

# 膜曝气生物膜反应器运行单级自养脱氮工艺功能型菌群特性研究

包涵<sup>1</sup>, 张卫东<sup>1\*</sup>, 宫正<sup>2</sup>, 薛源<sup>3</sup>

(1. 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116024; 2. 北京师范大学水科学研究院, 北京 110875; 3. 大连理工大学环境与生命学院, 大连 116024)

**摘要:** 基于 16S rDNA 基因的分子生物学方法, 对运行单级自养脱氮工艺的膜曝气生物膜反应器(membrane-aerated biofilm bioreactor, MABR) 内的 2 个主要效应菌群( 氨氧化菌和厌氧氨氧化菌) 之间的协同作用关系和在生物膜上可能的空间分布进行研究. 荧光原位杂交结果显示, 试验的曝气生物膜主要存在 2 个明显的功能层, 一个是靠近曝气膜和生物膜交界的氨氧化菌聚集层, 另一个是靠近生物膜与水体交界的厌氧氨氧化菌聚集层. 氨氧化菌和厌氧氨氧化菌群为曝气生物膜上的 2 个主要功能菌群, 它们之间的合作共生和协同作用是膜曝气生物膜实现单级自养脱氮的基础.

**关键词:** 膜曝气生物膜反应器; 微生物群落; 厌氧氨氧化; 生物脱氮; 生物膜

中图分类号: X173; X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)05-1461-07

## Functional Microbial Community in a Membrane-Aerated Biofilm Reactor Operated for Completely Autotrophic Nitrogen Removal

BAO Han<sup>1</sup>, ZHANG Weidong<sup>1</sup>, GONG Zheng<sup>2</sup>, XUE Yuan<sup>3</sup>

(1. School of Biological Science, Liaoning Normal University, Dalian 116024, China; 2. College of Water Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3. School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

**Abstract:** The 16S rDNA-based molecular technique was applied to investigate the functional microbial community of a membrane-aerated biofilm bioreactor(MABR) that was used for completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON). The relationships among two kinds of key bacteria responsible for CANON: aerobic ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ANAMMOX bacteria, and their possible distributions in the MAB were discussed based on the microbial community analysis. FISH analysis showed the existence of two visible active layers in experimental MAB. One was the partial nitrifying layer located in the region of oxygen-rich membrane-biofilm interface, dominated by NS0190-positive AOB. The other was the ANAMMOX active layer located in the region of anoxic liquid-biofilm interface, dominated by PLA46 and AMX820-positive ANAMMOX microorganisms. As a result, the AOB as well as ANAMMOX bacteria were present and active in experimental MABR, and the cooperation between AOB and ANAMMOX bacteria was considered to be responsible for CANON.

**Key words:** membrane-aerated biofilm reactor(MABR); microbial community; ANAMMOX; nitrogen removal; biofilm

基于短程硝化和厌氧氨氧化的单级自养脱氮 (completely autotrophic nitrogen removal over nitrite, CANON), 作为一种高效低耗的简捷脱氮工艺成为目前国内外高氨氮废水处理领域的研究热点<sup>[1,2]</sup>. 该工艺通过控制溶解氧(DO)浓度分别在生物膜的不同厚度形成好氧区和厌氧区, 使好氧氨氧化菌(AOB) 在好氧区将氨氮部分氧化成亚硝酸, 产生的亚硝酸与部分剩余的氨氮在厌氧区发生 ANAMMOX 反应生成氮气<sup>[1,3-5]</sup>. 研究表明, 包裹无纺布的多微孔炭管作为生物膜载体和供氧装置的膜曝气生物膜反应器, 凭借其高效的氧传质速率、巨大的生物膜载体比表面积和内外分层的特殊生物膜结构在运行 CANON 工艺中具有更多的优势和更大的应用潜力<sup>[6,7]</sup>. 整个实验过程的关键是通过曝气膜内腔压

力的控制来调节生物膜内的溶解氧浓度, 使生物膜形成好氧层和厌氧层共存的分层结构, 从而使 2 类代谢条件完全不同的细菌能够和谐共生在同一个反应系统中, 进而实现单级自养生物脱氮.

由于 MABR 单级自养脱氮系统的生物脱氮过程主要是由好氧氨氧化菌群(AOB) 和厌氧氨氧化(ANAMMOX) 菌群相互作用、协同代谢的过程, 所以反应器出水中含氮化合物浓度的变化必然与反应器中微生物的种群结构和组成发生的规律性变化相关联. 因此可以通过分析功能性菌群在反应器运行的不同条件时的结构组成, 来探讨微生物群落动态变

收稿日期: 2008-09-09; 修订日期: 2008-12-08

作者简介: 包涵(1981~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为完全自养生物脱氮. E-mail: baohan2002@163.com

\* 通讯联系人, E-mail: papergong@yahoo.com.cn

化与反应器出水中含氮化合物浓度的变化之间的内在联系,迄今为止,关于该方面的研究国内外还鲜见报道.本试验利用特异性引物的巢式 PCR<sup>[8]</sup> (Nested-PCR)、PCR-DGGE<sup>[9]</sup> 和特异性探针 FISH<sup>[10]</sup> 等分子技术,研究了单级自养生物脱氮系统中膜曝气生物膜上好氧氨氧化和厌氧氨氧化等主要功能型微生物种群的结构组成和动态变化,以期为反应器条件的优化和脱氮效率的提高提供技术支撑.

## 1 材料与方 法

### 1.1 生物膜培养

试验研究的生物膜样品,取自于一个用包裹无纺布的微孔炭管作为曝气膜组件的膜曝气生物膜反应器<sup>[7]</sup>.该反应器进水为人工模拟高氨氮废水,只含有 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、KHCO<sub>3</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub>·MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 和微量元素溶液.具有全程自养脱氮功能的膜曝气生物膜培养过程可分为 2 个阶段,首先接种普通硝化污泥启动反应器,在温度 35℃,pH 为 7.9 条件下,通过对膜内腔压力的适当控制逐步降

表 1 膜曝气生物膜样品采集频度及当时反应器的运行参数

Table 1 Frequency of sampling and relevant parameters of membrane-aerated biofilm

运行时间 /d	膜内腔压力 /MPa	溶解氧浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	出水中含氮化合物浓度/mg·L <sup>-1</sup>			
			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	TN
0	0.4	8.2	135.8	3.2	62.4	ND
20	0.015	0.2	102.85	67.2	18.9	191.5
43	0.015	0.1	106.0	87.8	2.2	197.6
65	0.015	0.18	62.5	62.3	14.7	142.2
110	0.015	0.55	26.8	3.6	19.7	52.3

### 1.3 生物膜样品中细菌总 DNA 提取

膜曝气生物膜样品的预处理、细菌粗 DNA 提取及 DNA 样品的纯化按 Lakay 等<sup>[11]</sup> 的方法进行操作.将纯化后的 DNA 用 50 μL 试剂盒提供的 TE Buffer (pH 8.0) 洗脱于收集管中, -20℃ 保存.

### 1.4 Nested-PCR 扩增氨氧化细菌(AOB)的16S rDNA

以膜曝气生物膜中提取的基因组 DNA 为模板,采用文献<sup>[12]</sup> 报道的氨氧化细菌的特异性引物(正向引物 CTO189ABf 和 CTO189Cf,反向引物 CTO654r)进行第 1 轮 PCR 扩增.第 2 轮 PCR 的扩增以第 1 轮 PCR 扩增产物为模板,采用细菌通用引物(带 GC 夹子的前向引物 P338f 和反向引物 P518r)进行扩增.2 轮 PCR 的扩增产物大小均经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测验证,电泳条件 100 V, 30 min, 电泳缓冲液为 0.5×TAE 缓冲溶液.

### 1.5 Nested-PCR 扩增 ANAMMOX 细菌的 16S rDNA

低反应器溶解氧浓度,形成 AOB 最适生长条件,使其成为膜曝气生物膜的优势菌群.然后在反应器中接种已经培养成熟的 ANAMMOX 污泥,并继续通过调节膜内压力来控制生物膜中溶解氧浓度,使生物膜形成好氧层和厌氧层共存的分层结构,形成 AOB 菌群和 ANAMMOX 菌群的稳定共生体系.

### 1.2 生物膜样品制备

在反应器运行的不同时期,用无菌剃须刀切下一小块附着生物膜的无纺布条.将一部分无纺布条立刻用新鲜配制的 4% 多聚甲醛溶液固定.再以磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗脱 2 次,悬浮于等体积 PBS 与 100% 乙醇的混合液中,储存于 -20℃ 备用;将另一部分无纺布条用消毒的毛刷分别将其上附着的生物膜轻轻刷下,然后提取刷下的生物膜样品的细菌总 DNA,并进行相关的分子生物学技术分析.样品采集时期分别为反应器运行的 0 d(接种的普通硝化污泥)、20 d、43 d(再次接种 ANAMMOX 污泥)、65 d 和第 110 d.各时期反应器曝气膜内腔压力、溶解氧浓度及出水中总氮和含氮化合物的组成情况见表 1.

采用文献报道的与 ANAMMOX 细菌亲缘关系较近的 *Planctomycetes*(浮霉菌)的特异性引物(正向引物 Pla40f 和反向引物 P518r)进行第 1 轮 PCR 扩增<sup>[12]</sup>.第 2 轮 PCR 的扩增以第 1 轮 PCR 扩增产物为模板,采用细菌通用引物(带 GC 夹子的前向引物 P338f 和反向引物 P518r)进行扩增.2 轮 PCR 的扩增产物大小均经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测验证,电泳条件 100 V, 30 min, 电泳缓冲液为 0.5×TAE 缓冲溶液.

### 1.6 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

采用 Bio-rad 公司生产的 DGGE 装置对第 2 轮带 GC 夹子的 PCR 产物进行分析.聚丙烯酰胺变性梯度胶浓度为 8%,变性梯度为 45%~60%,温度 60℃,电压 38 V,1×TAE 缓冲液中电泳 16 h 后,用 SYBR Green I 核酸染色液(1:10000 稀释度, Rockland, USA)染色 10 min,然后立即在紫外照射仪(VilbertLourmat, France)上观察并照相.

## 1.7 生物膜样品荧光原位杂交分析

取 2~ 10 mL 固定后的样品, 均匀点于明胶包被的载玻片上, 45 °C 条件下干燥, 使样品固定在载玻片上, 然后分别用 50%、80% 及 100% 乙醇室温脱水 3 min, 自然风干. 进行杂交前配制新鲜的杂交缓冲液 [20 mmol/L Tris-HCl (pH= 7. 2), 0. 01% SDS, 氯化钠

和甲酰胺浓度视探针而定], 将杂交缓冲液和探针 (与荧光染料 Cy3 和 Cy5 结合的探针在杂交缓冲液中的浓度为 20 ng/μL, 而与荧光染料 Fluos 结合的探针在杂交缓冲液中的浓度为 50 ng/μL) 按体积比 9: 1 混合后点于样品上, 然后与样品在湿盒内 46 °C 杂交 90 min, 所用探针和杂交条件如表 2 所示.

表 2 FISH 试验中所用探针及杂交条件

Table 2 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes

探针	特异性	靶位点( <i>E. coli</i> )	甲酰胺 %	NaCl/mmole·L <sup>-1</sup>	标记	文献
NSO190	AOB in the $\beta$ -Proteobacteria	190~ 208	40	25	Cy3( 红色)	[ 13]
PLA 46	Planctomycetales	46~ 63	30	159	Cy5( 蓝色)	[ 10]
AMX820	Cand. " <i>Brocadia anammoxidans</i> "	820~ 841	40	56	Cy5( 蓝色)	[ 14]
AMX820	Cand. " <i>Kuenenia stuttgartiensis</i> "	820~ 841	40	56	Cy5( 蓝色)	[ 15]
EUB338 plus	Eubacteria	338~ 355	20	170	FTTC( 绿色)	[ 15]

杂交结束后, 用洗脱缓冲液(含相应浓度的氯化钠)洗脱载玻片, 以除去未杂交的探针和杂交缓冲液, 并在 48 °C 水浴中温育 10 min, 然后用冰冷的超纯水冲洗后自然风干. 杂交后样品采用共聚焦激光扫描电镜( CSLM, TCS-SP2, Leica, Germany) 观察, 图像采用 Image pro Plus 4. 0 软件进行统计分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 氨氧化细菌 16S rDNA Nested-PCR 扩增

采用 Nested-PCR 技术对生物膜内的氨氧化细菌的 16S rDNA 基因的特异部分进行 PCR 扩增. 试验第 1 轮 PCR 采用文献报道的 AOB 特异性引物(正向引物 CTO189Abf 和 CTO189Cf, 反向引物 CTO654r) 进行扩增, 扩增图谱如图 1 所示.

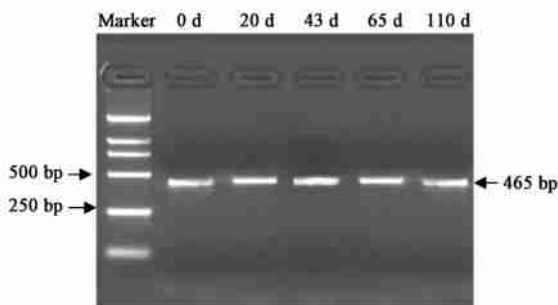


图 1 氨氧化细菌 16S rDNA 基因的第 1 轮 PCR 扩增产物

Fig. 1 First round PCR productions of 16S rDNA amplification of AOB

以第 1 轮 PCR 扩增产物为模板, 采用加有 GC 发夹结构的细菌通用引物 P338f+ GC 和 P518r 进行第 2 轮 PCR 扩增, 扩增结果见图 2. 可以看出, 第 2 轮 PCR 扩增得到了与预期大小(220 bp) 相符的扩增片段. 将 PCR 扩增产物于 -20 °C 保存, 用于下一步



图 2 氨氧化细菌 16S rDNA 基因的第 2 轮 PCR 扩增产物

Fig. 2 Second round PCR productions of 16S rDNA amplification of AOB

分析.

### 2.2 厌氧氨氧化细菌 16S rDNA Nested-PCR 扩增

采用 Nested-PCR 技术对生物膜内的厌氧氨氧化细菌的 16S rDNA 基因的特异部分进行 PCR 扩增. 第 1 轮 PCR 以生物膜样品中细菌总 DNA 为模板, 采用文献报道的 ANAMMOX 细菌的特异性引物(正向引物 Pla40f 和反向引物 P518r) 进行 PCR 扩增, 扩增图谱如图 3 所示. 可以看出, 采用 ANAMMOX 细菌的特异性引物, 对 5 个不同时期的生物膜样品中细菌的基因组 DNA 进行扩增, 只有在第 43、65 和 110 d 的生物膜样品中可以得到与预期大小(478 bp) 相符的特异性扩增片段, 而在 MABR 最先接种的硝化污泥中(0 d) 和第 20 d 的样品中均扩增不到相符的扩增片段, 这也说明 MABR 生物膜中的 ANAMMOX 细菌来自 MABR 在第 43 d 时再次接种的成熟 ANAMMOX 污泥.

以第 1 轮 PCR 扩增产物为模板, 采用加有 GC 发夹结构的细菌通用引物 P338f+ GC 和 P518r 进行第 2 轮 PCR 扩增, 扩增结果见图 4. 可以看出, 第 2

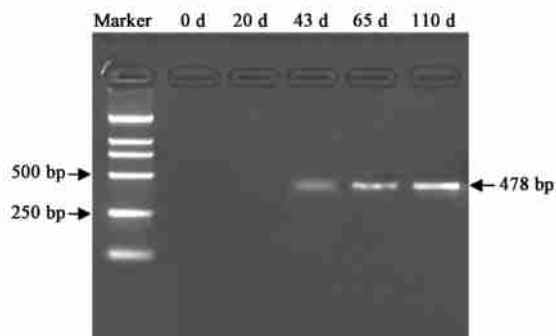


图3 厌氧氨氧化细菌 16S rDNA 基因的第1轮 PCR 扩增产物

Fig.3 First round PCR productions of 16S rDNA amplification of ANAMMOX bacteria

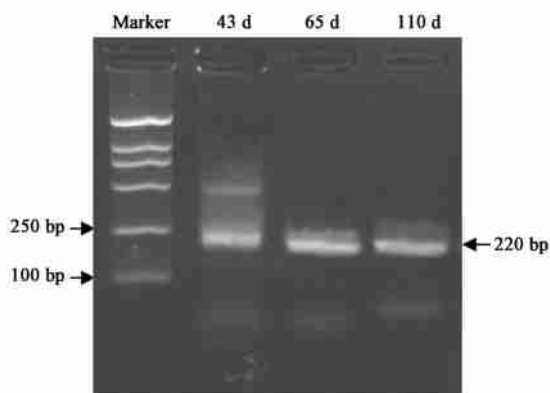


图4 厌氧氨氧化细菌 16S rDNA 基因的第2轮 PCR 扩增产物

Fig.4 Second round PCR productions of 16S rDNA amplification of ANAMMOX bacteria

轮 PCR 扩增得到了与预期大小(220 bp)相符的扩增片段. 将 PCR 扩增产物于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存, 用于下一步 DGGE 分析.

### 2.3 氨氧化菌 16S rDNA 的 Nested-PCR 扩增产物的 DGGE 分析

膜曝气生物膜反应器运行单级自养脱氮的启动过程涉及到好氧氨氧化菌的驯化和厌氧氨氧化污泥的接种. 实验过程中最关键的就是通过对曝气膜内腔压力的控制来调节生物膜内的溶解氧浓度, 使生物膜形成好氧层和厌氧层共存的分层结构, 从而使 2 类代谢条件完全不同的细菌能够和谐共生在同一个反应系统中, 进而实现单级自养生物脱氮. 由于生物脱氮过程主要是由多个微生物种群相互作用, 协同代谢的过程, 所以反应器出水中含氮化合物浓度的变化必然与反应器中微生物的种群结构和组成发生的规律性变化相关联. 因此可以通过分析功能性菌群在反应器运行的不同条件时的 DGGE 指纹图谱, 来探讨微生物群落动态变化与反应器出水中含

氮化合物浓度的变化之间的内在联系.

氨氧化细菌的 16S rDNA 经 Nested-PCR 扩增得到了 220 bp 左右的扩增片段, 试验的 DGGE 分离条件为:  $60^{\circ}\text{C}$ , 100 V, 10 h. 聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 8%, 变性梯度经过预实验, 确定为 45% ~ 60%. 从氨氧化菌 DGGE 指纹图谱(图 5)可以看出, 与刚接种后的反应器(0 d)相比, 第 20 d 的泳道内的条带数量明显减少, 这说明接种的硝化污泥中的氨氧化菌群丰富, 但随着曝气膜内腔压力的逐渐降低, 在运行至第 20 d 时反应期内的氨氧化菌群随着溶解氧浓度的降低而发生了戏剧性的变化. 此后, 尽管反应器在低溶解氧条件下继续运行, 但第 43 d 生物膜样品的泳道和第 20 d 生物膜样品的泳道内的条带非常相似, 条带 A 和条带 B 代表的 2 类菌始终存在于反应器中, 说明条带 A 和条带 B 代表的菌能够适应较低的溶解氧条件, 是反应器低溶解氧运行过程中将  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  转化为  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的主要功能菌; 接种的硝化污泥中条带 C 代表的菌, 随着反应器溶解氧浓度的降低在第 20 d 消失, 但在反应器运行至 65 d 时再次出现, 推测条带 C 代表的菌只能在反应器内存在厌氧氨氧化菌的条件下进行好氧氨氧化代谢.

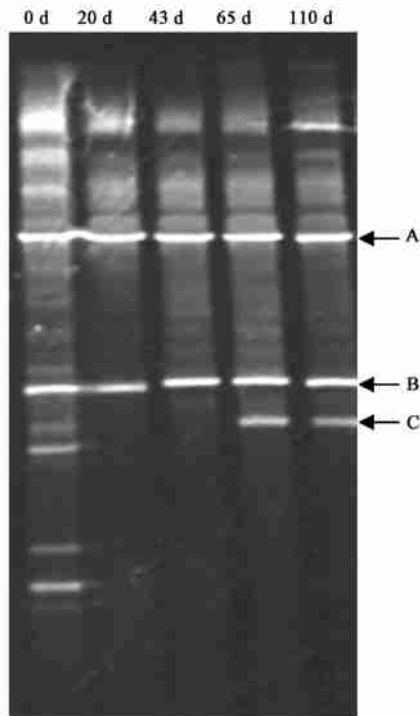


图5 氨氧化菌群 DGGE 指纹图谱

Fig.5 DGGE pattern of AOB population

### 2.4 厌氧氨氧化菌 16S rDNA 的 Nested-PCR 扩增产物的 DGGE 分析

厌氧氨氧化细菌的 16S rDNA 经 Nested-PCR 扩增得到了 220 bp 左右的扩增片段,本试验的 DGGE 分离条件为: 60 °C, 100 V, 10 h. 聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 8%, 变性梯度经过预实验, 确定为 45% ~ 60%. 从厌氧氨氧化菌 DGGE 指纹图谱(图 6)可以看出, 反应器在第 43 d 再次接种的成熟厌氧氨氧化污泥随着反应器运行, 种群也发生了一定的变化, 最终在单级自养脱氮工艺稳定运行阶段主要含有两类厌氧氨氧化细菌, 分别是条带 D 和条带 E 代表的菌.

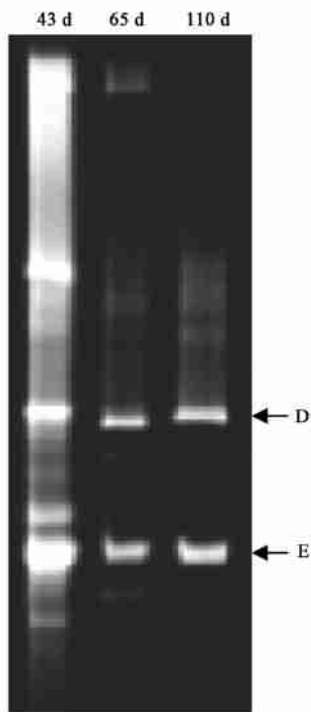


图 6 厌氧氨氧化菌种群 DGGE 指纹图谱

Fig. 6 DGGE pattern of ANAMMOX bacteria population

## 2.5 DGGE 优势条带的测序和系统发育分析

分别将 MABR 运行单级自养脱氮至稳定期的主要 DGGE 条带 A、B、C、D 和 E 回收, 并将得到的片段送到大连 TaKaRa 生物公司测序, 将得到的 5 个序列分别与 GenBank 数据库中已有序列进行 BLASTn 分析同源性, 结果见表 3.

以得到的 5 个 16S rDNA 基因序列为基础, 利用 MEGA3.0 软件将 GenBank 数据库中分别与优势菌 A、B、C、D 和 E 同源性较高的基因序列进行比对后构建系统进化树, 结果见图 7 和图 8.

## 2.6 生物膜样品的 FISH 分析

利用全部真细菌的特异性探针 EUB338 plus(蓝色)、好氧氨氧化细菌的特异性探针 NSO190(绿色)和 ANAMMOX 细菌的特异性探针 PLA46(红色)加

表 3 DGGE 主要条带同源性分析

Table 3 Percent identity of 16S rDNA fragments obtained from DGGE gel

DGGE 条带	检索结果		
	Closest match (Accession No.)	序列相似性 / %	描述
A	AB290690.1	99	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA
B	EF042983.1	100	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone 61-1
C	DQ988297.1	99	Uncultured bacterium clone LR A2-16
D	AB057453.1	98	<i>Planctomycete</i> KSU-1 gene for 16S ribosomal RNA
E	DQ786746.1	97	Uncultured <i>Planctomycetales</i> bacterium clone R12

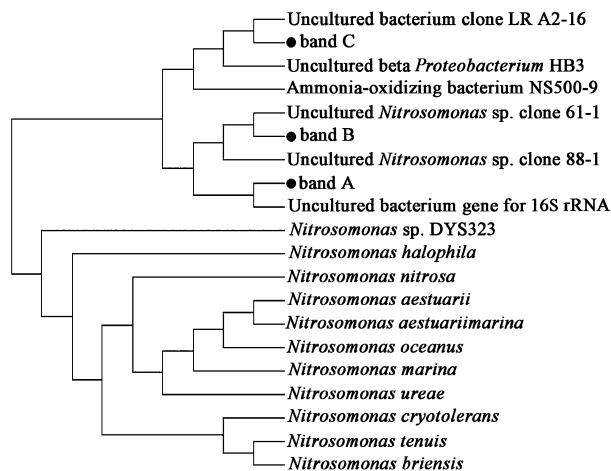


图 7 好氧氨氧化菌的系统进化树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree based on the sequences of aerobic ammonia oxidation bacteria

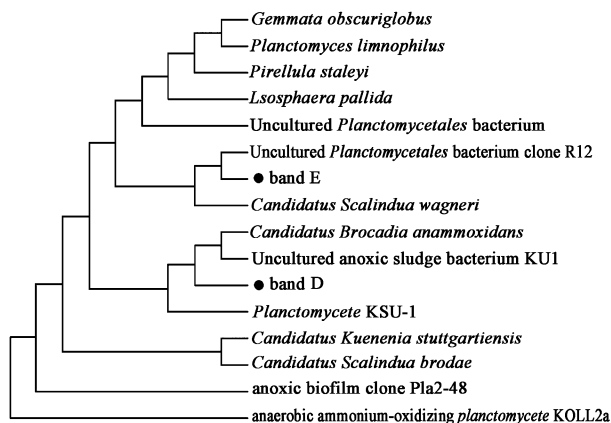
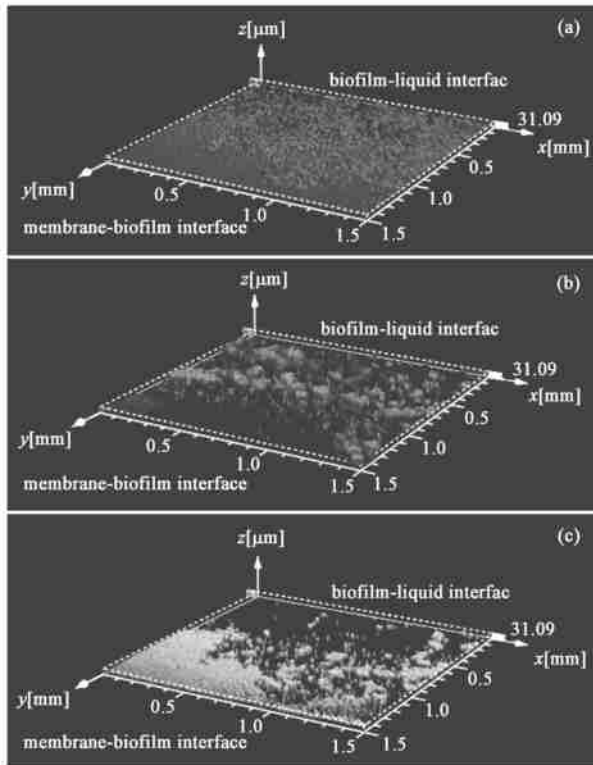


图 8 厌氧氨氧化菌的系统进化树分析

Fig. 8 Phylogenetic tree based on the sequences of ANAMMOX bacteria

AMX820(红色)对 MABR 第 110 d 的生物膜样品进行杂交, 为探究此阶段好氧氨氧化细菌和 ANAMMOX

细菌在生物膜内的空间位置, 随机选取多个视野, 利用共聚焦扫描电镜对生物膜样品进行连续的多层扫描, 结合显微镜自身配套的软件将扫描结果进行拟合, 模拟出此阶段生物膜的立体结构模型(图 9)。从生物膜模型可以看出, 生物膜内好氧氨氧化菌主要分布在靠近曝气膜的好氧区域, 而厌氧氨氧化细菌则主要分布在生物膜内靠近水体侧的缺氧或厌氧区域, 证明在透气膜表面可以形成以好氧氨氧化菌为主体的好氧层与以厌氧氨氧化菌为主体的厌氧层同时存在的生物膜分层结构, 实现生长条件不同的 2 个微生物群落间的协同共生。



(a) 代表全部真细菌; (b) 代表 ANAMMOX 细菌;  
(c) 代表好氧氨氧化细菌

图 9 膜曝气生物膜模拟模型(110 d)

Fig. 9 Model of membrane-aerated biofilm(110 d)

### 3 结论

(1) Nested-PCR 和 DGGE 结果表明, 氨氧化菌的种群结构和数量在 MABR 运行不同阶段明显不同: 在限氧条件下的亚硝酸盐积累阶段, 随着溶解氧浓度的逐渐降低, 膜曝气生物膜内的氨氧化菌的种群数量明显下降, 减少至 2 种; 在随后的单级自养脱氮阶段, 随着 MABR 被再次接种 ANAMMOX 污泥, 氨氧化菌群的种群结构再次发生变化, 在反应器运行至

65 d, 一个新的氨氧化菌的种群出现在膜曝气生物膜内。在稳定运行单级自养脱氮工艺的 MABR 系统中, 曝气生物膜内的氨氧化菌群主要由 3 类菌所组成。

(2) Nested-PCR 和 DGGE 结果表明, MABR 在限氧亚硝酸盐积累阶段, 生物膜内检测不到有 ANAMMOX 细菌的存在, 直到 MABR 被再次接种 ANAMMOX 污泥后, 才在膜曝气生物膜内检测到 ANAMMOX 细菌。曝气生物膜内的 ANAMMOX 菌群结构随反应器运行并没有明显变化。在稳定运行单级自养脱氮工艺的 MABR 系统中, ANAMMOX 菌群主要由 2 类菌所组成。

(3) 对检测到的 3 种氨氧化细菌的系统发育分析表明, 3 种氨氧化菌的部分 16S rRNA 基因序列分别与 GenBank 数据库中登录号为 AB290690.1 (Uncultured bacterium gene for 16S rRNA)、EF042983.1 (Uncultured *Nitrosomonas* sp. clone 61-1) 和 DQ988297.1 (Uncultured bacterium clone LR A2-16) 的细菌的基因序列最相似, 相似性 > 99%。

(4) 对检测到的 2 种 ANAMMOX 细菌的系统发育分析表明, 2 种 ANAMMOX 细菌的部分 16S rRNA 基因序列分别与 GenBank 数据库中登录号为 AB057453.1 (*Planctomycete* KSU-1 gene for 16S rRNA) 和 DQ786746.1 (Uncultured *Planctomycetales* bacterium clone R12) 细菌的基因序列最相似, 相似性 > 97%。

(5) FISH 结果表明, 在稳定运行单级自养脱氮工艺的 MABR 系统中, 曝气生物膜内的真细菌主要由氨氧化细菌和 ANAMMOX 细菌组成。利用共聚焦扫描电镜对生物膜样品进行连续的多层扫描结果显示, 生物膜内好氧氨氧化菌主要分布在生物膜内靠近曝气膜/生物膜交界面的好氧区域, 而厌氧氨氧化细菌则主要分布在生物膜内靠近水体侧的缺氧或厌氧区域。这种膜曝气生物膜分层结构, 使 2 个微生物群落间在氧气利用、基质消耗和转化过程中合作共生、代谢平衡, 进而保证反应器较高的自养脱氮效率。

参考文献:

- [1] Nielsen M, Bollmann A, Slijkers O, *et al.* Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of chemistry and organisms in a CANON reactor [J]. *FEMS Microb Ecol*, 2005, **51**(2): 247-256.
- [2] Third K A, Slijkers A O, Kuenen J G, *et al.* The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2001, **24**(4): 588-596.
- [3] Hao X, Heijnen J J, Van Loosdrecht M C. Sensitivity analysis of a

- biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **77**(3): 266-277.
- [ 4 ] Egli K, Bosshard F, Weren C, *et al.* Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon [J]. *Microb Ecol*, 2003, **45** (4): 419-432.
- [ 5 ] Strous M, Van Gerven E, Kuenen J G, *et al.* Effects of Aerobic and Microaerobic Conditions on Anaerobic Ammonium-Oxidizing (ANAMMOX) Sludge [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(6): 2446-2448.
- [ 6 ] Terada A, Lackner S, Tsuneda S, *et al.* Redox-stratification controlled biofilm ( ReSCoBi) for completely autotrophic nitrogen removal: The effect of co- versus counter-diffusion on reactor performance [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007, **97**(1): 40-51.
- [ 7 ] Zheng G, Fenglin Y, Sitong L, *et al.* Feasibility of a membrane-aerated biofilm reactor to achieve single-stage autotrophic nitrogen removal based on ANAMMOX [J]. *Chemosphere*, 2007, **69**(5): 776-784.
- [ 8 ] Temmema R, Masco L, Vanhoutte T, *et al.* Development and validation of a nested-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(11): 6380-6385.
- [ 9 ] Muyzer G, De Waal 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 rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 695-700.
- [ 10 ] Neef A, Amann R, Schlesner H, *et al.* Monitoring a widespread bacterial group: *In situ* detection of plantomycetes with 16S rRNA-targeted probes [J]. *Microbiology*, 1998, **144**(12): 3257-3266.
- [ 11 ] Lakay F M, Botha A, Prior B A. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils [J]. *Appl Microbiol*, 2007, **102**(2): 265-273.
- [ 12 ] 张丹, 徐慧, 李相力, 等. 限氧自养硝化-反硝化生物脱氮新技术 [J]. *应用生态学报*, 2003, **14**(12): 2333-2336.
- [ 13 ] Biesterfeld S, Figueroa L, Hernandez M, *et al.* Quantification of nitrifying bacterial populations in a full-scale nitrifying trickling filter using fluorescent *in situ* hybridization [J]. *Water Environ Res*, 2001, **73**(3): 329-338.
- [ 14 ] Schmid M C, Maas B, Dapera A, *et al.* Biomarkers for *in situ* detection of anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMMOX) bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(4): 1677-1684.
- [ 15 ] Christensen H, Hansen M, Sørensen J. Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence *in situ* hybridization with an rRNA oligonucleotide probe [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (4): 1753-1761.