

甲烷氧化混合菌的保藏方法研究

江皓¹ 侯仲轩² 韩冰² 邢新会^{2*}

(1. 中国石油大学(北京) 新能源研究院 北京 102249)

(2. 清华大学 化学工程系 工业生物催化教育部重点实验室 北京 100084)

摘要:【目的】甲烷氧化混合菌是自然界中吸收甲烷的关键微生物,在甲烷氧化混合菌的研究和应用中,首先要解决其长期稳定保藏的问题,保藏方法应能有效保持菌群结构和功能的完整性、稳定性。【方法】以从煤矿土壤富集得到的两种结构稳定的甲烷氧化混合菌为实验体系,研究对比了冷藏法、低温冷冻法、石蜡油冷冻法、甘油冷冻法4种保藏方法,考察保藏前后混合菌的生长状况、MMO活性、菌群结构等。【结果】保藏6个月后,除甘油冷冻法以外,经其它3种方法保藏的混合菌,都具有与保藏前相当的细胞密度、甲烷氧化能力、MMO酶活以及传代稳定性,且DGGE图谱显示保藏前后的菌群结构变化不大。【结论】这3种保藏方法都可以有效的保持甲烷氧化混合菌功能和菌群结构的稳定性。

关键词: 甲烷氧化菌, 混合菌, 保藏方法, 菌群结构与功能

Study on preservation methods of mixed methane-oxidizing bacteria

JIANG Hao¹ GOU Zhong-Xuan² HAN Bing² XING Xin-Hui^{2*}

(1. Institute of New Energy, China University of Petroleum, Beijing 102249, China)

(2. Department of Chemical Engineering, Key Laboratory for Industrial Biocatalysis, Ministry of Education, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: [Objective] Mixed methane-oxidizing bacteria are useful for reduction of methane emission. For research and application of mixed methane-oxidizing bacteria, their long-term stable preservation must be first solved. The preservation methods should be able to maintain the integrity and stability of the community structure and function. [Methods] Two kinds of stable mixed methane-oxidizing cultures enriched from a coal mine soil were used as the bacterial community. Four preservation methods, refrigeration, ultralow freezing, freezing in paraffin oil and freezing in glycerin, were comparatively studied. The growth, MMO activity and community structure before and after the preservation were investigated. [Results] The method with glycerin could not be used for mixed methane-oxidizing bacteria preservation. After preservation using the other three methods, the cell density, methane oxidation capacity, MMO activity and subculture stability reached the same level as before the preservation. DGGE fingerprints of 16S rRNA for the mixed cultures before and after the preservation showed that the change of the community structure during the preservation was not much. [Conclusion] The three preservation methods can effectively maintain the function and community structure of the mixed methane-oxidizing bacteria stable.

基金项目: NSFC-JST 国际合作项目(No. 21161140328)

*通讯作者: Tel: 86-10-62794771; Fax: 86-10-62787472; ✉: xhxing@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2013-12-12; 接受日期: 2014-02-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-03-24

Keywords: Methanotroph, Mixed bacteria, Preservation method, Community structure and function

甲烷氧化菌是甲基氧化菌的一个分支,广泛存在于泥土、沼泽、稻田、河流、湖泊、森林和海洋等环境中,能够利用甲烷作为唯一的碳源和能源^[1]。甲烷单加氧酶(Methane monooxygenase, MMO)是甲烷氧化菌代谢甲烷过程中的关键酶系,它在分子氧和还原性辅酶 NADH 的作用下催化甲烷氧化为甲醇。MMO 在甲烷氧化菌中以可溶性甲烷单加氧酶 sMMO 和颗粒性甲烷单加氧酶 pMMO 两种形式存在。两种 MMO 都具有广泛的底物范围,特别是 sMMO,能够催化正构烷烃、酯、环烃、芳香化合物和杂环化合物羟基化,催化烯烃环氧化,氧化降解卤代烃等^[2]。基于这些特性,甲烷氧化菌在生物催化、生物修复、甲烷排放控制等方面,具有良好的应用前景和潜力。但到目前为止,已分离鉴定的可工业化应用的甲烷氧化菌种类有限,且甲烷氧化菌生长速度慢、细胞密度低、发酵周期长,MMO 的纯化过程复杂,纯酶稳定性差,这些都无法满足工业应用的要求。此外,甲醇、甲醛等代谢产物的积累也会对细胞产生毒性,抑制甲烷氧化菌的生长。

甲烷氧化混合菌是以一种或多种甲烷氧化菌为优势菌群,同时伴生有其它具有协同作用菌群的混合菌体系。非甲烷氧化菌的存在,能够通过去除甲烷氧化菌产生的毒性代谢物(如甲醇)或提供必需的生长物质等改善甲烷氧化菌的生长^[3]。已有研究应用甲烷氧化混合菌生产单细胞蛋白^[4]和聚羧基丁酸酯^[3,5-6]、降解有机污染物^[7-11]等。相比纯的甲烷氧化菌,甲烷氧化混合菌表现出更好的生长特性和活性,更高的稳定性和环境适应性,而且有利于在开放体系下操作。

应用混合菌时,其功能的稳定性,取决于菌群结构的稳定性。在对甲烷氧化混合菌的研究和应用中,首先要解决其长时间稳定保藏的问题,既要防止保藏方法引起混合菌中菌种的丢失,也要避免因引入其它碳源而改变菌群结构,目前国内外罕见该方面的研究报道。本文以从煤矿土壤富集得到的两

种结构稳定的甲烷氧化混合菌为实验体系,研究对比了 4 种用于甲烷氧化混合菌的保藏方法,考察了保藏前后混合菌的生长状况、MMO 活性、群落结构和功能等的变化,为甲烷氧化混合菌的研究和应用提供了基础方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 甲烷氧化混合菌:从河南许昌新峰四矿某高瓦斯矿井的通风口取土壤样品,分别以人工瓦斯气(93.99% CH₄、4% CO₂、2% C₂H₆、0.01% C₃H₈)和甲烷气(99.9% CH₄)为碳源,驯化传代培养 30 代以上,得到了两种菌群结构稳定的甲烷氧化混合菌,分别称为 1#混合菌和 2#混合菌。

1.1.2 主要试剂和仪器:甲烷气、人工瓦斯气和丙烯均购自北京氢普北分气体工业有限公司;石蜡油购自北京东方精细化学品有限公司;丙烯酰胺(40%)、Bis-丙烯酰胺(2%)和甲酰胺购自 Bio-Rad Laboratories, Inc.;其余试剂均为市售分析纯试剂。气相色谱仪为日本岛津 GC-2010 型;紫外-可见光分光光度计为上海精密科学仪器有限公司生产的 UV757CRT 型;变性梯度凝胶电泳为 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的 Dcode universal mutation detection system 系统。

1.2 甲烷氧化混合菌的培养

培养甲烷氧化混合菌所用的液体培养基是铜离子浓度为 5 mol/L 的 NMS (Nitrate mineral salt) 培养基^[12]。用螺口密封、底部带挡板的 300 mL 三角瓶进行培养,三角瓶中装有 NMS 培养基 50 mL,用注射器置换入 40 mL 人工瓦斯气或甲烷气,使空气:人工瓦斯气或甲烷气的体积比约为 5:1,30 °C、170 r/min 摇床培养,每 24 h 重新置换入气体。换气前后用气相色谱检测三角瓶中的甲烷含量。每接种 10% (体积比)的菌液至新的 NMS 培养基,为传代 1 次。驯化培养初期每代的培养时间为 10 d,驯化培养中后期及保藏菌种复苏培养时每代的培养

长情况、甲烷氧化能力和 MMO 酶活,并与相同条件下培养的甲烷氧化菌 *Methylosinus trichosporium* OB3b 进行对比,如图 1 所示。甲烷氧化混合菌的生长明显优于 *M. trichosporium* OB3b 纯菌,且人工瓦斯气驯化的 1#混合菌比甲烷气驯化的 2#混合菌生长更快,培养 5 d 后 OD_{660} 接近 1.6,约是 *M. trichosporium* OB3b 最终菌浓的 4 倍,说明混合菌体系相比纯菌培养更容易实现快速生长。同步监测了甲烷氧化能力和 MMO 酶活的变化,两种混合菌相比纯菌都显示出更好的特性,但在生长后期,甲烷氧化能力和 MMO 活性也显著下降。由于酶活是以单位细胞干重来评价的,所以会与整体上的甲烷消耗表现有所差异,如混合菌在培养第 4 天和第 5 天的 MMO 酶活显著降低,但仍有较高的甲烷消耗。

基于上述结果,对保藏后复苏的混合菌进行传代培养和性质评价时,细胞干重取培养第 6 天,即生长平台期的数值,MMO 酶活在培养第 2 天进行测定,甲烷消耗测定培养 5 d 的平均值。

2.2 保藏混合菌的甲烷氧化能力

添加了甘油和石蜡油保藏的菌种在复苏过程中,甘油和石蜡油的存在会干扰 OD_{660} 的测定,所

以在复苏后培养的前 4 代,通过检测每天消耗甲烷的量考察甲烷氧化菌的活性,如表 1 所示。甘油冷冻法的保藏效果最差,菌种复苏后几乎没有消耗甲烷的能力,从生长状况看,复苏后培养第 1 代时有明显混浊,推测为混合菌中能够代谢甘油的微生物快速生长,但由于持续的供给甲烷作为唯一碳源,传代到第 4 代时培养液已澄清,说明该方法无法稳定地保藏甲烷氧化混合菌。与甘油不同,石蜡油难以被微生物作为碳源利用,所以可以作为保水性有机物用于甲烷氧化混合菌的保藏。石蜡油冷冻法保藏的菌种在复苏初期消耗甲烷的能力较差,但随着传代次数的增加,呈逐渐增强的趋势,这主要是因为相比冷藏法和低温冷冻法,该保藏方法保藏的细胞量较少,造成复苏时接种量少,从而影响菌种在复苏初期的生长。对比图 1B 的数据可知,保藏前 1#和 2#混合菌消耗甲烷的能力分别为 28.2 mL/d 和 29.3 mL/d (前 5 天),冷藏法和低温冷冻法保藏的菌种复苏后对甲烷的代谢能力与保藏前相当。总的来说,除甘油冷冻法以外,其它 3 种保藏方法保存的甲烷氧化菌群,复苏后仍然保持了较好的氧化甲烷的能力。

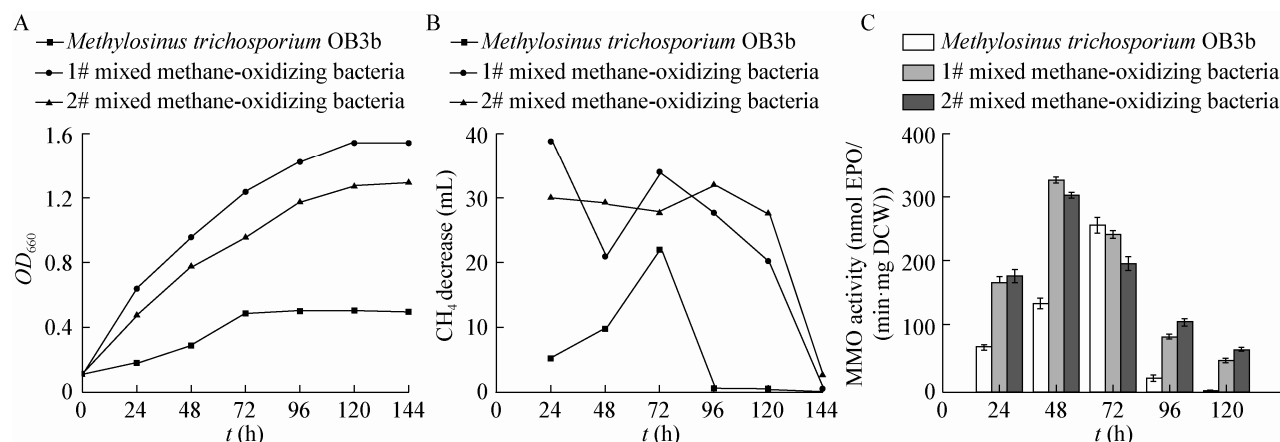


图 1 甲烷氧化混合菌和 *M. trichosporium* OB3b 保藏前的生长曲线、甲烷消耗能力和 MMO 酶活
Figure 1 Growth curve, methane oxidation capacity and MMO activity of mixed methane-oxidizing bacteria and *M. trichosporium* OB3b before preservation

Note: A: Growth curve; B: Methane oxidation capacity; C: MMO activity.

2.3 保藏混合菌的生长状况和 MMO 酶活

对能够保持甲烷氧化菌活性的 3 种保藏方法(冷藏法、低温冷冻法和石蜡油冷冻法)进一步考察其传代稳定性、生长情况和 MMO 酶活。测定复苏后第 6 代和第 10 代菌种的干重和 MMO 酶活，如图 2、3 所示，干重为菌体生长 6 d 后到达平台期的值，而 MMO 酶活在生长第 2 天测定。保藏前后的

1#甲烷氧化混合菌平台期的细胞干重在 0.8–1.0 g/L 之间波动，2#甲烷氧化混合菌的平台期干重则处于 0.7–0.9 g/L 间。保藏前后两种混合菌在培养第 2 天的 MMO 酶活均在 300–500 nmol EPO/(min·mg dry cell weight)变化。说明经这 3 种保藏方法保藏的混合菌，都具有很好的传代稳定性，且表现出与保藏前相当的生长状况和 MMO 活性。

表 1 保藏混合菌种复苏后的甲烷氧化能力									
Table 1 Methane oxidation capacity of mixed bacteria after preservation and recovery									
序号 No.	保藏方法 Preservation method	甲烷氧化能力 ^a							
		Methane-oxidizing capacity ^a (mL CH ₄ /d)							
		1#-1 ^b	1#-2	1#-3	1#-4	2#-1	2#-2	2#-3	2#-4
1	Refrigeration	36.8	30.1	29.4	29.0	29.4	30.3	28.0	25.4
2	Ultralow freezing	26.1	25.8	27.2	26.6	27.8	28.3	24.6	26.3
3	Freezing in paraffin oil	10.7	16.9	20.4	23.4	16.7	19.5	21.6	20.4
4	Freezing in glycerin	0.9	0.4	0.0	0.0	1.7	0.7	0.0	0.0

注：^a：甲烷氧化能力为一个培养周期中前 5 天的甲烷消耗的平均值；^b：在 1#和 2#后的数字 1、2、3、4 表示复苏后的两种混合菌的传代次数。

Note: ^a: The methane oxidation capacity was defined as the average methane consumption of first five days in a culture cycle; ^b: The number 1, 2, 3, 4 after 1# and 2# represented the passage number of the two different mixed bacteria after recovery.

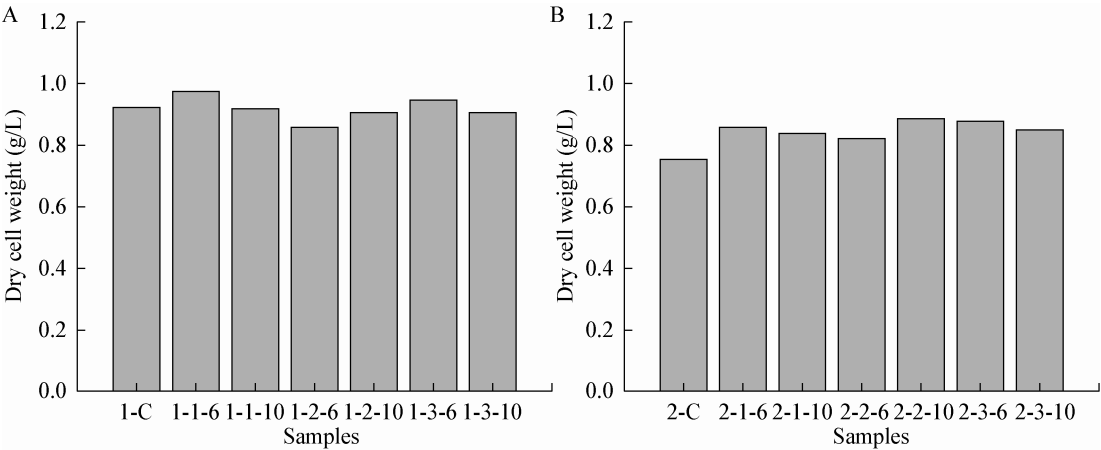


图 2 保藏甲烷氧化混合菌复苏后的生长状况

Figure 2 Growth of mixed methane-oxidizing bacteria after preservation and recovery

注：A：1#甲烷氧化混合菌；B：2#甲烷氧化混合菌。培养 6 d 后进行测定，1-C 和 2-C 分别表示保藏前的 1#和 2#混合菌，其他样品均用 3 个数字表示，第一个数字 1 或 2 代表 1#或 2#混合菌，之后的数字 1、2、3 分别代表冷藏法、低温冷冻法和石蜡油冷冻法，之后的数字 6 或 10 表示两种混合菌复苏后的传代次数。

Note: A: 1# mixed methane-oxidizing bacteria; B: 2# mixed methane-oxidizing bacteria. The samples were tested after six days cultivation. Sample 1-C and 2-C represented the control of 1# and 2# mixed bacteria before preservation. The other samples were indicated by three numbers: the first number 1 and 2 represented 1# and 2# mixed methane-oxidizing bacteria; the number 1, 2 and 3 after the 1st number represented the preservation methods, refrigeration, ultralow freezing, and freezing in paraffin oil, respectively; the number 6 and 10 after the 2nd number represented the passage number of the two kinds of mixed bacteria after recovery.

2.4 保藏混合菌的菌群结构变化

对 3 种保藏方法保藏后复苏培养第 10 代的菌液,提取基因组 DNA,用 341F-GC/907R 引物进行扩增,做 DGGE 电泳,并以保藏前的菌种作为对照,如图 4 所示。从图 4 中可以直观地看出,保藏前后的微生物种群变化不大,相似性系数 C_s 值均在 78% 以上,说明这 3 种保藏方法都可以有效地保持甲烷

氧化混合菌的菌群多样性,可以根据需要选择合适的方法进行保藏。对比两个混合菌群,2#甲烷氧化混合菌的保藏效果更为理想,冷藏法和低温冷冻法均可使其与保藏前的菌群相似性达 97%,这是由于 2#混合菌是以甲烷为单一碳源驯化得到,菌群以甲烷氧化菌和甲基氧化菌为主,不同细菌间的协同联系更为紧密,保藏过程不容易丢失菌种。

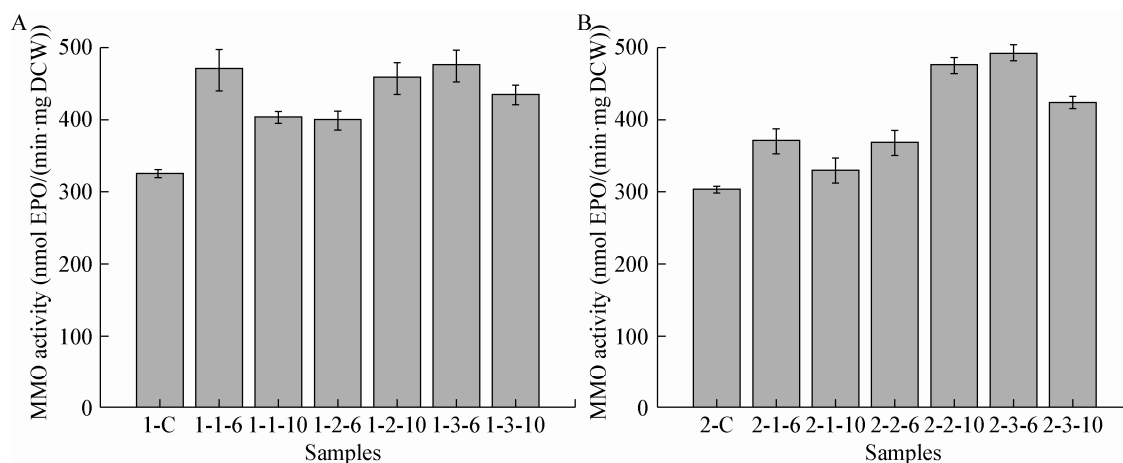


图 3 保藏甲烷氧化混合菌复苏后的 MMO 酶活

Figure 3 MMO activity of mixed methane-oxidizing bacteria after preservation and recovery

注: 样品编号说明同图 2.

Note: The meaning of each number was the same as that in Figure 2.

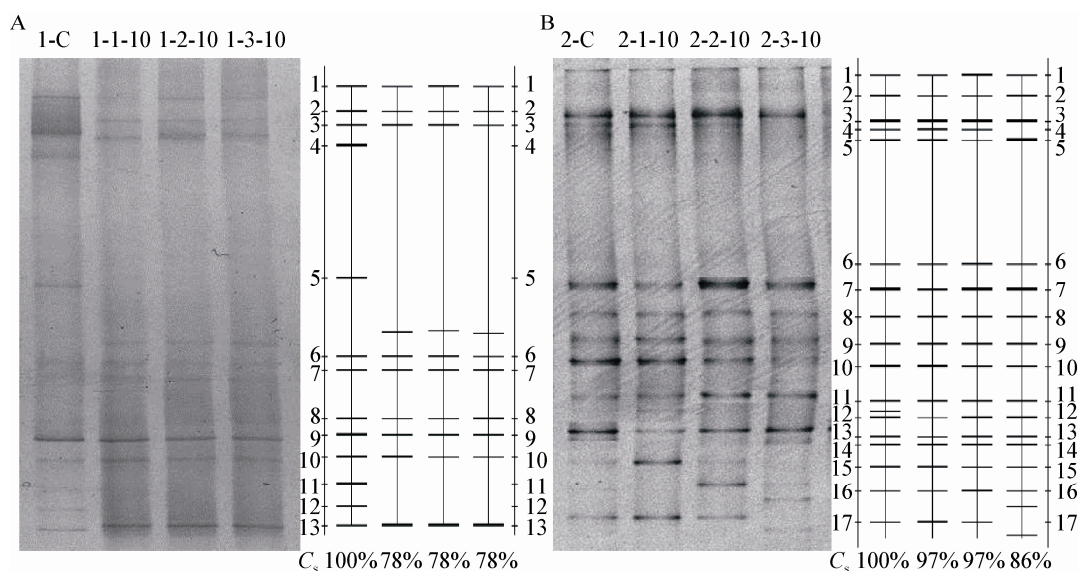


图 4 保藏前后甲烷氧化混合菌 16S rRNA 的 DGGE 图谱

Figure 4 16S rRNA DGGE fingerprints of mixed methane-oxidizing bacteria before and after preservation

注: 样品编号说明同图 2.

Note: The different lines indicated the different samples and the meaning of each number was the same as that in Figure 2.

3 讨论

甲烷氧化混合菌的保藏较为困难,相关研究报道少,这也限制了甲烷氧化混合菌的研究和应用。本研究中所用的两种甲烷氧化混合菌体系,均是从自然界富集筛选得到,可能存在一些无法进行纯培养的微生物,所以更应注重菌群保藏的完整性和稳定性。

本研究在考察甲烷氧化混合菌的保藏方法中,分别添加了甘油和石蜡油作为保水性有机物进行混合菌的冷冻保存。结果表明,甘油的添加引入了碳源,使得利用甘油的细菌快速增殖,抑制了甲烷氧化菌的生长,即使持续的以甲烷为碳源进行传代培养,菌种仍然逐渐消亡。石蜡油的生物降解性较差,可作为甲烷传递体提高甲烷被甲烷氧化菌利用的速度,促进菌体的快速生长^[17],因此对甲烷氧化混合菌而言是一种理想的保水性有机物。但启动保藏的菌种时,需要一定的传代次数才能达到较好的活性水平(表 1),这可能与保藏的细胞量较少有关,可以尝试将培养液浓缩后再添加石蜡油进行保藏,以提高菌体的复苏效率。此外,石蜡油与水不互溶,需要传代数次才能去除石蜡油,得到均一的培养液,这是该方法的一个缺点。

其它两种方法中,4℃冷藏保存时,菌体处于缓慢代谢状态,所以需要定期充入新的甲烷并添加 NMS 培养基,增加了操作步骤,但复苏过程简单,菌种启动快。使用低温冷冻法进行保藏时,菌种也可以快速启动,但不加保水性液体就直接冻存对细胞造成的损伤较大,所以进行保藏时需要收集较多的菌体,以增加再次启动时细胞的存活量,并稳定混合菌的菌群结构。

综上所述,甲烷氧化混合菌的保藏可采用冷藏法、低温冷冻法和石蜡油冷冻法。经这 3 种方法保藏 6 个月的混合菌,都具有与保藏前相当的生长状况、甲烷氧化能力、MMO 酶活以及传代稳定性,而且保藏前后的菌群结构变化不大,证明这 3 种保藏方法都可以有效地保持混合菌功能和菌群结构的稳定性,在实际应用中,可根据具体要求进行选择,更长时间的保藏效果需要通过实验进一步验证。

参考文献

- [1] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic bacteria[J]. Microbiological Reviews, 1996, 60(2): 439-471.
- [2] Jiang H, Chen Y, Jiang P, et al. Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 49(3): 277-288.
- [3] 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]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(2): 387-395.
- [4] Bothe H, Möller Jensen K, Mergel A, et al. Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus capsulatus* (Bath) in a single cell protein production process[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(1): 33-39.
- [5] Helm J, Wendlandt KD, Jechorek M, et al. Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly- β -hydroxybutyrate in a methane-utilizing mixed culture[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(4): 1054-1061.
- [6] Pieja AJ, Sundstrom ER, Criddle CS. Cyclic, alternating methane and nitrogen limitation increases PHB production in a methanotrophic community[J]. Bioresource Technology, 2012, 107: 385-392.
- [7] Chang HL, Alvarez-Cohen L. Two-stage methanotrophic bioreactor for the treatment of chlorinated organic wastewater[J]. Water Research, 1997, 31: 2026-2036.
- [8] Hrsak D, Grbicgalic D. Biodegradation of linear alkylbenzenesulphonates (LAS) by mixed methanotrophic-heterotrophic cultures[J]. Journal of Applied Microbiology, 1995, 78(5): 487-494.
- [9] Smith LH, McCarty PL. Laboratory evaluation of a two-stage treatment system for TCE cometabolism by a methane-oxidizing mixed culture[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, 55(4): 650-659.
- [10] Hesselsoe M, Boysen S, Iversen N, et al. Degradation of organic pollutants by methane grown microbial consortia[J]. Biodegradation, 2005, 16(5): 435-448.
- [11] 罗明芳, 吴昊, 王磊, 等. 含有甲烷氧化菌的混合菌群特性研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(1): 103-109.
- [12] Xing XH, Wu H, Luo MF, et al. Effects of organic chemicals on growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 31: 113-117.
- [13] 苏涛, 韩冰, 杨程, 等. *Methylosinus trichosporium* OB3b 整细胞催化丙烯制备环氧丙烷的工艺条件[J]. 化工学报, 2009, 60(7): 1767-1772.
- [14] Shan G, Jin W, Lam EK, et al. Purification of total DNA extracted from activated sludge[J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(1): 80-87.
- [15] Yan S, Miyanaga K, Xing XH, et al. Succession of bacterial community and enzymatic activities of activated sludge by heat-treatment for reduction of excess sludge[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 39(3): 598-603.
- [16] Miura Y, Hiraiwa MN, Ito T, et al. Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance[J]. Water Research, 2007, 41(3): 627-637.
- [17] Han B, Su T, Wu H, et al. Paraffin oil as a "methane vector" for rapid and high cell density cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(4): 669-677.