

王玉双,李一路,郭照辉,等.高耐镉硫酸盐还原菌群的特性研究[J].江苏农业科学,2018,46(3):238-240,245.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.060

高耐镉硫酸盐还原菌群的特性研究

王玉双,李一路,郭照辉,单世平,付祖姣,靳磊,魏小武,黄军

(湖南省微生物研究院,湖南长沙 410009)

摘要:从湖南省株洲市镉污染矿区淤泥中富集得到 1 组硫酸盐还原菌菌群 SRB10,研究了该菌群对镉、盐及氧气的耐受性,通过单因子试验考察了温度、pH 值和 SO_4^{2-} 浓度对其生长及硫酸盐还原力的影响,通过正交试验确定了该菌群的最佳工艺条件及影响因子顺序。结果表明,SRB10 属于中温耐碱性菌群,能够在镉浓度为 175 mg/L 或盐度为 50 g/L 的条件下正常生长,能够耐受一定浓度的氧。单因子试验显示,在培养温度 35 ℃、pH 值 7.5、 SO_4^{2-} 浓度 1 500 mg/L 下,SRB10 菌群生长最快,还原硫酸盐的能力最强。正交试验结果表明,对该菌群硫酸盐还原力的影响因素顺序为 SO_4^{2-} > pH 值 > 温度 > 时间,最佳工艺条件为 pH 值 8.0、温度 35 ℃、 SO_4^{2-} 浓度 1 000 mg/L、培养时间 40 h,该条件下硫酸盐还原效率可达 98.91%。

关键词:硫酸盐还原菌群;耐受性;硫酸盐还原;正交试验

中图分类号: X53;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)03-0238-03

硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacterium,SRB)是一类厌氧或兼性厌氧菌,广泛存在于土壤、海底淤泥、油田及地下管道等缺氧或局部缺氧环境中。自 1985 年 Jerinck 首次发现 SRB 以来,据不完全统计,目前已发现且合法有效的 SRB 有 40 个属、137 个种^[1]。SRB 区别于其他菌种的一个重要生理特征是能够利用硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐等硫氧化物及硫元素作为电子受体将其还原为硫化氢^[2]。重金属离子可与硫化氢反应生成稳定性极强的硫化物沉淀,人们利用这一特征已将 SRB 广泛应用于重金属污染废水、废气的治理^[3-5]。

在众多重金属污染源中,强毒性的镉污染对生态环境和人类的毒害早已引起了世界各国高度重视。目前,利用硫酸盐还原菌对镉污染进行治理已成为研究热点^[6]。此研究的前提在于高耐镉硫酸盐还原菌的筛选及如何提高筛选菌对硫酸盐的还原效率。由于大部分硫酸盐还原菌只能存活于厌氧或缺氧环境中,其分离纯化对试验设备要求高,在实际应用中多菌种协同作用效果更好^[7]。

从实际应用角度出发,富集驯化硫酸盐还原菌群能节约时间及成本。前人报道了 1 种复合 SRB-SRBⅢ,主要由脱硫弧菌、脱硫肠状菌等组成,因其有很强的还原重金属离子的能力,在冶金、电镀等行业重金属废水处理中有较为广泛的应用。马忠友等分离了 1 组硫酸盐混合菌群,在 FeSO_4 初始浓度为 2 g/L 时恒温静置培养 30 h 后,硫酸盐还原率达 95% 以上^[7]。潘嘉川等从海底底泥中富集驯化了 1 组高耐盐的海洋硫酸盐还原菌群,并对影响该菌群脱硫率的影响因子进行

了考察^[8]。本研究从湖南省株洲市镉污染矿区淤泥中富集驯化出 1 组硫酸盐还原菌群 SRB10,考察该菌群对镉、盐及氧的耐受性,并在不同温度、pH 值、硫酸根离子浓度条件下,研究其生长特性及硫酸盐还原率,最后通过正交试验确定该菌群的最佳脱硫工艺条件,旨在为镉污染土壤的微生物修复及含硫酸盐、重金属废水的生物治理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SRB10 菌群的富集驯化:该菌群由笔者实验室从株洲市镉污染矿区淤泥中分离所得,并经多次富集驯化后保存。

1.2 培养基

液体培养基: K_2HPO_4 0.5 g, NH_4Cl 1.0 g, Na_2SO_4 0.5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g, 乳酸钠 5 mL, 酵母提取物 1.0 g。将上述试剂溶解在 1 L 水中,调节 pH 值为 7.5~8.0,121 ℃ 高压灭菌 20 min。冷却后再加入经过滤除菌的 1 mL 1.2% 硫酸亚铁铵,1 mL 0.4% 浓度抗坏血酸。

无硫基础培养基: K_2HPO_4 0.65 g, NH_4Cl 1.0 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.06 g, 乳酸钠 3.5 mL, 酵母提取物 1.0 g。将上述试剂溶解在 1 L 水中,调节 pH 值为 7.5~8.0,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

1.3 SRB10 菌群的特性研究

1.3.1 SRB10 菌群对不同硫源的利用情况 在无硫培养基中分别加入硫酸钠、硫代硫酸钠、亚硫酸钠、单质硫及硫酸钙为硫源,以 5% 的接种量将菌液分别接种于上述培养基,30 ℃ 静置恒温培养 2~3 d 后观察培养基颜色变化及 PbAc 试纸变色情况。

1.3.2 SRB10 菌群对镉及盐的耐受能力 以 5% 的接种量将菌液分别接种于一系列镉浓度梯度及盐浓度梯度的液体培养基中,30 ℃ 恒温静置培养 2~3 d,观察培养基颜色变化及 PbAc 试纸变色情况。

1.3.3 SRB10 对氧气的耐受能力 以 5% 的接种量将菌液

收稿日期:2016-08-08

基金项目:湖南省重点研发计划(编号:2017NK2144);湖南省长沙市科技局重大专项(编号:kq1703010);湖南农业科技创新联盟项目(编号:2017LM0305)。

作者简介:王玉双(1987—),女,湖南永州人,硕士,助理研究员,主要从事农业微生物研究。

通信作者:黄军,助理研究员,主要从事农业微生物研究。
E-mail:ssp312@hotmail.com。

接种于液体培养基中,按照好氧和厌氧条件对其进行恒温培养 2~3 d,观察培养基颜色变化及 PbAc 试纸变色情况。

1.3.4 温度、pH 值及 SO_4^{2-} 浓度对 SRB10 菌群生长及硫酸盐还原率的影响 (1)以 5% 接种量将 SRB10 接种于液体培养液中,分别置于 20、25、30、35、40、50、60 ℃ 恒温培养箱中静置培养,分别在培养 0、20、40、60 h 后取样。以未接种的培养液作空白对照,测定各培养液的 $D_{600\text{ nm}}$ 、 $D_{420\text{ nm}}$ 值。(2)以 5% 接种量将 SRB10 接种于 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0 的培养液中,恒温培养 48 h。以未接种的培养液作空白对照,测定各培养液的 $D_{600\text{ nm}}$ 、 $D_{420\text{ nm}}$ 值。(3)以 5% 接种量将 SRB10 接种于 SO_4^{2-} 浓度梯度为 500、1 500、2 500、3 500、4 500、5 500、6 500 mg/L 的培养液中,恒温培养 48 h。以未接种的培养液作空白对照,测定各培养液的 $D_{600\text{ nm}}$ 、 $D_{420\text{ nm}}$ 值。

1.3.5 正交试验设计 为了提高 SRB10 菌群硫酸盐还原率,利用正交试验法对各因素进行了优化。选取温度 30、35、40 ℃,硫酸根浓度 1 000、1 500、2 000 mg/L, pH 值 7.5、8.0、9.0,培养时间 40、48、56 h,采用 $\text{L}_9(3^4)$ 表进行 4 因素 3 水平正交试验。每组设置 3 组平行试验。

1.3.6 硫酸盐还原率的测定 测定 SRB10 菌群对硫酸盐的还原率。

2 结果与分析

2.1 SRB10 菌群对不同硫源的利用

本试验中 SRB10 菌群对不同硫源的利用情况如表 1 所示。SRB10 菌群可以很好地利用硫酸钠、硫代硫酸钠、单质硫、硫酸钙作为硫源,其中利用硫代硫酸钠的效果最好,不能利用亚硫酸钠作为硫源。

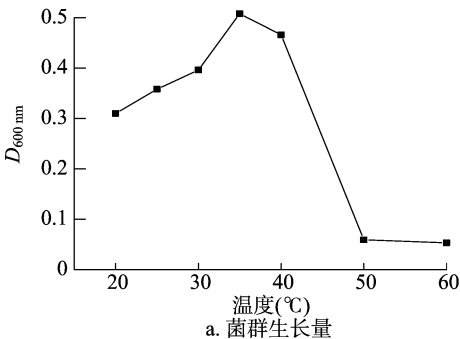
表 1 SRB10 菌群对不同硫源的利用

硫源	Na_2SO_4	Na_2SO_3	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	S	CaSO_4
结果	++	-	++	++	+

注:“++”表示生长较好;“+”表示可以生长;“-”表示不能生长。下表同。

2.2 SRB10 菌群对镉及盐的耐受性

在不同镉浓度梯度的培养基中接种 SRB10 菌群后恒温培养 48 h,结果显示:培养基中镉浓度为 0~175 mg/L 时,菌群能正常生长,培养基颜色变黑,底层有大量黑色沉淀产生, PbAc 试纸显色明显。当镉浓度上升至 200 mg/L 时,培养基颜色无变化, PbAc 试纸不显色,说明菌群在此浓度下基本不生长。此结果表明, SRB10 菌群对镉的耐受性可达 175 mg/L^[9-10],属于高耐镉菌群。



对 SRB10 菌群进行耐盐性考察结果显示:当培养基中盐浓度从 0 升至 40 g/L 时, SRB10 菌群能够较好生长并还原硫酸盐,培养基颜色较黑。当盐浓度升至 50 g/L 时,该菌群仍能生长,具有一定的还原能力,培养基颜色变黑,但变化程度不显著。超过此浓度范围培养基颜色无变化, PbAc 试纸不显色,即菌群无法生长。说明该菌群的耐盐范围在 0~50 g/L。海洋微生物的耐盐机制高于传统的微生物^[8],本试验富集的 SRB10 菌群亦属于高耐盐菌群。

2.3 SRB10 菌群对氧气的耐受性

早期研究者认为, SRB 属于严格厌氧菌,但近年来越来越多的研究发现, SRB 应属于兼性厌氧菌,能在一定浓度的氧环境下生存甚至占优势^[11-12]。本试验分离的 SRB10 菌群在不同氧浓度条件下生长情况如表 2 所示。菌群在摇瓶培养时培养基不变黑, PbAc 试纸不显色,而将该菌群分别置于加石蜡油或不加石蜡油的培养基中静置培养,培养基均变黑, PbAc 试纸显色,说明 SRB10 菌群属于兼性厌氧菌。

表 2 SRB10 菌群对氧气的耐受性

培养条件	(静置培养) 加石蜡油	(静置培养) 不加石蜡油	摇瓶培养
结果	++	++	-

2.4 温度对 SRB10 菌群生长及硫酸盐还原率的影响

温度直接影响 SRB 的生长速度及代谢活动。温度太低抑制了细胞内酶的活性, SRB 菌不生长或生长缓慢,温度过高则会使得细胞中的大分子物质如蛋白质、核酸及其他生物活性物质发生不可逆改变,参与生化反应的功能丧失,甚至导致 SRB 菌死亡^[13]。目前人们分离的 SRB 多为中温性菌,可生长温度为 20~45 ℃,最适宜生长温度为 28~38 ℃^[14]。本试验分离的 SRB10 菌群在不同温度下的生长情况如图 1 所示。该菌群的生长温度范围较宽,在 20~40 ℃ 下均能生长,其中在 30~40 ℃ 下生长速度较快,最适宜生长温度为 35 ℃,这与前人的研究结果基本一致。SRB10 菌群在不同温度、不同培养时间下对硫酸盐还原情况如图 1 所示。当培养温度为 20 ℃ 时, SRB10 菌群对硫酸盐的还原能力一般,硫酸盐还原率仅为 25.28%;随着培养温度的上升, SRB10 菌群的还原能力逐渐增强,当培养温度为 30~40 ℃ 时,随着培养时间的延长, SRB10 菌群对硫酸盐的还原能力高达 97% 以上;随着温度的继续上升,硫酸盐还原率下降。此结果与 SRB10 菌群的生长情况基本一致。

2.5 pH 值对 SRB10 菌群生长及硫酸盐还原率的影响

在 SRB 代谢活动中, pH 值主要影响硫酸盐还原酶系的

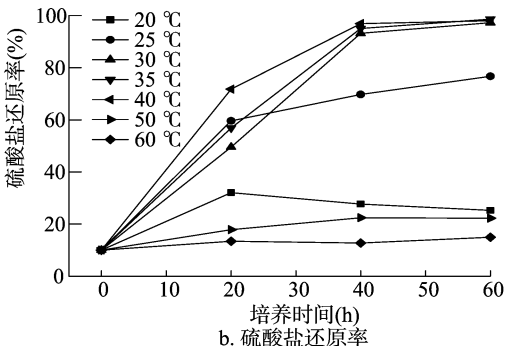


图 1 温度对 SRB10 菌群生长及硫酸盐还原率的影响

构象、性质、生物学活性与稳定性,引起细胞膜电荷的改变^[15]。适宜的 pH 值有利于 SRB 的生长繁殖。SRB10 菌群在不同 pH 值的培养基中生长情况及对硫酸盐还原情况如图 2 所示。该菌群对 pH 值的适应范围较广,在 pH 值 6.0 ~

10.0 范围内均能生长代谢,其中适宜的 pH 值范围为 7.0 ~ 10.0,在此范围内,菌群对硫酸盐的还原率可达 85% 以上。菌群在 pH 值 7.5 时生长最为旺盛,对硫酸盐的还原率达 89.24%。此结果表明,该菌群更适于在偏碱性条件下生长。

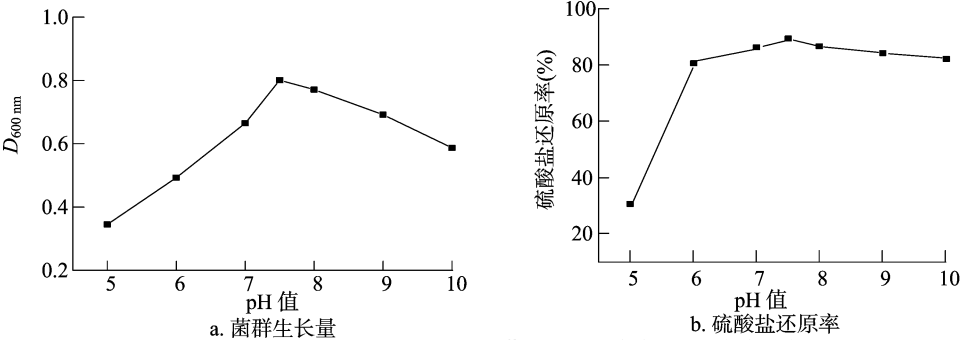


图2 pH 值对 SRB10 菌群生长及硫酸盐还原率的影响

2.6 硫酸根浓度对 SRB10 菌群生长及硫酸盐还原率的影响

硫酸根浓度对 SRB 代谢活动的影响主要表现在,低浓度硫酸根浓度会促进 SRB 的生长和代谢,而高浓度的硫酸根使得 SRB 在还原过程中产生过量的中间产物(如亚硫酸根)或产物(H_2S 气体),这会抑制 SRB 的生长及代谢^[16]。SRB10 菌群在不同 SO_4^{2-} 浓度下生长及还原硫酸盐情况如图 3 所

示。随着 SO_4^{2-} 浓度升高,SRB10 的生长情况及对硫酸盐的还原能力均呈先上升后下降的趋势。当硫酸根浓度为 1 500 mg/L 时,SRB10 菌群的繁殖速度最快,对硫酸盐还原能力最强,随着 SO_4^{2-} 浓度进一步升高,该菌群的生长及还原力急剧下降。由此结果可知,该菌群的最适硫酸根浓度为 1 500 mg/L。

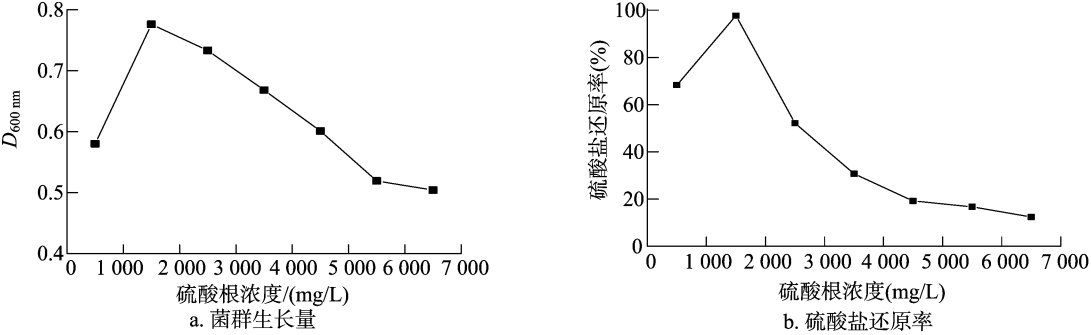


图3 硫酸根浓度对 SRB10 菌群生长及硫酸盐还原率的影响

2.7 正交试验结果

为了优化 SRB10 菌群还原硫酸盐的最适条件,本研究在单因子试验的基础上进行了正交试验(表 3)。结果显示:4 因素的主次顺序为 $\text{C} > \text{A} > \text{B} > \text{D}$,即 4 因素对 SRB10 菌群还原能力影响的强度顺序为 SO_4^{2-} 、pH 值、温度、培养时间。根据均值结果,确定出 SRB10 菌群的最佳脱硫工艺条件为 $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_1\text{D}_1$,即 pH 值 8.0、温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 、 SO_4^{2-} 浓度 1 000 mg/L、培养时间 40 h。

3 结论

经过多次富集和驯化,获得的 SRB10 菌群属于兼性厌氧菌群,能在镉浓度为 175 mg/L 或盐浓度为 50 g/L 的条件下正常生长。该菌群能够利用硫酸钠、硫代硫酸钠、单质硫作为硫源,其中利用硫代硫酸钠的效果最好。该菌群为中温耐碱性菌群,单因子试验显示,在 35 $^{\circ}\text{C}$ 的培养温度,pH 值 7.5 和 1 500 mg/L 硫酸根浓度下,SRB10 菌群生长最快,还原硫酸盐的能力最强。正交试验结果表明,影响 SRB10 菌群还原率的因素强度顺序为 SO_4^{2-} 、pH 值、温度及时间。最佳工艺条件为 pH 值 8.0、温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 、 SO_4^{2-} 浓度 1 000 mg/L、培养时间

表 3 SRB10 菌群正交实验结果

编号	A:pH 值	B:温度 ($^{\circ}\text{C}$)	C: SO_4^{2-} 浓度 (mg/L)	D:时间 (h)	脱硫效率 (%)
1	7.5	30	1 000	40	98.74
2	7.5	35	1 500	48	87.98
3	7.5	40	2 000	56	66.18
4	8	30	1 500	56	88.13
5	8	35	2 000	40	69.25
6	8	40	1 000	48	98.35
7	9	30	2 000	48	61.99
8	9	35	1 000	56	98.87
9	9	40	1 500	40	86.66
k_1	84.30	82.95	98.65	84.88	
k_2	85.24	85.37	87.59	82.77	
k_3	82.51	83.73	65.81	84.39	
R	2.73	2.42	32.84	2.11	

40 h,此条件下硫酸盐还原效率可达 98.91%。本试验富集的 SRB10 菌群所需培养时间短,对硫酸盐还原力强,且高耐镉,在重金属镉污染修复中具有较好的应用前景。但 SRB10 菌 (下转第 245 页)

- addition on water retention and water repellency of sandy soil[J]. *Geoderma*, 2013, 202: 183–191.
- [13] 齐瑞鹏, 张磊, 颜永毫, 等. 定容重条件下生物炭对半干旱区土壤水分入渗特征的影响[J]. *应用生态学报*, 2014, 25(8): 2281–2288.
- [14] Barnes R T, Gallaghe M E, Masiello C A, et al. Biochar – induced changes in soil hydraulic conductivity and dissolved nutrient fluxes constrained by laboratory experiments [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108340.
- [15] 姚永慧. 中国西南喀斯特石漠化研究进展与展望[J]. *地理科学进展*, 2014, 33(1): 76–84.
- [16] 刘方, 王世杰, 刘元生, 等. 喀斯特石漠化过程土壤质量变化及生态环境影响评价[J]. *生态学报*, 2005, 25(3): 639–644.
- [17] 罗海波, 宋光煜, 何腾兵, 等. 贵州喀斯特山区石漠化治理过程中土壤质量特性研究[J]. *水土保持学报*, 2004, 18(6): 112–115.
- [18] 王丁, 张丽琴, 薛建辉. 苗抗旱性综合评价研究——以 6 种喀斯特造林树种苗木为例[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(25): 5–12.
- [19] 姚健, 薛建辉, 吴秋菊, 等. 喀斯特地区 4 种造林幼苗的抗旱性评价[J]. *生态与农村环境学报*, 2010, 26(4): 318–322.
- [20] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 14–24.
- [21] 李江舟, 代快, 张立猛, 等. 施用生物炭对云南烟区红壤团聚体组成及有机碳分布的影响[J]. *环境科学学报*, 2016, 36(6): 2114–2120.
- [22] 何玉亭, 王昌全, 沈杰, 等. 两种生物质炭对红壤团聚体结构稳定性和微生物群落的影响[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(12): 2333–2342.
- [23] 尚杰, 耿增超, 赵军, 等. 生物炭对壤土水热特性及团聚体稳定性的影响[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(7): 1969–1976.
- [24] 张磊, 柳璇, 韩俊杰, 等. 生物炭对土壤团聚体及结合态碳库影响研究进展[J]. *山东农业科学*, 2016, 48(9): 157–161.
- [25] Ouyang L, Wang F, Tang J, et al. Effects of biochar amendment on soil aggregates and hydraulic properties[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2013, 13(4): 991–1002.
- [26] Liu Z, Chen X, Jing Y, et al. Effects of biochar amendment on rapeseed and sweet potato yields and water stable aggregate in upland red soil[J]. *Catena*, 2014, 123: 45–51.
- [27] Liu X H, Han F P, Zhang X C. Effect of biochar on soil aggregates in the loess plateau: results from incubation experiments [J]. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2012, 14(6): 975–979.
- [28] 吴崇书, 邱志腾, 章明奎. 施用生物质炭对不同类型土壤物理性状的影响[J]. *浙江农业科学*, 2014(10): 1617–1619, 1623.
- [29] 侯晓娜, 李慧, 朱刘兵, 等. 生物炭与秸秆添加对砂姜黑土团聚体组成和有机碳分布的影响[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(4): 705–712.
- [30] Busscher W J, Novak J M, Evans D E, et al. Influence of pecan biochar on physical properties of a Norfolk loamy sand [J]. *Soil Science*, 2010, 175(1): 10–14.
- [31] Uzoma K C, Inoue M, Andry H, et al. Influence of biochar application on sandy soil hydraulic properties and nutrient retention [J]. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 2011, 9(2/3/4): 1137–1143.
- [32] 卜巧珍. 生物炭对石灰土理化性质和作物生长的影响[D]. 桂林: 广西师范大学, 2014.

(上接第 240 页)

群对于重金属镉的吸附试验, 吸附机理以及其对实际重金属镉污染土壤的修复效果还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈悟. 硫酸盐还原菌多相分类系统与综合防治方法研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2006.
- [2] Mihcaei W, Anderw J R, Jodi L F, et al. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration[J]. *Bacteriol*, 1998, 180: 2975–2982.
- [3] Joo J O, Choi J H, Kim I H, et al. Effective bioremediation of cadmium (II), nickel (II), and chromium (VI) in a marine environment by using *Desulfovibrio desulfuricans* [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2015, 20(5): 937–941.
- [4] 苏宇, 王进, 彭书传, 等. 以稻草和污泥为碳源硫酸盐还原菌处理酸性矿山排水[J]. *环境科学*, 2010, 31(8): 1858–1863.
- [5] Kousi P, Remoundaki E, Hatzikioseyan A A, et al. Metal precipitation in an ethanol – fed, fixed – bed sulphate – reducing bioreactor[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 189(3, SI): 677–684.
- [6] Omaechevarria J R, Posadas H G, Ferreras J F. First essays for cadmium wastewater elimination by sulphate – reducing bacteria[J]. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 2007, 5(1): 1–10.
- [7] 马忠友, 邓盾, 汪建飞, 等. 一组混合菌群还原硫酸盐的特性[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(8): 184–188.
- [8] 潘嘉川, 曹宏斌, 邵宗泽, 等. 海洋硫酸盐还原菌群处理烟气脱硫废水[J]. *环境科学*, 2009, 30(2): 504–509.
- [9] Kolmert A, Wikstrom P, Hallberg K B. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate – reducing bacterial cultures[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 41(3): 179–184.
- [10] 朱晓丽, 张建霞, 徐雅雅, 等. 常温等离子体诱变选育高效耐镉硫酸盐还原菌[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 2015, 45(2): 303–307.
- [11] 周冰玉, 吴迎奔, 陈薇, 等. 高耐镉硫酸盐还原菌的筛选及鉴定[J]. *湖南农业科学*, 2015(7): 91–93.
- [12] 张小里, 陈志听, 刘海洪, 等. 环境因素对硫酸盐还原菌生长的影响[J]. *中国腐蚀与防护学报*, 2000, 20(4): 224–229.
- [13] Bade K, Manz W, Ulrich S. Behavior of sulfate – reducing bacteria under oligotrophic conditions and oxygen stress in particle – free systems related to drinking water[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 32(3): 215–223.
- [14] 山丹. 大庆油田注水系统硫酸盐还原菌的分布规律及生态因子研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2005.
- [15] 刘靖, 侯宝利, 郑家荣, 等. 硫酸盐还原菌腐蚀研究进展[J]. *材料保护*, 2001, 34(8): 8–11.
- [16] 刘安波. 硫酸盐还原作用对升流式厌氧污泥床工艺性能影响的研究[D]. 北京: 清华大学, 1993.