

生物絮团中异养亚硝化菌的分离鉴定及其特性

胡修贵^{1,2} 赵培² 李玉宏^{2,3} 宋晓玲² 马甦¹ 黄捷^{2*}

(¹中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

(²农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(³上海海洋大学, 201306)

摘要 采用富集培养、分离纯化等微生物学手段, 从对虾养殖池的生物絮团中筛选出两株对氨氮具有高转化率的菌株。16S rRNA 测序及系统发育分析结果表明, 两株菌均属于盐单胞菌属, 菌株 2011072708 与食物盐单胞菌 *Halomonas alimentaria* 有 99% 的同源性, 而菌株 2011072709 与胜利盐单胞菌 *H. shengliensis* 有 100% 的同源性。比较研究了两株菌在不同温度、盐度、pH、碳氮比条件下对氨氮的转化率, 菌株 2011072708 在温度 37 °C、盐度 30~40、pH 8、碳氮比 28 的条件下对氨氮的转化率最高; 菌株 2011072709 在温度 27~42 °C、盐度 40~50、pH 6、碳氮比 21 的条件下对氨氮的转化率最高。研究结果表明, 胜利盐单胞菌(2011072709)对温度、盐度、pH、碳氮比等各方面的适应性优于食物盐单胞菌(2011072708), 更适合在生物絮团技术中得到应用。

关键词 生物絮团 异养亚硝化细菌 氨氮转化率 盐单胞菌

中图分类号 Q939.9 文献识别码 A 文章编号 1000-7075(2013)05-0097-07

Isolation and identification of heterotrophic nitrosobacteria from bio-flocs and analysis of their characteristics

HU Xiu-gui^{1,2} ZHAO Pei² LI Yu-hong^{2,3}
SONG Xiao-ling² MA Shen¹ HUANG Jie^{2*}

(¹College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(²Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(³Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT Two strains of nitrosobacteria with high ammonia transformation rate were isolated by enrichment and selective culture from bio-flocs of shrimp culture ponds. Sequences of 16S rRNA indicated that both strains belonged to the genus *Halomonas* sp., while strain 2011072708 was identified as *H. alimentaria* with 99% similarity, and strain 2011072709 as *H. shengliensis* with 100% similarity. Ammonia transformation rates of the two strains were compared under different temperatures, salinities, pH, and C/N ratios. The ammonia transformation rate of strain 2011072708 reached the highest level at 37 °C, 30~40, pH 8, and C/N ra-

公益性行业(农业)科研专项经费项目(201103034)和现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助

* 通讯作者。E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823062

收稿日期: 2012-08-06; 接受日期: 2012-09-24

作者简介: 胡修贵(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产养殖相关微生物研究。E-mail: huxiugui8139@126.com, Tel: 18765228367

tio of 28, while that of strain 2011072709 reached the maximum at 27~42 °C, 40~50, pH 6, and C/N ratio of 21. The present study showed high ammonia transformation rates in both nitrosobacteria strains isolated from bio-flocs. Strain *H. shenliensis* (2011072709) had better adaptability to temperature, salinity, pH, and C/N ratio than *H. alimentaria* (2011072708), and may be more suitable for application in bio-flocs technology.

KEY WORDS Bio-flocs Nitrosobacteria Ammonia transforming rate *Halomonas* sp.

生物絮团是养殖水体中以异养微生物为主的有机质经生物絮凝形成的团聚物,通过调节养殖水体中的C/N比促使异养微生物大量繁殖形成生物絮团,达到同化无机氮、降低养殖水体的氨氮和亚硝酸氮水平(Avnimelech 1999,2006)。传统理论认为,水体中氮素的去除主要通过硝化细菌和亚硝化细菌的硝化作用,且脱氮过程中决定反应速度的重要一步是异养亚硝化细菌的亚硝化作用(Eckenfelder 2000)。然而,异养亚硝化细菌在生物絮团中通常不是优势菌,并且对氨氮的去除能力存在差异,因此,从生物絮团中获得高效的功能菌株并使其在生物絮团中成为优势种群而发挥硝化作用是很有意义的工作。本研究从生物絮团中分离得到两株异养亚硝化细菌,并对其在不同条件下的氨氮去除率进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 样品

试验所需生物絮团样品于2011年7月27日采自青岛市宝荣水产科技发展有限公司的凡纳滨对虾生物絮团养殖池,在6个养殖池中分别取1L池水于沉淀漏斗(1000-0010 Nalgene)中,静置30 min,收集漏斗底端的生物絮团于50 ml离心管中,4 °C保存备用(邓应能等 2012)。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基

在1L过滤海水中添加1.2 g NH₄Cl,7.2 g CH₃COONa,1.2 g K₂HPO₄·3H₂O,pH 8。先配制不含NH₄Cl的组分,121 °C高压灭菌30 min,配制40 g/L NH₄Cl母液,经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,再按3%比例将除菌后的NH₄Cl母液加入到灭菌的培养基中。

1.2.2 筛选培养基

在1L过滤海水中添加0.4 g NH₄Cl,2.4 g CH₃COONa,1 g K₂HPO₄·3H₂O,pH 8;固体培养基在此基础上加1.6%的琼脂。先配制不含NH₄Cl的组分,121 °C高压灭菌30 min,再按1%比例将除菌后的NH₄Cl母液加入到灭菌的培养基中。

1.3 异养亚硝化细菌的富集和筛选

1.3.1 异养亚硝化细菌的富集

将10 ml生物絮团样品加入装有200 ml富集培养基的500 ml锥形瓶中,37 °C、180 r/min振荡培养,每天取1 ml富集培养液于50 ml玻璃试管中,加入格利斯试剂I、II(张辉等 2006)各两滴,若呈现粉红色则表明培养液中生成了亚硝酸盐,此时移取1 ml富集培养液接入新鲜富集培养基,继续培养并进行上述测试,重复3次,淘汰其他异养菌。

1.3.2 异养亚硝化细菌的筛选

将1 ml上述富集培养液进行梯度稀释(10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶)后,分别涂布于固体筛选培养基平板上,37 °C倒置培养,待形成单菌落后挑取单菌落进行纯化培养,肉眼观察菌落的形状、大小、边缘、颜色、透明度以及菌落的质地等(杨俊忠等 2010)。采用革兰氏染色法,显微镜(D-80i Nikon)观察菌体的外部形

态。

1.4 异养亚硝化细菌的鉴定

1.4.1 16S rRNA 测序

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302-02 天根)提取上述纯化培养细菌的基因组 DNA,作为 16S rRNA 扩增的模板。16S rRNA 的正向引物序列为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物序列为:5'-TACCTTGTACGACTT-3'(Heuer *et al.* 1997)。扩增预混液选用 TaKaRa 的 Ex Taq pre-mix (500 μ l 含 4 mmol/L MgCl₂, 0.4 mmol/L dNTP 和 25 U Ex Taq DNA 聚合酶)。50 μ l PCR 反应体系含 Ex Taq pre-mix 25 μ l, DNA 模板 2.5 μ l, 正/反向引物各 2.5 μ l, 无 RNase 水 17.5 μ l。PCR 反应在 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;再 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,用 PCR 凝胶回收试剂盒(TaKaRa)回收 1.5 kb 左右的目的片段,送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.4.2 系统发育分析

测序结果在 NCBI(National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行 BLAST,通过 BIOEDIT 7.0 和 MEGA 4.0 等软件进行多重序列比对分析,并以 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

1.5 菌株生长特性及其在不同条件下对氨氮的去除率

1.5.1 菌株生长曲线测定

取不同菌株的对数生长期菌液按 5%接种量接种到装有 200 ml 液体筛选培养基的 500 ml 锥形瓶中,37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养,每 4 h 取菌液,利用全波长扫描式多功能读数仪(Varioskan Flash Thermo)测定 OD₆₀₀,绘制其生长曲线。

1.5.2 菌株在不同条件下对氨氮的转化率

取不同菌株的对数生长期菌液按 5%接种量接种到装有 200 ml 液体筛选培养基的 500 ml 锥形瓶中,每株菌设 3 个平行,空白液体培养基为对照,分别在不同温度(22、27、32、37、42 $^{\circ}$ C)、初始 pH(6、7、8、9、10)、盐度(0、10、20、30、40、50)、碳氮比(0、7、14、21、28)条件下,180 r/min 振荡培养,连续培养至相应菌株的稳定生长期,离心菌体取上清液,使用次溴酸盐氧化法测定上清液的氨氮浓度(国家环境保护总局 2002)。培养过程中,温度由恒温培养箱调控,初始 pH 由浓度为 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 溶液调控,碳氮比由氯化铵与乙酸钠的添加量调控。氨氮转化率计算公式如下:

$$\text{氨氮转化率}(\%) = (1 - \text{处理组的氨氮浓度} / \text{对照组的氨氮浓度}) \times 100$$

1.6 数据统计分析

试验结果用平均数 \pm 标准方差($\bar{x} \pm s, n=3$)表示,运用软件 SPSS 11.0,经 One-Way ANOVA 分析,采用 Duncan's 多重检验分析试验结果平均数的差异显著性,设差异水平 $\alpha=0.05$ ($P<0.05$ 为差异显著)。

2 结果与分析

2.1 异养亚硝化细菌的分离

采集的生物絮团样品经异养亚硝化细菌富集培养基的富集得到富集培养液,后将富集培养液添加到筛选培养基进行分离,得到两株异养亚硝化菌,分别编号为 2011072708 和 2011072709。两株菌在筛选培养基上的菌落形态相似,直径均为约 0.5 mm,圆形、边缘整齐、有隆起、无色透明、色泽一致且质地均匀。对两菌株进行革兰氏染色,均呈阴性(G^{-}),菌体形态均为杆状,菌体大小略有不同,其中 2011072708 菌体在 1.17 μ m \times 0.49 μ m 左右,2011072709 菌体在 1.48 μ m \times 0.48 μ m 左右。

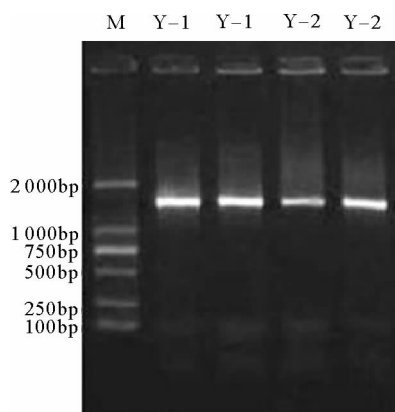
2.2 异养亚硝化细菌的鉴定

2.2.1 16S rRNA 测序

分别提取菌株 2011072708 和 2011072709 的总 DNA, 进行 16S rRNA 的 PCR 扩增, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的特异性(图 1)。经 Gel-Pro 软件分析, 菌株 2011072708 和 2011072709 的 16S rRNA 的 PCR 产物大小均约为 1 500 bp。

2.2.2 系统发育分析

将 PCR 扩增并经电泳分离回收的 16S rRNA 的 PCR 产物送至上海生工生物工程股份有限公司测序, 测序结果与 GenBank 数据库序列进行 BLAST 比对, 挑选分别与菌株 2011072708 和 2011072709 相似性达 98% 以上的 15 株典型菌株序列, 通过 BIOEDIT 7.0 和 MEGA 4.0 等软件进行多重序列比对构建系统发育树(图 2), 结果表明, 菌株 2011072708 为食物盐单胞菌 *Halomonas alimentaria*, 菌株 2011072709 为胜利盐单胞菌 *Halomonas shengliensis*。两株菌的 16S rDNA 序列提交到 GenBank, 序列号分别为 NR 025054.1 和 JQ336975.1。



M, DL2000 分子量标准; Y-1, 菌株 2011072708;
Y-2, 菌株 2011072709

M, DL2000 marker; Y-1, Strain 2011072708;
Y-2, Strain 2011072709

图 1 16S rRNA 扩增产物电泳

Fig. 1 Agarose gel map of 16S rRNA

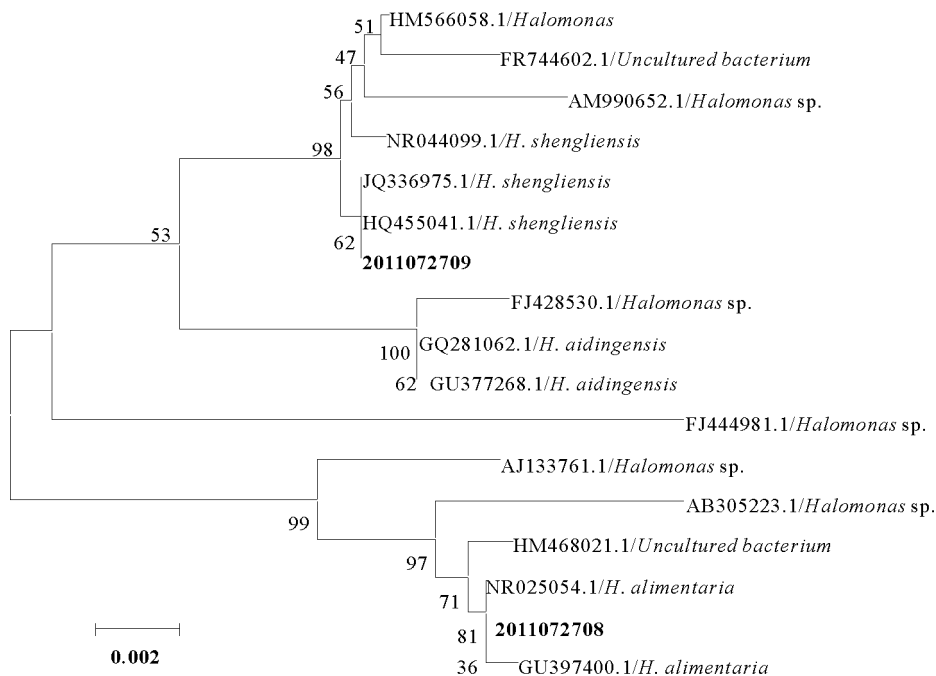


图 2 基于 16S rRNA 序列的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree based on 16S rRNA sequencing

已报道的异养亚硝化细菌包括芽孢杆菌属(Mevel *et al.*, 2000)、假单胞菌属(苏俊峰等 2007)、粪产碱菌属(Anderson *et al.*, 1993)等, 这些菌株可降低养殖水体的氨氮含量, 在减少氮素污染等方面发挥重要作用(何霞等 2007; 温东辉等 2003; 杨波等 2007)。菌株 2011072708 和 2011072709 经鉴定属于盐单胞菌属, 目前国内外的研究还比较少。任世英等(2008)报道一株盐单胞菌生长对磷的需求, 具有除磷的效果, 本研究的培养基中添加有磷酸盐, 保证了该菌能被筛选出来。张太凤等(2011)报道一株深海盐单胞菌具有生物絮凝作用。在生物絮凝的应用中, 盐单胞菌的除氮、除磷和生物絮凝作用将都有利于生物絮凝技术取得更好的应

用效果。

2.3 菌株生长特性及其在不同条件下对氨氮的转化率

2.3.1 菌株生长曲线测定

在 200 ml 筛选培养基中按 5% 接种, 37 °C、180 r/min 连续培养, 每 4 h 测定培养物的 OD₆₀₀。结果表明, 菌株 2011072708 和 2011072709 在筛选培养基中均生长缓慢(图 3), 其中菌株 2011072708 的迟缓期较长(0~12 h), 对数期持续 16 h 后进入稳定期(28~36 h), 培养 36 h 后进入衰退期; 菌株 2011072709 延缓期(0~8 h)较菌株 2011072708 加快 4 h, 对数期相对较长, 持续到 32 h, 而后进入稳定期, 培养 40 h 后进入衰亡期。由于本研究采用的培养基主要是菌株筛选所用, 这种生长缓慢的问题可以通过优化培养基和发酵条件来克服, 使这两株盐单胞菌实现应用需求的快速规模化发酵。

2.3.2 菌株在不同温度条件下对氨氮的转化率

不同温度(22、27、32、37、42 °C)条件下, 连续培养至菌株 2011072708 和 2011072709 均达到稳定生长期(32 h)后, 测定各个条件培养液中的氨氮浓度和菌体生长量。结果表明(图 4), 随着温度的升高, 菌株 2011072708 的生长量及对氨氮的转化率呈先升高后降低的趋势; 温度为 37 °C 时, 菌株 2011072708 的 OD₆₀₀ 最高为 0.83 ± 0.02, 对氨氮的转化率达到最大值(86.5% ± 3.22%); 温度上升到 42 °C 时, 菌株 2011072708 的 OD₆₀₀ 下降至 0.72 ± 0.02, 对氨氮的转化率也随之下落到 68.5% ± 3.28%。相同条件下, 菌株 2011072709 的生长量及对氨氮的转化率随温度的升高呈稳步上升趋势, 且始终高于菌株 2011072708; 温度为 37 °C 时, 菌株 2011072709 的 OD₆₀₀ 最高为 1.03 ± 0.02, 对氨氮的转化率达到最大值(89.57% ± 1.91%); 温度上升到 42 °C 时, 菌株 2011072709 的生长量及对氨氮的去除率维持不变。在 27~42 °C 温度范围内, 菌株 2011072709 的生长较好, 且实现了 80% 以上的氨氮转化率, 而菌株 2011072708 仅在 37 °C 时达到较高的氨氮转化率。与菌株 2011072708 相比, 2011072709 具有更广的温度耐受范围。

2.3.3 菌株在不同盐度条件下对氨氮的转化率

不同盐度(0、10、20、30、40、50)条件下, 连续培养至菌株 2011072708 和 2011072709 均达到稳定生长期(32 h)后, 测定各个条件培养液中的氨氮浓度和菌体生长量。结果表明(图 5), 随着盐度的升高, 菌株 2011072708 对氨氮的转化率先升高后逐渐降低; 盐度为 30 和 40 时, 菌株 2011072708 对氨氮的转化率较高, 分别为 81.57% ± 0.02% 和 80.32% ± 0.01%; 盐度为 50 时, 菌株 2011072708 的生长量及对氨氮的转化率相对降低, 但仍显著高于 0~20 的低盐度水平($P < 0.05$)。相同条件下, 菌株 2011072709 的生长量及对氨氮的转化率呈缓慢上升趋势; 盐度为 40 和 50 时, 菌株 2011072709 对氨氮的转化率较高, 分别为 81.74% ± 0.01% 和 84.71% ± 0.02%, 与盐度 10~30 差异不显著, 但与盐度为 0 时差异显著($P < 0.05$)。菌株 2011072708 和 2011072709 在不含盐的培养液中生长量极少, 可见两种菌株的生长均依赖于一定的盐度。菌体需要一定浓度的无机盐离子来维持细胞结构, 在盐度太小或无盐环境中, 易发生细胞壁溶解、细胞膜碎裂(张培玉等 2009), 因此两菌株在不含盐的环境中生长量极少, 导致其对氨氮的去除率很低。与菌株 2011072708 相比, 菌株 2011072709 具有更广的盐度耐受范围。

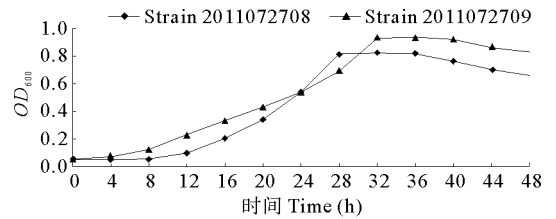


图3 不同菌株的生长曲线

Fig. 3 The growth curves of different strains

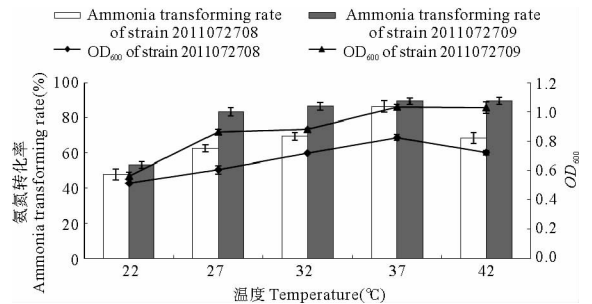


图4 温度对不同菌株氨氮转化率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on ammonia transformation rate of different strains

2.3.4 菌株在不同起始 pH 条件下对氨氮的转化率

不同起始 pH(6、7、8、9、10)条件下,连续培养至菌株 2011072708 和 2011072709 均达到稳定生长期(32 h)后,测定各个条件培养液中的氨氮浓度和菌体生长量。结果表明(图 6),菌株 2011072708 在起始 pH 为 8 时,对氨氮的转化率最高为 $91.1\% \pm 2.48\%$,而后随起始 pH 升高而缓慢降低;起始 pH 为 10 时,菌株 2011072708 对氨氮的转化率降至最低为 $56.47\% \pm 1.86\%$,菌株 2011072708 最适宜的生长起始 pH 为偏碱条件 7~9。相同条件下,菌株 2011072709 的生长量及对氨氮的转化率随起始 pH 升高而降低;起始 pH 为 6 时,菌株 2011072709 对氨氮的转化率最高为 $89.4\% \pm 2.16\%$;起始 pH 为 10 时,对氨氮的转化率最低为 $73.33\% \pm 1.61\%$ 。与菌株 2011072708 相比,菌株 2011072709 具有更广的初始 pH 耐受范围。

2.3.5 菌株在不同碳氮比条件下对氨氮的转化率

不同碳氮比(0、7、14、21、28)条件下,连续培养至菌株 2011072708 和 2011072709 均达到稳定生长期(32 h)后,测定各个条件培养液中的氨氮浓度和菌体生长量。结果表明(图 7),随着碳氮比的增加,菌株 2011072708 的生长量及对氨氮的转化率呈显著上升趋势;当碳氮比达到 28 时,菌株 2011072708 对氨氮的转化率达到最高值为 $85.53\% \pm 2.24\%$ 。相同条件下,菌株 2011072709 的生长量及对氨氮的转化率呈先升高后降低的趋势;当碳氮比达到 21 时,菌株 2011072709 对氨氮的转化率达到最高值为 $90.7\% \pm 3.25\%$;而当碳氮比为 28 时,菌株 2011072709 对氨氮的转化率相对下降。碳氮比为 7、14、21 条件下,菌株 2011072709 的菌体生长量及对氨氮的转化率均显著高于菌株 2011072708($P < 0.05$)。

碳氮比是异养亚硝化的一个重要的影响因素, Kim 等(2008)分离获得的一株恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 在碳氮比为 8 时对氨氮的转化率达到最高值 95.9%,而后随着碳氮比的增加对氨氮的转化率下降。而同时对一株施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* 的研究表明,其氨氮转化率随着碳氮比的增加而增加,在碳氮比为 10 时,对氨氮的转化率仅为 63.7%(Takaya *et al.* 2003)。本研究中的食物盐单胞菌(2011072708)和胜利盐单胞菌(2011072709)随碳氮比的增加而呈现不同的变化趋势,表明不同的碳氮比对不同菌株有着不同的影响,合适的碳氮比对用异养亚硝化细菌转化氨氮的成本和效率有着重要的参考价值。

3 结论

1) 从生物絮团中富集筛选得到两株异养亚硝化细菌 2011072708 和 2011072709,经 16S rRNA 序列同源

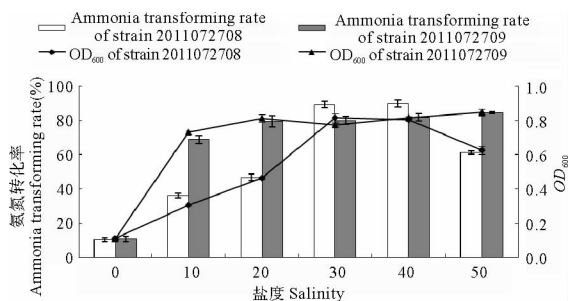


图 5 盐度对不同菌株氨氮去除率的影响

Fig. 5 Effect of salinity on ammonia transformation rate of different strains

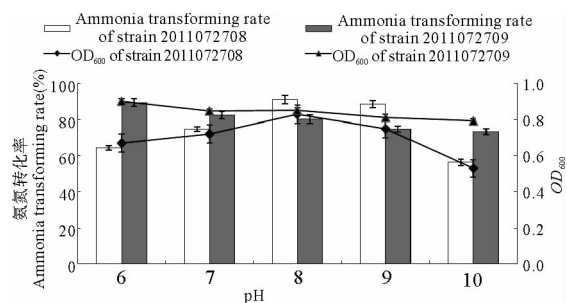


图 6 pH 对不同菌株氨氮转化率的影响

Fig. 6 Effect of pH on ammonia transformation rate of different strains

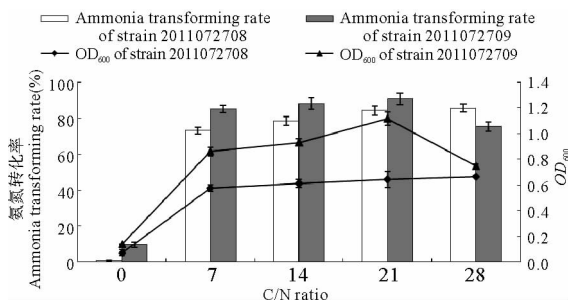


图 7 碳氮比对不同菌株氨氮转化率的影响

Fig. 7 Effect of C/N ratio on ammonia transformation rate of different strains

性比对和系统发育树分析,菌株 2011072708 和 2011072709 分别与食物盐单胞菌 *Halomonas alimentaria* (NR025054.1)和胜利盐单胞菌 *H. shengliensis* (JQ336975.1)有 99%和 100%的同源性。

2) 胜利盐单胞菌(2011072709)在 27~42 °C 的温度范围内对氨氮均有 80%以上的转化率,而食物盐单胞菌(2011072708)仅在温度为 37 °C 时对氨氮的转化率达到 80%以上,胜利盐单胞菌(2011072709)具有更广的温度耐受范围。

3) 食物盐单胞菌(2011072708)在盐度为 30~40 时对氨氮具有 80%以上的转化率,而胜利盐单胞菌(2011072709)在盐度 30~50 时对氨氮的转化率达 80%以上,胜利盐单胞菌(2011072709)具有更广的盐度耐受范围,更适用于高盐度生物絮团养殖系统的脱氮处理。

4) 食物盐单胞菌(2011072708)在偏碱的条件下对氨氮具有较高的转化效果,最适宜的 pH 为 7~9,而胜利盐单胞菌(2011072709)在 pH 为 6 时也具有较高的氨氮去除率,胜利盐单胞菌(2011072709)具有更广的 pH 耐受范围。

5) 食物盐单胞菌(2011072708)和胜利盐单胞菌(2011072709)随碳氮比的增加而呈现不同的变化趋势,表明不同的碳氮比对不同菌株有着不同的影响,合适的碳氮比对用异养亚硝化细菌去除氨氮的成本和效率有着重要的参考价值。

6) 综上所述,胜利盐单胞菌(2011072709)对温度、盐度、pH、碳氮比等各方面的适应性优于食物盐单胞菌(2011072708),更适合在生物絮团技术中得到应用。

参 考 文 献

- 邓应能, 赵 培, 孙运忠, 杨丛海, 黄 健. 2012. 生物絮团在凡纳滨对虾封闭养殖试验中的形成条件及作用效果. 渔业科学进展, 33(2): 69-75
- 任世英, 张宇红, 张武昌, 肖 天. 2008. 海洋聚磷菌 *Halomonas* YSR-3 的除磷特性研究. 高技术通讯, 18(7): 743-747
- 张太凤, 汪保江, 邵宗泽. 2011. 深海生物絮凝剂产生菌 *Halomonas* sp. V3a 的突变株筛选与发酵条件优化. 中南大学学报(自然科学版), 42(2): 204-208
- 杨 波, 杨志恒, 胡文容, 古志钦. 2007. 亚硝化细菌处理氨氮废水的研究. 武汉理工大学学报, 29(3): 63-66
- 杨俊忠, 倪 砚, 许尚营, 徐可瀚, 刘 义, 曾丽霞, 刘德立. 2010. 一株高效好氧反硝化菌的分离及特性. 微生物学通报, 37(11): 1594-1599
- 苏俊峰, 马 放, 王继华, 高珊珊, 魏 利, 李维国. 2007. 新型异养硝化细菌的硝化和反硝化特性. 天津大学学报, 40(10): 1205-1208
- 张培玉, 郭艳丽, 于德爽, 成广勇. 2009. 一株轻度嗜盐反硝化细菌的分离鉴定和反硝化特性初探. 微生物学通报, 36(4): 581-586
- 张 辉, 李培军, 胡筱敏, 王 新. 2006. 亚硝化细菌的筛选及培养条件的研究. 化工环保, 26(5): 366-369
- 何 霞, 赵 彬, 吕 剑, 靳 强, 张文英. 2007. 异养硝化细菌 *Bacillus* sp. LY 脱氮性能研究. 环境科学, 28(6): 1404-1408
- 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 2002. 水和废水监测分析方法. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 279-281
- 温东辉, 唐孝炎. 2003. 异养硝化及其在污水脱氮中的作用. 环境污染与防治, 25(5): 283-285
- Anderson IC, Poth M, Homstead J, Burdige D. 1993. A comparison of NO and N₂O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. Applied and Environmental Microbiology 59(11): 3525-3533
- Avnimelech Y. 1999. C/N ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture 176(3-4): 227-235
- Avnimelech Y. 2006. Biofilters: The need for a new comprehensive approach. Aquaculture Engineering 34(3): 172-178
- Eckenfelder WW. 2000. Industrial Water Pollution Control, 3rd Edition. USA: McGraw-Hill Companies Inc.
- Heuer H, Krsek M, Baker P and 2 others. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Applied and Environmental Microbiology 63(8): 3233-3241
- Kim M, Jeong SY, Yoon SJ and 5 others. 2008. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. Journal of Bioscience and Bioengineering 106(5): 498-502
- Mevel G, Prieur D. 2000. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture condition. Canadian Journal of Microbiology 46(5): 465-473
- Takaya N, Catalan Sakairi MA, Sakaguchi Y and 3 others. 2003. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. Applied and Environmental Microbiology 69(6): 3152-3157