

光合细菌产氢条件的研究

孙 琦 徐向阳¹ 焦杨文²

(浙江大学生物科学与技术系 杭州 310027)

摘 要 从被有机物污染的土壤及水域中分离得到 13 株属于红螺菌科的光合细菌, 对其在苹果酸、乳酸、葡萄糖、乙酸、丙酸及丁酸中的光致产氢现象进行了研究。最高产氢量为 $39.8 \text{ ml} \cdot 20 \text{ ml 菌液}^{-1} \cdot 48 \text{ h}^{-1}$, 产氢活性为 $7.8 \text{ ml} \cdot \text{g 生物量}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。底物对不同菌株的产氢量与产氢活性均具有影响, pH 对产氢过程也有明显的作用, 大于 6000 lx 的光强度对提高产氢活性已无明显作用。固定化细胞在静态培养条件下也能提高产氢能力, 但延长产氢时间的作用不明显。

关键词 光产氢, 光合细菌 (PSB), 固定化细胞, 底物, 有机废水

氢作为一种未来的、理想而无污染的能源, 日益受到人们的关注。1949 年 Gest 首先报道了光合细菌中红螺菌科的一种 *Rhodospseudomonas rubrum* 能在厌氧光照条件下分解有机物质, 并释放分子氢, 这是光合细菌产氢的一个开创性工作^[1]。此后, 国外便广泛地开展了这方面的生理、生化以及基因领域的研究, 取得了进展。现在, 某些光合细菌已被成功地应用于有机废水的生物处理, 有的已达到工业化规模^[2], 近年来国内也已开展了这方面的研究。不过, 无论国内或国外均比较缺少有关产氢特性的基础研究, 这妨碍了该项生物技术的迅速发展。

作者利用 13 株光合细菌, 在模拟有机废水主成分的基质条件下, 初步探讨其产氢特性, 并观察固定化细胞技术在其中应用的可能性。

1 材料和方法

1.1 微生物菌株与培养条件

从水沟、活性污泥曝气池及湖泊中分离得到 13 株红螺菌科的光合细菌菌株纯培养物, 其代号分别为 517B、D、N₃、N₃₅₇、N₃₈₆、HDJ、FYP、NL、5、G、5233、5254 及 Nb-W。

采用 RCVBN 培养液^[3]。碳源为苹果酸 (30 mmol/L), 氮源为谷氨酸 (7 mmol/L)。转代接种培养在螺口试管内。光照条件为 $6000-7500 \text{ lx}$, 培养温度为 $30 \pm 2^\circ \text{C}$ 。

底物试验时, 除改变碳源外, 其它成分不变。

1.2 产氢活性的评估方法

1 现地址: 浙江农业大学环保系, 杭州 310029。

2 现地址: 浙江医科大学, 杭州 310006。

本文于 1993 年 9 月 6 日收到。

取对数生长后期 (48h) 的菌株培养物 1.5ml (浓度为 10^8 — 10^9 个细胞/ml, 生物量约 10mg) 转接于 100ml 血清瓶中 (内含 30 mmol/L 底物的培养液 20ml), 用橡皮塞塞紧, 外加铝盖。为考虑实际应用时的方便, 气相概不充氩, 一律为空气。置恒温水浴中, 在 7500 lx 及 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 下培养 48 小时, 取样测定气相中的氢浓度和生物量。用每小时每克生物量产氢的毫升数来表示产氢活性 ($\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)。

1.3 细胞固定化操作

以琼脂为固定相。取一定生长阶段的细菌培养物 1.25ml (细胞干重约为 9—10mg) 与 3.75ml 4% 的琼脂液混合均匀。在恒温水浴中用蠕动泵将此混合物滴入 20ml 冷却的培养液内, 可获得直径为 4—5mm 的固定化细胞珠粒。培养液的碳源为苹果酸 (30 mmol/L), 氮源为谷氨酸 (7 mmol/L)。光照强度为 7300—7400 lx。培养温度为 $32 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

1.4 产氢动态试验

动态试验在一种自制的装置中进行, 如图 1 所示。培养瓶 A 的体积为 75ml。CO₂ 吸收瓶 B 内加有 0.1mol/L 的 NaOH 溶液。用厚壁玻璃管 D 将二者联接起来。每隔一定的时间记录氢体积测定管 C 上的体积变化, 扣除由气温所引起的差值, 即可得到产氢的动态变化。

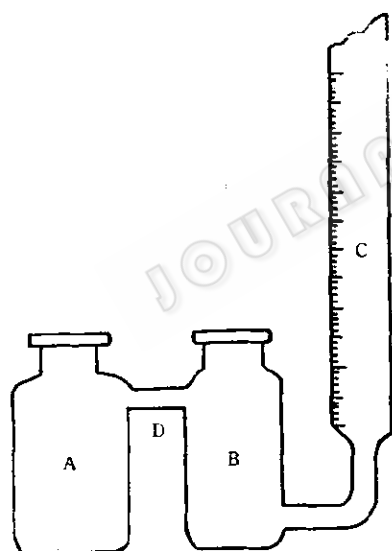


图 1 产氢动态测试装置

A. 培养瓶; B. CO₂ 吸收瓶;

C. 氢体积测定管; D. 厚壁玻璃管。

Fig. 1 Apparatus for measuring dynamics of H₂-photoproduction

A. Culture bottle; B. CO₂ absorption bottle;

C. Gas volume measuring tube; D. Glass tube.

1.5 半连续产氢试验

系采用注射器, 通过培养瓶瓶塞向内加注一定体积的底物来达到。

1.6 分析方法

氢浓度测定是用 102G 气相色谱仪进行的。以氩作载气。被测气样为 0.5ml。高纯氢 (99.999%) 为标准, 用外标法定量。

生物量的测定是取一定体积的菌液在 103°C 中烘干到恒重。

2 结果与分析

2.1 菌株的产氢能力比较

除苹果酸和乳酸外, 从实际应用出发, 还采用了有机废水中的某些主成分, 如葡萄糖、乙酸、丙酸及丁酸作为底物, 测定了 13 株菌在 48 小时内的光产氢量 (HP) 和产氢活性 (AHP)。

表 1 所列结果说明, 13 株菌在 6 种基质中的光产氢活性是有差异的。除乙酸外, 517B 菌株均具有较高的产氢活性 (5.0 — $7.8 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), 与之相应的产氢量也偏高 (32 — $40 \text{ ml} \cdot 20 \text{ ml}^{-1} \cdot 48 \text{ h}^{-1}$)。同一菌株对

表 1 13 株菌株在不同基质中的产氢量(HP)和产氢活性(AHP)

Table 1 HP and AHP of 13 strains of PSB in different substrates

菌株 Strains	苹果酸 Malic acid		乳酸 Lactic acid		葡萄糖 Glucose		乙酸 Acetic acid		丙酸 Propionic acid		丁酸 Butyric acid	
	HP	AHP	HP	AHP	HP	AHP	HP	AHP	HP	AHP	HP	AHP
D	36.2±0.05	5.18±0.05	36.70±0.3	6.37±0.10	24.0±1.70	4.64±0.17	0.67±0.23	0.14±0.50	10.9±0.40	2.49±0.39	9.6±1.50	1.32±0.28
517B	35.5±0.00	5.07±0.00	39.8±0.23	7.81±0.37	32.1±1.50	6.13±0.41	6.10±0.80	1.28	[27.20±0.40 4.15±0.45]	[27.40±2.40 3.16±0.32]	33.9±0.11	6.07±0.31
N ₃₈₇	32.5±1.40	5.07±0.28	32.80±1.80	5.83±0.45	25.00±0.50	5.15±0.14	1.80±0.90	0.38±0.20	[30.90±0.90 4.11±0.10]	[45.50±5.4 5.46±6.89]	31.00±0.90	3.51±0.31
N ₃₈₈	27.05±1.40	3.93±0.16	38.30±0.00	6.04±0.00	27.1±1.60	6.04±0.01	8.00±2.1	1.43±0.30	22.30	3.90±0.00	6.10±1.10	0.67±1.00
5	22.00±0.90	3.22±0.16	34.00±4.90	5.94±0.97	23.70±2.2	4.88±0.21	3.80±0.30	0.68±0.20	24.60±0.50	4.13±0.05	15.60±1.00	1.72±0.04
NL	19.50±0.00	3.05±0.00	28.00±1.00	4.87±0.28	24.00±2.50	5.22±0.30	7.50±0.40	1.31±0.10	13.80±1.40	2.35±0.22	27.70±0.01	2.80±0.10
HDJ	19.20±0.10	2.81±0.03	28.8±1.00	4.83±0.82	23.10±1.00	4.91±0.33	14.20±0.50	2.64±0.20	13.90±1.00	2.43±0.01	28.90±1.50	3.22±0.12
G	16.4±0.00	2.48±0.00	24.5±1.60	4.86±0.32	15.80±0.20	3.70±0.01	6.2±0.00	1.11±0.00	9.50±0.70	1.78±0.08	6.20±0.00	0.90±0.00
N ₃	17.20±2.30	2.20±0.09	20.00±0.4	3.89±0.14	23.6±1.10	4.27±0.02	7.2±0.20	1.55±0.19	12.00±0.60	2.52±0.19	6.30±0.20	0.66±0.20
FYP	13.90±0.70	2.16±0.09	30.9±1.00	5.68±0.21	28.40±1.10	6.08±0.40	49.00±0.20	7.85±0.00	30.60±0.80	5.29±0.25	16.00±0.10	1.81±0.20
5233	17.20±0.00	2.49±0.00	8.7±2.10	1.77±0.30	8.4±0.00	1.59	1.0	0.26	10.7	/	20.8	2.33
5259	11.20	1.69	19.6±0.00	2.88±0.97	4.00±0.70	0.84±0.14	0.70±0.20	0.14±0.30	12.30±0.20	2.15±0.10	21.80±0.40	2.38±0.16
Nb-W	12.60	1.94	7.8±1.3	1.56±0.26	2.0±0.00	0.42	0	0	0	0	1.0	0

* 产氢量(HP): 20ml 菌液在 48 小时内产氢的毫升数, 简写为 ml · 20ml⁻¹ · 48h⁻¹。

产氢活性(AHP): 每克生物量在每小时内产氢的毫升数, 简写为 ml · g⁻¹ · h⁻¹。

[] 72 小时的数值。

HP, Amount of H₂-photoproduction (milliliters of H₂ photoproduced by 20ml of bacterial suspension in 48 hours, ml · 20ml⁻¹ · 48h⁻¹).

AHP, Activity of H₂-photoproduction (milliliters of H₂ photoproduced per gram dry weight of bacteria per hour, ml · g⁻¹ · h⁻¹).

[] Amount of H₂ photoproduced in 72 hours.

底物也存在选择性,例如FYP菌株利用葡萄糖和乙酸及丙酸的产氢活性远高于利用苹果酸。无论以产氢量或产氢活性来衡量,乙酸都不是很理想的基质,但FYP菌株却是例外。

选择D及517B二菌株为对象,观察了若干生长因素对光产氢的影响。

2.2 光照强度及pH值对光产氢的影响

图2为光照强度实验的结果。当以苹果酸为碳源,光强大于6000lx时二菌株均具有较高的光产氢量和产氢活性,其值分别为30—40ml·20ml⁻¹·48h⁻¹及3.07—5.29ml·g⁻¹·h⁻¹,但再提高光强时,对二者便无明显作用了。

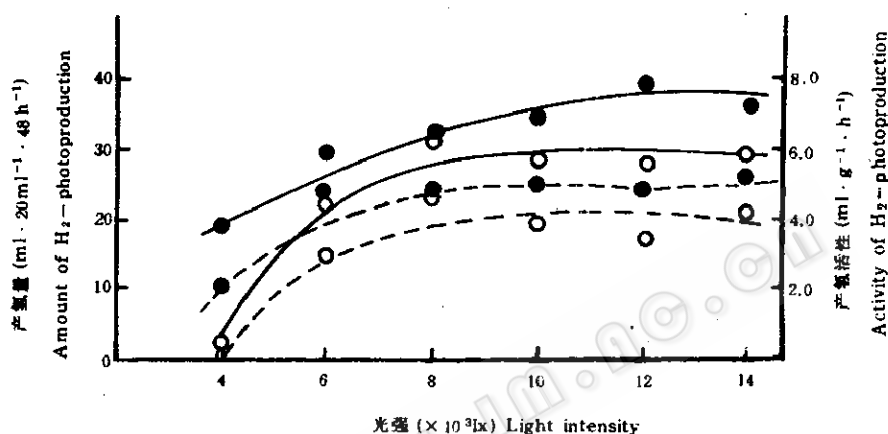


图2 光照强度(lx)对菌株D及517B光产氢的影响

Fig. 2 Effect of light intensity on H₂-photoproduction by strains D and 517B

- 菌株D的产氢活性 Activity of H₂-photoproduction by strain D;
- 菌株517B的产氢活性 Activity of H₂-photoproduction by strain 517B;
- 菌株D的产氢量 Amount of H₂-photoproduction;
- 菌株517B的产氢量 Amount of H₂-photoproduction by strain 517B.

pH值的影响比较显著(图3)。当pH为4.0—5.0时,二菌株几乎不产氢,或产氢量很低;pH在7.0左右时,产氢量剧增。pH值对二菌株产氢活性的影响也遵循同样的规律。另外,菌株517B所能适应的pH范围较菌株D为宽,在较低或较高的pH下仍具有一定的产氢能力。因此,培养液的pH值以严格保持在7.0左右为宜,此与文献中对*Rhodospseudomonas sphaeroides* VM81所报道的数值7.2很接近^[4]。

2.3 在不同浓度底物中的光产氢动力学

以乳酸作底物研究15、30、45、60及90 mmol/L 5种不同浓度对菌株D和517B的产氢动力学的影响(图4及图5)。

在低浓度15 mmol/L乳酸中菌株D及517B不但产氢水平较低,而且正常的生长都受到抑制。若以30 mmol/L为标准,则45 mmol/L及60 mmol/L分别在48小时及72小时以内对菌株D的产氢均起抑制作用;而对菌株517B则开始略有刺激作用,随后迅速增强,到120小时左右达最高峰,此后便出现吸氢现象。在实验中还曾观察到在90 mmol/L下二菌株均不再出现产氢现象。

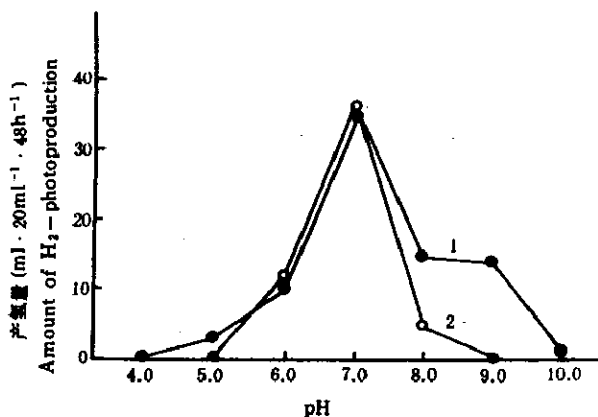


图3 pH 值对菌株 D 及 517B 产氢量的影响

Fig. 3 Effect of pH on H₂-photoproduction by strains D and 517B

1. 菌株 517B Strain 517B; 2. 菌株 D Strain D.

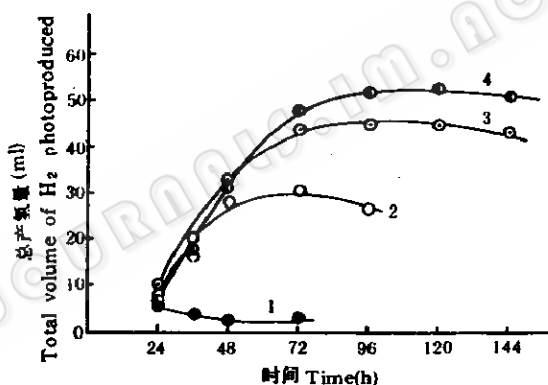


图4 菌株 517B 在不同浓度乳酸中的产氢动态变化

Fig. 4 Dynamics of H₂-photoproduction by strain 517B growing in different concentrations of lactic acid

1. 15 mmol/L; 2. 30 mmol/L; 3. 45 mmol/L; 4. 60 mmol/L.

为了评价二菌株在不同基质浓度中的产氢能力,作者引进“单位基质最大产氢率”这个概念,它的定义是每摩尔基质的最大产氢量,以 $\max \cdot \text{H}_2\text{ml/mol}$ 表示。

表2数据说明,当浓度为30—45 mmol/L时,单位基质最大产氢率最高,这也是使用乳酸培养菌株D及517B的最合适浓度。Magaritis和Hirayama等人分别研究了*R. sphaeroides* VM81及*Rs. rubrum* G-90BM,发现葡萄糖的最适浓度为38 mmol/L,而乳酸、乙酸和丁酸的最适浓度为22—33.4 mmol/L^[4,5],这与作者的结果基本一致。

2.4 固定化光合细菌细胞与游离细胞光产氢能力的比较

以苹果酸为基质,在静止培养条件下比较了固定化细胞与游离细胞的产氢能力。产氢能力系指在额定时间内,20ml培养物所释放的氢毫升数。菌株N₃、Nb-W及HDJ各有一组实验因故告缺。表3结果说明固定化技术能够提高517B、N₃、Nb-W、NL及D6株

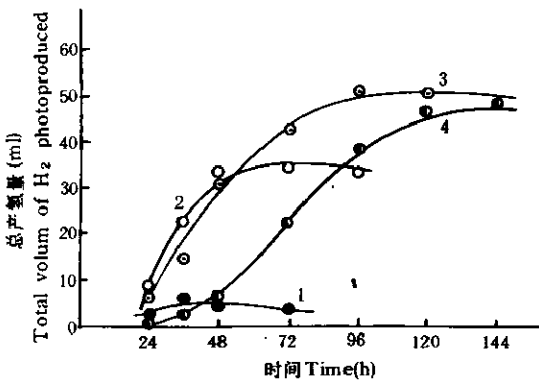


图 5 菌株 D 在不同浓度乳酸中的产氢动态变化

Fig. 5 Dynamics of H₂-photoproduction by strain D growing in different concentrations of lactic acid.

1. 15 mmol/L; 2. 30 mmol/L; 3. 45 mmol/L; 4. 60 mmol/L.

表 2 在不同浓度乳酸中菌株 D 及 517B 的单位基质最大产氢率

Table 2 [max · H₂ ml/mol] · by strains D and 517B growing in different concentrations of lactic acid

基质浓度 Conc. of substrate (mmol/L)	单位基质最大产氢率 max · H ₂ ml/mole		基质浓度 Conc. of substrate (mmol/L)	单位基质最大产氢率 max · H ₂ ml/mole	
	D	517B		D	517B
15	19.7	19.0	45	55.4	49.5
30	56.5	48.8	60	40.3	43.3

* [max · H₂ ml/mol]: 每摩尔基质的最大产氢量。

The maximum amount of H₂ photoproduced per mole of a given substrate.

菌的光产氢能力，其幅度大多位于 14%—60% 之间；其中 Nb-W 表现突出，在 5 个测定数值中，固定化细胞产氢能力的提高幅度竟达 87.5%—111.0%。不过，此技术对延长产氢时间的作用似不明显，这点与文献中使用流动培养液法所得的结果不一致，很可能是由于静止态限制了基质的供给所致，因为若在中途予以补充基质，则产氢便剧增。此外，固定不同生长时间（36h 及 48h）的细胞对各菌株的产氢量和产氢动态均无明显影响，这与 Hirayama 等人所得的结论不同^[5]。Hirayama 等人观察到 *Rhodospirillum rubrum* G-9BM 的固定化细胞在苹果酸中的产氢量为 349ml · 48h⁻¹ · g 基质⁻¹^[5]，而作者用 517B、N₃、NL、HDJ 及 D 5 株菌所得的固定化实验数值分别为 456.5、465.2、426.6、334.6 及 421.6ml · 48h⁻¹ · g 基质⁻¹；产氢量除 HDJ 菌株略低外，其它菌株均超过前者。与文献上某些红螺菌科光合细菌的产氢量相比，也处于中等水平^[13]。

表 3 固定化光合细菌与游离细胞间的光产氢能力比较
Table 3 Comparison of ability of H₂-photoproduction between free cells and immobilized cells

菌龄 Inoculum age (h)	测定时间 Measuring time (h)	517B		N ₃		NL		HDJ		D	
		固定化 Imm.	游离细胞 Free cells	固定化 Imm.	游离细胞 Free cells	固定化 Imm.	游离细胞 Free cells	固定化 Imm.	游离细胞 Free cells	固定化 Imm.	游离细胞 Free cells
	24	21.8±0.5	14.9±1.0	12.1±0.8	8.5±0.5	9.1±1.6	7.8±0.2	—	—	20.4±1.0	15.8±1.6
	48	35.9±0.5	30.8±0.3	37.4±0.8	25.3±1.6	35.7±4.0	23.7±1.4	—	—	33.3±0.7	25.1±1.0
36	72	31.4±0.5	27.4±0.2	35.6±1.6	21.8±2.1	31.1±1.0	22.0±1.4	—	—	27.6±1.3	23.7±1.3
	96	29.7±0.8	26.0±1.2	32.7±2.5	19.5±2.2	28.2±2.5	19.8±1.0	—	—	24.9±1.0	21.4±0.9
	120	24.3±1.0	23.0±0.5	27.3±3.0	17.7±2.6	23.7±1.6	18.2±1.7	—	—	20.4±2.0	19.4±0.8
				Nb-W							
	24	20.3±0.2	17.3±0.5	12.0±0.2	6.4±1.7	9.6±0.8	5.4±0.2	3.2±0.2	5.9±1.2	13.0±0.9	15.9±2.0
	48	36.7±0.9	30.2±1.2	25.4±0.5	12.2±0.6	34.3±2.3	26.9±2.5	26.9±1.9	14.0±0.8	33.9±1.4	27.9±2.2
48	72	32.8±0.4	26.2±0.7	31.2±0.7	15.5±1.6	31.1±2.8	24.3±0.4	29.7±0.4	24.4±0.4	29.9±1.2	23.3±1.2
	96	29.1±0.4	23.8±0.3	26.8±1.0	12.7±0.2	27.9±2.6	22.2±0.7	25.9±1.5	23.0±0.2	27.7±0.4	23.0±1.0
	120	24.7±0.4	20.2±1.0	23.9±0.9	11.5±1.2	23.3±2.1	19.7±1.4	22.7±1.8	19.5±1.9	21.4±1.2	17.8±2.2
初始生物量 Initial biomass (mg/20ml)		11.0		10.0		10.0		10.8		9.5	

* 光产氢能力
Ability of H₂-photoproduction: Milliliters of H₂ photoproduced by 20ml of bacterial suspension in a given time.

3 讨论

光合细菌中的红螺菌科的菌株能利用的碳水化合物基质,其类型是相当广谱的^[6],本实验的结果也是如此。不同菌株的产氢效率各异;同一菌株在不同基质中的产氢效率也各异(产氢效率系指48小时利用基质所产氢的量为该基质理论值的百分率)。因此,通过采取多种菌株混合使用,是有可能提高所分离得到的某些菌株在废水主成分中的产氢能力的,而且还可能应用多混合菌株从多组分有机废水中产氢;关于后者可以借鉴Fujii等人的工作^[7]。他们曾报道过*Rhodospseudomonas* sp. No. 7在含几种醇类与苹果酸的混合物中生长时,其产氢量要远超过在单一的苹果酸中生长者。利用乙酸产氢时转化效率低的事实早已见报道^[10],这大概和机体的代谢途径有关系。

对不同菌株的光产氢量或光产氢活性存在最适光照强度和pH,其数值分别为6000lx及7.0左右。同一底物的不同浓度对不同菌株的产氢动态变化的影响是不同的,但以单位基质的最大产氢率为标准可以选择出极为接近的最适浓度范围。这些结果证明,以菌株在特定条件下的生理、生化特性为基础,完全有可能达到应用多混合菌株从多组分有机废水中获得较高产氢量的目的。

一般认为产氢过程是受气相调控的,空气会严重抑制产氢作用^[11],但也有不同的报道,例如Hirayama等人观察到在固定化及悬浮液两种状态下*Rs. rubrum* G-9BM的产氢能力所受到的气相限制并不严重。本实验结果也证明产氢过程可以在不十分严格的厌氧条件下进行,这可能和菌株的种类及生理状态均有关系。

一般报道均认为固定化技术能提高产氢能力和稳定性,并延长产氢时间^[11,12]。作者的初步实验说明在静态条件下,固定化可以提高菌体的产氢能力,但延长产氢时间的作用却不明显;不过,若中途补充基质,则产氢能力便可剧增。因此,应用连续运行的生物反应器,消除固定化细胞颗粒与基质的接触障碍,以及基质浓度的不均一性,则有希望改善固定化细胞的产氢效能。

在处理有机废水的同时很值得注意开发所释出的生物质能氢。

参 考 文 献

- [1] Gest H, Kamen M D. *Science*, 1949, **109**: 558—559.
- [2] 徐向阳, 孙 琦. 环境污染与防治, 1990, **12** (5): 32—37.
- [3] Weaver P F, Wall J D, Gest H. *Arch Microbiol*, 1975, **105**: 207—216.
- [4] Margaritis A, Vogrinetz J. *Int J Hydrogen Energy*, 1983, **8** (4): 281—284.
- [5] Hirayama O, Uya K, Hiramatsu Y *et al.* *Agric Biol Chem*, 1986, **50** (4): 891—897.
- [6] Zurrer H. *Experientia*, 1982, **38**: 64—66.
- [7] Fujii T, Masaaki T, Masaki M *et al.* *Agric Biol chem*, 1987, **51** (1): 1—7.
- [8] Gest H, Ormerod J G, Ormerod K S. *Arch Biochem Biophys*, 1962, **97**: 21—23.
- [9] Stanier R Y. *Bact Rev*, 1961, **25**: 1—17.
- [10] Vincenzini M, Materassi R, Tredici M R. *et al.* *J Hydrogen Energy*, 1982, **7** (3): 231—236.
- [11] Sasikala K, Ramana V, Raghuvier Rao P. *et al.* *J Hydrogen Energy*, 1990, **15** (11): 795—797.
- [12] Felten P V, Zurrer H, Bachofen R. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985, **23**: 15—20.
- [13] Weaver P F, Lien S, Seibert M. *Solar Energy*, 1980, **24**: 3—45.

STUDIES ON THE CONDITIONS OF HYDROGEN-PHOTOPRODUCTION BY PHOTOSYNTHETIC BACTERIA

Sun Qi Xu Xiangyan Jao Yangwen

(Department of Biological Science and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract 13 pure cultures of *Rhodospirillaceae* have been isolated from soil and water samples polluted by organic wasteproducts. The H_2 -photoproduction (HP) and its activity (AHP) were studied and found their maximum values are $39.8 \text{ ml} \cdot 20\text{ml bacterial suspension}^{-1} \cdot 48\text{h}^{-1}$ and $7.8 \text{ ml} \cdot \text{g cell dry wt.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectively. Substrate exerts a grest influence on HP and AHP of all 13 strains, pH value also affects the evolving process evidently, and light intensity higher than 6000lx cannot further increases the AHP. Under static culture conditions cell immobilization is able to raise the H_2 -photoproduction, but gives no evident effect on its duration.

Key words H_2 -photoproduction, Photosynthetic bacteria (PSB), Cell immobilization, Substrate, Organic waste water