

利用甲醇的弗氏柠檬酸细菌的分离鉴定

胡永松 毛富根 阮法华 余锦勤 王忠彦

(四川大学生物系,成都)

摘要 分离到一株新的甲醇利用细菌,初步鉴定为弗氏柠檬酸细菌 (*Citrobacter freundii*) 4-1-1。该菌能以甲醇作为唯一碳源和能源,在甲醇无机合成培养基上,28—42℃ 条件下均能生长,以 32℃ 为最适温度; pH 5.4—8.0 下可生长,最适 pH 为 6.4—7.0;对甲醇最高耐受量为 5.5% (V/V)。在适宜条件下,该菌比生长速率常数为 0.691/h,甲醇转化率为 36%。

关键词 弗氏柠檬酸细菌;利用甲醇;甲基营养细菌

由于分离、培养技术上的种种原因,多年来,对甲基营养细菌的研究进展十分缓慢。1966 年之后,由于对甲烷利用细菌的富集、分离和培养方法的突破,才得到了一些甲烷利用细菌的纯培养物,并发现这些细菌还能以甲醇、甲胺等甲基化合物作为碳源生长。

本文报道从四川省永川县永安场某天然气井附近土壤中分离到的一株新的甲醇利用细菌,经研究,初步鉴定为柠檬细菌属弗氏柠檬酸细菌 (*Citrobacter freundii* 4-1-1)。

材料和方法

(一) 菌种的来源

从四川省永川县永安场某天然气井附近土壤中,经甲醇无机盐合成培养基富集、分离和培养所得,菌株编号为 4-1-1。

(二) 培养基的制备

甲醇无机盐合成培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KH_2PO_4 2g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 加蒸馏水至 1000ml, pH 6.8—7.0, 经 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 高压蒸汽灭菌 20 分钟。用前加甲醇 20ml。

条件试验培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4g, KH_2PO_4 2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g。加蒸馏水至 1000ml, pH

6.8—7.0, 经 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 高压蒸汽灭菌 20 分钟。根据试验需要加入甲醇或其他不同的碳源和微量元素。当其作氮素营养试验时,则不加磷酸氢二铵改为其他氮源。

牛肉膏培养基: 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 琼脂 20g, 加蒸馏水至 1000ml, pH 7.4。经 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 高压蒸汽灭菌 30 分钟备用。

(三) 菌株鉴定方法

按文献[3,4,5]等介绍的方法进行。

(四) 生长测定

按常规的比浊法测定细菌悬液的浓度、细胞干重法和平板活菌计数法进行。

结果与讨论

(一) 菌株的鉴定

本实验所分离的 4-1-1 菌株为革兰氏阴性杆菌,两端钝圆,细胞大小为 $0.3\text{—}0.4\mu\text{m} \times 1.3\text{—}1.6\mu\text{m}$, 不形成芽孢和荚膜。以周身鞭毛运动,在牛肉膏培养基上行兼性厌氧呼吸,发酵葡萄糖产酸产气,不产生水溶性色素,氧化酶阴性,苯丙氨酸脱氨酶阴性,利用柠檬酸钠, M. R 反应阳性, KCN 不抑制生长,发酵阿拉伯糖及

本研究系省科委资助的重点项目中的部分工作结果;本文由胡永松、王忠彦整理执笔,参加工作的还有本系微生物专业其他同志。

山梨醇,不发酵肌醇, V. P 反应阴性等性状特征,应列入柠檬酸菌属 (*Citrobacter*)。该属包括弗氏柠檬酸细菌(*C. freundii*)和中型柠檬酸细菌(*C. intermedius*)两个种。由于 4-1-1 菌株还具有产生硫化氢,不产生吲哚,不利用丙二酸盐和 KCN 不抑制生长等特性,故初步鉴定为弗氏柠檬酸细菌 (*C. freundii* 4-1-1)。

4-1-1 菌株,既能以葡萄糖、乙醇等化合物作碳源与能源生长,又能以甲醇作碳源和能源生长,说明此菌是一株典型的兼性甲醇利用细菌。在柠檬酸细菌属中,细菌利用甲醇的生理特性,过去尚未见有其类似的报道。因此认为弗氏柠檬细菌 4-1-1 是一株新的甲醇利用细菌。

(二) 弗氏柠檬细菌 4-1-1 的生长条件

1. 对氧的要求: 在以焦性没食子酸吸收氧气的条件下,该菌在牛肉膏琼脂培养基上能正常生长,表现为好气和兼性厌氧;但在甲醇无机盐合成培养基上则不能生长,表现为对甲醇氧化作用的专性好氧特性。在 250ml 的三角瓶中培养,其培养基不同装量对菌体干重的显著影响,也进一步说明其好氧特性。

表 1 不同装量的培养基对生长的影响

装量 (ml)	100 ml 培养基 菌体干重 (g)	甲醇转化率(%)
10	0.276	36.0
20	0.272	35.4
30	0.230	30.0
40	0.234	30.4

2. 温度的影响: 其结果为表 2 所示。

表 2 温度对生长的影响

培养温度 (℃)	OD _{610nm} ×10	培养温度 (℃)	OD _{610nm} ×10
28	0.56	37	0.56
32	0.57	42	0.45

3. pH 值对生长的影响: 以 30ml 甲醇无机盐合成培养基分装于 250ml 的三角瓶内,灭菌后以无菌操作调节其 pH 值分别为 4.0、5.0、5.4、6.4、6.7、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0; 甲醇含量为 1—1.5% (V/V), 接种后摇瓶培养, 每 3 小时测定并调整其 pH 至上述规定值。其结

果表明该菌的生长 pH 值范围是 5.4—8.0, 最适 pH 值为 6.4—7.0。

4. 甲醇浓度对生长的影响: 其试验结果表明甲醇浓度在 0.2—0.5% (V/V) 时,该菌生长速率不变,可以认为是其生长的甲醇浓度范围。当其甲醇浓度超过 0.5% 时, 甲醇对生长的抑制效应随甲醇浓度增加而增大,到 3% 时,生长速度急剧下降。甲醇对此菌的完全抑制浓度是 5.5% (V/V)。 甲醇浓度 5.0—7.0% 所表现的微弱生长,可能是在摇瓶培养过程中,由于甲醇挥发损失而浓度下降所致。用 12 l 玻璃发酵罐以条件试验培养基为基础, 甲醇用蠕动泵以每小时加 80—100ml 滴入 10 l 发酵液中,控制 pH 6.8, 溶解氧 40% (饱和度)以上,结果甲醇转化率为 32—36%, 比增殖速度为 0.69/小时。

5. 不同氮源对生长的影响: 试验中的含氮量均按 0.4% 磷酸氢二铵的实际含氮量 0.8484%, 加入到试验培养基内进行比较,其结果如表 3 所示。

表 3 不同氮源对生长的影响

试验氮源	氮源浓度(%)	最终 pH 值	OD _{610nm} ×10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4.0	6.2	0.392
NH ₄ Cl	3.24	5.4	0.422
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.0	5.4	0.425
(NH ₄) ₂ CO	1.8	8.5	0.125
KNO ₃	6.13	7.0	0.203
{(NH ₄) ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ CO	2.2 0.82	7.5	0.29
NH ₄ NO ₃	4.85	5.4	0.358
NaNO ₃	5.15	7.5	0.202

由此可见,铵盐、硝酸盐和尿素均能作为氮源供其生长,但以铵盐最佳,硝酸盐对此菌生长有明显的不良影响,单独使用尿素,则由于 pH 急剧上升至 8.5, 超过 4-1-1 菌株生长所需 pH 值的极限而受到强烈的抑制。

6. 对不同碳源的同化作用: 以条件试验培养基为基础, 以不同碳源化合物取代甲醇为唯一碳源和能源, 其结果是: 4-1-1 菌株能以葡萄糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、果糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、鼠李糖、纤维二糖、菊糖、柠檬酸钠、丙酮酸钠、醋酸钠、乳酸铵、苹果酸钠、反丁烯二酸、

甘油、甘露醇、山梨醇、甲醇、乙醇（以上浓度均为1%）、甲醛（0.001%）、乙醛（0.1%）、乙酰胺（0.1%）作为唯一碳源和能源。但不能同化甲烷、丙醇、丙酮（均为1%）、单甲胺（0.1%）、二甲胺（0.1%）、酚（0.005%）、萘（0.1%）、煤油和液体石蜡（1%）。也不能同化丙二酸钠、赖氨酸、甘氨酸、亮氨酸和淀粉。

从该菌株在牛肉膏琼脂培养基上为兼性厌氧、氧化酶反应阴性，而在甲醇无机盐合成培养基上营专性好氧呼吸，氧化酶反应为阳性的结果，表明4-1-1菌株有两条不同的代谢途径氧化甲醇和其他含碳化合物，它们各自的代谢过程尚待进一步研究。

综上所述，由本试验分离得到的一株新的甲醇利用细菌，弗氏柠檬细菌4-1-1，能以甲醇作为唯一碳源和能源；在甲醇无机盐合成培养

基上28—42℃均能生长，以32℃为最佳；生长所需pH范围为5.4—8.0，最适pH为6.4—7.0；对甲醇的最高耐受量为5.5%（V/V）；在适宜的条件下，生长速率常数为 $0.69 \frac{1}{h}$ ，甲醇转化率为36%，可作为甲醇生产单细胞蛋白的出发菌株，以选育转化率更高的生产菌株。

参 考 文 献

- [1] Whittenbury, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **61**: 205, 1970.
- [2] Whittenbury, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **62**: 219, 1970.
- [3] 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。
- [4] 王大稻: 《细菌分类基础》，科学出版社，北京，1977。
- [5] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th edition The Williams and Wilkins, Company Baltimore, 1974.