

宋佳秀,任南琪,张永明,等. 2010 产氢反应器内两种发酵类型细菌的种群结构与发酵特征 [J]. 环境科学学报, 30(2): 321– 326
Song JX, Ren N Q, Zhang Y M, *et al.* 2010. Microbial community group characteristics for two types of fermentative hydrogen-production in a hydrogen producing reactor [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 30(2): 321– 326

产氢反应器内两种发酵类型细菌的种群结构与发酵特征

宋佳秀^{1*}, 任南琪², 张永明¹, 陈瑛²

1 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234
2 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090

收稿日期: 2009-05-03 修回日期: 2009-09-02 录用日期: 2009-11-20

摘要: 通过改变 CSTR 系统内 pH 值, 启动发酵类型由乙醇型向丁酸型转化, 研究了转化前后系统内产氢动态和细菌群落变迁. 结果表明, 在有机负荷不变的情况下, 启动发酵类型转化 15d 后, 系统内种群由乙醇型转化为丁酸型, 消耗碱度量由 350mg L⁻¹ 增至 1720mg L⁻¹, 平均比产氢速率由 21.2mol kg⁻¹ d⁻¹ 降低至 11.1mol kg⁻¹ d⁻¹. 荧光原位杂交技术 (FISH) 对反应系统内 3 类微生物群的监测结果表明, 未启动转化时, 肠杆菌、梭菌 I、II 和梭菌 XI 的相对丰度分别为 22%、48% 和 30%, 转化结束后, 3 类细菌的相对丰度为 19%、24% 和 53%.

关键词: 发酵; 产氢; 细菌; 荧光原位杂交

文章编号: 0253-2468(2010)02-321-06 中图分类号: X172 文献标识码: A

Microbial community group characteristics for two types of fermentative hydrogen-production in a hydrogen producing reactor

SONG Jiaxiu^{1*}, REN Nanqi², ZHANG Yongming¹, CHEN Ying²

1 College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234
2 School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090

Received 3 May 2009 received in revised form 2 September 2009; accepted 20 November 2009

Abstract The hydrogen-producing system and the bacterial community in a continuous stirred-tank reactor (CSTR) were studied before and after converting the process from ethanol-type fermentation to butyric acid-type by changing the pH. The results showed that the type of fermentation system transformed after 15 d from ethanol into acid-based type with organic loading unchanged. Alkalinity consumption increased from 350 mg L⁻¹ to 1720 mg L⁻¹ and the average hydrogen production rate changed from 21.2 mol kg⁻¹ d⁻¹ to 11.1 mol kg⁻¹ d⁻¹. Three types of microorganisms were detected in the reactor by fluorescence in situ hybridization (FISH). Before the process, the relative abundances of Enterobacter, Clostridium cluster I, II and Clostridium cluster XI were 22%, 48% and 30% compared with 19%, 24% and 53% after transformation, respectively.

Keywords fermentation; hydrogen production; bacteria; fluorescent in situ hybridization (FISH)

1 引言 (Introduction)

发酵法生物制氢是以细菌性发酵理论为基础的制氢技术 (Xiao *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2008), 其反应条件温和、底物廉价易获得, 兼具废物利用、节省能耗和净化环境等多重优

点, 因此受到研究者的重视.

在发酵产氢系统内, 存在由不同种类细菌优势种群决定的多种发酵类型, 当反应器的控制条件发生变化时, 将引起微生物群落大幅度变迁, 直接影响生物制氢反应器的产氢能力 (任南琪等, 2003). 以往对种群的研究多依靠大量的细菌分离培养的

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 50808049); 上海师范大学一般科研项目基金 (No. DKL842); 上海师范大学重点学科资助项目基金 (No. DZL711)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 50808049), the General Scientific Project of Shanghai Normal University (No. DKL842) and the Leading Academic Discipline Project of Shanghai Normal University (No. DZL711)
作者简介: 宋佳秀 (1979—), 女, 讲师 (博士); * 通讯作者 (责任作者), E-mail: songjiaxiu@shnu.edu.cn
Biography: Song Jiaxiu (1979—), female, lecturer (Ph.D.); * Corresponding author E-mail: songjiaxiu@shnu.edu.cn
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

鉴定工作(林明, 2002; 秦智等, 2007), 存在局限性(Amann *et al.*, 1995). 而 FISH 技术具有灵敏、快速、使用安全、特异性好等特点, 被用于分析复杂环境的微生物群落结构(Zeng *et al.*, 2003; Oehmen *et al.*, 2005; Oehmen *et al.*, 2006), 可监测和量化微生物群落结构动态, 为人工创建生物处理系统的最佳工况条件提供理论依据(Delong *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1996).

以往的研究结果显示, 丁酸型发酵和乙醇型发酵均可达到可观的氢气产量(Amann *et al.*, 1996; Snair *et al.*, 1997; Vatsala *et al.*, 2008), 因此, 成为制氢研究的重点(Ren *et al.*, 1997; Harklia *et al.*, 2006). 本研究将 CSTR 系统内 pH 由 4.2 一次性提高至 6.0 左右, 启动发酵类型由乙醇型向丁酸型转化, 考察转化前后系统内的产氢发酵特性, 同时应用荧光原位杂交技术(FISH)检测种群数量. 本研究从微生物生态学的角度分析比较了两种发酵类型的产氢特征, 拓展和深化了相同领域的研究, 以为制氢反应器的选择和调控提供微生物生态学依据.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 实验装置与运行

2.1.1 实验装置 反应器为连续流搅拌槽式反应器(CSTR)(任南琪等, 1994), 有效容积 6L, 连续搅拌, 搅拌速度 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 控制操作温度在 $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$, 连续恒定泵入底物.

2.1.2 运行 实验所用底物为葡萄糖, 添加适量 N、P 营养物, 使 COD:N:P = 1000:5:1(质量比), 补充微量元素及维生素. 进水 COD 为 $5000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 停留时间(HRT)为 4h. 种子污泥取自城市污水处理厂二沉池. 反应器启动 1 个月后形成乙醇型发酵, 稳定运行 3 个月后, 调节进水碱度, 将反应器内 pH 值从乙醇型发酵最适的 4.0~4.5 提高为丁酸型发酵最适的 5.5~6.5 启动转化过程. 15d 后, 形成稳定的丁酸型发酵. 在转化过程中每隔 2d 取活性污泥进行 FISH 监测.

2.2 监测方法

2.2.1 常规监测 挥发酸种类和数量、产气速率、氢气百分含量等检测方法参照文献(许丽英, 2006); pH 值采用 pH 探头通过单片机连接计算机在线检测; 碱度、VSS 等按国家标准方法测定(国家环保局, 1997).

2.2.2 FISH 监测 研究结果表明, 大多数产氢发酵细菌属于梭菌属(*Clostridium*)和肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*). 通过查询 probeBase 寡核苷酸数据库, 获得了它们的专一性探针以及与其他发酵菌专一性杂交的探针的寡核苷酸序列, 分别为: Chis150, 专一杂交 *Clostridium* cluster I 和 II (序列为 5'-TET-TTATGCGGTATTAATCTYCCITT-3'); Clit135, 专一杂交 *Clostridium* cluster XI (序列为 5'-FIRC-GTTATCCGTGTGTACAGGG-3'). 另选择探针 ENT183 (序列为 5'-ROX-CTCTTTGGTCTTGCGACG-3'), 专一杂交 *Enterobacteriaceae*. 探针的合成与荧光素标记均由 Invitrogen 公司完成, 置于 -20°C 下避光保存. 使用前用超纯水将探针稀释到 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分装备用.

实验操作如下: ① 取样: 取反应器中的活性污泥, 用灭菌玻璃珠振荡打碎, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2min, 将上清液 $5000 \sim 8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2min, 弃上清液, 再用 PBS 将收集到的细菌冲洗 1 次. ② 固定: 用 4% 多聚甲醛溶液固定, 4°C 过夜. 杂交实验前, 用 PBS 液清洗, 离心收集. ③ 预处理: 用蛋白酶 K, 37°C 消化 30min, 减少蛋白质对杂交的影响. 再用溶菌酶处理 10min, 以增加细胞的通透性. 最后用梯度酒精(50%、80%、95%、100%)依次脱水. ④ 杂交: 探针在杂交前加入杂交液中 ($0.9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Cl, 0.1% ~ 1% SDS, 5% ~ 5.5% 甲酰胺), 使其终浓度为 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. 杂交在载玻片上进行, 取经过预处理的样品 10 μL 涂于载片, 充分干燥后, 加 20 μL 杂交液, 置于密闭湿盒, 46°C 杂交炉中避光杂交 2~4h. ⑤ 洗脱: 杂交完成后, 用 SET 洗脱液, 46°C 将多余的探针除去. ⑥ 双杂交: 洗脱后, 在新的杂交液中再加入另一种 16S rRNA 探针溶液, 按上述步骤杂交.

结果分析: 全部操作完成后, 加少量对苯二胺-甘油溶液覆盖样品, 防止荧光淬灭, 再封片. 结果用 Zeiss LSM 共聚焦显微镜观察、照相, 利用 Zeiss LSM Image Browser 软件进行结果分析. 通过观察照片和计算荧光面积, 可以获得目标菌群的相对数量和空间分布情况.

3 结果 (Results)

3.1 发酵特征

CSTR 系统发酵产物检测结果如图 1 所示. 启动转化前, 系统内发酵产物以乙醇、乙酸为主, 平均产

量为 $1210 \pm 82 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均比产氢速率为 $21.2 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. 启动转化初期各种产物产量均明显增多, 尽管在此期间发酵产物比例发生了变化, 乙酸、丙酸和丁酸等物质增多, 但仍呈典型的乙醇型发酵. 8d后产氢速率开始降低, 至第 11d 乙醇型发酵种群被以丙酸杆菌为主的丙酸型发酵菌群代替, 主要代谢产物为丙酸和乙酸, 而此时, 基本无氢气产出. 至第 14d 系统内又呈混合酸发酵特征, 产氢速率则呈上升趋势. 在转化中期, 各发酵产物变化剧烈, 系统处在极不稳定状态. 至第 15d 反应器内开始呈现典型的丁酸型发酵, 这是因为在 pH 值为 5.5~6.5 时, 丁酸型发酵细菌具有较强的竞争力

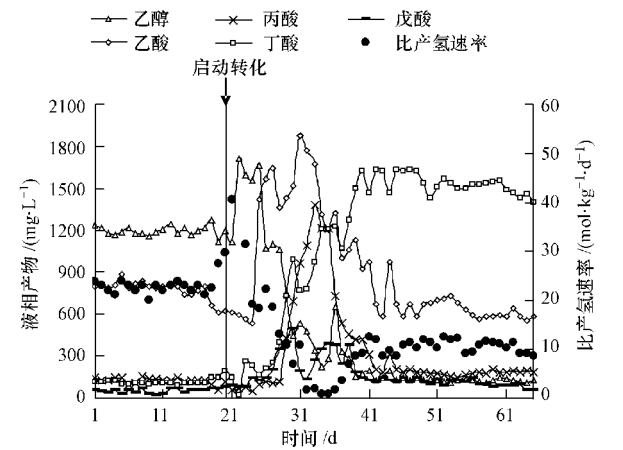


图 1 转化期间 CSTR 系统内发酵产物

Fig 1 Fementation products in the CSTR during the transform ation process

(Jaime *et al*, 2008; Xiao *et al*, 2006), 最终取代了其他种群成为优势种群. 其主要液相产物为丁酸和乙酸, 平均产量分别为 1594 和 $735 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 并逐渐趋于稳定, 标志着转化结束. 此时相应的产氢速率也开始回升并趋于稳定, 平均为 $11.1 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. 转化前后系统内挥发酸产量如表 1 所示, 转化前系统呈现乙醇型发酵, 转化后呈现丁酸型发酵.

表 1 转化前后挥发酸产量变化					
Table 1 Volatile acids production before and after transformation					
	mg L ⁻¹				
时间	乙醇	乙酸	丙酸	丁酸	戊酸
转化前	1115.2	799.5	126.4	110.4	55.7
转化后	144.1	585.3	181.5	1628.1	141.9

反应器各项参数变化如表 2 所示. 未启动转化时系统内 VSS 平均为 $4.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 转化结束后 VSS 平均为 $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 可见, 细菌数量与产氢量未成正比关系. 转化前, 需在进水投加少量碱 (NaOH) 维持系统内 pH 值使发酵稳定, 平均消耗掉的碱度为 $350 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 而转化为丁酸型发酵后, 需在进水中投入大量碱 (NaOH) 以维持发酵稳定, 平均消耗掉碱度为 $1720 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 乙醇型发酵达到的最高比产氢速率和平均比产氢速率为 $30.7 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $21.2 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 丁酸型发酵达到的最高比产氢速率和平均比产氢速率为 $14.9 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $11.1 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 而反应器产氢能力分别为 $99.64 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $81.03 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, 前者均高于后者.

表 2 转化前后反应器内各项参数变化									
Table 2 Reactor parameters before and after transformation									
时间	$P_{H_2 \max} /$ ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	$P_{H_2 \text{min}} /$ ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	$Y_{H_2} /$ ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$)	$H_2 /$ (V/V)	VSS/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	pH	消耗碱度 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	HRT / h	$E_h /$ mV
转化前	30.7	21.2	99.64	43.2	4.7	4.2~4.5	350	4	-400~-350
转化后	14.9	11.1	81.03	40.6	7.3	5.5~6.2	1720	4	-450~-550

注: 表中 P_{H_2} 为单位菌体比产氢速率; Y_{H_2} 为单位体积比产氢速率 (平均值).

3.2 细菌群落结构与产氢能力

采用 3 种寡核苷酸探针针对不同时期的样品进行平行杂交实验 (从第 18d 开始取样), 获得的两组结果如图 2 所示, 使用的探针分别为 ENT183 (标记红色)、Chis150 (标记黄色) 和 Cili135 (标记绿色), A (a)、B (b) 和 C (c) 分别代表转化前期、中期和末期. 由图 2 可见, 活性污泥中的肠杆菌 (红色区域) 数量至转化中期明显增多, 末期有所减少; *Clostridium* cluster I 和 II (梭菌 I、II 群; 黄色区域) 数量则至

中期呈逐渐减少态势; 而 *Clostridium* cluster XI (梭菌 XI 群; 绿色区域) 数量呈逐渐增加态势. 利用 Zeiss LSM Image Browser 软件对荧光面积的计算, 得出菌群的相对丰度, 并同反应器的比产氢速率及生物量进行综合分析, 结果见图 3. 未启动转化时, 反应器内肠杆菌、梭菌 I、II 与梭菌 XI 的相对丰度分别为 22%、48% 和 30%; 在转化过程中, 当系统呈现丙酸型发酵时, 三者的相对丰度分别为 29%、33% 和 38%; 当系统呈现混合酸发酵时, 三者

的相对丰度为 29%、33% 和 38%; 转化结束后, 系统呈现丁酸型发酵, 三者的相对丰度为 19%、24% 和 55%. 由图 3 可见, 肠杆菌的相对数量从转化初期开始逐渐增多, 至末期丁酸型发酵形成 (第 15d) 时又逐渐减少. 梭菌 I、II 的相对丰度变化有较大波动,

乙醇型发酵时期梭菌 I、II 占优势, 转化启动后, 呈逐渐减少态势. 而梭菌 XI (绿色) 数量呈现逐渐增多态势, 最终成为优势菌群, 同时, 3 类细菌的变化趋势与液相发酵产物的变化趋势相呼应 (参见图 1). 产氢速率在启动转化初期 (第 3~6d) 有短暂升高

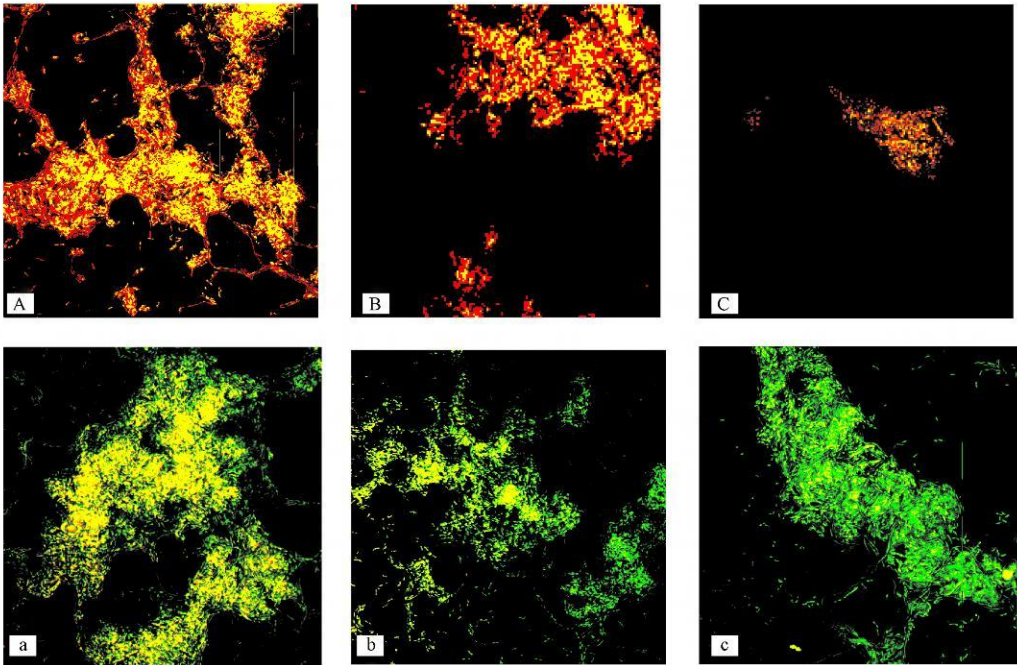


图 2 CSTR 内细菌群 FISH 监测照片
Fig 2 Photos for bacterial group identification by FISH monitoring in the CSTR

现象, 而后逐渐降低, 与梭菌 I、II 的变化趋势相同. 此阶段平均比产氢速率为 $23.6 \text{ mol kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$; 转化中期 3 类细菌数量相当, 两类梭菌属均无明显的优势, 而此时产氢速率达到低谷; 转化后期, 丁酸型发酵形成, 产氢速率逐渐回升并趋于稳定, 与梭菌 XI 的变化趋势相同, 尤其至转化末期, 梭菌 XI 的

数量大量增加, 丁酸型发酵也趋于稳定. 此时比产氢速率也回升并趋于稳定, 但要明显低于转化初期. 这期间肠杆菌尽管在中期数量有小幅增加, 但总体来看与产氢量变化无明显相关性.

4 讨论 (Discussion)

在 CSTR 系统内, 可通过控制 pH 使系统呈现乙醇型发酵和丁酸型发酵. 乙醇型发酵在环境 pH 急剧变化时 (由 4.2 升至 6.0), 发酵特征未出现明显变化, 各项产物出现增多现象, 说明此时乙醇型发酵进程加深, 此状况维持了约 3d 此后尽管发酵产物比例发生了变化, 乙酸、丙酸和丁酸等物质增多, 但反应仍呈典型的乙醇型发酵. 这种稳定是有限的, 由于原有的生存环境发生改变, 适应新环境的细菌开始出现, 并参与竞争, 数量逐渐增多, 乙醇型发酵细菌群落逐渐在竞争中失去优势地位, 发酵趋势开始改变, 表现为代谢产物的变化. 随后系统开始向其他发酵类型转化, 历经丙酸型发酵、混合酸

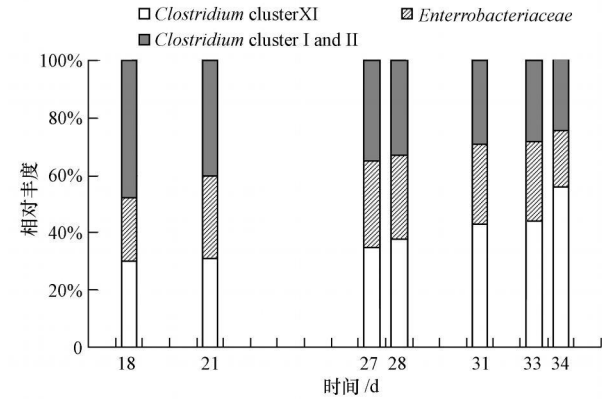


图 3 转化前后种群相对数量变化

发酵,此阶段历时短(共 5d),发酵特征变化剧烈,系统处在不稳定状态。直至第 16d 发酵特征趋于稳定,系统呈现丁酸型发酵。在此 pH 范围内,丁酸型发酵细菌具有更强的竞争优势,因此最终取代了其他种群。产氢能力和耗碱量是选择工艺的重要参考,本实验中,乙醇型发酵和丁酸型发酵单位菌体比产氢速率差距较大,日平均值分别为 $23.6 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $11.1 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,前者约是后者二倍;单位体积产氢速率前者也明显大于后者,日平均值分别为 $99.64 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $81.03 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ 。本系统以葡萄糖为底物,乙醇型发酵需维持 pH 值为 4.0~4.5,丁酸型为 5.5~6.5,这使得丁酸型发酵需添加大量碱性物质来维持较高的 pH 值条件,消耗碱度平均为 $1720 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;而乙醇型发酵可以不投碱或少量投碱便可维持发酵稳定,消耗碱度平均为 $350 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

通过荧光原位杂交技术检测了各个时期细菌种类和数量,乙醇型发酵时,肠杆菌、梭菌 I、II 与梭菌 XI 的相对丰度分别为 22%、48% 和 30%,以 *Clostridium* cluster I 和 II 占优势,与其产氢量变化相对应,说明此时该类细菌是产氢的主要种群;丙酸型发酵时,3 类细菌数量相当,相对丰度分别为 29%、33% 和 38%,两类梭菌属均无明显的优势,系统产氢能力很低;丁酸型发酵时 3 类细菌的相对丰度为 19%、24% 和 55%,以 *Clostridium* cluster XI 占优势,也与其产氢量变化相对应,说明此时该类细菌是产氢的主要种群;在各个时期,肠杆菌的数量未发现大幅波动,与产氢量和发酵类型的变化未发现有密切联系。因此从生态学的角度分析认为,尽管上述 3 类产氢菌在两种发酵类型中始终大量存在,但由于其种群结构的差异,使得二者的功能呈现明显差别,其中,梭菌属的种类和数量是影响产氢能力的关键,*Clostridium* cluster I 和 II 的产氢能力更佳,因此,乙醇型发酵具有更高的产氢能力。

参考文献 (References):

- Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiol Rev*, 59 (1): 143—169
- Amann R I, Snaidr J, Wagner M, et al. 1996. In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community [J]. *J Bacteriol*, 178: 3496—3500
- Das D, Vezinghi T N. 2008. Advances in biological hydrogen production processes [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 6046—6057

- DeLong E F, Wickham G S, Pace N R. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA based probes for the identification of single microbial cells [J]. *Science*, 65: 5554—5563
- Giovannoni S J, DeLong E F, Olsen G J, et al. 1988. Phylogenetic group specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells [J]. *J Bacteriol*, 170: 720—726
- 国家环保局. 1997. 水与废水监测分析方法 (第 3 版) [M]. 北京: 中国环境科学出版社. 233—238
- Environmental Protection Agency. 1997. Monitoring and Analysis Method for Water and Wastewater (Third edition) [M]. Beijing: China Environmental Science Press. 233—238 (in Chinese)
- Harkila N, Ioannis V, Ahring K B. 2006. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (9): 1164—1175
- Jain M N, Dinsdale R, Guwy A. 2008. Hydrogen production from sewage sludge using mixed microflora inoculum: Effect of pH and enzymatic pretreatment [J]. *Bioresource Technology*, 99: 6325—6331
- 林明. 2002. 高效产氢发酵新菌种的产氢机理及生态学研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学. 8—10
- Lin M. 2002. Hydrogen-producing mechanism and ecology on high efficient hydrogen-producing fermentation bacteria [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology. 8—10 (in Chinese)
- Snaidr J, Amann R, Huber I, et al. 1997. Phylogeny analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge [J]. *Appl Environ Microbiol*, 63: 2884—2896
- Oehmen A, Vives M T, Lu H B, et al. 2005. The effect of pH on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms [J]. *Water Research*, 39: 3727—3737
- Oehmen A, Saunders A M, Vives M T, et al. 2006. Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources [J]. *Journal of Biotechnology*, 123: 22—32
- 秦智, 任南琪, 李建政. 2007. 发酵生物制氢反应器的产氢菌生物强化作用研究 [J]. *环境科学*, 28 (12): 2843—2848
- Qin Z, Ren N Q, Li J Z. 2007. Bioaugmentation of hydrogen producing bacteria on operation of biohydrogen producing reactor [J]. *Environmental Science*, 28 (12): 2843—2848 (in Chinese)
- 任南琪, 秦智, 李建政. 2003. 不同产酸发酵菌群产氢能力对比分析 [J]. *环境科学*, 24 (2): 70—75
- Ren N Q, Qin Z, Li J Z. 2003. Comparison and analysis of hydrogen production capacity with different acidogenic fermentative microflora [J]. *Environmental Science*, 24 (2): 70—75 (in Chinese)
- 任南琪, 王宝贞. 1994. 有机废水发酵法生物制氢技术——原理与方法 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科技出版社. 38—47
- Ren N Q, Wang B Z. 1994. Bio-hydrogen Production: Fermentation Technology from Organic Waste Water—Principles and Methods [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press. 38—47 (in Chinese)
- Ren N Q, Wang B Z, Huang J. 1997. Ethanol-type fermentation of carbohydrate wastewater in high acidogenic reactor [J]. *Biotechnol*

- bieng 54 428—433
- Vatsa T M, Raj S M, Maniyan A. 2008. A pilot-scale study of biohydrogen production from distillery effluent using defined bacterial co-culture[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 33 5404—5415
- Wang J L, Wan W. 2008. The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models[J]. Sci China Ser B-Chem, 51(11): 1110—1117
- Xiao B Y, Liu J X. 2006 Effects of thermally pretreated temperature on biohydrogen production from sewage sludge[J]. Journal of Environmental Sciences 8(1): 6—12
- 许丽英. 2006 产氢新菌 *Ethanoligenens Harbinense* B49 产氢代谢途径研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学. 5—15
- Xu L Y. 2006 Hydrogen-producing metabolic pathway for the new hydrogen-producing bacteria *Ethanoligenens Harbinense* B49[D]. Harbin Harbin Institute of Technology. 5—15 (in Chinese)
- Xiao B Y, Liu J X. 2006 pH dependency of hydrogen fermentation from alkali pretreated sludge[J]. Chinese Science Bulletin 51 (4): 399—404
- Zeng R J, Saunders A M, Yuan Z G, *et al* 2003. Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms[J]. Biotechnol Bioeng 83 (2): 140—148