

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.2014.05.007

红树林沉积物中产氢微生物的分离鉴定和性能分析

朱大玲, 杨振芳, 潘光华

(天津市海洋化学与资源重点实验室, 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 采用厌氧富集三层平板和螺口试管培养法, 根据产气特征从红树林沉积物中筛选分离海水条件下的高效产氢菌株, 获得1株兼性厌氧具有较高产氢能力的菌株BH-16. 通过形态观察、Biolog鉴定和16S rDNA序列分析, 该菌株鉴定为摩氏摩根氏菌BH-16. 实验表明: 在厌氧培养条件下, 菌株BH-16的最适起始pH、NaCl质量浓度和培养温度分别为8.0、0.01 g/mL、37 °C. 通过间歇产气实验和气相色谱分析对菌株的产氢能力进行分析, 结果表明: 菌株BH-16大量产氢发生在细胞指数生长后期和细胞生长平稳期; 在海水培养条件下, 在起始葡萄糖质量浓度为20 g/L、起始pH为7.2时, 菌株的总产氢量和平均产氢速率分别为1 120 mL/L和93.3 mL/(L·h).

关键词: 红树林沉积物; 摩氏摩根氏菌; 分离鉴定; 发酵产氢

中图分类号: Q935 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2014)05-0029-06

Isolation and Characterization of a *Morganella morganii* Strain with Hydrogen-producing Activities from the Mangrove Sediments

ZHU Daling, YANG Zhenfang, PAN Guanghua

(Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: According to the property of gas production, highly hydrogen-producing bacterial strain BH-16 was screened in the culture condition of marine water from the mangrove sediment. The screening and isolation of the strain were realized with the methods of anaerobic enrichment, three-layer plate and the culture in the tube with nut. Strain BH-16 was identified and designated as *Morganella morganii* with light microscopic examination, Biolog test and 16S rDNA sequence analysis. Experiments show that in the anaerobic culture, the optimum initial pH value, NaCl concentration and temperature for cell growth were 8.0, 0.01 g/mL and 37 °C, respectively. During fermentation, hydrogen started to evolve when cell growth entered the middle-exponential phase and was mainly produced in the late-exponential phase and the stationary phase. The total hydrogen-production yield (1 120 mL/L) and the overall hydrogen production rate (93.3 mL/(L·h)) were obtained at an initial glucose concentration of 20 g/L and an initial pH value of 7.2 in marine culture conditions.

Key words: mangrove sediments; *Morganella morganii*; isolation and identification; hydrogen production by fermentation.

氢气以清洁、可再生等特点被认为是最有希望的石油燃料替代品. 与热化学或是电化学制氢过程相比, 生物制氢过程因其对环境友好, 投入能量少等特点而倍受关注^[1]. 生物制氢主要为光合生物制氢和非光合生物制氢. 其中, 暗发酵微生物制氢可以在无光条件下厌氧发酵制氢, 使得生物反应器的设计较光合

微生物制氢简单, 应用前景更广. 已报道的暗发酵产氢微生物有肠杆菌 (*Enterobacter*)、芽胞杆菌 (*Bacillus*)、梭菌 (*Clostridium*)、成团泛菌 (*Pantoea*) 等^[2-6], 其中部分是专性厌氧菌, 部分是兼性厌氧菌. 与专性厌氧菌相比, 兼性厌氧菌对氧气的敏感性使其在培养和应用方面表现出很大的优势. 截至

收稿日期: 2013-12-18; 修回日期: 2014-05-04

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(12JJCQNJC04300); 天津市海洋化学与资源重点实验室基金资助项目(201203)

作者简介: 朱大玲(1978—), 女, 山东蓬莱人, 副研究员, zhudaling@tust.edu.cn.

目前,对产氢细菌的报道主要集中在淡水领域,有关海水或高盐环境的产氢微生物报道相对较少。

我国的海水养殖业居世界第一。采用的集约化养殖模式使得海水养殖废水有机质和氨氮含量超标严重,这些养殖废水的直接排放势必使得当地的环境质量降级^[7]。更甚者,沿岸海域的富营养化常导致有害水华的发生,所以对海水养殖有机废水处理是非常必要的。此外,因淡水资源的短缺,部分沿海城市直接利用海水作为工业用水或是生活用水,由此也将产生大量的高盐有机废水,在排放之前也需进行处理。目前,厌氧处理有机物产生氢气和二氧化碳来处理淡水有机废水和废物的技术已经比较成熟^[8],因此利用海洋废水和有机废物进行微生物制氢技术在理论上是可行的。而利用海水养殖废水或高盐有机废水进行发酵制氢的前提条件是产氢海洋细菌或产氢耐盐细菌的筛选。

许多研究报道从淡水环境中筛选产氢微生物,例如城市垃圾、下水道污泥和池塘污泥等^[2-3]。而分离自海洋环境或是高盐环境的产氢微生物的研究报道较少。在多种多样的海洋环境中,红树林沉积物是用来筛选产氢微生物的良好材料。红树林是位于热带和亚热带的一类特殊的生态环境^[9],其沉积物营养丰富、微氧及盐度梯度变化等特点使得该底泥中细菌种群呈多样性分布。本研究从红树林沉积物中分离获得了1株海水暗发酵产氢细菌,采用16S rDNA序列分析和Biolog鉴定方法对该菌株进行鉴定,并对其培养条件和产氢能力进行了分析,以期为利用海水养殖有机废水或高盐有机废水进行微生物发酵产氢提供候选产氢菌株。

1 材料与方法

1.1 样品来源

实验用沉积物采自我国广西省北海市(108°50'~109°47'E, 21°29'~21°55'N)的红树林保护区潮间带。采样点处于低潮带、离地表30~40 cm处。采样后污泥密封4℃保存,维持细菌种群的多样性。

1.2 培养基

菌群富集和菌株分离所用培养基LM-H,根据李永峰等^[10]LM-1培养基进行改良(g/L):葡萄糖20.0,胰蛋白胨4.0,牛肉膏2.0,酵母粉1.0,NaCl30.0, K₂HPO₄1.5, MgCl₂0.1, FeSO₄·7H₂O0.1, L-Cysteine0.5, 微量元素液(MnSO₄·7H₂O0.01, ZnSO₄·7H₂O

0.05, H₃BO₃0.01, CaCl₂·2H₂O0.01, Na₂MoO₄0.01, CoCl₂·6H₂O0.2)10 mL, 维生素溶液(L-抗坏血酸Vc0.025, 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B₁0.02, 核黄素0.025)10 mL, 琼脂20.0或不加琼脂;pH7.2~7.5。

1.3 产氢菌群富集

将3 g(湿质量)沉积物接种到装有100 mL培养基的150 mL血清瓶中。充氮气15 s后迅速盖上橡皮塞子,创造厌氧环境。将血清瓶放入摇床,于37℃振荡培养24 h。取1 mL培养物加入新鲜的100 mL培养基中,相同的条件下培养24 h,重复3次,以达到富集产氢微生物目的。

1.4 菌株分离与纯化

采用对文献[11]方法进行改进的三层平板法,步骤如下:LM-H培养基经灭菌后无菌条件下倒平板,待冷却凝固后用稀释菌液进行涂布;涂布后正置5 min,再倒入一层普通琼脂;待冷凝后,倾入一层固体石蜡,密闭平板已达到厌氧条件。待固体石蜡凝固彻底之后,盖上平皿,37℃倒置培养24 h。挑取培养出的单个菌落接种于装满LM-H液体培养基的螺口试管中,37℃正置培养48~72 h。将螺口试管倒置,观察产气的高度。选取产气量较大的试管进行编号,进行分离、纯化及产氢实验,以获得产氢的兼性厌氧或严格厌氧微生物。

1.5 形态学和生理生化实验

通过光镜(Olympus,日本)对菌体的形态进行观察。生理生化实验采用Biolog鉴定系统,具体步骤参照Biolog操作手册(Biolog,美国)。

1.6 16S rDNA序列测定及序列分析

细菌基因组DNA提取采用酚-氯仿抽提法。根据Pitcher等^[12]的描述稍作改动:取待测微生物菌种接种于LM-H培养基,充氮气达到厌氧条件(操作步骤见1.3),密封后37℃振荡培养24 h,5 000 r/min离心10 min收集菌体,用TE缓冲液洗涤2次;菌体重悬于200 μL TE缓冲液,加入溶菌酶(25 μg/mL)混匀,65℃孵育1 h;加入蛋白酶K(250 μg/mL)和10% SDS 10 μL混匀,55℃孵育30 min,溶菌产物暂时置于冰上。加入等体积的抽提液(V(酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1),抽提2次,取上层水相。加入2.5倍体积的预冷无水乙醇沉淀。沉淀DNA重溶于无菌水中,-20℃保存备用。

以基因组DNA为模板PCR扩增16S rRNA基因,引物按文献[13]报道,在上海生工生物工程技术服务

务有限公司合成,序列如下:8 F(5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3').反应体系采用 25 μ L 体系:10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 2 μ L, 引物(20 μ mol/L)各 1 μ L;模板 DNA 1 μ L; TaKaRa Ex Taq(5 U/ μ L)0.125 μ L;加灭菌蒸馏水至 25 μ L.按以下步骤进行 PCR 循环:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.

取 5 μ L PCR 扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶(含适量的 EB)电泳,用 Gene-Genius 凝胶成像系统拍照、记录和分析.扩增产物用凝胶纯化试剂盒纯化后进行序列测定,测序由上海生工生物工程技术有限公司完成.

根据获得 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行 Blast 搜索同源序列,并以 ClusterX 软件进行多重序列比对.通过 MEGA 4.0 等软件,以邻接法(neighbour-joining)建立系统进化树,Bootstrap 置信值估算重复次数 1 000 次^[14].

1.7 培养条件的优化

无菌 LM-H 培养基装满无菌螺口试管(10 mL),按无菌操作接种菌液 5 μ L.37 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h,混匀后用分光光度计(UV757CRT,中国)测定培养液在 600 nm 波长处的吸光度.分别对影响生长的起始 pH(4~10)、培养温度(15~42 $^{\circ}$ C)、NaCl 质量浓度

(0~0.05 g/mL)3 个主要条件进行单因素实验,其他条件相同.

1.8 间歇产气实验及产氢过程中理化因子的变化

无菌操作接种菌液 5 μ L 到装有 100 mL LM-H 培养基的 150 mL 血清瓶中;充氮气 15 s 后迅速盖上橡皮塞子,以创造厌氧环境;将血清瓶放入摇床 37 $^{\circ}$ C、130 r/min 振荡培养 26 h;采用排水法收集气体.在间歇产气实验中,根据产气情况分别在产气前、产气中和产气后取样,连续监测厌氧发酵系统的 pH 和氧化还原电位(ORP).pH 和氧化还原电位采用 DLELTA-320 型酸度计进行测量;氢气含量采用 GC-2010 型气相色谱仪(中国滕州)测定,氮气作为载气,桥流 70 mA;柱室、热导池、汽化室的温度分别为 70、100、80 $^{\circ}$ C.

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离和鉴定

从红树林沉积物中分离获得 1 株产氢菌株 BH-16,该菌株为兼性厌氧菌株,在有氧条件下生长速度慢.光镜形态观察菌株为短杆状的革兰氏阴性菌.采用 Biolog 鉴定系统分析菌株利用碳源的情况表明:菌株 BH-16 能够利用 95 种碳源中的 33 种(表 1),在数据库中进行比对,没有找到结果相似的菌株.

表 1 菌株 BH-16 的 Biolog 鉴定结果

Tab. 1 Biolog analysis results of strain BH-16

项目	结果	项目	结果	项目	结果
α -环糊精	-	木糖醇	+	L-丙胺酰胺	-
糊精	-	丙酮酸甲酯	w	D-丙氨酸	+
肝糖	-	琥珀酸单甲酯	+	L-丙氨酸	+
吐温 40	-	乙酸	-	L-丙氨酰甘氨酸	+
吐温 80	-	顺式乌头酸	-	L-天门冬酰胺	+
N-乙酰-D-半乳糖胺	w	柠檬酸	-	L-天门冬氨酸	+
N-乙酰-D-葡萄糖胺	w	蚁酸	+	L-谷氨酸	-
戊五醇/核糖醇	-	D-半乳糖酸内脂	-	甘氨酸-L-天门冬氨酸	+
L-阿拉伯糖	w	D-半乳糖醛酸	-	甘氨酸-L-谷氨酸	-
D-阿拉伯醇	-	D-葡萄糖酸	+	L-组氨酸	-
D-纤维二糖	-	D-葡萄糖胺酸	-	羟基-L-脯氨酸	-
<i>i</i> -赤藓糖醇	-	D-葡萄糖醛酸	-	L-亮氨酸	-
D-果糖	+	α -羟丁酸	+	L-鸟氨酸	-
L-海藻糖	-	β -羟丁酸	-	L-苯基丙氨酸	-
D-半乳糖	-	γ -羟丁酸	-	L-脯氨酸	+
龙胆二糖	-	<i>p</i> -羟基苯乙酸	-	L-焦谷氨酸	-
α -D-葡萄糖	w	衣康酸	-	D-丝氨酸	+
<i>m</i> -肌醇	-	α -丁酮酸	+	L-丝氨酸	+
α -D-乳糖	-	α -酮戊二酸	-	L-苏氨酸	+
乳果糖	-	α -戊酮酸	-	D,L-肉(毒)碱	-

续表

项目	结果	项目	结果	项目	结果
麦芽糖	-	D,L-乳酸	+	γ-氨基丁酸	-
D-甘露醇	-	丙二酸	-	尿刊酸	-
D-甘露糖	w	丙酸	+	次黄苷/肌苷	+
D-蜜二糖	-	奎宁酸/金鸡纳酸	-	尿苷	+
β-甲基-D-葡萄糖苷	-	D-葡萄糖二酸	-	胸苷	w
D-阿洛酮糖	-	癸二酸	-	苯乙胺	-
D-蜜三糖/棉子糖	-	琥珀酸	+	腐胺	-
L-鼠李糖	-	溴代丁二酸	+	2-氨基乙醇	-
D-山梨醇	-	琥珀酰胺酸	-	2,3-丁二醇	-
蔗糖	-	葡萄糖酰胺	-	甘油/丙三醇	+
D-海藻糖	-	α-D-葡萄糖-1-磷酸	+	D,L-α-磷酸甘油	-
松二糖	-	D-葡萄糖-6-磷酸	w		

注：“+”代表阳性；“w”代表弱阳性；“-”代表阴性。

经 PCR 扩增和序列测定获得菌株 BH-16 的 16S rDNA 序列, 长度为 1 418 bp, GenBank 登录号为 FJ219587. 16S rRNA 基因相似性分析发现菌株 BH-16 与摩氏摩根氏菌 (*Morganella morganii*) 相似性达到 99%. 采用 NJ 法构建系统进化树, 结果菌株 BH-16 与摩氏摩根氏菌归为一类(图 1). 综合形态学观察、Biolog 鉴定和 16S rRNA 基因序列分析结果, 菌株 BH-16 被鉴定为摩氏摩根氏菌, 定名为摩氏摩

根氏菌 *M. morganii* BH-16.

许多肠杆菌属菌株已被报道能够利用碳水化合物进行发酵制氢, 例如: *E. cloacae* IIT-BT08、*E. asburiae* SNU-1、*E. aerogenes* HU-101、*Pantoea agglomerans* BH-18 等^[2,15-17]. 摩氏摩根氏菌隶属于肠杆菌科摩氏菌属, 目前尚未见有关利用此菌进行产氢研究的报道.

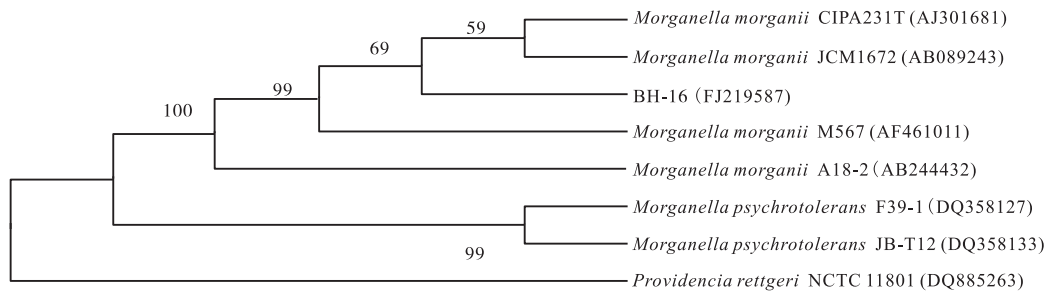


图 1 菌株 BH-16 的 16S rRNA 基因序列 NJ 系统进化树

Fig. 1 NJ Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequence of strain BH-16

2.2 生长条件的优化

为深入开发利用产氢菌株 BH-16, 分析了该菌株在厌氧条件下起始 pH、培养温度和 NaCl 质量浓度对生物量积聚的影响. 结果表明: 厌氧条件下起始 pH 对生物量的积聚影响显著(图 2), 菌株 BH-16 的最适起始 pH 为 8.0; 菌株在 0~0.05 g/mL 的 NaCl 质量浓度下都能够存活, 且在 0.01~0.03 g/mL 条件下生长状况较好, 具有较好的盐度耐受性(图 3); 菌株在 30~42 °C 条件下生长状态良好, 最适生长温度为 37 °C(图 4).

通常海水的 pH 和 NaCl 质量浓度分别为 7.8~8.2 和 0.03 g/mL, 摩氏摩根氏菌 BH-16 在此条件下的生长状态良好, 表明菌株在红树林特殊的环境中已

经完全适应了海水条件, 可作为利用海水养殖废水进行废水处理的候选菌株进行深入研究.

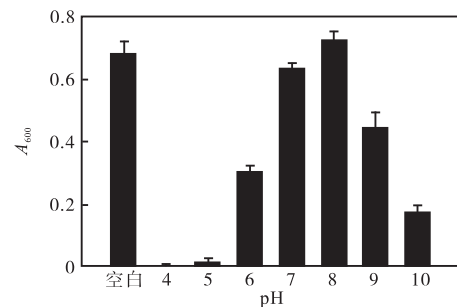


图 2 起始 pH 对菌株 BH-16 生物量积聚的影响

Fig. 2 Effect of initial pH on the biomass accumulation of strain BH-16

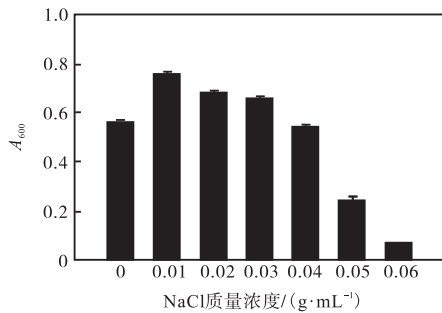


图3 NaCl质量浓度对菌株BH-16生物量积聚的影响

Fig. 3 Effect of NaCl concentration on the biomass accumulation of strain BH-16

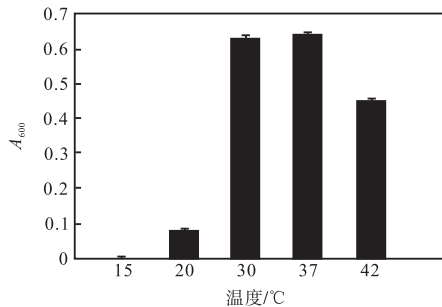


图4 培养温度对菌株BH-16生物量积聚的影响

Fig. 4 Effect of culture temperature on the biomass accumulation of strain BH-16

2.3 菌株BH-16的产氢能力分析

采用间歇产气实验方法分析了在海水培养条件下摩氏摩根氏菌BH-16的发酵产氢情况,结果表明在起始葡萄糖质量浓度为20 g/L、起始pH为7.2时,菌株BH-16的总产氢量(以单位体积培养液产生氢气的体积计)和平均产氢速率分别为1120 mL/L和93.3 mL/(L·h)。产氢现象主要发生在13~22 h,氢气的产生始于细胞生长指数中期(13 h),在细胞生长指数后期(16 h)产氢速率达到最高,氢气主要产生于细胞生长指数后期和生长平稳早期。

菌株BH-16发酵产氢过程中生物量的积聚、pH值和氧化还原电位的监测如图5所示。产氢过程中发酵液的pH从6.0降至4.5,ORP维持在-82~-72 mV。肠杆菌科细菌发酵类型多为混合酸发酵,在利用葡萄糖发酵产氢的过程中,伴随产生乳酸、乙酸和乙醇等产物^[18]。pH降低主要是由于有机酸乳酸和乙酸的积聚导致的。ORP是表明溶液的氧化和还原性质的指标,与pH、盐度、有机物等因子相关,常用于废水处理过程中一个有效的调控因子^[19]。高产氢速率通常发生在发酵系统处于低ORP和适合的pH范围内,所以pH和ORP可作为提高产氢速率的调控指标,摩氏摩根氏菌BH-16的高产氢速率发生

在pH为5.2和ORP为-82 mV时。

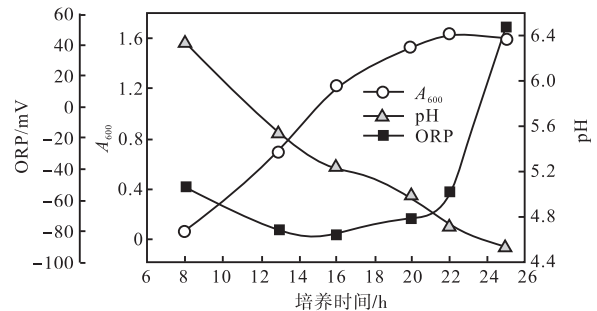


图5 菌株BH-16产氢过程中生物量、pH和ORP的变化
Fig. 5 Changes of biomass accumulation, pH and ORP in the hydrogen production of strain BH-16

3 结 语

从红树林沉积物中分离获得1株产氢的兼性厌氧革兰氏阴性菌,通过形态学、生理生化和分子生物学等方法鉴定,确定其为摩氏摩根氏菌BH-16。菌株BH-16的生长条件优化结果表明,该菌株适合在海水条件下生长。间歇产气实验表明:摩氏摩根氏菌BH-16具有较高的产氢能力,在起始葡萄糖质量浓度为20 g/L、起始pH为7.2的海水培养条件下,菌株的总产氢量和平均产氢速率分别为1120 mL/L和93.3 mL/(L·h),可作为利用海水养殖废水微生物发酵制氢的候选菌株进行深入研究。

参考文献:

- [1] Das D, Veziroglu T N. Hydrogen production by biological processes: A survey of literature[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2001, 26(1): 13-28.
- [2] Shin J H, Yoon J H, Ahn E K, et al. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2007, 32(2): 192-199.
- [3] Kalia V C, Jain S R, Kumar A, et al. Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1994, 10(2): 224-227.
- [4] Chen W M, Tseng Z J, Lee K S, et al. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2005, 30(10): 1063-1070.
- [5] Lin C Y, Chang C C, Hung C H. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures[J].

- International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(10): 2445–2453.
- [6] Zhu D L, Wang G C, Qiao H J, et al. Fermentative hydrogen production by the new marine *Pantoea agglomerans* isolated from the mangrove sludge[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(21): 6116–6123.
- [7] Cui Y, Chen B J, Chen J F. Evaluation on self-pollution of marine culture in the Yellow Sea and Bohai Sea[J]. The Journal of Applied Ecology, 2005, 16(1): 180–185.
- [8] Levin D B, Pitt L, Love M. Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2004, 29(2): 173–185.
- [9] 任健, 阎冰, 洪葵. 海南东寨港红树林不同植被土壤微生物群落结构比较[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 736–743.
- [10] 李永峰, 任南琪, 陈瑛, 等. 发酵产氢细菌分离培养的厌氧实验操作技术[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2004, 36(12): 1589–1592.
- [11] Archana A, Sasikala C, Ramana C V, et al. “Paraffin wax-overlay of pour plate”, a method for the isolation and enumeration of purple non-sulfur bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 59(3): 423–425.
- [12] Pitcher D G, Saunders N A, Owen R J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate[J]. Letters in Applied Microbiology, 1989, 8(4): 151–156.
- [13] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697–703.
- [14] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783–791.
- [15] Rachman M A, Furutani Y, Nakashimada Y, et al. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 83(4): 358–363.
- [16] Yokoi H, Ohkawara T, Hirose J, et al. Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 80(6): 571–574.
- [17] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08[J]. Process Biochemistry, 2000, 35(9): 589–593.
- [18] 杨生玉, 王刚, 沈永红. 微生物生理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 78–80.
- [19] 唐晓, 王佳. 海水 ORP 的影响因素[J]. 装备环境工程, 2004, 1(4): 7–39.

责任编辑: 常涛