# 常温下 CANON 反应器中功能微生物的沿程分布

刘 涛1,李 冬2,曾辉平2,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:**为研究常温环境中上向流曝气生物滤池型 CANON 反应器中功能微生物的沿程分布特点,采用扫描电镜 对微生物形态进行观测,并基于 amoA 以及 16S rDNA 片段的多样性,采用聚合酶链式反应 - 变性梯度凝胶电泳分 析技术(PCR-DCGE)对滤层不同高度的功能微生物进行群落结构分析,通过分子克隆法进行种属鉴定及系统发育 分析.结果表明:反应器内微生物形态多样,其中优势菌为0.2~1.0 μm 的球形及椭球形菌;滤层 500 mm 以下的氨 氧化细菌种类和数量远远高于滤层上半部分,而厌氧氨氧化菌种类单一,其数量沿滤层自上而下有增强的趋势;反 应器中检测到的氨氧化细菌为亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*),而厌氧氨氧化菌 与 Candidatus Kuenenia stuttgariensis 的相似度高达 98%.基于功能微生物的种属特征及沿程分布特点,可以有针 对性地改善功能分区,改变滤料材质,从而增强反应器的脱氮效果及抗冲击能力.

关键词: CANON 反应器;氨氧化细菌;厌氧氨氧化菌;系统发育;群落分布;扫描电镜

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 0367-6234(2012)10-0022-06

## Distribution of functional bacteria alone bio-filter of CANON reactor at room temperature

LIU Tao<sup>1</sup>, LI Dong<sup>2</sup>, ZENG Hui-ping<sup>2</sup>, ZHANG Jie<sup>1, 2</sup>

(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: The distribution of functional bacteria alone the bio-filter of a up-flow biological aerated CANON reactor was investigated using PCR-DGGE techniques based on the diversity of *amoA* and 16S rDNA fragments and the i-dentification and phylogeny were performed by molecular clone methods. Besides, the morphology was observed u-sing scan electron microscope (SEM) in this study. The SEM photographs indicated a diverse morphology, of which spherical and elliptical  $(0.2 - 1.0 \ \mu\text{m})$  were predominant. The PCR-DGGE results indicated a much better diversity and bigger population of ammonia oxidizing bacteria under a depth of 500 mm, while ANAMMOX bacteria showed a low diversity and the population increased in some degree from top to bottom along the filter. Phylogenetic analysis indicated that *Nitrosococcus* and *Nitrosomonas* related ammonia oxidizing bacteria existed in the reactor. Based on the species traits and the distribution of functional bacteria along the filter, some strategies should be made to improve the partition function and change the filter material, aiming at enhancing nitrogen removal and impact resistance of the reactor.

**Key words**: CANON reactor; ammonia-oxidizing bacteria; ANAMMOX bacteria; phylogeny; community distribution; scan electron microscope (SEM)

收稿日期: 2012-03-20.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50878003);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开放基金项目(QAK201005);国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07208-008-003,2009ZX07424-001,2009ZX07424-002-003,2009ZX07424-005).
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. 由于上向流曝气生物滤池具有处理效率高、 占地面积小、抗冲击负荷能力强等特点<sup>[1-2]</sup>,目前 许多 CANON 工艺多采用此形式实现. 然而,这种 反应器作为一种推流式反应器,由于滤池内部自 下而上各段 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N 负荷及其他水力条件不 同,会造成滤层各段微生物的活性及群落结构不 同,从而会出现反应器沿程各段对 NH4<sup>+</sup> - N 的 去除能力不同<sup>[3]</sup>.因此,需要分析内部微生物的 沿程分布规律,从而优化工艺运行条件.然而,目 前这种类型 CANON 反应器内部的微生物沿程分 布研究还鲜见报道<sup>[4-5]</sup>.由于 CANON 反应器中 的两种功能细菌为氨氧化细菌(AOB)与厌氧氨 氧化菌(ANAMMOX 菌)<sup>[6]</sup>,相比于分离、纯化等 传统的生物学方法,应用显微技术及分子生物技 术研究两类功能微生物的形态特征、群落结构及 种属特性,能够更有效、更准确地获得微生物方面 的信息. 扫描电镜(SEM)虽然不能对微生物种群 进行直接定性,但可对系统内微生物形态特征的 变化进行直观的评价.此外,在 CANON 工艺中, NH4<sup>+</sup>-N在氨单加氧酶(AMO)的催化作用下氧 化生成羟胺(NH<sub>2</sub>OH),这是脱氮反应的第一步, 也是极为关键的一步<sup>[7]</sup>, amoA 基因正是编码氨 单加氧酶(AMO)活性位点多肽的基因<sup>[8-9]</sup>.利用 amoA 基因作为分子标记可以从分子水平研究氨 氧化细菌的多样性及种属特性<sup>[10]</sup>.对于厌氧氨氧 化微生物来说,应用其特异性引物扩增 16S rDNA 作为标记可以研究其种群结构<sup>[11]</sup>.

本文研究上向流曝气生物滤池型 CANON 反 应器中功能微生物种群结构及种属特性的沿程变 化规律,以便更合理地设置功能分区、优化设计参 数,提高脱氮效果.

1 实 验

#### 1.1 CANON 反应器及样品采集

上向流曝气生物滤池型 CANON 反应器如图 1 所示.反应器内径 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.以 NaHCO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>与自来水配制进水氨氮为 300 mg/L 左 右原水,从反应器底部进入,由上部出水口排出, 在整个过程中,温度一直保持在 16~20 ℃.



图1 CANON 反应器试验装置及工艺流程图

在反应器连续稳定运行第28天,分别从反应 器滤层由上至下100、300、500和700mm处采集 滤料若干,将样品保存于-20℃冰箱中用以提取 基因组DNA.

#### 1.2 扫描电镜观察

取不同滤层高度采集的滤料少许,经戊二醛 固定、乙醇梯度脱水、乙酸异戊酯置换、临界点干燥、离子溅射喷金处理后使用日立 S-4300 型扫 描电镜仪对样品进行观察并拍照.每个样品随机 拍摄 5~10 张照片.

#### 1.3 基因组 DNA 的提取

用无菌玻璃棒搅拌滤料以使生物膜脱落,称 取1g湿质量的生物膜,加入2.7 mL DNA 提取液 (100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA ( 乙二 胺四乙酸),1.5 mol/L NaCl,100 mmol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>, 1% CTAB(十六烷基三甲基溴化铵), pH 8.0), 并 加入 50 µL 蛋白酶 K(30 g/L), 50 µL 溶菌酶 (20 g/L)以及数粒玻璃珠,37 ℃水浴 30 min. 此 后加入 1.5 mL SDS (十二烷基硫酸钠)溶液 (200 g/L),65 ℃水溶 2 h,期间每隔 20 min 上下 颠倒混匀一次.8000g离心10min,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), 混匀, 8 000 g 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 倍体积预冷 的异丙醇, -20 ℃过夜保存. 12 000 g 离心5 min, 弃上清,再以同样的转速离心3 min,弃上清液并将 样品置于通风处彻底晾干,之后用50 uL1× TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解.所提取的基因组 DNA 结果用 0.8% (质量分数)的琼脂糖凝胶电泳检测以备 PCR 用.

#### 1.4 PCR 扩增及 DGGE 电泳

用引物 amoA-1F 和 amoA-2R<sup>[12]</sup> 扩增氨氧化细 菌 amoA 基因.其中 amoA-1F 的 5 端所加 GC 夹子 为 DGGE 设计;对于 ANAMMOX 菌的特异性片段 的扩增采用巢式 PCR 方法:第一阶段先用细菌的 通用引物 27F/1492R<sup>[13]</sup> 进行 16S rDNA 序列的 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/Amx820<sup>[14]</sup> 进行第二阶段的 PCR 扩增,Amx368F 的 5 端加 GC 夹子同样为后续 DGGE 所设计. PCR 反应体系为 25  $\mu$ L,其中包含 2.5  $\mu$ L 10 × Ex Taq buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus), dNTP 2.0  $\mu$ L,引物各 1.0  $\mu$ L,TaKaRa Ex Taq 酶0.625 U, 模板 DNA 约 1.0 ng,用无菌水补齐至 25  $\mu$ L.各种 引物序列及 PCR 反应条件见文献[12 – 14]. PCR 扩增产物用 1.5% (质量分数)的琼脂糖凝胶进行 电泳检测.

采用北京天根公司 DNA 胶回收试剂盒进行 PCR 产物的纯化回收,具体操作按说明书进行. 对 PCR 产物进行 DGGE 分析:聚丙烯酰胺质量分 数 8%,变性梯度为 30% ~60%,电压 120 V,电泳 时间 5 h, PCR 产物上样量约 500 ng,电泳在 Dcode Universal Mutation Detection System 仪器上 进行.电泳结束后用 Bassam 等<sup>[15]</sup>的方法对凝胶 进行银染,并对凝胶拍照.

#### 1.5 基因文库的构建、测序及系统发育分析

切取 DGGE 图谱中的目的条带溶于 50 μL TE(pH 8.0)溶液中,4 ℃过夜,以此为模板,以不 含 GC 夹的引物进行 PCR 扩增,并对 PCR 产物进 行纯化.按照 pMD19-T plasmid vector system 说明 书进行基因片段与载体的连接后,转化到大肠杆 菌 DH5α 感受态细胞中,通过蓝白斑法筛选阳性 克隆子并进行测序.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 4.0 软件,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 稳定运行时的脱氮效果

反应器在常温、进水氨氮为 300 mg/L 条件 下,通过调节曝气及水力停留时间实现了 CANON 的稳定运行,并连续稳定运行约 30 d.取样时反应 器运行工况为:进水氨氮质量浓度 300 mg/L,温 度 18 ℃,曝气量 4.5 L/min,氨氮去除率达 83%, 氨氮去除负荷为 1.4 kg/(m<sup>3</sup> · d),总氮去除率 75%,总氮去除负荷 1.1 kg/(m<sup>3</sup> · d),出水硝氮 浓度维持在 20 ~ 35 mg/L.尽管得到的总氮去除 负荷略低于 Sliekers 以及 Chuang 等的研究<sup>[16-17]</sup>, 但依然属于较高的去除负荷,因此,分析在该运行 工况下的微生物沿程分布特点更具有代表性.

#### 2.2 电镜(SEM)照片

由于氨氧化细菌和厌氧氨氧化细菌形态多样, 一般难以通过形态来区分和鉴定其种属. 污水处理 厂经常出现的氨氧化细菌主要是亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus*)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*), 其形态分别呈球状和短杆状,而亚硝酸盐氧化菌主 要是 硝 化 螺 菌 属(*Nitrospira*)和 硝 化 杆 菌 属 (*Nitrobacter*),形态分别呈螺旋状和杆状<sup>[18]</sup>.过去 曾报导厌氧氨氧化菌为规则或者不规则的球形和 椭球形,单生或成簇聚生<sup>[19]</sup>,直径约 0.8~1.1 μm. 因此,图 2 中的球菌和椭球菌可能为亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus*)和厌氧氨氧化细菌,短杆菌可能为 亚硝化单胞菌属(Nitrosomonas),而长杆菌可能为 硝化杆菌属(Nitrobacter).

由图2可见,显微镜下可检测到长杆菌、短杆 菌、球菌和椭球形的菌,其中直径0.2~1.0μm 的椭球形和球形菌为优势菌,几乎未检测到螺旋 状细菌,而长杆菌所占的比例也很低,说明反应器 中亚硝酸盐氧化菌含量很低,这也保证了反应器 中的亚氮几乎不会被硝酸盐氧化菌利用,从而得 到有效积累,为后续的厌氧氨氧化创造条件. 图2(a)中微生物数量较少,多数为单生,并未成 簇聚生;在滤层 300 mm 处,细菌数量增加,且出 现了聚集生长的趋势(图2(b));随着滤层深度 的增加,微生物数量明显增多(图2(c)、(d)),且 成簇聚生,其中以椭球形和球形菌为主,但也存在 数量可观的短杆菌.这些细菌可能为氨氧化细菌 和厌氧氨氧化菌,其种属特性将通过接下来的分 子生物学技术进一步验证.



(a) 滤层由上至下 100 mm 处



(b) 滤层由上到下 300 mm 处



(c)滤层由上到下 500 mm 处



(d)滤层由上到下 700 mm 处图 2 不同滤层高度样品的电镜照片

#### 2.3 PCR-DGGE 图谱及系统发育分析

由于 PCR-DGGE 图谱中的每一条带代表一 个可能的细菌类群或可操作分类单位(OTU),条 带的数量和信号强度与生物多样性和生物数量密 切相关,基于 PCR-DGGE 图谱可以确定不同取样 处微生物的种类和数量关系.

不同高度采集样品的 DGGE 分析见图 3. 氨 氧化细菌在100和300mm 处的可见条带只有3 条,而在500和700mm 处条带数量明显增多,条 带信号明显增强,说明氨氧化细菌在滤层 500 mm 处以下的种类和数量明显增多,这与扫描电镜试 验的结果一致.其原因可能为:由于反应器采用上 向流曝气,而氨氧化细菌是一种严格的好氧细菌, 在反应器底部曝气量充足,有利于其生长,而富含 氨氮基质的进水也是从反应器底部进入,氨氮会 率先供给下部的氨氧化细菌. 随着反应器内溶解 氧和氨氮被利用,在反应器上部的氨氧化细菌受 到抑制,从而造成种类和数量的下降.此外,水力 冲刷作用导致上部生物膜在一定程度上的破坏也 是造成这种现象的原因之一. Purkhold 等研究表 明:污水处理系统中氨氧化细菌的多样性程度越 高,对复杂环境的适应能力就越强,其抗冲击能力 也就越强;反之,如果系统中只含有单一的氨氧化 细菌,其抗干扰能力就较差<sup>[10]</sup>.在本实验所用的 CANON 反应器中,500 mm 以下处的氨氧化细菌 的多样性程度很高,具有较强的抗冲击负荷. 然 而在 300 mm 以上的位置, 氨氧化细菌多样性很 低,抗干扰能力较差.因此,为了提高滤层上部区 域的抗冲击负荷,需要采取一定措施提高氨氧化 细菌的多样性程度,其中最直接的做法就是对滤 料进行重新排布.考虑到火山岩生物陶粒滤料填 充的 CANON 反应器内已经形成稳定的气道,重 新排布滤料可能会破坏系统内的好氧/厌氧区域 分布,进而破坏功能微生物的稳定性,影响系统的 脱氮性能,可改用便于排布的软性填料,比如海 绵、无纺布等.但是它们对细菌的持留能力可能低 于火山岩生物陶粒滤料,从而使 CANON 的启动 时间延长,具体解决方案还需进一步研究.

对于 ANAMMOX 菌来说,4 个取样点的 DGGE 图谱基本一致,而且只有两条可见条带,说明 ANA-MMOX 菌的群落结构在整个反应器中基本一致,几 乎不随滤层高度的变化而变化.此外,条带6 的信 号沿滤层自上而下有逐渐增强的趋势,也说明 AN-AMMOX 菌在反应器下方的数量要略多于上方.原 因可能在于反应器上部氨氧化细菌种类和数量的 减少,不能为 ANAMMOX 菌很好地创造厌氧环境, 也不能提供 ANAMMOX 菌很好地创造厌氧环境, 也不能提供 ANAMMOX 菌代谢所需足够的亚硝酸 盐.此外,水力冲刷作用导致上部生物膜一定程度 的破坏也是造成这种现象的原因之一.值得注意的 是,通过条带信号的强弱只能粗略推测细菌数量的 多少,要想更精确地检测细菌数量,还需要通过荧 光定量 PCR 等其他检测手段.



(a) 氨氧化细菌图谱 (b) 厌氧氨氧化细菌图谱 A,B,C,D 分别代表滤层由上至下 100、300、500 和 700 mm 处.

#### 图 3 PCR 产物 DGGE 图谱沿程分布

对 DCGE 图谱上的 7 条主要条带进行切割、 DNA 洗脱、回收、重新扩增,构建基因克隆文库,经 测序所得的 DNA 序列提交至 GenBank,得到的 GenBank 序列号为 JN367453-JN367457 以及 JQ753318. 对测序结果和基因库中已知序列进行相 似性对比分析,结果见表 1. 由于条带 6 和 7 之间相 似度达 98%,可以归并为一个可操作分类单位 (OTU),它们与 Candidatus Kuenenia stuttgariensis 相似度达 98%.这些已知细菌的形态多为球形、椭 球形和短杆状,与前文扫描电镜结果一致.

表1	7个条带所代表的基因序列对比结果
----	------------------

条带编号	Genbank 登陆号	最相似种属	相似度/%
1	JN367453	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium (HQ142897)	99
2	JN367454	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium (HQ123432)	99
3	JN367455	Nitrosococcus (AF047705)	96
4	JN367456	Nitrosomonas europaea (L08050)	96
5	JN367457	Nitrosomonas sp. (AY958703)	96
6,7	JQ753318	Candidatus Kuenenia stuttgariensis (AF375995)	98

基于 amoA 基因序列构建系统发育树(图 4),树图的外源基因为4种常见的氨氧化微生物, 即亚硝化单胞菌属(Nitrosomonas)、亚硝化螺菌 属(Nitrosospira)、亚硝化球菌属(Nitrosococcus)、 亚硝化叶菌属(Nitrosolobus)以及一些未培养的 氨氧化细菌.从图4可知,条带3与亚硝化球菌属 (Nitrosococcus)处于一个分枝上,其余4个条带均 与亚硝化单胞菌属(Nitrosomonas)的亲缘关系较 近,与亚硝化叶菌(Nitrosolobus)、亚硝化螺菌 (Nitrosospira)的遗传距离较远.由于所研究的反 应器进水氨氮浓度为300 mg/L,属于较高的氨氮 环境,在该条件中检测到亚硝化球菌 (Nitrosococcus)的存在,这与前人报道的亚硝化 球菌属(Nitrosococcus)在高氨氮环境中作为氨氧 化细菌的结果吻合<sup>[20]</sup>.此外,系统中还存在亚硝 化单胞菌属(Nitrosomonas),它是许多水生态系 统中最常见的氨氧化菌类型<sup>[7]</sup>.

从图 3(a)不同泳道的条带变化情况来看,亚 硝化球菌(Nitrosococcus)仅出现在滤层 100 及 300 mm 处,而与亚硝化单胞菌属(Nitrosomonas) 相关的条带 1、条带 2 所代表的氨氧化细菌仅在 滤层下方出现.如何根据这些细菌的空间分布特 点改进工艺条件以达到更好的脱氮效果,还有待 于进一步的研究.

基于 ANAMMOX 菌 16S rDNA 序列构建的系 统发育树见图 5. 树图的外源基因洗取了常见的几 种 ANAMMOX 菌. 可以看出,条带 6、7 与 Candidatus Kuenenia stuttgariensis 遗传距离最近, 这与之前报道的在一个特定的环境条件中,只可能 有一种 ANAMMOX 菌会成为优势菌种的结果相一 致<sup>[21]</sup>. Candidatus Kuenenia stuttgariensis 属干浮 霍菌属,是污水处理系统中除 Candidatus Brocadia anammoxidans 之外的典型的具有厌氧氨氧化活性 的微生物<sup>[22-24]</sup>.存在于本系统中的 ANAMMOX 菌 是 Candidatus Kuenenia stuttgariensis 而 非 Candidatus Brocadia anammoxidans,其原因在于 本实验所用污水是用自来水加一定的无机盐配制 而成,具有较高的盐离子浓度,而 Candidatus Kuenenia stuttgariensis 被认为是一种存在于淡水 环境中,并对较高的盐离子浓度具有一定耐受性的 ANAMMOX 菌<sup>[21]</sup>, 因此, Candidatus Kuenenia stuttgariensis 成为系统中的优势 ANAMMOX 菌.



### 3 结 论

1)上向流曝气生物滤池型 CANON 反应器

中,滤层下方的氨氧化细菌的种类和数量远高于 滤层上部;厌氧氨氧化菌的多样性几乎不随滤层 高度发生变化,其数量沿着滤层自上而下有逐渐 增强的趋势.

2)反应器中微生物形态多样,易成簇生长,其 中以直径 0.2~1.0 μm 的球形及椭球形菌为主.

 3) DNA 测序结果表明,亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus*)和亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*)是 反应器中的主要氨氧化细菌,而厌氧氨氧化菌与 Candidatus Kuenenia stuttgariensis 的相似度高达 98%.

参考文献:

- [1] RYH H D, LEE S I. Comparison of 4-stage biological aerated filter (BAF) with MLE process in nitrogen removal from low carbon-to-nitrogen wastewater [J]. Environmental Engineering Science, 2009, 26(1):163 – 170.
- [2] CHANG W S, TRAN H T, PARK D H, et al. Ammonium nitrogen removal characteristics of zeolite media in a biological aerated filter (BAF) for the treatment of textile wastewater[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2009, 15(4):524-528.
- [3] 张文艺,夏绍凤,翟建平,等.曝气生物滤池反应器的沿程生化特性研究[J].中国给水排水,2006,22 (15):71-74.
- [4] CHUDOBA J, CECH J S, CHUDOBA P. The effect of aeration tank configuration on nitrification kinetics [J]. Journal Water Pollution Control Federation, 1985, 57 (11):1078-1083.
- [5] AZIMI A A, HORAN N J. The influence of reactor mixing characteristics on the rate of nitrification in the activated-sludge process [J]. Water Research, 1991, 25 (4):419-423.
- [6] 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(8):97-100.
- [7] TAO L, DONG L, JIE Z. Phylogenetic and microbial community analysis based on amoA gene and 16SrDNA in nitrosification biofilm reactor[J]. Environmental Biotechnology and Materials Engineering, 2011, 183:1051 – 1056.
- [8] KLOTZ M G, ALZERRECA J, NORTON J M. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the amoA/amoB genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the amo operon[J]. Fems Microbiology Letters, 1997, 150(1):65-73.
- [9] MCTAVISH H, FUCHS J A, HOOPER A B. Sequence of the gene coding for Ammonia Monooxygenase in Nitrosomonas-Europaea [J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(8):2436-2444.
- [10] PURKHOLD U, POMMERENING R A, JURETSCHK O, et al. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys[J]. Applied and Environmental Microbiology,

2000, 66(12):5368-5382.

- [11] 张亚平,阮晓红. 浅水湖泊(阳澄湖)沉积物氨氧化 菌的分子证据[J]. 环境科学学报,2012,32(1):182 -189.
- [12] LING C, ZHENHUAN M. Detecting and diversity analysis of amoA gene from ammonia-oxidizing bacteria in a nitrifying pool[J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2004,31(5):565-9.
- [13] 樊景凤. 北戴河近岸沉积物中微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析 [J]. 海洋环境科学, 2008, 27(5): 409-413.
- [14]叶磊,祝贵兵,伦中财,等.应用分子生物学与同位 素示踪技术研究厌氧氨氧化菌活性及功效[J].环境 科学学报,2011,31(6):1206-1211.
- [15] 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.
- [16] SLIKERS 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.
- [17] 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.
- [18]郭建华,王淑莹,郑雅楠,等. 实时控制实现短程硝 化过程中种群结构的演变[J]. 哈尔滨工业大学学 报,2010,42(8):1259-1263.
- [19]秦玉洁,周少奇,朱明石. 厌氧氨氧化反应器微生态的研究[J]. 环境科学,2008,29(6):1638-1643.
- [20]段莎丽,孙亚琴,伍阳,等. 两株耐碱性亚硝化细菌 的初步鉴定和特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2007 (S2):406-409.
- [21] 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.
- [22] STROUS M, FUERST J A, KRAMER E H M, et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete [J]. Nature, 1999, 400(6743):446-449.
- [23] JETTEN M S M, WAGNER M, FUERST J, et al. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 12(3):283-288.
- [24] YANG Q X, JIA Z J, LIU R Y, et al. Molecular diversity and anammox activity of novel planctomycete-like bacteria in the wastewater treatment system of a fullscale alcohol manufacturing plant[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(2):180 - 18722.

(编辑 刘 形)