

基于 RT-PCR 对低温沼气发酵过程中 巴氏德醋杆菌的分析

代金平^{1,2}, 冯 蕾^{1,2}, 谢玉清^{1,2}, 王志方^{1,2}, 陈 竞^{1,2}, 王小武^{1,2,3},
周留艳^{1,2}, 张慧涛^{1,2}, 古丽·艾合买提^{1,2}, 杨新平^{1,2,3*}

(1. 新疆农科院微生物应用研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091; 2. 新疆特殊环境微生物重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830091; 3. 新疆万康诚一肥业有限公司, 新疆 乌鲁木齐 831201)

摘要: 巴氏德醋杆菌(*Acetobacter pastcurianum*) 在低温沼气发酵过程中能够提高牛羊粪沼气产量, 同时也可增加发酵残渣纤维素含量。为探究其在低温沼气发酵过程中的作用, 使用荧光定量 PCR 的方法对不同处理发酵过程中添加的巴氏德醋杆菌(*Acetobacter pastcurianum*) 进行定量分析。试验结果表明, 巴氏德醋杆菌(*Acetobacter pastcurianum*) 质粒标准曲线方程为 $y = -3.024x + 30.73$, 误差为 0.0680。处理 2、4、7 中巴氏德醋杆菌(*Acetobacter pastcurianum*) 基因拷贝数分别为 $1.83 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $33.77 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $31.93 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 巴氏德醋杆菌(*Acetobacter pastcurianum*) 基因拷贝数分别比对照组高出 90%、54% 和 45.6%, 且 3 个处理的产气量也相对较高。建立低温沼气发酵中添加巴氏德醋杆菌的荧光定量检测体系, 可以更加快速灵敏地进行添加菌的相关性变化规律分析, 为北方地区冬季低温沼气发酵促进菌剂的筛选奠定相关理论基础。

关键词: 巴氏德醋杆菌; 低温; 沼气发酵; RT-PCR; 绝对定量

中图分类号: S216.4; X713 文献标志码: A 文章编号: 1000-1166(2022)04-0031-05

DOI: 10.20022/j.cnki.1000-1166.2022040031

Analysis of *Acetobacter pastcurianum* in Low Temperature Biogas Fermentation Process by RT-PCR / DAI Jinping^{1,2}, FENG Lei^{1,2}, XIE Yuqing^{1,2}, WANG Zhifang^{1,2}, CHEN Jing^{1,2}, WANG Xiawu^{1,2,3}, ZHOU Liuyan^{1,2}, ZHANG Huitao^{1,2}, GULIahmat^{1,2}, YANG Xinping^{1,2,3*} / (1. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi 830091, China; 3. Xinjiang WanKangChengYi fertilizer Co., Ltd, Urumqi 831201, China)

Abstract: In low temperature biogas fermentation process, *Acetobacter pastcurianum* can effectively increase biogas production of cattle and sheep manure, as well as cellulose content of biogas fermentation residue. In order to explore its role in low-temperature biogas fermentation, fluorescence quantitative PCR was used to quantitatively analyze *Acetobacter pastcurianum* added in the process of low-temperature fermentation under different treatment conditions in this paper. The results showed that the equation of standard curve is $y = -3.024x + 30.73$ with an error of 0.0680. The concentrations of 16S rDNA of *Acetobacter pastcurianum* were $41.83 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $33.77 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and $31.93 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ in the sample 2, 4 and 7 respectively. The copy number of *Acetobacter pastcurianum* gene was 90%, 54% and 45.6% higher than that of the control group, respectively, and the gas production of the three treatments was relatively high. Establishing the detection system by real-time fluorescent quantitative PCR can quickly and sensitively quantify *Acetobacter pastcurianum* more in low-temperature biogas fermentation, meanwhile determine the relevance between the bacteria and gas production. It may lay a theoretical foundation on the screening of microbial inoculums for low temperature biogas fermentation in northern China.

Key words: *Acetobacter pastcurianum*; low temperature; RT-PCR; AQ

沼气发酵过程中维持产气盛期的条件是厌氧产酸、厌氧氨化和产甲烷细菌的快速增殖以及相互协

调生长。沼气发酵初期, 由厌氧和兼性厌氧的水解细菌或发酵细菌将纤维素、淀粉等水解成单糖, 进一

收稿日期: 2022-01-12 修回日期: 2022-03-14

项目来源: 自治区科技支疆项目计划项目(2020E0202); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01B65)。

作者简介: 代金平(1987-), 女, 新疆乌鲁木齐人, 副研究员, 主要研究方向为微生物发酵, E-mail: 383691178@qq.com

通信作者: 杨新平, E-mail: yangxin9337@163.com

步形成丙酮;将蛋白质水解成氨基酸,再进一步形成有机酸的氨;将脂类水解为甘油和脂肪酸,进一步形成乙酸、丙酸、丁酸、乙醇等;接下来,由产氢产乙酸细菌利用第1阶段合成的有机酸,氧化分解成乙酸和分子氢;最后再由严格厌氧的产甲烷细菌群完成。醋酸菌(*acetic acid bacteria*, AAB)是一类严格好氧的革兰氏阴性细菌。醋酸菌常见于气候温暖、空气湿润的区域。1898年 Beijerinck^[1]确定了醋杆菌属具有氧化乙醇生成乙酸的能力。巴氏德醋杆菌(*Acetobacter pasteurianum*, AP)能够在低温条件下提高牛羊粪沼气产量,同时也可增加沼气发酵残渣纤维素含量。研究低温沼气发酵过程中 AP 菌 16S rDNA 基因的拷贝数,对低温沼气发酵过程中产甲烷阶段有重要的指导意义。前人通过传统的分离培养的方法一般不能全面准确地了解沼气发酵微生物。对于其在低温条件下外源添加剂促进沼气发酵的研究比较缺乏。现已报道的微生物分子生物学技术有 RFLP 技术、ARDAR 技术和 PCR-DGGE 技术等^[2-4]。荧光定量 PCR 技术是以 PCR 技术(指聚合酶链式反应技术)为基础,将荧光能量传递技术融入到了 PCR 仪器的应用中,利用反应体系中荧光染料或荧光基因的显示,观测模板浓度变化,借此实现对未知模板浓度的预测。该技术实现了对 PCR 的优化和提升,既解决了 PCR 污染环境的问题,同时也提升了其特异性和自动化水平^[5-6]。唐凤^[7]等利用实时荧光定量 PCR 技术建立了乌鲁木齐 10 号冷泉泉水细菌群落的定量分析体系。王彦伟^[8]等利用 DGGE 及 Real-Time PCR 技术对不同地区低温沼气池中沼泥行进行发酵前期、后期产甲烷古菌群落变化进行了研究。本研究利用这些技术可以研究发现沼气发酵过程中不同阶段产甲烷微生物群落的种类随着料液浓度和 pH 值变化的规律。本文应用实时荧光定量 PCR 技术,对低温下(15℃)牛粪沼气反应器中添加的 AP 菌发酵样品进行定量分析,为低温沼气过程中添加促进菌剂的相关作用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 培养基制备

(1) FC2 液体培养基制备称取酵母膏 2.5 g,蛋白胨 1.5 g, Na₂HPO₃ 1.0 g,蔗糖 10 g,置于 1.0 L 的三角烧瓶中,加去离子水 500 mL,调至 pH 值为 7.0

左右,高压灭菌,备用。

(2) 实验室自筛菌株液体培养基制备:将 AP 菌在无菌操作台接种于已经灭菌后的 FC2 液体培养基中,120 rpm,30℃培养 24 h,备用。

1.1.2 实验药品与仪器

酵母膏,蛋白胨,Na₂HPO₃,蔗糖,2 × Taq PCR MasterMix,罗氏荧光定量试剂盒,所用水为去离子水。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计

称取自然晾干,粉碎后的牛粪 240 g 分别装于 2 L 发酵瓶中,再分别加入自筛促进菌剂配伍,按照以下配伍添加:配伍 I(1 g 固体 ZHC);配伍 II(5 g 固体 ZHC);配伍 III(2.0 g 固体酱渣 + Fe³⁺:Ni²⁺ 0.1:0.02 mg·L⁻¹);配伍 IV(5 mL 液体 ZHC 菌);配伍 V(Fe³⁺:Ni²⁺ 0.1:0.02 mg·L⁻¹);配伍 VI(1 mL 液体 ZHC 菌 + Fe³⁺:Ni²⁺ 0.1:0.02 mg·L⁻¹);配伍 VII(5 mL 液体 ZHC 菌 + Fe³⁺:Ni²⁺ 0.1:0.02 mg·L⁻¹)。最后加水至 1500 g,混匀,连接集气装置,制备模拟沼气发酵罐,置于 15℃恒温培养,CK1 为 15℃空白对照(不添加任何外源物),CK2 为 30℃空白对照(不添加任何外源物)。在发酵过程中,分别在发酵第 0 天、30 天、60 天、180 天取 50 mL 发酵沼液样品进行后续分析。本研究试验于新疆特殊环境微生物重点实验室进行。

表 1 样品处理表

处理组	处理温度	菌剂的组成
1	15℃	配伍 I
2	15℃	配伍 II
3	15℃	配伍 III
4	15℃	配伍 IV
5	15℃	配伍 V
6	15℃	配伍 VI
7	15℃	配伍 VII
CK1	15℃(对照)	空白对照
CK2	30℃(对照)	空白对照

1.2.2 日产气量的测定

产气量的测定采用液压原理,当反应装置的压力过大时,会迫使装满水的容器中的水溶液移至到另一空瓶中,每隔 24 h 测量量筒水的体积即为相对日产气量,连续测量 180 d 以上。

1.2.3 总 DNA 的提取

沼液总 DNA 提取方法参考张琳^[9] 等和陈竞^[10] 等。

1.2.4 AP 菌荧光定量目标片段 PCR 分析及优化

分别以 AP 菌 16S rDNA 序列为模板,设计荧光定量 PCR 引物分别为 AC5: CCTGGCTCATTACT-GACG, AC4: AGCCCTGGTAAGGTTCTGC; 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

优化的 PCR 反应条件以及反应体系如下: 50 μL 的体系, 24 μL PCR mix, 23 μL dd H_2O , 1 μL DNA 模板, 引物 1 μL (F-primer 和 R-primer 各 1 μL)。

反应程序为预变性 90 度, 变性 94 度 10 s, 退火 55 度 45 s, 延伸 72 度 10 s, 35 个循环。

1.2.5 AP 菌 16S rDNA 片段荧光定量 PCR 标准品制备

将单一目标条带 DNA 进行切胶回收, 用上海生化有限公司的琼脂凝胶 DNA 回收试剂盒切胶回收。回收得到的目标 PCR 产物使用上海生工提供的 DNA 克隆载体试剂盒进行 T 载体连接, 然后用热激法转化到感受态细胞 (*E. coli* DH5 α) 上, 并涂布到含有氨苄青霉素 ($\text{AMP } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 固体培养基上。挑取阳性菌落进行 PCR 扩增, 反应条件及体系与 PCR 优化体系一致, 1% 凝胶电泳检测, 确定重组质粒构建成功。挑取阳性菌落接种于含有氨苄青霉素 ($\text{AMP } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡, 培养过夜。使用上海生物工程公司质粒提试剂盒进行质粒提取, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。测定克隆子质粒的 OD (260 nm), 计算其拷贝数, 然后作梯度稀释, 稀释的各浓度为: 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} , 作为荧光定量 PCR 的标准品。

1.2.6 样品 DNA AP 菌密度定量

用超微量微孔板分光光度计分别测定阳性重组质粒于 260 nm 和 280 nm 处的吸光度, 并计算重组质粒的含量和纯度。将重组质粒进行 10 倍梯度稀释。使用 20 μL 的实时定量 PCR 的反应体系: 1 μL 模板 DNA, 17 μL SYBR Premix Ex Tap (Light Cycler 480 试剂盒), 引物各 1 μL 。同时设立阴性对照。Real-Time PCR 定量扩增仪型号为 Light Cycler 480II。

2 结果与分析

2.1 产气量分析结果

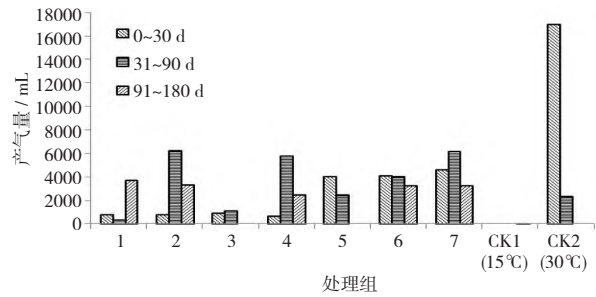


图1 不同处理不同阶段产气量

由图1所示,在发酵0~30 d中,CK2(30 $^{\circ}\text{C}$)产气量明显高于其他处理组,且产气量达到16990 mL;在发酵31~90 d中,在15 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下,明显看出样品2>样品7>样品4>其他样品组,且产气量分别为6195 mL,6113 mL,5723 mL;在发酵180 d内,在相同发酵条件下样品7总产气量最高,达到13915 mL。

2.2 沼液样品总 DNA 提取纯化结果

提取样品总 DNA 结果见图2。提取 DNA 片段大小约为 20 kb 以上,目标条带清晰,可进行下一步实验。

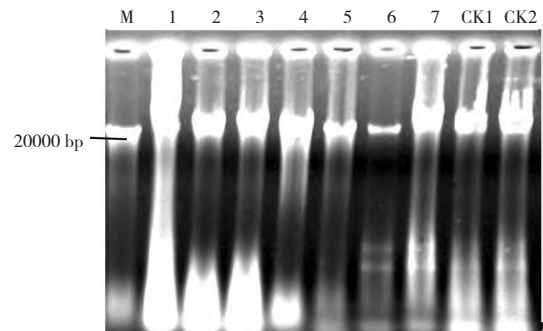


图2 样品总 DNA 电泳图

2.3 AP 菌目标条带的质粒制备

如图3所示,为 PUC19 + 引物 AC45 扩增条带转化后所提质粒,可从大小上判断出 1、2、4、5、6、

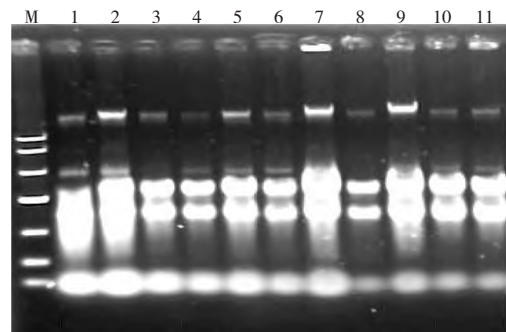
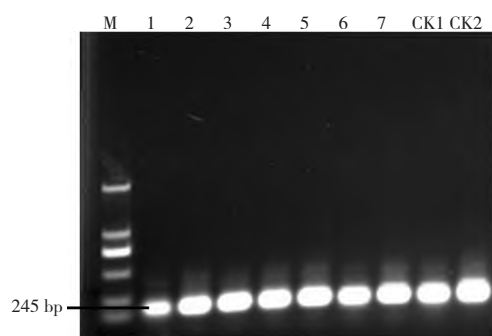


图3 巴氏德醋杆菌质粒电泳筛选结果

10、11 号质粒为阳性克隆,随机挑取阳性质粒进行 PCR,其产物用琼脂糖电泳检测,阳性重组质粒经 PCR 后,得到 245bp 的条带,反应条件及体系与 PCR 优化体系一致,再次将所扩增的条带进行测序验证,确定重组质粒构建成功,以备后续试验。

2.4 不同处理样品总 DNA 巴氏德醋杆菌荧光条带的 PCR 扩增优化结果

以纯化的样品总 DNA 为模板,进行巴氏德醋杆菌荧光条带的 PCR 扩增,Maker 为 2000 bp,获得 PCR 产物约为 245 bp,与预计大小一致。经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,与目的条带一致,可进行后续 Real-Time PCR 试验(见图 4)。



注:其中 1~7 分别为添加配伍 I、配伍 II、配伍 III、配伍 IV、配伍 V、配伍 VI 和配伍 VII 样品,CK1 为 15℃ 空白对照,CK2 为 30℃ 空白对照,Maker 为 2000 bp。

图 4 巴氏德醋杆菌荧光定量 PCR 产物优化电泳图

2.5 AP 菌 16S rDNA 片段荧光定量 PCR 标准品制备

测定阳性克隆子质粒的在 260 nm 下的 OD 值,计算其拷贝数,然后作梯度稀释,选取稀释度为: 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,作为标准样品进行荧光定量 PCR 扩增,结果显示绘制的扩增曲线,各样品平行间所测定的 C_p 差异 < 0.5 bp(C_p 值是指在实时监测过程的荧光信号达到指数扩增时

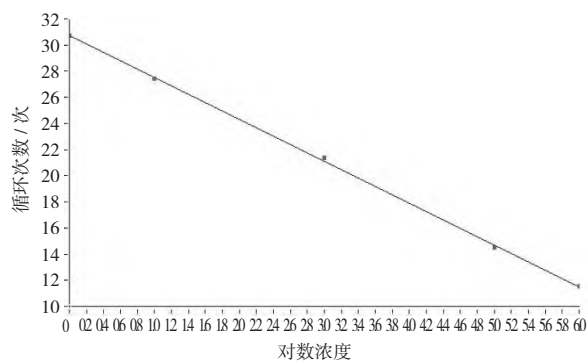


图 5 AP 菌的 Real-Time PCR 标准曲线

的循环周期数),说明样品平行间一致性较好,且每个稀释梯度样品较分明,可信度较高。将标准品放入荧光定量 PCR 体系中进行扩增,得标准曲线。回归方程为 $y = -3.024x + 30.73$,误差为 0.0680(见图 5)。

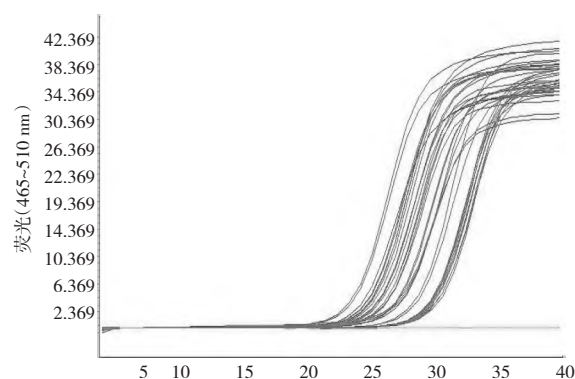


图 6 AP 菌样品 DNA Real-Time PCR 扩增曲线图

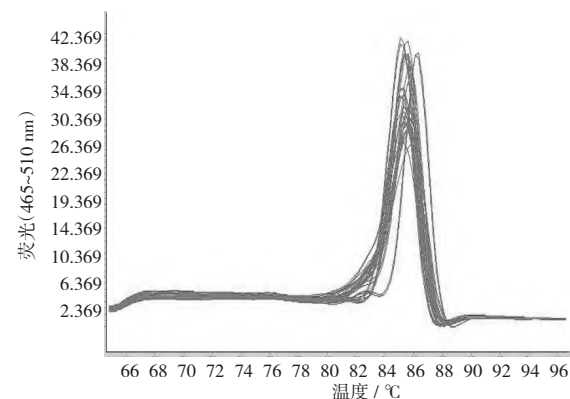


图 7 样品 DNA 溶解曲线图

巴氏德醋杆菌 (*Acetobacter pasteurianum*) 样品 DNA Real-Time PCR 扩增,每个样品 DNA 做 3 个重复, C_p 值相近,表明重复性较好(见图 6)。溶解曲线均为单峰,进一步证明标准曲线的准确可靠(见图 7)。

2.6 不同处理样品 DNA AP 菌 16S rDNA 基因的拷贝数结果

利用实时定量 PCR 的方法测定沼气发酵中 AP 菌的浓度,结果显示不同样品处理下,最高基因的拷贝数(Conc)为 $1.83 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。定量结果显示:配伍 II(5 g 固体 ZHC)、配伍 IV(5 mL 液体 ZHC 菌)和配伍 VII(5 mL 液体 ZHC 菌 + Fe^{3+} : Ni^{2+} 0.1:0.02 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理后,AP 菌的浓度较其他处理浓度较高,Conc 分别为 $41.83 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $33.77 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $31.93 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,Conc 分别比 15℃ 对照组高出 90%、54% 和 45.6%(见表 2)。

表2 AP 菌的 Real-Time PCR 扩增定量结果

样品号	Cp 值	Conc / (fg·μL ⁻¹)
1	25.86	24.73
2	24.37	41.83
3	23.99	30.4
4	24.86	33.77
5	26.08	23.37
6	27.64	20.1
7	24.46	31.93
CK1(15℃)	25.01	21.93
CK2(30℃)	29.23	24.6

3 讨论

(1) 在近年的研究中,细菌纤维素产生菌研究最多、产量最高的细菌是产醋酸的 AP 菌,并且 AP 菌已经被作为细菌纤维素基础和应用研究的模拟微生物^[11-13]。目前,醋酸杆菌发酵生产纤维素的研究仍然存在着许多的问题,但是具有较好的发展前景,应当在后续的试验中,加强相关研究和探讨。

(2) 沼气发酵过程中,主要分为 3 个阶段:水解和发酵阶段、产氢产乙酸阶段和产甲烷阶段。在沼气发酵第 1 阶段水解和发酵阶段中,主要是使有机物中的一些纤维素物质进行水解,给下一反应阶段提供大量的发酵底物,而 AP 菌在这一阶段中,可以产生大量的纤维素物质,为其提供大量的发酵底物,使沼气发酵可以更加顺利快速地完成^[14]。

(3) 本试验中,在发酵 31~90 d 中,可以看出产气量的大小是样品 2 > 样品 7 > 样品 4 > 其他样品组,同时这一阶段中,AP 菌 16S rDNA 基因拷贝数依次为 41.83 fg·μL⁻¹、33.77 fg·μL⁻¹ 和 31.93 fg·μL⁻¹。相较于其他处理组,AP 菌 16S rDNA 基因拷贝数均较高,可以初步看出,在添加 AP 菌后,牛粪低温沼气发酵过程中,AP 菌 16S rDNA 基因拷贝数越高,则发酵产气量也越高。AP 菌具有氧化乙醇生成乙酸的能力,为沼气发酵中期,产氢产乙酸细菌利用第 1 阶段合成的有机酸,氧化分解成乙酸和分子氢提供有力保障,具有一定的应用价值。

4 结论

利用实时荧光定量 PCR 技术监测添加 AP 菌的数量变化,对后续的低温沼气发酵促进菌剂的研究有着重要的意义。在后续的相关研究中结合其他分子生物学方法可以更准确地研究沼气发酵中微生物

群落多样性的变化,为沼气发酵促进菌剂的筛选和制备研究奠定理论基础,从而为北方地区冬季低温沼气发酵促进菌剂的筛选奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 陈竞. 纤维素产生菌—巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianum*) 发酵工艺优化及其对牛羊粪甲烷产量的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2014.
- [2] Lee C, Kim J, Shin S G, et al. Quantitative and qualitative transitions of methanogen community structure during the batch anaerobic digestion of cheese-processing wastewater [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87950: 1963 - 1973.
- [3] 王刘阳,尹小波,胡国全. 分子生物学技术在产甲烷古菌研究中的应用[J]. *中国沼气*, 2008, 26(1): 19 - 24.
- [4] 宋金龙,阮志勇,胡国全,等. 沼泥及其富集物中微生物多样性和区系变化的分析[J]. *中国沼气*, 2010, 28(2): 3 - 11.
- [5] 吕欣,李笑. 荧光定量 PCR 技术在环境微生物检测中的应用[J]. *清洗世界*, 2021, 37(11): 40 - 41.
- [6] 张月玲,马涛,庞世超,等. 临床微生物检测中荧光定量 PCR 技术的应用研究[J]. *航空航天医学杂志*, 2021, 32(01): 58 - 59.
- [7] 唐凤,史应武,李萍,等. 乌鲁木齐 10 号冷泉细菌群落密度实施荧光定量 PCR 检测体系的建立[J]. *新疆农业科学*, 2015, 52(10): 1872 - 1877.
- [8] 王彦伟,徐凤花,阮志勇,等. 用 DGGE 和 Real-Time PCR 对低温沼气池中产甲烷古菌群落的研究[J]. *中国沼气*, 2012, 30(1): 8 - 12.
- [9] 张琳,熊格生,吴莎莎,等. 沼气池污泥微生物总 DNA 提取方法的比较[J]. *激光生物学报*, 2011, 20(6): 847 - 853.
- [10] 陈竞,冯蕾,杨新平,等. 羊粪沼液微生物总 DNA 提取方法优化比较研究[J]. *新疆农业科学*, 2013, 50(12): 2280 - 2285.
- [11] 孙东平,徐军,周伶俐. 醋酸杆菌发酵生产细菌纤维素的研究进展[J]. *生物学*, 2004, (21): 8.
- [12] Lo Y C, Saratale G D, Chen W M, et al. Isolation of Cellulosehydrolytic Bacteria and Applications of the Cellulolytic Enzymes for Cellulosic Biohydrogen Production [J]. *Enzyme Microbial Technology*, 2009, 44(6-7): 417 - 425.
- [13] 王刘阳,尹小波,胡国全. 分子生物学技术在产甲烷古菌研究中的应用[J]. *中国沼气*, 2008, 26(1): 19 - 24.
- [14] 赵兴青,杨柳燕,陈灿,等. 基于不同引物的湖泊沉积物中细菌群落结构多样性的比较研究[J]. *南京大学学报*, 2008, 44(3): 289 - 296.