

甲烷¹³C同位素比值表征温度对甲烷生成途径的影响

瞿贤^{1,2}, 何晶晶^{1*}, Mazéas Laurent², Bouchez Théodore²

(1. 同济大学环境科学与工程学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092;

2. Cemagref-HBAN, parc de Tourvoie, BP 44, 92163 Antony cedex, France)

摘要:采用测试气相碳同位素比值的方法比较了中温厌氧降解和高温厌氧降解过程中甲烷(CH₄)生成途径的差异, 表征了生活垃圾厌氧消化过程 CH₄ 生成途径的演变, 并结合气液相化学组分和产甲烷菌荧光原位杂交(FISH)分析对同位素表征结果进行了验证. 中温(35℃)条件下, 垃圾降解初期甲烷¹³C同位素比值(δ¹³CH₄)下降至 -69.5‰, 表明此阶段 CH₄ 主要产生自 CO₂ 还原途径; 随着垃圾降解进入快速产 CH₄ 阶段, δ¹³CH₄ 值相应迅速上升至 -23.8‰, 说明乙酸发酵逐渐成为 CH₄ 生成的主要途径, FISH 实验结果也发现此阶段以乙酸发酵型产甲烷菌 Methanosarcinaceae 为主; 当产 CH₄ 速率逐渐减小进入稳定期时, δ¹³CH₄ 值迅速降低至 -55‰后相对稳定, 说明乙酸发酵途径的比例减小, 并且维持在较稳定的水平. 高温(55℃)条件下, δ¹³CH₄ 值始终维持在约 -70‰, 表明甲烷主要由 CO₂ 还原作用生成, 在快速产 CH₄ 阶段, 乙酸氧化和 CO₂ 还原作用是 CH₄ 生成的重要途径.

关键词: 甲烷碳同位素比值; 荧光原位杂交; 生活垃圾; 厌氧降解; 乙酸发酵产甲烷途径; CO₂ 还原产甲烷途径

中图分类号: X708 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3252-06

Effect of Temperature on Methanogenic Pathway During Household Waste Anaerobic Digestion by Stable Carbon Isotopic Signature of CH₄

QU Xian^{1,2}, HE Pin-jing¹, Mazéas Laurent², Bouchez Théodore²

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Key Laboratory of Yangtze River Water Environment, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Cemagref-HBAN, parc de Tourvoie, BP 44, 92163 Antony cedex, France)

Abstract: The methanogenic pathway during anaerobic digestion of household waste was investigated by stable carbon isotopic signature analysis and testified by the analysis of gas production, leachate characteristics and microbial fluorescence *in situ* hybridization (FISH) methods. Furthermore, the difference of methanogenic pathway between mesophilic and thermophilic anaerobic digestion was also discussed. Results showed that under mesophilic conditions, the isotopic stable carbon signature of CH₄ (δ¹³CH₄) initially decreased to -69.5‰, indicating that CH₄ was produced from CO₂ and H₂ by hydrogenotrophic methanogens. When active CH₄ production phase started, the δ¹³CH₄ values quickly increased to -23.8‰, which indicated more and more CH₄ were formed by acetoclastic methanogens, dominantly the family of Methanosarcinaceae, shown by the FISH results. The δ¹³CH₄ values decreased successively and ultimately remained at -55‰, indicating that the fraction of acetoclastic methanogenesis finally decreased to a steady level comparative with CO₂-derived methanogenesis at the steady slow methane production phase. Under thermophilic conditions, the δ¹³CH₄ values remained at a level about -70‰, showing that methane were solely produced from CO₂ reduction, and acetate syntrophic oxidation happened during the active methane production phase.

Key words: stable carbon isotopic signature of CH₄; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); household waste; anaerobic digestion; acetoclastic methanogenesis; hydrogenotrophic methanogenesis

生物质厌氧消化处理可以实现甲烷气能源的有效回收利用. 厌氧消化工艺操作温度通常为中温(30~40℃)或高温(50~60℃)^[1-4]. 相对中温反应器而言, 高温条件下产甲烷(CH₄)迟滞时间更短, 反应速率更快, 产 CH₄ 量更高^[5]. 但高温厌氧工艺也存在运行不稳定, 并且对环境条件的改变比中温更敏感等问题^[1, 2, 6]. 为了进一步地了解温度对厌氧过程的影响, 一些研究对厌氧消化过程中水解酸化细菌和产 CH₄ 菌群落进行分析, 试图从微生物多样性的角度揭示不同温度下厌氧消化过程的差异^[4, 7]. 但是, 由

于微生物本身代谢途径的多样性^[8], 仅从微生物本身了解厌氧消化过程并不全面.

产 CH₄ 过程是厌氧消化的最终步骤. 测定 CH₄ 的¹³C同位素比值是近年来逐渐发展起来的判断产甲烷途径的新方法^[9-11], 已逐渐应用于农业土

收稿日期: 2007-11-27; 修订日期: 2008-01-16

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(50538080); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2003AA644020); 国家教育部科技技术研究重点项目(107122)

作者简介: 瞿贤(1979~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为固体废物处理与资源化, E-mail: solidwaste@mail.tongji.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: solidwaste@mail.tongji.edu.cn

壤^[12, 13]、湖泊底泥^[14]和泥炭沼泽^[15]等产 CH₄ 途径的研究,但在厌氧消化研究领域还鲜有文献报道.本研究采用 CH₄ 的¹³C同位素比值分析方法,揭示生活垃圾厌氧消化过程 CH₄ 生成途径的演变,并进一步比较中温和高温条件下 CH₄ 生成途径的差异.同时,采用荧光原位杂交(FISH)法观测厌氧消化过程中产甲烷菌种群的变化,从而可以从代谢微生物和代谢途径这两方面共同表征厌氧消化过程,以期为厌氧消化的理论研究和工艺应用提供依据.

1 材料与方法

1.1 反应器的运行操作

本实验采用 2 个 1.1 L 带密封橡皮塞的玻璃瓶作反应器.每个瓶内放置 40 g 模拟生活垃圾,并加 680 mL CO₃²⁻/HCO₃⁻ 缓冲溶液,以防止垃圾降解初期酸化而导致的对厌氧消化的抑制;另取 5 g 经离心(5 000 r•min⁻¹)浓缩的生活污水处理厂厌氧污泥作为接种物;2 个反应器分别置于 35℃ 和 55℃ 的恒温箱内进行培养,培养时间为 160 d.模拟生活垃圾的物理组成见表 1.

表 1 模拟生活垃圾的物理组成/%

Table 1 Composition of the reconstituted waste/%

食物垃圾	纸	纸板	织物	塑料	竹木	玻璃	金属	无机垃圾
61.6	6.0	1.1	4.7	20.0	2.1	1.8	0.5	2.2

1.2 取样

为了测定产气量及气体组成,同时及时排出反应器内产生的气体,每隔一定时间用 100 mL 针筒等压排出反应器内产生的气体,同时记录排出气体量.

一部分排出的气体用 5 mL 真空玻璃管收集存放,用于气体组分和气相¹³C同位素比值的测试.

另外,每隔 3 ~ 7 d 用针筒抽取反应器内的液体,测试液相的化学性质.每次抽取的液体样品约 5 mL,其中 0.5 mL 液体样品原样在取样后立即测试 pH.另取 2 mL 样品在 11 000 r•min⁻¹ 下进行固液离心分离,上清液用于测试氨氮(NH₄⁺-N)、总有机碳(TOC)和总无机碳(TIC).离心所得的沉淀物则用于 FISH 法的微生物种群测定.

1.3 测试方法

气相组分 CO₂ 和 CH₄ 体积分数采用装有热导检测器的微气相色谱(μGC CP4900, Varian, U. S. A.)进行测定.用 InLab 427 型 pH 计(Mettler-Toledo, Urdorf, Switzerland)测试 pH.用 Bioritech 700 型有机碳氮分析仪(Bioritech Inc., France)测试 TOC 和 TIC.

采用气相色谱-氧化炉-同位素比值质谱联用的方法测试气相中 CH₄ 和 CO₂ 的¹³C同位素比值.气体样品经由气相色谱(Trace GC Ultra, Thermo Electron Corporation, U. S. A.),分离成 CH₄ 和 CO₂, 2 种组分先后经氧化炉(Finnigan GC combustion III, Thermo Electron Corporation, U. S. A.)在 940℃ 下被催化氧化为 CO₂,然后先后进入同位素比值质谱(Delta V plus isotope ratio mass spectrometer, Thermo Electron Corporation, U. S. A.)进行分析.对已知 CH₄ 和 CO₂ 同位素比值的标准样品的测试偏差为 ± 0.4‰.

荧光原位杂交.对渗滤液离心沉淀物中的产甲烷菌进行荧光原位杂交,实验步骤见文献[16 ~ 18].所用探针特性及目标微生物见表 2.

表 2 FISH 用探针

Table 2 Oligonucleotide probes used in FISH

探针名称	目标微生物	微生物功能	探针核苷酸序列(5'-3')	文献
Eub338	细菌	水解酸化	GCTGCTCTCCGTTAGGAGT	[19]
Arch915	古菌	主要为产甲烷菌	GTGCTCCCCGCGCAATTCCT	[20]
MX825	Methanosaetaceae	乙酸发酵型产甲烷菌	GCTAGGTGTCGGCCACGGTGCGA	[21]
MS1414	Methanosarcinaceae	乙酸发酵型和 CO ₂ 还原型产甲烷菌	CCCGAGTGAGGTATGGGTGAG	[21]
MC1109	Methanococcales	CO ₂ 还原型产甲烷菌	AGACCCGTGCCCTATGTTGC	[21]
MB1174	Methanobacteriales	CO ₂ 还原型产甲烷菌	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC	[21]

2 结果与讨论

2.1 温度对反应器运行状况的影响

不同温度下反应器的产气和渗滤液性质见图 1. 从中可知,2 种温度下,产气速率的变化过程相似:随培养时间可大致分为迟滞期、缓慢产甲烷期、快速产甲烷期和稳定期[图 1(a)]4 个阶段.反应初

期,高温(55℃)反应器内的甲烷体积分数较早地上升至 20%[图 1(b)],在 40 d 后进入高速产甲烷期;而中温(35℃)反应器的产甲烷迟滞时间较高温反应器略长,但两者高速产甲烷期甲烷产生速率相当.实验至 95 d 和 75 d,中温和高温反应器相继进入稳定期,甲烷产生速率趋缓,产气中甲烷体积分数也略有下降.至实验终了时中温和高温反应器的累积产甲

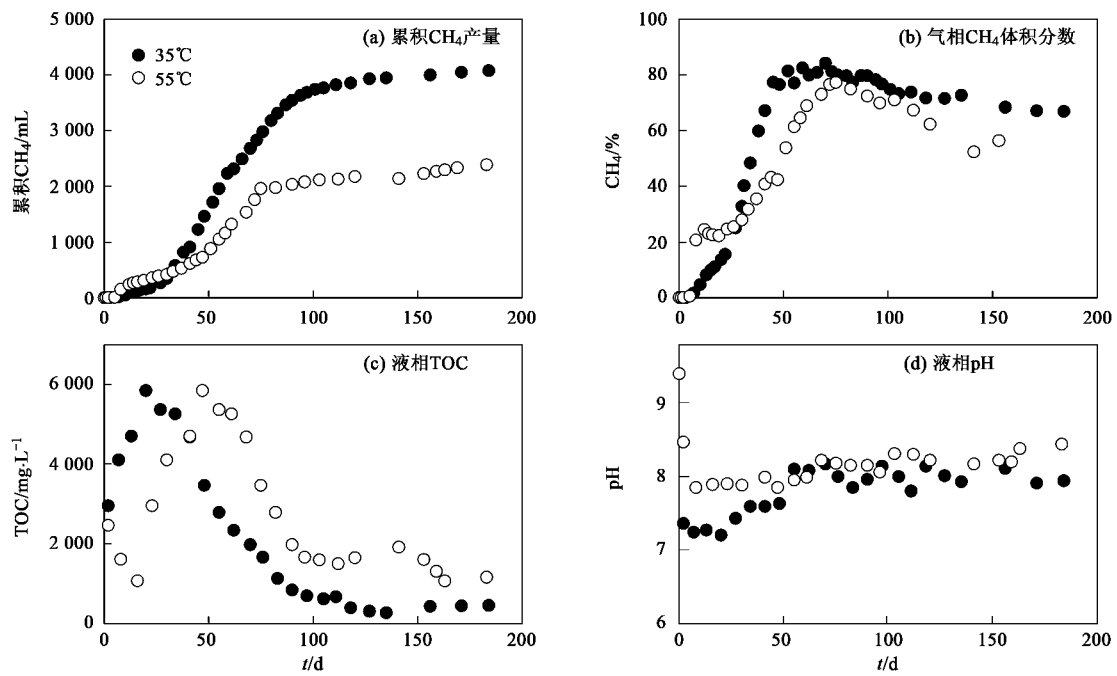


图 1 35℃ 和 55℃下反应器的产气和渗滤液性质

Fig.1 Methane production and leachate characteristics of the reactors under 35℃ and 55℃

烷量分别为4 070和2 380 mL.

渗滤液水质的变化与甲烷气体产生过程相对应.初期随着垃圾的快速水解酸化,液相中大量有机物(如挥发性有机酸)积累[图 1(c)],虽然在缓冲液的作用下液相 pH 保持在 7~8[图 1(d)],但产甲烷过程仍受一定程度的抑制,此阶段甲烷产生量较少.进入快速产甲烷阶段,液相 TOC 显著下降,pH 也随着有机酸的消耗而略有上升.当 TOC 下降至稳定

后,甲烷的产生速率也逐渐下降至最低.

表 3 是根据物料守恒计算的固、液和气相的碳平衡.从中可知,中温条件下,初期水解较高温更快速,但高温可加速初期的甲烷产生.实验终了时高温反应器的甲烷产量远小于中温,这可能是由于中温条件更有利于有机物的水解;而接种微生物量较少,也可能是造成高温反应器甲烷产生量较低的原因^[5].

表 3 培养过程中碳的物料平衡

Table 3 Mass balance of carbon in gas, liquid, and solid phase during the incubation period

温度/℃	降解阶段	终了时间/d	无机碳/%	甲烷中的碳/%	液相 TOC/%	固相碳/%
35	迟滞期	3	0.9	0.0	24.2	74.9
	缓慢产甲烷期	30	5.6	1.7	44.0	48.7
	快速产甲烷期	95	26.3	23.6	7.7	42.4
	稳定期	184	28.6	26.1	5.8	39.4
55	迟滞期	2	11.9	0.0	20.0	68.1
	缓慢产甲烷期	41	2.4	3.9	37.2	56.5
	快速产甲烷期	75	11.9	12.6	26.3	49.2
	稳定期	185	20.3	15.3	8.1	56.3

2.2 温度对甲烷生成途径的影响

图 2 显示了 2 组反应器中碳同位素比值($\delta^{13}\text{CH}_4$)随时间的变化.初期同位素比值从 -50‰ 分别下降至 -69.5‰ (中温反应器)和 -80‰ (高温反应器).随着反应器进入快速产甲烷阶段,中温反应器的 $\delta^{13}\text{CH}_4$ 也随之快速上升至 -23.8‰ .之后,伴

随着液相 TOC 的下降和甲烷产生速率的降低, $\delta^{13}\text{CH}_4$ 也随之快速下降.进入稳定期后, $\delta^{13}\text{CH}_4$ 略有波动,并在 110 d 后稳定在 -55‰ 左右.而高温反应器的 $\delta^{13}\text{CH}_4$ 都维持在略低于中温反应器最低值的水平,高速产甲烷期最低,稳定期略有上升并维持在 -70‰ 左右.

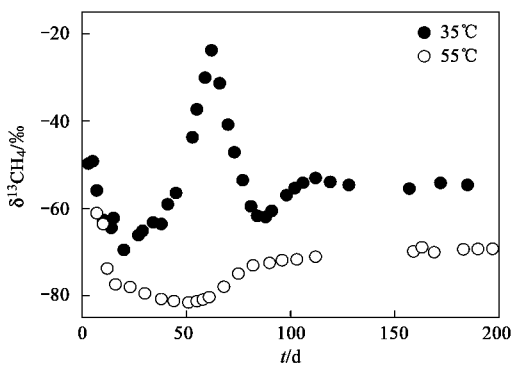


图2 35℃和55℃时甲烷碳同位素比值

Fig.2 Stable carbon isotopic signatures of CH₄ from two reactors under 35℃ and 55℃, respectively

甲烷生成是生活垃圾厌氧消化过程的最终步骤,有机废物经过水解、酸化和乙酸化,产生乙酸、CO₂、H₂等中间产物,在各种产甲烷菌的作用下通过多种途径转化为CH₄,最主要的CH₄生成途径为乙酸发酵产甲烷和CO₂还原产甲烷.理论上,乙酸途径生成的甲烷约占甲烷生成总量的2/3,CO₂还原产甲烷途径则约占1/3^[22].但研究发现,作为水解酸化产物的乙酸可以先氧化为CO₂^[23],而CO₂和H₂也可以被同型产乙酸细菌利用生成乙酸^[9],这些代谢途径都可以导致甲烷生成途径的改变,从而影响整个厌氧消化过程.

δ¹³CH₄的变化表征了厌氧降解过程中甲烷生成途径的改变.产气中δ¹³CH₄比值取决于底物(乙酸和CO₂)的碳同位素比值和甲烷生成反应的同位素效应.计算公式为^[9]:

$$\delta_{ma} = (1/\alpha_{ma})(\delta_{ac} + 10^3 - \alpha_{ma} 10^3) \quad (1)$$

$$\delta_{mc} = (1/\alpha_{mc})(\delta_{CO_2} + 10^3 - \alpha_{mc} 10^3) \quad (2)$$

$$\delta_{CH_4} = f_{mc} \cdot \delta_{mc} + (1 - f_{mc}) \cdot \delta_{ma} \quad (3)$$

式中,δ_{ac}、δ_{CO₂}、δ_{ma}、δ_{mc}、δ_{CH₄}分别为乙酸中的甲基、CO₂、乙酸发酵产生的CH₄、CO₂还原产生的CH₄和整体CH₄中¹³C的同位素比值;α_{ma}、α_{mc}分别为乙酸发酵产CH₄和CO₂还原产CH₄的同位素效应;f_{mc}为由CO₂还原产生的CH₄占总CH₄产生量的比例.

本研究中测得CO₂的¹³C同位素比值为-20‰~-10‰.由于测试方法的限制,本研究中未能测得乙酸中甲基的¹³C同位素比值及2种产甲烷途径的同位素效应.已有的对农田土壤和湖泊底泥等的研究表明,α_{ma}的范围为1.000~1.032,α_{mc}值略大,为1.045~1.080^[9],而乙酸中甲基的¹³C同位素比值

则约为-10‰~-30‰^[12].根据式(1)和式(2),则乙酸还原产生的CH₄的¹³C同位素比值为-10‰~-60‰,而CO₂还原生成的CH₄的¹³C同位素比值比前者更低,为-52‰~-96‰.

由此可得,中温反应器中,初期缓慢产CH₄阶段CH₄主要由CO₂还原途径产生,随后逐渐向乙酸还原途径转化,在高速产甲烷阶段以乙酸还原途径为主,当液相中有机物(主要是乙酸)逐渐被消耗,TOC显著下降时,乙酸还原途径的比重也迅速下降,并在稳定期与CO₂还原产甲烷途径维持一定的比例.第77~88 d,由于液相中乙酸含量的持续降低(TOC下降),导致乙酸还原途径的比重进一步降低至最小.与此同时,乙酸发酵途径的产甲烷速率也进一步降低,当乙酸消耗速率小于其乙酸化生成速率后,乙酸浓度的上升也使得随后的乙酸发酵途径比重略有上升(第88~105 d).

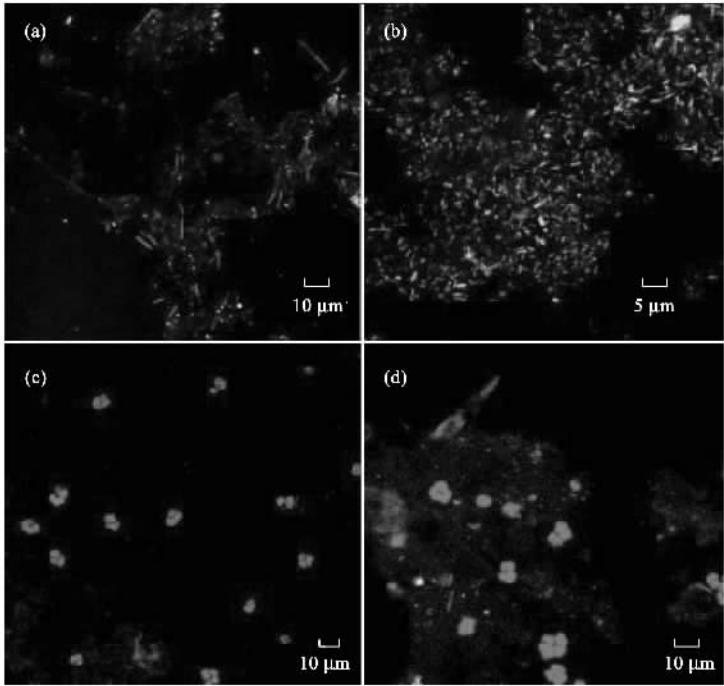
高温反应器中,甲烷的生成则主要由CO₂还原途径实现.由图2可得,高温反应器中产生的甲烷,其¹³C同位素比值比中温反应器缓慢产CH₄阶段(CO₂还原途径为主)所产甲烷的¹³C同位素比值更低.由图1(a)和(c)可得,高速产甲烷阶段,液相TOC也显著下降.由此表明,此阶段水解酸化的中间产物(乙酸)并不直接通过乙酸发酵途径产生甲烷,而是先氧化为CO₂,然后由CO₂和H₂合成甲烷.Fey等^[24]的研究指出通过乙酸氧化产生CO₂然后由CO₂还原途径产得的甲烷,其¹³C同位素比值比由其它途径产生的CO₂还原产生的甲烷¹³C同位素比值更低.这也是第68~90 d高温反应器中TOC浓度下降至2 000 mg·L⁻¹(液相中乙酸被消耗殆尽)后,CH₄的¹³C同位素比值略有上升的原因.

2.3 温度对产甲烷菌群落的影响

图3是中温反应器培养过程中取样分析获得的产甲烷菌荧光原位杂交的结果.由图3(a)可得,接种污泥中的产甲烷菌以Methanosaetaceae为主^[7,25],而随着培养过程的进行,这类甲烷古菌在培养初期迅速消失,取而代之的是Methanosarcinaceae和其它CO₂还原性产甲烷菌群落[图3(b)和3(c)].高温反应器中,培养初期Methanosaetaceae科甲烷古菌也迅速消失,在随后的培养阶段则以少量CO₂还原性产甲烷菌群落为主[图3(d)].Methanosaetaceae是专性乙酸还原型产甲烷菌,而Methanosarcinaceae则能同时利用乙酸和CO₂^[8].初期Methanosaetaceae的消失也验证了甲烷¹³C碳同位素比值起始时的下降,即由

乙酸发酵型产甲烷向 CO_2 还原型产甲烷转化的事实,而中温反应器中 *Methanosarcinaceae* 的产甲烷古菌大量出现,也表明了乙酸型产甲烷菌是快速产甲

烷阶段主要的产甲烷菌.高温反应器的样品中未检出 *Methanosaetaceae* 和 *Methanosarcinaceae*,则证实了高温条件下 CO_2 还原是甲烷产生的主要途径.



(a) 接种污泥 [Eub338-fite (绿色); Arc915-Cy5(红色)]; (b) 20d [Eub338-fite (绿色); Arc915-Cy5(红色)];
(c) 55d [Arc915-Cy5 (蓝色); MS1414-Cy3(红色)]; (d) 62d [Eub338-fite (绿色); Arc915-Cy5(红色)]

图 3 35℃反应器的样品 FISH 实验结果

Fig.3 FISH micrographs of the samples from the reactor incubated under 35℃

3 结论

(1)甲烷¹³C同位素比值的测试方法可有效地显示生活垃圾厌氧降解过程甲烷生成途径的演变.而这种方法与气液相参数和 FISH 方法相结合,则可以从反应物、代谢过程、代谢产物和功能微生物等角度全面地表征厌氧消化过程.

(2)中温(35℃)条件下,有机物降解初期甲烷主要产生自 CO_2 还原途径,随着厌氧降解进入稳定产甲烷阶段,以 *Methanosarcinaceae* 为主的乙酸型甲烷菌作用下的乙酸发酵逐渐成为甲烷生成的主要途径,当产甲烷速率逐渐减小进入稳定期时,乙酸发酵途径的比例迅速减小,并且维持在较稳定的水平.

(3)高温(55℃)条件下,甲烷主要由 CO_2 还原作用生成,在快速产甲烷阶段,乙酸氧化和随后的 CO_2 还原作用是甲烷产生的重要途径.

参考文献:

[1] Hartmann H, Ahring B K. Strategies for the anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: an overview [J]. Water

Science and Technology, 2006, **53**(8): 7-22.
[2] Lier J B V, Tilche A, Ahring B, *et al*. New perspectives in anaerobic digestion [J]. Water Science and Technology, 2001, **43**(1): 1-18.
[3] Yadavika S, Sreekrishnan T R, Kohli S, *et al*. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques-a review [J]. Bioresource Technology, 2004, **95**(1): 1-10.
[4] Levén L, Eriksson A R B, Schnürer A. Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste [J]. Federation of European Microbiological Societies, 2007, **59**(3): 683-693.
[5] Hartmann H, Ahring B K. Strategies for the anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: an overview [J]. Water Science and Technology, 2006, **53**(8): 7-22.
[6] Kim M, Ahn Y, Speece R E. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion: mesophilic vs. thermophilic [J]. Water Research, 2002, **36**(17): 4369-4385.
[7] Karakashev D, Batstone D J, Angelidaki I. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(1): 331-338.
[8] Ferry J. Ecology, physiology, biochemistry and genetics [M]. New York, NY: Chapman and Hall, 1993. 305-334.
[9] Conrad R. Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal [J]. Organic

- Geochemistry, 2005, **36**(5): 739-752.
- [10] Krzycki J A, Kenealy W R, DeNiro M J, *et al.* Stable carbon isotope fractionation by *Methanosarcina barkeri* during methanogenesis from acetate, methanol, or carbon dioxide-hydrogen [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, **53**(10): 2597-2599.
- [11] Jeffrey T G, Risatti J B, Hayes J M. Carbon isotope effects associated with acetoclastic methanogenesis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, **60**(2): 467-472.
- [12] Penning H, Claus P, Casper P, *et al.* Carbon isotope fractionation during acetoclastic methanogenesis by *methanosaeta concilii* in culture and a lake sediment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(8): 5648-5652.
- [13] Penning H, Conrad R. Quantification of carbon flow from stable isotope fractionation in rice field soils with different organic matter content [J]. Organic Geochemistry, 2007, **38**(12): 2058-2069.
- [14] Glissmann K, Chin K J, Casper P, *et al.* Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic lake dagow: effect of temperature [J]. Microbial Ecology, 2004, **48**(3): 389-399.
- [15] Kotsyurbenko O R, Chin K J, Glagolev M V, *et al.* Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog [J]. Environmental Microbiology, 2004, **6**(11): 1159-1173.
- [16] Laloui-Carpentier W, Li T, Vigneron V, *et al.* Methanogenic diversity and activity in municipal solid waste landfill leachates [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2006, **89**(3-4): 423-434.
- [17] Heimann A C, Batstone D J, Jakobsen R. *Methanosarcina* spp. drive vinyl chloride dechlorination via interspecies hydrogen transfer [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(4): 2942-2949.
- [18] Hori T, Haruta S, Ueno Y, *et al.* Dynamic Transition of a Methanogenic Population in Response to the Concentration of Volatile Fatty Acids in a Thermophilic Anaerobic Digester [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(2): 1623-1630.
- [19] Amann R I, Krumholz L, Stahl D A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology [J]. Journal of Bacteriology, 1990, **172**(2): 762-770.
- [20] Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics [M]. New York, NY: Wiley, 1991. 205-248.
- [21] Raskin L, Stromley J M, Rittmann B R, *et al.* Group-specific 16SrRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, **60**(4): 1232-1240.
- [22] Conrad R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, **28**(3): 193-202.
- [23] Karakashev D, Batstone D J, Trably E, *et al.* Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of *methanosaetaceae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(7): 5138-5141.
- [24] Fey A, Claus P, Conrad R. Temporal change of ¹³C-isotope signatures and methanogenic pathways in rice field soil incubated anoxically at different temperatures [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2004, **68**(2): 293-306.
- [25] Calli B, Mertoglu B, Roest K, *et al.* Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate [J]. Bioresource Technology, 2006, **97**(4): 641-647.