

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(8):852-859; 4 August 2013
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>

一株甲醇利用菌的分离及其在甲醇测定中的应用

郭珺^{1#}, 高炜^{2#}, 张强³, 屈非², 卢东涛², 郑军^{2*}, 庞金梅¹, 杨玉景²

¹山西省农业科学院农业环境与资源研究所, 山西省土壤环境与养分资源重点实验室, 太原 030006

²山西省农业科学院小麦研究所, 临汾 041000

³山西师范大学生命科学学院, 临汾 041004

摘要:【目的】筛选能够利用甲醇的微生物菌株,并将其应用于甲醇测定的初步研究中。【方法】采用富集培养及固体平板分离法分离菌株;通过生理生化特征及 16S rDNA 序列分析进行菌株鉴定;以固定化细胞和溶氧仪组合成测定系统,测定了不同含量甲醇的响应时间以及溶氧变化与甲醇含量的关系。【结果】从山西清徐农用沼气池中分离得到一株能以甲醇为唯一碳源和能源生长的菌株 M211,通过生理生化特征及 16S rDNA 序列分析,该菌株被鉴定为嗜有机甲基杆菌 (*Methylobacterium organophilum*)。传感系统在 0.02% - 1% (V/V) 甲醇含量范围内测定,响应时间小于 20 min,检出限为 0.27 mg/L,溶氧消耗量同甲醇含量呈线性关系,拟合系数 (R^2) 为 0.9986。该测定体系不易受其它干扰物质影响,检测结果与实际样品浓度一致。【结论】该测定体系具有较强的选择性,及良好的重现性和稳定性,具有较好的应用前景。

关键词: 甲醇, 嗜有机甲基杆菌, 甲醇测定, 固定化细胞

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)08-0852-08

甲醇是一种无色透明、易挥发,易燃烧的液体,广泛应用于化学工业、医疗卫生、有机合成、工业合成等各个领域,是重要的有机化工基础原料。此外,甲醇作为一种清洁能源,将会替代矿物能源发挥重要的作用^[1]。但甲醇是一种剧毒物质,在生产生活排放的废水、废气中的含量日益增多,不仅污染环境、危害人类健康,而且对水生生物和微生物均有毒性。人体摄入甲醇后可引起头痛及失明等症状,如果摄入量超过 10g 足以毙命^[2]。因此,在酿酒、制药、发酵和合成工业产品、化妆品等工业应用领域以及环境保护工作中准确、快速的检测甲醇含量具有

重要的意义。

甲醇测定的常用方法有蒸馏法、比重法、比色法、气相色谱法和液相色谱法^[3-4]。蒸馏法及比重法操作简便,成本低,一般用于高含量甲醇测定,也可用于混合体系中醇类物质的检测,但在单一醇类物质检测方面精密度和准确性上存在较大缺陷^[5]。色谱法能检测微量甲醇含量,精密度和准确性很高,目前应用普遍但操作较为复杂;亚硫酸钠比色法、碘量滴法等比色法,显色缓慢且不稳定,干扰因素多,操作更为繁琐。此外,色谱法和比色法由于仪器性质限制,无法进行户外便携检测。也有红外光谱法、

基金项目: 山西省科技攻关项目(20120311009-2);山西省青年科学基金(2011021031-3);山西省农业科学院科技攻关项目(2013gg30)

* 通信作者。Tel: +86-351-7123157; E-mail: zhengjun@sxagri.ac.cn

作者简介: #并列第一作者。郭珺(1974-),女,山西人,助理研究员,硕士,研究方向为微生物资源利用, E-mail: 13935163790@163.com;

高炜(1979-),男,山西人,助理研究员,硕士,研究方向为农业微生物, E-mail: nina0861@sina.com

收稿日期:2012-09-27;修回日期:2013-03-08;

荧光法和激光拉曼光谱法等方法的报道,仍处于实验室研究阶段^[6]。因此寻找一种简便、快速、准确,能够广泛应用于样品定性、定量分析的甲醇测定方法一直倍受重视。

甲醇生物传感器的研究起始于20世纪末,大多以醇脱氢酶和微生物细胞作为分子识别的元件。近年来,Podola等建立了以微藻类和芯片为材料,通过荧光光谱测定蒸气中甲醇的方法^[4]。此外,Kirchhoff于2007年也报道了通过醇脱氢酶测定醇类物质的研究^[2]。由于醇脱氢酶专一性较差,此类传感器依然存在选择性不高,寿命短、和稳定性差等缺点,极大地限制了甲醇微生物传感器的发展^[7]。我国目前在这方面研究较少,仅有孙裕生等报道了一种甲醇细菌电极的制备,并初步用于样品检测,但检测线性范围只有0.2-9 mg/L,且测量过程中易受醇类及其它物质干扰,无法满足甲醇测定发展的要求^[8-9]。此外,所用菌株尚未明确鉴定,代谢机理也不甚清楚。可见国内外微生物法测定甲醇的报道较少,而且多处于实验室研发阶段。因此,深入开发适用于甲醇检测的微生物资源并应用于甲醇含量的测定具有重要的意义。本文从山西清徐农用沼气池中分离得到1株能利用甲醇作为唯一碳源生长的M211菌株,16S rDNA序列分析和生理生化特性完成M211菌株的鉴定,以微生物作为识别元件研究了该体系对不同甲醇含量的响应,并考察了该传感系统的最佳工作条件及分析测试性能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:山西清徐农用沼气池采集

1.1.2 培养基:液体培养基参考文献[8]配制,每L加CH₃OH₆ mL;固体培养基:含有2%琼脂液体培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器:聚乙烯醇(PVA1799 ± 50, Sigma);Taq酶、引物合成及其它生化试剂购自大连宝生物公司;其它化学试剂均为国产分析纯。GC9800型气相色谱仪(上海科创色谱有限公司),溶氧响应仪(CI-6542, Pasco Scientific, USA)。

1.2 菌种的富集和分离纯化

采用富集培养及固体平板分离法,以5%的接种量将样品接入盛有50 mL液体培养基的250 mL

三角瓶中,密闭120 r/min摇床振荡,30℃培养,待菌液浑浊后,再次转接进行富集培养。经固体琼脂培养基平板划线分离,30℃培养。在相同培养条件下设置不含甲醇的对照实验。

1.3 形态、培养特征的观察与生理生化实验及碳源利用

菌体染色后在光学显微镜下观察细胞形态。固体琼脂培养基平板上观察菌落特征。参考文献[11]对M211菌株相关生理生化实验研究进行属内鉴定。菌株接种于含有20 mL液体培养基的三角瓶中,液体培养基中分别添加不同种类和浓度的碳源。

1.4 16S rDNA序列分析及系统发育分析

细菌DNA提取及16S rDNA序列PCR按文献[10]方法进行。以DNA为模板进行PCR扩增,5'-AGTTTGATCCTGGCTCA-3'和5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3'为引物,进行PCR扩增。经克隆测序后,测序结果在GenBank中进行Blast比对。Clustal X多序列比对,用MEGA3.1中的Neighbor-Joining(NJ)方法构建系统发育树。

1.5 固定化细胞的制备及活化

1.5.1 制备:固定化小球制备参考文献[10]进行,洗涤后4℃保存。

1.5.2 活化:每次使用前将适量制备好的固定化细胞放入盛有50 mL液体培养基的250 mL三角瓶中,120 r/min摇床振荡,30℃活化1 h。

1.6 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,将2 mL的测试样品加入18 mL的反应体系中,关闭装置的通气口,待体系溶氧平衡后置入固

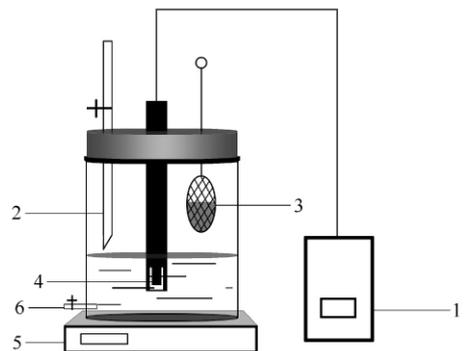


图1. 实验装置示意图

Figure 1. Experimental equipment. 1. Dissolved O₂ sensor; 2. Inlet port; 3. immobilized cells; 4. Dissolved O₂ electrode; 5. Thermostat water bath cauldron; 6. Outlet port.

定化细胞。通过溶氧响应仪及 Clark 氧电极检测体系溶氧变化,记录溶氧值。

1.7 测量条件的选择

分别研究了在不同温度、pH、离子强度条件下各因素对甲醇测定的影响,并确定最佳实验条件。

1.8 响应时间的测定

测试样品加入体系,待溶氧平衡后,加入固定化细胞,溶氧下降直至平衡。通过 Clark 氧电极和溶氧响应仪测定并记录溶氧变化。从开始测定到溶氧下降至平衡,2 次平衡之间的时间即为甲醇测量的响应时间^[9]。

1.9 标准曲线的测定

加入体系的 2 mL 样品中甲醇含量分别为 0.02%、0.05%、0.2%、0.4%、0.6%、1% (V/V),记录相应的溶氧消耗量,绘制标准曲线。

1.10 干扰实验及样品测定

在甲醇含量为 0.4% (V/V) 的测量条件下,分别加入不同干扰物质对测量甲醇含量的影响,以每种干扰物质的浓度对测量甲醇含量影响不超过 $\pm 5\%$ 为标准进行干扰物质的评价。

采用 95% 的甲醇(北京化工厂生产)和生产甲胺的工业废水为实际样品,分别编号为 1、2、3。以本实验方法和气相色谱法分别进行甲醇含量测定,检测器为氢火焰检测器,按外标法以峰面积计算甲

醇含量。

1.11 固定化细菌的使用寿命

固定化小球置于 pH 7.0 的磷酸缓冲液中 4℃ 保存,以 0.4% 的甲醇为样品进行测定,每隔 2 天测试 1 次,以测定值与初次测定值相比不超过 $\pm 5\%$ 为标准。

2 结果

2.1 菌株的分离及鉴定

采用富集和平板分离法共得到利用甲醇的微生物菌株 197 株,经过反复筛选,从中选出 1 株生长速度快、甲醇利用率较高的菌株 M211。该菌株在不含甲醇的对照培养基及含有甲醇无氧条件中均不生长,而在含甲醇和有氧的条件下生长良好。说明菌株 M211 能够利用甲醇同时消耗氧气。M211 菌株在固体培养基平板上培养 5 d,菌落直径 0.6 mm - 1.2 mm,粉色,圆形,稍隆起,边缘光滑,较湿润,不透明。细胞呈短杆状,0.8 μm \times 1.0 μm ,革兰氏阴性,无荚膜和芽孢,能运动。

菌株 16S rDNA 序列进行测序后提交 GenBank (Accession No. HQ260325)。比对结果表明,M211 菌株与甲基杆菌属的菌株具有高度的同源性,与该属菌株 *Methylobacterium luteus* (AM910531) 16S

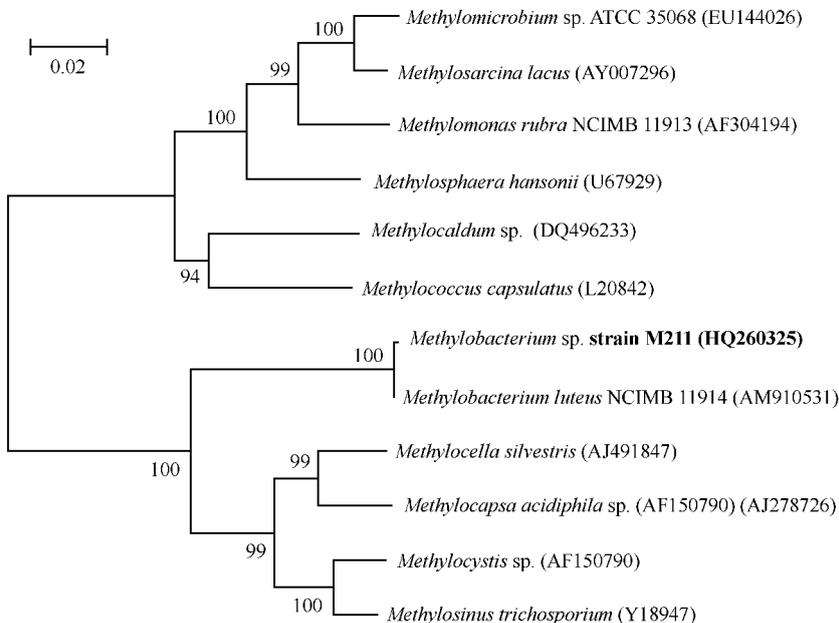


图 2. 菌株 M211 16S r DNA 序列系统发育分析

Figure 2. Phylogenetic tree derived from 16S rDNA sequences of strain M211. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on neighbor-joining analysis of 1000 resampled data sets.

rDNA 序列一致性达 99% (见图 2)。菌株 M211 形态和培养特征与甲基杆菌属一致,结合 16S rDNA 序列分析, M211 菌株可被鉴定为甲基杆菌属 (*Methylobacterium* sp.)。M211 菌株相关生理生化实验显示,该菌株能够利用葡萄糖、果糖、乙酸钠、乙醇、甲醇、甲烷和甲基胺;不能利用癸二酸钠、甜菜碱和酒石酸钾钠;氧化酶和接触酶为阳性。因此,根据形态培养特征、16S rDNA 序列分析及部分生理生化特征, M211 菌株可初步鉴定为甲基杆菌属的嗜有机甲基杆菌 (*M. organophilum*)。

2.2 测定工作条件的选择

菌株 M211 能够在耗氧条件下以甲醇为唯一碳源生长,因而设计了相关实验装置,利用该菌株进行甲醇含量的测定。在 18 mL 反应体系中,加入 2 mL

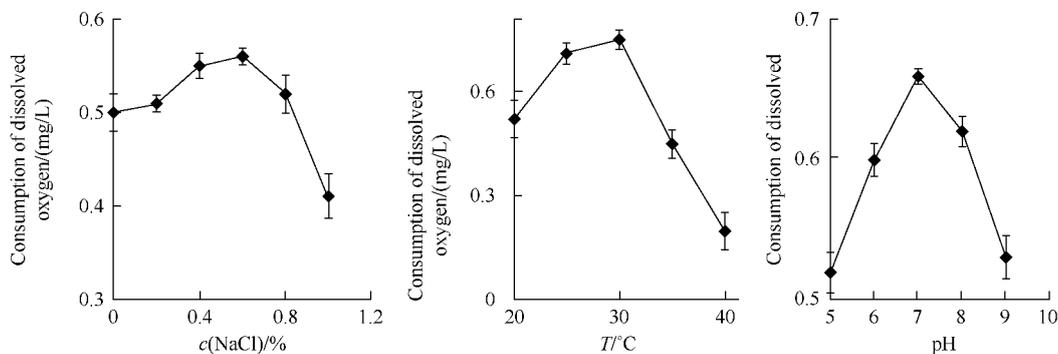


图 3. 离子强度、温度和 pH 对测定的影响

Figure 3. Effect of temperature and pH on the biosensing system response.

2.3 不同含量甲醇测定的响应时间

不同含量甲醇测定的响应时间见图 4,待体系加入甲醇溶氧平衡后,加入固定化细菌,体系溶氧迅速下降,随着甲醇含量的增加,响应时间有所延长,溶氧消耗量增大。由于测定过程中未搅拌,因此不

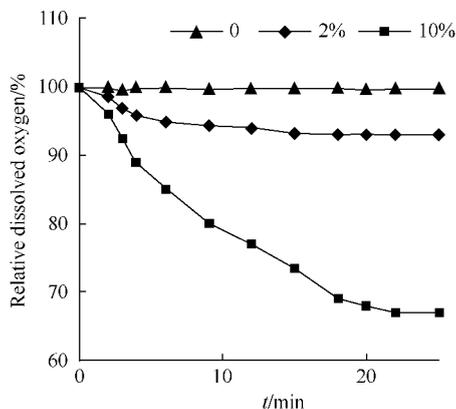


图 4. 不同含量甲醇的响应时间

Figure 4. Response time in different methanol content.

的甲醇样品,待体系溶氧达到平衡,加入 3 g 固定化细菌,菌体利用甲醇,体系溶氧下降,并最终达到平衡即为甲醇测量的响应时间。甲醇含量高,体系溶氧下降的幅度大,利用 Clark 氧电极及溶氧检测器测定固定化细菌消耗体系中溶氧来分析甲醇的含量。

测试体系的温度、pH 和离子强度不仅影响微生物催化底物反应的活性,也影响底物和溶解氧的扩散状况。根据实验获得各因素影响曲线见图 3,该传感系统在 30°C、pH 7.0、离子强度为 0.5 mol/L 的条件下具有较好的响应。因此,采用温度 30°C、pH 7.0、缓冲液为 18 mL 的 0.5 mol/L 磷酸缓冲液进行实验。

同含量甲醇测定的响应时间较长,响应过程在 20 min 左右达到平衡。

2.4 不同含量甲醇测定的标准曲线

不同含量甲醇测量的标准曲线见图 5,通入体系中的甲醇含量增大,细菌对溶氧的消耗量增多,以

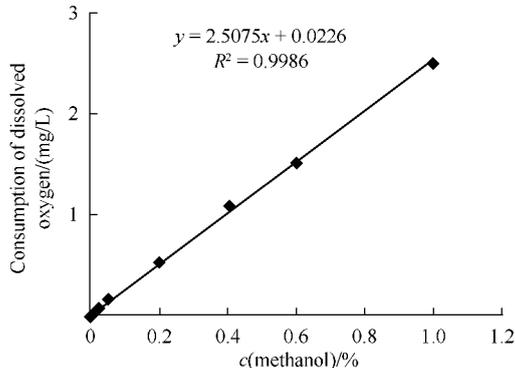


图 5. 不同含量甲醇与溶氧消耗量的关系

Figure 5. Relationship between dissolved oxygen consumption and different methanol content.

不同甲醇含量对相应的溶氧消耗量作图,体系溶氧的消耗量(y)与通入甲醇的含量(x)在 0.02% - 1% (V/V) 范围内线性关系良好,拟合方程为 $y = 0.2507x + 0.0226$,拟合系数为 0.9986,经计算检出限为 0.27 mg/L。

2.5 干扰实验

在含有 0.4% 甲醇的测量体系中分别加入不同干扰物质进行测量,以每种干扰物质的浓度对测量甲醇含量影响不超过 $\pm 5\%$ 为标准进行干扰物质及干扰浓度的评价。结果见表 1,实际样品中可能存在的干扰物质如有机酸类、氨基酸等物质,尤其是其

它醇类物质,对甲醇含量的测定几乎不产生干扰,然而苯酚却对该体系影响较为明显,可能由于苯酚具有毒性,从而影响微生物的活性导致。

2.6 样品含量的测定

用 95% 的甲醇(北京化工厂生产)和生产甲胺的工业废水为实际样品,进行甲醇含量的测定,以考察系统的准确性和重复性。将实际样品逐步稀释进行测定,直至溶氧消耗量的测定值进入标准曲线的测定范围,并进行多次测定,测定结果见表 2,可以看出本实验方法的测定值与气相色谱的测定值相一致。

表 1. 干扰物质的测定 ($n=7$)

Table 1. The maximum permissible concentration of potential interferents

Interferents	$c/(\text{mg/mL})$	Interferents	$c/(\text{mg/mL})$	Interferents	$c/(\text{mg/mL})$
Acetic acid	132	Formic acid	66	Maltose	161
1-Butanol	80	Fructose	110	Phenol	14
Ethanol	135	Glucose	80	Serine	180
n-propylalcohol	97	Sodium acetate	156	Tyrosine	175

表 2. 甲醇样品的测定 ($n=7$)

Table 2. Results of different methanol detections

No.	Our method			Gas chromatographic method		
	n	Average(%)	RSD(%)	n	Average(%)	RE(%)
1	7	92.3	3.5	3	95.4	3.2
2	7	2.5	3.1	3	2.6	3.8
3	7	6.9	2.7	3	7.1	2.8

2.7 固定化细菌的使用寿命

以 0.4% 的甲醇为样品,测定值与初次测定值

相比不超过 $\pm 5\%$ 为标准,对固定化细菌的使用次数和保存时间进行研究。测定结果表明,固定化细菌在此条件下可以存放 40 d,可进行重复测定 180 次以上。

2.8 甲醇不同测定方法分析性能比较

不同甲醇测定方法及其特性比较见表 3,测量 RSD 值都小于 5% 的基础上对不同的方法进行评价。AOD/CAT-流动注射分析法和电催化甲醇传感器法拥有较好的检测限,但是流动注射分析法比

表 3. 生物传感器法与其它方法的分析性能比较

Table 3. Comparison of the analytical performance between the methanol biosensing and other reported methods.

Analytical performance	Linear range	Detection limit	RSD/%	Cost	Reference
Biosensing system	0.002% - 1% (V/V)	0.27 mg/L	4.24	lower	This work
Enzyme electrode	0 - 118 mg/L	-	≤ 1.6	lower	[12]
MPMS-FIA	0.1 - 100 mg/L	0.1 mg/L	≤ 3	lower	[13]
FIA	6 - 100 mg/L	0.6 mg/L	1.16	lower	[14]
FTIR	-	0.316 g/L	≤ 1.4	lower	[15]
AOD/CAT-FIA	0.13 - 2.5 mg/L	0.04 mg/L	≤ 1.8	expensive	[16]
Colorimetry	200 - 600 mg/L	100 mg/L	2.9 - 4.0	expensive	[17]
DNP-H-colorimetry	-	2.7 mg/L	≤ 0.6	expensive	[18]
GC-FID	100 - 1200 mg/L	-	≤ 2.0	expensive	[19]
HPLC	6 - 640 mg/L	3.0 mg/L	≤ 1.6	expensive	[20]

MPMS-FI: 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate flow-injection analysis; AOD/CAT-FIA: alcohol oxidase/catalase-FIA; DNP-H-colorimetry: dinonyl *o*-phthalate-hydrazine-colorimetry.

较复杂,需要昂贵的设备和繁琐的操作过程。与之相比本实验方法测量成本相对较低、测量过程相对简单;电催化甲醇传感器法的测量过程相对简单,但甲醇的选择性却低于本实验方法。根据设备成本,表3中提到这些测定方法可以分成两类,红外光谱法、MPMS-流动注射分析法、AOD/CAT-流动注射分析法、流动注射分析法、气相色谱法和高效液相色谱法这些方法较为精确、可靠,但测量成本较高,步骤也较为繁琐。其它测量方法成本较低,比色法的线性范围和检测限不及本实验方法;与酶传感器相比,本实验方法响应时间短、线性范围宽。可以看出,本实验方法与色谱法在测量特性上相当,测量成本也相对较低,由于采用微生物作为元件,响应时间较长,但对甲醇具有较好的选择性。

3 结论

为了筛选能够利用甲醇的微生物菌株,并将其应用于甲醇测定的初步研究中。本文从环境中筛选相关菌株,并利用电化学方法初步研究了以微生物作为识别元件体系中不同含量乙醇对溶氧的响应时间以及溶氧变化与乙醇含量的关系,得到如下结论:

(1)从沼气池中分离得到1株好氧利用甲醇的M211菌株,经生理生化实验及16S rDNA序列分析鉴定,该菌株为嗜有机甲基杆菌(*Methylobacterium organophilum*),丰富了该类细菌的种质资源。

(2)根据该菌株利用甲醇的同时需要消耗氧气这一特点,以固定化细菌及Clark电极及溶氧检测器设计了相关生物传感系统进行甲醇含量的测定,该系统选择性较强,不易受醇类等物质的干扰在0.02%~1%(V/V)范围内成线性关系,响应时间小于20min。

(3)以95%甲醇和工业废水为样品进行多次测定,测定值与气相色谱法基本相同,表明该反应体系具有较好的重现性和稳定性。

(4)与已报道的甲醇测定方法相比,该方法具有装置简便,成本低和寿命长等特点,灵敏度、检出

限、重现性及检测范围等分析性能方面也较高,进一步研究和开发有望实现传感器的便携式和自动化。

参考文献

- [1] Seo SH, Lee CS. Impedance characteristics of the direct methanol fuel cell under various operating conditions. *Energy Fuels*, 2008, 22(2): 1204-1211.
- [2] Liu QF, Kirchhoff JR. Amperometric detection of methanol with a methanol dehydrogenase modified electrode sensor. *Electroanalytical Chemistry*, 2007, 601(2): 125-131.
- [3] Tagliaro F, Schiavon G, Dorizzi R. Development of post-column enzymic reactors with immobilized alcohol oxidase for use in the high-performance liquid chromatographic assay of alcohols with electrochemical detection. *Biomedical Sciences and Applications*, 1991, 563(1): 11-21.
- [4] Podola B, Nowack EC, Melkonian M. The use of multiple-strain algal sensor chips for the detection and identification of volatile organic compounds. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 19(10): 1253-1260.
- [5] Mendes LS, Oliveira FCC, Suarez PAZ, Rubim JC. Determination of ethanol in fuel ethanol and beverages by Fourier transform (FT)-near infrared and FT-Raman spectrometries. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 493(2): 219-231.
- [6] Park JY, Aulice Scibioh M, Kim SK, Kim HJ, Lee TG, Ha HY. Investigations of performance degradation and mitigation strategies in direct methanol fuel cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34(4): 2043-2051.
- [7] Wu YH, Hu SS. Biosensors based on direct electron transfer in redoxproteins. *Microchim Acta*, 2007, 159(1): 1-17.
- [8] Li X, Wang X, Sun Y, Han S. Study and application on methanol bacterial electrode. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1999, 27(3): 281-284. (in Chinese)
李新,王晓辉,孙裕生,韩树波. 甲醇细菌电极的研究与

- 应用. 分析化学, 1999, 27(3): 281-284.
- [9] Sun Y, Lang Z. Study on the determination of methanol by microbial sensor. *Modern Scientific Instruments*, 1999, 3: 32-34. (in Chinese)
孙裕生, 郎志敏. 用微生物传感器法测定甲醇的研究. 现代科学仪器, 1999, 9(3): 32-34.
- [10] Zhao CG, Zheng J, Li HP, Wen GM, He YY, Yang SP, Dong C, Choi MM. Characterization of a methane-utilizing strain and its application for monitoring methane. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(6): 2024-2030.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 一般细菌分类手册. 北京: 科学出版社, 2001: 145-155.
- [12] Liu Y, Luo SL, Wei WZ. Methanol sensor based on the combined electrocatalytic oxidative effect of chitosan-immobilized nickel(II) and the antibiotic cefixime on the oxidation of methanol in alkaline medium. *Microchim Acta*, 2009, 164(3): 351-355.
- [13] Gulce H, Gulce A, Kavanoz M, Coskun H, Yildiz A. A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, 17(6): 517-521.
- [14] Zhou J. Detection of methanol in alcohol by colorimetry. *Chinese Journal of Public Health*, 1994, 13(4): 255-260. (in Chinese)
周坚勇. 多点标准加入法测定酒中甲醇. 中国公共卫生学报, 1994, 13(4): 255-260.
- [15] Lu C, Zhao E, Li P. Determination of micro amounts of methyl alcohol in white spirits by 2, 4-dinitrophenylhydrazine. *Journal Zhengzhou Engineering College*, 2004, 25(4): 29-34. (in Chinese)
路纯明, 赵二伟, 李沛青. 2,4-二硝基苯肼法测定白酒中甲醇的研究. 郑州工程学院学报, 2004, 25(4): 29-34.
- [16] Garrigues JM, Pérez-Ponce A, Garrigues S, Guardia M de la. Direct determination of ethanol and methanol in liquid samples by means of vapor phase-Fourier transform infrared spectrometry. *Vibrational Spectroscopy*, 1997, 15(2): 219-288.
- [17] Sekine Y, Suzuki M, Takeuchi T. Selective flow-injection determination of methanol in the presence of ethanol based on a multi-enzyme system with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 1993, 280(2): 179-184.
- [18] Garcia de MC, Manzano T, Duarte R, Alonso A. Selective flow-injection determination of methanol using immobilized enzyme reactors. *Analytica Chimica Acta*, 1995, 309: 241-250.
- [19] Almuzara C, Cos O, Baeza M, Gabriel D, Valero F. Methanol determination in *pichiapastoris* cultures by flow injection analysis. *Biotechnology Letters*, 2002, 24(5): 413-417.
- [20] Liu J, Li X. Headspace gas chromatography measurement of trace methanol in a dark-colored wine, *Wine Brewing*, 2002, 29(1): 91-92. (in Chinese)
刘江勋, 黎锡流. 顶空气相色谱法测深色酒中微量甲醇. 酿酒, 2002, 29(2): 91-92.
- [21] Chen SH, Wu HL, Yen CH, Wu SM, Lin SJ, Kou HS. Trace determination of methanol in water-ethanol solution by determination and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1998, 799(1): 93-99.

Isolation of a methanol-utilizing strain and its application for determining methanol

Jun Guo^{1#}, Wei Gao^{2#}, Qiang Zhang³, Fei Qu², Dongtao Lu², Jun Zheng^{2*}, Jinmei Pang¹, Yujing Yang²

¹Institute of Agricultural Environment & Resource, Shanxi Academy of Agricultural Sciences; Key of Laboratory Soil Environment & Nutrient Resource, Taiyuan 030006, China

²Wheat Research Institute Agricultural Sciences, Linfen 041000, China

³College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China

Abstract: [**Objective**] To isolate and characterize bacteria that can be used to develop microbial biosensor for methanol (MeOH) determination. [**Methods**] We used selective medium and streak plate to isolate bacteria. Morphological, physiological characteristics and 16S rDNA sequence analysis were used to identify the strain. An MeOH biosensor was then developed by immobilizing M211 along with dissolved oxygen (O₂) sensor. [**Result**] An MeOH utilizing bacterium was isolated from biogas-producing tank using methanol as the sole carbon source, and identified as *Methylobacterium organophilum*. Decrease of O₂ concentration is linearly related to the MeOH concentration in the range from 0.02% to 1%, with the MeOH detection limit of 0.27 mg/L. The response time of the biosensor is within 20 min. Furthermore, the result of interference test and the detection of methanol sample are both satisfactory. [**Conclusion**] Good results are obtained in interference test and the detection of methanol sample. The proposed method seems very attractive in monitoring methanol.

Keywords: methanol, *Methylobacterium organophilum*, methanol determination, immobilizing cell

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Technology Project of Shanxi Province (20120311009-2), by the Youth Science Foundation of Shanxi Province (2011021031-3) and by the Key Technology Project of Shanxi Academy of Agricultural Sciences (2013gg30)

* Corresponding author. Tel: +86-351-7123157; E-mail: zhengjun@sxagri.ac.cn

#These authors contributed equally to this work

Received: 27 September 2012/Revised: 8 March 2013

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。