

基于 *mcrA* 基因的厌氧颗粒污泥产甲烷菌群分析

刘春¹, 李亮¹, 马俊科¹, 吴根², 杨景亮^{1*}

(1. 河北科技大学环境科学与工程学院, 石家庄 050018; 2. 科技部基础研究管理中心, 北京 100862)

摘要:基于 *mcrA* 基因对阿维菌素废水处理工业化 UASB 厌氧颗粒污泥中产甲烷菌群进行分析, 并与基于 16S rRNA 基因的产甲烷菌群分析结果进行比较. 结果表明, 基于 2 种目标基因 PCR 产物的 DGGE 图谱存在差异, 但根据图谱计算所得产甲烷菌群 Shannon 多样性指数、Margalef 丰富度指数和 Berger-Parker 优势度指数没有差异, 表明基于 2 种目标基因的产甲烷菌群多样性分析基本一致. 基于不同目标基因的优势产甲烷菌群系统发育种属的分析结果大体相似, 产甲烷杆菌目和产甲烷八叠球菌目是厌氧颗粒污泥样品中的优势产甲烷种群; 同时, 分析结果的差异表明 2 种目标基因的检测特异性不完全相同. 基于 2 种目标基因的产甲烷菌群 FISH 杂交区域具有很高的-致性, 但杂交区域面积有所差异. 基于 *mcrA* 基因 FISH 检测的产甲烷菌群平均相对丰度为 $24.25\% \pm 6.47\%$, 低于基于 16S rRNA 基因 FISH 检测结果 ($33.42\% \pm 2.34\%$). 以上结果表明, 基于 *mcrA* 基因与基于 16S rRNA 基因的产甲烷菌群分析结果具有较高的相似度, *mcrA* 基因可以作为 16S rRNA 基因的替代目标基因.

关键词: *mcrA* 基因; 厌氧颗粒污泥; 产甲烷菌群; PCR-DGGE; FISH

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)04-1114-06

Analysis of Methanogenic Community of Anaerobic Granular Sludge Based on *mcrA* Gene

LIU Chun¹, LI Liang¹, MA Jun-ke¹, WU Gen², YANG Jing-liang¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. Basic Research Service Center, Ministry of Science and Technology, Beijing 100862, China)

Abstract: The methanogenic community in anaerobic granular sludge from a full-scale UASB treating avernecitin wastewater was analyzed based on *mcrA* gene, compared to 16S rRNA gene. The results indicated that the diversity indices of methanogenic community, including Shannon diversity index, Margalef richness index and Berger-Parker dominance index, were no difference between *mcrA* gene-based and 16S rRNA gene-based PCR products analysis by DGGE, although their DGGE band patterns were different, implying that the diversity analysis of methanogenic community based on *mcrA* genes was consistent with 16S rRNA gene. The phylogenetic analysis of dominant methanogenic populations based on these two target genes also showed resemble and Methanobacteriales and Methanosarcinales were determined to be the main orders of methanogenic populations in anaerobic granular sludge. On the other hand, the difference in phylogenetic analysis suggested simultaneously some group-specific of the two target genes. The hybridization of methanogenic community in FISH analysis based on two target genes was almost identical except a little different hybridization areas. The average relative abundance of methanogenic community was $24.25\% \pm 6.47\%$ detected by FISH based on *mcrA* gene, lower than that based on 16S rRNA gene ($33.42\% \pm 2.34\%$). Then it could be concluded that the analysis of methanogenic community based on *mcrA* gene and 16S rRNA gene exhibited high resemblance and *mcrA* gene could used to be target gene for methanogenic community, as an alternative of 16S rRNA gene.

Key words: *mcrA* gene; anaerobic granular sludge; methanogenic community; PCR-DGGE; FISH

厌氧颗粒污泥是高效厌氧反应器稳定和高效运行的关键, 产甲烷菌群是厌氧颗粒污泥中的主要功能菌群, UASB 颗粒污泥中的产甲烷菌数量可达 $10^9/\text{mL}$ ^[1]. 目前, 现代分子生物学技术已经广泛应用于包括厌氧颗粒污泥在内的不同环境样品中的产甲烷菌群分析^[2-13], 而且多数研究都是基于 16S rRNA 基因. 有研究认为, 基于 16S rRNA 基因的 PCR 引物对产甲烷菌群的-特异性会受到产甲烷菌群自身系统发育多样性的影响, 因而 *mcrA* 基因在产甲烷菌群分析中逐渐受到关注^[14, 15].

mcrA 基因编码甲基辅酶 M 还原酶 (MCR) 的 α

亚基. MCR 是产甲烷过程中的一种关键酶, 在甲烷化的最后一步反应中, 将辅酶 M 连接的甲基催化还原为 CH_4 ^[16]. MCR 存在于所有已知的产甲烷菌中, 且具有很强的产甲烷菌-特异性, 因此 *mcrA* 可以作为目标基因用于产甲烷菌的系统发育分析; 同时, 研究表明, 基于 *mcrA* 基因的产甲烷菌系统发育分析与 16S rRNA 基因结果非常相似, 可以作为 PCR 的替

收稿日期: 2010-05-05; 修订日期: 2010-06-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50878072); 河北省自然科学基金项目 (E2008000694, E2009000709)

作者简介: 刘春 (1976 ~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为废水处理技术. E-mail: liuchun02@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: yangjingliang@hebust.edu.cn

代目标基因用于产甲烷菌群的分子生物学分析^[17-19]。

本研究以阿维菌素废水处理工业化厌氧颗粒污泥为研究对象,以 *mcrA* 基因为 PCR 的目标基因,利用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoreses, DGGE) 技术,对厌氧颗粒污泥中的优势产甲烷菌群的系统发育进行了分析,并基于 *mcrA* 基因利用荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术对产甲烷菌群进行了原位分析。同时,对基于 *mcrA* 基因和 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 及 FISH 检测结果进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 污泥样品

本研究所用厌氧颗粒污泥样品取自河北石家庄某阿维菌素废水处理工业化 UASB 反应器 (500 m³) ,其平均 VSS/SS 值为 0.882。

1.2 污泥样品总 DNA 提取

采用改进后的工业化废水处理反应器污泥样品总 DNA 提取方法对厌氧颗粒污泥样品总 DNA 进行提取^[20]。总 DNA 提取产物用 0.7% 的琼脂糖电泳检测,并用凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国) 观察电泳结果。总 DNA 纯度和浓度采用紫外-可见分光光度计检测,其中纯度以 A_{260}/A_{280} 作为指标。

1.3 总 DNA 样品的 PCR 扩增

以总 DNA 样品为模板,以 *mcrA* 基因引物和 16S rRNA 基因引物进行 PCR 扩增。其中,基于 *mcrA* 的 PCR 引物序列为: MLf (5'-GGTGGTGTGTTGACATCACACARTAYGCWACAGC-3') 和 MLr (5'-TTCATTGC-RTAGTTWGGRTAGTT-3')^[17]; 基于 16S rRNA 基因的 PCR 引物序列为: ARC787F (5'-ATTAGATACCCSBGTAGTCC-3') (GC 夹为 5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG-3') 和 ARC1059R (5'-GCCATGCACCWCCTCT-3')^[21]。以上引物均由上海生工 (Sangon) 合成。

PCR 反应体系为 50 μ L, 包括: 5 μ L PCR Buffer、1 μ L dNTPmixs、5 μ L DNA 模板、1 μ L 上游引物、1 μ L 下游引物、1 μ L *Taq* 酶和 36 μ L 无菌水。

PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 1 min, 65℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 每个循环退火温度降低 0.5℃, 直至 55℃, 20 个循环; 然后 94℃ 变性 1 min; 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 10 个循环; 72℃ 最终延伸 8 min。用 1% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

1.4 PCR 产物的 DGGE 分析

污泥样品总 DNA 的 PCR 产物采用 Bio-Rad 变性梯度凝胶电泳仪进行分析。根据 PCR 产物的大小, 分别选用 6% (基于 *mcrA* 的 PCR 产物) 和 8% (基于 16S rRNA 基因的 PCR 产物) 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 变性剂浓度范围为 30% ~ 70% (100% 的变性剂为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺混合物)。电泳条件为: 在 1 $\times$ TAE 缓冲液中, 60℃, 120 V 电压下, 电泳 12 h。电泳结果经 EB 染色后用 Bio-Rad 凝胶成像系统观察并用 Quantity One 软件进行分析。

1.5 DGGE 图谱条带多样性分析

根据 DGGE 图谱及 Quantity One 软件对图谱条带的分析, 测定条带光强度, 以条带数表示污泥样品的产甲烷菌种数, 以条带光强度表示产甲烷菌群的优势程度。利用条带数和条带光强度计算污泥样品中菌群的 Shannon 多样性指数 (H')、Margalef 丰富度指数 (D_{Mg}) 和 Berger-Parker 优势度指数 (d)^[22, 23], 如表 1 所示。

表 1 多样性指标及计算公式¹⁾

Table 1 Diversity indices and expressions

指标	计算公式
Shannon 多样性指数 (H')	$H' = - \sum P_i / \ln P_i (P_i = N_i / N)$
Margalef 丰富度指数 (D_{Mg})	$D_{Mg} = (S - 1) / \ln N$
Berger-Parker 优势度指数 (d)	$d = N_{max} / N$

1) N_i 为 DGGE 图谱中条带 i 的光强度; N_{max} 为光强度最大的条带光强度; N 为所有条带的光强度之和; S 为条带数目

1.6 DGGE 条带测序及系统发育分析

将 DGGE 图谱中条带切下, 回收条带中的 DNA 样品, 以其为模板进行二次 PCR 扩增, PCR 反应体系和条件同 1.3 节。扩增产物由上海生工 (Sangon) 纯化测序。登陆 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 将条带 DNA 测序结果与数据库中的已知序列进行比对, 并提交序列。在 EBI 数据库中使用 ClustalW2, 以邻接法 (neighbor joining, NJ) 绘制系统发育树。

1.7 污泥样品 FISH 分析

本研究共采用 2 种检测产甲烷菌群的寡核苷酸荧光探针, 分别是基于 *mcrA* 基因的特异性探针, 探针序列为 5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3'^[17], 5' 标记 Fam; 基于 16S rDNA 的探针 MPB1, 探针序列为 5'-CATGCACCACCTCTCAGC-3'^[24], 5' 标记 Hex。以上探针由上海生工 (Sangon) 合成。

FISH 杂交、镜检及图像处理过程和方法见文献 [25]。

2 结果与讨论

2.1 总 DNA 提取和 PCR 扩增

厌氧颗粒污泥样品总 DNA 提取结果如图 1 所示。可以看到,总 DNA 片段长度约为 23 kb, DNA 样品的核酸测量结果 A_{260}/A_{280} 为 1.756 4, A_{260}/A_{230} 为 1.707 8,表明总 DNA 提取结果较好,可以作为 DNA 模板进行后续分析。

以总 DNA 样品为模板,以 *mcrA* 基因和 16S

rRNA 基因为目标基因进行 PCR 扩增,结果如图 2 所示。基于 *mcrA* 基因的 PCR 扩增产物大小约为 472 bp,基于 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物大小约为 270 bp,与预期目标条带一致,未出现非特异性扩增。



图 1 污泥样品总 DNA

Fig. 1 Total DNA of granular sludge sample

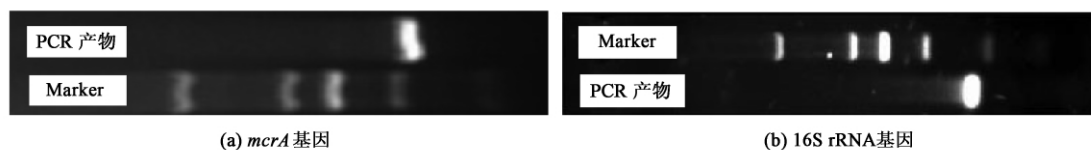


图 2 基于 *mcrA* 和 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR products targeting for *mcrA* gene and 16S rRNA gene

2.2 PCR 产物的 DGGE 分析

基于 *mcrA* 基因和 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物的 DGGE 电泳图谱如图 3 和图 4 所示。可以看到,基于不同目标基因 PCR 扩增产物的 DGGE 图谱条带均为 6 条,但条带分布及亮度差异较大。这个结果表明,厌氧颗粒污泥样品中基于不同目标基因的 PCR-DGGE 分析所检测到产甲烷菌群及其优势程度存在差异。

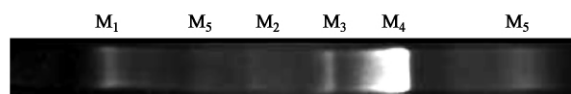


图 3 基于 *mcrA* 基因 PCR 产物的 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE pattern of PCR product targeting for *mcrA* gene



图 4 基于 16S rRNA 基因 PCR 产物的 DGGE 图谱

Fig. 4 DGGE pattern of PCR product targeting for 16S rRNA gene

根据基于不同目标基因的 DGGE 图谱计算产甲烷菌群 Shannon 多样性指数、Margalef 丰富度指数和 Berger-Parker 优势度指数,结果如表 2 所示。可以看到,基于 *mcrA* 基因和 16S rRNA 基因的 DGGE 图谱,其计算所得产甲烷菌群的多样性指数、丰富度指数和优势度指数基本相同, F 检验表明,二者种群多

样性指标之间没有差异($p < 0.01$)。这个结果表明,尽管 DGGE 图谱模式不同,但基于 *mcrA* 基因和 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 对产甲烷菌群多样性分析没有差异。

表 2 产甲烷菌群的多样性指数

Table 2 Diversity indices of methanogenic community

目标基因	条带数	H'	D_{Mg}	d
<i>mcrA</i>	6	0.5688	0.5369	0.2288
16S rDNA	6	0.5794	0.5392	0.2397

2.3 产甲烷菌群系统发育分析

基于 *mcrA* 基因和 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 对污泥样品中产甲烷菌群多样性分析结果一致,但 DGGE 图谱条带存在明显差异,表明条带所代表的产甲烷菌群及优势程度不同。对 DGGE 图谱中的 DNA 条带进行回收并测序,将测序结果与 NCBI 数据库进行比对,确定各条带所对应的产甲烷菌群,结果如表 3 和表 4 所示。对 DGGE 图谱中各条带对应的产甲烷菌群进行系统发育分析,结果如图 5 所示。

可以看到,基于 16S rRNA 基因的 DGGE 图谱中,所有条带均代表产甲烷菌群,且分属于产甲烷杆菌目和产甲烷八叠球菌目。其中, G_1 、 G_2 和 G_6 为产甲烷杆菌目,其在产甲烷菌群中的相对丰度(条带光强度与总光强度之比)之和 50.03%; G_3 、 G_4 和 G_5 为产甲烷八叠球菌目,其在产甲烷菌群中的相对丰度之和 49.97%,其中, G_4 为产甲烷髭菌属,相对丰

表 3 基于 16S rDNA 基因序列的 DGGE 图谱条带系统发育种属

Table 3 16S rDNA gene sequence-based phylogenetic affiliations of DGGE bands

条带	丰度 /%	所属门、纲或目	相似菌属	相似度 /%
G ₁	14.24	Methanobacteriales	<i>Methanobacterium beijingense</i> (EU544027)	99
G ₂	12.70	Methanobacteriales	Uncultured <i>Methanobacteriaceae archaeon</i> (FJ898359)	95
G ₃	11.04	Methanosarcinales	Uncultured <i>Methanomethylovorans</i> sp. (AY780565)	97
G ₄	10.75	Methanosarcinales	Uncultured <i>Methanosaeta</i> sp. (AY899830)	94
G ₅	28.18	Methanosarcinales	Uncultured <i>Methanosarcinales</i> sp. (CU916488)	97
G ₆	23.09	Methanobacteriales	Uncultured <i>Methanobacterium</i> sp. (AY899845)	98

表 4 基于 *mcrA* 基因序列的 DGGE 图谱条带系统发育种属

Table 4 *mcrA* gene sequence-based phylogenetic affiliations of DGGE bands

条带	丰度 /%	所属纲、目或科	相似菌属	相似度 /%
M ₁	17.64	Methanobacteriales	Uncultured <i>Methanobacteriales Archaeon</i> (AB353235.1)	98
M ₂	14.28	Methanobacteriales	Uncultured <i>Methanobacteriales Archaeon</i> (AB353235.1)	97
M ₃	19.31	Methanobacteriales	<i>Methanobacterium Beijingense</i> (EF465106.1)	97
M ₄	32.82	Euryarchaeota	Uncultured <i>Methanogenic Archaeon</i> (DQ260890.1)	99
M ₅	15.95	Euryarchaeota	Uncultured <i>Methanogenic Archaeon</i> (DQ262419.1)	98

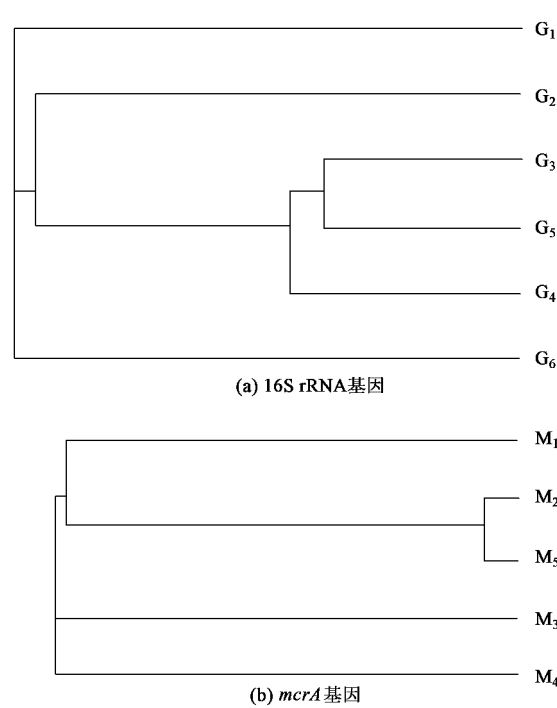


图 5 基于 16S rRNA 基因和基于 *mcrA* 基因的
产甲烷菌群系统发育分析
Fig. 5 Phylogenetic analysis of methanogenic populations
based on 16S rRNA gene and *mcrA* gene

度为 10.75%。图 5(a) 为基于 16S rRNA 基因的产甲烷菌群种属系统发育树,其中,产甲烷杆菌目 G₁、G₂ 和 G₆ 亲缘关系很近,可以达到 95%;产甲烷八叠球菌目中,G₃ 和 G₅ 亲缘关系较近,而与 G₄ 亲缘关系略远。

基于 *mcrA* 基因的 DGGE 图谱中,M₁、M₂ 和 M₃

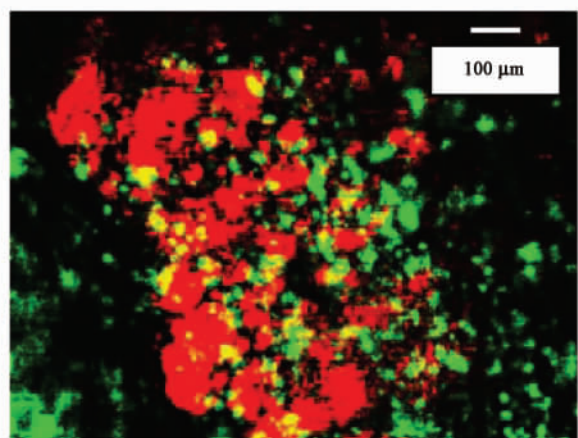
为产甲烷杆菌目,其在产甲烷菌群中的相对丰度之和 44.86%;M₄ 和 M₅ 属于广古菌门,其在产甲烷菌群中的相对丰度之和 42.42%;条带 M₆ 相对丰度为 12.27%,但未取得测序结果。图 5(b) 为基于 *mcrA* 基因的产甲烷菌群种属系统发育树,M₂ 和 M₅ 的亲缘关系较近,M₅ 可能也属于产甲烷杆菌目;与基于 16S rRNA 基因的分析结果相比较,M₄ 和 M₆ 可能属于产甲烷八叠球菌目。

这些结果表明,基于 *mcrA* 基因和 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 对优势产甲烷菌群系统发育种属的分析结果大体相似,2 种目标基因具有可替换性;同时,分析结果存在一定的差异,表明 2 种目标基因的检测特异性不完全相同。以上基因序列已提交至 NCBI 数据库,M₁ ~ M₅ 的登录序列号为 GU183143 和 GU186965 ~ GU186968;G₁ ~ G₆ 的登录序列号为 GU294765 ~ GU294770。

2.4 产甲烷菌群的 FISH 分析

采用基于 *mcrA* 基因和基于 16S rRNA 基因的特异性探针针对厌氧颗粒污泥样品进行产甲烷菌群的 FISH 分析,FISH 杂交图像如图 6 所示。可以看到,2 种基于不同目标基因的产甲烷菌群特异性探针,杂交区域重合度很高(图像分析表明,二者的杂交区域重合度为 70% ~ 80%),表明基于 2 种目标基因的 FISH 检测具有很高的-致性。同时,2 种探针的杂交区域面积有所差异,基于 16S rRNA 基因探针的杂交区域面积高于基于 *mcrA* 基因的探针,图像分析和计算结果表明,基于 *mcrA* 基因 FISH 检测的产甲烷菌群平均相对丰度为 24.25% ± 6.47%,基于

16S rRNA 基因 FISH 检测的产甲烷菌群平均相对丰度为 $33.42\% \pm 2.34\%$ 。这些结果表明,基于 *mcrA* 基因和基于 16S rRNA 基因对产甲烷菌群的 FISH 分析既具有很高的一致性,同时也存在一定的特异性差异。这个结果与 PCR-DGGE 的分析结果基本一致。



绿色:*mcrA* 基因;红色:16S rRNA 基因

图 6 基于 *mcrA* 基因和基于 16S rRNA 基因的产甲烷菌群 FISH 检测

Fig.6 Detection of methanogenic population by FISH based on *mcrA* gene and 16S rRNA gene

3 结论

(1) 基于 *mcrA* 基因和基于 16S rRNA 基因对阿维菌素废水处理工业化厌氧颗粒污泥产甲烷菌群进行 PCR-DGGE 分析,二者的 DGGE 图谱模式存在差异,但根据图谱计算所得产甲烷菌群 Shannon 多样性指数、Margalef 丰富度指数和 Berger-Parker 优势度指数没有差异,表明基于 2 种不同目标基因的产甲烷菌群多样性分析基本一致。

(2) 基于 *mcrA* 基因和基于 16S rRNA 基因的优势产甲烷菌群系统发育分析表明,产甲烷杆菌目和产甲烷八叠球菌目是厌氧颗粒污泥样品中的优势产甲烷种群。基于不同目标基因的优势产甲烷菌群系统发育种属的分析结果大体相似,2 种目标基因具有可替换性;同时,分析结果存在一定的差异,表明 2 种目标基因的检测特异性不完全相同。

(3) 基于 *mcrA* 基因和基于 16S rRNA 基因的产甲烷菌群 FISH 杂交区域重合度很高,表明基于 2 种目标基因的 FISH 检测具有很高的一致性,但杂交区域面积有所差异。基于 *mcrA* 基因 FISH 检测的产甲烷菌群平均相对丰度为 $24.25\% \pm 6.47\%$,低于

基于 16S rRNA 基因 FISH 检测结果 ($33.42\% \pm 2.34\%$)。

参考文献:

- [1] 胡纪萃,周孟津,左剑恶,等. 废水厌氧生物处理理论与技术 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2002.
- [2] Lueders T, Friedrich M. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(7): 2732-2742.
- [3] Ramakrishnan B, Lueders T, Dunfield P F, et al. Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, **37**(2): 175-186.
- [4] Purdy K J, Nedwell D B, Embley T M. Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrasting Antarctic sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(6): 3181-3191.
- [5] Chan O C, Claus P, Casper P, et al. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment [J]. Environmental Microbiology, 2005, **7**(8): 1139-1149.
- [6] Akarsubasi A T, Ince O, Oz N A, et al. Evaluation of performance acetoclastic methanogenic activity and archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters [J]. Process Biochemistry, 2006, **41**(1): 28-35.
- [7] Montero B, Garcia-Morales J L, Sales D, et al. Analysis of methanogenic activity in a thermophilic-dry anaerobic reactor: Use of fluorescent *in situ* hybridization [J]. Waste Management, 2009, **29**(3): 1144-1151.
- [8] Song M K, Shin S G, Hwang S K. Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater [J]. Bioresource Technology, 2010, **101**: S23-S28.
- [9] Lange M, Ahfing B K. A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic Archaea [J]. FEMS Microbiology Review, 2001, **25**(5): 553-571.
- [10] Pender S, Toomey M, Cart M, et al. Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors [J]. Water Research, 2004, **38**(3): 619-630.
- [11] 孙寓姣,左剑恶,邢薇,等. 高效厌氧产甲烷颗粒污泥微生物多样性及量化研究 [J]. 环境科学, 2006, **27**(11): 2354-2357.
- [12] Del Nery V, Pozzi E, Damianovic M H R Z, et al. Granules characteristics in the vertical profile of a full-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor treating poultry slaughterhouse wastewater [J]. Bioresource Technology, 2008, **99**(6): 2018-2024.
- [13] O'Reilly J, Lee C S, Collins G, et al. Quantitative and qualitative analysis of methanogenic communities in mesophilically and psychrophilically cultivated anaerobic granular biofilms [J]. Water Research, 2009, **43**(14): 3365-3374.
- [14] Springer E, Sachs M S, Woese C R, et al. Partial gene-

- sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (*mcrI*) as a phylogenetic tool for the family *Methanosarcinaceae* [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, **45** (3): 554-559.
- [15] Hales B A, Edwards C, Ritchie D A, *et al.* Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(2): 668-675.
- [16] Ellermann J, Hedderich R, Böcher R, *et al.* The final step in methane formation. Investigations with highly purified methyl-CoM reductase (component C) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg) [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1988, **172**(3): 669-677.
- [17] Luton P E, Wayne J M, Sharp R J, *et al.* The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill [J]. *Microbiology*, 2002, **148**: 3521-3530.
- [18] Juottonen H, Galand P E, Yrjälä K. Detection of methanogenic Archaea in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcrA* gene [J]. *Research in Microbiology*, 2006, **157** (10): 914-921.
- [19] Rastogi G, Ranade D R, Yeole T Y, *et al.* Investigation of methanogen population structure in biogas reactor by molecular characterization of methyl-coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes [J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(13): 5317-5326.
- [20] 张苏, 刘春, 杨景亮, 等. 工业化废水处理反应器污泥总 DNA 提取方法 [J]. *微生物学通报*, 2008, **35** (10): 1659-1663.
- [21] Yu Y, Lee C, Kim J, *et al.* Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, **89**(6): 670-679.
- [22] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, *et al.* Using ecological diversity measures with bacterial communities [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **43**(1): 1-11.
- [23] Asakawa S, Kimura M. Comparison of bacterial community structures at main habitats in paddy field ecosystem based on DGGE analysis [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, **40** (6): 1322-1329.
- [24] Jupraputtasri W, Boonapatcharoen N, Cheevadhanarak S, *et al.* Use of an alternative archaea specific probe for methanogen detection [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, **61** (1): 95-104.
- [25] 刘春, 马俊科, 吴根, 等. 阿维菌素废水工业化 UASB 颗粒污泥产甲烷菌群分析 [J]. *环境科学*, 2010, **31** (3): 725-730.