

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE



ENVIRONMENTAL SCIENCE

第37卷 第7期 2016年7月15日

目 次

2015 年北京市两次红色预警期间 PM _{2.5} 浓度特征 ·······
程念亮,张大伟,陈添,石爱军,孙峰,刘保献,邹本东,王琴,李倩,王小菊,姜磊,孟凡(2409)
北京市冬季雾霾天人体呼吸高度 PM, 5变化特征对气象因素的响应 ······ 张南,熊黑钢,葛秀秀,段鹏程,毛先如,王亚龙(2419)
· 山州十号细颗粉物由名环芒松远沈蛙作及亚洲分析 · · · · · · · · · · · · · 本 · · · · ·
三川八(如林德·沙丁夕/17月7月17年7月1127年7月1127年7月11日7年7月11日7年7日7年7日7年7日7年7日7年7日7年7日7年7日7年7日7年7日7
兰州大气细颗粒物中多环芳烃污染特征及来源分析
新疆准东煤田降尘重金属污染及健康风险评价 ····································
利亚化尔森口牌土里立周行朱汉健康风险[T]] "你本,爷也用位徒'行仪者,庆祀手,同于师,刈为,发佣(2403) 香中地区十年长坡上中与与同民考虑化维尔及上十年扩流的关系
重庆地区大气场降水中氢氧同位素变化特征及与大气环流的关系
例外图集中位系组分的时间变化特征及影响因于分析。————————————————————————————————————
一
何小-地下小侧间父互审地球化学付征;以里庆川当致侯为例。————————————————————————————————————
张宇,杨平恒,王建力,谢世友,陈峰,詹兆君,任娟,张海月,刘黛薇,孟元可(2478)
亚热带典型岩溶溪流水气界面 CO ₂ 交换通量变化过程及其环境影响 ·········· 李丽, 蒲俊兵, 李建鸿, 于奭, 肖琼, 张陶(2487)
淹水条件下三峡库区典型消落带土壤释放 DOM 的光谱特征:紫外-可见吸收光谱
 准水条件トニ峡库区典型消洛带土壌棒成 DOM 的光谱特征: 紫外-可见吸収光谱
 準水条件トニ映库区典型消洛常土
(Marking Ethin 1987)
华东地区杲水源水中 13 种磺胺类抗生素的分布特征及人体健康风险评价
金磊,姜蕾,韩琪,薛佳怡,叶辉,曹国民,林匡飞,崔长征(2515) 北京水环境中氯胺酮和去甲氯胺酮的浓度水平····································
北京水环境中氯胺酮和去甲氯胺酮的浓度水平
输水期间于桥水库流域水体中溶解态多环芳烃的分布特征与风险 昌盛,赵兴茹,付青,郭睿,王山军(2530)
输水期间于桥水库流域水体中溶解态多环芳烃的分布特征与风险 ····································
岩溶地下河水中多环芳烃、脂肪酸分布特征及来源分析
哈尔滨主城区不同下垫面融雪径流污染特性 孙夕涵,刘硕,万鲁河,王宏(2556)
降水对沣河水质和水体微生物的影响 卢思丹, 孙寓姣, 赵轩, 王蕾, 郑丹阳(2563)
不同磷源下铜绿微囊藻的生长差异及对砷酸盐的响应 王振红,张汉鹏,罗专溪(2570)
布洛芬和双氯芬酸在不同构型人工湿地中的去除行为研究 景瑞瑛,杨扬,戴玉女,万翔,邰义萍,樊静静(2577)
化学预氧化对苏氨酸生成三氯乙醛的影响 蔡广强,傅学敏,刘丽君,卢小艳,张金松,刘嘉祺,曲莹(2586)
活性炭负载 Co ₃ O ₄ 活化过一硫酸盐降解金橙 G 王忠明,陈家斌,张黎明,李文卫,黄天寅(2591)
碳纳米管活化过—硫酸盐降解金橙 G 过程及动力学························ 张黎明,陈家斌,李文卫,王忠明,黄天寅(2601)
化学预氧化对苏氨酸生成三氯乙醛的影响
. 健和 表 London 夠深 L 支 付外影 E 产展 形 由 AOV - 角 医和 10C 附 上 经对 电研究
. 健和 表 London 夠深 L 支 付外影 E 产展 形 由 AOV - 角 医和 10C 附 上 经对 电研究
. 健和 表 London 夠深 L 支 付外影 E 产展 形 由 AOV - 角 医和 10C 附 上 经对 电研究
. 健和 表 London 夠深 L 支 付外影 E 产展 形 由 AOV - 角 医和 10C 附 上 经对 电研究
. 健和 表 London 夠深 L 支 付外影 E 产展 形 由 AOV - 角 医和 10C 附 上 经对 电研究
铁刨花-Fenton-絮凝工艺对染料生产废水中 AOX、色度和 TOC 的丢除效果研究 ————————————————————————————————————
铁刨花-Fenton-絮凝上艺对染料生产废水中 AOX、色度和 TOC 的去除效果研究 ————————————————————————————————————
探刨花-Fenton-絮凝工艺对染料生产废水中 AOX、色度和 TOC 的丟除效果研究
读刨花-Fenton-絮凝工艺对染料生产废水中 AOX、色度和 TOC 的去除效果研究 一部 在 上海 大 上海 大 上海 大 大 東 東 法 大 大 大 東 東 法 大 大 大 大
读刨花-Fenton-絮凝工艺对染料生产废水中 AOX、色度和 TOC 的去除效果研究 一部 在 上海 大 上海 大 上海 大 大 東 東 法 大 大 大 東 東 法 大 大 大 大
读刨花-Fenton-絮凝工艺对染料生产废水中 AOX、色度和 TOC 的去除效果研究 一部 在 上海 大 上海 大 上海 大 大 東 東 法 大 大 大 東 東 法 大 大 大 大
探刨花-Fenton-繁凝工艺对染料生产废水甲 AOX、色度和 TOC 的去除效果研究
读刨花-Fenton-繁健工艺对染料生产废水中 AOX、色度和 TOC 的去除效果研究
读刨花-Fenton-繁健工艺对染料生产废水中 AOX、色度和 TOC 的去除效果研究
等側花-Fenton 繁雄上乙対染料生产废水甲 AOX、色度和 TOC 的丢除效果研究
探側花-Fenton 氧化去除制药企业活性污泥中 AOX 的效果研究
探側花-Fenton 氧化去除制药企业活性污泥中 AOX 的效果研究
探側花-Fenton 氧化去除制药企业活性污泥中 AOX 的效果研究
(空間花-Fenton-繁凝上 Z 対染料生产废水中 AOX、色度和 TOC 的 医 家

基于高通量测序的 ABR 厌氧氨氧化反应器各隔室细菌群落特征分析

陈重军1,2,3,张海芹1,汪瑶琪1,喻徐良1,王建芳1,2,沈耀良1,2*

(1. 苏州科技大学环境科学与工程学院, 苏州 215009; 2. 江苏省水处理技术与材料协同创新中心, 苏州 215009; 3. 浙江省水体污染控制与环境安全技术重点实验室, 杭州 310058)

摘要:为明确厌氧折流板反应器(ABR)稳定运行厌氧氨氧化反应后各隔室微生物群落结构特征,本文采用 Miseq 高通量测序分析技术,对 ABR 厌氧氨氧化反应器 5 个隔室的微生物分布规律进行了研究,结果表明,ABR 反应器中脱氮微生物多样性较为丰富,变形菌门(Proteobacteria)占 11.66% ~ 20.28%,浮霉菌门(Planctomycetes)占 2.18% ~ 7.94%,硝化螺旋菌门(Nitrospirae)占 0.19% ~ 6.30%. 其中,在 ABR 反应器中变形菌门占据主导地位,主要包含 Rhodoplanes、Dok59、Rubrivivax 和 Bdellovibrio 等菌属,浮酶菌门次之,主要包含 Candidatus brocadia 和 Candidatus kuenenia 菌属. 从第 1 ~ 5 隔室,污泥表观红色逐渐减退,趋向于灰黑色,Chao、ACE、Shannon、Simpson 指数均表明微生物群落丰富度逐渐增加,且变形菌门微生物逐渐增加,而浮霉菌门微生物逐渐降低,这与基质的降解和功能微生物的富集规律相一致.

关键词: 厌氧折流板反应器; 隔室; 厌氧氨氧化菌; 群落特征; 高通量测序

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2016)07-2652-07 DOI: 10.13227/j. hjkx. 2016. 07. 031

Characteristics of Microbial Community in Each Compartment of ABR ANAMMOX Reactor Based on High-throughput Sequencing

CHEN Chong-jun^{1,2,3}, ZHANG Hai-qin¹, WANG Yao-qi¹, YU Xu-liang¹, WANG Jian-fang^{1,2}, SHEN Yao-liang^{1,2}*

(1. School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Technology and Material of Water Treatment, Suzhou 215009, China; 3. Key Laboratory for Water Pollution Control and Environmental Safety, Zhejiang Province, Hangzhou 310058, China)

Abstract: In order to investigate the characteristics of microbial community in each compartment of ABR anammox reactor, a five-compartment ABR reactor was used to analyze the microbial community by Miseq High-throughput Sequencing during the steady operational process. The results indicated that the denitrifying bacteria coexisted in the reactor, such as Proteobacteria, Planctomycete, and Nitrospirae bacteria, and the percentages of these three microbial populations in the sludge were 11.66% - 20.28%, 2.18% - 7.94% and 0.19% -6.30%, respectively. In addition, there were four dominant genera in the phylum Proteobacteria; Rhodoplanes, Dok59, Rubrivivax and Bdellovibrio. Furthermore, Candidatus brocadia and Candidatus kuenenia were the main genera in the phylum Planctomycete. The color of sludge in the five compartments, in turn, varied from red to black. In addition, the biodiversity index of Chao, ACE, Shannon and Simpson indicated that the richness and diversity of microbial community increased gradually, and at the same time, the relative abundance of Proteobacteria increased while that of Planctomycetes gradually decreased. The above conclusion was consistent with the laws of substrate degradation and enrichment of functional microorganisms.

Key words: anaerobic baffled reactor (ABR); compartment; ANAMMOX bacteria; microbial community characteristics; high-throughput sequencing

厌氧氨氧化反应(anaerobic ammonium oxidation, ANAMMOX)在废水脱氮过程中应用优势明显^[1,2]. 但 ANAMMOX 菌生长缓慢(最大比生长率仅0.0027 h⁻¹)、倍增时间长(10~12 d),导致厌氧氨氧化反应器启动耗时长且功能菌难以富集^[3],成为限制厌氧氨氧化处理工艺大规模应用的最主要因素^[4]. 因此,如何选择合适的反应器,降低ANAMMOX 菌的流失,是成功应用厌氧氨氧化过程的关键. 而厌氧折流板反应器(anaerobic baffled

reactor, ABR)具有可耐受较高的污染负荷、良好的生物截留能力、易于固液分离、易形成颗粒污泥等特点,对培养增殖速度缓慢的 ANAMMOX 菌具有较好的菌体持留能力,已经应用于厌氧氨氧化研究,表

收稿日期: 2015-12-27; 修订日期: 2016-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(51508366,51308367); 江苏省

高校自然科学基金项目(14KJB610008)

作者简介: 陈重军(1984~),男,博士研究生,讲师,主要研究方向为 废水生物处理技术与机制, E-mail: chongjunchen@ 163.

* 通讯联系人,E-mail:ylshen@ mail. usts. edu. cn

明 ABR 反应器在低基质浓度快速启动、ANAMMOX 污泥流失率降低及不同负荷氮素稳步去除等方面具 有显著优势^[5,6].

高通量测序技术作为新型微生物种群鉴定技术,具有分析结果准确、高速、高灵敏度和高自动化等特点,在环境微生物鉴定领域应用广泛^[7,8].同时,该技术也已经应用于厌氧氨氧化反应器微生物群落结构的检测,取得了较好的应用效果^[9].而在ABR 厌氧氨氧化反应器各隔室微生物的分布方面,还未有相关研究.本研究拟采用 Miseq 高通量测序分析,定性并定量研究 ABR 反应器启动厌氧氨氧化成功并稳定运行后,各隔室微生物的分布情况,以期为 ANAMMOX 微生物在 ABR 反应器的分布规律提供理论支持.

1 材料与方法

1.1 污泥来源

本研究污泥取自 5 隔室 ABR 反应器,反应器由有机玻璃制成,长 37.5 cm,宽 8 cm,高度 33 cm,持水高度 26.5 cm,有效容积 6.36 L,每隔室升流区降流区格间宽度比为 4:1,折流板导向角 45°,见图 1.为保证 ANAMMOX 菌适宜生存的温度,ABR 反应器置于水浴维持温度 30~35°C,启动初期接种取自 UASB 反应器的厌氧颗粒污泥和城市污水处理厂 A^2/O 工艺的厌氧污泥作为混合污泥(1:3质量比混合).

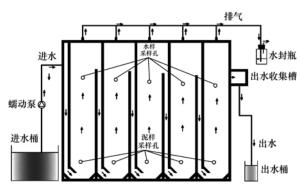


图 1 ABR 反应器装置示意

Fig. 1 Schematic of anaerobic baffled reactor

ABR 反应器采用连续流方式运行,原水采用人工模拟配水,控制较低的进水基质浓度,进水 NH_4^+ -N和 NO_2^- -N浓度分别控制在 55 mg·L⁻¹和 60 mg·L⁻¹,水力停留时间(HRT)为 48 h^[10]. 120 d 后,ABR 反应器启动厌氧氨氧化获得成功并进入稳定运行期. 稳定运行期间,通过缓慢降低 HRT 至 5 h,反应器表现出较强的 TN 去除效果,对 TN 的去除率>80%, TN 去除负荷达 504. 8 g·(m³·d)⁻¹. 按照各

隔室对氮素的去除贡献来看, NH_4^+ - $N和NO_2^-$ -N基本在第 $1\sim2$ 隔室被去除,对氮素的去除贡献率分别为 97% 和 2%,后端第 $3\sim5$ 隔室的脱氮贡献率不明显,见表 1.

表 1 ABR 反应器各隔室脱氮效率

Table 1 Nitrogen removal efficiency in each

compartment of ABR reactor						
ABR 各隔室	NH ₄ -N浓度	NO ₂ -N浓度	氮素去除			
出水水质	$/\mathrm{mg} \cdot \mathrm{L}^{-1}$	/mg·L ⁻¹	贡献率/%			
原水	55	60				
A-1 出水	5	5	97			
A-2 出水	1	0	2			
A-3 出水	1	0	0			
A-4 出水	1	0	0			
A-5 出水	1	0	0			

1.2 Miseq 高通量测序分析方法

1.2.1 样品采集及 DNA 提取

取稳定运行期的 ABR 反应器各隔室中污泥,污泥经过多点采样混合作为该隔室样品,5 个隔室的污泥样品分别标记为 A-1、A-2、A-3、A-4 和 A-5.样品总 DNA 的提取采用 FastPrep DNA 提取试剂盒法(QBIOGENE, USA) DNA,并利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA,核对基因组 DNA 的完整性与浓度.

1.2.2 PCR 扩增

采用 16S RNA 基因 V3-V4 区通用引物, 16S rRNA 引物序列为: 338F(5'-ACTCCTRCGGGA GGCAGCAG-3'),806R (5'-GGACTACCAGGGTATC TAAT-3')^[11,12]. 采样 PCR 仪(ABI GeneAmp® 9700型)对细菌16S rRNA基因进行 PCR 扩增,扩增反应体系(50 μL)为: Premix 25 μL,引物 1 μL,模板 DNA 5 μL,加入蒸馏水 18 μL.

全部样本按照已摸索的正式实验条件进行,每个样本3个重复,将同一样本的PCR产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN公司)切胶回收PCR产物,Tris_HCl洗脱;2%琼脂糖电泳检测.

参照电泳初步定量结果,将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司) 进行检测定量,之后按照每个样品的测序量要求,进行相应比例的混合.

1.2.3 Miseg 文库构建

连接"Y"字形接头;使用磁珠筛选去除接头自连片段;利用 PCR 扩增进行文库模板的富集;氢氧化钠变性,产生单链 DNA 片段.

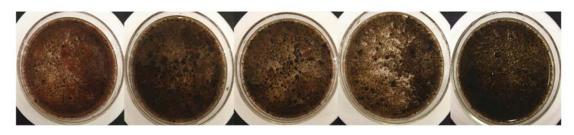
1.2.4 Miseq 测序

按照 Illumina 公司 Miseq 的操作说明对形成的 cDNA 文库进行 2×300 bp 的高通量测序,测序后的 DNA 序列进行拼接,同时用 Qubit 2.0 (Life technologies, USA)和 Bioanalyzer 2100 (Agilent, Germany)进行质量控制,并按照 barcode 标签序列识别并区分样品得到有效数据.利用 CASAVA 1.8 软件,设置 97% 相似性,对有效 DNA 序列数据进行操作分类单元(OTU)分类. Miseq 测序、序列拼接及 OTU 分类均由苏州帕诺米克生物科技有限公司完成.

2 结果与讨论

2.1 ABR 各隔室污泥表观现象分析 ABR 反应器接种的厌氧颗粒污泥和厌氧絮状

污泥分别是黑色和灰黑色,混合后的接种污泥为暗黑色. 启动过程中,污泥颜色从暗黑色变为淡黄色,然后逐渐变为棕红色,在稳定运行期红颜色逐渐加深,因厌氧氨氧化污泥含有丰富的细胞色素 C 而呈现红色(图 2) [13]. 然而,在各隔室污泥的表观颜色上具有明显差异,第 1 隔室有较为明显的红棕色,随着水流的方向,从第 2~5 隔室,反应器污泥颜色变化依次为少量红棕色→黄褐色→黑色,这是由于采用低浓度基质(进水 NH_4^+ - $N和NO_2^-$ -N浓度分别为 55 $mg \cdot L^{-1}$ 和 60 $mg \cdot L^{-1}$)启动厌氧氨氧化反应器,ANAMMOX 菌主要集中在基质浓度较高的第 1 隔室,造成第 1 隔室内表观红色强于其余隔室 [14]. 而后端隔室基质浓度较低,ANAMMOX 菌富集率过低,难以表现出红色.



从左向右分别为第1~5隔室

图 2 ABR 反应器稳定运行期各隔室污泥表观现象

Fig. 2 Sludge pictures of each compartment during stable operation in ABR

2.2 Miseq 高通量测序结果分析

2.2.1 ABR 各隔室细菌丰度及多样性分析

从表 2 可以看出, ABR 反应器 5 个隔室的序列 数和 OTU 数差异较大,在12 195~39 495 和9 690~ 31 697之间波动,特别是第3隔室(样品 A-3),序列 数和 OTU 数均较低,造成该 ABR 反应器中间隔室 "低谷"的具体原因还有待分析. Chao、ACE、 Shannon、Simpson 指数表明各隔室细菌群落和物种 的丰富度,其中丰富度指数 Chao 和 ACE 可以估算 群落中含 OTU 数目的指数,在生态学中常用来估计 物种总数,值越大代表物种总数越多[15]. 从该两个 指数来看,从第1~5隔室,细菌多样性总体上呈现 持续上升趋势,上升幅度分别为 29.8% 和 30.1%, 而在第3隔室存在低谷,这与序列数和 OTU 数结果 相一致. Shannon 指数反映了基于物种数量的群落 种类多样性,指数越大表明群落的复杂程度越 高[16]. Shannon 指数的变化趋势与 Chao、Ace 指数 的变化趋势基本一致,从第1~5隔室呈现持续上升 趋势,上升幅度为24.1%.从以上3种指数结果来 看,ABR 反应器从第1~5 隔室细菌群落的多样性 逐渐增加,也就是说基质浓度较高的前端隔室,因为ANAMMOX 菌的富集,竞争能力弱的菌群将逐渐减少,而功能性脱氮菌逐渐占据主导地位,造成群落结构逐渐集中化. Simpson 指数与 Shannon 指数结果相反,呈现逐渐降低趋势,降低幅度为 57.6%,特别是从第 3 隔室开始,Simpson 指数出现较大幅度降低. Simpson 指数体现了优势物种生物量占群落生物总量的比重,该指数越大表明优势菌群生物量占总生物量比重越大,反之则优势菌群生物量占总生物量比重越小[17],与 Shannon 指数一样,表明 ABR反应器前端隔室基质充足,ANAMMOX 菌逐渐富集,优势种群比例较大,而后端隔室因为基质浓度过低,优势种群并不明显.

2.2.2 ABR 各隔室细菌在门分类层面的分布规律

从图 3 可以看出,ABR 反应器中细菌群落结构 多样性较为丰富,按照丰富度排列主要存在绿曲挠菌门(Chloroflexi)、变形菌门(Proteobacteria)、绿菌门(Chlorobi)、厚壁菌门(Firmicutes)、浮霉菌门(Planctomycetes)以及硝化螺旋菌门(Nitrospirae)等门类,ANAMMOX菌所在的浮霉菌门排在第5位.

表 2 ABR 反应器各隔室细菌丰度变化情况

Table 2	Variations of rightness and	L diversity estimators	of microbial	communities in the	e compartment of ABR reactor
rabie 2	variations of richness and	i diversity estimators	s of inferoplat	communities in the	e compartment of ADN reactor

					•	
样品	序列数	OTU 数	Chao 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
A-1	24 211	19 647	551	539	4. 19	0. 033
A-2	31 172	22 732	668	651	4. 62	0. 033
A-3	12 195	9 690	612	625	4. 95	0.020
A-4	24 006	20 499	700	689	5. 14	0.013
A-5	39 495	31 697	715	701	5. 20	0.014

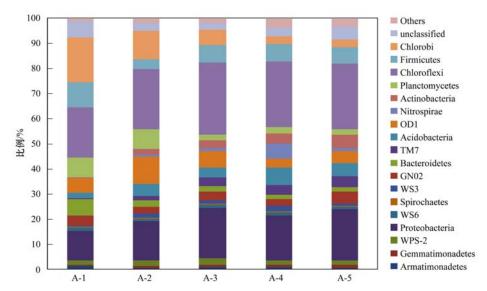


图 3 ABR 各隔室中细菌分类(门)的群落组成相对百分比

Fig. 3 Taxonomic classification of bacterial communities in the compartment of ABR reactor at a phylum level

其中,涉及到脱氮功能微生物的有变形菌门,浮霉菌门和硝化螺旋菌门3种,占总细菌的19.29%~26.62%,见表3.

从脱氮细菌来看,变形菌门在各隔室内所占比例分别为 11.66%、15.42%、19.75%、18.14%和 20.28%,从第 1~5 隔室所占比例逐渐加大(表 3).而 ANAMMOX 菌所在的浮霉菌门,在 5 个隔室的分布比例为 7.44%、7.94%、2.30%、2.18%和 2.51%,低于变形菌门,而且在各隔室中的分布与变形菌门细菌存在较大差异. 浮霉菌门在第 1 和第 2 隔室分布较多,占总细菌比例的 7.44%~7.94%,而在后端 3 个隔室基本维持在较低水平,占总细菌比例的 2.18%~2.51%. 浮霉菌门的分布与厌氧氨氧化反应基质的利用场所有关,低浓

度的基质仅在前两隔室得到利用,后端隔室因基质缺乏而导致 ANAMMOX 菌富集较低,这也与反应器污泥的表观特性相一致. 而硝化螺旋菌门,占总细菌比例较低,在0.19%~6.30%之间,仅在第4隔室处在较高水平(6.30%),具体原因还有待分析和研究. 硝化螺旋菌门是推动亚硝化反应的重要微生物,在多种厌氧氨氧化环境中被检测到,如膜曝气生物膜反应器(membrane-aerated biofilm reactor, MABR)^[18],序批式生物膜反应器(sequencing batch biofilm reactor, SBBR)^[19]等都发现了硝化螺旋菌门的足迹. 硝化螺旋菌门是硝化作用的主要实践者,污水中带入的少量氧气导致其在反应器内得到生长,但在厌氧环境中对脱氮过程所起的作用可忽略不计.

表 3 ABR 各隔室中主要脱氮细菌(门水平)的群落组成相对百分比/%

Table 3 Relative abundance of the dominant denitrifying bacterial communities in the compartment of ABR reactor at a phylum level/%

菌门	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5
Proteobacteria	11.66	15. 42	19. 75	18. 14	20. 28
Nitrospirae	0. 19	0. 57	1. 22	6. 30	1.50
Planctomycetes	7. 44	7. 94	2. 30	2. 18	2. 51
合计	19. 29	23. 93	23. 27	26. 62	24. 29

本研究发现,三大门类的脱氮菌相比较,变形菌门占据最为重要的位置,这与多数厌氧氨氧化反应器细菌群落分布情况相一致. Bae 等^[20]研究发现启动成功后变形菌门占 42%,高于浮霉菌门的 20%.李滨等^[21]分析了稳定运行的 UASB 厌氧氨氧化反应器,发现变形菌门占据主导位置(41.9%),而浮霉菌门仅占 3.1%. 但也有研究表明,启动成功后浮霉菌门(占 23.2%)会超过变形菌门(占 12.9%)成为优势类群,这可能是与该研究采用颗粒污泥作为接种污泥相关,颗粒污泥具有良好的沉降性能,易通过重力沉降持留于反应器内,提高反应器内的微生物浓度,降低 ANAMMOX 菌的流失,从而促进ANAMMOX 菌成为颗粒污泥中的优势菌群^[22]. 因此,采用颗粒污泥作为接种污泥可有效提高反应器内 ANAMMOX 菌的富集率.

而对于其他非参与脱氮的细菌,如绿曲挠菌门、绿菌门和厚壁菌门等,在厌氧氨氧化反应器中常被检测到.绿曲挠菌门常存在于富集程度较高的厌氧氨氧化污泥中,有研究指出在成功启动厌氧氨氧化的 SBBR 反应器^[19]、上升式厌氧颗粒床反应器^[23]、CANON 反应器^[24]等都发现了绿曲挠菌门,其作用是固碳,将 CO₂ 固定为最终产物丙酮酸.而绿菌门是一类进行不产氧光合作用的细菌,在以聚乙烯海绵为填料的升流式填料塔厌氧氨氧化反应器^[25]、UASB 反应器^[20]等厌氧氨氧化环境中被发现,但其在厌氧氨氧化反应中起何种作用还不得而知.厚壁菌门在污水处理污泥中较为常见,常存在于接种污泥中,因此在厌氧氨氧化反应器中经常被检测到,但

随着启动过程丰富度会下降. 宋雨夏等^[22]以厌氧颗粒污泥作为接种物,通过 185 d 的运行,成功启动了 UASB 厌氧氨氧化反应器,发现在反应器启动到成功运行后,厚壁菌门一直存在于反应器中,但种群丰度大幅度降低,从7.66%降至0.48%.

2.2.3 ABR 各隔室细菌在属和种分类层面的分布规律

为进一步阐明反应器在运行过程中细菌群落的 演化,在属的水平上,选取系统中占有比例较多的具 有脱氮功能的变形菌门和浮霉菌门进行分析. 在变 形菌门中,共鉴定出属的细菌有41种,占变形菌门 总量的 38.42% ~ 54.67%, 见图 4. 在变形菌门中, 占据比例较高的是 Rhodoplanes 属 (含量在 0.33% ~3.58%)、Dok59属(含量在 0.78% ~2.06%)、 Rubrivivax 属 (含量在 0.05% ~ 1.62%) 和 Bdellovibrio 属(含量在 0.14%~1.15%). 这些属均 属于变形菌门主要细菌,在废水处理及环境样品中 常被检测到. 5 个隔室的主要细菌群落结构在属水 平上差异并不大,但在比例上差异明显. 从第1~5 隔室, Rhodoplanes 属所占比例逐渐增大, 而 Dok59 属、Rubrivivax 属和 Bdellovibrio 属均呈现下降趋势. Rhodoplanes 属可在厌氧黑暗环境下很好地降解有 机物,一些难以生物降解的含氮杂环化合物如喹啉 都能较好地被其降解[26]. 随着隔室的后推,亚硝态 氮底物快速降低, ANAMMOX 作用逐渐减弱, 可广 谱性利用有机物的反硝化类细菌开始增长,如 Rhodoplanes 属,而难以在少量有机物环境下及时利 用有机物的细菌,如 Dok59 属、Rubrivivax 属和

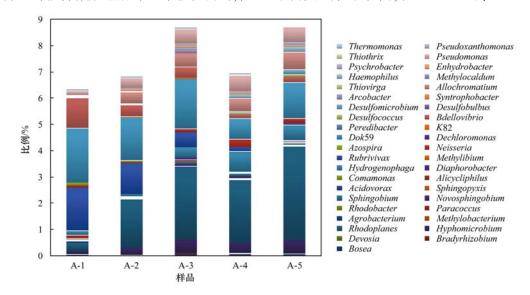


图 4 ABR 各隔室中变形菌门的群落组成(属)相对百分比

Fig. 4 Taxonomic classification of the Proteobacteria bacterial communities in the compartment of ABR reactor at a genus level

Bdellovibrio 属所占比例则逐渐减少.

在浮酶菌门中, Candidatus brocadia 和 Candidatus kuenenia 是最主要的属,它们也是污水处理厂脱氮系统中常见的浮霉菌门细菌. 在总细菌的分布比例上, Candidatus brocadia 属占 0.60% ~ 5.19%,在前2个隔室所占比例明显高于后3个隔

5.00 4.00 4.00 2.00 1.00 A-1 A-2 A-3 A-4 A-5 室;而 Candidatus kuenenia 属占比较低,仅 0.08% ~ 0.13%,仅分布于前 2 个隔室,在后 3 个隔室并未检出,见图 5. ANAMMOX 菌在前两个隔室里面富集率较高,也与基质底物在此较为充足,造成 ANAMMOX 菌大量增长与富集有关,但因底物的缺乏,末端 3 个隔室 ANAMMOX 菌的比例处在较低水平.

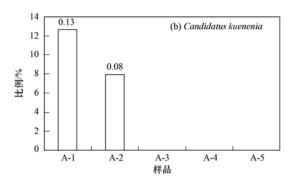


图 5 ABR 各隔室中主要 ANAMMOX 菌菌属的分布规律

Fig. 5 Distribution regulation of the anammox genus in the ABR reactor at a genus level

Candidatus brocadia 属最早是在荷兰的污水处 理厂污泥中发现的,是第一个被富集鉴定的 ANAMMOX 菌种^[27]. Candidatus brocadia 属以亚硝 酸为能源,以 CO。为碳源,不能利用小分子有机酸 类,如甲酸、丙酸等. 目前已经发现的属于 Candidatus brocadia 属的 ANAMMOX 菌有两种,即 "待定厌氧氨氧化布罗卡地菌(Candidatus brocadia anammoxidans)"和"待定荧光布罗卡地菌 (Candidatus brocadia fulgida)". 因测序手段的局限 性,本研究中并未鉴定出 Candidatus brocadia 属属于 哪一种细菌. 而 Candidatus kuenenia 属是在德国斯 图加特废水处理滴滤池中发现的,与 Candidatus brocadia 属一致,以CO2为唯一碳源,通过将NO2-N 氧化成 NO, -N获得能量[28]. 在本研究 ABR 反应器 中, Candidatus kuenenia 属仅检测到 stuttgartiensis 种,即"待定斯图加特库氏菌(Candidatus kuenenias stuttgartiensis)",该种是 ANAMMOX 反应器中主要 种群[29],在污水处理反应器中分布较广,研究者已 对其代谢途径和关键酶进行了研究[30],为解析 ANAMMOX 反应的微生物学机制奠定了基础.

3 结论

- (1)ABR 反应器厌氧氨氧化反应运行稳定,氮素去除率高,TN 去除率 > 80%.
- (2)高通量测序分析技术结果表明, ABR 厌氧 氨氧化反应器中脱氮细菌较为丰富, 其中变形菌门 (Proteobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)和硝化

螺旋菌门(Nitrospirae)是主体脱氮细菌,分别占11.66%~20.28%、2.18%~7.94%和0.19%~6.30%,变形菌门主要包含 Rhodoplanes、Dok59、Rubrivivax和 Bdellovibrio 等属,占据主导地位,而浮霉菌门次之,主要包含 Candidatus brocadia 和 Candidatus kuenenia 属.

(3)从各隔室细菌分布来看存在较大差异,从第1~5隔室,污泥表观红色逐渐减退,趋向于灰黑色,Chao、ACE、Shannon、Simpson 指数均表明细菌群落丰富度逐渐增加,且变形菌门逐渐增加,而浮霉菌门逐渐降低,这与基质的降解规律相一致.

参考文献:

- [1] Volcke E I P, Van Hulle S W H, Donckels B M R, et al. Coupling the SHARON process with Anammox: model-based scenario analysis with focus on operating costs[J]. Water Science & Technology, 2005, 52(4): 107-115.
- [2] 于英翠,高大文,陶彧,等. 利用序批式生物膜反应器启动 厌氧氨氧化研究[J]. 中国环境科学,2012,32(5):843-849.
- [3] van der Star W R L, Abma W R, Blommers D, et al. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam [J]. Water Research, 2007, 41(18): 4149-4163.
- [4] 丁爽, 郑平, 唐崇俭, 等. 三种接种物启动 Anammox-EGSB 反应器的性能[J]. 生物工程学报, 2011, **27**(4): 629-636.
- [5] 朱月琪, 张丽娟, 曾国驱, 等. 低浓度氨氮废水在 ABR 中的 厌氧氨氧化研究[J]. 环境工程学报, 2010, **4**(6): 1224-1230.
- [6] Yu J J, Chen H, Guo Q, et al. Response of performance of an anammox anaerobic baffled reactor (ABR) to changes in feeding

- regime[J]. Ecological Engineering, 2015, 83: 19-27.
- [7] 唐霁旭, 王志伟, 马金星, 等. 454 高通量焦磷酸测序法鉴定 膜生物反应器膜污染优势菌种[J]. 微生物学通报, 2014, 41(2): 391-398.
- [8] 夏围围, 贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价 [J]. 微生物学报, 2014, 54 (12): 1489-1499.
- [9] 闫媛,黎力,王亚宜,等.采用高通量测序分析全程自养脱氮(CANON)系统不同脱氮效能下的微生物群落结构[J].北京工业大学学报,2015,41(10):1485-1492
- [10] 张海芹,王翻翻,李月寒,等.不同接种污泥 ABR 厌氧氨氧化的启动特征[J]. 环境科学, 2015, **36**(6): 2216-2221.
- [11] Zhang X L, Tian X Q, Ma L Y, et al. Biodiversity of the symbiotic bacteria associated with toxic marine dinoflagellate Alexandrium tamarense [J]. Journal of Biosciences and Medicines, 2015, 3(6): 23-28.
- [12] 闻韵,王晓慧,林常青. Miseq 测序分析活性污泥系统中细菌群落的动态变化[J]. 环境工程学报,2015,**9**(11):5225-5230
- [13] Molinuevo B, García M C, Karakashev D, et al. Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: effect of organic matter content on process performance [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(7): 2171-2175.
- [14] 鲍林林, 赵建国, 李晓凯, 等. 常温低基质厌氧氨氧化反应 器启动及其稳定性[J]. 环境工程学报, 2013, **7**(3): 981-986.
- [15] Shu D T, He Y L, Yue H, et al. Metagenomic insights into the effects of volatile fatty acids on microbial community structures and functional genes in organotrophic anammox process [J]. Bioresource Technology, 2015, 196: 621-633.
- [16] 王智, 张志勇, 张君倩, 等. 水葫芦修复富营养化湖泊水体 区域内外底栖动物群落特征[J]. 中国环境科学, 2012, **32** (1): 142-149.
- [17] 刁晓君, 李一葳, 王曙光. 水华生消过程对巢湖沉积物微生物群落结构的影响[J]. 环境科学, 2015, **36**(1); 107-113.
- [18] Gong Z, Liu S T, Yang F L, et al. Characterization of functional microbial community in a membrane-aerated biofilm reactor operated for completely autotrophic nitrogen removal [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8): 2749-2756.
- [19] Xiao Y, Zeng G M, Yang Z H, et al. Coexistence of nitrifiers,

- denitrifiers and Anammox bacteria in a sequencing batch biofilm reactor as revealed by PCR-DGGE [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(2): 496-505.
- [20] Bae H, Chung Y C, Jung J Y. Microbial community structure and occurrence of diverse autotrophic ammonium oxidizing microorganisms in the anammox process [J]. Water Science & Technology, 2010, 61(11): 2723-2732.
- [21] 李滨, 赵志瑞, 马斌, 等. 克隆文库方法分析厌氧氨氧化反应器中细菌群落结构[J]. 环境科学与技术, 2012, **35**(12): 159-164, 179.
- [22] 宋雨夏,熊蕾,柴立元,等. Anammox 反应器启动过程中颗粒污泥性状变化特性[J]. 生物工程学报, 2014, **30**(12): 1854-1864.
- [23] Cho S, Takahashi Y, Fujii N, et al. Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor[J]. Chemosphere, 2010, 78(9): 1129-1135.
- [24] Park H, Rosenthal A, Jezek R, et al. Impact of inocula and growth mode on the molecular microbial ecology of anaerobic ammonia oxidation (anammox) bioreactor communities [J]. Water Research, 2010, 44(17): 5005-5013.
- [25] Zhang L, Yang J C, Ma Y G, et al. Treatment capability of an up-flow anammox column reactor using polyethylene sponge strips as biomass carrier[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(1): 72-78.
- [26] 仲汇慧. 喹啉废水反硝化反应器中微生物菌群结构与功能的研究[D]. 上海:上海交通大学,2010.
- [27] Kuenen J G, Jetten M S M. Extraordinary anaerobic ammonium-oxidizing bacteria [J]. ASM News, 2001, 67: 456-463.
- [28] Schmid M, Twachtmann U, Klein M, et al. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2000, 23(1): 93-106.
- [29] Zhang X J, Zhang H Z, Ye C M, et al. Effect of COD/N ratio on nitrogen removal and microbial communities of CANON process in membrane bioreactors [J]. Bioresource Technology, 2015, 189: 302-308.
- [30] 周英杰,王淑梅,张兆基,等. 厌氧氨氧化菌的代谢途径及 其关键酶的研究进展[J]. 生态学杂志,2012,**31**(3):738-744.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 37 No. 7 Jul. 15, 2016

CONTENTS

Concentration Characteristics of PM _{2,5} in Beijing During Two Red Alert Periods Response of Human Respiratory Height PM _{2,5} Variation Characteristics to Meteorological Factors During Winter Haze Days in Beijin	g
Pollutional Characteristics and Sources Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Fine Particulate Matter in Lanz	ZHANG Nan, XIONG Hei-gang, GE Xiu-xiu, et al. (2419)
Tollutollar characteristics and cources manysis of rotycycle fromatic hydrocarbons in minospiene that rathenate matter in cana-	
Determination and Source Apportionment of Aromatic Acids in PM _{2,5} from the Northern Suburb of Nanjing in Winter	
Impact of Marine-atmospheric Process on Aerosol Number Size Distribution in the South China Sea	KONG Ya-wen, SHENG Li-fang, LIU Qian, et al. (2443)
Assessment of Heavy Metals Pollution and Its Health Risk of Atmospheric Dust Fall from East Part of Junggar Basin in Xinjiang	
Variations of Stable Isotope in Precipitation and Its Atmospheric Circulation Effect in Chongqing	WEN Yan-ru, WANG Jian-li (2462)
Temporal Dynamics of Stable Isotopic Composition in Lake Taihu and Controlling Factors	
Geochemical Characteristics of Lateral Hypotheic Zone Between the River Water and Groundwater, a Case Study of Maanyi in Chons	oring
Occidental characteristics a factor hypothete 20th Detrect the fact which that occidentally a case study of maintain change	ZHANG Yu, YANG Ping-heng, WANG Jian-li, et al. (2478)
Variations of CO ₂ Exchange Fluxes Across Water-air Interface and Environmental Meaning in a Surface Stream in Subtropical Karst	Area, SW China ·····
Spectral Characteristics of Dissolved Organic Matter (DOM), Releases from Soils of Typical Water-Level Fluctuation Zones of Three	Corges Reservoir Areas, IIV-Vis Spectrum
Special Guarde of Dissorted Signife Fault (DSA) Release from Soils of Typical water 1200 Tale dation 2016 of Time S	LIANG Jian, JIANG Tao, LU Song, et al. (2496)
Spectral Characteristics of Dissolved Organic Matter (DOM) Releases from Soils of Typical Water-Level Fluctuation Zones of Three	Gorges Reservoir Areas: Fluorescence Spectra
operation of the state of the s	LIANG Jian, JIANG Tao, LU Song, et al. (2506)
Distribution Characteristics and Health Risk Assessment of Thirteen Sulfonamides Antibiotics in a Drinking Water Source in East Chi	
Concentrations of Ketamine and Norketamine in the Water Environment in Beijing	
Distribution Characteristics and Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Water of Yuqiao Reservoir Watershed I	Ouring the Water Delivery Period
	CHANG Sheng, ZHAO Xing-ru, FU Qing, et al. (2530)
Concentrations and Partitioning of Halogenated Flame Retardants in Industrial Water of Dongjiang River	HE Ming-jing, LI Qi, ZHAO Jia-yuan, et al. (2539)
Distribution Characteristics and Source Identification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Fatty Acids in Water of Karst Undergroup	nd River
Desiration distinctions and course remainded to topological remainder remain	····· XIE Zheng-lan, SUN Yu-chuan, ZHANG Mei, et al. (2547)
Pollution Characteristics of Snowmelt Runoff on Different Underlying Surface in Main Urban Area of Harbin	SUN Xi-han, LIU Shuo, WAN Lu-he, et al. (2556)
Impact of Precipitation on Fenghe River Water and Aquatic Microorganisms	LU Si-dan, SUN Yu-jiao, ZHAO Xuan, et al. (2563)
Response of Microcystis aeruginosa Growth to Arsenate Under Different Phosphorus Regimes	
Removal Behavior of Ibuprofen and Diclofenac in Different Constructed Wetlands	
Influence of Chemical Pre-oxidation on Chloral Hydrate Formation of Threonine	CAI Guang-qiang, FU Xue-min, LIU Li-jun, et al. (2586)
Activated Carbon Supported Co ₃ O ₄ Catalysts to Activate Peroxymonosulfate for Orange G Degradation W.	
Kinetics for Degradation of Orange G with Peroxymonosulfate Activated by Carbon Nanotubes	ZHANG Li-ming, CHEN Jia-bin, LI Wen-wei, et al. (2601)
Removal of Chloramphenicol in Wastewater by Electrocatalytic Reduction with Carbon Nanotubes-Modified Electrode	
Removal of AOX, Chroma and TOC in Chemical Dyestuff Wastewater with Iron Scraps-Fenton-Coagulation Combined Process	
Removal of AOX in Activated Sludge of a Chemical Pharmaceutical Industry with Fenton Oxidation	CHEN Si, XU Can-can, LIU Rui, et al. (2625)
Performance Evaluation of a Pilot-scale Microbubble-aerated Biofilm Reactor	
Nitrogen Removal Performance of Novel HABR Reactor over CANON Process	BAO Lin-lin, CHEN Wan-qiu (2639)
Characteristics of a Combined Heterotrophic and Sulfur Autotrophic Denitrification Technology for Removal of High Nitrate in Water	
Characteristics of Microbial Community in Each Compartment of ABR ANAMMOX Reactor Based on High-throughput Sequencing	
(100)	CHEN Chong-jun, ZHANG Hai-qin, WANG Yao-qi, et al. (2652)
Nitrogen Removal and the Characteristics of Denitrification Bacteria Using NUA-DAS Ecofilter	
Coupling of Hydrocarbon Accumulation and Cobalt Removal During Treatment of Cobalt Enriched Industrial Wastewater with Botryoc	occus braunii Biofilm Attached Cultivation
Couping of Hydrocanous Accumulation and Constant Removal During Healthan of Constant Indicated Hadestran Water Donyton	··· CHENG Peng-fei, WANG Yan, YANG Qi-yong, et al. (2666)
Isolation of Raoultella sp. sari01 and Its Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Characteristics	
Screening and Nitrogen Removing Characteristics of Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacteria SLWX2 from Sea Wat	
Biodiversity of Thiocyanate-degrading Bacteria in Activated Sludge from Coking Wastewater	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •
Responses of Plankton Microeukaryotic Community to Increasing Temperatures Created by Power Plant Thermal Discharges	
Characteristics of Soil Microbial Community Structure in the Rhizospheric Soil of Ammopiptanthus mongolicus by Phospholipid Fatty	Acid (PLFA) ·····
Response of Soil Respiration to Extreme Precipitation in Semi-arid Regions	
Features and Influencing Factors of $\mathrm{N}_2\mathrm{O}$ Emissions from Drawdown Area in the Three Gorges Reservoir \cdots	
${\it Denitrification Loss and N}_2{\it O Emission from Different Carbon Inputs in Orchard Drains Sediments}$	
Emissions Characteristics of Greenhouse Gas from Sewage Sludge Composting Process in Winter	······ YI Jian-ting, YANG Yu-han, ZHANG Cheng, et al. (2738)
Distribution and Source Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Organochlorine Pesticides (OCPs) in Soils from	Shergyla Mountain, Southeast Tibetan Plateau
Applications of Geostatistical Analyses and Stochastic Models to Identify Sources of Soil Heavy Metals in Wuqing District, Tianjin, C	China
Effects of Soil Moisture and Temperature Variations on Organic Carbon Mineralization of Purple Soil in the Hydro-fluctuation Belt of	the Three Gorges Reservoir
	DING Chang-huan, WANG Lian-ge, TANG Jiang, et al. (2763)
Reduction Effect of Reduced Phosphorus Fertilizer and Combining Organic Fertilizers on Phosphorus Loss of Purple Soil Sloping Field	
Transformation and Migration of Sulfur Speciation in the Rhizosphere and Bulk Soil of Paddy Soil	DU Guang-hui ,RAO Wei .LI Xin .et al. (2779)
Comparison of the Persistence of a Combined Amendment Stabilizing Pb, Cd, Cu and Zn in Polluted Paddy Soil	
Bio-inspired Recovery of Platinum Nanoparticle and Its Mechanism	
Preparation of γ -Fe ₂ O ₃ Catalyst by Heat Treatment of Natural Limonite for Selective Catalytic Reduction of NO by NH ₃ ····································	
	. , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编:赵进才

副主编:赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委:(按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军

朱永官 刘志培 刘 毅 汤鸿霄 孟 伟 周宗灿 林金明

赵进才 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞

黄耀鲍强潘纲潘涛魏复盛

环维种草

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2016年7月15日 第37卷 第7期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 37 No. 7 Jul. 15, 2016

主	管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主	办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese
协	办	(以参加先后为序)			Academy of Sciences
		北京市环境保护科学研究院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental
		清华大学环境学院			Protection
主	编	赵进才			School of Environment, Tsinghua University
编	辑	《环境科学》编辑委员会	Editor-in -Chief		ZHAO Jin-cai
<i>5</i> ₩	74	北京市 2871 信箱(海淀区双清路	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING
					KEXUE)
		18号,邮政编码:100085)			P. O. Box 2871, Beijing 100085, China
		电话:010-62941102,010-62849343 传真:010-62849343			Tel:010-62941102,010-62849343; Fax:010-62849343
		,,,,,,			E-mail:hjkx@rcees.ac.cn
		E-mail; hjkx@ reees. ac. cn			http://www.hjkx.ac.en
ili	版	http://www.hjkx.ac.cn	Published	by	Science Press
出	hХ	4 4 4 A A A A A A A A A A A A A A A A A		·	16 Donghuangchenggen North Street,
		邮政编码:100717			Beijing 100717, China
印刷装	- 1 T	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发	行	4 4 4 K A	Distributed	by	Science Press
X.	11	电话:010-64017032			Tel:010-64017032
		E-mail: journal@ mail. sciencep. com			E-mail:journal@mail.sciencep.com
订购	处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总统		中国国际图书贸易集团有限公司	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji
白 川 心 り	C 1 1	(北京399信箱)	1 of Cign		Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China
		(402) 222 HTB/			Shudian),1. O. box 399, beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301 CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价:120.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行