

一个甲烷氧化菌株的分离、鉴定及其特性研究

王晓丽 于建国*

(华东理工大学化学工程联合国家重点实验室 上海 200237)

摘 要: 实验室自行设计方案分离多株以甲烷为唯一碳源的菌株, 对其中的 1 株 QJ16 进行了研究, 根据该菌株形态特征与 16S rDNA 序列的同源性分析, 证实该菌株是一个与其最近的甲基单胞菌属各成员都不相同的菌株。对该菌株的培养条件和利用甲烷的特性进行研究结果表明, 氮源以氯化铵和硝酸钾共同作用最好, 碳源以甲烷最佳, 最佳生长温度为 30℃, 最佳生长 pH 为 6~7; 在批次实验时菌株利用甲烷的最适 pH 为 6.5 左右, 微量元素 Cu^{2+} 的浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 。

关键词: 甲烷氧化细菌, 甲烷, 16S rDNA 测序, 分离鉴定, 特性

Isolation, Identification and Characterization of a Methanotrophic Strain

WANG Xiao-Li YU Jian-Guo*

(State Key Lab of Chemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: Strain QJ16, one of some methanotrophic bacteria isolated from soil samples utilizing the separate device designed by our laboratory; was studied in detail and identified as one of the Genus *methylobacter* through 16S rDNA sequencing and comparison. The culturing and reaction conditions for methane utilization of this strain were investigated. The results indicated that the optimal conditions for the growth of strain QJ16 were methane gas as carbon source and the coexistence of NH_4Cl and KNO_3 as nitrogen source, the cultivation temperature of 30℃ and medium initial pH 6~7, and the optimal Cu^{2+} concentration of 15 $\mu\text{mol/L}$.

Keywords: Methanotrophic bacteria, Methane, 16S rDNA sequencing, Isolation and identification, Characterization

甲烷氧化菌是一类以甲烷为唯一碳源和能源的微生物, 它的典型特征是利用本身含有的甲烷单氧酶(MMO)氧化甲烷使其转化成甲醇、甲酸等物质, 因而具有潜在的工业应用价值; 在生态和环境方面, 甲烷氧化菌不但对全球甲烷的消耗起着重要作用而且还能降解污水中的三氯甲烷、三氯乙烯等有毒卤代烃和多环芳烃^[1,2], 因此对于甲烷氧化菌种的研究

已经越来越引起人们的重视。

研究发现甲烷氧化菌广泛分布于水田、湖泊、沼泽、森林以及许多极端环境^[3-7]中, 但该菌种的筛选分离过程繁琐等问题又阻碍其应用, 因此对高效能、易培养的甲烷氧化菌种的分离以及应用成为了关注的课题之一。本文报道在上海某河底淤泥中筛选出 1 株具有较高转化甲烷性能的菌株, 并对其进

* 通讯作者: ✉ jgyu@ecust.edu.cn

收稿日期: 2007-10-09; 接受日期: 2008-01-14

行分子生物学鉴定、生理生化以及转化条件等进行初步研究,为进一步对甲烷氧化细菌的遗传改良和工业生产的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

采集上海某河底淤泥等土壤样品。

1.2 选择性培养基的配制

培养基成分(g/L): NH_4Cl 0.50; K_2HPO_4 0.49; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.40; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.30; $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02; KNO_3 1.6; NaCl 0.3; EDTA 0.02; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0013; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0004; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.00034; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00024; 琼脂 15; pH 6.8。配制方法详见文献[5]。

甲烷气体购于上海雷兹创益有限公司,纯度为99%。

1.3 分离方法

各取样品2 g溶于20 mL水后过滤,取其3 mL接种于装有已灭菌的30 mL分离培养基的120 mL的血清瓶中,用异丁基胶塞密封,同时用注射器置换入30 mL的甲烷,然后置于32℃,180 r/min摇床培养7 d~10 d直至培养液混浊,取5 mL培养液接种于培养基中在相同条件下培养7 d~10 d,如此重复3次。取1 mL的培养液按10倍稀释法将其稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 的稀释度,各取0.2 mL菌液在平板上涂布,将平板放入真空干燥器后密封,置换入经过滤的甲烷和空气(1:1, V/V)混合气体,在32℃下培养7 d~10 d,挑取各个单菌落分别放入混合气体(甲烷和空气)和仅有空气的真空干燥器中进行对照培养,保留在混合气体中生长良好而在空气中不生长的菌落进行实验。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 形态观察:分离的单菌落在无碳无机盐培养基中培养7 d,经革兰氏染色后,用NIKON-E200显微镜观察细胞形态。

1.4.2 16S rDNA的测序与系统发育树的构建:以基因组DNA为模板PCR扩增16S rDNA的基因,按文献[7]设计扩增引物(上海生工):F27(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')和R1492(5'-TAGGGTTACCTTGTTACGACTT-3')。

PCR体系选用25 μL 反应体系:10 \times PCR反应缓冲液2.5 μL (成分:100 mmol/L Tris-Cl, 500 mmol/L

KCl, 15 mmol/L MgCl_2 , 1.315 mg/mL BSA, 0.01% Gelatin, pH8.4);基因组DNA(10 $\mu\text{g/mL}$)2 μL ;Taq酶(5 U/ μL)0.2 μL ;dNTPs(各2.5 mmol/L)1 μL ;引物(5 $\mu\text{mol/L}$)1 μL ;ddH₂O补足体积。样品在PTC-200扩增仪上进行扩增,94℃预变性5 min;94℃30 s,57℃1 s,72℃1 min,35个循环;72℃延伸10 min;4℃保存。PCR扩增产物用1.5%含EB的琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统观察并照相。PCR产物用UNIQ-10(上海生工)柱式纯化试剂盒纯化,纯化产物在ABI310型自动测序仪(Perkin Elmers)上进行测序。

根据获得16S rDNA序列在GenBank中进行Blast搜索同源序列,并以ClusterX软件进行多重序列比对。通过MEGA 4.0等软件,以邻接法(Neighbour-Joining)建立系统进化树Bootstrap置信值^[8]估算重复次数1000次。

1.5 菌株的生理生化实验

实验装置为通过真空三通活塞连接储气瓶、真空泵、精密压力表的密封的三角烧瓶,按 10^7 个/mL~ 10^8 个/mL的接种量配置菌悬液,将30 mL菌悬液置于100 mL的三角烧瓶中,通过真空泵置换经除菌净化的甲烷和空气(1:1, V/V)的混和气体,控制压力在0.1 MPa,通气完毕关闭活塞,置于摇床培养。实验设3次重复,用7230G分光光度计测培养液 OD_{560} 值。实验分别从不同温度、pH、碳源和氮源等方面探讨菌株的生长条件。

1.6 菌株利用甲烷能力的测定

实验装置同1.5部分,充入甲烷气体后控制压力在0.1 MPa,培养后,充入氮气抵消产生的负压^[9]。实验探讨了不同的pH值和 Cu^{2+} 对菌株利用甲烷能力的影响。

甲烷用GC-950型气相色谱仪检测,外标法定量甲烷的浓度。色谱条件为:SE-54弹性石英毛细管柱(25 m \times 0.25 mm),载气N₂,检测器FID,分流进样。进样器和检测器温度分别控制在180℃和200℃,柱温60℃,进样体积0.1 mL。

2 结果

2.1 菌株 QJ16 的鉴定

2.1.1 形态特征:本实验通过富集、分离以及纯化等几步的重复培养,得到利用甲烷的培养物,根据形态特征和16S rDNA测序,将其中的1株命名为菌

株 QJ16。平板上培养 7 d 后, 菌株 QJ16 的单菌落颜色呈圆形微突状、棕黄色; 光学显微镜下观察, 细胞的形态如图 1 所示, 菌体的直径在 $0.5\ \mu\text{m}$ ~ $1\ \mu\text{m}$ 左右, 细胞棒杆状或略弯; 革兰氏染色呈阴性。

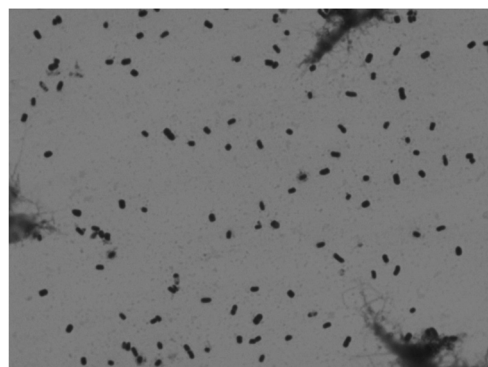


图 1 甲烷氧化菌株 QJ16 的细胞形态图($\times 1260$)
Fig. 1 The morphology of cells of strain QJ16

2.1.2 16S rDNA 碱基序列与系统发育树: 分离菌株的 16S rDNA 碱基长度为 1000 bp。GenBank 的登录号为 EF186089。将菌株的 16S rDNA 碱基的全序列输入 GenBank 核酸序列数据库进行比较, 发现与甲基单胞菌属 10 个菌株的同源性在 93%~94%, 将与菌株 QJ16 同源性最高的菌株序列构建系统发育树。由图 2 的系统发育树可见, 这些同源性序列分为 4 个不同的分支, 菌株 QJ16 与 *Methylomonas* 位同于一个分支, 并且这个分支的支持率达到 90%, 而其它的 3 个属可以作为外群, 通过此系统发育树看出, 菌株 QJ16 定位于 *Methylomonas* 属, 所以从这个聚类关系可以判断, 菌株 QJ16 属于 *Methylomonas* 的一个种。

2.2 生理生化特性

2.2.1 菌株的生长曲线: 通过菌株的培养实验表明, 该菌株的最适生长温度为 $30\ ^\circ\text{C}$, 最佳生长 pH 值为 6~7。

将菌株接种于灭过菌的培养基中, 充入甲烷和空气的混合气体, 间隔 8 h~12 h 取样, 用分光光度计在波长 560 nm 处检测菌悬液的吸光度, 结果如图 3。从生长曲线可以看出, 此菌株生长较慢, 这有可能是因为菌株生长利用的碳源是甲烷, 而常压下甲烷在水溶液中的溶解度很低所致^[10], 该菌株在 150 h~200 h 是指数生长期, 稳定期持续时间较长, 大约在 50 h 左右, 此后菌株的生长呈现衰亡。

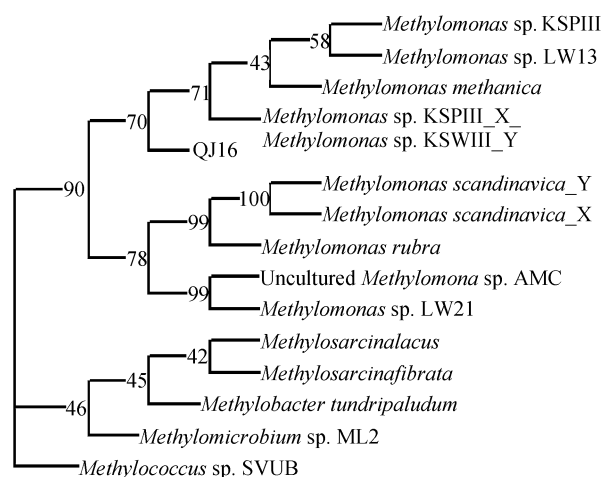


图 2 基于 16S rDNA 序列的甲烷氧化菌属的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree based on 1000 bp-fragment of 16S rDNA sequences

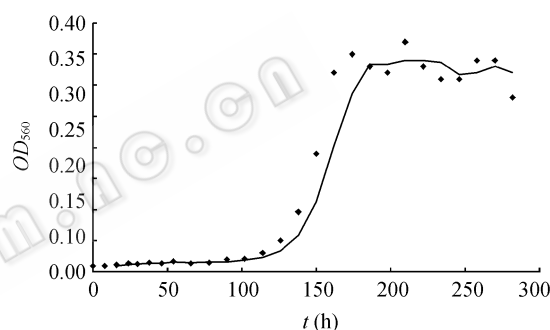


图3 菌株QJ16的生长曲线
Fig. 3 The growth curve of the strain QJ16

2.2.2 碳源实验: 碳是构成微生物细胞和代谢产物中碳架来源的重要营养物质。本实验比较了几种比较常见的碳源对菌体生长量的影响, 在基础培养基中将葡萄糖、淀粉、甲醇、甲烷、蛋白胨作碳源, 结果见图 4。从图中可见该菌株在葡萄糖、淀粉和蛋白胨等作为唯一碳源时近似于不生长(菌种的生长量很少); 而在甲烷和甲醇作为碳源时明显生长, 在实验过程中观察到以甲醇作为碳源的培养物比甲烷为碳源的浑浊速度要快, 但最终结果是以甲烷为碳源的培养物生长量更大, 这也许与菌株长时间在一定浓度甲醇环境中受到毒害作用有关。

2.2.3 氮源实验: 实验选择了 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{KNO}_3$ 做单因子氮源实验, 在进行氮源实验前, 对所用接种液进行离心和洗涤, 以避免接种液携带的氮源物质的影响, 结果见图 4。由图可见在尿素和碳酸铵为氮源时菌

株生长量很少或不生长,而在氯化铵和硝酸钾共同作用时生长量最大,这说明该菌株能同时利用铵态氮和硝态氮,这两种氮源对菌株的生长过程中有一定的促进作用。

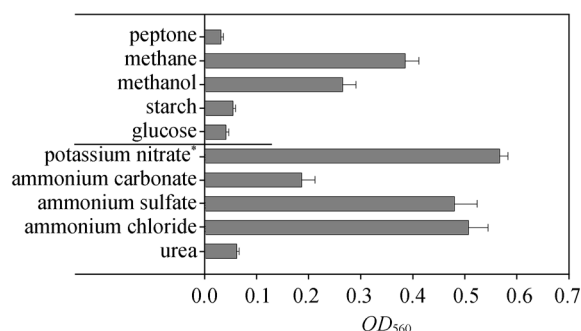


图4 碳源、氮源对菌株生长的影响

Fig. 4 Effects of carbon sources, nitrogen sources on growth of the strain

注: Potassium nitrate*: 硝酸钾和氯化铵共同作为氮源

2.3 菌株利用甲烷的能力

菌株生长的最适 pH 范围为 6~7, 在 pH6.46 时菌株转化甲烷的能力最大。菌株的生长和转化甲烷的能力对碱性环境较敏感,若培养基显碱性或弱碱性,则菌株生长缓慢, pH8.44 时菌株已经基本不生长,这说明该菌株是一个喜酸性环境的生物体。

微量元素 Cu^{2+} 的浓度直接影响到甲烷单加氧酶的活性,因而对于甲烷氧化菌利用甲烷的能力具有较大的影响^[11,12]。本实验选择不同 Cu^{2+} 浓度的培养基检测菌株对甲烷利用的结果如图 5。由结果可见,当 Cu^{2+} 在低时菌株利用甲烷的能力随着浓度增大而增加, 15 $\mu\text{mol/L}$ 时对甲烷的利用率最大,此后菌株的甲烷利用能力呈现下降趋势,但 Cu^{2+} 浓度在

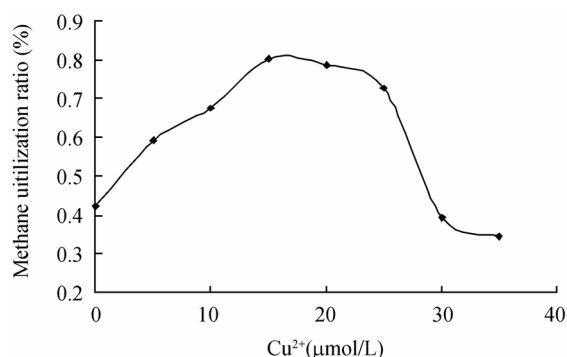


图5 Cu^{2+} 浓度对甲烷利用的影响

Fig. 5 Effect of the concentration of Cu^{2+} on the methane utilization

15 $\mu\text{mol/L}$ ~25 $\mu\text{mol/L}$ 之间, 甲烷的利用率都在 70% 以上。

3 讨论

近些年来,人们利用分子生物学的手段在自然环境中发现了大量甲烷氧化菌的存在,但是其中有很大部分是不可培养物^[13],而为了利用甲烷单加氧酶转化甲烷,获得甲烷氧化菌的纯培养物是必须的前提,但是分离和保存甲烷氧化菌种却非常困难。本研究在总结前人研究的基础上对实验方法和设备等进行简化和改进,总结分离过程必须要满足以下 3 点:第一,样品地点务必要选择甲烷气体富集的地点,由于好氧性甲烷氧化菌的存在必须要在甲烷和氧气同时存在的环境中,因此样品的选择尤其重要。研究者已经从污染的水域中筛选分离出多株甲烷氧化菌的纯培养物^[14,15]。本实验的样品是在上海市内河道的淤泥(有沼气产生);第二,整个富集分离过程中,样品始终在甲烷和空气的混合气里培养,由于甲烷氧化菌分为好氧、厌氧和兼性几类,而本研究的目的是为了获得能催化氧化甲烷的菌种,因此分离过程在好氧环境中进行;第三,最后在筛选菌种时选择无甲烷存在的培养物作为对照^[16]。这样基本上克服了甲烷氧化菌的筛选分离过程繁琐和不确定性,并且实验的重复性高,分离过程简便。

本实验得到的菌株 QJ16 在固体培养基上的生长特征、形态变化以及温度适应性、pH 值范围等方面与宁治中^[17]从油田样品中分离得到的甲基单胞菌 (*Methylomons*) 相似,王福来等^[10]分离的 *Methylomons* Z201 在碳氮源利用、温度、pH 值等方面也与此菌株相似。通过 16S rDNA 等分子生物学手段的鉴定可以初步判断此菌种属于甲基单胞菌 (*Methylomons*) 属,且有可能为新种。本文对菌株 QJ16 的生理生化特征进行实验,对其碳源、氮源、温度、pH 以及 Cu^{2+} 等进行优化培养,结果表明,以氯化铵和硝酸钾为共同氮源生长最好,碳源以甲烷最佳,最适生长温度为 30,最适生长 pH 为 6~7;在批式实验时菌株利用甲烷的最适 pH 为 6.5 左右,微量元素 Cu^{2+} 的浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 。在以上条件下培养的 QJ16 菌株悬浮液转化甲烷的能力 70% 以上,国内有研究^[18-20]发现在甲烷氧化菌的纯培养物的利用甲烷的能力在 40%~60%。今后将进一步优化菌株的培养条件,调节代谢速率,提高菌株催化活性,为

以后的工业应用打下基础。

参 考 文 献

- [1] Clapp LW, Regan JM, Ali F, *et al.* Activity, structure, and stratification of membrane-attached methanotrophic biofilms cometabolically degrading trichloroethylene. *Water Science and Technology*, 1999, **39**(7): 153–161.
- [2] 梁战备, 史 奕, 岳 进. 甲烷氧化菌研究进展. 生态学杂志, 2004, **23**(5): 198–205.
- [3] Bodelier PL, Roslev EP. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **403**: 421–424.
- [4] Cheng YS, Halsey JL. Detection of methanotrophs in ground-water by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 648–651.
- [5] Frans W. Spatial distribution and inhibition by ammonium of methane oxidation in intertidal freshwater marshes. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4734–4740.
- [6] Dedysh SN. Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria. *Soil Biol Biochem*, 1996, **98**: 101–108.
- [7] Levente B, Korneël L, Kovaëcs IR, *et al.* A novel thermophilic methane-oxidising γ -Proteobacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **170**: 335–341.
- [8] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, **39**: 783–791.
- [9] 赵树杰, 张玉英, 郑 坚, 等. 甲烷氧化细菌的一个新种. 微生物学报, 1989, **29**(2): 84–92.
- [10] 王福来, 郑 坚, 王 钊, 等. 一株催化丙烯环氧化菌株的分离及特性. 微生物学报, 1993, **33**(2): 129–134.
- [11] Best D J, Higgins IJ. Methane-oxidizing activity and membrane morphology in a methanol grown obligate methanotroph, *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Journal of General Microbiology*, 1981, **125**: 73–84.
- [12] Fuse H, Ohta M. Oxidation of trichloroethylene and dimethyl Sulfide by a marine *Methylgomicrobium* strain containing soluble Methane monooxygenase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, **62**: 1925–1931.
- [13] Murrell JC, McDonald IR, Bourne DG. Molecular methods for the study of methanotroph ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **27**(2): 103–114.
- [14] De MP, Pacheco CC, Figueiredo AR, *et al.* Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, **234**(1): 75–80.
- [15] Dunfield PF, Yimga MT, Dedysh SN, *et al.* Isolation of a *Methylocystis* strain containing a novel pmoA-like gene. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **41**(1): 17–26.
- [16] Dianou D, Adachi K. Characterization of methanotrophic bacteria isolated from a subtropical paddy field. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **173**(1): 163–173.
- [17] 宁治中, 廖佳垠. 丙烯酶催化氧化产生环氧丙烷的研究: 甲烷氧化菌的. 微生物学通报, 1990, **17**(5): 283–286.
- [18] 闵 航, 谭玉龙. 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: 农业与生命科学版, 2002, **28**(6): 619–624.
- [19] 刘 颖, 闵 航. 甲烷氧化菌分离物的分离及其特性. 上海铁道大学学报, 2000, **21**(11): 8–11.
- [20] 梁家骥, 程光胜. 厌氧消化器中的甲烷氧化菌. 微生物学通报, 1989, **16**(4): 211–214.