

朱爽, 周林, 梁翠谊, 等. 2009 一种高效提取焦化废水活性污泥总 DNA 的方法 [J]. 环境科学学报, 29(11): 2318– 2323
Zhu S, Zhou L, Liang C Y, *et al.* 2009 A highly efficient method for extracting total DNA from activated sludge of coking wastewater[J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(11): 2318– 2323

一种高效提取焦化废水活性污泥总 DNA 的方法

朱爽¹, 周林¹, 梁翠谊¹, 吴海华¹, 吴海珍², 韦朝海^{3,*}

- 1 广东药学院生命科学与生物制药学院, 广州 510006
2 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006
3 华南理工大学环境科学与工程学院, 广州 510006

收稿日期: 2009-02-17 修回日期: 2009-05-05 录用日期: 2009-08-10

摘要: 对焦化废水活性污泥中微生物建立高质量的总 DNA 提取方法是开展分子生态学研究的重要前提. 通过反复冻融-蛋白酶 K-SDS 溶菌酶-反复冻融-SDS 及溶菌酶-反复冻融-蛋白酶 K-SDS 这 3 种综合方法对焦化废水活性污泥总 DNA 进行提取, 以 OD₂₆₀/OD₂₈₀、OD₂₆₀/OD₂₃₀、产率、片段完整性、片段大小 5 个指标来评价样品总 DNA 的提取效果. 结果表明, 溶菌酶-反复冻融-蛋白酶 K-SDS 法所提取的总 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值约为 1.8, 产率为 1.90~16.30 μg g⁻¹, 片段完整性好, 主带清晰, 大小约为 23 kb. 其 PCR 反应抑制物少, 能够直接进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增. 溶菌酶-反复冻融-蛋白酶 K-SDS 法能够为焦化废水活性污泥中微生物的分子生态学研究提供高质量的总 DNA.

关键词: 焦化废水; 活性污泥; DNA 提取; PCR 扩增

文章编号: 0253-2468(2009)11-2318-06 中图分类号: X703 文献标识码: A

A highly efficient method for extracting total DNA from activated sludge of coking wastewater

ZHU Shuang¹, ZHOU Lin¹, LIANG Cuiyi¹, WU Haihua¹, WU Haizhen², WEI Chaohai^{3,*}

- 1 School of Life Science and Biopharmacology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006
2 School of Biological Science and Engineering South China University of Technology, Guangzhou 510006
3 College of Environmental Science and Engineering South China University of Technology, Guangzhou 510006

Received 17 February 2009; **received in revised form** 5 May 2009; **accepted** 10 August 2009

Abstract Development of an efficient method to extract high quality total DNA from activated sludge of coking wastewater is a prerequisite for understanding its molecular microbial ecology. In this study, three methods with different combinations of extraction steps (i.e., Freezing and Thawing-Protease K-SDS, Lysozyme-Freezing and Thawing-SDS, and Lysozyme-Freezing and Thawing-Protease K-SDS) for extracting total DNA from activated sludge were compared. The extraction efficiency of total DNA was evaluated by the yield, purity, size, and integrity of the DNA fragments. The effect of PCR inhibitors on the extraction efficiency of total DNA was also investigated. The results showed that Method III (Lysozyme-Freezing and Thawing-Protease K-SDS) was the most efficient extraction method. The DNA yields ranged from 1.90 μg g⁻¹ to 16.30 μg g⁻¹. The OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio was about 1.8 and the size of the extracted DNA was 23 kb. The total DNA extracted with Method III can be directly applied to PCR amplification of 16S rRNA. These results indicate that Method III efficiently provides high quality total DNA from activated sludge of coking wastewater, which allows study of the bacterial community structure and diversity.

Keywords coking wastewater; activated sludge; DNA extraction; PCR amplification

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863)项目 (No. 2006AA062378); 国家自然科学基金资助项目 (No. 50278036)
Supported by the Hi-Tech Research and Development Program of China (No. 2006AA062378) and the National Natural Science Foundation of China (No. 50278036)
作者简介: 朱爽 (1977—), 男, 讲师, E-mail: wenchengji@yahoo.com.cn * 通讯作者 (责任作者), E-mail: cecwhe@scut.edu.cn Tel (Fax): 020-39380588
Biography: ZHU Shuang (1977—), male, lecturer, E-mail: wenchengji@yahoo.com.cn * **Corresponding author:** E-mail: cecwhe@scut.edu.cn Tel (Fax): 020-39380588
©1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 引言 (Introduction)

焦化废水具有成份复杂、难降解有机物浓度高、毒性大等特点,是很难被生物降解的工业废水之一(任源等, 2006 韦朝海等, 2007)。焦化废水活性污泥是焦化废水生物处理技术的主体,活性污泥中的微生物在群落结构和种类丰度上应和其他活性污泥有较大差异(Sayler *et al*, 1982),并蕴涵着大量新的功能基因。对焦化废水活性污泥中的微生物进行分子生态学研究,有助于探讨焦化废水处理的反应机理、工艺改进、动态监控和优化控制(郑雪松等, 2004 Dande *et al*, 2007)。用传统纯培养方法分离培养的微生物种类只占自然界微生物总量的 1%左右,不能够真实、全面地反映特定生态环境中的微生物种群结构,因此,迄今为止对焦化废水活性污泥中的微生物了解十分有限(Chen *et al*, 2003)。利用分子生物学技术对焦化废水活性污泥中的微生物群落进行结构与功能的研究,可以了解菌群结构在有害物质降解中的功能和作用,揭示菌群结构与功能的关系,从而为优化焦化废水活性污泥法生物处理系统运行,提高焦化废水处理效果提供理论依据(Choi *et al*, 2006 Lin *et al*, 2006 郑维等, 2008)。

对焦化废水活性污泥中微生物进行分子生态学研究的首要条件是建立一种高效提取焦化废水活性污泥总 DNA 的方法。根据破壁方法的不同,活性污泥总 DNA 提取可分为物理、化学和生物酶等多种方法(Roose *et al*, 2001),而破壁方法的不同会导致 DNA 的释放效率不同,适宜的细胞裂解方法是 DNA 提取成功的关键。近年来,有关活性污泥总 DNA 提取的方法已有很好的发展,大多数研究者将上述几种方法结合起来使用,基本能够使细胞裂解(Bourrain *et al*, 1999 高平等, 2002 郑雪松等, 2004 Liao *et al*, 2007 苏俊峰等, 2007),但目前还没有一种有效提取焦化废水不同单元工艺中活性污泥总 DNA 的方法。焦化废水活性污泥细菌种类组成复杂且混杂有大量有毒物质,其中的腐殖酸、褐菌素以及酚类化合物等有机或无机化合物均会影响到 DNA 提取产率和质量。如何使所有细胞裂解、充分释放 DNA,有效去除杂质,提取到纯度高、产率高、完整性好、抑制物少、多样性齐全的微生物基因组总 DNA 是研究焦化废水活性污泥微生物群落结构与功能的关键所在。本文将物理、化学和生物酶

等多种微生物细胞破碎方法有机结合起来,通过比较 3 种综合提取焦化废水活性污泥总 DNA 的方法(I:反复冻融-蛋白酶 K-SDS II:溶菌酶-反复冻融-SDS III:溶菌酶-反复冻融-蛋白酶 K-SDS),总结出一种高效提取焦化废水活性污泥总 DNA 的综合法,以期为焦化废水活性污泥中微生物的分子生态学研究提供高质量的总 DNA。

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 焦化废水活性污泥样品采集

用于本实验的焦化废水活性污泥样品,采集自广东韶钢集团焦化厂的酚氰废水处理一期工程项目 A/O²组合工艺中的 3 个单元工艺,分别为厌氧流化床 A (anaerobic stage)、I 级好氧流化床 O1 (O1 stage)、II 级好氧流化床 O2 (O2 stage)。将采集的焦化废水活性污泥样品保存于 0℃泡沫箱中迅速带回实验室,用灭菌的 1.5 mL 离心管离心 (12000 g 4℃)收集,每管活性污泥湿重约 0.5 g 48 h 内进行总 DNA 提取,其他样品于 -70℃冰箱保存备用。

2.2 实验方法

2.2.1 预处理 取冻存的 3 个样品共 9 管(每个样品取 3 管平行, A × 3 O1 × 3 O2 × 3),分别加入 1 mL TENP 缓冲液 (50 mmol L⁻¹ Tris, 20 mmol L⁻¹ EDTA, 100 mmol L⁻¹ NaCl, 1% (质量分数) PVP, pH = 10.0)充分混匀后离心 10 min (12000 g 4℃),洗涤 3 次;再加入 1 mL 提取缓冲液 (100 mmol L⁻¹ Tris·Cl, 200 mmol L⁻¹ NaCl, 100 mmol L⁻¹ EDTA, 1% PVP, 2% (质量分数) CTAB, pH = 8.0)混匀。

2.2.2 细胞破碎 反复冻融-蛋白酶 K-SDS 法 将样品放在 -20℃冷冻 15 min, 50℃水浴 2 min, 重复 3 次;先加入蛋白酶 K (20 mg mL⁻¹) 20 μL, 轻柔混匀后,再加入 10% (质量分数) SDS 100 μL, 65℃温浴 1.5 h (每隔 15~20 min 颠倒振荡 1 次),离心 10 min (12000 g 4℃),取上清液用于下一步的抽提。

溶菌酶-反复冻融-SDS 法 先加入溶菌酶 (50 mg mL⁻¹) 40 μL, 轻柔混匀, 37℃温浴 45 min (每隔 15~20 min 颠倒振荡 1 次);再将样品放在 -20℃冷冻 15 min, 50℃水浴 2 min, 重复 3 次;最后加入 10% SDS 100 μL, 65℃温浴 1.5 h (每隔 15~20 min 颠倒振荡 1 次),离心 10 min (12000 g 4℃),取上清液用于下一步的抽提。

溶菌酶-反复冻融-蛋白酶 K-SDS 法 先加入溶菌酶 (50 mg mL⁻¹) 40 μL, 轻柔混匀, 37℃温浴 45

min(每隔 15~20 min 颠倒振荡 1 次);再将样品放在 -20℃ 冷冻 15 min, 50℃ 水浴 2 min, 重复 3 次;分别加入蛋白酶 K (20 mg mL⁻¹) 20 μL, 10% SDS 100 μL, 65℃ 温浴 1.5 h(每隔 15~20 min 颠倒振荡 1 次), 离心 10 min (12000 g, 4℃), 取上清液用于下一步的抽提。

2.2.3 DNA 的提取纯化 得到的上清液用等体积的 Tris 饱和酚抽提 2 次, 酚:氯仿:异戊醇 (体积比为 25:24:1) 和氯仿:异戊醇 (体积比为 24:1) 各抽提 1 次, 离心 10 min (12000 g, 4℃), 取上清液。先加入 NaAc (pH = 5.2), 使溶液最终浓度为 0.3 mol L⁻¹, 再加入 0.6 倍体积的异丙醇, -20℃ 沉淀 1 h, 离心 20 min (12000 g, 4℃), 收集沉淀, 用 70% 冷乙醇 1 mL 漂洗 2 次, 沉淀干后溶于 50 μL 无菌 TE 缓冲液中。

2.2.4 提取 DNA 的测定 在 Thermo Helios 紫外分光光度计上进行 DNA 的测定, 取样本 DNA 抽提液稀释 10 倍于 230 nm、260 nm、280 nm 处测量吸光度值。DNA 浓度和纯度按下式计算:

$$C = 50 \times OD_{260} \times n \quad (1)$$

$$P = OD_{260} / OD_{280}, P = OD_{260} / OD_{230} \quad (2)$$

$$Y = C \times V / m \quad (3)$$

式中, C 是 DNA 浓度 (mg L⁻¹), n 为稀释倍数, P 是 DNA 纯度, Y 是 DNA 产率 (μg g⁻¹), V 是体积 (mL), m 为取样量 (g)。

测定 DNA 的 OD_{260} / OD_{280} , 如果其值为 1.8 则表明 DNA 的纯度较高; $OD_{260} / OD_{280} > 1.8$ 则可能有 RNA 污染; $OD_{260} / OD_{280} < 1.8$ 则可能有蛋白质等杂质污染。 OD_{260} / OD_{230} 比值越高说明腐殖酸含量越低, 反之则含量高。

2.2.5 PCR 扩增 16S rRNA 基因 选择扩增真细菌 16S rRNA 基因的引物 (上海生工生物工程公司合成) 27f (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') 和 1492r (5' GGTACCTTGTTACGACTT3') 对总 DNA 样品进行 16S rRNA 基因的扩增。在 20 μL 的 PCR 反应体系 (宝生物工程大连有限公司) 中含有 10 × buffer 2 μL (含 MgCl₂), dNTP (10 mmol L⁻¹) 0.4 μL, 引物量为 10 pmol, Taq (5 U μL⁻¹) 0.2 μL, 模板量视实验目的而不同, 其余体积以无菌超纯水补足。PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环, 最

后在 72℃ 延伸 10 min PCR 仪型号为 Applied Biosystems (2720 Thermal cycler PCR)。

3 实验结果 (Results)

3.1 总 DNA 电泳检测

用 3 种不同的方法 (I、II、III) 分别提取焦化废水活性污泥总 DNA, 每种方法用来提取 3 个不同单元工艺中的活性污泥样品 (A、O1、O2), 总共得到 9 个总 DNA 样品, 最后都用 50 μL TE 回溶。取 3 μL 总 DNA 样品, 用 SYBR Green I 染色 10 min 后进行 1% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统记录结果如图 1 所示。

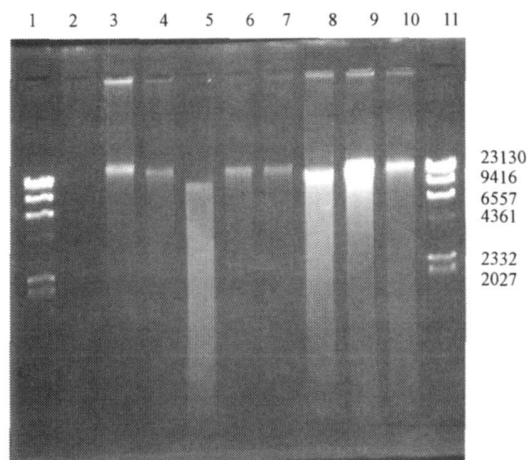


图 1 总 DNA 样品的琼脂糖凝胶电泳图 (1, 11 Marker (λDNA / Hind III); 2 I-A; 3 I-O1; 4 I-O2; 5 II-A; 6 II-O1; 7 II-O2; 8 III-A; 9 III-O1; 10 III-O2)

Fig 1 Gel electrophoresis result of total DNA samples (1, 11 Marker (λDNA / Hind III); 2 I-A; 3 I-O1; 4 I-O2; 5 II-A; 6 II-O1; 7 II-O2; 8 III-A; 9 III-O1; 10 III-O2)

3.2 DNA 产物的浓度、产率和纯度

根据 2.2.4 节的公式, 求得各样品的 C 、 P 和 Y , 结果如表 1 所示。由表 1 可知, 方法 II 提取 3 个样品的纯度、浓度及产率都是最高的, OD_{260} / OD_{280} 分别为 1.83、1.75、1.76, 浓度分别达到 118、163、39.5 mg L⁻¹, 产率分别达到 11.8、16.3、3.95 μg g⁻¹。而方法 I、II 只对焦化废水处理过程中某些工艺单元的活性污泥样品总 DNA 提取效果比较好, 因此, 方法 II 适合提取各不同单元工艺焦化废水活性污泥总 DNA。

表 1 DNA 产物的浓度、产率和纯度							
Table 1 Concentration, yield & purity of the DNA products extracted from activated sludge							
方法	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₃₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	C/(mg L ⁻¹)	Y/(μg g ⁻¹)
I -A	0.038	0.019	0.096	2.00	0.40	19.0	1.90
I -O1	0.282	0.197	0.215	1.43	1.31	141.0	14.10
I -O2	0.047	0.023	0.205	2.04	0.23	23.5	2.35
II -A	0.195	0.120	0.107	1.63	1.82	97.5	9.75
II -O1	0.104	0.057	0.233	1.82	0.45	52.0	5.20
II -O2	0.021	0.030	0.148	0.70	0.14	10.5	1.05
III-A	0.236	0.129	0.261	1.83	0.91	118.0	11.80
III-O1	0.326	0.189	0.205	1.75	1.54	163.0	16.30
III-O2	0.079	0.045	0.146	1.76	0.55	39.5	3.95

3.3 真细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

以提取的 9 个总 DNA 样品为模板, 模板浓度按 1、10、10²、10³、10⁴ 倍的梯度稀释后进行真细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增. 模板浓度梯度扩增结果表明, 可进行真细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增的模板浓度范围在 0.25~47 ng 之间, 但不同样品的最适范围有所不同.

在最佳模板浓度下, 真细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 2. 由图 2 可知, 9 个样品中, 除用方法 II 提取的 O2 样品外, 其余 8 个样品的真细菌 16S rRNA 基因均能够很好地扩增出来. PCR 产物主条带清晰, 非特异扩增条带少, 大小约为 1.5 kb. 由此可见, 在最佳模板浓度下, 可以减小腐殖酸等抑制物对 PCR 的不利影响.

4 讨论 (Discussion)

4.1 总 DNA 提取过程杂质的去除

本文在总 DNA 提取过程的样品预处理、细胞破壁和 DNA 纯化等步骤均注意去除腐殖酸等杂质. 样品的预处理是去除腐殖酸等杂质的关键步骤, 文中用于 3 个综合方法比较的 9 个环境样品均做了预处理, 预处理液 TENP 中的 PVP 可以吸附焦化废水活性污泥中的酚类化合物和腐殖酸, 形成复合物存在离心液的上清液中; Tris 和 EDTA 被用于保护提取的 DNA 免受溶液中 DNA 酶的攻击, EDTA 还可以有效络合重金属离子, 抑制核酸酶的活性 (Lemarchand *et al.*, 2005). 在细胞破壁时提取缓冲液中加入的 CTAB 也有助于去除腐殖酸. 在 DNA 纯化时, 用异丙醇沉淀的 DNA 较多且没有腐殖酸等杂质干扰 (陈竹等, 2007). 由于实验方法的每一个环节都考虑到杂质的去除, 这样就可以避免总 DNA 进一步纯化而带来更多的 DNA 损失, 也可以最大程度地保证微生物群落的完整性.

4.2 总 DNA 提取结果分析

由图 1 可以看出, 除泳道 2、5 外, 其他 7 个总 DNA 样品主带清晰, 片段完整性好, 大小约 23 kb. 从不同方法来看, 无论提取的是哪一个单元工艺样品, 方法 II 提取的 3 个样品总 DNA 条带总是最亮, 而且主带清晰, 分子量约 23 kb, DNA 片段保护完整, 基本没有断裂情况; 方法 I 提取 O1、O2 样品的总 DNA 条带清楚, 但是样品 A 几乎看不到 DNA 主带; 方法 II 提取 3 个样品的总 DNA 条带清楚, 但是亮度均不如方法 III, 而且样品 A 有少量降解.

从表 1 可看出, 方法 II 提取的 3 个样品总 DNA 效果最好, 获得的 DNA 总量最多, 杂质含量少, DNA 纯度高. 由此可见, 采用方法 III 提取焦化废水活性

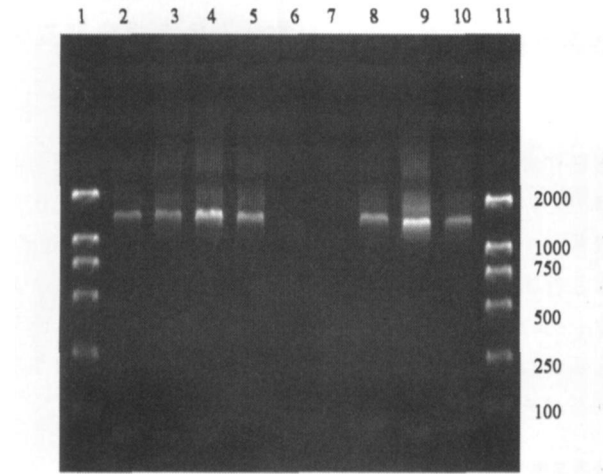


图 2 最佳模板浓度条件下 PCR 扩增产物电泳图 (1、11. Marker (DL2000); 2. I -A; 3. I -O1; 4. I -O2; 5. II -A; 6. II -O1; 7. II -O2; 8. III-A; 9. III-O1; 10. III-O2)

Fig 2 PCR result of the optimal template concentration (1, 11. Marker (DL2000); 2. I -A; 3. I -O1; 4. I -O2; 5. II -A; 6. II -O1; 7. II -O2; 8. III-A; 9. III-O1; 10. III-O2)

污泥总 DNA 不但可以避免样品内不同微生物类群间多样性的偏差,最大程度地保证微生物群落的完整性,而且由于在不同单元工艺样品间采用同一种方法来提取,不同样品间的总 DNA 没有提取方法的偏倚性,有利于后续的基因文库比较。

另外,表 1 的结果显示,3 个 DNA 提取方法都获得了较高的产率,这是因为这些方法都由单个方法(物理、化学或酶法)组合成的综合法。先通过单个方法的选取,再到各种方法的有机排列,最后得到破壁彻底, DNA 保护好,杂质去除有效的提取组合。单就物理法来说,就有玻璃珠匀浆法、液氮研磨法、冻融法、超声波法、煮沸法等,在活性污泥的总 DNA 提取中,郑雪松等(郑雪松等, 2004)已经报道了反复冻融法比玻璃珠匀浆法好,虽然玻璃珠匀浆法在国外最常用,在理论上破壁效果最好。其次,玻璃珠匀浆法和液氮研磨法由于操作较剧烈,容易造成 DNA 被剪切,大片段少(通常大于 2 k 而小于 20 k),而反复冻融法由于过程中间扰动较少,提取的物理条件相对温和许多,因此,提取到的大片段 DNA 最多,并且纯度很高。而在综合的提取方法中,还有酶法和化学法的补充,这些操作都会使 DNA 片段进一步断裂。基于以上两点,本研究选取了条件温和的反复冻融法加入到综合法中。化学法包括表面活性剂法、盐类法和有机溶剂法等,选取的是破壁效果好的 SDS 法。酶法包括裂解酶法、溶菌酶法和蛋白酶 K 法等,其中,蛋白酶 K 可以使细菌细胞充分裂解释放出 DNA,而溶菌酶提取 DNA 产率较低,纯度也不高。蛋白酶 K 法比溶菌酶法的效果好,能使 DNA 大片段总得率提高 20% 以上。相对于方法 I 和 III,方法 II 提取的 DNA 产量和质量较差,这种结果可能是因为焦化废水中的某些成分对溶菌酶的活性及 DNA 的纯化产生影响。在方法 II 中同时选用两种酶,其提取 DNA 的效果比仅选用一种酶的方法 I 和 II 优。

综合来看,方法 III 比 I 和 II 的效果好,这是因为同时使用两种酶(溶菌酶、蛋白酶 K)来破壁,再加上条件温和的反复冻融法以及破壁效果好的 SDS 化学法综合使用。

4.3 总 DNA 的 PCR 扩增分析

环境样品提取的 DNA 中有很多抑制 PCR 反应的物质,如腐殖酸、重金属离子等,这些物质可以在预处理及提取过程中被部分去除(Miller *et al*, 2005)。未能除净的杂质还可以通过稀释总 DNA 样

品进行 PCR,将抑制物也同时稀释,增加 PCR 的可能性。为了验证方法 I、II 和 III 所提取的总 DNA 含有的杂质浓度足够低,无需进一步纯化就可以直接用于后续的 PCR 反应,先是进行了模板浓度梯度实验,接着在最佳模板浓度下进行 PCR 扩增。结果显示 9 个总 DNA 样品除了 II-02 外,均可直接用于 PCR 扩增反应。用方法 II 提取的样品 02 总 DNA 扩增失败,该样品总 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值仅为 0.70 OD_{260}/OD_{230} 的比值也仅为 0.14 这可能是 DNA 的纯度不够以及含有较高浓度的腐殖酸等 PCR 抑制物等,导致了 PCR 扩增失败。在最佳模板浓度下,用方法 III 提取 3 个总 DNA 样品的 PCR 扩增结果最好,扩增后的主条带最清晰,可进行 PCR 扩增模板浓度范围集中在 0.33 ~ 32.6 ng 之间,进一步说明方法 III 提取焦化废水活性污泥各单元工艺总 DNA 的质量最好。

5 结论 (Conclusions)

1) 所提出的溶菌酶-反复冻融-蛋白酶 K-SDS 法适合用于不同单元工艺中的焦化废水活性污泥总 DNA 的提取。

2) 提取的焦化废水活性污泥总 DNA 产率高、纯度高、片断完整性好、抑制物少,可直接用于 PCR 扩增,进行微生物群落分析以及构建文库等后续分子生物学操作。

3) 溶菌酶-反复冻融-蛋白酶 K-SDS 法能够为焦化废水活性污泥中微生物的分子生态学研究提供高质量的总 DNA。

责任作者简介: 韦朝海 (1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师。研究方向为水污染控制理论与技术, 主要兴趣为废水处理的流态化过程及有毒难降解有机污染物的高级氧化过程。曾主持国家、省部级科研项目 22 项以及焦化废水、印染废水、化工废水、制药废水等环境工程技术开发与应用项目 30 余项, 主持发表学术论文 190 余篇, 有 4 项通过省部级鉴定的科研成果并获奖。

参考文献 (References):

- Bourrain M, Achouak W, Urbain V, *et al*. 1999 DNA extraction from activated sludges [J]. *Current Microbiology*, 38: 315—319
- 陈敏, 赵立平. 2003 焦化废水处理系统中不同培养基分离的细菌种群多样性 [J]. *微生物学报*, 43(3): 366—371
- Chen M, Zhao L P. 2003 Biodiversity of bacterial isolates on three different media from coking wastewater treatment system [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 43(3): 366—371 (in Chinese)

- 陈竹, 陈元彩, 付时雨, 等. 2007 环境样品中 DNA 提取方法的研究进展 [J]. 环境污染与防治, 29 (7): 537—540
- Chen Z, Chen Y C, Fu S Y, *et al*. 2007. Methods for extracting DNA from environmental samples [J]. Environmental Pollution & Control 29 (7): 537—540 (in Chinese)
- Choi H, Zhang K, Dimytsiou D D, *et al*. 2006. Effect of activated sludge properties and membrane operation conditions on fouling characteristics in membrane bioreactors [J]. Chemosphere, 63: 1699—1708
- Damde P, Kapley A, Purohit H J. 2007. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater containing hydrocarbons [J]. Environmental Science and Pollution Research International 14(1): 7—11
- 高平平, 赵立平. 2002 可用于微生物群落分子生态研究的活性污泥总 DNA 提取方法研究 [J]. 生态学报, 22 (11): 2015—2019
- Gao P P, Zhao L P. 2002. DNA extraction from activated sludge for molecular community analysis [J]. Acta Ecologica Sinica 22 (11): 2015—2019 (in Chinese)
- Leonard K, Berthumeau F, Maynard C, *et al*. 2005. Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays [J]. Journal of Microbiological Methods 63(2): 115—126
- 廖永红, 周晓宏, 汪苹, 等. 2007 脱氮活性污泥总 DNA 提取研究 [J]. 环境科学与技术, 15(4): 75—79
- Liao Y H, Zhou X H, Wang P, *et al*. 2007. Total DNA extraction from SBR denitrification of activated sludge [J]. Environmental Science and Technology, 15(4): 75—79 (in Chinese)
- Liu B B, Zhang F, Feng X X, *et al*. 2006. Thauera and Azorarcus as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison [J]. FEMS Microbiology Ecology, 55: 274—286
- Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, *et al*. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples [J]. Applied and Environmental Microbiology 65(11): 4715—4724
- 任源, 韦朝海, 吴超飞, 等. 2006 生物流化床 A/O²工艺处理焦化废水过程中有机组分的 GC/MS 分析 [J]. 环境科学学报, 26(11): 1785—1791
- Ren Y, Wei C H, Wu C F, *et al*. 2006. Organic compounds analysis by GC/MS during the biological fluidized bed A/O² process of coking wastewater [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 26(11): 1785—1791 (in Chinese)
- Roose Amsale C L, Gamier Sillan E, Harry M. 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples [J]. Applied Soil Ecology, 18: 47—60
- Saylor G S, Sherrill T W, Perkins R E, *et al*. 1982. Impact of coal-coking effluent on sediment microbial communities: A multivariate approach [J]. Applied and Environmental Microbiology 44(5): 1118—1129
- 苏俊峰, 马放, 侯宁, 等. 2007. 活性污泥总 DNA 不同提取方法的比较 [J]. 生态环境, 16(1): 47—49
- Su J F, Ma F, Hou N, *et al*. 2007. Comparison of different DNA extraction methods for activated sludge [J]. Ecology and Environment 16(1): 47—49 (in Chinese)
- 韦朝海, 贺明和, 吴超飞, 等. 2007 生物三相流化床 A/O²组合工艺在焦化废水处理中的工程应用 [J]. 环境科学学报, 27 (7): 1107—1112
- Wei C H, He M H, Wu C F, *et al*. 2007. Engineering application of biological three-phase fluidized bed A/O² process in coking wastewater treatment [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 27 (7): 1107—1112 (in Chinese)
- 郑维, 权春善, 朴永哲, 等. 2008. 一种从活性污泥中提取微生物总 DNA 的方法 [J]. 中国生物工程杂志, 28 (7): 97—99
- Zheng W, Quan C S, Piao Y Z, *et al*. 2008. The extraction method of bacterial DNA from activated sludges [J]. China Biotechnology, 28 (7): 97—99 (in Chinese)
- 郑雪松, 李道棠, 杨虹. 2004 不同破壁方法对活性污泥总 DNA 提取效果的影响 [J]. 上海交通大学学报, 38 (5): 815—818
- Zheng X S, Li D T, Yang H. 2004. Evaluation of different DNA extraction methods for activated sludge [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 38 (5): 815—818 (in Chinese)