潮间带暗发酵产氢菌群富集和产氢过程分析

才金玲^{*}, 王广策^{*}, 李延川^{*}, 朱大玲^{*}, 潘光华^{*}

中国科学院海洋研究所, 青岛 266071;

中国科学院研究生院, 北京 100049;

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;

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

() 泥样和预处理. 海洋污泥取自青岛胶州湾的潮间带, 4 °C 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

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-11-1547>

10, 在室温下放置 30 min 后调至 pH 7; 热处理是将污泥在 100 °C 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.

() 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 $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.000125 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 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 °C 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.

() 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 $2\text{ m} \times 3\text{ mm}$ 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 °C, 60 °C 和 80 °C. 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 DLETA-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 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 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°C 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 $27.5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. 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/ $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$	产气延迟时间/h	最大产氢速率/ $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	100 h 终 pH
热处理	$1225 \pm 46 \text{ a}$	$26 \pm 1.87 \text{ a}$	$27.5 \pm 4.5 \text{ a}$	$4.16 \pm 0.12 \text{ c}$
KNO_3 处理	$850 \pm 18 \text{ b}$	$21 \pm 1.83 \text{ b}$	$19.3 \pm 1.4 \text{ b}$	$4.58 \pm 0.17 \text{ a}$
酸处理	$659 \pm 65 \text{ c}$	$21 \pm 1.78 \text{ b}$	$15.0 \pm 1.1 \text{ c}$	$4.18 \pm 0.23 \text{ c}$
碱处理	$379 \pm 22 \text{ d}$	$17 \pm 0.91 \text{ c}$	$9.1 \pm 0.9 \text{ d}$	$4.52 \pm 0.20 \text{ ab}$
未处理	$84 \pm 12 \text{ e}$	$21 \pm 0.71 \text{ b}$	$1.5 \pm 0.2 \text{ e}$	$4.3 \pm 0.11 \text{ b c}$

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

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 $27.5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (图 1(c)), 产氢量达 1240 mL/L (图 1(b)), 蔗糖的转化率为 79 mL/g ($\text{H}_2/\text{蔗糖}$) (表 2)。在淡水方面达到的产氢效率分别为 $89.8\sim 132.3 \text{ mL/g}$ ($\text{H}_2/\text{蔗糖}$)^[17]、 $80 \text{ mL H}_2/\text{g}$ ($\text{H}_2/\text{淀粉}$)^[18]、 72 mL/g ($\text{H}_2/\text{蔗糖}$)^[19]、 $30\sim 126 \text{ mL/g}$ ($\text{H}_2/\text{蔗糖}$)^[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 ($\text{H}_2/\text{蔗糖}$), 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

- 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]
- Nandi R, Sengupta S. Microbial production of hydrogen: An overview. *Crit Rev Microbiol*, 1998, 24: 61—84
- Hallenbeck P C, Benemann J R. Biological hydrogen production, fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energ*, 2002, 27: 1185—1193
- 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]
- 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
- 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]
- 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]
- 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]
- Davila-Vazquez G, Arriaga S, Alariste-Mondragón F, et al. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2008, 7: 27—45[doi]
- 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—67[doi]
- 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]
- 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]
- 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]
- 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
- Kochler L H. Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. *Am Chem Soc*, 1952, 24: 1576—1579
- 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
- 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]
- 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
- 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
- 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
- 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]
- 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]