

丝瓜络填料反硝化滤池中微生物群落结构研究

张 浏¹, 栾晓男², 杜玉来³ (1. 安徽省环境科学研究院, 安徽合肥 230001; 2. 复旦大学环境科学与工程系, 上海 200433; 3. 合肥工业大学土木与水利工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 [目的]检测丝瓜络反硝化滤池内主要微生物菌群, 优化滤池运行参数。[方法]综合使用 PCR-DGGE、高通量测序等微生物分析手段, 研究了该滤池内生物群落结构。[结果]填料表面微生物多样性丰富, 优势菌属为红假单胞菌属、绿棒菌属、红芽生菌属、芽生绿菌属、气单胞菌属。[结论]该研究结果对于提高反硝化滤池处理污染物的效率具有指导意义。
关键词 丝瓜络填料; 微生物分析; 反硝化生物滤池
中图分类号 X52 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)20-0060-05

Study on the Loofah Filler Microorganism Community Structure in Denitrification Filters
ZHANG Liu¹, LUAN Xiao-nan², DU Yu-lai³ (1. Anhui Institute of Environmental Science, Hefei, Anhui 230001; 2. Department of Environmental Science and Engineering, Fudan University, Shanghai 200433; 3. School of Civil Engineering and Water Conservancy, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)
Abstract [Objective] To test the main microbial flora in the loofah denitrification biofilter and optimize the operation parameters. [Method] The community structure of the filter was studied by means of PCR-DGGE, high throughput sequencing and other microbiological analysis methods. [Result] The microbial diversity on the surface of the stuffing is abundant. The dominant species were *Rhodopseudomonas*, *Chlorobaculum*, *Rhodoblastus*, *Blastochloris*, *Eromonas*. [Conclusion] The research results have guiding significance for improving the efficiency of denitrifying filter treatment pollutants.
Key words Loofah filler; Microbiological analysis; Denitrification filter

目前, 我国污水处理厂普遍采用的污水处理工艺有 A/O、氧化沟和 SBR 等, 由于受原污水 COD/N 较低的限制, 加之长期以来我国污水处理厂污染物排放标准中仅规定了氨氮(NH₄⁺-N)和总氮(TN)的最高允许排放浓度, 且 TN 最高允许排放浓度比 NH₄⁺-N 至少高 10 mg/L, 这些因素导致污水处理厂出水中 TN 至少有 60% 为硝酸盐氮, 部分污水处理厂出水硝酸盐最高可达 20 mg/L^[1], 并已造成地表及地下水体不同程度的硝酸盐污染^[2-3]。水体中过高的硝酸盐浓度直接影响供水水质安全, 对婴幼儿具有毒害作用, 在人体内可转化为致癌物质^[4]; 另一方面, 可导致温室性气体 N₂O 的产生^[5-6]。因此, 降低硝酸盐浓度已经成为水处理研究中的重要课题^[7-13]。

常规去除硝酸盐的办法有离子交换、反渗透和生物法^[14], 但离子交换和反渗透由于价格昂贵, 处理费用较高, 去除效果有限, 而难以达到推广应用^[15-19]。而生物法中反硝化生物滤池是解决该类问题经济有效的方法之一。其中反硝化是将硝酸盐或者亚硝酸盐氮转变为气态氮的生物过程^[20-21], 而反硝化生物滤池中起关键作用的就是生长在载体填料上的微生物。笔者研究了以丝瓜络为填料的生物滤池, 分析其微生物特征, 以期找到更优异的填料, 旨在为以丝瓜络为填料的生物滤池处理生活污水提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验装置 试验采用的反应器由有机玻璃圆柱制成, 高 420 cm, 内径 12 cm, 有效体积 47 L(图 1)。球形丝瓜络填料直径为 8 cm, 每个球形填料中丝瓜络重量为 5 g 左右。采

用间歇运行的方式, 进水时间为 6 min, 流量为 0.47 m³/h。

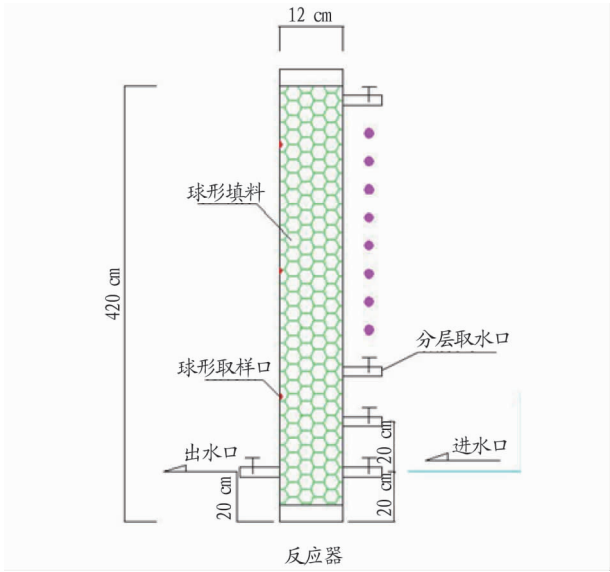


图 1 试验装置示意

Fig. 1 Schematic diagram of experimental equipment

1.2 试验材料 试验采用运行稳定、且控制在最优脱氮条件下的丝瓜络填料为研究对象, 对其进行微生物分析。

1.3 分析方法

1.3.1 Miseq 高通量测序生物信息学分析。 首先提取样品基因组 DNA, 设计并合成引物接头, 再进行 PCR 扩增及产物纯化, 待纯化完成后, 进行 PCR 产物定量和均一化, 最后进行高通量测序。测序完成后对序列进行数据统计分析及生物信息学分析。

1.3.2 PCR-DGGE 技术原理及环境微生物群落多样性分析。 DGGE 是通过聚丙烯酰胺凝胶中变性剂浓度梯度的不同, 将序列不同的 DNA 分开。根据变性剂梯度方向的不同, DGGE

可分为:垂直 DGGE,即变性剂梯度与电场方向垂直,常用于试验决定分离型、野生型和变异型的最佳变性剂梯度范围;平行

DGGE,其变性剂的梯度和电场方向平行,主要用于解链范围明确的 DNA 片段检测。该试验流程如图 2 所示。

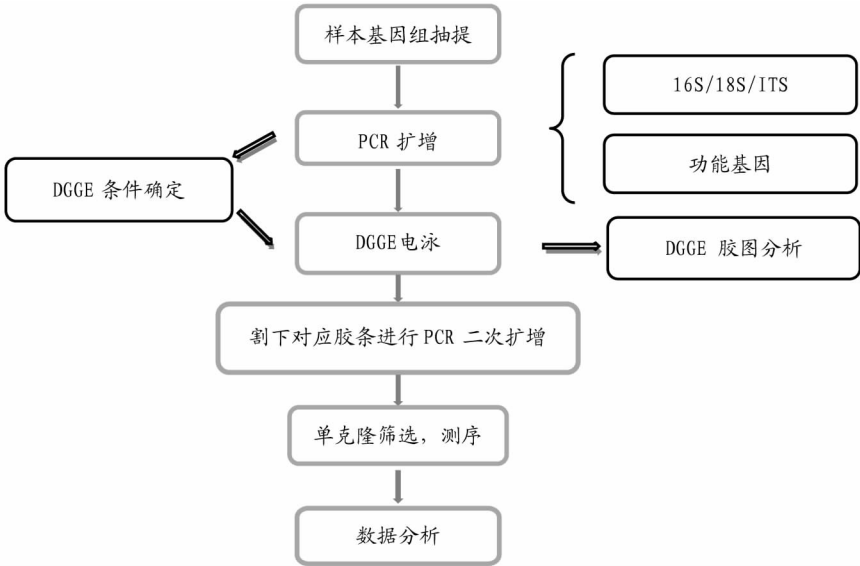


图 2 DGGE 流程
Fig.2 DGGE processes

2 结果与分析

2.1 PCR - DGGE 测序结果

2.1.1 DGGE 凝胶电泳图。试验共取 3 个样品进行测定,每个样品取 2 组平行(样品 1 平行样记为 1 - 1 和 1 - 2,样品 2 平行样记为 2 - 1 和 2 - 2,样品 3 平行样记为 3 - 1 和 3 - 2)。采用 Biolinker DNA Red 染液对 DGGE 胶图进行泡染,染色完成后的胶图在 Bio - Rad 凝胶成像仪上进行拍照,结果见图 3。

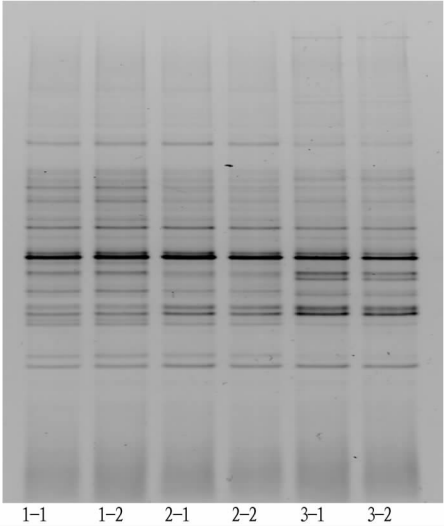


图 3 DGGE 凝胶电泳图

Fig.3 DGGE gel electrophoresis

通过 Quantity - One 软件分析原 DGGE 胶图,将胶图转换成直观的条带分布图(图 4),位于同一水平线的为相同物种,该图左右两侧的数字为经分析后该板胶共有的条带数(也可认为是该板胶上所有样本包含的物种数)。最下面一行表示以第 1 个样本为基准的前提下,其余样本与第 1 个样

本的相似性。

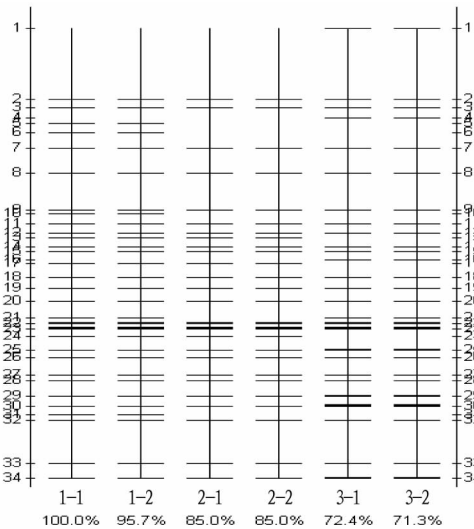


图 4 DGGE 条形图

Fig.4 Bar chart of DGGE

图 4 下方的百分数中 1 对应的 100% 表示以样品 1 - 1 为基准,在该条件下,其余样本与该样本的相似性。可以看出,1 - 1 与 1 - 2、2 - 1 与 1 - 2、3 - 1 与 3 - 2 非常相似,说明取样情况较好,能够反映各样品的真实情况。同时可知,样品 1 与样品 2 的相似性在 85% 左右,与样品 3 的相似性仅在 70%,说明样品 1 和样品 2 群落结构更相似。

2.1.2 生物群落多样性指数。由表 1 可知,样品 1 的群落多样性最高,样品 2 最小。

2.1.3 非加权组平均法(UPGMA)进行样品间的聚类分析。UPGMA 是一种较常用的聚类分析方法。通过 Quantity One 软件的 UPGMA 法所产生的系统发生树可以直观地看到各样品之间的相似性。由图 5 可知,对于 3 个样品所取的平行

组,相似系数均在 95% 以上,说明这 3 个样品取样均一,能够代表样品的真实情况,并且从图 5 中也可以看出样品 1 和样品 2 的相似性更高。

表 1 基于 DGGE 条带分布的生物群落多样性指数

Table 1 Biological community diversity index based on distribution of DGGE bands

编号 Sample No.	均匀度指数 Evenness index	丰富度指数 Richness index	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
1-1	0.842 215 480	31	2.892 157 180	0.911 995 576
1-2	0.851 412 987	31	2.923 741 304	0.918 363 706
2-1	0.809 980 895	26	2.638 995 951	0.886 591 638
2-2	0.796 122 559	26	2.593 844 153	0.881 324 094
3-1	0.810 807 525	27	2.672 289 332	0.905 337 945
3-2	0.800 201 466	27	2.637 333 491	0.901 101 304

2.1.4 克隆测序汇总。PCR-DGGE 的胶条切下共 16 条(编号 1~6)进行回收,扩增区域:16S,克隆测序结果见表 2。由表 2 可知,菌种 *Chlorobium limicola* strain DSM 245,*Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 strain TIE-1,*Chlorobaculum limnaeum* strain DSM 1677,*Magnetospirillum bellicus* strain VDY,*Rhodoblastus acidophilus* strain DSM 137,*Clostridium saccharobutylicum* strain NCP 262 的相似性均为 100%,说明这些菌种是 3 个样品共有的菌种,而其中 *Chlorobaculum limnaeum* strain DSM 1677 菌属相似度为 100%,条带占比 100%,说明该菌种是 3 个样品的优势菌种。*Chondromyces Robustus* strain Cm a13,*Chlorobaculum parvum* NCIB 8327,*Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 strain TIE-1,*Thiomonas perometabolis* strain ATCC 23370,*Dyella thiooxydans* strain ATSB10 菌种的数目也较多,且在 3 个样品中也基本都有。

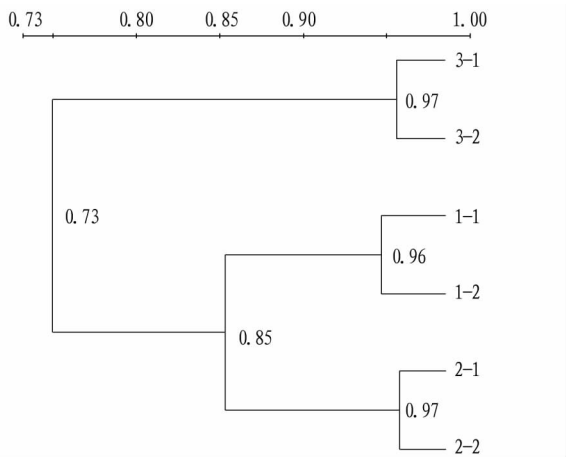


图 5 系统发生树

Fig.5 Phylogenetic tree of system

表 2 克隆测序汇总

Table 2 Cloning sequencing summary table

条带编号 Strip No.	克隆子编号 Clone child number	菌种名称 Strain name	最大相似度 Maximum likelihood// %	GenBank' 序列号 GenBank' serial No.	条带占比 Strip ratio// %
1	3	<i>Chondromyces robustus</i> strain Cm a13	96	NR_025346.1	67
1	6	<i>Chlorobaculum limnaeum</i> strain DSM 1677	96	NR_104865.1	33
2	1	<i>Chlorobium limicola</i> strain DSM 245	100	NR_074355.1	33
2	5	<i>Clostridium cellulovorans</i> strain 743B	88	NR_119029.1	33
2	6	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> TIE-1 strain TIE-1	100	NR_103926.1	33
3	3	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144 strain IL144	99	NR_074794.1	33
3	6	<i>Chlorobaculum limnaeum</i> strain DSM 1677	96	NR_104865.1	33
3	7	<i>Flavobacterium urocaniciphilum</i> strain YIT 12746	91	NR_125467.1	33
4	6	<i>Chlorobaculum limnaeum</i> strain DSM 1677	96	NR_104865.1	100
5	1	<i>Aeromonas sharmiana</i> strain GPTSA-6	97	NR_043470.1	100
6	3	<i>Chlorobaculum limnaeum</i> strain DSM 1677	99	NR_104865.1	33
6	6	<i>Chlorobaculum parvum</i> NCIB 8327	99	NR_074362.1	67
7	1	<i>Chlorobaculum limnaeum</i> strain DSM 1677	100	NR_104865.1	100
8	3	<i>Chlorobaculum limnaeum</i> strain DSM 1677	99	NR_104865.1	33
8	7	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB strain RCB	95	NR_074748.1	33
8	8	<i>Magnetospirillum bellicus</i> strain VDY	100	NR_116009.1	33
9	2	<i>Chlorobaculum parvum</i> NCIB 8327	99	NR_074362.1	33
9	3	<i>Chlorobaculum limnaeum</i> strain DSM 1677	96	NR_104865.1	33

接下表

续表 2

条带编号 Strip No.	克隆子编号 Clone child number	菌种名称 Strain name	最大相似度 Maximum likelihood// %	GenBank' 序列号 GenBank' serial No.	条带占比 Strip ratio// %
9	7	<i>Treponema zuelzeriae</i> strain DSM 1903	98	NR_104797.1	33
10	2	<i>Chlorobaculum limnaeum</i> strain DSM 1677	96	NR_104865.1	100
11	2	<i>Aureimonas phyllosphaerae</i> strain I9-753	98	NR_109590.1	33
11	3	<i>Candidatus solibacter usitatus</i> Ellin6076 strain Ellin6076	96	NR_074351.1	33
11	6	<i>Rhodoblastus acidophilus</i> strain DSM 137	100	NR_104756.1	33
12	3	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> TIE-1 strain TIE-1	100	NR_103926.1	67
12	6	<i>Bradyrhizobium valentinum</i> strain LmjM3	99	NR_125638.1	33
13	1	<i>Chlorobaculum limnaeum</i> strain DSM 1677	96	NR_104865.1	33
13	3	<i>Thiomonas perometabolis</i> strain ATCC 23370	99	NR_042910.1	33
13	5	<i>Dyella jiangningensis</i> strain SBZ 3-12	98	NR_121724.1	33
14	3	<i>Thiomonas perometabolis</i> strain ATCC 23370	99	NR_042910.1	67
14	4	<i>Clostridium saccharobutylicum</i> strain NCP 262	100	NR_122051.1	33
15	3	<i>Dyella thiooxydans</i> strain ATSB10	99	NR_116006.1	67
15	4	<i>Chlorobaculum limnaeum</i> strain DSM 1677	99	NR_104865.1	33
16	2	<i>Paludibacter propionici</i> strain WB4	93	NR_074577.1	33
16	5	<i>Chlorobaculum limnaeum</i> strain DSM 1677	96	NR_104865.1	33
16	6	<i>Burkholderia terrestris</i> strain R-23321	98	NR_125558.1	33

2.2 高通量测序结果 通过 PCR-DGGE 分析结果可知,6 个样品均具有较好的代表性。同时也为了节约测序成本,采用编号 1-1 样品代表样品 1,编号 2-1 代表样品 2,3-1 代表样品 3 来开展高通量测序工作。

2.2.1 指数分析结果统计。由在指定的相似水平为 97% (0.03)的条件下,样品的各多样性指数见表 3。由表 3 可知,

样品 2-1 的 OTU 序列数最高,1-3 最低,而 3 个样品中 1-1 的优化序列划分得到的 OTU 数目最多,为 1 566。由此可知,1-1 和 3-1 样品的物种总数较多,样品 3-1 的香农指数最高,为 3.48。各样品文库的覆盖率均在 98% 以上,样本中序列没有被测出的概率较低,覆盖较深,可见该次测序结果能够充分代表样本的真实情况。

表 3 各样品的多样性指数统计
Table 3 Diversity index statistics of each sample

样品编号 Sample No.	OUT 序列数 OUT sequence number	OUT 数目 OUT number	群落丰富度指数 Community richness index	文库覆盖率 Library coverage rate	香农指数 Shannon index
1-1	47 230	1 566	5 578	0.980 881	3.24
2-1	48 971	1 336	3 921	0.985 297	2.79
3-1	44 895	1 525	5 571	0.980 443	3.48

2.2.2 稀释性曲线。图 6 是在 97% 相似水平下划分 OUT 并绘制出的各样品稀释曲线。知以看出,3 个样品的曲线趋向平坦,说明这 3 个样品的取样数量合理,取样深度足够,能够代表样品的真实情况。

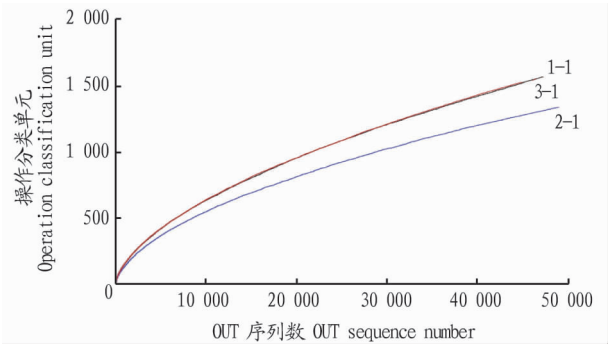


图 6 样品的稀释性曲线
Fig.6 Rarefaction curve of sample

2.2.3 各样本间在门分类水平的比较。在门分类水平上,

根据各样品中微生物组成绘制柱状图,比较各样本在门分类水平上群落结构组成的差异,结果见图 7。由图 7 可知,1-1、1-2 样品在门水平上群落结构比较相似,与 1-3 样品中群落结构略有差距,这与 DGGE 测序得出的结果一致。主要体现在 1-1、1-2 样品群落结构中,绿菌门(Chlorobi)数目占的比例最大,变形菌门(Proteobacteria)次之,而 1-3 样品中变形菌门最多,其次是绿菌门。在拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)等菌门上,差距不明显。

2.2.4 热图(Heatmap)。Heatmap 可以用颜色变化来反映二维矩阵或表格中的数据信息,它可以直观地将数据值的大小以定义的颜色深浅表示出来。常根据需要将数据进行聚类,将聚类后的数据表示在 heatmap 图上,通过颜色的梯度及相似程度来反映数据的相似性和差异性。

图 8 是根据属水平上 OTU 中所含序列的数量位于前 50 的信息进行绘制,分别按照样品和分类进行聚类后做出 Heatmap 图,能够反映出样品在属水平上表现的相似性或者

差异性。

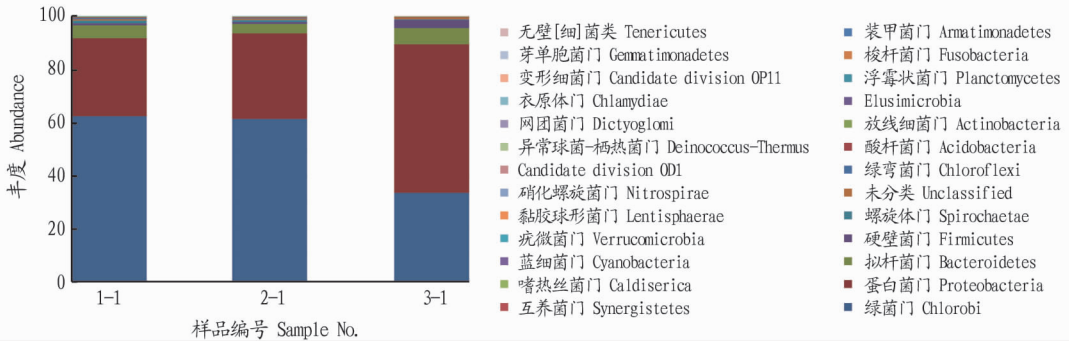


图7 各样本门水平上群落结构组成的差异

Fig.7 Differences in the community structure of phylum level of the samples

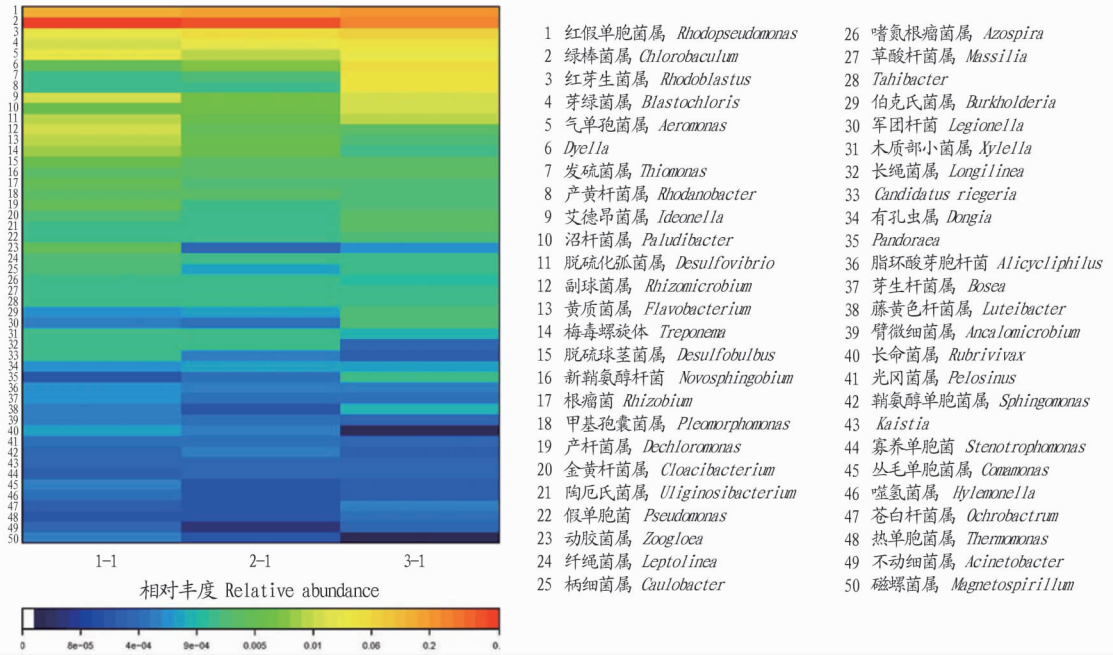


图8 基于各样品属分布及丰度的 heatmap 图

Fig.8 Based on the sample genus and abundance of the heatmap

由图8可知,3个样品的菌落结构在菌属水平上非常相似,红假单胞菌属(*Rhodospseudomonas*)、绿棒菌属(*Chlorobaculum*)、红芽生菌属(*Rhodoblastus*)、芽生绿菌属(*Blastochloris*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)是这3个样品共同的优势菌属,其中绿棒菌属在所有的菌属中丰度最大,而此菌属一般为光能无机自养型,专性厌氧,在无氧、有光照的水体中生长。说明试验装置中溶解氧浓度非常低,厌氧环境好。同时反应装置由有机玻璃制成,透明,光照条件好,有利于这些菌属的生长。

3 结论

(1)该研究结果表明,DGGE 测序与高通量测序结论基本一致。而 DGGE 测序只能检测到主要的微生物,如果总量占 1% 以下,便不能被检测到,高通量测序样品检测到 26 门 35 纲 55 目 85 科 153 属,说明 DGGE 显著低估了微生物的群落组成。通过对比这两种测序方法可知,高通量测序的检测灵敏度是 DGGE 的 4~39 倍,若进一步分析样品主要微生物类群的相对丰度,发现分类水平越低,高通量测序与 DGGE 的结果差异越大,尤其在科和属的水平上差异最大^[22]。并

且高通量测序能够较为全面和准确的反映微生物群落结构,而 DGGE 仅能够反映有限的优势微生物类群,在很大程度上极可能低估微生物的物种组成并高估其丰度。

(2)以丝瓜络作为反硝化滤池的填料,通过高通量测序以及基于 PCR-DGGE 技术的环境微生物群落多样性分析,初步得出:优势菌属为红假单胞菌属、绿棒菌属、红芽生菌属、芽生绿菌属、气单胞菌属。

丝瓜络作为反硝化滤池填料时,微生物生长状况良好,表面微生物比较丰富,初步认为丝瓜络可以作为反硝化生物滤池的填料。

参考文献

[1] 李魁晓,白雪,李鑫玮,等.城市污水厂二级处理出水深度处理组合工艺研究[J].环境工程学报,2012,6(1):63-67.
[2] 刘相超,周政辉,宋献方,等.梁滩河地表水与地下水水化学及硝酸盐污染[J].重庆交通大学学报(自然科学版),2009,28(5):942-947.
[3] KIM R H,LEE J,CHANG H W.Characteristics of organic matter as indicators of pollution from small-scale livestock and nitrate contamination of shallow groundwater in an agricultural area[J].Hydrological processes,2003,17(12):2485-2496.

86.8%。其中 pH 6.5 的甲烷八叠球菌属含量最高,为50.8%; pH 6.0 的甲烷鬃毛菌属含量最高为 46.3%。同样地,甲烷八叠球菌属和甲烷鬃毛菌属在 pH 8.5 中的相对丰度仅为 9.4%与9.9%,其发酵系统内的优势古菌为隶属于甲烷杆菌目的甲烷杆菌属和甲烷热杆菌属,其在反应器 pH 8.5 中的全古菌序列中分别占 62.3%和 11.4%,而甲烷杆菌属和甲烷热杆菌属是 2 类氢营养型的产甲烷菌。造成上述现象的原因可能是,当初始发酵 pH 接近中性时,系统内存在大量产乙酸细菌,如梭菌属、密螺旋菌属,促进了乙酸型产甲烷菌的生长如甲烷鬃毛菌属和甲烷八叠球菌属。相反地,当初始 pH 偏碱性时,系统内产乙酸菌的生长会受到抑制产氢细菌大量繁殖,从而促使了氢营养型产甲烷菌的繁殖。而一个良好的沼气反应器中产甲烷的主要途径应该是乙酸型的产甲烷途径^[14-15],所以这可能就是反应器 pH 8.5 产气不良的主要原因。

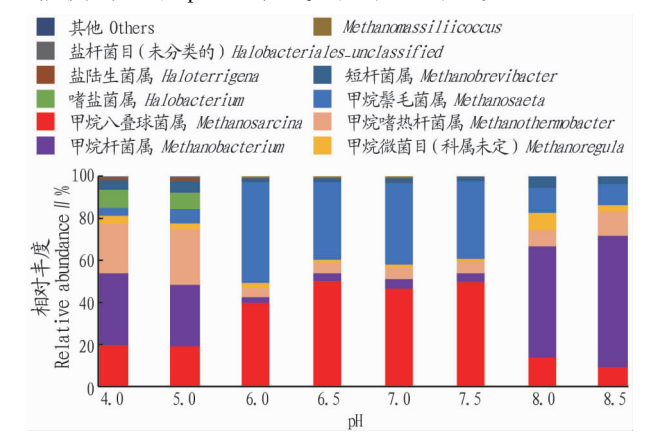


图7 不同反应器中古菌在属水平上的相对丰度
Fig.7 The relative abundance of archaeal at genus level in different reactors

3 结论与展望

当初始发酵 pH 为 6.5 时,甲烷的产气最高。过低的 pH 会抑制参与水解了大分子有机物的微生物和产甲烷菌的生长,造成发酵系统不能正常启动;过高的 pH 则会阻碍产乙酸菌的生长,从而导致产氢菌的繁殖,最终导致氢营养型的

甲烷菌成为优势菌,从而造成不良产气效果。该研究还缺乏对整个发酵阶段的微生物动态变化进行系统性的研究,结论的数据支持还不够完整,最后希望能够通过该研究给酒精醪液发酵产业及研究带来一定的技术支持。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家发展和改革委员会基础产业发展司. 中国新能源与可再生能源 1999 白皮书[M]. 北京:中国计划出版社,2000.

[2] 杨霞. 糖蜜酒精废液的厌氧生物处理及反应器中微生物群落结构分析[D]. 南宁:广西大学,2012.

[3] 石智慧. 纤维素乙醇废水生物处理技术研究[D]. 武汉:武汉理工大学,2010.

[4] 王晋. 厌氧发酵产酸微生物种群生态及互营关系研究[D]. 无锡:江南大学,2013.

[5] SHIN S G, LEE S, LEE C, et al. Qualitative and quantitative assessment of microbial community in batch anaerobic digestion of secondary sludge[J]. Bioresource technology, 2010, 101(24): 9461-9470.

[6] WANG X J, YANG G H, FENG Y Z, et al. Optimizing feeding composition and carbon-nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw[J]. Bioresource technology, 2012, 120(8): 78-83.

[7] 王晓娇. 混合原料沼气厌氧发酵影响因素分析及工艺优化[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013.

[8] GU Y, CHEN X H, LIU Z G, et al. Effect of inoculum sources on the anaerobic digestion of rice straw[J]. Bioresource technology, 2014, 158(4): 149-155.

[9] KAWAI M, NAGAO N, TAJIMA N, et al. The effect of the labile organic fraction in food waste and the substrate/inoculum ratio on anaerobic digestion for a reliable methane yield[J]. Bioresource technology, 2014, 157(1): 174-180.

[10] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and environmental microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.

[11] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic acids research, 2013, 41: 590-596.

[12] ZHANG S, BANASZAK J E, PARAMESWARAN P, et al. Focused-pulsed sludge pre-treatment increases the bacterial diversity and relative abundance of acetoclastic methanogens in a full-scale anaerobic digester[J]. Water research, 2009, 43(18): 4517-4526.

[13] ZENED A, COMBES S, CAUQUIL L, et al. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets[J]. FEMS microbiology ecology, 2013, 83(2): 504-514.

[14] LIU Y C, WHITMAN W B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea[J]. Annals of the New York academy of sciences, 2008, 1125(1): 171-189.

[15] VALCKE D, VERSTRAETE W. A practical method to estimate the acetoclastic methanogenic biomass in anaerobic sludges[J]. Journal of Water pollution control federation, 1983, 55(9): 1191-1195.

(上接第 64 页)

[4] 吴雨华. 欧美国家地下水硝酸盐污染防治研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(8): 284-290.

[5] BANGE H W. New directions: The importance of oceanic nitrous oxide emissions[J]. Atmospheric environment, 2006, 40(1): 198-199.

[6] PUNSHON S, MOORE R M. Nitrous oxide production and consumption in a eutrophic coastal embayment[J]. Marine chemistry, 2004, 91(1/2/3/4): 37-51.

[7] 高洋. 生活污水排放现状及改进策略探究[J]. 资源节约与环保, 2014(2): 116.

[8] 梁康, 王启烁, 王飞华, 等. 人工湿地处理生活污水的研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(3): 422-428.

[9] 孙瑞敏. 我国农村生活污水排水现状分析[J]. 能源与环境, 2010(5): 33-34, 42.

[10] 彭举威, 汪诚文, 付宏祥, 等. 我国农村水污染现状及治理措施[J]. 中国资源综合利用, 2010, 28(2): 44-45.

[11] PARASTAR S, NASSERI S, BORJI S H, et al. Application of Ag-doped TiO₂ nanoparticle prepared by photodeposition method for nitrate photocatalytic removal from aqueous solutions[J]. Desalination & water treatment, 2013, 51(37/38/39): 7137-7144.

[12] 杜勇立, 黄向京, 戚芳方, 等. 煤矸石作路基材料对地下水硝酸盐污染数值模拟分析[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2014, 43(3):

297-303.

[13] 吴雅丽, 许海, 杨桂军, 等. 太湖水体氮素污染状况研究进展[J]. 湖泊科学, 2014, 26(1): 19-28.

[14] 毕晶晶, 彭昌盛, 胥慧真. 地下水硝酸盐污染与治理研究进展综述[J]. 地下水, 2010, 32(1): 97-102.

[15] 甘一萍. 污水处理厂深度处理与再生利用技术[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2010.

[16] 张立辉, 曹国民, 盛梅, 等. 地下水硝酸盐去除技术进展[J]. 净水技术, 2010, 29(5): 4-10.

[17] 赵群. 废水中硝态氮来源、转化及去除方法[J]. 山东理工大学学报(自然科学版), 2014, 28(4): 53-56.

[18] 冯锦霞, 朱建军, 陈立. 我国地下水硝酸盐污染防治及评估预测方法[J]. 地下水, 2006, 28(4): 58-62.

[19] 迟峰. 反渗透法脱除地下水中硝酸盐的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.

[20] 王弘宇, 马放, 苏俊峰, 等. 不同碳源和碳氮比对一株好氧反硝化细菌脱氮性能的影响[J]. 环境科学学报, 2007, 27(6): 968-972.

[21] 巩有奎, 彭登瑶, 王淑莹, 等. 流量分配对短程生物脱氮过程中 N₂O 产生的影响[J]. 环境科学学报, 2014, 34(7): 1668-1673.

[22] 夏国围, 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.