

# 产氢细菌 *Enterbacter sakazakii* HP 的分离及产氢特性\*

常 娥 齐亚林 邬小兵 徐惠娟 龙敏南\*\*

(厦门大学生命科学院 厦门大学生物能源中心 厦门 361005)

**摘要:** 在自然环境中分离到一株具有高产氢活性的微生物菌株, 经细菌鉴定仪及 16S rDNA 基因序列分析, 鉴定该菌株为 *Enterbacter sakazakii* HP。分析了起始 pH 值、反应温度、碳源、起始糖浓度、起始氧浓度及菌体密度等因素对菌株产氢活性的影响。研究表明, 该菌株发酵产氢较适合的条件为: 以葡萄糖为产氢底物, 起始 pH 值 8.0, 菌体密度  $OD_{600} = 0.7$ , 反应温度 35℃, 糖浓度为 0.1 mol/L, 氧浓度为 0% 的条件下, 此时产氢菌株的最高产氢活性为  $5.34 \mu\text{mol H}_2 / \text{h} \cdot \text{mg dw}$ , 氢的得率为  $1.94 \text{ mol H}_2 / \text{mol 葡萄糖}$ 。

**关键词:** *Enterbacter sakazakii*, 分离鉴定, 放氢特性

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2007) 02-0270-05

## Isolation and Characterization of a $\text{H}_2$ -producing Strain *Enterbacter sakazakii* HP\*

CHANG E QI Y a-Lin WU X iaoBing XU Hu r Juan LONG M in An

(School of Life Sciences Bioenergy Center, Xiamen University Xiamen 361005)

**Abstract** A  $\text{H}_2$ -producing bacterial strain was newly isolated and identified as *Enterbacter sakazakii* HP by 16S rDNA sequence analysis and detection by BBLCRYSTAL AUTOREADER. Various factors including substrates and its concentration, initial pH, temperature and oxygen on the hydrogen production of *E. sakazakii* HP have been studied extensively. Among several sugars glucose was the favorite substrate for hydrogen production. The optimum condition for hydrogen production by *Enterbacter sakazakii* HP was achieved as initial pH 8.0, cell density  $OD_{600} = 0.7$ , temperature 35℃, glucose concentration 0.1 mol/L, oxygen concentration 0%. Under batch fermentative hydrogen production conditions the maximal hydrogen production activity and hydrogen yield were obtained as  $5.34 \mu\text{mol H}_2 / \text{h} \cdot \text{mg dw}$  and  $1.94 \text{ mol H}_2 / \text{mol glucose}$ , respectively. The research results suggest that *Enterbacter sakazakii* HP is an ideal candidate for biological hydrogen production.

**Key words** *Enterbacter sakazakii* HP, Isolation and identification, Hydrogen production

据 2004 年世界能源统计年鉴的最新数据, 世界石油总储量为 1.5 万亿桶, 仅能够生产使用 40 多年; 全球煤炭储藏量 1 万亿吨仅够开采 200 多年。而使用化石燃料生成大量的  $\text{CO}_2$ 、 $\text{SO}_2$  等又会给地球带来温室效应和酸雨等, 引发严重的环境问题<sup>[1]</sup>, 因而开发可再生的清洁能源成为保持世界经济可持续发展的必然选择<sup>[2]</sup>。氢由于其本身无色、无嗅、无毒且燃烧后仅生成水而被认为是理想的清洁能源。氢的能量密度高, 每千克氢的热值为  $14.3 \text{ MJ}$  约为石油热值的 3 倍<sup>[3]</sup>; 它可以气

态、液态或固态金属氢化物的形式储存, 能适应储运及各种应用环境的不同要求<sup>[4]</sup>。

氢的制备包括化石燃料制氢、电解水制氢和生物质制氢等方式。生物制氢主要包括光合生物制氢<sup>[5, 6]</sup>和发酵细菌制氢<sup>[7-9]</sup>。到目前为止, 已筛选到许多产氢微生物, 包括专性厌氧菌、兼性厌氧菌、好氧菌、光合细菌和蓝、绿藻等<sup>[10]</sup>。在这些产氢微生物中, 兼性厌氧菌对氧环境具有较高的适应性, 在解除氧的抑制后能迅速恢复产氢活性, 因而被认为比严格的专性厌氧菌更适用于生

\* 国家自然科学基金项目 (No. 30470395)

厦门市科技项目 (No. 3502Z20041070)

厦门大学新世纪优秀人才计划项目

福建省青年科技人才创新项目 (No. 2005J003)

\*\* 通讯作者 Tel: 0592-2185731, E-mail: bngmr@xmu.edu.cn

收稿日期: 2006-05-22, 修回日期: 2006-07-15

物制氢<sup>[11]</sup>。20世纪90年代后,人们开始利用厌氧活性污泥进行产氢,以废水中的碳水化合物作为供氢体,通过厌氧发酵制取氢<sup>[12-15]</sup>,从而使生物制氢的成本大大降低,并使生物制氢技术走向应用化。目前,发酵法生物制氢技术在国际上仍处于实验室研究和中试阶段,在提高微生物产氢能力及开发廉价生产原料、改进发酵工艺等方面仍有很多需要解决的问题。

本文报道了高产氢耐热菌株 *Enterbacter sakazakii* HP 的分离鉴定及其放氢特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株的分离及鉴定

采集高温环境水样,取 100 $\mu$ L 在生长培养基(酵母粉 3g/L, 蛋白胨 6g/L, 葡萄糖 10g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3g/L, pH 7.0) 平板上涂布,于 37 $^{\circ}C$  温箱培养 12h 后分离单菌落,将单菌落分别接种于 50mL 生长培养基,在 140mL 血清瓶中培养,血清瓶以翻口橡胶塞密封。培养一段时间后检测各菌株是否产氢。将所有产氢菌株再分别接种于 450mL 生长培养基中培养至对数生长期,低速离心收集菌体并将菌体重新悬浮于放氢缓冲液( $N_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  14.33g/L,  $KH_2PO_4$  3.63g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.37g/L, 葡萄糖 20g/L) 中,调节菌液  $OD_{600} = 1.0$  然后将 10mL 菌液移至 140mL 血清瓶中,以翻口橡皮塞密封好后,反复抽气充氮气( $A_r$ )。12h 后于 102G 型气相层析仪测定各菌株的产氢量,挑选产氢量最高的菌株做进一步分析。

以光学显微镜(Olympus CH-30, Japan)观察细胞的形态再以透射电子显微镜(JEPL, JEM-2100, Japan)观察细胞的微观形态结构。利用细菌鉴定仪(BBLCRYSTAL™, USA)对细菌的生理生化特性进行分析,确定细菌的种属;根据细菌 16S rRNA 基因中的特异保守序列设计 PCR 引物(引物 1: 5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG -3'; 引物 2: 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3'), PCR 扩增该产氢菌株 16S rRNA 基因,测序后将序列与 GenBank 中已知 16S rRNA 基因序列进行比较,确定菌株在分类学中的位置。

### 1.2 菌株生长曲线的测定

将活化好的菌株接种于 50mL 生长培养基,接

种量 1% (体积比),于 35 $^{\circ}C$  摇床振荡培养,摇床转速设为 120r/min,共培养 36 瓶。每小时取 3 瓶于分光光度计(722 光栅分光光度计)测菌液  $OD_{600}$  的吸光值。

### 1.3 菌体干重测定

产氢菌培养物经离心和生理盐水洗涤后,再悬浮于生理盐水中,分别调节菌体浓度至  $OD_{600}$  为 0.33、0.62、0.97、1.21、1.52、1.71,各取 200mL 离心,将沉淀溶于少量蒸馏水中,置于称量瓶中于 105 $^{\circ}C$  烘至恒重。

### 1.4 菌株放氢活性的测定

产氢菌株接种于 50mL 生长培养基中活化 2 次,再接种于 1000mL 生长培养基中扩大培养,培养至对数生长期后期,低速离心(4000 r/min) 8 min 后收集菌体细胞,然后重新悬浮于不同条件的放氢缓冲液中,利用分光光度计调节菌液浓度后,取 10mL 菌悬液置于容积为 140mL 的血清瓶中,充  $A_r$  赶出瓶中空气后以翻口橡皮塞密封,定时检测菌株在不同条件下的放氢活性:(1) 通过调整  $N_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  及  $KH_2PO_4$  在放氢缓冲液中比例,将产氢系统起始 pH 值调为 7.0、8.0、8.5,以测定反应系统起始 pH 值对菌体放氢的影响。(2) 以 0.1mol/L 的葡萄糖、D-木糖、蔗糖及浓度为 2% 的可溶性淀粉为反应底物中的供氢体,测定不同底物对菌体放氢的影响。(3) 将菌体密度调节至  $OD_{600} = 0.33、0.69、1.01、1.23、1.49$  以测定菌体密度对放氢的影响。(4) 将产氢系统置于 25 $^{\circ}C$ 、30 $^{\circ}C$ 、35 $^{\circ}C$ 、40 $^{\circ}C$ 、45 $^{\circ}C$  下反应,以测定温度对菌株放氢的影响。(5) 将产氢系统起始糖浓度调节为 0.05mol/L、0.1mol/L、0.2mol/L、0.4mol/L,以测定不同起始糖浓度对产氢的影响。(6) 充  $A_r$  赶出血清瓶中空气并以翻口橡皮塞密封后,用注射器抽出一定量的瓶内气体,再向瓶中注入不同体积氧气,将产氢系统气相起始氧浓度调节为 0%、1.0%、5.0%、7.5%、10.0%,以测定不同起始氧浓度对菌株放氢的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 产氢菌株的鉴定及其生理生化特性

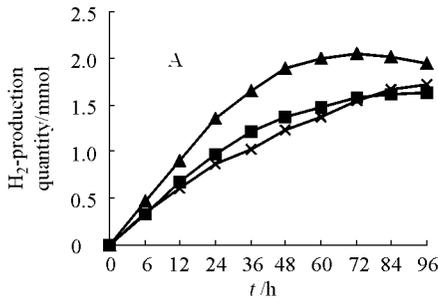
水样经过多次平板涂布、划线后,分离纯化得到产氢活性较高的菌株。该菌株经革兰氏染色呈阴性,吲哚实验及氧化酶实验也均呈阴性;可

在有氧或无氧条件下生长, 属于兼性厌氧菌; 在透射电镜下观察菌体细胞呈短杆状, 有鞭毛。

通过细菌鉴定仪对菌种进行鉴定, 结果显示该菌株的生理生化特性与 *Enterbacter sakazakii* 的相似性达 99.55%。提取菌株总 DNA 后扩增其 16S rRNA 基因, 所得序列与 GenBank 中已知基因序列进行比较, 结果表明该菌株 16S rRNA 基因与 *Enterbacter sakazakii* 的 16S rRNA 基因相似性达 97%。根据菌株形态结构及生理生化特征、细菌鉴定仪鉴定结果以及菌株 16S rRNA 基因序列分析结果, 初步确定该菌株为 *Enterbacter sakazakii* HP。

### 2.2 菌株生长曲线的测定

由菌株在培养不同时间的菌体密度制作生长



曲线, 结果显示, 该菌株在培养 1h 后进入对数生长期, 培养 6h 后进入稳定期, 9h 后进入衰亡期。

### 2.3 起始 pH 值对菌体放氢的影响

反应系统 pH 值是影响微生物代谢的重要因素。经气相色谱 (VARIAN, CP3800.USA) 分析, 该菌株在产氢的代谢过程中会产生一些有机酸, 主要是乙酸和丁酸, 导致系统 pH 值降低。在系统起始 pH 值较高时, 菌体表现出较高的放氢活性, 前 6h 的平均产氢速率可达  $5.06 \mu\text{mol}/\text{h} \cdot \text{mg dw}$ , 且放氢时间持续较长, 氢转化率达  $1.94 \text{ molH}_2/\text{mol}$  葡萄糖。从实验结果来看, 在批次发酵产氢中, 菌株产氢的最适起始 pH 值为 8.0 (图 1)。

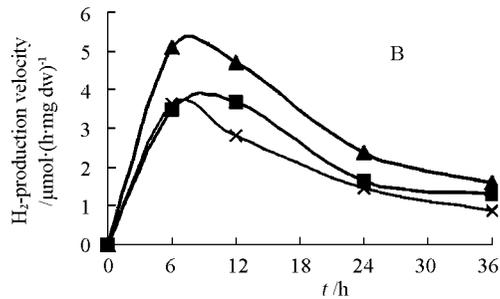


图 1 反应系统起始 pH 对菌体放氢的影响

糖浓度: 0.1 mol/L, 菌体密度:  $OD_{600} = 0.7$ , 反应温度: 35°C, 氧浓度: 0%, A: 菌体放氢总量, B: 菌体放氢速率

■ pH7.0, ▲ pH8.0, × pH8.5

### 2.4 碳源对菌体放氢的影响

不同菌株在代谢过程中对碳源的利用情况不同, 分别以葡萄糖、D-木糖、蔗糖及可溶性淀粉为产氢底物。结果表明, 该菌株以葡萄糖为碳源

时放氢活性最高, 前 6h 的平均产氢速率可达  $5.34 \mu\text{mol}/\text{h} \cdot \text{mg dw}$ , 氢转化率为  $1.93 \text{ molH}_2/\text{mol}$  葡萄糖。其次是蔗糖、D-木糖, 最后是可溶性淀粉 (图 2)。因此选择葡萄糖为碳原作进一步的研究。

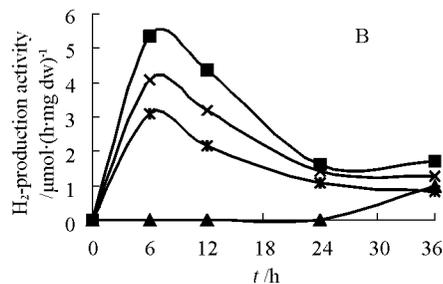
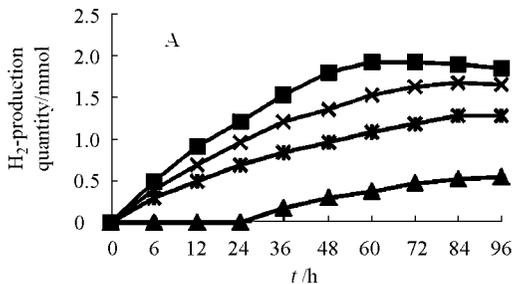


图 2 不同碳源对菌体放氢的影响

可溶性淀粉浓度 2%, 其他碳源浓度均为 0.1 mol/L, 起始 pH: 8.0 菌体密度:  $OD_{600} = 0.7$ , 反应温度: 35°C, 氧浓度: 0%,

A: 菌体放氢总量, B 菌体放氢速率

■ 葡萄糖, ▲ 淀粉, × 蔗糖, \* D-木糖

### 2.5 细胞密度对放氢活性的影响

菌体细胞密度对该菌株反应前期放氢速率的影响不十分明显, 但不同菌体密度的反应体系最

终产氢总量表现出显著的差异。在本实验所设计的不同菌体密度的放氢体系中, 当菌体密度为  $OD_{600} = 0.33$  时前 6h 的平均产氢速率较低, 放氢

活性不高, 当反应体系菌体密度为  $OD_{600} = 0.7$ 、1.0 或 1.2、1.5 时, 放氢速率相差不多, 可达  $5.17 \mu\text{mol}/\text{h} \cdot \text{mg dw}$ 。因此, 综合考虑菌体的放氢速率和放氢总量, 以菌体  $OD_{600} = 0.7$  左右时为最适放氢菌体密度。

## 2.6 温度对菌体放氢活性的影响

温度是影响微生物生长代谢的重要因素, 对

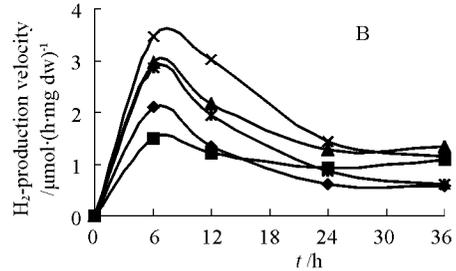
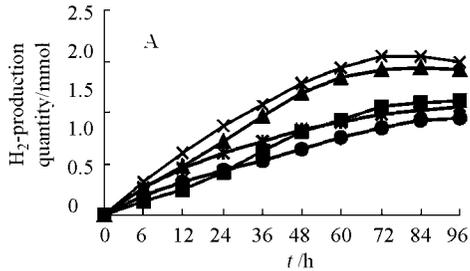


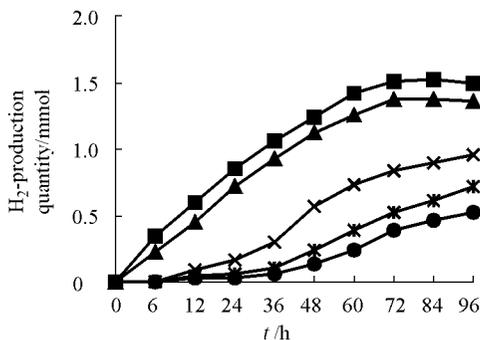
图 3 温度对菌体放氢的影响

葡萄糖浓度:  $0.1 \text{ mol/L}$ , 细胞密度:  $OD_{600} = 0.7$ , 起始  $\text{pH}$ :  $8.0$ , 氧浓度:  $0\%$ , A: 温度对菌体放氢总量的影响 B 温度对菌体放氢速率的影响

■— 25°C, ▲— 30°C, ×— 35°C, \*— 40°C, ●— 45°C

## 2.7 不同糖浓度对菌株放氢活性的影响

以葡萄糖做为该产氢菌株的碳源, 不同的糖浓度对菌株的生长代谢会产生一定的影响。当糖浓度过高时, 反应系统渗透压增高, 对菌株生长不利且会造成浪费; 当糖浓度过低时, 不能满足菌株代谢所需能量。从实验结果来看, 该菌株在葡萄糖浓度为  $0.1 \text{ mol/L}$  的培养基中氢转化率为  $1.57 \text{ mol H}_2/\text{mol}$  葡萄糖, 前 6h 平均产氢速率为  $3.02 \mu\text{mol}/\text{h} \cdot \text{mg dw}$ 。综合考虑菌体对原料的利用



率及放氢活性, 葡萄糖浓度为  $0.1 \text{ mol/L}$  时优于其他浓度。

## 2.8 起始氧浓度对菌株放氢活性的影响

对多数产氢微生物来说, 氧气对其产氢都有一定的影响。这是因为微生物放氢所需氢酶对氧气非常敏感<sup>[16-17]</sup>。该菌株在反应体系氧气含量为  $0\%$  时氢转化率为  $1.52 \text{ mol H}_2/\text{mol}$  葡萄糖, 前 6h 平均产氢速率为  $3.64 \mu\text{mol}/\text{h} \cdot \text{mg dw}$  (图 4), 随着氧气含量的增加, 菌株放氢活性逐渐降低。

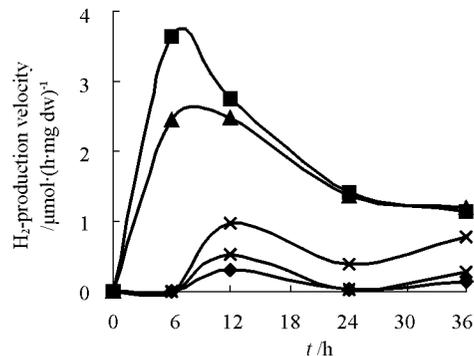


图 4 起始氧浓度对菌株放氢的影响

起始  $\text{pH}$  值:  $8.0$ , 葡萄糖浓度:  $0.1 \text{ mol/L}$ , 菌体密度:  $OD_{600} = 0.7$ , 反应温度:  $35^\circ\text{C}$  A: 菌株放氢总量, B: 菌株放氢速率

■— 0%, ▲— 1.0%, ×— 5.0%, \*— 7.5%, ●— 10.0%

## 3 讨论

选育高产氢活性的微生物菌株是构建高效生

物制氢系统的关键。与目前所报道的多数产氢微生物相比较, 本研究所获得的菌株具有以下 4 方面的优点: (1) 产氢活性较高, 前 6h 平均产氢速

率可达  $5.34 \mu\text{mol H}_2 / \text{h} \cdot \text{mg dw}$ ; (2) 可以在温度较高的环境中生存 ( $55^\circ\text{C}$ ); (3) 对氧的耐受性强, 可在氧含量为 10% 的环境中生长并产氢; (4) 能利用多种有机物进行发酵放氢, 如对淀粉的发酵转化可用于处理淀粉类废水; 对木糖的利用可以更充分的降解纤维素类物质, 实现对生物质资源更有效地利用等。本研究中分离得到的耐热菌株 *E. sakazakii* HP 在以葡萄糖为产氢底物, 反应系统起始 pH 值为 8.0, 菌体密度  $OD_{600} = 0.7$ , 反应温度  $35^\circ\text{C}$ , 糖浓度  $0.1 \text{ mol/L}$ , 氧气分压 0% 的条件下, 产氢活性较高, 氢的转化率可达  $1.94 \text{ mol H}_2 / \text{mol}$  葡萄糖。本研究表明, 菌株 *E. sakazakii* HP 在生物制氢研究中有良好的应用前景。

### 参考文献

[ 1 ] 卢元, 张翀, 邢新会. 生物加工过程, 2004 **2** 41~45.  
 [ 2 ] Dresselhaus M S, Thomas IL. Nature, 2001, **414**: 332~337.  
 [ 3 ] 袁振宏, 吴创之, 马隆龙, 等. 生物质能利用原理与技术. 北京: 化学工业出版社, 2005.  
 [ 4 ] 元英进, 史春梅, 韩金玉. 现代化工, 1995 **15** (7): 8~11.  
 [ 5 ] Matsunaga T, Hatano T, Yamada A, et al. Biotechnology and Bioengineering, 2000 **68** (6): 647~651.

[ 6 ] Benemann JR. J Appl Phycol, 2000 **12** (3-5): 291~300.  
 [ 7 ] Das D, Veziroglu T N. Int J Hydrogen Energ, 2001 **26** (1): 13~28.  
 [ 8 ] Woodward J, Orr M, Cordray K, et al. Nature, 2000 **405** (6790): 1014~1015.  
 [ 9 ] Michael W W A, Edward I S. Science, 1998 **282**: 1842~1843.  
 [ 10 ] Takabataka H, Suzuki K, Irbem K, et al. Bioresource Technology, 2004 **95**: 151~158.  
 [ 11 ] Minna L, Jinli H, Xiaobin W, et al. Research in Microbiology, 2005 **156**: 76~81.  
 [ 12 ] Jiunn J L. Biotechnology and Bioengineering, 2000, **68**: 269~277.  
 [ 13 ] 任南琪, 王宝贞, 马放. 中国环境科学, 1995, **15** (6): 401~406.  
 [ 14 ] 樊耀亭, 李晨林, 侯红卫, 等. 中国环境科学, 2002, **22** (4): 370~374.  
 [ 15 ] Ueno Y, Hanuta S, Ishii M, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **57**: 555~562.  
 [ 16 ] Happe R P, Roseboom W, Pierk A J, et al. Nature, 1997, **388**: 126.  
 [ 17 ] Van der Zwaan JW, Coremans JM C C, Bouwens E C M, et al. Biochim Biophys, 1990 **1041**: 101~110.

### 论文规范化与标准化

#### 论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写 (正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 年用 a; 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度) 和 N (当量浓度) 等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体) 表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 用量和单位的比值表示数值, 即物理量符号 (斜体) 与单位 (正体) 之间用斜线隔开, 例如:  $t / \text{h}$  (表示时间, 单位是小时)。

带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 例如:  $20 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$ , 不能写成  $20 \times 0.3 \text{ cm}$ ,  $3^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$  不可写成  $3 \sim 5^\circ\text{C}$ ;  $3\% \sim 6\%$  不可写成  $3 \sim 6\%$  等。