

一株噬甲烷菌的分离鉴定及其消除煤矿瓦斯能力的初步研究

段学军, 黄春晓

中原工学院能源与环境学院, 郑州 450007

[摘要] 借鉴滚管法, 从煤矿矿井及甲烷处理水稻田土壤中分离纯化, 获得一株可在以甲烷为唯一碳源的培养基上正常生长且具有较高甲烷氧化活性的噬甲烷细菌, 暂命名为 ZD4, 经对该菌进行形态观察、Biolog 生理生化分析、G+C mol% 含量分析和 16S rDNA 序列同源性比较, 鉴定该菌为甲烷甲基单胞菌 (*Methylomonas capsulatus*), 并对 ZD4 菌株进行了生长量、对甲烷消除作用的分析。试验结果表明, 该菌株可以使甲烷含量在一周内比初始甲烷浓度降低 85% 以上。利用其良好的甲烷消除能力, 用于煤矿瓦斯治理是可行的。

[关键词] 甲烷甲基单胞菌; 分离鉴定; 甲烷消除

[中图分类号] TD712, Q939

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)11-0005-04

Separation and Identification of a Methane-oxidizing Bacteria and a Preliminary Study on Its Methane Oxidation Capacity

DUAN Xuejun, HUANG Chunxiao

Department of Energy and Environment Engineering, Zhongyuan Institute of Technology, Zhengzhou 450007, China

Abstract: A bacterium (strain ZD4) was separated from soil treated with methane, which can grow with methane as the sole carbon source. Based on the morphological observations and the analyses of Biolog-GN and G+C mol% on the 16S rRNA gene, the strain was identified as *Methylomonas capsulatus*. The detection of the methane oxidation rate indicates that the strain ZD4 can reduce the methane concentration by 85%, and therefore, it is feasible to control the coal mine gas using ZD4's methane oxidation capacity.

Key Words: *Methylomonas capsulatus*; isolation identification; methane oxidation

CLC Numbers: TD712, Q939

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)11-0005-04

受煤炭地质赋存条件、井工开采方式等客观因素的制约, 我国煤矿瓦斯灾害严重, 成为当前煤矿安全生产最薄弱的环节。如何遏制煤矿重特大瓦斯事故的多发势头、实现煤矿安全状况的稳定好转, 是我国煤矿企业、各级政府相关部门以及相关领域科研工作者的共同使命^[1]。

目前, 治理瓦斯主要采用的技术是单一的风排措施或建立瓦斯抽放系统^[2], 向大气排放煤层气造成严重的大气污染, 所以, 如何寻找新的瓦斯治理方法, 有效

降低瓦斯浓度, 提高煤矿生产的安全性, 减少生产成本, 亟待研究解决。用生物技术治理矿井瓦斯始于 20 世纪 60 年代末, 俄罗斯科学院的科学家开始研究利用生物技术有效控制煤矿中煤层和采空区甲烷含量的可能性。甲烷氧化菌是能以甲烷为唯一碳源和能源生长的一类细菌, 分布广泛, 目前世界上正在研究利用其消除矿井下甲烷, 防治煤矿中的瓦斯爆炸^[3-4]。

本文针对目前煤矿瓦斯灾害严重、重特重大事故频发的严峻形势, 从长期甲烷处理水田土壤中分离筛选

收稿日期: 2007-04-05

基金项目: 河南省自然科学基金项目 (0611022000)

作者简介: 段学军, 男, 郑州市中原中路 41 号中原工学院能源与环境学院, 副教授, 研究方向为土壤与环境微生物学;

E-mail: dxjsqy@163.com

获得的一株噬甲烷细菌,对其进行生理鉴定、部分长度的 16S rDNA 序列分析及在系统发育中的地位,并初步对该菌株对甲烷的消除作用进行了研究,为选择合理技术有效地控制煤矿中煤层和采空区的甲烷含量,利用生物技术提高煤矿瓦斯灾害防治技术水平,有效地控制重特大煤矿瓦斯灾害事故,促进煤矿安全生产,提供了必要的技术基础。

1 材料和方法

1.1 噬甲烷细菌的筛选与分离

分离源为经过河南省鹤煤集团二矿矿井和经甲烷处理的河南新安暗棕稻田土。

1) 无机盐(MM)培养基

无机盐(MM)培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)为: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2, KH_2PO_4 0.26, K_2HPO_4 0.74, NH_4NO_3 1.0, FeCl_3 0.05, NaNO_3 1.0, NH_4Cl 0.25, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004, EDTA 0.01,微量元素液 10 mL,土壤浸出液 100 mL,琼脂 18 g,用 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调节 pH 值至 7^[5]。将上述组分的好氧性培养基分装于可密封的厌氧试管中,每管 5 mL,塞上异丁基胶塞,灭菌备用。

取新鲜水稻田土壤,以 100 倍稀释液用灭菌注射器接种 0.25 mL 于装有 60℃ 左右溶化的 5 mL MM 培养基的密闭厌氧试管中,在旋涡混合器上混匀,滚管,注入用 Millex-GS 型 Millipore 气体无菌过滤器滤过的甲烷 4 mL,置 35℃ 培养 7 d;然后挑取单菌落,移入装有 5 mL MM 液体培养基中,同法注入 4 mL 甲烷培养,重复多次直至纯化。

2) 加富 MM 培养基

在 MM 培养基中分别加入 0.1% 甲醇,制备平板,涂布菌悬液,倒置平板,在皿盖上加大块吸附有甲烷的无菌棉花,置 30℃ 培养 2~3 d,用于菌株的平板培养与保存。

1.2 分离菌株形态观察

吸取培养液,滴一滴于铜网上,再滴加负染剂,用吸水纸吸干多余液体,置于透射式电镜下观察细菌细胞形态;培养液经离心沉淀、固定、包埋、切片等过程后,在 JEM-1200EX 型电镜下分离菌株进行观察和拍摄^[6]。

1.3 分离菌株生理鉴定

采用 Biolog 公司生产的 GN (格兰氏阴性菌) MicroPlate™ 测试板,在 Biolog 96 孔平板上,除对照孔不含碳源外,每孔都含有 tetrazolium violet 缓冲营养培养基和不同碳源,被鉴定的菌细胞悬浮于微孔中,培养 72 h 后用 Biolog 细菌自动鉴定仪检测供试菌株的代谢指数,采用计算机软件 MicroLog 3 (Biolog Inc., Hay-

ward, CA) 完成菌株的鉴定。

1.4 分离菌株 G+C mol% 测定

细菌总 DNA 提取采用氯仿苯酚混合提取法制备, DNA 溶于 0.1 SSC 溶液中。确定解链温度 T_m 采用热变性解链法。G+C 摩尔百分含量(G+C mol%)按照经验公式 $0.1\text{SSC } G+C\% = 2.44(T_m - 53.9)$ 计算^[7]。

1.5 分离菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增、序列测定及比对

从加富 MM 培养基平板中直接挑取一环菌体,加入 100 μL 无菌重蒸 H_2O 中,旋涡混匀后,沸水浴 2 min, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 上清液直接用于 PCR。16S rDNA 引物^[8]为 5'-AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3' 和 5'-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3'。扩增反应体积 50 μL ^[9],反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共进行 29 个循环,PCR 反应在 PTC-200 型热循环仪上进行^[9-10]。反应结束后取 5 μL 反应液在 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测^[11]。PCR 产物的纯化和测序由生物技术公司完成。将所得序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析^[12]。

1.6 菌株消耗甲烷能力的测定

用 100 mL 血清瓶,内装 10 mL 的 MM 培养基,接种培养 3 d 的菌种,加 10 mL 甲烷培养,以 102G 型气相色谱氢焰检测器检测甲烷消耗量。以 100% 纯甲烷气体作标准气体,在 100 mL 血清瓶中加入不同量的标准甲烷气体,获得不同浓度的标准气体,然后制作甲烷含量与峰高的标准曲线,样品中甲烷含量根据标准曲线进行换算。甲烷检测条件为: N_2 25 mL/min, H_2 60~70 mL/min,空气 600~700 mL/min,层析柱温 38℃,担体 GDX-502,出峰时间 17 s。用甲烷浓度占初始甲烷浓度的百分比表示菌株对甲烷的利用率。

1.7 以甲烷为碳源的菌体生长量的测定

在装有 4.5 mL MM 培养基的密闭厌氧试管中,接入 0.5 mL 已培养 3 d 的菌种,密封,然后加 4 mL 的纯甲烷气体,置于试管架上于 30℃ 摇瓶培养,每隔一定时间用紫外光栅分光光度计在 600 nm 波长测其光密度,重复两次,绘制分离菌株的生长曲线。

2 结果与分析

2.1 噬甲烷菌的富集、分离和纯化

经多次富集、转接、滚管、菌落挑取、扩大培养、甲烷氧化能力检测,获得多株能在好氧条件下以甲烷作为碳源、生长良好的细菌菌株。其中,以命名为 ZD4 的菌株氧化甲烷的能力最强,同时可以在加富 MM 培养基上良好生长。

2.2 分离菌株的细胞形态学

单菌落培养 4 d 后,取样,采用透射电子显微镜观测菌株 ZD4 的细胞形态为杆状或略弯,大小为 (0.4~

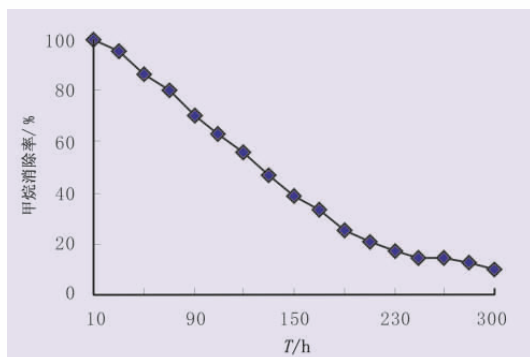


图 5 ZD4 菌株的甲烷消除率

Fig. 5 Methane utilization of the strain ZD4

3 结论

瓦斯事故是威胁煤矿安全的头号大敌, 如何实施综合治理、遏制重特大瓦斯事故的发生, 已成为全社会的主要任务之一。相关研究表明, 甲烷氧化细菌 (Methanotrophs) 是一类以甲烷为唯一碳源和能源生长的细菌, 它们能通过以甲烷单加氧酶 (Methane monooxygenase, MMO) 开始的一个酶系在分子氧作用下将甲烷直接氧化成甲醇, 再由其他酶最终代谢成 CO_2 和水^[13], 本文分离获得的菌株可以甲烷为唯一碳源而繁衍, 1 周内甲烷气的去除率达 85%, 具有较高的甲烷利用能力。利用生物技术, 进一步对该菌株进行煤矿井下瓦斯消除功能性研究, 以控制煤矿井下甲烷含量, 在理论上是完全可行的。本研究的深入将大大推动微生物技术在煤矿瓦斯治理中的应用, 为煤矿瓦斯防治提供全新方法与重要材料。

参考文献 (References)

- [1] 李 平. 国家力推煤矿瓦斯治理技术攻关[J]. 化工经济技术信息, 2005, 5: 5-6.
LI Ping. Prevent and cure coal methane technology was pushed in China[J]. Chemical Industry Economic Technological Information, 2005, 5: 5-6.
- [2] 方焕明. 综放工作面瓦斯治理技术探讨 [J]. 煤炭工程, 2005, 3: 56-57.
FANG Huanming. Analyse the prevention and cure technology of methane in a long wall with top-coal caving mining[J]. Coal Engineering, 2005, 3: 56-57.
- [3] 柯 为. 治理煤矿瓦斯爆炸的微生物技术 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 460.
KE Wei. Microbiological technology to prevent the methane in coal mine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(3): 460.
- [4] 闵 航, 谭玉龙, 吴伟祥. 一株厌氧甲烷氧化菌菌株的分离、纯化和特征研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, 28(6): 619-624.
MIN Hang, TAN Yulong, WU Weixiang. Isolation, purification and characterization of an anaerobic methane oxidizer [J]. Journal of Zhejiang University (Agr Life Sci ed), 2002, 28(6): 619-624.
- [5] 陈劲春, 李 珊, 陶慧明. 一株甲烷氧化杆菌的分离及其功能的初步研究[J]. 北京化工大学学报, 1999, 26(1): 8-11.
CHEN Jinchun, LI Shan, TAO Huiming. Isolation, characterization and function test of a strain of methanotrophic bacterium [J]. Journal of Beijing University of Chemistry Technology, 1999, 26(1): 8-11.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG Xiuzhu, CAI Miaoying. Manual of familiar determinative bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [7] F·奥斯伯, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
AUSUBEL F M, *et al.* Short protocols in molecular biology [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [8] 段学军, 闵 航. 一株抗镉细菌的分离鉴定及其抗性基因定位的初步研究[J]. 环境科学学报, 2004, 14(1): 154-158.
DUAN Xuejun, MIN Hang. Isolation, identification and preliminary studies on the resistance gene detection of a Cd-resisting bacterium[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2004, 24(1): 154-158.
- [9] DEVEREUX R, WILLIS S G. Amplification of ribosomal RNA sequences. Molecular microbial ecology manual[M]. the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995, 3.3.11: 11.
- [10] DAMIANI G, AMEDEO P, BANDI C, *et al.* Bacteria identification by PCR-based techniques [M]. London: CRC Press, 1996: 167-17.
- [11] NALIN R, SIMONET P, VOGEL T M, *et al.* Rhodanobacter lindaniclasticus gen nov, sp nov, a lindane-degrading bacterium[J]. Int J Sys Bacteriol, 1999, 49(1): 19-23.
- [12] BLAST finds regions of similarity between biological sequences[DB/EB]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.
- [13] 梁战备, 史奕一, 岳 进. 甲烷氧化菌研究进展 [J]. 生态学杂志, 2004, 23(5): 198-205.
LIANG Zhanbei, SHI Yiyi, YUE Jin. Advances in the rearch of methanotroph [J]. Chinese Journal of Ecology, 2004, 23(5): 198-205.

(责任编辑 朱 宇)