# 优势产氢-产酸发酵类型的建立及比较

宋佳秀　任南琪　段志杰

（哈尔滨工业大学市政环境工程学院，哈尔滨　150090）

**摘要**　利用两套连续流搅拌槽式生物制氢反应器(CSTR)，采用优化的启动参数，实现了优势产氢-产酸发酵类型(乙醇型和丁酸型)的启动和稳定运行；计算两者的投碱量，发现维持丁酸型发酵所消耗的碱是维持乙醇型发酵的7倍；在稳定运行阶段，在相同进水COD负荷情况下，两个反应器的产气及产氢能力基本相当，日产氢量在11.3～14.5 L范围内，而丁酸型发酵的生物持有量为乙醇型的1.8倍，而乙醇型发酵菌群的比产氢速率要高于丁酸型，分别为平均21.2 mol/(kgVSS·d)和11.1 mol/(kgVSS·d)。试验证明，乙醇型发酵菌群具有更宽的pH耐受幅，因此对环境的适应能力更强。

**关键词**　生物制氢　氢经济　比产氢速率　荧光原位杂交

## Establishment and comparation for the predominant hydrogen production-acidogenic fermentation types

Song Jia-xiu, Ren Nan-qi, Duan Zhi-jie

(*School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China*)

**Abstract**: Two predominant hydrogen production and acidogenic fermentation types startup and operation were realized successfully in certain pH by adjusting inlet alkalinity in two CSTRs. By calculating the amounts of alkalinity during steady operation, it was found that the consumed alkalinity for maintaining butyric acid fermentation was seven times than that for ethanol fermentation. In this stage, with the same inlet COD loading the amounts of gas production and hydrogen production were similar about 11.3～14.5 L/d. The biomass in butyric acid fermentation reactor was accounted about 1.8 times more than that in ethanol fermentation reactor. As a result, the specific hydrogen production rate for ethanol fermentation was 21.2 mol/(kgVSS·d) averagely and the other was 11.1 mol/(kgVSS·d) averagely. The result showed ethanol fermentative microflora was more adaptable with pH extent and its ambient.

**Keywords**: Hydrogen production; Hydrogen economy; Specific hydrogen production rate; Fluorescent in situ Hybridization(FISH)

氢能具有热值高、清洁、来源广和存在形式多等优点，为唯一不含碳的燃料，被认为是最理想的化石能源的替代能源，更有学者提出了"氢经济"的概念[1]。当前，已成熟的制氢方法或来源于不可再生的能源(化石燃料重整法)，或要消耗大量的电力资源(水电解制氢法)，无法从根本解决能源短缺问题。而利用细菌发酵法制取氢气从本质上说来源于太阳能[2]，被认为是更具发展前景的制氢方法，成为近几年世界各国的研究热点[3~7]。

在生物制氢反应器中，厌氧活性污泥为产氢主

国家自然科学基金(30470054)；国家973项目(G2000026402)。



© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

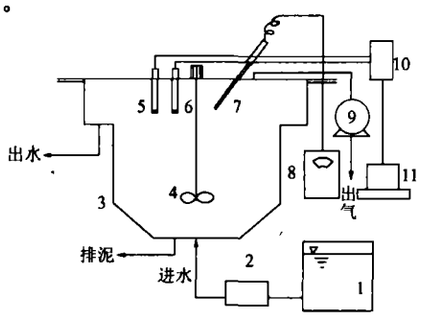
体，并存在多种发酵类型，发酵类型是由群落结构不同的优势菌群决定的，并以不同的特征末端产物为标志。不同产酸发酵类型的产氢能力有较大差异，目前的研究认为，丁酸型发酵和乙醇型发酵同其他发酵类型相比具有较高的产氢优势，为产氢发酵优先选用的发酵类型[8~9]。一些研究者对这两种优势产氢-产酸发酵类型进行了研究，并认为乙醇型发酵在运行稳定性及产氢能力方面同丁酸型发酵相比有较大的优势。秦智等[10]认为乙醇型 $NAD^+/NADH$ 更易实现平衡因而更加稳定；王勇[11]通过连续流试验证明乙醇型发酵在抗冲击负荷方面优于丁酸型。但这些已有的研究大都集中在理论推测和宏观反应参数上，对发酵类型的动态研究和比较尚有待深入。

本文采用连续流反应器，利用经优化的运行参数分别建立乙醇型发酵和丁酸型发酵类型，一方面从两种发酵类型的工艺运行特性、运行参数和产氢能力等方面进行较深入的研究及比较，另一方面利用小型静态试验考察了两种发酵类型下污泥的产氢特性和差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验装置与方法

连续流试验采用 2 套连续流搅拌槽式生物制氢反应器(CSTR，专利号：92114474.1)，见图 1，内设反应区、沉淀区及气-液-固三相分离装置，有效容积 6 L，操作温度(35±1)℃。在线监测反应器内部 pH 和 ORP。试验种泥为某城市市政污泥，采用人工配水方式，葡萄糖为唯一碳源，补充 N、P、维生素及微量元素。

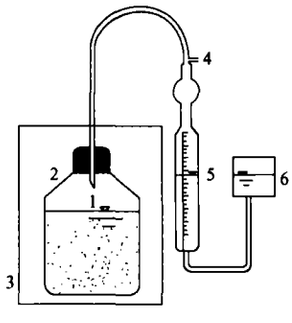



1 水箱 2 磁力泵 3 CSTR 反应器 4 搅拌器
5 pH 探头 6 ORP 探头 7 温控探头 8 温控仪
9 湿式气体流量计 10 单片机 11 计算机

图 1 连续流生物制氢反应器

1# 反应器发酵类型为乙醇型，2# 为丁酸型。启动参数均采用优化的经验参数：启动负荷 8 kg $COD_{Cr}/(m^3 \cdot d)$，HRT6 h，内部 pH 分别控制在 4～4.5和 6～6.5。逐步提升进水葡萄糖浓度和缩短 HRT，直至进水负荷为 30 kgCOD/($m^3$ · d)，HRT 为 3 h。

小型静态试验装置见图 2。在两套反应器分别稳定运行时取泥作为混合菌种，并经生理盐水反复离心淘洗 3 次备用。试验为 12 组反应瓶，每组 3 个平行样，结果取平均。分别按比例加入 0.1 mol/L 的磷酸氢二钠溶液和柠檬酸溶液，使溶液呈现不同的 pH，范围为 3.4～7.4。营养液含葡萄糖(10%)、N、P、微生素及微量元素等。试验时，各培养瓶分别加入 10 mL 培养液，10 mL 混合菌种和 30 mL 不同 pH 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液，混合后溶液的葡萄糖浓度为 10 g/L。装瓶时均用无氧氮气吹脱，密封后放入恒温气浴振荡器中培养，转速 120 r/min，温度(35±1)℃。




1 反应器 2 密封胶塞 3 恒温气浴振荡器
4 取样口 5 搅拌器 6 平衡瓶

图 2 静态反应装置

### 1.2 分析方法

挥发酸和醇类采用 GC122 型气相色谱仪测定；氢气和二氧化碳采用 SC-Ⅱ型气相色谱仪测定，COD、碱度、pH、VSS 等均采用国家标准方法测定[11]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 碱度和液相末端产物的关系

不同的发酵类型[13]占有不同的生态位，因而通过向进水投碱(NaOH)的方法控制反应器内部 pH 环境，可加速反应器内微生物的选择性富集过程[14]，进而驯化成目标发酵类型。



© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进水碱度和pH变化见图3，液相末端产物浓度变化见图4和图5。从挥发酸变化看，污泥接近反应器后很快出现厌氧发酵现象，反应器在启动第2 d

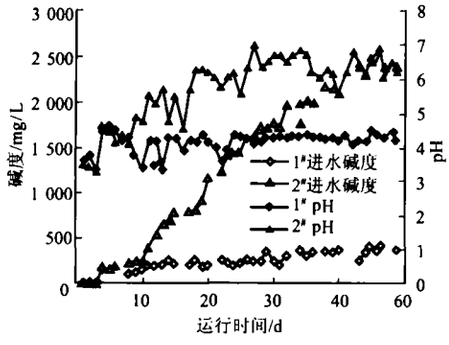



图3 反应器内pH控制

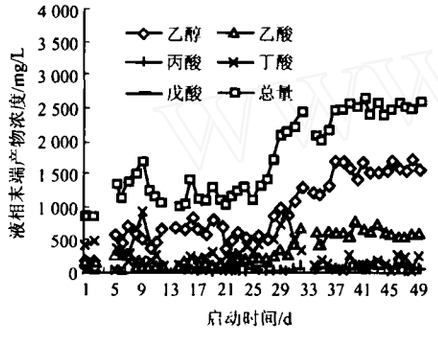



图4 1#反应器液相末端产物变化

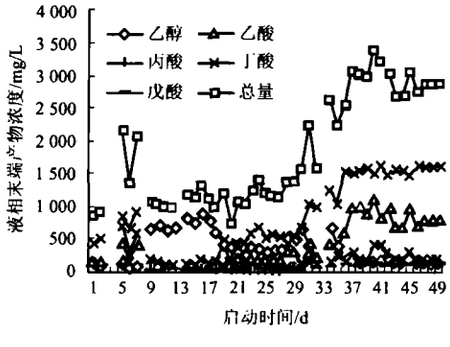



图5 2#反应器液相末端产物变化

挥发酸和醇类的液相产物总量就达到了800 mg/L以上，在启动初期均出现丙酸型发酵，液相产物以丙酸和乙酸为主；随后均出现丁酸型发酵，液相产物以丁酸和乙酸为主，此时由于没有人为控制反应器内部pH，酸性末端的积累使反应器内呈现酸化状态(pH<4)，此时在进水中投加少量碱，使反应器内pH>4，两个反应器内很快出现液相产物以乙醇和乙酸为主的乙醇型发酵。逐步增加两个反应器的进水负荷，维持1#反应器内pH为4.3左右，逐步增加2#反应器进水的投碱量，使其pH逐渐达到6～7。1#反应器一直为稳定的乙醇型发酵，并在第27 d时达到目标负荷并稳定运行；2#反应器先是呈现乙醇型发酵，随着反应器内pH的增加发酵类型开始转变，在第21 d时转为丁酸型发酵，之后偶有波动，并在第30 d时达到目标负荷并稳定运行。计算各反应器进水投碱量可得，维持丁酸型发酵所需的碱量(NaOH)为乙醇型的7倍。

## 2.2 产气和产氢能力

微生物在厌氧产酸发酵阶段还产生氢气和二氧化碳，污泥进入反应器后立刻出现产气现象，并逐日增加(见图6)。启动第5 d在1#反应器产生的气体中检出含有少量氢气，2#反应器在第7 d检出有氢气产生。此后氢气含量逐渐增加，直至形成稳定的目的发酵类型。两个反应器的产气速率和产氢速率基本相当，氢气含量均达到产气量的45%以上，日产气量和产氢量为分别稳定在25～30 L和11.3～14.5 L。

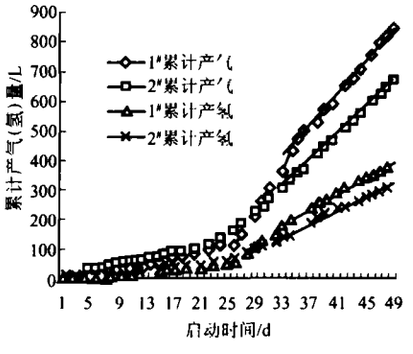



图6 反应器产气变化

## 2.3 生物量和比产氢速率

达到目的发酵类型后，检测反应器内微生物量的变化发现，在进水负荷相同的情况下，1#反应器内生物持有量平均为4.3 g/L左右，2#反应器平均为7.3 g/L。根据反应器内的生物量，计算反应器的比产氢速率(见图7)，结果发现，两个反应器的比产氢速率差别明显，乙醇型发酵的比产氢速率平均为21.2 mol/(kgVSS·d)，而丁酸型稳定在11.1 mol/(kgVSS·d)。这说明，以乙醇杆菌为主的乙醇型发酵菌群的单位生物量产氢能力要显著高于以丁酸梭菌为主的丁酸型发酵菌群。



© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

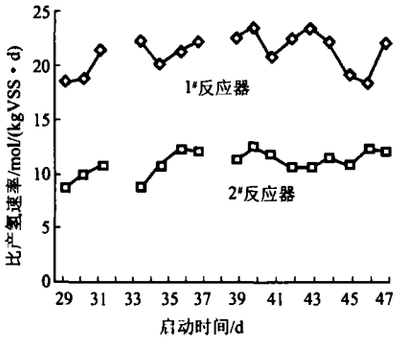



图 7　反应器比产氢速率变化

## 2.4　生物相观察

在运行稳定阶段，分别取出两个反应器内的活性污泥，经预处理后放入扫描电子显微镜(SEM)下观察，见图 8(放大倍数 12.3 mm×10 000)。由图 8 可见，乙醇型发酵菌群结构较为单一，多为长杆菌，有的连成链状，形态类似丝状菌，包括少量短杆菌，圆圈处表示杆菌链接处；而丁酸型发酵菌群结构较为丰富，多为杆菌(有长杆菌、短杆菌，白色箭头指处为梭状芽孢杆菌)，包括少量球菌，也可见部分杆菌成链现象，但数量要少得多。

a 乙醇型发酵的菌群微观形态

b 丁酸型发酵的菌群微观形态

图 8　两种发酵类型菌群微观形态 SEM 照片

杆菌在细菌中种类最多，同一种杆菌的粗细较为稳定，但长度和形态经常伴着培养时间、培养条件的变化而呈较大变化，有时长可是宽的 10 倍，一些杆菌还会出现成链现象，但在单独培养时这些菌往往不呈链状，并非属于链菌[15]。在本试验的培养条件下，乙醇型发酵菌群大量呈现链状，但在对乙醇型发酵菌群进行分离纯培养时，在大量分离出的纯菌中并未发现有链菌出现，经现代分子生态学手段——荧光原位杂交技术(FISH)鉴定菌群种类时发现，一些梭菌属(*Clostridium*)和肠杆菌属(*Enterobacteriaceae*)有结链现象，而并非链菌，只是在该培养条件下出现成链的生理特征。

## 2.5　pH 耐受性比较

在运行稳定阶段，分别取出两个反应器内的菌群，放入间歇反应瓶内进行小型静态产氢试验，反应结束后抽气进行产气组分分析。在缓冲液中，pH 随酸性末端产物的增加下滑幅度较小，可基本视为稳定。在不同的 pH 缓冲环境下，各个反应瓶内的产氢能力出现差异(见图 9)。对于乙醇型发酵菌群，在低 pH 环境下菌群产氢存在一定抑制作用，但抑制作用不明显。对于丁酸型发酵菌群，在 pH 为 3.4～5.6 的范围内，产氢能力较弱，菌群的发酵明显受到抑制。由此可见，乙醇型发酵菌群有更宽的 pH 耐受性。因而，在连续流生物制氢反应器内，在低 pH 环境下(4～4.5)，乙醇型发酵菌群在竞争中处于强势地位，并形成顶级群落。

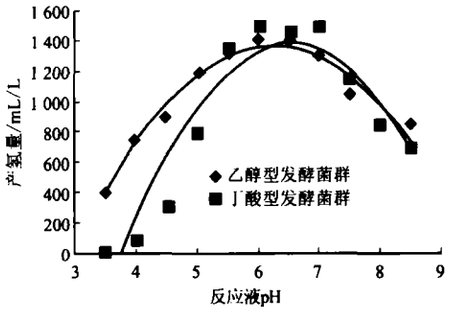



图 9　两种不同发酵类型菌群在不同 pH 体系内的产氢能力

## 2.6　试验结果讨论

通过控制进水碱度进而控制反应器内部所需的最适 pH，可加速生物制氢反应器内微生物的选择性富集过程，成功的建立两种不同发酵类型并稳定



© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

运行。在本试验中，控制 1# 反应器内 pH 为 4～4.5，控制 2# 反应器内 pH 为 6～7，分别在 27 d 和 30 d 形成稳定的乙醇型发酵和丁酸型发酵。比较稳定运行时期二者的投碱量，维持丁酸型发酵所消耗的碱是维持乙醇型发酵的 7 倍，因此，在生物制氢工程应用中，考虑到运行成本，乙醇型发酵是首选发酵类型。在稳定运行阶段，在相同的进水 $COD_{Cr}$ 负荷下，两个反应器的产气及产氢能力基本相当，而乙醇型发酵菌群的比产氢能力要高于丁酸型。资料表明[16]，从乙醇型发酵菌群分离的产氢高效纯菌——B49 的比产氢能力高于从丁酸型发酵菌群中分离出的丁酸型发酵产氢纯菌，因此本试验进一步说明乙醇型发酵菌群的比产氢能力同丁酸型相比具有显著的优势。

在工业发酵生产用细菌中大多数为杆菌，在产氢-产酸发酵中，大部分细菌也是杆菌。比较两种优势产氢-产酸发酵类型菌群的微观形态，乙醇型发酵菌群的形态有其特殊性。同丁酸型发酵相比，乙醇型发酵的生物持有量略低，在今后的氢气生产中，应进一步增加乙醇型发酵菌群的生物浓度；乙醇型发酵菌群对环境的具有较强的适应能力，一般，细菌的 pH 耐受幅较窄，在 3～4 个 pH 单位之间，因而发酵细菌对 pH 变动较敏感，并由此产生运行不稳定。经本实验证明，乙醇型发酵菌群同丁酸型发酵相比有更宽的 pH 耐受幅，因此，乙醇型发酵菌群在连续流运行中更加适应环境 pH 的波动。

## 3 结论

(1) 经过计算，维持丁酸型发酵所需的碱度是维持乙醇型发酵的 7 倍，在生长成本上乙醇型发酵占有明显优势。

(2) 乙醇型发酵的菌群形态以长杆菌为主，丁酸型发酵菌群以长杆菌、杆菌为主，前者在生物持有量方面占劣势。计算两者的比产氢速率，乙醇型发酵明显优于丁酸型发酵，平均分别为 21.2 mol/(kgVSS·d)和 11.1 mol/(kgVSS·d)。

(3) 通过在不同 pH 缓冲液中进行小型间歇产氢试验，证明乙醇型发酵细菌比丁酸型发酵菌群具有更宽的 pH 耐受幅度，因此适应环境波动的能力更强。

## 参考文献


1 Caldeira K, Jain A K, Hoffert M I. Climate sensitivety uncertainty and the need for energy without $CO_2$ emission. Science, 2003, 299: 2052～2053

2 Etiope G, Klusman R W. Geologec emissions of methane to the atmosphere. Chemosphere, 2002, (49): 777～789

3 Wang C C, Chang C W, Chu C P, et al. Using filtrate of waste biosolids to effectively produce bio-hydrogen by anaerobic fermentation. Water Research, 2003, (37): 2 789～2 793

4 Chang, F Y, Lin C Y. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. International Journal of Hydrogen Energy, 2004, (29): 33～39

5 Reysenbach A L, Shock E. Merging genomics with geochemistry in hydrothermal ecosystems. Science, 2002, (296): 1 077～1 082

6 Zhang T, Liu H, Herbert H P, et al. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermo-philic condition. Journal of Environmental Management, 2003, (69): 149～156

7 Han S K, Shin H S. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. International Journal of Hydrogen Energy, 2004, (29): 569～577

8 任南琪，王宝贞. 有机废水发酵法生物制氢技术——原理与方法. 哈尔滨：黑龙江科学技术出版社，1994

9 任南琪，秦智，李建政. 不同产酸发酵菌群产氢能力对比分析. 环境科学，2003，24(2)：70～75

10 秦智，任南琪，李建政. 丁酸型发酵产氢的运行稳定性. 太阳能学报，2004，25(1)：46～50

11 王勇. 微生物最佳产氢发酵类型控制及高效产氢细菌研究：[学位论文]. 哈尔滨：哈尔滨工业大学市政环境工程学院，2002

12 国家环保局《水与废水监测分析方法》编委会. 水与废水监测分析方法. 第 3 版. 北京：中国环境科学出版社，1989

13 Bai M D, Cheng S S, Chang S M, et al. Feasibility Study of Hydrogen Production with Anaerobic Digestion of Pretreated Sludge. Proceeding of 9th International Conference on Anaerobic Kigestion, 2001. 245～247

14 宫曼丽，任南琪，唐婧. pH 5 条件下生物制氢反应器的启动及运行特性. 环境科学，2006：26(2)：177～180

15 岑沛霖，蔡谨. 工业微生物学. 化学工业出版社，2000

16 王相晶. 发酵产氢细菌 B49 生理特性及其固定化应用研究：[学位论文]. 哈尔滨：哈尔滨工业大学，2003



& 通讯处：150090 哈尔滨工业大学市政环境工程学院
电话：(0451)82345187
E-mail：sjxiu@163.com


收稿日期：2006-04-28
修回日期：2006-06-19




© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net