第 24 卷 第 1 期
2003 年 2 月

太 阳 能 学 报
ACTA ENERGIAE SOLARIS SINICA

Vol. 24 ,No. 1
Feb. ,2003

文章编号:0254-0096(2003)01-0080-05

厌氧高效产氢细菌的筛选及其耐酸性研究

任南琪[1] ,林 明[1] ,马汐平[2] ,王爱杰[1] ,李建政[1]

(1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院,哈尔滨 150090;2. 辽宁大学环境科学系,沈阳 110036)

摘 要:采用厌氧 Hungate 技术,从生物制氢反应器厌氧活性污泥中分离到 18 株发酵产氢细菌,并从中优选出 1 株高效产氢细菌 B49。通过间歇试验,B49 获得最大比产氢速率 Q_{H2} 为 25.0mmol/ g ·h ,单位体积产氢量 Y_{H2} 为 1813.8mL/ L ,氢气含量为 64.15 %。B49 菌株为乙醇型发酵产氢细菌,具有良好的耐酸性,在 pH3.3 仍能生长。发酵产氢和细菌生长的最适 pH 值约为 3.9～4.2。

关键词:产氢;发酵细菌;乙醇型发酵;耐酸细菌

中图分类号:TK6 **文献标识码**:A

0 前 言

生物制氢技术作为可再生的清洁能源生产,在世界上已引起高度重视。微生物产氢机制分为两种类型:光合法生物制氢和发酵法生物制氢。提供充分的光能是光合微生物产氢的必要条件,由于光的穿透能力有限,若要提供足够的光源需要消耗大量的能源,更重要的是光源的维护与管理十分复杂,并且所占空间较大,使得实现产业化氢气生产难度很大。发酵微生物产氢有着无需光照,产氢稳定等优点[1～2],具有更为广阔的前景。

目前,发酵法生物制氢技术在国际上仍处于实验室研究阶段,究其原因,是因为人们将主要精力投入到光合产氢微生物的研究中。部分发酵产氢细菌产氢能力的研究[1,4～8]如表 1 所示。尽管大多数发酵产氢菌株的产氢率比光合微生物[8～13]要高,如阴沟肠杆菌 IIT-BT08 最大产氢速率为 29.63mmol/ g · h[8],但仍需进一步提高产氢能力。产氢细菌的丁酸型发酵的应用最为普遍,即在 pH > 6 条件下,发生以乙酸、丁酸、H_2 和 CO_2 为主要产物的产氢发酵,而任南琪[14]则利用了产氢细菌的乙醇型发酵。由于发酵产氢细菌产氢过程中主要副产物是有机酸,使得反应器内 pH 下降,抑制微生物产氢,因此常需采取一定方法调节 pH,这即不经济,又容易因失误而导致反应器生态系统受到破坏。所以,开展嗜酸或具有较强耐酸能力的产氢细菌研究是十分必要的。Yokoi[15]曾分离到 1 株较耐酸的产氢细菌(产气肠杆菌 HO-39),能在 pH4 条件下厌氧生长,而嗜酸产氢细菌的分离至今未见报道。

表 1 发酵产氢细菌的产氢能力比较

Table 1 Comparison of the hydrogen production ability of ferment hydrogen production bacteria

细菌的种属	细菌的代号	Q^a_{H2}	作者
待鉴定	No.5	2.28[b]	李白昆[4]
产气肠杆菌	E.82005	17	Tanisho S.[1]
丁酸梭菌	ND	7	Tanisho S.[1]
梭菌属	No.2	20.3[b]	Taguchi F.[5]
拜氏梭菌	AM21B	21.25[b]	Taguchi F.[6]
巴氏梭菌	ND	1.2[c]	James D.[7]
弗氏柠檬酸杆菌	ND	2.5[c]	James D.[7]
阴沟肠杆菌	IIT-BT08	29.63	Kumar N.[8]

a 单位为 mmol/ g ·h

b 经文献中其他数据计算而来

c 单位为 mmol/ g ·h ,biomass 在文献中没有查到其分析方法可能与 drycell 相同

针对上述问题,进行了高效产氢细菌的筛选工作,分离到一株有高效产氢能力的乙醇型发酵细菌,并进行了耐酸性的研究。

1 材料和方法

1.1 菌种来源和厌氧培养方法

菌种取自本实验室连续流生物制氢反应器内厌氧活性污泥。细菌培养中无菌水和培养基的制备和

收稿日期:2001-08-28

基金项目:国家“973”项目(G2000026402)

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

全部实验操作采用改进的 Hungate 厌氧技术[3],以高纯氮气为气相,用厌氧螺旋管装液体和固体培养基,35 ℃常规培养。

1.2　培养基

液体培养基(g/L):葡萄糖 20;胰蛋白胨 4;牛肉膏 2;酵母汁 1;NaCl 4;K_2HPO_4 1.5;$MgCl_2$ 0.1;$FeSO_4.7H_2O$ 0.1;L —半胱氨酸 0.5;发酵液 10ml;维生素液(钴铵素 0.01;抗坏血酸 0.025;核黄素 0.025;柠檬酸 0.02;吡多醛 0.05;叶酸 0.01;对氨基苯甲酸 0.01;肌酸 0.025) 10ml;微量元素液(Mn-$SO_4.7H_2O$ 0.01;$ZnSO_4.7H_2O$ 0.05;H_3BO_3 0.01;N$(CH_2COOH)_3$ 4.5;$CaCl_2.2H_2O$ 0.01;Na_2MoO_4 0.01;$CoCl_2.6H_2O$ 0.2;$AlK(SO_4)_2$(0.01 %) 10ml;刃天青(0.2 %) 1～2ml;pH 6～6.4

固体培养基:液体培养基 + 琼脂(2 %)

1.3　菌株的分离、纯化和筛选

从生物制氢反应器中取出一定量产氢发酵活性污泥,放入充满氮气的三角瓶中,加入数颗玻璃珠,在振荡器上振荡 2h,将污泥中菌胶团打碎,用无菌水进行倍比稀释,再接种于固体培养基中,制成滚管,培养 10～14d,用无菌毛细管挑取单菌落,转接入固体培养基中。重复以上操作若干次,直至管内菌落和显微镜下的细胞形态一致认为是纯菌株,进一步用电镜确认。

将分离纯化的发酵细菌转接于液体培养基中,35 ℃120r/min 振荡培养 5～8d,用 1mL 无菌注射器从其气相中取样,检测其气相成分中是否有氢气存在。如果有,即为产氢菌。

1.4　高效产氢菌株优选

将筛选出的产氢菌株,重复分离、纯化操作,待其产气稳定后,测其产氢能力,并将产氢能力高的菌株,重复分离操作,用无菌毛细管挑取在固体培养基中产生气泡较大的细菌菌落进行纯化,反复上述步骤,直至滚管中细菌稳定产生大而多的气泡为止。富集后,再测其产氢能力。反复多次,直至优选出产氢能力最高的菌株为止。

1.5　产气量和产氢能力测定

产氢能力试验采用间歇试验装置,如图 1 所示。将产氢细菌按 6×10^8 个菌量接入盛有 145mL 液体培养基(初次优选为 100mL)的锥形瓶中,置于恒温气浴振荡器中,在 35 ℃下以 120r/min 振荡培养,定时测其产气量、pH 值、菌浊、细胞干重和氢气含量。在产气量测定的数值读取中,平衡瓶液面与气量测定管液面相平,以保证测定数值的准确性。

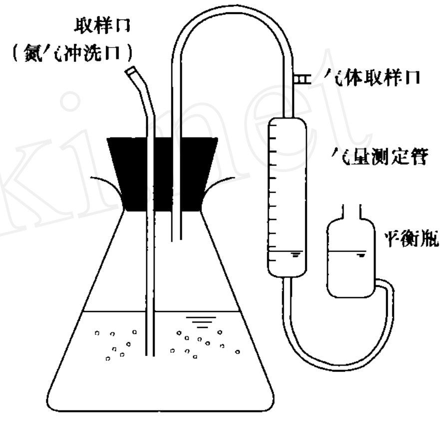

图 1　产气间歇试验装置示意图

Fig. 1　Sketch of gas production device of batch test

1.6　菌浊和细胞干重的测定

用 752 紫外分光光度计,在 600nm 处测定样品的吸光度值,作为菌浊(A_{600nm})。将样品在 4000rpm 条件下离心,弃出上清夜,用 PSB 液洗 2 次,80 ℃干燥 12h 至恒重,用分析天平称其重量。

1.7　发酵产物的分析

挥发酸和醇类测定:使用 GC122 型气相色谱仪,取 1mL 培养液,离心 5000rpm,取上清液进样,柱长 2m,担体 GDX103,60～80 目,氢火焰检测器,氮气作载气,流速 60mL/min,氢气流速为 50mL/min,空气流速为 490mL/min,汽化室 210 ℃,柱和检测室 190 ℃。

氢气和二氧化碳测定:使用 SC-Ⅱ型气相色谱仪,从图 1 气体取样口取气相样品进样,柱长 2m,担体为 TDS-01,60～80 目,热导池检测器,氮气作载气,流速为 70mL/min,柱和检测室 150 ℃。

2　结果与讨论

2.1　产氢菌株的筛选和优选

从本实验室连续流生物制氢反应器中 6 次取泥,分离出 210 株发酵细菌,从中筛选出 18 株产氢细菌。从 18 株产氢菌株中选出产氢稳定的 11 株细菌,通过间歇试验测其产氢能力(表 2),分别用最大比产氢速率(Q_{H2})和单位体积培养基产氢量(Y_{H2})来表示。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 分离出的产氢菌株的产氢能力

Table 2 The hydrogen production ability of the isolated hydrogen production bacteria

菌名	Q_{H2}	Y_{H2}
B49	21.60	887.20
LB13	5.48	116.10
LD7	3.79	284.60
LB20	2.45	216.00
B50	4.41	325.50
H1	5.44	404.40
W	2.33	94.70
LB19	1.75	73.20
LM11	2.94	391.20
LM12	16.06	407.60
B51	12.01	348.80

注:Q_{H2}为最大比产氢速率(mmol/g·h);Y_{H2}为单位体积培养基产氢量(mL/L)。

由表 2 可知,B49、H1、LM12、B51、LM11 的 Y_{H2} 较大,B49、LM12 和 B51 的 Q_{H2} 较高,其中 B49 的 Y_{H2}和 Q_{H2}最大,分别达到887.2mL/L 和21.6mmol/g·h。将 B49、H1、LM12、B51、LM11 等 5 株菌株作为进一步选择的产氢菌株进行了多次优选试验,最终从上述 5 株菌中优选出 B49、H1、LM12 等 3 株菌作为优选出的菌株,通过间歇试验进一步测定它们的产氢能力(见图 2 和表 3)。从图 2 和表 3 中可见,B49 和 LM12 的 Q_{H2} 较大,分别为 25 和 27.9 mmol/g·h。但 B49 的 Y_{H2}最大,为 1813.8mL/L,远远高于 LM12 的 Y_{H2}(975.9mL/L),所以我们选择 B49 为最优产氢菌株。表 3 中 B49 的 Q_{H2}是在发酵 18h,pH4.1,菌浊 A_{600nm}1.115,细胞干重 3.8425g/L 时获得,其氢气含量为 64.15 %。

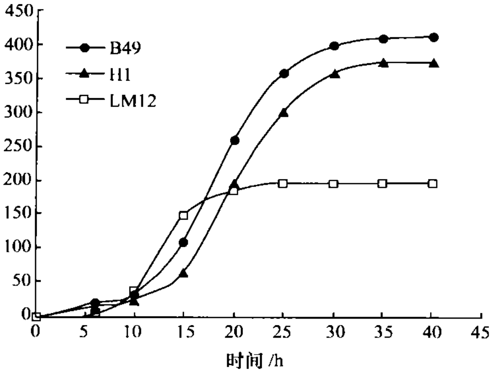

图 2 B49、H1 和 LM12 的产气情况

Fig. 2 Gas production of B49. H1 and LM12

表 3 筛选后产氢菌株的产氢能力

Table 3 The hydrogen production ability of hydrogen production bacteria after screening

菌名	Q_{H2}	Y_{H2}
B49	25.0	1813.8
H1	10.3	1275.2
LM12	27.9	975.9

从表 2 和表 3 可以看到,经过优选,B49 的 Q_{H2} 由 21.6mmol/g·h 提高到 25.0mmol/g·h,而 Y_{H2}由 887.2mL/L 提高到 1813.8mL/L。H1 和 LM12 的 Q_{H2}和 Y_{H2}也都有很大的提高。从表 1 和表 3 中我们还可以看到,B49 菌株的 Q_{H2}远大于以前我们分离的产氢细菌 No.5(Q_{H2} = 2.28mmol/g·h),而且其 Q_{H2}仅低于阴沟肠杆菌(Enterobacter cloacae)的 29.63 mmol/g·h[8],高于我们目前所掌握的其他发酵产氢细菌的产氢能力。

2.2 高效产氢菌株 B49 的生长和发酵最适 pH 值

从图 3 可知,静止培养中在 pH4.75 时,B49 的菌浊增长速率最快,为 0.03/h,即 B49 菌株静止培养的最适生长 pH 值为 4.75。振荡培养中在 pH4 左右时 B49 的菌浊增长速率最快,为 0.07/h,即 B49 菌株振荡培养的最适生长 pH 值在 4 左右。在静止培养过程中,由于产生的氢气无法象振荡培养装置中迅速释放,从而对细菌生长产生抑制,导致静止培养获得的最大菌浊增长速率小于振荡培养的。振荡培养在 pH3.9 左右可获得最高的产氢速率,由此可见,B49 菌株在振荡培养条件下,发酵产氢和细菌生长的最适 pH 值基本相同,约为 3.9~4.2,这与我们生物制氢中试研究结果 pH4.0~4.5 相近[16]。

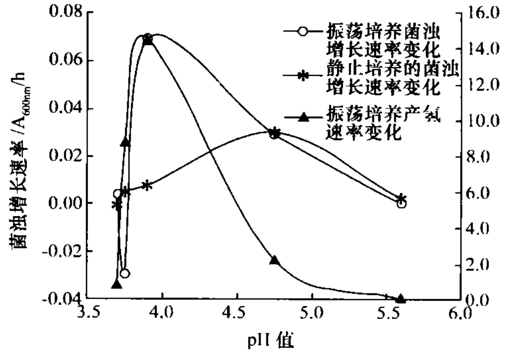

图 3 B49 产氢和 pH 变化情况

Fig. 3 Variations of B49's hydrogen production and pH

2.3 产氢菌株耐酸性的研究

我们在起始 pH 值为 3.3 条件下,对 B49、H1、

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

B51、LM11、LM12 等 5 株菌静止培养,对其菌浊进行观察(见图 4)。可以看到 B49 在 96h 获得比其它细菌都高的菌浊(A_{600nm} = 0.2),说明 B49 虽然受 pH 抑制,但仍能微弱地生长,且比其他细菌更耐酸。通过对 5 株菌间歇试验中液相产物的分析(见表 4),可以发现 5 株细菌除了共同的主要液相末端产物乙酸外,B49 和 H1 的主要液相产物为中性末端的乙醇,其他细菌为酸性末端丁酸,这可能是 B49 和 H1 菌株耐酸的机理之一。如果采用 B49 和 H1 这种以乙醇为主要液相末端产物的菌种作为生物制氢的主要菌种,可以在一定程度上缓解发酵产酸对微生物产氢过程的抑制,使生物制氢反应器运行更稳定,从而可得到更大的氢气产率。

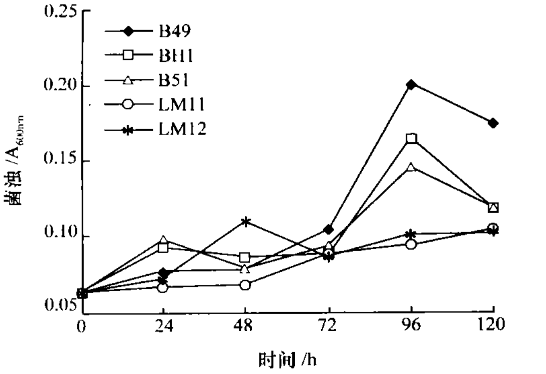

图 4　部分产氢细菌在 pH3.3 值静止培养的菌浊变化

Fig. 4　Variations of some hydrogen production bacteria turbidity at pH 3.3 in batch culture

表 4　部分产氢细菌的液相末端产物

Table 4　Main liquid fermentive products of some hydrogen production bacteria

(单位:mg/L)

菌名	乙醇	乙酸	丙酸	丁酸
B49	3149.7	3425.7	16.7	18.4
H1	3044.0	3244.4	9.0	13.3
B51	58.4	754.1	96.1	1016.7
LM 11	19.6	1327.3	24.0	1205.2
LM12	76.1	987.5	132.9	1094.7

Yokoi[15]分离到 1 株高效耐酸产氢细菌(产气肠杆菌 HO-39),可在厌氧条件 pH4 下生长,最适发酵产氢 pH 值为 6～7。B49 的最适生长 pH 值、发酵 pH 值都比产气肠杆菌 HO-39 低,大约在 4 左右;同时,在 pH3.3 时仍能缓慢生长。这说明 B49 本身具有较强的耐酸性,并且最适产氢 pH 值也很低,这对该菌的工程应用将具备优越的条件。

由表 3 和表 4 可知,本试验中所优选出的 5 株菌中,最大比产氢速率(Q_{H2})和单位体积培养基产氢量(Y_{H2})均较高的株菌为乙醇型发酵的 B49 产氢细菌,而丁酸型发酵产氢细菌的 LM12 菌株尽管 Q_{H2} 值较高,但培养基中底物利用率较低,即 Y_{H2} 值较低,且耐酸性能也低于 B49 菌株。因此,从综合角度来看,B49 菌株具有更为显著的优越性。

3　结　论

1) 通过我们对产氢活性污泥的分离、筛选和优选,从 210 株发酵细菌中得到了一株高效产氢菌株 B49,其最大比产氢速率 Q_{H2} 为 25mmol/g·h,反映出底物利用率的单位体积培养基产氢量 Y_{H2} 高达 1813.8mL/L。

2) B49 是 1 株乙醇型发酵的产氢细菌,以中性产物乙醇为主要的液相末端产物,耐酸性明显高于其他细菌,具有良好的耐酸性,有利于工程应用。

3) B49 菌株的耐酸性很强,在振荡培养条件下,发酵产氢和细菌生长的最适 pH 值基本相同,约为 pH3.9～4.2。

[参考文献]

[1] Tanisho S, Ishiwata Y. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium Enterobacter aerogenes [J]. Int J Hydrogen Energy, 1994, 19(10):807—812.

[2] Tanisho S, Suzuki Y, Wakao N. Fermentative hydrogen evolution by Enterobacter aerogenes strain E. 82005[J]. Int J Hydrogen Energy, 1987, 12(9):623—627.

[3] Hungate R E. Methods in microbiology[M]. New York: Academic press; 1969. 117—132.

[4] 李白昆. 有机废水发酵法生物产氢原理研究—产氢细菌产氢机理和能力[D]. 黑龙江:哈尔滨建筑大学市政与环境工程学院,1995,41.

[5] Taguchi F, Mizukami N, Hasegawa K, et al. Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a newly isolated Clostridium sp[J]. Can J Microbiol, 1994, 40(2):228—233.

[6] Taguchi F, Chang J D, Mizukami N, et al. Isolation of a hydrogen-producing bacterium, Clostridium beijerinckii strain AM21B, from termites[J]. Can J Microbiol, 1993, 39: 726—730.

[7] James D, Brosseau and Zaji J E. Hydrogen-gas production with Citrobacter intermedius and Clostridium pasteurianum. J Chem Tech Biotechnol, 1982, 32: 496—

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

502.

[8] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by Enterobacter cloacae IIT-BT08 [J]. Proc Biochem, 2000, 35: 589—593.

[9] Kim J S, Ito K, Izaki K, et al. Production of molecular hydrogen by a continuous culture under laboratory conditions[J]. Agric Biol Chem, 1987, 51(9): 2591—2593.

[10] Tanisho S, Kamiya N, Wakao N. Hydrogen evolution of Enterobacter aerogenes depending on culture pH: mechanism of hydrogen evolution from NADH by means of membrane-bound hydrogenase[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 973: 1—6.

[11] Ooshima H, Takakuwa S, Katsuda T, et al. Production of hydrogen by a hydrogenase - deficient mutant of Rhodobacter capsulatus[J]. J Fermernt Bioeng, 1998, 85(5): 470—475.

[12] Kumar D, Kumar H D. Hydrogen production by several Cyanobacteria[J]. Int J Hydrogen Energy, 1992, 17, (11): 847—852.

[13] Kayano H, Matsunaga T, Karube I, et al. Hydrogen evolution by co-immobilized Chlorella vulgaris and Clostridium butyricum cells[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1981, (638): 80—85.

[14] 任南琪. 有机废水发酵法生物制氢技术[M]. 黑龙江:黑龙江科学技术出版社, 1994, 32—33.

[15] Yokoi H, Ohkawara T, Hirose J, et al. Characteristics of hydrogen production by aciduric Enterobacter aerogenes strain HO-39 [J]. J Ferment Bioeng, 1995, 80 (6): 571—574.

[16] 李建政. 有机废水发酵法生物制氢技术研究[D]. 哈尔滨建筑大学市政与环境工程学院, 1999, 62—63.

A STRAIN OF ANAEROBIC BACTERIA SCREENED FOR HIGH EFFICIENT HYDROGEN PRODUCTION AND ITS ACIDURIC CHARACTER

Ren Nanqi[1], Lin Ming[1], Ma Xiping[2], Wang Aijie[1], Li Jianzhen[1]

(1. *School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin* 150090, *China*;
2. *Department of Environmental Science, Liaoning University, Shenyang* 110036, *China*)

Abstract: By anaerobic Hungate technique, 18 strains of hydrogen-producing bacteria were isolated from the biohydrogen production reactor. A strain of high efficient hydrogen-producing bacteria, B49, was specially screened. Its capability of hydrogen production was measured in the batch culture experiment. The maximum specific H_2 producing rate was 25.0 mmol/g·h, the hydrogen producing yield was 1813.8mL/L, and the content of hydrogen in the gas was 64.15%. The strain of B49 was ethanol-type fermentation bacteria of good aciduric ability. B49 growth can be at pH3.3. The optimal operating pH for both B49 growth and H_2 production could select 4.0～4.2.

Keywords: hydrogen production; fermentation bacterium; ethanol-type fermentation; aciduric bacteria

联系人 **E-mail**: jidx3@public.hr.hl.cn

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net