科学通报 2009 年 第 54 卷 第 11 期: 1547 ~ 1551
论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

潮间带暗发酵产氢菌群富集和产氢过程分析

才金玲[①②③], 王广策[①③*], 李延川[④], 朱大玲[③], 潘光华[③]

① 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071;
② 中国科学院研究生院, 北京 100049;
③ 天津科技大学环境科学与工程学院, 藻类生物质能源与环境效应研究中心, 天津 300457;
④ 昆明理工大学生物工程技术研究中心, 昆明 650224
* 联系人, E-mail: gcwang@ms.qdio.ac.cn

2008-10-06 收稿, 2009-4-22 接受
国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA05Z112)、天津市科技支撑计划(批准号: 2007LS700310)、青岛市科技计划(批准号: 07-2-3-7-jch)和国家重点基础研究发展计划前期研究专项(批准号: 2007CB216410)资助项目

摘要 用热、酸、碱和硝酸盐等方法处理海洋潮间带污泥, 富集厌氧发酵产氢菌群; 以蔗糖为底物配制海水培养基, 进行暗发酵产氢研究. 通过对产氢菌群的产氢量、pH 变化、产气延迟期和产氢速率变化的分析, 发现热、酸、碱和硝酸盐等方法处理菌组的产氢量均明显高于未处理组(P<0.05), 其中热处理污泥的产氢量最高, 是未处理污泥的 14.6 倍. 由此进一步研究起始 pH 对富集的产氢菌群的产氢影响; 发现当起始 pH 为 8 时产氢菌群的产氢率最高, 达 79 mL/g 蔗糖. 在发酵过程中发酵液的 pH 不断下降, 表明所富集的海洋产氢菌属于产酸菌, 且当 H^+浓度下降 100 倍时会反馈抑制其产氢.

关键词
生物制氢
海水
预处理
起始 pH

氢能是具有战略意义的可替代能源. 在众多的制氢技术中, 生物制氢尤其受到关注. 产氢生物包括藻类(原核或真核)、光合细菌和发酵产酸细菌等[1~3], 其中发酵产酸细菌的产氢过程可以同有机污水的处理相结合, 兼收环境处理之利, 因而率先达到中试规模[4,5].

目前微生物发酵制氢技术利用的纯菌种包括肠杆菌(*Enterobacter*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)和梭菌(*Clostridium*)等[2,6~9], 但由于有机废水的成分复杂, 单一菌种难以有效地降解不同种类的有机物. 产氢菌群由于容易获得且其代谢过程具有多样性, 因而备受青睐[10~12].

海洋不仅要接纳大量陆源生活污水和工业污水, 而且大规模的海水养殖本身也产生大量有机污水. 例如, 青岛胶州湾内养殖池的排污量就与数十万人口的城市排污量相当. 因此, 如果利用这些排入海洋的有机废物进行生物制氢, 将对新能源的开发尤其是对海水养殖业的可持续发展具有重要意义. 然而, 目前利用有机废水进行生物制氢主要集中在淡水体系中, 对高盐度有机废水进行生物制氢的报道较少[13].

海水环境具有高盐和高 pH 的特点, 多数淡水菌很难适应这种环境. 因此, 如要利用海洋有机废水产氢, 首先要从海水环境中筛选产氢菌. 根据淡水方面的经验, 产氢和耗氢生物同时存在于污泥与污水中, 利用高温、极端 pH 等预处理可以富集产氢菌群, 杀死或抑制耗氢的产甲烷菌[10~12]. 我们用相似的方法, 从海洋污泥中富集了可以在海水中生长的产氢菌群, 研究其产氢过程, 为利用高盐度有机废水奠定了基础.

1 材料和方法

(ⅰ) 泥样和预处理. 海洋污泥取自青岛胶州湾的潮间带, 4℃保存. 污泥的盐度和 pH 约为 3.3%和 7.8. 污泥分别通过酸、碱、热和硝酸盐处理, 以富集产氢菌群, 具体方法参考文献[10~12], 并略作修改. 酸处理是用 1 mol/L HCl 调 pH 至 3, 在室温下放置 30 min 后调至 pH 7; 碱处理是用 1 mol/L NaOH 调 pH 至

引用格式: 才金玲, 王广策, 李延川, 等. 0B 潮间带暗发酵产氢菌群富集和产氢过程分析. 科学通报, 2009, 54: 1547~1551
Cai J L, Wang G C, Li Y C, et al. Enrichment of and hydrogen production by marine anaerobic hydrogen-producing microflora. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0399-5

10, 在室温下放置 30 min 后调至 pH 7; 热处理是将污泥在 100℃条件下维持 90 min; 硝酸盐处理是将 KNO_3 加入到污泥中使其在污泥中的终浓度为 10 mmol/L.

(ⅱ) 培养条件. 培养液配制参考文献[14], 并加以修改, 省略了海水中含量较高的无机盐成分 Mg. 培养液的组成为: 天然海水中加入蔗糖 25 g/L, 无机盐等成分如下: 5.24 g/L NH_4HCO_3, 0.125 g/L K_2HPO_4, 0.1 g/L $MgCl_2$, 0.015 mg/L $MnSO_4·6H_2O$, 0.025 g/L $FeSO_4·7H_2O$, 0.005 g/L $CuSO_4·5H_2O$, 0.0000125 g/L $CoCl_2·5H_2O$, 6.72 g/L $NaHCO_3$.

各培养瓶加入 50 mL 污泥和 200 mL 培养液, 混匀后放入恒温摇床内, 35℃和 150 r/min 培养. 培养瓶塞插入导气管与集气瓶相连, 排水法收集气体. 各预处理富集的菌群发酵产氢实验和起始 pH 对热处理富集的菌群产氢的影响在同一批次中进行, 共 11 个培养, 包括在起始 pH 7 的条件下酸、碱、硝酸盐、热处理及未处理 5 个培养, 和起始 pH 4, 5, 6, 8, 9 和 10 条件下热处理的 6 个培养. 每个实验皆重复 3 次.

(ⅲ) 分析方法. 气体用排水集气法收集. 氢气含量用气相色谱法测定(GC-2010, 山东金普仪器公司). 气相色谱配有热导检测器和 2 m × 3 mm 不锈钢柱内添 5 Å 分子筛, N_2 为载气, 流速为 30 mL/min. 注射器、柱室和检测器的温度分别为 100℃, 60℃和 80℃. 氢气产生速率为每 20 h 内产氢的平均速率.

每隔 20 h 从反应瓶中抽取 5 mL 发酵液用于分析 pH, 氧化还原电位和蔗糖含量等指标. pH 用 pH 计(delta-320, Mettler, USA)测定, 氧化还原电位采用 DLELTA-320 型酸度计连接氧化还原电极进行测量. 发酵液经 12000 r/min 离心 5 min 后, 再经 0.45 μm 滤膜过滤, 用于测定蔗糖含量. 蔗糖含量用蒽酮法测定[15]. 数据使用 SPSS 软件分析.

2 结果与分析

2.1 产氢菌群的富集

经过各种预处理的泥样各 50 mL 加入 200 mL 海水培养基中, 摇床培养, 检测产氢情况, 作为判断各种预处理方法富集产氢菌群的效果. 结果如图 1 所示.

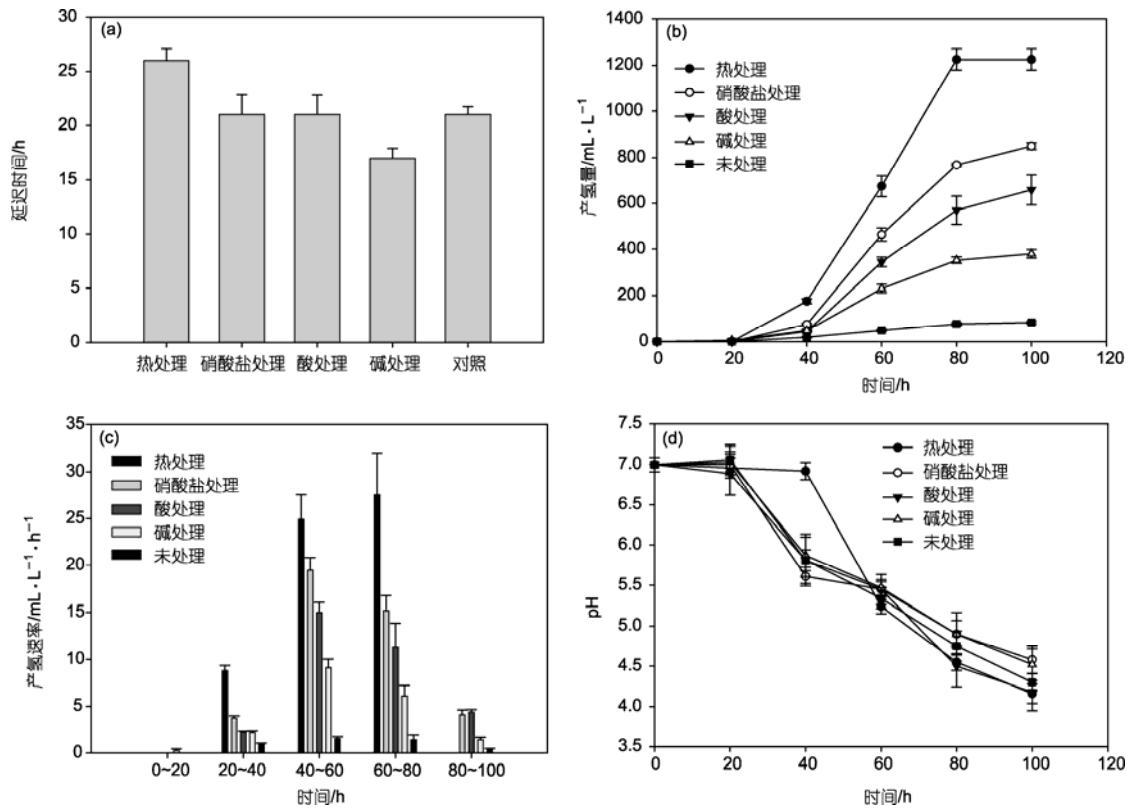

图 1 预处理过程对产氢过程的影响

(a) 预处理过程对产气延迟时间的影响; (b) 预处理过程对产氢量的影响; (c) 预处理过程对产氢速率的影响; (d) 预处理过程对培养液 pH 的影响

经酸、碱、热和 KNO_3 处理组的产氢量显著高于未处理组($P<0.05$)，其中热处理组的产氢量最大，达 1240 mL/L，为对照的 14.6 倍，蔗糖转化成氢气的效率达到 79 mL/g 蔗糖，但其产氢的延迟期较长. 热处理方法简便，富集产氢菌群的效果最好(表 1).

在产氢过程中，4 种预处理的培养液的 pH 逐渐由起始 pH 7 下降到 4.1~4.6 左右. 以上结果表明，通过酸、碱、热和 KNO_3 等方法处理所获得的产氢菌群均能获得利用蔗糖的产酸菌群.

2.2 产氢过程的分析

由于热处理组的产氢量和产氢速率最大，因此，深入研究其产氢过程. 在起始 pH 8，温度 35℃和 150 r/min 震荡培养条件下研究热处理产氢过程中各参数的变化，所得结果如图 2 所示.

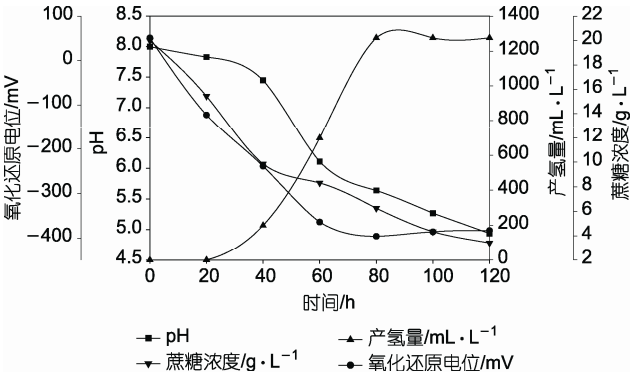

图 2 热处理获得菌群的产氢过程

培养初期，产氢速率逐渐增加. 在 40~80 h 期间，产氢速率达到 27.5 $mL\cdot L^{-1}\cdot h^{-1}$. 80 h 以后停止放氢. 这时产氢量达到 1240 mL/L. 同时，作为底物的蔗糖浓度迅速下降，但在 80 h 后产氢已经停止，蔗糖仍被其他代谢过程消耗，浓度继续下降. 在 80 h 以前，氧化还原电位迅速下降，由最初的 51 mV 下降至–396 mV，以后略有回升(至–386 V)(表 2). 培养液的 pH 从开始时的 8 下降至 4.94 左右(图 2).

上述结果表明，菌群的产氢过程伴随着产酸的过程，表现为 pH 和氧化还原电位下降. 同时，当培养液中 H^+浓度提高约 100 倍时，又会反馈抑制产氢过程，但不影响其他代谢继续消耗蔗糖.

2.3 起始 pH 的影响

通过对不同预处理富集海洋产氢菌群产氢性能的比较，发现热处理所得菌群的产氢量最大，由此对该菌群进行进一步的研究. 由于海洋环境下的 pH 高于淡水环境，因而研究 H^+对产氢过程的影响，以检测海洋产氢菌群产氢的最适起始 pH. 将起始 pH 调为 4, 5, 6, 7, 8, 9 和 10，观察起始 pH 对菌群产氢速率和产氢量的影响，同时测定了培养液蔗糖浓度、pH 和氧化还原电位的动态变化. 图 3 和图 4 的结果表明，当起始 pH 为 8 时，菌群的产氢速率和总产氢量最高. 产氢在 80 h 左右停止. 因此，当起始 pH 为 8 时，主要是提高 80 h 前的产氢速率和产氢量. 值得注意的

表 1 预处理对污泥菌群暗发酵产氢的影响 a)

预处理方法	总产氢量/$mL\cdot L^{-1}$	产气延迟时间/h	最大产氢速率/$mL\cdot L^{-1}\cdot h^{-1}$	100 h 终 pH
热处理	1225±46 a	26±1.87 a	27.5±4.5 a	4.16±0.12 c
KNO_3 处理	850±18 b	21±1.83 b	19.3±1.4 b	4.58±0.17 a
酸处理	659±65 c	21±1.78 b	15.0±1.1 c	4.18±0.23 c
碱处理	379±22 d	17±0.91 c	9.1±0.9 d	4.52±0.20 ab
未处理	84±12 e	21±0.71 b	1.5±0.2 e	4.3±0.11b c

a) 不同的字母表示 Duncan 检验结果标识，$\alpha = 0.05$

表 2 起始 pH 对热处理富集产氢菌群产氢的影响 a)

起始 pH	总产氢量 /$mL\cdot L^{-1}$	产氢效率 /$mL\cdot g^{-1}$ 蔗糖	产气延迟时间/h	最大产氢速率 /$mL\cdot L^{-1}\cdot h^{-1}$	120 h 终 pH	120 h 终氧化还原电位/mV	100 h 蔗糖终浓度 /$mL\cdot g^{-1}$
4	651±45 e	44±2.3 e	31±2.83 a	18.6±1.73 cd	4.21±0.14 e	–384.00±22.32 a	5.32±0.28 a
5	900±73 c	58±3.8 d	28.5±1.68 ab	23.7±2.5 bc	4.36±0.11 de	–405.00±18.07 a	4.42±0.47 b
6	1100±88 b	70±4.5 bc	27.5±1.29 b	24.3±3.24 abc	4.45±0.15 d	–400.00±20.05 a	4.22±0.49 bc
7	1225±46 a	76±2.3 ab	26±1.87 b	27.5±4.5 ab	4.46±0.16 e	–385.00±7.96 a	3.76±0.25 c
8	1240±65 a	79±3.3 a	26±1.41 b	28.7±2.4 a	5.27±0.15 c	–386.00±15.38 a	4.34±0.31 b
9	1000±108 bc	63±5.5 cd	27±1.41 b	22.4±4.2 c	5.53±0.11 b	–378.00±18.35 a	4.17±0.36 bc
10	775±29 d	50±1.5 e	29±2.45 ab	17.5±2.27 d	5.92±0.13 a	–386.00±14.99 a	4.46±0.30 b

a) 不同的字母表示 Duncan 检验结果标识，$\alpha = 0.05$

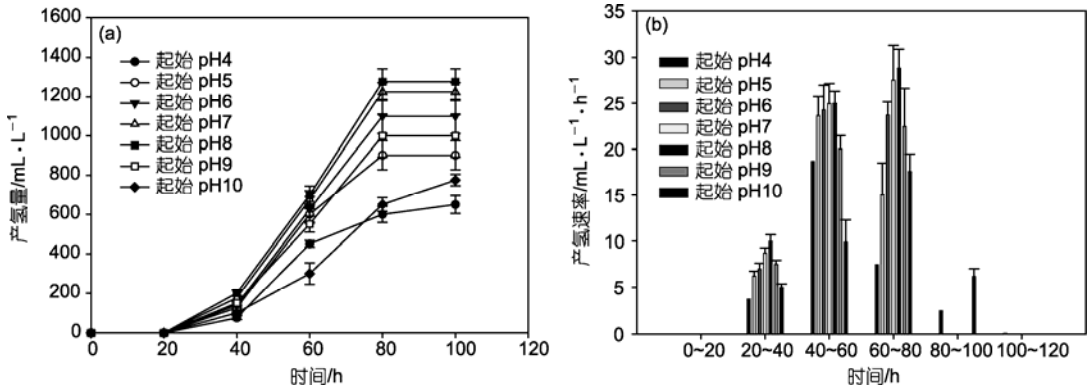

图 3 起始 pH 对热处理所得菌群的产氢过程的影响

(a) 总产氢量; (b) 产氢速率

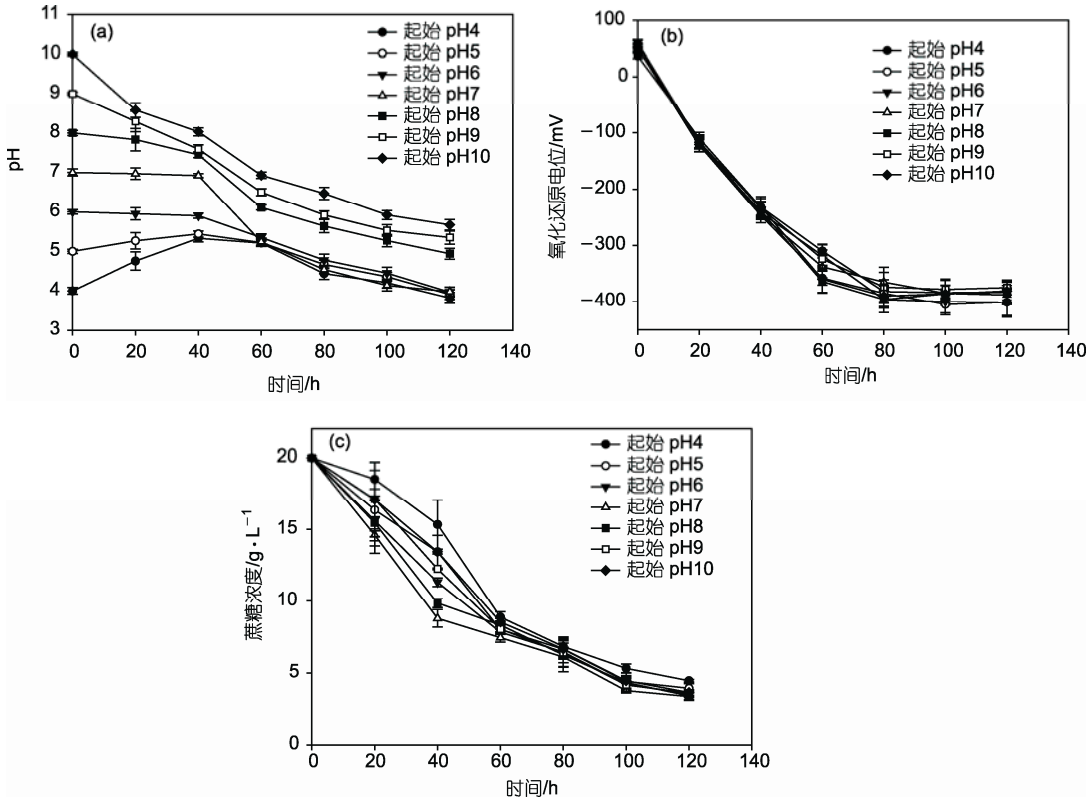

图 4 起始 pH 对培养液性质的影响

(a) pH; (b) 氧化还原电位; (c) 蔗糖浓度的变化

是天然海水的 pH 就是 8 左右, 说明所得菌群适于用海水培养液培养并达到最高的产氢量.

产氢过程中发酵液的变化如图 4 所示. 在产氢的过程中, 发酵液的蔗糖不断被分解利用, 同时发酵液的 pH 和氧化还原电位不断下降. 但发酵液中的氧化还原电位在降低到大约–400 mV 左右时, 下降趋势减缓.

3 讨论

从青岛胶州湾潮间带富集的污泥样品经过酸、碱、硝酸盐和热等方法处理后作为菌种, 在海水培养基中都有不同程度的产氢能力. 以上结果表明, 在海洋污泥中也普遍存在发酵产氢菌群, 此菌群是产酸菌群, 它能够适应海水的高盐和高 pH 环境. 4 种处理

方法中，以热处理的效果最好. 这与淡水中产氢菌群的富集也以热处理的效果最好相一致[16]. 用热处理方法获得的海洋菌群的最大产氢速率为 27.5 mL·L^{-1}·h^{-1}(图 1(c))，产氢量达 1240 mL/L (图 1(b))，蔗糖的转化率为 79 mL/g (H_2/蔗糖)(表 2). 在淡水方面达到的产氢效率分别为 89.8~132.3 mL/g (H_2/蔗糖)[17]、80 mL H_2/g (H_2/淀粉)[18]、72 mL/g (H_2/蔗糖)[19]、30~126 mL/g (H_2/蔗糖)[20]等. 此产氢量与本实验所获得的海洋混合产氢菌群的产氢能力相差不多. 但也有人在淡水领域使产氢率高达 252 mL/g (H_2/蔗糖)，但这是在高效反应器(发酵罐)和维持适宜产氢 pH 值等最适产氢条件下获得的[21]. 这种相差也可能是由于培养条件没有得到进一步的优化，以及反应器等条件的差异造成的. 因此，本实验获得的产氢菌群可以作为起始菌种，直接用于发酵制氢或进一步分离、纯化获得纯菌株. 由于这类产氢菌在海洋活性污泥中普遍存在，如对更多的泥样进行富集、分离、筛选和纯化，也有可能获得产氢能力和污水处理能力更强的的菌株.

由于厌氧暗发酵产氢菌在放氢的同时使培养液 pH 下降，反过来又抑制产氢. 光合细菌方面的研究结果表明，光合细菌在产氢过程中会使 pH 升高，并且能利用乙酸、丁酸等酸性底物产氢[22]. 如果将暗发酵产氢与光合细菌制氢相结合，将会有利于稳定 pH 值和提高底物利用率，从而提高产氢量和产氢效率. 海洋产氢菌的进一步收集、分离、纯化，发酵产氢菌和光合细菌偶联制氢是今后需要重点研究的问题.

参考文献

1 Basak N, Das D. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: The present state of the art. World J Microb Biot, 2007, 23: 31—42[doi]
2 Nandi R, Sengupta S. Microbial production of hydrogen: An overview. Crit Rev Microbiol, 1998, 24: 61—84
3 Hallenbeck P C, Benemann J R. Biological hydrogen production, fundamentals and limiting processes. Int J Hydrogen Energ, 2002, 27: 1185—1193
4 Li C L, Fang H H P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. Crit Rev Env Sci Tec, 2007, 37: 1—39[doi]
5 李建政，任南琪，林明，等. 有机废水发酵法生物制氢中试研究. 太阳能学报, 2002, 23: 252—256
6 Jo J H, Lee D S, Park D, et al. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. Bioresour Technol, 2008, 99: 2061—2066[doi]
7 Kotay S M, Das D. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. Bioresour Technol, 2007, 98: 1183—1190[doi]
8 Lin P Y, Whang L M, Wu Y R, et al. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. Int J Hydrogen Energ, 2007, 32: 1728—1735[doi]
9 Davila-Vazquez G, Arriaga S, Alatriste-Mondragón F, et al. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. Rev Environ Sci Biotechnol, 2008, 7: 27—45[doi]
10 Mohan S V, Babu V L, Sarma P N. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. Bioresour Technol, 2008, 99: 59—6710[doi]
11 Zhu H, Béland M. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. Int J Hydrogen Energ, 2006, 31: 1980—1988[doi]
12 Mu Y, Yu H Q, Wang G. Evaluation of three methods for enriching H_2-producing cultures from anaerobic sludge. Enzyme Microb Tech, 2007, 40: 947—953[doi]
13 Tramice A, Pagnotta E, Romano I, et al. Transglycosylation reactions using glycosyl hydrolases from *Thermotoga neapolitana*, a marine hydrogen-producing bacterium. J Mol Catal B-ENZYM, 2007, 47: 21—27[doi]
14 Endo G, Noike T, Matsumoto T. Characteristics of cellulose and glucose decomposition in acidogenic phase of anaerobic digestion. Proc Soc Civ Engrs, 1982, 325: 61—68
15 Koehler L H. Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. Am Chem Soc, 1952, 24: 1576—1579
16 肖本益，刘俊新. 4 种预处理对污水厂污泥生物产氢的影响. 科学通报, 2008, 53: 1987—1992
17 Fan Y, Li C, Lay J J, et al. Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. Bioresour Technol, 2004, 91: 189—193[doi]
18 刘敏，陈滢，任南琪. 模拟淀粉废水厌氧发酵生物制氢. 四川大学学报: 工程科学版, 2006, 38: 55—59
19 吴薛明. Biolog 鉴定产氢发酵细菌及其产氢能力的研究. 应用化工, 2006, 35: 491—493
20 樊耀亭，李晨林，侯红卫，等. 天然厌氧微生物氢发酵生产生物氢气的研究. 中国环境科学, 2002, 22: 370—374
21 Mu Y, Wang G, Yu H Q. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. Enzyme Microb Tech, 2006, 38: 905—913[doi]
22 Tao Y, He Y, Wu Y, et al. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. Int J Hydrogen Energ, 2008, 33: 963—973[doi]