

潮间带污泥中厌氧发酵产氢混合菌群组成与 Fe-氢酶基因多样性分析*

刘洪艳^{1,2} 王广策² 朱大玲¹ 潘光华¹

(1. 天津科技大学海洋科学与工程学院 天津市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)

摘要 以采自天津海水浴场潮间带的污泥为研究材料,将污泥热休克处理后富集混合菌群进行厌氧发酵产氢,测定混合菌群在发酵过程中累积产氢量和相关产氢指标(吸光度、酸碱度和氧化还原电位)的变化。结果表明,热休克处理后富集的产氢混合菌群产氢量为 0.41 mol H₂/mol 葡萄糖。产氢结束后,利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析混合菌群组成和 Fe-氢酶基因的多样性。混合菌群基因组 DNA 的 16S rRNA V3 区扩增产物经过 DGGE 电泳分离,结果得到 6 条丰度比较高的条带,测序结果表明优势菌为 *Clostridium* sp.。利用梭菌氢酶基因保守性引物克隆混合产氢菌群中梭菌 Fe-氢酶基因,扩增产物经 DGGE 电泳分离,电泳结果表明混合菌群中 Fe-氢酶基因分为 3 个分类单元,NCBI-BLAST 比对结果与 *Clostridium roseum* 和 *Clostridium perfringens* 的 Fe-氢酶基因相似度分别为 79% 和 98%。分析产氢混合菌群组成和 Fe-氢酶基因多样性,可以为扩大产氢微生物种质资源奠定基础。

关键词 混合菌群,产氢量,16S rRNA,Fe-氢酶基因,变性梯度凝胶电泳
中图分类号 Q933

生物制氢是目前化石能源燃料的替代途径之一,生物制氢主要有暗发酵和光合制氢两种方式。在暗发酵制氢中,由于混合菌比纯菌种具有更广泛实际应用价值,尤其是利用活性污泥中的混合菌群进行有机废水产氢技术,因其对环境治理和能源开发的双重利用效应,这方面的研究备受关注(Fang *et al.*, 2006a)。混合菌暗发酵制氢过程中,混合菌群之间具有相互的协同效应有利于提高产氢量,但由于混合菌群中存在产氢菌的同时亦存在耗氢菌,种群之间具有相互的演替,将会导致产氢量的不稳定(Noike *et al.*, 2002)。选择适当的产氢污泥预处理方法将会抑制耗氢菌而仍然保持产氢菌的产氢效率(Wang *et al.*, 2008)。已报道预处理产氢污泥的方法,主要包括热休克、酸、碱、通气搅拌、冻融和甲烷菌抑制剂(BES)等(Li *et al.*, 2007),其中热休克方法是最常用的方法。

混合菌群发酵产氢的相关研究中,环境因子对产氢量影响的研究比较多,然而关于混合菌产氢中微生物方面的研究比较少。

变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)是目前研究微生物遗传多样性最有力的分子生物学技术(Muyzer *et al.*, 1993)。因为不同微生物的 16S rRNA 基因序列中可变区的碱基顺序有很大差异,来自不同微生物的相同长度扩增片段能够通过 DGGE 得到分离,根据电泳条带的数量和条带的强弱可以辨别出样品中微生物的种类和优势菌,用以分析混合菌群多样性。

混合菌利用有机废水制氢技术可以同时解决能源和环境问题,在国内外的研究中越来越受到重视(Levin *et al.*, 2004),但这些研究都是集中于淡水系统。我国海水养殖业居世界首位(周百成, 2004),集约

* 国家自然科学基金项目, 40906074 号; 天津市自然科学基金项目, 12JCQNJC04200 号; 天津科技大学科学研究基金资助项目, 20110101 号。刘洪艳, 博士, 讲师, E-mail: hongyanliu1214@163.com

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

收稿日期: 2010-12-09, 收修改稿日期: 2011-06-30

化养殖是我国海水养殖业的主要模式。海水养殖产生大量有机废物, 不仅引发病害发生, 直接影响养殖产量的提高, 而且使海区富营养化, 造成赤潮频发 (Levin *et al*, 2004)。为了养殖业的可持续发展和保护海洋环境, 需要对养殖废水(泥)进行处理, 利用海水养殖有机废水进行相关研究仍为空白。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。淡水系统中分离的微生物种群是不能适合海水有机废水制氢系统。在本实验中, 从海洋环境中筛选产氢混合菌群, 利用 PCR-DGGE 分析混合菌群组成及梭菌 Fe-氢酶基因的多样性, 以期在氢酶基因水平上对混合菌群发酵产氢进行调控, 将在海洋有机废水制氢技术的研究中为拓宽微生物种质资源提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

污泥于 2009 年 5 月取自天津海水浴场潮间带。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 Liu 等(2009)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、K₂HPO₄ 1.5、MgCl₂ 0.1、FeSO₄·7H₂O 0.1、L-Cysteine 0.5、微量元素液 (MnSO₄·7H₂O 0.01、ZnSO₄·7H₂O 0.05、H₃BO₃ 0.01、CaCl₂·2H₂O 0.01、Na₂MoO₄ 0.01、KALSO₄ 0.01、CoCl₂·6H₂O 0.2) 10ml、维生素溶液(L-抗坏血酸 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、硫胺素 0.02、核黄素 0.025) 10ml, pH 值 7.2。

1.2 发酵产氢菌群的富集与培养

取 10g 污泥于沸水浴 20min 进行热休克, 室温冷却, 将热休克处理的污泥接种到 100ml 培养基中, 充氮气 1min, 于 120r/min, 37℃ 恒温摇床中培养 24h。按 1:100 接种比例连续培养 3 次, 目的在于富集厌氧产氢混合菌群。获得的混合菌进行发酵产气实验, 连续厌氧发酵 36h。定时间隔用 5ml 注射器取样, 测定 pH 值、OD 值和 ORP。气体的收集采用排水法。

1.3 分析方法

利用气相色谱仪(型号 6820, Agilent)测定发酵气体中氢气的含量。用氮气作为载气, 流量为 25ml/min, 色谱柱填料为 5A 分子筛(60/80 目), 柱长 2m, 检测器为热导检测器(TCD), 柱温、进样器温度、检测器温度分别 40℃、200℃、200℃。

1.4 16S rRNA PCR 扩增

细菌 16S rRNA 基因设计保守性引物(Hiroshi *et*

al, 2007), GC-357F: 5'-CGCCCCGCCGCGCGGGCGG GCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGG CAGCAG-3'和 517R: 5'-ATTACCGCGG CTGCTGG-3'。PCR 的 50μl 反应体系包括以下成分: *Taq* DNA 聚合酶 buffer 5μl (10×), 引物 GC-357 F 和 517R 各 1μl (10μmol/L), dNTP 1μl (10mmol/L), *Taq* DNA 聚合酶 1μl (5U/L), 模板 1μl, 超纯水 40μl。反应程序为 94℃ 4min; 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 30s, 30 个循环; 72℃, 10min。

1.5 Fe-氢酶基因的克隆

根据梭菌 Fe 氢酶基因设计保守性引物(Chang *et al*, 2006), E1F: 5'-GCTGATATGACAATAATGGAAG AA-3'; E1R: 5'-GCAGCTTCCATAACTCCACCGGTT GCACC-3'。PCR 反应体系 50μl 反应体系包括以下成分: *Taq* DNA 聚合酶 buffer 5μl (10×), 引物 E1F 和 E1R 各 1μl (10μmol/L), dNTP 1μl (10mmol/L), *Taq* DNA 聚合酶 1μl (5U/L), 模板 1μl, 超纯水 40μl。反应程序为 94℃ 4min; 94℃ 45s, 55℃ 30s, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃, 10min。

1.6 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统对 PCR 产物进行分离。制备 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂浓度从 30% 到 60% (100% 的变性剂为 7mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物), 在 150V 的电压下, 60℃ 电泳 3h。电泳结束后, 将凝胶进行银染, 切取特异性条带, 利用聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒(BIOFLUX)提取与纯化 DNA, 并将此回收的 DNA 作为模板, 引物 GC-357F/517R 和 E1F/E1R 分别重新再扩增, PCR 再次扩增(条件同上)并测定序列, 序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST, 测序由上海生工生物工程有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 发酵过程中产氢相关指标的变化

污泥经过热休克处理之后富集培养混合菌群, 进行厌氧发酵产氢。在发酵产气停止 12h 后, 产氢量为 0.41mol H₂/mol 葡萄糖。混合菌群发酵过程中 OD₆₀₀、pH 值和氧化还原电位(ORP)三个产氢相关指标的变化见图 1, 产氢过程发生在发酵过程中 12—24h 之间, 混合菌群在发酵开始 18h 进入指数生长期, 在发酵 24h 时细胞生物量的累积达到最高, 大多数产氢发生在指数生长期。这与 Valdez-Vazquez 等(2006)报道的产氢的延迟时间小于 14h 相一致。Zhu 等(2008)和 Chen 等(2005)报道 *Pantoea agglomerans* 和 *Clostridium*

butyricum CGS5 的产氢均发生在静止生长期。这可能是由于本研究中混合菌群不同菌种之间的相互作用,缩短了产氢的延迟时间。

微生物厌氧发酵产氢过程中,有机酸是伴随氢气的生成。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(Kumar *et al*, 2000)。本实验从天津潮间带污泥富集的产氢混合菌群在发酵过程中 pH 值由起始值 7.2 持续下降,终止 pH 值为 3.51,在 pH 值为 5.5—3.7 时产氢(图 1)。Wang 等(2008)报道混合菌发酵的终 pH 值在 3.4—4.1 之间,而 Yang 等(2006)和 Zhang 等(2005)报道的发酵终止 pH 值分别为 5.3 和 4.6。不同的终止 pH 值的形成可能是由于微生物的不同代谢途径所导致。

氧化还原电位(ORP)是表示产氢能力的一个间接指标,在发酵过程中,较高的产氢效率发生在发酵液处于较低的 ORP 值时,可以作为产氢效率的实时调控指标(Zhu *et al*, 2008)。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(朱大玲等, 2009)。在实验中,产氢过程(发酵时间的 12—24h)中 ORP 值在 -39mV 到 35mV 之间(图 1),较低的 ORP 有利于产氢的发生。

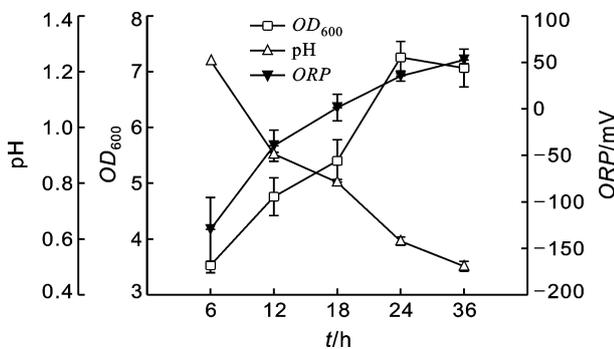


图 1 混合菌群发酵过程中 OD_{600} 、pH 值和 ORP 的变化
Fig.1 The variation of OD_{600} , pH, ORP of mixed culture during the fermentation

2.2 产氢混合菌群组成和 Fe-氢酶基因多样性分析

2.2.1 16S rRNA 和 Fe-氢酶基因扩增

利用 16S rRNA 基因通用引物 GC-357F 和 517R 扩增基因组 DNA, 琼脂糖凝胶电泳显示片段大小约 200bp 左右(图 2 左, 泳道 1)。利用梭菌氢酶基因的保守序列设计的引物 E1F 和 E1R 扩增基因组 DNA, 琼脂糖凝胶电泳显示片段长度约为 400bp(图 2 左, 泳道 2)。片段长度与预期目标一致, 而且特异性强。PCR 产物可以



图 2 混合菌群 16S rRNA 和 Fe-氢酶基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱(左)以及 DGGE 图谱(右)

Fig.2 Agarose gel electrophoresis (left) and variation of DGGE profiles (right) of 16S rRNA gene and Fe-*hydA* gene of the mixed culture

注: 左为 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱, 其中泳道 1 为 16S rRNA 的 PCR 产物, 泳道 2 为氢酶基因 PCR 产物, M 为 DL2000; 右为 DGGE 图谱, 其中 A 为 16S rRNA 基因, B 为 Fe-氢酶基因

直接作为 DGGE 电泳的样品。

2.2.2 变性梯度凝胶电泳 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物利用 DGGE 分离, 用以分析产氢混合菌群组成。

DGGE 凝胶通过 $AgNO_3$ 染色(图 2 右, A), 可以看到混合菌群中有六个操作分类单元(operational taxonomy units, OTUs)分布, 这代表混合菌群中至少含有 6 个不同的菌种, 其中有 2 个 OTUs 的丰度较高。

将丰度最高的电泳条带 1 和 2 进行测序, NCBI-BLAST 的比对结果是

与本实验的厌氧发酵系统中占绝对优势的产氢菌是梭菌, 梭菌是革兰氏阳性, 能够产芽孢, 对于环境中热和化学处理等逆境有着比较强的抵抗力 (Chang *et al*, 2006)。

Fe-氢酶基因与梭菌属菌株发酵产氢直接相关。针对 16S rRNA 的 PCR-DGGE 方法不能提供更多有关混合菌群中氢酶基因的相关信息。利用梭菌 Fe-氢酶基因的保守序列扩增混合菌群中氢酶基因片段, 经过 DGGE 电泳分离, 银染结果表明 Fe-氢酶基因 PCR 产物的 DGGE 图谱存在多态性, 有 3 个 OTUs (图 2 右, B), 测序结果表明条带 a 所代表混合菌群中氢酶基因片段与 *Clostridium roseum* 氢酶基因的相似度为 79% (登录号 GQ289375), 条带 b 和 c 与 *Clostridium perfringens* 氢酶基因的相似度为 98% (登录号 GQ289377)。结合 16S rRNA 的 PCR-DGGE 的比对结果, 在混合菌群中有两种梭菌菌株参与了产氢过程。

3 讨论与结论

混合菌群 16S rRNA 基因 DGGE 电泳分离得到 6 条丰度比较高的条带, 表明混合菌群中至少有 6 种菌株分布, 丰度最高条带所代表菌株的测序结果是梭

菌, 说明热休克预处理方法能够富集以梭菌为优势菌的产氢菌群中能够起到比较理想效果。Valdez-Vazquez 等(2009)研究发现热休克处理有利于富集产芽孢细菌, 比如 *Clostridium* sp. 和 *Bacillus* sp., 不能形成芽孢的非产氢菌和耗氢菌在热休克处理中被杀死, 而能产生芽孢的产氢菌能够得以成为优势菌种。Wang 等(2008)报道了经热休克处理后富集的混合菌群的产氢能力是高于未处理的对照混合菌群。

不同学者利用 DGGE 研究了培养条件对混合菌群组成的影响(Jun *et al*, 2008; Hiroshi *et al*, 2007), 这通常都是基于 16S rRNA 基因序列分析混合菌群的多样性, 但针对细菌的特定功能利用这种方法分析其多样性, 可能是引物特异覆盖不够显得不足(Fang *et al*, 2006b)。通过扩增功能基因, 可以利用 DGGE 来研究功能基因及功能菌群的多样性(Nicolaisen *et al*, 2002)。Fe-氢酶基因的研究是生物制氢中的热点, Fe-氢酶与发酵产氢直接相关。已经测定的 Fe-氢酶基因序列大多属于梭菌, 主要包括 *C. acetobutylicum* (Santangelo *et al*, 1995)、*C. perfringens* (Kaji *et al*, 1999)和 *C. paraputrificum* (Morimoto *et al*, 2005)等。然而针对混合菌群中 Fe-氢酶基因的关于多样性方面的报道比较少。本研究中混合菌群 Fe-氢酶基因 DGGE 电泳分离得到 3 个条带, 表明 Fe-氢酶基因的 DGGE 图谱存在多态性。测序结果表明混合菌群中 Fe-氢酶基因主要来自两种梭菌。梭菌类菌株大多是严格厌氧菌株, 其产氢效率较高, 其中, Fe-氢酶与氢气的生成直接相关, 该酶的活性比 NiFe-氢酶的酶活高 100 多倍。DGGE 可以用来研究功能基因及功能菌群的多样性(Valdez-Vazquez *et al*, 2006), 通过扩增功能基因, 采用 DGGE 分析产氢混合菌群的组成和 Fe-氢酶基因的多样性, 为在氢酶基因水平上研究海水有机废水生物制氢技术奠定基础。

参 考 文 献

- 朱大玲, 王广策, 乔洪金等, 2009. 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. 海洋与湖沼, 40(4): 518—524
- 周百成, 2004. 我国的海水养殖业和海洋生物种苗业. 见: 中国生物技术产业发展报告(2003). 北京: 化学工业出版社, 第 12 章: 231—242
- Chang J J, Chen W E, Shih S Y, 2006. Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR. Appl Microbiol Biotechnol, 70: 598—604
- Chen W M, Tseng Z J, Lee K S *et al*, 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. Int J of Hydrogen Energy, 30: 1063—1070
- Fang H H P, Li C L, Zhang T, 2006a. Acidophilic hydrogen production from rice slurry. Int J Hydrogen Energy, 31: 683—692
- Fang H H P, Zhang T, Li C L, 2006b. Characterization of Fe-hydrogenase genes diversity and hydrogen-producing population in an acidophilic sludge. Journal of Biotechnology, 126: 357—364
- Hiroshi Yokoyama, Miyoko Waki, Naoko Moriya, 2007. Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry. Appl Microbiol Biotechnol, 74: 474—483
- Jun Y S, Yu S H, Ryu K G *et al*, 2008. Kinetic Study of pH Effects on Biological Hydrogen Production by a Mixed Culture. J Microbiol Biotechnol, 18(6): 1130—1135
- Kaji M, Taniguchi Y, Matsushita O, 1999. The *hydA* gene encoding the H₂-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 P, Love L M, 2004. Bio-hydrogen production: Prospects and limitations to practical application. Int J Hydrogen Energy, 29(2): 173—185
- Li C L, Fang H H P, 2007. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. Crit Rev Env Sci Technol, 37: 1—39
- Liu H Y, Wang G C, Zhu D L *et al*, 2009. Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. Int J Hydrogen Energy, 34: 9696—9701
- 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
- Muyzer G, Waal E C D, Uitterlinden A G, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol, 59: 695—700
- Nicolaisen M H, Ramsing N B, 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. J Microbiol Methods, 50: 189—203
- Noike T, Takabatake H, Mizuno O *et al*, 2002. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. Int J Hydrogen Energy, 27(11—12): 1367—1371
- Santangelo J D, Durre P, Woods D R, 1995. Characterization and expression of the hydrogenase-encoding gene from *Clos-*

- tridium acetobutylicum*. Microbiology, 141: 171—180
- Valdez-Vazquez I, Ponce-Noyola M T, Poggi-Varaldo H M, 2009. Nutrients related to spore germination improve H₂ production from heat-shock-treated consortia. Int J Hydrogen Energy, 34(10): 4291—4295
- Valdez-Vazquez I, Ríos-Leal E, Muñoz-Páez K M *et al*, 2006. Effect of inhibition treatment, type of inocula and incubation temperature on batch H₂ production from organic solid waste. Biotechnol Bioeng, 95(3): 342—349
- Wang J L, Wan W, 2008. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge. Int J Hydrogen Energy, 33: 2934—2941
- Yang H J, Shen J Q, 2006. Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. Int J Hydrogen Energy, 31(15): 2137—2146
- Zhang Y F, Liu G Z, Shen J Q, 2005. Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. Int J Hydrogen Energy, 30(8): 855—860
- Zhu D L, Wang G C, Qiao H J *et al*, 2008. Fermentative hydrogen production by the new marine *Pantoea agglomerans* isolated from the mangrove sludge. Int J Hydrogen Energy, 33: 6116—6123

DIVERSITY ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITY AND Fe-HYDROGENASE GENES OF FERMENTATIVE MIXED CULTURE FROM INTERTIDAL SLUDGE

LIU Hong-Yan^{1,2}, WANG Guang-Ce², ZHU Da-Ling¹, PAN Guang-Hua¹

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

Abstract Sludge sample, collected from intertidal zone of a bathing beach in Tianjin, was pretreated by heat-shock method for enrichment of hydrogen-producing microbial community. The hydrogen production and indicators of hydrogen production (OD_{600} , pH and ORP values) were measured. The results showed that the efficiency of hydrogen production of the heat-shock pretreated sludge was 0.41 mol H₂/mol glucose. At the end of fermentation, 16S rRNA gene and Fe-hydrogenase gene of the mixed culture were PCR amplified and analyzed by DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) respectively. For 16S rRNA gene six special bands were obtained. The sequencing results showed that the dominate bacterium of the mixed culture belong to *Clostridium* sp.. Heat-shock pretreatment was favorable to enrich the most known hydrogen-producing bacterium, i.e. *Clostridium* sp.. As for the Fe-hydrogenase gene of *Clostridium* three operational taxonomical units (OUTs) were obtained. The segments of Fe-hydrogenase gene were cloned and sequenced. NCBI blast result indicates that the segments of Fe-hydrogenase gene were 79% and 98% identical to that of *Clostridium roseum* and *Clostridium perfringens* respectively. The analysis about composition of microbial community and diversity of Fe-hydrogenase gene contribute to enlarge the resource of hydrogen-producing bacteria group.

Key words Mixed culture, Hydrogen production, 16S rRNA, Fe-hydrogenase gene, Denatured gradient gel electrophoresis