

产氢产乙酸菌 ZR-1 的分离鉴定及产酸特性

习彦花^{1,2} 程辉彩¹ 张丽萍^{1*} 崔冠慧¹ 马金亮^{1,3}

(1. 河北省科学院生物研究所 河北 石家庄 050081)

(2. 河北师范大学生命科学学院 河北 石家庄 050016)

(3. 河北大学生命科学学院 河北 保定 071002)

摘要: 采用改良的亨盖特厌氧操作技术, 从有机废水污泥中分离到一株耐低温高效产氢产乙酸菌 ZR-1。经过对其形态学观察、生理生化特征研究及 16S rRNA 序列比对, 初步鉴定为梭状芽胞杆菌属的乙二醇梭菌(*Clostridium glycolicum*)。通过单因子实验, 在厌氧条件下对该菌株的培养温度、pH、最适底物、金属离子的影响等产酸条件进行了优化。结果表明该菌株最适生长温度 37 °C, 最佳培养基初始 pH 值 8.5, 最适发酵底物丁酸盐, Mn^{2+} 对其产酸有一定的激活作用。最适培养条件下丁酸盐降解率达到 12.7%, H_2 含量达到了 28.73%。

关键词: 厌氧消化, 产氢产乙酸菌, 鉴定, 生酸特性

Separation and identification of a hydrogen-producing acetogens strain ZR-1 and its acetic production characters

XI Yan-Hua^{1,2} CHENG Hui-Cai¹ ZHANG Li-Ping^{1*} CUI Guan-Hui¹
MA Jin-Liang^{1,3}

(1. Institute of Biology of Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050081, China)

(2. College of Life Sciences of Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050016, China)

(3. College of Life Sciences of Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

Abstract: A hydrogen-producing acetogen strain ZR-1 was isolated from organic wastewater sludge by applying modified Hungate anaerobic method. According to morphological observation, physiological-biochemical characteristics and homology analysis of 16S rRNA gene sequence, the strain was identified as a genus of *Clostridium glycolicum*. The effects of temperature, pH, optimum substrate and metal ions on its productivity of acetic acid in anaerobic conditions were investigated and then optimized by uniform tests. The results indicated that the optimum temperature and initial pH of culture media for strain ZR-1 were 37 °C, 8.5, and its optimum substrate was butyrate. Supply of Mn^{2+} in culture medium can promote acetic acid production of ZR-1. At optimum cultivation conditions, the conversion

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目(No. 2008BADCC4B02-8); 河北省科技支撑项目(No. 08225502D)

* 通讯作者: Tel: 86-311-83014879; E-mail: Lizzle-69@163.com

收稿日期: 2010-07-12; 接受日期: 2010-11-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

rate of butyrate reached 12.7% and the content of H_2 was up to 28.73%.

Keywords: Anaerobic digestion, Hydrogen-producing acetogen, Identify, Acetic acid production characteristics

随着我国城市化进程的加快,有机废水的产生量逐年增加,未经恰当处理的废水进入环境后,会直接给水体和大气带来二次污染,并且对生态环境和人类活动构成严重威胁^[1]。厌氧生物处理方法日渐成为公认的治理废水的有效途径之一。利用厌氧消化对有机废水进行发酵产酸过程中,76%的能量通过产氢产乙酸细菌的厌氧降解来转化^[2-4]。产氢产乙酸细菌在清除环境有机物污染、厌氧降解有机酸和能源再生过程中占有重要地位,是有机物转化过程中的“限速因子”。

自 Bryant 等人在 1967 年发现并分离纯化出了最早的产氢产乙酸菌株^[5]之后,国内外对产氢产乙酸细菌的研究一直未断。随着厌氧分离培养技术的改进,越来越多的产氢产乙酸互营细菌被描述。迄今已有 12 个属的 19 个种(亚种)被系统描述^[1]。

加强产氢产乙酸菌的研究,可为水解产酸、厌氧制备 H_2 、 CH_4 等技术提供必要的理论依据,同时对厌氧处理工程控制和运行提供有益的指导^[6-7]。本研究旨在从废水污泥中分离筛选出低温、高效产氢产乙酸的厌氧微生物,为冬季或低温条件下污水水解酸化和整体提高厌氧生产效率提供理论服务,并为以后研制微生物菌剂用于厌氧发酵提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 样品

来自河北省不同地区的废水污泥、沼液等。运回时密封,不与空气接触。

1.2 培养基基本成分

富集培养基:丙酸钠 10 g,丁酸钠 10 g,葡萄糖 10 g, $MgCl_2$ 0.1 g, $NaCl$ 3.0 g, NH_4Cl 1.0 g, K_2HPO_4 0.4 g,半胱氨酸 0.5 g,维生素液 10 mL,微量元素液 10 mL,0.2%刃天青 0.2 mL,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

微量元素液: $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

0.05 g, H_3BO_3 0.01 g, $N(CH_2COOH)_3$ 1.00 g, $CaCl_2$ 0.01 g, Na_2MoO_4 0.01 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.20 g, $AlK(SO_4)_2$ 0.01 g, 蒸馏水 1 000 mL。

维生素液:钴氨素 0.010 g,抗坏血酸 0.025 g,核黄素 0.025 g,柠檬酸 0.020 g,吡多醛 0.050 g,叶酸 0.010 g,对氨基苯甲酸 0.010 g,肌酸 0.025 g,蒸馏水 1 000 mL。

1.3 产氢产乙酸菌的富集与分离

1.3.1 富集培养:将采集来的样品通过富集培养基 16 °C 培养,1 周左右培养物混浊,取样进行显微观察,检测菌体生长情况。培养 10 d 后,通过气相色谱检测培养液中产物成分,然后将有乙酸存在的培养物转接到新鲜培养基中传代培养,经传代达到稳定后,选择乙酸产量较高的样品进行下一步的滚管分离。

1.3.2 分离纯化:采用亨盖特滚管法,主要包括梯度稀释滚管和挑取单菌落两步。具体方法参见文献[8-9]。纯菌的确定主要通过革兰氏染色涂片染色观察和滚管菌落观察两种方法。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 生理生化鉴定:生理生化鉴定试验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[10]。

1.4.2 16S rRNA 序列分析:选取处于对数生长期的 ZR-1 的液体培养物,用天根公司生产的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取其基因组 DNA。

将得到的总 DNA 做为模板,直接用于 PCR 扩增。引物为一对细菌通用引物,正向引物 Pf: 5'-AGAGTTTGACCTGGCTCAG-3',反向引物 Pr: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3'。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

PCR 产物的测序由北京天根公司完成。将测序得到的 ZR-1 的 16S rRNA 序列提交 GenBank 数据库,申请注册;并通过 NCBI 的 BLASTn 序列比对进行同源性分析,采用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。

1.5 生长及产酸特性研究

在发酵培养基基础上, 分别研究培养温度、培养基初始 pH 值、不同发酵底物和金属离子等因素对菌株 ZR-1 发酵产酸的影响。所有试验均采用 3 个相同的培养平行进行, 检测结果取平均值。

1.6 主要分析项目及方法

1.6.1 液相末端产物及气相末端产物 H_2 的检测: 挥发性脂肪酸(VFAs)、乙醇, 以及发酵气组分 CO_2 和 H_2 的检测, 均采用北京福立 9790 II 型气相色谱仪。不锈钢填充柱, 柱长 2 m, 担体 GDX-401 (60–80 目); 液相采用 FID 检测器, 汽化室 200 °C, 柱温 220 °C, 检测室温度 250 °C。具体方法: 取 1 mL 培养液, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清。用 50% 硫酸酸化至 pH<2, 取 2 μ L 进样。

气相采用 TCD 检测器, 载气为氮气, 流速 70 mL/min, 进样量 30 μ L。检测条件: 柱温 40 °C, 进样器温度 120 °C, TCD 室 150 °C。

1.6.2 菌悬液细胞密度的测定: 采用 752 型分光

光度计, 以未接种的培养液做空白对照, 于波长 510 nm 处测定 OD 值。

2 结果与分析

2.1 富集与分离

采用亨盖特厌氧滚管分离法共筛选到单菌 8 株, 通过初筛得到 5 株产氢产乙酸菌株, 进一步复筛得到一株产酸稳定的菌株 ZR-1, 其乙酸产量达到 1 125.6 mg/L, H_2 含量达到 28.37%, 将该菌株作为出发菌株进行研究。具体情况见表 1。

2.2 形态特征

分离菌株 ZR-1 为 G^+ 的产芽孢杆菌, 长 2 μ m–2.5 μ m, 宽 0.2 μ m–0.5 μ m, 液体培养常排列成对或短链, 2 d 左右开始形成芽孢(图 1、2)。当细菌增殖速度开始减慢的时候, 液体培养基逐渐清澈透明, 菌体逐渐沉降在培养基底部。在固体培养基上生长时菌落较大, 圆形, 长势饱满、凸起, 直径 1.5 mm–2.0 mm, 边缘整齐, 不透明, 呈白色或乳白色。

表 1 初筛菌株特性
Table 1 Characteristics of the screening strains

菌株 Strains	来源 Sources	底物 Substrates	菌体形态 Cell morphology	乙酸 Acetic acid (mg/L)	H_2 (%)
ZQ-1	沼液	葡萄糖	杆菌, 对生	502.2	5.97
CD-2	承德湿地	丙酸盐	杆菌, 对生, 产芽孢	850.8	12.67
SY-2	药厂污泥	葡萄糖	杆菌, 对生或排列成链状	380.4	7.62
CD-1	承德湿地	丙酸盐+丁酸盐	球菌, 对生或成链状	770.4	9.09
ZR-1	生活污水	丙酸盐+丁酸盐	杆菌, 成长链状, 产芽孢	1 125.6	28.37

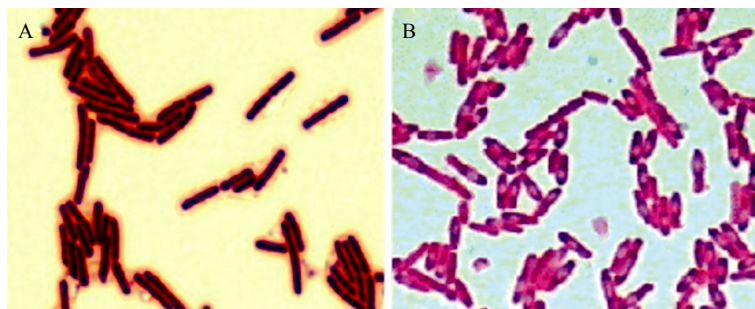


图 1 菌株 ZR-1 光学显微照片($\times 1\ 000$)

Fig. 1 Phase-contrast micrograph of strain ZR-1 ($\times 1\ 000$)

Note: A: Single cell morphology; B: Spore morphology.

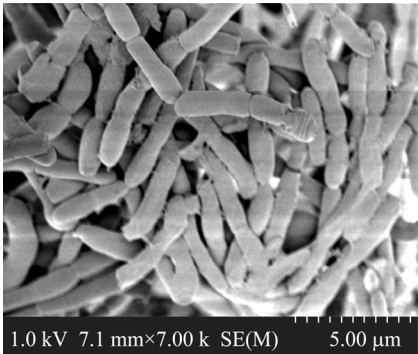


图 2 菌株 ZR-1 菌体电镜扫描照片(×7 000)
Fig. 2 SEM photographs of strain ZR-1 (×7 000)

2.3 菌种鉴定结果

2.3.1 生理生化特征: 生理生化试验结果(表 2)表明, 菌株 ZR-1 为严格厌氧菌, 发酵葡萄糖产酸产气, 具有广泛的糖利用范围, 可同时利用五碳糖和六碳糖。

2.3.2 16S rRNA 序列分析: 通过对 16S rRNA 测序, 其碱基数为 1 389 bp (图 3), 将测序结果提交到 GenBank, Accession No.为 EF687741, 用 BLAST 进行相似性搜索比对并绘制系统进化树。

分析结果显示: ZR-1 与梭状芽胞杆菌属乙二醇梭菌(*Clostridium glycolicum*)序列有较高的相似性(99%), 在系统发育树中位于同一分支(图 4)。结合菌株的形态和生理生化特征, 认为 ZR-1 属于梭状芽胞杆菌属的乙二醇梭菌。

表 2 菌株 ZR-1 的生理生化特征 Table 2 The physiological and biochemical characteristics of ZR-1			
项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
Unaerobic	+	Glucose fermentation	+
V-P test	-	Acid: D-glucose	+
Final pH of the V-P culture	6.5	Fructose	+
M.R	+	Maltose	+
Gelation hydrolysis	-	Carbon source: Citrate	+
Starch hydrolysis	-	Propionate	+
Nitrate reduction test	-	Butyrate	+
Indole test	-	H ₂ S production	-

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应。
Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

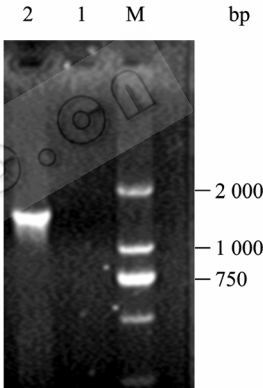


图 3 ZR-1 的 16S rRNA PCR 琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 3 Result of ZR-1 16S rRNA PCR in agarose electrophoresis
Note: M: DL2000; 1: Negative control; 2: ZR-1 16S rRNA.

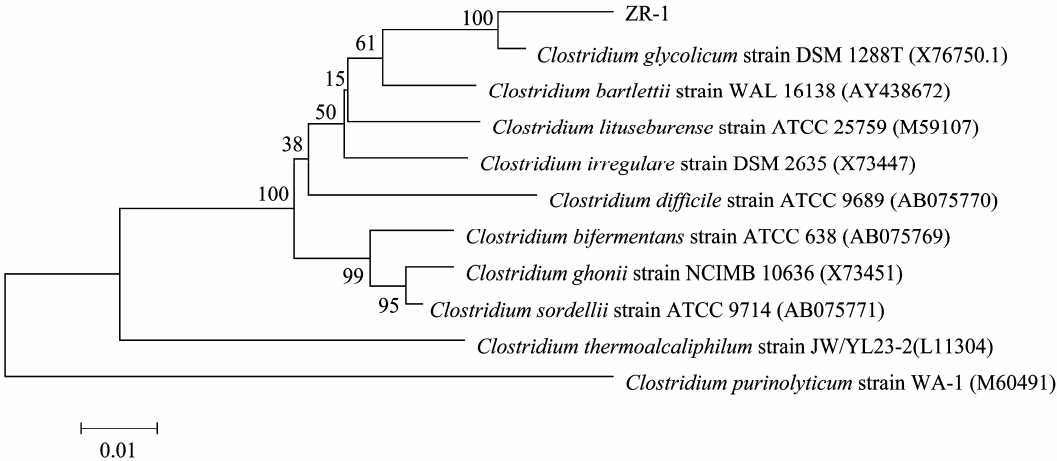


图 4 基于 16S rRNA 序列同源性的系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree of the strain ZR-1 based on the 16S rRNA sequence
Note: Numbers at nodes present bootstrap percentages (based on 100 samplings). GenBank accession numbers are shown in the parentheses. Bar: 0.01 sequence divergence.

2.4 生长及产酸特性

2.4.1 最适生长温度的测定: 采用容积为 25 mL 的厌氧管作为反应器, 葡萄糖为底物, 调节初始 pH 值至 7.0, 分别置于 4 °C、16 °C、22 °C、30 °C、37 °C、45 °C, 厌氧培养 12、24 和 48 h 菌液变浑浊后, 测定培养液的 OD₅₁₀。

由温度试验(图 5)可知, 菌株 ZR-1 的温度生态位较宽, 在 4 °C–50 °C 区间, 均有一定的生长量。从 16 °C 开始, 随着温度的升高, ZR-1 的增殖加速; 培养 12 h, 在 37 °C 时 OD 达到最大值 1.206; 培养 24 h, 在 30 °C 时 OD 达到最大值 1.235; 培养 48 h, 在 22 °C 时 OD 达到最大值 1.183。当温度达到 45 °C 时, 其细胞增殖受到显著抑制, 培养结束时的 OD 仅为 0.007。可见, 在 22 °C–37 °C 中温范围内, 更有利于产乙酸菌群的增殖。

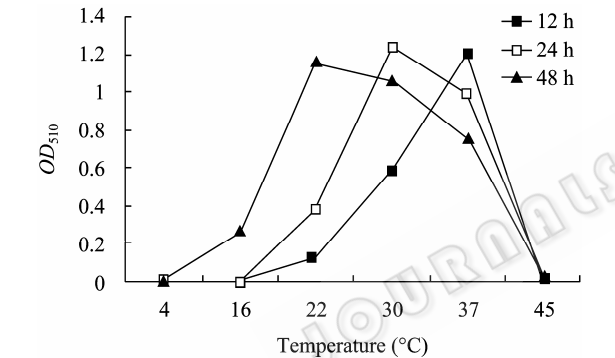


图 5 不同培养温度对菌株生长的影响
Fig. 5 Effect of temperature on ZR-1 growth

2.4.2 初始 pH 值对产酸能力的影响: 在基础发酵培养基的基础上, 接种后采用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 溶液调整培养基的初始 pH 值为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5, 37 °C 恒温厌氧培养 24 h 后, 测定乙酸产量。

由 pH 实验(图 6)可知, 菌株 ZR-1 在初始 pH 8.5 的条件下, 细胞的增殖量和乙酸产量最大, 培养结束时, 乙酸产量达到 10.76 mmol/L。随着培养液初始 pH 的降低, ZR-1 的增殖量和乙酸产量均随之减小。当 pH 降低到 5.0 时, ZR-1 的生命活动受到显著抑制, 培养结束时未见明显的细胞增殖和乙酸产生。可见, 欲在厌氧生物处理系统中富集更多的产

氢产乙酸菌群, 需要控制反应系统的 pH 不低于 5.5, 理想的 pH 则应控制在中性偏碱的范围。

2.4.3 ZR-1 菌株不同底物转化率试验: 在基础培养基基本成分的基础上, 加入酵母粉(1%)作为刺激因子, 再分别按质量分数 0.3%加入丙酸钠、丁酸钠、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖, 初始 pH 值 8.5, 接种量 10%, 37 °C 培养 72 h, 测定乙酸产量。结果见表 3。

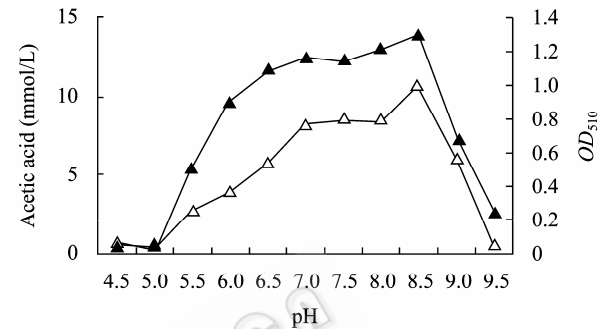


图 6 发酵培养基初始 pH 值对菌株产乙酸能力的影响
Fig. 6 Growth and acetic acid yield of ZR-1 under different pH

表 3 菌株 ZR-1 发酵不同底物的乙酸产量分析				
Table 3 The analysis of acetic acid yield with different substrates by fermentation of ZR-1				
底物 Substrate	加入量 Dosage (g/L)	理论产酸 Acid theory (mmol/L)	发酵产酸 The actual acid (mmol/L)	转化率 Conversion rate (%)
丙酸 Propionic acid	2.31	62.43	6.17	9.9
丁酸 Butyric acid	2.40	54.55	6.74	12.4
葡萄糖 Glucose	3.00	50.00	5.51	11.0
麦芽糖 Maltose	3.00	52.63	4.76	9.0
蔗糖 Sucrose	3.00	52.63	5.42	10.3
乳糖 Lactose	3.00	52.63	4.17	7.9

实验结果显示, ZR-1 对丙酸、丁酸、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖等碳源物质均有不同程度的转化能力, 但产物成分及乙酸转化率则表现出显著差异, 对丁酸盐的转化率最高, 达到了 12.4%。其次为葡萄糖, 转化率为 11.0%。

2.4.4 金属离子对 ZR-1 产酸的影响: 在培养基基本成分的基础上分别加入 8 mmol/L 的 Cu²⁺、Zn²⁺、

Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 、 K^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} ^[9], 空白对照中不加入任何金属离子。初始 pH 值 8.5, 37 °C 培养 72 h 后, 测定乙酸产量。结果如图 7 所示。

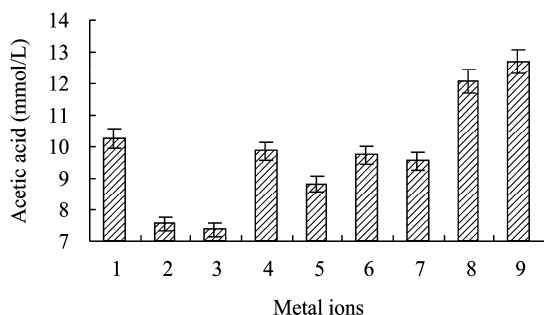


图 7 金属离子对菌株 ZR-1 产酸能力的影响

Fig. 7 Effect on acetic acid yield of ZR-1 under different Metal ions

Note: 1: Blank; 2: Cu^{2+} ; 3: Zn^{2+} ; 4: Fe^{2+} ; 5: Mg^{2+} ; 6: Al^{3+} ; 7: K^{+} ; 8: Ca^{2+} ; 9: Mn^{2+} .

结果表明培养基中加入 8 mmol/L 的 Mn^{2+} 能明显促进菌株的产酸, 使乙酸产量增加了 24%。 Ca^{2+} 有微弱刺激作用, 而 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对其产酸有明显的抑制作用, 其他对其产酸能力并无太大影响。

3 结论

近年来, 国内外针对于厌氧消化水解酸化阶段的研究越来越多。其中大多是利用污水处理厂的初沉池污泥水解发酵来产生挥发性脂肪酸(VFAs), 利用其作为发酵工业原料生产高附加值的发酵产品或作为化工原料合成其它产品。其中乙酸与其他有机酸相比, 有更广阔的市场, 目前产量与市场需求量都远超过丙酸、丁酸等。另外人们为了提高厌氧发酵产气率, 也加强了对原料液化产酸阶段的研究^[11]。

本实验采用亨盖特厌氧操作技术从废水污泥中分离得到的 *Clostridium glycolicum* ZR-1, 不仅能分解利用多种底物产乙酸, 并且有一定的产氢能力, 最佳发酵条件下其乙酸产量达到 1 125.6 mg/L, H_2 含量达到 28.37%。另外, 该菌株在液体培养基中生长时有集结生长现象, 即所谓的自絮凝现象^[12]。在废水处理过程中可以利用这种自絮凝特征减少反应器运行中的菌种流失, 并在废液排出时, 使污泥沉淀, 减少对环境的影响^[13]。该菌株的发现拓宽了产

氢产乙酸菌的范围, 为厌氧水解酸化体系中产氢产乙酸的分子生态学研究提供了宝贵的菌种资源。另外利用该菌耐低温、产氢产乙酸的特性, 为将来在低温条件下应用于厌氧发酵, 提高原料转化率和沼气产气量提供了可能, 有极高的潜在应用价值。

参考文献

- [1] 李艳娜. 产氢产乙酸细菌在厌氧产酸体系中的微生态机理分析[D]. 江南大学硕士学位论文, 2008.
- [2] 刘敏, 任南琪, 丁杰, 等. 糖蜜、淀粉与乳品废水厌氧发酵法生物制氢[J]. 环境科学, 2004, 25(5): 65-69.
- [3] Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL, et al. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization[J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2002, 27(11/12): 1339-1347.
- [4] 任南琪, 王爱杰, 马放. 产酸发酵微生物生理生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 51-135.
- [5] Bryant MP, Wolin EA, Wolin MJ, et al. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria[J]. *Arch Mikrobiol*, 1967, 59(1/3): 20-31.
- [6] Zhu Gf, Li JZ, Wu P, et al. The performance and phase separated characteristics of an anaerobic baffled reactor treating soybean protein processing wastewater[J]. *Biore-source Technology*, 2008, 99(17): 8027-8033.
- [7] Oh YK, Seol EH, Kim JR, et al. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19[J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2003, 28(12): 1353-1359.
- [8] Balch WE, Wolfe RS. New approach to the cultivation of ethanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfon-cacid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere[J]. *Apply Environ Microbiol*, 1976, 32(6): 781-791.
- [9] 竺建荣, 胡纪萃, 顾夏声. 颗粒厌氧污泥中的产氢产乙酸细菌研究[J]. 微生物学通报, 1994, 21(4): 207-209.
- [10] 东秀株, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 46-48.
- [11] 张丛志, 左玉静, 张华, 等. 国内外乙酸生产及消费[J]. 化工技术经济, 2004, 22(7): 1-5.
- [12] Li ZK, Wrenn BA, Venosa AD. Effect of iron on the sensitivity of hydrogen, acetate, and butyrate metabolism to inhibition by long-chain fatty acids in vegetable-oil-enriched freshwater sediments[J]. *Water research*, 2005, 39(13): 3109-3119.
- [13] 牛莉莉, 刘晓黎, 陈双雅, 等. 一个新的高温产氢菌及产氢特性的研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(2): 280-284.