

一株高效好氧反硝化菌的分离及特性

杨俊忠 倪砚 许尚营 徐可瀚 刘义 曾丽霞 刘德立*

(华中师范大学生命科学学院 湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室 湖北 武汉 430079)

摘要: 利用富集培养的方法从南昌市郊某养鱼塘采样分离出 22 株反硝化细菌, 其中 8 株反硝化率较高, 从中选择一株效果最好的作为研究对象, 命名为 HS-N62, 对其生长特性进行了深入研究。结果表明: 硝酸盐氮初始浓度为 140 mg/L, 菌株 HS-N62 在 12 h 内对硝酸盐氮的去除率可达 96%, 而且没有亚硝酸盐氮的积累。该菌最适生长温度范围为 30°C–37°C, 最适生长 pH 范围 6.0–8.0, 最适 C/N 比为 10:1, 并能利用多种碳源生长。运用正交试验探讨了该菌株最适的反硝化条件。反硝化菌株 HS-N62 还具有较好的除磷能力, 12 h 除磷率达到 67.7% (初始磷酸盐浓度 57 mg/L)。通过形态学特性和生理生化分析以及 16S rRNA 基因序列分析, 菌株 HS-N62 与 *Pseudomonas* sp. 亲缘关系最为接近, 相似性达 99%, 初步鉴定该菌为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

关键词: 好氧反硝化, 分离鉴定, 特性研究

Isolation and Characterization of a High Efficiency Aerobic Denitrifier

YANG Jun-Zhong NI Yan XU Shang-Ying XU Ke-Han LIU Yi ZENG Li-Xia
LIU De-Li*

(Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

Abstract: Twenty two bacterial strains with a capacity of denitrification were isolated from fish pond, of which eight strains have the high rate of denitrification while one strain named HS-N62 has the strongest effect of denitrification. The results showed that the denitrifying rate of strain HS-N62 reached 96% in 12 hours with initial nitrate nitrogen concentration of 140 mg/L and no nitrite nitrogen accumulation. The growth rate and characteristics of HS-N62 were further studied, and the results showed that the optimum growth temperature ranged from 30°C to 37°C, pH value from 6.0 to 8.0 and the optimal C/N ratio 10:1. Meanwhile strain HS-N62 could utilize a variety of carbon sources for growth. The most suitable denitrification condition for strain HS-N62 was confirmed by using a series of the orthogonal test. This denitrifying strain HS-N62 also has good ability of phosphorus removal, and the removal rate within 12 hours was up to 67.7% (at initial phosphate concentration 57 mg/L). Strain HS-N62 showed 99% 16S rRNA gene sequence similarity to many *Pseudomonas* strains. Based on the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30170011, 30771429); 教育部博士点基金项目(No. 20060511002); 湖北省科技攻关计划项目(No. 2007AA201C50, 2007AA301C26)

* 通讯作者: Tel: 86-27-67865534; 信箱: deliliu2002@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-05-21; 接受日期: 2010-08-19

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

morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, the strain HS-N62 was identified as *Pseudomonas* sp.

Keywords: Aerobic denitrification, Isolation and identification, Characteristic research

近十几年来,我国水产养殖业迅猛发展,但在水产养殖过程中的氨、硝酸盐、亚硝酸盐、磷酸盐等营养元素含量过高所造成的富营养化现象日益严重,造成大量鱼虾死亡,最终导致重大经济损失。因此,控制水体中的硝态氮和亚硝态氮成为规模化养殖成功的关键之一。反硝化是将硝酸盐或亚硝酸盐还原成 N_2O 或 N_2 的过程^[1]。微生物的反硝化作用是去除水域和陆地上过量氮素的主要方式,是全球氮循环的重要组成部分^[2]。传统观点认为:反硝化细菌大都是厌氧细菌,其反硝化作用在无氧条件下发生。对好氧反硝化细菌的研究最早开始于 20 世纪 80 年代,随着好氧反硝化细菌副球菌属(*Paracoccus*)的首次发现^[3],近年来越来越多的好氧反硝化细菌被发现。已报道的菌属有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、戴尔福特属(*Delftia*)等 50 多个属都存在好氧反硝化现象^[4-5]。好氧反硝化的发现,突破了传统理论的认识,为生物脱氮技术提供了一种崭新的思路。

污水的脱氮处理有物理、化学和生物方法,由于生物脱氮更有效和相对价格低廉,它已被广泛采用^[3]。传统理论认为脱氮必须经过好氧硝化和缺氧反硝化两个过程,因此脱氮过程工艺环节多,处理成本高。好氧反硝化菌的发现,意味着硝酸盐氮也可在有氧情况下转化为氮气,即硝化反硝化可以在同一环境下同时进行,这不仅节约了投资和运行成本,也缩短脱氮周期^[6]。生物脱氮工艺包括自养和异养反硝化作用,大多数好氧反硝化细菌是异养菌,少数反硝化细菌为自养菌。在生物反硝化处理高氨氮废水过程中,碳源的种类与浓度对反硝化的速率起至关重要的作用,因此寻找合适的外加碳源并控制其投加量是实现脱氮目标的关键^[7]。本文从常年养鱼池塘中采样筛选出多株好氧反硝化细菌,并研究了其生长条件及其反硝化效率,将为好氧反硝化脱氮的实际应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 培养基

富集培养基(SM, g/L): $NaNO_3$ 0.85, 丁二酸钠 2.84, KH_2PO_4 1.36, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.19, 2.00 mL 微量元素溶液, pH 7.0-7.4。

反硝化培养基(SC, g/L): $NaNO_3$ 0.85, 丁二酸钠 4.72, 酸水解酪素 5.00, Na_2HPO_4 7.90, KH_2PO_4 1.50, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.10, 2.00 mL 微量元素溶液, pH 7.0-7.4。微量元素(g/L): $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 4.00, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.70, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 7.00, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.20, $NaMO_4 \cdot 2H_2O$ 3.40, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.00, pH 7.0^[4]。

BTB 培养基(g/L): 丁二酸钠 4.72, $NaNO_3$ 0.85, KH_2PO_4 1.00, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.10, 琼脂 15.00, pH 7.0^[4]。

聚磷培养基(g/L): 葡萄糖 10.00, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.20, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50, $(NH_4)_2SO_4$ 2.00, KH_2PO_4 0.25, pH 7.0。

1.2 富集培养和菌种分离

从常年养鱼池塘中采集水样,将 1 mL 样品加入装有 100 mL SM 的 500 mL 锥形瓶中,30°C 静置培养 3-4 d,待培养基浑浊;取 10 mL 菌悬液于 100 mL 新鲜 SM 培养基中培养,富集培养 5-6 次。将最后得到的菌悬液稀释涂布于 BTB 培养基,置 30°C 培养 1-2 d;用接种环挑取不同形态单菌落于新鲜的 SM 中振荡过夜(30°C)。重复划线培养 2-3 次,直至平板菌落形态单一,无其他形态的菌落为止^[8]。

1.3 菌体形态和生理生化鉴定

取适当稀释的反硝化细菌纯培养液涂平板,置 30°C 培养。待长出菌落后,观察菌落的大小、颜色等特征。采用革兰氏染色,观察其个体形态。细菌生理生化鉴定根据《常见细菌系统鉴定手册》进行鉴定^[9]。

1.4 16S rRNA 基因 PCR 扩增与序列分析

提取菌株 HS-N62 基因组 DNA 为模板,16S rRNA 基因 PCR 反应引物为通用引物,即正向引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'),反向引物 1492R (5'-GATTACCTTGTTACGACTT-3') (上海基康公司合成)。PCR 反应体系(25 μ L): 2.5 μ L

10 × PCR 缓冲液, 3.5 μL MgCl₂ (3 mmol/L), 0.5 μL 模板 DNA, 正反向引物各 0.5 μL, 1 μL dNTPs, 0.5 μL *Taq* polymerase, 16 μL 超纯水。PCR 扩增条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min^[6,8]。PCR 产物采用纯化试剂盒纯化, 测序由北京三博远志公司完成。测序结果提交 GenBank 进行 BLAST 比对。

1.5 反硝化能力的测定

挑取单菌落于 SC 培养基中过夜培养, 按 1% 的接种量接种到装有 100 mL SC 培养基的 500 mL 锥形瓶中, 30°C、120 r/min 培养 12 h, 每隔一定时间取样, 测定培养基中剩余的 $c(\text{NO}_3^-)$ 、 $c(\text{NO}_2^-)$ 和 $c(\text{NH}_4^+)$, 计算其去除率。总氮的测定采用过硫酸钾紫外分光光度法, 硝酸盐氮测定采用磺胺 Brucine 光度法; 亚硝酸盐氮测定采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法; 氨氮的测定采用纳氏试剂分光光度法^[10]。菌体量采用比浊法, 即用分光光度计测定微生物悬浮液的光密度 OD_{600} 。

1.6 正交法测定不同条件下的硝酸盐去除能力

采用 $L_9(3^4)$ 正交表, 按 4 因素 3 水平进行正交试验设计, 考虑温度、pH、C/N 和不同碳源, 分别测定 12 h 和 24 h 时 SC 培养基中剩余的 $c(\text{NO}_3^-)$, 计算其去除率^[11]。

1.7 菌株 NO_3^- 和 NO_2^- 耐受度检测

配制不同浓度的以 NaNO_3 为唯一氮源的培养基, 使 NO_3^- 的最终浓度为 20、50、100、150 和 200 mmol/L。再以 NaNO_2 代替 NaNO_3 为唯一氮源, 使 NO_2^- 的最终浓度为 5、10、20、50 和 100 mmol/L。在最优的条件下培养, 分别测定 24 h 和 48 h 时 SC 培养基中剩余的 $c(\text{NO}_3^-)$, 计算其去除率^[11]。

1.8 菌株聚磷能力的测定

菌株培养方法同 1.5, 磷酸盐的测定采用钼酸铵分光光度法^[12], 并计算其除磷率。

2 结果与分析

2.1 反硝化菌株的筛选与初步鉴定

从常年养鱼的池塘采样分离筛选出 22 株反硝化细菌, 其中 8 株反硝化率较高, 从中选择效果最好的一株作为研究对象, 命名为 HS-N62。该菌菌落较小, 圆形、整齐、隆起, 乳白色, 色泽一致, 且质地均匀。革兰氏染色呈阴性(G⁻)。观察该菌呈杆状或棍棒状, 2 μm–3 μm。

菌株 HS-N62 的 16S rRNA 基因 PCR 扩增在 1500 bp 处有特异性条带, 对其序列测序并将该序列结果提交 GenBank, 其登录号为: HM543464。该序列在 GenBank 数据库中通过 BLAST 方法比对, 结果表明该菌株与多株 *Pseudomonas* sp. 相似性达 99% 以上。结合菌株的形态学和生理生化鉴定可初步确定 HS-N62 菌株为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

2.2 菌株 HS-N62 反硝化能力的测定和 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 耐受度检测

测定菌体光密度 OD_{600} , 菌株 HS-N62 在 SC 培养基中 6 h 达到对数期, 12 h 达到稳定期, 反硝化作用主要发生在菌株生长的对数生长期至稳定期(图 1A)。在好氧条件下, 菌株 HS-N62 使 SC 培养中的初始 140 mg/L 总氮在 12 h 去除率达到 65.9%。菌株 HS-N62 在 12 h 硝酸盐氮由 140 mg/L 降至 5.46 mg/L, 去除率达 96%, 该菌在反硝化过程中有亚硝酸盐的产生, 亚硝酸盐氮的产生量在 9 h 达到最高, 为 89.4 mg/L, 但随着菌体进入稳定期, 亚硝

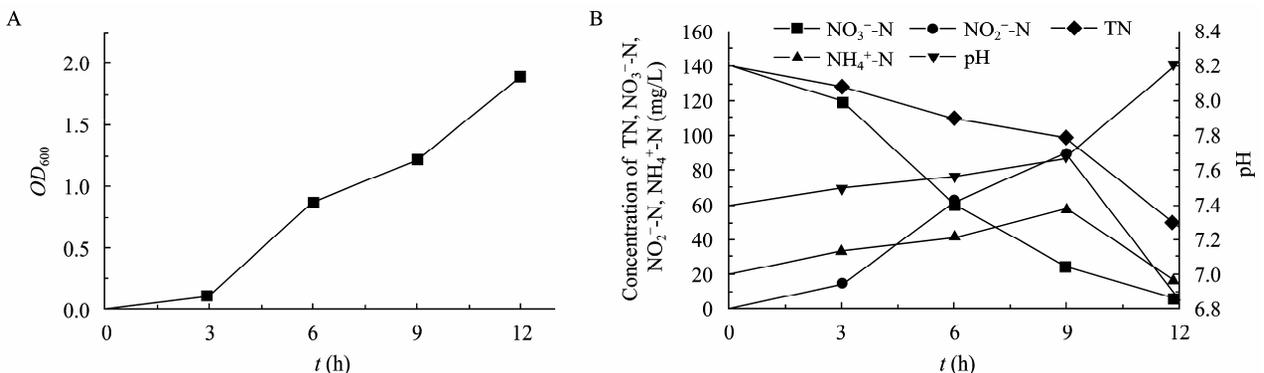


图 1 菌株 HS-N62 的生长(A)和反硝化能力测定(B)
Fig. 1 Growth (A) and denitrifying capability (B) of strain HS-N62

酸盐氮的积累量减少, 12 h 减少为 5.4 mg/L, 24 h 时完全消失, 这是由于硝酸盐氮先被还原为亚硝酸盐氮, 亚硝酸盐氮再逐步被还原为氮气。SC 培养基中氨氮的初始浓度为 20 mg/L, 在培养过程中也有少量的氨氮产生, 在 9 h 达到最高, 为 57.13 mg/L, 之后就呈下降的趋势。SC 培养基的初始 pH 为 7.4, 培养 12 h 后上升到 8.2, 可能是碳源丁二酸钠的代谢产物呈碱性(图 1B)。

菌株 HS-N62 在 NO_3^- 浓度为 20 mmol/L (280 mg/L) 时硝态氮 24 h 去除率仍然能达到 100%, 在 100 mmol/L (NO_3^- -N: 1400 mg/L, 碳源丁二酸钠浓度仍为 4.72 g/L) 时去除率大于 60% (图 2A)。菌株 HS-N62 对亚硝酸盐的去除如图 2B 所示, 该

菌能以亚硝酸钠为唯一氮源生长并能转化 NO_2^- , 在 5 mmol/L 和 10 mmol/L 时 24 h 能完全转化, 当亚硝酸盐氮浓度大于 50 mmol/L 时抑制菌株 HS-N62 反硝化作用。

2.3 菌株 HS-N62 反硝化最适条件的确定

运用正交试验法, 设计不同组合(表 1), 对菌株 HS-N62 在不同条件下反硝化能力进行了测定并做极差分析。通过对实验结果极差分析, 按照极差决定因素影响菌株 HS-N62 反硝化能力的主次顺序为: A (温度) > B (pH) > D (碳源) > C (C/N)。菌株 HS-N62 的最佳组合为 A3B2C2D2, 即利用丁二酸钠为碳源, C/N 为 10 : 1, pH 7.0, 35°C。多因素实验与各单因素实验结果基本一致。

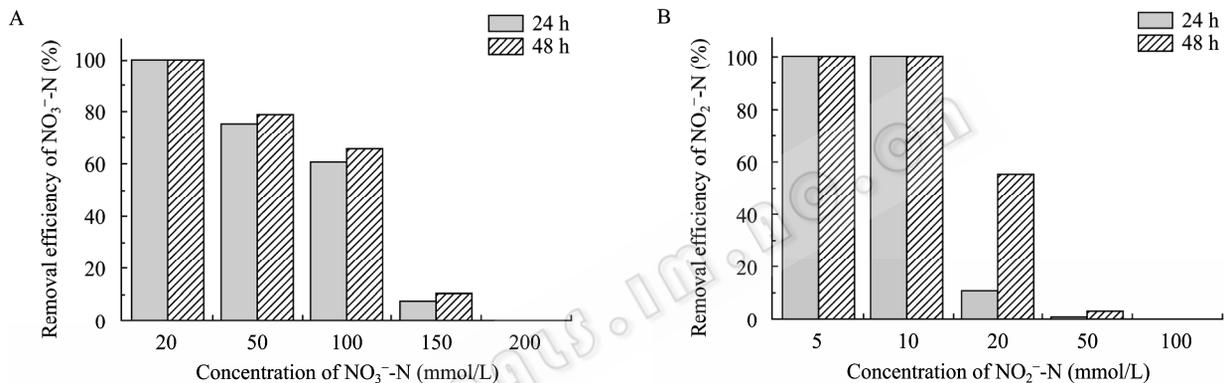


图 2 NO_3^- (A) 和 NO_2^- (B) 的浓度对菌株 HS-N62 反硝化作用的影响
 Fig. 2 Effect of NO_3^- (A) and NO_2^- (B) on denitrification of strain HS-N62

试验号 No. of tested	因素 Factor				NO ₃ ⁻ 去除率 Removal efficiency of NO ₃ ⁻ (%)		菌株生长量 Strain growth (OD ₆₀₀)	
	A (Temperature)	B (pH)	C (C/N)	D (Carbon source)	12 h	24 h	12 h	24 h
1	25°C	6.0	8 : 1	葡萄糖	50.32	66.19	0.82	1.21
2	25°C	7.0	10 : 1	丁二酸钠	75.08	100	1.35	1.75
3	25°C	8.0	13 : 1	甲醇	49.68	70.95	0.80	1.29
4	30°C	6.0	10 : 1	甲醇	72.54	86.82	1.34	1.68
5	30°C	7.0	13 : 1	葡萄糖	89.27	100	1.81	1.73
6	30°C	8.0	8 : 1	丁二酸钠	81.92	100	1.88	1.65
7	35°C	6.0	13 : 1	丁二酸钠	78.72	100	1.77	1.62
8	35°C	7.0	8 : 1	甲醇	100	100	1.91	1.75
9	35°C	8.0	10 : 1	葡萄糖	93.6	97.36	1.88	1.73
T1					58.36 (79.05)	67.20 (84.34)	77.41 (88.73)	77.73 (87.85)
T2					81.24 (95.61)	88.17 (100)	80.41 (94.73)	78.57 (100)
T3					90.77 (99.12)	75.07 (89.44)	72.56 (90.32)	74.04 (85.92)
R					32.41 (20.07)	20.97 (15.55)	7.85 (6.00)	4.50 (14.08)

注: 括号内为 24 h 的硝酸盐氮去除率(%). T1、T2、T3 分别为各试验水平下平均硝酸盐氮去除率. R 为 T1、T2、T3 三者极差.

Note: This is the removal rate of nitrate nitrogen at 24 h in the brackets (%). T1, T2 and T3 are average removal rate at different test condition respectively. R is the sample range of T1, T2 and T3.

菌株 HS-N62 在 20°C–37°C 均能生长, 在 30°C–37°C 时生长状态和硝态氮去除率较好, 并且没有亚硝酸氮的积累。HS-N62 生长 pH 范围较宽, 在 pH 5.0–10.0 时都能生长, 在 pH 6.0–9.0 生长状态和反硝化率较好。菌株 HS-N62 在不同的碳氮比的情况下都有较高的反硝化率, 碳氮比为 5–15 时, 硝态氮的去除率在 24 h 都能完全降解, 甚至在碳氮比为 30 : 1 的情况下也有较高的反硝化率。Kim 等^[13]分离的菌株 *Pseudomonas putida* AD-21 在 C/N 为 8 时有较高硝酸盐去除率, 但在 C/N 为 10 时硝酸盐去除率明显下降。碳源对菌株 HS-N62 反硝化能力的影响如图 3 所示。不同碳源利用实验表明: HS-N62 能利用不同的碳源, 但不同碳源种类对菌株反硝化能力有明显影响, 在葡萄糖、乳糖、蔗糖、甲醇和甘油为碳源的培养基中, 与以丁二酸钠为碳源相比较, 菌体的生长量和硝酸盐氮去除率几乎相当, 培养基中总氮的去除率也都在 60%–70%, 其余的氮主要被微生物生长利用。

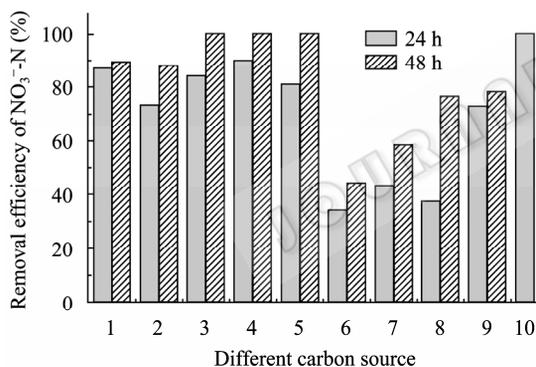


图 3 不同碳源对菌株 HS-N62 反硝化作用的影响

Fig. 3 Denitrification activity of stain HS-N62 under different carbon source

注: 1: 葡萄糖; 2: 乳糖; 3: 蔗糖; 4: 甲醇; 5: 甘油; 6: 三水乙酸钠; 7: 柠檬酸三钠; 8: 酒石酸钾钠; 9: 淀粉; 10: 丁二酸钠。

Note: 1: Glucose; 2: Lactose; 3: Sucrose; 4: Methanol; 5: Glycerol; 6: Sodium acetate trihydrate; 7: Trisodium citrate dehydrate; 8: Seignette salt; 9: Starch; 10: Sodium succinate dibasic hexahydrate.

2.4 菌株 HS-N62 聚磷能力的测定

菌株 HS-N62 在富磷培养基中培养 12 h, 磷酸盐由 57 mg/L 降至 18.38 mg/L, 除磷率为 67.7%, 其除磷能力主要发生在对数期至稳定期之间(图 4)。在 24 h 后培养基中的磷酸盐浓度有所升高, 说明反硝化菌株将摄取的磷酸盐有少量的释放出细胞。异染

颗粒染色实验表明菌体存在异染颗粒, 表明该反硝化菌具有较好的聚磷能力。在污水的脱氮除磷上具有良好的应用前景。

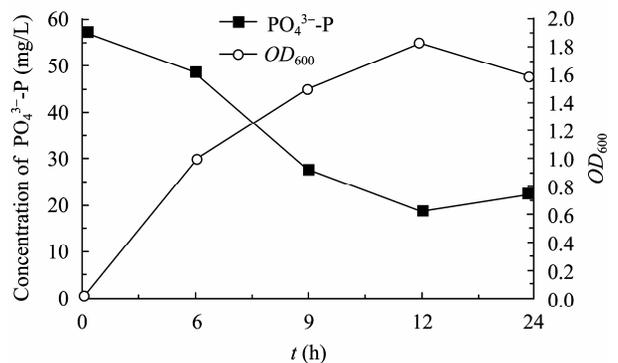


图 4 菌株 HS-N62 生长和磷酸盐吸收曲线

Fig. 4 Growth and phosphate-uptake curve of stain HS-N62

3 讨论

本研究从常年养鱼的池塘中采样, 以丁二酸钠为碳源的反硝化培养基在好氧条件下进行富集分离, 得到一株反硝化能力较高的菌株 HS-N62, 实验证实菌株 HS-N62 在好氧条件下具有高效反硝化率。在 12 h 内, 菌株 HS-N62 能够将 140 mg/L 硝酸盐氮降至 5.46 mg/L, 降解率达 96%, 在硝酸盐氮去除过程中没有亚硝酸盐和氨氮的积累。12 h 内总氮的去除率达到 65.9%, 其余的氮被微生物生长利用。与已报道的同类反硝化细菌相比, 菌株 HS-N62 反硝化能力较强。詹吉东等^[14]筛选的菌株 ADZ1 需要 48 h 才能将培养基中近 35 mg/L 硝酸盐的氮去除 93.1%。本文报道的反硝化菌 HS-N62 能够耐受高浓度的硝酸盐, 在硝酸盐氮浓度为 20 mmol/L (280 mg/L) 时能 24 h 完全转化; 在硝酸盐氮浓度高达 100 mmol/L (1400 mg/L) 时 24 h 的硝态氮去除率仍能达到 60%。朱晓宇等^[15]报道的两株反硝化菌假产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)和假单胞菌属门多萨菌(*P. mendocina*)能够耐受 280 mg/L 的硝酸盐氮浓度, 与之相比菌株 HS-N62 具有更高的硝酸盐耐受度。

菌株 HS-N62 能以亚硝酸盐氮为唯一氮源进行生长且有较好的去除亚硝酸盐氮能力, 在亚硝酸盐氮浓度为 10 mmol/L (140 mg/L) 时 24 h 能完全降解。水产养殖水体中的氮素污染主要是亚硝态氮、氨氮和饵料残余蛋白质, 由于菌株 HS-N62 是从养鱼塘

中分离, 所以该菌在水产养殖水体中具有良好的应用前景。该反硝化菌株在脱氮的同时, 兼具一定的除磷能力, 在磷酸盐浓度为 57 mg/L 时 12 h 除磷率达到 67.7%, 在废水脱氮除磷上具有良好的应用前景。

反硝化菌的硝酸盐还原酶(NaR)有两种形式, 分别为膜结合硝酸盐还原酶和周质硝酸盐还原酶^[16]。亚硝酸盐还原酶(NiR)也有两种形式, 分别为测定 cd1 细胞色素型(cd1-NiR), 一种是铜结合型(Cu-NiR)^[17]。高效好氧反硝化菌 HS-N62 的硝酸还原酶和亚硝酸还原酶作用的形式和机制有待于进一步研究。2010 年 Li 等人的最新研究表明在反硝化条件下有些微生物能够降解苯、萘及喹啉等不同化合物^[18-19], 但在反硝化条件下微生物能否降解含氮农药是一个值得深入探讨的问题。

参 考 文 献

- [1] Mancheva TP, Beschkov V. Microbial denitrification by immobilized bacteria *Pseudomonas denitrificans* stimulated by constant electric field. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, **44**(2/3): 208-213.
- [2] Domenech GMG, Checa FM, Bejar V, et al. Denitrification as an important taxonomic marker within the genus *Halomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, **33**(2): 85-93.
- [3] Ahn YH. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*, 2006, **41**(8): 1709-1721.
- [4] Li P, Zheng YL, Chen SL, et al. Identification of an aerobic denitrifying bacterium and its potential application in wastewater treatment. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2005, **11**(5): 600-603.
- [5] Wang P, Li XT, Xiang MF, et al. Characterization of efficient aerobic denitrifiers isolated from two different sequencing batch reactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, **103**(6): 563-567.
- [6] 朱月琪, 卫晋波, 曾国驱, 等. 一株好氧反硝化菌的分离及特性研究. *微生物学通报*, 2009, **36**(4): 616-619.
- [7] Park JY, Yoo YJ. Biological nitrate removal in industrial wastewater treatment: which electron donor we can choose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **82**(3): 415-429.
- [8] 杨希, 刘德立, 邓灵福, 等. 蜡状芽孢杆菌好氧反硝化特性研究. *环境科学研究*, 2008, **21**(3): 155-159.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 370-390.
- [10] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 254-257, 259-261, 271-274, 279-281.
- [11] 傅利剑. 反硝化微生物的生物学特性及其固定化细胞对硝态氮去除的研究. 南京农业大学硕士毕业论文, 2004.
- [12] 王海峰, 李春燕, 刘新侠. 钼酸铵分光光度法测定水中总磷的改进消解方法. *中国给水排水*, 2009, **25**(16): 81-83.
- [13] Kim M, Jeong SY, Yoon SJ, et al. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, **106**(5): 498-502.
- [14] 詹吉东, 汤江武, 王新, 等. 城市河道污水中好氧反硝化菌的分离鉴定与特性. *微生物学通报*, 2010, **37**(4): 566-572.
- [15] 朱晓宇, 王世梅, 梁剑茹, 等. 两株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮效率. *环境科学学报*, 2009, **29**(1): 111-117.
- [16] Reyna L, Wunderlin DA, Raimondi SG. Identification and quantification of a novel nitrate-reducing community in sediments of Suqui'a River basin along a nitrate gradient. *Environmental Pollution*, 2010, **158**(5): 1608-1614.
- [17] Rinaldo S, Brunori M, Cutruzzola F. Nitrite controls the release of nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa* cd1 nitrite reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **363**(3): 662-666.
- [18] 全向春, 王文燕, 何孟常, 等. 硝酸盐还原条件下不同碳源对萘生物降解特性的影响. *环境科学研究*, 2009, **22**(3): 261-265.
- [19] Li YM, Wang L, Liao L, et al. Nitrate-dependent biodegradation of quinoline, isoquinoline, and 2-methylquinoline by acclimated activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **173**(1/3): 151-158.