

# 甲烷利用细菌降解三氯乙烯的研究\*

沈润南 李树本

(中国科学院兰州化学物理研究所碳基合成与选择氧化国家重点实验室 兰州 730000)

**摘 要** GYJ3 菌株细胞微结构的电镜观察结果表明: 它具有 II 型甲烷利用细菌的特征, 应归属于 II 型菌。考察了  $\text{Cu}^{2+}$  浓度、培养气相中甲烷浓度对菌株细胞中甲烷单加氧酶 (EC1.14.13.25, 简称 MMO) 活性的影响。结果表明, 培养液中  $\text{Cu}^{2+}$  浓度为  $1.5\mu\text{mol/L}$ , 培养气相中甲烷: 空气比为 2:1 时, 可溶性甲烷单加氧酶占细胞中 MMO 总量的 95%。研究了 GYJ3 菌株细胞悬浮液降解三氯乙烯过程。实验结果表明, GYJ3 菌株能够降解不同浓度的三氯乙烯, 较高浓度的三氯乙烯对降解反应没有明显的抑制作用。加入甲酸盐作为电子给体能够提高三氯乙烯降解反应速率。实验中观察到 GYJ3 菌株降解三氯乙烯过程中反应速率随着反应的进行而下降, 在三氯乙烯降解过程中三氯乙烯氧化产物是导致细胞失活的主要原因。实验室中测定了 GYJ3 菌株单位重量细胞降解三氯乙烯极限量, 它可作为评价细菌降解三氯乙烯能力的重要指标。

**关键词** 甲烷利用细菌, 甲基单胞菌, 甲烷单加氧酶, 降解, 三氯乙烯

**分类号** Q936

氯代烃类化合物具有很强的致癌作用, 由于在工业上的广泛应用, 氯代烃类化合物造成地下水和饮用水的严重污染, 三氯乙烯 (trichloroethylene, 简称 TCE) 是这类化合物中常见的污染物。在自然环境中, 氯代烃类化合物被降解, 所以利用细菌降解这类化合物具有重要的现实意义。

甲烷利用细菌是一类利用  $\text{C}_1$  化合物作为碳源和能源生长的细菌。1977 年, Dalton 等<sup>[1]</sup>报道了甲烷利用细菌中的甲烷单加氧酶 (EC1.14.13.25, methane monooxygenase, 简称 MMO) 能够催化氯化烯烃类化合物环氧化反应。1986 年, Fogel 等<sup>[2]</sup>报道了甲烷利用细菌降解氯代烃类化合物的研究。在此之后报道了许多不同种类的甲烷利用细菌降解氯代烃类化合物的研究<sup>[3,4]</sup>。研究结果表明甲烷利用细菌降解氯代烃类化合物具有反应速率高、底物选择性宽、不产生有毒的中间体等优点。

作者从甘肃玉门油田泥土中筛选出一株具有较高 MMO 催化活性的甲基单胞菌 *Methylomonas* sp. GYJ3 菌株<sup>[5,6]</sup>。本文报道 GYJ3 菌株降解 TCE 的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

甲基单胞菌 *Methylomonas* sp. GYJ3 菌株系本实验室从甘肃省玉门油田泥土样中筛

\*国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1996-10-05

选得到,经8年保存,琼脂培养基培养,菌落单一,无杂菌生长,MMO活性稳定。

## 1.2 细菌发酵培养

无机盐J培养基(组份见文献[5]),接种量10%,在甲烷:空气为2:1的气相中,31℃下,静止培养4d,然后以此为种子,再次接种,摇床培养5d,转速为200r/min,培养液中硫酸铜浓度为 $1.5\mu\text{mol/L}$ 。

## 1.3 细胞悬浮液的制备

将发酵液离心( $10\,000\times g$ )20min,收集细胞,用50mmol/L磷酸盐缓冲液(pH=7.0,含5mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ )洗涤两次,再加入适量磷酸盐缓冲液制成细胞浓度为540mg干重细胞/L(每升相当于含540mg干细胞重的活细胞)的细胞悬浮液,置4℃冰箱中待用。

## 1.4 TCE降解反应

取1ml细胞悬浮液置10ml反应瓶中,按计算量加入TCE饱和的磷酸盐缓冲液(含TCE 950mg/L,GC定量)。用聚四氟乙烯衬硅橡胶瓶塞封口,在31℃恒温水浴中旋转反应,反应一定时间后加2ml正己烷终止反应,轻微震摇,将反应液中剩余的TCE全部萃取至正己烷层中,取有机相分析TCE浓度。

## 1.5 分析方法

1.5.1 细胞细微结构的电镜观察:细胞经包埋、干燥、切片、制样,用JM-1200EX/S型电镜观察。

1.5.2 细胞密度的测定:采用光密度法测定,岛津UV-120型紫外分光光度仪,选用波长600nm。

1.5.3 TCE浓度的测定:TCE的测定采用气相色谱电子捕获检测法(GC-ECD),仪器为上海分析仪器厂1001型气相色谱仪,色谱条件:进样器和ECD温度为200℃,柱温为80℃,毛细管色谱柱(25m $\times$ 0.25mm,长 $\times$ 内径):固定液SE-54。采用外标法测定TCE浓度。

# 2 结果

## 2.1 GYJ3菌株细胞细微结构的特征

作者曾报道过GYJ3菌株的筛选和生产特性<sup>[5]</sup>,并将其归属为甲基单胞菌属 *Methylomonas*。甲烷利用细菌因其代谢途径不同,可分类为I型菌——单磷酸核酮糖(RuMP)碳代谢途径;II型菌——丝氨酸(Serine)碳代谢途径;X型菌——兼有RuMP途径和Serine途径。不同类型的甲烷利用细菌其细胞结构有所不同,可通过细胞结构的特性来归属细菌的类型。I型和X型菌的细胞内膜是以盘状膜囊堆积形式存在,并分布于细胞质中。II型菌具有管状膜囊结构,通常沿细胞边缘排列且成对出现,表现为双层细胞壁脂膜结构。GYJ3菌株细胞超薄切片的电镜照片可见沿细胞周边清晰呈现的配对双层外膜(图1),具有II型甲烷利用细胞的特征。

## 2.2 培养条件对GYJ3菌株MMO的影响

甲烷利用细菌中的MMO具有两种不同的表现形式——可溶性MMO(sMMO)和颗粒性MMO(pMMO),它们都能够催化烷烃羰基化和烯烃环氧化反应,但是,由于它们对底物的选择性不同,细胞中只有sMMO能够催化TCE降解过程中第一步氧化反应,生成TCE的环氧化合物。甲烷利用细菌细胞中MMO的调控可以通过培养过程中 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度来

完成,当  $\text{Cu}^{2+}$  浓度低,培养气相中甲烷浓度较高时,细胞主要产生 sMMO。实验中考察了培养液中  $\text{Cu}^{2+}$  浓度对 MMO 调控的影响,MMO 活性测定采用丙烯环氧化反应,首先用超声波破碎细胞,低温冷冻离心分离两种形式的 MMO,离心 ( $10000 \times g$ ) 20min,上清液含 sMMO,沉淀物含 pMMO,用相同体积的缓冲液悬浮沉淀物,分别取 1ml 上清液和沉淀物悬浮液测定酶活。培养液中不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  对 GYJ3 菌株细胞中 sMMO 和 pMMO 分布的影响见图 2。图 2 结果表明,当培养液中无  $\text{Cu}^{2+}$  存在时,细胞中的 MMO 全部以 sMMO 形式存在,当  $\text{Cu}^{2+}$  浓度为  $1.5\mu\text{mol/L}$  时,sMMO 活性最高,sMMO 占细胞中 MMO 总量的 95%。

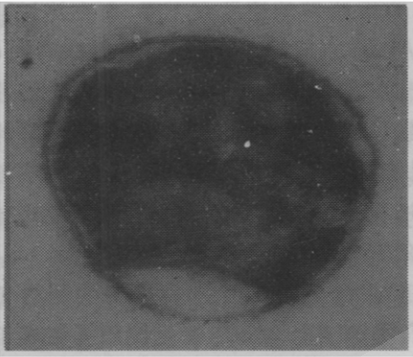


图1 GYJ3 菌株细胞的超薄切片的电镜图  
(60000 ×)

Fig. 1 Electron micrograph of ultrathin section of the strain GYJ3 examined in JEM-1200 EX electron microscopy

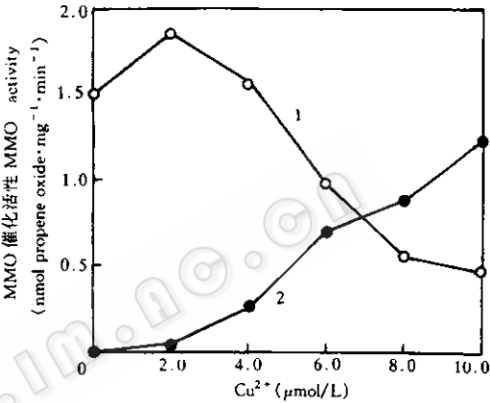


图2  $\text{Cu}^{2+}$  浓度对 *Methylobacter* sp. GYJ3 菌株生长过程中甲烷单加氧酶的影响

Fig. 2 Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration on methane monooxygenase during the growth of *Methylobacter* sp. GYJ3  
1. sMMO; 2. pMMO.

培养气相中甲烷和空气比对 MMO 的调控结果(表 1)表明,培养气相中甲烷:空气为 2:1 时,sMMO 占细胞中 MMO 总量的 95%,在此条件下,细胞的生长不受影响。故在 GYJ3 菌株降解 TCE 研究中选定培养条件为:培养液中  $\text{Cu}^{2+}$  浓度为  $1.5\mu\text{mol/L}$ ,培养气相中甲烷:空气为 2:1。

表1 培养气相中甲烷和空气比对MMO活性的影响

Table 1 The effect of ratio of methane to air in atmosphere on MMO activity during the period of culture

培养气相	甲烷单加氧酶活性	
Culture atmosphere	MMO activity (total activity of the cell set as 100%)	
CH <sub>4</sub> /air (V/V)	pMMO(%)	sMMO(%)
1:4	20~30	70~80
1:1	10~16	84~90
1:2	0~5	95~100

2.3 TCE 的降解

对 GYJ3 菌株细胞悬浮液降解不同浓度 TCE 进行了研究,结果(图 3)表明,GYJ3 菌株能够降解 TCE,当 TCE 浓度达到 30mg/L 时,GYJ3 菌株仍能以较高的速率降解 TCE,高浓度的 TCE 对降解反应无明显抑制作用。不同浓度的 TCE 在其降解过程中平均降解速率不同,图 3 中 TCE 初始浓度开始为 5,10,15,20,25,30mg/L 时,TCE 降解的平均速率分别为 1.17,1.67,1.73,1.54,1.42 和 1.22nmol TCE · mg 干细胞<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>。当 TCE 初始浓度为 15mg / L 时,TCE 降解的平均速率最大。不同 TCE 浓度下的初始降解反应速率设定为 0~5min 的平均速率,结果表明当反应液中 TCE 浓度大于 12mg / L 时,TCE 降解反应为 0 级反应,即反应速度与 TCE 浓度无关。但是,从图 2 的实验结果中可以发现在 TCE 降解过程中 TCE 浓度大于 12mg / L 时,随着反应的进行,TCE 降解的速度在下降,而在这过程中 TCE 降解速度本应保持不变,以初始浓度为 30mg / L 的 TCE 降解过程为例,反应时间 0~5min,TCE 降解的速度为 3.36nmol TCE · mg 干细胞<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>,0~80min,TCE 降解速度为 2.27nmol · mg 干细胞<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>。导致 TCE 降解反应速率随反应时间增加而下降的原因可能是:(1)随着反应的进行,可供 MMO 催化反应所必需的电子给体 NADH 量逐渐减少。MMO 是一个三组份复合酶系,在 MMO 催化过程中每转化一分子底物需消耗一分子的 NADH,在 TCE 的降解过程中 MMO 催化 TCE 的环氧化反应,随着反应的进行,NADH 被消耗,由于 TCE 不是甲烷利用细菌的生长底物,NADH 不能被再生,可能成为制约 TCE 降解进行的原因。(2)TCE 氧化产物的毒性,研究表明 TCE 和 MMO 催化作用下生成 TCE 环氧化合物,作为一种反应性中间体,它不可逆键合 MMO 并使之失活,成为制约这一过程工业化的主要因素。实验中进一步考察了这两个影响 TCE 降解的重要因素。

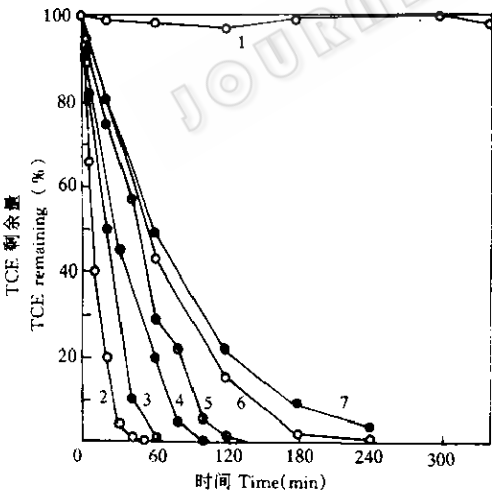


图 3 GYJ3 菌株细胞悬浮液降解不同 TCE 的结果

Fig. 3 TCE biodegradation by the resting cells of the strain GYJ3 with different initial TCE concentrations.

1. CK; 2. 5mg/L TCE; 3. 10mg/L TCE; 4. 15mg/L TCE; 5. 20mg/L TCE; 6. 25mg/L TCE; 7. 30mg/L TCE.

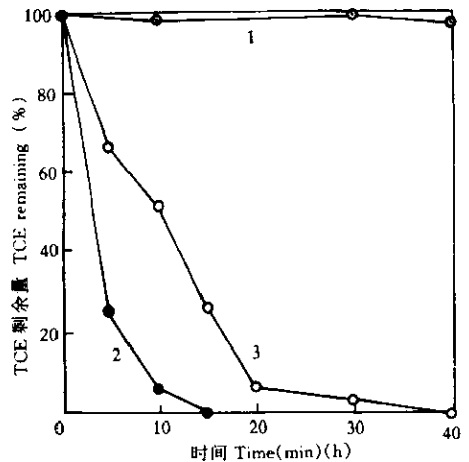


图 4 甲酸盐作为电子给体的加入对 TCE 生物降解的影响

Fig. 4 Effect of the addition of formate as electron donor on TCE biodegradation by strain GYJ3

1. 控制实验(热杀死细胞) Controlled (heat killed cell); 2. 5mg/L TCE; 3. 25mg/L TCE.

## 2.4 甲酸盐作为电子给体的加入对 TCE 降解的影响

在甲烷利用细菌代谢甲烷的过程中甲酸盐作为甲烷利用细菌的代谢产物之一, 一分子的甲酸盐代谢为二氧化碳和水可再生一分子 NADH。作者<sup>[7]</sup>曾报道了不同浓度的甲酸盐对 MMO 活性的影响, 研究结果表明, 在细胞反应体系中加入 20mmol/L 甲酸盐存在时, GYJ3 菌株细胞悬浮 MMO 的活性提高 20 倍。图 4 的结果表明甲酸盐的加入能够提高 TCE 降解的反应速率。以初始浓度为 5mg/L 和 25mg/L TCE 的降解为例, TCE 降解速度为 1.17, 1.54 提高至 4.63 和 9.26nmol TCE · mg 干细胞<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>。在实验中仍观察到 TCE 降解反应速率随反应的进行而下降的过程, 这说明甲酸盐的加入能够提高 TCE 降解反应速率, 随着反应的进行细胞的失活并没有得到改善, 失活的主要原因是 TCE 氧化产物的毒性。

## 2.5 TCE 氧化产物的毒性

实验结果表明, 随着 TCE 降解的进行, TCE 降解反应速率下降, 细胞失活的原因是由于 TCE 氧化产物和蛋白的不可逆键合所致。细菌细胞对 TCE 氧化产物中毒失活的敏感度是评价细菌降解 TCE 能力的重要参数, 也是工业应用必须考虑的重要因素之一。为了定量评价 TCE 降解过程中 TCE 氧化产物的毒性, 在实验选定 TCE 初始浓度为 15mg/L, 细胞浓度为 540mg/L, 相同条件下进行反应, 直到 TCE 不再被降解, 反应过程中取 1ml 反应液监测 TCE 浓度, 结果见图 5。图 5 中 a 为无甲酸盐加入时的实验曲线, b 为 20mmol/L 甲酸盐存在时的实验曲线, 根据实验数据可计算出单位重量细胞降解 TCE 的极限量( $T_c$ 值), 它等于总的 TCE 降解量除以细胞重量, 它可以反映细菌细胞降解 TCE 的能力, 没甲酸盐存在时和有 20mmol/L 甲酸盐存在时  $T_c$  值分别为 0.0778 和 0.0851mg TCE / mg 干细胞。结果表明甲酸盐的加入细胞降解 TCE 的能力略有提高, 但是, 随着反应的进行, 细胞完全丧失 TCE 降解活性, 这说明失活的原因是 TCE 氧化产物的毒性, 加入甲酸盐作为电子给体只能提高 GYJ3 菌株降解反应速率, 对细胞失活的减少影响很小。

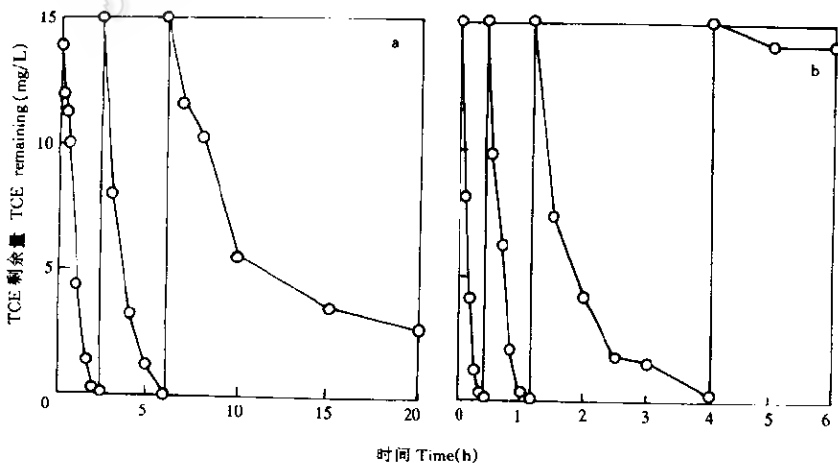


图 5 GYJ3 菌株单位重量细胞降解 TCE 极限量的测定

Fig.5 Results of TCE reinjection to measure the total degradation capacity of cells of the strain GYJ3

a. 未加甲酸盐; b. 加入 20mmol/L 甲酸盐.

a. No formate added; b. 20mmol/L formate.

### 3 讨论

根据 GYJ3 菌株的形态学和生长特征, GYJ3 菌株被归属为甲基单胞菌属 *Methylomonas*<sup>[5]</sup>, 具有 II 型甲烷利用细菌的特征, 而大多数甲基单胞菌为 I 型甲烷利用细菌, II 型甲烷利用细菌中 MMO 的调控可以通过改变培养液中  $\text{Cu}^{2+}$  浓度和培养甲烷的浓度来进行, GYJ3 菌株的特性更象 II 型菌。

GYJ3 菌株的细胞悬浮液降解 TCE 能力和已经报道的一些能够降解 TCE 的甲烷利用细菌相比, GYJ3 菌株降解 TCE 的初始反应活性较低, *Methylosinus trichosporium* OB3b 菌降解 TCE 反应初始反应活性很高<sup>[4]</sup>, 但是随着 TCE 的降解, 细胞的降解 TCE 的活性逐渐减少, 通过测定 GYJ3 菌株单位重量细胞降解 TCE 的极限量表明 GYJ3 菌株细胞具有较强降解 TCE 的能力, 尽管 GYJ3 菌株降解 TCE 初始速度较低, 但是, 它单位重量细胞降解 TCE 的极限量大, 也就是说在降解 TCE 过程中细胞不易失活, 这有利于实际应用。

GYJ3 菌株同大多数甲烷利用细菌一样, 甲酸盐的加入能够提高 TCE 降解速率, 我们发现甲酸盐虽能提高 TCE 降解的反应速率, 但它对在 TCE 降解过程中细胞的中毒失活无明显改善作用, 而 Alvarez-cohen 等<sup>[8]</sup>报道了在一种混合的甲烷利用细菌降解 TCE 过程中甲酸盐的加入不仅能够提高细胞的初始活性, 而且能够提高单位重量细胞生物降解 TCE 的极限量, 这种差异主要由不同菌种所致。

### 参 考 文 献

- [1] Colby J, Stirling D I, Dalton H. *Biochem J*, 1977, **165**:395~402.
- [2] Fogel M, Taddeo A R, Fogel S. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51**(2):720~724.
- [3] Fox B G, Borneman J G, Wackett L P et al. *Biochemistry*, 1989, **29**(27):6419~6427.
- [4] Oldenhuis R R, Vink J M, Janssen D B et al. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**(11):2819~2826.
- [5] 宁治中, 缪德坝, 易淑云, 等. 微生物学通报. 1990, **17**(4):283~286.
- [6] Liu A M, Li S B, Yu W L et al. *Biochem Internat*, 1990, **22**(3):959~967.
- [7] 沈润南, 尉迟力, 李树本. 生物工程学报, 1996, **12**(3):322~326.
- [8] Alvarez-Cohen L, McCarty P. *Environ Sci Technol*, 1991, **25**(3):1381~1387.

## THE BIODEGRADATION OF TRICHLOROETHYLENE BY A METHANOTROPHIC BACTERIUM

Shen Runnan     Li Shuben

(State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical

Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

**Abstract** A *Methylobacter* (strain GYJ3) isolated in our laboratory was identified as the type II methanotroph on the basis of the intracytoplasmic membrane of the ultrastructure. The optimal culture conditions for production of the soluble form of methane monooxygenase (MMO) were determined, in which the ratio of methane to air in atmosphere was 2 to 1 and  $\text{Cu}^{2+}$  concentration was  $1.5\mu\text{mol/L}$ . The biodegradation of trichloroethylene (TCE) by the resting cells of the strain GYJ3 was studied. All experiments were performed with cells grown under above conditions and thus expressing soluble MMO. This results showed that TCE at the high concentration of  $30\text{mg/L}$  did not inhibit to the enzymes in the cells. Addition of formate increased the initial specific TCE degradation rates. The product of TCE oxidation was found to be toxic to the cells. The degree of inactivation of MMO was proportional to the amount of TCE degraded. The TCE degradation capacities ( $T_c$ ) of resting cells was determined. In no-formate and formate-fed experiments, the TCE degradation capacities were found to be 0.0778 and 0.0851 mg of TCE / mg of dry cell, respectively.

**Key words** Methanotroph, *Methylobacter*, Trichloroethylene, Biodegradation, Methane monooxygenase