

# 抗生素废水批量处理的 pH 调控及其影响

全铁铮, 张燕燕, 郑少奎\*, 杨佳

(北京师范大学环境学院环境模拟国家重点实验室, 北京 100875)

**摘要:** 在不同 pH 水平下进行了抗生素废水的批量处理, 试验结束时利用扫描电镜(SEM)、荧光原位杂交-流式细胞术联用技术(FISH-FCM)分析了不同 pH 条件下获得的降解菌群中酵母和细菌的构成, 基于 Biolog 方法比较了不同降解菌群的代谢多样性, 并考察了降解菌群构成的变化对抗生素废水批量处理效果的影响。结果表明, 批量处理过程的 pH 调控显著影响了降解菌群中酵母和细菌的比例, 并进而影响了废水处理效果。当批量处理过程的 pH 值分别控制在 4~5、5~6、6.5~7.5 时, 降解菌群中酵母构成比例分别达到 88.20%、54.43%、1.75%, 同时细菌的构成比例相应呈逆向变化; Biolog FF 微平板分析表明, 3 种 pH 条件下的降解菌群具有类似的代谢多样性, 但酵母占优势时降解菌群的代谢活性较低; 随着酵母比例的下降或细菌比例的上升, 批量处理的 COD 去除率分别为 34.8%、44.8% 和 61.2%。

**关键词:** 抗生素废水; 种群结构; 批量处理; pH 调控; 荧光原位杂交; 流式细胞术; Biolog

中图分类号: X787 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)02-0338-06

## Control of Microbial Communities Achieved by pH Adjustment and Its Influences on Batch Treatment of Antibiotic Wastewater

TONG Tie-zheng, ZHANG Yan-yan, ZHENG Shao-kui, YANG Jia

(State Key Laboratory of Water Environment Simulation, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**Abstract:** Scanning electron microscope (SEM), Fluorescent in-situ hybridization (FISH)-Flow Cytometry (FCM) as well as Biolog method were used to discuss the effect of pH control during the batch treatment on the composition and catabolic diversity of the microbial communities obtained from antibiotic wastewater. The following results were obtained: ① At the end of batch treatment, the percentages of yeast cells in three cultures amount to 88.20%, 54.43% and 1.75%, respectively, when pH levels are individually maintained at 4~5, 5~6 and 6.5~7.5 throughout three batch experiments. Correspondingly, the percentages of bacterial cells in three cultures increase with the increase of pH levels. ② No significant differences are found among the catabolic diversity of three cultures while the yeast-predominant culture has slightly less catabolic activities in Biolog FF microplate. ③ When bacteria gradually develop to be the dominant species in the culture, gradually enhanced COD removals of 34.8%, 44.8% and 61.2%, respectively, are achieved.

**Key words:** antibiotic wastewater; microbial community; batch treatment; pH control; FISH; FCM; Biolog

以细菌为优势降解微生物是目前绝大多数废水生物处理工艺的重要特征, 而近 10 年来, 酵母也被应用于某些特殊类型高浓度有机废水的处理并获得了较好的处理效果, 比如高含油废水<sup>[1,2]</sup>、高浓度味精发酵离交尾液<sup>[3,4]</sup>等。由于废水处理过程在开放式反应器中进行, 如何使酵母成为反应器中的优势微生物成为需要解决的重要问题。

除嗜酸菌和嗜碱菌外, 大多数细菌生长的最适 pH 范围为 6~8, 而酵母生长的最适 pH 范围为 4.5~6.5<sup>[5]</sup>, 2 种微生物生长的最适 pH 值存在一定差异。目前已经有研究者注意到 pH 值对微生物群落中酵母和细菌的比例有一定影响。例如孙玉红等<sup>[1]</sup>通过电镜照片观察到 SBR 反应器内酵母比例随初始 pH 值的上升而逐渐下降, 同时细菌数量增多的现象; 高大文等<sup>[6]</sup>在非灭菌条件下培养白腐真菌, 通过显微镜观察发现当初始 pH 值从 3.6 升至 5.6 时会导致培养液中细菌数量增加。由于显微照片、显微

观察等微生物群落常规分析手段的局限性, 现有工作并不能深刻反映出 pH 范围对废水处理过程中微生物群落的影响。

本研究以含高硫酸盐、多种抑制物、碳氮比低的难降解高浓度抗生素废水<sup>[7]</sup>作为对象, 通过全程 pH 调控考察了不同 pH 范围(4~5、5~6、6.5~7.5)对抗生素废水批量处理结束时降解菌群中酵母、细菌构成与降解效果的影响, 在以扫描电镜照片初步分析了不同 pH 条件下获得的降解菌群中酵母与细菌的分布规律之后, 以荧光原位杂交技术(fluorescent in-situ hybridization, FISH)和流式细胞术(flow cytometry, FCM)联用检测技术(FISH-FCM)定量分析

收稿日期: 2007-02-02; 修订日期: 2007-03-25

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2006CB403306); 北京师范大学本科生科学研究基金项目

作者简介: 全铁铮(1985~), 男, 主要研究方向为环境工程, E-mail: tongtiezheng@sohu.com

\* 通讯联系人, E-mail: zshaokui@yahoo.com.cn

了不同降解菌群中酵母与细菌的比例, 并通过 Biolog 分析方法比较了 3 种降解菌群的代谢特性, 最后在此基础上讨论了降解菌群构成差异对抗生素废水批量处理效果的影响. 作为微生物定量检测和代谢多样性分析的有效手段, FISH-FCM 技术和 Biolog 分析方法在国内外环境领域已得到不同程度的应

用<sup>[8-16]</sup>.

1 材料与方法

1.1 抗生素废水水质

试验用抗生素废水取自石家庄某抗生素生产厂废水排放口, 其水质特征如表 1 所示.

表 1 抗生素废水水质特征

| Table 1 Characteristics of antibiotic wastewater |                       |                       |                       |                                                     |     |     |
|--------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------|-----|-----|
| COD/mg•L <sup>-1</sup>                           | SS/mg•L <sup>-1</sup> | TN/mg•L <sup>-1</sup> | TP/mg•L <sup>-1</sup> | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/ mg•L <sup>-1</sup> | 色度  | pH  |
| 14 000                                           | 680                   | 640                   | 145                   | 410                                                 | 1.5 | 3.8 |

1.2 pH 调控下抗生素废水降解菌群的富集培养

本研究中微生物土样取自北京师范大学生物园果树下表层土壤, 富集培养过程采用经典的多次批量培养工艺<sup>[4, 17, 18]</sup>. 首先将土样加水溶解, 放入呈有玻璃珠的三角瓶中手摇振荡, 将土样打碎以充分释放出其中的微生物, 静置一段时间后取约 1 mL 上清液分别加入 2 个 500 mL 三角瓶(内含 300 mL 抗生素废水)中, 调整抗生素废水起始 pH 范围分别为 5~6、6.5~7.5, 设置摇床转速为 120 r/min, 在 25℃ 恒温下培养, 培养过程中随时加入稀硫酸或碳酸氢钠溶液使废水 pH 保持在起始范围内, 每隔 24 h 测量废水中的 MLSS 值, 当 MLSS 值趋于稳定时即认为反应已达到终点, 然后将 1 mL 培养液接入已调好 pH 的抗生素废水中开始新一轮富集培养过程, 待第 2 轮培养结束后以 10 000 r/min 分别离心后收集不同 pH 条件下的富集培养物, 将其保存在 -80℃ 下作为下阶段试验的菌种.

1.3 pH 调控下抗生素废水降解菌群构成分析与批量处理效果研究

在 3 个 500 mL 三角瓶中分别装入 300 mL 抗生素废水, 将 pH 分别调至 4~5、5~6、6.5~7.5, 然后分别接种等量的 pH 5~6、5~6、6.5~7.5 富集培养物(即 pH 5~6 下的富集培养物分别接入 2 个不同 pH 条件的三角瓶中), 设置摇床转速为 120 r/min, 在 25℃ 下恒温培养, 培养过程中分别控制 pH 在原起始范围内, 从试验第 1 d 起每天分别从不同系统中取 10 mL 废水用于测定 COD 和 MLSS 等水质指标. 待反应达到终点后将剩余废水以 10 000 r/min 离心后收集菌体, 取部分菌体通过普通光学显微镜和扫描电镜(S-4800, Hitachi Co., Japan)观察微生物的显微形态, 并通过 FISH-FCM 技术和 Biolog 方法分析不同 pH 条件下抗生素废水降解菌群的种群结构.

1.4 基于 FISH-FCM 技术的酵母和细菌比例分析

1.4.1 样品的预处理

将微生物样品与 4% 的多聚甲醛溶液按 3:1 比例混合, 在 4℃ 条件下避光固定 4 h, 然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.2)洗涤 3 次, 用  $m(\text{PBS}):m(\text{乙醇})=1:1$  液稀释至  $10^9 \sim 10^{10}$  个/mL, 放置于 -20℃ 下备用.

1.4.2 寡核苷酸探针

本研究采用细菌探针 EUB338<sup>[19]</sup>, 探针的核苷酸序列为 5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3', 5'用荧光染料 FAM 修饰; 酵母探针采用 PF2<sup>[20]</sup>, 探针的核苷酸序列为 5'-CTC TGG CTT CAC CCT ATT C-3', 探针的 5'用荧光染料 Cy3 修饰.

1.4.3 FISH 操作过程

向 92.5  $\mu\text{L}$  已预热的杂交缓冲液(0.9 mol/L NaCl, 0.01% SDS, 20 mmol/L Tris-HCl, 20% 甲酰胺, pH 7.2)中加入 5  $\mu\text{L}$  微生物稀释液以及 2.5  $\mu\text{L}$  浓度为 100 ng/ $\mu\text{L}$  的探针, 在 46℃ 恒温下杂交 3 h. 离心、洗涤并且再次离心, 重悬于 100  $\mu\text{L}$  1×PBS 中, 再取 20  $\mu\text{L}$  重悬菌体加入 4 mL 1×PBS, 超声振荡.

1.4.4 FCM 检测

FCM 分析由装有 488nm 氩离子激光器的 FACSCalibur 流式细胞仪(Becton Dickinson, USA)完成. 分别使用 FL1 通道(515~545 nm)和 FL2 通道(564~606 nm)来检测 FAM 和 Cy3 发出的荧光, 并测量前向散射光(FSC-H)和侧向散射光(SSC-H). 数据分析采用 CellQuest 软件(Becton Dickinson, USA).

1.5 基于 Biolog 的代谢多样性分析

本研究中代谢多样性分析在 Biolog 全自动微生物鉴定仪(Biolog Co., USA)上进行, 采用 96 孔 Biolog FF 板测定微生物代谢多样性. 将微生物悬液稀释到 590 nm 下光密度为 0.3, 用 8 通道加样器向微平板各孔中加入 100  $\mu\text{L}$  的微生物悬液(内含 50  $\mu\text{g/mL}$  青霉素和 50  $\mu\text{g/mL}$  链霉素以抑制细菌的生长), 然后置

于 25℃下恒温培养,培养期间于 24、48、72、96、120、168、192、216、240 h 用 Biolog 自动读数装置测定 96 个孔在 490 nm 下的吸光度,以监测显色反应的进行.

不同时刻微生物对碳源的代谢情况用 490 nm 处的平均每孔吸光度值 (average well color development, AWCD)表示,某时刻微平板内 AWCD 的计算公式为:

$$AWCD = [\sum(C_i - R)]/95$$

式中,  $C_i$  为除对照孔外的吸光度,  $R$  为对照孔吸光度值.

反应终点(240 h)时每个孔的碳源利用情况被计算机自动记录下来,“1”为阳性,“0”为阴性,利用简单匹配系数 (simple matching coefficient)来比较不同微生物样品间的代谢相似性<sup>[21]</sup>.

1.6 水质分析方法

pH 测试采用 HANNA HI8124 型便携式酸度计.将所取水样在 10 000 r/min 转速下离心 10 min 后抽取上清液,采用标准方法<sup>[22]</sup>分析上清液中 COD、TN、TP、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的值.将抽去上清液后的离心管在 105℃下烘干至恒重以测试水样中的 MLSS 浓度.色度采用分光光度法在 380 nm 时测量并以吸光度值定量.

2 结果与讨论

2.1 不同 pH 条件下的抗生素废水降解菌群构成分析

2.1.1 扫描电镜(SEM)结果

由于本研究考察的重点是 pH 范围对废水处理过程中微生物群落的影响,并不以处理效果为最终判据,因此,本研究中微生物土样取自北京师范大学生物园果树下表层土壤(许多研究表明果树下土壤因为糖分高往往富集大量酵母和细菌),而未在抗生素废水排放口针对性采样.不同 pH 范围下得到的抗生素废水降解菌群的扫描电镜照片(× 5000)如图 1 所示.从图 1 可以看出,在 pH 4~5 和 6.5~7.5 条件下均富集得到大小形态较为单一的微生物类型,其中 pH 6.5~7.5 条件下得到的微生物多呈棒状,约 0.3 μm×1 μm,而 pH 4~5 条件下得到的微生物多呈椭圆形,长约 3 μm~5 μm,并有明显的出芽生殖现象.从显微形态、生存环境等方面分析,初步认为 pH 4~5 下得到的微生物基本上是酵母,而 pH 6.5~7.5 下得到的微生物基本上是细菌.在 pH 5~6 范围内的微生物的组成较前两者更为复杂,从显微照片可以清楚地看到在这种过渡 pH 范围下出现了细菌和酵母共存的现象.

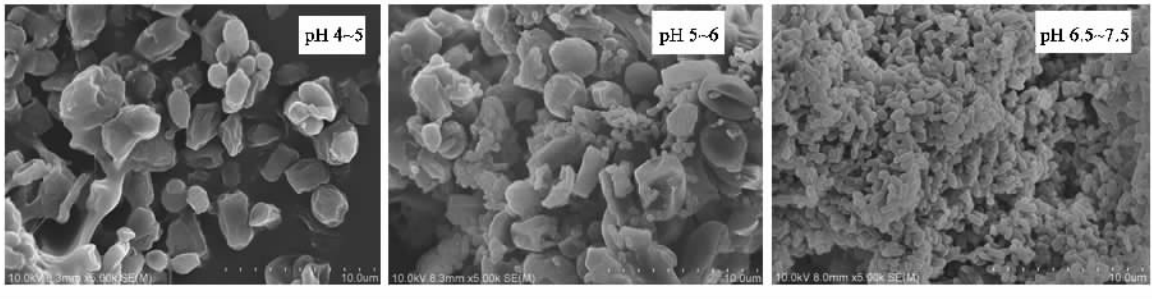
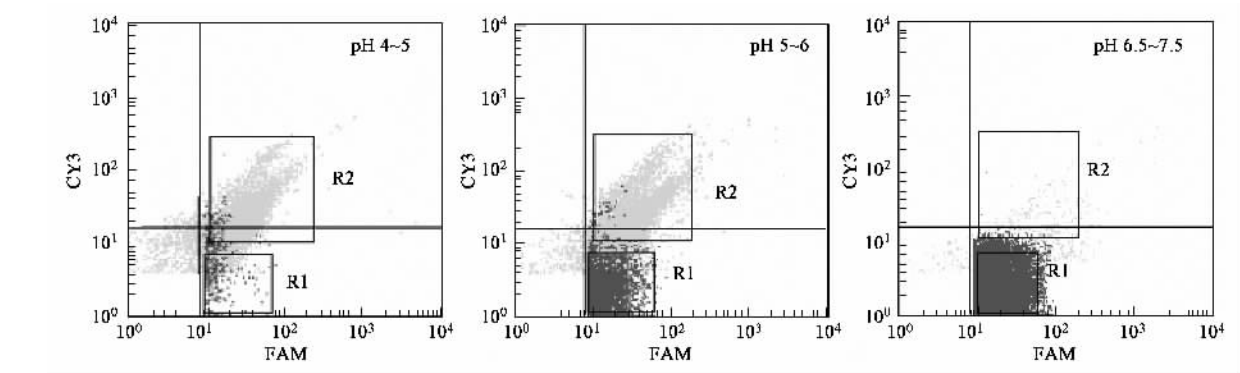


图 1 不同降解菌群中微生物形态的扫描电镜图(× 5 000)  
Fig.1 SEM photos of batch cultures obtained at different pH levels(× 5 000)

2.1.2 FISH-FCM 检测结果

由于显微照片或显微观察存在无法定量的缺点,并且其结果易受观测区域选择的影响,因此国内外某些研究者利用实时定量链式聚合酶反应(RTQ-PCR)<sup>[23]</sup>或 FISH-FCM<sup>[24,25]</sup>等技术定量检测了样品中特定微生物的数量或比例,相比之下 RTQ-PCR 操作过程较为复杂,因此本研究采用 FISH-FCM 技术测量了不同降解菌群中细菌和酵母的构成比例,其结果如图 2 和图 3 所示.从 FCM 检测结果(图 2)可以看出,细菌和酵母通过 FCM 能够较好地分离开,

形成不同的区域 R1 和 R2.由于圆点密度代表相应的微生物浓度水平,从图 2 中可以看出,在 3 种降解菌群中细菌与酵母的构成比例存在明显不同.通过 CellQuest 软件计算,得出不同条件下酵母和细菌的比例如图 3 所示.从图 3 可以看出,pH 4~5 下得到的降解菌群中酵母占绝大多数,达到了 88.20%,细菌只占 11.80%;pH 5~6 下得到的降解菌群中酵母与细菌在微生物群落中占有的比例接近,分别为 54.43%和 45.57%;pH 6.5~7.5 条件下细菌成为优势种群,占降解菌群的 98.25%,而酵母的数量极



R1 代表杂交后细菌的区域, R2 代表杂交后酵母的区域

图 2 流式细胞仪的二维散点图

Fig.2 FCM analysis of three batch cultures

少,只占有 1.75% .这定量地反映了扫描电镜照片所反映的 3 种 pH 条件下得到的降解菌群中酵母和细菌构成比例的差异.

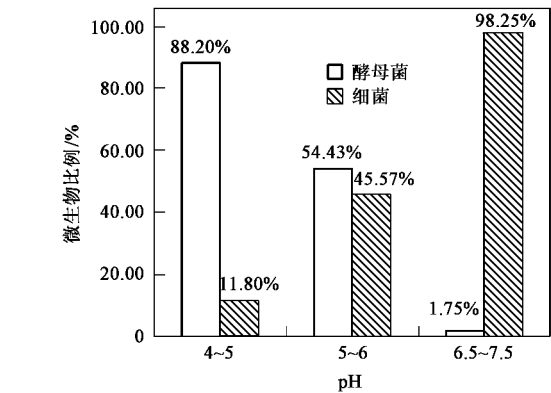


图 3 不同降解菌群中酵母和细菌的比例

Fig.3 Percentage of yeast and bacteria cells in the batch cultures

上述结果表明采用 pH 调控可有效控制生物处理系统中酵母和细菌的相对数量,使酵母或细菌占绝对优势,也可使两者共存于同一反应系统中.值得一提的是,本研究中 pH 4 ~ 5 条件下的批量处理过程采用 pH5 ~ 6 下获得的富集产物,更低的 pH 范围成功抑制了原有接种物中细菌的生长,并且大幅度提高了酵母的构成比例(54.43% ~ 88.20%),更进一步论证了 pH 调控对于控制反应系统中酵母和细菌构成比例的重要作用.

2.1.3 代谢多样性分析

Biolog FF 板通常用于真菌的代谢多样性分析,为减少细菌的影响,常加入抗生素以抑制细菌对于真菌代谢多样性分析的干扰.这一研究方法已被广泛应用于土壤中真菌代谢多样性的检测,其应用具有普遍性<sup>[27,28]</sup>.本研究也采用该方法分析了 3 种不

同降解菌群的代谢多样性特征.

(1)平均每孔吸光度值(AWCD)分析 平均每孔吸光度值(AWCD)及其时间变化可以用来表示微生物的平均活性<sup>[28,29]</sup>.不同 pH 值条件下得到的降解菌群的 AWCD 值随时间的变化曲线如图 4 所示.从 120 h 开始到反应终点,3 种降解菌群的 AWCD 值均保持稳定.在这个范围内,pH 4 ~ 5 条件下的降解菌群的 AWCD 值低于其他 2 个 pH 条件下的微生物群落的 AWCD 值,表明以酵母为优势微生物的降解菌群其代谢活性低于其他 2 个条件下的降解菌群.

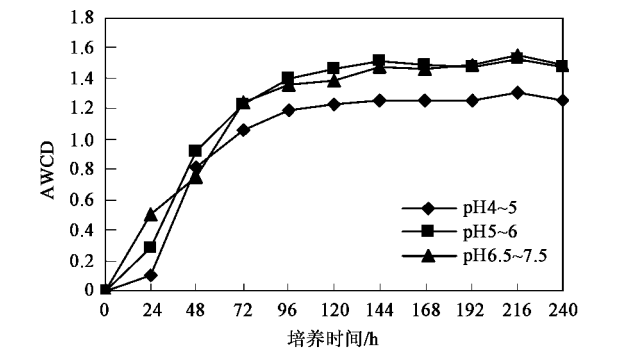


图 4 不同降解菌群的平均吸光度值(AWCD)

Fig.4 Time-course of AWCD at 490 nm for three batch cultures

(2)相似性分析 3 种降解菌群的代谢相似性见表 2 所示.从表 2 可以看出,3 种降解菌群相互之间的相似性极高,到反应终点时分别为 95.8%、93.7%、93.7%,这表明尽管 pH 调控使降解菌群中酵母和细菌的比例发生了明显变化,但 3 种降解菌群的代谢多样性并没有明显差异.此外,尽管检测真菌代谢多样性时通过添加抗生素以排除细菌的干扰,但本研究结果表明,通过富集培养得到的对抗生素具有较强抗性的细菌也能够 在 FF 板上显示与酵

母占优势时相似的代谢多样性,这说明即使添加了抗生素,FF板所反映的不仅仅只是真菌的代谢多样性,准确地说,应该是耐抗生素微生物(包括细菌和真菌)的代谢多样性.

表 2 不同降解菌群的相似性矩阵

| Table 2 Comparison of similarity among different cultures |        |        |            |
|-----------------------------------------------------------|--------|--------|------------|
|                                                           | pH 4~5 | pH 5~6 | pH 6.5~7.5 |
| pH 4~5                                                    | 100%   | 95.8%  | 93.7%      |
| pH 5~6                                                    | 95.8%  | 100%   | 93.7%      |
| pH 6.5~7.5                                                | 93.7%  | 93.7%  | 100%       |

2.2 不同 pH 条件下抗生素废水中降解菌群的生长与批量处理效果

不同 pH 条件下批量培养过程中 MLSS 变化曲线和 COD 变化曲线分别如图 5 所示.

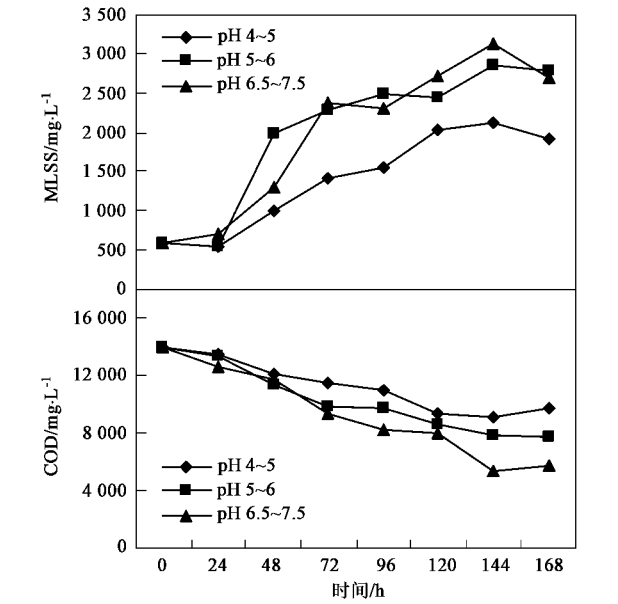


图 5 不同 pH 条件下 MLSS 和 COD 变化曲线  
Fig.5 Time-course of MLSS and COD at different pH levels in batch experiments

从 MLSS 的变化可以看出,随着反应的进行,各 pH 条件下培养液中的微生物浓度均有较大的增长,并都于 144 h 达到稳定值,pH 5~6 和 6.5~7.5 范围内微生物浓度大致相等并且高于 pH 为 4~5 范围内的微生物浓度.这与 2.1.3 中 AWCD 的变化趋势一致.

从 COD 的变化可以看出,pH 为 6.5~7.5 时 COD 去除率最高,达到了 61.2%;pH 为 5~6 范围内的 COD 去除率次之,达到 44.8%;pH 为 4~5 范围内的 COD 去除率最低,仅为 34.8%.结合扫描电镜以及 FISH-FCM 的结果,可以看出以细菌为主的降

解菌群对抗生素废水的批量处理效果最高,即细菌比例的上升有助于提高处理效果.由以上结果可以认为,pH 范围决定了降解菌群中酵母和细菌的比例,从而决定了抗生素废水的批量处理效果.

3 结论

(1)批量处理过程中的 pH 调控过程对抗生素废水降解菌群中酵母和细菌的比例具有明显影响.其中酵母比例随 pH 范围的升高而呈下降趋势,而细菌比例变化则呈相反趋势,在 pH 4~5 和 pH 6.5~7.5 范围内分别可以得到酵母和细菌占绝对优势的降解菌群.

(2)pH 4~5 条件下降解菌群的代谢活性低于其他 2 个条件下的降解菌群.但 3 种降解菌群对 Biolog FF 板上 95 种碳源的利用类型相似.

(3)pH 可以通过影响降解菌群中酵母和细菌的比例从而影响抗生素废水的生物处理效果.

致谢:北京师范大学环境学院徐思、王静宜以及生命科学学院韦玲等同学参与了部分试验,在此谨致谢意!

参考文献:

[1] 孙玉红,吕文洲,高静,等.不同 pH 条件下酵母菌处理高含油废水的研究[J].环境污染治理技术与设备,2006,7(9):94-98.

[2] 汪严明,杨敏,郑少奎,等.用酵母菌处理油田钻井废水的研究[J].环境科学,2002,23(5):72-75.

[3] 黑亮,杨清香,杨敏,等.利用酵母菌处理高浓度味精废水的连续小试[J].环境科学,2002,23(4):62-66.

[4] 杨清香,杨敏,郑少奎,等.酵母菌对味精生产中离交尾液的处理初探[J].环境科学,2001,22(6):44-48.

[5] 顾夏声,李献文,竺建荣.水处理微生物学[M].北京:中国建筑工业出版社,1998.11,63.

[6] 高大文,文湘华,周晓燕,等.pH 值对白腐真菌液体培养基抑制杂菌效果的影响研究[J].环境科学,2005,26(6):173-179.

[7] 杨军,陆正禹,胡纪萃,等.抗生素工业废水生物处理技术的现状与展望[J].环境科学,1997,18(3):83-85.

[8] Wallner G, Erhart R, Amann R. Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(5): 1859-1866.

[9] Gerds G, Luedke G. FISH and chips: Marine bacterial communities analyzed by flow cytometry based on microfluidics[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 64: 232-240.

[10] Ivanov V N, Wang J Y, Stabnikova O V, et al. Microbiological monitoring in the biodegradation of sewage sludge and food waste [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96: 641-647.

[11] Zoetendal E G, Ben-Amor K, Harmsen H J M, et al. Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in Human fecal samples by fluorescent in-situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9):4225-4232.

[12] Garland J L, Mills A. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source Utilization [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**(8): 2351-2359.

[13] Anderson S A, Sissons C H, Coleman M J, *et al.* Application of carbon source utilization patterns to measure the metabolic similarity of complex dental plaque biofilm microcosms [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(11): 5779-5783.

[14] Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles-a critique[J]. *Microbiology Ecology*, 2002, **42**: 1-14.

[15] 席劲瑛, 胡洪营, 姜健, 等. 生物过滤塔中微生物群落的代谢特性[J]. *环境科学*, 2005, **26**(4): 165-170.

[16] 叶央芳, 闵航. 代谢指纹评估苯噻草胺对水稻土微生物群落的短期影响[J]. *土壤学报*, 2006, **43**(2): 287-294.

[17] 翟晓萌, 李道棠. 有机微污染源水生物预处理微生物菌种的分离筛选[J]. *环境科学*, 2000, **21**(5): 77-79.

[18] 李明堂, 徐静波, 盛连喜. 硝基苯好氧降解细菌的筛选和降解活性研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2006, **28**(5): 552-555.

[19] Amann R I, Krumholz L, Stahl D A. Fluorescent-oligo-nucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology[J]. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 762-770.

[20] Kempf V A J, Trebesius K, Autenrieth I B. Fluorescent In Situ Hybridization Allows Rapid Identification of Microorganisms in Blood Cultures[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2000, **38**(2): 830-838.

[21] van Heerden J, Ehlers M M, Cloete T E. Biolog for the determination of microbial diversity in activated sludge systems[J]. *Water Science and Technology*, 2001, **43**(1): 83-90.

[22] 中国标准出版社第二编辑室. 水质分析方法国家标准汇编[M]. 北京: 中国标准出版社, 1996.

[23] 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.

[24] Vaahtovuori J, Korkeamäki M, Munukka E, *et al.* Quantification of bacteria in human feces using 16S rRNA-hybridization, DNA-staining and flow cytometry[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, **63**: 276-286.

[25] Joachimsthal E L, Ivanov V, Tay S T L, *et al.* Quantification of whole-cell in situ hybridization with oligonucleotide probes by flow cytometry of *Escherichia coli* cells[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2003, **19**: 527-533.

[27] Classen A T, Boyle S I, Haskins K E, *et al.* Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils[J]. *Microbiology Ecology*, 2003, **44**: 319-328.

[28] Buyer J S, Roberts D P, Millner P, *et al.* Analysis of fungal communities by sole carbon source utilization profiles[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, **45**: 23-60.

[28] 席劲瑛, 胡洪营, 钱易, 等. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J]. *微生物学报*, 2003, **43**(1): 138-141.

[29] Choi K H, Dobbs F C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, **36**: 203-213.