



环境科学
Environmental Science
ISSN 0250-3301, CN 11-1895/X

《环境科学》网络首发论文

题目： 不同污泥在微波预处理-厌氧消化过程中抗性基因分布及菌群结构演替
作者： 李慧莉，武彩云，唐安平，佟娟，魏源送
DOI： 10.13227/j.hjcx.202006079
收稿日期： 2020-06-08
网络首发日期： 2020-07-27
引用格式： 李慧莉，武彩云，唐安平，佟娟，魏源送. 不同污泥在微波预处理-厌氧消化过程中抗性基因分布及菌群结构演替. 环境科学.
<https://doi.org/10.13227/j.hjcx.202006079>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

不同污泥在微波预处理-厌氧消化过程中抗性基因分布及菌群结构演替

李慧莉¹，武彩云^{1,2}，唐安平²，佟娟^{2,3,4*}，魏源送^{2,3,4}

(1. 兰州理工大学土木工程学院，兰州 730050； 2. 中国科学院生态环境研究中心环境模拟与污染控制国家重点联合实验室，北京 100085； 3. 中国科学院生态环境研究中心水污染控制实验室，北京 100085； 4. 中国科学院大学，北京 100049)

摘要：城市污水厂剩余污泥是抗生素抗性基因 (antibiotic resistance genes, ARG) 的重要储存库，污泥处理过程中 ARG 的转归趋势及其与菌群结构变化的关系仍需人们深入研究。本研究考察了 A²O 和 A²O-MBR 工艺的城市污水厂剩余污泥的 ARG 与细菌群落结构在微波预处理-厌氧消化处理过程中的演变规律，结果表明，两种原污泥的菌群结构及携带的 ARG 丰度分布区别较大；虽然微波预处理不会显著改变菌群结构，但预处理-厌氧处理后的消化污泥菌群结构有显著差异；无论有/无预处理，厌氧消化过程对污泥中 ARG 和 MGE 的分布有趋同性的作用；*ermF*、*qnrS* 和 *bla_{NDM-1}* 是厌氧消化过程中易于增殖传播的抗性基因；污泥特性中，生物量、氨氮和正磷对 ARG 和 MGE 分布的影响力最大；污泥性质对细菌群落结构、尤其是部分功能菌属变化有重要影响。本研究结果可为人们进一步了解污泥厌氧消化过程中 ARG 的传播与控制提供科学参考。

关键词：污泥厌氧消化；微波预处理；抗生素抗性基因 (ARG)；细菌菌群结构；污泥性质
DOI:10.13227/j.hjcx.202006079

Occurrence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Community Structure of Different Sludge During Microwave Pretreatment-Anaerobic Digestion

LI Hui-li¹, WU Cai-yun^{1,2}, TANG An-ping², TONG Juan^{2,3,4*}, WEI Yuan-song^{2,3,4}

(1. School of Civil Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 2. State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 3. Department of Water Pollution Control, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Waste sludge of municipal wastewater treatment plants is an important reservoir for antibiotic resistance genes (ARG). It is necessary to explore the fate of ARG, microbial community succession, and the correlations between them. Therefore, the distribution of ARG and microbial community structure of waste sludge from the wastewater treatment plants with A²O and A²O-MBR processes during microwave pretreatment and anaerobic digestion were studied in this research. Results showed that, the occurrence of ARG and microbial community structure were quite different in the waste sludge of A²O and A²O-MBR processes. The microwave pretreatment did not change the microbial community much, whereas community structure of the digested sludge with pretreatment showed significant differences. The anaerobic digestion has a conformity effect on the distribution of

收稿日期：2020-06-08；修订日期：2020-07-13

基金项目：国家自然科学基金项目 (51578535)；国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2015ZX07203-005)

作者简介：李慧莉 (1970~)，女，副教授，主要研究方向为污染物控制及废弃物处理，E-mail: huilhit@163.com

*通信作者，E-mail: hittj@163.com

ARG and MGE in the digested sludge with or without pretreatment. *ermF*, *qnrS*, and *bla_{NDM-1}* are the most hard to be reduced ARG and prone to propagation during anaerobic digestion. The influence of biomass, ammonia nitrogen and phosphorus on the distribution of ARG and MGE is higher than other environmental factors. The sludge characteristics also showed important impacts on the microbial community, especially on some genera with specific function. These results could help people to better understand the spread and control of the ARG during sludge anaerobic digestion.

Key words: sludge anaerobic digestion; microwave pretreatment; antibiotic resistance genes (ARG); bacterial community structure; sludge characteristics

近年来, 由于抗生素广泛使用于医学治疗、畜禽养殖及农业生产等众多领域, 使得环境中的部分细菌在较高的抗生素选择压力下产生耐药性从而成为耐药菌 (antibiotic resistant bacteria, ARB)。另外, 抗性基因 (antibiotic resistant genes, ARG) 特有的生物学特性使其能在环境中多维度传播扩散^[1], 这给人类健康和环境安全造成了巨大的潜在威胁。所以有效削减 ARB 和 ARG、控制抗性污染已经成为当前研究的热点之一。

城市污泥向环境释放 ARB 和 ARG 的贡献高于污水厂出水^[2], 剩余污泥是 ARG 的重要储存库和基因水平转移的重要场所。厌氧消化作为目前应用最广泛的污泥处理技术之一, 近年来研究者们更为关注强化厌氧消化工艺的研究。但目前人们对污泥处理过程中 ARG 归趋的影响因素, 以及如何控制 ARG 的传播研究仍处于黑箱状态。研究表明底物性质, 如 COD、氨氮和磷等, 是厌氧消化过程 ARG 水平转移及转归的重要影响因素^[3], 并且底物类型, 如猪粪、鸡粪和污泥的差异也显著影响 ARG 的转归和微生物群落结构^[4]。也有研究认为细菌群落结构是 ARG 传播的主要驱动力^[5], 例如 Ma 等^[6]的研究发现厌氧消化中细菌的群落结构比原始 ARG 组成对 ARG 转归的影响更大。此外, 底物性质也是影响 ARG 转归的重要因素, 如: 生物处理反应器中进水有机底物的浓度极大的影响 ARG 的绝对丰度^[7]; 工业废水处理过程中, 高盐度可能会抑制某些 ARG 宿主细菌的生长从而抑制部分 ARG 的传播扩散^[8]。以上研究表明, 在厌氧消化中污泥性质对 ARG 的转归和细菌群落变化有影响。

在众多预处理强化厌氧消化工艺中, 微波-H₂O₂-碱预处理不仅可提高甲烷产量, 而且能促进 ARG 和 ARB 的削减^[9-11]。本课题组前期研究了不同性质的剩余污泥 (即 A²O 和 A²O-MBR 工艺剩余污泥) 对微波预处理强化厌氧消化的产气效果及古菌群落结构的影响^[12]。在此基础上, 本研究重点考察不同性质剩余污泥 (A²O 和 A²O-MBR 剩余污泥) 对微波预处理强化厌氧消化过程 ARG 的转归特征及细菌群落结构演变的影响。

1 材料与方法

1.1 实验设备与样品采集

本实验装置和所取样品与文献^[12]一致, 简要叙述为, 厌氧消化进泥取自北京某污水处理厂一、二期 A²O 工艺 (SRT=20d) 及三期 A²O-MBR 工艺 (SRT=30d) 的脱水污泥, 将其分别经微波-H₂O₂-碱预处理, 然后和北京市某污水处理厂卵形消化池出泥 (作为接种污泥) 以 VS 比为 3:1 的比例混合后作为 BMP 测试系统的进泥, 以未经微波预处理的则作为对照组, 每组设置 3 个平行实验, 在 38°C ± 1°C 进行为期 25d 的厌氧消化, 分别在微波预处理前 (即原污泥)、微波预处理后和厌氧消化后收集泥样进行分析。鉴于污泥性质的变化已经在

前期研究中详细讨论^[12], 本研究只讨论污泥性质与 ARG 和细菌群落结构的关系。各样品污泥性质见表 1。

表 1 厌氧消化过程中污泥性质变化 (平均值)
Table 1 Sludge characteristics in various stages of anaerobic digestion (mean value)

指标	原泥		微波泥		原泥厌氧后		微波厌氧后	
	A ² O	A ² O-MBR	A ² O	A ² O-MBR	A ² O	A ² O-MBR	A ² O	A ² O-MBR
TS /mg L ⁻¹	79400	109200	84200	115800	50914	71104	52703	70518
VS /mg L ⁻¹	52700	54600	53800	55700	29969	31485	29108	31284
VS/TS (%)	66.40	50.00	63.90	48.10	58.90	44.30	53.00	44.40
SCOD /mg L ⁻¹	8780	7080	28650	26150	4573	4473	5050	3993
溶解性蛋白 /mg L ⁻¹	2143.42	1060.68	9677.62	8933.22	724.96	612.14	583.98	565.15
溶解性多糖 /mg L ⁻¹	659.25	135.79	2624.89	2624.89	859.35	1071.55	1084.50	468.50
碱度 /mg L ⁻¹	2450.34	1710.74	4300.25	3900.46	10783.33	12417.12	15416.67	18234.00
氨氮 /mg L ⁻¹	946.43	570.65	742.54	517.50	1772.15	1861.81	2071.95	1908.78
正磷 /mg L ⁻¹	123.83	51.43	297.12	114.64	79.24	28.94	95.32	41.46
VFA /mg L ⁻¹	3415.36	4945.21	3948.77	5124.26	60.00	56.00	62.00	58.00

1.2 DNA 提取与定量 PCR

采用试剂盒 Fast DNA Spin Kit for soil 提取污泥基因组 DNA, 用 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) 测定 DNA 浓度和质量, 将提取的 DNA 样品于 -80℃ 冰箱保存备用。采用荧光定量 PCR (qPCR) 定量分析 ARG 与 16S rRNA 基因, 具体包括 β -内酰胺类抗性基因 *bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M} 和 *bla*_{NDM-1}, 大环内酯类抗性基因 *ermB*、*ermF* 和 *mefA/E*, 喹诺酮类抗性基因 *qnrA* 和 *qnrS*, 四环素类抗性基因 *tetA*、*tetM* 和 *tetX*, 磺胺类抗性基因 *sulI* 和 *sulII*, 整合子 *intI1* 及转座子 *Tn916/1545*。引物信息如表 2 所示。PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 SYBR® Premix ExTaq™ (Tli RNaseHplus) (TAKARA) 10.0 μ L, 引物 F 为 0.4 μ L, 引物 R 为 0.4 μ L, DNA 模板 5.0 μ L 和 RNase-free (Ambion) 水 4.2 μ L。荧光定量 PCR 反应条件为: ① 50℃, 2 min; ② 95℃, 30s; ③ 95℃, 15s; ④ 退火, 20s; ⑤ 72℃, 30s; ⑥ Plate read, 重复③~⑤, 39 次重复; ⑦ Melt-curve 分析: 60℃ 至 95℃, 使用无菌水作为阴性对照, 每隔 0.2℃ 采集生成溶解曲线。将扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析。

表 2 抗性基因和转移元件所需的引物序列

Table 2 Primers for resistance genes and mobile elements

基因	引物序列 (5'-3')	片段大小/bp	退火温度/°C	文献
<i>bla_{TEM}</i>	F:ATCAGCAATAAACCCAGC	516	60	[13]
	R:CCCCGAAGAACGTTTTTC			
<i>bla_{CTX-M}</i>	F:ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	300	60	[13]
	R:ATCACKCGGRTCGCCXGGRAT			
<i>bla_{NDM-1}</i>	F:CCCATACCCGGATCAAGAATAA	214	57	[14]
	R:CAGCGAATTGGTGCAGCTACTA			
<i>ermB</i>	F:GATACCGTTTACGAAATTGG	364	58	[15]
	R:GAATCGAGACTTGAGTGTGC			
<i>ermF</i>	F:CGACACAGCTTTGGTTGAAC	309	56	[15]
	R:GGACCTACCTCATAGACAAG			
<i>mefA/E</i>	F:AGTATCATTAACTACTAGTGC	348	45	[15]
	R:TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG			
<i>qnrA</i>	F:AGAGGATTCTCACGCCAGG	580	54	[16]
	R:TGCCAGGCACAGATCTTGAC			
<i>qnrS</i>	F:GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	54	[16]
	R:TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG			
<i>tetA</i>	F:GCTACATCCTGCTTGCCTTC	210	60	[15]
	R:CATAGATCGCCGTGAAGAGG			
<i>tetM</i>	F:ACAGAAAGCTTATTATATAAC	171	55	[15]
	R:TGGCGTGTCTATGATGTTAC			
<i>tetX</i>	F:CAATAATTGGTGGTGGACCC	468	60	[15]
	R:TTCTTACCTTGGACATCCCG			
<i>sulI</i>	F:CACCGAAACATCGCTGCA	158	55	[17]
	R:AAGTTCCGCCGCAAGGCT			
<i>sulII</i>	F:TCCGGTGGAGGCCGTATCTGG	191	60	[17]
	R:CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG			
<i>intI1</i>	F:CTGGATTTCGATCACGGCACG	473	55	[17]
	R:ACATGCGTGTAATCATCGTCG			
<i>Tn916/1545</i>	F:GACAGTATTAAGCCATCAGAC	142	50	[15]
	R:TCTTCCGAACACAATCATCT			
16S rRNA	F:CGGTGAATACGTTTCYCGG	128	55	[17]
	R:GGWTACCTTGTTACGACTT			

1.3 细菌菌群结构分析

采用 515F/806R 引物, 对污泥 DNA 样品经巢式 PCR 扩增后, 使用 Illumina MiSeq 对 16S rRNA 的 V4 区进行高通量测序, 所得序列以 97% 的序列相似性处理生成 OTUs (操作分类单元), 使用 RDP (核糖体数据库项目) 分类器将每个样品中的序列进行分类, 分析细菌菌群结构的演变。

1.4 数据分析

采用 Origin 2017 软件对 ARG 的变化进行分析; 通过 Heml 1.0 软件制作细菌菌群结构

热图，基于欧氏距离的相似度进行聚类分析，采用 Gephi 0.9.1 软件，基于 Spearman 相关分析，对 ARG 和细菌菌群结构进行网络分析，考察二者相关性；采用 Canoco 5.0 (Microcomputer Power, USA) 进行冗余分析 (RDA)，考察污泥性质对污泥处理过程 ARG 分布和细菌群落结构变化的影响。

2 结果与讨论

2.1 生物量的变化

本研究以 16S rRNA 拷贝数的变化作为污泥中生物量变化的参考。A²O 和 A²O-MBR 污泥在微波预处理-厌氧消化过程中 16S rRNA 的变化情况如图 1 所示。虽然 A²O 原污泥中的 VS 低于 A²O-MBR 污泥 (表 1)，但前者的 16S rRNA 拷贝数是后者的 2.6 倍，分别为 4.13×10^{12} copies g⁻¹ (以 TS 计，下同) 和 1.60×10^{12} copies g⁻¹，这可能是由于 A²O 原泥中可溶性有机物的含量高于 A²O-MBR 原泥 (A²O 原泥的 SCOD 为 8780 mg L⁻¹，A²O-MBR 原泥的 SCOD 为 7080 mg L⁻¹)，使得 A²O 原泥中的微生物有更好的生长和增殖条件^[12]。微波预处理对两种污泥 16S rRNA 拷贝数的削减率分别为 81.6% 和 41.6%。但在厌氧消化过程，A²O 微波污泥的生物量增加，而 A²O-MBR 微波污泥的生物量呈持续下降趋势。一方面是由于本研究厌氧进泥中加入了 25% (VS 占比) 的接种污泥^[12]，影响了厌氧进泥的生物量，另一方面也说明在同等厌氧实验条件下，A²O 微波污泥的生物活性高于 A²O-MBR 微波污泥的生物活性。

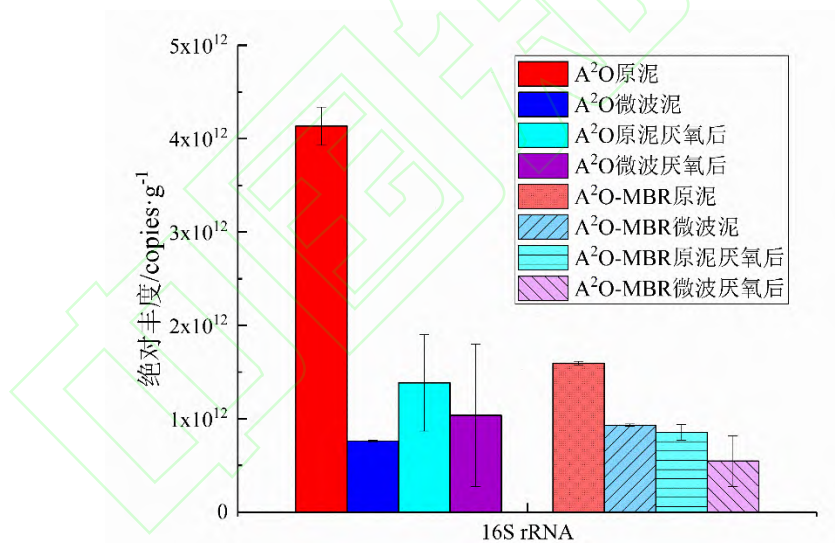


图 1 污泥处理过程中 16S rRNA 的变化

Fig. 1 Variation of 16S rRNA during sludge treatment

2.2 抗性基因绝对丰度的变化

污泥在微波-厌氧消化过程中总 ARG 绝对丰度变化如图 2 所示。A²O 原污泥中总 ARG 为 A²O-MBR 原污泥的 2 倍，这与其生物量较高可为 ARG 提供更多的潜在宿主有关。微波预处理-厌氧消化全过程对 A²O 和 A²O-MBR 污泥所携带的总 ARG 均有较好的削减作用，二者总 ARG 分别削减了 2.62×10^{11} copies g⁻¹ 和 1.14×10^{11} copies g⁻¹，削减率分别为 78.8% 和 68.7%，可见微波-厌氧消化对 A²O 原污泥中总 ARG 的削减效果更佳。其中微波预处理对总 ARG 的削减率分别为 72.1% 和 48.9%，这是由于预处理过程中，微波辐射与热效应、H₂O₂ 的加入及调节的碱性条件在促进细菌溶胞破壁释放有机物的同时，也促进了微生物的

死亡和 DNA 的破坏^[11,18-20], 使得 ARG 的绝对丰度与生物量同时降低; 随后的厌氧消化对微波污泥的总 ARG 又分别削减了 24.1%和 38.8%, 能使 ARG 总绝对丰度进一步降低。与之相比, 在未经预处理的污泥厌氧消化过程中, 总 ARG 削减效率分别为 53.5%和 30.6%, 低于微波预处理-厌氧消化的削减率 (78.8%和 68.7%)。由此可见, 微波预处理有利于污泥处理过程中的抗性污染控制。

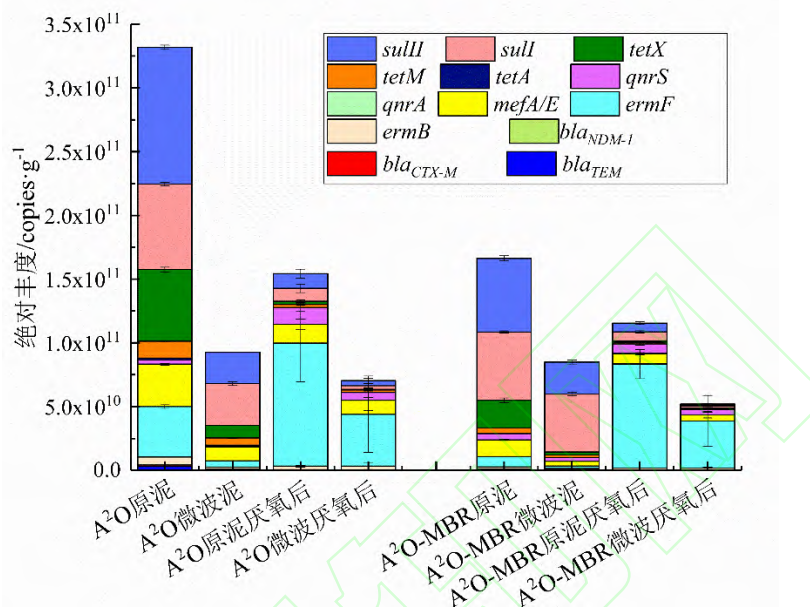


图2 污泥处理过程中 ARG 绝对丰度的变化

Fig. 2 Variation of absolute abundance of ARG during sludge treatment

无论是 A²O 还是 A²O-MBR 原污泥, *sull* 和 *sullI* 均为占比最高的 ARG, 其次是四环素类 ARG, 其中 *tetX* 的占比最高; 再次是大环内酯类 ARG; β -内酰胺类 ARG 和喹诺酮类 ARG 则占比较低。已有研究也发现剩余污泥中最丰富的 ARG 类型为磺胺类 ARG^[18,21]。对比 A²O 和 A²O-MBR 两种剩余污泥中各种类别 ARG 的占比, A²O 污泥中大环内酯类 ARG、 β -内酰胺类和四环素类 ARG 绝对丰度占比均高于 A²O-MBR 污泥 (23.8%、1.26%和 21.4% vs. 13.8%、0.5%和 15.7%), 磺胺类和喹诺酮类 ARG 的占比反而低于 A²O-MBR 污泥 (52.6%和 1.0% vs. 67.0%和 3.0%)。经微波处理后, A²O 和 A²O-MBR 污泥的优势 ARG 仍为 *sull* 和 *sullI*。无论有/无微波预处理, 厌氧消化后两种消化污泥中的优势 ARG 均为 *ermF*, 同时 *qnrS* 和 *bla_{NDM-1}* 的绝对丰度也在厌氧过程增加, 说明 *ermF*、*qnrS* 和 *bla_{NDM-1}* 是污泥厌氧消化过程中难削减、易于增殖传播的抗性基因。课题组前期研究同样发现, 经热水解预处理的污泥在厌氧消化后, *ermF*、*qnrS* 和 *bla_{NDM-1}* 的绝对丰度也增加^[22]。因此, 在今后研究中应更加关注此类抗性基因。

2.3 抗性基因相对丰度的变化

微波预处理-厌氧消化对不同性质污泥 ARG 相对丰度的削减效果如图 3 所示。无论有/无预处理, 消化污泥的总 ARG 相对丰度均高于原污泥, 有预处理的消化污泥低于没有预处理的消化污泥, 这些结果说明: 微波预处理有助于控制污泥处理过程中的总 ARG 相对丰度; 污泥厌氧消化过程可能促使 ARG 宿主增殖及抗性基因水平转移, 造成总 ARG 相对丰度增加。由图 3 可知, 在厌氧消化过程中, *ermF* 相对丰度的增加是造成总 ARG 相对丰度增加的主要原因, 表明与其他目标 ARG 相比, *ermF* 更难以被削减, 而趋向于在污泥中持久性存在。

已有研究也发现^[22,23], 无论是抗生素废水处理所产生的剩余污泥还是城市污水厂产生的剩余污泥, 不论是 BMP 小试实验还是实际污泥厌氧消化工艺, 厌氧过程均可导致 *ermF* 的丰度明显增加, 这主要是因为 *ermF* 常与其他 ARG (如 *tetQ*) 以及遗传元件 (如转座子) 相关联, 从而产生基因共选择的现象^[24,25], 导致 *ermF* 更易存在于系统中。此外, A²O 污泥和 A²O-MBR 两种污泥中 *sulI* 的相对丰度在微波处理后均呈显著增加, 说明 *sulI* 的宿主菌与其他目标 ARG 的宿主细菌相比, 可能对微波预处理更不敏感。

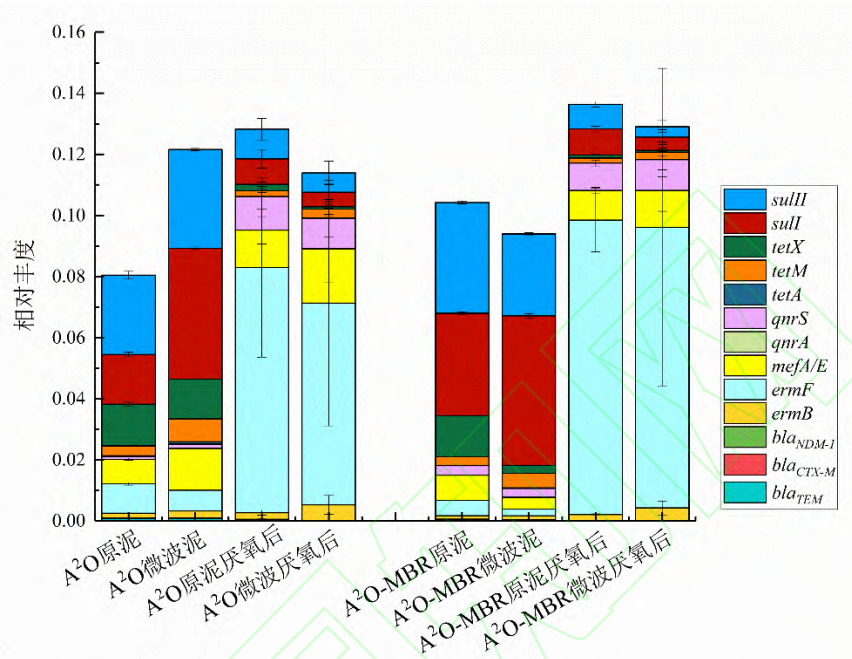


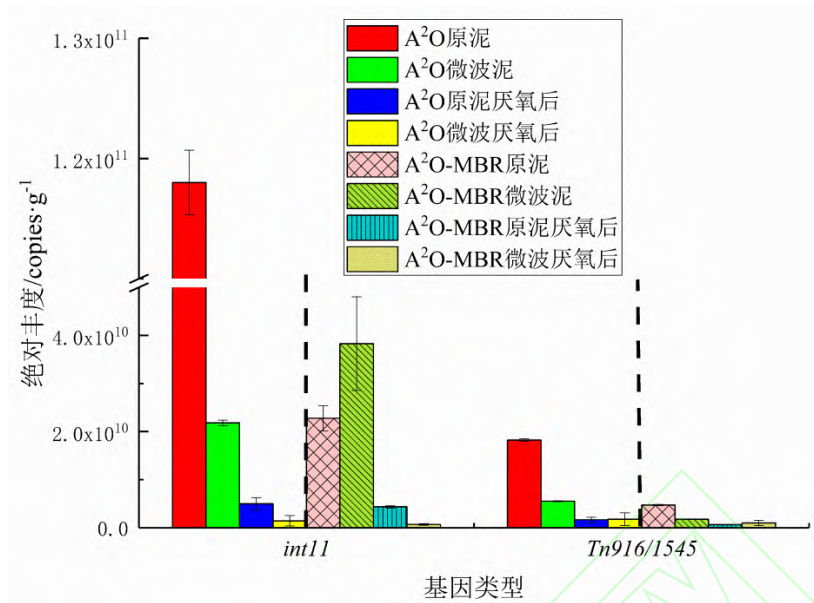
图 3 污泥处理过程中 ARG 相对丰度的变化

Fig. 3 Variation of relative abundance of ARG during sludge treatment

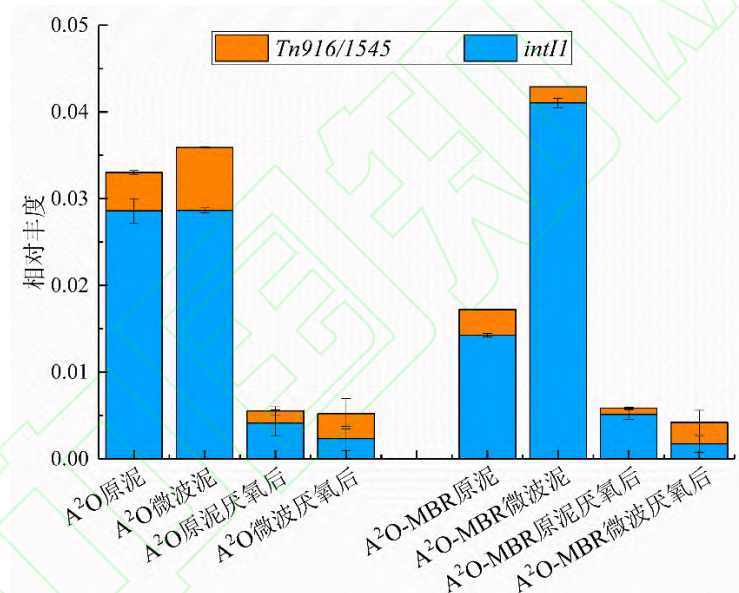
2.4 遗传元件的变化

MGE 在基因水平转移所引起的 ARG 传播扩散中起十分重要的作用^[26]。本研究中 *intI1* 和 *Tn916/1545* 的绝对丰度和相对丰度在污泥处理过程中的变化如图 4 所示。

由图 4 (a) 可知, A²O 原污泥中 *intI1* 和 *Tn916/1545* 的绝对丰度均高于 A²O-MBR 原污泥, 并且几乎所有污泥样品中 *intI1* 的绝对丰度均高于 *Tn916/1545*。无论有/无预处理, 厌氧消化可削减两种 MGE 的绝对丰度, A²O 和 A²O-MBR 原污泥在微波预处理-厌氧消化过程污泥总 MGE 绝对丰度的削减率分别为 97.6%和 93.8%。未经预处理的厌氧消化 MGE 削减效率则相对略低, 分别为 95.1%和 81.9%, 说明有预处理的厌氧消化工艺对转移元件的削减效果更佳。同样的, 由图 4 (b) 可知, 无论有无预处理, 微波预处理-厌氧消化对 *intI1* 和 *Tn916/1545* 相对丰度的削减也较为明显。无论污泥性质如何, 微波过程会导致总 MGE 相对丰度增加。



(a) 绝对丰度



(b) 相对丰度

图 4 污泥处理过程中 MGE 绝对丰度和相对丰度的变化

Fig. 4 Variation of absolute abundance and relative abundance of MGE during sludge treatment

2.5 细菌群落结构的变化

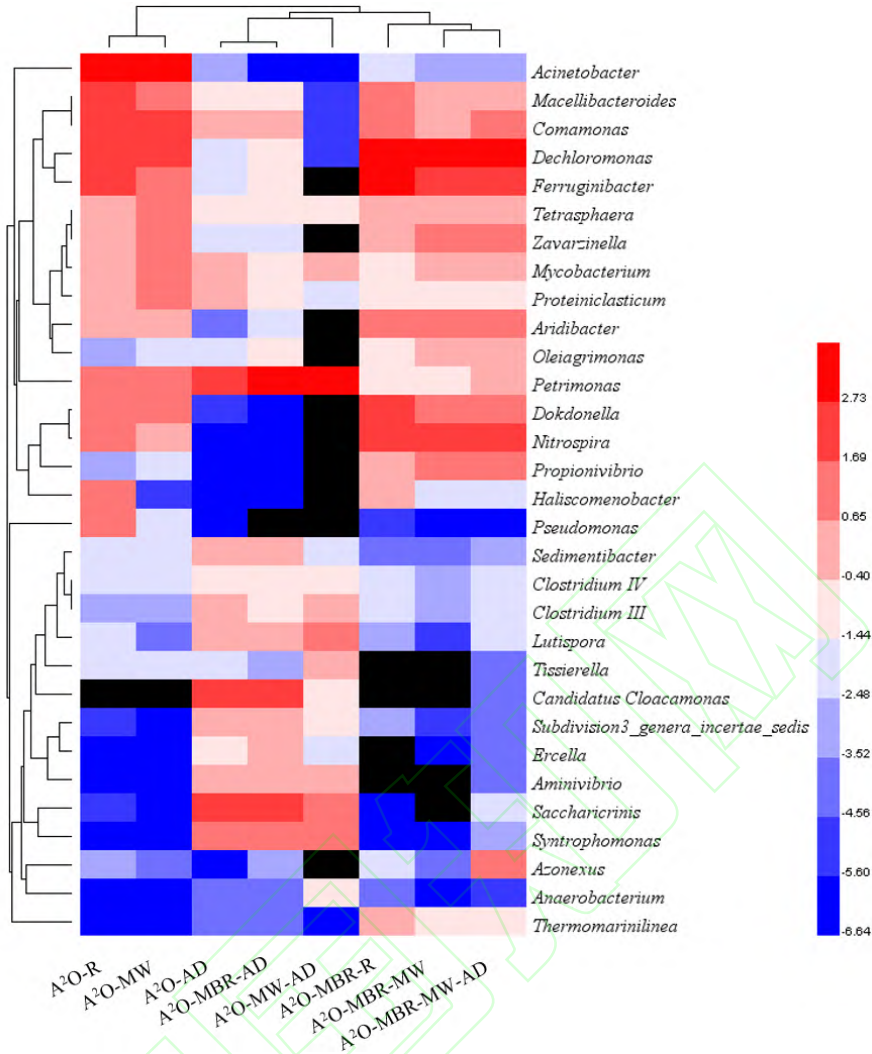
污泥处理过程中细菌菌群结构的演变如图 5 所示。由聚类分析结果可知，A²O 和 A²O-MBR 原污泥的菌群结构差异较大。A²O 污泥中的优势细菌为 *Acinetobacter* (10.7%)、*Macellibacteroides* (4.0%) 和 *Dechloromonas* (3.9%)，而 A²O-MBR 污泥中的优势菌群为 *Ferruginibacter* (7.9%)、*Dechloromonas* (7.2%) 和 *Nitrospira* (6.1%)，其中 *Ferruginibacter* 可以有效降解有机物，*Dechloromonas* 是典型的反硝化除磷菌，*Nitrospira* 是废水处理过程中常见的亚硝酸盐氧化菌 (NOB) [27-29]，由此可见，原污泥中含有大量去除营养物的功能菌。

从图 5 的聚类分析结果可知，A²O 原污泥和 A²O 微波泥结构相似，A²O-MBR 原污泥和 A²O-MBR 微波泥结构相似。微波后丰度均增加的菌属主要有 *Dechloromonas*、*Tetrasphaera*、

Proteiniclasticum、*Zavarzinella* 和 *Mycobacterium* 等(增幅为 0.1~6.5%)。其中 *Dechloromonas* 可以以 O_2 、 ClO_3^- 、 ClO_4^- 和 NO_3^- 为电子受体, 分解有机酸, 并完全还原氯酸盐和高氯酸盐为氯化物, 不能形成孢子^[30]。*Proteiniclasticum* 是严格厌氧的蛋白水解细菌, 水解产物为乙酸、丙酸和异丁酸, 不能形成孢子^[31]。*Tetrasphaera* 菌属被认为是重要的聚磷菌, 可在厌氧、好氧交替的环境里富集磷酸盐, 而且具有反硝化和发酵的功能, 不能形成孢子^[32]。*Zavarzinella* 为需氧菌, 可降解多种有机物, 如碳水化合物、氨基酸和有机酸等^[33]。*Mycobacterium* 菌属大部分为好氧和微需氧菌, 可引起人类结核病等疾病, 大多数以自由活动的形式存在于土壤和水中, 也属于非孢子生成菌^[34]。由此可知, 微波处理后, 丰度增加的优势菌属多为非孢子生成菌, 而且多个菌属并非严格厌氧菌, 这一结果与热水解后丰度增加的菌多为孢子生成菌^[22]显著不同。此外, 由图 5 的聚类分析可知, 微波前后污泥的菌群结构较为相似。这些结果说明, 本研究微波过程的辐射、热效应和 H_2O_2 的氧化作用对污泥中微生物的刺激性相对较小, 非孢子生成菌易于存活, 未能显著改变菌群结构。

对于厌氧消化阶段, 未经预处理的 A^2O 和 A^2O -MBR 污泥在厌氧消化后的优势菌属相似, 均为 *Petrimonas* (5.7% 和 7.8%)、*Saccharicrinis* (3.8% 和 3.4%) 和 *Candidatus Cloacamonas* (3.8% 和 5.3%); 而有预处理的厌氧消化, 细菌菌群结构则发生了较大变化: A^2O 厌氧消化泥中的优势细菌变为 *Petrimonas* (10.2%)、*Lutispora* (2.2%) 和 *Saccharicrinis* (2.1%), A^2O -MBR 的优势细菌则仍为 *Dechloromonas* (11.4%)、*Ferruginibacter* (5.1%) 和 *Nitrospira* (3.7%)。以上结果表明, 污泥性质对无预处理的厌氧消化菌群结构变化影响较小, 但对预处理-厌氧消化工艺的菌群结构变化影响较大。无论有/无微波预处理, 厌氧消化后丰度均增加的菌属为 *Petrimonas*、*Clostridium IV*、*Lutispora*、*Clostridium III*、*Anaerobacterium*、*Saccharicrinis*、*Subdivision3_genera_incertaine_sedis*、*Syntrophomonas*、*Aminivibrio*、*Ercella* 和 *Candidatus Cloacamonas*。其中 *Petrimonas* 是一种在厌氧期间可产生乙酸盐、 H_2 和 CO_2 的发酵细菌^[35]。*Lutispora* 是严格厌氧的中度嗜热菌, 可利用蛋白质、氨基酸等为底物生成 VFA, 如乙酸、丙酸、异丁酸和异戊酸^[36]。*Clostridium IV* 和 *Clostridium III* 为典型的发酵菌群; *Syntrophomonas* 具有降解短链 VFAs 和协同产甲烷的能力, 有利于正向促进乙酸产甲烷代谢途径, 提高沼气产量率^[37]等。由此可见, 无论有/无预处理, 厌氧消化过程中促进产酸发酵和协同产甲烷过程的细菌会大量增殖, 与优势菌属共同促进有机物的降解和甲烷的产生, 从而使厌氧消化系统稳定运行。

总之, 不同性质的污泥在微波预处理-厌氧消化过程中细菌群落的演变及其影响因素较为复杂, 根据已有研究, 微生物群落结构对 ARG 的转归有较大的贡献, 因此, 本研究中微生物群落结构对 ARG 的转归可能也有十分重要的作用。



每个样品取前 10 菌属，细菌丰度以 2 为底的对数处理

图 5 属水平菌群结构的热图

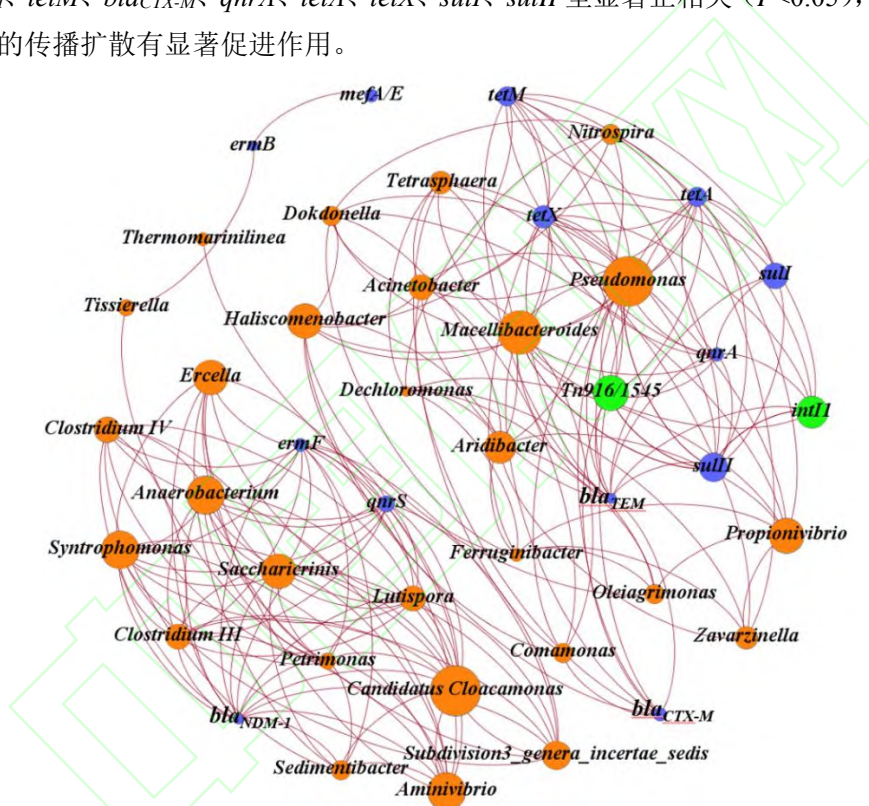
Fig.5 Heat map of the genus horizontal flora

2.6 ARG 与细菌群落结构的关系

为了明确 ARG、MGE 和细菌群落结构间的内在联系，本研究基于 Spearman 相关性分析进行了网络分析（图 6）。由图可知，本研究中部分菌属与多种 ARG、MGE 密切正相关，如 *Macellibacteroides* 和 *Pseudomonas* 均与 *bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M}、*qnrA*、*tetA*、*tetX*、*tetM*、*sull* 和 *sullI* 显著正相关，*Acinetobacter* 同时与 *bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M}、*tetA*、*tetX* 和 *tetM* 显著正相关等；此外，*Macellibacteroides* 同时与 *intI1* 和 *Tn916/1545* 显著正相关 ($P < 0.05$)，*Pseudomonas* 与 *Tn916/1545* 显著正相关 ($P < 0.05$)。由群落结构演替结果可知，*Acinetobacter*、*Macellibacteroides* 和 *Pseudomonas* 的丰度在微波预处理过程中均呈降低趋势，而这 3 种菌属均与多种 ARG 显著正相关，说明预处理过程中，以上菌属丰度的降低对总 ARG 的降低可能起到了重要贡献。*Pseudomonas* 和 *Acinetobacter* 菌属中包含有典型致病菌；虽然未见 *Macellibacteroides* 是致病菌的报道，但已有研究发现 *Macellibacteroides* 对氨基糖苷类的卡那霉素有耐药性^[38]，因此这些菌属在污泥厌氧消化过程中具有携带多种 ARG 的潜在风险，且具有致病性的潜在危险，可能会为下游的环境安全带来威胁，应在今后的研究中予以关注。

此外, *bla_{NDM-1}*、*ermF* 和 *qnrS* 均与 *Clostridium IV*、*Lutispora*、*Clostridium III*、*Saccharicrinis*、*Subdivision3_genera_incertae_sedis*、*Anaerobacterium*、*Syntrophomonas* 和 *Candidatus Cloacamonas* 显著正相关 ($P<0.05$)，而这些菌属在厌氧过程中均丰度升高，表明以上菌属有可能会促进厌氧消化过程中 ARG 的增加。此外, *bla_{NDM-1}* 和 *ermF* 还与 *Petrimonas*、*Sedimentibacter*、*Aminivibrio* 和 *Ercella* 显著正相关 ($P<0.05$)，说明这两种 ARG 与其他 ARG 相比而言，潜在宿主范围更广，传播耐药性的风险更高。

通过网络分析还发现，部分 ARG 和 MGE 之间也有显著相关性，如 *bla_{TEM}* 与 *qnrA*、*tetA*、*tetM*、*tetX*、*sullI*、*sullII* 呈显著正相关 ($P<0.01$)，*qnrA* 与 *tetA*、*tetM*、*tetX*、*sullI*、*sullII* 呈显著正相关 ($P<0.01$)，*tetA*、*tetM* 和 *tetX* 均与 *sullI* 和 *sullII* 呈显著正相关 ($P<0.01$)；此外，遗传元件 *intI1* 与 *bla_{TEM}*、*qnrA*、*tetA*、*tetM*、*tetX*、*sullI*、*sullII* 呈显著正相关 ($P<0.05$)，*Tn916/1545* 与 *bla_{TEM}*、*tetM*、*bla_{CTX-M}*、*qnrA*、*tetA*、*tetX*、*sullI*、*sullII* 呈显著正相关 ($P<0.05$)，可见 MGE 对 ARG 的传播扩散有显著促进作用。



基于 Spearman 相关性分析, $P<0.05$, 其中橙色节点代表细菌, 绿色节点代表 MGE, 蓝色节点代表 ARG, 节点的大小代表与该节点相关的节点数多少, 边代表物种间相关关系

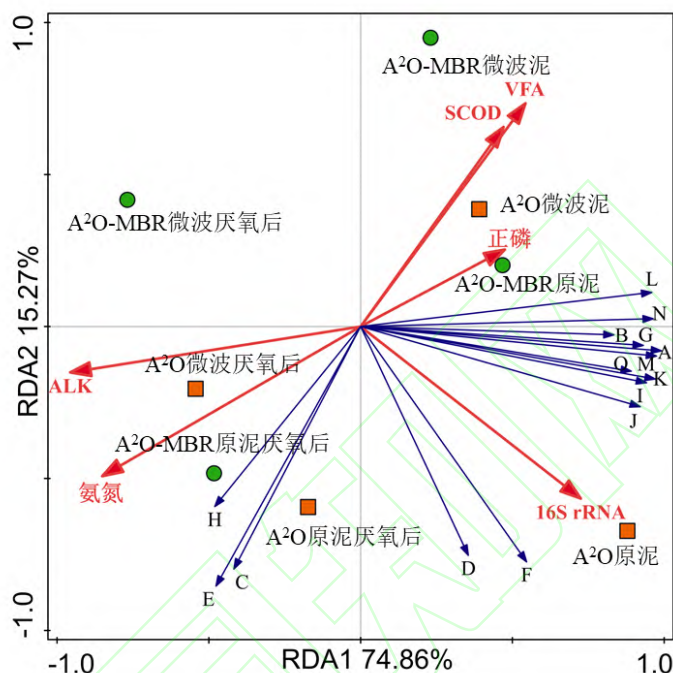
图 6 污泥在预处理-厌氧消化过程中 ARG 和细菌群落结构的关系

Fig.6 Relationship between ARG and bacterial community structure during sludge pretreatment-anaerobic digestion

2.7 污泥性质对 ARG 和菌群结构的影响

本研究通过 RDA 分析考察微波-厌氧消化过程中，污泥性质对 ARG 分布的影响以及污泥性质与细菌群落结构演替之间的关系（图 7 和图 8）。图 7 中，RDA 分析结果对 ARG 和 MGE 变化的解释度为 97.80%，其中轴 1 的解释度为 74.86%，轴 2 的解释度为 15.27%。 A^2O 和 A^2O -MBR 的原污泥、微波泥和厌氧消化污泥这些样本的分布较分散，说明不同样本中 ARG 和 MGE 分布的相似度较低。其中， A^2O 和 A^2O -MBR 的原污泥在轴 1 的投影距离相对较远，说明不同来源的原污泥中携带的初始 ARG 差异较大；而 A^2O 原泥厌氧后、 A^2O 微波

厌氧后、A²O-MBR 原泥厌氧后、以及 A²O-MBR 微波厌氧后的污泥样品在轴 1 投影距离相对较近，说明无论有/无预处理，厌氧消化工艺过程对污泥中 ARG 和 MGE 的分布有趋同性的作用。16S rRNA、氨氮和正磷与 ARG 和 MGE 夹角相对较小，说明污泥特性中，这 3 种指标对 ARG 和 MGE 分布的影响力最大，其中生物量即 16S rRNA，对 *ermB*、*tetM* 和 *mefA/E* 的影响较大，氨氮与 *bla_{NDM-1}*、*ermF* 和 *qnrS* 这 3 种 ARG 的分布密切相关。*intI1* 和 *Tn916/1545* 均与多种 ARG 密切相关，再次表明本研究中 MGE 对 ARG 的传播和水平转移有促进作用。

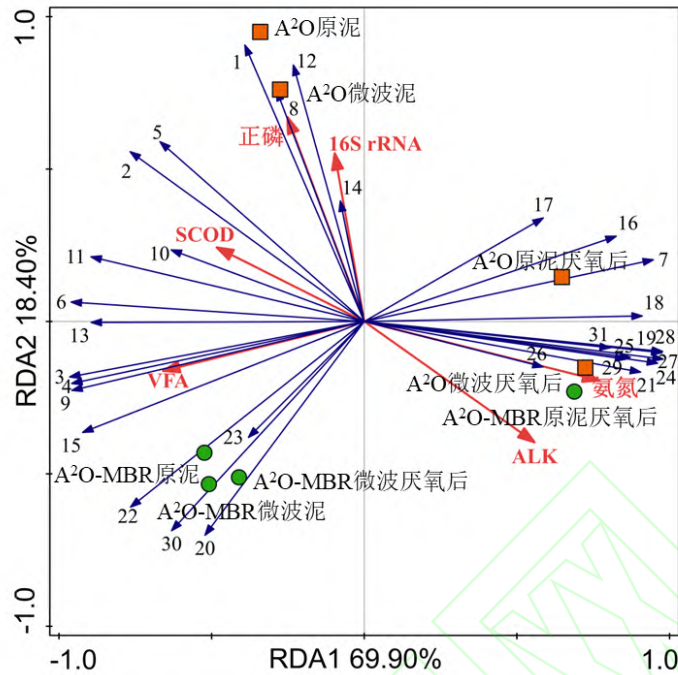


红色箭头代表环境变量；蓝色箭头代表 ARG 和 MGE: A. *bal_{TEM}*; B. *bal_{CTX-M}*; C. *bal_{NDM-1}*; D. *ermB*; E. *ermF*; F. *mefA/E*; G. *qnrA*; H. *qnrS*; I. *tetA*; J. *tetM*; K. *tetX*; L. *sull*; M. *sullI*; N. *intI1*; O. *Tn916/1545*;

图 7 ARG 和 MGE 与污泥性质的 RDA 分析

Fig.7 RDA analysis of ARG, MGE and sludge characteristics

污泥性质对菌群结构影响的 RDA 分析如图 8 所示，RDA 分析结果对细菌群落结构变化的解释度为 98.50%，其中轴 1 的解释度为 69.90%，轴 2 的解释度为 18.40%。由图中污泥性质与菌群结构关系表明，污泥性质常与菌属的功能密切相关。例如，VFA 与 *Dechloromonas*、*Nitrospira*、*Ferruginibacter* 和 *Aridibacter* 正相关，其中 *Dechloromonas* 是具有水解功能的细菌^[39]，并且在厌氧条件下可降解碳水化合物和蛋白质，*Ferruginibacter* 与葡萄糖的发酵有关，并且可促进水解从而使污泥减量化^[39]，*Aridibacter* 则可有效利用低浓度蛋白质作为其生长底物^[40]，这些细菌在厌氧消化过程中参与了有机物的水解及产酸发酵过程，从而与厌氧消化的重要中间产物 VFA 密切相关；同时这些细菌是 A²O 原泥、A²O-MBR 原泥、A²O-MBR 微波泥和 A²O-MBR 微波厌氧消化泥中的优势细菌，可见 VFA 对厌氧污泥中细菌群落结构变化有着重要影响作用。氨氮与多个菌属密切相关，如 *Anaerobacterium*、*Ercella*、*Saccharicrinis*、*Clostridium III* 和 *Syntrophomonas*。其中 *Saccharicrinis* 菌属中已检测到固氮酶的同源基因 *nif* 基因^[41]，说明该菌属有潜在的固氮能力。正磷和 16S rRNA 则对 *Acinetobacter*、*Pseudomonas*、*Proteinclasticum* 和 *Mycobacterium* 有显著正向影响。其中的 *Acinetobacter* 和 *Pseudomonas* 均为聚磷微生物，跟系统中磷的迁移转化有关^[42]。



红色箭头代表环境变量(污泥性质);蓝色箭头代表物种变量(属水平): 1. *Acinetobacter*; 2. *Macellibacteroides*; 3. *Dechloromonas*; 4. *Ferruginibacter*; 5. *Comamonas*; 6. *Dokdonella*; 7. *Petrimonas*; 8. *Pseudomonas*; 9. *Nitrospira*; 10. *Haliscomenobacter*; 11. *Tetrasphaera*; 12. *Proteiniclasticum*; 13. *Zavarzinella*; 14. *Mycobacterium*; 15. *Aridibacter*; 16. *Sedimentibacter*; 17. *Tissierella*; 18. *Clostridium IV*; 19. *Lutispora*; 20. *Oleigrimonas*; 21. *Clostridium III*; 22. *Propionivibrio*; 23. *Azonexus*; 24. *Saccharicrinis*; 25. *Subdivision3_genera_incertae_sedis*; 26. *Anaerobacterium*; 27. *Syntrophomonas*; 28. *Aminivibrio*; 29. *Ercella*; 30. *Thermomarinilinea*; 31. *Candidatus Cloacamonas*;

图8 菌群结构与污泥性质的RDA分析

Fig.8 RDA analysis of bacterial community structure and sludge characteristics

3 结论

(1) A²O 和 A²O-MBR 原污泥的菌群结构差异较大;微波预处理不会显著改变菌群结构;污泥性质对无预处理的厌氧消化污泥菌群结构影响较小,但对预处理-厌氧消化污泥的菌群结构变化影响较大。

(2) 不同来源的原污泥中携带的初始 ARG 差异较大,但无论有/无预处理,厌氧消化工艺过程对污泥中 ARG 和 MGE 的分布有趋同性的作用。无论有/无预处理的污泥厌氧消化工艺, *ermF*、*qnrS* 和 *bla_{NDM-1}* 均是厌氧消化过程中难以削减、易于增殖传播的抗性基因,而 *Clostridium IV*、*Clostridium III*、*Lutispora* 和 *Saccharicrinis* 等多个菌属均与这 3 种 ARG 显著相关,对这 3 种 ARG 的增殖与传播有促进作用。

(3) 污泥特性中,16S rRNA、氨氮和正磷对 ARG 和 MGE 分布的影响力最高;污泥性质对细菌群落结构有重要影响,与部分功能菌属丰度变化密切相关。

参考文献:

- [1] Gao H, Zhang L X, Lu Z H, *et al.* Complex migration of antibiotic resistance in natural aquatic environments [J]. *Environmental Pollution*, 2018, **232**: 1-9.
- [2] Munir M, Wong K, Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan [J]. *Water Research*, 2011, **45**(2): 681-693.
- [3] Yuan Q B, Zhai Y F, Mao B Y, *et al.* Fates of antibiotic resistance genes in a distributed swine wastewater treatment plant [J]. *Water Environment Research*, 2019, **91**(12): 1565-1575.
- [4] Zhang J Y, Lu T D, Shen P H, *et al.* The role of substrate types and substrate microbial community on the fate of antibiotic resistance genes during anaerobic digestion [J]. *Chemosphere*, 2019, **229**: 461-470.
- [5] Zhang J Y, Chen M X, Sui Q W, *et al.* Fate of antibiotic resistance genes and its drivers during anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge based on microwave pretreatment [J]. *Bioresource Technology*, 2016, **217**: 28-36.
- [6] Ma Y J, Wilson C A, Novak J T, *et al.* Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**(18): 7855-7861.
- [7] Xia J T, Sun H H, Zhang X X, *et al.* Aromatic compounds lead to increased abundance of antibiotic resistance genes in wastewater treatment bioreactors [J]. *Water Research*, 2019, **166**: doi: 10.1016/j.watres.2019.115073.
- [8] Liu M T, Li Q L, Sun H H, *et al.* Impact of salinity on antibiotic resistance genes in wastewater treatment bioreactors [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, **338**: 557-563.
- [9] 路雪婷, 徐享, 刘吉宝, 等. 不同预处理方法强化抗生素废水剩余污泥厌氧消化实验研究 [J]. *中国沼气*, 2017, **35**(3): 33-38.
- [10] Serrano A, Siles J A, Martin M A, *et al.* Improvement of anaerobic digestion of sewage sludge through microwave pretreatment [J]. *Journal of Environmental Management*, 2016, **177**: 231-239.
- [11] Tong J, Liu J B, Zheng X, *et al.* Fate of antibiotic resistance bacteria and genes during enhanced anaerobic digestion of sewage sludge by microwave pretreatment [J]. *Bioresource Technology*, 2016, **217**: 37-43.
- [12] 房平, 唐安平, 付兴民, 等. 污泥性质对微波预处理-厌氧消化的影响及古菌群落结构分析 [J]. *环境科学*, 2018, **39**(11): 5108-5115.
- Fang P, Tang A P, Fu X M, *et al.* Impacts of sludge characteristics on anaerobic digestion with microwave pretreatment and archaeal community structure analysis [J]. *Environmental Science*, 2018, **39**(11): 5108-5115.
- [13] Zhang J Y, Lu T D, Wang Z Y, *et al.* Effects of magnetite on anaerobic digestion of swine manure: Attention to methane production and fate of antibiotic resistance genes [J]. *Bioresource Technology*, 2019, **291**: doi: 10.1016/j.biortech.2019.121847
- [14] 杜娜. *bla*_{NDM-1} 基因在耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌中播散机制研究[D]. 昆明:昆明医科大学, 2018. 1-57.
- [15] 李慧莉, 裴媛玫, 李姗, 等. 热水解污泥厌氧消化过程中肠球菌抗生素抗性基因与毒力基因的转归 [J]. *环境科学*, 2019, **40**(7): 3270-3275.

Li H L, Pei Y M, Li S, *et al.* Fate of antibiotic resistance genes and virulence genes in *Enterococci* during anaerobic digestion process of thermal hydrolyzed sludge[J]. Environmental Science, 2019, **40**(7): 3270-3275.

[16] Tong J, Tang A P, Wang H Y, *et al.* Microbial community evolution and fate of antibiotic resistance genes along six different full-scale municipal wastewater treatment processes [J]. Bioresource Technology, 2019, **272**: 489-500.

[17] Sui Q W, Jiang C, Zhang J Y, *et al.* Does the biological treatment or membrane separation reduce the antibiotic resistance genes from swine wastewater through a sequencing-batch membrane bioreactor treatment process [J]. Environment International, 2018, **118**: 274-281.

[18] Zhang J Y, Liu J B, Wang Y W, *et al.* Profiles and drivers of antibiotic resistance genes distribution in one-stage and two stage sludge anaerobic digestion based on microwave-H₂O₂ pretreatment [J]. Bioresource Technology, 2017, **241**: 573-581.

[19] Wang Y W, Wei Y S, Liu J X. Effect of H₂O₂ dosing strategy on sludge pretreatment by microwave-H₂O₂ advanced oxidation process [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, **169**(1-3):680-684.

[20] Tan R, Miyanaga K, Toyama K, *et al.* Changes in composition and microbial communities in excess sludge after heat-alkaline treatment and acclimation [J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, **52**(2-3):151-159.

[21] 张欢欢, 贲伟伟, 邵天华, 等. 升级 A/O 工艺污水处理系统中抗生素抗性基因的分布与去除研究 [J]. 环境科学学报, 2020, **40**(4): 1160-1166.

[22] Tong J, Fang P, Zhang J Y, *et al.* Microbial community evolution and fate of antibiotic resistance genes during sludge treatment in two full-scale anaerobic digestion plants with thermal hydrolysis pretreatment [J]. Bioresource Technology, 2019, **288**: doi: 10.1016/j.biortech.2019.121575

[23] Tong J, Lu X T, Zhang J Y, *et al.* Occurrence of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in *enterococci* and genomic DNA during anaerobic digestion of pharmaceutical waste sludge with different pretreatments [J]. Bioresource Technology, 2017, **235**: 316-324.

[24] Hernandez A, Sanchez M B, Martinez J L. Quinolone resistance: much more than predicted [J]. Frontiers in Microbiology, 2011, **2**: doi: 10.3389/fmicb.2011.00022

[25] Roberts M C, Sutcliffe J, Courvalin P, *et al.* Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, **43**(12): 2823-2830.

[26] Alekshun M N, Levy S B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance [J]. Cell, 2007, **128**(6): 1037-1050.

[27] Xu J, He J G, Wang M F, *et al.* Cultivation and stable operation of aerobic granular sludge at low temperature by sieving out the batt-like sludge [J]. Chemosphere, 2018, **211**: 1219-1227.

[28] Yun G, Lee H, Hong Y, *et al.* The difference of morphological characteristics and population structure in PAO and DPAO granular sludges [J]. Journal of Environmental Sciences, 2018, **76**: 388-402.

[29] Wu W Z, Yang L H, Wang J L. Denitrification performance and microbial diversity in a packed-bed bioreactor using PCL as carbon source and biofilm carrier [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, **97**(6): 2725-2733.

[30] Achenbach L A, Michaelidou U, Bruce R A, *et al.* *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant

- (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51**(2): 527-533.
- [31] Zhang K G, Song L, Dong X Z. *Proteinoclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic proteolytic bacterium isolated from yak rumen[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, **60**(9):2221-2225.
- [32] Kristiansen R, Nguyen H T T, Saunders A M, *et al.* A metabolic model for members of the genus *Tetrasphaera* involved in enhanced biological phosphorus removal [J]. *The ISME Journal*, 2013, **7**(3): 543-554.
- [33] Kulichevskaya I S, Baulina O I, Bodelier P L E, *et al.* *Zavarzinella formosa* gen. nov., sp. nov., a novel stalked, Gemmata-like planctomycete from a Siberian peat bog [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, **59**(2): 357-364.
- [34] Steven L P, David W W. Chapter Nine-*Mycobacterium* [M]. *Microbiology of waterborne diseases*. London: Elsevier Ltd., 2014. 177-207.
- [35] 常笑. 微生物在铁氧化物促进短链脂肪酸产甲烷过程中的关系-基于 SPSS 的统计学分析[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018.1-88.
- [36] Shiratori H, Ohiwa H, Ikeno H, *et al.* *Lutispora thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming bacterium isolated from a thermophilic methanogenic bioreactor digesting municipal solid wastes [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, **58**(4): 964-969
- [37] 赵光, 郑盼, 郭海娟, 等. 糖浆废水与牛粪厌氧共发酵产甲烷特性研究 [J]. *可再生能源*, 2016, **34**(9): 1403-1410.
- [38] Jabari L, Gannoun H, Cayol J L, *et al.* *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Porphyromonadaceae* isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, **62**(10): 2522-2527.
- [39] Zheng Y, Cheng C, Zhou Z, *et al.* Insight into the roles of packing carriers and ultrasonication in anaerobic side-stream reactor coupled membrane bioreactors: Sludge reduction performance and mechanism [J]. *Water Research*, 2019, **155**: 310-319.
- [40] Pascual J, Wuest P K, Geppert A, *et al.* Novel isolates double the number of chemotrophic species and allow the first description of higher taxa in Acidobacteria subdivision 4 [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2015, **38**(8): 534-544.
- [41] Inoue J, Oshima K, Suda W, *et al.* Distribution and evolution of nitrogen fixation genes in the Phylum Bacteroidetes [J]. *Microbes and Environments*, 2015, **30**(1): 44-50.
- [42] Han Y H, Fu T, Wang S S, *et al.* Efficient phosphate accumulation in the newly isolated *Acinetobacter junii* strain LH4[J]. *Biotech*, 2018, **8**(7): doi: 10.1007/s13205-018-1338-4.