

# 传统活性污泥法和膜生物反应器驯化期微生物群落组成特征

李安峰, 骆坚平, 黄丹, 潘涛 (北京市环境保护科学研究院国家城市环境污染控制工程技术研究中心, 北京 100037)

**摘要** [目的]比较传统活性污泥法(S1)和膜生物反应器(MBR, S2)工艺微生物群落之间的差异。[方法]通过 MiSeq 高通量测序平台, 分析处于驯化期的 S1 和 S2 工艺中微生物群落结构组成。[结果]从 S1 和 S2 分别获得 47 354 和 51 882 条有效序列, 平均长度为 253 bp。在 97% 相似性水平下, 从 S1 和 S2 分别可确定 2 693 和 3 208 个操作分类单元(OTU), 其中有 1 156 个 OTU 为相同单元。S1 和 S2 的丰度指数(Chao 1)分别为 6 639.3 和 9 564.1, Shannon 指数为 9.03 和 9.13。系统进化分析结果表明, 两种处理系统中活性污泥的优势菌群均为变形菌门(Proteobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes); 同时, 硝化螺旋菌门(Nitrospirae)在 MBR 中更易富集, 所占比例要高于传统活性污泥法。[结论]在驯化期中, MBR 和传统活性污泥法均具有较高的微生物多样性以及相似的优势菌群结构。由于对微生物的高效过滤作用, 驯化期 MBR 中微生物群落多样性更为丰富。

**关键词** 传统活性污泥法; 膜生物反应器; 高通量; 微生物群落

中图分类号 S181.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)01-189-03

## Microbial Community Characteristics of Traditional Activated Sludge Process and MBR in Acclimation Period

LI An-feng, LUO Jian-ping, HUANG Dan et al (National Engineering Research Center for Urban Environmental Pollution Control, Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection, Beijing 100037)

**Abstract** [Objective] To compare the microbial community characteristics in a traditional activated sludge process (S1) and membrane bioreactor (MBR, S2). [Method] MiSeq high-throughput sequencing was used to investigate the microbial community characteristics in S1 and S2. [Result] The results showed that 47 354 and 51 882 reads with an average read length of 253 bp were found from S1 and S2, respectively. At the similarity level of 97%, 2 693 and 3 208 operational taxonomic units (OTUs) were obtained from S1 and S2, respectively, and number of common OTUs was 1 156. The richness index (Chao 1) of S1 and S2 were 6 639.3 and 9 564.1, and Shannon index were 9.03 and 9.13, respectively. In addition, Analysis of system evolution demonstrated that Proteobacteria, Planctomycetes and Bacteroidetes were the dominant phylum in both S1 and S2. Moreover, the nitrifying bacteria could be enriched more effectively in MBR, and the ratio of Nitrospirae was higher in comparison with that in the traditional activated sludge process. [Conclusion] In acclimation period, both traditional activated sludge process and MBR had very high microbial community diversity, and similar microbial community structure at phylum level. Higher diversity could be found from MBR in acclimation period due to its efficient filtration.

**Key words** Traditional activated sludge process; MBR; High-throughput sequencing; Microbial community

污水处理系统中, 驯化期是微生物群落对环境因子和操作条件处于逐渐适应的阶段, 与稳定运行期相比, 微生物群落结构存在显著的差异<sup>[1-2]</sup>。因而, 了解处于驯化期污水处理系统的微生物组成对于工艺的设计、调试和稳定运行具有指导意义。然而, 污水处理系统中微生物群落是极其复杂的。由于能够被纯培养的微生物在环境中的比例只有 0.1% ~ 10.0%, 因此采用传统纯培养技术进行污水处理系统的微生物群落结构分析局限性较大, 无法获取足够的微生物信息<sup>[3]</sup>。20 世纪 90 年代以来, 以核酸技术为主要内容的分子生物学技术, 例如原位荧光杂交法(FISH)、聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳/温度梯度凝胶电泳(PCR-DGGE/TGGE)、末端标记限制性片段长度多态性(T-RFLP)、16S rRNA 克隆文库构建、实时 PCR 等, 极大地克服了微生物传统培养法的不足, 可以在分子水平评价群落多样性, 揭示生物与环境之间的作用机制等<sup>[4-5]</sup>。Rosenkran 等通过 DGGE 分析发现, 当进水苯酚浓度从 120 mg/L 增加到 800 mg/L 时, 厌氧序批式反应器中微生物群落结构并没有明显变化, 但是当苯酚进水浓度从 800 mg/L 上升到 1 200 mg/L 时, 微生物群落结构发生了急剧变化, 其中优势菌由 Spirochaetaceae、Anaerolineaceae 变为 Anaerolineaceae<sup>[6]</sup>。通过 T-RFLP 对 A/O-MBR 系统微生物群落进行分析, 发现不同膜污染时

期, 好氧池中微生物结构也随着变化, 在膜污染初期, 好氧池中微生物以 *Thiothrix* sp. 为主; 当膜污染加剧时, *Zoogloea ramigera* 则取代 *Thiothrix* sp. 成为优势菌种<sup>[7]</sup>。DGGE 结果表明, 利用不同接种污泥而相同厌氧工艺处理奶酪厂生产废水时, 污泥微生物群落结构表现出高度一致性<sup>[8]</sup>。但是, 这些技术由于存在操作引起的误差大、步骤繁杂等问题, 为其应用带来了许多限制<sup>[9-10]</sup>。

近年来, 作为第二代测序技术的高通量测序得到了快速的发展和运用, 如 454 焦磷酸高通量测序、MiSeq 高通量测序等。高通量测序技术一次可以对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测序, 可以对物种的转录组和基因组进行全貌分析<sup>[11-12]</sup>。Hu 等采用 454 焦磷酸高通量测序技术对不同 MBR 污水处理系统的微生物群落结构分析发现, 有些污水厂活性污泥中 *Proteobacteria* 为优势菌种, 而有些污水厂活性污泥中则以 *Bacteroidetes* 为主, 并且通过 *Sørensen* 相似性指数及主成分分析发现, 微生物群落结构总体相似性不是很高<sup>[13]</sup>。笔者通过 MiSeq 高通量测序平台, 对驯化期 MBR 以及传统活性污泥法工艺的微生物群落结构进行分析, 为工艺的调试和优化提供微生物学方面的信息。

## 1 试验材料与方法

**1.1 试验装置** 该试验采用好氧平板式 MBR 以及传统活性污泥法处理小区生活污水。反应器有效容积均为 120 L, 试验过程中溶解氧均控制在 2 mg/L 左右。MBR 和传统活性污泥法均处于驯化期, 驯化时间 2 个月。其中, MBR 膜组件

基金项目 北京市环境保护科学研究院科技基金项目(2013A07)。  
作者简介 李安峰(1974-), 男, 山东泰安人, 副研究员, 博士, 从事水污染控制研究。  
收稿日期 2014-11-21

有效膜面积为  $1 \text{ m}^2$ , 材质为聚偏氟乙烯 (PVDF), 孔径  $< 0.1 \mu\text{m}$ , 购自上海斯纳普公司。MBR 抽停比为 6:2, 污泥浓度为  $4 \text{ g/L}$ , HRT 为 8 h。传统活性污泥反应器 MLSS 为  $1.5 \text{ g/L}$  左右, HRT = 8 h。小区生活污水进水 COD、TN 分别在  $200 \sim 800, 50 \sim 120 \text{ mg/L}$  之间波动, 该试验接种污泥均取自某污水处理厂二沉池所排出的剩余污泥。

**1.2 主要试剂及仪器** Omega 土壤 DNA 小量提取试剂盒 (美国 Omega 公司); Nanodrop ND-1000 全波长紫外/可见光扫描分光光度计 (美国 Thermo Fisher 公司); CFX 96 实时定量 PCR 仪 (美国 BIORAD 公司); 离心柱型超薄琼脂糖凝胶回收试剂盒 (北京天根生化科技有限公司); Illumina MiSeq 测序仪 (美国 Illumina 公司); 引物合成、MiSeq 高通量测序和生物信息学分析由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

### 1.3 微生物多样性分析

**1.3.1 DNA 提取与 PCR 扩增。** 分别提取传统活性污泥反应器 (S1) 和 MBR (S2) 中的污泥混合液。首先利用 Omega 土壤 DNA 小量提取试剂盒提取两组样品的 DNA, DNA 的浓度与纯度利用分光光度法检验。其中, DNA 浓度通过测定其在  $260 \text{ nm}$  下吸光度确定; DNA 纯度通过比较  $260 \text{ nm}/230 \text{ nm}$  (DNA/腐殖酸) 和  $260 \text{ nm}/280 \text{ nm}$  (DNA/蛋白质) 的值确定。PCR 扩增区域选择样本 16S rRNA 的 V4 区域, 16S rRNA 引物序列为 515F:  $5'-\text{GTGCCAGCMGCCGCGGTAA}-3'$ ; 806R:  $5'-\text{GGACTACHVGGGTWTCTAAT}-3'$ 。PCR 反应体系以  $1 \mu\text{l}$  DNA 为模板, 扩增条件:  $98 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 1 min;  $98 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 10 s,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 进行 35 个循环; 35 个循环之后,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 5 min。利用超薄琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 并用 2% ( $w/v$ ) 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

**1.3.2 MiSeq 高通量测序。** 使用 Illumina 的 MiSeq 测序仪, 对 16S rRNA 的 PCR 产物进行双端测序。使用 QIIME 软件对测序数据进行过滤。通过 flash 软件将有 overlap 的一对 reads 进行拼接。

**1.3.3 生物信息学分析。** 根据序列的相似性, 在 97% 相似水平下, 利用 uparse 软件将序列归为多个 OTU (操作分类单元)。根据 OTU 数据, 做出每个样品的稀释曲线, 同时计算各个样品的相关分析指数, 包括丰度指数 (Chao 1)、多样性指数 (Shannon 指数)。另外, 根据相关数据进行主成分、OTU 分布 Venn 图、Rank-Abundance 曲线以及门水平的样品群落结构的分析。

## 2 结果与分析

**2.1 样品序列数目** 通过对活性污泥样品 16S rRNA 基因文库 MiSeq 测序, 从传统活性污泥法污泥混合液样品 (S1) 和 MBR 污泥混合液样品 (S2) 各获得 47 354 和 51 882 条有效序列, 序列平均长度为 253 bp。将序列与 Silva 库进行比对聚类分析, 在 97% 相似水平下, 从 S1 和 S2 中分别得到的 OTU 数目为 2 693 和 3 208, 并共有 1 156 个 OTU (图 1)。这表明在驯化期中传统活性污泥法和 MBR 均具有较高的微生物多样性, 而且 MBR 中的多样性可能更丰富。

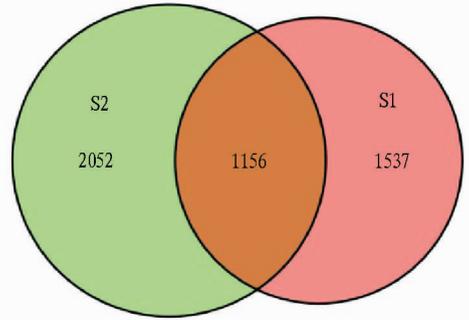


图 1 S1 和 S2 OTU 分布 venn 图

**2.2 主成分分析** 从图 2 可知, 与污泥混合液细菌群落结构相关的有关主成分中, P1 主成分的方差贡献率为 15.45%, P2 主成分的方差贡献率为 17.91%。S1 和 S2 所代表的点距离相近, 这表明 S1 和 S2 所代表的菌群结构存在一定差异, 但不是很大, 这与上述两个系统中 OTU 的分布相吻合。

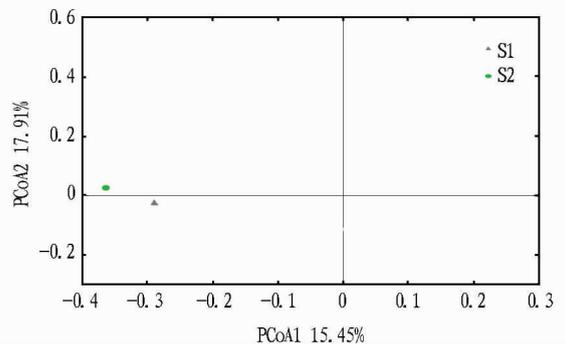


图 2 S1 和 S2 微生物群落组成的主成分分析

**2.3 Rank-Abundance 曲线** 图 3 为 S1 和 S2 样品的 Rank-Abundance (相对丰度) 曲线。Rank-Abundance 曲线用于同时解释样品多样性的两个方面, 即样品所含物种的丰富程度和均匀程度。物种的丰富程度由曲线在横轴上的长度, 即 OTU 数来反映, 曲线越宽, 表示物种的组成越丰富, 结果与 OTU 分布 Venn 图分析一致。物种组成的均匀程度由曲线的形状来反映, 曲线越平坦, 表示物种组成的均匀程度越高。对比 S1 和 S2 的曲线可知, S1 和 S2 的曲线的形状均不太平坦, 这意味着 S1 和 S2 中微生物群落物种的分布均匀程度不高。

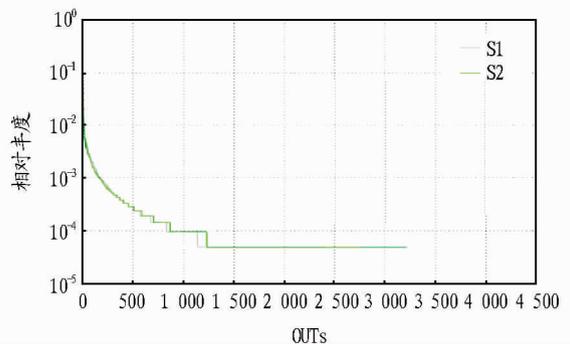


图 3 S1 和 S2 的相对丰度曲线

**2.4 微生物群落多样性分析** 为了研究污泥混合液中微生物群落多样性, 选取群落丰度指数 (Chao 1 指数)、多样性指数 (Shannon 指数) 为参考标准。在 97% 和 95% 的相似水

平下, S1 的 Chao 1 指数为 6 639.3/2 904.5, Shannon 指数为 9.03/8.23; S2 的 Chao 1 指数为 8 564.1/3 819.5, Shannon 指数为 9.13/8.27。驯化期中 MBR 污泥混合液的群落多样性高于传统污泥法污泥混合液样品, 而且 MBR 和传统活性污泥法反应器中 Shannon 指数 (97%) 均高于之前报道<sup>[13-15]</sup>。一般认为, 处于稳定运行期的 MBR 的 SRT 较长, F/M 较低, 污泥浓度较高, 这些条件更利于适应性强的菌落富集, 因而 MBR 中微生物群落多样性 (Simpon 指数) 要低于普通 A/A/O、A/O 工艺<sup>[13]</sup>。但在该研究中, 由于污水处理系统均处于驯化期, 反应器中微生物还处于增长阶段, MLSS 仍具有较大的上升空间, 此时不同的微生物正在对系统条件进行适应性变化, 会表现出较高的多样性<sup>[16]</sup>。同时, MBR 的高效过滤作用使得这种多样性在这一时期可以得到更多的保留。当然, 当环境因素和操作条件对微生物的定向选择完成后, 系统进入稳定期, 此时微生物群落结构组成稳定, 种群数量较接种时期大为减少<sup>[17-18]</sup>。

**2.5 样品群落结构分析** 从门分类水平的群落分析表明 (图 4), S1 和 S2 均由 11 个门以及其他未知的菌类组成, 其中变形菌门 (Proteobacteria)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、拟

果基本一致, 不过次优势菌略有差异<sup>[20-21]</sup>。从门分类水平而言, 传统活性污泥法工艺和 MBR 工艺中微生物群落结构相似, 无显著性差异。之前也有类似的报道, 同一废水处理系统不同运行工艺 (A<sup>2</sup>O 和倒置 A<sup>2</sup>O、MBR 和传统活性污泥法) 的微生物群落结构有高度的相似性, 这可能跟相同的进水水质有很大的关系<sup>[22-23]</sup>。另外, S2 中未知菌类所占比例更高, 这与 S2 中生物多样性更丰富的结论是一致的。

众所周知, 由于 MBR 工艺可以实现水力停留时间和污泥龄的完全分离, MBR 工艺更有利于世代周期长的硝化菌的截留与生长。该研究中, 通过对比也发现了该类现象, S2 中硝化螺旋菌门比例要高于 S1。

### 3 总结

处于驯化期的 MBR 和传统活性污泥处理系统中均具有较高的微生物多样性, 而且由于 MBR 的高效过滤作用, 其微生物群落多样性更为丰富。在门分类水平上, 两种处理系统中活性污泥具有相似的优势菌结构, 优势菌均为变形菌门、浮霉菌门、拟杆菌门; 同时, 硝化螺旋菌门在 MBR 中更易富集, 所占比例要高于传统活性污泥法。

### 参考文献

- [1] 邢德峰, 任南琪, 宫曼丽. PCR-DGGE 技术解析生物制氢反应器微生物多样性[J]. 环境科学, 2005, 26(2): 172-176.
- [2] 朱铁群, 李凯慧, 张杰. 活性污泥驯化的微生物生态学原理[J]. 微生物学通报, 2008, 35(6): 939-943.
- [3] 张昱, 王振宇, 杨敏. 环境净化中的微生物生态学[J]. 化工进展, 2009, 21(2/3): 565-569.
- [4] YE L, ZHANG T. Estimation of nitrifier abundances in a partial nitrification reactor treating ammonium-rich saline wastewater using DGGE, T-RFLP and mathematical modeling[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(6): 1403-1412.
- [5] LEFEBVRE O, NGUYEN HTT, AL-MAMUN A, et al. T-RFLP reveals high  $\beta$ -Proteobacteria diversity in microbial fuel cells enriched with domestic wastewater[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(3): 839-850.
- [6] ROSENKRANZ F, CABROL L, CARBALLA M, et al. Relationship between phenol degradation efficiency and microbial community structure in an anaerobic SBR[J]. Water Research, 2013, 47(17): 6739-6749.
- [7] GAO DW, WEN ZD, LI B, et al. Microbial community structure characteristics associated membrane fouling in A/O-MBR system[J]. Bioresource Technology, 2014, 154: 87-93.
- [8] KIM J, LEE S, LEE C. Comparative study of changes in reaction profile and microbial community structure in two anaerobic repeated-batch reactors started up with different seed sludges[J]. Bioresource Technology, 2013, 129: 495-505.
- [9] 李桥, 王龙龙. 454 高通量测序技术在土壤微生物中的应用[J]. 绿色科技, 2013(8): 202-204.
- [10] 孙庆华, 柏耀辉, 赵翠, 等. DGGE, T-RFLP, LH-PCR 对两种活性污泥的微生物种群多样性分析的比较[J]. 环境工程学报, 2009, 3(8): 1365-1370.
- [11] 金迪, 王加启, 赵圣国, 等. 元转录组学在微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 237-245.
- [12] CAPORASO JG, LAUBER CL, WALTERS WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. International Society for Microbial Ecology, 2012, 6(8): 1621-1624.
- [13] HU M, WANG XH, WEN XH, et al. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis[J]. Bioresource Technology, 2012, 117: 72-79.
- [14] MA JX, WANG ZW, YANG Y, et al. Correlating microbial community structure and composition with aeration intensity in submerged membrane bioreactors by 454 high-throughput pyrosequencing[J]. Water Research, 2013, 47(2): 859-869.

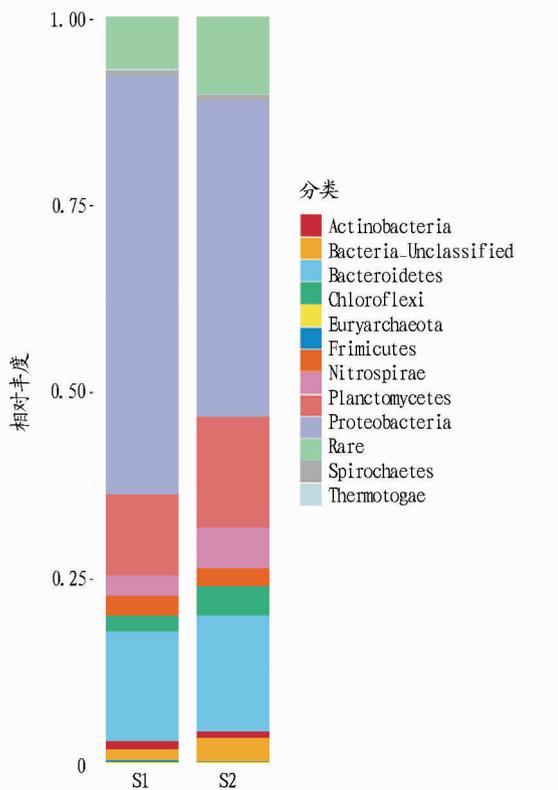


图 4 S1 和 S2 在门水平的分类

杆菌门 (Bacteroidetes)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 共占 85% 以上, 其余部分如放线菌 (Actinobacteria)、泉古菌门 (Crenarchaeota)、广古菌门 (Euryarchaeota)、螺旋体门 (Spirochaetes)、热袍菌门 (Thermotogae) 以及其他一些未知菌种仅占 15% 左右。在 S1 和 S2 中, 变形菌门所占比例最大, 主要功能为去除水中有机物<sup>[19]</sup>, 其次为拟杆菌门、浮霉菌门。优势菌与之前的研究结

可安排学生轮流参与;②课前应要求学生认真预习,鼓励学生大胆对实验方法、步骤进行改革,在原有实验的基础上自己设计实验,创新实验,并进一步验证自我设计的合理性及可行性,此举学生受益程度远比大批“照方抓药”实验的进行效果要好的多;③改变传统教师全程讲解,学生只负责“做”的授课模式。可先由学生进行讲解,继而老师和其余同学进行提问的方式进行补充或修正,从而促使学生更全面更深入地对实验进行学习了解,甚至因此学习更多的相关知识。该教学模式培养的学生,讲解、查阅文献的能力会更强,知识面会更宽,学生的自主学习能力会更强;④改变传统的实验报告批阅模式。以往的实验报告批阅全部由教师完成,然后存档保存。学生没有办法更好的得到反馈信息,形成实验报告上交后即完成了该实验全部工作的心理,不知道自己的实验报告存在什么样的问题,思考题的解答是否正确。可由学生参与实验报告的批阅,在批阅同学的实验报告中进一步发现问题,思考问题的解决方式,从而进一步提高学生的判断及解决问题的能力。

### 3 考核方式的改革

传统的实验课成绩由平时成绩和实验报告成绩综合评定。一般情况下,平时成绩占 60%~70%,实验报告成绩占 40%~30%,平时成绩主要包括出勤情况、实验操作、课堂提问、学习态度、数据处理实验报告、操作考试等多方面的量化打分。弊端是一部分同学实验过程不操作、无数据、课后抄袭他人实验报告却同样可以取得课程学分。为此,笔者对实验课的考核进行了改进。改革后的学生实验成绩由平时成绩、实验报告及期末考试三部分组成。平时成绩缩减为 40%,实验报告为 30%,期末考试为 30%。其中,平时成绩部分加入了学生参与实验准备、课堂讲解两部分。不仅提高了公平性,也进一步督促学生更好地学习。期末考试采取现场抽签,以动手操作及教师提问的方式进行。首先,由几名任课教师集体出题,然后由学生进行抽签,给学生 5~10 分钟的思考和准备时间,然后由学生自己完成试剂的配制、仪器的选择和组装,继而完成整个实验题目。最后,教师针对实

验过程的一些问题进行提问。考查题目均来自于平时实验课的实验或某实验的某一环节,若学生平时不认真做实验,则很难很好地完成考试,使得实验成绩的最终评定更具公平性和合理性。

此外,以往的实验课考核方式是单一的教师考核学生。为了督促教师更好的服务于学生,也是为了学生更好的反馈对该门课程的认识,也应增加学生对教师的考核部分<sup>[6]</sup>。具体方式可采用不记名的方式,对任课教师的授课水平、实验指导、课后答疑、实验报告的批改等方面进行综合评定,相对真实、客观的反映出学生对任课教师的评价,同时也对教师改进教学方法、进一步提高教师的教学水平起到一定的作用。相信双向考核评价体制的建设,不但能检验学生通过对该门课程的学习提高相关技能的程度,也可以让教师看到自己工作的不足或有待提高的方面。

随着学校转型应用技术型大学,人才培养方案的修订加大了实验课程的学时,同时加强了实验课的重要性。随着应用型人才培养计划的修订,新人才培养计划缩减了理论课程学时,加大了实验课程学时。实验课课程重要性的提高,也促使教师对实验工作的认识发生了质的转变。为适应时代发展,无机与分析化学实验教学改革还应加强师资队伍的建设,积极开展教学方法及教学内容的交流和研究,不断探索无机与分析化学实验课程教学的新思路、新模式。以适应学校转型的要求和社会对人才技能的需求,不断提高无机与分析化学实验的教学质量,提高毕业生的整体素质。

### 参考文献

- [1] 米娟,阙海宝. 应用技术类型高校的发展建议—源自德国应用科技大学的启示[J]. 乐山师范学院学报,2014,29(5):113-117.
  - [2] 李龙珠. 应用型大学艺术教育现状与展望[J]. 黑龙江教育(理论与实践),2014(5):45-46.
  - [3] 程利平,周祖新,康诗钊,等. 应用技术型院校无机化学教学改革与探索[J]. 广州化工,2012,40(16):200-201.
  - [4] 陈德碧,杨帆. 应用型人才培养的实验教学改革实践[J]. 实验科学与技术,2012,8(4):42-43.
  - [5] 陈睿,阎杰,蒋旭红,等. 大学基础化学实验立体化开放教学模式的探索与实践[J]. 安徽农业科学,2009,37(22):10804-10805.
  - [6] 王广慧,刘海燕. 应用型本科院校化学实验教学中创新型人才的培养[J]. 吉林农业科技学院学报,2009,18(2):108-110.
- (上接第 191 页)
- [15] 唐雾旭,王志伟,马金星,等. 454 高通量焦磷酸测序法鉴定膜生物反应器膜污染优势菌种[J]. 微生物学通报,2014(2):187-194.
  - [16] 胡培杉,孙宝盛,王盛勇. MBR 和 CAS 工艺污泥在贫营养培养条件下的微生物群落结构研究[J]. 环境科学学报,2011,31(9):1900-1907.
  - [17] 张斌,孙宝盛,季民,等. MBR 中微生物群落结构的演变与分析[J]. 环境科学学报,2008,28(11):2192-2199.
  - [18] 于凤庆,孙宝盛,陈谊,等. MBR 活性污泥培养驯化过程中生物多样性研究[J]. 环境科学学报,2012,32(9):2084-2090.
  - [19] WANGER M, AMANN R, LEMMER H, et al. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for Proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(5): 1520-1525.
  - [20] WANG XH, HU M, XIA Y, et al. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(19): 7042-7047.
  - [21] SANAPAREDDY N, HAMP TIMOTHY JT, GONZALEZ CL, et al. Molecular diversity of a north Carolina wastewater treatment plant as revealed by pyrosequencing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(6): 1688-1696.
  - [22] HESHAM AE, QI R, YANG M. Comparison of bacterial community structures in two systems of a sewage treatment plants using PCR-DGGE analysis[J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(12): 2049-2054.
  - [23] MIURA Y, HIRAIWA NM, ITO T, et al. Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance[J]. Water Research, 2007, 41(3): 627-637.