http://qks.cqu.edu.cn

BAF 反应器中好氧反硝化菌的分子鉴定及分析

张文艺,陈雪珍,陆丽巧,闫 刚,赵婷婷,姚立荣
(常州大学 环境与安全工程学院,江苏 常州 213164)

摘 要:从处理高浓度蛋白质废水的 BAF 反应器中经富集分离出一株能以 KNO_3 为唯一氮源生长的好氧反硝化菌 N1。为进一步研究其分子生物学特性,采用传统的生理生化特征鉴定法及 16S rDNA 序列分析法对该菌株进行研究,并与已知种和相关种的菌株进行比较,得到系统发育树状图。结果表明,菌株 N1 的 16S rDNA 的核苷酸序列与蒙氏假单胞菌(Pseudomonas monteilii strain CIP 104883)的同源性为 99.2%,在细菌系统发育分类学上属于假单胞菌属,蒙氏假单胞菌。好氧反硝化菌株 N1 的序列已向 GenBank 提交并得到登录号为 HQ840771。关于蒙氏假单胞菌的反硝化研究在国内尚未见报道,此研究对于利用微生物技术治理环境中的氮污染具有较高的研究和应用价值。

关键词:好氧反硝化菌;分子鉴定;16S rDNA;系统发育树
中图分类号:X703.1 **文献标志码**:A **文章编号**:1674-4764(2012)01-0118-06

Molecular Classification, Identification and Phylogenetic Analysis of Aerobic Denitrifier N1 in the BAF Reator

ZHANG Wen-yi, CHEN Xue-zhen, LU Li-qiao, YAN Gang, ZHAO Ting-ting, YAO Li-rong
(School of Environmental and Safety Engineering, ChangZhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, P. R. China)

Abstract: A strain of aerobic denitrifier N1 screened from the biofilm of BAF combined reactor for treating high concentration organic pharmaceutical wastewater was found capable of aerobic denitrification, which can be used nitrate of potash by as sole nitro-gen source. The results indicated that the strain N1 was most similar to Pseudomonas monteilii based on the results of morphologic characteristics, physiological and biochemical properties and phylogentic analysis of 16S rDNA sequence, and the sequence had the highest similarity of 99.2% with 16S rDAN sequence of strain Pseudomonas monteilii strain CIP 104883 obtained from GenBank using BLAST. At present, there are few reports on the degradation of nitrate nitrogen with Pseudomonas monteilii. The nucleotide sequences of strain N1 have been submitted to the GenBank databases under accession numbers HQ840771. So far there are few studies related to aerobic denitrificaton of Pseudomonas monteilii. Therefore, the study is high valuable for treating nitrogenous wastewater using microbe technology.

Key words: aerobic denitrifier; molecular identification; 16S rDNA; phylogenetic tree

20 世纪 80 年代中期以来,人们在各种不同的环境诸如土壤、沟渠、池塘、活性污泥、沉积物等陆续分离出了一些好氧反硝化菌[1-4]。Robertson[5]在反硝化和脱硫系统中首次分离出好氧反硝化菌 Thiosphaera Pantotropha,在国内,杨希[6]等从活性污泥和土壤中分离得到 3 株反硝化能力较强的菌株,经形态观察、生理生化及 16S rDNA 分子鉴定,均为蜡状芽孢杆菌(Bacillus cereus);罗固源[7]等从

收稿日期:2011-04-30
基金项目:"十一五"国家科技重大专项(2008ZX07101-007-01);江苏省自然科学基金项目(BK200930405)
作者简介:张文艺(1968-),男,博士,教授,主要从事水污染控制与生态修复研究,(E-mail)zwy@jpu.edu.cn。

http://qks.cqu.edu.cn

OGO 反应器中分离出 3 株好氧反硝化菌 T3、T6、T7，经 16S rDNA 同源性比较，确定 T3、T7 为赤红红球菌属，T6 为戈登氏菌属；范利荣[8]等从实验室生物滤塔填料的生物膜中分离出一株无亚硝酸盐积累的好氧反硝化菌 A1，初步判定其为假单胞菌(Pseudomonas putida)；廖绍安[9]等从养虾池中分离出一株好氧反硝化菌，经形态学特征、生理生化反应及 16S rDNA 序列分析初步判定其为嗜麦芽寡养单胞菌(Stenotrophomonas malto-philia)。

本研究从处理高浓度蛋白质废水的 BAF 反应器中分离出 1 株好氧反硝化菌 N1，对其进行形态观察及生理生化分析，初步鉴定其为假单胞菌属(Pseudomonas)[10]。在此基础上，采用细菌的 16S rDNA 序列分析对好氧反硝化菌株 N1 进行细菌分类学的鉴定和系统发育树的构建，试图了解该好氧反硝化菌株 N1 的细菌分类学地位及部分生物学性质，并对该菌株的好氧反硝化特性进行研究，以期为好氧反硝化菌的分子生物学鉴定分析及资源利用提供技术基础。

1　材料与方法

1.1　培养基组成

好氧反硝化菌(暂命名为 N1)分离自本实验室处理高浓度制药废水的 BAF 反应器的生物膜中，培养基采用好氧反硝化培养基[10]。

1)灭菌条件：1.03×10^5 Pa，121℃，20 min。

2)BTB 初筛培养基(/L)[11]：琼脂 20 g；KNO_3 1 g；KH_2PO_4 1 g；$FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.5 g；$CaCl_2$ 0.2 g；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g；琥珀酸钠 8.5 g；溴百里酚蓝(BTB)(取 0.1 gBTB 溶于 10 mL 酒精)1 mL，pH 至 7.0～7.3。

3)富集培养基(/L)：KNO_3 4.0 g，KH_2PO_4 4.0 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g，琥珀酸钠 19.4 g，pH 7.2～7.5。

4)固体培养基(/L)：KNO_3 1 g；KH_2PO_4 1 g；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g；KCl 0.5 g；琥珀酸钠 2.8 g，琼脂 2%，pH 7.0～7.3。

1.2　主要试剂和仪器

1)试剂：引物合成(F8、R1492)(上海捷瑞生物工程有限公司)；dNTPS；10 × buffer；rTaq 酶(TaKaRa)；其余试剂均为中国产分析纯试剂。

2)仪器：细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)(上海捷瑞生物工程有限公司)；DNA 快速回收试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司)；倒置显微镜(XDS/XDS-PHD)(江西凤凰光学仪器有限公司)；高速离心机(TGL-16C)(上海安亭科学仪器厂制造)；DYY-604 电泳仪(南京新校园生物技术研究所)；2720 Thermal Cycler PCR 仪(Applied Biosystem (AB))；XW-80A 涡旋混合器(上海琪特分析仪器有限公司)。

1.3　菌体富集培养及菌种分离纯化

从运行稳定的处理高浓度制药废水的 BAF 反应器中取少量含生物膜的污水 160 r/min 充分摇匀打碎，然后将其接种于富集培养基中，调 pH 为 7.2～7.5，30℃，120 r/min 培养 1 d 后，重复操作 2～3 次，作为备用菌液。

用倍比稀释法将富集培养后的上层液分别稀释 10^{-7} 倍、10^{-8} 倍和 10^{-9} 倍，涂布于 BTB 初筛培养基平板上，30℃倒置培养，直到长出肉眼可见的单菌落。选出长势良好，形态不同，且周围有蓝色晕圈的菌落，进行划线分离，直到平板上的菌落形态基本相同。将分离后得到的纯菌进行斜面保存。

1.4　形态观察和生理生化实验

1)菌株形态学鉴定：对筛选的菌株进行革兰氏染色及电子显微镜观察。

2)菌株生理生化鉴定：根据《常见细菌系统鉴定手册》[12](2001)及《伯杰氏细菌手册(第八版)》[13]进行。

1.5　细菌反硝化能力鉴定

向灭菌后的反硝化培养基中按 1%的量接入菌株 N1，30℃、120 r/min 摇床振荡培养，每隔 2 h 测定培养基中菌株 N1 在 600 nm 处的吸光度值，同时测定培养基中硝酸盐氮的变化情况及亚硝酸盐氮的累积量，以考察菌株 N1 在好氧条件下的反硝化特性。

1.6　16S rDNA 的 PCR 扩增和序列测定

1)模板 DNA 的提取：采用上海捷瑞生物工程有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)对好氧反硝化菌株 N1 进行 DNA 提取。

2)16S rDNA 基因的 PCR 扩增：以基因组 DNA 为模板，扩增采用一对通用引物[14-16]：正向引物 F8：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3'(位置 8～27)，反向引物 R1492：5'-CTAC GGTTACCTTGTTACGAC-3'(位置 1492～1512)。

3)PCR 扩增的反应体系：全基因组扩增产物 1 μL，TapDNA 聚合酶(TaKaRa)0.25 μL，加水补足 25 μL。

4)PCR 扩增的反应条件：95℃预变性 5 min；95℃变性 30 s，54℃复性 45 s，72℃延伸 5 min，25 个循环；72℃，10 min。全基因组扩增的阴性对照用于

http://qks.cqu.edu.cn

同步实验。

5)经 PCR 反应扩增出 16S rDNA,用上海捷瑞生物工程有限公司的 DNA 快速回收试剂盒将 PCR 产物进行纯化,以备测序。

1.7 16S rDNA 序列分析及系统发育分析

16S rDNA 的全序列测定和分析:测序工作委托百奥迈科生物技术有限公司完成。测定序列与 GenBank 上已发表的 16S rDNA 进行比对(BLAST),并将其在 Clustaw 程序包中进行分析,最后形成一个多重序列匹配排列阵。用 WEGA 5 程序包中的 Phylogeny 程序,采用邻近法(NJ 法)计算进化距离,根据"Kimura 2-参数"方式,各分枝的重复性采用 MEGA 程序包中的 Bootstrap method 程序分析,重复数为 1 500,以确保系统进化树的可信度。

2 结果与分析

2.1 好氧反硝化菌株的分离及形态观察

用倍比稀释法将富集培养后的菌液分别稀释 10^{-7}倍、10^{-8}倍和 10^{-9}倍,涂布于 BTB 初筛培养基平板上,30℃恒温培养 2~3 d 后,挑取长势良好,形态不同,且周围有蓝色晕圈的菌落,进行多次划线分离纯化。并通过革兰氏染色与电子显微镜观察判断其是否为纯菌株及其菌体形态,最终分离出 1 株可在 BTB 初筛培养基上生长良好的纯菌(命名为 N1)。经形态观察,菌株 N1 在平板上培养 2 d 后,形成直径为 2~5 mm的圆形菌落,菌落表面光滑,隆起,呈浅黄色,边缘光滑;该菌株革兰氏染色呈阴性;电子显微镜观察显示,菌体呈杆状,无芽孢,如图 1、图 2 所示。

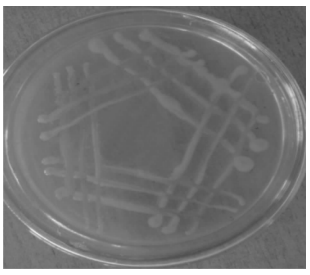


图 1 菌株 N1 在固体培养基上的菌落

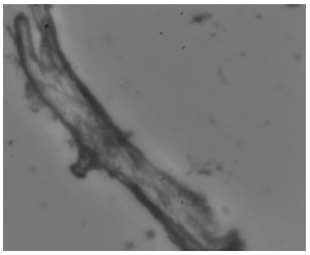


图 2 菌株 N1 镜检结果(40×10)

2.2 生理生化特性分析与 16S rDNA 测序

由于各种细菌的新陈代谢类型不同,利用不同物质后产生的代谢产物有差异,因此细菌的生理生化反应成了细菌分类鉴定的主要依据。

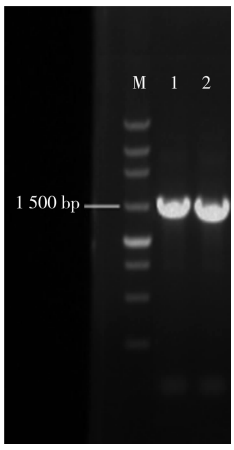
对菌株 N1 进行了常规的生理生化鉴定,其结果如表 1:接触酶反应、糖类发酵试验及硝酸盐还原试验均呈阳性,好氧,葡萄糖发酵产酸,淀粉水解、乙酰甲基醇试验及甲基红试验反应呈阴性。

表 1 分离菌株 N1 的生理生化试验结果

菌株编号	革兰氏	接触酶	V.P 试验	甲基红	葡萄糖氧化	糖发酵	硝酸盐还原	淀粉水解
N1	—	+	—	—	—	+	+	—

注:"+"表示阳性,"—"表示阴性。

提取菌株 N1 的基因组 DNA,PCR 扩增目的片段得到 1%的琼脂糖凝胶电泳图(图 3)。扩增出来的 DNA 条带大约是 1.5 kb,与引物设计区域大小相同,电泳条带单一清晰,且无明显非特异性的扩增产物出现,表明 DNA 提取及 PCR 扩增均较成功。菌株 N1 的 16S rDNA 序列长 1 432 bp,由 16S rDNA 基因序列比较可知,分离得到的菌株 N1 与假单胞杆菌属(Pseudomonas)最为接近,同源性达 99%。结合菌株 N1 的形态学特征(图 1)、生理生化鉴定(表 1)及 16S rDNA 序列分析结果,可初步确定菌株为假单胞杆菌属(Pseudomonas)。



M:DNA 分子标记;1、2:16S rDNA 的 PCR 扩增产物

图 3 好氧反硝化菌株 N1 的 16S rDNA 的 PCR 产物电泳图

测定纯化的 PCR 产物的 16S rDNA 的全序列见图 4,用软件录入后,转化为 GenBank 信息库形式。

2.3 细菌反硝化能力鉴定

由图 5 可以看出,在好氧条件下,菌株 N1 在接种 6 h 后进入对数生长期,18 h 时菌体浓度达到最

http://qks.cqu.edu.cn

高，随后进入生长稳定期，20 h 左右进入衰亡期。菌株 N1 的对数生长期持续了 12 h，时间较长，但稳定生长期较短。好氧条件下培养 48 h 后，菌株 N1 培养液中的硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的浓度不再有明显变化。且菌株 N1 的硝酸盐氮由 97.4 mg·L^{-1}降为 38.0 mg·L^{-1}，降解率为 61.0%，与孔庆鑫[17]等利用间歇曝气分离的假单胞菌株 Pseudomonas sp. Y2-1-1 经培养 5 d 后硝态氮的降解率达 47.1%相比，具有较好的好氧反硝化性能。

1 GGATGCGCAGCTACCATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGCGGC
61 GGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAA
121 CGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCA
181 GATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCG
241 TAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACG
301 GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG
361 TGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAA
421 TACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCC
481 GCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGT
541 GGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGG
601 CGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
661 TAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGA
721 AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAAC
781 TAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGG
841 GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
901 GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAAC
961 TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
1021 AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTT
1081 ACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
1141 GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCG
1201 GTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCAAAACCGATCGTAGTCCGG
1261 ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATG
1321 TCGCGGTGAATACGTTCCCG GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG GGAGTGGGTT
1381 GCACCAGAAG TAGCTAGTCT AACCTTCGGG AGGACGGTAC CACGGTGGAT GC

其中：359 A　324 C　453 G　296 T

图 4　菌株 N1 16S rDNA 序列

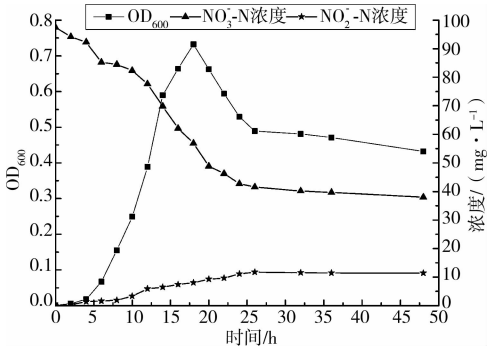


图 5　菌株 N1 反硝化有力

2.4　16S rDNA 序列分析及其系统发育分析

菌株 N1 的 16S rDNA 部分序列已在 GenBank 中注册，登录号 HQ840771，利用 BLAST GenBank 数据库进行同源性检索，显示菌株 N1 与假单胞菌属的多种细菌同源性(>99%)，多数为假单胞菌，其余为未鉴定细菌。进行初步的 BLAST 后，将其与 GenBank 数据库中已发表的 29 株标准菌株(表 2)进行多序列比对。

将菌株 N1 与假单胞菌属标准菌株的 16S rDNA 序列比对用 WEGA 5 程序包中的 Phylogeny 程序，采用 NJ 法计算进化距离，根据“Kimura 2-参数”方式，各分枝的重复性采用 Bootstrap method 程序分析，重复数为 1 500，确保系统进化树的可信度，构建系统发育树，结果见图 6。从所绘制的假单胞菌的系统发育树可知，N1 与 Pseudomonas monteilii strain CIP 104883 的亲缘关系最近并位于同一分支，自展值为 95%，因此用此法构建的系统发育树出现的分支点是可靠的，即该系统进化树是可信的。且该菌株与 Pseudomonas monteilii strain CIP 104883^T 菌株的同源性高达 99.2%。2 菌株部分序列对比排列见图 7 所示，其中菌株 N1 的 5’-20 位置核缺失。

表 2　用于系统发育树构建的分离菌株和相关参比菌株的细菌名称、菌株编号和序列登录号

菌株	菌株编号	序列登录号	相似性/%
Pseudomonas aeruginosa strain	DSM 50071	NR 026078	93.8
Pseudomonas resinovorans strain	LMG 2274	NR 026534	93.8
Pseudomonas anguilliseptica strain	S1	NR 029319	96.2
Pseudomonas citronellolis strain	DSM 50332	NR 026533	95.0
Pseudomonas jinjuensis strain	Pss 26	NR 025226	95.0
Pseudomonas balearica strain	SP1402	NR 025972	94.6
Pseudomonas thermotolerans strain	CM3	NR 028008	93.7
Pseudomonas indica strain	IMT37	NR 028801	94.1
Pseudomonas luteola strain	4239	NR 037134	95.9
Pseudomonas flavescens strain	B62	NR 025947	97.3
Pseudomonas straminea strain	CB-7	NR 036908	96.6
Pseudomonas alcaliphila strain	AL15-21	NR 024734	97.0
Pseudomonas pseudoalcaligenes strain	Stanier 63	NR 037000	97.3
Pseudomonas oryzihabitans strain	L-1	NR 025881	98.2
Pseudomonas mosselii strain	CIP 105259	NR 024924	98.7
Pseudomonas plecoglossicida strain	FPC 951	NR 024662	99.1
Pseudomonas monteilii strain	CIP 104883^T	AB 021409	99.2
Pseudomonas graminis strain	DSM 11363	NR 026395	97.1
Pseudomonas lutea strain	OK2	NR 029103	97.1
Pseudomonas rhizosphaerae strain	IH5	NR 029063	97.1
Pseudomonas koreensis strain	Ps 9-14	NR 025228	97.3
Pseudomonas jessenii strain	CIP 105274	NR 024918	97.6
Pseudomonas umsongensis strain	Ps 3-10	NR 025227	97.3
Pseudomonas agarici strain	ICMP 2656^T	AJ 308298	97.5
Pseudomonas fragi strain	IFO 3458^T	AB 021413	95.6
Pseudomonas psychrophila strain	E-3	NR 028619	95.5
Pseudomonas lundensis strain	ATCC 49968^T	AB 021395	95.9
Pseudomonas taetrolens strain	I11	NR 036909	95.2
Pseudomonas amygdali strain	AL1	NR 036999	95.3

注：上标“T”表示该菌株为模式菌株

按照国际分类委员会的建议，DNA 同源性 70%作为定种的界限，即大于或等于 70%为同一个种群，小于 70%为不同的种群。综上所述，可以推测从 BAF 反应器中筛选出的好氧反硝化菌株 N1 属于蒙氏假单胞菌，在系统发育地位上属于细菌(Bacteria)中变形菌门(Proteobacteria)、γ-变形杆菌纲(Gammaproteobacteria)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、假单胞菌属

http://qks.cqu.edu.cn

(Pseudomonas)、蒙氏假单胞菌种(Pseudomonas monteilii)。这与菌株N1根据形态学特征及生理生化特性所得到的初步鉴定结果相符。

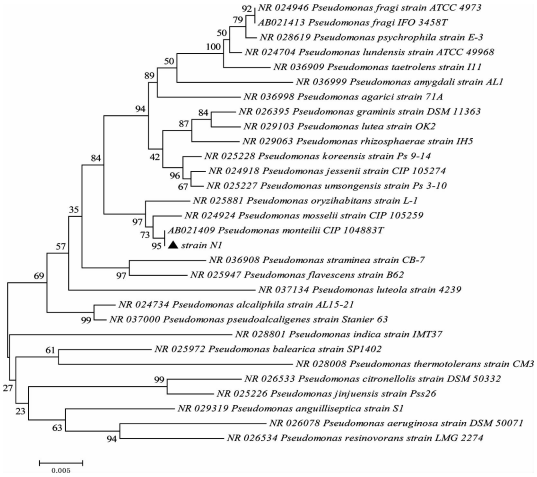


图6 基于16S rDNA序列建立的菌N1和相关细菌的系统发育树

```
                5'-15                                          3'-66
Strain N1       CATGC-AGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGCGGCGGACG
                     |
CIP104883       CATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGCGGCGGACG
```

CIP 104883：GenBank登记号NR 024910；菌株N1：5'-20位缺失

图7 N1菌16S rDNA部分序列的排列比较

研究发现，能够进行反硝化作用的微生物很多，它们不属于一个特定的种群，其中已有多种菌属的细菌被鉴定为好氧反硝化菌，包括产碱菌属(Alcaligenes)[18-19]、副球菌属(Paracoccus)[20]、恶臭假单胞杆菌(Pseudomonas putida)[21]、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)[22]和Diaphorobacter sp.[23]等，分布广泛。本研究分离得到的好氧反硝化菌株N1经鉴定其为蒙氏假单胞菌，该菌株可在好氧条件下以硝酸盐氮作为受氢体高效降解硝酸盐氮，具有较强的反硝化能力。目前国内关于蒙氏假单胞菌对硝酸盐氮的降解鲜有报道。

3 结论

1)经形态学观察、生理生化特性试验及利用16S rDNA进行序列分析，并构建系统发育树，结果表明，好氧反硝化菌N1其与蒙氏假单胞菌(Pseudomonas monteilii strain CIP 104883)亲缘关系最近，且属于同一分支，两者的相似性为99.2%，因此将该菌株归为蒙氏假单胞菌(Pseudomonas monteilii)。

2)分离鉴定好氧反硝化菌对进一步研究BAF反应器生物膜微生物的遗传背景，分析其代谢途径，分析菌株间的亲缘关系及开发利用好氧反硝化菌资源提供了技术基础，但关于蒙氏假单胞菌的代谢机理、生长条件、降解效率等有待进一步研究。

3)好氧反硝化菌N1(Pseudomonas monteilii)在好氧条件下对硝酸盐氮具有较好的降解效率，在国内尚属首次报道，这些基础的研究工作对于利用微生物技术治理环境中的氮污染具有较高的研究和应用价值。

参考文献：

[1] 许尚营，张华，李娜，等. 一株好氧反硝化菌的鉴定及反硝化特性研究[J]. 环境科学与技术，2010，33(2)：10-13.
XU SHANG-YING，ZHANG HUA，LI NA，et al. Isolation of a new aerobic denitrifying bacterium and its denitrification characteristics[J]. Environment Science & Technology，2010，33(2)：10-13.

[2] 王莹，周巧红，梁威，等. 人工湿地高效好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究[J]. 农业环境科学学报，2010，29(6)：1193-1198.
WANG YING，ZHOU QIAO-HONG，LIANG WEI，et al. Isolation and identification of a high-efficiency aerobic denitrifier and its denitrifying characteristic in constructed wetland[J]. Journal of Agro-Environment Science，2010，29(6)：1193-1198.

[3] 李慧颖，黄少斌，范利荣. 一株好氧反硝化菌的反硝化性能研究[J]. 环境科学与技术，2009，32(8)：9-12.
LI HUI-YING，HUANG SHAO-BIN，FAN LI-RONG. De nitrification characteristics of an aerobic denitrifying bac-terium pseudomonas putida strain A1 [J]. Environment Science & Technology，2009，32(8)：9-12.

[4] 黄廷林，苏俊峰，李倩. 好氧反硝化菌株的筛选培养及其反硝化性能研究[J]. 西安建筑科技大学学报：自然科学版，2009，41(5)：704-707.
HUANG TIN-LIN，SU JUN-FENG，LI QIAN. Isolation，identification and denitrifying characteristics of aerobic denitrifying bacteria[J]. J. Xi'an Univ. of Arch. & Tech.：Natural Science Edition，2009，41(5)：704-707.

[5] ROBERTSON L A，KUENEN J G. Thiosphaera pantotropha gen. nov. sp. nov.，a facultatively anaerobic，facultatively autotrophic sulfur bacterium[J]. Journal of General Microbiology，1983，129：2847-2855.

[6] 杨希，刘德立，邓灵福，等. 蜡状芽孢杆菌好氧反硝化特性研究[J]. 环境科学研究，2008，21(3)：155-159.
YANG XI，LIU DE-LI，DENG LING-FU，et al. Study on aerobic denitrification characteristics of bacillus cereus[J]. Research of Environmental Sciences，2008，21(3)：155-159.

[7] 罗固源，汤丽娟，许晓毅，等. 好氧反硝化菌筛选及强化

http://qks.cqu.edu.cn

OGO 反应器脱氮的研究[J]. 中国给水排水，2010，26(1)：16-19.
LUO GU-YUAN，TANG LI-JIAN，XU XIAO-YI，et al. Screeningof aerobic denitrifying bacteria and enhancement of nitrogen removal in OGO reactor[J]. China Water & Wastewater，2010，26(1)：16-19.

[8] 范利荣，黄少斌，杨军，等. 生物滤塔体系好氧反硝化菌的分离鉴定与特性研究[J]. 微生物学通报，2008，35(5)：679-684.
FAN LI-RONG，HUANG SHAO-BIN，YANG JUN，et al. Separating and studying of the aerobic denitrifying bacteria from bio-filter[J]. Microbiology，2008，35(5)：679-684.

[9] 廖绍安，郑桂丽，王安利，等. 养虾池好氧反硝化细菌新菌株的分离鉴定及特征[J]. 生态学报，2006，26(11)：3718-3724.
LIAO SHAO-AN，ZHENG GUI-LI，WANG AN-LI，et al. Isolation and characterization of a novel aerobic denitrifier from shrimp pond[J]. Acta Ecologica Sinica，2006，26(11)：3718-3724.

[10] 张文艺，陆丽巧，姚立荣，等. BAF 反应器中好氧反硝化细菌的筛选分离及反硝化特性研究[J]. 中国农村水利水电，2011(1)：59-64.
ZHANG WEN-YI，LU LI-QIAO，YAO LI-RONG，et al. Isolation of aerobic denitrification bacteria and denitrifying character of BAF bioreactor [J]. China Rural Water and Hydropo-wer，2011(1)：59-64.

[11] 项慕飞. 好氧反硝化菌的分离筛选和鉴别研究[D]. 北京：北京工商大学，2007.

[12] 东秀珠，蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京：科学出版社，2001.

[13] R. E. 布坎南，N. E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京：科学出版社，1984.

[14] 赵玲一. 聚合酶链反应检测血管炎性皮肤病皮损中分枝杆菌 16S rRNA 基因和结核杆菌 DNA 的实验研究[D]. 重庆：重庆医科大学，2008.

[15] TERESA E LEONARDO，EDWARD B MONDOR. Symbiont modifies host life-history traits that affect gene flow[J]. Proceeding of the Royal Society，2006，273：1079-1084.

[16] 童晓梅，陈芳，于军，等. 卓奥友顶峰(8201m)积雪中细菌菌群结构及多样性分析[J]. 科学通报，2008，53(18)：2216-2222.
TONG XIAO-MEI，CHEN FANG，YU JUN，et al. Analysis the bacteria of microbes structure and diversity on the top of Zhuoaoyou from the snowcap[J]. Chinese Science Bulletin，2008，53(18)：2216-2222.

[17] 孔庆鑫，李君文，王新为，等. 一种新的好氧反硝化菌筛选方法的建立及新菌株的发现[J]. 应用与环境生物学报，2005，11(2)：222-225.
KONG QING-XIN，LI JUN-WEN，WANG XIN-WEI，et al. A new screening method for aerobic denitrification bacteria and isolation of a novel strain [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology，2005，11(2)：222-225.

[18] JOO H S，HIRAI M，SHODA M. Piggery wastewater treatment using Alcaligenes faecalis strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification [J]. Water Research，2006，40(16)：3029-3036.

[19] 马放，周丹丹，王宏宇，等. 一株好氧反硝化细菌生理生态特征的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报，2006，38(4)：576-577.
MA FANG，ZHOU DAN-DAN，WANG HONG-YU，et al. Characteristics of psammophytes of an aerobic denitrifier [J]. Journal of Harbin Institute of Technology，2006，38(4)：576-577.

[20] VELDMAN R，REIJNEDRS W N M，VAN SPANNING R J M. Specificity of FNR-type regulators in Paracoccu denitrificans [J]. Biochemical Society Transaction，2006，34(1)：94-96.

[21] MIA KIM，SEONG-YUN JEONG，SU JEONG YOON，et al. Aerobic denitrification of pseudomonas putida AD-21 at different C/N ratios[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering，2008，106(5)：498-502.

[22] YANG XIN-PING，WANG SHI-MEI，ZHANG DE-WEI，et al. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic hetero-trophic nitrifying-denitrifying bacterium，bacillus subtilis A1 [J]. Bioresource Technology，2011，102：854-862.

[23] ANSHUMAN A KHARDENAVIS，ATYA KAPLEY，HEMANT J PUROHIT. Simultaneous nitrification and denitrification by diverse diaph-orobacter sp. [J]. Appl Microbiol Biotechnol，2007，77：403-409.

（编辑　王秀玲）