

甲烷甲基单胞菌的一个新变种

赵 树 杰

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

对甲烷氧化细菌 761M 菌株做了进一步鉴定。结果表明, 该菌株为甲烷甲基单胞菌的一个新变种, 命名为甲烷甲基单胞菌成都变种 (*Methylomonas methanica* var. *chengduensis*)。

关键词 甲烷氧化细菌; 甲烷甲基单胞菌; 甲烷甲基单胞菌成都变种

甲烷氧化细菌是以甲烷为唯一碳源和能源而生长的一类细菌。尽管在本世纪初就发现了这类细菌, 但直到 1970 年, 才由 Whittenbury 等^[1]建立了这类细菌的分类学基础。《伯杰细菌鉴定手册》第八版^[2]中记述了这类细菌, 建立了甲基单胞菌科 (*Methylomonadaceae*)。Романовская 等^[3]继而在 Whittenbury 等工作的基础上建立了更完整详细的分类系统。在《伯杰系统细菌学手册》^[4]中, 总结和进一步讨论了这类细菌的分类学, 将科的命名更改为甲基球菌 (*Methylococcaceae*), 对这类细菌的分类规范作了重新说明, 在种的描述部分, 删去了《伯杰细菌鉴定手册》第八版中所列的四个种中的两个。这些分类系统的共同点是在分类到属之前都根据几个基本性状先将它们分为 I 型和 II 型(表 1)。

本实验室曾于 1979 年首先在中国分离出甲烷氧化细菌的纯培养物。当时根据《伯杰细菌鉴定手册》第八版和 Романовская 的分类系统, 只鉴定到属, 无法把它归于任何已知种, 暂记为 *Methylomonas* sp. 761M^[5]。其后的研究发现它具有不寻常的特性。本文报道对该菌株进一步鉴定的结果。

材 料 和 方 法

(一) 培养方法及污染检查

使用 2 号无机盐培养基在含有甲烷的气圈中静止培养或振荡培养^[5, 9]。培养结束时按文献 [5] 进行严格的污染检查。

(二) 葡萄糖和蛋白胨对生长的影响试验

使用 300ml 具侧臂的三角瓶, 内盛 30 ml 硝酸钾 2 号培养基, 处理组含有葡萄糖和蛋白胨, 接种后充以甲烷, 置 30°C 水浴摇床上培养, 每隔 8—12 小时, 利用侧臂测定浊度, 实验结束后进行污染检查^[9]。

(三) 葡萄糖同化的检测

培养基中含有葡萄糖 6 g/L, 其中包括 [U-¹⁴C]-葡萄糖 (总放射性强度 10⁵ cpm/mmol 葡萄糖), 在含有甲烷的气圈中振荡培养后, 测定细胞的不同馏分以及水解后各种氨基酸的放射性强度^[9]。

(四) 三羧酸循环完整性的检定

无机培养基中添加 0.75 mmol/L 的苹

本文于 1990 年 3 月 5 日收到。

本研究工作得到美国明尼苏达大学 R. S. Hanson 教授的协助; 陈耀初和何开泽同志参加了核酸成分的分析工作。

果酸和 1.23 mmol/L 的 [2-¹⁴C] 乙酸 (1.8 × 10⁷ dpm/mmol), 在含有甲烷的气圈中振荡培养后, 测定产生的二氧化碳、细胞不同馏分和水解后各种氨基酸的放射性强度^[8]。

(五) α-酮戊二酸脱氢酶的检定

在无氧条件下检定无细胞粗提液催化 2-酮-[5-¹⁴C] 戊二酸脱氢后积累 [¹⁴C] 琥珀酸的能力^[9]。

(六) DNA 中 G + C mol% 的测定
使用热变性温度法。

(七) 内膜结构的检定

见参考文献 [5, 6, 8]。

(八) 试剂

[U-¹⁴C] 葡萄糖和 [2-¹⁴C] 乙酸购自 New England Nuclear Corp., 2-酮-[5-¹⁴C] 戊二酸钠盐购自 Amersham Interna-

tional Ltd., 甲烷 (化学纯) 购自 Union Carbide Corp.。

结果和讨论

对于区分 I 型和 II 型甲烷氧化细菌的典型性状来说, 菌株 761M 一方面具有 I 型菌的典型特性: 成束的泡囊盘型原生质内膜结构^[5-7]和只用核酮糖单磷酸途径同化一碳化合物^[6]; 另一方面, 蛋白胨和葡萄糖对其生长有明显的促进作用, 在甲烷存在的条件下, 葡萄糖的碳原子大量地被同化到细胞多种化学组分中去^[9, 10]。特别是用 ¹⁴C 在 2 位标记乙酸进行试验。证明了该菌株具有完整的三羧酸循环, 也进一步用同位素技术证实了 α-酮戊二酸脱氢酶的存在^[8], 这使 761M 又区别于所有的 I 型菌, 而具有 II 型菌的属性 (表 1)。

表 1 甲烷氧化细菌的两个类型及菌株 761M 的性状^[11]

Table 1 Characteristics of the types of methanotrophs and strain 761M

性状 Characteristics	I 型 Type I	II 型 Type II	菌株 761M Strain 761M
原生质内膜排列: Arrangement of intracytoplasmic membrane:			
成束的泡囊盘 Bundles of vesicular discs	+	-	+
成对膜沿细胞周边平行排列 Paired membranes aligned to cell periphery	-	+	-
主要碳同化途径: Major carbon assimilation pathways:			
核酮糖单磷酸途径 (3-己酮糖磷酸合成酶阳性) Ribulose monophosphate pathway (3-hexulose phosphate synthase-positive)	+	-	+
丝氨酸途径 (羟基丙酮酸还原酶阳性) Serine pathway (Hydroxypyruvate reductase-positive)	-	+	-
三羧酸循环: Tricarboxylic acid cycle:			
完整 Complete	-	+	+
不完整 (α-酮戊二酸脱氢酶阴性) Incomplete (α-oxoglutarate dehydrogenase-negative)	+	-	-

菌株 761M 的多数性状, 十分接近于《伯杰系统细菌学手册》中甲基球菌科

(Methylococcaceae) 的甲烷甲基单胞菌 (*Methylomonas methanica*)。然而, 该种乃

至该属为典型的 I 型菌, 其性状的描述在三羧酸循环不完整和缺少 α -酮戊二酸脱氢酶这一重要方面, 不适合于 761M。此外 761M 菌株的最适和最高生长温度, 细胞大小及排列^[5], 某些有机物对其在甲烷中生长的促进作用等, 也与该属的描述有明显差异。Романовская 分类系统十分重视生长温度在属内不同种的分类时的地位。不过, 考虑《伯杰系统细菌学手册》关于在建立新种时要慎重的劝告, 则不必顾及包括生长温度在内的次要性状的差异, 761M 应归属甲烷甲基单胞菌。甲烷甲基单胞菌的分布十分广泛, 也曾多次被分离出来, 但其性状彼此十分相似, 与其模式菌株的描述基本相符。而分离自中国大陆的 761M 菌株, 与模式菌株比较却呈现了上述的差异, 这已经远远超过菌株间的差异, 应该确定是一个新变种。

所有其它实验室报告的甲烷氧化细菌, 都非常适合于表 1 中区分 I 型和 II 型的规范, 界限十分分明。而 761M 在三羧酸循环方面的性状, 使 I 型菌与 III 型菌之间建立了“桥梁”。把它确定为一个新变种是有意义的。

甲烷甲基单胞菌成都变种

Methylobacterium methanicum var. *chengduensis*

革兰氏阴性、抗酸染色阴性的直杆菌, 两端圆形, $0.9-1.1 \times 1.4-1.5 \mu\text{m}$, 单极生鞭毛^[5]。细胞单生、成对或 3—4 个细胞成链排列, 未见玫瑰花结排列。细胞粉红

色, 无水溶性色素。能利用甲烷作为唯一碳源和能源在有氧条件下生长, 蛋白胨、葡萄糖和酵母膏均对其在甲烷中的生长有促进作用。具有典型的 I 型成束泡囊盘原生质内膜结构。用核酮糖单磷酸酯途径同化一碳化合物。具有 α -酮戊二酸脱氢酶和完整的三羧酸循环。最适生长温度为 34—36°C, 最高生长温度为 40°C。

DNA 的 G + C 含量为 52.5mol% (Tm)。

其他性状与模式菌株相同。

参 考 文 献

- [1] Whittenbury, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **61**: 205—208, 1970.
- [2] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 268—269, 1974.
- [3] Романовская, В. А. и др.: *Микробиология*, **47**:120—130, 1978.
- [4] Krieg, N. et al.: In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol I, Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 256—261, 1984.
- [5] 赵树杰等: *微生物学报*, **21**(3):271—277, 1981.
- [6] 郑中华、赵树杰: *微生物学报*, **28**(4):295—300, 1988.
- [7] Zhao Shujie and R. S. Hanson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**(4): 807—812, 1984.
- [8] Zhao Shujie and R. S. Hanson: *ibid.*, **48**(6): 1237—1242, 1984.
- [9] Zhao Shujie and R. S. Hanson: *Microbial Growth on C₁ Compounds* (ed. by Crawford R. L. et al.), American Society for Microbiology, Washington D. C., pp. 262—268, 1984.
- [10] Haber, C. L. et al.: *Science*, **221**: 1147—1153, 1983.

A NEW VARIETY OF *METHYLOMONAS METHANICA*

Zhao Shujie

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu)

A methanotrophic strain 761M was identified further. It was shown that strain 761M was a new variety of *Methylomonas methanica*. It is named *Methylomonas methanica* var. **chengduensis**.

Key words

Methanotroph; *Methylomonas methanica*;
Methylomonas methanica var. *chengduensis*

JOURNALS.IM.AC.CN