

## 厌氧发酵产氢细菌的筛选及其产氢优化

李珊珊<sup>1,2,3</sup> 范代娣<sup>1,2,3\*</sup> 马晓轩<sup>1,2,3</sup> 骆艳娥<sup>1,2,3</sup> 米钰<sup>1,2,3</sup>  
马沛<sup>1,2,3</sup> 朱晨辉<sup>1,2,3</sup> 惠俊峰<sup>1,2,3</sup>

- (1. 陕西省可降解生物医用材料重点实验室 陕西 西安 710069)
- (2. 陕西省生物材料与发酵工程技术研究中心 陕西 西安 710069)
- (3. 西北大学化工学院 陕西 西安 710069)

**摘要:** 本研究以河底泥为来源,使用产氢培养基进行初筛,再利用小管产氢试验进行复筛,得到5株产氢能力较好的菌株。对产氢量最高的菌株FML-C<sub>1</sub>进行16S rDNA序列分析,鉴定为阴沟肠杆菌,确定了其分类地位。培养基优化采用Plackett-Burman试验设计筛选出影响产氢的3个主要因素:葡萄糖、缓冲液和还原剂。利用最陡爬坡路径逼近最大响应区,采用中心复合试验设计(CCD)及响应面分析法(RSM)进行回归分析,建立产氢培养基优化的二次模型。模型求解产氢最佳培养基为葡萄糖21.5 g/L、缓冲液13.6 mL/L和还原剂10.0 mL/L,最大理论产氢量2367.83 mL/L。5批验证试验结果平均值与预测值接近,表明该模型与实际情况拟合良好,实际最大产氢量2347.40 mL/L,较优化前产氢量提高127.42%。

**关键词:** 生物制氢, 菌种筛选, 厌氧发酵, 培养基优化, 响应面分析法

## Anaerobic Biohydrogen Production Bacteria Selection and Its Optimization of Biohydrogen Fermentation Process

LI Shan-Shan<sup>1,2,3</sup> FAN Dai-Di<sup>1,2,3\*</sup> MA Xiao-Xuan<sup>1,2,3</sup> LUO Yan-E<sup>1,2,3</sup>  
MI Yu<sup>1,2,3</sup> MA Pei<sup>1,2,3</sup> ZHU Chen-Hui<sup>1,2,3</sup> HUI Jun-Feng<sup>1,2,3</sup>

- (1. Key Laboratory of Degradable Medical Material, Xi'an, Shaanxi 710069, China)
- (2. Research Center of Biomaterial and Fermentation Engineering, Xi'an, Shaanxi 710069, China)
- (3. College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

**Abstract:** This research adopted silt as the sample, and the five highest hydrogen production performing strains contained in the sample were isolated. The strain whose hydrogen production was the highest was identified as *Enterobacter cloacae* by the analysis of 16S rDNA sequencing and comparison. It is showed by Plackett-Burman Experimental Design that only glucose, citric buffer and reducing agent had significant effects on hydrogen production by *Enterobacter cloacae* FML-C<sub>1</sub>. The path of steepest ascent was undertaken to approach the optimal response region of those three factors. Central Composite Design (CCD) and Response Surface Methodology (RSM) were employed to investigate the interaction of the variables and to ascertain the optimal values of the factors, which finally led to the maximum hydrogen production ( $V_{H_2}$ ). The theoretical optimal medium conditions were: glucose 21.5 g/L, citric buffer 13.6 mL/L, reducing agent

10.0 mL/L. The five tentative tests matched this model well. The final  $V_{H_2}$  was up to 2347.4 mL/L, which was 127.42% enhanced in comparison to the original. The result shows that PB experiment design and RSM analytical method work well in selecting factors which have significant influences on the hydrogen production and, moreover, achieve the ideal optimal result.

**Keywords:** Biological hydrogen, Screening, Anaerobic fermentation, Culture optimization, Response surface

生物制氢是利用可再生能源通过生物的转化作用制取氢气。这一途径既缓解了能源危机,又消除了环境污染,是一种理想的产能方式<sup>[1-4]</sup>。其中,由于厌氧发酵自身所具有的优点<sup>[5]</sup>,成为近些年来研究的热点。

产氢菌株是生物制氢的核心,高效产氢菌株的筛选不但是生物制氢最基础的研究课题,也为产氢菌株遗传育种和生理生化的研究提供了重要的微生物资源。发酵产氢实质是产氢产酸细菌降解有机物质释放出  $H_2$ 。结合 Gray 和 Gest 1965 年在《Science》提出的产氢理论<sup>[6]</sup>,及 Tanisho 1995 年所提出的细菌产氢发酵途径的分类方法<sup>[7]</sup>,可将细菌产氢途径分为 3 类:丙酮酸途径、甲酸途径和 NADH/NAD<sup>+</sup>平衡调节途径<sup>[8]</sup>。

Plackett-Burman 设计法和响应面分析法是 20 世纪中后期发展起来的优化试验条件统计学方法,优化效率高,应用广泛。培养基的成分配比对于产氢细菌的生长代谢有重要的影响,而目前对于产氢培养基研究绝大多数只围绕其中某种成分对产氢效果的影响来展开,利用统计学方法对产氢菌的培养基进行系统优化以提高单菌产氢能力的研究鲜有报道。基于以上几点,本文采用改进的 Hungate 厌氧培养方法,筛选到的 1 株天然兼性厌氧发酵产氢细菌(FML-C<sub>1</sub>),并对其产氢培养基进行了系统的优化研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 以西安市东郊浐河深层底泥为混合菌种来源,产氢菌株 FML-系列由本实验室保藏。

**1.1.2 液体产氢培养基(g/L):** 葡萄糖 10, 酵母粉 2, 蛋白胨 2, NaCl 4, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, L-半胱氨酸 0.5, 柠檬酸盐缓冲液 10 mL, 微量元素液[MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, NaMoO<sub>4</sub> 0.01, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2,

AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.01] 10 mL, 维生素液(抗坏血酸 0.025, 钴胺素 0.01, 叶酸 0.01, 肌酸 0.025) 10 mL, 0.2% Na<sub>2</sub>S 1 mL, 美兰指示剂(6%葡萄糖 10 mL, 0.1 mol/L NaOH 0.6 mL 稀释到 10 mL, 0.5%亚甲基蓝 0.3 mL 稀释到 10 mL, 三者等量混合) 10 mL, 初始 pH 6.0~6.4。

固体产氢培养基: 液体产氢培养基, 琼脂粉 1.5%~2%。

### 1.2 实验方案

**1.2.1 菌种初筛:** 将天然来源的深层河底泥装入充满氩气的三角瓶中,加入玻璃珠,充分振荡均匀,过滤除去其中的悬浮物和颗粒性杂质。将经过预处理的样品用无菌水进行倍比稀释,采用改进的 Hungate 厌氧操作方法,制成滚管培养<sup>[9]</sup>。待菌落长出后,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,直至管内菌落形态和显微镜下的细胞形态一致时,认为是获得纯菌株<sup>[10]</sup>。

**1.2.2 产氢菌的复筛:** 将分离纯化得到的菌株接入装有液体产氢培养基的杜氏小管中(如图 1 所示),35°C 恒温水浴静置培养 24 h,用无菌注射器从气相产物中取样,检测气相成分中是否有氢气存在,筛选产氢菌。

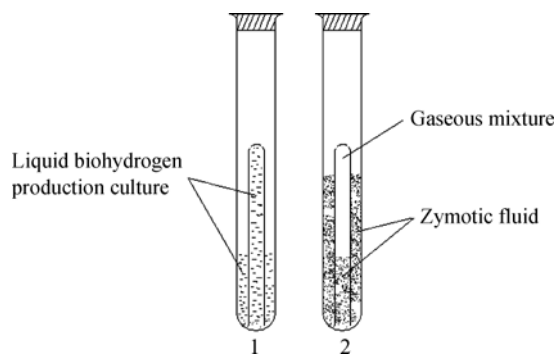


图 1 杜氏小管产氢装置图

Fig. 1 Schematic of Durbam tube

注: 1: 培养前的情况; 2: 培养后产气。

Note: 1: Before cultivation; 2: Hydrogen production after cultivation.

再将产氢菌种接入装有液体发酵培养基的三角瓶中, 35°C、150 r/min 恒温气浴振荡培养 1 d~2 d, 检测气相产物中的氢气含量。根据单位培养基产氢量 ( $V_{H_2}$ , mL/L) 衡量不同菌株的产氢能力, 筛选产氢能力相对较高的菌株。对这些菌株重复进行 3 次产氢能力测定后, 最终确定实验所需产氢细菌。

**1.2.3 产氢菌 FML-C<sub>1</sub> 形态学观察:** 对 FML-C<sub>1</sub> 进行扫描电镜观察。扫描电镜样品制备方法参照文献[11]。

**1.2.4 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析:** 采用蛋白酶/SDS 法制备总 DNA 模板<sup>[12]</sup>。采用 1 对细菌通用引物(27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492r: 5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'), 进行 PCR 扩增。反应体系: 取 DNA 模板 5 ng, STR 缓冲液 2  $\mu$ L, 引物各 100 ng, dNTPs 2  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.1  $\mu$ L, 补无菌水至 20  $\mu$ L。温度循环参数: 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 5 min。琼脂糖电泳回收检测。PCR 扩增及 16S rDNA 测序及序列分析由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。将测定的序列用 Blast 软件在 GenBank 中与已知的 16S rDNA 进行比较, 初步确定菌株在分类学中的位置。

**1.2.5 Planckett-Burman 设计法筛选该菌株产氢培养基重要因素:** 根据微生物生长所需要的营养要素的基本原则和发酵影响因素的一般规律, 结合相关的文献资料<sup>[13,14]</sup>, 本实验选取 7 个因素进行考察(见表 2), 响应值为单位培养基产氢量 ( $V_{H_2}$ , mL/L)。

**1.2.6 中心复合试验设计:** 对单因素实验筛选到的关键因子进一步研究, 以获得影响该产氢菌发酵产氢的最优培养基。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 产气量的测定:** 采用排水法收集气体(图 2), 累积产氢量按下述公式计算<sup>[15]</sup>:

$$V = V_0 x_i + \sum V_i x_i \quad (1)$$

其中:  $V$  是累积产氢量(mL);  $V_0$  是反应器液面上空的体积(mL);  $V_i$  是第  $i$  次抽出气体的体积(mL);  $x_i$  是第  $i$  次抽出气体中氢气的含量。

**1.3.2 菌浊的测定:** 将发酵液进行适当的稀释后, 采用美谱达 V-1100 型可见分光光度计在波长 600 nm 处测定发酵液的吸光度值  $OD_{600}$ 。

**1.3.3 气相末端产物的测定:** 将发酵气体干燥后使用 Agilent 7890A G3440A 型气相色谱分析气体组分。热导检测器(TCD), Proapak Q 不锈钢填充

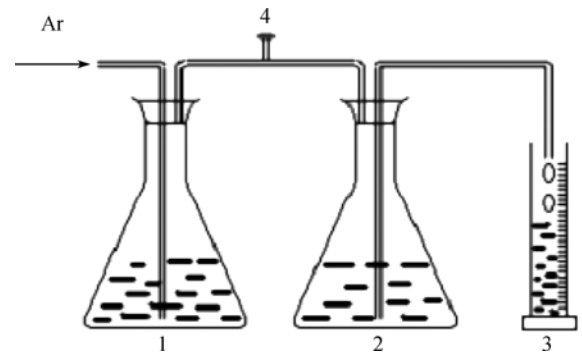


图 2 生物制氢反应装置示意图

Fig. 2 Schematic of biohydrogen production system

注: 1: 产氢反应器; 2: 气体收集器; 3: 气体测量器; 4: 气体取样阀。

Note: 1: Reaction vessel; 2: Gas collection; 3: Dosimeter; 4: Sample collection valve.

柱, 80/100 目, 2 m×3 mm, 氩气作载气, 流速为 20 mL/min。汽化温度、柱温、检测器温度分别为 150°C、35°C、200°C。

以外标法确定  $H_2$  标准曲线, 由于温度对气体体积影响十分显著, 因而要确保在恒温环境中完成实验。本实验气体检测环境温度为 27°C。确定  $H_2$  峰面积与体积含量的关系为  $y = 56317x + 870.83$ ,  $R^2 = 0.9946$ 。

**1.3.4 产氢动力学模型:** 使用修正的 Gompertz 方程式描述产氢过程<sup>[16]</sup>。

$$H = P \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{R_m e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (2)$$

其中,  $H$  是累积产氢量(mL);  $\lambda$  是产氢延迟时间(h);  $P$  是产氢潜势(mL);  $R_m$  是最大产氢速率 [mL/(L·h)];  $e = 2.718281828$ ; 在此研究中,  $P_s$  (特定的产氢潜势) 和  $R_m$  分别定义为 mL/L 和 [mL/(L·h)]。

## 2 结果与分析

### 2.1 产氢细菌的筛选

经初筛和复筛, 实验得到 5 株产氢能力较好的菌株, 见表 1。

筛选得到的 5 株产氢细菌, 其单位体积产氢量为  $892 \text{ mL/L} \pm 140 \text{ mL/L}$ , 与文献数据相比, 该未驯化的天然来源的菌株具有较大的优化空间。其中以菌株 FML-C<sub>1</sub> 的产氢能力相对最高。静态产氢试验时, 接种 3 h 后 FML-C<sub>1</sub> 开始有气泡产生。24 h 后用气相色谱对产气菌的气相产物进行分析, 氢气含量达到 56.51%。间歇产氢试验中, FML-C<sub>1</sub> 的产氢总体积达到 1032.20 mL/L, 氢气转化率为

表 1 筛选后的产氢菌株的产氢能力对比  
Table 1 The hydrogen production ability of hydrogen production bacteria after screening

实验数值 Experiment		参考文献[10] Reference[10]	
菌种 Strain	氢气体积 Hydrogen production $V_{H_2}$ (mL/L culture)	菌种 Strain	氢气体积 Hydrogen production $V_{H_2}$ (mL/L culture)
FML-C <sub>1</sub>	1032.2	B49	887.2
FML-EH <sub>21</sub>	939.8	H1	404.4
FML-D <sub>1</sub>	914.2	LM12	407.6
FML-ES <sub>12</sub>	869.5	LM11	391.2
FML-DPH	805.4	B51	348.8

0.83 mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖。在目前国内外的研究报道中, 只有 Van Niel 等研究的十几种产氢菌对葡萄糖的最大转化率在 1.2 以上<sup>[10,17-19]</sup>, 对分布范围较广的转化率在 1.0 左右的菌株的研究优化未见报道。

## 2.2 产氢菌株 FML-C<sub>1</sub> 的鉴定

该产氢菌株在固体产氢培养基平板 35°C 培养 18 h 后, 单菌落呈乳白色, 边缘光滑, 湿润(见图 3)。扫描电镜观察菌株 FML-C<sub>1</sub> 呈杆状, 1.2 μm~2.4 μm(见图 4)。16S rDNA 序列同源性比较发现,



图 3 菌株 FML-C<sub>1</sub> 的菌落形态  
Fig. 3 Colony of strain FML-C<sub>1</sub>

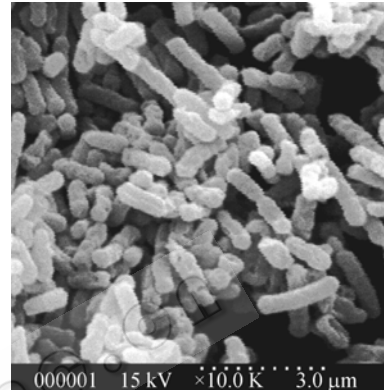


图 4 菌株 FML-C<sub>1</sub> 的菌体形态

Fig. 4 Morphological characteristics of strain FML-C<sub>1</sub>

FML-C<sub>1</sub> 和 *Enterobacter cloacae* 同源性最高, 达到 99%。根据菌株形态特征及 16S rDNA 序列分析结果, 初步鉴定菌株为 *Enterobacte* sp.。

## 2.3 Planckett-Burman 设计法筛选该菌株产氢培养基重要因素

对表 2 所列因素进行两水平 Planckett-Burman 实验, 以氢气产量  $V_{H_2}$  (mL/L) 为响应值。Planckett-Burman 实验设计表及结果分析见表 2 和表 3。

表 2 Planckett-Burman 实验设计与结果  
Table 2 Planckett-Burman experimental design and results

运行序 Run	葡萄糖 Glucose $x_1$	酵母粉 Yeast extract $x_2$	初始 pH Initial pH $x_3$	微量元素 Trace ele- ment $x_4$	缓冲液 Citric buffer $x_5$	维生素液 Vitamin solution $x_6$	还原剂 Reducing agent $x_7$	氢气体积 $V_{H_2}$ (mL/L) *
1	-1	1	-1	1	1	1	1	698.7
2	-1	1	1	-1	1	-1	-1	588.5
3	1	-1	-1	-1	1	-1	1	758.4
4	1	-1	1	-1	-1	1	1	854.0
5	1	-1	-1	1	1	1	-1	703.3
6	-1	-1	1	1	-1	1	-1	653.3
7	1	1	1	-1	1	1	-1	807.3
8	1	1	1	1	-1	-1	1	744.8
9	-1	-1	1	1	1	-1	1	643.8
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	582.3
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	687.7
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	684.4

Note: \*: Testing temperature is 27°C.

表 3 Planckett-Burman 实验设计的因素水平及效应分析  
Table 3 The level of factors and the results of regression analysis for Planckett-Burman design

项目 Item	水平 Level		系数 Coefficient	t 值 t-value	Pro> t	显著性 Significant level
	-1	1				
Intercept			700.54	91.67	0	***
$x_1$ Glucose (g/L)	5	15	58.16	7.61	0.002	***
$x_2$ Yeast extract (g/L)	1	2	1.36	0.18	0.868	
$x_3$ pH	5	7	14.74	1.93	0.126	
$x_4$ L-Cys (g/L)	0.2	0.5	-12.49	-1.63	0.177	
$x_5$ Trace element (mL/L)	5	10	-0.54	-0.07	0.974	
$x_6$ Citric buffer (mL/L)	5	10	33.51	4.38	0.012	**
$x_7$ Reducing agent (mL/L)	3	7	30.69	4.02	0.016	**

Note: \*: Stand for significant level variance.

由表 3 可看出: 葡萄糖、缓冲液和还原剂依次是影响产氢量的 3 个显著性因素, 因此可选取这 3 个因素进一步实验。该实验置信水平为 95%, 一次多项式拟合方程为:

$$Y=700.54+58.16x_1+1.36x_2+14.74x_3-12.49x_4-0.54x_5+33.51x_6+30.69x_7, R-S_q=0.9614 \quad (3)$$

#### 2.4 最陡爬坡实验

最陡爬坡实验设计及结果, 如表 4 所示。

#### 2.5 响应面分析实验设计优化培养基

根据 Planckett-Burman 设计法试验和最陡爬坡试验确定的实验因素与水平后, 采用中心复合试验设计对产氢发酵培养基进行三因素二水平的响应面

分析实验(表 5、6)。根据下述公式分别进行编码转化: 其中  $x_1=(X_1-20)/5$ ;  $x_6=(X_6-13)/3$ ;  $x_7=(X_7-9.5)/2.5$ 。

表 4 最陡爬坡试验设计及结果  
Table 4 Design of the path of steepest ascent and results

运行序 Run	葡萄糖 Glucose $X_1$	缓冲液 Citric buffer $X_6$	还原剂 Reducing agent $X_7$	氢气体积 $V_{H_2}$ (mL/L)
1	15.00	10.00	7.00	1254.50
2	20.00	13.00	9.50	1426.50
3	25.00	16.00	12.00	1396.50
4	30.00	19.00	14.50	1367.50
5	35.00	22.00	17.00	1303.50

表 5  $2^3$  全因子中心复合试验设计及结果  
Table 5 Experimental design and results of the  $2^3$  full factorial central composite design

运行序 Run	葡萄糖 Glucose (g/L)		柠檬酸缓冲液 Citric buffer (mL/L)		还原剂 Reducing agent (mL/L)		氢气体积 $V_{H_2}$ (mL/L)
	编码值	转换值	编码值	转换值	编码值	转换值	
	$x_1$	$X_1$	$x_6$	$X_6$	$x_7$	$X_7$	
1	0	20	0	13	1.681793	13.704483	2035.2
2	-1.68179	11.59105	0	13	0	9.5	1972.5
3	-1	15	1	16	-1	7.5	1872.7
4	0	20	0	13	0	9.5	2388.8
5	0	20	0	13	0	9.5	2345.6
6	0	20	0	13	0	9.5	2286.4
7	-1	15	-1	10	1	12	1916.1
8	1	25	-1	10	1	12	1997.9
9	0	20	0	13	-1.68179	5.295525	1965.6
10	1	25	-1	10	-1	7.5	1902.3
11	0	20	-1.68179	7.95463	0	9.5	2036.4
12	0	20	0	13	0	9.5	2366.7
13	1	25	1	16	-1	7.5	1967.8
14	-1	15	-1	10	-1	7.5	1985.2
15	-1	15	1	16	1	12	1974.0
16	1	25	1	16	1	12	2267.0
17	0	20	1.681793	18.04538	0	9.5	2034.2
18	1.681793	28.40895	0	13	0	9.5	2123.4
19	0	20	0	13	0	9.5	2354.3
20	0	20	0	13	0	9.5	2377.9

表6  $2^3$ 全因子中心复合试验回归分析表  
Table 6 The results of  $2^3$  full factorial central composite design regression analysis for  $V_{H_2}$

项目 Item	系数 Coefficient	系数标准误差 Coefficient standard error	t 值 t-value	Pro> t
Intercept	2354.0	16.41	143.546	<0.001
$x_1$	46.92	10.88	4.312	0.002
$x_6$	20.23	10.88	1.859	0.093
$x_7$	39.84	10.88	3.661	0.004
$x_1 * x_1$	-112.76	10.59	-10.646	<0.001
$x_6 * x_6$	-117.23	10.59	-11.068	<0.001
$x_7 * x_7$	-129.57	10.59	-12.233	<0.001
$x_1 * x_6$	48.65	14.22	3.422	0.007
$x_1 * x_7$	45.33	14.22	3.188	0.010
$x_6 * x_7$	46.75	14.22	3.289	0.008

用 Minitab15 对实验数据进行二次多项式回归拟合, 得到氢气产量对上述三因素的三元二次拟合回归方程为:

$$Y=2354.02+46.92x_1+20.23x_6+39.84x_7-112.76x_1^2-117.23x_6^2-129.57x_7^2+48.65x_1x_6+45.33x_1x_7+46.75x_6x_7, R-Sq=0.9750, R-Sq(\text{调整})=0.9525 \quad (4)$$

方差分析显著性检验表明, 方程(4)的  $F=43.35 > \omega_{9,5,0.05}=4.78$ , 方程回归性显著。且能够较好地反映真实值和预测值之间的关系, 因此该模型可用于预测该产氢菌的产氢量预测。

利用 Excel 求解方程(4)的极值。根据编码转换

公式, 求得  $X_1=21.5 \text{ g/L}$ ,  $X_6=13.6 \text{ mL/L}$ ,  $X_7=10.0 \text{ mL/L}$ , 即为该模型极值点, 此时得到理论最大产量为  $2367.83 \text{ mL/L}$ 。

根据中心复合试验结果绘出响应面分析图及其等高线图, 见图 5。该实验所考察的 3 个变量对产氢量均有显著性影响, 且交互作用明显。

## 2.6 FML-C<sub>1</sub> 菌种的验证实验

确定的优化培养基(g/L): 葡萄糖 21.5, 柠檬酸盐缓冲液 13.6 mL, 0.2% Na<sub>2</sub>S 10.0 mL, 其他成分与液体培养基相同。在上述优化条件进行验证实验, 测得  $V_{H_2}$  为  $2326.40 \text{ mL/L} \pm 21 \text{ mL/L} (N=5)$ , 与模型理论

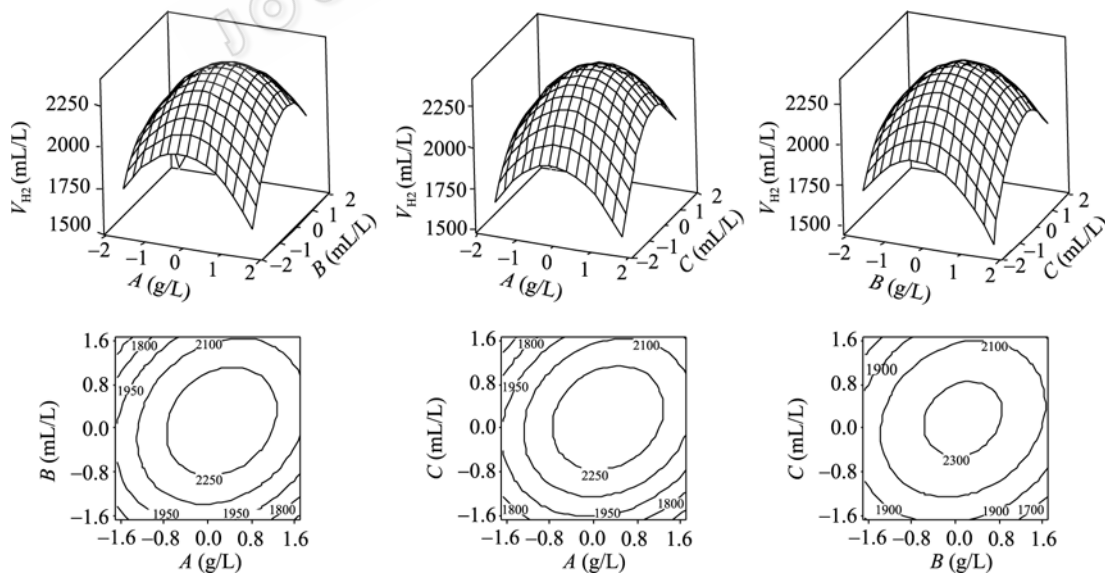


图5 葡萄糖、缓冲液和还原剂对产氢量的响应面分析图和等高线图(第3个因素保持值为0)

Fig. 5 Response surface and corresponding contour plots for the effects of glucose, citric buffer and reducing agent (the value of the third factor is zero)

注: A: 葡萄糖; B: 缓冲液; C: 还原剂。

Note: A: Glucose; B: Citric buffer; C: Reducing agent.

最大值非常接近, 可见该模型可以较好地预测实际发酵情况。

实验结果表明, 菌体生长与产氢过程同步, 属伴随生长型(如图 6 所示)。根据修正的 Gompertz 方程, 菌体生长的迟滞期很短( $\lambda=3.4$  h), 测得 4 h 累积气体中氢气的含量为 17.83%。对数生长期(6 h~16 h)有较高的产气速率,  $R_{\max}=24.93$  mmol  $H_2/g$  dry cell/h。发酵至 28 h 时产气总量 4160.8 mL/L 和氢气的产量 2347.4 mL/L 都达到最大, 此时菌体的  $OD_{600}=3.36$ , 气相产物中氢气含量为 57.83%, 转化率为 1.11, 与优化前相比, 氢气产量提高了 127.42%, 转化率提高了 33.74%。

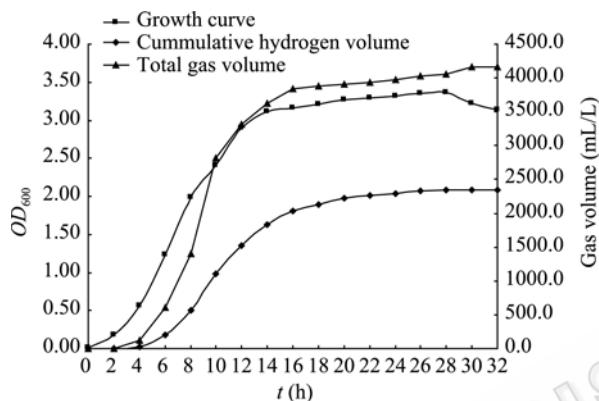


图 6  $C_1$  间歇产氢发酵过程  $OD_{600}$  与  $V_{H_2}$  相关性曲线  
Fig. 6 Correlation of  $OD_{600}$  and  $V_{H_2}$  in  $C_1$  batch fermentation experiment

### 3 讨论

本研究采用改进的 Hungate 厌氧操作方法, 对从河底泥中筛选到的 1 株产氢细菌, 进行 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定为阴沟肠杆菌。

使用响应面分析法能够有效地提高菌株的产氢量和转化率。进行培养基优化后, 该菌的产氢能力达 24.93 mmol  $H_2/g$  dry cell/h, 与 Kumar<sup>[20]</sup> 分离得到的高产氢菌株 *Enterobacter cloacae* IIT-BT08 产氢能力相当。菌株的转化率为 1.11, 与 Van Neil 报导的高产氢菌株 *C. saccharolyticus* (DSM 8903) 的转化率相比较, 仍有一定差距。在肠杆菌属中, Yokoi<sup>[21]</sup> 分离得到的 *Enterobacter aerogens* HO-39 的转化率为 1.0, Rachman<sup>[22]</sup> 分离得到的 *Enterobacter aerogens* HU-101 改良菌株 AY-2 的转化率为 1.17, 与之相比, 菌株 FML- $C_1$  仍是一株具有高产氢潜能的菌株。

目前所报导的产氢菌主要有 2 类: 梭菌属和肠

杆菌属, 通过对生物产氢途径的代谢流分析, Manish 分析了这 2 类菌种的代谢差异<sup>[23]</sup>。因此, 产氢菌产氢能力的差别可能主要是由于不同菌株的代谢差异造成的。微生物代谢机理的研究, 是提高产氢转化率、降低生产成本、实现中试产业化的基础, 因此, 这是一项重要的且需要长期开展的研究。

### 参考文献

- [1] Zhuwei Du, Haoran Li, Tingyue Gu. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*, 2007, **25**: 464–482.
- [2] Ayhan D. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 2008, **49**: 2106–2116.
- [3] Johnston B, Mayo MC, Khare A. Hydrogen: the energy source for the 21<sup>st</sup> century. *Technovation*, 2005, **25**: 569–585.
- [4] Momirlan M, Veziroglu TN. The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner planet. *Int J Hydrogen Energy*, 2005, **30**: 759–802.
- [5] Lin CN, Wu SY, Chang JS. Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicone-gel-immobilized anaerobic sludge. *Int J Hydrogen Energy*, 2006, **31**: 2200–2210.
- [6] Gray CT, Gest H. Biological formation of molecular hydrogen. *Science*, 1965, **148**: 186–192.
- [7] Tanisho S, Ishiwata Y. Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. *Int J Hydrogen Energy*, 1995, **20**(7): 541–545.
- [8] Li C, Bai JH, Cai ZL, et al. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, 2002, **93**: 27–34.
- [9] 李永峰, 任南琪, 陈 瑛, 等. 发酵产氢细菌分离培养的厌氧实验操作技术. 哈尔滨工业大学学报, 2004, **36**(12): 1589–1592.
- [10] 任南琪, 林 明, 马汐平, 等. 厌氧高效产氢细菌的筛选及其耐酸性研究. 太阳能学报, 2003, **24**(1): 80–84.
- [11] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法. 电子显微学报, 2005, **24**(4): 440.
- [12] Pitcher DC, Saunder NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol*, 1989, **8**: 151–156.

- [13] Tanisho S, Lshiwata Y. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. *Int J Hydrogen Energy*, 1994, **19**(10): 807–812.
- [14] Argun H, Kanrgi F, Ngi K, *et al.* Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *Hydrogen Energy*, 2008, **33**: 1813–1819.
- [15] 潘春梅, 樊耀亭, 赵攀. 发酵产氢培养基的响应面分析优化. *农业技术生物科学*, 2008, 24(1): 38–44.
- [16] Lay JJ, Li YY, Noike T. The influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. *Water Res*, 1997, **31**(6): 1518–1524.
- [17] Van Niel EWJ, Budde MAW, De Haas GG, *et al.* Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfi*. *Int J Hydrogen Energy*, 2002, **27**(11-12): 1391–1398.
- [18] Mizuno O, Ohara T, Shinya M, *et al.* Characteristics of hydrogen production from bean card manu factoring waste by Anaerobic Microflora. *Water Science and Technology*, 2000, **42**: 345–350.
- [19] You-Kwan Oh, Eun-Hee Seola, Jung Rae Kimb, *et al.*, Fermentative biohydrogen production by a new chemo-heterotrophic Bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *Int J Hydrogen Energy*, 2003, **28**: 1353–1359.
- [20] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT08. *Proc Biochem*, 2000, **35**: 589–593.
- [21] Youoi H, Tokushige T, Hirose J, *et al.* Hydrogen production by immobilized cells of *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *J Ferment Bioeng*, 1997, **83**(5): 481–484.
- [22] Rachman MA, Furutani Y, Nakashimada Y, *et al.* Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *J Ferment Bioeng*, 1997, **83**(4): 358–363.
- [23] Manish S, Venkatesh KV, Rangan B. Metabolic flux analysis of biological hydrogen production by *Escherichia coli*. *Hydrogen Energy*, 2007, **32**: 3820–3830.

## 征订启事

### 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年，是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办，国内外公开发行的，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：基础微生物学研究；农业微生物学研究；工业微生物学研究；医学微生物学研究；食品微生物学研究；环境微生物学研究；微生物功能基因组研究；微生物蛋白组学研究；微生物模式菌株研究；微生物工程与药物研究；微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖，中国科学院优秀科技期刊三等奖，北京优秀科技期刊奖，2000年再获中国科学院优秀期刊三等奖，2001年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自2008年本刊已经全新改版，由双月刊改为月刊，更换了彩色封面，纸张改用铜版纸，由原来的小16开本改为标准大16开本（210×297），发表周期缩短，内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买，2010年的每册定价为48元，全年576元，我们将按期免费邮寄。

另，本刊编辑部现存有少量过期期刊，如有需要者可直接与编辑部联系，款到即免费寄上。（请事先与编辑部联系，获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量）

邮购地址：(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: (010) 64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; bjb@im.ac.cn; http://journals.im.ac.cn

国内邮发代号：2-817; 国外发行代号：BM413