

# XH02 菌强化反应器脱氮过程中菌群结构的高通量分析

黄郑郑<sup>1</sup>, 曹刚<sup>1,2\*</sup>, 李紫惠<sup>1</sup>, 陈海升<sup>1</sup>, 莫测辉<sup>1,2</sup> (1.暨南大学环境学院,广东 广州 510630; 2.广东省污染控制与修复材料工程技术中心,广东 广州 510630)

**摘要:** 为了强化生物反应器脱氮以及揭示微生物菌群结构随时间的动态变化,以 *Ochroactrum anthropi* XH02 和 SBR 反应器为研究对象,利用 16Sr DNA 高通量测序技术,对不同时期反应器中微生物的菌群结构和多样性进行了动态分析.研究表明,XH02 菌的加入使得反应器中 TN 和 COD 的去除率分别提升了 15% 和 10% 以上;反应器中微生物菌群在属水平上的相对丰度和多样性呈先下降后上升的趋势;XH02 的加入对菌群结构产生了较大影响.*Acinetobacter*、*Blvii28* 和 *Aquabacterium* 菌的相对丰度显著下降,而 *Fontibacter* 和 *Treponema* 菌的相对丰度则在强化过程中显著升高;XH02 的相对丰度随着反应器的运行逐渐增加,最后形成了较为稳定的菌群.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.

**关键词:** 异养硝化-好氧反硝化;生物多样性;高通量测序技术;SBR 反应器;菌群结构

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2017)05-1922-08

**High-throughput sequencing analysis of community structure in reactor enhanced by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria XH02.** HUANG Zheng-zheng<sup>1</sup>, CAO Gang<sup>1,2\*</sup>, LI Zi-hui<sup>1</sup>, CHEN Hai-sheng<sup>1</sup>, MO Ce-hui<sup>1,2</sup> (1.School of Environment, Jinan University, Guangzhou 510630, China; 2.Guangdong Engineering Center for Environment Contamination Control and Restorative Materials, Guangzhou 510630, China). *China Environmental science*, 2017,37(5): 1922~1929

**Abstract:** To improve the denitrification of bio-reactor and reveal dynamic changes of microbial community structure over time, the microbial community structure and diversity were analyzed by high-throughput sequencing technology in different stages of the SBR reactor inoculated with heterotrophic nitrification-aerobic denitrification XH02. Results showed that the removal rates of TN and COD increased by more than 15% and 10%, respectively. The relative abundance and diversity of microbial flora on the genus level decreased at first and then increased. XH02 exerted a great influence on the microbial community structure of indigenous microorganisms, leading to a significant decrease in the relative abundance of *Acinetobacter*, *Blvii28* and *Aquabacterium*, but a visible increase in the relative abundance of *Treponema* and *Fontibacter*. The relative abundance of XH02 increased gradually with the operation of the reactor until a relatively stable flora was finally established. The SBR operation was roughly divided into four stages based on the results of principal component analysis (PCA) and UPGMA cluster analysis.

**Key words:** heterotrophic nitrification-aerobic denitrification; biological diversity; high throughput sequencing technology; SBR; microbial community structure

微生物在水体氮循环中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>. 污水中氮素的去除主要通过微生物菌群的硝化和反硝化作用来实现<sup>[2]</sup>. 传统的生物脱氮技术中硝化和反硝化不能同时进行,必须通过两个独立的过程来完成. 而异养硝化-好氧反硝化脱氮技术实现了在同一个反应器中同时完成硝化和反硝化作用,有效缩短了反应途径,且脱氮效率更高、反应速率更快. 目前,国内外利用异养硝化-好氧反硝化菌强化污水脱氮已取得了较好的效

果<sup>[3-5]</sup>,但大部分研究只关注强化过程的脱氮效率以及影响因素,而对反应器中微生物菌群结构的变化研究较少.

分子生物学的快速发展,为研究微生物菌群

收稿日期: 2016-09-22

基金项目: 国家基金委-广东省政府联合基金重点项目(U1501233); 广东省基金研究团队项目(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)

\* 责任作者, 副教授, cao\_g@163.com

结构提供了多种方法,包括 RFLP<sup>[6]</sup>、16S rRNA 文库构建<sup>[7]</sup>和 PCR-DGGE<sup>[8-9]</sup>等.但这些传统方法效率较低,得到的数据信息有限,不能有效、系统地反映群落的丰度和多样性.而高通量测序技术具有通量高、数据量大、准确率高、测序周期短以及成本低等优点<sup>[10]</sup>,在微生物学研究中具有很强的优越性,广泛应用于各种分子生物学领域<sup>[11-15]</sup>.

本研究将实验前期筛出的异养硝化-好氧反硝化菌 *Ochrobactrum anthropi* XH02 活化后投加到 SBR 反应器中,建立微生物强化系统.利用高通量测序技术分析加入 XH02 菌前后反应器中微生物菌群的相对丰度和多样性随着运行阶段的变化,并对各阶段的微生物菌群结构进行了主成分分析和聚类分析.以阐明微生物菌群结构随着反应器运行的动态演替过程.为后续通过改变环境条件来调控反应器中菌群结构,进而提高反应器处理效率提供依据.以为为污水生物脱氮提供一定的理论和技术参考.

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌源 从广州大坦沙污水处理厂好氧污泥中筛选出一株异养硝化-好氧反硝化菌 XH02<sup>[16]</sup>,经过 16S rDNA 鉴定,此菌为人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*),GenBank 的登录号为 KU999381.

1.1.2 污泥来源 广州大坦沙污水处理厂 A<sup>2</sup>/O 工艺中的好氧活性污泥.

1.1.3 人工合成水质 反应器进水采用人工配水水质,如表 1 所示.

表 1 人工合成水质

Table 1 Water quality of the synthetic wastewater

水质指标	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	COD (mg/L)	pH 值
范围	80.0~100.0	50.0~60.0	50.0~60.0	800.0~1000.0	7.2~7.5

### 1.2 SBR 反应器的建立与运行

SBR 反应器由有机玻璃加工而成,有效容积为 1.5L,采用向上流进水,利用鼓风机曝气,气水同向运

行.将新鲜的活性污泥接种于 SBR 反应器中,周期设定为 12h,进水 2h,反应 9h 25min,沉淀 30min,出水 5min,期间控制进水流量为 1L/d,空气从底部经曝气头扩散进入反应体系中,用空气流量计调节进气量为 4.0L/min,温度控制在 30 左右.加入 XH02 菌之前,每隔 2d 测定出水的各个指标,待反应器稳定后加入 XH02,每隔 3d 测定出水水质指标.

### 1.3 取样方法和检测项目

SBR 反应器在加入 XH02 之前的稳定期,取一份污泥样品保存.XH02 加入反应器后,在第 2h 取样一次,然后每隔 3d 取一次污泥样品.直至 21d,共取污泥样品 9 份,用于 DNA 的提取,取污泥样品的同时,采集出水,并测定 COD、TN、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的浓度变化.

### 1.4 细菌总 DNA 的提取

每次取污泥样品 20mL,加入 50mL 锥形瓶中,120r/min 摇床震荡 10min 使污泥破碎均匀.取 10mL 于 15mL 的离心管中,8000r/min 离心 10min,弃去上清液,收集沉淀,上述步骤重复一次.取 5mL 新鲜污泥进行总 DNA 的提取<sup>[17]</sup>,设 3 个平行,提取的 DNA 一部分于-20 保存,另一部分在 0.7%的琼脂糖凝胶中做电泳检测,并将电泳条带进行扫描拍照.

### 1.5 Illumina Miseq 高通量测序

首先进行 PCR 扩增,引物为细菌 16Sr DNA 引物 515F 5' GTGCCAGCMGCCGCGG 3';907R 5' CCGTCAATTCMTTTRAGTTT 3',PCR 扩增产物用 Illumina Miseq 平台双端测序分析.PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物,2% 琼脂糖凝胶电泳检测.

### 1.6 微生物群落结构和多样性分析

多样性分析前必须对原始序列去杂,然后进行拼接,通过标签找回每个样品对应的序列,低质量的序列被去除.质量控制标准包括:无错配碱基、精确匹配引物和 barcode、无模糊碱基、长度大于 300bp.采用 CD-HIT 分类法对有效数据在 97%水平上进行 OTU 划分,并与 Greengenes 数据库比对,通过 RDPclassifier Naive Bayesian 分类算法对代表序列在门、纲、目、科和属 5 个水

平上进行分类注释.用 Chao 指数公式<sup>[18]</sup>分析样品的物种丰度,用 Shannon 和 Simpson 指数公式<sup>[19]</sup>分析样品的物种多样性.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 XH02 菌对 COD 和氮素的去除特性

菌株 XH02 对 COD、TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的去除特性见图 1.如图 1(a)所示,以

$\text{NH}_4^+\text{-N}$  为底物的异养硝化过程中,第 60h 菌株 XH02 对 COD、TN 和  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除率分别为 81.10%、62.74% 和 95.01%;由图 1(b)可知,以  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  为底物的好氧反硝化过程中,第 60h 菌株 XH02 对 COD、TN 和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的去除率分别为达到 75.73%、70.49% 和 100%;图 1(c)给出了菌株 XH02 以  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  为底物时的反硝化过程,60h 时 XH02 菌对 COD、TN 和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的去除率分别为 86.15%、80.40% 和 97.35%.

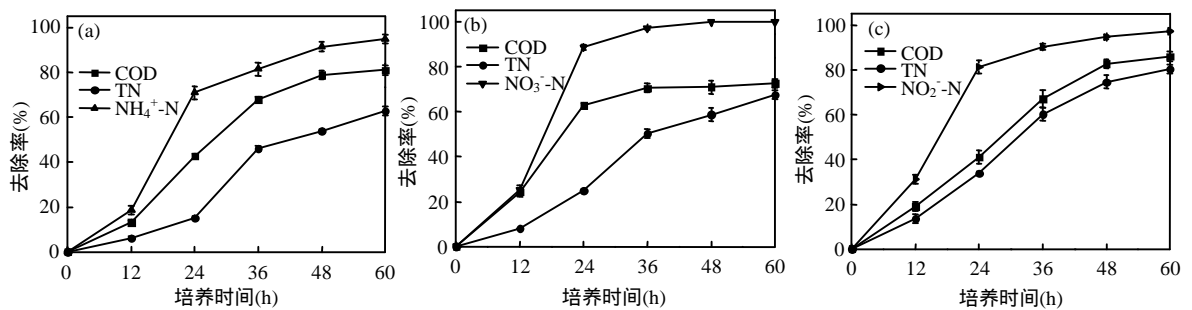


图 1 XH02 菌对 COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的去除特性

Fig.1 Removal characteristics on COD,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  and  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  of XH02

### 2.2 SBR 反应器的运行过程

反应器的启动过程见图 2(a),在第 1~7d 内 COD、TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的降解呈现出无规律变化,这一阶段为活性污泥的适应期.第 7~17d 内,COD、TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的去除率显著升高,这一阶段污泥中

的菌群已逐渐适应环境,一部分不能适应的细菌被淘汰.从 17d 开始,反应器基本达到稳定状态,17~25d 内,COD 的去除率分别为 78.05%、77.65%、78.05%、77.38% 和 79.51%,TN 的去除率分别为 62.54%、62.79%、64.07%、64.78% 和 62.02%.反应器经过 25d 的运行,启动成功.

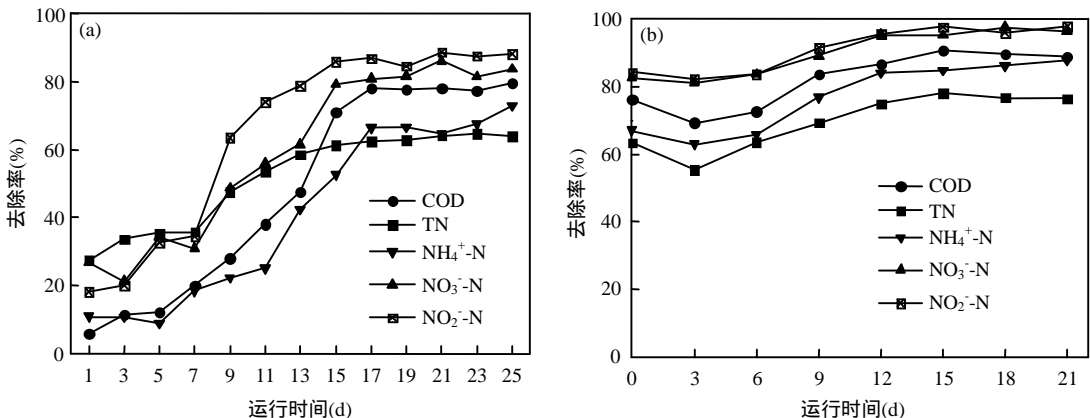


图 2 反应器的启动和强化阶段各指标去除率的变化

Fig.2 Removal changes of indicators in starting and strengthening phase of the reactor

反应器运行稳定后,第 25d 将 XH02 菌加入反应器,强化阶段开始,COD、TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的去除率变化见图 2(b).强化阶段的前 3d 内,与未加 XH02 的反应器相比,COD 和 TN 的去除率出现了下降的趋势,可能是因为 XH02 的加入,与反应器中其他菌群发生强烈的竞争,使整个反应体系内的群落结构发生了变化,一些不适应的菌群被淘汰,适应的菌群继续生长.在 3~15d 内,反应器对 COD 和 TN 的去除率持续升高,运行至第 15d,基本达到稳定状态.15~21d 内 COD 的去除率分别为 90.82%、89.58% 和 90.79%,TN 的去除率分别达到 78.17%、76.82% 和 78.49%.

比较反应器的启动和强化两个阶段,强化反应器在第 15d 对 COD 和 TN 的去除率较原系统分别提高了 15.38% 和 13.44%.因此,利用菌剂强化反应器去除氮和有机物是一种有效治理污水的方法.曲洋等<sup>[20]</sup>的研究中利用菌剂强化反应器,也达到了较好效果,强化系统较原系统对 TN 和 COD 的去除率分别提高了 15.24% 和 5.39%.

### 2.3 强化反应器中菌群的丰度和多样性分析

反应器运行各阶段的污泥样品经过高通量测序得到丰度和多样性指数见图 3.图 3(a)中 Chao 指数的变化趋势为先降低再升高,Chao 指数可以表征微生物菌群的相对丰度,表明反应器中微生物菌群的丰度整体变化趋势为先降低然后再升高.图 3(b)和 3(c)中给出了 Shannon 和 Simpson 指数的变化情况,这两个指数可以表征微生物菌群的多样性.Shannon 指数和 Simpson 指数对多样性的反映情况相似,XH02 加入后,0~3d 内菌群的多样性先降低后升高,3~6d 内,又迅速降低,6~9d 内保持相对稳定的状态,9~21d 内,微生物的多样性呈现出缓缓上升的趋势,总体变化趋势呈先下降后上升.可能是因为 XH02 加入反应器后,要适应外界环境,并与其他微生物强烈竞争,争夺营养环境,不能适应的菌群被淘汰,导致菌群的丰度和多样性降低.反应器运行后期,菌群的丰度和多样性又呈现出上升的趋势,可能是反应器中出现了新的菌属,也可能是 XH02 适应环境后丰度持续升高,体系内形成了新的菌群

结构,多样性升高.邵基伦等<sup>[21]</sup>的研究利用 PCR-DGGE 技术分析反应器中微生物菌群丰度和多样性的变化,也呈现出先下降后上升的趋势.表明不同运行阶段反应器中微生物菌群的丰度和多样性会发生很大的变化,但微生物菌群可以通过自我调控来适应环境.

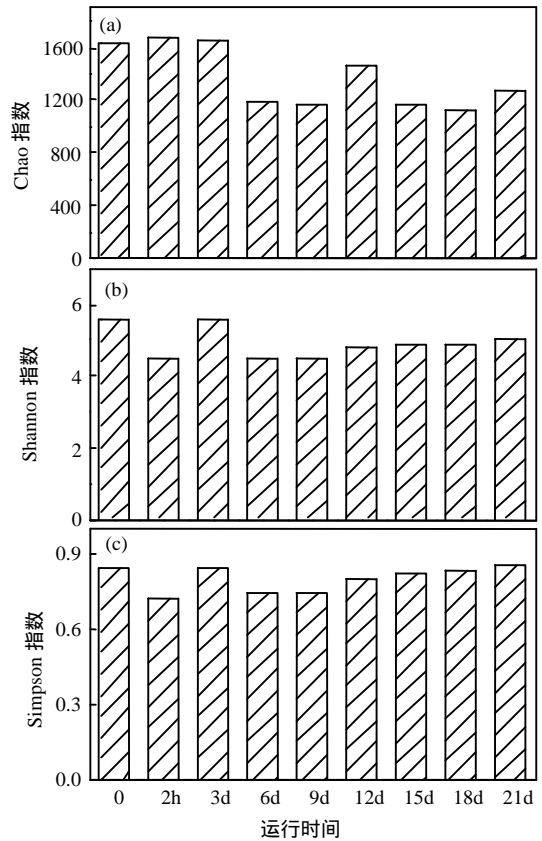


图 3 丰度指数与多样性指数  
Fig.3 Abundance index and diversity index

### 2.4 强化过程中微生物菌群结构的变化

#### 2.4.1 16S rDNA 序列在门水平上的对比

如图 4 所示,9 个污泥样品一共检测到了 23 个菌门,共有的菌门为 13 个,相对丰度前 4 的菌门分别为 Proteobacteria(变形菌门)、Bacteroidetes(拟杆菌门)、Firmicutes(厚壁菌门)和 Planctomycetes(浮霉菌门).其中 Proteobacteria 是反应器中最优势的种群,这与 Snaidr 等<sup>[22-23]</sup>的研究结果类似.XH02 加入反应器之前,Proteobacteria 的相对丰度为 71.79%,加入目标菌后,Proteobacteria 的

相对丰度继续升高,稳定期保持在 80%左右,因此 XH02 对 Proteobacteria 的生长具有促进作用,可能是因为 XH02 的加入,使得原来和 Proteobacteria 竞争的菌群,与 XH02 也形成竞争关系而被削弱,从而 Proteobacteria 得到更大的生长环境和营养条件,相对丰度持续升高. Proteobacteria 为革兰氏阴性菌,多为兼性或专性厌氧及异养生活,对有机物和氮的去除有重要作用<sup>[24]</sup>. Bacteroidetes 在反应器运行初期相对丰度为 18.57%,是反应器中第二大优势菌群,到运行中期时降至 13%左右,然后又上升,运行后期时升至 17.60%,表明 XH02 的加入与 Bacteroidetes 形成了竞争关系,使得 Bacteroidetes 生长受阻,相对丰度降低,但 Bacteroidetes 的适应和恢复能力较强,运行后期丰度又升高. Bacteroidetes 可以降解蛋白质等多种复杂有机大分子化合物,对去除 COD 具有重要作用<sup>[25]</sup>. Firmicutes 在反应器运行开始时的相对丰度为 6.65%,随着反应器运行,一直降低,后期降至 2.50%,可能是因为 XH02 与 Firmicutes 形成了竞争作用,使得 Firmicutes 的相对丰度一直降低. Firmicutes 属于革兰氏阳性菌,和乳酸降解有关,对 COD 的去除具有重要作用<sup>[26]</sup>. Planctomycetes 的相对丰度逐渐升高,从运行初期的 0.26%到后期升至 0.63%.它在缺氧环境下可利用亚硝酸盐氧化铵离子生成氮气来获得能量,主要参与脱氮过程<sup>[27]</sup>.

2.4.2 16S rDNA 序列在属水平上的对比 为了进一步阐明反应器运行过程中微生物群落的演替过程,在属水平上,选取丰度前 30 的物种作群落结构 Heatmap 图,如图 5 所示,每一列代表一个样本,行代表菌属,色块代表物种的相对丰度,颜色越红表示相对丰度越高,颜色越绿表示相对丰度越低.通过色块对比可以观察群落结构的变化. *Thauera*(陶厄氏菌属)、*Thermomonas*(热单胞菌属)和 *Flavobacterium*(黄杆菌属)在反应器运行期间占主导地位,它们对氮和有机物的去除都具有重要作用<sup>[28-30]</sup>.其中 *Thauera*、*Thermomonas* 属于变形菌门(Proteobacteria),*Flavobacterium* 属于拟杆菌门(Bacteroidetes).*Thauera* 是反应器中最占优势的菌属,反应器运行初期的相对丰度为 38.30%,

随着反应器的运行,*Thauera* 的相对丰度上升,中期升高至 50.63%,运行后期又下降至 35.06%. XH02 的加入促进了 *Thauera* 的生长,后期下降可能是因为反应器中形成了新的菌群结构,产生了新的菌属,与之竞争.*Thermomonas* 在加入 XH02 之前的相对丰度为 4.49%,加入 XH02 后,*Thermomonas* 的相对丰度呈现出缓缓下降的趋势,在运行后期降至 2.37%,可能是因为 XH02 与 *Thermomonas* 形成了竞争的关系,致使 *Thermomonas* 的含量下降.*Flavobacterium* 在反应器运行中相对丰度的变化趋势为持续下降,从反应器运行初期的 4.07%降至运行后期的 2.21%.

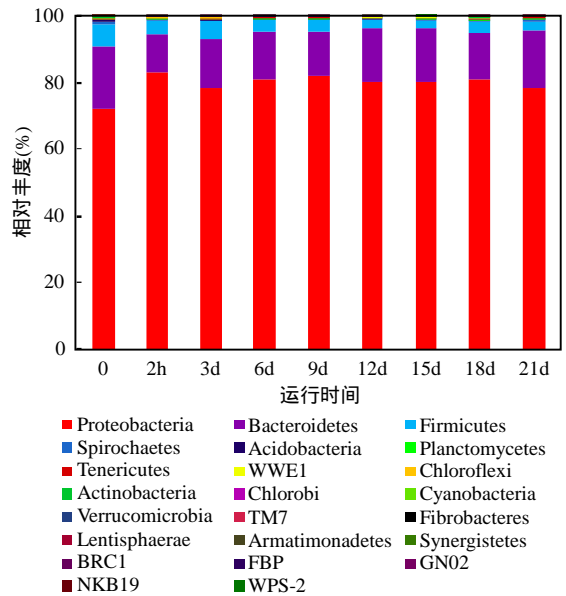


图 4 门水平上微生物相对丰度的变化  
Fig.4 Changes in relative abundance of microorganisms at the phylum level

图 6 显示了 XH02(*Ochrobactrum*)、*Fontibacter*、*Treponema* 等菌在反应器运行各阶段相对丰度的变化.如图 6(a)所示,XH02 在反应器运行初期的相对丰度为 0.02%,随着反应器运行,XH02 的相对丰度持续升高,在反应器运行中期趋于稳定,最高达到0.11%,后期又呈现降低然后再升高的趋势,但未成为反应器中丰度最高的菌属,可能是因为投加菌株 XH02 的量较少,也可能是反应器中一直存在着抑制 XH02 生长的菌群.

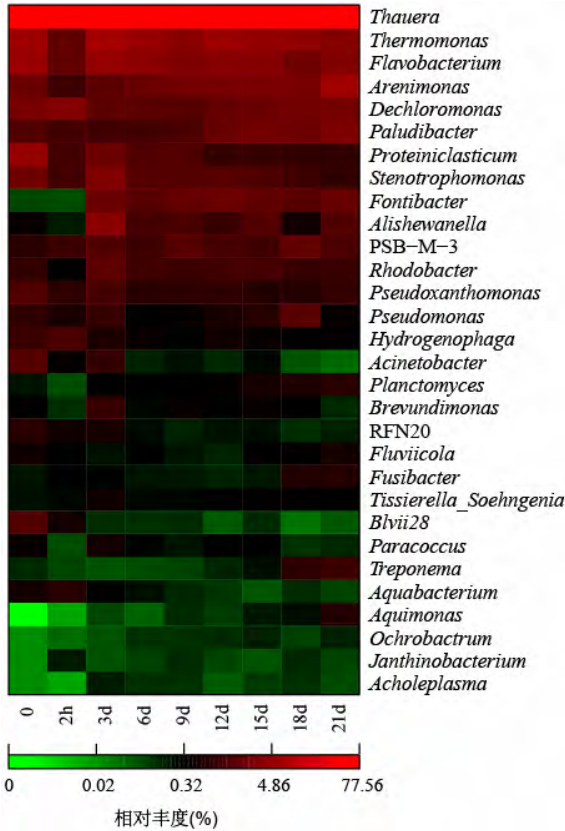


图5 菌属的丰度热图

Fig.5 Heatmap of bacterial community at the genus level

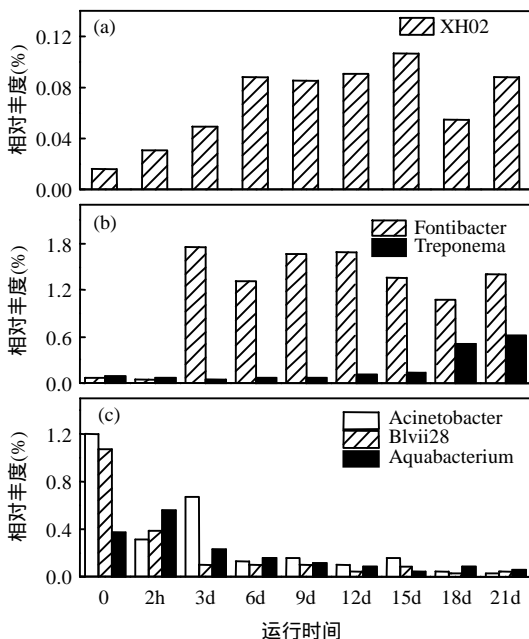


图6 菌属的丰度变化

Fig.6 Abundance variation at the genus level

由图 6(b)可知,XH02 加入反应器后,使得 *Fontibacter*、*Treponema* 的相对丰度随着反应器运行逐渐升高.而图 6(c)中 *Acinetobacter*、*Blvii28* 和 *Aquabacterium* 的相对丰度随着反应器运行逐渐降低.因此,XH02 加入反应器后,与其他菌群竞争外部环境和营养条件,致使某些菌群的丰度升高或降低,随着反应器的持续运行,会形成新的菌群结构.

### 2.5 不同阶段的微生物菌群结构分析

2.5.1 微生物菌群的主成分分析 对反应器运行过程中 9 个污泥样品的 OTU 组成进行主成分分析,通过方差分解,将多组数据的差异反映在 PCA 图上,样本间的分散和聚集可以反映菌群结构的相似程度.菌群结构组成越相似,表现在 PCA 图中的距离越近,反之则越分散.通过主成分分析可以揭示反应器运行过程中不同阶段微生物菌群结构的变化规律<sup>[31-32]</sup>.如图 7 所示,可以明显看出反应器运行 0~3d 内各样品距离较远,说明运行前期反应器中的微生物种类相似度低,可能是因为 XH02 加入后,与反应器中其他菌群发生着强烈的竞争,使得群落结构发生了巨大变化.6~15d 内的 4 个样品距离较近,表明各样品中微生物种类相似度较高,反应器在此段时间内微生物群落结构处于相对稳定的状态,6~15d 与 18~21d 的样品之间有一定的距离,说明反应器运行后期,微生物群落结构有一定的变化,可能是因为产生了新的菌群.因此,可以将反应器运行过程分成 4 个不同的阶段.表明 XH02 菌加入反应器后,菌群结构随着强化的不同时段而改变,更清楚地反映了反应器运行过程中菌群的演替过程.

2.5.2 微生物菌群的聚类分析 微生物菌群变化分析可能由于统计模型的不同而产生差异<sup>[33-34]</sup>,聚类分析能够较好地反映菌群结构变化与反应器运行的联系<sup>[21]</sup>.对 9 个样品检测到的功能基因进行 UPGMA 聚类分析,结果见图 8,由图可知,2h 的菌群在强化初期,处于不稳定的状态;3d 时反应器内菌群竞争激烈,群落结构较之前不同;6~15d 这一阶段各菌群相似性高,聚为一类;18d 和 21d 的菌群相似,较 6~15d 的菌群不同,聚为一类.因此,强化反应器运行过程分为 4 个阶段,分



别为 2h、3d、6~15d 和 18d~21d。表明反应器在不同运行阶段,微生物群落存在着一定的演变关系,经过演替最终会形成较稳定的菌群结构。菌群这一变化情况与主成分分析的结果较为一致。

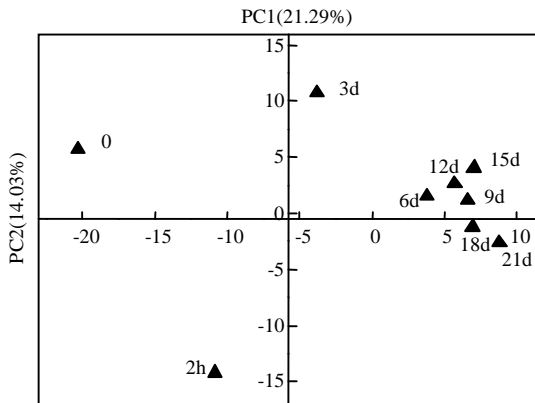


图 7 菌群的主成分分析

Fig.7 Principal component analysis of bacterial community

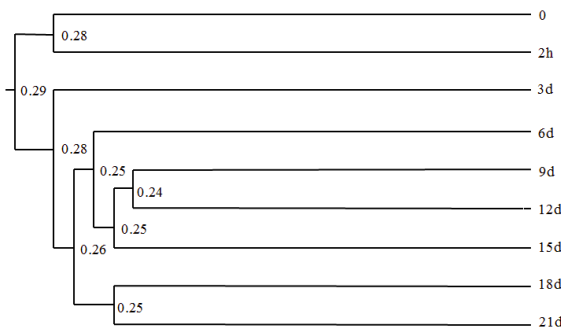


图 8 菌群的 UPGMA 聚类分析

Fig.8 Cluster analysis of bacterial community by UPGMA

### 3 结论

3.1 XH02 菌强化反应器去除有机物和脱氮有较好的效果,TN 和 COD 的去除率分别提高了 15%和 10%以上。

3.2 反应器中微生物菌群在属水平上的相对丰度和多样性变化呈先下降后上升的趋势, *Acinetobacter*、*Blvii28* 和 *Aquabacterium* 菌的相对丰度显著下降,而 *Fontibacter* 和 *Treponema* 菌的相对丰度显著升高,最终形成较稳定的菌群。

3.3 XH02 加入反应器后其相对丰度呈逐渐增加的趋势,后期上下波动,但未成为菌群系统中最优优势的种群。

3.4 主成分分析和 UPGMA 聚类分析大致把反应器运行过程分为 4 个阶段,分别对应于 0~2h、3d、6~15d 和 18~21d。

### 参考文献 :

- [1] Han H J, Li Z K. Effects of macrophyte-associated nitrogen cycling bacteria on ANAMMOX and denitrification in river sediments in the Taihu Lake region of China [J]. Ecological Engineering, 2016,93:82-90.
- [2] Chen J H, Han Y, Wang Y M, et al. Start-up and microbial communities of a simultaneous nitrogen removal system for high salinity and high nitrogen organic wastewater via heterotrophic nitrification [J]. Bioresource Technology, 2016,216:196-202.
- [3] 牟丽婷,黄 钧,苟莎.异养硝化微生物菌剂及其好氧颗粒污泥的脱氮试验 [J]. 应用与环境生物学报, 2009,15(3):356-360.
- [4] 邹艳艳,张 宇,李明智,等.一株异养硝化-好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮活性研究 [J]. 中国环境科学, 2016,36(3):887-893.
- [5] Li H B, Zhou B H, Tian Z Y, et al. Efficient biological nitrogen removal by Johannesburg-Sulfur autotrophic denitrification from low COD/TN ratio municipal wastewater at low temperature [J]. Environmental Earth Sciences, 2015,73(9):5027-5035.
- [6] Brandt F B, Breidenbach B, Brenzinger K, et al. Impact of short-term storage temperature on determination of microbial community composition and abundance in aerated forest soil and anoxic pond sediment samples [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2014,37(8):570-577.
- [7] Otlewska A, Adamiak J, Gutarowska B. Clone-based comparative sequence analysis of 16S rRNA genes retrieved from biodeteriorating brick buildings of the former Auschwitz II-Birkenau concentration and extermination camp [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2015,38(1):48-55.
- [8] Kayako H, Ryoki A, Yutaka N. Change in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge during selective incubation for MPN determination [J]. Journal of Industrial Microbiology&Biotechnology, 2009,36(5):679-685.
- [9] Arcuri E F, El A F, Rychlik T, et al. Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR-DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese [J]. Food Control, 2013,30(1):1-6.
- [10] Ju F, Zhang T. 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015,99(10):4119-4129.
- [11] You J, Wu G, Ren F P, et al. Microbial community dynamics in

- Baolige oilfield during MEOR treatment, revealed by Illumina MiSeq sequencing [J]. *Environmental Biotechnology*, 2016, 100(3):1469-1478.
- [12] Xu N, Tan G C, Wang H Y, et al. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2016,74:1-8.
- [13] Wang Z T, Liu L, Chen Q, et al. Conservation tillage increases soil bacterial diversity in the dryland of northern China [J]. *Research Article*, 2016,36(2):1-9.
- [14] Finley S J, Benbow M E, Javan G T. Potential applications of soil microbial ecology and next-generation sequencing in criminal investigations [J]. *Applied Soil Ecology*, 2015,88:69-78.
- [15] Jiang X B, Shen J Y, Lou S, et al. Comprehensive comparison of bacterial communities in a membrane-free bioelectrochemical system for removing different mononitrophenols from wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2016,216:645-652.
- [16] 李紫惠,曹刚,邵基伦,等.响应面优化好氧反硝化菌的硝化影响因素 [J]. *环境科学与技术*, 2016,39(3):26-32.
- [17] Scollo F, Egea L A, Gentile A, et al. Absolute quantification of olive oil DNA by droplet digital-PCR (ddPCR):Comparison of isolation and amplification methodologies [J]. *Food Chemistry*, 2016,213:388-394.
- [18] Barros M P, Gayeski L M, Tundisi J G. Benthic macroinvertebrate community in the Sinos river drainage basin, Rio Grande do Sul, Brazil [J]. *Brazilian Journal of Biology*, 2016,76(4):942-950.
- [19] 张岩,朱敏,刘焕光,等.利用 RFLP 分析 DO 对附积床系统中 AOB 群落结构的影响 [J]. *中国环境科学*, 2014,34(9):2387-2393.
- [20] 曲洋,张培玉,于德爽,等.异养硝化/好氧反硝化菌生物强化含海水污水的 SBR 短程硝化系统初探 [J]. *环境科学*, 2010, 31(10):2376-2384.
- [21] 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.
- [22] Snaird J, Amann R, Huber I, et al. Phylogenetic analysis and insitu identification of bacteria in activated sludge [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1997,63(7):2884-2896.
- [23] 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.
- [24] Li A J, Yang S F, Li X Y, et al. Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates [J]. *Water Research*, 2008,42(13):3552-3560.
- [25] Chouari R, Le-Paslier D, Daegelen P, et al. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester [J]. *Environmental Microbiology*, 2005,7(8):1104-1115.
- [26] 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.
- [27] Tal Y, Watts J M, Schreiber S B, et al. Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system [J]. *Aquaculture*, 2003,215(1-4):187-202.
- [28] 郑林雪,李军,胡家玮,等.同步硝化反硝化系统中反硝化细菌多样性研究 [J]. *中国环境科学*, 2015,35(1):116-121.
- [29] 黄兴如,张琼琼,张瑞杰,等.再生水补水对河流湿地香蒲根际细菌群落结构影响研究 [J]. *中国环境科学*, 2016,36(2):569-580.
- [30] 张楠,初里冰,丁鹏元,等.A/O 生物膜法强化处理石化废水及生物膜种群结构研究 [J]. *中国环境科学*, 2015,35(1):80-86.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- 作者简介:黄郑郑(1991-),男,河南洛阳人,暨南大学硕士研究生,主要从事污水生物脱氮的相关研究。