

发酵生物制氢反应器的产氢菌生物强化作用研究

秦智^{1,2}, 任南琪^{2*}, 李建政²

(1. 哈尔滨理工大学化学与环境工程学院, 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090)

摘要: 将发酵产氢菌 *Ethanoligenens* sp. B49 投加到连续流搅拌槽式反应器(CSTR)的活性污泥中, 以糖蜜废水为底物, 进行强化活性污泥产氢效能的研究. 对生物强化前和生物强化后反应系统的产氢能力、发酵产物组成和 pH 值进行了对比分析. 结果表明, 在 COD 容积负荷为 12 kg/(m³·d)条件下, 投加产氢菌可显著提高反应系统的产氢能力并改善发酵产物组成. 反应系统的比产氢速率从强化前的 3.6 mmol/(kg·d)提高到强化后的 5.7 mmol/(kg·d), 是生物强化前的 1.5 倍. 生物强化前, 反应系统液相发酵产物乙醇、乙酸和丙酸的平均浓度分别为 6.8、5.3 和 4.8 mmol/L, 生物强化后乙醇、乙酸和丙酸的平均浓度分别为 10.5、7.5 和 1.7 mmol/L, 其中乙醇型发酵目的产物乙醇和乙酸在总发酵产物中的比例从生物强化前的 72.0% 提高为强化后的 86.8%. 生物强化作用使出水 pH 值从 4.5~4.7 下降为 4.3. 产氢菌的生物强化作用有助于反应器在低负荷运行期迅速形成产氢能力较高的乙醇型发酵.

关键词: 生物制氢; CSTR 型反应器; 生物强化; 比产氢速率

中图分类号: X382; X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)12-2843-06

Bioaugmentation of Hydrogen Producing Bacteria on Operation of Bio-hydrogen Producing Reactor

QIN Zhi^{1,2}, REN Nan-qi², LI Jian-zheng²

(1. School of Chemical and Environmental Engineering, Harbin University of Science and Technology, Harbin 150040, China; 2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Hydrogen producing strain *Ethanoligenens* sp. B49 was inoculated into activated sludge of continuous stirred tank reactor(CSTR) to bioaugment hydrogen production. Hydrogen production capacities, compositions of fermentation products and pH value before and after bioaugmentation were investigated. When organic loading rate was 12 kg/(m³·d), bioaugmentation of hydrogen producing strain enhanced hydrogen production rate and improved the composition of fermentation products significantly. After bioaugmentation, hydrogen production rate increased from 3.6 mmol/(kg·d) to 5.7 mmol/(kg·d), which was 1.5 times as that before bioaugmentation. Before bioaugmentation, average concentration of ethanol, acetic acid and propionic acid were 6.8 mmol/L, 5.3 mmol/L, 4.8 mmol/L respectively, while after bioaugmentation, those were 10.5 mmol/L, 7.5 mmol/L and 1.7 mmol/L respectively. Ethanol and acetic acid accounted for 86.8% in total fermentative products after bioaugmentation, while only 72% before bioaugmentation. pH value of effluent dropped from 4.5~4.7 to 4.3. Bioaugmentation of hydrogen producing strain is helpful to promote the formation of ethanol-type fermentation in low organic loading rate.

Key words: bio-hydrogen production; CSTR type reactor; bioaugmentation; specific hydrogen production rate

氢气被誉为“绿色能源”, 由于它具有清洁、可再生等优点而成为国内外开发新型能源的研究热点. 近年来, 发酵法生物制氢技术越来越受到人们的关注. 通过分离和筛选, 国内外研究者获得了大量具有较高产氢能力的发酵产氢细菌^[1~9]. 从国内外生物制氢技术的研究成果来看, 大多数采用纯菌种培养和细胞固定化的方式, 多处于实验室中的基础研究阶段. 任南琪等^[10~13]的研究表明, 采用非固定化混合菌种的连续流培养, 利用两相厌氧处理工艺的产酸相从有机废水中发酵制氢是可行的, 并在研究中发现生物制氢反应器的乙醇型发酵具有较高的产氢能力.

发酵生物制氢反应器产氢能力的提高是发酵法生物制氢技术降低连续培养成本、实现工业化生产

的技术关键. 生物强化技术是近年发展起来的用于提高废水处理效果的一项新技术. McLaughlin 等^[14]研究发现, 向 SBR 反应器中投加细菌 *Pseudomonas putida* 强化无 4-氯酚降解能力的活性污泥后, 可实现反应器中 4-氯酚的降解. Ivanov 等^[15]通过细菌的生物强化作用加速了好氧废水处理中好氧颗粒污泥的形成. 但利用高效产氢菌进行 CSTR 型生物制氢反应器产氢能力的生物强化研究还鲜见报道. 本研究利用从活性污泥中筛选的高效产氢菌种, 有针对

收稿日期: 2007-01-31; 修订日期: 2007-03-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA05Z109); 国家杰出青年科学基金项目(50125823); 黑龙江省自然科学基金项目(E2004-08); 黑龙江省教育厅科研项目(10541053); 哈尔滨市青年基金项目(2004AFQXJ041)

作者简介: 秦智(1974~), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: qinzhi0916@sina.com

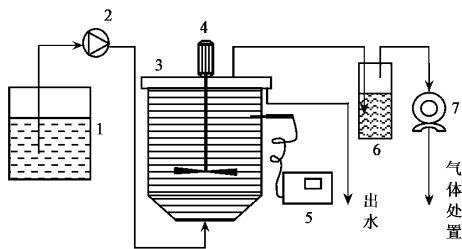
* 通讯联系人, E-mail: mq@hit.edu.cn

性地投加到 CSTR 型生物制氢反应器中进行生物强化,增加反应器内功能性产氢菌在活性污泥微生物群落中的数量与比例,从而提高反应系统的产氢效能.进行了生物制氢系统生物强化的工程控制参数研究,并对高效产氢菌种连续流生物强化前后的产氢能力进行了对比分析,以期生物制氢技术产氢效能的提高和生物强化系统的工程控制提供研究依据.

1 材料与方法

1.1 连续流试验装置及流程

本研究采用的生物制氢反应器由有机玻璃制成,属连续流搅拌槽式反应器(CSTR),内设气-液-固三相分离装置,为反应区与沉淀区一体化结构.反应区的有效容积为 9.6 L,沉淀区为 5.4 L.反应器设有搅拌装置,通过轴封密闭以保证反应器的厌氧条件.反应器外壁缠绕电热丝,通过温控系统保持反应器内温度为 $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$.试验流程如图 1 所示.



1. 配水箱 2. 计量泵 3. 生物制氢反应器
4. 搅拌机 5. 温控仪 6. 水封 7. 气体流量计

图 1 试验装置及流程示意

Fig.1 Schematic diagram of experiment

1.2 反应器的启动与生物强化的工程控制

反应器的接种污泥为生活污水排放沟的底泥,经曝气培养后接种到反应器,反应器在特定的控制条件下启动^[16].反应系统经过 40 d 左右完成了启动过程.在生物强化研究前,生物制氢反应系统控制在进水 COD 为 3 000 mg/L、pH 值为 4.6 和 ORP 为 -300 mV 的稳定运行状态.

1.3 菌种的扩大培养方法

生物强化的菌种为哈尔滨工业大学环境生物技术中心在前期研究中分离筛选的高效产氢新菌种 *Ethanoligenens* sp. B49.产氢菌种的扩大培养采用人工配制的微生物培养基,培养基配方根据文献^[17]配制.产氢菌的培养方法采用改进的 Hungate 厌氧操作技术.产氢菌离心除去高浓度发酵液后投加到生物制氢连续流反应器中.

1.4 试验用底物

试验用底物为甜菜制糖厂的废糖蜜配制而成的有机废水,配水中投加少量 N 和 P,使进水 COD:N:P $\approx 1\,000:5:1$.

1.5 分析项目及测定方法

液相末端发酵产物采用 GC-122 型气相色谱仪(氢火焰检测器),载气流速 50 mL/min, H_2 流速 50 mL/min,空气流速 50 mL/min,柱箱温度 190°C ,进样量 2 μL ; pH 值测定采用 pH S-25 酸度计;产气量由湿式气体流量计计量,发酵气体的组分采用 SC-II 型气相色谱仪、热导池检测器,担体 TDS-01 (60/80 目),载气流速 70 mL/min,进样量 500 μL ; MLVSS 和悬浮物采用重量法测定.

2 结果与分析

2.1 生物强化过程的水力停留时间研究

水力停留时间(HRT)是影响生物强化效果的一个重要参数.为了使反应器的产氢效能得到有效发挥,运行中应尽可能减小 HRT.但是生物强化过程中 HRT 过小,又会增加反应器内产氢菌的流失,影响高效菌在反应器内的滞留,降低生物强化的效果.实验过程中对 HRT 与反应器出水悬浮物的关系进行了研究,结果如图 2 所示.由图 2 可见,随水力停留时间的减小,出水中的悬浮物含量逐渐增加,当反应器的水力停留时间为 4.4 h 时,出水悬浮物迅速增加达到 220 mg/L,同时有大量活性污泥絮体流失,而水力停留时间为 6.5 h 时,出水的悬浮物仅为 92 mg/L.因此分析认为生物制氢反应器在生物强化阶段的水力停留时间应保持在 6h 左右.

2.2 反应器的生物强化时期研究

试验中考察了容积负荷对活性污泥 MLVSS 的影响,如图 3 所示.分析图 3 可知,随着反应器容积负荷的升高,制氢系统内的活性污泥量也随之增加,在容积负荷为 $9.9\text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 时,MLVSS 仅为 8.0 g/L,而容积负荷升高至 $21.9\text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 时,MLVSS 达到 16.2 g/L.另外,为了保证产氢菌强化后在反应器内的滞留和增殖,产氢菌投加到活性污泥时,应保证达到一定的投配比例.在保持相同的细菌投配比的条件下,控制较低容积负荷下的生物强化,投加产氢菌的绝对剂量较小,可降低生物强化的运行成本.因此,生物强化应选择容积负荷为 10 ~ 15 $\text{kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 的低负荷运行期进行.

2.3 高效产氢菌种 B49 的特性及其对生物强化的影响

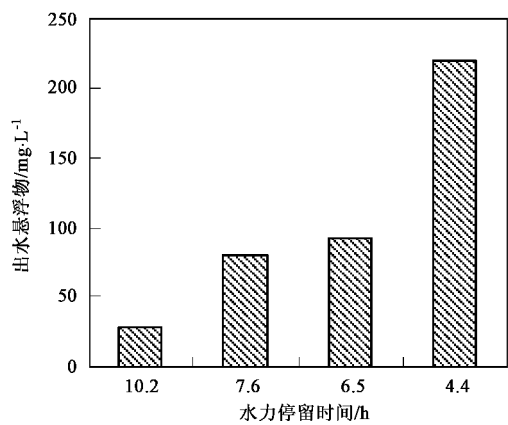


图 2 HRT 对出水悬浮物的影响

Fig.2 Effects of HRT on suspended solids in the effluent

高效菌种在反应器内的滞留和增殖是保证生物强化效果的一个关键因素. CSTR 型反应器的工艺特点要求系统内的微生物具有一定的形成细菌絮状体的特性. 因此在生物强化时, 向生物制氢反应器中投加具有一定絮凝能力的细菌是避免细菌流失的一个有效方法. Soda 等^[18]和 McLaughlin 等^[14]在生物强化研究中都提出, 投加细菌的絮状体形成能力的强弱是它能否在反应器内滞留、繁殖的关键因素, 也是影响生物强化作用效果的一个重要因素. 本研究通

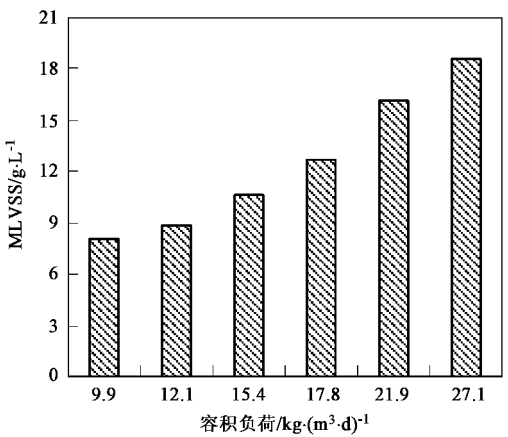
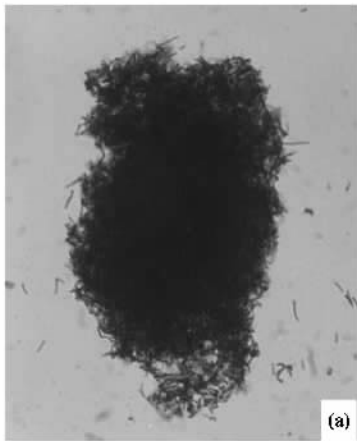


图 3 容积负荷对活性污泥 MLVSS 的影响

Fig.3 Effects of VLR on the MLVSS of activated sludge

过显微镜观察到高效产氢菌 B49 在培养过程中可形成絮状体, 如图 4 所示. 由图 4 可见, B49 细菌之间分泌胞外多糖类物质, 使细胞之间紧密联结, 在培养液中形成细菌絮状体, 具有较好的絮凝能力. 产氢菌的这一特性有助于它自身在反应器内形成絮状体, 或粘附在系统原有活性污泥的表面, 从而避免生物强化细菌的流失, 促使产氢菌在反应器内滞留和增殖, 可增加反应器运行的生态稳定性.



(a) 300×



(b) 700×

图 4 高效产氢菌 B49 形成的絮状体

Fig.4 Floc of hydrogen producing bacteria B49

另外, 产氢菌 B49 发酵葡萄糖的主要发酵产物为 H₂、CO₂、乙醇、乙酸, 最大比产氢速率为 25.0 mmol/(g·h), 是 1 株具有较高产氢能力的乙醇型发酵菌株^[17], 适宜于在 CSTR 型反应器内发挥生物强化作用.

2.4 生物制氢系统在生物强化前后变化的对比分析

生物强化研究在反应器容积负荷为 12 kg/(m³·d)的运行条件下进行. 产氢菌 B49 的生物强化试验共进行了 3 次, 第 1 次生物强化在反应器稳定运行的第 15 d 进行, 第 2 次和第 3 次投加分别第 25 d 和第 47 d 进行, 产氢菌投加量(占活性污泥 MLVSS 的质量分数)分别为 1.3%、3.1%和 5.2%.

2.4.1 生物强化前后比产气和比产氢速率的比较

生物制氢反应系统的比产气(氢)速率是反映反应器产氢能力的重要指标.研究中对生物强化前后

比产气速率、比产氢速率及氢气含量的变化进行了监测,结果如图 5 所示(图 5 中的 3 个箭头分别代表 3 次强化高效菌 B49 的时间,下同).

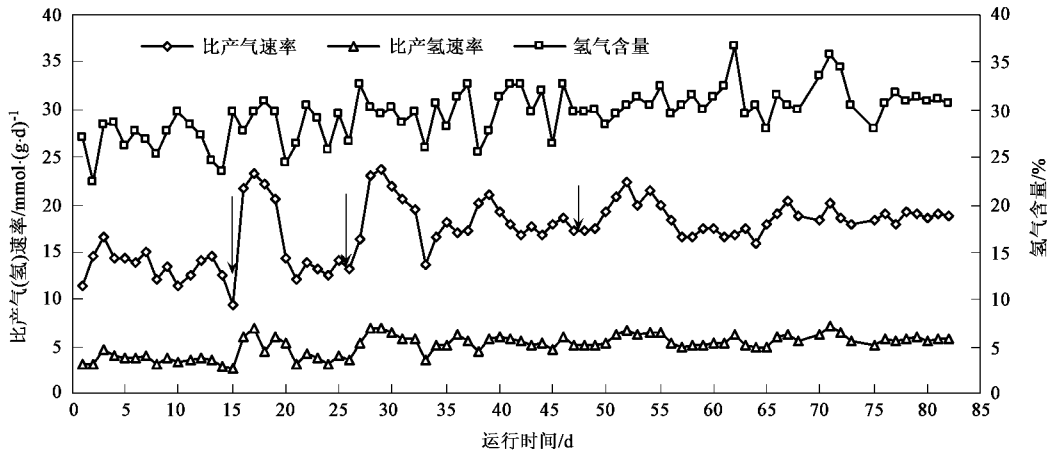


图 5 生物强化前后比产气速率和比产氢速率的变化
Fig.5 Specific biogas and hydrogen production rate before and after bioaugmentation

在生物强化前 14 d 的稳定运行阶段,平均比产气速率为 13.6 mmol/(kg·d),平均比产氢速率为 3.6 mmol/(kg·d).向反应器中投加菌种 B49 强化后,系统的比产气速率和比产氢速率均发生了变化.在第 1 次生物强化后,反应系统的比产气和比产氢速率都有一个迅速上升的过程,但是在 5 d 后又下降,基本维持在强化前的水平.经第 2 次和第 3 次生物强化后达到稳定运行状态时,系统的比产氢速率达到在 5.7 mmol/(kg·d)左右.氢气含量在生物强化前后的变化不大,基本稳定在 30% 左右.

从生物强化前后的比产气和比产氢速率的对比分析可知,高效产氢菌的生物强化可显著地提高生物制氢系统低负荷稳定运行初期的比产氢速率.经

过 3 次生物强化作用,生物制氢系统的比产氢速率从强化前的 3.6 mmol/(kg·d)提高到强化后的 5.7 mmol/(kg·d),是强化前的 1.5 倍.

2.4.2 生物强化处理前后的液相发酵产物比较

图 6 反映了生物强化过程中制氢系统液相发酵产物的变化情况.生物强化前 CSTR 型生物制氢反应系统的主要液相发酵产物中为乙醇、乙酸和丙酸,它们的平均浓度分别为 6.8、5.3 和 4.8 mmol/L,分别占发酵产物总量的 40.5%、31.5% 和 28.6%.高效产氢菌 B49 的液相发酵产物则主要为乙醇和乙酸.

第 1 次生物强化后,发酵产物的组成发生了一定的波动后,基本恢复了强化前的状态.第 2 次强化后,液相发酵产物中乙醇和乙酸的比例发生了变化.

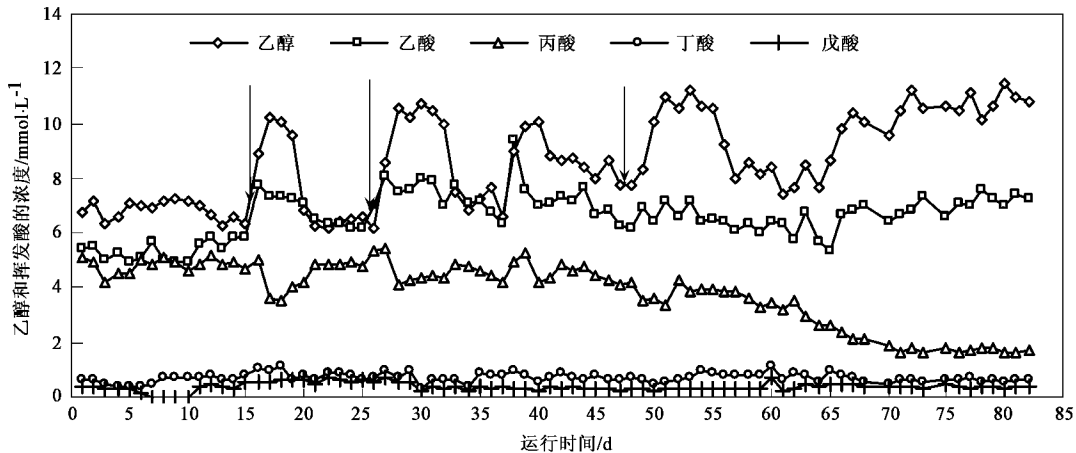


图 6 生物强化前后液相发酵产物的变化
Fig.6 Fermentation products before and after bioaugmentation

波动期结束后, 发酵产物中的乙醇和乙酸含量增加, 乙醇、乙酸和丙酸分别为 8.5、7.0 和 4.4 mmol/L 左右, 并基本维持在这一状态. 第 3 次生物强化后, 发酵产物中的乙醇和乙酸含量经历了先上升、后下降、再上升的过程, 当系统达到稳定状态时, 发酵产物中乙醇、乙酸和丙酸含量分别为 10.5、7.5 和 1.7 mmol/L 左右, 乙醇和乙酸的含量较强化前有较大幅度地提高.

Fujita 等^[19]和 Kanagawa 等^[20]在废水的生物强化研究中, 也出现了投加细菌的数量先下降, 后有所回升并达到稳定状态的现象, 分析认为这种波动的主要原因在于投加的产氢菌和反应器内固有活性污泥之间的生存竞争. 制氢系统中发酵产物的变化实际上也反映了投加的高效产氢菌和反应器内部固有活性污泥之间此消彼长的生存竞争过程. 乙醇和乙酸是产氢菌的主要发酵产物, 因此乙醇和乙酸的含量增加阶段, 也是产氢菌在反应器内大量增殖的阶段, 当产氢菌逐渐适应反应器的环境后, 产氢菌与活性污泥之间形成一种新的动态平衡, 此后发酵产物的组成和含量也基本维持在稳定的状态, 不再发生明显的变化.

产氢菌的生物强化可显著改善反应器低负荷稳定运行阶段的发酵产物组成, 乙醇型发酵的目的产

物乙醇和乙酸在总发酵产物中的比例从生物强化前的 72.0% 提高为强化后的 86.8%. 另外, 分析图 5 和图 6 可见, 生物强化后发酵产物中乙醇和乙酸含量的变化规律与产氢速率的变化规律相对应, 在生物强化后乙醇和乙酸含量的上升阶段都相应地伴随着产氢速率的增加, 分析认为发酵过程中产乙醇和乙酸代谢途径的强化可能是引起产氢速率增加的直接原因.

2.4.3 生物强化前后的 pH 值比较分析

生物强化前后反应器的进出水 pH 值变化情况如图 7 所示. 生物强化前后, 制氢系统的进水 pH 值基本维持在 6.5~7.0 之间, 没有明显变化. 出水 pH 值在生物强化后有一个波动变化的过程. 生物强化前, 出水 pH 值基本在 4.5~4.7 之间. 3 次生物强化过程中, 出水 pH 值都有一个下降的过程. 第 1 次和第 2 次强化处理后, 出水 pH 值经过波动期后从 4.7 下降到 4.5 左右; 第 3 次强化后, 出水 pH 值逐渐下降并稳定在 4.3 左右. 研究表明, 发酵生物制氢反应器在乙醇型发酵阶段的产氢能力较高, 而典型乙醇型发酵的 pH 值范围一般为 4.0~4.5^[11]. 生物强化后, 制氢系统的 pH 值达到典型乙醇型发酵的 pH 值范围. 生物强化作用可促进生物制氢反应器的发酵类型向产氢能力较高的乙醇型发酵转变.

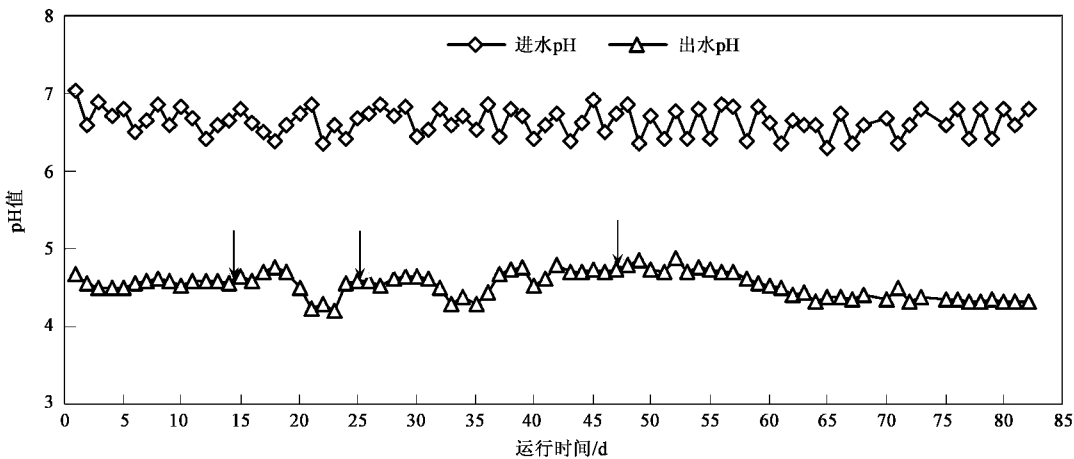


图 7 生物强化前后 pH 值的变化
Fig.7 pH value before and after bioaugmentation

3 结论

(1) 对生物强化阶段的控制参数研究表明, CSTR 型生物制氢反应器在生物强化阶段的水力停留时间应保持在 6 h 左右, 反应器的生物强化时期应选择在反应器容积负荷为 10~15 kg/(m³·d) 的低

负荷运行期.
(2) 通过显微镜观察可见, 高效产氢菌种 B49 具有一定的形成絮状体能力, 这一特性有助于避免生物强化过程中细菌的流失, 能促进产氢菌在反应器内滞留和进一步增殖, 因而可增加反应器运行的生态稳定性.

(3)生物强化前后的对比分析表明,在反应器容积负荷为 $12 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 条件下,通过投加高效产氢菌生物强化 CSTR 型生物制氢反应器,可显著提高反应系统的产氢能力并改善反应系统的发酵产物组成.制氢系统的产氢速率从强化前的 $3.6 \text{ mmol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 提高到强化后的 $5.7 \text{ mmol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,是强化前的 1.5 倍.生物强化后,乙醇型发酵的目的产物乙醇和乙酸占总发酵产物比例从生物强化前的 72.0% 提高为强化后的 86.8%.生物强化后的出水 pH 值从 4.5 ~ 4.7 下降到 4.3 左右,达到典型乙醇型发酵的 pH 值范围.产氢菌的生物强化有助于反应器在低负荷运行期迅速形成产氢能力较高的乙醇型发酵.

参考文献:

- [1] Yokoi H, Tokushige T, Hirose J, *et al.* Hydrogen production by immobilized cells of aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39 [J]. J Ferment Bioeng, 1997, **83**(5):481 ~ 484.
- [2] Chen W M, Tseng Z J, Lee K S, *et al.* Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2005, **30**(10):1063 ~ 1070.
- [3] Lin C Y, Lee C Y, Tseng I C, *et al.* Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora[J]. Process Biochemistry, 2006, **41**(4):915 ~ 919.
- [4] Jung G Y, Kim J R, Park J Y, *et al.* Hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19 [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2002, **27**:601 ~ 610.
- [5] Oh Y K, Seol E H, Lee E Y, *et al.* Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4 [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2002, **27**:1373 ~ 1379.
- [6] Shin J H, Hyun Y J, Eun K A, *et al.* Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2007, **32**(2):192 ~ 199.
- [7] Kotay S M, Das D. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge[J]. Bioresource Technology, 2007, **98**(6):1183 ~ 1190.
- [8] Xing D F, Ren N Q, Li Q B, *et al.* *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. Nov., from molasses waste water[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, **56**(4):755 ~ 760.
- [9] Li Y F, Ren N Q, Wang A J, *et al.* The molecular characterization and hydrogen production of a new species of biohydrogen production anaerobe[J]. J of Environmental Science and Health Part A, 2005, **40**(10):1929 ~ 1938.
- [10] Ren N Q, Wang B Z, Ma F. Hydrogen bio-production of carbohydrate by anaerobic activated sludge process[A]. In: Water Environ Fed Annu Conf Expo 68th [C]. Miami Beach: Water Environ Fed, 1995.145 ~ 153.
- [11] Ren N Q, Wang B Z, Huang J C. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, **54**(5):428 ~ 433.
- [12] Ren N Q, Li J Z, Li B K, *et al.* Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, **31**:2147 ~ 2157.
- [13] 任南琪,秦智,李建政. 不同产酸发酵菌群产氢能力的对比与分析[J]. 环境科学,2003, **24**(1):70 ~ 74.
- [14] McLaughlin H, Farrell A, Quilty B. Bioaugmentation of activated sludge with two *Pseudomonas putida* strains for the degradation of 4-chlorophenol[J]. Journal of Environmental Science and Health part A, 2006, **41**(5):763 ~ 777.
- [15] Ivanov V, Wang X H, Tay S T L, *et al.* Bioaugmentation and enhanced formation of microbial granules used in aerobic wastewater treatment[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, **70**(3):374 ~ 381.
- [16] Ren N Q, Chen X L, Zhao D. Control of fermentation types in continuous-flow acidogenic reactors: effects of pH and redox potential [J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2001, **8**(2): 116 ~ 119.
- [17] 任南琪,林明,马汐平. 厌氧高效产氢细菌的筛选及其耐酸性研究[J]. 太阳能学报,2003, **24**(1):80 ~ 84.
- [18] Soda S, Ike M, Fujita M. Adsorption of bacterial cells onto activated sludge flocs[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, **87**(4): 513 ~ 518.
- [19] Fujita M, Ike M, Hashimoto S. Feasibility of wastewater treatment using genetically engineered microorganisms[J]. Water Research, 1991, **25**(8): 979 ~ 984.
- [20] Kanagawa E, Mikami K. Survival of a non-flocculating bacterium, *Thiobacillus thioparus* TK-1, inoculated to activated sludge[J]. Water Research, 1995, **29**(12): 2751 ~ 2754.