



甲烷利用菌研究概况

赵 树 杰

(中国科学院成都生物研究所)

自从 1905 年 Kaserer 和 Söhngen 分别报道发现利用甲烷细菌以来,随着有关微生物法勘探石油、天然气的研究,以及利用天然气生产单细胞蛋白的研究工作的开展,对于利用甲烷的微生物及其对甲烷的转化,逐步有了深入的认识,积累了大量资料。本文就甲烷利用菌的研究作一概述。

甲烷利用菌的种类及分布

迄今所发现的具有吸收和代谢甲烷能力的生物仅限于细菌。至于其它微生物,有少数至多只在生命活动过程中对甲烷有辅氧化的能力。关于分枝杆菌是否

能利用甲烷,各国学者看法不同。据 Малашенко 的报告^[1],分枝杆菌实际上只能利用天然气中的高级气态烃;饭塚广^[2]则报道过两株可在纯度为 99.98% 的甲烷中生长的分枝杆菌。

通常所指利用甲烷的细菌,是利用甲烷作唯一碳源和能源生长的细菌。所谓甲烷的生物转化,就是通过利用甲烷的细菌来进行的。在第一次报道利用甲烷的细菌之后的六十多年内,事实上总共只分离出 4 个种,其中第一株纯培养物的分离和描述是 Dworkin, 和 Foster^[3] 于 1956 年报道的。Whittenbury 等^[4]从采自世界各地的样品中共分离出 100 多株利用甲烷的

表 1 利用甲烷的细菌

菌 名	分 离 者
甲烷甲基单胞菌 (<i>Methylobacter methanica</i>)	Dworkin et al., 1956
氧化甲烷甲基单胞菌 (<i>Methylobacter methanooxidans</i>)	Brown et al., 1964
固氮甲烷甲基单胞菌 (<i>Methylobacter methanitrificans</i>)	Davis et al., 1964
荚膜甲基球菌 (<i>Methylococcus capsulatus</i>)	Foster et al., 1966
毛孢子甲基菱形杆菌 (<i>Methylosinus trichosporium</i>)	Whittenbury et al., 1970
外孢甲基菱形杆菌 (<i>Methylosinus sporium</i>)	Whittenbury et al., 1970
微小甲基孢囊菌 (<i>Methylocystis parvus</i>)	Whittenbury et al., 1970
白色甲基单胞菌 (<i>Methylobacter albus</i>)	Whittenbury et al., 1970
链杆甲基单胞菌 (<i>Methylobacter streptobacterium</i>)	Whittenbury et al., 1970
活跃甲基单胞菌 (<i>Methylobacter agile</i>)	Whittenbury et al., 1970
红色甲基单胞菌 (<i>Methylobacter rubrum</i>)	Whittenbury et al., 1970
玫瑰甲基单胞菌 (<i>Methylobacter rosaceus</i>)	Whittenbury et al., 1970
有色球状甲基杆菌* (<i>Methylobacter chroococcum</i>)	Whittenbury et al., 1970
牛甲基杆菌 (<i>Methylobacter bovis</i>)	Whittenbury et al., 1970
荚膜甲基杆菌 (<i>Methylobacter capsulatus</i>)	Whittenbury et al., 1970
维涅兰德甲基杆菌 (<i>Methylobacter vinelandii</i>)	Whittenbury et al., 1970
微小甲基球菌 (<i>Methylococcus minimus</i>)	Whittenbury et al., 1970
乌克兰甲基球菌 (<i>Methylococcus ukrainicus</i>)	Малашенко и др., 1973
淡棕甲基球菌 (<i>Methylococcus fulvus</i>)	Малашенко и др., 1973
兼性甲基杆菌 (<i>Methylobacterium organophilum</i>)	Patt et al., 1974
珍珠甲基杆菌 (<i>Methylobacter margaritae</i>)	Takeda et al., 1974
喜温甲基球菌 (<i>Methylococcus thermophilus</i>)	Малашенко и др., 1975
细长甲基单胞菌 (<i>Methylobacter gracilis</i>)	Малашенко и др., 1975
金黄甲基球菌 (<i>Methylococcus luteus</i>)	Романовская и др., 1978
芽孢杆菌 (<i>Bacillus</i> sp.)	Wolnak, 1967
短杆菌 (<i>Brevibacterium</i> JOB 5)	Perry, 1968
甲基单胞菌 (<i>Methylobacter</i> sp. AJ 3670)	微生物工业研究所(日), 1975
多孢泉发菌 (<i>Crenothrix polyspora</i>)	Völker et al., 1977

* 后由 Малашенко и др. 重新命名为韦氏甲基球菌 (*Methylococcus whittenburyi*)

表 2 各属甲烷利用菌的特征

属 名	甲基塞形杆菌 <i>Methylosinus</i>	甲基孢囊菌 <i>Methlocystis</i>	甲基单胞菌 <i>Methylomonas</i>	甲基杆菌 <i>Methylobacter</i>	甲基球菌 <i>Methylo</i>
特 征					
休眠体	外生芽孢	类脂孢囊	不成熟的孢囊*	固氮菌型孢囊	不成熟的孢囊*
内膜结构	II 型	II 型	I 型	I 型	I 型
形 态	杆状或梨形	杆状或弧形	杆状或球杆状	杆状或球杆状	球状或球杆状
玫瑰花结排列	有	有	无	无	无
碳同化途径	丝氨酸途径		戊糖磷酸途径		
游 动 性	有	无	有或无	有或无	无
鞭 毛	极生丛毛	无	极生单毛	极生单毛	无
荚膜或粘液	有	有	有或无	有或无	有
菌落颜色	白—黄	白	白、黄粉红、红	白—棕	白
水溶性色素	棕褐色或无	无	绿色或无	黄色或无	无

* 不是所有菌株都形成可识别的休眠体。

细菌,将其归纳为 15 个种。其中包括了以前已知的几乎所有种类。迄今为止已知的利用甲烷的细菌总结于表 1。

在早期,发现的甲烷利用细菌都归在已建立各属中。后来考虑到这类细菌的若干特性,单独建立了若干个属。这些属名都冠以“甲基(Methylo-)”的字头。在第八版《伯杰氏鉴定细菌学手册》中,单独建立了一个科。近年来多采用 Whittenbury 等提出的分类原则^[4],也把若干种专性利用单碳化合物的细菌归属在同一种内。利用甲烷的各属细菌的特征如表 2 所示。1975 年,Whittenbury 等^[5]主张按内膜结构之不同分为两个类群,各包括两个属。1978 年 Малащенко 等^[6,7]根据数值分类的结果,对 Whittenbury 的分类方法作了一些增补和修订,提出了四个属共十六个种的分类系统,统归甲基单胞菌科。

甲烷利用菌分布极为广泛,我们从油田、气田,煤矿坑道水、丘陵土、森林土、池塘、湖沼、菜园、稻田、庭院、岩芯、下水道、污水处理站,乃至新鲜动物的粪便中,都曾发现。就是在湖底和地下水这样的嫌氧环境中,也可以发现它们^[1,7]。因此,用它作为油田或气田的指示菌,必须慎重。

甲烷利用菌的特征

Perry 在 1968 年分离的短杆菌是唯一已发现的能利用甲烷及少于 22 个碳原子的革兰氏阳性细菌。其它都是革兰氏染色阴性,抗酸染色阴性。下面就甲烷利用菌在细胞学、营养及生长特性等方面的特征加以说明。

一、细胞学特征

(一) 内膜结构

甲烷利用菌的细胞内有一种与中体不同的特殊内生物膜器^[10]。它由真正的单位膜构成。从发生学上说,它可能也是质膜反褶而成。根据结构不同,分为 I、II 两型:

I 型:成束排列,贯穿整个细胞,甚至可以占据细胞三分之二以上的空间。每一束都由定向排列的孢囊盘组成,每个小孢囊盘由平行排列的一对膜构成。单膜厚约 90 Å,分三层。电镜观察,里外两层为稠密层,夹在中间的是透明层。

II 型:由成对的膜组成。单膜厚约 80 Å,也分三层。它延伸至细胞深处,或在边缘与质膜相平行。膜可与大小不同的腔管相连接,电镜观察可见腔管中充满稠密物质。

这种内生物膜器的功能尚不了解。利用高级气态烃的细菌只有类似中体的构造,而利用液态正烷烃的微生物则没有特殊的膜器。Völker 等^[11]发现多孢泉发菌(*Crenothrix polyspora*)也具有复杂的内膜结构,并发现它也能利用甲烷。在某些光合细菌和硝化细菌中也发现复杂的内膜结构。在甲烷氧化过程中,自由能的改变很大,如甲烷氧化为甲醇的反应,自由能变化为 -26.12 大卡/克分子,这样高的能量利用和特殊的内膜结构是分不开的。此外,这种内膜结构也许还和提高异化代谢中能量利用效率有关。

(二) 休眠体形态

甲烷利用细菌大多有休眠期, 休眠体有两类: 外生芽孢和孢囊。孢囊又分类脂孢囊、固氮菌型孢囊和不成熟的固氮菌型孢囊三种。

外生芽孢生成时, 细胞拉长, 一端变细而成梨形或逗号形, 变细一端由外孢囊包裹, 最后成芽状脱落下来。外生芽孢的结构类似内生芽孢, 但没有二皮嗜胺酸, 能抗干旱、耐热。

类脂孢囊是在细胞内积聚大量 β -羟基丁酸类脂内含物, 细胞变圆变大而成。它的细胞壁复杂化, 内膜结构消失。它抗干旱不耐热, 可存活 18 个月。热刺激可诱导萌发。

固氮菌型孢囊的形态与固氮菌的孢囊类似, 单个, 成对或多个聚在一起。形成色素, 抗干旱不耐热。

不成熟的孢囊由细胞变圆而成, 它的细胞壁结构介于营养细胞与成熟的孢囊之间。这种孢囊在没有甲烷时可存活 5—6 周。

由于甲烷是这类细菌赖以生成的唯一碳源和能源, 而它的供应不是很稳定, 因此休眠体的形成是这类菌对环境的适应。

(三) 多态现象

甲烷利用细菌常形成大型细胞、四联体或畸变成不规则形状。它的荚膜、粘液及玫瑰花结排列等特征也会因生理状态不同而不同。

二、营养要求

(一) 碳源

根据对甲烷之外其它有机物需求程度的不同, 甲烷利用菌分专性与兼性两类。专性甲烷利用菌除利用甲烷、甲醇或二甲醚外, 其它有机物均不被利用。某些有机物可以促进甲烷利用菌的生长, 有机物本身被辅氧化, 不过更多见到的是它们抑制甲烷利用菌的生长。兼性菌在无甲烷时, 可利用其它碳源。如兼性甲基杆菌可以利用多种有机酸、糖类和牛肉汁作为碳源^[11]。

关于甲烷利用菌对二氧化碳的需求, 各家说法不一。我们认为正常生长的菌, 外源的二氧化碳最多只是作为培养物开始生长的诱导因子, 因为它们代谢产生的二氧化碳已足够自身利用。而且浓度过高会抑制菌的生长。

(二) 氮源

利用甲烷的细菌都不必需有机氮源, 只是有些菌可以利用有机氮源。这类细菌几乎都可以利用铵盐, 大多数可利用硝态氮。不同氮源常使菌的特性发生改变。有若干种可以固氮, 某些种的固氮活性未能测定出, 可能和培养条件和测定方法有关。如在氧水平很

低的条件下, 有利于使细菌表现这种活性。

(三) 其它矿物营养

甲烷利用细菌从无机磷酸盐取得磷源。Whittenbury 等^[4]表明, 磷酸盐浓度大于 0.2% (重量/体积), 对很多这类细菌有抑制作用。这类菌多喜高浓度镁离子, 据称只要不与培养基中其它成分形成沉淀, 镁离子的浓度愈高愈好。

其它微量元素, 一般来说, 铜、铁和钙离子是必需的。

三、生长特性

甲烷利用细菌与其它细菌有着很强的共生关系, 确切地说, 是一种细胞外互生关系。因此, 这类细菌纯培养的分离、保藏和培养仍较困难。Whittenbury 等^[4]和 Wilkinson 等^[12]证实, 许多这类菌的生长会受 0.01%, 甚至 0.005 克/升的外源甲醇抑制; Малащенко 等^[11]报道, 0.01—0.1% 的氨基酸、多肽或蛋白质抑制其生长; 我们实验室也发现 0.02% 的葡萄糖对某种菌也有明显的抑制作用。另一方面, Harwood 等发现在培养液中加入 Amberlite CG 120 树脂, 可使菌体浓度提高一倍以上, 生长速度加快约一倍; Naguib^[13]用透析培养技术使菌体浓度达到 30 克/升, 并测定了一种细胞外抑制物质的分子量为 5000 以下。另外, Wilkinson 等^[12]研究过一种稳定的混合培养物, 其中含一种甲烷利用菌和分属生丝微菌、不动杆菌、黄杆菌等属的三种共生细菌。他们发现缺少三种共生菌中任一种, 甲烷利用菌都要受到影响, 还发现生丝微菌可以解除外源甲醇的抑制作用。Lamb 曾发现共生细菌为甲烷利用菌提供维生素 B₁₂ 而保证它的生长。

现已报道的一般甲烷利用细菌都是严格好氧的, 尤其是用铵盐作氮源时无氧不能生长。甲烷利用菌的生长速度, 主要受甲烷和氧的供给量影响。这两种基质应有适当比例, 否则会引起代谢异常。溶解氧浓度超过 30 ppm 还会有毒害作用。关于甲烷利用菌的生长动力学, 已经做过不少工作。它的生长速度因菌种不同而有很大差异。一般 I 型菌的一代时间为 3.5—4 小时; II 型菌为 5 小时左右。与共生菌混合培养, 一代时间可以缩短。Sheehan 等^[14]测定混合培养物的最大比生长速率为 0.303/小时, 即一代时间为 2.29 小时, 这是迄今最好的记录。

甲烷转化的生物化学

一、甲烷的生物氧化

甲烷利用细菌氧化甲烷的反应顺序如图 1 所示^[15]。

Tonge 等^[16]首先从毛孢子甲基寡形杆菌中提纯了甲烷单加氧酶复合物。据报道, 这个酶系统不利用

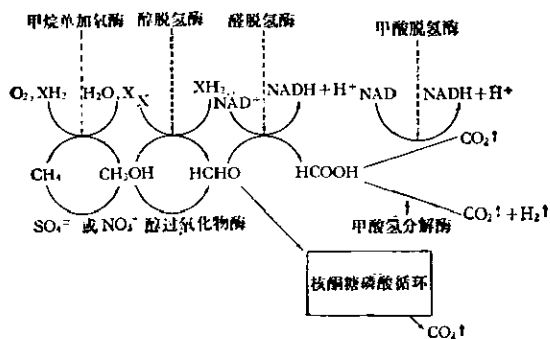


图1 甲烷生物氧化过程

NADH 或 NAD(P)H 而利用抗坏血酸作电子给体。Stirling 等^[11]却从同一菌株中得到用 NAD(P)H 作电子给体的单加氧酶,而且抗坏血酸不能代替 NAD(P)H。另据 Colby 等^[12]报道,荚膜甲基球菌的甲烷单加氧酶是需要 NADH 的。

甲醇的脱氢过程,现在多认为没有 NAD 和 H_2O_2 参与。有人认为某种噻啉衍生物参与此过程。该脱氢酶对 NH_4^+ 有特殊的要求。甲醛脱氢酶和甲酸脱氢酶的催化过程可有 NAD 参与。甲醛也可直接通过磷酸核酮糖循环氧化成 CO_2 ^[13]。

甲烷的生物氧化是甲烷利用细菌赖以生存的基础。氧化产物将被用来作生物合成的原料。甲烷氧化为二氧化碳的自由能变化是 -186.33 大卡/克分子,从理论上说可形成 6—12 个分子的 ATP,作为生命活动的能源。

二、由单碳化合物合成细胞物质

这一过程目前尚未完全阐明,但 Quayle 等提出的两种途径,已成为进一步研究的基础^[14]。

(一) 单磷酸核酮糖循环途径

用核酮糖-5-磷酸作为甲醛的受体,经过一系列反应而合成细胞物质,详细过程如图 2 所示。

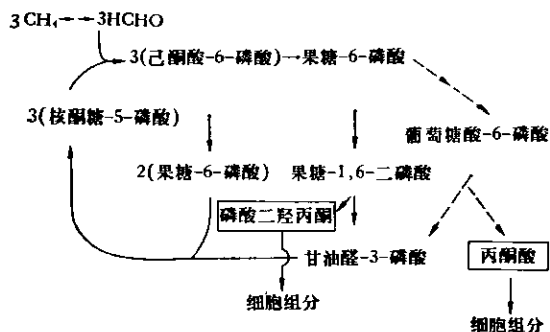


图2 单磷酸核酮糖循环途径

(二) 丝氨酸途径

用甘氨酸作为甲醛的受体,经过一系列反应变成

草酰乙酸而参与细胞组分的生物合成(见图 3)。反应途径中甘氨酸的来源有两种说法,一种说由 $N^5,^{10}$ -甲撑四氢叶酸与二氧化碳反应直接合成;一种说通过丝氨酸-异柠檬酸路线反复利用。详见图 4、5。

一般说来, I 型菌通过单磷酸核酮糖途径同化单碳化合物; II 型菌通过丝氨酸途径。但有某些 I 型菌,

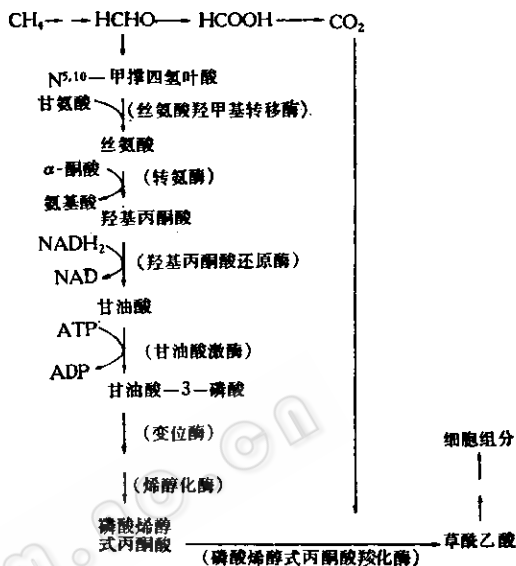


图3 丝氨酸途径

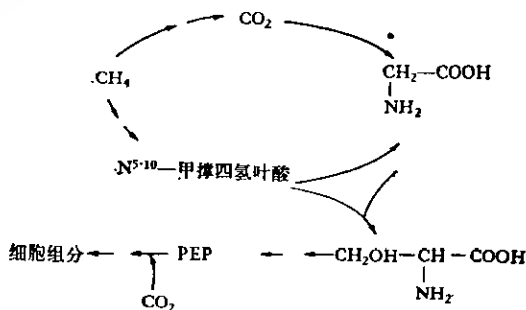


图4 甘氨酸的直接合成

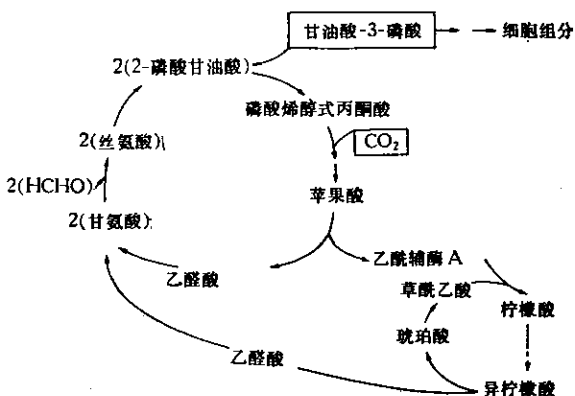


图5 丝氨酸-异柠檬酸途径

如美膜甲基球菌,在较高温度下培养时,可以具有两种途径。

多数甲烷利用细菌体内没有完整的三羧酸循环途径。

甲烷利用细菌的开发和利用

我们可以期望借助甲烷利用细菌,以天然气作原料生产各种发酵产品。目前研究得最多的是生产单细胞蛋白。还有关于由天然气发酵制取多糖、维生素、丙酮丁醇、细胞色素和甲醇等的报道。

以天然气作原料发酵生产单细胞蛋白的研究,由于提供了蛋白质食物新的来源,而且在工艺上后处理简便,受到人们的重视。欧美等国在六十年代初开始这项研究,现已有年产千吨或日产十吨的专利报告,据称其成本可与鱼粉竞争^[19-21]。

以天然气为原料生产的单细胞蛋白,含蛋白质50—70%。其中必需氨基酸齐全,某些维生素含量也较高。在安全性方面,因是气态碳源,较少使人担心。经化学分析及动物试验,表明是较为理想的饲料^[21]。

甲烷利用细菌的研究,在理论生物学方面是一个不容忽视的领域;它促进了关于自营养方式的概念的变迁^[21],使单碳化合物的生物合成和利用研究成为一个独立的学科分支,使对原核生物中的单位膜结构有了新的认识。它的研究与生物固氮、好氧与厌氧生理过程的研究联系在一起了。要对它进行深入研究,势必要把该类细菌能量代谢机理的研究与它所特有的内生物膜器的结构与功能研究、发生学的研究有机地结合起来。这样,人们将会从这种貌似极端特殊的生物中,发现若干类截然不同的生命现象之间的过渡类型,从而促使人们加深对若干普遍性生命过程的本质理解。

在应用方面,甲烷利用细菌的开发和利用,可以使甲烷-生物-甲烷这个物质循环链更好地造福于人类。除了生产各种发酵产品外,在排除煤矿瓦斯、污水处理、生物固氮、乃至制作生物电池方面均有很大的潜力。而化学工作者,还企望模拟甲烷生物转化过程,使烃化工过程在一般的工艺条件下实现烃的定向转化。

诚然,为了更好地开发利用这类微生物,还有许多问题需要解决。即以生产单细胞蛋白而言,阐明甲烷利用细菌与伴生菌共生机理,从而提供最佳菌种,就是十分重要的课题。

参 考 文 献

- [1] Малащенко, Ю. Р., В. А. Романовская, И. В. Н. Богаченко и др.: *Микробиология*, 42(3):403—408, 1973.
- [2] 石油发酵研究会: 石油发酵, 辛善房, 天津工业微生物研究所资料组译: 石油发酵, 科学出版社, 北京, 1973, 第38页。

- [3] Dworkin, M. & J. W. Foster: *J. Bacteriol.*, 72: 646—659, 1956.
- [4] Whittenbury, R., K. C. Phillips and J. F. Wilkinson: *J. Gen. Microbiol.*, 61: 205—218, 1970.
- [5] Whittenbury, R., H. Dalton, M. Eccleston et al.: The Different Type of Methane-Oxidizing Bacteria and Some of Their More Unusual Properties. *Microbial Growth on C₁-Compounds: Proceedings of the International Symposium on Microbial Growth on C₁-Compounds* (ed. by Terium, G.) Society of Fermentation Technology, Japan, Tokyo, 1975, pp. 1—9.
- [6] Малащенко, Ю. Р., В. А. Романовская и Ю. А. Троценко: *Метаноокисляющие Микроорганизмы*, издательство «наука», Москва, 1978.
- [7] Романовская, В. А., Ю. А. Малащенко и В. Н. Богаченко: *Микробиология*, 47:120—130, 1978.
- [8] Max-Planck-Ges. Zur Förderung der Wissenschaften E. V.: French Pat., 2,107,688, 1971.
- [9] Panganiban, A. T., T. E. Patt and W. Hart: *Appl. Environ. Microbiol.*, 37(2): 303—309, 1979.
- [10] Davies, S. L. and R. Whittenbury: *J. Gen. Microbiol.*, 61: 227—232, 1970.
- [11] Patt, T. E., G. C. Cole and R. S. Hanson: *J. Bacteriol.*, 120(2): 955—964, 1974.
- [12] Wilkinson, T. G., H. H. Topiwala and G. Hamer: *Biotech. Bioeng.*, 16(1): 41—59, 1974.
- [13] Naguib, M.: Overall Metabolic Regulations in Cultures of the Obligate Methane-Oxidizing Strain M102, *Microbial Growth on C₁-Compounds: Proceedings of the International Symposium on Microbial Growth on C₁-Compounds* (ed. by Terium, G.) Society of Fermentation Technology, Japan, Tokyo, 1975, pp. 203—212.
- [14] Sheehan, B. T. and M. J. Johnson: *Appl. Microbiol.*, 21(3): 511—515, 1971.
- [15] Anthony, C.: *Sci. Prog. Oxf.*, 62: 167—206, 1975.
- [16] Tonge, G. M., D. E. F. Harrison and I. J. Higgins: *Biochem. J.*, 161(2):333—344, 1977.
- [17] Stirling, D. I. and H. Dalton: *Eur. J. Biochem.*, 96(1): 205—212, 1979.
- [18] Colby, J., D. I. Stirling and H. Dalton: *Biochem. J.*, 165(2): 395—402, 1977.
- [19] British Petroleum Co. Ltd.: Brit. Pat., 1, 463, 295, 1976.
- [20] Murray Moo-Young: *Process Biochem.*, 11(10): 32—34, 1976.
- [21] Hamer, G., D. E. F. Harrison, J. H. Harwood et al.: SCP Production From Methane, *Single-Cell Protein 2* (Conf.) Massachusetts Inst. Technol., 1975, pp. 357—369.
- [22] Whittenbury, R. and D. P. Kelly: Autotrophy: A Conceptual Phoenix, *Microbial Energetics, The Society for General Microbiology Symposium 27*, (ed. by Haddock, B. A. et al.), Cambridge University Press, London 1977, pp. 121—149.