

# 甲醇细菌的研究

## 1. 强同化甲醇细菌的分离与筛选\*

林伯荃 汪锦帮 党平 侯庆

(北京市营养源研究所)

甲醇细菌是能以甲醇作为唯一碳源与能源的细菌,自本世纪六十年代以来,随着世界性蛋白质资源的缺乏,世界上有不少人致力于用甲醇细菌生产单细胞蛋白并获得了高产菌株<sup>[1-3]</sup>。我们从1979年开始研究甲醇细菌,现报道如下。

### 材料与 方法

1. 样品来源:自河北、山东省、海南岛、内蒙、江苏和北京的4193个土样中。样品装在消毒过的小塑料袋中。来不及投样时暂存于4℃冰箱中保存,但不超过3天。

2. 培养基: (1) 甲醇1号培养基(g):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 4.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.3,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 酵母浸出汁0.1。甲醇1ml(99.5%含量),蒸馏水1000ml, pH7(固体培养基加琼脂20g/l)。

(2) 甲醇2号培养基:同1号培养基,只是去掉酵母浸出液,加上维生素混合液(每升含盐酸硫胺素400mg,维生素 $\text{B}_{12}$ 100mg,盐酸吡哆醇400mg,烟酰胺400mg,生物素10mg,泛酸钙400mg,对氨基苯甲酸100mg)1ml。

(3) 牛肉汁培养基(g):牛肉膏5,蛋白胨

---

\* 承中国科学院微生物研究所供给甲烷气,陈子英同志指导;本室发酵组和本所分析室供给有关数据,一并致谢。

10,NaCl5,琼脂 20,蒸馏水 1000ml, pH7—7.2。

3. 富集分离与纯化: 样品 0.5—1g 投入装有 50 ml 甲醇 1 号培养液的 500 ml 三角瓶内, 每瓶投样 5—10 个, 于往复式摇床上(每分钟振荡 120 次)富集培养 1 周后, 在相同培养液上转接 3 次(每次培养 1 周)。然后在甲醇 1 号固体培养基平板上稀释划线纯化。将在平板上于 48 小时内明显地生长出的单菌落再纯化二次后转到甲醇 1 号斜面及牛肉汁斜面上, 置于 4℃ 冰箱内保存。

4. 同化甲醇能力的比较: 将分得的甲醇细菌菌株接种于甲醇 1 号斜面上, 转接 3 次后, 凡在 48 小时内明显地生长的为甲醇细菌。将甲醇细菌接种于甲醇 1 号培养液中振荡培养 20 小时作为种子液。以 0.5% 的接种量接种于相同的培养液中振荡培养 24 小时, 测光密度。以在 610nm 下光密度乘上稀释倍数在 2.0 以上的为强同化甲醇细菌, 1.25 以上的为较强同化甲醇细菌, 0.5 以上的为同化甲醇细菌, 0.5 以下的为弱同化甲醇的细菌, 用转速为 11000 转/分的离心机离心收集, 用无菌蒸馏水洗涤后, 在 105℃ 下烘干至恒重后称重, 比较其干物重。最后用 MD250 型 2.6 L 发酵罐培养比较其产量。

5. 甲醇细菌的鉴定: 按 Bergey 氏细菌鉴定手册第七版<sup>[4]</sup>和第八版<sup>[5][6]</sup>中所列的特性及方法测定。碳素同化试验用甲醇 2 号培养基去

掉甲醇分别加上不同碳源进行测定。其中甲醇, 乙醇, 乙酸钠, 葡萄糖, 果糖, 蛋白胨浓度为 1%, 苹果酸钠浓度为 0.5%, 甲酸钠浓度为 0.01%, 甲醛浓度为 0.02%。烷基胺的测定是用甲醇 1 号培养基去掉甲醇及硫铵加 2.5% 的三甲胺。方法是先将 5% 的三甲胺水溶液用 1NHCl 调至中性, 过滤灭菌后再加入培养基中。测定时采用了固体斜面和液体培养两种方法。接种后培养 1 周以确定其生长。甲烷气体含 CH<sub>4</sub>50%, 在特制的密闭干燥器中培养 1 周, 观察其生长。

上述试验全部在 37℃ 下进行, 重复 3 次。

试验结果

1. 分离, 纯化及同化甲醇能力的比较: 4193 个样品经富集培养, 分离与纯化后共得到甲醇细菌 110 株。进行了同化甲醇能力的比较结果如下

表 1 甲醇细菌同化甲醇能力的比较

| 同化程度 | 610nm 光密度×稀释倍数 | 株数 | 占%    |
|------|----------------|----|-------|
| 强同化  | >2             | 30 | 27.27 |
| 较强同化 | 1.25—2         | 27 | 24.54 |
| 同化   | 0.5—1.25       | 33 | 30.00 |
| 弱同化  | <0.5           | 20 | 18.19 |

将强同化甲醇的 30 个菌株作了精选, 在 500 ml 三角瓶中及 2.6 L 发酵罐中表现同化能力最强的 6 个菌株测定结果如下

表 2 强同化甲醇细菌同化甲醇能力比较\*

| 菌号      | 来源   | 在 500 ml 三角瓶中       |              | 在 2.6L 罐中 |              |
|---------|------|---------------------|--------------|-----------|--------------|
|         |      | 610nm 光密度<br>× 稀释倍数 | 得率 g 干重/g 甲醇 | 比增殖速度     | 得率 g 干重/g 甲醇 |
| BB810   | 青 岛  | 2.255               | 0.311        | 0.570     | 0.367        |
| BB231   | 海南岛  | 2.385               | 0.311        | 0.573     | 0.337        |
| BB240   | 海南岛  | 2.170               | 0.204        | 0.563     | 0.311        |
| BB517-1 | 青 岛  | 2.720               | 0.279        | 0.42      | 0.257        |
| BB570   | 胜利油田 | 2.375               | 0.296        | 0.57      | 0.331        |
| BB574   | 石家庄  | 2.125               | 0.108        | 0.47      | 0.25         |

\* 上表得率计算中未除去蒸发的甲醇

从表 2 中可以看到强同化甲醇细菌的光密度与得率有时不一致，可能因其色泽及含水量不同之故。所以，当以高产单细胞蛋白为选择目标时，在筛选时除比较其光密度外还应测干物重以比较其得率，最后并应在小型发酵罐中比较得率。

2. 分属鉴定：首先按其碳源同化的不同特性分成专性甲醇细菌和兼性甲醇细菌两大类：

(1) 专性甲醇细菌：其特点是能在甲醇固体及液体培养基上良好生长，但在以牛肉汁，蛋白胨，葡萄糖，果糖，蔗糖等为碳源时，无论在固体及液体培养基上均不能生长。在甲醇加牛肉汁固体及液体上生长微弱。这类细菌共分离到 5 个菌株。都是革兰氏阴性无芽孢杆菌。极生单鞭毛。在甲醇斜面上无色或红色。根据以上特性鉴定属于嗜甲基单胞杆菌属 *Methylomonas*。这一属包括有同化甲醇能力强的菌株。

(2) 兼性甲醇细菌：其特点是不但在甲醇无机盐上可以良好生长，也可以良好地生长于牛肉汁，蛋白胨，葡萄糖，果糖，蔗糖等为碳源的

固体及液体培养基上，根据其形态及生理特性大致可分为三个属。① 生丝微菌属 *Hyphomicrobium*：革兰氏阴性，菌体杆状或卵圆形，其最大特点是菌体长到一定阶段产生细丝状突起，突起之端部形成子细胞，突起有时很长可达菌体之数倍，但有时也较短。子细胞小球形，这类细菌只分离到 2 个菌株。它们在甲醇斜面上均为土黄色，在牛肉汁斜面上为深奶油色到土黄色。同化甲醇能力一般。② 假单胞杆菌属 *Pseudomonas*：革兰氏阴性，无芽孢，不分枝，杆状，极毛，不包埋于菌胶团中，不发酵葡萄糖，不氧化乙醇为乙酸，pH4.5 以下不生长，不需要加 12% NaCl 就能良好地生长。能或不能同化烷基胺。在甲醇斜面上乳白色，奶油色到红色。在牛肉汁斜面上有时有萤光及绿或红色可溶性色素。这一属包括多种同化甲醇能力强的菌株和能产生多种氨基酸的菌株。③ 无色细菌属 *Achromobacter*：其特点是革兰氏阴性，周毛，石蕊牛奶呈酸性反应。这一属细菌同化甲醇能力一般。

3. 六株强同化甲醇细菌重要特性的比较：

表 3 各属甲醇细菌重要特性之比较

| 特 性              | 属 名<br>代表菌株 | <i>Hyphomicrobium</i>      | <i>Pseudomonas</i>   | <i>Methylomonas</i> | <i>Achromobacter</i> |
|------------------|-------------|----------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|                  |             | BB194, BB174               | BB810, BB231         | BB570, BB574        | BB517—3              |
| 革兰氏染色            |             | —                          | —                    | —                   | —                    |
| 芽 孢              |             | —                          | —                    | —                   | —                    |
| 鞭 毛              |             | 无                          | 极 生                  | 单极生                 | 周 生                  |
| 荚 膜              |             | 无                          | 有或无                  | 有或无                 | 无                    |
| 细 胞 形 态          |             | 卵状到杆状，上生丝状突起。突起上端形成小球形。多细胞 | 杆 状                  | 杆 状                 | 杆 状                  |
| 在牛肉汁培养基上产生的可溶性色素 |             | 无                          | 有的有、黄绿色或红色，生长后期变为褐色。 | 无                   | 无                    |
| 石蕊牛奶反应           |             | —                          | 酸性或硷性                | 酸 性                 | 酸 性                  |

甲醇细菌对碳源的利用范围是确定其属和种的重要根据之一。我们做了 6 株强同化甲醇细菌利用 20 种碳源的试验，其结果如下：

从表 4 可以看出不同属之间，和同属不同种之间对碳源的利用上有明显地区别。两个 *Methylomonas* BB570 与 BB574 在对碳源利用

表 4 六株强同化甲醇细菌对碳源的利用特性的比较

| 碳 源   | 属 名<br>菌 株 | <i>Pseudomonas</i> |       |        |         | <i>Methylomonas</i> |       |
|-------|------------|--------------------|-------|--------|---------|---------------------|-------|
|       |            | BB 810             | BB240 | BB 231 | BB517-1 | BB570               | BB574 |
| 甲 醇   |            | +                  | +     | +      | +       | +                   | +     |
| 甲 醛   |            | -                  | -     | -      | -       | -                   | -     |
| 甲 胺   |            | +                  | +     | -      | -       | -                   | -     |
| 甲酸钠   |            | +                  | -     | +      | +       | -                   | -     |
| 甲 烷   |            | -                  | -     | -      | -       | -                   | -     |
| 乙 醇   |            | +                  | +     | +      | +       | -                   | -     |
| 乳酸钠   |            | +                  | -     | +      | +       | -                   | -     |
| 草酸钠   |            | +                  | -     | -      | +       | -                   | -     |
| 酒石酸钠  |            | +                  | -     | +      | -       | -                   | -     |
| 丙二酸钠  |            | +                  | -     | +      | -       | -                   | -     |
| 葡萄糖   |            | +                  | +     | +      | +       | -                   | -     |
| 果 糖   |            | +                  | -     | +      | +       | -                   | -     |
| 蔗 糖   |            | +                  | +     | +      | +       | -                   | -     |
| 乳 糖   |            | +                  | -     | +      | +       | -                   | -     |
| 淀 粉   |            | +                  | -     | +      | -       | -                   | -     |
| 明 胶   |            | +                  | -     | +      | +       | -                   | -     |
| 顺丁烯二酸 |            | -                  | -     | +      | -       | -                   | -     |
| 海藻糖   |            | +                  | +     | -      | +       | -                   | -     |
| 甘氨酸   |            | +                  | +     | -      | +       | -                   | -     |
| 不加碳源  |            | +                  | +     | -      | -       | -                   | -     |
| 过氧化氢酶 |            | +                  | +     | +      | +       | -                   | +     |
| 淀粉水解  |            | -                  | -     | -      | -       | +                   | -     |

上虽无区别但在过氧化氢酶和淀粉水解反应上有所不同。

都不能分纯,因而至今尚不能鉴定,其原因尚有待进一步研究。

讨 论

参 考 文 献

Sahm<sup>[7]</sup>总结了已发现的革兰氏阴性兼性甲醇细菌 6 个属,专性甲醇细菌 5 个属,但其中高产菌株仅限于 *Pseudomonas*与*Methylomonas* 2 个属<sup>[8-13]</sup>。这与我们所分得的结果相一致。

我们所采用的集体投样法虽然有可能丢失一些适应期长,不适于与其他菌株混合生长或竞争不过其他细菌的菌株,但能效率较高地分得同化能力强且适应性也强的菌株。

在试验中发现甲醇细菌分离时极易污染,如 BB517 在纯化前由 517-1 红色极毛,517-2 无色极毛和 517-3 无色周毛三种细菌混合组成,混合菌株产量虽高但极不稳定。纯化后产量低于混合菌株但稳定。有的菌株经多次分离

[1] W. Hohnloser: *Eur. J. App. Microbiol.*, 6: 167, 1968.

[2] C. Anthony: *Biochem. J.*, 92. 609, 1972.

[3] Goto: *J. Ferment. Technol.*, 56(5): 516, 1978.

[4] Bergey's manual of determinative bacteriology 7th. ed., London, 1957.

[5] Bergey's manual of determinative bacteriology 8th. ed., Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1974.

[6] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 北京, 第一版, 1978年。

[7] Sahm: *Adv. Bio. Engineering*, 6: 77, 1977.

[8] D. Peel: *Biochem. J.*, 81: 465, 1961.

[9] T. Kameela: *Can. J. Microbiol.*, 5: 87, 1959.

[10] Yoshifumi: *J. Ferment Technol.* 53: 315, 1975.

[11] L. R. Brown: *Can. J. Microbiol.*, 10: 791, 1964.

[12] Bill, J: *App. Envir. Microbiol.*, 33: 269, 1977.

[13] Dradley: *App. Microbiol.*, 27: 1112, 1974.