

阿维菌素废水工业化 UASB 颗粒污泥产甲烷菌群分析

刘春¹, 马俊科¹, 吴根², 杨景亮^{1*}, 郭建博¹, 李再兴¹

(1. 河北科技大学环境科学与工程学院, 石家庄 050018; 2. 科技部基础研究管理中心, 北京 100862)

摘要 产甲烷菌群是厌氧颗粒污泥的重要功能菌群, 采用荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术对阿维菌素废水处理工业化 UASB 颗粒污泥产甲烷菌群进行分析。结果表明, 不同形成阶段 (不同粒径) 颗粒污泥表面和内部剖面, 一般产甲烷菌 (methanogens)、产甲烷杆菌 (*Methanobacteriales*) 和产甲烷八叠球菌 (*Methanosarcinales*) 的分布形态相同, 但相对丰度存在差异。颗粒污泥内部剖面产甲烷菌群相对丰度大于表面; 产甲烷杆菌相对丰度大于产甲烷八叠球菌; 颗粒污泥表面和内部剖面产甲烷菌群相对丰度范围为 $(25.50 \pm 8.63)\% \sim (48.67 \pm 8.87)\%$; $1.0 \sim 2.0$ mm 粒径颗粒污泥产甲烷菌群相对丰度最大, 内部剖面 and 表面一般产甲烷菌的相对丰度分别为 $(47.08 \pm 8.26)\%$ 和 $(48.67 \pm 8.87)\%$ 。废水阿维菌素残留可能对产甲烷菌群具有抑制作用。不同粒径颗粒污泥最大比产甲烷活性范围为 $1.311 \sim 1.562$ g/(g·d), 变化趋势与 COD 去除率变化趋势相同, 而且与产甲烷菌群相对丰度变化趋势一致, 表明颗粒污泥生物活性与产甲烷菌群密切相关。

关键词 厌氧颗粒污泥; 产甲烷菌群; 荧光原位杂交; 相对丰度; 阿维菌素废水

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)03-0725-06

Analysis of Methanogenic Community of Anaerobic Granular Sludge in a Full-scale UASB Treating Avermectin Wastewater

LIU Chun¹, MA Jun-ke¹, WU Gen², YANG Jing-liang¹, GUO Jian-bo¹, LI Zai-xing¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. Basic Research Service Center, Ministry of Science and Technology, Beijing 100862, China)

Abstract Methanogens is considered to be important functional microbial population in anaerobic granular sludge. Fluorescence *in situ* hybridization was used to analyze methanogens of anaerobic granular sludge in a full-scale UASB treating avermectin wastewater. The results indicated that the distribution forms of methanogens, *Methanobacteriales* and *Methanosarcinales* were identical on the surface and inner face of granular sludge samples in different formation stages (with different diameters), although the relative abundances of these methanogens were different. The relative abundances of methanogens on the inner face were larger than these on the surface of granular sludge samples. The relative abundances of *Methanobacteriales* were larger than these of *Methanosarcinales*. The relative abundances of methanogens in all granular sludge samples ranged from $(25.50 \pm 8.63)\%$ to $(48.67 \pm 8.87)\%$. The maximum relative abundances of methanogens were obtained in mature granular sludge with diameter of $1.0 \sim 2.0$ mm, $(47.08 \pm 8.26)\%$ on the surface and $(48.67 \pm 8.87)\%$ on the inner face, respectively. The avermectin residue in wastewater showed possible inhibition effect on methanogens. The maximum specific methanogenic activities of granular sludge samples ranged from 1.311 to 1.562 g/(g·d), varying as same as COD removal ratios and relative abundances of methanogens, implying the strong correlation of methanogens with bioactivity of granular sludge.

Key words: anaerobic granular sludge; methanogens; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); relative abundance; avermectin wastewater

产甲烷菌群是厌氧颗粒污泥中的重要功能菌群, 对颗粒污泥污染物去除生物活性具有重要贡献, 一直是厌氧生物处理研究中的热点^[1~4]。现代分子生物技术和广泛应用, 使得深入认识产甲烷菌群在厌氧颗粒污泥中的分布、丰度和功能成为可能。其中, 荧光原位杂交 (FISH) 技术在厌氧颗粒污泥产甲烷菌群分析中得到普遍应用, 并且不断得到改进和完善^[5, 6]。文献^[7~9]分别利用 FISH 技术检测了啤酒废水处理工业化或实验室规模反应器中厌氧颗粒污泥的产甲烷菌, 揭示了优势产甲烷菌群及其在颗粒污泥中的分布, 描述了产甲烷菌分布与污泥

宏观性质, 如沉降性的关系。Montero 等^[10]采用 FISH 技术检测并证实产甲烷菌群的差异将对污泥产甲烷活性造成影响。这些研究使得对厌氧颗粒污泥产甲烷菌群特性及其与污泥生物活性关系的认识更为深入。

厌氧生物处理主要应用于高浓度有机废水处理, 已有厌氧颗粒污泥产甲烷菌的研究多侧重于易

收稿日期: 2009-05-11 修订日期: 2009-06-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50878072); 河北省自然科学基金项目 (E2008000694, E2009000709)

作者简介: 刘春 (1976~), 男, 博士, 讲师, 主要研究方向为废水生物处理技术, E-mail: liuchun02@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: yangjingliang@hebut.edu.cn

降解食品工业废水^[11, 12]或人工模拟废水^[13]. 事实上,废水水质对厌氧颗粒污泥中产甲烷菌群具有重要影响,特别是废水中存在有毒有害或难降解污染物时,将对产甲烷菌群及产甲烷活性造成影响. Chen 等^[14]研究表明废水中酚、对苯二酸、苯甲酸等污染物会造成污泥中产甲烷菌群的差异, Liu 等^[15]在 PCP 废水处理的过程中观察到 PCP 对厌氧颗粒污泥产甲烷活性的抑制影响.

抗生素生产发酵废水是典型的高浓度有机废水,多采用厌氧生物处理. 抗生素废水的重要水质特征是具有抗生素残留,对处理系统中微生物种群具有一定影响. 分析抗生素废水处理厌氧颗粒污泥,特别是实际运行的工业化厌氧反应器颗粒污泥产甲烷菌群及其与污泥生物活性的关系,有助于深入认识抗生素废水对厌氧处理系统的影响.

本研究以阿维菌素废水处理工业化 UASB 颗粒污泥为对象,采用 FISH 技术对不同产甲烷菌群在厌氧颗粒污泥中的分布形态和相对丰度进行了分析,并探讨了产甲烷菌群与污泥产甲烷活性和污染物去除活性的关系.

1 材料与方法

1.1 污泥样品

本研究中厌氧颗粒污泥样品取自河北石家庄某阿维菌素废水处理工业化 UASB 反应器(500 m³),污泥平均 VSS/SS 值为 0.941. 将 UASB 颗粒污泥样品用标准筛筛出 <0.6 mm、0.6~1.0 mm、1.0~2.0 mm、

>2.0 mm 这 4 种粒径的污泥样品,其质量分数为 14.8%、5.3%、60.3% 和 19.6%, VSS/SS 值分别为 0.905、0.940、0.957 和 0.945. 1.0~2.0 mm 粒径污泥样品所占质量分数最大,为成熟颗粒污泥主体. 0.6~1.0 mm 粒径污泥为未成熟颗粒污泥;>2.0 mm 粒径污泥为老化颗粒污泥;<0.6 mm 粒径污泥为解体颗粒污泥及未形成颗粒污泥的絮状污泥.

1.2 FISH 杂交

1.2.1 特异性探针

本研究采用 4 种寡核苷酸荧光探针:通用探针 UNIV1392、一般产甲烷菌探针 MPB1、产甲烷杆菌探针 MEB859 和产甲烷八叠球菌探针 MSSH859,分别杂交不同目标的产甲烷菌群,如表 1 所示. 探针由大连宝生物(Takara)公司合成.

1.2.2 杂交

取 250 μL 的污泥样品置于 1.5 mL 离心管中,加入 3 倍体积的 4% 多聚甲醛固定. 4℃ 静置 1 h, 10 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,再用 1×PBS 缓冲液清洗样品 3 次,然后将污泥样品涂在载玻片上,分别用 50%、80% 和 100% 的梯度乙醇进行脱水,每个系列 3 min.

将 1 μL 浓度为 0.1 nmol/μL 的探针与 9 μL 杂交缓冲液(0.9 mol/L NaCl,0.01% SDS,0.02 mol/L Tris-HCl,一定浓度的甲酰胺,pH 7.2)充分混合,然后将探针与杂交缓冲液均匀展开在污泥样品上,再把载玻片放入预先平衡好温度和湿度的分子杂交箱(UVP,HB-1000,美国)中,46℃ 杂交 5 h.

表 1 FISH 中用到的探针
Table 1 Probes used in FISH

探针	目标微生物	序列(5'-3')	标记种类	文献
UNIV1392	细菌和古菌	ACGGGCGGTGTGTAC	5'FITC	[8]
MPB1	产甲烷菌	CATGCACCACCTCTCAGC	5'FITC	[12]
MEB859	产甲烷杆菌	GGACTTAACAGCTTCCT	5'FITC(或 5'罗丹明)	[16]
MSSH859	产甲烷八叠球菌	CTCACCCATACCTCACTCGGG	5'FITC	[16]

杂交好的污泥样品用 46℃ 的杂交清洗液(0.01% SDS,0.02 mol/L Tris-HCl,一定浓度的 NaCl,pH 7.2)清洗未杂交的探针和杂交缓冲液,再用 46℃ 的灭菌 ddH₂O 漂洗 3 次,后自然风干.

双杂交:风干后,再按上述步骤在污泥样品上杂交另一种探针.

1.2.3 镜检与图像处理

杂交后的污泥样品置于荧光显微镜(Motic, BA200,中国)下观察,每个样品取 30 个视野获得 FISH 杂交图像(Moticam2206). 使用 Motic Fluo 1.0

荧光分析软件对图像进行分析,确定目标菌群的分布形态,并计算荧光杂交区域面积,根据公式(1)计算目标菌群的相对丰度^[17].

菌群相对丰度(%) =

$$\frac{\text{特异性探针杂交的细胞数目}}{\text{通用探针杂交的细胞数目}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3 污泥样品活性测定

最大比产甲烷活性:接种相同质量(VSS)的 4 种粒径的污泥样品,35℃ 恒温水浴培养,采用排水集气法测定污泥样品的产甲烷活性. 间歇进水,水质组

成为 1% 酵母浸粉、1% 胰蛋白胨、0.25% 乙酸钠、0.25% 甲醇、0.05% NH_4Cl 、0.02% K_2PO_4 和 0.005% MgCl_2 (以上浓度均为质量分数), pH 值为 7.2, COD 为 4 000 ~ 5 500 mg/L ^[18], 进水负荷为 1.6 ~ 2.2 $\text{kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$. 测定产气量随时间的变化, 并用线性回归求得最大产甲烷速率 K , 最后根据公式 (2) 计算污泥样品的最大比产甲烷活性 A ^[19].

$$A = \frac{24 \times K \times f}{V \times S} \quad (2)$$

式中, A 为污泥样品最大比产甲烷活性, $\text{g}/(\text{g} \cdot \text{d})$; K 为最大产甲烷速率, L/h ; f 为转换系数, g/L , 取 2.574; V 为培养瓶中反应区的容积, L ; S 为颗粒污泥浓度, g/L .

COD 去除率 测定进水 8h 后 COD 的去除率, 以此表征污泥样品去除有机污染物的宏观生物活性.

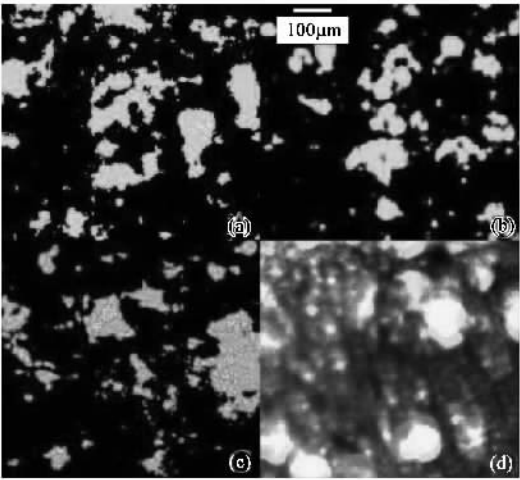
2 结果与讨论

2.1 产甲烷菌群在颗粒污泥中分布和相对丰度

2.1.1 颗粒污泥表面

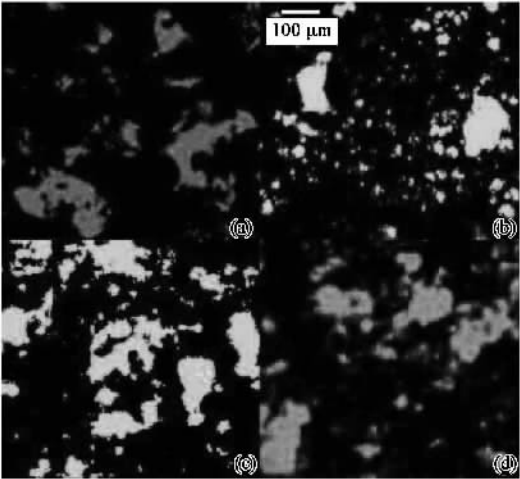
本研究中所使用的 3 种产甲烷菌特异性探针分别针对一般产甲烷菌 (Methanogens)、产甲烷杆菌 (Methanobacteriales) 和产甲烷八叠球菌 (Methanosarcinales) 进行检测, 后两者是厌氧颗粒污泥中常见的优势产甲烷菌群. 以不同粒径的污泥样品表征颗粒污泥形成的不同阶段, 使用不同的特异性探针针对不同粒径污泥样品表面的产甲烷菌群进行杂交, 污泥样品表面的产甲烷菌群呈现出相同的分布形态. 图 1 所示为粒径为 1.0 ~ 2.0 mm 污泥样品表面产甲烷菌、产甲烷杆菌和产甲烷八叠球菌的分布形态. 分布形态相同; 产甲烷菌杂交区域面积较大, 产甲烷杆菌和产甲烷八叠球菌交叉重叠分布 [图 1(d)]. 图 2 所示为产甲烷菌在 4 个粒径污泥样品表面的分布形态. 分布形态相同. 但是, 不同产甲烷菌群在不同污泥样品表面杂交区域面积存在差异, 表明产甲烷菌群相对丰度存在差异.

以通用探针杂交区域面积为比较基准, 计算不同产甲烷菌群在不同粒径污泥样品表面的相对丰度, 平均相对丰度如图 3 所示. 可以看到, 随着污泥粒径增加, 不同产甲烷菌群相对丰度均逐渐升高, 1.0 ~ 2.0 mm 粒径污泥样品产甲烷菌群相对丰度最大, >2.0 mm 粒径污泥样品产甲烷菌群相对丰度又略有降低. 以产甲烷菌为例, <0.6 mm、0.6 ~ 1.0 mm、1.0 ~ 2.0 mm 和 >2.0 mm 4 种粒径污泥样品表面的相对丰度分别为 $(25.50 \pm 8.63)\%$ 、 $(39.48$



(a) 产甲烷菌;(b) 产甲烷八叠球菌;(c) 产甲烷杆菌;
(d) 产甲烷杆菌(红)与产甲烷八叠球菌(绿)

图 1 不同产甲烷菌在粒径 1.0 ~ 2.0 mm 污泥样品表面分布
Fig.1 Distributions of different methanogens on the surface of
sludge sample with diameter of 1.0-2.0 mm



(a) <0.6 mm;(b) 0.6 ~ 1.0 mm;
(c) 1.0 ~ 2.0 mm;(d) >2.0 mm

图 2 产甲烷菌在不同粒径污泥样品表面分布形态
Fig.2 Distribution of Methanogens on the surface of
sludge samples with different diameters

$\pm 9.05)$ %、 (47.08 ± 8.26) % 和 (43.69 ± 9.26) % . 这个结果表明, 随着颗粒污泥的逐渐形成, 产甲烷菌群的种群规模逐渐增大; 1.0 ~ 2.0 mm 粒径为成熟颗粒污泥, 产甲烷菌群种群规模最大. 随着颗粒污泥老化, 产甲烷菌群种群规模又有所降低.

同一粒径污泥样品表面, 产甲烷杆菌相对丰度均大于产甲烷八叠球菌, 且两者的相对丰度之和大于产甲烷菌. 以 1.0 ~ 2.0 mm 粒径污泥样品为例, 产甲烷杆菌和产甲烷八叠球菌的相对丰度分别为 (43.68 ± 7.98) % 和 (35.31 ± 6.24) % , 两者之和大

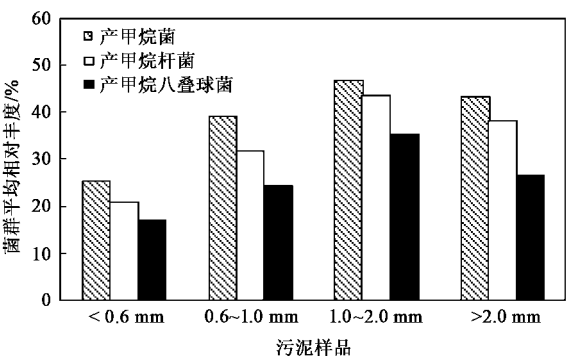


图3 不同产甲烷菌群在颗粒污泥表面的相对丰度
Fig.3 Relative abundances of different methanogens on the surface of granular sludge

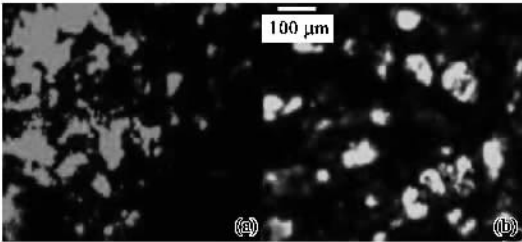
于产甲烷菌相对丰度(47.08 ± 8.26) %。这个结果也说明产甲烷杆菌和产甲烷八叠球菌是交叉重叠分布的。同时,1.0 ~ 2.0 mm 粒径污泥表面产甲烷杆菌与产甲烷八叠球菌相对丰度之比为 1.23,低于其他粒径污泥,表明产甲烷八叠球菌的相对比例更高。

2.1.2 颗粒污泥内部

将 1.0 ~ 2.0 mm 和 > 2.0 mm 粒径的污泥样品剖开,在其内部剖面使用不同的产甲烷菌群特异性探针进行 FISH 杂交,不同产甲烷菌群分布形态相同,亦与表面分布形态相同。图 4 所示为产甲烷八叠球菌在 1.0 ~ 2.0 mm 粒径污泥样品内部剖面和表面的分布形态。以通用探针杂交区域面积为比较基准,计算不同产甲烷菌群在污泥样品内部剖面的相对丰度,平均相对丰度如图 5 所示。可以看到,内部剖面不同产甲烷菌群相对丰度之间的关系与表面相同。1.0 ~ 2.0 mm 粒径的污泥产甲烷菌群相对丰度高于 > 2.0 mm 粒径的污泥,如 1.0 ~ 2.0 mm 和 > 2.0 mm 粒径污泥内部剖面产甲烷菌的相对丰度分别为(48.67 ± 8.87) %、(45.01 ± 8.97) % ;产甲烷杆菌相对丰度大于产甲烷八叠球菌,两者之和大于产甲烷菌相对丰度,如 1.0 ~ 2.0 mm 粒径污泥内部剖面产甲烷杆菌和产甲烷八叠球菌的相对丰度分别为(44.94 ± 8.78) %、(37.87 ± 6.58) % ,相对丰度之比为 1.18,低于 > 2.0 mm 粒径污泥。同时,颗粒污泥内部剖面产甲烷菌群相对丰度大于表面,如 1.0 ~ 2.0 mm 粒径污泥内部剖面和表面产甲烷八叠球菌的相对丰度分别为(37.87 ± 6.58) %、(35.31 ± 6.24) % 。

Jupraputtasri 等^[12] 采用 FISH 法检测淀粉废水处理厌氧颗粒污泥,其产甲烷菌的相对丰度为(50.7 ± 6.9) % ;Liu 等^[8] 利用条形斑点杂交(Slot-blot hybridization)检测啤酒废水处理厌氧颗粒污泥

总 rRNA,其中产甲烷菌 rRNA 的相对比例为 62.4 %。以上结果均高于本研究中阿维菌素废水处理厌氧颗粒污泥产甲烷菌群相对丰度。其原因可能在于处理水质的差异,特别是废水中阿维菌素残留的平均浓度为 40 mg/L^[20],对颗粒污泥中产甲烷菌群具有一定的抑制作用。颗粒污泥内部剖面产甲烷菌群相对丰度高于表面也可能是因为内部产甲烷菌群受废水中阿维菌素的抑制影响较小。



(a) 内部 ;(b) 表面
图4 产甲烷八叠球菌群在 1.0 ~ 2.0 mm 粒径污泥样品内部和表面的分布

Fig.4 Distribution of *Methanosarcinales* on the inner face and surface of sludge sample with diameter of 1.0-2.0 mm

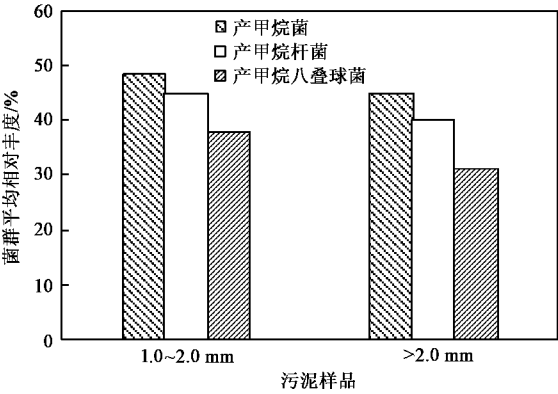


图5 不同产甲烷菌群在颗粒污泥内部剖面的相对丰度
Fig.5 Relative abundances of different methanogens on the inner face of granular sludge

2.2 不同粒径颗粒污泥宏观生物活性比较

厌氧颗粒污泥样品的宏观生物活性受到污泥中微生物种群结构的影响,不同粒径污泥样品产甲烷菌群相对丰度存在差异,可能会造成污泥产甲烷活性和污染物去除活性的差异。对 4 种粒径污泥样品的最大比产甲烷活性和 COD 去除率进行测定,以比较污泥样品宏观生物活性的差异,结果如表 2 所示。

可以看到,不同粒径污泥样品最大比产甲烷活性和 COD 去除率变化趋势相同,均为随着污泥粒径增加而增大,至 1.0 ~ 2.0 mm 粒径污泥样品时最大,最大比产甲烷活性为 1.562 g / (g · d),COD 去

除率为 88.64% , >2.0 mm 粒径污泥样品又略有降低. 这个结果说明污泥样品的产甲烷活性和有机污染物去除生物活性密切相关. 同时, 污泥样品宏观生物活性的变化趋势与产甲烷菌群相对丰度的变化趋势一致, 证实污泥微生物种群结构对其宏观生物活性具有重要影响. 值得注意的是, 1.0 ~ 2.0 mm 粒径

污泥样品表面和内部剖面产甲烷杆菌与产甲烷八叠球菌相对丰度之比分别为 1.23 和 1.18, 均低于其他粒径污泥样品, 即产甲烷八叠球菌的相对比例更高. 这个结果表明尽管产甲烷杆菌的相对丰度更大, 但产甲烷八叠球菌对宏观生物活性的贡献可能更大.

表 2 不同粒径污泥样品最大比产甲烷活性和 COD 去除率

Table 2 COD removal ratio and maximum specific methanogenic activity of sludge samples with different diameters

项目	粒径 /mm			
	<0.6	0.6 ~ 1.0	1.0 ~ 2.0	>2.0
平均最大比产甲烷活性/ $\text{g} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$	1.311	1.394	1.562	1.467
COD 平均去除率 /%	76.31	81.21	88.64	85.81

3 结论

(1) 产甲烷菌群在不同形成阶段(不同粒径)阿维菌素废水处理厌氧颗粒污泥表面和内部剖面的分布形态相同, 产甲烷杆菌和产甲烷八叠球菌交叉重叠分布.

(2) 产甲烷菌群在不同形成阶段(不同粒径)颗粒污泥中的相对丰度存在差异: 颗粒污泥表面和内部剖面产甲烷菌相对丰度范围为 $(25.50 \pm 8.63)\%$ ~ $(48.67 \pm 8.87)\%$; 成熟的 1.0 ~ 2.0 mm 粒径污泥样品产甲烷菌群相对丰度最大; 产甲烷杆菌相对丰度大于产甲烷八叠球菌; 污泥内部剖面产甲烷菌群相对丰度大于表面. 阿维菌素残留可能对产甲烷菌群产生抑制作用.

(3) 颗粒污泥最大比产甲烷活性范围为 1.311 ~ 1.562 $\text{g}/(\text{g} \cdot \text{d})$, 不同粒径污泥样品最大比产甲烷活性与 COD 去除率变化趋势相同, 而且与产甲烷菌群相对丰度变化趋势一致, 表明颗粒污泥的宏观生物活性与产甲烷菌群密切相关.

参考文献:

[1] Chang Y J, Nishio N, Nagai S. Characteristics of granular methanogenic sludge grown on phenol synthetic medium and methanogenic fermentation of phenolic wastewater in a UASB Reactor [J]. J Ferment Bioeng, 1995, **79**(4) :348-353.

[2] Fukuzaki S, Nishio N, Nagai S. High rate performance and characterization of granular methanogenic sludges in upflow anaerobic sludge blanket reactors fed with various defined substrates [J]. J Ferment Bioeng, 1995, **79**(4) :354-359.

[3] Akarsubasi A T, Ince O, Oz N A, et al. Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity and archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters [J]. Process Biochem, 2006, **41** :28-35.

[4] Shigematsu T, Tang Y Q, Mizuno Y, et al. Microbial diversity of mesophilic methanogenic consortia that can degrade long-chain

fatty acids in chemostat cultivation [J]. J Biosci Bioeng, 2006, **102**(6) :535-544.

[5] Crocetti G, Murto M, Björnsson L. An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH) [J]. J Microbiol Meth, 2006, **65** :194-201.

[6] Kubota K, Imachi H, Kawakami S, et al. Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens [J]. J Microbiol Meth, 2008, **72** :54-59.

[7] Saiki Y, Iwabuchi C, Katami A, et al. Microbial analyses by fluorescence in situ hybridization of well-settled granular sludge in brewery wastewater treatment plants [J]. J Biosci Bioeng, 2002, **93**(6) :601-606.

[8] Liu W T, Chan O C, Fang H H P. Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater [J]. Water Res, 2002, **36** :1767-1775.

[9] Saiki Y, Katami A, Kitagawa Y. Factual analysis of granule flotation in brewery wastewater treatment plants by the fluorescence in situ hybridization method [J]. J Biosci Bioeng, 2003, **95**(2) :188-191.

[10] Montero B, García-Morales J L, Sales D, et al. Analysis of methanogenic activity in a thermophilic-dry anaerobic reactor: use of fluorescent in situ hybridization [J]. Waste Manage, 2009, **29** :1144-1151.

[11] Tang Y Q, Fujimura Y, Shigematsu T. Anaerobic treatment performance and microbial population of thermophilic upflow anaerobic filter reactor treating Awamori distillery wastewater [J]. J Biosci Bioeng, 2007, **104**(4) :281-287.

[12] Juprattasri W, Boonapatcharoen N, Cheevadhanarak S, et al. Use of an alternative archaea specific probe for methanogen detection [J]. J Microbiol Meth, 2005, **61** :95-104.

[13] Shigematsu T, Tang Y Q, Kawaguchi H, et al. Effect of dilution rate on structure of a mesophilic acetate-degrading methanogenic community during continuous cultivation [J]. J Biosci Bioeng, 2003, **96**(6) :547-558.

[14] Chen C L, Wu J H, Liu W T. Identification of important microbial populations in the mesophilic and thermophilic phenol-degrading methanogenic consortia [J]. Water Res, 2008, **42** :

- 1963-1976.
- [15] Liu X W, He R, Shen D S. Studies on the toxic effects of pentachlorophenol on the biological activity of anaerobic granular sludge [J]. J Environ Manage, 2008, **88** :939-946.
- [16] Fernandez N, Siera-Alvarez R, Field J A, *et al.* Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge [J]. Chemosphere, 2008, **70** :462-474.
- [17] Wallner G, Amann R, Beisker W. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms [J]. Cytometry, 1993, **14** :136-143.
- [18] 田沈, 赵军, 曹亚莉, 等. 产甲烷菌固定化新方法及其甲烷化特征[J]. 太阳能学报, 2002, **12** :778-781.
- [19] 裘湛. UASB 反应器内污泥颗粒化过程加速的研究[D]. 合肥 :合肥工业大学, 2002.
- [20] 李再兴, 宋存义, 杨景亮, 等. 高效液相色谱法测定废水中阿维菌素的含量[J]. 中国环境监测, 2007, **23**(3) :7-9.