



## 产氢菌株 *Clostridium* sp.T7 的快速筛选

刘洪艳, 陈国超

(天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 取自潮间带的污泥分别在不同温度下(80、100、121 °C)进行热休克预处理,富集产氢菌群并测定其产氢量,利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析混合菌群组成. 结果表明:3种热处理条件下混合菌群的产氢量都要高于对照未处理菌群. DGGE图谱表明,与80、100 °C热休克处理混合菌群相比,经121 °C热休克处理富集的混合菌群,其电泳条带最少,测序结果发现该混合菌群中包括产氢菌 *Clostridium* sp.. 从该混合菌群中纯化并鉴定了1株产氢菌株 *Clostridium* sp.T7(登录号 HM104461). 培养温度对菌株 T7 产氢有一定影响,温度在 25 ~ 55 °C 范围内菌株 *Clostridium* sp.T7 都能产氢,最适产氢温度是 35 °C.

**关键词:** 热休克预处理; 变性梯度凝胶电泳; 产氢菌株; 培养温度

中图分类号: Q949.28\*8.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2011)02-0013-04

## A Rapid Screening for Isolation of Hydrogen-Producing Bacterium *Clostridium* sp.T7

LIU Hong-yan, CHEN Guo-chao

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

**Abstract:** To determine the effects of heat-shock pretreatment on hydrogen production and hydrogen-producing microbial community, sludge from the intertidal zone was pretreated with three different heat treatment temperature, respectively 80 °C, 100 °C and 121 °C. The results showed that hydrogen production of mixed culture by three heat-shock pretreatments was higher than those in the control group. The result of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) showed that electrophoretic bands of mixed culture pretreated by heat-shock temperature of 121 °C were the least, compared with those by heat-shock pretreatment of 80 °C and 100 °C. Although the composition of microbial community isolation by heat-shock temperature of 121 °C was simple, this heat treatment temperature was favorable to enrich the dominant hydrogen-producing bacterium, i.e. *Clostridium* sp.. A hydrogen-producing bacterium strain T7 (accession number HM104461) was isolated from the mixed culture by heat-shock pretreatment of 121 °C. The effect of culture temperature on hydrogen production of *Clostridium* sp.T7 was determined. The strain was able to produce hydrogen over a wide range of culture temperature from 25 °C to 55 °C, with an optimum culture temperature of 35 °C.

**Keywords:** heat-shock pretreatment; denaturing gradient gel electrophoresis; hydrogen-producing bacterium; culture temperature

氢气作为高效、清洁、可再生的能源,越来越受人们的关注. 多种制氢方法中,生物制氢因其对环境友好和能量投入少等特点引起研究者的重视,其中微生物厌氧暗发酵可利用有机废水(物)等生物质制氢,具

有治污、环保和产能等多重优越性,开发前景广阔<sup>[1]</sup>. 暗发酵生物制氢包括混合菌群和纯菌株两种方式,纯培养生物制氢的开展比较早,但是由于产氢菌株的筛选费时费力、实验周期长、筛选成功率比较低等缺点,

收稿日期: 2010-10-25; 修回日期: 2011-01-06

基金项目: 天津市海洋资源与化学重点实验室开放基金(200912)

作者简介: 刘洪艳(1977—),女,吉林人,讲师,博士, lhy1214@tust.edu.cn.

导致目前获得产氢微生物的产氢能力低及菌种的耐逆性差,仍难进入工业化生产中<sup>[2]</sup>。一般来说,产氢细菌耐逆境能力比较强,比如梭菌和芽孢杆菌可以通过形成芽孢,比耗氢甲烷菌能够耐受更高的温度<sup>[3]</sup>。采用合适的预处理方法处理产氢混合菌群,可提高筛选产氢菌株的成功率。目前应用于产氢菌株预处理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<sup>[4]</sup>,其中热休克方法是最常用的方法<sup>[5]</sup>。热休克预处理方法对于富集产氢菌具有促进作用,是筛选能形成芽孢的梭菌(*Clostridium*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)和热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacterium*)等产氢菌株的有效手段<sup>[6-8]</sup>。而Zhu等<sup>[9]</sup>研究结果表明,热休克处理混合菌群的产氢能力不及未处理的对照。这种截然相反的结果可能在于不同研究者热休克处理方法不同,如加热温度和加热时间等。常用的热处理温度范围是80~121℃,处理时间为15~120 min<sup>[10]</sup>。热处理条件是影响高效产氢菌株筛选的一个重要因素,不同热处理后混合菌群组成会发生相应变化。

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<sup>[11]</sup>。实验以潮间带污泥为实验材料,采用不同热休克温度预处理污泥,同时结合DGGE分析混合菌群组成。获得一组产氢菌群,该混合菌群不但包括产氢菌株而且菌种组成简单,这样减少了杂菌干扰,有利于缩短菌株分离纯化过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 污泥的热处理

分别取10 g污泥于80、100、121℃进行热处理,时间均为20 min。

### 1.2 菌群的富集

热休克处理污泥分别接种到100 mL培养基中,充氮气1 min,120 r/min、37℃富集培养36 h。

### 1.3 菌群组成分析

提取3种热处理条件下的混合菌群DNA,以细菌16S rRNA基因V3区通用引物扩增,引物<sup>[12]</sup> GC-357F: 5'-CGCCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGC GGGGACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'和517R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'。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

度为30%~60%,150 V的电压、60℃电泳3 h,AgNO<sub>3</sub>法染色。

### 1.4 菌株分离鉴定

采用三层平板进行固体培养,挑取单克隆菌落液体培养,挑取产氢量高的菌株再次划平板培养,此过程重复1~2次。选择产氢效果最好的菌株进行鉴定。菌种的鉴定通过以下步骤:DNA提取;16S rRNA的PCR扩增;序列测定。扩增引物采用细菌通用引物27F:5'-AGAGTTTGATCCATGGCTCAG-3'和1541R:5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'。PCR反应体系50 μL包括以下成分:buffer(10×)5 μL;10 μmol/L引物27F和1541R各1 μL;10 mmol/L dNTP 1 μL;5 U/L Taq酶1 μL;模板1 μL;超纯水40 μL。反应程序为94℃4 min,94℃30 s,56℃30 s,72℃2 min,30个循环;72℃10 min。测序由上海生工公司完成。

### 1.5 分析方法

pH采用Delta-320型酸度计进行测量。生物量以分光光度计测定600 nm处吸光度表示。葡萄糖利用率采用葡萄糖试剂盒(葡萄糖氧化酶法)进行测定。Agilent 6820型气相色谱仪测定发酵气体中氢气含量,载气为氮气,流量为30 mL/min,色谱柱填料为5A分子筛(60/80目),柱长2 m,检测器为热导检测器(TCD),色谱柱、进样器和检测器的温度分别为40、200、200℃。通过排水法测定细菌发酵产生的气体体积,产氢量通过产气体积与氢气含量的乘积计算得到,单位mL/L。

## 2 结果与分析

### 2.1 热处理温度对混合菌群产氢量的影响

污泥分别于80、100、121℃进行热处理,热处理污泥进行富集培养,混合菌群发酵36 h时结束产氢,测定混合菌群产氢量。不同热处理混合菌群产氢量如图1所示。

与未处理混合菌群相比,热处理后混合菌群的产氢量都有不同程度提高,这可能是由于热休克处理有利于富集常见的产氢芽孢菌,如*Clostridium* sp.和*Bacillus* sp.<sup>[13]</sup>。可见热休克预处理方法对于富集产氢菌有促进作用。不同热处理温度富集混合菌群的产氢量是有差异的,热处理温度为80℃时,混合菌群产氢量最高,产氢量为(1 254 ± 133)mL/L。这可能是由于不同热处理温度富集混合菌群组成的差异造成的。

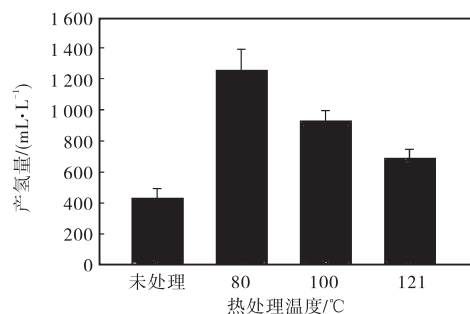


图1 热处理温度对混合菌群产氢量的影响

Fig.1 Effect of heat treatment temperature on hydrogen production of mixed culture

### 2.2 热处理温度对混合菌群组成的影响

Kim 等<sup>[14]</sup> 研究表明, 热处理能够改变微生物群落组成, *Lactobacillus* sp. 和 *Bifidobacterium* sp. 是未处理污泥的优势菌, *Clostridium perfringens* 则在高温处理的污泥中占绝对优势. 因此, 研究混合菌群组成能够从根本上解释热处理对混合菌群产氢量的影响. 运用 PCR-DGGE 分析不同热处理下混合菌群的组成, 每条电泳条带至少代表一种微生物, 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.

从图 2 可以看出, 80 °C 处理混合菌群的 DGGE 条带最多, 而且染色强度大, 这表明该混合菌群的微生物数量和种类最丰富. 121 °C 处理混合菌群的 DGGE 图谱中, 仅出现了 2 个电泳条带, 将条带 B1 切下来, 回收进行测序, 碱基序列为 AGGCGTGGGG AATATTCGCACAATCGATGCGAAAGCCTGATGC AGCAACGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTCGG GTCGTAAAGCTCTGTCTCAAGGAAGATAATGACGGTACTTGAGGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAA. 通过 Genbank 数

据库进行相似性比对, 该菌株与 *Clostridium* sp. 相似性达到 98%. 热处理温度为 121 °C 时, 菌群的种类和数量明显下降, 通过 DGGE 分析发现该混合菌群中仍含有高效产氢菌 *Clostridium* sp., 采用该混合菌群进行产氢菌株筛选, 可减少杂菌干扰, 缩短分离纯化产氢菌株过程.

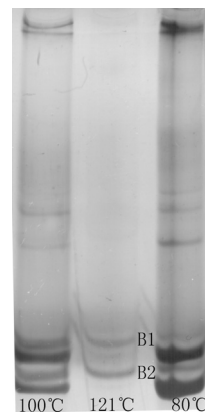


图2 不同热处理混合菌群 DGGE 图谱

Fig.2 Effect of heat treatment temperature on DGGE profiles of mixed culture

### 2.3 产氢菌株的分离鉴定

热休克处理(温度 121 °C)的混合菌群用于分离纯化产氢菌株. 将光学显微镜下个体形态一致的菌株测定产氢量, 获得 1 株具有最高产氢量的菌株 T7. 菌株 T7 革兰氏染色呈阳性. 16S rRNA 序列分析从基因水平上对该菌株进行种类鉴定. 1 436 bp 基因片段序列被测定(登录号为 HM104461). 通过 16S rRNA 基因相似性分析发现, 该菌株与 *Clostridium bifementans* 相似性达到 98%, 构建进化树(图 3)确定菌株的分类地位, 菌株 T7 命名为 *Clostridium* sp.T7.

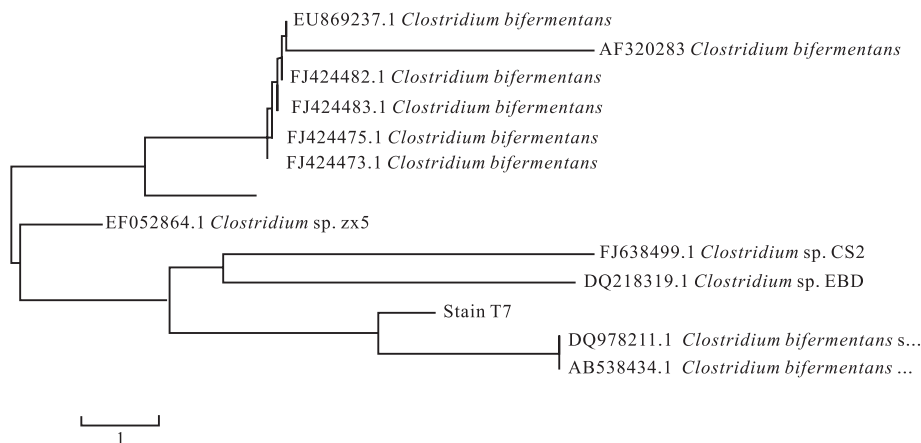


图3 菌株 T7 16S rRNA 序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree derived from the full-length 16S rRNA sequence of strain T7

### 2.4 培养温度对菌株 T7 产氢影响

温度是影响微生物产氢的重要因子,不同的微生物生长繁殖要求的最适温度不同. 为研究培养温度对菌株 T7 的产氢影响,设置培养温度分别为 25、35、45、55 °C,结果如图 4 所示.

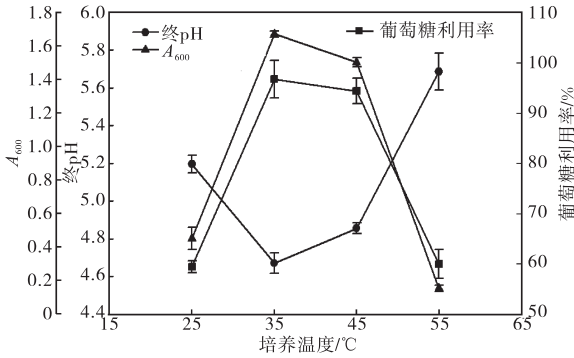


图 4 培养温度对菌株 T7 终 pH、A<sub>600</sub> 和葡萄糖利用率的影响  
Fig.4 Effect of culture temperature on final pH, A<sub>600</sub> and glucose utility of strain T7

从图 4 可以看出,菌株 T7 在温度 35 °C 时生物量最大. 发酵产氢停止时,不同温度培养条件下发酵液终 pH 范围在 4.67 ~ 5.69,均不同程度低于起始 pH. 发酵液 pH 的下降是由于微生物厌氧发酵产氢过程中,伴随氢气而产生了有机酸造成的,较低的发醇液 pH 能反馈抑制细菌的生长和产氢行为<sup>[15]</sup>. 当培养温度为 35 °C 和 45 °C 时,菌株 T7 对葡萄糖利用率最高,达到 90% 以上.

菌株 T7 分离自热处理的污泥,该菌株应具有比较高的耐热性,测定菌株 T7 在不同培养温度下的产氢量,结果如图 5 所示.

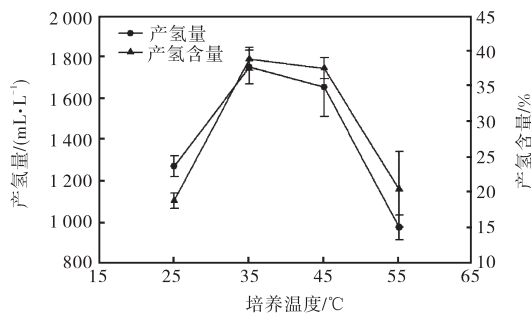


图 5 培养温度对菌株 T7 产氢含量与产氢量的影响  
Fig.5 Effect of culture temperature on hydrogen content and hydrogen production of strain T7

从图 5 可以看出,菌株 T7 在温度 25 ~ 55 °C 内都有产氢行为,最适产氢温度是 35 °C,产氢含量和产氢量依次为 (38.88 ± 1.61)% 和 (1 751 ± 81)mL/L. 培养温度 45 °C 时菌株 T7 产氢量为 (1 654 ± 142)mL/L,

只有略微下降,培养温度 55 °C 时其产氢量下降 40% 左右. 菌株 T7 虽然是一株中温菌,但是在一定范围内升高温度对其产氢过程没有明显抑制,可应用于较高温度发酵产氢过程.

### 3 结 论

热休克预处理混合菌群的产氢量要高于对照未处理菌群,表明热处理方法是一种富集产氢菌的有效方法. 设置 80、100、121 °C 这 3 种热处理温度,121 °C 热休克污泥富集的混合菌群是分离纯化产氢菌株的合适来源. 该菌群组成包含高效产氢菌株 *Clostridium* sp., 同时其菌种组成最少,有利于减少杂菌干扰,缩短产氢菌株的筛选过程. 实验中纯化鉴定的一株产氢菌株为 *Clostridium* sp.T7.

菌株 T7 最适产氢温度是 35 °C,属于一株中温菌. 培养温度为 45 °C 和 55 °C 时,菌株 T7 仍具有较高产氢量,表明该菌株具有较强耐热性,有望应用于微生物高温产氢过程.

### 参考文献:

[ 1 ] Benemann J. Hydrogen biotechnology : progress and prospects[J]. Nature Biotechnology,1996,14(9) :1101-1103.

[ 2 ] Wang C C,Chang C W,Chu C P,et al. Hydrogen production from wastewater sludge using a *Clostridium* strain[J]. Journal of Environmental Science and Health, 2003,38(9) :1867-1875.

[ 3 ] Kawagoshi Y,Hino N,Fujimoto A,et al. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2005, 100(5) :524-530.

[ 4 ] Wang Jianglong,Wan Wei. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge[J]. International Journal of Hydrogen Energy,2008,33(12) :2934-2941.

[ 5 ] Li Chenlin,Fang H H P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures[J]. Critical Reviews in Environment Science and Technology,2007,37(1) :1-39.

[ 6 ] Ahn Y,Park E J,Oh Y K,et al. Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for con-

(下转第 48 页)