

生物制氢技术的发展及应用前景

任南琪, 郭婉茜, 刘冰峰

(哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090, rq@hit.edu.cn)

摘 要: 介绍了生物制氢技术的几个基本方法. 生物制氢技术作为一种可再生能源生产技术, 主要包括暗发酵、光发酵、光解水和光暗发酵耦合生物制氢 4 种方法, 菌种选育、工艺形式、工艺调控以及暗光发酵的耦合方式对高效、持续和稳定产氢至关重要. 对生物制氢技术近年的发展及现状进行了总结, 并结合生物制氢领域存在的问题, 展望了其发展前景.

关键词: 生物制氢技术; 可再生能源; 暗发酵; 光发酵

中图分类号: X505 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2010)06-0855-09

Development and application prospect of bio-hydrogen production technology

REN Nan-qi, GUO Wan-qian, LIU Bing-feng

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, rq@hit.edu.cn)

Abstract: Bio-hydrogen production technology as a renewable energy production technology mainly includes dark-fermentation, photo-fermentation, photolysis of water and the combination of dark- and photo-fermentation. The screening of strain, forms and regulation of process and forms of coupling are important to high efficient, continuous and stable hydrogen production. This paper summarizes the development of current bio-hydrogen technology, analyzes the problems in its theoretical and technical studies, and introduces the application prospect of bio-hydrogen technology.

Key words: bio-hydrogen production technology; renewable energy source; dark-fermentation; photo-fermentation

目前,化石能源短缺,石油价格日益攀升,亟需寻求可再生、高效、清洁能源来替代. 氢气作为清洁能源的首选,是未来理想的燃料之一. 在不同的制氢方法中,生物制氢技术作为一种低成本、低能耗的绿色能源生产技术,可以结合有机废水处理和清洁能源生产而备受关注.

本文对生物制氢技术的发展及现状进行了分析,指出目前生物制氢领域存在的主要问题,并对生物制氢的前景进行了展望. 研究结果对于促进

生物制氢技术的发展和加快生物制氢技术的产业化步伐具有重要的意义.

微生物制氢过程可以分为:(1)暗发酵制氢;(2)光生物制氢(光解水制氢和光发酵制氢);(3)光暗发酵耦合制氢. 光解水和光发酵生物制氢是依赖光能供应的过程,暗发酵生物制氢是不需要光能的过程. 这几种制氢过程主要涉及 3 种微生物类群:暗发酵细菌,光解微生物(绿藻和蓝细菌)和光发酵细菌.

1 暗发酵生物制氢技术

暗发酵生物制氢是利用厌氧发酵产氢细菌在厌氧条件下将有机物分解转化为氢气,此过程不需要光能供应. 能够进行暗发酵产氢的微生物种类繁多,

收稿日期: 2010-03-01.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30870037, 50638020); 城市水资源与水环境国家重点实验室开放基金资助项目(QAK200806).
作者简介: 任南琪(1959—),男,长江学者特聘教授,中国工程院院士.

包括一些专性厌氧细菌、兼性厌氧细菌及少量好氧细菌^[1], 例如梭菌属 (*Clostridium*)、类芽孢菌属 (*Paenibacillus*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 等。

目前, 已知的暗发酵产氢过程主要包括甲酸分解产氢、丙酮酸脱羧产氢以及 NADH/NAD 平衡调节产氢 3 种途径。以葡萄糖为例, 其暗发酵产氢过程为: 首先, 葡萄糖经糖酵解途径生成丙酮酸、ATP 和 NADH; 然后, 丙酮酸被丙酮酸铁氧化还原蛋白酶氧化成乙酰辅酶 A、CO₂ 和还原性铁氧化还原蛋白 (丙酮酸脱羧过程); 或者经丙酮酸甲酸裂解酶而分解成乙酰辅酶 A 和甲酸, 生成的甲酸再次被氧化为二氧化碳, 并使铁氧化还原蛋白还原 (甲酸裂解过程); 最后, 还原性铁氧化还原蛋白在氢化酶和质子的作用下生成氢气。在产氢代谢过程中, 不同的生态环境和不同的生物类群导致代谢的末端产物也不尽相同。根据末端代谢产物的不同, 可以产生不同的发酵类型。传统的暗发酵生物制氢可以分为丁酸型发酵和丙酸型发酵^[2]。1990 年以来, 任南琪等通过对糖蜜废水的连续流制氢研究, 发现并提出了新的乙醇型发酵产氢途径^[3-5]。研究表明, 当末端产物为乙醇时, 氢气产量较高^[6]。特别指出的是 *E. harbinense* sp. B49^[7]、*E. harbinense* sp. Y3^[8] 及 *E. harbinense* sp. lyf3^[9] 等高效产氢发酵细菌从 CSTR 反应器的活性污泥中成功地陆续分离, 进一步证实末端产物以乙醇和乙酸为主的代谢类型可以得到较高的氢产率和产量。乙醇和乙酸的耦联反应可保持 NAD⁺/NADH 的平衡关系, 从而使乙醇型发酵得以有序地进行并具有较强的稳定性。

1.1 高效产氢新菌种的选育

为了寻求高效产氢微生物, 获得较高的产氢能力, 国内外研究者们分离纯化了大量新菌种, 主要是兼性的肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、专性厌氧的梭菌科 (*Clostridiaceae*) 以及一些高温菌属 (*Thermoanaerobacterium*) 等。

Kumar 等^[10]分离得到的阴沟肠杆菌 *E. cloacae* IIT-BT08, 静态培养时其最大产氢能力为每摩尔己糖 2.7 mol。之后又报道了产气肠杆菌 *E. aerogens* DM11 静态培养时的最大产氢能力可达每摩尔己糖 2.80 mol^[11]。我国研究者在高效产氢暗发酵细菌的选育工作中也取得一定的成绩。林明^[12]从正在运行的生物制氢反应器的厌氧活性污泥中分离出产氢细菌 B49, 其代谢类型为乙醇型, 干细胞产氢能力为 25~28 mmol/(g·h)。任南琪等^[8-9]陆续又从 CSTR 反应器中分离出高效乙醇型产氢细菌 *Ethanoligenens harbinense* sp. R3 和 *Ethanoligenens harbinense* sp. Y3,

在以葡萄糖为底物时, 它们的最大产氢能力分别为干细胞产氢 35.74 mmol/(g·h) 和每摩尔葡萄糖产氢 2.81 mol, 产氢能力在国际上现有的高效野生产氢菌株中居于前列。该课题组还从温泉中分离出一株能有效利用木糖发酵产氢的高温菌 *T. thermosaccharolyticum* W16, 每摩尔木糖产氢 2.19 mol, 最大产氢速率为 10.7 mmol/(L·h)^[13]。

1.2 暗发酵生物制氢工艺形式

为了满足高有机负荷和高生物量的要求, 研究人员对多种新的工艺进行了研究。Alzate-Gaviria 等^[14]研究发现, 利用 UASB 反应器处理城市垃圾和人工混合污水制氢, 在 pH=5.7±0.2、水力停留时间 24 h 的条件下, 干细胞产氢量可达 127 mL/(g·d); Chang 等^[15]采用有效容积为 300 mL 的固定床反应器, 以蔗糖为底物, 研究了水力停留时间在 0.5~5.0 h, 不同填料对生物产氢的影响。结果表明: 以膨胀土为填料, 水力停留时间为 2 h 时, 最大氢气产率为 0.42 L/(L·h); 以活性炭为填料, 水力停留时间为 1 h 时, 最大氢气产率为 1.32 L/(L·h)。Lin 等^[16]利用硅胶树脂做载体, 以蔗糖为底物, 在流化床中进行生物制氢研究, 发现在一定范围内, 蔗糖浓度的升高和水力停留时间的降低都有利于产氢的增加。在蔗糖质量浓度为 40 g/L, 水力停留时间为 2.2 h 时, 每摩尔蔗糖最大氢气产量为 (4.98±0.18) mol。Wu 等^[17]报道了在膨胀床反应器运行中, 当水力停留时间为 2 h 时, 临界流速为 0.85 cm/s, 获得的最大产氢速率为每 m³ 反应器 0.93 m³/h, 每摩尔蔗糖最大氢气产量可达 2.67 mol。

我国暗发酵生物制氢技术发展较快, 任南琪教授领导的课题组对碳水化合物 (含糖废水) 为底物以自絮凝的厌氧活性污泥为氢气生产者的发酵产氢进行了近 20 年的研究, 研制出了 CSTR 型和 EGSB 型两种高效生物制氢反应器, 并于 1999 年完成了世界上首例中试研究, 每立方米反应器每天稳定产氢 5.7 m³。2005 年, 又完成了世界上首例“废水发酵生物制氢示范工程”, 采用的生物制氢装置 (CSTR 型) 有效容积 65 m³, 日产氢能力 350 m³, 成功完成了与氢燃料电池耦合发电的工程示范, 日产氢量可用满足 60~80 户使用。

1.3 暗发酵生物制氢工艺运行与调控

影响生物制氢反应器工艺运行的因素很多, 如温度、pH、原料 (底物) 和水力停留时间等等。

温度是影响微生物生长代谢的重要因素之一。大部分产氢微生物属于嗜温菌, 厌氧菌的最适生长温度在嗜温菌生长温度范围的上限, 但不同发酵产氢微生物的产氢温度也存在较大的差

异. Kumar 等^[18] 证明 *Enterobacter cloacae* IIT - BT08 在 36 °C 时具有最大的产氢速率. Jung 等^[19] 对 *Citrobacter* sp. Y19 的研究表明,其最适的细胞生长和产氢温度为 30 ~ 40 °C. 从节能的角度考虑,有研究者进行了常温发酵产氢的研究,如 Lin 等^[20] 采用厌氧恒化器,在温度 15 ~ 34 °C 范围内进行了活性污泥的产氢研究,与 (35 ± 1) °C 条件下的产氢过程相比,常温条件下 (15 ~ 25 °C) 反应器的氢气产量和氢气体积分数均远低于后者,因此尚未看出常温发酵制氢的优势. 也有少数报道控制最佳产氢温度为高温范围,如 55 °C 时,可以达到较好的产氢效能^[21].

pH 值对发酵产氢的影响往往与细胞内 NADH/NAD 动态平衡和产氢菌的生理条件有关. pH 值会影响产氢微生物细胞内氢化酶活性和 (或) 代谢途径,另外还会影响细胞的氧化还原电位、基质可利用性、代谢产物及其形态等. 多数文献报道^[22-25], 严格的丁酸梭菌产氢最佳 pH 是 6.0 ~ 6.5; 而产气肠杆菌的产氢最佳 pH 在 5.5 ~ 6.0^[26]. Monot 等^[27] 研究了细胞内 pH 值对发酵产物的影响,结果表明,高 pH 值条件下的发酵产物以酸类物质为主,低 pH 值条件下的发酵产物往往是丙酮和丁醇等物质. 利用混合细菌发酵产氢的最佳 pH 范围的报道分歧较大. 大部分研究表明^[28-33], 厌氧发酵产氢细菌产氢的最佳 pH 范围在 5.5 左右. 而任南琪等报道的乙醇型发酵最佳产氢 pH 4.2 ~ 4.5^[34].

发酵法生物制氢过程的可持续性取决于产氢原料 (底物), 而整个工艺的效率取决于底物的物理化学性质. 目前的理论研究通常使用纯底物 (主要是葡萄糖、蔗糖、淀粉和纤维素), 而生产性应用则需要更为复杂的底物. 研究发现,糖蜜废水较适于暗发酵产氢^[35], 淀粉产氢也具有较好的应用前景^[36]. 也有少数报道以有机废弃物^[37-40], 如豆腐渣、生活垃圾作为厌氧发酵产氢的底物,这类产氢试验还仅限于小批量的间歇试验阶段,另有报道^[41-42] 以结晶纤维和麦秆作为发酵产氢底物,这些研究为降低生物制氢成本做出了极大的贡献.

对于连续流运行的发酵产氢反应器,水力停留时间是重要的调控因子. 从目前的研究看,厌氧反应器控制的水力停留时间通常为 2 ~ 24 h,并且水力停留时间的差异与反应器结构形式的差异密切相关. 文献[43]指出:应用连续流搅拌槽式反应器 (CSTR),最佳产氢的水力停留时间通常控制在 2 ~ 12 h;序批式厌氧反应器^[44] 最佳产氢的水力停留时间通常控制在 4 ~ 12 h;填充式反应

器^[45-46] 最佳产氢的水力停留时间通常控制在 2 ~ 6 h;添加载体的竖向流反应器最佳水力停留时间很短,为 0.5 ~ 2.0 h^[47]. EGSB 反应器在连续流生物制氢中显示出很多优势,在反应器停留时间为 1.5 ~ 2.0 h 时,每摩尔葡萄糖可产氢 3.47 mol^[35].

2 光生物制氢技术

2.1 光解水生物制氢技术

光解水生物制氢主要是指绿藻和蓝细菌,在厌氧光照条件下,利用自身特有的产氢酶系,将水裂解为氢气和氧气的过程,此过程没有 CO₂ 的产生. 其产氢机理和绿色植物光合作用机理相类似,但放氢机制却截然不同. 这两种微生物生长的营养需求较低,只需空气 (CO₂ 和 N₂ 分别作为碳源和氮源)、水 (电子和质子)、简单的无机盐和光,能直接光解水产生氢气,将太阳能转化为氢能. 绿藻在光照和厌氧条件下的产氢则由氢酶催化,而蓝细菌的产氢则由固氮酶和氢酶的共同催化下完成. 两种生物所需的电子和质子均来自于水的裂解.

绿藻和蓝细菌含有 2 个位于类囊体膜上的光合系统 PS I 和 PS II, PS I 的作用主要是生成还原剂用来还原 CO₂, PS II 的功能是水的裂解和氧的释放. 绿藻类囊体膜上的捕光色素吸收光能后被迅速传递到 PS II (P680) 的反应中心,然后将水分解为 H⁺ 和 O₂,并释放电子. 氧气透过叶绿体膜进入线粒体,被线粒体呼吸作用消耗,同时固定 CO₂. 质子被 ATP 合成酶泵到基质,以确保膜内外的质子梯度. 电子按氧化还原电位依次升高的顺序,经过类囊体膜上的质体醌、细胞色素等一系列电子传递链,传递至光系统 PS I (P700),在光照条件下进行能级跃迁,传递给铁氧还蛋白 (Fd),最终传给 Fe - Fe 氢酶的活性中心 (HC)^[48]. 在氢酶的催化下,基质中的质子和从膜上传来的电子结合生成氢气,产氢过程仅仅维持几秒至几分钟^[49-50]. 氧分子的存在,对氢酶活性产生强烈抑制,氧分压达到 2% 时,氢化酶将失去活力,影响到产氢速率和产氢效率^[51]. 其原因是氧接近 [Fe] - 氢化酶或 [NiFe] - 氢化酶的催化位点,致使氢不能与 H₂ - channel 结合,导致氢化酶失活^[52]. 许多研究者致力于通过不同方法来增加氢酶对氧气的耐受能力,来延长产氢时间,提高氢气产量.

2000 年,美国 Melis 等通过“剥夺”莱茵绿藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 培养物中的硫来使该藻类的 CO₂ 固定、放氧过程和碳消耗、产氢过程相分离,从而细胞在光照条件下通过光呼吸消耗氧气,形成厌氧环境以使氢酶产氢顺利进行,以间接避免氧

气对产氢的抑制,但是改造后的绿藻产氢量只达到理论产氢量的 15%^[53]. 根据这种研究思想,两步法制氢工艺被成功的应用,每升莱茵衣藻产氢速率可达到约 3 mL/h,产氢时间长达 70 h^[54-55]. Seribert 等^[56]人根据氢酶的可逆催化特性,通过化学诱变成功筛选到 2 株耐氧性高出野生藻株 10 倍左右的诱变藻株,克服了 H₂ 和 O₂ 生成的不可兼容性,避免氧气对氢酶的抑制,是绿藻产氢领域的重大突破. 然而,在实际产业化和商业化应用中仍面临许多技术问题. 研究表明:光照条件下,氢酶所需的还原力除水外,内源性有机物质如淀粉等也可作为产氢的还原力,绿藻白天进行光合作用积累的有机物在黑暗条件下也可通过氢酶发酵产氢,但产氢效率较低^[57].

而蓝细菌产氢则是在固氮酶和氢酶的共同催化下进行的,其中固氮酶催化产氢,氢酶吸收产生的氢气. 有异形胞的蓝细菌主要通过固氮产氢^[58],可分为营养细胞和异形胞两种. 营养细胞含光系统 I(PS I)和光系统 II(PS II),可进行 CO₂ 的还原和 H₂O 的光解,释放 O₂ 并产生还原性物质. 产生的还原性物质可通过厚壁孔道运输到异形胞,用于异形胞的固氮和产氢. 在缺氮条件下,蓝藻丝状体由普通细胞经过细胞壁加厚形成一种特化细胞即异形胞. O₂ 被加厚的细胞壁有效地阻止进入,为异形胞提供了局部低氧或厌氧环境,利于产氢. 正常的营养细胞在厌氧条件下生长时,异形胞内的固氮酶系统可产生固氮酶并固氮. 异形胞没有 PS II,只含 PS I,所以不能进行水的光解放氧和 CO₂ 的固定,使异形胞维持在无氧或缺氧的环境. 异形胞的光合磷酸化为固氮酶提供能量,确保固氮产氢过程的顺利进行^[59]. 一种丝状好氧固氮蓝藻如鱼腥藻,其细胞具有异形胞和营养细胞 2 种类型^[60]. 大多数藻类都是通过固氮催化释放氢气,在异形胞与营养细胞的共同作用下,光解水释放 H₂ 和 O₂,即固氮放氢的过程. 无异形胞单细胞蓝藻的产氢主要由固氮酶催化,大部分无异形胞的蓝藻由于没有异形胞而失去了对氧气的防护能力,只能在光暗交替情况下释放 H₂^[61].

2.2 光发酵生物制氢技术

光发酵生物制氢是在厌氧光照条件下,光发酵细菌利用小分子有机物、还原态无机硫化物或氢气做供氢体,光驱动产氢,产氢过程没有氧气的释放. 光发酵细菌只含有光合系统 PS I,不含有 PS II,所以同绿藻和蓝细菌相比,在产氢的同时不产生氧气,不存在氧气对产氢酶的抑制,产氢纯度和产氢效率高,可以简化工艺过程. 光发酵生物制氢是与光合磷酸化相偶联的,由固氮酶催化的放氢过程.

同时由于所需 ATP 来自光合磷酸化,所以固氮放氢所需要的能量来源不受限制,这也是光发酵细菌产氢效率高于暗发酵细菌的主要原因.

无论在间歇还是连续培养产氢过程中,菌种都扮演着重要的角色,其性能的优良直接影响到生物制氢技术的成败. 因此,获取高效产氢的光发酵细菌一直是研究者关注的焦点.

Willison 通过化学诱变的方法,筛选到 *Rhodospseudomonas capsulata* B10 菌株的膜结合氢酶缺陷株,生长迅速,该变异株在 DL-苹果酸、L-苹果酸和 D-苹果酸中的产氢量比野生型菌株提高 10% ~ 70%^[62]. Kim^[63] 研究了 *Rhodobacter sphaeroides* KD131 的吸氢酶 Phb⁻/Hup⁻ 突变株,产氢量明显提高,为野生型的 1 倍左右. Tao^[64] 从废水池塘中分离获得一株光发酵细菌 ZX-5,具有较强的产氢能力,在以琥珀酸盐、苹果酸盐、乙酸钠和丁酸钠为碳源时,细胞生长都很好,底物转化效率分别为 81.4%、78.9%、69.0% 和 74.6%,最大氢气产率分别是 94、92、90 和 110 mL/(L·h). 任南琪等^[65] 从淡水池塘底泥中分离获得光发酵细菌 *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53,该光发酵细菌具有较强的转化乙酸为氢气的能力,每 mol 乙酸盐氢气产量可达 2.64 ~ 2.84 mol. 郑耀通等^[66] 在鱼塘内分离到一株生长快的耐氨光发酵细菌 *Rhodobacter sphaeroides* G_{2B},并结合处理有机废水进行产氢研究^[67].

目前,除采用传统选择培养和遗传诱变技术之外,遗传工程技术改造产氢菌株和构建多功能基因工程菌是未来发展的方向. 通过诱变或敲除吸氢酶基因,消除菌株的吸氢现象,采用基因重组等手段构建基因工程菌也是一种可行性比较强的提高产氢能力的方法. Kim 等^[68] 通过基因重组 *R. rubrum* (pRKhydA 和 pRKhydC) Fe-氢酶基因,在丙酮酸盐存在的情况下,氢气产量增加了约 3 倍,也说明了 Fe-氢酶对丙酮酸具有明显的依赖性. Kars 等^[69] 通过缺失突变重组获得了 *R. sphaeroides* O. U. 001 的 hupSL 缺失突变株,在 15 mmol/L 苹果酸盐和 30 mmol/L 乙酸钠的培养基中每升培养基分别产氢 2.42 L 和 0.25 L,较野生型(1.97 L 和 0.210 L)明显提高约 20%.

国内外研究者相继展开了各种生活废水、工业废水、农副产品废弃物等作为产氢底物的研究,以降低光发酵产氢的成本.

已有一些研究者模拟有机废水成分进行了光发酵产氢试验的研究. Takabatake 等^[70] 研究了乙酸、丙酸和丁酸作为混合碳源同时添加碳酸盐去除

氨的产氢试验. 我国的余汉青等^[71]研究了 *Rhodopseudomonas capsulata* 利用混合挥发酸作为电子受体进行连续流产氢试验, 当乙酸钠、丙酸盐、丁酸钠的质量浓度为 1.8, 0.2, 1.0 g/L 时, 最大氢气产率为 37.8 mL/(g·h), 底物转化效率 45%. 台湾的张嘉修等^[72]人也研究了 *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5 使用乙酸钠和丁酸钠共同作为碳源用于氢气生产, 最大氢气产率达 39.5 mL/h, 最大累计氢气体积 2 738 mL, 氢气产量 51.6%. 我国尤希凤等^[73]人研究了 *Rhodobacter sphaeroides* 菌株利用猪粪废水的产氢能力及对猪粪废水的处理能力, 猪粪废水的 COD 从 5 687, 3 500, 1 214 mg/L 分别下降到 3 586, 2 135, 723 mg/L, 产氢速率分别为 27.3, 18.5, 15.0 mL/(L·d). Tao 等^[64]人在使用 ZX-5 处理废水时, COD 去除率可达 80%, 每克 COD 氢气产量 500 mL.

上述研究表明, 使用光发酵细菌对废水进行处理的同时, 既得到清洁能源氢气、降低制氢成本, 又实现了废弃物的资源化.

3 暗-光发酵耦合生物制氢技术

利用厌氧暗发酵产氢细菌和光发酵产氢细菌的优势和互补协同作用, 将二者联合起来组成的产氢系统称为光-暗发酵耦合生物制氢技术, 包括暗-光发酵细菌两步法和混合培养产氢 2 种方法.

3.1 暗-光发酵细菌混合培养生物制氢

暗发酵细菌能够将大分子有机物分解成小分子有机酸和醇, 以获得维持自身生长所需的能量和还原力, 解除电子积累而快速释放部分氢气. 由于产生的有机酸不能被暗发酵细菌继续分解而大量积累, 导致暗发酵细菌产氢效率低下, 成为暗发酵细菌产氢大规模应用面临的瓶颈问题^[74]. 而光发酵细菌能够利用暗发酵产生的小分子有机酸, 消除有机酸对暗发酵制氢的抑制作用, 进一步释放氢气. 同时光发酵细菌不能直接利用纤维素和淀粉等大分子的复杂有机物, 对廉价的废弃的有机资源的直接利用能力和产氢能力较差. 所以, 充分结合暗-光发酵两种细菌各自的优势, 将二者耦合到一起形成一个高效产氢体系, 不仅可以减少光能需求, 而且可以提高体系的产氢效率, 同时还可扩大底物的利用范围.

目前, 光发酵生物制氢技术的研究程度和规模还基本处于试验室水平, 暗发酵生物制氢技术已完成中试研究^[75], 要实现工业化生产仍需进一步提高转化效率, 降低制氢成本. 纯菌种生物制氢规模化面临诸多困难, 而且自然界的物质和能量

循环过程, 特别是有机废水、废弃物和生物质的降解过程, 通常由 2 种或多种微生物协同作用. 因此, 利用微生物进行混合培养或混合发酵产氢已越来越受到重视.

暗-光发酵细菌混合培养是将不同营养类型和性能的微生物菌株共存存在一个系统中, 构建高效混合培养产氢体系, 利用这些细菌的互补功能特性, 提高氢气生产能力及底物转化范围和转化效率.

Miyake 等^[76]验证了混合产氢途径的可行性, 暗发酵细菌 *Clostridium butyricum* 和光发酵细菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 联合氢气产量高达每摩尔葡萄糖 7 mol, 而且降低了光发酵细菌产氢所需的能量. Yokoi 等^[77]报道了 *C. butyricum* 和 *Rhodobacter sp.* M-19 混合培养利用淀粉最大产氢量达到每摩尔葡萄糖 6.6 mol, 比单一厌氧菌利用淀粉的产氢量高 4 倍. 郑耀通和闵航^[78]认为共固定光-暗两种发酵细菌的混合培养方式是处理高浓度有机废水持续产氢的最佳工艺模式. Asada 等^[79]采用乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* NBRC13953 和 *Rhodobacter sphaeroides* RV 共固定在琼脂凝胶中产氢, 每摩尔葡萄糖最大氢气产量为 7.1 mol. 丁杰等^[80]利用固定化光发酵细菌 *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53 和游离的 *C. butyricum* 进行混合培养产氢, 并对产氢过程中的一些关键性因素进行分析研究, 实现了一个较高的氢气产量, 每摩尔葡萄糖产氢 4.13 mol. Fang 等^[81]人研究了 *Clostridium butyricum* 和 *Rhodobacter sphaeroides* 以细胞数量比 1:5.9 的比例混合培养, 每毫升培养基氢气产量最大为 0.6 mL, 同时应用 FISH 技术对混合培养产氢体系中 2 种菌进行了相对定量, 认为该技术对于细菌在混合系统中的定量是有效的方法. 然而, 由于混合培养的 2 种类型的细菌在生长速率、种间差异等上存在着很大差别, 实现其启动和运行是很难实现的.

3.2 暗光发酵两步法生物制氢

相对于混合培养产氢, 两步法产氢更容易实现, 2 种菌在各自的环境中发挥作用. 第一步是暗发酵细菌发酵产生氢气, 同时产生大量的可溶性小分子有机代谢物, 第二步是光发酵细菌依赖光能进一步的利用这些小分子代谢物, 释放氢气.

Nath 等^[82]尝试使用 *Rhodobacter sphaeroides* O. U. 001 来光发酵 *Enterobacter cloacae* DM11 的代谢产物, 整个过程的氢气量比单一过程的高. Tao 等^[83]证实了通过暗-光发酵细菌两步法试验, 利用蔗糖作为底物, 能够显著增加氢气产量, 每摩尔蔗糖氢气产量最大达 6.63 mol. Liu 等^[84]通过使用游离的乙醇型发酵细菌 B49 和固定化光发酵细菌

R. faecalis RLD-53 两步法利用葡萄糖进行产氢, 每摩尔葡萄糖产氢量达 6.32 mol. Chen 等^[85]通过使用暗发酵细菌 *Clostridium pasteurianum* CH4 利用蔗糖作为底物时每摩尔蔗糖可以产生氢气 3.8 mol, 通过 *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 对上述发酵液进一步处理, 每摩尔蔗糖产氢 10.02 mol, 同时 COD 去除率达到 72%. 当使用光纤反应器进行光发酵试验时, 2 个过程氢气产量进一步增加到每摩尔蔗糖产氢 14.2 mol, COD 去除率几乎接近 90%, 显示了很好的氢气生产能力和 COD 处理效果. Lo 等^[86]对难降解大分子物质淀粉进行酶解处理后, 经过暗-光发酵 2 个过程即三步法氢气生产过程, 使 COD 去除率达到 54.3%, 每摩尔葡萄糖产氢 3.09 mol, 这一试验结果说明: 暗-光发酵的两步法氢气生产过程可以结合一定的预处理方法实现难降解大分子有机物的产氢, 降低产氢原料成本, 增加底物转化效率, 为实现生物制氢的商业化生产奠定基础. 然而, 两步法产氢过程中, 需要 2 个反应器, 增加了占地面积和处理步骤, 而且光发酵过程的氢气生产速率和细菌生长速率同暗发酵相比较低, 是规模化生产的限制因素.

4 存在问题

生物制氢技术虽然发展较快, 然而, 该技术存在的一些主要问题限制了其产业化的步伐.

1) 暗发酵生物制氢虽然具有产氢稳定、速率快等优点, 但是, 由于挥发酸的积累而产生反馈抑制作用限制了其产氢量. 同时其生产和储运设施不够完善, 严重制约其大规模应用.

2) 光生物产氢技术, 光能转化效率低下问题一直困扰着广大研究者. 运用基因工程手段改造光发酵细菌的光合系统或人工诱变获取高光能转化效率的光发酵产氢菌株, 深入研究光能转化机制包括光能吸收、转化和利用方面的机理, 提高光能的利用率, 以加快生物产氢的工业化进程.

3) 成本问题制约了生物制氢技术的工业化应用. 廉价底物的开发利用对降低生物制氢的成本至关重要. 重点开展以工农业废水、城市污水、畜禽废水等可再生资源以及秸秆等含纤维素类生物质为原料进行暗发酵和光发酵产氢的研究, 既可降低生产成本又可净化环境.

4) 暗-光发酵耦合系统的协同系统的生态共融性问题. 暗光发酵 2 种细菌在生长速率、酸的耐受力等方面存在巨大差异, 而且暗发酵产酸速率快, 致使体系 pH 急剧下降, 严重抑制光发酵细菌的生长, 产氢效率降低, 这也是混合培养产氢的

瓶颈问题. 如何使二者充分利用各自优势, 发挥互补功能, 解除彼此间的抑制及产物的反馈抑制, 提高氢气生产能力、底物转化范围和转化效率, 是亟需解决的问题. 需要研究者不断的分离筛选同一生态位的光发酵和暗发酵细菌或改进产氢条件, 优化产氢系统, 使二者能够更好地发挥协同产氢作用, 使之能够在同一系统中共存, 实现真正意义上的底物的梯级利用, 深度产氢.

5 前景分析

人类赖以依存的化石能源将消耗殆尽, 而氢气正是目前最理想的清洁燃料之一. 目前, 氢燃料汽车、氢燃料电池等都是将氢气作为化石能源的替代品. 人类对氢燃料的需求也将越来越多, 石油、化工、电力、化纤等行业都大量使用氢, 强大的市场需求必将加快氢气工业产业化发展的步伐. 氢气必将成为后化石燃料时代的能源主要供应方式之一.

氢气作为能源是现代经济与可持续发展的需要. 目前, 从煤、石油和天然气等化石燃料中制取氢气已初具规模, 但从长远观点看, 不符合可持续发展的需要. 成本高是生物制氢技术没有产业化的主要问题, 我国可用于生物制氢的原料非常多, 如利用工业废弃物、城市污水、生活垃圾、动物粪便等有机废物以及秸秆等含纤维素类生物质发酵制氢, 可大大降低生产成本. 暗光发酵耦合生物制氢技术可将废水处理、太阳能利用和清洁能源生产三者有机结合, 并形成一种新型的环保企业. 因此, 无论从环境保护, 还是从新能源开发、可持续发展的角度来看, 发酵法生物制氢技术都具有很大的发展潜力.

参考文献:

- [1] NANDI R, SENGUPTA S. Microbial Production of Hydrogen: An Overview [J]. Critical Reviews in Microbiology, 1998, 24(1): 61-84.
- [2] COHEN A, GEMERT J M, ZOEREMEYER R J, et al. Main characteristics and stoichiometric aspects of acidogenesis of soluble carbohydrate containing wastewater [J]. Process Biochem, 1984, 19(6): 228-232.
- [3] 任南琪, 王宝贞. 有机废水发酵法生物制氢技术 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1994: 32-33.
- [4] REN Nanqi, CHUA H, CHAN S Y, et al. Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous acidogenic reactors [J]. Bioresource Technol, 2007, 98: 1774-1780.
- [5] REN Nanqi, WANG Baozhen, HUANG Juchang. Etha-

- nol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 54(5): 428 – 433.
- [6] 任南琪. 有机废水处理生物产氢原理与工程控制对策研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨建筑大学, 1993.
- [7] 任南琪, 林明, 马汐平, 等. 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.
- [8] XING Defeng, REN Nanqi, LI Qiubo, *et al.* *Ethanoligenes harbinense* gen. nov., sp. Nov., Isolated from Molasses wastewater [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 755 – 760.
- [9] 李永峰. 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, 2005.
- [10] KUMAR N, DAS D. Enhancement of Hydrogen Production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 [J]. *Process Biochemistry*, 2000, 35(6): 589 – 593.
- [11] KUMAR N, DAS D. Continuous Hydrogen Production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 29(4/5): 280 – 287.
- [12] 林明. 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, 2002.
- [13] REN Nanqi, CAO Guangli, WANG Aijie, *et al.* Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2008, 33(21): 6124 – 6132.
- [14] ALZATE – GAVIRIA L M, SEBASTIAN P J, PREZ – HERNANDEZ A, *et al.* Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and sythetic wastewater [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2007, 32(15): 3141 – 3146.
- [15] CHANG J S, LEE K S, LIN P J. Biohydrogen Production with Fixed-bed Bioreactors [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2002, 27(11 – 12): 1167 – 1174.
- [16] LIN C N, WU S Y, CHANG J S. Fermentative Hydrogen Production with a Draft Tube Fluidized Bed Reactor Containing Silicone-gel-immobilized Anaerobic Sludge [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2006, 31(15): 2200 – 2210.
- [17] WU K J, CHANG J S. Batch and continuous fermentative production of hydrogen with anaerobic sludge entrapped in a composite polymeric matrix [J]. *Process Biochem*, 2007, 42(2): 279 – 284.
- [18] KUMAR N, DAS D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 [J]. *Process Biochemistry*, 2000, 35(6): 589 – 593.
- [19] JUNG G Y, KIM J R, PARK J Y, *et al.* Hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19 [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2002, 27(6): 601 – 610.
- [20] LIN C Y, CHANG R C. Fermentative hydrogen production at ambient temperature [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2004, 29(7): 715 – 720.
- [21] YU Hangqing, ZHU Zhenhu, HU Wenrong, *et al.* Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic culture [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2002, 27(11/12): 1359 – 1365.
- [22] YOKOI H, TOKUSHIGE T, HIROSE J, *et al.* Hydrogen production by immobilized cells of *enterobacter aerogenes* strain HO – 39 [J]. *J Fermentation Bioengineering*, 1997, 83(5): 481 – 484.
- [23] KATAOKA N, MIYA A, KIRIYAMA K. Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria [J]. *Water Science and Technology*, 1997, 36(6/7): 41 – 47.
- [24] TAGUCHI F, CHANG JD, TAKIGUCHI S, *et al.* Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites [J]. *J Fermentation Bioengineering*, 1992, 73(3): 244 – 245.
- [25] TAGUCHI F, MIZUKAMI N, TAKI T S, *et al.* Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. Strain No2 [J]. *Can J Microbiol*, 1995, 41(6): 536 – 540.
- [26] EVVYERNIE D, AMAZAKI A Y, MORIMOTO K, *et al.* Identification and characterization of *Clostridium Paraputrificum* M-21, a chitinolytic mesophilic and hydrogen – producing bacterium [J]. *J Biosci Bioeng*, 2000, 89(6): 596 – 601.
- [27] MONOT F, ENGASSER J, PETITDEMANGE H. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1984, 19(6): 422 – 426.
- [28] LIN C Y, CHANG R C. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 1999, 74(6): 498 – 500.
- [29] LAY J J, LEE Y J, NOIKE T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste [J]. *Water Research*, 1999, 33(11): 2579 – 2586.
- [30] 赵春芳, 邝生鲁, 奚强. 以葡萄糖为基质的消化污泥厌氧发酵产氢的研究 [J]. *化学工业与工程技术*, 2001, 22(4): 4 – 6.
- [31] FANG H H P, LIU Hong. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 82(1): 87 – 93.
- [32] MOHAN S V, BHASKAR Y V, KRISHNA P M, *et al.* Biohydrogen production from chemical wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed consortia: influence of fermentation pH and substrate composition [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2007, 32(13): 2286 – 2295.
- [33] CHEONG D Y, HANSEN C L, STEVENS D K. Pro-

- duction of bio – hydrogen by mesophilic anaerobic fermentation in an acid – phase sequencing batch reactor [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96(3): 421 – 432.
- [34] GUO Wanqian, REN Nanqi, WANG Xiangjing, *et al.* Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49 using response surface methodology [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 1192 – 1196.
- [35] GUO Wanqian, REN Nanqi, WANG Xiangjing, *et al.* Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an acidogenic expanded granular sludge bed (EGSB) reactor [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2008, 33: 4981 – 4988.
- [36] GUO Wanqian, REN Nanqi, CHEN Zhaobo, *et al.* Simultaneous biohydrogen production and starch wastewater treatment in an acidogenic expanded granular sludge bed reactor by mixed culture for long – term operation [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2008, 33: 7397 – 7404.
- [37] FAN Yaoting, ZHANG Yahui, ZHANG Shufang, *et al.* Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(2): 500 – 505.
- [38] OKAMOTO M, MIYAHARA T, MIZUNO O, *et al.* Biological hydrogen potential of materials characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes [J]. *Wat Sci Tech*, 2000, 41(3): 25 – 32.
- [39] LAY J Y. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 74(4): 280 – 287.
- [40] VAN GINKEL S, SUNG S, LAY J J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration [J]. *Environ Sci Technol*, 2001, 35(24): 4726 – 4730.
- [41] LAY J Y I. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 68(3): 269 – 278.
- [42] FAN Yaoting, ZHANG Yahui, ZHANG Shufang, *et al.* Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(3): 500 – 505.
- [43] FANG HHP, LIU H. Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge [J]. *Wat Sci Tech*, 2003, 47(1): 153 – 158.
- [44] LIN C Y, JO C H. Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2003, 78: 678 – 684.
- [45] CHANG J S, LEE K S, LIN P J. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2002, 27(11/12): 1167 – 1174.
- [46] LEE K S, LO Y S, LO Y C, *et al.* H₂ production with anaerobic sludge using activated – carbon supported packed-bed bioreactors [J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(2): 133 – 138.
- [47] ZHANG Zhenpeng, TAY J H, SHOW K Y, *et al.* Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2007, 32(2): 185 – 191.
- [48] FLORIN L, TSOKOGLIOU A, HAPPE T. A novel type of [Fe]-hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 6125 – 6132.
- [49] GAFFRON H. Reduction of carbon dioxide with molecular hydrogen in green algae [J]. *Am J Bot*, 1939, 27: 273 – 283.
- [50] GAFFTON H, RUBIN J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae [J]. *J Gen Physiol*, 1942, 26: 219 – 240.
- [51] GHIRARDI M L, TOGASAKI R K, SEIBERT M. Oxygen sensitivity of algal H₂ production [J]. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 1997, 63 – 65: 141 – 151.
- [52] 潘丽霞, 杨登峰, 梁智群. 绿藻高效制氢影响因素的研究 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(4): 146 – 152.
- [53] ZHANG L, HAPPE T, MELIS A. Biochemistry and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂ – producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga) [J]. *Planta*, 2002, 214(4): 552 – 561.
- [54] ANASTASIOS, ZHANG Liping, FORESTIER M, *et al.* Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 127 – 135.
- [55] ANASTASIOS M, THOMAS H. Hydrogen production: Green algae as a source of energy [J]. *Plant Physiology*, 2001, 127: 740 – 748.
- [56] SERIBERT M, GHIRARDI M L, SERBERT M. Accumulation of O₂ – tolerant phenotypes in H₂-producing strains of *Chlamydomonas reinhardtii* by sequential application of chemical mutagenesis and selection [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2002, 27(11/12): 1421 – 1430.
- [57] ZHU Changxi, CHEN Bingjian, SONG Hongyu. *Rhodospseudomonas capsulate* membrane union condition hydrogen enzyme physiology electron acceptor archery target research [J]. *Acta Micrologica Sinica*, 1986, 26(4): 326 – 332.
- [58] 才金玲, 王广策, 杨素萍, 等. 生物制氢研究进展 [J]. *海洋科学集*, 2007, 48: 176 – 190.
- [59] BENEMANN J R. Hydrogen production by microalgae [J]. *J Applied Phycology*, 2000, 12(3/4/5): 291 – 300.
- [60] KUMAR D, KUMAR H D. Hydrogen production by several cyanobacteria [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 1992, 17(11): 847 – 852.
- [61] 朱建良, 冯有智. 固氮类微生物产氢机理研究进展

- [J]. 南京工业大学学报, 2003, 25(1): 102 – 105.
- [62] WILLISON J C, MADERN D, VIGNAIS P M. Increased photoproduction of hydrogen by non-autotrophic mutants of *Rhodospseudomonas capsulate* [J]. Biochem J, 1984, 219: 583.
- [63] KIM M S, BAEKA J S, LEEB J K. Comparison of H₂ accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant [J]. Int J Hydrogen Energy, 2006, 31(1): 121 – 127.
- [64] TAO Yongzhen, HE Yanling, WU Yongqiang, et al. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment [J]. Int J Hydrogen Energy, 2008, 33(3): 963 – 973.
- [65] REN Nanqi, LIU Bingfeng, DING Jie, et al. Hydrogen production with *R. faecalis* RLD-53 isolated from freshwater pond sludge [J]. Bioresource Technol, 2009, 100(1): 484 – 487.
- [66] 郑耀通, 胡开辉, 高树芳. 高效净化水产养殖水域紫色非硫光合细菌的分离与筛选 [J]. 福建农业大学学报, 1998, 27(3): 342 – 346.
- [67] 郑耀通, 高树芳. 耐氨光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* G_{2B} 处理有机废水产氢性能研究 [J]. 武夷科学, 2003, 19(1): 11 – 16.
- [68] KIN E J, LEE M K, KIM M S, et al. Molecular hydrogen production by nitrogenase of *Rhodobacter sphaeroides* and by Fe-only hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum* [J]. Int J Hydrogen Energy, 2008, 33(5): 1516 – 1521.
- [69] KARS G, GÜNDÜZ U, YÜCEL M, et al. Evaluation of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O. U. 001 and its hupSL deficient mutant using acetate and malate as carbon sources [J]. Int J Hydrogen Energy, 2009, 34(5): 2184 – 2190.
- [70] TAKABATAKE H, SUZUKI K, KO IB, et al. Characteristics of anaerobic ammonia removal by a mixed culture of hydrogen producing photosynthetic bacteria [J]. Bioresource Technology, 2004, 95(2): 151 – 158.
- [71] SHI Xianyang, YU Hanqing. Continuous production of hydrogen from mixed volatile fatty acids with *Rhodospseudomonas capsulate* [J]. Int J Hydrogen Energy, 2006, 31(12): 1641 – 1647.
- [72] CHEN Chunyen, LU Weibin, LIU Chienhung, et al. Improved phototrophic H₂ production with *Rhodospseudomonas palustris* WP3 – 5 using acetate and butyrate as dual carbon substrates [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(9): 3609 – 3616.
- [73] 尤希凤, 周静懿, 张全国, 等. 红假单胞菌利用畜禽粪便产氢能力的试验研究 [J]. 河南农业大学学报, 2005, 39(2): 215 – 217.
- [74] DAS D, VEZIROGLU T N. Hydrogen production by biological processes; a survey of literature [J]. Int J Hydrogen Energy, 2001, 26(1): 13 – 28.
- [75] 李建政, 任南琪, 林明, 等. 有机废水发酵法生物制氢中试研究 [J]. 太阳能学报, 2002, 23(2): 252 – 256.
- [76] MIYAKE J, MAO X Y, KAWAMURA S. Photoproduction of hydrogen from glucose by a co-culture of a photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum* [J]. J Ferment Tech, 1984, 62: 531 – 535.
- [77] YOKOI H, MORI S, HIROSE J, et al. H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter* sp. M – 19 [J]. Biotechnology Letters, 1998, 20(9): 895 – 899.
- [78] 郑耀通, 闵航. 共固定光合和发酵性细菌处理有机废水生物制氢技术 [J]. 污染防治技术, 1998, 11(3): 187 – 189.
- [79] ASADA Y, TOKUMOTO M, AIHARAY, et al. Hydrogen production by co – cultures of *Lactobacillus* and a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* RV [J]. Int J Hydrogen Energy, 2006, 31(11): 1509 – 1513.
- [80] DING Jie, LIU Bingfeng, REN Nanqi, et al. Hydrogen production from glucose by co-culture of *Clostridium Butyricum* and immobilized *Rhodospseudomonas faecalis* RLD – 53 [J]. Int J Hydrogen Energy, 2009, 34(9): 3647 – 52.
- [81] FANG H H P, ZHU Huguang, ZHANG Tong. Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides* [J]. Int J Hydrogen Energy, 2006, 31(15): 2223 – 2230.
- [82] NATH K, KUMAR A. DAS D. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O. U. 001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68(4): 533 – 541.
- [83] TAO Yongzhen, CHEN Yang, WUYongqiang, et al. High hydrogen yield from a two – step process of dark- and photo-fermentation of sucrose [J]. Int J Hydrogen Energy, 2007, 32(2): 200 – 206.
- [84] LIU Bingfeng, REN Nanqi, XING Defeng, et al. Biohydrogen production by immobilized *R. faecalis* RLD-53 using soluble metabolites from ethanol fermentation bacteria *E. harbinense* B49 [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(10): 2719 – 2723.
- [85] CHEN Chunyen, YANG Muhoe, YEH Kueiling, et al. Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes [J]. Int J Hydrogen Energy, 2008, 33(18): 4755 – 4762.
- [86] LO Y C, CHEN S D, CHEN C Y, et al. Combining enzymatic hydrolysis and dark-photo fermentation processes for hydrogen production from starch feedstock: A feasibility study [J]. Int J Hydrogen Energy, 2008, 33(19): 5224 – 5233.