

兼性甲烷氧化菌的发现历程

赵天涛^{1,2}, 邢志林¹, 张丽杰^{1*}

¹重庆理工大学化学化工学院, 重庆 400050

²重庆大学城市建设与环境工程学院, 重庆 400045

摘要: 兼性甲烷氧化菌在新陈代谢上具有独一无二的特性: 它们能够利用甲烷或一些含碳碳键的有机物作为唯一碳源和能源。甲基细胞菌属 (*Methylocella*)、甲基孢囊菌属 (*Methylocystis*) 和甲基帽菌属 (*Methylocapsa*) 的一些菌株已经被确定为兼性甲烷氧化菌。它们都属于 α -变形菌纲, 能够像利用甲烷一样在大分子有机酸或乙醇里生长。本文全面系统地总结了兼性甲烷氧化菌的研究发展历史, 推断出兼性甲烷氧化菌易在酸性环境富集生长; 介绍了与之有相近功能的兼性甲烷氧化生物; 浅析了其多碳化合物的代谢机理; 最后讨论了兼性甲烷氧化菌研究的现存问题和工程应用前景。

关键词: 兼性甲烷氧化菌, 代谢, 甲烷, 甲基孢囊菌

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)08-0781-09

好氧甲烷氧化菌在自然界分布广泛, 这其中包括湿地、沼泽、农田、森林和城镇土壤、米稻田、地下水、垃圾填埋场覆盖层等^[1]。这些生物利用甲烷为碳源和能源, 在全球碳循环中起着关键作用。据估计, 仅在土壤中好氧甲烷氧化菌每年能消耗掉约 3000 万吨甲烷^[2]。目前, 公认的好氧甲烷氧化菌属于变形菌纲 (*Proteobacteria*) 和疣微菌纲 (*Verrucomicrobia*) 两大类^[3]。绝大多数好氧甲烷氧化菌仅仅依靠甲烷生长, 也有一些可以利用甲醇、甲酸、甲醛和甲胺。起初, 好氧甲烷氧化菌被认为是专一营养的, 即它们可以利用 C1 化合物, 但不能利用含有 C-C 键的化合物^[4], 其专一性的原因现在还没有得到完美的解释^[5]。

相比而言, 兼性甲烷氧化菌能够利用甲烷或一些多碳化合物作为碳源和能源^[6]。虽然兼性甲烷氧化菌在 20 世纪 70 年代就有报道, 但时至今日, 兼

性甲烷氧化菌的存在才被广泛地认可。已发现的兼性甲烷氧化菌包括了变性菌纲的甲基细胞菌属 (*Methylocella*), 甲基孢囊菌属 (*Methylocystis*) 和甲基帽菌属 (*Methylocapsa*)^[7-9]。现在已有不少关于甲烷氧化菌可以利用多碳化合物为生长底物的报道, 因此, 兼性甲烷氧化菌似乎比原来想象中要更普遍。

兼性甲烷氧化菌有着独特的生理学和底物选择特性。*Methylocella* 是首先被确定和公认的兼性甲烷氧化菌^[8]。大多数甲烷氧化菌都拥有颗粒甲烷单加氧酶 (particulate methane monooxygenase, pMMO), 也有少数同时拥有溶解甲烷单加氧酶 (solution methane monooxygenase, sMMO) 和 pMMO。但 *Methylocella* 仅拥有 sMMO, 并且较常见甲烷氧化菌而言缺少广泛的胞内膜体系 (intracytoplasmic membrane, ICM)。而其另一显著特点是能利用多

基金项目: 国家自然科学基金 (51008322); 重庆教委基金 (KJ110812)

* 通信作者。Tel: +86-13883049591; Fax: +86-23-62563221; E-mail: tiantaozhao@gmail.com

作者简介: 赵天涛 (1976-), 男, 河北沧州人, 博士, 副教授, 从事环境微生物方面的研究。E-mail: tiantaozhao@gmail.com

收稿日期: 2013-01-02; 修回日期: 2013-03-31

碳化合物(乙酸、丙酮酸、琥珀酸、苹果酸和乙醇等),有些多碳化合物是优先被兼性甲烷氧化菌利用的^[10]。本文全面总结了兼性甲烷氧化菌的发现历程,结合课题组的研究成果介绍了相关的兼性甲烷氧化生物的研究进展,简析了其利用乙酸盐的代谢机理,最后讨论了其现存问题和工程应用前景。

1 兼性甲烷氧化菌

1.1 坎坷的发展过程

对甲烷氧化菌进行全面介绍最早可追溯到1958年,Leadbetter在论文“Studies on some methane-utilizing bacteria”中,总结了自1906年首次发现甲烷氧化菌以来的研究成果^[11]。文章之所以提及甲烷利用细菌而不是甲烷氧化菌,主要是因为当时研究条件以及研究深度和广度的局限,并不能给出这一类菌的共同特征。但自20世纪50和60年代起,甲烷氧化菌就被定性为专一营养菌,即这些菌株只能利用甲烷或甲醇等C1化合物生长^[12-14]。伯杰细菌手册第八版(1984)中,将甲烷氧化菌归属于了甲基单胞菌科,并定义这一类菌仅利用单碳有机化合物作为碳源,属于革兰氏阴性菌。1996年,Hanson发表了论文“Methanotrophic bacteria”,对甲烷氧化菌的称谓进行了统一,即Methane-oxidation bacteria和Methane-utilizing bacteria统称为methanotrophs,其定义特征就是含有甲烷单加氧酶^[1]。

兼性甲烷氧化菌的研究历程如表1所示。早在1970年,Whittenbury就发现*Methylocystis sporium*、*Methylocystis methanica*和*Methylocystis albus*等甲烷氧化菌能够在苹果酸盐,醋酸盐或者琥珀酸盐存在

的甲烷培养基中加速生长,由此推测了兼性甲烷氧化菌存在的可能性^[15-16]。在随后的十几年内也有兼性甲烷氧化菌的相关报道,但有的在纯化培养后便失去氧化甲烷能力^[15-16];有的无法确定其系统发育分类;有的无法进行重复实验和其它基因工程方面的验证;还有在后续研究中被证实是由两株菌组成的稳定共营养体(syntrophic consortium)^[17-18]。由于缺乏目标菌株氧化甲烷的基因证据和酶学机理,同时又出现了可疑的培养物纯度等问题,导致在随后20年内该领域研究受到严重的限制。直到1998年发现的属于 α -变形菌纲中的*Methylocella palustris*菌株^[8],重新燃起了科学家对该类菌株的研究热情。

随后相继发现的*Methylocella silvestris*和*Methylocella tundrae*^[9,19-20]通过一套严格的化学和生物分析步骤后证实为纯菌,这其中包括:(1)将分别生长在甲烷或乙酸中的上万细胞进行相差分析;(2)将分别以乙酸和甲烷培养菌株的16S rRNA基因的50个克隆质粒进行序列分析和比较;(3)用针对*Methylocella*的特定探针对上万单细胞进行全细胞杂交。所有情况下都没有发现污染。实时PCR分析表明*mmoX*基因(编码sMMO大的羟化酶亚基)增加,与直接显微细胞计数得到的细胞增加比例非常接近。*Methylocella silvestri*在以甲烷为唯一碳源和能源驯化培养的基础上,以乙酸为底物培养并进行全细胞杂交,结果如图1所示。上图为相差对照图;中图是以Mcell-1445为探针*Methylocella silvestris*的全细胞杂交图;下图为以Mcell-1024为探针*Methylocella silvestris*的全细胞杂交图。比较可知,培养物为纯菌株。因此以上研究明确证实了兼性甲烷氧化菌的存在。

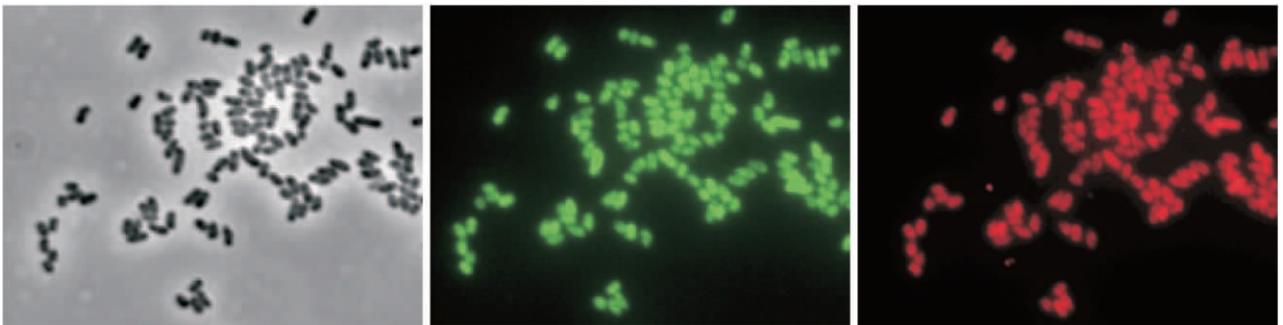


图1. 以乙酸为底物菌株*Methylocella silvestris*的全细胞杂交^[21]

Figure 1. Whole-cell hybridization in a culture of *Methylocella silvestris* grown on acetate as the sole carbon and energy source^[21].

此后不久, *Methylocapsa*^[22] 和 *Methylocystis*^[7] 也被发现并被确认为兼性甲烷氧化菌。新发现的嗜酸甲烷氧化菌 *Methylocapsa aurea* 与 *Methylocapsa silvestris* 相比, *M. aurea* 只能表达 pMMO 并且拥有发育良好的 ICM 体系, *M. aurea* 在甲烷中生长较之在多碳底物中更好 (最大 $OD_{600} = 1.2$, $\mu_{max} = 0.018 \text{ h}^{-1}$)。值得一提的是, *M. aurea* 在无甲烷的乙酸或乙醇中存活, 在利用这些多碳化合物生长的同时, pMMO 可以被表达^[18,22]。2010 年, Belova 发现 *Methylocystis* 属 (*Methylocystaceae* 科) 的其他嗜酸甲烷氧化菌能够利用甲烷和乙酸生长^[7]。具有 sMMO 和 pMMO 的功能基因, 不但能利用甲烷和甲醇还可以利用乙酸生长, 在甲烷和乙酸中生长的最大 OD 分别在 0.8 - 1.0 和 0.25 - 0.30, μ_{max} 分别为 0.06 h^{-1} 和 0.006 h^{-1} 。这些数据说明甲烷是 *Methylocystis* H2s 的优势生长底物。但 *M. H2s* 和其它嗜酸甲烷氧化菌一样, 也无法在其他有机酸或糖中生长。随后, Belova 等筛选得到了一株兼性甲烷氧化菌 *Methylocystis heyeri* H2, 在乙酸盐中也可显著生长^[7]。2012 年 Belova 等再次分离了 *Methylocystis* strain H2s^T 和 S284, 它们能表达 sMMO 和 pMMO, 优先利用甲烷和甲醇, 在乙酸盐中可缓慢生长^[23]。此外, Im 等报道了一株兼性嗜常态的菌株 *Methylocystis* SB2, 该菌株只能表达 pMMO^[20], 能够利用甲烷、乙醇或乙酸作为生长底物。在甲烷中生长最快, 其次是乙醇和乙酸 (最大 OD_{600} 分别是 0.83、0.45 和 0.26)。

对以报道兼性甲烷氧化菌的发源地和生长特性进行总结, 发现 *Methylocella silvestris* (BL2) 的生长 pH 值范围为 4.2 - 7.0 (最适 pH 值为 5.5)^[9], *Methylocella tundrae* 的生长 pH 值范围为 4.2 - 7.5 (最适 pH 值为 5.5 - 6.0)^[19], *Methylocapsa aurea* strain KYGT 生长 pH 值范围为 5.2 - 7.2^[22], *Methylocystis* H2s 是一株温和的嗜酸菌, 最佳生长 pH 值为 6.0 - 6.5, *Methylocystis heyeri* H2 最优 pH 值为 5.8 - 6.2^[22], *Methylocystis* SB2 最佳生长 pH 值是 6.8^[24]。 *Methylocystis* strain H2s^T 和 S284 最适生长 pH 值为 6.0 - 6.5^[23]。可以基本推断出兼性甲

烷氧化菌易在酸性环境富集, 最适 pH 值为 5.5 - 6.5。

1.2 其他甲烷氧化生物的研究进展

在伯杰细菌手册关于甲基单胞菌科的介绍中有另一个重要的信息, “许多细菌是能利用多碳化合物以及单碳化合物, 而不是专依靠甲烷或甲醇作为碳源和能源”。由于经典生物学研究在培养基优化中很少关注以甲烷为碳源, 而且当时甲烷以及温室效应并未受到科学家的重视, 因此能够利用甲烷以及其它碳源的细菌并未受到关注。

目前, 已有一些文献报道了可以氧化甲烷的甲基营养菌, 这其中包括了细菌, 酵母菌和古细菌。Wolf 早在 1979 年就发现了可以利用甲烷的酵母菌。经过单细胞的抗生素筛选确定该其属于嗜甲烷酵母, 并通过观察菌体的超微结构确定了其属于真核生物^[30]。遗憾的是, 相关研究没有继续进展下去。直到 2006 年, Paweł 发现了毛孢子菌属的菌株 *Trichosporon cutaneum* 可以甲烷为唯一碳源和能源生长^[31]。该酵母菌是在波兰当地被石油严重污染的土壤中分离得到的, 它可以利用甲醛以及多种多碳化合物, 其中包括: 葡萄糖、甘油、乙醇、以及苯酚。1999 年, Hinrichs 在 *Nature* 上发表了 “Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments”, 论文中提及一些还未能鉴定但可以确信有甲烷降解能力的古菌^[32]。

本课题组近 5 年以来, 一直致力于生活垃圾填埋场等人为源的甲烷减排, 采用了生物抑制和生物氧化等手段, 有效控制了填埋场前期的甲烷生成和填埋后期的甲烷排放^[33-35]。2009 年, 课题组从填埋了 10 年的矿化垃圾中分离得到一株兼性甲烷氧化菌 *Methylocystis* strain JTA1^[36]。将其 16S rDNA 碱基序列与已报道的其它兼性甲烷氧化菌进行比较, 发现 *Methylocystis* strain JTA1 (GenBank: KC129107) 与 *Methylocystis* strain H2s 和 *Methylocystis* strain SB2 的相似度达到 97.13% 和 97.45%。细枝发菌属的 *Clonothrix fusca* strain AW-b 和泉发菌属的 *Crenothrix polyspora* clone 6 可利用甲烷和葡萄糖, 但目前还没有分离得到纯菌株。

表 1. 兼性甲烷氧化菌的发现历程

Table 1. The discovery process of facultative methanotrophs

菌株	发现者	发现时间	发现地	代谢特性	最终结论
Gram-negative, strictly aerobic methane-utilizing bacteria	Whittenbury, R. Phillips, K.C. Wilkinson JF. [6]	1970 年	-	这些菌株中的 <i>sporium</i> , <i>methanica</i> 和 <i>albus</i> 能够在苹果酸盐, 醋酸盐或者琥珀酸盐存在的甲烷培养基中加速生长。	可能存在兼性甲烷氧化菌
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Patt T. E. 等 [18]	1974 - 1976 年	双季对流混合淡水湖中	该菌株能利用多种有机酸和糖类, 但当多次培养在含有葡萄糖的培养基中时会失去氧化甲烷的能力, 且无法恢复 [15-16]。	最终确认不是兼性甲烷氧化菌
<i>Methylobacterium ethanolicum</i> strain R6	Patel, R. N. Hou, C. T. Felix, A. [25-27]	1978 年	美国东北部炼油厂土壤中	该菌株仅能够在葡萄糖中生长, 但不能在其他如果糖, 半乳糖和蔗糖等糖类中生长。	不能进行重复培养和基因鉴定, 最终无法验证
<i>Methylobacterium ethanolicum</i> <i>Methylobacterium hypolimneticum</i>	Lynch, M. J. Wopat, A. E. O'Connor, M. L. [18,28]	1980 年	淡水湖河床	该菌株不仅能利用甲烷而且也能利用酪蛋白氨基酸, 营养琼脂各种有机酸和糖类作为碳源和能源。	后来被鉴定为是由两种株 <i>Methylocys</i> 和 <i>Xanthobacter</i> 组成的稳定共营养体 [17] 之后未有报道
<i>Methylomonas</i> sp. strain 761M/761H	Zhao, S. J. Hanson, R. S. [26]	1984 年	中国南方水稻田	761M 仅能够在葡萄糖中生长, 变种 761H 不能把葡萄糖作为单一碳源而生长, 但是葡萄糖, 乙酸酯, 和 2-羟基丁二酸能够促进其在甲烷中的生长。	未找到相同菌株, 最终无法验证
<i>Methylocella palustris</i>	Dedysh, S. N. 等 [8]	1998 年	水藓泥炭沼泽	一种嗜酸型甲烷氧化菌, 该菌株的发现为后来对兼性甲烷氧化菌的发现带来了新动力。	α -变形菌纲中的新菌株
<i>Methylocella silvestris</i> BL2 <i>Methylocella tundrae</i>	Dunfield, P. F. 等 [9] Dedysh, S. N. 等 [19]	2003 年 2004 年	德国马尔堡的酸性森林形成层中 酸性苔原泥炭	能够在甲烷和甲醇等一碳化合物的底物中生长, 也能够乙酰酸盐, 丙酮酸盐, 琥珀酸盐等多碳化合物的基质中生长。 能够在甲烷、甲醇等一碳化合物中生长, 也能够乙酰酸盐, 丙酮酸盐, 琥珀酸盐等多碳化合物的基质中生长。	2005 年第一次确认 <i>Methylocella</i> 为兼性甲烷氧化菌 [21,29]
<i>Methylocapsa aurea</i>	Dunfield, P. F 等 [22]	2010 年	2003 年 3 月在德国马尔堡森林季节性小溪下收集的土样	能够在甲烷、甲醇和乙酸盐底物中生长, 只能表达 pMMO。	<i>Methylocapsa</i> 是一种兼性甲烷氧化菌的新属 [18,22]
<i>Methylocystis</i> strain H2s/ <i>heyeri</i> H2	Belova, S. E 等 [7]	2011 年	含有大量水藓的湿地中	含有 sMMO 和 pMMO 基因的耐弱酸菌株, 不仅能够利用甲烷和甲醇生长, 也能在乙酸盐中较好的生长。	<i>Methylocystis</i> 也是一种兼性甲烷氧化菌的新属
<i>Methylocystis</i> , strain SB2	Im, J 等 [24]	2011 年	春季密歇根州东南部的泥沼中	该菌株能够在甲烷、甲醇和乙酸盐中生长, 只能表达 pMMO。	
<i>Methylocystis</i> strain H2s ^T <i>Methylocystis</i> strain S284	Belova, S. E. 等 [23]	2012 年	德国 Teufelssee 一个酸性水藓泥炭沼泽和俄罗斯的酸性沼泽中	拥有 sMMO 和 pMMO 两种酶, 优先在甲烷和甲醇中生长, 缺少 C1 底物时能利用乙酸盐缓慢生长。	

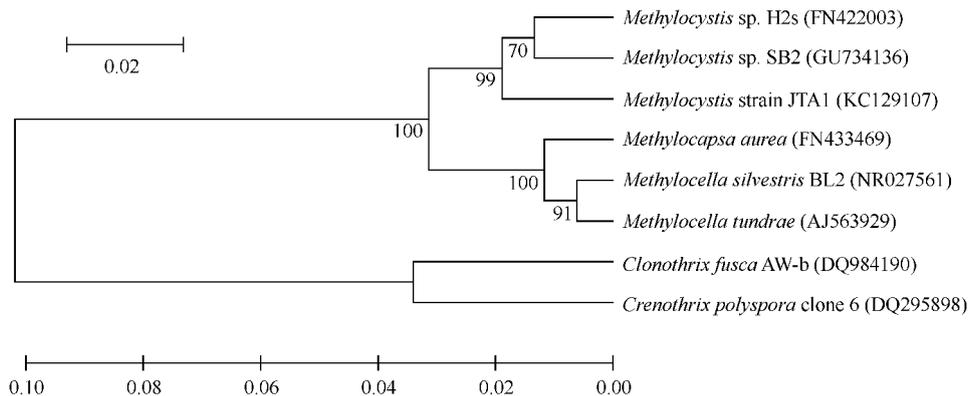


图 2. 基于 *Methylocystis strain JTA1* 16S rDNA 序列的系统进化树

Figure 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of the type strains of facultative methanotrophs. Numbers in parentheses represent the sequence's accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

Methylocystis strain JTA1 生长的最适 pH 值为 6.0 - 6.5。基于均衡生长假设, 以 Monod 方程为基础, 推导了底物消耗模型并用以表征菌株的甲烷亲和和氧化能力。在低密度的菌体培养条件下, 考察了不同甲烷含量的甲烷消耗速率。拟合结果符合 Monod 方程假设, 推演其半饱和常数 $K_{m(\text{app})} = 7.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($R^2 = 0.982$)^[36]。 K_m 越小, 表明菌体和底物的亲和力越高。从以往报道可知, 已报道甲烷氧化菌的 K_m 一般为 60 mmol/L 左右, 这说明菌株 JTA1 对甲烷有较强的亲和力, 可以高效降解甲烷^[37-39]。兼性甲烷氧化菌具有更广泛的底物范围, 可利用较为低廉的碳源实现富集和扩大培养, 因此有助于甲烷生物氧化技术在生活垃圾填埋场等人为源温室气体减排的工程化应用。

2 兼性甲烷氧化菌的代谢特性

2.1 兼性甲烷氧化菌的起源推测

关于兼性甲烷氧化菌的起源主要有两种推测: 一是兼性甲基营养菌 (methylophilic bacteria) 基因突变而得; 二是由专性营养甲烷氧化菌环境驯化而得。 *Methylocella* 菌属最初被认为是兼性甲基营养菌, 该类菌株很可能通过基因水平转移 (Lateral Gene Transfer) 而能够表达 sMMO, 使其后来能够利用甲烷作为生长底物, 并最终发展成可随碳源变化而控制 MMO 表达的能力。照此推断, *Methylocella aurea* 可能也曾经是甲基营养菌, 但是通过基因水平转移演化出表达 pMMO 的能力。然而截止到目前

为止, *M. aurea* 在乙酸中生长时是否表达 pMMO 还未见报道。另一方面, 兼性甲烷氧化菌属 *Methylocystis* 最初可能是专性甲烷氧化菌, 可以构成性表达 pMMO, 但由于外界环境的因素, 在底物竞争压力下发展了利用乙酸的能力, 或者是为了更有效吸收乙酸而增加了相关酶系的表达, 也可能是通过基因水平转移来完成需要的相应路径。尽管这些兼性甲烷氧化菌是从甲基营养菌中起源的说法只是推测, 但已有类似的过程被报道。一株甲基杆菌属的兼性甲基营养菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 在表达氨单加氧酶 (ammonia monooxygenase, AMO) 时, 能够利用甲烷为单一碳源^[40], 并将甲烷氧化为甲醇。想要更深入了解兼性甲烷氧化菌起源, 有必要进行更深入的基因组研究和代谢分析。

2.2 兼性甲烷氧化菌利用乙酸盐的代谢途径简析

尽管现有成果已经可以证实兼性甲烷氧化菌的存在, 但多碳化合物如何被这些菌株吸收利用还不清楚。以往报道认为甲烷氧化菌代谢过程存在以下两个特点: 第一, 甲烷氧化菌由于缺少 α -酮戊二酸脱氢酶而导致柠檬酸循环不完整, 并最终导致其无法利用多碳化合物; 第二, 甲烷氧化菌缺少运输碳-碳键的载体。这两个原因被认为是甲烷氧化菌只能利用一碳化合物的主要原因^[5]。考察现有的兼性甲烷氧化菌, 均属于 α -变形菌纲, 而该菌纲所属细菌拥有完整的三羧酸循环, 因此上面提及的一个原因已经被消除。到目前为止, 已经报道的兼性甲烷氧化菌可以利用二碳到四碳有机酸或者乙醇作为单一生长底物。由于这些化合物可以进行膜渗透

而无需载体进入细胞内部,因此关于甲烷氧化菌第二个代谢限制也消除了。以上讨论确保了兼性甲烷氧化菌利用多碳碳源的可能性。而基于现有兼性甲烷氧化菌都可利用乙酸的共性,主要讨论以乙酸为单一生长底物的可能代谢途径。

微生物吸收乙酸和乙酸盐主要是借助一种特定的通透酶或是通过被动运输的方式扩散至细胞内部。大部分兼性甲烷氧化菌从高乙酸浓度的酸性环境中分离得到,这个事实说明乙酸是通过被动运输进入细胞内的。乙酸如果要被进一步吸收利用,则必须先活化成乙酰辅酶 A (acetyl-CoA), 然后才能进

入生物代谢循环中。当乙酸盐的环境浓度达到 30 mmol/L 以上或者细胞内有主动运输系统时,乙酸盐可以通过一种激酶和一种磷酸转乙酰酶活化成乙酰辅酶 A (图 3), 该途径被称为低亲和路径。在缺少以上酶或者低浓度乙酸盐的情况下,乙酸盐可以通过乙酰辅酶 A 合成酶活化(需要 AMP 或者 ADP 参与),该途径被称为高亲和路径^[41]。一旦被活化,乙酰辅酶 A 就可以通过各种途径被吸收,常见途径包括乙醛酸循环,乙基丙二酰-CoA 途径,甲基天冬氨酸循环,或者柠檬酸循环。

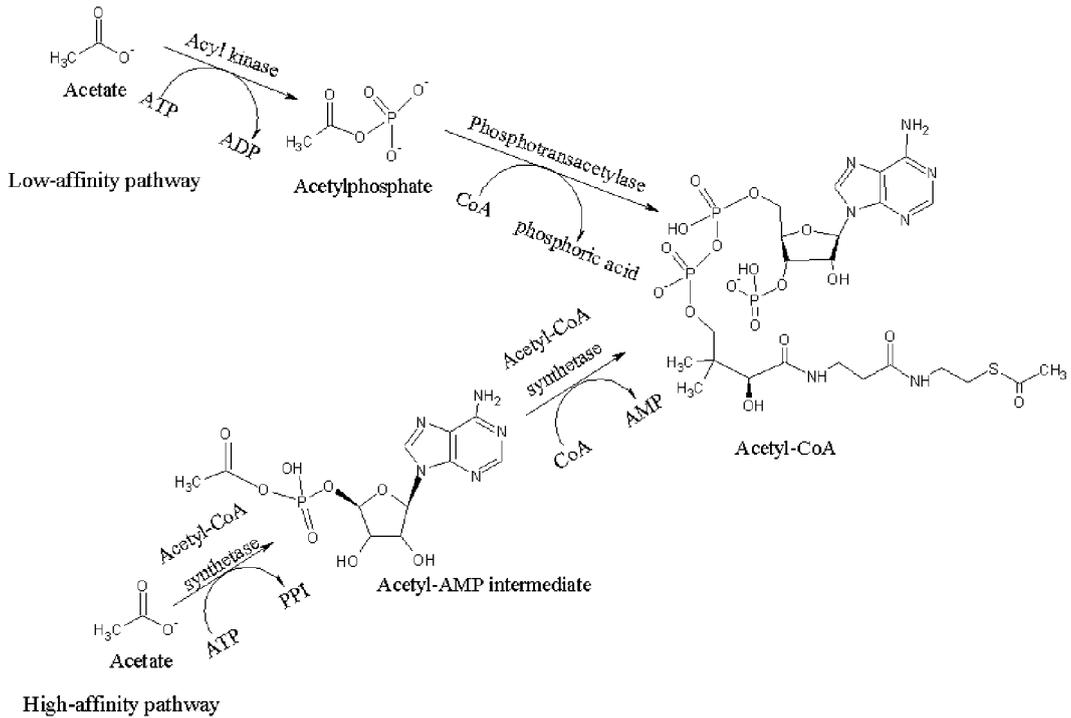


图 3. 乙酸生成乙酰辅酶 A 的机理图^[18]

Figure 3. Mechanisms for the production of acetyl-CoA from acetate^[18].

3 兼性甲烷氧化菌的研究展望

由于专一营养甲烷氧化菌仅能以甲烷或甲基化合物为碳源,这就使得菌体富集和扩大培养手段难于在工程上应用。兼性甲烷氧化菌的研究可以实现以经济廉价的多碳碳源进行菌体增殖,因此恰好弥补了这一不足。在人为源甲烷减排领域,兼性甲烷氧化菌由于更容易实现富集而展现出了广阔的工程应用前景。此外,作为一个重要里程碑,兼性甲烷氧化菌的发现在土壤或填埋场生物修复和废水污染物

移除等环境生物技术开辟了新的领域。例如兼性甲烷氧化菌可以提高卤代烃的降解率,课题组发现菌株 JTA1 对氯仿的高耐受性可以促进矿化垃圾生物覆盖层甲烷氧化能力^[20,42]。当氯仿浓度为 50 mg/L 时,生物覆盖层的甲烷氧化速率达到了 0.114 mL/(day·g),远远高出了已报道的 0.0135 mL/(day·g)。

目前,兼性甲烷氧化菌的研究才刚刚起步,国内外公开的兼性甲烷氧化菌株还不超过 10 个,更多新菌的分离纯化和生物特性都亟待研究。兼性甲烷氧化菌易在酸性环境富集,但已知基因序列信息还不

足以解释某些特性反应, 很多代谢特性需要在基因组测序工作完成的基础上进行。此外, 兼性甲烷氧化菌代谢途径中可能存在的特征酶亟待验证和发现, 氯代烃生物降解过程中菌体的底物亲和性、竞争性和共代谢条件下的降解机理机制信息也十分欠缺。在未来研究中, 应该更广泛地确定兼性甲烷氧化菌在不同地域的丰度和分布, 以及在异养生物同时存在的环境中竞争其他生长底物的能力。这些研究有助于其在环境工程领域的深入应用, 也可为研究发现新的兼性甲烷氧化菌提供相对明确的指定。

参考文献

- [1] Hanson R, Hanson T. Methanotrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60 (2): 439-471.
- [2] Kolb S. Aerobic methanol-oxidizing bacteria in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 300(1): 1-10.
- [3] Op den Camp HJM, Islam T, Stott MB, Harhangi HR, Hynes A, Schouten S, Jetten MSM, Birkeland NK, Pol A, Dunfield PF. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5): 293-306.
- [4] Bowman J. The methanotrophs-the families Methylococcaceae and Methylocystaceae// Dworkin M, Falkow S, Rosenberg S, Schleifer KH, Stackebrandt E. The Prokaryotes. 2nd eds. New York: Springer, 2000: 266-289.
- [5] Wood AP, Aurikko JP, Kelly DP. A challenge for 21st century molecular biology and biochemistry: what are the causes of obligate autotrophy and methanotrophy. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28(3): 335-352.
- [6] Whittenbury R, Phillips K, Wilkinson J. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology*, 1970, 61(2): 205-218.
- [7] Belova SE, Baani M, Suzina NE, Bodelier PLE, Liesack W, Dedysh SN. Acetate utilization as a survival strategy of peat-inhabiting *Methylocystis* spp.. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(1): 36-46.
- [8] Dedysh SN, Panikov NS, Liesack W, Grokopf R, Zhou J, Tiedje JM. Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. *Science*, 1998, 282 (5387): 281-284.
- [9] Dunfield PF, Khmelenina VN, Suzina NE, Trotsenko YA, Dedysh SN. *Methylocella silvestris* sp. nov., a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(5): 1231-1239.
- [10] Theisen AR, Ali MH, Radajewski S, Dumont MG, Dunfield PF, McDonald IR, Dedysh SN, Miguez CB, Murrell JC. Regulation of methane oxidation in the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(3): 682-692.
- [11] Leadbetter E, Foster J. Studies on some methane-utilizing bacteria. *Archives of Microbiology*, 1958, 30(1): 91-118.
- [12] Brown L, Strawinski R, McCleskey C. The isolation and characterization of *Methanomonas methanooxidans* Brown and Strawinski. *Canadian Journal of Microbiology*, 1964, 10(5): 791-799.
- [13] Dworkin M, Foster J. Studies on *Pseudomonas methanica* (Sohngen) nov. comb.. *Canadian Journal of Microbiology*, 1956, 72(5): 646-659.
- [14] Foster J, Davis RH. A methane-dependent coccus, with notes on classification and nomenclature of obligate, methane-utilizing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1966, 91(5): 1924-1931.
- [15] Green P, Bousfield I. Emendation of *Methylobacterium* Patt, Cole, Hanson 1976; *Methylobacterium rhodinum* (Heumann 1962) comb. nov. corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971) comb. nov. corrig.; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1983, 33(4): 875-877.
- [16] Urakami T, Araki H, Suzuki KI, Komagata K. Further studies of the genus *Methylobacterium* and description of *Methylobacterium aminovorans* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1993, 43(3): 504-513.
- [17] Lidstrom-Oconnor ME, Fulton GL, Wopat AE. "*Methylobacterium ethanolicum*": a syntrophic association of two Methylophilic bacteria. *Journal of General Microbiology*, 1983, 129(10): 3139-3148.
- [18] Semrau JD, DiSpirito AA, Vuilleumier S. Facultative methanotrophy: false leads, true results, and suggestions for future research. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 323(1): 1-12.
- [19] Dedysh SN, Berestovskaya YY, Vasylieva LV, Belova SE, Khmelenina VN, Suzina NE, Trotsenko YA, Liesack W, Zavarzin GA. *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(1): 151-156.
- [20] Im J, Semrau JD. Pollutant degradation by a *Methylocystis* strain SB2 grown on ethanol: bioremediation via

- facultative methanotrophy. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 318(2): 137-142.
- [21] Dedysh SN, Knief C, Dunfield PF. *Methylocella* species are facultatively methanotrophic. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(13): 4665-4670.
- [22] Dunfield PF, Belova SE, Vorob'ev AV, Cornish SL, Dedysh SN. *Methylocapsa aurea* sp. nov., a facultative methanotroph possessing a particulate methane monoxygenase, and emended description of the genus *Methylocapsa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(11): 2659-2664.
- [23] Belova SE, Kulichevskaya IS, Bodelier PL, Dedysh S. *Methylocystis bryophila* sp. nov., a novel facultatively methanotrophic bacterium from acidic Sphagnum peat, and emended description of the genus *Methylocystis* (ex Whittenbury et al. 1970) Bowman et al. 1993. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63: 1096-1104.
- [24] Im J, Lee SW, Yoon S, DiSpirito AA, Semrau JD. Characterization of a novel facultative *Methylocystis* species capable of growth on methane, acetate and ethanol. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(2): 174-181.
- [25] Patel RN, Hou CT, Felix A. Microbial oxidation of methane and methanol: crystallization of methanol dehydrogenase and properties of holo- and apo-methanol dehydrogenase from *Methylomonas methanica*. *Journal of Bacteriology*, 1978, 133(2): 641-648.
- [26] Zhao SJ, Hanson R. Isolate 761M: a new type I methanotroph that possesses a complete tricarboxylic acid cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48(6): 1237-1242.
- [27] Zhao SJ, Hanson R. Variants of the obligate methanotroph isolate 761M capable of growth on glucose in the absence of methane. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48(4): 807-812.
- [28] Lynch MJ, Wopat AE, O'Connor ML. Characterization of two new facultative methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 40(2): 400-407.
- [29] Chen Y, Crombie A, Rahman MT, Dedysh SN, Liesack W, Stott MB, Alam M, Theisen AR, Murrell JC, Dunfield PF. Complete genome sequence of the aerobic facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(14): 3840-3841.
- [30] Wolf H, Hanson R. Identification of methane-utilizing yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 1980, 7(2): 177-179.
- [31] Kaszycki P, Czechowska K, Petryszak P, Miedzobrodzki J, Pawlik B, Koloczek H. Methylophilic extremophilic yeast *Trichosporon* sp.: a soil-derived isolate with potential applications in environmental biotechnology. *Acta Biochimica Polonica*, 2006, 53(3): 463-473.
- [32] Hinrichs K, Hayes J, Sylva S, Brewer P, Delong E. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature (London)*, 1999, 398(6730): 802-805.
- [33] Zhao T, He C, Zhang L, Quan X, Zhao Y. Kinetics of affinity methane oxidation by *Chryseobacterium* sp. from aged-refuse. *Chemical Industry and Engineering Society of China*, 2011, 62(7): 1915-1921. (in Chinese)
赵天涛, 何成明, 张丽杰, 全学军, 赵由才. 矿化垃圾中金黄杆菌甲烷亲和氧化动力学. *化工学报*, 2011, 62(7): 1915-1921.
- [34] Zhao TT, Zhang LJ, Chen HQ, Zhao YC. Co-inhibition of methanogens for methane mitigation in biodegradable wastes. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(6): 827-833.
- [35] Zhao TT, Zhang LJ, Zhao YC. Study on the inhibition of methane production from anaerobic digestion of biodegradable solid waste. *Waste Management & Research*, 2010, 28(4): 347-354.
- [36] Zhao TT, Zhang LJ, Zhang YR, Xing ZL, Peng XY. Characterization of *Methylocystis* strain JTA1 isolated from aged refuse and its tolerance to chloroform. *Journal of Environmental Sciences*, 2013, 25(4).
- [37] Benstead J, King G. Response of methanotrophic activity in forest soil to methane availability. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 23(4): 333-340.
- [38] Carlsen H, Joergensen L, Degn H. Inhibition by ammonia of methane utilization in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 35(1): 124-127.
- [39] Joergensen L, Degn H. Mass spectrometric measurements of methane and oxygen utilization by methanotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1983, 20(3): 331-335.
- [40] Crossman LC, Moir JWB, Enticknap JJ, Richardson DJ, Spiro S. Heterologous expression of heterotrophic nitrification genes. *Microbiology*, 1997, 143(12): 3775-3783.
- [41] Starai V, Escalante-Semerena J. Acetyl-coenzyme a synthetase (AMP forming). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61(16): 2020-2030.
- [42] Yoon S, Im J, Bandow N, DiSpirito AA, Semrau JD. Constitutive expression of pMMO by *Methylocystis* strain SB2 when grown on multi-carbon substrates: implications for biodegradation of chlorinated ethenes. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(2): 182-188.

Research progress and discovery process of facultative methanotrophs—A review

Tiantao Zhao^{1,2}, Zhilin Xing¹, Lijie Zhang^{1*}

¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China

²College of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China

Abstract: Facultative methanotrophs are a group of phylogenetically diverse microorganisms characterized by their ability to use methane and some other compounds containing C-C bond as their sole source of carbon and energy. Recently, facultative methanotrophs in the genera *Methylocella*, *Methylocapsa* and *Methylocystis*, which belong to the *Alphaproteobacteria*, have been reported that can grow on larger organic acids or ethanol for some species, as well as methane. In this paper, the research history of facultative methanotrophs was summarized systematically, some other facultative methane-oxidizing microorganisms were introduced, the metabolic mechanisms of utilizing multi-carbon compounds by facultative methanotrophs were analyzed, and the current problems and the future engineering applications were discussed.

Keywords: facultative methanotrophy, metabolism, methane, *Methylocystis*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (51008322)

* Corresponding author. Tel: +86-13883049591; Fax: +86-23-62563221; E-mail: tiantaozhao@gmail.com

Received: 2 January 2013/Revised: 31 March 2013

1953年创刊以来所有文章全文上网

从2008年1月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远,为方便读者查阅,将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2013年8月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊3年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊6年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008 - 2012	月刊	48 - 52	1 - 12
2013	月刊	53	1 - 8