

甲 醇 细 菌 的 研 究

II. 两株甲醇细菌的形态及生理生化特性

汪锦邦 林伯荃 侯庆党 平

(北京市营养源研究所)

甲醇氧化细菌的研究国外已有报道^[1,2],近年来很多国家仍在进行这方面菌种收集、筛选、分类、鉴定^[3-11]及工业化生产的研究工作。我们从4193个样品中得到30株强同化甲醇菌株。有两株为专性的高产菌株BB570、BB574,对它们的形态及生理生化特征进行了研究及观察,经初步鉴定与伯杰氏手册第八版中三个种及国外已发表种都有区别,现将实验结果报道如下。

材 料 及 方 法

(一) 菌种来源

BB570从海南岛土壤中分离得到, BB574由石家庄土壤中分得。

(二) 培养基

1. 甲醇2号培养基: 见文献^[12]。
2. 甲醇3号培养基: 甲醇2号培养基中再添加(g/l): NaCl 0.04、CuSO₄ 0.006、磷酸0.0015、硫酸锌0.004、钼酸铵0.00015。

(三) 鉴定方法

根据伯杰氏(Bergey's)^[3,4]的细菌分类系统进行鉴定,对各种醇类的同化试验是用甲醇2号培养基灭菌后再加入0.5—1%的各种醇类。甲酸、甲胺、甲醛浓度为0.01%,于灭菌后加入。糖类及有机酸浓度为0.5%,于灭菌前加入,6磅灭菌30分钟。

由于专性甲醇细菌只能利用甲醇为生长的

唯一碳源及能源,因而在做各种鉴定实验中,按1%添加甲醇作碳源(如MR, vp等实验)。

(四) 粗蛋白含量的测定

按凯氏定氮法测定。

(五) 菌体核酸含量测定

用高氯酸冷抽提后,在240—260 nm处测光吸收。

(六) 菌体氨基酸

采用日立835—50型氨基酸分析仪测定。

(七) 生长最适温度

采用TN-3型温度梯度仪测定。

试验结果

(一) BB570 菌的形态及生理生化特征

1. BB570 菌的形态特征:革兰氏染色阴性、无芽孢、杆状,0.5—0.8 × 1.0—2.0 μ ,单根极生鞭毛、单独或成双或呈短链状,无荚膜。

2. 培养特性: BB570 于甲醇2号培养基琼脂平板上37 $^{\circ}$ C条件下培养3天后,菌落呈圆形,直径2mm左右;呈中凸状;不透明;全缘;光滑并闪光。而于甲醇2号琼脂斜面培养基中生长3天后可见到在接种线周围生长旺盛;表面平滑;边缘整齐;灰白色;不透明。在甲醇2号液体培养基中于37 $^{\circ}$ C下培养3天后,生长中等;混浊;无沉淀;不生膜。培养于牛肉汁琼脂斜面及牛肉汁液体培养基中(于上述同样条件下)未见到菌体生长。如在牛肉汁培养基加入1%甲醇无论固体及液体培养只见到微弱生长,有时有沉淀产生。

3. 生理生化特点:严格好氧,生长温度范围为30.5—42 $^{\circ}$ C,最适生长温度37.5 $^{\circ}$ C。生长pH范围为5—9,最适pH为7—8,硝酸还原(+),尿酶(+),过氧化氢酶(-),氧化酶(+),MR反应(-),VP反应(-),不产生H₂S,不水解淀粉,石蕊牛奶反应酸性,不利用柠檬酸,吡啶反应(-),明胶液化(-)。

4. 对碳源的利用:可利用甲醇,不能利用甲烷、甲胺、二甲胺、三甲胺、甲醛、甲酸、乙醇、丙醇、丁醇、己醇、辛醇、戊醇、丙三醇、丙二醇、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、果糖、蔗糖、柠檬酸、琥珀

酸、丙二酸、苹果酸、酒石酸。

其他性状:生长耐盐力4%,耐甲醇力6%,生长不需添加任何维生素,镁、铁离子有促进生长作用。

5. 生产性能: 于2.6L小型发酵罐中间歇培养,世代时间72分钟,转化率为0.331g干细胞/g甲醇(培养48小时后),粗蛋白含量84.32%,主要氨基酸含量(占干重的%):赖氨酸4.2,苏氨酸3.46,亮氨酸4.92,胱氨酸1.13,蛋氨酸2.28,缬氨酸4.2,异亮氨酸3.03,酪氨酸1.93,苯丙氨酸3.25,色氨酸1.04。

6. BB570 菌的初步鉴定:根据上述结果可以确定BB570菌为*Methylomonas*属的细菌,它与Bergey's手册第八版中的三个种及已发表过本属的种的比较见表1中所列。

由表1可见BB570与Bergey's手册中三个已知种在菌落颜色、生长温度、铵盐的利用以及对甲烷、甲胺的利用,过氧化氢酶的活性方面有明显区别。与近几年发表的新种^[5-11]中仅同化甲醇而不利用其他碳源的6个种比较与*M. Methandis* BNK-84的不同,BNK-84氧化酶为阴性,可产生水溶性色素,而BB570氧化酶为阳性,不产生水溶性色素。与*M. probus*区别为*M. probus*过氧化氢酶为阳性可利用甲胺而BB570与其相反。因此可以认为BB570为*Methylomonas*属有别于已发表三个种的新菌株。

(二) BB574 菌的形态及生理生化特征

1. 形态特征:革兰氏染色阴性、无芽孢杆菌,0.4—0.8 × 2.0—2.5 μ ,单根极生鞭毛,单独、成双或呈短链状,有荚膜。

2. 培养特性:严格好氧,生长温度范围29—43.3 $^{\circ}$ C,最适生长温度39 $^{\circ}$ C。生长pH范围5—10,最适pH为6—9。硝酸还原(+),尿酶(+),过氧化氢酶(+),氧化酶(+),MR反应(-),vp反应(-),不产生H₂S,不水解淀粉,石蕊牛奶反应酸性,不利用柠檬酸,吡啶反应(-),明胶液化(-)。

3. 对碳源的利用:可利用甲醇,不能利用甲烷、甲胺、二甲胺、三甲胺、甲醛、甲酸、乙醇、丙醇、丁醇、己醇、辛醇、戊醇、丙三醇、丙二醇、

表 1 BB570、BB574 与 *Methylomonas* 属已知种的比较

特性 项目	形态特点		在39℃ 生长	pH 范围	过氧化 氢酶活 性	氧化酶 活性	对 C ₁ 化合物的同化					是否产 生水溶 性色素	参考 文献	
	菌种名称	大小(μm)					菌落颜色	甲烷	甲醇	甲酸	甲胺			甲醛
<i>M. methanica</i>		无	黄—粉红	-	6.6—8.0	+	+	+	+	-	无	-	+	3,4
<i>M. methanooxidans</i>		无	无	+	5.0—7.0	无	无	+	+	-	无	-	-	4
<i>M. methanitificans</i>		无	黄	-	无	无	无	+	+	-	无	-	-	4
<i>M. probus</i>		0.5—0.7× 1.5—1.7	白—灰	+	5.3—9.5	+	+	-	+	-	+	-	-	5
<i>M. methylavora</i>		0.4—0.7× 1.0—4.0	无色	+	6.5—7.5	无	无	-	+	-	-	-	无	6
<i>M. methanophila</i>		0.4—0.8× 0.8—2.0	无色—白	-	5.0—9.0	+	+	-	+	-	-	-	无	7
<i>M. aminofeciens</i>		0.4—0.5× 1.5—3.0	白—黄	+	5.0—9.0	+	+	-	+	无	-	无	+	8
<i>M. methandis</i> BNK-84		0.3—0.5× 1.0—3.0	白	+	5.0—9.0	-	-	无	+	无	无	无	无	9
<i>M. L3</i>		0.5×1.3	白—灰	+	6.0—7.0	+	+	-	+	-	-	-	无	10
<i>M. BB570</i>		0.2—0.4× 0.8—2.0	白—灰	-	5.0—9.0	-	+	-	+	-	-	-	-	无
<i>M. BB574</i>		0.4—0.8× 2.0—2.5	白灰	+	5.0— 10.0	+	+	-	+	-	-	-	-	无
<i>M. sp. 761M</i>		0.9—1.1× 1.4—1.5	粉红	+	5.5—8.0	+	+	+	-	-	-	-	-	11

葡萄糖、乳糖、麦芽糖、果糖、蔗糖、柠檬酸、琥珀酸、丙二酸、苹果酸、酒石酸盐。

5. 其他性状: 生长耐盐力低于 2%, 可以在 4% 以下浓度的甲醇无机盐固体培养基及 6% 以下的甲醇液体培养基中生长, 镁及铁离子对生长有促进作用。在 2.6L 发酵罐间歇培养时, 转化率为 0.25g 干细胞/g 甲醇, 粗蛋白含量为 65.3%。主要氨基酸含量(占干重%): 赖氨酸 3.84, 苏氨酸 2.86, 胱氨酸 0.45, 蛋氨酸 1.22, 缬氨酸 3.79, 导亮氨酸 2.84, 亮氨酸 4.35, 酪氨酸 1.91, 苯丙氨酸 1.91, 色氨酸 2.06。

BB574 与 Bergey's 第八版中三个种在对甲烷的同化能力, 生长温度范围及对 β-羟基丁酸的同化方面不一致。但其他特征基本相似。而与表 1 中其他甲醇氧化细菌的区别为 BB574 与 *M. probus* 只在同化甲胺方面不一致; 与 L3 (未

定名) 基本特征一致; 与 BB570 在生长温度范围、过氧化氢酶活性及形体大小上不同。BB574 也应属于 *Methylomonas* 属的一个未定名菌株。

参 考 文 献

- [1] Sohngen, N. L.: *Zater Bakterial.*, Parasitenk., 15: 513, 1906.
- [2] Dworkin, M. Foster, J. W.: *J. Bacterial.*, 72: 646, 1956.
- [3] Breed, R. S., E. G. D. Murray and R. Nathan., R. Smith: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., Bailliere, Tindall and Cox, Ltd. London. 1957.
- [4] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- [5] Raymond, N. J.: *US Patent* 4106988. 1978.
- [6] Kovno, K., et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 19: 11—21, 1973.

- [7] Suzuki, M., et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55(5): 459—465, 1977.
- [8] Ogata, K., et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55(5): 444, 1977.
- [9] 日本三菱瓦斯化学公司: 甲醇单细胞蛋白和原料甲醇

- 生产技术, p.2, 北京科技情报所出版, 1978。
- [10] Willian, H., et al.: *Applied and Envir Microbiol.*, 36(1): 56—62, 1978.
- [11] 赵树杰: 微生物学报, 21(3): 271, 1981。
- [12] 林伯荃等: 微生物学通报, 10(6): 248—251, 1983。