

# 选育高效产氢细菌的诱变剂选择

郑国香<sup>1,2</sup>,任南琪<sup>1</sup>,李永峰<sup>1</sup>,林海龙<sup>1</sup>,李建政<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 哈尔滨 150090; 2. 东北农业大学 工程学院, 哈尔滨 150090,  
E-mail: zgx720331@126.com)

**摘要:** 为选育高效产酸产氢细菌, 采用 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍 (NTG)、紫外线+亚硝酸 (UV+亚硝酸) 和 5-溴尿嘧啶+紫外线 (5-BU+UV) 对产氢发酵细菌 *Ethanoligenens harbinense* ZGX4 进行诱变处理, 显示出不同的诱变效应差异. NTG 只得到一种类型产氢突变株; 紫外线+亚硝酸法获得 5 种突变体类型, 且出现一种自絮凝很强、产氢能力提高约 50% 的突变类型. 5-溴尿嘧啶+紫外线法获得 2 种突变类型, 约 80% 的突变株的释氢能力呈现负增长趋势. 实验证明, 紫外线+亚硝酸法的诱变效应最好, 高产氢能力突变株显示其菌落直径增大、颜色透明的变化特征.

**关键词:** 诱变剂; 产氢发酵细菌; 突变体; 诱变效应

**中图分类号:** X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 0367-6234(2008)08-1233-05

## Selection of mutagens on screening high efficient hydrogen-producing bacterium

ZHENG Guo-xiang<sup>1,2</sup>, REN Nan-qi<sup>1</sup>, LI Yong-feng<sup>1</sup>, LI N Hai-bng<sup>1</sup>, LI Jian-zheng<sup>1</sup>

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China;

2. Institute of Engineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150090, China, E-mail: zgx720331@126.com)

**Abstract:** In order to screen high efficient acid-producing and hydrogen-producing bacteria, the mutagenesis of 1-methyl-3-nitryl-1-nitrosoguanidine (NTG), ultraviolet rays (UV) and nitrous acid, 5-bromouracil and ultraviolet rays (5-BU+UV) on fermentative hydrogen-producing bacterium *Ethanoligenens harbinense* ZGX4 was studied, and different mutagenic effects were obtained. Only a kind of mutant was obtained by NTG mutagenesis; 5 kinds of mutants were attained by UV and nitrous acid, including a kind of H<sub>2</sub>-producing mutant with strong auto flocculation capacity and the improved H<sub>2</sub>-producing ability of about 50%; 2 kinds of mutants were obtained by 5-BU+UV and the H<sub>2</sub>-producing ability of about 80% mutants trended to decrease. Experimental results proved that the complex mutagenesis of UV and nitrous acid is the best way comparing with NTG and 5-BU+UV. The morphological characteristics of high efficient H<sub>2</sub>-producing mutants exhibit transparent color and bigger diameter.

**Key words:** mutagenesis; fermentative hydrogen-producing bacterium; mutant; mutagenic effect

氢能作为一种清洁、高效、安全、可持续的新能源, 被视为 21 世纪最具发展潜力的能源, 已逐渐成为能源界关注的热点<sup>[1-2]</sup>. 其中, 发酵法生物制氢能以相对较高效率实现能源再生的同时减少

废物的污染强度. 而提高反应体系的产氢能力和降低生产成本是决定发酵法生物制氢技术实现工业化的关键指标. 因此, 针对如何提高菌种的发酵产氢能力的研究已成为生物制氢领域急需解决的研究热点之一. 目前, 质子自杀法<sup>[3-4]</sup>和烯丙基乙醇方法<sup>[5-7]</sup>是生物制氢领域突变体获得的主要方法. 传统的诱变手段在工业微生物育种上, 特别是筛选高产、优质的菌种突变体中仍然占据着不可忽视的地位, 而诱变剂及诱变方式是否适当将直

收稿日期: 2006-11-17.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470054); 国家高技术  
研究发展计划资助项目 (863-2006AA05Z109).

作者简介: 郑国香 (1972—), 女, 博士;

任南琪 (1959—), 男, 特聘教授, 博士生导师.

接影响目标突变菌株的获得.因此,探讨不同诱变剂及不同组合对产氢细菌的诱变效应,将为发酵产氢菌种 *Ethanoligenens harbinense* ZGX4 的进一步遗传改良提供重要的参考.

## 1 实验

### 1.1 菌种

出发菌株为哈尔滨产乙醇杆菌 *Ethanoligenens harbinense* ZGX4,采用改进后的 Hungate 厌氧滚管技术和培养瓶平板法<sup>[8]</sup>,从连续流搅拌槽式反应器(CSTR)的乙醇型发酵活性污泥菌群中分离得到,由哈尔滨工业大学市政环境生物技术中心提供.

### 1.2 培养基

培养基成分和配制见文献[8].

### 1.3 分析方法

挥发酸、乙醇及氢气、CO<sub>2</sub> 的测定见文献[8].

### 1.4 产氢量和产氢能力的测定

产氢能力实验采用间歇试验装置<sup>[9]</sup>.按 2% 的接菌量接入产氢细菌,反应有效体积为 50 mL.突变菌株的扩大培养条件控制在温度 37 ℃,摇床转速为 120 r/min,恒温空气浴摇床上振荡培养.

### 1.5 诱变方法

#### 1.5.1 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(NTG)

对数期的 *E. harbinense* ZGX4 菌株离心 10 min (4000 r/min) 收集菌体制成浓度为 10<sup>7</sup> 个/mL 的菌悬液,用 pH 7.0 的 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液配制 NTG 溶液,使其最终浓度为 30 μg/mL.取 1 mL 菌悬液加入 9 mL pH 7.0 的 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液充分混合,于 37 ℃ 下震荡培养 15 min, 30 min, 40 min, 60 min 后,分别加入 90 mL pH 7.0 的 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液.取 1 mL 梯度稀释至 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 涂于琼脂分离培养基上,放于 37 ℃ 保温厌氧条件下培养.菌落记数,计算存活率和致死率.挑出菌落形态差异明显的突变菌落继代培养.

#### 1.5.2 紫外线(UV)+亚硝酸复合诱变

产氢菌 ZGX4 培养至对数期,1 mL (10<sup>7</sup> 个/mL) 菌液置于 Eppendorf 管中离心 10 min (4500 r/min),弃上清,用生理盐水洗涤悬浮后的菌悬液放于直距 25 cm、20 W 紫外灯下照射 120 s 后,接入液体培养基中 37 ℃ 避光培养 28 h, 4500 r/min 离心 10 min,弃上清,制成菌悬液,每毫升约含 10<sup>7</sup> 个,取 1 mL 紫外处理后的菌悬液加入 2 mL pH 4.5 醋酸缓冲液和 1 mL 0.1 mol/L 亚硝酸钠溶液,37 ℃ 震荡保温处理 15 min 后,加入

0.07 mol pH 8.6 磷酸氢二钠溶液终止反应,用无菌无氧生理盐水梯度稀释涂平板,未经亚硝酸钠溶液处理的菌液稀释涂平板做对照,置于 37 ℃ 厌氧箱中培养.上述操作过程在厌氧操作培养箱中进行.

#### 1.5.3 5-溴尿嘧啶(5-BU)+紫外线(UV)复合诱变

培养 ZGX4 至对数生长期,离心除去培养液后,加入生理盐水,饥饿培养 8~10 h,以消耗体内的贮存物质.将 5-溴尿嘧啶(5-BU)加入到经饥饿培养的培养液中,最后处理浓度为 30 μg/mL,混合均匀,振荡培养 5~8 h 后,取 5 mL 菌悬液置于紫外线下辐射(UV 处理过程同 UV+亚硝酸诱变),然后稀释、涂平板、37 ℃ 避光厌氧条件下培养.未经诱变处理的菌液稀释涂平板做对照.

## 2 结果与讨论

### 2.1 NTG 的诱变效应

超诱变剂 NTG 是一种烷化剂,通过和 DNA 直接起化学反应后引起突变,其诱变效应很高,能使细胞发生一次或多次突变,还能使多基因并发突变,在复制叉附近一个基因突变能诱发附近位置的基因陆续连锁突变,这种并发突变的几率必小于点突变几率<sup>[10]</sup>.表 1、2 的实验结果证实,使用 NTG 处理产氢细菌 ZGX4,菌株的死亡率随着时间的增加明显递增,而获得的突变菌株的类型显示,只有一种突变类型菌株出现,其菌落的形态特征与对照相似,菌落直径略大于对照(1.0~

表 1 NTG 对产氢细菌 ZGX4 的诱变作用

$\frac{t}{\text{min}}$	稀释倍数	每平皿菌落数 个·平皿 <sup>-1</sup>	存活率 %	死亡率 %
0	10 <sup>-3</sup>	582	100	0
0	10 <sup>-4</sup>	201	100	0
0	10 <sup>-5</sup>	49	100	0
10	10 <sup>-3</sup>	421	72.3	27.7
10	10 <sup>-4</sup>	147	73.1	26.9
10	10 <sup>-5</sup>	37	75.5	24.5
25	10 <sup>-3</sup>	371	63.7	36.2
25	10 <sup>-4</sup>	123	61.2	38.8
25	10 <sup>-5</sup>	31	63.3	36.7
45	10 <sup>-3</sup>	274	47.1	52.2
45	10 <sup>-4</sup>	98	48.7	51.3
45	10 <sup>-5</sup>	23	46.9	53.1
60	10 <sup>-3</sup>	151	25.9	75.1
60	10 <sup>-4</sup>	59	29.4	70.6
60	10 <sup>-5</sup>	11	22.4	77.6

2.5 mm),这种类型菌株的产氢能力 (mmol/(g · h))增幅在 22.5% ~ 35.4%。

表 2 NTG 诱变突变体的特征

突变类型	菌落直径 mm	菌落形态特征	产氢能力 mmol · g <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>	氢气比例 %
A	1.2 ~ 3.0	乳白色、光滑圆型、透明凸起	27.4 ~ 34.8	58 ~ 78

2.2 UV +亚硝酸对 ZGX4的诱变效应

亚硝酸作为脱氨基剂,它可以直接作用于正在复制或未复制的 DNA 分子,脱去碱基中的氨基变成酮基,改变碱基氢键的电位,引起转换而发生变异,如图 1 所示.当亚硝酸处理引起脱氨基作用,A T 经过两次 DNA 复制后转换为 G C。

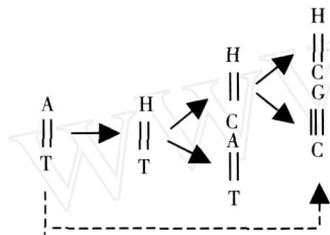


图 1 亚硝酸的诱变机制

从诱变处理后菌株的死亡率和存活率来看(见表 3),菌株 ZGX4 经亚硝酸单独处理后,随着亚硝酸处理时间的延长,菌株的死亡率逐渐增加,

表 3 亚硝酸对 ZGX4 的诱变效应

t / min	稀释倍数	每平皿菌落数 个 · 平皿 <sup>-1</sup>	存活率 %	死亡率 %
0	10 <sup>-2</sup>	397	100	0
0	10 <sup>-3</sup>	284	100	0
0	10 <sup>-4</sup>	82	100	0
5	10 <sup>-2</sup>	317	79.8	20.2
5	10 <sup>-3</sup>	231	81.3	17.9
5	10 <sup>-4</sup>	64	78.0	24.5
10	10 <sup>-2</sup>	211	53.1	46.9
10	10 <sup>-3</sup>	164	57.7	42.3
10	10 <sup>-4</sup>	44	53.7	46.3
15	10 <sup>-2</sup>	120	30.2	69.8
15	10 <sup>-3</sup>	77	27.1	72.9
15	10 <sup>-4</sup>	25	30.0	70.0
25	10 <sup>-2</sup>	19	4.8	95.2
25	10 <sup>-3</sup>	12	4.2	95.6
25	10 <sup>-4</sup>	3	3.6	96.4

当处理时间为 15 min 时,菌株 ZGX4 的死亡率在 70% 左右. 一般情况,对于诱变史较短或野生菌株来说,致死率在 70% ~ 80% 所使用的诱变剂的剂量为最佳选择范围. 因此,亚硝酸的最佳处理时间为 15 min

两种诱变剂结合起来对产氢细菌 ZGX4 进行处理的诱变效应见图 2,从产氢能力的增幅程度来分析,产氢能力以单位时间单位细胞产氢量 (mmol/(g · h))为衡量值,结果发现,增幅范围在 20% 的突变菌株占的比例较多,约为总数的 40% 左右;而产氢能力相对野生菌 ZGX4 提高 40% 以上的突变菌株仅占约 3% 左右;出现产氢下降甚至零产氢的负突变菌株占总数的 57% 左右。

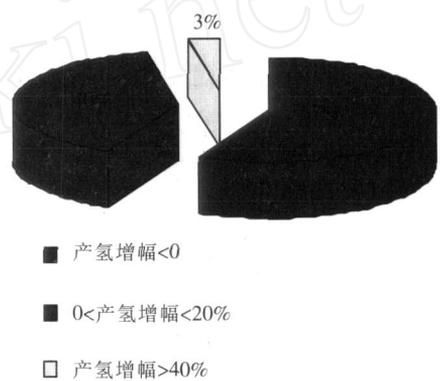


图 2 UV +亚硝酸对 ZGX4 的诱变效应

从菌落表现出来的特征来分析(表 4),双重诱变处理后,突变株的类型也相应增多,出现了 5 种突变类型的菌落,而且还出现了不产气的突变体,见表 4 的 E,这种菌株的菌落明显变小,颜色为白色,但形态与对照相似,仍然为圆形. 而正突

表 4 UV +亚硝酸对产氢细菌 ZGX4 的诱变作用

突变类型	菌落直径 mm	菌落形态特征	产氢能力 mmol · g <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>	氢气比例 %
A	1.5 ~ 3.5	淡黄色、光滑圆型、透明凸起菌苔	34.1 ~ 37.6	70 ~ 82
B	1 ~ 2.5	淡黄色、不规则褶皱不透明、扁平	19.8 ~ 22.8	35 ~ 51
C	0.5 ~ 1.5	白色、不规则透明、圆型凸起	24.8 ~ 29.4	42 ~ 65
D	0.5 ~ 2.0	黄褐色、褶皱不透明、凹陷	17.4 ~ 21.0	44 ~ 53
E	0.2 ~ 1.0	白色、圆型不透明菌苔	0	0

变体的菌落特征总体上与对照相似,如表 4 中 A 型,只有菌落直径相对于对照有所增大(1.5 ~ 3.5 mm),液体培养中有较强的自絮凝能力.邢德峰等<sup>[11]</sup>已从 CSTR 反应器的厌氧活性污泥中成功分离出自絮能力较强的野生菌株,这些能够产生絮体或颗粒的产氢菌株将为生物制氢反应器实现无载体固定化细胞技术提供非常重要的应用菌株.可见,利用亚硝酸和 UV 进行复合诱变处理 ZGX4,对菌株基因组的影响较大,伤害性相对较大,但得到的高产菌株往往效果都很好.

### 2.3 5-溴尿嘧啶(5-BU)对 ZGX4 的诱变效应

5-BU 是一种常用的诱变剂,通常和其他诱变剂结合使用,它是一类碱基类似物.碱基类似物是一类和天然的嘧啶嘌呤等 4 种碱基分子结构相似的物质,它们的诱变作用是取代核酸分子中碱基的位置,再通过 DNA 的复制引起突变,因此,也叫掺入诱变剂.当这种物质加入到微生物培养基中,在繁殖过程中可以掺入到微生物的 DNA 分子中,不影响 DNA 的复制,如图 3 所示.

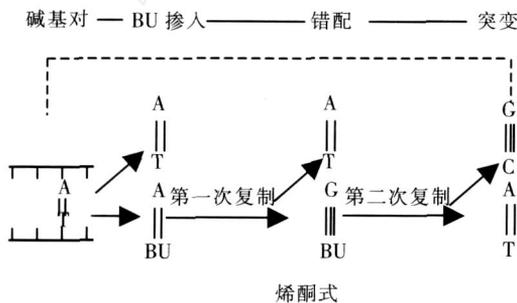


图 3 5-BU 的诱变机制

将 5-BU 和紫外线(5-BU + UV)双重诱变剂处理野生产氢细菌 ZGX4,通过统计突变体的产氢能力( $\text{mmol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ )的增幅确定其作用结果.结果发现,利用 5-BU + UV 双重作用产氢细菌 ZGX4 后,获得的突变菌株的产氢能力呈现下降趋势的比例占绝大多数,见图 4 所示.绝大多数突变菌株的产氢能力降低,即负产突变菌株的总数接近 80%左右;而产氢能力提高的突变菌株的增加幅度相对也较小,小于 20%.

从菌落的表型分类来看,出现 2 种突变类型的菌落,而菌落显现不规则形状,而且直径的大小显示缩小的趋势,见表 5.突变体的产氢幅度较小,没有出现产氢能力有很大提高的突变类型.

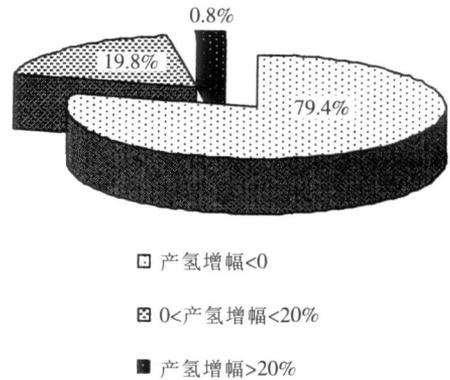


图 4 5-BU + UV 对 ZGX4 的诱变效应

表 5 5-BU + UV 对产氢细菌 ZGX4 的诱变作用

突变类型	菌落直径/mm	菌落形态特征	产氢能力/ $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	氢气比例/%
A	0.5 ~ 2.0	乳白色、不规则、圆型不透明	23.0 ~ 27.4	49 ~ 63
B	0.5 ~ 1.0	白色、不规则、褶皱凸起	15.8 ~ 21.5	0 ~ 38

### 2.4 讨论

本实验采用了 3 种诱变方法对产氢细菌 ZGX4 进行突变体筛选,结果显示,NTG 法得到了 1 种类型突变株,UV + 亚硝酸复合诱变法获得 5 种类型突变株,UV + 5-BU 复合诱变法得到 2 种突变类型突变株.各种诱变因子的作用机制不一样,主要是 DNA 分子上的不同基因位点对各种诱变剂吸收阈值有较大差异,即不同诱变剂对基因位点有其一定的专一性,有的甚至具有特异性.一般认为单因子不如复合因子处理效果好,多因子复合处理可以取长补短,动摇 DNA 分子上多种基因的遗传稳定性,以弥补某种不亲和性或热点饱和现象,容易得到更多突变类型<sup>[10]</sup>.NTG 是一种超强诱变剂,作用在复制叉附近,极易诱发突变而得到多重突变株,但多重突变的几率要小于点突变的几率,所以,NTG 法得到的突变体类型最少;而作为一种脱氨剂的诱变剂,亚硝酸可以引起 A:T G:C 的转换,以及碱基的缺失.亚硝酸与紫外线结合处理产氢细菌 ZGX4 后,最终有 5 种突变类型的突变体出现,这证实 UV + 亚硝酸这种利用多因子复合处理 *E. harbinense* ZGX4 菌株的诱变方法,能够致使 DNA 分子上多种基因出现不稳

定状态,从而在后代出现多种突变类型;作为一种弱诱变剂,5-BU通常与紫外线结合一起作为微生物诱变育种的一类手段,从诱变产氢细菌 ZGX4所获得的突变菌株类型看,只获得 2 种类型的突变菌株,而且正突变菌株的产氢能力提高幅度很小,根据本研究的目的,选育产氢能力大幅度提高的产氢突变体作为根本出发点,可以确定 UV + 5-BU 复合诱变获得高效产氢突变菌株的效果不是很理想,未出现产氢能力明显提高的突变菌株.因此,不适合选择紫外线 + 5-BU 复合诱变因子处理产氢细菌 ZGX4 来选育高效产氢突变体.

### 3 结 论

1) UV + 亚硝酸是一种筛选高产氢能力突变菌株的较好诱变手段,得到 5 种突变体类型,并且获得产氢能力明显提高同时具有较强自絮凝能力的突变菌株,为实现生物治理污染、丰富生物功能菌群提供重要的物质资源.

2) 3 种诱变方法中获得的菌落形态表明,产氢能力明显提高的突变体显示出菌落透明、直径明显增大而且附近培养基中出现气泡的特征;相反,菌落直径缩小、形状不规则不透明且菌苔扁平的突变类型是负突变体显示的主要特征,这些信息可为进一步平板分离筛选高产稳定产氢突变体的获得提供比对参考.

### 参考文献:

- [1] DORIAN J P, FRANSSEN H T, SMBECK D R. Global challenges in energy [J]. Energy Policy, 2006, 34: 1984 - 1991.
- [2] PETER W, BETNA J, LENE L, et al. Maximizing renewable hydrogen production from biomass in a bio/cata-

lytic refinery [J]. Int J Hydrogen Energy, 2007, 32: 4135 - 4141.

- [3] WNKELMAN J W, CLARK D. Proton suicide general method for direct selection of sugar transport and fermentation defective mutants [J]. J Bacteriol, 1987, 160: 687 - 690.
- [4] PABLO H C, MENDEZ B S. Direct selection of *Clostridium acetobutylicum* fermentation mutants by a proton suicide method [J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(2): 578 - 580.
- [5] ROGERS P, PALOSAAR I N. *Clostridium acetobutylicum* mutants that produce butyraldehyde and alter quantities of solvents [J]. Appl Environ Microbiol, 1987, 53(12): 2761 - 2766.
- [6] CLARK D, CRONAN J E Jr. A cetaldehyde coenzyme A dehydrogenase of *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1980, 144: 179 - 184.
- [7] MAT - JAN F, KISWAR Y A, CLARK D. Mutants of *E. coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase [J]. J Bacteriol, 1989, 171: 342 - 348.
- [8] 郑国香,任南琪,林海龙,等. 厌氧发酵产氢细菌的厌氧操作与紫外线诱变技术 [J]. 化学工程, 2007, 35(5): 48 - 51.
- [9] REN N Q, ZHENG G X, LI Y F, et al. Mutagenesis and selection of high efficiency hydrogen - producing mutants by ultraviolet radiation [J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2006, 13(6): 635 - 639.
- [10] 施巧琴. 工业微生物育种学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [11] XNG D F, REN N Q, LI Q B, et al. *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. Nov., isolated from molasses wastewater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56: 755 - 760.

(编辑 刘 彤)