

光合细菌与产气肠杆菌协同产氢特性分析

张晓蓉* 龚双娇 廖惠敏 杨冬梅 陈义光

(植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室 吉首大学生物资源与环境科学学院 湖南 吉首 416000)

摘要: 对光合细菌(*Rhodospseudomonas* sp. DT)与产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)进行了发酵产氢试验,考察了不同起始接种比例、培养温度及碳源条件下混合菌协同产氢特性。结果表明:光合细菌与产气肠杆菌初始接种比例对协同产氢影响较大,初始接种比例为 1:1 最有利于协同产氢,产氢效率和产氢周期达到了 3.1 mol H₂/mol 葡萄糖及 81 h。进一步培养液 pH 动力学变化研究发现初始接种比例为 1:1 的混合菌培养液 pH 变化较小,为 pH 6~7,利于混合菌协同产氢。28°C~37°C 温度范围混合菌可保持较高的协同产氢活性,20°C 条件下混合菌协同产氢效率低,50°C 条件下不能产氢。混合菌可利用葡萄糖、琥珀酸、苹果酸以及可溶性淀粉为碳源产氢。葡萄糖为最佳产氢碳源,底物转化率为 36.11%。利用可溶性淀粉产氢,转化率仅为 8.22%,该结果表明协同作用可拓展对多种产氢碳源的利用。

关键词: 光合细菌,产气肠杆菌,产氢,协同作用

Characteristic Analysis of Cooperation Hydrogen Production Using *Rhodospseudomonas* sp. DT and *Enterobacter Aerogenes*

ZHANG Xiao-Rong* GONG Shuang-Jiao LIAO Hui-Min
YANG Dong-Mei CHEN Yi-Guang

(Key Laboratory Plant Resources Conservation and Utilization, College of Bio-resources and Environment Science, Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China)

Abstract: Cooperation hydrogen production was carried out using *Rhodospseudomonas* sp. DT and *Enterobacter aerogenes*. The effects of the initial ratio of *Rhodospseudomonas* sp. DT and *Enterobacter aerogenes*, culture temperature, and carbon source on the cooperation hydrogen production were investigated. The results suggested that cooperation hydrogen production rate was highly affected by the initial ratio of *Rhodospseudomonas* sp. DT and *Enterobacter aerogenes*. The mixed bacteria of *Rhodospseudomonas* sp. DT and *Enterobacter aerogenes* with 1:1 initial ratio benefited to the cooperation hydrogen production, which led the hydrogen production rate and duration of gas production to 3.1 mol H₂/mol glucose and 81 h, respectively. The pH dynamics analysis of culture medium further discovered that the pH of the mixed bacteria with 1:1 initial ratio changed from 6 to 7 smaller than other conditions, which was probably fitted to produce hydrogen. Furthermore, the mixed bacteria with 1:1 initial ratio had the higher hydrogen production efficiency at temperatures of 28°C and 37°C than at 20°C, and without any hydrogen production at temperature of 50°C. The carbon sources of glucose, succinate acid, malic acid could be used to produce hydrogen by the

基金项目: 湖南省教育厅基金(No. C05168); 湖南省科技计划项目(No. 2009FJ3011)

* 通讯作者: ✉: xrzhang0743@163.com

收稿日期: 2009-06-01; 接受日期: 2009-08-24

mixed bacteria. Even the soluble starch, unused by *Rhodopseudomonas* sp. DT, was also decomposed by the mixed bacteria to produce hydrogen with the conversion efficiency of 8.22%. The glucose was the optimal carbon resource, and the conversion efficiency could reach to 36.11%. The results, further, implied that the cooperation hydrogen production could enlarge the use of the carbon sources.

Keywords: *Rhodopseudomonas* sp. DT, *Enterobacter aerogenes*, Hydrogen production, Cooperation

生物制氢因对环境无害、操作条件温和以及可再生等优点而具有重大研究意义。迄今为止,已报道生物制氢类群主要分为非光合微生物(厌氧发酵细菌)和光合微生物(光合细菌、蓝细菌和绿藻)。光合细菌为光合产氢主要微生物类群,具有能量转化效率高及氢气纯度好等优点而被广泛研究^[1-3]。利用光合细菌产氢主要采用纯菌株方式,但纯菌株产氢周期较短、底物利用不彻底而影响产氢效果,不利于规模化产氢。

近年来,生物制氢依据生态学协同效应发展了一种新型的协同产氢技术,利用两种或两种以上的产氢菌株进行混合培养产氢。由于混合菌株之间发生协同效应,不仅使代谢产物充分利用,而且有利于相互间创造有利的生存环境提高代谢活性,更好的发挥产氢能力。任南琪研究小组采用非固定化技术对光合细菌与活性污泥进行了协同产氢,研究表明由于对底物利用的协同作用,混合菌株发酵产氢可以达到理想的效果^[4,5]。张立宏等利用活性污泥分离的光合细菌混合菌为产氢菌株进行产氢试验,研究了混合菌产氢特性,并建立了产氢 Compertz 动力学模型^[6]。此外, Kaushik Nath 等研究了非光合微生物产气肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)DM11 菌株与光合细菌球形红细菌 O.U.001 菌株进行混合培养协同产氢,混合培养体系的代谢协同效应使产氢效率达 1.5 mol H₂/mol 葡萄糖~1.7 mol H₂/mol 葡萄糖^[7]。Toshihiko Kondo 等对 *Rhodobacter sphaeroides* RV 及其色素突变株 MTP4 进行了联合产氢特性研究^[8]。

协同产氢可有效提高底物转化效率和产氢效率,延长产氢周期长。相对于采用活性污泥混合菌进行协同产氢而言,采用纯菌株进行混合培养协同产氢可更好的控制各菌株起始接种比例、生长所需碳源和培养温度等产氢条件,利于稳定产氢效率和产氢规模化。但有关光合细菌与非光合细菌协同产氢特性研究未见相关报道,本文利用一株具有产氢活性的光合细菌(*Rhodopseudomonas* sp. DT)与产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)作为混合培养协同产氢

模型,研究了不同初始接种比例、不同碳源及培养温度等产氢条件下混合菌协同产氢特性。以期能为协同产氢理论研究以及产氢规模化提供试验参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

光合细菌(*Rhodopseudomonas* sp. DT)、产气肠杆菌(*E. aerogenes*)为本实验室保藏。

1.2 培养基及培养条件

参照文献[9]方法, *Rhodopseudomonas* sp. DT 采用生长培养基活化。 *E. aerogenes* 采用牛肉高蛋白肽培养基活化。协同产氢混合菌初始接种量均保持 OD₆₆₀ 为 0.2±0.02, 3000 lx 光照厌氧培养。

1.3 试验方法

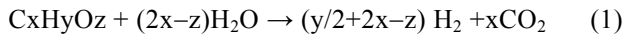
1.3.1 活细胞吸收光谱及起始接种量计算: 以细胞悬液 OD₆₆₀ 表示活细胞浓度及起始接种量。光合细菌吸收光谱测定采用 3 次离心收集光照厌氧培养物,以 UV-1601PC 光度计上扫描,扫描范围为 200 nm~1000 nm。

1.3.2 光合细菌协同产氢装置设计及 H₂ 的测定: 产氢试验在稍加改造的 500 mL 规格玻璃瓶内进行。产氢反应器产出的气体采用排水法收集,产出气体组成采用气相色谱法测定(HP6890, 热导探测器,色谱柱为 PORAPAK Q 和分子筛 5A, 载气为 He)。

1.3.3 协同产氢试验: 协同产氢试验在上述产氢反应器进行,定时记录气体体积,以体积表示产氢量。pH 动力学变化采用 pH 计测定。混合菌起始接种比例设置为 *Rhodopseudomonas* sp. DT 与 *E. aerogenes* 按 0:1、2:1、1:1、1:2、1:0 比例混合制成混合菌液。温度设置为: 20°C、28°C、37°C 和 50°C。碳源设置为以终浓度为 54.7 mmol/L 葡萄糖、82.9 mmol/L 琥珀酸、44.7 mmol/L 苹果酸、50.7 mmol/L 可溶性淀粉取代生长培养基的碳源,培养基其它组分不变。

1.3.4 底物转化效率计算^[10,11]: 底物转化效率是指实际产氢量与理论产氢量百分比。它是衡量生物制氢效率的一个重要指标。理论产氢摩尔数可依据公

式计算得到:



底物转化效率 η 可以由实际产氢量与碳底物完全转化为 H_2 的理论最大值的比值计算。

2 结果与讨论

2.1 *Rhodopseudomonas* sp. DT 以及 *E. aerogenes* 生长周期

生长条件下测定了两种产氢菌株生长周期。由图 1 可知, *Rhodopseudomonas* sp. DT 起始 OD_{660} 为 0.113, 经过 5 h 缓慢生长期, OD_{660} 增长到 0.212。5 h~30 h 为对数生长期。30 h~68 h 为稳定生长期, 68 h 后进入衰亡期。*E. aerogenes* 起始 OD_{660} 为 0.012, 经过 3 h 缓慢生长期, OD_{660} 增长到 0.145。3 h~22 h 为对数生长期。因此, *Rhodopseudomonas* sp. DT 以及 *E. aerogenes* 产氢试验菌株取生长培养基活化 30 h~68 h 和 3 h 的菌株。

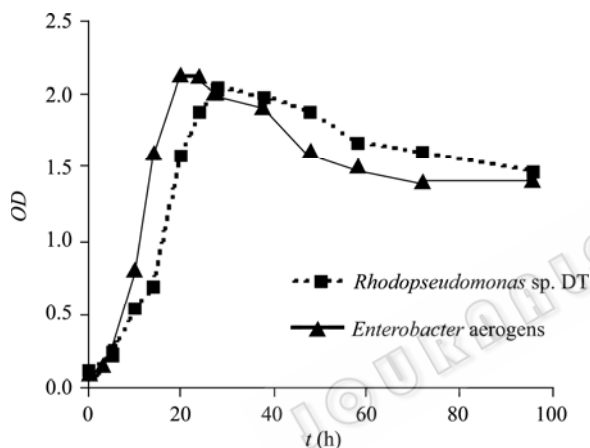


图 1 *Rhodopseudomonas* sp. DT 以及 *E. aerogenes* 生长周期

Fig. 1 Growth periods of *Rhodopseudomonas* sp. DT and *E. aerogenes*

图 2 为 *Rhodopseudomonas* sp. DT 在生长培养基生长 24 h 的全波长紫外可见光谱表征。由图 2 结果可知, DT 菌株存在 470 nm、502 nm、537 nm 光合细菌类胡萝卜素特征吸收峰, 以及 375 nm、595 nm、806 nm、863 nm 细菌叶绿素特征吸收峰。

2.2 不同起始接种比例协同产氢特性

取对数生长 *Rhodopseudomonas* sp. DT 以及 *E. aerogenes* 菌株按 0:1、1:2、1:1、2:1、1:0 比例混合, 保持混合菌起始接种浓度为 OD_{660} 为 0.2 ± 0.02 , 以葡萄糖为协同产氢碳源, 研究了不同起始接种比例混合菌协同产氢效率, 并进一步对协同产氢培养液 pH

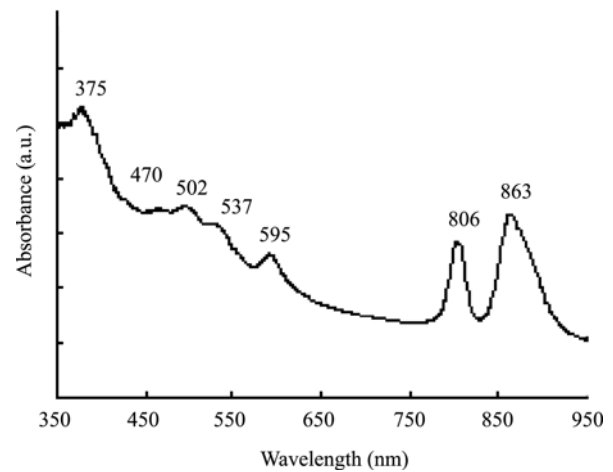


图 2 *Rhodopseudomonas* sp. DT 紫外/可见吸收光谱
Fig. 2 UV/vis spectrum of *Rhodopseudomonas* sp. DT

变化进行了实时测定。图 3 结果表明, *Rhodopseudomonas* sp. DT 与 *E. aerogenes* 混合菌产氢存在协同效应, 各菌株的起始接种比例对协同产氢效率有较大影响。1:2、1:1、2:1 比例接种的混合菌协同产氢效率分别为 $2.02 \text{ mol } H_2/\text{mol}$ 葡萄糖(123.7 mL/g 葡萄糖)、 $3.1 \text{ mol } H_2/\text{mol}$ 葡萄糖(189.9 mL/g 葡萄糖)、 $2.2 \text{ mol } H_2/\text{mol}$ 葡萄糖(134.7 mL/g 葡萄糖), 均高于纯菌株产氢。产氢周期也达到 62 h、81 h 和 65 h, 较纯菌株产氢周期明显延长。其中, 起始接种比例为 1:1 的协同产氢体系相对于 1:2 和 2:1 比例接种的混合菌以及纯菌株产氢效率增加了 1.4~7.5 倍, 周期延长了 0.05~2.00 倍, 与文献报道相近^[4-8,11,12]。这可能与 *E. aerogenes* 对葡萄糖的发酵分解为光合细菌产氢提供了多种产氢碳源(电子供体)有关。

混合菌协同产氢培养液 pH 变化实时测定结果如图 4 所示。比较图 4 结果可知, 当体系存在 *E. aerogenes* 菌株时, 培养液 pH 值均有较大程度降低。*E. aerogenes* 接种量越大, 培养液酸化越快。*Rhodopseudomonas* sp. DT 与 *E. aerogenes* 初始接种比例为 1:1 及 2:1 的协同产氢培养液 pH 变化较小, 约为 6~7 左右。初始接种比例为 1:2 的培养液 pH 下降最快, 为 4 左右, 协同产氢效率也最低。光合细菌对培养液的 pH 影响较小, 产氢培养液 pH 变化为 7~8, 微碱性。培养液的酸化可能由于 *E. aerogenes* 发酵产酸所致。很明显酸性条件不利于光合细菌产氢, 各菌株合理的配比才能更利于协同产氢。如 *E. aerogenes* 与 *Rhodopseudomonas* sp. DT 比例为 1:1 时, 协同产氢效率最高, 产氢周期最长。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

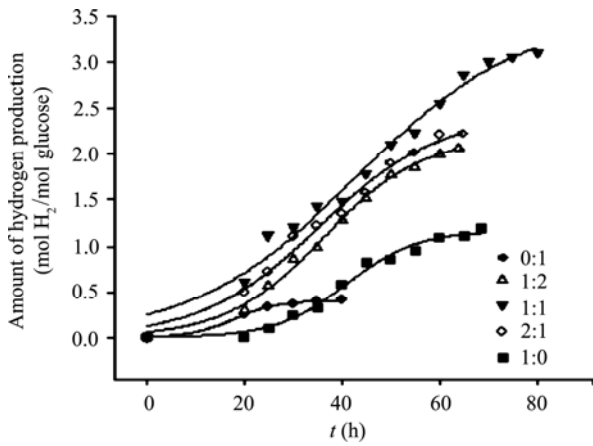


图3 不同初始接种比例混合菌协同产氢效率及周期
Fig. 3 Cooperation hydrogen production rate and time course of hydrogen accumulating of mixed bacteria with different initial ratio
 注: 0:1、1:2、1:1、2:1、1:0为 *Rhodospseudomonas* sp. DT 与 *E. aerogenes* 初始接种比例。
 Note: 0:1, 1:2, 1:1, 2:1, 1:0 showed the initial ratio of *Rhodospseudomonas* sp. DT and *E. aerogenes*.

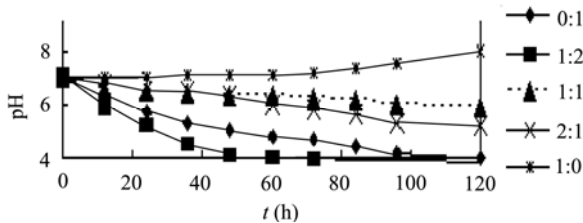


图4 协同产氢培养基 pH 动力学分析
Fig. 4 pH dynamics analysis of culture medium
 注: 0:1、1:2、1:1、2:1、1:0为 *Rhodospseudomonas* sp. DT 与 *E. aerogenes* 初始接种比例。
 Note: 0:1, 1:2, 1:1, 2:1, 1:0 showed the initial ratio of *Rhodospseudomonas* sp. DT and *E. aerogenes*.

2.3 温度的影响

温度是影响微生物生长和生存的重要环境因素,是微生物保持生物活性的重要环境条件。本文以葡萄糖为协同产氢碳源, *Rhodospseudomonas* sp. DT 与 *E. aerogenes* 混合菌液分别以 0:1、1:2、1:1、2:1、1:0 比例接种,起始菌液浓度保持 OD_{660} 为 0.2 ± 0.02 , 选择了 28°C (光合细菌最适生长温度)、37°C (产气肠杆菌最适生长温度)以及 20°C、50°C 等温度条件,研究了不同温度条件下混合菌协同产氢效率。由图 5 结果可知,协同作用使混合菌可在较宽的温度范围产氢。20°C~37°C 混合菌均可进行协同产氢,28°C~37°C 温度范围混合菌协同产氢效率较高,达到了 $0.9 \text{ mol H}_2/\text{mol}$ 葡萄糖~ $3.2 \text{ mol H}_2/\text{mol}$ 葡萄糖,该结果与文献相似^[7,8,12]。28°C 培养条件下,1:1 混合菌协同产氢效率最高,为 $3.2 \text{ mol H}_2/\text{mol}$ 葡萄糖(196 mL/g 葡萄

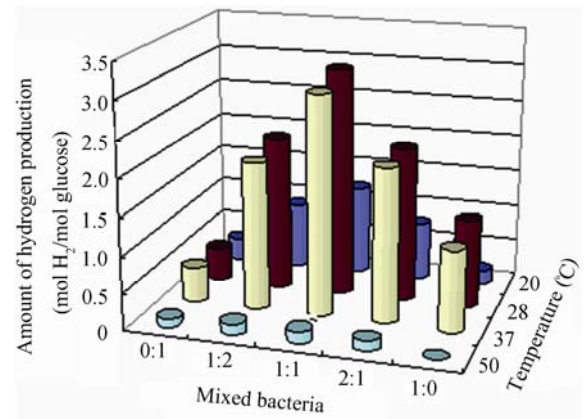


图5 温度对混合培养协同产氢影响
Fig. 5 Effects of temperature on cooperation hydrogen production
 注: 0:1、1:2、1:1、2:1、1:0为 *Rhodospseudomonas* sp. DT 与 *E. aerogenes* 初始接种比例。
 Note: 0:1, 1:2, 1:1, 2:1, 1:0 showed the initial ratio of *Rhodospseudomonas* sp. DT and *E. aerogenes*.

糖)。20°C 条件下混合菌协同产氢效率很低,仅为 $1.22 \text{ mol H}_2/\text{mol}$ 葡萄糖(74 mL/g 葡萄糖)。50°C 条件下混合菌几乎不产气了。

2.4 不同碳源的协同作用产氢结果

碳源对光合细菌产氢有重要影响,碳源不同产氢效率也有明显差异。产气肠杆菌可利用多种碳源,通过糖酵解产生有机酸(如乳酸、醋酸、丙酮等)和气体(包括氢气等)。本文利用葡萄糖、琥珀酸、苹果酸以及可溶性淀粉为协同产氢碳源,菌株按 1:1 比例接种,研究了混合菌对不同碳源的利用效率及其协同产氢特性。图 6 结果表明,混合菌可利用葡萄糖、琥珀酸、苹果酸以及可溶性淀粉碳源进行协同产氢,协同产氢效率分别为 $3.05 \text{ mol H}_2/\text{mol}$ 葡萄糖、 $1.96 \text{ mol H}_2/\text{mol}$ 琥珀酸、 $1.8 \text{ mol H}_2/\text{mol}$ 苹果酸、

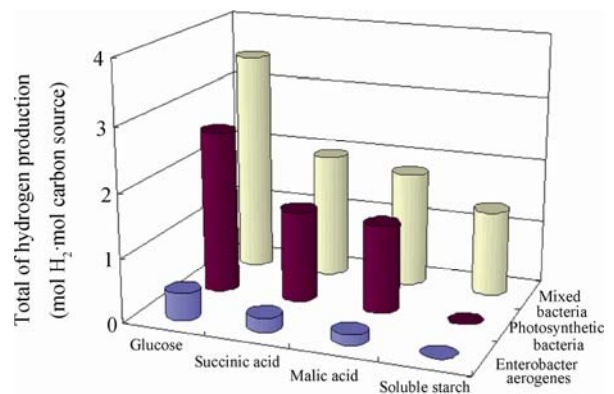


图6 不同碳源对光合细菌协同产氢的效应
Fig. 6 Effects of carbon source on cooperation hydrogen production

表 1 不同碳源条件下协同产氢的最大积累量及底物转化效率
Table 1 Total of hydrogen production and carbon source conversion efficiency

	最大积累产氢量	气相中氢的含量	底物转化效率
	Total yield of H ₂ (mol)	Content of H ₂ in gas (%)	Carbon source conversion efficiency η (%)
Glucose	3.05	70.38	36.11
Succinic acid	1.96	79.95	35.02
Malic acid	1.80	86.51	34.68
Soluble starch	1.04	52.27	8.22

1.04 mol H₂/mol 可溶性淀粉, 氢积累量均大于纯菌株。葡萄糖为混合菌协同产氢最佳碳源, 氢的积累量达到最大。这可能与产气肠杆菌能很好利用葡萄糖生长和产氢(发酵产氢), 同时其代谢产物为 *Rhodospseudomonas* sp. DT 生长和产氢提供更广谱碳源, 促进光合细菌生长和产氢(光合产氢)有关。光合细菌不能利用淀粉为碳底物产氢, 通过混合培养, 混合体系可以产氢, 这可能由于产气肠杆菌对淀粉分解所致。

根据公式(1), 混合菌对底物转化效率计算结果见表 1。葡萄糖为混合菌协同产氢最佳碳源, 底物转化效率达到了 36.11%。琥珀酸以及苹果酸为光合细菌最佳产氢碳源, 但协同产氢体系对其转化效率为 35.02% 以及 34.68%, 低于对葡萄糖的转化。协同产氢体系对可溶性淀粉底物转化效率为 8.22%。可见, 利用微生物代谢的协同作用, 不仅有利于菌株相互创造有利生存环境, 使代谢产物不易积累, 而且也拓宽了光合细菌产氢对多种碳源的利用, 提高了产氢效率和底物转化效率。

3 结论

通过光合细菌与产气肠杆菌协同产氢特性分析表明, 协同作用有利于提高产氢效率和底物转化率, 延长产氢周期, 同时可拓展对产氢碳源的利用。利用混合菌进行协同产氢时, 各菌株的合理配比可以使微生物协同作用更好发挥。*Rhodospseudomonas* sp. DT 与 *E. aerogenes* 初始接种比例为 1:1 最有利于光合细菌协同产氢, 与纯菌株产氢比较产氢效率增加了 1.4~7.5 倍, 周期延长了 0.05~2.00 倍。培养液 pH 动力学分析表明, *E. aerogenes* 发酵产酸导致培养液 pH 酸性环境, 混合菌接种比例为 1:1 培养液 pH 变化为 pH 6~7, 有利于混合菌的产氢。

此外, 利用协同产氢可使产氢温度条件变得更加温和, 28°C~37°C 温度范围均可保持较高的产氢活性, 这一特性明显好于利用纯菌株产氢, 有利于

实际利用。

混合菌以不同碳源进行协同产氢时, 对底物转化效率不同, 产氢效率也存在差异。葡萄糖为最佳产氢碳源, 底物转化率可高达 36.11%。更值得一提的是, 利用协同产氢可拓宽对产氢碳源的利用(如对可溶性淀粉的利用), 这为协同产氢产业化提供了条件。

参 考 文 献

- [1] 钱一帆, 郑广宏, 康铸慧, 等. 不产氧光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 产氢影响因子研究. 工业微生物, 2007, 37(5): 6-12.
- [2] 张晓蓉, 赵春贵, 杨素萍. 产氢红杆菌类胡萝卜素含量和组分分析. 微生物学通报, 2007, 34(5): 863-866.
- [3] 郑先君, 张占晓, 魏丽芳, 等. 利用乙酸光合细菌产氢的研究. 太阳能学报, 2007, 28(12): 1346-1349.
- [4] 包红旭, 任南琪, 王爱杰. 新菌 X_9 协同 B_49 同步发酵纤维素产氢能力分析. 沈阳建筑大学学报, 2008, 24(3): 3-7.
- [5] 林 明, 任南琪, 王爱杰, 等. 混合菌种在发酵法生物产氢中的协同作用. 环境科学, 2003, 24(2): 54-59.
- [6] 张立宏, 周俊虎, 陈 明, 等. 活性污泥分离混合菌的光合产氢特性分析. 太阳能学报, 2008, 29(2): 145-151.
- [7] Kaushik N, Anish K, Debabrata D. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain OU001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68: 533-541.
- [8] Toshihiko K, Masayasu A, Tatsuki W. Hydrogen production by combining two types of photosynthetic bacteria with different characteristics. *Int J Hydrogen Energy*, 2002, 27: 1303-1308.
- [9] 张晓蓉, 马文丽, 杨素萍. 产氢红杆菌类胡萝卜素代谢研究. 山西大学学报, 2006, 29(2): 201-204.
- [10] 何德良, 周 舟, 张小华, 等. 几种荚膜红细菌变异体的光合制氢研究. 湖南大学学报, 2005, 32(1): 73-77.
- [11] 田 鑫, 廖 强, 张 攀, 等. 光合细菌生物膜反应器葡萄糖降解及产氢特性实验. 化工学报, 2008, 59(9): 2346-2350.
- [12] Zhang YF, Shen J. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *Int J Hydrogen Energy*, 2006, 31: 441-446.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>