

正交实验优选光合细菌混合菌群产氢的最佳条件

崔宝臣* 张国欣 侯博 邵姝媛

(大庆石油学院化学化工学院 黑龙江 大庆 163318)

摘要: 对光合细菌混合菌群产氢影响因子进行了实验研究。通过单因素实验和正交实验,系统考察了碳源、氮源、碳源浓度、氮源浓度、初始 pH 值、光照方式、接种量等因素对产氢量的影响,实验得出最佳工艺条件为:采用 3 号菌群,碳源为葡萄糖,碳源浓度为 3 g/L,氮源为尿素,氮源浓度为 9 g/L,接种量为 10%,pH 值为 8.5,光照方式为 12 h 光照-12 h 黑暗交替光照,培养温度为 30°C。菌种、碳源、碳源浓度、氮源是影响产氢量的重要因素。

关键词: 光合细菌,混合菌群,产氢,正交实验

Optimization of Hydrogen Production Conditions of Photosynthetic Bacteria Group by Orthogonal Test

CUI Bao-Chen* ZHANG Guo-Xin HOU Bo SHAO Shu-Yuan

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Daqing Petroleum Institute, Daqing, Heilongjiang 163318, China)

Abstract: The influence factors for hydrogen production using photosynthetic bacteria group were studied. The effects of carbon sources, nitrogen sources, carbon concentration, nitrogen concentration, initial pH value, illumination mode and inoculation amount on hydrogen production were investigated by experiment of single factor and orthogonal experiment. The optimum process conditions were as follows: the best bacteria group was number 3, the glucose was carbon source and concentration of carbon source was 3 g/L; the urea was nitrogen source and concentration of nitrogen source was 9 g/L; the inoculation amount was 10%; initial pH value was 8.5; the illumination mode was 12 h light and 12 h dark alternation; incubation temperature was 30°C. The main factors affecting hydrogen production were strain, carbon sources, carbon source concentration and nitrogen sources.

Keywords: Photosynthetic bacteria, Mixed bacteria group, Hydrogen production, Orthogonal test

氢气被誉为“世界上最干净的能源”,在新能源舞台上占有举足轻重的地位。生物制氢具有“环境友好”的特点,备受人类关注。在生物制氢中,光合细菌以其制造氢气同时降解有机污染物的优点,成为国内外制氢技术的一个重要研究方向。张全国等^[1]利用猪粪废水作为实验底物,对影响球形红假单胞

菌(*Rhodobacter sphaeroides*)1.1737 菌株的产氢因子进行了考察。刘双江等^[2]以红假单胞菌属(*Rhodospseudomonas*)H 菌株为实验对象,对影响放氢能力的底物成分进行了筛选。王永忠等^[3]着重考察了产氢培养基中不同金属离子和 C/N 值对纯化的沼泽红假单胞菌产氢能力的影响。Barbosa 等^[4]分别

基金项目:黑龙江省科学技术厅攻关项目(No. GZ08B205)

*通讯作者: Tel: 86-459-6503502; ✉: cuibaochen2005@163.com

收稿日期: 2009-09-15; 接受日期: 2009-10-16

考察了不同碳源和光照强度对 3 株纯种光合细菌产氢性能的影响。目前对于光合细菌混合菌群产氢性能的系统研究较少。本实验以光合细菌混合菌群为实验对象, 主要对不同的碳源、氮源、碳源浓度、氮源浓度、pH 值、光照交替、接种量等因素进行系统研究, 并利用正交实验设计得出最优产氢方案, 旨在为光合细菌产氢研究提供科学的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌种与培养基

1、2、3 号光合细菌混合菌群分别从城市污水处理活性污泥、炼油污水处理活性污泥和花园土壤中富集得到。

富集培养基: NH_4Cl 0.1 g, NaHCO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.02 g, CH_3COONa 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, NaCl 0.15 g, 生长因子 1 mL, 微量元素 1 mL, 蒸馏水 97 mL。

产氢培养基: 谷氨酸钠 ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na}$) 0.1 g, NaHCO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.02 g, CH_3COONa 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, NaCl 0.15 g, 生长因子 1 mL, 微量元素 1 mL, 蒸馏水 97 mL。

1.2 试剂与仪器

氯化铵、谷氨酸钠、葡萄糖、草酸铵等均为分析纯;

SP3420 型气相色谱仪; LRH-250 型生化培养箱; HWS26 型电热恒温水浴锅; PHS-25 型数显 pH 计。

1.3 实验方法

将光合细菌混合菌种以 10% 的接种量加入含有产氢培养基的血清瓶中, 在 50°C 水浴中加热 30 min, 驱赶瓶内空气, 密封。放入生化培养箱中, 用 100 W 白炽灯作为光源照射, 在 $30^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下厌氧培养 8 d 后, 抽取血清瓶内气体, 采用气相色谱仪测定氢气含量。

产氢量 = 血清瓶中气体体积 \times 氢气浓度 $\times 1000$ / 培养基体积, 单位: mL H_2 / (L-培养基);

最大产氢速率 = 最大产氢量 / (培养基体积 \cdot 培养时间), 单位: mL H_2 / (L-培养基 \cdot h)。

2 结果与讨论

2.1 影响产氢量的主要参数的确定

首先进行单因素实验, 分别考察碳源、氮源、碳源浓度、氮源浓度、pH 值、光照方式和接种量对产氢量的影响。从表 1 中可以看出当葡萄糖和草酸

铵分别作为碳氮源时产氢量最高。由图 1 得产氢量随葡萄糖浓度的增加而升高。图 2 中产氢量随谷氨酸钠浓度的增加先升高再降低至最低点, 最终升高达到最高点。初始 pH 值对产氢量的影响幅度较大, 从图 3 中可以看出该光合细菌混合菌群易在偏酸性或偏碱性的条件下产氢。Wakayama 等^[5]研究发现明暗交替方法有助于提高光能转化效率, 由图 4 可得光照时间间隔缩短有利于产氢量升高。接种量是影响细菌生长能否形成优势菌种的重要因素, 图 5 说明当接种量为 10% 时, 产氢量有显著提高, 但接种量再增大时氢气产量明显下降。

表 1 不同碳源、氮源对产氢的影响
Table 1 Effect of different carbon sources and nitrogen sources on hydrogen production

营养源 Nutrient sources	类别 Category	产 H_2 量 Hydrogen amount [mLH_2 /(L-culture)]	最大产氢速率 The highest hydrogen rate [mLH_2 /(L-culture-h)]
碳源 Carbon sources	乙酸钠	0.339	0.006
	葡萄糖	23.090	0.403
	柠檬酸三钠	1.756	0.039
	琥珀酸钠	0	0
	乳酸钠	2.889	0.081
	无水乙醇	0	0
	丙酸	0	0
	正丁酸	0.119	0.003
	正戊酸	0.259	0.006
	可溶性淀粉	0	0
氮源 Nitrogen sources	谷氨酸钠	0.323	0.009
	尿素	0.130	0.002
	硫酸铵	0.031	0.0007
	磷酸铵	0.057	0.001
	草酸铵	0.889	0.031

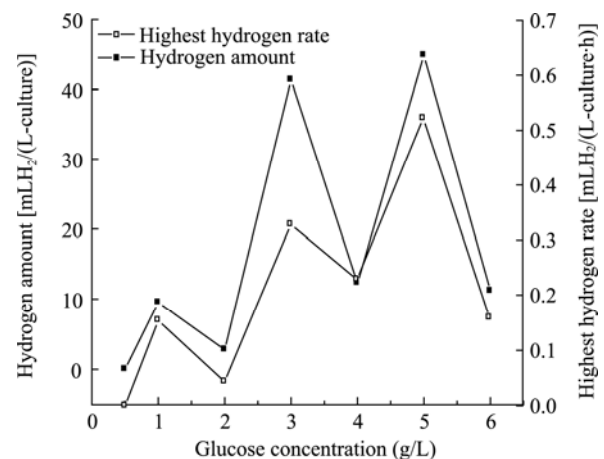


图 1 葡萄糖浓度对产氢影响

Fig. 1 Effect of glucose concentration on hydrogen production

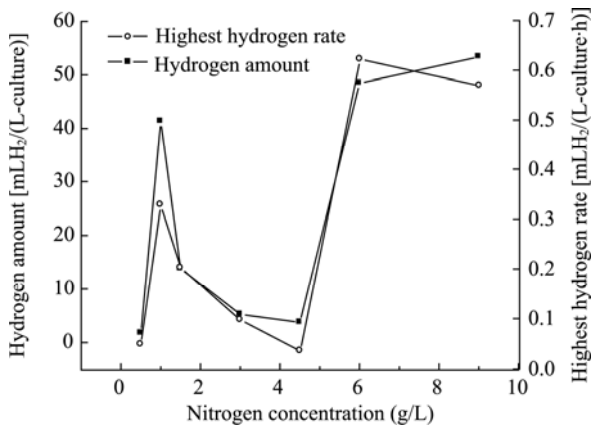


图2 谷氨酸钠浓度对产氢影响
Fig. 2 Effect of nitrogen concentration on hydrogen production

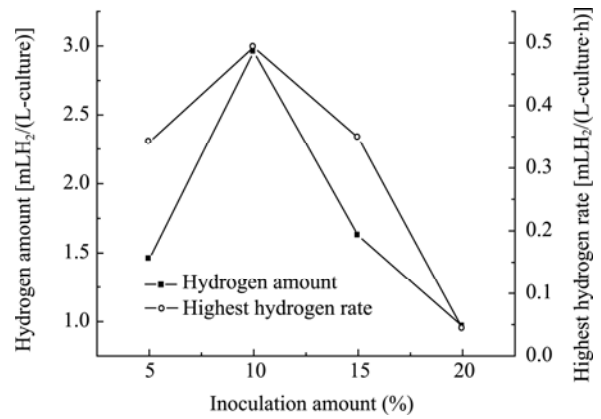


图5 接种量对产氢影响
Fig. 5 Effect of inoculation amount on hydrogen production

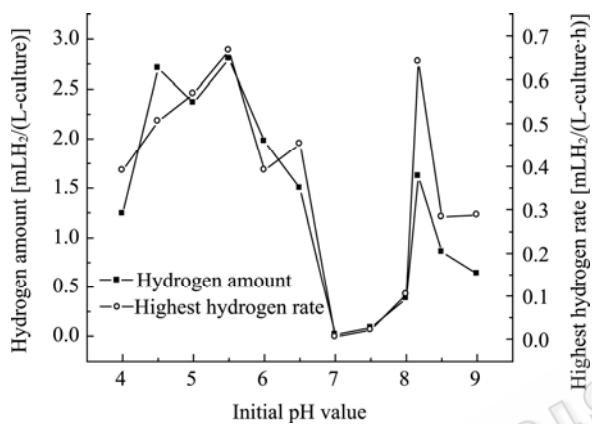


图3 不同初始 pH 值对产氢影响
Fig. 3 Effect of initial pH value on hydrogen production

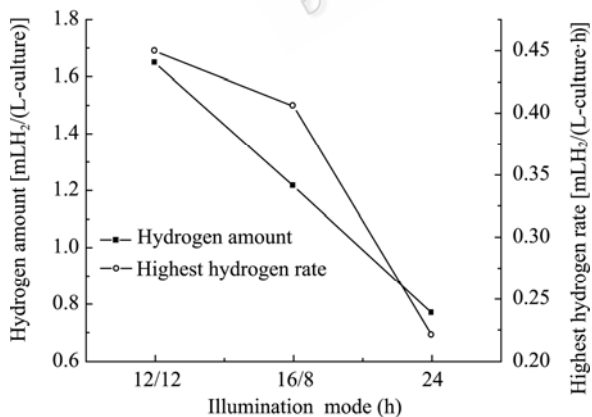


图4 光照方式对产氢影响
Fig. 4 Effect of illumination mode on hydrogen production
注: 12/12: 12 h 光照, 12 h 黑暗交替; 16/8: 16 h 光照, 8 h 黑暗交替; 24 h: 恒光照。
Note: 12/12: 12 h light, 12 h dark alternation; 16/8: 16 h light, 8 h dark alternation; 24h: Continuous illumination.

2.2 参数优化—正交实验结果

本文在单因素实验的基础上, 选定菌种、碳源、氮源、碳源浓度、氮源浓度、pH 值、光照方式、接种量、培养温度作为正交实验的 9 个因素, 每个因素选 3 个水平, 如表 2 所示。选用正交表 $L_{27}(3^{13})$ 进行 9 因素 3 水平的正交实验。

正交实验数据及其极差分析结果如表 3 所示, 表中极差为同一因素各水平的实验指标平均值中最大与最小之差, 其大小反映了因素水平的变化对实验指标的影响。根据各因素所对应的极差的大小, 可以得出各因素的影响依次为碳源 > 碳源浓度 > 氮源 > 菌种 > 氮源浓度 > 温度 > pH 值 > 光照方式 > 接种量。方差分析结果如表 4 所示, 当 P 值 < 0.05 时认为该因素对实验结果有显著影响, 因此菌种种类、碳源、碳源浓度、氮源对产氢量的影响是十分显著的, 接种量是最不显著影响, 这与极差分析的结果是一致的。

3 结论

1) 从花园土壤中分离出来的光合细菌混合菌群具有较好的产氢能力, 分别进行了碳源、氮源、碳源浓度、氮源浓度、初始 pH 值、光照方式、接种量单因素实验, 实验结果说明这些因子对于产氢量有较大影响作用。

2) 利用正交实验考察了 9 个因素对产氢量的影响大小, 利用极差和方差分析得出最佳工艺参数为: 3 号菌、碳源为葡萄糖、碳源浓度为 3 g/L、氮源为尿素、氮源浓度为 9 g/L、接种量为 10%、pH 值为

表 2 正交实验水平因素
Table 2 Levels and factors of orthogonal experiment

水 平 Levels	因素 Factors								
	A 菌种 Strains	B 碳源 Carbon sources	C 氮源 Nitrogen sources	D 碳浓度 Carbon con- centration (g/L)	E 氮浓度 Nitrogen con- centration (g/L)	F 接种量 Inoculation amount (%)	G 初始 pH 值 Initial pH value	H 光照方式 Illumination mode	I 培养温度 Incubation temperature (°C)
1	1 号	葡萄糖	谷氨酸钠	1	1	5	4.5	1*	25
2	2 号	乙酸钠	草酸铵	3	6	10	6.5	2*	30
3	3 号	乳酸钠	尿素	6	9	15	8.5	3*	35

注: 1*: 24 h 恒光照; 2*: 16 h 光照, 8 h 黑暗交替; 3*: 12 h 光照, 12 h 黑暗交替.

Note: 1*: 24 h continuous illumination; 2*: 16 h light, 8 h dark alternation; 3*: 12 h light, 12 h dark alternation.

表 3 $L_{27}(3^{13})$ 正交实验表与结果
Table 3 $L_{27}(3^{13})$ orthogonal experiment table and results

实 验 号 No.	因素 Factors										产氢量 Hydrogen amount [mLH ₂ /(L-culture)]			
	A	B	C	D	E	F	G	H	L	空列 Empty column	空列 Empty column	空列 Empty column	空列 Empty column	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7.43
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	6.99
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	11.2
4	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	0.0562
5	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	1	1	0.540
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2	0.339
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2	0.211
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3	0.143
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1	0.852
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	3.58
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1	0.0797
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	2	3	1	2	0.157
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	1	3	1	2	0.0916
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2	1	2	3	0.152
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	3	2	3	1	0.0522
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2	2	3	1	0.881
17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	3	1	2	0.461
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	2.59
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2	13.6
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	3	2	1	3	13.2
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	1	3	2	1	17.2
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	3	3	2	1	0.156
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	0.236
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	2	1	3	0.0208
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	1	2	1	3	0.111
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	2	3	2	1	0.743
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	3	1	2	3	0.0643
\bar{T}_1	3.08	8.15	3.32	2.98	2.90	2.74	2.86	2.93	2.50	3.14	3.23	2.54	3.10	—
\bar{T}_2	0.89	0.18	0.63	5.43	2.50	3.28	2.70	2.67	3.29	2.61	2.43	3.55	2.46	—
\bar{T}_3	5.03	0.67	5.05	0.60	3.61	2.99	3.45	3.41	3.22	3.27	3.36	2.92	3.45	—
R	4.14	7.97	4.42	4.83	1.11	0.54	0.75	0.74	0.79	0.66	0.93	1.01	0.99	—

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

表 4 方差分析
Table 4 Variance analysis

Source	SS	DF	MS	F	P
A	25.7382	2	12.8691	19.3116	0.0492
B	119.6496	2	59.8248	89.7739	0.0110
C	29.7654	2	14.8827	22.3332	0.0429
D	34.9526	2	17.4763	26.2251	0.0367
E	1.8962	2	0.9481	1.4227	0.4128
F	0.4382	2	0.2191	0.3288	0.7526
G	0.9362	2	0.4681	0.7024	0.5874
H	0.8456	2	0.4228	0.6345	0.6118
I	1.1474	2	0.5737	0.8609	0.5374
空列 Empty column	0.7334	2	0.3667	0.5503	--
空列 Empty column	1.5218	2	0.7609	1.1418	--
空列 Empty column	1.5614	2	0.7807	1.1715	--
空列 Empty column	1.5146	2	0.7573	1.1364	--
误差 Error	5.3312	8	0.6664	--	--

8.5、光照方式为 12 h 光照-12 h 黑暗交替光照、培养温度为 30°C。菌种、碳源、碳源浓度、氮源是影响产氢量的主要因素，其他各因素影响不大。

参 考 文 献

[1] 张全国, 范振山, 王艳锦, 等. 猪粪污水光合细菌制氢的影响因素. 化工学报, 2004, 55 (增刊): 85-89.

[2] 刘双江, 孙 燕, 杨惠芳, 等. 红假单胞菌 H 菌株生长细胞光照放氢条件的研究. 微生物学通报, 1994, 21(5): 259-262.





[3] 王永忠, 廖 强, 朱 恂, 等. 静态培养条件对光合细菌产氢行为的影响. 工程热物理学报, 2007, 28(增刊 2): 45-48.

[4] Barbosa MJ, Rocha JMS, Tramper J, et al. Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *Journal of Biotechnology*, 2001, 85(1): 25-33.

[5] Wakayama T, Nakada E, Asada Y, et al. Effect of light/dark cycle on bacterial hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* RV. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000, 1-9(84/86): 431-440.

征 订 启 事

2010 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>