

TMAH浓度对生物硝化系统中微生物群落多样性的影响

李慧仪, 谢奇旭, 谭发祥

苏州崇越工程有限公司, 江苏 苏州

Email: chacha.lee@topco-global.com

收稿日期: 2020年10月1日; 录用日期: 2020年10月23日; 发布日期: 2020年10月30日

摘要

本研究以高科技产业常用化学品氢氧化四甲基铵(Tetramethylammonium hydroxide, TMAH)作为研究目标, 以生物处理方法进行TMAH生物急毒性减量, 期能解决高科技产业废水生物急毒性议题。针对含TMAH的工艺废水, 以好氧(Aerobic)反应槽进行探讨, 设计TMAH浓度分别为0、1000、3000 mg·L⁻¹三个反应槽; 实验结果, TMAH 0 mg·L⁻¹组呈现良好的硝化反应, 微生物结构组成中浮霉菌门 (Placotomycetes) *Gemmata*属的比例比其他两组高。TMAH 1000 mg·L⁻¹组与TMAH 0 mg·L⁻¹组相比, TMAH 1000 mg·L⁻¹组增加了TMAH浓度的变异性, 因而带入新的真菌物种(如: 变形菌门(Proteobacteria) *Brachymonas*属、拟杆菌门(Bacteroidetes) *Flavobacterium*属), 所以菌种丰富度也明显提高。TMAH 3000 mg·L⁻¹组菌种分布受到诸多因素(TMAH浓度高、硝化作用抑制)的综合制约影响, 物种总量和丰度具有特异性, 其中以变形菌门(Proteobacteria)中的*Reyranella*属数量明显比TMAH 0 mg·L⁻¹组及TMAH 1000 mg·L⁻¹组高。

关键词

TMAH, 高通量测序, 细菌群落结构, 菌种多样性

Microbial Community Diversity Analysis of Nitrification Performance in Bioreactors with under TMAH Concentrations

Huei-Yi Li, Chi-Hsu Hsieh, Steve Tan

Suzhou Topco Construction Ltd., Suzhou Jiangsu

Email: chacha.lee@topco-global.com

Abstract

This study used an aerobic batch reactor feeding TMAH (Tetramethylammonium hydroxide) containing synthetic wastewater to evaluate TMAH degradation and microbial community changes in the aerobic batch reactor through different influent TMAH concentration. Based on different influent TMAH concentration (0, 1000, 3000 mg·L⁻¹), TMAH 0 mg·L⁻¹ showed a good nitrification reaction, and the proportion of *Gemmata* genus in the Planctomycetes was higher than that of the other two groups. With TMAH concentration increasing, the relative abundance of TMAH 1000 mg·L⁻¹ was high, and Proteobacteria and Bacteroidetes were the new species. Afterward, the distribution of TMAH 3000 mg·L⁻¹ strains was affected by a combination of factors (high TMAH concentration, nitrification inhibition), and the total amount and abundance of the species were specific. Among them, the *Reyranella* genus in Proteobacteria was obviously higher than TMAH 0 mg·L⁻¹ and TMAH 1000 mg·L⁻¹.

Keywords

TMAH, High-Throughput Sequencing, Bacterial Community, Bacterial Diversity

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

集成电路与 LCD 生产工艺常使用 TMAH 作为显影剂, TMAH 是一种具有毒性的含氮有机物质, 该类有机废水具有强碱性及高氮特性。目前中国大陆尚未有法规管制 TMAH 排放浓度, 但由于近年来环保意识高涨, 台湾环保署增订光电、科学园区污水下水道系统和晶圆制造业的放流水标准, 新竹科学园区管理局也修改相关水质标准, 将 TMAH 纳入二阶段管制(TMAH < 30 mg·L⁻¹)。

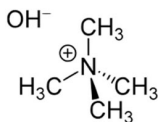


Figure 1. The structure of TMAH

图 1. 氢氧化四甲基铵结构式图

氢氧化四甲基铵分子式为(CH₃)₄NOH, 结构式如图 1, 其分子量为 91.15, 是一种离子键结的物质, 具有类似铵类(Amine)气味、极易溶于水、pH 值大于 13, 水解后会形成 OH⁻基、TMA⁺基(王及陈, 2008) [1]。

本研究主要是在好氧条件下以生物分解废水中的 TMAH。甲烷氧化菌分解四甲基铵盐类的代谢途径, 主要是以连续氧化反应将四甲基铵依序降解成三甲基胺(Trimethylamine)、二甲基胺(Dimethylamine)、甲基胺(Methylamine), 而伴随着降解过程, 甲醛(HCHO)与氨氮会被释放出来(Anthony, 1982) [2]。

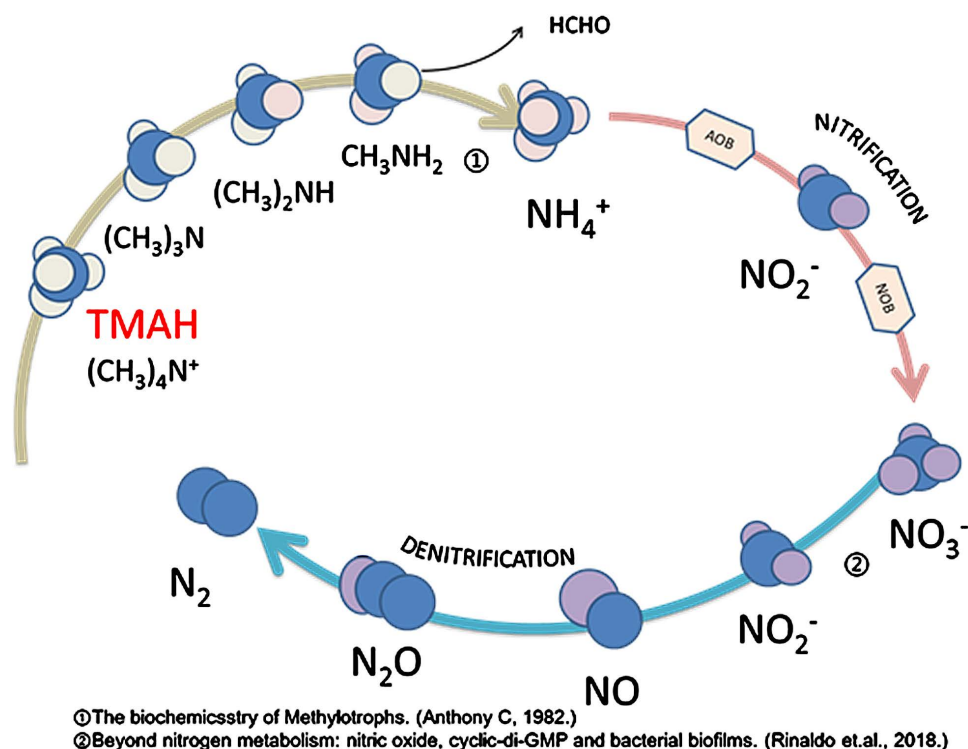


Figure 2. Mechanism metabolic pathway of TMAH

图 2. TMAH 的生物代谢途径

生物除氮过程包括生物发生硝化反应的好氧阶段和短时间缺氧过程, 以提供生物的反硝化。用 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的氧化和 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的还原将氨氮转化成氮气, 以达到去除氨氮的目的[3]。根据以上相关文献汇整 TMAH 生物代谢途径如图 2。

Lei 等人[4]研究了一种在好氧和厌氧条件下处理包含 TMAH、二甲基亚砜(DMSO)和单乙醇胺(MEA)的废水, 于两种情况下都可能降解 TMAH。另外, 文献显示有多种可以分解 TMAH 之微生物, *Mycobacterium* sp.、*Pseudomonas aminovorans* (Urakami *et al.*, 1990; Ghisalba *et al.* 1985) [5] [6]可于好氧的环境下分解 TMAH。厌氧条件下, *Methanomethylovorans* spp.、*Methanococcoide* spp.和 *Methanosarcina* spp. 具有直接降解 TMAH 的潜力[7]。

水体中微生物是水域生态系统的重要组成部分, 微生物群落状况与水质状况有着密切的联系, 其结构的变化对水质污染负荷积累有很好的响应[8] [9], 它们在生源要素循环、有机物分解和污染物净化等方面起着非常重要的作用。近年来, 在微生物群落多样性研究中倾向于采用分子生物学技术[10] [11] [12], 分子生物学技术是以细菌基因序列信息做为基础, 通过细菌的基因序列来探讨样品中的微生物的组成及变化, 由于其不需要对样品中的微生物进行分离培养, 就能够快速检测出大量未培养的微生物, 与传统研究方法相比具有重现性高、节省时间等优点[13] [14]。而 16S rDNA 通常作为鉴定生物物种的特征核酸序列, 16S rDNA 是进行高通量测序和菌种鉴别[15] [16]。本研究主要采用 Illumina MiSeq 测序技术研究不同 TMAH 浓度下对硝化系统微生物群落结构差异组成。

2. 实验与方法

2.1. 污泥来源与采集

本实验所使用的硝化污泥来源于台湾某半导体厂内氨氮生物处理槽体, 批次反应器内进水是利用 RO

水人工配制氨氮与 TMAH 的混合废水。批次反应器内初期先添加 NH_4Cl 使氨氮浓度为 $200\sim 400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右, 硝酸盐氮及亚硝酸盐氮趋近于 0, 实验期间 pH 控制于 $7.5\sim 8.5$ 。

反应稳定期间, 每日取样分别分析氨氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐氮及总氮之数值。表 1 为生物槽体内的初始与最终数值。

Table 1. The initial and final concentration of wastewater quality

表 1. 各组废水的初始与最终组成成分

分析项目	组别 A TMAH $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$		组别 B TMAH $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$		组别 C TMAH $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
	初始	最终	初始	最终	初始	最终
$\text{NH}_3\text{-N}$	228	1.5	234	62.5	243	232
TMAH	-	-	1107	<10	2713	1080

单位: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2. 分析方法

本研究之水质分析为监测 pH、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、TN 之变化与并利用 TN 与氨氮换算成 TMAH 浓度进而观察 TMAH 的降解情况, 表 2 为本研究水质之分析方法。

Table 2. Methods of analysis for wastewater quality

表 2. 水质之参考分析方法

项目	方法
SS	Standard Method 2540 B&D
VSS	Standard Method 2540E
$\text{NH}_3\text{-N}$	HACH Method 8038 Nessler Method
$\text{NO}_2\text{-N}$	HACH Method 8507 Diazotization Method Powder Pillows or AccuVac [®] Ampuls
$\text{NO}_3\text{-N}$	HACH Method 10020 Chromotropic Acid Method Test 'N Tube [™] Vials
TN	HACH Method 10072 Persulfate Digestion Method Test 'N Tube [™] Vials

2.3. 微生物核酸萃取、16S rRNA 基因测序库(Amplicon Library)建立与高通量测序

反应器运行 16 天后, 取样送至 Genomics (Taiwan)公司进行微生物核酸与萃取测序, 此部分分析将采用次世代测序技术 Illumina MiSeq 2000 sequencing system (San Diego, USA)。

3. 结果与讨论

3.1. 样品测序质量分析

稀释曲线(Rarefaction Curve)用于描述组内样品多样性的曲线, 可直接反映测序数据量的合理性, 并间接反映样品中物种的丰富程度。对样品随机抽样, 以抽取的测序数据量与对应的物种数构建稀释曲线如图 3 所示, 当随机抽取的测序数量大于 30000 条时, 曲线趋向平坦, 表明测序数据量渐进合理, 更多的资料量对发现新的 OUT (Operational Taxonomic Units)边际贡献率较小。而当测序数量相同时, 细菌群落 OTU 数量表现为组别 B ($\text{TMAH } 1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > 组别 A ($\text{TMAH } 0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > 组别 C ($\text{TMAH } 3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 表明组别 B ($\text{TMAH } 1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)微生物丰富度明显高于其他样品。

Rank Abundance 曲线(图 4)反映了样品中物种的丰富度和均匀度。当水平曲线跨度较大,表示物种的丰富度较高;而在垂直方向上曲线平滑程度较小,表明测定样品中物种的均匀程度相对较低。图 4 明显得知组别 B-TMAH 1000 mg·L⁻¹ 的曲线跨度大,代表物种的丰富度高于其他两组。

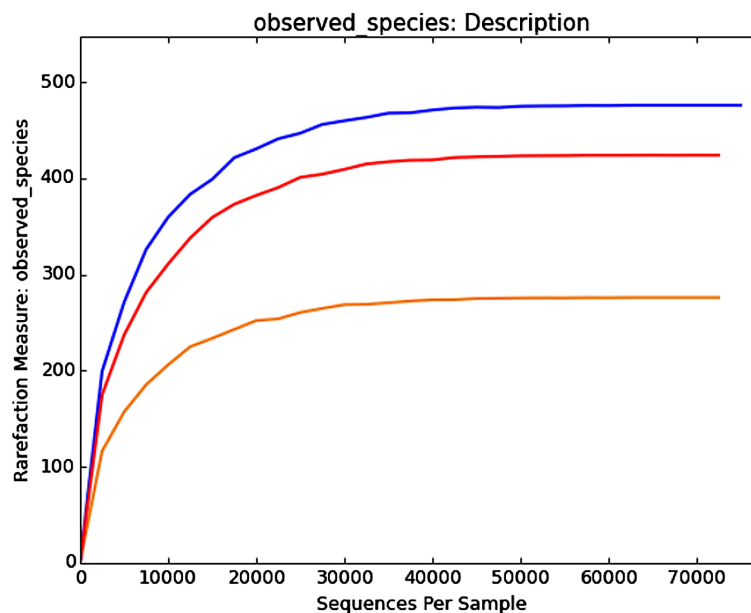


Figure 3. Rarefaction curve for Sample-A, B, C

图 3. 样品的稀释曲线图

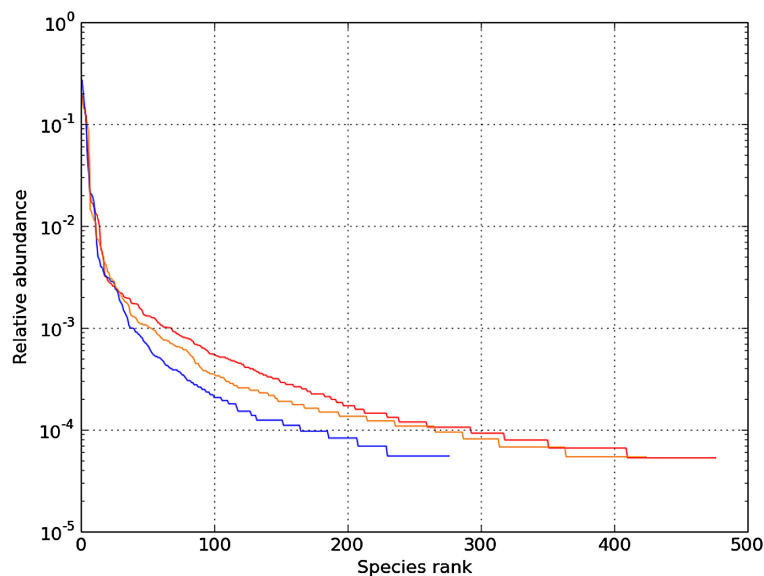


Figure 4. Rank Abundance curve for Sample-A, B, C

图 4. 样品的 Rank Abundance 曲线图

3.2. 细菌菌种丰度与歧异度

由表 3 可知,组别 A-TMAH 0 mg·L⁻¹ 得到的拼接序列数共有 76,832 条 Tags, 在 97% 的序列相似性条件下,可分为 2809 个 OTUs, 包括 40,260 条 Unique Tags, 40,247 条 Taxon Tags; 组别 B TMAH-1000

mg·L⁻¹得到的拼接序列数共有 78,493 条 Tags, 在 97%的序列相似性条件下, 可分为 2651 个 OTUs, 包括 43,352 条 Unique Tags, 43,335 条 Taxon Tags; 组别 C-TMAH 3000 mg·L⁻¹得到的拼接序列数共有 74,489 条 Tags, 在 97%的序列相似性条件下, 可分为 1851 个 OTUs, 包括 38,180 条 Unique Tags, 38,180 条 Taxon Tags。从这些资料可以看出, 生物硝化系统中含有 TMAH 1000 mg·L⁻¹者, 其与 TMAH 0 mg·L⁻¹者的生物菌群数量差异不大, 但丰富度略高于 TMAH 0 mg·L⁻¹者; 而当 TMAH 提高至 3000 mg·L⁻¹总体微生物总数变低且微生物种类比较单一。TMAH 的加入使得环境内的菌种丰富度提高, 但浓度提高到一定比例时, TMAH 的毒性会造成微生物数量及种类变少。

Table 3. Numbers of Tags and OTUs

表 3. 样品的 Tags 和 OTUs 数目统计

组别	OTU			
	Total_Tags	Unique_Tags	Taxon_Tags	OTUs
A 0 mg·L ⁻¹	76,832	40,260	40,247	2809
B 1000 mg·L ⁻¹	78,493	43,352	43,335	2651
C 3000 mg·L ⁻¹	74,489	38,180	38,180	1851

样品中的 OTU 数量可代表物种丰富度, 可进一步分析其物种丰富度指数(Community Richness)、物种均匀度指数(Community Evenness)以及物种多样性指数(Community Diversity)。物种丰富度即为物种的数目, 数目愈多代表丰富度愈大, 生物多样性也就越高。物种均匀度说明一个群集中各个物种个体数目的分配状况, 反映出各个物种个体数目分配的均匀程度, 一个群集中各物种的个体数目愈相近者, 代表物种均匀度高。在物种丰富度相同的状况下物种均匀度越高者, 则说明物种多样性越高。

根据 OTU 聚类分析结果和研究需求, 当样品数大于 5 时, 对所有样品进行均一化处理, 分析不同样品之间共有和特有的 OTU 并绘制花瓣图(图 5)。从图中可以直观的看出不同样品 OTU 数目组成相似性重迭情况, 3 个样品共有的 OTU 数目为 105, 不同样品中特有 OTU 表现为组别 B-TMAH 1000 mg·L⁻¹ 最高(155), 组别 A-TMAH 0 mg·L⁻¹ 次之(121)组别 C-TMAH 3000 mg·L⁻¹ 最低(57)。

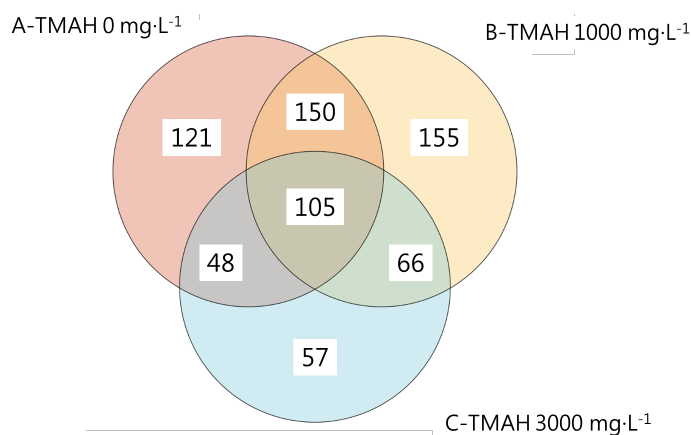


Figure 5. Flower diagram based on OTUs

图 5. 基于 OTUs 绘制的花瓣图

3.3. TMAH 浓度对微生物群落结构之影响

稀释曲组别 A (TMAH 0 mg·L⁻¹)序列数据库比对后共得到 14 个门、26 个纲、51 个目、71 个科、113 个

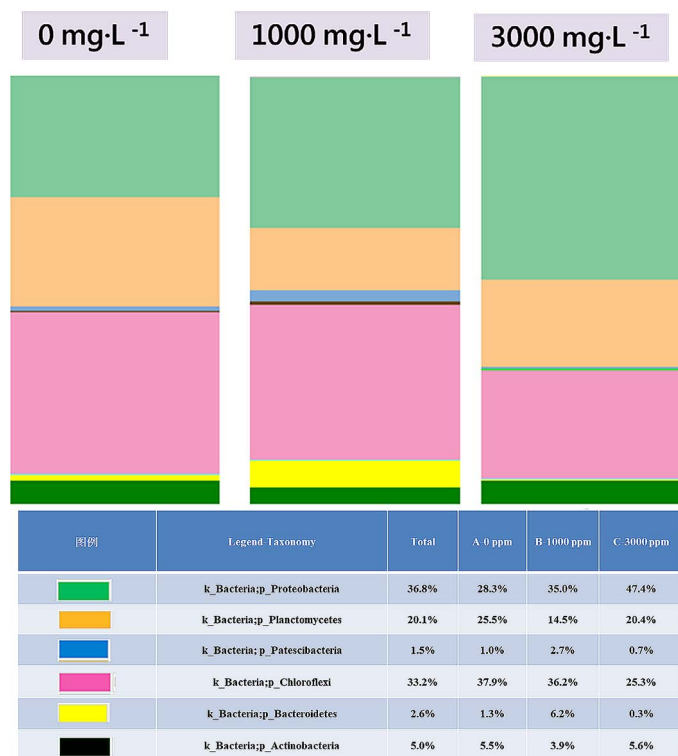


Figure 6. Relative abundance of OTUs assigned at the phylum level
图 6. 分类层级为门之结构组成

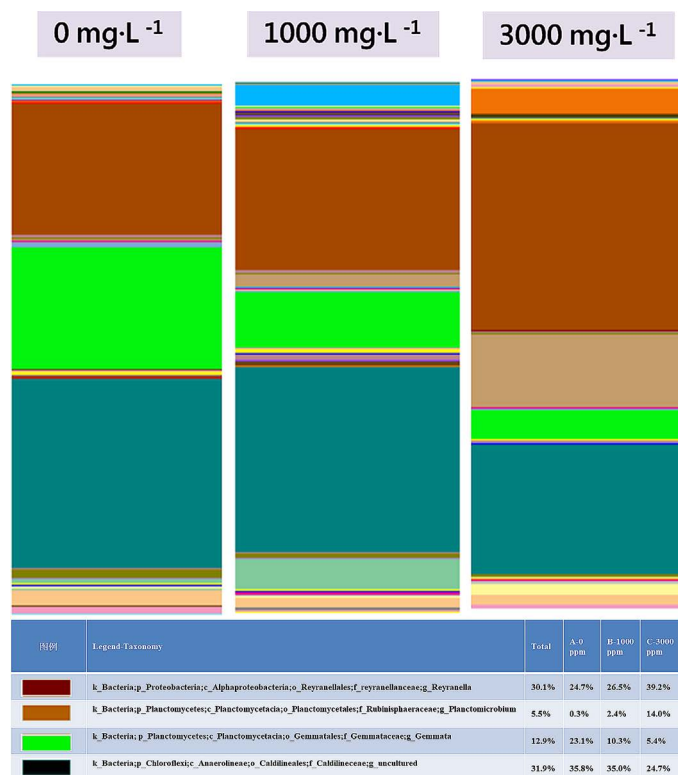


Figure 7. Relative abundance of OTUs assigned at the genus level
图 7. 分类层级为属之结构组成

属及 113 个种。以门分类层级来看, Chloroflexi 为最优势、Proteobacteria 次之再来是 Planctomycetes (图 6)。以属的分类层级来看, *Caldilineaceae* (Genus uncultured) 为最优势、*Reyranella* 次之再来是 *Gemmata* (图 7)。

组别 B (TMAH 1000 mg·L⁻¹) 序列数据库比对后共得到 18 个门、32 个纲、65 个目、96 个科、150 个属及 175 个种。以门分类层级来看, Chloroflexi 为最优势、Proteobacteria 次之再来是 Planctomycetes (图 6)。以属的分类层级来看, *Caldilineaceae* (Genus uncultured) 为最优势、*Reyranella* 次之再来是 *Gemmata* (图 7)。

组别 C (TMAH 3000 mg·L⁻¹) 序列数据库比对后共得到 14 个门、23 个纲、46 个目、62 个科、97 个属及 113 个种。以门分类层级来看, Proteobacteria 为最优势、Chloroflexi 次之再来是 Planctomycetes (图 6)。以属的分类层级来看, *Reyranella* 为最优势、*Caldilineaceae* (Genus uncultured) 次之再来是 *Planctomicrobium* (图 7)。

3.4. 样品复杂度分析

Alpha 多样性主要是探讨样品内的微生物群落多样性, 通过分析评估各样品中微生物群落的物种丰富度和多样性的差异。序列相似度大于 97% 的情况下可聚类成一个 OTU, 通常被认为是源自同一个种 (Species Boundary) 所得的 Alpha 多样性指数取平均值如表 4 所示。分析表明, 所有取样点的多样性测序结果 Coverage 均高于 99%, 表明测序结果覆盖度好且具有较高可信度, 能够代表样本的真实情况。Shannon 指数和 Simpson 指数则是反映物种丰富度和均匀度的 2 个重要参数, 其值越大代表个体分配越均匀、群落多样性越高, 从表 4 可以看出, 3 组菌落的 Shannon 多样性指数和 Simpson 多样性指数排序分别为组别 B (TMAH 1000 mg·L⁻¹) > 组别 A (TMAH 0 mg·L⁻¹) > 组别 C (TMAH 3000 mg·L⁻¹), 结果表明高浓度 TMAH 系统中细菌微生物群落多样性相对较低。Chao1 指数是生态学中用于估算样本物种丰富度的常用指数, 表现为组别 B (TMAH 1000 mg·L⁻¹) 值最大、组别 C (TMAH 3000 mg·L⁻¹) 最低, 表明前者群落的丰富度最高, 而后者丰富度最低。

Table 4. Diversity index of bacterial community

表 4. 微生物群落多样性指数

样品名称	菌群多样性		菌群丰富度	测序深度
测定方法	Shannon 指数	Simpson 指数	chao1	覆盖度 Goods coverage %
组别 A 0 mg·L ⁻¹	4.329	9.627	424	100
组别 B 1000 mg·L ⁻¹	4.629	10.028	476	100
组别 C 3000 mg·L ⁻¹	3.746	6.789	276	100

3.5. 聚类分析

为了进一步得到不同样品间群落结构差异, 对 OTU 进行多序列比对并基于 Weighted Unifrac 距离矩阵构建非加权组平均聚类树形图 (Unweighted Pairgroup Method with Arithmetic Mean, UPGMA) 结果如图 8 所示, 组别 B (TMAH 1000 mg·L⁻¹) 和组别 A (TMAH 0 mg·L⁻¹) 相似度最高, 组别 C (TMAH 3000 mg·L⁻¹) 与其他样品间距离最远, 相似度最低。

3.6. 综合讨论

由表 5(A) 以上的分析结果可知, 浮霉菌门 (Planctomycetes) 中的 *Gemmata* 属于组别 A 占 22.52%, 在组别 B 及组别 C 却减少至 10.29% 及 5.13%。放线菌门 (Actinobacteria) 中的 *Rhodococcus* 属于组别 A 占 2.68%, 在组别 B 及组别 C 也减少至 < 2%, 相对数量明显, 表明 TMAH 对 *Gemmata* 属及 *Rhodococcus* 属有较大的抑制作用。

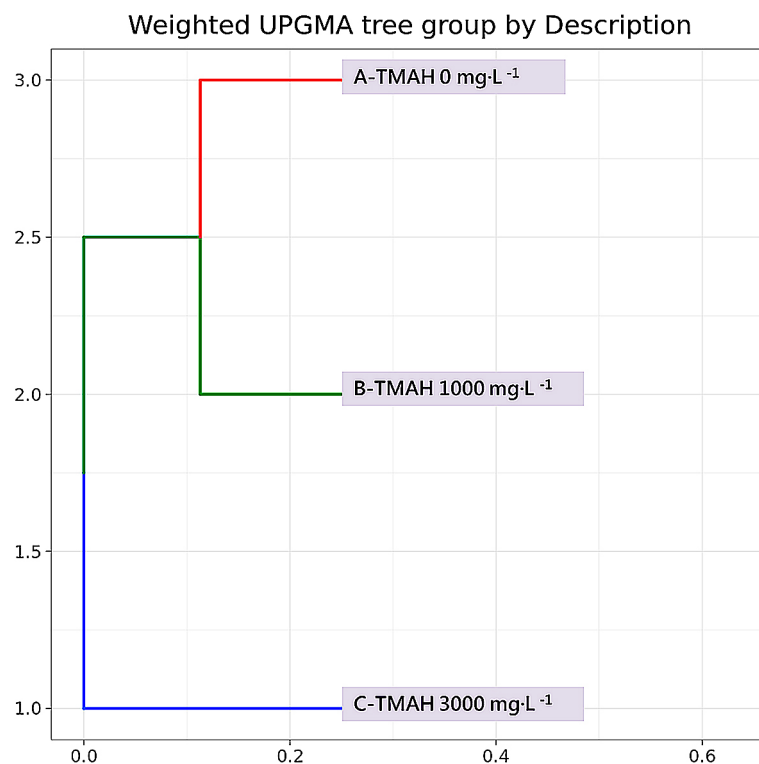


Figure 8. UPMGA phylogenetic tree

图 8. UPGMA 聚类树形图

表 5(B)显示组别 B (TMAH 1000 mg·L⁻¹)与组别 A (TMAH 0 mg·L⁻¹)相比, 增加 TMAH 浓度的变异性, 带入了新的真菌物种(如: 变形菌门(Proteobacteria) *Brachymonas* 属、拟杆菌门(Bacteroidetes) *Flavobacterium* 属), 其菌种丰富度也明显提高。但以上菌种于 TMAH 浓度 3000 mg·L⁻¹时, 其占比锐减, 受到高浓度 TMAH 一定程度的抑制。

变形菌门(Proteobacteria)中的 *Reyranella* 属通常出现在含氮系统的中后期, 相关研究表明, 变形菌门在生物脱氮及诸多污染物降解过程中起着重要作用[12], 随着 TMAH 浓度增加其生长环境和代谢基质方面都更加有利于 *Reyranella* 属繁殖, 最终表现为随着 TMAH 浓度的增加其数量也增加, 以上现象于浮霉菌门(Planctomycetes) *Planctomicrobium* 属及变形菌门(Proteobacteria) *Castellaniella* 属的占比中也呈现递增的趋势。

Table 5. (A) TMAH inhibition (B) relative abundance of TMAH 1000 ppm (C) optimum bacteria of high TMAH concentration

表 5. 各项目探讨(A) TMAH 抑制(B) TMAH1000 相对丰富度(C)高浓度 TMAH 最适菌

比较项目	菌属名	组别 A 0 mg·L ⁻¹	组别 B 1000 mg·L ⁻¹	组别 C 3000 mg·L ⁻¹
(A) TMAH 抑制	<i>Gemmat</i>	22.52%	10.29%	5.13%
	<i>Rhodococcus</i>	2.68%	1.86%	1.74%
(B) TMAH 1000 相对丰富度	<i>Brachymonas</i>	0.00%	0.24%	0.07%
	<i>Flavobacterium</i>	0.00%	0.18%	0.01%
	<i>Reyranella</i>	24.05%	26.55%	37.54%
(C) 高浓度 TMAH 最适菌	<i>Planctomicrobium</i>	0.29%	2.43%	13.36%
	<i>Castellaniella</i>	0.12%	0.18%	4.50%

4. 讨论

综合以上各条件实验之结果, 本研究初步之结论如下:

1) 从各组细菌物种分类可以看出, 硝化系统中的绝对优势的细菌主要来自变形菌门(Proteobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)。

2) 组别 A TMAH $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈现良好的硝化反应, 其属之结构组成中浮霉菌门(Planctomycetes) *Gemmat* 属的比例比其他两组高。组别 C TMAH $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 高浓度下变形菌门(Proteobacteria) *Reyranella* 属明显比组别 A 及组别 B 高。

3) 细菌丰富度表现为组别 B (TMAH $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > 组别 A (TMAH $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > 组别 C (TMAH $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。组别 B (TMAH $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)与组别 A (TMAH $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)相比, 增加 TMAH 浓度的变异性, 可能带入了新的真菌物种, 其菌种丰富度也明显提高。

4) 细菌群落 OTU 数量表现为组别 A (TMAH $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > 组别 B (TMAH $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > 组别 C (TMAH $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。测试期间 TMAH $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 菌种分布受到诸多因素(TMAH 浓度高、硝化作用抑制)的综合制约影响, 和其他样品距离较远, 物种总量和丰度具有特异性。

参考文献

- [1] 王沁镇, 陈永煌. 氢氧化四甲铵(TMAH)暴露之现场急救处理评估[J]. 中华职业医学杂志, 2008, 15(1): 1-7.
- [2] Anthony, C. (1982) The Biochemisstry of Methylothropfs. Department of Biochemistry, University of Southampton, Southampton.
- [3] Rinaldo, S., Giardina, G., Mantoni, F., Paone, A. and Cutruzzolà, F. (1982) Beyond Nitrogen Metabolism: Nitric Oxide, Cyclic-Di-GMP and Bacterial Biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, **365**, fny029. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny029>
- [4] Lei, C.N., Whang, L.M. and Chen, P.C. (2010) Biological Treatment of Thin-Film Transistor Liquid Crystal Display (TFT-LCD) Wastewater Using Aerobic and Anoxic/Oxic Sequencing Batch Reactors. *Chemosphere*, **81**, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.001>
- [5] Urakami, T., Araki, H. and Kobayashi, H. (1990) Isolation and Identification of Tetramethylammonium-Biodegrading Bacteria. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **70**, 41-44. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90028-U](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90028-U)
- [6] Ghisalpa, O., Cevey, P., Küenzi, M. and Schär, H.-P. (1985) Biodegradation of Chemical Waste by Specialized Methylothropfs, an Alternative to Physical Methods of Waste Disposal. *Conservation & Recycling*, **8**, 47-71. [https://doi.org/10.1016/0361-3658\(85\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0361-3658(85)90025-6)
- [7] 洪钰清. 以分子生物技术评估 TFT-LCD 废水中降解 TMAH 之甲烷菌群变化[D]: [硕士学位论文]. 台南: 国立成功大学, 2011.
- [8] 柴晓娟, 骆大伟, 吴春笃, 等. 水体中微生物分布及与环境因素的相关性研究[J]. 人民长江, 2008, 39(3): 45-47.
- [9] Newton, R.J., Jones, S.E., Eiler, A., *et al.* (2011) A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **75**, 14-49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10>
- [10] 张岩, 吴燕燕, 李来好, 等. 16S rDNA 序列分析鉴定一株合浦珠母贝共附生乳酸菌[J]. 南方水产科学, 2012, 8(6): 9-15.
- [11] Polka, J., Rebecchia, A., Pisacane, V., *et al.* (2015) Bacterial Diversity in Typical Italian Salami at Different Ripening Stages as Revealed by High-Throughput Sequencing of 16S rRNA Amplicons. *Food Microbiology*, **46**, 342-356. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.023>
- [12] Williams, S.T., Foster, P.G. and Littlewood, T.J. (2014) The Complete Mitochondrial Genome of a Turbinid Vetigastropod from MiSeq Illumina Sequencing of Genomic DNA and Steps towards a Resolved Gastropod Phylogeny. *Gene*, **533**, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.005>
- [13] Youssef, N., Sheik, C.S., Krumholz, L.R., *et al.* (2009) Comparison of Species Richness Estimates Obtained Using Nearly Complete Fragments and Simulated Pyrosequencing-Generated Fragments in 16S rRNA Gene-Based Environmental Surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 5227-5236. <https://doi.org/10.1128/AEM.00592-09>
- [14] 吴燕燕, 钱茜茜, 李来好, 等. 基于 Illumina MiSeq 技术分析腌干鱼加工过程中微生物群落多样性[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 1-8.

-
- [15] 聂志强, 韩玥, 郑宇, 等. 宏基因组学技术分析传统食醋发酵过程微生物多样性[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 198-203.
- [16] Li, B., Zhang, X., Guo, F., *et al.* (2013) Characterization of Tetracycline Resistant Bacterial Community in Saline Activated Sludge Using Batch Stress Incubation with High-Throughput Sequencing Analysis. *Water Research*, **47**, 4207-4216. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.021>