

## 生物膜法强化净化氨氮污染水体及其微生物群落解析

吕鹏翼<sup>1</sup> 罗金学<sup>2</sup> 韩振飞<sup>1</sup> 黄占斌<sup>1\*</sup>

(1. 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院 北京 100083)

(2. 中国科学院生态环境研究中心 中国科学院环境生物技术重点实验室 北京 100085)

**摘要:**【目的】比较不同营养条件及挂膜方式下生物膜法对氨氮污染水体的净化效果及其功能微生物群落结构。【方法】设置空白(Blank)、自然成膜(Raw)、预附脱氮菌强化挂膜(PCC) 3 组生物膜反应器, 利用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术和非度量多维标度(NMDS)分析方法对生物膜反应器转化氨氮过程中微生物群落结构及其演替过程进行动态解析。【结果】在 C/N=1:1 时, 除 PCC 在起始阶段短暂具有较高的氨氮脱除效率外, Blank、Raw 和 PCC 最终均表现出较低的氨氮转化效率(10%–20%)。改变 C/N=2:1 后, Raw 和 PCC 对人工合成污水中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的转化率均提高至 95%以上, 而且 Raw 与 PCC 的群落结构在 C/N=2:1 时具有较高的相似性, 优势菌群主要为  $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、放线菌纲(Actinobacteria)和硝化螺菌纲(Nitrospira)。【结论】C/N 是影响生物膜反应器氨氮去除效果及驱动生物膜反应器中细菌群落结构发生改变的重要因子。

**关键词:** 生物膜强化净化, T-RFLP, 微生物群落, 氨氧化, 异养硝化

## Purification of ammonia-polluted water through biofilm augmentation: operating conditions and key microbial community

LÜ Peng-Yi<sup>1</sup> LUO Jin-Xue<sup>2</sup> HAN Zhen-Fei<sup>1</sup> HUANG Zhan-Bin<sup>1\*</sup>

(1. School of Chemical & Environmental Engineering, China University of Mining & Technology (Beijing), Beijing 100083, China)

(2. CAS Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

**Abstract:** [Objective] We compared the effect of nutritional conditions and start-up method on the biofilm augmented purification performance of ammonia-polluted water and the microbial community structures. [Methods] The effect of ammonia removal was tested in three lab-scale reactors, including control reactor (Blank), biofilm reactor with the raw carrier (Raw) and biofilm reactor with the

**Foundation item:** Major Science and Technology Program for Water Pollution Control and Treatment of China (No. 2014ZX07204-005); Key Program of the Chinese Academy of Sciences (No. ZDRW-ZS-2016-5)

\*Corresponding author: Tel: 86-10-82376357; E-mail: zbhuang2003@163.com

Received: February 14, 2017; Accepted: April 11, 2017; Published online (www.cnki.net): April 20, 2017

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项项目(No. 2014ZX07204-005); 中国科学院重点部署项目(No. ZDRW-ZS-2016-5)

\*通讯作者: Tel: 86-10-82376357; E-mail: zbhuang2003@163.com

收稿日期: 2017-02-14; 接受日期: 2017-04-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-04-20

functional bacteria-immobilized carrier (PCC). The microbial community structures were assessed by terminal restriction fragment length polymorphism and the succession process of community was analyzed using the plot of nonmetric multidimensional scaling. **[Results]** When the C/N ratio was kept at 1:1 for 25 days, the ammonia removal efficiency was only 10%–20% for all the reactors, except for that the PCC showed a temporary high efficiency in the first 5 days. However, the ammonia removal efficiencies of both the Raw and PCC were higher than 95% when the C/N ratio was adjusted to 2:1. The NMDS results showed that the microbial structures of Raw and PCC had high similarity when the C/N was 2:1, and the dominant bacteria were composed of Gammaproteobacteria, Actinobacteria and Nitrospira. **[Conclusion]** The C/N ratio is not only a key factor impacting on the ammonia removal efficiencies of biofilm augmentation but also a driving force for the shifts of microbial community structures in the biofilm reactors.

**Keywords:** Biofilm augmentation, T-RFLP, Microbial community, Ammonia oxidation, Heterotrophic nitrification

近年来,地表水体中氨氮浓度远超出受纳水体的自净能力,已成为我国水环境保护面临的一大难题。环境保护部公布的2016年上半年地表水环境质量状况显示,全国地表水环境质量监测网1 907个断面中,劣V类断面所占比例为10.5%,其中,氨氮为主要污染指标之一。依据2015年《环境统计年报》,我国水环境中氨氮排放源主要为城镇生活污水(70.12%)、农业面源污染(24.93%)、集中式治理设施排放(3.09%)及工业废水点源污染(1.86%)。水体中氨氮污染不仅会引起富营养化等一系列环境问题<sup>[1]</sup>,同时也是威胁人类健康的一大隐患<sup>[2]</sup>。

生物膜技术以其修复时间短、净化效果好等优势逐步成为原位修复的研究热点<sup>[3]</sup>。当前应用生物膜技术原位修复污染水体在我国已有一定的研究基础<sup>[4-6]</sup>,但是关于预固定脱氮菌的生物膜技术在污染水体处理中的应用及生物膜技术修复过程中微生物群落多样性的研究鲜有报道。在原位修复过程中由于各环境因素的制约,在实际应用前进行小试研究,衡量生物修复技术的可行性不可或缺。末端限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)是通过将荧光标记的PCR扩增产物进行限制性酶切后,通过荧光检测得到限制性末端片段(T-RFs)<sup>[7]</sup>。理论上每一种菌对应一个T-RF,一个T-RF可认为是一个操

作分类单元(OTU),每个T-RF的相对峰面积代表该T-RF的相对数量,通过与相应数据库分析可获得T-RF对应的菌种信息,因此可以根据T-RFs的多样性对细菌群落结构快速进行初步的定量、定性分析<sup>[8]</sup>。

本研究以自然成膜的生物膜反应器和预固定脱氮菌的生物膜反应器为研究对象,考察不同营养条件下两种挂膜方式的生物膜反应器的脱氮效果,研究附菌强化挂膜技术的可行性,并基于T-RFLP技术获得的大量T-RFs对不同挂膜方式的成膜过程及微生物群落组成进行考察,以期原位生物膜修复技术的应用提供一种新的思路及理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

**1.1.1 主要试剂:** T-RFLP所用引物27F-FAM(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'),北京睿博兴科生物技术有限公司;2×Taq PCR Master Mix,北京博迈德基因技术有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒,OMEGA Bio-Tek公司;限制性内切酶Rsa I,NEB公司。

**1.1.2 主要仪器:** PCR仪,德国Eppendorf公司;凝胶成像仪,美国Bio-Rad公司;NanoDrop分光光度计,美国Thermo Scientific公司。

## 1.2 生物膜反应器模拟装置

设置 3 组对照实验, (1) 空白组(Blank): 未安装空载填料, 未添加菌剂; (2) 自然成膜组(Raw): 安装填料, 未附菌; (3) 预附脱氮菌强化挂膜组(PCC): 安装填料并预附脱氮副球菌 *Paracoccus denitrificans* PD1222。载体填料为生物膜接触氧化的核心构件, 实验填料选用绳索状聚丙烯纤维, 其比表面积为  $2\ 580\ \text{m}^2/\text{m}^3$ 。启动前, 分别将空载的聚丙烯纤维填料和附菌的填料垂直于水体进行排布, 填料纤维绳浸没并悬浮于水体中, 同时在填料纤维绳悬浮端底布设置曝气点进

行人工曝气。每个反应器的有效容积为 50 L; 3 个反应器底部均铺设厚度约为 1–2 cm 的底泥, 反应器初始水体及底泥取自于凉水河小红门污水处理厂出水口下游 500 m 处, 实验前在实验室条件下驯化 30 d。反应器进水为人工合成污水, 氨氮含量为 5 mg/L。污水在蠕动泵作用下进入 3 个反应器, Raw 与 PCC 中污水经生物膜处理后排出, 模拟装置如图 1 所示。在不同 C/N 条件下反应器以连续流方式连续运行 60 d, 其中 1–25 d 的 C/N=1:1 (5 mg/L TOC : 5 mg/L  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ), 26–60 d 的 C/N=2:1 (10 mg/L TOC : 5 mg/L  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ); 整个运行过程中反应器水力

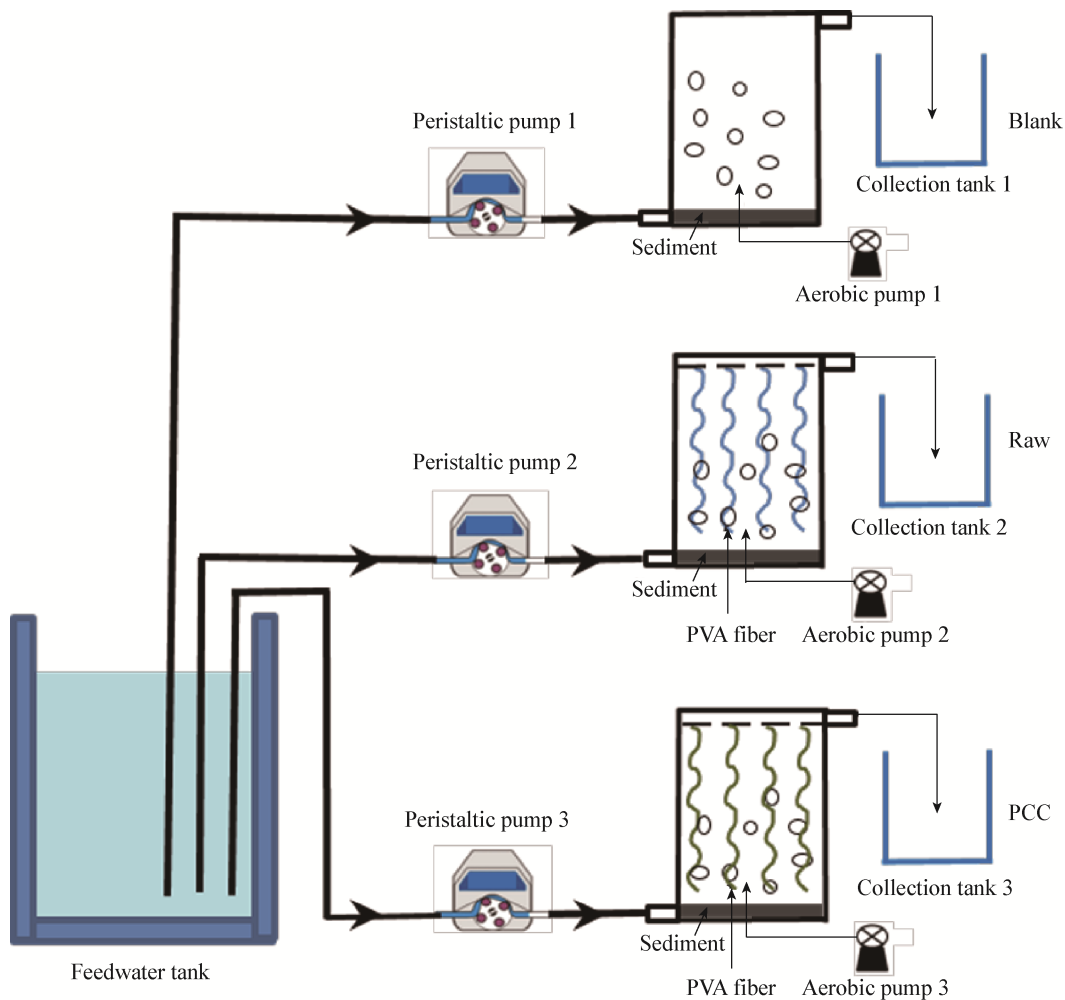


图 1 生物膜反应器模拟示意图

Figure 1 Simulation diagram of the biofilm reactors

注: Blank: 空白组反应器; Raw: 自然成膜反应器; PCC: 预附脱氮菌强化挂膜反应器。

Note: Blank: The control reactor; Raw: The biofilm reactor with the raw carrier; PCC: The biofilm reactor with the functional bacteria-immobilized carrier.

停留时间(HRT)均为 21.6 h, 溶解氧(DO)控制在 3–5 mg/L, pH 波动范围为 7.0–8.0。实时监测反应器对氨氮、硝态氮、亚硝态氮的消减情况, 比较生物膜反应器(Raw、PCC)与水体自净(Blank)对含氮污水的处理能力。

### 1.3 样品采集及处理

在反应器整个运行过程中共取样 5 次, 采样位点为反应器的水体和生物膜, 每个位点均取 3 个平行样品。水样从反应器出水口取水 1 L, 用 0.45 μm 水系微孔滤膜过滤收集水体中菌体; 生物膜样直接从成膜的载体填料上获取。分别在第 1、8、16 天(C/N=1:1)及第 30、60 天(C/N=2:1)时采集样品提取 DNA。

### 1.4 样品总 DNA 提取

样品中微生物总 DNA 用 CTAB-PEG 方法提取<sup>[9-10]</sup>。用 NanoDrop 分光光度计测定各样品 DNA 浓度及提取质量, DNA 样品  $A_{260}/A_{280}$  比值均在 1.8–2.0 范围内,  $A_{260}/A_{230}$  比值均在 1.9–2.1 范围内, 表明提取的 DNA 质量较高。DNA 样品于–80 °C 保存。

### 1.5 T-RFLP 分析

**1.5.1 目的片段 16S rRNA 基因 PCR:** 选择具有荧光标记的引物 27F-FAM 和 1492R 对 16S rRNA 基因进行特异性扩增<sup>[11]</sup>。50 μL PCR 反应体系: 2×Taq PCR Master Mix (不含染料) 25 μL, 27F-FAM (10 μmol/L) 1 μL, 1492R (10 μmol/L) 1 μL, DNA 模板(10 mg/L) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 22 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。使用 OMEGA 琼脂糖凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行切胶回收。

**1.5.2 PCR 产物限制性酶切:** 选用识别位点为 4 个碱基(5'-GTAC-3')的限制性内切酶 *Rsa* I 对纯化的 PCR 产物进行酶切。酶切消化反应体系(20 μL): 10×NEB buffer 2 μL, *Rsa* I (10 units/μL) 0.5 μL, PCR 纯化产物 15 μL, ddH<sub>2</sub>O 2.5 μL。37 °C 酶切 4 h。利用凝胶电泳成像验证酶切片段质量, 将酶

切产物经过毛细管电泳检测分析得到 T-RFLP 图谱。酶切产物由北京睿博兴科生物技术有限公司进行基因扫描(Gene scan)。

### 1.6 数据分析

T-RFLP 图谱用 Gene marker V 2.2.0 软件(Soft Genetics, USA)进行处理, 内标选择 GS1200LIZ, 分析片段长度范围设置为 60–1 000 bp, 去掉相对丰度小于 1%的 T-RFs<sup>[12]</sup>。将通过 T-RFLP 分析所得的 T-RFs 与微生物群落分析数据库 MiCA 进行在线比对(<http://mica.ibest.uidaho.edu/>), 得出 T-RFs 可能代表的菌群<sup>[13]</sup>。

考察一个群落或生境中物种多样性一般从物种丰富度(Species richness)和均匀度(Evenness)进行综合评估<sup>[14]</sup>。(1) *S* 代表直观可统计的物种数(The observed species numbers)<sup>[14]</sup>。(2) 香农指数(Shannon index, *H'*)<sup>[15]</sup>反映了一个群落物种的多样性程度, 其数值越大代表该群落物种多样性越高, 香农指数对物种的丰富度更为敏感。(3) 均匀度指数(Pielou's evenness index, *J'*)<sup>[16]</sup>用于评估一个群落中各物种数目分配的均匀程度。多样性指数采用 Primer 6.0 软件分析。

香农指数计算公式:

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i。$$

均匀度指数计算公式:

$$J' = \frac{H'}{\ln S}。$$

$P_i$  为种 *i* 的个体数在群落总个体数中所占的比例, *S* 为总物种数。

不同反应器不同生态位微生物群落动态变化过程主要用 NMDS 展示, 由 Primer 6.0 完成。群落间的相似性用 Bray-Curtis 指数表征<sup>[17]</sup>。不同群落之间的差异性分析通过 Primer 6.0 中的“SIMPER”命令完成<sup>[17]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物膜反应器对氨氮的去除效果

各反应器连续运行期间氨氮消减变化如图 2 所

示。反应器运行初期(1-10 d), Blank 和 Raw 的氨氮去除率分别为 0-5%和 0-10%, PCC 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除率逐渐升高, 在第 5 天时达到最高为 70%, 此时填料上所附的 *Paracoccus denitrificans* PD1222 (异养硝化-好氧反硝化模式菌株)起主要的作用。11-25 d 运行过程中, Blank、Raw 和 PCC 三组反应器的氨氮去除率均在 13%-18%范围内。第 25 天提高碳氮比后, 3 组反应器氨氮去除率不同程度提高, C/N 由 1:1 改为 2:1 反应器运行 24 h 后 Blank、Raw 和 PCC 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除率分别为 37.81%、82.83%和 66.63%。随着微生物生物量增大及生物膜的成熟, 在第 46 天时 Blank 的氨氮去除率为 90%, 达到《地表水环境质量标准(GB 3838-2002)》II 类水质(0.5 mg/L)标准, 而两个挂膜反应器 Raw 与 PCC 仅在运行第 29 天时即达到相同处理效果, 此时的硝化作用可能主要由异养微生物主导。由运行结果可知生物膜反应器具有较好的氨氮转化性能, 且相比于水体自净(Blank)大大缩短了, 达到同一处理效率的时间。反应器运行稳定后 Raw 与 PCC 的氨氮转化率均达到 95%以上, 生物膜的处理能力可能超过了污染负荷; 同时应注意到运行后期 Blank 同样具有较高的氨氮转化率, 推测原因可能是实验的 HRT 较长, 导致 Blank 中功能微生物生物量的累积达到了可以处理进水中的氨态氮的浓度。在整个运行过程中随着  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除

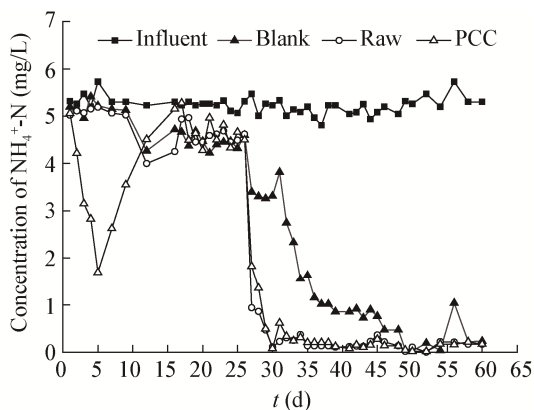


图 2 生物膜反应器运行过程中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  消减情况  
Figure 2 The variation of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  concentration during the operation of the biofilm reactors

$\text{NO}_3^-\text{-N}$  有一定程度的积累,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  无显著累积。

## 2.2 生物膜反应器中微生物 T-RFLP 图谱分析

基于 T-RFLP 结果对 3 个反应器中细菌群落结构进行分析。不同运行条件下 3 个反应器水体中共检测到优势片段 17 个, Raw 和 PCC 的生物膜中共检测到优势片段 19 个(表 1)。不同碳氮比条件下不同生态位(水体与生物膜)细菌群落结构差异性较大。将 T-RFLP 分析所得的 22 个 T-RFs 与 MiCA 平台的细菌 16S rRNA 基因 RDP 数据库比对(表 1), 结果表明在 3 个反应器中门水平上的细菌主要有变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、浮霉菌门(Planctomycetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)及芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)。

## 2.3 不同 C/N 条件下微生物 $\alpha$ 多样性分析

微生物多样性指数从不同角度反映了微生物群落结构的多样性。改变 C/N 后, 3 组反应器水体和生物膜中微生物群落结构均发生了显著变化(表 2)。(1) 物种数  $S$ 。高碳氮比条件(C/N=2:1)下 3 个反应器水体中物种数目均显著降低。反应器水体中的微生物主要来自于凉水河的水体和底泥, 反应器水体中物种丰度减少可能是由于某些土著微生物不适应反应器中的生态环境从而被适应性更强的微生物所演替。此外, 相比于浮游状态微生物更易在载体上富集形成生物膜, 因此 Raw 与 PCC 水体中微生物种类减少也可能是部分易成膜微生物倾向于定殖于载体填料, 该结果与香农指数  $H'$  相一致。(2) 香农指数  $H'$ 。富营养条件(C/N=2:1)下 RB (Raw biofilm)和 PB (PCC biofilm)的香农指数显著上升, 表明生物膜中微生物种类更为丰富, 更多的微生物吸附定殖于载体填料。(3) 均匀度  $J'$ 。PB 在寡营养条件(C/N=1:1)下物种均匀度指数范围为 0.5-0.6, 富营养条件下物种均匀度指数范围为 0.8-0.9, PB 中优势微生物由单一的 *Paracoccus denitrificans* PD1222 演变成多种优势物种共存, 表明填料表面预固定的外源微生物的生长受到了土著微生物物种的竞争性抑制。

表 1 T-RFs 比对结果  
Table 1 The comparison results of T-RFs

T-RFs 长度 T-RFs length (bp)	相似菌株 The similar strain	NCBI 登录号 NCBI accession No.	门水平分类 Phylum level classification
67 <sup>a&amp;b</sup>	Micromonosporaceae bacterium YIM 65646	GU367156	Actinobacteria
114 <sup>a&amp;b</sup>	Uncultured <i>Planctomyces</i> sp. A05-07C	FJ542858	Planctomycetes
116 <sup>a&amp;b</sup>	Uncultured <i>Xanthobacter</i> sp. A03-02E	FJ542831	Proteobacteria
122 <sup>a&amp;b</sup>	Uncultured Hydrogenophilaceae bacterium	EU266782	Proteobacteria
149 <sup>a</sup>	Uncultured <i>Gemmatimonas</i> sp. X-18	HQ132388	Gemmatimonadetes
415 <sup>a&amp;b</sup>	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium XA2A0	FJ269265	Acidobacteria
420 <sup>b</sup>	<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	CP000489	Proteobacteria
423 <sup>a&amp;b</sup>	<i>Rhodobacter</i> sp. TCRI	AB017798	Proteobacteria
426 <sup>a&amp;b</sup>	Uncultured Comamonadaceae bacterium D2514	EU266893	Proteobacteria
447 <sup>b</sup>	<i>Brevibacillus</i> sp. AV-Pb	AJ457160	Firmicutes
463 <sup>a&amp;b</sup>	Uncultured Nitrospiraceae bacterium D2514	EU266889	Nitrospirae
467 <sup>a&amp;b</sup>	Uncultured Rhodocyclaceae bacterium 48	HQ184352	Proteobacteria
472 <sup>a&amp;b</sup>	Burkholderiaceae bacterium KVD-1982-1	DQ490286	Proteobacteria
482 <sup>b</sup>	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-3	AB039330	Proteobacteria
564 <sup>a</sup>	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. AS-43	AJ391204	Proteobacteria
635 <sup>a</sup>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> TB36	AM283534	Actinobacteria
641 <sup>a</sup>	Uncultured Pseudomonadaceae bacterium B02-07B	FJ542959	Proteobacteria
744 <sup>a&amp;b</sup>	<i>Acinetobacter</i> sp. BD189	HM120259	Proteobacteria
821 <sup>a&amp;b</sup>	<i>Rhizobium</i> sp. TJ171	AJ505298	Proteobacteria
860 <sup>a</sup>	<i>Corynebacterium</i> sp. ATCC 43833	AF262996	Actinobacteria
867 <sup>a&amp;b</sup>	<i>Allochroamium vinosum</i> DSM 180	CP001896	Proteobacteria
874 <sup>a&amp;b</sup>	<i>Pseudomonas</i> sp. JT08	AB554725	Proteobacteria

注：<sup>a</sup>：存在于水体中的限制性末端片段；<sup>b</sup>：存在于生物膜中的限制性末端片段；<sup>a&b</sup>：水体和生物膜中均存在的限制性末端片段。

Note: <sup>a</sup>: T-RFs in water samples; <sup>b</sup>: T-RFs in biofilm samples; <sup>a&b</sup>: T-RFs both in water and biofilm samples.

## 2.4 C/N 对水体中浮游微生物群落结构的影响

理论上不同营养条件下同一反应器中微生物群落结构不同，为更好地解析 3 组反应器在不同碳氮比环境下水体中微生物种群演变过程，依据 Bray-curtis 相似性(Bray-curtis similarity)计算不同组间微生物群落的差异度，并根据不同水样中 T-RFs 的峰面积进行 NMDS 分析。

NMDS 表明不同碳氮比条件下 3 个反应器中微生物群落组成差异较大(图 3 和图 4)。初始运行阶段 BW、RW 及 PW 中的微生物群落构成相差不大，均主要来自经过驯化的凉水河水体和底泥，典型优势片段主要有 472、423、122、116、467 bp 等。第 1 天样品组 BW-1 和 RW-1、BW-1 和 PW-1、RW-1 和 PW-1 之间的差异度分别为 8.89%、12.34%、10.60%。在第 25 天将 C/N 由 1:1 改为 2:1

后 3 个反应器水体中微生物种群结构开始发生显著变化(图 3)，67、463、744、821、874 bp 等 T-RFs 开始富集。30 d 时样品组 BW-30 和 RW-30、BW-30 和 PW-30、RW-30 和 PW-30 的差异度相比于第 1 天时均显著增大，分别为 33.06%、44.52%、27.65%，相较于空白组，自然成膜的生物膜反应器和预固定脱氮菌的生物膜反应器相似度更高，说明空白组比挂膜组水体中的微生物群落变动性更大。第 60 天时样品组 BW-60 和 RW-60、BW-60 和 PW-60、RW-60 和 PW-60 之间的差异度分别为 21.52%、37.90%、22.70%，此时反应器运行稳定，相较于第 30 天时 3 个反应器水体中微生物群落结构差异显著性降低，差异性最大的是 BW-60 和 PW-60，可能是因为 PCC 填料中最初所附的 *Paracoccus denitrificans* PD1222 对 PW 中的微生物

群落组成有一定影响。此外, *P. denitrificans* PD1222 所对应的片段长度为 420 bp, 但是在整个运行过程中 *P. denitrificans* PD1222 并未在 PW 中富集, 该结果说明在生物修复中单纯的应用外源纯菌难以形成优势菌<sup>[18]</sup>。

表 2 生物膜反应器中的细菌多样性指数			
Table 2 The biodiversity indices of biofilm reactors			
样品 Samples	<i>S</i>	<i>H'</i>	<i>J'</i>
BW-1	13	2.836	0.766 4
BW-8	15	3.225	0.825 5
BW-16	11	2.557	0.739 1
BW-30	10	2.935	0.883 6
BW-60	7	2.550	0.908 3
RW-1	13	2.769	0.748 2
RW-8	14	2.758	0.724 5
RW-16	10	2.708	0.815 1
RW-30	12	2.818	0.786 1
RW-60	8	2.442	0.814 0
PW-1	12	2.402	0.670 0
PW-8	12	2.855	0.796 3
PW-16	11	2.957	0.854 9
PW-30	8	2.511	0.837 2
PW-60	8	2.245	0.748 4
RB-8	7	2.595	0.924 3
RB-16	8	2.514	0.838 0
RB-30	12	3.195	0.891 3
RB-60	13	3.455	0.933 7
PB-8	4	1.180	0.589 9
PB-16	6	1.488	0.575 7
PB-30	11	3.019	0.872 7
PB-60	10	2.758	0.830 3

注: BW (Blank water): 空白组水样; RW (Raw water): 自然挂膜组水样; PW (PCC water): 附菌强化挂膜组水样; RB (Raw biofilm): 自然挂膜组生物膜样; PB (PCC biofilm): 附菌强化挂膜组生物膜样. -1、-8、-16、-30、-60: 取样所对应的反应器运行天数。

Note: BW: The water samples in Blank; RW represents the water samples in Raw; PW: The water samples in PCC; RB: The biofilm samples in Raw; PB: The biofilm samples in PCC. -1, -8, -16, -30, -60: The sampling time (day) of the reactors operation.

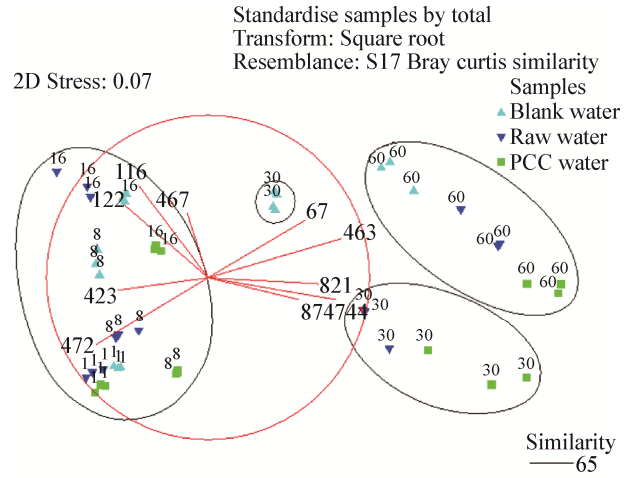


图 3 不同反应器水体中细菌群落 NMDS 分析  
Figure 3 The NMDS plot of bacterial communities for water samples in different reactors

结果表明, C/N 是 3 个反应器水体中微生物群落结构发生演替的主要驱动因子。实验对 3 个反应器不同营养条件下水体中微生物群落进行了调查, 根据不同反应器水体中 T-RFs 相对丰度(图 4)得出以下结论: 423 bp (红细菌目, Rhodobacterales)和 472 bp (伯克氏菌目, Burkholderiales)均为寡营养条件下的优势菌, 但是在高碳氮比下其优势地位被取代; 富营养条件下, 744 bp (假单胞菌目, Pseudomonadales)、67 bp (放线菌纲, Actinobacteria)、874 bp (假单胞菌目, Pseudomonadales)和 463 bp (硝化螺旋菌目, Nitrospirales)为 3 个反应器水体中同时富集的菌; 116 bp (根瘤菌目, Rhizobiales)在 BW-60 时富集, 相对丰度 13.37%, 但是在 RW-60 和 PW-60 中并未富集; 821 bp (根瘤菌目, Rhizobiales)在 RW 和 PW 中被富集。对照 C/N 改变前后反应器的氨氮去除效率, 推测 744、67、874、463 bp 是在高 C/N 条件下具有异养硝化功能的细菌。

### 2.5 C/N 对生物膜中微生物群落结构的影响

反应器中的填料为微生物的定殖、成膜提供载体, 生物膜形成过程受营养、温度、pH 等因素影响。当环境条件改变时, 不适应环境变化的微生物会从生物膜中分散脱离<sup>[19]</sup>。因此, 实验将空载填料和固定有脱氮功能的 *P. denitrificans* PD1222

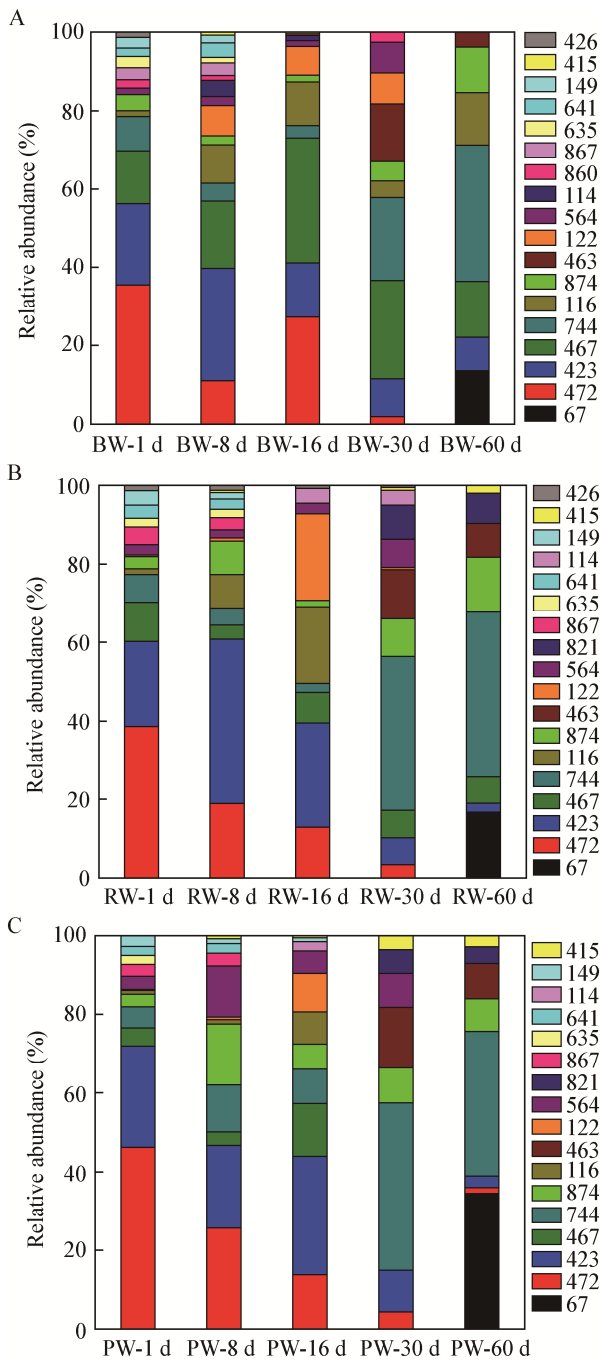


图4 不同反应器水体中 T-RFs 相对丰度  
**Figure 4 Relative abundance of T-RFs in the water niche of different reactors**

注：A：空白反应器(Blank)运行过程中水体中 T-RFs 的相对丰度；B：自然成膜反应器(Raw)运行过程中水体中 T-RFs 的相对丰度；C：预附脱氮菌强化挂膜反应器(PCC)运行过程中水体中 T-RFs 的相对丰度。

Note: A: The relative abundance of T-RFs in the water niche during the operation of Blank; B: The relative abundance of T-RFs in the water niche during the operation of Raw; C: The relative abundance of T-RFs in the water niche during the operation of PCC.

的填料浸入反应器，研究其成膜过程及不同营养条件下生物膜中微生物群落变化规律。

不同反应器生物膜中细菌群落 NMDS 表明，运行初期 RB 与 PB 中的微生物簇差异显著(图 5)。此时 RB 中的优势片段 116 bp 和 472 bp 等同时也是 RW 中的优势微生物(图 3)，表明 RB 上的微生物主要来自 RW。PB 上的优势微生物主要为所附的 *P. denitrificans* PD1222。第 8 天时 RB-8 和 PB-8 之间的差异度高达 67.45% (图 6)，其中 420、116、744 bp 对差异度的累计贡献为 58.81%；第 16 天时 RB-16 和 PB-16 之间的差异度为 52.62% (图 6)，其中 420、116、415 bp 对差异度的累计贡献值为 67.42%。在第 25 天将 C/N 由 1:1 改为 2:1 后 RB 与 PB 中细菌群落结构变化明显(图 5 和图 7)，相比于寡营养条件，样品组 RB-30 和 PB-30 及 RB-60 和 PB-60 的差异度显著下降，分别为 30.05% 和 27.03%。高 C/N 下 67、744、463、821、867、415 bp 等 T-RFs 开始逐渐富集，第 60 天时 PB 中 420 bp 的相对丰度仅为 2.46%，表明 PB 中 *P. denitrificans* PD1222 的优势地位被取代。同时生物膜成熟后 PCC 与 Raw 中生物膜上的微生物群落相似性较高 (72.97%)。与 Blank 相比，富营养条件下 67、744、463、821 bp 在水体和生物膜中均得到了富集，而 867 bp 只在生物膜中得到了富集。

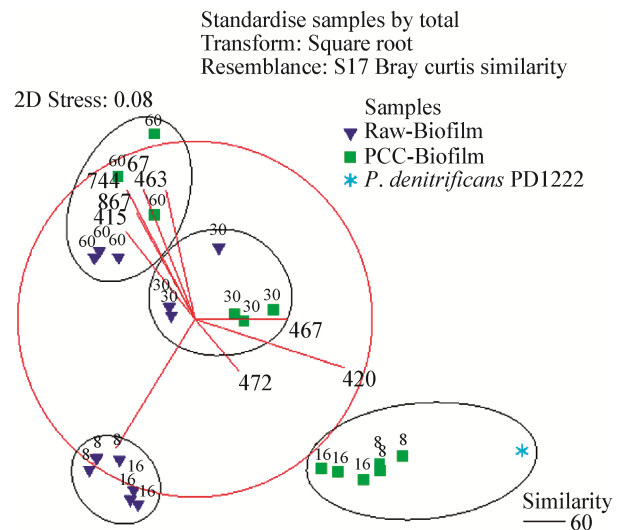


图5 不同反应器生物膜中细菌群落 NMDS 分析  
**Figure 5 The NMDS plot of bacterial communities for biofilm samples in different reactors**



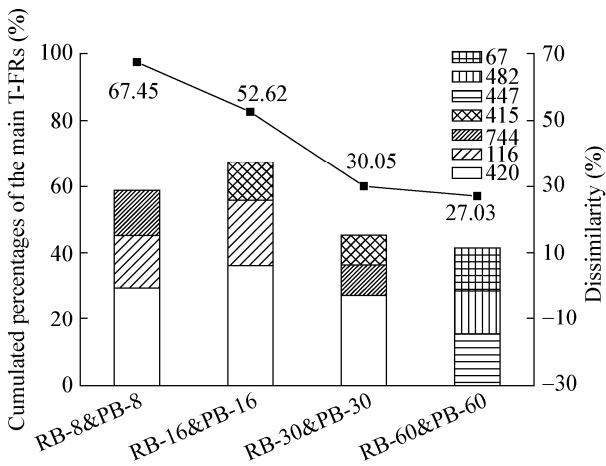


图6 RB与PB的差异度趋势曲线及主要T-RFs的累计贡献  
Figure 6 The dissimilarity of RB and PB and the cumulated contribution of the main T-RFs

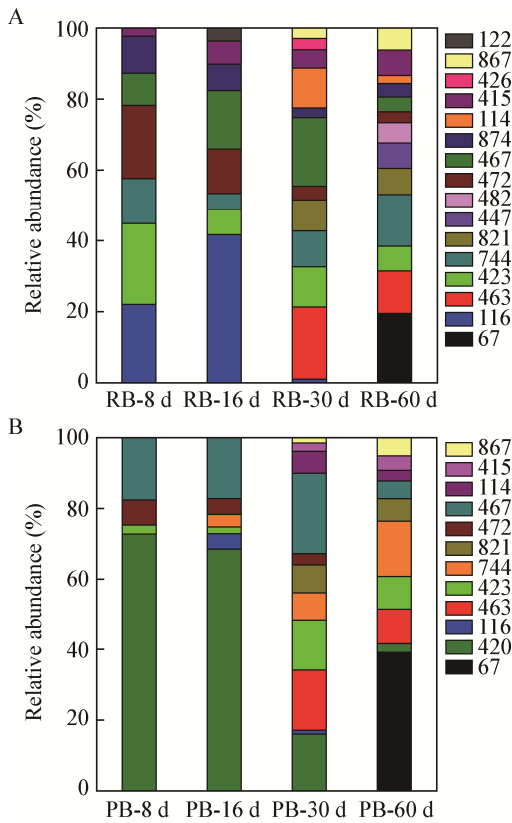


图7 不同反应器生物膜中T-RFs相对丰度  
Figure 7 Relative abundance of T-RFs in the biofilm niche of different reactors

注：A：自然成膜反应器(Raw)运行过程中生物膜中T-RFs的相对丰度；B：预附脱氮菌强化挂膜反应器(PCC)运行过程中生物膜中T-RFs的相对丰度。

Note: A: The relative abundance of T-RFs in the biofilm niche during the operation of Raw; B: The relative abundance of T-RFs in the biofilm niche during the operation of PCC.

为进一步研究不同营养条件下细菌群落的动态变化过程，对RB与PB中T-RFs的相对丰度进行了比较分析(图7)。C/N=1:1条件下RB上所富集的优势片段116、423、472、874 bp等，在C/N=2:1条件下被67、744、463、821、447(芽孢杆菌目, Bacillales)、867 bp(着色菌目, Chromatiales)等T-RFs所代表的菌群所演替；改变碳氮比后423 bp在RB中的优势地位被取代，其相对丰度由22.87%(RB-8)变为7.03%(RB-60)；447、482 bp(黄色单胞菌目, Xanthomonadales)为RB-60时富集的菌，而在PB中未富集。C/N=1:1条件下PB上的微生物结构较为单一，优势菌群主要为420、467、472 bp；在C/N=2:1条件下微生物多样性显著提高，67、744、463、821 bp等T-RFs大量富集成为优势菌(图7B)。

### 3 讨论

#### 3.1 C/N与氨氧化微生物群落结构之间的关系

C/N、温度、pH、DO、污染物类型等因素是影响微生物群落结构的主要因子<sup>[20-22]</sup>，实验中温度、pH、DO及污染物类型无显著差异，因此，C/N是影响微生物群落结构改变的一个重要因素。本实验中，不同生态位细菌群落具有相似的演替规律。C/N=1:1时优势菌主要为α-变形菌纲(423、116 bp)和β-变形菌纲(467、472 bp)，C/N=2:1时优势菌主要为γ-变形菌纲(744、874、867 bp)、放线菌纲(67 bp)和硝化螺旋菌纲(463 bp)。

氨氧化是指在微生物作用下将氨氮氧化为亚硝态氮的过程，是硝化作用(NH<sub>3</sub>→NO<sub>2</sub><sup>-</sup>→NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)的第一步，同时也是其限速步骤，典型的氨氧化过程被认为主要是由变形菌纲中β-变形菌纲(β-Proteobacteria)等细菌类群进行的专性好氧化能自养过程，该类微生物统称为氨氧化细菌(AOB)<sup>[23-25]</sup>。本实验中高COD下3个反应器NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N去除率均显著提高，但相应的功能微生物β-变形菌纲的丰度下降，原因可能是由于在反应器系统中硝化作用是由自养细菌和异养细菌协同完成的，充足的有机碳为异养硝化细菌的生长和作用提供了基质，促使假单胞菌目(744, 874 bp)<sup>[26]</sup>、

放线菌纲(67 bp)<sup>[27]</sup>、根瘤菌目(821 bp)<sup>[28]</sup>等潜在的异养硝化微生物快速富集,上述细菌在生物膜反应器脱氮过程中可能起主要作用。假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)具有较强的环境适应能力,在地表水体、土壤等自然环境中具有普遍存在性<sup>[29]</sup>。施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)被认为是具有异养硝化-好氧反硝化特性的模式菌株,在有氧条件下能够同时去除氨氮及硝态氮<sup>[2,30]</sup>; Ji 等<sup>[31]</sup>研究发现在高溶氧条件下 *Pseudomonas stutzeri* 对  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除速率可达到 5.7 mg/(L·h),且只有少量的  $\text{NO}_2^-$ -N 累积,并且对该菌株异养硝化-好氧反硝化过程中关键酶的编码基因 *napA*、*narG*、*nirS*、*norB*、*nosZ* 进行了验证;研究表明好氧反硝化菌株的终产物大多为温室气体  $\text{N}_2\text{O}$ , Miyahara 等<sup>[32]</sup>发现在反硝化过程中 *Pseudomonas stutzeri* 的  $\text{N}_2\text{O}$  排放量较低,可以将  $\text{N}_2\text{O}$  还原为  $\text{N}_2$ 。此外,门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)<sup>[33]</sup>、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)<sup>[34]</sup>均表现出了一定的好氧反硝化能力。放线菌中的红球菌属(*Rhodococcus* sp.)等同样具有异养硝化-好氧反硝化潜能, Chen 等<sup>[27]</sup>报道了一株从养殖废水中筛选的同时具有异养硝化和好氧反硝化能力的红球菌 *Rhodococcus* sp. CPZ24,其反硝化产物中  $\text{N}_2$  和  $\text{N}_2\text{O}$  分别占了约 99%和 1%的量。根瘤菌目是一类重要的亚硝酸盐氧化菌(NO<sub>B</sub>), Okada 等<sup>[35]</sup>从土壤中分离出了一株好氧反硝化菌 *Mesorhizobium* sp. strain NH-14,在有氧或缺氧条件下均能将  $\text{NO}_2^-$ -N 还原为  $\text{N}_2\text{O}$ 。因此推测本实验室生物膜反应器的硝化作用可能主要由异养硝化菌贡献,高氨氮去除率、低 AOB 丰度的实验结果与之前的报道一致<sup>[23,36-37]</sup>。此外,大部分具有异养硝化特性的微生物同时能进行好氧反硝化<sup>[38-40]</sup>,本实验中随着  $\text{NH}_4^+$ -N 的消减,  $\text{NO}_3^-$ -N 有一定程度的积累,因为不同异养硝化-好氧反硝化微生物进行反硝化作用对应的氧阈值(The oxygen threshold)不同<sup>[41-42]</sup>,因此推测 DO 可能是影响好氧反硝化程度的关键因子。硝化螺旋菌为典型的亚硝酸盐氧化细菌(NO<sub>B</sub>), 463 bp 的富集可能解释了本实验中几乎无  $\text{NO}_2^-$  累积的原因。关于异养硝化

在反应器脱氮过程中的贡献、作用条件及其作用机制仍需深入研究。

### 3.2 生物膜反应器硝化过程中的关键微生物

本研究中假单胞菌目(Pseudomonadales)、根瘤菌目(Rhizobiales)、放线菌纲(Actinobacteria)在生物膜中具有较高的丰度。已有研究发现假单胞菌目(Pseudomonadales)、根瘤菌目(Rhizobiales)是微生物电池阴极生物膜及饮用水排水系统中的主要群落<sup>[43]</sup>;同时,  $\gamma$ -变形菌纲被证实是形成生物膜的主要微生物<sup>[44-46]</sup>。以上研究与本实验结果一致,说明这些微生物具有较强的成膜能力。伯克氏菌目(Burkholderiales)被证明是生物膜中的主要菌群<sup>[47-48]</sup>,然而本研究中伯克氏菌目(472 bp)随着反应器的运行其绝对优势地位被取代,该差异可能与实验运行条件有关。

研究表明,第 30 天时生物膜中的 114 (浮霉菌目, Planctomycetales)、423、463、467 bp 等 T-RFs 快速富集,相对丰度显著提高,但是,在反应器运行稳定后取样分析发现以上菌群的相对丰度明显下降,发生了演替。反应器生物膜形成过程是一个有序的过程,在成膜过程中,某些微生物首先构建生物膜的初期结构,另一些微生物受益于该结构而定殖繁殖,导致后期生物膜的形成。

运行初期相比于 Blank 和 Raw, PCC 脱除氨氮能力较好, PCC 填料上所附的脱氮副球菌 PD1222 起主要作用,但是在反应器运行过程中该菌逐渐被演替,分析原因如下:(1) *Paracoccus denitrificans* PD1222 为外源功能菌,可能与生态系统中的土著微生物存在竞争关系而不能形成优势菌,从而难以发挥其作用<sup>[49-51]</sup>; (2) *Paracoccus denitrificans* PD1222 分泌的胞外多聚物可能会促进 PCC 生物膜的形成,缩短成膜周期,但由于其自身成膜能力较差导致其优势地位被取代。

## 4 结论

对实验室规模的不同成膜方式的生物膜反应器的运行效果及在氨氮消减过程中微生物群落结构多样性特征进行了分析。研究表明:(1) 可控条

件下生物膜反应器 Raw 与 PCC 对氨氮(5 mg/L)的去除率均可达到 95%以上, 可达到《地表水环境质量标准(GB 3838-2002)》II 类水水质(0.5 mg/L)标准。

(2) C/N 是影响氨氮去除效果的关键因素之一, 且不同营养环境下微生物群落结构差异较大, C/N=2:1 条件下反应器运行稳定后优势菌群主要为  $\gamma$ -变形菌纲(744、874、867 bp)、放线菌纲(67 bp)和硝化螺旋菌纲(463 bp)。异养硝化微生物在氨氮转化过程中可能起主导作用。(3) PCC 在运行初期相比于 Blank 和 Raw 氨氮转化效率较突出, 反应器运行稳定后, Raw 与 PCC 脱氮效率及微生物群落结构差异并不显著, 说明 PCC 预附的 *Paracoccus denitrificans* PD1222 已被演替, 土著微生物的污染物降解能力被充分放大。

总体而言, 生物膜反应器本质是一种生物强化修复技术, 结合生物膜技术抗逆性强、净化能力高、微生物群落结构稳定性好等优势, 该技术可广泛应用于污水处理厂尾水深度处理, 以及河流、湖泊、景观水体等地表水体的原位修复。基于受污染环境水体的差异性和复杂性, 筛选高效、易成膜的土著功能微生物, 优化培养与生物膜联合应用技术, 探究环境因素对原位生物膜修复的影响, 建立并完善生物膜修复工程体系是该技术未来发展的侧重点。本实验采用的生物膜技术为污染水体原位微生物强化净化提供了一种思路。

## 参 考 文 献

- [1] Qin BQ, Xu PZ, Wu QL, et al. Environmental issues of lake Taihu, China[J]. *Hydrobiologia*, 2007, 581(1): 3-14
- [2] Guo LY, Chen QK, Fang F, et al. Application potential of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier for nitrate and ammonium removal of eutrophic lake water[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 45-51
- [3] Tian WJ, Hao FH, Zhai JB. Elasticity plastic filler for purification of polluted streams *in situ* entering lake[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(5): 1308-1312 (in Chinese)  
田伟君, 郝芳华, 翟金波. 弹性填料净化受污染入湖河流的现场试验研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(5): 1308-1312
- [4] Wang RC, Wen XH, Jing YQ, et al. Remediation of polluted river water by using a suspended carrier biofilm reactor[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(S1): 67-69 (in Chinese)  
王荣昌, 文湘华, 景永强, 等. 悬浮载体生物膜反应器修复受污染河水试验研究[J]. *环境科学*, 2004, 25(S1): 67-69
- [5] Song YW, Nie ZD, Nian YG, et al. Research of aeration with bio-film technology to treat urban landscape water[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(1): 58-62 (in Chinese)  
宋英伟, 聂志丹, 年跃刚, 等. 城市景观水体曝气与生物膜联合净化技术研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(1): 58-62
- [6] Ma Q, Gao MY, Tan W, et al. Role of new type floating island in improving effluent quality and the characterization of microbe on biofilm carrier[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(6): 1596-1601 (in Chinese)  
马强, 高明瑜, 谭伟, 等. 新型生态浮岛在改善水质中的作用及生物膜载体微生物特征研究[J]. *环境科学*, 2011, 32(6): 1596-1601
- [7] Marsh TL, Saxman P, Cole J, et al. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8): 3616-3620
- [8] Jia JT, Song LS, Li Y. T-RFLP technique and its application in research on microbial community structure[J]. *Marine Sciences*, 2004, 28(3): 64-68 (in Chinese)  
贾俊涛, 宋林生, 李筠. T-RFLP 技术及其在微生物群落结构研究中的应用[J]. *海洋科学*, 2004, 28(3): 64-68
- [9] Paithankar K, Prasad KSN. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(6): 1346
- [10] Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA-and rRNA-based microbial community composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5488-5491
- [11] Moeseneder MM, Arrieta JM, Muyzer G, et al. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(8): 3518-3525
- [12] Wang XH, Wen XH, Criddle C, et al. Community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of eight wastewater treatment systems[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22(4): 627-634
- [13] Shyu C, Soule T, Bent SJ, et al. MiCA: a web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(4): 562-570
- [14] Hill TC, Walsh KA, Harris JA, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(1): 1-11
- [15] Shannon CE. A mathematical theory of communication[J]. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review*, 2001, 5(1): 3-55
- [16] Heip C. A new index measuring evenness[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1974, 54(3): 555-557
- [17] Clarke KR. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure[J]. *Austral Ecology*, 1993, 18(1): 117-143
- [18] Tyagi M, da Fonseca MMR, de Carvalho CCR. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes[J]. *Biodegradation*, 2011, 22(2): 231-241
- [19] Cogan N, Keener JP. The role of the biofilm matrix in structural development[J]. *Mathematical Medicine and Biology*, 2004, 21(2): 147-166

- [20] Valentín-Vargas A, Toro-Labrador G, Massol-Deyá AA. Bacterial community dynamics in full-scale activated sludge bioreactors: operational and ecological factors driving community assembly and performance[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42524
- [21] Wang XH, Hu M, Xia Y, et al. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(19): 7042-7047
- [22] Shen CC, Xiong JB, Zhang HY, et al. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 57: 204-211
- [23] Ma Q, Qu YY, Shen WL, et al. Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 436-443
- [24] Purkhold U, Pommerening-Röser A, 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
- [25] Li M, Cao HL, Hong YG, et al. Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(4): 1243-1254
- [26] Zhang JB, Wu PX, Hao B, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(21): 9866-9869
- [27] Chen PZ, Li J, Li QX, et al. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 116: 266-270
- [28] Pai SL, Chong NM, Chen CH. Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology*, 1999, 68(2): 179-185
- [29] Ueda A, Saneoka H. Characterization of the ability to form biofilms by plant-associated *Pseudomonas* species[J]. *Current Microbiology*, 2015, 70(4): 506-513
- [30] Huang TL, Guo L, Zhang HH, et al. Nitrogen-removal efficiency of a novel aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri* strain ZF31, isolated from a drinking-water reservoir[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 196: 209-216
- [31] Ji B, Wang HY, Yang K. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O<sub>2</sub> concentrations[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(4): 719-722
- [32] Miyahara M, Kim SW, Fushinobu S, et al. Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide emissions from wastewater treatment plants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(14): 4619-4625
- [33] Zhu L, Ding W, Feng LJ, et al. Characteristics of an aerobic denitrifier that utilizes ammonium and nitrate simultaneously under the oligotrophic niche[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2012, 19(8): 3185-3191
- [34] Kim M, Jeong SY, Yoon SJ, et al. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(5): 498-502
- [35] Okada N, Nomura N, Nakajima-Kambe T, et al. Characterization of the aerobic denitrification in *Mesorhizobium* sp. strain NH-14 in comparison with that in related Rhizobia[J]. *Microbes and Environments*, 2005, 20(4): 208-215
- [36] Ye L, Shao MF, Zhang T, et al. Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing[J]. *Water Research*, 2011, 45(15): 4390-4398
- [37] Zhao YG, Huang J, Zhao H, et al. Microbial community and N removal of aerobic granular sludge at high COD and N loading rates[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 439-446
- [38] Padhi SK, Tripathy S, Sen R, et al. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 78: 67-73
- [39] Joo HS, 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
- [40] Zhang Y, Shi Z, Chen MX, et al. Evaluation of simultaneous nitrification and denitrification under controlled conditions by an aerobic denitrifier culture[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 175: 602-605
- [41] Ji B, Yang K, Zhu L, et al. Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 20(4): 643-651
- [42] Su JJ, Liu BY, Liu CY. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropa* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90(3): 457-462
- [43] Wang ZJ, Zheng Y, Xiao Y, et al. Analysis of oxygen reduction and microbial community of air-diffusion biocathode in microbial fuel cells[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 144: 74-79
- [44] Zhang K, Choi H, Dionysiou DD, et al. Application of membrane bioreactors in the preliminary treatment of early planetary base wastewater for long-duration space missions[J]. *Water Environment Research*, 2008, 80(12): 2209-2218
- [45] Lim SY, Kim S, Yeon KM, et al. Correlation between microbial community structure and biofouling in a laboratory scale membrane bioreactor with synthetic wastewater[J]. *Desalination*, 2012, 287: 209-215
- [46] Miura Y, Watanabe Y, Okabe S. Membrane biofouling in pilot-scale membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater: impact of biofilm formation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(2): 632-638
- [47] Ivnitsky H, Katz I, Minz D, et al. Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treatment[J]. *Water Research*, 2007, 41(17): 3924-3935
- [48] Liu RY, Yu ZS, Guo HG, et al. Pyrosequencing analysis of eukaryotic and bacterial communities in faucet biofilms[J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 435-436: 124-131
- [49] Boon N, Top EM, Verstraete W, et al. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1511-1520
- [50] Boon N, Goris J, de Vos P, et al. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 2906-2913
- [51] Quan XC, Shi HC, Liu H, et al. Removal of 2,4-dichlorophenol in a conventional activated sludge system through bioaugmentation[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(11): 1701-1707