

膜生物反应器中氨氧化菌群落结构的演替与分析

张 斌^{1,2}, 孙宝盛¹, 刘慧娜³, 黄翠芳⁴, 季 民¹

(1. 天津大学环境科学与工程学院 天津 300072 ;2. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所 天津 300050 ;
3. 天津市金厦规划建筑设计有限公司 天津 300074 ;4. 国家环境保护部环境标准研究所 北京 100012)

摘 要: 为了揭示膜生物反应器中氨氧化菌群落结构的演替过程,利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)、克隆测序和实时定量聚合酶链式反应(PCR)等分子生物学技术对膜生物反应器中氨氧化菌群落的演替进行了研究。DGGE结果表明,在实验过程中氨氧化菌群落结构的演替过程较为缓慢,有些种群一直保持着较为稳定的优势地位。测序结果表明,氨氧化菌群中的主要优势种群为 *Comamonas* sp、Uncultured *Nitrosomonas* sp、Uncultured *Nitrospira* sp 和 Uncultured β -Proteobacterium;并在实验后期鉴定出3株反硝化优势菌群。实时PCR结果表明,氨氧化菌在总细菌中所占比例尚不足0.01%,但其含量在经过驯化后显著增长,第80天时为接种污泥中含量的12.38倍,但其比氨氧化速度从初期的 0.30×10^{15} g/(拷贝数·h)上升到 11.73×10^{15} g/(拷贝数·h)后,逐渐降低到末期的 0.068×10^{15} g/(拷贝数·h)。而且,这一结果与反应器中对氨氮的去除效果相对应。

关键词: 膜生物反应器;氨氧化菌;变性梯度凝胶电泳;克隆测序;实时聚合酶链式反应

中图分类号:X703.1

文献标志码:A

文章编号:0493-2137(2009)01-0065-07

Analysis and Succession of Ammonia-Oxidizing Bacterial Community Structure in Membrane Bioreactor

ZHANG Bin^{1,2}, SUN Bao-sheng¹, LIU Hui-na³, HUANG Cui-fang⁴, JI Min¹

(1.School of Environmental Science and Engineering ,Tianjin University ,Tianjin 300072 ,China ;

2.Institute of Hygiene and Environmental Medicine ,Academy of Military Medical Sciences ,Tianjin 300050 ,China ;

3.Tianjin Jinsha Architecture and Planning Limited Company ,Tianjin 300074 ,China ;

4.Environment Standard Institute ,Ministry of Environmental Protection ,Beijing 100012 ,China)

Abstract : To reveal the succession procedure of ammonia-oxidizing bacterial(AOB)community structure in membrane bioreactor(MBR),the molecular biological techniques of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE),cloning and sequencing and real-time quantitative polymerase chain reaction(PCR)were applied. The results of DGGE showed that in the process of the experiment,the succession procedure of the AOB community was slow,and that some kinds of populations had been highly preponderance consistently. The results of cloning and sequencing revealed that *Comamonas* sp, Uncultured *Nitrosomonas* sp, Uncultured *Nitrospira* sp and Uncultured β -Proteobacterium were dominant species in the AOB population, and that three denitrifying species were identified at later stage of the experiment. The results of real-time PCR indicated that the percentage of the AOB in the total amount of bacteria was less than 0.01% but after the domestication period, the amount of the AOB increased significantly, and the AOB content on the 80th day was 12.38 times that of the inoculating activated sludge. However, the specific ammonia-oxidizing activity increased from the initial 0.30×10^{15} g/(copies·h) to 11.73×10^{15} g/(copies·h), and decreased to the final 0.068×10^{15} g/(copies·h). Furthermore, the results were in correspondence with the NH_4^+-N removal efficiency in MBR.

Keywords : membrane bioreactor ;ammonia oxidizing bacterium ;denaturing gradient gel electrophoresis ;cloning and sequencing ;real-time polymerase chain reaction

收稿日期:2008-06-12;修回日期:2008-10-21.

基金项目:天津市自然科学基金重点资助项目(07JCZDJC02100).

作者简介:张 斌(1980—),男,博士研究生,助理实验师.

通讯作者:孙宝盛,baosheng_sun@sina.com.

在膜生物反应器(membrane bioreactor, MBR)污水处理工艺中,将氨氧化为硝酸盐的过程是由硝化细菌完成的.硝化细菌包括两个亚菌群:氨氧化菌(又称亚硝酸菌,将氨氧化成亚硝酸盐)和亚硝酸氧化菌(又称硝酸菌,将亚硝酸盐氧化成硝酸盐).在 MBR 中,膜组件的截留作用可将污泥中微生物完全保留在反应器内,使得世代时间较长的硝化细菌能逐渐积累,从而提高硝化能力^[1-2].亚硝化作用是硝化过程中的一个限速反应^[3],决定着污泥负荷和水力停留时间等工艺参数的设定.因此,反应器内污泥微生物群落中氨氧化菌群结构和多样性的生态学研究对于优化 MBR 系统运行,提高污水处理效果都具有一定的实际应用价值和理论探索意义.

目前利用 16S rDNA 序列分析方法已确定了两大种群的好氧氨氧化细菌:属于 β -Proteobacteria 的 *Nitrosomonas*、*Nitrospira* 和属于 γ -Proteobacteria 的 *Nitrosococcus*^[4-6].随着现代分子生物技术的发展,通过针对某些菌群的特异性聚合酶链式反应扩增,并结合变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)或克隆文库分析可以详细地监测到微生物群落的构成^[7-8],为研究生物群落构成及其多样性提供了强有力的方法和手段.而实时定量聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)技术通过监测指数扩增期内每个循环后荧光信号强度,计算出达到设定的域值时所经历的循环数(Ct 值),通过与加入已知量的标准品的 Ct 值进行

比较,可计算出目的基因的拷贝数目,从而实现实时定量,用以检测环境样品中特定微生物的数量变化^[9].

为了更深入探索 MBR 中氨氧化菌群的多样性和演替规律,改进工艺,本研究以小试 MBR 中活性污泥作为对象,利用 Nested PCR-DGGE 技术对污泥中氨氧化菌群多样性的演变进行了观察和分析,对其中的主要优势种群进行克隆测序并将测序结果在 GenBank 数据库中进行比对和鉴定;并应用 real-time PCR 技术对不同时期污泥中总细菌和氨氧化菌进行了定量分析和比较.

1 材料与方法

1.1 实验装置与取样条件

小试 MBR 总有效体积 30 L,总高 1.5 m.接种污泥取自某污水处理厂二沉池回流污泥,进水取自某生活小区污水井.实验工艺流程见文献[10],采用聚偏氟乙烯(PVDF)中空纤维膜组件,内径 0.65 mm、外径 1.0 mm,过滤孔径 0.22 μm ,膜面积 1 m^2 ,反应器内温度始终维持在 15~18 $^{\circ}\text{C}$.在膜组件底部采用穿孔曝气的方式对污泥混合液进行搅拌和充氧,并对膜表面进行气泡擦洗以减缓膜污染速度,水力停留时间 6 h,膜出水为恒流间歇方式,出水 10 min,停 2 min,采用 PLC 进行自动控制.反应器运行期间始终没有主动排泥.具体取样时间及工艺参数见表 1.

表 1 取样时间和运行参数

Tab.1 Characteristics of technology at time of sampling

取样时间/d	取样编号	运行条件			污泥性状		跨膜压力/MPa
		$b_{\text{DO}^*}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	pH	气水比	$b_{\text{MLSS}}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$b_{\text{MLVSS}}/b_{\text{MLSS}}$	
1	G ₁	7.8	7.1	20:1	5 996	0.54	0.04
13	G ₂	8.2	7.3		4 950	0.72	0.06
25	G ₃	7.9	7.3		6 220	0.78	0.08
37	G ₄	7.5	7.5		7 340	0.80	0.12
49	G ₅	7.8	6.9		7 860	0.81	0.14
61	G ₆	7.5	7.2		9 300	0.82	0.15
73	G ₇	7.3	7.2		9 120	0.85	0.19
86	G ₈	7.3	7.5	20:1	11 440	0.82	0.22
101	G ₉	7.0	7.9	↓	13 500	0.84	0.27
115	G ₁₀	6.8	7.8	50:1*	14 840	0.83	0.33

*至实验后期为延缓膜污染速度,将曝气量逐渐加大.

1.2 污泥中基因组 DNA 的提取

每次取样后,立即采用化学裂解→酚\氯仿\异戊醇抽提→试剂盒纯化的方法提取基因组 DNA^[11].经电泳检测,所得 DNA 片断等于或略大于 23 kb;经分

光光度计检测,其 A260/A280 均在 1.76~1.79,表明得到较为完整和纯度较高的基因组 DNA.可以此为模板进行 PCR 扩增.

1.3 氨氧化菌的 Nested PCR 扩增

对氨氧化菌采用了巢式 PCR(nested PCR)技术.第1轮采用对氨氧化菌特异性的引物对 CTO189f 和 CTO654r 及相应的反应程序^[12]进行扩增.第2轮 PCR 以第1轮 PCR 产物作为模板,使用通用引物 F357-GC 和 R518 进行扩增^[13].这样既增加了反应的特异性,又可得到丰产的特异性靶序列,增加敏感性.

以上 PCR 产物经 1.5%琼脂糖电泳检测均可得到清晰的目标条带.

1.4 总细菌 16S rDNA 片段的 DGGE 分析

将 PCR 产物取样 25 μL,采用 C.B.S. SCIEN-TIFIC 公司 DGGE-2001 系统,凝胶浓度为 8%,变性梯度为 35%~55%,温度 60℃,电压 150 V,在 1×TAE 中电泳 6.5 h,完毕后将凝胶进行硝酸银染色,并将图像在观测仪中拍照存档.应用凝胶分析软件 Quantity One(v4.31 版)对图谱中各泳道进行相似性分析.

1.5 目的条带的克隆与测序

挑取 DGGE 图谱中的目的条带溶于 20 μL ddH₂O 中,4℃过夜.以此为模板,以 F357 和 R518 为引物进行 PCR 扩增.PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测并切胶纯化.纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接(Promega 公司 pGEM[®]-T Vector System I)后,转化到 *E.coli* TOP10 感受态细胞,在含有 X-gal、IPTG 和 Amp 的 LB 培养基上平板培养 16 h (37℃),蓝白斑筛选阳性转化子接种于 LB 培养基中,37℃振荡过夜,提取质粒并纯化,重新 PCR 后对产物进行测序(北京 Invitrogen 生命技术有限公司).

1.6 同源性分析

应用 DNAMAN(v5.2.2 版)对测序结果进行处理后提交到 GenBank 数据库,采用 BLAST 进行目标序列和基因库中所含序列的相似性分析.

1.7 实时 PCR

分别选用 2 对针对真细菌和氨氧化菌的引物,经运行 PCR 确定各自的最佳运行条件和参数,如表 2 所示.总细菌定量中利用大肠杆菌 16S rDNA 序列的 T 质粒载体克隆作为标准品,并将其进行倍比稀释,稀释度分别为:5.81×10⁷(拷贝数/μL)、5.81×10⁸(拷贝数/μL)、5.81×10⁹(拷贝数/μL)、5.81×10¹⁰(拷贝数/μL)、5.81×10¹¹(拷贝数/μL).氨氧化菌定量中以 1.3 节中第 1 轮 PCR 产物的 T 质粒载体克隆作为

标准品,稀释度分别为:5.82×10⁶(拷贝数/μL)、5.82×10⁷(拷贝数/μL)、5.82×10⁸(拷贝数/μL)、5.82×10⁹(拷贝数/μL)、5.82×10¹⁰(拷贝数/μL).利用标准品扩增绘制标准曲线(R²>0.99),并通过标准曲线对样品进行定量分析.

表 2 实时 PCR 引物与运行参数
Tab.2 Primer characteristics and condition parameters for real-time PCR

目标菌群	引物	反应程序	参考文献
总细菌	F357 R518	预变性 94℃ 3 min;变性 94℃ 30 s;退火 55℃ 15 s;延伸 72℃ 30 s;35 个循环	[13]
氨氧化菌	CTO189fA/B CTO189fC CTO654r	预变性 95℃ 10 min;变性 94℃ 30 s;退火 57℃ 35 s;延伸 72℃ 400 s;40 个循环	[14]

PCR 扩增选用 2×Power SYBR[®] Green PCR Master Mix 试剂盒(Applied Biosystems 公司),仪器为 iQTM5 多重实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司).25 μL 反应体系中含正向引物和反向引物各 0.5 μmol/L,1 μL 待测样品或质粒标准品 DNA,12.5 μLPCR Master Mix.每个样品做 3 个平行实验,结果取平均值.

2 结果与讨论

2.1 MBR 运行效果

反应器处理效果如图 1~图 3 所示.MBR 启动运行后,在第 10 天后对 COD_{Cr} 的去除率可达到 80%以上,第 30 天后可稳定地保持在 90%以上;在污泥驯化期内(系统运行前 25 天),对 NH₄⁺-N 的平均去除率为 67.2%,而在稳定运行期间对 NH₄⁺-N 的平均去除率为 85.3%,而且随着反应器的运行略有提高.

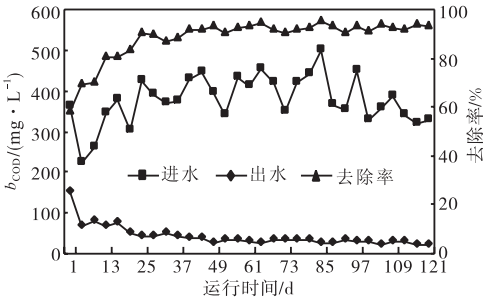


图 1 MBR 对 COD_{Cr} 的去除效果
Fig.1 Removal efficiency of COD_{Cr} in MBR

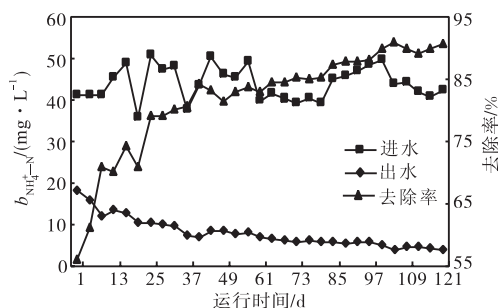


图 2 MBR 对氨氮的去除效果

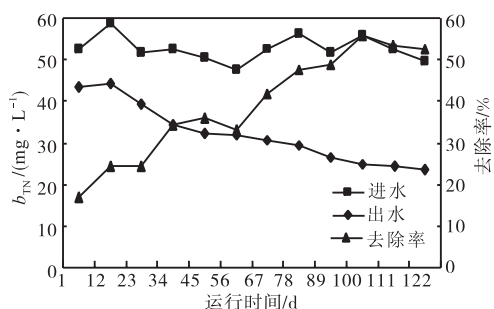
Fig.2 Removal efficiency of NH_4^+-N in MBR

图 3 MBR 对总氮的去除效果

Fig.3 Removal efficiency of TN in MBR

2.2 氨氧化菌群结构的演变

利用 DGGE 技术对反应器中氨氧化菌的演变进行了分析,结果如图 4 所示(以 G_1 为标准带序号,下侧的相似百分数由大到小排列)。可以看到不同阶段活性污泥样品中氨氧化菌的多样性变化状况。从图 4(a)可见,氨氧化菌中的某些种属作为顶级优势种属存在于反应器运行的各个时期,如 Band_A、B、C、D,说明这些种属较适应 MBR 内的运行环境,可以很好地生存下来。但其对于氨氮的降解所起的作用大小还有待于进一步研究,因为实验前期氨氮的去除率较低。接种污泥中的另外一些条带所代表的种属如 Band_a、b、c 最初为优势种属,但随着实验的进行逐渐失去优势地位,从 DGGE 图谱中这些条带的亮度变化可以看出,这些菌群不适应于新的工艺条件和进水水质,逐渐被淘汰或演变为非优势菌属,不能再在后面的图谱中显示出来。反应器运行中后期,氨氧化菌群结构经过一定的调整,又逐渐演变出了一些新的优势菌群,如 Band_d、e、f、g,说明这些菌群逐渐适应了 MBR 内的环境而在数量上逐渐增加但其丰度还是要低于 Band_A~D 等优势菌群。

图 4(b)是以污泥样品 G_1 作为标准时各泳道与其相似性的顺序分布。污泥中氨氧化菌的结构变化较为缓和。由于氨氧化菌世代周期长,生长缓慢,在

取样 G_5 之前,反应器内氨氧化菌群结构与接种污泥保持着将近 80% 的相似性;而在 G_5 之后,菌群结构才逐渐变化。

应用 Shannon-Weaver 指数表征氨氧化菌群结构多样性,结果见图 5 所示。氨氧化菌 Shannon 多样性指数 H 呈现出了增高→减少→稳定的变化过程。且相邻取样时间样品之间变化范围较小,在第 49 天时多样性指数出现最大值,而此后多样性指数又逐渐降低,说明菌群内部在不断地调整自身结构使得最适应 MBR 内环境的种属逐渐成为优势群落。

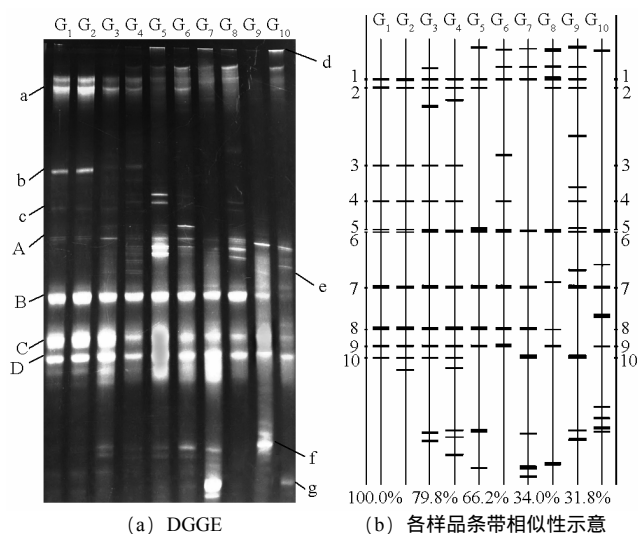


图 4 活性污泥样品中氨氧化菌 DGGE 图谱

Fig.4 DGGE profile of AOB in the activated sludge samples

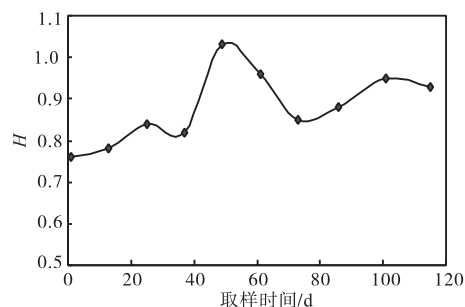


图 5 氨氧化菌多样性指数变化

Fig.5 Change of Shannon diversity index of AOB population in MBR

2.3 主要氨氧化菌群测序结果

将图 4(a)中主要条带进行切胶测序后,在 GenBank 中进行比对,获得各条带的同源性信息,结果如表 3 所示。MBR 中存在着多种不同种属的氨氧化菌群,而且绝大部分为未经培养菌(uncultured bacterium)。这也与 Purkhold 等人^[15]对污水处理厂中氨氧化细菌的研究结果相吻合。在活性污泥中最常见的氨氧化菌是 β -Proteobacteria 中亚硝化螺菌属

(*Nitrosospira*) 和亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*)^[16] , 这在 MBR 中都有所体现 . 在反应器运行中后期 , 一些具有反硝化功能的菌群逐渐演变为优势种群 , 其中 Band_e/f 分别为丛毛单胞菌属 (*Comamonas*) 和无色杆菌属 (*Achromobacter*) , 二者都属于变形菌纲 β 亚纲 (β -Proteobacteria) 伯克氏菌目 (Burkholderiales) , Band_g 没有被鉴定出具体种属 . 与之相对应 , 从反应器的处理效能上看 , 对总氮的去除率从第 34 天的 34.4% 逐渐上升到后期的 50% 以上 . 说明在好氧 MBR 中除了传统的硝化途径外 , 还同时存在着多种反硝化反应作用于氨氮的去除过程中 . 但从图 3 可见 , 总氮

的去除率在最高达到 55% 后不再上升 , 而且从图 4 (a) 可见 , 代表反硝化菌的条带还很不稳定 , 其优势地位与顶级种群相比也还处于弱势 . 这主要是由进水中 C 与 N 的比例较低 (6~7) 和反应器内 DO 浓度较高造成的 . 已有研究表明 C 与 N 比例较高时 (>20) , 由于好氧菌的剧烈活动 , 可保持较高的耗氧速度 , 使得污泥菌胶团内部容易形成厌氧微环境 , 从而提高反硝化能力^[17] . 而如何根据这些反硝化菌的生理特性改进 MBR 工艺条件以利于上述反硝化菌群的生长繁殖 , 达到更高的总氮去除率 , 还有待于进一步的研究 .

表 3 部分条带 16S rDNA 序列比对结果
Tab.3 16S rDNA sequencing results of some bands

条带编号	NCBI 查询号	GenBank 比对结果		
		登记号	菌种名	同源性/%
A	WU24UK4A01R	EU375651	<i>Comamonas</i> sp.y42 16S rRNA gene ,partial sequence	99
B	WS2HY3UJ014	AY583664	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.isolate DGGE gel band CS3-b7-Honfleur 16S rRNA gene ,partial sequence	97
C	WU2Z6174016	EF042993	Uncultured <i>Nitrosospira</i> sp.clone 47-2 16S rRNA gene ,partial sequence	94
D	WU3AWT1F012	DQ211512	Uncultured β -Proteobacterium clone nsc162 16S rRNA gene ,partial sequence	98
a	WJ4EDRHJ016	EF042983	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.clone 61-1 16S rRNA gene ,partial sequence	92
b	WPUSEG12016	AJ311607	Uncultured β -proteobacterium partial 16S rRNA gene ,DGGE band ADS-1	98
e	WS1S5STY01R	AF233876	<i>Comamonas</i> denitrificans strain 110 16S rRNA gene ,partial sequence	97
f	WTZC4G14014	EU301775	<i>Achromobacter</i> denitrificans strain L2 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence	99
g	WU3PGR9F016	DQ450405	Uncultured <i>denitrifying bacterium</i> clone N4 16S rRNA gene ,partial sequence	95

2.4 MBR 中 AOB 定量化与氨氧化活性研究

利用实时 PCR 技术所具有的较高灵敏度和精确度 , 对 MBR 内不同运行时期的总细菌和氨氧化菌进行了定量分析 , 分别测定样品中 AOB 与总细菌 16S rDNA 的拷贝数 , 结果如图 6 所示 .

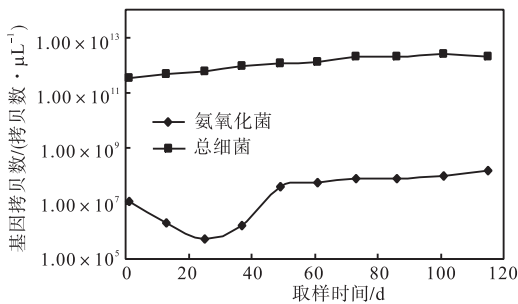


图 6 MBR 中 AOB 与总细菌基因拷贝数变化
Fig.6 Variation of 16S rDNA copies of AOB and total bacteria in MBR

因为对于所有的细菌和 AOB , 其每个基因组内只有一个 rRNA 基因拷贝^[18] , 所以应用定量 PCR 技术所测得的其基因拷贝数质量浓度即为细菌在样品中的细胞质量浓度 . 由图 6 可见 , 随着反应器的运

行 , 总细菌数量缓慢上升 , 从接种污泥中的 3.55×10^{11} 拷贝数/ μL 逐渐上升到第 115 天的 2.60×10^{12} 拷贝数/ μL , 细菌浓度是接种污泥中的 7.32 倍 . 氨氧化菌的含量则是从接种污泥中的 1.26×10^7 拷贝数/ μL 下降到了第 11 天的 5.33×10^5 拷贝数/ μL , 在第 25 天之后又逐渐上升 , 在第 49 天时达到 3.91×10^7 拷贝数/ μL , 随后上升幅度较为缓慢 , 在第 115 天时为 1.56×10^8 拷贝数/ μL , 是接种污泥中氨氧化菌含量的 12.38 倍 .

在运行初期、培养驯化阶段 , 由于氨氧化菌对环境变化的高度敏感性 , 大量 AOB 种群不能快速地适应新的进水底物和运行环境而凋亡 ; 而随着运行时间的延长 , 部分适应了 MBR 内环境的 AOB 开始增长并发挥作用 , 并且由于 MBR 良好的污泥截留效果和超长的污泥停留时间为 AOB 的繁殖和积累提供了条件 , AOB 在经历了较长时间的适应期后开始出现数量上的增长 . 与之相对应 , 在运行至第 25 天之后 , 反应器对氨氮的处理效果虽然还会有些波动 , 但总的趋势是随着 AOB 含量的增长而逐渐小幅上升 . 从绝对数量上看 , 在 MBR 中虽然氨氧化菌增长幅度较大 , 但在总细菌中所占比例很小 , 直至运行后期其所占比

例尚不足 0.01%。

以反应器内氨氧化菌单位拷贝数 (10^{15} 拷贝数) 的氨氧化速度 (specific ammonium oxidizing rate, SAOR) 来表征污泥的氨氧化活性, 结果如图 7 所示。从图中可见, 系统中的氨氧化速度在第 25 天达到最高水平 $11.73 \times 10^{15} \text{ g}/(\text{拷贝数} \cdot \text{h})$, 之后随着氨氧化菌数量的增长而大幅下降, 逐渐稳定在 $0.08 \times 10^{15} \text{ g}/(\text{拷贝数} \cdot \text{h})$ 左右, 而在反应器运行后期膜污染较为严重时最终降低为 $0.04 \times 10^{15} \text{ g}/(\text{拷贝数} \cdot \text{h})$ 。虽然依靠膜截留功能使得系统内 AOB 数量不断增长, 但由此也产生了微生物产物积累效应, 并且随着污泥质量浓度的提高所积累的产物也逐渐增多, 从而导致污泥氨氧化活性的不断降低^[19]。这一变化规律也解释了实验中 MBR 对 NH_4^+-N 的去除率在第 25 天后不再继续大幅上升的原因。而如何在高污泥浓度的条件下采取措施来提高氨氧化活性, 从而提高 NH_4^+-N 去除效率, 也有待于去做进一步的研究。

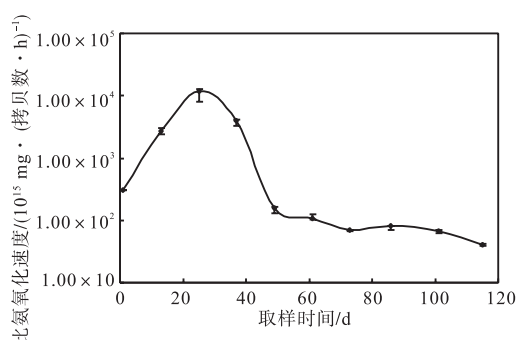


图 7 MBR 中比氨氧化速度的变化

Fig.7 Variation of specific ammonia-oxidizing activity in MBR

除 AOB 外, 氨氮还可以通过其他种属微生物转化为其细胞组分或其他的代谢产物等方式去除, 这部分微生物所归属的种类较多、进化距离较大, 而无法用统一的引物将其扩增出来, 且对氨氮的去除不起主要作用, 故在本研究中没有涉及。

3 结 论

(1) 氨氧化菌中的某些种属作为优势种属存在于反应器运行的各个时期。菌群结构的调整过程较为缓慢, 至实验末期也未出现较大变化。测序结果表明, AOB 中的优势菌群为 *Comamonas* sp、Uncultured *Nitrosomonas* sp、Uncultured *Nitrosospira* sp 和 Uncultured β -Proteobacterium clone nsc162。

(2) 在反应器运行中后期, 一些具有反硝化功能的菌群逐渐演变为优势种群, 分别为 *Comamonas denitrificans*、*Achromobacter denitrificans* 和 Uncultured *denitrifying bacterium*。说明在 MBR 中除了传统的硝化途径外, 还同时存在着多种反硝化脱氮作用。

(3) 在接种初期, AOB 含量大幅下降, 在经历了较长时间的适应期后数量上开始增长。反应器对氨氮的去除率随着 AOB 含量的上升而逐渐提高并趋于稳定。氨氧化菌含量在第 115 天时为 1.56×10^7 拷贝数/ μL , 是接种污泥中含量的 12.38 倍。但从绝对数量上来看, AOB 在总细菌中所占比例很小, 尚不足 0.01%。但污泥的氨氧化活性随着污泥质量浓度的增长而降低。

参考文献:

- [1] Thomas H, John M. Fouling characteristics of membrane filtration in membrane bioreactors [J]. *Membrane Technology*, 2000, 122(6): 10-13.
- [2] Rosenberger S, Krieger U, Witzig R, et al. Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater [J]. *Water Research*, 2002, 36(2): 413-420.
- [3] Limpiyakorn T, Kurisu F, Yagi O. Development and application of real-time PCR for quantification of specific ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of sewage treatment systems [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(5): 1004-1013.
- [4] de Bie M J M, Speksnijder A G C L, Kowalchuk G A, et al. Shifts in the dominant populations of ammonia-oxidizing beta-subclass Proteobacteria along the eutrophic Schelde estuary [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, 23(3): 225-236.
- [5] Koops H P, Röser A P. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 37(1): 1-9.
- [6] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 485-529.
- [7] Nicolaisen M H, Ramsing N B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50(2): 189-203.

- [8] Limpiyakorn T ,Shinohara Y ,Kurusu F ,et al. Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo [J] . *FEMS Microbiology Ecology* ,2005 ,54 (2) : 205-217.
- [9] Harms G ,Layton A C ,Dionisi H M ,et al. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant [J] . *Environmental Science and Technology* ,2003 ,37 (2) : 343-351.
- [10] 张 斌 ,孙宝盛 ,金 敏 ,等. 浸没式膜-生物反应器膜污染物中胞外聚合物的提取与分析 [J] . *环境科学学报* ,2007 ,27 (3) : 391-395.
Zhang Bin ,Sun Baosheng ,Jin Min ,et al. Extraction and analysis of extracellular polymeric substances in membrane fouling in SMBR [J] . *Acta Scientiae Circumstantiae* ,2007 ,27 (3) : 391-395 (in Chinese).
- [11] 孙宝盛 ,张 斌 ,吴 卿 ,等. 应用 PCR-DGGE 技术解析 MBR 中微生物群落多样性 [J] . *天津大学学报* ,2008 ,41 (3) : 356-361.
Sun Baosheng ,Zhang Bin ,Wu Qing ,et al. Application of PCR-DGGE to analysis of microbial community diversity in MBRs [J] . *Journal of Tianjin University* ,2008 ,41 (3) : 356-361 (in Chinese).
- [12] Cébron A ,Coci M ,Garnier J ,et al. Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine river: Impact of Paris wastewater effluents [J] . *Applied and Environmental Microbiology* ,2004 ,70 (11) : 6726-6737.
- [13] Muyzer G ,Waal E C ,Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA [J] . *Applied and Environmental Microbiology* ,1993 ,59 (3) : 695-700.
- [14] Kowalchuk G A ,Stephen J R ,Boer W D ,et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments [J] . *Applied and Environmental Microbiology* ,1997 ,63 (4) : 1489-1497.
- [15] Purkhold U ,Röser A P ,Juretschko S ,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.
- [16] Ballinger S J ,Head I M ,Curtis T P ,et al. Molecular microbial ecology of nitrification in an activated sludge process treating refinery wastewater [J] . *Water Science and Technology* ,1998 ,37 (4/5) : 105-108.
- [17] 郑 祥 ,刘俊新. 影响 MBR 脱氮效率的因素研究 [J] . *环境科学学报* ,2005 ,25 (10) : 1325-1329.
Zheng Xiang ,Liu Junxin. Nitrogen removal in A/O and SND processes using MBR [J] . *Acta Scientiae Circumstantiae* ,2005 ,25 (10) : 1325-1329 (in Chinese).
- [18] Aakra A ,Utaker J B ,Nes I F. RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: A phylogenetic approach [J] . *International Journal of Systematic Bacteriology* ,1999 ,49 (1) : 123-130.
- [19] 李红岩. 膜生物反应器与传统活性污泥两硝化系统的性能与生物群落结构研究 [D] . 北京: 中国科学院 ,2005.
Li Hongyan. Study on Nitrification Performance and Microbial Community Structure in a Submerged Membrane Bioreactor and a Conventional Activated Sludge System [D] . Beijing: Academy of China ,2005 (in Chinese).