

# 产氢菌 *Enterobacter* sp. 和 *Clostridium* sp. 的分离鉴定及产氢特性 Isolation and Characterization of H<sub>2</sub>-producing Strains *Enterobacter* sp. and *Clostridium* sp.

支晓鹏, 刘清锋, 鄢小兵, 徐惠娟, 龙敏南\*

ZHI Xiao-Peng, LIU Qing-Feng, WU Xiao-Bing, XU Hui-Juan and LONG Min-Nan\*

厦门大学生命科学学院, 厦门大学生物能源中心, 厦门 361005

School of Life Sciences, Bio-Energy Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**摘 要** 在高温水体中分离得到 2 株具有较高产氢活性的微生物菌株 Z-16 和 C-32。根据两菌株的 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定菌株 Z-16 为 *Enterobacter* sp., 菌株 C-32 为 *Clostridium* sp.。研究了起始 pH 值、反应温度、碳源等对菌株放氢活性的影响。菌株 Z-16 的最适产氢条件为: 反应系统起始 pH 7.0, 反应温度 35℃, 以蔗糖为产氢底物。在最适条件下, 菌株 Z-16 的氢转化率为 2.68 mol H<sub>2</sub>/mol 蔗糖。菌株 C-32 的最适产氢条件为: 反应系统起始 pH 8.0, 反应温度 35℃, 以麦芽糖为产氢底物。在最适条件下, 菌株 C-32 的氢转化率为 2.71 mol H<sub>2</sub>/mol 麦芽糖。以葡萄糖为碳源时, 菌株 Z-16 和菌株 C-32 的氢转化率分别为 2.35 和 2.48 mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖。

**关键词** 产氢菌株, 分离鉴定, 产氢特性

中图分类号 Q939.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0152-05

**Abstract** Two hydrogen-producing bacterial strains were newly isolated and identified as *Enterobacter* sp. Z-16 and *Clostridium* sp. C-32 by 16S rDNA sequence analysis. Various parameters for hydrogen production, including substrates, initial pH and temperature, have been studied. The optimum condition for hydrogen production of strain Z-16 were achieved as: initial pH 7.0, temperature 35℃, sucrose as the favorite substrate. In comparison, The optimum condition for hydrogen production of strain C-32 were obtained as: initial pH 8.0, temperature 35℃, maltose as the favorite substrate. Under batch fermentative hydrogen production conditions, the maximal hydrogen conversion rate for strain Z-16 and strain C-32 were 2.68 mol H<sub>2</sub>/mol sucrose and 2.71 mol H<sub>2</sub>/mol maltose, respectively. Using glucose as substrate, the hydrogen conversion rate of strain Z-16 and strain C-32 were 2.35 and 2.48 mol H<sub>2</sub>/mol glucose, respectively. This research suggest a good application potential of strain Z-16 and C-32 in the future biological hydrogen production.

**Key words** H<sub>2</sub>-producing strains, isolation and identification, H<sub>2</sub>-producing characteristics

氢作为一种无污染的清洁燃料, 受到世界各国的重视。氢在燃烧过程中不产生含碳化合物, 只生成水。氢的能量密度高, 每千克氢的热值为 143MJ,

约为石油热值的 3 倍<sup>[1]</sup>。氢燃料电池和其它氢利用技术的快速发展促进了对氢能的开发利用。在各种制氢方式中, 微生物厌氧发酵产氢方法比较适合大

Received: July 17, 2006; Accepted: August 29, 2006.

This work was supported by the Key Project of Science and Technology of Fujian Province of China (No. 20051016) and the Project of Science and Technology of Xiamen of China (No. 3502Z20041070).

\* Corresponding author. Tel: + 86-592-2185731; E-mail: longmn@xmu.edu.cn

福建省重点科技项目( No. 20051016 )和厦门市科技项目( No. 3502Z2004 )资助。院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

规模的工业制氢,我国在这方面取得了较好的进展<sup>[2]</sup>。国外学者对生物制氢也进行了较多的研究, Morimoto 等<sup>[3]</sup>研究了混合微生物的产氢, Hussy 等<sup>[4]</sup>研究了利用蔗糖和甜菜糖液进行连续流制氢。

产氢菌株是生物制氢的核心,高效产氢菌株的筛选不但是生物制氢最基础的研究课题,也为产氢菌株遗传育种和生理生化的研究提供了重要的微生物资源。迄今,已报道了许多产氢菌株,大部分为兼性厌氧肠杆菌、厌氧梭菌及少数其他种属的菌株<sup>[3-10]</sup>。本文报道了兼性厌氧产氢菌 *Enterobacter* sp. Z-16 和专性厌氧产氢菌 *Clostridium* sp. C-32 的筛选鉴定及其产氢特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基和缓冲液

生长培养基:葡萄糖 10g/L,蛋白胨 6g/L,酵母膏 2g/L, NaCl 5g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3g/L, L-半胱氨酸 1g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g/L, pH 值为 7.2; 121℃ 灭菌 20min。

产氢缓冲液:先配制不同 pH 值(5.0, 6.0, 7.0, 8.0)的磷酸缓冲液(50mmol/L),然后加入不同浓度的产氢底物。

### 1.2 菌株的分离及鉴定

**1.2.1 兼性厌氧菌的分离纯化** 取水样 100 $\mu$ L,接种于含 50mL 生长培养基的 140mL 血清瓶中,血清瓶抽气充 Ar,然后以翻口橡胶塞密封,置于摇床(120 r/min) 37℃ 厌氧培养,一段时间后于 102G 型气相层析仪检测各瓶产氢量,挑选产氢量较高的样品,利用平板划线的方法分离产氢量较高的菌株。

**1.2.2 专性厌氧菌的分离纯化** 取水样 100 $\mu$ L,接种于含 50mL 生长培养基的 140mL 血清瓶中,血清瓶抽气充 Ar,然后以翻口橡胶塞密封,37℃ 厌氧培养,培养一段时间后于 102G 型气相层析仪检测各瓶产氢量。确定有氢气产生后,首先在普通生长培养基平板上面划线会发现几乎无菌长出,初步判断为专性厌氧菌,然后使用血清瓶平板(含 2% 琼脂的生长培养基)划线,并抽气充 Ar,37℃ 厌氧静置培养。反复划线分离专性厌氧产氢菌。

### 1.2.3 菌株鉴定:

(1)形态观察和生理生化实验:以电子显微镜(JEPL JEM-2100)观察菌株的微观形态结构。对两菌株进行革兰氏染色,并进行观察。对兼性厌氧菌 Z-16 辅以氧化酶和吡啶实验,并采用美国 BD (Becton, Dickinson and Company) 公司生产的 BBL

Crystal™ 型细菌鉴定系统进行分类鉴定。对专性厌氧菌 C-32 辅以芽孢染色法进行形态观察。

(2)16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析:采用蛋白酶/SDS 法制备总 DNA 模板<sup>[11]</sup>。采用一对通用引物(正向引物 F:5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物 R:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min; 95℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 1.5min, 循环 32 次; 72℃ 7min, 4℃ 保温。PCR 产物胶回收后,分别与 pMD18-T Vector (TaKaRa) 连接,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ ,在含氨基青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上筛选白色菌落,碱裂解法提取质粒 DNA,验证阳性克隆,由上海英骏生物技术有限公司完成测序。将测定的序列用 BLAST 软件在 GenBank 中与已知的 16S rDNA 进行同源性比较,初步确定菌株在分类学中的位置。

### 1.3 菌株产氢特性

将两菌株接种于 50mL 生长培养基中活化 1 次,再接种于 1000mL 生长培养基中扩大培养,培养至对数生长期,离心(4000  $\times$  g, 8min)收集菌体细胞,然后重新悬浮于不同条件产氢缓冲液中,调节菌悬液浓度至 OD<sub>600</sub> = 0.6,取 10mL 菌悬液置于容积为 140mL 的血清瓶中,每个条件设置 3 个重复,抽气充 Ar 厌氧培养,以翻口橡皮塞密封,置于摇床温育(120r/min),定时取血清瓶中 50 $\mu$ L 气样于 102G 型气相层析仪测定 H<sub>2</sub> 含量,并进行产氢比较。

**1.3.1 不同 pH 条件下菌株产氢特性** 在反应系统起始 pH 值为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 的磷酸缓冲液(50mmol/L),加入终浓度为 50mmol/L 葡萄糖,测定反应系统起始 pH 对菌株产氢的影响,并进行产氢比较。

**1.3.2 不同温度条件下菌株产氢特性** 将反应系统温度设置为 25℃、30℃、35℃、40℃,两菌株各自使用最适 pH 的磷酸缓冲液,加入终浓度为 50mmol/L 葡萄糖,测定不同反应温度对菌株产氢的影响,并进行产氢比较。

**1.3.3 不同碳源条件下菌株产氢特性** 以终浓度为 50mmol/L 的葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖及浓度为 2% 的可溶性淀粉为反应系统中的碳源,分别加入到两菌株最适 pH 的磷酸缓冲液中,在各自最适产氢温度条件下测定不同碳源对两菌株产氢的影响,并进行产氢比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 产氢菌株的鉴定

将分离纯化得到的两菌株进行革兰氏染色并镜

检观察,发现菌株 Z-16 呈阴性,菌株 C-32 呈阳性。菌株 Z-16 吡啉实验及氧化酶实验均呈阴性,细菌鉴定仪显示该菌株属于 *Enterobacter* 属。菌株 C-32 芽孢染色法染色后镜检可观察到芽孢生成。透射电镜观察发现菌株 Z-16 呈杆状(图 1-A),菌株 C-32 呈杆状(图 1-B)。16S rDNA 序列同源性比较发现菌株 Z-

16 和 *Enterobacter hormaechei* 的同源性最高,达到 97%,菌株 C-32 和 *Clostridium butyricum* 的同源性最高,为 99%。根据菌株形态特征,生理生化特征和 16S rDNA 序列分析结果初步鉴定菌株 Z-16 为 *Enterobacter* sp.,菌株 C-32 为 *Clostridium* sp.。

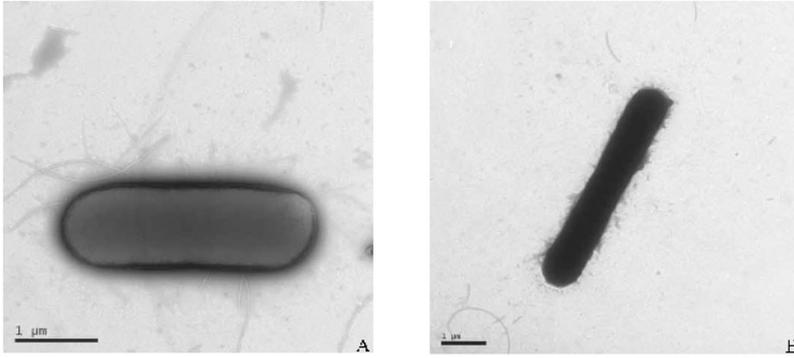


图 1 菌株 *Enterobacter* sp. Z-16 和菌株 *Clostridium* sp. C-32 透射电镜照片

Fig. 1 Electron microscope photographs of *Enterobacter* sp. Z-16 and *Clostridium* sp. C-32  
A Z-16 (40000 ×), B C-32 (20000 ×).

2.2 产氢特性

2.2.1 不同初始 pH 条件下菌株产氢特性:反应系统 pH 值是影响微生物代谢的重要因素,微生物产氢过程中也伴随生成有机酸,导致系统 pH 降低。反应系统为 140mL 血清瓶,菌株 Z-16 在初始 pH 为 7.0 条件下产氢量最高可达 26.6mL,转化率为 2.35mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖。菌株 C-32 在初始 pH 为 8.0 条件下产氢量最高达到 27.8mL,转化率为 2.48mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖。在 pH=5.0 条件下,菌株 Z-16 的不产氢,菌株 C-32 可产氢 3.3mL。在 pH=6.0 条件下菌株 Z-16 产氢量为 1.5mL,菌株 C-32 可达 11.5mL。实验表明在酸性条件下,菌株 Z-16 产氢量明显低于菌株 C-32,菌株 Z-16 更易受到低 pH 影响而抑制产

氢(图 2)。

2.2.2 不同温度条件下菌株产氢特性:温度是影响菌株产氢的重要条件。设置 25℃、30℃、35℃、40℃ 4 个温度条件,进行不同温度条件下放氢研究,反应系统为 140mL 血清瓶。结果为:产氢菌株均在 35℃ 时产氢量最高,在一定温度范围内升高温度(≤ 35℃)均可以提高菌株的放氢量。菌株 Z-16 在 40℃ 条件下产氢量可达 18.9mL,在 30℃ 条件下可产氢 16.1mL,40℃ 条件下产氢量略大于 30℃ 条件下;而菌株 C-32 在 40℃ 条件下产氢量为 17.6mL,在 30℃ 条件下产氢量则为 19.3mL,40℃ 条件下产氢量略小于 30℃ 条件下(图 3)。实验表明两株菌在不同的温度条件下具有不同的产氢特性。

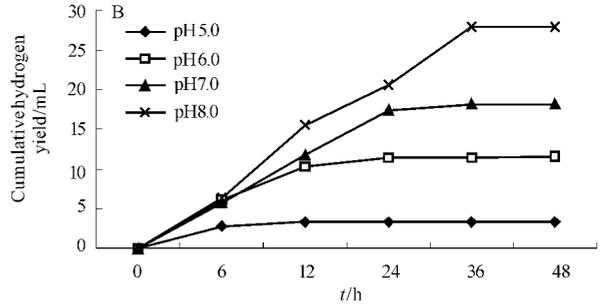
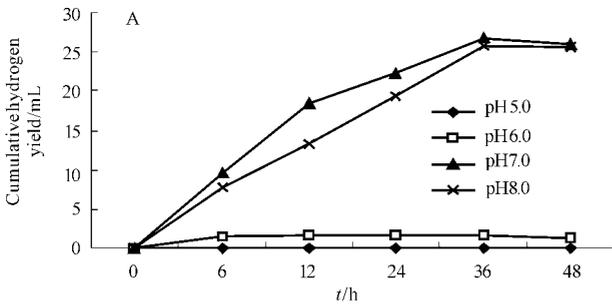


图 2 不同初始 pH 条件下菌株产氢特性(葡萄糖浓度:50mmol/L,菌体密度:OD<sub>600</sub> = 0.6;反应温度:35℃;厌氧培养)

Fig. 2 Effects of starting pH on the H<sub>2</sub>-production of strains Z-16 and C-32

A Z-16; B C-32.

2.2.3 不同碳源条件下菌株产氢特性:分别以葡萄

糖、可溶性淀粉、蔗糖、乳糖及麦芽糖为碳源进行产

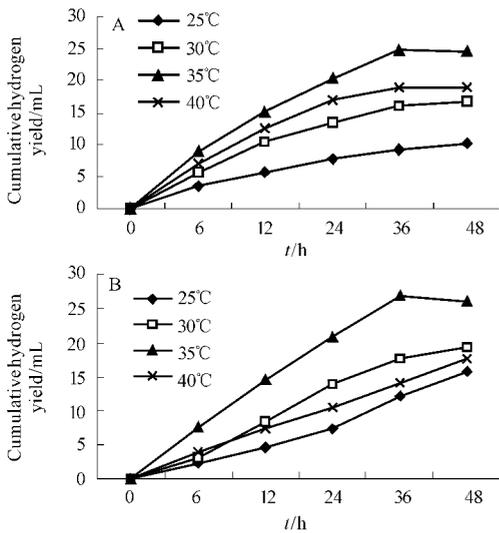


图3 不同温度条件下菌株产氢特性(葡萄糖浓度: 50mmol/L,菌体密度:  $OD_{600} = 0.6$  厌氧培养)

Fig. 3 Effects of temperature on the  $H_2$ -production of strains Z-16 and C-32

A Z-16 B C-32.

氢研究,反应系统为 140mL 血清瓶,在最适 pH 和温度条件下。结果表明,菌株 Z-16 以蔗糖为碳源时产氢量达到最高,转化率达到  $2.68 \text{ mol } H_2/\text{mol}$  蔗糖,乳糖最低,转化率只有  $1.17 \text{ mol } H_2/\text{mol}$  乳糖,菌株 C-32 以麦芽糖为碳源时产氢量最高,转化率达  $2.71 \text{ mol } H_2/\text{mol}$  麦芽糖,最低也为乳糖,转化率为  $1.54 \text{ mol } H_2/\text{mol}$  乳糖。表明乳糖不适于作为此两株菌产氢的碳源。以葡萄糖(单糖)为碳源,转化率最高也可以达到  $2.35 \text{ mol } H_2/\text{mol}$  葡萄糖和  $2.48 \text{ mol } H_2/\text{mol}$  葡萄糖,可见葡萄糖的转化为  $H_2$  的效率是最高的。以可溶性淀粉为碳源,菌株 C-32 的产氢量明显高于菌株 Z-16,表明菌株 C-32 对可溶性淀粉有较好的利用率(图 4)。

### 3 讨论

本研究通过常规分离方法和厌氧分离方法在同一样品中获得了两株产氢菌 *Enterobacter* sp. Z-16 和 *Clostridium* sp. C-32,对其产氢进行了研究和比较。研究发现:菌株 Z-16 和菌株 C-32 的最适产氢初始 pH 分别为 7.0 和 8.0,表明两株菌对产氢的 pH 要求是不同的,只有在合适的 pH 条件下才达到最高产氢量;最适产氢温度都为  $35^\circ\text{C}$ ,表明保持合适的温度是菌株正常代谢和达到最高产氢量的必要条件;蔗糖是菌株 Z-16 的理想产氢底物之一,其氢转化率达到  $2.68 \text{ mol } H_2/\text{mol}$  蔗糖,麦芽糖作为菌株 C-32 的产氢底物时,其氢转化率为  $2.71 \text{ mol } H_2/\text{mol}$  麦芽糖。

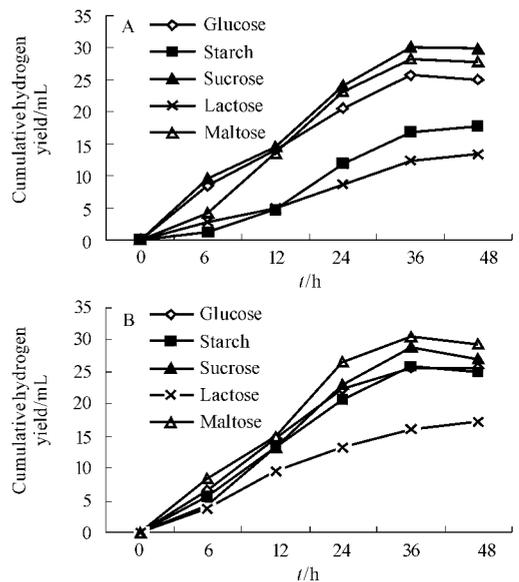


图4 不同碳源条件下菌株产氢特性(可溶性淀粉浓度 2%,其他碳源浓度均为 50mmol/L,起始 pH 分别为 7.0 和 8.0;菌体密度:  $OD_{600} = 0.6$ ;反应温度  $35^\circ\text{C}$ ;厌氧培养)

Fig. 4  $H_2$ -production of strains Z-16 and C-32

by using different organic substrates

A Z-16 B C-32.

以葡萄糖为碳源时,菌株 Z-16 和菌株 C-32 的氢转化率分别为  $2.35$  和  $2.48 \text{ mol } H_2/\text{mol}$  葡萄糖,兼性厌氧菌略低于专性厌氧菌。产氢菌株利用葡萄糖产氢的转化率与 Morimoto 等<sup>[3]</sup>和 Kumar 等<sup>[6]</sup>研究得到的结果相近。菌株 C-32 在利用可溶性淀粉产氢方面优于菌株 Z-16。研究表明两株产氢菌可作为生物制氢研究中的优良菌种,在生物制氢中有较好的应用前景。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Yuan ZH(袁振宏), Wu CZ(吴创之), Ma LL(马隆龙), et al. Theory and Technology for Biomass Utilization. Beijing: Chemical Industry Press(化学工业出版社) 2005.
- [2] Li JZ(李建政), Ren NQ(任南琪), Lin MC(林明), et al. Hydrogen bio-production by anaerobic fermentation of organic wastewater in pilot-scale. *Acta Energetica Solaris Sinica* (太阳能学报) 2002, 23(2): 252-256.
- [3] Morimoto M, Atsuko M, Atif AAY, et al. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *Int J Hydrogen Energy*, 2004, 29: 709-713.
- [4] Hussya I, Hawkes FR, Dinsdale R, et al. Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *Int J Hydrogen Energy*, 2005, 30: 471-483.
- [5] Chen WM, Tseng ZJ, Lee KS, et al. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *Int J Hydrogen Energy*, 2005, 30: 1063-1070.

- [ 6 ] Narendra Kumar , Debabrata Das. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem* , 2000 , **35** : 589 – 593.
- [ 7 ] Tamotsu Kanai , Hiroyuki Imanaka , Akihito Nakajima , *et al.* Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon , *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Biotechnol* , 2005 , **116** : 271 – 282.
- [ 8 ] Oha YK , Seol EH , Kim JR , *et al.* Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *Int J Hydrogen Energ* , 2003 , **28** : 1353 – 1359.
- [ 9 ] Christophe Collet , Nevenka Adler , Jean-Paul Schwitzguébel , *et al.* Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose . *Int J Hydrogen Energ* , 2004 , **29** : 1479 – 1485.
- [ 10 ] Haruhiko Yokoi , Takanobu Ohkawara , *et al.* Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *J Ferment Bioeng* , 1995 , **80**( 6 ) : 571 – 574.
- [ 11 ] Pitcher DC , Saunder NA , Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* , 1989 , **8** : 151 – 156.