红树林混合发酵产氢菌群中梭菌属 Fe-氢酶基因(*hydA*)的克隆及序列分析*

朱大玲[1]　王广策[2①]　潘光华[1]　乔洪金[2]　才金玲[1]

(1. 天津科技大学海洋科学与工程学院海洋资源与化学重点实验室　天津　300457; 2. 中国科学院海洋研究所　青岛　266071)

提要　　采用间歇产气试验方法对红树林淤泥中的混合菌群进行产氢菌群富集，并对混合产氢菌群发酵产氢过程中发酵液的 pH 值和氧化还原电位(ORP)的变化进行分析。此外，在产氢速率最高时段，发酵液中菌群经过常规的基因组提取，分别采用通用的梭菌属 Fe-氢酶基因和 16S rRNA 基因引物进行 PCR 扩增，扩增产物经变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析。结果发现产氢菌群中至少有 6 种，而 Fe-氢酶基因只含有一种。将 Fe-氢酶基因的扩增片段切胶纯化之后，经 PCR 重新扩增、纯化，克隆测序。NCBI 序列比对结果表明，该片段序列与产气荚膜梭菌 Fe-氢酶基因的序列相似性达 99%。根据已知产气荚膜梭菌 Fe-氢酶基因序列设计引物，经两轮 PCR 扩增获得 Fe-氢酶基因全序列。混合菌群中 Fe-氢酶基因 GenBank 数据库的登录号为 EU590683。此外，采用 Bioedit 和 Mega2 软件构建了 Fe-氢酶的 NJ 系统进化树，结果表明该 Fe-氢酶基因与产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)聚为一类。推测的氨基酸序列与产气荚膜梭菌的相应序列相似性达 97%—99%。PfamHMM 结构域查找结果发现，此氢酶含有五个结构域，分别为 1 个 2Fe-2S 铁硫簇结合区域、2 个 4Fe-4S 结合区域、Fe-氢酶大亚基和 Fe-氢酶小亚基。

关键词　　红树林，产氢菌群，变性梯度凝胶电泳, Fe-氢酶基因，序列分析

中图分类号　　Q933

近年来，由于能源短缺以及大量的传统燃料消耗所造成的全球气候变化，氢气作为一种清洁能源，越来越受到人们的青睐。在众多的制氢技术中，生物制氢因其对环境友好、少能量投入等特点备受研究者的重视(Benemann, 1996)。高效产氢微生物的分离是微生物制氢的前提条件。产氢微生物根据对氧气和光照的依赖性可分为严格厌氧、兼性厌氧、好氧和光合细菌四大类，但根据生物制氢的方法主要分为两大类。一类为在厌氧光照条件下利用光合细菌产氢，即光合制氢；另一类在厌氧条件下利用暗发酵细菌发酵产氢，即暗发酵制氢。后者因其能够利用环境有机废水和有机废物制氢被认为是一种更环保的工艺(Das *et al*, 2001)。

从生理学的角度讲，微生物制氢过程中氢酶是必需的。氢酶按其金属组成主要分为三大类：Fe-氢酶、NiFe-氢酶和 NiFeSe-氢酶。后两者氢酶通常存在于耗氢微生物中，催化氧化反应；而 Fe-氢酶催化还原反应，与氢气的生成直接相关。目前已有 400 多条来源于不同微生物的序列被测定。随着分子生物学的研究发展，多种氢酶已成功被重组、突变来提高微生物的产氢水平。梭菌属(*Clostridium*)菌株能够厌氧发酵制氢，经常在产氢混合菌群中被检测到。梭菌属产氢微生物及其 Fe-氢酶基因，因其产氢能力越来越受到重视，目前多种梭菌的氢酶基因已经被测序和鉴定，包括 *C. pasteurianum* (Yokoi *et al*, 1995; Kumar *et al*, 2000)、*C. acetobutylicum* 和 *C. perfringens*

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目, 2006AA05Z112 号；天津市科技支撑计划重点项目, 07ZCGYSH03400 号；青岛市科技计划项目, 07-2-3-7-jch 号; 973 计划前期研究专项项目, 2007CB216410 号。朱大玲，博士，讲师, E-mail: zhudaling@163.com

① 通讯作者：王广策，研究员，博士生导师, E-mail: gcwang@ms.qido.ac.cn

收稿日期: 2008-03-27，收修改稿日期: 2008-06-10

(Santangelo *et al*, 1995; Kaji *et al*, 1999)。

目前利用工业有机废水和城市有机废物进行微生物制氢技术已经比较成熟, 但是利用海水养殖有机废水进行相关研究仍为空白。我国海水养殖业居世界首位(周百成, 2004), 集约化养殖模式是我国海水养殖业的主要模式。由于海水养殖产生的废水常常导致当地海域生态环境的降格, 更加严重的是, 海域的富营养化常引起赤潮的爆发(Levin *et al*, 2004)。因此, 利用海水养殖有机废水进行微生物制氢, 可在保护环境的同时获得清洁的能源, 意义重大。利用海水养殖有机废水进行微生物制氢的前提是从海洋环境中筛选高效的产氢菌群或菌株。

在众多的海洋环境中, 红树林淤泥是筛选产氢菌群或菌株的良好材料。红树林是处于热带亚热带陆地与海洋潮间带间的一类特殊的生态系统。由于潮水的流动性, 使得不同区域的菌群混杂在一起, 微生物资源比较丰富(王岳坤等, 2005)。此外, 红树林淤泥营养物质丰富、低氧及存在盐度梯度变化等特点都非常利于发酵产氢微生物的筛选。本研究以红树林淤泥为材料, 采用间歇产气试验方法对红树林淤泥中的菌群进行产氢菌群富集。经多次富集之后, 稳定产氢菌群用来进行菌群和梭菌氢酶的多样性分析。克隆获得了 Fe 氢酶基因的全序列, 并对其序列进行分析, 为利用海水养殖有机废水微生物制氢技术研究积累资料。

1　材料与方法

1.1　材料

试验用厌氧污泥采自广西北海市红树林保护区潮间带, 分别离岸 500m, 样品命名为 BH。采样后污泥密封 4℃保存, 维持细菌种群的多样性。

LM-H 海水培养基, 参照李永峰等(2004)稍作修改, 成分如下(g/L)：葡萄糖 40.0、胰蛋白胨 4.0、牛肉膏 2.0、酵母粉 1.0、NaCl 30.0、K_2HPO_4 1.5、$MgCl_2$ 0.1、$FeSO_4·7H_2O$ 0.1、L-Cysteine 0.5、微量元素液($MnSO_4·7H_2O$ 0.01、$ZnSO_4·7H_2O$ 0.05、H_3BO_3 0.01、$CaCl_2·2H_2O$ 0.01、Na_2MoO_4 0.01、$CoCl_2·6H_2O$ 0.2) 10ml、维生素溶液(L-抗坏血酸 V_C 0.025、柠檬酸 0.02、吡哆醛 0.05、对氨基苯甲酸 0.01、生物素 0.01、维生素 B_1 0.02、核黄素 0.0250) 10ml、琼脂 20.0 或不加琼脂; pH 值 7.2—7.5。

大肠杆菌 *E. coli* DH5α菌株由本实验室保存; 载体 pMD-18T 分别购自大连宝生物有限公司。

1.2　发酵产氢菌群的富集

将 3g(湿重)污泥接种到装有 100ml 培养基的 150ml 血清瓶中。充氮气 15s 驱除瓶内空气后, 迅速盖上橡皮塞子, 创造厌氧环境。将血清瓶放入摇床 37℃、180r/min 振荡培养 24h。取 1ml 培养物加入新鲜的 100ml 培养基中, 相同条件下培养 24h。上述步骤重复 3 次, 以达到富集产氢微生物目的。获得的混合菌液作为母液进行间歇产气实验。

间歇产气实验中, 每隔 1 天用 5ml 注射器采样, 连续监测系统的 pH 值和氧化还原电位(ORP)。pH 值和氧化还原电位采用 DLELTA-320 型酸度计进行测量; 气体的收集采用排水法。氢气含量的测定采用 GC-2010 型气相色谱仪(中国滕州)测定。以氮气作为载气, 桥流 70mA; 柱室、热导池、汽化室温度分别为 70℃、100℃、80℃。

1.3　细菌总 DNA 的提取

按常规酚-氯仿法提取获得的 DNA 水溶液, 继续用 UNIQ-10 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒进一步纯化, 去除 DNA 水溶液中的腐殖酸。纯化后的 DNA 进行 0.7%琼脂糖凝胶电泳来检测 DNA 的完整性。

1.4　产氢菌群多样性及氢酶多样性分析

1.4.1　常规 PCR 扩增　根据梭菌 Fe 氢酶基因(Chang *et al*, 2006)及细菌 16S rRNA 基因(Nielsen *et al*, 1999)设计保守性引物 *hydA*-F、*hydA*-R, 341F、517R, 序列见表 1。PCR 扩增反应体系采用 25μl 体系：10

表 1　Fe-氢酶基因(*hydA*)克隆和表达用引物序列

Tab.1　Primers used for cloning and expression of the Fe-hydrogenase (*hydA*) gene

引物名称	引物序列(5′—3′)
hydA-F	TCACCACAACAAATATTTGGT
hydA-R	GCTGCTTCCATAACTCC
CF-*hydA*-F	CATGAATAAAATAATAATCAATG
CF-*hydA*-R	GATACATTAAACATCCTGTC
GC+*hydA*-F	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGTCACCACAACAAATATTTG
GC+341F	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG
517R	ATTACCGCGGCTGCTGG

×Ex *Taq* Buffer, 2.5μl; dNTP Mixture (各 2mmol/L), 2μl; 引物(10μmol/L)各 0.5μl; 模板 DNA, 1μl; TaKaRa Ex *Taq* (5 U/μl), 0.2μl; 加灭菌蒸馏水至 25μl。然后按以下步骤进行 PCR 循环：94℃预变性 5min; 94℃ 30s, 52℃或 55℃ 30s, 72℃ 1min, 35 个循环; 72℃延伸 10min。PCR 扩增产物取 5μl 经 1.0%进口琼脂糖凝胶(含适量的 EB)电泳, 用 Bio-Rad DOC1000 凝胶成像系统拍照。

1.4.2 梯度 PCR 扩增用引物 GC+*hydA*-F、*hydA*-R 和 GC+341F、517R, 序列见表 1, 进行扩增, 反应体系同上, 反应步骤如下：94℃预变性 5min; 94℃30s, 54—52℃或 60—55℃30s, 72℃ 1min, 10 个循环; 94℃ 30s, 52℃或 55℃ 30s, 72℃ 1min, 25 个循环; 72℃延伸 10min。PCR 扩增产物取 5μl 经 1.0%进口琼脂糖凝胶(含适量的 EB)电泳确定条带单一。

1.4.3 DGGE 电泳 使用梯度混合装置, 制备 10%的变性聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂浓度从 0 到 100% (100%变性剂中含有 7mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺), 其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增 加入 20μl 样品(含 10%的加样缓冲液) 在 150V、52℃或 60℃电泳 4h, EB 染色 15min; 用 Bio-Rad DOC1000 凝胶成像系统观察拍照。详细步骤参见 DGGE 使用说明书。

1.5 Fe-氢酶基因全长的克隆

DGGE 电泳获得的片段用聚丙烯酰胺凝胶回收试剂盒纯化, 纯化后的产物连接到载体 pMD-18T 后进行克隆测序。根据测序获得的序列分析, 设计引物 CF-*hydA*-F、CF-*hydA*-R, 序列详见表 1。CF-*hydA*-F、*hydA*-R 和 CF-*hydA*-R、*hydA*-F 分别进行扩增, 获得 *hydA* 基因的 5′和 3′端片段, 片段用琼脂糖凝胶纯化试剂盒纯化后连接到载体 pMD-18T 上进行克隆测序, 测序结果通过拼接最终获得 *hydA* 基因全序列。

1.6 Fe-氢酶基因序列分析

测序结果用软件 BLAST P(www.ncbi.nlm.nih.gov) 进行比对分析。采用 DNADIST 和 NEIGHBOR 分析方法对该 Fe-氢酶基因和相似的氢酶基因序列进行系统进化树分析。翻译后的氨基酸序列在 www.expasy.org 上进行分析。在 http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml 上进行结构域查找。

2 结果与分析

2.1 发酵过程中 pH 值、ORP 与产氢情况的相关性

间歇产气实验发现, 红树林污泥富集之后的混合菌群的产氢能力较高, 最高产氢量和平均产氢速率分别达到 1120ml/L 和 33.41ml/(L·h)。BH 在接种 24—36h 之间开始产气, 气体中氢气含量>38%。此外, 厌氧发酵过程中, 混合菌群产氢情况与发酵液中的 pH 值和氧化还原电位的相关性进行了分析(表 2)。结果表明 pH 值在 4.0—3.3 范围内可以放氢。pH 4.0 时开始放氢, pH 3.5 时产氢速率达到最高, pH 3.3 时放氢现象消失; 产氢过程中 ORP 处于 99—131mV, 当产氢速率达到最高时氧化还原电位为 131mV(表 2)。

发酵过程中, 发酵液的 pH 值下降主要是由于有机酸的积聚(Meyer *et al*, 1991; Rachman *et al*, 1997; Peters *et al*, 1998)。产氢现象发生在 pH 值为 4.0—3.6 时, 暗示着将 pH 值控制在一定适合的水平有利于提高产氢量。ORP 是废水处理过程中一个非常有用的控制参数, 用来检测溶液中氧化还原性质(Baukui *et al*, 2001)。ORP 值是一个宽泛的参数, 能够反映液相的电动势, 与很多因素相关, 例如：pH 值、盐度、有机物等(Tang *et al*, 2004)。ORP 处于一定范围内才能够产氢, 也意味着其可作为一个实时控制参数来提高产氢效率。

表 2 混合菌群 BH 发酵产氢过程中产氢情况与发酵液中 pH 值及 ORP 的相关性

Tab.2 The correlation between the hydrogen production by mixed culture BH and the value of pH and ORP in fermentative liquid

发酵时间(h)	总产氢量 (ml/L)	产氢速率 [ml/(L·h)]	pH 值	ORP(mV)
0	0	0	7.40	–162
12	0	0	4.32	92
24	0	0	4.07	109
36	39	3.90	4.00	99
60	841	33.42	3.45	131
80	1120	13.95	3.36	129

2.2 发酵混合菌群中菌群及 Fe-氢酶的多样性分析

发酵混合菌群中 16S rRNA 基因 V3 区及 Fe-氢酶基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱如图 1 中 H 和 S 所示。两基因 PCR 扩增皆获得预期的目的片段, 特异性较强。混合菌群 16S rDNA 序列 PCR 产物的 DGGE 图谱(图 1, SG)表明根据迁移率的不同, 混合菌群中有六个操作分类单元(operational taxonomy units, OTUs)分布, 其中有 3 个 OTUs 的丰度较高(分别为 A、B、C); 而 Fe-氢酶基因 PCR 产物的 DGGE 图谱(图 1, HG)条带单一, 只有一个 OUT。尽管 DGGE 图谱条带有时存在多态性, 但是该结果表明混合菌

群中至少有 6 个不同菌种, 而其中至少一种梭菌获得富集。

混合菌群 Fe-氢酶基因 DGGE 的单一条带, 采用聚丙烯酰胺凝胶回收试剂盒纯化, 纯化产物克隆后挑取 5 个阳性克隆进行测序。5 个克隆的测序结果相同, 表明 Fe-氢酶的 DGGE 图谱条带不存在多态性, 所以混合菌群中只有一种梭菌参与了混合产氢过程。该片段序列与 NCBI 数据库中的相似序列进行 BLAST 分析, 结果表明该片段与已报道的产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)Fe-氢酶基因序列的相似性达到 99%—100%。因此混合产氢菌群中的单种梭菌可以初步确定为产气荚膜梭菌。

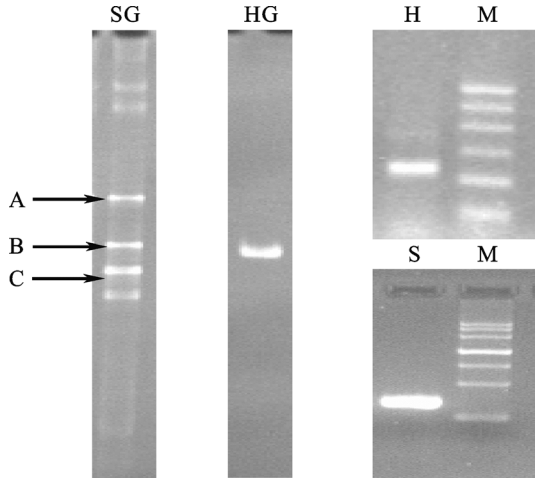

图 1　混合菌群 16S rRNA 基因及 Fe-氢酶基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳及变性梯度凝胶电泳图

Fig.1　The profiles of agarose gel electrophoresis and DGGE of PCR-amplified 16S rRNA(V3) gene and Fe-hydrogenase gene (*hydA*) in the bacteria group

M：Marker 3; H：基因 *hydA* 的琼脂糖凝胶电泳图谱; S：16S rRNA 基因 V3 可变区的琼脂糖凝胶电泳图谱; HG：*hydA* 基因的 DGGE 图谱; SG：16S rRNA (V3)基因的 DGGE 图谱

2.3　Fe-氢酶基因(*hydA*)的克隆及序列分析

根据已报道产气荚膜梭菌的 *hydA* 序列, 采用 Primer Premier 5.0 及 PCR design 软件设计 5′端引物 CF-*hydA*-F 和 3′端引物 CF-*hydA*-R。通过两个反应获得了 *hydA* 的全长, 克隆流程如图 2 所示。该基因序列 NCBI 数据库的登录号为 EU590683, 序列全长共约 1752bp 被测定。其中开放阅读框(ORF)从 2nt 处的起始密码子 ATG 到 1720nt 处 TAA 终止密码子结束, ORF 编码 572aa, 推测分子量为 63.54kD, 理论 pI 值为 6.19。

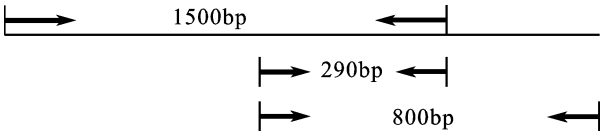

图 2　Fe-氢酶基因(*hydA*)扩增流程图

Fig.2　Flowchart of the cloning of the *hydA* gene

核苷酸序列比对结果表明, 混合菌群 *hydA* 基因与产气荚膜梭菌 *hydA* 基因(AB035092、CP000246、AB016775、AB000016、AB016820)相似性为 99%—100%, 与类腐败梭状芽胞杆菌(*Clostridium paraputrificum*)*hydA* 基因相似性为 93%。翻译后氨基酸序列与已报道的产气荚膜梭菌 HydA 相似性为 97%—99%, 类腐败梭状芽胞杆菌等其它梭菌属菌株 HydA 相似性为 64%—70%。由此可以看出产气荚膜梭菌的氢酶基因在核苷酸和蛋白质水平上序列皆有较高保守性。

采用 Bioedit 和 Mega2 软件成功构建梭菌 HydA 的 NJ 系统进化树, 结果表明混合菌群中的 HydA 与产气荚膜梭菌 Fe-氢酶聚为一类, 因此混合菌群中唯一的梭菌为产气荚膜梭菌(图 3)。

PfamHMM 结构域查找, 发现该 Fe-氢酶含有五个结构域, 分别为 1 个 2Fe-2S 铁硫簇结合区域、2 个 4Fe-4S 结合区域、Fe-氢酶大亚基、Fe-氢酶小亚基。分别位于 4—68aa、140—163aa、183—206aa、211—508aa、515—572aa 处。其中 Fe-氢酶大亚基和小亚基两个区域的相似性分值很高, 分别为 764.9 和 111.6 (表 3)。

3　讨论与结论

微生物厌氧发酵产氢过程中, 有机酸是伴随的主要副产物。发酵后期, 由于有机酸的积累导致发酵液的 pH 值降低, 影响细胞的生长和代谢, 进而影响了混合菌群发酵产氢能力(Yokoi *et al*, 1995; Kumar *et al*, 2000)。为获得较高的产氢效率, 维持发酵环境中 pH 值处于中性或是弱酸性非常重要。目前工业中主要采用加碱中和法, 但是该方法的成本较高(卢文玉等, 2006)。因此, 筛选具有较强耐酸能力的发酵产氢菌非常重要。本研究从广西北海市红树林污泥富集获得的混合产氢菌群, 在 pH 值为 4.0—3.3 时产氢, 表明混合菌群中存在强耐酸能力产氢细菌。所以, 有必要对混合菌群进行进一步的分离纯化, 获得具有耐酸性的高效产氢菌株。

众多研究表明, 梭菌具有较强的发酵产氢能力,

但发酵过程中需要严格厌氧(Park *et al*, 2001; Morimoto *et al*, 2005)。梭菌对氧气比较敏感，即使溶液中有少量的溶解氧也能影响其产氢效率，因此其作为产氢候选菌株的应用发展受到很大局限。有学者报道，利用肠杆菌与梭菌混合培养，通过肠杆菌代谢消耗掉发酵液中的溶解氧，来降低梭菌单独厌氧发酵产氢的成本(Yokoi *et al*, 1998)。本研究中混合菌群 16S rRNA 基因 DGGE 分析发现，混合菌群分为 6 个分类单元，表明混合菌群中至少有 6 种菌株分布，其中包括肠杆菌科的成团泛菌(Zhu *et al*, 2008)。采用间歇产气实验，DGGE 分析发现混合菌群中存在产气荚膜梭菌，可能是因为混合菌群中的兼性厌氧菌成团泛菌代谢吸收了溶液中的溶解氧，使发酵环境达到严格厌氧环境，从而使得具有产氢能力的产气荚膜梭菌得到了富集。

众多研究表明，梭菌属菌株 Fe-氢酶与发酵产氢

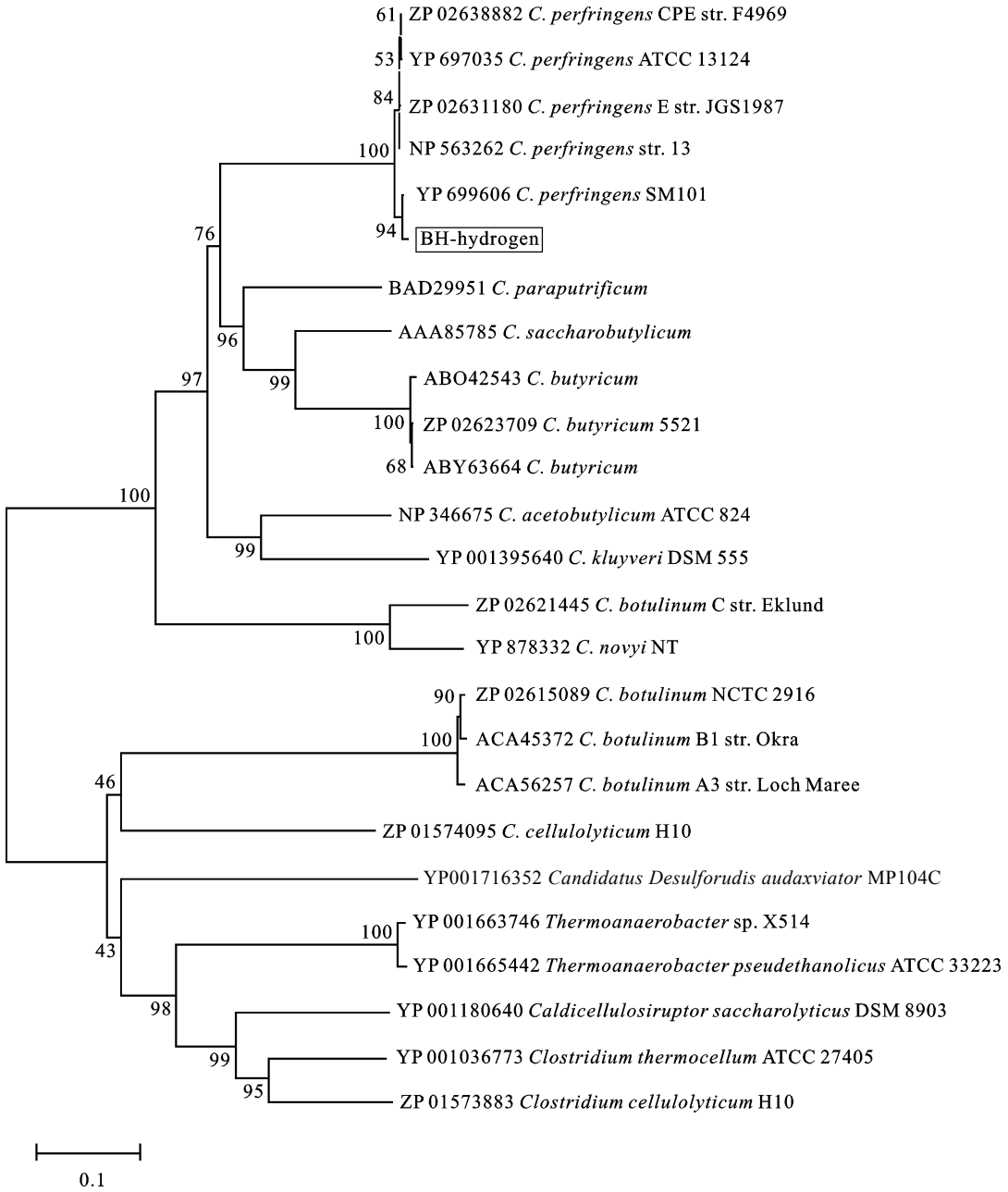

图 3 Fe-氢酶基因编码的氨基酸序列通过 NJ 法构建的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic analysis of amino acid sequences encoded by the hydrogenanse gene in NJ method

注：框线表示本文中研究的物种

表 3　Pfam HMMs 结构域分析图谱及相似结构域的特点描述

Tab.3　The profile of Pfam HMMs domain and the description of the identical domain

结构域	特点描述	序列		HMM 结构域		Bits score	E 值
		Start	End	From	To		
Fer2	2Fe-2S 铁硫簇结合区域	4	68	1	95	53.7	6.2e-13
Fer4	4Fe-4S 结合区域	140	163	1	24	27.1	2.1e-05
Fer4	4Fe-4S 结合区域	183	206	1	24	28.9	1.1e-05
Fe_hyd_lg_C	Fe 氢酶大亚基 C-末端区域	211	508	1	325	764.9	5.1e-227
Fe_hyd_SSU	Fe 氢酶小亚基	515	572	1	60	111.6	2.4e-30

直接相关(Peters *et al*, 1998; Park *et al*, 2001; Meyer *et al*, 1991; Santangelo *et al*, 1995; Kaji *et al*, 1999)。其中, *C. pasteurianum* Fe-氢酶Ⅰ和 *C. acetobutylicum* Fe-氢酶的研究比较深入。这些 Fe-氢酶基因序列已测定和蛋白三维结构被检测(Peters *et al*, 1998; Park *et al*, 2001; Meyer *et al*, 1991)。相较于这些酶, 产气荚膜梭菌的 Fe-氢酶基因研究报道较少。Kaji 等(1999)克隆获得了 *C. perfringens* NCTC8237 的 Fe-氢酶基因及其相邻基因丁酸激酶基因, 两基因在葡萄糖发酵时表达量上调, 缺乏葡萄糖时表达量微弱。Morimoto 等(2005)克隆 *C. perfringens* 13 的 Fe-氢酶基因转化入 *C. paraputrificum* M-21 过表达, 结果发现重组菌的产氢量提高 0.7 倍。本研究将海洋环境红树林污泥中筛选的混合产氢菌群中的氢酶基因进行了克隆和序列分析, 为氢酶的深入研究奠定基础。

参　考　文　献

王岳坤, 洪　葵, 2005. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析. 微生物学报, 45(2): 201—204

卢文玉, 闻建平, 陈　宇等, 2006. 激光诱变选育耐酸产氢菌产气肠杆菌. 化工进展, 25(7): 799—802

李永峰, 任南琪, 陈　瑛等, 2004. 发酵产氢细菌分离培养的厌氧实验操作技术. 哈尔滨工业大学学报, 36(12): 1589—1592

周百成, 2004. 我国的海水养殖业和海洋生物种苗业. 见: 中国生物技术发展中心编. 中国生物技术产业发展报告(2003). 北京: 化学工业出版社, 第 12 章: 231—242

Baukui L, Paul L B, 2001. The application of ORP in activated sludge wastewater treatment processes. Environ Eng Sci, 18: 309—321

Benemann J, 1996. Hydrogen biotechnology: progress and prospects. Nat Biotechnol, 14: 1101—1103

Chang J J, Chen W E, Shih S Y *et al*, 2006. Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentatation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR. Appl Microbiol Cell Physiol, 70: 598—604

Das D, Veziroglu T N, 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. Int J Hydrogen Energy, 26: 13—28

Kaji M, Taniguchi Y, Matsushita O *et al*, 1999. The *hydA* gene encoding the H_2-evolving hydrogenase of *Clostridium perfringens*: molecular characterization and expression of the gene. FEMS Microbiol Lett, 181: 329—336

Kumar N, Das D, 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. Process Biochem, 35: 589—593

Levin D B, Pitt L, Love M, 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. Int J Hydrogen Energy, 29: 173—185

Meyer J, Gagnon J, 1991. Primary structure of hydrogenase I from *Clostridium pasteurianum*. Biochemistry, 30: 9697—9704

Morimoto K, Kimura T, Sakka K *et al*, 2005. Overexpression of a hydrogenase gene in *Clostridium paraputrificum* to enhance hydrogen gas production. FEMS Microbiol Lett, 246: 229—234

Nielsen A T, Liu W T, Filipe C *et al*, 1999. Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. Appl Environ Microbiol, 65: 1251—1258

Park H S, Kim B H, Hyo Suk Kim H S *et al*, 2001. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. Anaerobe, 7: 297—306

Peters J W, Lanzilotta W N, Lemon B J *et al*, 1998. X-ray crystal structure of the Fe only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. Science, 282: 1853—1858

Rachman M A, Furutani Y, Nakashimada Y *et al*, 1997. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. J Ferment Bioeng, 83: 358—363

Santangelo J D, Durre P, Woods D R *et al*, 1995. Characterization and expression of the hydrogenase-encoding gene from *Clostridium acetobutylicum* P262. Microbiology, 171—180

Tang X, Wang J, 2004. Factors affecting the ORP in seawater. Equip Environ Eng, 4: 37—39

Yokoi H, Ohkawara T, Hirose J *et al*, 1995. Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. J Ferment Bioeng, 80(6): 571—574

Yokoi H, Tokushige T, Hirose J *et al*, 1998. H_2 production from starch by a mix culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. Biotechnol Lett, 20: 143—147

Zhu D L, Wang G C, Qiao H J *et al*, 2008. Fermentative hydrogen production by the newly marine *Pantoea agglomerans* isolated from the mangrove forest sludge. Int J Hydrogen Energy, 33: 6116—6123

CLONING AND SEQUENCE OF Fe-HYDROGENASE GENES OF *CLOSTRIDIUM* SP. FROM MANGROVE OOZE

ZHU Da-Ling[1], WANG Guang-Ce[2], PAN Guang-Hua[1], QIAO Hong-Jin[2], CAI Jin-Ling[1]

(1. *Laboratory of Marine Resources and Chemistry*, *College of Marine Science and Engineering*, *Tianjin University of Science and Technology*, *Tianjin*, 300457; 2. *Institute of Oceanology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Qingdao*, 266071)

Abstract Hydrogen-producing bacteria groups were studied for seeking a bioenergy source. The bacteria were sampled in mangrove ooze from Beihai intertidal zone Guangxi, South China, and were enriched in batch fermentation culture. The pH and ORP (oxidation reduction potential) values were measured. During the peak hydrogen production by the bacteria, Fe-hydrogenase gene and 16S rRNA gene of the bacteria was PCR amplified and analyzed in DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). Six operational taxonomical units (OUT) were obtained on the 16S rRNA gene but only one on the Fe-hydrogenase gene of *Clostridium*. The segment of Fe-hydrogenase gene was cloned and sequenced. NCBI blast result indicates that the segment of Fe-hydrogenase gene was 99% identical to that of *C. perfringens*. Thus, forward and reverse primers were designed according to the reported Fe-hydrogenase gene of *C. perfringens*. After two PCR amplifications, the full-length of Fe-hydrogenase gene was obtained. The accession number of this gene is EU590683. The sequence of this gene was arranged and analyzed with Mega software package having a phylogenetic tree built up in DNADist and Neighbor. The deduced amino acid sequence shared 97%—99% homology with the Fe-hydrogenase of *C. perfringens*. Five domains were found in the Fe-hydrogenase by PfamHMM domain search, namely, a 2Fe-2S binding domain, two 4Fe-4S binding domains, an Fe-hydrogenase large subunit, and an Fe-hydrogenase small subunit.

Key words Mangrove, Hydrogen-producing bacteria group, Denatured gradient gel electrophoresis, Fe-hydrogenase gene, Sequence analysis