

# TISTD 反应器中的菌群结构及生态变化

叶姜瑜<sup>a,b</sup>, 丁维<sup>a,b</sup>, 何强<sup>a,b</sup>, 孙兴福<sup>a,b</sup>

(重庆大学 a. 城市建设与环境工程学院; b. 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400045)

**摘要:**以两相一体式污泥浓缩消化反应器(Two-phase Integrated Sludge Thickening and Digestion reactor, TISTD)为对象,研究了反应器稳定运行期间菌群结构及反应器负荷改变时其内部生态结构的变化。在以30%的投配率稳定运行时,从产酸相和产甲烷相分别取样、培养和分离出20株优势菌属。选取其中6株进行了16S rDNA序列分析,分属于芽孢杆菌属、产甲烷螺菌属和产甲烷球菌属。在投配率分别为10%、20%、30%以及启动期和系统崩溃期5个时期采取10组样品,对其污泥进行DNA提取、纯化和16S rDNA PCR扩增及温度梯度凝胶电泳(Temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)电泳检测等。结果表明:中温下反应器中微生物菌群呈多样性分布,生态系统复杂稳定,维持了反应器的正常功能;反应器不同负荷时期污泥DNA提取及扩增效果良好;TGGE图谱分析表明,投配率20%、30%时的群落结构相似度最高,污泥中生物含量丰富,支撑了TISTD在污泥浓缩下良好的消化效果。

**关键词:**TISTD; 菌群结构; 温度梯度凝胶电泳; 多样性; 16S rDNA; 生态系统

**中图分类号:**X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-4764(2011)01-0147-06

## Microbial Community Structure and Ecological Variation in TISTD Reactor

YE Jiang-yu<sup>a,b</sup>, DING Wei<sup>a,b</sup>, HE Qiang<sup>a,b</sup>, SUN Xing-fu<sup>a,b</sup>

(a. College of Urban Construction and Environmental Engineering; b. Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment, Ministry of Education, Chongqing 400045, P. R. China)

**Abstract:** Based on the sewage treatment device of Two-phase Integrated Sludge Thickening and Digestion reactor (TISTD), microbial community structure in stable operation and its ecological variation when load changes are investigated. During a stable operation with 30% sludge dosage rate, 20 dominant bacterial strains are individually isolated from acid-phase and methane-phase of the reactor. Sequence analysis of 16S rDNA reveals that six of the achieved strains belong to Bacillus, Methanospirillum and Methanococcus respectively. Ten sludge samples are collected separately in 5 periods when the reactor operates with 10%, 20% and 30% sludge dosage rate and in the state of started-up and disordered, and followed by DNA extraction, purification, 16S rDNA PCR amplification and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). The good quality of DNA extraction and amplification demonstrates that there is an abundant biomass in the sludge under mid-temperature condition. The results show that TISTD reactor has a high biodiversity in microbial communities and is complex and stable in ecosystem structure, which effectively supports the good digestion in sludge thickening.

**Key words:** TISTD; microbial community structure; TGGE; diversity; 16S rDNA; ecosystems

收稿日期: 2010-05-29

基金项目: 科技部国际合作项目(2007DFA90660); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07315-003)

作者简介: 叶姜瑜(1963-), 男, 副教授, 博士, 从事环境微生物学及微生物生态学研究, (E-mail) yejy8888@163.com.

在传统厌氧处理工艺中,由于产酸菌群和产甲烷菌群在生理、营养需求、生长速度及环境因子敏感度等方面的巨大差异,造成这二者的平衡非常脆弱<sup>[1]</sup>。两相厌氧技术是着重于工艺变革而非反应器结构的改造的一项生物处理新工艺<sup>[2]</sup>,它把酸化和甲烷化 2 个阶段分离在 2 个串联反应器中,使产酸菌和产甲烷菌各自在最佳环境条件下生长,充分发挥其各自的活性。针对污水厂污泥处理的难题,发展的两相一体式污泥浓缩消化反应器(Two-phase Integrated Sludge Thickening and Digestion reactor, TISTD)能够集污泥浓缩消化功能于一体,但其中的微生物学基础还远未得到调查和阐明<sup>[3]</sup>。从微生物生态学角度看,虽然产酸相中主要有产酸发酵细菌存在,产甲烷相中有产甲烷细菌存在,但整个系统也包含多种其它菌群<sup>[4-5]</sup>。反应器运行的稳定性和效率在很大程度上取决于其中微生物种群多样性以及优势种群的活性<sup>[6]</sup>。不同条件下反应器运行的稳定性及效率与系统群落结构的变迁有必然的联系。传统的微生物纯培养技术可以分离出一部分功能菌株,却不足以充分反映环境中微生物多样性的丰度和范围,现代分子生态学技术为研究未培养微生物提供了新的途径<sup>[7-8]</sup>。

该研究运用传统纯培养技术结合 16S rDNA 序列分析法和 PCR-TGGE 技术,对不同运行条件下两相厌氧反应器中的微生物种群结构及优势种群进行了调查和分析,解读两相厌氧反应器中微生物多样性及其演替规律。

## 1 试验装置与方法

### 1.1 TISTD 系统装置及运行

试验的 TISTD 设备流程如图 1 所示。首先将

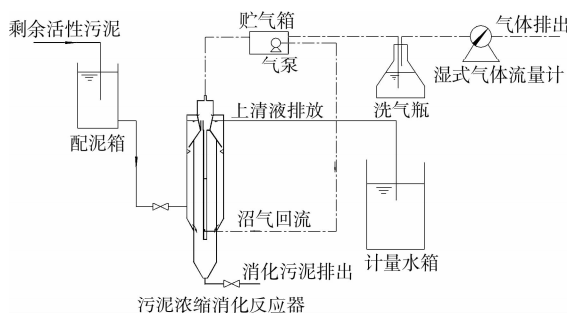


图 1 TISTD 系统装置及运行示意图

回流污泥泵站的剩余活性污泥提升至高位配泥箱,在重力作用下经阀门控制进入反应器中。污泥从反应器外反应室底部进入,经浓缩及一定的水解预酸后由底部的过水孔进入内反应室,在内反应室完成

产甲烷相的反应,消化污泥由反应器底部排出,沼气由气液分离器顶部经洗气瓶和湿式气体流量计计量后排至室外,上清液由外反应室上部排入体积计量水箱并计量上清液体积。

### 1.2 采样方法

中温条件下,反应器投配率为 30% 时,分别从 TISTD 反应器的产酸相(外反应器)和产甲烷相(内反应器)取样,用于污泥中微生物的分离和培养。中温条件下,在反应器的启动期,投配率为 10%、20%、30% 以及反应器的崩溃期等 5 个时期分别取样,取样点为内反应室和外反应室,每次取样后于当天提取污泥总 DNA。

### 1.3 菌株的分离与培养

菌株分离自重庆大学 TISTD 反应器,该反应器中污泥的初始来源为重庆鸡冠石污水处理厂。所有分离和培养均在厌氧工作站(Bugbox)中进行。

取样用灭菌后充满  $N_2$  的 100 mL 三角瓶盛取,样品取自反应器中下部,通过阀门直接引流。样品呈黑色,稀泥状或不规则颗粒状,有臭味。采用产甲烷菌培养基,其配方及制备方法参考 Zehnder (1977)<sup>[9]</sup> 和孙征<sup>[10]</sup> 等人所用培养基改进而成。取 1 g 样本,在厌氧工作站内采用 10 倍梯度稀释法计数,无菌移液管取 0.5 mL 加入平板,无菌刮涂布后放置于厌氧工作站培养;7 d 后计数,划线法分离纯化菌株;优势菌株被染色后在显微镜下做形态观察。

### 1.4 菌株 16S rDNA 序列分析

用于 16S rDNA 扩增的 PCR 反应引物为通用引物,按文献 [11] 设计,正向引物 8F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 反向引物 1495R: CTACGGCTACCTTGTTACGA。PCR 反应体系总反应体积为 25  $\mu$ L,其中含 16  $\mu$ L 双蒸水,2.5  $\mu$ L Buffer (含  $Mg^{2+}$ ),引物稀释到 10 pmol  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>,P1 和 P2 各 1  $\mu$ L,DNA 模板 2  $\mu$ L,2U Taq 聚合酶(鼎国生物技术有限公司)。以 TE 取代模板 DNA 做空白对照。温度设置:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min;56 $^{\circ}$ C 退火 1 min;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 结束反应。所得产物由琼脂糖电泳检测,委托商业机构进行测序。

### 1.5 污泥总 DNA 的提取

在 10 mL 无菌离心管中加入 8 mL 泥水混合液,以 8 000  $r \cdot \min^{-1}$  的速率在 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min,弃上清;在离心管中加入灭菌双蒸水 8 mL,振荡悬浮污泥,再以 8 000  $r \cdot \min^{-1}$  的速率在 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min,弃上清。该步骤重复 3 次。污泥洗涤后,在离

心管中加入 2 mL DNA 提取缓冲液(STE 缓冲液: 20 mL 5 mol · L<sup>-1</sup> NaCl; 10 mL 1 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH=8.0; 2 mL 0.5 mol · L<sup>-1</sup> EDTA pH=8.0), 以及 40 uL 蛋白酶 K(10 mg · mL<sup>-1</sup>), 将污泥与溶液混合均匀, 在 37℃ 下置于水平振荡器上以 225 r · min<sup>-1</sup> 的速率振荡 30 min 结束后, 加入 2 mL 10% 的 SDS, 混合均匀置于 65℃ 水浴 2 h, 期间每 10 min 轻摇一次。最后样品于 8 000 r · min<sup>-1</sup> 的速率离心 10 min, 取上清置于冰上留用。

在 DNA 上清液中加入等体积的酚-氯仿(1:1), 轻缓混合使溶液呈乳浊液。乳浊液在室温下以 8 000 r · min<sup>-1</sup> 的速率离心 5 min, 上层水相转移至另一无菌离心管, 此步骤重复 3 次。最后水相中加入等体积氯仿, 混合均匀至乳浊状, 室温下 8 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 水相转移至另一无菌离心管, 该步骤重复 3 次。用 40 uL 的 3 mol · L<sup>-1</sup> 乙酸铵和 4 mL 无水乙醇沉淀 DNA, -20℃ 下放置 30 min 后在 10 000 r · min<sup>-1</sup> 的速率下离心 20 min。用 2 mL 的 70% 乙醇洗涤沉淀, 在 10 000 r · min<sup>-1</sup> 的速率下离心 10 min, 小心吸去上清, 室温下使残留的液体挥发至干。将 DNA 沉淀溶于 100 uL 灭菌的双蒸水中。粗制 DNA 采用 DNA 纯化试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司)纯化, DNA 样品于 -20℃ 保存备用。

### 1.6 16S rDNA V3 区扩增与 TGGE 电泳

扩增引物按文献[12]进行设计, 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司(Invitrogen Biotechnology Co., Ltd)合成。引物 P1 序列为: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'; 引物 P2 序列为: 5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGC ACGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'。

PCR 反应体系的组成和反应条件如下: 总反应体积为 25 uL, 其中含 16 uL 双蒸水, 2.5 uL Buffer (含 Mg<sup>2+</sup>), 引物稀释到 10 pmol · uL<sup>-1</sup>, P1 和 P2 各 1 uL, DNA 模板 2 uL, 2U Taq 聚合酶(鼎国生物技术有限公司)。以 TE 取代模板 DNA 做空白对照。温度设置: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 45 s;

55℃ 退火 1 min; 72℃ 延伸 45 s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min 结束反应。

PCR 产物分析: PCR 产物(25 uL)用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 电泳液为 TBE 缓冲液(0.1 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 硼酸, 0.002 mol · L<sup>-1</sup> EDTA, pH=8.0), 电压为 4 V · cm<sup>-1</sup>, 电泳时间为 1 h, 以 1 kb 梯度 DNA 为标准分子量, 电泳结果在凝胶成像系统上观察。

TGGE 制胶所需溶液配制: 尿素 24 g, 丙烯酰胺 3.896 g, 甲叉双丙烯酰胺 0.103 8 g, 甲酰胺 10 mL, 100% 甘油 50 uL, 50 × TAE 1 mL, 10% APS 80 uL, 100% TEMED 110 uL, 以超纯水定容至 50 mL。

TGGE 温度梯度及电压设置: 300 V, L0: 20℃, L10: 20℃, 10 min; 0 V, L0: 42℃, L10: 60℃, 10 min; 155 V, L0: 42℃, L10: 60℃, 18 h。

TGGE 银染操作流程: 配制固定液 300 ~ 400 mL, 10% 冰乙酸, 固定 20 min; 以去离子水洗涤 3 次, 每次 2 min; 用 400 mL 0.1% AgNO<sub>3</sub> 和 500 uL 37% 甲醛混合液银染 25 min; 以去离子水洗涤 3 次, 时间依次为 30 s, 1 min, 30 s; 取 15 g NaOH, 0.19 g 四硼酸钠, 溶解定容至 1 000 mL, 加入 1.5 mL 甲醛进行显影; 在条带开始出现时用固定液终止。实验结果在凝胶成像系统上观察与成像, Quantity One 软件对成像结果进行分析。

## 2 试验结果与讨论

### 2.1 微生物形态观察及优势种属序列分析

为解读 TISTD 系统内外反应室中的微生物种群, 特别是对厌氧微生物的定性和定量分析, 首先对各反应室污泥进行了光学显微镜和扫描电镜观察; 然后在厌氧工作站中, 利用稀释培养法对污泥进行了厌氧性分离纯化和计数, 并从内、外反应室各选出 10 株细菌, 分别编号为 N1-N10 和 W1-W10; 还对各反应室中数量最多的 3 个样本进行了 16S rDNA 测序分析和鉴定。其扫描电镜结果如图 2, 反应室中厌氧菌计数见表 1。

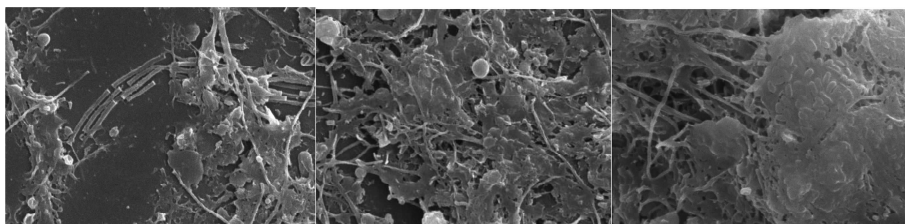


图 2 TISTD 系统内部反应室污泥微生物的扫描电镜照片

表 1 内外反应器中污泥的菌落计数结果

菌落编号 <sup>①</sup>	计数结果/ (CFU · g <sup>-1</sup> )	菌落编号 <sup>①</sup>	计数结果/ (CFU · g <sup>-1</sup> )
N1	1.6 × 10 <sup>3</sup>	W1	1.3 × 10 <sup>4</sup>
N2	2.4 × 10 <sup>3</sup>	W2	1.8 × 10 <sup>3</sup>
N3	1.8 × 10 <sup>3</sup>	W3	8.6 × 10 <sup>4</sup>
N4	2.8 × 10 <sup>4</sup>	W4	2.6 × 10 <sup>5</sup>
N5	3.0 × 10 <sup>4</sup>	W5	2.2 × 10 <sup>3</sup>
N6	4.8 × 10 <sup>4</sup>	W6	1.3 × 10 <sup>4</sup>
N7	1.2 × 10 <sup>3</sup>	W7	1.1 × 10 <sup>4</sup>
N8	2.2 × 10 <sup>3</sup>	W8	1.4 × 10 <sup>3</sup>
N9	8.0 × 10 <sup>2</sup>	W9	2.4 × 10 <sup>5</sup>
N10	4.0 × 10 <sup>2</sup>	W10	1.6 × 10 <sup>3</sup>

注:① N1—N10 分离自内反应室;W1—W10 分离自外反应室

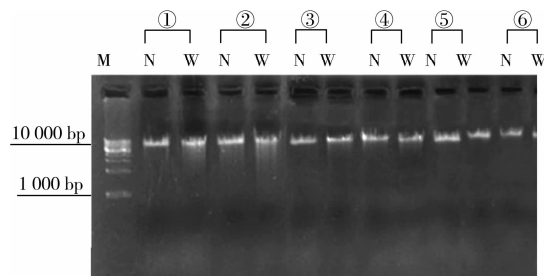
在外反应室的污泥中,微生物种类较多,有各种形态的变形虫、鞭毛虫和纤毛虫等,呈团状存在或零星分布,说明外反应室是污泥水解酸化阶段的主要场所。从光学显微镜分析和图 2 的扫描电镜观察可以看出,内反应室污泥中菌群种类复杂,细胞形态包括球状、杆状和丝状等,并有许多菌胶团存在,说明厌氧环境下的内反应器有着丰富的微生物种群多样性。

厌氧工作站为厌氧微生物的培养提供了良好的条件,可以进行厌氧细菌的计数分析。但从表 1 中可以看出,采用稀释活菌落计数法的测定,发现反应室中厌氧细菌数目并不高。这很可能由于反应室中许多细菌属于未培养微生物<sup>[7]</sup>,这从后面 TGGE 条带的分析可以得到证实。从可培养厌氧细菌中选出数量最多的 6 株编号为 N4、N5、N6、W3、W4 和 W9 的菌株进行 16S rDNA 测序分析,BLAST 比对后发现分属 *Bacillus*、*Methanospirillum* 和 *Methanococcus* 3 个属,依次为亨氏甲烷螺菌(*Methanospirillum hungatei*)、杂色甲烷球菌(*Methanococcus aeolicus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*)和假坚强芽孢杆菌(*Bacillus pseudofirmus*)。该结果表明,TISTD 反应器中的可培养种群大部分为通常厌氧性甲烷形成中的主要功能菌群,它们为该反应器良好的处理性能提供了主要支撑<sup>[3]</sup>。不过,传统方法的局限性以及未培养微生物的存在<sup>[6-7,13]</sup>,要更加精确反映系统内部微生物种群的生态结构、动态变化,仍需运用现代分子生态学手段作为后续研究。

## 2.2 污泥总 DNA 提取及扩增产物分析

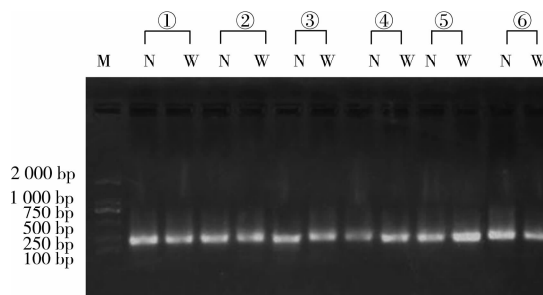
很多研究表明,总 DNA 的提取方法及效果对

微生物多样性的分析有重大影响<sup>[14]</sup>。经过多次预实验,实验采用“酚-氯仿抽提法”实现 DNA 的有效提取,其结果如图 3。DNA 纯度是影响 PCR 成功的关键<sup>[15]</sup>。因此,对系统中污泥总 DNA 经过了纯化扩增,结果见图 4。



M:1kbp DNA Ladder Marker;N:反应器内反应室;W:反应器外反应室;① TISTD 反应器启动期;② 投配率 10%;③ 投配率 20%;④ 投配率 30%;⑤ 反应器崩溃期;⑥ 污水处理厂中试运行阶段。

图 3 污泥总 DNA 凝胶电泳图谱



M:1kbp DNA Ladder Marker;N:反应器内反应室;W:反应器外反应室;① TISTD 反应器启动期;② 投配率 10%;③ 投配率 20%;④ 投配率 30%;⑤ 反应器崩溃期;⑥ 污水处理厂中试运行阶段。

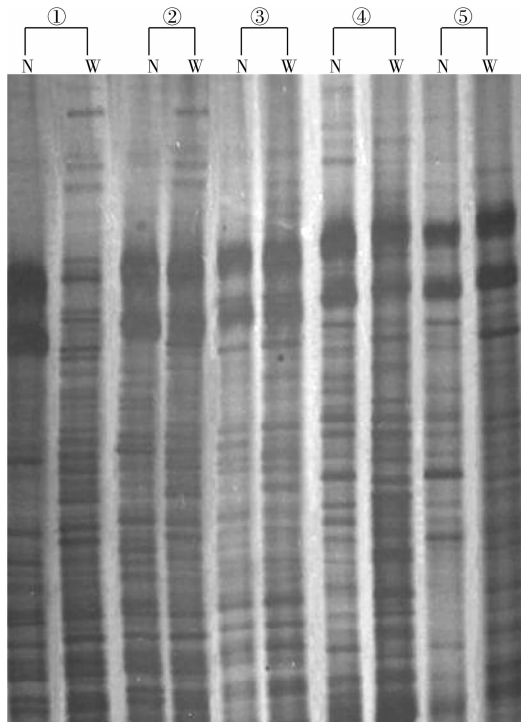
图 4 总 DNA V3 区 PCR 扩增图谱

从图 3 来看,污泥总 DNA 条带明显,亮度较高,大小约为 10 kb,无明显拖尾和 RNA 干扰现象。此结果表明系统中污泥微生物含量丰富,采用“酚-氯仿抽提法”可实现 DNA 的有效提取,DNA 提取效果较好。从图 4 对总 DNA V3 区的 PCR 扩增可见,扩增后条带清晰、明亮,大小约为 250 bp 左右,没有非特异性条带,表明扩增后的 PCR 产物纯度高,不含 PCR 反应抑制物,可满足后续分子生物学技术应用的要求。

## 2.3 TISTD 反应器微生物多样性分析

温度梯度凝胶电泳系统(Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE)近年来逐渐代替化学变性剂的 DGGE 法,避免制胶烦琐、运行时间长以及缓冲液积贮等问题,已广泛应用于微生物种群多样性检测中。为比较种群结构,传统上将 TGGE 凝胶上每个以相同速率迁移的条带视为一个分类操作

单元,每个单元代表一个种属<sup>[16]</sup>。从理论上讲,该法可以将群落中多种细菌种属分开,谱带明显程度与该种属在整个群落结构中的比例成正相关。对 TISTD 系统中污泥进行 PCR 扩增,然后进行 TGGE 电泳,结果见图 5。利用 Quantity One 软件对内、外反应室分别进行条带分析和聚类,得到图 6 和图 7。



N:内反应室;W:外反应室;①投配率 10%;②投配率 20%;③投配率 30%;④反应器启动期;⑤反应器崩溃期。

图 5 TISTD 反应器不同负荷污泥 TGGE 图谱

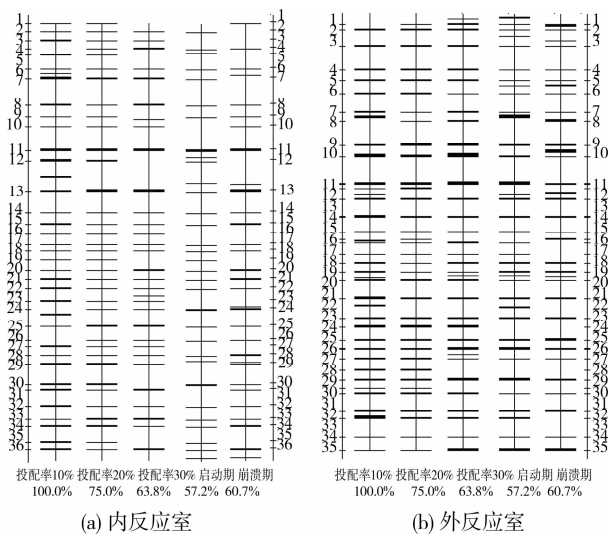


图 6 TISTD 系统条带识别与相似性比率图 (以投配率 10%为对比泳道)

从图 5 可以看出,中温下 5 个时期污泥 TGGE

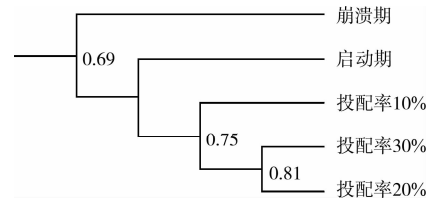


图 7 不同条件下 TISTD 系统中微生物种群相似性关系

图谱均有多个条带,这说明微生物种群呈多样性分布,表明该反应器在中温条件下能够维持多种微生物的存在,有利于满足反应器承受高冲击负荷。从不同取样时期来看,反应器中微生物优势菌群也呈现一定的差异,表明系统中种群结构随反应器负荷改变而出现相应的动态变化。从图 6 的条带识别和相似度比较(以投配率 10%记为 100%)可以看出,在内反应室中,投配率 10%与投配率 20%条件下微生物种群相似度最高;而在外反应室中,10%投配率与投配率 20%、投配率 30%相似度都高,计算表明投配率 20%与投配率 30%时,微生物种群相似度在 81%。从图 7 可以看出,各条件下微生物种群的总相似度也以投配率 20%和投配率 30%时为最高。

在内反应室中,8、9、11、13、15、17、20、31、33、34 和 36 等条带在各条件下都存在和明显,呈优势条带,随反应器负荷的改变其所占比重变化不大,其中以 7 和 25 为启动器、崩溃期缺乏或较弱的种群,应该是甲烷产生菌群。外反应室中以 3、4、5、9、10、11、14、18、22、24、29 和 31 等为优势条带,其中 3、10、24 和 31 等为启动期、崩溃期缺乏或较弱的条带,应该是维持外反应室水解酸化的特征性谱带种群,是支持反应器污泥消化稳定运行的关键性菌株;此外,外反应室的 3 号条带也不出现在内反应室,在系统崩溃期数量大量减少,表明此菌株只能在水解酸化阶段起作用,而且抗负荷冲击能力不强。内反应室的 24 号、外反应室 9 号与 10 号之间的菌株,都只存在于系统崩溃期,为此时期的特有种群,很可能是引起崩溃的主导性细菌;外反应室 18 号条带的菌株在崩溃期基本上消失,也表明该菌不能适应崩溃期生长条件,是系统正常运行的支撑性种群。后续研究应该对各特征条带进行种属鉴定和研究,可以获得更多可靠信息用于分析 TISTD 系统中的微生物群落结构与组成。

### 3 结论

1) TISTD 反应器中可培养的优势细菌主要为 *Bacillus*、*Methanospirillum* 和 *Methanococcus* 3 个属中,皆为酸化和甲烷产生菌等功能种群,为该反应器良好的处理性能提供了主要支撑。

2) TISTD 反应器中微生物数量充足、种群丰

富,呈较高的多样性分布,是该反应器稳定运行的重要基础和保证。中温下投配率 30%与投配率 20%时反应器中微生物种群相似度最高。特别是投配率 30%时,优势种群明显、功能菌株活性较强、种类稳定,符合此环境下反应器运行效率为最优条件的结论。

3)在相同投配率时,内外反应器中优势菌群种类有明显不同的优势种群起作用,且种群多样性分布较好。崩溃期微生物种群多样性未发现明显降低,但部分其它时期未见微生物种群出现,表明它们在崩溃期起重要作用,是系统运行不稳定的主要生物因子。

#### 参考文献:

- [1] 李东伟,王克浩,李斗,等. 两相厌氧消化的研究现状及展望[J]. 水处理技术, 2007, 33(12): 1-6.  
LI DONG-WEI, WANG KE-HAO, LI DOU, et al. Progress in and prospect of researches on Two-Phase Anaerobic Digestion(TPAD)[J]. Technology of Water Treatment, 2007, 33(12): 1-6.
- [2] 凡广生,李多松. 两相厌氧消化工艺的研究进展及其应用[J]. 能源环境保护, 2006, 20(1): 10-13.  
FAN GUANG-SHENG, LI DUO-SONG. Research development and its application of two phase anaerobic digestion[J]. Energy Environmental Protection, 2006, 20(1): 10-13.
- [3] 何强,杨巍,刘鸿霞,等. 两相一体式污泥浓缩消化反应器的性能研究[J]. 中国给水排水, 2009, 25(11): 15-21.  
HE QIANG, YANG WEI, LIU HONG-XIA, et al. Performance of two-phase integrated sludge thickening and digestion reactor[J]. China Water & Wastewater, 2009, 25(11): 15-21.
- [4] YOSHIDA H, TOKUMOTO H, ISHII K, et al. Efficient, high-speed methane fermentation for sewage sludge using subcritical water hydrolysis as pretreatment[J]. Bioresour Technol, 2009, 100(12): 2933-2939.
- [5] SONG M, SHIN S G, HWANG S. Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater [J]. Bioresour Technol, 2010, 101(S1): 23-28.
- [6] 叶姜瑜,罗固源,吉芳英,等. 污水生物处理功能微生物的多样性[J]. 重庆大学学报:自然科学版, 2005, 28(10): 119-123.  
YE JIANG-YU, LUO GU-YUAN, JI FANG-YING, et al. Functional microbial diversities in wastewater biological treatment [J]. Journal of Chongqing University: Natural Science Edition, 2005, 28(10): 119-123.
- [7] 叶姜瑜,罗固源. 未培养微生物的研究与微生物分子生态学的发展[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5): 111-115.  
YE JIANG-YU, LUO GU-YUAN. Progress in the biodiversity of nonculturable microorganisms and microbial molecular ecology[J]. Microbiology, 2004, 31(5): 111-115.
- [8] GOMEZ-VILLALBA B, CALVO C, VILCHEZ R, et al. TGGE analysis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72(2): 393-400.
- [9] WELLINGER A, WUHRMANN K. Influence of sulfide compounds on the metabolism of Methanobacterium strain AZ [J]. Arch Microbiol, 1977, 115(1): 13-17.
- [10] 孙征,周宇光,东秀珠. 一个甲烷杆菌新种的描述和系统分类学研究[J]. 微生物学报, 2001, 41(3): 265-269.  
SUN ZHENG, ZHOU YU-GUANG, DONG XIU-ZHU. Characterization and phylogenetics of a new species of genus methanobacterium [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(3): 265-269.
- [11] VERSALOVIC J, KOEUTH T, LUPSKI J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [12] WATANABE K, TERAMOTO M, FUTAMATA H, et al. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(11): 4396-4402.
- [13] SANZ J L, KOCHLING T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(2): 119-133.
- [14] DE LIPTHAY J R, ENZINGER C, JOHSEN K, et al. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2004, 36(10): 1607-1614.
- [15] STACH J E, BATHE S, CLAPP J P, et al. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 36(23): 139-151.
- [16] MEDINA-PONS F J, TERRADOS J, ROSSELLO-MORA R, et al. Application of temperature gradient gel electrophoresis technique to monitor changes in the structure of the eukaryotic leaf-epiphytic community of Posidonia oceanica[J]. Marine Biology, 2008, 155(4): 451-460.