

# 高效产氢细菌新种——*Ethanologenbacterium* sp. X-1 的分离鉴定及其产氢效能

邢德峰 任南琪\* 李秋波

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院 哈尔滨 150090)

**摘 要:** 为获得高效产氢发酵细菌,采用改进的厌氧 Hungate 培养技术,从生物制氢反应器 CSTR 中分离一株产氢细菌 X-1。对该株细菌进行了形态学特征、生理生化指标、16S rDNA 和 16S-23S rDNA 间隔区序列分析等研究。结果表明与最相近的种属 *Clostridium cellulosi* 和 *Acetanaerobacterium elongatum* 等的 16S rRNA 基因序列同源性为 94% 以下。16S-23S rRNA 间隔区基因序列比对分析显示保守区域仅为 tRNA<sup>Ala</sup> 和 tRNA<sup>Ile</sup> 序列,其它可变部位没有同源性区域,鉴定为新属 *Ethanologenbacterium* sp.。该株细菌为专性厌氧杆菌,代谢特征为乙醇发酵,葡萄糖发酵产物主要为乙醇、乙酸、H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>。在 pH4.0 和 36℃ 条件下最大产氢速率是 28.3mmol H<sub>2</sub>/(g dry cell·h)。经鉴定和产氢效能分析表明该菌株是一新属的高效产氢细菌。

**关键词:** 产氢发酵细菌, *Ethanologenbacterium* gen. nov., 新属, 乙醇发酵, 产氢速率

**中图分类号:** Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2004)06-0724-05

生物制氢技术是解决能源危机和环境污染问题的重要手段之一,由于其具有双重功效和可持续性特点,日益受到世界各国的重视<sup>[1]</sup>。提高产氢效率是生物制氢技术工业化亟待解决的难题。筛选出高效产氢细菌是加快实现生物制氢工业化的有效途径。为了获得高效产氢发酵细菌,国外研究者分离了大量的产氢发酵细菌,分离的产氢发酵菌株多数集中在梭菌属和肠杆菌属<sup>[2~5]</sup>。Kumar 等<sup>[6]</sup>从树叶榨出物中分离到阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) IIT-BT08,该菌株在 36℃、培养液 pH 值 6.0 条件下,最大产氢速率为 29.63mmol H<sub>2</sub>/(g dry cell·h),是目前报道的产氢能力最高的细菌。Rachman 等<sup>[7]</sup>从厌氧污泥中分离到产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) HU101 和其突变体 AY-2,在 37℃ 培养液 pH 值 7.0 的条件下最大产氢速率分别为 31 mmolH<sub>2</sub>/(L 培养液·h) 和 58mmolH<sub>2</sub>/(L 培养液·h)。

由于制氢反应器的生长条件与静态培养不同,尤其是产酸发酵过程中反应系统的 pH 均较低,因此目前所分离的高效发酵细菌虽然具有较高的产氢能力,但在反应器内往往不能达到其最佳产氢和生长条件,高效产氢细菌不能成为微生物群落中的优势种群,只能采取固定化方式,限制了其产氢效能,增加了运行成本。为了进一步完善发酵法生物制氢

技术和提高系统的产氢能力,仍然需要分离既具有高效产氢能力和又能成为优势生长的菌株。因而,从实际运行的反应器中分离高效产氢细菌更具有现实意义和工程应用价值。本文报道了从连续流运行的生物制氢反应器分离到一株高效产氢细菌 X-1 (*Ethanologenbacterium* sp.) 菌株,并对其进行了生理生化、分子生物学鉴定和产氢特性研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器和试剂

用于本试验的设备主要为低温冷冻离心机 (BECKMAN Allegra 21R)、紫外分光光度计 (UNICAM HEXIOS) 和 PCR 扩增仪 (PE9700)。采用 GC122 型气相色谱仪和 SC-II 型气相色谱仪分析细菌发酵产物。试验所用 *ExTaq* DNA 酶、pMD18-T 载体和感受态细胞 (*Escherichia coli* JM109) 购于 TaKaRa 公司。

### 1.2 厌氧培养方法

培养基与无菌水的制备,以及全部实验操作采用改进的 Hungate 厌氧技术<sup>[8]</sup>,以高纯氮气为气相,用厌氧螺口试管分装液体和固体培养基,35℃ 常规培养。

### 1.3 细菌的分离纯化和培养基

采用改良的细菌分离培养基进行产氢细菌的分

基金项目: 国家 973 项目 (G2000026402)、国家 863 计划 (2003AA515030)、国家杰出青年科学基金 (50125823)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-451-86282008; E-mail: jidx3@public.hr.hl.cn

作者简介: 邢德峰 (1977 - ) 男, 黑龙江省讷河人, 博士研究生, 研究方向为生物制氢技术和环境生物技术。E-mail: jidxf@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-04-19, 修回日期: 2004-07-01

离试验<sup>[9]</sup>。从连续流生物制氢反应器 CSTR 中取出 1~2 mL 产氢发酵活性污泥,放入充满氮气的三角瓶中,加入数颗玻璃珠,在摇床上振荡 1 h,将污泥中菌胶团打碎,用无菌水进行倍比稀释,再接种于固体培养基中,制成滚管,培养 7~10 d。挑取单菌落转接入液体培养基中。重复以上操作若干次,直至管内菌落和显微镜下的细胞形态一致认为是纯菌株,进一步用电镜确认。将分离纯化的发酵细菌转接于液体培养基中,35℃,120 r/min 振荡培养 3~7 d,用 1 mL 无菌注射器从其气相中取样,检测其气相成分中是否有氢气存在。如果有即为产氢菌。

#### 1.4 细菌生长测定和生理生化分析

细菌的生长用紫外分光光度计,在 600 nm 处测定样品的吸光度值,作为菌浊。不同菌浊的细菌干重测定是将样品在 5000 r/min 下离心,弃上清液,用无菌纯净水洗细菌沉淀 2 次,80℃干燥 12 h,用精密电子天平称其重量。形态学鉴定和碳源利用指标测定参照文献<sup>[10]</sup>的方法。

#### 1.5 发酵产物测定

挥发酸和醇类测定:GC122 型气相色谱仪,柱长 2 m,担体 GDX103。60~80 目,氢火焰检测器,氮气作载气,流速 60 mL/min,氢气流速 50 mL/min,空气流速 490 mL/min。气化室 210℃,柱和检测室 190℃。取 1 mL 培养液,离心 5000 r/min,取上清液进样。

氢气和二氧化碳测定:发酵气体的组分采用 SC-I 型气相色谱仪,柱长 2 m,担体 Porapak Q,50/80 目。热导池检测器,用氮气为载气,流速为 40 mL/min。

#### 1.6 16S rDNA 和 16S-23S rDNA ITS 序列测定

细菌 DNA 提取<sup>[11]</sup>,用于 16S rDNA 扩增的 PCR 反应引物为通用引物:正向引物 BSF8/20:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物 BSR1541/1522:5'-ACGGCTACCTGTTACGACT-3',分别对应于大肠埃希氏菌(*E. coli*)16S rRNA 的 8~27 和 16S rRNA 的 1522~1541 碱基。16S-23S rRNA ITS 的扩增引物为 PSA1486/1505:5'-GGGGTGAAGTCGTA-ACAAGG-3';PLA209/189:5'-GGTACTTAGATGTTTCA-GTTC-3'。分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 的 1486~1505 和 23S rRNA 的 189~209 碱基。PCR 反应体系(50  $\mu$ L):10 $\times$  buffer( $\text{mg}^{2+}$ ) 5  $\mu$ L,2.5 mmol/L dNTP 5  $\mu$ L,20 pmol/L 引物各 1  $\mu$ L,*Ex Taq* DNA 酶 0.25  $\mu$ L。PCR 扩增条件:95℃ 5 min;94℃ 1 min,60℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 8 min。用 pMD18-T 载体克隆,测序由上海博雅生物科技有限公司进行。X-1 菌种 16S rDNA 和 16S-23S rRNA ITS 序列在 GenBank 的注

册号分别为 AY434720 和 AY556388。

#### 1.7 16S rDNA 序列分析和系统树

16S rDNA 和 16S-23S rDNA ITS 序列同源性分析采用 NCBI 的 blastN 以及 DNAMAN 软件进行多重序列比对。通过 BIOEDIT、PHYLIP 和 MEGA 等软件,以 Neighbor-Joining 法和自展评估绘制 16S rRNA 系统发育树。

#### 1.8 产氢能力的测定

采用间歇试验测定产氢能力,将对数生长时期的产氢细菌按等量接入盛有 50 mL 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,置于恒温气浴摇床中,在 36℃条件下,120 r/min 振荡培养,定时测其产气量、pH 值、菌浊和氢气含量。

## 2 结果

#### 2.1 产氢细菌的分离纯化

在连续流生物制氢反应器,产氢效能较高时取泥,进行产氢细菌分离,经过发酵产物的筛选产氢量比较高的细菌,不产氢的淘汰。经过 5 次纯化,获得了一株产氢能力较好的产氢细菌菌株 X-1。该菌株在固体培养基上生长时,为乳白色圆形菌落,表面光滑,边缘整齐。细胞为革兰氏阳性杆菌,细菌长短多变(0.4  $\mu$ m~0.5  $\mu$ m $\times$ 2  $\mu$ m~6  $\mu$ m),无荚膜,无内生芽孢,专性厌氧生长。透射电镜观测,发现菌体周生鞭毛(图 1-A),扫描电镜观测菌体有表面呈现凹凸不平(图 1-B)。

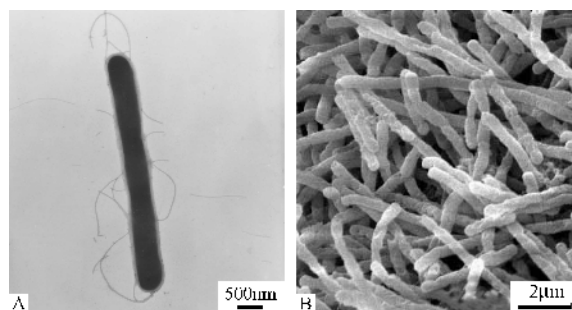


图 1 菌株 X-1 的电子显微镜形态

Fig.1 Electron micrographs of strain X-1

A. Transmission electron micrograph(10000 $\times$ ). B. Scanning electron micrograph(8000 $\times$ )

#### 2.2 细菌生长测定和生理生化分析

菌株 X-1 的生长以  $OD_{600}$  的吸光度值表示,通过细菌对数时期单位内数量的增长计算生长代时为 3.8 h。富集培养基的最大生长量为  $1.0 \times 10^{10}$  个/mL 培养液。可以利用柠檬酸生长,牛乳石蕊试验、甲基红试验、伏-普试验(Voges-Prokauer)、明胶试验均为阳性,硝酸盐试验和  $\text{H}_2\text{S}$  试验均呈阳性。

## 2.3 发酵产物测定

菌株 X-1 在以葡萄糖为碳源时液相末端发酵产物主要为乙醇和乙酸还有少量的丙酸和丁酸,为典型的乙醇型发酵细菌。图 2 所示在该菌生长过程中,液相末端发酵产物的含量逐渐增加,乙醇和乙酸含量在对数生长期迅速增加,细菌此时代谢活动旺盛,由于生长繁殖需要能量和合成物质,因此底物通过细菌的分解代谢被大量利用。在培养 28h 后生物量达到最大  $OD_{600}$  为 1.19。此后,由于营养物质和代谢产物成为生长限制性因子导致细菌种内竞争,细菌进入衰亡期,细菌代谢活性低下,液相末端发酵产物增加平缓。培养 48h 后乙醇和乙酸的含量达到最大分别为 3396.9mg/L 和 3009.6mg/L,占总挥发酸和醇含量的 98.6%。

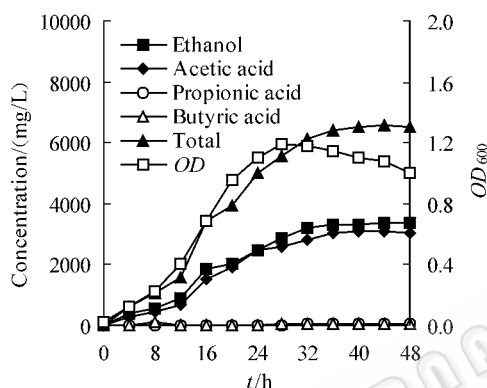


图 2 菌株 X-1 生长过程中的液相末端发酵产物

Fig.2 Liquid end fermentative product of strain X-1 during growth

该菌株的发酵气体主要为氢气和二氧化碳,通过气相色谱分析氢气含量,计算累计产生气体中的氢气含量即为累计产氢量。图 3 所示菌株 X-1 从接种培养基后,细菌迅速增长,伴随物质和能量代谢活动产氢量迅速上升,菌株的产氢量增加过程同生长过程一致,较高的代谢活性和生物量的增长是产氢量增加的直接原因。在培养 36h 后累计产氢量增长

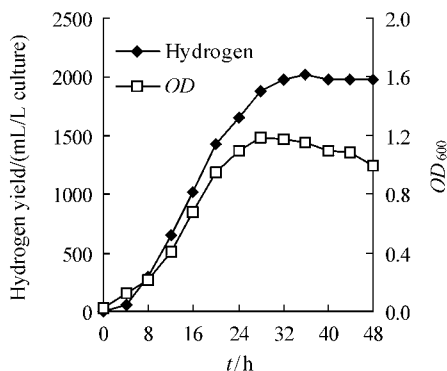


图 3 菌株 X-1 的生长和产氢效能

Fig.3 The growth of X-1 and hydrogen production

缓慢,最大累积产氢量为 2017mL/L 培养液,与目前报道产氢细菌比较属于高效产氢细菌。

## 2.4 温度对细菌生长和产氢量的影响

将处于对数生长期的 X-1 菌株按 5% 接种到等量培养液中,在 120r/min,不同温度下振荡培养。在培养 36h 后测定细胞的生长和累计产氢量。图 4 所示,温度对 X-1 菌株的生长和产氢能力影响显著,在 36℃ 左右时达到最大生长状态和最大累计产氢量。在高于或者低于此温度时,菌株的生物量和产氢效能都相对较低。由于温度较低或较高会延长菌株的增殖代时,影响细胞内酶类活性,因此物质和能量代谢水平相对最适生长温度大为降低。

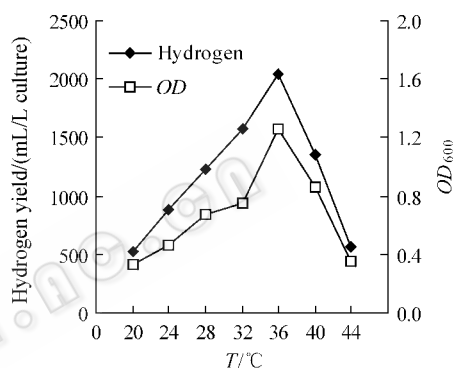


图 4 温度对菌株 X-1 的生长和产氢效能的影响

Fig.4 Effect of temperature on the growth of X-1 and hydrogen production

## 2.5 pH 对细菌生长和产氢量的影响

调整培养液的初始 pH 值后,等量接种对数期生长的细菌,在 36℃ 条件下振荡培养。图 5 表明,不同 pH 值下,细胞生长和产氢效能不同,pH 值 4.5 时菌株 X-1 获得最大生物量, $OD_{600}$  为 1.56。pH 值 4.0 时菌株 X-1 获得最大累积产氢量 2336mL/L 培养液,最大产氢速率是 28.3mmol  $H_2$ /(g dry cell·h)。当 pH 值 5~7 时对最大生物量影响不大,但是累积产氢量的差别较大,可见在菌株 X-1,所能耐受的生态幅情况下,其代谢速率和水平不同。当 pH 值达 3.5

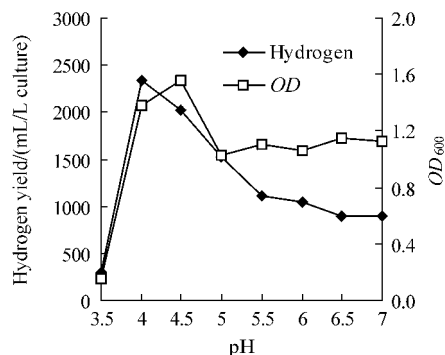


图 5 pH 值对菌株 X-1 生长和产氢效能的影响

Fig.5 Effect of pH on the growth of X-1 and hydrogen production

时,其生长非常微弱,但是仍有氢气的产生。由上可见,菌株 X-1 的最适累积产氢 pH 为 4.0,最佳生长 pH 值为 4.5。

2.6 16S rDNA 和 16S-23S rDNA ITS 序列分析

扩增菌株 X-1 的 16S rDNA 全序列和 16S-23S rRNA ITS 序列后进行克隆测序,通过 NCBI 的 blastN 序列比对进行同源性分析。结果表明,该细菌 16S rDNA 全序列与 *Clostridium cellulosi* 和 *Acetanaerobacterium elongatum* 等最相近的种属 16S rRNA 基因序列同源性为 94% 以下。16S-23S rRNA ITS 序列比对分析显示保守区域仅为 tRNA<sup>Ala</sup> 和 tRNA<sup>Ile</sup> 序列,其

它可变部位没有同源性区域。结合形态学特征和生理生化鉴定认为该菌株为一新种,即 *Ethanologenbacterium* sp. X-1。通过 BIOEDIT 和 PHYLIP 等软件,以 Neighbor-Joining 法和自展分析绘制 16S rRNA 系统树(图 6),将与菌株 X-1 同源性较高的种属进行序列比对绘制系统发育树,发现菌株 X-1 在进化上与大多数的梭菌属(*Clostridium*)处于不同分支,而只有纤维梭菌(*Clostridium cellulosi*)似乎与其进化具有同源性。由于菌株 X-1 没有内生芽孢,16S rRNA 系统进化上与梭菌属同源性小于 97%,因此是一类不同于梭菌属的细菌。

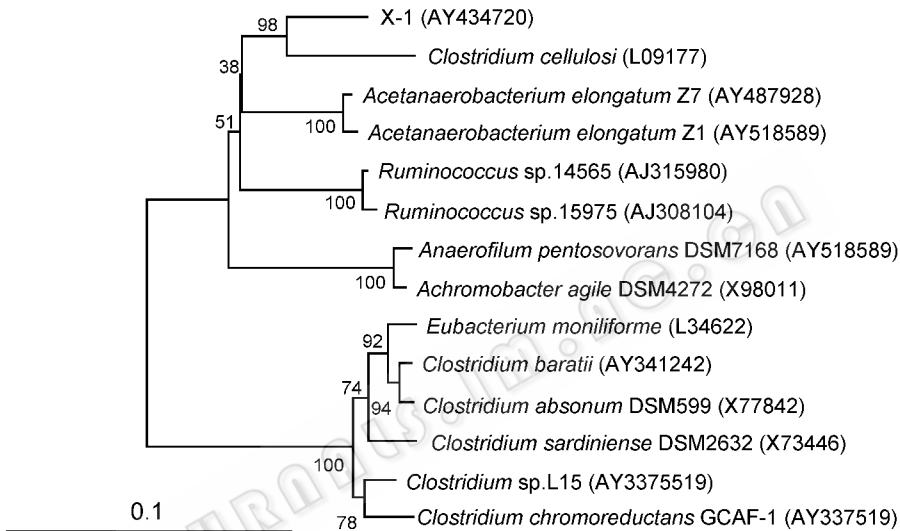


图 6 菌株 X-1 的 16S rRNA 系统树

Fig.6 Phylogenetic tree of strain X-1 based on 16S rRNA sequences

X-1 refers to the isolated strain from hydrogen producing reactor. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar 0.1% sequence divergence.

3 讨论

早在 19 世纪,人们就已经认识到细菌和藻类具有产生分子氢的特性<sup>[12]</sup>。迄今为止,已报道的产氢生物类群主要包括光合生物(厌氧光合细菌、蓝细菌和绿藻)、非光合生物(严格厌氧细菌、兼性厌氧细菌和好氧细菌)和古细菌类群<sup>[13]</sup>。直到 20 世纪 90 年代后期,人们直接以厌氧活性污泥作为天然产氢微生物,以碳水化合物为供氢体,通过厌氧发酵成功制备出氢气<sup>[14]</sup>。任南琪等<sup>[15]</sup>以厌氧活性污泥为菌种来源,以废糖蜜为原料,采用两相厌氧反应器制备出氢气,开创了利用非固定化菌种进行生物制氢的新途径,首次提出乙醇型发酵产氢理论<sup>[16]</sup>。由于此技术采用的是混合菌种,在运行中方便操作和管理,大大提高了生物制氢技术工业化的可行性。

高效产氢细菌是提高产氢效能的重要因素之

一。本文从连续流运行的制氢反应器中分离到一株具有较强的产氢能力、生长能力和耐酸能力的新种属菌株 X-1,它的发酵类型为乙醇发酵,为乙醇型发酵产氢理论找到了直接证据。产氢菌株 X-1 在产乙醇的同时还伴随氢气的释放,与不能产生氢气的酵母菌乙醇发酵的代谢途径相比是不同的。该菌株在温度为 36℃,pH 值为 4.0 时,最大比产氢速率为 28.3mmol H<sub>2</sub>/(g dry cell·h),同目前所报道的高效产氢菌株相比,属于耐酸的高效产氢细菌。由于其来源于生物制氢反应器厌氧活性污泥,因此能够适应工业化制氢反应器内部的特殊生境,在产氢细菌微生物群落的特异生态位下,可以通过人工调控使之成为优势种群,从而发挥更大的产氢效能,由此可见,该菌株具有更大的现实意义和应用价值。同时,该类细菌的发现,以及通过研究其生理生化特性、功能基因表达和产氢效能,进一步揭示产氢细菌的产

氢分子机理,为构建改造工程菌株和实现生物强化产氢提供了宝贵的出发菌株和信息。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Benemann J. Hydrogen biotechnology : progress and prospects. *Nat Biotechnol* , 1996 , **14** : 1101 – 1103.
- [ 2 ] Tanisho S , Ishiwata Y. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes* . *Int J Hydrogen Energy* , 1994 , **19** ( 10 ) : 807 – 812.
- [ 3 ] Taguchi F , Mizukami N , Hasegawa K , *et al* . Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a newly isolated *Clostridium* sp. No.2. *Can J Microbiol* , 1994 , **40** : 228 – 233.
- [ 4 ] Taguchi F , Chang J D , Mizukami N , *et al* . Isolation of a hydrogen – producing bacterium , *Clostridium beijerinckii* strain AM21B , from termites. *Can J Microbiol* , 1993 , **39** : 726 – 730.
- [ 5 ] James D , Brosseau , Zajic J E. Hydrogen-gas production with *Citrobacter intermedius* and *Clostridium pasteurianum* . *J Chem Tech Biotechnol* , 1982 , **32** : 496 – 502.
- [ 6 ] Kumar N , Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-08. *Proc Biochem* , 2000 , **35** : 589 – 593.
- [ 7 ] Rachman M A , Nakashimada Y , Kakizono T , *et al* . Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated

cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1998 , **49** : 450 – 454.

- [ 8 ] Hungate R E. Methods in Microbiology. New York : Academic Press Inc , 1969.
- [ 9 ] 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.
- [ 10 ] 东秀珠 , 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京 : 科学出版社 , 2001.
- [ 11 ] Miller D N , Bryant J E , Madsen E L , *et al* . Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** : 4715 – 4724.
- [ 12 ] Gray C T , Gest H. Biological formation of molecular hydrogen. *Science* , 1964 , **148** : 186 – 192.
- [ 13 ] 任南琪 , 王宝贞. 有机废水发酵法生物制氢技术. 哈尔滨 : 黑龙江科学技术出版社 , 1994.
- [ 14 ] Lay J J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol Bioeng* , 2000 , **68** , ( 3 ) : 269 – 278.
- [ 15 ] 任南琪 , 王宝贞. 有机废水处理生物制氢技术. 中国环境科学 , 1994 , **14** ( 6 ) : 411 – 415.
- [ 16 ] Ren N , Wang B , Huang J. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor. *Biotechnol Bioeng* , 1997 , **54** ( 5 ) : 428 – 433.

## Isolation and Characterization of New Species Hydrogen Producing Bacterium *Ethanologenbacterium* sp. Strain X-1 and Its Capability of Hydrogen Production

XING De-Feng REN Nan-Qi\* LI Qiu-Bo

( School of Municipal and Environmental Engineering , Harbin Institute of Technology , Harbin 150090 , China )

**Abstract** : To obtain hydrogen-producing bacterium of high efficiency , a strain X-1 of hydrogen-producing bacteria was isolated from the continuous stirred-tank reactor ( CSTR ) by anaerobic Hungate technique. The Comparative sequence analysis of 16S rDNA showed that homology of strain X-1 with *Clostridium cellulose* and *Acetanaerobacterium elongatum* is less than 94% . All sequence alignment of 16S-23S rDNA intergenic spacer regions ( ISR ) indicated displayed that consensus region is tRNA<sup>Ala</sup> and tRNA<sup>Ile</sup> , variable region is not homologous. Morphological , physic-biochemical character , and comparative sequence analysis of 16S rDNA and 16S-23S rDNA ISR indicated that strain X-1 belong to new genus named *Ethanologenbacterium* gen. nov. . Strain X-1 is facultative anaerobe bacillus ; its main fermentative products are acetic acid , ethanol , H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> . The metabolic character of strain X-1 is typical ethanol type fermentation. Its capability of hydrogen production was measured in the batch culture experiment. X-1 's maximum specific hydrogen producing rate is 28.3 mmol H<sub>2</sub> ( g dry cell · h ) at pH 4.0 and 36℃ . Result of identify and analysis of hydrogen production ability demonstrated strain X-1 belong to new genus of high hydrogen-producing bacteria.

**Key words** : Fermentative hydrogen-producing bacterium , *Ethanologenbacterium* gen. nov. , New genus , Ethanol fermentation , Hydrogen production rate

Foundation items : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development ( G2000026402 ) ; Chinese National Programs for High Technology Research and Development ( 2003AA515030 ) ; National Science Foundation for Distinguished Young Scholars ( 50125823 )

\* Corresponding author. Tel/Fax : 86-451-86282008 ; E-mail : Jidx3@public.hr.hl.cn

Received date : 04-19-2004