ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第5期

Vol.33 No.5

2012

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版

中国期刊方阵 双奖期刊 中华人民共和国新闻出版总署

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第33卷 第5期
2012年5月15日

目 次

区域空气质量模拟中查表法的应用研究 …… 谢旻,王体健,江飞,李树,蔡彦枫,庄炳亮(1409)
长江三角洲地区秸秆露天焚烧大气污染物排放清单及其在空气质量模式中的应用 …… 苏继峰,朱彬,康汉青,王红磊,王体健(1418)
北京及周边城市一元脂肪酸大气颗粒物干沉降通量及来源分析研究 …… 徐小娟,李杏茹,王跃思,刘晨书,潘月鹏,王英锋(1425)
上海大气超细颗粒物和工业纳米颗粒的表征及细胞毒性的比较研究 …… 张睿,吕森林,尚羽,易飞,任晶晶,郝晓洁,安静,吴明红(1431)
青岛市大气 $PM_{2.5}$ 元素组成及来源研究 …… 李秀镇,盛立芳,徐华,屈文军(1438)
冬季天津家庭室内空气颗粒物中邻苯二甲酸酯污染研究 …… 王夫美,陈丽,焦姣,张雷波,姬亚芹,白志鹏,张利文,孙增荣,张星梅(1446)
再悬浮装置在大气 $PM_{2.5}$ 源谱分析中的应用 …… 段恒轶,钱冉冉,吴水平,印红玲(1452)
黔西南煤燃烧产物微量元素分布特征及富集规律研究 …… 魏晓飞,张国平,李玲,项萌,蔡永兵(1457)
三峡水库不同运行状态下支流澎溪河水-气界面温室气体通量特征初探 …… 蒋滔,郭劲松,李哲,方芳,白镭,刘静(1463)
香溪河库湾夏季温室气体通量及影响因素分析 …… 王亮,肖尚斌,刘德富,陈文重,王雨春,陈小燕,段玉杰(1471)
臭氧浓度升高与土壤湿度对农田土壤微生物呼吸温度敏感性的影响 …… 陈书涛,张勇,胡正华,史艳姝,沈小帅(1476)
托木尔峰青冰滩72号冰川径流水化学特征初步研究 …… 赵爱芳,张明军,李忠勤,王飞腾,王圣杰(1484)
五大连池水溶性有机磷矿化特性的研究 …… 张斌,席北斗,赵越,魏自民,白雪,王曼林(1491)
7条环太湖河流沉积物氮含量沿程分布规律 …… 卢少勇,远野,金相灿,焦伟,吴瑶洁,任德有,周羽化,陈雷(1497)
巢湖十五里河沉积物氮磷形态分布及生物有效性 …… 李如忠,李峰,周爱佳,童芳,钱家忠(1503)
北运河系地表水近10年来水质变化及影响因素分析 …… 郭婧,荆红卫,李金香,李令军(1511)
东莞运河排涝对东江河网水质影响分析 …… 孙磊,毛献忠,黄旻旻(1519)
北京平原区地下水污染源识别与危害性分级 …… 陆燕,何江涛,王俊杰,刘丽雅,张小亮(1526)
地下水曝气修复过程的三维数值模拟 …… 李恒震,胡黎明,王建,武晓峰,刘培斌(1532)
垂向水动力扰动机的蓝藻控制效应数值实验研究 …… 邹锐,周璟,孙永健,嵇晓燕,岳佳,刘永(1540)
新型生物岛栅中污染物去除的微生物机制研究 …… 高明瑜,谢慧君,王文兴(1550)
营养盐水平对念珠藻胞外有机物产生的影响 …… 齐飞,刘晓媛,徐冰冰,黄岳,封莉,张立秋(1556)
水网藻种植水对铜绿微囊藻生长的抑制作用研究 …… 傅海燕,柴天,赵坤,刘智峰,张明真,侯明,许鹏成(1564)
酞酸酯在模拟海河菹草微宇宙中的消减和分布特征 …… 迟杰,杨青(1570)
电子束辐射对铜绿微囊藻藻毒素产生和释放的抑制作用研究 …… 刘书宇,吴明红,姜钦鹏(1575)
青铜峡灌区典型排水沟水污特征解析 …… 李强坤,胡亚伟,罗良国(1579)
四溴双酚A的辐照降解研究 …… 李杰,徐殿斗,徐刚,马玲玲,吴明红(1587)
污泥基活性炭催化臭氧氧化降解水中微量布洛芬的效能研究 …… 王红娟,齐飞,封莉,张立秋(1591)
高水力负荷对人工湿地处理精养虾塘排水效果的影响 …… 李怀正,章星异,陈卫兵,叶剑峰(1597)
城市污水生物脱氮系统出水经氯胺消毒形成NDMA的影响因素研究 …… 尚晓玲,李咏梅(1604)
利用淀粉基共混物作为反硝化固体碳源的研究 …… 沈志强,吴为中,杨春平,陈佳利,王建龙(1609)
好氧污泥颗粒化过程中Zeta电位与EPS的变化特性 …… 王浩宇,苏本生,黄丹,崔晓姣,竺建荣(1614)
活性污泥对病毒的生物吸附特性 …… 周玉芬,郑祥,雷洋,陈迪(1621)
阴离子型聚丙烯酰胺在离子交换膜上的吸附规律 …… 邓梦洁,于水利,时文歆,衣雪松(1625)
两性修饰膨润土对苯酚的吸附及热力学特征 …… 李婷,孟昭福,张斌(1632)
表面活性剂对苯并[a]芘在黑炭表面吸附解吸的影响 …… 张景环,陈春溶,张玮航,栗桂州(1639)
南京市4个污水处理厂的活性污泥中细菌的分离鉴定和抗生素耐药性分析 …… 葛峰,郭坤,周广灿,张会娟,刘济宁,戴亦军(1646)
焦化废水中苯酚降解菌筛选及其降解性能 …… 陈春,李文英,吴静文,李静(1652)
Xanthobacter flavus DT8降解二噁烷的特性研究 …… 金小君,陈东之,朱润晔,陈静,陈建孟(1657)
未开发油气田地表烃氧化菌空间定量分布 …… 满鹏,齐鸿雁,呼庆,马安周,白志辉,庄国强(1663)
矿化垃圾中氧化甲烷兼性营养菌的筛选与生物特性研究 …… 赵天涛,项锦欣,张丽杰,全学军,赵由才(1670)
长江中游干流及22条支流表层水中多氯联苯的分布特征及其潜在风险 …… 李昆,赵高峰,周怀东,曾敏,廖柏寒,吴正勇,张盼伟,郝红(1676)
典型血吸虫病疫区表层水中酚类化合物的污染特征及潜在风险 …… 吴正勇,赵高峰,周怀东,李科林,曾敏,李昆,张盼伟,郝红(1682)
闽江福州段沉积物中多环芳烃的空间分布异质性研究 …… 陈卫锋,倪进治,杨红玉,魏然,杨玉盛(1687)
三峡库区蓄水运用期表层沉积物重金属污染及其潜在生态风险评价 …… 王健康,高博,周怀东,陆瑾,王雨春,殷淑华,郝红,袁浩(1693)
典型电器工业区河涌沉积物中重金属的分布和潜在生态风险 …… 邓代永,孙国萍,郭俊,张宏涛,张琴,许玫英(1700)
密云水库上游金属矿区土壤中重金属形态分布及风险评价 …… 高彦鑫,冯金国,唐磊,朱先芳,刘文清,季宏兵(1707)
湘西花垣矿区土壤重金属污染及其生物有效性 …… 杨胜香,袁志忠,李朝阳,龙华,唐文杰(1718)
基于GIS的某训练场土壤重金属污染评价 …… 刘玉通,方振东,杨琴,谢朝新,王大勇,毛华军(1725)
土壤质地和湿度对SVE技术修复苯污染土壤的影响 …… 刘少卿,姜林,姚珏君,李艳霞,刘希涛,林春野(1731)
蒙脱土、高岭土和针铁矿对DNA吸附与解吸特征 …… 王慎阳,饶伟,王代长,张亚楠,李腾,唐冰培,杨世杰(1736)
LNAPL在砂质含水层中动态迁移的电阻率法监测试验研究 …… 潘玉英,贾永刚,郭磊,李进军,单红仙(1744)
亚临界水解预处理稻草秸秆制备活性炭及表征 …… 董宇,申哲民,雷阳明,王茜,刘婷婷(1753)
蓝藻好氧堆肥及其氮素损失控制的研究 …… 任云,崔春红,刘奋武,占新华,周立祥(1760)
固定化微生物技术修复PAHs污染土壤的研究进展 …… 钱林波,元妙新,陈宝梁(1767)
《环境科学》征订启事(1483) 《环境科学》征稿简则(1620) 信息(1490,1496,1586,1743)

矿化垃圾中氧化甲烷兼性营养菌的筛选与生物特性研究

赵天涛[1,2], 项锦欣[1], 张丽杰[1], 全学军[1], 赵由才[2]
(1. 重庆理工大学化学化工学院, 重庆 400050; 2. 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 从填埋了 10 a 的矿化垃圾中分离得到 1 株能以甲烷为碳源和能源生长的菌株 DH, 经 NCBI 比对发现, 该菌株的 16S rDNA序列与微杆菌(*Microbacterium* sp.)3 个菌株的同源性在 99% 以上. 目前该菌株已经在中国典型培养物保藏中心申请了专利保藏, 保藏号为 M2010099. 微杆菌 DH 具有极强的温度耐受性, 最佳培养 pH 为 6.5, 以甲烷为碳源可实现高密度生长, 菌液 $D_{560\ nm}$ 值可达到 1.1 ~ 1.2. 微杆菌 DH 对甘露糖、果糖和葡萄糖 3 种单糖以及蔗糖和乳糖 2 种双糖的利用效果较好. 当以蔗糖和甘露糖为碳源时, 菌液 $D_{560\ nm}$ 值分别达到了 0.758 和 0.742. 与对照组相比, 喷洒 DH 菌液可以提高矿化垃圾的甲烷氧化率 1 倍以上. 微杆菌 DH 的发现克服了专一营养甲烷氧化菌难于扩大培养、活性低等工程应用问题, 为该类细菌在实际工程应用提供了生物学基础.

关键词: 微杆菌; 矿化垃圾; 兼性营养菌; 甲烷; 填埋场
中图分类号: X172 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2012)05-1670-06

Screening and Biological Characteristics of Amphitrophic Methane-Oxidizing Bacteria from Aged-Refuse

ZHAO Tian-tao[1,2], XIANG Jin-xin[1], ZHANG Li-jie[1], QUAN Xue-jun[1], ZHAO You-cai[2]
(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: A new kind of strain, which can utilize methane as carbon and energy source, was screened from 10-year aged-refuse. According to the biochemical characteristics and the 16S rDNA identification results, the strain belongs to *Microbacterium* sp. and was named as DH. And the patent preservation of the strain was carried out by China Center for Type Culture Collection (CCTCC NO. M2010099). *Microbacterium* sp. DH has great tolerance on temperature, and the best pH value of culture is 6.5. High cell density with the $D_{560\ nm}$ value of 1.1-1.2 was available with methane as carbon source. Monosaccharide (glucose, mannose and fructose) and disaccharide (lactose and sucrose) can be utilized well by *Microbacterium* sp. DH. The $D_{560\ nm}$ value of medium reached 0.758 and 0.742 with sucrose and mannose as carbon source, respectively. Methane-oxidation rates were enhanced significantly by adding *Microbacterium* sp. DH into aged-refuse. Compared with the controlled group, the methane-oxidation rates experimental group of increased more than 100%. Problems about the application of obligate methanotrophs were overcome due to the discovery of the new bacteria.

Key words: *Microbacterium* sp.; aged-refuse; amphitrophic bacteria; methane; landfills

甲烷是一种仅次于 CO_2 的重要温室气体, 全球每年排放量达到 5.35×10^8 t, 其中人为源甲烷排放量占 70% 以上[1,2]. 而生活垃圾填埋场等人为源甲烷减排已成为减缓温室效应的重要研究方向, 而甲烷的生物氧化则是有效途径之一[3~5]. 长期以来, 甲烷氧化菌都被认为是专一营养的, 即它们无法利用含有碳碳键的化合物生长[6~8]. 但这一观念最近已经被推翻了, 研究人员已经发现了多种既可氧化甲烷, 也可以利用多碳化合物的细菌, 这其中包括了 *Methylocella*、*Methylocystis* 和 *Methylocapsa*[9~11]. 它们仅拥有一种溶解甲烷单加氧酶(sMMO)并且较常见甲烷氧化菌而言缺少广泛的细胞质内膜(intracytoplasmic membrane, ICM), 它们能利用乙酸、丙酮酸、琥珀酸、苹果酸和乙醇等多碳化合物, 并被称为兼性营养甲烷氧化菌[11~13].

尽管专一营养甲烷氧化菌在填埋场等人为源甲烷减排的研究已经比较普遍[14~16], 但由于只能以单碳化合物为碳源, 因此存在着细胞生长速度慢、密度低、催化反应受还原性辅酶影响等一些瓶颈问题[17,18]. 相比而言, 兼性营养菌具有更广泛的底物选择性, 这对菌株扩大培养以及提高其环境耐受性都大有裨益, 势必会成为甲烷生物氧化新的研究热点.

值得注意的是, 已报道的兼性营养甲烷氧化菌

收稿日期: 2011-07-10; **修订日期**: 2011-09-23
基金项目: 国家自然科学基金项目(51008322); 重庆自然科学基金项目(2010BB7300&5309); 重庆教委科学技术研究项目(KJ110812)
作者简介: 赵天涛(1976 ~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: tiantaozhao@gmail.com

还无法利用大于四碳的化合物以及糖类化合物[12]. 课题组前期研究表明矿化垃圾存在有降解甲烷能力的兼性营养菌[19,20]，并在此基础发现了微杆菌 *Microbacterium* sp. DH 可以利用糖类化合物为碳源增殖，并显示了良好的环境耐受性和甲烷亲和性. 该方面研究有望在甲烷生物氧化的工程应用领域实现新突破，有助于为其在温室气体减排的工程应用提供新的研究平台.

本研究旨在矿化垃圾中筛选分离可氧化甲烷的兼性营养菌，通过基因工程手段和生理生化分析考察纯菌的生物特性. 此外研究了该类细菌对不同糖类碳源的利用情况，并考察了对实际矿化垃圾氧化甲烷的强化作用，以期为兼性营养甲烷氧化菌在实际工程应用提供依据.

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

选取上海老港垃圾填埋场（上海市南汇区老港东部）已填埋 10 a 的矿化垃圾，取 4 mm 筛下和 2 mm筛上垃圾颗粒，在甲烷和空气混合气中密闭驯化 2 周以实现菌株的复壮.

NMS（Nitrate Mineral Salts）培养基的组成如下（$g\cdot L^{-1}$）：KH_2PO_4 1.0，$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$ 2.9，$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 0.32，$(NH_4)_2SO_4$ 3.0，微量元素溶液 10 mL，蒸馏水 990 mL，pH 6.8. 微量元素溶液组成如下（$mg\cdot L^{-1}$）：$ZnSO_4\cdot 7H_2O$ 0.287；$MnSO_4\cdot 7H_2O$ 0.223；H_3BO_3 0.062；$Na_2M_oO_4\cdot 2H_2O$ 0.048；$CoCl_2\cdot 6H_2O$ 0.048；KI 0.083；$CaCl_2\cdot 2H_2O$ 3.5. 糖类碳源以及配置 NMS 培养基的相关试剂购于上海国药集团化学试剂有限公司.

1.2　实验方法

1.2.1　菌种富集与优化实验

（1）富集培养　称取矿化垃圾 1 g 置于 100 mL NMS 培养液中，于 30℃、160 $r\cdot min^{-1}$ 恒温振荡 2 h. 取菌悬液 2 mL 作为种子接入分装了 20 mL NMS 培养基的 100 mL 血清瓶中，以橡胶塞密封；用 20 mL 甲烷气置换瓶内 20 mL 空气，然后在 30℃、160 $r\cdot min^{-1}$ 条件下恒温振荡培养一周.

（2）纯菌分离　用无菌蒸馏水对菌液进行 10 倍系列稀释，制成稀释倍数为 10^{-1}、10^{-2} 和 10^{-3} 的稀释液. 采用倾注法进行 NMS 固体培养基培养. 将平板倒置于真空干燥器中，并向干燥器中通入一定量的甲烷，然后用保鲜膜封口. 将干燥器置于生化培养箱中，30℃培养 4～5 d. 将长势好的菌株进行多次传代，纯化. 采用环境扫描电镜（XL-30，Philips，Holland）考察纯菌的形态特征.

（3）优化实验　利用固体平板培养的纯菌制备一定浓度的菌悬液，加入到装有一定量 NMS 培养液的血清瓶中；用甲烷置换瓶内空气，之后具塞密封. 在 30℃、160 $r\cdot min^{-1}$ 条件下恒温振荡培养. 定期检测菌液浓度以及生物气浓度. 随着甲烷的消耗，定期补充一定体积的无菌空气和甲烷，以消除瓶中负压.

1.2.2　菌种鉴定实验

使用 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit（Code No. D310）对纯菌株进行 PCR 扩增并获得目的片段. 取扩增产物 5 μL 进行 3% 琼脂糖凝胶电泳（polyacrylamide gel electrophoresis，PAGE），使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0（Code No. DV805A）切胶回收目的片段进行 DNA 测序. 以 Seq Forward、Seq Reverse、Seq Internal 为引物，DNA 测序委托大连宝生物公司完成.

1.2.3　浓度测定方法

菌液的 *D* 值采用 UV2000 分光光度计检测，波长为 560 nm. 利用硫酸蒽酮法检测糖浓度的变化，每个实验最少做 2 组平行实验，确保 RSD < 5%. 甲烷和二氧化碳的检测采用气相色谱（安捷伦 6890N）. 色谱条件：GDX 不锈钢柱（10 m × 2 mm），进样口温度、柱温以及检测器（TCD）温度分别为 80、50、120℃，氢气为载气，流速为 25 $mL\cdot min^{-1}$，进样量 0.2 mL.

2　结果与讨论

2.1　矿化垃圾中甲烷氧化菌驯化与筛选

以甲烷为唯一碳源，进行了矿化垃圾中甲烷氧化菌的富集，并采用消减稀释法进行了多次液体传代培养. 实验历经了 6 个月，最终得到了 3 种形态明显不同的单菌落. 对 3 个菌株又进行了为期 3 个月的传代培养，仍以甲烷为唯一碳源，最终得到了 1 株可高效氧化甲烷的目标菌株，命名此菌株为 DH. 对其进行固体平板传代，传 3 代的菌株 DH 长势良好，有类似脂类的黄色分泌物产生（图 1）. 对菌株 DH 继续进行多次单克隆传代，最终得到了菌株 DH 的第 10 代纯化菌. 该菌属于革兰氏阳性菌，淡黄色小菌落，菌落直径 1 mm 左右，半透明，突起，边缘光滑. 根据培养基及培养条件的变化，菌落颜色有淡黄、黄色和桔黄色. 目前该菌株已经在中国典型培养物保藏中心申请了专利保藏，保藏号为 M2010099. 鉴于该菌具有高效的甲烷氧化能力，因此申请了国

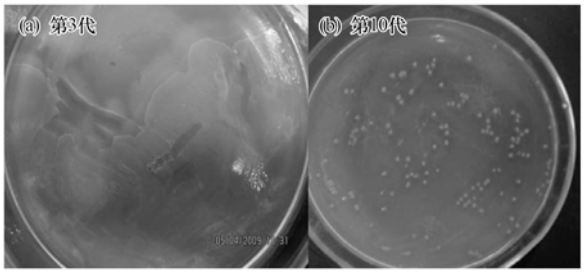


图 1 菌株 DH 第 3 代和第 10 代固体平板培养照片

Fig. 1 Photograph of strain DH of the third and the 10th generation in plate culture

家发明专利,专利公开号为 201010260104.8.

2.2 菌株 DH 的生物特性和 DNA 鉴定

2.2.1 菌株 DH 的生物特性

菌株 DH 的电镜扫描照片见图 2. 菌体呈短杆状,中间向内凹陷,似圆盆形,外径 0.6 ~ 0.7 μm,内径 0.2 ~ 0.4 μm. 电镜扫描过程并未发现形态明显不同的菌体,因此可以基本判定传 10 代的菌株 DH 是纯菌. 其生理生化特性见表 1,菌株 DH 可以利用乳糖代谢得到乳酸是一个有趣的结果,这说明该菌的代谢途径与专一营养的甲烷氧化菌是不同的,或者该菌株并不是纯菌. 因此,有必要进行更深入的鉴定.

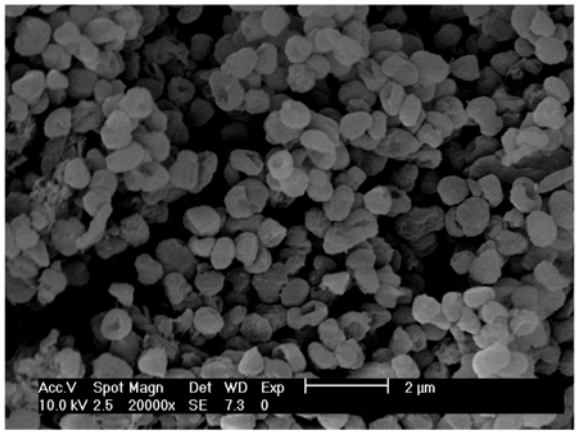


图 2 传 10 代的菌株 DH 电镜扫描照片

Fig. 2 SEM photograph of strain DH of the 10th generation

表 1 菌株 DH 的生理生化特性[1)]

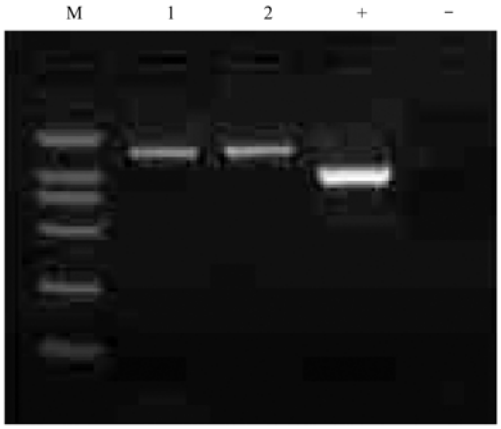
Table 1 Physiological and biochemical characters of strain DH

生理生化指标	特征	生理生化指标	特征
苯丙氨酸脱氨酶	–	淀粉水解酶	+
吲哚反应	–	明胶水解	–
乙酰甲基甲醇反应	–	接触酶	+
H_2S 气体产生	–	细胞色素氧化酶	–
反硝化反应	–	柠檬酸盐利用	–
甲基红反应	–	乳酸产生	+

1) + 表示阳性, – 表示阴性

2.2.2 菌株 DH 的 16S rDNA 鉴定

对菌株 DH 的 PCR 产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳. 由图 3 可以看到一条 PCR 产物的凝胶条带非常清晰,未见其他片段,基本可以判断菌株 DH 为纯菌株.



M:DL2 000 DNA Marker; 1:DH-PCR 产物; +:正对照; –:负对照

图 3 菌株 DH 切胶回收目的片段的 DNA 电泳

Fig. 3 16S rDNA-PAGE profile of strain DH

经扩增产物测序结果可知,菌株 DH 的 16S rDNA 碱基长度为1 397 bp,测序谱图无套峰出现,可判定菌株 DH 是纯菌株. 将碱基序列输入 GenBank 核酸序列数据库进行比较,发现与微杆菌属(*Microbacterium* sp.)的 3 个菌株的同源性在 99% 以上,将与菌株 DH 同源性最高的菌株序列进行系统发育树构建. 由图 4 可知,这些同源序列分为 4 个主要分支,菌株 DH 和 *Microbacterium* sp. MAS133 和 RM10D 属于同一分支. 菌株 *Microbacterium* sp. MAS133 是 2000 年 11 月由法国的 Ashraf 在盐碱地中小麦的根部提取分离的,该菌株的 16S rDNA 碱基长度为1 407 bp,在盐碱土壤中该菌可以促进小麦根部生长[21]. 菌株 *Microbacterium* sp. RM10D 是 2007 年 7 月由印度的 Krishna 在极端碱性的铝矾土渣中发现的,属于非自养菌,该菌株的 16S rDNA 碱基长度为1 486 bp[22]. 由伯杰细菌手册可知,微杆菌在空气中的固体培养基表面上生长良好,从可发酵

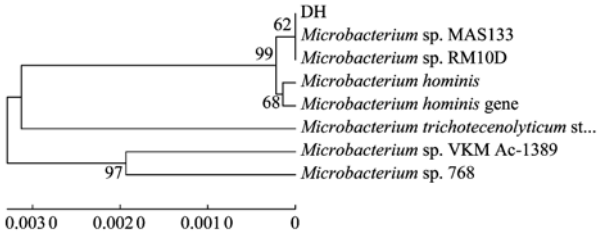


图 4 基于 16S rDNA 序列的菌株 DH 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 1 397 bp-fragment of 16S rDNA sequences of strain DH

的碳水化合物产酸，最适生长温度为 30℃，在 72℃的脱脂牛奶中能存活 15 min 或更长时间，首先发现于酪制品中和制酪器皿上[23]. 对菌株 DH 进行了乳酸管的碳源验证实验，结果呈阳性，以上分析可知，菌株 DH 并非传统意义的专一营养甲烷氧化菌. 目前，国内外均未见微杆菌利用甲烷的报道，而且菌株 DH 在实验过程中所表现出的对甲烷氧化的良好效果也确保了继续深入研究的必要性.

2.3　微杆菌 DH 的培养条件和碳源利用

2.3.1　微杆菌 DH 的生长曲线与分析

取固体培养 10 代的微杆菌 DH，制成 $D_{560\ nm}$ 值 0.52 的菌液. 在 30℃、2% 接种量、25% 甲烷含量和 pH 值 7.0 的条件下，以甲烷为唯一碳源和能源进行生长曲线实验，结果见图 5. 微杆菌 DH 的延迟期较长，大约为 180 h. 但当微杆菌 DH 进入对数期后菌体生长迅速，$D_{560\ nm}$ 值从 0.161 升至 1.037 仅用了 60 h，之后便达到了平稳期. 研究发现，将富集的纯菌液置于 −20℃冰箱保存 10 d，仅需要约 1 d 即可实现复壮. 经历了垃圾降解过程高温驯化的微杆菌 DH 在 40℃条件下，从 2% 接种量的培养液达到对数生长期仅需要约 6 ~ 7 h. 该温度下，多数甲烷氧化菌无法生长，多数微杆菌的活性也会下降[24,25]，由此可见，微杆菌 DH 具有极强的温度耐受性.

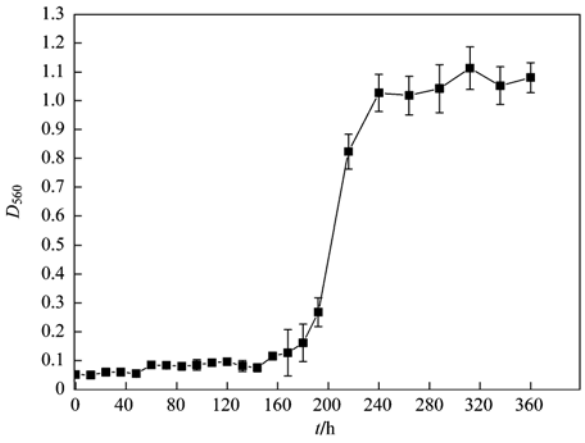


图 5　微杆菌 DH 以甲烷为碳源的生长曲线

Fig. 5　Growth curve of *Microbacterium* sp. DH with methane as carbon source

2.3.2　pH 值对微杆菌 DH 培养的影响

通过甲烷消耗和菌体生长考察 pH 值对微杆菌 DH 生长的影响，结果见图 6. 培养体系总计 20 mL，以甲烷为唯一碳源和能源，培养时间为 3 d，甲烷的消耗体积和培养液 $D_{560\ nm}$ 值变化分别用来表征菌体的活性和生长情况. 微杆菌 DH 在 pH 为 6.52 时活性最高，平均每 mL 菌液每天消耗甲烷 0.15 mL. 从菌体生长情况而言，当 pH 为 6.53 时，菌体密度达到 0.548. 当 pH 值 < 5.0 或 > 8.0 时微杆菌 DH 的基本失去了活性，无法利用甲烷. 因此，DH 菌最适生长 pH 应该在 6.5 左右.

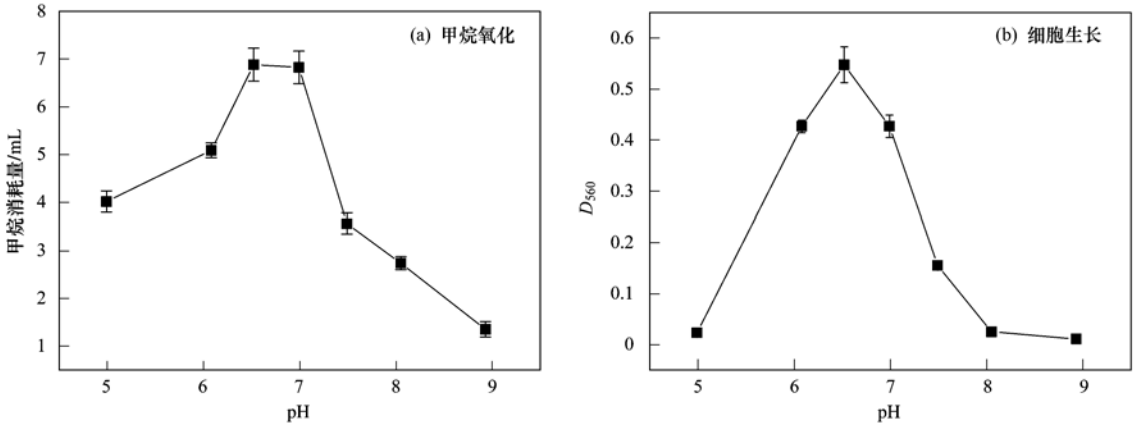


图 6　不同 pH 对微杆菌 DH 氧化甲烷和菌体生长的影响

Fig. 6　Effects of pH on methane oxidation and the cell growth of *Microbacterium* sp. DH

2.3.3　不同糖类碳源对微杆菌 DH 的亲和性

选取了 7 种具有代表性的糖类碳源进行碳源优化实验，这其中包括了单糖（甘露糖、果糖和葡萄糖）、双糖（蔗糖和乳糖）、三糖（棉子糖）和多糖（淀粉）. 每种糖溶液均使用 NMS 培养液配制，初始浓度为 3.0 $g \cdot L^{-1}$，培养温度为 30℃考察 70 h 后的碳源消耗情况和菌体生长情况，结果见表 2.

微杆菌 DH 对 3 种单糖和 2 种多糖的利用效果较好，总消耗量在 36 mg 以上，约消耗了总量的 60%. 当以蔗糖和甘露糖为碳源时，菌液 $D_{560\ nm}$ 值分别达到了 0.758 和 0.742，这说明以这 2 种糖为碳源时微杆菌 DH 菌增殖较快. 以其它几种糖为碳源时，菌液 $D_{560\ nm}$ 值均有明显增长，这表明微杆菌 DH 菌既可高效氧化甲烷，又可以利用多种碳源增殖，与甲

表 2 不同糖类碳源培养微杆菌 DH 生长的影响

Table 2 Effect on activity of *Microbacterium* sp. DH with different carbon sources

碳源名称	碳源特性	菌液吸光度 $D_{560\ nm}$	菌液糖浓度 /g·L^{-1}	糖的消耗量 /mg
蔗糖	双糖(葡萄糖+果糖)	0.758	1.171	36.6
乳糖	双糖(葡萄糖+半乳糖)	0.698	0.986	40.3
棉子糖	三糖(半乳糖+果糖+葡萄糖)	0.503	1.696	26.1
淀粉	多糖(D-葡萄糖聚合)	0.601	1.523	29.5
果糖	单糖(六碳)	0.665	1.123	37.5
葡萄糖	单糖(六碳)	0.557	1.045	39.1
甘露糖	单糖(六碳)	0.742	1.187	36.3

烷为碳源相比可大大节省菌株的富集成本,这为矿化垃圾减排填埋场无序甲烷的工程应用提供了重要保证.

2.4 DH 菌强化矿化垃圾减排甲烷

目前通过覆盖层进行甲烷氧化的效果并不十分理想,这其中的最大的问题就是菌体的活性较低,通过喷洒具有高效甲烷氧化效率的菌液是突破这一瓶颈有效途径. 将复壮的微杆菌 DH 菌液 1 mL 喷洒到 20 g 矿化垃圾中,与未喷洒菌液的矿化垃圾比较甲烷氧化效果. 由图 7 可知,实验组甲烷氧化效果远好于对照组. 在培养 4 d 后甲烷消耗便呈现了对数增长的趋势,在之后的 6 d 中,消耗了约 92 mL 甲烷. 而对照组到达甲烷消耗的对数期经历约 14 d,在培养的 30 d 内,总计氧化甲烷约 60 mL,仅为实验组的 50%. 这说明喷洒 DH 菌液可以大幅度提高覆盖层的甲烷氧化率.

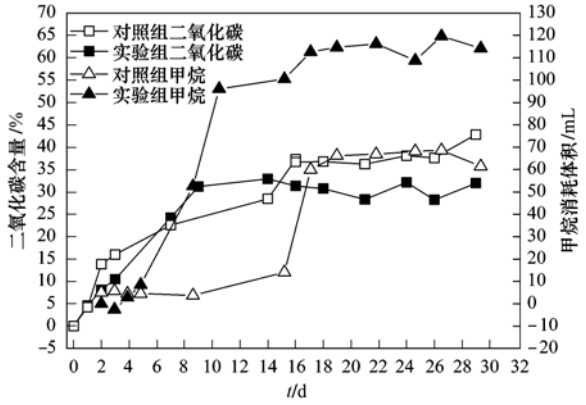


图 7 添加微杆菌 DH 对矿化垃圾氧化甲烷的影响

Fig. 7 Effect on methane oxidation of aged-refuse by adding *Microbacterium* sp. DH

3 结论

(1)分离并鉴定了菌株 DH 属于微杆菌属(*Microbacterium* sp.),其特点是甲烷利用率高,菌体培养密度大,温度耐受性强,适用于填埋前期产气量高甲烷浓度高时期的甲烷氧化.

(2)微杆菌 DH 的发现克服了甲烷氧化菌菌体密度低,难于扩大培养等应用困难. 微杆菌 DH 是可以氧化甲烷的兼性营养菌,由于能够更好的适应环境条件而在富集过程中成为了优势菌株. 以廉价的多糖为碳源可以大大节省菌株的富集成本,这为矿化垃圾减排填埋场无序甲烷的工程应用提供了重要保证.

参考文献:

[1] De Visscher A, Van Cleemput O. Simulation model for gas diffusion and methane oxidation in landfill cover soils[J]. Waste Management, 2003, **23**(7): 581-591.

[2] Ogram A, Castro H, Stanley E, *et al*. Distribution of methanotrophs in managed and highly disturbed watersheds[J]. Ecological Indicators, 2006, **6**(4): 631-643.

[3] 赵由才, 赵天涛, 韩丹, 等. 生活垃圾卫生填埋场甲烷减排与控制技术研究[J]. 环境污染与防治, 2009, **31**(12): 48-52.

[4] Kolb S. Aerobic methanol-oxidizing bacteria in soil[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, **300**(1): 1-10.

[5] 张丽杰, 赵天涛, 赵由才, 等. 生物甲烷抑制剂缓释扩散模型推导与优化[J]. 环境科学, 2010, **31**(7): 1689-1694.

[6] Dunfield P F, Liesack W, Henckel T, *et al*. High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type ii methanotroph[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**(3): 1009-1014.

[7] Conrad R. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs [J]. Advances in Agronomy, 2007, **96**: 1-63.

[8] Lidstrom-Oconnor M E, Fulton G L, Wopat A E. "Methylobacterium ethanolicum": A syntrophic association of two methylotrophic bacteria[J]. Microbiology, 1983, **129**(10): 3139-3148.

[9] Theisen A R, Murrell J C. Facultative methanotrophs revisited [J]. Journal of Bacteriology, 2005, **187**(13): 4303-4305.

[10] Rahman M T, Crombie A, Chen Y, *et al*. Environmental distribution and abundance of the facultative methanotroph methylocella[J]. International Society for Microbial Ecology, 2010, **5**(6): 1061-1066.

[11] Dedysh S N, Knief C, Dunfield P F. Methylocella species are facultatively methanotrophic[J]. Journal of Bacteriology, 2005, **187**(13): 4665-4670.

[12] Dedysh S N, Dunfield P F. Facultative and obligate methanotrophs: How to identify and differentiate them [J]. Methods in Enzymology, 2011, **495**: 31-44.

[13] Crombie A, Murrell J C. Development of a system for genetic manipulation of the facultative methanotroph methylocella silvestris Bl2 [J]. Methods in Enzymology, 2011, **495**: 119-133.

[14] Boeckx P, Van Cleemput O, Villaralvo I. Methane emission from a landfill and the methane oxidising capacity of its covering soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1996, **28**(10-11): 1397-1405.

[15] Lou X F, Nair J. The impact of landfilling and composting on greenhouse gas emissions-a review[J]. Bioresource Technology, 2009, **100**(16): 3792-3798.

[16] 余婷, 何品晶, 吕凡, 等. 生活垃圾填埋操作方式对覆土中I型甲烷氧化菌的影响研究[J]. 环境科学, 2008, **29**(10): 2987-2992.

[17] 吕镇梅, 闵航, 陈中云, 等. 水稻田土壤甲烷厌氧氧化在整个甲烷氧化中的贡献率[J]. 环境科学, 2005, **12**(4): 3574-3579.

[18] 何若, 姜晨竞, 王静, 等. 甲烷胁迫下不同填埋场覆盖土的氧化活性及其菌群结构[J]. 环境科学, 2008, **29**(12): 3574-3579.

[19] Zhao Y C, Song L Y, Huang R H, *et al*. Recycling of aged refuse from a closed landfill [J]. Waste Management & Research, 2007, **25**(2): 130-138.

[20] 赵天涛, 何成明, 张丽杰, 等. 矿化垃圾中金黄杆菌甲烷亲和氧化动力学[J]. 化工学报, 2011, **62**(7): 1615-1921.

[21] Muhammad A. Bacterial exopolysaccharides and productivity of salt affected soils: I. Diversity of exopolysaccharide-producing bacteria isolated from the rhizosphere of wheat (triticum aestivum l.) grown in normal and saline pakistani soils [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 1999, **2**(1): 201-206.

[22] Agranoff D, Monahan I M, Mangan J A, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel ph-dependent divalent cation transporter belonging to the nramp family [J]. Journal of Experimental Medicine, 1999, **190**(5): 717-724.

[23] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.

[24] Pattanapipitpaisal P, Brown N L, Macaskie L E. Chromate reduction by microbacterium liquefaciens immobilised in polyvinyl alcohol[J]. Biotechnology Letters, 2001, **23**(1): 61-65.

[25] Sheng X F, He L Y, Zhou L, *et al*. Characterization of *Microbacterium* sp. F10a and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon removal in low-temperature soil [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, **55**(5): 529-535.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 33 No. 5

May 15, 2012

CONTENTS

Using Look-up Table Method in the Simulation of Regional Atmospheric Environment ····· XIE Min, WANG Ti-jian, JIANG Fei, *et al.* (1409)

Applications of Pollutants Released form Crop Residues at Open Burning in Yangtze River Delta Region in Air Quality Model ····· SU Ji-feng, ZHU Bin, KANG Han-qing, *et al.* (1418)

Atmospheric Dry Deposition Flux and Sources of Monocarboxylic Acids in Beijing and Surrounding Cities ····· XU Xiao-juan, LI Xing-ru, WANG Yue-si, *et al.* (1425)

Comparison of Physicochemical Characterization of Shanghai Ambient Ultrafine Particles and Engineered Nano Particles and Their Cytotoxicity ····· ZHANG Rui, LÜ Sen-lin, SHANG Yu, *et al.* (1431)

Element Compositions and Source of $PM_{2.5}$ Aerosols in Qingdao ····· LI Xiu-zhen, SHENG Li-fang, XU Hua, *et al.* (1438)

Phthalate Esters Pollution in Household Indoor Air Particles of Tianjin in Winter ····· WANG Fu-mei, CHEN Li, JIAO Jiao, *et al.* (1446)

Application of a Resuspension Test Chamber in $PM_{2.5}$ Source Profile Analysis ····· DUAN Heng-yi, QIAN Ran-ran, WU Shui-ping, *et al.* (1452)

Distribution and Enrichment of Trace Elements in Coal Combustion Products from Southwestern Guizhou ····· WEI Xiao-fei, ZHANG Guo-ping, LI Ling, *et al.* (1457)

Air-Water Surface Greenhouse Gas Flux in Pengxi River at Different Operational Stages of the Three Gorges Reservoir ····· JIANG Tao, GUO Jing-song, LI Zhe, *et al.* (1463)

Fluxes of Greenhouse Gases from Xiangxi River in Summer and Their Influencing Factors ····· WANG Liang, XIAO Shang-bin, LIU De-fu, *et al.* (1471)

Effects of Elevated Ozone Concentration and Soil Moisture on Temperature Sensitivity of Soil Microbial Respiration in a Cropland ····· CHEN Shu-tao, ZHANG Yong, HU Zheng-hua, *et al.* (1476)

Hydrochemical Characteristics in the Glacier No. 72 of Qingbingtan, Tomur Peak ····· ZHAO Ai-fang, ZHANG Ming-jun, LI Zhong-qin, *et al.* (1484)

Mineralization Characteristics of Dissolved Organic Phosphorous in Wudalianchi Lake, China ····· ZHANG Bin, XI Bei-dou, ZHAO Yue, *et al.* (1491)

Speciation Distribution of Nitrogen in Sediments of 7 Rivers around Taihu Lake ····· LU Shao-yong, YUAN Ye, JIN Xiang-can, *et al.* (1497)

Distribution and Bioavailability of Nitrogen and Phosphorus Species in the Sediments from Shiwuli Stream in Lake Chaohu ····· LI Ru-zhong, LI Feng, ZHOU Ai-jia, *et al.* (1503)

Surface Water Quality of Beiyun Rivers Basin and the Analysis of Acting Factors for the Recent Ten Years ····· GUO Jing, JING Hong-wei, LI Jin-xiang, *et al.* (1511)

Water Quality Impact of Dongjiang River Network Caused by Dongguan Canal Drainage ····· SUN Lei, MAO Xian-zhong, HUANG Min-min (1519)

Groundwater Pollution Sources Identification and Grading in Beijing Plain ····· LU Yan, HE Jiang-tao, WANG Jun-jie, *et al.* (1526)

3D Numerical Simulation of Air Sparging Remediation Process ····· LI Heng-zhen, HU Li-ming, WANG Jian, *et al.* (1532)

Numerical Experiment Study on the Algae Suppression Effect of Vertical Hydrodynamic Mixers ····· ZOU Rui, ZHOU Jing, SUN Yong-jian, *et al.* (1540)

Microbial Mechanism of Pollutants Removal in New Biological Island Grid ····· GAO Ming-yu, XIE Hui-jun, WANG Wen-xing (1550)

Effect of Nutrition Level of Phosphorus and Nitrogen on the Metabolism of the Extracellular Organic Matter of *Nostoc flagelliforme* ····· QI Fei, LIU Xiao-yuan, XU Bing-bing, *et al.* (1556)

Inhibitory Effects of Liquor Cultured with *Hydrodictyon reticulatum* on the Growth of *Microcystis aeruginosa* ····· FU Hai-yan, CHAI Tian, ZHAO Kun, *et al.* (1564)

Removal and Distribution of Phthalate Acid Esters in *Potamogeton crispus* L. Microcosm of Haihe River ····· CHI Jie, YANG Qing (1570)

Control and Removal of Microcystin Production of *Microcystis aeruginosa* by Irradiation of Electron Beam ····· LIU Shu-yu, WU Ming-hong, JIANG Qin-peng (1575)

Source Characteristics Analysis of Discharge and Pollutants in Typical Drainage Ditch of Qingtongxia Irrigation District ····· LI Qiang-kun, HU Ya-wei, LUO Liang-guo (1579)

Degradation of TBBPA by Electron Beam Radiolysis ····· LI Jie, XU Dian-dou, XU Gang, *et al.* (1587)

Catalytic Ozonation of Ibuprofen in Aqueous Solution by Activated Carbon Made from Sludge and Corn Cob ····· WANG Hong-juan, QI Fei, FENG Li, *et al.* (1591)

Effect of High Hydraulic Loading on Intensive Shrimp Aquaculture Wastewater Treatment Performance in Constructed Wetland ····· LI Huai-zheng, ZHANG Xing-yi, CHEN Wei-bing, *et al.* (1597)

Factors Influencing the Formation of NDMA During Chloramination Disinfection of Effluent from Biological Nitrogen Removal System for the Treatment of Municipal Sewage ····· SHANG Xiao-ling, LI Yong-mei (1604)

Denitrification Using Starch/PCL Blends as Solid Carbon Source ····· SHEN Zhi-qiang, WU Wei-zhong, YANG Chun-ping, *et al.* (1609)

Profiles of Zeta Potential and EPS in Granulation Process of Aerobic Sludge ····· WANG Hao-yu, SU Ben-sheng, HUANG Dan, *et al.* (1614)

Biosorption Characteristics of f2 Bacteriophage onto Activated Sludge ····· ZHOU Yu-fen, ZHENG Xiang, LEI Yang, *et al.* (1621)

Adsorption of Anionic Polyacrylamide on the Surface of Ion Exchange Membranes ····· DENG Meng-jie, YU Shui-li, SHI Wen-xin, *et al.* (1625)

Adsorption of Amphoteric Modified Bentonites to Phenol and Its Thermodynamics ····· LI Ting, MENG Zhao-fu, ZHANG Bin (1632)

Effect of Surfactants on Sorption and Desorption of Benzo[a]pyrene onto Black Carbon ····· ZHANG Jing-huan, CHEN Chun-rong, ZHANG Wei-hang, *et al.* (1639)

Isolation and Identification of Bacteria in the Activated Sludge from Four Sewage Treatment Plants in Nanjing City and Its Antibiotic Resistance Analysis ····· GE Feng, GUO Kun, ZHOU Guang-can, *et al.* (1646)

Screening and Characterization of Phenol Degrading Bacteria for the Coking Wastewater Treatment ····· CHEN Chun, LI Wen-ying, WU Jing-wen, *et al.* (1652)

Characteristics of 1,4-Dioxane Degradation by *Xanthobacter flavus* DT8 ····· JIN Xiao-jun, CHEN Dong-zhi, ZHU Run-ye, *et al.* (1657)

Spatial Quantitative Distribution of Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria of Unexploited Oil and Gas Fields ····· MAN Peng, QI Hong-yan, HU Qing, *et al.* (1663)

Screening and Biological Characteristics of Amphitrophic Methane-Oxidizing Bacteria from Aged-Refuse ····· ZHAO Tian-tao, XIANG Jin-xin, ZHANG Li-jie, *et al.* (1670)

Distribution Characteristics and Potential Risk of PCBs in Surface Water from 22 Tributaries and Mainstream in Middle Reaches of Yangtze River ····· LI Kun, ZHAO Gao-feng, ZHOU Huai-dong, *et al.* (1676)

Pollution Characteristics and Potential Risks of Phenolic Compounds in Schistosomiasis Epidemic Areas ····· WU Zheng-yong, ZHAO Gao-feng, ZHOU Huai-dong, *et al.* (1682)

Spatial Heterogeneity and Autocorrelation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Sediment of Minjiang River in Fuzhou City ····· CHEN Wei-feng, NI Jin-zhi, YANG Hong-yu, *et al.* (1687)

Heavy Metals Pollution and Its Potential Ecological Risk of the Sediments in Three Gorges Reservoir During Its Impounding Period ····· WANG Jian-kang, GAO Bo, ZHOU Huai-dong, *et al.* (1693)

Investigation on the Distribution and Potential Ecological Risk of Heavy Metal in the Sediments from Typical Electrical Industrial Zone ····· DENG Dai-yong, SUN Guo-ping, GUO Ju, *et al.* (1700)

Fraction Distribution and Risk Assessment of Heavy Metals in Iron and Gold Mine Soil of Miyun Reservoir Upstream ····· GAO Yan-xin, FENG Jin-guo, TANG Lei, *et al.* (1707)

Heavy Metal Contamination and Bioavailability in Huayuan Manganese and Lead/Zinc Mineland, Xiangxi ····· YANG Sheng-xiang, YUAN Zhi-zhong, LI Zhao-yang, *et al.* (1718)

Evaluation of Heavy Metal Pollution in Soils from a Training Ground Based on GIS ····· LIU Yu-tong, FANG Zhen-dong, YANG Qin, *et al.* (1725)

Effects of Soil Texture and Water Content on Remediation of SVE on Soils Contaminated by Benzene ····· LIU Shao-qing, JIANG Lin, YAO Yu-jun, *et al.* (1731)

Characteristics of DNA Adsorption and Desorption in Montmorillonite, Kaoline and Goethite ····· WANG Shen-yang, RAO Wei, WANG Dai-zhang, *et al.* (1736)

LNAPL Migration Monitoring in Simulated Sand Aquifer Using Resistivity Method ····· PAN Yu-ying, JIA Yong-gang, GUO Lei, *et al.* (1744)

Preparation and Characterization of Activated Carbon from Rice Straw Pre-treated by the Subcritical Hydrolysis ····· DONG Yu, SHEN Zhe-min, LEI Yang-ming, *et al.* (1753)

Study on Composting of Cyanobacteria Amended with Different N Loss Inhibitor ····· REN Yun, CUI Chun-hong, LIU Fen-wu, *et al.* (1760)

Research Progress About Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Contaminated Soil with Immobilized Microorganism Technique ····· QIAN Lin-bo, YUAN Miao-xin, CHEN Bao-liang (1767)

《环境科学》第 6 届编辑委员会

主　编：欧阳自远

副主编：赵景柱　郝吉明　田　刚

编　委：（按姓氏笔画排序）

万国江　王华聪　王凯军　王绪绪　田　刚　田　静　史培军

朱永官　刘志培　汤鸿霄　陈吉宁　孟　伟　周宗灿　林金明

欧阳自远　赵景柱　姜　林　郝郑平　郝吉明　聂永丰　黄　霞

黄　耀　鲍　强　潘　纲　潘　涛　魏复盛

环 境 科 学

（HUANJING KEXUE）

（月刊　1976 年 8 月创刊）

2012 年 5 月 15 日　33 卷　第 5 期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

（Monthly　Started in 1976）

Vol. 33　No. 5　May 15, 2012

主　　管	中国科学院	**Superintended** by	Chinese Academy of Sciences
主　　办	中国科学院生态环境研究中心	**Sponsored** by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协　　办	（以参加先后为序） 北京市环境保护科学研究院 清 华 大 学 环 境 学 院	**Co-Sponsored** by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主　　编	欧 阳 自 远	**Editor-in -Chief**	OUYANG Zi-yuan
编　　辑	《环境科学》编辑委员会 北京市 2871 信箱（海淀区双清路 18 号，邮政编码：100085） 电话：010-62941102，010-62849343 传真：010-62849343 E-mail：hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	**Edited** by	The Editorial Board of Environmental Science（HUANJING KEXUE） P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel：010-62941102, 010-62849343; Fax：010-62849343 E-mail：hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出　　版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码：100717	**Published** by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing　100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	**Printed** by	Beijing Bei Lin Printing House
发　　行	科 学 出 版 社 电话：010-64017032 E-mail：journal@ mail. sciencep. com	**Distributed** by	Science Press Tel：010-64017032 E-mail：journal@ mail. sciencep. com
订　购　处	全国各地邮电局	**Domestic**	All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 （北京 399 信箱）	**Foreign**	China International Book Trading Corporation（Guoji Shudian）, P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号：ISSN 0250-3301 / CN 11-1895/X　　**国内邮发代号**：2-821

国 内 定 价：70.00 元　　**国外发行代号**：M 205

国 内 外 公 开 发 行