

# 实时荧光定量 PCR 对 A<sup>2</sup>/O 短程硝化系统内氨氧化菌的定量分析

李磊<sup>1</sup> 张立东<sup>2</sup> 刘晶茹<sup>3</sup> 曾薇<sup>1\*</sup> 杨莹莹<sup>1</sup> 王向东<sup>1</sup>

(1. 北京工业大学环境与能源工程学院, 北京 100124; 2. 北京工业大学建筑期查设计院, 北京 100124; 3. 大连海洋大学土木工程学院, 大连 116023)

**摘要** 通过控制好氧区低 DO 浓度以及缩短好氧实际水力停留时间 (actual hydraulic retention time, AHRT), 在处理低 C/N 比实际生活污水的 A<sup>2</sup>/O 工艺中, 成功启动并维持了短程硝化反硝化; 系统亚硝酸盐积累率稳定维持在 90% 左右, 氨氮去除率在 95% 以上。通过提取富集氨氧化菌 (ammonia oxidizing bacteria, AOB) 的基因组 DNA, 经两次常规 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳, 以纯化回收的 DNA 扩增片段作为实时荧光定量 PCR 检测 AOB 数量的 DNA 标准品, 建立了检测 AOB 数量的实时荧光定量 PCR 标准曲线。利用实时荧光定量 PCR 技术比较了 A<sup>2</sup>/O 系统在不同运行条件及亚硝酸盐积累率情况下 AOB 菌群数量。结果表明, 随着系统亚硝酸盐积累率的上升, 系统内 AOB 菌群数量也大幅上升。全程硝化和短程硝化时, 系统内的 AOB 菌群数量分别为  $5.28 \times 10^9$  cells/g MLVSS 和  $3.95 \times 10^{10}$  cells/g MLVSS。此外, 亚硝酸盐积累率的下降相对于 AOB 菌群数量的下降有一定的滞后性。

**关键词** 实时荧光定量 PCR 氨氧化菌 A<sup>2</sup>/O 工艺 短程硝化

中图分类号 X703.1 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2012)10-3597-06

## Real-time PCR quantification of ammonia oxidizing bacteria in short-cut A<sup>2</sup>/O process treating domestic wastewater

Li Lei<sup>1</sup> Zhang Lidong<sup>2</sup> Liu Jingru<sup>3</sup> Zeng Wei<sup>1</sup> Yang Yingying<sup>1</sup> Wang Xiangdong<sup>1</sup>

(1. College of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; 2. Institute of Architectural Exploration and Design, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; 3. School of Civil Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract** Short-cut nitrification and denitrification was started up and maintained in a lab-scale A<sup>2</sup>/O process treating low C/N ratio domestic wastewater by controlling DO concentration in low level and decreasing the aerobic actual hydraulic retention time (AHRT). The average nitrite accumulation rate reached about 90% and above 95% of ammonia nitrogen (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) could be removed. The genome DNA of the enriched ammonia oxidizing bacteria (AOB) culture was extracted and amplified, and then electrophoresed on agarose gel twice. The DNA fragments in reamplified agarose gel bands were recovered and purified, and then used as standard molecule. A standard curve of real-time fluorescent PCR was set up for AOB quantification. The numbers of the AOB in sludge samples under different operational conditions and nitrite accumulation rates were monitored and compared by using real-time quantitative PCR. The results showed that the numbers of AOB significantly increased with increasing of nitrite accumulation rates. The numbers of AOB in the complete nitrification activated sludge and short-cut nitrification activated sludge were  $5.28 \times 10^9$  cells/g MLVSS and  $3.95 \times 10^{10}$  cells/g MLVSS, respectively. Moreover, the decrease of the nitrite accumulation rates lagged behind the decline of AOB numbers.

**Key words** real-time fluorescent quantitative PCR; ammonia oxidizing bacteria; A<sup>2</sup>/O process; short-cut nitrification

污水生物脱氮包括硝化和反硝化两大阶段。其中硝化菌群是硝化阶段的功能微生物, 包括将 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 氧化为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的氨氧化菌 (ammonia oxidizing bacteria, AOB) 和将 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 氧化为 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的亚硝酸盐氧化菌 (nitrite oxidizing bacteria, NOB)<sup>[1]</sup>。

**基金项目:**北京市自然科学基金项目(8102005);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0891);霍英东教育基金会高等院校青年教师基金(121076)

**收稿日期:**2011-06-21; **修订日期:**2011-08-16

**作者简介:**李磊(1984~),男,硕士,主要从事污水生物脱氮除磷的研究。E-mail:llbxo1984@163.com

\* 通讯联系人, E-mail: zengwei\_1@263.net

近年来,短程脱氮( $\text{NH}_4^+$ -N 氧化为  $\text{NO}_2^-$ -N 后直接还原为  $\text{N}_2$ )由于能够有效节省碳源和能源而成为污水生物处理领域的研究热点<sup>[2,3]</sup>。实现短程脱氮的关键是采取调控手段使 AOB 成为优势硝化菌群,抑制或淘汰 NOB<sup>[4,5]</sup>。因此,对污水处理系统内 AOB 菌群结构、数量及活性进行深入研究,将为污水生物脱氮系统,尤其是短程脱氮的长期稳定运行提供有力保障。

目前,国外普遍采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR) 技术对污水生物处理系统内 AOB 菌群进行定量分析<sup>[6-8]</sup>。与传统的 PCR 技术和 FISH 技术相比,实时荧光定量 PCR 具有灵敏度高、重现性好,同时处理的样品量大等特点。实时荧光定量 PCR 普遍采用两种荧光物质进行定量分析。一种是带有荧光染料的 TaqMan 探针<sup>[9]</sup>,一种是 SYBR Green 染料<sup>[10]</sup>。无论使用哪种方法都要先建立目标 DNA 含量与 Ct 值之间的标准曲线。目前,研究者大都通过等梯度稀释纯培养目标菌的基因组 DNA、基因组 PCR 扩增片段切胶纯化回收产物、合成 DNA 片段或者含有目标 DNA 片段的质粒来制备标准品进而建立标准曲线<sup>[11]</sup>。其中利用质粒建立的标准曲线的重现性最好,但由于其操作较为复杂而限制了其广泛应用。

本研究的目的是:(1)通过采取一定的调控措施,在  $\text{A}^2/\text{O}$  系统内实现由全程脱氮向短程脱氮的转化;(2)使用 TaqMan 探针,快速建立实时荧光定量 PCR 检测 AOB 菌群数量的标准曲线;(3)采用实时荧光定量 PCR 技术对短程硝化的  $\text{A}^2/\text{O}$  系统内的 AOB 菌群数量进行定量分析,揭示 AOB 菌群动态变化与系统运行的相关性。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 主要试剂

DNA 提取试剂盒 (Fast DNA Spin kit for soil, BIO 101 system);琼脂糖;50×TAE 及 Goodviewna II 型染料购于北京博大生物科技有限公司;琼脂糖回收纯化试剂盒 (TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0)、DL500 DNA Marker、常规 PCR 扩增试剂盒 (TaKaRa EX Taq) 及实时荧光定量试剂盒 (Premix Ex Taq) 购于大连宝生物工程有限公司。

### 1.2 引物和探针

本实验中选取了针对 AOB 16S rDNA 基因的一组引物<sup>[8]</sup>。其中正向引物包括 CTO189fA/B (5'-

GGAGRAAAGCAGGGGATCG-3') 和 CTO189fC (5'-GGAGGAAAGTAGGGGATCG-3'), CTO189fA/B 与 CTO189fC 按 2:1 混合后使用;反向引物为 RT1r (5'-CGTCCTCTCAGACCARCT ACTG-3');探针为 TMP1 (5'-FAM-CAACTAGCTAATCAGRCATCRGCCGCTC-TAMRA-3')。正反向引物扩增的片段长度为 116 bp。引物和探针均由大连宝生物科技有限公司合成。

### 1.3 主要仪器

MP FastPrep 球磨仪、WLM BIO 1 恒温加热仪、ND-1000 紫外分光光度计、TC-512 型 PCR 扩增仪、Mx 3005 型实时荧光定量 PCR 仪、Sub-Cell GT 琼脂糖凝胶电泳系统、Bio-Rad 凝胶成像系统、高速冷冻离心机、掌上离心机。

### 1.4 实验装置及其运行

本实验采用的  $\text{A}^2/\text{O}$  实验装置如图 1 所示。该装置由有效容积为 80 L 的合建式的预缺氧-厌氧-缺氧-好氧反应器和有效容积为 24 L 的竖流式二沉池组成。合建式反应器分为 6 个格室,其中第 1 格室为预缺氧区,第 2 格室为厌氧区,第 3、4 格室为缺氧区,剩下的两个格室为好氧区;预缺氧区、厌氧区、缺氧区和好氧区的容积比为 1:2:3:6。在预缺氧区、厌氧区、缺氧区和好氧区均安装搅拌器以提供充分的泥水混合,好氧区通过固定在反应器底端的曝气头供气。实验进水全部进入厌氧区;回流污泥进入预缺氧区;内循环混合液由好氧区最后一个格室回流到缺氧区第 1 个格室。实验进水、回流污泥和内循环混合液流量均采用蠕动泵控制。

本实验采用取自某生活小区化粪池的实际生活污水作为实验用水。该生活污水属于典型的低 C/N 比生活污水,进水  $\text{NH}_4^+$ -N 平均值 69.4 mg/L,进水 COD 平均值为 177.5 mg/L,平均 C/N 仅为 2.53。在实验第 1 阶段和第 5 阶段向该生活污水中投加一定量的乙酸钠和丙酸钠作为外碳源,COD 投加当量分别为 150 mg/L 和 50 mg/L。接种污泥取自北京某城市污水处理厂二沉池回流污泥,属全程硝化污泥。实验分为 5 个阶段进行,反应器在每个阶段的运行参数如表 1 所示。实验期间,每个实验阶段均在系统调整后稳定运行 1~2 周后进行采样分析。冬季反应器内水温通过温控装置控制在  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,夏季反应器内水温为自然水温 ( $23 \sim 28^\circ\text{C}$ ),不加以调节。通过从二沉池底部排泥,控制系统 SRT 在 15~20 d,反应器内 MLSS 为  $(2\ 500 \pm 500)\text{mg/L}$ 。

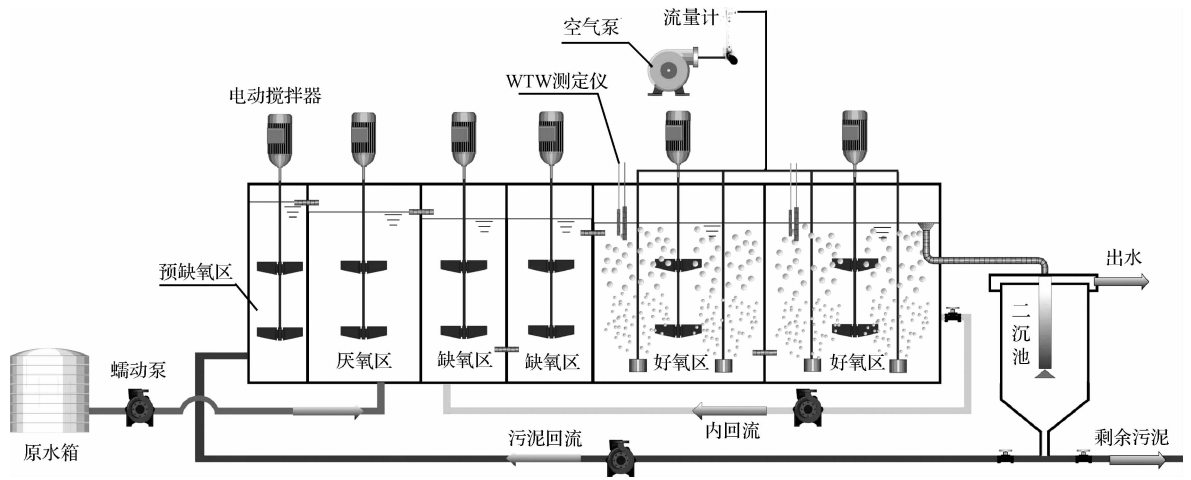


图 1 A<sup>2</sup>/O 工艺实验装置

Fig. 1 Schematic diagram of A<sup>2</sup>/O process

好氧实际水力停留时间 (AHRT) 和缺氧 AHRT 的计算公式如下:

$$\text{好氧 AHRT (好氧实际水力停留时间)} = \frac{V_{\text{好}}}{Q(1+R+r)}$$

$$\text{缺氧 AHRT (缺氧实际水力停留时间)} = \frac{V_{\text{缺}}}{Q(1+R+r)}$$

式中:  $V_{\text{好}}$  为好氧区有效容积;  $V_{\text{缺}}$  为缺氧区有效容积;  $Q$  为进水流量;  $r$  为内回流比;  $R$  为污泥回流比。

### 1.5 活性污泥样品

从 A<sup>2</sup>/O 工艺好氧区最后一个格室同时取 3 份 2 mL 活性污泥样品, 同时测定该格室 MLVSS。用 3 × PBS 清洗污泥样品 2 次, 14 000 × g 离心 2 min, 去除上清液, 加 0.5 mL 冰乙醇, 置于 -20℃ 保存。污泥取样点为系统运行的第 1、16、40、56、84、100、130、144 和第 156 天。

表 1 A<sup>2</sup>/O 工艺处理实际生活污水实现短程硝化的实验方案

Table 1 Scheme of the experiments for short-cut nitrification in A<sup>2</sup>/O process treating domestic wastewater

实验阶段	HRT (h)	缺氧 HRT (h)	好氧 HRT (h)	缺氧 AHRT (h)	好氧 AHRT (h)	DO (mg/L)
I (1~20 d)	9.31	2.54	4.97	0.53	1.03	1.5~2.5
II (21~42 d)	13.96	3.82	7.45	0.64	1.24	0.1~0.3
II (43~60 d)	9.31	2.54	4.97	0.53	1.03	0.3~0.5
III (61~88 d)	9.31	2.54	4.97	0.44	0.86	0.3~0.5
III (89~100 d)	9.31	2.54	4.97	0.53	1.03	0.3~0.5
III (101~108 d)	11.63	3.18	6.21	0.53	1.03	0.3~0.5
IV (109~140 d)	13.96	3.82	7.45	0.53	1.03	0.3~0.5
V (141~156 d)	13.96	3.82	7.45	0.80	1.55	0.3~0.5

### 1.6 富集培养 AOB 样品

本实验取本课题组富集培养的 AOB 菌群构建实时荧光定量 PCR 标准品。AOB 富集培养方法如下: 取一定量硝化性能良好的活性污泥, 置于 300 mL 三角瓶中, 在恒温 26℃、摇床转速 140 r/min 的条件下, 采用间歇式更换富集培养液的方式对亚硝化菌进行富集培养。经过 4 周富集培养, 活性污泥对 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 去除效果稳定, 亚硝积累率稳定维持在 98% 以上, 经 FISH 检测, AOB 占全菌数量的 80% 以上。富集培养液配方为: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g/L; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L; NaHCO<sub>3</sub> 3.0 g/L; FeSO<sub>4</sub> 0.4 g/L; NaCl 2 g/L 及微量元素营养液。

### 1.7 DNA 的提取

采用 DNA 提取试剂盒 (Fast DNA Spin kit for soil) 对保存的活性污泥样品和富集培养的 AOB 进行 DNA 提取。3 个平行样品分别进行 DNA 提取后混合在一起, 以降低提取过程中的操作误差给实验结果带来的影响。利用 ND-1000 紫外分光光度计检测 DNA 提取效果及其浓度。

### 1.8 常规 PCR 及实时荧光定量 PCR

使用常规 PCR 扩增试剂盒 (TaKaRa EX Taq), 配置 50 μL 的反应体系; 该体系中包括 5 μL 10 × Ex Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus), 4 μL dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 1 μL 正向引物 (10 μmol/L), 1 μL 反向引物 (10 μmol/L), 0.25 μL TaKaRa Ex Taq (5 U/μL), 1 μL DNA 模板, 37.75 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增条件如下: 94℃ 3 min; 95℃ 45 s; 58℃ 30 s; 72℃ 45

s, 30 个循环; 72℃ 4 min。反应体系温度最后降至 4℃, 待分析。

实时荧光定量 PCR 扩增体系为 25 μL, 该体系中包括 12.5 μL 10 × Ex Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus), 0.75 μL 正向引物 (10 μmol/L), 0.75 μL 反向引物 (10 μmol/L), 1 μL TMP1, 1 μL DNA 模板, 0.5 μL ROX Reference Dye II, 8.5 μL ddH<sub>2</sub>O。扩增条件为 95℃ 30s; 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 40 个循环。

### 1.9 分析测试方法

实验分析方法均采用国家规定的标准方法<sup>[12]</sup>, 项目包括 COD、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、MLVSS 等, 水样经滤纸过滤后进行分析测定。DO 的检测采用德国 WTW-Multi-340i 便携式在线测定仪进行测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 A<sup>2</sup>/O 反应器短程脱氮的运行

A<sup>2</sup>/O 反应器运行期间的亚硝酸盐积累率和氨氮去除情况如图 2 所示, 本实验第 1 阶段采取高 DO 的运行方式, 系统对氨氮的去除率达 95% 以上, 出水以硝酸盐为主。实验第 2 阶段前期 (21 ~ 42 d) 采取低 DO 的运行方式, 该阶段出水仍以硝酸盐为主; 但系统对氨氮去除率降为 30% 左右, 硝化能力受到严重影响。第 2 阶段后期 (43 ~ 60 d), 将 DO 控制在 0.3 ~ 0.5 mg/L, 并提高了系统的负荷, 但该阶段也没有 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 积累。随后在第 3 阶段前期 (61 ~ 88 d) 通过增大内回流量来降低系统好氧实际水力停留时间 (好氧 AHRT)。随着系统的运行, 好氧 2 出水中的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 积累率逐渐上升, 最后稳定在 80% 以上, 但由于系统的 HRT 较短, 低 DO 下系统对氨氮的平均去除率仅为 53.5%。第 3 阶段中期 (89 ~ 100 d) 在保持进水流量不变的情况下, 将内回流量

降低, 好氧 AHRT 恢复到第 3 阶段前期水平, 该阶段 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 积累率仍保持在 80% 以上。第 3 阶段后期 (101 ~ 108 d) 及第 4 阶段则通过逐渐降低进水流量、延长系统 HRT 来提高系统对氨氮的去除效果; 在降低进水流量的同时, 适当调高内回流流量, 保持这两个阶段好氧 AHRT 与第 3 阶段中期 (89 ~ 100 d) 相同。通过各个阶段的调节, 第 4 阶段 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 积累率稳定在 90% 左右, 氨氮的去除率也达到 95% 以上。在第 5 阶段通过降低内回流量, 将好氧 AHRT 调整为 1.55 h, 导致该阶段系统的亚硝酸积累率逐渐下降, 实验末期亚硝酸盐积累率仅为 33.6%。上述运行结果表明, 控制好氧区低 DO 浓度及缩短好氧 AHRT 是实现 A<sup>2</sup>/O 系统短程硝化的主要原因。

### 2.2 AOB 实时荧光定量标准曲线的建立

利用 DNA 提取试剂盒, 从富集的 AOB 菌群中提取基因组 DNA。为防止抑制物对 PCR 扩增的影响, 将提取的 DNA 用超纯水稀释 10 倍后再进行常规 PCR 扩增 (扩增体系组成及扩增条件见 1.8)。配制 3% 琼脂糖凝胶电泳 (加入 Goodviewna II 型染料), 取 30 μL PCR 扩增产物在 75 V 电压下电泳。切下含 116 bp 的条带后用琼脂糖回收纯化试剂盒对目的 DNA 片段进行纯化回收。将纯化回收产物作为模板再重复进行一次 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、回收纯化产物。

经紫外分光光度计测定回收的二次 PCR 回收产物浓度为 14.1 ng/μL, 根据公式 (1) 计算 DNA 拷贝数。

$$\text{DNA 拷贝个数 (个/}\mu\text{L)} = \frac{6 \times 10^{23} \times C_{\text{DNA}} \times 10^{-9}}{MW}$$

式中:  $M$  为 1 拷贝 DNA 分子的碱基对数, bp/个;  $W$  为 1 个碱基对的道尔顿数, 660 Daltons/bp; Daltons 为道尔顿, 质量单位, 1 g 约为  $6 \times 10^{23}$  Daltons;  $C_{\text{DNA}}$  为 DNA 浓度, ng/μL。

计算得出 DNA 拷贝数为  $1.01 \times 10^{11}$  个/μL。将回收产物按 10 倍梯度稀释用作标准品, 即  $1.01 \times 10^9$ 、 $1.01 \times 10^8$ 、 $1.01 \times 10^7$ 、 $1.01 \times 10^6$ 、 $1.01 \times 10^5$ 、 $1.01 \times 10^4$ 、 $1.01 \times 10^3$  个/μL。然后将标准品在实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增 (扩增体系组成及扩增条件见 1.8), 每个浓度的标准品均设 3 个平行, 结果取平均值。建立的反应阈值 (cycle threshold,  $C_t$ ) 与 DNA 浓度对应关系的 AOB 定量标准曲线如图 3 所示。该实时荧光定量 PCR 标准曲线 ( $y = -3.341x + 43.63$ ) 以初始模板量的对数值为横坐标,  $C_t$  值为纵坐标, 其初始模板浓度与  $C_t$  值之间呈现较

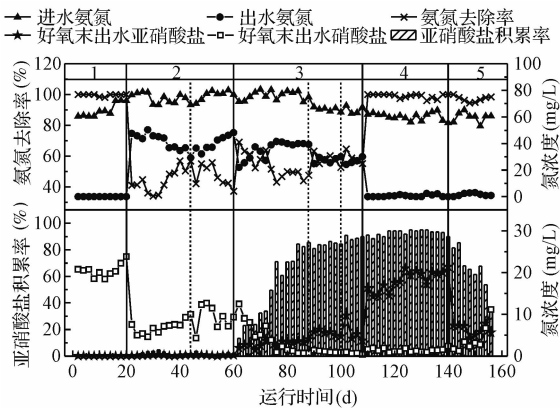


图 2 亚硝酸盐积累及氨氮去除情况

Fig. 2 Nitrite accumulation rates and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N removal

好的线性关系(相关系数为 0.999),斜率为 -3.341,PCR 扩增效率为 99.2%。由此可见,该实时荧光定量 PCR 的引物、反应条件及标准品的制备都符合试验要求,可以根据建立的标准曲线来计算未知样品中 AOB 的菌群数量。

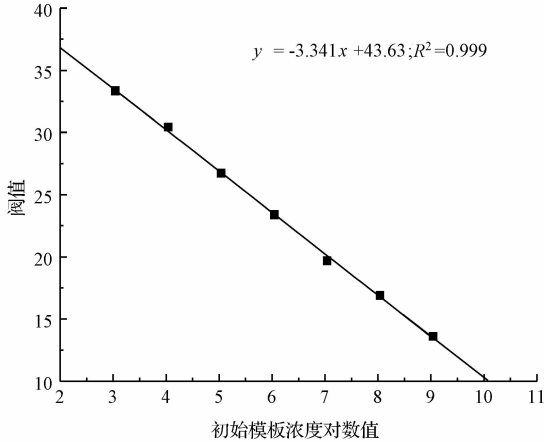


图 3 AOB 实时荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 3 Standard curve of AOB assay by real-time PCR

### 2.3 对污泥样品的检测

本实验利用实时荧光定量 PCR 技术对不同运行条件及亚硝酸盐积累率情况下 A<sup>2</sup>/O 系统内 AOB 菌群数量进行了定量分析,其定量结果如图 4 所示。在实验第 1 阶段,高 DO 运行情况下系统硝化性能良好,但由于接种污泥本身硝化性能较好,所以 AOB 含量在该阶段系统运行期间并没有明显增加,仅从种泥的  $4.66 \times 10^9$  cells/g MLVSS(第 1 天)上升到  $5.28 \times 10^9$  cells/g MLVSS(第 16 天)。随后由于 DO 下降,系统硝化性能恶化,该阶段 AOB 的种群数量下降幅度达 33.5%(第 40 天)。第 3 阶段通过降低好氧 AHRT,系统的亚硝酸盐积累率逐渐上升。在第 84 天, AOB 的种群数量达到了  $4.40 \times 10^{10}$  cells/g MLVSS,系统的亚硝酸盐积累率也达 84.2%。随后通过延长水力停留时间,系统的硝化能力得到加强,出水亚硝酸积累率平均值在 90% 左右,但 AOB 菌群数量相对稳定,并没有明显的变化,完全短程硝化阶段为  $3.95 \times 10^{10}$  cells/g MLVSS。说明通过第 3 阶段前期的驯化富集, AOB 的菌群数量在一定氨氮负荷以及 SRT 条件下达到了相对稳定状态。在实验第 5 阶段, AOB 的种群数量下降到  $2.18 \times 10^{10}$  cells/g MLVSS(第 144 天),系统的亚硝酸盐积累率却依然保持在 85.2%,但随后系统的亚硝酸盐积累率逐渐下降到 33.6%。可见 AOB 菌群数量的

减少对系统亚硝酸盐积累率的影响有一定的滞后性,故当系统内的 AOB 菌群数量降低时,应及时调整控制策略,恢复 AOB 菌群数量,进而能够稳定系统的短程硝化效果。

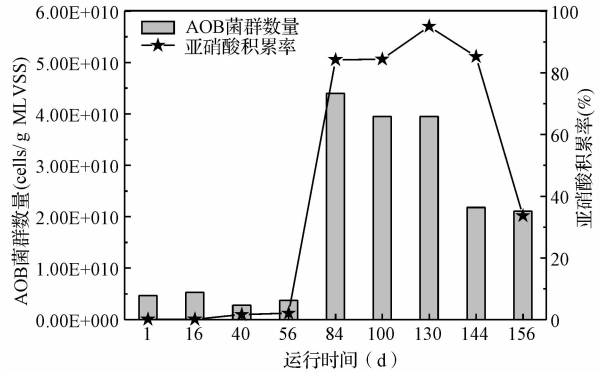


图 4 污泥样品 AOB 的定量

Fig. 4 AOB quantification in sludge samples

### 3 结 论

(1) 通过控制 DO 浓度以及好氧 AHRT,在处理生活污水 A<sup>2</sup>/O 工艺中成功启动短程硝化反硝化,系统的亚硝酸积累率平均值达 90%,氨氮去除率在 95% 以上。

(2) 以富集的 AOB 菌群 DNA 提取物为基础,经两次 PCR 扩增以及琼脂糖凝胶回收获得了 AOB 实时荧光定量标准品,成功建立了 AOB 实时荧光定量 PCR 的标准曲线。

(3) 利用建立的 AOB 实时荧光定量 PCR 标准曲线对污泥样品内的 AOB 菌群进行定量分析,证实了好氧区低 DO 浓度及缩短好氧 AHRT 促进了 AOB 增殖,使其成为优势硝化菌群,实现短程硝化。系统亚硝酸盐积累率的下降相对于 AOB 菌群数量的下降有一定的滞后性。

### 参 考 文 献

- [1] Zhu G., Peng Y., Li B., et al. Biological removal of nitrogen from wastewater. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 2008, 192: 159-195
- [2] 孙洪伟,王淑莹,王希明,等. 高氨氮垃圾渗滤液 SBR 法短程深度生物脱氮. 化工学报, 2009, 60(7): 1806-1811  
Sun Hongwei, Wang Shuying, Wang Ximing, et al. Advanced nitrogen removal from landfill leachate with highly concentrated ammonia nitrogen via nitrite in SBR. CIESC Journal, 2009, 60(7): 1806-1811 (in Chinese)
- [3] 杨庆,王淑莹,杨岸明,等. 城市污水 SBR 法短程生物脱

- 氮的中试研究. 中国环境科学, **2007**, 27(2): 150-154
- Yang Qing, Wang Shuying, Yang Anming, et al. A pilot scale study on short-cut biological nitrogen removal of municipal wastewater with SBR process. China Environmental Science, **2007**, 27(2): 150-154 (in Chinese)
- [4] 曾薇, 张悦, 李磊, 等. 生活污水常温处理系统中 AOB 与 NOB 竞争优势的调控. 环境科学, **2009**, 30(5): 1430-1436
- Zeng Wei, Zhang Yue, Li Lei, et al. Competition and optimization of AOB and NOB for domestic wastewater treatment at normal temperatures. Environmental Science, **2009**, 30(5): 1430-1436 (in Chinese)
- [5] Ma Y., Peng Y., Wang S., et al. Achieving nitrogen removal via nitrite in a pilot-scale continuous pre-denitrification plant. Water Research, **2009**, 43(3): 563-572
- [6] Limpiyakorn T., Shinohara Y., Kurisu F., et al. Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. FEMS Microbiol. Ecol., **2005**, 54(2): 205-217
- [7] Layton A., Dionisi H., Kuo H., et al. Emergence of competitive dominant ammonia-oxidizing bacterial populations in a full-scale industrial wastewater treatment plant. Appl. Environ. Microbiol., **2005**, 71(2): 1105-1108
- [8] Harms G., Layton A., Dionisi H., et al. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. Environ. Sci. Technol., **2003**, 37(2): 343-351
- [9] Okano Y., Hristova K., Leutenegger C., et al. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. Appl. Environ. Microbiol., **2004**, 70(2): 1008-1016
- [10] Araki N., Yamaguchi T., Yamazaki S., et al. Quantification of amoA gene abundance and their amoA mRNA levels in activated sludge by real-time PCR. Water Science and Technology, **2004**, 50(8): 1-8
- [11] Dionisi H. M., Layton A. C., Harms G., et al. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-Like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. Appl. Environ. Microbiol., **2002**, 68(1): 245-253
- [12] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法(第4版). 北京: 中国环境科学出版社, **2002**