

不同底物种类对厌氧发酵产氢的影响

汤桂兰¹, 汤亲青², 黄健¹, 刘广青³, 孙振钧^{1*}

(1. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094; 2. 南京大学医学院, 南京 210093; 3. 北京化工大学化学工程学院, 北京 100029)

摘要:在批式培养试验中以人工配置的废水为原料, 以厌氧消化污泥作为天然产氢菌源, 通过厌氧生物发酵制备生物氢气, 研究了不同底物葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、乳糖对产氢能力的影响, 以及生物制氢发酵过程中液相组成的变化, 并对产氢动力学和细菌生长动力学进行了分析. 结果表明, 5 种底物中最佳的底物是葡萄糖, 氢气含量、累积产氢量和氢气产量最高可达到 49.52%、67.21 L/mol、3.23 mol/mol. 发酵产氢代谢产物以丁酸和乙酸为主, 乙酸的含量占到 26.76%~40.49%, 丁酸的含量占到 37.60%~58.07%, 并含有部分丙酸和乙醇, 属于丁酸型发酵. 丁酸/乙酸比值可作为衡量氢气产生效率的一个指标, 比值越大产氢量越高. 实验中氧化还原电位均在 -300 mV 以下, 以厌氧为主. Gompertz 模型能够很好地拟合其产氢过程和产氢菌生长过程.

关键词:混合微生物; 生物产氢; 底物种类; 厌氧发酵

中图分类号: X382 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)08-2345-05

Effects of Substrate Species on Fermentative Hydrogen Production

TANG Gui-lan¹, TANG Qin-qing², HUANG Jian¹, LIU Guang-qing³, SUN Zhen-jun¹

(1. College of Resources and Environmental Sciences, China Agriculture University, Beijing 100094, China; 2. School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 3. College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Biohydrogen production by anaerobic sludge was studied by using wastewater as substrate in batch process. Hydrogen production potential of different substrate species, as well as the composition of fermentation product in liquid phase, was studied in the batch culture experiments. The hydrogen production and bacterial growth dynamics were also analyzed. The experiment results demonstrated that the optimal substrate was glucose for hydrogen production. It could be obtained maximum cumulative hydrogen production 67.21 L/mol, hydrogen yield 3.23 mol/mol and hydrogen content 49.52%. The butyrate and acetate were main liquid end products, occupied 26.76%~40.49% of acetate, 37.60%~58.07% of butyrate, implying that it is butyrate-type fermentation. Butyrate/acetate could be used as the indicator for evaluating the effectiveness of H₂ production, with that the higher butyrate/acetate, the higher the hydrogen yield. ORP was less than -300 mV during fermentation indicating the experiment was anaerobic. A modified Gompertz model can adequately describe the H₂ production and bacterial growth.

Key words: mixture anaerobic microorganism; biohydrogen production; substrate species; anaerobic fermentation

氢能源以其燃烧值高、清洁无污染、后续性强等诸多优点, 被认为是未来最理想的能源^[1~4]. 在众多的制氢技术中, 厌氧发酵产氢技术可利用农业废料、城市垃圾、工业有机废水和其它生物质制取氢气, 不但产氢成本低, 而且反应条件温和, 具有废物利用、节省能量消耗和净化环境的重要意义^[5,6]. 混合菌种发酵法生物制氢技术为近年来研究热点^[7~12]. 林明等^[13]以厌氧活性污泥为菌种来源, 以废糖蜜为原料, 采用两相厌氧反应器制备出氢气, 开创了利用非固定化菌种进行生物制氢的新途径. 最近, 樊耀亭等^[14]以牛粪堆肥作为混合产氢菌来源, 以蔗糖和淀粉为底物, 通过厌氧发酵制备了生物氢气. 微生物发酵产氢过程受诸多因素的影响, 如底物种类、废水性质、反应器构型等多方面^[15~18]. 底物种类是微生物发酵产氢的重要影响因素之一. 底物种类是微生物

进行生长和繁殖的基础, 不同的微生物对底物的利用有一定的选择性. 但是不同底物厌氧发酵产氢的研究鲜见报道, 因此, 本研究以厌氧污泥作为天然混合产氢微生物来源, 在批式培养试验中, 分析不同种类的底物对厌氧发酵生物制氢的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 产氢菌来源

北京留民营沼气发酵罐厌氧污泥, 其 pH 值为 8, VSS 为 24.7 g/L. 在取回的厌氧消化污泥放置过

收稿日期: 2007-08-12; 修订日期: 2007-11-16

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(107117)

作者简介: 汤桂兰(1981~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物与生物质能, E-mail: t-angguilan@163.com

* 通讯联系人, E-mail: sun108@cau.edu.cn

夜后,倒去上面清水,然后用筛子除去石头、沙子等杂质后,接种到厌氧生物产氢反应器中,接种量为 100 g/L.

1.1.2 培养液组成

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, NaCl 1 g, $\text{L-cysteine} \cdot \text{HCl}$ 0.25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g, FeCl_2 0.278 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g, 酵母浸粉 1 g, 水 1 000 mL, 分别加入不同碳源物质木糖、蔗糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖各 5 g.

1.2 试验方法

1.2.1 试验装置及仪器

采用全自动发酵罐(BIOTECH-2002,上海保兴生物设备公司)作试验设备.反应器总体积为 5.0 L.温度、pH 和搅拌速度分别有发酵罐的自动控制器自动检测和控制,其中,温度、pH 和搅拌速度的控制精度分别为 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 、 ± 0.02 和 ± 5 r/min.向发酵罐加入厌氧污泥 200 g,然后加入产氢基质 2 000 mL,迅速通氮气 10 min 除去氧气使发酵罐保持厌氧状态.发酵罐的 pH 和搅拌速度分别控制在 6.0 和 250 r/min,发酵罐自动控制温度为 45°C .

1.2.2 氢气含量测定

采用 GC-9900 型(北京佳分分析仪器技术有限公司)气相色谱仪,氮气做载气,流量为 30 mL/min.色谱柱填料为 5Å 分子筛,检测器为热导检测器(TCD);气化温度为 100°C ,柱温为 50°C ,检测器温度为 180°C ;通过外标法定量分析气体中各组分的含量.所产生的气体用排水法收集和计量.

1.2.3 液体含量测定

液相组分(乙醇、乙酸、丙酸、丁酸)由气相色谱仪(GC-9900 型)测定,色谱柱为 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm 的熔融硅胶毛细管色谱柱,测定条件为:进样口和检测器的温度分别控制为 250 和 300°C ,柱温采用程序升温方式,初温为 50°C 保持 1 min,然后以 $15^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速度逐渐地升高到 180°C ,并在 180°C 保持 6 min;用高纯氮气作载气,其气体流速为 30 mL/min,进样方式为分流进样,分流比为 10:1.空气和氢气流速分别为 400、30 mL/min.

气体体积采用排水法测定.挥发性悬浮固体(VSS)的测定方法参照国家标准方法^[9].实验中用 VSS 表示菌体浓度.实验结果利用 SAS 统计软件进行方差和显著性分析.

1.3 底物种类对产氢动力学的影响

为了更好地比较不同种类底物对厌氧发酵产氢的影响,采用 Gompertz 模型对产氢过程进行模

拟^[20].Gompertz 模型的数学表达式如下:

$$H = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

式中, H 是累积产氢量 (mL); P 是产氢潜力 (mL); R_m 是最大产氢速率 ($\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$); e 是 $\exp(1) = 2.718\,28\cdots$; λ 是产氢停滞期 (h), t 是接种时间 (h).

1.4 底物种类对细菌动力学的影响

为了更好地比较不同种类底物对产氢菌的影响,采用改进的 Gompertz 模型对细菌生长过程进行模拟^[20].改进的 Gompertz 模型的数学表达式如下:

$$X(t) = X_{\max} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_x \cdot e}{X_{\max}} (\lambda_x - t) + 1 \right] \right\} + X_0 \quad (2)$$

式中, $X(t)$ 是生物质浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $X_{\max}$ 是最大细胞生长浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), R_x 是最大细胞生长率 [$\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$], λ_x 细胞生长的停滞期 (h), X_0 是初始生物质浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), t 是接种时间 (h).

使用 Origin 7.5 对试验数据进行非线性回归,得出 Gompertz 常数.

2 结果与分析

2.1 底物种类对氢气产量的影响

分别考察不同种类的底物对累积产氢量的影响,结果示于图 1.在给定菌种来源条件下,不同底物通过厌氧发酵,均可制备出生物氢气,但其产氢能力存在较大差异.厌氧污泥对葡萄糖、蔗糖、麦芽糖的累积产氢量明显高于乳糖和木糖.这说明厌氧污泥对底物的产氢具有显著的选择性,也反映出不同底物之间结构的差异和降解的难易程度.由图 1 可以看出,葡萄糖的累积产氢量最大为 67.21 L/mol,木糖的累积产氢量最小为 34.70 L/mol.

生物气中的氢气含量是厌氧发酵产氢的重要参数.不同底物种类对氢气浓度(体积分数)的影响见图 2.氢气浓度随培养时间的变化而改变.产氢量随时间的变化可分为 4 个阶段:反应延迟、开始产氢、持续产氢和产氢衰减.反应停滞阶段时间很短,很快产氢微生物开始生长、繁殖,并对底物进行降解,产氢能力也逐渐增加,这是因为生物菌群经过一段时间培养后,逐渐形成稳定平衡的产氢群落,形成产氢的最佳条件;之后体系中逐渐有氢的生成,随着时间的增加,氢气浓度逐渐变大.当发酵时间为 4h 时,麦芽糖达到最大氢气浓度 18.83%,当发酵时间为 5 h 时,葡萄糖、乳糖、蔗糖分别达到最大氢气浓度 49.52%、25.75%、18.61%,其后进入持续产氢阶段;

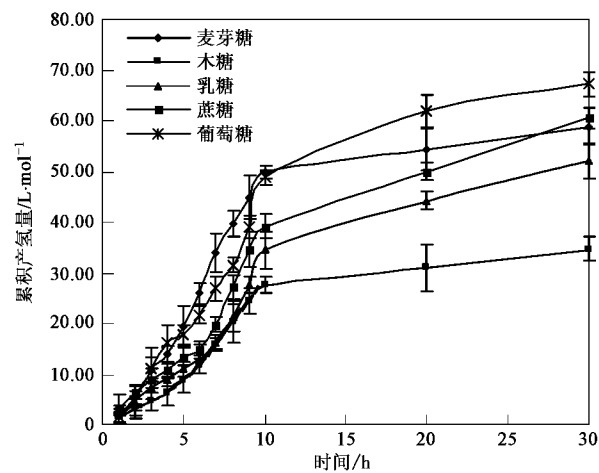


图 1 不同底物对累积产氢量的影响

Fig.1 Effect of different substrates on cumulative hydrogen yield

随着反应体系中底物逐渐被消耗,产氢能力逐渐下降;培养时间约为 20 h 后,反应体系几乎停止产氢,氢气浓度明显下降,由于产氢菌群得不到营养而进行内源呼吸,细菌群体进入衰亡期,整个产氢反应周期持续约 30h,反应中没有检测到甲烷气体的存在.

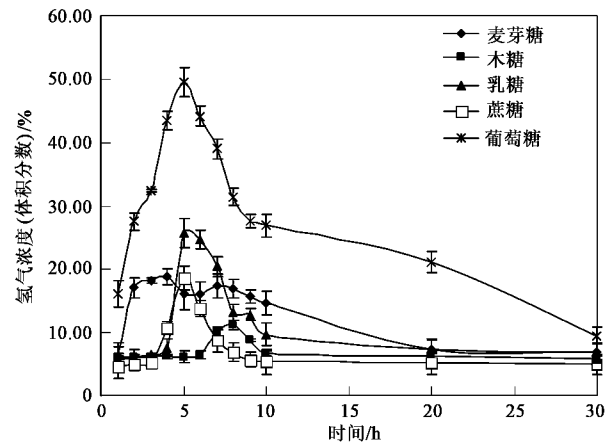


图 2 不同底物种类对氢气含量的影响

Fig.2 Effect of different substrates on hydrogen content in biogas

不同碳源对底物产氢能力的影响结果示于图 3.从图 3 结果可知,厌氧污泥对底物产氢能力具有一定的选择性.葡萄糖、蔗糖、麦芽糖都是发酵细菌很好的产氢底物,同等摩尔数的碳源,其氢气产量分别为 3.23、2.76 和 2.69 mol.相比之下,乳糖、木糖的氢气产量较低,分别为 2.37 和 1.62 mol.因此,在厌氧发酵产氢体系中,简单和较复杂的碳水化合物都是产氢的很好底物.由于不同的底物在组成、分子结构和理化性质等方面存在差异,因而其发酵产氢途径也有所不同.通常,结构简单、分子量小的化合物

可直接被微生物利用转化为氢,而复杂的大分子化合物则首先必须被分解为小分子,然后才能被微生物转化为氢.一般认为,不同的单糖在胞内酵解生成丙酮酸的途径也不相同,六碳糖(葡萄糖)直接通过 EMP 途径产生丙酮酸,而五碳糖(木糖)则首先进入 HMP 途径,产生的某些中间产生再进入 EMP 途径,最终发酵生成丙酮酸,因此,五碳糖发酵生成丙酮酸的过程比六碳糖更复杂,相应的反应步骤和参与的酶也更多;且单位 mol 五碳糖产生丙酮酸的数量也低于六碳糖,最终导致以五碳糖为基质时的氢气产量会明显少于六碳糖.这与试验结果基本一致.

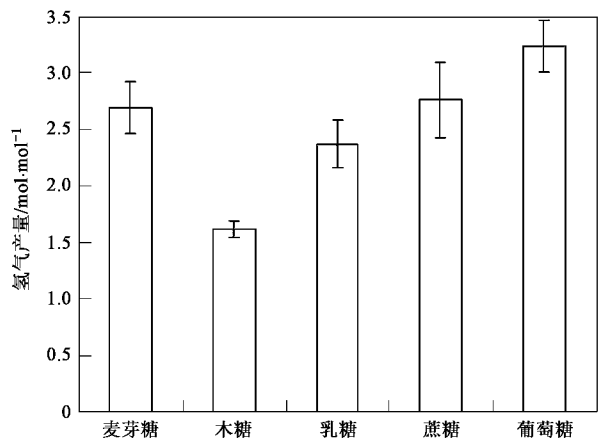


图 3 不同底物种类对氢气产量的影响

Fig.3 Effect of different substrates on hydrogen yield

2.2 生物氢发酵过程中液相组成的变化

当以厌氧污泥为菌种原料,5 种糖分别为底物时,底物降解过程中挥发性脂肪酸(VFA)和醇的含量示于表 1.底物种类的变化不仅影响产氢潜势,也影响发酵末端产物的组成.由于蔗糖、乳糖、麦芽糖是二糖碳水化合物,木糖属于五碳糖,简单糖类作为生物活动能量的供给者,可被细菌直接利用并作为能量的来源和细胞合成的原料.但由于其它糖分子量较大,不能透过细胞膜被细菌直接利用,因此首先被细菌胞外酶水解转化为单糖.在无氧条件下,单糖在酶和辅酶作用下发酵形成有机酸.实验表明,发酵的末端产物中主要为丁酸和乙酸,乙酸的含量占到 26.76% ~ 40.49%,丁酸的含量占到 37.60% ~ 58.07%,并含有部分丙酸和乙醇.由此可见,发酵型以“丁酸型”为主.随着丁酸和乙酸的比值的增加,氢气产量也随之增加.丁酸和乙酸比值可以作为衡量产氢效率的一个指标^[21,22].比值越高,其氢气产量越高.其中葡萄糖为底物其比值为 2.15,显著高于其它底物的比值,对应的产氢量也最高.以木糖为底物

时其丁酸/乙酸的比值仅为 0.93,对应的产氢量也明显低于其它底物.

表 1 不同底物对液体末端产物分布的影响

Table 1 Characteristics of final metabolite content for different substrate species								
不同底物种类	乙醇/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	乙酸/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	丙酸/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	丁酸/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	SMP ¹⁾ / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	丁酸/乙酸	乙酸/SMP	丁酸/SMP
葡萄糖	499.37	1 047.45	119.47	2 248.28	3 914.57	2.15	26.76	57.43
蔗糖	352.19	1 365.30	124.45	2 551.14	4 393.09	1.87	31.08	58.07
麦芽糖	388.91	1 619.69	154.54	2 410.49	4 573.62	1.49	35.41	52.70
乳糖	518.29	1 575.84	295.30	1 897.47	4 286.90	1.20	36.76	44.26
木糖	381.94	1 481.49	419.395	1 375.80	3 658.62	0.93	40.49	37.60

1)SMP = 乙醇 + 乙酸 + 丙酸 + 丁酸

2.3 产氢动力学分析

由表 2 可见,试验结果经 Gompertz 方程式拟合之后,关联因子 R^2 值均大于 0.97,说明用 Gompertz 方程式来拟合试验结果,描述厌氧微生物发酵产氢过程非常合适.考察了产氢趋势,产氢速率和延迟时间.5 种底物中,以葡萄糖的产氢潜力最大,为 66.86 L/mol,而以麦芽糖的产氢速率最大,达到 6.82 L/(h·mol).5 种底物种类的产氢潜力变化趋势和氢气产量一致.以葡萄糖为底物,其产氢停滞期最短,在木糖为底物,其产氢停滞期最长.表明每种微生物能够利用的底物都有特定的种类和对某些种类的优先选择性,不同底物种类引起了种间的生存竞争^[23].

表 2 不同底物产氢动力学参数

Table 2 Kinetic parameters for different carbon source				
底物种类	$P/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$R_m/\text{L}\cdot(\text{h}\cdot\text{mol})^{-1}$	λ/h	R^2
葡萄糖	66.86	5.44	1.67	0.987 6
蔗糖	58.25	4.40	1.76	0.976 5
麦芽糖	57.66	6.82	1.89	0.992 5
乳糖	50.73	3.81	2.01	0.980 9
木糖	33.65	3.72	2.38	0.985 0

2.4 菌的生长动力学分析

厌氧发酵生物制氢过程中所出现的 4 个阶段(反应延迟、开始产氢、持续产氢和产氢衰减)是与微生物的生长规律密切相关的.如图 4,经过停滞期的适应,细菌开始繁殖,并逐渐将底物转化为氢气.进入对数生长期后,细菌的生长速度增至最大,细菌数量以几何级数增加,氢气也随之持续产生.由于细菌的快速繁殖消耗了大量的营养物质,致使培养基浓度降低,同时,代谢产物大量积累对菌体本身产生毒害,细菌死亡率增加,进入静止期.静止期的细菌总数达到最大值,并恒定一段时间,新生的细菌数和死亡的细菌数相当.继静止期之后,营养物被耗尽,细菌因缺乏营养而利用储存物质进行内源呼吸,死菌数大于新生菌数,细菌群体进入衰亡期.在衰亡期,产氢结束,氢气含量也逐渐降低,试验数据证明:整个产氢过程也是微生物生长代谢的过程.

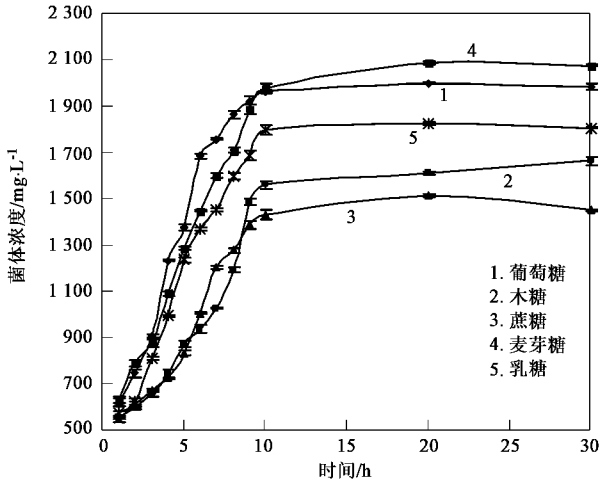


图 4 不同底物种类对菌体浓度的影响

Fig.4 Effect of different substrates on bacterial concentration

为了更好地分析不同底物对产氢菌生长的影响,采用 Gompertz 模型对上述曲线进行非线性回归,把回归所得到的 Gompertz 常数列于表 3.结果表明,麦芽糖作为底物时菌体的浓度和菌体的生长速率达到最大,分别为 1.55 g/L和 0.196 g/(L·h).葡萄糖作为底物时菌体的浓度最小为 1.06 g/L,蔗糖作为底物时菌体的生长速率最小达到 0.150 g/(L·h).木糖为底物时,菌的停滞期最长为 4.26 h.选择适当的底物可以提高菌的生长速率.这与产氢量变化趋势不一致,原因有待进一步研究.

表 3 不同底物细菌生长动力学参数

Table 3 Microbial growth parameters for different carbon sources					
底物种类	$X_{\max}$ / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	R_x / $\text{g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$	λ /h	X_0 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	R^2
葡萄糖	1.06	0.172	3.24	1.119	0.990 1
蔗糖	1.23	0.150	3.02	0.564	0.993 3
麦芽糖	1.55	0.196	1.50	0.592	0.996 2
乳糖	1.43	0.191	1.30	0.483	0.991 9
木糖	1.44	0.184	4.26	0.614	0.974 9

2.5 氧化还原电位的分析

氧化还原电位(ORP)是影响微生物正常生长繁殖重要的环境因子之一,对微生物的生存状态有着重要影响^[24].各种微生物对生境的氧化还原电位要

求是不同的,一般好氧微生物要求 Eh 为 300 ~ 400mV, Eh 在 100 mV 以上好氧微生物可以生长;兼性厌氧微生物在 Eh 为 100 mV 以上时进行有氧呼吸, Eh 在 100 mV 以下时进行无氧呼吸;专性厌氧细菌要求 Eh 为 -200 ~ -250 mV. 不同底物在产氢过程中氧化还原电位的变化趋势如图 5 所示. 实验中氧化还原电位均在 -300 mV 下,以厌氧为主. 厌氧微生物的生存要求较低的 Eh 值环境的原因,是由于它们的一些脱氢酶系包括辅酶 I、铁氧还蛋白和黄素蛋白等要求低的 Eh 值环境才能保持活性.

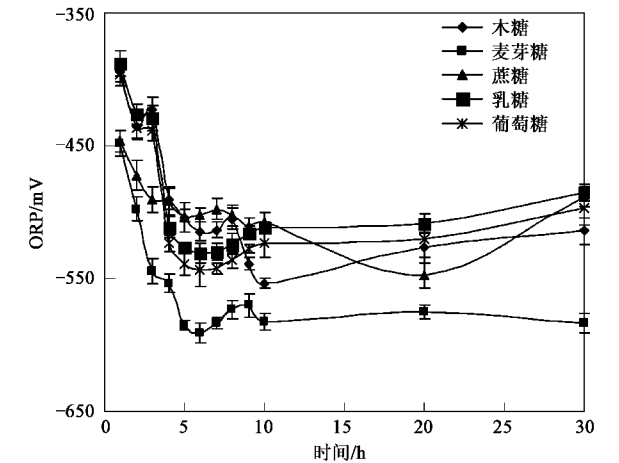


图 5 不同底物种类对氧化还原电位的影响
Fig.5 Effect of different substrates on ORP

3 结论

(1)葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、乳糖均可作为厌氧发酵产氢的底物,其中葡萄糖的氢气产量最大,当以葡萄糖为基质时,其累积产氢量、氢气产量、氢气含量均最大,分别可达到单位 mol 葡萄糖 67.21 L/mol、3.23 mol/mol和 49.52%. 代谢的末端产物在生物气中为氢气和二氧化碳,液相中为乙酸和丁酸,产氢型为产氢能力较高的“丁酸型”发酵.

(2)Gompertz 模型可以很好地模拟 5 种底物产氢过程和细菌生长过程,整个过程中氧化还原电位维持在 -300 mV 以下,属于厌氧发酵.

参考文献:

[1] Das D, Veziroglu T N. Hydrogen production by biological process: a survey of literature [J]. Int J of Hydrogen Energy, 2001, **26**: 13-28.
[2] Momirlan M, Veziroglu T. Recent directions of world hydrogen production [J]. Renew Sust Energy Rev, 1999, **3**: 219-231.
[3] Onodera H, Miyahara T, Noike T. Influence of ammonia concentration on hydrogen transformation of sucrose [A]. In: Asian Waterqual' 99, 7th IAWQ Asia-Pacific Regional Conference [C]. Taipei, 1999. 1139-1144.
[4] Mizumo O, Dinsdale R, Hawkes F R, et al. Enhancement of

hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparing [J]. Bioresour Technol, 2000, **73**: 59-65.
[5] Fang H H P, Liu H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture[J]. Bioresour Technol, 2002, **82**: 87-93.
[6] Lay J J, Lee Y J, Noike T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste [J]. Water Res, 1999, **33**: 2579-2586.
[7] Yu H Q, Zhu Z H, Hu W R, et al. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures [J]. Int J Hydrogen Energy, 2002, **27**: 1359-1365.
[8] Idania V V, Richard S, Derek R, et al. Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes [J]. Bioresource Technology, 2005, **96**: 1907-1913.
[9] Idania V V, Elvira R L, Fernando E G, et al. Semicontinuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime [J]. Int J of Hydrogen Energy, 2005, **30**: 1383-1391.
[10] Collet C, Adler N, Schwitzguébel J P, et al. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose [J]. Int J of Hydrogen Energy, 2004, **14**: 1479-1485.
[11] Han S K, Shin H S. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste [J]. Int J of Hydrogen Energy, 2004, **29**: 569-577.
[12] Lin C Y, Chang R C. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose [J]. J Chem Technol Biotechnol, 1999, **74**: 498-500.
[13] 林明,任南琪,王爱杰,等.混合菌种在发酵法生物制氢中的协同作用[J].环境科学,2003,**24**(2):54-59.
[14] 樊耀亭,李晨林,侯红卫,等.天然厌氧微生物气发酵生产生物氢气的研究[J].中国环境科学,2002,**22**(4):370-374.
[15] Kondratieva E N, Gogotov I. Production of molecular hydrogen in microorganisms [J]. Adv Biochem Eng, 1983, **28**: 139-191.
[16] Bowles L K, Ellefson W. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum* [J]. Appl Environ Microbiol, 1985, **50**(5): 1165-1170.
[17] Yu H Q, Fang H P. Acidification of mid- and highstrength dairy wastewater [J]. Wat Res, 2001,**35**: 3697-3705.
[18] Dabrock B, Bahl H, Gottschalk G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum* [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, **58**: 1233-1239.
[19] 国家环保总局.水和废水监测分析方法[M].北京:中国环境科学出版社,1998.
[20] Lay J J, Lee Y J, Noike T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste [J]. Wat Res, 1999,**33**(11):2579-2586.
[21] Van Ginkel S, Sung S, Lay J J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration [J]. Environ Sci Technol, 2002, **35**: 4726-4730.
[22] Hawkes F R, Dindale R, Hawkes D L, et al. Sustainable fermentative biohydrogen: challenges for process optimization [J]. Int J of Hydrogen Energy, 2002, **27**: 1339-1347.
[23] 任南琪,王宝贞,马放.厌氧活性污泥工艺生物发酵产氢能力研究[J].中国环境科学,1995,**15**(6):401-416.
[24] 康宇红,尹玉先.产酸发酵体系中 ORP 动力学模型的建立及其检验 [J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2003,**19**(4): 408-410.