

混合菌种在发酵法生物产氢中的协同作用

林明,任南琪,王爱杰,王相晶(哈尔滨工业大学市政与环境工程学院,哈尔滨 150090, E-mail: stuartlinen@yahoo.com.cn)

摘要:为探讨产氢发酵细菌混合培养时菌种间的协同作用,本研究在间歇试验条件下,分别考察以葡萄糖和复杂有机物(淀粉、牛肉膏、聚乙二醇乙酸酯和胰蛋白胨)为底物时,5株HPB(B49、H1、LMI2、LMI1和B51)混合培养,高效HPB(B49)与3株非产氢发酵细菌(L10、拟3-2和芽孢1)分别混合培养,以及B49与活性污泥混合培养对产氢能力的影响。试验结果表明,混合菌种间协同作用发挥是有条件的。当利用葡萄糖发酵产氢时,菌种间对共同底物的竞争使其协同作用无法发挥,从而制约了高效产氢细菌(HPB)的产氢能力;而利用复杂有机物发酵产氢时,菌种间的协同作用得以发挥,并促进了高效HPB产氢能力的提高。同时提出,针对不同底物可以采用不同的培养方式。

关键词:产氢;发酵细菌;混合培养;协同作用

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2003)02-06-0054

Cooperation of Mixed Culturing Bacteria in the Hydrogen Production by Fermentation

Lin Ming, Ren Nanqi, Wang Aijie, Wang Xiangjing(School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China E-mail:stuartlinen@yahoo.com.cn)

Abstract:In order to discuss the cooperation of H_2 -producing fermentation bacteria (HPFB) in mixed culture, a batch test fed with glucose and complex organic substance (starch, beef, PEP and peptone) respectively, was conducted to investigate the effects of mixed culture on H_2 -producing ability. For the systemic and accurate analysis, three kinds of the mixed culture were used to this batch test. It included that the mixed culture with five strains of HPFB (B49, H1, LMI2, LMI1 and B51), B49 and three strains of non-HPFB (L10, Bacteroides 3-2, Sporobacter 1), and B49 and hydrogen producing sludge. The results showed that the cooperation of mixed culturing bacteria was conditional on the substrates. When fed with glucose, which were easily utilized by HPB, the H_2 -producing ability of HPB was restrained because of the competition on the co-substrate between HPB and other fermentation bacteria, and it was quite difficult for the cooperation of mixed culturing bacteria to be performed. When fed with complex organic substance, the H_2 -producing ability of HPB was enhanced via the cooperation of mixed culturing bacteria. Furthermore, a strategy was put forward, that is, different kind of HPB cultures could be adopted according to the difference of substrates.

Keywords:hydrogen production; fermentation bacteria; mixed culture; cooperation

目前,在生物制氢技术领域,发酵细菌产氢的效率高于光合细菌的观点已得到普遍的认识^[1,2]。但是,在采取纯培养还是混合培养上仍存在着很大的分歧,其根本原因是尚未明确混合培养时菌种间的协同作用是否有利于产氢反应的进行。

从微生物生态学上分析,混合菌种的协同作用实质上是菌群间的一种互生和共生关系,它在生物降解^[3]、重金属耐受^[4]和产甲烷过程^[5]中所起到的重要作用已成为不争的事实,

但大量混合菌种发酵产氢的实验研究却令人难以轻言协同作用对提高产氢效率的利弊。截止到目前的研究成果主要集中在以下几方面:①发酵细菌与光合细菌混合培养时,协同作用能促进产氢反应^[6~8];②发酵产氢细菌与耗氢菌之间的协同作用往往抑制了产氢反应的进

基金项目:国家“973”项目(G2000026402);国家“863”项目(2001 AA515030)

作者简介:林明(1975~),男,博士研究生,主要从事发酵法生物制氢的研究。

收稿日期:2002-02-05;修订日期:2002-03-28

行^[9,10]; ③仅有实验证明发酵菌种协同作用有利于产氢代谢^[12~14]; ④Scheifinger(1975)^[11]发现反刍月形单胞菌在纯培养时不产氢(可能是由于产氢量极低,不易被检测),而在与产甲烷细菌混合培养时能够产生微量的氢气。

可见,产氢发酵细菌混合培养时协同作用对产氢反应影响的研究,因实验条件和产氢细菌的差异较大,国内外至今尚无较为明确和统一的阐述。本研究试图通过间歇实验,利用从连续流生物制氢反应器厌氧活性污泥中分离到的 5 株高效 HPB(B49、H1、LM12、LM11 和 B51)和 3 株非产氢发酵细菌(L10、拟 3-2 和芽孢 1),分别考察以葡萄糖和复杂有机物(淀粉、牛肉膏、聚乙二醇乙二酸酯和胰蛋白胨)为底物时,5 株高效 HPB 混合培养,高效 HPB(B49)与 3 株非产氢细菌(NHPB)分别混合培养,以及 B49 与活性污泥混合培养对产氢能力的影响,从而探讨协同作用发挥的程度。

1 材料和方法

1.1 厌氧活性污泥和实验菌种的来源

实验用厌氧活性污泥来自本研究室的连续流生物制氢反应器($V=9.6\text{ L}$),取泥时反应器处于稳定运行状态: $35\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养,以糖蜜为底物,进水 COD 浓度 4686 mg/L ,产气 21 L/d ,氢气含量 48.8% , $\text{pH}3.9\sim4.2$, $\text{HRT}=8\text{ h}$ 。采用 Hungate 技术,经 6 次分离实验,从污泥中获得 210 株优势菌株,再以最大产氢速率(Q_{H_2})为指标筛选出 5 株高效 HPB(B49、H1、LM12、LM11 和 B51),同时得到具有典型发酵类型的 3 株非产氢发酵细菌(NHPB),即:L10、拟 3-2 和芽孢 1。上述 8 株菌的发酵类型和 Q_{H_2} 见表 1。

1.2 纯培养和混合培养菌种投加原则

本实验中投加的纯培养菌种、混合培养菌种和活性污泥均要求总菌数为 $6\times10^8\text{ 个/mL}$,混合培养指 5 株高效 HPB 按等比例数混合,活性污泥指连续流生物制氢反应器中的厌氧活性污泥。

1.3 菌浊和细胞干重的测定

用 752 紫外分光光度计,在 600 nm 处测定样品的吸光度值,作为菌浊($\text{OD}_{600\text{ nm}}$)。将样品

在 4000 r/min 条件下离心,弃上清液,用 PSB 液洗 2 次, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 h 干燥至恒重,用分析天平称其重量。PSB 液($\text{pH}7.2$): $\text{NaCl } 8.0\text{ g}$; $\text{KCl } 0.2\text{ g}$; $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{ } 1.15\text{ g}$; $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{ } 0.2\text{ g}$; 蒸馏水 1000 mL 。

表 1 筛选出的 HPB 和 NHPB 及其发酵类型

Table 1 The HPB and NHPB screened out and their fermentation types

菌种	发酵类型	液相末端产物 ¹⁾ / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$				$Q_{\text{H}_2}/\text{mmol}\cdot(\text{g}\cdot\text{h})^{-1}$
		乙醇	乙酸	丙酸	丁酸	
B49	乙醇型发酵	114.5	91.8	0.4	1.6	21.6
H1	乙醇型发酵	162.1	53.8	0.2	0.5	5.44
B51	丁酸型发酵	1.4	27.1	2.7	16.9	12.1
LM11	丁酸型发酵	0.6	39.5	0.6	16.9	2.94
LM12	丁酸型发酵	0.7	36.3	0.8	21.0	12.06
L10	丙酸型发酵	0.0	8.3	27.1	9.0	ND
拟 3-2	乙醇型发酵	29.1	14.7	3.4	0.0	ND
芽孢 1	乙酸型发酵	2.2	12.8	4.7	0.0	ND
活性污泥	乙醇型发酵	18.1	11.7	1.6	1.0	0.75

1) 培养 7d 后的结果;ND 为未测出。

1.4 发酵产物的分析

挥发酸和醇类测定:用 GC122 型气相色谱仪,柱长 2 m ,担体 GDX103, $60\sim80\text{ 目}$,氢火焰检测器,氮气作载气,流速 60 mL/min ,氢气流速为 50 mL/min ,空气流速为 490 mL/min ,气化室温度 $210\text{ }^{\circ}\text{C}$,柱温和检测室温度 $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。取 1 mL 培养液,离心 5000 r/min ,取上清液进样。

H_2 和 CO_2 测定:使用 SC-II 型气相色谱仪,柱长 2 m ,担体为 TDS-01, $60\sim80\text{ 目}$,热导池检测器,氮气作载气,流速为 70 mL/min ,柱温和检测室温度 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.5 产氢指标的计算

最大产氢速率:

Q_{H_2} = 单位时间最大产气摩尔质量 $\times$

H_2 比例/当时细胞干重 $[\text{mmol}/(\text{g}\cdot\text{h})^{-1}]$

单位体积产氢量: Y_{H_2} = 累计产气量 $\times$

H_2 比例/培养基体积(mL/L)

1.6 试验装置与条件

间歇试验装置如图 1 所示。以氮气为气相,菌种接入 145 mL 液体培养基中,培养基成分如下(g/L):葡萄糖 20;胰蛋白胨 4;牛肉膏 2;酵

母汁 1 ;NaCl 4 ;K₂HPO₄ 1.5 ;MgCl₂ 0.1 ;FeSO₄·7H₂O 0.1 ;L-半胱氨酸 0.5 ;发酵液 10 mL ;维生素液(钴胺素 0.01 ;抗坏血酸 0.025 ;核黄素 0.025 ;柠檬酸 0.02 ;吡多醛 0.05 ;叶酸 0.01 ;对氨基苯甲酸 0.01 ;肌酸 0.025)10 mL ;微量元素液(MnSO₄·7H₂O 0.01 ;ZnSO₄·7H₂O 0.05 ;H₃BO₃ 0.01 ;N(CH₂COOH)₃ 4.5 ;CaCl₂·2H₂O 0.01 ; Na₂MoO₄ 0.01 ; CoCl₂·6H₂O 0.2 ;AlK(SO₄)₂ 0.01)10 mL ;刃天青 (0.2 %) 1 ~ 2 mL ;pH 6 ~ 6.4 (注 :当进行其它底物降解实验时 ,培养基碳源葡萄糖被换为相应的底物) .置于恒温气浴振荡器中 ,在 35 ℃ 下以 120r/ min 振荡培养 .定时测其产气量、pH 值、菌浊、细胞干重和氢气含量 .在产气量测定的数值读取中 ,平衡瓶液面与气量测定管液面相平 ,以保证测定数值的准确性 .

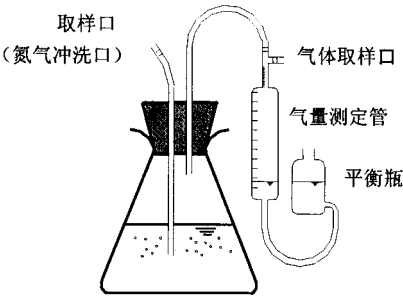


图 1 间歇试验装置示意图
Fig.1 Sketch of batch test reactor

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖为底物时 HPB 纯培养和混合培养产氢能力的比较

2.1.1 纯培养和混合培养产氢能力的比较

以葡萄糖为底物时 ,HPB 纯培养和混合培养产氢能力的测试结果见图 2 和表 2 .可见 ,纯培养的 B49 产氢能力最强 ,因为其 Q_{H_2} 、 Y_{H_2} 和累计产气量均最大 .B49、H1、LM12、LM11 和 B51 混合培养的 Q_{H_2} 、 Y_{H_2} 和累计产气量均低于 B49 .但混合培养的 Q_{H_2} 高于 H1、LM11 和 B51 , Y_{H_2} 和累计产气量高于 LM12、LM11 和 B51 .因此 ,混合培养的 HPB 产氢能力介于 5 株高效产氢细菌之间 .而活性污泥的 Q_{H_2} 、 Y_{H_2} 和累计产

气量均为最低水平 ,说明其产氢能力最低 .笔者认为 ,5 株高效 HPB 都具备完整降解葡萄糖的酶系 ,能较充分地利用葡萄糖 .当以葡萄糖为底物进行产氢发酵时 ,混合菌种间是底物竞争关系 ,它们争夺共同的底物产氢 ,所以其协同作用难以发挥 .而活性污泥中菌群较为复杂 ,存在大量的非产氢发酵细菌 ,它们不仅与 HPB 争夺葡萄糖 ,而且其发酵产物可能对 HPB 有拮抗作用 ,导致产氢能力较低 .但是图 2 还反映出活性污泥反应停滞期最短 ,能够迅速产氢 ,这说明连续培养更能保证细菌的活性 .

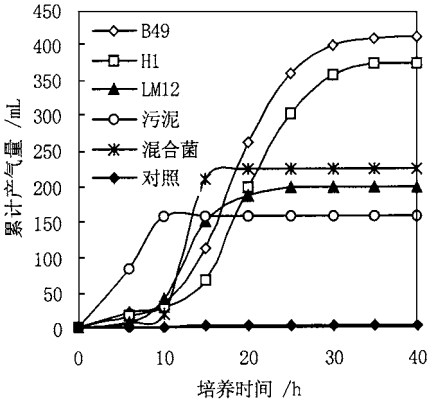


图 2 不同培养方式 HPB 发酵葡萄糖的产气情况
Fig.2 Gas production in the different kinds of culture by the glucose fermentation

表 2 产氢发酵菌株纯培养和混合培养的产氢能力¹⁾
Table 2 The H₂-producing abilities of HPBs in pure culture and mixed culture

菌株	Q_{H_2}	Y_{H_2}	菌株	Q_{H_2}	Y_{H_2}
B49	25.0	1813.8	混合培养	19.0	1140.0
H1	10.3	1275.2	活性污泥	18.8	631.0
LM12	27.9	975.9	对照	ND	ND

1) 混合培养为 B49、H1、LM12、LM11 和 B51 等比例混合 ;ND 为未检

2.1.2 葡萄糖为底物时 HPB 与 NHPB 混合培养产氢能力的比较

表 3 和图 3 表明 ,B49 的 Q_{H_2} 、 Y_{H_2} 和累计产气量均高于它与 L10 拟 3-2 和芽孢 1 混合培养的结果 .说明葡萄糖为底物时 ,HPB 与 NHPB 混合培养使 HPB 的产氢能力下降 .分析认为 ,无论乙醇型发酵还是丁酸型发酵 ,都是通过 2 条途径产氢 : ① 丙酮酸氧化生成乙酰 CoA 直接

产氢;②通过 NADH 途径产氢^[15].在产氢发酵细菌中,第 1 种途径产氢较为有限,NADH 途径的产氢作用更为直接.但是 NADH 途径产氢必须在氢分压较低的条件下进行,为了维持 NADH/ NAD⁺ 的平衡,必须将过剩的 NADH 氧化成还原性产物乙醇、乙酸、丙酸和丁酸等.然而,L10、拟 3-2 和芽孢 1 的发酵类型分别为典型的丙酸型发酵、乙醇型发酵和乙酸型发酵(见表 1).因此,5 株 HPB 与 3 株 NHPB 混合培养时,后者无法通过耦联反应促进前者产氢效率的提高.

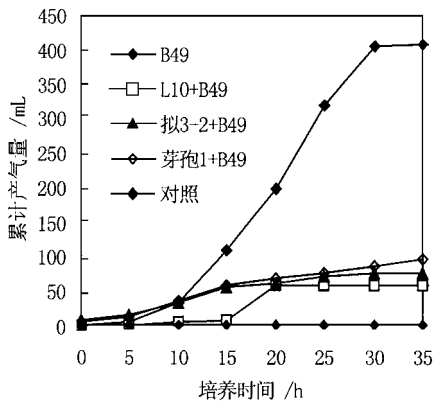


图 3 HPB 与 NHPB 混合发酵葡萄糖的产气情况
Fig.3 The compare of gas production of mixed cultured HPB and NHPB

另外,在从生物制氢反应器中分离的发酵细菌尚未发现进行丁酸发酵而不产氢的细菌.而从表 2 和图 2 中混合培养产氢的结果来看,丁酸发酵细菌(LMI1 和 LMI2)和 B49 混合培养时也没有促进产氢效率的提高.B49 在表 1 ~ 3 中 Q_{H_2} 的数值有所不同,但偏差不大,是因为不同实验中启动菌种活性不同和正常的实验误差.而重复对 B49 进行产氢能力测量是为了使同一对比实验中 B49 与其它比较的菌种背景值相同,使比较结果更科学.

表 3 HPB 与 NHPB 混合培养的产氢能力

Table 3 The compare of H_2 -producing abilities for mixed cultured HPB and NHPB

菌株	Q_{H_2}	Y_{H_2}	菌株	Q_{H_2}	Y_{H_2}
B49	23.6	2430.87	拟 3-2 + B49	10.74	442.34
L10 + B49	17.7	292.26	芽孢 1 + B49	6.98	579.65

上述实验结果证明,以葡萄糖为底物进行产氢发酵时,无论是 HPB 与 NHPB 的混合培养,还是不同 HPB 之间的混合培养,菌种间的协同作用不但不能发挥,反而会因菌种间对底物的竞争,使产氢效率下降.

2.2 复杂底物纯培养和 B49 与活性污泥混合培养时产氢能力的比较

由表 4 和图 4 可见,以淀粉、牛肉膏、聚乙二醇乙二酸酯和胰蛋白胨为底物时,纯培养和混合培养的实验结果与 2.1 节大不相同.以淀粉为底物时,B49 纯培养的累计产气量和 Y_{H_2} 分别为 49.2 mL/L 和 24.2 mL,产氢能力极低,说明 B49 不能较好地利用淀粉;活性污泥降解淀粉时, Y_{H_2} 和累计产气量分别为 235.3 mL/L 和 53 mL,这说明活性污泥中存在细菌分解淀粉,可以将淀粉转化成麦芽糖和葡萄糖,使污泥中的 HPB 的产氢能力高于纯培养的 B49;而将 B49 与活性污泥按菌数等比例混合培养时, Y_{H_2} 和累计产气量分别为 425.3 mL/L 和 91 mL,即产氢能力大大高于活性污泥和纯培养的 B49,这说明污泥中分解淀粉的细菌将 B49 不能利用的淀粉分解成 B49 可以利用的葡萄糖,即分解淀粉的细菌与 B49 之间存在协同作用,从而使混合培养的产氢能力大大提高(图 4A 和表 4).

另外,从表 4 的液相末端产物分析还可以发现,纯培养的 B49 时虽然代谢淀粉的能力微弱,但其末端发酵产物仍以乙醇为主,为乙醇型发酵;而活性污泥代谢淀粉时为丁酸型发酵,这是因为多数丁酸型发酵的梭菌属能利用淀粉产氢,所以在以淀粉为底物代谢时,乙醇型发酵污泥中为数不多的丁酸型细菌得以大量生长.因此 B49 与活性污泥混合培养时,乙醇和丁酸在液相末端产物中比例都很高,就不难解释了.

由表 4 和图 4B 可见,当以牛肉膏进行不同培养方式的发酵产氢实验时,得到了类似的结果,说明混合培养时,分解牛肉膏的细菌与 B49 之间存在着协同作用,从而促进产氢作用的发挥.然而,由图 4C 和表 4 可知,以聚乙二醇乙二酸酯为底物时,无论采取那种培养方式,其产氢能力都不理想.这说明活性污泥中分解聚乙二

醇乙二酸酯的细菌不存在或活性难以发挥.由表 4 和图 4D 可见,当以胰蛋白胨为底物时,3 种培养方式却都进行一定程度的产氢发酵.这说明 B49 能够分解蛋白质进行发酵产氢,而且 B49 与活性污泥中分解蛋白质的细菌之间也存在着协同作用.

表 4 以复杂底物产氢发酵时产氢能力的比较

Table 4 The compare of H₂-producing abilities in pure culture and mixed culture

底物	培养方式	Y _{H₂}	pH	OD _{600nm}	液相末端产物 / mmol·L ⁻¹			
					乙醇	乙酸	丙酸	丁酸
牛肉膏	纯培养的 B49	117.6	6.35	0.403	4.3	25.3	0.5	1.9
	B49 + 活性污泥	757.9	6.4	1.925	9.9	38.7	9.0	7.0
	活性污泥	625.3	6.7	1.925	2.1	42.5	12.6	8.1
聚乙二醇乙二酸酯	纯培养的 B49	20.2	5.31	0.44	1.2	10.2	1.2	1.1
	B49 + 活性污泥	19.2	6.1	0.146	0.8	6.9	0.6	0.2
	活性污泥	12.3	6	0.162	0.2	4.3	1.0	0
胰蛋白胨	纯培养的 B49	33.9	6.35	1.74	2.7	18.3	2.9	1.5
	B49 + 活性污泥	45	6.5	1.715	0.4	23.2	0.9	0.5
	活性污泥	40.8	6.5	1.8	0.1	29.1	0.7	3.1
淀粉	纯培养的 B49	49.2	4.95	0.417	2.4	9.9	0.9	0.2
	B49 + 活性污泥	425.3	3.6	1.445	9.9	23.0	0.9	7.0
	活性污泥	235.3	3.7	1.525	2.1	20.7	1.1	7.1

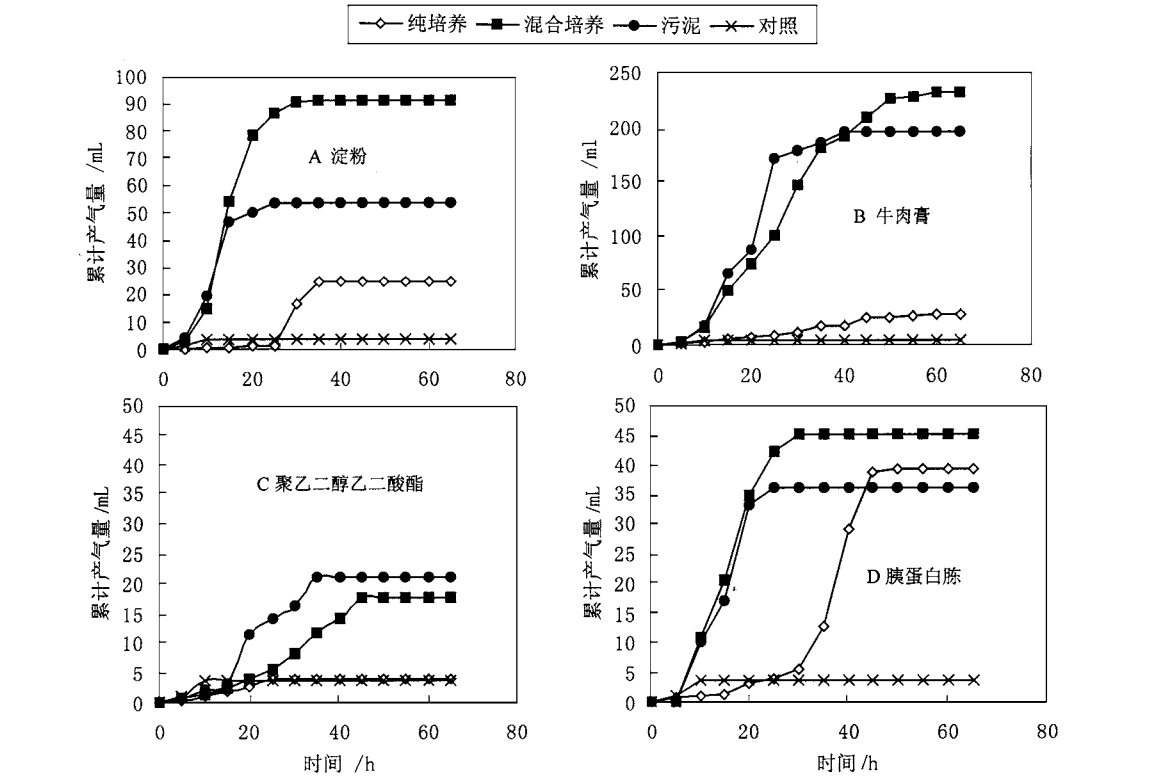


图 4 不同培养方式产气能力的比较

Fig. 4 The compare of gas production in pure culture and mixed culture

可见,只有纯培养 HPB 自身具备降解蛋白质降解能力的 HPB 与活性污泥中能降解这些物质和脂类等物质的能力,或者对这些物质没有物质的细菌之间产生协同作用,才能促进复杂底

物的发酵产氢过程。

2.3 混合培养协同作用在发酵法生物制氢技术中的应用

上述研究表明,高效 HPB 以单糖(葡萄糖)发酵产氢效率较高,而利用复杂物质如脂类、蛋白质、酯类等产氢的能力则较低,这就使发酵法生物制氢技术的应用有所局限。以自然界中最为普遍和廉价的纤维素进行生物制氢为例,很多专家采用了不同的方法,但都很难达到理想的效果:①分离和筛选能够利用纤维素产氢细菌如热纤维梭菌(*Clostridium thermocellum*)直接产氢,但是菌株的产氢效率并不理想^[16,17];②通过商用纤维素酶对纤维素进行水化预处理的两相系统制氢,由于预处理高昂的成本,大大提高了制氢成本^[18];③以纤维素驯化产氢污泥进行发酵产氢,但是难以得到很高的产氢效率,并且启动困难^[19]。

根据本研究的结果,笔者提出如下策略以供商榷:当以葡萄糖等简单底物进行发酵制氢时,高效产氢细菌应以纯培养的方式培养,以保证高效产氢细菌充分的利用底物,发挥理想的产氢效果。②当以复杂底物进行发酵制氢时,可以利用高效 HPB 与活性污泥混合培养,以发挥菌种间协同作用,达到理想的产氢效果。

3 结论

(1)产氢细菌对不同底物的产氢效果是不同的。对 B49,葡萄糖是产氢效率最高的底物。

(2)以单糖(葡萄糖)为底物进行发酵产氢时,无论产氢细菌和非产氢细菌的混合培养还是产氢细菌之间的混合培养,菌种间协同作用不但不能发挥,反而由于菌种间对底物的竞争,抑制了高效产氢菌的产氢能力的发挥。

(3)以复杂的底物(脂类、蛋白质、酯类等)进行发酵产氢时,应采取不同的策略。可以利用高效 HPB 与活性污泥混合培养,以发挥菌种间协同作用,促进高效 HPB 产氢能力的发挥。

参考文献:

- 1 Yokoi H, Ohkawara T et al. Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. J. Ferment. Bioeng., 1995, **80**(6): 571 ~ 574.
- 2 Tanisho S, Ishiwata Y. Continuous hydrogen production

- from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. Int. J. Hydrogen Energy, 1994, **19**(10): 807 ~ 812.
- 3 金志刚等编著. 污染物生物降解. 上海:华东理工大学出版社, 1997.
- 4 Mori K et al. Effect of heavy metals on the growth of a methanogen in pure and co-culture with a sulfate-reducing bacterium. J. Biosci. Bioeng., 2000, **90**(3): 260 ~ 265.
- 5 赵一章. 产甲烷细菌及研究方法. 成都:成都科技大学出版社, 1997.
- 6 Kayano H, Matsunaga T et al. Hydrogen evolution by co-immobilized *Chlorella vulgaris* and *Clostridium butyricum* cells. Biochimica et Biophysica Acta, 1981, **638**: 80 ~ 85.
- 7 Miyake J, Mao X Y, Kawamura S. Photoproduction of hydrogen from glucose by a co-culture of a photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum*. J. Ferment. Technol., 1990, **62**(6): 531 ~ 535.
- 8 Kawaguchi H, Hashimoto K, Hirata K, Miyamoto K. H₂ production from algal biomass by a mixed culture of *Rhodospirillum rubrum* A-501 and *Lactobacillus amylovorus*. J. Biosci. Bioeng., 2001, **91**(3): 277 ~ 282.
- 9 Iannotti E L, Kafkewitz D et al. Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio succinogenes*: changes caused by interspecies transfer of H₂. J. Bacteriol., 1973, **114**(3): 1231 ~ 1240.
- 10 闵航, 陈美慈, 赵宇华等. 厌氧微生物学. 杭州:浙江大学出版社, 1993.
- 11 Scheifinger C C et al. H₂ production by *Selenomonas ruminantium* in the absence and presence of methanogenic bacteria. Appl. Microbiol., 1975, **29**(4): 480 ~ 483.
- 12 Lin C Y, Chang R C. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. J. Chem. Technol. Biotechnol., 1999, **74**: 498 ~ 500.
- 13 Ueno Y, Otsuka S, Morimoto M. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. J. Ferment. Bioeng., 1996, **82**(2): 194 ~ 197.
- 14 Roychowdhury S, Cox D, Levandowsky M. Production of hydrogen by microbial fermentation. Int. J. Hydrogen Energy, 1988, **13**(7): 407 ~ 410.
- 15 Tanisho S, Ishiwata Y. Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. Int. J. Hydrogen Energy, 1995, **20**(7): 541 ~ 545.
- 16 Lamed R J, Lobos J H, Su M T. Effects of stirring and hydrogen on fermentation products of *Clostridium thermocellum*. Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54**(5): 1216 ~ 1221.
- 17 Taguchi F, Mizukami N et al. Direct conversion of cellulosic materials to hydrogen by *Clostridium* sp. Strain no. 2. Enzyme Microb. Technol., 1995, **17**(2): 147 ~ 150.
- 18 Taguchi F, Yamada K, Hasegawa K, Takasaito T, Hara K. Continuous hydrogen production by *Clostridium* sp. Strain No. 2 from cellulose hydrolysate in aqueous two-phase system. J. Ferment. Bioeng., 1996, **82**(1): 80 ~ 83.
- 19 Britz T J, Spangenberg G, Venter C A. Acidogenic microbial species diversity in anaerobic digesters treating different substrates. Wat. Sci. Tech., 1994, **30**(12): 55 ~ 61.