

李玉友, 褚春风, 堆洋平. 2009 厌氧发酵生物制氢微生物及工艺开发的研究进展 [J]. 环境科学学报, 29(8): 1569-1588

Li Y Y, Chu C F, Akutsu Y H. 2009. Bacterial community and process development for anaerobic hydrogen fermentation [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(8): 1569-1588

厌氧发酵生物制氢微生物及工艺开发的研究进展

李玉友^{1,2*}, 褚春风³, 堆洋平¹

1 东北大学大学院环境科学研究科, 日本仙台 980-8579

2 天津城市建设学院环境与市政工程系, 天津 300384

3 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240

收稿日期: 2009-01-07 修回日期: 2009-06-21 录用日期: 2009-06-23

摘要: 厌氧发酵生物制氢在国内外受到了普遍关注, 如何确保稳定、持续、高效的产氢率成为生物制氢研究的关键问题所在。本文在查阅国内外大量文献的基础上, 重点介绍了产氢发酵微生物、产氢菌种的构建、产氢反应器及厌氧发酵产氢工艺的最新研究状况。同时, 就两相循环高温氢/甲烷发酵工艺的进一步发展前景提出了建议。

关键词: 产氢发酵微生物; 接种物预处理; 产氢反应器; 高温氢发酵; 两相循环工艺

文章编号: 0253-2468(2009)08-1569-20 中图分类号: X703 文献标识码: A

Bacterial community and process development for anaerobic hydrogen fermentation

LI Yuyou^{1,2*}, CHU Chunfeng³, AKUTSU Yohei¹

1 Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, Sendai 980-8579

2 Department of Environmental and Municipal Engineering, Tianjin Institute of Urban Construction, Tianjin 300384

3 School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240

Received 7 January 2009; received in revised form 21 June 2009; accepted 23 June 2009

Abstract Anaerobic hydrogen fermentation has been extensively investigated recently with the focus of the new research being how to maintain stable and continuous hydrogen production and achieve a high yield. This paper reviews the new developments in the studies of hydrogen-producing bacteria, the pre-treatment of seed microorganisms, the hydrogen fermentation reactor and analysis of the microbial community based on both domestic literature and foreign journals. It is suggested that the two-stage fermentation process combining theophilic hydrogen fermentation and methane fermentation with the recirculation of the digested sludge warrants further development.

Keywords hydrogen-producing bacteria; seed microorganisms; pre-treatment; hydrogenic reactor; theophilic hydrogenesis; two-stage; recirculation process

1 引言 (Introduction)

随着经济的发展, 能源问题越来越引起人们的关注和重视。氢能作为一种无污染、可再生的理想燃料, 被认为是最有吸引力的石油替代能源。制氢的方法很多, 与水分解法或水电解等物理化学法制氢比较, 生物制氢主要是通过微生物的作用, 分解有机物获得氢气, 成本低廉, 更有发展应用前景。

生物制氢过程可分为光合生物制氢和厌氧发

酵制氢两大类。厌氧发酵制氢的末端产物为有机酸和乙醇, 这些代谢产物是光合生物制氢或甲烷发酵可利用的底物。为此, 生物制氢的工艺也可分为: 1) 厌氧发酵制氢和光合生物制氢的组合工艺 (Kapdan *et al.*, 2006; Hawkes *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2008); 2) 厌氧发酵制氢和厌氧甲烷发酵的组合工艺 (Hawkes *et al.*, 2002; Nishio *et al.*, 2004)。后者的组合工艺, 不需要光能源, 反应装置的设计、操作及管理简单方便, 可利用的有机物诸如高浓度有机

基金项目: 日本学术振兴会·科研费挑战性萌芽研究 (No 21651027)

Supported by the Japan Society for the Promotion of Science (Challenging Sprout Research, No 21651027)

作者简介: 李玉友 (1961-), 男, 副教授; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: yyl@epll.civil.tohoku.ac.jp

Biography: LI Yuyou (1961-), male, associate professor. * Corresponding author. E-mail: yy@epll.civil.tohoku.ac.jp

废水、固体生物质等一系列可再生资源,达到除废和产能的双重目的,更利于大规模产业化,具有发展潜力(Wang et al., 2009a, 2009b).

影响厌氧发酵制氢的生态因子很多,有微生物种类及数量的生物因子;有机营养物及无机营养物的底物因子; pH、温度、水力停留时间(HRT)、操作方式、氢分压及氧化还原电位(ORP)的环境因子等(Hawkes et al., 2002; Wang et al., 2009b).而厌氧产氢微生物是厌氧发酵制氢过程中的核心,也成为了发酵产氢的重要研究内容.很多研究者利用分批试验,探讨各种生态因子对厌氧发酵制氢的影响,并且大多采用人工配水或易降解的有机物(葡萄糖、淀粉)(Wang et al., 2009b).本文针对实际有机废水废弃物的厌氧发酵制氢和甲烷发酵的组合工艺,重点对发酵产氢微生物、产氢率、产氢反应器及连续发酵工艺方面进行了总结、分析和阐述,以期对厌氧发酵制氢的优化组合工艺研究提供参考.

2 产氢微生物(Hydrogen-producing bacteria)

大自然环境中能够通过厌氧发酵方式产氢的细菌种类很多. Gray等(1965)将所有的产氢微生物

分为4类:①专性厌氧的异养微生物,包括梭菌属(*Clostridium*)、甲基营养菌(*Methylotrichs*)、产甲烷菌(*Methanogenic bacteria*)、瘤胃细菌(*Rumen bacteria*)以及一些古细菌(*Archaea*)等;②兼性厌氧菌,能够通过分解甲酸的代谢途径产氢.包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)等;③需氧菌(*Aerobes*),包括产碱杆菌属(*Alcaligenes*)和一些杆菌属(*Bacillus*)等;④光合细菌(*Photosynthetic bacteria*).厌氧发酵产氢微生物主要包括前两类微生物.目前,发酵法产氢研究较多的产氢细菌种类有梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*),如丁酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*)和拜氏梭状芽孢杆菌(*Clostridium pasteurianum*)等;肠道芽孢杆菌属(*Enterobacter*),如产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)和阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacaeceae*)等.不同种类的微生物对同一有机底物的产氢能力不同,通常严格厌氧菌高于兼性厌氧菌(Hawkes 2002).另外,同种微生物不同菌株的产氢能力也存在差异.产氢细菌的产氢率按培养温度整理列于表1.

表1 产氢细菌的培养条件和产氢率

Table 1 Operational conditions and hydrogen yield of hydrogen-production bacteria

发酵温度	微生物	基质	温度 / °C	培养条件	产氢率 ^d / (mol mol ⁻¹)	文献
中温	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	葡萄糖	37	分批	1.35	Podest et al., 1996
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	葡萄糖	37	连续	2.00	Chin et al., 2003
	<i>Clostridium butyricum</i>	淀粉	30	分批	1.90	Yokoi et al., 1998a
	<i>Clostridium butyricum</i>	淀粉	36	连续	2.0	Yokoi et al., 1998b
	<i>Clostridium butyricum</i>	淀粉	36	连续	2.3	Yokoi et al., 1997
	<i>Clostridium butyricum</i>	蔗糖	37	分批	2.78°	Chen et al., 2005
	<i>Clostridium butyricum</i>	葡萄糖	30	连续	1.4~2.3	Kataoka et al., 1997
	<i>Clostridium pasteurianum</i>	葡萄糖	34	分批	1.50	Brosseau et al., 1982
	<i>Clostridium pasteurianum</i>	葡萄糖	37	分批	2.14~2.33	Hendrickx et al., 1991
	<i>Clostridium pasteurianum</i>	葡萄糖	37	连续	1.86	Hendrickx et al., 1991
	<i>Clostridium paraputrificum</i>	葡萄糖	45	连续	1.10	Evvyemie et al., 2001
	<i>Clostridium trybutyricum</i>	葡萄糖	37	连续	1.79	Jo et al., 2007
	<i>Ethanoligenes harbinense</i> B49	葡萄糖	35	分批	2.20	Guo et al., 2009
	<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	葡萄糖	38	分批	1.00	Yokoi et al., 1995
	<i>Enterobacter aerogenes</i> A-1	葡萄糖	37	分批	0.84	Rachman et al., 1997
	<i>Enterobacter aerogenes</i> HZ-3	葡萄糖	37	分批	0.83	Rachman et al., 1997
	<i>Enterobacter aerogenes</i> AY-2	葡萄糖	37	分批	1.17	Rachman et al., 1997
	<i>Enterobacter aerogenes</i> AY-2	葡萄糖	37	连续	1.10	Rachman et al., 1998
	<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101 ^a	葡萄糖	37	分批	1.17	Rachman et al., 1997
	<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	葡萄糖	37	分批	0.35	Nakashimada et al., 2002

续表 1

发酵温度	微生物	基质	温度 / °C	培养条件	产氢率 ^d / (mol mol ⁻¹)	文献
	<i>Enterobacter cloacae</i> DM11	葡萄糖	37	分批	3.90	Mandala et al., 2006
	<i>Enterobacter cloacae</i> III-BT08	葡萄糖	36	分批	2.25	Kumara et al., 2000
	<i>Enterobacter cloacae</i> DM11	葡萄糖	36	分批	3.31	Nath et al., 2006
	<i>Enterobacter aerogenes</i> E. 82005	葡萄糖	37.5	分批	1.1	Tanisho et al., 1987
	<i>Enterobacter aerogenes</i> E. 82005	葡萄糖	38	分批	1.58	Tanisho et al., 1998
	<i>Escherichia coli</i>	葡萄糖	37	分批	2.0	Bisailon et al., 2006
	<i>Citrobacter intermedius</i>	葡萄糖	34	分批	1.0	Brosseau et al., 1982
	<i>Citrobacter</i> sp. Y19	葡萄糖	36	分批	1.05~2.49	Oh et al., 2003
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	葡萄糖	35	分批	1.0	Minnan et al., 2005
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	蔗糖	38	连续	1.8	Minnan et al., 2005
	<i>Bacillus licheniformis</i>	葡萄糖	38~40	分批	0.58	Kalia et al., 1994
	<i>Bacillus coagulans</i>	葡萄糖	37	分批	2.28	Kotay et al., 2007
	<i>Ruminococcus albus</i>	葡萄糖	N. R.	连续	2.37	Ianottiet al., 1973
高温	<i>Clostridium thermocellum</i>	DLW ^b	60	分批	1.6	Levin et al., 2006
	<i>Clostridium thermolacticum</i>	乳糖	58	连续	3 ^c	Collet et al., 2004
	<i>Clostridium thermosphaerophilum</i>	葡萄糖	50	分批	1.61	Li et al., 1994
	<i>Clostridium thermobutyricum</i>	葡萄糖	57	分批	1.9	Wiegel et al., 1989
	<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	葡萄糖	62	分批	0.55	Lovitt et al., 1988
	<i>Clostridium thermosulfurigenes</i>	葡萄糖	60	分批	0.95	Schink et al., 1983
	<i>Acetivibrio flavidum</i>	葡萄糖	58	分批	4.0	Soutscheck et al., 1984
	<i>Acetothermus paucivorans</i>	葡萄糖	58	分批	4.0	Dietrich et al., 1988
	<i>Thermoanaerobacteroides acetothelium</i>	葡萄糖	65	分批	1.3	Kondratieva et al., 1989
	<i>Thermoanaerobium brockii</i>	糖	35~85	分批	N. R.	Zekus et al., 1979
	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	葡萄糖	60	分批	2.39	Ueno et al., 2001c
	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	葡萄糖	60	分批	1.42	Ueno et al., 2001c
	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	葡萄糖	60	分批	1.64	Nikitina et al., 1993
	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	葡萄糖	55	分批	1.72	Vavcanneyt et al., 1990a
	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	葡萄糖	55	连续	1.63	Vavcanneyt et al., 1990b
	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	葡萄糖	55	分批	1.65	Vavcanneyt et al., 1987a
	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	葡萄糖	55	分批	0.9~1.91	Vavcanneyt et al., 1987b
超高温	<i>Coprothermobacter protoelyticus</i>	葡萄糖	65	分批	1.25 ^c	Ollivier et al., 1985
	<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	葡萄糖	70	分批	1.0	Wiegel et al., 1979
	<i>Clostridium thermosuccinogenes</i>	葡萄糖	70	分批	0.25	Srilhar et al., 2000
	<i>Caldicellulosiphon saccharolyticus</i>	蔗糖	70	分批	3.3	Srilhar et al., 2000
	<i>Acetivibrio faecalis</i>	葡萄糖	70	分批	1.36	Winter et al., 1987
	<i>Thermotoga elfi</i>	葡萄糖	65	分批	3.3	van Nieuwenhuis et al., 2002
	<i>Thermotoga neapolitana</i>	葡萄糖	80	分批	2.4	Eriksen et al., 2007
	<i>Thermotoga maritima</i>	葡萄糖	80	分批	4.0	Schäfer et al., 1994
	<i>Thermotoga maritima</i>	葡萄糖	80	分批	1.67	Nguyen et al., 2008
	<i>Thermotoga neapolitana</i>	葡萄糖	75	分批	1.84	Nguyen et al., 2008
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	葡萄糖	95	分批	3.0	Schäfer et al., 1992

注: a 氢分压 380毫米汞柱; b 脱木质素的纤维; c mol mol⁻¹(以加入的葡萄糖计); d mol mol⁻¹(以消耗的葡萄糖计); e mol L⁻¹(以消耗的蔗糖计); N. R.: 未报道(但产氢已被确认)

2.1 中温发酵产氢微生物

已知的中温发酵产氢细菌包括: 梭菌科 (Clostridiaceae)、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)、芽孢杆菌科 (Bacillaceae)及毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)等。

梭菌科 (Clostridiaceae)中研究较多的是梭菌属 (*Clostridium*)。梭菌属为产孢子细菌,其中,乙酸梭状芽孢杆菌 (*C. acetobutylicum*)、丁酸梭状芽孢杆菌 (*C. butyricum*)、拜氏梭状芽孢杆菌 (*C. pasteurianum*)、

num)等是已知的在丙酮丁醇发酵过程中的发酵产氢细菌. 研究报道, *Clostridium* 属细菌的产氢率为 $1.1 \sim 2.3 \text{ mol mol}^{-1}$ (以消耗的 glucose 计, 下同) (Yokoi *et al.*, 1997; Evvyemie *et al.*, 2001).

肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 研究较多的有肠道芽孢杆菌属 (*Enterobacter*)、柠檬酸细菌属 (*Citrobacter*) 及克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*). 其中, 肠杆菌属的分离菌是研究利用最多的纯菌, 尤其是产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 和阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*), 产氢率在 $0.35 \sim 3.3 \text{ mol mol}^{-1}$ 之间. 埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、柠檬酸细菌属 (*Citrobacter*) 和克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 的产氢率分别达到 2 mol mol^{-1} , $1 \sim 2.49 \text{ mol mol}^{-1}$ 和 $1.0 \sim 1.8 \text{ mol mol}^{-1}$.

芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 的杆状菌属 (*Bacillus*) 也常用于产氢发酵的研究. 杆状菌属是化学合成性厌氧或兼性厌氧细菌, 持孢子形成能, 对各种条件具有抗性 (Holt *et al.*, 1994). 杆状菌属细菌的产氢率为 $0.58 \sim 2.28 \text{ mol mol}^{-1}$.

毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae) 的瘤胃球菌 (*Ruminococcus albus*), 其产氢率为 $2.37 \text{ mol mol}^{-1}$. 瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*) 属于球状或杆状形态的绝对厌氧、化学合成性细菌, 末端产物为有机酸、乙醇、 H_2 和 CO_2 (Holt *et al.*, 1994).

2.2 好热发酵产氢微生物

高温条件下, 已有拟杆菌科 (Bacteroidaceae)、梭菌科 (Clostridiaceae) 及好热厌氧杆菌科 (Thermoanaerobacteriaceae) 细菌用于产氢发酵研究.

拟杆菌科 (Bacteroidaceae) 的醋杆菌 (*Acetivibrio flavidum*), 其产氢率为 4.0 mol mol^{-1} (Soutschek *et al.*, 1984).

梭菌科 (Clostridiaceae) 的梭菌属 (*Clostridium*) 也常用于产氢发酵研究. 其中, 好热性梭菌属的产氢率为 $0.55 \sim 1.9 \text{ mol mol}^{-1}$, 略微低于中温性梭菌属.

好热厌氧杆菌科 (Thermoanaerobacteriaceae) 包括高温厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*)、高温厌氧拟杆菌属 (*Thermoanaerobacteroides*) 及高温厌氧芽孢杆菌属 (*Thermoanaerobacterium*) 等. 其中, 热解糖好热厌氧杆菌 (*T. thermosaccharolyticum*) 常被用于产氢发酵研究, 其产氢率达到 2.4 mol mol^{-1} (Ueno *et al.*, 2001c).

2.3 超高温发酵产氢微生物

已往的研究中对超高温发酵产氢细菌的报道较少. 已知的超高温发酵产氢细菌包括: 梭菌属 (*Clostridium*)、热解纤维素果汁杆菌属 (*Caldicellulosiruptor*)、栖热粪杆菌属 (*Coprothermobacter*)、*Thermotoga* 属、醋杆菌属 (*Acetivibrio*) 及热球菌属 (*Pyrococcus*) 等. 研究结果表明, 超高温产氢细菌的产氢率很高, 其中, *Thermotoga elfi* 和热解纤维素果汁杆菌 (*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*) 的产氢率达到 3.3 mol mol^{-1} (van Niel *et al.*, 2002), 热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 的产氢率为 3.0 mol mol^{-1} (Schlfer *et al.*, 1992), *Thermotoga maritima* 的产氢率高达 4 mol mol^{-1} (Schlfer *et al.*, 1994).

以上的发酵产氢微生物分析结果表明, 对于不同种类的产氢微生物而言, 温度越高越有利于产氢率的提高. 以往的研究报道大多采用含糖多的有机废水进行产氢发酵, 且以中温发酵最为常见. Shin 等 (2004) 以食品废弃物为底物, 采用分批试验, 比较了中温和高温条件下的发酵产氢效果. 结果发现, 高温时的产氢率高于中温; 中温发酵丙酸浓度高, 并检测到甲烷气; 而高温发酵丙酸浓度低, 没有发现甲烷气. 这表明高温发酵有利于抑制丙酸菌和氢气营养型产甲烷菌的增长, 从而提高产氢率. Noke 等 (2002) 在利用豆腐渣废弃物的产氢发酵试验中发现, 乳酸菌对产氢菌有抑制作用, 但发酵温度高于 50°C 或 pH 大于 5.0 时可避免乳酸菌的抑制效应. 一般来说, 高温有利于提高废弃物的水解速率, 并且, 高温条件下可减少液相中溶解性氢气的浓度 (Hawkes *et al.*, 2002), 更有利于产氢率的提高. 由此可见, 高温发酵更适合有机废弃物的产氢发酵.

2.4 发酵产氢细菌种群

利用混合菌种产氢的研究, 自上世纪 90 年代中后期开始有所报道 (Ueno *et al.*, 1995; 沈建权等, 1995; 李建政等, 2002). 目前的研究结果表明, 与利用纯菌产氢相比, 利用混合菌系进行厌氧生物制氢具有明显的优势. 由于菌种间的协同作用, 导致纯菌的产氢能力不如混合菌种, 其中, 厌氧活性污泥具有最大的产氢能力; 厌氧产氢微生物来源广泛, 除了污水处理厂的活性污泥和厌氧消化污泥外, 各种土壤中也含有大量的产氢微生物; 混合细菌可利用的底物比较广泛, 除了常用的葡萄糖、蔗糖外, 甚至还利用固体废弃物和有机废水, 如酿酒废水、

淀粉加工废水等. 因此, 从应用角度出发, 利用厌氧活性污泥作为发酵产氢的接种物进行发酵产氢的研究, 已成为人们关注的焦点. 利用混合菌种的产氢过程主要是通过发酵操作条件的控制使得产氢能力高的发酵细菌在体系中占优势, 而 *Clostridium* sp 正是混合培养中的优势微生物 (Xiao *et al.*, 2004; 宋丽等, 2008). 但以实际废弃物作为底物进行产氢发酵时, 附着于废弃物的杂菌一起混入产氢发酵体系, 容易使细菌种群变得复杂. 因此, 生物制氢反应器的操作条件控制, 不仅要考虑产氢细菌的发酵途径, 控制细菌种群的变化也是很重要的一个方面. 此外, 为了构建高效的厌氧产氢菌种, 除了控制生物制氢反应器的操作条件, 接种物的预处理也是人们关注的焦点.

3 预处理构建厌氧产氢菌种 (Seed microorganisms pre-treatment)

可作为接种物利用的厌氧消化污泥、活性污泥、堆肥、土壤等混合菌种, 不仅存在产氢发酵细菌, 也存在不产氢的乳酸菌和产甲烷的古细菌. 产甲烷古细菌不仅存活于厌氧环境中, 在好氧环境也可能存活 (安田等, 2007). 因此, 为了实现持续、高效的氢气生产, 应抑制非产氢细菌和产甲烷古细菌等氢气营养型细菌的增殖, 开发产氢能力高的细菌富集技术. 迄今为止, 为了构建厌氧产氢菌种, 已有有关各种接种物预处理方法和处理效果的文献报道 (表 2), 其中, 接种物的预处理方法有物理化学方法 (热处理、酸碱处理和冻结解冻) 和针对产甲烷古细菌添加抑制剂及曝气的方法. 在这些预处理方法的研究探讨中一般都采用中温产氢发酵体系.

表 2 促进生物制氢的种泥预处理方法

Table 2 The pretreatment methods to inoculum for enhancement of hydrogen production

预处理	方法	接种污泥	试验方法	培养温度 / $^{\circ}\text{C}$	产氢提高倍数 (与对照组比)	文献
热处理	100 $^{\circ}\text{C}$, 15 min	消化污泥	分批	37	N. A.	Lay <i>et al.</i> , 1999
	100 $^{\circ}\text{C}$, 15 min	消化污泥	分批	37	N. A.	Okamoto <i>et al.</i> , 2000
	100 $^{\circ}\text{C}$, 15 min	豆粕	分批	35	N. A.	Noke <i>et al.</i> , 2000
	100 $^{\circ}\text{C}$, 15 min	豆粕	分批	35	N. A.	Mizuno <i>et al.</i> , 2000a
	100 $^{\circ}\text{C}$, 2 min	堆肥	分批	37	N. A.	Lay <i>et al.</i> , 2003
	50~90 $^{\circ}\text{C}$, 30 min	消化污泥	连续	35	N. A.	Noke <i>et al.</i> , 2002
	93 $^{\circ}\text{C}$, 60 min	中温消化污泥	分批	37	23.8	Vaklez-Vazquez <i>et al.</i> , 2006
	93 $^{\circ}\text{C}$, 60 min	高温消化污泥	分批	37	10.6	
	93 $^{\circ}\text{C}$, 60 min	中温消化污泥	分批	55	1.7	
	93 $^{\circ}\text{C}$, 60 min	高温消化污泥	分批	55	1.6	
	95 $^{\circ}\text{C}$, 2 h	消化污泥	分批	35.5	4.07	Cheong <i>et al.</i> , 2006
	70 $^{\circ}\text{C}$, 15 min	底泥	连续	35	N. A.	Zuo <i>et al.</i> , 2005
	70 $^{\circ}\text{C}$, 1 h	下水污泥	连续	40	7.15	Lin <i>et al.</i> , 2006
	80 $^{\circ}\text{C}$, 1 h	下水污泥	连续	40	2.06	
	100 $^{\circ}\text{C}$, 20 min	消化污泥	分批	35	0.50~0.70	Zhu <i>et al.</i> , 2006
酸处理	pH 3 24 h	下水污泥	分批	35	333	Chen <i>et al.</i> , 2002
	pH 3 24 h	下水污泥	连续	35	N. A.	Lee <i>et al.</i> , 2004
	pH 3~4 24 h	下水污泥	连续	35	N. A.	Chang <i>et al.</i> , 2002
	pH 3 30 min	消化污泥	分批	35	< 0.6	Zhu <i>et al.</i> , 2006
	pH 2.2~4 h (4 $^{\circ}\text{C}$)	消化污泥	分批	35.5	9.82	Cheong <i>et al.</i> , 2006
碱处理	pH 10 24 h	下水污泥	分批	35	200	Chen <i>et al.</i> , 2002
	pH 10 30 min	消化污泥	分批	35	0.28~1.34	Zhu <i>et al.</i> , 2006
	曝气	堆肥	连续	60	N. A.	Ueno <i>et al.</i> , 1995
曝气	堆肥	连续	60	N. A.	Ueno <i>et al.</i> , 1996	
曝气	堆肥	连续	60	N. A.	Ueno <i>et al.</i> , 2001b	

续表 2

预处理	方法	接种污泥	试验方法	培养温度 / $^{\circ}\text{C}$	产氢提高倍数 (与对照组比)	文献
	曝气	堆肥	连续	60	N. A.	Ueno <i>et al.</i> , 2001a
	曝气	消化污泥	分批	55	N. A. (无效)	Sparling <i>et al.</i> , 1997
	3d(60 $^{\circ}\text{C}$)	堆肥	分批	50~60	N. A.	Morimoto <i>et al.</i> , 2004
	30 min	消化污泥	分批	35	0.8~0.94	Zhu <i>et al.</i> , 2006
干热/干燥	105 $^{\circ}\text{C}$, 2 min/干燥箱 2 h	消化污泥	分批	35.5	7.97	Cheong <i>et al.</i> , 2006
冻结/解冻	-10 $^{\circ}\text{C}$, 24 h /30 $^{\circ}\text{C}$, 6 h	消化污泥	分批	35.5	6.69	Cheong <i>et al.</i> , 2006
甲烷菌抑制剂	硝酸钾, 200 mg L $^{-1}$	消化污泥	连续	35	2.5	Kin <i>et al.</i> , 2006c
	BES, 25 mmol L $^{-1}$	消化污泥	分批	55	N. A. (有效)	Sparling <i>et al.</i> , 1997
	BES, 10 mmol L $^{-1}$	消化污泥	连续	70	1.32	Kotsopoulos <i>et al.</i> , 2005
	乙炔 1% (v/v)	中温消化污泥	分批	37	13.9	Valdez-Vazquez <i>et al.</i> , 2006
	乙炔 1% (v/v)	高温消化污泥	分批	37	7.6	
	乙炔 1% (v/v)	中温消化污泥	分批	55	14.3	
	乙炔 1% (v/v)	高温消化污泥	分批	55	6.6	
	乙炔 1% (v/v)	消化污泥	分批	55	N. A. (有效)	Sparling <i>et al.</i> , 1997
	氯仿	消化污泥	连续	35	N. A.	Liang <i>et al.</i> , 2002
	BES, 0.5 mol L $^{-1}$	消化污泥	分批	35.5	7.75	Cheong <i>et al.</i> , 2006
	BES, 10 mmol L $^{-1}$ (30 min)	消化污泥	分批	35	0.80~1.02	Zhu <i>et al.</i> , 2006
	碘丙烷, 10 mmol L $^{-1}$ (30 min)	消化污泥	分批	35	0.53~1.09	Zhu <i>et al.</i> , 2006

BES: 溴尿嘧啶酸; N. A.: 未报道

3.1 物理化学预处理方法

物理化学预处理方法的原理是利用梭菌属 (*Clostridium*) 中温产氢细菌持有孢子形成能特性, 即 *Clostridium* 属细菌即使在其他细菌生存困难的条件下也能形成孢子进入休眠状态而存活. 热处理是最常见的一种物理化学预处理方法. 一般来说, 对接种物进行 70~100 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min 以上的湿热/干热处理, 可有效地杀灭非产氢细菌或产甲烷古细菌, 富集产氢细菌, 从而提高氢气产率 (Lay *et al.*, 1999; Cheong *et al.*, 2006). Cheong 等 (2006) 对消化污泥采用 105 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h 干热后再施行 2 h 干燥的预处理方法, 经中温的产氢发酵试验得到与未处理的对照组相比, 氢气产量提高了 7.97 倍.

所谓的酸碱处理法就是接种物在接种前在酸性 (pH = 3) 或碱性 (pH = 10) 的状态下筛选产氢细菌的方法. 尤其是酸处理法常被用于连续试验的接种物预处理, 并能达到稳定的产氢效果 (Chang *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). Chen 等 (2002) 报道, 与无处理相比较, 酸处理和碱处理后的产氢量分别提高了 333 倍和 200 倍.

Cheong 等 (2006) 报道了对消化污泥采用干热 (105 $^{\circ}\text{C}$, 2 h) 后再施行干燥 (2 h) 的干热/干燥预处理法和冻结 (-10 $^{\circ}\text{C}$, 24 h) 后再施行解冻 (30 $^{\circ}\text{C}$, 6 h) 的冻结/解冻预处理法, 与未处理的对照组相比,

氢气产量分别提高了 7.97 倍和 6.69 倍.

3.2 添加产甲烷古细菌抑制剂的方法

能抑制产甲烷古细菌活性的抑制剂包括: 溴尿嘧啶酸 (bromoethanesulfonic acid, BES) (Sparling *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003; Kotsopoulos *et al.*, 2005)、乙炔 (Sparling *et al.*, 1997; Valdez-Vazquez *et al.*, 2006)、氯仿 (Liang *et al.*, 2002)、碘丙烷 (Zhu *et al.*, 2006) 及 KNO_3 (Kin *et al.*, 2006c) 等. 除了 Zhu 等 (2006) 报道的溴尿嘧啶酸和碘丙烷对氢气产量无效果外, 其他研究中添加这些产甲烷古细菌抑制剂后, 均可通过抑制接种物或混合菌种中的产甲烷古细菌活性而提高氢气产量.

溴尿嘧啶酸是产甲烷古细菌特有的甲基辅酶 M ($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$) 的类似物, 可阻碍甲基辅酶 M 产生的甲烷 (Robert *et al.*, 1978), 对所有的产甲烷古细菌均有效. 乙炔可使产甲烷古细菌细胞内的腺嘌呤核苷三磷酸 ATP 浓度下降, 导致细胞膜内外的 pH 梯度无法维持而阻碍甲烷菌的活性 (Sprott *et al.*, 1982). 氯仿可在乙酰辅酶 A (CoA) 分解路径中有效地阻碍乙酸产甲烷和硫酸盐的还原 (Scholten *et al.*, 2000; Chidthaisong *et al.*, 2000). 另外, Chidthaisong 等 (2000) 指出, 氯仿可能对氢气营养型同型乙酸菌有阻碍效果. 但是, 产甲烷古细菌可以通过驯化而对氯仿产生抗性作用 (Yang *et al.*,

1986). Kim (2006c)指出, 添加 KNO_3 阻碍产甲烷的理由可能是 NO_3^- 在脱氮过程中产生的 NO 和 N_2O 能够阻碍甲烷产生。

曝气预处理的目的包括: ①采用微曝气以提高肠杆菌属 (*Enterobacter*) 等兼性厌氧产氢菌的活性 (Ueno *et al.*, 2001b); ②利用空气曝气来抑制甲烷菌的活性 (Zhu *et al.*, 2006). Ueno 等 (1995; 1996; 2001a; 2001b) 利用堆肥采用微曝气方法富集培养出了产氢菌种. Zhu 等 (2006) 报道了对消化污泥施行 30 min 曝气预处理, 虽能抑制甲烷菌的活性但没有明显提高氢气产量。

以上各种预处理法中, 热处理法是最为常见的抑制甲烷菌并富集产氢菌的方法 (Kraemer *et al.*, 2007). 这是由于热处理法可以选择产氢孢子菌, 如 *Clostridium*、*Bacillus* 和 *Thermoanaerobacterium* 等, 热处理后的种群趋于单纯化, 而未经热处理的污泥含有更多的肠道菌和其他非孢子细菌, 微生物多样性高. 但是, 热处理法并不能杀死所有的营养细胞, 还要取决于热处理污泥的状态 (干的或湿的)、热处理时间和温度等. 例如, 热处理后非孢子细菌 *Bacteroides*、*Lactobacillus* 和 *Enterobacter* 等也可能残存. 虽然热处理的目的是杀死甲烷菌, 但热处理法无法获得所有的产氢菌, 可能残存非孢子产氢菌, 如肠道细菌 (*Enterobacter* spp.)、*Citrobacter* spp 等; 孢子形成的氢营养型细菌也有醋酸菌 (*Acetobacterium*、某些 *Clostridium* spp.、*Sporomusa*)、丙酸菌 (*Prorionibacterium*)、乳酸菌 (*Sporolactobacillus*) 和硫酸还原菌 (*Desulfotomaculum*). Kim 等 (2006b) 研究发现, 在热处理污泥中也检测到醋酸菌 (*Clostridium scatologenes*).

目前的文献报道还不能充分证明热处理法就一定确保氢气产量的增加. 与非热处理系统相比, 只有少数研究报道的热处理与非热处理是在相同的实验系列下进行的, 而多数研究采用分批试验 (Kraemer *et al.*, 2007). Valle-Vazquez 等 (2006) 指出, 与高温产氢发酵相比, 热处理对中温产氢发酵更为有效. Noke 等 (2002) 指出, 热处理不仅可杀灭产甲烷古细菌以外的非产氢细菌, 还可有效地抑制乳酸菌对产氢细菌的阻害作用. Oh 等 (2003) 发现, 在 pH 值为 6.2 时, 与非热处理相比, 热处理后氢气产量较高. 然而, Zhu 等 (2006) 指出, 与添加溴尿嘧啶酸相比, 热处理后氢气产量却下降. 同样, Cheong 等 (2006) 报道指出, 与溴尿嘧啶酸和高氯酸

处理法比较, 湿热和干热处理后氢气产量反而减少. Kawagoshi 等 (2005) 也观察了非热处理和热处理的消化污泥, 发现其氢气产量相同。

另外, 热处理后残留的主要是产孢子细菌, 容易造成营养物 (氨基酸等) 缺乏而影响产氢率, 因而对底物的有机和无机营养要求更高 (Hawkes *et al.*, 2002). 因此, 热处理法可能导致产氢效率无法达到最大化. 在连续运行时可通过短的 HRT 和低 pH 值 (约 5.5) 控制来抑制产甲烷菌, 使产甲烷菌由于增值速度慢而冲出反应器 (Kraemer *et al.*, 2007).

4 产氢发酵种群的分子生物学解析 (Microbial community of hydrogen fermentation by molecular biological techniques)

文献报道中采用混合菌群解析得到的细菌群汇总于表 3

由于底物向末端产物的物质转换过程很大程度上依赖于微生物的代谢特性. 因此, 构建高效的生物制氢发酵体系, 了解生物处理的产氢发酵特性, 对于正确理解产氢发酵细菌群极为重要. 温度是构建细菌群组成的重要参数之一, 通常情况下, 生物制氢的操作温度可分为中温 (30~40°C)、高温 (50~60°C) 或超高温 (>65°C).

在很多中温生物制氢的研究报道中, 发现梭菌属 (*Clostridium*) 近缘的细菌为优势菌种. 以 *Clostridium* 属细菌为代表的产氢发酵细菌的产氢率为 $1.1 \sim 2.3 \text{ mol mol}^{-1}$ (表 1). 因此, 可以认为中温条件下, *Clostridium* 属细菌对生物制氢起重要的作用. *Clostridium* 属细菌以外的优势菌还有葡糖酸醋酸杆菌属 (*Gluconacetobacter*) (Kim *et al.*, 2006a)、乳酸菌属 (*Lactobacillus*) (Kim *et al.*, 2006a)、杆状菌属 (*Bacillus*) (Kim *et al.*, 2006b)、噬纤维菌属 (*Cytophaga*) (Oh *et al.*, 2004)、克氏杆菌属 (*Klebsiella*) (Lay *et al.*, 2005)、*Citrobacter* 属 (Fang *et al.*, 2002b)、链球菌属 (*Streptococcus*) (Fang *et al.*, 2002b) 等. 由此可见, 产氢发酵菌群的组成因反应器的操作条件或使用的接种物不同而产生差异。

高温条件下好热厌氧杆菌科 (*Thermoanaerobacteriaceae*) 细菌是优势菌种, 尤其是热解糖好热厌氧杆菌 (*T. thermosaccharolyticum*) 近缘的细菌被多次报道. 从表 3 中由 DGGE 法或克隆分析的结果可知, 好热厌氧杆菌科 (*Thermoanaerobacteriaceae*) 细菌在产氢发酵菌群中占有相当高的比例. 好热厌氧杆菌

表 3 分子生物学解析得到的氢发酵微生物种群

Table 3 Microbial community of hydrogen fermentation by molecular biological techniques

温度	分析方法	接种污泥	预处理	反应器	底物	操作条件			产氢率 / (mol·mol ⁻¹)	优势菌	文献
						温度/℃	pH	HRT/h			
中温	DGGE	活性污泥	热处理	CSABR	蔗糖	6.6	0.5	1.75	<i>C. pasteurianum</i>	Wu et al., 2006	
	DGGE	消化污泥	热处理	CSTR	蔗糖	5.3	12	1.68	<i>Clostridium</i> sp. (<i>C. butyricum</i> , <i>C. pasteurianum</i> , <i>C. col-lagenovorans</i> , <i>C. homopropionicum</i>), <i>Glucoacetobacter</i> sp.	Kim et al., 2006a	
	DGGE	豆粕	未处理	CSTR	葡萄糖	5.5	12	1.44	<i>Clostridium</i> sp. (<i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. pasteurianum</i>)	登坂等, 2005	
	DGGE	消化污泥	热处理	CSTR	蔗糖	5.4	12	1.22	<i>Clostridium</i> sp. (<i>C. pasteurianum</i> , <i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. saccharobutylicum</i> , <i>C. acidisoli</i> , <i>C. scatolo-genes</i>) <i>Bacillus</i> sp.	Kim et al., 2006b	
	DGGE	消化污泥	热处理	CSTR	淀粉	5.5	4	1.5	<i>Clostridium butyricum</i> <i>C. pasteurianum</i> <i>Klebsiella pneu-moniae</i> , <i>Streptococcus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Lin et al., 2008	
	RISA	土壤	热处理	MBR	葡萄糖	5.5	5	1.48	<i>Clostridiaceae</i> (<i>Clostridium acidisoli</i> , <i>Limningia china</i>), <i>Flexibacteriaceae</i> (<i>Cytophaga</i> sp.)	Oh et al., 2004	
	RISA	混合污泥	热处理	CSTR	葡萄糖	5.5	30	0.9	<i>Bacillaceae</i> (4/6 bands), <i>Clostridiaceae</i> (1/6 bands), <i>Enterobacteriaceae</i> (1/6 bands)	Iyer et al., 2004	
	RISA	土壤	热处理	CSTR	葡萄糖	5.5	10	1.6	<i>Clostridiaceae</i> (12/12 bands)		
	RISA	葡萄糖	热处理	CSTR	葡萄糖	5.5	30	1.8	<i>Clostridiaceae</i> (12/14 bands), <i>Enterobacteriaceae</i> (2/14 bands)		
	克隆	混合污泥	未处理	CSTR	葡萄糖	5.5	6.6	(4.6 l·g ⁻¹ VSS·d ⁻¹)	<i>Clostridiaceae</i> 64.6%, <i>Enterobacteriaceae</i> 18.8%, <i>Streptococcaceae</i> 13.5%	Fang et al., 2002a	
	克隆	混合污泥	未处理	CSTR	葡萄糖	5.5	6	0.2(0.28 L·g ⁻¹ sucrose)	<i>Clostridiaceae</i> 69.1%, <i>Bacillus/Staphylococcus</i> 13.5%	Fang et al., 2001b	
	RT-PCR	堆肥	未处理	CSTR	酵母废弃物	5.8	32	(460 ml·g ⁻¹ VSS·d ⁻¹)	<i>Clostridium thermocellum</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lay et al., 2005	
	T-RFLP	酸化污泥	未处理	I-CSTR	厨余垃圾	5.3-5.6	32	(1.30 mmol·g ⁻¹ COD)	<i>Butyrivibrio fibrosolvens</i> 62%, <i>Clostridium aminophilum</i> 5%	Li et al., 2007	
	FISH	湿地土壤	未处理	AGSB	淀粉	6	0.5	(5.41 mmol·g ⁻¹ -starch)	<i>bacteria structure composition</i> (% , probe/DAPI), <i>Clos-tridium</i> sp. 32%, Gram positive high G + C bacteria 37%, Gram positive low G + C bacteria 10%	Cheng et al., 2008	
DGGE	土壤	热处理	TBR	葡萄糖	5.5	-	1.11	<i>Clostridia</i> , <i>Bacilli</i>	Ahn et al., 2005		
DGGE	堆肥	曝气	CSTR	纤维素	6.4	72	1-2	<i>Thermoanaerobacteriaceae</i> (<i>T. thermosaccharolyticum</i>), <i>Clostridiaceae</i> , <i>Bacillaceae</i>	Ueno et al., 2001b		
DGGE	活性污泥	未处理	CSTR	纤维素或葡萄糖	7.4	5-342	0.7	<i>Clostridium</i> sp.	Ueno et al., 2001a		
DGGE	消化污泥	未处理	CSTR	食品废弃物	5.5	120		<i>Thermoanaerobacteriaceae</i> (<i>T. thermosaccharolyticum</i>)	Shin et al., 2005		
DGGE	消化污泥	未处理	CSTR	土豆废弃物	5.3	48	1.67	产氢菌: <i>Clostridium sporosphaeroides</i> , <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> . 乳酸菌: <i>Vagococcus salmoninarum</i>	大羽等, 2006		

续表 3

温度	分析方法	接种污泥	预处理	反应器	底物	操作条件		产氢率 ($\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	优势菌	文献
						温度/ $^{\circ}\text{C}$	pH			
中温	克隆	消化污泥	未处理	分批	纤维素	55	6.5	0.82 (102 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ cellulose)	<i>Thermoanaerobacterium</i>	Liu <i>et al.</i> , 2003
	克隆	剩余污泥	未处理	分批	纤维素	55	6.0	0.74 (92 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ starch)	<i>Thermoanaerobacteriaceae</i> 85.7%, uncultured <i>Sceharococcus</i> sp. 14.3%	Zhang <i>et al.</i> , 2003
	克隆	消化污泥	未处理	CSTR	纤维素	55	4.9	2.31	<i>Thermoanaerobacteriaceae</i> 88.8%, <i>Flavobacteriaceae</i> 7.9%	Akutsu <i>et al.</i> , 2008
高温	FISH	剩余污泥	未处理	分批	淀粉	55	6.0	0.74 (92 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ starch)	<i>Clostridium histolyticum</i> group	Zhang <i>et al.</i> , 2003
	T-RFLP	堆肥	曝气	CSTR	纤维素	60	6.0	(199.1 $\text{mmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$)	<i>Thermoanaerobacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i>	Ueno <i>et al.</i> , 2006
超高温	DGGE	无	未处理	重复分批	牛粪	60	7	(392 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ slurry)	<i>Clostridium thermocellum</i>	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007a
	DGGE	无	未处理	重复分批	牛粪	75	7	(248 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ slurry)	<i>Caloramator fervidus</i>	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007a
超高温	DGGE	牛粪	热处理	重复分批	糖(木糖, 葡萄糖, 乳糖, 纤维素, 可溶性淀粉)	75	-	0.56 ~ 2.68	<i>Caloramator fervidus</i>	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007b

注: RISA: ribosomal intergenic spacer analysis, 核糖体基因间区分析; DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis, 变性梯度凝胶电泳; RT-PCR: Reverse Transcription-polymerase chain reaction, 逆转录-聚合酶链反应; T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, 末端限制性片段长度多样性; FISH: Fluorescence in-situ hybridization, 荧光原位杂交法; I-CSTR: intermittent-continuous stirred tank reactor, 间歇搅拌反应器; CSABR: Continuously Stirred Anaerobic Bioreactor, 含有硅胶固定化污泥的连续搅拌厌氧反应器; CSTR: Completely Stirred Tank Reactor, 完全混合型反应器; TBR: Trickle Biofilter Reactor, 散水滤床反应器。

科 (*Thermoanaerobacteriaceae*) 以外的优势菌还有梭菌科 (*Clostridiaceae*) (Ueno *et al.*, 2001h; Ueno *et al.*, 2006) 和芽胞杆菌科 (*Bacillaceae*) (Ueno *et al.*, 2001b) 等好热菌的存在, 但中温和高温属水平的菌群构造有很大的差异 (表 1)。此外, 优势种 *Clostridium* 属的种水平的生物多样性在中温条件高而高温条件低, 这表明高温氢发酵的细菌群构造与中温条件相比更趋于单纯化。

有关超高温氢发酵细菌群构造解析的报道比较少见。仅仅只是 Yokoyama 等 (2007a, 2007b) 报道了在不添加任何接种物的情况下, 采用牛粪尿进行超高温 (75°C) 产氢发酵的细菌群构造, 实验观察到的产氢发酵优势菌为喜热菌 (*Caloramator fervidus*) 近缘的细菌。

Shin 等 (2004) 采用在 HRT 为 5 d, pH = 5.6 的条件下驯化一个半月后的污泥作为接种污泥, 并以食品废弃物为底物, 分别进行中温和高温产氢发酵的分批试验。结果发现, 高温发酵体系丙酸浓度低, 产氢率高, 没有发现甲烷气; 而中温发酵体系丙酸浓度高, 产氢率低, 并检测到甲烷气。这些结果表明高温发酵有利于抑制丙酸菌和氢气营养型产甲烷菌的增长, 从而提高产氢率。DGGE 法分析表明, 高温条件下的微生物多样性低于中温, 高温发酵体系中检测到高温产氢菌 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* 和 *Desulfotomaculum geothermicum*。而中温发酵体系中检测到的产氢菌 *Thermotogales* strain 和 *Bacillus* species *T. thermosaccharolyticum* 是解糖嗜热产氢菌, 分解碳水化合物生产大量氢气, 当 pH = 5~6 温度 60°C 时, 最大产氢率为 $2.4 \text{ mol l}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (Ueno *et al.*, 2001c)。 *D. geothermicum* (*Thermodesulfobacteria* 新种) 是高温性脂肪酸降解硫酸还原菌, 在丙酮酸发酵中以末端产物醋酸、二氧化碳和氢气、硫酸盐和硫代硫酸盐作为电子受体, 以乳酸和丙酮酸作为电子供体而增长; *T. thermosaccharolyticum* 和 *D. geothermicum* 主要通过乙酸/丁酸发酵途径产生氢气; *Thermotogales* strain 发酵葡萄糖产生醋酸、二氧化碳和氢气。

除发酵温度外, 接种物或底物的预处理也会影响微生物的种群构造。接种物的热处理使发酵体系内孢子形成的产氢菌占优势。Kim 等 (2008) 以食品废弃物为对象, 对底物碱处理 (pH = 12.5, 1d) 后, 采用热处理消化污泥作为接种物, 在 HRT 为 1d, pH = 5.3 的条件下进行发酵产氢试验。DGGE 分析结

果发现, 底物碱处理后检测到产氢菌 *Clostridium proteoclasticum* 和 *Anaerotruncus colthamensis* (*Clostridium leptum* subgroup); 而底物无任何预处理的控制试验中则检测到发酵碳水化合物并产生乳酸、醋酸、丙酸和丁酸的 *Megasphaera elsdenii*, 可分解蛋白质-糖微生物并产生有机酸, 但不产氢气的 *Microbacterium phyllophaerae*, 以及发酵碳水化合物并产生醋酸、丙酸的 *Dialister invisus*, 没有发现产氢菌存在。由于采用的是热处理消化污泥作为接种物, 因此, 推测底物无任何预处理的控制试验中的非产氢菌来自废弃物固有的土著微生物。这些结果表明, 底物碱处理可抑制废弃物固有的土著微生物的增长。

从热力学角度分析可知, 降低氢分压可有效提高氢气的生产。降低氢分压的主要方法包括: ①采用惰性气体换气以降低反应器顶部的氢分压; ②加速反应器内的搅拌速度以减少溶液中的溶解性氢气浓度; ③膜分离技术分离移去产生的氢气。Kraemer 等 (2007) 根据文献报道比较了各种气体的换气效果, 研究发现 $\text{CO}_2 > \text{N}_2 > \text{CH}_4 > \text{CO}_2/\text{H}_2$, 即用 CO_2 换气对提高氢气生产效果最好。Kim 等 (2006d) 采用 CSTR 连续反应器, 比较了控制系 (不换气)、内部气体循环换气、 N_2 换气、 CO_2 换气的效果, 发现 N_2 和 CO_2 换气效果优于控制系和内部气体循环换气。DGGE 法分析发现, CO_2 换气后检测到的产氢菌有 *Clostridium tyrobutyricum*、*C. proteolyticum* 和 *C. acidisoli* 而其他体系除了检测到上述产氢菌外, 还检测到氢气营养型的产乙酸菌 (*C. pasteurianum*)、乳酸菌 (*Lactobacillus* sp.) 和利用糖产乙酸的 *Glucoacetobacter europaeus*。研究还指出, N_2 换气不改变微生物相, CO_2 换气对产氢菌的影响很小, 但能抑制氢气营养型的产乙酸菌和乳酸菌或与产氢菌竞争底物的微生物。因此, CO_2 换气的效果优于 N_2 换气。

5 产氢发酵反应器 (Hydrogen production reactor)

产氢发酵可采用各种形式的反应器, 表 4 归纳了利用各种反应器的产氢发酵的研究报告。

5.1 完全混合型反应器 (Completely Stirred Tank Reactor, CSTR)

CSTR 常用于探讨操作条件参数 (pH、HRT、温度等) 对产氢发酵的影响或产氢发酵细菌群的动力学参数的解析。已往采用 CSTR 连续产氢发酵的研究中, 最大的产氢率为 $2.8 \text{ mol l}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (van Ginkel *et al.*, 2005a)。

表 4 用于生物制氢的各种反应器构造

Table 4 A variety of reactor construction for bio-hydrogen production

反应器	接种污泥	预处理	底物			操作条件			负荷/ (g(COD)· L ⁻¹ ·d ⁻¹)	产氢速度/ (L·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	产氢率* / (mol·mol ⁻¹)	文献
			来源	浓度/ (g(COD)·L ⁻¹)	温度 /°C	pH	HRT /h					
CSTR	堆肥	曝气	糖蜜废水	10.5b	60	6.8	12	21.0	2.59	2.59	Ueno <i>et al.</i> , 1996	
	堆肥	曝气	纤维素	10.7	60	6.4	72	36	2.0	2.0	Ueno <i>et al.</i> , 2001b	
	堆肥	曝气	葡萄糖	10.7	60	6.6	12	21.3	1.19	1.19	Ueno <i>et al.</i> , 2001a	
	农田	热处理	葡萄糖	10.7	30	5.5	10	25.7	2.2	2.2	van Ginkel <i>et al.</i> , 2005a	
	农田	热处理	葡萄糖	2.5	30	5.5	10	6.0	2.8	2.8	van Ginkel <i>et al.</i> , 2005b	
	剩余污泥	未处理	葡萄糖	7.5	35	5.5	6	29.9	2.1	2.1	Fang <i>et al.</i> , 2002c	
	豆粕	未处理	葡萄糖	10.7	35	6	8.5	30.1	1.43	1.43	Mizuno <i>et al.</i> , 2000b	
	底泥	热处理	葡萄糖	9.0	35	5.1	6	36.0	1.4	1.4	Zuo <i>et al.</i> , 2005	
	消化污泥	未处理	葡萄糖	20.0	35	5.7	6	80.0	1.7	1.7	Lin <i>et al.</i> , 1999	
	豆粕	热处理	葡萄糖	10.7	35	5.5	12	21.3	1.44	1.44	登坂等, 2005	
	豆粕	未处理	蔗糖	12.5	35	6	8	37.5	1.59	1.59	沈建權等, 1995	
	豆粕	未处理	葡萄糖	12.5	35	6	8	37.5	1.52	1.52	沈建權等, 1996	
	消化污泥	曝气或热处理	葡萄糖	5.3	35	4.0	6	21.3	0.89 ~ 1.19	0.89 ~ 1.19	Lin <i>et al.</i> , 2007	
	消化污泥	曝气或热处理	葡萄糖	5.3	35	5.5	6	21.3	0.48 ~ 0.65	0.48 ~ 0.65	Lin <i>et al.</i> , 2007	
	消化污泥	热处理	蔗糖	30.0	35	5.4	12	60.0	1.23	1.23	Kim <i>et al.</i> , 2005a	
	消化污泥	热处理	蔗糖	11.2	35	5.2	12	22.5	1.65	1.65	Kyazze <i>et al.</i> , 2006	
	消化污泥	热处理	淀粉	8.0	30	5.2	18	10.7	1.25	1.25	Hussy <i>et al.</i> , 2003	
	UASB	处理柠檬酸生产废水的颗粒污泥	未处理	蔗糖	10	39	4.2	13	18	3.48 (145 mL·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	1.61	Mu <i>et al.</i> , 2006
		处理纸浆工业废水的颗粒污泥	未处理	蔗糖	5.33	38	4.4	18	7	4.56 (190 mL·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	1.44	Yu <i>et al.</i> , 2006
	厌氧流化床反应器	剩余污泥	热处理	葡萄糖	10.7	35	4.4	2.0	128	10.2 (19.05 mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.79d	Gavala <i>et al.</i> , 2006
(1) 高温消化污泥		(1) 未处理	葡萄糖	4.85	70	4.8	27	4	1.24c	2.47	Kotsopoulos <i>et al.</i> , 2005	
(2) 高温颗粒污泥		(2) 热处理	蔗糖	20	35	6	8.0	60	1.20 (53.5 m mol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.75 (1.50)	Chang <i>et al.</i> , 2004	
剩余污泥		未处理	柠檬酸废水	15 ~ 21	35 ~ 38	4.5 ~ 5.5	12	408	0.69	0.84	Yang <i>et al.</i> , 2006	
兼性厌氧菌		未处理	酒精废水	34	55	5.5	2.0	408	(9.33 l·g(VSS) ⁻¹ ·d ⁻¹)	1.37 ~ 2.14	Yu <i>et al.</i> , 2002	
剩余污泥		未处理	蔗糖	20	40	5.8 ~ 6.8	2.0	240	22.1	2.47	Wu <i>et al.</i> , 2003	
固定化污泥		酸处理	葡萄糖	10.7	37	4.0	1.0	256	56.6	1.10	Zhang <i>et al.</i> , 2007	
活性污泥 & 消化污泥		未处理	蔗糖	20	35	-	1.0	480	31.7	0.65 (1.30)	Chang <i>et al.</i> , 2004	
剩余污泥		酸处理	蔗糖	40	40	-	2.2	436	54.5	1.46 (2.92)	Lin <i>et al.</i> , 2006	
剩余污泥		酸处理	蔗糖	20	35	-	0.5	960	176	1.52 (3.03)	Lee <i>et al.</i> , 2004	

反应器	接种污泥	预处理	底物		操作条件			负荷/ (g(COD)·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	产氢速度/ (L·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	产氢率 ^a / (mol·mol ⁻¹)	文献
			来源	浓度/ (g(COD)·L ⁻¹)	温度 /°C	pH	HRT /h				
EGSB	剩余污泥	未处理	蔗糖	20	35	6.7	0.5	960	223	1.96 (3.91)	Lee et al., 2006
	活性污泥	未处理	蔗糖	-	35	4.2~4.4	-	120	17	1.74 (3.47)	Guo et al., 2008
固定床	活性炭 + 硅凝胶	热处理	蔗糖	30	40	6.6	0.5	1440	348	1.93 (3.86)	Wu et al., 2006
	活性炭 + 丙烯酸乙酯共聚物	酸处理	蔗糖	40	40	6.7	重复分批		(0.488 l·h ⁻¹ ·g(VSS) ⁻¹)	0.87 (1.74)	Wu et al., 2005
	丙烯酸乳胶 + 硅藻	酸处理	蔗糖	20	35	5.6~6.8	2.0	240	22.3	1.34 (2.67)	Wu et al., 2003
	海藻酸钙 + 活性炭	酸处理	蔗糖	20	35	6.7	重复分批		-	1.98 (3.95)	Wu et al., 2002
载体型											
	活性炭	酸处理	蔗糖	20	35	-	0.5	960	178	1.45 (2.9)	Lee et al., 2004
	活性炭	酸处理	蔗糖	20	35	-	1.0	480	31.7	0.65 (1.30)	Chang et al., 2002
	颗粒活性炭	热处理	葡萄糖	30	37	4.0	1.0	720	56.6	1.19	Zhang et al., 2007
	球状活性炭	酸处理	蔗糖	20	35	-	0.5	960	176	1.52 (3.03)	Lee et al., 2004
	圆柱活性炭	酸处理	蔗糖	20	35	-	0.5	960	169	1.19 (2.37)	Lee et al., 2004
		酸处理	蔗糖	20	35	6.7	0.5	960	223	2.01 (4.02)	Lee et al., 2006
	过滤海绵	酸处理	蔗糖	20	35	-	0.5	960	91.4	0.82 (1.64)	Lee et al., 2004
	砂	酸处理	蔗糖	20	35	-	0.5	960	81.6	0.78 (1.56)	Lee et al., 2004
	聚乙烯醇	消化污泥	葡萄糖	21.3	37	5	20	26	0.30	-	Kim et al., 2005b
	膨胀土	酸处理	蔗糖	20	35	-	2.0	240	9.96	0.19 (0.37)	Chang et al., 2002
	膜生物反应器	热处理	蔗糖	10	-	5.5	5.0	48	9.22e	1.48	Oh et al., 2004a
		热处理	葡萄糖	8.8	35	5.5	9.0	23	2.46~2.56	0.86	李东列等, 2003
	生物滴滤床反应器	未处理	葡萄糖	7.3	60	5.5	4.0	44	23.6 (1053 mmol·d ⁻¹ ·L ⁻¹)	1.11	Oh et al., 2004b
		未处理	葡萄糖	8.9	30	-	2.1 [min]	-	0.65 (27.2 mL·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.9	Zhang et al., 2006
厌氧序批式反应器	消化污泥	酸处理	葡萄糖	25	34.5	5.7	8.0	75	4.46~5.54	0.51~0.63 [60~74 mL·g(COD) ⁻¹]	Cheong et al., 2007
	消化污泥	热处理	蔗糖	50	35	5.4	12.0	100	87.1 (3.89 mol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.48	Kim et al., 2005a
	剩余污泥	酸处理	蔗糖	20	35	6.7	8.0	60	10.1 (450 mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	1.30 (2.60)	Lin et al., 2003
	剩余污泥	酸处理	蔗糖	20	35	6.7	8.0	60	7.3 (328 mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	1.25 (2.50)	Lin et al., 2004

EGSB: Expanded Granular Sludge Bed, 厌氧颗粒污泥膨胀床; a: 产氢率 mol·mol⁻¹ 以消耗的 glucose 计, () 以内以消耗的 sucrose 计; b: 以碳水化合物作为葡萄糖计算得到; c: 假定投入的葡萄糖全部被消耗, 根据所报道的数据计算得到; d: 按产氢速度 [L·L⁻¹·d⁻¹] × (氢气组成 [%] / 100) 计算所得; e: 按 [(产氢速度 [L·L⁻¹·d⁻¹] / 22.4) / (底物浓度 [g·L⁻¹])] / (摩尔质量 [g·mol⁻¹]) × (去除率 [%] / 100) × 1/HRT [1/h)] 计算所得。

5.2 升流式厌氧污泥床反应器 (Up-flow Anaerobic Sludge Bed UASB)

采用 UASB 反应器及在这些反应器内添加载体的上流式反应器近几年已受到关注. UASB 反应器由于污泥停留时间 (SRT) 长可能会引起甲烷的产生, 但通过对接种物的预处理及 pH 的控制, 可以实现稳定的氢生产. 采用 UASB 反应器的报道, 产氢率受条件控制差异很大, 中温条件产氢率为 $0.65 \sim 2.01 \text{ mol mol}^{-1}$; 高温条件下的产氢率各有不同, Yu 等 (2002) 报道指出, 采用葡萄酒酿造废水产氢率为 $2.14 \text{ mol mol}^{-1}$, Kotsopoulos 等 (2005) 采用超高温 (70°C) UASB 反应器, 以葡萄糖为底物在水力停留时间 (HRT) 27 h, pH 4.8 的条件下, 最大产氢率为 $2.47 \text{ mol mol}^{-1}$, 没有发现有甲烷气体的产生; Wu 等 (2003) 报道了在丙烯酸乳胶和硅树脂 (acrylic latex plus silicone) 载体上固定产氢发酵细菌后作为 UASB 反应器的接种物所进行的连续试验, 在 HRT 2 h 的条件下产氢率达到 $2.67 \text{ mol mol}^{-1}$; Lin 等 (2006) 通过将接种污泥和活性炭混合后固定在硅凝胶上, 然后作为 UASB 反应器的接种物, 在 HRT 2.2 h 的条件下达到最大产氢速度 ($2.27 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Lee 等 (2004) 通过对在 UASB 反应器内导入载体后的 CIGSB (Carrier Induced Granular Sludge Bed) 反应器与常规的 UASB 反应器相比, 发现 CIGSB 反应器可促进颗粒化污泥的形成, 在 HRT 为 0.5 h 的条件下维持菌体浓度 26.1 g L^{-1} (以 VSS 计), 即可达到最大产氢率 ($3.03 \text{ mol mol}^{-1}$) 和产氢速度 ($175 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). 并且, Lee 等 (2006) 还探讨了 CIGSB 反应器的高径 (H/D) 比对生物产氢的影响, 提出 $H/D = 8$ 为产氢的最适条件. Zhang 等 (2007) 通过在 UASB 反应器内导入颗粒活性炭载体, 并维持很高的菌体浓度 (21.5 g L^{-1} , 以 VSS 计), 发现在 HRT 为 1 h 的条件下可达到最大产氢速度 $2.36 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (产氢率 $1.10 \text{ mol mol}^{-1}$).

5.3 产氢细菌的固定化

以活性炭为首选的各种材料常用于菌体的固定化研究中. 报道指出, 产氢细菌被固定化后即使在极短的 HRT 条件下也能连续产氢发酵. Wu 等 (2002, 2003, 2005, 2006) 研究发现, 活性污泥经预处理后作为接种物, 然后使其固定化, 可实现高效的产氢发酵. 例如, Wu 等 (2006) 通过将接种污泥和活性炭粉末混合后固定在硅凝胶上作为接种物, 采

用 CSTR 连续试验, 在 HRT 为 0.5 h 的条件下即可达到最大产氢速度 ($15 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Lin 等 (2006) 采用同样的方法得到固定化菌体, 采用 UASB 反应器在 HRT 2.2 h 的条件下达到最大产氢速度 ($2.27 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Lee 等 (2004) 为了探讨载体对产氢的影响, 分别将注射状活性炭、球状活性炭、过滤海绵、砂载体导入 UASB 反应器, 进行以蔗糖为底物的连续产氢发酵试验, 研究发现, 与其它载体比较, 使用活性炭载体可以快速形成颗粒污泥、产氢速度最大. 此外, 注射状和球状活性炭相比, 采用球状活性炭的产氢速度较大. Chang 等 (2002) 通过采用丝瓜海绵、发泡碟靶 (Caly) 及活性炭作为上流式固定床反应器的固定床进行连续发酵试验, 结果表明, 采用活性炭时, 产氢速度相对较高, HRT 为 1 h 的条件下最大产氢速度 $1.32 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

5.4 膜分离反应器 (Membrane Bioreactor MBR)

Oh 等 (2004) 采用 MBR, 通过改变 HRT 和 SRT 进行连续产氢发酵试验. 研究发现, 在 HRT 为 3.3 h 保持不变, SRT 从 3.3 h 至 12 h 条件下, SRT 越长, 葡萄糖分解率、产氢速度和产氢率越大. 但在 HRT 为 5 h 的条件下, SRT 为 5 h 时的产氢速度及产氢率达到最大值, 随后 SRT 增大, 产氢速度及产氢率反而降低. 李东列等 (2003) 以葡萄糖 (8.25 g L^{-1}) 为底物, 比较了 MBR 和 CSTR 的产氢发酵特性, 结果表明, MBR 的产氢率低, 底物分解率高, 产氢速度较 CSTR 高 2 倍.

5.5 散水滤床反应器 (Trickling Biofilter Reactor TBR)

Oh 等 (2004) 在 $55 \sim 64^\circ\text{C}$ 的高温条件下用 TBR 进行连续产氢发酵试验, 结果发现, 在 60°C 、pH = 5.5 HRT 为 4 h 时的产氢率最大 ($1.48 \text{ mol mol}^{-1}$). Ahn 等 (2005) 分析了在 TBR 形成的生物膜上的细菌群, 发现在生物膜上热解糖好热厌氧杆菌 (*T. thermosaccharolyticum*) 近缘的好热产氢细菌占优势. Zhang 等 (2006) 以乙酰丁酸梭状芽孢杆菌 (*C. acetobutyricum*) 作为接种物, 采用 TBR 在中温条件下 (30°C) 进行连续试验, 获得产氢率为 0.9 mol mol^{-1} . 但是, 出现了增殖的生物量 (污泥) 在反应器内堵塞的现象, 为了去除堵塞的污泥, 需要定期维护管理.

5.6 厌氧批式反应器 (Anaerobic Sequencing Batch Reactor ASBR)

研究发现, 与 CSTR 相比, ASBR 可提高菌体浓

度,因此,也能提高产氢速度(Lin *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005a; Cheong *et al.*, 2007)。但是,采用ASBR得到的产氢率($0.48 \sim 1.30 \text{ mol mol}^{-1}$)比采用CSTR得到的结果偏低。

6 两相氢/甲烷发酵系统 (Two-stage process for hydrogen and methane production)

产氢发酵的末端产物为有机酸,单独的氢发酵工艺只能将原料COD中的很少一部分(20%)转化为氢气,而大部分的COD将转化为有机酸等,需要进一步处理或利用。因此,在产氢反应器的后段设置甲烷反应器,可将大量的有机酸转换成沼气能源。两相氢/甲烷发酵工艺的发端是两相酸/甲烷发酵工艺,即在甲烷反应器的前段单独设置酸反应器,使产酸细菌和产甲烷细菌各自在最佳增殖条件下生长,促进甲烷发酵限速阶段的水解反应(Pohland *et al.*, 1971)。已知酸反应器会产生过量氢气,以回收氢气为主要目的在近几年才受到关注(Han *et al.*, 2005; 大羽等, 2005; Liu *et al.*, 2006)。与单相甲烷发酵工艺比较,两相氢/甲烷发酵工艺具有如下优点:①理论上最大可提高10%的能量回收;②提高有机物的分解率并加速甲烷发酵;③促进生物气作为燃料电池的能源利用等(河野等, 2005)。

6.1 两相氢/甲烷发酵工艺的研究实例

研究报道的两相氢/甲烷发酵工艺中,使用的基质有厨余垃圾(Han *et al.*, 2005; Youn *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; 片岡等, 2006; Ueno *et al.*, 2007)、烧酒酒糟(和田等, 2007)、土豆(大羽等, 2005)、葡萄糖(Kraemer *et al.*, 2005)等。从能源回收的角度考虑,两相氢/甲烷发酵工艺较单相甲烷发酵工艺更为有利(Liu *et al.*, 2006)。

Youn等(2005)以厨余垃圾为基质,探讨了兩相氢/甲烷发酵系统中氢反应器温度(35°C 、 55°C)对氢发酵的影响。研究发现,氢反应器在HRT为5d、 $\text{pH} = 5.5$ 的条件下, 35°C 时的产氢率为 $0.07 \sim 0.56 \text{ mol mol}^{-1}$ (以hexose计), 55°C 时的产氢率高达 $1.5 \sim 2.4 \text{ mol mol}^{-1}$ (以hexose计)。并且,氢反应器在 35°C 时有甲烷产生,而 55°C 时没有检测到甲烷。

6.2 两相氢/甲烷发酵系统中甲烷发酵残液的利用

长期以来,高浓度甲烷发酵系统中存在因为基质浓度高而造成有机物去除率低的问题,如果用水稀释废弃物料,那么就会导致消化液的脱水滤液

处理成本增加等一系列的问题。为此,有学者提出将两相氢发酵/甲烷发酵残液的一部分回流到酸反应器,研究证明这些方法是有效的(李玉友等, 2003; 水野等, 2004)。Kraemer等(2005)采用两相氢/甲烷反应器(CSTR-UASB),以葡萄糖为基质,氢反应器温度为 35°C , $\text{pH} = 5.5$ 的控制条件下,将后段的甲烷发酵残液循环回流至氢反应器,首次提出了两相循环式氢/甲烷发酵工艺的技术路线。试验结果表明,后段的甲烷发酵残液不循环时产氢率为 $1.38 \text{ mol mol}^{-1}$,循环后虽然向氢反应器添加的碱量减少了,但产氢率变为 $0.18 \text{ mol mol}^{-1}$,较之前降低了近90%。同时,循环后在氢反应器也检测到甲烷,丙酸和乙醇的产率也随之增大。但是,也有报道发现,采用同样的工艺系统,当前段的氢反应器为高温时,可以抑制甲烷气的产生,有效地进行产氢发酵。大羽等(2005)采用高温(55°C)氢反应器和中温(35°C)甲烷反应器(CSTR-CSTR)的两相循环式工艺,以土豆为基质进行试验(使用的土豆在投入氢反应器前先在贮存罐内与甲烷发酵残液以大约2:1的重量比例混合稀释,不再添加水进行稀释),研究结果发现,氢反应器的产氢率为 $1.67 \text{ mol mol}^{-1}$, pH 在5.2~5.3之间为氢发酵的适宜 pH 范围。片岡等(2006)以厨余垃圾和废纸的混合物为基质,采用两相氢/甲烷发酵工艺系统进行试验。结果表明,当甲烷发酵残液不循环时,氢反应器的 pH 维持在4~4.5较低水平,产氢率也低;循环后氢反应器的 pH 稳定在5~5.5之间,产氢率也随之提高。Chu等(2008)以厨余垃圾为基质,采用两相循环式氢/甲烷(CSTR-CSTR)发酵工艺系统的结果表明,高温氢反应器(pH 控制在5.5)的产氢率达到 $2.5 \sim 2.8 \text{ mol mol}^{-1}$ 。研究还同时指出,甲烷发酵残液的循环可向氢反应器补充一些残液中存在的产氢发酵细菌。

综上所述,两相氢/甲烷发酵工艺中甲烷发酵残液的循环(图1)具有如下优点:①可减少原料浓度调节所需稀释水的用量;②减少氢反应器 pH 调整所需添加的碱量;③可向氢反应器补充产氢细菌。另外,利用生物质碳水化合物产氢发酵时,可能会出现氮源不足的现象(Yokoi *et al.*, 1997; Tanisho *et al.*, 1998),而甲烷发酵残液中的氨态氮可作为氮源对其进行补充。因此,甲烷发酵残液的循环利用可提高整个工艺系统的经济性。

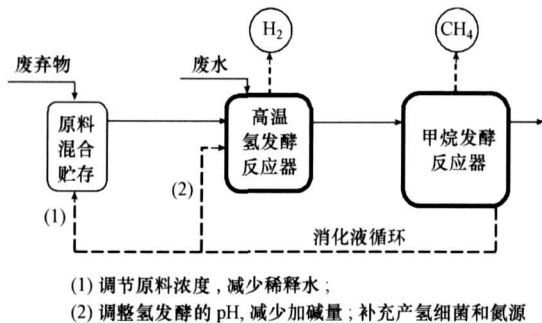


图 1 两相循环高温氢/甲烷发酵工艺

Fig. 1 A two-stage fermentation process combined thermophilic hydrogen production and methane production with recirculation of the digested sludge

7 结论 (Conclusions)

已往的研究表明, 厌氧产氢微生物种群的构建并不困难, 确保连续产氢的稳定性和高效性才是关键问题所在. 近年的研究报道表明, 高温氢发酵工艺可有效地抑制甲烷的产生, 确保稳定和持续的产氢发酵. 另外, 单独的氢发酵工艺只能将原料 COD 中的很少一部分 (20%) 转化为氢气, 而大部分的 COD 将转化为有机酸等. 因此, 从提高产能效率和降低出水 COD 的角度出发, 采用在氢发酵的后段设置甲烷发酵的两相工艺是合理可行的. 最新研究发现, 两相氢/甲烷发酵工艺中甲烷发酵残液的循环对于前段的氢发酵工艺来说具有多方面的促进作用. 但是, 甲烷发酵残液中存在的产甲烷古细菌也可能一起流入氢反应器中, 虽然有研究报道已经指出将氢反应器维持在高温和酸性条件可有效地解决这一问题 (大羽等, 2005; Chu *et al.*, 2008), 但是否只限于这些研究报道的反应条件, 还有待今后作进一步的详细探讨. 进一步开发高负荷的两相循环式氢/甲烷发酵工艺系统, 使整体系统运行的费用降低, 这将促进该工艺系统的工业化进程.

责任作者简介: 李玉友 (1961—), 日本东北大学环境科学研究科准教授 (博导、注册工程师), 天津市特聘讲座教授. 主要从事污水和废弃物处理工艺方面的研究, 在厌氧生物处理和厌氧微生物领域有突出成果. 已发表原创性期刊论文 120 余篇,



参加编写专业书籍 11 册.

参考文献 (References):

- Ahn Y, Park E J, Oh Y K, *et al.* 2005. Bifilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production [J]. *FEMS Microbiol Lett* 249 (1): 31–38
- Akutsu Y, Li Y Y, Tandukar M, *et al.* 2008. Effects of seed sludge on fermentative characteristics and microbial community structures in thermophilic hydrogen fermentation of starch [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 33: 6541–6548
- Bisillon A, Turcot J, Hallenbeck P C. 2006. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli* [J]. *Int J Hydrogen Energy* 31: 1504–1508
- Broseau J D, Zajic Z E. 1982. Hydrogen-gas production with *Citrobacter intermedium* and *Clostridium pasteurianum* [J]. *Chemical Technol Biotechnol* 32: 496–500
- Chang J S, Lee K S, Lin P J. 2002. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 27: 1167–1174
- Chang F Y, Lin C Y. 2004. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 29: 33–39
- Chen C C, Lin C T, Lin M C. 2002. Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 224–228
- Chen W M, Jing Z, Lee K S *et al.* 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 30: 1063–1070
- Cheng C H, Hung C H, Lee K S *et al.* 2008. Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 33: 5242–5249
- Cheong D Y, Hansen C L. 2006. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 72 (4): 635–643
- Cheong D Y, Hansen C L, Stevens D K. 2007. Production of biohydrogen by mesophilic anaerobic fermentation in an acid-phase sequencing batch reactor [J]. *Biotechnol Bioeng* 96 (3): 421–432
- Chidthaisong A, Conrad R. 2000. Specificity of chloroform, 2-bromoethanesulfonate and fluoroacetate to inhibit methanogenesis and other anaerobic processes in anoxic rice field soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 32 (7): 977–988
- Chin H L, Chen Z S, Chou C P. 2003. Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production [J]. *Biotechnol Prog* 19 (2): 383–388
- Chu C F, Li Y Y, Xu K Q, *et al.* 2008. A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste [J]. *Int J Hydrogen Energy* 33: 4739–4746
- Collet C, Aklender N, Schwitzgebel J P, *et al.* 2004. Hydrogen production by *Clostridium thermocultum* during continuous

- fermentation of lactose [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 29: 1479—1485
- Das D, Vezirgoh N. 2008 Advances in biological hydrogen production processes[J]. *Int J Hydrogen Energy*, 33: 6046—6057
- Dietrich G, Weiss N, Winter J. 1998. *Aeothemus paucivorans* gen. nov. sp., nov. a strictly anaerobic, thermophilic bacterium from sewage sludge fermenting hexose to acetate, CO₂ and H₂[J]. *Syst Appl Microbiol* 10: 174—179
- Erkisen N T, Nielsen T M, Iversen N. 2007 Hydrogen production in anaerobic and microaerobic *Thermotoga neapolitana*[J]. *Biotechnol Lett* 30 (1): 103—109
- Evvyemie D, Morimoto K, Karita S, *et al* 2001 Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21 [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 91: 339—343
- Fang H H P, Liu H, Zhang T. 2002a Characterization of a hydrogen-producing granular sludge[J]. *Biotechnol Bioeng* 78 (1): 44—52
- Fang H H P, Zhang T, Liu H. 2002b. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 112—118
- Fang H H P, Liu H. 2002c. Effect of pH on hydrogen production from glucose by mixed culture[J]. *Biores Technol* 82: 87—93
- Gavala H N, Skiadas I V, Ahring B K. 2006. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems[J]. *Int J Hydrogen Energy*, 31 (9): 1164—1175
- Gray C T, Gest H. 1965 Biological formation of molecular hydrogen [J]. *Science* 148: 186—192
- Guo W Q, Ren N Q, Wang X J *et al* 2008. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor[J]. *Int J Hydrogen Energy*, 33: 4981—4988
- Guo W Q, Ren N Q, Wang X J *et al* 2009 Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49 using response surface methodology [J]. *Bioresour Technol*, 100: 1192—1196
- Han S K, Kim S H, Shin H S. 2005 UASB treatment of wastewater with VFA and alcohol generated during hydrogen fermentation of food waste[J]. *Process Biochem*, 40 (8): 2897—2905
- Hawkes F R, Dinsdale R, Hawkes D L, *et al* 2002 Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization[J]. *Int J Hydrogen Energy*, 27: 1339—1347
- Hawkes F R, Hussy I, Kyazze G, *et al* 2007. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress[J]. *Int J Hydrogen Energy*, 32: 172—184
- Hendrickx M, Vos P D e, Ley J D e. 1991. Fermentation characteristics of *Clostridium pasteurianum* IMG3285 grown on glucose and mannitol[J]. *Appl Bacteriol* 70 (1): 52—58
- Holt H G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al* 1994 Bergy's manual of determinative bacteriology 9th ed[M]. Baltimore, USA: Williams & Wilkins
- Hussy I, Hawkes F R, Dinsdale R, *et al* 2003. Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora[J]. *Biotechnol Bioeng*, 84 (4): 619—626
- Ianotti E L, Kalkowitz P, Wolin M J *et al* 1973 Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio Succinogenes* changes caused by interspecies transfer of H₂ [J]. *Bacteriol* 114: 1231—1240
- Iyer P, Buns M A, Zhang H, *et al* 2004. H₂-producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum[J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 66 (2): 166—173
- Jo J H, Lee D S, Park D, *et al* 2007. Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium trybutyricum* M1 isolated from a food waste treating process[C]. Proceedings of 11th W A W orld Congress on Anaerobic Digestion, Brisbane, Australia
- 野野孝志, 李玉友, 野池達也. 2005. 嫌気性水素発酵の基礎既往研究と展望 (II) [J]. *用水と廃水*, 47 (11): 39—47
- 片岡直明, 菖蒲昌平, 宮晶子, 等. 2006. 水素? 二段発酵法による生ごみと紙ごみの特性 [J]. *環境工学研究論文集*, 43: 15—22
- Kalia V C, Jain S R, Kumar A, *et al* 1994. Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*[J]. *World J Microbiol Biotechnol* 10: 224—227
- Kapdan I K, Kargi F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 569—582
- Kataoka N, Miya A, Kiriyan A K. 1997. Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria [J]. *Wat Sci Technol* 39: 41—47
- Kim S H, Han S K, Shin H S. 2005a. Performance comparison of a continuous-flow stirred-tank reactor and an anaerobic sequencing batch reactor for fermentative hydrogen depending on substrate concentration[J]. *Wat Sci Technol* 52 (10-11): 23—29
- Kim J O, Kim Y H, Ryu J Y, *et al* 2005b. Immobilization methods for continuous hydrogen gas production: biofilm formation versus granulation[J]. *Process Biochem*, 40: 1331—1337
- Kim D H, Han S K, Kim S H, *et al* 2006a. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 31 (15): 2158—2169
- Kim S H, Han S K, Shin H S. 2006b. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter [J]. *Process Biochem*, 41: 199—207
- Kim S H, Shin K H. 2008. Effects of base-pretreatment on continuous enriched culture for hydrogen production from food waste[J]. *Int J Hydrogen Energy* 33: 5266—5274
- Kim J O, Kim Y H, Yem S H, *et al* 2006c. Enhancing continuous hydrogen gas production by the addition of nitrate into an anaerobic reactor[J]. *Process Biochem*, 41 (5): 1208—1212
- Kim D H, Han S K, Kim S H, *et al* 2006d. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 31: 2158—2169
- Kotay S M, Das D. 2007. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* HIF-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge[J]. *Biores Technol* 98 (6): 1183—1190
- Kondratieva E N, Zakharova E V, Duda V I *et al* 1989. *Thermoanaerobium lactoethylicum* spec. nov. a New Anaerobic

- Bacterium from a Hot Spring of Kamchatka [J]. Arch Microbiol 151: 117—122
- Kotsopoulos T A, Zeng R J, Angelidaki I. 2005. Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyperthermophilic temperature (70°C) [J]. Biotechnol Bioeng 94: 296—302
- Kramer J T, Bagley D M. 2005. Continuous fermentative hydrogen production using a two-phase reactor system with recycle [J]. Environ Sci Technol 39 (10): 3819—3825
- Kramer J T, Bagley D M. 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production [J]. Biotechnol Lett 29: 685—695
- Kumar N, Das D. 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* H-BT 08 [J]. Process Biochem, 35: 589—593
- Kyazze G, M-Perez N, Dinsdale R, et al. 2006. Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production [J]. Biotechnol Bioeng 93: 971—979
- Lay J J, Lee Y J, Noike T. 1999. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste [J]. Wat Res 33 (11): 2579—2586
- Lay J J, Fan K S, Chang J, et al. 2003. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge [J]. Int J Hydrogen Energy 28: 1361—1367
- Lay J J, Tsai C J, Huang C C, et al. 2005. Influence of pH and hydraulic Retention time on anaerobes converting beer processing wastes into hydrogen [J]. Wat Sci Technol 52 (1-2): 123—129
- Lee K S, Wu J F, Lo Y S, et al. 2004. Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor [J]. Biotechnol Bioeng 87 (5): 648—657
- Lee K S, Lo Y C, Lin P J, et al. 2006. Improving biohydrogen production in a carrier-induced granular sludge bed by altering physical configuration and agitation pattern of the bioreactor [J]. Int J Hydrogen Energy 31 (12): 1648—1657
- Levin D B, Iskm R, Cicel N, et al. 2006. Hydrogen production by *Clostridium thermoacellum* 27405 from cellulosic biomass [J]. Int J Hydrogen Energy 31: 1496—1503
- Li Y, Engle M, Weiss N, et al. 1994. *Clostridium thermoalkaliphilum* sp. nov., an anaerobic and thermotolerant facultative alkaliphile [J]. Int J Syst Bacteriol 44 (1): 111—118
- 李玉友, 水野修, 船石圭介, 等. 2003. 二相循環式高濃度 発酵・í r 用いた生ごみの高速 化処理 [J]. 環境工学研究論文集, 40: 321—331
- 李东列, 野池達也. 2003. 膜分離型反応槽を用いた連続的水素発酵 [J]. 環境工学研究論文集, 40: 353—362
- 李建政, 任南琪, 林明, 等. 2002. 有机废水发酵法生物制氢中试研究 [J]. 太阳能学报, 23(2): 252—256
- Li J Z, Ren N Q, Lin M, et al. 2002. Hydrogen bio-production by anaerobic fermentation of organic wastewater in pilot-scale [J]. Acta Energetica Solaris Sinica 23(2): 252—256 (in Chinese)
- Li S L, Lin J S, Wang Y H, et al. 2007. Microbial diversity of HCSTR hydrogen fermentor feeding with kitchen waste [A]. Proceedings of 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion [C]. Brisbane, Australia
- Liang T M, Cheng S S, Wu K L. 2002. Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane [J]. Int J Hydrogen Energy 27 (11-12): 1157—1165
- Lin C Y, Chang R C. 1999. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose [J]. J Chem Technol Biotechnol 74: 498—500
- Lin C Y, Jo C H. 2003. Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process [J]. Chem Technol Biotechnol 78: 678—684
- Lin C Y, Chou C H. 2004. Anaerobic hydrogen production from sucrose using an acid-enriched sewage sludge microflora [J]. Eng Life Sci 4 (1): 66—70
- Lin C N, Wu S Y, Chang J S. 2006. Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicone-gel-immobilized anaerobic sludge [J]. Int J Hydrogen Energy 31 (5): 2200—2210
- Lin C Y, Chang C C, Hung C H. 2008. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures [J]. Int J Hydrogen Energy 33: 2445—2453
- Lin M, Guist S R. 2007. Comparison of hydrogen fermentative production from glucose by mixed culture at pH 4.0 and 5.5 [A]. Proceedings of 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion [C]. Brisbane, Australia
- Liu H, Zhang T, Fang H H P. 2003. Thermophilic H₂ production from a cellulose-containing wastewater [J]. Biotechnol Lett 25: 365—369
- Liu D, Zeng R J, Angelidaki I. 2006. Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process [J]. Wat Res 40: 2230—2236
- Lovitt R W, Shen G J, Zeikus J G. 1988. Ethanol production by thermophilic bacteria: biochemical basis for ethanol and hydrogen tolerance in *Clostridium thermoaceticum* [J]. Bacteriol 170 (6): 2809—2815
- Mandal B, Nath K, Das D. 2006. Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae* [J]. Biotechnol Lett 28 (11): 831—835
- Minnan L, Jinli H, Xiaobin W, et al. 2005. Isolation and characterization of a high H₂-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring [J]. Research in Microbiology, 156: 76—81
- Mizuno O, Ohara T, Shinya M, et al. 2000a. Characteristics of hydrogen production from bean curd manufacturing waste by anaerobic microflora [J]. Wat Sci Technol 42: 345—350
- Mizuno O, Dinsdale R, Hawkes F R, et al. 2000b. Enhanced hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging [J]. Biores Technol 73: 59—65
- 水野修, 李玉友, 奥野芳男, 等. 2004. 二相循環式 発酵・í K h k 食品加工廃棄物の無希釈処理 [J]. 環境工学研究論文集, 41: 9—17
- Morimoto M, Atsuko M, Akiyama A Y, et al. 2004. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora [J]. Int J Hydrogen Energy 29: 709—713
- Mu Y, Yu H Q, Wang Y. 2006. The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor [J].

- Chemosphere 64 (3): 350–358
- Nakashinada Y, Rachman M A, Kakizono T, *et al* 2002 Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 27 (11–12): 1399–1405
- Nath K, Kumar A, Das D. 2006. Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM 11 [J]. *Can J Microbiol* 52 (6): 525–532
- Nguyen T A D, Kim J P, Kim M S *et al* 2008. Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 33: 1483–1488
- Nikitina O A, Zatsepina S S, Kalyuzhnyi S V, *et al* 1993. Hydrogen production by thermophilic anaerobic bacteria *Clostridium thermosaccharolyticum*, immobilized in polyvinyl alcohol cryogel [J]. *Microbiology* 62 (3): 296–301
- Nishio N, Nakashinada Y. 2004 High rate production of hydrogen/methane from various substrates and wastes [J]. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 90: 63–87
- 登坂充博, 李玉友, 野池達也. 2005. PCR-DGGE法を用いた水素発酵微生物群集の構造解析 [J]. *土木学会論文集*, 790/II-35: 1–10
- Noike T, Mizuno O. 2000 Hydrogen fermentation of organic municipal wastes [J]. *Wat Sci Technol* 42: 155–162
- Noike T, Takabatake H, Mizuno O, *et al* 2002 Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 27 (11–12): 1367–1371
- Oh S E, Lyer P, Bruns M A, *et al* 2004a Biological hydrogen production using a membrane bioreactor [J]. *Biotechnol Bioeng* 87: 119–127
- Oh Y K, Kim S H, Kim M S, *et al* 2004b. Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter [J]. *Biotechnol Bioeng* 88 (6): 690–698
- Oh Y K, Seol E H, Kim J R, *et al* 2003 Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19 [J]. *Int J Hydrogen Energy* 28: 1353–1359
- Olivier B M, Hah R A, Ferguson T J *et al* 1985 Emendation of the genus *Thermobacteroides* *Thermobacteroides proteolyticus* sp. nov., a proteolytic acetogen from methanogenic enrichment [J]. *Int J Syst Bacteriol* 35: 425–428
- Okanoto M, Miyahara T, Mizuno *et al* 2000. Biological hydrogen potential of materials characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes [J]. *Wat Sci Technol* 41 (3): 25–32
- 大羽美香, 李玉友, 野池達也. 2005 二相循環・ H_2 K h k H_2 H_2 加工廃棄物の無希釈水素? 発酵の特性 [J]. *水環境学会誌*, 28 (10): 629–636
- 大羽美香, 李玉友, 野池達也. 2006 二相循環式水素? 発酵・ H_2 K * l k 微生物群集の構造解析 [J]. *水環境学会誌*, 29 (7): 399–406
- Pohland F G, Ghosh S. 1971 Developments in anaerobic treatment process [J]. *Biotechnol Bioeng Symp* 2: 85–106
- Podest J J, Estrella C N, Estes M A. 1996 Evaluation of the absorption on mild steel of hydrogen evolved on glucose fermentation by pure cultures of *Clostridium acetobutylicum* and *Enterobacter* [J]. *Sensors and Actuators B* 32: 27–31
- Rachman M A, Furutani Y, Nakashinada Y, *et al* 1997. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes* [J]. *J Ferment Bioeng* 83 (4): 358–363
- Rachman M A, Nakashinada Y, Kakizono T, *et al* 1998. Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 450–454
- Robert P G, James A R, Ralph S W. 1978. Preparation of coenzyme M analogues and their activity in the methyl coenzyme M reductase system of *Methanobacterium thermoautotrophicum* [J]. *Biochemistry* 17 (12): 2374–2377
- Schfer T, Schneit P. 1992. Maltose fermentation to acetate, CO_2 and H_2 in the anaerobic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: evidence for the operation of a novel sugar fermentation pathway [J]. *Arch Microbiol* 158: 188–202
- Schink B, Zeikus J G. 1983. *Clostridium thermosulfurigenes* sp. nov., a new thermophile that produces elemental sulphur trisulphate [J]. *J Gen Microbiol* 129: 1149–1158
- Schröder C, Selig M, Schönheit P. 1994. Glucose fermentation to acetate, CO_2 and H_2 in the anaerobic hyperthermophilic *Eubacterium Thermotoga maritima*: involvement of the Embden-Meyerhof pathway [J]. *Arch Microbiol* 161: 460–470
- Scholten J C M, Conrad R, Stams A J M. 2000. Effect of 2-bromooethane sulfonate, molybdate and chloroform on acetate consumption by methanogenic and sulfate-reducing populations in freshwater sediment [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 32 (1): 35–42
- 沈建權, 李玉友, 野池達也. 1995 嫌気性水素発酵法による有機排水の処理特性 [J]. *環境工学研究論文集*, 32: 213–220
- 沈建權, 李玉友, 野池達也. 1996 嫌気性細菌による糖類排水の水素発酵特性の比較 [J]. *土木学会論文集*, 552/II-1: 23–31
- Shin H S, Youn J H, Kim S H. 2004. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 29: 1355–1363
- Shin H S, Youn J H. 2005. Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis [J]. *Biodegradation* 16: 33–44
- 宋丽, 刘晓风, 袁月祥, 等. 2008 厌氧发酵产氢微生物的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 24 (6): 933–939
- Song L, Liu X F, Yuan Y X, *et al* 2008. Progress on hydrogen-production microorganisms by anaerobic fermentation [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24 (6): 933–939 (in Chinese)
- Soutschek E, Winte J, Schindler F, *et al* 1984. *Acetamicrobium fluidum*, gen. nov. sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium from sewage sludge, forming acetate, CO_2 and H_2 from glucose [J]. *Syst Appl Microbiol* 5: 377–390
- Sparling R, Risbey D, Poggi-Varaldo H M. 1997. Hydrogen production from inhibited anaerobic cm posters [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 22 (6): 563–566
- Spratt G D, Jarrel K F, Shaw K M, *et al* 1982. A cetylène as inhibitor of methanogenic bacteria [J]. *J Gen Microbiol* 128: 2453–2462

- Sridhar J, Eiteman M A, Wiegell J W. 2000. Elucidation of enzymes in fermentation pathways used by *Clostridium thermosuccinogenes* growing on inulin [J]. *Appl Environ Microbiol* 66 (1): 246–251
- Tanisho S Y, Suzuki Y, Wakao N. 1987. Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E. 825005 [J]. *Int J Hydrogen Energy* 12 (9): 623–627
- Tanisho S, Kunimoto M, Kadokura N. 1998. Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation [J]. *Int J Hydrogen Energy* 23 (7): 559–563
- Ueno Y, Kawai T, Sato S, *et al* 1995. Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora [J]. *J Ferment Bioproc* 79 (4): 395–397
- Ueno Y, Otsuka S, Morimoto M. 1996. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture [J]. *J Ferment Bioproc* 82 (2): 194–197
- Ueno Y, Haruta S, Ishii M, *et al* 2001a. Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flow stirred tank reactor [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 65–73
- Ueno Y, Haruta S, Ishii M, *et al* 2001b. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost [J]. *J Appl Microbiol Biotechnol* 57: 555–562
- Ueno Y, Haruta S, Ishii M, *et al* 2001c. Characterization of microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora [J]. *J Biosci Bioproc* 92 (4): 397–400
- Ueno Y, Sasaki D, Fukui H, *et al* 2006. Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora [J]. *J Appl Microbiol Biotechnol* 101: 331–343
- Ueno Y, Fukui H, Goto M. 2007. Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste [J]. *Environ Sci Technol* 41 (4): 1413–1419
- Valdez-Vazquez I, Ros-Leal E, Muñoz-Pérez K M, *et al* 2006. Effect of inhibition treatment type of inoculum and incubation temperature on batch H₂ production from organic solid waste [J]. *Biotechnol Bioeng* 95 (3): 342–349
- van Niel E W J, Budde M A W, de Haas G G, *et al* 2002. Distinctive Properties of High Hydrogen Producing Extreme Thermophiles *Caldicellulosivorax saccharolyticus* and *Thermotoga elfii* [J]. *Int J Hydrogen Energy* 27: 1391–1398
- van Ginkel S W, Logan B. 2005a. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading [J]. *Water Res* 39: 3819–3826
- van Ginkel S, Logan B E. 2005b. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids [J]. *Environ Sci Technol* 39: 9351–9356
- Vancanneyt M, Devos P, Kersters K, *et al* 1987a. Isolation, characterization and identification determination of strictly anaerobic, thermophilic, ethanol producing bacteria from compost [J]. *Syst Appl Microbiol Biotechnol* 9 (3): 293–298
- Vancanneyt M, De Vos P, De Ley J. 1987b. Ethanol+production from glucose by *Clostridium thermosaccharolyticum*. Strains effect of pH and temperature [J]. *Biotechnol Lett* 9 (8): 567–572
- Vancanneyt M, Devos P, Maras M, *et al* 1990a. Ethanol+production in batch and continuous culture from some carbohydrates with *Clostridium-thermosaccharolyticum* IMG-6564 [J]. *Syst Appl Microbiol* 13 (4): 382–387
- Vancanneyt M, Vos P D, Vermens L, *et al* 1990b. Lactate and ethanol dehydrogenase activities in continuous cultures of *Clostridium thermosaccharolyticum*, IMG 6564 [J]. *J Gen Microbiol* 136: 1945–1951
- 和田克士, 河野孝志. 2007. 烧酎粕の 糖 水素 発酵実証・レポート “運転報告 [C]. 第 10 回日本水環境学会 0 % ル講演集, 42–43
- Wang C C, Chang C W, Chu C P, *et al* 2003. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifementans* [J]. *J Biotechnol* 102: 83–92
- Wang J, Wan W. 2009a. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review [J]. *Int J Hydrogen Energy* 34: 235–244
- Wang J, Wan W. 2009b. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review [J]. *Int J Hydrogen Energy* 34: 799–811
- Wiegell J, Ljungdahl L G, Ravson J R. 1979. Isolation from soil and properties of extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum* [J]. *J Bacteriol* 139: 800–810
- Wiegell J, Kuk S U, Kohring G W. 1989. *Clostridium thermobutyricum* sp. nov., a moderate thermophile isolated from a cellulytic culture that produces butyrate as the major product [J]. *Int J Syst Bacteriol* 39: 199–204
- Winter J, Braum E, Zabel H P. 1987. *Acetomicrobium faecalis* spec nov., a strictly anaerobic bacterium from sewage sludge, producing ethanol from pentoses [J]. *Syst Appl Microbiol* 9: 71–76
- Wu S Y, Lin C N, Chang J S, *et al* 2002. Microbial hydrogen production with immobilized sewage sludge [J]. *Biotechnol Prog* 18 (5): 921–926
- Wu S Y, Lin C N, Chang J S. 2003. Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors [J]. *Biotechnol Prog* 19 (3): 828–832
- Wu S Y, Lin C N, Chang J S, *et al* 2005. Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer [J]. *Int J Hydrogen Energy* 30: 1375–1381
- Wu S Y, Lin C N, Chang J S, *et al* 2006. Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge [J]. *Biotechnol Bioeng* 93: 934–946
- Xiao B Y, Wei Y S, Liu J X. 2004. Factors of affecting microbial fermentative hydrogen production [J]. *Microbiology* 31 (3): 130–134
- 安田大介, 北條俊昌, 李玉友, 等. 2007. 余剰活性汚泥を植種源とした 発酵槽の ー ス ヅ 方法 [A]. 第 18 回廃棄物学会研究発表会講演論文集 [C], 518–520
- Yang J, Speece R E. 1986. The effects of chloroform toxicity on methane fermentation [J]. *Water Res* 20 (10): 1273–1279
- Yang H, Shen J. 2006. Effect of ferrous iron concentration on anaerobic

- bio-hydrogen production from soluble starch [J]. *Int J Hydrogen Energy* 31 (15): 2137—2146
- Yokoi H, Maeda Y, Mori S *et al* 1997. H₂ production by a immobilized cell of *Clostridium butyricum* on porous glass beads [J]. *Biotechnol Techniq* 11 (6): 431—433
- Yokoi H, Mori S, Hirose J *et al* 1998a. H₂ production by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter* sp. M-19 [J]. *Biotechnology Letters* 20 895—899
- Yokoi H, Tokushige T, Hirose J *et al* 1998b. H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes* [J]. *Biotechnology Letters* 20 (2): 143—147
- Yokoi H, Ohkavara T, Hirose J *et al* 1995. Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39 [J]. *J Ferment Bioeng* 80 (6): 571—574
- Yokoyama H, Wakai M, Moriya N, *et al* 2007a. Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 74 (2): 474—483
- Yokoyama H, Moriya N, Ohmori H, *et al* 2007b. Community analysis of hydrogen-producing extreme thermophilic anaerobic microflora enriched from cow manure with five substrates [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 77 (1): 213—222
- Youn J H, Shin H S 2005. Comparative performance between temperature-phased and conventional mesophilic two-phased processes in terms of anaerobically produced bioenergy from food waste [J]. *Waste Manage Res* 23 (1): 32—38
- Yu H, Zhu Z, Hu W, *et al* 2002. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic culture [J]. *Int J Hydrogen Energy* 27: 1359—1365
- Yu H Q, Mu Y. 2006. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. II reactor performance in 3-year operation [J]. *Biotechnol Bioeng* 94 (5): 988—995
- Zhang T, Liu H. 2003. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition [J]. *J Environ Manage* 69: 149—156
- Zhang H, Brunns M A, Logan B E. 2006. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor [J]. *Wat Res* 40 (4): 728—734
- Zhang Z P, Tay J H, Show K Y, *et al* 2007. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor [J]. *Int J Hydrogen Energy* 32 (2): 185—191
- Zeikus J G, Hegge P W, Anderson M A. 1979. *Thermotoga brockii* gen. nov. and sp. nov., a new chemorganotrophic caldophilic anaerobic bacterium [J]. *Arch Microbiol* 122 41—48
- Zhu H, Band M. 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge [J]. *Int J Hydrogen Energy* 31 (14): 1980—1988
- Zuo J, Zuo Y, Zhang W, *et al* 2005. Anaerobic bio-hydrogen production using pre-heated river sediments as seed sludge [J]. *Wat Sci Technol* 52 (10-11): 31—39