

一种新厌氧氨氧化菌的 16S rRNA 基因序列测试

祖波^{1,3}, 张代钧^{1,2*}, 阎青¹

(1. 重庆大学环境科学系, 重庆 400030; 2. 重庆大学西南资源开发及环境灾害控制工程教育部重点实验室, 重庆 400030; 3. 重庆交通大学河海学院, 重庆 400074)

摘要:运用序批式试验测定厌氧氨氧化污泥的氨氮和亚硝态氮消耗量, 求得厌氧氨氧化活性为 $9.84 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$, 厌氧氨氧化菌消耗 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 与 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 之比为 1.311; 采用分子生物学方法从 EGSB 反应器颗粒污泥中提取细菌总 DNA, 经纯化、特异引物 PCR 扩增、克隆、测序等过程, 得到厌氧氨氧化菌部分 16S rDNA 序列; 通过系统发育树分析可以发现, 在 EGSB 反应器中富集得到的厌氧氨氧化菌种(anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete cquenwiron-1*)与 *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* 和 *Candidatus "Jettenia asiatica"* 同属, anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete cquenwiron-1* 与其他厌氧氨氧化菌基因序列的同源性最大为 93%。结果表明, 前期 EGSB 反应器富集得到了一种新型厌氧氨氧化菌, 该菌株命名为 anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete cquenwiron-1*。

关键词: 厌氧氨氧化菌; 16S rRNA; 基因序列

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)02-0469-05

Determination of 16S rRNA Gene Sequence for a New ANAMMOX Bacterial Species

ZU Bo^{1,3}, ZHANG Dai-jun^{1,2}, YAN Qing¹

(1. Department of Environmental Science, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 2. Key Laboratory of Southwest-China Resources Exploitation & Environmental Disaster Control Engineering, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 3. School of River and Ocean Engineering, Chongqing Jiaotong University, Chongqing 400074, China)

Abstract: The anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) activity of the sludge was about $9.84 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$ by measuring the simultaneous consumption of ammonium and nitrite under anoxic conditions in the batch tests. The consumption of $\text{NO}_2^- \text{-N}$ and $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ was 1.311 for ANAMMOX bacteria. The partial 16S rDNA sequence was obtained by using molecule biology methods. Crude DNA of the total bacteria in granular sludge from EGSB reactor was extracted and purified. Then, PCR amplification by using specific primer, clone and sequence determination was performed. ANAMMOX bacterial species(anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete cquenwiron-1*) which was enrichment cultivated from EGSB reactor were the same genera with *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* and *Candidatus "Jettenia asiatica"* by analyzing phylogenetic tree. The maximum identities of anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete cquenwiron-1* with other ANAMMOX bacterial species was about 93%. The results showed that a new ANAMMOX bacterial species which was enrichment cultivated from EGSB reactor was found and anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete cquenwiron-1* was denominated.

Key words: anaerobic ammonium-oxidizing bacteria; 16S rRNA; gene sequence

目前, 已经发现了 4 种厌氧氨氧化菌属: *Candidatus "Brocadia"* (*Candidatus "Brocadia fulgida"* 和 *Candidatus "Brocadia anammoxida"*), *Candidatus "Kuenenia"* (*Candidatus "Kuenenia stuttgarti"*), *Candidatus "Scalindua"* (*Candidatus "Scalindua wagneri"*, *Candidatus "Scalindua brodae"* 和 *Candidatus "Scalindua sorokinii"*) 和异养厌氧氨氧化菌属 (*Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* 和 *Candidatus "Jettenia asiatica"*)^[1,2]。对于厌氧氨氧化菌的测定可以采用传统方法和分子生物学方法进行检测。传统方法中包括同位素追踪法^[3]、特有反应测试法^[4]、蛋白质免疫荧光检测法^[5]、在线亚硝酸盐监测生物传感器^[6]等。分子生物学方法包括: 通过 PCR

扩增检测 ANAMMOX 微生物^[7]、用 FISH 检测 ANAMMOX 菌^[8]、高级的 FISH 方法测定 ANAMMOX 菌的活性(FISH 和微自动放射线照相术(FISH-MAR)和 FISH 靶标在 16S 和 23S rRNA 基因间的间隔区域(ISR-FISH))^[9]等。本课题组在 EGSB 反应器进水中供给含有亚硝酸钠和氯化氨的合成废水, 反应器运行条件控制在 32 ~ 35℃, pH 7.5 ~ 8.3, ORP - 40 ~ - 150 mV, 水力停留时间(HRT)4.2 h, 上升流速 4.86

收稿日期: 2007-05-31; 修订日期: 2007-09-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(50378094); 重庆大学研究生科技创新基金项目(200609Y1A0260185)

作者简介: 祖波(1980 ~), 男, 博士, 主要研究方向为废水处理理论与技术、环境生物技术, E-mail: boby123321@sina.com.cn

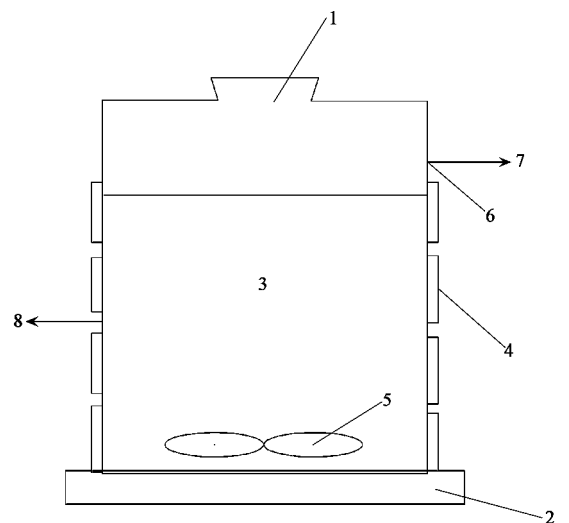
* 通讯联系人, E-mail: dzhang@cqu.edu.cn

$\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, 经过 270 d 运行, 富集得到具有厌氧氨氧化与甲烷化反硝化活性的颗粒污泥^[10]. 本研究运用传统方法对颗粒污泥厌氧氨氧化活性进行测试, 采用 16S rRNA 分子生物学方法对颗粒污泥中的厌氧氨氧化菌进行了分析, 以期为发展同时脱除有机 COD 和氮组分的新型厌氧废水处理技术积累基础资料.

1 材料与方法

1.1 污泥厌氧氨氧化菌活性测试

批试验反应装置如图 1, 热水循环保持反应器内部温度 $32\sim 35^{\circ}\text{C}$, 用 NaHCO_3 控制反应器 pH 7.0 ~ 7.5, 水质碱度调至 $1\,000\sim 2\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 CaCO_3 计). 加入经富集好的 EGSB 反应器中的 $1.197\,3\text{ g}$ 颗粒污泥^[8], 加入合成废水 0.5 L , N_2 吹脱 30 min 去除溶解氧. 合成废水组成: 亚硝态氮 (NaNO_2) $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 氨氮 (NH_4Cl) $39.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; (NH_4) $_2\text{SO}_4$ $7.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; KH_2PO_4 $3.04\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; K_2HPO_4 $3.96\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; NaHCO_3 $2\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 微量元素溶液 $2.0\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$. 微量元素溶液组成: EDTA $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $2.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $1.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $5.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $1.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (NH_4) $_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $1.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0.42\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.



1. 磨砂具塞进样口 2. 磁力搅拌器 3. 反应器 4. 橡胶恒温水浴管 5. 转子 6. 取样口 7. 取样口 8. 取样口

图 1 批试验反应器

Fig.1 Batch test reactor

法测定 MLSS, 钠氏试剂光度法测定 NH_4^+-N ^[11].

1.2 厌氧氨氧化菌部分基因序列测试

1.2.1 主要试剂及仪器

污泥取自 EGSB 反应器已经富集好的特殊功能颗粒污泥^[8]; 平衡酚和 TE 溶液购自上海生物技术有限公司; DNA 纯化试剂盒购自赛百胜生物科技有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 菌株为实验室保藏菌种. RNA 提取试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; pMD18-T 测序载体、DNA 凝胶回收纯化试剂盒、DNA 标准分子量、*E. coli* I 和 *Hind* III 限制性内切酶、ExTaq 酶以及 RT-PCR 均购自 Takara 公司, 测序由 Invitrogen 公司完成, 其它试剂均为分析纯. Bio-rad PCR 扩增仪, Sigma 高速冷冻离心机, Sigma 成像系统, Bio-rad 电泳仪, Thermo 超低温箱.

引物购自上海生物技术有限公司, 引物序列分别为: 上游的引物序列为: 5'-GTGGCGTAAGGGTGAGTAAT-3'; 下游的引物序列为: 5'-TAGGAGTCTGGGC AGTGTCT-3'.

1.2.2 细菌组织 DNA 的提取

取 250 mg 污泥于 1.5 mL 无菌离心管中, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集沉淀; 加入 400 μL TE 缓冲液 ($100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液, $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 1% CTAB, 用 HCl 调节 pH 至 8.0) 洗涤 2 次; 加入 500 μL 平衡酚, 37°C 水浴 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡 2 h, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 取上清液, 再往酚相中加入 400 μL TE 缓冲液 37°C 水浴 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡 2 h, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 取上清液; 把 2 次上清液合并; 上清液中加入 (0.6 ~ 1) 倍体积的异丙醇后静置 5 min, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min; 用 70% 乙醇漂洗沉淀, 干燥后溶于 100 μL TE 缓冲液. 粗制 DNA 采用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒纯化法, 纯化过程按照纯化试剂盒说明书进行. 总 DNA 用 1% 的琼脂凝胶电泳进行检测.

1.2.3 厌氧氨氧化菌 16S rDNA 部分片断的扩增

细菌 16S rDNA 基因片段的 PCR 反应体系 (总体积 20 μL): 1.8 μL dNTP (脱氧核糖核酸, $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1.5 μL MgCl_2 ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL 上游引物 ($20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL 下游引物 ($20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 0.2 μL DNA 模板, 0.3 μL ExTaq 聚合酶 ($5\text{ U}/\mu\text{L}$), 双蒸水 12.2 μL . PCR 扩增程序: 95°C 预变性 10 s; 94°C 变性 30 s, 52°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测. PCR 产物以 DNA 凝胶回收纯化试剂盒纯化.

用 *N*-(1 奈基)-乙二胺比色法测定 $\text{NO}_2^- -\text{N}$, 重量

1.2.4 16S rDNA 目的片段连接 pMD18-T 载体克隆

PCR 反应管(总体积 20 μL)中, 依序加入: 10 μL 纯化的 PCR 产物、0.3 μL DNA T4 Ligase、2 μL 10 $\times$ Ligation 缓冲溶液、0.2 μL pMD18-T、7.5 μL 双蒸水; 轻轻混匀上述连接成分, 低速离心后, 放置在 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜.

1.2.5 大肠杆菌感受态细胞的转化和克隆子的阳性检测

然后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 进行氨苄青霉素选择; 提取小量质粒 DNA, 并进行双酶切分析鉴定(依次加入 2 μL 10 $\times$ Buffer、5 μL pMD18-T-16S rDNA、0.3 μL *Eco*RI (5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、0.3 μL *Hind* III (5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)和 12.7 μL 双蒸水), 轻弹混匀并离心, 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切消化 4 h, 取 5 μL 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测.

PCR 检测克隆子: 在一微量离心管(总体积 20 μL)中依次加入: 2 μL 10 $\times$ Ex*Taq* Buffer、2 μL dNTP (25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)、1 μL 上游引物(20 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)、1 μL 下游引物 (20 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)、0.2 μL 模板质粒、0.3 μL Ex*Taq*(5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)和 13.5 μL 双蒸水. PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测.

1.2.6 16S rDNA 序列测定和系统进化分析

根据酶切结果挑出的阳性克隆送 Invitrogen 公司测序. 本研究所测得的 ANAMMOX 菌 16S rDNA 序列已在 GenBank 中登录, 登录号为 122892766. 测定的序列用 BLAST 在 GenBank 中搜索相近序列. 同时将该序列与已发表的相关细菌的 16S rDNA 序列目标用 Clustal X1.83 软件进行完全比对. 以 bootstrap-NJ 法构建 bootstrap-NJ 进化树.

2 结果与分析

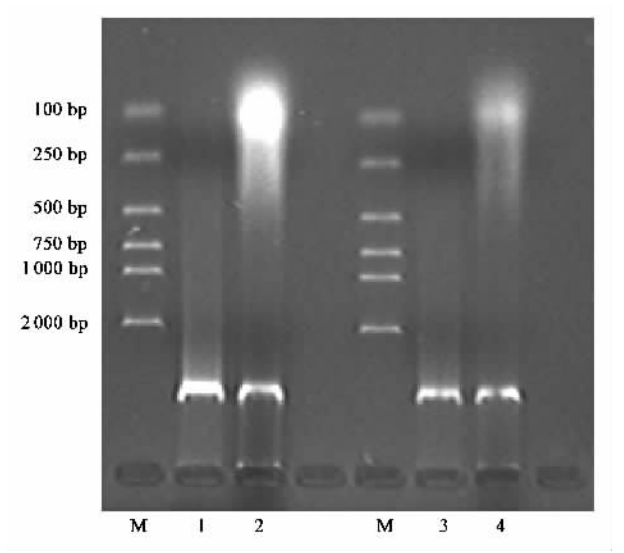
2.1 污泥厌氧氨氧化活性

试验氨氮浓度为 30 mg $\cdot\text{L}^{-1}$, 亚硝态氮浓度为 39.3 mg $\cdot\text{L}^{-1}$, 同时测定氨氮和亚硝态氮浓度的消耗量, 求得厌氧氨氧化活性: 以氨氮去除率表示为 9.84×10^{-4} mg $\cdot(\text{mg}\cdot\text{h})^{-1}$ 或者以亚硝态氮去除率表示为 12.9×10^{-4} mg $\cdot(\text{mg}\cdot\text{h})^{-1}$, NO $_2^{-}$ -N 去除量与 NH $_4^{+}$ -N 去除量的比值为 1.311.

2.2 厌氧氨氧化菌部系统发育树

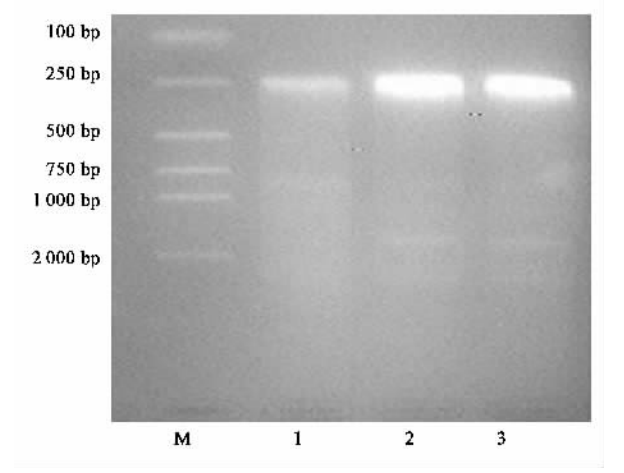
将颗粒污泥抽提所得 DNA 溶液经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 出现条带(图 2), 表明已获得较长片段的污泥微生物的总 DNA 基因组. 另外也可以看出,

目标条带的弥散和拖尾现象虽然不太明显, 但有一定的弥散和拖尾现象, 这显示 DNA 溶液中仍然含有少量的污染物.

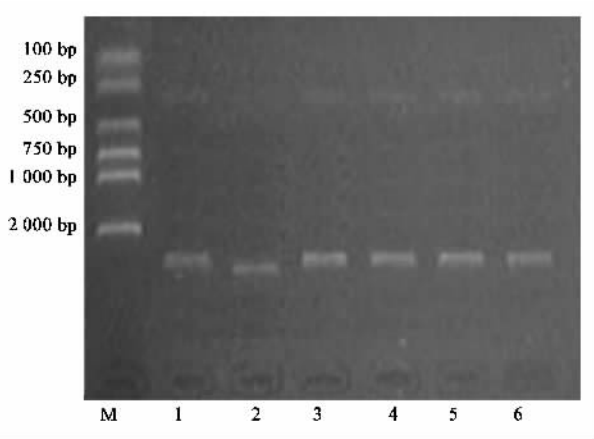


M: DNA marker; 2 和 4: 直接提取的 DNA; 1 和 3: 提取的 DNA 经纯化
图 2 颗粒污泥基因组 DNA 电泳结果
Fig.2 Genome DNA of granular sludge

从扩增 ANAMMOX 类菌的 16S rDNA 片段的 结果看(图 3), 细菌总 DNA 中扩增出的片段约为 250 bp. 颗粒污泥总 DNA 经 16S rDNA 部分片断的扩增后, PCR 产物以 DNA 凝胶回收纯化试剂盒纯化. 然后将 16S rDNA 目的片段连接到 pMD18-T 载体上克隆, 转化大肠杆菌感受态细胞, 提取小量质粒, 采用双酶切分析(如图 4)和 PCR 鉴定 16S rDNA 目标克隆子(如图 5), 最后送上海 Invitrogen 公司测序, 测得序列选最保守的核酸序列进行 BLAST 检索, 得到多个相近细菌的 16S rDNA 片段, 以这些序列构建系统发育树(图 6).



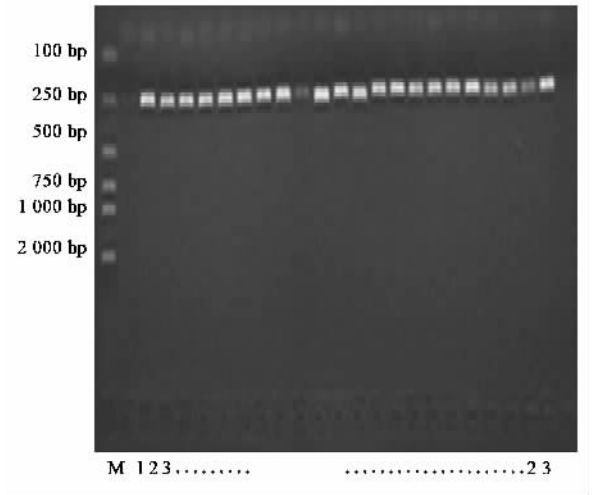
M: DNA marker; 1、2 和 3: 颗粒污泥 DNA
图 3 颗粒污泥 16S rDNA 片段扩增电泳结果
Fig.3 16S rDNA segment of granular



M: marker; 1 ~ 6: plasmid pMD-T-16S rDNA fragment

图 4 阳性克隆子的双酶切鉴定

Fig.4 Positive cloned plasmids sludge by PCR digested by two kinds of nzyme



M: marker; 1 ~ 23: 阳性克隆子

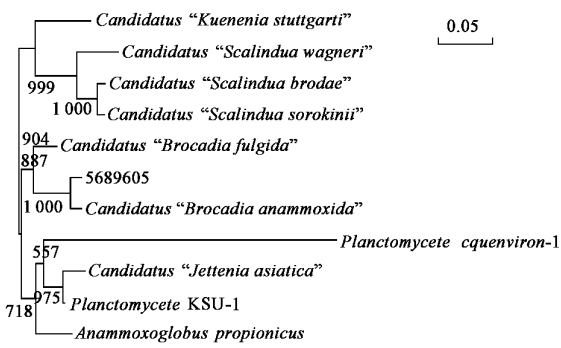
图 5 阳性克隆子 PCR 扩增鉴定

Fig.5 Positive cloned plasmids identified by PCR

3 讨论

由厌氧氨氧化菌活性测试,得到污泥的厌氧氨氧化活性为:以氨氮去除率表示为 $9.84 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$ 或者以亚硝态氮去除率表示为 $12.9 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$,厌氧氨氧化菌消耗 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 与消耗 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 之比为 1.311,这与其他学者^[12~14]研究结果基本一致.

本研究采用的引物与国内外研究者^[1,15~17]用于扩增厌氧氨氧化菌的引物有一定差异,但是本引物对厌氧氨氧化细菌具有一定的特异性,并进行了适当的延展,能包括 ANAMMOX 类菌.通过系统发育树分析可以发现,本研究得到新型厌氧氨氧化菌种



基因库中细菌的基因序列号 (GBBCT): 5689605 anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete* 16S rRNA 基因, GBBCT: 122892766 (EF185817) anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete cquenviron-1* 16S rRNA 基因,部分序列. 图右上角的尺度表示 100 个核苷中 2 个被替代,发育树树枝下面的数字表示自举值

图 6 颗粒污泥中厌氧氨氧化细菌与其他相关细菌的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of the ANAMMOX bacteria in granular sludge with its relatives

(anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete cquenviron-1*) 属于异养厌氧氨氧化菌属 (与 *Candidatus*“ *Anammoxoglobus propionicus*”和 *Candidatus*“ *Jettenia asiatica*”同属). anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete cquenviron-1* 与其他厌氧氨氧化菌基因序列的同源性最大为 93% .

有研究表明,“ *Candidatus Brocadia annamoxidans*”的细胞密度高于 $10^{10} \sim 10^{11} / \text{mL}^{-1}$ 才发生厌氧氨氧化,这个细胞密度决定反应活性的原因目前还不清楚^[18]. Sumino 等^[19]在单一反应器中研究了同时反化和厌氧氨氧化脱氮,颗粒污泥取自上流式反应器中甲烷化污泥,然后添加 C/N 为 1 的合成废水培养反硝化菌;当总 N 去除率达到了 30%,在反应器中添加厌氧氨氧化菌污泥,总 N 去除率达到了 80% ~ 94%, FISH 和同位素追踪法证明了厌氧氨氧化反应. Pathak 等^[20]在研究低氨浓度的生物反应器中发现存在厌氧氨氧化菌和反硝化菌及其活性,反应器运行了 300 d, FISH 和同位素追踪法证明了生物反应器中存在厌氧氨氧化菌,厌氧氨氧化菌在生物反应器的中心部位,证实了厌氧氨氧化菌在生物反应器中成功富集,厌氧氨氧化菌和反硝化菌在生物反应器中共生, N 去除率达到了 80%. Dong 等^[21]在研究家禽废水中评价了厌氧氨氧化与反硝化,发现了 13% ~ 22% 的氨被厌氧氨氧化菌消耗,也认为厌氧氨氧化菌和反硝化菌在批厌氧培养反应器中共生,厌氧氨氧化菌比反硝化菌竞争性要稍微

差一些.Guven 等^[22]研究发现丙酸盐在纯的厌氧氨氧化菌细胞中以(以单位蛋白质计) $0.8 \text{ nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ 速率被消耗,用丙酸盐富集培养厌氧氨氧化菌 150 d,厌氧氨氧化菌和反硝化菌的相对数量没有改变,表明了厌氧氨氧化菌比异氧反硝化菌更有效地竞争丙酸盐,并通过分子生物学测试得到一种新型的厌氧氨氧化菌并命名为 *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"*, *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* 氧化丙酸盐可能只发生能量代谢^[2].本研究所取颗粒污泥是在乙酸盐、氨盐和亚硝酸盐共存的 EGSB 反应器中经过 270 d 富集得到,所富集的厌氧氨氧化菌数量较大,并能与甲烷菌和反硝化菌共生,这与 *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"*^[2] 的特性相似.目前,废水处理过程中污泥减量是一个相当困难的问题.异氧厌氧氨氧化菌以及厌氧氨氧化甲烷化和反硝化的耦合^[10]的发现,对于现代废水处理技术朝着高污泥浓度,低污泥产率,高容积负荷速率,同时去除 COD 和营养成分,转化废水中有机物为清洁能源的综合化方向发展,有着重要价值.

4 结论

用序批试验同时测定氨氮和亚硝态氮浓度的消耗量,求得污泥厌氧氨氧化活性为: $9.84 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$ 或者 $12.9 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$;基于 16S rRNA 的分子生物学方法测定得到厌氧氨氧化菌的部分基因序列,进行了细菌的系统发育树分析;上述两方面结果表明,前期 EGSB 反应器富集得到了一种新型厌氧氨氧化菌,暂命名 anaerobic ammonium-oxidizing *Planctomycete cquenviron-1*.这种厌氧氨氧化菌能够同时代谢 COD、亚硝态氮和氨氮,并且细胞产率很低,对于发展新的废水处理技术具有重要价值.

参考文献:

- [1] Schmid M C, Maas B, Dapena A. Biomarkers for In Situ Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**: 1677-1684.
- [2] Kartala B, Jayne R, van Niftrika L A, et al. *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2007, **30**: 39-49.
- [3] Thamdrup B, Dalsgaard T. Production of N_2 through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 1312-1318.
- [4] Schmid M C, Walsh K, Webb R, et al. *Candidatus "Scalindua brodae"*, sp. nov., *Candidatus "Scalindua wagneri"*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. Syst Appl Microbiol, 2003, **26**: 529-538.
- [5] Schalk J, DeVries S, Kuenen J G, et al. Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation[J]. Biochemistry, 2000, **39**: 5405-5412.
- [6] Nielsen M, Revsbech N P, Larsen L H, et al. On-line determination of nitrite in wastewater treatment by use of a biosensor[J]. Water Sci Technol, 2002, **45**: 69-76.
- [7] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 1995, **59**: 143-169.
- [8] Neef A, Amann R I, Schlesner H, et al. Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes[J]. Microbiology, 1998, **144**: 3257-3266.
- [9] Lee N, Nielsen P H, Andreasen K H, et al. Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, **65**: 1289-1297.
- [10] 祖波, 张代钧, 白玉华, 等. EGSB 反应器中耦合厌氧氨氧化与甲烷化反硝化的研究[J]. 环境科学研究, 2007, **20**(2): 49-57.
- [11] 国家环境保护局. 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.
- [12] Strous M, Heijnen J J, Kuenen J G, et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, **50**: 589-596.
- [13] Van de Graaf A A, Mulder A, De Bruijn P, et al. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, **61**: 1246-1251.
- [14] Bock E, Schmidt I, Stüven R, et al. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonia or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor[J]. Arch Microbiol, 1995, **163**: 16-20.
- [15] 雒怀庆, 胡勇有. 厌氧氨氧化污泥中效应菌的分子生物学研究[J]. 微生物学报, 2005, **45**(3): 335-338.
- [16] 徐昕荣, 贾晓珊, 陈杰娥. 一种未见报道过的厌氧氨氧化微生物的鉴定及其活性分析[J]. 环境科学学报, 2006, **26**(6): 912-918.
- [17] 杨洋, 左剑恶, 全哲学, 等. UASB 反应器中厌氧氨氧化污泥的种群分析[J]. 中国环境科学, 2006, **26**(6): 52-56.
- [18] Jetten M, Wagner M, Fuerst J, et al. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ("anammox") process[J]. Curr Opin Biotechnol, 2001, **12**: 283-288.
- [19] Tatsuo S, Kazuichi I, Hajime I, et al. Nitrogen Removal from Wastewater Using Simultaneous Nitrate Reduction and Anaerobic Ammonium Oxidation in Single Reactor[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, **102**(4): 346-351.
- [20] Pathak B K, Kazama F, Saiki Y, et al. Presence and activity of anammox and denitrification process in low ammonium-fed bioreactors[J]. Bioresource Technology, 2007, **98**: 2201-2206.
- [21] Dong X, Tollner E W. Evaluation of Anammox and denitrification during anaerobic digestion of poultry manure[J]. Bioresource Technology, 2003, **86**: 139-145.
- [22] Guven D, Dapena A, Kartal B, et al. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(2): 1066-1071.