

李永峰, 王璐, 李建政, 等. 2009 利用 *Ethanoligenens harbinense* R3 连续培养的 CSTR 的启动与运行 [J]. 环境科学学报, 29 (8): 1624—1628
LI Y F, Wang L, Li J Z, et al. 2009. Start up and continuous operation of continuous stirred-tank reactors (CSTR) using *Ethanoligenens harbinense* R3 [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29 (8) : 1624—1628

利用 *Ethanoligenens harbinense* R3 连续培养的 CSTR 的启动与运行

李永峰^{1 2 3}, 王璐¹, 李建政³, 刘晓烨¹, 杨传平¹, 任南琪^{3 *}

1 东北林业大学 林学院, 哈尔滨 150040
2 上海工程技术大学化工学院, 上海 201620
3 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090

收稿日期: 2008-10-02 录用日期: 2009-06-30

摘要: 采用连续流搅拌槽式反应器 (CSIR) 为实验装置, 探讨了利用新型发酵产氢菌 R3 的生物制氢反应器的启动与运行情况. 实验表明, 维持反应器内 pH 在 4.5 左右, COD 启动值为 6000 mg L⁻¹, 水力停留时间为 8 h 等条件, 可在 30 d 内完成反应器内菌种对环境的适应并进入稳定运行阶段. 此时系统氧化还原电位 (HRT) 稳定在 -400 mV 左右. 系统内的液相末端发酵产物中乙醇含量最大, 占发酵产物总含量的 65%, 乙醇和乙酸所占比例为 95%. 系统呈现明显的乙醇型发酵特性. 启动和运行阶段的积累产氢量为 399.33 L, 最大产氢量达 15768.8 mL d⁻¹, 最大氢气产率为 49.94%. 有机氮源可被微生物利用而无机氮源对产氢并无太大影响. 使用有机氮源和磷源时积累产气量、积累产氢量和发酵液相末端产物与空白对照相比有所增大.
关键词: 生物制氢; CSIR 反应器; 连续发酵

文章编号: 0253-2468 (2009)08-1624-05 中图分类号: X703.1 文献标识码: A

Start up and continuous operation of continuous stirred-tank reactors (CSTR) using *Ethanoligenens harbinense* R3

LI Yongfeng^{2 3}, WANG Lu, LI Jianzheng, LIU Xiaoye, YANG Chuanping, REN Nanqi^{3 *}

1 School of Forestry, University of Northeast Forestry, Harbin 150040
2 College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University Engineering and Science, Shanghai 201620
3 Harbin Institute of Technology, Harbin 150090

Received 2 October 2008 accepted 30 June 2009

Abstract: Continuous stirred-tank reactors (CSTR) for biohydrogen production were studied using *Ethanoligenens harbinense* R3, a new anaerobic hydrogen producing bacterium. The study aimed to assess the start-up and continuous operation characteristics for biohydrogen production of the CSTR. At a pH of about 4.5, COD concentration of 6000 mg L⁻¹, and a hydraulic retention time (HRT) of 8 h, a hydrogen producing microbial community could adapt to the environment and operate stably. At the same time, the reduction potential of the biohydrogen reactor system remained steady at about -400 mV. The concentration of ethanol could reach 65% of the aqueous terminal production in the system. The total hydrogen production was 399.33 L, and the highest hydrogen production was 15768.8 mL d⁻¹ during the stage of the start up and operation. Organic compounds containing nitrogen could be digested well by the microbes, while inorganic nitrogen had no obvious effects on hydrogen production and bacterium growth. When organic compounds containing nitrogen and phosphorus were added to the culture medium, the total biogas production, the accumulated hydrogen production and total ethanol concentration of the end liquid products were higher than in the control group.
Keywords: biohydrogen production; CSTR reactor; continuous fermentation

1 引言 (Introduction)

随着社会的发展,人类在生产活动和生活中排放的大量废弃物对人类赖以生存的环境造成的污染日益严重.同时,人类对能源的需求量也日益增大,环境污染和能源危机正阻滞着人类前进的步伐.在所有可替代能源中,氢气以其洁净燃烧、能量密度高、可再生等优点而被能源界公认为最理想的矿石燃料的替代能源.生物制氢耗能低和成本相对较低的特点弥补了传统物理和化学制取氢气的缺点.从人类可持续发展角度出发,以非石化燃料制取氢气是制氢的正确途径.生物制氢技术为制氢工业开辟了一个新的领域,生物制氢主要分为 3 种类型:光解水产氢、光合细菌制氢和厌氧发酵制氢.

光解水产氢也称为光分解水产氢途径,因为蓝细菌和绿藻的产氢属于光解水产氢类型,它们在厌氧的条件下,通过光解水合作用分解水产生氢气和氧气 (Das et al., 2008).自从 Ges 等 (1949) 首次证明光合细菌可利用有机物光合产氢以来,大量的生理生化研究主要用于揭示这种光合产氢机制.光合细菌所固有的只有一个光合作用中心的特殊键但结构,决定了它所固有的相对较高的光转化效率,具有提高光转化效率的巨大潜力 (张全国等, 2005).厌氧发酵制氢的研究开始于 20 世纪 60 年代, Kuma 等 (2002) 以椰子壳纤维固定阴沟肠杆菌 (*Enterobacter aerogens*) II-BT08 以葡萄糖作为底物在连续运行下获得最大产氢率 $62 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

发酵产氢是利用产氢微生物,在厌氧条件和酸性介质中代谢有机物产生氢气的过程 (Kissalajita et al., 1987).厌氧发酵主要分为两个阶段:水解和产氢产酸阶段.在水解阶段,淀粉、纤维素和蛋白质在水解性细菌作用下,水解成葡萄糖、二糖、氨基酸和脂肪酸;在产氢产酸阶段,产酸细菌发酵可溶性低分子碳水化合物、有机酸等,产生醋酸、丙酸、丁酸等有机小分子化合物以及 H_2 和 CO_2 . 发酵法生物制氢分为混合培养发酵法生物制氢和纯培养发酵法生物制氢 (李永峰, 2005).

混合培养发酵法生物制氢工艺的基本操作是接种活性污泥,利用生物厌氧产氢产酸发酵过程制取氢气,产氢单元就是作为污水的二项厌氧生物处理工艺的产酸项 (李永峰, 2005).任南琪 (1995) 首先提出了利用厌氧活性污泥对有机废水的发酵作用制取氢气,并应用研制的连续流生物制氢反应器

(任南琪, 1993) 进行试验,并发现碳水化合物产氢产酸过程是通过乙醇型发酵.这种发酵类型的稳定性优于丙酸型发酵和丁酸型发酵,被认为是产酸相的最佳发酵类型 (Ren et al., 2008).此后,国内多为利用颗粒污泥进行混合培养发酵生物制氢的研究.直至林明 (2002) 分离了一株乙醇发酵产氢新菌,被命名为 B49,其主要末端产物为乙醇、乙酸、氢气、二氧化碳和极少量的乳酸,研究人员逐渐开始了纯培养发酵法生物制氢的研究.李永峰 (2005) 发现并分离了纯菌种 *Ethanoligenens harbinense* R3,利用间歇培养实验研究了其产氢能力和调控方法,其他作者也做了类似的工作 (Danko et al., 2008).基于目前大多数发酵生物制氢的研究是关于纯菌种间歇试验和混合培养的,因此,本文尝试采用纯菌种 R3 发酵的方法,探讨连续流生物制氢反应器的启动与运行过程中, pH 值、液相末端产物、产氢量、产氢率变化情况及营养物质对产氢的影响,同时探索新型发酵菌 R3 的发酵类型及在连续发酵过程中的产氢能力和产氢行为的调控;根据相关研究控制参数,提出连续培养工艺的生物制氢控制对策.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 菌种来源

本试验采用的菌种取自连续流搅拌槽式厌氧发酵产氢活性污泥中,采用 Hungate 滚管技术将菌种分离培养.从生物制氢反应器中取 10 mL 产氢发酵活性污泥,放入事先充满氮气的无氧灭菌的培养瓶中,加入 10 粒玻璃珠,在振荡器中振荡 1 h 将污泥中菌胶团打碎,用去氧无菌水或去氧无菌生理盐水进行 10 倍系列稀释,接种于固体培养基之中,进行平板培养或滚管培养,培养时间为 20 d 通过 MPN 法估计菌体数量. 15°C 下灭菌 30 min 后,在 37°C 条件下,转速 120 r min^{-1} 的空气浴摇床中培养.

2.2 连续流装置

本试验采用的装置连续搅拌槽式生物制氢反应器如图 1 所示.系统主体设备生物制氢反应器是任南琪 (1993) 研制的国家发明专利 (Zl921144741.1),属于连续搅拌槽式反应器 (CSIR).反应器由有机玻璃制成,设有三相分离装置,反应区和沉淀区一体化设计,设有搅拌装置.反应器总容积 18.8 L ,其中反应区的有效容积 9.6 L ,沉淀区 5.4 L .反应器外壁装有电加热系统,由温控器控制反应器温度为

(35 ± 1) $^{\circ}\text{C}$.

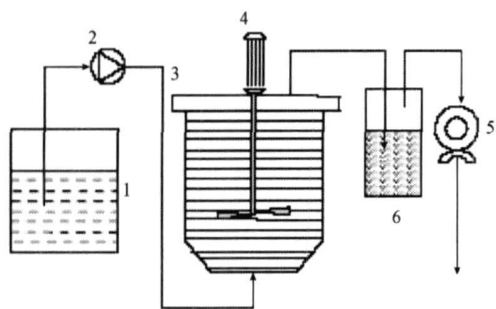


图 1 连续流混合培养生物制氢系统 (1. 废水箱; 2 恒流泵; 3. 反应器; 4 搅拌棒; 5 气体流量计; 6 过滤器)

Fig 1 Continuous H_2 -Producing fermentation reactor system

(1. feed tank 2. pump 3. reactor 4. blender 5. biogas meter 6. waterlock)

2.3 分析方法

氢气的测定: 发酵气体组分采用 SC-II 型气相色谱仪 (上海分析仪器厂, 上海) 进行分析测定, 柱长 2 m, 担体 Porapak Q 50/80 目, 热导池检测器 (TCD), 氮气 (99.99%) 作为载气, 流速为 $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 用 1 mL 注射器抽气进样。

挥发酸和醇类测定: 采用 GC122 型气相色谱仪 (上海分析仪器厂, 上海) 对液相末端产物进行测定。气相色谱仪的不锈钢色谱填充柱长 2 m, 担体 GDX103 60~80 目, 氢火焰检测器, 氮气作为载气, 流速为 $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 氢气流速为 $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 空气流速为 $490 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 汽化室温度 220°C , 柱室和检测室温度 190°C 。反应结束后, 取反应液 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 取上清液进样。

采用国家标准方法测定 COD , 采用 PH-25 型酸度计测量 pH 和 ORP, 用 IML-1 型湿式气体流量计计量发酵气体产量。

3 结果 (Results)

3.1 反应器的启动与运行

生物制氢反应器采用连续流的方式运行。在整个的启动与运行过程中, 调节进水的 pH 值以维持反应器内部的 pH 值在 4.5 左右。HRT 为 8 h, 温度为 (35 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。CSIR 反应器的启动主要分 3 个阶段: 第 1 个阶段 (1~10 d) 采用 COD 浓度为 $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进水; 第 2 个阶段 (11~20 d) 采用 COD 值为 $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进水; 第 3 个阶段 (21~30 d) 采用 COD 值为 $6000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进水。每次提升负荷时都要稳定 24 个 HRT 再进入到下一个阶段中。在启动进入到

第 35 d 时, 反应器在目标负荷 $6000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 COD 计) 下稳定运行。在启动初期的氧化还原电位较高在 -500 mV 左右, 随着发酵的进行, 氧化还原电位逐渐降低。这主要是因为产氢菌对有机物的氧化及代谢过程中所产生的氢、硫化氢等还原性物质会消耗反应期内的溶解氧, 从而降低氧化还原电位。在随后的启动与运行过程中, ORP 都较稳定的维持在 -450 mV 左右。

3.2 液相末端发酵产物

液相末端发酵产物对微生物发酵过程具有重要的影响, 在厌氧发酵产氢过程中, 主要发酵产物是乙酸和乙醇, 并有微量的丙酸和戊酸产生。通过检测挥发性脂肪酸 (VFA) 的组成和含量, 可以初步判断从生物制氢反应器中分离出的纯菌的发酵类型, 并可适时地反映系统运行特征及其稳定性。在产氢发酵过程中, 液相末端产物作为影响因子直接影响着产氢发酵进程。图 2 中所示为启动与运行过程中液相末端产物中各个成分的含量。从图 2 中可看出, 乙醇、乙酸分别占发酵液相末端产物的 65% 和 30% 左右。乙醇在液相末端产物中占据一定的优势, 由此可以证明, 新型发酵产氢菌 R3 的主要代谢类型就是乙醇型发酵。

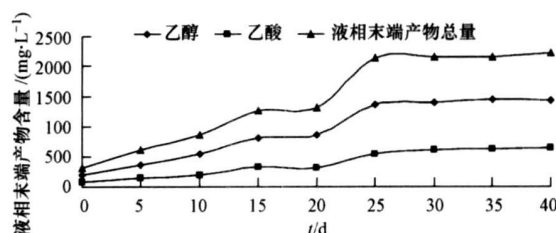


图 2 菌种 R3 的各液相末端产物的含量

Fig 2 The contents of end liquid products of R3

3.3 反应器的产氢能力

生物制氢的主要气相产物为 H_2 和 CO_2 。图 3 和图 4 所示是在实验过程中反应器利用纯菌种 R3 发酵的产氢量和氢气产率。从图 3 和图 4 可以看出, 在启动初期, 由于菌种没有完全适应反应器内的环境和有机负荷的冲击, 只有微弱的氢气产生。随着发酵过程的进行, 细菌生长的速度逐渐加快, 其产氢量、产氢速率和氢气含量也随之增大。在反应器运行到 35 d 左右时, 产氢量保持在 $15.6 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$ 左右, 氢气产率为 45% 左右, 反应器进入稳定运行阶段。启动和运行阶段的积累产氢量为 399.3 L , 最大产氢量达 $15.8 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$, 最大氢气产率为 49.94%。

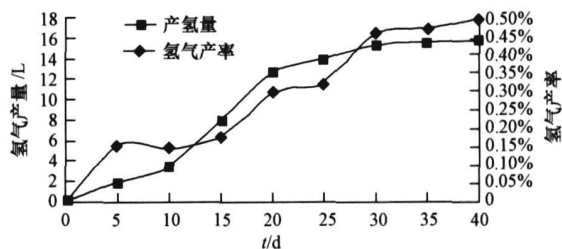


图3 连续流反应器的产氢量

Fig. 3 Hydrogen production of the continuous flow reactor

3.4 pH值

pH值是废水厌氧处理过程中最重要的影响因素之一。因为废水进入反应器后, 水解和发酵产酸反应会迅速改变溶液的 pH 值。启动过程中反应系统的 pH 值是反应器运行的重要工程控制参数。从图 4 中可看出, 出水 pH 值始终保持在 4.0~4.5 之间, 废水的乙醇型发酵也没有受到影响。这说明乙醇型发酵一旦实现, 发酵制氢反应器中的微生物生态体系即具备了较强的稳定性和抗荷冲击能力。实现乙醇型发酵的生物制氢反应系统的 pH 均在 5.0 以下, 此时反应系统中的酸性末端成为限制产酸细菌群发酵能力的主要因素。而乙醇型发酵的目的产物乙醇则不会加速反应系统 pH 值的继续降低, 这也是产酸发酵菌群为了自我生存而进行的生理调节机制。

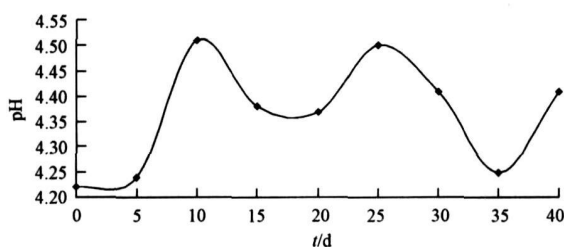


图4 反应器的启动与运行阶段出水 pH 值的变化情况

Fig. 4 pH value of outflow during start up and operation

3.5 氮源

有机氮源和无机氮源对产氢的影响如图 5 所示。本试验在发酵阶段分别投加了有机氮源和无机氮源各 7 d 并设置空白试验与它进行对比。有机氮源选择的是牛肉膏、蛋白胨和酵母粉的组合, 每一种氮源物质各为 0.5 g L⁻¹; 无机氮源选择的是氯化铵, 浓度为 1.5 g L⁻¹。由图 5 可知, 使用有机氮源时累计产气量和累计产氢量与空白时相比有所增大, 分别为 286.47 L 和 136.47 L, 使用无机氮源对发

酵产氢并无太大影响。有机氮和无机氮对液相末端产物的影响如图 6 所示。由图 6 可看出, 有机氮对发酵液相末端产物的影响较大, 乙醇和乙酸的产量都较空白时高, 分别达到 2563.8 mg L⁻¹ 和 1275.4 mg L⁻¹, 而且液相末端产物的产量也有所增大, 为 4373 mg L⁻¹。

无机氮源对液相末端产物的影响不大。因为无机氮源难于被产氢微生物同化, 应该加入有机氮源, 提高生物制氢系统的产氢菌的活性; 严格厌氧产氢细菌缺乏无机氮源同化代谢的酶类, 或者这样的生化代谢只有在极端缺乏氮源时才能够激活。

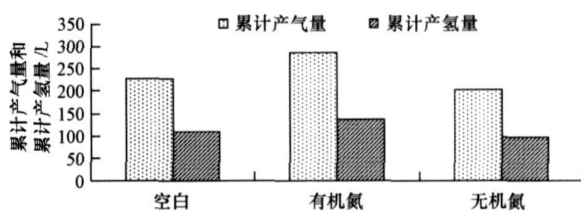


图5 有机氮源和无机氮源对产氢的影响

Fig. 5 The effect of organic source of nitrogen to accumulation of hydrogen production and accumulation of bio-gas production

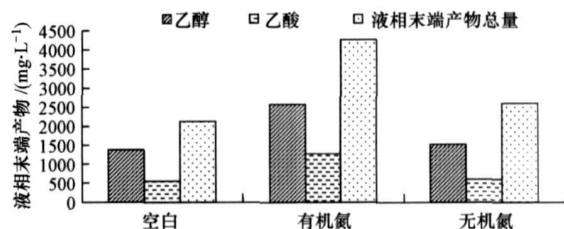


图6 有机氮和无机氮对液相末端产物的影响

Fig. 6 The effect of organic source of nitrogen on end liquid products

3.6 磷源

本试验采用磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 作为磷酸的来源, 浓度为 1.5 g L⁻¹, 并置空白试验。由图 7 可以看出, K_2HPO_4 促进了发酵产氢的产气量和产氢量, 最大值分别达到 237.47 L 和 151.99 L。 K_2HPO_4 对菌株 R3 液相末端产物的影响的结果见图 9。从图 9 可以看出, 液相末端产物主要是乙醇和乙酸, 浓度分别是 2352.9 mg L⁻¹ 和 1027.7 mg L⁻¹。液相末端产物中乙醇含量高于乙酸, K_2HPO_4 浓度的变化没有改变菌株 R3 发酵产氢的代谢类型, 代谢类型仍属乙醇型发酵。

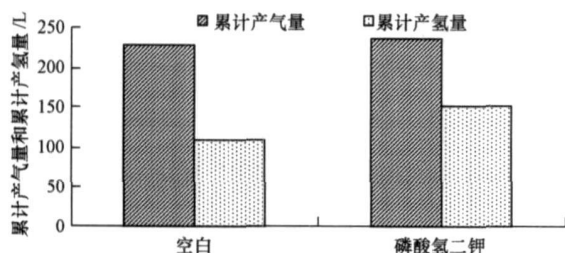


图7 磷酸氢二钾对累计产气量和累计产氢量的影响

Fig. 7 The effect of K_2HPO_4 on accumulation of hydrogen production and accumulation of bio-gas production

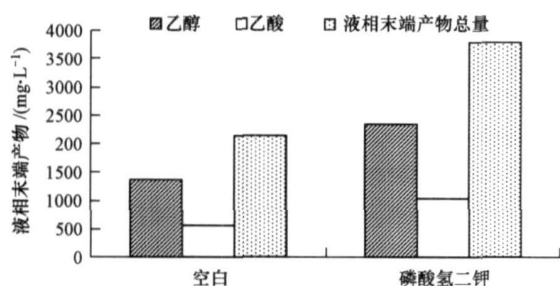


图8 磷酸氢二钾对液相末端产物的影响

Fig. 8 The effect of K_2HPO_4 on end liquid products

4 结论 (Conclusions)

1)保持反应器内 pH 为 4.5 左右、COD 启动值为 6000 mg L^{-1} 、水力停留时间为 8 h 等条件,可在 30 d 内完成反应器内菌种对环境的适应并进入稳定运行阶段,此时系统氧化还原电位稳定在 -450 mV 左右。

2)系统内的液相末端发酵产物中乙醇含量最大,乙醇和乙酸分别占发酵产物总含量的 65% 和 30% 左右,系统呈现明显的乙醇型发酵特性。

3)启动和运行阶段的积累产氢量为 399328.9 mL ,最大产氢量达 $15768.8 \text{ mL d}^{-1}$,最大氢气产率为 49.94%。

4)有机氮源可被微生物利用而无机氮源对产氢并无太大影响,使用有机氮源和磷源时累计产气量、累计产氢量和发酵液相末端产物较空白对照有所增大。

责任作者简介:任南琪(1959—),男,哈尔滨工业大学校长助理,市政环境工程学院院长,教授,博士生导师,主要研究方向是微生物分子诊断技术;生物制氢理论与技术;生物脱硫理论与技术;微生物絮凝剂;生物脱氮除磷技术;膜生物反应器;区域生态修复技术等,主持国家自然科学基金等省部级

级以上项目 19 项(国家自然科学基金委资助 5 项),获国家科技进步二等奖 1 项,省部级科技进步奖 6 项,获省级教学成果奖 2 项;在国内外核心期刊以上刊物上发表论文 170 余篇,专著和编著 7 部,申请和获得发明专利 7 项,实用新型专利 5 项。

参考文献 (References)

- Danko A S, Abreu A A, Alves M M. 2008. Effect of arabinose concentration on dark fermentation hydrogen production using different mixed cultures [J]. *International Journal of Hydrogen Energy* 33: 4527—4532.
- Das D. 2008. Advances in biological hydrogen production processes [J]. *International Journal of Hydrogen Energy* 33: 6046—6057.
- Gest H, Kanen M D. 1949. Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria [J]. *J. Bacteriol* 58: 239.
- Kissajit W, SK L. 1987. Pinder Acidogenic Fermentation of Lactose [J]. *Biotechnology and Bioengineering* 15: 88—95.
- Kumar N, Das D. 2002. Biological hydrogen production in packed bed reactor using agro-residues as solid matrices [A]. *Proceedings of the 13th World Hydrogen Conference*, Beijing, China: 364—369.
- 林明. 2002. 高效产氢发酵新菌种的产氢机理及生态学研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 29—40.
- Lin M. 2002. Hydrogen production mechanism and ecology of a new species of high efficiency hydrogen production by fermentation [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology 29—40 (in Chinese).
- 李永峰. 2005. 发酵产氢新菌种及纯培养生物制氢工艺研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 18—19.
- Li Y F. 2005. The novel species of fermentative hydrogen producing bacteria and the bihydrogen process by pure culture [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology 18—19 (in Chinese).
- 任南琪, 王宝贞. 1994. 有机废水处理生物制氢技术 [J]. *中国环境科学*, 14(6): 412—414.
- Ren N Q, Wang B Z. 1994. The treatment technology of biological hydrogen production with organic waste water [J]. *China Environmental Science* 14(6): 412—414 (in Chinese).
- 任南琪. 1993. 有机废水处理生物制氢原理与工程控制对策研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨建筑大学, 26—28.
- Ren N Q. 1993. The treatment principle of biogas hydrogen producing with organic waste water and countermeasure study on engineering control [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology 26—28 (in Chinese).
- 任南琪, 宫曼丽, 邢德峰. 1995. 生物制氢反应系统的启动负荷与乙醇型发酵 [J]. *太阳能学报*, 26(2): 244—247.
- Ren N Q, Gong M L, Xing D F. 1995. Startup of hydrogen bio-production reactor and ethanol type fermentation [J]. *Acta Energiae Solaris Sinica* 26(2): 244—247.
- Ren N Q, Cao J, Wang A J et al. 2008. Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermoaccharolyticum* W16 [J]. *International Journal of Hydrogen Energy* 33: 6124—6132.
- 张全国, 尤希凤, 周汝雁, 等. 2005. 国内外生物制氢技术研究进展 [A]. *中国农业工程学会 2005 年学术年会论文集* [C]. 北京: 农业工程学报杂志社, 350—351.
- Zhang G Q, You X F, Zhou R Y et al. 2005. The production of the biology hydrogen production in the world [A]. *The set academic of the Chinese Society of Agricultural Engineering* [C]. Beijing: Academic Journal of Agricultural Engineering 350—351 (in Chinese).