

一株分离自潮间带污泥细菌 *Clostridium* sp.T7 产氢特性分析

刘洪艳, 王文磊

(天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 产氢菌株 *Clostridium* sp.T7 分离自天津海水浴场潮间带的污泥。研究起始 pH、碳源、氮源、NaCl 质量分数对菌株 T7 产氢性质的影响。结果表明: 菌株 T7 最适产氢的起始 pH 是 6.0, 能够利用蔗糖、葡萄糖和果糖等碳源发酵产氢。菌株 T7 能够利用牛肉膏和酵母粉为单一氮源产氢, 不能利用蛋白胨为氮源进行产氢。NaCl 质量分数能影响菌株 T7 的产氢量, 海水培养条件 (NaCl 质量分数为 3%) 下, 最高产氢量是每摩尔葡萄糖 (1.48 ± 0.05) mol, 相比之下, 淡水培养条件下其产氢量提高 20%。NaCl 质量分数在 0.4%~7% 时, 菌株 T7 都能够产氢, 这表明菌株 T7 有望应用于淡水或高盐有机废水产氢领域。

关键词: 潮间带污泥; 产氢菌株; 产氢量

中图分类号: Q949.28⁺8.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2011)06-0012-04

Characterization of Hydrogen Production of a Strain *Clostridium* sp. T7 Isolated from Intertidal Sludge

LIU Hong-yan, WANG Wen-lei

(Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine Science and Engineering,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A hydrogen-producing bacterium, *Clostridium* sp. T7, was isolated from the sludge collected from intertidal zone of a bathing beach in Tianjin. The effects of initial pH value, carbon source, nitrogen source and NaCl concentration on hydrogen production of strain T7 were determined in this study. The results showed that strain T7 produced hydrogen production at maximal level when growing at initial pH of 6.0. The strain was able to produce hydrogen using many carbon sources, such as glucose, sucrose and fructose. The strain T7 could produce hydrogen by using yeast extract and beef as nitrogen source, but not peptone. The level of hydrogen production was affected by the salt concentration. In marine conditions (NaCl concentration as 3%), hydrogen production was (1.48 ± 0.05) mol/mol glucose, whereas, it increased by 20% in fresh conditions. It could produce hydrogen at the NaCl concentration from 0.4% to 7%. As a result, *Clostridium* sp. T7 can be considered to be used for bio-hydrogen production and biological treatment of fresh or marine organic waste.

Keywords: intertidal sludge; hydrogen-producing strain; hydrogen production

生物制氢是目前化石能源燃料的替代途径之一, 生物制氢主要包括藻类制氢、光合细菌制氢和微生物暗发酵制氢。暗发酵微生物制氢在处理废物的同时获取氢气, 具有更广阔的工程应用前景^[1]。已报道的产氢菌主要有 *Enterobacter*^[2]、*Bacillus*^[3] 和 *Clostridium*^[4]。由于产氢能力和耐逆性的原因, 目前分离获得

的产氢菌株仍难进入工业化生产中^[5]。分离高效产氢菌是构建生物制氢工程菌株的必要手段, 也是产氢菌种遗传改良的前提条件^[6]。继续广泛筛选产氢效率高、极端条件耐受性能好的菌株进行纯培养生物制氢研究, 对拓宽产氢微生物种质资源、提高生物制氢效能有重要意义。

收稿日期: 2011-02-13; 修回日期: 2011-07-08

基金项目: 天津市海洋资源与化学重点实验室开放基金(200912); 天津科技大学实验室开放基金(1105A213)

作者简介: 刘洪艳(1977—), 女, 吉林人, 内聘副教授, 博士, lhy1214@tust.edu.cn.

海水工厂化养殖和海水广泛使用已经造成了高盐有机废水累积. 为了养殖业的可持续发展和保护海洋环境, 需要对海洋有机废水(泥)进行处理. 将单纯的海洋有机废水处理结合生物制氢过程, 不仅可达到环保和资源利用的目的, 而且使海水生物制氢实用化. 海洋有机废水盐度高, 淡水环境筛选菌株不能用于海水生物制氢. 海洋产氢菌株的研究还十分有限^[7]. 在众多的海洋环境类群中, 潮间带是陆地和海洋环境的过渡区域, 其温度、水分和盐度等环境条件变化剧烈, 为筛选耐逆境性强的微生物提供有利条件.

微生物厌氧发酵产氢过程容易受环境因子的影响, 如碳源、氮源、pH、温度^[8-10]. 本实验室从海洋环境分离鉴定一株厌氧产氢菌 *Clostridium* sp.T7^[11], 同时优化菌株 T7 产氢培养条件, 拓宽应用于高盐有机废水制氢的微生物种质资源.

1 材料与方法

1.1 菌株来源

菌株 *Clostridium* sp. T7(登录号为 HM104461), 由天津科技大学海洋学院海洋生物技术研究室分离自潮间带污泥.

1.2 培养基

LM-H 海水培养基, 参照文献[12]稍作变化, 成分如下(g/L): 葡萄糖 20.0、胰蛋白胨 4.0、牛肉膏 2.0、酵母粉 1.0、NaCl 30.0、K₂HPO₄ 1.5、MgCl₂ 0.1、FeSO₄·7H₂O 0.1、L-cysteine 0.5、微量元素液(MnSO₄·7H₂O 0.01、ZnSO₄·7H₂O 0.05、H₃BO₃ 0.01、CaCl₂·2H₂O 0.01、Na₂MoO₄ 0.01、CoCl₂·6H₂O 0.2) 10 mL、维生素溶液(L-抗坏血酸 0.025、柠檬酸 0.02、吡哆醛 0.05、对氨基苯甲酸 0.01、生物素 0.01、维生素 B₁ 0.02、核黄素 0.025) 10 mL, pH 7.2.

1.3 产氢条件分析

研究起始 pH、碳源、氮源和 NaCl 质量分数对菌株 T7 的产氢影响. 菌液按 1%接种于 150 mL 血清瓶内, 充氮气 1 min, 120 r/min、37 °C 恒温摇床培养, 分批测定起始 pH、碳源(葡萄糖、蔗糖、果糖、淀粉和纤维素)、葡萄糖浓度、氮源(牛肉膏、蛋白胨和酵母粉)、碳氮比 C/N 和 NaCl 质量分数对菌株 T7 相关产氢指标和产氢量的影响.

1.4 分析方法

pH 采用 Delta-320 型酸度计进行测量. A_{600} 采用岛津分光光度计. 葡萄糖利用率采用葡萄糖试剂盒(葡萄糖氧化酶法)进行测定. 气体的收集采用排水

法. 氢气含量的测定利用 Agilent 6820 气相色谱仪测定发酵气体中氢气的含量. 氮气作为载气, 流量为 30 mL/min, 色谱柱填料为 5 A 分子筛(60/80 目), 柱长 2 m, 检测器为热导检测器(TCD), 柱温、进样器和检测器分别为 40、200、200 °C.

2 结果与分析

2.1 起始 pH 对菌株 T7 产氢的影响

不同起始 pH 的培养条件下, 测定菌株 T7 终 pH、 A_{600} 和葡萄糖利用率见图 1.

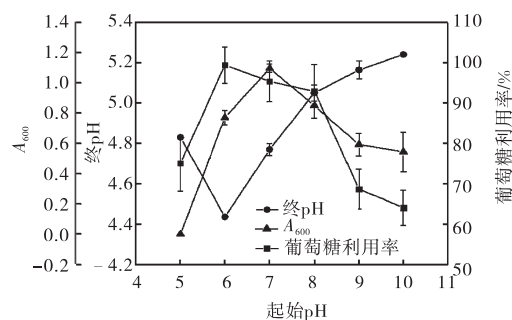


图 1 起始 pH 对菌株 T7 生长的影响

Fig.1 Effect of initial pH on growth of strain T7

菌株 T7 在不同起始 pH 培养条件下, 终 pH 范围在 4.43 ~ 5.24, 相比起始 pH, 都有不同程度下降. 测定 A_{600} 作为指示细胞生长状态的间接指标, 菌株 T7 最适生长 pH 为 7.0. 当起始 pH 为 6.0 和 7.0 时, 菌株 T7 对葡萄糖利用率达到 95%以上.

菌株 T7 在起始 pH 为 5.0 ~ 10.0 范围内都能产氢(图 2). 起始 pH 6.0 时, 菌株 T7 产氢量最高, 产氢量达到每摩尔葡萄糖产氢 (1.79 ± 0.08) mol, 氢气含量为 $(47.03 \pm 1.07)\%$. 菌株 T7 的最适产氢起始 pH 是 6.0, 最适生长 pH 为 7.0, 这表明菌株最适生长 pH 与最适产氢的 pH 是不吻合的.

Zhu 等^[7]的研究结果表明微生物在利用碳源发酵产氢过程中, 氢气的产生是不利于细胞生物量的累积. pH 对不同菌株的产氢影响是有差异的. 菌株 T7 在起始 pH 5.0 时, 产氢量是每摩尔葡萄糖产氢 (1.04 ± 0.08) mol. 菌株 *Clostridium butyricum* CGS5 起始 pH 5.0 不能够产氢^[4]. 而菌株 *Enterobacter* sp. C32 在起始 pH 5.0 的产氢行为微弱^[13]. 细菌发酵产氢过程中, 由于有机酸的累积会导致发酵液 pH 下降, 发酵液的低 pH 将抑制产氢行为. 低 pH 培养条件下菌株 T7 仍具有较高产氢量, 表明其耐酸性能比较强, 具有耐酸性的菌株能够延长发酵产氢过程, 提高产氢量.

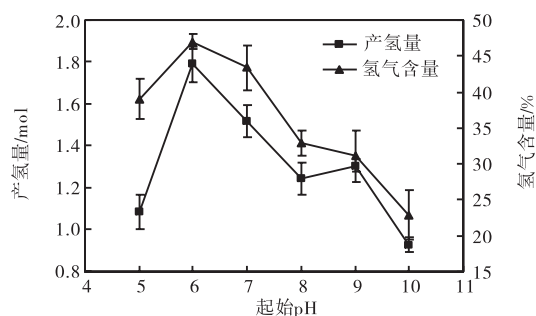


图2 起始 pH 对菌株 T7 产氢量与产氢含量的影响

Fig.2 Effect of initial pH value on hydrogen production and hydrogen content of strain T7

2.2 碳源对菌株 T7 产氢的影响

考察菌株 T7 利用不同碳水化合物(葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、淀粉、纤维素)发酵产氢能力. 结果表明, 蔗糖为底物进行发酵产氢时, 菌株 T7 产氢量最高, 产氢量为每摩尔葡萄糖产氢 (1.91 ± 0.05) mol. 菌株 T7 不能够利用乳糖、淀粉和纤维素发酵产氢.

葡萄糖浓度能明显影响菌株的产氢量, 过高的碳源浓度会降低产氢菌株氢气产量^[14]. 测定菌株 T7 在不同葡萄糖浓度范围的产氢量, 结果如图 3 所示. 葡萄糖质量浓度为 20 g/L 时, 菌株 T7 产氢量最高, 产氢量达到每摩尔葡萄糖产氢 (1.79 ± 0.22) mol. 这与菌株 *Enterobacter asburiae* SNU-1 的产氢性质相似, 葡萄糖质量浓度在 10 ~ 60 g/L 的产氢量研究表明, 在葡萄糖质量浓度为 25 g/L 时该菌株产氢量最高^[2].

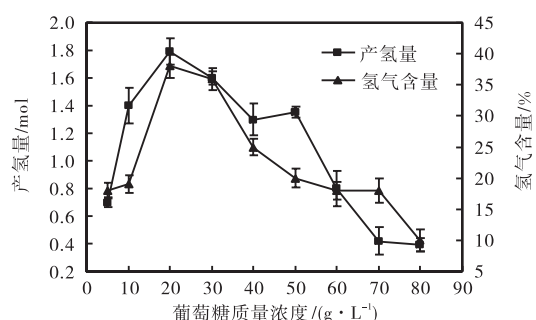


图3 葡萄糖质量浓度对菌株 T7 产氢量和产氢含量的影响

Fig.3 Effects of glucose concentration on hydrogen production and hydrogen content of strain T7

2.3 有机氮源对菌株 T7 产氢影响

菌株 T7 分别培养于蛋白胨、牛肉膏和酵母粉中, 研究不同有机氮源对菌株 T7 产氢影响. 菌株 T7 不能利用蛋白胨为氮源产氢. 以牛肉膏为单一有机氮源时, 每摩尔葡萄糖的产氢量为 (0.50 ± 0.03) mol, 氢气含量为 $(21.03 \pm 1.93)\%$. 当以酵母粉为氮源时, 菌株 T7 的产氢微弱, 产氢量只有每摩尔葡萄糖产氢 (0.20 ± 0.04) mol, 氢气含量是 $(1.81 \pm 0.80)\%$. 菌株

T7 的最适有机氮源是牛肉膏.

碳氮比(carbon/nitrogen ratio, C/N)指的是碳源和氮源质量比, 能影响产氢细菌代谢液相末端产物的构成^[15]. 碳氮比(碳源为葡萄糖, 氮源为牛肉膏)对菌株 T7 的产氢影响如图 4 所示, 当 C/N 为 2 时, 菌株 T7 每摩尔葡萄糖产氢量为 (1.69 ± 0.09) mol, 氢气含量是 $(29.93 \pm 4.92)\%$. 培养液中只有碳源没有氮源, 即 C/N 为 0, 每摩尔葡萄糖产氢量是 (0.47 ± 0.11) mol, 产氢含量只有 $(7.87 \pm 0.92)\%$.

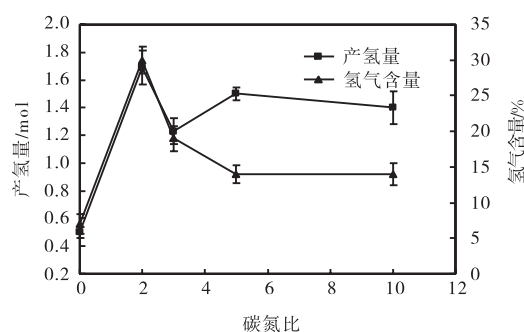


图4 碳氮比对菌株 T7 产氢量和产氢含量的影响

Fig.4 Effects of carbon/nitrogen on hydrogen production and hydrogen content of strain T7

2.4 NaCl 质量分数对菌株 T7 产氢的影响

不同 NaCl 质量分数培养条件下菌株 T7 的生长如图 5 所示. 淡水条件下, 菌株 T7 生物量的累积最高. 随着 NaCl 质量分数增加, 细胞生长 (A_{600}) 呈下降趋势. 菌株 T7 发酵液终 pH 在不同 NaCl 质量分数培养条件下的差别不明显, 基本维持在 5.0, 只有当 NaCl 质量分数达到 6% 时, 菌株 T7 发酵液 pH 升高明显. NaCl 质量分数为 0.4%、3% 和 4% 时, 菌株 T7 对葡萄糖的利用率几乎达到 100%. NaCl 质量分数达到 5% 及以上时, 菌株 T7 对葡萄糖的利用率开始下降.

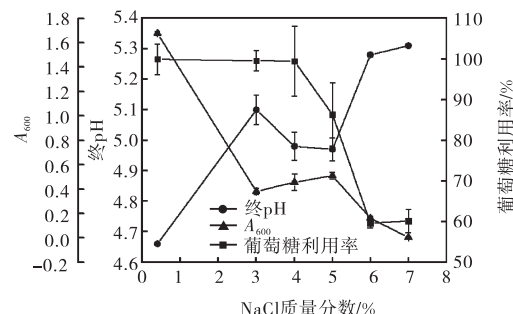


图5 NaCl 质量分数对菌株 T7 生长的影响

Fig.5 Effect of NaCl concentration on growth of strain T7

菌株 T7 在不同 NaCl 浓度条件下的产氢情况如图 6 所示. 淡水和海水条件下, 菌株 T7 的产氢含量差别不大, 淡水条件的产氢量是海水条件的 1.2 倍, 这

表明菌株 T7 虽生活自海洋环境,可能是一株来源于陆地的淡水菌,由于长时间进化形成或激活了耐盐机制,在海水和淡水培养条件下都能表现较高产氢能力.海水培养条件下,菌株 T7 在 NaCl 质量分数 3% 时产氢量最高.随 NaCl 浓度增加,菌株产氢量开始下降,NaCl 质量分数达到 6% 和 7% 时,产氢量分别为每摩尔葡萄糖产氢 (0.27 ± 0.04) mol 和 (0.06 ± 0.02) mol,菌株 T7 的产氢行为受到比较明显抑制.菌株 T7 分离自热休克处理的潮间带污泥,其耐逆境能力比较强,该菌株有望在高盐有机废水产氢技术领域得到应用.

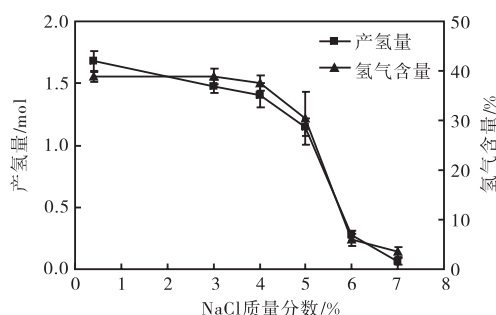


图 6 NaCl 质量分数对菌株 T7 产氢量和产氢含量的影响
Fig.6 Effect of NaCl concentration on hydrogen production and hydrogen content of strain T7

3 结 论

菌株 *Clostridium* sp. T7 分离自潮间带污泥,起始 pH、葡萄糖浓度、碳氮比和 NaCl 质量分数能够影响其产氢量.菌株 T7 的最适产氢起始 pH 为 6.0、葡萄糖质量浓度为 20.0 g/L、碳氮比为 2.0.海水培养条件 (NaCl 质量分数为 3%) 下,菌株 T7 产氢量是每摩尔葡萄糖产氢 (1.48 ± 0.05) mol,在淡水条件下产氢量会提高 20%.菌株 T7 对 NaCl 浓度的耐受范围比较宽,NaCl 质量分数在 0.4% ~ 7% 范围内都能生长而且有产氢行为.

参考文献:

- [1] Claassen P A M, Van Lier J B, Lopez Contreras A M, et al. Utilisation of biomass for the supply of energycarriers[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(6): 741-755.
- [2] Shin J H, Yoon J H, Ahn E K, et al. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2007, 32(2): 192-199.
- [3] Kalia V C, Jain S R, Kumar A, et al. Fermentation of bio-waste to H₂ by *Bacillus licheniformis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1994, 10: 224-227.
- [4] Chen W M, Tseng Z J, Lee K S, et al. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2005, 30(10): 1063-1070.
- [5] Wang C C, Chang C W, Chu C P, et al. Using filtrate of waste biosolids to effectively produce bio-hydrogen by anaerobic fermentation[J]. Water Research, 2003, 37(11): 2789-2793.
- [6] Okamoto M, Miyahara T, Mizuno O, et al. Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes[J]. Water Science and Technology, 2000, 41(3): 25-32.
- [7] Zhu D L, Wang G C, Qiao H J, et al. Fermentative hydrogen production by the new marine *Pantoea agglomerans* isolated from the mangrove sludge [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(21): 6116-6123.
- [8] Noike T, Mizuno O. Hydrogen fermentation of organic municipal wastes[J]. Water Science and Technology, 2000, 42(12): 155-162.
- [9] Sparling R, Risbey D, Poggi-Varaldo H M. Hydrogen production from inhibited anaerobic composters[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 1997, 22(6): 563-566.
- [10] Khanal S K, Chen W H, Li L, et al. Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2004, 29(11): 1123-1131.
- [11] 刘洪艳, 陈国超. 产氢菌株 *Clostridium* sp. T7 的快速筛选[J]. 天津科技大学学报, 2011, 26(2): 13-16.
- [12] 李永峰, 任南琪, 陈瑛. 发酵产氢细菌分离培养的厌氧实验操作技术[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2004, 36(12): 1589-1592.
- [13] 支晓鹏, 刘清锋, 郭小兵, 等. 产氢菌 *Enterobacter* sp. 和 *Clostridium* sp. 的分离鉴定及产氢特性[J]. 生物工程学报, 2007, 23(1): 152-156.
- [14] Mizuno O, Ohara T, Shinya M. Characteristics of hydrogen production from bean curd manufacturing waste by anaerobic microflora[J]. Water Science and Technology, 2000, 42(3/4): 345-350.
- [15] 刘和, 刘晓玲, 邱坚, 等. C/N 对污泥厌氧发酵产酸类型及代谢途径的影响[J]. 环境科学学报, 2010, 30(2): 340-346.