

有机碳源条件下厌氧氨氧化 SBBR 中的微生物多样性

贾 丽 郭劲松* 陈猷鹏 方 芳
(重庆大学城市建设与环境工程学院 重庆 400045)

摘 要 研究有机碳源对 SBBR 厌氧氨氧化菌群等微生物的影响。采用 16S rDNA 序列与 PCR-DGGE 分析技术相结合的方法,对稳定运行的反应器内的活性污泥和生物膜样品,进行细菌多样性图谱分析,同时采用巢式 PCR-DGGE 技术对浮霉状菌属(Planctomycetes)细菌进行分析。结果表明,在有机碳源反应系统细菌条带数和多样性指数均高于无机系统,与活性污泥相比,生物膜表尤为明显。当进水不含有有机碳源时,氨氧化细菌(ammonia oxidizing bacteria, AOB)厌氧氨氧化菌(anaerobic ammonia oxidizing bacteria, ANAMMOX)为优势功能菌;当进水含有有机碳源时,系统中存在的 AOB 以亚硝化单胞菌(Nitrosomonas sp.)为优势菌群,同时存在反硝化菌,如索氏菌(Thauera sp.)以及厌氧氨氧化菌,它们共同作用完成 N 的去除。此外,与无机碳源系统相比,有机碳源的存在,有利于浮霉状菌的积累,但压缩了 ANAMMOX 的生存空间。本研究可为厌氧氨氧化工艺处理低 C/N 比有机废水提供了理论依据。

关键词 有机碳源 厌氧氨氧化 微生物多样性 PCR-DGGE

中图分类号 X703.1 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2012)09-3137-06

Microbial diversity in anaerobic ammonium oxidation reactor under organic carbon condition

Jia Li Guo Jingsong Chen Youpeng Fang Fang

(Faculty of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

Abstract In order to investigate the effects of organic carbon on microbial community, total bacterial genomic DNA was extracted from biomass in two SBBRs fed with inorganic and organic wastewater respectively. The molecular techniques based on the sequence of 16S rDNA V3 region gene and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were used to analyze the microbial community structures. Further, the Planctomycetes diversity was studied by nest PCR-DGGE. DGGE profiles show that the number of bands and the microbial diversity index of activated sludge and biofilm in reactor fed with organic wastewater, were higher than that of the reactor fed with inorganic wastewater. The profiles of Planctomycetes community in the two reactors are similar. The *Nitrosomonas* sp. (aerobic nitrifying bacteria), *Candidatus Brocadia* sp and uncultured anaerobic ammonium-oxidizing bacterium (the ANAMMOX bacteria) dominated in the reactor fed with inorganic wastewater. However, the numbers of ANAMMOX bacteria decreased and the denitrifying bacteria, such as *Thauera* sp, was found in the reactor fed with organic wastewater. The results revealed that the organic carbon helped to the accumulation of Planctomycetes, but the denitrifying bacteria could compete with ANAMMOX bacteria for living space. In conclusion, aerobic nitrifying bacteria, denitrifying bacteria and ANAMMOX bacteria could coexist and cooperate for nitrogen removal at C/N ratio of 1.2, which may have implications in the treatment of lower C/N organic wastewater.

Key words organic carbon; microbial diversity; anaerobic ammonium oxidation; PCR-DGGE

厌氧氨氧化是由一类具有特殊结构的浮霉目细菌,在厌氧条件下,以 CO_2 和碳酸盐为碳源,氧化 NH_4^+-N 的自养微生物代谢过程^[1,2]。由于厌氧氨氧化菌实现了 NH_4^+-N 的短程转化,缩短了氮素的转化过程,因此为开发高效低耗的新型废水脱氮技术奠定了生物学基础。

自首例厌氧氨氧化细菌报道以来,学者们在这

个领域进行了大量的研究,并取得了可喜的进展。

基金项目:教育部重大项目(308020);中央高校基本科研业务费(CDJZR11210002);水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07104-002)

收稿日期:2011-03-27;修订日期:2011-05-25

作者简介:贾丽(1980~),女,博士研究生,主要研究方向为废水生物处理理论与技术。E-mail: janetj@163.com

* 通讯联系人, E-mail: guo0768@cqu.edu.cn

但有关有机物对厌氧氨氧化的影响看法仍存在分歧。有研究认为:厌氧氨氧化细菌是化能自养菌,在有机碳源条件下,反硝化菌等异养菌增殖,与厌氧氨氧化菌共存并形成基质竞争,有机物浓度高时,异养菌大量繁殖,厌氧氨氧化菌不再表现活性^[3-5],并且厌氧氨氧化活性随 COD 浓度或 C/N 比的增加而逐渐降低^[4-8]。但也有学者指出两者之间并不存在竞争^[9]。同时也有研究指出:反硝化能消耗有机物,产生 CO₂ 为厌氧氨氧化解毒,同时提供无机碳源;厌氧氨氧化产生硝氮,为反硝化提供电子受体,两者可实现协同作用^[10,11]。另外,自 Güven 等^[8]首次发现厌氧氨氧化微生物能分解丙酸盐为 CO₂ 进行反硝化脱氮这一非厌氧氨氧化代谢途径以来,陆续有文献报道一些厌氧氨氧化细菌能利用甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐等小分子有机酸。甚至 Kartal 等^[12]发现 *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* 这一厌氧氨氧化菌能够优于反硝化菌利用丙酸盐进行反硝化代谢。

目前,有关厌氧氨氧化工艺的研究多是在无机条件下进行的,处理含氮有机废水的研究还较少。尽管有研究证实:氨氮、COD 可以在一个反应器中通过 AOB 菌、ANAMMOX 菌及反硝化菌等协同作用,达到脱氮除碳的效果^[13,14],但在有机碳源条件下,反应器运行的稳定性及不同的碳源水平下微生物菌群特性如何,还有待进一步研究。

因此,本文在稳定运行序批式生物膜反应器 (sequencing batch biofilm reactor, SBBR) 的基础上,改变进水条件,考察有机碳源(葡萄糖为主)系统微生物群落及功能菌组成的影响,从而探索有机碳源条件下反应器内存在的主要生物过程及其相互之间的关系,以期为厌氧氨氧化工艺处理低 C/N 比有机废水提供理论支撑。

1 实验部分

1.1 实验装置及运行条件

实验装置沿用 SBBR^[15],反应器呈方形,有效容积 30 L;反应器内置填料供微生物附着,配备恒温加热棒以保持系统温度稳定在 (30 ± 2) °C;内设低功率潜水搅拌机以避免污泥沉积在反应器底部。反应器采用间歇曝气、间歇进出水方式运行,每周周期换水 2 次,每次换水量为反应器容积的 1/2,出水经沉淀后污泥回流至反应器中, HRT 为 48 h。A 反应器的 pH 控制在 7.8 ~ 8.5、DO 控制在 2.0 ~ 2.5 mg/L (曝气) / 0.2 ~ 0.4 mg/L (停曝气)、曝/停比为 2 h:2 h。B 反应器除 DO 不同外(DO 控制 1.4 ~

1.7 mg/L (曝气) / 0.2 ~ 0.4 mg/L (停曝气),其他控制条件与 A 反应器完全相同。A、B 反应器均采用人工配水,进水水质见表 1。

表 1 反应器进水水质特征

Table 1 Characteristics of influents of two reactors

反应器	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	NO _x ⁻ -N (mg/L)	TN (mg/L)	TP (mg/L)	COD (mg/L)
A	155 ~ 165	<2	155 ~ 165	4 ~ 8	<20
B	240 ~ 255	<3	240 ~ 255	5 ~ 7	245 ~ 295

A 反应器实验用水为人工合成无机废水,通过投加适量的 NH₄HCO₃,使氨氮浓度控制在 155 ~ 165 mg/L;加入适量的 KH₂PO₄ 以供给微生物足够的磷源;加入适量的 NaHCO₃ 调节 pH 至 7.5 ~ 8.5;微量元素标准贮存溶液配制参见^[13],按每升人工配液 2 mL 微量元素的比列加入反应器。B 反应器采用的人工合成有机废水,分别用 NH₄HCO₃、葡萄糖调节进水 NH₄⁺-N 和 COD 浓度;同时加入一定量的 NaHCO₃ 调节进水 pH 保持 7.8 ~ 8.2。在获得反应器最佳运行效能且稳定运行的基础上,分别研究 A 反应器(进水为无机合成废水)和 B 反应器(低 C/N 比有机废水)的微生物群落结构。

1.2 检测方法

1.2.1 理化指标的测试

pH: 美国 HACH 公司 pH 计; DO: 美国 HACH 公司 LDOTM HQ10 溶氧仪。NH₄⁺-N、NO₂⁻-N、NO₃⁻-N、TN、COD 的测定方法参见文献^[16]。

1.2.2 微生物群落结构分析

(1) 样品的准备及 DNA 提取参见文献^[17]。

(2) PCR-DGGE 分析

总细菌的扩增采用 V3 区通用引物进行扩增^[18]。ANAMMOX 细菌采用巢式 PCR 进行扩增,扩增引物及程序详见文献^[19]。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖电泳检测。

取上述 PCR 产物各 30 μL,在 DcodeTM Universal Mutation Detection System (U. S. A, Bio-Rad Co.) 进行电泳分析。变性梯度胶配置为 8% (W/V) 聚丙烯酰胺(丙烯酰胺:双丙烯酰胺 = 37.5:1, W/W)。其中细菌的变性梯度范围为 35% ~ 55% (100% 的变性剂中含有 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺);ANAMMOX 菌的变性梯度为:35% ~ 60%。运行条件为:在 1 × TAE 电泳缓冲液中,60 °C 条件下,200 V 运行 10 min,然后 100 V 运行 13 h,电泳完成后,用 0.5 μg/mL 的溴化乙锭染色 20 min,再用去

离子水漂洗 2 次,然后在 BIO-RAD Versa Doc IMAGING SYSTEM 系统内观察电泳结果并照相。

(3) 克隆和测序

切下清晰条带,置于 1.5 mL 离心管中,加入无菌水 30 μ L,用灭菌牙签捣碎胶条, -4 $^{\circ}$ C 浸泡过夜,取溶液作为模板,再次进行 PCR 扩增,引物及反应条件同上。二次 PCR 产物用凝胶纯化试剂盒纯化后连接到 pMD18-T 载体上,转化到 *E. coli* JM109 中,克隆经 M13 通用引物检测后,挑取阳性克隆子测序,测序结果于 NCBI 数据库上进行比对分析,寻找同源性高的序列。

(4) 数据处理

使用 Quantity One-1-D 软件分析 DGGE 分离像。因 DGGE 分离条带的亮度与 DNA 含量呈比,所以用每个条带的亮度值与该列所有条带平亮度值的比值,计算微生物群落多样性 Shannon 数(H)指数^[20],公式为 $H = - \sum P_i \lg P_i$,经 PA 软件统计分析得到系统样品的 Shannon 多样性指数(H)数据。

2 实验结果和分析

2.1 SBBR 运行情况

在反应器调试运行的基础上,定期检测反应器进出水水质,当系统氨氮转化率和 TN 去除率持续保持在一定水平时,可以认为反应器达到稳定运行状态。此时 A、B 反应器的运行效能见表 2。

表 2 系统运行效能

Table 2 Performance of two reactors

指 标	反应器 A	反应器 B
C/N	0	1.2
$\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 转化率(%)	>93	>99
TN 去除率(%)	81~87	84~95
COD 去除率(%)	*	>90
出水 TN(mg/L)	20~31	12~38
出水 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ (mg/L)	<10.78	<2
出水 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ (mg/L)	<6.8	<0.5
出水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ (mg/L)	15~25	12~38
出水 COD(mg/L)	*	38

※表示未检测。

从表 2 可以看出,在有机碳源存在时,SBBR 可以达到同时脱氮除碳的效果,且反应器运行良好。

2.2 有机碳源对 SBBR 总细菌群落结构的影响

A、B 两个反应器活性污泥和生物膜样品的 DGGE 图谱如图 3(A) 所示。根据 DGGE 原理,图谱中不同位置的条带代表不同的细菌,并且条带的信

号强度一定程度上反映了其丰度的大小。反应器中的微生物是在特定进水条件下经过长期的演替过程而形成的稳定群落结构。由图 3 可见,与 A 反应器相比,B 反应器中微生物群落结构有很大不同。它们之间既有一些相同的微生物种属也有其各自独有的种属,共有的微生物种属,如图 3 所标记的 Band 2、Band 4 等;各自特有的条带,如 B 反应器中的 Band 13、Band 14 等。通过条带信号的强弱还可看出,即使是共有的种属在各自的反应器中所处的优势地位也不相同,如 Band 4、Band 7 等。不同样品的 Shannon 多样性指数见表 3。

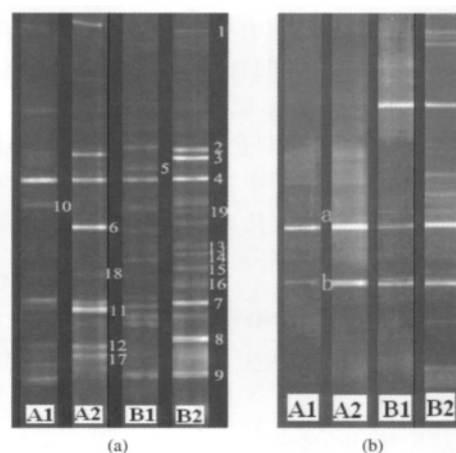


图 3 PCR 产物的 DGGE 图谱(A) 和巢式 PCR 产物的 DGGE 图谱(B)

Fig. 3 DGGE gel of PCR products (A) and DGGE gel of nest-PCR products (B)

表 3 基于 Shannon 指数(H)的微生物多样性

Table 3 Microbial diversity based on Shannon index

反应器	活性污泥		生物膜	
	条带数	Shannon index(H)	条带数	Shannon index(H)
A	14	2.374	18	2.513
B	16	2.449	24	2.928

A 反应器中活性污泥样品和生物膜样品条带数分别为 14 和 18 条,Shannon 多样性指数(H)分别为 2.374、2.513; B 反应器分别为 16 和 24 条,Shannon 多样性指数(H)分别为 2.449、2.928(见表 3)。这一结果表明有机碳源使得 B 反应器微生物更加丰富,尤其是生物膜。A 反应器由于进水不含有有机碳源,系统中异养菌在与自养菌竞争中处于劣势,其微生物结构相对简单,Shannon 多样性指数较低。B 反应器 COD 去除率达 90%,COD 的去除意味着系统

中异养菌大量增殖,与自养菌竞争生存空间,部分自养菌被“淘洗”,形成一个更为复杂的生态系统。而生物膜结构使得反应基质和 DO 在其内部纵向分层分布,有利于形成好氧与厌氧共存的微环境,为微生物的生长提供有利的条件,使得膜系统内的微生物种群数量和种类都大大提高。

2.3 有机碳源对 SBBR 厌氧氨氧化菌群的影响

厌氧氨氧化菌主要属于浮霉菌门(Planctomycetes)类群^[21]。巢式 PCR-DGGE 对厌氧氨氧化菌多样性的检测结果见图 3(b)。从图上可以看出,与 A 反应器相比,B 反应器菌群结构明显不同,多样性增加,表明有机碳源的存在有利于与浮霉菌属(*Planctomycete* sp.)相似性较高的 ANAMMOX 菌群的富集。

有机碳源对厌氧氨氧化过程的影响具有复杂性,结论也不尽一致。刘金苓等^[22]通过 PCR-DGGE 和分子克隆测序等分子生物学技术分析葡萄糖条件下的厌氧氨氧化群落变化,认为与对照相比,葡萄糖

处理(0.5 和 1 mmol/L)对厌氧氨氧化微生物群落多样性没有显著影响。胡安辉等^[23]通过分批和连续实验,考察了 TCA 循环中间产物对厌氧氨氧化及富集产物的影响及微生物菌群的变化,结果却发现所选有机物均能刺激厌氧氨氧化活性。同时发现添加有机物改变了微生物的菌群结构,且 ANAMMOX 菌丰度提高,其在 DGGE 泳道上的亮度增强。(低浓度:以 C 计,有机物为 2 mmol/L)。造成这种差异的原因还有待进一步分析。

2.4 同源性分析

将图 3 中的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,结果详见表 4。91% 的序列与已知菌群具有很高的相似性,相似度达 97% 以上。A、B 反应器 β -proteobacteria(β -变形菌纲)最为丰富,Bacteroidetes(拟杆菌门)次之, α -proteobacteria(α -变形菌纲)占第 3 位。但 B 反应器微生物类群更加丰富。

表 4 细菌 16S rDNA 的 DGGE 图谱序列比对结果

Table 6 Sequences closely related to those of denaturing gradient gel electrophoresis bands

条带	GenBank 接受号	比对序列 (GenBank 接受号)	同源性	系统类群
1	HQ821458	Uncultured Bacteroidetes bacterium (AY956649. 1)	97%	δ -proteobacteria
2	HQ821459	Uncultured <i>Chloroflexus</i> sp. (GQ183192. 1)	99%	/
3	HQ821460	<i>Nitrosomonas europaea</i> (AL954747. 1)	99%	β -proteobacteria
4	HQ821461	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp(AB500057. 1)	100%	β -proteobacteria
5	HQ821462	Uncultured beta proteobacterium(AY795706. 2)	99%	β -proteobacteria
6	HQ821463	Uncultured bacterium(AB376613. 1)	100%	/
7	HQ821464	Uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium (DQ329882. 1)	92%	/
8	HQ821465	Uncultured Beta proteobacteria (CU921775. 1)	98%	β -proteobacteria
9	HQ821466	Uncultured <i>Cellvibrio</i> sp. (EU449583)	100%	/
10	HQ821467	Uncultured Bacteroidetes bacterium(EF651047. 1)	96%	δ -proteobacteria
11	HQ821468	Uncultured gamma proteobacterium (EU283406. 1)	98%	γ -proteobacteria
12	HQ821469	Uncultured bacterium clone(GU732042. 1)		/
13	HQ821470	Uncultured <i>Thauera</i> sp. (GU980064. 1)	99%	β -proteobacteria
14	HQ821471	Uncultured <i>Thauera</i> sp. (EF205258. 1)	100%	β -proteobacteria
15	HQ821472	Uncultured Firmicutes bacterium (EF650872. 1)	94%	Firmicutes
16	HQ821473	Uncultured Bacteroidetes bacterium(DQ640733. 1)	97%	δ -proteobacteria
17	HQ821474	Candidate division TM7 bacterium (AY766347)	97%	Planctomycetes
18	HQ821475	Uncultured Bacteroidetes bacterium(EF179847)	97%	δ -proteobacteria
19	HQ821476	Uncultured Verrucomicrobia bacterium (EF665567. 1)	95%	Verrucomicrobia
a	HQ821477	Uncultured <i>Candidatus Brocadia</i> sp. (HM769652)	97%	Planctomycetes
b	HQ821478	Uncultured anaerobic ammonium-oxidizing bacterium (AB164477)	100%	Planctomycetes

从测序结果看,条带 3 与 *Nitrosomonas europaea* (欧洲亚硝化单胞菌)相似性达 99%,条带 4 与 *Nitrosomonas* sp. (亚单胞菌)的相似性达 100%,为系统中的氨氧化菌群(ammonia oxidizing bacteria, AOB 菌),可在好氧阶段将 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 转化为 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 。AOB 菌在 A、B 反应器的生物膜和活性污泥中都存在,分

布在活性污泥和生物膜外层。系统并未检测到亚硝酸盐氧化细菌(nitrite oxidizing bacteria, NOB)的存在,但这并不表明该系统中不存在 NOB 菌,或许由于其丰度较低,以至于 DGGE 技术无法检出。秦宇等^[24]用荧光定量的方法检测了 A 反应器中 AOB、NOB 等功能菌的数量,发现尽管在较高的 DO 条件

下,NOB 在该反应器中不占优势,与其他功能菌相比相差 2~3 个数量级。而在反应器 B 中,DO 控制在 1.4~1.7 mg/L,曝停比为 2 h:2 h,实验条件有利于将反应控制在亚硝态阶段。这是因为:一方面,鉴于好氧氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌的氧饱和系数不同,在溶解氧浓度较低的情况下,AOB 与 NOB 的增长速率均下降,但 NOB 的下降趋势比 AOB 要快,NOB 菌失去其竞争优势,有利于亚硝态氮的积累;另一方面,研究表明间歇曝气也有利于亚硝态氮的积累^[25-26]。

条带 13、14 为反应器 B 所独有,它们与索氏菌(*Thauera* sp.)相似性分别达 99%、100%。据文献报道,*Thauera* 属细菌是一种重要的反硝化菌,具有反硝化能力,但属内各种群的反硝化能力存在差异。有机碳源及好氧/缺氧交替的环境为异养反硝化菌的生存提供了必要的条件,使得其与厌氧氨氧化菌在竞争底物中占据一定的生态位,A 反应器几乎检测不到异养反硝化菌的存在,但这并不意味着反硝化菌在无机反应器中不存在。课题组前期对单级自养脱氮系统脱氮途径的研究表明:A 反应器以亚硝化-厌氧氨氧化自养脱氮占主导作用,传统反硝化途径仅占 6.02%^[27]。这主要是由于 A 反应器进水不含有有机碳源,系统中异养菌在与自养菌竞争中处于劣势,A 反应器中不断有细菌死亡,反硝化菌仍然可以利用这些死细菌进行异养反硝化,把单级自养脱氮系统的 NO₂⁻ 转化为 NO、NO₂ 和 N₂O 等,并从中获得能量使自身得到增殖。

条带 a、b 均为 Planctomycetes 属的 ANAMMOX 细菌,其中条带 a 与 Uncultured Candidatus *Brocadia* sp. (HM769652)相似性达 97%;条带 b 与 Uncultured anaerobic ammonium-oxidizing bacterium, (AB164477)相似性达 100%。但条带 a 和 b 的亮度在不同样品间存在差异,较活性污泥样品,生物膜更有利于形成厌氧氨氧化菌生长的微环境,表现为较高的亮度。由于厌氧氨氧化菌与反硝化菌生长的基质相近,但 ANAMMOX 菌是化能自养菌,生长速率较慢;反硝化菌有异养菌,生长速率较快。而有机物的存在会导致系统内异养反硝化菌增殖,与 ANAMMOX 菌竞争生长空间和代谢底物,对 ANAMMOX 菌的生长构成一定的威胁。因此,与无机系统相比,尽管在进水 C/N 为 1.2 的条件下,ANAMMOX 菌的生存空间缩减,但其仍在重要的生态位,与反硝化菌共同作用,完成 N 的去除。

3 结 论

(1) 在一定的控制条件下,以葡萄糖为主要有机碳源(2 mmol/L)的 SBBR,可以达到同时脱氮除碳的效果。

(2) 当进水含有有机碳源时,系统中异养菌增殖,与系统自养菌竞争生存空间,微生物群落结构更加丰富,与活性污泥相比,生物膜尤为明显。

(3) 在有机碳源条件下,厌氧氨氧化反应器内可发生多种反应,反应器中细菌的种群发生很大变化,且有利于 Planctomycete 相似性较高的 ANAMMOX 菌群的富集,但 ANAMMOX 菌的丰富度有所下降。此时反硝化菌与 ANAMMOX 菌之间通过竞争、协同,实现氮的去除。

参 考 文 献

- [1] Strous M., Fuerst J. A., Kramer E. H. M., et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, **1999**, 400 (29): 446-449
- [2] Graaf A., Bruijn P., Robertson L. A., et al. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, **1997**, 143 (7): 2415-2421
- [3] 朱静平, 胡勇有, 闫佳. 有机碳源条件下厌氧氨氧化 ASBR 反应器中的主要反应. *环境科学*, **2006**, 27 (7), 1353-1357
Zhu Jingping, Hu Yongyou, Yan Jia. Main reactions in anaerobic ammonium oxidation reactor under organic carbon condition. *Environmental Science*, **2006**, 27 (7), 1353-1357 (in Chinese)
- [4] Wang J. L., Kang J. The characteristic of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) by granular sludge from an EGSB reactor. *Process Biochem*, **2005**, 40 (5), 1973-1978
- [5] Chamchoi N., Nitisoravut S., Schmidt J. E. Inactivation of ANAMMOX communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation and denitrification. *Biore-sour. Technol.*, **2008**, 99 (9), 3331-3336
- [6] Waki M., Tokutomi T., Yokoyama H., et al. Nitrogen removal from animal waste treatment water by anammox enrichment. *Biore-sour. Technol.*, **2007**, 98 (14), 2775-2780
- [7] Molinuevo B., García M. C., Karakashev D., et al. Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: Effect of organic matter content on process performance. *Biore-sour. Technol.*, **2009**, 100 (7), 2171-2175
- [8] Güven A., Dapena B., Kartal M. C., et al. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**,

- 71(2) :1066-1071
- [9] 周少奇, 张鸿郭. 垃圾渗滤液厌氧氨氧化与反硝化的协同作用, 华南理工大学学报(自然科学版), **2008**, 36(3) :73-76
Zhou Shaoqi, Zhang Hongguo. Synergistic effect of anaerobic ammonium oxidation and denitrification of landfill leachate. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), **2008**, 36(3) :73-76 (in Chinese)
- [10] 李伙生, 周少奇, 孙艳波. 2种 UASB 的 ANAMMOX 与反硝化协同作用对比研究, 环境工程学报, **2010**, 4(2) :247-251
Li Qiusheng, Zhou Shaoqi, Sun Yanbo. Comparative study of ANAMMOX-denitrification synergism in two UASB-reactors. Chinese Journal of Environmental Engineering, **2010**, 4(2) :247-251 (in Chinese)
- [11] Ahn Y. H., Hwang I. S., Min K. S. ANAMMOX and partial denitrification in anaerobic nitrogen removal from piggery waste, Water Sci. Technol., **2004**, 49(56) :145-153
- [12] Kartal B., Rattray J., van Niftrik L. A., et al. Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. Syst. Appl. Microbiol., **2007**, 30(1) :39-49
- [13] Slikkers A. O., Derwort N., Gomez J. L. C., et al. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor, Water Res., **2002**, 36(10) :2475-2482
- [14] Chen H. H., Liu S. T., Yang F. L., et al. The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal, Bioresour. Technol., **2009**, 100(4) :1548-1554
- [15] 方芳, 杨国红, 郭劲松, 等. DO 和曝停比对单级自养脱氮工艺影响试验研究. 环境科学, **2007**, 28(9) :1975-1980
Fang Fang, Yang Guohong, Guo Jingsong, et al. Influence of DO and aeration/non-aeration ratio on one-step SBBR completely autotrophic nitrogen removal process. Environmental Science, **2007**, 28(9) :1975-1980 (in Chinese)
- [16] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法(第4版). 北京: 中国环境科学出版社, **2002**
- [17] 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. 环境科学, **2009**, 30(2) :493-498
Qin Yu, Guo Jingsong, Fang Fang, et al. Effect of DO and aeration/non-aeration ratio on the microbial community structure in one-step SBBR completely autotrophic nitrogen removal process. Environmental Science, **2009**, 30(2) :493-498 (in Chinese)
- [18] 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. Appl. Environ. Microb., **1993**, 59(3) :695-700
- [19] Kuenen J. G. Anammox bacteria: From discovery to application. Nat. Rev. Microbiol., **2008**, 6(4) :320-326
- [20] Vivas A., Moreno B., Garcia-Rodriguez S., et al. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. Bioresour. Technol., **2009**, 100(3) :1319-1326
- [21] Kuenen J. G., Jetten M. S. M. Extraordinary anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. ASM News, **2001**, 67(9) :456-463
- [22] 刘金苓. 厌氧氨氧化微生物的有机代谢机理及其固定化效应研究. 广州: 中山大学博士学位论文, **2009**
Liu Jinling. The study on metabolism of ANAMMOX bacterium under organic substrate and its immobilization effect. Guangzhou: Doctor Dissertation of SUN YAT-SET University, **2009** (in Chinese)
- [23] 胡安辉. 高效短程硝化/厌氧氨氧化富集培养物的研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文, **2010**
Hu Anhui. Research on high-efficient partial nitrification and anammox enrichment. Hangzhou: Doctor Dissertation of Zhejiang University, **2010** (in Chinese)
- [24] 方芳, 秦宇, 郭劲松, 等. 单级自养脱氮反应器效能与微生物群落结构的相关性. 土木建筑与环境工程, **2010**, 32(3) :113-118
Fang Fang, Qin Yu, Guo Jingsong, et al. Relationship between performance and microbial community structure of the sbbr autotrophic nitrogen removal process. Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering, **2010**, 32(3) :113-118 (in Chinese)
- [25] Kornaros M., Dokianakis N., Lybeatos G. Partial nitrification/denitrification can be attributed to the slow response of nitrite oxidizing bacteria to periodic anoxic disturbances. Environ. Sci. Technol., **2010**, 44(19) :7245-7253
- [26] Pollice A., Tandoi V., Lestingi C. Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate. Water Res., **2002**, 36(10) :2541-2546
- [27] 杨国红, 方芳, 郭劲松, 等. 单级自养脱氮工艺氨氮去除途径研究. 环境科学, **2009**, 30(1) :102-107
Yang Guohong, Fang Fang, Guo Jingsong, et al. Mechanism of ammonium removal in the completely autotrophic nitrogen removal in one reactor process. Environmental Science, **2009**, 30(1) :102-107 (in Chinese)