

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2014.0540

王金玉,李旭东,刘庆华.2014.荧光定量 PCR 检测生物强化 SBR 系统中苯胺降解菌的数量变化[J].环境科学学报,34(7):1674-1679

Wang J Y, Li X D, Liu Q H. 2014. Monitoring of the number changes of aniline-degrading bacterium in bioaugmented system by quantitative Real-time PCR[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 34(7):1674-1679

荧光定量 PCR 检测生物强化 SBR 系统中苯胺降解菌的数量变化

王金玉^{1,2}, 李旭东^{1,*}, 刘庆华¹

1. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041

2. 中国科学院大学, 北京 100049

收稿日期: 2013-10-10

修回日期: 2013-12-04

录用日期: 2013-12-10

摘要:生物强化 SBR 系统中苯胺降解菌 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 在降解苯胺废水过程中发挥重要作用.本研究根据该菌株的邻苯二酚 1,2 双加氧酶 (C12O) 的基因序列,设计特异引物,扩增特异片段并克隆到 PGM-T 载体中,以此重组质粒为参照,系统活性污泥中提取的总 DNA 为模板,应用实时荧光定量 PCR 方法定量检测该菌在苯胺废水生物强化 SBR 系统中的丰度变化.同时应用高效液相色谱法检测系统中苯胺的残留.结果表明,苯胺初始浓度在 200~500 mg·L⁻¹ 范围内,苯胺降解率均达到 96% 以上.并且 SBR 反应系统活性污泥中每单位 (mg) MLVSS 的 C12O 基因拷贝数随苯胺浓度的升高而显著上升,最高拷贝数达到 2.7×10⁹ 个,表明该菌的数量随苯胺浓度的升高而显著上升.结果显示,在苯胺去除过程中 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 的投加能够稳定活性污泥中的 MLVSS,当含有高浓度苯胺废水系统运行稳定时,该降解菌逐渐成为活性污泥当中的优势菌.

关键词:荧光定量 PCR; *Pseudomonas otitidis* strain JY9; C12O; 苯胺降解率; 活性污泥

文章编号: 0253-2468(2014)07-1674-06

中图分类号: X703

文献标识码: A

Monitoring of the number changes of aniline-degrading bacterium in bioaugmented system by quantitative Real-time PCR

WANG Jinyu^{1,2}, LI Xudong^{1,*}, LIU Qinghua¹

1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

Received 10 October 2013;

received in revised form 4 December 2013;

accepted 10 December 2013

Abstract: Aniline-degrading bacterium, *Pseudomonas otitidis* JY9, plays an important role in bioaugmentating aniline degradation in sequential batch reactor (SBR). According to the sequence of Catechol 1,2-dioxygenase (C12O) gene from *Pseudomonas otitidis* strain JY9, a pair of specific primers for amplifying a fragment of this gene was designed and the amplification products were cloned to PGM-T vector. Using the recombinant plasmid as a reference and the total DNA abstracted from SBR activated sludge as a template, quantitative real-time PCR was performed to detect the changes of the abundance of this strain and aniline residue was detected by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results showed that the aniline degradation rate reached over 96% at aniline concentration of 200—500 mg·L⁻¹. Moreover, the copies of C12O increased obviously with the increasing of the aniline concentration, and the highest copy number of gene C12O reached 2.7×10⁹/mg MLVSS, indicating that *Pseudomonas otitidis* strain JY9 and the abundance of C12O increased rapidly. During the degradation of aniline, MLVSS concentration in activated sludge was stabilized by adding the strain JY9. When the SBR reactor steadily operated at high concentration aniline wastewater, the strain JY9 gradually become the dominant population in the activated sludge.

Keywords: quantitative Real-time PCR; *Pseudomonas otitidis* strain JY9; C12O; aniline degradation rate; activated sludge

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (No.KSCX2-EW\G-15); 四川省科技支撑项目 (No.2010SZ0207)

Supported by the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-EW-G-15) and the Sichuan Science & Technology Pillar Program (No.2010SZ0207)

作者简介: 王金玉 (1988—), 男, E-mail: jinyucool88314@126.com * 通讯作者 (责任作者), E-mail: lixd@cib.ac.cn

Biography: WANG Jinyu (1988—), male, E-mail: jinyucool88314@126.com * **Corresponding author**, E-mail: lixd@cib.ac.cn

1 引言(Introduction)

生物强化废水处理系统功能的发挥与该系统中功能菌的数量和种类有直接的关系 (Van Limbergen *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2002), 为了保证生物强化废水处理系统高效稳定的运行, 在运用 COD, BOD 以及目标物质的去除效果来评价强化系统的同时, 更需要对系统中功能菌数量的变化进行实时的检测. 此项数据的准确把握将为实际操作条件的优化, 工艺性能的改进提供重要的理论依据.

传统的活菌计数法 (CFU 法) 或最大然数计数法 (MPN 法) 存在耗时, 繁琐的缺陷, 而且由于分离培养技术的限制, 很难对培养条件苛刻的微生物进行研究 (李久安等, 2011; 朱海霞等, 2007). 目前在对环境中特定微生物丰度的研究中, 较多地应用 Southern blot 杂交技术 (马丽华等, 2005; 王建龙, 2003), 而应用 Southern blot 检测基因拷贝数则对操作要求高, 工作量大 (宣姚吉等, 2009). 近年来, 荧光定量 PCR 技术的迅猛发展为检测废水处理系统中功能菌数量的变化提供了一个新途径. 该方法可以通过定量表征功能菌中特征基因片段的数量来实时检测功能菌数量的变化. 与上述方法相比, 荧光定量 PCR 技术操作简便, 快捷. 具有很高的灵敏性和特异性, 其在检测废水处理系统中特定功能微生物, 如氨氧化细菌群、硝化菌群, 硫酸盐还原菌群, 产甲烷菌群等, 或特异基因, 如抗生素抗性基因, 毒力基因等的数量动态变化方面也得到了较广泛的应用 (Harms *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012; Ben-Dov *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2010; Volkman *et al.*, 2004; 孙婷婷等, 2013).

文中模拟了生物强化降解苯胺 SBR 反应器运行, 降解菌采用实验室保存的 *pseudomonas otitidis* strain JY9. 通过特异引物设计, 直接定位于该降解菌的功能基因片段 C120. 研究不同苯胺浓度条件下, C120 数量变化及其与苯胺降解率和生物强化反应器运行过程中表征活性污泥有机生物量的重要指标 MLVSS (混合液挥发性悬浮固体浓度) 之间的关系.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 实验菌株

苯胺降解菌 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 由实

验室筛选获得, 该菌株现保存于中国普通微生物菌种保藏中心, 保藏号: CGMCC NO. 7787, 大肠杆菌 XL-Blue1, 购自 Invitrogen 公司.

2.2 主要试剂及仪器

细菌基因组提取试剂盒 (DP302)、PGM-T 连接试剂盒 (VT202)、质粒小量快速提取试剂盒 (DP103)、胶回收试剂盒 (DP204)、荧光定量 PCR 酶 RealMasterMix SYBR Green (FP202) 均购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 低温冷冻离心机, 荧光定量 PCR 仪 (Bio-rad) 和微量核酸定量仪 Nanodrop2000 均购自 thermo 公司.

2.3 培养基

LB 培养基: NaCl: 10 g, 酵母粉: 5 g, 蛋白胨: 10 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0.

无机盐培养基: 无机盐培养基成分: Na_2HPO_4 : 2.52 g, KH_2PO_4 : 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.4 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0.

2.4 引物设计与合成

根据 Genbank 网站中公布的假单胞菌属 C120 基因序列保守区设计引物 PHO-RTs 和 PHO-RTas 见表 1. 引物合成由上海英潍捷基公司完成.

表 1 实验所用克隆 C120 基因的引物序列

Table 1 Primers for cloning C120 used in this study

引物 序列(5'-3') 扩增片段长度(bp) Tm ^a
PHO-RTs TTCACATCGTACATCACCT 299 58 °C
PHO-RTas GAGACCACCTCCTTCATC 58 °C

2.5 标准质粒构建

以苯胺降解菌 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 菌株的基因组为模板, PHO-RTs 和 PHO-RTas 为引物, 扩增 C120 基因. 回收目的片段, 16 °C 下与 PGM-T 载体连接, 构建含 C120 的标准质粒, 转化感受态大肠杆菌 XL-Blue1, 37 °C 过夜培养, 次日挑选白色菌落送检测序, 测序正确的质粒即为标准质粒命名为 T-PHO.

2.6 标准曲线建立

试剂盒法抽提质粒 T-PHO, 具体步骤参照说明书. 用微量核酸定量仪测定其浓度, 其浓度为 $67.4 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 重组质粒序列大小接近 3 Mb, 计算其分子量为 $1.98 \times 10^6 \text{ Da}$, 根据分子量和阿伏伽德罗常数 ($6.02 \times 10^{23} \text{ 分子数} \cdot \text{mol}^{-1}$), 计算其分子拷贝数为 $2.05 \times 10^{-8} \text{ 拷贝} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. 将质粒作十倍梯度稀释, 稀释成 $10 \sim 10^6$ 个拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, 分别以 $1 \mu\text{L}$ 各质粒浓度作为模板, 以 PHO-RTs 和 PHO-RTas 为引物进行荧光

定量 PCR. 每个浓度重复 3 次实验. 以仪器软件给出的 Ct 值作为纵坐标, 起始模板中质粒拷贝数的对数作为横坐标, 建立标准曲线.

2.7 荧光定量 PCR 试验

反应体系和反应条件: 反应体系为 20 μL , SYBR Green Realtime PCR Master 10 μL , DNA 模板 1 μL , 引物各 0.8 μL (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ddH₂O 7.6 μL . 反应条件: 预变性: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 4 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 35 个循环.

2.8 模拟生物强化苯胺降解 SBR 反应器装置

2.8.1 试验装置 SBR 反应器为有机玻璃制成, 如图 1 所示, 有效容积 1.5 L, 共采用 6 个相同的反应器, 其对应的反应器编号为 SBR-AS0—SBR-AS5. 反应器内设曝气头, 曝气量 1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 保持环境温度 25.0 $^{\circ}\text{C}\pm 0.5$ $^{\circ}\text{C}$. 由于反应器较小, 进排水时间基本可以忽略. 反应器运行周期: 沉淀时间 1 h, 曝气时间 10 h, 闲置时间 0.5 h, 进水后静止 0.5 h, 每个周期 12 h, 每天两个运行周期.

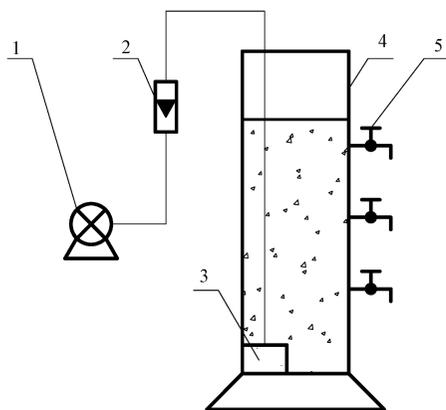


图 1 实验用 SBR 装置 (1. 曝气泵; 2. 流量计; 3. 曝气头; 4. SBR 反应器; 5. 取样口)

Fig. 1 SBR reactor used in study (1. Aeration pump; 2. Flowmeter; 3. Aeration tap; 4. SBR reactor; 5. Sampling port)

2.8.2 试验菌种和进水水质 试验用活性污泥取自成都第二污水处理厂二沉池的回流污泥, 向 6 个 SBR 反应器中加入活性污泥. 采用人工配制废水对其做短期驯化. 人工配制废水成分为: 蔗糖: 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 : 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaHCO_3 : 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NH_4Cl : 75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母膏: 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 MgSO_4 : 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 系统运行稳定后向 SBR-AS2—SBR-AS5 中加入一定量的苯胺, 使其终浓度依次为 200、300、400、500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 与此同时, 苯胺降解菌 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 经添加苯胺的无机盐培养基活化 24 小时, 当 OD_{600} 值接近于 1 时, 按照体积分数 2%

接种量分别等量地接种到 SBR-AS1—SBR-AS5 反应器中.

研究过程中设置两个空白对照 SBR-AS0 和 SBR-AS1, 其中 SBR-AS0 为不接种苯胺降解菌 *Pseudomonas otitidis* strain JY9, 并向其中添加终浓度为 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的苯胺; SBR-AS1 接种苯胺降解菌 *Pseudomonas otitidis* strain JY9, 接种量如上所述, 但不向其中添加苯胺.

2.8.3 DNA 提取 混合曝气阶段取泥水混合物 10 mL, 15000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 弃上清, 准确称取新鲜污泥 200 mg, 总 DNA 提取方法参照文献 (Boon *et al.*, 2000). 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 片段.

2.8.4 分析测试项目 苯胺浓度测定采用高效液相色谱法, 具体参数设置参照文献 (Ahmed *et al.*, 2010), MLVSS (混合液挥发性悬浮固体浓度) 的测定参考文献 (李晓雁等, 2009).

3 结果与讨论 (Results and discussion)

3.1 标准曲线的建立

标准曲线共设置 3 次重复, 每次重复 R^2 均大于 0.994, 标准曲线的斜率为 -3.14 ± 0.06 (图 2 所示), 变异系数 1.91%. 标准曲线 C_t 值标准偏差为 0.13~0.34, 变异系数为 1.11%~2.78% (表 2 所示). 表明所建立的标准曲线具有较好的重复性和精确度.

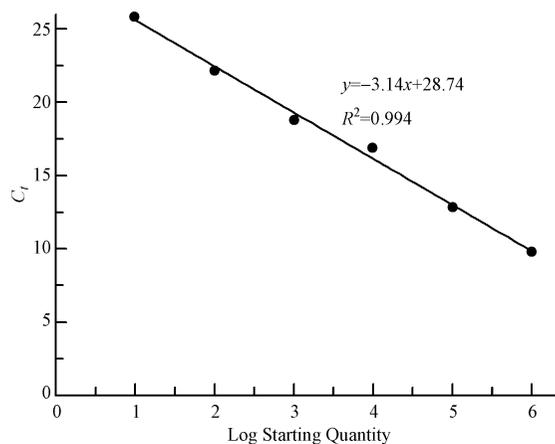


图 2 荧光定量 PCR 检测 C120 的标准曲线

Fig. 2 Standard curves of C120 monitored by real-time PCR

3.2 SBR 反应器中苯胺浓度对苯胺降解率的影响

如图 3 所示, 当苯胺终浓度在 200~500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 苯胺降解率在一个运行周期内均不受明显影响. 降解率均在 96.0% 以上. 而在空白对照 SBR-AS0 反应器中, 苯胺降解率仅为 11.94% (表 3). 显示了苯胺降解菌 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 在苯胺

快速降解过程中所起的关键作用。

表 2 标准曲线的重复性

DNA 量/ (拷贝数· μL^{-1})	C_i 值			SD	CV
	C120 基因				
	1	2	3		
10^6	9.18	9.00	8.94	0.13	1.38%
10^5	12.85	12.42	12.98	0.29	2.30%
10^4	16.82	16.69	16.33	0.25	1.52%
10^3	18.81	19.37	19.65	0.14	2.78%
10^2	22.17	22.54	22.13	0.25	1.11%
10^1	25.86	25.37	25.21	0.34	1.32%

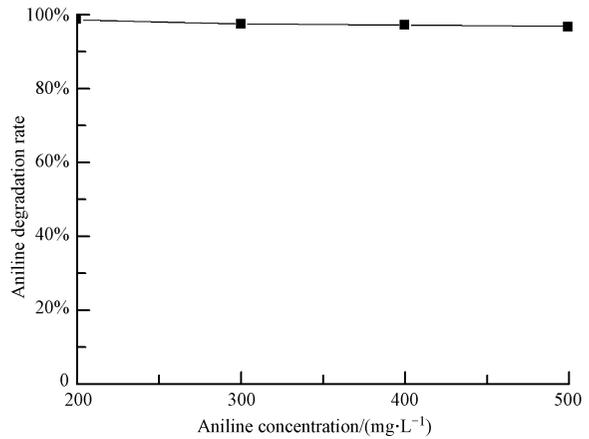


图 3 苯胺浓度对降解率的影响

Fig.3 Aniline degradations rate under different concentrations

表 3 SBR 反应器运行指标考察及 C120 定量拷贝数

反应器编号	进水苯胺浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	出水苯胺浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	苯胺去除率	MLVSS/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	C120/ (拷贝数· mg^{-1} (MLVSS))
SBR-AS0	200	176.13	11.94%	780	—
SBR-AS1	0	0	—	1970	4.2×10^3
SBR-AS2	200	9.92	97.2%	2790	1.8×10^6
SBR-AS3	300	15.56	96.1%	2480	5.4×10^7
SBR-AS4	400	18.17	96.0%	2570	9.2×10^8
SBR-AS5	500	13.26	97.4%	2630	2.7×10^9

3.3 苯胺浓度变化对 C120 数量和 MLVSS 的影响

利用上述实时荧光定量 PCR 检测 SBR 系统活性污泥在不同苯胺浓度下 C120 数量和 MLVSS 的变化。如图 4 和表 3 所示,随着在一定范围内苯胺浓度的逐渐升高,C120 的数量在显著上升,变化范围从 $1.8\times 10^6 \text{ mg}^{-1}$ 到 $2.7\times 10^9 \text{ mg}^{-1}$ 。然而在空白组 SBR-AS1 中,C120 的拷贝数仅有 4.2×10^3 个,与存在苯胺的反应器中的数量相差 3 到 6 个数量级。表明一定浓度范围内的苯胺对 SBR 系统中 C120 拷贝数量的提升有较强的促进作用,并且更高的 C120 拷贝数保证了高浓度苯胺的快速降解。当苯胺浓度在 $200\sim 500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,活性污泥中的 MLVSS 维持在 $2480\sim 2790 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的稳定水平,与空白组 SBR-AS1 的 MLVSS 相比较,微生物量的变化较为显著。间接表明苯胺降解菌 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 在苯胺降解过程中数量上得到了显著的增长。而空白组 SBR-AS0 的结果表明,在不存在苯胺降解菌 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 的条件下,苯胺无法得到有效的降解,并且一定浓度的苯胺显著降低了活性污泥当中的微生物量。这部分归因于苯胺具有

极强的生物毒性,在缺乏高效降解苯胺的功能菌时,高浓度的苯胺抑制了活性污泥中其他功能微生物的生长。

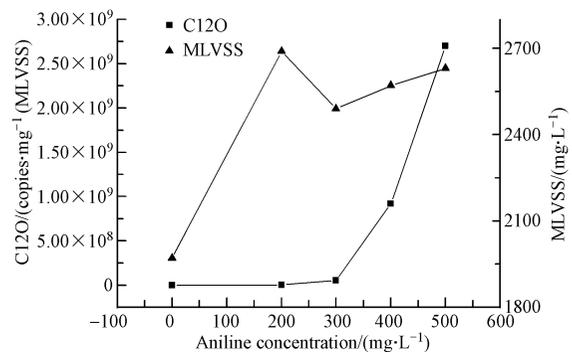


图 4 不同苯胺浓度下 C120 拷贝数及 MLVSS 变化情况

Fig.4 C120 copies and change of MLVSS under different aniline concentrations

4 讨论 (Discussion)

文中通过特异性引物的设计,直接定位于苯胺生物强化 SBR 反应器中所投加 *Pseudomonas otitidis*

strain JY9 的功能基因 C120.并建立了 C120 的 RT-PCR 检测体系,并且该体系具有较好的重复性,检测周期较短.该方法的建立为检测生物强化反应器中功能菌数量的变化提供了一定的参考.

随着 SBR 反应器中苯胺浓度的增加,C120 的拷贝数也在显著增加,高浓度苯胺的完全降解依赖于 C120 数量的增加,而单个细胞的 C120 拷贝数是固定的,因此,在实际应用中可以考虑向生物强化反应器中投加更多的功能菌剂来快速处理更高浓度的目标污染物.

SBR 反应器中活性污泥 MLVSS 的数值可表示活性污泥微生物量 (Arbuckle and Griggs, 1982; Li *et al.*, 2005). 实验结果表明降解菌 (*Pseudomonas otitidis* strain JY9) 的投加在稳定活性污泥中微生物量的过程中发挥了一定作用,在 SBR-ASO 反应器中由于受到苯胺的冲击并且没有投加高效降解苯胺的功能菌,活性污泥中 MLVSS 明显下降,这可能部分归因于苯胺较强的生物毒性作用.

随着 SBR 反应器中苯胺浓度的逐渐升高,每单位 (mg) MLVSS 中 C120 的数量在显著上升,由于 C120 拷贝在 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 单细胞中的数量是固定的,一定程度上表明 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 在 MLVSS 中的比重显著增加,当反应器运行稳定时,苯胺降解菌 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 逐渐成为反应系统活性污泥当中的优势菌.有学者 (Boon *et al.*, 2003) 在研究 3-氯苯胺冲击条件下,采用直接投菌的生物强化技术来保护活性污泥微生物群落的功能和结构时也发现,随着 3-氯苯胺的持续冲击, DGGE 图谱显示 8 d 之后,功能菌 *Comamonas testosteroni* 12 *gfp* 在污泥系统中成为优势菌,并且反应系统当中的硝化菌群代谢活力没有受到明显影响.本文的实验结果在一定程度上也符合了上述事实.

5 结论 (Conclusions)

1) 建立了生物强化苯胺降解 SBR 反应器中特征功能基因 C120 荧光定量 PCR 检测方法.为探究功能菌投加到反应器后,其存在状况与数量变化情况提供了重复性好,较为可靠的检测手段.

2) 随着反应器中苯胺浓度的逐渐升高,每单位 (mg) MLVSS 中,C120 拷贝数量在显著上升.高浓度苯胺的完全降解依赖于反应器中较高的 C120 拷贝数.

3) 在反应系统受到苯胺冲击时,苯胺降解菌的投加能够稳定活性污泥中的 MLVSS,当含有高浓度苯胺废水系统运行稳定时,降解菌 *Pseudomonas otitidis* strain JY9 逐渐成为活性污泥当中的优势菌.

参考文献 (References):

- Ahmed S, Nisar M F, Hussain K, *et al.* 2010. Isolation and characterization of a bacterial strain for aniline degradation [J]. *African Journal of Biotechnology*, 9(8): 1173-1179
- Arbuckle W, Griggs A A. 1982. Determination of biomass MLVSS in pact sludges [J]. *Journal Water Pollution Control Federation*, 54(12): 1553-1557
- Ben-Dov E, Brenner A, Kushmaro A. 2007. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes [J]. *Microbial Ecology*, 54(3): 439-451
- Boon N, Goris J, De Vos P, *et al.* 2000. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, 12*gfp* [J]. *Applied Environment Microbiology*, 66(7): 2906-2913
- Boon N, Top E M, Verstraete W, *et al.* 2003. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load [J]. *Applied Environment Microbiology*, 69(3): 1511-1520
- Hall S J, Hugenholtz P, Siyambalapatiya N, *et al.* 2002. The development and use of real-time PCR for the quantification of nitrifiers in activated sludge [J]. *Water Science Technology*, 46(1/2): 267-272
- Harms G, Layton A C, Dionisi H M, *et al.* 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant [J]. *Environment Science Technology*, 37(2): 343-351
- Li F S, Yuasa A, Obara A, *et al.* 2005. Aerobic batch degradation of 17- β estradiol (E2) by activated sludge: Effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures [J]. *Water Research*, 39(10): 2065-2075
- 李久安, 周后珍, 刘庆华, 等. 2011. 废水生物强化处理技术研究进展 [J]. *应用与环境生物学报*, 17(2): 273-279
- 李晓雁, 黄海东, 卢显芝, 等. 2009. 活性污泥中 PHA 合成优势菌的筛选及产物结构分析 [J]. *环境科学与技术*, 32(9): 124-128
- 马丽华, 张道方, 黄民生, 等. 2005. 活性污泥微生物分子生态学研究与进展 [J]. *净水技术*, 24(1): 33-35
- Song M, Shin S G, Hwang S. 2010. Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 101(Suppl 1): S23-S28
- 孙婷婷, 张崇森, 王晓昌, 等. 2013. 城市生活污水中志贺氏菌 *ipaH* 毒力基因的定量 PCR 检测 [J]. *环境工程学报*, 7(5): 1631-1635
- Van Limbergen H, Top E M, Verstraete W. 1998. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives [J].

- Applied Microbiology and Biotechnology, 50(1): 16-23
- Volkman H, Schwartz T, Bischoff P, *et al.* 2004. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan) [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2): 277-286
- 王建龙. 2003. 核酸杂交技术用于废水处理的微生物学研究[J]. *中国给水排水*, (5): 23-27
- Wang X H, Zhang Y, Wen X H, *et al.* 2012. Real-time PCR quantification of the population dynamics of ammonia-oxidizing bacteria in a pilot-scale wastewater treatment plant[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 66(10): 61-65
- 宣姚吉, 周祥山, 张元兴. 2009. 实时荧光定量 PCR 检测毕赤酵母基因组中外源基因拷贝数[J]. *中国生物制品学杂志*, 22(12): 1236-1239, 1243
- 朱海霞, 陈林海, 张大伟, 等. 2007. 活性污泥微生物菌群研究方法进展[J]. *生态学报*, 27(1): 314-322