

甲烷氧化菌混合菌株的研究*

I. 混合菌株中非甲烷氧化菌的种类与特征

陈子英 曹家鳌 尹光琳 赵玉峰
王雪松 梁家驷 吴家燕 沈安

(中国科学院微生物研究所,北京)

甲烷氧化菌是一群特殊的微生物。它们能够利用化学性质稳定的甲烷作为唯一的碳源与能源生长(个别菌株也能利用甲醇)。近二十年来,全世界许多学者越来越重视这一类微生物的研究^[1,2]。通过研究发现^[3-5],甲烷氧化菌经常与其它一些特定的微生物组成难以分开的混合菌株。本文主要报道甲烷氧化菌混合菌株中非甲烷氧化菌的种类与特征。

材料与 方法

一、菌株来源

从我国的天然气井、油田、矿山、湖泊、河流等处的土壤、污泥、积水中分离出的甲烷氧化菌混合菌株,实验菌株采用其中的非甲烷氧化菌。

二、培养基

甲烷无机盐培养基 No. 7, 其组成是(克/升): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0, NaCl 0.5, MgSO_4 0.5, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.025, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.004, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.014, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0034, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0004, $\text{NaMnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00024, 酵母膏 0.05。冷开水 1000 毫升, pH6.5—6.8。以天然气或纯甲烷作为碳源, 常用的混合气体组分为: $\text{CH}_4:\text{O}_2=300:300$ (毫米汞柱分压)。

三、培养方法

将已接种的平皿或斜面放在能抽成真空的

干燥器或类似的容器中, 分别通入一定量的甲烷和氧气。具体过程见图 1。

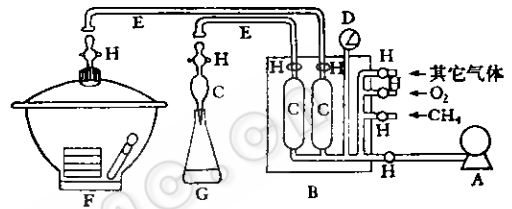


图 1 混合气体配制器示意图

A: 真空抽气泵; B: 配气管; C: 空气过滤管; D: 真空指示表; E: 输气导管; F: 真空干燥器; G: 液体培养瓶; H: 开关。

四、分离方法

将 1 克左右的样品放入装有 10—20 毫升液体培养基的有盖小杯或大试管中, 在充入混合气体的密闭容器中培养 10—15 天, 挑取一片菌膜放入新鲜培养基中静止或振荡培养, 重复 2—3 次后作平皿划线或稀释培养, 得到组成稳定的甲烷氧化菌混合菌株。其他方法见文献^[6]。

结果与 讨论

从 10 株不同的甲烷氧化菌混合菌株中分离出 4 株甲烷氧化菌纯种与 24 株不能利用甲烷的其他细菌, 见表 1。

* 中国科学院成都生物研究所杨文博同志(现在天津南开大学生物系工作)参加部分工作。

表 1 甲烷氧化菌混合菌株的组成

编号	样 品		培养温度 (°C)	分 离 菌 株				
	种类	采集地点		混合菌株	甲烷 氧化菌	非甲烷氧化菌		
						1	2	3
1	淤泥	安徽蚌埠淮河口	30	A43	m16		m63	C43-1, C43-2, C43-3
2	油污土	江苏泰县石油井	30	S63			m146	C20-1, C20-2, C20-3
3	坑道水	安徽淮南煤矿	30	A26				C27-1, C27-2, C27-3
4	污泥	北京污水站	30	P41			m165	C70-1, C70-2, C70-3
5	土壤	湖南南县气苗处	30	T96				C96-1, C96-2, C96-3
6	污泥	北京西郊排水沟	42	T52	T52A	T52-C		T52B
7	煤屑	山西阳泉煤矿	30	阳 2	m79-2			m-79-2B
8	淤泥	北京紫竹院积水池	42	T4	T60			
9	岩芯	四川汽井岩芯	42	T76				
10	土壤	四川天然气井	42	T59		T59-C		T76A, T76B

表 1 表明在这些混合菌株中,除了甲烷氧化菌之外,还有一些不同种类的其他细菌,这些不能氧化甲烷的细菌可以分为 3 类。

第一类细菌的特点是不能利用肉汁蛋白胨等有机物质生长,而利用甲醇、甲酸盐等物质。如生丝微菌(*Hyphomicrobium* sp. T52c, T59c),它们的细胞个体细小(0.3—0.5 微米),呈椭圆形,形态十分特别,在旺盛生长期有一条比细胞长数倍甚至数十倍的细丝状附着物,见图 2。

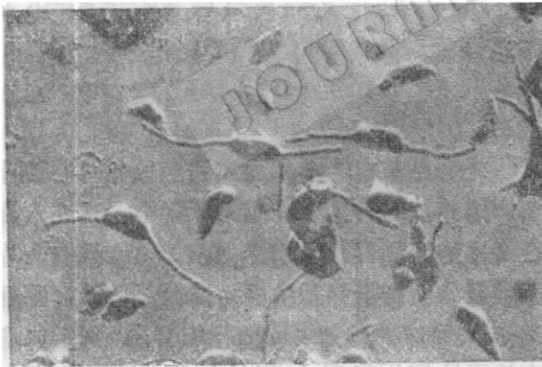


图 2 生丝微菌 T52C 细胞的电子显微镜照片, 4000×

经染色(苯胺结晶紫)后看出,生长后期脱落而成为卵形细胞,有时一半不着色一半着色。当甲烷氧化菌生长后期形成大量粘液时,生丝微菌被裹在粘液中与甲烷氧化菌的细胞碎片混杂而难于辨别。它们虽然数量不多,个体细小,但有很重要的作用,能够清除对甲烷氧化菌有害的代谢产物甲醇,因为该菌能利用甲醇而不利用肉汁胨。因此甲烷氧化菌能否在肉汁胨培

养基上生长,作为是否是纯种的指标是不可靠的。

当用含甲烷 91.38%、乙烷 4.97%、丙烷 1.80%、丁烷 0.8% 的天然气作碳源培养甲烷氧化菌时,经常出现另一类非甲烷氧化菌(2 类)。它们数量不多,个体较大,有的有明显的分枝,抗酸染色阳性,如 m63 菌株,可能属于分枝杆菌中能利用烃类的某些种,它们能利用天然气中的乙、丙、丁烷,而当用纯甲烷作碳源时,可将它们淘汰掉。这是一类与甲烷氧化菌无关而与其他烷烃有关的菌,当用天然气作碳源生产单细胞蛋白时,接种这一类细菌是有益的,因为它可使天然气中甲烷氧化菌不能利用的乙、丙、丁烷等气体转化成蛋白质而提高天然气的利用率。

在甲烷氧化菌中比较复杂的是第三类非甲烷氧化菌。它们不利用甲烷,也不利用其他烷烃。它们可以与甲烷氧化菌在甲烷无机盐培养基上形成菌落,也可以在肉汁胨培养基上单独生长。在液体培养时,初期这种非氧化菌的数量极少,当甲烷氧化菌停止生长而细胞开始溶解时,该菌数量急剧增加。我们选择了其中的 16 株按 Bergey 氏手册进行了常规鉴定。

结果表明,它们是粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*; S-63)、娇养无色杆菌(*Achromobacter delicanulus*; S-63)、臭味假单胞菌(*Pseudomonas putida*; A-26)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*; T-96)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas*

acruiginasa; P-41)、不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.; A-26) 等。其中的一些种如粪产碱杆菌与甲烷氧化菌共生时形成大量的粘性物质, 给制取单细胞蛋白的后处理增加了困难。

在第三类细菌中有些菌有毒, 我们与四川省防疫站协作对甲烷氧化菌纯种 T52 (T52A) 与混合菌株 T76 及其中的非甲烷氧化菌 T76A 与 T76B, 用小白鼠进行了毒性试验, 结果见

表 2。

从表 2 看出, 纯甲烷氧化菌 T52 不产生致死毒性, 混合菌株 T76 与 T42 都能产生致死毒素, 而其它非甲烷氧化菌株的毒性各异, T76A 没有致死毒性, T76B 却使 9 只小白鼠死亡, 占供试小白鼠总数的 90%, 因此, 在采用混合菌株制取单细胞蛋白时, 必须选择无毒的菌株。

表 2 甲烷氧化菌的生物毒性试验*

供试菌株	活细胞数** (亿/毫升)	注射剂量 (毫升)	小白鼠死亡数量与致死时间				共计死亡(只)
			一天内	二天内	四天内	七天内	
甲烷氧化菌纯种 T52	3720	0.5					0
		0.1					
混合菌株 T76	228	0.5	1	3			4
		0.1					
伴生菌 T76A	2740	0.5					0
		0.1					
伴生菌 T76B	2320	0.5	4				9
		0.1	2	3			
混合菌株 T42	200	0.5			1	1	3
		0.1			1		
对照	0	0.5					0
		0.1					

* 方法: 小白鼠体重 18—20 克, 雌雄搭配, 随机分组, 每组 5 只, 一次注入腹腔, 观察两周。

** 活细胞数小 10 倍的另一组均无死亡, 未列入表。

参 考 文 献

[1] Whittenbury, R., Eccleston, M. and Reed, H. L.: Proc. Int. Symp. Microbial Growth on C₁-compounds, Soc. Ferment. Technol., 1—9, 1975.
[2] Малащенко Ю. Р. Романовская В. А. Троценко

Ю. А.: Метанооксиляющие микроорганизмы. Изд. "Наука", Москва, 1978.
[3] Wilkinson, T. G. and Johnson, M. J.: Biotech. Bioeng., 16: 41, 1974.
[4] Vary, P. S. and Johnson, M. J.: Appl. Microbiol., 15(2): 1473, 1967.
[5] 王大耜: 细菌分类基础, 北京, 科学出版社, 1977年。

《立克次氏体病与衣原体病专辑》和《钩端螺旋体病专辑》征订启事

由《流行病学杂志》编辑部和中国微生物学会人兽共患疾病病原学专业委员会共同编辑的《立克次氏体病与衣原体病专辑》和《钩端螺旋体病专辑》将于今年 5 月出版。前书辑有国内外研究进展的综述及中国微生物学会 1979 年学术年会立克次氏体专题讨论会的论文等; 后书主要内容是 1980 年全国钩端螺旋体学术会议的论文及澳大利亚 Faine 教授在会上作的学术报告。

两书各收工本费 1 元。欲购者请汇款至北京昌平医学科学院流行病学研究所情报室 (银行汇款寄北京昌平沙河镇人民银行办事处, 账号 93001), 并请写明书名及数量。印数有限, 欲订从速。