

Pseudomonas sp. GL1 利用不同预处理污泥产氢及其底物变化研究

谢波, 郭亮, 李小明*, 杨麒, 张昱, 杨永林, 曾光明, 刘精今, 杨志强

(湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410008)

摘要: 采用厌氧发酵的方法研究 *Pseudomonas* sp. GL1 利用灭菌、微波和超声波预处理污泥产氢效果, 讨论 3 种预处理污泥产氢效果的差异, 并对污泥发酵过程中底物性质变化 (SCOD、可溶性蛋白质、总糖和 pH 值等) 进行了探讨. 实验结果显示, 产氢菌 *Pseudomonas* sp. GL1 发酵各预处理污泥过程中均只有 H_2 和 CO_2 产生, 无 CH_4 产生. 3 种不同预处理污泥同等条件下发酵, 灭菌污泥的产氢效果最佳, 氢气含量高达 81.45%, 产氢率为 $30.07\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$. 超声波处理污泥产氢延迟时间最短 (3 h); 灭菌污泥最长 (15 h); 微波预处理污泥为 12 h. 在预处理污泥发酵产氢过程中, 各种污泥性质变化情况各不相同, 尤其是灭菌污泥, 这说明不同的预处理方法影响 *Pseudomonas* sp. GL1 发酵过程对污泥中营养物质的利用.

关键词: 生物产氢; 预处理; 污泥; 厌氧发酵; 底物; 延迟时间

中图分类号: X382 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)04-0996-06

Bio-hydrogen Production from Different Pretreated Sludge by *Pseudomonas* sp. GL1 and Changes in the Liquid Phases

XIE Bo, GUO Liang, LI Xiao-ming, YANG Qi, ZHANG Yu, YANG Yong-lin, ZENG Guang-ming, LIU Jing-jin, YANG Zhi-qiang

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410008, China)

Abstract: Batch tests of anaerobic fermentative hydrogen production by *Pseudomonas* sp. GL1 were investigated using sterilization, microwave and ultrasonication pretreated sludge as substrate. The profiles of soluble COD, protein, carbohydrate and pH value during the fermentation process were monitored. The results showed that only hydrogen and carbon dioxide were produced and methane was not observed during the process. A maximal hydrogen yield ($30.07\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$) and bio-hydrogen content (81.45%) were obtained from the sterilization pretreated sludge run. The shortest lag time for hydrogen production was in ultrasonication pretreated sludge run (3 h), while the longest one was in sterilization pretreated sludge run (15 h), and the medial one was in microwave pretreated sludge run (12 h). It was found that the changes of sludge substrates (soluble COD, protein, carbohydrate and pH value) were various with different pretreated sludge during the fermentation process, especially in the sterilization sludge run, which implied that the pretreatment method could affect substrate utilization by *Pseudomonas* sp. GL1.

Key words: bio-hydrogen production; pretreatment; sludge; anaerobic fermentation; substrate; lag time

氢气作为一种无污染、可再生的理想燃料, 已在世界范围内得到广泛重视. 城市污水处理厂剩余污泥或其他生物质能制取氢气, 反应条件温和, 具有开发新能源、节省能量消耗及净化环境的重要意义^[1,2]. 近几年来, 在我国许多大城市出现了污泥围城的现象, 并已开始向中小城市蔓延, 给生态环境带来了极大的隐患^[3]. 与此同时, 由于污泥制氢具有能源和环境保护方面的双重意义, 也逐渐引起国内外学者的关注. 污泥制氢前, 一般需一定的预处理, 目前常用的预处理方法主要有热处理^[4]、酸处理和碱处理^[5]等. Lin 等^[6]成功地用热处理污泥发酵污泥碱水解物产氢, 其氢产率 (H_2/TCOD) 达到 $1.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. 肖本益等^[7]也利用热、碱处理污泥产氢, 其中碱处理污泥最大产氢率 (H_2/VS) 为 $14.4\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$.

Wang 等^[8]利用灭菌和冻融预处理污泥, 产氢量 (H_2/COD) 达到 $1.5 \sim 2.1\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$. 本研究中对灭菌 (热)、微波和超声波 3 种预处理方法处理剩余污泥生物制氢进行了探讨, 分析了 3 种不同预处理污泥产氢过程中底物的变化情况, 并分析了各发酵类型. 其中热和超声波处理污泥产氢已有报道, 但是微波预处理污泥产氢国内外还没有相关的报道. 本研究目的在于探讨在无外加营养物质的条件下 *Pseudomonas* sp. GL1 菌株利用不同预处理污泥的产

收稿日期: 2007-05-17; 修订日期: 2007-06-29

基金项目: 科技部国际科技合作重点项目 (2004DFA06200); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-04-0770)

作者简介: 谢波 (1981 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为水处理及城市剩余污泥处理, E-mail: 83636288@163.com

* 通讯联系人, E-mail: xmli@hnu.cn

氢能力,比较各预处理方法的优缺点,综合考虑从而得出合适的污泥预处理方法,提高产氢效果.

1 材料与方法

1.1 实验材料

污泥厌氧发酵过程中产生的气体体积采用定期排饱和食盐水法进行测定^[9]. 用 1 mL 气密性注射器取气体样,气体样含量采用气相色谱法(安捷伦 6890N 色谱分析仪,TCOD 检测器)测定.用 10mL 注射器对反应瓶中的污泥进行取样.测定污泥的挥发性酸 VFA(安捷伦 6890N 色谱分析仪,FID 检测器);pH 值(WTW muti340i pH 计);蛋白质、总糖浓度^[10];总化学需氧量(TCOD)和可溶解性化学需氧量(SCOD):标准重铬酸钾法^[11].

1.3 实验方法

1.3.1 产氢菌的培养

产氢菌假单胞菌属 *Pseudomonas* sp. GL1 从岳阳纸厂厌氧颗粒污泥中筛选纯化而来.细菌提纯程序如下:①在 80℃温度下热预处理 2 h,以降低产 CH₄ 菌的生物活性;②用已灭菌的器皿将颗粒污泥捣碎;③利用滚管技术^[12]对已接种的污泥进行产氢菌的分离和纯化,先在固体培养基上培养,然后把菌落接种于液体培养基中,再取 1 cm³ 菌液,稀释 10⁻⁶ 倍,再与固体培养基中,重复 3 次;④测定 3 次提纯细菌的产氢量,选择产氢效果最好的菌株作为本实验的菌种.

1.3.2 污泥预处理

在本实验中分别采用了灭菌、微波和超声波等 3 种方法预处理剩余污泥.灭菌处理是以 $T = 121^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min;微波预处理是利用 GLANZ K7 微波炉以功率 $P = 560\text{ W}$ 持续辐射 180 s;超声波预处理是利用 SonifierS-450D 模拟式超声波细胞破碎仪以频率 $f = 20\text{ kHz}$,能量密度 $A = 2\text{ W/mL}$ 连续辐射 5 min.

1.3.3 厌氧发酵

实验中先接种 5 mL 的纯种菌液加入到盛有 100 mL 预处理污泥的锥型瓶中,N₂ 吹脱瓶中的氧气,凡士林密封,在设置为 $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,转速 120 ~ 140 r·min⁻¹ 的往复水浴恒温振荡器上连续运行.实验中,各组实验均设置 10 个相同条件的反应瓶,同时

种泥来自岳阳印染厂厌氧污泥;纯种菌为笔者培养筛选出的假单胞产氢菌属 *Pseudomonas* sp. GL1,实验用的污泥取自长沙市第一污水厂剩余污泥,污泥性质如表 1 所示.

1.2 分析方法

表 1 污泥性质

Table 1 Characters of raw sludge

pH	TCOD/mg·L ⁻¹	SCOD/mg·L ⁻¹	TS/g·L ⁻¹	VS/g·L ⁻¹	蛋白质/mg·L ⁻¹	总糖/mg·L ⁻¹
7.0 ~ 7.4	8 284 ~ 12 182	42 ~ 336	12.0 ~ 14.7	7.2 ~ 9.2	0 ~ 60	0 ~ 13.9

开始运行,产气后每 3 ~ 4 h 按编号依次取出 1 个瓶,记录产气量,测定气体成分和反应瓶中污泥底物的各项指标(由于超声波处理污泥产氢时间很短,观察时间也较其他污泥短,为 28 h).

2 结果与讨论

2.1 菌种的鉴定及其性质

菌种的鉴定通过以下步骤:DNA 提取;电泳检查 DNA;16S DNA 的 PCR 扩增;序列测定.测定结果显示本实验中的菌种是假单胞菌属 GL1 (*Pseudomonas* sp. GL1),其注册号为 EF535992. 图 1 为假单胞菌 GL1 的系统发育树.

如图 2 所示,*Pseudomonas* sp. GL1 为短杆菌,长度为 0.9 ~ 2.4 μm. 固体培养基上生长,产生白色菌落,边缘整齐,表面光滑.这种菌有荚膜,分裂生殖,能够降解污泥中的糖和蛋白质,同时产生氢气.

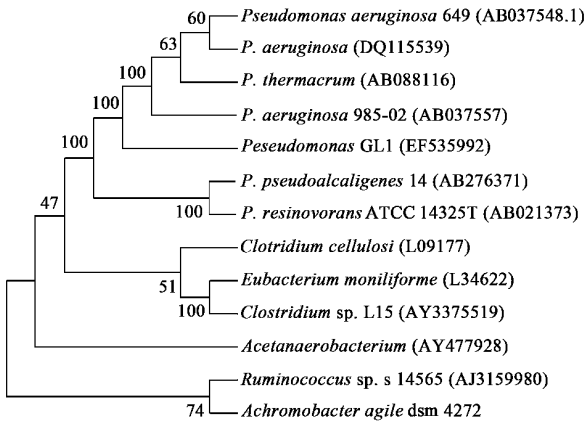


图 1 基于 16S rDNA 序列的假单胞 GL1 菌株的系统发育树
Fig.1 Phylogenetic tree of strain *Pseudomonas* sp. GL1
based on 16S rDNA sequence

2.2 各预处理污泥产氢效果

氢气产量如图 3 所示,不同处理预污泥中产氢效果最好的是灭菌污泥,产气量为 29.20 mL,氢气含量高达 81.45%,平均产氢率(H₂/VS)为 30.07

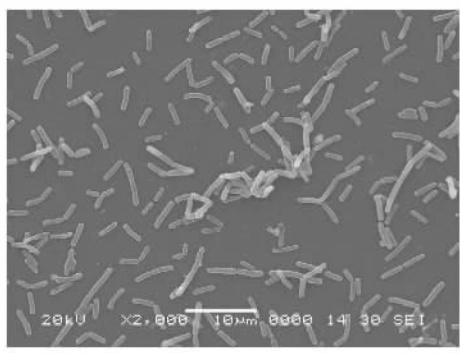


图2 假单胞菌 GL1 扫描电镜图片(4 000 倍)

Fig.2 Scanning electron microscopy (SME) of *Pseudomonas* sp. GL1 ($\times 4\,000$)

$\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$;微波处理污泥产气 20.20 mL, 氢气含量达 72.56%, 平均产氢率为 $16.30\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$;而超声波处理污泥产氢效果最差, 产气量为 11.2 mL, 氢气含量仅为 41.00%, 平均产氢率为 $6.03\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

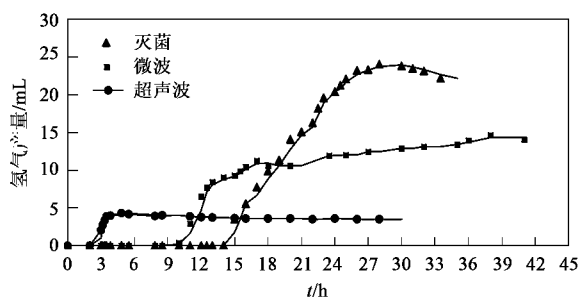


图3 不同预处理污泥厌氧发酵氢气产量变化

Fig.3 Change of hydrogen yield in the anaerobic fermentations of various pretreated sludge

在上述 3 种预处理污泥发酵气体中均未检测到 CH_4 。虽然 Brosseau 等^[13] 发酵葡萄糖产氢, 王相晶等^[14] 以 B49 发酵葡萄糖产氢, Taguchi 等^[15,16] 也报道了菌株 *C. beijerincki* AM21B 发酵葡萄糖、淀粉产氢, 产氢率均较高且不产 CH_4 , 但他们都是以葡萄糖等单一化合物为底物, 其产氢量大。而本研究利用纯种菌发酵成分复杂的预处理污泥, 虽产氢量稍小, 但更具实际意义。

不同预处理污泥发酵产氢量的差异与污泥的起始 SCOD 有关, 也就是说与预处理对污泥的破解效果的差异有关。污泥起始 SCOD 越大, 产氢菌可以利用的有机物越多, 污泥的产气量越大。灭菌污泥时释放的 SCOD 最多, 产气量最大。灭菌、微波和超声波预处理后污泥 SCOD 分别为 2 840、1 890 和 1 190 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 氢气产量分别为 23.8、14.7 和 4.6 mL, 产氢

量的变化与污泥 SCOD 的变化相似。肖本益等^[7] 也曾得出这样的结论。

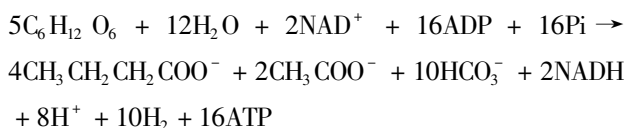
如图 1 所示, 不同预处理污泥的产氢延长期 (λ) 差异也很大。灭菌污泥延长期 λ 最长 (15 h), 微波预处理污泥 λ 为 12 h, 超声波预处理污泥 λ 最短 (3 h)。

产氢率和产氢延长时间 (λ) 的差异与不同预处理方法对污泥的破解方式相关。污泥灭菌处理避免了污泥中其他微生物对产氢菌的干扰, 因而产氢速率快。由于产氢细菌体内一般都存在与产氢有密切相关的氢化酶 (hydrogenase), 该酶最适 pH 值为 6.5^[17], 热处理后污泥 pH = 7.38, 产氢菌需要一定的时间驯化使 pH 达到 6.5 左右, 故产气延迟时间长。而超声波的空化作用能使细胞局部瞬间破裂, 改变细胞的通透性, 加快细胞内物质的释放, 甚至细胞核都能被破坏, 释放出核酸, 强化污泥厌氧发酵活性^[18]。预处理后污泥 pH = 6.94, 接近产氢的最适 pH 值。另外, 由于超声波对污泥活性的促进作用在停止超声辐射数小时后仍然存在^[17], 从而使超声波预处理污泥延迟时间仅为 3 h, 产气率也很高达 $3.73\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, 为各预处理污泥产气速率之最。但产气时间短, 3 h 后产气量不再增加, 这可能是由于污泥中残留超声波作用随着时间的推移而消退和原始污泥还存在嗜氢菌而消耗氢气。

而微波对污泥的预处理作用介乎热处理和超声波之间, 所以其产气各项指标均也是介乎期间。另外, 由于微波辐射能够释放出污泥中的重金属^[19], 重金属对微生物有抑制作用, 在一定程度上影响了 *Pseudomonas* sp. GL1 发酵产氢。

2.3 厌氧发酵产氢类型分析

根据液相末端发酵产物组分含量的不同, 产酸反应器中存在的发酵类型主要有 3 种: 丁酸型发酵、丙酸型发酵和乙醇型发酵。丙酸型发酵气体产量很少, 仅产生 CO_2 , 无 H_2 的产生。乙醇型发酵是由宫曼丽等^[20]发现的, 在一定条件下, 碳水化合物的产酸发酵末端产物主要形成了以乙醇、乙酸、 H_2 和 CO_2 为主, 并有少量丁酸和丙酸的发酵类型。其中丁酸发酵中主要末端产物为丁酸、乙酸、 H_2 、 CO_2 和少量的丙酸。发酵葡萄糖产氢时, 其反应式如下:



从表 2 可知, 产氢发酵产生的挥发性酸 (VFA)

中主要是乙酸和丁酸,灭菌污泥发酵产生的 VFA 只有乙酸和丁酸,各占 VFA 总量的 66.1% 和 33.9%;微波预处理污泥中乙酸、丁酸占 VFA 总量的 88.1% 和 5.3%;超声波预处理污泥中乙酸、丁酸分别占 VFA 总量的 74.4% 和 12.7%. 在上述 3 种条件下,乙酸和丁酸均是 VFA 的主要组成成分,是丁酸型发酵.这与碳水化合物(如葡萄糖、糖蜜等)发酵产氢时丁酸为 VFA 主要成分不同^[6,21],这主要是由于预处理污泥发酵产氢时底物是复杂的混合物,其中含有多种有机物,如蛋白质碳水化合物和脂类.这一结果与 Caimu 等^[21]研究一致.

表 2 不同预处理污泥产氢后污泥中挥发性酸(VFA)含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Table 2 Concentration of the volatility fat acid (VFA) in different pretreatment sludge/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

VFA	灭菌处理	微波处理	超声波处理
乙酸	9 569.8	9 065.8	2 4881.2
丙酸	0	0	568.9
丁酸	4 912.6	549.7	4 240.0
戊酸	0	672.1	3 747.3

2.4 污泥产氢过程中底物变化情况

在污泥发酵过程中污泥水解是限速步骤^[22,23],污泥中的有机物大部分是微生物物质,为细胞壁所包裹,限制了污泥的厌氧消化.采用适当的预处理,破坏微生物细胞壁使有机质融出^[24~26],改变污泥中有机物的可利用性,提高污泥厌氧消化的效率.在以往的研究中,主要有热、碱、超声波、冻融和臭氧等预处理污泥产氢.本研究中既用了比较传统的热和超声波预处理方法,同时用了微波这种新的预处理方法.表 3 为不同预处理后污泥各项指标.

表 3 污泥预处理后各项指标/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Table 3 Characters of the pretreatment sludge/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

污泥种类	pH	SCOD	蛋白质	总糖
灭菌处理	7.38	2 840.00	270	202.65
微波处理	8.32	1 890.00	600	450.51
超声波处理	6.94	1 190.50	360	101.96
原污泥	7.0~7.4	42~336	0~60	0~13.9

2.4.1 污泥可溶解性化学需氧量(SCOD)变化

原污泥 SCOD 为 42~336 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,经灭菌、微波和超声波预处理后,污泥 SCOD 分别达到 2 840、1 890和1 190.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.预处理污泥在产氢延长期后,SCOD 有较大幅度上升,分别达到了 3 572、466和1 746 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,较发酵前增加了 25.8%、24.7%和 46.7%.如图 4,各预处理污泥在发酵过程中污泥 SCOD 变化不大,但在发酵末期均有比较明显下降趋

势.发酵终止时除灭菌污泥 SCOD 有约 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的降低,微波和超声波处理污泥 SCOD 不降反升,分别上升了 1 389 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 610 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.这与 Caimu 等^[21]在利用碱处理污泥产氢中的研究不同,碱预处理污泥随着发酵的进行 SCOD 渐渐下降.这表明微波、超声波、灭菌和碱处理污泥发酵过程中 SCOD 浓度变化情况各异.另外,由于灭菌、微波和超声波处理污泥产氢结束后 SCOD 含量仍然很高,仍具有较高的可生化性,可以后续利用,如产甲烷等.

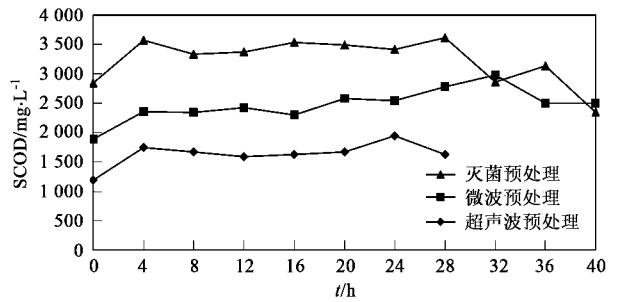


图 4 各预处理污泥发酵过程中 SCOD 浓度变化
Fig.4 Change of SCOD concentration in anaerobic fermentations of various pretreated sludge

2.4.2 污泥中可溶蛋白质、总糖浓度变化

对于污泥发酵产氢过程中蛋白质和总糖等营养物质变化的研究,国内外报道很少.Caimu 等^[21]研究混合菌发酵碱处理污泥产氢时蛋白质浓度变化情况,他们认为蛋白质是微生物产氢的主要营养物质.图 5、6 是各预处理污泥发酵过程中总糖和可溶性蛋白质的变化情况.在微波和超声波预处理污泥发酵过程中,总糖和可溶性蛋白质浓度变化呈逐渐下降趋势.总糖含量从起始 450 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 203 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降至 222 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 183 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,较发酵前的预处理污泥分别降低了 50.7% 和 9.8%;蛋白质浓度分别从起始的 597 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 355 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降至 369 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 210 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,较发酵前的预处理污泥降低了 38.1% 和 40.8%.而灭菌污泥发酵过程中总糖和可溶性蛋白质含量变化很大.灭菌污泥在开始产气后总糖和可溶性蛋白质浓度迅速上升,总糖浓度从 203 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 升至 1 306 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,蛋白质浓度从 272 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 升至 1 113 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,发酵过程中总糖和可溶性蛋白质浓度呈无规律变化,发酵终止时较起始时浓度均有大幅度的上升,分别为 416 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 790 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,是起始时的 2.05 倍和 2.90 倍.

Xiao 等^[27]在研究利用碱处理污泥产氢时,发现总糖和可溶性蛋白质含量随发酵的进行逐渐下降.这与微波和超声波处理污泥的变化类似,但灭菌污

泥中总糖和可溶性蛋白质变化情况与碱、微波和超声波处理污泥变化大有不同,这说明不同预处理方法影响 *Pseudomonas* sp. GL1 发酵过程中对污泥中营养物质的利用.

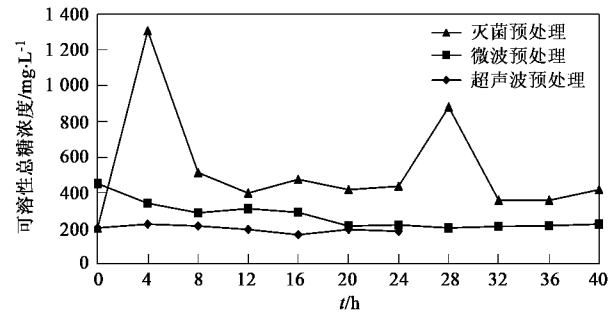


图 5 各预处理污泥发酵过程中总糖浓度变化
Fig.5 Change of carbohydrate concentration in anaerobic fermentations of various pretreated sludge

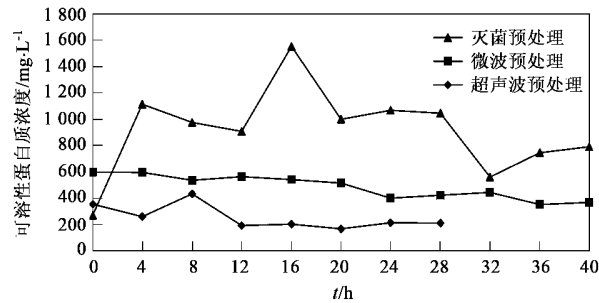


图 6 各预处理污泥发酵过程中可溶性蛋白质浓度变化
Fig.6 Change of soluble protein concentration in anaerobic fermentations of various pretreated sludge

2.4.3 污泥 pH 值变化

由图 7 可知,各预处理污泥在开始阶段 pH 值变化迅速,特别是灭菌污泥,这一阶段是污泥发酵产氢的延迟期.污泥开始产氢后,污泥 pH 值下降幅度明

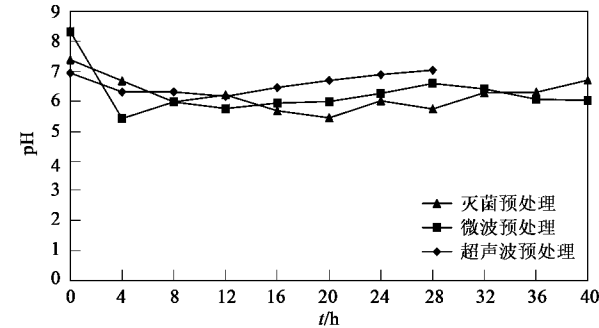


图 7 各预处理污泥发酵过程中 pH 值变化
Fig.7 Change of pH value in anaerobic fermentations of various pretreated sludge

显减缓甚至略有升高,但整个发酵过程中 pH 值基本都在 6~7 之间变动,这主要是由于污泥中含有大量蛋白质,蛋白质降解产生的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 会中和 VFA,从而减缓污泥 pH 值下降^[28].

3 结论

(1) 产氢菌 *Pseudomonas* sp. GL1 利用预处理污泥产氢实验中,产氢效果最好的是灭菌污泥,其氢气产量 29.20 mL,氢气含量高达 81.45%,产氢率为 30.07 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$.微波处理污泥产氢效果次之,超声波最差.另外,各污泥发酵气体均只含 H_2 和 CO_2 ,不含 CH_4 . 本研究中提出的新方法——微波预处理污泥产氢效果并不好,其产气量为 20.20 mL,氢气含量为 72.56%,产氢率 16.30 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$.

(2) 在产氢延迟时间上,产氢效果最好的灭菌污泥延迟最长(15 h);产氢效果最差的超声波处理污泥延迟最短(3 h);微波预处理污泥的延长时间为 12 h.在将来的继续研究中,可以考虑利用灭菌和超声波同时处理污泥,提高产氢效率.

(3) 预处理污泥发酵产氢过程中,污泥 SCOD、可溶性蛋白质、总糖含量和 pH 等指标变化情况各有不同,尤其是灭菌污泥.这说明不同预处理方法影响产氢菌 *Pseudomonas* sp. GL1 在发酵过程中对污泥中营养物质的利用.

参考文献:

[1] Lopes Pinto F A, Troshina O, Lindblad P. A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution [J]. Int J Hydrogen Energy, 2002, 27(11-12): 1209-1215.

[2] Levin D B, Pitt L love M. Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application [J]. Int J Hydrogen Energy, 2004, 29(2): 173-185.

[3] 杭世君,刘旭东,梁鹏. 污泥处理处置的认识误区与控制对策[J]. 中国给水排水 2004, 20(12): 89-92.

[4] Lay J J, Fan K S, Chang J L, et al. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge [J]. Int J Hydrogen Energy, 2003, 28: 1361-1367.

[5] 蔡木林,刘俊新. 污泥厌氧发酵产氢的影响因素[J]. 环境科学 2005, 26(2): 98-101.

[6] Lin H Y, Tsai Y Y, Wu R H. Study of hydrogen production from the anaerobic digestion of hydrolyzed biological sludge [A]. The Twenty-sixth Wastewater Technology Conference, Kanhsing, Taiwan, 2001.

[7] 肖本益,刘俊新. pH 值对碱处理污泥厌氧发酵产氢的影响[J]. 科学通报 2005, 50(24): 2734-2738.

[8] Wang C C, Chang C W, Chu C P, et al. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans* [J]. J Biotech, 2003,

102: 83-92.

[9] Owen W F, Stuckey D C, Jr Healy J B, *et al.* Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity [J]. *Wat Res*, 1979, **13**: 485-493.

[10] 任南琪,王爱杰,马放. 产酸发酵微生物生理生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2005. 301-306.

[11] 国家环保局编. 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. 354-359.

[12] Hungate R E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes [A]. *Methods in microbiology*(volume 2)[C]. New York: Academic Press 1969, 117-132.

[13] Brosseau J D, Zajic J E. Hydrogen gas production with *Citrobacter intermedius* and *Clostridium pasteurianum* [J]. *Chem Tech Biotechnol*, 1982, **32**: 496-502.

[14] 王相晶,任南琪,向文胜,等. 影响产氢发酵细菌 B49 产氢的部分因子研究[J]. *东北农业大学学报*, 2005, **36**(5): 615-620.

[15] Taguchi F, Chang J D, Takiguchi S, *et al.* Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites [J]. *Ferment Bioeng*, 1992, **73**(3): 244-245.

[16] Taguchi F, Chang J D, Mizukami N, *et al.* Isolation of a hydrogen producing bacterium, *Clostridium beijerinckii* strain AM21B, from termites [J]. *Can J Microbiol*, 1993, **39**: 726-730.

[17] Chen C C, Lin Y Y, Lin M C. Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2002, **58**: 224-228.

[18] Tiehm A, Nickel K, Neis U. The use of ultrasound to accelerate the anaerobic digestion of sewage sludge [J]. *Wat Sci Tech*, 1997, **36** (11): 121-128.

[19] Nakazato T, Akasoka M, Tao H. A rapid fractionation method for heavy metals in soil by continuous flow sequential extraction assisted by focused microwaves [J]. *Anal bioanal chem*, 2006, **386**: 1515-1523.

[20] 任南琪,唐婧,宫曼丽. 生物载体强化的连续流生物制氢反应器的运行特性[J]. *环境科学*, 2006, **27**(6): 1176-1180.

[21] Caimu Lin, Liujun Xin, Yuansong Wei. Enhanced Biohydrogen Production from Sewage Sludge with Alkaline Pretreatment [J]. *Environ Sci Technol* 2004, **38**: 3195-3202.

[22] Eastman J A, Ferguson J F. Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion [J]. *J WPCF*, 1981, **53**(3): 352-366.

[23] Alvarez J M, Macé S, Llabrés P. Anaerobic digestion of organic solid wastes: An overview of research achievements and perspectives [J]. *Bioresour Technol*, 2000, **74**: 3-16.

[24] Muller J A. Prospects and problems of sludge pretreatment processes [J]. *Wat Sci Tech*, 2001, **44**(10): 121-128.

[25] Wang Q H, Noguch I C, Hara Y, *et al.* Studies on Anaerobic Digestion Mechanism: Influence of Pretreatment Temperature on Biodegradation of Waste Activated Sludge [J]. *Environ Technol*, 1997, **18**(10): 999-1008.

[26] Antti GRÖNROOS, Hanna KYLLÖNEN, Kirsi KORPIJÄRVI, *et al.* Ultrasound Assisted Method to Increase Soluble Chemical Oxygen Demand (SCOD) of Sewage Sludge for Digestion [J]. *Ultrason sonochem*, 2005, **12**: 115-120.

[27] Xiao Benyi, Liu Junxin. Effects of thermally pretreated temperature on biohydrogen production from sewage sludge [J]. *J Environ Sci*, 2006, **18**(1): 6-12.

[28] Sung S H, Liu T. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion [J]. *Chemo sphere*, 2003, **53**: 43-52.