

三株新型发酵产氢菌生物学特征鉴定与比较

陈 瑛^{1,2}, 任南琪¹, 李永峰¹, 张大维², 程 瑶¹

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

摘 要 比较了三株发酵产氢细菌的形态和生理生化特征, 分析了它们的 16S rDNA 序列系统发育关系, 并测定了它们的产氢量和液相发酵产物。认为它们同属于一类新的发酵产氢菌属, 其液相产物以乙醇和乙酸为主, 在一定的培养条件下可获得较高产氢量。此外, 对该类细菌的某些共同的生物学特征也作了描述。

关键词: 生物制氢; 发酵微生物; 产氢细菌; 16S rDNA 全序列; 系统发育树

当今全球环境污染严重, 自然资源日趋枯竭, 以新的清洁、环保型能源代替传统的石油、煤等能源物质, 实现人类的可持续发展, 已经成为当务之急。氢气因其燃烧产物为水, 且无毒、无味而成为理想能源的代表。对于氢气制取技术的研究也成为一个研究热点。其中, 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的生物制氢技术备受人们的青睐。产氢微生物主要分为两个类群: 光合生物和发酵产氢细菌。以发酵产氢细菌为对象的发酵法生物制氢技术因其本身的多种优点越来越受到重视。国内外研究者分离了大量的发酵菌, 以期找到有理想产氢能力的菌种。这些被分离到的发酵产氢菌基本属于梭菌属和肠杆菌属^[1]。

任南琪和王宝贞进行有机废水发酵法生物制氢技术研究时, 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]。并分离到一类特殊的乙醇型发酵产氢细菌^[4]。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。它们有特定的最适生长条件, 在生物制氢反应器中, 它们的生长量和代谢产物对整个制氢系统的调控有重要意义, 因此有必要对其产氢能力和生物学特征进行深入的研究。

1 材料和方法

1.1 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^[5]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、C12、C49 菌株进行比较研究。

1.2 产氢能力的研究

培养基采用林明的 LM-1 液体培养基^[6], 装置和方法参照文献^[4], 培养时间为 60 ~ 70h。

1.3 细菌生物学特征研究

细菌的生物学特征分析, 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 ~ 4。

扫描电镜样本的制作: 将样品置 2.5 % 戊二醛固定 2h, 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 清洗三次, 再用 1 % 锇酸固定 1h, 用配置锇酸的缓冲液清洗三次。30 % ~ 100 % 乙醇脱水, 乙酸异戊酯置换, HCP-2 临界点干燥, 镀膜, 观察照相。

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 3min, 置无尘阴凉处干燥, 待达到一定强度将其放在 JEOL-1200 透射电镜下观察并照相。

国家 863 计划项目 (2006AA05Z109)、国家杰出青年科学基金资助项目 (50125823)、国家重点基础研究发展规划资助项目 (G2000026402)。

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

2 结果与讨论

2.1 细菌培养特征和产氢能力

这三株产氢菌的培养特征如表 1 所示。它们均需严格厌氧条件,最适生长温度为 35 ±1 ,菌落形态相似。用液体培养基和间歇实验装置对三者的产氢量进行了测定,结果如图 1 所示。

表 1 产氢细菌培养特征

菌株	菌落形态	生长温度()	需氧性
C3	圆形、透明、凸起、乳白	30 ~ 35	-
C12	圆形、透明、凹型、乳白	30 ~ 35	-
C49	圆形、不透明、乳白	30 ~ 35	-

C49 在 pH4.4 时获得最大单位体积培养基累积产氢量 2284 mL/L ,C3、C12 在 pH6.5 时获得最大单位体积培养基累积产氢量分别为 1520.8mL/L、1881.8 mL/L ,超过或接近以往报道^[4,9]。

对于三株细菌的液相末端产物也进行了测定,结果显示三者发酵产生的挥发酸包括乙醇、乙酸、丙酸和丁酸等。其中,平均 95 %以上是乙醇和乙酸,

表 2 产氢细菌的形态特征

形态特征	C3	C12	C49
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
	0.3~0.5μm ×1.5~2.0μm	0.3~0.5μm ×1.5~3.0μm	0.3~0.4μm ×1.0~5.5μm

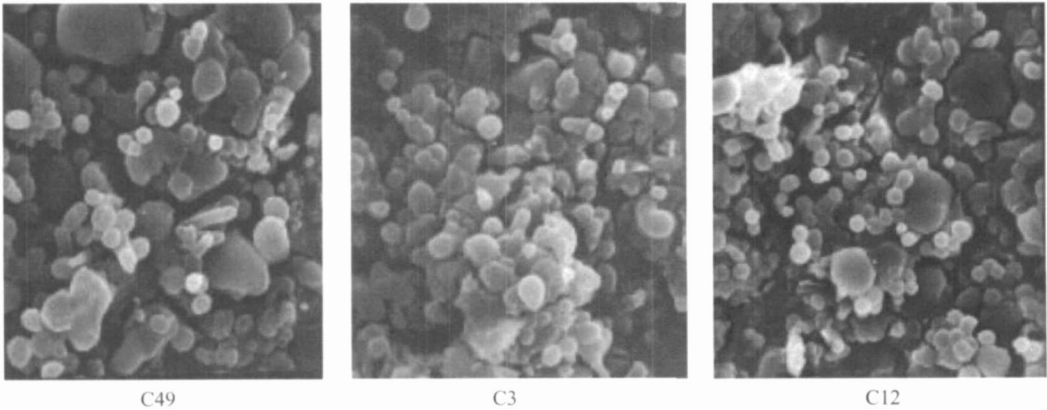


图 2 三株发酵产氢菌扫描电镜照片(放大倍数:5 ×10³)

而且二者的比值对产氢量有重要影响。

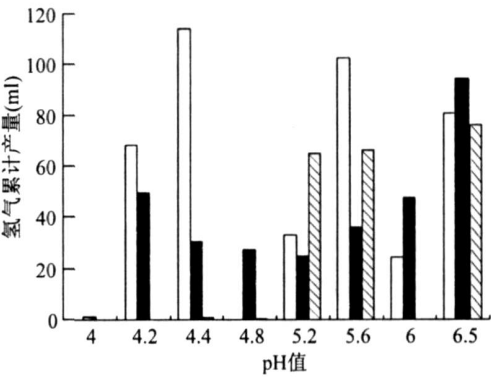


图 1 三株细菌在不同 pH 值条件下的累积产氢量

□ C49 ■ C12 ▨ C3

2.2 细菌的形态特征

从三株产氢细菌的电子显微镜照片(图 2、3)和形态特征鉴定结果(表 2)中可以看出,三株菌均为具有鞭毛的杆状菌,革兰氏染色阳性,有荚膜而无芽孢,其他的形态特征也基本相似。它们很可能属于一类产氢菌。

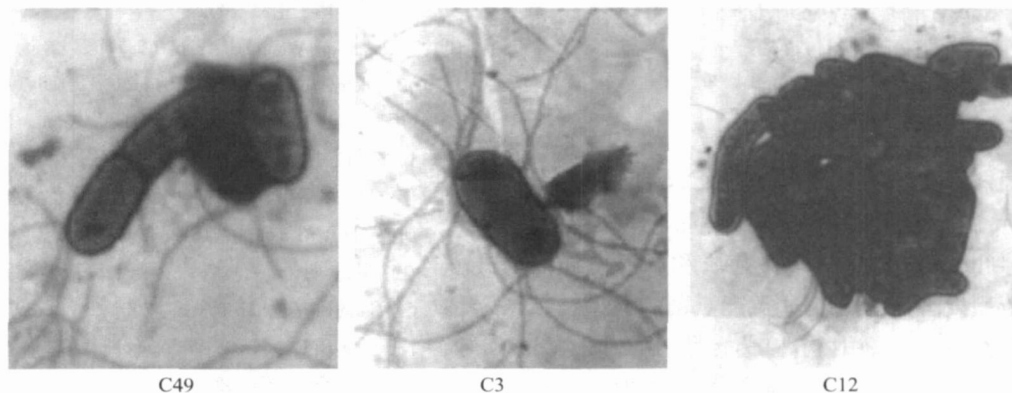


图 3 三株发酵产氢菌透射电镜照片(放大倍数:C49、C3 为 2×10^4 , C12 为 1.5×10^4)

在这三株细菌中, C3 和 C12 在一定条件下的液体培养基中有集结生长现象, 即所谓的自絮凝现象。可以利用这种自絮凝特征减少反应器运行中的菌种流失, 并在产氢废液排出时, 使污泥沉淀, 减少对环境的污染。

2.3 细菌生理和生化特征

三株新型发酵产氢菌对于碳源和氮源的利用情况见表 3, 生化特征见表 4。菌株 C3 和 C12 对碳源的利用基本一致, C49 与二者的区别是不能利用山梨醇、核糖醇和木糖醇。对氮源的利用差别较大, C3 不能利用硝态氮, C49 不能利用氨态氮, 而 C12 既不能利用硝态氮又不能利用氨态氮。在所鉴定的生化特征项目中, 它们表现为完全的一致性。都含有氧化酶, 能够氧化乙醇和乙酸, 甲基红和 V-P 测定为阳性; 都不能还原硝酸盐和进行反硝化反应, 不能分解淀粉和纤维素, 不产生硫化氢; 另外, 都能使明胶液化, 不含有接触酶。

表 3 产氢细菌碳源及氮源利用

菌株	碳源利用						氮源利用	
	葡萄糖	甘露糖	半乳糖	山梨醇	核糖醇	木糖醇	氨态氮	硝态氮
C3	+	+	+	+	-	+	+	-
C12	+	+	+	+	-	+	-	-
C49	+	+	+	-	-	-	-	+

表 4 产氢细菌生化特征

项目	C3	C12	C49	项目	C3	C12	C49
氧化酶	+	+	+	明胶液化	+	+	+
接触酶	-	-	-	硝酸盐还原	-	-	-
甲基红 (M. R)	+	+	+	反硝化	-	-	-
V-P 测定	+	+	+	乙醇氧化	+	+	+
淀粉水解	-	-	-	乙酸氧化	+	+	+
纤维素分解	-	-	-	硫化氢	-	-	-

对照《伯杰氏细菌鉴定手册》, 可以发现这三株菌的生理生化特征与梭菌属的某些菌种很相似, 但在形态上却没有芽孢形成。为了搞清它们是梭菌的一种, 还是梭菌以外的新种, 需要在分子水平上研究三者的进化地位和亲缘关系。

2.4 细菌的分类地位

细菌在分子水平上的分类研究, 目前普遍采用 16S rDNA 序列分析方法。本文中的三株产氢菌其 16S rDNA 序列均可从 NCBI 网站查到, 其登录号分别为 A Y363375 (C3), A Y332392 (C12) 和 A Y481148 (C49)。用 Clustalw 软件进行多序列比对, 生成进化树, 如图 4 所示。

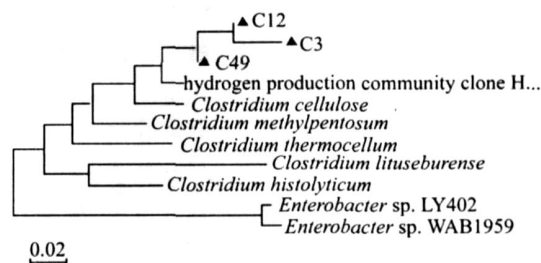


图 4 三株产氢菌 16S rDNA 全序列系统发育树状图

可以看出, 菌株 C49、C3、C12 亲缘关系很近, 基本属于同一菌属。它们与一株产氢菌最相似, 且与纤维素梭菌 (*Clostridium cellulose*) 进化地位接近, 同源性等于或低于 94 %。与肠杆菌的两株菌 *Enterobacter* sp. L Y402 和 *Enterobacter* sp. WAB 1959 亲缘关系较远, 同源性低于 91 %。一般细菌 16S rDNA 序列同源性低于 93 % ~ 95 % 时, 就可以认为分属不同的菌属。因此, 结合形态特征和生理生化

特征分析,本文中的三株产氢菌应同属于梭菌属和肠杆菌属之外的一个新的菌属。

3 小结

通过菌株 C49、C3、C12 的 16S rDNA 全序列系统发育分析,并结合形态特征和生理生化特征鉴定结果,可以判断三株菌应属于梭菌属和肠杆菌属之外的一类新型发酵产氢菌。这类产氢菌的典型特征之一是其液相发酵产物中 95 %以上为乙醇和乙酸。其生物学特征可描述为:革兰氏染色阳性的杆状菌,有鞭毛和荚膜而无芽孢,含有异染粒和类脂粒,有自絮凝现象。都能利用葡萄糖、甘露糖和半乳糖,不能分解核糖醇。含有氧化酶,可氧化乙醇和乙酸,不能还原硝酸盐,不能水解淀粉和纤维素。甲基红和 V-P 测定为阳性等。

三株产氢菌用 LM-1 液体培养基,35 °C 条件下,严格厌氧培养,可获得较大产氢量。其最适 pH 值分别为 pH4.4(C49)和 pH6.5(C3、C12)。

参 考 文 献

[1] 林明. 高效产氢发酵新菌种产氢机理及生态学研究. 哈尔滨

工业大学博士论文,2002:1~4

- [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. 中国沼气, 1997, 15(2):3~7
- [4] 任南琪, 林明, 马汐萍, 等. 一株厌氧高效产氢细菌的筛选及其耐酸性的研究. 太阳能学报, 2003, 24(1):80~84
- [5] Hungate R. E. Methods in Microbiology. New York: Academic Press, 1969:117-132
- [6] 林明, 任南琪, 王爱杰, 等. 产氢发酵细菌培养基的选择和改进. [J]. 哈尔滨工业大学学报, 2003, 35(4):398~402
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 《常见细菌系统鉴定手册》. 北京:科学出版社, 2001
- [8] 布坎南 R. E., 吉本斯 N. E. 《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版). 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. 化工学报, 2004, 55:119~121

Identification and comparison of biology characteristics among three novel fermentative hydrogen producing bacteria

CHEN Ying^{1,2}, REN Nan-qi¹, LI Yong-feng¹, ZHANG Da-wei², CHENG Yao¹

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

2. Department of Biology, Harbin Normal University, Harbin 150090, China)

Abstract The morphology, physiology and biochemistry characteristics of three fermentative hydrogen producing bacteria were compared. Furthermore, their phylogenetic tree derived from the full-length 16S rDNA sequence was analyzed, their hydrogen production and their liquid products were determined. It was suggested that these three bacteria belong to a new fermentative H₂-producing bacterium genus. Their liquid products included alcohol and acetic acid mainly. Under the given culture conditions, high hydrogen production could be achieved. At the same time some common biology characteristics of these bacteria were also described.

Key words biohydrogen production; fermentative microbe; H₂-producing bacterium; full-length 16S rDNA sequence; phylogenetic tree