

厌氧条件下微生物将磷还原为磷化氢

王瑾丰^{1,2} 牛晓君^{1,2*} 马金玲^{1,2} 陆美青^{1,2}

(1. 华南理工大学 环境与能源学院 广东 广州 510006)

(2. 工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室 广东 广州 510006)

摘要:【目的】磷化氢为磷的气态形式,将污水中磷通过转化为磷化氢的方式去除,为污水除磷提供新思路。【方法】采用厌氧持续培养的方式,以经过磷化氢处理和没有处理的水稻土分别作为接种物,在氧化还原电位(ORP) -300 mV、恒温 35 °C,避光持续培养 160 d。【结果】培养器 1 出水总磷的去除率稳定达到 25% ,最高去除率为 26.78% ,气体磷化氢的产量达到 130 ng/L 以上。培养器 2 出水总磷去除达到 23% ,气体磷化氢的产量达到 126 ng/L。【结论】对水稻土进行厌氧条件下连续培养,可以形成稳定的厌氧产磷化氢微生物体系,提高磷化氢的释放量。

关键词: 厌氧除磷, 磷化氢, 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳

Conversion of phosphorus to phosphine by microbial deoxidization under anaerobic conditions

WANG Jin-Feng^{1,2} NIU Xiao-Jun^{1,2*} MA Jin-Ling^{1,2} LU Mei-Qing^{1,2}

(1. College of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

(2. The Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: [Objective] Conversion of phosphorus to phosphine, a gaseous form of phosphorus, has the potential to remove phosphorus from wastewater. [Methods] Incubator was kept anaerobically for 160 days, with paddy soil as inoculum that was treated either with phosphine without phosphine, under the condition ORP -300 mV, 35 °C and in dark. [Results] In incubator 1, total phosphorus removal in the effluent reached 25% , with the highest rate of 26.8% , and the gas phosphine output was above 130 ng/L; and in incubator 2, total phosphorus removal in the effluent reached 23% with gas phosphine output of 126 ng/L. [Conclusion] Microorganisms from paddy soil can form a stable system to produce phosphine from phosphorus under anaerobic conditions to remove phosphorus contamination in soils.

Keywords: Anaerobic phosphate removal, Phosphine, PCR-DGGE

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41071305)

*通讯作者: ✉: xjniu@scut.edu.cn

收稿日期: 2014-05-22; 接受日期: 2014-08-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-08-29

富营养物质对水体造成了严重的影响,一直是人们关注的热点^[1]。磷作为水体富营养化的限制性物质,其去除方式受到广泛关注^[2]。目前经济的生物除磷方式主要是通过聚磷菌除磷工艺实现^[3],但是该工艺中能耗问题是主要的缺陷。

大量学者研究表明,在厌氧环境中磷可以转化为磷化氢^[4-5]。污水处理厂厌氧污泥、鸡粪、猪粪、牛粪、鸭粪等材料^[6-7]被研究者作为接种物,研究厌氧条件下磷化氢的产量和不同因素之间的关系,以探寻高效产磷化氢的除磷途径,但是并没有研究这些不同体系中微生物群落和磷化氢产量之间的直接关系。磷化氢作为磷循环的重要载体,广泛存在于稻田^[8-9]以及其他自然环境中^[10-11]。研究统计结果表明,稻田中结合态磷化氢的含量低于厌氧污泥中的含量,但高于牛等动物排泄物中的含量^[12-13],但是水稻土中的微生物比污泥中微生物具有更好的多样性及丰富性。因此,以水稻土作为接种物,研究厌氧条件下通过磷化氢途径除磷的技术具有重要现实意义。研究表明环境样品中磷化氢的释放过程和微生物的活动密切相关^[10],将水稻土中的微生物进行厌氧富集培养,可研究磷化氢的生物形成过程,对污水中磷通过生物形成磷化氢的方式去除具有参考意义。

为探讨微生物与磷化氢之间的关系及微生物在磷化氢形成中的作用,本研究将水稻田中新鲜水稻土在厌氧混合连续流培养装置内进行厌氧除磷产生磷化氢功能菌培养,对微生物群落结构采用聚合酶链式反应-变形梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)分析,并对丰度高的菌株进行克隆测序分析,为富集高效磷酸盐还原菌和提高厌氧除磷过程的效率,开发高效低耗的厌氧除磷工艺提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 厌氧培养培养器

厌氧除磷功能菌培养的混合连续流培养装置(图1)采用有机玻璃制成,共两组,编号为培养器1和培养器2。总容积为10 L,其中液相容积9 L,气相容积1 L。培养器采用机械搅拌器连续持续搅拌,置于恒温避光培养箱中。

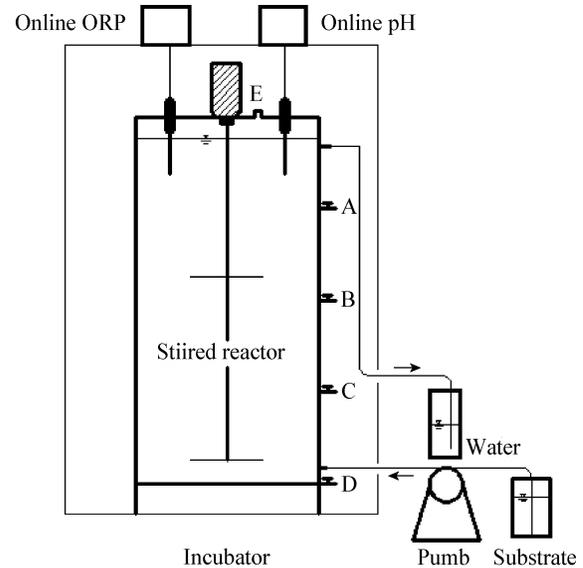


图1 厌氧混合连续流富集培养装置

Figure 1 Continuous stirred enrichment reactor under anaerobic condition

注: A、B、C、D: 不同高度取样口; E: 气体取样口。

Note: A, B, C, D: The sampling sites along the height, separately; E: Gas sampling site.

1.2 供试材料

1.2.1 供试土壤: 本实验的土壤来自广东省农业科学院大丰试验基地。使用 AMS 分离式土壤柱状采样器,以 S 形 5 点采样法采样,采样深度为 0-10 cm。将 5 点采集样品混合均匀,去除石块、植物根等杂质后装于聚乙烯塑料密封袋中。土壤的理化性质于 24 h 内测定。

1.2.2 试剂和仪器: 本试验中所有的化学试剂均为分析纯级别,均购自天津市大茂化学试剂厂;植物培养箱(ZSX 1000 GS/CO₂/PH₃),武汉瑞华仪器设备有限公司;恒温培养箱(ZSD-1160),上海成顺仪器有限公司;ORP 仪(TP 560),广州特佳环保有限公司;恒流泵(Longerpumb BT100-2J),保定兰格恒流泵有限公司;高速离心机(Avanti J-26 XP),贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;PowerSoil[®] DNA Isolation Kit,美国 Mobio 公司;Dcode Universal Multation Detection System、Gel imaging system、涡旋仪(Vortex Genie[®] 2 Vortex),美国 Bio-Rad 公司;气相色谱(7820A),美国安捷伦公司。

1.2.3 培养基(g/L): 酵母膏 0.250, KH_2PO_4 0.500, K_2HPO_4 0.740, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.200, CaCl_2 0.075, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.040, 葡萄糖 0.500, 乙酸钠 0.500, 蛋白胨 1.000, 氯化铵 0.500, NaNO_3 0.500, pH 6.5–7.4, 蒸馏水 1 L, 基础培养液用氮气曝气 10 min, 置于 4 °C 保存。

1.3 实验方法

1.3.1 供试土壤的处理: 新鲜土壤分两份, 一份平摊在托盘上, 置于植物培养箱中。每天在植物培养箱中通入 7.0 mg/m^3 磷化氢气体 1.5 h, 连续处理一个月; 另一份不做处理。

1.3.2 厌氧除磷功能菌的培养: 采用混合连续流方式, 将基础培养液通过恒流泵以 1 000 mL/d 加入培养器与土壤混合, 控制恒温培养箱的温度为 35 °C, ORP 值为 -200–-400 mV, HRT 为 9 d, 避光条件下进行续培养。

1.3.3 样品基因组总 DNA 提取和 PCR 扩增: 在两个培养器的 A、B、C、D 口分别取 5 mL 出水, $10\,000 \times g$ 离心 30 s, 弃去上清液, 称取 0.5 g 污泥用于提取 DNA。污泥 DNA 的提取采用 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit, 提取步骤依据说明书操作, 最后将过滤的 DNA 溶解在 50 μL TE 溶液中, 保存在 -20 °C。

以提取的基因组 DNA 作为模板, 使用 16S rRNA 基因 V3–V5 区特异性引物 GCF341 和 R907^[15-16], 扩增片段长度约为 626 bp。本实验采用 50 μL 的 PCR 反应体系: 1 μL 模板, 0.02 nmol 正反向引物, 25 μL PCR mix (生工), 21 μL 灭菌水。PCR 的反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 检测。

1.3.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE): DGGE 操作采用 Dcode Universal Miltation Detection System 进行。采用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:双丙烯酰胺=37.5:1), 选用的变性剂梯度为 40%–65%, 上样为 6 μL PCR 产物和 1 μL Loading dye 的混合物(32 孔梳)。运行条件: 在 60 °C 的 $1 \times \text{TAE}$ [40 mmol/L

Tris, 40 mmol/L 冰乙酸, 1.0 mmol/L EDTA (pH 8.0)] 电泳液中 80 V 运行 14 h。具体操作步骤根据说明书进行。电泳完毕后采用银染法^[17]对凝胶进行染色。采用 Gel imaging system 对显色的凝胶进行拍照。

1.3.5 优势条带切胶回收、测序: 对不同采样口的优势条带切胶后进行回收, 捣碎后加入 40 μL Tris-HCl (pH 8.0) 放置 48 h, 离心后取上清液作为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系和条件同 1.3.3, 所采用的引物为 F341 和 R907。对 PCR 产物采用 pUCm-T Vector Cloning (生工) 进行克隆, 操作步骤根据说明书进行。挑选 2–3 个克隆子进行测序分析。

1.4 指标分析方法

1.4.1 土壤指标测定: 部分所采样品自然风干后, 用玛瑙研钵研磨后过 2 mm 和 0.25 mm 钢筛, 依据常规土壤农化分析方法^[3]测定土壤基本理化性质。土壤 pH 采用酸度计法测定(土:水比为 1:5); 土壤有机质采用重铬酸钾-硫酸外加热法; 分析土壤含水率测定采用 105 °C 烘干 12 h, 土壤有机质测定采用重铬酸钾-硫酸外加热法; 速效钾采用乙酸铵浸提、火焰光度计法; 无机磷采用盐酸溶液浸提 24 h、钼锑抗分光光度法, 总磷采用碱熔-钼锑抗分光光度法, 有机磷为总磷和无机磷的差值。

1.4.2 水体总磷测定: 采用过硫酸钾消解并用钼锑抗分光光度法测定总磷。

1.4.3 磷化氢测定: (1) 气体中磷化氢的测定。气体磷化氢在二次冷阱富集之后, 采用气相色谱(GC-NPD, Agilent 7820A)分析^[18]。

(2) 水体中磷化氢的测定。用 100 mL 注射器准确吸取 50 mL 水样, 然后注入高纯氮气 50 mL^[19], 置于涡旋仪上以最高挡涡旋 5 min。吸取 20 mL 经过平衡的气体按照(1)所述方法进行测定。

(3) 土壤中磷化氢的测定。土壤中结合态磷化氢采用 0.5 mol/L 的硫酸消解^[18], 抽取 50 mL 混合气体按照(1)所述的方法进行测定。

1.5 数据分析

使用 Quantity one V4.6.2 (美国 Bio-Rad) 软件对

DGGE 电泳图谱进行分析,将 DGGE 图谱中包含的信息进行量化处理,以二进制的格式输出。再进行 UPGMA 聚类分析不同样品间细菌群落结构的相似性。在 NCBI 数据库中通过 BLAST 比对出相似性高于 98% 的序列,与测序已知序列构建进化树,进化树构建采用软件 MEGA 5.1 实现。

其他数据分析采用 Origin 8.0.

2 结果与分析

2.1 供试土壤理化性质

大丰试验基地位于广东省广州市天河区(经度 113.4,纬度 23.2)。所采土壤的理化性质如表 1 所示。

2.2 厌氧培养器运行状况

2.2.1 培养器基本参数检测:厌氧培养器总共连续运行 160 d,培养期间氧化还原电位(ORP)和 pH 变化如图 2 所示。在整个过程中,ORP 在连续培养 70 d 后变化趋于稳定,在 -200—-400 mV。pH 随着培养时间的变化逐渐升高,在 100 d 后逐渐趋于稳定。

2.2.2 总磷(TP)去除率和结合态磷化氢(MBP)含

量:在厌氧培养器连续培养 160 d 时,出水 TP 的去除率稳定达到 25%,最高去除率为 26.78%,比郭夏丽等^[20]研究总磷去除水平 21.31%稍高。如图 3 所示,培养器 1 的总磷去除率在整个过程中稍高于培养器 2,在运行时间超过 80 d 时,差异逐渐显著化。整个厌氧培养过程中所产生的气态磷化氢的含量也逐渐呈现出上升的趋势,磷化氢的含量在前 40 天升高缓慢,接着磷化氢的含量出现了较大幅度的提高,在 130—160 d 时,磷化氢的含量趋于稳定,产量在 130 ng/L 以上。同时气态磷化氢产量和总磷的去除之间表现出较好的相似性,在总磷去除率不断上升的过程中,磷化氢的含量逐渐升高。培养器 1 中总磷去除率和气态磷化氢的产量在同期水平下均高于培养器 2。

在连续培养 160 d 的时候,对培养器沿不同高度的取样口进行取样。样品中磷化氢的含量沿着培养器高度的分布如图 4 所示。结合态磷化氢的产量在厌氧培养器中的分布规律表现出在底部的分布高于在顶部的含量。培养器 1 和培养器 2 表现出相似的趋势,同时培养器 1 样品中结合态磷化氢的含量比培养器 2 中的含量略高。

表 1 大丰试验基地土壤理化性质

Table 1 Physico-chemical characterization of Dafeng experimental base

pH	有机质 Organic matter (g/kg)	总磷 Total phosphorus (mg/kg)	无机磷 IP (mg/kg)	有机磷 OP (mg/kg)	速效钾 Available K (g/kg)	结合态磷化氢 Matrix-bound PH ₃ (ng/kg)
6.72±0.10	26.15±0.69	684.01±10.10	557.25±9.31	126.76±2.05	17.37±0.30	74.10±3.73

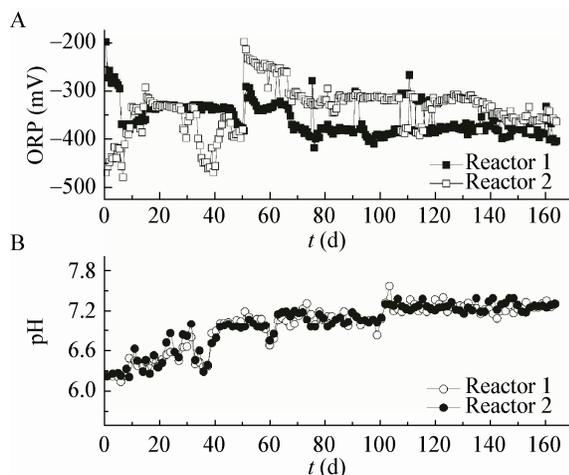


图 2 pH 和 ORP 随培养时间的变化
Figure 2 pH and ORP change along with the incubation time

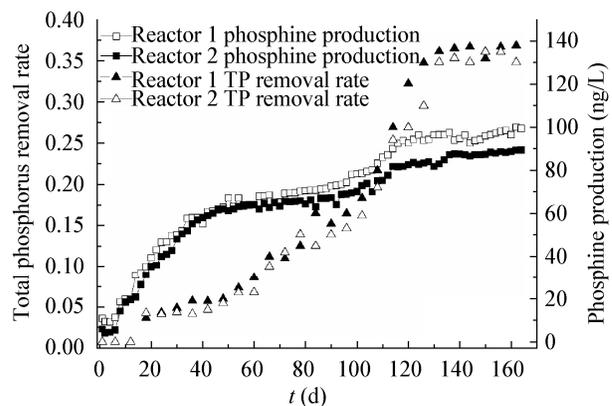


图 3 总磷去除率和磷化氢产量随时间变化
Figure 3 Total phosphorus removal and phosphine production along with the time

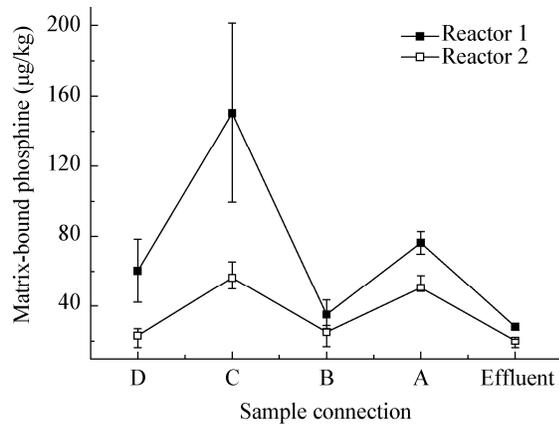


图4 结合态磷化氢沿培养器高度分布

Figure 4 Matrix-bound phosphine (MBP) distribution in a full scale of anaerobic reactor

2.3 样品基因组总 DNA 提取和 PCR 扩增结果

本试验采用 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit 提取水样中污泥的 DNA,对提取方法稍加改变,将最后提取的 DNA 溶解在 TE 溶液中,提取效果较好。1% 琼脂糖电泳结果显示,在 23 kb 的地方均有条带出现,说明每个样品都已经获得了较完整培养器中水样微生物的基因组总 DNA,因为每个水样中微生物的多寡不一,一些样品的条带亮度不够,但已经满足作为 PCR 扩增模板的要求。

将提取的水样基因组总 DNA 直接进行 PCR 扩增,电泳检测结果显示 8 个样品均已扩出,且亮度、纯度都较好,未出现非特异性扩增,通过与 Marker DL2000 对比,可知其片段大小在 630 bp 左右,说明 PCR 扩增效果良好,得到了目的条带。

2.4 DGGE 指纹图谱分析

DGGE 的电泳结果如图 5 所示。从 DGGE 图谱显示,培养器 1 和 2 微生物群落差异比较明显,同时微生物群落沿培养器高度变化趋势比较明显。共检测到 27 个条带,并对每个条带进行了测序分析。通过 UPGMA 算法对采样口样品的测序结果进行聚类分析,生成系统进化树,如图 6 所示。

图 6 中 A1-D2 分别代表培养器 1 和 2 中采样口微生物群落的图谱指纹,具体如图 5 所示。聚类分析结果显示培养器 1 和培养器 2 被分到两族,之间的相似性达到 63%。同时培养器相邻取样口之间的

相似性最高,且随着取样口间距的增加相似性降低。

2.5 序列比对及进化树构建

将所得序列输入 GenBank,用 BLAST 程序进行相似性比较分析,所有序列与数据库中 16S rRNA 基因序列的相似性在 95%–100%之间。在本次克隆测序中,由于部分样品降解,只得到 15 条序列。测序序列均提交至基因库,登录号为 KJ883000–KJ883015。采用 N-J 方法构建进化树,结果见图 7。

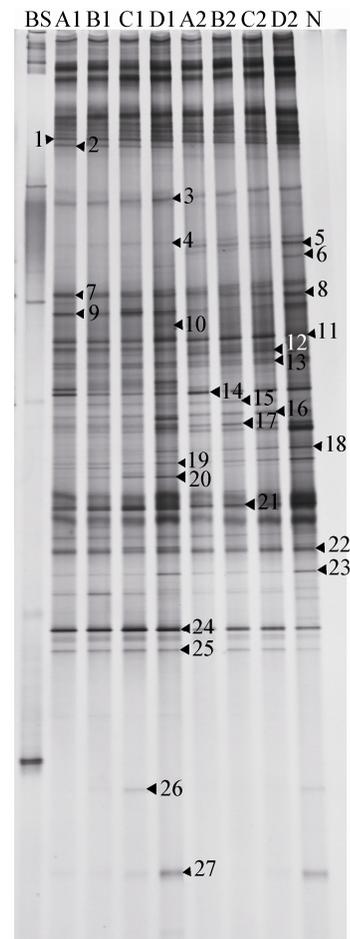


图5 厌氧培养器中 DGGE 图谱指纹

Figure 5 DGGE fingerprint of the anaerobic reactor

注:1-27:切胶的具体位置。A1-D1:培养器 1 中 A、B、C、D 采样口微生物群落的指纹图谱;A2-D2:培养器 2 中 A、B、C、D 采样口微生物群落的指纹图谱;BS:Marker DL2000;N:PCR 阴性对照样本。

Note: 1-27: The location of gel extraction. A1-D1: Fingerprint of microbial community in incubator one for A, B, C, D sampling sites; A2-D2: Fingerprint of microbial community in incubator two for A, B, C, D sampling sites; BS: Marker DL2000; N: PCR negative control sample.

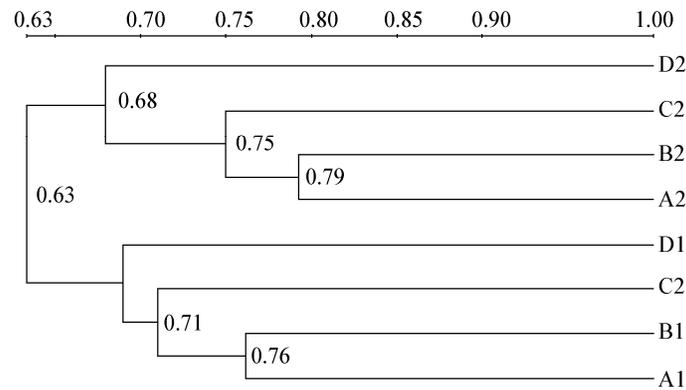


图 6 培养器取样口聚类分析图
Figure 6 Cluster analysis of reactor sampling port

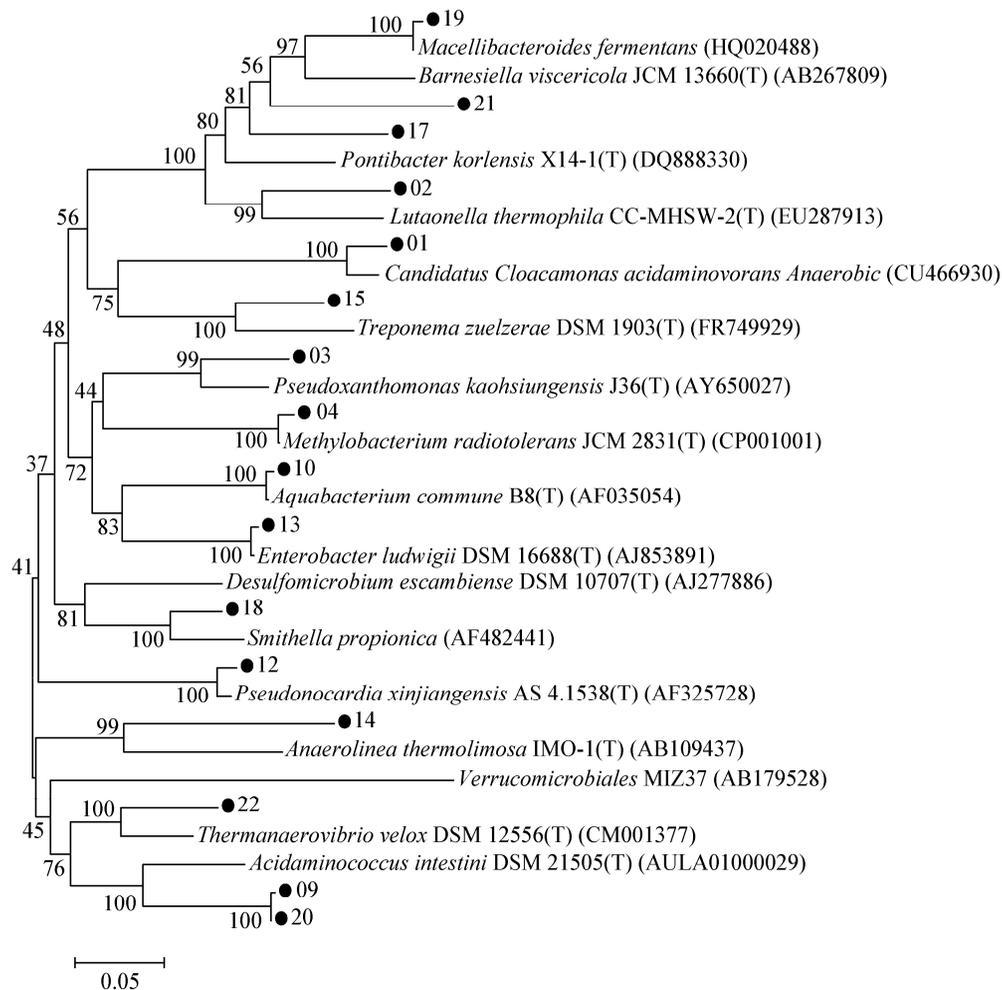


图 7 厌氧培养器 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 7 16S rRNA gene phylogenetic tree of the anaerobic reactor

注：图中的数字表示图 4 中切胶测序的序列；分支点上的数字代表可信度；刻度代表遗传距离。

Note: The figures represent the gel extraction sequencing as marked in Figure 4; Numbers of branch point represent the credibility; Scale represent the genetic distance.

所获得的序列分别属于拟杆菌门(Bacteroidetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、厚壁菌门(Firmicutes)、互氧菌门(Synergistetes)、放线菌门(Actinobacteria)、Cloacamonas_p 9 个门。

3 讨论

研究表明,在自然条件下由于热力学原因磷酸盐无法自然还原为磷化氢气体。目前关于磷化氢产生的机理主要集中在生物方面^[21]和非生物方面^[22]。国内学者周康群等^[7]研究了不同接种污泥对总磷去除和磷化氢生成之间的关系;孙亮等^[23]研究了不同磷源、碳源、碳磷比、不同的环境条件(pH、温度)等对磷化氢产量的影响。本文在之前学者^[7,23]对产磷化氢最优化的条件下,通过连续持续培养,在厌氧条件下(ORP 介于-300—400 mV)对土壤微生物进行富集,对不同时期总磷去除率以及磷化氢含量的测定,发现在 160 d 时总磷去除已趋于稳定,达到 26.78%,同时气体磷化氢的含量在 130 ng/L 以上。我们发现,在经过磷化氢预处理之后,同期总磷的去除率以及磷化氢的产量都低于没有处理的情况。通过对 160 d 培养器中微生物群落的分布情况(图 5)观察,我们发现经过磷化氢处理后的图谱条带相比没有处理的情况会变得稀疏。同期经过处理之后培养器的稳定条件(ORP 和 pH)也表现出下降(图 2)。

微生物群落指数 Berger-Parker 指数 $d (d=N/n_{\max})$ 表示了种群的优势度,培养器 1 中指数 d 均值为 9.52,培养器 2 中指数 d 均值在 11.96;群落多样性(Diversity)以 Shannon-Wiener 多样性指数(H')表示,培养器 1 的指数 H' 均值为 3.32,培养器 2 的指数 H' 均值为 3.34。微生物群落多样性指数 d 和 H' 表明磷化氢处理可以降低微生物群落的多样性以及改变部分优势菌。已有对昆虫害虫、啮齿动物和人等的研究表明,高浓度的磷化氢为一种强还原剂,可使 DNA 氧化或使 DNA 烷基化,从而造成 DNA 损伤和畸变^[24-25],但是对微生物群落的影响机理尚未见报道。

目前确认的磷化氢产生菌有大肠杆菌(*Escherichia coli*)、鸡沙门氏菌(*Salmonella gallinarum*)、亚利桑那沙门氏菌(*Salmonella arizonae*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)及丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutyricum*),这 6 种细菌主要属于变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)。图 7 中表明本研究主要的属于变形菌门和厚壁菌门的序列有 5 条,通过对已知菌的序列和实验所得序列构建进化树分析可得图 8,通过分析可以发现,这些序列与已知的产磷化氢微生物^[26]相似性很高,尤其是条带 20,与已知的生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)相似性极高,而条带 20 主要集中在培养器 1 中。

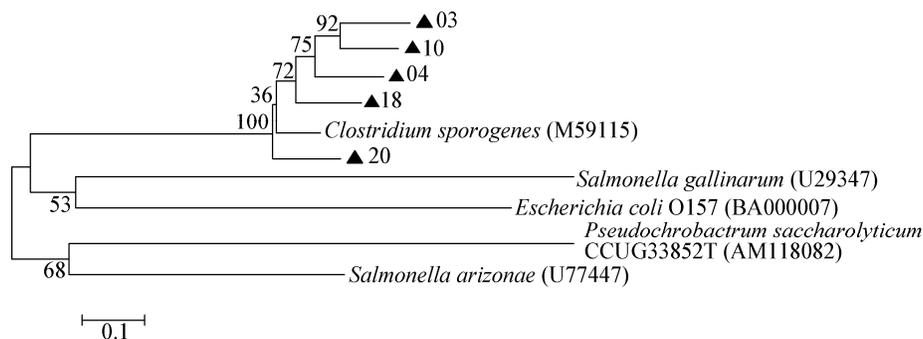


图 8 磷化氢产生细菌 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 8 16S rRNA gene phylogenetic tree of the phosphine bacteria

注:图中的数字表示图 4 中切胶测序的序列;分支点上的数字代表可信度;刻度代表遗传距离。

Note: The figures represent the gel extraction sequencing as marked in figure 4; Numbers of branch point represent the credibility; Scale represent the genetic distance.

目前已有的研究表明, 16S rRNA 基因不同区域存在不同程度的异质性, 但是 V4-V5 区域显示了最低的高估程度^[27], 本研究选取的 V3-V5 区最大程度上降低了对 16S rRNA 基因丰度的高估, 较为准确地反映了培养器中微生物的组成。通过研究我们发现, 对土壤进行磷化氢处理可降低微生物群落的多样性, 同时并不有利于产磷化氢菌的富集。不同接种物影响到磷化氢的产量, 因此稳定以及高效的接种物质是提高磷化氢产量的前提。对水稻土进行连续培养, 可以形成稳定的微生物体系, 同时可富集产磷化氢微生物, 提高磷化氢的释放量, 而这一现象是本研究首次发现。这一发现对于厌氧除磷体系的构建以及接种物质的选择具有重要理论支持以及一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Zhang Z, Lin Y, Liang J. Water eutrophication and controls[J]. *Chongqing Environmental Science*, 2002, 24(3): 52-55 (in Chinese)
张智, 林艳, 梁健. 水体富营养化及其治理措施[J]. *重庆环境科学*, 2002, 24(3): 52-55
- [2] Ji JJ, Wang MD, Ge LY, et al. Developing trends of technologies for nitrogen and phosphorus removal by biological processes[J]. *Sichuan Environment*, 2003, 22(4): 38-40 (in Chinese)
季俊杰, 王美东, 葛丽英, 等. 污水生物脱氮除磷技术研究进展[J]. *四川环境*, 2003, 22(4): 38-40
- [3] Bao SD. *Soil Agro-chemical Analysis*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 29-37 (in Chinese)
鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 29-37
- [4] Liu Z, Jia S, Wang B, et al. Preliminary investigation on the role of microorganisms in the production of phosphine[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(7): 885-890
- [5] Rutishauser BV, Bachofen R. Phosphine formation from sewage sludge cultures[J]. *Anaerobe*, 1999, 5(5): 525-531
- [6] Guo XL, Zheng P, Mei LL. Screening for the phosphate reducer and study on their dephosphorization conditions conditions[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(2): 238-241 (in Chinese)
郭夏丽, 郑平, 梅玲玲. 厌氧除磷种源的筛选与厌氧除磷条件的研究[J]. *环境科学学报*, 2005(2): 238-241
- [7] Zhou KQ, Liu H, Sun YF, et al. Screening the phosphate reducer deoxidizing total phosphate into PH₃ and the identification of the functional bacteria[J]. *Ecology and Environment*, 2007(6): 1669-1673 (in Chinese)
周康群, 刘晖, 孙彦富, 等. 厌氧条件总磷还原为磷化氢种泥筛选及功能菌株鉴定[J]. *生态环境*, 2007(6): 1669-1673
- [8] Niu X, Wei A, Li Y, et al. Phosphine in paddy fields and the effects of environmental factors[J]. *Chemosphere*, 2013, 93(9): 1942-1947
- [9] Han C, Geng J, Zhang R, et al. Matrix-bound phosphine and phosphorus fractions in paddy soils[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13(4): 844-849
- [10] Niu X, Geng J, Wang X, et al. Temporal and spatial distributions of phosphine in Taihu Lake, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2004, 323(1/3): 169-178
- [11] Glindemann D, Edwards M, Liu J, et al. Phosphine in soils, sludges, biogases and atmospheric implications—a review[J]. *Ecological Engineering*, 2005, 24(5): 457-463
- [12] Gassmann G, Glindemann D. Phosphane (PH₃) in the biosphere[J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1993, 32(5): 761-763
- [13] Liu JA, Yahui CHZ, Kuschik P, et al. Phosphine in the urban air of Beijing and its possible sources[J]. *Water Air and Soil Pollution*, 1999, 116(3/4): 597-604
- [14] Niu X, Mi L, Li Y, et al. Physiological and biochemical responses of rice seeds to phosphine exposure during germination[J]. *Chemosphere*, 2013, 93(10): 2239-2244
- [15] Kjellerup BV, Veeh RH, Sumithraratne P, et al. Monitoring of microbial souring in chemically treated, produced-water biofilm systems using molecular techniques[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2005, 32(4): 163-170
- [16] Muyzer G, Ramsing NB. Molecular methods to study the organization of microbial communities[J]. *Water Science and Technology*, 1995, 32(8): 1-9
- [17] van Orsouw NJ, Li D, Vijg J. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) increases resolution and informativity of Alu-directed inter-repeat PCR[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 1997, 11(2): 95-101
- [18] Niu X, Wei A, Li Y, et al. Phosphine in paddy fields and the effects of environmental factors[J]. *Chemosphere*, 2013, 93(9): 1942-1947
- [19] Niu XJ, Geng JJ, Ma HR, et al. Discovery of a new phosphide-phosphine in eutrophic lakes[J]. *China Environmental Science*, 2004, 24(1): 85-88 (in Chinese)
牛晓君, 耿金菊, 马宏瑞, 等. 富营养浅水湖泊中新发现的磷化氢[J]. *中国环境科学*, 2004, 24(1): 85-88
- [20] Guo XL, Zheng P, Mei LL. Phosphate reducer and study on their dephosphorization conditions[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(2): 238-241 (in Chinese)
郭夏丽, 郑平, 梅玲玲. 厌氧除磷种源的筛选与厌氧除磷条件的研究[J]. *环境科学学报*, 2005, 25(2): 238-241
- [21] Geng J, Jin X, Wang Q, et al. Matrix bound phosphine formation and depletion in eutrophic lake sediment fermentation—simulation of different environmental factors[J]. *Anaerobe*, 2005, 11(5): 273-279
- [22] Glindemann D, Eismann F, Bergmann A, et al. Phosphine by bio-corrosion of phosphide-rich iron[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 1998, 5(2): 71-74
- [23] Sun L, Zhang CS, Zhang FK, et al. Effects of different phosphorus sources on phosphine production from anaerobic sludge[J]. *China Water and Wastewater*, 2012, 28(21): 89-91 (in Chinese)
孙亮, 张朝升, 张可方, 等. 不同磷源对厌氧活性污泥产生磷化氢的影响[J]. *中国给水排水*, 2012, 28(21): 89-91
- [24] Liu YB, Liu SS, Simmons G, et al. Effects of phosphine fumigation on survivorship of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae) eggs[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2013, 106(4): 1613-1618
- [25] Lam WW, Toia RF, Casida JE. Oxidatively initiated phosphorylation reactions of phosphine[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, 39(12): 2274-2278
- [26] Jenkins RO, Morris TA, Craig PJ, et al. Phosphine generation by mixed-and monoseptic-cultures of anaerobic bacteria[J]. *Science of the Total Environment*, 2000, 250(1/3): 73-81
- [27] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of Prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969