

处理不同废水 MBR 系统中微生物群落结构的比较

张斌^{1,2}, 孙宝盛^{1*}, 刘慧娜¹, 刘宪华¹, 季民¹

(1. 天津大学环境科学与工程学院, 天津 300072; 2. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050)

摘要: 为了研究膜生物反应器中微生物群落结构与系统处理效能的关系, 为工艺改进提供依据, 从 4 种处理不同水质的 MBR 污泥中提取细菌总基因组 DNA, 采用 PCR-DGGE 和克隆测序技术对系统中的微生物群落结构进行了解析, 根据序列数据进行同源性分析并建立了系统发育树. 结果表明, 在长期稳定运行后不同 MBR 中形成了各自特有的生态群落, 进水水质对总细菌的群落结构有着较大的影响, 处理含有较复杂成分废水的反应器中, 种群多样性较高, Shannon 指数分别为 0.77 和 0.78. 总细菌中, 主要优势种群以 Proteobacteria 纲(8 个 OUTs)和 Bacillus 属(2 个 OUTs)为主. 不同反应器中氨氧化菌群落结构较为相似, 存在着相同的顶级优势群落; 测序结果表明 MBR 中存在着多种亚硝化菌属, 其中以亚硝化单胞菌属最为普遍, 并鉴定出 2 株反硝化菌属 Uncultured Achromobacter sp. 和 Uncultured denitrifying bacterium, 说明反应器中可能同时存在多种硝化和脱氮途径.

关键词: 膜生物反应器; 16S rDNA; PCR-DGGE; 微生物群落结构; 氨氧化菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)10-2944-06

Comparison of Microbial Community Structure in MBRs Treating Different Wastewater

ZHANG Bin^{1,2}, SUN Bao-sheng¹, LIU Hui-na¹, LIU Xian-hua¹, JI Min¹

(1. School of Environmental Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

Abstract: In order to investigate the microbial community structures in different membrane bioreactors, total bacterial genomic DNA was extracted from biomass in four MBRs treating different wastewater. The microbial community structures were studied by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis(PCR-DGGE) and cloning-sequencing. Furthermore, the sequences were used for homology analysis and then two phylogenetic trees were constructed. Results indicate that each MBR owns its specific ecological community after a long-term of operation. Influent wastewater composition has a significant impact on total bacterial community structures. Population diversity, which is in the bioreactor fed with more complex components wastewater, is higher than those of other MBRs. The Shannon Index are 0.77 and 0.78. Proteobacteria and Bacillus, which contain 8 OUTs and 2 OUTs, are the climax communities in the investigable MBRs. The profiles of ammonia-oxidizing bacterial community in the four reactors are very similar. There may exist several modes of nitrification and denitrification in MBR because sequences revealed that there exist multitude nitrifying organisms, in which Nitrosomonas are the most predominant, and two denitrifying bacterium (uncultured Achromobacter sp. and uncultured denitrifying bacterium) in reactors.

Key words: MBR; 16S rDNA; PCR-DGGE; microbial community structure; ammonia-oxidizing bacteria

膜生物反应器(MBR)由于其具有占地面积小, 容积负荷高, 污泥产量低, 出水水质好等优点而使其在城市、生活和工业污水的净化和处理等领域得到了广泛的应用^[1,2]. 研究表明 MBR 工艺中 90% 以上的被去除污染物是由活性污泥去除的^[3], 同时污泥特征与膜污染紧密相关^[4,5], 这说明污泥特征很大程度上决定了最终的出水水质和膜分离性能.

聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术^[6]直接利用 DNA 及 RNA 的微生物遗传特性进行表征, 不但避免了传统上耗时的菌种分离, 更可进而鉴定出无法利用传统方法分离出来的菌种. 这一技术所分析出的微生物群落多样性可使研究者能够快速、准确地进行复杂微生物群落结构演替规律、微生物种群动态性的评价分析.

从生态学的角度, 可以将每个膜生物反应器都看作一个相对完整和独立的微生态系统, 进水中的各种有机物和盐类, 以及人工曝气装置所提供的溶解氧是反应器内整个生态系统的能量来源. 因此, 通过对处理不同废水的 MBR 内微生物种群结构进行比较和分析, 可以从根本上找出影响其结构与功能的主要因素及其内在关系.

本研究组在实际工程中应用 MBR 工艺处理不同性质的污水, 均取得了良好的处理效果^[7-9]. 在此基础上, 本研究采用 PCR-DGGE 技术对不同 MBR 中

收稿日期: 2007-10-31; 修订日期: 2008-01-08

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目(07JCZDJ02100)

作者简介: 张斌(1980~), 男, 博士研究生, 助理实验师, 主要研究方向为水污染控制与环境生态学, E-mail: tjzhangbin@sohu.com

* 通讯联系人, E-mail: baosheng_sun@sina.com

总细菌和氨氧化菌的群落结构进行了比较, 对其中的主要优势种群进行克隆测序并将测序结果在 GenBank 中进行比对和鉴定, 以揭示不同的运行环境与微生物群落结构之间的联系, 以及各反应器内各自特有的优势种群, 以期为在实际工程中进一步提高反应器的处理能力、优化操作参数提供理论依据。

表 1 反应器主要工艺参数与运行状况

反应器 编号	进水来源	进水水质主要指标/mg•L ⁻¹				处理效果	主要工艺参数
		TOC	BOD ₅	氨氮	总磷		
A	浴池、游泳馆 综合污水	50 ~ 100	35 ~ 65	15 ~ 25	—	浊度、SS 去除率为 100%、TOC 去除率为 80% ~ 95%、氨氮去除率为 70% ~ 80%	DO 为 4.0 ~ 7.0 mg/L, HRT = 6 h
B	实验室人工 配水	150 ~ 250	180 ~ 275	35 ~ 50	4.5 ~ 5.5	SS 去除率为 95% ~ 100%、TOC 去除率为 90% ~ 95%、氨氮去除率为 60% ~ 70%	DO 为 6.5 ~ 7.5 mg/L, HRT = 5 h
C	学生公寓洗 浴污水	100 ~ 130	100 ~ 250	7 ~ 15	—	浊度、SS 去除率为 100%、TOC 去除率为 80% ~ 92%、氨氮去除率为 60% ~ 70%	DO 为 5.5 ~ 7.5 mg/L, HRT = 5 h
D	医院污水	100 ~ 250	50 ~ 75	30 ~ 40	1 ~ 3	SS 去除率为 90% ~ 100%、TOC 去除率为 85% ~ 90%、氨氮去除率为 80% ~ 95%	DO 为 4.5 ~ 6.5mg/L, HRT = 5 h

DNA 的提取工作。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用化学裂解、酚/氯仿/异戊醇抽提、试剂盒纯化的方法可以保证得到较为完整和纯度较高的基因组 DNA, 片断等于或略大于 23 kb, 以此为模板, 可以成功地进行 PCR 扩增, 具体提取方法参见文献[11]。

1.3 基因组 DNA 16S rDNA V3 区 PCR 扩增

1.3.1 总细菌的 PCR 扩增

采用对大多数细菌和古细菌 16S rDNA 基因 V3 区都具有特异性的引物对 F357-GC 和 R518, 以反映各个阶段反应器中优势细菌群落的总体构成状况。采用降落式 PCR 反应策略^[6]。

100 μL 反应体系组成为: 10 ~ 100 ng 模板, 10 μL 的 10 × PCR buffer(with 20 mmol/L MgCl₂), 200 μmol/L 的 dNTPs, 0.5 μmol/L 每种引物, 2.5 U 的 Ex Taq 酶, 其余用无菌超纯水补足。用柱式 PCR 产物纯化试剂盒(BIO BASIC INC. Cat. No. BS363)纯化, 最终浓缩于 40 μL Buffer。

1.3.2 氨氧化菌的巢式 PCR 扩增

第一轮采用对氨氧化菌特异性的引物对 CTO189f 和 CTO654r, 及相应的反应程序^[12]。第二轮 PCR 以第一轮 PCR 产物作为模板, 使用引物 F357-GC 和 R518 进行扩增, 扩增程序和反应体系同上。这样既增加了反应的特异性, 又可得到丰产的特异性靶序列, 增加敏感性。

以上 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳检测均可得

1 材料与方法

1.1 反应器运行条件和处理效果

反应器运行状况如表 1。表中浊度、SS、氨氮、总磷等按标准方法进行监测^[10]。TOC 采用岛津 TOC-VCPH 测定。为保证污泥中微生物的原始形貌, 用灭菌采样瓶在现场取样后立即运回实验室进行基因组

到清晰的目标条带。

1.4 PCR 产物的 DGGE 分析

采用 C. B. S. SCIENTIFIC DGGE-2001 系统, 凝胶浓度为 8%, 变性梯度为 35% ~ 55%, 温度 60℃, 电压 150V, 在 1 × TAE 中电泳 6.5 h, 完毕后将凝胶进行硝酸银染色, 并将图像在观测仪中拍照存档。

1.5 Shannon-Weaver 指数

微生物群落多样性采用 Shannon 指数(*H*)表示, 公式为: $H = - \sum P_i \lg P_i$, *H* 的计算是基于 DGGE 胶条带的位置和条带的强度, 而条带的强度则通过经 Quantity One 分析后得到的波峰面积来表示, 即 $P_i = n_i / N$, 式中 n_i 为峰面积, *N* 为所有峰的总面积。

1.6 目的条带的克隆与测序

挑取 DGGE 图谱中的目的条带溶于 20 μL ddH₂O 中, 4℃ 过夜。以此为模板, 以 F357 和 R518 为引物进行 PCR 扩增, 设定退火温度为 55℃, 其它扩增程序同 1.3.1。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并切胶纯化。纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接(Promega 公司 pGEM[®]-T Vector System I)后, 转化到 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 在含有 X-gal、IPTG 和 Amp 的 LB 培养基上平板培养 16 h(37℃), 蓝白斑筛选阳性转化子接种于 LB 培养基中, 37℃ 振荡过夜, 提取质粒并纯化, 重新 PCR 后对产物进行测序(上海 Invitrogen 生命技术有限公司)。

1.7 同源性分析与系统进化树构建

利用 BioEdit(V7.0.5 版)对测序结果进行处理

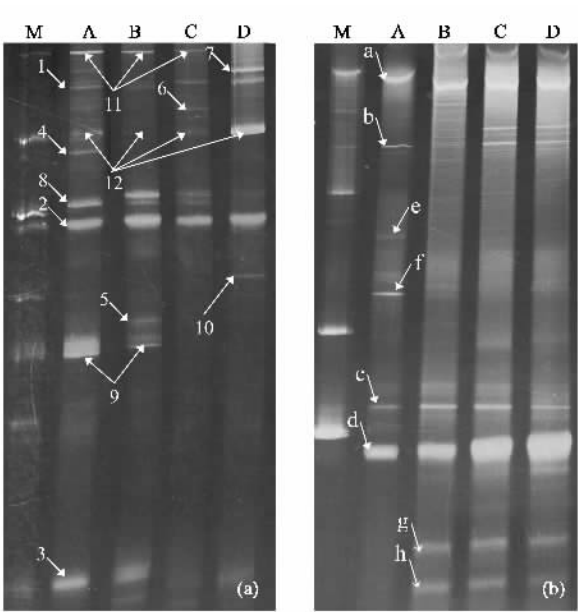
后提交到 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),采用 BLAST 将目标序列和基因库中所含序列进行比对,得到同源性最近的序列.最后采用 DNAMAN(V5.2.2 版)建立进化树.

2 结果与讨论

2.1 不同反应器内总细菌群落结构的比较

总细菌的 DGGE 图谱如图 1(a)所示,可见微生物的群落结构随反应器而异.不同样品 Shannon 指数的比较如图 2 所示.以进水中的各种营养物质为基质,多种微生物(主要是细菌,同时还包括古细菌、真菌以及原生动物和后生动物等)大量繁殖在系统内形成了完整的食物链,从而形成了较为稳定的生态系统,实现废水的高效、快速净化.由于不同进水为微生物所提供的底物是不同的,使得那些能高效地利用进水中营养物质的微生物种群会逐渐演变为优势群落,同时也显示了每个反应器不同的生态系统功能.由图 1(a)可见,处理不同水质的 MBR 中,既有一些相同的微生物种属也有其各自独有的种属.共有的微生物种属如图 1(a)中所标记的 Band 1、2、3、8、12;各自特有的种属,如 A 中的 Band 4, B 中的 Band 5, C 中的 Band 6, D 中的 Band 7、10.其余还有若干 2 个或 3 个反应器内共有的条带,如 Band 9、11.通过条带信号的强弱还可看出,即使是共有的种属在各自的反应器中所处的优势地位也不相同,如 Band 3、8 在 A 和 B 反应器中可视为顶级优势群落,而在 C 和 D 反应器中只是次级群落和一般的优势群落;反之 Band 1、12 在 A 和 D 反应器中可视为顶级优势群落,而在 B 和 C 反应器中只是一般的优势群落.在 4 个反应器中信号都较强的 Band 2 可被视为 MBR 工艺中生态幅较为广泛的种属,在 MBR 生态系统中对物质和能量的代谢发挥着重要的作用.而反应器中各自特有的微生物种属则是针对不同的水质经过长期的演替过程而适生的优势群落.

从图 2 中可见, A 和 B 中总细菌的 Shannon 指数较高, C 中进水组成较为简单, 污染程度较轻^[8], 污泥中微生物经过长期演变后淘汰了大量不能利用进水中组成简单的基质进行繁殖生长的菌种, 对应于进水水质也形成了功能上较为简单的群落结构, Shannon 指数也较低^[13]. 而且 C 中污泥沉降性能很差($SV_{30} \geq 80$), 这也是和缺乏某些细菌而不能形成大粒径的菌胶团有关. D 的进水中虽然底物较为丰富但也含有大量的抗生素等抑菌性物质^[7], 造成了反应器内微生物的生长环境较为恶劣, 限制了微生



(a)总细菌 DGGE 谱图; (b)氨氧化菌 DGGE 谱图;

M: Marker DL2000

图 1 不同 MBR 中总细菌和氨氧化菌 DGGE 谱图

Fig.1 DGGE profile of bacteria and ammonia oxidizing bacteria in the different MBRs

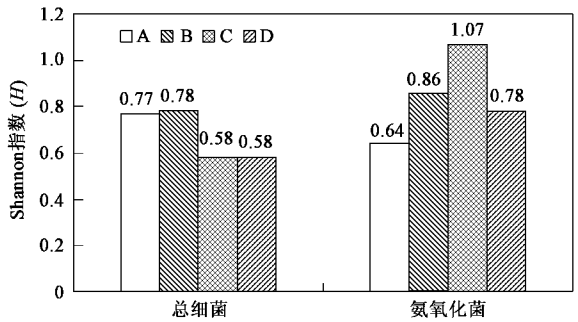


图 2 不同 MBR 中微生物群落 Shannon 多样性指数

Fig.2 Shannon index of microbial population in the different MBRs

物种群的丰富程度.说明在操作工艺参数相似的条件 下,进水水质决定了反应器内微生物种群的多样性程度.

将图 1(a)中主要条带进行切胶测序后,在 GenBank 中进行比对,获得各条带的同源性信息,结果如表 2 所列,系统发育树如图 3 所示. DGGE 谱图中的每一条带代表一个可能的细菌类群或可操作分类单位(OTU),从表 2 可见,所有条带均在 GenBank 中找到了与其同源性很高的种群,主要优势种群以 Proteobacteria 纲(8 个 OUTs)和 Bacillus 属(2 个 OUTs)为主,这也与 Wagner 等^[14]的研究成果相吻合.而且这些菌属已在多种不同的污水生物处理工

表 2 部分条带 16S rDNA 序列比对结果

Table 2 Results of some partial 16S rDNA sequences using BLAST in GenBank

分类	条带 编号	NCBI 查询号	GenBank 比对结果		
			登记号	菌种名	同源性/%
总细菌	1	DEZDC1X8015	AJ853605	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene	100
	2	DF0U3A7V01R	DQ805501	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene	95
	3	DDJ075E0015	EF681114	<i>Aeromonas hydrophila</i> isolate AHPN3-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	4	DRRM385A014	DQ886173	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone edNE9 16S rRNA gene, partial sequence	99
	5	DF3NEPVU015	EF645247	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	100
	7	DF5NND3801R	AM697386	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene	100
	9	DF4UVH61014	EU031774	<i>Comamonas</i> sp. BS27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	10	DS015KJ9012	AY960268	Uncultured <i>Enterobacteriaceae</i> bacterium clone 903 16S rRNA gene, partial sequence	99
	11	EFR978X1012	AY803983	<i>Bacillus</i> sp. HPC40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	12	EFTKWUH801R	EF584540	<i>Bacillus</i> sp. JDM-2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
氨氧化菌	a	EFEBYEG1012	AY543664	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone 20SB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94
	b	DFSRZF75012	EF042985	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone H3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	c	DFRYFY8N015	AY543074	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. clone 15BAFln1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
	d	EETRUD3Y01R	EF042993	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp. clone 47-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94
	e	EF5GPMVJ016	AF351233	Uncultured beta <i>Proteobacterium</i> clone 4-70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	f	DFTPASSN015	CP000127	<i>Nitrosococcus oceanii</i> ATCC 19707	94
	g	EFC8REFY012	EF033497	Uncultured <i>Achromobacter</i> sp. clone DGR1-p1c02 16S rRNA gene, partial sequence	100
	h	DRP79XX8012	DQ450405	Uncultured denitrifying bacterium clone N4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95

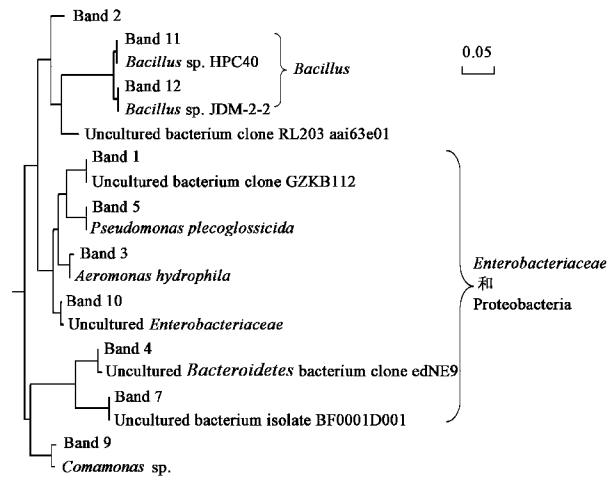


图 3 MBR 中总细菌系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of bacteria in MBRs

艺中被发现和鉴定为对污染物的去除具有主要作用的菌群^[15,16],经这些菌的胞外酶作用,可将大分子有机污染物降解成水溶性低分子的氨基酸、单糖和无机酸等,从而使污染物得到降解.

2.2 不同反应器内氨氧化菌群落结构的比较

Muyzer 等^[17]的研究表明,一些优势种群的存在导致了细菌群落的简单化,只有占优势的种群才能被观察到.在活性污泥样品中细菌丰度很高,由于 PCR 的选择性扩增,使得 DGGE 图谱中只能显示那些最具优势地位的种群,掩盖了其中的次级地位细菌.针对某一类特定功能的亚纲类细菌,使用特异性

更强的引物进行 Nested PCR-DGGE,可以更加全面地考察这一类菌的群落结构特征.氨氧化菌群的 DGGE 分析结果如图 1(b)所示.从中可见,不同反应器中氨氧化菌群结构的相似性较大,可以看到数条在所有或大多数反应器中都存在的氨氧化菌属如 Band a、b、c、d、g、h,且这几种菌属在图中的亮度都较高,是群落内的顶级优势种属.各污泥样品中也都有着各自独有的氨氧化菌属,但几乎都处于次级地位.

由图 2 可见,氨氧化菌的多样性指数体现出与总细菌不同的趋势,且 B、C、D 这 3 个反应器中氨氧化菌群 Shannon 指数比总细菌还要高.这也证实了由细菌 DGGE 图谱计算的多样性仅仅与优势种群的数目有关,而与环境样品不同种群的总数目无关,即存在优势种群的情况下,背景细菌群体被忽略.

在好氧条件下,作为专性化能自养菌,氨氧化菌中的氨单加氧酶(AMO)和羟胺氧化酶(HAO)催化一系列氧化反应,从氨氧化为亚硝酸盐这一过程中获取能量^[18].综合图 1(b)和图 2 可见,C 进水组成较为简单的底物和 D 进水中抗生素等物质对于氨氧化菌优势菌群的分布几乎没有影响,且各反应器中氨氧化菌群条带分布具有较高的相似性.主要氨氧化菌条带的切胶克隆测序结果见表 2,系统发育树见图 4.可见,MBR 中存在着多种不同种属的氨氧化菌,而且绝大部分为未经培养菌种(uncultured

bacterium).在活性污泥中最常见的氨氧化菌是 β -Proteobacteria 中的亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)^[19],这在 MBR 中都有所体现,并鉴定出 3 种不同的亚硝化单胞菌种,且均为各反应器氨氧化菌群落中的顶级优势菌群.在反应器 A 中还存在有亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*),这是由反应器内的成长环境和代谢机能上的差异造成的.不同种属的氨氧化细菌在生长动力学、对底物和氧的亲合力、对底物的氧化速率以及对环境因子的敏感性等方面都是不同的.因此,污水处理系统中氨氧化细菌的种群多样性越高,对复杂环境的适应能力就越强,其硝化作用的抗干扰能力也就越强. Band g、h 为 2 种具有反硝化功能的细菌,二者的进化距离较远,具有不同的生化特性. Band g 属于变形菌纲 β 亚纲(β -Proteobacteria)伯克氏菌目(*Burkholderiales*)产碱菌科(*Alcaligenaceae*)无色杆菌属(*Achromobacter*),在 MBR 中随着污泥浓度的提高会造成菌胶团内部溶解氧浓度过低的情况,该菌为兼性厌氧菌可在缺氧或厌氧条件下以硝酸盐或亚硝酸盐为电子受体,而体现出反硝化功能. Band h 在低氧条件下表现出反硝化功能,但还没有被鉴定出具体种属.这说明在好氧 MBR 中除了传统的硝化途径外,还同时存在着多种好氧反硝化反应作用于氨氮的去除过程中.

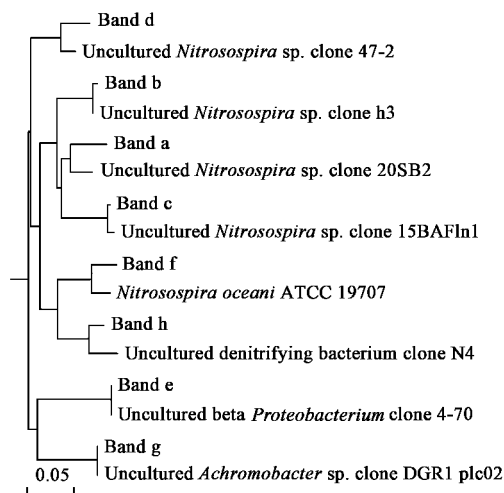


图 4 MBR 中氨氧化菌系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of ammonia oxidizing bacteria in MBRs

3 结论

(1)膜生物反应器中微生物种属之间通过协同和竞争作用,在长期稳定运行后形成了各自特有的生态群落结构;不同的 MBR 中既有共同的优势种群也有各自特有的种群;相同的微生物种群在不同的

反应器中的优势地位不同.

(2)在操作工艺参数相似的条件,进水水质对总体微生物群落多样性有着较大的决定作用,当进水中含有的可利用底物较为丰富时可以形成较多的优势种群.不同的 MBR 中主要优势种群都以 Proteobacteria 纲和 *Bacillus* 属为主.

(3)氨氧化菌在系统中的相对数量不占优势.进水水质对氨氧化菌群影响较小,不同的 MBR 中,对氨氮降解起主要作用的细菌群落属于相同的种属,且都处于顶级地位,测序结果表明反应器中存在着多种氨氧化菌属,其中以亚硝化单胞菌属最为普遍,并且鉴定出 2 种反硝化菌属.说明在 MBR 中除了传统的硝化途径外,还同时有多种好氧反硝化反应存在于氨氮的去除过程中.

参考文献:

- [1] Thomas H, Murrer J. Fouling characteristics of membrane filtration in membrane bioreactors[J]. Membrane Technology, 2000, **122**(6): 10-13.
- [2] Rosenberger S, Krüger U, Witzig R, et al. Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater[J]. Water Research, 2002, **36**(2): 413-420.
- [3] 何义亮,顾国维,刘洁.膜生物反应器生物降解与膜分离共用特性研究[J].环境污染与防治,1998,**20**(6): 18-20.
- [4] 张树国,顾国维,吴志超.膜生物反应器中污泥特性对膜污染的影响研究[J].工业水处理,2003,**23**(12): 8-12.
- [5] Lee W, Kang S, Shin H. Sludge characteristics and their contribution to microfiltration in submerged membrane bioreactors[J]. Journal of Membrane Science, 2003, **216**(1-2): 217-227.
- [6] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**(3): 695-700.
- [7] 臧倩,孙宝盛,魏青.膜生物反应器用于医院废水处理[J].水处理技术,2006,**32**(9): 85-87.
- [8] 张云霞,郭淑琴,季民,等.膜生物反应器发生污泥膨胀后的控制措施研究[J].中国给水排水,2007, **23**(9): 64-66.
- [9] 张斌,龚泰石,孙宝盛. MBR 处理生活污水试验中膜污染的清洗[J].水处理技术,2006, **32**(10): 80-83.
- [10] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会.水和废水监测分析方法[M].(第四版).北京:中国环境科学出版社,2002. 99-100,107-109,279-281.
- [11] 孙宝盛,张斌,吴卿,等.应用 PCR-DGGE 技术解析 MBR 中微生物群落多样性[J].天津大学学报(自然科学版),2008, **41**(3): 356-361.
- [12] Cébron A, Coci M, Garnier J, et al. Denaturing Gradient Gel Electrophoretic Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacterial Community Structure in the Lower Seine River: Impact of Paris Wastewater Effluent[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70**

(11): 6726-6737.

[13] Miura Y, Hiraiwa M N, Ito T, *et al.* Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance[J]. Water Research, 2007, **41**(2):627-637.

[14] Wagner M, Amann R, Lemmer H, *et al.* Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**(5): 1520-1525.

[15] Huang L N, Zhu S, Zhou H, *et al.* Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with the leachate of a closed municipal solid waste landfill[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, **242**(2):297-303.

[16] Kapley A, Prasad S, Purohit H. Changes in microbial diversity in fed-batch reactor operation with wastewater containing nitroaromatic residues[J]. Bioresource Technology, 2007, **98**(13): 2479-2484.

[17] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems[J].Current Opinion in Microbiology, 1999, **2**(3): 317-322.

[18] Philips S, Laanbroek H J, Verstraete W O. Causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments[J]. Rev Environ Sci Biotechnol, 2002, (1): 115-141.

[19] Ballinger S J, Head I M, Curtis T P, *et al.* Molecular microbial ecology of nitrification in an activated sludge process treating refinery wastewater[J]. Water Science and Technology, 1998, **37**(4-5): 105-108.

关于反对个别作者一稿两投行为的联合声明

为保证所发表论文的首创性和学术严谨性,《环境科学》、《中国环境科学》、《环境科学学报》编辑部和《Journal of Environmental Sciences》编辑部特发表如下联合声明.

我们明确反对个别作者的一稿两投或变相一稿两投行为.自即日起,我们各刊在接受作者投稿时,要求论文全体作者就所投稿件作出以下承诺(附在投稿上):

1) 来稿所报道的研究成果均系全体作者的原创性研究成果,文中报道的研究成果(含图、表中数据的全部或部分)未曾发表亦未曾投其它科技期刊.

2) 在接到所投期刊编辑部关于稿件处理结果之前,所投稿件的全部或部分内容不再投其它科技期刊.

我们将认真对待作者所作的上述承诺,并建立信息共享机制,对违背上述承诺的作者(包括在文中署名的全体作者)采取联合行动.

净化学术环境、促进学术繁荣是学术期刊作者和编者的共同责任.我们诚恳地希望广大作者能够了解我们的上述立场和做法,并积极宣传和配合.

《环境科学》编辑部

《中国环境科学》编辑部

《环境科学学报》编辑部

《Journal of Environmental Sciences》编辑部