

光合细菌产氢过程中氮源利用实验*

王毅 周雪花 张志萍 张全国

(河南农业大学农业部可再生能源新材料与装备重点实验室, 郑州 450002)

摘要: 对从活性污泥中筛选出的光合产氢混合菌群进行了光合产氢实验,研究了氮源对光合细菌生长和产氢过程的影响,分析了光合产氢过程中混合菌群对氮源的利用规律。结果表明:光合细菌生长过程中对氮源有很强的选择性,无机氮源尤其是铵盐类物质最易为光合细菌所利用,有机氮源次之;以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源,添加浓度为7 mmol/L时,菌体生长最为良好,在培养24~48 h内, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 利用速率最大,最大消耗速率为0.105 mmol/L。不同种类氮源对光合产氢混合菌群产氢的影响不很明显,利用有机氮源产氢效果好于无机氮源。光合细菌以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源,添加浓度为3.5 mmol/L时,菌体具有较强的产氢活性,光合产氢过程中氮源只在0~48 h内有少量消耗,菌体进入产氢高峰期后不再利用氮源。

关键词: 光合细菌 混合菌群 光合产氢 氮源 实验

中图分类号: TK6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2014)10-0194-06

引言

氢能由于其清洁、高效、可再生的特点,是一种最为理想的替代能源^[1-2]。利用光合细菌制氢,反应条件温和,能够利用工农业有机废水制氢,能将太阳能利用、氢能开发和有机废水净化处理相结合,是一种非常理想的低成本、低能耗的制氢方法^[3-5]。

光合细菌产氢主要是由固氮酶催化,氮源的种类及其浓度对光合细菌产氢有很大的影响。氮源对光合细菌产氢的影响主要体现在高浓度的氮源对产氢有较强的抑制作用,主要是由于高浓度的 NH_4^+ 对光合细菌的固氮酶的合成有较强的抑制作用,固氮酶缺失使得光合细菌的产氢受到严重抑制^[6-8]。此外, NH_4^+ 对光合磷酸化也有解偶联作用,影响光合细菌通过光合作用产生ATP,光合产氢过程中过量的 NH_4^+ 直接导致细胞内ATP水平的下降,光合产氢过程因能量缺失而使产氢受到抑制^[9]。 NH_4^+ 对固氮酶的抑制作用是可逆的,当 NH_4^+ 消耗完毕之后,固氮酶的活性就可以恢复,光合细菌则恢复产氢^[10]。国内外在固氮酶放氢机理及固氮酶活性影响因素方面已有一定的了解^[11-16]。氮源对光合细菌产氢的影响研究多集中于*Rs. Rubrum*、*Rhodospseudomonas capsulata*、*Rhodobacter sphaeroides*等光合细菌纯菌种的产氢研究,关于氮源对光合产

氢混合菌群生长和产氢的影响以及混合菌群产氢过程中氮源的利用还未见相关报道。本文研究氮源对光合产氢混合菌群生长和产氢的影响以及光合细菌产氢过程中氮源的代谢规律,以期初步揭示光合细菌产氢过程中氮源的利用规律,为光合细菌产氢过程中氮代谢的机理研究提供相关依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌种

采用河南农业大学农业部可再生能源新材料与装备重点实验室筛选培养的高效光合产氢菌群作为实验菌株。从郑州东郊新大牧业种猪场、郑州市污水处理厂、郑州市西刘湖、郑州市郊豆腐加工厂、河南农科院实验田、郑州市金水河等地在4个季节取得24个样品菌株,经过富集、分离培养,筛选出来的高效产氢优势菌种F1、F5、F7、F11、L6、S7和S9组成光合产氢混合菌群^[17]。

1.1.2 培养基

(1) 生长培养基(GM)

在本研究中,混合菌群生长所用培养基配方: NH_4Cl 0.1 g, NaHCO_3 0.2 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 0.2 g, 酵母膏 0.1 g, 蒸馏水 96 mL, 微量元素溶液 1 mL, 生长因

收稿日期: 2013-10-14 修回日期: 2013-11-28

* 国家自然科学基金资助项目(50976029)、国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2012AA051502)和高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20060466001)

作者简介: 王毅, 实验师, 主要从事可再生能源研究, E-mail: wangyi2543@126.com

通讯作者: 张全国, 教授, 博士生导师, 主要从事可再生能源研究, E-mail: zquanguo@163.com

子溶液 1 mL, pH 值为 7.0。其中, 生长碳源为 3.0 g/L CH_3COONa , 微量元素溶液为 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg、 H_3BO_4 1 mg、 $\text{CO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg, 溶解到 1 000 mL 蒸馏水中, 生长因子溶液为维生素 B_1 0.01 mg、尼克酸 1 mg、生物素 0.01 mg、对氨基苯甲酸 0.1 mg, 溶解到 100 mL 蒸馏水中^[18]。

(2) 产氢培养基(HM)

产氢培养基用谷氨酸钠代替基础培养基中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 其他成分与基础培养基相同^[19]。

1.2 实验方法

1.2.1 生长实验

培养容器采用 500 mL 玻璃瓶, 接种对数期种子液(菌体培养 40 h), 接种量为 20%。接种后用反口橡胶塞密封, 用一个长针头插入液面下方取样。光照厌氧培养在 30℃, 3 000 lx 条件下进行。实验周期为 7 d。

(1) 不同氮源对光合细菌生长的影响

选取等量 N_2 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、谷氨酰胺、蛋白胨、谷氨酸作为氮源, 考察不同氮源对光合细菌生长的影响。

(2) 不同铵盐浓度对光合细菌生长的影响

以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源, 分别设 0、3.5、7、10.5、14 mmol/L 5 个浓度, 研究不同铵盐浓度对光合细菌生长的影响。

1.2.2 产氢实验

培养容器采用 500 mL 玻璃瓶, 接种对数期种子液(菌体培养 40 h), 接种量为 20%。接种后用反口橡胶塞密封, 用一个长针头插入液面下方取样, 另外一个针头插入培养瓶上部气体空间用以收集产生的气体, 气体使用排水集气法收集, 定时记录产氢量。光照厌氧培养在 30℃, 3 000 lx 条件下进行。实验周期为 7 d。

(1) 不同氮源对光合细菌产氢的影响

选取等量 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、谷氨酰胺、蛋白胨、谷氨酸作为氮源, 考察不同氮源对光合细菌产氢的影响。

(2) 不同铵盐浓度对光合细菌产氢的影响

以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源, 设 0、3.5、7、10.5、14 mmol/L 5 个浓度, 研究不同氮源浓度对光合细菌产氢的影响。

1.2.3 检测方法

(1) OD 值的测定

收集对数期培养物, 经离心洗涤后悬浮于 60% 的蔗糖溶液中, 于 HP8453 型分光光度计上扫描, 扫描范围为波长 190~900 nm, 获得细胞的吸收光谱, 定

点记录培养液在波长 660 nm 处的吸光度(OD 值)^[20]。

(2) 细胞干质量测定

取 50 mL 洁净离心管置鼓风干燥箱于 105℃ 干燥 1 h, 冷却后称取质量 m_1 ; 加入样品 10 mL 后以 5 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液后再加入去离子水 20 mL 继续离心 10 min, 离心完成后将上清液除去后于干燥箱 105℃ 干燥 2 h, 冷却后称 m_2 , 细胞干质量为

$$m_{\text{CDW}} = \frac{m_2 - m_1}{30}$$

(3) 菌液 pH 值测定

培养液 pH 值采用瑞士 Delta320 型酸度计测定, 广州德润仪器科技有限公司生产, pH 值测量范围 0~14, 分辨率 0.01。

(4) 光照强度测定

采用广州骏凯电子科技有限公司生产的 TES-1335 型数字式照度计测定, 分辨率为 0.01 lx。

(5) 氢气含量测定

氢气含量测定采用 GC-14B 型气相色谱仪, 色谱柱填料为 5A 分子筛, 氮气作载气, 流量 45 mL/min, 采用 99.999% 的高纯氢气作标准气。色谱条件: 进样口温度 100℃, 柱温 80℃, TCD 检测器 150℃, 进样量 500 μL , 保留时间 2 min。产氢总量为 168 h 产氢量^[21]。

(6) NH_4^+ 的测定

离心样品, 收集上清液, 在室温下添加 NaOH 后, 插入 P-NH₃21 型电极, 搅拌 5 min 后读数。从标准曲线上查找相应 NH_4^+ 的浓度。

3 结果与分析

3.1 光合细菌生长过程中对氮源的利用

光合细菌是一类古老的固氮菌类, 可利用广泛氮源进行生长, 既能利用无机氮源也可利用有机氮源, 也可以通过固氮作用, 将空气中的氮气固定进行生长, 但光合细菌对不同类型的氮源的利用效率有很大不同, 不同菌种对同一氮源的利用也有很大不同, 光合细菌生长过程中对氮源有很强的选择性^[22]。

3.1.1 不同氮源对光合细菌生长的影响

选取氮气、硫酸铵、硝酸钠、谷氨酰胺、蛋白胨几种物质作为氮源, 考察不同氮源对光合细菌生长的影响, 结果如表 1 所示。

表 1 不同氮源对光合细菌生长的影响

Tab.1 Effect of different nitrogen source on growth of photo-bacteria

氮源	氮气	硝酸钠	硫酸铵	蛋白胨	谷氨酰胺
OD 值	0.63	1.94	3.71	2.72	2.84

从表1可以看出,铵盐和硝酸盐条件下,光合细菌的生长情况明显好于其他氮源,以铵盐作为氮源时,光合细菌的生长情况最为良好,培养120 h后,菌体OD值达到3.71。这是因为生物对氮源的利用形式为 NH_4^+ ,铵盐不需进行转换就可以直接为光合细菌所利用,而硝酸盐、谷氨酸等氮源,菌体不能直接利用,需要转化为 NH_4^+ ,才能为细胞所利用,所以铵盐类物质为光合细菌的最佳生长氮源。相对于其他氮源,光合细菌在 N_2 条件下生长最为缓慢,这是因为光合细菌的固氮效率要比生长速率慢得多,氮源的缺乏导致生长速率较慢。

总体上看,光合细菌生长过程中对氮源有很强的选择性,无机氮源最有利于光合细菌的生长,尤其是铵盐类物质最易为光合细菌所利用,有机氮源次之, N_2 条件下菌体生长则最为缓慢。

3.1.2 不同铵盐浓度对光合细菌生长的影响

以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源,设0、3.5、7、10.5、14 mmol/L 5个浓度,研究不同氮源浓度对光合细菌生长的影响,如图1所示。

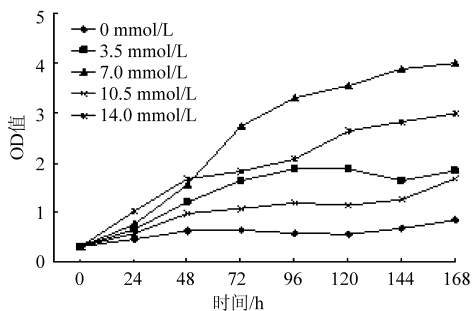


图1 不同氮源浓度对光合细菌生长的影响

Fig.1 Effect of nitrogen concentration on hydrogen production

图1表明,氮源的添加浓度对光合细菌的生长有很大影响, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为0 mmol/L时,菌体几乎没有出现生长现象,说明氮源是光合细菌生长的必须物质,氮源的缺乏会引起菌体生长的停止, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为0 mmol/L时菌体出现少量的生长,可能是由于接种时带入少量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 所引起的; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为0~10.5 mmol/L时,在菌体生长初期,菌体生长随着氮源浓度的升高而升高,但当菌体进入对数生长期时,10.5 mmol/L的浓度对菌体的生长产生较强的抑制作用,表现为菌体培养48 h后生长放慢,生长速率下降; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为3.5~7 mmol/L时,菌体生长情况较为良好,氮源添加浓度为7 mmol/L时,菌体生长最为良好。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加浓度超过10.5 mmol/L时,氮源浓度对菌体的生长产生较强的抑制作用,菌体几乎没有出现生长,氮源对细胞的抑制作用主要是由于过

高的浓度会引起细胞渗透压过大,导致细胞破裂死亡。

3.1.3 光合细菌生长过程中对氮源的利用

以7 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为光合细菌的唯一氮源,研究光合细菌生长过程中对氮源的利用规律,如图2所示。

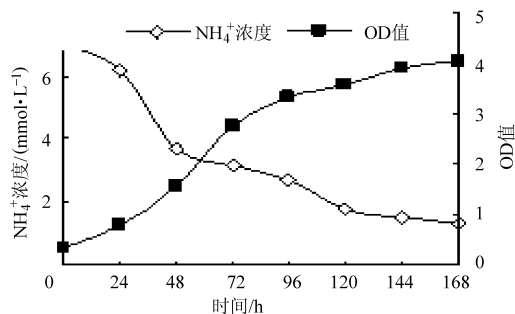


图2 光合细菌生长过程中氮源的利用

Fig.2 Usage of nitrogen in process of growth

从图2可以看出,光合细菌生长条件下以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时,0~24 h菌体对氮源的利用较少,该阶段菌体处于生长延滞期。24~120 h随着菌体进入对数生长期,氮源利用速率也迅速上升,尤其是24~48 h时间内, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的消耗速率最大,达到0.105 mmol/h。120 h后,随着氮源的逐渐消耗,氮源浓度不能满足光合细菌快速生长的需要,菌体生长受到抑制,生长速率开始下降,菌体生长进入稳定期。

3.2 光合细菌产氢过程中对氮源的利用

光合细菌产氢主要是由固氮酶催化的,氮源的种类及氮源的浓度对光合细菌产氢有很大的影响。当培养环境中存在 N_2 或 NH_4^+ 时, NH_4^+ 会抑制固氮酶的产氢活性,使光合细菌产氢能力下降或完全停止,研究发现,不同的氮源种类及不同的氮源浓度对光合细菌的产氢均有显著影响,氮源对光合细菌产氢活性的影响主要表现为光固氮酶活性的影响,尤其是培养液中的C/N是光合细菌固氮酶活性的决定因素,也是影响光合细菌产氢的最重要的一个因素^[23]。

3.2.1 不同氮源对光合细菌产氢的影响

氮源对光合细菌产氢的影响,主要是因为 NH_4^+ 对固氮酶有较强抑制作用,光合细菌的固氮酶活性在加入铵盐几分钟后就完全抑制, NH_4^+ 消耗完毕后固氮酶既可恢复产氢活性。不同菌种光合细菌产氢过程中对不同氮源的利用能力是不同的,有机氮源由于菌体要进一步分解为 NH_4^+ 才能进行利用,所以对固氮酶抑制作用较弱,而无机氮源则能够直接为菌体利用对固氮酶有较强的抑制作用。因此,各文献光合细菌产氢过程中一般以有机氮谷氨酰胺作为氮源,但混合菌群由于存在代谢上的协调效应,对氮

源利用与纯菌种有很大不同, 选取 7 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、谷氨酰胺、蛋白胨几种物质作为氮源, 研究不同氮源对光合细菌产氢的影响, 结果如表 2 所示。

表 2 不同氮源对光合细菌产氢的影响

Tab.2 Effect of different nitrogen source on hydrogen production

氮源	硫酸铵	硝酸钠	谷氨酰胺	蛋白胨
产氢量/mL	410	362	438	272

表 2 表明, 不同氮源对光合细菌混合菌群产氢的影响以谷氨酸钠为氮源时的产氢量最高, 达到 438 mL。而以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时产氢量也达到 410 mL。4 种氮源物质中蛋白胨的产氢量最少。可以看出不同氮源对光合产氢混合菌群产氢的影响并不是很明显, 无机氮源对光合细菌产氢并没有表现出抑制作用, 这可能是因为混合菌种间存在协调效应, 能够有效消除无机氮对产氢活性的抑制, 也可能是因为氮源添加浓度较低, 还没有达到对固氮酶的抑制水平所引起。已有的研究表明, 氮源并不对光合细菌的产氢活性有决定性的抑制作用, 培养液中 C/N 才是决定光合细菌固氮酶产氢活性的决定因素, 无机氮源对混合菌群产氢并没有表现出抑制作用, 也可能与培养液中 C/N 有关, 其原因还需要进一步研究。

3.2.2 不同氮源浓度对光合细菌产氢的影响

设 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度分别为 0、3.5、7、10.5 和 14 mmol/L, 乙酸钠浓度为 30 mmol/L, 研究不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对光合细菌产氢的影响, 如图 3 所示。

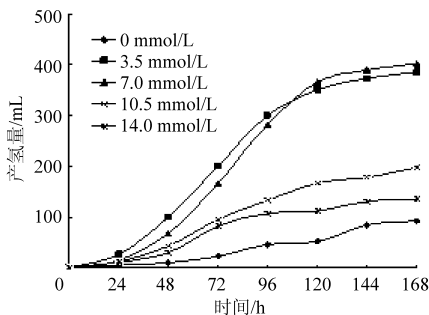


图 3 不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对光合细菌产氢的影响

Fig.3 Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on hydrogen production

由图 3 可以看出, 培养基中不添加氮源时, 菌体几乎没有产氢现象的出现, 说明氮源是光合细菌产氢的必须物质, 没有氮源条件, 菌体生长受到抑制, 固氮酶也不能有效合成, 而固氮酶是光合细菌产氢的必须条件, 因此菌体不具有产氢活性。此外, 氮源

在光合细菌产氢过程中可能也起到代谢的协调效应, 因此培养基中缺失氮源时, 菌体代谢受到抑制, 其产氢活性也受到明显抑制。3.5 ~ 7 mmol/L 范围内的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为产氢适宜浓度, 尤其是氮源浓度为 3.5 mmol/L 时, 产氢延滞期较短, 菌体具有较强的产氢活性。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 7 mmol/L 时, 较 3.5 mmol/L 的添加量虽然产氢延滞期有所延长, 但对菌体的产氢量并没有很大的影响。而当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度超过 7 mmol/L 时, 菌体的产氢活性则受到了明显的抑制, 产氢量明显下降。可能是由于产氢体系提高中出现了游离 NH_4^+ , NH_4^+ 的出现会抑制固氮酶活性, 使依赖于固氮酶的光放氢作用受到抑制, 表现为产氢量和产氢活性的下降。

3.2.3 光合细菌产氢过程中对氮源的利用

光合细菌产氢是在厌氧条件下, 由固氮酶催化的, 固氮酶的产氢活性又受到 NH_4^+ 的严格抑制。一般认为氮源在光合细菌产氢过程中的作用为提供菌体生长所需的氮素以合成产氢所必须的固氮酶, 一旦固氮酶开始产氢后, 过量氮源的存在对产氢活性有较强的抑制作用, 因此, 氮源只在光合细菌生长过程中必须, 而产氢过程中则需要严格控制氮源的浓度。选择 3.5 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源, 以 40 mmol/L 乙酸钠为碳源, 研究光合细菌产氢过程中对氮源的利用, 结果如图 4 所示。

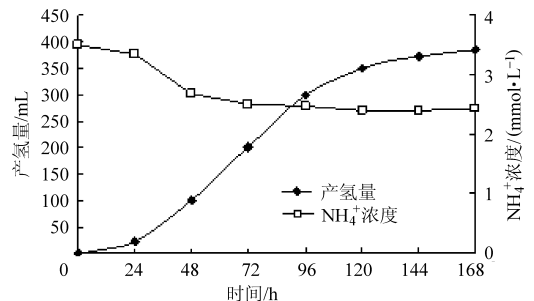


图 4 光合细菌生长过程中对氮源的利用

Fig.4 Usage of nitrogen in the process of hydrogen production

氮源在光合细菌产氢过程中除了提供菌体生长所需的氮素, 合成固氮酶所必须外, 可能也会参与细胞的产氢代谢。图 4 表明, 光合细菌产氢过程中氮源的消耗较少, 只在 0 ~ 48 h 内有所消耗, 最大消耗速率仅为 0.028 mmol/L, 这一阶段菌体处于产氢延滞期, 菌体主要是适应产氢环境, 进行生长, 一旦菌体进入产氢高峰期后, 细胞停止生长, 菌体则不再利用氮源, 说明氮源在光合产氢过程中并不参与细胞的产氢, 氮源是否参与细胞的其他能量代谢过程还不得而知。一方面是由于菌体进入产氢高峰后, 菌体的能量代谢途径发生改变, 菌体不再利用氮源生

长,另一方面,氮源对固氮酶产氢活性由强抑制作用,菌体开始产氢后,不再进行氮源的代谢,才能保证产氢的顺利进行。氮源在光合细菌产氢过程中的详细作用,还有待于进一步研究。

光合细菌产氢过程中,对氮源利用较少,说明氮源并不是决定细胞产氢的决定性因素,但是氮源对光合细菌产氢的影响,不仅仅体现在对产氢酶活性的抑制作用上,产氢条件下,如果培养基中不添加氮源,菌体则不产氢,一方面可能是由于氮源能够促进固氮酶的合成,氮源浓度低,固氮酶的活性也会受到抑制,另一方面,氮源在产氢过程中除了影响菌体的代谢途径,可能也会参与细胞的产氢代谢,其内在原因还有待于进一步研究。

4 结 论

(1)光合细菌生长过程中对氮源有很强的选择性,无机氮源尤其是铵盐类物质最易为光合细菌所

利用,有机氮源次之, N_2 条件下菌体生长则最为缓慢。以 $(NH_4)_2SO_4$ 为氮源,添加浓度为7 mmol/L时,菌体生长最为良好。

(2)光合细菌以 $(NH_4)_2SO_4$ 为氮源生长时,0~24 h内菌体对氮源的利用较少,该阶段菌体处于生长延滞期。24~120 h内随着菌体进入对数生长期,氮源利用速率迅速上升,尤其是24~48 h期间, $(NH_4)_2SO_4$ 利用速率最大,最大消耗速率为0.105 mmol/L。120 h后, $(NH_4)_2SO_4$ 基本消耗完毕,菌体进入稳定期。

(3)不同种类氮源对光合产氢混合菌群产氢的影响不很明显,有机氮源条件下菌体的产氢效果好于无机氮源。光合细菌以 $(NH_4)_2SO_4$ 为氮源产氢时, $(NH_4)_2SO_4$ 添加浓度为3.5 mmol/L时,菌体具有较强的产氢活性。光合细菌产氢过程中氮源只在0~48 h内有少量消耗,菌体进入产氢高峰期后不再利用氮源。

参 考 文 献

- 1 Sandy Falka, Hubertus Brunnb, Christa Schröter-Kermanic, et al. Temporal and spatial trends of perfluoroalkyl substances in liver of roe deer (*Capreolus capreolus*) [J]. Environmental Pollution, 2012, 171: 1-8.
- 2 王北星. 美国的能源战略及其启示[J]. 中外能源, 2010, 15(6): 12-17.
Wang Beixing. US energy strategy and enlightenment [J]. Sino-Global Energy, 2010, 15(6): 12-17. (in Chinese)
- 3 毛宗强. 氢能——21世纪的绿色能源[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- 4 Nitai B, Debabrata D. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(1): 31-42.
- 5 张全国, 王毅. 光合细菌生物制氢技术研究进展[J]. 农业机械学报, 2013, 44(6): 156-161.
Zhang Quanguo, Wang Yi. Progress in study of the hydrogen production technology by photosynthetic bacteria [J]. Transaction of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(6): 156-161. (in Chinese)
- 6 尤崇灼, 姜通明, 宋鸿遇. 生物固氮[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- 7 Eui-Jin Kim, Ju-Sim Kim, Mi-Sun Kim, et al. Effect of changes in the level of light harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides* on the photoheterotrophic production of hydrogen [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31(4): 531-538.
- 8 Scolnik P A, Virosco J, Haselkorn R. The wild-type gene for glutamine synthetase restores ammonia control of nitrogen fixation to Gln- (glnA) mutants of *Rhodospseudomonas capsulata* [J]. Journal of Bacteriol, 1983, 155(1): 180-185.
- 9 Zhu H, Ueda S, Asada Y, et al. Hydrogen production as a novel process of wastewater treatment—studies on tofu wastewater with entrapped *R. sphaeroides* and mutagenesis [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2002, 27(11-12): 1394-1357.
- 10 Klug G, Jock S, Rothfuchs R. The rate of decay in *Rhodobacter capsulatus-specific* puf mRNA segments is differentially affected by RNase E activity in *Escherichia coli* [J]. Gene, 1992, 121(1-2): 95-102.
- 11 Postgate J R. The fundamentals of nitrogen fixation [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1982.
- 12 王友绍, 李季伦. 固氮酶催化机制及化学模拟生物固氮研究进展[J]. 自然科学进展, 2000, 10(6): 481-490.
- 13 Madden M S, Paustian T D, Ludden P W, et al. Effects of homocitrate, homocitrate lactone, and fluorohomocitrate on nitrogenase in NifV- mutants of *Azotobacter vinelandii* [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(17): 5403-5405.
- 14 Scolnik P A, Virosco J, Haselkorn R. The wild-type gene for glutamine synthetase restores ammonia control of nitrogen fixation to Gln- (glnA) mutants of *Rhodospseudomonas capsulata* [J]. Journal of Bacteriology, 1983, 155(1): 180-185.
- 15 师玉忠, 张全国, 张君合. 猪粪污水中 NH_4^+ 与产氢光合细菌的相关关系研究 [J]. 武汉理工大学学报, 2006, 28(增刊1): 264-267.
Shi Yuzhong, Zhang Quanguo, Zhang Junhe. Correlativity of NH_4^+ in pig dejecta wastewater and photosynthetic bacteria of hydrogen production [J]. Journal of Wuhan University of Technology, 2006, 28(Supp. 1): 264-267. (in Chinese)
- 16 Tadashi Matsunaga, Tomoyuki Hatano, Akiyo Yamada. Microaerobic hydrogen production by photosynthetic bacteria in a double-phase photobioreactor [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 68(6): 20-24.
- 17 师玉忠. 光合细菌连续制氢工艺及相关机理研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2008.

- Shi Yuzhong. The technology and relative mechanical of continuous process for hydrogen production by photosynthetic bacteria[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- 18 康铸慧. 光合细菌生物产氢实验研究[D]. 上海: 同济大学, 2006.
Kang Zhuhui. Research on bio-hydrogen production by photosynthetic bacteria[D]. Shanghai: Tongji University, 2006. (in Chinese)
- 19 杨素萍, 赵春贵, 李建波, 等. 高效选育产氢光合细菌的研究[J]. 山东大学学报: 理学版, 2002, 37(4): 353 - 358.
Yang Suping, Zhao Chungui, Li Jianbo, et al. High effective screening of hydrogen-producing photosynthetic bacteria[J]. Journal of Shandong University: Natural Science, 2002, 37(4): 353 - 358. (in Chinese)
- 20 荆艳艳, 周雪花, 李遂亮, 等. 光合细菌产氢系统产热速率影响因素的研究[J]. 农业工程学报, 2009, 25(3): 184 - 188.
Jing Yanyan, Zhou Xuehua, Li Suiliang, et al. Influencing factors for the heat production rate of photosynthetic bacteria in hydrogen production system[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2009, 25(3): 184 - 188. (in Chinese)
- 21 师玉忠, 张全国, 王毅, 等. 生物质制氢的光合细菌连续培养技术实验研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(6): 218 - 221.
Shi Yuzhong, Zhang Quanguo, Wang Yi, et al. Experimental study on continuous culture of photosynthetic bacteria for hydrogen production from biomass[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2008, 24(6): 218 - 221. (in Chinese)
- 22 崔宝臣, 张国欣, 侯博, 等. 碳氮源对光合细菌混合菌群产氢性能的影响[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(12): 5 - 8.
Cui Baochen, Zhang Guoxin, Hou Bo, et al. Effect of carbon and nitrogen source on properties of hydrogen production with photosynthetic bacteria group[J]. Environmental Science and Technology, 2010, 33(12): 5 - 8. (in Chinese)
- 23 张全国, 王毅. 光合细菌生物制氢技术研究进展[J]. 农业机械学报, 2013, 44(6): 156 - 161.
Zhang Quanguo, Wang Yi. Research progress of hydrogen production technology with photosynthetic bacteria[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(6): 156 - 161. (in Chinese)

Nitrogen Source Utilization of Photosynthetic Bacteria in Process of Hydrogen Production

Wang Yi Zhou Xuehua Zhang Zhiping Zhang Quanguo

(Key Laboratory of New Materials and Facilities for Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture,
Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The mixed culture of photosynthetic bacterial was screened from activated sludge to carry out the experiment of hydrogen production. The effect of different nitrogen sources on the growth and hydrogen production of photosynthetic bacteria was studied, and the utilization pattern of nitrogen source in the process of hydrogen production by photosynthetic bacterial was also analysed. The results showed that: the photosynthetic bacteria had a significant selectivity in the process of growth to utilize nitrogen source. Inorganic nitrogen sources, especially ammonium salts was the most vulnerable to be used by photosynthetic bacteria, and organic nitrogen sources followed. Using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as nitrogen source for growth, the best added concentration was obtained, which was 7 mmol/L. The maximum utilization appeared in 24 ~ 48 h of cultivated time, and the top consumption rate was 0.105 mmol/L. The impact of different nitrogen type on photosynthetic hydrogen production was not significant and the organic nitrogen was slightly better than inorganic nitrogen. When photosynthetic bacteria utilized $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as nitrogen source for hydrogen production and the added concentration was set as 3.5 mmol/L, the photosynthetic bacteria showed better activity of hydrogen production. The nitrogen source was only consumed during 0 ~ 48 h in the process of hydrogen production, and the cell no longer utilized the nitrogen source once the cell went into the period of hydrogen-producing peak.

Key words: Photosynthetic bacterial Mixed culture Photosynthetic hydrogen production Nitrogen source Experiment