

烟气脱硝尾液厌氧氨氧化处理中微生物群落结构分析

李津, 于德爽, 赵丹, 汪晓晨

青岛大学环境科学与工程学院, 山东 青岛 266071

李津, 于德爽, 赵丹, 等. 烟气脱硝尾液厌氧氨氧化处理中微生物群落结构分析. 生物工程学报, 2014, 30(12): 1865-1875.

Li J, Yu DS, Zhao D, et al. Microbial community in the Anammox process of thermal denitration tail liquid. Chin J Biotech, 2014, 30(12): 1865-1875.

摘要: 采用厌氧序批式反应器处理火电厂烟气脱硝尾液并研究厌氧氨氧化微生物群落结构。通过扫描电镜观察发现, 优势菌群为椭圆形的球菌且具有下凹的火山口状, 直径约为 0.7 μm 。通过污泥总 DNA 提取、PCR 扩增、阳性克隆验证和测序等分子生物学手段得到反应器内菌群 16S rRNA 基因序列, 建立系统发育树和克隆文库。结果表明, 在细菌通用引物 27F-1 492R PCR 扩增的体系中, 得到 85 个克隆子, 分为 21 个 OTU, 各菌群所占的比例为: 变形菌门 Proteobacteria: 61.18%; 酸杆菌门 Acidobacteria: 17.65%; 绿菌门 Chlorobi: 8.24%; 绿弯菌门 Chloroflexi: 5.88%; 芽单胞菌门 Gemmatimonadetes: 3.53%; 硝化螺旋菌门 Nitrospirae: 2.35%; 浮酶状菌门 Planctomycetes: 1.18%。而在厌氧氨氧化菌特异引物 pla46rc-630r; AMX368-AMX820 PCR 扩增的体系中有 45 个克隆子, 分为 3 个 OTU, 其中 *Candidatus brocadia* sp. 占有 95.6%, 未知菌种 4.4%。

关键词: 烟气脱硝尾液, 厌氧氨氧化, 16S rDNA 克隆文库, 群落结构, *Candidatus brocadia sinica*

Received: April 3, 2014; **Accepted:** August 13, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 51278258, 51478229), Qingdao Municipal Applied Fundamental Research Program (No. 13-1-4-203-jch).

Corresponding author: Jin Li. Tel: +86-532-85955529; E-mail: ljin0532@126.com

国家自然科学基金 (Nos. 51278258, 51478229), 青岛市应用基础研究项目 (No. 13-1-4-203-jch) 资助。

Microbial community in the Anammox process of thermal denitration tail liquid

Jin Li, Deshuang Yu, Dan Zhao, and Xiaochen Wang

School of Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China

Abstract: An anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) was used to treat thermal denitration tail liquid and microbial community was studied. Activated sludge was taken from the reactor for scanning electron microscope analysis. The images showed that the dominant cells in the flora were oval cocci. Its diameter was about 0.7 μm . Through a series of molecular biology methods such as extracting total DNA from the sludge, PCR amplification, positive clone authentication and sequencing, we obtained the 16S rDNA sequences of the flora. Phylogenetic tree and clone library were established. The universal bacteria primers of 27F-1492R PCR amplification system obtained 85 clones and could be divided into 21 OTUS. The proportions were as follows: Proteobacteria 61.18%; Acidobacteria 17.65%; Chlorobi 8.24%; Chloroflexi 5.88%; Gemmatimonadetes 3.53%; Nitrospirae 2.35% and Planctomycetes 1.18%. The specific anammox bacterial primers of pla46rc-630r and AMX368-AMX820 PCR amplification system obtained 45 clones. They were divided into 3 OTUS. *Candidatus brocadia* sp. occupied 95.6% and unknown strains occupied 4.4%.

Keywords: thermal denitration tail liquid, Anammox, 16S rDNA clone library, molecular community, *Candidatus brocadia sinica*

厌氧氨氧化 (Anammox) 是一个自养过程, 因不需要投加碳源可以节省运行成本^[1-2]。厌氧氨氧化菌属于浮霉状菌目 *Planctomycetales* 的厌氧氨氧化菌科, 该科有 5 个属, 10 个种, 皆为化能自养型厌氧菌并且具有厌氧氨氧化功能^[3]。在这 5 个厌氧氨氧化菌属中当前有 4 个 Anammox 菌属是从活性污泥中得到的, 分别是 “*Kuenenia* sp.”^[4-5], “*Brocadia* sp.”^[6], “*Anammoxoglobus* sp.”^[7]和“*Jettenia* sp.”^[8]。第 5 个厌氧氨氧化菌属“*Candidatus scalindua*”^[9-10]通常可以在自然生境中发现, 尤其是在海底沉积物和海洋最低含氧带。

Anammox 菌形态多样, 呈球形、卵形等, 直径 0.8–1.1 μm ^[11]。该菌是革兰氏阴性菌; 细胞外无荚膜; 细胞壁表面有火山口形状的结构; 少数有菌毛。细胞内分隔成 3 部分: 厌氧氨氧化体 (Anammoxosome)、核糖细胞质 (Riboplasm)

及外室细胞质 (Paryphoplasm)^[12]。

Anammox 菌是一类难培养微生物, 其生长速率较慢, 倍增时间约为 11 d, 采用稀释分离、平板划线分离、显微单细胞分离等传统微生物分离方法均未分离成功^[13]。这为 ANAMMOX 菌的酶学研究以及功能基因研究等带来了不便。然而由于分子生物学技术可以直接从环境样品中提取微生物的总 DNA, 不需要对微生物进行分离培养, 从而成为研究厌氧氨氧化菌的最佳手段, 如多聚酶链式反应 (PCR)、荧光原位杂交 (FISH)、DNA 克隆测序、及梯度凝胶电泳 (DGGE) 等。其中 16S rRNA 基因序列分析技术是分子生态学领域的一项重要技术, 已被广泛用于研究微生物的分类、鉴定以及微生物群落分析, 且在很多方面都取得了显著成果^[14]。

火电厂烟气脱硝尾液具有较高的氨氮浓度 (100–125 mg/L)、较低的 B/C 比 (低于 0.1), 较

高的进水温度 (30–40 °C), 适合于采用 Anammox 工艺脱氮。试验采用 ASBR 反应器研究了火电厂烟气脱硝尾液 Anammox 过程, 经过 228 d 培养及驯化实现了稳定的厌氧氨氧化运行。取少量厌氧氨氧化活性污泥, 通过 DNA 提取、PCR 扩增等一系列分子生物学手段获得反应器内菌群的 16S rRNA 基因序列, 通过构建克隆文库法对反应器内微生物种群进行了多样性分析, 为火电厂烟气脱硝尾液的厌氧氨氧化处理提供指导。

1 材料与方 法

1.1 污泥来源

实验污泥取自水污染控制实验室稳定运行的 ASBR 厌氧氨氧化反应器, 反应器装置如图 1 所示。反应器采用有机玻璃制成, 有效容积 7 L, 反应器外壁采用黑布包裹, 通过水浴加热, 使反应器内温度控制在 35 °C。反应器进水氨氮和亚硝酸盐氮分别为 115 mg/L 和 140 mg/L 左右, 进水 pH 值为 7.5, 水力停留时间为 8 h, 混合液污泥浓度保持在 3 500 mg/L。在此条件下, 反应器对氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别为 91.5%和 97.0%, 脱氮性能良好。其中进出水各项指标如表 1 所示。

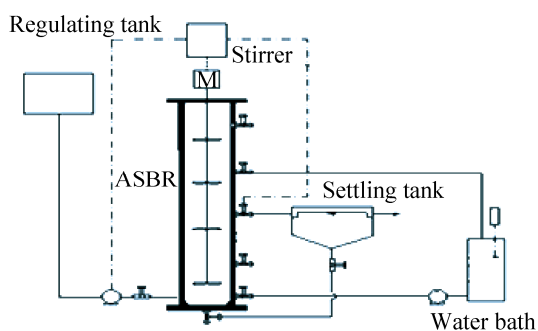


图 1 ASBR 厌氧氨氧化反应器流程图

Fig. 1 Flowchart of ASBR Anammox reactor.

表 1 进出水各项指标

Table 1 Indicators of influent and effluent

Item	NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	COD	C/N
Influent (mg/L)	115.0	140.0	10.5	58	0.22
Effluent (mg/L)	9.8	4.25	29.9	50	1.1

1.2 主要试剂及仪器

WisepinCF-1 离心机; BIO-RAD PCR 扩增仪; DYY-7 型电泳仪; 水浴锅; 台式紫外透射仪; 移液枪; WH-3 型漩涡振荡仪; 微型漩涡混合仪; 低速离心机; 迷你离心机。

MO BIO 土壤 DNA 提取试剂盒 μ 2Taq PCR MasterMix, 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (离心柱型), PMD18-T 载体, 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。核酸染料, MSP, ALU I 限制性内切酶。

引物由上海博尚生物科技有限公司合成, 上游引物 27F, Pla46rc, AMX368; 下游引物 1492R, 630r, AMX820。引物的序列见表 2。

1.3 方法

1.3.1 污泥总细菌 DNA 基因组的提取与 PCR 扩增

污泥总 DNA 基因组的提取按照土壤基因 DNA 提取试剂盒说明书操作, 完成后取 5 μ L 收集好的 DNA 溶液用 1%的琼脂凝胶电泳检测, 其余分装至微量离心管中-20 °C 保存。

表 2 引物序列

Table 2 Sequences of primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')
27F	AGAGTTTGATCCTGGTTCAG
Pla46rc	GGATTAGGCATGCAAGTC
AMX368	TTCGCAATGCCCGAAAGG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT
630r	CAKAAAGGAGGTGATCC
AMX820	A AAACCCCTCTACTTAGTGCC

分别采用细菌通用引物 (27F-1492R) 和厌氧氨氧化特异引物 (pla46rc-630r; AMX368-AMX820) 对污泥样品总 DNA 进行 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增。其中通用引物扩增体系及反应程序如下: 细菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 反应体系 (50 μ L): 1 μ L 引物 27F (10 μ mol/L), 1 μ L 引物 1492R (10 μ mol/L), 25 μ L $2\times$ Taq PCR MasterMix, 2 μ L 细菌 DNA 模板, 适量 ddH₂O 补至 50 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 52 $^{\circ}$ C 复性 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物以普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行纯化。

采用浮霉菌通用引物和细菌通用引物对 pla46rc-630r 及厌氧氨氧化菌特异引物对 AMX368-AMX820 对污泥样品总 DNA 进行巢式 PCR, 首先采用 pla46rc-630r 引物对进行第一轮 PCR 扩增, 将第一轮得到的目的片段条带纯化后再作为模板以引物对 AMX368-AMX820 进行第二轮扩增。PCR 反应体系 (50 μ L): 1 μ L 上游引物 (10 μ mol/L), 1 μ L 下游引物 (10 μ mol/L), 25 μ L $2\times$ Taq PCR MasterMix, 2 μ L 细菌 DNA 模板, 适量 ddH₂O 补至 50 μ L。反应条件^[15-16]: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56 $^{\circ}$ C (第一轮 PCR 扩增) / 52 $^{\circ}$ C (第二轮 PCR 扩增) 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.3.2 PCR 产物的连接与克隆

微量离心管中依次加入: 1 μ L PMD18-T, 2 μ L PCR 纯化产物, 2 μ L ddH₂O, 5 μ L Solution I (EDTA 5g/L, FeSO₄·7H₂O 5g/L), 低速离心后

16 $^{\circ}$ C 反应 16 h。然后全量 (10 μ L) 加入至 50 μ L DH5 α 感受态细胞中冰浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 加热 60 s, 再在冰中放置 1 min, 加入 890 μ L LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 60 min。最后取 50 μ L 上述连接产物涂布至含有 X-gal、IPTG、Amp 的 LB 固体培养基上 37 $^{\circ}$ C 培养 14 h 后进行蓝白筛选, 随即挑选 150 个白色菌株 (细菌通用引物体系挑选 100 个, 厌氧氨氧化特异引物体系挑选 50 个) 接种至 5 mL 含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h。

1.3.3 PCR 法验证阳性克隆及酶切

取 200 μ L 上述菌液进行沸水浴 10 min, 冰浴 5 min 制得 PCR 反应模板。PCR 反应体系 (50 μ L): 1 μ L 引物 M-13-47 (10 μ mol/L), 1 μ L 引物 RV-M (10 μ mol/L), 25 μ L $2\times$ Taq PCR MasterMix, 2 μ L 细菌 DNA 模板, 适量 ddH₂O 补至 50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 32 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

采用 MSP, ALU I 两种限制性内切酶对挑选出的阳性克隆进行酶切反应 (37 $^{\circ}$ C, 2 h), 将两种酶切条带都分别相同的克隆子认定为同一个菌种。酶切结果用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 形态学观察

取样时反应器内污泥总体呈现红褐色, 在取样瓶壁上附着很多红色颗粒污泥, 挑选红色颗粒进行扫描电镜结果如图 2 所示, 颗粒内的菌群为椭圆形球菌聚集体。球形菌具有下凹的火山口状, 直径约为 0.7 μ m, 该结果与多数文献报道的厌氧氨氧化菌呈球形、卵形, 直径在 0.8–1.1 μ m 的十分相似^[17-19]。

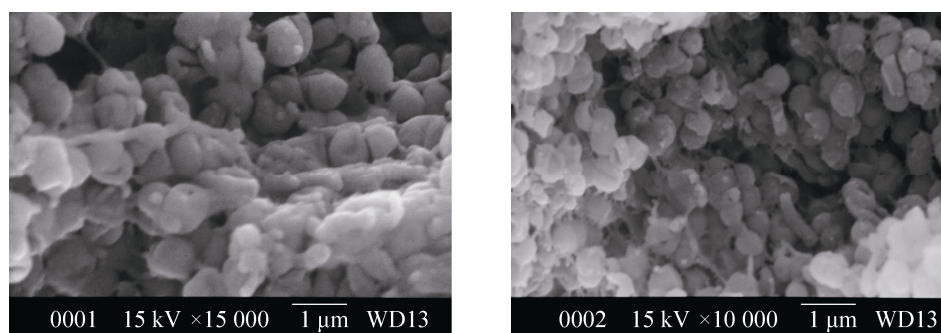


图 2 厌氧氨氧化菌颗粒污泥的扫描电镜照片

Fig. 2 SEM photo of Anammox bacteria granular sludge.

2.2 污泥细菌总 DNA 提取

污泥样品提取的总 DNA 经凝胶电泳检测,测得 DNA 浓度为 $50.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。 $A_{260}/A_{280}=1.619$, 该比值用于评估所提取的 DNA 纯度,一般认为 A_{260}/A_{280} 在 1.8 ± 0.2 范围内说明提取的 DNA 较为纯净,比值过低表示存在蛋白质或者酚类物质的影响。本次总 DNA 该比值为 1.619,说明所提取的 DNA 纯度较高,不需要纯化即可进行后续实验。

2.3 细菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

采用细菌通用引物 27F-1492R,扩增结果产生一条 1 500 bp 左右的条带,与预期结果一致。采用厌氧氨氧化菌特异引物 (pla46rc-630r) 以及 (AMX368-AMX820), 得到目的条带在 500 bp 左右。张亚平等^[20]采用相同引物得到目的片段大小为 470 bp 左右,与本实验结果相似。本研究采用巢式 PCR 对厌氧氨氧化菌进行分子生物学检测,第二轮扩增时上游和下游引物均采用了 Anammox 菌的特异引物,该特异引物可以扩增出不同种类的 Anammox 菌序列^[1,20],从而对反应器内厌氧氨氧化菌的多样性分析更全面。

2.4 克隆文库分析

经过阳性克隆筛选,采用通用引物对

27F-1492R 的 PCR 体系共得到 85 个阳性克隆子,经 *MSP*, *ALU I* 酶切后共得到 30 个酶切类型,每个酶切类型挑选 1-2 个阳性克隆子送去测序,得到 45 个有效序列。去除两端的载体序列,所得序列长度均在 1 400-15 000 bp 之间。将测序得到的序列输入 GenBank 数据库中进行 Blast 同源性比对,寻找相似度最高及具有明确分类地位的已知 16S rRNA 基因序列,将所测序列与已知序列用 Mega 软件进行聚类分析,采用 Neighbor-Joinin 法构建系统发育树,结果如图 3 所示。将序列比对结果与同一个相关序列相似度相同的克隆子定义为一个操作单元 (OTU),共得到 21 个 OTU,建立克隆文库表格如表 3 所示。

通过 Blast 检索发现,目前鉴定的厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因全序列中没有与引物 27F-1492R 相匹配的序列,所以认为引物 27F-1492R 对厌氧氨氧化菌并不具有通用性。文库中主要菌群种类分布在变形菌门 Proteobacteria,酸杆菌门 Acidobacteria,绿菌门 Chlorobi,绿弯菌门 Chloroflexi,芽单胞菌门 Gemmatimonadetes 浮霉状菌门 Planctomycetes 及硝化螺旋菌门 Nitrospirae。

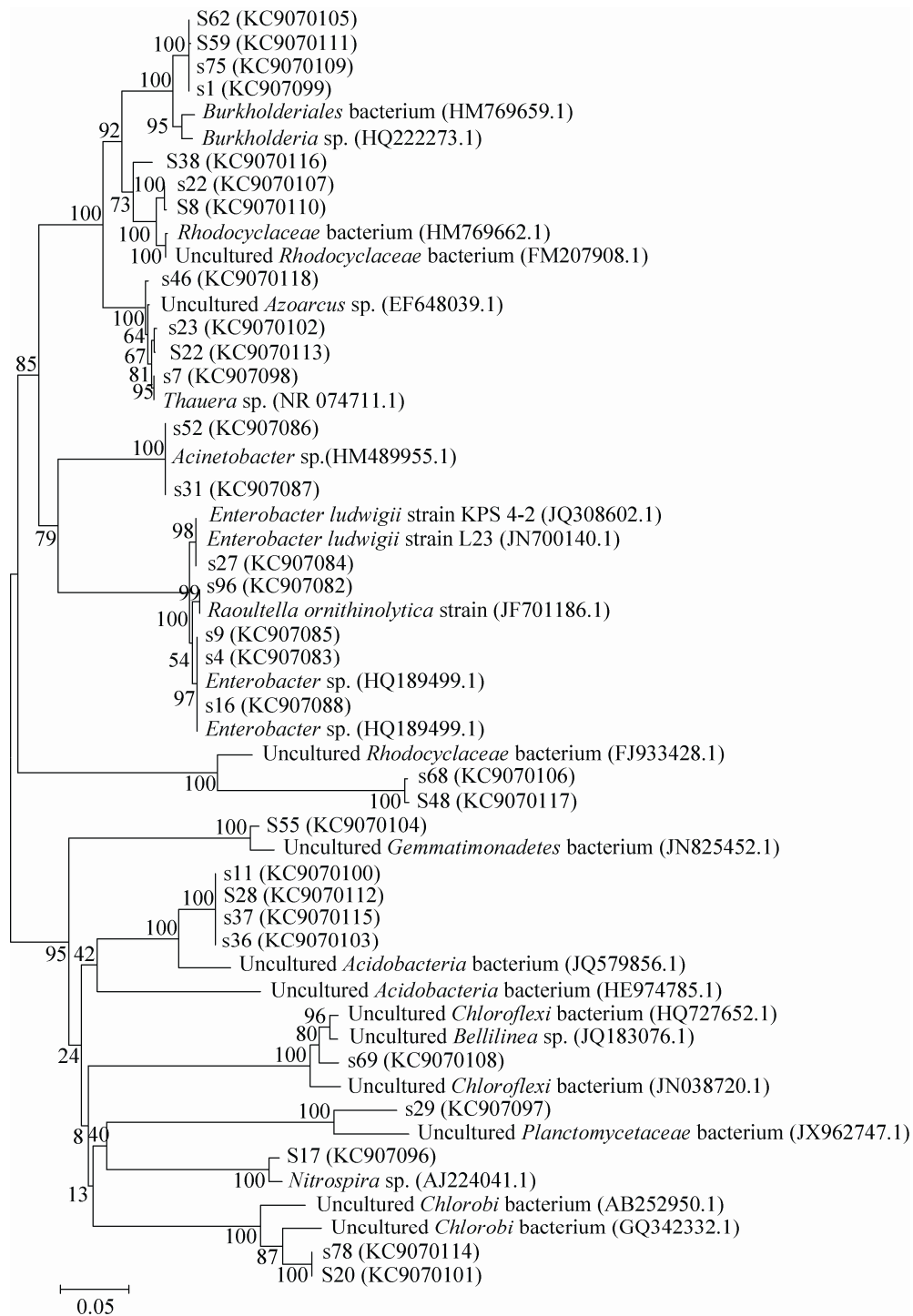


图 3 反应器内细菌克隆的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of bacteria in the reactor.

表 3 27F-1492R 体系 16S rDNA 克隆文库结果

Table 3 16S rDNA clone library results of 27F-1492R system

Population	OTU	Percentage (%)	Most similar bacteria in GenBank	Similarity (%)
<i>Candidatus Brocadia</i>	L50 (26)	57.78	<i>Candidatus Brocadia sinica</i> JPN1 (AB565477.1)	100
	L44 (6), L36 (6)	37.78	<i>Candidatus Brocadia sinica</i> JPN1 (AB565477.1)	99
	L5 (4), L27 (1)			
<i>Planctomycetales bacterium</i>	L31 (1), L16 (1)	4.44	Uncultured <i>Planctomycetales</i> bacterium (JQ919107.1)	95
Total number	3 (45)	100		

其中变形菌门 Proteobacteria 所占的比例最高,共 52 个克隆子,丰度为 61.18%,为样品污泥除厌氧氨氧化菌之外的优势菌群。变形菌门中检测到两个亚纲的菌群, β -Proteobacteria 和 γ -Proteobacteria,其中 β -Proteobacteria 内菌种占变形菌门的 84.62%,是变形菌门中的主要亚纲, γ -Proteobacteria 有 8 个克隆子,占变形菌门的 15.38%。在 β -Proteobacteria 中归属红环菌科 Rhodocyclaceae 的克隆子有 35 个,伯克氏菌科 Burkholderiaceae 有 9 个克隆子。归属 γ -Proteobacteria 的主要菌属有肠杆菌属 *Enterobacter* sp. 和不动杆菌属 *Acinetobacter* sp. 以及 *Raoultella* sp.。

酸杆菌门 Acidobacteria 是反应器内除了变

形菌门的另一大菌群,共有 15 个克隆子占 17.65%的比例。其余菌门按比例依次是绿菌门 Chlorobi 为 8.24%,绿弯菌门 Chloroflexi 为 5.88%,芽单胞菌门 Gemmatimonadetes 为 3.53%,硝化螺旋菌门 Nitrospirae 为 2.35%。浮霉状菌门 Planctomycetes 为 1.18%。

采用厌氧氨氧化菌特异引物 (pla46rc-630r, AMX368-AMX820) 的体系中,共挑选出 45 个阳性克隆,经酶切后共有 7 个酶切类型,每个酶切类型挑选 1-2 个阳性克隆子测序,共得到 9 个有效序列,根据这些序列在 GenBank 中检索结果构建的系统发育树和克隆文库如图 4 和表 4 所示。厌氧氨氧化反应器内主要的厌氧氨氧化菌群分为 3 个 OTU,其中分

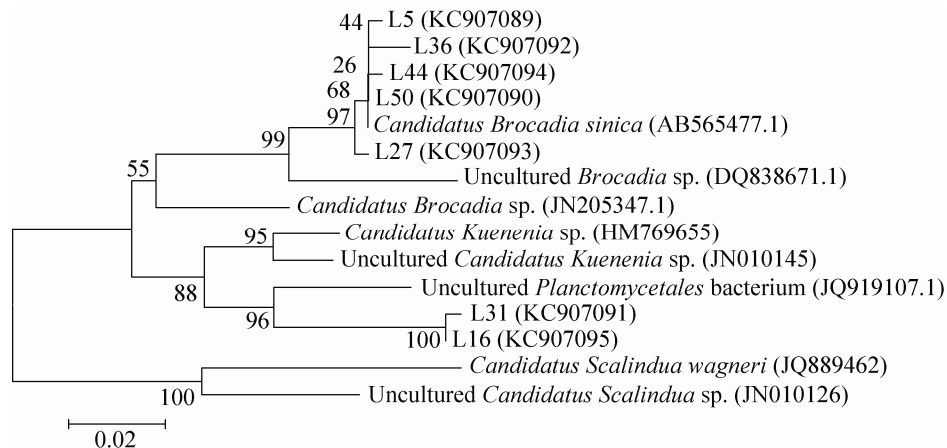


图 4 反应器内厌氧氨氧化菌克隆的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of anaerobic ammonia oxidizing bacteria in the reactor.

表 4 *pla46rc-630r*, AMX368-AMX820 体系 16S rDNA 克隆文库结果Table 4 16S rDNA clone library results of *pla46rc-630r*, AMX368-AMX820 system

Population	OTU	Percentage (%)	Most similar bacteria in GenBank	Similarity (%)
β-Proteobacteria	S22 (5) s8 (3)	9.41	Uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium (FM207908.1)	98
	s38 (7)	8.24	Uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium (FM207908.1)	95
	S68 (2), s48 (1)	3.53	Uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium (FJ933428.1)	96
	s7 (3)	3.53	<i>Thauera</i> sp. (NR_074711.1)	96
	S23 (5) s22 (5)	11.76	<i>Thauera</i> sp. (NR_074711.1)	99
	S46 (4)	4.71	Uncultured <i>Azoarcus</i> sp. (EF648039.1)	99
	S75 (4)	4.71	<i>Burkholderia</i> sp. (HQ222273.1)	96
	s62 (3), s59 (1)	4.71	<i>Burkholderia</i> sp. (HQ222273.1)	97
γ-Proteobacteria	S1 (1)	1.18	<i>Burkholderia</i> sp. (HQ222273.1)	98
	S27 (1)	1.18	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain KPS 4-2 (JQ308602.1)	99
	S96 (1)	1.18	<i>Raoultella ornithinolytica</i> strain TJ_DMFA (JF701186.1)	100
	S52 (1) S31 (2)	3.53	<i>Acinetobacter</i> sp. (HM489955.1)	99
	s4 (1)	1.18	<i>Enterobacter</i> sp. (HQ189499.1)	100
Acidobacteria	s16 (1), s9 (1)	2.35	<i>Enterobacter</i> sp. (HQ189499.1)	99
	S37 (6), s28 (7) s11 (1), s36 (1)	17.65	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium (JQ579856.1)	92
Chlorobi	S78 (6) s20 (1)	8.24	Uncultured <i>Chlorobi</i> bacterium (GQ342332.1)	94
Chloroflexi	s69 (5)	5.88	Uncultured <i>Bellilinea</i> sp. (JQ183076.1)	97
Gemmatimonadetes	s55 (3)	3.53	Uncultured <i>Gemmatimonadetes</i> bacterium (JN825452.1)	98
Nitrospirae	s17 (2)	2.35	<i>Nitrospira</i> sp. (AJ224041.1)	98
Planctomycetes	s29 (1)	1.18	Uncultured <i>Planctomycetaceae</i> bacterium (JX962747.1)	89
Total number	20 (85)	100.00		

布在 *Candidatus Brocadia* sp. 的占 2 个 OTU, 有 43 个克隆子, 占总克隆子数的 95.6%, 与相关序列的相似度分别为 100%和 99%, 说明这 43 个克隆子所代表的菌株基本属于 *Candidatus Brocadia* sp., 其中有 26 个克隆子与 *Candidatus Brocadia sinica* JPN1 同源相似度达 100%, 可以认为反应器内存在的大部分厌氧氨氧化菌属于 *Candidatus Brocadia sinica*。而第 3 个 OTU 克隆

子数为 2 个, 占 4.4%; 与 Uncultured *Planctomycetales* bacterium 的相似度为 95%, 说明这两个菌种可能是尚未被鉴定的菌种。

3 讨论

采用厌氧氨氧化工艺处理烟气脱硝尾液, 反应器内除了厌氧氨氧化菌外还有其他菌群。其中, 变形菌门中的 β-Proteobacteria 菌群占的

比例最大。已有研究表明, β -Proteobacteria 是脱氮活性污泥系统中数量最丰富的优势菌群^[21], 其大多数趋向于在厌氧环境下生存^[22]。本研究发现的 β -Proteobacteria 的菌群主要分布在红环菌目 Rhodocyclales 和伯克氏菌目 Burkholderiales, 这与方芳等^[23]的研究结果类似。本研究的红环菌目 Rhodocyclales 中存在有 *Thauera* sp., 而该菌属属于反硝化细菌^[24-25], 说明反硝化作用也在烟气脱硝尾液的脱氮过程中发挥作用。

除了变形菌门, 反应器内还存在着酸杆菌门、绿菌门、绿弯菌门、芽单胞菌门、浮霉菌门和硝化螺旋菌门。研究表明, 绿弯菌门是厌氧污泥消化器中的主要微生物^[26], 并且厌氧氨氧化系统中存在绿弯菌门细菌对反应器内污泥的颗粒化起到一定的作用^[5,27]。然而本研究中污泥始终呈松散状态, 没有颗粒污泥的形成, 这或许与本研究所采用的烟气脱硝尾液特殊的废水水质有关。

采用厌氧氨氧化工艺处理烟气脱硝尾液, 厌氧氨氧化反应器内 95.6%的厌氧氨氧化菌属于 *Candidatus Brocadia* sp., 其中 57.8%与 *Candidatus Brocadia sinica* 的同源相似性达 100%。有研究表明, 在某一特定的生长环境中, 厌氧氨氧化菌的生物多样性较低, 通常只有一个种属的厌氧氨氧化细菌占据优势^[7,28], 每种厌氧氨氧化菌都有特定的生存环境。*Candidatus Brocadia sinica* 更适合处理烟气脱硝尾液。

4 结论

采用 ASBR 反应器处理火电厂烟气脱硝尾液并研究了 Anammox 微生物群落结构。通过扫

描电镜观察发现, 优势菌群为椭圆形的球菌且具有下凹的火山口状, 直径约为 0.7 μm 。通过构建克隆文库发现厌氧氨氧化反应器内 95.6%的厌氧氨氧化菌属于 *Candidatus Brocadia* sp., *Candidatus Brocadia sinica* 更适合处理烟气脱硝尾液。反应器内除了厌氧氨氧化菌外还有其他菌群, 其中变形菌门中的 β -Proteobacteria 菌群占的比例最大, 反硝化作用也在烟气脱硝尾液的脱氮过程中发挥作用。

REFERENCES

- [1] van de Graff AA, Mulder A, de Bruijn P, et al. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microb*, 1995, 61(4): 1246-1251.
- [2] Abma WR, Schultz CE, Mulder JW, et al. Full-scale granular sludge anammox process. *Water Sci Technol*, 2007, 55: 27-33.
- [3] Starr MP, Schmidt JM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer, 1995: 56-57.
- [4] Schmid M, Twachtmann U, Klein M, et al. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol*, 2000, 23(1): 93-106.
- [5] Strous M, Pelletier E, Mangenot S, et al. Deciphering the evolution and metabolism of an ANAMMOX bacterium from a community genome. *Nature*, 2006, 440(6): 790-794.
- [6] Kuenen JG, Jetten MSM. Extraordinary anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microb*, 2001, 67: 456-463.
- [7] Kartal B, Rattray J, van Niftrik LA, et al. *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new

- propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol*, 2007, 30(1): 39–49.
- [8] Quan ZX, Rhee SK, Zuo JE, et al. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environ Microb*, 2008, 10(11): 3130–3139.
- [9] Kuypers MMM, Slikers AO, Lavik G, et al. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 2003, 422: 608–611.
- [10] Schmidt I, Slikers O, Schmid M, et al. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27(4): 481–492.
- [11] van Niftrik L, Geerts WJC, van Donselaar EG, et al. Linking ultrastructure and function in four genera of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: cell plan, glycogen storage, and localization of cytochrome c proteins. *J Bacteriol*, 2008, 190(2): 708–717.
- [12] van Niftrik LA, Fuerst JA, Damste JS, et al. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 233(1): 7–13.
- [13] Strous M, Heijnen JJ, Kuenen JG, et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganism. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 50: 589–596.
- [14] Tan FX, Ye C. Molecular identification of 2 strains of Amromonas based on 16S rDNA sequence. *J Yangtze Univ*, 2011, 8(7): 257–262 (in Chinese).
谭凤霞, 叶聪. 基于16S rDNA序列的2株单胞菌属细菌的分子鉴定. *长江大学学报*, 2007, 8(7): 257–262.
- [15] Shen LD, Hu BL, Zheng P, et al. Molecular detection of anammox bacteria in the sediment of West Lake, Hangzhou. *Acta Sci Circum*, 2011, 31(8): 1609–1615 (in Chinese).
沈李东, 胡宝兰, 郑平, 等. 西湖底泥中厌氧氨氧化菌的分子生物学检测. *环境科学学报*, 2011, 31(8): 1609–1615.
- [16] Fan GN, Zhu GB, Wang Y, et al. New functional microorganisms in nitrogen cycle restoration of river riparian ecosystems. *Acta Sci Circum*, 2010, 30 (8) : 1558–1563 (in Chinese).
范改娜, 祝贵兵, 王雨, 等. 河流湿地氮循环修复过程中的新型功能微生物. *环境科学学报*, 2010, 30(8): 1558–1563.
- [17] Dalsgaard T, Canfield DE, Petersen J, et al. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*, 2003, 422(6932): 606–608.
- [18] Jetten M, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, et al. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, 22(6): 421–437.
- [19] Egli K, Bosshard F, Werlen C, et al. Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic Carbon. *Microb Ecol*, 2003, 45(4): 419–432.
- [20] Zhang YP, Luan XH. Molecular evidence for ammonia oxidation bacteria in the sediments of shallow lake: A case study in Yangcheng Lake. *Acta Sci Circum*, 2012, 32(1): 182–189 (in Chinese).
张亚平, 阮晓红. 浅水湖泊(阳澄湖)沉积物氨氧化菌的分子证据. *环境科学学报*, 2012, 32(1): 182–189.
- [21] Lee HW, Lee SY, Lee JW, et al. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microb Ecol*, 2002, 41(2): 85–94.

- [22] Tao TS, Yang RF, Dong XZ, et al. Systematics of prokaryotes. Beijing: Chemistry Industry Press, 2007: 97–99 (in Chinese).
陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠, 等. 原核生物系统学. 北京: 化学工业出版社, 2007: 97–99.
- [23] Fang F, Wang SM, Feng CJ, et al. Community structure of denitrifying bacteria in a hybrid AS-biofilm process under aerobic condition. *Chin J Ecol*, 2011, 30(3): 430–437 (in Chinese).
方芳, 王淑梅, 冯翠杰, 等. 好氧条件下复合生物膜-活性污泥反应器中的反硝化菌群结构. *生态学杂志*, 2011, 30(3): 430–437.
- [24] Wang YH, Ma XY, Liu CF, et al. The bacterial diversity in biofilms associated with media of anammox bioreactors. *J Dalian Ocean Univ*, 2011, 26(6): 500–506.
王银华, 马欣悦, 刘长发, 等. 厌氧氨氧化反应器载体生物膜细菌多样性的研究. *大连海洋大学学报*, 2011, 26(6): 500–506.
- [25] Liu B, Zhang F, Feng X, et al. *Thauera* and *Azoarcus* functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison. *FEMS Microb Ecol*, 2006, 55(2): 274–286 .
- [26] Rivière D, Desvignes V, Pelletier E, et al. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J*, 2009, 3(6): 700–714 .
- [27] Li XR, Du B, Fu HX, et al. The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMMOX) reactor community. *Syst Appl Microbiol*, 2009, 32(4): 278–289.
- [28] van de Vossenberg J, Rattray JE, Geerts W, et al. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production. *Environ Microb*, 2008, 10(11): 3120–3129 .

(本文责编 郝丽芳)