

碳源浓度对微生物发酵产氢及铁还原特征的影响

游萍, 贾蓉, 乔莎莎, 曲东*

(西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:为揭示碳源浓度对微生物发酵产氢及铁还原特征的影响,研究了发酵产氢型 Fe(Ⅲ)还原菌 JX1-25 以不同浓度葡萄糖为唯一碳源时对 Fe(Ⅲ)的还原特征、培养体系氢气分压及 pH 值,探讨了微生物产氢过程与 Fe(Ⅲ)还原过程的关系,以及 Fe(Ⅲ)还原过程对体系碳源电子消耗的贡献。结果表明:菌株 JX1-25 利用 0.25、0.5、2、4、8、16 mmol·L⁻¹ 葡萄糖为碳源还原 Fe(Ⅲ)时, Fe(Ⅲ)还原率分别达到 6.81%、12.47%、56.69%、97.71%、96.86%、99.77%; Fe(Ⅲ)还原潜势(a)、铁还原最大反应速率($V_{\max}$)与氢气分压峰值(ppH_{2max})均随着体系葡萄糖浓度的升高而升高,而体系 pH 值随之降低; Fe(Ⅲ)还原过程消耗电子占体系葡萄糖提供电子的比例为 2.02%~9.69%,产氢过程对体系葡萄糖提供电子的消耗比例为 13.74%~19.45%。CCA 分析发现菌株 JX1-25 利用不同浓度葡萄糖的 Fe(Ⅲ)还原过程与产氢过程存在一定的相关性, ppH_{2max} 与 a 、 $V_{\max}$ 呈显著正相关关系,与达到最大反应速率对应的时间($T_{V_{\max}}$)和体系最低 pH 值(pH_{min})呈显著负相关关系。

关键词:葡萄糖浓度;发酵产氢;Fe(Ⅲ)还原;电子消耗比例

中图分类号:S154.3 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2015)04-0722-06 doi:10.11654/jaes.2015.04.017

Effect of Carbon Source Concentrations on Microbial Hydrogen Production and Fe(Ⅲ) Reduction

YOU Ping, JIA Rong, QIAO Sha-sha, QU Dong*

(College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Fermentative Fe(Ⅲ) reducing microorganism as a facultative anaerobe can reduce Fe(Ⅲ) to Fe(Ⅱ) by using the intermediates of glucose metabolism as an electron donor. However, the effects of carbon source concentrations on microbial hydrogen production and Fe(Ⅲ) reduction were unclear. A 30-d anaerobic pure incubation experiment with Fe(Ⅲ) reducing bacteria JX1-25 was conducted to investigate the effects of glucose concentrations on Fe(Ⅲ) reduction, pH and hydrogen partial pressure. When glucose was the sole carbon source, Fe(Ⅲ) reduction rates by the strain JX1-25 were 6.81%, 12.47%, 56.69%, 97.71%, 96.86% and 99.77% for 0.25, 0.5, 2, 4, 8 mmol·L⁻¹ and 16 mmol·L⁻¹ glucose, respectively. The Fe(Ⅲ) reduction potential(a) and maximum reduction rate($V_{\max}$) and hydrogen pressure peak(ppH_{2max}) increased with increasing glucose concentrations. Electron consumption percentages of microbial Fe(Ⅲ) reduction and hydrogen production were respectively 2.02%~9.69% and 13.74%~19.45% at different concentrations of glucose. Glucose at 4 mmol·L⁻¹ was able to satisfy the demand of Fe(Ⅲ) reduction. Canonical correspondence analysis(CCA) indicated that there was to some extent correlation between microbial Fe(Ⅲ) reduction and hydrogen production, in which the strain JX1-25 used glucose as carbon source. The peak of hydrogen partial pressure(ppH_{2max}) had an extremely significant positive correlation with a and $V_{\max}$ but a negative correlation with the time to the maximum reduction rate($T_{V_{\max}}$) and the minimum pH value of the incubation system(pH_{min}).

Keywords: glucose concentration; fermentative hydrogen production; Fe(Ⅲ) reduction; electron consumption ratio

厌氧土壤或沉积物中 Fe(Ⅲ)还原过程主要是由微生物介导的生物化学过程。具有 Fe(Ⅲ)还原功能的微生物能够以 Fe(Ⅲ)作为电子受体,并从有机物的代谢或 Fe(Ⅲ)还原过程中获得能量维持生长。Fe(Ⅲ)

还原研究具有重要的地学与环境学意义,与碳循环、多种金属元素和非金属元素的转化紧密相关,并在污染环境的生物修复、微生物电池研究中发挥重要作用^[1-2]。目前已在水体、淹水土壤及沉积物等各种厌氧环境中鉴定出不同类型的 Fe(Ⅲ)还原微生物^[3-4],其中专性 Fe(Ⅲ)还原菌可依靠铁呼吸获得能量^[5-6],而兼性 Fe(Ⅲ)还原微生物则能够以糖类代谢过程中得到的发酵产物(如甲酸、乙酸、丙酮酸和 H₂ 等)为电子供体还原 Fe(Ⅲ)^[3]。从沼泽土壤中分离得到的一株专

收稿日期:2014-11-22

基金项目:国家自然科学基金面上项目(41171204)

作者简介:游萍(1992—),女,湖南永州人,硕士研究生,主要从事土壤环境化学研究。E-mail:youping@nwsuaf.edu.cn

*通信作者:曲东 E-mail:dongqu@nwfafu.edu.cn

性Fe(Ⅲ)还原菌 *Pseudomonas* 能够在消耗 H_2 的同时还原 Fe(Ⅲ),并且还原 Fe(Ⅲ)的速率是消耗 H_2 速率的两倍^[7]。继 *Pseudomonas* sp.和 *Shewanella putrefaciens*^[8]被发现能够以 H_2 作为电子供体还原 Fe(Ⅲ)后, Frank^[9-10]又从海底沉积物中分离出菌株 BrY 和菌株 PCA,能够氧化 H_2 或乙酸盐来还原 Fe(Ⅲ)。Yi 等^[4]的研究发现,在添加葡萄糖、丙酮酸盐和乳酸盐的水稻土富集培养体系中,具有发酵功能的 *Clostridium* 和 *Bacillus* 等微生物是土壤中 Fe(Ⅲ)还原微生物的优势种群。黎慧娟等^[11]向水稻土富集培养体系中添加 H_2 后,能够促进体系的 Fe(Ⅲ)还原过程。这些研究表明微生物发酵产氢与 Fe(Ⅲ)还原过程存在一定的关联性。然而,有关碳源浓度对发酵型微生物的产氢过程与 Fe(Ⅲ)还原过程的影响、产氢过程与 Fe(Ⅲ)还原过程的关系以及 Fe(Ⅲ)还原过程消耗电子在微生物厌氧电子传递链中所占比例的研究鲜有报道。因此,本试验通过向 Fe(Ⅲ)还原微生物的纯培养体系中添加不同浓度的葡萄糖作为唯一电子供体,测定体系中 Fe(Ⅱ)和 H_2 的累积量及 pH 值随培养时间的变化,比较微生物 Fe(Ⅲ)还原过程和产氢过程对不同葡萄糖浓度的响应;同时通过计算微生物发酵产氢和 Fe(Ⅲ)还原消耗的电子占体系添加葡萄糖提供电子的比例,阐明 Fe(Ⅲ)还原过程在微生物生长代谢过程中对体系碳源电子消耗的贡献,为揭示微生物产氢与 Fe(Ⅲ)还原的关系,以及发酵型 Fe(Ⅲ)还原微生物依赖 H_2 还原 Fe(Ⅲ)的机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与培养基

供试的 Fe(Ⅲ)还原菌为本实验室从水稻土中分离获得,具有较强 Fe(Ⅲ)还原能力(编号 JX1-25),菌株为 G⁻,杆状。菌落形态为:菌落较小,白色,无隆起,规则圆,边缘光滑,有光泽,表面光滑,不透明。对菌株做 16S rDNA 序列分析,将所得到的序列与 EzTaxon Server 2.1 数据库中已测定的原核微生物 16S rDNA 序列进行比对,发现菌株 JX1-25 与 *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052[CP000721]的相似度达 99.66%。

菌株通过 5% PTYG 液体培养基扩繁,3500 r·min⁻¹ 离心 10 min 获得菌落沉淀,用无菌水稀释制备接种用菌液。5% PTYG 液体培养基经 121 °C 高温灭菌 35 min,成分为:蛋白胨 0.25 g·L⁻¹、胰蛋白胨 0.25 g·L⁻¹、酵母浸粉 0.50 g·L⁻¹、葡萄糖 0.50 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 0.60 g·L⁻¹、CaCl₂·2H₂O 0.07 g·L⁻¹。用 1 mol·L⁻¹

NaOH 调节 pH 至 6.5~7.0。

1.2 试验处理设置与培养方法

试验共设置 6 个葡萄糖浓度水平,分别用 G1、G2、G3、G4、G5、G6 表示,培养体系中添加葡萄糖的最终浓度分别为 0.25、0.5、2、4、8、16 mmol·L⁻¹。试验采用厌氧恒温培养方法,分别向经 121 °C 高温灭菌的 10 mL 血清瓶中加入 1 mL 不同浓度葡萄糖溶液、1 mL 人工合成的 Fe(OH)₃ 悬液(2.13 g·L⁻¹)、1 mL NH₄Cl 溶液(5 g·L⁻¹)、1 mL 磷酸缓冲液(0.025 mol·L⁻¹)和 1 mL 微生物接种液。充氮除氧,用橡胶盖和铝盖密封,30 °C 避光培养,定期采样测定 Fe(Ⅱ)及体系 pH 值。同时,另将上述培养体系添加至灭菌后的 25 mL 血清瓶中,充氮除氧后密封,30 °C 避光培养,定期测定培养体系 H_2 分压。

1.3 采样及测定方法

氢气分压测定采用气相色谱法:柱填充物为 TDX-01 分子筛(60~80 目),柱长 2 m,内径 2 mm,柱温 40 °C,进样口温度 120 °C,检测器为 TCD,检测器温度 120 °C,载气(N₂)流量 0.3 kg·cm⁻²。标准气体购于北京华元气体化工有限公司,浓度为 1990 μL/L。

体系 Fe(Ⅱ)浓度测定采用邻菲罗啉比色法:采样时将样品充分摇匀,用自动加样枪吸取 1 mL 悬液置于含 4 mL 0.50 mol·L⁻¹ 盐酸溶液的带盖聚乙烯管中,于 30 °C 恒温浸提 24 h,重复 3 份。测定时,于 3500 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取 1 mL 上清液至 50 mL 容量瓶,用 5 mL 1 mol·L⁻¹ NaAc 调控 pH 值,加入 5 mL 1 mg·mL⁻¹ 邻菲罗啉显色,定容后于 510 nm 测定吸光度,计算 Fe(Ⅱ)浓度。

体系 pH 值测定采用玻璃电极电位法。

1.4 数据统计分析

采用 Excel 及 Origin 8.0 进行数据处理及作图,同时用描述微生物生长动力学的 Logistic 方程对不同处理 Fe(Ⅲ)还原过程中 Fe(Ⅱ)累积浓度随时间的变化进行拟合。Logistic 方程的表达式为:

$$C_t = a / (1 + b e^{-ct})$$

式中: t 为培养时间; C_t 为培养时间 t 时体系的 Fe(Ⅱ)浓度; a 、 b 、 c 均为参数。

通过方程拟合,可求出 Fe(Ⅲ)还原的最大潜势,[即 Fe(Ⅱ)最大累积量,数值等于参数 a]、Fe(Ⅲ)最大还原速率($V_{\max}$,数值等于 $0.25ac$)和最大还原速率对应的时间($T_{V_{\max}}$,数值为 $\ln b/c$)。采用典范对应分析(Canonical correspondence analysis, CCA)^[12-13]分析异化铁还原过程与产氢过程的关系。排序参数包括

Fe(Ⅲ)还原过程动力学参数(a 、 $V_{\max}$ 、 $T_{V_{\max}}$)、培养过程中体系最低 pH 值($\text{pH}_{\min}$)及对应时间($\text{pH}_{\min}$ - T)、氢气分压峰值($\text{ppH}_{2\max}$)及对应时间($\text{ppH}_{2\max}$ - T)共 7 个参数。CCA 排序采用软件 CANOCO4.5 完成。

2 结果与分析

2.1 碳源浓度对 Fe(Ⅲ)还原的影响

纯培养体系中 Fe(Ⅲ)还原菌 JX1-25 利用不同浓度葡萄糖时,Fe(Ⅱ)浓度随培养时间的变化如图 1 所示。菌株 JX1-25 能较好地利用葡萄糖还原 Fe(Ⅲ),体系的 Fe(Ⅱ)浓度随着所添加的葡萄糖浓度的升高而升高。添加低浓度葡萄糖的处理 G1、G2,在培养的 30 d 内 Fe(Ⅲ)还原几乎没有发生,其他四个处理在第 10 d 后表现出明显差异,且在培养 10~15 d 期间差异最为显著。Fe(Ⅲ)还原速率随着葡萄糖浓度增高而增快,至培养结束时,G4、G5、G6 处理最终 Fe(Ⅱ)含量分别达到 431.83、432.03、433.35 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,与初始添加的 Fe(Ⅲ)量($425.71\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)基本接近,Fe(Ⅲ)基本完全还原;而 G1、G2 和 G3 的最终 Fe(Ⅱ)

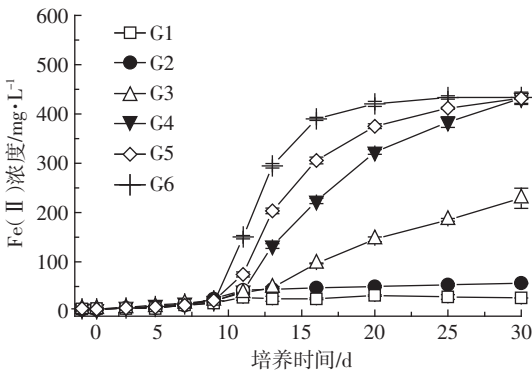


图 1 添加不同浓度葡萄糖时菌株 JX1-25 纯培养体系中 Fe(Ⅱ)浓度的变化

Figure 1 Changes of Fe(Ⅱ) concentrations during pure culture of strain JX1-25 with different concentrations of glucose

浓度仅为 26.74、56.74、229.27 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,表明碳源不足时对 Fe(Ⅲ)还原过程影响显著。

用 Logistic 方程对 Fe(Ⅲ)还原过程中 Fe(Ⅱ)累积浓度随培养时间的变化进行拟合,拟合参数如表 1 所示。相关系数(r)在 0.976~0.999 之间,说明菌株 JX1-25 利用不同浓度的葡萄糖还原 Fe(Ⅲ)的过程可以用 Logistic 方程较好地拟合。 a 与添加碳源浓度关系密切,G1、G2、G3 与 G4、G5、G6 处理间差异显著; $V_{\max}$ 随着体系葡萄糖浓度增高而增大,不同处理间差异明显;不同处理中 $T_{V_{\max}}$ 及最终 Fe(Ⅲ)还原率也表现为随葡萄糖浓度的增高而增高,当葡萄糖浓度增加到 G4 处理时其还原率已趋于 100%,此时葡萄糖浓度不再是制约因素,表明体系葡萄糖浓度为 4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时已能够很好地满足体系 Fe(Ⅲ)还原过程的需求。

2.2 碳源浓度对培养体系 pH 值的影响

菌株 JX1-25 厌氧培养过程中体系的 pH 变化如图 2 所示。G1 和 G2 处理中 pH 基本维持在 7.0 左右,而其他处理则明显表现出 pH 值在培养前 5 d 中迅速

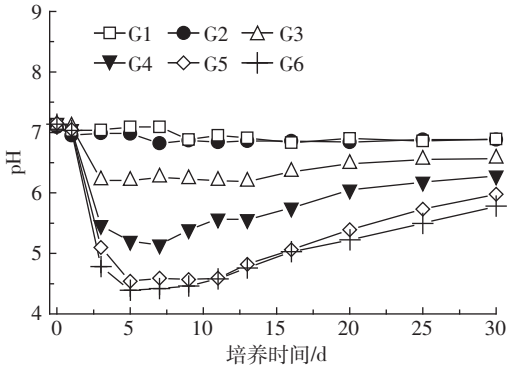


图 2 添加不同浓度葡萄糖时菌株 JX1-25 纯培养体系 pH 值的变化

Figure 2 Changes of pH values during pure culture of strain JX1-25 with different concentrations of glucose

表 1 菌株 JX1-25 纯培养条件下利用不同浓度葡萄糖的 Fe(Ⅲ)还原动力学拟合参数

Table 1 Kinetic parameters of Fe(Ⅲ) reduction during pure culture of strain JX1-25 with different concentrations of glucose

处理 Treatment	Logistic 方程参数 Logistic model parameters				$V_{\max}/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	$T_{V_{\max}}/\text{d}$	Fe(Ⅲ)还原率/% Reduction rate
	a	b	c	r			
G1	29.0±1.93d	13.7±5.51	0.332±0.069 0	0.976	2.39±0.331f	7.79±0.596f	6.81
G2	53.0±0.164c	63.0±26.0	0.453±0.054 0	0.987	6.02±0.714e	9.04±0.230e	12.5
G3	241±29.0b	74.2±22.1	0.234±0.036 0	0.997	14.0±0.399d	18.4±1.52a	56.7
G4	416±11.8a	252±59.2	0.347±0.018 0	0.996	36.1±1.07c	15.9±0.197b	97.7
G5	412±5.72a	828±137	0.494±0.013 0	0.997	51.0±1.63b	13.6±0.058 0c	96.9
G6	425±1.51a	1.04×10 ⁴ ±2.33×10 ³	0.774±0.024 0	0.999	82.2±2.29a	12.0±0.063 0d	99.8

注:同列标有不同小写字母者为差异显著($P<0.05$)。

Note: Means followed by different letters within a column indicate significant difference at $P<0.05$.

降低的趋势,并且随着葡萄糖浓度增加,pH 值降幅增大,G5 和 G6 处理中 pH 可降低至 4.2 左右;随着培养时间的延长,pH 可缓慢上升。添加葡萄糖后 pH 值的降低通常与葡萄糖发酵过程产生的有机酸有关,由于添加的葡萄糖在厌氧培养的前期发酵产酸过程剧烈,导致培养体系 pH 值明显下降。在培养 10 d 后,pH 值上升表明体系对 H^+ 的消耗量增大。

2.3 碳源浓度对培养体系产氢过程的影响

菌株 JX1-25 以葡萄糖作为碳源时体系氢气分压随培养时间的变化如图 3 所示,氢气分压呈先增后降的趋势。G1、G2 处理在整个培养过程中只能检测到很低的氢气分压,G3~G6 处理在培养 5 d 后氢气分压开始迅速增加,至培养 10 d 左右体系中氢气分压达到峰值,随后快速下降,在培养 20 d 时氢气分压降至检出限以下(未检出)。葡萄糖浓度对产氢速率及氢气分压有显著影响,表现为产氢速率及氢气分压随葡萄糖浓度的增加而增大,体系中的 ppH_{2max} 分别为:0.31、0.005、2.54、5.88、10.12、16.62 kPa。比较产氢过程与体系的 pH 值变化趋势可以看出, $pH_{min}-T$ 与氢气分压开始迅速增加的时间相对应,而氢气分压开始下降时体系的 pH 值开始回升。

2.4 不同碳源浓度体系中铁还原过程与产氢过程的 CCA 分析

采用 CCA 对本试验中 6 个处理和 7 个相关参数进行关联分析(图 4),图中箭头分别表示参数 a 、 V_{max} 、 T_{Vmax} 、 pH_{min} 、 $pH_{min}-T$ 、 ppH_{2max} 、 $ppH_{2max}-T$,空心圆表示 6 个不同浓度葡萄糖处理 G1、G2、G3、G4、G5、G6。前两个排序轴的特征值分别为 0.069 和 0.006,共同解释了不同葡萄糖浓度处理分布特征的 96.2%;两个环境

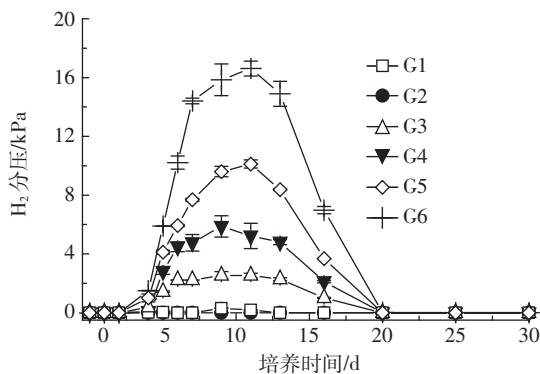


图 3 添加不同浓度葡萄糖时菌株 JX1-25 纯培养体系中氢气分压的变化

Figure 3 Changes of hydrogen partial pressure during pure culture of strain JX1-25 with different concentrations of glucose

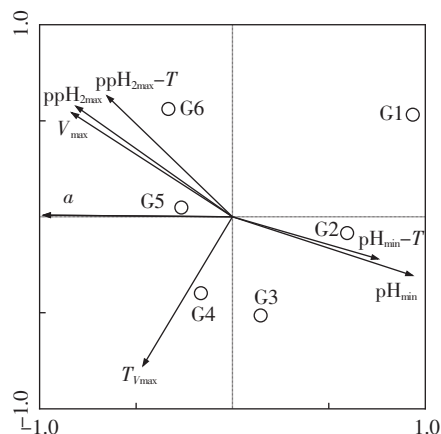


图 4 菌株 JX1-25 利用不同浓度葡萄糖时 Fe(III)还原及产氢过程参数的二维排序图

Figure 4 Biplot of canonical correspondence analysis(CCA) for hydrogen production and Fe(III) reduction processes at different concentrations of glucose

排序轴的相关系数为 0,表明排序结果可靠,能够较好地反应异化铁还原过程与产氢过程中变量因子与不同葡萄糖浓度的关系。与 CCA 排序图中第一排序轴相关系数较高的是 Fe(II)还原潜势 a ($r=0.979$),说明第一排序轴从左至右表示涉及 Fe(III)还原过程的强度增加,反映的是不同浓度葡萄糖添加条件下 Fe(III)还原能力的变化;与第二排序轴相关性较高的有 T_{Vmax} ($r=0.776$)、 V_{max} ($r=0.541$)、 ppH_{2max} ($r=0.576$)、 $ppH_{2max}-T$ ($r=0.629$)、 pH_{min} ($r=0.759$) 及 $pH_{min}-T$ ($r=0.849$),说明第二排序轴自下而上反映了不同葡萄糖浓度添加条件下微生物 Fe(III)还原与产酸及产氢过程的强度增加。

3 讨论

葡萄糖作为体系唯一碳源对微生物生长代谢有重要的影响。CCA 分析发现,不同浓度葡萄糖的添加导致了各体系 pH 值的不同、Fe(III)还原过程及产氢过程的差异,从而形成不同的微生物生境,故添加不同浓度葡萄糖对微生物活动总体特征呈现较大差异。Fe(III)还原潜势与氢气分压峰值、pH 最低值的相关系数分别为 0.785**、-0.715**,最大还原速率与氢气分压峰值的相关系数为 0.996**,显示出产氢过程与 Fe(III)还原过程的联系,说明随着葡萄糖发酵,微生物脱氢释放了大量 H^+ ,加速了微生物对 Fe(III)的利用能力,氢气的产生对 Fe(III)还原过程有促进作用。贾蓉等^[14]也得出类似结论。有大量文献报道了氢气对 Fe(III)还原过程的影响,如 Lovley 等^[15]发现在水底沉

积物中添加 H_2 能够明显刺激 $Fe(III)$ 还原作用,在沉积物中 $Fe(III)$ 为主要的末端电子受体,容易利用所添加的 H_2 ,并且 $Fe(III)$ 还原微生物对氢分子的亲和力远大于产甲烷微生物。

微生物发酵产氢需要在一定的条件下进行,本试验条件下,JX1-25 培养前 5 d 体系中仅能检测到很低的氢气分压。其原因可能是微生物生长有一段适应期,产生氢气量少于消耗量,另一方面可能是因为未达到诱导产氢的条件。CCA 分析发现,氢气分压峰值与 pH 最低值之间存在极显著的负相关关系($r = -0.916^{**}$)。任南琪等^[16]研究表明,发酵产氢一般是在酸性条件下进行的,在糖酵解途径中产生的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和氢离子($NADH + H^+$)通过 $NAD^+/NADH$ 的平衡调节产氢,形成氧化性 NAD^+ 。发酵微生物产氢代谢过程中,产酸类型与体系氧化还原电位(Eh)有关,王勇等^[17]研究表明,丁酸型发酵过程中 Eh 在 $-350 \sim -420$ mV 之间,而乙醇型发酵过程中 Eh 在 $-180 \sim -260$ mV 之间变化。通过调解体系 pH 值可以调节电势差,如氢气分压高达 50 662.5 Pa 时, pH 小于 4.7 可使 $NADH + H^+$ 转化为氢,如果氢分压为 10 132.5 Pa, pH 值只要小于 6.6 即可。培养体系 pH 也会影响产氢过程的进行,李建昌等^[18]研究发现,在启动产氢时 pH 值不宜低于 4.5,正常产氢时 pH 值应控制在 4.5~5.5 的范围。由此可以解释本试验中培养初期氢气分压低而当体系 pH 值降至最低时产氢速率达到最大的现象。同时,在培养 20 d 后体系 pH 值高于 5.5 时,体系氢气分压逐渐降低,一方面是由于 pH 对产氢过程的抑制,另一方面是由于 $Fe(III)$ 还原对氢气的消耗。

Lovley 等^[19]研究发现,以葡萄糖为唯一碳源,添加 $Fe(OH)_3$ 的厌氧体系中,微生物利用葡萄糖无氧呼吸的 ΔG 值($-76 \text{ kJ} \cdot \text{e}^{-1}$)低于葡萄糖发酵反应的自由能($-57 \text{ kJ} \cdot \text{e}^{-1}$)。这从热力学角度证实 $Fe(III)$ 的添加能够改变碳源的代谢途径,使微生物获得更多的能量支持生长。也有研究发现,虽然兼性 $Fe(III)$ 还原微生物从有机物代谢过程中仅可将少于 5% 的电子传递给 $Fe(III)$,但可以累积大量的 $Fe(II)$ ^[20]。本试验培养体系中葡萄糖为唯一的电子供体, $Fe(III)$ 还原及产氢过程所需的电子均来源于葡萄糖,理论上 1 mol 葡萄糖能提供 24 mol 电子,故用测得的 $Fe(II)$ 累积量与氢气累积量可计算出微生物 $Fe(III)$ 还原过程与产氢过程消耗的电子占体系葡萄糖所能提供总电子的比例(图 5)。 $Fe(III)$ 还原过程所利用的电子仅占体系葡

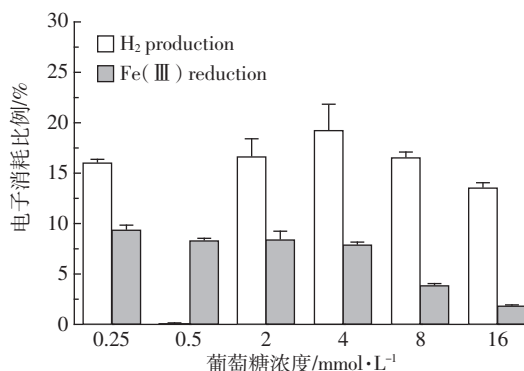


图5 不同浓度葡萄糖体系中菌株 JX1-25 产氢和铁还原过程消耗的电子占体系葡萄糖提供电子的比例

Figure 5 Electron consumption percentages of hydrogen production and $Fe(III)$ reduction during pure culture of strain JX1-25 with different concentrations of glucose

萄糖所含电子的 2.02%~9.69%,产氢过程占 13.74%~19.45%,其中葡萄糖浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时产氢过程的电子消耗比例最高,达 $(19.45 \pm 2.39)\%$ 。这说明本试验中,体系碳源浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 是体系最优产氢浓度,结合葡萄糖浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时已趋于 100% 的 $Fe(III)$ 还原率,可以确定在本试验中最适宜碳源浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当葡萄糖浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时试验体系中几乎检测不到氢气分压,产氢量比 $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理少,可能是在低浓度的葡萄糖条件下葡萄糖的代谢仅用作维持微生物自身生长,当浓度达到一定值时由于 $Fe(OH)_3$ 的存在使得微生物代谢葡萄糖的途径发生了改变。王玉波^[21]的研究表明,从热力学角度上低底物浓度发酵产氢过程更有利于乙酸生成,然而计算实际葡萄糖代谢过程中电子等效体平衡,发现底物浓度过低时,体系被用于产能反应 NAD^+ 还原的电子等效体增多,产乙醇与丁酸增高,产乙酸产氢随之降低。微生物会根据环境条件自行调节其代谢途径以维持细胞正常代谢,不同的代谢途径对应着不同的液相末端产物及不同的氢产量。Lehours 等^[22]研究发现,纯培养体系葡萄糖为 50 mmol 时,添加 $Fe(III)$ 能促进发酵型微生物 BS2 对葡萄糖的代谢,氢气的碳源利用率由未添加 $Fe(III)$ 的 30% 增至 65%, $Fe(III)$ 的添加对葡萄糖代谢过程中电子流的传递有重要影响。微生物发酵产氢过程是个复杂的生物过程,本试验条件下不同浓度葡萄糖代谢过程中电子流向问题及 $Fe(OH)_3$ 存在的影响有待进一步研究和探讨。

4 结论

从水稻土中分离得到的菌株 JX1-25 可以高效利

用葡萄糖作为电子供体进行发酵产氢和 Fe(III) 还原,碳源浓度对菌株JX1-25产氢和 Fe(III) 还原过程有重要影响。 Fe(III) 还原潜势、 Fe(III) 还原反应最大速率及体系氢气分压随着葡萄糖浓度的升高而增大,培养体系pH值随着葡萄糖浓度升高而降低。 Fe(III) 还原过程消耗电子占体系葡萄糖能提供总电子的比例达2.02%~9.69%;产氢过程的电子消耗比例为13.74%~19.45%;葡萄糖浓度为 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时已能够很好地满足体系 Fe(III) 还原过程的需求。CCA分析表明菌株JX1-25 Fe(III) 还原过程与产氢过程存在一定的相关性。

参考文献:

- [1] 贺江舟, 曲东, 张莉利. Fe(III) 的微生物异化还原[J]. 微生物学通报, 2006, 33(5): 158-164.
HE Jiang-zhou, QU Dong, ZHANG Li-li. Dissimilatory Fe(III) reduction by microorganisms[J]. *Microbiology*, 2006, 33(5): 158-164.
- [2] 迟光宇, 陈欣, 史奕, 等. 土壤 Fe(III) 异化还原的环境效益[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(增刊): 273-277.
CHI Guang-yu, CHEN Xin, SHI Yi, et al. Environmental benefits of soil Fe(III) dissimilatory reduction[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(Suppl): 273-277.
- [3] Lovley D R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reducing prokaryotes [M]. The prokaryotes. Springer New York, 2006: 635-658.
- [4] Yi W J, Wang B L, Qu D. Diversity of isolates performing Fe(III) reduction from paddy soil fed by different organic carbon sources[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(19): 4407-4417.
- [5] Lovley D R, Giovannoni S J, White D C, et al. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov.: A microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals [J]. *Archives of microbiology*, 1993, 159(4): 336-344.
- [6] Myers C R, Myers J M. *Shewanella oneidensis* MR-1 restores menaquinone synthesis to a menaquinone-negative mutant[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5415-5425.
- [7] Balashova V V, Zavarzin G A. Anaerobic reduction of ferric iron by hydrogen bacteria[J]. *Microbiology*, 1979, 48(5): 635-639.
- [8] Lovley D R, Phillips E J P, Lonergan D J. Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese by *Alteromonas putrefaciens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(3): 700-706.
- [9] Caccavo F, Blakemore R P, Lovley D R. A hydrogen-oxidizing, Fe(III) -reducing microorganism from the Great Bay Estuary, New Hampshire [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(10): 3211-3216.
- [10] Caccavo F, Lonergan D J, Lovley D R, et al. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov.: A hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(10): 3752-3759.
- [11] 黎慧娟, 彭静静. 水稻土中铁还原菌多样性[J]. 应用生态学报, 2011, 22(10): 2705-2710.
LI Hui-juan, PENG Jing-jing. Phylogenetic diversity of dissimilatory Fe(III) -reducing bacteria in paddy soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(10): 2705-2710.
- [12] Ter Braak C J F, Verdonschot P F M. Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology[J]. *Aquatic Sciences*, 1995, 57(3): 255-289.
- [13] Hoy C W, Grewal P S, Lawrence J L, et al. Canonical correspondence analysis demonstrates unique soil conditions for entomopathogenic nematode species compared with other free-living nematode species[J]. *Biological Control*, 2008, 46(3): 371-379.
- [14] 贾蓉, 曲东, 乔莎莎. 发酵脱氢产氢过程对微生物铁还原的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(12): 2395-2402.
JIA Rong, QU Dong, QIAO Sha-sha. Microbial iron reduction as influenced by fermentative dehydrogenation and hydrogen production [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(12): 2395-2402.
- [15] Lovley D R, Phillips E J P. Availability of ferric iron for microbial reduction in bottom sediments of the freshwater tidal Potomac River[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52(4): 751-757.
- [16] 任南琪, 李建政, 林明, 等. 产酸发酵细菌产氢机理探讨[J]. 太阳能学报, 2002, 23(1): 124-128.
REN Nan-qi, LI Jian-zheng, LIN Ming, et al. Study on the mechanism of bacterial hydrogen evolution by fermentation[J]. *Acta Energetica Sinica*, 2002, 23(1): 124-128.
- [17] 王勇, 任南琪, 孙寓娇, 等. 乙醇型发酵与丁酸型发酵产氢机理及能力分析[J]. 太阳能学报, 2002, 23(3): 365-373.
WANG Yong, REN Nan-qi, SUN Yu-jiao, et al. Analysis on the mechanism and capacity of two types of hydrogen production-ethanol fermentation and butyric acid fermentation[J]. *Acta Energetica Sinica*, 2002, 23(3): 365-373.
- [18] 李建昌, 张无敌, 宋洪川, 等. pH值调控对发酵产氢的影响[J]. 能源工程, 2004, 6: 28-31.
LI Jian-chang, ZHANG Wu-di, SONG Hong-chuan, et al. The effect of pH value on fermentative hydrogen production[J]. *Energy Engineering*, 2004, 6: 28-31.
- [19] Lovley D R, Phillips E J P. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 51(4): 683-689.
- [20] Lovley D R. Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: A review[J]. *Geomicrobiology Journal*, 1987, 5(3-4): 375-399.
- [21] 王玉波. 生物质发酵产氢过程的化学计量学与热力学分析纤维素降解菌的生物富集[D]. 郑州: 郑州大学, 2012.
WANG Yu-bo. Stiochiometric and thermodynamic analysis of bio-hydrogen production from cellulosic biomass, and bioenrichment of cellulose degradation bacteria from anaerobic sludge[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2012.
- [22] Lehours A C, Rabiet M, et al. Ferric iron reduction by fermentative strain BS2 isolated from an iron-rich anoxic environment (Lake Pavin, France)[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2010, 27(8): 714-722.