植物营养与肥料学报 2012,18(6):1492-1498
Plant Nutrition and Fertilizer Science

茶园一株异养硝化-好氧脱氮菌的鉴定及特性研究

韩晓阳,王乃栋,于亚伟,张丽霞*
(山东农业大学园艺科学与工程学院,作物生物学国家重点实验室,山东泰安 271018)

摘要:经过菌株富集培养、分离纯化等一系列步骤,从山东茶园土壤中筛选出一株菌株 F1,通过对其进行 16S rRNA 测序及生理生化指标的测定,结合负染电镜观察结果,参照《伯杰细菌鉴定手册》鉴定该菌株属于黄杆菌属。同时对其硝化和反硝化脱氮能力进行了研究。结果表明,菌株 F1 能在利用有机物的同时进行硝化和反硝化脱氮作用。经过 60 h 的培养,在硝化培养基上对氨氮的去除率达到 84.54%,对亚硝酸盐的去除率达到 91.87%;在反硝化培养基上对硝酸盐的去除率达到 79.17%,对亚硝酸盐的去除率达到 84.30%;在以铵态氮为初始氮源的条件下脱氮能力最强。

关键词:茶园土壤;异养硝化-好氧脱氮菌;鉴定;特性
中图分类号:S154.3　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1008-505X(2012)06-1492-07

Identification and characterization of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria from tea garden

HAN Xiao-yang, WANG Nai-dong, YU Ya-wei, ZHANG Li-xia*
(*1 College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agriculture University/ State Key laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China*)

Abstract: By the experimental procedure of enrichment culture and purification, one bacterial strain F1 was screened from the soil of tea garden in Shandong province. The strain was identified as *Flavobacterium* sp., on the base of 16S rRNA sequencing analysis and physiological & biochemistry tests as well as the observation of negative staining electron microscopy. The nitrification performance and denitrification ability were studied and the results showed that while using organic matter, strain F1 has the function of both nitrification and denitrification. After 60 h culture, ammonia nitrogen removal rate reached 84.54% and nitrite nitrogen removal rate reached 91.87% in the nitrifying medium; ammonia nitrogen removal rate reached 79.17% and nitrite nitrogen removal rate reached 84.30% in the denitrifying medium; the denitrification capacity of ammonium nitrogen was the strongest under the conditions of the initial nitrogen.

Key words: tea garden soil; heterotrophic nitrification-aerobic denitrifying bacteria; identification; characteristic

传统观念认为,自养硝化作用在自然界硝化过程中占主导地位,异养硝化作用虽然早在 19 世纪末 20 世纪初就被发现,但由于其在环境中作用不甚明显,一直少于研究。近 20 多年来不断有异养硝化方面的报道,一些异养硝化菌也被陆续分离出来。已经发现的有:*Thiosphaera pantotropha*[1]、*Alcaligenes*

收稿日期:2012-03-22　　**接受日期**:2012-08-15
基金项目:"十一五"国家科技支撑计划(2011BAD11B01, 2011BAD11B02)项目资助。
作者简介:韩晓阳(1984—),男,山东泰安人,博士研究生,主要从事茶树生理生态方面的研究。E-mail: xyhan623@126.com
*通讯作者 Tel: 0538-8249983, E-mail: zlx_sdau@163.com.cn

faecalis[2]、*Hyphomicrobium X*[3]、*Pseudomonas stutzeri*[4]等。很多文献报道这些特殊的异养硝化菌可以同时进行好氧脱氮作用[2,5-6]，这些细菌被称为异养硝化-好氧脱氮菌。与自养硝化细菌相比，其世代周期短、生长速率快、可耐受低溶解氧（DO）、对环境的适应能力强[7]，可以在大量氧存在的条件下直接把氨氮离子转化为气态氮化物（NO、N_2O、N_2）而去除，且已逐渐成为人们的研究热点和重点[8-10]。

茶树是典型的喜铵、耐铵植物，因此人们常选用铵态氮肥作为茶树生长所需的氮源。由于土壤中存在的硝化和脱氮作用导致铵态氮转化为硝态氮和含氮气体（N_2、N_2O）散失到大气中，从而影响茶树吸收，降低氮肥的有效性，引起温室效应等问题。本研究从山东茶园土壤中，用琼脂平板分离出一株硝化细菌，命名为 F1 菌株，进一步研究发现它能异养生长和好氧脱氮。通过生理生化实验、16S rRNA 序列分析，对 F1 菌株进行了分析，确定了其分类学和系统发育地位，并初步研究了其硝化和好氧脱氮能力，为探明茶园土壤氮素循环，提高茶园铵态氮肥的利用率提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　菌株来源

从山东省泰安市泰山茶苑茶园土样中分离纯化硝化细菌[11]时，发现一株具有反硝化作用特性的菌株，标记为 F1。

1.2　培养基的制备[12-13]

富集培养基：$NaNO_2$ 1 g，K_2HPO_4 0.75 g，NaH_2PO_4 0.25 g，$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01 g，Na_2CO_3 1.5 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g，溶解定容至 1000 mL，调 pH 至 7.2，灭菌。

分离培养基的制备：每 1000 mL 富集培养液加入 18g 琼脂，加热溶解，灭菌 30 min。

牛肉膏-蛋白胨液体培养基：牛肉膏 10 g，蛋白胨 10 g，NaCl 5 g，溶解定容至 1000 mL，调 pH 至 7.0，灭菌。

氨化培养基（或亚硝酸盐培养基）：$(NH_4)_2SO_4$（或 $NaNO_2$）0.5 g，乙酸钠 2g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g，K_2HPO_4 0.2 g，$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01 g，$FeSO_4$ 0.01 g，溶解定容至 1000 mL，调 pH 至 7.2，灭菌。

反硝化培养基：$NaNO_3$（$NaNO_2$）0.5 g，KH_2PO_4 0.7 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g，$CaCl_2$ 0.5 g，乙酸钠 1 g，溶解定容至 1000 mL，调 pH 至 7.2，灭菌。

LB 培养基：蛋白胨 10 g，酵母膏 5 g，NaCl 10 g，水 1000 mL，调 pH 至 7.0，灭菌。

1.3　菌株鉴定

1.3.1 16S rRNA 分子鉴定　根据细菌 16S rRNA 两端的保守序列设计通用引物[14]，16S－8F：5′－AGAGTTTGATYMTGGCTCAG－3′；16S－1510R：5′－AGGGYTACCTTGTTACGACTT－3′。同时按文献[14]的反应体系及条件进行 PCR 扩增后，相继进行琼脂糖凝胶电泳、扩增片段回收，构建 pMD18－T 载体，转化 E. coli BL21（DE3）感受态细胞，送北京华大基因科技有限公司进行 DNA 片段测序。

将所测得的菌株 16S rRNA 序列通过 NCBI 网站 Blast 程序与 GenBank 数据库中核酸序列进行比对分析，并获得同源性较高的种属。使用 Clustal X 软件将菌株 16S rRNA 序列以及相似性较高的序列进行完全比对分析，然后通过 MEGA4 软件分析生成系统发育树，并选用 Bootstrap（1000 次重复）法检验发育树，分析其系统发育地位。

1.3.2 形态特征及生理生化鉴定　肉眼观察琼脂平板上生长的菌落颜色、形状等形态特征，并进行革兰氏染色[15]和鞭毛、芽孢染色以及负染法电镜拍片，观察菌株个体形态特征。同时按照《常见细菌系统鉴定手册》[16]进行菌株的生理生化鉴定。

1.4　菌株特性研究

1.4.1 碳源、氮源的确定　碳源试验时，培养基无机氮源改为亚硝酸钠（0.2%），分别以浓度为 0.2% 的乙酸钠、葡萄糖、乙酰胺、酵母膏、蛋白胨、碳酸钠为碳源；氮源试验时，碳源改为葡萄糖（0.2%），分别以浓度为 0.2% 硫酸铵、乙酰胺、硝酸钠、亚硝酸钠、尿素、乙酸铵为氮源。接种量为 1%，30℃条件下培养 48 h，在 600 nm 下检测菌株生长量。

1.4.2 菌株生长曲线　在牛肉膏-蛋白胨液体培养基中扩大培养菌种，制成菌悬液。接种到 1.4.1 试验筛选出的最佳碳、氮源的液体培养基中，接种量为 1%，在 30℃，200 r/min 条件下振荡培养，每隔 12h 取样测定 OD 值，作出菌株的生长曲线。

1.4.3 硝化能力　将 1% 接种量接种于 20 mL 新鲜液体氨氧化培养基或亚硝酸培养基中，标号为 1#、2#。同时以 1% 灭活接种液作为对照，3 次重复。30℃ 200 r/min 振荡培养 60 h 后测定氨氮浓度、亚硝酸盐氮浓度、硝酸盐氮浓度。

1.4.4 好氧脱氮能力　分别采用乙酸钠-亚硝酸钠（A）和乙酸钠-硝酸钠（B）做碳源和氮源检测菌株的硝化活性，将 1% 接种量接种于 20 mL 反硝化培

养基中,以1%灭活接种液作为对照,3次重复。30℃ 200 r/min振荡培养60 h后测定降解率。

1.5 分析方法

氨氮测定采用纳氏试剂法,亚硝酸盐测定采用N-1-萘基-乙二胺光度法[16],硝酸盐测定采用紫外分光光度法,菌体生长量采用液态培养基中波长600 nm的吸光度值来表示。

1.6 数据处理

采用Microsoft Excel 2003软件对数据进行处理和绘图,采用DPS 7.5统计分析软件对数据进行差异显著性检验(Duncan新复极差法)。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 16S rRNA分子鉴定 以F1菌株的细菌总基因组DNA为模板,进行PCR扩增。得到的扩增产物经琼脂糖电泳检测结果表明(图1),基因组DNA中扩增出16S rRNA核苷酸片段与DL2000Mark比较,约在1500 bp处有一明亮的PCR特征条带,其分子量大小与菌株16S rRNA的理论值基本相符。经测序分析,所测菌株F1的16SrRNA为1477bp,在GenBank中的登录号为JF922682。

将F1菌株测得的序列在NCBI上进行Blast比对发现,属于黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.),与其16S rRNA最相近的模式菌株污水黄杆菌(*F. defluvii*),反硝化黄杆菌(*F. denitrificans*),约氏黄杆菌(*F. johnsoniae*)等菌的相似性分别为97%,97%,96%。与其他黄杆菌属的16S rRNA基因序列相似性都在96%左右。

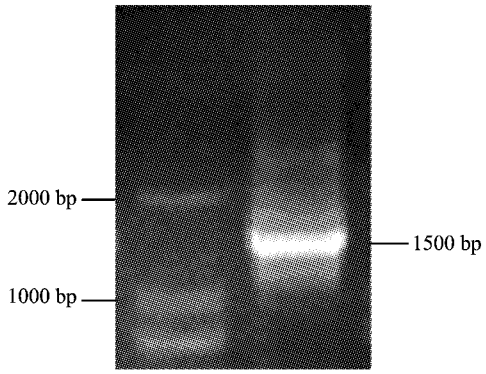

图1 菌株F1的16S rRNA扩增结果

Fig. 1 Results of PCR amplification for 16S rRNA of strain F1

用Clustal1.83软件进行多重序列比较后,再用Mega4软件采用邻接法构建了系统进化树(图2)。结果表明,测定的F1菌株与HM776705.1(*Flavobacterium* sp.)聚在一起,初步确定F1菌株为黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)中的菌株。

2.1.2 菌落形态、革兰氏染色及菌体形态观察 F1菌株的菌落颜色为浅黄色,圆形,表面光滑,边缘整齐,油状,半透明;革兰氏染色呈阴性。透射电镜照片观察(图3)显示,菌株为直细长杆状,无鞭毛,不运动。

为了更进一步确定菌株的鉴定结果,对菌株进行了生理生化培养特征观察。F1菌株在含NaCl的培养基中的生长浓度范围为0~5%,其中2%的NaCl浓度为最佳生长条件,其它测定项目见表1。根据检测结果查阅《常见细菌鉴定手册》[16]及《伯杰细菌鉴定手册》[17]进一步证实F1菌株为黄杆菌属细菌。

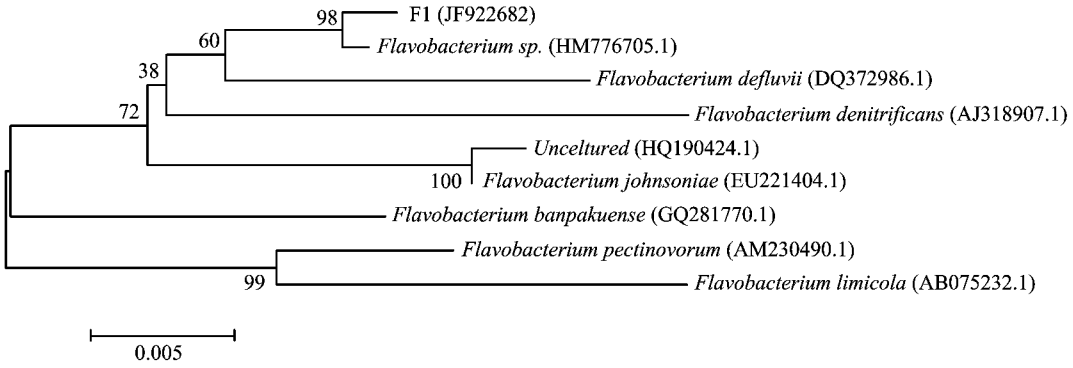

图2 根据16S rRNA序列同源性构建的进化树

Fig. 2 Phylogenic trees based on 16S rRNA sequences

表 1　菌株 F1 生理生化特性鉴定结果

Table 1　The physiological & biochemistry characteristics of strain F1

测定项目 Testing items	反应状况 Reaction status	测定项目 Testing items	反应状况 Reaction status	测定项目 Testing items	反应状况 Reaction status
60℃耐受 60℃ tolerance	－	过氧化氢酶 Catalase	＋	硝酸盐还原 Nitrate reduction	＋
2%NaCl 耐受 2% NaCl tolerance	＋	氧化酶 Oxidase	＋	亚硝酸盐还原 Nitrite reduction	＋
葡萄糖发酵 Glucose ferment	＋	甲基红试验 Methyl red	－	反硝化 Denitrification	＋
淀粉水解 Amylohydrolysis	－	V－P	＋	乙醇氧化 Ethanol oxidation	－
明胶液化 Gelatin liquefaction	＋	吲哚试验 Indole test	＋	硫化氢 Hydrogen sulfide	＋

注(Note)：“＋”为阳性反应 Positive；“－”为阴性反应 Negative.

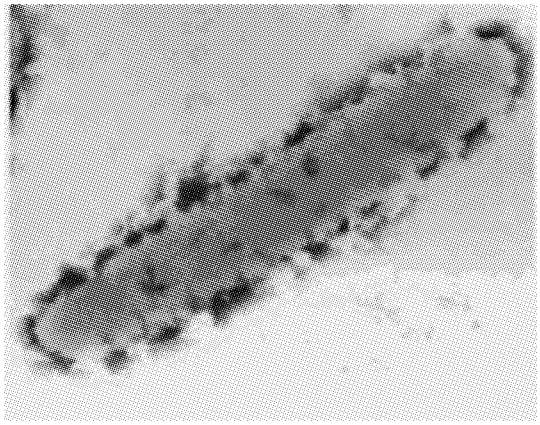

图 3　菌株 F1 负染电镜照片(×25K)

Fig. 3　Electron micrograph of negative staining strain F1

2.2　菌株生长条件及功能特性

2.2.1 培养基碳源和氮源选择　如表 2 所示，菌株可以在分别以乙酸钠、葡萄糖、乙酰胺、酵母膏、蛋白胨、碳酸钠为碳源和乙酰胺、硫酸铵、硝酸钾、亚硝酸钠、尿素、乙酸胺为氮源的培养基中生长，但生长量各异。其中以乙酸钠为碳源、硫酸铵为氮源时生长量最大；其次是以蛋白胨为碳源、以尿素为氮源；以碳酸钠为碳源、乙酰胺为氮源时生长量最差。因此本试验选定乙酸钠为碳源、硫酸铵为氮源检测菌的硝化活性，这同时也说明该菌株可以以有机物为碳源和氮源并生长良好，是异养菌。

2.2.2 菌株生长曲线　如图 4 所示，菌株在接种后，OD 值呈现先上升后下降的趋势，菌株在培养 36 h 时达到最大生长量，处于活跃的生长中，40 h 后进入衰亡期。

2.2.3 硝化和好氧脱氮特性　采用氨氧化培养基、亚硝酸盐培养基以及反硝化培养基对其培养，进行硝化和反硝化脱氮特性试验。硝化效果如表 3 所示，对照 CK1#处理中 NH_4^+-N 的浓度和 CK2#处理中 NO_2^--N 的浓度几乎没有变化，说明 1% 灭活接种液中不存在硝化作用。再经过 60 h 的好氧培养后，采用乙酸钠－硫酸铵作碳源和氮源时，表观硝化率为 1.37%，溶液中仅有少量硝酸盐积累，未检测出亚硝酸盐积累，氨氮的最终去除率为 84.54%；采用乙酸钠－亚硝酸钠作碳源和氮源时，表观硝化率为 37.83%，显著高于 1#处理，NO_3^--N 出现一定量的积累。这可能是由于硝化培养基中有 Fe、Mn 等元素的存在，增强了羟胺氧化酶的活性[18]，使硝化速率大于反硝化速率。亚硝酸盐的最终去除率为 91.87%。从表 3 的数据还可看出，同一条件下 F1 菌株在进行反应时，以铵态氮为初始氮源的脱氮效果显著好于亚硝态氮。

表2 菌株F1的碳源和氮源试验

Table 2 The carbon and nitrogen experiment of strain F1

碳源 Carbon source	OD_{600}	氮源 Nitrogen source	OD_{600}
乙酸钠 Sodium acetate	1.342	乙酰胺 Acetamide	0.762
葡萄糖 Glucose	0.902	硫酸铵 Ammonium sulfate	1.352
乙酰胺 Acetamide	0.694	硝酸钾 Potassium nitrate	0.822
酵母膏 Yeast extract	1.046	亚硝酸钠 Sodium nitrite	1.010
蛋白胨 Peptone	1.079	尿素 Urea	1.190
碳酸钠 Sodium carbonate	0.116	乙酸胺 Acetamide	0.979

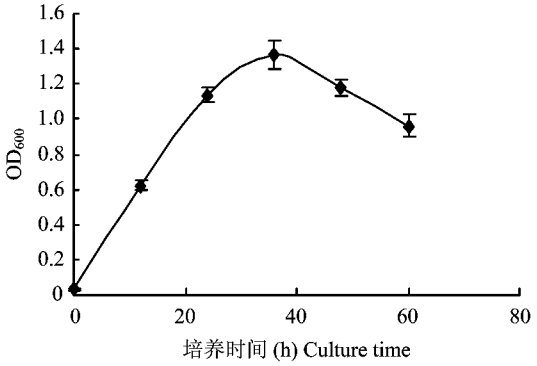

图4 菌株生长曲线

Fig. 4 The growth curve of strain F1

从表1可知,F1菌株可进行好氧脱氮,因此对该菌株的好氧脱氮特性进行测定。由表4可见,两组对照处理中原物质含量基本不变,也说明1%灭活接种液中不存在好养脱氮作用。在分别以亚硝酸盐(A)和硝酸盐(B)为初始氮源的试验中,菌株F1均有很好的脱氮效果。其中,亚硝酸氮的去除率为84.49%,而培养基中 NO_3^--N 含量少;硝酸氮的去除率为81.87%,培养基中 NO_3^--N 含量有一定的剩余。同时由表4还可以看出,同等条件下,在以亚硝酸盐为初始氮源的试验中,菌株F1脱氮率显著高于以硝酸盐为初始氮源的处理。

表3 菌株F1的硝化效果

Table 3 Nitrification performance of strain F1

培养基 Medium	测定项目 Testing items	初始浓度 Initial concent. (mg/L)	终浓度 Final concent. (mg/L)	表观硝化率 Apparent nitrific. rate (%)	去除率 Removal rate (%)	脱氮率 Denitrific. rate (%)
CK 1#	NH_4^+-N	63.53 ±0.36	62.30 ±0.51			
	NO_2^--N	0	0.11 ±0.007			
	NO_3^--N	0	0			
1#	NH_4^+-N	63.70 ±0.33	9.85 ±0.03	1.37 b	84.54 b	
	NO_2^--N	0	0			83.18 a
	NO_3^--N	0	0.87 ±0.01			
CK 2#	NH_4^+-N	0	0			
	NO_2^--N	61.23 ±0.73	60.37 ±0.23			
	NO_3^--N	0	0.79 ±0.03			
2#	NH_4^+-N	0	0			
	NO_2^--N	60.30 ±0.62	4.90 ±0.05	37.83 a	91.87 a	54.04 b
	NO_3^--N	0	22.80 ±0.15			

注(Note): 1#—氨氧化培养基 Ammonia oxidation medium; 2#—亚硝酸培养基 Nitrite medium. 同列数据后不同字母表示差异达5%显著水平 Values followed by different letters in the same row are significant at the 5% level.

表 4　菌株 F1 的好氧脱氮效果

Table 4　Denitrification performance of strain F1

碳和氮源类型 Carbon & nitrogen source type	测定项目 Testing items	初始浓度 Initial concentration (mg/L)	终浓度 Final concentration (mg/L)	去除率 Removal rate (%)	脱氮率 Denitrification rate (%)
CK A	NO_2^--N	45.40 ±0.25	44.14 ±0.23		
	NO_3^--N	0	0.94 ±0.02		
A	NO_2^--N	44.80 ±0.21	6.95 ±0.02	84.49 a	
	NO_3^--N	0	0.081 ±0.001		84.30 a
CK B	NO_2^--N	0	0		
	NO_3^--N	37.40 ±0.38	36.87 ±0.19		
B	NO_2^--N	0	1.01 ±0.02		79.17 b
	NO_3^--N	37.50 ±0.40	6.80 ±0.10	81.87 b	

注(Note)：A—乙酸钠－亚硝酸钠 Sodium acetate-sodium nitrite；B—乙酸钠-硝酸钠 Sodium acetate-sodium nitrate. 同列数据后不同字母表示差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in the same row are significant at the 5% level.

3　讨论及结论

本研究结合异氧硝化-好氧脱氮细菌的生理生态和 16SrRNA 分子特征，鉴定菌株 F1 属于黄杆菌属。黄杆菌属最早由 Bergry[19] 在 1923 年提出，多发现于土壤、淡水、海水环境中，许多黄杆菌属对海洋鱼类生长有很大影响，是一种条件致病菌。曾有人从安徽淮远菜园土中分离出安徽黄杆菌[20]，而本研究首次从山东茶园土壤中分离获得了黄杆菌。

研究表明，F1 菌株在以乙酸钠为碳源、硫酸铵为氮源时生长量最大。同时，F1 菌株在进行硝化反应的同时还应进行着好氧脱氮反应，且氨氮参与反应的脱氮能力优于亚硝态氮。而在同等条件下，亚硝态氮参与反应的脱氮能力要优于硝态氮。综合分析来看，菌株 F1 在以铵态氮为初始氮源的条件下脱氮能力最强。根据异养硝化-好氧反硝化脱氮的代谢途径假说，异养硝化菌在氨氧化过程将产生的电子传递给反硝化酶系，从而同步将氨氧化产生的 NO_2^- 还原为氮氧化物(N_2O、NO)或氮气[20]。结合假说分析来看，低价态的 NH_4^+-N 氧化为高价态氮时，传递电子给反硝化酶系的电子数最大，脱氮能力最强，试验结果印证了这一假说。

有资料表明，异养硝化菌代谢底物的途径和产物都具有多样性，好氧脱氮作用是 NO_2^--N 和NO_3^--N 积累偏低的原因[21]。陈赵芳等[20]曾从生活污水生物脱氮除磷装置中分离到 1 株脱氮效果较好的异养硝化菌株，脱氮过程中无 NO_2^--N 积累，只有少量 NO_3^--N 积累。此外，在国内外资料中报道的异养硝化细菌，大部分是具有硝化作用的氨氧化细菌，而能在亚硝酸盐作为氮源的培养基中进行生长繁殖的细菌至今未见报道[22]。但此次分离获得的 F1 菌株可在 NO_2^--N 培养基(2#、A)上生长，并具有较强的硝化和好氧反硝化脱氮能力。

参 考 文 献：

[1] Roberson L A, Kuenen J G, Kleijntjens R. Aerobic denitrification and heterotrophic nitrification by *Thiosphaera pantotropha* [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1985, 51(4): 445.

[2] Hung-Soo J, Mitsuyo H, Makoto S. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by Alcaligenes faecalis No. 4 [J]. J. Biosci. Bioeng., 2005, 100 (2): 184-191.

[3] Meiberg J B, Bruinenberg M P M, Harder W. Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated amines in Hyphomicrobium X in the absence and presence of nitrate: evidence for aerobic denitrification [J]. J. Gen. Microbiol., 1980, 120: 453-463.

[4] Su J J, Liu B Y, Lin J *et al*. Isolation of an aerobic denitrifying bacterial strain NS－2 from the activated sludge of piggery wastewater treatment systems in Taiwan possessing denitrification under 92% oxygen atmosphere[J]. J. Appl. Microbiol., 2001, 91: 853-860.

[5] Lin Y, Kong H N, He Y L *et al*. Simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor and isolation of heterotrophic nitrifying bacteria[J]. Jpn. J. Water Treat. Biol.,

2004, 40(3): 105-114.

[6] Kim J K, Park K J, Cho K S *et al*. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus strains*[J]. Biores. Technol., 2005, 3(29): 1897-1906.

[7] Islam A, Chen D, White R E. Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture soils[J]. Soil Biol. Biochem., 2007, 39(4): 972-975.

[8] Patureau D, Zumstein E, Delgenes J P *et al*. Aerobic denitrification isolation from diverse natural and managed ecosystems[J]. Microbiol. Ecol., 2000, 39: 145-152.

[9] 王弘宇, 马放, 杨开, 等. 两株异养硝化细菌的氨氮去除特性[J]. 中国环境科学, 2009, 29(1): 47-52.
Wang H Y, Ma F, Yang K *et al*. Ammonia removal by two strains of heterotrophic nitrifying bacteria[J]. China Environ. Sci., 2009, 29(1): 47-52.

[10] 张朝晖, 吕锡武, 沈耀良. 污水硝化过程中 N_2O 逸出控制的理论与实践[J]. 环境污染治理技术与设备, 2005, 6(12): 42-47.
Zhang Z H, Lü X W, Shen Y L. Theory and practice of controlling N_2O emission from process of wastewater nitrification[J]. Techniq. Equipm. Environ. Poll. Contr., 2005, 6(12): 42-47.

[11] 于亚伟, 黄晓琴, 王乃栋, 等. 山东泰安茶区土壤硝化细菌的筛选及分离鉴定[J]. 中国科技论文在线精品论文, 2011, 4(19): 1749-1754.
Yu Y W, Huang X Q, Wang N D *et al*. Screening and identification of nitrobacteria from the soils of tea garden in Shandong province[J]. Sciencepaper Onl., 2011, 4(19): 1749-1754.

[12] 苏俊峰, 马放, 王继华, 等. 新型异养硝化细菌的硝化和反硝化特性[J]. 天津大学学报, 2007, 40(10): 1205-1208.
Su J F, Ma F, Wang J H *et al*. Nitrification and denitrification characteristics of new heterotrophic nitrifying bacteria[J]. J. Tianjin Univ., 2007, 40(10): 1205-1208.

[13] 朱月琪, 卫晋波, 曾国驱, 孙国萍. 一株好氧反硝化菌的分离及特性研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 616-619.
Zhu Y Q, Wei J B, Zheng G Q, Sun G P. Isolation and characterization of an aerobic denitrifier[J]. Microbiology, 2009, 36(4): 616-619.

[14] Weisburgw G, Bams M, Elletier D A. 16s Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. J. Bacterial., 1991, 173(2): 697-703.

[15] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 156-162.
Zhao B, He S J. Microbiology experiment[M]. Beijing: Science Press, 2002. 156-162.

[16] 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.
Dong X Z, Cai M Y. Manual of common determinative bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001.

[17] Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1989. 254-354.
Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's manual of determinative bacteriology(8th Ed)[M]. Beijing: Science Press, 1984. 254-354.

[18] 杨航, 黄钧, 刘博. 异养硝化-好氧反硝化菌 *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 的研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(4): 585-592.
Yang H, Huang J, Liu B. Advances in research of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512[J]. Chin. J. Appl. Environ. Biol., 2008, 14(4): 585-592.

[19] Bergey D H, Harrison F C, Breed R S *et al*. Genus II. *Flavobacterium gen.* nov[M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1923. 97-117.

[20] 陈赵芳, 尹立红, 浦跃朴, 等. 一株异养硝化菌的筛选及其脱氮条件[J]. 东南大学学报(自然科学版), 2007, 37(3): 486-490.
Chen Z F, Yin L H, Pu Y P *et al*. Screening of a heterotrophic nitrifying bacterium strain and its optimal conditions for nitrogen removing[J]. J. Southeast Univ. (Nat. Sci. Ed.), 2007, 37(3): 486-490.

[21] 王一明, 彭光浩. 异养硝化微生物的分子生物学研究进展[J]. 土壤, 2003, 35(5): 378-386.
Wang Y M, Peng G H. Advance in molecular blology of heterotrophic nitrifier[J]. Soils, 2003, 35(5): 378-386.

[22] 苏俊峰. 异养型同步硝化反硝化脱氮技术及微生物特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2007.
Su J F. The study of denitrifying chnology of heterotrophic simultaneous nitrification and denitrification and microbial character[D]. Harbin: PhD dissertation, Harbin Institute of Technology, 2007.