

SSCP 技术解析硫酸盐还原反应器中微生物群落结构

赵阳国,任南琪,王爱杰,刘广民,赵秋实,商淮湘

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院,哈尔滨 150090)

摘要:采用改进的单链构象多态性(SSCP)技术,以 16S rRNA 基因的 V3 区为靶对象,分析完全混合式硫酸盐还原反应器中微生物的群落结构以及硫酸盐还原菌(SRBs)与产酸菌(ABs)的种间关系。共得到 13 个可辨晰的 SSCP 条带,对其中的 6 条带(A1, A3, A4, A5, A9, A10)进行了测序分析,分别同嗜柠檬酸明串球菌(GenBank 登录号:A Y453065,下同)、未培养细菌(AJ318147, AF227834, AJ576427)、产乙醇杆菌(A Y434722)、梭杆菌(AB084627)等相似性较大。为检测系统中的 SRBs,以 SRBs 富集培养基,对反应器中的活性污泥进行选择富集,培养的混合菌群同样采用 SSCP 分析,带型与前者相差较大,其中有 2 条带与 *Bacteroidetes* (AB074606)和脱硫弧菌(Y12254, U42221)最为相似。分析表明,SRBs 在总 DNA 中的含量可能不到 1.5%,但是它们与大量的 ABs 形成很好的种间协作关系,从而维持工艺系统较高的硫酸盐去除率和运行稳定性。

关键词:微生物群落;群落结构;单链构象多态性;硫酸盐还原菌;产酸菌

中图分类号:X172;Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2005)04-0171-06

Microbial Community Structure Analyzed by Single-Strand Conformation Polymorphism Technique in Sulfate-Reducing Reactor

ZHAO Yang-guo, REN Nan-qi, WANG Ai-jie, LIU Guang-min, ZHAO Qiu-shi, SHANG Huai-xiang

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Analyses of microbial community structure and the relationships between Sulfate-Reducing Bacteria (SRBs) and Acidogenic Bacteria (ABs) in a completely stirred sulfate-reducing reactor were carried out by modified polymerase chain reaction-single-stranded conformation polymorphism (PCR-SSCP) targeted eubacterial 16S ribosomal RNA gene. A total of 13 bands were obtained and 6 of them (A1, A3, A4, A5, A9, A10) were sequenced. The sequences are similar to *Leuconostoc mesenteroides* (GenBank Access No. A Y453065), some uncultured bacteria (AJ318147, AF227834, AJ576427), *Ethanologobacterium* (A Y434722), *Clostridiaceae* (AB084627), etc. In order to investigate the SRBs in the reactor, the active sludge was cultured on SRB-selected media and also did SSCP with the compound cultured bacteria. Two new bands appeared, one similar to *Bacteroidetes* (AB074606) and another similar to *Desulfovibrio* (Y12254, U42221). The experimental results indicate that the proportion of SRBs in the reactor is probably less than 1.5 percent. But the few SRBs play a very important role during the course of sulfate reduction via cooperation with acidogenic bacteria.

Key words: microbial community; community structure; Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP); Sulfate-Reducing Bacteria (SRBs); Acidogenic Bacteria (ABs)

分子生物学方法与传统的微生物分离培养方法相比,能更客观地反映微生物群落结构的本征。在群落动态监测中应用最广泛的分子生物学技术主要包括荧光原位杂交技术(Fluorescence *in situ* Hybridization, FISH),变性/温度梯度凝胶电泳技术(Denaturing/ Temperature Gradient Gel Electrophoreses, D/ TGGE),末端限制性片段长度多态性技术(Terminate-Restriction Length Fragment Polymorphism, T-RL FP)以及单链构象多态性技术(Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP),这些技术均是以环境基因组信息为基础,以核糖体小亚基 RNA 基因为靶对象从而实现分析群落动态的目的。前 3 种技术在微生物群落动态监测、群落结构分析及生物多样性表征等方面发挥着重要作用。

SSCP 技术作为突变检测技术,首先由 Lee 等^[1]将其发展并应用于微生物群落分析。同其他分子生物学技术相比,它具有使用设备简单,只需普通引物,后续杂交不需变性处理等优点,在根际微生物群落结构分析^[2],自然生境微生物多样性调查^[1],有机肥沤制^[3]和反应器崩溃过程中^[4]微生物群落动态学等研究方面,SSCP 技术都表现出较强的应用潜力。本研究拟通过对 16S rDNA 的 PCR-SSCP、序列的比较分析,考察稳定运行状态下完全混合式硫酸盐还原反应器中微生物的群落结构以及硫酸盐还

收稿日期:2004-09-05;修订日期:2004-11-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50208006)

作者简介:赵阳国(1976~),男,山东人,博士研究生,研究方向为硫酸盐废水处理与微生物分子生态学。E-mail: zhaoyangguo@hit.edu.cn

原菌 (Sulfate-Reducing Bacteria, SRBs) 与产酸菌 (Acidogenic Bacteria, ABs) 的种间关系。

1 材料与方法

1.1 反应器与工艺运行条件

本研究采用的硫酸盐还原反应器为 CSTR 型一体化装置^[5], 总容积 22.0 L, 有效容积 9.7 L, 采用外缠电阻丝加热, 温度控制在 $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。种泥采自哈尔滨炼油厂废水处理车间二沉池, 接种生物量为 3.0 L, VSS $11.7\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采用人工配水, 进水碳硫比 ($\text{COD} : \text{SO}_4^{2-}$) 控制在 3.0, 硫酸盐浓度 $2\,000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, COD 浓度 $6\,000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0, 水力停留时间 (HRT) 为 10.6 h。在反应器硫酸盐去除率大于 90 % 并稳定运行的状态下取活性污泥样品分析。

1.2 样品采集

采用灭菌的移液管从反应器上方取样孔吸取活性污泥 5 mL 置于无菌的离心管中, 并迅速插入冰中, 样品直接用于稀释培养或基因组 DNA 的提取。

1.3 SRBs 的选择性培养

采用无氧的灭菌水, 将活性污泥稀释至 10^{-8} , 取 0.1 mL 按 Hungate 法用 Postgate C^[6] SRBs 固体培养基对菌液进行选择培养, 35 $^\circ\text{C}$ 培养 5~7 d, 直到培养基表面长满黑色的菌苔。

1.4 基因组 DNA 的提取

0.5 mL 活性污泥 (简称为 A), 1.0 mL 无菌水洗下的选择培养物 (简称为 S), 1.5 mL 的 *E. coli* (简称为 E) 培养液, 1.5 mL 从该反应器中分离的纯菌 p3 培养液, 1.5 mL 从发酵产氢反应器中分离的纯菌 W-1 培养液离心除去上清后, 采用细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司) 按产品说明书提取基因组 DNA, 最后用 $50\mu\text{L}$ $2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl (pH 8.0~8.5) 溶解纯化的 DNA, 采用相同的方法对群落 (A 和 S) 重复提取基因组 DNA。

1.5 引物选择及 PCR 扩增

PCR 扩增采用引物^[1], SRV3-1: $5' \text{CGG}(\text{C}/\text{T})\text{CCA GACTCCTAC GGG}-3'$; SRV3-2: $5' \text{TTACCGCGGCTG CTGGCA}-3'$ 。反向引物 SRV3-2 的 5' 端采用磷酸标记, 分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的 330~348 bp 和 533~515 bp, 由上海博亚生物技术有限公司合成并标记。PCR 采用宝生物工程 (大连) 有限公司的 PCR 扩增试剂盒, 在 PE 公司 9700 PCR 仪上进行, $50\mu\text{L}$ 反应体系中分别包括 $5\mu\text{L}$ $10 \times \text{PCR buffer}$ (plus $2.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Mg^{2+}), $4\mu\text{L}$ dNTP (各 $2.5\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 引物各 $1.5\mu\text{L}$ ($20\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Taq DNA 聚合酶 $0.5\mu\text{L}$ ($5\text{U}/\mu\text{L}$), 模板 $2\mu\text{L}$ 。反应程序为: 94 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min 后, 接以 30 个循环, 即 94 $^\circ\text{C}$ 变性 40 s, 50 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 40 s; 循环完毕后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。取 $3\mu\text{L}$ 于 1 % 的琼脂糖凝胶上电泳, 并与 DNA 定量 marker DL2000 (分子量分别为: 2000, 1000, 750, 500, 250, 100, 宝生物 (大连) 有限公司) 比较确定浓度。剩余 PCR 产物采用纯化试剂盒 (上海生工生物公司) 切胶纯化, 并溶解于 $50\mu\text{L}$ $2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl (pH 8.0~8.5) 中。

1.6 PCR 产物的 λ 核酸外切酶处理

λ 核酸外切酶能够很专一地降解双链 DNA 中 5' 磷酸标记的链, 从而使非标记的单链释放出来^[7]。 $60\mu\text{L}$ 反应体系中包括, λ 核酸外切酶 ($5\text{U}/\mu\text{L}$) (New England Biolabs Inc., USA; 纯菌 PCR 产物 $4\mu\text{L}$, 群落 PCR 产物 $6\mu\text{L}$); $10 \times \text{buffer}$ $6\mu\text{L}$; PCR 产物 (纯菌 $20\mu\text{L}$, 群落 $30\mu\text{L}$)。37 $^\circ\text{C}$ 温浴 4 h, 处理完毕后, 72 $^\circ\text{C}$ 10 min 灭活 λ 核酸外切酶。

1.7 凝胶制备及 SSCP 图谱的获得

电泳仪为 Pharmacia Biotech EPS 3500, 电泳槽为北京六一 DYCZ-28B, 采用循环水冷却系统 (Pharmacia LKB MultiTemp II) 在 20 $^\circ\text{C}$ 恒温下进行。采用 10 % 的聚丙烯酰胺 (交联度 49:1, Sigma, USA), 并加 10 % 的甘油 (Amresco Inc., USA), 40 mL 凝胶中加入 10 % 的 APS (Amresco) $450\mu\text{L}$, Termed (Applied Biosystems, USA) $30\mu\text{L}$, 室温凝固 30 min 后, 250 V, 预电泳 30 min。

混合菌酶解产物 $10\mu\text{L}$ (约 100 ng), 纯菌酶解产物 $5\mu\text{L}$ (约 15 ng) 分别与 $10\mu\text{L}$ 缓冲液 (体积分数 95 % 的去离子甲酰胺, $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, $20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 质量浓度 0.02 % 溴酚蓝和 0.02 % 二甲苯酚 FF)^[8] 混合后 95 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min, 迅速插入冰中, 5 min 后上样。20 $^\circ\text{C}$ 下, 恒压 250 V, 11 h, 采用相同的上样量及电泳条件对重复实验群落样品电泳。

电泳结束后, 剥胶染色, 银染按 Bassam^[9] 的方法进行。获得的 SSCP 图谱采用 Epson photo 2000 扫描。

1.8 条带分离及克隆、测序

特异条带的回收按 Tebbe 等^[8] 的方法进行。取回收的 DNA $2\mu\text{L}$ 为模板, 以 SRV3-1 和 SRV3-2 为引物, 采用同前体系和 PCR 程序进行扩增。取 $3\mu\text{L}$ 产物进行琼脂糖电泳验证后, 采用 λ 核酸外切酶进

行处理.将得到的处理产物同样进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳.对 PCR 产物切胶纯化(纯化试剂盒,上海生工生物公司)后,按产品说明书克隆进 T-载体[pMD-18-T,宝生物(大连)有限公司].对转化子的筛选采用了蓝白斑及 PCR 的方法,PCR 直接以白斑菌落为模板,采用能与 T-载体插入点两侧特异结合的 M13 通用引物进行检测.每条带选取几个克隆,同样以 M13 通用引物进行测序(3730, Applied Biosystems).

1.9 系统发育学分析

通过 Blast 软件,将获得的序列与 GenBank 进行比对,并下载最相近的序列,以 phylic 软件包同已经获得的序列按最小相邻法(NJ)构建系统进化树,以 TreeView 输出.

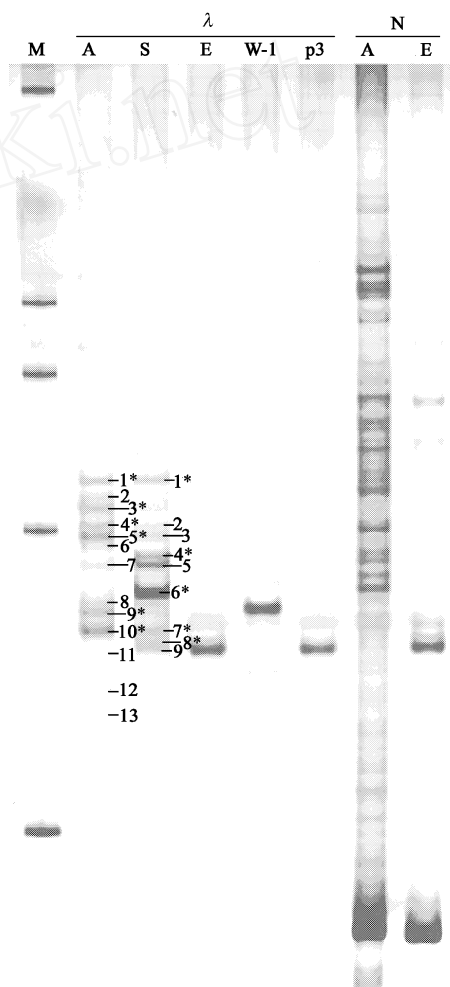
2 结果与讨论

反应器运行稳定后, SO_4^{2-} 去除率已经达到 90%以上,之后 1a 内的 SO_4^{2-} 去除率变化很小(图未给出).经过长期的运行,同硫酸盐代谢相关的微生物得到富集,而关系不太密切的微生物被逐渐淘汰.反应器已经形成了一个微生物生态系统.

2.1 SSCP 图谱

采用传统的 SSCP 方法(不用 λ 核酸外切酶处理),对该硫酸盐还原反应器中微生物群落进行分析时,其异源双链 SSCP 图谱非常复杂(图 1 N 中的泳道 A,重复实验图谱相同,故省略,下同),而且即使 *E. coli* 的异源双链 SSCP 图谱也在 3 条以上(图 1 N 的泳道 E).若将这种 SSCP 图谱中某些条带分离并以之为模板进行 PCR 扩增,得到的异源双链 SSCP 图谱,除了包含回收条带之外,还包含多条其它未回收的条带,各泳道复杂程度基本相同(图未给出),这说明群落中的一个操作分类单元(Operational Taxonomy Unit, OTU),在进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳时,由于同其它互补链的作用,会形成多种空间构象,从而出现了一个 OTU 对多条带的现象,使得 SSCP 图谱无序性提高.同时,这种异源双链 SSCP 图谱中,1 条带中极有可能包含着一个 OTU 及与其它 OTU 相互作用的异源双链.将反意链去掉后,有意链由于无法同互补链相互作用,而仅是通过链内作用形成不同的三维构象,所以形成的条带便是由于序列不同而引起的.这种 SSCP 图谱非常简单明了,如图 1 λ 中, A 泳道得到 13 个可辨析的条带, S 泳道得到 9 个条带,二者存在较大差异,且 1 种微生物只对应着 1 个条带.回收条带的

PCR 产物经 λ 核酸外切酶处理后,再进行 SSCP 时仍处于原来的位置,进一步验证了该技术的可靠性(图 2),但仍无法排除一条带中包含多个 OTUs 的可能性,如图 1 λ 中的 E 和 p3 具有相同迁移距,二者混合会形成一条带.



M:DL2000; λ :Lambda Exonuclease digested; N:non-digested; A: community in reactor; S:community growing on SRBs medium; E: *E. coli*; W-1: bacterium isolated from hydrogen-producing reactor; p3, bacterium isolated from sulfate-reducing reactor

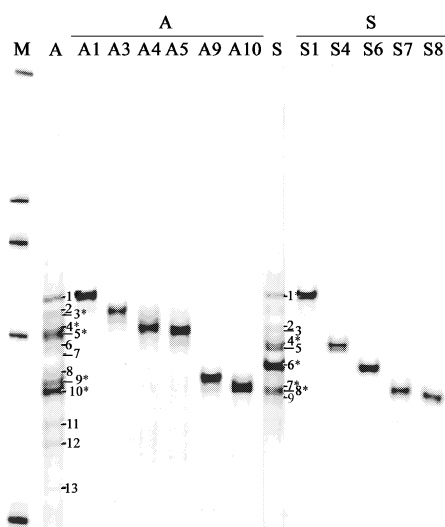
图 1 不同群落的 SSCP 图谱

Fig. 1 SSCP profile of different communities

2.2 条带的分离、克隆、测序及系统学研究

对图 1 λ 中星号标记的条带(泳道 A 中的 A1, A3, A4, A5, A9, A10;泳道 S 中的 S1, S4, S6, S7, S8)进行了回收,其它条带未得到再扩增产物.纯化的 PCR 产物与载体连接并转化后,每个条带均得到了大量的白斑菌落,以白斑菌落为模板采用 PCR 法筛选阳性克隆的结果见图 3.取 2 个以上的阳性克隆用于测序分析(其中 A3 仅获得一个阳性克隆).所得序列包括引物在内约 200bp,通过比较得到并下

载 GenBank 中的最相近序列. 自泳道 A 中的 6 个条带得到 12 个 OTUs, GenBank 登录号为 A Y652848 ~ A Y652859, 分别同 *Leuconostoc mesenteroides* (A Y453065)、未培养细菌 (AJ318147, AF227834, AJ576427)、*Ethanologobacterium* (A Y434722)、*Clostridiaceae* (AB084627) 等的相似性较高 (> 90%); 自泳道 S 中的 5 条带得到 7 个 OTUs, GenBank 登录号为 A Y652841 ~ A Y652847, 分别同 *Leuconostoc mesenteroides* (A Y453065), *Desulfovibrio* (Y12254, U42221); *Bacterioides* (AB074606); *Clostridium* (AB084627) 等的相似性较高, 19 个 OTUs 同 GenBank 中相近序列以 NJ 法绘制的系统发育树见图 4, 本研究中测得的序列在进化树中均以黑体字标识, 为阳性克隆序号加 GenBank 中的登录号. 由于所测条带其微生物含量已占群落总量的绝大多数 (根据条带浓度计算得知), 而所测序列又以产酸菌为主, 故通过比较的结果可知, 在硫酸盐还原反应器稳定运行时 ($\text{COD SO}_4^{2-} = 3$), 在数量上占优势的微生物主要是产酸菌及一些未培养菌, SRBs 没有检测到或包含在微弱的条带中. 经 SRBs 培养基富集培养后, A2, A3, A6, A8, A9 被淘汰; 而 S4, S6 得到富集. 泳道 S 中, 且除了 S4 之外, 其余的条带均为非硫酸盐还原菌. 本研究采用的 SRBs 选择性培养基为 SRBs 富集培养、计数等的通用培养基, 这说明采用该培养基进行 SRBs 的分离及计数时, 无意中对 SRBs 的实际数量进行了放大, 同时也增加了分离工作量.



M:DL2000; all of stored bands used to clone

图2 回收条带的 SSCP 图谱

Fig. 2 SSCP profile of recovered bands



图3 转化子的 PCR 检测

Fig. 3 Checking transformers by PCR method

M:DL2000; positive clones appearing bands

between 250 ~ 500bp were used to sequence

2.3 改进的 SSCP 技术用于微生物群落结构分析的可行性

2.3.1 从个体到群落的 SSCP 分析

Schwieger 等采用改进的 SSCP 技术对微生物个体及模拟群落进行了 SSCP 分析, 证明每种微生物均具有特异的迁移距, 而且可以检测到模拟群落中的大部分微生物 (10 种微生物中的 9 种)^[10]. 本试验结果也表明, 采用传统的 SSCP, 得到微生物群落带型非常复杂 (图 1N 中的 A), 将其中的某些条带分离并重新扩增后, 得到的产物也包含大量的非特异性序列, 致使 SSCP 图谱难以分辨 (图未给出). 但采用改进的 SSCP 技术后, 纯菌具有独特的迁移距, 群落的 SSCP 图谱也相对简化, 而且分离再扩增的产物仍在原来的位置 (图 2). 同一种微生物处在不同群落中时, 其迁移距离也是基本一致的 (A1 与 S1, A10 与 S7、S8), 这保证了技术的重复性和可靠性.

2.3.2 同一条带中包含有不同的 OTUs

在 SSCP 技术中, 一个条带中有可能包含有多个不同的 OTUs. 本研究中 A 组基本每个条带均包含了 1 个以上的 OTUs, 图 1 λ 中 E 和 p3 的迁移距相同也说明了这一点. 分析认为, 是由于序列部分碱基的替换不能影响到其三维结构的重大变化, 从而无法将它们分开. 这种情况的出现同群落的复杂程度是有一定关系的, 由于 A 组是对反应器总 DNA 的 SSCP, 群落较为复杂, 所以出现异序同构的现象较多; 而 S 组是经富集培养的, 群落相对简单, 所以条带中包含的 OTUs 数量减少, 只有 1 个或 2 个 OTUs. 类似的现象在 DGGE 分析中也出现过^[11], 可见, 这些问题是以基因指纹技术为基础的群落分

析方法无法避免的. 所以认为,SSCP 技术本身对简单微生物群落分析更加准确,而分析复杂群落时存在一些弱点,但是这些弱点可以通过大量的克隆测

序加以克服. 泳道 A 和 S 中分离出 19 个 OTUs 同相近序列采用 NJ 法构建的系统进化树见图 4.

2.4 硫酸盐还原反应器中微生物的群落结构分析

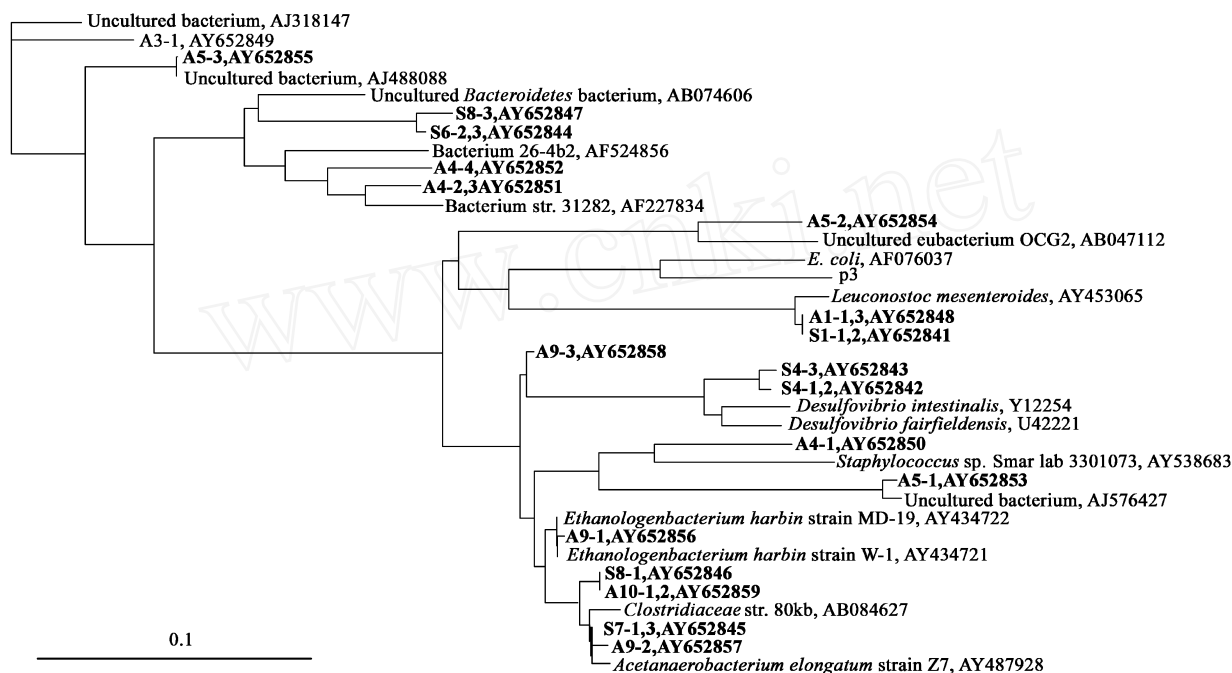


图4 自泳道 A 和 S 中分离出的 19 个 OTUs 同相近序列采用 NJ 法构建的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of 19 OTUs and similar sequences in GenBank, constructed by Neighbor Joining method

2.4.1 SRBs 种群的数量

在 A 组中无 SRBs 对应的条带,或者条带较微弱而没有克隆到,只有经过富集培养后才出现(图 1,图 2 群落 S 中的 S4),这是因为 SRBs 的 DNA 含量在总 DNA 中所占比例,即 SRBs 在总微生物中的含量小于 1.5%,所以通过该技术无法检测出来^[1]. 王爱杰分析硫酸盐还原反应器中的 SRBs 和 ABs 的数量组成时发现,在不同的条件下,ABs 要比 SRBs 高出 1~4 个数量级^[12]. 刘广民对硫酸盐还原反应器活性污泥中的 ABs 和 SRBs 计数表明,ABs 菌数为 3.5×10^{12} 个/mL,SRBs 菌数为 1.2×10^8 个/mL^[13],也符合这一数量比例关系.

经过 SRBs 培养基的富集培养,大部分无法培养或不能生长的微生物被淘汰,而 SRBs 反而得到放大,所以在 S 组中又出现了部分新的条带(S4, S6),测序表明了 S4 同硫酸弧菌(Y12254, U42221)相似性最高(97%).

2.4.2 SRBs 与 ABs 的种间协作关系

根据王爱杰研究^[14],在产酸-硫酸盐还原工艺系统中,产酸菌和硫酸盐还原菌之间存在着生物链式协同代谢关系. 刘广民^[13]也认为产酸-硫酸盐还

原工艺中,产酸菌主要进行乙醇型发酵,末端产物以乙醇、乙酸和 H_2 为主,而 SRBs 主要是利用其中的乙醇和 H_2 . 本试验中,大量的 ABs(占微生物总量的 98.5%左右),如嗜柠檬酸明串球菌属(*Leuconostoc*)、*Bacteroidetes*、*Clostridiaceae*等,能够将大分子碳水化合物降解成为脂肪酸、醇等 SRBs(占微生物总量的 1.5%左右)易于利用的小分子物质;同时,SRBs 对这些产物的利用也消除了 ABs 的末端产物抑制. 这种互利共生关系加速了有机物的降解和电子流的分流,使两大类微生物处于活跃代谢的状态,从而表现出硫酸盐去除率高且稳定,工艺运行稳定的特征.

3 结论

研究结果表明,采用改进 SSCP 技术分析硫酸盐还原反应器中微生物群落结构是可行的,针对 SSCP 分析复杂群落结构时出现的一条带对应多个 OTUs 的缺点,可以通过对该带进行克隆及测序加以克服. 通过对序列的比较分析,得出该反应器在碳硫比为 3.0 的条件下稳定运行时,微生物的群落组成为: ABs (包括 *Leuconostoc*, *Clostridiaceae*,

Ethanologenbacterium 等) 占微生物总量的 98.5% 以上, 而 SRBs 占微生物总量小于 1.5%, SRBs 和 ABs 通过底物供给和利用形成稳定的种间协作关系, 维持生态系统的稳定。

致谢: 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所孙效文研究员, 梁丽群研究员为本研究的顺利进行提供了许多建设性意见, 特此感谢。

参考文献:

- [1] Lee D H, Zo Y G, Kim S J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, **62**: 3112 ~ 3120.
- [2] Schmalenberger A, Tebbe C C. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies [J]. Mol. Ecol., 2003, **12**: 251 ~ 262.
- [3] Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, et al. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, **66**: 930 ~ 936.
- [4] Delbes C, Moletta R, Godon J. Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem [J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2001, **35**: 19 ~ 26.
- [5] 任南琪. 一体化有机废水处理产酸发酵设备[P]. 中国专利: 98240801.3, 1998-09-21.
- [6] Postgate J R. The Sulphate-Reducing Bacteria, (2nd) [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1984.
- [7] Subramanian K, Rutvisuttinunt W, Scott W. et al. The enzymatic basis of processivity in λ exonuclease[J] Nucleic Acids Research, 2003, **31**: 1585 ~ 1596.
- [8] Tebbe C C, Schmalenberger A, Peters S, et al. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. In Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications [M]. UK Wymondham: Horizon Scientific Press, 2001. 161 ~ 175.
- [9] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Anal. Biochem., 1991, **196**: 80 ~ 83.
- [10] Schwieger F and Tebbe C C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, **64**: 4870 ~ 4876.
- [11] Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, et al. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis [J]. Biotechnol Lett., 2001, **23**: 1205 ~ 1208.
- [12] 王爱杰. 产酸脱硫反应器中 SRB 的生态学研究——顶极群落形成与生态因子调控[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2000.
- [13] 刘广民. 硫酸盐还原工艺中微生物生理生态特性及单质硫回收研究[R]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2003.
- [14] 王爱杰, 任南琪, 杜大仲, 等. 硫酸盐还原过程中乙酸型代谢方式的形成及其稳定性[J]. 环境科学, 2004, **25**(2): 73 ~ 76.