

彭永臻,高守有. 分子生物学技术在污水处理微生物检测中的应用[J]. 环境科学学报,2005,25(9):1143-1147

PENG Yongzhen, GAO Shouyou. The applications of molecular biological tools to microbial ecosystem analyses in wastewater treatment process [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2005, 25(9):1143-1147

[免审稿件]责任编辑提示:本刊欢迎广大读者针对免审稿件提出各种意见

分子生物学技术在污水处理微生物检测中的应用

彭永臻^{1,2,*}, 高守有¹

1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090

2. 北京工业大学北京市水质科学与水环境恢复工程重点实验室, 北京 100022

收稿日期:2005-04-16 修回日期:2005-07-04 录用日期:2005-07-04

摘要:对现代分子生物学技术在污水生物处理系统微生物检测和群落分析中的应用进行了系统总结,重点对应用较多的 PCR 技术、FISH 技术进行了介绍并对其优缺点进行了探讨.通过对生物处理系统中微生物检测和生态学研究,可以分析确定系统中功能微生物的数量,群体结构和活性,从而实现构建人工强化生态系统,提高废水生物处理效率的目的.分析认为,以 DNA 序列和相关的结构基因为基础的分子生物学技术已经在污水生物处理系统的种群分析方面得到了广泛和成功的应用,而且必将会对深入认识和优化污水生物处理过程,加快新工艺的开发和应用以及强化处理工艺的过程控制方面起到更大的作用.

关键词:污水生物处理; 分子生物学技术; 微生物群落分析

文章编号:0253-2468(2005)09-1143-05 中图分类号:X832 文献标识码:A

The applications of molecular biological tools to microbial ecosystem analyses in wastewater treatment process

PENG Yongzhen^{1,2,*}, GAO Shouyou¹

1. School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090

2. Key Laboratory of Beijing for Water Quality Science and Water Environment Recovery Engineering, Beijing Polytechnic University, Beijing 100022

Received 16 April 2005; received in revised form 4 July 2005; accepted 4 July 2005

Abstract: The use of molecular biological tools to microorganism detections and community analyses in the biological wastewater treatment process had been discussed, and the major points were put on the more frequently used techniques such as polymerase chain reaction (PCR) and fluorescence in situ hybridization (FISH). The advantages and disadvantages of each technique were analyzed. Through the detections and analyses, the information of the amounts, the community structures and the activities of the microorganism in the system could be obtained, so these informations can be used to build enhanced ecosystem and to strengthen the efficiency of the existed system. It is believed that, the molecular biological tools based on the DNA sequences and the relevant structure genes have been successfully used in community analyses in the biological wastewater treatment process, and will surely help to get a deeper insight into and optimize the biological treatment process. Furthermore, it will promote the developments and applications of novel techniques, and play an even more important role in the process controlling of the biological wastewater treatments.

Keywords: biological wastewater treatment; molecular tools; analyses of microorganism community

生物法作为一种传统的污水治理方法在揭示污水中复杂微生态系统方面存在很大的局限性.传统的微生物记数方法,如平板培养法,用于环境生物学研究时存在许多不足:环境中只有不超过十分之一的微生物可以培养,而活性污泥中生存的主要细菌群落不一定都能用培养的方法分析;不能充分揭示

生物反应器的实时的、有意义的信息;当特定微生物系统不具竞争性且相关的结构基因未被诱导出来时,传统方法就不可能检验该系统降解污染物的能力;传统的显微方法难于获得微生物群落结构和空间分布的有关信息,因而不利于根据微生物群落多样性的变化以迅速判断环境的变化 (Schramm

基金项目:国家自然科学基金(No. 50521140075);国家“863”重大科技专项项目(No. 2003AA601010)

作者简介:彭永臻(1949—),男,教授(博士),E-mail: pyz@bjut.edu.cn; * 通讯作者(责任作者)

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 50521140075); National Basic Research Program of China (No. 2003AA601010)

Biography: PENG Yongzhen (1949—), male, professor (Ph. D.), E-mail: pyz@bjut.edu.cn; * Corresponding author

et al., 1996). 采用分子生物学方法可有助于解决上述问题. 20 世纪 90 年代, 分子生物学方法被应用到废水的生物处理过程中, 以确定废水中的菌群组成、动态变化以及主要的功能菌群. 以 16rDNA 序列和相关的结构基因为基础的分子生物学技术, 为鉴别和量化环境中特定微生物的系统发育群体提供了强有力的工具. 利用分子生物学技术可以进行菌群动态跟踪和功能种群鉴定, 揭示菌群结构与功能的关系, 从而更好地控制生物处理过程. 此外, 采用重组 DNA 技术所建立的基因工程微生物对于培育优良功能菌群, 提高生物处理效率和节省成本等方面均具有重要意义. 本文对分子生物学技术基本理论及其在污水微生物检测中的应用进行综述.

1 聚合酶链反应(PCR)技术

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)是 20 世纪 80 年代后期由 K. Mullis 等建立的一种体外酶促扩增特异 DNA 片段的技术, PCR 是利用针对目的基因所设计的一对特异寡核苷酸引物, 以目的基因为模板进行的 DNA 体外合成反应. 由于反应循环可进行一定次数(通常为 25 ~ 30 个循环), 所以在短时间内即可扩增获得大量目的基因. 这种技术具有灵敏度高、特异性强、操作简便等特点. PCR 技术的基础是只有在微生物特定核酸存在的条件下, 重复性酶促 DNA 合成和扩增才能够发生(Metcalf *et al.*, 2003). PCR 扩增产物可通过琼脂糖凝胶电泳来检验和纯化, 也可以被用来克隆、转化和测序. 在具体应用中往往采用经过修正的或与其它技术联合应用的 PCR 衍生技术, 如 RT-PCR、竞争 PCR、PCR-DGGE、PCR-SSCP 和巢式 PCR 等.

RT-PCR 以检测只含有 RNA 的病毒而著称, RNA 首先必须被一种相反的转录酶转变为 DNA. Selvaratnam 等人(1997)用 *dmpN* 基因的 PCR 扩增来检测间歇式反应器中的降解酚的假单胞菌(*Pseudomonas*). 在该研究中, RT-PCR 不仅能检测出微生物降解酚的能力, 还能测量出 *dmpN* 基因的转录水平, 从而确定该假单胞菌特殊的分解活性. 已有研究结果表明, 在转录水平、酚浓度、通气阶段之间存在正相关.

竞争性 PCR(competitive PCR)是一种定量 PCR, 通过向 PCR 反应体系中加入人工构建的带有突变的竞争模板、控制竞争模板的浓度来确定目的模板的浓度, 从而对目的模板作定量研究. 竞争性 PCR

曾被用来测定受多环芳香烃污染的沉降物中的编码邻苯二酚-2,3-加双氧酶的 *dmpB* 基因的浓度(Tiper *et al.*, 1992). 对 PCR 扩增 *dmpB* 的基因片段进行人工改造, 可使其带有一个 40bp 大小的缺失, 作为 PCR 扩增的竞争模板. 因此, 竞争模板的 PCR 产物就比目的模板的 PCR 产物短. 用竞争性 PCR 对二者进行共扩增, 通过与竞争模板的浓度进行比较, 可对沉降物中 *dmpB* 基因的浓度进行定量分析.

传统的显微镜观察和培养分离技术可分离取得单一菌株进行鉴定分析, 但这种方法受到微生物可培养性的限制, 实际分离出的菌株往往只占样品中微生物种类很小的一部分. 同时, 由于环境样品中微生物种群结构十分复杂, 因此, 对其中菌种进行培养分离和鉴定存在周期较长和工作量大等问题. 应用 PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction Denaturing Gradient Gel Electrophoreses)方法对环境微生物进行研究就可以不经过培养, 直接从样品中提取细菌的 DNA, 再将编码有 16SrDNA 的基因进行扩增. 通过这种方法能够直接了解样品中微生物分布结构, 并能大致比较相同条件下单一菌群的生物量. 王峰等(2004)采用 PCR-DGGE 技术来分析活性污泥与生物膜中微生物种群的结构, 可以不经过常规培养而直接从活性污泥和生物膜样品中提取 DNA; Marsh 等(1998)利用 PCR-DGGE 分析并获得了活性污泥中真核微生物的种群变化情况; Nicolaisen 等(2002)利用 PCR-DGGE 技术发现 *Nitrosomonas-like* 细菌是上流式好氧流化床颗粒污泥中的主要氨氧化菌. 以上的事实均说明, PCR-DGGE 结合测序技术是一种完全可行的适于环境样品微生物研究的快速分析方法.

单链构象多态性技术(Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP)是随着对人类基因组的研究而发展起来的用于检测碱基突变的技术. 近年来, SSCP 在微生物鉴定中的发展为其在群落分析中的应用奠定了基础. 采用 PCR 与 SSCP 联用技术可通过比较 PCR 扩增菌株的 rRNA 图谱对细菌进行快速鉴定. Zumstein 等(2001)以荧光 PCR-SSCP 技术对运行了长达两年的流化床厌氧反应器中的真细菌和古细菌的群落动态情况分别进行了跟踪监测, 能够检测到 45 株真细菌和 7 株古细菌参与了反应器酒糟厌氧发酵过程; 在外部参量恒定的条件下, 真细菌的群落种类组成变化很快, 而古细菌却相对稳定. Delbes 等(2001)便采用 PCR-SSCP 技术研究了厌氧反应器在崩溃和恢复时期真细菌和古细菌的群落动

态情况,其中螺旋菌在整个过程中的含量较高,一梭菌(*Clostridium*sp)伴随着乙酸的积累活性升高,而大量的高活性的古细菌群从利用氢产甲烷到利用乙酸产甲烷的转变过程中,是反应器恢复的主要贡献者.

PCR 通过对待测 DNA 片段的特异性扩增,一方面作为菌株定性鉴定的重要手段,同时也为定性和定量研究微生物的群落特征提供帮助.自 PCR 技术问世以来,通过其自身的不断完善以及同其它相关技术的联用,在污水生物处理微生物的检测和鉴定方面得到了长足的发展,为该领域的研究提供了一个高效、灵敏、简便的研究工具.尽管 PCR 技术是目前检测某些不能进行培养的病毒(如 *Norwalk virus*)的唯一手段,但从 PCR 技术的使用方面来看,还存在一定的缺点和不足之处(Tiper *et al.*,1992):可分析样品容量小;存在环境样品中干扰物质的抑制作用;一般情况下,属于非定量的研究;不能检测分辨微生物的活性(从理论上讲,任何可以提供核酸物质的样品都可以进行 PCR 扩增)等.例如,PCR 扩增片段长度一般不超过 2kb;PCR-DGGE 必须选择合适的电泳条件以提高对 DNA 片段的分辨率;在巢式 PCR 过程中存在难以避免的非特异性扩增;Taq DNA 聚合酶在合成时易发生错误以及费用比较昂贵等局限性(Zumstein *et al.*,2000).鉴于以上问题,PCR 技术尚有待于进一步的改进.相信随着科研水平的不断进步还会有更多更先进的 PCR 相关新方法被发现.

2 限制性片段长度多态性(RFLP)分析

在进行限制性片段长度多态性(Restrictive Fragment Length Polymorphism, RFLP)分析过程中,DNA 从混合微生物群落中被提取出来,通过分析以提供该群落的基因指纹信息.利用限制性内切核酸酶将被扩增的 DNA 切成片段;限制性酶对 DNA 的剪切能够避开靶基因区;利用限制性酶切后的 DNA 片段大小不同,通过电泳可以进行分离. RFLP 分析的优点是不必进行放射性标记的探针杂交就可以观察到结果.Liu 等(1998)利用 RFLP 研究了缺氧-好氧 SBR 反应器内,不同碳源和不同碳磷比条件下, Glycogen-accumulating organisms (GAOs) 与 Polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) 的富集与竞争情况; Jane 等(1998)采用 PCR 联合 RFLP 技术对于废水菌群中 *Poliovirus* 进行了分析鉴定.

3 寡核苷酸探针技术

寡核苷酸或者核酸探针方法通常通过鉴别和列

举群落内微生物的遗传信息以反映群落结构,其原理是特定微生物的特定核酸序列存在于 rRNA 或者 DNA 中.针对 rRNA 的寡核苷酸探针是最直接的一种途径.寡核苷酸探针被构造为代表微生物目标基因信息的单链 DNA,碱基对数量可以少至 15 到 18,多至超过 100.探针的碱基序列与目标细胞的 RNA 上的某个区域互补.控制检测条件,可使探针 DNA 与目标细胞的 RNA 被适当固定.当 RNA 被适当固定,可以将未杂交的探针冲洗掉,只留下与目标 RNA 杂交的探针;通过检测杂交探针就能确定目标 rRNA 的存在以及数量.

寡核苷酸杂交作用可以通过两种基本方法进行,比较传统的方法是狭线印迹法,这种方法要求把 RNA 从样品中提取出来.目前比较常用的做法是不需要进行 RNA 提取的荧光原位杂交.

荧光原位杂交技术(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性,能够在自然的微生物环境中检测和鉴定不同的微生物个体,并提供污水处理过程中微生物的数量、空间分布和原位生理学等信息. FISH 技术的基本原理是通过荧光标记的探针在细胞内与特异的互补核酸序列杂交,通过激发杂交探针的荧光来检测信号从而对未知的核酸序列进行检测.

Nielsen 等(2001)对工业废水处理厂活性污泥的细菌表面疏水性进行了原位检测,并应用 FISH 技术结合细胞表面微球体分析研究了丝状细菌的胞外聚合物. Konuma 等(2001)运用 FISH 法来测定氨氧化菌(*ammonia-oxidizing bacteria*)的数量,结果表明, FISH 法对氨氮含量高的活性污泥混合液检测结果较好,但对氨氮含量低的污水厂出水和河水的检测效果不佳.表 1 列举了 FISH 技术的一些应用实例.

表 1 FISH 技术在废水中微生物检测的具体应用实例

Table 1 The applications of FISH in the microorganism detections in wastewater

应 用	文献来源
检测活化污泥反应器中的 <i>Microthrix parvicella</i>	(Eberl <i>et al.</i> ,1997)
在 EBPR 系统中,考察聚磷菌(PAOs)的微生物特性和生化特性	(Mino <i>et al.</i> ,1998)
探明废水处理湿地生物膜中影响氨氧化的主要功能菌群	(Silyn-Roberts <i>et al.</i> ,2001)
揭示 UASB 反应器中高温和中温颗粒污泥的厌氧微生物群落的空间分布和多样性	(Sekiguchi <i>et al.</i> ,2002; Syutsubo <i>et al.</i> ,2001)
鉴定了活性污泥中硝化细菌群落数量和空间分布	(Coskuner <i>et al.</i> ,2002)
SBR 反应器内,不同电子受体条件下,反硝化除磷菌(DNPAOs)的种群变化	(Johuan <i>et al.</i> ,2002)

寡核苷酸探测技术最大的特点是能够将探针设计成具有不同的特异性,以获得群落结构信息.然而,由于 FISH 检测的精确性和可靠性依赖于探针的特异性,因此,探针的设计和评价十分重要.对于未被培养的细菌的检测,应首先采用杂交方法对探针进行鉴定,以此来判断探针是否合理,否则就要重新分离菌株并设计探针.此外,假阳性结果的出现也是 FISH 技术的一个缺陷.由于一部分微生物自身荧光会干扰检测结果,目前已知在一些细菌如假单胞菌属、军团菌属、世纪红蓝菌、蓝细菌属和古细菌如产甲烷菌中均存在荧光特性.环境样品中自发荧光的生物或化学残留物的自身荧光特性也使应用 FISH 分析环境微生物变得复杂.因此,在检测未知混合菌群时要进行防止自身背景荧光干扰的处理,以防止假阳性的发生.

近年来,多种检测技术的联合应用在各个领域内的研究中不断被采用,其中 FISH 技术与其它技术的结合也为环境微生物学研究提供了更多的信息. Zhang Dan 等 (2004) 应用 PCR-DGGE 结合测序技术和 FISH 技术研究了两阶段限氧自养硝化-反硝化生物脱氮系统中限氧亚硝酸化过程中,氨氧化细菌的种群变化和数量情况,结果表明,在稳定的亚硝酸盐积累阶段, *Nitrosomonas* 占到所有氨氧化细菌总数的 72.5%. FISH 技术与共聚焦激光扫描显微镜和多光子显微镜的应用可获得清晰的图像;与微传感器的结合也是 FISH 技术在环境微生物学中应用的又一新的技术手段.

4 DNA 生物传感器

生物传感器设计的理论基础是固定化生物层与目标污染物之间的专一性作用.基于生物催化和免疫原理的生物传感器在环境领域得到了广泛的应用 (Mascini, 2001). 尽管以核酸探针为敏感元件的传感器在环境检测中的应用尚处于起步阶段,但分子生物学与生物技术的发展为研究 DNA 生物传感器提供了可能.核酸杂交生物传感器的理论基础是 DNA 碱基配对原理,其高度专一性的 DNA 杂交反应与高灵敏度的电化学检测器相结合形成的 DNA 杂交生物传感器除了可用于微生物的核酸序列分析、微量污染物的检测外,还可用于研究污染物与 DNA 之间的相互作用,为解释污染物毒性作用机理提供了可能.

Chiti 等 (2001) 开发了电化学 DNA 传感器进行

水体中 *aromatic amines* 的检测;Wang 等 (1996) 开发出了 DNA 杂交生物传感器并用于环境样品的微生物检测,如水体中病原菌 *Cryptosporidium* 的测定、*Escherichiacoli* 的测定等.这类传感器的研究包括核酸探针固定化的优化、杂交反应条件、指示剂的结合与检测等.杂交过程并不是一个简单的在液相中探针与 DNA 片段按碱基配对规则形成双链的反应.影响杂交的因素很多,特别要注意影响杂交反应动力学和效率的因素,包括杂交时间、离子强度、探针长度、序列和杂交温度等,以保证其高度专一性和灵敏度.

5 DNA 重组技术

20 世纪 70 年代初,限制性核酸内切酶的发现为 DNA 重组技术的建立揭开序幕. DNA 重组技术的实质是,将两个或多个单独的 DNA 片段连接起来产生一个能在特定宿主中自主复制的 DNA 分子.其基本程序是:外源 DNA 的获得;选择载体并进行处理;将目的 DNA 片段和处理后的载体连接;将连接产物导入合适的宿主细胞内,使重组 DNA 分子在宿主细胞内复制扩增;将转化菌落在平板培养基上培养成单个菌落,筛选获得含有重组 DNA 的阳性克隆.

在废水的处理过程中仅靠分离和筛选的功能性微生物是不够的.如上所述,在混合的微生物群体中筛选特定的微生物菌种时往往得不到预期的结果;特定的微生物可能难以培养,从而无法应用到实际的生物反应器中;人类排放到环境中的污染物越来越复杂且难以处理.因此,有必要通过基因工程技术并根据具体的需要构建有效的基因工程菌或培育出可高效降解复杂多样的有害污染物的细菌来解决以上的问题.

指示菌在废水的微生物动态检测中具有重要意义.由于指示菌具有较高的存活力且对环境中的特定物质的变化比较敏感,所以采用指示菌可以迅速、明确地反映污水中成分的改变情况.运用分子生物学技术中的基因重组技术可以把特定的基因整合到某些微生物的基因组中,再把这些基因工程菌释放到特定环境中,从而达到对环境进行监测的目的.必须明确的是,作为指示菌的基因工程菌至少应具有如下特点:含有易于被扩增、检测和定量的外源基因;在特定环境中具有较高的存活力;对环境中的特定物质的变化比较敏感. Hwang 和 Farrand (Hwang *et al.*, 1994) 把一种单胞菌 (*Pseudomonas*) 进行基因工程处

理,使其包含甘露醇冠瘿碱分解代谢的基因,通过在冰草氨酸和甘露氨酸中生长,这些微生物可以从环境样品中提取出来,对菌株构建时产生的融合区域进行 PCR 扩增,就可以进行灵敏的特异性检测。

6 展望

以 DNA 序列和相关的结构基因为中心内容的分子生物学技术在 20 世纪 80 年代完成了创始阶段,进入了在全世界的普及阶段,并且在医学、生物学、环境工程学和考古学等领域不断有新的进展,手段日新月异。分子生物学与多种技术联合应用所产生的时间效益和经济效益进一步证实了这一技术的实用性,同时也预示着它将在未来各个领域研究中的良好应用前景。相信随着分子生物学技术、环境工程检测技术的发展并结合我们已经掌握的微生物群落结构和功能方面的知识,我们将会逐渐了解到污水生物处理系统中微生物群体的多样性、实际生存状态、功能特点,从而更有效地对其加以开发和利用。

参考文献 (References):

- Coskuner G, Curtis T P. 2002. In situ characterization of nitrifiers in an activated sludge plant: Detection of *Nitrobacter* spp [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 431—437
- Delbes C, Møletta R, Gøden J J. 2001. Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem [J]. *Fems Microbiol Ecol*, 35: 16—28
- Giacomo C, Giovanna M, Marco M. 2001. Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring [J]. *Analytica Chimica Acta*, 427:155—164
- Hwang I, Farrand S K. 1994. Molecular biology of bacterial bioluminescence [J]. *Appl Environ Microbiol*, 60: 913—920
- Johwan A, Tomotaka D, Satoshi T, et al. 2002. Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay [J]. *Wat Res*, 36:403—412
- Konuma S, satoh H, Mino T. 2001. Comparison of enumeration methods for ammonia-oxidizing bacteria [J]. *Wat Sci Tech*, 43(1):107—114
- Leo E, Renate S, Aldo A, et al. 1997. Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities[J]. *Fems Microbiology Letters*, 149(1):20:77—83
- Liu W T, Marsh T L, Forney L J. 1998. Determination of the microbial diversity of anaerobic-aerobic activated sludge by a novel molecular biological[J]. *Wat Sci. Tech*, 37(3):417—422
- Marsh TL, Liu W T, Forney L J. 1998. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge [J]. *Wat Sci Tech*, 37(4—5): 455—460
- Mascini M L. 2004. Affinity electrochemical biosensors for pollution control [J]. *Pure Appl Chem*, 73 (1):23—30
- Metcalf, Eddy, Inc. 2003. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse (Fourth Edition)* [M]. Beijing: Tsinghua University Press:129—130
- Mette H N, Niels B R. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 50:189—203
- Mino T, Van Loosdrecht M C M, Heijnen J J. 1998. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process[J]. *Wat Res*, (32):3193—3207
- Nielsen J L, Mikkelsen L H, Nielsen P H. 2001. In situ detection of cell surface hydrophobicity of probe-defined bacteria in activated sludge [J]. *Wat Sci Tech*, 43(6):97—103
- Schramm A, Larsen L H, Revsbech, et al. 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 62: 4641—4647
- Sekiguchi Y, Kamagata Y, Ohashi A, et al. 2002. Molecular and conventional analyses of microbial diversity in mesophilic and thermophilic upflow anaerobic sludge blanket granular sludge [J]. *Wat Sci Tech*, 45(10):19—25
- Sellwood J, Litton P A, McDermott J, et al. 1995. Studies on wild and vaccine strains of poliovirus isolated from water and sewage [J]. *Wat Sci Tech*, 31(5—6):317—321
- Selvaratnam S, Shoedel B A, McFarland B L, et al. 1997. Application of the polymerase chain reaction and reverse transcriptase/PCR for determining the fate of phage-degrading *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in a bioaugmented sequencing batch reactor [J]. *Appl Environ Microbiol*, 47: 236—240
- Slynn Roberts G, Lewis G. 2001. In situ analysis of *Nitrosomonas* spp. in wastewater treatment wetland biofilms [J]. *Wat Res*, 11 (35): 2731—2739
- Simon T. 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater[J]. *Wat Res*, 33(17):3545—3556
- Syutsubo K, Sinthurat N, Ohashi A, et al. 2001. Population dynamics of anaerobic microbial consortia in thermophilic granular sludge in response to feed composition change [J]. *Wat Sci Tech*, 43(1):59—61
- Tiper H G, Imhoff J F. 1992. The genera *Phodocyclus* and *Rubribibax* [J]. *Springerlag*, 1: 2557—2561
- Wang F, Fu Y G. 2004. Characteristics of municipal sewage chem-biofloculation treatment process by using PCR-DGGE technology[J]. *Environmental Science*, 25(6):74—80 (in Chinese)
- Wang J, Chicharro M, Rivas G, et al. 1996. DNA biosensor for the detection of hydrazines [J]. *Anal Chem*, 68(13):2251—2254
- Zhang D, Zhang D M, Liu Y P, et al. 2004. Community analysis of ammonia oxidizer in the oxygen-limited nitrification stage of OLAND system by DGGE of PCR amplified 16S rDNA fragments and FISH [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 16(5):838—842

中文参考文献:

- 王 峰,傅以钢. 2004. PCR-DGGE 技术在城市污水化学生物絮凝处理中的特点 [J]. *环境科学*, 25(6):74—80