

# 碱处理污泥发酵产氢生物相特征

魏素珍,刘俊新\*

(中国科学院生态环境研究中心,北京 100085)

**摘要:**为了揭示碱处理污泥发酵产氢生物相的特征,分别将取自 3 个不同处理工艺污水厂的污泥进行碱处理,并分别在酸性(pH 5)和碱性(pH 11)的条件下进行发酵产氢。结果表明,虽然污泥来源不同,但经碱处理后溶出的可溶性有机质均以蛋白质居多,碳水化合物量仅是蛋白质的 15%~16%。在初始 pH 11 的碱性条件下发酵产氢均可获得较高的产氢率,最大(以 H<sub>2</sub>/TCOD 计)可达 31.9 mL/g,但在初始 pH 5 的酸性条件下产氢率不高,且伴有耗氢现象。用 F338GC/R534 细菌 16S rDNA 通用引物对发酵产氢结束时的生物相进行 PCR-DGGE 分析,不同污水厂污泥产氢的生物相差异显著。随着发酵的进行,生物相中优势菌群有增多的趋势,产氢反应过程中微生物菌群表现出更替消长的现象。

**关键词:**碱处理污泥;发酵产氢;生物相特征;PCR-DGGE

中图分类号:X703 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)10-2398-07

## Characteristics of Microbial Community in Biohydrogen Production from Alkali Pretreated Sludge

WEI Su-zhen, LIU Jun-xin

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

**Abstract:** In order to reveal the characteristics of microbial community in biohydrogen production from alkali pretreated sludge, the biohydrogen fermentation was conducted under acidic condition (pH 5) and alkali condition (pH 11) using alkali pretreated sludge from three wastewater treatment plants with different process, respectively. The results indicate that, although the sludge from different sources, protein is main component in the soluble organic matter released from the three sludge samples by the alkali pretreatment and carbohydrate is only 15%~16% of protein. A high hydrogen yield occurs at the condition of initial pH 11, a maximal hydrogen yield of up to 31.9 mL/g, while the hydrogen yield decreases and hydrogen consumption occurs at the condition of initial pH 5. The analysis using PCR-DGGE technique based on 16S rDNA sequences with the universal primers (F338GC and R534) show that the microbial community in the biohydrogen production process from various sludge structure is significant different, and the microbial population appear a phenomenon of turnover growth and decline and the amount of dominant microbial community present a increasing trend.

**Key words:** alkali pretreated sludge; biohydrogen fermentation; characteristics of microbial community; PCR-DGGE

在污水生物处理过程中会产生大量的剩余污泥,这些污泥主要由微生物和有机物组成,目前主要采用厌氧消化的方法进行处理,同时可产生一定量的甲烷气体。氢是污泥厌氧消化过程中的一种中间产物,但会被甲烷菌或硫酸盐还原菌等耗氢微生物所消耗<sup>[1-3]</sup>,如能将产氢作为污泥厌氧消化过程一个相对独立阶段加以控制,提高污泥产氢率,则对污泥的资源化利用以及清洁能源的获得都是十分有意义的。

污泥中含有丰富的可以作为生物制氢基质的有机物,Tanaka 等<sup>[4]</sup>对污水处理厂剩余污泥的组成分析结果显示,每单位 COD 中有机质组成一般为:41% 蛋白质、14% 糖类、25% 脂类和 20% 的其他物质。然而,污泥中的有机质大部分在细胞内,难以直接利用。前期研究发现,污泥经碱处理后产氢量显著提高<sup>[5]</sup>,其原因之一就是碱处理使得污泥中部分细胞发生融胞,细胞内的有机质释放出来,可以被微生

物直接利用。此外,利用蛋白质产氢和碳水化合物等不同物质产氢的适宜条件是不同的<sup>[6]</sup>,生物发酵产氢在一定程度上可以认为是由微生物在一定条件下和底物相互作用的结果。因此,除了发酵条件和底物外,微生物菌种也是至关重要的因素。污泥中微生物的种类是极其丰富,而目前只有 0.1%~1% 的微生物种类可以通过常规的方法被培养<sup>[7]</sup>。因此,依赖于纯培养方法进行微生物群落分析时其结果往往存在缺陷。以污泥中已有混合菌进行发酵产氢,则菌种的组成以及各菌种在群落中所占的比例便是决定产氢成败的关键因素。虽然污泥在碱性条件下发酵可以提高污泥产氢率的结果已被观察到,但对碱性条件下污泥发酵产氢的机制以及生物相特征还不清

收稿日期:2009-12-02;修订日期:2010-03-24

基金项目:国家自然科学基金项目(50921064)

作者简介:魏素珍(1977~),女,博士研究生,主要研究方向为环境生物技术,E-mail: szhwei@yahoo.cn

\* 通讯联系人,E-mail: jxliu@cees.ac.cn

楚.近年来,基于 16S rRNA 基因的现代分子生物学诊断技术的出现,为描述环境中微生物群落结构提供了快速、准确的有效方法,其中 PCR-DGGE 技术能够快速、准确地鉴定自然生境或人工生境中的微生物种群,并进行复杂微生物群落结构演替规律、微生物种群动态、基因定位、表达调控的评价分析,目前已被广泛用于活性污泥、生物膜、土壤、底泥等环境样品中的微生物多样性检测和种群演替的研究<sup>[8]</sup>.

本研究运用 PCR-DGGE 分子生物学方法,通过分析不同来源污泥经碱处理后发酵产氢微生物相组成的差异,以及碱处理污泥发酵产氢过程中微生物相的演替规律,解析碱处理污泥发酵产氢的生物相特征.

## 1 材料与方 法

### 1.1 污泥来源、性质及预处理方法

本研究所用污泥分别取自北京 3 座城市污水处理厂(分别用 Q 厂、F 厂和 H 厂表示)的回流污泥. Q 厂、F 厂和 H 厂分别采用 A<sup>2</sup>/O(anaerobic/anoxic/oxic)、A/O(anoxic/oxic)和奥贝尔氧化沟工艺.取来的污泥首先经过浓缩沉淀,然后按文献[5]的方法进行碱处理,并通过 4 000 r/min 离心 15 min 获得上清液.

### 1.2 产氢发酵实验

由于污泥的成分复杂、杂质较多,对 DNA 提取和 PCR 扩增反应有一定的干扰.在笔者的前期试验中发现,与直接用碱处理污泥产氢相比,用碱处理污泥上清液产氢可以获得更多的氢气.因此,本研究采用经 4 000 r/min、15 min 离心分离的碱处理污泥上清液进行发酵产氢.产氢发酵实验在总体积为 300 mL、工作体积为 150 mL 的三角瓶中进行.产氢发酵实验的初始 pH 值分别为 5 和 11,其中 pH 5 是目前常规发酵易于获得较高产氢量的 pH<sup>[9]</sup>;pH 11 是污泥发酵产氢研究中获得较高产氢量的 pH 值<sup>[5]</sup>.将 150 mL 的碱处理污泥上清液 pH 分别调节至 5 和 11 后放入三角瓶中进行高纯氮吹脱,之后放在摇床上进行发酵产氢,温度控制在 37℃,摇床转速为 150 r/min.每个产氢反应器都留有取气样孔和取液样孔.

### 1.3 液相指标分析

污泥中可溶性蛋白的测定按照 Lowry 的方法以牛血清白蛋白为标准进行<sup>[10]</sup>.多糖的测定使用 Folin-酚的方法进行<sup>[11]</sup>.污泥中总固体悬浮物(TSS)、可挥发性固体悬浮物(VSS)、可溶性化学需氧量(SCOD)和总化学需氧量(TCOD)测量分别按

照标准方法进行<sup>[12]</sup>.其中样品在进行可溶性蛋白、可溶性多糖和 SCOD 分析之前用 0.22 μm 的膜进行了过滤.溶液的 pH 值用 pH 计进行测量,型号(pHS-3C,上海).

### 1.4 产氢分析

氢气浓度用气相色谱仪 GC122(中国上海)进行检测,采用热导检测器(TCD),6 m 不锈钢填充柱,填料为活性炭(60~80目).控制检测器温度 140℃,柱温为 80℃,汽化室温度为 140℃,以高纯 N<sub>2</sub> 为载气,流速 30 mL/min.采用外标法定量(标气为 H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>=9.86%).

氢气产量根据 Logan 等<sup>[13]</sup>的方法对每个时间段所产的总气体体积和反应器顶部空间氢气浓度计算确定,其方程式如下:

$$V_{H,i} = V_{H,i-1} + c_{H,i}(V_{G,i} - V_{G,i-1}) + V_H(c_{H,i} - c_{H,i-1}) \quad (1)$$

式中, $V_{H,i}$ 和 $V_{H,i-1}$ 分别代表在当前时间( $i$ )和前一时间( $i-1$ )时的累积产氢体积, $V_{G,i}$ 和 $V_{G,i-1}$ 分别代表了在当前时间和前一时间总产气体积, $c_{H,i}$ 和 $c_{H,i-1}$ 分别代表了当前时间和前一时间用气相色谱测量到的瓶子顶部空间的氢气浓度, $V_H$ 代表了反应器顶部空间的总体积.

本研究采用修改后的 Gompertz 方程式对发酵产氢参数进行回归分析<sup>[14]</sup>:

$$H = H_{\max} \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_m e}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (2)$$

式中, $H$ 代表累积产氢量(mL); $H_{\max}$ 代表最大产氢量(mL); $R_m$ 代表最大产氢速率(mL/h); $\lambda$ 代表产氢延迟时间(h); $e$ 为常数 2.718 281 828. $H_{\max}$ 、 $R_m$ 和 $\lambda$ 的值用 Matlab 6.5(Math Works, Inc. Cory right 2001-2002)软件对方程(2)进行拟合得到<sup>[15,16]</sup>.

### 1.5 微生物群落分析

采用碱裂解法提取细菌基因组 DNA<sup>[17]</sup>,用天根生化科技有限公司普通 DNA 纯化试剂盒对 DNA 进行纯化,之后用细菌通用引物进行 PCR 扩增,正向引物 F338:5'-ACTCCTACGGGAGGCGCAG-3';反向引物 R534:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'.GC 夹:CGCCC GCCGC GCCCC GCGCC CGTCC CGCCC. PCR 反应体系(50 μL)如下:10 × buffer (Mg<sup>2+</sup>) 5 μL、2.5 mmol/L dNTP 5 μL、20 pmol/L 引物各 1 μL、ExTaq DNA 酶 0.25 μL. PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环,72℃ 最终延伸 10 min. PCR 仪型号:PTC100(MJ Research, Inc., USA).

分别用 0.8% 和 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳对基因组 DNA 和 PCR 结果进行检测,之后采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行变性梯度凝胶电泳 (DGGE),胶浓度 8%,变性剂浓度 30%~60% (100% 的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺混合物),从胶的上方向下方依次递增.试剂的配制和操作过程参见仪器使用说明.电泳条件为 60℃、120 V、9 h.电泳结束后,凝胶用 GelRed 核酸染色剂 (美国 Biotium 公司) 进行染色.其中 GelRed 核酸染色按照说明书进行.

DGGE 凝胶指纹图谱分析采用 Bio-Rad 公司 Quantity One 软件进行 (软件版本 4.6.2).不依赖于条带的光强度对 DGGE 指纹图谱上存在或不存在共迁移的条带进行自动分析.使用 Dice 指数对样品条带间的同源性进行评估,其中 Dice 指数 ( $C$ ) 定义为:  $C = 2j / (a + b)$ ,式中  $j$  是样品 A 和样品 B 拥有共同条带的数目, $a$  和  $b$  分别是样品 A 和样品 B 的条带数目<sup>[18,19]</sup>.Dice 指数范围为 0~1,其中 0 是指

样品间没有共同条带,1 是指样品的条带完全重合. DGGE 条带的聚类分析 (unweighted pair-group method with arithmetic averages,UPGMA) 是基于 Dice 指数的数值,由 Pearson 相关性分析得到.

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同来源污泥碱处理后可溶性有机组分分析

表 1 为不同污水处理厂污泥进行碱处理前后污泥和上清液性质的分析结果.虽然 3 个污水厂的处理工艺不同,但其污泥经浓缩后的性质基本相似,经碱处理后溶出的有机物浓度也基本相似,即 3 种污泥碱处理后溶出的蛋白质都远多于碳水化合物的量,其碳水化合物与蛋白质的浓度比几乎完全相同,分别为 0.16、0.15 和 0.15.污泥中的有机物主要由微生物细胞和一些难降解物构成,而构成微生物细胞的主要有机成分是很相似的,即都由多数的蛋白质、多糖和脂类构成,所以污泥经碱处理之后会释放出相似的有机物组成.

表 1 不同来源污泥碱处理前后性质<sup>1)</sup>

Table 1 Characteristics of different sludge before and after the alkali pretreatment

项目	Q 厂			F 厂			H 厂		
	原污泥	碱处理污泥	SAPS	原污泥	碱处理污泥	SAPS	原污泥	碱处理污泥	SAPS
pH	7.1	11.4	11.4	7.3	10.8	10.8	7.8	11.2	11.2
SCOD/mg·L <sup>-1</sup>	107	3 574	3 574	88	3 620	3 620	94	3 512	3 512
TCOD/mg·L <sup>-1</sup>	12 624	12 624	4 668	10 985	10 985	4 173	11 567	11 567	4 679
SCOD/TCOD/%	0.85	28.3	76.6	0.80	32.9	86.7	0.81	30.3	75.1
可溶性碳水化合物/mg·L <sup>-1</sup>	17.1	344	344	84.7	334	334	56	312	312
可溶性蛋白质/mg·L <sup>-1</sup>	20.1	2 144	2 144	76.6	2 218	2 218	65	2 089	2 089
碳水化合物/蛋白质	0.85	0.16	0.16	1.1	0.15	0.15	0.86	0.15	0.15

1) SAPS 为碱处理污泥上清液

### 2.2 不同来源污泥碱处理后的发酵产氢

为了研究污泥碱处理后的发酵产氢是否受污泥来源的影响,分别将 Q 厂、F 厂和 H 厂回流污泥碱处理后的上清液进行发酵产氢,结果如图 1 所示.由图 1 可知,至产氢结束时,Q 厂、F 厂和 H 厂的碱处理污泥在初始 pH 11 时的最大累积产氢量分别为: 20.3、20.1 和 18.7 mL;在初始 pH 5 时的最大累积产氢量分别为: 7.4、8.0 和 6.8 mL.由于 3 组污泥碱处理后上清液中的 TCOD 有些不同,因此依据初始 TCOD 计算的氢产率也略有不同. Q 厂、F 厂和 H 厂 3 组碱处理污泥上清液在初始 pH 11 时的最大氢产率 (以 H<sub>2</sub>/TCOD 计) 分别为: 29.29、31.9 和 28.86 mL/g,在初始 pH 5 时的最大氢产率 (以 H<sub>2</sub>/TCOD 计) 分别为: 10.57、13.02 和 9.86 mL/g (表 2). 这些结果表明 3 个污水厂的污泥经碱处理之后在酸性和碱性条件下都分别表现出相似的产氢,即

都在初始 pH 为 11 的条件下有较高的产氢量,而在初始 pH 为 5 的条件下产氢量较低且存在有明显的耗氢现象.此外,3 组不同来源碱处理污泥的产氢延迟期与 pH 值有关,初始 pH 5 的酸性条件下有较短的产氢延迟期,分别为 2.0、4.3 和 1.9 h;而初始 pH 为 11 的碱性条件下有较长的产氢延迟期,分别为 23、21.5 和 23 h.对发酵产氢过程中培养基 pH 的监测发现,这 3 种不同来源污泥的碱处理污泥在发酵过程中 pH 也分别具有相似的变化规律 (图 2),即在初始 pH 11 时随着发酵的进行培养基的 pH 会逐渐下降,在发酵结束时的 pH 分别为 9.28、9.30 和 9.12;而在初始 pH 为 5 时随着发酵的进行培养基的 pH 都呈逐渐上升的趋势,至发酵结束时的 pH 分别为: 6.11、6.31 和 6.21. 这表明虽然污泥的来源不同,其性质也略有差异,但经碱处理之后其产氢性质却几乎没有差异.

表 2 产氢动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of hydrogen production

位置	pH 11			pH 5		
	$\lambda$ /h	$R_m$ /mL·h <sup>-1</sup>	最大产氢率 /mL·g <sup>-1</sup>	$\lambda$ /h	$R_m$ /mL·h <sup>-1</sup>	最大产氢率 /mL·g <sup>-1</sup>
Q 厂	23.0	2.71	29.29	1.6	2.43	10.57
F 厂	21.6	2.54	31.90	3.1	1.35	13.02
H 厂	23.0	2.29	26.86	2.5	0.43	9.86

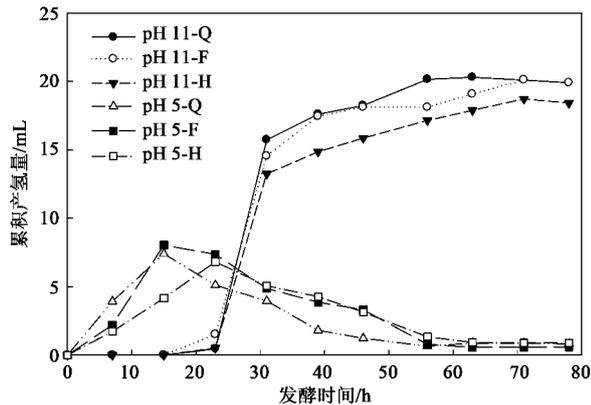


图 1 不同来源污泥碱处理后的发酵产氢

Fig. 1 Hydrogen production from different alkali pretreated sludge

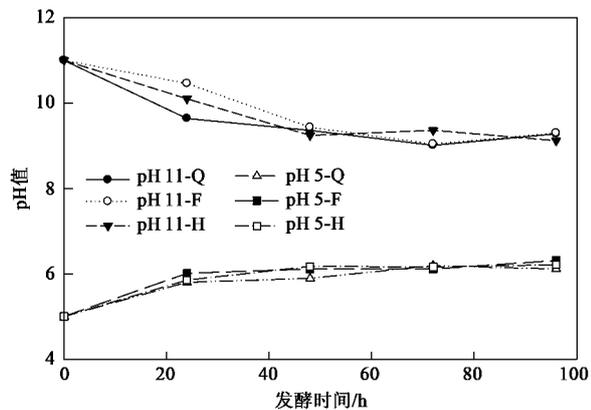


图 2 不同来源污泥碱处理后产氢过程中培养基 pH 的改变

Fig. 2 Changes of medium pH during the hydrogen production from different alkali pretreated sludge

### 2.3 不同来源污泥产氢结束后生物相的比较

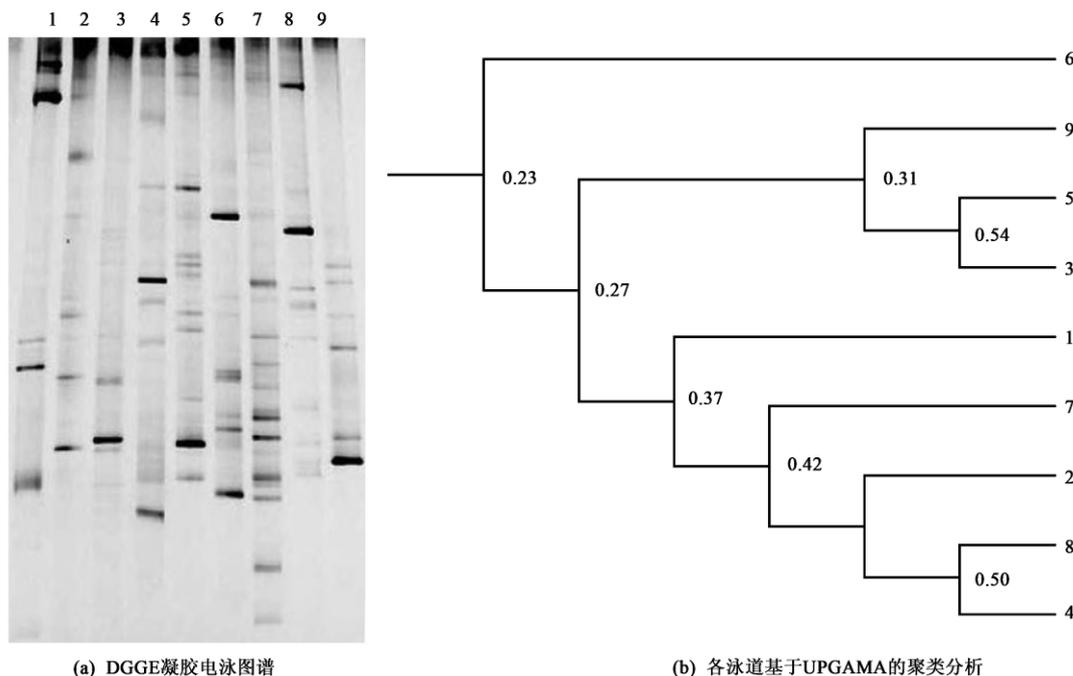
为了考察这种不同来源的碱处理污泥具有相似的产氢性质是否源于相似的微生物群落结构,分别将初始 pH 11 和初始 pH 5 发酵实验的发酵液进行 PCR-DGGE 分析,结果如图 3 所示,其中泳道 1、2、3 分别是 Q 厂、F 厂和 H 厂污泥经碱处理尚未发酵产氢时的微生物群落结构;泳道 4、5、6 分别是 Q 厂、F 厂和 H 厂污泥在初始 pH 11 条件下发酵产氢后的微生物群落结构;泳道 7、8、9 分别是 Q 厂、F

厂和 H 厂在初始 pH 5 条件下发酵产氢后的微生物群落结构.由 DGGE 图谱可知,泳道 1、2、3 的条带差异很大,聚类分析也表明这 3 个泳道的相似性很小,其 Dice 指数都低于 40% (表 3),表明来自 3 个不同污水处理厂的污泥经碱处理后其微生物群落结构的相似性是很小的,这可能跟污水处理厂的运行方式有关,因为不同的污水处理厂由于采用的处理工艺不同会使得微生物群落结构有所不同.然而值得注意的是 3 个厂的污泥在碱处理之后,不论是在酸性的初始条件下 (pH 5) 还是在碱性的初始条件下 (pH 11) 进行发酵产氢,虽然三者的发酵产氢十分相似并且发酵过程中 pH 的改变也十分相似,但其微生物群落结构的差异却是十分明显的 (图 3).在碱性条件下,泳道 4、5、6 条带的相似性很小,其 Dice 系数都分别 < 40% (表 3),聚类分析也表明这 3 个泳道的距离相距很远 (图 3).同样,在酸性条件下 (pH 5),其 Dice 系数也都低于 50%.以上的实验结果表明,虽然 3 个污水处理厂的碱处理污泥产氢情况十分相似,但其微生物群落结构的相似性却很小,表明适合在碱性或酸性条件下产氢的微生物菌种是十分丰富的,碱处理污泥的发酵产氢几乎不受污泥来源的限制.

### 2.4 碱性条件下污泥发酵产氢过程中生物相的演替规律

以上研究表明,3 种不同来源的污泥碱处理后的产氢规律是十分相似的,因此本研究中仅对其中一种污泥碱处理后发酵过程中生物相的演替规律进行了分析.图 4 显示了发酵产氢过程中累积产氢量随时间的变化情况.整个产氢过程可分为 4 个阶段:产氢延迟期 (介于箭头 0~1 之间)、产氢期 (介于箭头 1~2 之间)、产氢稳定期 (介于箭头 2~3 之间) 和氢气消耗阶段 (位于箭头 3 之后).分别取图 4 中箭头所示时间处的发酵液进行 PCR-DGGE 分析,结果如图 5 所示.

根据变性梯度凝胶电泳对具有大小相同而序列不同 DNA 片段的分离原理,虽然整个发酵过程历时很短,但整个生物相却呈现出动态变化的现象.泳道



1. 发酵前 Q; 2. 发酵前 F; 3. 发酵前 H; 4. 碱性条件下 Q; 5. 碱性条件下 F; 6. 碱性条件下 H;  
7. 酸性条件下 Q; 8. 酸性条件下 F; 9. 酸性条件下 H

图 3 不同来源碱处理污泥在发酵前和发酵至产氢稳定阶段的 DGGE 图谱分析

Fig. 3 DGGE analysis to the microbial community from different alkali pretreated sludge before fermentation and during the stable stage of hydrogen fermentation

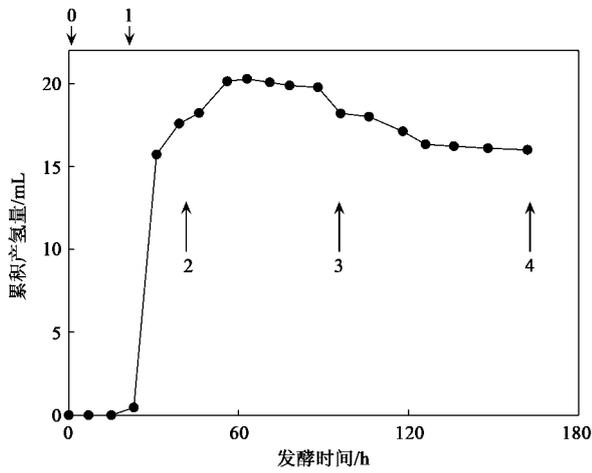
表 3 DGGE 图谱各泳道间的相似性矩阵分析

Table 3 Dice coefficients comparing the similarities of DGGE fingerprints

泳道	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100.0	36.1	12.2	46.1	32.6	10.9	39.1	25.6	7.0
2		100.0	32.7	47.3	37.7	15.8	34.1	44.1	24.1
3			100.0	17.9	54.1	17.0	34.9	26.0	34.0
4				100.0	32.9	23.8	47.3	49.5	25.3
5					100.0	26.5	37.7	38.0	28.9
6						100.0	40.6	37.2	14.2
7							100.0	43.7	22.0
8								100.0	25.6
9									100.0

0 代表的是污泥碱处理后未发酵前的微生物相,其微生物多样性较低.由于污泥经过碱处理之后会有大量的微生物被溶胞而死,因此该处的 DGGE 条带并不能反映原污泥中的微生物多样性,也不能反映出原污泥中的优势菌,仅能部分反映出污泥被碱处理之后残存的微生物信息.随着时间的推移,微生物相中的优势菌群有增多的趋势.图 4 中箭头所指处条带与氢气的产生时间是一致的,显示出该条带所代表的菌种对所产氢气有很大的贡献作用,另外随着发酵的进行该条带的亮度有减弱的趋势,而此时培养基的 pH 也在逐渐的降低(图 2),显示出该条

带所代表的菌种适合在碱性的条件下生长.图 5 中标记空心圈的条带为发酵过程中逐渐出现的条带.由于污泥中的微生物种类是异常丰富的,而发酵的进行导致培养基 pH 的降低,因而可以满足更多菌种生长的需要.这也可能是导致后期氢气消耗的原因.而标记实心圈的条带为共同带,其代表的菌种在产氢发酵过程中一直存在,说明这类微生物是一些生态幅比较广泛的种属.值得注意的是,图 5 中用方框标识的条带在产氢期和产氢稳定期都很少出现,却在产氢延迟期与产氢消耗期有明显的存在,推测这一现象可能与 PCR 的随机扩增有关,有关这一点



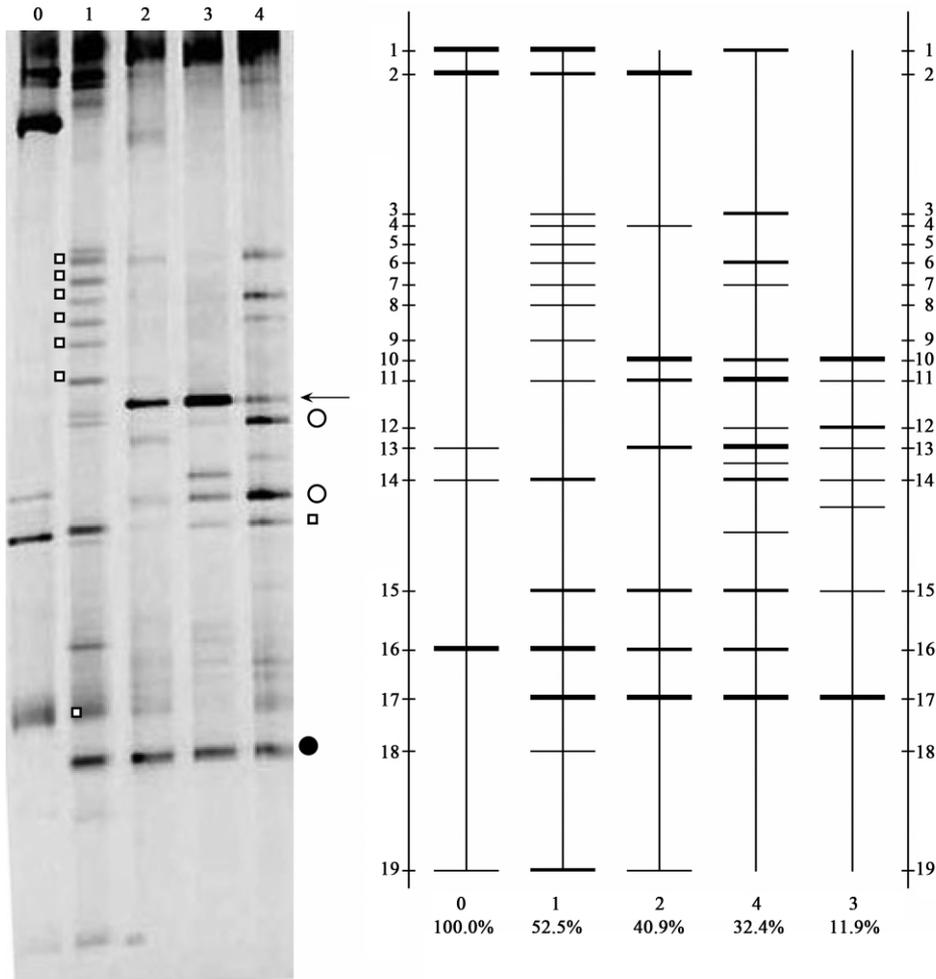
图中箭头所示处为取样点

图 4 碱处理污泥碱性条件发酵产氢过程中累积产氢量随时间的变化关系

Fig. 4 Cumulative hydrogen production during the fermentation of alkali pretreated sludge under alkali condition

还需要进一步的研究证实.

从发酵产氢过程中微生物相的更替规律可以看出,微生物相中的优势菌属是变化的,没有形成稳定的生物相.其中泳道 2 代表的产氢期中条带数目较少,而随着发酵的进行条带数目逐渐增加.泳道 2 取样时间处对应的培养基 pH 为 9.6,因此,在以碱处理污泥进行的序批式或连续式产氢反应器中,其 pH 应维持在 9.6 左右才能有较好的产氢效果,低于该值会有较多的杂菌出现,而 pH 值过高可能不利于反应器的启动.此外,对各泳道间的相似性分析表明,随着发酵的进行,与初始发酵时的生物相相比,其相似性逐渐减小,而后又开始增加.其 Dice 系数由延迟期的 52.5% 减小到了产氢稳定期的 11.9%,又增加到氢气消耗期的 32.4% (图 5). 这些数据表明,在产氢发酵的初期能够大量生长的微生物种类是比较少的,而随着发酵的进行会有越来越多微生



泳道 0、1、2、3、4 分别代表发酵前、产氢延迟期、产氢期、稳定期以及氢气消耗期

图 5 在碱性条件下上清液发酵产氢至不同阶段的 DGGE 图谱分析

Fig. 5 DGGE analysis to the microbial community of hydrogen production from the supernate of alkali pretreated sludge under alkali condition at various fermentation stage

物开始生长.其原因可能与培养基的 pH 值降低有关,也可能是由于后生长的微生物缺乏降解某种底物的酶所致,还需要进一步的证实.

### 3 结论

(1)虽然污泥来源于不同的污水厂,但其在碱性和酸性 pH 条件下的产氢规律却非常相似,而产氢结束后微生物群落的结构差异却十分明显,表明能够在碱性或酸性条件进行产氢的微生物菌种是十分丰富的.

(2)在整个发酵过程中,微生物的群落结构处于动态变化,其中的优势菌随着发酵历时的延续呈逐渐增加的趋势.

#### 参考文献:

- [1] Weemaes M P J, Verstraete W H. Evaluation of current wet sludge disintegration techniques [J]. *J Chemi Tech Biotech*, 1998, **73**(2): 83-92.
- [2] Das D, Veziroglu T N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2001, **26**(1): 13-28.
- [3] Gujer W, Zehnder A J B. Conversion processes in anaerobic digestion [J]. *Water Sci Technol*, 1983, **15**(8-9): 127-167.
- [4] Tanaka S, Kobayashi T, Kamiyama K I, *et al.* Effects of thermochemical pretreatment on the anaerobic digestion of waste activated sludge [J]. *Water Sci Technol*, 1997, **35**(8): 209-215.
- [5] Cai M, Liu J, Wei Y. Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment [J]. *Environ Sci Technol*, 2004, **38**(11): 3195-3202.
- [6] 魏素珍,肖本益,刘俊新. 碱处理和热处理对污泥发酵产氢途径的影响[J]. *科学通报*, 2009, **54**(21): 3291-3300.
- [7] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiol Rev*, 1995, **59**(1): 143-169.
- [8] 邢德峰,任南琪. 应用 DGGE 研究微生物群落时的常见问题分析[J]. *微生物学报*, 2006, **46**(2): 331-335.
- [9] Li C L, Fang H H P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures [J]. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 2007, **37**(1): 1-39.
- [10] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1): 265-275.
- [11] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Calorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chem*, 1956, **28**(3): 350-356.
- [12] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [13] Logan B E, Oh S E, Kim I S, *et al.* Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers [J]. *Environ Sci Technol*, 2002, **36**(11): 2530-2535.
- [14] Lay J J, Lee Y J, Noike T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste [J]. *Water Res*, 1999, **33**(11): 2579-2586.
- [15] Xiao B, Liu J. Effects of thermally pretreated temperature on biohydrogen production from sewage sludge [J]. *J Environ Sci*, 2006, **18**(1): 6-12.
- [16] Zhang T, Liu H, Fang H H P. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition [J]. *J Environ Manage*, 2003, **69**(2): 149-156.
- [17] Sambrook J, Russel D W. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. (Third Edition). New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.
- [18] Dice L R. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species [J]. *Ecology*, 1945, **26**(3): 297-302.
- [19] Liu X, Zhang Y, Yang M, *et al.* Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method [J]. *J Environ Sci*, 2007, **19**(1): 60-66.