

研究简报

菌源处理方式对发酵产氢微生物菌群 及产氢性能的影响

刘 义¹, 樊绍群², 徐耀伟¹, 樊耀亭¹, 侯红卫¹

(¹ 郑州大学化学系, 河南 郑州 450052; ² 中国电信股份有限公司北京研究院, 北京 100035)

关键词: 生物制氢; 菌源处理方式; 凝胶电泳分析; 发酵

中图分类号: TK 91; X 712

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2010) 06-1545-05

Effect of treatment methods for natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen-producing potential

LIU Yi¹, FAN Shaoqun², XU Yaowei¹, FAN Yaoting¹, HOU Hongwei¹

(¹ Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China;

² China Telecom Corporation Limited, Beijing Institute, Beijing 100035, China)

Abstract: The pretreatment of bacteria source is one of the key factors affecting the efficiency of bio-hydrogen production. Prior to inoculation, cow dung compost as the natural microbial consortium is treated by following methods: (1) forced aeration combined adding sugar after infrared drying; (2) infrared drying; (3) infrared drying combined forced aeration; and (4) water immersion. The effects of the microbial community on bio-hydrogen production were investigated in a 20 L continuous stirred tank reactor (CSTR). The results showed that the maximum hydrogen production ability, hydrogen content and the rate of hydrogen production was $387.6 \text{ ml H}_2 \cdot (\text{g-sucrose})^{-1}$, 55.5% and $0.5089 \text{ L H}_2 \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ at fixed sucrose concentration of $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, operating pH of 5.0 ± 0.1 and the pretreated bacteria source by method (1), respectively. The contents of acetic acid and butyric acid were more than 75% of VFAs in the terminal liquid phase by-product. Furthermore, the image analysis by PCR-DGGE technology showed that there was district difference in the number of electrophoresis band and the strength. The sample, of which the bacteria source was treated by method (1), exhibited two maximum illumination bands, which implies that there exist two kinds of dominant microbial community.

Key words: bio-hydrogen production; treatment method of bacteria source; PCR-DGGE; fermentation

引 言

过度使用化石燃料所造成的能源短缺和环境污

染问题, 已经对全球经济的可持续发展带来严重的挑战, 因此研究开发可替代的清洁能源已成为科学界一项十分紧迫的任务。发酵法生物制氢具有清

2009-10-14 收到初稿, 2009-12-01 收到修改稿。

联系人: 樊耀亭。第一作者: 刘义 (1983—), 男, 硕士研究生。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2009CB220005); 国家自然科学基金项目 (20871106, 90610001); 高校博士专项科研基金项目 (20070459007); 教育部郑州大学“211”工程项目。

Received date: 2009-10-14.

Corresponding author: Prof. FAN Yaoting, yt.fan@zzu.edu.cn

Foundation item: supported by the National Basic Research Program of China (2009CB220005) and the National Natural Science Foundation of China (20871106, 90610001).

洁、高效和可再生的特点，是有望实现规模化生产的途径之一，因而受到人们的关注^[1-3]。在发酵法生物制氢中，除了底物的预处理外^[4-8]，产氢菌的活性、稳定性和寿命问题也是困扰和制约发酵法生物制氢技术规模化生产的关键因素。在这些因素中，除了菌源自身的特性外，菌源的处理方式也不同程度地影响产氢菌的菌群结构和数量，进而影响厌氧反应器的启动和产氢过程。关于菌源处理方式对发酵产氢的影响，最近已有个例报道，例如：Venkata Mohan 等^[9]以葡萄糖和添加化学废水的葡萄糖为底物，研究了热处理的活性污泥对生物产氢的影响，得到的最大氢产量为 $1.25 \text{ mmol} \cdot (\text{g COD})^{-1}$ ；樊耀亭等^[10]用红外烘干的牛粪堆肥为产氢菌源，以酸化预处理的秸秆为产氢底物，得到的最大氢产量为 $143.58 \text{ ml H}_2 \cdot (\text{g 秸秆})^{-1}$ ；任南琪等^[11]采用曝气结合间歇培养的方式对活性污泥进行处理后，以糖蜜废水为产氢底物，得到最大产氢能力为 $7.63 \text{ m}^3 \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ 。无论如何，在迄今为止的发酵产氢研究中，人们对于产氢菌源的研究还极其有限。

基于上述背景，本文在 20 L 连续流搅拌槽式反应器（CSTR）中考察了 4 种菌源处理方式对发酵生物制氢的影响，取得了预期的试验结果。

1 试验部分

1.1 试验原料

天然产氢菌源：牛粪堆肥取自郑州郊区奶牛场。为了抑制产甲烷菌及嗜氢菌的活性并富集产氢微生物^[12]，在发酵产氢前，按照表 1 方法对牛粪堆肥分别进行红外烘干、曝气^[10]、红外烘干结合曝气、红外烘干结合加糖曝气处理^[11]，之后参考文献^[13]方法用蔗糖进行驯化培养。经驯化培养的菌源作为种子液用于后续的发酵产氢试验。

产氢底物：蔗糖，食品级，云南凤庆糖业集团有限责任公司提供。

营养液组成 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)： NH_4HCO_3 ，2.0； KH_2PO_4 ，1.0； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.1； NaCl ，0.01； $\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.01； $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.01； $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.015； FeCl_2 ，0.00278。

1.2 仪器及分析方法

氢气和 VFAs 含量用 Agilent-4890 型气相色谱仪按照文献^[4]方法测定（美国安捷伦仪器公司）；生物气体积用湿式气体流量计计量；DcodeTM 基因

表 1 菌源预处理方式	
Table 1 Treatment fashion of bacteria source	
Serial No.	Treatment fashion of bacteria source
1	forced aeration combined adding sugar after infrared drying
2	infrared drying
3	infrared drying combined forced aeration
4	water immersion

突变检测系统（Bio-Rad 公司）；变形梯度凝胶电泳（DGGE），采用 DcodeTM 基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离测定。

1.3 试验方法

将种子液、水按照 1：4 的比例置于 20 L 生物制氢反应器中，加入营养液，密闭，充 N_2 除氧。产氢试验装置如图 1 所示。固定试验条件^[14]如下：发酵温度 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ ，搅拌转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，pH 为 5.0 ± 0.1 ，C：N：P=500：5：1，底物（蔗糖）浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，水力停留时间（HRT）为 11 h。

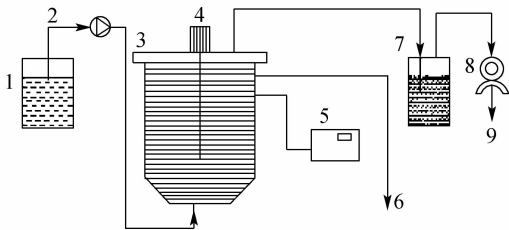


图 1 发酵产氢试验装置

Fig. 1 Schematic diagram of fermentation hydrogen production

- 1—feeding box；2—metering pump；
3—fermentation tank；4—stirrer；5—temperature controller；
6—outlet；7—liquid blocking；8—wet gas flowmeter；
9—escape hole

2 结果与讨论

2.1 菌源处理方式对产氢性能的影响

在发酵生物制氢过程中，采用适宜的菌源处理方式可以有效抑制产甲烷菌和其他嗜氢菌的活性，并使产氢菌得到富集。不同的菌源处理方式将导致反应器中产氢菌结构及菌群数量的变化^[15]，进而影响其产氢特性。菌源处理方式对产氢过程参数的影响示于表 2。由表 2 数据可以看出，在其他条件恒定的情况下，以 4 种不同方式处理的牛粪堆肥（表 1）作为产氢菌源进行发酵制氢时，四者在延迟时间、最大氢浓度、最大产氢速率和最大产氢能

表 2 不同菌源处理方式对产氢性能的影响

Table 2 Effects of different treatment fashion of bacteria source on performance of hydrogen production

Serial No.	Lag time /h	Maximum hydrogen content/%	Maximum hydrogen production rate/L H ₂ · (L · h) ⁻¹	Hydrogen production potential /ml H ₂ · (g sucrose) ⁻¹
1	5	55.5	0.5089	387.6
2	14	46.0	0.2157	164.3
3	10	48.6	0.2814	214.3
4	12	52.0	0.3309	251.4

力诸项指标中存在显著差别。经处理 2 得到的牛粪堆肥，产氢延迟时间、最大氢浓度、最大产氢速率和产氢能力分别为 14 h、46%、0.2157 L H₂ · (L · h)⁻¹ 和 164.3 ml H₂ · (g sucrose)⁻¹；牛粪堆肥经浸泡处理（4）后，其最大氢浓度提升至 52%，但产氢延迟时间较长（12 h），最大产氢速率较低 [0.3309 L H₂ · (L · h)⁻¹]，产氢能力也较低 [251.4 ml H₂ · (g sucrose)⁻¹]；经处理 3 得到的牛粪堆肥延迟时间虽有所降低（10 h），但最大氢浓度（48.6%）、最大产氢速率 [0.2814 L H₂ · (L · h)⁻¹] 和产氢能力 [214.3 ml H₂ · (g sucrose)⁻¹] 依然没有得到改善；与前述三种菌源处理方式相比，牛粪堆肥经方式 1 处理后，延迟时间最短（5 h），最大氢浓度（55.5%）、产氢速率 [0.5089 L H₂ · (L · h)⁻¹] 和产氢能力 [387.6 ml H₂ · (g sucrose)⁻¹] 均达到最大值。

菌群分析试验已经表明：在厌氧发酵产氢过程中，产氢菌种群和数量最主要的是梭菌，其次是肠杆菌^[16]。由平板计数法测定得到的四种菌源处理方式的菌群数量也证明了以处理 1 得到的菌群数量最大，这在一定程度上也揭示了经处理方式 1 得到的菌源产氢性能好的内在原因。

牛粪堆肥经方式 4 处理后，不但具有芽孢的梭菌可以存活下来，其他产氢菌如肠杆菌和兼性产氢菌也可以存活，使得产氢菌的种群和数量最大程度上得到保留，因而其发酵产氢性能优于处理 2 的菌源，因为经处理 2 得到的菌源，虽然可以抑制嗜氢菌（如产甲烷菌），但同时也抑制了一些不耐热的产氢菌（如肠杆菌和一部分芽孢梭菌），使得产氢菌群种类和数量减少，导致产氢性能欠佳；经处理 3 得到的牛粪堆肥，由于二者的双重作用，在有效抑制嗜氢菌活性的同时，也部分抑制了产氢菌的活性，导致产氢菌群种类和数量减少，因而产氢性能较差；经处理 1 得到的牛粪堆肥，由于碳源的加入，有效改善了产氢菌的生存环境，导致产氢菌群

种类和数量迅速增加，因而产氢延迟时间最短，氢浓度、产氢速率和产氢能力均达到最大值。

2.2 PCR-DGGE 指纹图谱分析

利用变形梯度凝胶电泳（DGGE）技术，采用 Dcode™ 基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行了分离测定，考察了产氢反应器中经不同处理方式的牛粪堆肥中微生物种群的变化特征。首先从 4 种菌源处理方式得到的产氢菌源中提取总的 DNA 片段，然后针对 16S rDNA V3 片段进行 PCR 扩增，最后利用 DGGE 技术分离 16S rDNA V3 区基因片段 PCR 产物，得到了数目不等的电泳条带。图 2 为从产氢系统中得到的经不同方式处理的牛粪堆肥 PCR-DGGE 的指纹图谱，图中每个独立分离的 DNA 片段代表一个微生物种属，电泳条带越多说明生物多样性越丰富，条带信号越强表示该种属的数量越多^[17]，由图可以看出，不同样品的 PCR 产物出现的带型存在一定差别。

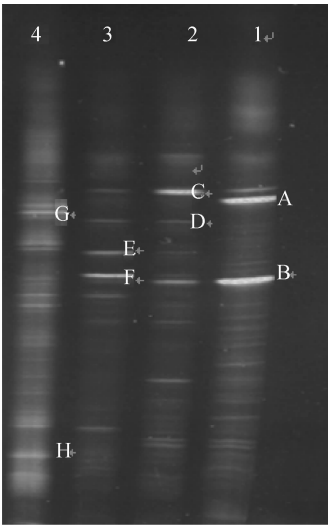


图 2 不同处理方式菌源的 PCR-DGGE 图谱
Fig. 2 PCR-DGGE fingerprint diagram of bacteria source with different treatment fashion
1—treatment fashion 1; 2—treatment fashion 2;
3—treatment fashion 3; 4—treatment fashion 4

在 PCR-DGGE 指纹图谱 (图 2) 中, 经不同方式处理的牛粪堆肥产氢发酵液中电泳条带的数目和信号强度呈现一定程度的差异, 反映了产氢菌源 (牛粪堆肥) 中微生物种群的多样性。例如: 由处理 2 和处理 3 得到的菌源中条带数目远低于处理 4 和处理 1 的菌源, 表明牛粪堆肥经方式 1 和 4 处理后微生物种群数目进一步增强。通过比较图谱的条带亮度可以看出, 在处理 1、2 和 3 的菌源中, 分别出现 A、B、C、D、E、F 六条不同亮度的条带, 其中处理 1 中条带 A 和 B 的亮度最大, 表明处理 1、2 和 3 中各有两种数量较大的微生物种群, 其中处理 1 中, 两种优势微生物种群的数量最大。结果暗示, 由于在处理 1 加入了碳源, 使得两个优势微生物种群得到迅速生长和繁殖。本实验室从产氢系统中分离出的菌株所进行的 16S rDNA 基因测序分析结果已经证实: 在该产氢体系中得到的优势菌株主要为梭状芽孢杆菌^[16]。

2.3 产氢特性验证试验

固定试验条件: T 为 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH 为 5.0 ± 0.1 , C:N:P=500:5:1, 底物浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 HRT 为 11 h, 在 20 L 反应器中进一步考察了经处理 1 得到的样品的产氢特性。图 3 为处理 1 和对照试验样品的氢浓度随培养时间的变化曲线。由图 3 可以看出, 处理 1 的样品产氢延迟时间约为 5 h, 反应器启动后, 产氢立即开始, 氢浓度随着发酵时间的增加而迅速增加, 大约至发酵 10 h 时, 产氢速率和氢浓度分别达到最大值 $0.5089 \text{ L H}_2 \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ 和 55.5%。其间测得的产氢能力为 $387.6 \text{ ml H}_2 \cdot (\text{g sucrose})^{-1}$ (表 2)。液相发酵末端副产物主要为丁酸、乙酸和乙醇, 其相应的含量分别为 527.4、460.3 和 $100.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其中乙酸和丁酸含量大于 VFAs 的 75%。根据液相发酵末端产物的变化判断其发酵类型属丁酸型发酵^[15]。此外, 也伴随少量丙酸的生成, 但没有检测到甲烷气体的存在。在对照试验中, 以传统热处理方式 (105°C 烘干 2 h) 处理的牛粪堆肥为菌源, 以蔗糖为产氢底物时得到的产氢能力、最大氢浓度和产氢速率分别是 $291.5 \text{ ml H}_2 \cdot (\text{g sucrose})^{-1}$ 、50.8%、 $0.4607 \text{ L H}_2 \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ 。如果牛粪堆肥不做任何处理, 在发酵产氢条件下则不产生氢气。结果表明: 在发酵生物制氢中, 对产氢菌源 (牛粪堆肥) 进行红外烘干结合加糖曝气处理 (处理 1) 是一种有效的菌源处理方式。

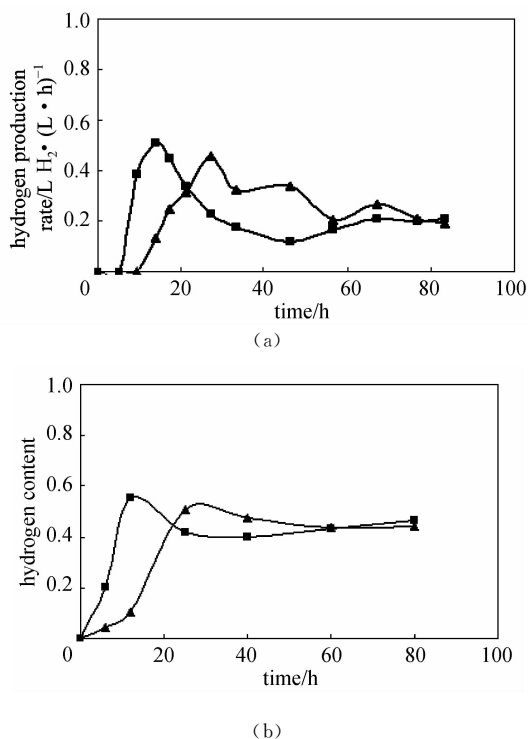


图 3 处理 1 和对照样品的产氢速率和氢浓度随培养时间的变化曲线

Fig. 3 Variation curve of hydrogen production rate and hydrogen content with culture time for treated fashion 1 and control test
■ treated fashion 1; ▲ control test

3 结 论

(1) 在发酵生物制氢中, 对产氢菌源 (牛粪堆肥) 进行红外烘干耦合加糖曝气处理 (处理 1) 是一种有效的菌源处理方式。

(2) 在最佳发酵产氢条件下, 在 20 L 反应器中以处理 1 的牛粪堆肥为产氢菌源, 蔗糖的产氢能力、最大浓度和产氢速率分别为: $387.6 \text{ ml H}_2 \cdot (\text{g sucrose})^{-1}$ 、55.5% 和 $0.5089 \text{ L H}_2 \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ 。

(3) PCR-DGGE 指纹图谱分析表明: 处理 1 的菌源中呈现丰富的微生物种群, 其中含有两种数量大的优势产氢微生物种群。

References

- [1] Fan Yaoting, Zhang Yahui, Zhang Shufang, Hou Hongwei, Ren Baozeng. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology*, 2006, **97** (3): 500-505
- [2] Li C C, Fang H H P. Fermentative hydrogen production

- from wastewater and solid wastes by mixed culture. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, 2007, **37**: 1-39
- [3] Zhang Maoling, Fan Yaoting, Xing Yan, Pan Chunmei, Zhang Gaosheng, Lay Jiunn-Jyi. Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass & Bioenergy*, 2007, **31**: 250-254
- [4] Fan Yaoting, Zhang Gaosheng, Guo Xinyong, Xing Yan, Hou Hongwei. Biohydrogen-production from beer lees biomass by cow dung compost. *Biomass & Bioenergy*, 2006, **30**: 493-496
- [5] Li Yanhong (李燕红), Lin Yu (林钰), Xing Yan (杏艳), Fan Yaoting (樊耀亭), Zhang Yahui (张亚辉). Research of fermentative hydrogen production from agricultural straw waste. *Environmental Science & Technology* (环境科学与技术), 2006, **29** (17): 8-9
- [6] Pan Chunmei, Fan Yaoting, Hou Hongwei. Fermentative production of hydrogen from wheat bran by mixed anaerobic cultures. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2008, **47**: 5812-5818
- [7] Fang H H P, Li C L, Zhang T. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 2006, **31**: 683-692
- [8] Pan Chunmei, Fan Yaoting, Zhao Pan, Hou Hongwei. Bioconversion of corncob to hydrogen using anaerobic mixed microflora. *Hydrogen Energy*, 2009, doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.04.023
- [9] Venkata Mohan S, Vijaya Bhaskar Y, Maruli Krishna P, Chandrasekhara Rao N, Lalit Babu V, Sarma P N. Biohydrogen production from chemical wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed consortia: influence of fermentation pH and substrate composition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007, **32**: 2286-2295
- [10] Fan Yaoting (樊耀亭), Hou Hongwei (侯红卫), Ren Baozeng (任保增). Screening method of hydrogen production bacteria selected from natural mixed anaerobic microbial: CN, 03126345.3. 2006
- [11] Ren Nanqi (任南琪), Gong Manli (宫曼丽), Xing Defeng (邢德峰). Continuous operation of hydrogen bio-production reactor with ethanol-type fermentation. *Environmental Science* (环境科学), 2004, **25**: 113-116
- [12] Xing Yan, Ma Hongcui, Fan Yaoting, Hou Hongwei, Chen Jingyun. Cellulose-hydrogen production from corn stalk biomass by anaerobic fermentation. *Chinese Science Bulletin*, 2009, **54**: 648-654
- [13] Fan Yaoting, Li Chenlin, Lay Jiunn-Jyi, Hou Hongwei, Zhang Gaosheng. Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. *Bioresource Technology*, 2004, **91**: 189-193
- [14] Zhang Maolin (张茂林), Wei Ruixia (魏瑞霞), Fan Yaoting (樊耀亭), Xing Yan (杏艳), Hou Hongwei (侯红卫). Enlargement test studies of bio-hydrogen production using artificial wastewater of corn stalk fermentation lixivium by mixed culture. *Environmental Science* (环境科学), 2007, **28**: 1889-1893
- [15] Ren Nanqi (任南琪), Wang Aijie (王爱杰), Ma Fang (马放). *Physiological Ecology on Microorganism of Acidogenic Fermentation* (产酸发酵微生物生理生态学). Beijing: Science Press, 2005
- [16] Pan Chunmei, Fan Yaoting, Zhao Pan, Hou Hongwei. Biological hydrogen production with *Clostridium beijerinckii* Fanp3 isolated from anaerobic sludge. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 2008, **33**: 5383-5391
- [17] Xing Defeng (邢德峰), Ren Nanqi (任南琪), Gong Manli (宫曼丽). Application of PCR-DGGR to resolve microbial diversity in bio-hydrogen producing reactor. *Environmental Science* (环境科学), 2005, **26**: 172-176