	pH 培养前 Before incubation	培养后 After incubation
氯化铵 NH_4Cl (0.01mol/L)	0.020	0.430	0.360	0.270	0.353±0.083	6.7	6.5
氯化铵 NH_4Cl (0.02 mol/L)	0.020	0.150	0.125	0.115	0.130±0.020	6.7	6.4
氯化铵＋尿素 0.01mol/L NH_4Cl + 0.005 mol/L Urea	0.020	0.085	0.085	0.095	0.088±0.007	6.7	6.8

源的液体培养基中移转，并在相应氮源的平板上涂布，无氮培养基的培养物，在液体中或平板上均能继续生长，并能从平板上挑取单菌落再返回液体无机盐培养基中增殖。而含尿素培养基中的培养物在其相应的平板上无菌落出现。在不含氮源、含硝酸钾和含氯化铵三种平板上，13d 后菌落一致，其大小分别为直径 0.5、0.7 和 1.0 mm。这进一步证实了前述的结果。

严格好氧：在基本无机盐培养基中，以甲烷作为唯一碳源，缺氧时不能生长也不能消耗甲烷（表 2）。表 2 中 3、4 两个处理，培养前后氧与甲烷的变化在分析误差范围之内。当气圈中仅含痕迹量氧时，经 20d 的培养，培养物的 O.D. 值仅微弱增加，其主要由于细胞裂解造成。将此培养物转移到空气-甲烷气圈中培养 8d，仍不生长。

生长温度：生长温度范围为 16—40℃，最适生长温度为 33℃，45℃ 时不能生长。

生长 pH：生长 pH 范围为 5.5—8.0，最适生长 pH 为 7.0。

（四）有机物对 81Z 菌株在甲烷中生长的影响

0.5g/L 浓度的乙酸、丙酸、丙酮酸、琥珀酸、苹果酸、柠檬酸、马来酸，8g/L 的葡萄糖，0.1g/L 的酵母膏或 0.5g/L 的蛋白胨对 81Z 菌株在甲烷中的生长无明显的抑制或促进作用。5g/L 的蛋白胨和 1g/L 的酵母膏却明显地抑制其生长。

（五）生化特性和 DNA 中 G+C 含量的测定

81Z 菌株氧化酶阳性，过氧化氢酶阴性。无论是平板培养物还是液体培养物，都与其它甲烷利用细菌菌株明显不同，用不同菌龄的培养物反复实验，甚至在放大镜下观察都检测不到过氧化氢的分解反应。

81Z 菌株取决于甲烷的氧吸收速率为 62nmol 氧/mg 干细胞/min，内源基质的呼吸作用接近于零。当供给乙烯时，环氧乙烷在胞外积累的速率为 0.97nmol/mg 干细胞/min。表明了 81Z 菌株甲烷单加氧酶的存在。

用热变性温度法测定 81Z 菌株 DNA 中 G+C 克分子含量为 61.9%。

表 6 81Z 菌株与 *Methylosinus* 属中各已知种的比较

Table 6 Comparision of 81Z with other species of *Methylosinus*

分类特征 Characteristics	*Methylosinus trichosporium*	*Methylosinus sporium*	Strain 81Z
细胞形态 Shape of vegetative cells	杆状梨形 rod and pearshaped	弧 状 vibriod	弯杆状 curved rod
细胞大小 Cell dimension	0.8×1.0—3.5	0.8—1.1×1.5—2.2	0.8×2—4
菌落颜色 Colony colour	白色 white	从白至褐色 white to brown	白色 white
水溶性色素 Water soluble pigment	–	褐至黑色 brown to black	–
玫瑰花结排列 Rosettes formed	+	+	+
荚膜形成 Capsule formed	+	+	–
利用甲醇生长 Growth on methanol (0.1% V/V)	+	–	–
鞭毛类型 Flagella type	丛生、极毛 polar tufts of flagella	丛生极毛 polar tufts of flagella	单生极毛 polar flagella
氧化酶 Oxidase	+	+	+
过氧化氢酶 Catalase	+	+	–
DNA 中 G+C mol% G+C mol% of DNA	62.5	62.5	61.9
生态环境 Ecologic environment	污水，泥中 wast water and mud	污水，泥中 wast water and mud	沼气发酵池 biogas fermentor

（六）分类与定名

81Z 菌株具有一般甲烷氧化细菌甲基球菌科（Methylococcaceae）的典型特征[12-14]。如革兰氏染色阴性，抗酸染色阴性，细胞色素氧化酶反应阳性，严格呼吸型代谢，能利用甲烷作为生长的碳源和能源，以及复杂的细胞内膜结构等。其细胞形态，运动特性，休眠体类型和固氮性能也符合这一科的描述。根据 81Z 菌株的内膜结构和碱基组成特性，它显然是 II 型甲烷氧化细菌。II 型甲烷氧化细菌包括甲基弯菌属（*Methylosinus*）、甲基孢囊菌属（*Methylocystis*）和甲基杆菌属（*Methylobacterium*）。甲基孢囊菌属的休眠形态是类脂孢囊，营养细胞无鞭毛。甲基杆菌属不能形成孢子。梁家骝等曾报道一个 II 型菌新属刺孢杆菌属（*Eghinosporobacterium*），它以形成胞囊，产生两个孢子以及周身刺状突出物为特征。81Z 菌株不具备这些特征。由于其休眠体形态为外生孢子，营养细胞具有运动鞭毛这两个主要分类特征，暂将 81Z 菌株归属于甲基弯菌属（*Methylosinus*）。

在甲基弯菌属中，目前报道的只有两个种，即 *M. trichosporium* 和 *M. sporium*（表 6）。在细胞形态及不利用甲醇生长等特征上，81Z 菌株与 *M. sporium* 相似，而在细胞形态、菌落颜色及色素分泌等特征上，则接近 *M. trichosporium*。81Z 菌株为极生单鞭毛，过氧化氢酶反应阴性，无明显的荚膜包被。这些特征上述两种菌均不具备。这株来自沼气发酵池的甲烷氧化菌与上述两个种的典型特征不符。因此，认为 81Z 菌株是一个新种，命名为沼气甲基弯菌（***Methylosinus methanica***）。

讨　　论

我们曾指出，甲烷氧化细菌是厌氧消化器中普遍而正常存在的一类活跃的微生物，是其中微生物区系中固有的一员[4,5]。但它们的纯培养物，当以甲烷作为唯一碳源时，均为严格好氧的细菌。它们在厌氧条件下如何生活的问题尚未解决。81Z 菌株过氧化氢酶阴性，这是与沼气发酵器中厌氧条件相适应的。既然没有氧分子的供给，当然不会有过氧化氢的形成。过氧化氢酶的存在就成为多余的了。从表 2 进一步计算还发现它生长的甲烷和氧的收率 Y_{CH_4} 和 Y_{O_2} 都明显低于通常的甲烷氧化细菌，它的甲烷单加氧酶活性也低于大多数好气环境中分离到的甲烷氧化细菌，这表明它在好气环境中利用甲烷作为生长碳源和能源的生化过程存在着某种缺陷。另一方面，它却能利用乙酸作为唯一碳源和能源微弱生长，这一特点值得深入研究。总之，如上几个方面似乎反映了 81Z 菌株可能存在某种特有的补偿代谢系统，以适应沼气发酵装置中的极端厌氧生态环境。

Kawamura 等报道了甲烷氧化细菌在厌氧条件下具有由甲酸产氢的能力[14]。这和我们的研究结果一致，由此表明：甲烷氧化细菌在厌氧条件下依然以它特有的方式维持正常的生命活动，从而积极地参与该环境下的物质与能量代谢过程。

参　考　文　献

[1] Zehnder, A. J. et al.: *J. Bacteriol.*, **137**: 420, 1979.
[2] Hanson, R. S.: *Adv. in Appl. Microbiol.*, **26**: 3—39, 1980.
[3] Reaburgh, W. S. et al.: *Limnol Oceanogr.*, **22**: 1, 1977.
[4] Panganiban, A. T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 303—309, 1979.
[5] Zhao Shujie et al.: Anaerobic Digestion 1985 (ed. by Chinese State Biogas Association), p. 546, 1985.
[6] 赵树杰等：中国沼气(增刊)，第130—137页，1985。
[7] Zhao Shujie et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**: 1237—1242, 1984.

[8] Zhao Shujie et al.: Microbial Growth on C_1 Compounds (ed, by Crawford R. L, et al.). American Society for Microbiol., Washington D. C., pp. 262—268, 1984.

[9] Gerhardt, P. et al.: Manual of Methods for General Bacteriol., American Society for Microbiol., Washington D. C., p. 413, 1981.

[10] 赵树杰等: 微生物学报, **21** (3): 271—277, 1981。

[11] Zhao Shujie et al.: *Appl. Environ. Microbiol*., **48**: 807—812, 1984.

[12] Krieg, N. et al.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 256—261, 1984.

[13] Романовская, В. А. и др.: *Микробиология*, **47**:120—130, 1978.

[14] Whitenbury, R. et al.: *J. Gen. Microbiol*., **61**: 205—218, 1970.

[15] 梁家騵等: 微生物学报,**23**(3):193－196,1983。

[16] Sugio, K. et al.: *J. Ferment. Technol*., **61**(2): 151—156, 1983.

A NEW METHANOTROPHIC SPECIES

Zhao Shujie Zhang Yuying Zheng Jian Chen Jingru Chen Yaocu
Peng Li Li Hao Cai Jian

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu)

From a biogas fermentor a type II methanotrophic strain 81Z was isolated. It possess the general characteristics of methanotrophs. However, some of its properties, such as polar flagellum, catalase-negative etc. indicated that it apparently differs from any known strains of methanotrophs. A new species was established and named as ***Methylosinus methanica.*** According to its catalase-negative property, slight unstable growth on acetate and low Y_{CH_4}, it was supposed that it may have a complemented metabolic system to adapt to anaerobic condition and take active part in material and energy metabolism under this condition.

Key words

Methanotroph; *Methylosinus methanica*