

复合菌株 YH01 + YH02 强化 SBR 好氧反硝化脱氮及菌群结构分析

陈海升¹, 曹刚^{1, 2*}, 张迪¹, 黄郑郑¹, 莫测辉^{1, 2}

(1. 暨南大学环境学院, 广州 510630; 2. 广东省污染控制与修复材料工程技术中心, 广州 510630)

摘要: 为探讨复合菌株强化好氧反硝化的脱氮特性以及揭示菌群结构动态演替与生物反应器运行效率之间的联系, 以硝态氮为底物, 研究了异养硝化-好氧反硝化复合菌株 *Delftia* sp. YH01 + *Acidovorax* sp. YH02 强化好氧 SBR 的脱氮特性, 并借助高通量测序技术对强化过程中的菌群结构进行了分析. 结果表明, 经复合菌株强化后, 反应器对 NO_3^- -N、TN 和 COD 去除率分别提高了 12.1%、9.2% 和 9.4%; 复合菌株 YH01 + YH02 的加入对菌群结构产生了较大的影响, 菌群结构在属水平上丰度呈上升趋势, 多样性呈下降趋势; PCA 主成分分析和 UPGMA 聚类分析大致把反应器运行过程分成 4 个阶段; *Delftia* 和 *Acidovorax* 菌的丰度随着反应器呈上升趋势, 复合菌株 YH01 + YH02 在 SBR 反应器内具有良好的适应能力, 对好氧反硝化起着非常重要的作用.

关键词: 异养硝化-好氧反硝化; 复合菌株; SBR 反应器; 高通量测序技术; 菌群结构

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2018)04-1773-09 DOI: 10.13227/j.hjks.201708253

Aerobic Denitrification and Microbial Community Shift in SBR Bioaugmented with Strains YH01 and YH02

CHEN Hai-sheng¹, CAO Gang^{1, 2*}, ZHANG Di¹, HUANG Zheng-zheng¹, MO Ce-hui^{1, 2}

(1. School of Environment, Jinan University, Guangzhou 510630, China; 2. Guangdong Engineering Center for Environment Contamination Control and Restorative Materials, Guangzhou 510630, China)

Abstract: The enhanced aerobic denitrification capability of the mixed strains YH01 + YH02 in utilizing potassium nitrate, and the dynamic changes in the microbial community component during the period of operation, were evaluated. The microbial community in different stages of the SBR was analyzed by using high-throughput sequencing technology after inoculation with YH01 + YH02. The results showed that the NO_3^- -N, TN, and COD removal efficiencies increased by 12.1%, 9.2%, and 9.4%, respectively. The relative abundances of the microbes in the microbial community increased at the genus level, and the diversity in the microbial community decreased after enhancement. Principal component analysis and UPGMA analysis revealed that the period of SBR operation was roughly divided into four phases. The relative abundances of *Delftia* and *Acidovorax* increased during the period of operation, and YH01 + YH02 exhibited excellent compatibility with the SBR ecosystem and played an important part in aerobic denitrification.

Key words: heterotrophic nitrification-aerobic denitrification; mixed strains; SBR reactor; high-throughput sequencing technology; microbial community component

在好氧条件下能够进行硝化和反硝化的一类微生物称作异养硝化-好氧反硝化菌, 从 Robertson^[1] 1988 年首次分离出异养硝化-好氧反硝化菌 *Thiosphaera pantotropha* 以来, 已发现了 *Bacillus*^[2]、*Pseudomonas*^[3]、*Alcaligenes*^[4]、*Acinetobacter*^[5] 等具有异养硝化-好氧反硝化能力的菌属. 传统的生物脱氮技术须经好氧硝化和厌氧反硝化两个单独过程, 但异养硝化-好氧反硝化细菌则可以在好氧条件下在同一生物反应器内实现同步硝化反硝化, 这一脱氮特性能够有效缩短反应路径, 提高脱氮效率, 因此在含氮废水的生物处理中成为一个研究热点.

目前对于异养硝化-好氧反硝化菌的研究主要集中在其脱氮特性上, 且大多为摇瓶实验^[2-5]. 文

献[6~8]以氨氮为底物分别研究了单菌株 *Ochrobactrum anthropi* XH02、*Bacillus* sp. K5 和 *Acinetobacter junii* YB 的强化脱氮特性, 取得了较好的效果. 然而, 目前利用异养硝化-好氧反硝化菌强化去除硝态氮的研究则鲜有报道. 此外, 由于复合菌株较单菌株而言, 具有适应性好^[9, 10], 负荷性高的特点^[11], 对于生物反应器脱氮强化有较强的潜力, 应更适合作为强化菌株, 但是目前几乎没有利

收稿日期: 2017-08-31; 修订日期: 2017-09-17

基金项目: 国家自然科学基金委员会-广东省政府联合基金重点项目(U1501233); 广东省自然科学基金研究团队项目(2016A030312009); 广东省环境污染控制与修复材料工程技术研究中心建设项目(2015B090903070)

作者简介: 陈海升(1991~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为污水生物脱氮, E-mail: 913421208@qq.com

* 通信作者 E-mail: cao_g@163.com

用复合菌株进行生物脱氮强化的报道。而目前生物脱氮强化的研究更多关注在脱氮特性上,对强化脱氮过程中菌群结构变化演替规律的研究则关注较少,菌群结构组成会直接影响到生物反应器处理效率^[12],探究复合菌株强化过程中的菌群结构对生物反应器有重要的意义。

本文以好氧 SBR 反硝化反应器为研究对象,利用实验室筛选出来的异养硝化-好氧反硝化复合菌株 YH01 + YH02 进行好氧反硝化强化,探究其对硝态氮的强化去除潜力。同时利用高通量测序技术分析反应器中的菌群丰度和多样性的动态变化,并对菌群结构进行 PCA 主成分分析和 UPGMA 聚类分析,通过阐明菌群结构的变化与工艺运行效率之间的联系,以为生物处理硝态氮废水提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株和接种污泥

实验菌株来自本实验室筛选到的两株高效的异养硝化-好氧反硝化菌株 *Delftia* sp. YH01 和 *Acidovorax* sp. YH02。YH01、YH02 分别接入 500 mL LB 培养基的摇瓶中,于 30℃、120 r·min⁻¹ 摇床中培养 24 h,然后离心收集菌体。最后按照 1:1 的比例把菌株混合,再用无菌水重悬菌体至 D_{600} 为 2.0 左右而得复合菌株培养液。

实验活性污泥来自于广州市大坦沙污水处理厂的生化好氧池,其 MLSS 为 2 500 ~ 3 000 mg·L⁻¹, SVI 为 90 ~ 120 mL·g⁻¹。

1.1.2 实验进水

实验进水采用人工合成水质,以柠檬酸三钠为碳源, KNO₃ 为氮源,具体水质如下: COD 950 ~ 1050 mg·L⁻¹; NO₃⁻-N 190 ~ 210 mg·L⁻¹; pH 7.4 ~ 7.6。每 1 L 进水加入 50 mL 微量元素溶液,微量元素配方如下: K₂HPO₄, 5.0 g·L⁻¹; MgSO₄·7H₂O, 2.5 g·L⁻¹; NaCl, 2.5 g·L⁻¹; FeSO₄·7H₂O, 0.05 g·L⁻¹; MnSO₄·4H₂O, 0.05 g·L⁻¹。

1.2 好氧 SBR 反硝化工艺

好氧 SBR 反应器由有机玻璃制成,有效容积 3 L。采用向上流进水,利用鼓风机曝气,使气水同向。将新鲜的活性污泥接种于 SBR 反应器中,运行周期设为 12 h,进水 2 h,曝气 9 h 25 min,沉淀 30 min,出水 5 min,实验期间不进行排泥处理。空气经底部曝气头扩散到反应器内,用空气流量计调节进气

量为 3.5 L·min⁻¹,温度控制在 30℃ 左右。好氧 SBR 反硝化工艺分为两个阶段:第一阶段(启动阶段):未投加复合菌株培养液,每 3 d 测定出水水质指标,直到出水稳定。第二阶段(强化阶段):出水水质稳定后,按进水量的 30% 投加复合菌株培养液,每 3 d 测定出水水质指标。出水水质指标包括 TN、NH₄⁺-N、NO₂⁻-N 和 COD。

1.3 菌株的鉴定

利用细菌的特异性引物 27F(5'-AGAGTTTGAT CMTGGCTCAG-3') 和 1492F(5'-TTGGYTACCTG TTACGACT-3') 对菌株进行 DNA 提取和 PCR 扩增。其扩增产物交由上海美吉科技公司进行测序。

1.4 微生物群落结构分析

为研究反应器内生物群落结构的变化趋势,取其污泥样品来测定生物群落组成。反应器在投加 YH01 + YH02 前的稳定期,取污泥样品一份。YH01 + YH02 培养液投加到反应器后取样一次,而后每隔 2 d 进行污泥样品取样,共取 9 份样品用于 DNA 提取。

使用 TruSeq™ DNA Sample Prep Kit 试剂盒对细菌 DNA 进行提取,其提取方法均按照标准步骤。提取出来的 DNA 用细菌的 16S rDNA 引物 338F5'-ACTCCTACGGGAGGCAGGAC-3' 和 806R5'-GGACTA CHVGGGTWTCTAAT-3' 进行 PCR 扩增。PCR(10 ng)反应体系为 20 μL: 缓冲液 4 μL; dNTPs(25 mmol·mL⁻¹) 2 μL; DNA 模板 100 ng; 上下游引物(50 mmol·mL⁻¹) 0.8 μL; 其余用双蒸水补充。PCR 扩增步骤: 95℃ 3 min; 30 个循环(95℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 42 s); 72℃ 延伸 10 min。然后再将 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测条带,用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega) 对标记的 PCR 产物检测定量。再利用 PCR 扩增建立测序文库,在 Illumina MiSeq 测序仪进行测序,由上海美吉生物科技公司完成。

微生物群落多样性分析前对原始数据进行质量控制,去除低质量序列。采用 QIIME 在 97% 相似水平上对高质量序列进行 OTU 划分,OTU 丰度小于 0.001% 会被去除^[13]。并通过 Greengenes 数据库对比,对 OTU 进行分类注释。用 Ace 和 Chao 指数分析群落丰度^[14], Shannon 和 Simpson 指数分析群落多样性^[15],并用 Canoco 和 Mothur 软件分别进行主成分分析和聚类分析。

2 结果与讨论

2.1 16S rDNA 基因序列和系统发育分析

为确定 YH01、YH02 种属, 对菌株进行 DNA 提取和 PCR 扩增, 扩增后产物进行 DNA 测序, 获

得的基因序列在 GenBank 中登录号为 KY419588、KY419589, 通过 Blast 同源性检索, 构建系统进化发育树. 如图 1 所示, 可初步确定 YH01 为戴尔福特菌属(*Delftia*), YH02 为食酸菌属(*Acidovorax*), 均属于变形菌门(Proteobacteria).

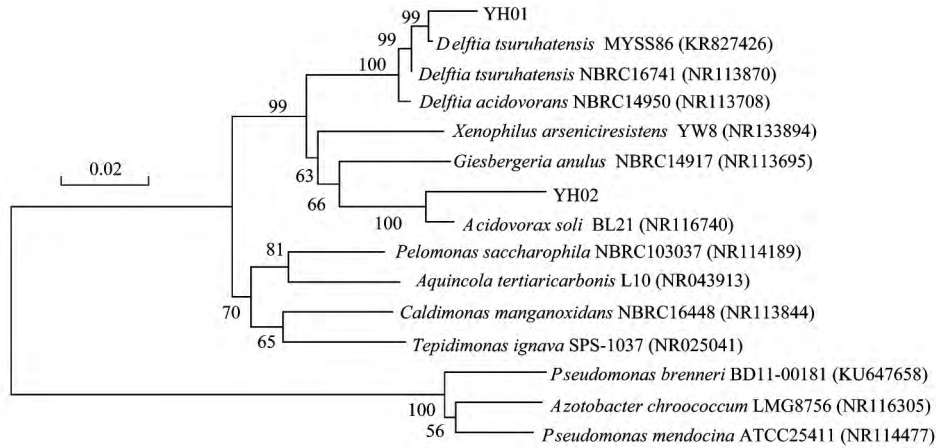


图 1 基于 16S rDNA 基因序列同源性构建 YH01、YH02 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the strains YH01 and YH02 based on the complete sequence of the 16S rDNA gene

2.2 菌株 YH01 和 YH02 异养硝化-好氧反硝化特性

为测定菌株 YH01、YH02 和 YH01 + YH02 的好氧反硝化特性, 分别以 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ $220 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ $220 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为单一氮源来测定它们的反硝化效率. 如图 2(a) ~ 2(c) 所示, 在以 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 为单一氮源的摇瓶实验中, 可以发现 24 h 后单菌株和复合菌株对 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、TN、COD 的去除率基本保持稳定. 从图 2(a) 和图 2(b) 可以看出, YH01、YH02、YH01 + YH02 在 24 h 对 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的去除率分别为 88.7%、85.1%、95.3%, 对 TN 去除率分别为 67.2%、70.3%、87.2%, 明显地复合菌株 YH01 + YH02 反硝化效率比单菌高, 复合菌株更有益于提高脱氮效率. 图 2(c) 所示, 24 h 后 YH01、YH02、YH01 + YH02 对 COD 的去除率较为接近, 分别为 88.2%、89.4%、90.1%.

而当 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 为单一氮源时的反硝化效率如图 2(d) ~ 2(f) 所示, 在 24 h 后, YH01、YH02 和 YH01 + YH02 对 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、TN、COD 的去除率基本保持稳定. 在 24 h 时, YH01、YH02 和 YH01 + YH02 对 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的去除率分别为 88.2%、89.0% 和 90.1%, 对 TN 的去除率分别为 85.3%、88.9% 和 88.9%, COD 的去除率为 89.0%、90.1% 和 91.2%. 可以看出, 当以 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 为单一氮源时, YH01、YH02 和 YH01 + YH02 的反硝化的效率与以 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 为单一氮源时差异不大.

在关于复合菌株脱氮研究中, *Ochrobactrum* sp. XH02 + *Pseudomonas* sp. XH03^[10] 和 *Pseudomonas* sp. B2 + *Streptomyces* sp. A9 + *Fusarium* sp. F3^[9], 这些复合菌株均有较高的脱氮效率. 此外, 复合菌株较单菌株对环境耐受性更强^[16], 原因可能是复合菌株之间的协同效应使其对环境有更强的适应性, 因此复合菌株更适合进行生物脱氮强化. 复合菌株 YH01 + YH02 具有高效的好氧反硝化能力, 比单菌株 YH01、YH02 更有益于提高脱氮效率, 这对于实际的含氮废水处理有重要的意义, 因此 YH01 + YH02 复合菌株适合进行生物脱氮强化.

2.3 SBR 反应器

反应器启动过程见图 3(a). 启动初期的脱氮效率较差, 这一阶段为活性污泥的适应期. 在 10 ~ 31 d, 脱氮效率稳定上升, 此阶段中能适应环境的微生物被保留下来, 不能适应的被淘汰. 在启动末期 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、TN 和 COD 去除率基本稳定, 平均去除率分别为 73.4%、64.5% 和 80.7%. 反应器经过 31 d 的运行, 启动成功.

反应器运行稳定后, 在 31 d 投加复合菌株进行强化. 强化阶段中的反硝化效率如图 3(b) 所示, 在 31 ~ 34 d 内, 脱氮效率较强化前出现下降的趋势, 而后在 34 ~ 52 d, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、TN 和 COD 去除率回升并趋向稳定, 其平均去除率较强化前分别增加 12.1%、9.2% 和 9.4%. 在强化阶段中, 脱氮效率出现波动的原因可能是因为复合菌株 YH01 + YH02

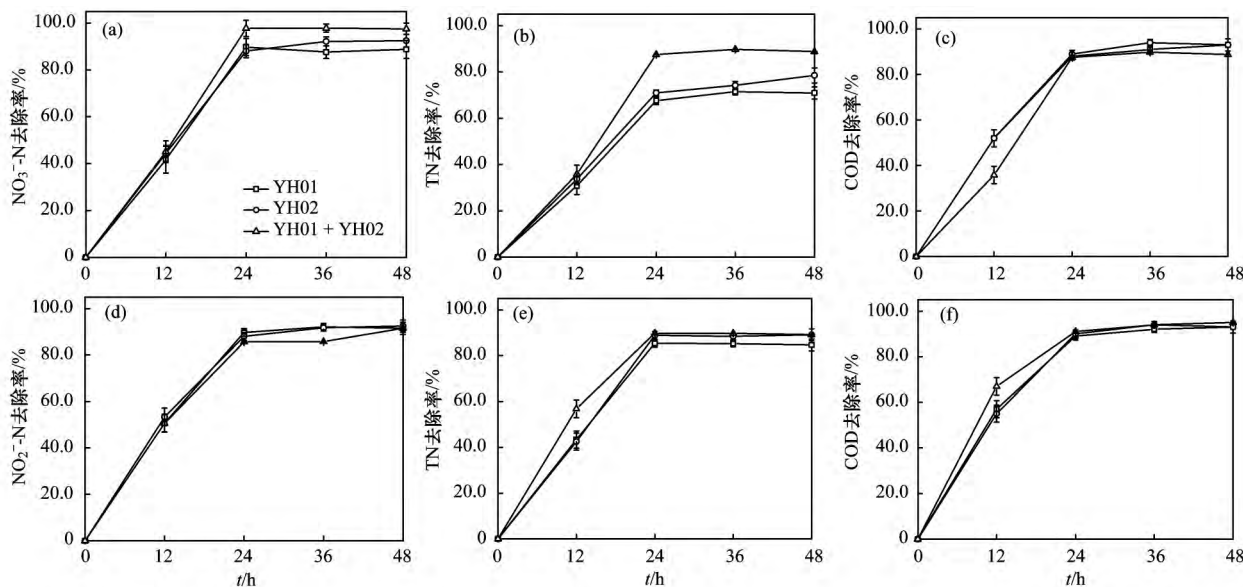


图2 YH01、YH02、YH01 + YH02 反硝化特性

Fig. 2 Characteristics of denitrification by YH01 , YH02 , and YH01 + YH02

的加入,与原系统的微生物菌群在生存空间和营养上进行竞争,使得原系统的生物菌群结构发生变化,反应器运行效率故此受到影响.此外,根据研究发现,在废水处理上成功的生物强化需要强化菌株在强化系统中能够存活下来并保持活性,且不对体系内的原有菌群的降解能力产生消极影响^[17].所以为确保强化菌株存活下来并保持活性,有研究人员通过重复投加强化菌株^[18]或者包埋菌株^[19]的方式进行强化脱氮,但这些方法会额外增加运行成本且操作繁复.而在本实验中,复合菌株 YH01 + YH02 仅通过一次投加就成功引入到原活性污泥反应体系中,并在反应器脱氮过程中产生积极的影响,说明 YH01 + YH02 在实际强化处理上具有灵活性强、适应性好的优势.

2.4 生物群落丰度和多样性分析

SBR 反应器运行中各阶段的污泥样品经过高通

量测序得到的丰度指数(Ace 和 Chao 指数)和多样性指数(Shannon 和 Simpson 指数)见图 4. Chao 和 Ace 指数总体呈上升趋势,这表明反应器中生物群落丰度变化整体为上升趋势,其中第 40 d 的样品丰度(Ace: 417 , Chao: 420)最高. Shannon 和 Simpson 指数从初始的 3. 71 和 0. 06 ,到 52 d 时下降到 3. 60 和 0. 05 ,表明反应器内生物多样性总体呈下降趋势.相似的现象,也发生在一些生物脱氮研究中,对反应器内的生物群落分析中也观察到生物多样性出现下降的现象^[6 20 ,21],这与有的学者认为生物强化并不会引起反应器多样性产生变化的观点不同^[8].随着复合菌株 YH01 + YH02 投加到反应器后,活性污泥体系中生物群落的相对丰度和多样性都出现了较大的波动现象,主要原因可能是 YH01 + YH02 加入到反应器后,与某些异养细菌之间存在协同效应,能够促进相互之间的生长繁殖,而且

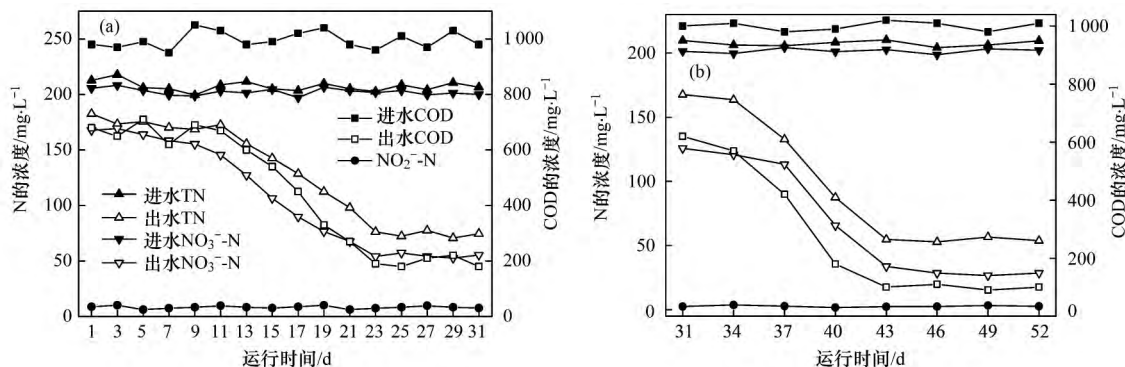


图3 反应器的启动和强化阶段各指标的浓度变化

Fig. 3 Changes in N and COD concentrations in the period of start-up and enhancement

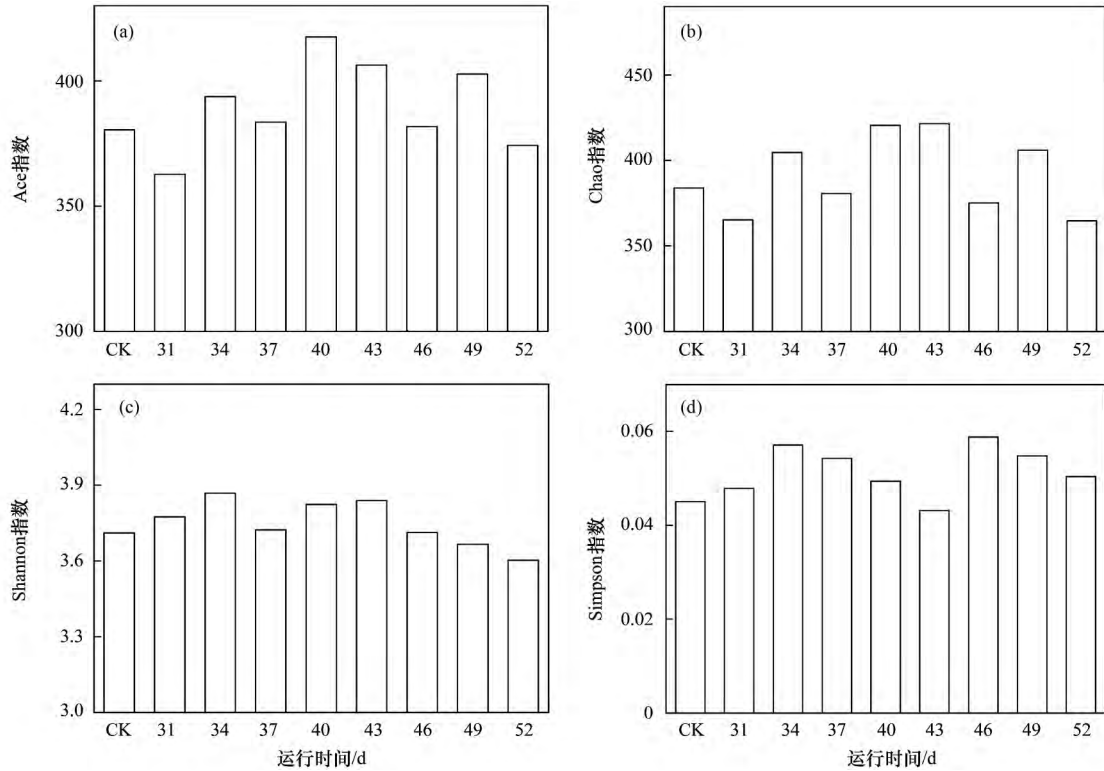


图 4 丰度指数和多样性指数

Fig. 4 Abundance and diversity indexes

有机碳更容易被异养细菌所利用^[22], 这样使得它们在竞争空间和营养中处于优势地位, 从而淘汰了一些与它们存在竞争关系的菌株. 因此生物群落相对丰度整体呈上升趋势, 而多样性则略有下降.

2.5 生物群落结构变化

如图 5 所示, 9 个污泥样品共检测到 27 个菌门, 共有的菌门为 19 个, 其中 Proteobacteria(变形菌门)、Bacteroidetes(拟杆菌门)、Planctomycetes

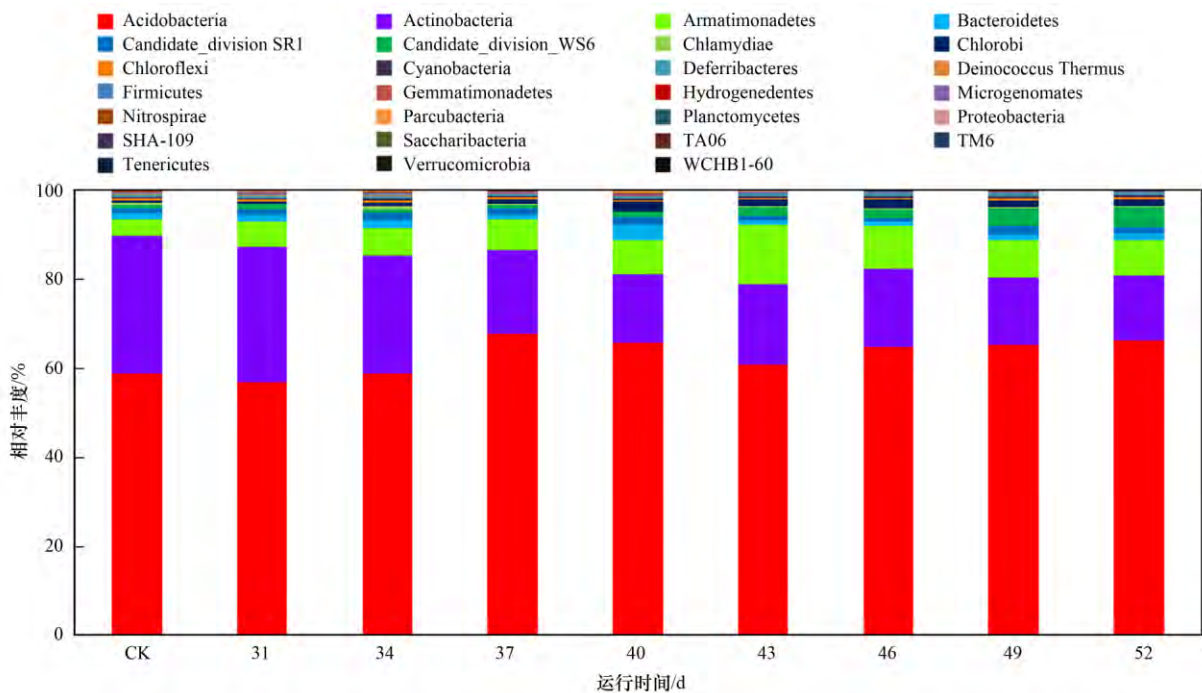


图 5 门水平上微生物相对丰度的变化

Fig. 5 Changes in the relative abundance of microorganisms at the phylum level

(浮霉菌门)和 Chloroflexi(绿弯菌门)在反应器内丰度靠前,分别为 $62.1\% \pm 4.1\%$ 、 $22.2\% \pm 8.0\%$ 、 $7\% \pm 3\%$ 和 $3.3\% \pm 2.0\%$ 。Proteobacteria 是反应器内最优势种群,同样地在 *Ochrobactrum anthropi* XH02^[6] 强化反应器脱氮过程中,也发现 Proteobacteria 是反应器内最优势菌门。Proteobacteria、Chloroflexi 和 Planctomycetes 在投加 YH01 + YH02 后,其相对丰度增加了 7.0% 、 3.4% 和 3.1% 。Proteobacteria、Chloroflexi 和 Planctomycetes 都包含许多脱氮菌,且这些细菌广泛存在于好氧脱氮系统中^[23-25]。Bacteroidetes 的相对丰度从强化前的 31.0% 下降到 14.6% ,表明了 YH01 + YH02 与其存在竞争关系,并且 Bacteroidetes 处于劣势地位,其生长受阻,相对丰度一直降低到 15.0% 左右。

为清楚阐明 SBR 反应器在运行过程中生物群落的演替过程,在菌属水平上选取相对丰度排名前 30 的来制作群落结构 Heatmap 图,如图 6 所示,列

表示样品,行表示菌属,色块深浅表示相对丰度的大小,颜色越红其相对丰度越高,越绿其相对丰度越低。通过色块深浅变化可以观察生物群落结构变化过程。Uncultured *Saprospiraceae*、*Thauera*(陶厄氏菌属)、*Luteimonas*(藤黄单胞菌属)在运行期占主导地位,相对丰度均在 3% 以上,并且均属于 Proteobacteria 菌门。Uncultured *Saprospiraceae*、*Thauera* 和 *Luteimonas* 在 YH01 + YH02 投加后相对丰度都出现了先升后降的现象,到了 52 d 时跟强化前比较分别下降了 7.1% 、 0.5% 和 7.5% ,这可能是因为 YH01 + YH02 虽然能够促进它们的生长,但是反应器运行后期形成了新的菌群,与它们形成了竞争关系,其生长繁殖受到抑制。其中 Uncultured *Saprospiraceae* 在反应器运行期间一直是最优势菌属,但几乎没有关于其在脱氮方面相关的文献报道,而其在反应器内相对丰度较高,这意味着 Uncultured *Saprospiraceae* 属下的菌种具有较强的环境适应能力,值得进一步研究。

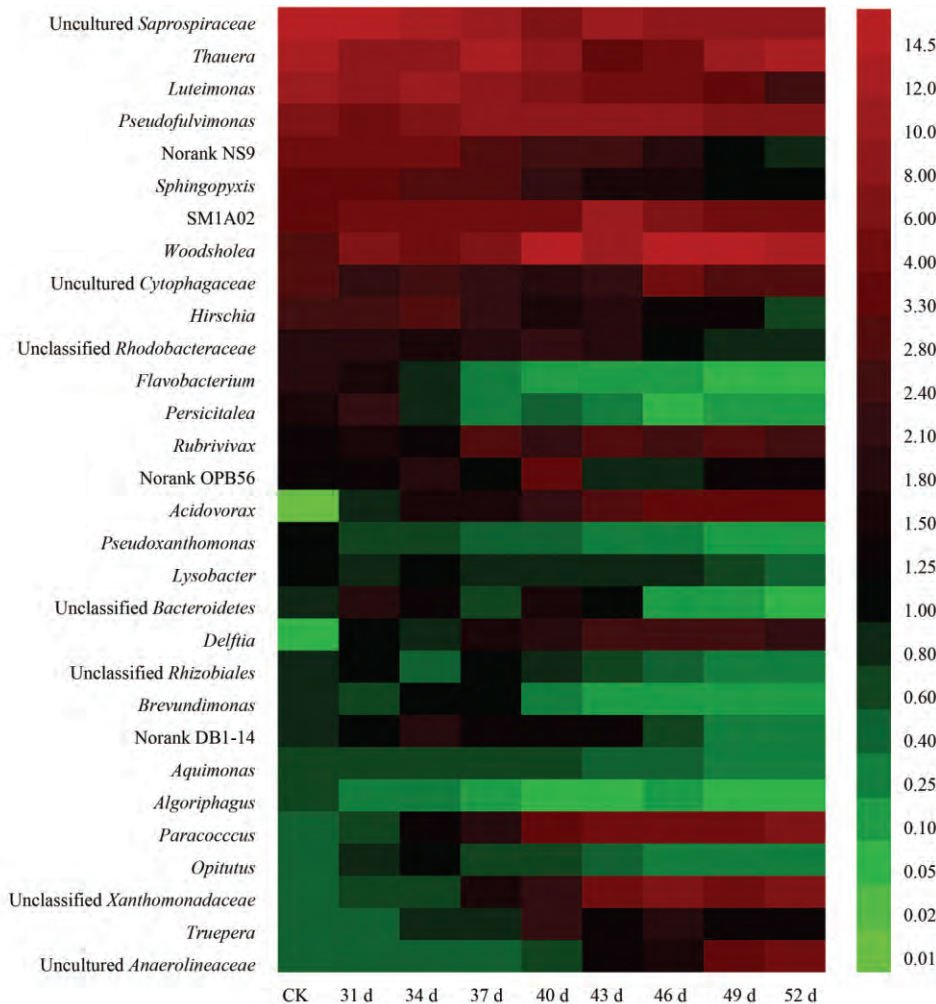


图 6 菌属的丰度热图

Fig. 6 Heatmap of the bacterial community at the genus level

Delftia 和 *Acidovorax* 在反应器运行各阶段的相对丰度的变化见图 7. *Delftia* 和 *Acidovorax* 在投加到反应器时丰度分别为 0.09% 和 0.1%, 随着反应器的运行, 它们的丰度呈上升趋势, 52 d 时相对丰度增加到 2.2% 和 3.5%. 虽然 *Delftia* 和 *Acidovorax* 在运行结束时没有成为最优菌属, 但是它们相对丰度排名在前 10 名以内, 而且可以观察到随着 *Delftia* sp. YH01 + *Acidovorax* sp. YH02 的加入, SBR 反硝

化效率提高了 10% 左右, 这可能是 YH01 + YH02 与其它菌属具有协同效应, 对反应器的脱氮起到重要作用. 此外, 因 *Delftia* 具有氨化、硝化和反硝化的能力, 这保证了它能较好适应新的环境^[26], 而 *Acidovorax* 在酸性环境下仍能进行好氧反硝化^[27], 表明了 *Delftia* + *Acidovorax* 在与其它菌属竞争中仍有较强竞争力, 并且对恶劣的环境有良好的适应能力.

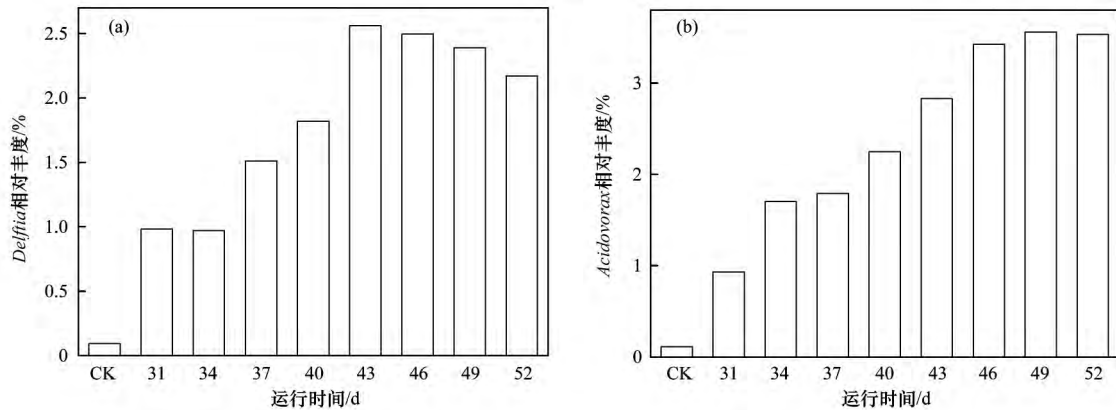


图 7 *Delftia* 和 *Acidovorax* 的相对丰度变化

Fig. 7 Relative abundances of *Delftia* and *Acidovorax*

2.6 生物菌群结构分析

2.6.1 生物菌群的 PCA 分析

PCA 分析指通过分析样本的不同组成可以反映样本间菌群结构的差异程度, 样本的菌群结构差异程度越大, 表现出在 PCA 图中距离越分散, 反之则越接近, 通过 PCA 分析可以揭示出反应器在运行过程中的不同阶段的生物菌群结构的变化规律^[28, 29]. 本实验对 9 个污泥样品的 OTU 组成进行 PCA 分析, 如图 8 所示, 可以明显看出 31 ~ 34 d 内的样品和第 37 d 的样品距离较远, 说明 31 ~ 34 d 与第 37 d 的微生物种类相似程度较低, 这可能是由于 YH01 + YH02 的加入后, 与其它菌种存在协同或竞争关系, 打破了原有的菌群平衡, 使得菌群结构发生了巨大的变化. 在 40 ~ 46 d 内的 3 个样品距离较近, 表明各样品中微生物种类相似程度较高, 反应器菌群结构在此阶段处于相对平衡状态. 而 40 ~ 46 d 与 49 ~ 52 d 的样品间有一定的距离, 这表明了 SBR 在运行末期菌群结构有一定的变化, 可能是出现了新的菌群. 因此, 可以将 SBR 运行过程分成 4 个不同的阶段, 表明复合菌株 YH01 + YH02 加入到反应器后, 菌群结构随着强化过程的不同阶段而变化, 更直观地反映了 SBR 反应器中生物菌群的演替过程.

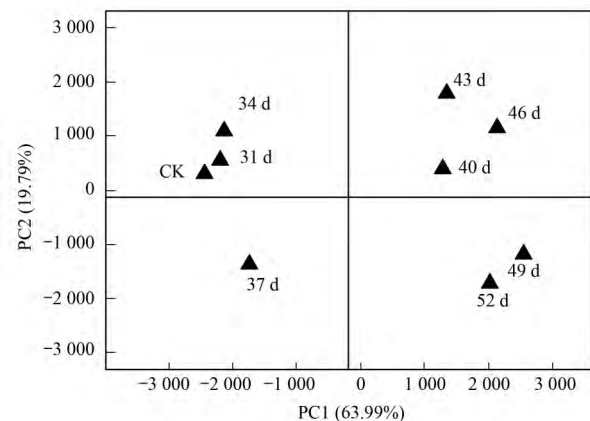


图 8 菌群的 PCA 主成分分析

Fig. 8 Principal component analysis of the bacterial community

2.6.2 生物菌群的聚类分析

微生物菌群变化分析通常会由于统计模型的不同而导致不同的分析结果^[30, 31]. 而 UPGMA 聚类分析能较好地反映出微生物菌落结构变化与反应器运行之间联系^[20]. 对 9 个样品的功能基因进行聚类分析, 结果如图 9 所示, 31 ~ 34 d 样品作为运行初期, 样品的菌群结构较为相似, 而到了 37 d 时样品菌群结构与运行初期相比发生较大变化, 这可能由于菌群竞争激烈所致. 而到了 40 ~ 46 d 的样品的菌群结构较为相似, 说明了反应器内菌群结构趋向稳定.

而到运行末期,49~51 d 样品的相似度较高,与 40~46 d 菌群结构有差异,说明末期菌群又发生了改变. 这样可大致将强化过程分为 31~34、37、40~46 和 49~52 d 这 4 个阶段,说明体系内菌群结构呈现规律演替,这与张斌等^[32]的研究结论类似. 这表明了强化的不同阶段微生物群落存在一定的演变关系,经过规律演替过程最终会形成稳定的菌群结构.

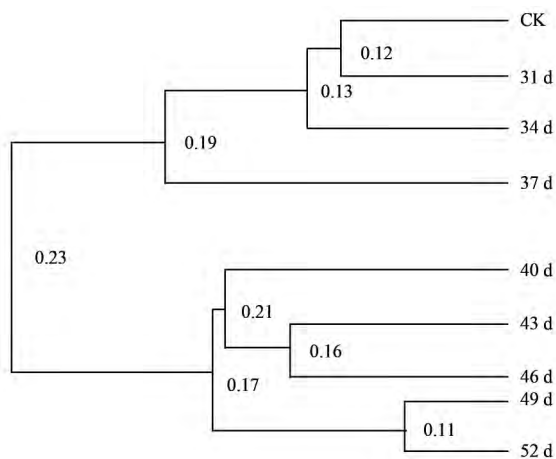


图9 菌群的UPGMA聚类分析

Fig. 9 Cluster analysis of the bacterial community by UPGMA

3 结论

(1) 复合菌株 YH01 + YH02 可明显提高 SBR 好氧反硝化效率, NO_3^- -N、TN 和 COD 去除率较强化前分别提高了 12.1%、9.2% 和 9.4%.

(2) 在强化 SBR 好氧反硝化过程中, 菌群在门水平以 Proteobacteria、Bacteroidetes 和 Planctomycetes 为主, 丰度均在 5% 以上. 在属水平上以 Uncultured *Saprosiraceae*、*Thauera* 和 *Luteimonas* 为主, 丰度均在 3% 以上.

(3) *Delftia* 和 *Acidovorax* 菌相对丰度在强化过程中呈现上升趋势, 复合菌株 YH01 + YH02 在反应器内具有良好的适应能力, 对好氧反硝化起着非常重要的作用.

(4) PCA 分析和 UPGMA 聚类分析大致把 SBR 强化脱氮运行过程分为 4 个阶段, 分别对应 31~34、37、40~46 和 49~52 d.

参考文献:

[1] Robertson L A, Kuenen J G. Aerobic denitrification: a controversy revived [J]. Archives of Microbiology, 1984, **139** (4): 351-354.

[2] 成钰, 李秋芬, 费聿涛, 等. 海水异养硝化-好氧反硝化芽孢杆菌 SLWX₂ 的筛选及脱氮特性 [J]. 环境科学, 2016, **37** (7): 2681-2688.

Cheng Y, Li Q F, Fei L T, et al. Screening and nitrogen

removing characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria SLWX₂ from sea water [J]. Environmental Science, 2016, **37** (7): 2681-2688.

- [3] Wan C L, Yang X, Lee D J, et al. Aerobic denitrification by novel isolated strain using $^-$ “-N as nitrogen source [J]. Bioresource Technology, 2011, **102** (15): 7244-7248.
- [4] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* NO.4 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, **100** (2): 184-191.
- [5] Wang H N, Ma X L, Li Y. Influence of different C/N ratios on aerobic denitrification characteristics of the strain [J]. Meteorological and Environmental Research, 2013, **4** (10): 22-24.
- [6] 黄郑郑, 曹刚, 李紫惠, 等. XH02 菌强化反应器脱氮过程中菌群结构的高通量分析 [J]. 中国环境科学, 2017, **37** (5): 1922-1929.
- Huang Z Z, Cao G, Li Z H, et al. High-throughput sequencing analysis of community structure in reactor enhanced by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria XH02 [J]. China Environmental Science, 2017, **37** (5): 1922-1929.
- [7] Yang Y, Xie L, Tao X, et al. Municipal wastewater treatment by the bioaugmentation of *Bacillus* sp. K5 within a sequencing batch reactor [J]. PLoS One, 2017, **12** (6): e0178837.
- [8] Yang L, Ren Y X, Liang X, et al. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater [J]. Bioresource Technology, 2015, **193**: 227-233.
- [9] Wang W F, Cao L X, Tan H M, et al. Nitrogen removal from synthetic wastewater using single and mixed culture systems of denitrifying fungi, bacteria, and actinobacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, **100** (22): 9699-9707.
- [10] 黄郑郑, 曹刚, 陈海升, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌协同竞争对脱氮特性的影响 [J]. 环境科学研究, 2017, **30** (5): 765-774.
- Huang Z Z, Cao G, Chen H S, et al. Synergy and competition for nitrogen removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria [J]. Research of Environmental Science, 2017, **30** (5): 765-774.
- [11] 全向春, 岑艳, 钱殷. 2 株好氧反硝化菌的筛选及其强化贫营养生物膜脱氮效果 [J]. 环境科学, 2013, **34** (7): 2862-2868.
- Quan X C, Cen Y, Qian Y, et al. Isolation, identification of two aerobic denitrifiers and bioaugmentation for enhancing denitrification of biofilm under oligotrophic conditions [J]. Environmental Science, 2013, **34** (7): 2862-2868.
- [12] 郭昱廷, 彭剑峰, 宋永会, 等. 温度对 ABR 反应器处理效果和微生物群落结构的影响 [J]. 环境科学学报, 2012, **32** (7): 1542-1548.
- Guo Y T, Peng J F, Song Y H, et al. Influence of temperature on the pollutant removal efficiency and the microbial community of the anaerobic baffled reactor [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2012, **32** (7): 1542-1548.
- [13] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing [J]. Nature Methods, 2013, **10** (1): 57-59.

- [14] Wang M, Chen J K, Li B. Characterization of bacterial community structure and diversity in rhizosphere soils of three plants in rapidly changing salt marshes using 16S rDNA [J]. *Pedosphere*, 2007, **17**(5): 545-556.
- [15] Xu C L, Sun R, Qiao X J, et al. Protective effect of glutamine on intestinal injury and bacterial community in rats exposed to hypobaric hypoxia environment [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, **20**(16): 4662-4674.
- [16] Vacková L, Srb M, Stloukal R, et al. Comparison of denitrification at low temperature using encapsulated *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens* and mixed culture [J]. *Bioresource Technology*, 2011, **102**(7): 4661-4666.
- [17] Chen Q, Ni J R, Ma T, et al. Bioaugmentation treatment of municipal wastewater with heterotrophic-aerobic nitrogen removal bacteria in a pilot-scale SBR [J]. *Bioresource Technology*, 2015, **183**: 25-32.
- [18] Boon N, De Gelder L, Lievens H, et al. Bioaugmenting bioreactors for the continuous removal of 3-chloroaniline by a slow release approach [J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, **36**(21): 4698-4704.
- [19] Bouchez T, Patureau D, Delgenès J P, et al. Successful bacterial incorporation into activated sludge flocs using alginate [J]. *Bioresource Technology*, 2009, **100**(2): 1031-1032.
- [20] 邵基伦, 曹刚, 李紫惠, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 *Burkholderia* sp. YX02 强化连续流反应器中微生物群落结构解析 [J]. *环境科学*, 2016, **37**(2): 630-637.
Shao J L, Cao G, Li Z H, et al. Analysis of the microbial community structure in continuous flow reactor enhanced by heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium *Burkholderia* sp. YX02 [J]. *Environmental Science*, 2016, **37**(2): 630-637.
- [21] Gao L, Zhou W L, Huang J C, et al. Nitrogen removal by the enhanced floating treatment wetlands from the secondary effluent [J]. *Bioresource Technology*, 2017, **234**: 243-252.
- [22] 侯爱月, 李军, 卞伟, 等. 不同短程硝化系统中微生物群落结构的对比分析 [J]. *中国环境科学*, 2016, **36**(2): 428-436.
Hou A Y, Li J, Bian W, et al. Analysis of microbial community structure in different partial nitrification system [J]. *China Environmental Science*, 2016, **36**(2): 428-436.
- [23] Islam M S, Zhang Y Y, Dong S M, et al. Dynamics of microbial community structure and nutrient removal from an innovative side-stream enhanced biological phosphorus removal process [J]. *Journal of Environmental Management*, 2017, **198**: 300-307.
- [24] Du C, Cui C W, Qiu S, et al. Nitrogen removal and microbial community shift in an aerobic denitrification reactor bioaugmented with a *Pseudomonas* strain for coal-based ethylene glycol industry wastewater treatment [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, **24**(12): 11435-11445.
- [25] Janssen P H, Evers S, Rainey F A, et al. *Lactosphaera* gen. nov., a new genus of lactic acid bacteria, and transfer of *Ruminococcus pasteurii* Schink 1984 to *Lactosphaera pasteurii* comb. nov [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, **45**(3): 565-571.
- [26] Patil N K, Kundapur R, Shouche Y S, et al. Degradation of plasticizer Di-*n*-butylphthalate by *Delftia* sp. TBKNP-05 [J]. *Current Microbiology*, 2006, **52**(5): 369-374.
- [27] Li P, Liu D L, Nahimana L, et al. High nitrogen removal from wastewater with several new aerobic bacteria isolated from diverse ecosystems [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2006, **18**(3): 525-529.
- [28] Zhang Z H, Liu Y, Yu C G, et al. Genetically modified WYMV-resistant wheat exerts little influence on rhizosphere microbial communities [J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, **105**: 169-176.
- [29] Chae J P, Pajarillo E A B, Oh J K, et al. Revealing the combined effects of lactulose and probiotic enterococci on the swine faecal microbiota using 454 pyrosequencing [J]. *Microbial Biotechnology*, 2016, **9**(4): 486-495.
- [30] 郭星亮, 谷洁, 陈智学, 等. 铜川煤矿区重金属污染对土壤微生物群落代谢和酶活性的影响 [J]. *应用生态学报*, 2012, **23**(3): 798-806.
Guo X L, Gu J, Chen Z X, et al. Effects of heavy metals pollution on soil microbial communities metabolism and soil enzyme activities in coal mining area of Tongchuan, Shaanxi Province of northwest China [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, **23**(3): 798-806.
- [31] 周石磊, 黄廷林, 张春华, 等. 基于 Miseq 的好氧反硝化菌源水脱氮的种群演变 [J]. *中国环境科学*, 2016, **36**(4): 1125-1135.
Zhou S L, Huang T L, Zhang C H, et al. Bacterial community structures of aerobic denitrification bacteria nitrogen removal process in source water experiment by using Miseq high-throughput sequencing technique [J]. *China Environmental Science*, 2016, **36**(4): 1125-1135.
- [32] 张斌, 孙宝盛, 季民, 等. MBR 中微生物群落结构的演变与分析 [J]. *环境科学学报*, 2008, **28**(11): 2192-2199.
Zhang B, Sun B S, Ji M, et al. Analysis and succession of microbial community structure in a membrane bioreactor [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, **28**(11): 2192-2199.