

厌氧折流板反应器 (ABR) 中微生物种群演替特征

刘 然^{1,2}, 彭剑峰², 宋永会^{2*}, 王毅力¹, 于 雷², 袁 鹏², 解明曙¹

1. 北京林业大学环境科学与工程学院, 北京 100083

2. 中国环境科学研究院城市水环境研究室, 北京 100012

摘要: 采用 SEM, FISH 和 PCR - DGGE 技术对 ABR (厌氧折流板反应器) 各隔室中厌氧颗粒污泥进行分析, 考察微生物形态、真细菌数量及种群结构演替过程, 并对优势菌种进行了系统发育分析. 结果表明: ABR 反应器颗粒污泥微生物中杆菌占优势, 其中前端的微生物生长较好, 活性高; 沿反应器流程方向, 各隔室微生物总量逐渐降低, 真细菌相对丰度随之递减, 其中 1[#] 隔室真细菌相对丰度最高, 为 65.9%, 而 5[#] 隔室只有 27.2%. 此外, ABR 反应器前端以真细菌为主, 而后端隔室古细菌含量升高, 微生物种群随流程发生显著演替, 但 5 个隔室间真细菌的 Shannon - Wiener 多样性指数没有显著性变化. UPMGA 聚类分析表明, 1[#] 隔室与 2[#] 隔室的微生物群落相似性为 77%, 4[#] 隔室与 5[#] 隔室的相似性为 85%, 3[#] 隔室与其他隔室的相似性均较低, 表明 ABR 反应器前端以发酵产酸作用为主, 后端以产甲烷作用为主, ABR 反应器具有明显的分阶段多相工艺特点.

关键词: 厌氧折流板反应器; 微生物种群; FISH; DGGE

中图分类号: X703.5 文献标志码: A 文章编号: 1001 - 6929(2010)06 - 0741 - 07

Succession Characteristics of Microbial Communities in an Anaerobic Baffled Reactor (ABR)

LIU Ran^{1,2}, PENG Jian-feng², SONG Yong-hui², WANG Yi-li¹, YU Lei², YUAN Peng², XIE Ming-shu¹

1. School of Environmental Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2. Section of Urban Water Environmental Research, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

Abstract: SEM, FISH and PCR-DGGE techniques were used to analyze the microbial succession of the anaerobic granule sludge in different chambers of an ABR (anaerobic baffled reactor). The microbial morphology, eubacteria abundance, population structure succession process and phylogenetic analysis of the dominant eubacteria were investigated. The results showed that the rod-shaped bacteria were the dominant microbes in the sludge granules. The bacteria in the front chambers had higher activity than in the other chambers. The total amount of microbes gradually decreased with the water flow direction from front to back. The eubacteria abundance decreased correspondingly, which could reach as much as 65.9% in Chamber 1[#], and only 27.2% in Chamber 5[#]. Furthermore, the eubacteria were the dominant community in the front chambers, while the archaea contents increased in the back ones. There was a significant succession of the microbial communities with the water flow direction from front to back in the ABR reactor, but the Shannon-Wiener indices of eubacteria did not display significant differences in the five chambers. The UPMGA results showed that the similarity of microbial population between Chamber 1[#] and Chamber 2[#] was 77%, and that between Chamber 4[#] and Chamber 5[#] was 85%. However, the similarity between that in Chamber 3[#] and that in the other chambers was lower. Therefore, it could be concluded that the anaerobic fermentation worked mainly in the front part of the ABR, while the methanogenesis worked mainly in the back part. Obvious staged and multi-phased characteristics were observed in the ABR reactor.

Key words: anaerobic baffled reactor; microbial community; FISH; DGGE

厌氧折流板反应器 (ABR) 工艺是基于 LETTINGA 提出的分阶段多相 (Staged Multi-Phase

Anaerobic Reactor) 理论的一种高效厌氧生物处理工艺^[1-3]. 该工艺使用一系列垂直放置的折流板, 将反应器分隔成多个连续的隔室, 水流依次流经各隔室, 使得隔室易于形成与自身环境相适应的优势微生物种群, 从而使废水中污染物逐级转化, 在不同微生物种群共同作用下得到降解^[4].

在 ABR 处理工艺中, 只有通过水解酸化菌、产氢产乙酸菌、耗氢产乙酸菌和产甲烷菌等多种微生

收稿日期: 2009 - 11 - 16 修订日期: 2010 - 01 - 28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50708101/E080402); 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2009ZX07208 - 003)

作者简介: 刘然 (1984 -), 女, 北京人, liuran_work@gmail.com.

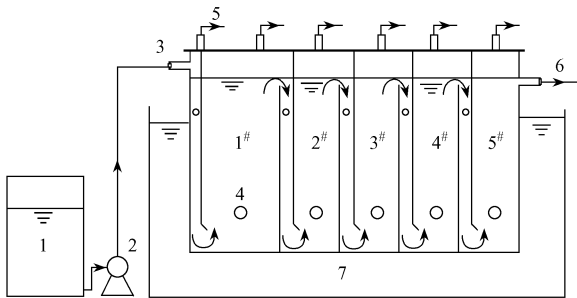
* 责任作者, 宋永会 (1967 -), 男, 山东莒南人, 研究员, 博士, 主要从事水污染控制技术研究, songyh@craes.org.cn

物的协同作用,水体中的有机物才能逐渐降解为低分子有机物或无机物.目前对 ABR 反应器中微生物的研究侧重于产甲烷菌和水解酸化菌^[5-7],而在厌氧代谢中间过程中具有重要作用的产氢菌和耗氢菌研究较少,尤其缺乏对厌氧处理中微生物种群演替过程的研究^[8-10].而了解 ABR 反应器中微生物的变化过程是判断 ABR 运行状态、保障反应器高效运行的关键.由于传统微生物培养难以实现对生物多样性的分析,笔者结合了 FISH(荧光原位杂交,Fluorescent In Situ Hybridization)和 PCR-DGGE(聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳,Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)^[11-12]解析 ABR 中微生物种群的数量变化及演替过程,以期改进和设计出高效的 ABR 厌氧处理工艺提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验装置

采用小试 ABR 反应器(见图1),反应器分为5个隔室,总体积为16.5 L,设计水力停留时间20 h.进水由计量泵连续流入1[#]隔室,再依次流经2[#]~5[#]隔室.其中1[#]隔室底长150 mm,2[#]~5[#]隔室底长100 mm,反应器高300 mm,宽100 mm.反应器正常运行时内部悬浮生长着大量的颗粒污泥,整个装置保持(35±1)℃恒温.ABR 反应器采用人工配水.正常运行时进水 $\rho(\text{COD}_{\text{Cr}})$ 为2 000 mg/L, $\rho(\text{COD}_{\text{Cr}}):\rho(\text{N}):\rho(\text{P})$ 为350:5:1,并适量补充 Mg, Fe, Co 和 Ni 等微量元素.以 NaHCO_3 调节碱度,保证进水 pH 为 6.8~7.5.



1—进水箱;2—蠕动泵;3—进水口;4—取样口;
5—沼气管;6—出水口;7—恒温水槽

图1 ABR 工艺流程

Fig. 1 Schematic diagram of the anaerobic baffled reactor

1.2 微生物样品来源和观察

污泥样品来源于反应器中1[#]~5[#]隔室,取样时

反应器处于稳定运行状态,进水 $\rho(\text{COD}_{\text{Cr}})$ 为2 000 mg/L,水力停留时间为24 h, COD_{Cr} 去除率稳定在90%以上.隔室内形成粒径2~4 mm的厌氧颗粒污泥.微生物相的观察采用 Olympus 光学显微镜和 FEI Quanta 200 环境电子扫描显微镜.

1.3 FISH 及寡核苷酸探针

新鲜的厌氧颗粒污泥样品用质量分数为4%的多聚甲醛于4℃下恒温固定过夜,保存备用^[13].杂交试验前,样品超声打散涂于专门定制的载玻片凹槽中,干燥后先后浸泡于50%,80%和98%的乙醇溶液中脱水3 min.试验中采用真细菌的通用探针 EUB338,序列为 GCTGCCTCCCGTAGGAGT^[14].探针用荧光染料 TAMRA 在5'端标记,其合成和标记均由大连宝生物公司完成.将探针储备液溶于杂交缓冲液(0.9 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,0.01% SDS,30% 甲酰胺)后滴在样品槽中,于46℃下避光杂交2 h.杂交后,迅速用杂交缓冲液洗去未杂交上的探针.最后用 DAPI 避光染色5 min,抗淬灭封片剂封片.在 Olympus BX51 荧光显微镜下观察、拍照,用 Image Pro Plus 软件分析结果.

1.4 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)

1.4.1 基因组 DNA 提取和纯化

DNA 提取采用基于 SDS 的裂解法^[15].取200 μL 污泥样品,加入270 μL DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L Na_2EDTA ,100 mmol/L 磷酸钠,1.5 mol/L NaCl,1% CTAB,pH 为8.0)和5 μL 蛋白酶 K (10 mg/mL),于37℃下225 r/min 振荡30 min.加入30 μL 的20% SDS,65℃水浴2 h,每隔15~20 min 轻轻摇动一次.水浴后于室温下6 000 r/min 离心10 min,取上清液.沉淀中加入90 μL DNA 提取液,10 μL 20% SDS,涡旋振荡10 s,65℃水浴10 min,离心10 min,再取上清液.将2次上清混合均匀.该细胞裂解液用等体积的 Tris 饱和酚抽提2次,用 $V(\text{酚}):V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})$ 为25:24:1 和 $V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})$ 为24:1 的溶液各抽提1次,以0.6倍体积的异丙醇于室温下沉淀 DNA.10 000 r/min 离心20 min,70% 乙醇洗涤沉淀,DNA 沉淀干燥后溶于100 μL TE 缓冲液中.置于-20℃冰箱保存备用.粗提液采用1%的琼脂糖凝胶电泳检测.提取的基因组 DNA 采用北京鼎国 DNA 纯化试剂盒进行纯化,纯化后的基因组 DNA 作为 PCR 的模板.

1.4.2 基因组 DNA 的 PCR 扩增

引物的选择:对细菌的 16S rRNA 的 V_3 区采用通用引物扩增,引物为 341F (5' - CCTACGGGAG GCAGCAG - 3') 和 534R (5' - ATTACCGCGGCT GCTGG - 3'). 为提高 DGGE 分辨效率,在 341F 的 5' 端加 GC 卡 (CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGG GCGGGGCACGGGGG). 引物由上海基康生物技术有限公司合成,稀释后备用.

50 μL 的 PCR 反应体系:5 μL 的 10 \times PCR buffer (含 Mg^{2+}), 0.25 μL dNTP mix (10 mmol/L), 正反引物 (45 pmol/ μL) 各 1 μL , *Taq* 聚合酶 (4.15 $\times 10^{-18}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 0.5 μL , 模板 DNA 稀释 10 倍后加入 1 μL , 适量的超纯水补足至 50 μL .

PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 最终延伸 5 min. PCR 产物用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

1.4.3 变性梯度凝胶电泳 DGGE 检测

DGGE 在 Dcode 系统 (美国 Bio - Rad 公司) 上进行,聚丙烯酰胺凝胶的质量分数为 8%,变性剂质量分数为 35% ~ 55%. 在 1 \times TAE 缓冲液中,以 200 V 电压,65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温电泳 4 h. 电泳后,以 1 \times SYBR Gold (美国 Invitrogen 公司) 染色 30 min, 用 BioSpectrum AC imaging system (美国 UVP 公司) 进行结果观察和照相. 所得图像中软件无法识别的条带采用 BECKER 等^[16] 的方法进行了手动处理. 不同微生物种属的 16S rRNA 基因 $V_2 \sim V_3$ 区的 DNA 片断,经过 DGGE 后得到分离. 每个样品 PCR 产物中含有多种不同指纹条带,每个独立分离的条带为

一个操作分类单元 (Operational Taxonomy Unit), 可能包括 1 种或 1 种以上的微生物种属.

1.4.4 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) DNA 条带分析

以 Bio - Rad Quantityone 软件对 DGGE 图谱进行分析.

Shannon - Wiener 指数:衡量种群多样性的指数,以 Quantityone 软件对 DGGE 图谱进行分析,根据条带的强度 (用吸光度表示) 和位置,由下式计算各样品的多样性指数 (Shannon - Wiener 指数, H):

$$H = - \sum (n_i/N) \lg(n_i/N)$$

式中, n_i 为样品上各条带吸收峰的面积; N 为样品上所有条带吸收峰的总面积.

族群归属分析:以 Quantityone 软件中的 UPGMA (The Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages) 算法对样品进行了聚类分析,做出系统树状图.

1.4.5 测序和系统发育分析

DGGE 完成后,选择胶上比较亮的条带进行切割,用不带 GC 夹子的正反引物进行 PCR 扩增 (条件同 1.4.2 节中 PCR 扩增). 用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,检查回收产物. 将 50 μL PCR 扩增产物送北京三博远致基因公司纯化测序. 将测序结果与 NCBI (美国国立生物技术信息中心) 数据库中的已知序列进行比对,利用 MEGA 4.1 软件,以邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 绘制系统发育树.

2 结果与讨论

2.1 颗粒污泥表观形态变化

光学显微镜下观察颗粒污泥表观形态,如图 2 所示.

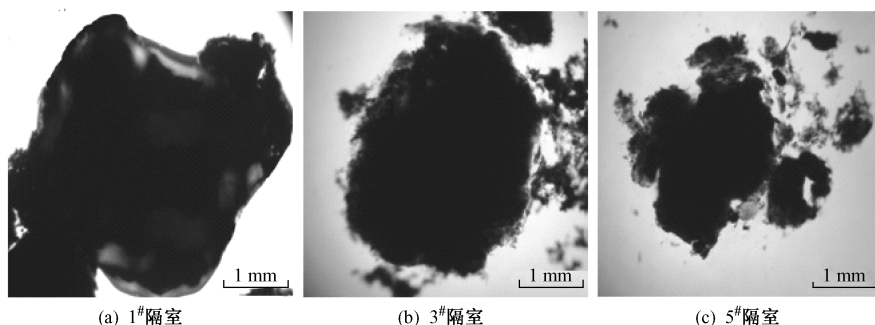


图 2 厌氧污泥的显微镜照片 ($\times 100$)

Fig. 2 Optical micrographs of the anaerobic sludge ($\times 100$)

前端隔室形成的颗粒污泥大多致密、边界清晰,表面圆润光滑,颜色黑亮;而后端隔室中污泥逐渐变为结构松散、表面粗糙,且逐渐呈现褐色. 表明 ABR 前端隔室颗粒污泥已成熟稳定,而后端隔室污

泥处于从絮状污泥向颗粒污泥转化的过程中.

观察微生物的表观形态 (见图 3), ABR 内大量分布着杆菌、球菌、弧菌. 其中杆菌为优势菌,约占菌群的 80% 以上,细菌大小为 (0.8 ~ 1.0) $\mu\text{m} \times$

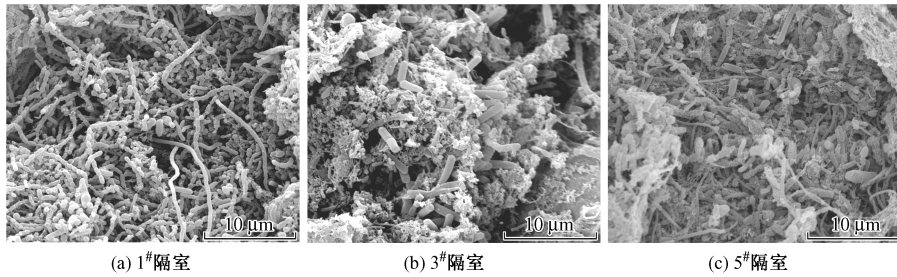


图3 厌氧颗粒污泥的扫描电镜照片($\times 4\ 000$)

Fig. 3 Scanning electron micrographs of the anaerobic granular sludge($\times 4\ 000$)

($1.0 \sim 7.0$) μm . 1[#]隔室菌群生长良好,从前到后各隔室中细胞残骸逐渐增多. 此外,对比各隔室中颗粒粒度可知,颗粒污泥粒度前端隔室明显大于后端隔室. 说明在采取多隔室设计的反应器中,由于前后隔室进水有机负荷不同,导致各隔室间微生物种群生长状况也存在显著不同. 前端隔室有机负荷丰富,微生物含量高,颗粒污泥形成快,生长良好;后端隔室营养相对缺乏,微生物生长相对缓慢,活性较

低,污泥接近絮状.

2.2 真菌定量分析

采用 FISH 方法,分别在 DAPI 对应的紫外激发光下和 TAMRA 对应的绿激发光下,对 5 个隔室的污泥样品进行了定量检测. 图 4 为经 Image Pro Plus 软件处理的 2 种激发光下的荧光合成图片,反映了微生物的总体变化. 由图 4 可见,从反应器前端到后端的 5 个隔室中微生物总数逐渐降低.

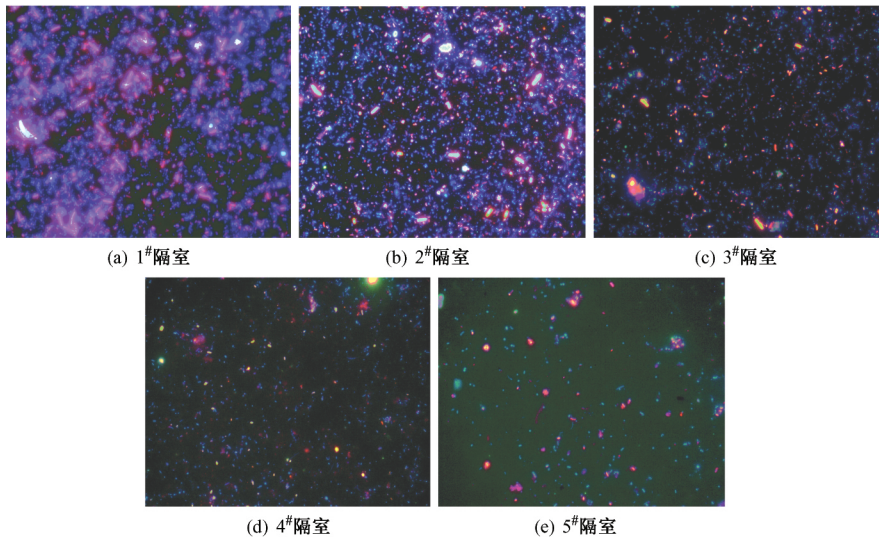


图4 FISH 杂交结果的荧光显微图像($\times 1\ 000$)

Fig. 4 Fluorescence images of ABR sludge samples($\times 1\ 000$)

表 1 为 ABR 反应器颗粒污泥中的微生物含量和真菌的相对丰度. 由表 1 可见,2[#]隔室微生物含量最高,达 $11.0 \times 10^{12} \text{ mL}^{-1}$,比 5[#]隔室高 2 个数量级;从反应器前端到后端真菌相对丰度递减,1[#]隔室真菌相对丰度最高,达 65.9%,5[#]隔室真菌相对丰度只有 27.2%. 由于 ABR 反应器中厌氧微生物种群主要由真菌和古细菌两大类组成,其中真菌主要包括发酵产酸菌、产氢产乙酸菌等,而古细菌主要由产甲烷菌构成. 因而在 ABR 厌氧反

应器中,反应器前端主要以发酵产酸菌和产氢产乙酸菌的水解酸化和产氢作用为主,而后端隔室主要以产甲烷菌的产甲烷作用为主,ABR 中微生物种群分布及代谢过程均具有明显的阶段性差异.

2.3 真菌种群多样性分析

2.3.1 DGGE 图谱分析

对 ABR 反应器各隔室的厌氧颗粒污泥样品同时进行总 DNA 提取,PCR 扩增及 DGGE 分析,可得到真菌的 DGGE 指纹图谱,如图 5 所示.

表 1 颗粒污泥中的微生物含量及真菌菌相对丰度

Table 1 Abundance of eubacteria population in anaerobic granular sludge

项目	1#隔室	2#隔室	3#隔室	4#隔室	5#隔室
微生物含量/(10 ¹² mL ⁻¹)	7.2 ± 0.5	11.0 ± 0.1	4.8 ± 0.1	1.9 ± 0.6	0.6 ± 0.3
真菌菌相对丰度/%	65.9	56.2	38.0	31.5	27.2

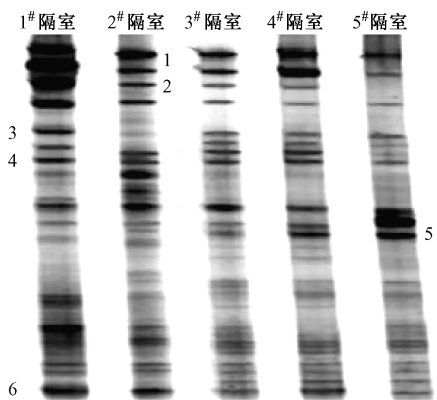


图 5 ABR 中厌氧污泥的 DGGE 电泳图像
Fig. 5 Electrophoresis image of anaerobic granular sludge in ABR

由图 5 可见,每个隔室的污泥样品经过变性梯度凝胶电泳都可以分离出数目不等的电泳条带,且各条带的强度和迁移率各不相同.一般认为,每一条带代表某种特定的微生物,且亮度相对大的条带代表样品中的优势微生物^[11,17-18].在 ABR 反应器中,不同隔室厌氧颗粒污泥的微生物群落结构及种群数量存在明显的演替过程.其中从反应器前端到后端,原有优势菌群(序列 1 和序列 2)明显衰减,而新优势种群(序列 5)得到增强.由此可见,种群的功能地位处在动态变化中,在物质和能量代谢过程中发挥着不同的作用.

2.3.2 真菌菌多样性指数分析

基于 Shannon - Wiener 指数分析,研究了 ABR 反应器微生物种群多样性变化,结果如表 2 所示.

表 2 颗粒污泥样品的真菌菌种群多样性指数

Table 2 Shannon index of eubacteria population in anaerobic granular sludge

隔室	1#	2#	3#	4#	5#
Shannon - Wiener 指数	2.79	2.95	3.11	3.02	2.99

由表 2 可见,在 ABR 反应器中 Shannon - Wiener 指数先增大后减小,其中 3#隔室的多样性指数可达 3.11,高于其他隔室;但整个反应器内 Shannon - Wiener 指数变化小于 11%,因而反应器内微生物多样性变化不大.说明在 ABR 反应器中,

从反应器前端到后端原有优势种群的削弱所导致的多样性降低被新种群的加强所弥补,整个真菌菌种群的多样性变化不大.

2.3.3 族群归属分析结果

通过对 DGGE 指纹图谱进行 UPGMA 聚类分析,可了解 ABR 反应器不同隔室间真菌菌相似性变化,结果如图 6 所示.

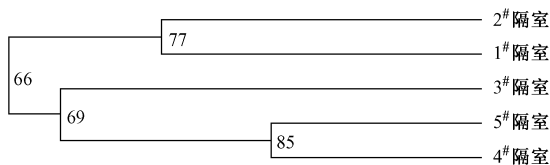


图 6 厌氧污泥样品中真菌菌的相似性分析

Fig. 6 Similarity analysis of eubacteria in five chambers

由图 6 可见,1#隔室与 2#隔室的相似性为 77%,4#隔室与 5#隔室的相似性为 85%,3#隔室与其他隔室的相似性相对较低.因而,结合 ABR 内真菌菌的相对丰度变化可知,ABR 反应器前 2 个隔室微生物种群结构相似,主要处于发酵产酸阶段;而后 2 个隔室微生物种群结构相似,主要处于产甲烷阶段;3#隔室微生物多样性指数最高,微生物种群最为丰富,隔室处于由发酵产酸阶段向产甲烷阶段的过渡期.

2.3.4 测序和系统发育分析结果

选取真菌菌 DGGE 图谱中有代表性的 6 个条带(见图 5),进行目标序列和相关性序列的比对分析,并建立系统发育树.真菌菌系统发育的分析结果如图 7 所示.

由图 7 可见,序列 1 和序列 2 与乳球菌 (*Lactococcus* sp. YM05004) 相似性达 100%;序列 3 与厚壁菌 (*Uncultured Firmicutes bacterium*) 的相似性为 98%;序列 4 和序列 6 分别与梭菌属 (*Uncultured Clostridium* sp.) 的 2 个菌种相似性达到 97% 以上;序列 5 与脱硫杆菌 (*Uncultured Desulfobacterales bacterium*) 相似性达 100%.厌氧微生物种群中的产氢产乙酸菌分支 *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophomonas bryantii* 在分类上均属于厚壁菌,耗氢产乙酸菌中多个重要菌群 *Clostridium aceticum*,

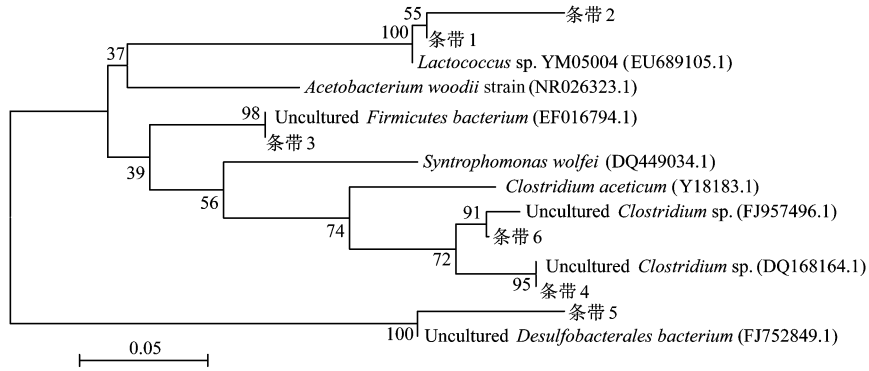


图 7 ABR 中厌氧菌的系统进化树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree based on the sequences of anaerobic bacteria in ABR

Clostridium formicoaceticum, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium cylindrosporium* 属于梭菌属。由于这些菌属在 ABR 中都属于优势菌群,说明产氢产乙酸菌和耗氢产乙酸菌在 ABR 厌氧处理过程均具有重要作用。

结合条带在图谱中的位置可知,从反应器前端到后端,与乳球菌属(序列 1 所表征)相似性达 100% 的发酵产酸菌群数量逐渐减少,与脱硫杆菌属(序列 5 所表征)相似极高的菌群得到加强,与梭菌属和厚壁菌相似极高的 3 种菌群在反应器前后数量变化不明显。这进一步说明 ABR 反应器前端隔室的发酵产酸作用大于后端隔室,而产氢产乙酸和耗氢产乙酸作用前后变化不大。

3 结论

a. 由显微观察结果可以看出,ABR 反应器中颗粒污泥微生物形态以杆菌为主。其中前端隔室颗粒污泥比后端隔室成熟稳定,微生物含量更高,活性更好。

b. 由 FISH 结果可知,ABR 反应器前端主要以发酵产酸菌、产氢产乙酸菌等真细菌为主,而后端隔室主要以产甲烷菌等古细菌为主。DGGE 条带分析得到,真细菌在 ABR 反应器各隔室中逐渐演替,但各隔室中真细菌的多样性指数分别为 2.79, 2.95, 3.11, 3.02 和 2.99,微生物多样性整体变化较小,新菌群抵消了原优势种群削弱所导致的多样性降低。

c. 由 DGGE 条带分析的结果可知,1[#]隔室与 2[#]隔室的真细菌种群相似性为 77%, 4[#]隔室与 5[#]隔室的相似性为 85%, 3[#]隔室与其他隔室的相似性均较低。ABR 内前端隔室的发酵产酸作用大于后端隔室,其中 1[#]和 2[#]隔室主要处于发酵产酸阶段, 3[#]隔室处于过渡阶段,而后端 4[#]和 5[#]隔室主要处于产甲烷阶段。ABR 反应器表现出明显的分阶段多相运行

特点。

d. 切胶测序的结果显示,反应器中优势菌属为乳球菌、厚壁菌、梭菌和脱硫杆菌。由于产氢产乙酸菌和耗氢产乙酸菌的一些分支分别属于厚壁菌和梭菌,说明产氢产乙酸菌和耗氢产乙酸菌在 ABR 厌氧处理过程均具有重要作用。结合条带在图谱中的位置可知,ABR 反应器前端隔室的发酵产酸作用大于后端隔室,而产氢产乙酸和耗氢产乙酸作用前后变化不大。

参考文献 (References):

- [1] LETTINGA G, FIELD J, LIER VAN J, *et al.* Advanced anaerobic wastewater treatment in the near future [J]. *Water Sci Technol*, 1997, 35(10): 5-12.
- [2] BARBER W P, STUCKEY D C. The use of the anaerobic baffled reactor (ABR) for wastewater treatment: a review [J]. *Water Res*, 1999, 33(7): 1559-1578.
- [3] 王建龙, 韩英健, 钱易. 折流式厌氧反应器 (ABR) 的研究进展 [J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(5): 490-498.
- [4] NACHAIYASIT S, STUCKEY D C. Microbial response to environmental changes in an anaerobic baffled reactor (ABR) [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1995, 67: 111-123.
- [5] 孙寓姣, 左剑恶, 邢薇, 等. 高效厌氧产甲烷颗粒污泥微生物多样性及定量化研究 [J]. *环境科学*, 2006, 27(11): 2354-2357.
- [6] RASKIN L, STRINMLEY J, RITTMANN B E, *et al.* Group specific 16S RNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens [J]. *Appl Environ Microb*, 1994, 60: 1232-1240.
- [7] SYLVIE R, CHARLES W G, JOHN R, *et al.* Differentiation of methanosaeta concilii and methanosarcina barkeri in anaerobic mesophilic granular sludge by fluorescent in situ hybridization and confocal scanning laser microscopy [J]. *Appl Environ Microb*, 1999, 65: 2222-2229.
- [8] NURIA F, EMILIANO E D, RICARDO A. *et al.* Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor [J]. *Microb Ecol*, 2008, 56(1): 121-

- 132.
- [9] MUYZER G, SMALLA K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology Mini review [J]. Anton Leeuw Int J G, 1998, 73: 127-141.
- [10] AMANN R I, KRUMHOLZ I, STAHL D A. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology [J]. Bacterial, 1990, 172: 762-770.
- [11] 邢德峰, 任南琪, 李建政. 荧光原位杂交在环境微生物学中的应用及进展 [J]. 环境科学研究, 2003, 16(3): 55-58.
- [12] 赵继红, 许春红. Carrousel 2000 氧化沟工艺中前置缺氧池与厌氧池的微生物多样性分析 [J]. 环境科学研究, 2008, 21(2): 150-153.
- [13] HERMIE J M, HARMSSEN H, KENGEN M P, *et al.* Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes [J]. Appl Environ Microb, 1996, 62(5): 1656-1663.
- [14] AMANN R I, BINDER B J, OLSON B J, *et al.* Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations [J]. Appl Environ Microb, 1990, 56: 1919-1925.
- [15] ZHOU J, MARY B, JAMES M T. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Appl Environ Microb, 1996, 62: 316-322.
- [16] BECKER S, BOGER P, OEHLMANN R, *et al.* PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities [J]. Appl Environ Microb, 2000, 66: 4945-4953.
- [17] 邢薇, 左剑恶, 孙寓姣, 等. 利用 FISH 和 DGGE 对产甲烷颗粒污泥中微生物种群的研究 [J]. 环境科学, 2006, 27(11): 2268-2272.
- [18] 李兆飞, 陶虎春, 梁敏, 等. 双室微生物燃料电池不同接种条件下处理薯蓣素废水 [J]. 环境科学研究, 2009, 22(4): 462-466.

(责任编辑:孔 欣)