

焦化废水工业处理装置和实验室装置硝化菌群的分子比较

严 兴¹, 徐正茂², 冯晓西², 张晓君¹, 赵立平^{1*}

(¹上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

(²华东理工大学资源与环境工程学院 上海 200037)

摘 要 :反应器的群落结构分析有助于对工业装置的故障原因进行诊断。为了解决某焦化废水处理装置硝化功能低下的故障,构建了一套相似的实验室装置作为参照系统,该装置的硝化功能良好。通过工业装置和实验室装置好氧池生物膜 16S rDNA 克隆文库的比较,分析了它们之间硝化菌群的组成差异。实验室装置克隆文库的构成说明 *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis* 类群和 *Nitrospira* 属 I 亚区系分别是该工艺条件下优势的氨氧化菌和亚硝酸氧化菌,但工业装置的克隆文库中却没有找到任何与硝化菌序列相近的克隆,这说明工业装置中硝化菌的多度较低。进一步使用 Taqman 荧光探针实时定量 PCR 测定了样品中 *Nitrospira* 属的多度,实验室装置中 *Nitrospira* 属 16S rDNA 的拷贝数达到 3.4×10^6 个/微克基因组 DNA,而工业装置的测定值不到实验室装置的 1/300。这些试验结果都表明工业装置好氧池微生物群落中缺少适当的硝化菌群是造成其硝化能力低下的重要原因。提高菌群中 *Nitrosomonas* 属和 *Nitrospira* 属的多度是解决工业装置硝化能力低下的关键。

关键词 :焦化废水;16S rDNA 克隆文库;Taqman 荧光探针实时定量 PCR;氨氧化菌;亚硝酸氧化菌

中图分类号 :Q938 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2007)02-0301-06

焦化废水中含有较高浓度的氨氮以及酚类化合物、含氮杂环类化合物和氰化物^[1],其中苯酚和氰化物等均会对硝化菌的生长和代谢产生抑制^[2]。 A_1 - A_2 -O 固定生物膜法是目前处理焦化废水的常用工艺,该工艺微生物停留时间长,废水流经 A_1 、 A_2 和 O 池,先后经过了厌氧酸化、缺氧反硝化以及好氧氧化的处理,无论是 COD 还是氨氮和硝态氮都能达到较好的去除效果^[1]。但是在该工艺的实际运行过程中,硝化过程一旦受到抑制或者破坏,就会因为进水成分的波动、工艺条件的复杂,而很难找到出现问题的具体原因和解决的方法。

参与废水处理的硝化菌群具有较高的多样性,适当的硝化菌群的构成对于反应器中硝化过程进行的效率是至关重要的^[3,4]。硝化过程的完成分为氨氧化成亚硝酸和亚硝酸再氧化成硝酸两个步骤,这两个步骤分别由氨氧化菌(AOB)亚硝酸氧化菌(NO₂-OB)分别完成。Purkhold 等^[3,5]对多个不同废水处理装置中氨氧化菌群的多样性进行了分析,发现属于 *Betaproteobacteria* 纲的氨氧化菌(β -AOB)是废水处理当中的最为普遍的氨氧化菌^[5]。 β -AOB 主要包含

了 *Nitrosomonas* 属和 *Nitrosospora* 属,而 *Nitrosomonas* 属又包括了 *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis*, *Nitrosomonas nitrosa*, *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosomonas cryotolerans* 和 *Nitrosomonas communis* 等许多的类群(cluster)。亚硝酸氧化菌则包括了 *Nitrobacter* 属和 *Nitrospira* 属两个属,其中 *Nitrospira* 属在废水处理当中最为普遍^[3]。*Nitrospira* 属也具有较高的多样性,在系统发育上至少可以分为 4 个亚区系^[6]。

实践表明将分子生态学的技术方法与工程调查和实验相结合可以为解决工业装置硝化效率低下的问题提供重要的指导^[7]。某焦化厂为了处理其日渐增多的焦化废水按照 A_1 - A_2 -O 固定生物膜工艺设计并建造了一套焦化废水处理装置,该工业装置的硝化能力非常低下。为了找到该工业装置出现故障的原因,构建了一套相似的实验室装置,实验室装置的硝化功能正常。通过分析实验装置中微生物群落的结构,可以鉴定出在正常的 A_1 - A_2 -O 固定生物膜法工艺条件下优势的硝化菌群。同时将工业装置中微生物群落与实验室装置进行比较,分析工业装置中

基金项目:国家“863 计划”(2001AA214131);上海市重点基础项目(03JC14048);国家自然科学基金(30470061)

* 通讯作者。Tel:86-21-34204877;Fax:86-21-34204878;E-mail:zlpzhao@sjtu.edu.cn

作者简介:严 兴(1975-),男,广西桂林人,博士研究生,研究方向为环境微生物分子生态学。E-mail:yanxing@sjtu.edu.cn

其他作者:刘勇第,刘彬彬

收稿日期:2006-08-18;接受日期:2006-10-12;修回日期:2006-11-09

硝化菌群的异常之处,可以为诊断和解决该工业装置中硝化能力低下的问题提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 装置调试与样品采集 工业装置的 O 池是一个圆环形的推流式反应器,整个 O 池沿着其内周可以平均分为 4 段,即 O_1 、 O_2 、 O_3 和 O_4 。反应器中充填固定在支架上的半柔性填料(semi-soft media),生物膜就生长在这些填料上。该工业装置连续 3 年出水 NH_3-N 浓度都达不到国家规定的标准。

实验室装置与工业装置一样都采用 A_1 - A_2 -O 固定生物膜,并且 A_1 、 A_2 和 O 池的水力停留时间与工业装置保持一致。为了模拟工业装置中 O 池的推流式反应器设计,实验室装置的 O 池沿着废水流动的方向插入了 3 个挡板,把 O 池等距离分为 4 段即 O_1 、 O_2 、 O_3 和 O_4 。实验室装置所使用的进水取自与工业装置相同的焦化废水,在整个实验过程中进水 NH_3-N 浓度介于 21 ~ 160mg/L。实验室装置的每个反应器的接种污泥均取自工业装置中相应的反应器。实验室装置在驯化结束后具有良好的硝化功能。氨氮的测定按照标准方法进行。

分别从工业装置和实验室装置好氧池的中前段(即 O_2 段)收集生物膜样品,采样过程参考文献 [1] 进行,具体过程如下:分别从反应器的顶部、中部和底部取 4g 带有生物膜的半柔性填料,把它们收集在一个无菌的三角烧瓶里,加入 10mL 无菌的 PBS 缓冲液(每升含有 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na_2HPO_4 、0.24g KH_2PO_4 , pH7.4),剧烈震荡使得生物膜从填料表面脱落,这一步骤反复数次,直到生物膜完全脱落。

1.1.2 试剂和仪器 *Taq* DNA 聚合酶和配套的缓冲液购于 Promega 公司和 TaKaRa 公司(用于定量 PCR);Ultraclean™ PCR 纯化试剂盒购于 Mo Bio 公司; dNTP、IPTG 和 X-gal 购于上海生工生物工程公司;所有引物均在上海生工生物工程公司合成;Taqman 探针在上海基康生物技术有限公司合成。PCR 仪器购于 Hybrid 公司,电转化仪购于 Bio-rad 公司,OPTICAL II 实时荧光定量 PCR 仪及配套软件为 MJ Research 公司产品。

1.2 总基因组 DNA 的提取

总基因组 DNA 的提取按照文献 [8] 进行。

1.3 16S rDNA V3 区 PCR 扩增

16S rDNA 的 V3 区扩增采用细菌通用引物 P2、P3^[9]。PCR 扩增体系如下:50μL PCR 反应体系含有

1.25U *Taq* DNA 聚合酶,5μL 10× 缓冲液,1.5mmol/L $MgCl_2$,200μmol/L dNTP,0.5μmol/L 引物 P2、P3 以及 10ng 总基因组 DNA。扩增程序参考 Muyzer 等^[9]的方法,反应条件:94℃ 3min,94℃ 1min,65℃ 1min(每两个循环退火温度降低 1℃直到 55℃,然后 55℃保持到循环结束),72℃ 1min,25 个循环,72℃ 10min。

PCR 过程中容易产生异源双链(heteroduplex)而在随后构建文库的过程中形成“mosaics”序列,“reconditioning PCR”可以用来消除 PCR 过程产生的异源双链^[10]。

1.4 16S rDNA V3 区克隆文库的构建

PCR 扩增产物经过 Ultraclean™ PCR 纯化试剂盒纯化以后,使用 T4 DNA 连接酶连接至 pGEM T-easy 克隆载体(Promega 公司),使用电击转化仪,电转化到宿主 *E. coli* DH5α 中。用表面涂布有 IPTG 和 X-gal 的含有 Amp 的 LB 平板对转化子进行“蓝白”筛选,随机挑取“白色”克隆,然后使用“煮菌法”^[11] PCR 扩增“白色”克隆的插入片段,并用琼脂糖电泳检查插入片段的大小是否正确。这样挑选到的阳性克隆构成克隆文库。

实验室装置 O_2 池样品构件的文库,以下称为 LR O_2 克隆文库;工业装置 O_2 池样品构件的文库,以下称为 IO2 克隆文库。

1.5 测序

对克隆文库中的所有克隆用 T7 通用引物测序,测序由上海英俊生物技术公司完成。使用 RDP 数据库中嵌合体检测程序(chimera check)(version 2.7; Ribosomal Database Project, www.rdp.cme.msu.edu/cgiis/chimera.cgi),将文库中的嵌合体序列排除,然后以序列相似性 97% 为标准,将文库中所有的序列划分为不同的操作分类单元(OTU, provisional operational taxonomic units)^[12]。

1.6 文库库容的评价

只有当文库的库容大到足以检出群落中主要的成员时,文库之间的比较才是有意义的。为了保证构建的克隆文库足够大,能够检测出群落中主要的成员,需要对实验数据进行统计学检验。Kemp 等^[13]提出的渐进采样的方法(progressive sampling)可以用来检验克隆文库的库容。这种方法首先要对所建的文库进行随机取样,组成不同大小的虚拟文库(pseudo-library)。然后根据不同组成大小的虚拟文库的组成,使用多样性估算指数(richness estimator)预测样品中的种群数量(predicted phylotypes)。如果随着虚拟文库中克隆数目的增加,理论预测的种群

数量趋于平稳,则说明所建文库中克隆数量已经包括了样品中主要微生物的种群,可以用来代表样品中微生物的多样性。为了使结果更为可靠,可以同时使用两种多样性估算指数即 S_{Chao1} 和 S_{ACE} 来预测样品的种群数量。为了便于方法的应用,Kemp 等还提供了基于互联网的计算机程序来完成对于文库库容的评价(<http://www.aslo.org/lomethods/free/2004/0114a.html>)。

1.7 序列分析

在 RDP-II 数据库(Ribosomal Database Project-II Release 9,<http://rdp.cme.msu.edu/>)中使用 Sequence Match 程序寻找与每一个 OTU 代表克隆最相近的序列^[14]。

本研究中所得的 LR O2 和 LNR O2 16S rDNA 克隆文库在 GenBank 数据库中的登录号分别为 DQ537386-DQ537436、DQ537437-DQ537478。

1.8 Nitrospira 属 16S rDNA 拷贝数的定量测定

根据 LR O2 16S rDNA 克隆文库中 *Nitrospira* 属的克隆序列,使用 Dionisi 等^[15]提出 Taqman 荧光探针实时定量 PCR 的方法对样品中 *Nitrospira* 属 16S rDNA 的拷贝数进行了定量测定。使用 OPTICAL II 实时荧光定量 PCR 仪及配套软件(MJ Research 公司)进行实时定量 PCR 试验。25 μ L 反应体系中含有 1.5U *Taq* DNA 聚合酶,2.5 μ L 10 \times 缓冲液,1.5mmol/L $MgCl_2$,200 μ mol/L dNTP,引物 NSR1113f 和 NSR1264r 均为 15pmol,Taq Man 探针 NSR1143(5'端使用 FAM 标记,3'端使用 TAMRA 标记)6.25pmol,3~10ng 样品总基因组 DNA 或者 1×10^2 到 1×10^7 个拷贝的标准样品 DNA。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}C$ 预变性 3min,95 $^{\circ}C$ 变性 30s,63 $^{\circ}C$ 退火并延伸 1min,随后读取荧光值,共运行 55 个循环。每个样品测定 4 次。

2 结果

2.1 实验室装置和工业装置功能之间的比较

对工业装置取样月份(2003 年 6 月份)的出水数据进行分析,其 NH_3-N 平均去除率仅为 -106%,这说明工业装置的 NH_3-N 去除效率非常低;工业装置的进水 NH_3-N 平均浓度为 49.3mg/L,出水 NH_3-N 平均浓度为 90.1mg/L,说明工业装置的出水 NH_3-N 浓度没有达到国家的排放标准。同时,对实验室装置的取样月份(2003 年 4 月份)的出水数据也进行了分析,其 NH_3-N 平均去除率和标准偏差为 $95.2 \pm 5.0\%$ (总共测定了 26 次),这说明实验室装置的 NH_3-N 去除效率高且功能稳定;实验室装置的进水

NH_3-N 平均浓度为 95.6mg/L,出水 NH_3-N 平均浓度为 5.4mg/L,这说明实验室装置的 NH_3-N 出水浓度已经达到国家一级排放标准(GB8979-1996)。

实验室装置和工业装置之间在硝化功能上的差异应该与它们之间硝化菌群的组成差异有关。通过构建 16S rDNA 克隆文库的方法可以对实验室装置和工业装置之间硝化菌的组成进行比较分析。

2.2 克隆文库中硝化菌 16S rDNA 序列分析

LR O₂ 文库共得到了 94 个克隆,可分为 51 个 OTU,而 IO2 文库共得到了 87 个克隆,可分为 42 个 OTU(表 1)。用渐进采样的方法对文库库容评价的结果如图 1 所示,用 S_{Chao1} 和 S_{ACE} 所预测的样品的种群数量,在 LR O2 和 IO2 两个文库的库容大小范围内都已经趋于平稳,这说明两个克隆文库都很好代表了样品中微生物的多样性。所以,可以通过对两个文库组成的比较来分析工业装置和实验室装置硝化菌群的组成差异。

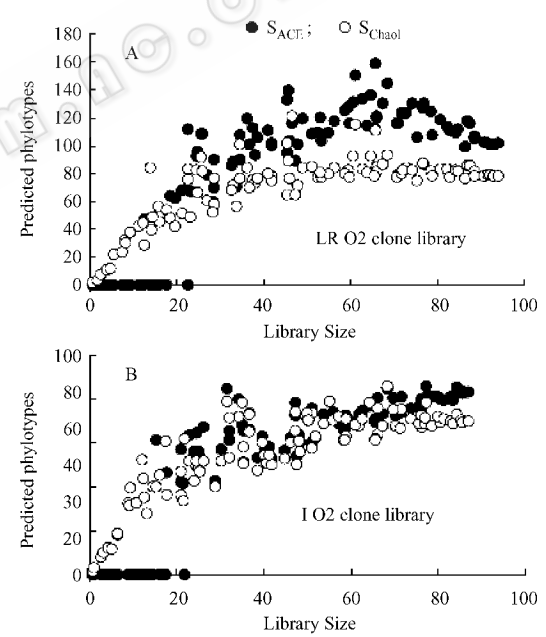


图 1 使用 Kemp 提出的渐进采样的方法来检验克隆文库的库容是否足够代表样品中微生物的多样性

Fig.1 Predicted numbers of phylotypes based on values of S_{ACE} (●) and S_{Chao1} (○) vs. library size. The library reached an asymptotic maximum, indicating that this library was large enough to yield stable estimates of phylotype richness. A LR O2 clone library; B IO2 clone library.

Actinobacteria 门、*Nitrospira* 门、*Spirochaetes* 门、*Deinococcus-Thermus* 门和 *Acidobacteria* 门的克隆仅在实验室文库(LR O2)中检测到,而 *Epsilonproteobacteria* 纲、*Cyanobacteria* 门和 *Genera incertae sedis TM7* 门的克隆则仅在工业装置文库(IO2)中检测到(图 2)。这表明工业装置和实验室装置好氧池的群落结

构存在显著差别。虽然属于 *Alphaproteobacteria* 纲, *Betaproteobacteria* 纲, *Gammaproteobacteria* 纲, *Deltaproteobacteria* 纲和 *Bacteroidetes* 门的克隆在 LR O2 和 IO2 文库中都存在(图 2),但是它们在两个文库中的结

构和比例也存在明显的差别。因为与处理装置的硝化功能直接有关的是氨氧化菌和亚硝酸氧化菌,本文重点对两个装置中好氧池群落中氨氧化菌和亚硝酸氧的组成进行了比较。

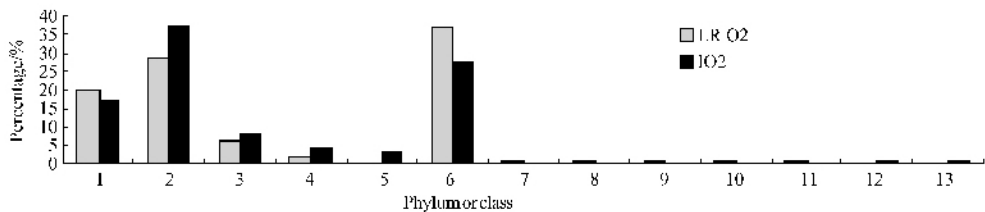


图 2 LR O2 和 IO2 16S rDNA 克隆文库中克隆在不同门(纲)的分布

Fig.2 Phylogenetic distribution of clones in 16S rDNA clone libraries of LR O2 and IO2. 1. *Alphaproteobacteria* 2. *Betaproteobacteria* , 3. *Gammaproteobacteria* 4. *Deltaproteobacteria* 5. *Epsilonproteobacteria* 6. *Bacteroidetes* 7. *Acidobacteria* 8. *Actinobacteria* , 9. *Nitrospira* , 10. *Spirochaetes* , 11. *Deinococcus-Thermus* , 12. *Cynaobacteria* , 13. *Genera incertae sedis* TM7.

对 LR O2 文库中所有 OTU 进行分析后发现有两个 OTU 分别与氨氧化菌和亚硝酸氧化菌相关(表 1)。LR O2-35(DQ537420,含有 1 个克隆占总克隆数的 1.1%)与氨氧化菌相关,序列分析表明它属于 *Nitrosomonas europaea* - *Nitrosoccus mobilis* 类群并与生物膜中分离的氨氧化菌 *Nitrosomonas* sp. Koll-21(AJ224941)的序列相似性达到 99.5%。Limpiyakorn 等^[16]也曾报道 *Nitrosomonas europaea* - *Nitrosoccus mobilis* 类群(cluster)是 A₁-A₂-O 工艺中的优势氨氧化菌类群。LR O2-18(DQ537403,含有 1 个克隆占总克隆数的 1.1%)与亚硝酸氧化菌相关,序列分析表明它属于 *Nitrospira* 属的 I 亚区系(sublineage)^[6]并与亚硝酸氧化菌 *Nitrospira* sp. clone b30(AJ224041)的相似性为 97%(表 1)。*Nitrospira* sp. clone b30 是流动床反应器中优势的亚硝酸氧化菌(未得到纯培养^[17])。LR O2 克隆文库的分析结果表明实验室装置中优势的氨氧化菌和亚硝酸氧化菌分别属于 *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosoccus mobilis* 类群和 *Nitrospira* 属 I 亚区系。而对 IO2 文库中所有 OTU 进行分析后没有发现任何与氨氧化菌和亚硝酸氧化菌序列相近的克隆,这说明工业装置中硝化菌的多度很低(表 1)。

表 1 LR O2 和 IO2 文库中与氨氧化菌和亚硝酸化菌的 OTUs 的数目

Table 1 The number of OTUs belonged to AOB ^a and NOB ^b in LR O2 and IO2 clone library				
Library	No. of clones	No. of OTUs	No. of OTUs belonged to AOB	No. of OTUs belonged to NOB
LR O2	94	51	1	1
IO2	87	42	0	0

a :Ammonia oxidizing bacteria b :Nitrite oxidizing bacteria.

2.3 Nitrospira 属 16S rDNA 的定量

Taq Man 探针实时荧光定量 PCR 可以对工业装置和实验室装置好氧池中的 *Nitrospira* 属 16S rDNA 的拷贝数作定量比较。*Nitrospira* 属的定量标准曲线表明循环阈值(Ct 值)与标准拷贝数的对数之间存在显著的线性关系(图 3, R² = 0.994),根据该标准曲线计算实验室装置好氧池每微克总基因组 DNA 中 *Nitrospira* 属的 16S rDNA 拷贝数达到 3.4 ± 0.7 × 10⁶ 个拷贝(表 2)。但是使用本方法未能检查到工业装置中 *Nitrospira* 属 16S rDNA 的拷贝数,这表明工业装置中 *Nitrospira* 属的多度低于本方法的检测限度。按照标准曲线的结果,本方法至少可以

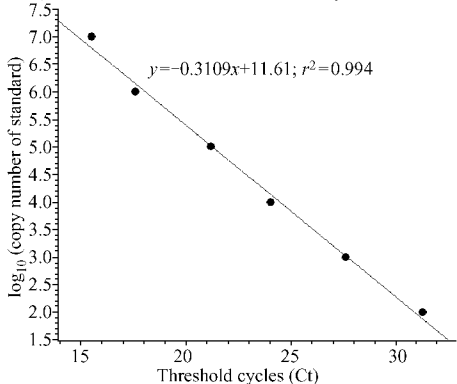


图 3 Nitrospira 属的定量标准曲线(R² = 0.994)

Fig.3 Standard curve of *Nitrospira*(R² = 0.994).

表 2 实验室装置和工业装置好氧池生物膜中 Nitrospira 属 16S rDNA 拷贝数的定量结果

Table 2 Quantification of copy number of Nitrospira 16S rDNA in biofilm of aerobic reactor of the industrial and the lab-scale system		
Sample	Average (copy/μg DNA)	Standard deviation (copy/μg DNA)
Lab system	3.4 × 10 ⁶	7 × 10 ⁵
Industrial system	< 1.0 × 10 ⁴	—

检查到 100 个拷贝的 *Nitrospira* 属 16S rDNA,所以工业装置中 *Nitrospira* 属的 16S rDNA 拷贝数应该少于 1.0×10^4 个/ μg DNA(使用 10ng DNA 作为定量的模板)。所以,好氧池中每微克总基因组 DNA 中,工业装置 *Nitrospira* 属 16S rDNA 的拷贝数不到实验室装置的 1/300,这进一步说明工业装置中 *Nitrospira* 属的种群多度要远低于实验室装置。

3 讨论

实验室装置能够高效得进行硝化反应,这说明使用 A_1 - A_2 -O 固定生物膜法处理该厂的焦化废水是完全合理的。虽然焦化废水中存在硝化菌的抑制物,但并不是工业装置硝化能力低下的主要原因。对实验室装置中硝化菌群的分析工作表明, *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosoccus mobilis* 类群和 *Nitrospira* 属 I 亚区系分别是其中优势的氨氧化菌和亚硝酸氧化菌。因为反应器的设计和操作对于硝化菌群的组成有着明显的选择性^[16],所以 *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosoccus mobilis* 类群和 *Nitrospira* 属 I 亚区系可能代表了 A_1 - A_2 -O 固定生物膜法工艺条件下处理焦化废水过程中优势的氨氧化菌和亚硝酸氧化菌。

Kreuzinger 等^[7]的实践表明,将分子生态学的技术方法与工程调查和实验相结合可以在解决工业装置硝化不彻底的问题时起到了重要的作用。他们首先通过工程调查发现污水处理系统的硝化能力与 β -AOB 中 *Nitrosomonas* 的优势地位具有相关性。接着他们将工程实验的方法(构建实验室装置)与分子生态学的方法结合起来成功得对一个硝化过程不彻底的炼油废水处理装置进行了改造。他们发现在原有的工艺条件下,活性污泥中 *Nitrospira* 属是优势的氨氧化菌,而在改用二阶段硝化工艺(two-sludge nitrification)后,活性污泥中 *Nitrosomonas* 属逐渐取代 *Nitrospira* 属成为优势的氨氧化菌,同时硝化过程能够高效的进行。

在本研究中,通过比较工业装置和实验室装置中硝化菌群的差别,发现工业装置中硝化菌的多度非常低,进一步使用实时定量 PCR 的方法证实了 *Nitrospira* 属(实验室装置中的优势亚硝酸氧化菌)在工业装置中的多度只有实验室装置的 1/300。这表明微生物群落缺少了这些与硝化作用密切相关的功能菌,导致了工业装置的硝化功能低下,所以提高工业装置菌群中 *Nitrosomonas* 属和 *Nitrospira* 属的多度是解决工业装置硝化能力低下的关键。

因为 A_1 - A_2 -O 固定生物膜法处理焦化废水是合理的工艺,所以应该对照 A_1 - A_2 -O 固定生物膜法的流程来考察工业装置在工艺参数和工程构造上的失误。特别应该注意从 *Nitrosomonas* 属和 *Nitrospira* 属的生理代谢特点^[18]出发寻找可能导致它们多度低下的工艺参数以及工程构造上的原因,比如溶解氧, pH 值和曝气装置存在的问题。虽然工业装置体积庞大、流程复杂,一时还难以确定工业装置出现问题的具体部位以及原因,但是我们的工作从分子生态学的角度为解决工业装置硝化能力低下的问题提供了重要的依据和指导。

参 考 文 献

- [1] Zhang M, Tay JH, Qian Y, et al. Coke plant wastewater treatment by fixed biofilm system for COD and NH_3 -N removal. *Water Research*, 1998, **32**(2): 519 - 527.
- [2] Chakraborty S, Veeramani H. Response of pulse phenol injection on an anaerobic-anoxic-aerobic system. *Bioresource Technology*, 2005, **96**(7): 761 - 767.
- [3] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, **13**(3): 218 - 227.
- [4] 许玫英, 曾国驱, 任随周, 等. 分子检测技术对活性污泥中氨氧化细菌的比较研究. *微生物学报*, 2004, **43**(3): 372 - 378.
- [5] Purkhold U, Pommerening-Roser 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. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(12): 5368 - 5382.
- [6] Daims H, Nielsen JL, Nielsen PH, et al. In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(11): 5273 - 5284.
- [7] Kreuzinger N, Famleitner A, Wandl G, et al. Molecular biological methods (DGGE) as a tool to investigate nitrification inhibition in wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 2003, **47**(11): 165 - 172.
- [8] Liu BB, Zhang F, Feng XX, et al. Thauera and Azoarcus as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison. *Fems Microbiology Ecology*, 2006, **55**(2): 274 - 286.
- [9] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 695 - 700.
- [10] Thompson JR, Marcelino LA, Polz MF. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(9): 2083 -

- [11] Liu WT , Huang CL , Hu JY , *et al.* . Denaturing gradient gel electrophoresis polymorphism for rapid 16S rDNA clone screening and microbial diversity study. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2002 **93** (1) : 101 – 103 .
- [12] Juretschko S , Loy A , Lehner A , *et al.* . The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst Appl Microbiol* 2002 **25** (1) : 84 – 99 .
- [13] Kemp PF , Aller JY . Estimating prokaryotic diversity : When are 16S rDNA libraries large enough ? *Limnol Oceanogr Methods* ,2004 ,**2** : 114 – 125 .
- [14] Cole JR , Chai B , Farris RJ , *et al.* . The Ribosomal Database Project (RDP- II) : sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2005 **33** (suppl-1) : D294 – D296 .
- [15] Dionisi HM , Harms G , Layton AC , *et al.* . Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Appl Environ Microbiol* 2003 **69** (11) : 6597 – 6604 .
- [16] Limpiyakorn T , Shinohara Y , Kurisu F , *et al.* . Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *Fems Microbiology Ecology* ,2005 ,**54** (2) : 205 – 217 .
- [17] Schramm A , de Beer D , Wagner M , *et al.* . Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64** (9) : 3480 – 3485 .
- [18] Schramm A , De Beer D , Gieseke A , *et al.* . Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. *Environmental Microbiology* 2000 **2** (6) : 680 – 686 .

Comparison of nitrifying populations between a lab-scale system and an industrial system treating coking wastewater

YAN Xing¹ , XU Zheng-mao² , FENG Xiao-xi² , ZHANG Xiao-jun¹ , ZHAO Li-ping^{1*}

(¹ College of Life Science and Biotechnology , Shanghai Jiaotong University , Shanghai 200240 , China)

(² College of Resource Science and Environmental Engineering , Eastern China University of Science and Technology , Shanghai 200237 , China)

Abstract :Molecular analysis of community structure can help diagnose problems in malfunctioning full-scale wastewater treatment system. A lab-scale A₁-A₂-O fixed biofilm system with highly efficient nitrification (NH₃-N removal at 95.2%) was set up as a reference for an industrial system with poor performance of nitrification (NH₃-N removal efficiency at – 106%) for treating coking wastewater. Composition of nitrifying bacteria of biofilm samples in aerobic reactors of the two systems was compared by 16S rDNA clone library analysis. The composition of clone library of the lab-scale system indicate *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosoccus mobilis* cluster and sublineage I of *Nitrospira* genus are dominant ammonia and nitrite oxidizers in this process respectively. However , there were no clones related to nitrifying bacteria in clone library of the industrial system which suggested low abundance of nitrifying bacteria in this system. Further , Real-Time PCR with Taqman probe revealed that 16S rDNA copy number of *Nitrospira* in aerobic reactor of the lab-scale system was $3.4 \times 10^6 / \mu\text{g DNA}$ of biofilm which is 300 times higher than that in the industrial system. The absence of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* in the industrial system leads to poor performance of nitrification. Building up of a high population level of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* in aerobic reactor is the key to improve efficiency of nitrification of the industrial system.

Keywords : coking wastewater ; 16S rDNA clone library ; real-time PCR with Taqman probe ; ammonia oxidizing bacteria ; nitrite oxidizing bacteria

Foundation item : National Programs for High-Tech Research and Development of China (2001AA214131) ; Shanghai Key Fundamental Research Program (03JC14048) ; National Natural Science Foundation of China (30470061)

* Corresponding author. Tel 86-21-34204877 ; Fax 86-21-34204878 ; E-mail : lpzhao@sjtu.edu.cn

Other authors : LIU Yong-di , LIU Bin-bin

Received : 18 August 2006 / Accepted : 12 October 2006 / Revised : 9 November 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>