

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

唐霁旭 王志伟* 马金星 杨洋 吴志超
(同济大学 环境科学与工程学院 上海 200092)

摘要:【目的】对诱发膜-生物反应器(Membrane bioreactors, MBR)膜污染的优势菌种进行研究。【方法】利用 454 高通量焦磷酸测序法对 MBR 污泥混合液样品与膜污染物样品中微生物信息进行统计,并对两组样品的 Chao 丰度指数与 Shannon 生物多样性指数计算,对测序结果进行系统发育学分析。【结果】从污泥混合液样品与膜污染物样品中获得 9 353 与 7 504 条优化序列,发现膜污染物中微生物丰度与多样性均高于污泥混合样品。借助基因频谱对 OTU 分布特点进行统计,表明源于污泥混合液中的微生物在膜表面定殖生长过程中发生了种群变化,在膜面污染物样品中, β -变形菌纲丰度显著降低, α -变形菌纲、 γ -变形菌纲与 Phycisphaerae 在微生物种群结构中比重增加。【结论】454 焦磷酸测序分析表明,黄色单胞菌(*Xanthomonadaceae*),嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacter*), *Phycisphaera* 以及 2 株尚未培养出的细菌(Candidate_division_TM7 及 Candidate_division_OD1)是诱发 MBR 膜污染的优势菌种(微生物丰度>1%)。诱发膜污染的细菌既包括了黏性高、表面疏水的种类(如 γ -变形菌),从而引发细菌在膜表面的定殖,也包括了代谢能力强的物种(如 Candidate_division_OD1)可以确保种间递氢顺畅。

关键词:膜-生物反应器,膜污染,焦磷酸测序,微生物种群

Identifying predominant strains causing membrane biofouling by using 454 high-throughput pyrosequencing

TANG Ji-Xu WANG Zhi-Wei* MA Jin-Xing YANG Yang WU Zhi-Chao

(School of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: [Objective] We identified predominant strains causing membrane biofouling in membrane bioreactors (MBR). **[Methods]** 454 high-throughput pyrosequencing was applied to analyze the genes of bacteria originated from the sludge mixed liquor (S_1) and membrane foulant (S_2). Chao richness index and Shannon diversity index of two samples were calculated and the sequencing results were analyzed by phylogenetic analysis. **[Results]** In total 9 353 and 7 504 effective reads were obtained from S_1 and S_2 , respectively, indicating that the microbial richness and diversity of S_2 were higher than those of S_1 . By performing the phylogenetic spectra, we found that the microbial community structure of S_2 was changed during the membrane surface colonization, and in S_2 , the abundance of β -Proteobacteria was significantly reduced while α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA063403); 上海市科委项目(No. 12230707000)

*通讯作者: Tel: 86-21-65980400; 信箱: zwwang@tongji.edu.cn

收稿日期: 2013-03-15; 接受日期: 2013-05-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

and Phycisphaerae were enriched. [Conclusion] 454 high-throughput pyrosequencing revealed that *Xanthomonadaceae*, *Thermoanaerobacter*, *Phycisphaera* and 2 strains of uncultured bacteria (Candidate_division_TM7 and Candidate_division_OD1) were predominant taxons involved in membrane fouling. These strains included those with high surface viscosity and hydrophobicity (e.g., γ -Proteobacteria) which were prone to adhesion onto the membrane surfaces, and the proficient species (e.g., Candidate_division_OD1) that facilitated the interspecies hydrogen transfer.

Keywords: Membrane bioreactor, Membrane fouling, Pyrosequencing, Microbial community

膜-生物反应器(Membrane bioreactors, MBR)作为一种高效的污水处理技术集成,近年来受到国内外专家学者的关注。MBR通过污泥停留时间(SRT)和水力停留时间(HRT)的独立控制,可以使反应器内保持较高的污泥浓度(MLSS),同时可以减少剩余污泥产量,提高出水水质^[1-2]。然而在MBR运行过程中,污泥混合液中部分微生物会附着到膜表面定殖并分泌溶解性微生物产物(SMP),诱发膜表面污染,引起通量衰减和跨膜压差(TMP)升高^[3]。因此,解析MBR膜面污染物中微生物群落结构,明确其主要生理代谢途径,从而寻求相应的膜污染控制策略,已经成为MBR研究热点之一^[4]。

目前,国内外众学者对引起膜污染的优势菌群进行了分析鉴定,如:Zhang等借助限制性酶切片段分析技术(ARDRA)发现膜表面微生物种类和混合液中微生物种类有很大不同,并通过基于16S rRNA基因序列的系统发育分析提供了一系列可能引起微滤膜污染的优势菌群^[5]。Miura等利用一体式MBR对经初沉池处理后的城市污水进行了为期3个月的实验,同样发现膜表面微生物种类和混合液中微生物种类有很大不同,并利用荧光原位杂交(FISH)和16S rRNA基因测序技术发现 β -变形菌有可能是引起不可逆膜污染的优势菌群^[6]。

然而现有的研究结果却并不尽如人意,部分数据矛盾甚至截然相反^[4]。造成这种现象的重要原因之一是目前广泛采用的环境微生物学鉴定方法自身存在不足。如:聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE)只能分离较小的片段(<500 bp),对于大片段的分离效率下降;不同类型细菌种群的16S rRNA基因有着相似的电迁移行为,一条

DGGE带可能代表几种菌;传统分子生物学手段并不能分离样品中所有的DNA片段等^[7-9]。近年来,一种以DNA扩增的乳胶系统和皮升大小焦磷酸为基础的高通量测序技术—454焦磷酸测序法被开发出来^[8-9]。因其具有分析结果准确、高速、高灵敏度和高自动化的特点,454焦磷酸测序法已在环境微生物鉴定领域取得了不错的应用效果。本文将借助454高通量焦磷酸测序法对MBR污泥混合液和膜污染物中微生物种类进行鉴定,并通过系统发育分析对两组微生物种群结构进行差异分析,从而确定引起膜污染的优势微生物种类。

1 材料与amp;方法

1.1 实验装置

本实验中采用好氧平板式MBR处理低浓度生活污水^[9]。反应器有效容积为26 L,内部利用挡板分为升流区与降流区。曝气管安置于升流区底部,实验过程中曝气强度利用气体流量计控制在 $28 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 。MBR膜组件尺寸为 $0.4 \text{ m} \times 0.3 \text{ m}$,有效膜面积 0.216 m^2 ,材质为聚氯乙烯(PVC),平均孔径 $0.40 \mu\text{m}$,由日本久保田公司提供。MBR出水采用蠕动泵(兰格,中国保定)间歇抽吸,抽停比10:2。出水流量由转子流量计监控,通量维持在 $18 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 。TMP由水银压力计记录,当TMP>30 kPa时,对膜片进行物理-化学清洗:首先利用海绵清洗球将膜表面凝胶污染物轻轻擦下,然后向膜腔内回灌0.5% NaClO浸泡约2 h,进行化学在线清洗。

本实验MBR接种污泥取自上海某污水处理厂长期运行MBR^[10],污泥浓度 $6.2 \pm 0.4 \text{ g MLSS/L}$ 。本实验过程持续约220 d,期间HRT=4.6 h,通过

周期排泥控制 SRT=45 d。关于该好氧平板 MBR 更多参数可参阅文献[9]。

1.2 微生物多样性分析

1.2.1 DNA 提取与 PCR 扩增: 当 MBR 运行到压力终点时,分别收集污泥混合液与膜表面凝胶污染物。两组样品首先利用 FastDNA[®]泥土样本提取试剂盒抽提 DNA (MP 生物医药,美国)。抽提 DNA 的含量与质量采用分光光度法进行检验^[11]。PCR 扩增区域选择样本 16S rRNA 的 V1-V3 区域,合成带有“5' 454 A、B 接头-特异引物 3'”的融合引物,其中 A 为测序端,需加标签,B 端引物可共用。16S rRNA 引物序列为: 8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 533R: 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'。PCR 反应体系以 2 μ g RNA 为模板,扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共循环 25 次; 72 $^{\circ}$ C 5 min。为保证后续数据分析的准确性及可靠性,PCR 扩增使用较低循环次数(25 次)并保证样品扩增循环次数统一。AXYGEN 胶回收试剂盒回收 PCR 产物,Tris-HCl 洗脱,1%琼脂糖凝胶电泳检测并对扩增产物定量。

1.2.2 454 文库构建和测序: 应用新一代高通量测序平台 454 GS FLX Titanium 对扩增产物进行焦磷酸测序^[9]。测序结束后将测序接头及引物序列去除,并对处理后的有效序列进行数据及长度分布统计。测序结果可在美国生物技术信息中心(NCBI)上进行查询(登录号: SRA068949)。为提高后续生物信息分析的准确性,对有效序列进行优化,包括: (1) 利用特异性引物信息将非特异性扩增片段序列去除; (2) 丢弃长度短于 150 bp、含有模糊碱基(Ns)、引物碱基含 2 个以上错配、单碱基重复超过 6 个的序列^[12]。

1.2.3 生物多样性与分类学分析: 首先,将序列按照彼此的相似性归为操作分类单元(OTU)。为了降低 OTU 错分的概率,将优化序列截齐(截取长度: 150 bp),与 SILVA106 库比对后,对序列进行聚类。

OTU 聚类利用 MOTHUR 软件(http://www.mothur.org/wiki/Main_Page),聚类相似性为 97%与 95%。对优化序列采用随机抽样的方法,以抽到的序列数与它们所能代表 OTU 的数目构建稀释性曲线。利用 MOTHUR 软件对样本 Chao 丰度指数(<http://www.mothur.org/wiki/Chao>), Shannon 多样性指数(<http://www.mothur.org/wiki/Shannon>)及测序深度指数 Good's coverage (<http://www.mothur.org/wiki/Coverage>)进行计算。在进行分类学分析时,为了提高比对速率与质量,同时保证分类学分析的高可信性,将优化序列截取前 400 bp 的序列,再根据 SILVA106 库中的参考序列对 OTU 进行种属鉴定,种属比对的可信度阈值设定为 80%。两组样品的相似程度采用 Venn 图进行表征,Venn 图交叉区域代表相同 OTU 数量。

1.3 其他分析方法

MBR 运行过程中,反应器进出水的化学需氧量(COD)、氨氮(NH₃-N)、总氮(TN)、总磷(TP),反应器污泥混合液 MLSS、挥发性悬浮固体浓度(MLVSS)均采用国际标准方法测定^[13]。

2 结果与讨论

2.1 污染物去除效果及膜运行压力分析

本套 MBR 共运行将近 300 d,反应器对低浓度生活污水中主要污染物去除如图 1 所示。由于进水中有机质浓度偏低,经 MBR 处理后出水 COD 平均浓度为 11.8 \pm 10.3 mg/L。该好氧 MBR 对 NH₃-N 有良好去除效果,反应器启动两周后(约 14 d),即可将进水中绝大部分的氨氮转化为亚硝酸盐与硝酸盐。这种情况主要归因于 MBR 通过膜分离实现污水处理的固液分离,减少了长世代周期的硝化细菌的流失;同时本实验中采用了较长的 SRT,也保证了硝化细菌的生存环境^[1]。由于反应器为好氧环境(溶解氧 DO=3-5 mg/L),且进水中有机碳源含量较低,MBR 对 TN 基本没有去除效果。此外,该好氧 MBR 对进水 TP 约有 40%去除效果,这可能是因膜对颗粒性磷拦截及生物同化吸收所造成的。

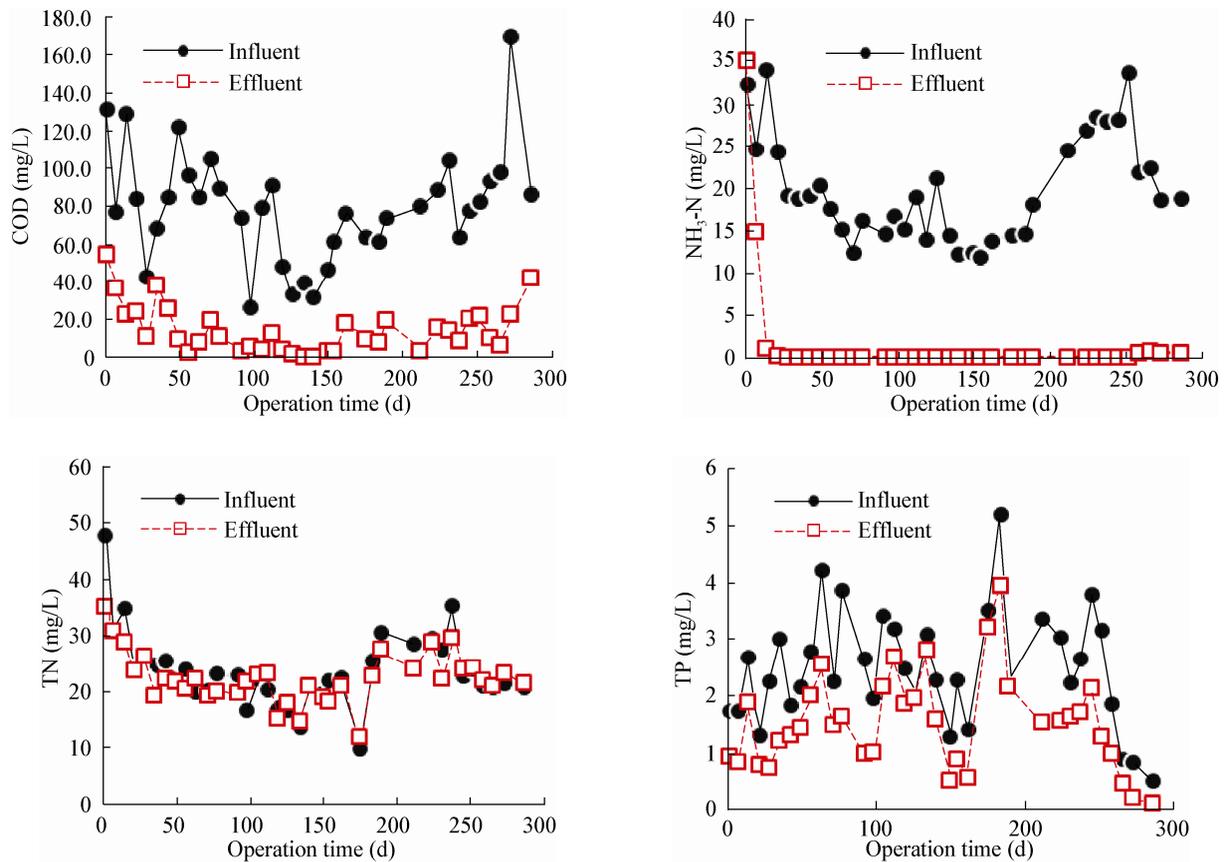


图1 MBR对进水中污染物去除效果

Figure 1 Removal efficiency of influent contaminants in the MBR

MBR 运行过程中 TMP 与水温的变化如图 2 所示。在反应器启动阶段(0-20 d), 污泥浓度逐渐由接种的 6.2 g MLSS/L 降低至 4.0 g MLSS/L, 与此同时, MBR 膜污染速率较快。反应器运行 30 d 之后, TMP 增长速率逐渐趋于稳定, 当水温维持在 20-30 °C, MBR 清洗周期超过 4 个月。240 d 后, 反应器内水温降低至 10 °C 以下, 膜污染趋于严重, 清洗周期小于 20 d, 这种现象说明水温对 MBR 稳定运行有重要影响, 低温会加速膜的污染^[1,9]。在 210 d 清洗膜时, 收集膜面污染物与污泥混合样品进行 454 高通量焦磷酸测序, 以期深入了解与膜污染过程有关的优势菌种。

2.2 微生物多样性与分类学分析

通过对两组样品 16S rRNA 基因文库进行焦磷酸测序, 污泥混合液样品(S₁)与膜污染物样品(S₂)

各获得 11 748 与 11 061 条有效序列。经修剪、去杂后, S₁ 与 S₂ 各获得 9 353 与 7 504 条优化序列, 序列平均长度为 419 bp。将优化序列截齐后, 与 SILVA106 库比对进行聚类, S₁ 与 S₂ 在 97%与 95%相似性下的稀释性曲线如图 3 所示。从图 3 中可以看出, 利用焦磷酸测序法可以获得更丰富的生物信息, 而且即使测序序列数量超过 10 000, 仍有新的 OTU 可以测出。本研究中两个样品的测序深度指数均高于 0.9 ($P < 0.1$), 即样本 OTU 可以有效表征样本中微生物种群。当测序序列数量趋向无穷时, 两组样品在 97%相似性下可获得 1 895 OTU (S₁)与 2 460 OTU (S₂), 在 95%相似性下可获得 1 318 OTU (S₁)与 1 817 OTU (S₂)。这说明在膜表面生长的微生物丰度要高于污泥混合液中微生物的丰度。同样地, 膜面微生物多样性也高于污泥混合液中微生物

多样性, S_1 的 Shannon 指数为 3.92 (97%)与 3.66 (95%), S_2 的 Shannon 指数为 5.10 (97%)与 4.79 (95%)。

OTU 分类学结果如基因频谱所示(图 4)。 S_1 样品中 OTU 聚类后包含酸杆菌门(Acidobacteria), 放线菌门(Actinobacteria), 拟杆菌门(Bacteroidetes), 绿菌门(Chlorobi), 绿弯菌门(Chloroflexi), 蓝藻菌门(Cyanobacteria), Deinococcus-Thermus, 厚壁菌门(Firmicutes), 芽单胞菌门(Gemmatimonadetes), 硝化螺旋菌门(Nitrospirae), 浮霉菌门(Planctomycetes), 变形菌门(Proteobacteria), 螺旋体门(Spirochaetes)及 Verrucomicrobia 14 个门, 此

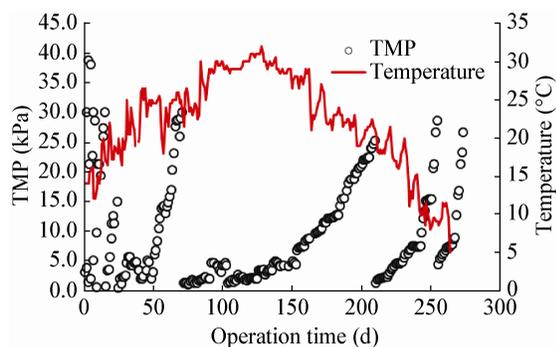


图 2 跨膜压差(TMP)与水温变化情况
Figure 2 Variations of TMP and temperature during the experiment

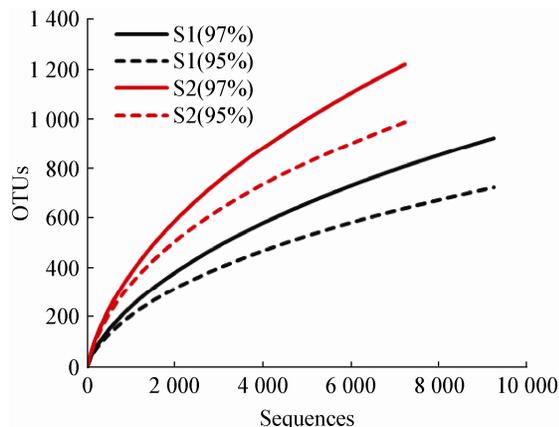


图 3 S_1 与 S_2 样品的稀释性曲线
Figure 3 Rarefaction curves base on pyrosequencing of S_1 and S_2

外 S_1 中还有 609 条测序序列不能分入已知细菌门, 说明这些细菌可能是未知种类。 S_2 样品中未发现 Deinococcus-Thermus, 而 S_2 样品中有 4 088 条测序序列不能分入已知细菌门, 说明 S_2 样品中微生物种群的未知性更高。从图 4 中可以看出, 两组样品 OTU 分布区间与各 OTU 相对丰度也有显著差异。通过 Venn 分析可知, 按 97%相似性归类, 两组样品 OTU 总和为 1 840, 共享 OTU 为 302, OTU 共享率为 16.4%。由于膜面定殖的微生物主要起源于 MBR 污泥混合液中, 两组样品具有相似性。然而微生物在膜表面生长选择性不同, 两组样品微生物种群结构又具有差异性, 即 OTU 共享性偏低。此外, 在主要细菌门中, S_1 与 S_2 在拟杆菌 OTU 共享率为 17.0%, 变形菌门 OTU 共享率为 21.9%, 未入门细菌 OTU 共享率为 4.8%, 这种现象说明当对两组样品微生物种群结构进行系统发育细化分析时, 差异性会变得愈发明显。因此下文将深入分析 S_1 与 S_2 样品中微生物种属的差异性, 从而揭示 MBR 膜面定殖生长的优势菌种。

2.3 诱发膜污染的优势菌种鉴定

两组样品进行系统发育比较时, 将优化序列截取前 400 bp 的序列, 再根据 SILVA106 库中的参考序列对 OTU 进行种属鉴定, 种属比对的可信度阈值设定为 80%。分析结果如图 5 所示。在两组样品中共测得 51 个细菌纲, 其中主要细菌纲为 14 个(相对丰度>0.5%), 与常规分子生物学手段相比, 454 高通量焦磷酸测序可以提供更丰富的微生物信息^[14-16]。尽管如此, S_1 与 S_2 仍有 48.5%与 59.7%

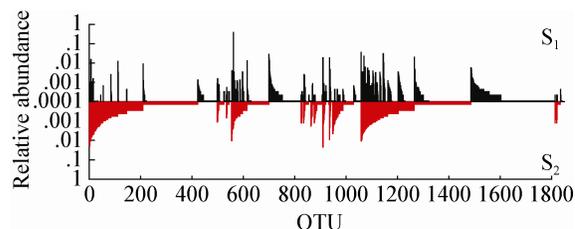


图 4 S_1 与 S_2 样品中微生物种群的基因频谱
Figure 4 Phylogenetic spectra of microbial communities from S_1 and S_2

的序列无法归入已知细菌纲。在 S_1 样品中, 主要细菌纲为 β -变形菌纲(Betaproteobacteria, 20.8%), 鞘脂杆菌纲(Sphingobacteria, 6.6%), α -变形菌纲(Alphaproteobacteria, 5.7%), 黄杆菌纲(Flavobacteria, 4.1%), δ -变形菌纲(Deltaproteobacteria, 3.4%), 硝化螺菌纲(Nitrospira, 2.5%), 芽孢菌纲(Gemmatimonadetes, 2.3%), γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria, 2.0%), Cytophagia (0.8%), 酸杆菌纲(Acidobacteria, 0.7%) 及浮霉菌纲(Planctomycetacia, 0.6%)。而在 S_2 样品中, β -变形菌纲丰度显著降低(6.1%), α -变形菌纲(7.5%)、 γ -变形菌纲(5.5%)与 Phycisphaerae (2.6%) 在微生物种群结构中比重增加。Lim 等^[14]研究结果显示膜污染物的微生物种群中 γ -变形菌纲丰度高于污泥混合液中, 表明 γ -变形菌纲是一类与 MBR 膜污染密切相关的微生物。Jinhua 等的研究也获得了相似的结论^[15], 即这种表面疏水性较高的细菌更容易附着到膜表面。

将两个样品中的微生物继续细分至细菌目可以让我们更好地了解微生物在 MBR 中的功能。 S_1 与 S_2 中共鉴定出 78 个细菌目, 其中主要细菌目为 22 个(相对丰度>0.5%)。与 MBR 污泥混合液中微生物种群相比, 膜污染物中微生物在黄色单胞菌目(Xanthomonadales, 3.8%), 芽单胞菌目(Gemmatimonadales, 2.8%), 柄杆菌目(Caulobacterales, 2.6%), Phycisphaerales (1.5%), mle1-8 (0.9%), 拟杆菌目(Bacteroidales, 0.9%), 梭菌目(Clostridiales, 0.8%) 及立克次氏体目(Rickettsiales, 0.6%) 中有更高的丰度。尽管反应器进水水质不同, 运行模式存在差异, 但不同 MBR 膜面污染物中的优势菌种存在一定共性。当发生严重膜污染时, 在膜污染物中可以检测出隶属于拟杆菌门与厚壁菌门的拟杆菌目与梭菌目^[14]。而黄色单胞菌目也是膜污染物中 γ -变形菌纲主要组成部分^[14]。尽管如此, S_2 样品中仍有 63.6% 的微生物物种在目的分类上未知, Gao 等利用 16S rDNA 指纹图谱技术对不同溶解氧下 MBR 膜污染物中微生物

种群进行鉴定, 同样发现约 50% 的物种为未知物种^[16]。这种现象说明目前还是十分缺乏对诱发膜污染的优势菌种进行全面系统的研究, 未来的研究需借助细菌培养技术、宏基因组与宏蛋白组技术更好表征这些微生物的环境功能, 从而获取更有效的 MBR 膜污染控制策略。

通过与 SILVA106 数据库进行比对, 共鉴定出 183 个已知微生物属种与 MBR 膜污染过程密切相关, 这部分已知微生物占 S_2 总测序序列量的 40.3%。与之前研究相比(10–30 种微生物)^[15-16], 利用高通量测序可以更全面了解膜污染物中微生物组成, 更好了解与膜污染有关的生物过程信息。本研究在两个样品中共发现 12 种优势菌种(图 5), 其中 MBR 污泥中硝化菌丰度较高(氢氧化细菌 *Nitrosospira*, 4.5% 及亚硝酸盐氧化细菌 *Nitrospiraceae_Nitrospira*, 2.5%), 这与之前关于 MBR 内微生物种群研究结果一致, 主要归因于膜拦截作用减缓了长世代周期的硝化细菌在反应器内的流失^[9]。与纲、目系统发育学分析一致, 在 MBR 膜面污染物中富集的菌种包括 2 株黄色单胞菌 *Xanthomonadaceae* (1.2%与 1.2%), 嗜热厌氧杆菌 *Thermoanaerobacter* (1.0%), *Phycisphaera* (1.1%) 以及 2 株尚未培养出的细菌 (Candidate_division_TM7, 1.9% 及 Candidate_division_OD1, 5.0%)。本研究中, 大部分膜面定殖优势菌种与厌氧代谢过程有关。生物丰度最高的 Candidate_division_OD1 已在多种沉积物中检出。尽管目前对 Candidate_division_OD1 的代谢途径了解甚少, 但已有研究结果表明 OD1 主要在厌氧、缺氧环境中被发现, 而它的基因结构与产甲烷古菌类似^[17]。而这种嗜氢菌可以有效利用产酸菌的代谢产物, 这种生物协同作用可以保证生物膜中微生物的高效的物质代谢与能量代谢^[18]。因此, 本研究利用 454 高通量焦磷酸测序方法表明诱发膜污染的细菌既包括了黏性高、表面疏水的种类从而引起细菌在膜表面的定殖, 也包括了代谢能力强可以确保种间递氢顺畅的物种。

诱发 MBR 膜污染的优势菌种提供更丰富的基因信息。诱发膜污染的细菌既包括了黏性高、表面疏水的种类(如 γ -变形菌), 从而保证细菌的表面定殖, 也包括了代谢能力强可以确保种间递氢顺畅的物种(如 Candidate_division_OD1)。此外, S₂ 样品中大部分细菌未知, 还是十分缺乏对诱发膜污染的优势菌种进行全面系统的研究, 未来的研究需借助细菌培养技术、宏基因组与宏蛋白组技术更好表征这些微生物的环境功能, 从而获取更有效的 MBR 膜污染控制策略。

参 考 文 献

- [1] Judd SJ. The MBR Book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors in Water and Wastewater Treatment[M]. Oxford: Elsevier, 2006.
- [2] Wang ZW, Wu ZC, Tang SJ. Characterization of dissolved organic matter in a submerged membrane bioreactor by using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy[J]. Water Research, 2009, 43(6): 1533-1540.
- [3] Le Clech P, Chen V, Fane TAG. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment[J]. Journal of Membrane Science, 2006, 284(1/2): 17-53.
- [4] Meng FG, Liao BQ, Liang S, et al. Morphological visualization, componential characterization and microbiological identification of membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs)[J]. Journal of Membrane Science, 2010, 361(1/2): 1-14.
- [5] Zhang K, Choi H, Dionysiou DD. Identifying pioneer bacterial species responsible for biofouling membrane bioreactors[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(3): 433-440.
- [6] Miura Y, Watanabe Y, Okabe S. Membrane biofouling in pilot-scale membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater: Impact of biofilm formation[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(2): 632-638.
- [7] 张珍妮, 吴晓芙, 陈永华, 等. DGGE 技术在环境微生物多样性研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2009, 12: 48-52.
- [8] Ye L, Shao MF, Zhang T, et al. Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing[J]. Water Research, 2011, 45(15): 4390-4398.
- [9] 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.
- [10] Wang P, Wang ZW, Wu ZC, et al. Fouling behaviours of two membranes in a submerged membrane bioreactor for municipal wastewater treatment[J]. Journal of Membrane Science, 2011, 382(1/2): 60-69.
- [11] Thakuria D, Schmidt O, Mac Siurtain M, et al. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(6): 1390-1403.
- [12] Claesson MJ, O'Sullivan O, Wang Q, et al. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine[J]. PLoS One, 2009, 4(8): 66-69.
- [13] APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater[M]. Twenty-second ed. Washington, DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, 2012.
- [14] Lim SY, Kim S, Yeon KM. Correlation between microbial community structure and biofouling in a laboratory scale membrane bioreactor with synthetic wastewater[J]. Desalination, 2012, 287: 209-215.
- [15] Jinhua P, Fukushi K, Yamamoto K. Bacterial community structure on membrane surface and characteristics of strains isolated from membrane surface in submerged membrane bioreactor[J]. Separation Science and Technology, 2006, 41(7): 1527-1549.
- [16] Gao DW, Fua Y, Tao Y, et al. Linking microbial community structure to membrane biofouling associated with varying dissolved oxygen concentrations[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 5626-5633.
- [17] Peura S, Eiler A, Bertilsson S. Distinct and diverse anaerobic bacterial communities in boreal lakes dominated by candidate division ODI[J]. International Society for Microbial Ecology, 2012, 6(9): 1640-1652.
- [18] Yu ZY, Wen XH, Xu ML, et al. Characteristics of extracellular polymeric substances and bacterial communities in an anaerobic membrane bioreactor coupled with online ultrasound equipment[J]. Bioresource Technology, 2012, 117: 333-340.