

荧光原位杂交技术解析发酵产氢细菌群落结构

陈 瑛^{1,2},任南琪^{1*},宋佳秀¹ (1.哈尔滨工业大学市政环境工程学院,黑龙江 哈尔滨 150090;2.哈尔滨师范大学生物系,黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要:应用荧光原位杂交(FISH)技术,研究了连续流搅拌槽式(CSTR)发酵制氢反应器中2种产氢发酵类型的菌群组成和发酵类型转化过程中的菌群种类和数量变化及其对产氢速率、生物量和发酵产物的影响.结果表明,梭菌属和肠杆菌科在决定产氢发酵类型方面有重要作用.以梭菌为优势种群的乙醇型发酵比以肠杆菌为优势种群的丁酸型发酵具有最佳的产氢能力.实验结果能够与生物发酵系统常规监测指标形成很好的印证.

关键词:生物制氢;发酵;荧光原位杂交(FISH);细菌;群落结构

中图分类号:X172,Q93 文献标识码:A 文章编号:1000-6923(2007)03-0295-05

Community structures of fermentative hydrogen-producing bacteria community by fluorescent in situ hybridization.
CHEN Ying^{1,2}, REN Nan-qi^{1*}, SONG Jia-xiu¹ (1.School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2.Department of Biology, Harbin Normal University, Harbin 150080, China). *China Environmental Science*, 2007,27(3):295~299

Abstract: Applying fluorescent in situ hybridization (FISH) technique, 2 kinds of community composition of hydrogen production, fermentative type and bacteria community kinds and amount variance and its influence on hydrogen production rate, biological quantity and fermentation product in the transform process of fermentation type in the continuous stir tough reactor (CSTR) fermentation hydrogen production reactor were studied. *Clostridium* and *Enterobacteriaceae* had important action on deciding the hydrogen production fermentation type; the ethanol type fermentation using *Clostridium* as the dominant group possessed the best hydrogen producing ability compared with the butyric acid type fermentation using *Enterobacteriaceae* as the dominate group. The test results could form very good corroborating with conventional monitor index of biofermentation system.

Key words: bioproduction of hydrogen; fermentation; fluorescent in situ hybridization (FISH); bacteria; community structure

生物制氢技术是20世纪80年代后发展起来的制氢技术.其原理是利用一些生理代谢过程中能够产生氢气的微生物制取氢气.这些微生物包括光合细菌和依靠发酵过程生长的严格厌氧菌^[1].由于这些发酵细菌中很多都是废水产酸发酵处理过程的主要菌群,因此可以利用废水发酵处理过程制氢,实现废物资源化.任南琪等^[2-3]利用废水两相厌氧生物处理工艺中的产酸相反应器,进行了有机废水发酵法生物制氢技术的研究,并发现了传统的发酵类型——丁酸型发酵与丙酸型发酵之外的新的乙醇型发酵.由于该工艺的主体是微生物,欲提高产氢效率、探讨工程控制对策,必须对细菌群落生态进行深入研究^[4].

荧光原位杂交(FISH)技术近几年已经成为微生物生态学研究中的热点^[5].由于其灵敏、快速、使用安全、特异性好等特点,被用于分析复杂环境的微生物群落结构,是一种监测和定量化复杂的环境样品中微生物群落动态的有效方法,也为人工创建生物处理系统的最佳工况条件提供了理论依据^[6-10].

本研究应用 FISH 技术,研究了连续流搅拌槽式(CSTR)发酵制氢反应器中2种发酵类型制氢细菌的群落结构.对菌群组成和发酵类型转化

收稿日期:2006-10-08

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(50125823)

* 责任作者,教授, rnq@hit.edu.cn

过程中的菌群种类和数量变化进行了监测,分析了群落结构的差异对产氢速率、生物量和发酵产物的影响.旨在建立发酵制氢系统的 FISH 监测平台,并为制氢反应器的调控提供微生物生态学的参考.

1 材料与方法

1.1 实验装置与运行

1.1.1 装置 采用 CSTR 反应器^[11],内设有反应区、沉淀区及气-液-固三相分离装置,有效容积为 6L.安装可调速搅拌机,搅拌速度 180r/min.外加电热缠丝及温控探头控制反应器内部温度为(35±1)℃.采用磁力泵连续恒定泵入底物,底物为工业纯葡萄糖添加适量 N、P 营养物,使 COD:N:P=1000:5:1,并补充适量微量元素及维生素.进水 COD 为 5000mg/L,停留时间(HRT)为 4h.污泥取自城市污水排污口,腐化后加入到反应器中.反应器底部和侧面设有取样口,可定期取泥水混合物进行监测.

1.1.2 运行 首先对 2 台大小、构造相同,平行运行的 CSTR 生物制氢反应器进行了顶级群落研究.通过加入无机弱酸或弱碱来调控反应器运行 pH 值,使 1 号反应器在 pH4.0~4.4 保持稳定的乙醇型发酵;2 号反应器在 pH5.7~7.0 保持稳定的丁酸型发酵.反应器从 2005 年 5 月 18 日至 7 月 5 日连续运行近 50d.然后选择 1 号反应器,进行 2 种发酵类型转化过程监测实验.实验从 2005 年 8 月 20 日开始,首先迅速将 pH 值从乙醇型发酵最适的 4.4 调整为丁酸型发酵最适的 6.0~6.5,以启动转化过程,至 9 月 7 日形成稳定的丁酸型发酵实验结束.在转化过程中每隔 2d 取活性污泥进行 FISH 实验,同时详细记录当天反应器内的 pH 值、产氢速率、生物量、末端发酵产物等指标以进行对照分析.

1.1.3 常规监测 监测指标包括温度、MLVSS、挥发酸种类和数量、产气速率、氢气百分含量、累计产氢量等,检测方法参照文献[12-14].反应器内 pH 值采用 pH 探头通过单片机连接计算机

在线监测,利用湿式气体流量计计量气体产量.

1.2 反应器的 FISH 监测

1.2.1 探针的选择和制备 以往的研究结果表明^[13],大多数产氢发酵细菌属于梭菌属(*Clostridium*)和肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*).通过查询 probeBase 寡核苷酸数据库,获得了它们的专一性探针以及与其他发酵菌专一性杂交的探针的寡核苷酸序列:Chis150(专一杂交 *Clostridium* cluster I and II);ENT183(专一杂交 *Enterobacteriaceae*);LGC354(专一杂交 Gram-positive firmicutes with low G+C content).探针的合成与荧光素标记均由 Invitrogen 公司完成,置于-20℃下避光保存.使用前用超纯水将探针稀释到 5ng/mL,分装备用.

1.2.2 实验方法 取样:定期取反应器中的活性污泥,用灭菌玻璃珠振荡打碎,1000r/min 离心 2min,将上清液 5000~8000r/min 离心 2min,弃上清液,再用 PBS 将收集到的细菌冲洗一次.

固定:用 4%多聚甲醛溶液固定,4℃过夜.如果不能马上进行杂交实验,可将固定好的样品暂时放在 50%乙醇/PBS 溶液中,-20℃保存.杂交实验前,用 PBS 液清洗,离心收集.

预处理:用蛋白酶 K,37℃消化 30min,减少蛋白质对杂交的影响.再用溶菌酶处理 10min,以增加细胞的通透性.最后用梯度酒精(50%,80%,95%,100%)依次脱水.

杂交:探针在杂交前加入杂交液中(0.9mol/L NaCl,20mmol/L Tris-Cl, 0.1%~1% SDS,5%~55% 甲酰胺),使其终浓度为 0.5ng/mL.杂交在载玻片上进行,取经过预处理的样品 10μL 涂于载片,充分干燥后,加 20μL 杂交液,置于密闭湿盒,46℃杂交炉中避光杂交 2~4h.

洗脱:杂交完成后,用 SET 洗脱液,46℃将多余的探针除去.

双杂交:洗脱后,在新的杂交液中再加入另一种 16S rRNA 探针溶液,按上述步骤杂交.

1.2.3 结果分析 全部操作完成后,加少量对苯二胺-甘油溶液覆盖样品,防止荧光淬灭,再封片.

结果用 Zeiss LSM 共聚焦显微镜观察、照相并进行分析.通过观察照片和计算荧光面积,可以获得目标菌群的相对数量和空间分布情况.

2 结果与讨论

2.1 2 种产氢发酵类型的细菌顶极群落结构

根据末端发酵产物组成,丁酸型和乙醇型发酵成为制氢研究的重点^[3,15-16].以往的研究结果^[4,11]显示,丁酸型发酵末端产物为丁酸、乙酸、氢气、二氧化碳和少量丙酸,乙醇型发酵的末端产物为乙醇、乙酸、氢气、二氧化碳和少量丁酸.这主要与组成细菌群落的细菌种类、数量有关.

检测结果表明,1号反应器的 MLVSS 从初始的 11.1g/L 减少至平均 5.1g/L,累计氢气产量 494.25L;2号反应器的 MLVSS 从初始的 9.0g/L 减少至平均 7.5g/L,累计产氢量 375.95L.虽然 1号反应器的生物量仅相当于 2号反应器的 68%,但是其累计产氢量却比 2号反应器多,这与二者细菌群落结构差异密切相关.

FISH 实验结果(图 1)显示了 2 种发酵类型细菌群落结构的不同.1号反应器的活性污泥中含有大量梭菌(图 1B)和少量肠杆菌(图 1A).二者丰度可用荧光面积之比表示,为 1.54.而 2号反应器的情况相反,含有极少量梭菌(图 1D)和大量肠杆菌(图 1C),二者丰度之比为 0.15.因此,稳定运行的乙醇型发酵制氢系统中梭菌占优势,而丁酸型发酵制氢系统中肠杆菌占优势.显然,在细菌数量接近的情况下,以梭菌为优势种群的乙醇型发酵的产氢量将大于以肠杆菌为优势种群的丁酸型发酵.以葡萄糖为底物的发酵制氢反应器中,乙醇型发酵的最佳 pH 值范围为 4.0~4.4,丁酸型为 5.7~7.0.由于二者均为产酸发酵,这使得丁酸型发酵需经常添加碱性物质来维持较高的 pH 值条件,增加了运行成本.因此,从产氢量和经济角度考虑,乙醇型发酵优于丁酸型发酵.

从荧光面积分析可知,1号反应器中的细菌数量明显少于 2号反应器,二者之比为 0.71.该结果与 MLVSS 测定得出的生物量的比值接近,证明 FISH 与常规监测方法之间有良好的对应性.

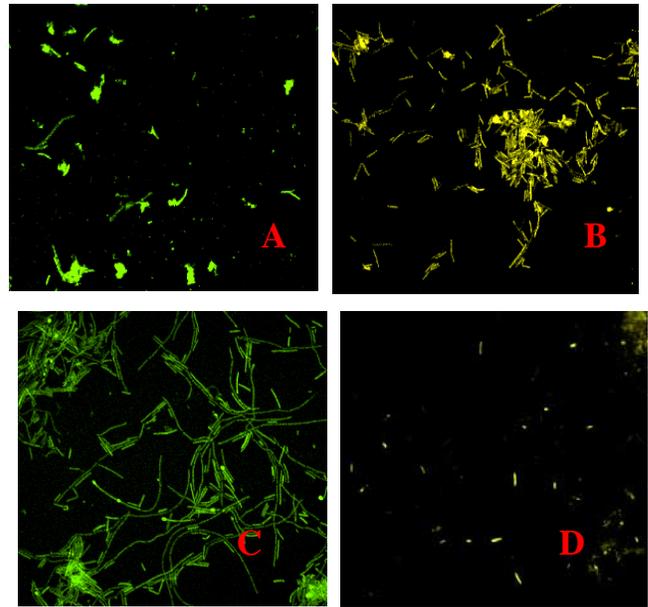


图 1 2 种产氢发酵类型细菌群落结构
Fig.1 Microbial community structure of two fermentation types
使用探针为 ENT183(绿色),Chis150(黄色)

2.2 2 种产氢发酵类型转化实验中的细菌群落动态

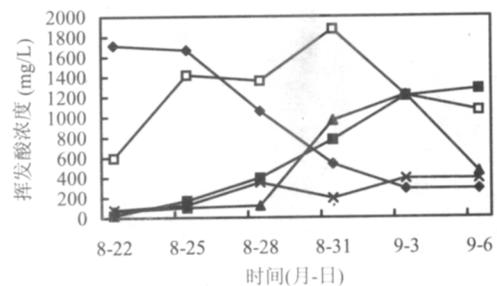


图 2 转化实验中液相末端发酵产物的变化
Fig.2 The variation of liquid fermentative productions in transforming experiment
— — 乙醇 — — 乙酸 — — 丙酸 — — 丁酸
—x— 戊酸

2.2.1 液相发酵产物的变化 反应器末端发酵产物检测结果显示(图 2),最初的液相末端产物以乙醇和乙酸为主,为稳定的乙醇型发酵.之后乙醇迅速减少,丙酸和乙酸含量增加,有短期的丙酸型发酵出现(8月 31 日).同时,丁酸含量稳步增加.最

后,经非典型丁酸发酵(9月3日),转化为稳定丁酸型发酵(9月6日).这样的变化过程与以往的相关研究结果相符^[11].

2.2.2 细菌群落结构动态 采用3种探针对每隔2d提取的活性污泥样品进行双杂交FISH实验,群落结构变化结果如图3,图4所示.图3A,图3B,图3C与图3a,图3b,图3c是用不同探针分别对取自转化不同时期的样品进行平行杂交实验获得的2组结果.其中A、a为转化前期的样品,B、b为转化中期的样品,C、c为转化末期的样品.由图3可见,活性污泥中的肠杆菌(红色)数量至转化中期明显减少,末期有所增加.梭菌(黄色)数量则至中期大量增加,末期又迅速减少.

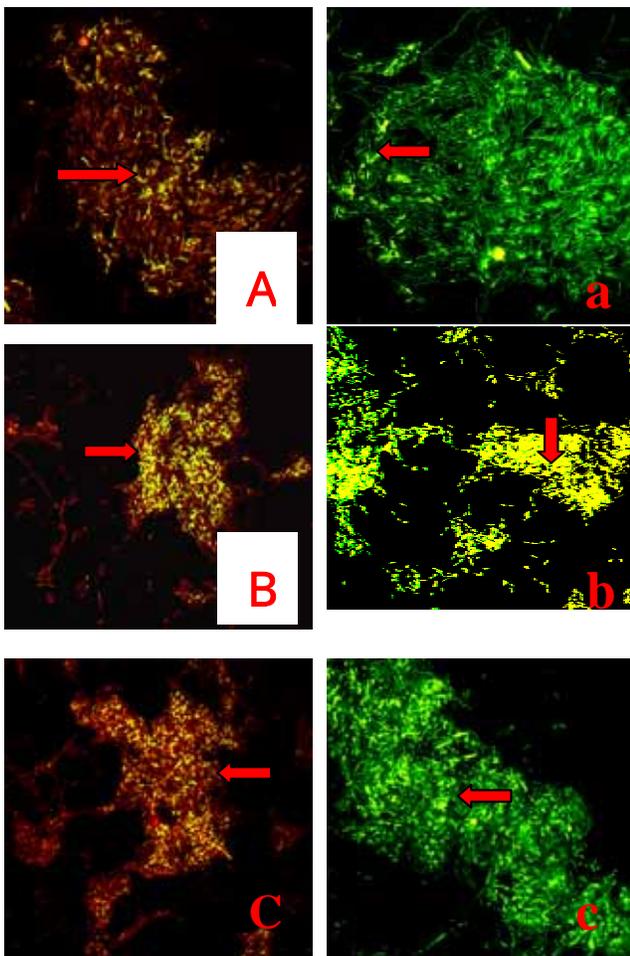


图3 发酵类型转化过程的菌群动态变化

Fig.3 The variation of microbial groups during the course of fermentation types changing.

A,B,C使用探针为ENT183(红色)和LGC354(黄绿); a,b,c使用探针为

Chis150(黄色)和LGC354(绿色),箭头指示黄色和黄绿色荧光区

利用Zeiss LSM Image Browser软件对荧光面积的计算分析结果(图4)更加详细地反映了细菌群落结构的变化过程.

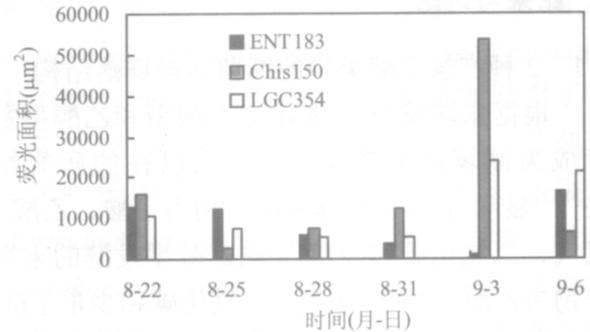


图4 转化实验中不同菌群相对数量动态变化

Fig.4 The richness variation of microbial groups in transforming experiment

由图4可见,探针ENT183荧光面积的变化显示肠杆菌的相对数量从转化初期开始逐渐减少,至末期丁酸型发酵形成(9月6日)时又突然增多.探针Chis150则代表了梭菌属的相对丰度,其变化有较大波动.先是前期突然减少(8月25日),之后开始增加,至末期数量突然激增后(9月3日)又急剧减少.而代表其他发酵细菌丰度的探针LGC354的荧光面积变化趋势与梭菌属相似,但是增减的幅度较小.分析三者的丰度比可以看出,乙醇型发酵时期梭菌占优势,转化启动后,梭菌与肠杆菌交替占据优势地位,但最终肠杆菌成为优势菌群,形成稳定的丁酸型发酵,这与液相发酵产物的变化相对应.而其他发酵菌群则始终处于伴生种群地位,与梭菌和肠杆菌协同作用,完成群落的演替过程.

2.2.3 产氢速率、生物量的变化 由图5可见,从乙醇型发酵到丁酸型发酵,反应器内的生物量逐渐增加,产氢速率的变化则相反,呈下降趋势.尤其是从丙酸型发酵转化为非典型丁酸发酵中,生物量突然猛增,转为丁酸型发酵后又稍回落,产氢速率则是迅速下降,丙酸型发酵时达到最低点,然后又有所回升.这进一步说明,产氢速率与细菌的数量无关,而与细菌的种类和反应器的发酵类型相关.以梭菌占优势的乙醇型发酵的产氢能力

优于肠杆菌占优势的丁酸型发酵.

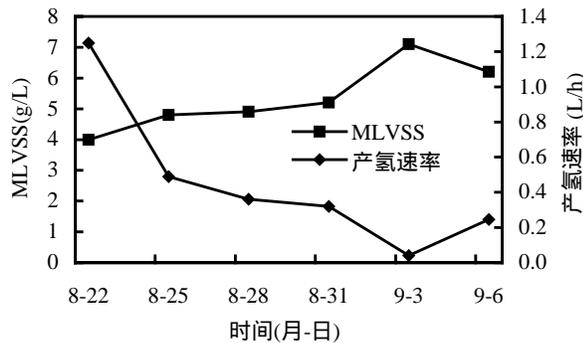


图5 转化实验中生物量和产氢速率的变化

Fig.5 The variation of hydrogen-producing speeds and MLVSS in transforming experiment

3 结论

3.1 生物制氢系统发酵类型的不同,实质是由于其具有不同的微生物群落结构.梭菌和肠杆菌的相对数量,决定了产氢发酵是乙醇型或是丁酸型.由于2类细菌生理代谢不同,使得以梭菌为优势种群的乙醇型发酵比以肠杆菌为优势种群的丁酸型发酵具有更佳的产氢能力.

3.2 pH 值是发酵制氢系统运行中重要的调控因子.当其他控制条件一定时,通过控制 pH 值就可以使发酵制氢反应器保持稳定的乙醇型发酵或是丁酸型发酵.由于存在优势菌群的竞争过程,即使有短期的 pH 值的波动,仍可在其群落结构彻底改变之前,通过及时回调 pH 值使系统得到恢复.

3.3 FISH 技术能够快速监测到反应器菌群种类和数量的改变,并且其结果可靠、能够与常规监测指标形成很好的印证,可以成为细菌群落结构动态监测的有效手段.

参考文献:

- [1] 李建政,任南琪.生物制氢技术的研究与发展 [J]. 新能源及工艺, 2001,(2):18-20.
- [2] 李建政,任南琪.产酸相最佳发酵类型工程控制对策 [J]. 中国环境科学, 1998,18(5):398-402.
- [3] 任南琪.产酸发酵细菌演替规律研究 [J]. 哈尔滨建筑大学学报, 1999,32(2):29-34.
- [4] 李白昆,吕炳南,任南琪.厌氧活性污泥与几株产氢细菌的产氢

能力及协同作用研究 [J]. 环境科学学报, 1997,17(4):459-463.

- [5] 余利岩,姚天爵.微生物生态学研究方法的新进展 [J]. 微生物学通报,2001,28(1):89-93.
- [6] 邢德峰,任南琪,李建政.荧光原位杂交在环境微生物学中的应用及进展 [J]. 环境科学研究,2003,16(3):55-58.
- [7] 逢兵,蒋学之,倪祖尧,等.荧光原位杂交原理及其在染色体畸变研究中的应用 [J]. 劳动医学,1997,14(1):52-56.
- [8] Giovannoni S J, DeLong E F, Olsen G J, *et al.* Phylogenetic group specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells [J]. J. Bacteriol., 1988,170:720-726.
- [9] DeLong E F, Wickham G S, Pace N R. Phylongenetic stains: ribosomal RNA based probes for the identification of single microbial cells [J]. Science, 1989,65:5554-5563.
- [10] 李牧尧.荧光原位杂交(FISH)技术 [J]. 国外医学遗传学分册, 1994,1:8-13.
- [11] 任南琪,王宝贞.有机废水发酵法生物制氢技术——原理与方法 [M]. 哈尔滨:黑龙江科技出版社,1994.
- [12] 国家环境保护总局水和废水检测分析方法编委会.水和废水检测分析方法 [M].4 版.北京:中国环境科学出版社,2002.
- [13] 林明.高效产氢发酵新菌种产氢机理及生态学研究 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2002.
- [14] 李永峰.发酵产氢新菌种及纯培养生物制氢工艺研究 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2005.
- [15] Ren Nan-qi, Wang Bao-zhen, Ma Fang. Hydrogen bio-production of carbohydrate fermentation by anaerobic activated sludge process. [J]. Proc. Water Environ. Fed. Annu. Conf. Expo 68th, 1995,(1):145-153.
- [16] 李白昆,吕炳南,任南琪.厌氧产氢细菌发酵类型和生态学的研究 [J]. 中国沼气, 1997,15(2):3-7.

作者简介:陈瑛(1972-),女,黑龙江哈尔滨市人,讲师,博士,研究方向为环境生物学.发表论文近 20 篇.