

## 厌氧发酵产氢微生物的研究进展

宋丽, 刘晓风, 袁月祥, 闫志英, 廖银章

中国科学院成都生物研究所, 成都 610041

**摘要:** 厌氧发酵法生物制氢在国内外受到了普遍关注, 对产氢起核心作用的微生物又成为了研究的重点课题。论述了厌氧发酵产氢微生物的研究进展, 分别对厌氧产氢细菌的发酵类型、产氢能力、菌种选育、基因改良等进行了介绍, 结合国内外研究现状, 对厌氧发酵产氢微生物研究目前存在的问题进行了总结和展望。

**关键词:** 厌氧发酵, 产氢微生物, 产氢能力, 菌种选育

## Progress on Hydrogen-production Microorganisms by Anaerobic Fermentation

Li Song, Xiaofeng Liu, Yuexiang Yuan, Zhiying Yan, and Yinzhang Liao

*Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China*

**Abstract:** Anaerobic fermentation bio-hydrogen production has captured extensive attention, hydrogen-production microorganisms has become the research focus as core role. Based on the review of current status and main achievements of hydrogen-producing microorganisms research both domestic and abroad, the fermentative type, the hydrogen-production capability, the bacterium type, breeding, and the gene modification were presented. The main associated issues were analyzed and the research prospects were put forward.

**Keywords:** anaerobic fermentation, hydrogen-production microorganisms, hydrogen-production capability, breeding

随着经济的发展, 能源问题越来越引起人们的关注和重视。氢能作为一种无污染、可再生的理想燃料, 被认为是最有吸引力的替代能源<sup>[1]</sup>。制氢的方法很多, 包括物理化学法和生物法, 物理化学法主要有太阳能制氢、水分解法制氢、水电解制氢、水煤气转化制氢及甲烷裂解制氢等<sup>[2-5]</sup>。这些方法存在着生产工艺复杂, 需要大量基础能源, 以及制氢成本高等特点。而生物法制氢通过微生物的作用, 将有机物分解, 获得氢气。可以利用诸如高浓度有机废水、固体生物质等一系列可再生资源来生产氢气,

达到除废和产能的双重目的, 具有广泛的应用前景<sup>[6]</sup>。

生物制氢过程可分为光合生物制氢和厌氧发酵制氢两大类。光合生物制氢所利用的是光合生物, 包括某些藻类和光合细菌, 厌氧发酵制氢利用的则为厌氧化能异养菌。与光合制氢相比, 发酵法生物制氢技术具有一定的优越性<sup>[7,8]</sup>: (1) 发酵产氢细菌的产氢能力较高, 光合细菌和发酵细菌产氢能力的综合比较表明, 迄今为止, 发酵产氢菌种的产氢能力要高于光合细菌, 而且发酵产氢细菌的生长速率一

**Received:** March 20, 2008; **Accepted:** April 11, 2008

**Supported by:** the grants from National Key Technology R&D Program of China(No. 2006BAD07A02).

**Corresponding author:** Xiaofeng Liu. Tel: +86-28-85229904; E-mail: liuxf@cib.ac.cn

国家科技支撑计划项目(No. 2006BAD07A02)资助。

般比光合细菌快。(2)发酵法生物制氢利用有机底物分解制取氢气,它不需要光能源,不但可以实现持续稳定产氢,而且反应装置的设计、操作及管理简单方便。(3)可利用的有机物范围广且成本低廉,可利用有机废水(如糖蜜废水、啤酒废水),有机固体废物(如畜禽粪便、城市垃圾)、植物(如农作物秸秆、凤眼莲)等。(4)兼性的发酵产氢细菌更易于保存和运输。因此,在生物制氢方法中,厌氧发酵制氢法更具有发展潜力。而厌氧产氢微生物是厌氧发酵制氢过程中的核心,也成为了生物制氢的重要研究内容,很多研究者针对活性污泥的混菌驯化、纯菌选育及氢酶基因改良,发酵工艺优化等方面做了大量的工作。本文对厌氧发酵产氢的发酵类型、菌种选育与基因改良等方面进行了总结、分析和阐述,同时还分析了当前的存在的问题并提出了以后的研究方向,以期对厌氧发酵产氢微生物的研究有所帮助。

## 1 厌氧发酵产氢细菌的发酵类型

复杂碳水化合物经水解后生成单糖,单糖通过丙酮酸途径实现分解,产生氢气的同时伴随挥发酸或醇类物质的生成。微生物的糖酵解经过丙酮酸途径主要有 EMP(Embden-Meyerhof-Parnas)途径、又称糖酵解途径或二磷酸己糖途径)、HMR(Hexose monophosphate)途径、ED (Entner-Doudoroff)途径(又称 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖裂解途径)和

PK(phosphoketolase)途径、又称磷酸酮解酶途径)4种。丙酮酸经发酵后转化为乙酸、丙酸、丁酸、乙醇或乳酸等(图 3)<sup>[9]</sup>。丙酮酸是物质代谢中的重要中间产物,在能量代谢中发挥着关键作用。由于微生物种群的差异导致丙酮酸的去路不同,因此产氢能力不同。

在丙酮酸不同去路的代谢途径中,目前发现通常丁酸发酵、混合酸发酵和细菌乙醇发酵可以产生氢气(表 1)<sup>[10]</sup>。目前报道的产氢细菌多数为丁酸发酵和混合酸发酵,梭菌属(*Clostridium*)为丁酸发酵中的主要产氢细菌,肠杆菌为混合酸发酵中的主要产氢细菌。细菌乙醇发酵也可分为产氢和不产氢两类细菌,目前报道的产氢细菌较少,主要为梭菌属(*Clostridium*)细菌、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)等。

## 2 厌氧发酵产氢微生物的存在方式

生化反应体系中的微生物存在方式通常有两种:游离悬浮态和附着固定态。研究表明固定化系统比悬浮系统的产氢效果好,因为固定化系统内可以保持更高的生物量。为了达到固定化的目的,目前国际上主要采用载体固定化细胞技术。Tanisho 等<sup>[11,12]</sup>以聚氨基甲酸乙酯泡沫作为 *Enterobacter aerogenes* E.82005 菌株的载体,产氢结果表明反应器的持续产氢率和最大产氢率分别从悬浮态的 1.5 mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖和 2.5 mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖提高到固定

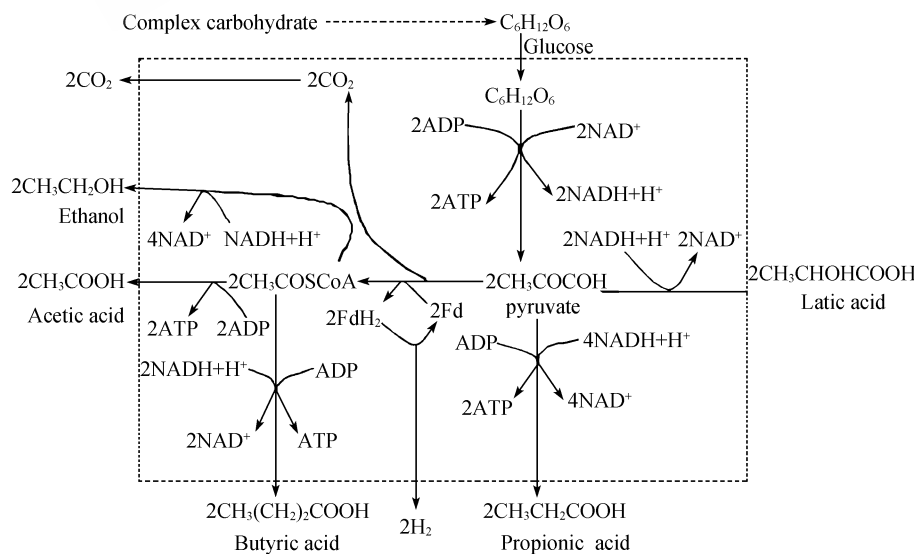


图 1 细菌的碳水化合物产氢发酵途径

Fig. 1 Fermentative pathway of hydrogen production bacterium on carbohydrate

表 1 与产氢相关的细菌发酵类型  
Table 1 Bacterial metabolic pathway of hydrogen production

Fermentative type	Most end products	Typical microbe
Butyric acid fermentation	Butyric acid, acetic acid, carbon dioxide, hydrogen,	<i>Clostridium</i> , <i>C.butyricum</i> , <i>Butyriolbrio</i>
Mixed acid fermentation	Lactic acid, acetate, ethanol, formic acid, carbon dioxide, hydrogen	<i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i>
Bacterial ethanol fermentation	Ethanol, acetic acid, carbon dioxide, hydrogen	<i>Clostridium</i> , <i>Ruminococcus</i>

态的 2.2 mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖和 3.5 mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖。Kumar 等<sup>[13,14]</sup>利用椰子壳固定 *Enterobacter cloacae* IIT-BT08, 在连续流运行中获得了 62 mmolH<sub>2</sub>/L-culture-h 的最高比产氢速率。然而, 由于载体基质在反应体系内占据一定的有效空间, 限制了产氢菌浓度提高, 因此, 反应体系比产氢速率的进一步提高也因生物持有量不足而受到限制, 较难在工业制氢工业化中应用。鉴于载体的这一不足, 研究者开始考虑利用能够自絮凝的产氢微生物, 使之能够自己形成絮凝、颗粒, 从而达到自固定化。

Rachman 等<sup>[15,16]</sup>从厌氧污泥中分离到自絮凝产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) HU-101 和突变体 AY-2, 能在没有任何载体下形成絮凝体, 在 37°C 和 pH 7.0 的条件下, 实现了菌株 AY-2 非固定化连续产氢, 产氢速率为 58 mmolH<sub>2</sub>/L-culture-h 和 101.5 mmol H<sub>2</sub>/L-culture-h。这为产氢细菌的非固定化提供了新的思路。因此筛选可以形成絮体或颗粒的产氢细菌, 将会利于产氢纯菌种的非固定化连续流产氢。

### 3 厌氧产氢微生物的培养方式

目前, 利用厌氧发酵进行微生物产氢的方式大体上可分为两种类型: 一是利用纯菌进行微生物产氢, 二是利用厌氧活性污泥或其它混合物, 以混合培养方式进行产氢。通常 *Enterobacter* sp. 主要用于纯培养, 而 *Clostridium* sp. 则是混合培养中的优势微生物<sup>[17]</sup>。

#### 3.1 纯培养

纯培养主要是利用单一的产氢细菌, 发酵基质产氢。就目前来看, 纯培养主要是进行发酵产氢的理论研究, 包括产氢菌的鉴定分类、适应的环境、代谢功能、酶学性质以及产氢能力等<sup>[18-22]</sup>, 在实际应用中难以实现。

#### 3.2 混合培养

混合培养主要是利用厌氧活性污泥, 在酸性条件下抑制产甲烷阶段的进行转为发酵产氢。国内外

研究者利用混合微生物发酵不同种类的基质进行产氢作了大量的研究<sup>[22-27]</sup>。目前研究结果表明: 与利用纯菌产氢相比, 利用混合菌系进行厌氧生物制氢具有明显的优势: 由于菌种间的协同作用, 导致纯菌的产氢能力不如混合菌种, 其中厌氧活性污泥具有最大的产氢能力; 厌氧产氢微生物来源广泛, 除了污水处理厂的活性污泥和厌氧消化污泥外, 各种土壤中也含有大量的产氢微生物; 混合细菌可利用的底物比较广泛, 除了常用的葡萄糖、蔗糖外, 甚至还利用固体废弃物和有机废水如酿酒废水、淀粉加工废水等。因此, 从应用角度出发, 利用厌氧活性污泥作为发酵产氢的接种物, 进行发酵产氢的研究, 是人们关注的焦点。

## 4 菌种选育

### 4.1 天然厌氧发酵产氢细菌分类及其产氢能力

发酵产氢微生物可以在发酵过程中分解有机物产生氢气, 研究表明, 能够进行发酵产氢的微生物有许多, 包括梭菌属(*Clostridium*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、丁酸芽孢杆菌属(*Tridiumbutyricum*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、柠檬酸细菌属(*Citrobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、鱼腥蓝细菌属(*Anabaena*)、产水菌属(*Aquifex*)、醋微菌属(*Acetomicrobium*)、甲烷球菌属(*Methanococcus*)等<sup>[28,29]</sup>。其中研究比较多的是梭菌属、脱硫弧菌属和肠杆菌属, 前两个属中都有氢酶晶体结构的报道, 目前的研究主要集中在这两个属。不同种类的微生物对同一有机底物的产氢能力不同, 通常严格厌氧菌高于兼性厌氧菌<sup>[30]</sup>。另外, 同种微生物不同菌株的产氢能力也存在差异。

随着对厌氧产氢技术的进一步研究, 厌氧发酵产氢已从实验室研究逐步开始了实际应用研究, 而产氢微生物的产氢能力不高成为限制厌氧发酵制氢技术发展的重要因素。为了解决这一问题, 国内外

的研究者纷纷进行产氢细菌的分离和筛选工作,以期得高效的厌氧产氢菌种。见表 2 总结了部分已分离到的产氢细菌及其产氢能力。Kumar<sup>[34]</sup>(2000)从树叶榨出物中分离得到一株阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)IIT-BT08,在 36°C 和 pH 6.0 的条件下,得到的最大产氢速率为 29.63 mmol H<sub>2</sub>/(g-drycell · h)。Oh 等<sup>[32]</sup>(2003)分离的柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* sp.)Y19 最大产氢速率达到了 32.3 mmol H<sub>2</sub>/(g-drycell · h)。林明<sup>[33,34]</sup>(2002)从生物制氢反应器的厌氧活性污泥中分离到一株高效产氢菌株 B49,最大产氢速率为 32.28 mmol H<sub>2</sub>/(g-drycell·h)。

表 2 发酵产氢细菌的产氢能力  
Table 2 Hydrogen production ability of fermentative hydrogen-producing bacterium

	No.	hydrogen production rate <sup>a</sup>	Hydrogen conversion rate <sup>b</sup>	References
<i>Enterobacter aerogenes</i>	HO-39	32.92		31
<i>Citrobacter</i> sp.	Y19	32.3	2.49	32
<i>Ethanoligenens</i> sp.	B49	32.28	2.34	33, 34
<i>Enterobacter cloacae</i>	IIT-BT08	29.63	2.25	13
<i>Clostridium beijerinckii</i>	AM21B	21.25		35
<i>Clostridium</i> sp.	No.2	20.3	2.0	36
<i>Enterobacter aerogenes</i>	E.82005	17.0		37
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	P4	29.9	2.76	38

a: mmol H<sub>2</sub>/g-drycell, b: mol H<sub>2</sub>/mol glucose

此外开展嗜酸或具有较强耐酸能力的产氢细菌研究成了一个具有重要意义研究课题。由于 pH 是厌氧发酵产氢过程中主要的限制因素,而厌氧发酵产氢主要副产物是有机酸,使得发酵后期反应体系内的 pH 急剧下降,影响了细胞的生长,从而抑制了发酵产氢细菌连续产氢,因此常常需要采取一定方法调节 pH,工业中常采用加碱中和法,这不仅存在成本高的问题,而且引入了其他的物质导致反应器生态系统受到破坏。Yokoi<sup>[31]</sup>分离到 1 株较耐酸的产氢细菌(产气肠杆菌 HO-39),能在 pH 为 4 的条件下厌氧生长,最大产氢能力达到 1 mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖。林明等<sup>[33,39]</sup>筛选得到 1 株高效厌氧产氢细菌 B49,其最大比产氢速率  $QH_2$  为 25.0 mmol/g · h,并具有良好的耐酸性,在 pH 3.3 仍能生长,最适 pH 值约为 3.9~4.2。以上均采用自然筛选方式获得,卢文玉等<sup>[40]</sup>

运用 He-Ne 激光辐照产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*),筛选到一株遗传性状稳定的高产氢耐酸突变株,在 pH 3.0 时仍能生长。表明了通过诱变选育、改变筛选模式等方式是未来获得耐酸菌株的较好途径。

## 4.2 菌种改良

### 4.2.1 诱变育种

为了突破野生型细菌的产氢能力,通过诱变育种进行高效产氢细菌的改良是一个突破口。目前,研究者作了大量关于发酵产氢细菌诱变选育的研究,如:紫外诱变、化学诱变、激光诱变等。

利用紫外诱变获得高产菌株的研究,崔有贵等<sup>[41]</sup>阐述了以甜菜废蜜配制而成的有机废水为底物的制氢反应器中产氢细菌的诱变育种技术,探讨了把工业微生物育种技术应用于生物制氢工艺上的可能性。李永峰等<sup>[42]</sup>研究表明利用紫外线诱变发酵产氢细菌,筛选高效产氢细菌是可行的并得到了几株菌,其中 BY49<sub>2</sub> 的比产氢率较原始菌增加 8.4%。任南琪等<sup>[43]</sup>通过紫外诱变选育得到两株高产突变株,其产氢能力和产氢速率较原始菌株分别提高 29.71%、22.22%和 38.18%、4.78%。郑国香等<sup>[44]</sup>紫外诱变获得的高效稳定产氢突变体的产氢能力比对照菌株提高 40%~65%。任南琪等<sup>[45]</sup>利用紫外线诱变获得一株高效产氢突变菌株 UV-d48,其单位体积产氢量和最大产氢速率比对照菌株分别提高了 65.1%和 56.4%;其氢气产率是对照菌株的 1.54 倍。

为了进一步提高诱变效应,郑国香等<sup>[46]</sup>采用紫外和亚硝酸复合诱变选育,经过连续传代得到一株遗传稳定性很好的高效产氢突变株 YR-3。产氢能力比对照提高 70.5%,最大产氢速率为 36.6 mmol/g · drycell · h 比对照高出 55.1%。

此外,卢文玉等<sup>[40]</sup>运用 He-Ne 激光辐照产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*),筛选到一株遗传性状稳定的高产氢突变株,产氢量和产氢速率比原始菌分别提高了 48%和 32%。说明激光诱变育种技术可以在产氢微生物领域中应用。

### 4.2.2 基因改良

通过基因工程手段进行高效产氢细菌的遗传改良,是突破野生型细菌的产氢能力的另一个突破口。目前,国内外关于产氢发酵细菌遗传改良的研

究还处于设想阶段, Kalia<sup>[47]</sup>通过全基因组或部分基因进行氢代谢相关基因序列比对, 筛选出多株可能的产氢细菌。如极端嗜热菌 *A. quif ex aeolicus*, 能够降解高氯酸盐的 *W. olinella succinogenes* 等 13 株细菌。Liu<sup>[48]</sup>诱变 *Clostridium tyrobutyricum*, 使 pta 基因失活, 通过编码 pta 酶, ack 基因和 ak 酶提高丁酸产量。结果表明, 诱变改变了代谢途径和基因表达, 提高了丁酸产量和产氢量。Chittibatu 等<sup>[49]</sup>采用重组 *Escherichia coli* BL21 为产氢微生物, 皮革厂废水为底物, 试验中最大产氢率是 66 mmol/(L·h), 和野生型 *Enterobacter cloacae* IIT-BT08 相比, 重组型 *E. coli* BL21 的产氢率高于野生型。这些研究将会大大推动目标菌株的获取效率, 是一个值得重视的研究方向<sup>[50]</sup>。美国能源部自 1994 年起开展微生物基因组计划, 期待通过代谢下程进行微生物改造, 揭示细菌间的协同关系。现已经完成了 8 个与产氢相关的能源微生物基因组测序工作, 但还没有实现产氢能力的大幅度提高。

能够产氢的微生物都含有氢酶, 氢酶是产氢代谢中的关键酶, 在整个能量代谢过程中, 氢酶是限速步骤, 起着关键的作用。它催化氢气与质子相互转化的反应:  $H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$ 。对于氢酶的分类、结构、活性中心、催化机理都进行了较多的研究, 最近氢酶基因的研究及对菌种的改造成为了研究热点。由于氢酶是厌氧发酵中起主要作用的酶。要想进一步提高产氢的速率和产率, 通过基因水平的研究进行菌种改造是可行的方法。很多学者已经开始了这方面研究的工作, 已经有超过 100 种的氢酶基因序列可以在基因库内获得。Vignais<sup>[51]</sup>的综述中也对氢酶的研究进展进行了详细报道。国内学者在吸氢酶 (hup) 基因方面做了不少研究。其中, 李强等<sup>[52]</sup>通过光合菌 SDH2 hup T 基因的突变与构建固氮工程菌, 研究了 hup T 基因的调节作用; 罗永华等<sup>[53]</sup>也进行了 hup 基因同源性的分子检测, 取得了很好的效果; 陈志锋等<sup>[54]</sup>进行了酒色着色菌 (*Chromatium vinosum*) 结合态氢酶大小亚基结构基因 hup SL 的克隆和序列分析, 发现 *vinosum* 中确实存在着一种尚未报道的 hup 膜结合态氢酶, 为通过缺失突变等方式改造氢酶和构建高效光合产氢菌株提供了依据。虽然许多氢酶的基因已被测序, 但其具体的调控机制仍不清楚, 有待进一步的研究。

## 5 厌氧产氢微生物的研究存在的主要问题与前景

随着生物制氢技术的进一步深入研究, 厌氧产氢微生物的研究在机理及实际应用开发等方面取得了一定的进展, 但仍处于实验室研究开发阶段, 要将其转化为可实用的应用技术尚需不懈努力。从产氢的发展趋势上看, 重点是选育高产氢的优势菌种和菌群, 菌种的改良, 探索影响菌种和菌群的产氢适宜条件, 产氢相关酶的酶学研究、产氢微生物的保存与运输、产品化、消除副产物抑制等方面, 以提高产氢率, 使生物制氢绿色能源生产技术更具有开发潜力和巨大的优越性。

欲使厌氧发酵产氢技术有所突破, 使厌氧产氢技术有较广阔的应用前景, 在未来厌氧产氢微生物的研究中, 应进一步深入研究一下几个方面。

(1) 高产菌株的选育。优良的菌种是生物制氢成功的首要因素, 如何才能培养出适应性和代谢能力强的产氢细菌是产氢的关键。目前, 未能找到一种或一类能够实现持续高效稳定的产氢微生物, 需要加强多种方式筛选和基因工程改良等方面的研究, 建立一个快速选育高效产氢细菌的模式。利用诱变或分子生物学手段获得具有特殊功能的产氢菌株, 如耐酸、耐盐菌株。

(2) 探索菌种和菌群的产氢适宜条件。系统研究影响厌氧产氢微生物的限制因素, 选择最佳产氢工艺, 提供适宜产氢菌产氢的生态位, 以达到高产、稳定和持续产氢。

(3) 维持混合生态体系的稳定高产 目前国内外利用固定化技术对生物质发酵产氢的研究较多, 但大多数仍然以纯菌种为主, 由于纯菌种的固定化处理对技术要求高, 抗污染能力低, 难以满足实际应用, 因而增加了生物制氢的难度与成本。而实际上, 生物制氢技术要达到工业上的发展其所利用的底物将会是一个十分复杂的混合体, 利用单一菌种的处理将很难达到实际应用的要求, 因此, 采用混合菌种固定化技术处理底物发酵产氢具有广阔的前景, 在传统工艺技术基础上渗入现代生物学技术。

(4) 分析产氢机理。进一步深入、准确地表达氢气的代谢途径及调节机制, 酶的作用过程, 能为提高产氢效率及其他方面的应用和研究提供基础, 尤

其是转化机制方面的研究。

(5) 厌氧发酵产物的抑制作用消除与利用。产氢的稳定性和持久性是发酵产氢中一直存在的问题。要从根本上提高产氢的稳定性和持久性, 必须要消除丙酸、丁酸等代谢产物的反馈抑制作用。要实现持续稳定的产氢, 就必须消除代谢物对产氢微生物的影响。利用其它一些物理、化学(如预处理和膜技术)和生物(如共培养技术的方法)对生物制氢的发酵副产物进行更深一步的利用, 在提高产氢效率的同时, 能最大化的降解有机物质, 并通过物理、化学和生物的方法对厌氧发酵副产物进行回收和利用, 以免造成二次污染, 同时也降低了成本。

(6) 开发不同基质的产氢潜能。目前培养厌氧微生物, 大多数为糖和淀粉, 包括含有这些简单碳水化合物化合物的有机废水作为底物, 所培养出来的产氢菌底物利用范围有限, 将其用于降解其他类物质时, 底物转化效率和产氢速率受到极大影响, 这成为了厌氧产氢微生物进行更加广泛工业化应用的一个瓶颈。对适合于厌氧产氢基质的研究偏少, 如何利用碳水化合物以外的大量有机废弃物作为厌氧产氢的基质仍需进一步研究。利用资源丰富的工农业废弃物、城市污水、养殖厂废水等可再生资源, 同时注重以污染源为原料进行产氢的研究, 既可降低生产成本又可净化环境。

(7) 开发高效厌氧产氢菌剂。厌氧产氢技术研究的最终目的是将其运用到规模化工业生产中去。要实施大规模工业化生产, 除了研制厌氧产氢控制系统, 评估工程投资、运行费用与产氢效率的关系, 实验室反应器模型放大到工程实践中的偏差外, 产氢菌剂的开发也是一个重要内容, 这就涉及到厌氧产氢微生物的生理生态学, 菌株之间的协同作用、菌剂的配伍、厌氧菌种的保藏技术等研究亟待加强。

## REFERENCES

- [1] Chen CC, Lin CY. Start-up of anaerobic hydrogen producing reactors seeded with sewage sludge. *Acta Biotechnol*, 2001, **21**(4): 371-379.
- [2] Sastri MVC. India's hydrogen energy program-A status report. *Int J Hydrogen Energy*, 1989, **14**: 507-520.
- [3] Liu FQ. Research and recommendations to the development petrochemical industry hydrogen technology of China. *Liaoning Chemical Industry*, 1997, **26**(3): 136-138.
- 刘发起. 我国石化工业制氢技术发展的研究与建议. 辽宁化工, 1997, **26**(3): 136-138.
- [4] Zhu HG, Shi JL. Progress of biological hydrogen production. *Chin J Appl Environ Biol*. 2002, **8**(1): 98-104.
- [5] Rosen MA, Scott DS. Comparative efficiency assessments for a range of hydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy*, 1998, **23**: 653-662.
- [6] Momirlan M, Veziroglu T. Recent directions of world hydrogen production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 1999, **6**(13): 219-231.
- [7] Nandi R, Sengupta S. Microbial production of hydrogen an overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 1998, **24**(1): 61-84.
- [8] Benemann J. Hydrogen biotechnology: process and prospects. *Nature Biotechnology*, 1996, **14**: 1101-1103.
- [9] Ren NQ, Wang AJ. Principles and Applications of Anaerobic Biotechnology. Beijing: Chemical Industry Press, 2004, 212-272.
- [10] Ren NQ, Wang AJ, et al. Physiological Ecology of Acid-producing Fermentative Microbiology. Beijing: Science Press, 2005, 36
- [11] Tanisho S, Ishiwata Y. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium enterobacter aerogenes. *Int J Hydrogen Energy*, 1994, **19**(10): 807-812.
- [12] 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.
- [13] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT08. *Proc Biochem*. 2000, **35**: 589-593.
- [14] Kumar N, Das D. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enzyme Microbiol, Technol*, 2001, **29**(45): 280-287.
- [15] Rachman MA, Furutani Y, Nakashimada Y, Kakiaono T, Nishio N. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *J Ferment Bioeng*, 1997, **83**(4): 358-363.
- [16] Rachman MA, Nakashimada Y, Kakiaono T, Nishio N. Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998, **49**: 450-454.
- [17] Xiao BY, Wei YS, Liu JX. Factors of affecting microbial fermentative hydrogen production. *Microbiology*, 2004, **31**(3): 130-134.
- [18] Taguchi F, Mizukami N, Hasegawa K, Saito-Taki T. Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a newly isolated *Clostridium* sp. No 2. *Can J Microbiol*, 1994, **40**: 228-233.
- [19] Chen WM, Tseng ZJ, Lee KS, et al. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2005, **30**: 1063-1070.
- [20] Liu KX, Xu JQ, Liao DQ, et al. Study on hydrogen producing bacteria in digesters. *Acta Microbiologica Sinica*, 1980, **20**: 385-389.
- [21] Chen SY, Niu LL, Dong XZ. Hydrogen production from glucose by *Acetanaerobacterium elongatum*. *Acta Microbiologica Sinica*. 2006, **46**(2): 233-237.
- [22] Okamoto M, Miyahara T, Mizuno O, et al. Biological hydrogen potential of materials characteristics of the

- organic fraction of municipal solid wastes. *Wat Sci Tech*, 2000, **41**(3): 25–32.
- [23] Han SK, Shin HS. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *Int J Hydrogen Energy*, 2004, **29**(6): 569–577.
- [24] Chiu-Yue Lin, Chao-Hui Cheng. Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006, **31**: 832–840.
- [25] Fan YT, Zhang YH, Zhang SF. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology*, 2006, **97**: 500–505.
- [26] Zhang CF, Kuang SL, Xi Q. Study of hydrogen production by a anaerobic fermentation of glucose disposed by digested sludge. *Journal of Chemical Industry & Engineering*, 2001, **22**(4): 4–6.
- [27] Li JZ, Ren NQ, Lin M, Wang Y. Hydrogen bio-production by anaerobic fermentation of organic wastewater in pilot-scale. *Acta Energetica Sinica*, 2002, **23**(2): 252–255.
- [28] Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes: A survey of literature. *Int J Hydrogen Energy*, 2001, **26**: 13–28.
- [29] Nanqi R, Sengupta S. Microbial production of hydrogen – an overview. *Crit Rev Microbiol*, 1998, **24**(1): 61–84.
- [30] Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkesb DL, *et al.* Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *Int J Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1339–1347.
- [31] Yokoi H, Tokushige T, Hirose J, Hayashi S, Takaskai Y. Hydrogen production by immobilized cells of *Enterobacter aerogenes* Strain HO-39. *J Ferment. Bioeng*, 1997, **83**(5): 481–484.
- [32] Oh YK, Seol EH, Kim JR, Park S. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *Int J Hydrogen Energy*, 2003, **28**: 1353–1359.
- [33] Lin M. Hydrogen production mechanism and ecology of a new species of high efficiency hydrogen production by fermentation. Harbin Industry University, PhD Dissertation, 2002, 29–76.
- [34] Wang XJ. Hydrogen production fermentation bacteria B49 physiological characteristics of fixed and applied research. Harbin Industry University, PhD Dissertation, 2003: 37–82.
- [35] Taguchi F, Mizukami N, Saito-Taki T, Hasegawa K. Isolation of a hydrogen-producing bacterium *Clostridium beijerinckii* Strain AM21B, from *Termites*. *Can J Microbiol*, 1993, **39**: 726–730.
- [36] Taguchi F, Mizukami N, Hasegawa K, Saito-Taki T. Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a new isolated *Clostridium* sp. No.2. *Can J Microbiol*, 1994, **40**: 228–233.
- [37] Tanisho S, Suzuki Y, Wakao N. Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E82005. *Int J Hydrogen Energy*, 1987, **12**(9): 623–627.
- [38] Oh YK, Seol EH, Lee EY, Park S. Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4. *Int J Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1373–1379.
- [39] Ren NQ, Lin M, Ma XP, *et al.* A strain of anaerobic bacteria screened for high efficient hydrogen production and its aciduric character. *Acta Energetica Sinica*, 2003, **24**(1): 80–84.
- [40] Lu WY, Wen JP, Chen Y, *et al.* Screening of hydrogen-producing aciduric *Enterobacter aerogenes* strain using He-Ne laser irradiation. *Chemical Industry And Engineering Progress*, 2006, **25**(7): 799–802.
- [41] Cui YG, Li YF, Ren NQ, *et al.* The techniques of genetic mutation for bacterium on bio-hydrogen production by beet sugar molasses. *China Beet & Sugar*, 2004, **3**: 1–4.
- [42] Li YF, Li JZ, Ren NQ, *et al.* Selection of high efficiency hydrogen-producing strains of anaerobes by ultra-violet radiation. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2004, **55**: 120–121.
- [43] Ren NQ, Zheng GX, Li YF, *et al.* Mutagenesis and selection of high efficiency hydrogen-producing mutants by ultraviolet radiation. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2006, **13**(6): 635–639.
- [44] Zheng GX, Ren NQ, Lin HL, *et al.* Anaerobic operation and UV-radiation mutagenesis for obligate anaerobic fermentative hydrogen-producing bacteria. *Chemical Engineering*, 2007, **35**(5): 48–51.
- [45] Ren NQ, Zheng GX. Screening and H<sub>2</sub>-producing behavior of highly efficient H<sub>2</sub>-producing mutant UV-d48. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2007, **58**(3): 755–758.
- [46] Zheng GX, Ren NQ, Lin HL, *et al.* Breeding high efficient hydrogen-producing bacteria by mutagenesis. *Acta Energetica Sinica*, 2007, **28**(6): 632–637.
- [47] Kalia VC, Lal S, Ghai R, Mandal M, Chauhan A. Mining genomic databases to identify novel hydrogen producers. *TRENDS in Biotechnol*, 2003, **21**: 152–156.
- [48] Liu XG, Zhu Y, Yang ST. Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, **38**: 521–528.
- [49] Chittibabu G, Kaushik Nath, Debabrata Das. Feasibility studies on the fermentative hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* BL-21. *Process Biochemistry*, 2006, **41**: 682–688.
- [50] Tang GL, Sun ZJ, Li YY. Progress in microbial fermentative hydrogen production and hydrogen-producing microorganisms. *Transactions of the CSAE*, 2007, **23**(12): 285–289.
- [51] Paulette M, Vignai s, Bernard Billoud, Jacques Meyer. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, **25**(4): 455–501.
- [52] Li Q, Wu YQ. Mutagenesis of hupT gene and H<sub>2</sub>-uptake hydrogenase expression in photosynthetic bacterium SDH2. *Acta Biochemical Biophysica Sinica*, 1999, **31**(3): 259–263.
- [53] Luo YH, Guo J. Molecular detection of homology of hydrogen uptaking gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Microbiology*, 2002, **22**(3): 12–13.
- [54] Chen ZF, Liu JJ, Long MN. Cloning of Membrane-bound hydrogenase genes hupSL from *Chromatium vinosum*. *Journal of Xiamen University(Natural Science)*, 2005, **44**: 162–166.