

CSTR 系统发酵产氢细菌群落动态与产氢能力关系解析

宋佳秀¹, 任南琪², 陈瑛², 安东³

(1. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234; 2. 哈尔滨工业大学市政与环境工程学院, 哈尔滨 150090; 3. 复旦大学环境科学与工程系, 上海 200433)

摘要:将 CSTR 系统内 pH 由 4.2 一次性提高至 6.0 左右, 启动发酵类型的转化, 研究了转化过程系统内的产氢动态和细菌群落. 结果表明, 在有机负荷维持在 $(33 \pm 1) \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 的情况下, 发酵类型 10 d 内未发生改变, 产氢量 8 d 内未降低, 15 d 后系统内种群由乙醇型转化为丁酸型, 进水碱度由 250 mg/L 增至 2 450 mg/L. 研究中利用荧光原位杂交技术(FISH)对反应系统内 3 类微生物群进行监测发现, 在转化过程中 *Clostridium* cluster XI 数量增加, *Clostridium* cluster I 和 II 数量减少, 而 Enterobacteriaceae 始终存在, 变化不明显. 种群的消长同反应系统产氢能力的高低存在密切关联, 以 *Clostridium* cluster I 和 II 占优势的乙醇型发酵具有更佳的产氢能力, 平均比产氢速率为 $23.6 \text{ mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$.

关键词: 发酵产氢; 细菌; 液相末端产物; 荧光原位杂交(FISH)

中图分类号: X172; X382 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)07-2124-06

Analysis of Dynamic Characteristics for Fermentative Hydrogen-producing Bacteria Community and Hydrogen Producing Capability in CSTR

SONG Jia-xiu¹, REN Nan-qi², CHEN Ying², AN Dong³

(1. College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2. School of Municipal and Environmental Engineering Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 3. Department of Environmental Science and Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The start into the types of fermentation was carried out by pH adjustment from 4.2 to 6.0 in CSTR system. The process of transforming of hydrogen production and dynamic community of bacteria were studied. The results showed that with the organic load maintained at $(33 \pm 1) \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, there was no change in 10 d for the type of fermentation, the amount of hydrogen does not reduce in 8 d. After 15 d, the system was transformed from the ethanol-based type into butyric acid type and water alkalinity was from 250 mg/L to 2 450 mg/L. The use of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) system was in response to the 3 groups of micro-organisms. It was found that in the process of transforming, *Clostridium* cluster XI increases and *Clostridium* cluster I and II decreases. Enterobacteriaceae always existed with no change. The microbial growth must be considered with hydrogen production capability. The average hydrogen production rate reached to $23.6 \text{ mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ with *Clostridium* cluster I and II dominated in fermentation reactor.

Key words: fermentative hydrogen-producing; bacteria; liquid end production; fluorescent *in situ* hybridization(FISH)

发酵法生物制氢即以产氢发酵细菌(HPFB)为氢气生产者、以细菌性发酵理论为基础的生物制氢技术, 这些细菌包括严格厌氧菌和兼性厌氧菌, 在废水产酸发酵过程大量存在, 所以可利用废水发酵过程制取氢气^[1-5], 实现废物资源化.

研究表明, 在发酵产氢系统内, 产氢的主体是由许多不同种类的微生物群完成的, 并存在由不同种类细菌的优势种群决定的多种发酵类型, 当反应器的控制条件发生变化时, 发酵趋势将发生改变, 并直接影响生物制氢反应器的产氢能力^[6]. 微生物群落的演替属于宏观生态学问题, 其形成的内在原因就需要从分子水平上加以阐述. 以往对细菌群落的研究往往建立在对宏观反应的研究以及大量的细菌分

离培养的鉴定工作^[7, 8], 存在很大的局限性^[9]. 因此, 欲提高产氢效率、探讨工程控制对策, 还应对细菌群落的生态学特征进行深入研究.

本研究通过调控连续流搅拌槽式(CSTR)发酵制氢反应器, 应用荧光原位杂交技术(FISH)对发酵制氢系统内的微生物群落进行监测和量化, 分析了群落结构的差异对产氢能力、生物量和发酵产物的影响, 以期对制氢反应器的调控提供微生物生态学的参考.

收稿日期: 2008-09-11; 修订日期: 2008-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(0808049); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金项目(RE630); 上海师范大学一般科研项目(DKL842)

作者简介: 宋佳秀(1979~), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为水污染控制和环境生物技术, E-mail: songjiaxiu@shun.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验装置与运行

1.1.1 实验装置

试验所用装置为连续流搅拌槽式生物制氢反应器^[10],有效容积 6 L,连续搅拌,搅拌速度 180 r/min,控制操作温度在(35±1)℃,连续恒定泵入底物。

1.1.2 运行

实验所用底物为工业纯葡萄糖,添加适量 N、P 营养物,使 COD:N:P=1 000:5:1,补充微量元素及维生素。进水 COD 为 5 000 mg/L,停留时间(HRT)为 4 h。种子污泥取自城市污水处理厂二沉池。反应器启动 1 个月后形成乙醇型发酵,稳定运行 3 个月后,启动转化过程。通过调控进水碱度迅速将 pH 值从乙醇型发酵最适的 4.0~4.5 调整为丁酸型发酵最适的 5.5~6.5,历经 15d 形成稳定的丁酸型发酵。在转化过程中每隔 2 d 取活性污泥进行 FISH 监测。

1.2 监测方法

1.2.1 常规监测

挥发酸种类和数量、产气速率、氢气百分含量等检测方法参照文献[11]; pH 值采用 pH 探头通过单片机连接计算机在线检测;碱度、VSS 等按国家标准方法测定,参照文献[12]。

1.2.2 FISH 监测

大量的研究表明,大多数产氢发酵细菌属于梭菌属(*Clostridium*)和肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)。通过查询 probeBase 寡核苷酸数据库,获得了它们的专一性探针以及与其他发酵菌专一性杂交的探针的寡核苷酸序列,见表 1。探针的合成与荧光素标记均由 Invitrogen 公司完成,置于-20℃下避光保存。使用前用超纯水将探针稀释到 5 ng/mL,分装备用。

表 1 所使用的寡核苷酸探针

Table 1 16S rRNA probes using in experiment

名称	标记染料	专一杂交的细菌种类
ENT183	ROX	Enterobacteriaceae
Chis150	TET	Most of the <i>Clostridium histolyticum</i> group (<i>Clostridium</i> cluster I and II)
Clit135	FTTC	Most of the <i>Clostridium lituseburense</i> group (<i>Clostridium</i> cluster XI)

实验操作如下。①取样:取反应器中的活性污泥,用灭菌玻璃珠振荡打碎,1 000 r/min 离心 2 min,将上清液 5 000~8 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,再用 PBS 将收集到的细菌冲洗 1 次。②固定:用 4%多

聚甲醛溶液固定,4℃过夜。杂交实验前,用 PBS 液清洗,离心收集。③预处理:用蛋白酶 K,37℃消化 30 min,减少蛋白质对杂交的影响。再用溶菌酶处理 10 min,以增加细胞的通透性。最后用梯度酒精(50%、80%、95%、100%)依次脱水。④杂交:探针在杂交前加入杂交液中(0.9 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-Cl, 0.1%~1% SDS, 5%~55% 甲酰胺),使其终浓度 0.5 ng/mL。杂交在载玻片上进行,取经过预处理的样品 10 μL 涂于载片,充分干燥后,加 20 μL 杂交液,置于密闭湿盒,46℃杂交炉中避光杂交 2~4 h。⑤洗脱:杂交完成后,用 SET 洗脱液,46℃将多余的探针除去。⑥双杂交:洗脱后,在新的杂交液中再加入另一种 16S rRNA 探针溶液,按上述步骤杂交。

结果分析:全部操作完成后,加少量对苯二胺-甘油溶液覆盖样品,防止荧光淬灭,再封片。结果用 Zeiss LSM 共聚焦显微镜观察、照相,利用 Zeiss LSM Image Browser 软件进行结果分析。通过观察照片和计算荧光面积,可以获得目标菌群的相对数量和空间分布情况。

2 结果与分析

2.1 反应器动态

2.1.1 pH 调控

以往的研究结果^[13, 14]显示,丁酸型发酵末端产物为丁酸、乙酸、氢气、二氧化碳和少量丙酸,乙醇型发酵的末端产物为乙醇、乙酸、氢气、二氧化碳和少量丁酸。而二者均可达到可观的氢气产量^[15],因此成为制氢研究的重点^[16, 17]。

实验中,反应系统内原呈乙醇型发酵,进水碱度平均为 250 mg/L。在第 4 d 开始提高进水碱度使反应体系内 pH 值一次性提高至 6 左右,并维持基本不变,如图 1 所示。由于反应系统内发酵趋势发生改变,中性产物(乙醇)逐渐减少,酸性末端产物(主要为丁酸)逐渐增多,因此耗碱量逐步增多。至第 19 d,反应器转为丁酸型发酵,此时进水碱度平均为 2 450 mg/L。在以葡萄糖为底物的发酵制氢反应器中,乙醇型发酵的最佳 pH 值范围为 4.0~4.5,丁酸型为 5.5~6.5,这使得丁酸型发酵需添加大量碱性物质来维持较高的 pH 值条件^[18],而乙醇型发酵可以不投碱或少量投碱便可维持发酵稳定,后者的平均投碱量(NaOH)是前者的 6 倍以上,这势必增加了运行成本,因此,采用乙醇型发酵作为产氢的发酵类型为佳。

2.1.2 发酵趋势

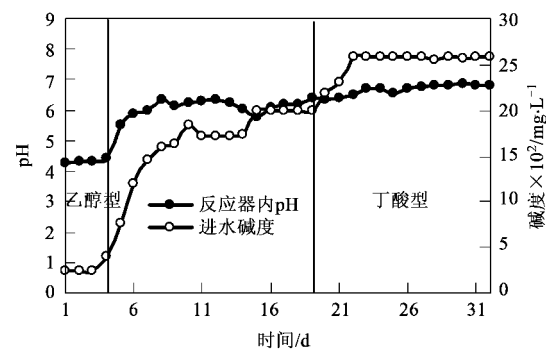


图 1 转化期间 CSTR 系统内 pH 调控

Fig.1 pH control in CSTR system during transformation process

CSTR 系统发酵产物检测结果如图 2 所示.启动转化前,乙醇、乙酸产量平均为1 210、821 mg/L,启动转化初期的前半段乙醇产量异常增多(第 6~9 d),最高达到1 714 mg/L,同时其对应的产氢速率(见图 3)也同步增高,各种产物得率均有增多,表明乙醇型发酵进程加强,其发生原因尚不十分明确.在转化初期后半段,乙醇产量持续下降(第 9 d 后),其他液相发酵产物明显增多.这期间尽管发酵产物比例发生了变化,乙酸、丙酸和丁酸等物质增多,但反应仍呈典型的乙醇型发酵,在 pH 偏离了乙醇型发酵的最适范围(高达 5.5~6.5)的条件下,维持了 10 d 未发生发酵类型的转化,产氢速率 8 d 未降低,可见,乙醇型发酵有很强的抗冲击能力和发酵稳定性.同时,这种稳定是有限的,由于原有的生存环境发生改变,适应新环境的细菌开始出现,并参与竞争,数量逐渐增多,乙醇型发酵细菌群落逐渐在竞争中失去优势地位,发酵趋势开始改变,表现为代谢产物的和种群结构的变化.至第 14 d,乙醇型发酵种群被以丙酸杆菌为主的丙酸型发酵菌群代替,主要代谢产物为丙酸和乙酸;至第 17 d,又呈混合酸发酵特征,几种发酵产量相当.可见,在转化中期,各发酵产物变化剧烈,发酵类型处在不稳定状态,此时相应的产氢速率(见图 3)也达到最低点.至第 19 d,反应器内开始呈现典型的丁酸型发酵,主要液相产物为丁酸和乙酸,平均产量分别为1 594 mg/L和 735 mg/L,并达到了一个稳态,此时相应的产氢速率(见图 3)也开始回升并稳定.这是因为在 pH 值为 5.5~6.5 时,丁酸型发酵菌群在竞争中具有强势地位^[19,20],最终代替了其他种群.

2.1.3 种群生态

实验中分别在稳定的乙醇型发酵期间和丁酸型发酵期间接取反应器内的微生物进行单批次发酵实

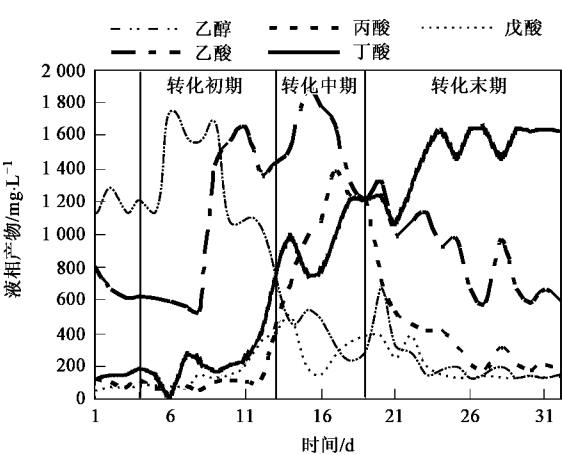


图 2 转化期间 CSTR 系统内发酵趋势

Fig.2 Fermentation process in CSTR system during transformation process

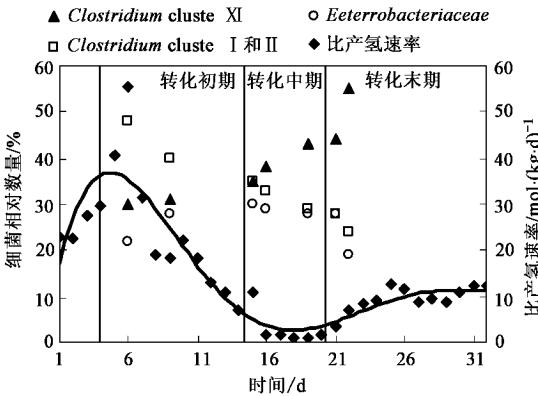


图 3 种群数量与产氢能力关系

Fig.3 Relation between microbial growth and hydrogen production capability

验,发酵底物成分与连续流反应器的进水相同,设定不同的 pH 梯度以考察该细菌群体的 pH 耐受性,其结果可近似地视为该种群的 pH 基础生态位,如图 4 所示.可见,乙醇型发酵细菌属广 pH 生态幅物种,而丁酸型发酵细菌属狭 pH 生态幅物种.此试验结果可以解释乙醇型发酵具有高稳定性的原因,正是由于乙醇型 HPFB 具有广的 pH 耐受幅,具有较强的维持内平衡和自身调节能力,pH 的波动对该种群的影响较小,因此在系统 pH 由 4.2 突然提高至 6.0 上下时,种群数量仍然在相当长的时间内维持在优势地位.同时,在连续流反应系统内,多种发酵细菌共存,因此在有多个竞争者存在的情况下,各种群的实际生态位仅占其基础生态位的一部分,如图 4 阴影区域所示.同时,2 个种群(乙醇型发酵细菌群和丁酸型发酵细菌群)均以 *Clostridium* 为优势种群,在分类学上为同一个属,亲缘关系近,根据格乌斯原理,2

个种群的基础生态位区域相似,必然存在激烈的种间竞争,其结果是导致其实际生态位发生分离,其中,乙醇型发酵细菌的实际生态位偏离了最适值(位于 pH 4.0~4.5). 因此,笔者认为,这可能就是转化初期乙醇型发酵进程突然增强(第 6~9 d, 见图 2)的原因. 提高系统的 pH 值至 6.0 左右时,乙醇型发酵细菌接近其最适生态位,因此发酵进程加深,气相产物和液相产物得率增加. 但由于种群处在连续流反应系统内,在此 pH 范围内乙醇型发酵种群优势地位不易维持,其他种群此时逐渐产生并发展,逐渐取代原有物种,导致演替,所以该现象仅维持了 3 d 即宣告结束.

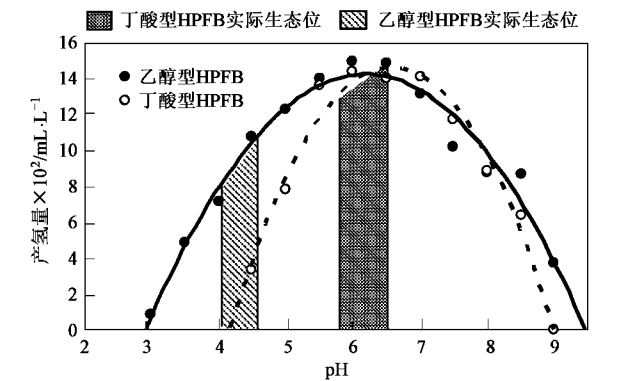


图 4 乙醇型和丁酸型细菌群的生态分离现象

Fig.4 Ecological isolation phenomena for bacteria community with alcohol and butyric acid fermentation type

2.1.4 细菌总量

反应系统内的微生物量变化如图 5 所示. 可见, 转化期间反应器内的生物量逐渐增加, 未启动转化时 VSS 平均为 4.6 g/L, 转化结束后 VSS 平均为 7.5 g/L, 这与产氢速率(图 3)的变化趋势不一致. 后者在转化初期短暂上升后呈逐渐下降趋势, 尤其是从丙酸型发酵开始(第 17 d)前后, 此时生物量突然大量增加, 而产氢速率则是迅速下降, 并在丙酸型发酵形成时达到最低点. 转为丁酸型发酵后, 微生物总量又稍回落, 然后又有所回升, 直至平稳, 而此时相应的产氢速率却稍有上升后略为下降, 直至平稳. 可见, 这个结果与大多数废水生物处理过程不同, 在废水生物处理过程中, 人们往往期望保有更多的微生物量而保证较高的处理效率, 而在产氢系统内, 并非细菌数量越多对产氢越有利, 产氢量主要是与细菌的种类和反应系统的发酵类型相关.

2.2 细菌群落结构与产氢能力

采用 3 种探针对取自转化不同时期的样品进行

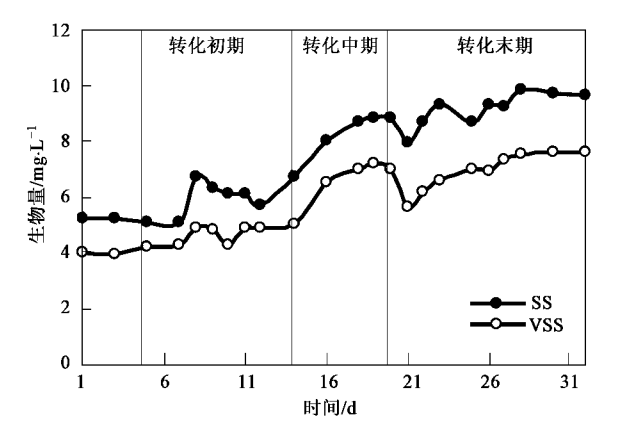


图 5 转化期间 CSTR 内生物量变化

Fig.5 Biomass change in CSTR during transformation process

平行杂交实验, 获得的 2 组结果如图 6 所示, 使用的探针分别为 ENT183(标记红色)、Chis150(标记黄色)和 Clit135(标记绿色). 由图 6 可见, 活性污泥中的肠杆菌(红色区域, 红色箭头所指)数量至转化中期明显增多, 末期有所减少; *Clostridium cluster I* 和 *II* (梭菌 I、II 群; 黄色区域, 黄色箭头所指)数量则至中期呈逐渐减少态势; 而 *Clostridium cluster XI* (梭菌 XI 群; 绿色区域, 绿色箭头所指)数量呈逐渐增加态势.

利用 Zeiss LSM Image Browser 软件对荧光面积的计算, 得出菌群的相对丰度, 并同反应器的比产氢速率及生物量进行综合分析, 结果见图 3. 可见, 肠杆菌的相对数量从转化初期开始逐渐增多, 至末期丁酸型发酵形成(第 19 d)时又逐渐减少. 梭菌 I、II 的相对丰度变化有较大波动, 乙醇型发酵时期梭菌 I、II 占优势, 转化启动后, 先是前期突然减少(第 9 d), 之后变化平稳, 至末期又急剧减少. 而梭菌 XI (绿色)数量呈现逐渐增多趋势, 最终成为优势菌群, 3 类细菌的变化趋势与液相发酵产物的变化趋势相呼应(见图 2). 而产氢速率在启动转化初期(第 6~9 d)有短暂升高现象, 而后逐渐降低, 与梭菌 I、II 的变化趋势相同. 这说明梭菌 I、II 具有较高的产氢能力, 是该阶段决定产氢能力的主要类群, 此阶段平均比产氢速率为 23.6 mol/(kg·d); 转化中期 3 类细菌数量相当, 2 类梭菌属均无明显优势, 而此时恰恰产氢速率跌至最低点, 仅为 0.9 mol/(kg·d), 这说明梭菌的数量是影响产氢能力的关键, 当 2 类梭菌均不占优势时, 系统产氢能力极低; 转化后期, 丁酸型发酵形成, 产氢速率逐渐回升并趋于稳定, 与梭菌 XI 的变化趋势相同, 尤其至转化末期, 梭菌 XI 的数量大量增加, 丁酸型发酵也趋于稳定, 这说明此期间梭菌

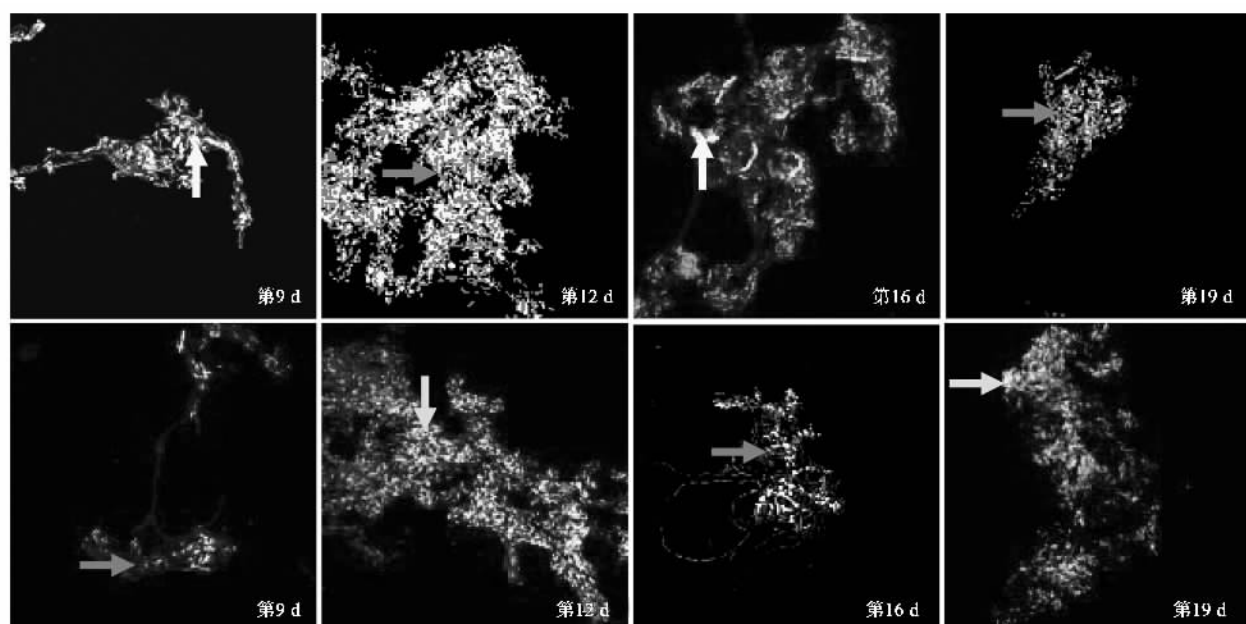


图 6 CSTR 内细菌群 FISH 监测图片

Fig.6 Pictures of microbial community in CSTR by FISH

XI 是决定产氢能力的主要类群,此时平均比产氢速率为 $9.3 \text{ mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,并维持稳定,但要明显低于转化初期.这期间肠杆菌尽管在中期数量有暂时增多,但总体来看变化过程较平稳,产氢贡献微乎其微,说明该种群始终处于伴生种群地位,其作用是与梭菌协同,完成群落的演替过程.

这个实验结果进一步说明,产氢速率与细菌的数量无关,而与细菌的种类和反应器的发酵类型相关,以 *Clostridium* cluster I 和 II 占优势的乙醇型发酵的产氢能力优于以 *Clostridium* cluster XI 占优势的丁酸型发酵.

3 结论

(1) 在 CSTR 系统内,除 pH 不同外,在其他控制条件相同的情况下,维持丁酸型发酵所需碱量是乙醇型发酵的 6 倍以上.

(2) 乙醇型发酵在环境 pH 出现急剧变化时,表现出了强的抗冲击能力,发酵类型 10 d 内未发生转化,产氢量 8 d 内未降低,从工程角度印证了乙醇型发酵是具有高稳定性的生态系统.

(3) 产氢速率与细菌的种类密切相关,乙醇型发酵以 *Clostridium* cluster I 和 II 占优势,平均比产氢速率为 $23.6 \text{ mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$;丁酸型发酵以 *Clostridium* cluster XI 占优势,平均比产氢速率为 $9.3 \text{ mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$;而肠杆菌为伴生种群,产氢贡献微小.

参考文献:

- [1] Chang F Y, Lin C Y. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2004, **29**: 33-39.
- [2] Han S K, Shin H S. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2004, **29**: 569-577.
- [3] Xiao B Y, Liu J X. Effects of thermally pretreated temperature on biohydrogen production from sewage sludge [J]. Journal of Environmental Sciences, 2006, **8**(1): 6-12.
- [4] Wang J L, Wan W. The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models [J]. Sci China Ser B-Chem, 2008, **51**(11): 1110-1117.
- [5] Das D, Veziroglu T N. Advances in biological hydrogen production processes [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, **33**: 6046-6057.
- [6] 任南琪,秦智,李建政.不同产酸发酵菌群产氢能力的对比与分析 [J].环境科学, 2003, **24**(2): 70-74.
- [7] 林明.高效产氢发酵新菌种的产氢机理及生态学研究 [D].哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2002.
- [8] 秦智,任南琪,李建政.发酵生物制氢反应器的产氢菌生物强化作用研究 [J].环境科学, 2007, **28**(12): 2843-2848.
- [9] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev, 1995, **59**(1): 143-169.
- [10] 任南琪,王宝贞.有机废水发酵法生物制氢技术——原理与方法 [M].哈尔滨:黑龙江科技出版社, 1994.
- [11] 许丽英.产氢新菌 *Ethanoligenens harbinense* B49 产氢代谢途径研究 [D].哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2006.
- [12] 国家环境保护局.水与废水监测分析方法 [M].(第三版).北

京: 中国环境科学出版社, 1997. 233-238.

[13] Amann R I, Snaidr J, Wagner M, *et al* . *In situ* Visualization of High Genetic diversity in a Natural Microbial Community[J]. J Bacteriol, 1996, **178**: 3496-3500.

[14] Snaidr J, Amann R, Huber I, *et al* . Phylogeny Analysis and *in situ* Identification of Bacteria in Activated Sludge[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**: 2884-2896.

[15] Vatsala T M, Raj S M, Manimaran A. A pilot-scale study of biohydrogen production from distillery effluent using defined bacterial co-culture[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, **33**: 5404-5415.

[16] Ren N, Wang B, Huang J. Ethanol-type fermentation of carbohydrate wastewater in high acidogenic reactor[J]. Biotechnol Bioeng, 1997, **54**: 428-433.

[17] Hariklia N, Ioannis V, Ahring K B. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, **31** (9): 1164-1175.

[18] 任南琪, 王爱杰. 产氢发酵微生物生理生态学[M]. 化学工业出版社, 2004. 170-173.

[19] Jaime M N, Dinsdale R, Guwy A. Hydrogen production from sewage sludge using mixed microflora inoculum: Effect of pH and enzymatic pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2008, **99**: 6325-6331.

[20] Xiao B Y, Liu J X. pH dependency of hydrogen fermentation from alkali-pretreated sludge[J]. Chinese Science Bulletin, 2006, **51**(4): 399-404.