



## 一株促甲烷氧化假单胞菌 *Pseudomonas putida* P7 的分离及电活性特征

郝钦钦<sup>1,2,3</sup>, 张月超<sup>1,2,3</sup>, 李新<sup>1,2,3</sup>, 刘芳华<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台 264003

<sup>2</sup> 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室(烟台海岸带研究所), 山东 烟台 264003

<sup>3</sup> 中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:**【目的】解析一株从黄河三角洲湿地甲烷氧化富集物中分离获得的甲烷氧化菌伴生菌的生理学及电化学特性, 并探究该菌株对甲烷氧化过程的影响。【方法】使用高通量测序技术解析甲烷氧化富集物的菌群结构, 采用稀释涂布法、平板划线法分离甲烷氧化菌的伴生菌, 通过16S rRNA基因测序技术进行菌株初步鉴定。利用扫描电子显微镜观察菌株形态, 并通过气相色谱(gas chromatography, GC)检测伴生菌利用甲烷情况以及对甲烷氧化菌氧化甲烷效率的影响。采用双室微生物燃料电池(microbial fuel cells, MFCs)及差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)检测菌株的电化学活性。【结果】黄河三角洲湿地土壤甲烷氧化富集物主要的好氧甲烷氧化菌为甲基杆菌属 *Methylobacter*, 同时还发现一些伴生菌。分离得到一株甲醇利用菌P7, 其16S rRNA基因序列与恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 的相似性达99.79%。扫描电镜结果显示该菌株为杆状, 长约1.5–2.5  $\mu\text{m}$ , 宽度约为0.5  $\mu\text{m}$ 。GC检测结果显示, 该菌株不能利用甲烷, 但与甲烷氧化菌共培养时, 可以促进甲烷氧化( $P<0.05$ )。双室MFCs检测结果显示该菌株具有电活性, 最大电流输出密度为28  $\text{mA}/\text{m}^2$ , DPV检测结果显示该菌株主要的氧化峰和还原峰分别位于-0.17 V和-0.25 V。【结论】本研究从黄河三角洲湿地甲烷氧化富集物中获得一株具有电活性的甲烷氧化菌的伴生菌恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* P7, 该菌株可以促进甲烷氧化。本研究加深了对甲烷氧化过程中伴生菌的生理学特性及功能的认识。

**关键词:** 甲烷氧化, 湿地, *Pseudomonas putida*, *Methylobacter*, 电化学活性

基金项目: 国家自然科学基金(91751112); “泰山学者”青年专家计划(tsqn20161054)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-535-2109268; E-mail: fhliu@yic.ac.cn

收稿日期: 2020-03-28; 修回日期: 2020-05-17; 网络出版日期: 2020-05-19

甲烷( $\text{CH}_4$ )是地球大气中仅次于二氧化碳( $\text{CO}_2$ )的温室气体。大气中甲烷含量远低于二氧化碳含量,但其辐射效率是二氧化碳的 26.5 倍<sup>[1]</sup>,拥有更高的全球增温潜势<sup>[2]</sup>。甲烷氧化菌(Methanotrophs)利用甲烷作为唯一碳源和能源,是自然环境中甲烷的唯一生物汇,包括好氧甲烷氧化菌和厌氧甲烷氧化菌。相较于难纯培养的厌氧甲烷氧化菌,好氧甲烷氧化菌生长快易分离。好氧甲烷氧化菌广泛分布在海洋、湿地等<sup>[3-4]</sup>生态环境中,在全球碳循环过程中发挥着重要作用。

甲基营养菌(Methylotrophy)是一类能够利用一碳化合物(如甲烷、甲醇、甲醛、甲酸等)作为唯一碳源和能源的微生物,在自然界广泛分布<sup>[5]</sup>。在好氧甲烷氧化菌中,甲烷经过甲烷单加氧酶氧化成甲醇,之后经甲醇脱氢酶作用进一步氧化为甲醛,再通过多酶系统氧化为甲酸<sup>[6]</sup>。这些一碳代谢产物可以被甲基营养菌利用,用于生长代谢<sup>[7]</sup>。因此,在分离甲烷氧化菌的过程中,会发现甲基营养型伴生菌存在<sup>[8]</sup>。这些甲基营养菌可以解除甲烷氧化过程中代谢物(甲醇、甲醛等)累积产生的抑制效应,同时有些伴生菌产生的分泌物可以促进甲烷氧化,如根瘤菌产生的钴胺素(Cobalamin)<sup>[9]</sup>。然而,有些非甲烷氧化菌(如 *Pseudomonas aeruginosa*)与甲烷氧化菌共培养时表现出抑制甲烷氧化的作用<sup>[7]</sup>。因此,不同菌种对甲烷氧化过程的影响存在差异,研究甲烷氧化菌伴生菌的生理学特性,有助于加深对微生物种间相互作用机制的认识。

电活性微生物是一类能够将胞内有机物氧化产生的电子传递到细胞外或从细胞外接收电子进行代谢的功能微生物<sup>[10]</sup>。当胞外固态电子受体是电极时,电活性微生物可以产生电流,该类

微生物可应用于构建微生物燃料电池(Microbial fuel cell, MFC)。目前,关于电活性微生物的研究主要集中在地杆菌属(*Geobacter*)<sup>[11-13]</sup>和希瓦氏菌属(*Shewanella*)<sup>[14-15]</sup>,自然界丰富的电能微生物资源仍需进一步挖掘。

本研究从甲烷氧化富集物中分离甲烷氧化菌的伴生菌,通过分离、纯化和鉴定获得了一株可以促进甲烷氧化的电活性菌株 *Pseudomonas putida* P7。该研究有助于加深对甲烷氧化过程中伴生菌的生理学特性及功能的认识,丰富了电能微生物的种类。

## 1 材料和方法

### 1.1 甲烷氧化菌富集物的获得及群落结构分析

从黄河三角洲湿地采集土壤样品,接种到甲烷氧化菌的培养基中富集培养,获得稳定氧化甲烷富集物<sup>[16]</sup>。甲烷氧化富集物培养 20 d 后,取 5 mL 培养液在 5000 r/min 下离心 5 min,去除上清,收集菌体。菌体经过 DNA 提取、16S rRNA 扩增(338F-ACTCCTACGGGAGGCAGCA/806R-GGACTACHVGGGTWTCTAAT),送于微基生物科技(上海)有限公司进行高通量测序,并进行生物信息分析<sup>[17]</sup>。

### 1.2 细菌的分离与鉴定

修改后的 NMS (nitrate mineral salts)培养基包括(g/L):  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.14,  $\text{KNO}_3$  1.0, 琼脂 18, pH 为 6.8<sup>[18]</sup>。培养基分装后于 121 °C 灭菌 20 min。灭菌后,补加 50 mL/L 磷酸溶液(5.44 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.68 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )和 2 mL/L 微量元素液(g/L,  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  1.0,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.0,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.8,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.03,

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.03, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.6, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.02, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05)。以甲醇(5%)作为碳源,摇匀后倒平板。

以 0.05 mL 的甲烷氧化富集物菌液进行平板涂布,之后于 30 °C 暗室培养。挑取单菌落并在固体培养基上继续平板划线,重复该步骤 3 次。将纯化后的 3 个单菌落分别接种到 5 mL 液体培养基,并添加甲醇(5%)作为碳源。随后,以菌液作为 DNA 模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系组成(50  $\mu$ L): 10 $\times$ ExTaq buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 5.0  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4.0  $\mu$ L, 引物 27F/1492R (10  $\mu$ mol/L)各 2.0  $\mu$ L, Ex Taq (5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, DNA 模板 2.0  $\mu$ L, 无菌超纯水 34.75  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。采用 1%琼脂糖凝胶电泳定性检测 PCR 扩增产物。菌株进行 16S rRNA 测序分析[英潍捷基(上海)贸易有限公司],之后将序列提交到 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)数据库(MT230035)。利用 NCBI 数据库 Nucleotide BLAST 功能进行同源性比对,使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树,方法为 Neighbor-Joining,其 Bootstrap 值设为 1000。

### 1.3 菌株的形态观察

扫描电子显微镜观察:取 2 mL 对数期菌液,5000 r/min 离心 3 min,弃上清;加入 2 mL 0.1 mol/L PBS 缓冲液,重悬后 5000 r/min 离心 3 min,重复清洗 3 遍;加入 1 mL 2.5%戊二醛磷酸缓冲液(pH 7.2),于 4 °C 固定过夜;用 0.15%的戊二醛磷酸缓冲液冲洗;依次用 30%、50%、70%、90%和无水乙醇进行梯度脱水,每次脱水 15 min;用叔丁醇置换乙醇。取 0.1 mL 菌液滴加

到盖玻片上,于超净工作台晾干;经镀金后,在扫描电子显微镜下观察菌体形态。

### 1.4 菌株利用甲烷能力及对甲烷氧化的影响

配制 NMS 液体培养基,取 4.5 mL 分装于 25 mL 厌氧管,取分离的菌株 0.5 mL 接种到培养基中,同时设置不接菌的对照组,并添加 5%甲烷为底物,检测初始和培养 13 d 后的甲烷浓度。气相色谱仪(安捷伦 7820A)检测条件:检测器 FID,温度 300 °C;柱箱温度 80 °C;甲烷出峰时间为 1.0 min,最低检测限约为 0.0008 mmol/L。

分离菌株与甲烷氧化菌共培养。*Methylobacter* sp. YHQ (MT242555)分离自本研究的甲烷氧化富集物<sup>[16]</sup>。将菌株 *Methylobacter* sp. YHQ 和分离的菌株分别培养到对数期,分别取 25 mL 菌体,5000 r/min 下离心 3 min,得到 OD<sub>600</sub> 为 0.1 的菌悬液。取菌悬液各 1 mL 于 125 mL 的西林瓶中(25 mL 工作液)共培养,并设有不接菌和接种菌株 YHQ 的对照组,添加 25%甲烷为底物,于 30 °C 暗室培养。检测培养过程中甲烷浓度变化。

### 1.5 电化学活性检测

**1.5.1 双室微生物燃料电池:**构建“H”型双室微生物燃料电池。将灭菌后的 MFCs 在超净工作台上进行组装,阳极室和阴极室之间以质子交换膜分隔,电极为石墨板(30 mm $\times$ 25 mm $\times$ 3 mm),以钛丝连接,外电路连接 1000  $\Omega$  的电阻。阳极室注入 90 mL 无菌 NMS 培养基,5 mL 甲醇;阴极室为 100 mL 50 mmol/L 铁氰化钾磷酸溶液。组装后阳极室进行除氧处理(氮吹 25 min)。于超净工作台中接种菌液(5 mL),以不接菌的空白培养基作为对照组。将电池连接到数据采集系统进行电压信号采集,每 60 s 采集 1 次电压信号。

**1.5.2 差分脉冲伏安扫描：**差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)检测 MFCs 微生物阳极室氧化还原特性。在开路状态下, 以阳极为工作电极, 铂电极为对电极, 并加入参比电极(Ag/AgCl), 依次与 CHI 660E 电化学工作站连接。静置 10 min 后, 在电位 $-1.6-0.8$  V 范围内, 采用 DPV 进行扫描, 记录氧化峰电位和氧化峰电流, 电流为负。之后, 从  $0.8--1.6$  V 范围内扫描, 记录还原峰电位和还原峰电流, 电流为正。

## 2 结果和分析

### 2.1 甲烷氧化富集物的菌群结构

16S rRNA 高通量测序结果显示, 在甲烷氧化富集物的菌群结构中, 排名前七菌属的相对丰度总和达 95.19%。其中, 主要的甲烷氧化菌为甲基杆菌属 *Methylobacter*, 其相对丰度为 2.58% (图 1)。伴生菌的优势类群为分枝杆菌属 *Mycobacterium*, 相对丰度为 62.47%, 此外, 还有慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium*、草螺菌属 *Herbaspirillum*、藤黄单胞菌属 *Luteimonas*、阿菲波菌属 *Afipia*、假单胞菌属 *Pseudomonas*, 这些菌属的相对丰度都>1%。好氧甲烷氧化菌在利用甲烷过程中会产生甲醇、甲醛、甲酸等有机小分子物质<sup>[6]</sup>, 这些伴生菌可能以这些中间代谢产物为碳源进行生长。

### 2.2 菌株 16S rRNA 序列分析及系统发育树的构建

从甲烷氧化富集物中分离到 3 株甲醇降解菌, 通过测定菌株的 16S rRNA 基因序列并比对后发现 3 株菌的序列相似, 因此选择 P7 菌株作为代表进行后续研究。P7 菌株基因片段的测定长

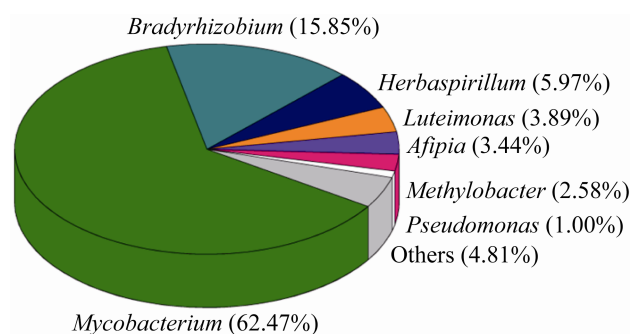


图 1. 甲烷氧化富集物在属水平上的菌群结构

Figure 1. Bacterial community composition of the aerobic methanotrophs enrichments at the genus levels.

度为 1465 bp。选取与该菌株相似性较高的序列及同属的模式种构建系统发育进化树。结果表明 P7 与菌株 *Pseudomonas putida* GNL8 (FJ768454) 的相似性达 99.79%, 处于系统发育树的同一分支, 同源性最高(图 2)。因此, 初步确认该菌株为 *Pseudomonas putida*, 并命名为 *Pseudomonas putida* P7。

### 2.3 形态观察

菌株 *P. putida* P7 在以甲醇为底物的 NMS 固体平板上呈圆形菌落, 边缘不整齐, 表面较光滑, 为淡青色不透明状(图 3-C)。革兰氏染色呈红色, 为革兰氏阴性菌。在扫描电子显微镜下观察, 发现菌体呈杆状, 长度约为  $1.5-2.5$   $\mu\text{m}$ , 宽度约为  $0.5$   $\mu\text{m}$  (图 3-A、B)。

### 2.4 利用甲烷能力及对甲烷氧化的影响

以甲烷为唯一碳源培养菌株 *P. putida* P7, 用气相色谱检测甲烷浓度变化, 结果显示在第 13 天时, 接菌的实验组与不接菌的对照组在减少的甲烷量上没有明显差异(图 4-A), 说明该菌株不可以利用甲烷。之后, 将菌株 *P. putida* P7 与甲烷氧

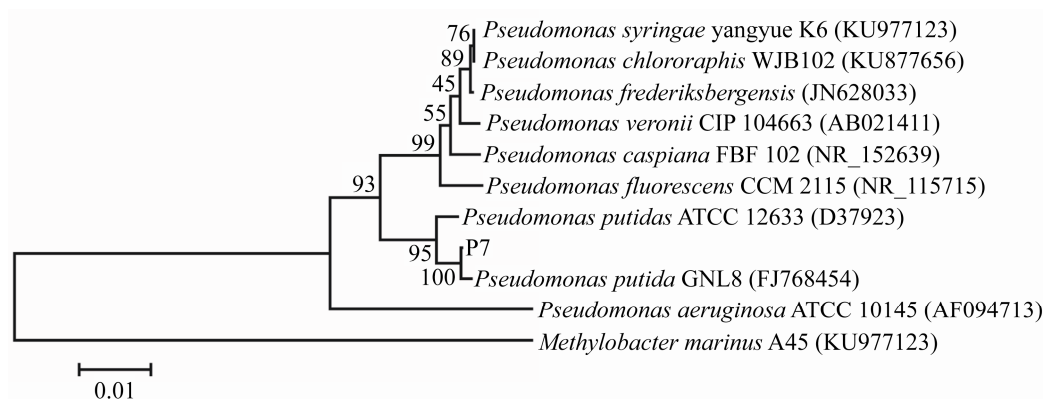


图 2. 菌株 P7 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

Figure 2. Phylogenetic analysis of strain P7 based on 16S rRNA gene sequence. Evolutionary distances showed in Figure 2 were calculated by MEGA 7.0; Bootstrap=1000. Bar, 0.01 substitution per nucleotide. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

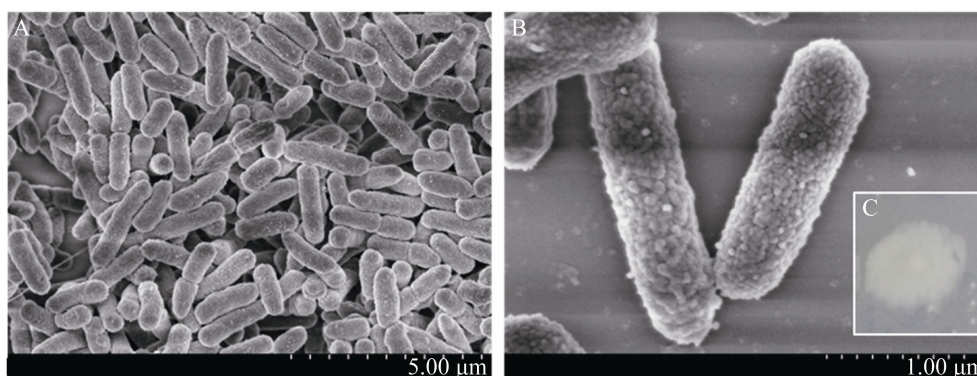


图 3. 菌株 *Pseudomonas putida* P7 的扫描电镜图像(A、B)及单菌落形态(C)

Figure 3. The images of scanning electron microscope (A, B) and signal colony (C) of strain *Pseudomonas putida* P7.

化菌 *Methylobacter* sp. YHQ 共培养, 同样以甲烷为唯一碳源, 检测甲烷消耗量。结果如图 4-B 所示, 菌株 *Methylobacter* sp. YHQ 可以利用甲烷且在第 3 天已进入稳定期, 之后甲烷不再被利用, 但加入菌株 *P. putida* P7 后, 甲烷仍可以被继续消耗。在检测的第 7 天, 接种甲烷氧化菌 *Methylobacter* sp. YHQ 的对照组消耗甲烷量为 5.17 mmol/L, 而同时接种菌株 *Methylobacter* sp. YHQ 和 *P. putida* P7 的实验组利用甲烷量为 5.52 mmol/L (图 4-B), 对

照组和实验组在甲烷消耗量上存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。因此, 菌株 *P. putida* P7 具有促进甲烷氧化的作用, 表明 *Pseudomonas* 在甲烷氧化富集物中可以促进甲烷氧化菌氧化甲烷, 有利于体系输入更多碳源。

## 2.5 电化学活性测试

构建双室 MFCs, 对菌株 *P. putida* P7 的电化学活性进行检测。双室 MFCs 的检测结果显示, 接种 *P. putida* P7 的实验组能够产生电流。

且电流的上升速度较快, 在大约 20 h 时电流密度达到最大值  $28 \text{ mA/m}^2$ , 之后电流呈稳定趋势, 直到第 50 h 电流密度开始逐步降低(图 5-A)。这表明 *P. putida* P7 是一株产电菌, 且产电时间较长。结束电流密度检测后, 通过 DPV 检测该体系的氧化还原特征。DPV 扫描结果显示, 该体系主要的氧化峰和还原峰分别位于  $-0.17 \text{ V}$  和  $-0.25 \text{ V}$ , 并在  $-0.94 \text{ V}$  及  $0.57 \text{ V}$  处有小的氧化还原峰

(图 5-B), 表明该菌株可以产生氧化还原物质。菌株 *P. putida* P7 培养结束时, 在电池中会看到图 5-C 的情形。由于菌株进入衰退期, 大量菌体沉在电池底部和瓶壁上(箭头所示), 而石墨电极上只附着少量的菌体(圆圈所示), 由此可能导致电流密度的下降。该结果说明 *P. putida* P7 可以产生氧化还原物质, 促进电子传递, 这有利于甲烷氧化富集物中物种间的电子交换。

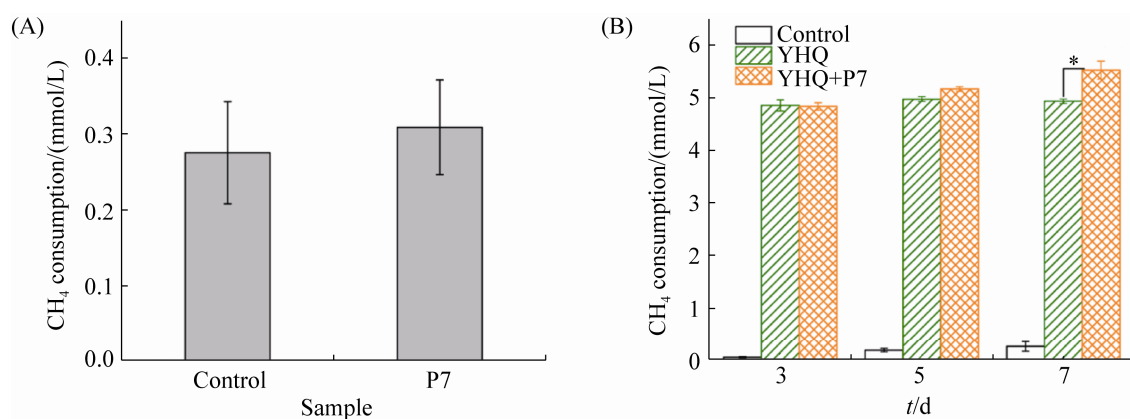


图 4. 菌株 *Pseudomonas putida* P7 利用甲烷特性(A)及对甲烷氧化菌氧化甲烷的影响(B)

Figure 4. The propertie of utilizing methane and influence on methane oxidation by methanotroph of strain *Pseudomonas putida* P7. Bars represented standard deviations of the means. Asterisk indicated significant difference ( $P < 0.05$ ) by ANOVA analyse.

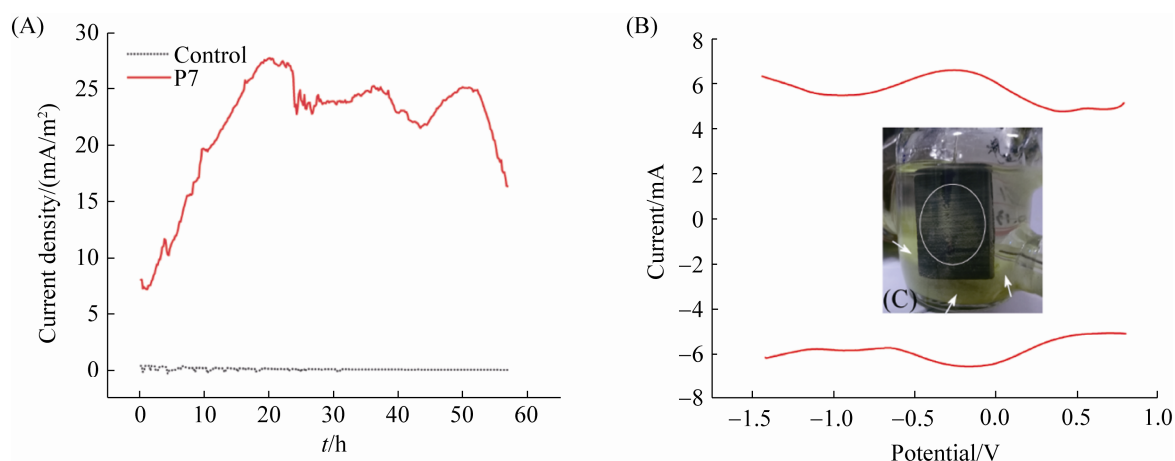


图 5. 菌株 *Pseudomonas putida* P7 的电化学活性(A)和氧化还原特征(B)及在电池中的附着形态(C)

Figure 5. The electrochemical activity (A) and redox characters (B) and location in MFCs (C) of strain *Pseudomonas putida* P7.



### 3 讨论

在以甲烷为唯一碳源和能源富集甲烷氧化菌的过程中, 会存在多种伴生菌。以黄河三角洲湿地土壤为接种物获得的甲烷氧化富集物, 主要的甲烷氧化菌为 *Methylobacter*, 这与该富集物来源土壤的主要甲烷氧化类群一致<sup>[16]</sup>。甲烷氧化富集物中还存在 *Mycobacterium*、*Bradyrhizobium*、*Herbaspirillum*、*Luteimonas*、*Afipia*、*Pseudomonas* 等细菌类群。在以污水、污泥为接种物富集甲烷氧化菌时, 除了甲烷氧化菌外, 也会检测到其他微生物<sup>[19-20]</sup>。Martin 等<sup>[21]</sup>采用 16S rRNA 基因测序技术对能降解多种有机污染物的甲烷氧化混合菌分析, 发现除了优势的甲烷氧化菌 *Methylosinus*/*Methylocystis* 外, 还包含 *Pseudomonas* 等非甲烷氧化伴生菌。*Mycobacterium* 和 *Bradyrhizobium* 在该甲烷氧化富集物中是优势类群, 据报道这些微生物可以降解甲醇<sup>[22]</sup>。因此, 这些伴生菌可能利用甲烷氧化菌氧化甲烷产生的甲醇作为底物进行生存。

以甲醇为底物, 从甲烷氧化富集物中获得一株甲烷氧化菌的伴生菌 *P. putida* P7。Riss 等<sup>[23]</sup>研究结果证实菌株 *P. putida* 9816 可以利用甲醇生长。菌株 *P. putida* P7 不能利用甲烷, 但可以促进甲烷氧化菌 *Methylobacter* sp. YHQ 氧化甲烷。类似地, Ho 等<sup>[24]</sup>发现 *P. putida* 可以促进甲烷氧化菌 *Methylomonas* spp. 生长, 且 *P. putida* 的接种量越多促进效果越显著。甲烷氧化过程中产生的中间代谢产物, 如甲醇、甲醛, 积累后会抑制甲烷氧化过程<sup>[25]</sup>。Rajala 等<sup>[26]</sup>研究发现在深层地下水样中添加甲烷和甲醇后, *Pseudomonas* 变为优势属, 推测是因为该属有许多可以利用甲醇的微

生物。因而, 本研究中 *P. putida* P7 对累积代谢产物甲醇的祛除作用可能是促进甲烷氧化的主要原因。在共培养后期, *P. putida* P7 促进 *Methylobacter* sp. YHQ 氧化甲烷的效果更明显。Kim 等<sup>[27]</sup>发现 *P. putida* AD-21 具有反硝化作用。最新的研究发现在低氧条件下, 甲烷氧化菌可以与利用甲醇的反硝化细菌协同作用<sup>[28-29]</sup>。在 *P. putida* P7 和 *Methylobacter* sp. YHQ 共培养的后期, 体系中氧气浓度较低, 我们推测 *P. putida* P7 利用 *Methylobacter* sp. YHQ 氧化甲烷产生甲醇并还原体系中的硝酸盐。此过程中, 甲醇不需要进一步氧化, 对氧气的需求减少。因此, *P. putida* 缓解了甲烷氧化菌在培养后期受低氧条件的限制, 有利于甲烷的继续利用。Iguchi 等<sup>[9]</sup>将甲烷氧化菌 *Methylovulum miyakonense* HT12 与根瘤菌 *Rhizobium* sp. Rb122 共培养, 检测发现后者产生的钴胺素可以促进前者的生长。*P. putida* P7 是否可以产生钴胺素类似物仍需要进一步的实验探究。

菌株 *P. putida* P7 具有电活性。*P. putida* 是好氧菌, 但研究发现该菌也可以在厌氧条件下发挥作用。Mahendran 等<sup>[30]</sup>证明 *P. putida* 在有氧和无氧的条件下都可以生长。在厌氧条件下, 一株 *P. putida* 可以产生电流<sup>[31]</sup>。类似地, Lai 等<sup>[32]</sup>发现 *P. putida* F1 在厌氧的电化学系统中可以产生电流, 最大电流密度约为 600 mA/m<sup>2</sup>, 而分离的 *P. putida* P7 产生的最大电流密度为 28 mA/m<sup>2</sup>, 这可能与底物的种类有关, 前者使用的是葡萄糖而后者是以甲醇为底物。根据 DPV 检测结果可知, 接种 *P. putida* P7 的电化学体系分别在 -0.17 V 和 -0.25 V 出现氧化峰和还原峰, 表明该菌株可以产生氧化还原介质。*P. putida* 产生的胞外聚合物中包含具有潜在氧化还原性质的亚铁血红素

结合蛋白<sup>[33]</sup>。此外, *P. putida* 还含有可以进行电子传递的血红素-硫铁蛋白(Heme-thiolate proteins), 其中的  $\text{Fe}^{\text{III/II}}$  氧化还原对在 $-0.227\text{ V}$ 处有峰<sup>[34]</sup>, 这与 *P. putida* P7 的氧化峰和还原峰( $-0.17\text{ V}/-0.25\text{ V}$ )非常接近。以上研究暗示 *P. putida* P7 可能通过氧化还原蛋白直接将电子传递给电极产生电流。与 *P. putida* 亲缘关系最近的铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 是常见的产电菌, 能够产生吩嗪类(phenazine)的电子穿梭体, 该物质可作为自身与电极间的电子传递介体提高产电能力<sup>[35]</sup>。然而, Stock 等<sup>[7]</sup>的研究发现, *P. aeruginosa* LMG 12228 会抑制甲烷氧化菌 *Methylobacterium radiotolerans* LMG 2269 的生长。Zuo 等<sup>[36]</sup>表明 *Ochrobactrum anthropi* 具有电活性。当添加 *O. anthropi* 到甲烷氧化菌 *Methylobacter sp.* YHQ 的培养体系后, *O. anthropi* 表现出促进甲烷氧化菌生长的功能<sup>[24]</sup>。本研究中的 *P. putida* P7 具有电活性, 可以促进 *Methylobacter sp.* YHQ 的甲烷氧化。因此, 电活性微生物的种类不同, 对甲烷氧化的影响也存在差异。

本研究从甲烷氧化富集物中分离得到一株具有促进甲烷氧化能力的电活性假单胞菌 *Pseudomonas putida* P7。该菌株的分离获得有助于加深对甲烷氧化过程中伴生菌的生理学特性及功能的认识, 丰富了电能微生物的种类, 为电能微生物学的发展积累了菌种资源。

## 参 考 文 献

- [1] Yashiro Y, Kadir WR, Okuda T, Koizumi H. The effects of logging on soil greenhouse gas ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) flux in a tropical rain forest, Peninsular Malaysia. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2008, 148(5): 799–806.
- [2] Edenhofer O, Seyboth K. Intergovernmental panel on climate change (IPCC). *Encyclopedia of Energy, Natural Resource,*

*and Environmental Economics*, 2013, 1: 48–56.

- [3] Cai YF, Zheng Y, Bodelier PLE, Conrad R, Jia ZJ. Conventional methanotrophs are responsible for atmospheric methane oxidation in paddy soils. *Nature Communications*, 2016, 7: 11728.
- [4] He ZF, Wang JQ, Hu JJ, Yu HQ, Jetten MSM, Liu H, Cai CY, Liu Y, Ren HX, Zhang X, Hua ML, Xu XH, Zheng P, Hu BL. Regulation of coastal methane sinks by a structured gradient of microbial methane oxidizers. *Environmental Pollution*, 2019, 244: 228–237.
- [5] Trotsenko YA, Murrell JC. Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. *Advances in Applied Microbiology*, 2008, 63: 183–229.
- [6] McDonald IR, Murrell JC. The methanol dehydrogenase structural gene *mxhF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8): 3218–3224.
- [7] Stock M, Hoefman S, Kerckhof FM, Boon N, De Vos P, De Baets B, Heylen K, Waegeman W. Exploration and prediction of interactions between methanotrophs and heterotrophs. *Research in Microbiology*, 2013, 164(10): 1045–1054.
- [8] Bowman J. The methanotrophs-the families methylococcaceae and methylocystaceae//Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. New York: Springer, 2006: 266–289.
- [9] Iguchi H, Yurimoto H, Sakai Y. Stimulation of methanotrophic growth in cocultures by cobalamin excreted by rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(24): 8509–8515.
- [10] Gregory KB, Lovley DR. Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(22): 8943–8947.
- [11] Liu FH, Rotaru AE, Shrestha PM, Malvankar NS, Nevin KP, Lovley DR. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *Energy & Environmental Science*, 2012, 5(10): 8982–8989.
- [12] Liu FH, Rotaru AE, Shrestha PM, Malvankar NS, Nevin KP, Lovley DR. Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated c-type cytochrome in extracellular electron exchange. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(3): 648–655.
- [13] Zheng SL, Liu FH, Li M, Xiao LL, Wang OM. Comparative transcriptomic insights into the mechanisms of electron transfer in *Geobacter* co-cultures with activated carbon and magnetite. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(7): 787–798.



- [14] Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, Coursolle D, Gralnick JA, Bond DR. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(10): 3968–3973.
- [15] Li X, Zhang YC, Liu FH. Physiological characteristics of an intestinal electroactive strain *Shewanella marisflavi* UU-3-2 from *Urechis unicinctus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(7): 1401–1412. (in Chinese)  
李新, 张月超, 刘芳华. 一株单环刺螵肠道电活性希瓦氏菌 *Shewanella marisflavi* 的生理学特性. *微生物学报*, 2020, 60(7): 1401–1412.
- [16] Hao QQ, Liu FH, Zhang YC, Wang OM, Xiao LL. *Methylobacter* accounts for strong aerobic methane oxidation in the Yellow River Delta with characteristics of a methane sink during the dry season. *Science of the Total Environment*, 2020, 704: 135383.
- [17] Xiao LL, Liu FH, Liu JC, Li JJ, Zhang YC, Yu JF, Wang OM. Nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles accelerating electromethanogenesis on an hour-long timescale in wetland soil. *Environmental Science: Nano*, 2018, 5(2): 436–445.
- [18] Puri AW, Owen S, Chu F, Chavkin T, Beck DAC, Kalyuzhnaya MG, Lidstrom ME. Genetic Tools for the industrially promising methanotroph *Methylobacterium buryatense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(5): 1775–1781.
- [19] Li YC, Wang YM, Lin ZY, Wang JL, He Q, Zhou J. A novel methanotrophic co-metabolic system with high soluble methane monooxygenase activity to biodegrade refractory organics in pulping wastewater. *Bioresource Technology*, 2018, 256: 358–365.
- [20] Zhang TT, Wang XW, Zhou JT, Zhang Y. Enrichments of methanotrophic-heterotrophic cultures with high poly-β-hydroxybutyrate (PHB) accumulation capacities. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 65: 133–143.
- [21] Hesselsoe M, Boysen S, Iversen N, Jørgensen L, Murrell JC, McDonald I, Radajewski S, Thestrup H, Roslev P. Degradation of organic pollutants by methane grown microbial consortia. *Biodegradation*, 2005, 16(5): 435–448.
- [22] Kolb S. Aerobic methanol-oxidizing *Bacteria* in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 300(1): 1–10.
- [23] Riis V, Miethe D, Babel W. Formate-stimulated oxidation of methanol by *Pseudomonas putida* 9816. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, 67(4): 684–690.
- [24] Ho A, De Roy K, Thas O, De Neve J, Hoefman S, Vandamme P, Heylen K, Boon N. The more, the merrier: heterotroph richness stimulates methanotrophic activity. *The ISME Journal*, 2014, 8(9): 1945–1948.
- [25] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(2): 439–471.
- [26] Rajala P, Bomberg M. Reactivation of deep subsurface microbial community in response to methane or methanol amendment. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 431.
- [27] Kim M, Jeong SY, Yoon SJ, Cho SJ, Kim YH, Kim MJ, Ryu EY, Lee SJ. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(5): 498–502.
- [28] Xu XK, Zhu J, Thies JE, Wu WX. Methanol-linked synergy between aerobic methanotrophs and denitrifiers enhanced nitrate removal efficiency in a membrane biofilm reactor under a low O<sub>2</sub>:CH<sub>4</sub> ratio. *Water Research*, 2020, 174: 115595.
- [29] Zhu J, Wang Q, Yuan MD, Tan GYA, Sun FQ, Wang C, Wu WX, Lee PH. Microbiology and potential applications of aerobic methane oxidation coupled to denitrification (AME-D) process: a review. *Water Research*, 2016, 90: 203–215.
- [30] Mahendran B, Choi NC, Choi JW, Kim DJ. Effect of dissolved oxygen regime on growth dynamics of *Pseudomonas* spp during benzene degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(3): 350–354.
- [31] Lai B, Nguyen AV, Krömer JO. Characterizing the anoxic phenotype of *Pseudomonas putida* using a bioelectrochemical system. *Methods and Protocols*, 2019, 2(2): 26.
- [32] Lai B, Yu SQ, Bernhardt PV, Rabaey K, Virdis B, Krömer JO. Anoxic metabolism and biochemical production in *Pseudomonas putida* F1 driven by a bioelectrochemical system. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 39.
- [33] Li SW, Sheng GP, Cheng YY, Yu HQ. Redox properties of Extracellular Polymeric Substances (EPS) from electroactive bacteria. *Scientific Reports*, 2016, 6: 39098.
- [34] Udit AK, Hill MG, Gray HB. Electrochemical generation of a high-valent state of cytochrome P450. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, 100(4): 519–523.
- [35] Rabaey K, Boon N, Höfte M, Verstraete W. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(9): 3401–3408.
- [36] Zuo Y, Xing DF, Regan JM, Logan BE. Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(10): 3130–3137.

# Isolation and electroactive characteristics of a methane-oxidation promoting *Pseudomonas putida* P7

Qinqin Hao<sup>1,2,3</sup>, Yuechao Zhang<sup>1,2,3</sup>, Xin Li<sup>1,2,3</sup>, Fanghua Liu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong Province, China

<sup>2</sup> CAS Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong Province, China

<sup>3</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract: [Objective]** To analyze the physiological and electrochemical characteristics of a methanotrophs-associated bacteria isolated from the methanotrophic enrichments in the Yellow River Delta wetland soil, and to explore their effect on the methane oxidation process. **[Methods]** High-throughput sequencing was used to analyze microbial community of methanotrophic enrichments. The methanotrophs-associated strain was isolated using plate smearing and scribing method and initially identified by 16S rRNA gene sequencing. The morphology of the isolate was depicted by scanning electron microscopy. Gas chromatography was used to analyze the methane concentration, which showed the ability of utilizing methane and influence of improving methane oxidation by methanotroph. Two-chamber microbial fuel cells and Differential Pulse Voltammetry were used to test the electrochemical activity. **[Results]** The microbial community of methanotrophic enrichments from incubation of Yellow River Delta wetland soil included methanotrophs *Methylobacter* and other accompanying genera. We isolated a methanol-metabolizing bacterium, *Pseudomonas putida* P7 (with the similarity of 99.79%) which was a rod bacterium with the length between 1.5  $\mu\text{m}$  and 2.5  $\mu\text{m}$  and width about 0.5  $\mu\text{m}$ . The GC analysis showed that this strain could not use methane but improved methane oxidation ( $P < 0.05$ ). The maximum current density was 28  $\text{mA}/\text{m}^2$ , and the results of DPV revealed that the oxidation peak and reduction peak occurred at  $-0.17\text{ V}$  and  $-0.25\text{ V}$ , respectively. **[Conclusion]** We successfully isolated an electrochemical activity microbe, *Pseudomonas putida* P7, with ability of improving methane oxidation. This study deepened the understanding of the physiological characteristics and functions of the methanotroph-associated bacteria in the process of methane oxidation.

**Keywords:** methane oxidation, wetland, *Pseudomonas putida*, *Methylobacter*, electrochemical activity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (91751112) and by the Young Taishan Scholars Program of Shandong Province (tsqn20161054)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-535-2109268; E-mail: fhliu@yic.ac.cn

Received: 28 March 2020; Revised: 17 May 2020; Published online: 19 May 2020

刘芳华, 博士, 博士生导师, 研究员。2009 年获得中国科学院上海生命科学研究院微生物学博士学位。研究方向为环境电能微生物学。现任中国微生物学会地质微生物专业委员会委员和山东微生物学会理事。获山东省自然科学基金杰出青年基金及泰山学者青年专家计划资助。主持国家自然科学基金委“水圈微生物”重大研究计划等 10 余项目。形成了以生源要素耦合循环为特色的“环境电微生物学”新方向, 成果入编新版美国《微生物学》教科书, 成为 2019 年国际“研究前沿”。已发表论文 67 篇, SCI 收录 54 篇, 最高单篇 IF 达 30, 单篇最高他引 237 次, 其中 2 篇为自然指数期刊, 5 篇入选高被引论文, 申请发明专利 9 项, 参撰专著 3 部。

