

# 污水处理系统中活性污泥细菌多样性研究

姜昕<sup>1,3</sup>, 马鸣超<sup>2</sup>, 李俊<sup>3,\*</sup>, 鲁安怀<sup>1</sup>, 钟佐燊<sup>4</sup>

1. 北京大学 地球与空间科学学院, 北京 100871
2. 北京市环境保护科学研究院, 北京 100037
3. 中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所, 北京 100081
4. 中国地质大学(北京) 水资源与环境学院, 北京 100083

Jiang Xin<sup>1,3</sup>, Ma Mingchao<sup>2</sup>, Li Jun<sup>3,\*</sup>, Lu Anhuai<sup>1</sup>, Zhong Zuoshen<sup>4</sup>

1. School of Earth and Space Sciences, Peking University, Beijing 100871, China
2. Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection, Beijing 100037, China
3. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081, China
4. School of Water Resources and Environment, China University of Geosciences(Beijing), Beijing 100083, China

Jiang Xin, Ma Mingchao, Li Jun, et al. Analysis on the bacterial diversity of active sludge in wastewater treatment plant. *Earth Science Frontiers*, 2008, 15(6): 163-168

**Abstract:** A bacterial 16S rDNA gene clone library was constructed to investigate the bacterial diversity of active sludge in Gaobeidian Wastewater Treatment Plant, Beijing. The results indicated that, the bacterial diversity of active sludge was very high, and the clones could be divided into 5 different groups. The dominant bacterial community was proteobacteria, which accounted for 76.7%. The order of predominancy of bacterial communities are as follows: the  $\beta$ -proteobacteria (39.8%), the uncultured bacteria (22.33%), the  $\gamma$ -proteobacteria (20.15%), the  $\alpha$ -proteobacteria (6.79%) and the  $\delta$ -proteobacteria (4.85%). The Nitrosomonas-like and Nitrospira-like bacteria, such as *Nitrosomonas* sp. (1.94%) and uncultured *Nitrospirae* bacterium (11.65%) were also found, which have played important roles in oxidation of ammonia and nitrite in the system. However, they were only of a small amount because of their slow growth and less competitive advantage than heterotrophic bacteria. Denitrifying bacteria like *Thauera* sp. was at a high percentage, and it suggests that the active sludge has a strong denitrifying effect. *Roseomonas* sp. was also found in the clone library, which could be related to the degradation of organophosphorus pesticide.

**Key words:** active sludge; microbial molecular ecology; 16S rDNA clone library; bacterial diversity; Gaobeidian Wastewater Treatment Plant

**摘要:**采用分子生物学手段 16S rDNA 克隆文库方法对北京高碑店污水处理厂回流污泥中的细菌进行了多样性研究。结果表明,活性污泥系统中细菌群落具有高度多样性,所有克隆子分属 5 个不同的细菌类群,优势细菌类群为变形菌(protobacteria),占克隆文库的 76.7%;细菌类群优势依次为  $\beta$ -变形菌类群( $\beta$ -proteobacteria, 占 39.8%)、不可培养菌类群(uncultured bacteria, 占 22.33%)、 $\gamma$ -变形菌类群( $\gamma$ -proteobacteria, 占 20.15%)、 $\alpha$ -变形菌类群( $\alpha$ -proteobacteria, 占 6.79%)和  $\delta$ -变形菌类群( $\delta$ -proteobacteria, 占 4.85%);活性污泥中起硝化作用的主要是亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas* sp., 占 1.94%)和硝化螺旋菌(uncultured *Nitrospirae*)

收稿日期:2008-10-10;修回日期:2008-10-30

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973”项目(G2007CB815600);国家科技支撑项目(2006BAD25B04)

作者简介:姜昕(1969—),女,副研究员,博士后,微生物学专业,现主要从事环境和农业微生物学研究。

\* 通讯作者简介:李俊,研究员,博士生导师,微生物学专业,主要从事农业微生物学研究。E-mail:jlj@caas.ac.cn

bacterium, 占 11.65%), 由于这 2 种硝化菌自身生长缓慢, 难以与异养细菌竞争, 以致其在文库中的比例较低; 而作为反硝化细菌的陶厄氏菌属在文库中的比例却高达 27.18%, 可见该活性污泥具有较强的反硝化能力; 克隆文库中还发现了少量的玫瑰单胞菌属(占 4.85%), 推测它的存在和有机磷的降解有关。

**关键词:** 活性污泥; 微生物分子生态技术; 16S rDNA 克隆文库; 细菌多样性; 高碑店污水处理厂

**中图分类号:** Q938 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-2321(2008)06-0163-06

北京高碑店污水处理厂地处北京东郊, 是北京市城市总体规划拟建的 16 座城市污水厂中规模最大、也是目前全国最大的污水处理厂。工程分别在 1993 年和 1999 年通过两期建设, 目前日处理污水 100 万  $\text{m}^3$ , 占北京市污水处理总量的 40%。在工艺设计方面, 处理流程采用的工艺为前置缺氧段活性污泥法; 一级处理包括格栅、泵房、曝气沉砂池和矩形平流沉淀池; 二级处理采用推流式曝气池; 污泥处理采用中温两级消化工艺。

近年来, 对高碑店污水处理厂工艺技术方面的研究较多, 而对其中起降解作用的细菌多样性的研究罕见报道, 且仅有的少数研究所采用的方法大多基于传统的纯培养法, 而该法只能对环境样品中“可计数、可培养”的细菌(只占细菌总数的 1%~10%)提供信息<sup>[1]</sup>, 并且不能很好地反映微生物种群存在的原始状态<sup>[2]</sup>, 因此获得的结果难以客观、全面地反映活性污泥系统菌群的多样性。随着不依赖分离培养的微生物分子生态学技术的发展, 通过分析环境样品的克隆文库序列<sup>[3]</sup>, 可以对环境样品中所有细菌进行多样性研究。克隆文库的构建是微生物分子生态学中用来研究微生物组成的常用方法之一, 目前细菌菌群分析中应用最多的是 16S rDNA 克隆文库方法。该方法无需分离培养, 大大增加了人们检测和鉴定环境中“非培养”微生物的能力, 已被广泛地应用到水体、土壤、海洋沉积物、生物水处理系统等细菌多样性研究<sup>[4-9]</sup>, 极大地丰富了环境微生物资源库, 并可以用于指导细菌的分离培养。

本文采用建立 16S rDNA 克隆文库的方法, 通过测序并与 GenBank 已知序列 BLAST 比对确定细菌种类, 以揭示活性污泥系统中的细菌多样性, 确定其中的优势类群, 同时也可以根据克隆文库中克隆子出现的频率了解系统中菌群的构成比例。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

活性污泥样品于 2006 年 8 月取自北京高碑店

污水处理厂的回流污泥, 进水水样取自初沉池进水口, 出水水样取自二沉池的出水端。

### 1.2 实验方法

(1) 样品总 DNA 提取及纯化。采用间接法, 对活性污泥样品进行总 DNA 的提取。用灭菌的 TENP buffer (50 mmol/L Tris-base, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.01 g/mL PVP, pH 10), 旋涡振荡污泥样品, 离心去上清液, 重复至上清液澄清; 沉淀溶于 PBS buffer (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 溶于 1 L 水, pH 7.4), 差速离心收集菌体; 将菌体转入带有 O 型密封环的 2 mL 螺旋口离心管中, 加入 900  $\mu\text{L}$  裂解液 (NaCl 500 mmol/L, Tris-HCl (pH 8.0) 50 mmol/L, EDTA 50 mmol/L, SDS 40 mg/mL), 1 g 0.1 mm 瓷珠, 酚-氯仿-异戊醇抽提液 700  $\mu\text{L}$ , 涡旋使沉淀充分悬浮, 将离心管置于珠式细胞破碎器 (MINI-BEADBEATER) 上均质化 (3 200 r/min) 2 min, 上清液继续用酚-氯仿-异戊醇抽提; DNA 粗体液采用 PCR-clean-up kit 试剂盒纯化。

(2) PCR 扩增。① 16S rDNA 全长 PCR 扩增: 以样品总 DNA 为模板, 采用 16S rDNA 基因特异性的引物对 P<sub>0</sub> 和 P<sub>6</sub> 进行 PCR 扩增。反应体系见参考文献<sup>[10]</sup>; 反应条件为, 采用降落 PCR 策略, 即预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 复性: 95  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 60  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 5 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 5 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 50  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 15 个循环; 最后在 60  $^{\circ}\text{C}$  下延伸 10 min。PCR 反应的产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。② Reconditioning PCR<sup>[11]</sup>: 反应体系中以 1.5  $\mu\text{L}$  第一轮 PCR 产物为模板, 其余同前; 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 50  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min 和 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 5 个循环, 最后在 72  $^{\circ}\text{C}$  下延伸 6 min。PCR 反应的产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

(3) 克隆文库的构建。使用上海生工生物工程技术有限公司胶回收试剂盒 UNIQ-10 胶回收柱对 Reconditioning PCR 产物进行割胶纯化, 并测

定回收后 PCR 产物浓度, 然后与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂板, 37 °C 培养 12 h 后, 进行蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆子, 用限制性内切酶 *Csp* 6 和 *Hinf* I 分型, 每个酶切类型挑取一个代表菌株进行测序(上海生工)。用 DNA Man、Gene Tool 等软件对测序结果进行编辑、分析, 并把编辑好的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性检索后下载同源性序列。系统发育树的绘制使用 MEGA 3.1 软件完成, 算法为邻位相连法 (neighbour-joining-analysis)。

(4) 水样测定。主要水质监测指标有: COD<sub>cr</sub>, NH<sub>4</sub>-N 和 TN, 其中, 用重铬酸钾法测定 COD<sub>cr</sub>, 纳氏试剂分光光度法测定 NH<sub>4</sub>-N, 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定 TN。

## 2 数据分析与讨论

### 2.1 总 DNA 提取和 PCR 扩增结果

对活性污泥样品提取的 DNA 进行电泳检测, 条带大小为 10 kb 左右, 满足后续试验要求; 以其为模板进行 16S rDNA 全长 PCR 扩增, 得到约 1 500 bp 的大小片段(图 1a); 再采用 Thompson 等<sup>[11]</sup>提出的“Reconditioning PCR”的方法, 消除了异源双链 DNA (heteroduplex), 保证了目的片段的特异性扩增, 为后续试验提供了理想的模板(图 1b)。

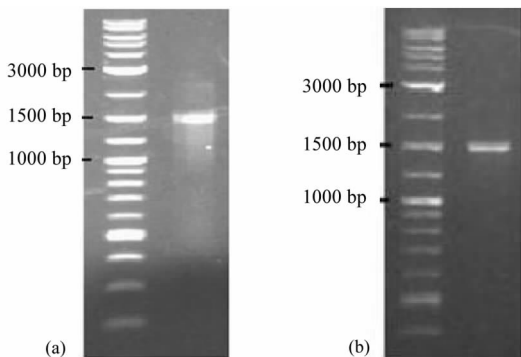


图 1 16S rDNA PCR 产物及“Reconditioning PCR”产物电泳图像

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR & “Reconditioning PCR” amplified 16S rDNA

### 2.2 16S rDNA 系统发育分析

只有当文库的库容大到足以检出群落中主要的成员时, 文库之间的比较才有意义。为了保证构建的克隆文库足够大, 能够检测出群落中主要的成员, 需要对实验数据进行统计学检验。以覆盖率  $C$  评

估所构建文库对细菌多样性的体现程度, 计算公式为

$$C = [1 - (n_1/N)] \times 100\%$$

其中,  $N$  代表阳性克隆子总数,  $n_1$  代表仅含单个克隆子的数量<sup>[12]</sup>。本实验中  $n_1$  为 6, 克隆文库的覆盖率为 94.2%, 表明该克隆文库能较全面地反映活性污泥系统中的细菌种群多样性。

对随机挑取样品的 103 个阳性克隆采用限制性内切酶 *Csp* 6 和 *Hinf* I 酶切, 共得 25 个酶切类型。每个酶切类型挑取一个代表克隆子进行测序, 测序结果在 GeneBank 数据库中进行 BLAST 比对, 将序列比对结果相同的克隆子定义为一个操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。活性污泥样品共得到 21 个 OTU, 样品中主要 OTU 所含克隆子数目及其相似性菌株如表 1 所示。

在活性污泥样品的克隆文库中, 21 个 OTU 分别属于细菌域的 5 个主要类群, 主要是  $\alpha$ -变形菌 ( $\alpha$ -proteobacterium)、 $\beta$ -变形菌 ( $\beta$ -proteobacterium)、 $\gamma$ -变形菌 ( $\gamma$ -proteobacterium)、 $\delta$ -变形菌 ( $\delta$ -proteobacterium) 和不可培养菌 (uncultured bacterium), 其中, 属于变形菌 (proteobacterium) 的克隆子占总数的 76.7%, 这与 Snaird 等<sup>[13]</sup>学者对常规活性污泥中菌群多样性的研究结论较为吻合, 即活性污泥池中的优势类群为 Proteobacteria 类群 (约占 81%)。研究同时表明, 在克隆文库中,  $\beta$ -变形菌是主要的优势菌群, 占文库比例的 39.8%; 其次某些不可培养菌 (uncultured bacterium) 和  $\gamma$ -变形菌 ( $\gamma$ -proteobacterium), 分别占文库比例的 22.33% 和 20.15%, 这与 Wagner 等学者根据对多篇关于废水生物处理反应器中细菌群落结构的研究报告的总结得出的结论一致, 即  $\beta$ -变形菌纲和拟杆菌纲是废水处理系统中的最优势类群<sup>[14]</sup>,  $\beta$ -变形菌不仅在数量上占有优势, 而且在有机物的降解、营养物质的去除以及絮状体结构的形成方面都起着重要作用<sup>[15]</sup>。在该系统中, COD<sub>cr</sub> 进水浓度为 333.7 mg/L, 出水浓度 26.0 mg/L, 去除率 91.6%, Proteobacteria 类群是 COD 去除的主要因素。

陶厄氏菌属 (*Thauera* sp.) 在克隆文库中的比例很大, 占 27.18%, 该菌属是一类反硝化细菌, 可以经反硝化作用去除污水中的 NO<sub>3</sub>-N<sup>[16]</sup>, 其在反硝化以及降解有机物, 特别是芳香族化合物的降解过程中起了非常重要的作用<sup>[17]</sup>, 而且这类菌在反硝化类型的废水处理装置中含有的比例较高<sup>[18]</sup>, 因此可

表 1 活性污泥样品主要细菌 16S rDNA 克隆文库分析结果

Table 1 Data of bacterial 16S rDNA clone library constructed with active sludge

系统类群	OUT 编号	含克隆数	所占比例/%	GenBank 中最大相似度细菌 (NCBI 登录号)	相似度/%
$\alpha$ -proteobacterium $\alpha$ -变形菌	OTU10	5	4.85	Uncultured <i>Roseomonas</i> sp. 玫瑰单胞菌属(DQ839351)	98
	OTU13	2	1.94	<i>Caulobacter</i> sp. 柄杆菌属(AF361188)	97
$\beta$ -proteobacterium $\beta$ -变形菌	OTU1	2	1.94	Uncultured bacterium clone(AY756593)	99
	OTU5	2	1.94	<i>Nitrosomonas</i> sp. 亚硝化单胞菌属(AJ621027)	99
	OTU6	2	1.94	Uncultured $\beta$ -proteobacterium (AF204250)	99
	OTU8	28	27.18	<i>Thauera</i> sp. 陶厄氏菌属(AJ315677)	99
	OTU9	5	4.85	Uncultured $\beta$ -proteobacterium (AB252908)	97
	OTU11	2	1.94	Uncultured soil bacterium clone(DQ378202)	97
$\gamma$ -proteobacterium $\gamma$ -变形菌	OTU4	2	1.94	<i>Methylobacter</i> sp. 甲基球菌属(AF016981)	97
	OTU7	6	5.83	Uncultured bacterium clone (AM086110)	97
	OTU15	13	12.38	Uncultured $\gamma$ -proteobacterium clone(AY509440)	95
$\delta$ -proteobacterium $\delta$ -变形菌	OTU12	5	4.85	Uncultured bacterium clone(AJ296570)	100
	OTU2	2	1.94	Uncultured bacterium clone(EF516519)	95
Uncultured bacterium 不可培养菌	OTU3	9	8.74	Uncultured bacterium clone(DQ499309)	97
	OTU14	12	11.65	Uncultured <i>Nitrospirae</i> bacterium 硝化螺旋菌(AB252944)	99

以认为北京高碑店污水处理厂的活性污泥具有较强的反硝化能力,这一点,可以由其对 TN 的去除率高达 70.1%进一步证实(TN 进水浓度 57.1 mg/L,出水浓度 17.1 mg/L)。

在本实验构建的克隆文库中,还发现了亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.)和硝化螺旋菌(uncultured *Nitrospirae* bacterium),分别占文库比例的 1.94%和 11.65%。亚硝化单胞菌属是一类氨氧化菌,负责将  $\text{NH}_4\text{-N}$  氧化为  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,是生物脱氮过程中的限速步骤。硝化螺旋菌是重要的亚硝酸盐氧化细菌,近年来的研究表明,在很多生境的硝化过程中,真正起亚硝酸盐氧化作用的可能是硝化螺旋菌属的细菌,而非硝化杆菌属(nitrobacter)这一传统硝化菌属的菌种<sup>[19-20]</sup>。正是在这两类菌的作用下,该系统才完成了对  $\text{NH}_4\text{-N}$  的去除,其中  $\text{NH}_4\text{-N}$  进水浓度 38.8 mg/L,出水浓度 3.78 mg/L,去除率 90.3%。这两类硝化细菌尤其是亚硝化单胞菌属,在活性污泥菌群中的比例较小,可能是由于它们自身生长缓慢,在与异养细菌共同生存时没有时空方面的竞争优势,从而受到抑制所致。

克隆文库中还发现了少量的玫瑰单胞菌属(*Roseomonas* sp.),占文库库容的 4.85%,该菌属是一类能够有效地降解有机磷农药的革兰氏阴性菌<sup>[21]</sup>,它的存在和该污水处理厂处理的一部分工业

废水有关。

用 OTU 代表克隆子的碱基序列构建在 GeneBank 数据库中进行 BLAST 比对,同源性检索后下载相应序列,绘制系统发育树(图 2)。结果表明,与活性污泥中细菌相似性较高的  $\beta$ -变形菌纲菌属主要是动胶菌属(*Z. ramigera*)、陶厄氏菌属(*Thauera* sp.)、亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.)和一些不可培养菌(uncultured bacterium); $\gamma$ -变形菌纲的细菌主要是甲基球菌属(*Methylobacter* sp.)和一些不可培养菌(uncultured bacterium); $\alpha$ -变形菌纲的细菌主要是柄杆菌属(*Caulobacter* sp.)和玫瑰单胞菌属(uncultured *Roseomonas* sp.);样品中属于  $\delta$ -变形菌纲的细菌大多是不可培养菌。

### 3 结论与建议

本研究表明,北京高碑店污水处理厂活性污泥系统中的细菌具有高度的多样性,通过克隆文库分析得出存在 5 个不同的细菌类群,优势细菌类群为变形菌,占克隆文库的 76.7%;细菌类群优势顺序为  $\beta$ -变形菌(占 39.8%)、不可培养菌(占 22.33%)、 $\gamma$ -变形菌(占 20.1%)、 $\alpha$ -变形菌(6.79%)和  $\delta$ -变形菌(4.85%)。克隆文库中的陶厄氏菌属(*Thauera* sp.)的比例很大,占文库的 27.18%,由于该类细菌



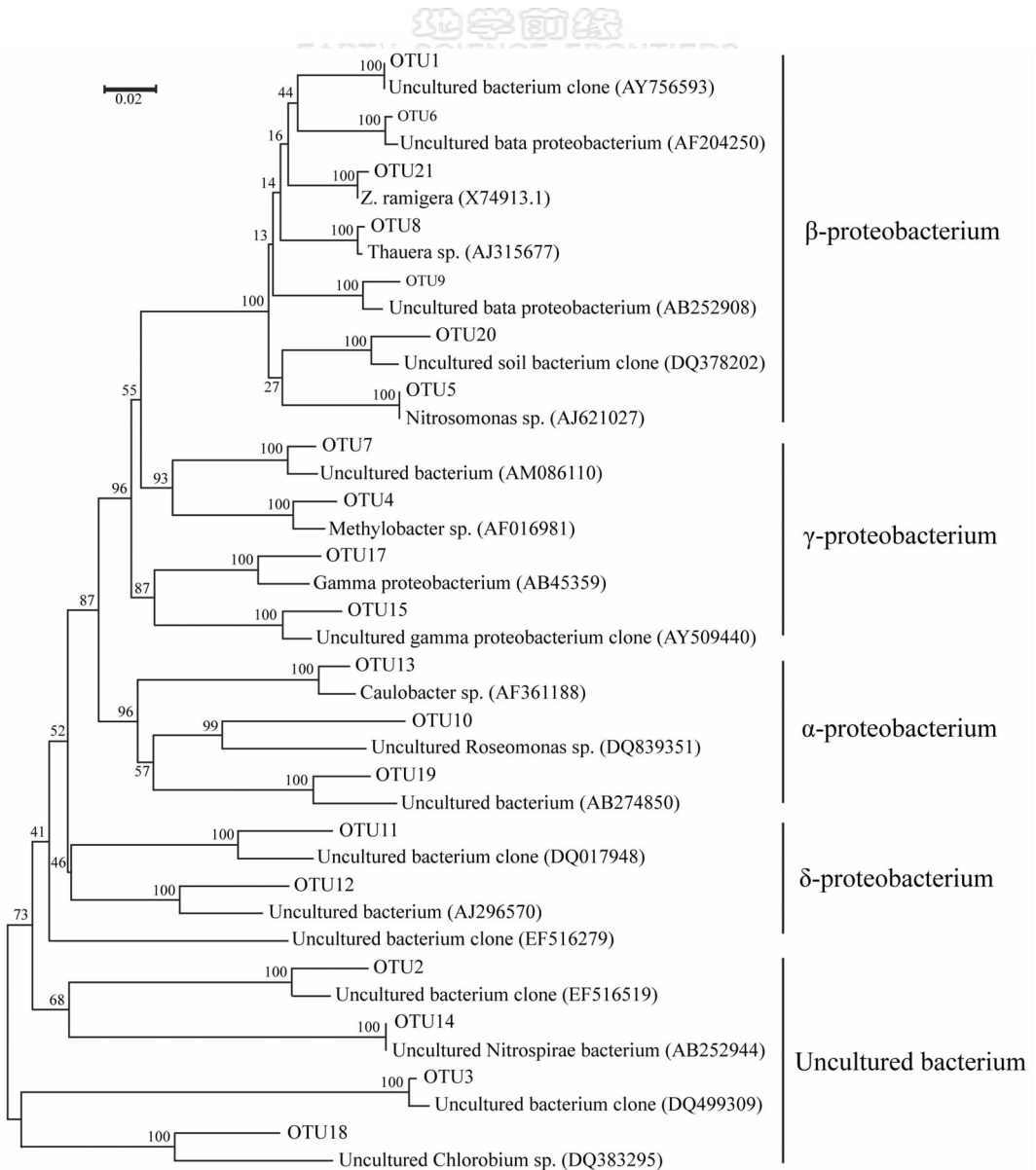


图2 活性污泥样品细菌系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the bacteria in active sludge

本文中的克隆子以 OTU 开头标识, 参照细菌序列引自 GenBank 数据库, 括号中的数字代表提交序号, 分支节点上的数字表示每 1 000 次 bootstrap 分析所支持的次数, 线段表示 2% 序列差异的分支长度

可以经反硝化作用去除污水中的  $\text{NO}_3\text{-N}$ , 经常出现在反硝化类型的废水处理装置中, 因此可以认为北京高碑店污水处理厂的活性污泥具有较强的反硝化能力, 其对 TN 的去除率为 70.1%。

克隆文库中发现了亚硝化单胞菌 (占 1.94%) 和硝化螺旋菌 (占 11.65%), 它们分别承担了反应系统中氨氧化和亚硝酸盐氧化的工作。由于硝化细菌自身生长缓慢, 在与异养细菌共同生存时没有时空方面的竞争优势, 从而导致其在文库中的比例较低。克隆文库中还发现了少量的能够有效地降解有

机磷农药的玫瑰单胞菌属 (占 4.85%), 与存在含磷的工业废水有关。

通过本研究, 建立了一套研究活性污泥样品菌群多样性的方法, 构建 16S rDNA 克隆文库可以定量的研究样品细菌多样性, 但耗时长, 工作量大, 不适合研究样品多样性动态变化规律, 因此可借助变性梯度凝胶电泳/温度梯度凝胶电泳技术, 对高碑店污水处理厂不同阶段活性污泥中的菌群分布进行分析, 进一步探讨其与处理效果之间的关系。

## References:

- [1] Wang H Y, Zhou Y X, Dai X, et al. Bacterial diversity study for the simultaneous nitrogen and phosphorus removal system (MDAT-IAT) by 16S rDNA cloning method[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2006, 26: 903-911(in Chinese).
- [2] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H, et al. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 1996, 59: 143-169.
- [3] Darby A C, Birkle L M, Tumer S L, et al. An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly[J]. FEMS Microbiol Eco, 2001, 36: 43-50.
- [4] Baker G C, Gaier S, Cowan D A, et al. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 200: 103-109.
- [5] Brambilla E, Hippe H, Hagelstein A, et al. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxel, McMurdo Dry Valleys, Antarctica [J]. Extremophiles, 2001, 5: 23-33.
- [6] Bond P L, Keller P H J, Blackall L L. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors [J]. Appl Environ Microbio. 1995, 61: 1910-1916.
- [7] Felske A, Wolterink A, van Lis R, et al. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 30: 138-145.
- [8] Schuppler M, Mertens F, Sch N G, et al. Molecular characterization of nocardioform actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analysis[J]. Microbiology, 1995, 141: 513-521.
- [9] Dai X, Zhou H, Chen Y Q, et al. A preliminary study on 16S rDNA diversity of bacteria in the sediments from Nansha sea area, South China Sea[J]. Progress in Natural Science, 2002, 12: 479-484(in Chinese).
- [10] Di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, et al. Biodiversity of a Burkholderia cepacia population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 4485-4493.
- [11] Thompson J R, Marcelino L A, Polz M F. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by "reconditioning PCR"[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30: 2083-2088.
- [12] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems[J]. Curr Opin Biotechnol, 2002, 13: 218-227.
- [13] Snaidr J, Amann R, Huber I, et al. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 2884-2896.
- [14] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 1995, 59: 143-169.
- [15] Manz W, Wagner M, Amann R, et al. In situ characterization of the microbial consortia active in two waste water treatment plants[J]. Water Res, 1994, 28: 1715-1723.
- [16] Cantafio A W, Hagen K D, Lewis G E, et al. Pilot-scale selenium bioremediation of San Joaquin drainage water with Thauera selenatis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 3298-3303.
- [17] Liu B B, Zhang F, Feng X X, et al. Thauera and Azoarcus as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 55: 274-286.
- [18] Shanghai Jiaotong University. A specificity molecule method on function flora in industrial wastewater treatment. China [S]. 200610116628. 3. Jul 11th, 2007(in Chinese).
- [19] Burrell P, Keller J, Blackall L. Characterisation of the bacterial consortium involved in nitrite oxidation in activated sludge [J]. Wat Sci Tech, 1999, 39: 45-52.
- [20] Lee H, Lee S, Lee J, et al. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 41: 85-94.
- [21] Jiang Y J, Deng Y M, Liu X R, et al. Isolation and identification of a bacterial strain JS018 capable of degrading several kinds of organophosphate pesticides[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46: 463-466(in Chinese).

## 参考文献:

- [1] 王海燕, 周岳溪, 戴欣, 等. 16S rDNA 克隆文库方法分析 MDAT-IAT 同步脱氮除磷系统细菌多样性研究[J]. 环境科学学报, 2006, 26: 903-911.
- [9] 戴欣, 周惠, 陈月琴, 等. 中国南海南沙海区沉积物中细菌 16S rDNA 多样性的初步研究[J]. 自然科学进展, 2002, 12: 479-484.
- [18] 上海交通大学. 工业废水处理中的功能菌群特异性分子检测方法. 中国[S]. 200610116628. 3. [2007-07-11].
- [21] 江玉姬, 邓优锦, 刘新锐, 等. 一株能高效降解几种有机磷农药的菌株 JS018 的鉴定[J]. 微生物学报, 2006, 46: 463-466.