

起始 pH 值对海洋混合菌群产氢量的影响

刘洪艳^{1,2}, 王广策²

(1. 天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津科技大学 海洋科学与工程学院, 天津 300457; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 对采自天津潮间带的污泥进行热休克处理, 厌氧条件下富集混合菌群进行产氢试验; 设置起始 pH 从 4.0 到 8.0(间隔 0.5 个单位), 比较混合菌群在不同 pH 培养条件下产氢量; 利用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析不同起始 pH 培养条件下的混合菌群组成。结果表明, 在起始 pH 为 7.0 时, 混合菌群产氢量最高。不同起始 pH 对产氢量的影响, 依次为 pH 6.5 > pH 7.5 > pH 8.0 > pH 6.0 > pH 5.5 > pH 5.0 > pH 4.5 > pH 4.0。混合菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物经 DGGE 分离, 电泳图谱表明, 不同起始 pH 条件下混合菌群的优势菌相同, PCR 产物的测序结果与 *Clostridium* sp. 存在比较高相似度(98%)。Fe-氢酶基因扩增产物在 DGGE 电泳图谱中存在一条特异条带, 其测定序列与 *Clostridium perfringens* 氢酶基因相似度为 98%。不同起始 pH 条件下混合菌群的产氢菌基本相同, 混合菌群产氢量之间的差异可能在于起始 pH 对混合菌群 Fe-氢酶基因活性的影响, 有待进一步研究确定。

关键词: 起始 pH; 产氢量; 变性梯度凝胶电泳; 16S rRNA 基因; Fe-氢酶基因

中图分类号: Q949.28+8.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2011)09-0043-06

化石能源日益耗竭引发的能源问题, 在最近几年中越来越受到关注。以生物质为原料获得例如酒精、柴油、甲烷和氢气等燃料的生物能源方式, 以可再生的特点能够满足实际和未来的能源需求而成为研究的热点^[1]。氢气的单位燃烧值要高于任何燃料^[2]而且燃烧产物无污染, 在工业上应用广泛, 包括氨、酒精、乙醛的合成, 石油的氢化, 已被应用到能源、工业和航空等领域。随着全球能源短缺的问题日益严峻, 国际上对可再生能源表现出浓厚的兴趣, 氢气的研究已经成为能源领域的研究焦点^[3]。制氢的方法有物化法和生物法, 其中生物制氢中的混合菌发酵产氢方式不但能有效处理有机废水(泥)而且还能低成本制得氢气, 相对比纯菌种制氢方式更具有实际应用前景。自 2000 年以来, 利用有机废水(泥)的混合菌发酵制氢方式日益受到重视^[4]。

影响混合菌群产氢效率因素主要有^[5-7]氮源和碳源的浓度, 氢气分压, 耗氢菌对氢气的利用, 培养液的 pH。虽然氢气量能够随着碳源浓度的升高而增加, 但是过高的碳源浓度将有利于细菌代谢途径中转向乙醇代谢而降低了氢气产量^[8]。Mizno 等^[9]报道, 低的氢气分压将有助于提高产氢量。在混合菌发酵制氢中, 解决耗氢菌对氢气的消耗与提高氢气的累积量是同等重要, 这是能否运用到产业化实际中的关键。一般认为, 耗氢菌对逆境条件比较敏感, 而产氢

菌(尤其是研究最多的梭菌属)能够应对苛刻环境条件。选择适当的产氢污泥预处理方法将会抑制耗氢菌而仍然保持产氢菌的产氢效率^[10]。热休克方法是最常用的方法, 经过热处理能够激活混合菌中产生芽孢的梭菌属而抑制不能形成芽孢的耗氢菌^[11]。因此选择合适的预处理方式将会提高混合菌群的产氢能力。除了以上这些影响氢产量的因素, 培养液的 pH 显得尤为关键, 因为 pH 能够影响微生物代谢类型^[12]。目前关于混合菌发酵产氢的最适 pH 报道存在不一致, Lay 等^[13]在以淀粉为底物的实验中认为最适 pH 是 4.7 ~ 5.7, Lee 等^[14]报道在利用蔗糖为底物情况下, 最适 pH 是 9, 而 Ren 等^[15]研究认为最适 pH 是 4.0 ~ 4.5。即使在同样利用葡萄糖为底物的实验中, 不同研究者报的最适 pH 也不一致, 变化范围为 5.0 ~ 6.7^[4]。

目前利用有机废水进行微生物制氢技术多集中在淡水系统, 在沿海城市中, 由于淡水资源的缺乏,

收稿日期: 2010-10-25; 修回日期: 2011-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(40906074); 天津市科技支撑计划重点项目(07ZCGYSH03400); 天津市海洋资源与化学重点实验室开放基金项目(200912)

作者简介: 刘洪艳(1977-), 女, 吉林通化人, 讲师, 博士, 主要从事海洋微生物研究, 电话: 022-6061305, E-mail: hongyanliu1214@163.com; 王广策, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898574, E-mail: guangcewang@sohu.com

海水的利用率在逐年加大,加之海水养殖产生的废水(泥),造成高盐的海水有机废水(泥)大量累积,利用海洋有机废水进行微生物制氢的前提是从海洋环境中筛选高效的产氢菌群或菌株。

变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术作为目前研究微生物遗传多样性最有力的分子生物学技术,在生物制氢研究中应用比较少^[16],更未见有关海洋产氢微生物菌群的相关分析。在本实验中,研究不同起始 pH 对从海洋环境中富集的产氢混合菌群相关产氢性质的影响。利用 DGGE 分析在不同起始 pH 培养条件中混合菌群的优势菌属组成,为海洋有机废水的混合菌发酵产氢研究在产业化实际应用中提供相关参数。

1 材料与amp;方法

1.1 产氢混合菌群富集与培养

污泥取自天津海水浴场潮间带。液体培养基参照文献^[17]稍有修改,成分如下(g/L):葡萄糖 20,胰蛋白胨 4,牛肉膏 2,酵母提取物 1,NaCl 30,K₂HPO₄ 1.5,MgCl₂ 0.1,FeSO₄·7H₂O 0.1,L-半胱氨酸 0.5,维生素液 10 mL/L(VB₁₂ 0.01,VC 0.025,VB₂ 0.025,柠檬酸 0.02,VB₆ 0.05,叶酸 0.01),微量元素液 10 mL/L(MnSO₄·7H₂O 0.01,ZnSO₄·7H₂O 0.05,H₃BO₃ 0.01,CaCl₂·2H₂O 0.01,Na₂MoO₄ 0.01,CoCl₂·6H₂O 0.2),刃天青(0.1%)1mL,pH 7.2。取 10 g 污泥于 121 °C 热休克处理 10 min,室温冷却,热休克处理的污泥接种到 100 mL 培养基中,充氮气 1 min,于 120 r/min,37 °C 恒温摇床中培养 24 h。按 1:100 接种比例连续培养 3 次,目的在于富集厌氧产氢混合菌群。获得的混合菌液作为母液进行间歇产气实验。

1.2 产氢过程中相关理化因子的测定

利用 1 mol/L HCl 或 NaOH 调节培养液的起始 pH,pH 梯度分别为 4.0,4.5,5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5 和 8.0。不同起始 pH 培养条件下的混合菌进行发酵产气实验,连续厌氧发酵 36 h。定时间隔用 5 mL 注射器取样,测定 pH,OD 和氧化还原电位(ORP)。pH 和 ORP 值采用 METTLER TOLEDO 酸度计进行测量。

1.3 氢气含量测定

气体的收集采用排水法。氢气含量的测定利用气相色谱仪(Agilent,型号 6820)测定发酵气体中氢

气的含量。氮气做载气,流量为 25 mL/min,色谱柱填料为 5 A 分子筛(60/80 目),柱长 2 m,检测器为热导检测器(TCD),柱温,进样器温度和检测器温度分别为 40,200,200 °C。

1.4 16S rRNA 基因和 Fe-氢酶基因 PCR 扩增

分别以大多数细菌和古细菌的 16S rRNA 基因 V3 区通用引物^[18]GC-357F: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'和 517R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'和 Chang 等^[19]设计的梭菌氢酶通用引物 E1F: 5'-GCTGATATGACAATAATGGAAGA-A-3'和 E1R: 5'-GCAGCTTCCATAACTCCACCGGTTGCACC-3',进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖电泳检测,条带单一即可以用做 DGGE 分离。

1.5 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

采用 Bio-Rad 公司 Dcode TM 的基因突变检测系统对 PCR 产物进行分离。制备 8 % 的聚丙烯酰胺凝胶,变性剂浓度 30 % ~ 60 %,在 150 V 的电压下,60 °C 电泳 3 h。电泳结束后,用 AgNO₃ 染色方法显示,切取目的条带,利用聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒(BIOFLUX)提取与纯化 DNA,并将此回收的 DNA 作为模板重新再扩增进行序列测定,测序由上海生工生物工程有限公司完成。

2 结果与amp;讨论

2.1 起始 pH 对混合菌发酵液终 pH 和 OD₆₀₀ 的影响

不同起始 pH 培养条件下,混合菌连续培养 36 h 后停止产氢,测定混合菌发酵液的终止 pH(图 1)。相对比起始 pH,混合菌发酵液的终 pH 都有不同程度下降。微生物厌氧发酵产氢过程中,有机酸是伴随氢气的生成,过多有机酸形成导致培养液 pH 降低^[20],结果会抑制产氢活动。发酵培养 36 h 时,测定混合菌在不同起始 pH 培养条件下的菌浊(图 1),OD₆₀₀ 值可以间接表示混合菌群的生长状态。在起始 pH 为 7.5 时,混合菌的 OD₆₀₀ 值最高,而混合菌在 pH7.0 时达到了最高产氢量。这表明混合菌最适生长 pH 与最适产氢的 pH 是不吻合的。Jun 等^[3]报道了混合菌群的最适产氢 pH 是 5.0,而最适细胞生长的 pH 为 7.0。可见细胞的生长和产氢不是成比例的。Zhu 等^[17]研究结果表明微生物在利用碳源发酵产氢过程中,

氢气的产生是不利于细胞的生物量的累积。

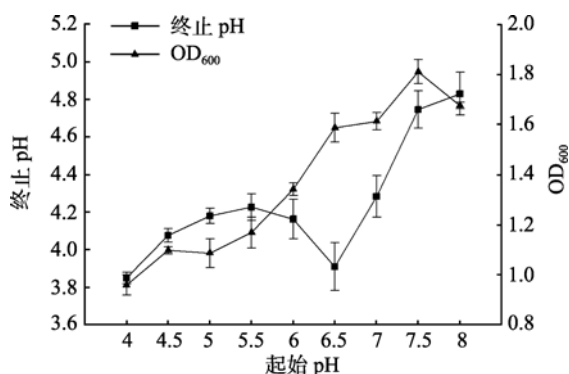


图 1 不同起始 pH 对混合菌 OD₆₀₀ 和终止 pH 的影响
Fig. 1 Effects of initial pH on OD₆₀₀ and final pH of mixed culture

2.2 起始 pH 对混合菌群产氢量的影响

混合菌群在底物为 20 g/L 葡萄糖的培养条件下, 37°C 连续培养 36 h, 起始培养液的 pH 梯度 4.0 ~ 8.0。起始 pH 对混合菌群产氢量有比较明显的影响(图 2)。起始 pH 为 7.0 时, 混合菌群获得最大产氢量, 产氢量达到 1.70 mol H₂/mol ± 0.05 mol H₂/mol 葡萄糖。在 pH 7.0 到 8.0 之间, 随着 pH 升高产氢量是下降的。在 pH 为 4.0 时, 产氢量比较微弱。pH 4.5 ~ 7.0 产氢量随着 pH 增加而升高, 最适产氢 pH 为 7.0。在同样以葡萄糖为底物条件下, 关于最适 pH 的报道也是有差异的。Fang 等^[4]和 Lin 等^[21]报道混合菌最适 pH 分别是 5.5 和 5.7, Kumar 等^[22]发现 *Enterobacter cloacae* 在 pH 5.0 ~ 6.0 达到最大产氢量, Kataoka 等^[23]报道 *Clostridium butyricum* 最适 pH 为 6.7。相同葡萄糖作为底物, 研究者提出的最适 pH 存在差异, 可能是由

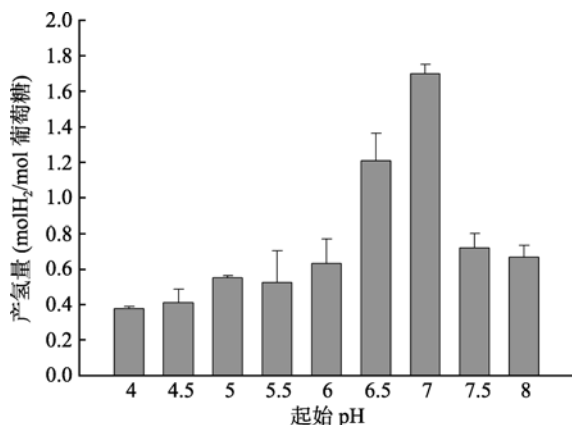


图 2 不同起始 pH 对混合菌产氢量的影响
Fig. 2 Effect of initial pH on hydrogen production of mixed culture

于富集的优势菌群不同所导致。例如 Jun 等^[3]在研究不同 pH 对产氢量的影响时, 发现最适 pH 是 5.0, 混合菌群中 4 个优势菌株有 3 个是属于肠杆菌科。

2.3 起始 pH 7.0 培养条件下混合菌群 pH, ORP 和 OD₆₀₀ 的变化

测定混合菌群在起始 pH 为 7.0 时相关产氢指标。混合菌群 pH, ORP 和 OD₆₀₀ 在产氢过程中的变化见图 3。混合菌群产氢过程发生在 12 ~ 24 h, 这与 Valdez 等^[20]报道的产氢延迟时间小于 14 h 相一致。混合菌群在发酵 24 h 时细胞生物量的累积达到最高。产氢过程中 pH 从 5.5 降到 4.3, 在比较低的 pH 仍有产氢行为, 说明这组混合菌的耐酸能力比较强。氧化还原电位(ORP)能够作为产氢过程的一个实时监测指标, 因为发酵过程中, 高产氢率对应于发酵液的低 ORP 值^[17], 产氢过程中(发酵时间 12 ~ 24 h), ORP 值范围是 -50 ~ -48 mV 之间。

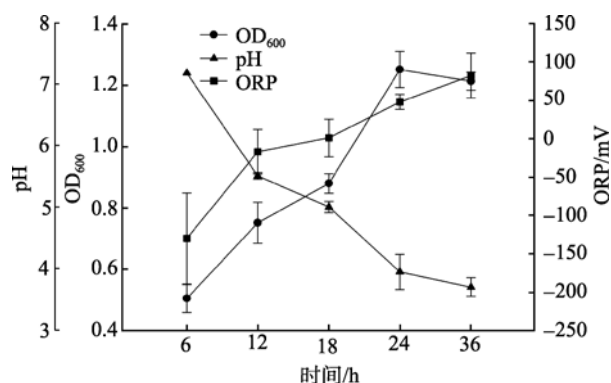


图 3 起始 pH 7.0 培养条件下混合菌 pH, ORP 和 OD₆₀₀ 的变化
Fig. 3 Variations of pH, ORP, and OD₆₀₀ of mixed culture when the initial pH is 7.0

2.4 16S rRNA 基因的 DGGE 分析

不同微生物的 16S rRNA 基因序列中可变区的碱基顺序有很大差异, 来自不同微生物的相同长度扩增片段能够通过 DGGE 得到分离, 根据电泳条带的数量和条带的强弱可以辨别出样品中微生物的种类和优势菌。发酵停止时, 利用 PCR-DGGE 测定在不同起始 pH 培养条件下的混合菌群组成(图 4)。从经过银染的 DGGE 凝胶图中可以看出, 不同 pH 培养条件中都占优势的条带是 B1-B3 所代表的菌属。将条带回收重新扩增进行序列测定, 结果见表 1。通过 NCBI-BLAST 比对发现, 3 条电泳带所代表的菌株都与 *Clostridium* sp. 存在高相似度。由此可见在不同起

始 pH 培养条件下混合菌群的优势菌是相同, 属于 *Clostridium* sp.。Valdez 等^[24]报道热处理污泥富集的混合菌群组成只包括能产生芽孢的 *Clostridium* sp.和 *Bacillus* sp.。不能形成芽孢的非产氢菌和耗氢菌在热休克处理中被杀死, 而能产生芽孢的产氢菌能够得以成为优势菌种。

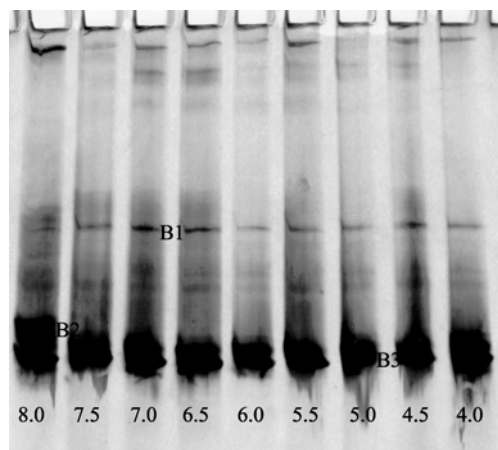


图 4 不同起始 pH 培养的混合菌群 16S rRNA 基因的 DGGE 图谱

Fig. 4 DGGE profiles of 16S rRNA gene of the mixed culture under different initial pHs

表 1 优势菌 16S rRNA 基因 DGGE 图谱条带的比对结果
Tab. 1 Affiliation of DGGE fragments determined by 16S rRNA sequence of dominant bacteria

条带	微生物种属	相似度(%)	登录号
B1	<i>Clostridium</i> sp.	98	GQ922595
B2	<i>Clostridium</i> sp.	99	GQ922596
B3	<i>Clostridium</i> sp.	98	GQ922597

2.5 Fe-氢酶基因的 DGGE 分析

不同起始 pH 对混合菌的产氢量有比较明显影响, 而 16S rRNA 基因的 DGGE 分离结果表明混合菌群的优势菌基本相同。针对细菌的特定功能, 只是基于 16S rRNA 基因序列分析混合菌群的多样性这种方法明显不足^[25]。通过扩增功能基因, 利用 DGGE 研究功能基因及功能菌群的多样性^[26]。*Clostridium* sp.产氢过程主要是 Fe-氢酶催化完成。通过 DGGE 分离梭菌 Fe-氢酶基因, 研究混合菌中 Fe-氢酶基因的多样性。梭菌 Fe-氢酶基因保守序列通用引物的扩增产物通过 DGGE 分离为特异性的单一条带(图 5)。Fe-氢酶的 DGGE 图谱条带不存在多态性, 这表明在不同起始 pH 培养条件下混合菌中参与产氢过程的 Fe-氢酶基因是相同的。该片段序列与 NCBI 数据库

中的相似序列进行 BLAST 分析, 与 *Clostridium perfringens* 氢酶基因的相似度为 98%(登录号 GQ289376)。不同起始 pH 培养条件下混合菌群中是同一种梭菌参与混合产氢过程, 产氢梭菌初步确定为 *Clostridium perfringens*。

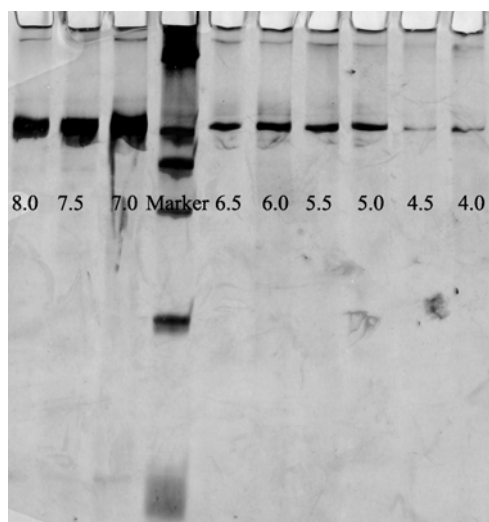


图 5 不同起始 pH 培养的混合菌群的 Fe-氢酶基因的 DGGE 图谱

Fig. 5 DGGE profiles of Fe-hydrogenase gene of the mixed culture under different initial pHs

3 结论

起始 pH 对混合菌产氢量有比较明显影响, 起始 pH 为 7.0 时, 混合菌群产氢量最高。变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析不同 pH 培养条件下混合菌群组成。混合菌群 16S rRNA 基因 DGGE 图谱表明, 不同起始 pH 培养下混合菌群的优势菌群组成基本相同。混合菌群的 Fe-氢酶基因的 DGGE 图谱结果表明, 在不同起始 pH 培养条件下的混合菌群中, 参与产氢过程的 Fe-氢酶基因相同, 与 *Clostridium perfringens* Fe-氢酶基因相似度是 98%。不同起始 pH 条件下, 混合菌群的产氢菌是相同的, 起始 pH 对混合菌产氢量的影响也许与 Fe-氢酶活性有关, 需进一步研究。

参考文献:

[1] Demirbas A. Progress and recent trends in biofuels [J]. *Progr Energy Combust Sci*, 2007, 33: 1-18.
 [2] Levin DB, Pitt L, Love M. Bio-hydrogen production: prospects and limitations to practical application [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2004, 29: 173-185.
 [3] Jun Y S, Yu S H, Ryu K G. Kinetic Study of pH Effects

- on Biological Hydrogen Production by a Mixed Culture [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(6): 1130-1135.
- [4] Fang H H P, Liu H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 82: 87-93.
- [5] Okamoto M, Miyahara T, Mizno O. Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes [J]. *Water Sci Technol*, 2000, 41: 25-32.
- [6] Noike T, Mizno O. Hydrogen fermentation of organic municipal wastes [J]. *Water Sci Technol*, 2000, 42: 155-162.
- [7] Sparling R, Risbey D, Poggi-Varaldo H M. Hydrogen production from inhibited anaerobic composters [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 1997, 22: 563-566.
- [8] Mizno O, Ohara T, Shinya M, et al. Characteristics of hydrogen production from bean curd manufacturing waste by anaerobic microflora [J]. *Water Sci Technol*, 2000, 42: 345-350.
- [9] Mizno, O, Dinsdale R, Hawkes F R, et al. Enhancement of hydrogen production from nitrogen gas sparging [J]. *Bioresource Technol*, 2000, 73: 59-65.
- [10] Wang J L, Wan W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2008, 33: 2934-2941.
- [11] Li C L, Fang H H P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures [J]. *Crit Rev Env Sci Technol*, 2007, 37: 1-39.
- [12] Dabrock B, Bahl H, Gottschalk G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum* [J]. *Appl. Environ Microbiol*, 1992, 58(4): 1233-1239.
- [13] Lay J J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 68(3): 269-278.
- [14] Lee Y J, Miyahara T, Noike T. Effect of pH on the microbial hydrogen fermentation [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2002, 77(6): 694-698.
- [15] Ren N, Wang B, Ma F. Hydrogen bio-production of carbohydrate fermentation by anaerobic sludge process [C]//Proceeding 68th Annual Water Environmental Federal Conference. Miami, 1995: 145-152.
- [16] 邢德峰, 任南琪, 宫曼丽, 等. DGGE 技术监测生物制氢反应器微生物群落结构和演替 [J]. *中国科学 C 辑*, 2004, 34(6): 569-574.
- [17] Zhu D L, Wang G C, Qiao H J, et al. Fermentative hydrogen production by the new marine *Pantoea agglomerans* isolated from the mangrove sludge [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2008, 33: 6116-6123.
- [18] Hiroshi Y, Miyoko W, Naoko M. Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74: 474-483.
- [19] Chang J J, Chen W E, Shih S Y, et al. Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70: 598-604.
- [20] Valdez-Vazquez I, Rios-Leal E, Muñoz-Páez KM, et al. Effect of inhibition treatment, type of inocula and incubation temperature on batch H₂ production from organic solid waste [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95(3): 342-349.
- [21] Lin C Y, Chang R C. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 1999, 74(6): 498-500.
- [22] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 [J]. *Process Biochem*, 2000, 35: 589-593.
- [23] Kataoka N, Miya K, Kiriyama K. Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria [J]. *Water Sci Technol*, 1997, 36: 41-47.
- [24] Valdez-Vazquez I, Ponce-Noyola M T, Poggi-Varaldo H M. Nutrients related to spore germination improve H₂ production from heat-shock-treated consortia [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2009, 34(10): 4291-4295.
- [25] Fang H H P, Zhang T, Li C L. Characterization of Fe-hydrogenase genes diversity and hydrogen-producing population in an acidophilic sludge [J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126: 357-364.
- [26] Nicolaisen, M H, Ramsing N B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria [J]. *J Microbiol Methods*, 2002, 50: 189-203.

The effect of initial pH on hydrogen production of microbial community from marine environment

LIU Hong-yan^{1, 2}, WANG Guang-ce²

(1. Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Oct., 25, 2010

Key words: initial pH; hydrogen production; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); 16S rRNA gene; Fe-hydrogenase gene

Abstract: Sludge, collected from the intertidal zone of a bathing beach in Tianjin, was pretreated by the heat-shock method and enriched under anaerobic condition for hydrogen-production. Hydrogen production was investigated under various initial pHs, ranging from 4.0 to 8.0. The composition of microbial community under various initial pHs was analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The result showed that hydrogen production potential of the mixed culture was the highest at the optimal pH of 7.0. The effects of initial pHs on hydrogen production followed the order of pH 6.5 > pH 7.5 > pH 8.0 > pH 6.0 > pH 5.5 > pH 5.0 > pH 4.5 > pH 4.0. The 16S rRNA gene was PCR amplified and analyzed by DGGE. The dominant bands obtained on DGGE of 16S rRNA gene were identical at various pH values. These bands were cloned and sequenced. NCBI blast indicated that the segment of 16S rRNA gene was identical to that of *Clostridium* sp.. There was only one band on DGGE of Fe-hydrogenase gene of *Clostridium* sp.. The result of sequence similarity searching with NCBI BLAST indicated that the segment of Fe-hydrogenase gene was 98% identical to that of *Clostridium perfringens*. There existed identical hydrogen-producing bacterium of the mixed culture under various pHs. Initial pH could affect hydrogen production of the mixed culture through its influence on Fe-hydrogenase activity. This hypothesis needs further confirmation.

(本文编辑: 康亦兼)