

文章编号:1000-582X(2005)10-0119-05

污水生物处理功能微生物的多样性*

叶姜瑜^{1,2}, 罗固源^{1,2}, 吉芳英^{1,2}, 王希³, 王丹云²(重庆大学 1. 三峡库区生态环境教育部重点实验室; 2. 城市建设与环境工程学院, 重庆 400030;
3. 重庆市环境科学研究院, 重庆 400020)

摘要:综述了污水处理微生物学近期的研究现状,介绍了一些仍不能培养的细菌被鉴定为对污泥膨胀、提高生物学除磷、亚硝酸盐氧化和脱氮负责,而许多原来认为的优势群体却对污水处理不是最重要的。这些知识可以为微生物多样性、种群动态、生态稳定和特定微生物种群活性等提供新的视野,可以应用于污水生物反应器的设计和处理参数的控制,为改进污水处理厂的处理策略等提供更多的理论基础和依据。

关键词:污水生物处理;丝状细菌;聚磷菌;硝化细菌;反硝化细菌

中图分类号:Q938

文献标识码:A

在所有类型的生物技术处理污水的工厂中,原核微生物占支配地位,负责转化,但同时也经常引起活性污泥膨胀和形成泡沫的问题。因此,污水反应器的稳定性和效率在很大程度上取决于其中微生物群落的组成和活性。然而,对该过程的微生物学研究一直受到严格的方法学限制。从 Wagner 等(1993)将分子技术介绍进污水微生物学方面之后^[1],才允许精确地对活性污泥和生物膜中微生物群落的组成和动力学等进行研究。现在,许多新的、还不能人工培养的细菌被鉴别为负责系统中的除磷、除氮等功能,这些细菌的原位生理学也正在被研究。

1 污水微生物多样性及非培养技术

1.1 污水微生物多样性

长期以来,微生物学是依靠纯培养技术研究微生物的。然而,许多未知细菌难以被标准实验室方法培养,成为未培养微生物(Nonculturable microorganism)。从不同生境微生物可培养性的测定来看,海水中可培养性仅约为 0.001%~0.1%,淡水约 0.25%,土壤约 0.3%,活性污泥为 1%~15% 左右。一般推测地球上所知细菌可能仅占环境细菌多样性的 1% 或者更少,很多真正起作用的微生物没有被认识,能培养出来的微生物并非一定是优势菌群。例如一直被教科书认定在硝化作用上起主要作用的欧洲亚硝化单胞菌(*Nitro-*

somonas europaea) 和维氏硝化杆菌(*Nitrobacter winogradskyi*),根据 16S rDNA 的分子研究表明很可能并不代表那些环境中的优势菌;而在变形杆菌纲(*Proteobacteria*) β 亚纲的氨氧化菌(*Ammonia-oxidizing bacteria*, AOB)中,序列的多样性已经大大超过了可能培养的 AOB^[2]。对污水生物膜研究表明,微生物种群常以特殊方式排列才有活性,单独的微生物培养是不可能获得这样活性的^[3]。

1.2 非培养技术

非培养技术已经成为研究污水微生物多样性、绕开微生物纯培养瓶颈的重要手段,一般主要包括活性物质检测(如荧光抗体染色、呼吸醌检测等)和分子生物技术^[1,4]。分子技术主要分为 2 类:对已经预先知道的微生物种群采用分子探针法,而对种群结构未知的微生物群落则采用核酸片断分析法。16S rRNA 序列分析法应用最早,不过它还需要其它的补充技术才可以鉴定污水反应器中的重要细菌生理类群。核酸指纹图谱法是建立在 DNA 多态性上的方法,可对微生物种属间分子水平的差异进行研究^[5],用于污水微生物的分类鉴定、基因分析比较和揭示 DNA 多态性^[6-7]。构建已知种属的特异性探针,特别是可直接计数并同时进行微生物种群空间分布分析的荧光原位杂交法 FISH (Fluorescent in situ hybridization)是现在用得最多的分子技术之一^[5],可以显示污水细菌的种类、位置及活

* 收稿日期:2005-05-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50378095,50278101);重庆大学骨干教师基金资助项目(716411045)

作者简介:叶姜瑜(1963-),男,四川青川人,重庆大学副教授,在职博士研究生,主要从事环境工程微生物学及微生物生态学研究。

性等. 变性凝胶梯度电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 法已逐渐成为研究微生物群落的重要方法, 用该法从一个 EBPR (Enhanced biological phosphorus removal) 反应器中发现了聚磷菌的一个新类群^[8].

2 污水处理反应器中重要的微生物种群

在利用 16r RNA 基因分析对污水反应器的调查中, 总共有 36 个细菌群被鉴定到, 表明污水微生物具有多样性, 这与使用组特异的 rRNA 目标寡聚核苷酸所探查的定量 FISH 实验相一致^[9]. 类群特异探针杂交证明, *Proteobacteria* 的 β 亚纲细菌几乎构成可检查细菌的总生物容量的一半, 其他的原位重要类群是 α - *Proteobacteria*, *Nitrospira*, *Planctomycetes* 和 *Chloroflexi*.

2.1 丝状细菌

丝状细菌 (Filamentous bacteria) 能显著影响絮状活性污泥的沉降性 (污泥膨胀) 或引起生物量变化和泡沫形成 (污泥发泡), 从而严重影响活性污泥的处理效率. 传统上, 丝状细菌是通过光学显微镜学进行分析鉴定的, 如革兰氏和 Neisser 染色反应、典型的形态学特征等. 但应用 full-cycle rRNA 技术发现, 传统形态学鉴定方法不能发现污水厂活性污泥中的许多丝状细菌^[10].

系统发生树部分提供了丝状菌的系统发生亲缘关系, 但有些丝状类型如 Eikelboom 1863 或 *Nostocoida limicola* 等则是放置在完全无关的类群中. 现在利用 rRNA 目标寡聚核苷酸探针能迅速地鉴定大多数丝状菌, 证明在活性污泥中有些丝状菌呈现多态性现象. Kanagawa 等 (2000) 从活性污泥中分离出 15 种丝状菌, 根据形态被分类为 Eikelboom 21N, 利用 16S rDNA 序列分析表明都同变形杆菌 γ 亚纲的 *Thiothrix* 丝状菌形成单系群 (monophyletic group)^[11]. *Thiothrix* 丝状菌在污水中通常表现出生理多能性, 在异养、兼性营养和化能自养情况下, 它们都能同标记的乙酸盐或碳酸氢盐结合. 在厌氧状况下 (无论有无硝酸盐), *Thiothrix* 丝状菌都很活跃, 它通过吸收硫代硫酸盐和乙酸盐来形成胞内硫粒^[12].

利用丝状菌的 FISH 探针, *Mircrothrix parvicella* 被发现有特殊的脂消费, 在厌氧情况下专门吸收长链脂肪酸 (而不是短链脂肪酸和葡萄糖), 随后当硝酸盐或氧可用作电子受体时它们则使用贮存完成生长. 不过, 在厌氧情况下, *M. parvicella* 不能吸收磷, 不适合那些有除磷要求的生物反应器. 利用 FISH 技术对丝状菌进行系统分类发现, 大多数未描述的丝状菌属于绿色非硫细菌 (*Chloroflexi*), 也可能是污水生物处理系统中丰度最高的丝状菌^[13]. Liao 等 (2004) 发展一种定量 FISH, 对实验室和污水厂反应器中的丝状菌进行了研

究, 以增加 *Sphaerotilus natans* 的方式来刺激污泥膨胀, 结果发现是 Eikelboom 1851 菌丛 (而不是试验的 *S. natans* 菌) 同活性污泥容积指数 (volume index) 极度相关, 其可延伸的菌丝长度约为 $6 \times 10^8 \mu\text{m/mL}$ ^[14].

2.2 生物除磷的重要细菌

生物除磷可以在 EBPR 的微生物途径中由完成, 该过程通过循环活性污泥进行交替的厌氧、需氧为特征^[15]. 基于微生物的纯培养技术, 变形杆菌纲 γ 亚纲的不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 长期被认为是唯一的 PAO (Polyphosphate-accumulating organism). 但实际上, 虽然不动杆菌能积累多聚磷酸盐, 却没有 PAO 的典型代谢方式. Wanger 等 (1994) 用 rRNA 目的探针测试后认为, 主要的 PAO 应该为 β 亚纲中的 *Rhodocyclus* 群, 其次为 α 亚纲中的 *Planctomycete* 群及屈挠杆菌属 (*Flexibacter*)、CFB 群 (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) 等. 利用荧光抗体染色、呼吸醌检测和属特异探针的 FISH 等非培养方法, 证明在 EBPR 系统中, 由于培养偏差显然高估了不动杆菌的相对丰度, 表明其对 EBPR 系统实际上不是最重要的, 而另外一些分离出的细菌才是 PAO 的候选者^[16-17]. 不过, 有 7 个 *Acinetobacter* 新种从活性污泥中分离到, 可望进一步阐释该属在脱磷中扮演的角色和意义^[18].

积磷小月菌 (*Microthrix phosphovorans*) 是一个高 G+C 含量的革兰氏阳性菌, 被认为是专性好氧菌, 可以通过 EMP 途径发酵葡萄糖为乙酸, 而不能够在厌氧情况下生长. 有明显吸收葡萄糖、分泌乙酸的转化, 导致胞内乙酸积累; 产生的乙酸在随后的好氧阶段消耗掉. *M. phosphovorans* 表现出卓越的吸收和释放磷的能力, 磷释放率和吸收率可分别高达 $3.34 \text{ mmol g/cell} \cdot \text{h}$ 和 $1.56 \text{ mmol g/cell} \cdot \text{h}$, 比 *Lamproedia* spp. 和 *Acinetobacter* spp. 要高 1 个数量级^[15], 特异探针证明其在 EBPR 工厂里可占总细菌的 2.7%^[19].

俊片菌属 (*Lamproedia*) 也拥有聚磷菌的基本代谢特征, 但比 EBPR 模型预言的吸收乙酸盐释放磷酸盐的比率要低很多. 那些被建议名为 “Candidatus Accumulibacter phosphates” 已被证实显著存在于 EBPR 系统中^[9]. Saunders 等 (2003)^[20] 在对 6 个运行污水厂进行了检测后认为, 很可能 “无关紧要” 的 “Candidatus Accumulibacter phosphates” 正是重要的 PAO. 另外还有显微镜原位观察显示, 酵母菌很可能涉及在生物除磷中, 许多 “聚磷菌” 很可能是酵母菌的孢子^[21], 但其作用机理显然还需要进一步探讨.

2.3 硝化细菌

氮循环是高度依赖微生物活性和转化的一个过程. 这类微生物在污水处理、农业等领域具有极其重要的作用, 因此成为近年来世界研究的热点, 变形杆菌的 β 亚纲几乎已经成为微生物生态学的模式系统^[22]. Kindaichi 等 (2004) 对自养硝化生物膜进行了 FISH 分

析表明,膜上有50%属于硝化细菌,其余50%为异养细菌,分布为变形杆菌 α 亚纲23%, γ 亚纲13%,绿色非硫细菌9%,CFB群2%,未定类群3%。该结果表明,硝化细菌通过可溶性产物的产生支持了异养菌,异养菌也从代谢多样性等方面确保了生物膜的生态稳定性^[7]。从培养角度来说,硝化细菌生长极慢;由于硝化细菌的分布同pH、温度等敏感,所以污水厂的硝化作用常有崩溃的情况发生。

2.3.1 氨氧化菌

基于16S rDNA序列分析,已经分离和描述过的氨氧化细菌都分属于变形杆菌纲的2个单系群中。*Nitrosococcus oceanus*和*N. halophilus*属于*Proteobacteria*的 γ 亚纲,包括亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)、亚硝化弧菌属(*Nitrosovibrio*)和亚硝化叶菌属(*Nitrosolobus*),后3个属关系密切;而*Nitrosococcus mobilis*(实际是*Nitrosomonas*的一个成员)则在 β 亚纲组成紧密相关的集合^[23]。

分子方法和传统方式的结合是现在许多污水微生物学研究的主要思路。对活性污泥中编码氨单氧化酶(ammonia monooxygenase)的*amoA*基因进行部分扩增,得到了13个克隆序列;对其分析表明,这些克隆序列高度相似,并同欧洲亚硝化单胞菌Nm50和活动亚硝化球菌的*amoA*基因片段相对应^[10]。这种*amoA*基因意想不到的序列高度相似性表明,很可能发生了基因横向转移。在从各种硝化污水厂中找到的199个*amoA*克隆中,仅有6个*amoA*克隆同*Nitrosospira*有关,而其余193个克隆则同*Nitrosococcus*有关^[24]。

教科书模式的氨氧化菌一直被认为是*Nitrosomonas europaea*。但根据上述研究分析表明,在硝化的活性污泥和生物膜中,其他氨氧化菌可能更重要,如*Nitrosococcus mobilis*,这是以前通常被认为仅出现在咸水中^[10],也在序批生物膜反应器中发现了其踪迹。所以现在一般认为,在污水厂中起氨氧化作用的是*Nitrosococcus*类,而不是其它类群。不过,几乎所有已识别的 β -亚纲的AOB都能在污水反应器中发现,如在一个实验室规模流化床反应器中,*Nitrosospira*的AOB被发现占优势,在另外一个污水厂中也被发现是重要属。定量FISH结果表明,有些污水厂的硝化菌甚至以单一的AOB占优势,而另外的厂则明显存在有5种不同的AOB^[25]。总之,污水厂内AOB的多样性显然被极大地低估了。

2.3.2 亚硝酸氧化菌

基于超微特性,已培养出的亚硝酸氧化菌(Nitrite-oxidizing bacteria, NOB)被分为4个已知属,硝化杆菌属(*Nitrobacter*)、硝化刺菌属(*Nitrospina*)、硝化球菌属(*Nitrococcus*)和硝化螺菌属(*Nitrosospira*)。16S rDNA序列比较分析表明,硝化杆菌属及其3个种都属于变形杆菌的 α -亚纲;*Nitrospina*和*Nitrococcus*各有一个种,

分属于变形杆菌的 δ 和 γ -亚纲;*Nitrosospira*属包含有*N. moscoviensis*和*N. marin*^[26]。

在传统上,*Nitrobacter*一直被认为是最重要的亚硝酸盐氧化菌。然而,在硝化污水厂内用目的探针的FISH法和定量斑点杂交(Quantitative dot blot)等发现,检测不到*Nitrobacter*或者数目很低,因此凸现了非*Nitrobacter*的NOB在硝化过程中的重要性。Egli等(2003)用不同污泥接种反应器,利用定量FISH和RFLP(Restriction fragment length polymorphism)方法对稳定的硝化作用反应器进行检测,发现有活性的都属于*Nitrosospira*属^[6]。以*Nitrosospira*序列发展的特定16S rRNA探针,对活性污泥进行FISH探查后表明,未培养的类硝化螺菌(*Nitrosospira-like*)以显著性数目(总菌数的9%)存在,其对亚硝酸盐氧化的重要性已由反应器富集研究所证实。*Nitrosospira*能固定CO₂,也能利用丙酮酸混合营养生长,而不利用乙酸盐、丁酸盐和丙酸盐^[27]。

在大多数污水反应器中*Nitrosospira*数量都超过*Nitrobacter*,很可能是由于它们采用了不同的生存策略。如*Nitrosospira*对氨的*K_m*值可低到40 μ M,*Nitrosospira*对亚硝酸的*K_m*值为10 μ M,这比大多数NOB和*Nitrobacter*要低1到2个数量级,说明其对氧和亚硝酸有较高的底物亲和力。所以,*Nitrosospira*很可能采用的是*K*-生存策略,拥有低 μ_{max} 值,有更好的适应能力、更耐饥饿和更强的毒物耐受等。而*Nitrobacter*被推测拥有生长相对迅速的*r*-策略,与亚硝酸盐和氧亲和关系则较差^[28]。由于大多数反应器内亚硝酸浓度很低,因此在系统竞争中,*Nitrosospira*将胜过*Nitrobacter*。在污水处理厂中从时空上提高亚硝酸盐浓度,例如在硝化SBR中,就会使得2种亚硝酸盐氧化菌共存。同该假说一致的是,已经在一个硝化序批生物膜反应器中利用FISH法观察到了*Nitrobacter*和*Nitrosospira*^[25]。

2.4 反硝化细菌

反硝化细菌(Denitrifying bacteria)的大多数鉴定和计数都是依赖培养法。很多属的成员,如产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、副球菌属(*Paracoccus*)和生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)等,都从污水厂中作为脱氮微生物群分离出来过,但这些细菌属在污水厂中是否具有原位脱氮的活性却很少被知道。在一个补充以甲醇作为还原碳化合物的脱氮沙滤中,使用特异FISH探针监测到有大量数目的*P. spp*和*H. spp*;而在没有附加甲醇的非脱氮沙滤中,两属存在的数目都低于总细胞0.1%,这间接证明了在脱氮过程中有两属的活性参与^[29]。

脱氮细菌群落组成的研究较难完成,因为脱氮显型不能从微生物系统发育中推断,但利用FISH和显微自显影结合就可以原位鉴定脱氮菌。该种技术同

full-cycle rRNA 方法结合,揭示了新的、还不能培养的固氮弧菌属(*Azoarcu*)相关细菌是污水厂反硝化中的重要脱氮菌^[30]。此外, Spring 等(2004)从活性污泥中分离到一株命名为 *Ottowia thiooxydans* 的兼性厌氧反硝化菌,不以三价铁、硫酸盐作为电子受体,不发酵,少量且短暂积累亚硝酸,其末端产物为 N_2O ,系统分类接近 *Aquaspirillum gracile*^[31]。

3 结 语

分子工具的应用正在改变污水处理系统中微生物生态学的许多观点,很多仍不能培养的细菌被鉴定为对污泥膨胀、提高生物学除磷、亚硝酸盐氧化和脱氮负责,而许多原来认为的优势群体却对污水处理不是最重要的。这些知识将可以应用于污水生物反应器的设计和处理参数的控制从而增加重要细菌功能类群的多样性,为处理反应器的失败和改进污水处理厂的处理策略等提供更多的理论基础和依据。在污水处理微生物学的下一个研究阶段,还需要获得更详细的关于上述的不可培养细菌的生物学知识;同时,适合这些细菌的培养策略仍然还急需发展。

参考文献:

- [1] 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]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59:1 520-1 525.
- [2] KOWALCHUK G A, STEPHEN J R, BOER W D, et al. Analysis of Ammonia-oxidizing Bacteria of the Subdivision of the Class Proteobacteria in Coastal Sand Dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of PCR-Amplified 16S Ribosomal DNA Fragments[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63:1 489-1 497.
- [3] CHRISTENSEN B B, STERNBERG C, ANDERSEN J B, et al. Establishment of New Genetic Traits in a Microbial Biofilm Community[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 2 247-2 255.
- [4] 叶姜瑜, 罗国源. 遗传指纹图谱技术对微生物群落的分析研究[J]. 重庆大学学报(自然科学版), 2003, 26(3):147-153.
- [5] KINDAICHI T, OKABE I T. Ecophysiological Interaction Between Nitrifying Bacteria and Heterotrophic Bacteria in Autotrophic Nitrifying Biofilms as Determined by Microautoradiography-fluorescence in Situ Hybridization[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70:1 641-1 650.
- [6] YAN T F, FIELDS M W, WU L Y, et al. Molecular Diversity and Characterization of Nitrite Reductase Gene Fragments (Nir K Andnir S) from Nitrate- and Uranium-contaminated Groundwater [J]. Environ Microbiol, 2003, 5: 13-24.
- [7] EGLI K, LANGER C, SIEGRIST H R, et al. Community Analysis of Ammonia and Nitrite Oxidizers during Start-up of Nitrification Reactors [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69:3 213-3 222.
- [8] NIELSEN A T, LIU W T, FILIPE C, et al. Identification of A Novel Group of Bacteria in Sludge From a Deteriorated Biological Phosphorus Removal Reactor[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65:1 251-1 258.
- [9] LIU W T, NIELSEN A T, WU J H, et al. In Situ Identification of Polyphosphate and Polyhydroxyalkanoate-accumulating Traits for Microbial Populations in a Biological Phosphorus Removal Process[J]. Environ Microbiol, 2001, 3: 110-122.
- [10] JURETSCHKO S, TIMMERMAN G, SCHNID M, et al. Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: Nitrosococcus Mobilis and Nitrospira-like Bacteria as Dominant Populations [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 3 042-3 051.
- [11] KANAGAWA T, KAMAGATA Y, ARUGA S, et al. Phylogenetic Analysis of and Oligonucleotide Probe Development for Eikelboom Type O21N Filamentous Bacteria Isolated from Bulking Activated Sludge[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66:5 043-5 052.
- [12] NIELSEN P H, AQUINO D M, NIELSEN J L. Studies on the in Situ Physiology of Thiobacillus spp. Present in Activated Sludge[J]. Environ Microbiol, 2000, 2:389-398.
- [13] BJORNSSON L, HUGENHOLTZ P, TYSON G W, et al. Filamentous Chloroflexi (Green Non-sulfur Bacteria) Are Abundant in Wastewater Treatment Processes with Biological Nutrient Removal [J]. Microbiology, 2002, 148: 2 309-2 318.
- [14] LIAO J, LOU I, DE LOS REYES III F L. Relationship of Species-specific Filament Levels to Filamentous Bulking in Activated Sludge[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 2 420-2 428.
- [15] SANTOS M M, LEMOS P C, REIS M A M, et al. Glucose Metabolism and Kinetics of Phosphorus Removal by the Fermentative Bacterium Micrococcus Phosphovorus [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65:3 920-3 928.
- [16] KONG Y H, BEER M, REES G N, et al. Functional Analysis of Microbial Communities in Aerobic-anaerobic Sequencing Batch Reactors Fed with Different Phosphorus/Carbon (P/C) Ratios [J]. Microbiol, 2002, 148: 2 299-2 307.
- [17] HIRAISHI A, UEDA Y, ISHIHARA J. Quinone Profiling of Bacterial Communities in Natural and Synthetic Sewage Activated Sludge for Enhanced Phosphate Removal [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64:992-998.
- [18] CARR E L, KAMPFER P, PATEL B K, et al. Seven Novel Species of Acinetobacter Isolated from Activated Sludge[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53:953-963.
- [19] KAWAHARASAKI M, KANAGAWA T, TANAKA H, et al. Development and Application of 16S Rrna-targeted Oligonu-

- cleotide Probe for Detection of the Phosphate-accumulating Bacterium *Micrococcus* Phosphovorus in an Enhanced Biological Phosphorus Removal Process [J]. *Wat Sci Tech*, 1998, 37:481-484.
- [20] SAUNDERS A M, OEHMEN A, BLACKALL L L, et al. The Effect of Gaos (Glycogen Accumulating Organisms) on Anaerobic Carbon Requirements in Full-scale Australian EBPR (Enhanced Biological Phosphorus Removal) Plants [J]. *Wat Sci Tech*, 2003, 47:37-43.
- [21] MELASNIEMI H, HERNESMAA A. Yeast Spores Seem to Be Involved in Biological Phosphate Removal; A Microscopic in Situ Case Study [J]. *Microbiol*, 2000, 146: 701-707.
- [22] KOWALCHUK G A, STEPHEN J R. Ammonia-oxidizing Bacteria; a Model for Molecular Microbial Ecology [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55:485-529.
- [23] TESKE A, ALM E, REGAN J M, et al. Evolutionary Relationships among Ammonia- and Nitrite-oxidizing Bacteria [J]. *J Bacteriol*, 1994, 176:6 623-6 630.
- [24] PURKHOLD U, POMMERING-R SER 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 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 5 368-5382.
- [25] 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 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68:245-253.
- [26] DAIMS H, NIELSEN J L, NIELSEN P H, et al. In Situ Characterization of *Nitrospira*-like Nitrite-oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67:5 273-5 284.
- [27] DAIMS H, RAMSING N B, SCHLEIFER K H, et al. Cultivation-independent, Semiautomatic Determination of Absolute Bacterial Cell Numbers in Environmental Samples by Fluorescence in Situ Hybridization [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67:5 810-5 818.
- [28] SCHRAMM A, DE BEER D, VAN DEN HEUVEL J C, et al. Microscale Distribution of Populations and Activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. Along a Macroscale Gradient in a Nitrifying Bioreactor: Quantification by in Situ Hybridization and the Use of Microsensors [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65:3 690-3 696.
- [29] NEEF A, ZAGLAUER A, MEIER H, et al. Population Analysis in a Denitrifying Sand Filter: Conventional and in Situ Identification of *Paracoccus* spp. in Methanofed Biofilms [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62:4 329-4339.
- [30] 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 [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2002, 25:84-99.
- [31] SPRING S, JACKEL U, WAGNER M, et al. *Ottowia Thiooxydans* Gen. Nov., Sp. Nov., A Novel Facultatively Anaerobic, N₂O-Producing Bacterium Isolated from Activated Sludge, and Transfer of *Aquaspirillum Gracile* to *Hylemonella Gracilis* Gen. Nov., Comb. Nov. [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54:99-106.

Functional Microbial Diversities in Wastewater Biological Treatment

YE Jiang-yu^{1,2}, LUO Gu-yuan^{1,2}, JI Fang-ying^{1,2}, WANG Xi³, WANG Dan-yun²

- (1. Key Laboratory of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region Under the State Ministry of Education;
2. College of City Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China
3. Chongqing Academy of Environmental Science, Chongqing 400020, China)

Abstract: Molecular biotechnology as one of culture-independent methods has been increasingly used in the studies of wastewater microorganisms, and many uncultured populations have been revealed, which have changed many views of microbial ecology. This paper gives a succinct review of recent studies in wastewater microorganisms. Some novel, in many cases yet not cultured bacteria were identified to be responsible for filamentous bulking and foaming as well as phosphorus and nitrogen removal in wastewater treatment systems; however, some predominate population recognized previously were proved unimportant. The data give some insights about microbial diversity, population dynamics, ecosystems stability and specific microbial population activity, and they will be helpful to optimize plant design and process parameter control.

Key words: wastewater biological treatment; filamentous bacteria; polyphosphate-accumulating organism; nitrifying bacteria; denitrifying bacteria