

一株可利用甲烷的克雷伯氏菌的分离及其在甲烷检测中的应用

郑军^{1*}, 郭琚^{2*}, 王玉军³, 杨玉景¹, 庞金梅², 杨素萍⁴, 赵良贵⁴, 董川⁴

- 1 山西省农业科学院小麦研究所, 临汾 041000
- 2 山西省农业科学院土壤肥料研究所 山西省土壤环境与养分资源重点实验室, 太原 030031
- 3 青岛优盟生物研究所, 青岛 266071
- 4 山西大学生物技术研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006

摘要: 从山西太原水稻田土壤中, 分离得到一株能以甲烷为唯一碳源和能源生长的菌株 C611。通过生理生化特征及 16S rDNA 序列分析, 该菌株初步鉴定为克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)。采用响应面法优化了该菌株利用甲烷的培养条件, 得到最佳培养条件为: 温度 24.4°C、接种量为 6.7%、甲烷含量 25%。以 C611 固定化细菌和溶氧响应仪为体系, 采用电化学法研究了不同含量甲烷的响应时间以及溶氧变化与甲烷含量的关系。结果表明, 菌株 C611 能利用甲烷, 该反应体系对 0~10% 甲烷气体测定的响应时间小于 100 s; 溶氧消耗量与通入甲烷气体含量呈线性关系, 拟合系数(R^2)为 0.9994。以 3% 甲烷气体样品进行 8 次测量, 测定平均值为 3.09%, RSD 为 3.48%, 相对误差为 3%。表明该反应体系重现性良好, 为该菌株进一步研究甲烷传感器奠定基础。

关键词: 甲烷, 克雷伯氏菌, 甲烷测定, 溶解氧

Isolation of a methane-utilizing *Klebsiella* sp. strain and its application for detecting methane

Jun Zheng^{1*}, Jun Guo^{2*}, Yujun Wang³, Yujing Yang¹, Jinmei Pang², Suping Yang⁴, Gengui Zhao⁴, and Chuan Dong⁴

- 1 Wheat Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Linfen 041000, China
- 2 Shanxi Key Laboratory of Soil Environment & Nutrient Resource, Soil & Fertilizer Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China
- 3 Institute of Youmeng Biotechnology, Qingdao 266071, China
- 4 Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: We have isolated a strain C611 that used methane as the sole carbon sources for growth from paddy soil in Taiyuan of Shanxi province. Based on the physiological characteristics and 16S rDNA sequence analysis, we identified the strain as *Klebsiella* sp.. We used statistic-based experimental design (RSM) to optimize the culture conditions for C611 strain. The optimum conditions

Received: December 18, 2008; **Accepted:** March 19, 2009

Supported by: Key Project of National Natural Science Foundation of China (No. 50534100).

Corresponding author: Gengui Zhao. Tel: +86-351-7016119; Fax: +86-351-7011499; E-mail: chungui@sxu.edu.cn

* These authors contribute equally to this study.

国家自然科学基金重点项目(No. 50534100)资助。

were as follows: temperature of 24.4°C, inoculum volume of 6.7% and methane content of 25%. We studied the response time and the relationship between consumption of dissolved oxygen and methane gas contents with PVA-H₃BO₃ immobilized cell of C611 using electrochemical method. The response time was no more than 100 s of this reaction system, and the linear range of detection of methane content was from 0 to 10%. The standard gas sample 3% methane was measured by this method with the mean content value of 3.09%, RSD of 3.48%, and the relative error of 3%. Hence, it has the potential in developing biosensor for methane.

Keywords: methane, *Klebsiella* sp., methane determination, dissolved oxygen

甲烷(CH₄)是煤矿瓦斯、煤层气和垃圾堆放产生的主要气体之一。它易燃易爆给煤矿安全生产构成重大威胁^[1],而且也能造成温室效应。据报道,等量CH₄形成的温室效应约是CO₂的20多倍,对大气臭氧层的破坏力约是CO₂的7倍,目前CH₄的排放量占温室气体总排放量的16%,大气排放量仍呈逐年增加的趋势^[2]。由于甲烷分子的碳氢键是sp³杂化轨道对称轴方向发生轨道重叠而形成,化学性质非常稳定,因而如何对矿井及排出的甲烷进行检测和治理已成为世界性难题^[2,3]。迄今为止,防止煤矿瓦斯爆炸主要是通过抽放、通风来控制,排出气体中含有甲烷等成分,对环境也造成一定的影响^[4]。我国煤矿瓦斯检测基本采用热催化型传感器法,但存在易中毒、选择性差、校正繁琐、寿命短等缺点,国外甲烷检测多采用红外吸收型传感器,虽然其检测灵敏度较高,但其价格昂贵、结构复杂,因而难以在矿下实际操作^[4,5]。关于甲烷检测、控制和治理尚未有更好的方法。因此,研究甲烷检测和处理的新方法、新原理、新器件备受关注。近年来,随着人们对甲烷利用细菌的研究不断深入,微生物法已经初步应用于检测和治理环境中甲烷,并取得了一定的进展,显示出极大的应用潜力和开发前景。

甲烷利用细菌是指能够以甲烷为碳源和能源进行生长繁殖的一类细菌,这类细菌能在温和有氧条件下,通过单加氧酶催化甲烷完成生物转化,这种独特的性质,近年来备受关注^[6]。甲烷利用细菌主要包括甲基微球菌属(*Methylomicrobium*)、甲基暖菌属(*Methylocaldum*)、甲基单胞菌属(*Methylomonas*)、甲基球菌形菌属(*Methylosphaera*)、甲基杆菌属(*Methylobacter*)、甲基八叠球菌属(*Methylosarcina*)、甲基弯菌属(*Methylosinus*)、甲基孢囊菌属(*Methylocystis*)、甲基球菌属(*Methylococcus*)、*Methylocapsa*和*Methylocella*等11个属^[7],广泛分布于稻田、森林土壤、湖泊、湿地等自然环境中^[8]。此外,Wolf和Hanson等描述了5株能利用甲烷作为

能源的酵母菌^[8],闵航等从稻田土中分离到2株能利用甲烷的吸水链霉菌^[9],近来Stoecker, Dunfield等国外学者在Nature和Proc Natl Acad Sci期刊上又报道了*Crenothrix*, *Clonothrix*和*Verrucomicrobia*的一些菌株能够利用甲烷^[10-12],可见参与自然环境中甲烷循环的细菌及代谢途径具有一定的多样性和复杂性。为了深入开发甲烷利用细菌资源,使其应用于甲烷检测、煤矿瓦斯气体治理等方面,本研究以甲烷为唯一碳源,从稻田土壤中分离得到1株能利用甲烷的克雷伯氏菌C611菌株,采用响应面法优化了该菌株甲烷利用的培养条件,并初步应用于甲烷含量的测定,为环境甲烷气体的检测和治理提供新的材料和方法。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 土样

土样采集于山西太原晋源区长期种植水稻的大田中。

1.1.2 培养基

无机盐培养基(g/L): KH₂PO₄ 0.5, Na₂HPO₄ 0.5, NaCl 0.4, KNO₃ 1.0, NH₄Cl 0.5, MgSO₄ · 7H₂O 1.0, CaCl₂ 0.2, FeSO₄ · 7H₂O 0.004, CuSO₄ · 5H₂O 0.004, MnSO₄ · H₂O 0.004, ZnSO₄ · 7H₂O 0.004, NaMoO₄ · 2H₂O 0.00024。固体培养基:含有2%琼脂的无机盐培养基。

1.1.3 主要试剂

聚乙烯醇(PVA 1799 ±50);甲烷气体(1%、1.5%、3%、5%、10%和99.99%)、氧气(99.99%),购自太原钢铁集团;Taq酶、引物合成及其他生化试剂购自大连宝生物公司,化学试剂均为国产分析纯级。

1.2 菌种的富集和分离纯化

将土壤悬液以5%的接种量接入盛有100 mL无机盐培养基的600 mL盐水瓶中,气相部分含有体

积比为 10% 甲烷气体，倒置密闭 120 r/min 摇床振荡，30°C 培养，待菌液浑浊后，反复转接进行富集培养。经无机盐琼脂培养基平板划线分离，置于含有 10% 甲烷气体的玻璃干燥器中 30°C 培养，在相同培养条件下设置不含甲烷的对照实验。

1.3 菌株形态观察及生理生化鉴定

菌体涂片染色，光学显微镜观察菌体形态，无机盐琼脂培养基平板上观察菌落特征。生理生化实验参考文献[13]进行。

1.4 16S rDNA 序列分析

细菌 DNA 提取及 16S rDNA 序列 PCR 按文献[14]方法进行。以 DNA 为模板，5'-AGTTTGATCCTGGCTCA-3'和 5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3'为引物，进行 PCR 扩增。经克隆后送上海生工测序。测序结果在 GenBank 中进行 Blast 比对。

1.5 菌体生长量的测定

8000 r/min 离心 10 min 收集菌体，经洗涤后测定其 OD_{600} 。

1.6 响应面法优化菌株培养条件

以培养温度、接种量和甲烷含量为自变量，菌体含量为响应值，进行三因素三水平 Box-Behnke 优化实验。以菌体生物量为响应值进行响应面试验^[15]，利用 SAS 软件进行分析，确定最佳培养条件。

1.7 固定化细菌制备和活化

固定化细菌的制备：称取 PVA，加热搅拌溶解，配制成 10% 的 PVA 溶液，冷却到 35°C 左右，按 3% 比例加入 7 d 液体培养物收集的预温的湿菌体，混匀，将其滴入 pH 6.0 饱和硼酸溶液中过夜，蒸馏水洗涤，称量湿重，4°C 保存^[16]。活化：每次使用前将适量制备好的固定化细菌放入盛有 100 mL 液体培养基，气相部分含有体积比为 10% 甲烷气体的 600 mL 盐水瓶中，120 r/min 摇床振荡，30°C 活化 1 h。

1.8 测量装置及方法

如图 1 所示安装测量装置，恒温水浴控制测量体系温度为 25°C。氧气与不同含量的甲烷气体待测气体，通入含有 25 mL、pH 7.4、0.05 mol/L 磷酸缓冲液的反应池，流量均为 80 mL/min，通气 1 min，停止通气，此时体系溶氧平衡，加入一定量固定化细菌后，溶解的甲烷气体与固定化的细菌反应，同时消耗溶氧，体系溶氧量减少，通过溶氧响应仪

(CI-6542, Pasco Scientific, USA)检测体系溶氧变化，记录溶氧值。体系溶氧消耗量与通入的甲烷含量相关。

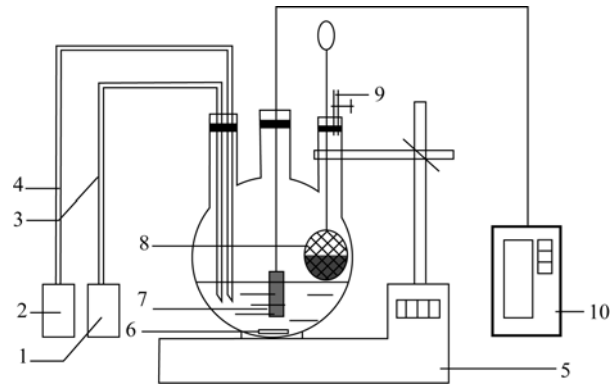


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Experimental equipment. 1, 2: gas flowmeter; 3: O₂ inlet port; 4: CH₄ inlet port; 5: thermostat water bath cauldron; 6: magnetic agitator; 7: dissolved O₂ electrode; 8: immobilized cells; 9: gas vent; 10: dissolved O₂ sensor.

1.9 响应时间的测定

同时通入氧气和含量分别为 0、1.5% 和 10% 的甲烷气体，体系通入氧气和甲烷平衡后，加入固定化细菌，体系溶氧迅速下降，直至平衡，测定并记录溶氧变化。从开始测定到溶氧下降直至平衡的时间，即为甲烷测量的响应时间。

1.10 标准曲线和样品测定

对含量分别为 1%、1.5%、3%、5% 和 10% 的甲烷气体进行测定，并记录相应的溶氧消耗量，绘制标准曲线。同时以 3% 的甲烷气体为样品，重复测量 8 次。

1.11 固定化细菌的使用寿命实验

固定化小球置于 pH 7.0 的磷酸缓冲液中 4°C 保存，以 3% 的甲烷气体为样品进行测定，每隔 2 天测试 1 次，以测定值与初次测定值相比不超过 ±5% 为标准进行评价。

2 结果与分析

2.1 甲烷利用菌的分离纯化和鉴定

对富集培养液反复平板划线获得菌株 C611。该菌株在不含甲烷的液体和固体对照培养基中均不生长，而在含甲烷的培养瓶中生长良好，表明该菌株能利用甲烷。C611 菌株在无机盐固体培养基平板上

培养 7 d, 菌落直径 2~4 mm, 白色、圆形、稍隆起、边缘光滑、较湿润、不透明。细胞短杆状、 $1.8 \mu\text{m} \sim 2.0 \mu\text{m} \times 3.5 \mu\text{m} \sim 4.0 \mu\text{m}$ 、革兰氏阴性、无芽孢、不运动。可利用柠檬酸钠、丙二酸、酒石酸钾钠、葡萄糖酸钠; 能利用粘酸盐、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、山梨醇、水杨甙、蔗糖、果糖以及木糖产酸; 能够以硝酸盐、吡啶、谷氨酸、肌醇为氮源, 不能利用尿素、鸟氨酸、精氨酸、苯丙氨酸; 接触酶、氧化酶、赖氨酸脱羧酶、V.P 反应、明胶降解为阳性, M.R. 实验呈阴性且不产生 H_2S 。实验结果表明 C611 菌株的形态培养特征及生理生化特性与克雷伯氏菌属基本一致。

16S rDNA 序列进行测序后提交 GenBank (Accession No. FJ555520)。结果表明, C611 菌株与克雷伯氏菌属的菌株具有高度的同源性, 与该属典型菌株 *Klebsiella trevisanii* ATCC33558^T (AF129444) 和 *Klebsiella planticola* ATCC33531^T (Y17659) 的同源性分别达到 97% 和 98%。因此, 结合菌体形态及生理生化特征, 将 C611 菌株鉴定为克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.)。

2.2 响应面法优化菌株培养条件

由于该菌株能够利用甲烷, 则提高菌体生物量, 获得甲烷转化率高的菌体是进行下一步应用研究的首要环节。与正交优化方法相比, 响应面法可以在整个响应面区域内寻求最优实验点, 并且能够较好地评估各参数之间的交互作用, 因此采用响应面法优化了该菌株利用甲烷的培养条件, 根据回归方程, 经 Box-Behnken 试验所得各因子的响应面分析见图 2, 可以看出拟合曲面有最大值。对拟合方程进行偏导并求解, 可得模型极值点, 即为最佳培养条件。经

计算当培养温度为 24.4°C , 接种量为 6.7%, 甲烷含量为 25% 时, 其理论最大生物量 OD_{600} 值为 0.143。为了验证了响应面法的可靠性, 采用优化培养条件对菌株 C611 进行培养, 得到最大生物量 OD_{600} 值为 0.147, 与理论值接近。

2.3 不同含量甲烷测定的响应时间

将优化条件培养后的细菌进行固定化, 并进行甲烷浓度测定实验。不同含量甲烷测定的响应时间见图 3, 待体系通入氧气和甲烷平衡后, 加入固定化细菌, 体系溶氧迅速下降, 直至平衡; 随着甲烷含量的增加响应时间有所延长, 溶氧消耗量增大, 在所测量的甲烷含量 0~10% 范围内, 响应过程在 100 s 内达到平衡。

2.4 不同含量甲烷测量的标准曲线

不同含量甲烷测量的标准曲线见图 4, 通入体系中的甲烷含量增大, 细菌对溶氧的消耗量增多, 以甲烷含量对相应的溶氧消耗量作图, 体系溶氧的消耗量(y)与通入甲烷的含量(x)在 0~10% 范围内具有良好的线性关系, 拟合方程为 $y=0.2098x - 0.0168$, 拟合系数为 0.9994。

2.5 甲烷含量测定的稳定性

以 3% 甲烷气体为样品, 室温条件下经过 8 次测定, 测定结果见表 1, 甲烷含量的测定平均值为 3.09%, 相对误差为 3%, RSD 为 3.48%。表明对甲烷测定具有良好的重现性。

2.6 固定化细菌的使用寿命

以测定值与初次测定值相比不超过 $\pm 5\%$ 为标准, 3% 的甲烷气体为样品对固定化细菌的使用次数和保存时间进行研究。测量结果表明, 固定化细菌在此条件下可以存放 25 d, 重复测量 110 次。

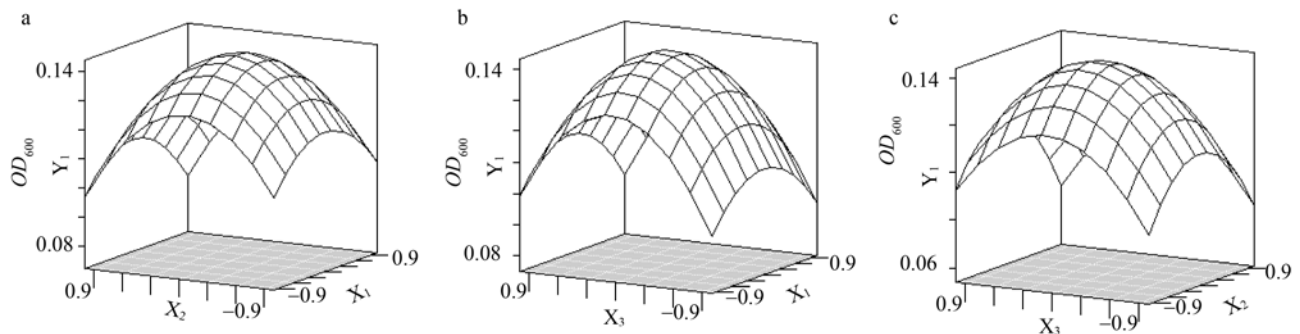


图 2 温度(X_1)、接种量(X_2)及甲烷含量(X_3)对 C611 生长影响的响应面分析

Fig. 2 Response surface of temperature(X_1), inoculum volume(X_2) and methane content(X_3). (a) Temperature and inoculum volume. (b) Temperature and methane content. (c) Inoculum volume and methane content.

表 1 3%甲烷样品气体的测定($n=8$)

Table 1 Determinations of samples of methane

n	1	2	3	4	5	6	7	8	\bar{X}	RSD
DO (mg/L)	0.62	0.63	0.59	0.64	0.59	0.65	0.63	0.62	0.62	3.48%
CH ₄ (%)	3.08	3.13	2.93	3.18	2.93	3.23	3.13	3.08	3.09	3.48%

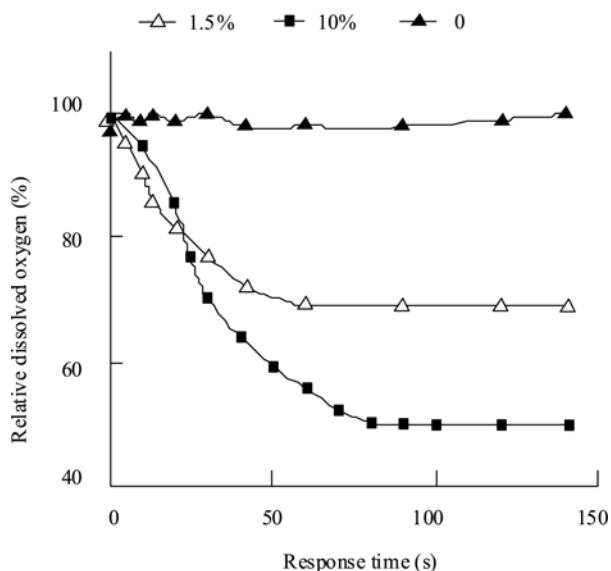


图 3 不同含量甲烷的响应时间

Fig. 3 Response time in different methane content.

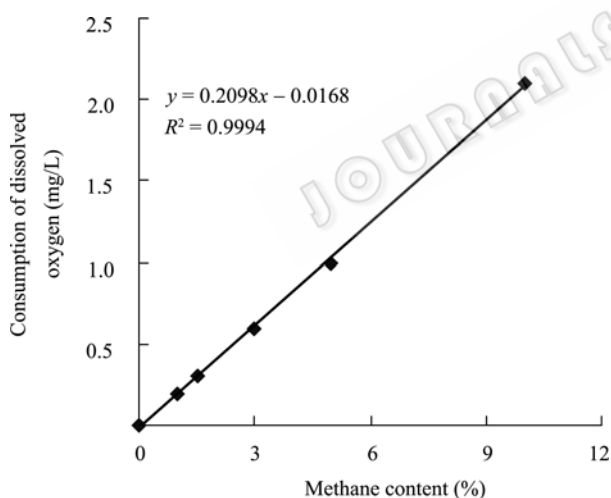


图 4 不同含量甲烷与溶氧消耗量的关系

Fig. 4 Relationship between dissolved oxygen consumption and different methane content.

3 讨论

甲烷的性质非常稳定,在常温下很难氧化,而甲烷利用细菌能在常温、常压和有氧条件下,由细菌胞内的单加氧酶系催化,通过 5-磷酸核酮糖单磷

酸途径 (RuMP pathway) 或丝氨酸途径 (Serine pathway) 进行甲烷的代谢转化^[8]。目前被发现的甲烷利用菌主要包括: 甲基单胞菌属 (*Methylomonas*)、甲基弯菌属 (*Methylosinus*)、甲基球菌属 (*Methylococcus*)、甲基微菌属 (*Methylomicrobium*)、甲基暖菌属 (*Methylocaldum*) 等, 被开发利用甲烷检测治理的菌种仅有 *Methylosinus* 和 *Methylomonas*^[17,18]。克雷伯氏菌广泛分布于土壤和水域中, 其研究主要集中在医药学耐药性和致病性及构建工程菌等方面。据文献报道某些克雷伯氏菌能够降解利用芳香烃、酚类、萜烯、甾类、醇和醛类等有机物^[19], 这种降解活性与其具有双加氧酶系或是 5-磷酸核酮糖单磷酸途径有关^[20]。本实验室分离得到的克雷伯氏菌菌株 C611, 能够在有氧的条件下利用甲烷, 这可能与该菌株具有 5-磷酸核酮糖单磷酸途径代谢途径有关。由此可见, 自然环境中参与甲烷代谢的菌株及其代谢能力是多样化、多层次性的, 还有待于对它们进行更深入的研究, 以便对甲烷利用菌的微生物资源多样性及代谢途径多样性有深入理解。

甲烷利用菌的培养一般是以甲烷作为碳源, 由于甲烷难溶于水, 采用甲烷作为碳源, 难以获得足够的菌体用于应用研究^[8]。菌株 C611 能够利用甲烷, 可用于开发微生物甲烷传感器和降解煤矿瓦斯气体等方面的应用研究。为了与应用研究无其他碳源的条件相一致, 本研究以无机盐培养基、甲烷气体为唯一碳源进行培养条件的考察和优化。响应面法是通过回归方程来分析寻求最优工艺参数, 解决多变量问题的一种统计方法, 在微生物培养条件的优化工作中已取得良好的效果^[15], 但未见用于优化甲烷氧化菌培养条件的报道。因此, 选择响应面法对影响细菌生长的主要培养条件进行考察和优化, 为该菌株的进一步应用研究奠定基础。

瓦斯气体成分为甲烷及其他烷烃, 还有 O₂、CO₂、N₂、H₂、CO、H₂S 及稀有气体氦和氩气等。菌株对甲烷及烷烃类具有选择性, O₂ 和 N₂ 等成分不

影响系统的检测。利用甲烷物理化学性质极不活泼这一原理,对检测样品进行前处理,分别进行酸、碱和脱水处理,可去掉干扰气体,其他残留的微量气体将不影响甲烷气体的测量。由于该菌株能在有氧条件下利用甲烷,因此设计了一种简单的测量装置进行甲烷含量的测定,初步建立了一种重复性好、简便、快速的微生物传感器测定甲烷气体的新方法。但用于煤矿和自然环境中甲烷检测还需要进一步实验研究。

REFERENCES

- [1] Chen IC, Hegde U, Chang CH, *et al.* Methane and carbon dioxide emissions from closed landfill in Taiwan. *Chemosphere*, 2008, **70**: 1484–1491.
- [2] Dickinson RE, Cicerone RJ. Future global warming from atmospheric trace gases. *Nature*, 1986, **319**: 109–115.
- [3] Amato FD, Mazzinghi P, Castagnoli F. Methane analyzer based on TDL's for measurements in the lower stratosphere: Design and laboratory tests. *Appl Phys*, 2002, **B75**: 195–202.
- [4] Li W, Huang SZ, Chen WZ. Recent developments of gas sensors for methane detection. *J Fujian Univ Technol*, 2006, **4** (1): 4–8.
李巍, 黄世震, 陈文哲. 甲烷气体传感元件的研究现状与发展趋势. 福建工程学院学报, 2006, **4** (1): 4–8.
- [5] Pang WN, Wu L, Zhou ZL. The development of absorption spectral optical fiber methane sensors. *Opti Commu Technol*, 2004, **28** (10): 48–50.
潘文娜, 武林, 周正利. 吸收型光纤甲烷传感器的研究进展. 光通信技, 2004, **28** (10): 48–50.
- [6] Hakemian AS, Rosenzweig AC. The biochemistry of methane oxidation. *Annu Rev Biochem*, 2007, **76**: 223–241.
- [7] Hutchens E, Radajewski S, Dumont MG, *et al.* Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing. *Environ Microbiol*, 2004, **6**: 111–120.
- [8] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev*, 1996, **60**: 439–471.
- [9] Chen ZY, Wu WX, Min H, *et al.* Isolation and identification of two methane-utilizing strains of *Streptomyces hygroscopicus*. *J Zhejiang Univ*, 2002, **26** (4): 384–388.
陈中云, 吴伟祥, 闵航, 等. 两株能利用甲烷的吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的分离鉴定. 浙江大学学报, 2002, **26** (4): 384–388.
- [10] Stoecker K, Bendinger B, Schoning B, *et al.* *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monoxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 2363–2367.
- [11] Dunfield PF, Yuryev A, Senin P, *et al.* Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. *Nature*, 2007, **450**: 879–882.
- [12] Vigliotta G, Nutricati E, Carata E, *et al.* *Clonothrix fusca* roze 1896, a filamentous, sheathed, methanotrophic γ -proteobacterium. *Appl Environ Microb*, 2007, **73**: 3556–3565.
- [13] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- [14] Chen L, Zheng J, Zhang YX, *et al.* Isolation of an ethanol-utilizing strain and its application for determination of ethanol. *Chin J Appl Environmental Biol*, 2009, **15** (Accepted).
陈亮, 郑军, 张益霞, 等. 一株乙醇利用菌的分离及其在乙醇含量测定中的应用. 应用与环境生物学报, 2009, **15**(已接受).
- [15] Zeng YF, Quan CS, Liu Q, *et al.* Medium optimization for the novel antifungal material by *Burkholderia cepacia* CF-66. *China Biotechnol*, 2006, **26** (9): 56–60.
曾勇峰, 权春善, 刘俏, 等. 洋葱克霍罗德菌(*Burkholderia cepacia*)CF-66 发酵生产新型抗菌物质 CF66I 培养基的优化. 中国生物工程杂志, 2006, **26** (9): 56–60.
- [16] He F, Hu WR, Li YZ. Investigation of isolation and immobilization of a microbial consortium for decoloring of azo dye 4 BS. *Water Res*, 2004, **38**: 3596–3604.
- [17] Karube I, Okada T, Suzuki S. A methane gas sensor based on oxidizing bacteria. *Anal Chim Acta*, 1982, **135**: 61–67.
- [18] Damgaard LR, Nielsen LP, Revsbech NP. Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. *Water Res*, 2001, **35**: 1379–1386.
- [19] Wang F, Qu H, Zhang DT, *et al.* Production of 1,3-propanediol from glycerol by recombinant *E. coli* using incompatible plasmids. *System Mol Biotechnol*, 2007, **37**: 112–119.
- [20] Vangnai AS, Petchkroh W. Biodegradation of 4-chloroaniline by bacteria enriched from soil. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, **268**: 209–216.