

常温 CANON 反应器内微生物群落结构及生物多样性

刘 涛¹, 李 冬², 畅晓燕², 曾辉平², 曾涛涛¹, 张 杰^{1,2}

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨;

2. 北京工业大学 水质科学与水环境恢复工程北京市重点实验室, 100124 北京)

摘 要: 为研究基于亚硝化的全程自养脱氮 (CANON) 工艺中微生物群落结构及种属特征, 从常温条件下稳定运行的 CANON 反应器中采集生物膜样品, 并基于聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 技术, 分别对总细菌、氨氧化细菌和厌氧氨氧化菌进行群落结构解析. 结果表明: 反应器中与亚硝化作用有关的功能菌为亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 和亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*), 与厌氧氨氧化作用有关的功能菌是 *Candidatus Brocadia* 属和 *Candidatus Kuenenia* 属, 未检测到亚硝酸盐氧化细菌, 且系统内氨氧化细菌的生物多样性明显高于厌氧氨氧化菌. 此外, 反应器中还存在其他微生物, 如 *Shewanella*、*Pseudomonas*、*Ignatzschineria*、*Dechloromonas* 以及属于 *Clostridia*、 α -*Proteobacteria*、*Bacillales* 的 uncultured bacterium 等.

关键词: 基于亚硝化的全程自养脱氮; 16S rDNA; 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳; 微生物群落结构; 生物多样性

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2013)08-0028-06

Bacterial community structure and biodiversity of CANON reactor at room temperature

LIU Tao¹, LI Dong², CHANG Xiaoyan², ZENG Huiping², ZENG Taotao¹, ZHANG Jie^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;

2. Key Laboratory of Water Quality Science and Water Environment Recovery Engineering, Beijing University of Technology, 100124 Beijing, China)

Abstract: To investigate bacterial community structure and biodiversity of a CANON reactor that was operated stably at room temperature, total DNA was extracted from the biofilm for PCR-DGGE analysis. The results of microbial community analysis showed that the ammonia oxidizing bacteria *Nitrosomonas* and *Nitrosospira*, together with the anaerobic ammonia oxidizing bacteria *Candidatus Brocadia* and *Candidatus Kuenenia* were detected as the functional bacteria while nitrite-oxidizing bacteria (NOB) was not found in the CANON system, and the biodiversity of AOB was significantly higher than anammox bacteria. Besides, some other bacteria like *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Ignatzschineria*, *Dechloromonas* and some uncultured bacterium related to *Clostridia*, α -*Proteobacteria* and *Bacillales* also existed in the reactor.

Key words: CANON; 16S rDNA; PCR-DGGE; biocommunity structure; biodiversity

收稿日期: 2012-09-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (50878003); 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2008ZX07208-003-003, 2008ZX07208-005-003, 2009ZX07424-001, 2009ZX07424-002-003, 2009ZX07424-005); 北京市自然科学基金资助项目 (8092006); 城市水资源与水环境国家重点实验室 (哈尔滨工业大学) 开放基金项目 (QAK201005).

作者简介: 刘 涛 (1987—), 男, 博士研究生;

李 冬 (1976—), 女, 教授, 博士生导师;

张 杰 (1938—), 男, 博士生导师, 中国工程院院士.

通信作者: 张 杰, 6282031@163.com.

与传统脱氮工艺相比, CANON (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) 工艺可节省 63% 的氧和近 100% 的外加碳源, 是最具可持续发展意义的生物脱氮工艺. Sliekers 等^[1] 采用 SBR 工艺流程首先实现了 CANON 工艺对高温高氨氮合成废水的处理, 此后 Young-Ho Ahn 等^[2] 实现了 CANON 工艺对污泥消化液的处理. 然而目前 CANON 工艺仍然处于实验研究阶段, 且是针对低负荷、高氨氮、高温废水的处理^[3-4], 还较难

应用在常温低基质浓度的城市生活污水处理中.

CANON 系统是一个内部微生物组成较为复杂的微生态系统,除了协同完成脱氮作用的氨氧化细菌和厌氧氨氧化细菌两类功能微生物之外^[5],还存在其他种类的微生物,甚至包括一些原生动物及少量的后生动物等^[6],因此,稳定的微生物群落结构的形成是影响反应器稳定运行的关键因素之一.然而,目前的研究主要集中在改变某些工艺参数,如 pH、温度、溶解氧等^[7-8],分析功能微生物产生的相应变化,较少涉及以维持工艺稳定运行为目的的其他非功能微生物的研究.因此,采用 PCR-DGGE 技术,分析了 CANON 反应器中的总细菌、氨氧化细菌和厌氧氨氧化菌的微生物群落结构,并对检测到的微生物进行种属鉴定,考察微生物群落与系统脱氮性能之间的关系,为维持 CANON 工艺的稳定运行、阐明 CANON 工艺的微生态系统提供理论基础.

1 实 验

1.1 工艺概述及样品采集

CANON 反应器由有机玻璃加工而成,如图 1 所示,内径 150 mm,有效高度 700 mm,总容积 8.15 L,有效体积 1.8 L,柱内装填火山岩活性生物陶粒滤料.接种污泥取自实验室之前运行效果较好的 CANON 反应器,并在室温、高氨氮浓度下成功启动并稳定运行.运行过程中氨氮浓度维持在 400 mg/L,进水从反应器底部进入,由上部出水口排出.反应器底部设曝气盘,通过气泵曝气.以 NaHCO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 与自来水配置原水,考虑到自来水中含有大量微量元素,不再进行微量元素的投加.进水中没有 COD 组成,即为不含有机碳源的高氨氮废水.

在反应器稳定运行时从滤层中间部位采集滤料数粒,将样品保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中用以提取基因组 DNA.

1.2 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

用无菌玻璃棒搅拌滤料以使生物膜脱落,取 1 g 湿重的生物膜,加入 2.7 mL DNA 提取液 (100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, 1.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na_3PO_3 , 1% CTAB, pH 8.0) 以及 50 μL 蛋白酶 K (30 g/L) 和 50 μL 溶菌酶 (20 g/L), 并加入直径为 0.5 mm 的玻璃珠 2~3 粒, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min. 此后加入 1.5 mL SDS (200 g/L) 溶液, $65\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 2 h, 期间每隔 20 min 将样品上下颠倒一次. 8 000g 离心 10 min, 将上清液转移至新的无菌离心管中, 并加入等体

积的氯仿/异戊醇 (24:1) 并混匀, 8 000g 离心 10 min 后将上清液转移至新的无菌离心管中, 并加入 0.6 倍体积的预冷异丙醇, 置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中过夜保存后, 12 000g 离心 5 min, 弃上清, 然后 12 000g 再离心 3 min, 弃上清液并将样品置于通风处, 彻底晾干后加入 50 μL 1 $\times$ TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0). 提取的基因组 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测.

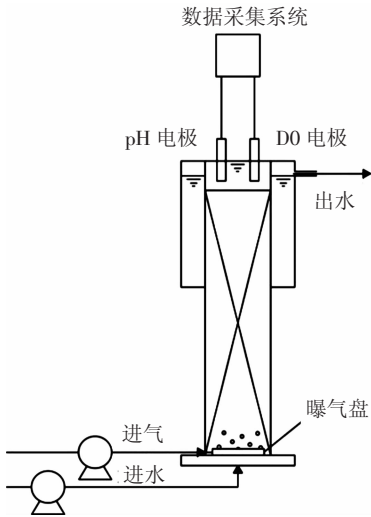


图 1 CANON 反应器实验装置

细菌 16S rDNA 的扩增, 使用通用引物对 F338-GC/R518; AOB 的 16S rDNA 的扩增采用巢式 PCR. 第一阶段先以 CTO189fA/B/C 以及 CTO654r 为引物进行扩增, 并对 PCR 产物进行纯化回收, 之后以第一阶段的 PCR 产物为模板, 以细菌通用引物对 F338-GC/R518 进行扩增. 对于 anammox 菌的特异性片段, 也采用巢式 PCR 方法: 第一阶段先用浮霉菌的特异性引物 Pla46F 和细菌通用引物 630R 进行 PCR 扩增, 并对 PCR 产物进行纯化回收, 之后以第一阶段的 PCR 产物为模板, 以 anammox 菌的特异性引物对 Amx368F-GC/Amx820 进行第二阶段的 PCR 扩增. 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列及扩增条件见文献 [9-10]. 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测.

1.3 DGGE 电泳

PCR 产物的 DGGE 分析采用 BIO-RAD 公司的 Dcode 通用突变检测系统进行电泳, 聚丙烯酰胺质量分数为 8%, 变性梯度为 30%~60%, 电压 120 V, PCR 产物上样量约 500 ng. 基于细菌和 AOB 的 PCR 产物电泳时间为 5 h, 基于 anammox 菌的 PCR 产物电泳时间为 7 h. 电泳结束后用 Bassam

等^[11]的方法进行银染,并对凝胶进行拍照。

1.4 16S rDNA 文库的构建、测序及系统发育分析

切取 DGGE 图谱中的目的条带溶于 50 μL 1 × TE buffer(pH 8.0)中,4 ℃ 过夜,以此为模板,以不含 GC 夹的引物进行 PCR 扩增.经试剂盒纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接后,转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,在含有 X-gal、IPTG 和 Amp 的 LB 培养基 37 ℃ 恒温培养 24 h,通过蓝白斑筛选阳性克隆子接种于 LB 培养液中,37 ℃ 恒温振荡过夜培养,通过菌落 PCR 方法检验转化是否成功,将阳性克隆子进行测序.采用 BLAST 对测序结果和基因库中已知序列进行相似性分析,并利用 MEGA 软件(版本 5.05),采用邻位相连法(Neighbor-Joining)构建系统发育树,自举值为 1 000.

2 结果与讨论

2.1 反应器运行状况分析

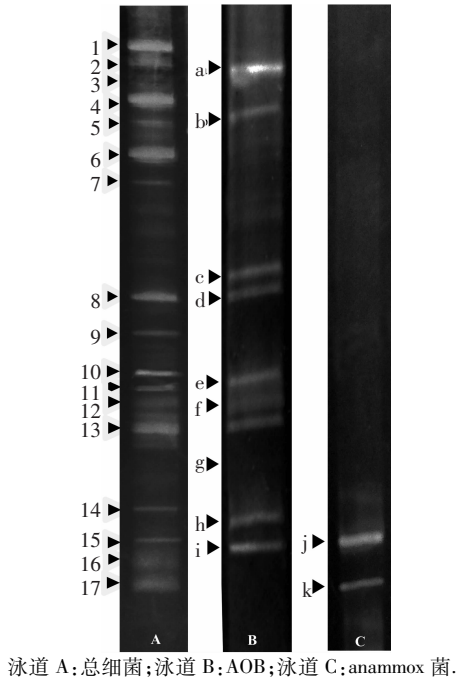
样品采集时反应器进水氨氮浓度 400 mg/L 左右,总氮去除率保持在 70% 以上,去除负荷在 1.2 kg/(m³ · d)左右,氨氮去除率达 83%,氨氮去除负荷为 1.4 kg/(m³ · d),出水硝氮浓度维持在 20 ~ 35 mg/L.反应器在该状态下稳定运行 60 d,其去除负荷与 Sliekers 以及 Chuang 等^[1, 12]的研究结果较为接近,属于较高的去除负荷,说明此时系统内的微生物群落结构组成较为合理,有利于系统发挥高效脱氮作用,因此,分析在该运行工况下的微生物特征更具有代表性。

2.2 样品总 DNA 提取及扩增产物分析

样品总 DNA 条带经琼脂糖凝胶电泳分析,大小约为 23 kb,亮度和纯度都较好,为后续的 PCR 反应提供了较为理想的 DNA 模板.分别采用总细菌、AOB 以及 anammox 菌特异性引物对,将样品总 DNA 进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测,均成功扩增出与预期相符的目的片段(电泳图未列出)。

2.3 PCR-DGGE 图谱及系统发育分析

PCR-DGGE 图谱如图 2 所示.总细菌的可见条带数为 17,氨氧化细菌和厌氧氨氧化菌图谱的条带数分别为 9 条和 2 条,可见氨氧化细菌的生物多样性明显高于厌氧氨氧化菌.由于不同种属的氨氧化细菌在生长动力学、对底物和氧的亲合力、对底物的氧化速率以及对环境因子的敏感性等方面都是不同的^[13],氨氧化细菌较高的种群多样性使得该 CANON 系统对环境的适应能力较强,提高了系统的抗干扰能力。



泳道 A:总细菌;泳道 B:AOB;泳道 C:anammox 菌.

图 2 基于 16S rDNA PCR 产物的 DGGE 图谱

为了分析系统内微生物群落结构的组成特点与反应器稳定运行的关系,对图 2 中 3 个泳道所有条带所代表的微生物进行了克隆测序,得到的总细菌、AOB 和 anammox 菌的 GenBank 登陆号分别为 JQ917126-JQ917142, JQ886072-JQ886080 以及 JQ943613-JQ943614,并与 GenBank 中的已知序列进行比对.泳道 A 的 17 个条带中,除条带 13 外,其他 DNA 序列均与 GenBank 中已知序列拥有较高的相似度(>96%), (见表 1),并基于 17 个条带的 DNA 序列构建系统发育树,如图 3 所示.可以看出,β-变形菌纲、γ-变形菌纲以及浮霉菌目的微生物为占有优势地位的菌群,此外还存在梭菌纲、杆菌纲、α-变形菌纲的微生物.其中条带 2 和条带 11 与 β-变形菌纲中的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*) 相似度高达 100% 和 99%,在反应器内将氨氧化为亚硝酸盐.由于采用的 CANON 系统内氨氮浓度为 400 mg/L 左右,属于高氨氮环境,亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*) 恰恰是更多地出现在高氨氮环境中的氨氧化微生物^[14],因此, *Nitrosomonas* 成为系统中的优势氨氧化细菌.值得注意的是,泳道 A 的 17 个可见条带中,只有条带 2 和条带 11 为氨氧化细菌,然而通过巢式 PCR 后对氨氧化细菌进行 DGGE 检测,所得的可见条带数为 9 条(图 2,泳道 B),远远多于泳道 A 中的氨氧化细菌条带数,原因在于:首先,由于 PCR-DGGE 技术本身的缺陷性,只能检测到占整个菌群不低于 1% 的优势菌群^[9],掩盖了其中次级地位的细菌.因此,采用细菌通用引物难以检

测到含量在 1% 以下的氨氧化细菌. 而采用巢式 PCR 方法, 可以先通过与氨氧化细菌结合性更好的特异性引物将菌群中含量较少的氨氧化细菌片段扩增出来, 再进行 PCR - DGGE 检测, 可以更全面地考察这一类菌的群落结构, 因此, 造成泳道 B 中的氨氧化细菌条带多于泳道 A; 其次, 由于巢式 PCR 采用两轮扩增, 可以保证 PCR 扩增的特异性, 但是在进行第二次 PCR 扩增时, 引起交叉污染的几率会增大, 可能造成一些假阳性结果. 条带 5、8、12 与浮霉菌目 (*Planctomycetia*) 中的待定厌氧氨氧化布罗卡地菌属 (*Candidatus*

Brocadia) 相似度最高, *Candidatus Brocadia* 是一种典型的厌氧氨氧化菌属^[15], 在反应器内起到厌氧氨氧化的作用. 研究表明, 在某一特定的生长环境中, 通常只有一个种属的厌氧氨氧化细菌占据优势^[16], 泳道 A 所检测到的 3 个条带都与 *Candidatus Brocadia* 具有很高的相似度, 而且条带 5 与条带 12 相似度为 99%, 可以归并为一个操作分类单元 (OTU). 而基于厌氧氨氧化菌特异性引物扩增出的 PCR 产物的 DGGE 图谱可见条带同样为 2 条 (图 2, 泳道 C), 这也说明 CANON 系统中的厌氧氨氧化菌种类很少.

表 1 16S rDNA 序列比对结果

条带号	最接近菌种	相似度/%	登陆号	类别	所属细菌类群
1	<i>Shewanella</i> sp. B200	96	FN295772	<i>Shewanella</i>	γ -Proteobacteria
2	<i>Nitrosomonas europaea</i>	100	GQ451713	<i>Nitrosomonas</i>	β -Proteobacteria
3	Uncultured bacterium	97	DQ478750	<i>Pasteuria</i>	Bacillales
4	<i>Shewanella</i> sp.	98	GQ988720	<i>Shewanella</i>	γ -Proteobacteria
5	<i>Candidatus Brocadia</i>	98	JF487828	<i>Candidatus Brocadia</i>	Planctomycetia
6	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> sp.	99	JQ681232	<i>Pseudomonas</i>	γ -Proteobacteria
7	<i>Microbulbifer</i> sp. ABABA 211	99	AB500895	<i>Microbulbifer</i>	γ -Proteobacteria
8	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	96	EU478693	<i>Candidatus Brocadia</i>	Planctomycetia
9	<i>Ignatzschineria indica</i>	98	HQ823562	<i>Ignatzschineria</i>	γ -Proteobacteria
10	<i>Dechloromonas</i> sp. RCB	96	AY032610	<i>Dechloromonas</i>	β -Proteobacteria
11	Uncultured bacterium	99	FM174336	<i>Nitrosomonas</i>	β -Proteobacteria
12	<i>Candidatus Brocadia</i>	97	JF487828	<i>Candidatus Brocadia</i>	Planctomycetia
13	Uncultured bacterium clone Rap25	93	EF192905	<i>Sphingobium</i>	α -Proteobacteria
14	<i>Shewanella</i> sp. B200	98	FN295772	<i>Shewanella</i>	γ -Proteobacteria
15	Uncultured bacterium	98	EU358700	<i>Tissierella</i>	Clostridia
16	<i>Pseudomonas</i> sp. AF125317	100	AF125317	<i>Pseudomonas</i>	γ -Proteobacteria
17	Uncultured β -Proteobacterium	97	DQ211512	<i>Dechloromonas</i>	β -Proteobacteria

条带 1、4、14 与 γ -变形菌纲中的希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 具有很高的相似度. 此外, 反应器中还有着假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (条带 6、16)、依格纳季氏菌 (*Ignatzschineria*) (条带 9)、产微球茎菌属 (*Microbulbifer*) (条带 7)、脱氯单胞菌属 (*Dechloromonas*) (条带 10、17) 以及属于梭菌纲 (*Clostridia*)、杆菌纲 (*Bacillales*)、 α -变形菌纲的未培养细菌 (Uncultured bacterium) (条带 3、13、15). 有报道称有些希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 具有耐盐、耐低温、降解卤代有机化合物和还原金属的能力^[17-18], 反应器进水由自来水加无机盐配制而成, 因此, 反应器内部存在一定浓度的氯离子和金属离子, 适合希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 的生长; 伯杰氏细菌分类学手册显示, 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和脱氯单胞菌属 (*Dechloromonas*) 是水体中常见的土著细菌. 依格纳季氏菌 (*Ignatzschineria*) 适合在脱氯除磷系统的生物膜上生长^[19], 其在 CANON 系统中所起的作用尚不明确; 产微球茎菌属 (*Microbulbifer*) 中的有些菌种是嗜盐菌和耐盐菌^[20], 由于本反应

器进水为盐离子浓度较高的人工配水, 为这些嗜盐菌和耐盐菌提供了较好的生境. 值得注意的是, 该 CANON 系统中并未检测到亚硝酸盐氧化菌 (NOB), 说明此时系统内亚硝酸盐氧化菌含量很低, 甚至完全被淘汰掉, 这对于基于亚硝化和厌氧氨氧化路径脱氮的 CANON 工艺非常有利.

对泳道 B 的 9 个条带测序并构建系统发育树, 如图 4 所示. 可以看出, 大部分条带所代表的细菌为亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*), 但是条带 d 与亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*) 具有更近的亲缘关系. 值得注意的是, 泳道 A 的 17 个条带中并未检测到亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*), 只是通过巢式 PCR 方法才能检测到亚硝化螺菌属, 可见其在系统中并非优势菌种. 这也说明相比传统的 PCR - DGGE 方法, 巢式 PCR - DGGE 方法更为灵敏, 可以检测到菌群中含量较少的非优势菌种.

基于泳道 C 的 2 个条带的 DNA 序列构建的系统发育树如图 5 所示. 可以看出, 条带 j 和条带 k 分别与待定斯图加特库氏菌 (*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*) 和待定厌氧氨氧化布罗

卡地菌 (*Candidatus Brocadia caroliniensis*) 处在一个分枝上. *Kuenenia* 属和 *Brocadia* 属是污水处理系统中典型的具有厌氧氨氧化活性的 anammox 菌,而且 *Kuenenia* 属细菌对较高的盐离子浓度具有一定的耐受性. 然而,泳道 A 的条带 5、8、12 是被认为与 *Brocadia* 属具有更高相似度的厌氧氨

氧化菌,并未检测到 *Kuenenia* 属的 anammox 菌,可见系统中的优势 anammox 菌是 *Brocadia* 属而非 *Kuenenia* 属,这也与之前报道的在某一特定的生长环境中,通常只有一个种属的厌氧氨氧化细菌占据优势的结论相一致^[16].

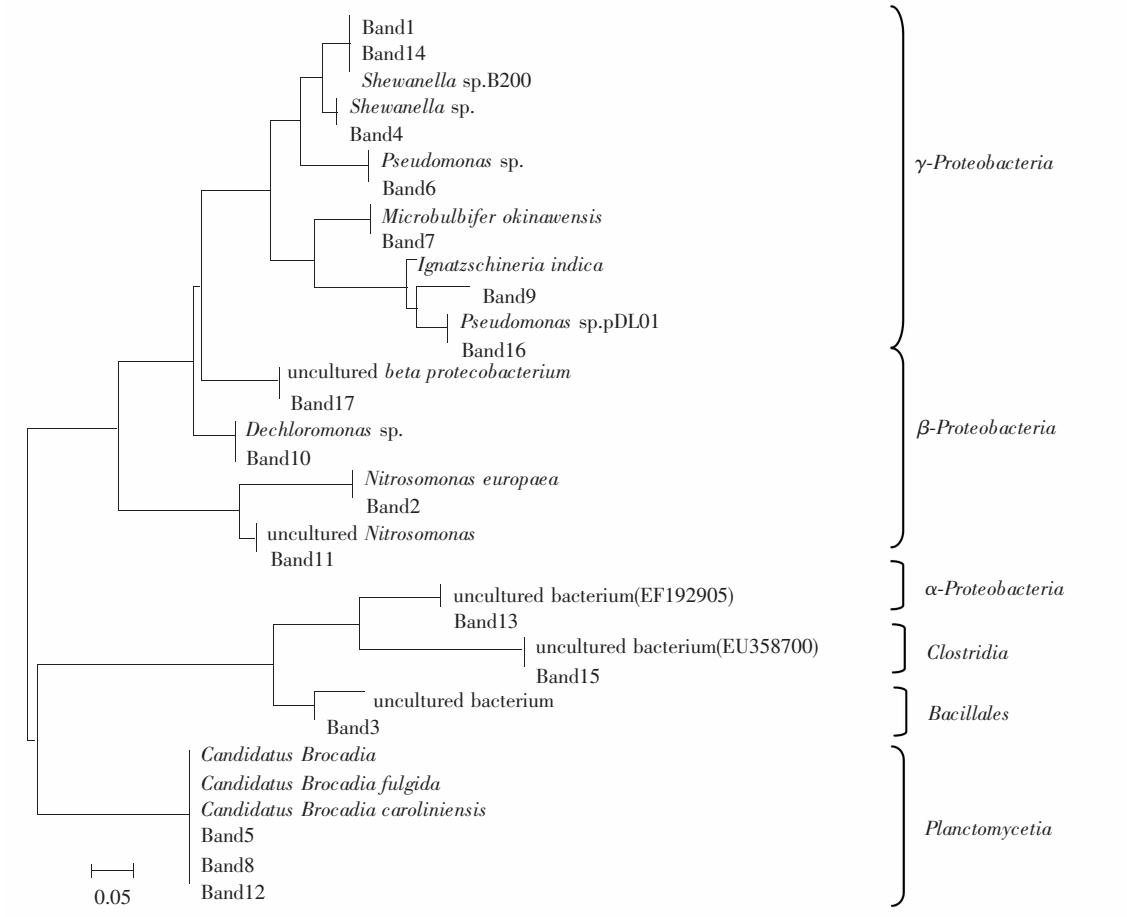


图 3 CANON 系统中总细菌的系统发育树

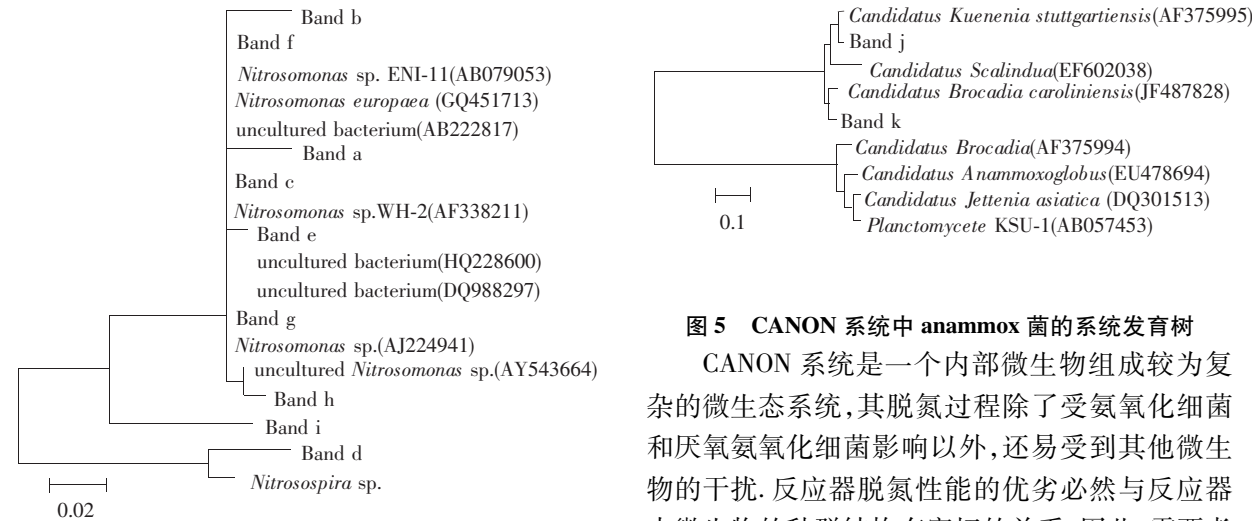


图 4 CANON 系统中 AOB 的系统发育树

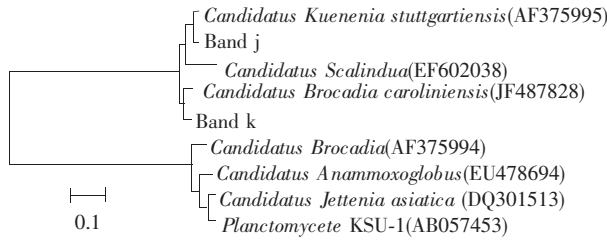


图 5 CANON 系统中 anammox 菌的系统发育树

CANON 系统是一个内部微生物组成较为复杂的微生态系统,其脱氮过程除了受氨氧化细菌和厌氧氨氧化细菌影响以外,还易受到其他微生物的干扰. 反应器脱氮性能的优劣必然与反应器中微生物的种群结构有密切的关系. 因此,需要考虑如何根据这些细菌的群落结构、种属特性以及生理特性有针对性地改进 CANON 工艺条件,以

利于各种微生物协同工作,达到稳定的脱氮效果.

3 结 论

1)CANON 反应器在常温、高氨氮条件下具有稳定、高效的脱氮能力. 系统内除了氨氧化细菌和厌氧氨氧化菌两类功能菌以外,还存在 *Shewanella*、*Pseudomonas*、*Ignatzschineria*、*Dechloromonas* 以及一些 uncultured bacterium 等,未检测到亚硝酸盐氧化菌,它们与氨氧化细菌和厌氧氨氧化细菌共同构成 CANON 反应器内部的微生物群落.

2) 反应器中参与亚硝化作用的功能菌为亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas*) 和亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*),与厌氧氨氧化作用有关的功能菌是 *Candidatus Brocadia* 属和 *Candidatus Kuenenia* 属,且氨氧化细菌的生物多样性明显高于厌氧氨氧化菌,保证了 CANON 系统一定的抗冲击能力.

3) 巢式 PCR - DGGE 方法与传统 PCR - DGGE 方法相比更灵敏,可以检测到菌群中含量较少的非优势菌种.

参考文献

- [1] SLIEKERS A O, THIRD K A, ABMA W, *et al.* CANON and anammox in a gas-lift reactor[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2003, 218(2):339 - 344.
- [2] AHN Y H, CHOI H C. Autotrophic nitrogen removal from sludge digester liquids in upflow sludge bed reactor with external aeration [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(9):1945 - 1950.
- [3] FURUKAWA K, LIEU P K, TOKITOH H, *et al.* Development of single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitrification (SNAP) and its treatment performances [J]. *Water Science and Technology*, 2006, 53(6):83 - 90.
- [4] VAZQUEZ-PADIN J R, POZO M J, JARPA M, *et al.* Treatment of anaerobic sludge digester effluents by the CANON process in an air pulsing SBR[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 166(1):336 - 341.
- [5] 王盼盼,陈建中. CANON 工艺中的微生物及其相互关系[J]. *环境科学与管理*,2007,32(08):97 - 100.
- [6] 黄俊丽,肖丽,王贵学,等. 全程自养脱氮反应系统的微生物区系分析[J]. *微生物学通报*,2005,32(06):78 - 82.
- [7] 郭劲松,杨国红,方芳,等. 温度和 pH 值对 CANON 工艺的影响试验研究[J]. *环境工程学报*,2009,3(01):22 - 26.
- [8] 秦宇,郭劲松,方芳,等. 溶解氧及曝停比对单级自养脱氮系统微生物群落结构的影响[J]. *环境科学*, 2009,30(02):493 - 498.
- [9] MUYZER G, DEWAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s Ribosomal-Rna [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3):695 - 700.
- [10] 沈李东,胡宝兰,郑平,等. 西湖底泥中厌氧氨氧化菌的分子生物学检测[J]. *环境科学学报*,2011,31(08):1609 - 1615.
- [11] BASSAM B J, CAETANOANOLLES G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196(1):80 - 83.
- [12] CHUANG H P, OHASHI A, IMACHI H, *et al.* Effective partial nitrification to nitrite by down-flow hanging sponge reactor under limited oxygen condition [J]. *Water Research*, 2007, 41(2):295 - 302.
- [13] 张斌,孙宝盛,刘慧娜,等. 处理不同废水 MBR 系统中微生物群落结构的比较[J]. *环境科学*,2008,29(10):2944 - 2949.
- [14] 郑雪松,龚钢明. 全程自养脱氮系统中氨氧化菌关键种群的变迁[J]. *环境科学与技术*,2009,32(11):9 - 12.
- [15] KARTAL B, RATTRAY J, VAN NIFTRIK L A, *et al.* *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30(1):39 - 49.
- [16] 王惠,易鹏,张树军,等. 短程硝化 - ANAMMOX 反应器处理城市污水过程中脱氮微生物的群落解析[J]. *中国科学院研究生院学报*,2012,29(01):38 - 46.
- [17] VENKATESWARAN K, MOSER D P, DOLLHOPF M E, *et al.* Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49:705 - 724.
- [18] VENKATESWARAN K, DOLLHOPF M E, ALLER R, *et al.* *Shewanella amazonensis* sp. nov., a novel metal-reducing facultative anaerobe from Amazonian shelf muds [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48:965 - 972.
- [19] 陈奇辉,刘祝祥,彭清忠,等. 小溪自然保护区非盐环境土壤中嗜盐和耐盐菌多样性[J]. *微生物学报*, 2010,50(11):1452 - 1459.
- [20] HU B L, ZHENG P, TANG C J, *et al.* Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors[J]. *Water Research*, 2010, 44(17):5014 - 5020.