

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2014.0966

郝晓地, 王吉敏, 胡沅胜. 2015. 降解剩余污泥中纤维素/半纤维素微生物富集培养实验研究[J]. 环境科学学报, 35(4): 999-1005

Hao X D, Wang J M, Hu Y S. 2015. Experimental study on enriching culture of cellulosic /hemicellulosic microorganisms in excess sludge[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 35(4): 999-1005

# 降解剩余污泥中纤维素/半纤维素微生物富集培养实验研究

郝晓地<sup>1,\*</sup>, 王吉敏<sup>1,2</sup>, 胡沅胜<sup>1</sup>

1. 北京建筑大学市政工程系/北京应对气候变化研究和人才培养基地, 北京 100044

2. 太原理工大学建筑设计研究院, 太原 030024

收稿日期: 2014-05-26

修回日期: 2014-10-13

录用日期: 2014-10-19

**摘要:**为促进剩余污泥中木质纤维素能源转化, 首先需要探知污泥中是否存在可以降解纤维素/半纤维素的微生物. 以木聚糖作为单一碳源分别从剩余污泥和厌氧消化污泥中富集培养可降解纤维素/半纤维素的微生物. 实验结果显示, 两种污泥源中均存在可降解纤维素/半纤维素的微生物, 并可成功富集培养获得该类微生物. FISH 与 LIVE/DEAD 实验证实, 富集微生物为梭状芽孢杆菌属和芽孢杆菌属的混合物, 并以梭状芽孢杆菌属为主; 富集微生物均具有很高活性.

**关键词:** 剩余污泥; 木质纤维素; 木聚糖; 酶活性; 荧光原位杂交 (FISH); LIVE/DEAD 染色

文章编号: 0253-2468(2015)04-999-07

中图分类号: X172

文献标识码: A

## Experimental study on enriching culture of cellulosic /hemicellulosic microorganisms in excess sludge

HAO Xiaodi<sup>1,\*</sup>, WANG Jimin<sup>1,2</sup>, HU Yuansheng<sup>1</sup>

1. Beijing University of Civil Engineering and Architecture/Beijing Climate Change Research and Education Centre, Beijing 100044

2. The Institute of Architectural Design and Research of Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024

Received 26 May 2014;

received in revised form 13 October 2014;

accepted 19 October 2014

**Abstract:** To improve energy conversion of lignocelluloses contained in excess sludge, we need to understand if there are cellulosic /hemicellulosic microorganisms in excess sludge. Xylan was chosen as a sole carbon source for enriching culture of cellulosic /hemicellulosic microorganisms in both excess sludge and anaerobic digestion sludge. The experimental results revealed that there were cellulosic /hemicellulosic microorganisms in the two types of sludge and that they were successfully enriched. Both FISH and LIVE/DEAD experiments verified that the enriched microorganisms were a mixture of *Clostridium* and *Bacillus* and dominated by *Clostridium*. The enriched microorganisms had very high activity.

**Keywords:** excess sludge; lignocelluloses; xylan; enzymatic activity; fluorescence *in-situ* hybridization (FISH); LIVE/DEAD staining

### 1 引言 (Introduction)

剩余污泥中存在着相当数量难以生物降解的木质纤维素 (周立祥和胡霭堂, 1997; 柳丽芬等, 1990; Fytli and Zabaniotou, 2008). 一方面, 这些木质纤维素难以在厌氧消化过程中被降解、转化, 使得能源 (甲烷) 产率过低 (郝晓地等, 2013a). 另一方面, 残留在消化污泥中的木质纤维素也阻碍污泥减

量, 为污泥填埋处置形成潜在隐患 (Mottet *et al.*, 2010).

研究表明, 木质纤维素是一种由纤维素、半纤维素和木质素组成的聚合物 (Hendriks and Zeeman, 2009; 郝晓地等, 2013a). 其中, 木质素最难降解, 且在厌氧条件下无法实现有效降解; 而纤维素和半纤维素相对容易降解并转化. 如果能实现木质纤维素其中 2 组分 (纤维素、半纤维素) 完全降解, 不仅污

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划 (No.2012BAJ14B03)

Supported by the National “Twelfth Five-Year” Plan for Science & Technology Support (No.2012BAJ14B03)

作者简介: 郝晓地 (1960—), 男, 教授 (博士), E-mail: haoxiaodi@bucea.edu.cn; \* 通讯作者 (责任作者)

Biography: HAO Xiaodi (1960—), male, professor (Ph.D.), E-mail: haoxiaodi@bucea.edu.cn; \* Corresponding author

泥能源转化率将会提高,而且也会对污泥减量起到一定的促进作用.污泥厌氧消化实践表明,传统厌氧消化几乎对木质纤维素没有降解.这表明,传统厌氧消化系统中很少或几乎不存在降解复杂化学结构木质纤维素的微生物(Motteta *et al.*, 2010; 郝晓地等, 2013b).

面对上述实际情况,本研究旨在通过微生物富集培养方法去探知消化污泥中是否存在可降解纤维素/半纤维素的厌氧微生物,为后续研究污泥中木质纤维素厌氧生物降解奠定实验基础.如上述,纤维素和半纤维素生物降解相对容易,这是因为这2种组分在结构上具有一定的相似性,如木聚糖(半纤维素主要成分)和纤维素都是由单糖经 $\beta$ -1,4糖苷键链接而成,它们的降解均是依靠胞外酶打破 $\beta$ -1,4糖苷键而实现.可见,可以通过富集培养降解一种物质的微生物便可实现对木质纤维素2种组分的同步降解.本研究中微生物富集培养实验也就由此开始.

## 2 实验材料与方法 (Experimental materials and methods)

### 2.1 种泥与基质

富集培养木质纤维素厌氧生物种泥分别取自北京市某大型市政污水处理厂剩余污泥(实际污泥)与实验室发酵罐中厌氧培养污泥(消化污泥).

实际污泥为污水处理厂脱水后污泥(含水率:80%),实验时按需要浓度进行兑水稀释.消化污泥原污泥来源于实验室一合成配水的SBR脱氮除磷中试装置(孙晓明, 2012)剩余污泥;用于消化污泥培养的发酵罐工作体积为4 L,在 $T=35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{SRT}=20\text{ d}$ 、 $\text{pH}=7.0$ 工况下运行.

选择木聚糖作为木质纤维素降解微生物富集培养的唯一基质,因为它相对于纤维素来说,结构疏松,无晶体结构,聚合度低,较容易被降解.

### 2.2 富集培养系统

富集培养采用系列平行摇瓶实验,配备有密封橡胶塞的250 mL血清瓶作为富集培养系统.血清瓶置于空气浴恒温摇床( $T=35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 摇动速度 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ )内进行实验.

两种不同来源的种泥在血清瓶中的污泥浓度分别为:①实际污泥:MLSS $\approx 22.28\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , MLVSS $\approx 14.56\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ②消化污泥:MLSS $\approx 22.37\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , MLVSS $\approx 17.69\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .两种污泥分别设置3个平行样(编号:1、2、3),并各设置1个不加基质的空白样瓶.实验中,以6 d作为1个周期进行底物置换,并进行相应指标检测,具体实验方案列于表1.细菌培养所需微量元素通过向血清瓶分别添加DIN EN ISO 11734 L47(简称L47)和DIN EN ISO 11734(简称M)培养液来补充,其成分见表2(Weiss *et al.*, 2010).

表1 微生物富集培养实验方案

Table 1 Experimental schemes of microbial enrichment culture

编号	木聚糖/g	污泥/mL	L47 培养液	M 培养液/mL	刃天青/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{Na}_2\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}/$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{N}_2$
实际空白	0	100	√	10	1	40	√
实际1号	0.25	100	√	10	1	40	√
实际2号	0.25	100	√	10	1	40	√
实际3号	0.25	100	√	10	1	40	√
消化空白	0	100	√	10	1	40	√
消化1号	0.25	100	√	10	1	40	√
消化2号	0.25	100	√	10	1	40	√
消化3号	0.25	100	√	10	1	40	√

在富集实验伊始,即使存在木聚糖降解类微生物,它们也不是优势菌种.所以,木聚糖如能降解,首先会形成单糖,随后会被占优势的产甲烷菌转化为 $\text{CH}_4$ 和 $\text{CO}_2$ .因此,可根据血清瓶产气情况来作为木聚糖是否降解之指示.另外,木聚糖降解微生物主要

是以分泌胞外酶的形式来水解木聚糖,且胞外酶之活性又与微生物的活性呈正比.故此,系统中的木聚糖酶活性可用作一种指标,以此判断系统中木聚糖降解微生物的生物活性.

表 2 培养液组成

Table 2 Composition of the synthetic culture medium

溶液	试剂名称	用量/g	溶液终浓度/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
L47 培养液	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.075	75
	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.02	20
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.27	270
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1	100
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.56	560
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.53	530
	M 培养液	$\text{CuCl}_2$	0.003
$\text{ZnCl}_2$		0.005	5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		0.05	50
$\text{H}_3\text{BO}_3$		0.005	5
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.001	1

### 2.3 气体组分测定

实验中采用气相色谱仪 (GC-2014 型) 检测血清瓶中产生的甲烷等气体, 测定方法为外标法; 选取标定物为高纯度标准氢气和甲烷制定标准曲线, 如图 1 所示。

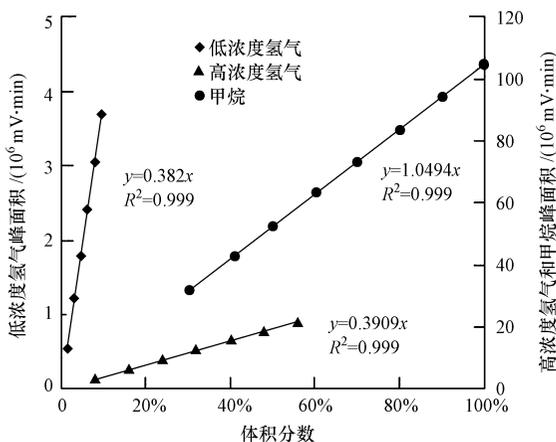


图 1 气相色谱标准曲线

Fig.1 Standard curves of the gas chromatograph

### 2.4 木聚糖酶活性测定

2.4.1 测定原理 木聚糖经过木聚糖酶水解后会生成寡糖和单糖。由于寡糖具有还原性末端和单糖具有还原基团, 所以, 导致两者在沸水浴条件下与 DNS 试剂会发生显色反应。因显色反应颜色强度与酶解产生的还原糖量成正比, 且还原糖量又与待测液中木聚糖酶活性成正比, 所以, 可通过显色反应强度来推算木聚糖酶活性。

2.4.2 测定方法 取 1% 木聚糖标准溶液 3.6 mL, 滴入 25 mL 具塞刻度试管中; 加入 0.4 mL 适当稀释

的富集培养上清液, 于 35 °C 水浴锅中保温 30 min; 加入 6 mL DNS 溶液, 混匀, 沸水浴 15 min; 冷却至室温, 定容到 25 mL, 在 540 nm 测定溶液吸光度。平行测定加入灭活上清液的空白对照组。

2.4.3 酶活性计算方法 木聚糖酶活性单位是指每 min 催化木聚糖水解释生成 1  $\mu\text{mol}$  木糖所需的酶量, 其中一个酶活性单位为 U。酶活性计算公式 (李彩霞等, 2001) 为:

$$H = DV_1 C_X / (TV_2) \quad (1)$$

式中,  $H$  为木聚糖酶活性 ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ );  $D$  为酶液稀释倍数;  $V_1$  为比色管定容体积 (mL);  $C_X$  为木糖浓度 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ );  $T$  为反应时间 (min);  $V_2$  为酶液体积 (mL)。

2.4.4 标准曲线 采用高纯度木聚糖溶液制定标准曲线 (外标法), 标定溶液中木聚糖酶活性, 测得的标准曲线如图 2 所示。该方法可准确地检测出反应液中的木糖含量, 从而可以根据计算公式推算出待测液中木聚糖酶活性。

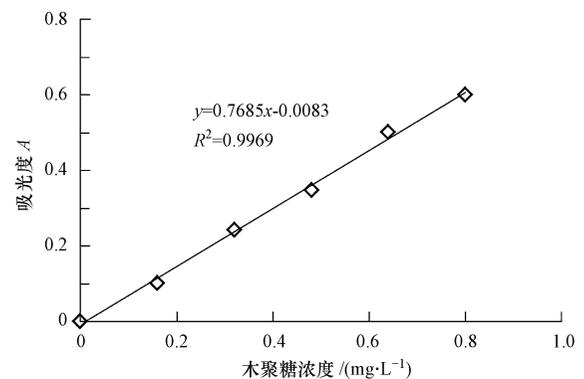


图 2 木聚糖酶活性标准曲线

Fig.2 Standard curve of the xylanase activity

### 2.5 荧光显微镜镜检

本实验, 微生物实验观察采用荧光显微镜 (Zeiss Axioskop 40, 正置式) 进行, 并配备了荧光激发光源和滤光片组, 以确保红、绿、蓝色荧光观察能够正常进行。此外, 显微镜还配置以数码相机, 可实现对观察到的微生物进行实时拍摄, 并随之通过配置的 AxioVision 软件进行分析, 以产生准确的数据信息。

### 2.6 荧光原位杂交 (FISH) 实验

荧光原位杂交 (FISH) 被用于鉴定富集培养系统中细菌种类。首先, 对测试泥样用 4% 多聚甲醛固定 2 h; 再对固定后的泥样离心, 并在 1×PBS 中重新悬浮 (重复 3 次)。其次, 对泥样进行机械破碎, 并将

破碎泥样滴加在明胶包被的载玻片上,分别用50%、80%和98%酒精浸泡3 min.再次,将荧光标记的寡核苷酸探针(见表3)溶解于杂交缓冲液中(组成:0.9 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.02 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH = 7.4), 0.01% SDS 和35% 去离子甲酰胺(DFA)),并在46 °C下与污泥样品杂交2 h.杂交结束后,采用清

洗液(组成:0.005 mol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH = 8.0), 0.02 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH = 7.2), 0.01% SDS 和0.9 mol·L<sup>-1</sup> NaCl)在48 °C下洗脱20 min.最后,对每个污泥样品用荧光显微镜(Zeiss Axioskop 40)随机拍照并进行定量分析.

表3 鉴定木聚糖降解菌的寡核苷酸序列探针

Table 3 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for xylan-degrading bacteria

探针	探针序列(5'-3')	16S rRNA 目标点	目标微生物	参考文献
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGATG	338~355	Most, but not all bacteria	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338-II	GCAGCCACCCGTAGGTTG	338~355	Bacteria but not covered by EUB338 and EUB338-III	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338-III	GCTGCCACCCGTAGGTTG	338~355	Bacteria but not covered by EUB338 and EUB338-II	Daims <i>et al.</i> , 1999
CST440	CGTCTATTTGCTCCCGATC	440~459	<i>Clostridium stercorarium</i> -related clones	Burrell <i>et al.</i> , 2004
BCE182	TTGATGCCAACCACTGTGT	182~201	<i>Bacteroides cellulosolvens</i> -related clones	Burrell <i>et al.</i> , 2004

## 2.7 细胞活性染色(LIVE/DEAD)

采用荧光染料对富集培养系统中的微生物进行染色,以确定富集培养系统中微生物的细胞活性,操作方法见参考文献(Invitrogen Molecular Probes, 2004; Ziglio *et al.*, 2002).

## 3 结果分析与讨论(Result analysis and discussion)

### 3.1 产气情况

血清瓶富集培养系统产气变化曲线示于图3,甲烷产气变化曲线示于图4,其中,实际污泥与消化污泥产气曲线均以3组平行实验数据求平均值绘制而成.

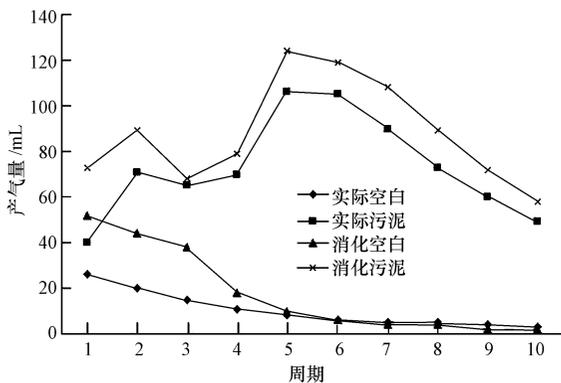


图3 总产气量趋势图

Fig.3 Trends of total produced gas

图3显示,未投加基质——木聚糖的两个空白样之气体产量随时间推移逐渐减少,直至第10周期(60 d)时为零,说明空白样因无外加碳源而只能进行内源呼吸,直至内源碳源消耗殆尽.反观投加木聚

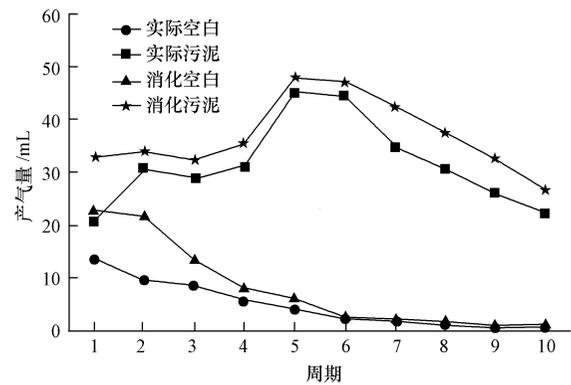


图4 CH<sub>4</sub>产气量趋势图

Fig.4 Trends of produced methane

糖血清瓶气体产量,先升后降,先后出现两个谷峰和谷底.这一产气量变化趋势说明,血清瓶中的木聚糖已被降解,即,两种种泥中均存在着不同含量可降解木聚糖的厌氧微生物.

图3、图4产气量出现的连续谷峰、谷底图形暗示,在实验的伊始,可能因降解木聚糖之细菌较少而造成木聚糖少量降解与细菌内源呼吸并行的状态,即,此时观测到的产气量为两者的叠加(以内源呼吸产气量为主),开始出现第一个谷峰.第2周期后,内源呼吸作用开始减弱,由此产生的气量随之减少,使得总产气量随之减少,以至于出现第一个谷底.从第3周期开始,血清瓶中富集培养的降解木聚糖细菌开始增多,使得木聚糖降解效果明显增强,由此通过水解产生的单糖并形成甲烷的份额出现跳跃式上升,于第5、6周间出现第2个谷峰.木聚糖降解率提高也意味着被水解成的单糖转化为挥

发性有机酸(VFAs)的程度得以增强,导致 pH 开始下降,最终抑制了产甲烷细菌的活性,使产气量不断下降,以至于出现第 2 个谷底。

实际污泥与消化污泥产气量高低略微不同的曲线表明,两种种泥中均存在着可降解木聚糖的微生物,但消化种泥中因厌氧培养而含量较高.因此,在随后投加富集木聚糖富集微生物实验中选择了厌氧消化培养种泥。

### 3.2 木聚糖酶活性

从第 6 周期开始,每周期开始检测并计算系统中木聚糖酶活性状况,结果如图 5 所示.与图 3 绘制数据处理相同,实际污泥与消化污泥酶活性曲线均以 3 组平行实验数据求平均值绘制而成,与图 3 对应一致。

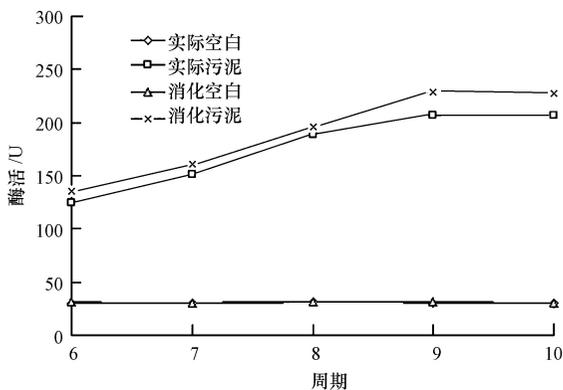


图 5 木聚糖酶活性趋势图

Fig.5 Scheme of xylanase enzyme activity trends

图 5 显示,两组空白对照实验中酶活性均保证不变并维持在一很低数值,说明因空白样中未投加木聚糖而使得其中可降解木聚糖微生物未能得到富集培养.相比之下,投加木聚糖的 6 组血清瓶中酶活性均显示出趋势一致的上升势头,说明其中已成功培养并富集到相当数量可降解木聚糖的微生物,这与图 3 显示的产气量变化曲线变化趋势一致.实际污泥与消化污泥酶活性平均值显示均是先稳定增长,至第 8 周期时趋于平稳,说明了在整个富集培养过程中,可降解木聚糖微生物数量持续增长至稳定.此外,消化污泥酶活性略高于实际污泥亦说明,消化种泥中可降解木聚糖微生物数量略多,与图 3 产气量结果推测一致。

### 3.3 微生物鉴定

3.3.1 细菌形态观察 对两种不同种泥富集获得的污泥和上清液各取 1 mL 并稀释 10 倍后,取一滴

至载玻片上;风干后用结晶紫染色 1 min,并用蒸馏水洗净后再次风干;置载玻片于显微镜下观察,观察到如图 6 所示的结果。

图 6 显示,两种种泥富集培养获得木聚糖降解细菌均为游离分散状态.其中,实际污泥富集后的细菌形态主要为杆状和球状,即,细菌主要以球状细菌及杆状细菌为主;消化污泥中的细菌形态为球状、杆状还有少量丝状,即,细菌除球状细菌及杆状细菌外,也有少量丝状细菌.由细菌鉴定知识(布坎南和吉本斯,1984)可知,从形态学角度只能确定出富集获得微生物为梭状芽孢杆菌、芽孢杆菌和拟杆菌种的一种或多种,但并不能确切甄别出到底属于哪一种或哪几种.因此,只有分子生物学方法才能具体鉴定出菌种的类别。

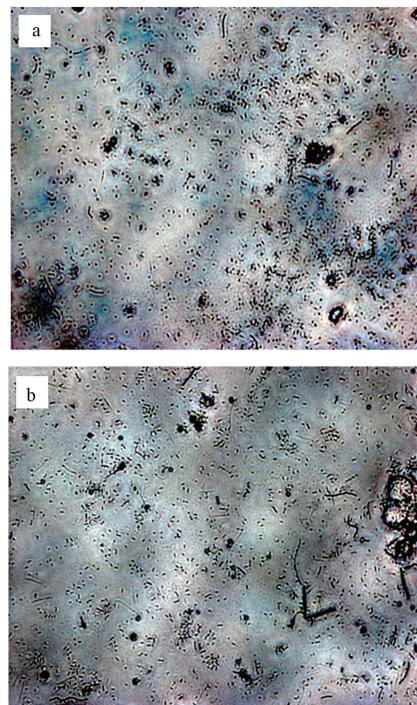


图 6 富集污泥中细菌形态(a.实际污泥;b.消化污泥)

Fig.6 Microbial morphologies of enriched sludge

3.3.2 FISH 实验 富集获得细菌菌种经 FISH 鉴定后结果示于图 7.图 7 显示,两张图片中均有绿色出现,说明富集获得微生物中梭状芽孢杆菌属和芽孢杆菌属同时存在.此外,图 7a 显示出较图 7b 多的绿色面积,说明富集获得的微生物中以梭状芽孢杆菌为主.由此可以断定,富集获得的微生物以梭状芽孢杆菌为主,同时含有芽孢杆菌,为两者的混合物。

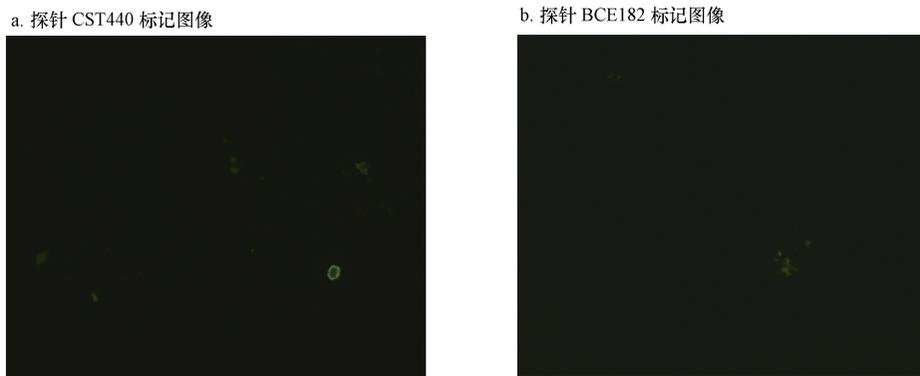


图7 FISH 图像(图中 CY3 标记探针 CST440 和 BCE182 为绿色,用于检测降解木聚糖微生物;CY5 标记的探针为红色,用于标记所有微生物)

Fig.7 FISH photos (CY3 labeled by CST440 and BCE182 for probing xylan-degrading microorganisms (green); CY5 labeled for probing all microorganisms (red))

### 3.4 微生物活性比例 (LIVE/DEAD)

LIVE/DEAD 染色实验显微图像结果示于图 8. 根据统计学分析可以得出,富集获得的微生物活性

分别为:实际污泥 83.6%、消化污泥 92.8%. 这样的实验结果足以说明,实际污泥与消化污泥中细菌存活率均保持在很高水平,具有很高活性.

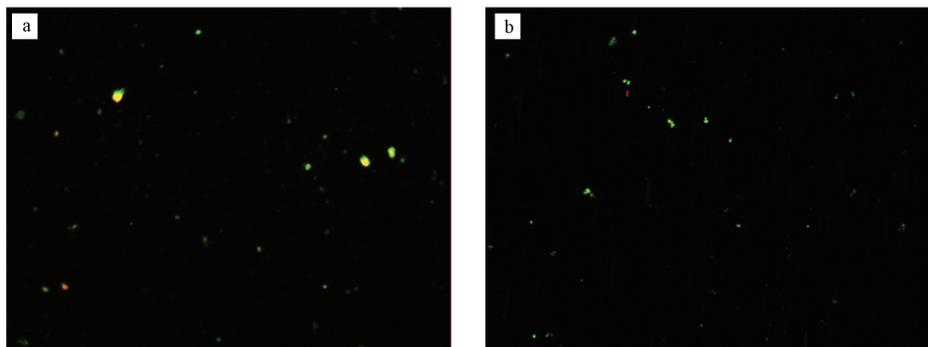


图8 LIVE/DEAD 显微图像(a. 实际污泥;b. 消化污泥; 图中绿色为活菌;红色为死菌;黄色为两种荧光颜色叠加效果)

Fig.8 LIVE/DEAD photos (Green; all live bacteria; Red; all dead bacteria; Yellow; binding of fluorescence)

## 4 结论 (Conclusions)

通过两种不同污泥投加同一底物——木聚糖进行可降解木聚糖微生物富集培养实验得知,无论是从污水处理厂剩余污泥中还是实验室发酵罐厌氧培养污泥中均可富集到相当数量(前者略低于后者)的可降解木聚糖微生物,说明污泥中至少存在着可厌氧降解纤维素和半纤维素的微生物. 通过 FISH 与 LIVE/DEAD 实验可知,富集获得的木聚糖降解细菌处于游离分散状态,为梭状芽孢杆菌属和芽孢杆菌属的混合物,以梭状芽孢杆菌属为主. 从两种不同种泥中获得的富集微生物活性分别为:实际污泥 83.6%,消化污泥 92.8%,说明富集出的微生物具有很高的细菌活性.

**责任作者简介:**郝晓地,男,54岁,获荷兰代尔夫特理工大学(TU Delft)博士学位,《Water Research》区域主编(Editor). 主要研究方向:污水处理生物脱氮除磷技术;污水处理数学模拟技术;可持续环境生物技术. 代表性著作:《可持续污水-废物处理技术》、《磷危机概观与磷回收技术》、《污水处理碳中和运行技术》. E-mail: haoxiaodi@ bucea.edu.cn.

### 参考文献 (References):

- Amann R I, Krumholz L, Stahl D A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology [J]. *The Journal of Bacteriology*, 170(2): 762-770
- 布坎南, 吉本斯. 1984. 伯杰细菌鉴定手册(第8版) [M]. 中国科学院《伯杰细菌鉴定手册》编译组译. 北京: 科学出版社
- Burrell P C, Sullivan C O, Song H, et al. 2004. Identification, detection, and spatial resolution of *Clostridium* populations responsible for cellulose degradation in a methanogenic landfill

- leachate bioreactor [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4): 2414-2419
- Daims H, Brühl A, Amann R, *et al.* 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(3): 434-444
- Fytili D, Zabaniotou A. 2008. Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods—A review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12(1): 116-140
- 郝晓地, 王吉敏, 曹兴坤, 等. 2013a. 剩余污泥中木质纤维素能源转化潜力分析 [J]. *环境工程学报*, 7(3): 1106-1114
- 郝晓地, 曹兴坤, 王吉敏, 等. 2013b. 剩余污泥中木质纤维素稳定并转化能源可行性分析 [J]. *环境科学学报*, 33(5): 1215-1223
- Hendriks A T W M, Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass [J]. *Bioresource Technology*, 100(1): 10-18
- Invitrogen Molecular Probes. 2004. LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kits [OL]. <http://www.mobitec.de/probes/docs/media/pis/mp07007.pdf>
- 李彩霞, 房桂干, 刘书钗. 2001. 木聚糖酶活测定方法 [J]. *纸和造纸*, 1(1): 60-61
- 柳丽芬, 赵树昌, 邓贻钊. 1990. 活性污泥化学组成的分析 [J]. *环境科学*, 11(2): 45-48
- Motteta A, François E, Latrille E, *et al.* 2010. Estimating anaerobic biodegradability indicators for waste activated sludge [J]. *Chemical Engineering Journal*, 160(2): 488-496
- 孙晓明. 2012. 填料强化生物营养物去除试验研究 [D]. 北京: 北京建筑工程学院
- Weiss S, Tauber M, Somitsch W, *et al.* 2010. Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite [J]. *Water Research*, 44(6): 1970-1980
- 周立祥, 胡霁堂. 1997. 厌氧消化污泥化学组成及其环境化学性质 [J]. *植物营养与肥料学报*, 3(2): 176-181
- Ziglio G, Andreottola G, Barbesti S, *et al.* 2002. Assessment of activated sludge viability with flow cytometry [J]. *Water Research*, 36(2): 460-468