

高效产氢菌株 *Enterococcus* sp. LG1 的分离及产氢特性

李宇亮 李小明* 郭 亮 周 屹 曾光明 杨 麒 廖德祥

(湖南大学环境科学与工程学院 长沙 410082)

摘 要: 采用 Hungate 厌氧培养技术分别从厌氧污泥、好氧污泥及河底泥中分离出 12 株厌氧产氢细菌, 并对其中的 *Enterococcus* sp. LG1(注册号: EU258743)进行了研究。结果表明, 该株细菌为专性厌氧菌, 经革兰氏染色结果为阴性。通过 16S rDNA 碱基测序和比对证实, 该菌株是目前尚未报道过的 1 个新菌种, 初步确定其细菌学上的分类地位。同时, 以灭菌预处理的污泥为底物培养基, 对该菌的产氢能力及污泥发酵过程中底物性质变化(SCOD、可溶性蛋白质、总糖和 pH 值等)进行了探讨。实验结果显示, 产氢菌 *Enterococcus* sp. LG1 的发酵过程中只有 H₂ 和 CO₂ 产生, 无 CH₄ 产生。产气量最高为 36.48 mL/g TCOD, 氢气含量高达 73.5%, 为已报道文献中以污泥为底物发酵制氢中之最高。根据污泥发酵产物分析得知, 该菌的发酵类行为典型的丁酸型发酵。

关键词: 生物产氢, 新菌, 污泥, 厌氧发酵, 产氢能力

Isolation and Characterization of a New High Efficient H₂-producing Bacterium *Enterococcus* sp. LG1

LI Yu-Liang LI Xiao-Ming* GUO Liang ZHOU Yi ZENG Guang-Ming
YANG Qi LIAO De-Xiang

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract: 12 strains of H₂-producing bacteria were isolated and purified from anaerobic sludge, aerobic sludge and river bottom sludge by Hungate method. A new species of high efficient hydrogen production bacterium *Enterococcus* sp. LG1 (registration number: EU258743) was studied deeply. It was showed that the *Enterococcus* sp. LG1 was an anaerobic and Gram-negative bacterium. Sequence analysis of this type of clones showed that it was affiliated with the genus *Enterococcus* and it was not reported yet in other paper at present. Meanwhile, batch tests of anaerobic fermentative hydrogen production by *Enterococcus* sp. LG1 were investigated by using sterilization pretreated sludge as substrate. The changes of soluble COD, protein, carbohydrate and pH value during hydrogen fermentation were monitored. It was found that only hydrogen and carbon dioxide were produced by this strain and no methane was detected during fermentation. The maximal hydrogen yield was 36.48 mL/g TCOD and the hydrogen concentration in the gas phase was 73.5%. The *Enterococcus* sp. LG1 was a butyrate fermentation bacteria analyzed by metabolites.

Keywords: Bio-hydrogen, Novel species, Sludge, Anaerobic fermentation, Hydrogen producing function

氢能被誉为未来的“清洁能源”^[1]。它本身可再生,燃烧时只产生水,而不产生热和污染物,可实现真正的“零”排放。同时,氢以水的形式大量存在于地球上,储量十分丰富。能量密度是汽油的2.75倍高,热转化率也很高。氢的制备包括化石燃料制氢、电解水制氢和生物质制氢等方式。生物制氢主要包括光合生物制氢和发酵细菌制氢^[2]。前两种方式要消耗大量的电能及天然气、煤和石油等化工燃料。因此,后者更有工程实践的价值。其中发酵产氢速度快,反应器设计简单,且能够利用可再生资源 and 废弃有机物进行生产,相对于光合产氢更容易在短期内实现^[3]。

与此同时,在污水处理中产生的大量剩余污泥,如果不做无害化处理,会给环境带来污染。目前常用的污泥处理方法有焚烧法、填埋法、土地利用等方法,但这些方法都对生态环境和人类健康具有长期潜在的危害性。合理地处置、处理、资源化利用污泥,已经成为城市经济发展和可持续性发展的一个重大问题。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

种泥分别来自厦门市污水处理厂厌氧污泥、长沙市第二污水处理厂的好氧污泥及长沙市湘江河底泥;纯种菌为笔者培养筛选出的产氢菌属 *Enterococcus* sp. LG1。

液体培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 胰蛋白胨 1.0, 蛋白胨 3.0, 牛肉膏 2.0, 酵母汁 1.0, NaCl 3.0, K₂HPO₄ 1.0, 2-半胱氨酸 0.5, 微量元素和维生素(抗坏血酸 0.025, 叶酸 0.01, NiCl₂·6H₂O 0.001, CaCl₂·2H₂O 0.01, ZnCl₂ 0.02)各 10.0 mL/L, 刃天青(0.2%) 1 mL; pH 6.0。

固体培养基(g/L): 琼脂 20~25, 其他成分同液体培养基。

实验用的污泥取自长沙市第一污水厂剩余污泥,污泥性质如表 1 所示。

1.2 分析方法

污泥厌氧发酵过程中产生的气体体积采用定期排饱和食盐水法进行测定^[4]。用 1 mL 气密性注射器取气体样,气体样含量采用气相色谱法(安捷伦

6890N 色谱分析仪, TCD 检测器)测定。用 10 mL 注射器对反应瓶中的污泥进行取样。测定污泥的挥发性酸 VFA(安捷伦 6890N 色谱分析仪, FID 检测器); pH 值(WTW muti340i pH 计); 蛋白质、总糖浓度^[5]; 总化学需氧量(TCOD)和可溶性化学需氧量(SCOD): 标准重铬酸钾法^[6]。

表 1 污泥性质
Table 1 Characters of raw sludge

pH	7.0~7.4
TCOD(mg/L)	8284~12182
SCOD(mg/L)	42~336
TS(g/L)	12.0~14.7
VS(g/L)	7.2~9.2
蛋白质(mg/L)	0~60
总糖(mg/L)	0~13.9

1.3 实验方法

1.3.1 产氢菌的分离及提纯: 分别取厦门市污水处理厂厌氧污泥、长沙市第二污水处理厂的好氧污泥及长沙市湘江河底泥,按下述的提纯方法进行纯化处理,共分离得到产氢菌 12 株。将其分别接种于剩余物泥中,测其产氢效果,得到一株高效产氢菌 *Enterococcus* sp. LG1。

细菌提纯程序: 在 80 °C 温度下热预处理 2 h,以降低产 CH₄ 菌的生物活性; 用已灭菌的器皿将颗粒污泥捣碎; 利用 Hungate 滚管技术^[7]对已接种的污泥进行产氢菌的分离和纯化,先在固体培养基上培养,然后把菌落接种于液体培养基中,再取 1 mL 菌液,稀释 10⁶倍,再接到固体培养基中,重复 3 次; 测定 3 次提纯细菌的产氢量,选择产氢效果最好的菌株。

1.3.2 产氢菌的鉴定: 菌种的鉴定通过以下步骤:

DNA 提取; 电泳检查 DNA; 16S rDNA 的 PCR 扩增; 序列测定。

16S rDNA 的 PCR 扩增方法: 正向引物 BSF8/20: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 PLA: 5'-GGTACTTAGATGTTTCAGTTC-3', 分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 的 8~27 和 23S rRNA 的 209~189 位。测序由上海博亚生物技术有限公司完成。PCR 扩增采用 PTC-100 热循环仪(美国 MJ 公司)。

反应体系 100 μL : 10 \times buffer(10 μL); 引物 BSF8/20 3 μL (0.6 μmol); 引物 PLA 3 μL (0.6 μmol); dNTP 8 μL (200 μmol); Taq 酶 0.5 μL (5 U/ μL); 模板 1 μL (0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)~1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); 双脱氧水 74.5 μL 。反应程序为 94 4 min; 94 1.5 min, 55 1 min; 72 1.5 min, 30 个循环; 72 10min。采用低熔点琼脂糖的方法切胶回收目的片段, 并电泳检测 PCR 产物的纯化^[5]。

测定结果显示本实验中的菌种是肠球型产氢菌属 *Enterococcus* sp. LG1, 其 16S rDNA 序列在 GenBank 中的注册号为 EU258743。

1.3.3 产氢菌的污泥发酵: 取 11 支三角锥形瓶, 各装实验用污泥 100 mL, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 备用。其中 1 支作为空白, 测定初始污泥性质。其余 10 支各接种 10 mL 的纯种菌液, 以 N_2 吹脱瓶中的氧气 5 min, 凡士林密封, 在设置为 35 ± 1 , 转速 120 r/min~140 r/min 的往复水浴恒温振荡器上连续运行 (实验装置如图 1 所示)。实验中, 各组实验均设置 10 个相同条件的反应瓶, 同时开始运行, 每隔 3 h~4 h 按编号依次取出 1 瓶, 记录产气量, 测定气体成分和反应瓶中污泥底物的各项指标(SCOD、可溶性蛋白质、总糖和 pH 值等)。试验反应装置如图 1 所示。

2 结果与分析

2.1 菌种的鉴定及其性质

2.1.1 菌种的鉴定: 菌种的鉴定通过以下步骤:

DNA 提取; 电泳检查 DNA; 16S rDNA 的 PCR 扩增; 序列测定。测定结果表明, 本实验中的菌种是肠球菌属 LG1(*Enterococcus* sp. LG1), 其注册号为 EU258743。图 2 为肠球菌 LG1 的系统发育树。

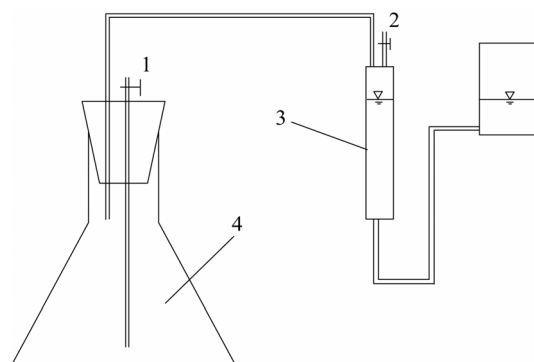


图 1 生物产氢反应装置

Fig. 1 Overall schematic of the hydrogen production reactor

1: 污泥取样口; 2: 气体取样口; 3: 气体收集装置; 4: 发酵装置
1: Sludge sampling orifice; 2: Gassampling orifice; 3: Gas collection device; 4: Fermentation device

2.1.2 菌种的形态特征: *Enterococcus* sp. LG1 为革兰氏阴性菌, 在液体培养基中呈现球状。固体培养基上生长时, 产生白色菌落, 边缘整齐, 不透明, 表面光滑。这种菌分裂生殖, 能够降解污泥中的糖和蛋白质, 同时产生氢气。菌体照片由 TEOL TSM-6360LV 电镜拍摄, 如图 3 所示。

2.2 菌种的产氢特性

Enterococcus sp. LG1 的氢气产量如图 4 所示: 将 *Enterococcus* sp. LG1 接种于经过灭菌的污泥中,

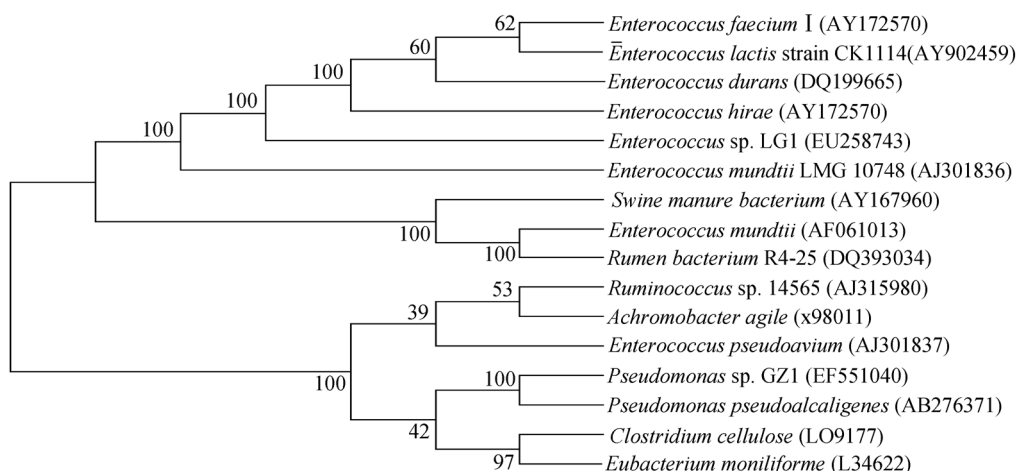


图 2 基于 16S rDNA 序列的肠球菌 *Enterococcus* sp. LG1 菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain *Enterococcus* sp. LG1 based on 16S rDNA sequence

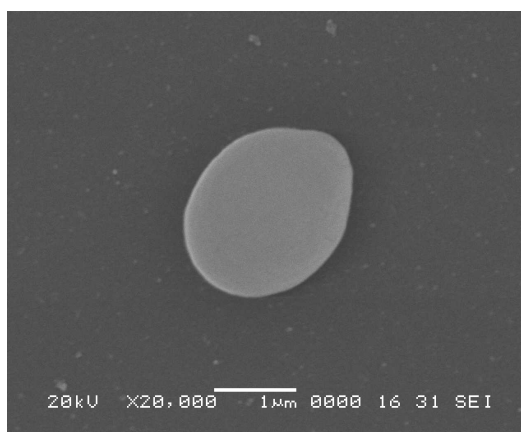
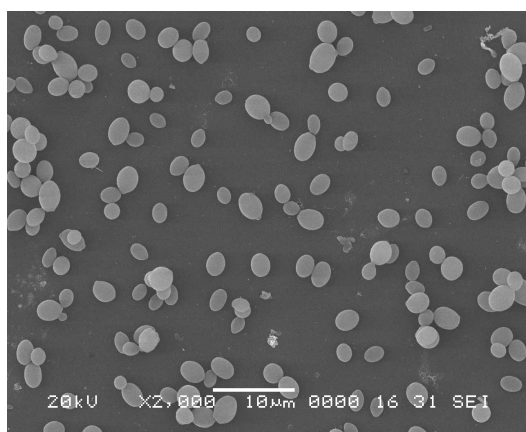
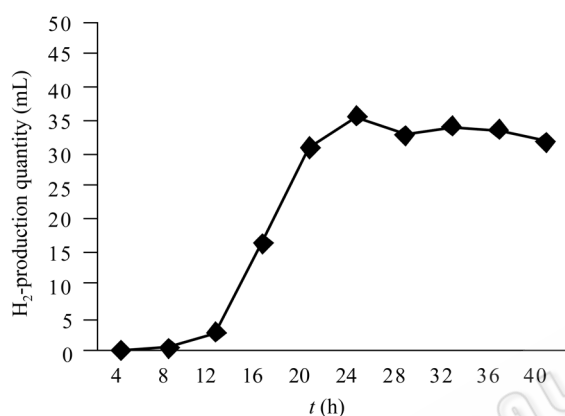
图3 *Enterococcus* sp. LG1 扫描电镜图片Fig. 3 Scanning electron microscopy (SME) of *Enterococcus* sp. LG1

图4 污泥厌氧发酵氢气产量变化

Fig. 4 Change of hydrogen yield in the anaerobic fermentations of sludge

在 35 ± 1 、120 r/min~140 r/min 的往复水浴恒温振荡器上恒发酵。菌种氢气产量为 35.5 mL, 氢气含量高达 73.5%, 且在发酵过程中没有监测到 CH₄ 气体, 平均产氢率为 36.48 mL H₂/g TCOD。

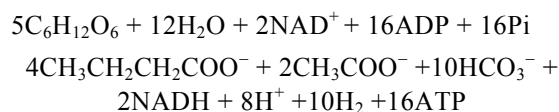
从图中可知, 氢气产量在发酵起始阶段增长缓慢, 这是由于菌种量少, 且对污泥的性质不适应, 生长受到抑制, 同时污泥中分子有机物居多, 需要先水解为小分子有机物, 细菌才能利用所致。随着发酵过程的进行, 菌体数量成对数增长, 污泥中大分子有机物被水解, 污泥中营养物质显著增加, 氢气产量迅速增加, 并于发酵 24 h 达到最大值 35 mL。在维持一段时间后, 菌体数量的增加, 营养物质减少, pH 下降, 有机酸浓度的增加等, 氢气产量开始下降。最后, 由于氢气是发酵过程的中间环节, 故产生的氢气又被产氢菌消耗。

目前, 在国内外已有一些关于污泥制氢菌的报

道, Guo 等^[8]厌氧污泥中筛选出的 *Pseudomonas* sp. GZ1 (EF551040), 以好氧污泥为底物, 其氢气的最大转化率为 15.02 mL H₂/g TCOD。Wang CC^[9]等筛选出 *C. bifermentans*, 以普通活性污泥为底物最大的产氢转化率为 13.4 mL H₂/g TCOD, 本试验中的 *Enterococcus* sp. LG1, 氢气的最大转化率为 36.48 mL H₂/g TCOD, 远远高于已报道的其它菌属。

2.3 菌种的发酵类型

根据液相末端发酵产物组分含量的不同, 产酸反应器中存在的发酵类型主要有 3 种: 丁酸型发酵、丙酸型发酵和乙醇型发酵^[5]。丙酸型发酵气体产量很少, 仅产生 CO₂, 无 H₂ 的产生。乙醇型发酵是在一定条件下, 碳水化合物的产酸发酵末端产物主要形成了以乙醇、乙酸、H₂ 和 CO₂ 为主, 并有少量丁酸和丙酸的发酵类型^[10]。丁酸发酵中主要末端产物为丁酸、乙酸、H₂、CO₂ 和少量的丙酸。发酵葡萄糖产氢时, 其反应式如下:



本试验液相末端发酵产物组分含量如表 2 所示, 产氢发酵产生的挥发性酸(VFA)中只有乙酸和丁酸。在上述 3 种条件下, 乙酸和丁酸均是 VFA 的主要组成成分, 所以该菌是典型的丁酸型发酵。

2.4 污泥产氢过程中底物变化情况

2.4.1 污泥可溶性化学需氧量(SCOD)变化: 污泥发酵产氢过程中可溶性有机物(SCOD)的变化情况如图 5 所示, 原污泥 SCOD 为 312 mg/L, 经过灭菌

表 2 污泥产氢后污泥中挥发性酸(VFA)含量(μg/L) Table 2 The concentration of the volatility fat acid (VFA) in the sludge(μg/L)	
VFA(μg/L)	含量
甲酸 Formyl acid	0
乙酸 Acetic acid	8372.698
丙酸 Propionic acid	0
丁酸 Butyric acid	3129.317
戊酸 Valeric acid	0

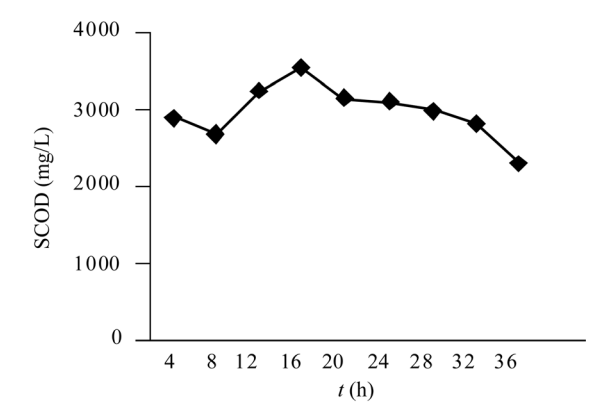


图 5 污泥发酵过程中 SCOD 浓度变化
Fig. 5 Change of SCOD concentration in anaerobic fermentations of sludge

预处理之后, SCOD 上升为 2912 mg/L。污泥发酵产氢开始后, SCOD 稍有下降, 但很快便又继续上升至最高点 3536 mg/L, 这比污泥发酵开始前增加了 21.4%, 这时氢气的产量也开始快速增加, 发酵过程高速进行。发酵的后期, SCOD 有着明显的下降趋势。

Bryant(1967)^[5]认为, 有机物的厌氧发酵会经历 4 个阶段: 水解阶段(hydrolysis); 产酸发酵(acidogenic fermentation)阶段; 产氢产乙酸(H_2 -producing acetogenesis)阶段; 产甲烷(methanogenesis)阶段。本实验以剩余污泥为底物, 污泥中含有大量的复杂有机物, 细菌不能利用, 因此在污泥发酵的起始阶段 SCOD 有所下降, 但随着发酵过程的水解阶段开始, 大分子的有机物被细菌水解为小分子可溶得有机物^[11,12], 故而污泥中的 SCOD 开始上升, 并快速上升到了最高点 3536 mg/L。同时在最高点时, 细菌量也达到了峰值, 对污泥中可溶性有机物的需求也达到了最大, 因此, SCOD 出现下降的趋势。

同时, 从图中看出, 污泥在产氢结束后其 SCOD 含量仍然很高, 仍具有较高的可生化性, 可

以后续利用, 如产甲烷等。
2.4.2 污泥中可溶蛋白质、总糖浓度变化: 污泥发酵制氢的过程中可溶性蛋白质及总糖的变化规律如图 6、图 7 所示。

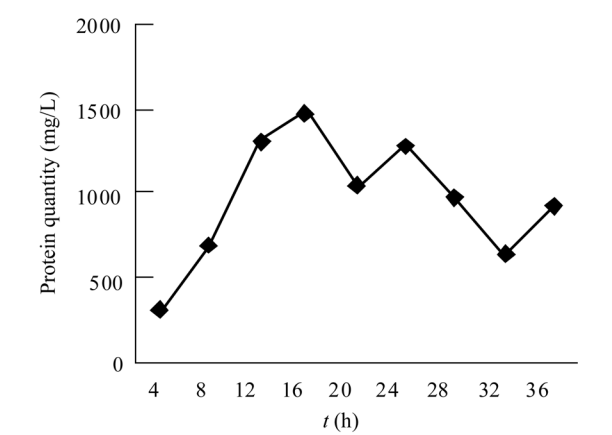


图 6 污泥发酵过程中可溶性蛋白质浓度变化
Fig. 6 Change of soluble protein concentration in anaerobic fermentations of sludge

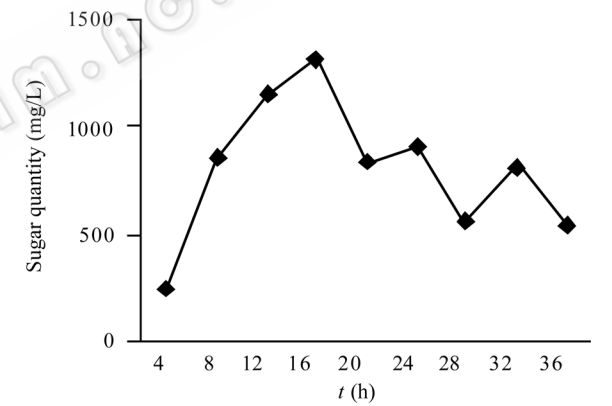


图 7 污泥发酵过程中总糖浓度变化
Fig. 7 Change of carbohydrate concentration in anaerobic fermentations of sludge

原污泥中可溶性蛋白质的含量为 41.79 mg/L, 总糖的含量为 25.81 mg/L。经过灭菌的预处理之后, 可溶性蛋白质及总糖的含量分别上升到了 319.23 mg/L 和 236.88 mg/L。污泥发酵过程开始后, 可溶性蛋白质及总糖的含量迅速上升, 并在发酵 16 h 时达到峰值, 分别为 1511.87 mg/L 和 1311.58 mg/L。在发酵过程的后期, 虽然各自的量偶有上升, 但总体的趋势是下降的。

目前, 关于污泥发酵产氢过程中蛋白质和总糖等营养物质变化的研究, 国内外报导的很少。Caimu 等^[13]研究混合菌发酵厌氧污泥产氢时蛋白质浓度变

化情况,他们认为蛋白质是微生物产氢的主要营养物质,在污泥发酵的初期,细菌首先将污泥内的大分子蛋白质及糖类物质水解为了小分子的污泥,故污泥中的可溶性蛋白质及总糖的含量迅速上升,并很快达到峰值。随着发酵过程的深入,细菌开始以发酵污泥中的可溶性有机物作为营养物质加以利用制氢时,污泥中的可溶性有机物的量开始明显下降,因此,可溶性蛋白质和总糖的含量呈现下降趋势。

2.4.3 污泥 pH 值变化:污泥发酵过程中 pH 值的变化如图 8 所示,由图中可知,污泥的 pH 在发酵产氢的初期变化迅速,这是因为在这一阶段中污泥是处在发酵产氢的延迟期,污泥中的大分子有机物在水解酸化过程中产生了一部分酸。当污泥产氢开始之后,污泥 pH 值下降幅度明显减缓甚至略有升高,但整个发酵过程中 pH 值基本都在 5~6 之间变动,这主要是由于污泥中含有大量蛋白质,蛋白质降解产生的 NH_4^+-N 会中和 VFA,从而减缓污泥 pH 值下降^[14]。

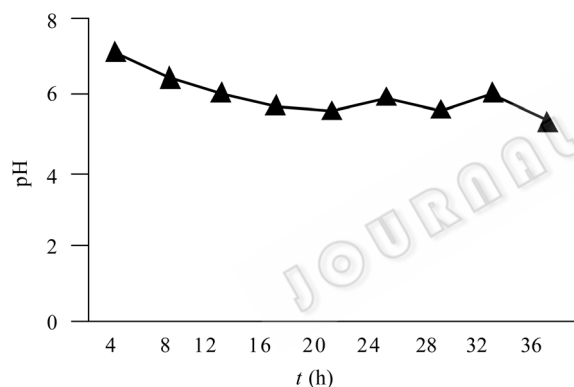


图 8 污泥发酵过程中 pH 值变化

Fig. 8 Change of pH value in anaerobic fermentations of sludge

3 结论

(1) 采用 Hungate 厌氧滚管技术从厌氧污泥、好氧污泥及河底污泥中分离出了 12 株发酵产氢细菌。通过形态特征及 16S rDNA 测序,将其中 1 株高效产氢菌命名为 *Enterococcus* sp. LG1。

(2) *Enterococcus* sp. LG1 为革兰氏阴性菌,可水解污泥,利用其中的蛋白质、糖等有机物产氢气,发酵类型为丁酸性发酵。

(3) 以经过 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 的污泥为底物,接种 *Enterococcus* sp. LG1,在 35 ± 1 、

120 r/min~140 r/min 的往复水浴恒温振荡器上连续运行,氢气的最高产量为 35.5 mL,氢气含量高达 73.5%,且在发酵过程中没有监测到 CH_4 气体,平均产氢率为 36.48 mL H_2 /g TCOD,远远高于已报道的其它菌属。

参考文献

- [1] Gong ML, Ren NQ, Xin DF. Continuous operation of hydrogen-producing reactor with butyrate-type fermentation. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, **25**(2): 275-278.
- [2] Takabataka H, Suzuki K, In-beom K, *et al.* Biological hydrogen production: fundamentals and limiting process. *Bioresource Technology*, 2004, **95**: 151-158.
- [3] Minna L, Jinli H, Xiaobin W, *et al.* Biotechnological hydrogen production: research for efficient light energy conversion. *Research in Microbiology*, 2005, **156**: 76-81.
- [4] Owen WF, Stuckey DC, Jr Healy JB, *et al.* Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Wat Res*, 1979, **13**: 485-493.
- [5] 任南琪,王爱杰,马放. 产酸发酵微生物生理生态学. 北京: 科学出版社, 2005, pp.301-306.
- [6] 国家环保局编. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002, pp.354-359.
- [7] Hungate RE. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in microbiology*(volume 2). New York: Academic Press, 1969, pp.117-132.
- [8] Guo L, Li XM, Xie B, *et al.* Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresour Technol*, 2007, doi:10.1016/j.biortech.2007.07.026.
- [9] Wang CC, Chang CW, Chu CP. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *J Biotech*, 2003, **102**: 83-92.
- [10] 宫曼丽,任南琪,邢德峰,等. 丁酸型发酵生物制氢反应器的运行特性研究. 环境科学学报, 2005, **25**(2): 275-278.
- [11] Eastman JA, Ferguson JF. Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *J WPCF*, 1981, **53**(3): 352-366.
- [12] Alvarez JM, Macé S, Llabrés P. Anaerobic digestion of organic solid wastes: An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour Technol*, 2000, **74**: 3-16.
- [13] Caimu L, Liu JX, Yuan SW. Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. *Environ Sci Technol*, 2004, **38**: 3195-3202.
- [14] Sung SH, Liu T. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere*, 2003, **53**: 43-52.