

三株新型发酵产氢菌的分离 和不同发酵条件下产氢性能的比较

陈 瑛^{1,2}, 任南琪¹, 程 瑶¹, 李永峰¹, 张大维²

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 哈尔滨 150090; 2. 哈尔滨师范大学 生物系, 哈尔滨 150080)

摘 要: 氢能是理想的清洁能源, 生物制氢技术的研究和开发已成为当前一个研究热点。许多细菌在厌氧条件下发酵复杂的有机化合物, 同时产生 H_2 。本文选择了来自同一活性污泥样品的 3 株有较高产氢能力的发酵细菌, 采用生化和电镜技术对其形态学特征进行了观察比较, 并进一步比较研究了在不同 pH 值条件下, 它们产氢量、细菌生长量、液相发酵产物组成的变化和差异。获得了三株产氢菌的单位体积培养基最大累积产氢量, 提出了纯培养生物制氢的最佳条件, 为混合培养生物制氢强化工艺提供参考。

关键词: 生物制氢; 发酵条件; 产氢微生物

中图分类号: X703

文献标识码: A

文章编号: 1001-7119(2008)01-0133-05

Isolation of Three Novel Fermentative H_2 -Producing Bacteria and Comparison of Their H_2 -Producing Ability under Different Conditions

CHEN Ying^{1,2}, REN Nanqi¹, CHENG Yao¹, LI Yongfeng¹, ZHANG Dawei²

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

2. Department of Biology, Harbin Normal University, Harbin 150080, China)

Abstract: Hydrogen gas is perfect and clean energy. The study of biohydrogen producing techniques has been a hot spot today. Under anaerobic condition, many bacteria can ferment complex organic compound to generate hydrogen gas. In this paper, three novel fermentative hydrogen producing bacteria isolated from an active sludge sample were chose to compare and observe their morphology characteristics by methods of biochemistry and electronic microscope. Furthermore, the variations and differences of cumulative production of hydrogen gas, density of bacteria and end liquid products were studied under different pH conditions. Their maximum cumulative H_2 -producing quantities of unit volume substrate were achieved and the optimum of biohydrogen process by pure culture was suggested to offer references for intensifying biohydrogen process by mixed culture.

Key words: biohydrogen production; fermentative condition; H_2 -producing bacteria

生物制氢技术的核心原理就是利用一些生

理代谢过程中能够产生氢气的微生物制取氢

收稿日期: 2006-08-04

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(50125823); 国家 863 项目(2006AA05Z109)

作者简介: 陈瑛(1972-), 女, 哈尔滨市人, 博士研究生, 研究方向: 生物制氢, E-mail: lh6666@126.com

气。许多微生物在代谢过程中可产生氢气,其中就有依靠发酵过程而生长的严格厌氧菌。这类细菌在厌氧条件下分解复杂的有机化合物,发酵糖、醇、有机酸的同时产生 H_2 ^[1]。而这些发酵细菌中很多都是废水产酸发酵处理过程的主角。因此可以利用废水发酵处理过程制氢,实现废物资源化。

任南琪和王宝贞就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,丙酸型发酵之外的新的乙醇型发酵^[2,3]。乙醇型发酵产物以乙酸、乙醇为主,发酵气体中含有大量的 H_2 。无论从产氢量还是为产甲烷相提供底物方面考虑,乙醇型发酵均有较高的优越性。进一步研究表明,存在一类特殊的乙醇型发酵产氢细菌^[4,5],它们的液相末端产物以乙酸、乙醇为主,气相末端产物中氢气的含量很高。它们有特定的生态位,其生长和代谢活动对反应器发酵类型有重要影响,对生物制氢工艺研究也具有重要意义,因此,有必要对其产氢性能进行深入的研究。

1 材料方法

1.1 发酵产氢细菌的分离和筛选

本实验所用菌株是取乙醇型发酵活性污泥样品,用 Hungate 技术^[6]进行分离培养所获得的。采用上海分析仪器厂的 GC122 型气相色谱仪对分离菌株的液相末端产物进行了测定,选出 32 株乙醇型发酵细菌。再用 SC- 型气相色谱仪对它们的气相末端产物进行测定,筛选出 5 株产氢细菌。选择其中产氢能力较高且产氢性能稳定的 3 株细菌,即 C3、C9、C12 菌株进行比较研究。

1.2 细菌形态学特征分析

细菌的形态特征分析,参照东秀珠《常见细菌系统鉴定手册》^[7]和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[8]的方法。具体项目见表 1。

透射电镜样本的制作:吸取菌悬液一滴,置蜡版上,用带有 FORMVAR 膜的铜网吸附样品后,置磷钨酸染色液中染色 3 min,置无尘阴凉处干燥,待达到一定强度后将其放在 JEOL-1200 透射电镜下观察并照相。

1.3 产氢性能研究

间歇实验装置如图 1 所示。装置中 ① 为发酵产氢细菌厌氧培养瓶,其中有事先配好的一定 pH 值的液体培养基 50 mL; ② 为平衡瓶; ③ 为产氢量计量器; ④ 为取样口和氮气冲洗口; ⑤ 为气体取样口。用导管将 ①、② 与 ③ 连接,并保证整个系统完全密封。将 ① 和 ② 中装一定量的水,并使二者液面等高。将实验菌株接种于厌氧培养瓶 ① 中,并置于 (35 ± 1) 恒温摇床,振荡培养。

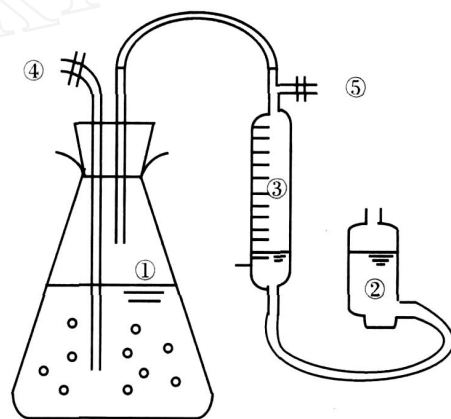


图 1 发酵制氢间歇实验装置

Fig. 1 Batch H_2 -producing fermentation apparatus

培养 60~70 h 后,通过读取 ③ 中排开的水量,可得出该菌株在一定 pH 值下这一时间段的总产气量,再计算出氢气累计产量。然后测定此时的菌浊和液相末端产物,以进行对比研究。

2 结果与讨论

根据以往的报道,在培养基成分和培养温度一定的条件下,影响乙醇型发酵产氢细菌产氢能力的因子主要是 pH 值^[9]。因此,本实验主要考察、比较了在 pH 4.0~6.5 这一酸性发酵范围内 3 株细菌的产氢量和细胞生长量的变化,以及 pH 值对细菌代谢液相末端产物的影响。

2.1 三株产氢菌形态特征比较

透射电镜照片如图 2。三株产乙醇产氢细菌 C3、C12、C9 的形态基本相似,均为杆状。

可见数目不定的鞭毛。C12 菌株集群现象明显,C3、C9 菌株则多为分散生长。

进一步鉴定发现 3 株菌革兰氏染色为阳性,鞭毛为周生或端生,具有运动性并有荚膜等共同特征,具体结果见表 1。

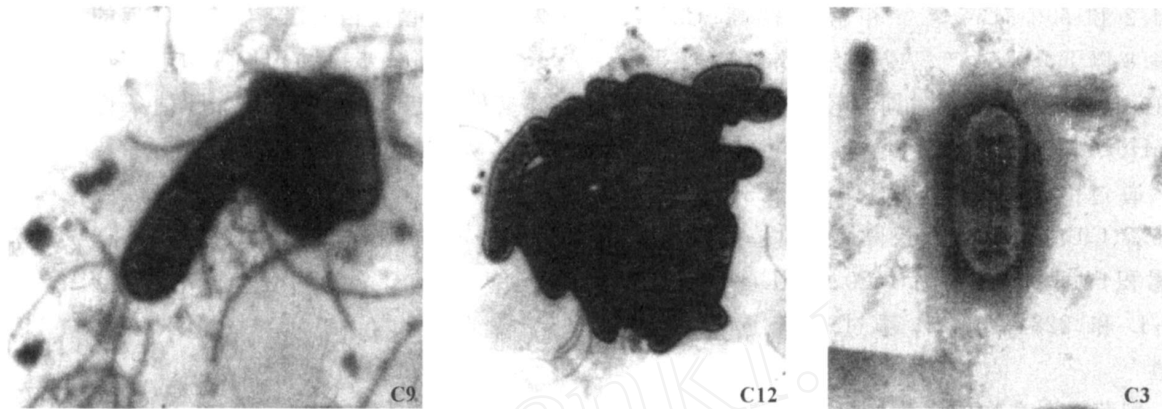


图 2 三株发酵产氢菌电子显微镜照片(放大倍数:C9、C3 为 2×10^4 ,C12 为 1.5×10^4)
Fig. 2 Electronic microscope photos of three fermentative hydrogen producing bacteria
(magnification: strainC9、C3 were 2×10^4 ,strainC12 was 1.5×10^4)

表 1 产氢细菌 C3、C12、C9 的形态特征

Table1 The morphology characteristics of strain C3、C12、C9

形态特征	C3	C12	C9
革兰氏染色	G ⁺	G ⁺	G ⁺
鞭毛	周生/ 端生/ 周生	周生/ 端生/ 周生	周生/ 端生/ 周生
运动性	+	+	+
芽孢	-	-	-
荚膜	+	+	+
细胞壁染色	+	+	+
异染粒	2~3	2~3	2~3
类脂粒	4~6	4~6	4~6
伴胞晶体	-	-	-
抗酸染色	-	-	-
细胞生长	单胞或集结生长	单胞或集结生长	单胞生长
细菌形态	长杆状	细长杆状	规则杆状
0.3~0.5 μm ×1.5~2.0 μm 0.3~0.5 μm ×1.5~3.0 μm 0.3~0.4 μm ×1.0~5.5 μm			

C3、C12、C9 这三株产氢细菌不仅形态特征高度相似,代谢产物成分也相似,均以乙醇、乙酸为主,同时产生大量氢气,这使其有别于传统的产大量丁酸和丙酸的发酵产氢菌。

2.2 三株产氢菌产氢量与 pH 值的关系

实验分成 C3、C12、C9 三组,每组不同 pH 值设置 3 个重复实验样品,进行平行实验,取其平均值作为每个菌株特定 pH 值下的累积氢气产量。结果见图 3。

C9 菌株在 pH4.4 时累计产氢最多,在 pH5.6、6.5 时产氢量也较高,而在 pH4.0 时无氢气产生,pH4.8 时只有微量氢气产生;C12 在

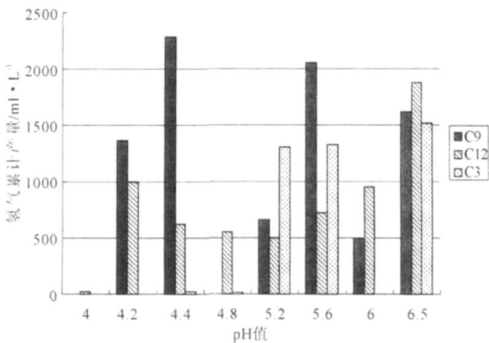


图 3 pH 值对三株产氢菌累积产氢量的影响

Fig.3 Effects of pH on cumulative H₂-production of three bacteria

各 pH 值均产氢,在 pH6.5 时产氢量最高,在

pH 4.2 和 6.0 时产氢量相似且较高; C3 在 pH 4.8 以下几乎不产氢或只有微量氢气产生, 而在 pH 5.2、5.6、6.5 时均有较高产氢量, 但是在 pH 6.0 时却没有产氢。

通过计算可知, 本实验中 C3、C12 在 pH 6.5、C9 在 pH 4.4 时获得最大单位体积培养基累积产氢量, 分别为 1520.8 mL/L、1881.8 mL/L 和 2284 mL/L, 超过或接近以往的报道^[4,9]。

细菌代谢产物的累积产量与细菌生长量密切相关, 因此, 本实验也测定了每个样品的菌浊。仍然取 3 个重复样品的平均值作为最终结果, 并换算成细胞浓度, 见图 4。

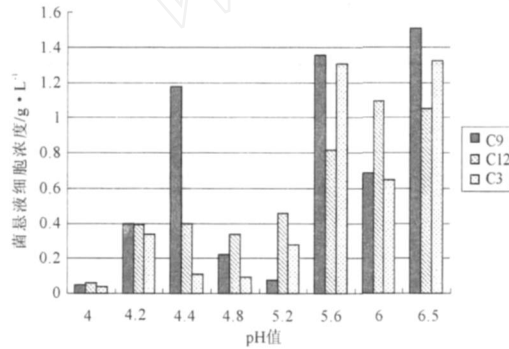


图 4 pH 值对三株产氢菌生长量的影响
Fig. 4 Effects of pH on cell density of three strains

C9 菌株在 pH 4.4、5.6、6.5 时生长较好, 但在产氢量最多的 pH 4.4 条件下, 其生长量并不是最大; C12 在 pH 5.6 和 6.5 时细胞浓度高, 而在产氢量相似的 pH 6.0 和 pH 4.2 条件下, 生长量却存在明显差异。其在 pH 6.0 时的氢气累积产量略低于 pH 4.2 时的产量, 但是生长量却相反, pH 6.0 时的细胞浓度远高于 pH 4.2 时的细胞浓度; C3 除了在产氢较高的 pH 5.6、6.5 时生长良好外, 在无氢气产生的 pH 4.2、6.0 条件下仍有较多的生长。

从上述结果可以看出, 在 pH 值影响下, 这三株产氢菌普遍存在产氢量与细菌细胞生长量并不平衡变化的情况。这说明 pH 值对这三株产乙醇产氢菌产氢量的调控, 除了影响其生长外, 还存在其它机制。很可能是 pH 值的改变使细菌的生理生化反应发生了变化, 从而影响了代谢产物之一的氢气的产量。同时也应伴随其他代谢产物的改变。

2.3 产氢菌液相末端产物与 pH 值的关系

为了进一步探讨 pH 值影响产氢量的原因, 本实验测定了 3 株菌不同 pH 值条件下液相末端产物组成, 结果如图 5、6、7 所示。

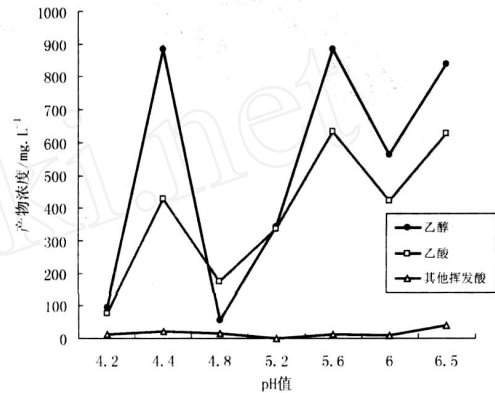


图 5 pH 值对 C9 菌株液相末端产物的影响
Fig. 5 Effects of pH on end liquid products of strain C9

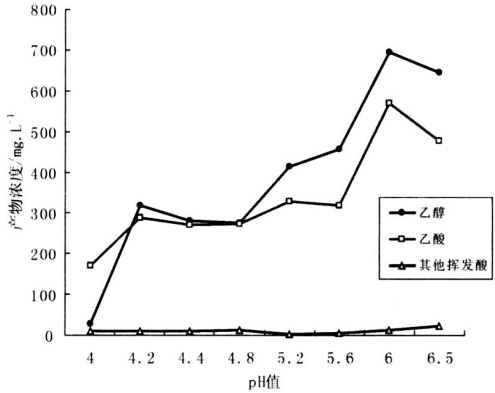


图 6 pH 值对 C12 菌株液相末端产物的影响
Fig. 6 Effects of pH on end liquid products of strain C12

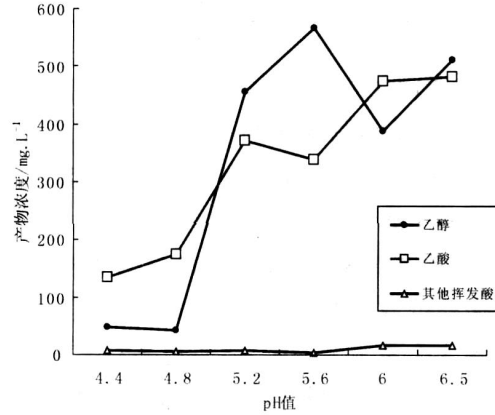


图 7 pH 值对 C3 菌株液相末端产物的影响
Fig. 7 Effects of pH on end liquid products of strain C3

从实验结果可以看出三株细菌液相末端产

物始终以乙醇和乙酸为主,但在不同 pH 值条件下二者含量的比值有较大差异。这种差异与氢气的产量有密切关系。

表现为:当乙醇/乙酸比值大于 1 时,产氢量也较高;当乙醇/乙酸比值接近或小于 1 时,氢气产量明显下降,甚至不产生氢气。例如:菌株 C9,在 pH 4.8 时乙醇/乙酸比值为 0.32,此时 C9 没有产氢,而在其他 pH 值时乙醇/乙酸均大于 1,产氢量也较高;菌株 C12 在 pH 4.0 时乙醇/乙酸的比值为 0.17,仅有微量氢气产生,之后随着 pH 升高,乙醇含量增加,氢气产量也呈递增趋势;菌株 C3 在 pH 4.4、4.8、6.0 时乙醇/乙酸的比值均小于 1,其对应氢气产量极低或为零,而在乙醇/乙酸大于 1 的 pH 5.2、5.6、6.5 时,产氢量则较高。这说明乙醇型发酵产氢细菌代谢产物中乙醇含量与氢气含量呈正相关关系。可能在此类产氢细菌内存在一条新的生化代谢途径或电子传递链,使其在代谢产生乙醇的同时也产生大量氢气。这还有待于进一步研究。

3 结论

pH 值通过影响细菌的生理代谢功能,一方面影响它们的生长量,另一方面影响其代谢产物组成。但是,这两方面的变化是受不同机制或代谢途径调控的,因而二者出现了差异。

在纯培养生物制氢工艺中,考虑到连续流运行反应器的稳定性和菌种流失的发生,应选择产氢量和细菌生长量均良好的调控条件,同时应尽可能减少维持这一条件的运行成本。因此,建议这三株产氢细菌在 35 ± 1 时的纯培养制氢最适 pH 值是: C9 为 pH 4.4, C12 为 pH 6.0, C3 为 pH 5.6。

对于混合培养生物制氢强化工艺,首先要考虑菌种的孵化。孵化器应选择能够使菌种快速大量生长的 pH 条件,而产氢的最佳 pH 可暂不考虑。制氢反应器的运行条件,既要能够维持稳定的乙醇型发酵,又要保证较高的产氢量,并尽量降低运行成本,其 pH 值的选择可参照纯培养的最佳值,再根据实际运行情况作适当的调整。

参考文献:

- [1] 任南琪,李建政,林明,等. 产酸发酵细菌产氢机理探讨[J]. 太阳能学报, 2002, 23(1): 124 - 127.
- [2] Ren Nan-qi, Wang Bao-zhen, Ma Fang. Hydrogen bio-production of carbohydrate fermentation by anaerobic activated sludge process[J]. Proc. Water Environ. L Fed. Annu. Conf. Expo. 68th, 1995 (1): 145 - 153.
- [3] 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.
- [4] 任南琪,林明,马汐萍,等. 厌氧高效产氢细菌的筛选及其耐酸性的研究[J]. 太阳能学报, 2003, 24(1): 80 - 84.
- [5] Hungate RE. Methods in Microbiology[M]. New York: Academic press, 1969: 117 - 132.
- [6] Li Y F, Ren N Q, Wang A J, et al. The molecular characterization and hydrogen production of a new species of biohydrogen production anaerobe [J]. Journal of Environmental Science and Health, Part A. 2005, 40(10): 1929 - 1938.
- [7] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [9] 李永峰,李建政,任南琪,等. 底物与 pH 值对菌株 *Clostridium R33* sp. nov. 产氢能力的影响[J]. 化工学报, 2004, 55: 119 - 121.