

一株甲烷利用菌的分离及其在甲烷气体测定中的应用

赵良贵^{1,2}, 郑军¹, 温广明², 杨素萍¹, 董川^{2*}

(¹山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

(²山西大学化学化工学院, 太原 030006)

摘要: 从山西太原晋阳湖水样中分离得到一株能以甲烷为唯一碳源生长的菌株 ME16。气相色谱分析表明 ME16 菌株能利用甲烷。ME16 菌株的 16S rDNA 序列与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 10145, AF094713)相似性为 99%。该菌株最适培养条件为 30℃、2%接种量、25% 甲烷含量和培养基 pH 为 6.0。用电化学法研究了 ME16 固定化细胞体系中不同含量甲烷对溶氧的响应时间以及溶氧变化与甲烷含量的关系。结果表明, 加入固定化细胞后, 溶氧变化在 100s 内达到平衡, 溶氧消耗量与通入甲烷气体含量在 0~16%呈线性关系, 相关系数为 0.9954。对样品气体 8 次测量, RSD 为 3.34%, 表明该反应体系重现性良好, 为该菌株进一步研究甲烷传感器奠定基础。

关键词: 甲烷利用; 假单胞菌; 甲烷测定; 电化学

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0398-05

甲烷(CH₄)是煤矿瓦斯、煤层气和垃圾堆放产生的主要气体, 易燃易爆, 甲烷的温室效应在全球气候变暖中的份额约为 15%, 等量甲烷造成的温室效应约是二氧化碳的 22 倍^[1,2], 快速检测甲烷的产生源、泄露源及在环境中的含量有着十分重要的意义。甲烷理化性质极不活泼, 准确、快速的对其进行检测已成为世界性难题。目前甲烷的检测方法主要包括载体催化法、半导体气敏传感器法、吸收型光纤传感器法等, 仍具有不稳定、寿命短、矫正繁琐、易中毒和仪器复杂等缺陷, 在数量和质量上无法满足甲烷测量的发展要求, 电化学法及红外光谱等其它方法尚处于研究水平^[3,4]。因此, 研制低成本、高灵敏度和良好选择性的甲烷传感器具有重大意义和广阔前景。

甲烷利用菌是一类能利用甲烷作为碳源和能源进行生长繁殖的细菌, 广泛分布于自然环境中。国外已有利用甲烷氧化菌制备微生物传感器测定水域环境中甲烷含量的报道, 所用菌种仅为 *Methylosinus*

trichosporium 和 *Methylomonas flagellata*^[5-7], 还未见有其它微生物用于甲烷传感器研究的报道, 而寻找简便、快速的甲烷分析方法一直备受重视。为了挖掘更适合于甲烷传感器的微生物资源, 本文以甲烷为唯一碳源从晋阳湖水中分离得到一株能利用甲烷的 ME16 菌株, 16S rDNA 序列分析初步鉴定 ME16 菌株是铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 并利用电化学方法初步研究了 ME16 固定化细胞体系中不同含量甲烷对溶氧的响应时间以及溶氧变化与甲烷含量的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 水样: 山西太原晋阳湖水面下约 0.5 m 处采集。

1.1.2 培养基: 无机盐培养基: 每升含 KH₂PO₄ 0.5 g, Na₂HPO₄ 0.5 g, NaCl 0.4 g, KNO₃ 1.0 g, NH₄Cl 0.5 g,

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(50534100)

*通讯作者。Tel: +86-351-7018338; E-mail: dc@sxu.edu.cn

作者简介: 赵良贵(1964-), 常用名赵春贵, 男, 山西榆次人, 副教授, 研究方向为资源微生物开发与应用。Tel: +86-351-7016119;

E-mail: chungui@sxu.edu.cn

收稿日期: 2007-07-24; 修回日期: 2007-11-12

MgSO₄·7H₂O 1.0 g, CaCl₂ 0.2 g, FeSO₄·7H₂O 0.004 g, CuSO₄·5H₂O 0.004 g, MnSO₄·H₂O 0.004 g, ZnSO₄·7H₂O 0.004 g, NaMoO₄·2H₂O 0.00024 g;

固体培养基：含有 2%琼脂的无机盐培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器：聚乙烯醇(PVA1799 ±50); 甲烷气体(1%, 1.5%, 3%, 5%, 10%, 16%, 99.99%)、氧气(99.99%)，购自太原钢铁集团; *Taq* 酶、引物合成及其它生化试剂购自大连宝生物公司; 其它化学试剂均为国产分析纯。GC9800 型气相色谱仪购自上海科创色谱有限公司; Xplorer GIX 溶氧测定仪购自 Pasco Scientific, USA。

1.2 菌种的富集和分离纯化

以 5%的接种量将水样接入盛有 100 mL 无机盐培养基的 600 mL 盐水瓶中，气相部分含有体积比为 10%甲烷气体，倒置密闭 120 r/min 摇床振荡，30℃培养，待菌液浑浊后，再次转接进行富集培养。经无机盐琼脂培养基平板划线分离，置于含有 10%甲烷气体的玻璃干燥器中 30℃培养。在相同培养条件下设置不含甲烷的对照实验。

1.3 形态与培养特征的观察

菌体染色后在光学显微镜下观察细胞形态。无机盐琼脂培养平板上观察菌落特征。

1.4 碳源利用

离心收集液体培养物菌体，无菌水洗涤，接种于含有 20 mL 液体培养基的 130 mL 盐水瓶中，液体培养基中分别添加终浓度为 1%不同种类的碳源。

1.5 利用甲烷能力的测定

挑取单菌落于盛有 20 mL 培养基的 130 mL 盐水瓶中，气相部分含有体积比为 5%甲烷气体，倒置密闭于 120 r/min 摇床振荡，30℃培养。分别在不同培养时间从培养瓶气相中取样 10 μL 气相色谱仪检测甲烷含量，检测器为氢火焰检测器，按外标法以峰面积计算甲烷含量。

1.6 16S rDNA 序列分析

按文献[8]方法提取菌体 DNA，以 DNA 为模板，5'-AGTTTGATCCTGGCTCA-3 和 5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3 为引物，进行 PCR 扩增。扩增条件为：94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min, 循环 30 次; 72℃ 10 min。PCR 扩增产物参照文献[8]方法，经克隆后送上海生工测序。测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对。

1.7 温度、接种量、甲烷浓度和培养基 pH 对细菌生长的影响

以 OD₆₀₀ 为 0.1 的液体纯培养物为接种物，在盛

有 100 mL 无机盐培养基的 600 mL 盐水瓶中，120 r/min 摇床振荡培养，研究了培养温度、接种量、甲烷含量和初始培养基 pH 四个因素对细胞生长的影响，以培养 150 h 的细胞生物量为测定指标。

1.8 菌体生物量的测定

离心收集液体培养物菌体，洗涤后加入原体积无菌水，于 600 nm 处测定菌液 OD 值。

1.9 固定化细胞的制备

称取 PVA，加热搅拌溶解，配制成 10%的 PVA 溶液，冷却到 35℃左右，按 3%比例加入 150 h 液体培养物收集的湿菌体，混匀，用 6 号针头将其滴入 pH 6.0 饱和硼酸溶液中过夜^[9]。

2.0 固定化细胞反应体系中甲烷含量与溶氧变化的关系

在 25℃恒温条件下，以 50 mL 的烧杯中装有 20 mL pH 7.4 0.05mol/L 磷酸缓冲液为反应体系，置入溶氧电极，通入氧气与不同含量的甲烷气体，溶氧测定仪检测体系溶氧变化，通气 1 min 体系溶氧平衡，停止通气，加入 PVA-硼酸固定化细胞，体系溶氧降低直至平衡，记录溶氧值。加入固定化细胞前后的溶氧差值即为细菌消耗的溶氧量。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离及形态、培养特征及碳源利用

两次富集培养液经反复平板划线获得菌株 ME16。该菌株在不含甲烷气体的对照液体和固体培养基中均不生长，而在含甲烷的培养瓶中生长良好。ME16 菌株在无机盐固体培养基平板上培养 8 d，菌落直径 0.5 mm~1 mm，黄色，圆形，稍隆起，边缘光滑，较湿润，不透明。细胞短杆状，0.8 μm~1.1 μm × 1.7 μm~2.1 μm，革兰氏阴性，无荚膜和芽孢，能运动。碳源利用实验表明，该菌株能利用葡萄糖、D-果糖、柠檬酸、苯丙氨酸、甲苯、苯酚、正十六烷、甲烷、甲醇、乙醇和煤油，不能利用海藻糖、甘露醇、甲醛、甲酸和甘油。

2.2 菌株 ME16 利用甲烷能力的测定

利用气相色谱测定不同培养时间培养瓶气相部分中甲烷含量，结果显示(图 1)，培养 100 h 培养瓶中的甲烷含量有所降低，培养 150 h，培养瓶中的甲烷含量降低了 65%，表明该菌株能较好利用甲烷。

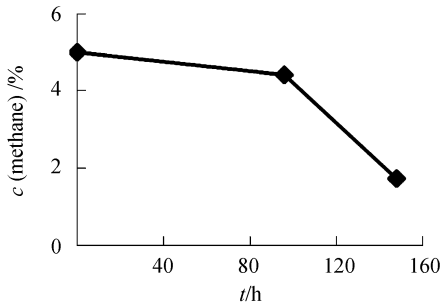


图1 不同培养时间菌株ME16对甲烷的利用
Fig. 1 Capacity of methane utilization of strain ME16 at different incubation time.

2.3 16S rDNA 序列分析

由于 ME16 菌株能利用甲烷作为唯一碳源生长, 故对该菌株进行了 16S rDNA 序列分析。GenBank 登录号为 EF650089。结果表明: ME16 菌株与 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145(登录号 AF094713)的 16S rDNA 序列同源性达到 99%, 而与甲烷氧化菌甲基单胞菌属和甲基球菌属 16S rDNA 序列同源性仅为 87%和 89%。结合菌体形态特征, 初步将 ME16 菌株鉴定为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

2.4 温度、接种量、甲烷含量和培养基 pH 对细菌生长的影响

图 2 为温度、接种量、甲烷含量和初始培养基 pH 对细菌生长的影响结果, 培养温度 30℃、接种量为 2%、甲烷含量 25%和起始培养基 pH 在 5~7 范围内 ME16 菌株生长良好。当甲烷含量在一定范围内, 随甲烷含量提高, 菌体生物量升高, 甲烷含量继续增加, 菌体生物量则下降。当甲烷与空气中氧气含量大致相等时, 细菌生物量较高, 表明该菌株在有氧条件下能利用甲烷。因此, 在不同甲烷含量条件下测定了该菌株的生长曲线。

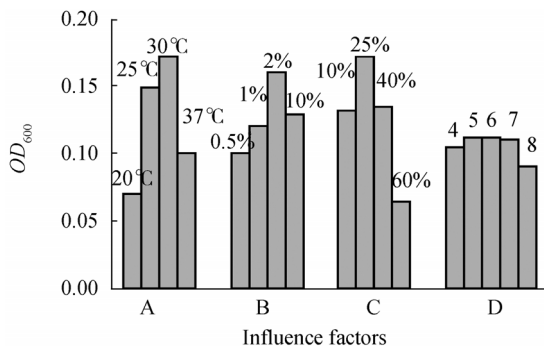


图2 温度、接种量、甲烷含量和pH对菌株ME16生长的影响
Fig. 2 Effects of temperature, inoculum volume, methane content and pH on cell growth of strain ME16. A: Temperature; B: Inoculum volume; C: Methane content; D: pH.

2.5 生长曲线测定

在 130 mL 盛有 20 mL pH 7.0 无机盐培养基的盐水瓶中, 设置气相部分甲烷含量分别为 5%和 25%, 以 OD_{600} 为 0.1 的液体纯培养物为菌种, 接种量为 2%, 于 120 r/min 摇床振荡 30℃培养测定该菌株的生长曲线。图 3 结果表明: 生长延滞期约 20 h, 20 h 后进入对数生长期。当甲烷含量较高时, 细菌生长快, 生物量高, 进一步表明该菌株具有利用甲烷的能力。

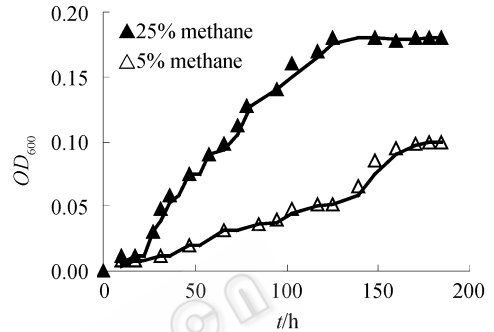


图3 不同甲烷含量对菌株ME16对生长的影响
Fig. 3 Effect of different methane content on cell growth of strain ME16.

2.6 固定化细胞反应体系中甲烷含量与溶氧变化的关系

ME16 菌株能够在氧气存在下较好的利用甲烷, 因而测定了该菌株利用甲烷与溶氧变化的关系。本实验利用溶氧测定仪测定固定化细菌消耗体系中溶氧来分析甲烷含量, 在磷酸盐缓冲液中, 同时通入氧气和一定含量的甲烷气体, 待体系溶氧达到平衡, 加入一定量的固定化细菌, 菌体利用甲烷, 则体系溶氧下降, 直至达到平衡即为甲烷测量的响应时间。甲烷含量高, 体系溶氧下降的幅度大, 由此测定了通入体系的甲烷含量与体系溶氧变化的关系。

图 4 为不同含量甲烷测量的响应时间, 当体系中含有甲烷时, 加入固定化细菌, 体系溶氧迅速下降, 随着甲烷含量的增加响应时间有所延长, 溶氧消耗量增大, 在所测量的 1%~16%甲烷含量范围内, 溶氧下降在 100 s 内达到平衡。

图 5 为不同含量的甲烷与溶氧消耗量的关系, 通入体系中的甲烷含量增大, 细菌对溶氧的消耗量增多, 以甲烷含量对相应的溶氧消耗量作图, 体系溶氧的消耗量(y)与通入甲烷的含量(x)在 0~16%范围内具有良好的线性关系, 拟合方程为 $y=0.19167x + 0.0288$, 相关系数为 0.9954。

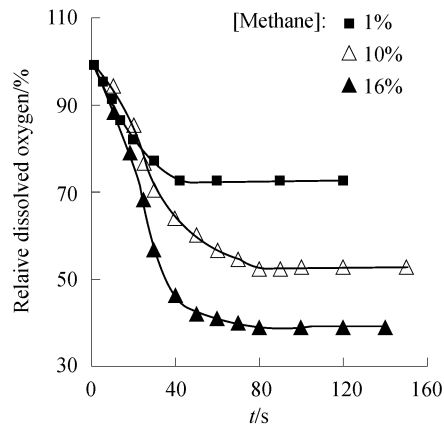


图4 不同含量甲烷的响应时间

Fig. 4 Response time in different methane content.

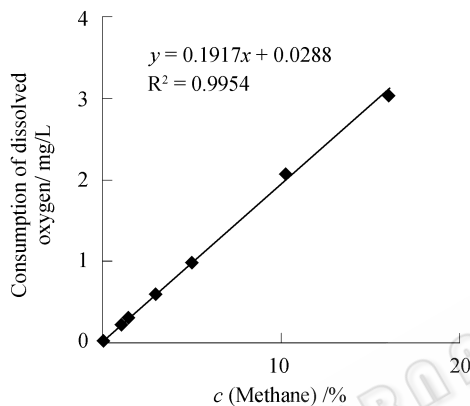


图5 不同含量甲烷与溶氧消耗量的关系

Fig. 5 Relationship between dissolved oxygen consumption and different methane content.

以 5% 甲烷气体为样品, 经过 8 次测定, 测定值为 4.99%, RSD 为 3.34%。

上述结果表明: 以固定化 ME16 菌体, 采用电化学的方法测定甲烷的响应时间快, 溶氧变化与甲烷浓度具有较好的线性关系, 测定重复性良好。

3 讨论

甲烷的性质非常稳定, 在常温下很难氧化, 但除少数厌氧微生物利用甲烷外^[10], 绝大部分甲烷利用细菌能在常温、常压且有氧条件下, 由细菌胞内的单加氧酶系催化转化甲烷, 这种独特的性质, 近年来备受关注。利用甲烷的细菌种类较多, 其研究主要涉及生成醇类等中间代谢产物、不饱和烷烃转化为相应的环氧化物等^[11], 而用于甲烷传感器研究的微生物仅有 *Methylosinus trichosporium*、*Methylomonas flagellata* 的报道^[5-7]。其原理是甲烷氧化菌利用甲烷

是一个耗氧的过程, 分别采用溶氧电极和气敏氧电极, 建立了相应的测定方法, 其中一种甚至达到了微型化, 初步进行了水域和稻田甲烷含量的测定^[5,6], 为微生物传感器研究奠定了基础。

假单胞菌广泛分布在土壤和水域中, 研究主要集中在医药学耐药性和致病性方面, 以及降解利用芳香烃、酚类、萜烯、甾类等有机物, 这种降解活性与其具有双加氧酶系有关^[12,13]。据文献报道某些假单胞菌菌株也能编码单加氧酶, 可以氧化长链烷烃^[14], 但未见有假单胞菌利用甲烷的报道。而本实验室分离得到一株假单胞菌 ME16, 并证明其在氧气存在下能利用甲烷, 这可能与该菌株含有单加氧酶有关。

由于该菌株能利用甲烷, 因此设计了一种简单的测量装置, 以溶氧测定仪和该细菌进行了甲烷含量的测定。反应体系通入气体后, 需要加入细菌利用甲烷而耗氧, 测量完毕需取出细菌再次通气, 为了将微生物能够方便的从反应体系中加入或取出, 满足多次测量的要求, 因此对该菌株进行固定化。选择了 PVA-硼酸固定化方法^[9], 由于该法具有菌体存活时间长、气体扩散性能好, 不易粘连, 能满足多次测量的要求。利用固定化细胞进行甲烷含量测定, 反应的响应时间在 100 s 内, 甲烷含量在 0~16% 呈线性关系, 再以太钢集团提供的 5% 标准甲烷气体为样品经多次测量, 测定结果与样品含量吻合, 重复性好, 为进一步矿坑瓦斯气体微生物甲烷传感器研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Dickinson RE, Cicerone RJ. Future global warming from atmospheric trace gases. *Nature*, 1986, 319: 109-115.
- [2] Amato FD, Mazzinghi P, Castagnoli F. Methane analyzer based on TDL's for measurements in the lower stratosphere: design and laboratory tests. *Applied Physic*, 2002, B75: 195-202.
- [3] 潘文娜, 武林, 周正利. 吸收型光纤甲烷传感器的研究进展. 光通信技术(*Optical Communication Technology*), 2004, 28(10): 48-50.
- [4] 李巍, 黄世震, 陈文哲. 甲烷气体传感元件的研究现状与发展趋势. 福建工程学院学报 (*Journal of Fujian University of Technology*), 2006, 4(1): 4-8.
- [5] Damgaard LR, Revsbech NP. A microscale biosensor for methane containing methanotrophic bacteria and an internal oxygen reservoir. *Anal Chem*, 1997, 69: 2262-2267.
- [6] Damgaard LR, Nielsen LP, Revsbech NP. Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor.

- Water Res.*, 2001, 35(6): 1379–1386.
- [7] Tadashi O, Isao K, Shuichi S. Microbial sensor system which uses *Methylomons* sp. for the determination of methane. *Appl Microbiol Biot*, 1981, 12(2): 102–106.
- [8] Ausubel FM, Kingston RE, Brent R. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [9] He F, Hu WR, Li YZ. Investigation of isolation and immobilization of a microbial consortium for decoloring of azo dye 4 BS. *Water Res.*, 2004, 38: 3596–3604.
- [10] 闵航, 谭玉龙, 吴伟祥, 等. 一个厌氧甲烷氧化菌菌株的分离、纯化和特征研究. 浙江大学学报(*Journal of Zhejiang University*), 2002, 28(6): 619–624.
- [11] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic Bacteria. *Microbiol Rev.*, 1996, 60(2): 439–471.
- [12] 李习武, 刘志培. 石油烃类的微生物降解. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2002, 42(6): 764–767.
- [13] 王琳, 邵宗泽. 四株苯系物降解菌菌株的筛选鉴定、降解特性及其降解基因研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(5): 753–757.
- [14] 杨国君, 宋若海, 华兆哲等. 两株假单胞菌对烷烃的摄取和降解. *过程工程学报(The Chinese Journal of Process Engineering)*, 2005, 5(2): 188–192.

Isolation of a methane-utilizing bacterium and its application in measuring methane gas

Gengui Zhao^{1,2}, Jun Zheng¹, Guangming Wen², Suping Yang¹, Chuan Dong^{2*}

(¹ Institute of Biotechnology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

(² College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: A bacterial strain ME16 was isolated from Jinyang Lake in Taiyuan of Shanxi Province, China. Gas chromatography analysis showed that the strain could use methane as the sole carbon and energy source. Based on 16S rDNA sequence analysis, the strain was identified as *Pseudomonas aeruginosa*. Effects of inoculum size, temperature, methane content and initial pH of media on cell growth were studied. In addition, we examined the response time of methane gas to dissolved oxygen and the relationship between consumption of dissolved oxygen and different methane gas content with PVA-H₃BO₃ immobilized cell of ME16 using electrochemical method. The optimal conditions for cell growth were 2% inoculum size, 25% methane content, 30°C and pH 6.0. Response time was within 100 s after adding of immobilized cells to reaction system. The linear range of measured methane content was from 0 to 16%, with the correlation coefficient 0.9954. Hence, this strain has potential application in developing of methane biosensor.

Keywords: Methane utilization; *Pseudomonas*; Methane determination; Electrochemistry

Supported by the Key Project of National Natural Science foundation of China(50534100)

*Corresponding author. Tel: +86-351-7018338; E-mail: dc@sxu.edu.cn

Received: 24 July 2007/ Revised: 12 November 2007

答 作 者 问

问: 我的文章现已审查完毕, 并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询, 如果文章修改后, 再次投递, 是否还需要交稿件受理费? 是否仍然用原论文编号提交?

答: 这要分 2 种情况, (1)如果你的文章已经被通知“退稿”了, 那么文章修改之后再投来的将按“新稿件”处理, 从程序上来讲和新投稿件是一样的, 仍需要缴纳稿件受理费, 只是为便于稿件受理进程, 请作者在投稿时注明“原稿件号+修后再投”字样。(2)如果是编辑部在审稿意见中要求您改后再投来“复审”, 则不作为新稿处置, 请直接注明“原稿件号+修后再审”字样, 不再另交稿件受理费。