



# **Formation and Hydrogen Production Performance of Photosynthetic Bacterial Biofilm on Solid Surface**



A Thesis Submitted to Chongqing University  
in Partial Fulfillment of the Requirement for the  
Degree of Master of Engineering  
**By**  
**Wang Yejun**

**Supervised by Prof. Liao Qiang**  
**Assistant Supervised by**  
**Associate Prof. Wang Yongzhong**  
**Major: Power Engineering and**  
**Engineering Thermophysics**

College of Power Engineering of  
Chongqing University, Chongqing, China.  
May, 2011



## 摘要

作为主要能源的化石燃料储量急剧地减少以及它们燃烧所带来的全球气候变化、环境污染和健康问题，对能源结构产生了巨大挑战。氢气由于其高燃烧值和有效燃烧或直接在燃料电池中使用，被认为是最有潜力的替代能源之一。生物制氢反应条件温和、能耗低、能够妥善解决环境污染和能源需求间的矛盾，具有良好的发展前景。相比于暗发酵制氢技术，光生物产氢技术具有纯度高、理论底物转化效率高和无氧气活性抑制等优点而备受研究者的关注。而作为细胞固定化技术之一的生物膜法，不仅能有效提高生物反应器单位体积内的生物量进而提高产氢速率，而且具有底物传质速率大、光传输特性好和操作简单等优点。

在典型的生物膜反应器中，底物从主流区对流和扩散进入生物膜内，而代谢产物反向从生物膜内扩散到主流区，因而生物膜结构对底物-产物质量传输和反应器整体性能均有重要影响。本文采用生物膜法光生物制氢技术，利用本实验室筛选培育的光合细菌沼泽红假单胞菌 *Rhodoseudomonas palustris* CQK 01 作为产氢菌种，构建了用于生物膜结构研究和实现产氢的可视化平板式光生物反应器，研究了不同光照强度、光照波长、进口溶液流量和底物浓度条件下形成的光合细菌生物膜结构，并讨论了不同膜结构对反应器内底物传输和产氢性能的影响。在实验研究基础上，采用扩散-反应方程和元胞自动机规则，结合前期实验得到的光合细菌生长动力学参数，建立了光合细菌生物膜在固体基质表面上生长的二维模型，预测了光照强度、底物浓度、温度、pH 和初始接种量对光合细菌在固体基质表面生长、成膜过程中表面形态和特征参数的影响。主要研究结果如下：

1. 生物膜中的光合细菌以短杆状为主，但也有少量的长杆状存在。不同启动条件下形成的生物膜结构对后期稳定运行期中光生物反应器的产氢性能有着显著影响。
2. 在光照强度为 5000 lx 和光照波长为 590 nm 下形成的生物膜具有较大的细菌形态、较高的孔隙率、生物膜干重( $0.915 \text{ mg/cm}^2$ )和厚度( $18.7 \mu\text{m}$ )，且该条件下形成的生物膜在稳定运行期的产氢性能最高。尽管光照波长为 470 nm 下形成的生物膜具有最大的生物膜干重和厚度( $1.013 \text{ mg/cm}^2$  和  $27.8 \mu\text{m}$ )，但由于其极低的孔隙率导致了产氢性能严重下降。
3. 生物膜结构随反应器进口溶液流量的增加变得更加致密，生物膜厚度在进口溶液流量为 38 ml/h 时形成的低流体剪切力作用下达到最大( $19.1 \mu\text{m}$ )，但此时生物量却较低；而在进口溶液流量为 228 ml/h 下形成的生物膜具有较大的细菌形态和适中的孔隙率，且该条件下形成的生物膜在稳定运行期的产氢性能最高。

4. 随着底物浓度的增加,生物膜结构会变得更加疏松,底物浓度为 110 mmol/l 下形成的生物膜具有最大的孔隙率。但生物膜干重和厚度是在底物浓度为 60 mmol/l 下获得最大值,且该条件下形成的生物膜在稳定期的产氢性能也为最佳。

5. 在稳定运行期,光合细菌生物膜产氢速率随光照波长、光照强度、进口流量和底物浓度的增加呈先增加后减小的趋势,最大产氢速率为 11.2 mmol/m<sup>2</sup>/h。产氢得率均随进口底物浓度的增加而持续减少,最大产氢得率为 0.66 mol H<sub>2</sub>/mol glucose。光能转化效率均随光照强度的增加而逐渐降低,最高光能转化效率为 28.1%。

6. 光合细菌生物膜生长模拟结果表明在生物膜生长、成膜过程中,孔隙率随时间都呈减小的规律,而表面粗糙度在生长一定时间后都趋于一个稳定值,生物膜厚度都随时间而逐渐增大。在光照强度为 5000 lx,底物浓度为 10.0 g/l,温度为 30 °C, pH 为 7.0 和初始接种量为 500 时生物膜具有较高的孔隙率、表面粗糙度和厚度。

**关键词:** 光生物制氢,生物膜结构,光能利用,元胞自动机,产氢速率

## ABSTRACT

The rapidly diminishing reserves of fossil fuels and resulting global climate change, environmental pollution and health problems by their combustion make the current energy structure face a significant challenge. Hydrogen, which is of high combustion efficiency with high caloric value and can be directly used in fuel cells, is considered as one of the most promising alternatives to fossil fuels. Bio-hydrogen production from organic pollutants leads a solution for the confliction of environmental protection and energy requirements and has a bright future due to its moderate reaction condition and low energy consumption. Compared with hydrogen production by dark-fermentation, the photo-fermentation process has attracted intensive attention due to high purity of the produced hydrogen, high theoretical substrate conversion efficiency and no O<sub>2</sub>-evolving activity which causes O<sub>2</sub> inactivation in green algae hydrogen production systems. The biofilm method, as one of the cell immobilization technologies, not only effectively improves the biomass amount per unit volume, the tolerance ability of bacteria and the hydrogen production rate, but also bear the advantages of high mass transfer rate, good light penetration and simple operation.

In a typical biofilm-based bioreactor, substrate diffuses from bulk liquid into biofilm, while end-products transports inversely into the bulk liquid. It can be expected that the biofilm structure is a critical factor affecting the mass transport substrates and products as well as the overall performance of the reactor. Focusing on photo-hydrogen production by biofilm technology, visualization flat-panel photobioreactors with indigenous *Rhodoseudomonas palustris* CQK 01 were constructed in the present study for observation on biofilm structure and hydrogen production performances, and the effect of the structure of photosynthetic bacterial (PSB) biofilm formed under different illumination intensities, illumination wavelengths, influent flow rates and substrate concentrations were then discussed on the substrate transport and hydrogen production performance in the bioreactor. Based on the experimental works, a two-dimensional model with the diffusion-reaction equations and cellular automata rules combined with the previously obtained growth kinetics parameters of PSB was established to simulate PSB growth and biofilm formation on the solid carrier. As a result, the effects of illumination intensity, substrate concentration, operation temperature, pH and initial inoculation were numerical predicted on the biofilm growth and structure on the solid

surface. The main outcomes of the present study were shown as following:

1. The predominant morphology of the bacteria in the biofilm was short rods, while a few long rods were also observed. The biofilm structures formed under different start-up conditions significantly affected hydrogen production performance of the photobioreactor during steady operation process.

2. The PSB biofilm formed under illumination wavelength 590 nm and illumination intensity 5000 lx had larger bacterial size, higher porosity, higher biomass dry weight ( $0.915 \text{ mg/cm}^2$ ) and biofilm thickness ( $18.7 \mu\text{m}$ ), resulting in the best hydrogen production performance during steady operation process. The biofilm formed under illumination wavelength 470 nm gained the highest biomass dry weight ( $1.013 \text{ mg/cm}^2$ ) and biofilm thickness ( $27.8 \mu\text{m}$ ); however, it led to inferior hydrogen production performance during steady operation process due to the lowest porosity.

3. The PSB biofilm structure turned to be dense with the increase in influent flow rate. The biofilm formed under influent flow rate 38 ml/h obtained the highest thickness ( $19.1 \mu\text{m}$ ) due to low shear force, while the biomass was insufficient. The biofilm formed under 228 ml/h gained larger bacterial size and moderate porosity, leading to the highest hydrogen production performance during the steady operation process.

4. The PSB biofilm turned to loose with increasing influent substrate concentration. The biofilm formed under 110 mmol/l of substrate concentration had the largest porosity, while the highest biomass dry weight and biofilm thickness were achieved by the biofilm formed under 60 mmol/l of substrate concentration inducing the best hydrogen production performance during steady operation process.

5. During the steady operation process, the hydrogen production rate of the PSB biofilm increased with increasing illumination wavelength, illumination intensity, influent flow rate and substrate concentration to achieve a peak value and then dropped when these parameters were further increased. The maximum hydrogen production rate was  $11.2 \text{ mmol/m}^2/\text{h}$ . The hydrogen yields of biofilms continuously dropped with the increase in influent substrate concentration and the maximal hydrogen yield was  $0.66 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$ . The light conversion efficiency of the reactor decreased with enhancing illumination intensity and the maximum value achieved to 28.1%.

6. The simulation results from the PSB biofilm growth model indicated that the biofilm porosity decreased during the biofilm formation process, while the surface roughness reached a stable value after a certain time of growth, and the biofilm thickness increased as time progressed. The optimal growth condition for the PSB

## 英文摘要

biofilm formation was 5000 lx of illumination intensity, 10.0 g/l of substrate concentration, 30 °C of temperature, 7.0 of pH and 500 of initial inoculation.

**Keywords:** photo bio-hydrogen production, biofilm structure, light utilization, cellular automata, hydrogen production rate



## 目 录

<b>中文摘要</b> .....	I
<b>英文摘要</b> .....	III
<b>1 绪 论</b> .....	1
<b>1.1 概述</b> .....	1
<b>1.2 生物制氢技术</b> .....	2
<b>1.3 光生物制氢技术研究现状</b> .....	4
1.3.1 光合细菌概述 .....	4
1.3.2 光合产氢细菌产氢原理 .....	6
1.3.3 光合细菌产氢影响因素 .....	8
1.3.4 细胞固定化制氢技术及研究现状 .....	12
<b>1.4 生物膜生长模型研究现状</b> .....	14
<b>1.5 课题研究内容及意义</b> .....	16
1.5.1 课题意义及研究目的 .....	16
1.5.2 本文研究内容 .....	17
<b>2 平板式光生物膜制氢反应器光合细菌成膜及产氢特性</b> .....	19
<b>2.1 引言</b> .....	19
<b>2.2 平板式光生物制氢反应器的设计</b> .....	20
<b>2.3 实验方法和材料</b> .....	21
2.3.1 菌种及培养基 .....	21
2.3.2 实验装置系统 .....	21
2.3.3 产氢性能评价指标 .....	23
2.3.4 分析与检测方法 .....	23
<b>2.4 实验结果及讨论</b> .....	24
2.4.1 光照强度对光合细菌生物膜微结构及产氢性能的影响.....	24
2.4.2 光照波长对光合细菌生物膜微结构及产氢性能的影响.....	35
2.4.3 进口流量对光合细菌生物膜微结构及产氢性能的影响.....	44
2.4.4 底物浓度对光合细菌生物膜微结构及产氢性能的影响.....	50
<b>2.5 本章小结</b> .....	55
<b>3 固体基质表面光合细菌生物膜生长特性模拟</b> .....	57
<b>3.1 引言</b> .....	57
<b>3.2 数学模型</b> .....	57

3.2.1 物理问题描述 .....	57
3.2.2 数学模型建立 .....	58
<b>3.3 数值计算方法 .....</b>	<b>62</b>
<b>3.4 计算结果与讨论 .....</b>	<b>64</b>
3.4.1 生物膜生长过程 .....	64
3.4.2 光照强度对生物膜生长特性的影响 .....	65
3.4.3 底物浓度对生物膜生长特性的影响 .....	68
3.4.4 pH 值对生物膜生长特性的影响 .....	70
3.4.5 温度对生物膜生长特性的影响 .....	71
3.4.6 初始接种量对生物膜生长特性的影响 .....	73
<b>3.5 本章小结 .....</b>	<b>75</b>
<b>4 结 论 .....</b>	<b>77</b>
4.1 本文主要结论 .....	77
4.2 后续研究工作展望 .....	78
<b>致 谢 .....</b>	<b>79</b>
<b>参 考 文 献 .....</b>	<b>81</b>
<b>附 录 .....</b>	<b>87</b>
A. 作者在攻读硕士学位期间发表的论文 .....	87
B. 作者在攻读硕士学位期间获得的荣誉 .....	87

## 符号说明

$c_s$	计算区域底物浓度 (g/L)	$n_0$	初始接种量
$C_{s0}$	理想源处底物浓度 (g/L)	$\lambda_{opt}$	最佳入射光照波长 (nm)
$S$	无量纲底物浓度	$I_{opt}$	最佳入射光照强度 (lx)
$c_x$	计算区域生物量浓度 (g/L)	$pH_{opt}$	最佳 pH
$C_{xm}$	最大生物量浓度 (g/L)	$T_{opt}$	最佳温度 (°C)
$C$	无量纲生物量浓度	$\bar{Y}_f$	生物膜平均前端点
$c_f$	单元格细菌占据信息	$\bar{c}_{f,Y}$	生物膜前端点平均密度
$D_s$	葡萄糖在生物膜内扩散系数 (m <sup>2</sup> /s)	$Y_{max}$	生物膜最大前端点
$L_x$	计算区域长度 (m)	$\Delta t$	底物消耗时间 (s)
$L_y$	计算区域高度 (m)	$\delta t_c$	细胞生长时间 (s)
$r_s$	底物转化率 (g/(L×s))	$\delta$	生物膜厚度 (m)
$r_x$	细胞生成率 (g/(L×s))	$\varepsilon$	生物膜孔隙率
$\rho_s$	标准化底物消耗速率 (s <sup>-1</sup> )	$\sigma_f$	生物膜表面绝对粗糙度
$\rho_x$	标准化细胞积累速率 (s <sup>-1</sup> )	$\sigma$	表面粗糙度相关系数
$K_s$	饱和常数 (kg·m <sup>-3</sup> )		
$m_s$	维持系数 (s <sup>-1</sup> )		
$\mu_m$	最大比生长速率 (h <sup>-1</sup> )		
$Y_{x/s}$	细胞得率		
$L_b$	扩散边界厚度 (m)		
$k_L$	外部传质系数 (m/s)		
$\lambda$	入射光波长 (nm)		
$I$	光照强度 (lx)		
$pH$	底物溶液 pH		
$T$	底物溶液温度 (°C)		



# 1 绪 论

## 1.1 概述

能源作为人类社会发展的源动力，每一次人类利用能源方式的进步，都会引起生产和社会的重大变革，从远古时期钻木取火所创造的最初文明到18世纪煤炭利用促成蒸汽机的发明与应用，开启了人类文明史上第一次工业革命。随着社会的继续发展，煤炭、石油、天然气等一次能源得到大量开发，同时电力作为二次能源的出现，并因此形成了一个庞大的能源工业体系，进一步推进了人类文明。人类在享受诸如煤、石油、天然气等化石能源带来的经济发展、科技进步等利益的同时，也遇到一系列能源安全挑战。由于地球上不可再生能源的储量非常有限，而伴随世界许多国家同时向工业化进程的迈进，能源需求持续增长对其供应形成巨大压力。自2003年以来，国际石油价格每年以约10美元的速度增长，尽管期间有所回落，但这种持续上涨并长时间在高位波动是世界经济发展史上从未有过的。此外，能源短缺对世界各国的经济和社会发展产生很多负面影响：(1) 化石能源属于不可再生能源，且地球上储量有限，若不改变当前的能源结构，人类社会发展的前景堪忧；(2) 化石能源开采和使用过程中对环境造成的严重影响，尤其是燃烧产物中的CO<sub>2</sub>引起温室效应，氮氧化物和SO<sub>2</sub>带来的酸雨等问题威胁着人类所居住的生态环境；(3) 日益突出的石油产区不稳定性所带来的国家石油战略安全问题，自日本京都会议和哥本哈根会议后，温室气体(CO<sub>2</sub>和CH<sub>4</sub>等)减排必然成为国际社会的重大环保议题，因而开发环境友好且符合经济发展的可再生能源，从根本上改变能源利用结构，突破当前能源、环境、资源三者之间的矛盾正成为人们关注的焦点和科学的研究热点。

目前，许多国家正在致力于太阳能、水能、地热能、风能和生物质能等可再生能源的大力研发。在各种可再生能源中，氢能源的研发成为研究者关注的焦点之一，与传统的化石能源和其它可再生能源相比较，氢气具有以下优势：(1) 除核燃料外，在所有的化石、生物和化工燃料中，氢的发热值最高；每千克氢燃料可产生33.6 Kw.h的能量，约为汽油燃烧的2.8倍，酒精的3.9倍，焦炭的4.5倍；(2) 与其他燃料相比，氢燃烧时最清洁无污染，除生成水和少量氮化氢外不会生成如CO、CO<sub>2</sub>、碳氢化合物、铅化合物和粉尘颗粒等对环境有害的物质，且燃烧生成的水可循环使用；(3) 氢气在所有气体中的导热性能最好，比很多气体的导热性高出10倍，因此可以作为一种很好的传热载体；(4) 氢能的利用形式多，既可通过燃烧产生热能并转换为机械能，又可作为能源材料用于燃料电池或转换成固态氢作结构材料；(5) 氢的形态能够根据需要而改变，氢可以以固、液或气态金属氢化物的形态存在，

适应不同应用环境的各种要求; (6) 氢的储量非常丰富, 它是自然界最普遍存在的元素, 主要以化合物的形态储存在水中。因此, 氢气作为洁净高效和可再生的二次能源而倍受关注。

国外对氢能的研发投入了大量的人力、物力和资金等。目前欧洲已有22座左右的加氢站, 美国、日本建立的加氢站则更多; 加拿大实施的“氢公路”计划; 北欧国家冰岛与戴-克、壳牌等公司合作, 希望在今后30-40年的时间内在该国的公共汽车、轿车和漁船上用氢取代石油; 德国宝马公司氢能7系燃料电池汽车也已面世。相比之下, 我国在新能源和可再生能源方面的研发技术水平还远落后于发达国家, 我国首个车用加氢站于2006年在北京正式投入使用。如何利用国外的研究成果, 开发高效制氢技术以缓解能源危机是我国研究者的重大责任。现在世界上氢的年产量在3600万吨以上<sup>[1]</sup>, 其主要制氢方法包括: (1) 电解水制氢, 此法应用较广且比较成熟, 其效率一般在75-85%, 工艺过程简单, 无污染, 但耗电量大; (2) 化石燃料制氢, 主要包括以煤为原料制取氢气、天然气催化重整制氢及热裂解制氢和石脑油的部分氧化制氢, 该制氢过程要消耗大量的矿物原料, 而且还会对环境产生影响。化石燃料制氢方法占全球产氢量90%以上, 属于能量密集型; (3) 太阳能制氢, 运用电解技术和光电技术相结合的方法制取氢气, 利用太阳能光伏电池或聚光器产生较高的转化效率, 提供给地球的太阳辐射能最大能流约 $5.7 \times 10^{24}$  J year<sup>-1</sup>, 相当于人类所消耗总能量的10000倍, 而被地球表面所接收的太阳能辐射率仅为 $1 \text{ kW m}^{-2}$ , 需要建造更大的接收面积以收集充足的太阳能量, 这也限制了该技术在商业应用中的竞争优势; 另外太阳能制氢技术对投资成本及技术要求都较高<sup>[2]</sup>; (4) 生物制氢, 使用自然界丰富的可再生资源-生物质和水为原料, 直接或间接利用太阳光, 反应条件温和、能耗低、能妥善解决能源与环境的矛盾, 同时产生的氢气能被燃料电池转化为电能<sup>[3]</sup>, 被认为是目前最具有前途的制氢技术之一。

## 1.2 生物制氢技术

当前生物制氢技术主要分为以下四种:

### (1) 绿藻等微型藻类的光合作用制氢

厌氧条件下, 绿藻等微型藻类利用氢化酶作为催化剂并在光能驱动下进行水的光解作用而生成氢气。绿藻产氢有两类: 固氮酶催化产氢和氢酶催化产氢, 其光合反应产氢机理为:

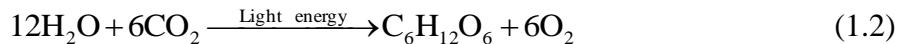


在此反应中,  $\text{O}_2$ 对产氢的氢化酶非常敏感, 它的存在会严重抑制氢化酶活性, 阻碍产氢过程的连续性, 因而必须随时将 $\text{O}_2$ 分离。同时, 高的光照强度会增加氧气的产率从而限制了可逆氢化酶的活力, 而导致氢气的产率下降<sup>[4]</sup>。可用于产氢的

绿藻种属包括：衣藻属(*Chlamydomonas*)，小球藻属(*Chlorella*)，栅藻属(*Scenedesmus*)，扁藻属(*Platymonas*)和微绿球藻属(*Chlorococcum*)等<sup>[5]</sup>。

### (2) 蓝细菌光合作用制氢

蓝细菌是一类品种繁多，含有光合色素如叶绿素a、类胡萝卜素和藻胆蛋白，能进行放氧光合作用的大型原核光能自养微生物，通过光合作用同样可以进行氢气合成：

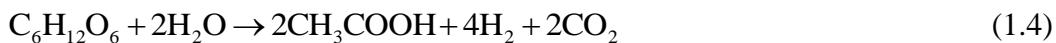


参与氢代谢的酶主要为固氮酶、吸氢酶和可逆氢酶三种，对蓝细菌供给空气( $\text{CO}_2$ 和 $\text{N}_2$ 分别作为碳源和氮源)、水(电子和还原剂来源)、无机盐和光时即可进行放氢行为，同时这三种酶对 $\text{O}_2$ 很敏感，它们可能被空气中的氧以及光合作用释放的氧抑制而失活。可用于产氢的蓝细菌有颤蓝细菌(*Oscillatoria* sp.)、鱼腥蓝细菌(*Anabaena* sp.)、聚球蓝细菌(*Synechococcus* sp.)、丝状蓝细菌(*Calothrix* sp.)和黏杆蓝细菌(*Gloebacter* sp.)等<sup>[6]</sup>。

### (3) 厌氧暗发酵细菌制氢

暗发酵制氢是异养型厌氧细菌利用碳水化合物等有机物，通过暗发酵反应生成氢气，产氢机理由于发酵途径和最终产物的不同而不同。

当乙酸作为最终产物时，其理论最大得率为4 mol  $\text{H}_2$ /mol glucose：



当丁酸作为最终产物时，其理论最大得率为2 mol  $\text{H}_2$ /mol glucose：



由此可见，高的产氢得率是伴随乙酸作为最终产物而获得。而实际应用中，高的产氢得率是伴随乙酸和丁酸的混合物作为最终产物而获得，低的产氢得率是伴随丙酸和其他最终产物(酒精，乳酸)作为最终产物而获得。另外，暗发酵产氢高度依赖于过程条件如pH、水力停留时间和气体分压等，底物的利用率较低，产物的抑制作用较明显。可用于产氢的发酵细菌包括：肠杆菌属(*Enterobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)、杆菌属(*Bacillus*)和埃希氏肠杆菌属(*Escherichia*)等。

### (4) 光合细菌(PSB)发酵制氢

光合细菌是一种具有原始光能合成体系的原核生物，其光合产氢机理为：



光合细菌可利用的光谱范围较宽，可利用废料的来源广泛，其能量利用率高，产氢速率较高。可用于产氢的光合细菌包括：沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)、荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)、球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)和深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)等。上述四种生物制氢法的对比如表1.1所示。

表 1.1 不同生物制氢方法比较

Table 1.1 Comparision of different bio-hydrogen production methods

微生物	是否需光	催化酶	抑制物质	电子供体
绿藻	是	双向氢酶	CO、O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O
蓝细菌	是	固氮酶/双向氢酶	N <sub>2</sub> 、O <sub>2</sub> 、外源氮源	H <sub>2</sub> O
暗发酵细菌	否	氢化酶	CO、O <sub>2</sub>	还原性有机物
光合细菌	是	固氮酶	O <sub>2</sub> 、N <sub>2</sub> 、外源氮源	还原性有机物

此外，从四种生物制氢法的产氢速率和气体组成来看，绿藻产氢速率高于蓝细菌；暗发酵产生的混合气中主要为 H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>，也包含少量的 CH<sub>4</sub>、CO 和/或 H<sub>2</sub>S，不能直接用于燃料电池，其发酵后的废液需要进行处理才能排放；光合细菌的产氢速率较藻类高，且能量利用率也比非光合细菌要高，同时可以实现光合产氢与工业有机废水处理相结合。鉴于此，国内外许多研究者对光合细菌展开了一系列的研究。

### 1.3 光生物制氢技术研究现状

#### 1.3.1 光合细菌概述

光合细菌是一类能进行光合作用并产生氢气的细菌，是地球上出现最早、分布广泛、其在腐败有机物质浓度高的水域中尤为丰富、具有原始光能合成体系的原核生物。光合细菌主要分为 2 大类：蓝细菌和红螺菌，其中可以进行光合作用而不产氧的红螺菌又可分为 3 个科：红螺菌科、着色菌科和绿菌科，18 个属。光合细菌属于革兰氏阴性细菌，在显微镜下可呈现多种形态：单细胞和多细胞；杆状、螺旋状、半环状和卵圆形状；有通过鞭毛运动的，有滑行运动或不运动的；主要以二分裂方式进行增殖，少量为出芽生殖，一般不具备形成芽孢的能力。光合细菌最初由 Ehrenberg<sup>[7]</sup>于 1836 年发现，并观察到能够使沼泽和湖泊等水体颜色变红的两种细菌，其生长与光和 H<sub>2</sub>S 的存在有着密切关系。Nakamura<sup>[7]</sup>于 1937 年发现在黑暗条件下光合细菌产生 H<sub>2</sub> 的现象，这也是关于光合细菌产氢最早的报道。Gest 和 Kamen<sup>[8]</sup>于 1949 年报道了深红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)在光照条件下的产氢现象以及光合固氮作用。此后关于光合细菌产氢的关键因素不断有报道，固氮酶、氢酶的发现和研究深入使人们对 PSB 产氢机理的研究有了较大进展。

光合细菌除具有产氢功能外，由于其菌体中含有丰富的蛋白质、氨基酸、生物必需的维生素、抗病毒活性因子、辅酶以及多种活性物质等，在很多科学领域都引起了人们的高度重视<sup>[7-9]</sup>。

①环境治理方面

光合细菌在好氧光照或好氧黑暗、厌氧光照的条件下都能利用废水中的有机酸、氨基酸和糖类等小分子有机物迅速增殖，达到废水净化的目的。光合细菌能处理高浓度有机废水，不仅对很多有机物质具有较强的分解转化力，且还能够耐受紫外线，对氯、氰、盐分和酚毒物耐性力较强，具有适应能力强、去除效率高的特点。相比于活性污泥法和厌氧法，光合细菌处理法有节约能源、设备及运行费低等优势，且得到的副产品(如：菌体污泥)可综合利用；在商业应用中较好的有对豆腐、水产品加工、制氨和酵母等工业废水的处理。但此法的不足之处在于需要不断添加新鲜菌体，菌体细胞的自然沉降困难，有效的生物需氧量只能降到 200 mg/L 左右。针对此问题，结合暗发酵和光合细菌工艺处理工业废水将成为一种新的趋势，在该综合系统中，暗发酵系统先将大分子有机物分解为小分子有机酸并生成一定量的氢气，再将发酵废液通入光生物反应器中将有机酸进行彻底降解(如式(1.7)-(1.9)所示)，同时使发酵液 pH 值得到提高，从而改善发酵细菌酶的活性。

暗发酵细菌产氢理论化学式为：



光合细菌利用乙酸产氢的理论化学式为：



发酵细菌和光合细菌联合制氢的理论化学式为：



因而，发酵细菌和光合细菌联合培养使有机物被彻底降解并连续产氢，提高光能转化和底物利用效率，降低挥发性酸对细菌的毒性，具有更广泛的发展前景<sup>[10, 11]</sup>。

## ②生物制药方面

光合细菌具有抗氧化作用、抗肿瘤作用、免疫和调脂作用等生理活性；无毒性，营养丰富并含有多种维生素，对生长繁殖有一定的促进作用。从菌体中提取的类胡萝卜素可用于食品、饮料及化妆品等生产；光合细菌同样可制作成中药试剂、保健食品等用于抑制肿瘤、延缓衰老和免疫调节等功效。

## ③水产养殖和农牧方面

光合细菌含有大量的氨基酸，特别是含有丰富的维生素 B<sub>12</sub> 和维生素 H，可用于饲料添加剂，用于孵化鱼虾幼仔的饵料及喂养饵料的蛋白源；光合细菌对鱼类具有促进生长和防治鱼虾疾病的功效，净化养殖水质、维持水体微生物的平衡；光合细菌具有固碳和氮功能，从而增加土壤肥力、改善植物营养、抑制病原微生物生长；光合细菌富含辅酶，具有提高免疫力、增强心肌功能、改善细胞内呼吸等生理功能。

### 1.3.2 光合产氢细菌产氢原理

光合细菌的产氢过程主要是在光照条件下利用有机酸作电子供体，利用固氮酶或氢酶将光合磷酸化和还原性物质代谢耦联，并将吸收的光能及代谢生成的还原力形成氢气的过程。光合细菌的产氢机理如图 1.1 所示，其中主要由光合系统和固氮酶、氢酶产氢系统两部分组成。

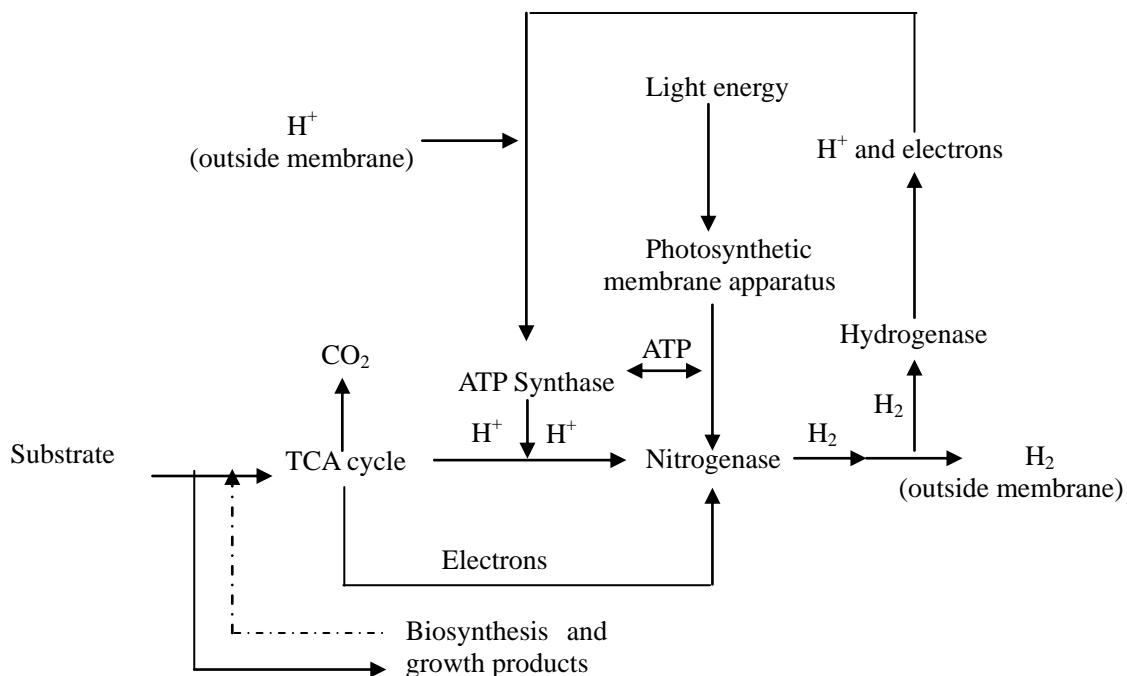
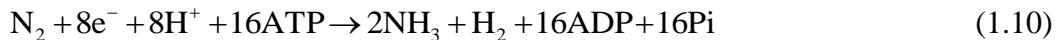


图 1.1 光合细菌产氢原理

Fig 1.1 The principle of hydrogen production of PSB

光合细菌细胞质膜内陷构成的内膜系统中具有光合系统，根据功能分为捕捉光能的光捕获复合体、光能转变为生物能的反应中心和电子传递系统三部分。光捕获复合体由各种细菌叶绿素和类胡萝卜素等组成，用于能量的吸收，又称天线光和色素；光能吸收后即传递给反应中心，反应中心主要由细菌叶绿素和脱镁细菌叶绿素组成<sup>[12]</sup>。光合细菌由于没有光合系统 II，光化学反应不会用水作为供氢体，因而不会产生  $O_2$ 。光合系统为细菌提供了大量的 ATP 和少量的还原力  $NAD(P)H_2$ ，即光子被捕捉到光合作用单元后，其能量传送给光合反应中心并进行电荷分离，产生高能电子，形成具有一定梯度的质子，从而进行 ATP 合成；产生的高能电子通过  $Fd-NADP^+$ 还原酶从  $Fd$  传至  $NADP^+$ 并生成  $NADPH$ ，再利用 ATP 与  $NADPH$  使固氮酶进行  $H^+$ 还原，生成  $H_2$ 。失去电子的光合反应中心需得到电子以回到基态，继续进行光合作用<sup>[13]</sup>。此外，光合细菌产氢需要足够的光照和严格的厌氧条件。

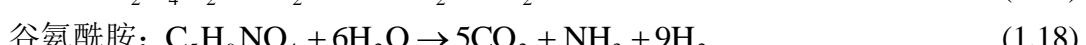
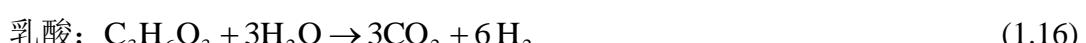
光合细菌产氢反应主要是由菌体中固氮酶催化而进行，其反应式为：



在固氮酶催化下，PSB 消耗 ATP 和 NAD(P)H<sub>2</sub> 中的 2 个 H<sup>+</sup>并释放电子，电子通过铁氧还蛋白传递到固氮酶的铁蛋白上，接着在 Mg-ATP 水解作用下传递到钼铁蛋白将分子氮还原成氨，此过程中未用电子将质子还原成 H<sub>2</sub>。在固氮和产氢过程中，氮气对产氢具有一定抑制作用，在氮饥饿时，NAD(P)H<sub>2</sub> 中的 H<sup>+</sup>几乎全部在固氮酶上被电子还原成 H<sub>2</sub><sup>[14]</sup>，也可用其他氮源代替 N<sub>2</sub>。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>对 PSB 产氢也有一定影响，主要是因为 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>抑制谷氨酰胺合成酶，对固氮酶有瞬间抑制作用，当其消耗完后，固氮酶又恢复活性<sup>[15]</sup>。此外，氧气对固氮酶合成氢有抑制作用并还能影响固氮酶的合成。但也有研究者表示微量氧的存在有助于产氢效率的提高<sup>[16]</sup>。

光合细菌的产氢代谢还与氢酶有关，所有的固氮蓝细菌和部分光合细菌都含有吸氢酶。根据功能的不同将其分为吸氢酶和可逆氢酶，吸氢酶显著的作用就是消耗由固氮酶所产生的氢气；可逆氢酶，既可催化 H<sub>2</sub> 产生又可氧化产生的 H<sub>2</sub>，其反应式可表示为：2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup>  $\leftrightarrow$  H<sub>2</sub>。在光照条件下，氢气被氢酶吸收并通过逆电子传递，分解为电子和质子并释放 ATP，补充固氮反应所需能量及细胞内还原力的损失；而在黑暗条件下，PSB 主要在氢酶的催化作用下发酵生成氢气<sup>[17]</sup>。CO 和 O<sub>2</sub> 对氢酶活性的抑制作用很强，但也有研究表明，光合细菌 *R. rubrum* 中存在 CO 脱氢酶和能耐受 CO 的氢化酶，在黑暗条件下利用 CO 生长并将其转化为 CO<sub>2</sub> 和氢气<sup>[18]</sup>。

光合细菌可利用的底物范围广，各种糖类(葡萄糖和果糖)、糖醇(乙醇、甘油和山梨醇等)、芳香类化合物(香草醛、苯甲基乙醇和苯甲酸等)和有机酸(低分子直链脂羟酸、肪酸和酮酸等三羧酸循环中的各种有机酸)都可用于光合细菌产氢。各种有机物碳源进入光合细菌内部代谢方式的差异，以及在厌氧条件下形成还原性 H<sup>+</sup>能力不同，因而会导致各种碳源底物产氢能力的不用。光合细菌利用各种有机底物产氢方程式如下所示：



### 1.3.3 光合细菌产氢影响因素

为提高光合细菌产氢速率和光能利用效率, 各国学者针对不同方面进行了大量研究。研究表明影响光合细菌产氢的主要因素在于三方面: 一是影响参与产氢的固氮酶和可逆氢酶活性(如  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{O}_2$  和  $\text{N}_2$  等); 二是外部运行条件(微量元素、如光照条件、底物类型和浓度、水力条件、温度、pH 和菌龄等); 三是反应器结构形式(光源布置和反应器构型等)。

从光合细菌产氢机理可以看出, 光合细菌内参与产氢的固氮酶和可逆氢酶活性受到  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{O}_2$  和  $\text{N}_2$  的抑制。近年来, 研究者通过基因改造或诱变技术改进光合系统以提高光能捕获效率, 从而筛选出具有高产氢性能的变异菌株。Kondo 等<sup>[19]</sup>从野生型光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 筛选出变异型菌株 MTP4, 从中发现该菌株中用于产氢的叶绿素和类胡萝卜素分别减小到野生菌株的 41% 和 49%, 外周捕光色素蛋白( $\text{LH}_2$ )和核心捕光色素蛋白( $\text{LH}_1$ )的含量较低, 但是其生长在一定范围的光照强度内与野生菌株相当。使用平板型反应器时, 发现产氢性能提高了 50%, 说明减少一定色素是有效提高单位反应器产氢能力的一种方法。

光合细菌产氢活动所需能量和还原力分别由光合磷酸化和有机物降解提供, 并由固氮酶催化完成。与光合产氢相关的电子传递载体、固氮酶和氢酶都需要铁的参与; 镍作为固氮酶催化活性基团, 对光合产氢也有影响<sup>[20, 21]</sup>。镍是组成光合细菌 NiFe 氢酶、CO 脱氢酶的主要活性基团, 因而铁、镍金属离子对光合细菌生长、酶合成及氢代谢都有重要影响。杨素萍等<sup>[22]</sup>研究了铁、镍对沼泽红假单胞菌 Z 菌株和一株红杆菌细胞生长、产氢和色素合成的影响, 实验发现高浓度  $\text{Fe}^{3+}$  可以提高菌株的产氢及生物的合成能力, 最适浓度的  $\text{Fe}^{3+}$  使两种菌株的产氢性能分别达到对照组的 1.32 倍和 2.8 倍, 生物量分别达到对照组的 1.42 倍和 1.54 倍;  $\text{Ni}^{2+}$  为 9  $\mu\text{mol/l}$  时使这两种菌株产氢性能分别达到对照组的 1.48 倍和 1.96 倍; 当  $\text{Ni}^{2+}$  浓度为 12  $\mu\text{mol/l}$  时, 产氢活性受到一定程度的抑制。 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  对菌株类胡萝卜素有明显的影响, 426 nm 处的色素峰随  $\text{Fe}^{3+}$  浓度的增加和  $\text{Ni}^{2+}$  的添加而消失, 而提高了产氢活性。方萍等<sup>[23]</sup>研究表明培养基中加入铁可提高非共生固氮菌的固氮酶活性, 但过高的铁浓度反而会影响固氮效果。

光照波长和强度对光合细菌的生长及产氢有着重要的影响。这是因为光合细菌产氢是一类光依赖性很强的电子传递过程, 光子的能量与电子的传递相耦合。Yang 等<sup>[24]</sup>利用光谱反射技术和无序激发理论研究了紫色光合细菌的色素天线系统在捕捉能量后传递到反应中心的能量传递机制, 发现色素天线选择性地吸收适宜波长或利用激子相互作用调节波长适应天线的光谱吸收。Nakada 等<sup>[25]</sup>研究悬浮培养的光合细菌溶液中光的渗透特性和产氢性能, 发现光到达反应器最深处的波长主要为 600-780 nm 且对产氢有促进作用, 而波长为 800-850 nm 的光在该区域基本

不存在而无法用于产氢。Xu 等<sup>[26]</sup>研究了光子传递到反应中心并激发出光合电子在细胞膜上的传递及能量转换过程，阐述了反应中心的能量代谢与光合电子传递过程。作用中心出来的一部分电子传递到泛醌，而作用中心的光化学活性分子得到电子以后回到基态，重新吸收光子，以进行下次循环；另一部分从作用中心出来的光合电子流向基质中的铁氧化蛋白，铁氧化蛋白被还原后将电子传输给固氮酶的铁蛋白，起电子转接器作用的铁蛋白将电子传递给钼铁蛋白，利用光合磷酸化合成的 ATP 及碳源底物代谢提供的还原型质子 H<sup>+</sup>在固氮酶的钼铁蛋白上产生 H<sub>2</sub>。Sasikala 等<sup>[27]</sup>通过实验指出光照强度是影响光合细菌生长而不是最终所获得的生物量，连续光照条件下的生长优于明暗交替下的情况，产氢在光照强度为 5000 lx 时达到饱和。Wakayama 等<sup>[28]</sup>同样研究了太阳光照下光合细菌的产氢性能，指出产氢水平取决于太阳光辐照强度，当光强度超过临界水平后反应器中的光分布会影响细菌的活性，其产氢速率也达到相应的饱和值。

氮源和碳源是影响光合细菌生长和制氢的重要因素。作为光合细菌生长繁殖的有效氮源，NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的浓度大于1 mmol/L时，会抑制固氮酶结构基因的转录和终止固氮酶的合成，对其合成产生“瞬间关闭”效应，因此可以控制环境中的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度的手段来增强固氮酶活性<sup>[29]</sup>。Zhu 等<sup>[30]</sup>用PLL、PEI和TGCI三种材料固定不产氢光合细菌*Rhodobacter sphaeroides*以阻止NH<sub>4</sub><sup>+</sup>对产氢的抑制影响，其结果表明包埋于TGCI和琼脂混合物中的细菌在有NH<sub>4</sub><sup>+</sup>存在下的产氢性能明显高于仅包埋于琼脂中的光合细菌。Fang 等<sup>[31]</sup>用醋酸盐和丁酸盐作为碳源，研究不同初始pH(5.0-10.0)和底物浓度(醋酸盐: 800-4100 mg/l, 丁酸盐: 1000-5100 mg/l)对产氢性能的影响，当醋酸盐和丁酸盐浓度分别为800和1000 mg/l时，最大产氢得率分别为2.5 mol H<sub>2</sub>/mol acetate 和 3.7 mol H<sub>2</sub>/mol butyrate。Barbosa 等<sup>[32]</sup>对 *Rhodopseudomonas* sp.，*Rhodopseudomonas palustris*和未知光合细菌三种不同菌株使用乳酸、苹果酸、丁酸盐和醋酸盐四种碳源作为底物，同时利用两种不用光照强度和醋酸盐作为电子受体研究产氢性能，实验表明*Rhodopseudomonas* sp.具有最高的产氢性能，在光照强度为680  $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/s时，最大产氢速率为25 ml H<sub>2</sub> /L/h；光照强度为43  $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/s时，最高光能转换效率为6.2%。杨素萍等<sup>[33]</sup>使用11种有机物对沼泽红假单胞菌Z菌株进行光合产氢实验，得出乙酸反应体系产氢活性最高，在此基础上发现种子菌龄、培养基类型、电子供体、接种量、氧浓度和氮源浓度对细菌生长和产氢活性有明显影响。当低于70 mmol/L乙酸钠和15mmol/L谷氨酸钠时，产氢活性随底物浓度的增加而增加，而谷氨酸钠浓度高于15 mmol/L时，由于游离NH<sub>4</sub><sup>+</sup>出现，产氢活性受到抑制而明显刺激了细胞生长。其最大产氢速率为标准状况下的19.4 mL/L/h。Lin 等<sup>[34]</sup>用研究了以蔗糖作为碳源底物，不同C/N比对产氢性能的影响，结果表明当C/N比为47时，最大产氢速率和产氢得率分别达到4.8 mol H<sub>2</sub>/mol

sucrose 和 270 mmol H<sub>2</sub>/L day, 相比于空白组分别增加了 500% 和 80%。这是因为合适的 C/N 比使细胞的代谢方式朝着有利于产氢方向进行。

光合细菌产氢过程中, 温度和 pH 值是影响微生物生长和繁殖的另一个重要因素。这是因为微生物在生长过程中机体内发生的生化反应为酶促反应, 而这种酶促反应对温度和 pH 值都有一个最合适范围的要求, 底物温度和 pH 值的改变将直接影响酶的活性中心存在形式, 从而改变底物分子和酶分子带电状态, 并因此影响酶与底物的结合。过高或过低的温度和 pH 值将会影响酶的稳定性, 进而使酶遭到不可逆的破坏, 导致细菌失活。魏丽芳等<sup>[35]</sup>研究了 pH 值对光合细菌利用乙酸钠制氢的影响, 其结果表明最佳 pH 值为 6.80, 在此最佳 pH 值下, 乙酸钠降解效率为 99.3%, 氢气的转化效率为 0.91 mol H<sub>2</sub>/mol 乙酸, 最大比产氢速率为 34.6 mL/(g-VSS.d), 能量转化效率为 22.8%。王永忠等<sup>[36]</sup>研究了外部操作条件对沼泽红假单胞菌产氢性能的影响, 发现 pH 为 8.0, 温度为 25 °C 时, 光合细菌产氢量最大, 但还需要进一步考察温度条件对光合细菌产氢代谢速率的影响。

光生物产氢反应器是用以实现光合细菌大规模培养与连续产氢的装置, 为光合细菌在生长和产氢过程中提供最适的条件, 主要由光源、循环装置、反应装置、控温系统、培养介质、气体分离与收集装置等组成。反应器必须满足能够封闭并建立厌氧环境以保证光合细菌的正常生理代谢; 具有较高的表面积与体积比, 材料透明便于光照的接收与传输并保证反应器内部光分布的均匀性, 最大限度地提高光化学转化效率与产氢速率, 消除产氢过程中的限制性影响。研究内容也多围绕反应器光源布置和构型方面展开研究工作。

### ①光源

光在反应器中射程较短, 光合细菌在生长代谢过程中的着色现象引起自我遮蔽效应, 从而妨碍光渗透及反应器内光照的分布均匀, 进而可能会转变代谢模式, 降低其产氢能力<sup>[37]</sup>。为更好的接受并透过光, 可采用较高比表面积的光生物反应器或内置光源生物反应器。Kondo 等<sup>[38]</sup>设计了多层式生物反应器以形成多种光路来有效增强产氢性能, 结果发现该反应器的产氢能力为平板式反应器的 2 倍。利用菌株 *Rhodobacter sphaeroides* RV 产氢时, 最大产氢速率达到 2.0 L/m<sup>2</sup>/h。光合细菌对光谱的吸收具有选择性, 而不同光源类型(如钨灯、卤素灯、氙灯、高压汞灯、金属卤化物灯和太阳光等)产生的不同范围波长对光合细菌产氢和光能转化效率都会有影响。Chen 等<sup>[39]</sup>对 *R.palustris* WP3-5 的吸收光谱进行了扫描, 发现在不同波长下光合细菌的吸光度有较大的差别。实验测试并比较了内置光纤(SLOF)、钨丝灯(TL)、卤素灯(HL)和金属卤化灯(OF-MH)的发射光谱, 如图 1.2 所示。

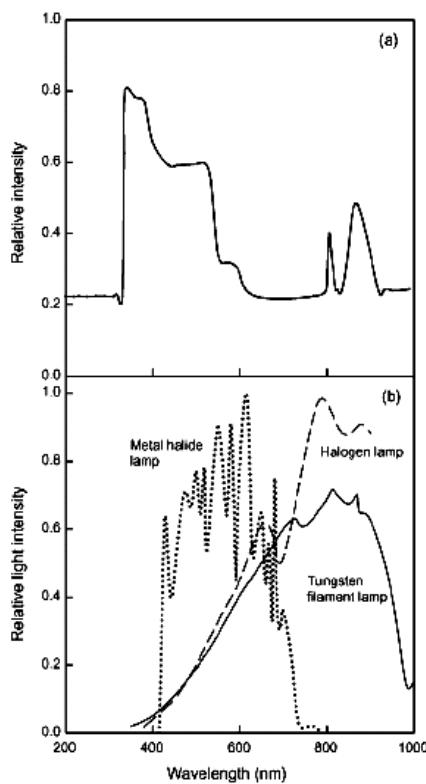


图1.2 (a) *R.palustris* WP3-5的吸收光谱; (b)钨灯, 卤素灯, 金属卤化灯的发射光谱<sup>[39]</sup>

Fig. 1.2 (a) Absorption spectrum of intact cells of *R. palustris* WP3-5 and (b) light emission spectrum of tungsten filament lamp (—), halogen lamp (---), and metal halide lamp (· · ·)<sup>[39]</sup>

与外置式光源相比, OF-HL 系统产生更多的氢气(625 ml), 更高的光能转化效率(1.8%)和较高的氢气得率(1.19 mol H<sub>2</sub>/mol acetic acid)。而在所有单光源测试中, HL 得到最高的总产氢速率和比产氢速率, 分别为 8.68 ml/l/h 和 3.01 ml/h/g cell。使用 OF-MH 系统导致较差的产氢, 表明光源的发散光谱对光合产氢是非常重要的。两种不同光源的联合显然能增强光合产氢, 特别是当内置光纤和外部光源一起使用, 如联合 OF-HL 和 TL 显示了最高的氢气得率、产氢速率和比产氢速率分别为 2.64 mol H<sub>2</sub>/mol acetic acid, 17.06 ml/h/l 和 9.47ml/h/g cell。而最高的总产氢量(944 ml)和光能转化效率(1.42%)是在两种类型的光纤共同使用(OF-HL/OF-MH)时获得。其他研究者也使用了包括钨灯、白炽灯、氘灯、卤素灯、金属卤化物灯、高压汞灯、LED 光电板和全光谱的太阳光等光源对光合细菌进行了产氢性能研究<sup>[40-42]</sup>。

## ②反应器构型

目前用于产氢的生物反应器主要为柱(罐)式、平板式和管道式等<sup>[43]</sup>, 柱(罐)式反应器是基于传统微生物发酵罐, 增加光照用于细菌培养, 可以在有限占地面积上具有较高的培养体积, 其缺点为光化学转化效率低; 平板式反应器调光能力较

强并保证有效液层充分受光，气流速度容易得到控制，增强光能吸收转换并实现高密度的培养，其缺点为反应器通气和搅拌所消耗的能量高；管道式反应器密封性较好，容易与其他加工设备配套，整个过程可实现自动化，但反应器管径过于狭窄，存在一定技术障碍及限制因素。从理论上来讲，具有最高的光化学转化效率的生物反应器为平板式，其次为管道式和柱(罐)式。在实际研究中，光合细菌的光谱吸收范围窄，光能利用效率较差，只有当光能利用效率大于 10% 时光合生物产氢技术才具有生产意义。Zabut 等<sup>[44]</sup>混合 *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 和 *Halobacterium salinarum* 菌株并在 400 ml 水套式柱状光生物反应器中进行产氢实验，结果表明这种联合系统的产氢性能增强了 4 到 6 倍，搅拌可以同时增加总的产氢量和产氢速率，光能转化效率也从 0.6% 增加到 2.25%。Hoekema 等<sup>[45]</sup>组装了一种气动搅拌式平板光生物反应器来优化光合产氢。Modigell 等<sup>[46]</sup>针对在室外应用的生物反应器温度要求在 45 °C 和保证足够的太阳光和底物供应等问题设计出模块管式反应器，丙烯酸树脂组成的中空通道板连接于上下部以形成一种闭式循环，产生的氢气泡主要在反应器光照面上升，上升过程中产生的流体循环可以增强细菌底物供给、组件温度损耗和保护。该反应装置在有阳光的天气下产氢量达到 40 l/m<sup>2</sup>·d，对应太阳光的转化效率为 2% 左右。

在光合细菌制氢技术被得到广泛研究的同时，发现光合细菌的产氢速率一直偏低，这主要归因于低的细胞生长速率和低的光能利用效率，从而严重限制光合发酵过程的工业化应用。研究表明前者通过增加反应器单位体积的生物量停留时间可以增强产氢性能，而后者主要是通过生物反应器结构和光源来提高光能利用效率<sup>[47]</sup>，而提高细菌在反应器中停留时间的最有效方法为细胞固定化技术。

### 1.3.4 细胞固定化制氢技术及研究现状

细胞固定化技术是利用物理或化学手段将细菌和真菌(微生物)、或酶与固态不溶性载体相结合，将其限定于有限的空间区域内，使其保持生物活性，在适宜的条件下可以增殖并反复循环使用的一种基本技术<sup>[48]</sup>。细胞固定化技术是 20 世纪 60 年代基于固定化酶而发展起来的，Hattori 等人首次实现大肠杆菌的固定化。最初主要用于工业发酵如酒精、制药、氨基酸生产等。随着工业发展所带来的水环境污染日益严重，该技术逐步开始了在生物废水处理方面的研究。在固定细菌和固定酶过程中，都需要某种媒介来承担或完成固定，目前所应用的载体主要有三大类：无机类载体、有机类载体和生物类载体。在载体选择中通常需要考虑到载体的机械强度，物理形态，生物、化学及热力学稳定性，亲疏水性及表面电性，孔隙度及表面粗糙度，比重，对生物活性影响及经济性等因素。

与游离细胞相比，固定化细胞技术的优势在于<sup>[49, 50]</sup>：①载体为细菌生长提供充足的空间以保证生物反应器内较高的细胞浓度，加快反应速度；②细胞被载体

固定，不会产生大量流失现象；③分离纯化过程中菌体从发酵液中分离容易；④固定化细胞可长期重复使用，防止营养基质的浪费，并可实现连续操作和自动控制，从而提高整体利用效率。常用细胞固定化方法大致可以分成吸附法、包埋法、共价结合法和交联法四大类<sup>[51-53]</sup>：

①吸附法：依据带电的微生物细胞和载体之间的静电、表面张力和黏附力作用，使微生物细胞固定在载体表面和内部形成生物膜。根据载体特性可以分为物理吸附和离子交换吸附。物理吸附指通过物理作用将细胞吸附在不溶于水的载体表面并使其固定的方法，常用的载体有如活性炭、多孔玻璃、硅胶、沸石、石英砂和多孔砖等。离子吸附是指利用微生物细胞在解离状态下因静电引力而固着于带有相异电荷的离子交换剂上。常用的离子交换剂有 DEAE-纤维素、CM-纤维素等。吸附法操作过程简单、载体可再生重复利用、空间位阻小、反应过程温和且成本低，但由于是自然吸附在载体表面，其牢固性较差，当外界环境发生突变时，容易造成微生物从载体上脱落。固定化细胞的结合量以及生物活性受载体种类和表面积的影响较大。

②包埋法：利用高分子载体将细菌包埋于半透明的聚合体内，或使细胞扩散进入多孔性的载体内部，小分子底物及代谢产物可自由出入这种多孔或凝胶膜，而微生物不动。该方法对细胞的活性影响较小，成本低，操作简单，制作的固定化微球强度高，但传质阻力较大，对大分子底物和难降解底物不太适用。

③共价结合法：共价结合法是为克服吸附法和包埋法固定细胞的缺点而提出，是细胞表面上的功能团(如羧基、氨基和羟基等)和固相支撑物表面反应基团间形成的化学共价键相连接，从而实现细胞固定化的方法。该法固定的微生物与载体结合力较强且不易脱落，但由于固定过程中反应激烈，控制与操作都较复杂，因而限制了微生物活性。

④交联法：交联法是通过微生物与具有两个或者两个以上官能基团的试剂反应，使菌体相互连接成网状结构从而达到固定化菌体的目的。常见交联剂多为戊二醛、双重氮联苯胺等。交联法固定的细胞结合强度高，稳定性好，耐环境反应的变化能力强，但交联过程生化反应复杂，微生物活性有较大的损失，同时交联剂比较昂贵，限制了该方法的广泛应用。

在实际研究与应用工程中以吸附法和包埋法使用最多，Zhang 等<sup>[54]</sup>在两个厌氧流化床反应器中采用生物膜污泥和颗粒污泥法将葡萄糖转化为氢气的实验，并研究了水力停留时间和底物浓度对产氢的影响。Lee 等<sup>[55]</sup>采用自絮凝厌氧颗粒污泥进行产氢研究，在水力停留时间为 0.5 h 和进口蔗糖浓度为 20 g COD/L 时，反应器最优体积产氢速率接近 7.3 L/h/L，最大产氢得率为 3.03 mol H<sub>2</sub>/mol sucrose，气相氢含量和底物转化效率同样分别超过 40% 和 90%。Tian 等<sup>[56]</sup>采用包埋法将光合细

菌固定在 PVA-凝胶颗粒中，并研究了光照、流速、底物浓度、温度和 pH 对产氢的影响。

在光生物制氢反应器中，对光渗透和分布都有一定的要求，而采用包埋法固定细胞存在透光性差，包埋材料很难做到无色透明，影响光传输进固定化颗粒内部；基质扩散存在较大的传质阻力；固定化颗粒密度低，微生物包埋量为保证包埋效果而不能太大；颗粒的物理强度和化学稳定性较差，连续运行会导致颗粒被破坏、包埋剂化学毒性凸显等负面影响<sup>[57]</sup>。相比于包埋法，生物膜法应用于光生物制氢中具有：生物膜与底物直接接触，传质阻力小，便于有机物降解；固定生物量较多，反应器的单位容积生物量可达悬浮活性污泥法的 5-20 倍；微生物的活性高，无包埋颗粒中存在的包埋剂化学毒性；因无包埋材料的阻碍，透光性能比较好；易于实现自动化操作等优点<sup>[58, 59]</sup>。Fißler 等<sup>[60]</sup>将紫色非硫细菌 *Rhodopseudomonas palustris* DSM 131 固定在聚合体材料中，产氢速率是悬浮液产氢的 2 倍。Chang 等<sup>[39]</sup>向光生物制氢反应器中加入了少量的固体载体添加物(活性碳，硅胶和粘土)以刺激细胞生长和产氢，结果表明粘土和硅胶添加物为有效提高产氢的方法，其产氢速率和得率分别提高 67.2-50.9% 和 37.2-32.5%。使用粘土添加物的序批式培养基中，最优醋酸浓度为 1000 mg COD/l，产氢速率和得率分别为 28.5 ml/h/l 和 2.97 mol H<sub>2</sub>/mol acetate。此外当联合内置光纤和粘土添加物时，产氢速率和得率分别达到 43.8 ml/h/l 和 3.63 mol H<sub>2</sub>/mol acetate。明显高于相关研究所报道的结果。Yokoi 等人<sup>[61]</sup>利用包埋法和表面吸附法将 *Enterobacter aerogenes* strain HO-39 固定在琼脂凝胶或多孔玻璃球上面进行产氢实验，实验结果表明固定化技术能够有效提高其产氢性能。在无 pH 控制的连续流下，固定在多孔玻璃球表面的生物膜柱状反应器的产氢速率和得率都较固定于琼脂凝胶内的搅拌反应器的产氢性能高，其产氢速率达到 850 ml/(L·h) (HRT = 1 h)。Tian 等<sup>[62]</sup>在填充床中将光合细菌以生物膜方式固定在玻璃珠上并发现产氢速率和光能转换效率分别增加到 1.74 mmol/l/h 和 56%。

生物膜法作为一种有效的细胞固定化技术在生物制氢工程中得到广泛应用，其产氢原理是工业废水中的有机物质通过扩散作用进入附着生长在载体表面的生物膜内，然后在生物膜内的微生物作用下将有机污染物分解代谢并产生氢气，同时生物膜吸收营养并得到生长。作为产氢主体的生物膜，其形成、结构特征及其动力学特性在该过程中起着至关重要的作用。

## 1.4 生物膜生长模型研究现状

微生物细胞能在水环境中的任何合适载体表面吸附并生长繁殖，由细胞向外分泌的胞外聚合物质(EPS)使细胞间形成纤维状的缠结结构，从而形成生物膜，这

种结构通常是菌体在逆环境条件如营养匮乏、微生物抑制等下产生，具有很强的抗逆性<sup>[63]</sup>。由此可见生物膜是由固定在附着生长载体上的并经常镶嵌在有机多聚物结构中的细胞所组成。自然环境中，微生物 90% 以上以生物膜形式存在，一方面它可清洁污水，黏附杂质，可作为污水处理的优良载体，还可进行污染土壤的修复，利用产氢细菌生物膜反应器产生清洁能源氢气；另一方面，致病细菌也可直接在人体器官的表面形成生物膜，从而导致一系列的感染并发症。因此生物膜研究一直是微生物、医学、环境及工程科学领域的热点。

生物膜形成是一个包括细菌初始粘附、生物膜粘附期、生长期、成熟期和播散期等阶段的一个动态过程<sup>[64]</sup>：

(1) 生物膜粘附期：游动细菌首先粘附到载体表面，启动载体表面生物膜形成。单个附着细胞仅由少量 EPS 包裹，大多数细菌还可以重新进入浮游状态，此时的粘附具有可逆性；

(2) 生物膜生长期：细菌粘附到载体表面后，调整基因表达，在生长繁殖的同时分泌大量的 EPS，此时对表面的粘附发展具有不可逆性。细菌间的粘结逐渐形成细菌团块即微菌落，大量微菌落的不断堆积使生物膜向厚度方向延伸；

(3) 生物膜成熟期：细菌生物膜在经历不可逆粘附后进入成熟期，成熟的生物膜具有高度的组织结构；

(4) 生物膜脱落期：生物膜一般都存在于流动的液体环境中，流动引起的剪切力对生物膜结构产生重要影响。成熟的生物膜通过蔓延、部分脱落释放出游动细菌等方式进行扩展，从生物膜中脱落或释放出来的细菌重新变成浮游生长的细菌，它们又可在载体其他表面形成新的生物膜或者随液体排出。

生物膜反应器中生物膜的形成实质就是微生物的生长，因此凡是影响微生物生长和代谢的因素都会对生物膜结构形态及功能特性产生不同的影响。研究表明影响水环境中生物膜形成最主要的因素为水文条件、载体类型、营养水平和光照等<sup>[65]</sup>。

最初的模型将生物膜考虑为层状稳定态，包含单一或多种类的微生物膜，并由一维的质量传输和生化转化方程控制，这些层状的动态模型并不能反映实验观察得到的结构异质性特征。随着显微镜技术(如共聚焦扫描激光显微镜(CSLM))的发展与应用，可以真实观察到水环境中生物膜呈蘑菇状或郁金香状突出物，这主要取决于生物膜在何种环境下生长<sup>[65]</sup>。Wimpenny<sup>[66]</sup>等总结了细菌生物膜结构的研究文献后，提出至少存在三种模型：水通道型生物膜、异质镶嵌型生物膜和致密型生物膜。他们认为在考虑不同生长环境时，这三种模型在较宽范围的基质浓度下都是正确的。目前，常用于模拟生物膜中微生物动力学行为和微结构的动力学方法为元胞自动机模型，它结合描述生物膜内传质和反应微分方程进行计算，以

研究环境参数对生物膜结构、形态和功能的影响。

元胞自动机是定义在一个具有离散、有限状态的元胞空间中，按照一定局部规则，在离散的时间维上进行演化的动力学系统。最早于 20 世纪 60 年代由 Von Neumann 等人提出，用于模拟生物系统中自组织和自复制现象的一种模型。1992 年，Colasanti 等<sup>[67]</sup>首次将元胞自动机模型作为数学方法引入生物膜模拟中以表征其异质性。Hermanowicz<sup>[68]</sup>定义了单个元胞生长和脱离规则的元胞自动机模型，结果发现水力边界层厚度和浓度边界层厚度对生物膜结构有重要的影响，当外部传质阻力存在明显限制时，生物膜生长为一种开放式结构；当浓度边界层减薄而外部传质得到增强时，生物膜发展为一种致密生物膜。Picioreanu<sup>[69]</sup>等用可溶解性成分代表连续场(如底物)，底物的空间分布利用反应-扩散质量平衡方程计算，单个元胞中的生物量密度采用底物限制性生长方程，利用元胞自动机规则定义生物量的扩散和分布。模拟得到的包埋颗粒内底物和生物量浓度分布与实际吻合较好，此外使用这种离散扩散规则可以预测在不同底物和接种密度下微生物的二维或三维分布。Laspidou 和 Rittmann<sup>[70]</sup>建立了包括非活性/死亡物质、活性物质和胞外聚合物质等在内的统一多组分元胞自动机模型以研究生物膜密度和形态，并将模拟结果与实验进行了比较。国内对于生物膜生长的研究较少，艾建宇等<sup>[71]</sup>基于代谢产物对杆菌繁殖的影响，定义扩散速率、繁殖扩散时间比率和代谢产物对繁殖的抑制系数，计算了杆菌代谢产物对二维杆菌自身繁殖及形态的影响，结果显示杆菌菌落内部趋于平衡和稳定，而边缘高度不平衡。李天成等<sup>[72]</sup>利用离散-差分法动态模拟二维空间中底物传输，生物膜形成及发展，建立扩散反应方程式和细菌分裂增殖的规则，并定义描述生物膜特征参数的厚度、密度和孔隙率，研究了生长时间和微生物接种量对生物膜微结构和形态的影响。赵峰等<sup>[73]</sup>在应用元胞自动机方法上建立的单细胞及其行为到细胞之间、细胞与胞外环境相互作用生物模式的模型基础上，考虑了营养物质和代谢产物对细胞繁殖的影响，模拟了菌落生长的分形结构。

## 1.5 课题研究内容及意义

### 1.5.1 课题意义及研究目的

以上文献研究可以看出，产氢光合细菌在环境治理和新能源开发中具有独特的优势。以往对光合细菌产氢的研究则主要集中在产氢机理、工艺操作条件、高产氢菌种筛选和光生物反应器设计等方面。目前光合细菌产氢技术还处于实验室研究阶段，要应用于工业中最突出的问题是产氢性能和光能利用效率还不能与暗发酵系统相比。因而将细胞固定化技术应用于光生物制氢中可增强细菌在反应器中停留时间，从而提高产氢量。同时，生物膜内部是一种多孔介质结构，底物和

代谢产物传输、细菌生长和光能传输都会严重受到生物膜微结构的影响。在已有的生物膜法生物制氢实验研究中，大多数都只是在任意一种条件下形成生物膜后，进而研究其产氢特性，但实际上不同的成膜条件可能影响生物膜中细菌的生长和形成，导致生物膜结构的差异，从而影响生物膜内底物和产物的传输特性。此外，尽管有多篇文献分别研究了不同环境参数对生物膜生长结构的影响和基于生物膜法的生物产氢系统，将二者结合考虑不同条件下形成的生物膜结构在产氢特性方面的差异还鲜有报道。采用生物膜内传质和反应的微分方程，细菌扩展和分布的元胞自动机模型对生物膜形态和结构的模拟得到了广泛的应用，但其模拟对象一般都为好氧硝化细菌，对光合细菌生物膜生长和结构的模拟还很少。而且元胞自动机模型对生物膜生长作了很多假设，实际水环境中的生物膜生长却相当复杂。模拟得到的生物膜结构与实验观察还有相当的差距。

本文主要针对不同环境条件形成的光合细菌生物膜结构及其产氢性能，采用平板式光生物制氢反应器，研究不同光照波长、光照强度、底物浓度和流速对生物膜形态和结构的影响，进而研究特定结构的生物膜对底物传输消耗和光能利用效率的影响。利用实验得到的光合细菌生长动力学参数，建立光合细菌在固体基质表面生长成膜的元胞自动机模型。揭示不同条件对光合细菌在固体基质表面上的吸附及生长过程过程中结构的改变，进而为光合细菌生物膜反应器的挂膜启动提供理论依据，进一步推广生物膜法在光生物制氢技术中的应用。

### 1.5.2 本文研究内容

设计并搭建平板式光生物制氢反应系统，研究不同光照强度、光照波长、流速和底物浓度条件对启动阶段生物膜的形态和微结构的影响。对每种条件下形成的成熟生物膜进行稳态条件下产氢性能研究，比较不同结构的生物膜对底物/产物传输和光能利用效率情况，得到最优产氢性能下的光合细菌生物膜启动条件。

利用前期实验结果拟合的光照条件、pH和温度对光合细胞沼泽红假单胞菌的最大比生长速率的关联式，建立固体基质表面光合细菌生物膜生长的元胞自动机模型，计算不同参数条件下生物膜生长过程中特征参数的变化。



## 2 平板式光生物膜制氢反应器光合细菌成膜及产氢特性

### 2.1 引言

目前光生物制氢技术主要是采用序批式或连续流悬浮液的纯菌种发酵方式, 但该方式反应器细菌持有量较低, 难以最大限度地发挥产氢菌的产氢能力, 因而很难实现生物反应器的规模化实际应用。采用细胞固定化技术可以使反应器中的生物量得到提高, 使单位反应器的比产氢速率和运行稳定性得以改善。生物膜法技术使产氢细菌直接与底物接触, 大大减少了传输阻力, 增强了光能在生物膜内部的渗透, 反应器空间利用率高, 从而提高了生物持有量和微生物活性。

在典型的生物膜反应器中, 大空间流体中的营养物质通过扩散作用经生物膜内部多孔通道到达活性细胞表面供其生长繁殖, 而光合细菌生长代谢的产物则反向扩散进入大空间流体中。由此可见生物膜结构对底物-产物的质量传输有着重要影响, 并进而影响光生物制氢反应器的总体性能。过去几十年对生物膜和其他微生物过程的研究表明许多物理(水力条件、质量传递、脱落、基质类型和颗粒物质等)、生物(细胞生理学、微生物群种和胞外聚合物(EPS)等)和化学(底物浓度, 物化环境, 底物种类和营养等)因素都会影响细菌吸附生长并产生不同的生物膜结构<sup>[74]</sup>。尽管先前有关于不同环境因素对生物膜结构影响的实验和模型研究, 但对光合细菌生物膜的生长和微结构研究目前还尚未见文献报道。光合细菌生长和产氢强烈地依赖光照波长和强度, 每种类型的光合细菌在一定的光波长范围内都有不同的光能吸收能力, 因而产生不同的光能利用效率。光照强度的增加可以提高固氮酶的活性和能量水平, 为光合细菌生长和产氢反应提供更多的能量和激发电子, 提高光合细菌新陈代谢和产氢性能。但当光照强度超过一定限值后, 光和色素天线系统吸收过多的能量而引起光合系统 I 的过量激发, 导致光合效率降低, 生长和产氢都会受到抑制。此外, 研究表明在不同流速和底物浓度条件下生长的生物膜内部的有效扩散系数有一定的差异, 生物膜表面平均相对有效扩散系数在高底物浓度和低流速下较高, 且受浓度的影响大于流速的影响<sup>[75]</sup>。Wäsche 等<sup>[76]</sup>在管式反应器中培养了不同底物和水力条件下的异养生物膜, 其结果表明这两个因素显著地影响生物膜结构、密度、厚度和底物转化率。因而光合细菌生物膜的生长和结构同样会受到底物和水力条件的影响。为研究光照条件对光合细菌生物膜生长形态、微结构及产氢性能的影响, 本文设计了平板式光生物反应器, 研究在启动期光照、水力和营养条件对生物膜成膜特性和微结构的影响, 并对不同微结构的成熟生物膜在稳定期的产氢性能进行研究。

## 2.2 平板式光生物制氢反应器的设计

光合细菌的生长和产氢都需要在较好的光照环境下进行，因而要求反应器具有较好的透光性能，以方便光照的接收和传输并保证反应器内部均匀的光分布。本实验采用热稳定性、刚性和硬度较好的聚甲基丙烯酸酯(有机玻璃)作为反应器主体材料。为便于生物膜结构观察和实现产氢的实验进行，构建了两种类型的平板式光生物制氢反应器，选取载玻片作为光合细菌吸附和生长的固体载体表面(如图2.1所示)。在生物膜结构观察实验中，反应器设置了两个流道，每个流道由载玻片通过有机玻璃板以螺栓联接的方式密封，同样便于对光合细菌生物膜样本的生长特性参数测量和结构观察，每个流道的流动横截面积为 $18\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ ，反应器体积为 $9,000\text{ mm}^3$ ；在实现产氢的实验中，为了增加产氢性能测试的准确性，将平板反应器的载玻片扩大为 $72\text{ mm} \times 100\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ ，对应流动横截面积为 $72\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ ，反应器体积为 $72,000\text{ mm}^3$ 。为使反应器内部获得均匀的流动场，在这两种类型的反应器进口处设置了由玻璃珠(直径为4 mm)和均流板组成的均流装置，在产氢反应器上部开口以利于废液和生物气的排出。

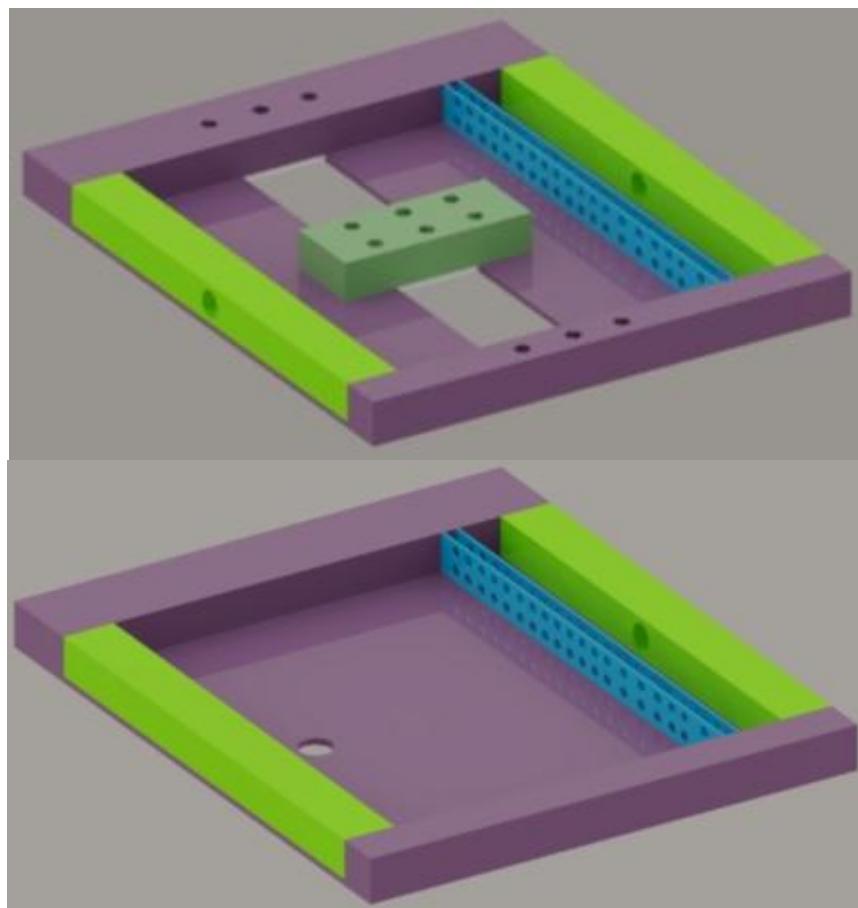


图2.1 平板式光生物制氢反应器结构图

Fig. 2.1 The structure of the flat-panel photobioreactor for hydrogen production

## 2.3 实验方法和材料

### 2.3.1 菌种及培养基

实验室所用光合细菌菌种来源于重庆大学工程热物理研究所前期从污水沟淤泥筛选、纯化并经鉴定的沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris* CQK-Z 01)<sup>[77]</sup>(Fig. 2.2)。细菌培养期间所使用的培养基配方为(单位: g/L):  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.001;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1.006;  $\text{CaCl}_2$  0.01;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0417;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.544;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2;  $\text{NaCl}$  0.2; 谷氨酸钠 0.5;  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  1.677; 酵母膏 1.0; 生长因子(包括维生素 H 1 g/L; 盐酸毗多辛 1 g/L; 核黄素 1 g/L; 盐酸硫胺素 1 g/L; 尼克酸 1 g/L) 1 mL/L。用电子天平称取培养基配方和用于生物膜特征参数测量的载玻片重量, 对培养基和实验设备灭菌后, 按 1:10 的体积比将光合细菌接种到培养基中, 放入光照培养箱进行培养。在光合细菌前期培养中, 使用葡萄糖作为有机碳源, 其浓度为 9.9 g/L。并在温度为 30 °C 和光照强度为 4000 lx 的 LED 灯条件下进行厌氧扩大培养至对数生长期, 使用氩气产生厌氧环境。培养基初始 pH 值由 0.1 M HCl 和 0.1 M NaOH 调整为 7.0 左右。

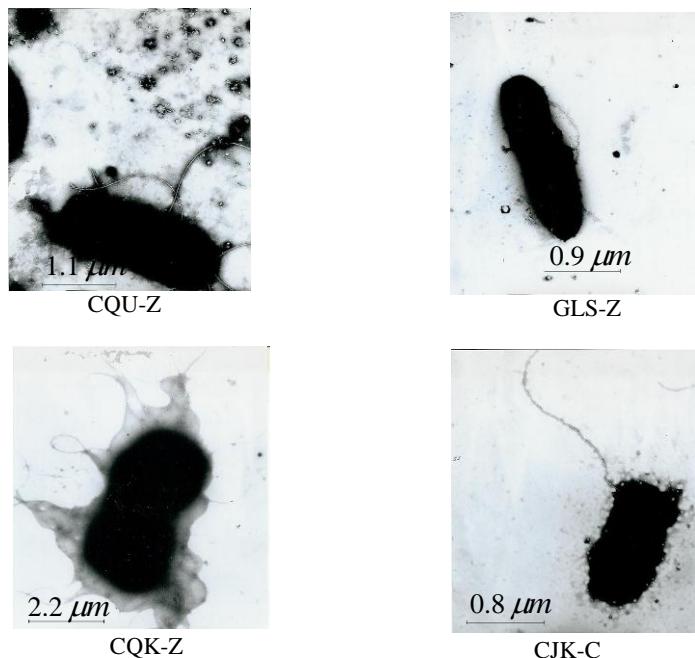


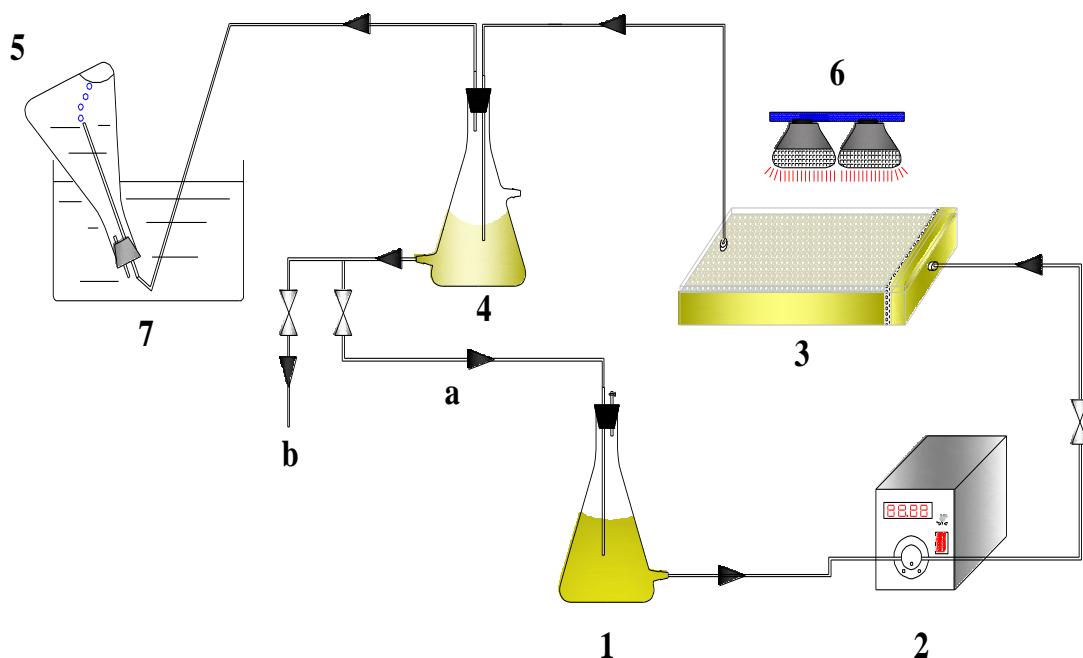
图 2.2 光合细菌菌株的电镜负染色照片

Fig. 2.2 Electron micrograph of PSB by negative dyeing

### 2.3.2 实验装置系统

生物膜光生物制氢反应器实验系统如图 2.3 所示, 整个系统包括储液瓶、蠕动泵、平板光生物反应器、气液分离瓶、LED 光源、收集瓶及若干连接实验系统的

硅胶管。有机底物通过蠕动泵流入反应器主体，在外置光源单面照射下有机底物与光合细菌进行复杂的光生化反应，降解后的废水和生物气( $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2$ )通过气液分离瓶进行分离，有机废物根据不同实验阶段流入储液瓶或直接排出，生物气进入收集瓶。在一定的间隔时间内抽取集气瓶内的气体采用气相色谱仪检测氢气的含量，同时在出液口取少量有机废液样品测量葡萄糖浓度。在整个实验过程中，除了接收外置光源光照表面外，反应器和连接实验系统的所有硅胶管都用铝箔包裹以减少光的损失和对实验结果的干扰。



1. 储液瓶 2. 蠕动泵 3. 平板生物反应器 4. 气液分离器 5. 集气瓶 6. 光源 7. 水槽

a.启动期 b.稳定运行期

图 2.3 实验装置示意图

Fig. 2.3 Schematic of the experimental setup

开始实验时，菌悬液通过蠕动泵泵入实验系统，为维持厌氧环境，反应器和硅胶管充满底物溶液并在储液瓶和气液分离瓶上部注入氩气。实验分为两个阶段：启动期和稳定运行期。在启动期，系统采用闭式循环以减少活性光合细菌的流失。每隔 24 h 用 250 ml 新鲜灭菌的培养基更换储液瓶中的溶液，直到生物膜成熟。当反应器出口底物转化率和生物量浓度在 24 h 内的偏差小于 5% 时，认为此时生物膜达到稳定期。在稳定期，系统采用开式循环，排水法收集气体测量产氢速率。此外，在实验开始前，用福尔马林溶液对反应器灭菌 15 分钟左右，用高压灭菌锅对硅胶管和储液瓶进行灭菌处理(压力维持在 0.10-0.15 MPa 之间 10-15 分钟)。

为研究光照、水力和营养条件对生物膜成膜及产氢特性的影响, 实验启动期中采用四种单色 LED 光源(630、590、520 和 470 nm), 光照强度为 1000、5000 和 8000 lx, 反应器进口溶液流量为 38、228 和 1080 ml/h, 及反应器进口底物浓度为 3、60 和 110 mmol/l 下形成生物膜。在特定条件下形成的生物膜通过改变运行操作参数(光照强度、光照波长、流量和底物浓度)测试产氢性能, 揭示光合细菌生物膜成膜结构与产氢性能间的关系。整个实验中维持光生物反应器内底物温度为 30 °C。

### 2.3.3 产氢性能评价指标

光生物反应器的连续产氢性能采用平均产氢速率、产氢得率和光能转化效率进行评价, 各参数定义如下:

$$\text{平均产氢速率}(HPR) = \frac{\text{产氢总量}(mmol)}{\text{氢气收集时间}(h) \times \text{光照面积}(m^2)} \quad (2.1)$$

$$\text{产氢得率}(HY) = \frac{\text{产氢总量}(mmol)}{\text{底物消耗总量}(mmol)} \quad (2.2)$$

$$\begin{aligned} \text{光能转化效率}(LCE) &= \frac{\text{产氢总量}(g) \times \text{氢气能量值}(J/g)}{\text{输入光能值}(J)} \times 100 \\ &= \frac{33.61 \times \rho_{H_2} \times V_{H_2}}{I \times A \times t} \times 100 \end{aligned} \quad (2.3)$$

其中  $V_{H_2}$  为产生的氢气体积(l),  $\rho_{H_2}$  为氢气密度(g/l),  $I$  为光照强度(W/m<sup>2</sup>),  $A$  为照射面积(m<sup>2</sup>),  $t$  为产氢时间(h)。

### 2.3.4 分析与检测方法

培养基成分采用 Sartorius BP114 型(德国)电子分析天平进行称量; 光合细菌培养采用 PGX-300B 型多段可编程光照培养箱(宁波江南仪器有限公司); pH 值采用 Ecoscan-pH6 型酸度计(新加坡)进行测量; 光照强度采用 ST-85 型自动量程照度计(北京师范大学光电仪器厂)进行测量。氢气浓度采用 SC-2000 气相色谱仪(四川仪表九厂)进行测量, 色谱柱填料为苯乙烯高分子多孔性小球, 柱长为 2 m, 载气为氩气, 流量为 25 mL/min, 采用 TCD 检测器, 电流为 80 mA, 柱箱、气化室和检测室温度分别为 55、100 和 100 °C。实验前, 先用气相色谱仪对配置好的标准氢气浓度气体进行测量, 在气相色谱工作站中绘制标准浓度曲线, 实验数据采用面积外标法进行处理。葡萄糖测量采用 3, 5-二硝基水杨酸试剂法(用适量的去离子水稀释)进行测量, 并用 UV-VIS 分光光度计(756MC, 上海)于 540 nm 波长处测量光密度。

光合细菌生物膜形态和微结构使用扫描电子显微镜(HITACHI S-3400N)分析。生物膜样品的预处理步骤如下: 首先从载玻片表面取生物膜进行取样, 并将样品浸泡在含有 2.5% 戊二醛(pH 7.2-7.4)的磷酸缓冲液(PBS)中直至固定在固体基质上,

时间为 30 min；然后在磷酸缓冲液中对用戊二醛固定的样品进行  $\text{OsO}_4$  注入，接着用相同的缓冲液进行冲洗。固定的样品用一系列的乙醇溶液(30, 50, 70, 80, 90 和 100%)进行梯度脱水，再用叔丁醇对样品进行置换干燥，并在样品表面镀一薄层金粉。处理后的生物膜样品在次级电镜模式下使用高真空的 SEM 下进行观察。

生物膜干重称量采用如下程序：用蒸馏水对吸附在载玻片上的成熟生物膜轻轻冲洗以去除尚未完全固定的生物量，然后放置于 105 ℃ 的烘箱内烘干至恒重，生物膜干重等于含有生物膜的载玻片重量与载玻片的重量之差，再将生物膜绝对干重换算为单位载体表面所吸附的生物量；生物膜厚度采用相差显微镜法<sup>[78]</sup>：将吸附有生物膜的载玻片置于显微镜载物台上并固定，采用 10 倍物镜对生物膜表面对焦，记录此时显微镜微调读数，再通过微调钮调整物镜对载玻片表面对焦，记录此时微调钮读数。两次成像的微调刻度数之差即为所测生物膜厚度，最终厚度值为测量 10 次之后所取的平均值。

## 2.4 实验结果及讨论

### 2.4.1 光照强度对光合细菌生物膜微结构及产氢性能的影响

为研究在启动期光照强度对光合细菌生物膜的形态和微结构以及产氢性能的影响，光合细菌在 1000、5000 和 8000 lx 三种光照强度( $I_s$ )下固定于载玻片上，光照波长( $\lambda_s=590 \text{ nm}$ )、流量( $V_s=228 \text{ ml/h}$ )和进口底物浓度( $C_s=60 \text{ mmol/l}$ )保持为常数。待生物膜形成稳定后，对光生物反应器在不同光照强度、光照波长、进口流量和底物浓度条件下进行连续产氢性能实验。

#### ①生物膜的形成及微结构

如上所述，使用 SEM 观察在载玻片表面形成的光合细菌生物膜形态和微结构。不同光照强度下形成的生物膜 SEM 图片如图 2.4 所示，其中照片的放大倍数分别为 2000(左)和 6000(右)倍。由图可以看出在光照强度为 1000、5000 和 8000 lx 下生物膜中的光合细菌主要形态为短杆状，也有少量的长杆细菌随机聚集在一起。细菌长度和宽度在光照强度为 1000 lx 下分别为 2.0-2.5  $\mu\text{m}$  和 0.5-0.7  $\mu\text{m}$ ，5000 lx 下分别为 3.5-4.5  $\mu\text{m}$  和 1.2-1.5  $\mu\text{m}$ ，8000 lx 下分别为 3.0-4.0  $\mu\text{m}$  和 0.5-0.8  $\mu\text{m}$ 。此外，在三种条件下的 SEM 图中都可以观察到具有粘性的胞外聚合物质(EPS)。水环境中许多细菌吸附到固体表面都是由 EPS 来调节，EPS 通过连结细胞形成一种复杂结构并包裹在有机载体和代谢产物中来增强生物膜的继续发展<sup>[79]</sup>。对比三种光照强度条件下的 SEM 图可知，在光照强度为 8000 lx 下形成的光合细菌生物膜中 EPS 含量显著高于 1000 和 5000 lx 条件下的 EPS 含量。此外，在生物膜中的细菌和 EPS 之间分布着不规则的孔隙，从而为底物和代谢产物传输，以及光渗透提供了通道。较高的 EPS 含量会增加细菌间的紧密连结，但同时会导致生物膜的孔隙

## 2 平板式光生物制氢反应器光合细菌成膜及产氢特性

率下降，这也就增加了底物和产物的传输阻力。

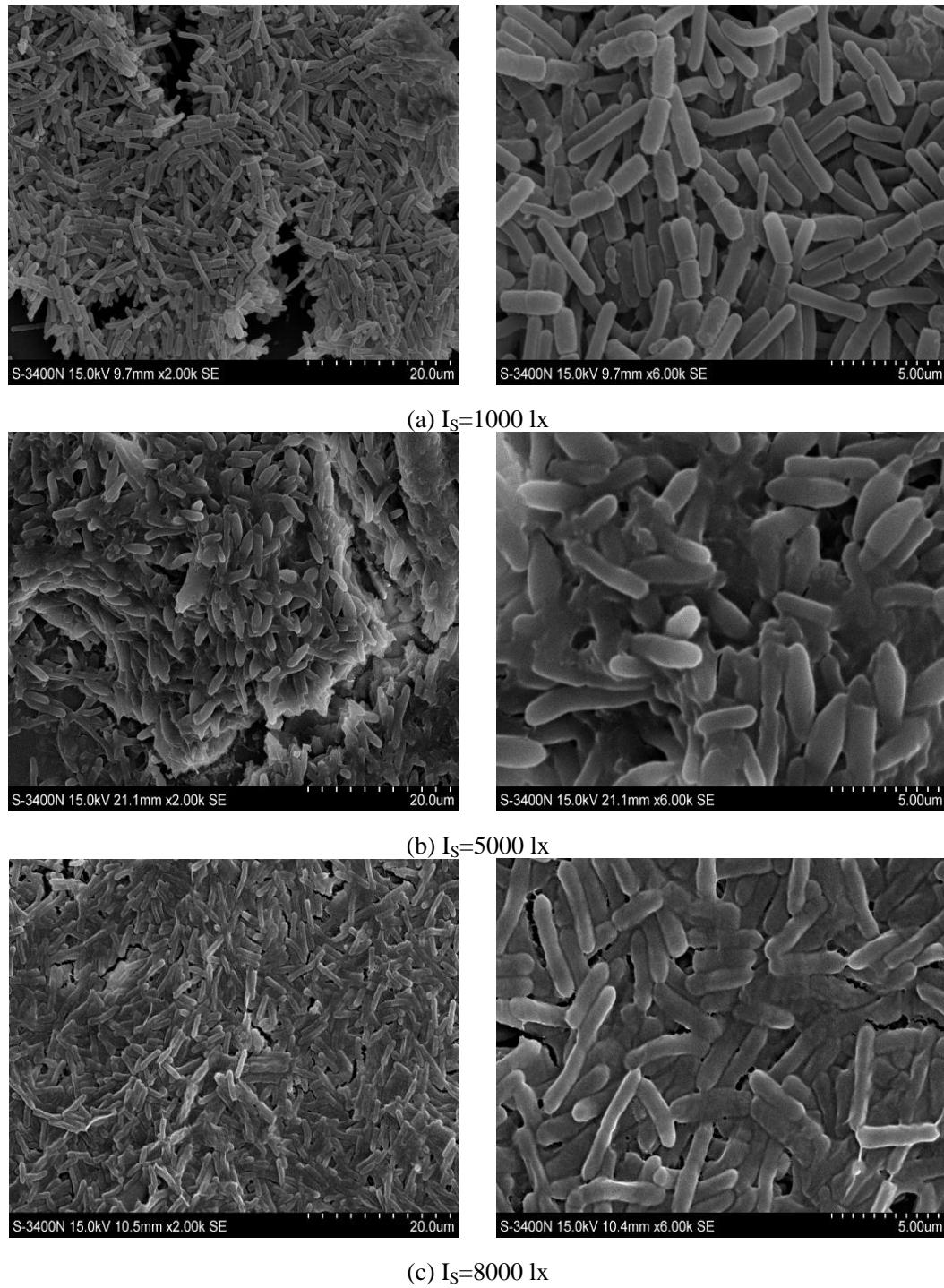


图 2.4 *R. palustris* CQK 01 生物膜扫描电子显微图片(左: 2000 $\times$ ; 右: 6000 $\times$ )

Fig. 2.4 Scanning electron micrographs of *R. palustris* CQK 01 biofilms  
(Left: 2000 $\times$ ; Right: 6000 $\times$ )

本文所用的 *R. palustris* CQK 01 单个细菌的形态随着光照强度的提高随之变

大，在5000 lx 的光照强度下生长的光合细菌明显比1000 lx 光照强度条件下的细菌。当超过5000 lx 的光照强度后，随着光照强度的继续增加，细菌形态反而变小，说明该细菌生长的光饱和点在5000 lx 左右，这与Sasikala<sup>[27]</sup>等指出紫色非硫光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 光合产氢过程的光饱和点为5000 lx 左右相一致。因此，光合细菌的活性随着光照强度的增强而增加，直到光照强度达到5000 lx；过高的光照强度将对光合色素产生抑制作用，从而降低光合细菌生物膜在厌氧条件下的光合生长能力。众所周知，生物膜基质中的细菌具有连续适应变化的能力，以保证在不同变化环境中的生长。所以8000 lx 光照强度下形成的光合细菌生物膜产生更多的EPS 用于保护细菌免受外界条件的恶化，而光合细菌的形态由于细菌活性的限制而降低。

不同光照强度条件下形成的生物膜干重和厚度如图2.5所示。生物膜干重先随光照强度的增加而增加，在光照强度为5000 lx 时达到最大值为0.915 mg/cm<sup>2</sup>，然后下降。生物膜厚度随着光照强度的增加而单调地减小，其厚度在光照强度为1000 lx 时最大为22.2  $\mu\text{m}$ 。

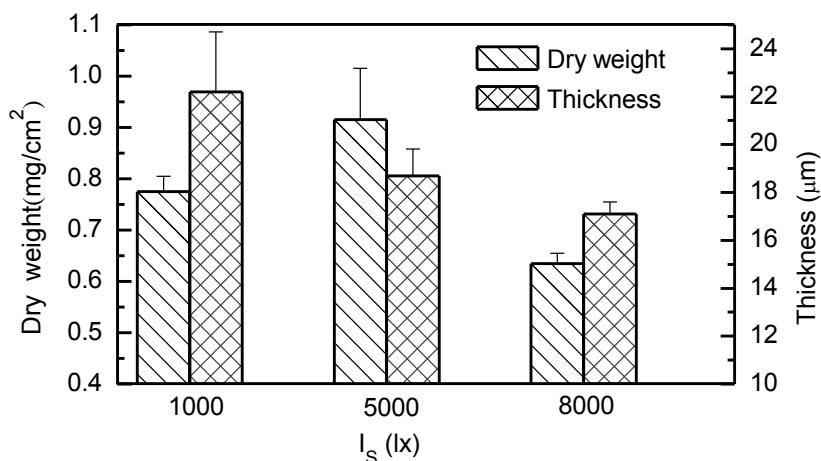


图 2.5 光照强度对 *R. palustris* CQK 01 生物膜干重和厚度的影响

Fig. 2.5 Effect of illumination intensity on dry weight and thickness of *R. palustris* CQK 01 biofilm

## ②生物膜产氢性能

光合细菌产氢不仅受到细菌生物量的影响，而且还受到生物膜的微生物结构影响，这种影响是通过影响光渗透，底物和产物的传输来表现。因此，为探讨不同生物膜结构在各操作参数下的产氢特性，本文就研究光照强度为1000、5000 和8000 lx 下形成具有不同微结构的生物膜产氢性能，并讨论成膜结构对光合细菌生物膜反应器的产氢性能影响。

运行时光照波长对不同微结构光合细菌生物膜产氢性能的影响如图2.6-2.8 所

示。由图可知, 不同微结构的生物膜的产氢速率、产氢得率和光能转化效率均先随着光照波长从 470 nm 增加到 590 nm 而持续增加, 当光波长继续增加到 630 nm 时, 反而下降。由此表明这三种生物膜在光波长为 590 nm 时具有最大的产氢性能。不同光合细菌内含有的色素种类有一定差异, 从而对不同波长段的光吸收具有选择性。通过对本实验所用光合细菌菌种 *R. palustris* CQK 01 进行光谱吸收特性扫描<sup>[62]</sup>(如图 2.9 所示), 发现该菌种的光谱吸收在光波长为 319、379、470、498、529、590、806 和 863 nm 处出现吸收峰, 波长为 590、806 和 863 nm 处的吸收峰表明该菌种中含有细菌叶绿素  $\alpha$ (Bacteriochlorophyll  $\alpha$ ), 而波长为 319、379 和 470 nm 处的吸收峰表明该菌种中含有类胡萝卜素(spheroidene carotenoid)<sup>[80]</sup>。在本实验中, 光波长对应的最大产氢性能与细菌在 590 nm 处出现的吸收峰相一致, 说明在此光波长下光能可以充分的被细菌叶绿素  $\alpha$  吸收, 用于增强光合细菌的活性进行 ATP 能量合成和产氢活动。

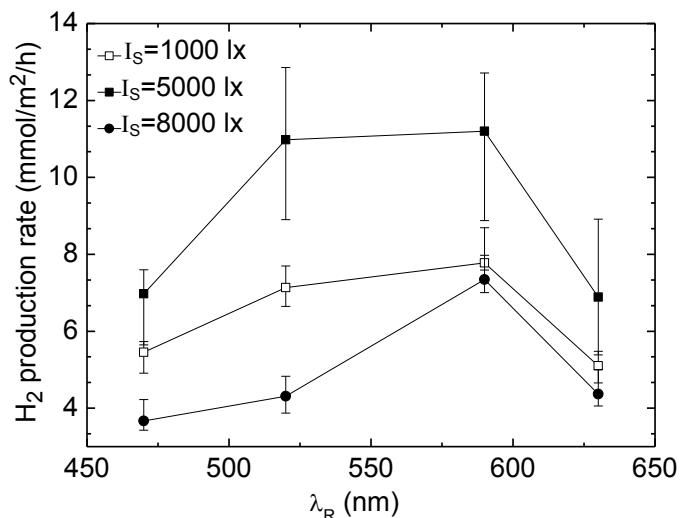


图 2.6 光照波长  $\lambda_R$  对不同光照强度下形成的生物膜产氢速率的影响( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,

$C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.6 Effect of illumination wavelength  $\lambda_R$  on average  $H_2$  production rate of biofilm formed under different illumination intensities ( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

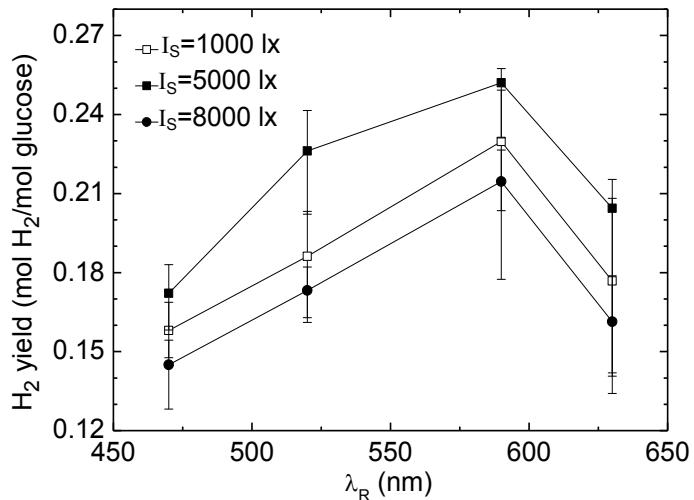


图 2.7 光照波长  $\lambda_R$  对不同光照强度下形成的生物膜产氢得率的影响( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.7 Effect of illumination wavelength  $\lambda_R$  on  $H_2$  yield of biofilm formed under different illumination intensities ( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

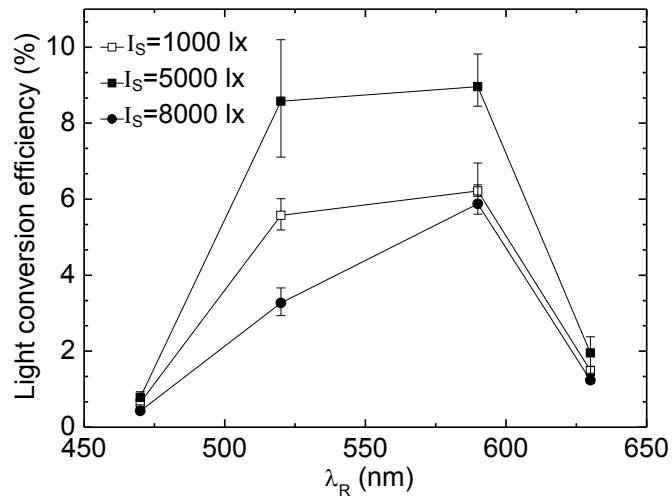
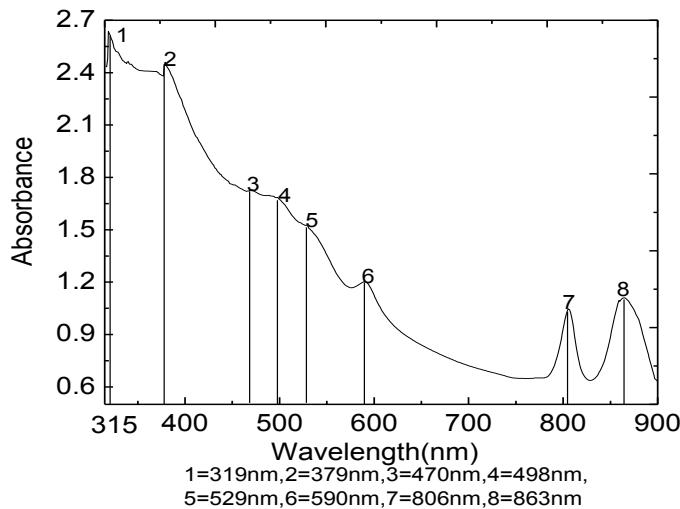


图 2.8 光照波长  $\lambda_R$  对不同光照强度下形成的生物膜光能转化效率的影响( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.8 Effect of illumination wavelength  $\lambda_R$  on light conversion efficiency of biofilm formed under different illumination intensities ( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

图 2.9 菌种 *Rhodoseudomonas palustris* CQK 01 的吸收光谱特性Fig. 2.9 Absorption spectrum of intact cells of *Rhodoseudomonas palustris* CQK 01

由图 2.6-2.8 同样可以看出, 5000 lx 光照强度下形成的生物膜在光照波长 470-630 nm 范围内具有最佳的产氢性能, 这一方面是由于在该条件下形成的生物膜具有最高的生物量, 也即最高的干重, 从而导致具有最高的产氢速率。另一方面, 在 5000 lx 下形成的生物膜具有较大的光合细菌细胞形态, 相对较大的孔隙率(图 2.4)和较薄的生物膜厚度(图 2.5), 这都将有利于增强光合细菌新陈代谢能力, 底物及代谢产物的传输和光能渗透。在 5000 lx 光照强度下形成的生物膜所获得的最大产氢速率, 得率和光能转化效率分别为  $11.2 \text{ mmol/m}^2/\text{h}$ 、 $0.25 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$  和 8.9%。此外, 1000 lx 光照强度下形成的生物膜比 8000 lx 光照强度下形成的生物膜具有更高的生物量和孔隙率, 因而其产氢性能高于 8000 lx 光照强度下的生物膜。

运行时光照强度对不同微结构的生物膜产氢速率、产氢得率和光能转化效率的影响如图 2.10-2.12 所示。当光照强度低于 5000 lx 时, 不同微结构的生物膜产氢速率和产氢得率随着光照强度的增加而连续增加; 当光照强度超过 5000 lx 后, 进一步增加光照强度将导致产氢速率和得率的降低。这是由于在低光照强度下, 细菌活性所需光能供应不足, 主要以葡萄糖发酵类型进行代谢, 光作为限制性条件, ATP 合成量随光能供应增加而逐步增加, 因而产氢速率和得率随光照强度增加而增加。当光照强度增加到 5000 lx 以上时, 光和色素的合成下降, 并导致在厌氧条件下细菌的光合异养生长能力下降, 光作为抑制性条件, 使得产氢速率和得率降低, 这与光合细菌产氢的光饱和点为 5000 lx 左右相一致。

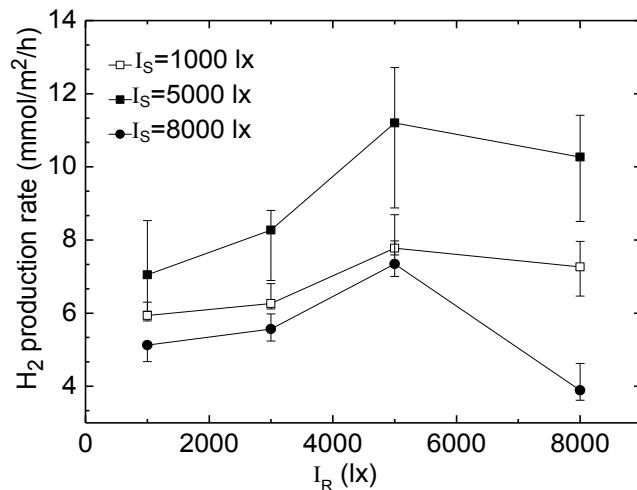


图 2.10 光照强度  $I_R$  对不同光照强度下形成的生物膜产氢速率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.10 Effect of illumination intensity  $I_R$  on average  $H_2$  production rate of biofilm formed under different illumination intensities ( $\lambda_R=590$  nm,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

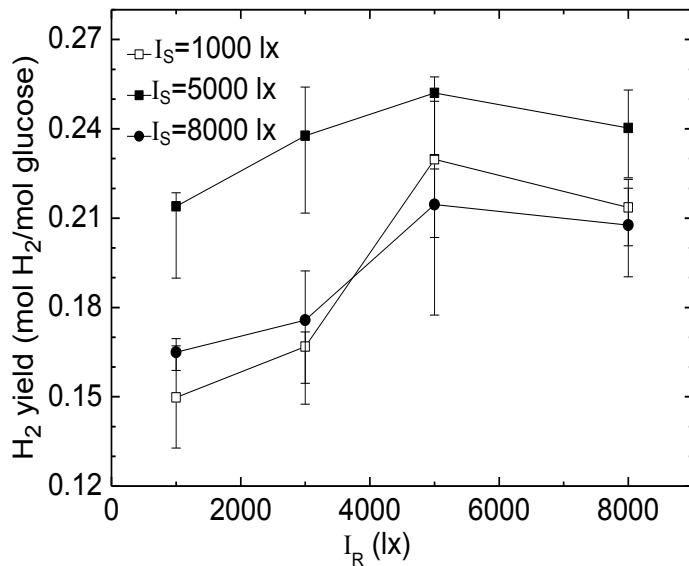


图 2.11 光照强度  $I_R$  对不同光照强度下形成的生物膜产氢得率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.11 Effect of illumination intensity  $I_R$  on  $H_2$  yield of biofilm formed under different illumination intensities ( $\lambda_R=590$  nm,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

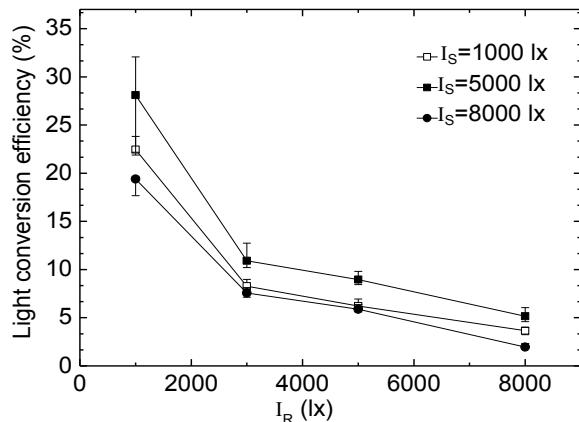


图 2.12 光照强度  $I_R$  对不同光照强度下形成的生物膜光能转化效率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.12 Effect of illumination intensity  $I_R$  on light conversion efficiency of biofilm formed under different illumination intensities ( $\lambda_R=590$  nm,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

由图 2.12 可知, 三种光照强度下形成的生物膜其光能转化效率随运行光照强度的增加都呈单调性减少的规律。比如当运行光照强度从 1000 lx 增加到 8000 lx 时, 5000 lx 条件下形成的生物膜光能转化效率从 28.1% 降低到 5.2%。这种规律主要归于两个原因: 在高光照强度下, 光合细菌并不能完全吸收这些光能; 另外, 过量的光能供应可能超过了光合细菌固氮酶的新陈代谢能力, 从而导致光能转化效率的降低<sup>[25]</sup>。由图 2.10-2.12 同样可以看出, 光照强度为 5000 lx 下形成的生物膜展现出最高的产氢性能, 这也主要是由于该条件下形成的生物膜具有最高的生物量。

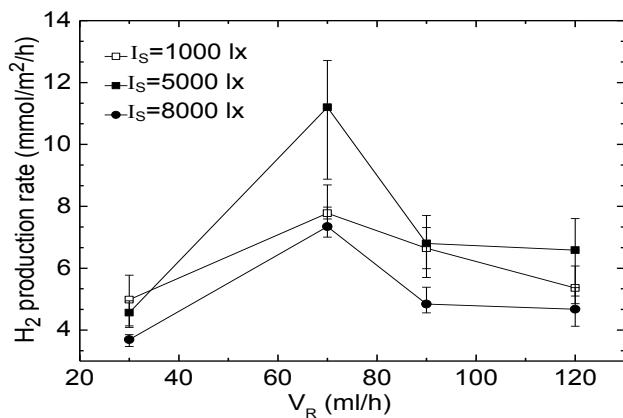
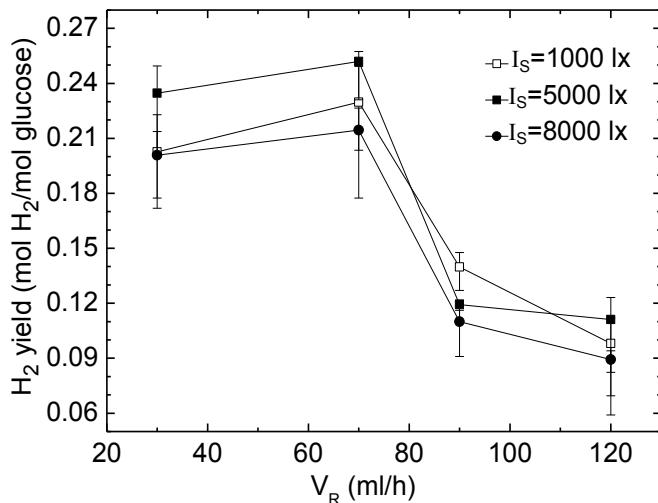


图 2.13 流量  $V_R$  对不同光照强度下形成的生物膜产氢速率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

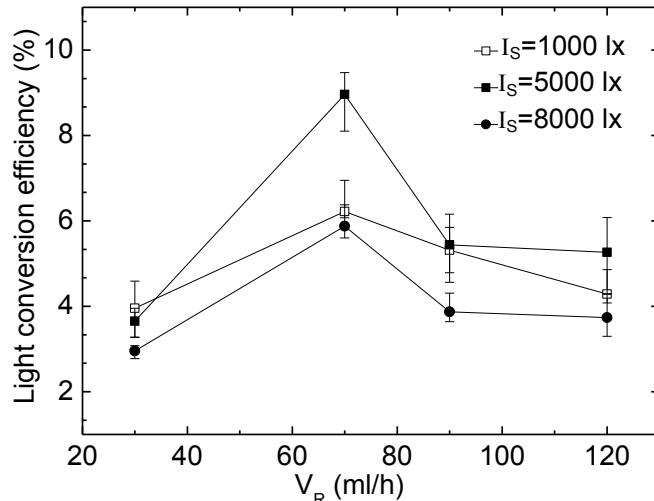
Fig. 2.13 Effect of flow rate  $V_R$  on average  $H_2$  production rate of biofilm formed under different illumination intensities ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

图 2.14 流量 V<sub>R</sub>对不同光照强度下形成的生物膜产氢得率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,

$$C_R=60 \text{ mmol/l})$$

Fig. 2.14 Effect of flow rate V<sub>R</sub> on H<sub>2</sub> yield of biofilm formed under different illumination intensities

$$(\lambda_R=590 \text{ nm}, I_R=5000 \text{ lx}, C_R=60 \text{ mmol/l})$$

图 2.15 流量 V<sub>R</sub>对不同光照强度下形成的生物膜光能转化效率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,

$$C_R=60 \text{ mmol/l})$$

Fig. 2.15 Effect of flow rate V<sub>R</sub> on light conversion efficiency of biofilm formed under different

$$(\lambda_R=590 \text{ nm}, I_R=5000 \text{ lx}, C_R=60 \text{ mmol/l})$$

运行时进口流量对不同光照强度条件下形成生物膜的产氢速率，产氢得率和光能转化效率的影响如图 2.13-2.15。由图可知：三种光照强度下形成的生物膜其产氢速率和得率随进口流量的增加呈先上升后下降的趋势，在进口流量为 70 ml/h 时达到最大值，较高和较低的流量对底物降解和产氢性能都存在不利的影响。增

加反应器进口流量可以增强主流区和生物膜区的对流传质性能，从而增加底物向生物膜区域的传质量，以满足光合细菌新陈代谢所需营养物质。在低进口流量条件下，传质边界层较厚，主流区底物向生物膜区扩散的阻力很大，但低流量使底物在反应器内部停留时间较长，底物的相对传输通量随流量的增加而逐渐增加。生物膜内细菌的底物降解和光合产氢主要由底物的传质速率起主导作用，因而产氢性能随着流量的增加而提高。然而，随着流量的继续增加，传质边界层的减薄有利于底物向生物膜区的传输，传输通量也会随着增加，而高流量使底物在反应器内部停留时间缩短，无足够时间使光合细菌进行吸收降解。此时主要由生物膜内光合细菌的新陈代谢能力起主导作用，因而随着进口流量的继续增加，光合产氢会有显著地的下降。由光能转化效率计算式(2.3)可知，特定条件下形成的生物膜光能转化效率与该生物膜的产氢速率成正比关系，因此三种光照强度下形成的生物膜光能转化效率与产氢速率具有相似的规律：随着进口流量的增加先增加后下降。

由图 2.13-2.15 同样可以看出 5000 lx 光照强度下形成的生物膜的产氢性能总体都高于 1000 和 8000 lx 下形成生物膜的产氢性能。此外，进口流量对光照强度为 5000 lx 下形成的生物膜产氢性能的影响明显地高于光照强度为 1000 和 8000 lx 下形成的生物膜产氢性能。这主要是因为 5000 lx 下形成的生物膜具有较大的细菌形态，较小的厚度和较大的孔隙率，这样就减少了底物从液相传输到生物膜的传质阻力。

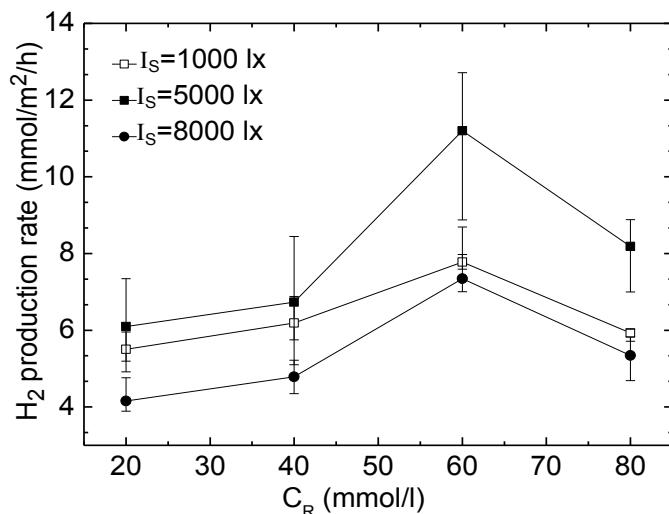


图 2.16 底物浓度  $C_R$  对不同光照强度下形成的生物膜产氢速率的影响( $\lambda_R=590 \text{ nm}$ ,  $I_R=5000 \text{ lx}$ ,  $V_R=70 \text{ ml/h}$ )

Fig. 2.16 Effect of substrate concentration  $C_R$  on average  $\text{H}_2$  production rate of biofilm formed under different illumination intensities ( $\lambda_R=590 \text{ nm}$ ,  $I_R=5000 \text{ lx}$ ,  $V_R=70 \text{ ml/h}$ )

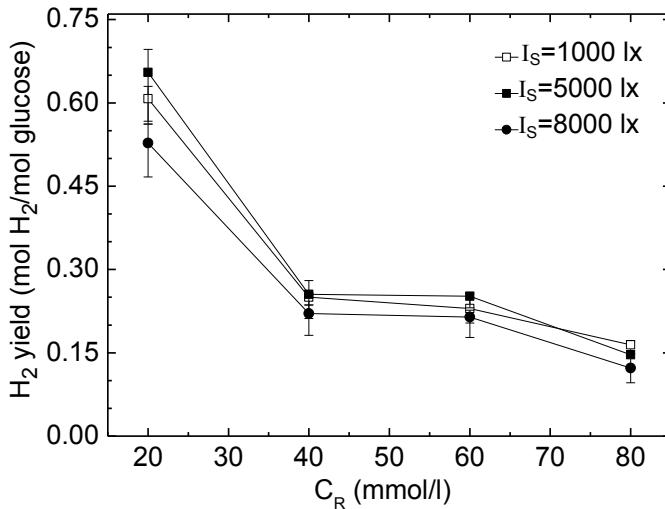


图 2.17 底物浓度  $C_R$  对不同光照强度下形成的生物膜产氢得率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

Fig. 2.17 Effect of substrate concentration  $C_R$  on  $H_2$  yield of biofilm formed under different illumination intensities ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

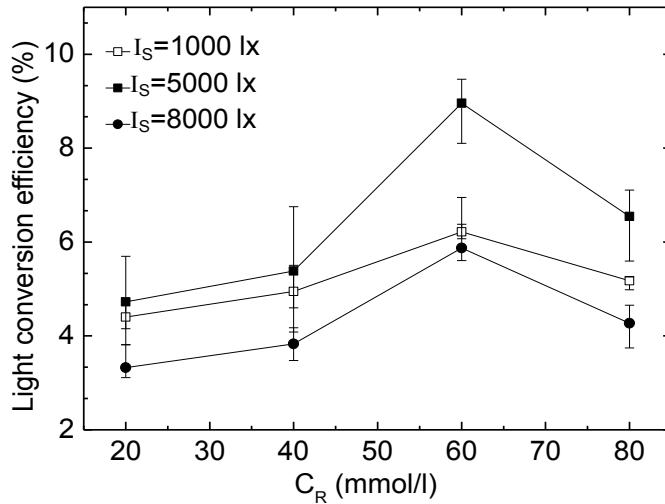


图 2.18 底物浓度  $C_R$  对不同光照强度下形成的生物膜光能转化效率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

Fig. 2.18 Effect of substrate concentration  $C_R$  on light conversion efficiency of biofilm formed under different illumination intensities ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

运行时底物浓度对不同光照强度条件下形成生物膜的产氢速率, 得率和光能转化效率的影响如图 2.16-2.18。由图可知: 随着底物浓度的增加, 三种光照强度下形成的生物膜产氢速率和光能转化效率呈先增加而后减小的规律, 在底物浓度为 60 mmol/l 时达到最大。这是由于在低底物浓度下, 光合细菌具有足够的新陈代谢

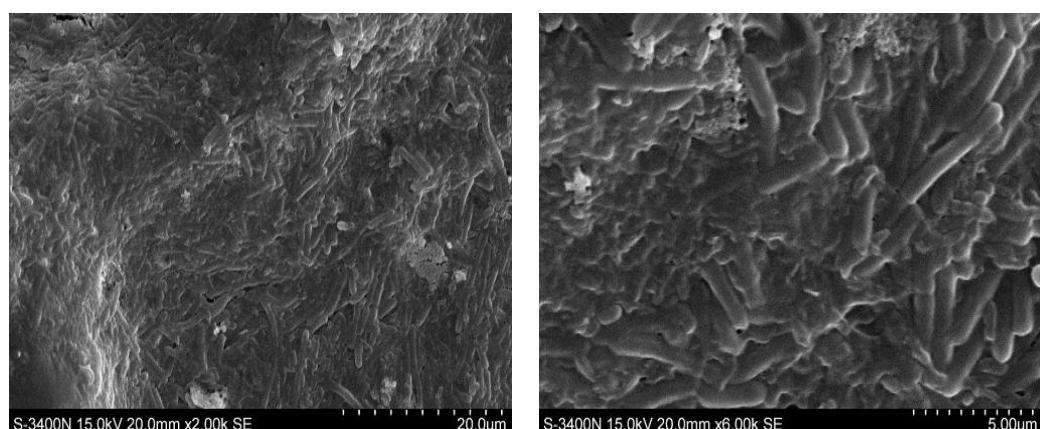
谢能力将葡萄糖底物转化为氢气，底物由主流区向生物膜内传递的扩散通量随着进口底物浓度的增加而增大，因而生物膜的产氢活动主要由底物的传质速率起主要作用，也即产氢速率随底物浓度的增加而增加。相反地，在高的底物浓度条件下，底物向生物膜区传输的通量相应增加，并超过了生物膜内的光合细菌代谢能力，此时产氢活动由光合细菌的代谢能力起主导作用。光照强度为 1000、5000 和 8000 lx 下形成的生物膜产氢得率随着底物浓度的增加而持续下降，其最高的产氢得率在底物浓度为 20 mmol/l 时获得，分别为 0.61、0.66 和 0.53 mol H<sub>2</sub>/mol glucose。这主要是因为光合细菌的代谢途径受到底物浓度的影响显著，不同底物浓度下生物膜产生的中间代谢产物会发生改变。在高的葡萄糖浓度下，未分解的有机酸(甲酸，乳酸等)的积累导致了产氢得率的下降<sup>[81]</sup>。

#### 2.4.2 光照波长对光合细菌生物膜微结构及产氢性能的影响

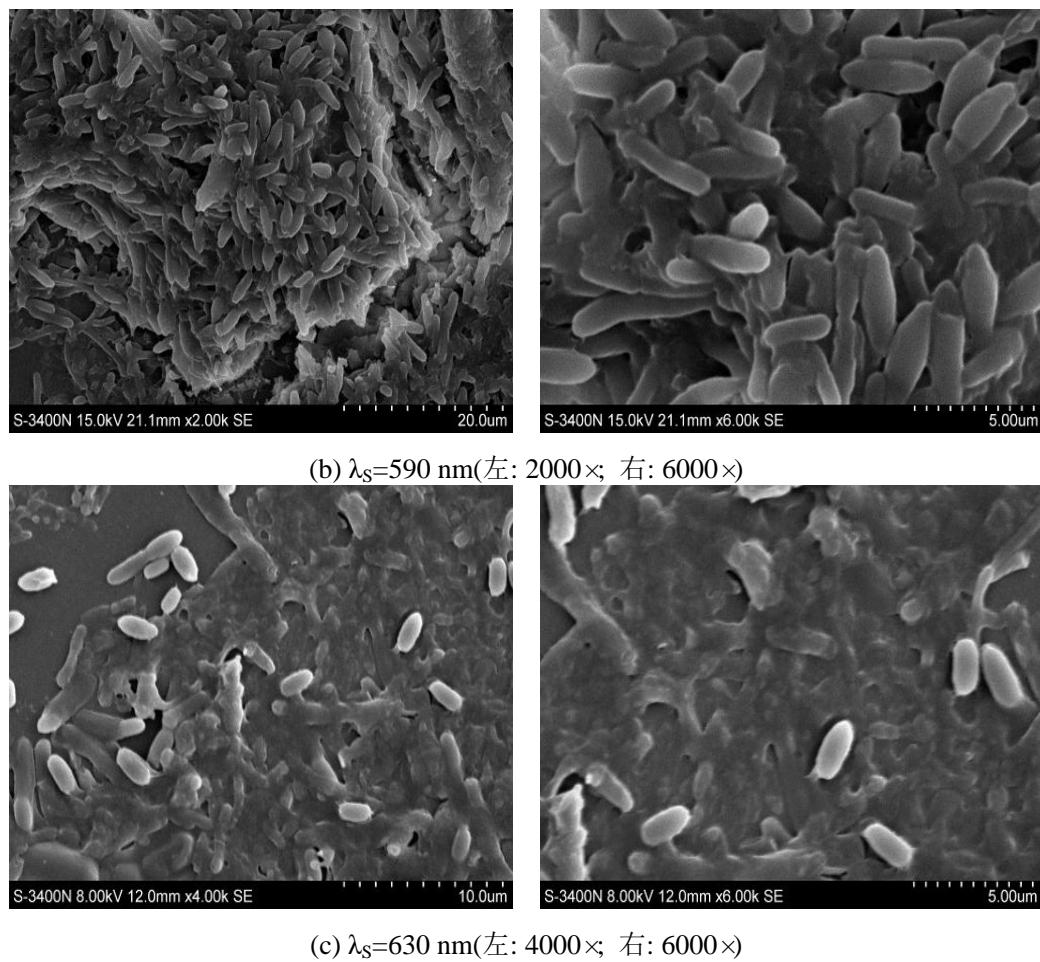
为研究启动期光照波长对光合细菌生物膜的形态结构及其产氢性能的影响，光合细菌在 470、590 和 630 nm 三种光照波长( $\lambda_s$ )下固定于载玻片上，光照波长( $I_s=5000$  lx)、流量( $V_s=228$  ml/h)和进口底物浓度( $C_s=60$  mmol/l)保持为常数。待生物膜形成稳定后，对光生物反应器在不同光照强度、光照波长、进口流量和底物浓度条件下进行连续产氢性能实验。

##### ①生物膜的形成及微结构

图 2.19 显示了在光照波长为 470、590 和 630 nm 条件下形成的光合细菌生物膜形态和微结构。由图可以看出三种光照波长条件下生物膜中的光合细菌主要形态为短杆状，同样有少量的长杆状细菌存在。细菌长度和宽度在光照波长为 470 nm 下分别为 2.9-3.3  $\mu$ m 和 0.6-0.8  $\mu$ m，590 nm 下分别为 3.5-4.5  $\mu$ m 和 1.2-1.5  $\mu$ m，及 630 nm 下分别为 2.0-2.5  $\mu$ m 和 0.9-1.1  $\mu$ m。不同光照波长条件下形成的生物膜中 EPS 含量也有一定的差异，从而导致生物膜内部孔隙率的改变。显而易见，相比于 470 和 630 nm 光照波长条件下的生物膜，590 nm 光照波长下形成的光合细



(a)  $\lambda_s=470$  nm(左: 2000 $\times$ ; 右: 6000 $\times$ )

图 2.19 *R. palustris* CQK 01 生物膜扫描电子显微图片Fig 2.19 Scanning electron micrographs of *R. palustris* CQK 01 biofilms

菌生物膜中 EPS 含量较低和孔隙率最大, 因而有利于光能渗透、底物和代谢产物传输。同时, 由于在 590 nm 处出现吸收峰表明光合细菌 *R. palustris* CQK 01 中含有细菌叶绿素  $\alpha$  较高, 也即说明生物膜中的光合细菌具有较高的活性进行 ATP 合成, 所以光照波长为 590 nm 下形成的生物膜具有较大的细菌形态和较少的 EPS 含量。

不同光照波长条件下形成的生物膜干重和厚度如图 2.20 所示。由图可知: 生物膜干重和厚度都随光照波长的增加而显著地减少。在光照波长为 470 nm 时获得最大的干重和生物膜厚度, 其值分别为  $1.013 \text{ mg/cm}^2$  和  $27.8 \mu\text{m}$ 。这主要是因为在 470 nm 处出现吸收峰表明光合细菌 *R. palustris* CQK 01 中含有较高的类胡萝卜素, 从而刺激细菌的生长。

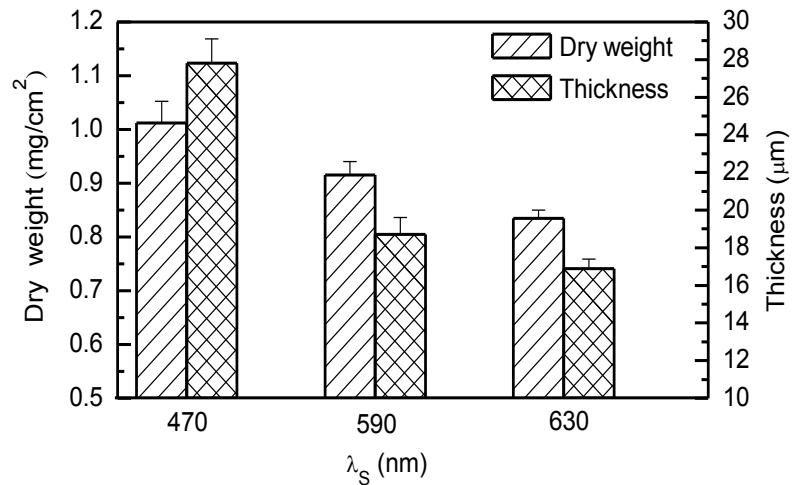
图 2.20 光照波长对 *R. palustris* CQK 01 生物膜干重和厚度的影响

Fig. 2.20 Effect of illumination wavelength on dry weight and thickness of *R. palustris* CQK 01 biofilm

## ②生物膜产氢性能

图 2.21-2.23 显示了运行时光照波长对启动期不同光照波长下形成生物膜的产氢速率、产氢得率和光能转化效率的影响。由图可知：不同微结构的生物膜产氢速率、产氢得率和光能转化效率随光照波长的增加呈先上升后下降的规律，且三种光波长下形成的生物膜产氢性能都在光照波长为 590 nm 处达到最大。此外，在相同条件下，590 nm 光照波长下形成的生物膜具有最高产氢速率、得率和光能转

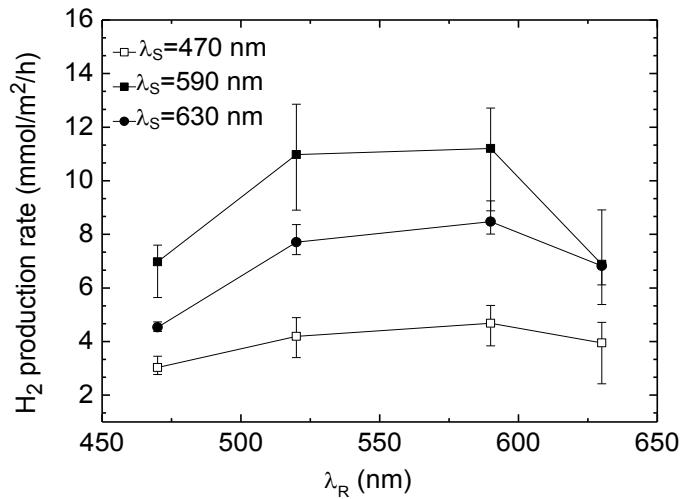


图 2.21 光照波长  $\lambda_R$  对不同光照波长下形成的生物膜产氢速率的影响( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.21 Effect of illumination wavelength  $\lambda_R$  on average  $H_2$  production rate of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

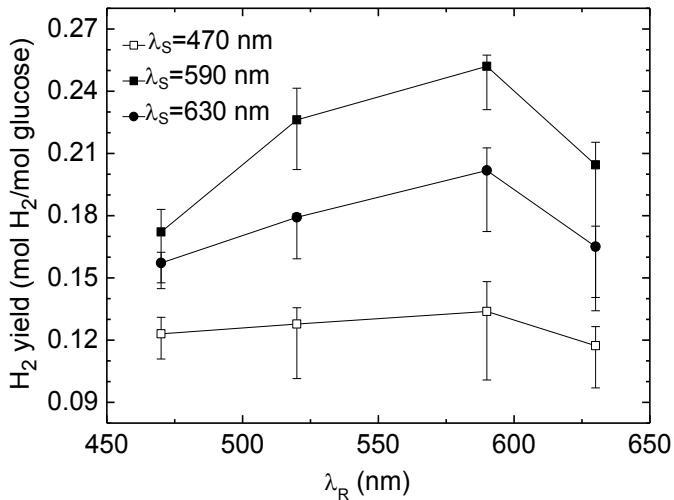


图 2.22 光照波长  $\lambda_R$  对不同光照波长下形成的生物膜产氢得率的影响( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.22 Effect of illumination wavelength  $\lambda_R$  on  $H_2$  yield of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

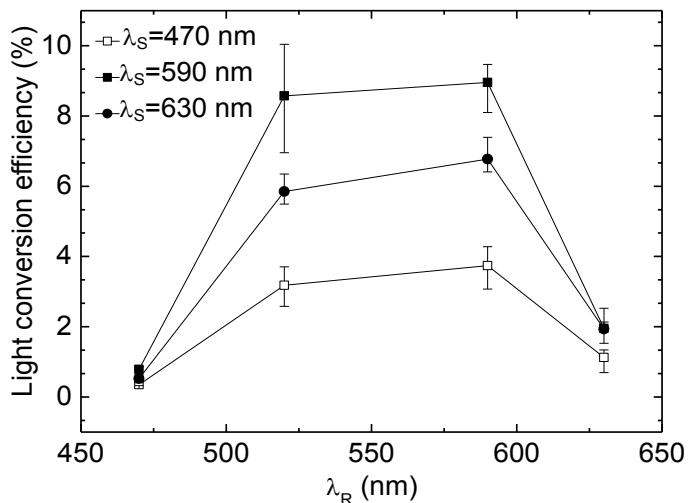


图 2.23 光照波长  $\lambda_R$  对不同光照波长下形成的生物膜光能转化效率的影响( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.23 Effect of illumination wavelength  $\lambda_R$  on light conversion efficiency of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

化效率,这也再次说明光合细菌在 590 nm 光照波长处吸收更多的光能用于 ATP 合成,以提高细菌活性和产氢能力。470 nm 光照波长下形成的生物膜厚度比 590 和 630 nm 光照波长下形成的生物膜厚度分别高 9.7% 和 20.2%,同时在此波长下形成的生物膜内更多的 EPS 含量降低了孔隙率。因而较高的生物膜厚度和较低的孔隙

率增加了底物和代谢产物的传输阻力和光能渗透，并导致了相对较低的光合产氢性能。590 nm 光照波长下形成的生物膜干重和厚度比 630 nm 光照波长下形成的生物膜干重和厚度分别高 9.5% 和 11.1%，并具有较大的孔隙率和细菌形态。这就有利于底物/产物的传输和光能渗透，并因此增强光合细菌的新陈代谢活性。所以光照波长为 590 nm 下形成的生物膜具有最高的产氢性能。

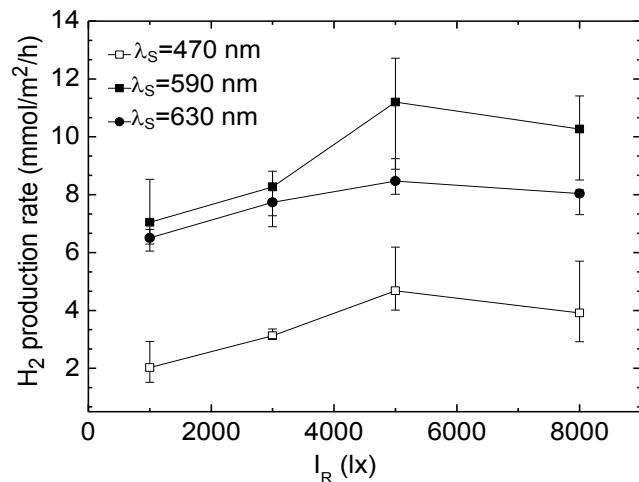


图 2.24 光照强度  $I_R$  对不同光照波长下形成的生物膜产氢速率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.24 Effect of illumination intensity  $I_R$  on average  $H_2$  production rate of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $\lambda_R=590$  nm,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

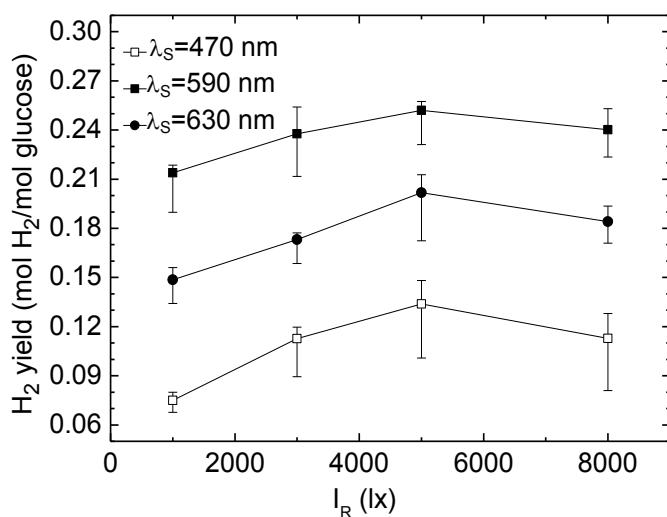


图 2.25 光照强度  $I_R$  对不同光照波长下形成的生物膜产氢得率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.25 Effect of illumination intensity  $I_R$  on  $H_2$  yield of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $\lambda_R=590$  nm,  $V_R=70$  ml/h,  $C_R=60$  mmol/l)

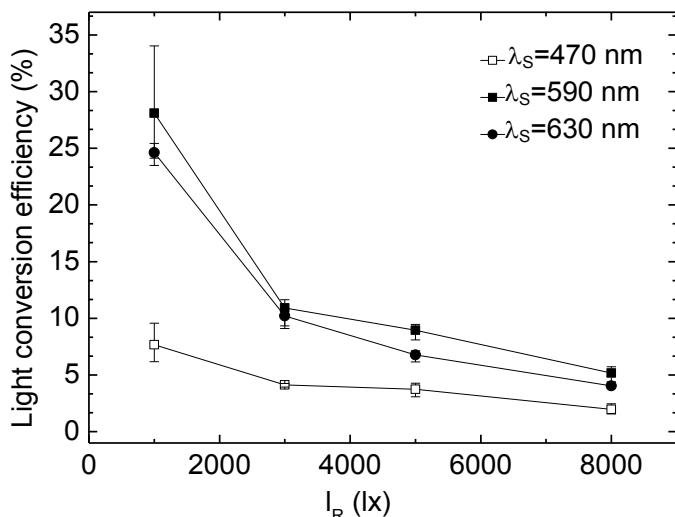


图 2.26 光照强度  $I_R$  对不同光照波长下形成的生物膜光能转化效率的影响( $\lambda_R=590 \text{ nm}$ ,  $V_R=70 \text{ ml/h}$ ,  $C_R=60 \text{ mmol/l}$ )

Fig. 2.26 Effect of illumination intensity  $I_R$  on light conversion efficiency of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $\lambda_R=590 \text{ nm}$ ,  $V_R=70 \text{ ml/h}$ ,  $C_R=60 \text{ mmol/l}$ )

光照强度对不同光照波长下形成的生物膜产氢性能的影响如图 2.24-2.26。由图可知：当光照强度由 1000 lx 增加到 5000 lx 时，470、590 和 630 nm 光照波长下形成的生物膜产氢速率和得率逐渐增加；当光照强度超过 5000 lx 后，三种条件下的生物膜产氢速率和得率反而下降。这也再次表明光合细菌 *R. palustris* CQK 01 光饱和点为 5000 lx 左右。由图 2.26 可知，470、590 和 630 nm 光照波长下形成的生物膜光能转化效率随光照强度的增加而持续下降，其最大值在光照强度为 1000 lx 处获得，分别为 7.7%、28.1% 和 24.6%，这也是由于在高光照强度下，一方面光合细菌未完全吸收光能，另一方面过量的光能超过光合细菌的活性。总体来讲，590 nm 光照波长下形成的生物膜因具有较高的生物量，孔隙率和细菌形态，其产氢性能也为最高。

由图 2.27-2.29 可以看出，随着反应器进口流量的增加，470、590 和 630 nm 光照波长下形成的生物膜产氢速率、产氢得率和光能转化效率呈先增加后下降的趋势，最大值在流量为 70 ml/h 时获得。当进口流量较低时，增加流量，底物及产物的传质得到增强，产氢速率也逐渐增加，此过程主要受扩散传质控制；而当流量增加到一定值后，尽管有足够的底物扩散进入生物膜，但光合细菌的产氢能力已不能继续增加，从而对光合细菌产生底物抑制。590 nm 光照波长下的生物膜产氢性能明显高于 470 和 630 nm 下形成的生物膜产氢性能。因此，进口流量对 590 nm 光照波长下形成的生物膜产氢性能的影响更加重要，这主要是该条件下的生物膜具有的较大孔隙率、细菌形态和相对较小的生物膜厚度减小了生物膜内底物和产

物的传输阻力。

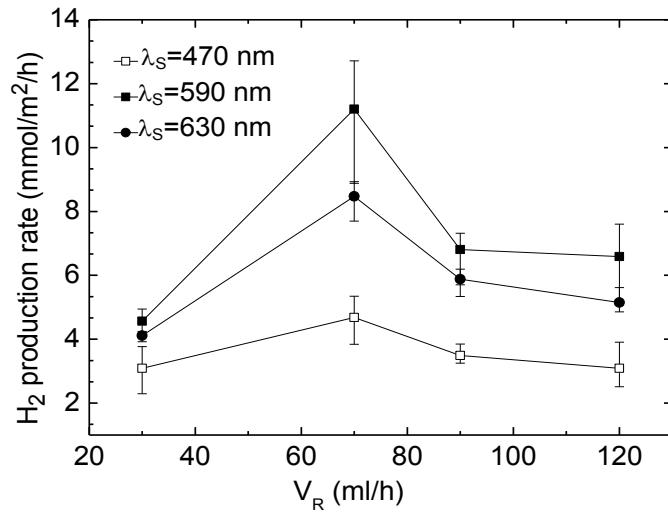


图 2.27 流量  $V_R$  对不同光照波长下形成的生物膜产氢速率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.27 Effect of flow rate  $V_R$  on average  $H_2$  production rate of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

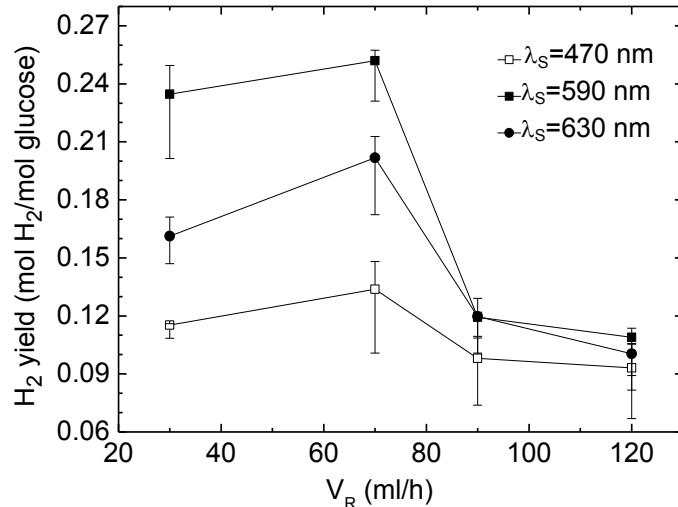


图 2.28 流量  $V_R$  对不同光照波长下形成的生物膜产氢得率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.28 Effect of flow rate  $V_R$  on  $H_2$  yield of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

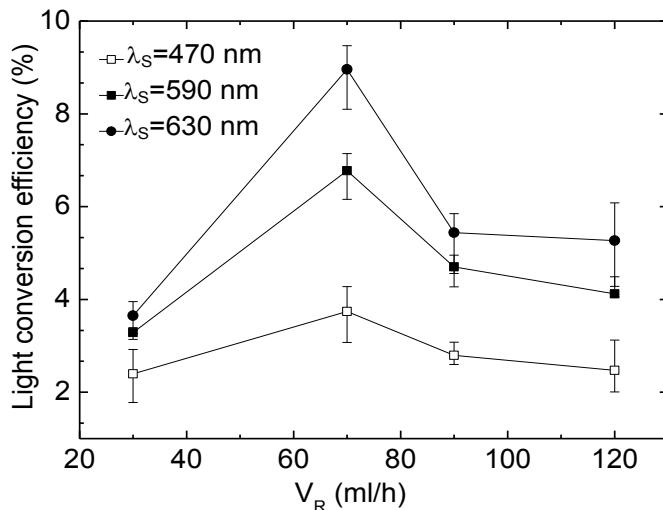


图 2.29 流量  $V_R$  对不同光照波长下形成的生物膜光能转化效率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.29 Effect of flow rate  $V_R$  on light conversion efficiency of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

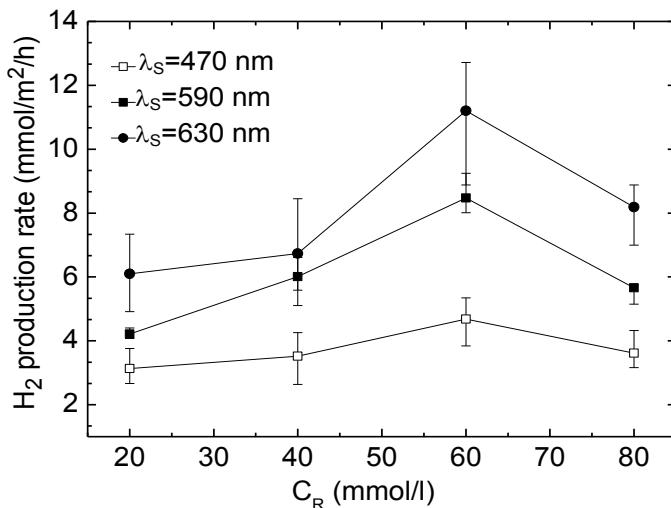


图 2.30 底物浓度  $C_R$  对不同光照波长下形成的生物膜产氢速率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

Fig. 2.30 Effect of substrate concentration  $C_R$  on average  $H_2$  production rate of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

底物浓度对不同光照波长条件下形成的生物膜产氢速率、得率和光能转化效率的影响如图 2.30-2.32。由图可知：光照波长为 470、590 和 630 nm 下形成的生物膜产氢速率和光能转化效率随着底物浓度的增加而增加，并在底物浓度为 60 mmol/l 时达到最大值，当进一步增加浓度时，三种光照波长下形成的生物膜产氢

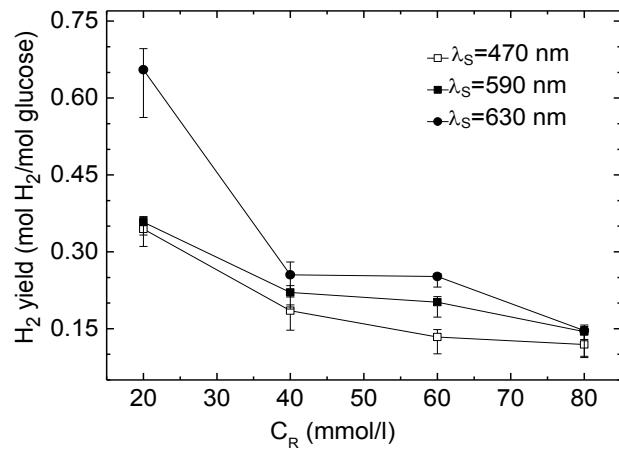


图 2.31 底物浓度  $C_R$  对不同光照波长下形成的生物膜产氢得率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

Fig. 2.31 Effect of substrate concentration  $C_R$  on  $H_2$  yield of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

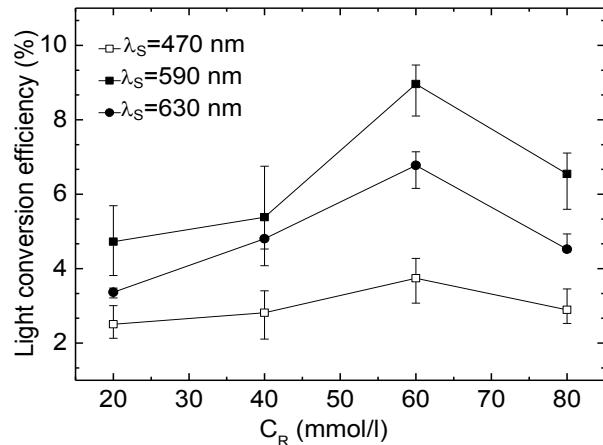


图 2.32 底物浓度  $C_R$  对不同光照波长下形成的生物膜光能转化效率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

Fig. 2.32 Effect of substrate concentration  $C_R$  on light conversion efficiency of biofilm formed under different illumination wavelengths ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

速率和光能转化效率反而下降。这主要是因为在低底物浓度条件下，传质驱动力较弱，反应器内的生化反应过程主要由底物的传质控制，此时增加进口底物浓度，使得主流区与生物膜区间的浓度梯度增大，进入生物膜内部的底物会逐渐增多以满足光合细菌生长代谢所需。继续增大进口底物浓度时，尽管传质驱动势有进一步的增加，但生物膜内过高的底物浓度反而抑制了光合细菌的活性，使得底物不能被完全降解，因而导致产氢速率和光能利用的下降。470、590 和 630 nm 光照波长下形成的生物膜产氢得率随着底物浓度的增加而单调性地减少，其最大值分别

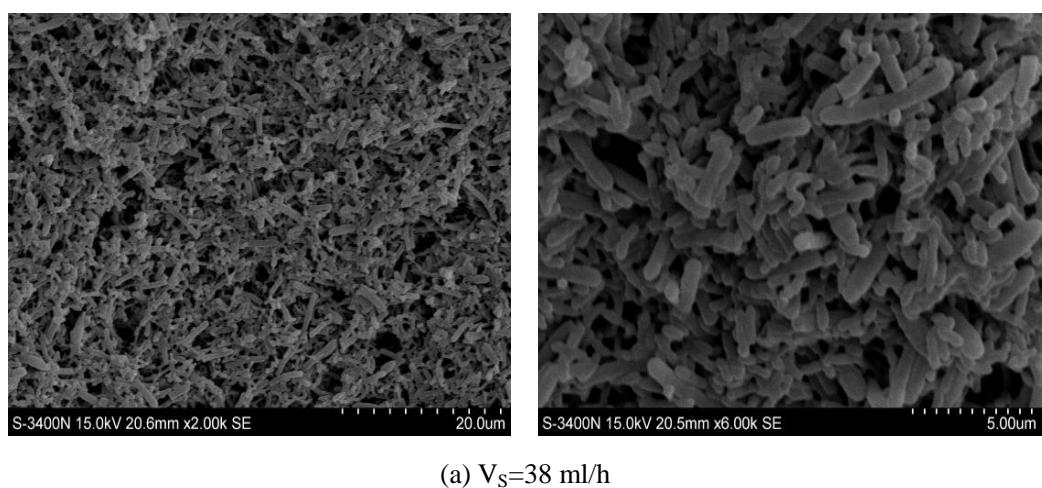
为 0.34、0.66 和 0.36 mol H<sub>2</sub>/mol glucose。这也主要是由于不同底物浓度导致光合细菌代谢途径的改变和未分解的有机酸积累抑制了产氢活动的进行。590 nm 光照波长下形成的生物膜产氢性能同样优于 470 和 630 nm 光照波长下形成的生物膜产氢性能。

#### 2.4.3 进口流量对光合细菌生物膜微结构及产氢性能的影响

为研究在启动期进口流量对光合细菌生物膜的形态和微结构以及产氢性能的影响, 光合细菌在 38、228 和 1080 ml/h 三种不同进口流量( $V_S$ )下固定于载玻片上, 光照波长( $\lambda_S=590$  nm)、强度( $I_S=5000$  lx)和进口底物浓度( $C_S=60$  mmol/l)保持为常数。生物膜形成稳定后, 对光生物反应器在不同进口流量和底物浓度条件下进行连续产氢性能实验。

##### ①生物膜的形成及微结构

38、228 和 1080 ml/h 进口流量下形成的生物膜微结构如图 2.33 所示, SEM 图片放大倍数分别为 2000(左)和 6000(右)。由图可以看出 38、228 和 1080 ml/h 进口流量下形成的生物膜中光合细菌主要以短杆状为主, 也有少量的细菌在不对称出芽生殖中连接在一起形成长杆状细菌。生物膜中细菌长度和宽度在进口流量为 38 ml/h 下分别为 2.1-2.8  $\mu\text{m}$  和 0.5-1.0  $\mu\text{m}$ , 228 ml/h 下分别为 3.5-4.5  $\mu\text{m}$  和 1.2-1.5  $\mu\text{m}$ , 1080 ml/h 下分别为 2.5-3.0  $\mu\text{m}$  和 0.6-1.2  $\mu\text{m}$ , 这主要是由于不同流速导致光合细菌中的细菌叶绿素  $\alpha$  和 ATP 合成的细胞活性改变<sup>[82]</sup>。由 SEM 图片可以看出, 在固定的光合细菌和细菌自身所分泌的 EPS 间有一定的孔隙存在, 形成底物传入-代谢产物传出和光能渗透的通道。此外, 随着进口流量的增加, 生物膜表面受到的流体剪切力也增加, 生物膜结构变得更加致密且 EPS 含量也相应增加。进口流量为 1080 ml/h 下形成的生物膜结构具有最低的孔隙率。



## 2 平板式光生物制氢反应器光合细菌成膜及产氢特性

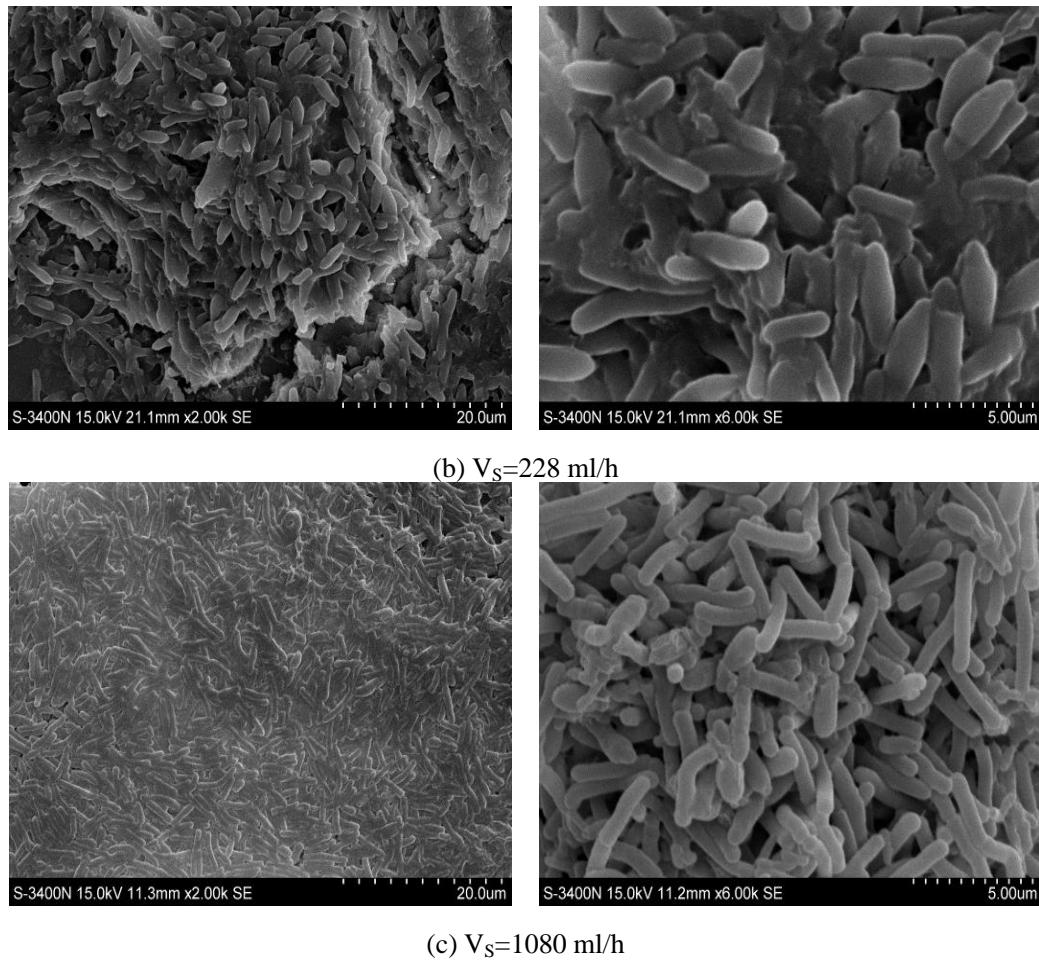


图 2.33 *R. palustris* CQK 01 生物膜扫描电子显微图片(左: 2000 $\times$ ; 右: 6000 $\times$ )

Fig. 2.33 Scanning electron micrographs of *R. palustris* CQK 01 biofilms

(Left: 2000 $\times$ ; Right: 6000 $\times$ )

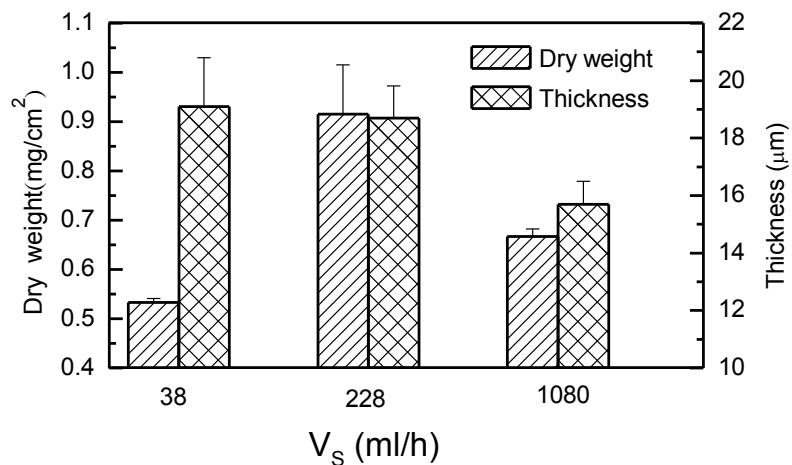


图 2.34 进口流量对 *R. palustris* CQK 01 生物膜干重和厚度的影响

Fig. 2.34 Effect of flow rate on dry weight and thickness of *R. palustris* CQK 01 biofilm

不同进口流量下形成的生物膜干重和厚度实验结果如图 2.34 所示。由图可知，生物膜干重随流量的增加为先上升后下降的趋势，而生物膜厚度则随流量的增加而逐渐减小，其最大生物膜厚度在进口流量为 38 ml/h 下获得，为 19.1  $\mu\text{m}$ 。相比于进口流量为 228 和 1080 ml/h 下形成的生物膜，进口流量为 38 ml/h 下形成的生物膜具有最大的生物膜厚度和最低的干重，因而这种条件下的生物膜具有更加疏松的结构，这是因为低进口流量条件对生物膜表面产生低的剪切力作用，细菌连接形成较疏松的结构，厚度也为最高，但这种疏松结构会导致较高的脱落率；而高进口流量条件对生物膜表面产生高的剪切力作用并形成致密结构的生物膜，厚度随之降低，底物扩散进入生物膜内阻力增加，光合细菌生长由于得不到足够营养而受到影响。这与 SEM 观察结果一致。

以上结果表明在低进口流量下容易形成低 EPS 含量的多孔性生物膜，而在高的进口流量下更易形成高 EPS 含量的致密性生物膜。为进一步评价生物膜结构对生物反应器性能的影响，接下来将对不同进口流量下形成的生物膜进行稳定期的产氢性能测试。

## ②生物膜产氢性能

图 2.35-2.37 显示了稳定期进口流量对不同微结构生物膜的产氢速率、得率和光能转化效率的影响。当进口流量在 70 ml/h 以下时，进口流量为 38、228 和 1080 ml/h 下形成的生物膜产氢速率、得率和光能转化效率随着流量的增加而增加；而

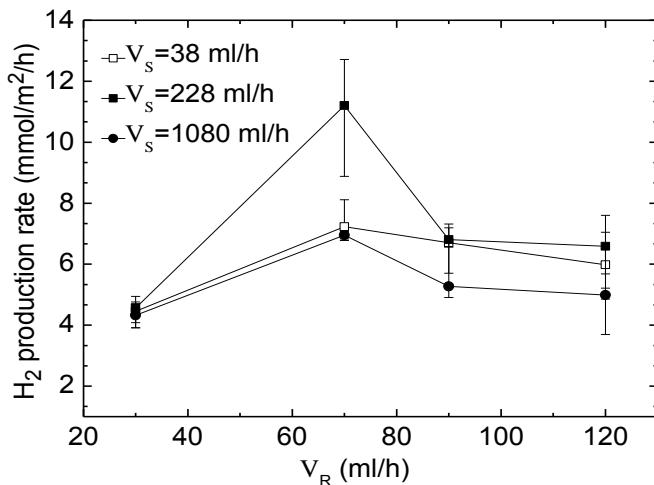


图 2.35 进口流量  $V_R$  对不同流量下形成的生物膜产氢速率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.35 Effect of flow rate  $V_R$  on average  $H_2$  production rate of biofilm formed under different flow rates ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

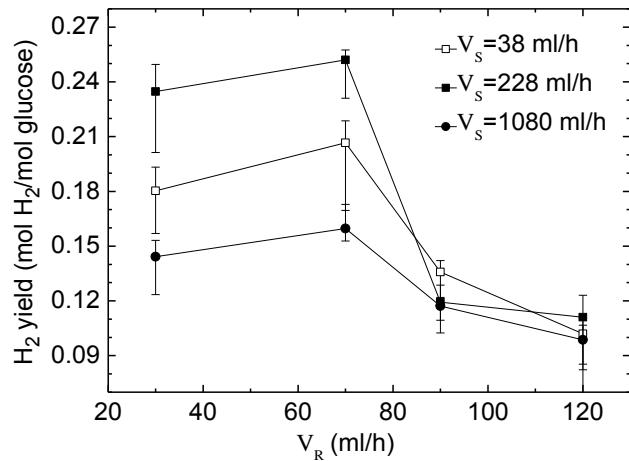


图 2.36 进口流量  $V_R$  对不同流量下形成的生物膜产氢得率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,

$$C_R=60 \text{ mmol/l})$$

Fig. 2.36 Effect of flow rate  $V_R$  on  $H_2$  yield of biofilm formed under different flow rates ( $\lambda_R=590$  nm,

$$I_R=5000 \text{ lx}, C_R=60 \text{ mmol/l})$$

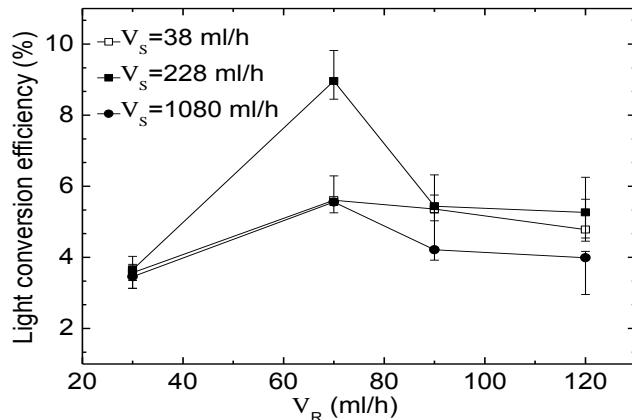


图 2.37 进口流量  $V_R$  对不同流量下形成的生物膜光能转化效率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,

$$C_R=60 \text{ mmol/l})$$

Fig. 2.37 Effect of flow rate  $V_R$  on light conversion efficiency of biofilm formed under different flow rates ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

当进口流量超过 70 ml/h 后, 生物膜的产氢性能随着流量的增加而减少。三种条件下形成的生物膜产氢性能在进口流量为 70 ml/h 时达到最大。增加进口流量通常会导致底物从液相空间向生物膜区域的传输, 这样就会增加生物膜内的底物浓度。在较低的进口流量下, 光合细菌的底物消耗和产氢主要由底物的质量传输起决定作用。因而产氢性能随流量的增加而增加。而当进口底物有机负荷超过光合细菌的新陈代谢能力后, 生物膜内的光合细菌活性将被抑制, 并导致产氢性能的下降。

因此,这种生物反应器的最佳进口流量存在是底物/产物传输和光合细菌新陈代谢能力间协调的结果。

图 2.35-2.37 显示了进口流量为 228 ml/h 下形成的生物膜产氢性能最高,其次为 38 和 1080 ml/h 下形成的生物膜。这是由于进口流量为 228 ml/h 下形成的生物膜具有最大的生物量。此外, 较大的细菌形态, 适中的孔隙率和较低的生物膜厚度同样有利于底物/产物传输和光能渗透。这都将显著地提高光合细菌的新陈代谢能力, 并相应地提高产氢性能。

底物浓度对不同进口流量下形成生物膜的产氢速率、得率和光能转化效率的影响如图 2.38-2.40。当进口底物浓度从 20 mmol/l 增加到 60 mmol/l 时, 进口流量为 38、228 和 1080 ml/h 下形成的生物膜的产氢速率和光能转化效率相应地增加; 当进一步增加进口底物浓度时, 三种条件下形成的生物膜产氢速率和光能转化效率反而下降。因而过高和过低的进口底物浓度都不利于光合细菌生物膜制氢反应器的产氢活动。进口底物浓度增加时, 主流区到生物膜区的底物传质驱动势相应增加。生物膜内部发生着底物扩散和生化反应的过程, 其生化反应过程直接决定生物膜整体产氢速率和底物降解特性。当传质驱动势引起的传质速率小于生物膜内生化反应的最大速率时, 此时主要由底物的传质过程起主导作用。因而产氢速率呈现随着进口底物浓度的增加而增加的趋势。然而进口底物浓度的继续增加导致传质驱动势也随之增加, 当底物的传质速率大于生物膜内的生化反应速率后, 即生物膜内底物供应已超过光合细菌新陈代谢能力, 此时主要由生化反应过程起

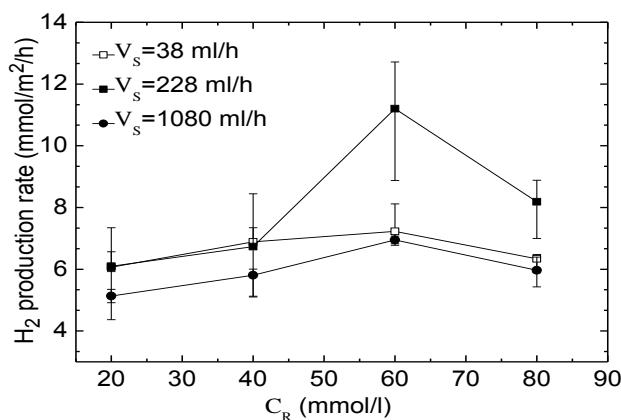


图 2.38 底物浓度  $C_R$  对不同流量下形成的生物膜产氢速率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

Fig. 2.38 Effect of substrate concentration  $C_R$  on average  $H_2$  production rate of biofilm formed under different flow rates ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

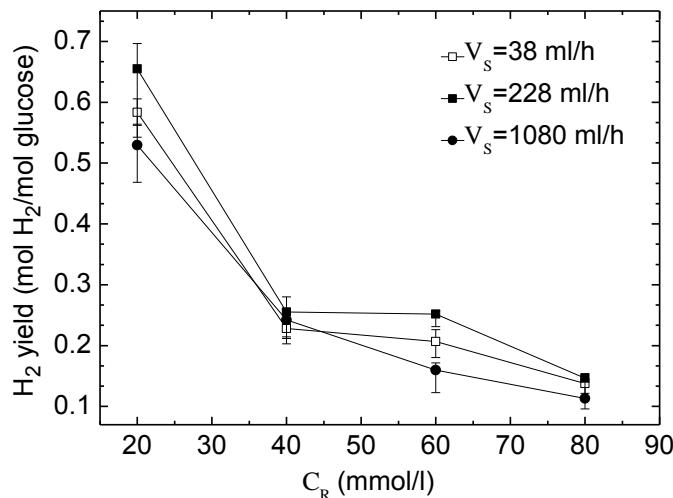


图 2.39 底物浓度  $C_R$  对不同流量下形成的生物膜产氢得率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

Fig. 2.39 Effect of substrate concentration  $C_R$  on  $H_2$  yield of biofilm formed under different flow rates ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

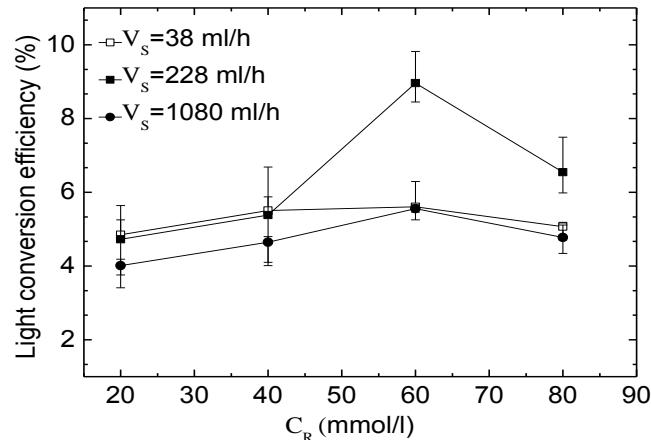


图 2.40 底物浓度  $C_R$  对不同流量下形成的生物膜光能转化效率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

Fig. 2.40 Effect of substrate concentration  $C_R$  on light conversion efficiency of biofilm formed under different flow rates ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

控制作用。生物膜内过剩底物的积聚对生化反应产生底物抑制作用，所以产氢速率和光能转化效率也随之降低。图 2.39 显示了进口流量为 38、228 和 1080 ml/h 下形成的生物膜产氢得率随进口底物浓度的增加而持续降低，最高的产氢得率在底物浓度为 20 mmol/l 时获得，分别为 0.58、0.66 和 0.53 mol  $H_2$ /mol glucose。这也主要是因为光合细菌的新陈代谢途径严重受到底物浓度的影响，在高的葡萄糖浓

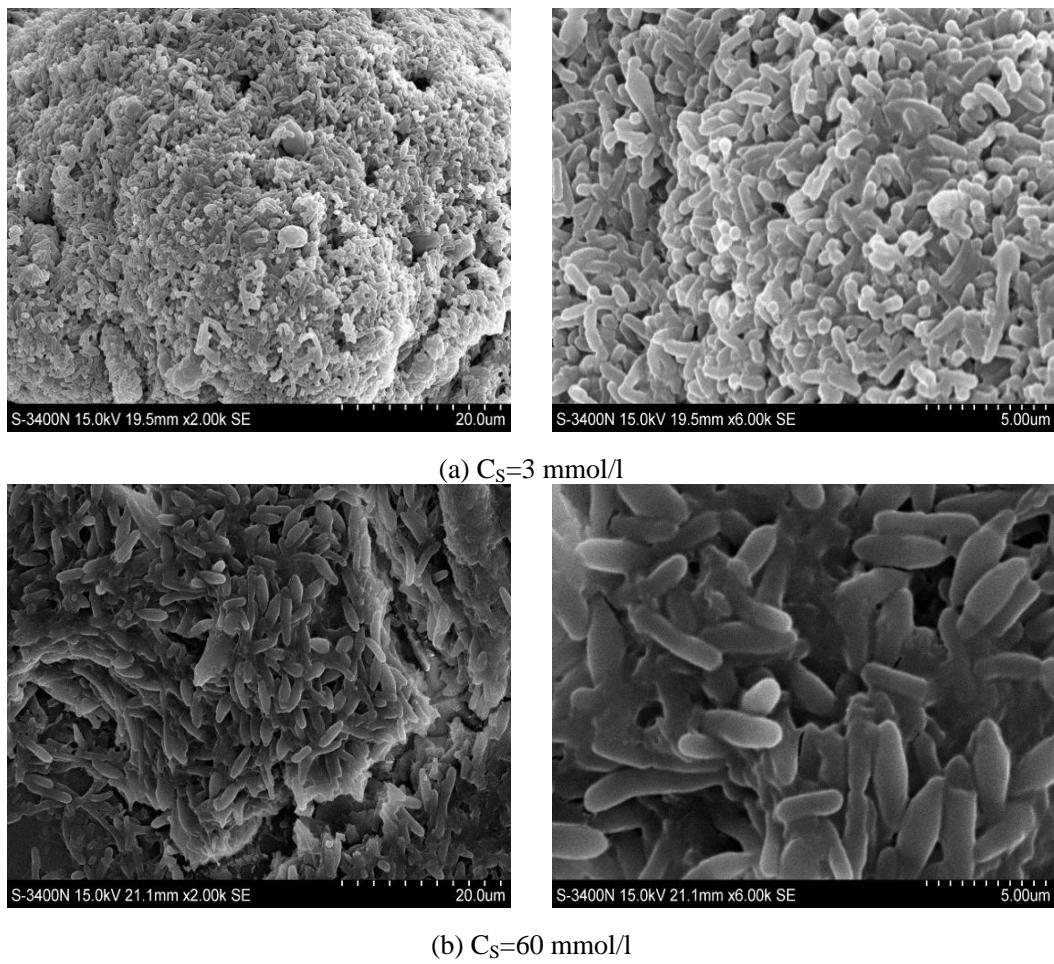
度下，产生的有机酸(甲酸，乳酸等)积累导致了产氢得率的下降。

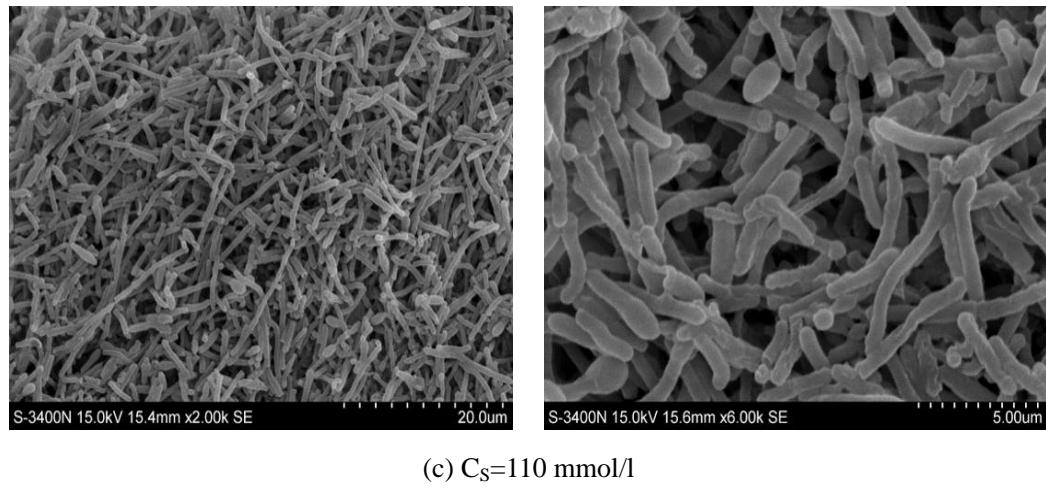
#### 2.4.4 底物浓度对光合细菌生物膜微结构及产氢性能的影响

为研究在启动期底物浓度对光合细菌生物膜的形态和微结构以及产氢性能影响，光合细菌在 3、60 和 110 mmol/l 三种不同底物浓度( $C_S$ )下固定于载玻片上，光照波长( $\lambda_S=590$  nm)、强度( $I_S=5000$  lx)和进口进口气流( $V_S=70$  ml/h)保持为常数。生物膜形成稳定后，对光生物反应器在不同进口气流和浓度条件下进行连续产氢性能实验。

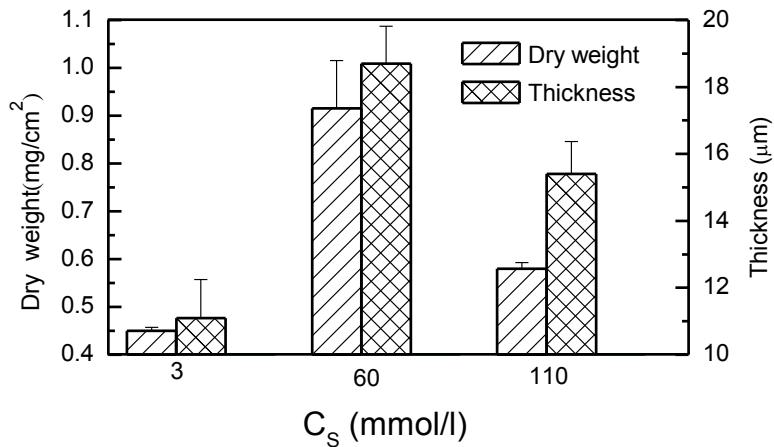
##### ①生物膜的形成及微结构

3、60 和 110 mmol/l 进口气流浓度下形成的生物膜 SEM 微结构如图 2.41 所示。由图可以看出不同微结构生物膜中光合细菌同样以短杆状为主，仍有少量的长杆状细菌形成，且 110 mmol/l 进口气流浓度下生物膜中的长杆状细菌比 3 和 60 mmol/l 下生物膜中的长杆菌多。3 mmol/l 条件下光合细菌形态的长度和宽度分别为 1.5-2.2  $\mu\text{m}$  和 0.3-0.6  $\mu\text{m}$ ，60 mmol/l 条件下分别为 3.5-4.5  $\mu\text{m}$  和 1.2-1.5  $\mu\text{m}$ ，110 mmol/l 条件下分别为 2.5-4.5  $\mu\text{m}$  和 0.6-1.1  $\mu\text{m}$ 。由三种条件下的 SEM 图片可以看



图 2.41 *R. palustris* CQK 01 生物膜扫描电子显微图片(左: 2000 $\times$ ; 右: 6000 $\times$ )Fig. 2.41 Scanning electron micrographs of *R. palustris* CQK 01 biofilms(Left: 2000 $\times$ ; Right: 6000 $\times$ )

出, 随着底物浓度的增加, 生物膜变得更加疏松。相比于底物浓度为 60 和 110 mmol/l 下形成的生物膜, 底物浓度为 3 mmol/l 下形成的生物膜结构具有最低的孔隙率。这就会增加底物和产物在流体区和生物膜区间的传输阻力, 进而影响生物膜的光合产氢性能。

图 2.42 底物浓度对 *R. palustris* CQK 01 生物膜干重和厚度的影响Fig. 2.42 Effect of substrate concentration on dry weight and thickness of *R. palustris* CQK 01 biofilm

不同进口底物浓度条件下形成的生物膜干重和厚度如图 2.42 所示。生物膜干重和厚度都先随进口底物浓度的增加而增加, 然后下降。并在底物浓度为 60 mmol/l 时达到最大, 分别为  $0.915 \text{ mg/cm}^2$  和  $18.7 \mu\text{m}$ 。而底物浓度为 3 和 110 mmol/l 下形

成的生物膜干重和厚度分别为  $0.45 \text{ mg/cm}^2$  和  $11.1 \mu\text{m}$ ,  $0.58 \text{ mg/cm}^2$  和  $15.4 \mu\text{m}$ 。这是由于低底物浓度条件会限制光合细菌的生长, 其干重和厚度都较低, 随着底物浓度的增加, 生物膜干重和厚度都会相应增加; 而在高底物浓度条件下, 光合细菌具有较高的生长速率和疏松的结构, 但这种疏松结构形成的较低吸附强度受流体剪切力影响很大, 生物膜干重和厚度会有所下降。

## ②生物膜产氢性能

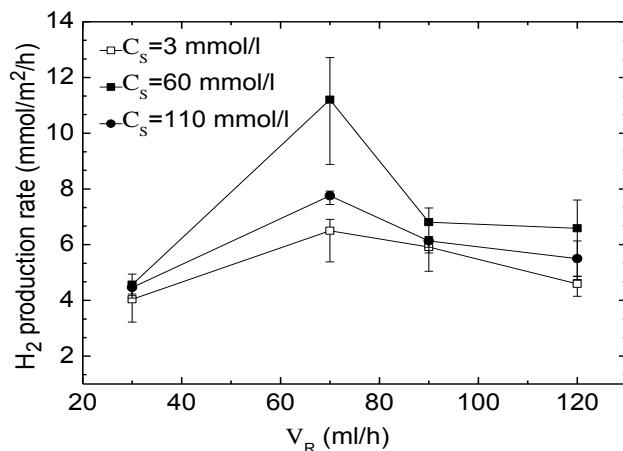


图 2.43 进口流量  $V_R$  对不同底物浓度下形成的生物膜产氢速率的影响( $\lambda_R=590 \text{ nm}$ ,  $I_R=5000 \text{ lx}$ ,  $C_R=60 \text{ mmol/l}$ )

Fig. 2.43 Effect of flow rate  $V_R$  on average  $H_2$  production rate of biofilm formed under different substrate concentrations ( $\lambda_R=590 \text{ nm}$ ,  $I_R=5000 \text{ lx}$ ,  $C_R=60 \text{ mmol/l}$ )

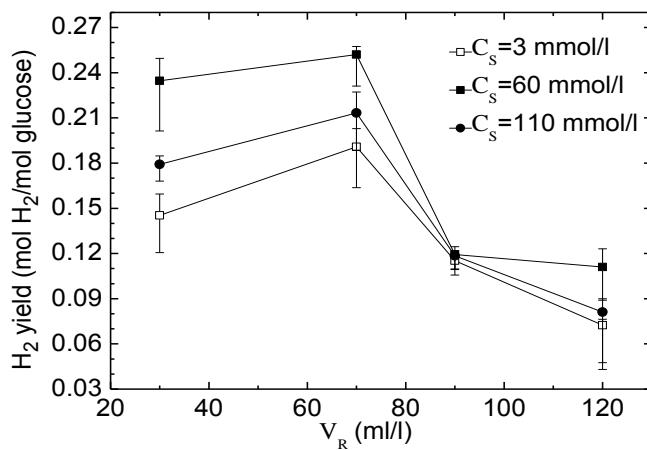


图 2.44 进口流量  $V_R$  对不同底物浓度下形成的生物膜产氢得率的影响( $\lambda_R=590 \text{ nm}$ ,  $I_R=5000 \text{ lx}$ ,  $C_R=60 \text{ mmol/l}$ )

Fig. 2.44 Effect of flow rate  $V_R$  on  $H_2$  yield of biofilm formed under different substrate concentrations ( $\lambda_R=590 \text{ nm}$ ,  $I_R=5000 \text{ lx}$ ,  $C_R=60 \text{ mmol/l}$ )

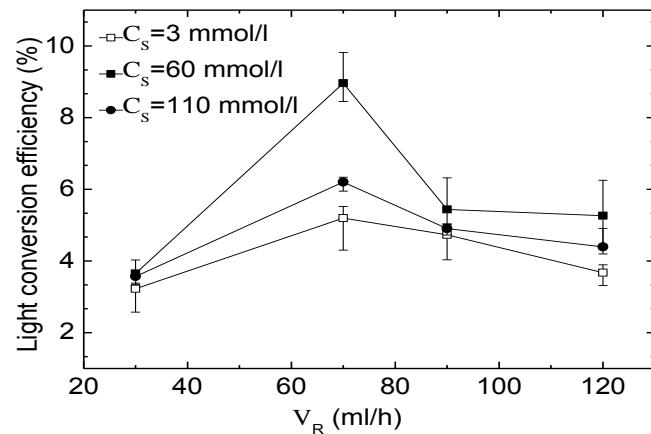
图 2.45 进口流量  $V_R$  对不同底物浓度下形成的生物膜光能转化效率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$ lx,  $C_R=60$  mmol/l)

Fig. 2.45 Effect of flow rate  $V_R$  on light conversion efficiency of biofilm formed under different substrate concentrations ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $C_R=60$  mmol/l)

图2.43-2.45显示了运行时流量对不同底物浓度条件下形成的生物膜产氢速率、产氢得率和光能转化效率的影响。从图中可以看出,底物浓度为3、60和110 mmol/l下形成的生物膜产氢性能随进口流量变化的规律一致。当反应器进口流量低于70 ml/h时,三种底物浓度条件下形成的生物膜产氢性能随着流量的增加而增加;当超过70 ml/h后,产氢性能逐渐下降。这主要是生物膜内传质速率和光合细菌生化反应速率协调一致后的结果。

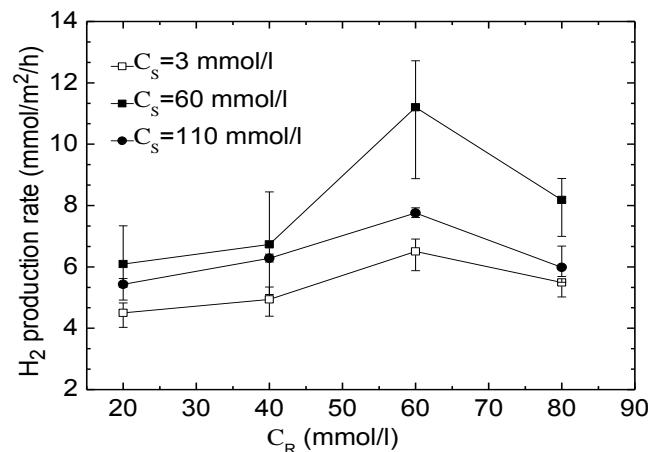
图 2.46 底物浓度  $C_R$  对不同底物浓度下形成的生物膜产氢速率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx, $V_R=70$  ml/h)

Fig. 2.46 Effect of substrate concentration  $C_R$  on average  $H_2$  production rate of biofilm formed under different substrate concentrations ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

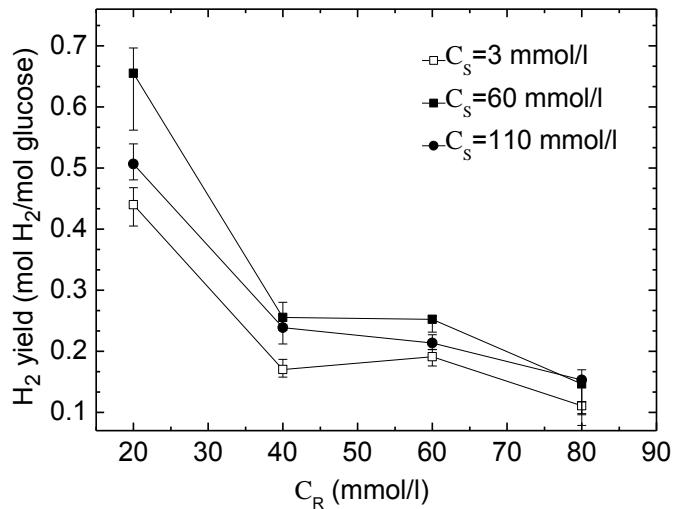


图 2.47 底物浓度  $C_R$  对不同底物浓度下形成的生物膜产氢得率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

Fig. 2.47 Effect of substrate concentration  $C_R$  on  $H_2$  yield of biofilm formed under different substrate concentrations ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

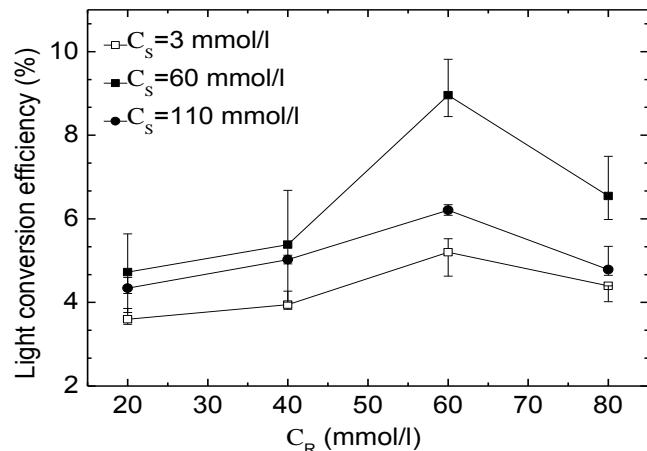


图 2.48 底物浓度  $C_R$  对不同底物浓度下形成的生物膜光能转化效率的影响( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

Fig. 2.48 Effect of substrate concentration  $C_R$  on light conversion efficiency of biofilm formed under different substrate concentrations ( $\lambda_R=590$  nm,  $I_R=5000$  lx,  $V_R=70$  ml/h)

底物浓度对启动期中不同微结构生物膜的产氢速率、产氢得率和光能转化效率的影响如图 2.46-2.48 所示。当底物浓度从 20 mmol/l 增加到 60 mmol/l 时, 底物浓度为 3、60 和 110 mmol/l 下形成的生物膜产氢速率逐渐增加; 当进口底物浓度超过 60 mmol/l 时, 产氢速率反而下降。在光照条件一定的情况下, 光生物制氢反应器的光能转化效率与产氢速率成正比关系, 因而三种条件下形成的生物膜光能

转化效率随底物浓度变化的规律与产氢速率相类似。底物浓度为 3、60 和 110 mmol/l 下形成的生物膜产氢得率随着浓度的增加呈单调下降的规律，其最大值分别为 0.44、0.66 和 0.51 mol H<sub>2</sub>/mol glucose。这主要是因为在高的底物浓度条件下，底物传质量增加，底物传质速率超过生物膜内生化反应速率最大值，使得生物膜内积累了更多的底物，产生底物抑制作用；另外高浓度改变了光合细菌代谢途径，二者综合因素导致了产氢代谢活性的降低，致使反应器产氢得率的下降。

## 2.5 本章小结

本章采用透明的有机玻璃材料作为生物膜反应器的主体，载玻片作为光合细菌吸附和生长的载体，构建了用于生物膜结构观察和产氢性能的两个实验系统，主要研究在启动期中不同光照、水力和营养条件对光合细菌生物膜成膜形态和微结构的影响；并进而研究稳定期中具有不同结构特性的生物膜在不同运行参数(光照波长、光照强度、进口流量和底物浓度)下的产氢性能。实验得到如下结论：

1. 生物膜中的光合细菌主要以短杆状为主，也有少量的长杆状存在。不同启动条件下形成的生物膜结构对后期稳定运行期中光生物反应器的底物转化、产氢性能和光能利用效率均有着显著影响。
2. 5000 lx 光照强度下形成的生物膜具有较大的细胞形态和孔隙率，也具有最大的生物膜干重为 0.915 mg/cm<sup>2</sup>。由于超过光合细菌光饱和点，8000 lx 光照强度下形成的生物膜含有较多的 EPS 并导致孔隙率最低。而最大生物膜厚度在光照强度为 1000 lx 下得到为 22.2 μm。光照强度为 5000 lx 下形成的生物膜在稳定期的产氢性能最高。
3. 光照波长为 470 nm 下的生物膜具有较多 EPS 含量，导致其孔隙率最低，同时具有最大的生物膜干重和厚度，分别为 1.013 mg/cm<sup>2</sup> 和 27.8 μm。光照波长为 590 nm 下形成的生物膜具有较大的细菌形态和孔隙率，且该条件下形成的生物膜在稳定期具有最高的产氢性能。
4. 生物膜结构随反应器进口流量的增加变得更加致密。最大生物膜厚度在进口流量为 38 ml/h 下获得，为 19.1 μm。进口流量为 228 ml/h 下形成的生物膜具有较大的细菌形态和适中的孔隙率，且该条件下形成的生物膜在稳定期的产氢性能最高。
5. 随着底物浓度的增加，生物膜结构会变得更加疏松。底物浓度为 110 mmol/l 下形成的生物膜具有最大的孔隙率。生物膜干重和厚度在底物浓度为 60 mmol/l 下获得最大值，且在该条件下形成的生物膜在稳定期的产氢性能最佳。
6. 在稳定运行期，光合细菌生物膜产氢速率随光照波长、光照强度、进口流量和底物浓度的增加呈先增加后减小的趋势，最大产氢速率为 11.2 mmol/m<sup>2</sup>/h。产

氢得率均随进口底物浓度的增加而持续减少，最大产氢得率为  $0.66 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$ 。光能转化效率均随光照强度的增加而逐渐降低，最高光能转化效率为 28.1%。

### 3 固体基质表面光合细菌生物膜生长特性模拟

#### 3.1 引言

由第二章平板式光生物膜制氢实验可以看出：不同启动操作条件对形成生物膜的形态和微结构有重要影响，且这种不同结构的生物膜在产氢速率和光能利用效率方面有很大差异，因而可以认为生物膜结构对生物膜反应器的整体性能起决定性作用。国内外研究者除了通过实验手段来获取不同操作条件对生物膜形成的结构影响外，数学模拟作为一种有效的方法，也应用于生物膜生长和结构的研究中。由于对细菌生长及分裂机理还不十分清楚，传统生物膜生长模型都假设生物膜为一种均匀结构的连续体，并人为设定简单的细胞分裂规则，其模拟结果与实验观察得到的复杂生物膜结构相差甚远。元胞自动机模型根据具体模拟对象制定相应的演化规则，结合描述生物膜内部传质和生化反应的微分方程，从而可以模拟出与实际生物膜相似的复杂结构，该方法被很多国外研究者用于生物膜结构研究，而国内在这方面研究则相对很少。此外，这些生物膜生长模型对象主要为好氧硝化细菌，对光合细菌生物的生长和结构模拟还很少。本文主要针对光合产氢细菌，利用前期实验拟合得到的光合细胞沼泽红假单胞菌的最大比生长速率的关联式，建立光合细菌生物膜在固体基质表面生长的元胞自动机模型，计算不同外部环境条件对生物膜生长过程中特征参数的变化。

#### 3.2 数学模型

##### 3.2.1 物理问题描述

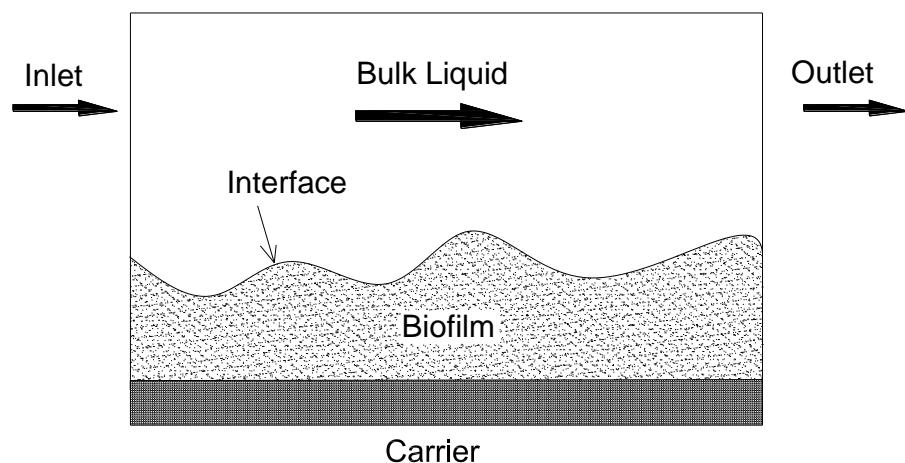


图 3.1 生物膜制氢反应器中典型生物膜形态示意图

Fig. 3.1 Schematic of the morphology of biofilm in biofilm-based reactor

图 3.1 为光生物膜制氢反应器中的一种典型生物膜形态。在外部光源的照射下, 有机废水进入反应器后通过对流和扩散作用进入生物膜内部被光合细菌降解, 生物膜内的代谢产物反向扩散回液相区并随主流液体流出。因而生物膜结构在这种传输过程中起着决定性作用, 而这种结构会受到光照条件、营养条件、水力条件、接种量、温度及 pH 等很多因素的影响。

### 3.2.2 数学模型建立

在采用扩散-反应方程和元胞自动机模型进行生物膜生长模拟时, 根据实际情况对模型作如下假设: ①生物膜为均相平衡系, 底物在其内部扩散并消耗, 只考虑由于底物消耗导致菌落的生长; ②在生物膜形成过程中, 微生物的生理特性不发生改变, 从悬浮细菌培养基中获得的细菌生长和底物消耗动力学同样适用于生物膜; ③底物的平均扩散系数用于整个生物膜区域; ④代谢产物在外部的扩散影响忽略不计; ⑤底物通过扩散传递进生物膜; ⑥生物膜内各点处的光照强度相同。

#### 1) 计算区域及变量定义

如图 4.2 所示, 光合细菌生物膜生长模拟区域在二维的笛卡尔坐标中进行, 计算区域为  $L_x$ ,  $L_y$ 。并将计算区域离散为  $N \times L$  个矩形网格单元, 每个网格单元表征一个光合细菌个体, 表示为  $(x, y) \in (0 \dots N-1, 0 \dots L-1)$ 。在计算过程中, 选用无量纲底物浓度( $S$ )和无量纲生物量密度( $C$ )来代表在生物膜生长过程中单元格的信息, 每个单元格中无量纲底物浓度  $S_{x,y}$  取和无量纲生物量密度  $C_{x,y}$  为 0 到 1

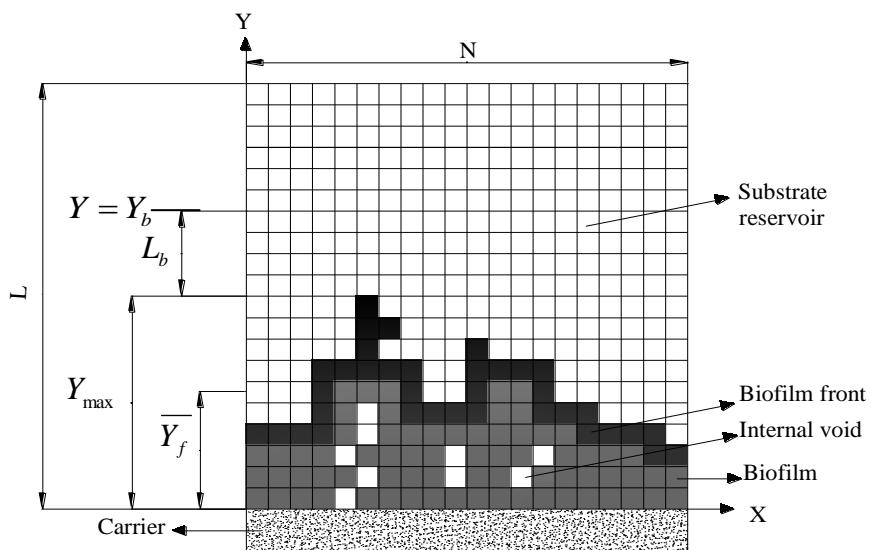


图 3.2 光合细菌生物膜生长示意图

Fig. 3.2 Schematic of the growth of PSB biofilm

之间的值。使用变量  $c_f$  存储单元格被固体颗粒(如细菌, 载体等)占据的信息, 单元

格占据状态  $c_{f,X,Y}$  为 0 表示未占据点, 为 1 表示被光合细菌占据。

计算开始时, 一定数量的细菌初始接种量( $n_0$ )随机性分布在固体基质表面上。底物来自于系统顶部的理想源; 假定生物膜在静态流体环境中生长, 即底物从理想源利用扩散作用传输, 通过液体边界层到达细菌表面进行降解。

## 2) 控制方程

网格单元中的底物浓度取决于生物膜内传输机理和反应之间的平衡。二维系统中的质量平衡式为:

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = D_s \left( \frac{\partial^2 c_s}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c_s}{\partial y^2} \right) - r_s(c_s, c_x) \quad (3.1)$$

式中  $c_s$  为底物浓度,  $c_x$  为生物量密度,  $r_s$  为底物消耗速率,  $D_s$  为底物在生物膜内的有效扩散系数,  $t$  为生物膜生长时间, 其中  $r_s$  取决于  $c_s$  和  $c_x$ 。对于生物反应过程,  $r_s$  一般定义为 Monod 方程形式:

$$r_s(c_s, c_x) = \frac{1}{Y_{X/S}} r_x(c_s, c_x) + m_s c_x \quad (3.2)$$

$$r_x(c_s, c_x) = \mu_m \frac{c_x c_s}{K_s + c_s} \quad (3.3)$$

式中  $Y_{X/S}$  为生成细胞的干重与完全消耗用于细胞生长的基质的质量之比, 表示在无维持代谢时的细胞得率, 即为最大细胞得率;  $m_s$  为包括细胞衰落在内的维持系数,  $r_x$  为细胞比生长速率,  $\mu_m$  为光合细菌的最大比生长速率,  $K_s$  为饱和常数。

引入无量纲变量:

$$X = \frac{x}{L_x}, \quad Y = \frac{y}{L_y}, \quad S = \frac{c_s}{c_{s0}}, \quad C = \frac{c_x}{c_{xm}}; \quad (3.4)$$

式中  $c_{s0}$  为初始浓度,  $C_{xm}$  为最大生物量浓度。

将式(3.4)代入式(3.1)得到质量守恒方程的无量纲形式为:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = D_s \left[ \frac{\partial^2 S}{(L_x \partial X)^2} + \frac{\partial^2 S}{(L_y \partial Y)^2} \right] - \rho_s(C, S) \quad (3.5)$$

式中  $\rho_s(C, S)$  为标准化底物消耗速率:

$$\rho_s(C, S) = \frac{r_s}{c_{s0}} \quad (3.6)$$

生物量密度通过生物量平衡方程进行计算, 当单元格无量纲生物量浓度达到最大值( $C_{xm} \geq 1$ )时, 按照 40% 和 60% 比例分裂为两部分。第一部分留在原单元格, 另一部分根据 CA 规则推动临近单元网格并将其取代。

考虑生物膜的积累是由于生物量的生长和衰退的净余结果, 则无量纲生物量平衡式为:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \rho_x(C, S) \quad (3.7)$$

式中  $\rho_x(C, S)$  为标准化生物量积累速率:

$$\rho_x(C, S) = r_x / c_{x_m} \quad (3.8)$$

将式(3.7)和(3.8)进行无量纲化可得到:

$$r_s(S, C) = \frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \times c_{x_m} \times C \times \frac{S}{\frac{K_s}{c_{s_0}} + S} + c_{x_m} \times C \times m_s \quad (3.9)$$

$$r_x(S, C) = \frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \times c_{x_m} \times C \times \frac{S}{\frac{K_s}{c_{s_0}} + S} \quad (3.10)$$

其中  $\mu_m$  和  $m_s$  采用前期实验得到的光合细菌生长动力学的关联式:

$$\mu_m = 0.25986 \exp[-1.2(I/I_{opt} - 1)^2] \exp[-10.8(pH/pH_{opt} - 1)^2] \exp[-10.5(T/T_{opt} - 1)^2] \quad (3.11)$$

$$m_s = 0.562137 \exp[-2.8(I/I_{opt} - 1)^2] \exp[-5.1(pH/pH_{opt} - 1)^2] \exp[-4.5(T/T_{opt} - 1)^2] \quad (3.12)$$

### 3) 边界条件

a 理想的底物源位于计算区域中的固定位置  $Y_b$ , 即  $S_{x,y}=1$ ,  $(X, Y) \in (0 \dots N-1, Y_b)$ 。为保持恒定的外部传质阻力,  $Y_b$  与生物膜顶端  $Y_{max}$  为一固定距离。因而底物源将随着生物膜前端扩展而向上移动。每一时刻的底物空间分布只在  $Y_b(t)$  之下的区域中进行计算。取葡萄糖扩散系数和外部传质系数分别为  $D_s = 1.68 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  和  $k_L = 4.2 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ <sup>[83]</sup>, 则浓度边界层厚度为  $L_b = \frac{D_s}{k_L} = 40 \mu\text{m}$ 。

b 基质壁面为零通量边界条件:  $\frac{dS}{dY} \Big|_{Y=0} = 0 \quad (3.13)$

c 在 X 方向采用周期性边界条件以减少有限尺寸带来的影响, 如单元格(N-1, Y)新生成的生物量将到达单元格(0, Y)。该条件对变量 S, C,  $c_f$  都适用。

### 4) 生物膜细胞生长的 CA 规则

如果  $C_{x,y} \geq 1$ (意味着单元格中的生物量密度达到最大值), 则:

a 单元格(X, Y)中的生物量分成两部分, 第一部分占据原来的单元格, 第二部分作为一个含有生物量的新单元格取代空间其他的单元格;

b 在 Moore 型邻居(如图 3.3 所示)单元格中搜索空的单元格;

c 若有较多的空邻居单元格(8 个最近邻居中至少有单元格(X, Y)的  $c_{f,x,y}=0$ ), 将新的生物量以相等的概率随机放入其中一个, 搜索结束;

d 若没有空的单元格(8 个最近邻居的  $c_{f,x,y}=1$ ), 则该子细胞将置换其邻居中一个能提供最小机械阻力的元胞, 即距离生物膜表面最近的那个元胞;

e 被替换的细胞将重复(b)-(d)在自由空间中搜索。

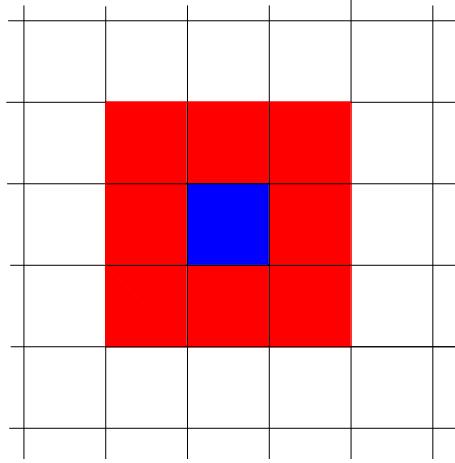


图 3.3 Moore 型邻居

Fig. 3.3 Moore-type neighbors

### 5) 特征变量

为了描述生物膜在生长过程中生物膜形态和结构的变化，引入特征变量来定量描述生物膜<sup>[84]</sup>：

#### a 生物膜孔隙率

生物膜最大前端点  $Y_{\max}$  为基质与最外端细胞间距离，则生物膜孔隙率定义为：

$$\varepsilon = 1 - \frac{\sum_{X=0}^{N-1} \sum_{Y=0}^{Y_{\max}-1} c_{X,Y}}{N \cdot Y_{\max}} \quad (3.14)$$

#### b 生物膜表面粗糙度

生物膜表面绝对粗糙度定义为生物膜前端点  $Y$  与平均前端点( $\bar{Y}_f$ )的绝对偏差( $\sigma_f$ )

$$\sigma_f = \frac{\sum_{Y=0}^{L-1} |Y - \bar{Y}_f| \cdot \bar{c}_{f,Y}}{\sum_{Y=0}^{L-1} \bar{c}_{f,Y}} \quad (3.15)$$

$t$  时刻距离固体载体为  $Y$  处的生物膜前端点平均密度  $\bar{c}_{f,Y}$  和平均前端点  $\bar{Y}_f$ ：

$$\bar{c}_{f,Y} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{X=0}^{N-1} c_{f,X,Y} \quad (3.16)$$

$$\bar{Y}_f = \frac{\sum_{Y=0}^{L-1} Y \cdot \bar{c}_{f,Y}}{\sum_{Y=0}^{L-1} \bar{c}_{f,Y}} \quad (3.17)$$

定义表面粗糙度相关系数  $\sigma$ ：

$$\sigma = \frac{\sigma_f}{\bar{Y}_f} \quad (3.18)$$

### c 生物膜厚度

生物膜厚度为  $Y_{\max}$  与  $Y$  方向单元格长度的乘积:

$$\delta = Y_{\max} \cdot dY \quad (3.19)$$

## 3.3 数值计算方法

采用有限差分法对式(3.5)进行离散, 其中等式左边非稳态项采用一阶精度的差分法, 扩散项采用二阶精度的中心差分法:

$$\begin{aligned} \frac{S_{X,Y}^{t+\Delta t} - S_{X,Y}^t}{\Delta t} &= D_s \left[ \left( \frac{S_{X+1,Y}^t - 2S_{X,Y}^t + S_{X-1,Y}^t}{(L_x dX)^2} \right) + \left( \frac{S_{X,Y+1}^t - 2S_{X,Y}^t + S_{X,Y-1}^t}{(L_y dY)^2} \right) \right] \\ &\quad - \left[ \left( \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \frac{c_{Xm}}{c_{S0}} C_{X,Y} \frac{S_{X,Y}}{\frac{K_s}{c_{S0}} + S_{X,Y}} + \frac{c_{Xm}}{c_{S0}} C_{X,Y} \cdot m_s \right) \right] \end{aligned} \quad (3.20)$$

而式(3.7)采用向前欧拉法求解:

$$C_{X,Y}^{(t+\delta t_C)} = C_{X,Y}^{(t)} + \rho_x (C_{X,Y}^{(t)}, S_{X,Y}^{(t)}) \delta t_C \quad (3.21)$$

对于如式(3.20)的非稳态多维扩散与反应方程, 当全部采用显式格式时, 求解结果的稳定性条件受到时间步长的取值限制; 而采用二阶截差的隐式格式时, 二维代数方程为五对角等式, 直接求解的计算工作量相当大。为满足结果的稳定性和减少计算工作量, 在每个坐标方向上分别采用 TDMA(tridiagonal matrix method) 进行直接求解, 而其他方向则按照显示处理的交替方向隐式方法 ADI(alternating direction implicit) 进行求解。

在每个方向上都以  $\Delta t/2$  为时间间隔用隐式方法求解一次, 连续求解两次完成一个时层的推进:

在  $X$  方向上, 式(3.20)可化为:

$$\begin{aligned} S_{X,Y}^{(t+\Delta t/2)} - S_{X,Y}^t &= D_s \frac{\Delta t}{2} \left[ \left( \frac{S_{X+1,Y}^{(t+\Delta t/2)} - 2S_{X,Y}^{(t+\Delta t/2)} + S_{X-1,Y}^{(t+\Delta t/2)}}{(L_x dX)^2} \right) + \left( \frac{S_{X,Y+1}^t - 2S_{X,Y}^t + S_{X,Y-1}^t}{(L_y dY)^2} \right) \right] \\ &\quad - \frac{\Delta t}{2} \left[ \left( \frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \frac{c_{Xm}}{c_{S0}} C_{X,Y}^t \frac{S_{X,Y}}{\frac{K_s}{c_{S0}} + S_{X,Y}} + \frac{c_{Xm}}{c_{S0}} C_{X,Y}^t \cdot m_s \right) \right] \end{aligned} \quad (3.22)$$

整理得到:

$$a_1 S_{X-1,Y}^{(t+\Delta t/2)} + a_2 S_{X,Y}^{(t+\Delta t/2)} + a_3 S_{X+1,Y}^{(t+\Delta t/2)} = b_1, \quad X = 0, \dots, N-1 \quad (3.23)$$

式中:

### 3 固体基质表面光合细菌生物膜生长特性模拟

$$\begin{aligned}
 a_1 = a_3 = -1; \quad a_2 = 2 + \frac{2}{\Delta t} \frac{(\mathbf{L}_x dX)^2}{D_s}; \\
 b_1 = & (\frac{\mathbf{L}_x dX}{\mathbf{L}_y dY})^2 S_{x, Y+1}^t + [\frac{2}{\Delta t} \frac{(\mathbf{L}_x dX)^2}{D_s} - 2(\frac{\mathbf{L}_x dX}{\mathbf{L}_y dY})^2] S_{x, Y}^t + (\frac{\mathbf{L}_x dX}{\mathbf{L}_y dY})^2 S_{x, Y-1}^t \\
 & - \frac{(\mathbf{L}_x dX)^2}{D_s} \left( \frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \frac{c_{xm}}{c_{s0}} C_{x, Y}^t \frac{S_{x, Y}^t}{\frac{K_s}{c_{s0}} + S_{x, Y}^t} + \frac{c_{xm}}{c_{s0}} C_{x, Y}^t \cdot m_s \right)
 \end{aligned} \tag{3.24}$$

在 Y 方向上, 式(3.20)可化为:

$$\begin{aligned}
 S_{x, Y}^{(t+\Delta t)} - S_{x, Y}^{(t+\Delta t/2)} = & D_s \frac{\Delta t}{2} \left[ \left( \frac{S_{x+1, Y}^{(t+\Delta t/2)} - 2S_{x, Y}^{(t+\Delta t/2)} + S_{x-1, Y}^{(t+\Delta t/2)}}{(\mathbf{L}_x dX)^2} \right) + \left( \frac{S_{x, Y+1}^{(t+\Delta t)} - 2S_{x, Y}^{(t+\Delta t)} + S_{x, Y-1}^{(t+\Delta t)}}{(\mathbf{L}_y dY)^2} \right) \right] \\
 & - \frac{\Delta t}{2} \left[ \left( \frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \frac{c_{xm}}{c_{s0}} C_{x, Y}^t \frac{S_{x, Y}^{(t+\Delta t/2)}}{\frac{K_s}{c_{s0}} + S_{x, Y}^{(t+\Delta t/2)}} + \frac{c_{xm}}{c_{s0}} C_{x, Y}^t \cdot m_s \right) \right]
 \end{aligned} \tag{3.25}$$

整理得到:

$$a_1 S_{x, Y-1}^{(t+\Delta t)} + a_4 S_{x, Y}^{(t+\Delta t)} + a_3 S_{x, Y+1}^{(t+\Delta t)} = b_2, \quad Y = 0, \dots, L-1 \tag{3.26}$$

式中:

$$\begin{aligned}
 a_1 = a_3 = -1; \quad a_4 = 2 + \frac{2}{\Delta t} \frac{(\mathbf{L}_y dY)^2}{D_s}; \\
 b_2 = & (\frac{\mathbf{L}_y dY}{\mathbf{L}_x dX})^2 S_{x+1, Y}^{(t+\Delta t/2)} + [\frac{2}{\Delta t} \frac{(\mathbf{L}_y dY)^2}{D_s} - 2(\frac{\mathbf{L}_y dY}{\mathbf{L}_x dX})^2] S_{x, Y}^{(t+\Delta t/2)} + (\frac{\mathbf{L}_y dY}{\mathbf{L}_x dX})^2 S_{x-1, Y}^{(t+\Delta t/2)} \\
 & - \frac{(\mathbf{L}_y dY)^2}{D_s} \left( \frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \frac{c_{xm}}{c_{s0}} C_{x, Y}^t \frac{S_{x, Y}^{(t+\Delta t/2)}}{\frac{K_s}{c_{s0}} + S_{x, Y}^{(t+\Delta t/2)}} + \frac{c_{xm}}{c_{s0}} C_{x, Y}^t \cdot m_s \right)
 \end{aligned} \tag{3.27}$$

对边界条件式(3.13)采用二阶精度的差分表达式:

$$(\frac{dS}{dY})_{Y=0} = \frac{-3S_{x,0} + 4S_{x,1} - S_{x,2}}{2\Delta X} = 0 \tag{3.28}$$

具体求解步骤如下:

- ① 在  $t=0$  时刻, 在基质表面初始接种细菌量  $n_0$ , 并将被细菌占据的单元格标记为 1。同时初始化单元格浓度  $S_{x, Y}^0$ ;
- ② 用  $\Delta t$  表示底物浓度的计算时间步长, 更新  $t + \Delta t$  时刻的单元格浓度  $S_{x, Y}^{(t+\Delta t)}$ ;
- ③ 用  $\delta t_c$  表示细胞生长的计算时间步长, 更新  $t + \delta t_c$  时刻的单元格生物量密度  $C_{x, Y}^{(t+\delta t_c)}$ ;
- ④ 根据生物膜生长的 CA 规则更新单元格占据信息  $c_{f, x, Y}^{(t+\delta t_c)}$ ;
- ⑤ 由新的变量  $S, C$  和  $c_f$  重复②-④, 直至达到设定的计算时间点。

由于在生化反应中, 生物量生长的时间远小于底物扩散和消耗的时间, 即  $\Delta t$  远小于  $\delta t_c$ 。因而在计算单元格浓度  $S_{x, Y}$  时, 单元格生物量  $C_{x, Y}$  和占据信息  $c_{f, x, Y}$  保持不变(通常  $\Delta t < 1$  s,  $\delta t_c = 1000$  s)。

模型计算中所用参数取值如表 3.1 所示:

表 3.1 模型计算所用参数表

Table 3.1 Parameters used for model prediction

参数	取值	单位
计算区域尺寸/ $L_X \times L_Y$	$(2 \times 10^{-3}) \times (0.4 \times 10^{-3})$	m
离散化网格/ $N \times L$	$500 \times 100$	---
Monod 饱和常数/ $K_S$	5.204	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
扩散系数/ $D_S$	$1.68 \times 10^{-9}$	$\text{m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$
细胞得率/ $Y_{X/S}$	0.61	---
最大生物量浓度/ $C_{Xm}$	20	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
最佳入射光照强度/ $(I)_{opt}$	6000	lx
最佳入射光照波长/ $(\lambda)_{opt}$	590	nm
最佳 pH/ $(\text{pH})_{opt}$	7.0	---
最佳温度/ $(T)_{opt}$	30.0	°C
扩散边界厚度/ $L_b$	$4.0 \times 10^{-5}$	m

## 3.4 计算结果与讨论

### 3.4.1 生物膜生长过程

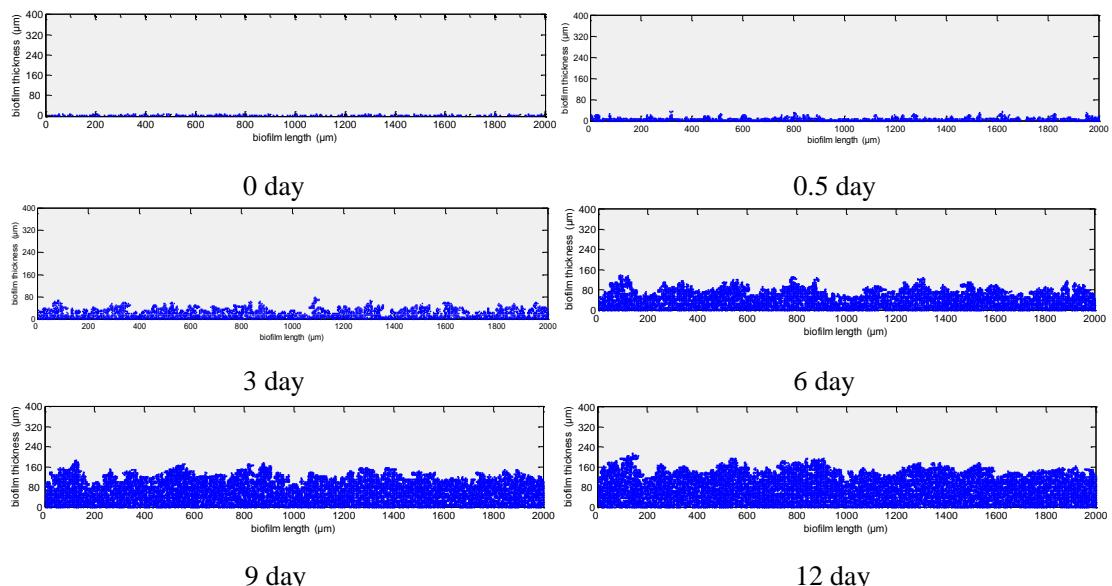


图 3.4 光合细菌生物膜在固体基质表面生长过程

Fig. 3.4 The growth of PSB biofilm on solid surface

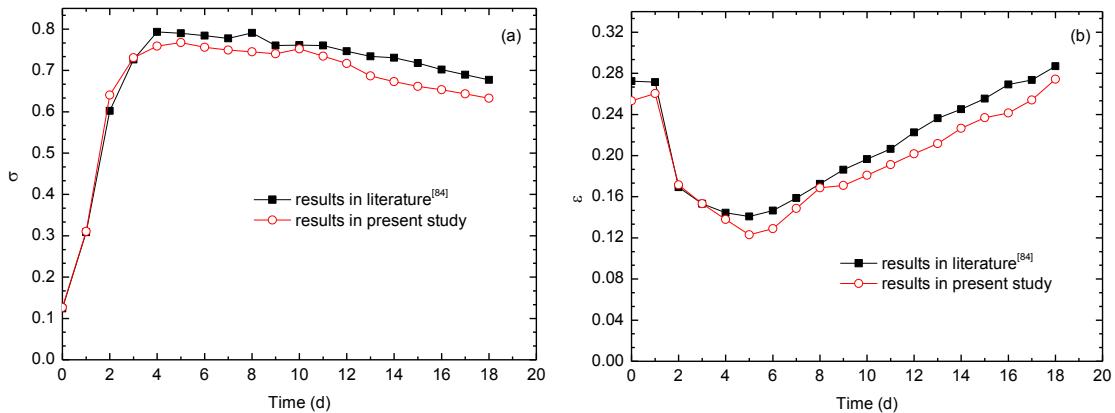
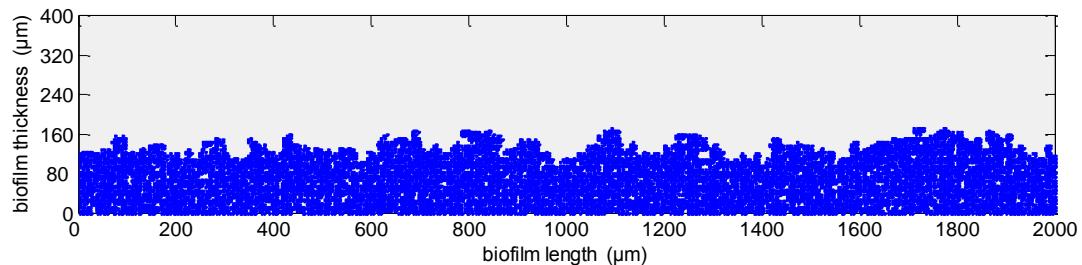


图 3.5 生物膜(a)孔隙率和(b)粗糙度随时间变化曲线

Fig. 3.5 (a) the porosity and (b) roughness of biofilm versus time

CA 模型模拟生物膜在固体基质表面生长过程的结果如图 3.4 所示。在对固体基质表面进行初始化接种后，光合细菌首先在基质表面上生长并牢固地吸附在表面上；待表面基本上被细菌覆盖后，细菌开始沿基质表面高度方向上生长，随着时间的进行，生物膜厚度逐渐增加，此外，由于在大空间液相区与生物膜区存在一定的底物浓度梯度，生物膜表面各点的底物浓度并不相同。在底物浓度较高处，细菌生长较快；而在浓度较低处，细菌生长相对较慢，从而造成生物膜表面形成具有一定粗糙度的界面。为了验证模型和计算方法的正确性，采用文献<sup>[84]</sup>中的参数进行模拟计算并将部分计算结果与该文献进行了比较，结果如图 3.5 所示。从图可以看出：本模型计算得到的生物膜孔隙率和表面粗糙度随时间的变化规律与文献得到的规律相一致。其最大相对误差分别为-12.1% ~ +6.3% 和-12.5% ~ +1.4%，说明本模型是正确的，从而进行下一步计算工作。

### 3.4.2 光照强度对生物膜生长特性的影响

(a)  $I=1000 \text{ lx}$

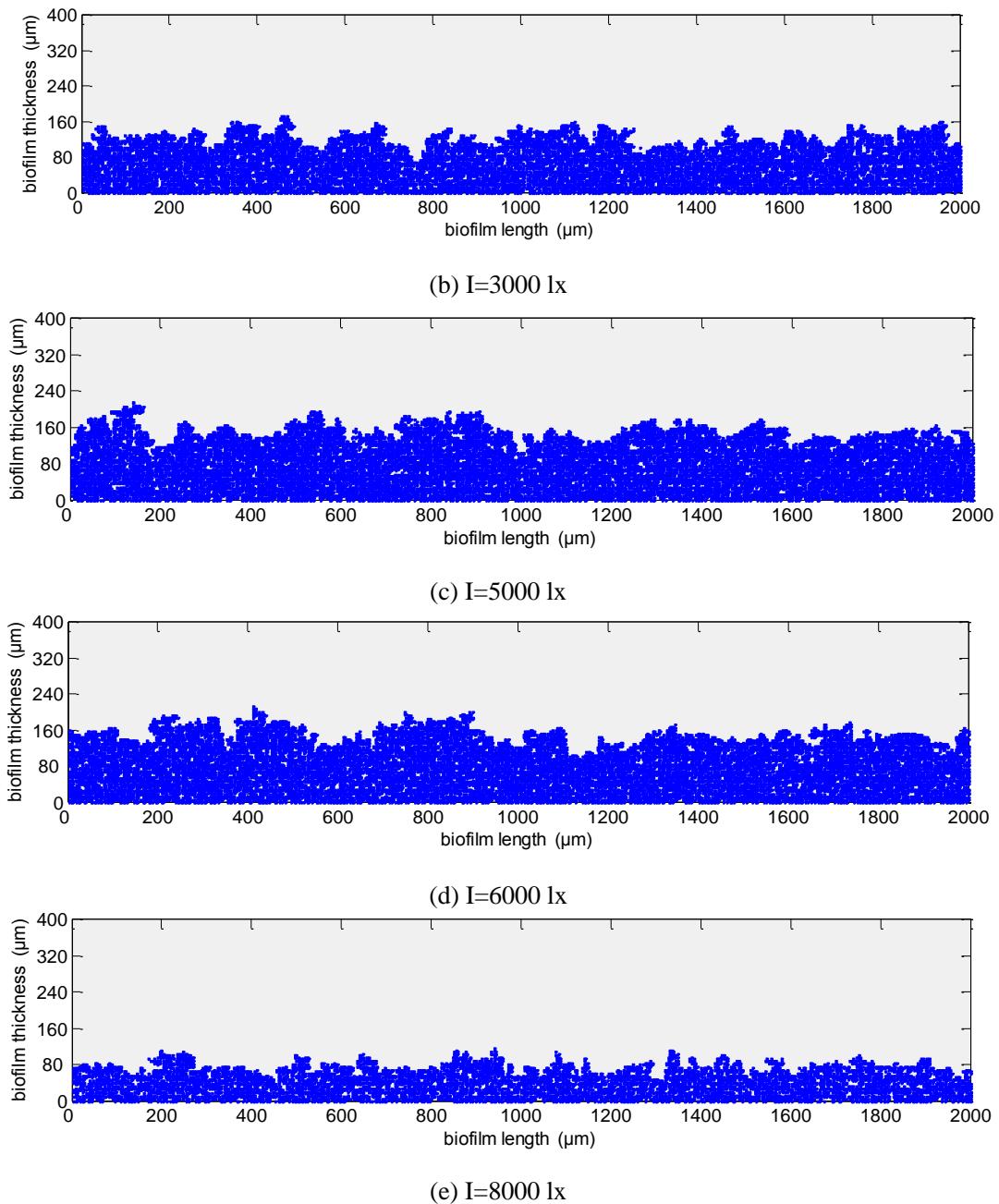


图 3.6 光照强度对生物膜生长的影响(12 天)

Fig. 3.6 Effect of illumination intensity on the growth of biofilm (12 days)

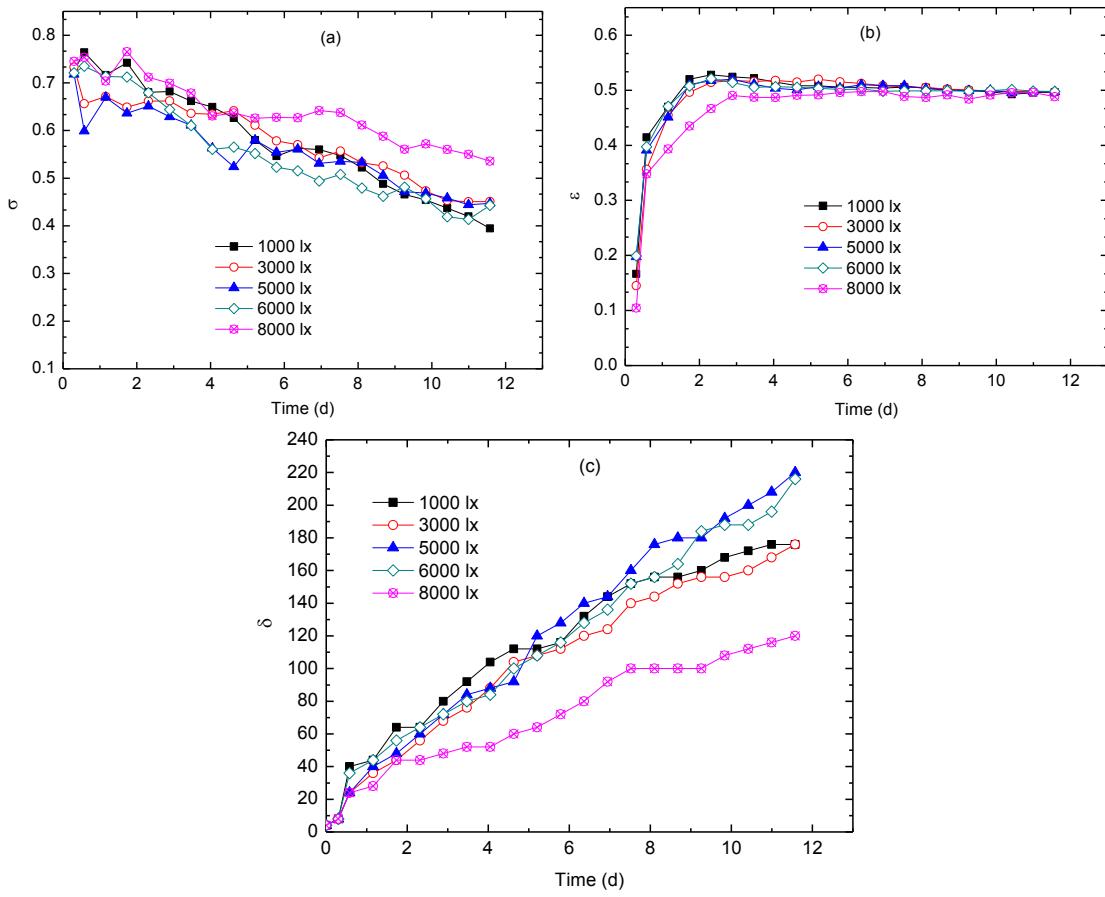


图 3.7 光照强度对生物膜特征参数(a) 孔隙率; (b) 粗糙度; (c) 厚度的影响

Fig. 3.7 Effect of illumination intensity on characteristic parameters (a) porosity, (b) roughness, (c) thickness of biofilm

光照强度对光合细菌生物膜生长过程的影响如图 3.6 和 3.7 所示, 模拟过程中底物浓度为 10.0 g/l, 温度为 30 °C, pH 为 7.0, 初始接种量为 500, 光照强度分别为 1000、3000、5000、6000 和 8000 lx。由图 3.6 可知, 五种光照强度下生长的光合细菌生物量均随时间在逐渐增加, 在相同生长时间内, 5000 和 6000 lx 光照强度下的生物量积累最多, 而 8000 lx 下的生物量积累最少。由图 3.7(a)所示, 在生物膜生长前 5 天左右, 各种光照强度下的生物膜孔隙率相差并不是很大; 在 5 天以后, 光照强度为 8000 lx 下生物膜生长的孔隙率与其他光照强度下生长的生物膜相差越来越大, 这与实验过程观察到的现象并不一致, 其主要原因为模拟过程中没有考虑光合细菌自身分泌的胞外聚合物质对生物膜孔隙率的影响。此外, 五种光照强度下的生物膜孔隙率均随着光照强度的增加呈持续减小的趋势。从图 3.7(b)可知, 五种光照强度下的生物膜表面粗糙度随时间都是先增加, 并在生长 4 天以后逐渐趋于一种稳定的状态, 说明此时生物膜表面新生长细菌与脱落细菌达到一个平衡状态。从图 3.7(c)可知, 光照强度对生物膜厚度有显著的影响, 在相同生长

时间内, 光照强度为 5000 和 6000 lx 下的生物膜厚度一般都高于其他三种光照强度下的生物膜厚度, 在生长到 12 天时, 光照强度为 5000 lx 下的最大生物膜厚度为 220  $\mu\text{m}$ , 光照强度为 8000 lx 下的最低生物膜厚度为 120  $\mu\text{m}$ , 说明高光照强度反而不利于光合细菌的生长, 这与实验结果基本相符。

### 3.4.3 底物浓度对生物膜生长特性的影响

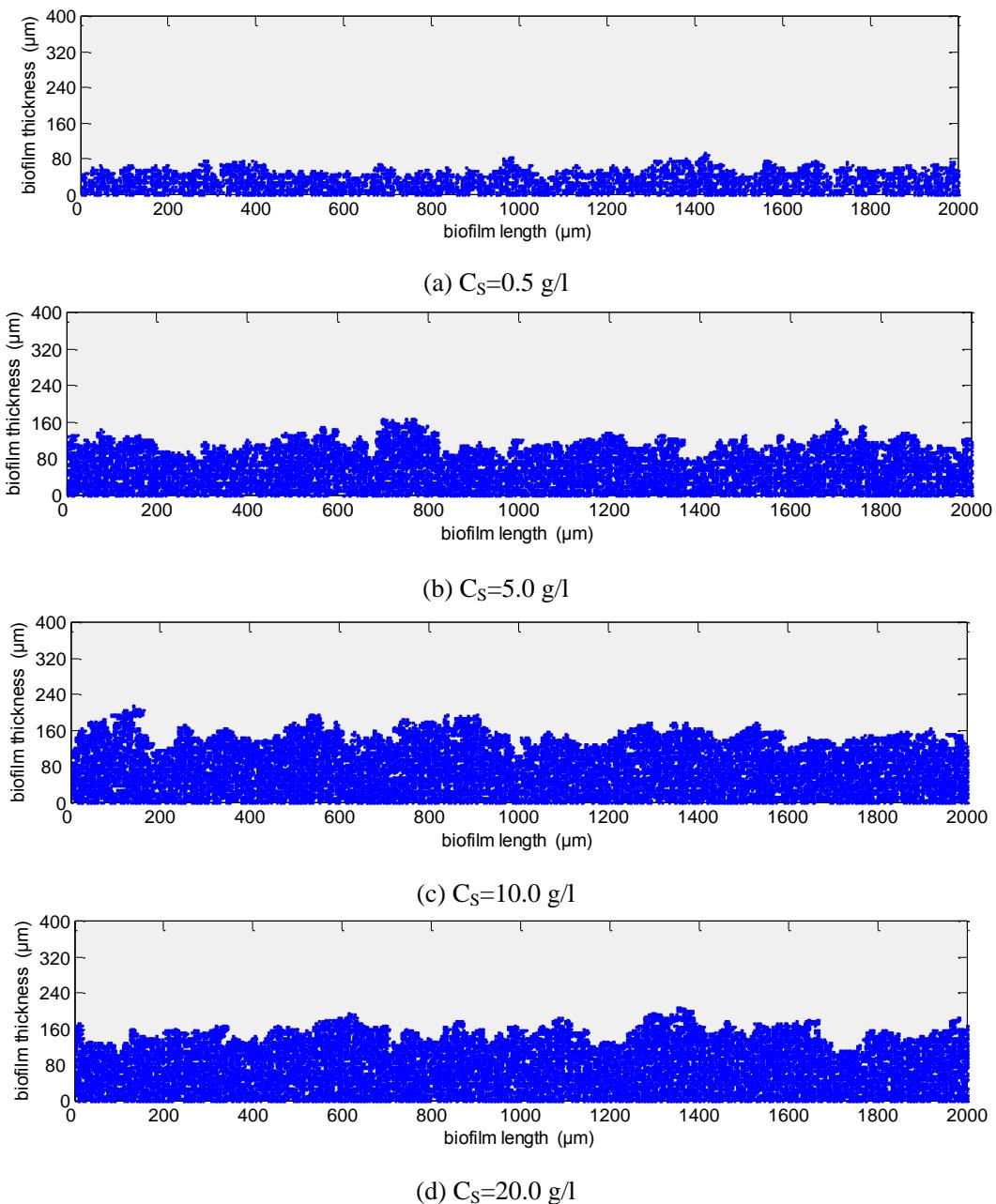


图 3.8 底物浓度对生物膜生长的影响(12 天)

Fig. 3.8 Effect of substrate concentration on the growth of biofilm (12 days)

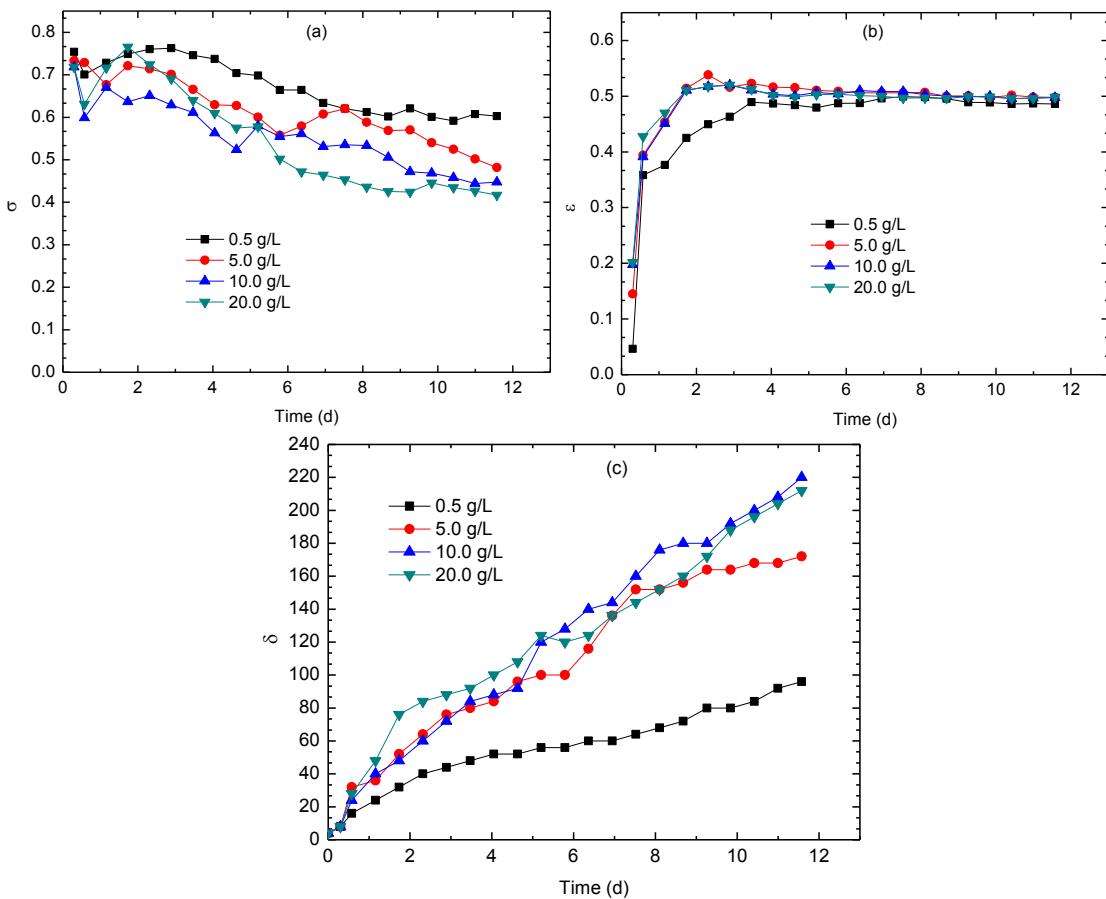


图 3.9 底物浓度对生物膜特征参数(a) 孔隙率; (b) 粗糙度; (c) 厚度的影响

Fig. 3.9 Effect of substrate concentration on characteristic parameters (a) porosity, (b) roughness, (c) thickness of biofilm

底物浓度对光合细菌生物膜生长过程的影响如图 3.8 和 3.9 所示, 模拟过程中光照强度为 5000 lx, 温度为 30 °C, pH 为 7.0, 初始接种量为 500, 底物浓度分别为 0.5、5.0、10.0 和 20.0 g/l。由图 3.8 可知, 在生长到 12 天时, 底物浓度为 0.5 g/l 条件下生长的生物膜具有最少的生物量, 随着底物浓度的增加, 生物量积累逐渐增多, 10.0 和 20.0 g/l 底物浓度下的生物量基本一样, 但明显高于其他两种条件下的生物量。从图 3.9 可知, 在光合细菌相同生长时间内, 四种底物浓度条件下的生物膜孔隙率均呈下降的趋势, 而表面粗糙度逐渐增加并在 6 天以后趋于稳定, 生物膜厚度均呈上升的规律。从图 3.9(c)还可以看出, 在细菌生长前 5 天, 底物浓度为 20.0 g/l 条件下的生物膜厚度在相同生长时间内最大, 而在细菌生长超过 5 天后, 底物浓度为 10.0 g/l 条件下的生物膜厚度最大, 表明高底物浓度在初期会促进生物膜的生长, 但在后期的这种作用并不会很明显。在生长 12 天时, 10.0 g/l 下的最高生物膜厚度为 220 μm, 0.5 g/l 下的最低生物厚度为 96 μm。

### 3.4.4 pH 值对生物膜生长特性的影响

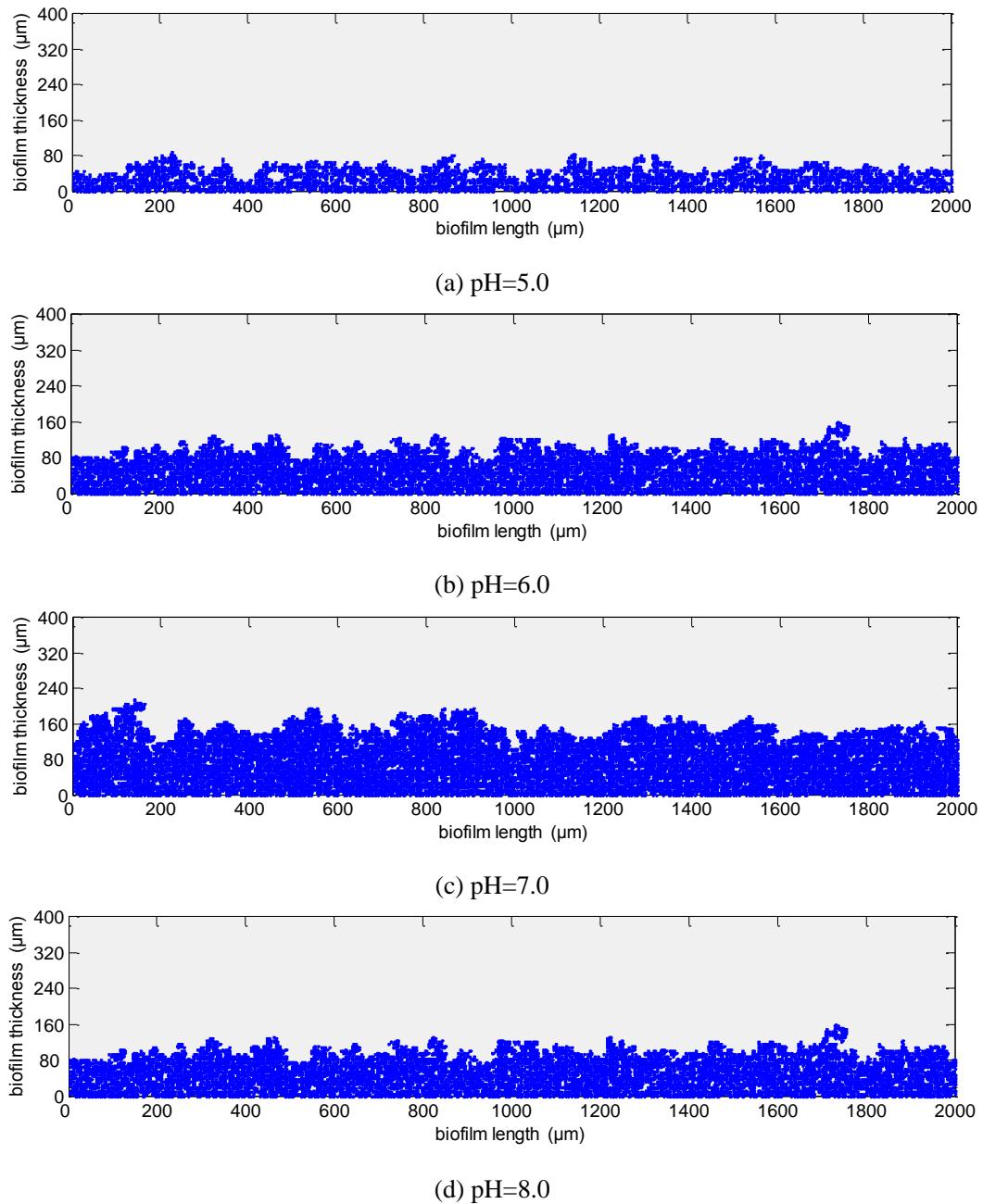


图 3.10 pH 值对生物膜生长的影响(12 天)

Fig. 3.10 Effect of pH on the growth of biofilm (12 days)

光合细菌生物膜生长受 pH 值影响很大, 其模拟结果如图 3.10 和 3.11 所示, 模拟过程中光照强度为 5000 lx, 温度为 30 °C, 底物浓度为 10.0 g/l, 初始接种量为 500, pH 值分别为 5.0、6.0、7.0 和 8.0。由图 3.10 可知, 在 pH=7.0 时光合细菌生物膜生长情况最好, pH=5.0 的酸性环境下严重限制了生物膜的生长, 而在 pH=6.0 和 pH=8.0 下生长的生物膜情况相似。这主要是因为 pH 会影响光合细菌细胞中的

固氮酶催化活性, 进而影响光合细菌新陈代谢能力和生物量的形成。模拟结果显示较低或较高的 pH 都会影响生物膜的生长, 表明光合细菌生物膜生长过程中适宜的 pH 为 7.0 左右。由图 3.11 所示, 四种 pH 条件下的生物膜孔隙率在相同生长时间内均呈下降的趋势, 而表面粗糙度逐渐增加并趋于稳定, 生物膜厚度均呈上升的规律。此外, 从图 3.11(a)和(c)可知, pH=7.0 条件下的生物膜孔隙率最低而厚度最大, 这也说明此条件是有利于细菌的生长, 而 pH=5.0 条件下的生物膜孔隙率最高而厚度最下, 表明酸性条件不利于细菌生长。

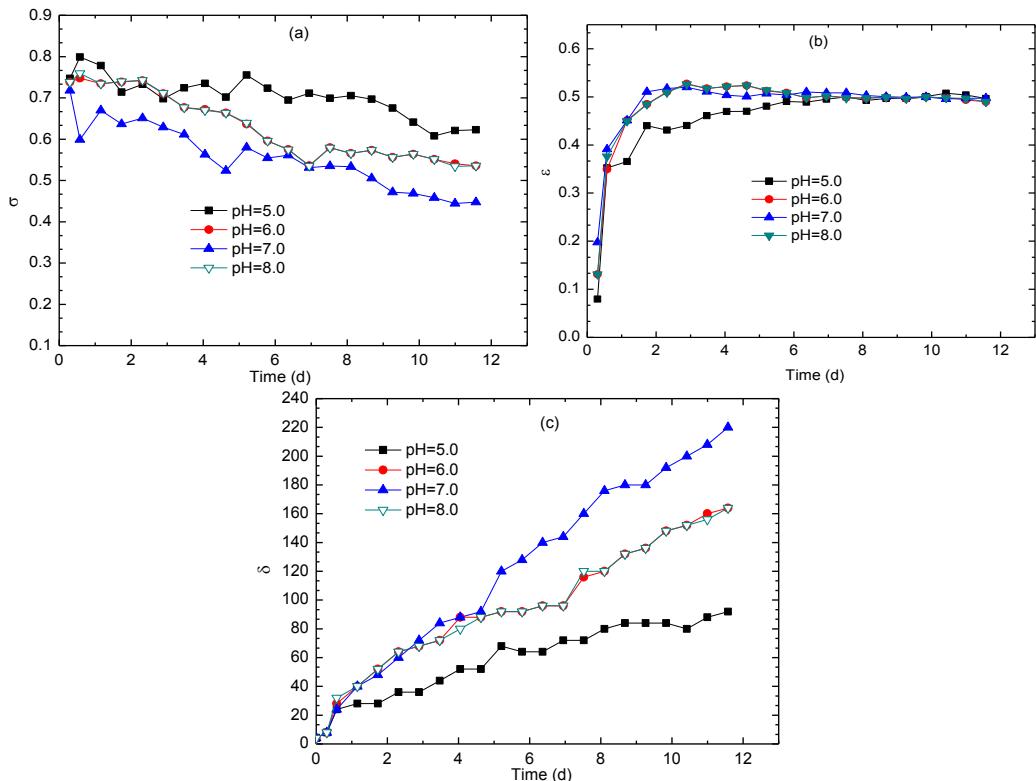
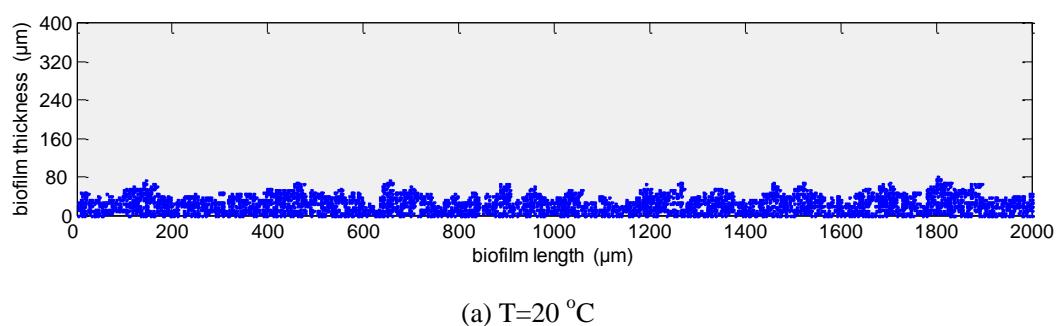


图 3.11 pH 值对生物膜特征参数(a) 孔隙率; (b) 粗糙度; (c) 厚度的影响

Fig. 3.11 Effect of pH on characteristic parameters (a) porosity, (b) roughness, (c) thickness of biofilm

#### 3.4.5 温度对生物膜生长特性的影响



(a)  $T=20^{\circ}\text{C}$

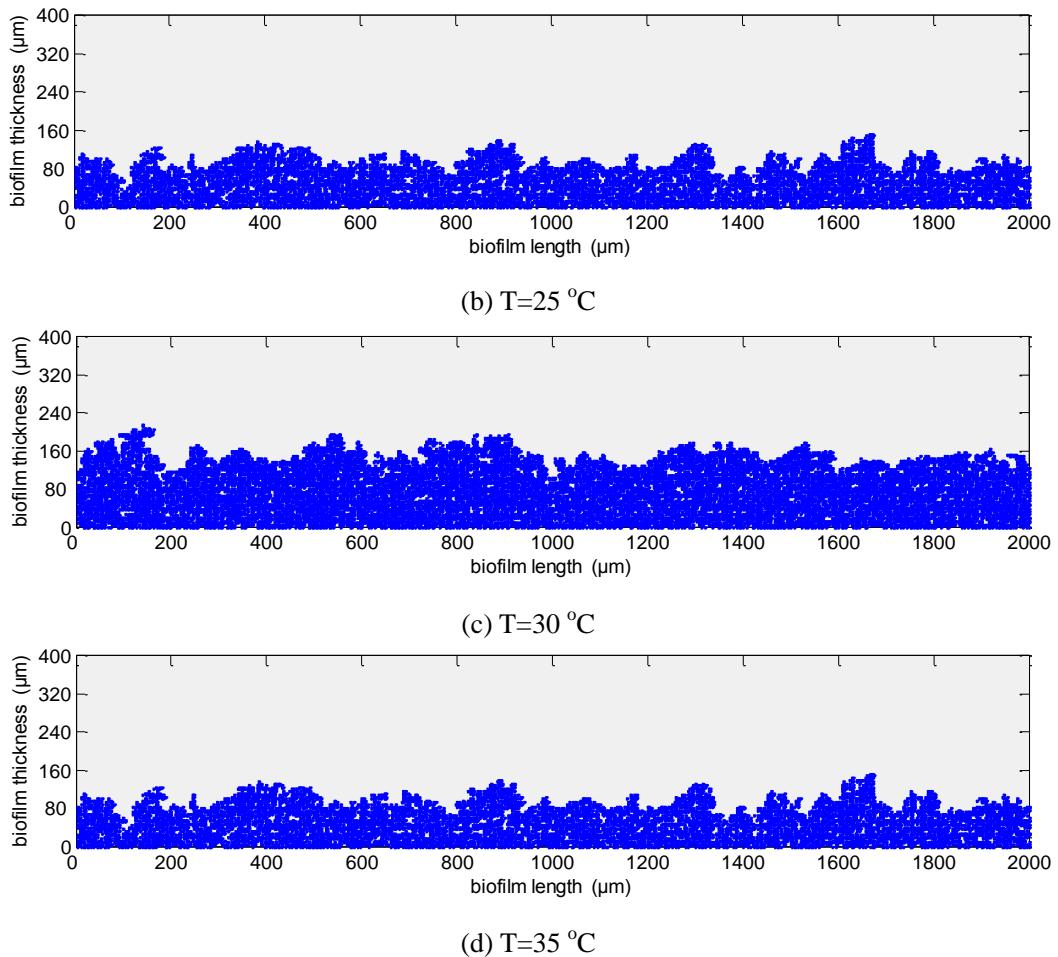


图 3.12 温度对生物膜生长的影响(12 天)

Fig. 3.12 Effect of temperature on the growth of biofilm (12 days)

温度对光合细菌生物膜生长和特征参数的影响如图 3.12 和 3.13 所示，模拟过程中光照强度为 5000 lx, pH 值为 7.0, 底物浓度为 10.0 g/l, 初始接种量为 500, 温度分别为 20、25、30 和 35 °C。由图 3.12 可知，在温度为 30 °C 时光合细菌生物膜生长情况最好，光合细菌在温度为 20 °C 条件下的生物量最少。由于光合细菌生长和代谢过程是一系列的各种酶催化结果，培养温度对光合细菌细胞内的酶活性起决定性作用，模拟结果显示在温度 30 °C 时最适宜光合细菌生物膜的生长，当低于此温度时，温度作为限制性条件，酶活性不足以满足细菌生长；当高于此温度时，温度却成为抑制性条件，主要是抑制了细菌内部各种酶活性，从而抑制其生长。从图 3.13 可知，温度对生物膜生长过程中的特征参数变化规律与其他影响因素相似，生物膜孔隙率在相同生长时间内均呈下降的趋势，而表面粗糙度逐渐增加并趋于稳定，生物膜厚度均呈上升的规律。

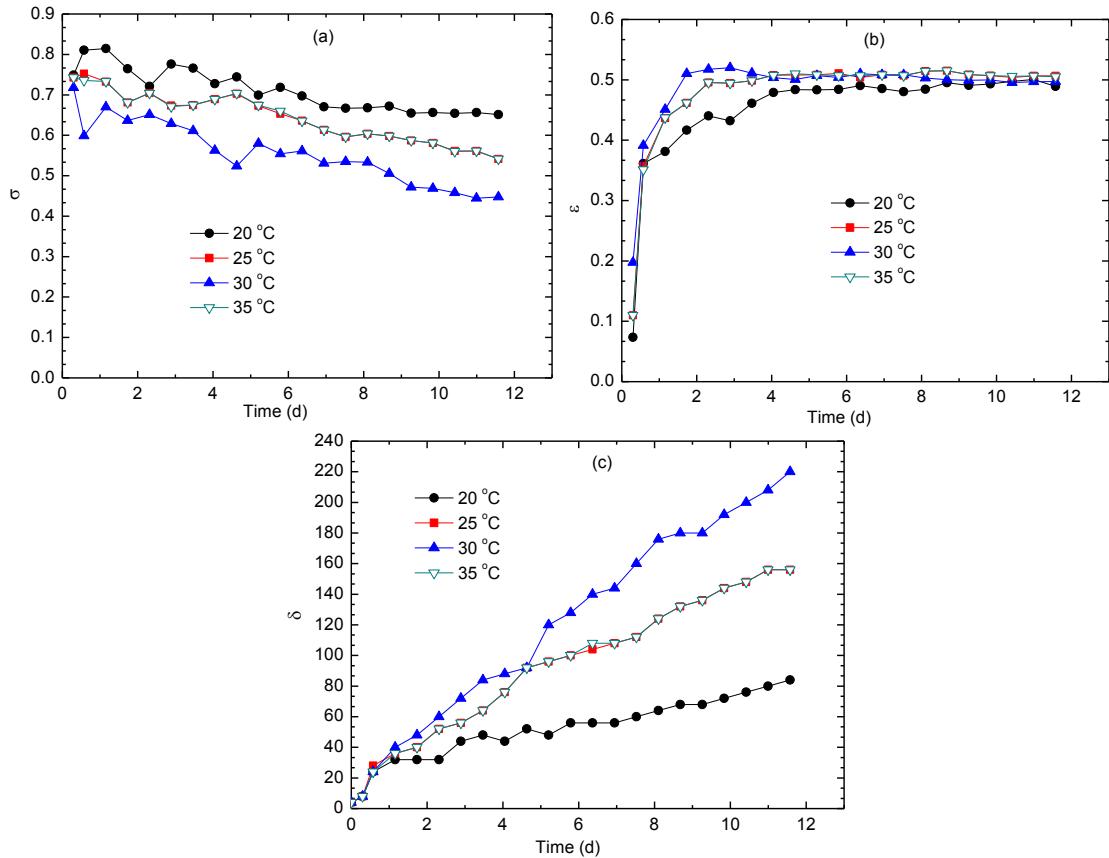
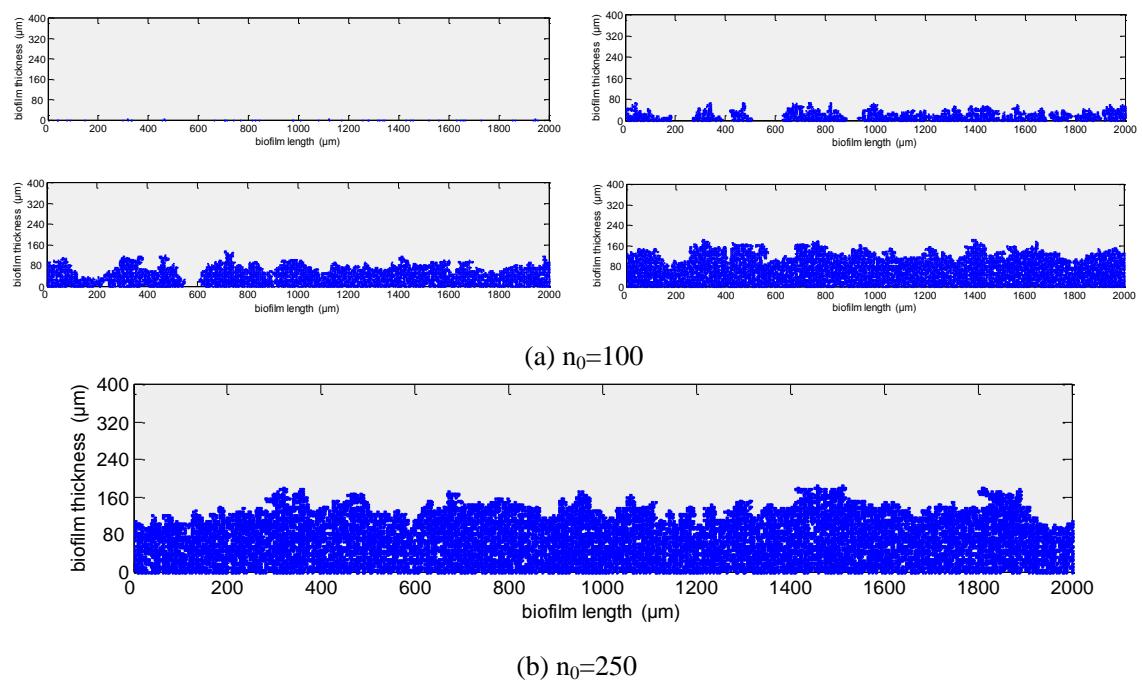


图 3.13 温度对生物膜特征参数(a) 孔隙率; (b) 粗糙度; (c) 厚度的影响

Fig. 3.13 Effect of temperature on characteristic parameters (a) porosity, (b) roughness  
(c) thickness of biofilm

### 3.4.6 初始接种量对生物膜生长特性的影响



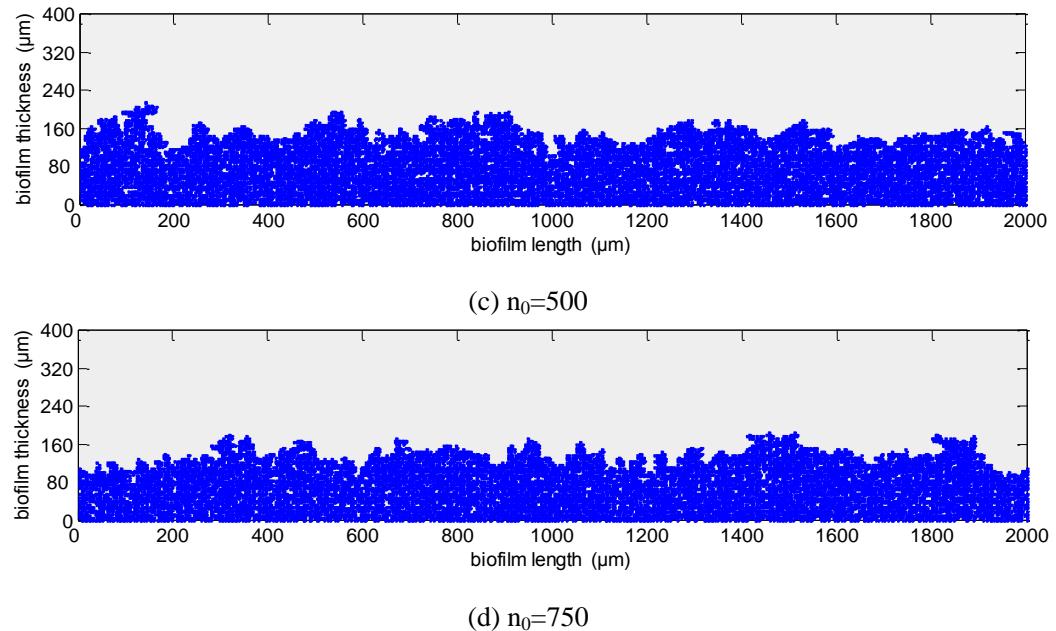


图 3.14 初始接种量对生物膜生长的影响(12 天)

Fig. 3.14 Effect of initial inoculation on the growth of biofilm (12 days)

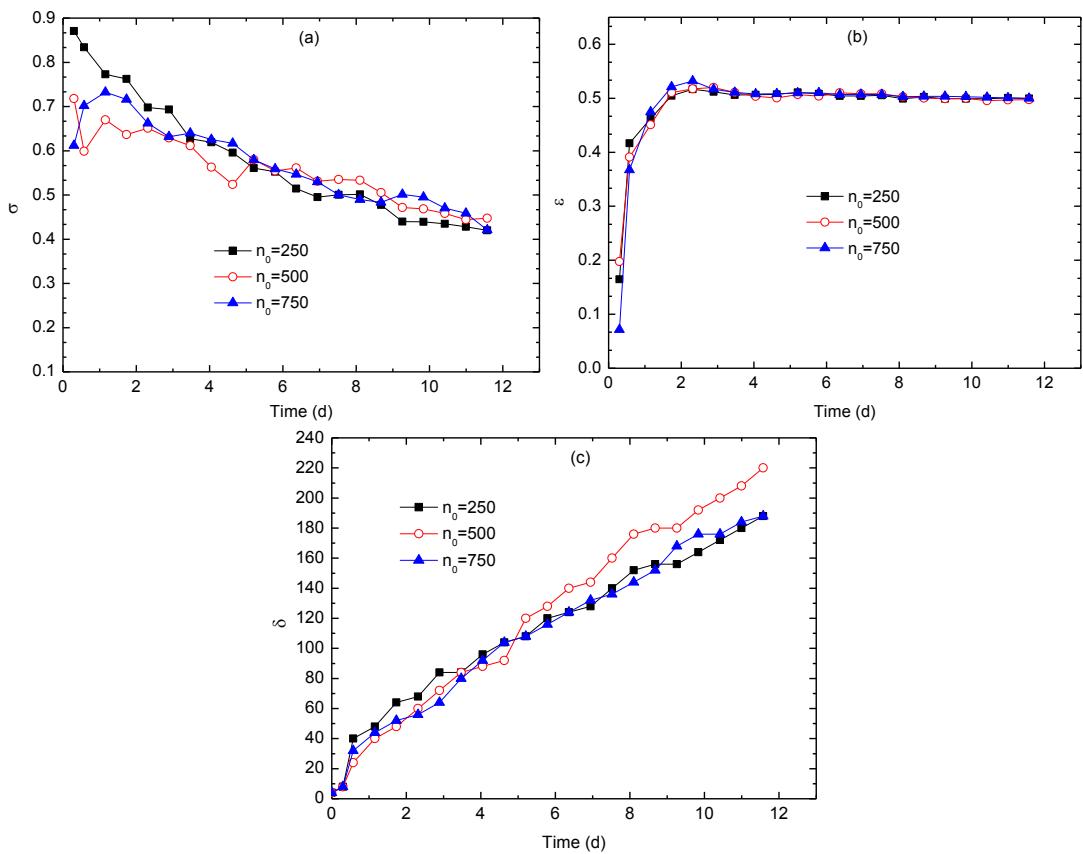


图 3.15 初始接种量对生物膜特征参数(a) 孔隙率; (b) 粗糙度; (c) 厚度的影响

Fig. 3.15 Effect of initial inoculation on characteristic parameters (a) porosity, (b) roughness  
(c) thickness of biofilm

初始接种量对光合细菌生物膜生长和特征参数的影响如图 3.14 和 3.15 所示，模拟过程中光照强度为 5000 lx，pH 值为 7.0，底物浓度为 10.0 g/l，温度为 30 °C，初始接种量分别为 100、250、500 和 750。由图 3.14(a)可知，当初始接种量为 100 时，从细菌开始生长到第 6 天左右，光合细菌主要以分散的堆状细菌群落聚集在一起，随着光合细菌的继续生长，才会将分散的堆状细菌群落连接在一起形成具有一定厚度的生物膜。由图 3.14 还可以看出，初始接种量为 500 时生物膜生长情况最佳，较低和较高的接种量都影响生长的稳定性。在光合细菌产氢实验中，研究者同样发现随着接种量的增加，其产氢性能未增强反而有明显的下降，其原因有可能是高浓度的光合细菌影响了反应液的光渗透性，同时会积累较多的抑制产氢活动的代谢中间产物<sup>[85]</sup>。由图 3.15 可知，三种接种量条件对生物膜孔隙率、粗糙度和厚度与其他影响因素相似，此外，从图 3.15(b)可以看出不同接种量条件下的生物膜粗糙度在相同生长时间内基本一致。

### 3.5 本章小结

根据扩散-反应方程，Monod 生化反应动力学和元胞自动机规则，建立光合细菌生物膜在固体基质表面生长的二维模型。其主要结论如下：

1. 光照条件和营养条件对生物膜生长和结构有重要影响，在光照强度为 5000 lx，底物浓度为 10.0 g/l 时生物膜生长情况最好，具有较多的生物量和厚度。
2. 温度和 pH 对光合细菌细胞内的酶催化活性起决定作用，较低或较高的温度和 pH 都会限制或抑制其酶活性，从而影响光合细菌生物膜生长。最适温度和 pH 条件分别为 30 °C 和 7.0。
3. 初始接种量较低时，生物膜生长初期主要以分散的堆状细菌群落为主。随着初始接种量的增加，光合细菌生物膜生长逐渐变好。但过高的初始接种量反而会抑制光合细菌生物膜的继续生长。本文模拟得到最适初始接种量为  $n_0=500$ 。



## 4 结 论

### 4.1 本文主要结论

本文采用生物膜法光生物制氢技术，主要针对不同操作条件下形成的光合细菌生物膜结构对产氢性能的影响，构建了用于生物膜结构观察和产氢性能实验的平板式光生物制氢反应器。以前期实验筛选鉴定的具有高产氢性能的沼泽红假单胞菌 *Rhodoseudomonas palustris* CQK 01 作为菌种，研究了不同光照强度、光照波长、底物流速和浓度对生物膜形态和微结构的影响，并讨论了不同微结构的生物膜对底物传输降解和光能利用效率的影响。在实验研究基础上，采用扩散-反应方程和元胞自动机规则，结合前期实验得到的光合细菌生长动力学参数，建立了光合细菌生物膜在固体基质表面生长的二维元胞自动机模型，并研究了不同光照强度、底物浓度、pH、温度和初始接种量对光合细菌在生长成膜过程中的结构及特征参数的影响。获得以下主要结论：

1. 生物膜中的光合细菌以短杆状为主，但也有少量的长杆状存在。不同启动条件下形成的生物膜结构对后期稳定运行期中光生物反应器的产氢性能有着显著影响。
2. 光照强度为 5000 lx 下形成的生物膜具有较大的细菌形态和孔隙率，且最大的生物膜干重为  $0.915 \text{ mg/cm}^2$ 。由于超过光合细菌光饱和点，光照强度为 8000 lx 下形成的生物膜含有较多的 EPS 并导致孔隙率最低。而最大生物膜厚度在光照强度为 1000 lx 下得到为  $22.2 \mu\text{m}$ 。光照强度为 5000 lx 下形成的生物膜在稳定期的产氢性能最高。
3. 光照波长为 470 nm 下的生物膜具有较多 EPS 含量，导致其孔隙率最低，同时具有最大的生物膜干重和厚度，分别为  $1.013 \text{ mg/cm}^2$  和  $27.8 \mu\text{m}$ 。光照波长为 590 nm 下形成的生物膜具有较大的细菌形态和孔隙率，且该条件下形成的生物膜在稳定期的产氢性能最高。
4. 生物膜结构随进口溶液流量的增加变得更加致密，在进口溶液流量为 38 ml/h 下形成的低流体剪切力使得生物膜厚度最大为  $19.1 \mu\text{m}$ 。而在进口溶液流量为 228 ml/h 下形成的生物膜具有较大的细菌形态和适中的孔隙率，且该条件下形成的生物膜在稳定运行期的产氢性能最高。
5. 随着底物浓度的增加，生物膜结构会变得更加疏松，底物浓度为  $110 \text{ mmol/l}$  下形成的生物膜具有最大的孔隙率。生物膜干重和厚度在底物浓度为  $60 \text{ mmol/l}$  下获得最大值，且该条件下形成的生物膜在稳定期的产氢性能也为最佳。
6. 在稳定运行期，光合细菌生物膜产氢速率随光照波长、光照强度、进口流

量和底物浓度的增加呈先增加后减小的趋势，最大产氢速率为  $11.2 \text{ mmol/m}^2/\text{h}$ 。产氢得率均随进口底物浓度的增加而持续减少，最大产氢得率为  $0.66 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$ 。光能转化效率均随光照强度的增加而逐渐降低，最高光能转化效率为 28.1%。

7. 光合细菌生物膜生长模拟结果表明在生物膜生长过程中生物膜孔隙率均逐渐减小，而表面粗糙度均逐渐增加并趋于一个稳定值，厚度都随时间而逐渐增大。在光照波长为  $590 \text{ nm}$ ，光照强度为  $5000 \text{ lx}$ ，底物浓度为  $10.0 \text{ g/l}$ ，温度为  $30^\circ\text{C}$ ， $\text{pH}$  为 7.0 和初始接种量  $n_0$  为 500 时生物膜生长情况最好。

## 4.2 后续研究工作展望

本文对生物膜法的光生物制氢和光合细菌生物膜生长进行了实验和模型研究。作为生物反应器中的最重要部分，生物膜内部发生着复杂的质量传输和生化反应过程。因此可以考虑从以下两方面进一步开展研究工作：

1. 本文实验是在液-固两相环境中进行，而在非饱和挂膜生物反应器中，生物膜是在气-液-固三相环境中形成，因此可以从实验和模型方面研究在气-液-固三相环境中各影响因素对生物膜形成结构、底物降解以及产氢性能的影响；
2. 进一步研究光合细菌生物膜生长和产氢过程中相关动力学参数变化以及细菌繁殖的条件，从而完善细胞分裂规则，使模拟得到的生物膜生长过程和稳定运行期中的底物传输和产氢性能更接近实验研究。

## 致 谢

时光荏苒，岁月如梭！当我完成这篇毕业论文时，也就意味着三年丰富多彩的研究生学习即将结束。回想自己所收获的知识和做人道理，对生活了七年的母校重大和这座城市多了一份不舍。

进入研究生学习之初，导师廖强教授就告诫我“态度决定一切”。导师严肃的科学态度，严谨的治学精神和渊博的学识深深地感染和激励着我，让我明白踏实做事，一分耕耘一分收获；师母朱恂教授严谨的治学态度、忘我的工作热情和对科研孜孜不倦的追求始终是我学习的榜样，师母对我生活和工作无微不至的关怀也让我倍受感动；副导师王永忠副教授在我的科研和生活中感到困惑时给予的鼓励和帮助让我少走弯路。在这人生最珍贵的三年中，我从他们身上学到了做事的态度，做人的原则。借此机会，向三位敬爱的老师表达我最诚挚的感谢，你们的教诲让我受益一生！

由衷的感谢我朴实而善良的父母和亲爱的姐姐，你们在物质和精神上毫无怨言、不计回报的支持和鼓励，让我能够成长到现在。感激之情无以言表，我将用一生来回报你们的爱，祝愿我的父母和姐姐身体健康！

非常荣幸能够加入工程热物理研究所这个团队中学习、工作和成长，感谢田鑫老师在学业上曾给予我的很多帮助，感谢李俊副教授在论文修改中给予的指导和付出，感谢研究所的陈蓉老师、丁玉栋老师、王宏老师、叶丁丁老师和石泳老师在三年生活中对我点点滴滴的关心和帮助。

感谢生物组的屈晓凡师兄、谢学旺师兄、钟年丙、曹明福、彭震、郭成龙、苗俊赫等兄弟及研究所其他师弟师妹们在平常科研和生活中给予的帮助，感谢杨艳霞在我模型计算中给予的帮助。也衷心祝愿谢建、张亮、杨艳霞、郭成龙在学术路上硕果累累！

本文的研究课题得到了国家自然科学基金(No.90510020, 20876183)，国家杰出青年基金(No.50825602)，重庆市自然科学基金(CSTC, 2009BA6022)和中央高校基本科研业务费(No.CDJXS11142230)的资助，在此表示感谢！

王业军

二〇一一年五月 于重庆



## 参考文献

- [1] 袁传敏, 颜种捷, 曹建勤. 生物质制氢气的研究[J]. 煤炭转化, 2002, 25: 18-22.
- [2] J. Miyake, M. Miyake, Y. Asada. Biotechnological hydrogen production: research for efficient light energy conversion [J]. Journal of Biotechnology, 1999, 70: 89–101.
- [3] A. Melis, M.R. Melnicki. Integrated biological hydrogen production [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31: 1563-1573.
- [4] A.A. Tsygankov, S.N. Kosourova, I.V. Tolstygina, M.L. Ghirardi, M. Seibert. Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31: 1574-1584.
- [5] M.L. Ghirardi, L. Zhang, J.W. Lee, T. Flynn, M. Seibert, E. Greenbaum, A. Melis. Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub> [J]. Trends in Biotechnology, 2000; 18: 506–511.
- [6] 傅秀梅, 王亚楠, 王长云, 鹿守本, 管华诗. 生物制氢-能源、资源、环境与经济可持续发展策略[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27: 119-125.
- [7] 李福枝, 刘飞, 曾晓希, 李小龙, 张凤琴. 光合细菌(PSB)应用的研究进展[J]. 食品与机械, 2008, 24: 152-158.
- [8] 揭晶, 赵越. 光合细菌应用的研究进展[J]. 广东药学院学报, 2006, 22: 113-115.
- [9] 曾宇, 秦松, 梁明山. 光合细菌综合应用新进展[J]. 水产科学, 2000, 19: 34-36.
- [10] C.Y. Chen, M.H. Yang, K.L. Yeh, C.H. Liu, J.S. Chang. Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33: 4755-4762.
- [11] 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: 187-189.
- [12] 邓平, 费良润, 刘雪梅. 光合细菌产氢机制研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36: 6184-6186.
- [13] 张明, 史家梁. 光合细菌光合产氢机理研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5: 25-29.
- [14] 刘如林, 刁虎欣, 梁凤来. 光合细菌及其应用[M]. 北京: 中国科技出版社, 1991.
- [15] 刘灵芝, 孙军德, 梅韩, 陈锡时. 光合细菌产氢因子的研究进展[J]. 生态科学, 2004, 23: 184-186.
- [16] Y.P. Zhang, E.L. Pohlmann, P.W. Ludden, G.P. Roberts. Mutagenesis and Functional Characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* Genes from the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182: 983-992.
- [17] 吴永强, 陈秉俭, 仇哲. 浑球红假单胞菌在暗处发酵生长时的固氮酶, 吸氢酶以及放氢机

- 制的研究[J]. 微生物通报, 1991, 18: 71-74.
- [18] H. Youn, M. Conrad, S.Y. Chung, G.P. Roberts. Roles of the heme and heme ligands in the activation of CooA, the CO-sensing transcriptional activator [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2006, 348: 345-350.
- [19] T. Kondo, M. Arakawa, T. Hirai, T. Wakayama, M. Hara, J. Miyake. Enhancement of hydrogen production by a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 93: 145-150.
- [20] J.W. Peters, W.N. Lanzilotta, B.J. Lemon, L.C. Seefeldt. X-ray Crystal Structure of the Fe-Only Hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Angstrom Resolution [J]. Science, 1998, 282: 1853-1858.
- [21] I. Tommasi, M. Arestaa, P. Giannoccaroa, E. Quarantaa, C. Fragale. Bioinorganic chemistry of nickel and carbon dioxide: a Ni complex behaving as a model system for carbon monoxide dehydrogenase enzyme [J]. Inorganica Chimica Acta, 1998, 272: 38-42.
- [22] 杨素萍, 赵春贵, 曲音波, 钱新民. 铁和镍对光合细菌生长和产氢的影响[J]. 微生物学报, 2003, 43: 257-263.
- [23] 方萍, A.M.N. Omar. 培养基铁浓度对不同非共生固氮菌株小麦基因型联合固氮效率的影响[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23: 716-721.
- [24] M. Yang, R. Agarwal, G.R. Fleming. The mechanism of energy transfer in the antenna of photosynthetic purple bacteria [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2001, 142: 107-119.
- [25] E. Nakada, Y. Asada, T. Arai, J. Miyake. Light Penetration into Cell Suspensions of Photosynthetic Bacteria and Relation to Hydrogen Production [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 80: 53-57.
- [26] Q. Xu, M.R. Gunner. Trapping conformational intermediate states in the reaction center protein from photosynthetic bacteria [J]. Biochemistry, 2001, 40: 3232-3241.
- [27] K. Sasikala, Ch.V. Ramana, P. R. Rao. Environmental regulation for optimal biomass yield and photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 1991, 16: 597-601.
- [28] T. Wakayama, J. Miyake, A. Toriyama, T. Kawasugi, T. Arai, Y. Asada. Photohydrogen production using photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* RV; simulation of the light cycle of natural sunlight using an artificial source [J]. In: Zaborsky OR, editor. Biohydrogen. New York: Plenum Press; 1998.
- [29] E. Eroğlu, İ. Eroğlu, U. Gündüz, M. Yücel. Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater [J]. Bioresource Technology, 2008, 99:

6799-6808.

- [30] H. Zhu, T. Wakayama, T. Suzuki, Y. Asada, J. Miyake. Entrapment of *Rhodobacter sphaeroides* RV in cationic polymer/agar gels for hydrogen production in the presence of  $\text{NH}_4^+$  [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88: 507-512.
- [31] H.H.P. Fang, H. Liu, T. Zhang. Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2005, 30: 785-793.
- [32] M.J. Barbosa, J.M.S. Rocha, J. Tramper, R.H. Wijffels. Acetate as carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria [J]. Journal of Biotechnology, 2001, 85: 25-33.
- [33] 杨素萍, 赵春贵, 刘瑞田, 曲音波, 钱新民. 沼泽红假单胞菌乙酸光合放氢研究[J]. 生物工程学报, 2002, 18: 486-490.
- [34] P. Hillmer, H. Gest.  $\text{H}_2$  metabolism in the photosynthetic bacterium *rhodopseudomonas capsulata*:  $\text{H}_2$  production by growing cultures [J]. Journal of bacteriology, 1977, 129: 724-731.
- [35] 魏丽芳, 郑先君, 张治红, 许培援, 魏明宝. pH值对光合细菌利用乙酸(钠)产氢的影响[J]. 河南化工, 2007, 24: 32-34.
- [36] 王永忠, 廖强, 朱恂, 张攀, 巴淑丽. 静态培养条件对光合细菌产氢行为的影响[J]. 工程热物理学报, 2007, 28: 45-48.
- [37] H. Koku, İ. Eroğlu, U. Gündüz, M. Yücel, L. Türker. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2002, 27: 1315-1329.
- [38] T. Kondo, T. Wakayama, J. Miyake. Efficient hydrogen production using a multi-layered photobioreactor and a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31: 1522-1526.
- [39] C.Y. Chen, J.S. Chang. Enhancing phototropic hydrogen production by solid-carrier assisted fermentation and internal optical-fiber illumination [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 2041-2049.
- [40] J. Miyake, T. Wakayama, J. Schnackenberg, T. Arai, Y. Asada. Simulation of the daily sunlight illumination pattern for bacterial photo-hydrogen production [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88: 659-663.
- [41] I. Agalidis, A. Ivancich, A. Tony, F.R.H. Mattioli. Characterization of the *Rhodococcus* *tenuis* photosynthetic reaction center [J]. Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics, 1997, 1321: 31-46.
- [42] T. Kondo. Hydrogen production by combining two types of photosynthetic bacteria with different characteristics [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2002, 27: 1303-1308.
- [43] M. Janssen. Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield [D]. Thesis,

- Wageningen University, Wageningen, the Netherlands, 2002.
- [44] B. Zabut, K. El-Kahlout, M. Yücel, U. Gündüz, L. Türker, İ. Eroğlu. Hydrogen gas production by combined systems of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 and *Halobacterium salinarum* in a photobioreactor [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31: 1553-1562.
- [45] S. Hoekema, M. Bijmans, M. Janssen, J. Tramper, R.H. Wijffels. A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium [J]. International Journal of Hydrogen Energy 2002, 27: 1331 – 1338.
- [46] M. Modigell, N. Holle. Reactor development for a biosolar hydrogen production process [J]. Renewable Energy, 1998, 14: 421-426.
- [47] C.Y. Chen, C.M. Lee, J.S. Chang. Hydrogen production by indigenous photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5 using optical fiber-illuminating photobioreactors [J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 32: 33-42.
- [48] 王建龙, 施汉昌, 钱易. 固定化微生物技术在难降解有机污染物治理中的研究进展[J]. 环境科学研究, 1999, 12: 60-64.
- [49] 肖美燕, 徐尔尼, 陈志文. 包埋法固定化细胞技术的研究进展[J]. 食品科学, 2003, 24: 158-161.
- [50] 刘蕾, 李杰, 王亚娥. 生物固定化技术中的包埋材料[J]. 净水技术, 2005, 24: 40-42.
- [51] 赵长青, 娄海彬, 宋丹, 郑柳仙, 陈武勇. 生物固定化技术在制革废水处理中的研究现状与展望[J]. 皮革科学与工程, 2008, 18: 39-45.
- [52] 段明峰, 吴卫霞, 肖俊霞, 李良红. 利用固定化细胞技术处理废水研究进展[J]. 油气田环境保护, 2004, 9:17-20.
- [53] 郭雪琳, 王成端. 固定化微生物技术在废水处理中的应用[J]. 广东化工, 2007, 34: 67-69.
- [54] Z.P. Zhang, K.Y. Show, J.H. Tay, D.T. Liang, D.J. Lee. Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors-A comparison of biofilm-based and granule-based systems [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 33: 1559-1564.
- [55] K.S. Lee, J.F. Wu, Y.S. Lo, Y.C. Lo, P.J. Lin, J.S. Chang. Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 87: 648-657.
- [56] X. Tian, Q. Liao, W. Liu, Y.Z. Wang, X. Zhu, J. Li, H. Wang. Photo-hydrogen production rate of a PVA-boric acid gel granule containing immobilized photosynthetic bacteria cells [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34: 4708-4717.
- [57] 齐水冰, 罗建中, 乔庆霞. 固定化微生物技术处理废水[J]. 上海环境科学, 2002, 21: 185-188.

- [58] 董双石, 周丹丹, 高 欣. 好氧锥形流化床生物膜反应器启动与生物膜形成特征研究[J]. 环境科学, 2009, 30: 827-833.
- [59] 田 鑫, 廖 强, 张 攀, 朱 恺, 王永忠. 生物膜光生物反应器启动及产氢特性[J]. 工程热物理学报, 2008, 10: 46-50.
- [60] J. Fißle, G.W. Kohring, F. Giffhorn. Enhanced hydrogen production from aromatic acids by immobilized cells of *Rhodopseudomonas palustris* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 44: 43-46.
- [61] H. Yokoi, T. Tokushige, J. Hirose, S. Hayashi, Y. Takasaki. Hydrogen production by immobilized cells of aciduric *enterobacter aerogenes* strain HO-39 [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 83: 481-484.
- [62] X. Tian, Q. Liao, X. Zhu, Y.Z. Wang, P. Zhang, J. Li, H. Wang. Characteristics of a biofilm photobioreactor as applied to photo-hydrogen production [J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 977-983.
- [63] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections [J]. Science, 1999, 284: 1318-1322.
- [64] G.O. Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter. Biofilm formation as microbial development [J]. Microbiology, 2000, 54: 49-79.
- [65] J. Wimpenny. Ecological determinants of biofilm formation [J]. Biofuleing, 1996, 10: 43-63.
- [66] S.W. Hermanowicz. A model of two-dimensional biofilm morphology [J]. Water science and technology, 1998, 37: 219-222.
- [67] R. Colasanti. Cellular automata models of microbial colonies [J]. Binary, 1992, 4: 191-193.
- [68] J.W.T. Wimpenny, R. Colasanti. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms bases on cellular automaton models [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 22:1-16.
- [69] C. Picioreanu, M.C.M. van Loosdrecht, J.J. Heijnen. A new combined differential-discrete cellular automaton approach for biofilm modeling: Application for growth in gel beads [J]. Biotechnology and bioengineering, 1998, 57: 718-731.
- [70] C.S. Lapidou, B.E. Rittmann. Modeling the development of biofilm density including active bacteria, inert biomass, and extracellular polymeric substances [J]. Water Research, 2004, 38: 3349-3361.
- [71] 艾建宇, 吴显辉, 冯胜彦, 陈蔚梅, 郭明雄, 熊晓然, 吴 炜. 杆菌在平板上的生长模拟[J]. 生物物理学报, 2002, 18: 246-250.
- [72] T.C. Li, X.G. Li, S.L. Zhu. Two-dimension dynamic simulations on biofilm forming and developing [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2005, 44: 50-54.
- [73] 赵 峰, 陶祖莱. 生物模式的元胞自动机模型(II): 菌落的生长模式[J]. 生物医学工程学杂

- 志, 2007, 24: 820-823.
- [74] S. Wijeyekoon, T. Mino, H. Satoh, T. Matsuo. Effects of substrate loading rate on biofilm structure [J]. Water research, 2004, 38: 2479-2488.
- [75] H. Beyenal, Z. Lewandowski. Combined effect of substrate concentration and flow velocity on effective diffusivity in biofilms [J]. Water Research, 2000, 34: 528-538.
- [76] S. Wäscche, H. Horn, D.C. Hempel. Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface [J]. Water Research, 2002, 36: 4775-4784.
- [77] 王永忠, 廖强, 朱恂, 田鑫, 王中康, 张攀, 张宝鹏. 产氢光合细菌的分离鉴定及高产氢菌株的筛选[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14: 673-677.
- [78] R. Bakke, P.Q. Oisson. Biofilm thickness measurement by light microscopy [J]. Journal of Microbiological Methods, 1986, 5: 93-98.
- [79] W.G. Characklis, K.E. Cooksey. Biofilms and microbial fouling [M], in: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.). Advances in Applied Microbiology. Academic Press Inc., London, 1983, pp. 93-138.
- [80] B. Uyar, I. Eroglu, M. Yücel, U. Gündüz, L. Türker. Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2007, 32: 4670-4677.
- [81] Y. Akutsu, Y.Y. Li, H. Harada, H.Q. Yu. Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34: 2558-2566.
- [82] T.J. Battin, L.A. Kaplan, D. Newbold, X.H. Cheng, C. Hansen. Effects of Current Velocity on the Nascent Architecture of Stream Microbial Biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 5443-5452.
- [83] D. de Beer, P. Stoodley, F. Roe, Z. Lewandowski. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 43: 1131-1138.
- [84] C. Picoreanu, M.C.M. van Loosdrecht, J.J. Heijnen. Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 58: 101-116.
- [85] 尤希凤. 光合产氢菌群的筛选及其利用猪粪污水产氢因素的研究[D]. 河南农业大学博士学位论文, 2005.

## 附录

### A. 作者在攻读硕士学位期间发表的论文

- [1] **Ye-Jun Wang**, Qiang Liao, Yong-Zhong Wang, Xun Zhu, Jun Li. Effects of flow rate and substrate concentration on the formation and H<sub>2</sub> production of photosynthetic bacterial biofilms. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 6902-6908; (SCI 收录, IF=4.253).
- [2] Qiang Liao, **Ye-Jun Wang**, Yong-Zhong Wang, Xun Zhu, Xin Tian, Jun Li. Formation and hydrogen production of photosynthetic bacterial biofilm under various illumination conditions. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 5315-5324; (SCI 收录, IF=4.253).
- [3] 王亚军, 廖强, 田鑫, 王永忠, 朱恂. 光波长对平板反应器成膜及产氢特性影响. *工程热物理学报*, 2011, 32(2): 284-286 (EI 收录).
- [4] 王亚军, 廖强, 田鑫, 王永忠, 朱恂. 光波长对平板反应器成膜及产氢特性影响. *中国工程热物理学会传热传质学学术会议论文集*. 青岛, 2009.

### B. 作者在攻读硕士学位期间获得的荣誉

- [1] 2011.04 重庆市优秀毕业研究生。
- [2] 2011.03 重庆大学栋才奖学金研究生优秀论文奖。
- [3] 2010.12 重庆大学首届研究生创新实践能力大赛高水平学术检索论文奖。
- [4] 2010.12 重庆大学首届研究生创新实践能力大赛工业设计及产品奖。
- [5] 2010.10 重庆大学优秀毕业研究生。
- [6] 2010.06 重庆大学工程热物理研究所一等奖学金。
- [7] 2008.12 第一届全国大学生节能减排社会实践与科技竞赛一等奖。
- [8] 2008.12 动力工程学院优秀研究生。

