47卷 1期
2007年2月4日
微 生 物 学 报
Acta Microbiologica Sinica
47(1):103~109
4 February 2007

含有甲烷氧化菌的混合菌群特性研究

罗明芳,吴 昊,王 磊,邢新会*
(清华大学化工系生物化工研究所 北京 100084)

摘 要:为获得高效甲烷氧化微生物体系,从农业土壤中采样,以甲烷作为唯一碳源进行好氧选择性传代培养,得到生长性能稳定、生长优于 *Methylosinus trichosporium* OB3b 纯培养的具有甲烷单加氧酶(Methane Monooxygenase,MMO)活性甲烷氧化混合菌。利用 MMO 的共代谢特性,分别以苯酚和环氧丙烷作为目标对象,考察该混合菌对有机污染物的降解及用于生产有用化学物质的催化特性。结果表明,所得混合菌具有高效降解苯酚能力,对初始浓度为600mg/L的苯酚,经过11h培养,苯酚降解率可达99%。另外,以该混合菌为催化剂可以实现丙烯氧化生产环氧丙烷。通过降低磷酸盐浓度可以有效提高环氧丙烷的积累浓度,最大可至5mmol/L。此外,采用纯种分离方法结合PCR扩增、16S rRNA和MMO功能基因分析技术对混合菌群结构进行解析。结果表明,该混合菌群由Ⅱ型甲烷氧化菌及其它至少4种非甲烷氧化菌组成,它们分别属于 *Methylosinus trichosporium* 和 *Acinetobacter junii*、*Cupriavidus metallidurans*、*Comamonas testosteroni* 和 *Stenotrophomonas maltophilia*。采用PCR方法从混合菌及纯化菌株 *M. trichosporiums* Y9 总DNA中都能扩增得到 *mmoB*、*mmoX* 和 *pmoA* 基因片段,表明该甲烷氧化菌同时具有sMMO和pMMO两种形式的MMO。通过对从甲烷氧化混合菌中分离纯化得到的甲烷氧化菌进行PCR产物测序,结果发现其与 *Methylosinus trichosporium* 的同源性为99.9%。

关键词:苯酚;环氧丙烷;甲烷氧化菌;混合菌;*Methylosinus trichosporium*
中图分类号:Q939.9 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2007)01-0103-07

甲烷氧化菌是自然界中广泛存在的一种利用甲烷作为唯一碳源和能源的细菌,对全球碳循环和大气中甲烷积累量的减少起重要作用。此类微生物利用甲烷的关键酶是甲烷单加氧酶(Methane Monooxygenase,MMO)。甲烷氧化菌在MMO作用下首先将甲烷氧化为甲醇,然后在甲醇脱氢酶的作用下将甲醇氧化为甲醛。根据甲烷氧化菌利用甲醛合成细胞物质代谢途径的不同,将甲烷氧化菌分为Ⅰ型甲烷氧化菌(戊糖磷酸途径)和Ⅱ型甲烷氧化菌(丝氨酸途径)。甲烷氧化菌中MMO以两种形式存在,一种是以可溶性形式存在于细胞质中,称为可溶性甲烷单加氧酶(sMMO);另一种是以颗粒形式存在于细胞膜上,称为颗粒性甲烷单加氧酶(pMMO)[1]。其中,已发现所有的甲烷氧化菌中都存在pMMO基因,少数菌中,如 *Methylosinus trichosporium* OB3b,*Methylococcus capsulatus* Bath 等,pMMO和sMMO基因均存在。铜离子浓度是调控pMMO和sMMO基因的表达的开关,高铜/生物量条件下,pMMO基因表达;低铜/生物量条件下sMMO基因表达[1,2]。

MMO催化甲烷部分氧化生产甲醇的反应条件温和,专一性好,具有潜在的工业应用价值[3,4]。除此之外,MMO潜在的工业化应用在于可以氧化部分C1~C20烷烃、C2~C10烯烃生产手性脂肪醇和环氧化物(如环氧丙烷)以及用于三氯甲烷、三氯乙烯、二氯甲烷等有毒卤代烃和多环芳烃污染的地下水和土壤的生物修复[5~8]。甲烷氧化菌在煤矿和油气田瓦斯气体控制方面也有重要的应用潜力。引起煤矿爆炸的主要原因是瓦斯气体,其主要成分是甲烷,含量达到80%以上,其他成分还包括一氧化碳(CO)、硫化氢(H_2S)、二氧化硫(SO_2)、乙烷(C_2H_6)、乙烯(C_2H_2)、氢气(H_2)等。含甲烷氧化菌的混合菌群在生产生物可降解塑料PHA中也具有良好的应用前景[9]。因此,在研究甲烷氧化菌的工业应用技术时,分离含甲烷单加氧酶的高效菌株或混合菌群的研究具有重要意义。本论文对富集得到的高效甲烷利用混合菌群的结构与功能进行了解析。

基金项目:国家自然科学基金(20606036);国家自然科学基金重点项目(20336010);中国石油天然气股份有限公司科技风险创新研究项目;中国博士后科学基金(2004036115和2005037366)
* 通讯作者。Tel:86-10-62794771;Fax:86-10-62790304;E-mail:xhxing@tsinghua.edu.cn
作者简介:罗明芳(1972-),女(土家族),重庆人,副教授,博士,从事生物化工研究。E-mail:luomf@gucas.ac.cn
收稿日期:2006-05-12;接受日期:2006-08-17;修回日期:2006-07-23
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Easy-DoTM PCR PreMix 傻瓜 PCR 反应体系购自赛百盛公司;细菌染色体 DNA 少量提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;甲醇为天津四友公司产品(色谱醇);甲烷和丙稀购自北京分析仪器公司;其余试剂均为市售分析纯试剂。

高压液相色谱为岛津 10A 高效液相色谱仪;气相色谱为岛津 GC-2010 气相色谱仪。

1.2 菌株和培养

1.2.1 培养基:改进的 NMS(Higgens nitrate minimal salt)培养基[10](MNMS)组成:KH_2PO_4 1.06g;$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 4.34g;$NaNO_3$ 1.70g;K_2SO_4 0.34g;$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.074g;$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.024g;$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.25mg;微量元素溶液 4mL,去离子水 1000mL,pH7.0。

微量元素溶液组成(mg/L):$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.287;$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.223;H_3BO_3 0.062;Na_2MOO_4 ($2H_2O$ 0.048;$COCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.048;KI 0.083;$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3.5,pH 7.0。

LB 培养基组成:酵母粉 5g;胰蛋白胨 10g;氯化钠 5g;去离子水 1000mL。

1.2.2 菌株筛选:从重庆山区农业土壤中采样,将土样碾碎,称取 0.2g 放入 20mL MNMS 培养基中,在 30℃摇床上振荡。2h 后取液体 1mL 作为种子接入分装了 10mL MNMS 培养基的 70mL 玻璃培养瓶中,加盖密封橡胶塞。用已灭菌的医用注射器抽取瓶内一定体积的空气,通过已灭菌的气体过滤器注入相同体积的甲烷,使瓶中空气与甲烷的体积比为 1:1,30 ℃,170r/min 摇床培养,1~2 周后移取其中 1mL 培养液作为种子接入新鲜的 MNMS 培养基中。如此选择性传代培养,得到了能以甲烷作为唯一碳源和能源的混合菌群。

1.2.3 菌株培养:70mL 玻璃培养瓶,装液量为 10mL。按 4%接种量接种后,加盖密封橡胶塞。用已灭菌的医用注射器抽取瓶 30mL 空气,通过已灭菌的气体过滤器注入相同体积的甲烷,使瓶中空气与甲烷的体积比约为 1:1,30℃,170r/min 摇床培养。

1.3 纯种分离

甲烷氧化菌的分离纯化:甲烷氧化混合菌培养液稀释涂 MNMS 固体平板(琼脂含量为 1.5%),将平板置于真空干燥器中,密封后用真空泵抽取干燥器中一定体积的空气,然后再加入相同体积的甲烷。之后将干燥器置于 30℃培养箱,培养 1~2 周,挑取单菌落在上述固体平板上划线分离。同上操作,分离纯化数次。同时在 LB 固体平板上划线培养检验甲烷氧化菌的纯度。当单菌落在 MNMS 固体平板上生长,在 LB 固体平板上不生长即认为甲烷氧化菌纯化成功。

非甲烷氧化菌的分离纯化:甲烷氧化混合菌培养液稀释涂 LB 固体平板(琼脂含量为 1.5%),30℃培养 1~2d,挑取单菌落在 LB 固体平板上划线分离。培养 1d 后,再挑取单菌落再次划线纯化。如此重复纯化 4 次,得到纯化的非甲烷氧化菌。

1.4 MMO 活性测定

反应在 70mL 玻璃培养瓶中进行。反应体系组成如下:10mL pH 7.0 磷酸缓冲溶液,其中包含 5mmol/L $MgCl_2$ 和 20mmol/L 甲酸钠,密封后抽出 30mL 空气,然后加入 30mL 丙烯。反应在 30℃,170r/min 摇床内进行。

1.5 分析方法

1.5.1 细胞浓度:细胞浓度用 660nm 波长下的光密度表示(OD_{660})。

1.5.2 PCR 扩增 16S rDNA、*mmoB*、*mmoX* 和 *pmoA* 基因片段:采用上海华舜生物工程有限公司的细菌染色体 DNA 少量提取试剂盒,提取甲烷氧化混合菌、从中分离纯化的甲烷氧化菌株 Y9 及非甲烷氧化菌的总 DNA,采用细菌 16S rRNA,sMMO 羟化酶的 α-亚基组分 mmoX,调控蛋白(mmoB),pMMO 的 pmoA 亚基基因特异性引物进行 PCR 反应,扩增 16S rDNA、*mmoB*、*mmoX* 和 *pmoA* 基因片段。所用 PCR 引物及反应条件见表 1。

PCR 反应程序:94℃预变性 7min;然后进行 30 个循环的 94℃变性 1min,55℃退火 1min,74℃延伸 2min 的反应;最后,74℃补充延伸 10min。将 PCR 扩增产物在 0.7%琼脂糖凝胶上电泳分离,送到上海生工测序,测序结果利用网址 http://www.ncbi.nlm.nih.gov 和 Blast 程序,将测定得到的 16S rDNA 序列在 GenBank 中与已知微生物的 16S rDNA 序列进行核苷酸同源性分析。

1.5.3 苯酚分析方法:苯酚采用高压液相色谱进行定量分析。分析条件如下:C18 色谱柱,UV 检测器,流动相为 50%甲醇,流速 0.5mL/min,柱温为 30℃,外标法定量。

1.5.4 环氧丙烷分析方法:环氧丙烷采用气相色谱进行定量分析。分析条件如下:AOC-20i 自动进样

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 1　细菌 16S rRNA 和甲烷氧化菌 MMO 功能基因 PCR 引物

Table 1　Primer sequences used for molecular characterization of mixed methanotroph population

Target	Primer	Primer sequence(5′→3′)	Size of product	Annealing temperature/℃	Refs
16S rRNA	F27 R1492	AGAGTTTGATCATGGCTCAG TACGGTTACCTTGTTACGACTT	1.5kb	55	[10]
mmoB	mmof mmor	ATGTCCAGCGCTCATAAC TCAGATGTCGGTCAGGGC	400bp	55	[11]
mmoX	mmof mmor	GGCTCCAAGTTCAAGGTCGAGC TGGCACTCGTAGCGCTCCGGCTCG	535bp	55	[12]
pmoA	pmof pmor	GGGGGAACTTCTGGGGITGGAC GGGGGRCIACGTCITTACCGAA	330bp	50	[13]

器,Porapak Q 色谱柱,FID 检测器,载气为氮气(60mL/min),进样口和检测器温度为 140℃,柱温为 120℃,外标法定量。

2　结果和讨论

2.1　甲烷氧化混合菌生长稳定性测试

通过 14 次传代培养,获得能以甲烷作为唯一碳源和能源的甲烷氧化混合菌。为了能够定量混合菌生长性能的稳定性,在之后传代培养过程中保持培养条件相同,测定细胞浓度和培养液 pH 值。在 70mL 的玻璃培养瓶中分装 10mL MNMS 培养基,按 4%接种量接种后,加盖密封橡胶塞。用已灭菌的医用注射器抽取瓶 30mL 空气,通过已灭菌的气体过滤器注入相同体积的甲烷,使瓶中空气与甲烷的体积比约为 1∶1,然后在 30℃,170r/min 摇床上进行培养。3～4d 后移取其中 0.4mL 培养液作为种子接入新鲜的 MNMS 培养基中,如此重复操作 30 多次。每转接 1 次,认为是传代 1 次。测定每次传代的种子细胞浓度和 pH 值,结果见图 1。

由图 1 可以看出,甲烷氧化混合菌经过连续传代培养,细胞浓度基本稳定,表明混合菌体系是一个能以甲烷作为唯一碳源的、生长性能稳定的甲烷氧化混合菌。在相同培养条件下,混合菌的细胞浓度约为 *M. trichosporium* OB3b 纯培养物的 2 倍。另外,从图中数据还可以看出,铜离子的添加(5μmol/L)还可以提高细胞浓度。

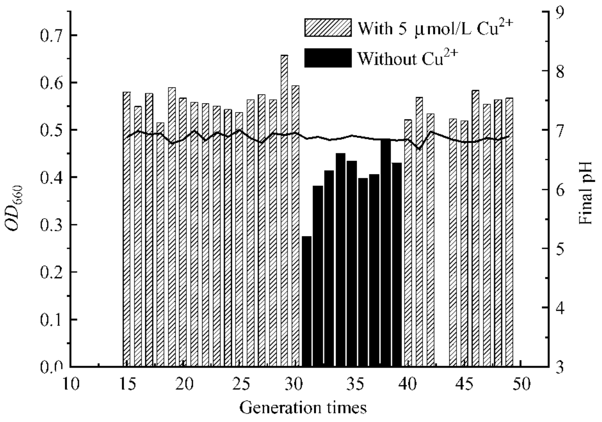

图 1　甲烷氧化混合菌生长稳定性

Fig. 1　Growth stability of the methane-oxidizing mixed microbial consortium.

2.2　甲烷氧化混合菌的苯酚降解特性

虽然甲烷氧化菌的碳源利用范围非常窄,仅为甲烷或甲醇。但由于甲烷氧化菌利用甲烷的关键酶 MMO 对很多含碳化合物,尤其是对苯等芳烃化合物和氯代烃类等有毒化合物具有共代谢特性[11],因此其中存在的非甲烷氧化菌可能以这些共代谢产物为生长底物,从而实现对这些有毒物质的完全降解。到目前为止,有很多关于甲烷氧化混合菌处理地下水中三氯乙烯、二氯甲烷等研究报道[11,12]。

苯酚是重要的化工原料,也是一种常见的工业污染物。苯酚可作用于中枢神经而引起痉挛;对水中生物有致畸性,使生物具有难闻的酚味。本文以苯酚为模型化合物,考察了得到的甲烷氧化混合菌对苯酚的生长耐受性(0～1000mg/L)及降解特性。

好氧条件下,以不同浓度苯酚作为唯一碳源,培

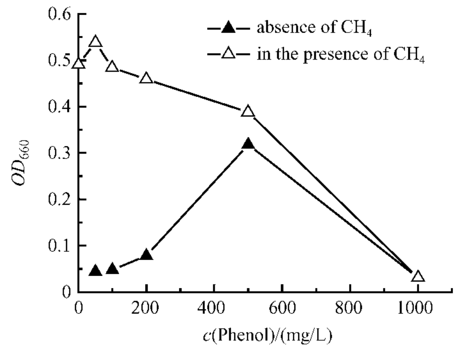

图 2　苯酚浓度对甲烷氧化混合菌生长的影响

Fig.2　Effect of phenol concentrations on the growth of the methane-oxidizing mixed microbial consortium with or without the presence of methane.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

养3d，测定甲烷氧化混合菌的细胞浓度(图2)。结果表明，甲烷氧化混合菌能以苯酚作为唯一的碳源和能源，测试条件下其最佳苯酚生长浓度为500mg/L。另外，在甲烷∶空气体积比约为1∶1条件下，添加不同浓度苯酚，培养3d，测定甲烷氧化混合菌的细胞浓度(图2)。结果表明，甲烷的存在有利于菌体的生长；甲烷的存在与否，菌体浓度与初始苯酚浓度的关系有很大的差异。同时，在苯酚和甲烷两种碳源同时存在条件下，随着苯酚浓度的增大，细胞浓度减小，表明高浓度苯酚的存在对混合菌群的生长产生抑制作用。可能是由于苯酚对蛋白的变性作用导致的细胞毒性，从而抑制细胞生长。

进一步，以约600mg/L苯酚为唯一碳源，考察甲烷氧化混合菌随时间对苯酚的降解情况，结果表明(图3)，所得甲烷氧化混合菌具有高效苯酚降解能力，对初始浓度为600mg/L的苯酚，经过11h生长，苯酚降解率可达99%。

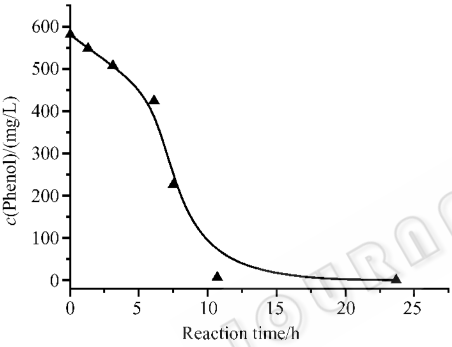

图3 混合菌对苯酚的降解曲线

Fig.3 Time course of phenol degradation by the methane-oxidizing mixed microbial consortium.

2.3 甲烷氧化混合菌氧化丙烯生成1,2-环氧丙烷

sMMO和pMMO均能氧化丙烯生成环氧丙烷，为此研究者们把丙烯氧化生成环氧丙烷作为MMO总活性测定的标准反应[13]。环氧丙烷本身是重要的基础化工原料，大量用于聚氨酯塑料、不饱和树脂和表面活性剂的生产，其衍生物还广泛用于食品、烟草、医药及化妆品等行业。已生产的下游产品近百种，是精细化工产品的重要原料，发展前景广阔。目前工业上主要采用过酸、过氧化物或氯醇法生产环氧丙烷，这些方法都存在环境污染和生成大量联产品等问题。因此，寻找无污染、成本低的新方法一直倍受学术界和工业界的关注。甲烷氧化菌中的MMO由于可在常温常压下直接用空气作氧化剂，且无污染、腐蚀性小，显示出了巨大的应用潜力[10~14]。兰州化物所辛嘉英等以*Methylomonas* sp. GYJ3为生物催化剂进行了大量的工作，取得了可喜的研究成果[15]。

和甲烷氧化菌纯种培养相比，甲烷氧化混合菌具有易获得、生长速率快、生长稳定且不易被杂菌破坏的优势，利用其中甲烷氧化菌的MMO生产环氧丙烷和甲醇等有用化学物质具有潜在的应用前景。但是，虽然甲烷氧化混合菌能以甲烷作为唯一的碳源和能源，表明存在MMO，但由于其中非甲烷氧化菌的存在，能否在MMO氧化丙烯之后积累环氧丙烷值得研究。但到目前为止，还没有相关的报道。为此，本文对此进行了初步探索。

离心收集生长至对数生长期的甲烷氧化混合菌，重悬于磷酸缓冲溶液，密封，加入丙烯进行反应，一定时间后取反应液，用气相色谱进行分析(图4-A)。图4-A中存在保留时间(Rt)分别为0.8min、1.2min和6.2min的3个峰，其中Rt为1.2min代表丙烯。Rt为6.2min与1,2-环氧丙烷标准品(图4-B)峰的保留时间相同，根据已知的MMO的催化特性，可以判断本研究得到的甲烷氧化混合菌具有氧化丙烯生成环氧丙烷的能力。

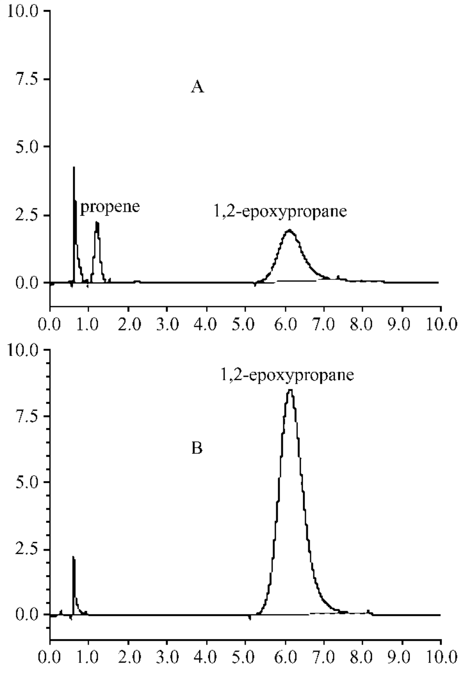

图4 1,2-环氧丙烷气相色谱分析谱图

Fig.4 GC analysis of 1,2-epoxypropane. A: 1,2-epoxypropane standard chemical; B: sample after reaction with propene as the substrate.

2.4 丙烯生物转化生成环氧丙烷动力学

分别收集在加铜(5μmol/L)和不加铜条件下生长的甲烷氧化混合菌用于丙烯转化生产环氧丙烷。测定反应液相中环氧丙烷浓度随时间的变化，得到

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

甲烷氧化混合菌氧化丙烯生产环氧丙烷的动力学曲线,结果见图5。由图可知,在该反应条件下,甲烷氧化混合菌能很快氧化丙烯,积累环氧丙烷。不加铜条件下生长的甲烷氧化混合菌,反应3h,生成的环氧丙烷到达最大并保持稳定。在加铜条件下生长的甲烷氧化混合菌,反应前6h,环氧丙烷浓度逐渐增加,但到反应8h时,浓度略有下降。其单位细胞浓度(以 OD_{660} 表示)环氧丙烷的生产能力为 0.85mmol/L/OD_{660},是不加铜条件下(0.48mmol/L/OD_{660})的1.8倍。

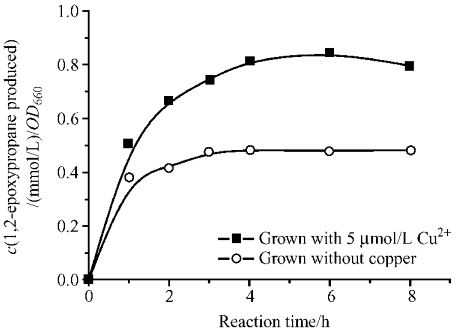

图5 甲烷氧化混合菌的环氧丙烷生成曲线

Fig.5 Time course of 1,2-epoxypropane production from propene by the methane-oxidizing mixed microbial consortium grown with or without the presence of copper.

2.5 磷酸盐浓度对环氧丙烷生成的影响

研究表明,在甲烷氧化菌氧化甲烷生成甲醇的反应体系中,以高浓度磷酸盐缓冲溶液作为反应介质,可以对甲烷氧化菌中的甲醇脱氢酶产生抑制作用从而到达胞外积累甲醇的目的[15]。但是,高浓度磷酸盐除了对甲醇脱氢酶产生抑制作用外,对MMO也具有抑制作用。为了充分发挥MMO的催化性能,实现环氧丙烷的高效积累,考察了反应体系中磷酸盐浓度对环氧丙烷生成的影响。在磷酸盐浓度分别为20、40、60、80和100mmol/L的反应体系中,测定反应液相中环氧丙烷浓度随时间的变化,如图6所示。由图6-A可以看出,反应液相中环氧丙烷的浓度随反应时间的进行,先迅速增大,然后降低。这种现象与 *Methylomonas* sp. GYJ3催化丙烯生产环氧丙烷的反应特性不同[7],具体原因有待进一步研究。另外,图6-A显示,随反应体系中磷酸盐浓度的增加,环氧丙烷的最大积累浓度降低。在20mmol/L磷酸盐缓冲溶液体系中,环氧丙烷的最大积累浓度可以达到5.0mmol/L,大于以 *Methylomonas* sp. GYJ3纯培养物为催化剂时环氧丙烷生成浓度(小于1.6mmol/L)[15]。图6-B是以反应30min时环氧丙烷生成浓度计算所得MMO比活性。结果表明,随着反应体系中磷酸盐浓度的增加,MMO比活性降低,显示出高浓度磷酸盐对MMO的抑制作用。

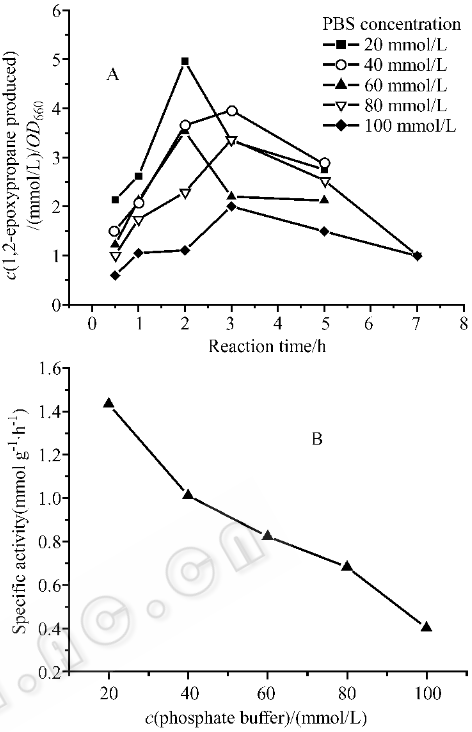

图6 磷酸盐浓度对环氧丙烷生产的影响

Fig.6 Effect of phosphate buffer concentration on the production of 1,2-epoxypropane from propene by the methane-oxidizing mixed microbial consortium.

2.6 甲烷氧化混合菌中菌群结构的解析

以甲烷作为唯一碳源的MNMS固体平板和LB固体平板上,采用纯种分离方法,从甲烷氧化混合菌中分离纯化得到1株甲烷氧化菌和4株能在LB固体平板上生长的非甲烷氧化菌。将分离纯化的甲烷氧化菌和非甲烷氧化菌分别在MNMS和LB液体中培养,9000r/min离心10min,菌体用于总DNA的提取。然后以F27和R1492为引物,采用PCR方法从总DNA中分别扩增得到各自约1.5kb的16S rRNA基因。将PCR扩增产物送到上海生工测序,根据 http://www.ncbi.nlm.nih.gov 数据库和Blast程序,将测定得到的16S rDNA序列与Genbank中已知的微生物的16S rDNA序列进行核苷酸同源性分析。分离纯化的1株甲烷氧化菌与 *Methylosinus trichosporium* 的同源性为99%以上,因此将其命名为 *M. trichosporium* Y9。4株非甲烷氧化菌的16S rDNA序列分别与 *Acinetobacter junii*、*Cupriavidus metallidurans*、*Comamonas testosteroni* 和 *Stenotrophomonas maltophilia* 的同源性都为99%以上。关于甲烷氧化

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

混合菌降解三氯乙烯等有机污染物的报道很多,但对于混合菌中菌群结构的解析报道较少。近年来逐渐有采用 PCR 技术,结合 16S rRNA 和 MMO 功能基因解析甲烷氧化混合菌群结构的报道。Martin 等[16]采用同样的方法筛选得到能降解多种有机污染物的甲烷氧化混合菌,采用 16S rRNA 基因分析测序,结果表明混合菌中优势甲烷氧化菌属于 *Methylosinus*/*Methylocystis* spp.,其中至少包含 4 种分别属于 *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Janthinobacterium* 和 *Rubivivax* 的非甲烷氧化菌。我们得到的甲烷氧化混合菌群结构与 Hesselso 等[16]报道的存在很大的差异,特别是非甲烷氧化菌的组成差异较大。

2.7 甲烷氧化混合菌 MMO 基因分析

甲烷氧化菌中 MMO 以 sMMO 和 pMMO 两种不同形式存在。采用选择性培养基,从甲烷氧化混合菌中分离纯化得到了属于 *Methylosinus trichosporium* 的Ⅱ型甲烷氧化菌。已有的研究表明,*Methylosinus* 种属甲烷氧化菌中,两种形式的 MMO 均存在。为此,本文进一步采用 *Methylosinus* 中 sMMO 羟化酶(MMOH)的 α-亚基 mmoX,调控蛋白 B(mmoB),pMMO 的 pmoA 亚基基因特异性引物进行 PCR 反应,从混合菌及 *M. trichosporium* Y9 总 DNA 中扩增得到长度分别为 535、400 和 330bp 的 *mmoX*、*mmoB* 和 *pmoA* 基因片段,如图 7 所示。结果表明,本研究中的甲烷氧化混合菌的 MMO 具有 sMMO 和 pMMO 两种形式,通过对从甲烷氧化混合菌中分离纯化得到的甲烷氧化菌进行 PCR 产物测序,结果发现其与 *Methylosinus trichosporium* 的同源性为 99.9%。

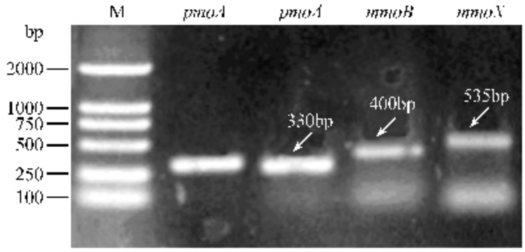

图 7 菌株 Y9 的 MMO 基因片段 PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 7 Electrophoresis analysis of MMO gene fragments of *M. trichosporium* Y9 amplified by PCR.

3 结论

本文以甲烷作为唯一碳源和能源,从农业土壤样品中筛选得到生长性能稳定的甲烷氧化混合菌,分别以苯酚和环氧丙烷作为目标对象,考察了该混合菌对有机污染物的降解及用于生产有用化学物质的催化特性。进一步,采用纯种分离方法结合 PCR、16S rRNA 和 MMO 功能基因分析技术对混合菌群结构进行了解析。得到了如下结论:

①本文筛选得到的甲烷氧化混合菌具有苯酚降解特性,能以苯酚作为唯一的碳源和能源,其最佳生长苯酚浓度为 500mg/L。对于初始浓度约 600mg/L 的苯酚,经过 11h 的生长,苯酚降解率可达 99%。

②甲烷氧化混合菌能催化丙烯生成 1,2-环氧丙烷,降低反应体系中磷酸盐浓度可有效增加 MMO 活性,提高环氧丙烷的生成浓度,最大可达 5mmol/L,具有潜在的应用价值。

③甲烷氧化混合菌由Ⅱ型甲烷氧化菌 *Methylosinus trichosporium* 和至少 4 种非甲烷氧化菌(*Acinetobacter junii*、*Cupriavidus metallidurans*、*Comamonas testosteroni* 和 *Stenotrophomonas maltophilia*)组成。

参 考 文 献

[1] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic Bacteria. *Microbiol Rev*, 1996, **60**:439 - 471.

[2] Murrell JC, McDonald IR, Gilbert B. Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions. *Trends Microbiol*, 2000, **8**:221 - 225.

[3] Anthony C. Bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv Microb Physiol*, 1986, **27**:113 - 210.

[4] Takeguchi M, Furuto T, Sugimori D, *et al*. Optimization of Methanol Biosynthesis by *Methylosinus trichosporium* OB3b: an approach to improve methanol accumulation. *Appl Biochem Biotechnol*, 1997, **68**:143 - 152.

[5] Burrows KJ, Cornish A, Scott D, *et al*. Substrate specificities of the soluble and particulate methane monooxygenases of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J Gen Microbiol*, 1984, **130**:3327 - 3333.

[6] Green J, Dalton H. Substrate Specificity of Soluble Methane Monooxygenase: Mechanistic Implications. *J Biologic Chem*, 1989, **264**(30):17698 - 17703.

[7] Xin JY, Cui JR, Zhu LM, *et al*. Epoxypropane Biosynthesis by *Methylomonas* sp. GYJ3: Batch and Continuous Studies. *World J Microbiol Biotechnol*, 2002, **18**:609 - 614.

[8] Scheutz C, Mosbak H, Kjeldsen P. Attenuation of methane and volatile organic compounds in landfill soil covers. *J Environ Qual*, 2004, **33**:61 - 72.

[9] Helm J, Wendlandt KD, Rogge G, *et al*. Characterizing a stable methane-utilizing mixed culture used in the synthesis of a high-quality biopolymer in an open system. *J Appl Microbiol*, 2006, **101**:387 - 395.

[10] Park S, Hanna L, Taylor RT, *et al*. Batch Cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. Ⅰ: Production of Soluble Methane Monooxygenase. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **38**:423 - 433.

[11] Fox BG, Borneman JG, Wackett LP, *et al*. Haloalkene Oxidation by the Soluble Methane Monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: Mechanistic and environmental implications. *Biochemistry*, 1990, **29**:6419 - 6427.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[12] Cornish A, MacDonald J, Burrows KJ, *et al*. Succinate as an in vitro Electron Donor for the Particulate Methane Mono-oxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biotechnol Lett*, 1985, **7**(5): 319 - 324.

[13] McDonald IR, Kenna EM, Murrell JC. Detection of Methanotrophic Bacteria in Environmental Samples with the PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 116 - 121.

[14] Cheng YS, Halsey JL, Fode KA, *et al*. Detection of Methanotrophs in Groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(2): 648 - 651.

[15] 辛嘉英,崔俊儒,陈建波,等. 甲基单胞菌 GYJ3 催化环氧丙烷的半连续合成. 分子催化,2001,**15**(3):206 - 210.

[16] Hesselsoe M, Boysen S, Iversen N, *et al*. Degradation of Organic Pollutants by Methane Grown Microbial Consortia. *Biodegradation*, 2005, **16**(5): 435 - 448.

Study on the structure and function of a stable methane-oxidizing mixed microbial consortium

LUO Ming-fang, WU Hao, WANG Lei, XING Xin-hui*

(*Institute of Biochemical Engineering*, *Department of Chemical Engineering*, *Tsinghua University*, *Beijing* 100084, *China*)

Abstract: From an agricultural sample taken in Chongqing, a stable methane-oxidizing mixed microbial consortium was established by enrichment culture with methane as a sole source of carbon and energy. The mixed consortium showed high capability of phenol degradation and 1,2-epoxypropane production from propene. More than 99% of phenol at an initial concentration of 600mg/L could be degraded by the mixed microbial consortium after 11 h of cultivation. The productivity of 1,2-epoxypropane could be increased with the decrease of phosphate concentration. The concentration of 1,2-epoxypropane produced could reach to 5.0mmol/L. The bacterial structure of the methane-oxidizing mixed microbial consortium was analyzed by pure culture isolation combining with 16S rRNA and PCR of the related MMO functional genes. The results showed that the methane-oxidizing mixed microbial consortium was composed of a type II methanotroph identified as *Methylosinus trichosporium* and at least 4 kinds of heterotrophs (*Comamonas testosteroni*, *Cupriavidus metallidurans*, *Acinetobacter junii* and *Stenotrophomonas maltophilia*). *M. trichosporium* Y9, isolated from the mixed consortium, harbored both sMMO and pMMO genes.

Keywords: Phenol; Epoxypropane; Methanotrophs; Mixed microbial consortium; *Methylosinus trichosporium*

Foundation items: National Natural Science Foundation (20606036); Key Project of National Natural Science Foundation of China (20336010); PetraChina Science and Technology Venture Innovative Research Project; China Postdoctoral Science Foundation (2004036115, 2005037366)

* Corresponding author. Tel: 86-10-62794771; Fax: 86-10-62790304; E-mail: xhxing@tsinghua.edu.cn

Received: 12 May 2006/ Accepted: 17 August 2006/ Revised: 23 July 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn