

一株耐盐性阴沟肠杆菌生长产氢对微量元素的需求

宋厉芸¹, 王广策², 朱大玲¹, 潘光华¹

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

摘要: 用单因素分析法研究在培养基中缺乏铁、镁、微量元素液、维生素液时对阴沟肠杆菌 XA-2 生长的影响。实验发现, 铁和镁对该菌的生长影响显著, 而缺乏微量元素液、维生素液对该菌的生长影响不明显。缺铁培养时该菌在稳定期的菌浊浓度 OD_{600nm} 为 1.2586, 缺镁培养时菌浊浓度为 0.6988, 仅为完全培养时菌浊浓度的三分之一, 其中, 镁对该菌生长的影响更显著。产氢实验表明, 各因素对产氢情况的影响显著, 依次为: 铁>镁>维生素液>微量元素液。当该菌利用缺铁培养基产氢时, 其累计产氢量仅为 44 mL/L, 铁元素的缺乏严重影响该菌的产氢活动。

关键词: 阴沟肠杆菌; 生物制氢; 铁; 镁

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)06-0108-05

微生物制氢作为一种新兴的制氢方法, 越来越受到人们的关注, 在氢生产及其应用研究开发中的地位也越来越显著, 世界上许多国家都投入了大量的人力物力对生物制氢技术进行开发研究。目前, 报道的发酵产氢细菌较多, 如梭菌属(*Clostridium*)^[1-3]和肠杆菌属(*Enterobacter*)^[4-7]。前者中几乎所有的都是严格厌氧菌, 而后者是主要的兼性厌氧菌成员。因为对氧气没有严格厌氧菌敏感, 兼性厌氧菌比严格厌氧菌更适合应用产氢。

阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)是肠杆菌科肠杆菌属的重要成员之一, 是存在于人和动物肠中的一种条件致病菌^[8]。关于阴沟肠杆菌发酵产氢报道较少, 仅 Kummam^[9]等报道从淡水环境中分离获得的阴沟肠杆菌 IIT-BT 08 可利用多种碳源产氢, 并对该菌的产氢机理进行了初步的研究^[10]。

随着沿海经济发展, 高盐有机废水的排放量不断增加。淡水菌受盐度影响生长受到抑制, 而不能用于高盐有机废水处理。因此, 筛选获得耐盐性菌是高盐有机废水处理的前提条件。前期作者从废水处理厂的活性污泥中分离到一株阴沟肠杆菌 XA-2。该菌的最适生长条件要求宽泛, 具有良好的盐耐受性, 且具有较高的产氢性能, 可作为利用海水养殖有机废水生物制氢的候选菌株, 具有较好的应用前景。

微生物在处理高盐有机废水产氢过程中, 为了满足微生物生长产氢对微量元素的需求, 处理废水的同时提高产氢效率, 有必要研究微量元素对微生物

生长产氢的影响。有研究报道金属离子等因素对发酵产氢情况有一定的影响^[11-12]。因此, 本文分析铁、镁、微量元素液、维生素液四种因素对阴沟肠杆菌 XA-2 生长和产氢情况的影响, 以期利用该菌进行微生物制氢的应用积累资料。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

从废水处理厂的活性污泥中通过富集培养、菌种初筛、复筛、分离纯化获得的菌株 XA-2, 根据 Biolog 微生物鉴定系统和 16S rDNA 序列分析, 将菌株 XA-2 定名为阴沟肠杆菌 XA-2。

1.2 培养基

发酵培养基成分如下(g/L): 葡萄糖 20; 胰蛋白胍 4; 牛肉膏 2; 酵母汁 1; NaCl 30; K₂HPO₄ 1.5; MgCl₂ 0.1; FeSO₄·7H₂O 0.1; L-半胱氨酸 0.5。此外, 每 1L 培养基加入 10 mL 微量元素和维生素液以满足微生物的生长需要。微量元素液成分如下(g/10 mL):

收稿日期: 2012-05-11; 修回日期: 2012-08-02

基金项目: 教育部博士点基金项目(20121208110001); 天津市自然科学基金项目(12JCZDJC22200, 12JCQNJC04300, 12JCQNJC04200); 天津市海洋化学与资源重点实验室基金项目(201203); 天津科技大学科研启动基金项目(20100410)

作者简介: 宋厉芸(1985-), 女, 陕西咸阳人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋微生物; 王广策, 通信作者, E-mail: gcwang@qdio.ac.cn

MnSO₄·7H₂O 0.01; ZnSO₄·7H₂O 0.05; H₃BO₃ 0.01; CaCl₂·2H₂O 0.01; Na₂MnO₄ 0.01; CoCl₂·6H₂O 0.2。维生素液成分如下: L-抗坏血酸 0.025; 柠檬酸 0.02; 磷酸吡哆醛 0.05; 对氨基苯甲酸 0.01; 生物素 0.01; 维生素 B1 0.02; 核黄素 0.025。起始 pH 值调至 8.0 左右。再加入 1.5~2.0 g 琼脂粉制成固体培养基。培养基在 112 °C, 灭菌 20 min, 备用。

缺乏元素是指在配制培养基时不加入缺乏的元素, 其他元素按照发酵培养基的成分依次加入。如缺铁培养基是指在配制发酵培养基时, 不加入 FeSO₄·7H₂O, 其他成分都加入的培养基。本文中所做的培养基元素缺乏实验包括缺铁、缺镁、微量元素液、缺维生素液。

1.3 实验设计

1.3.1 菌株 XA-2 在缺乏元素条件下的生长曲线

挑取单菌落接入充满缺乏元素培养基的厌氧管中, 37 °C 恒温培养 24 h, 将其按 1:100 的比例将 1 mL 新鲜菌液接入装有 100 mL 缺乏各元素的血清瓶中, 充入高纯氮气, 用翻口胶塞和封口膜密封, 37 °C, 150 r/min 恒温振荡培养, 每隔 1h, 同一条件每次取 3 个样品测定 OD_{600nm} 光吸收值, 以 OD_{600nm} 光吸收值为纵坐标, 生长时间为横坐标, 绘制的曲线为生长曲线, 曲线中的每一个点为 3 个样品的平均值。

1.3.2 缺乏元素对菌株 XA-2 产氢的影响

按 1:100 的比例将 1 mL 新鲜菌液接入装有 100 mL 液体培养基的培养瓶中, 充入高纯氮气, 用翻口胶塞和封口膜密封, 同时接入导气管, 用产气瓶排水法收集气体, 将培养瓶置于恒温气浴摇床中, 37 °C, 150 r/min 振荡培养, 在产气停止后测定终了 pH、OD_{600nm} 光吸收值和氢气含量。产氢实验在常温常压下进行, 每个培养条件进行三次重复。

1.4 测定方法

用 UV-1800 紫外分光光度计(日本岛津)测定样品在 600 nm 处的吸光值(OD_{600nm})代表菌浊, 即细胞浓度。使用 DELTA 320 pH 计(梅特勒托利多)测定 pH 值。氢气含量用 GC 6820 气相色谱仪(安捷伦)测定, TCD 检测器, 柱箱温度 40 °C, 气化室 250 °C, 检测器 200 °C, N₂ 为载气, 流速 65 mL/min。

2 结果与分析

2.1 菌株 XA-2 在缺铁、缺镁条件下的生长曲线

生长实验结果表明, 该菌经过 8 h 的延迟期后进

入指数生长期, 而指数生长期持续的时间因缺乏元素的不同而不同, 随后进入稳定期。菌株 XA-2 在缺铁培养基中的生长情况如图 1 所示, 在接种后的 8~12h, 该菌在缺铁培养基和完全培养基的生长情况基本保持一致, 说明在大部分的指数生长期中缺铁对该菌的生长基本无影响, 而 12 h 后, 指数生长后期, 铁元素的缺乏开始对该菌的生长造成影响, 14h 后进入稳定期该影响越来越显著。该菌最终在完全培养基的菌浊浓度 OD_{600nm} 达到 1.8546, 而在缺铁培养基的菌浊浓度大幅下降, 菌浊浓度为 1.2586, 表明铁元素对该菌的生长尤其是生长后期造成很大的影响。缺镁条件下该菌的生长情况见图 1, 从图中可知镁元素对菌株 XA-2 的生长体中都造成显著的影响, 8~14 h 的指数生长期生长速率增加趋势不明显, 在进入稳定期后, 最终菌浊浓度 OD_{600nm} 为 0.6988, 此时的细胞生长量仅为完全培养基的三分之一。从图 1 可以看出, 虽然该菌在缺铁、缺镁培养基中同完全培养基中的进入生长周期各时期的时间相同, 但菌浊浓度都与正常情况有大幅下降, 说明缺铁和缺镁对该菌的生长都造成很大影响, 镁元素的缺乏更加显著。

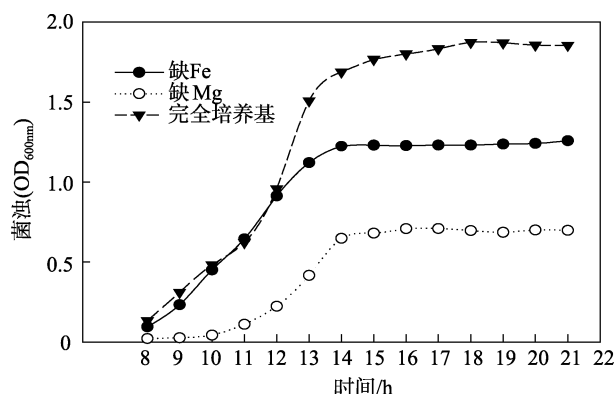


图 1 阴沟肠杆菌 XA-2 在缺铁、缺镁条件下的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *E. cloacae* XA-2 without Fe or Mg in culture medium

2.2 菌株 XA-2 在缺微量元素液、缺维生素液条件下的生长曲线

当发酵培养基中缺乏微量元素液时, 如图 2 所示, 菌株 XA-2 在接种后 8~22 h 内基本处在指数生长期, 到 19 h 才进入到稳定期, 与完全培养基中的生长情况相比, 指数期与稳定期之间的界限并不明显, 总体的菌浊浓度都有所下降, 直到 19 h 后才接近一致, 此结果表明微量元素液对该菌指数生长期的生长有一定的影响。从图 2 可以看出, 当发酵培养基中缺乏维生素液时, 对该菌的生长影响不大,

只是在接种后 10~16 h 内菌浊浓度有小幅降低, 17 h 后菌浊浓度跟正常情况下一致。综上所述, 当培养基中缺乏微量元素液和维生素液时, 对该菌的生长影响不明显, 当缺乏微量元素液时指数生长期延长。

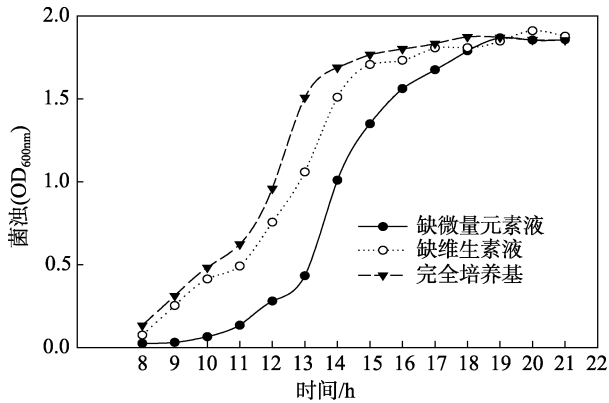


图 2 阴沟肠杆菌 XA-2 在缺乏微量元素液、缺维生素液条件下的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of *E. cloacae* XA-2 without trace nutrients solution or vitamin nutrients solution in culture medium

2.3 缺乏元素对菌株 XA-2 产氢的影响

图 3 表示阴沟肠杆菌 XA-2 在缺乏元素条件下产氢的累计产氢量, 从图中可以看出, 该菌利用完全培养基产氢时的累计产氢量为 515 mL/L, 不管缺乏如图所示的何种元素, 累计产氢量都没有使用完全培养基产氢时高。各元素对产氢的影响显著性依次为: 铁>镁>维生素液>微量元素液, 当该菌利用缺铁

培养基产氢时, 其累计产氢量为 44 mL/L, 与正常相比, 铁元素的缺乏严重影响该菌的产氢活动, 原因在于该菌在指数生长后期产氢, 而铁是产氢途径中所需铁氧还蛋白的重要组成部分, 也是细胞色素、铁硫蛋白等的结构元素或辅助因子, 因此, 铁在产氢过程中具有极其重要的作用, 缺乏时, 就会对产氢造成显著影响。从表 1 中可以具体看出该菌在缺乏元素时的产氢情况, 缺铁时的氢含量最低, 而缺微量元素液时的氢气含量与正常相比相差不大, 终了 pH 和菌浊浓度也在一定程度反映出缺乏元素对产氢的影响。

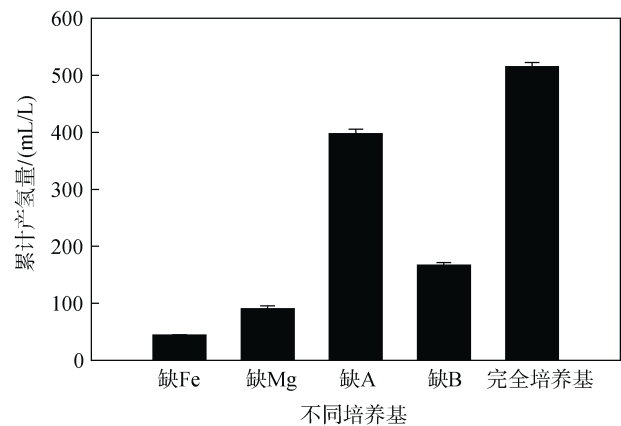


图 3 阴沟肠杆菌 XA-2 在缺乏元素时的产氢情况

Fig. 3 Hydrogen production of *E. cloacae* XA-2 without certain elements in culture medium

A: 微量元素液; B: 维生素液

A: trace nutrients solution; B: vitamin nutrients solution

表 1 当培养基缺乏元素时的产氢性能参数

Tab. 1 Hydrogen production data in element absence cases of culture medium

缺乏元素	气体总量 (mL/L 培养基)	氢气含量 (%)	终了 pH	终了菌浊浓度 (OD _{600nm})
缺铁	604	7.36	4.13	1.1726
缺镁	789	11.44	3.85	0.9783
缺微量元素液	1982	20.08	4.12	1.5124
缺维生素液	1078	15.51	4.08	1.1739
完全	2333	21.76	4.15	1.6582

3 讨论

本文所用阴沟肠杆菌 XA-2 是一株耐盐性较强, 耐盐范围广的发酵产氢菌。多数报道产氢菌皆是在淡水条件下发酵产氢^[13-14], 海水条件下产氢报道较少。阴沟肠杆菌在海水条件下产氢尚未见报道。本文所用培养基盐度为 30‰, pH 在 8 左右, 这与海水条件接近,

为该菌利用海水养殖有机废水发酵制氢奠定基础。

铁在微生物产氢发酵代谢中具有重要的作用, 它参与微生物产氢代谢中重要的辅酶铁氧还原蛋白的合成, 它可以形成 Fe—S 原子簇为产氢反应提供电子, 并激活氢酶。不同价态铁离子对厌氧发酵产氢的影响各有不同, 有研究表明^[15]二价铁离子最佳, 不同浓度的二价铁离子对厌氧发酵产氢的影响也不

同, 高浓度的铁离子反而会对产氢造成不利影响。阴沟肠杆菌是甲酸型产氢类型的代表菌株之一, 当铁元素缺乏时甲酸氢解酶系的合成会受到影响^[16]。本实验的结果表明当铁元素缺乏时, 严重地影响阴沟肠杆菌 XA-2 的产氢过程, 这与文献报道的阴沟肠杆菌的产氢代谢具有铁依赖性, 需要大量的铁元素才能正常进行的结果相近。

本文研究表明, 缺镁对阴沟肠杆菌的生长有明显影响, 该菌对镁的依赖性显著。因为镁是微生物生长的必要物质, 它可以维持磷酸化酶、烯醇化酶等的活性, 它可以与 ATP 形成 Mg^{2+} -ATP 复合物, 从而在糖和 ATP 代谢中发挥作用。微量元素液中含有锰、锌、硼、钙等一些金属离子和其他微量元素, 它们是一些酶作用必需的微量元素, 在微生物代谢中也起着重要的作用。本文结果表明, 该菌的生长对微量元素液与维生素液的需求并不是必需的, 但是缺乏维生素液对该菌的产氢有较明显的影响, 可能是因为维生素液中含有的一些水溶性维生素主要参与细胞内氧化还原、氢原子(电子)转移、转氨基脱羧作用及作为羟基化反应的辅助因子^[17], 从而影响产氢过程。综上所述, 铁、镁、微量元素液和维生素的缺乏都是影响发酵细菌的生长及产氢的重要因素。

参考文献:

- [1] Levin D B, Islamc R, Cicek N, et al. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates[J]. Int J Hydrogen Energy, 2006, 31(11): 1496–1503.
- [2] Liu X G, Zhu Y, Yang S T. Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants[J]. Enzyme Microb Technol, 2006, 38(3-4): 521–528.
- [3] Zhang H, Bruns M A, Logan B E. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor[J]. Water Res, 2006, 40(4): 728–734.
- [4] Fabiano B, Perego P. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*[J]. Int J Hydrogen Energy, 2002, 27(2): 149–156.
- [5] Nath K, Kumar A, Das D. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68(4): 533–541.
- [6] Palazzi E, Fabiano B, Perego P. Process development of continuous hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* in a packed column reactor[J]. Bioprocess Eng, 2000, 22(3): 205–213.
- [7] Zhu D L, Wang G C, Qiao H J. Fermentative hydrogen production by the new marine *Pantoea agglomerans* isolated from the mangrove sludge[J]. Int J Hydrogen Energy, 2008, 33(21): 6116–6123.
- [8] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984, 451-452.
- [9] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08[J]. Process Biochem, 2000, 35(6): 589–593.
- [10] Kumar N, Ghosh A, Das D. Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H_2 production by *Enterobacter cloacae*[J]. Biotechnol. Lett., 2001, 23(7): 537–541.
- [11] Zhang Y F, Shen J Q. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria[J]. Int J Hydrogen Energy, 2006, 31(4): 441-446.
- [12] Liu G Z, Shen J Q. Effects of Culture and Medium Conditions on Hydrogen Production from Starch Using Anaerobic Bacteria[J]. J. Biosci. Bioeng, 2004, 98(4): 251–256.
- [13] 许丽英, 任南琪, 王兴祖, 等. 产氢新种 *Ethanoligenens harbinense* B49 的氮素营养与代谢特征[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(2): 265-269.
- [14] 卢文玉, 闻建平, 陈宇, 等. 激光诱变选育耐酸产氢菌产气肠杆菌[J]. 化工进展, 2006, 25(7): 799-802.
- [15] 曹东福, 黄兵, 张续春. Fe 对厌氧发酵生物制氢的影响研究[J]. 江西农业学报, 2007, 19(4): 86-88.
- [16] 陈天寿. 微生物培养基的制造与使用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995:18.
- [17] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002:434.

Influence of trace elements on cell growth and hydrogen production of the salt-tolerant *Enterobacter cloacae*

SONG Li-yun¹, WANG Guang-ce², ZHU Da-ling¹, PAN Guang-hua¹

(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: May,11,2012

Key words: *Enterobacter cloacae*; Biohydrogen production; iron; magnesium

Abstract: The consequences of lack of iron, magnesium, trace nutrients and vitamin nutrients solution on the cell growth of *Enterobacter cloacae* XA-2 was researched by using single factor test. The results showed that iron and magnesium had significant effect on the growth of bacteria. Deficiency of trace nutrients, vitamin nutrients solution in medium had little effect on the growth of the strain. The absorbance at 600 nm of the strain in stationary phase was 1.2586 without iron and 0.6988 without magnesium in medium. The magnesium absence value was only one-third of complete medium. Compared with iron, magnesium had more significant effect on the growth of the bacterium. Hydrogen production experiments showed that the influence order of factors on hydrogen production was as follow: Fe>Mg>Vitamin nutrients>trace nutrients. In iron absence medium, cumulative hydrogen production was 44 mL/L medium. Iron deficiency had significant effect on hydrogen production of the strain.

(本文编辑: 张培新)