

## 好氧反硝化菌的选育及其初步应用

张小玲<sup>1\*</sup> 张卫东<sup>1</sup> 张玲<sup>1</sup> 李清丽<sup>2</sup> 郭国军<sup>2</sup> 华开<sup>2</sup> 张霞<sup>3</sup>

- (1. 河南省水产科学研究院 郑州 450044)  
(2. 河南大德饲料科技开发有限公司 郑州 450044)  
(3. 河南省土壤肥料站 郑州 450002)

**摘要:** 采用间歇曝气、极限稀释和酸碱指示剂培养基相结合的办法,从池塘底泥中成功分离到好氧反硝化菌株 H2,经生理生化和 16S rDNA 序列分析,初步判断为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。在室内模拟养殖水体中,菌株 H2 在 15 d 中对亚硝酸盐和硝酸盐的最高降解速率分别达到 0.885 mg/L·d 和 0.46 mg/L·d,试验结束时,总氮去除率达到 45.2%。结果表明,菌株 H2 具有应用于养殖水体生物脱氮领域的巨大潜力。

**关键词:** 好氧反硝化, 极限稀释, 芽孢杆菌

## Selection of an Aerobic Denitrifying Bacterium and Its Preliminary Application in Aquarium Water

ZHANG Xiao-Ling<sup>1\*</sup> ZHANG Wei-Dong<sup>1</sup> ZHANG Ling<sup>1</sup> LI Qing-Li<sup>2</sup> GUO Guo-Jun<sup>2</sup>  
HUA Kai<sup>2</sup> ZHANG Xia<sup>3</sup>

- (1. Henan Academy of Fishery Science, Zhengzhou 450044)  
(2. Henan DaDe Feed Technology Corporation, Zhengzhou 450044)  
(3. Henan Soil and Fertilizer Institute, Zhengzhou 450002)

**Abstract:** An aerobic denitrifying bacterium H2 was selected from the pond sludge by using a new screening method: Samples were enriched by intermittent aeration firstly, secondly limiting diluted, then screened with BTB screening culture medium. Strain H2 was identified as *Bacillus* sp. according to its physiological and biochemical characters, as well as 16S rDNA sequence homology comparison. The highest degradation velocity of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  were 0.46 mg/L·d and 0.885 mg/L·d, and the degradation rate of total nitrogen was 45.2% in aquarium water during the 15-day experiment. The study showed that strain H2 had great potential in the biodenitrification of aquaculture.

**Keywords:** Aerobic denitrification, Limiting dilution, *Bacillus*

俗话说“养鱼先养水”,水质是养殖成败的首要因素。但目前我国主要采用的集约化高密度养殖模式在水体积累了大量的鱼类粪便和饵料残渣,导

致水体氮素含量严重超标,尤其在养殖的中后期及夏季高温季节,亚硝酸盐含量居高不下,鱼虾等水生生物时时处于应激状态,浮头、厌食等现象时有

发生, 严重时还会出现大批死亡<sup>[1,2]</sup>。因此对水体中氮素, 尤其是亚硝酸盐的控制是调节水质的关键问题。

微生物反硝化作用可将水体中的硝态氮及亚硝态氮转化为  $N_2O$  及  $N_2$ , 使氮素彻底脱离水体, 达到脱氮的目的, 具有脱氮彻底、无二次污染、运行管理成本低等优点, 因此反硝化菌的选育和研究一直是生物脱氮研究领域的热点。传统的反硝化理论认为反硝化作用只能在厌氧条件下进行, 氧气的存在会抑制菌株的反硝化酶活性<sup>[3,4]</sup>, 而在实际生产中养殖水体的溶氧一般应保持在 4 mg/L~8 mg/L 之间, 这对矛盾使厌氧反硝化菌在水产中的应用一直受到很大限制。20 世纪 80 年代, Robertson 等<sup>[5]</sup>首次发现好氧反硝化菌的存在后, 不断有新的好氧反硝化菌株被发现<sup>[6-8,16]</sup>, 使反硝化菌应用于水产养殖业有了可能。目前, 具有良好生产应用潜力的好氧反硝化菌株的选育是解决反硝化菌在水产养殖业中应用瓶颈问题的关键, 具有重要的经济及社会意义。

本研究采用间歇曝气、极限稀释和酸碱指示剂培养基相结合的办法, 从郑州市近郊塘泥中分离到一株好氧反硝化菌, 并采用室内模拟养殖水体, 对其脱氮效果进行了跟踪检测, 为其在实际生产中的应用提供了有益指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 培养基

**1.1.1 富集培养基(g/L)**<sup>[6]</sup>: 琥珀酸钠 2.84,  $NaNO_2$  0.345,  $KH_2PO_4$  1.36,  $(NH_4)_2SO_4$  0.27, 酵母膏 1.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.19, 痕量微量元素液 1.0 mL, pH 7.2。

**1.1.2 BTB 分离培养基(g/L)**<sup>[6]</sup>: 琥珀酸钠 8.5, L-天冬酰胺酸 1.0,  $NaNO_2$  0.7,  $KH_2PO_4$  1.0,  $FeCl_2 \cdot 6H_2O$  0.05,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.2,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0, BTB 1.0 mL(1%, 溶于乙醇), 琼脂粉 2.0, pH 7.0~7.3。

**1.1.3 LB 培养基(g/L)**<sup>[9]</sup>: 蛋白胨 10.0, 酵母膏 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0~7.2。

**1.1.4 反硝化活性检测培养基 I (g/L)**<sup>[6]</sup>: 琥珀酸钠 4.72,  $NaNO_2$  0.70,  $KH_2PO_4$  1.50,  $Na_2HPO_4$  0.42,  $NH_4Cl$  0.61, 酪蛋白 0.50,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0, 痕量微量元素液 2.0 mL, pH 7.2。

**1.1.5 反硝化活性检测培养基 II**: 将反硝化活性检测培养基 中的  $NaNO_2$  0.7 换作  $KNO_3$  1.0 即得。

以上均为液体培养基配方, 添加 2.0% 的琼脂粉即为固体培养基。所有培养基均  $1 \times 10^5$  Pa, 30 min 灭菌, 备用。

### 1.2 好氧反硝化菌的选育

取郑州市郊养鱼池表面塘泥 4 份, 分别称取 1.0 g 到 200 mL 富集培养基中, 120 r/min(DO 6.0 mg/L  $\pm$  0.5 mg/L), 29°C~30°C 进行曝气培养富集, 曝气间隔为 12 h。每隔 2 天采用格利斯试剂和二苯胺试剂定性检测亚硝酸盐及硝酸盐含量。若亚硝酸盐消耗完毕, 取 5 mL 富集培养液到新鲜的培养基中, 继续培养, 重复 3 次。得到的培养液稀释至  $10^7$  倍, 将各梯度稀释液分别接入新鲜培养基中, 同等条件下培养 3 d, 选取亚硝酸盐及总氮降解率最高的稀释液在 BTB 分离培养基上进行划线分离, 挑选蓝色和具有蓝色晕圈的菌落作为初筛菌株。初筛菌株经 LB 培养基活化, 用无菌水洗涤 3 次, 按 1.0% 的接种量接入反硝化活性检测培养基, 120 r/min, 29°C~30°C 培养 3 d 后, 检测亚硝酸盐及总氮的降解率, 进行复筛, 得到的菌株接种斜面保存备用。

### 1.3 选育菌株硝酸盐降解活性检测

菌株经 LB 培养基活化后, 用无菌水洗涤 3 次, 按 1.0% 的接种量接入反硝化活性检测培养基, 120 r/min, 29°C~30°C 培养 3 d 后, 检测硝酸盐、亚硝酸盐的含量。

### 1.4 菌株的鉴定

**1.4.1 生理生化鉴定**: 依据文献[10]进行。

**1.4.2 16S rDNA 同源性比较**: 参照文献[11]的方法提取菌株总 DNA, 采用通用引物 P0: 5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3', Pc: 5'-GGTTACCTTGTTAC GACTT-3', 扩增其部分 16S rDNA 序列, 产物回收后送交北京博尚生物技术有限公司测序, 测序结果提交 GenBank 进行 Blast 分析。

### 1.5 选育菌株在室内养殖水体中脱氮活性的研究

**1.5.1 室内养殖水体的模拟**: 本项工作在河南省水产科学研究院工厂化育苗车间进行。试验用池为直径 1.1 m, 高 0.8 m 的柱形钢化玻璃缸, 试验用水采用经沙滤罐过滤的池塘养殖水, 底泥采自长期高密度养殖池塘。试验期间每缸加入底泥 15 kg, 约 3 cm 厚, 池水深度约为 50 cm, 每缸放入 10 尾规格为 25 g/尾  $\pm$  0.50 g/尾的鲤鱼以保证池水水质均匀, 试验期间不喂食。晚上开启保温层, 白天关闭, 保证水体温度稳定在 25°C~30°C, 光照充足, 充氧稳定 4 d

后,各项水质指标基本趋于稳定,备用。试验开始前一天,加入亚硝酸盐浓缩液,使各池亚硝酸盐浓度均为 3.2 mg/L。

**1.5.2 选育菌株在模拟养殖水体中的脱氮活性研究:**试验共设 2 组,每组设 3 个平行,分别为不加菌的对照组、投加选育菌株的试验组。选育菌株采用 LB 培养基活化,经无菌水洗涤后制成菌悬液,于晴好天气上午 9:30 投入试验缸中,菌体投加浓度约为  $10^5$  CFU/mL。试验期间通过调节充氧阀使各池溶氧稳定在 5.0 mg/L~9.0 mg/L。投菌前进行第 1 次采样作为各检测指标的初始值,之后采样时间定为每天上午 9:00~9:30。

1.6 检测方法

硝酸盐:紫外分光光度法(HJ/T 346-2007);亚硝酸盐:N-(1-萘基)-乙二胺光度法(GB/T 7493-1987);总氮:碱性过硫酸钾法(GB/T 11894-1989);菌体量:稀释平板计数法<sup>[9]</sup>。

2 结果与分析

2.1 好氧反硝化菌株的选育

经过间歇曝气富集、极限稀释、BTB 平板初筛,共得到 62 株单菌落,经过摇床复筛,得到 5 株具有良好反硝化活性的菌株,其对亚硝酸盐及总氮的降解效果如表 1 所示。

表 1 筛选菌株对亚硝酸盐及总氮的降解率 Table 1 Nitrite and total nitrogen removal rates by the strains		
菌株 Strain	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 降解率 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> removal rate	总氮降解率 TN removal rate
H2	98.8%	62.4%
F1	95.4%	55.7%
B10	99.8%	57.9%
I13	97.2%	42.5%
B12	98.6%	68.8%

从表 1 中可以看出,5 株细菌对亚硝酸盐的降解率均在 95%以上,表现出良好的降亚硝酸盐的能力。其中菌株 B10 的效果最优,降解率达到 99.8%;在总氮的去除率上,菌株 B12 和 H2 均在 60%以上,菌株 B10 和 F1 效果次之。

2.2 选育菌株硝酸盐降解活性检测

将筛选得到的 5 株细菌接入反硝化检测培养

基,考察其对硝酸盐的降解效果及亚硝酸盐的积累情况,结果如表 2 所示。

表 2 筛选菌株对硝酸盐的降解效果及亚硝酸盐的积累情况 Table 2 Nitrate removal and nitrite accumulation by the screened strains on the third day		
菌株 Strain	硝酸盐浓度 Nitrate concentration (mg/L)	亚硝酸盐浓度 Nitrite concentration (mg/L)
对照(Control)	142.80 ± 1.22	0.02 ± 0.005
H2	8.46 ± 0.31	0.16 ± 0.02
F1	5.82 ± 0.25	5.77 ± 0.36
B10	23.93 ± 0.45	2.89 ± 0.25
I13	48.52 ± 0.46	2.46 ± 0.06
B12	16.55 ± 0.35	1.61 ± 0.12

从表 2 中发现,虽然 5 株细菌对硝酸盐的降解效果都相当显著,但菌株 F1、B10、I13 和 B12 均积累了较高浓度的亚硝酸盐,这种情况在生物脱氮研究中曾被多次观察到<sup>[12-14,22]</sup>。目前对这种现象有两种解释:一种解释认为与亚硝酸盐相比,硝酸盐作为电子受体时基质释放的能量较高,因此微生物优先利用硝酸盐作为反硝化作用的电子供体,导致亚硝酸盐浓度升高;另一解释认为硝酸盐还原酶的合成要早于亚硝酸盐还原酶<sup>[15]</sup>,因此亚硝酸盐的降解要晚于硝酸盐。这种现象的出现在实际应用中是相当危险的。而菌株 H2 在降解硝酸盐时亚硝酸盐基本未出现积累,说明其反硝化效率比较高。因此将菌株 H2 作为目标菌株进行进一步的研究。

2.3 菌株 H2 的鉴定

**2.3.1 菌株 H2 的菌落培养特征:**在牛肉膏蛋白胨琼脂平板上,菌落湿润、透明,边缘不规则,凸起。见图 1。

**2.3.2 菌株 H2 的个体形态特征及生理生化特性:**培养 18 h 的菌体呈杆状,大小为 1.2 μm × 4.0 μm,多成链状排列,产芽孢,芽孢为杆状,大小为 1.2 μm × 3.8 μm。具体形态见图 2。革兰氏染色阳性,具运动性,可进行葡萄糖发酵,接触酶阳性,可在 7% NaCl 中生长,可水解淀粉和酪素。

**2.3.3 菌株 H2 的 16S rDNA 片段测序结果分析:**扩增菌株 H2 的 16S rDNA 序列送交测序,共测出 5'端约 700 bp,序列提交 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 进行 Blast 分析,查询登录号为 R180S7FP013,经相似性比对,与 GenBank 中 *Bacillus subtilis* subsp.



图1 菌株 H2 的菌落形态  
Fig. 1 The colony modality of strain H2

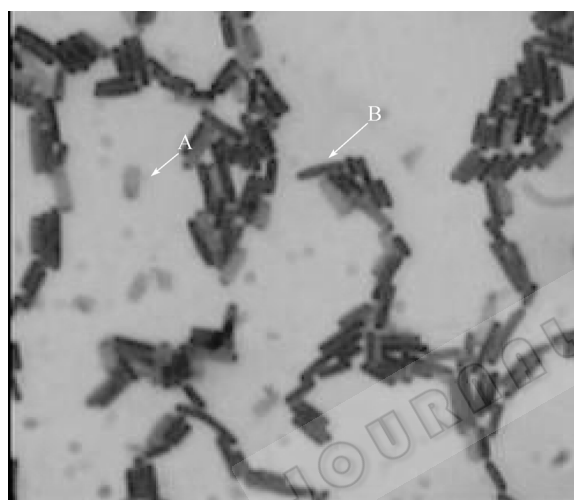


图2 菌株 H2 的显微摄影图(10×100, 简单染色)

Fig. 2 Micrography of strain H2

注: A: 菌株 H2 芽孢; B: 菌株 H2 营养体

Note: A: The spore of strain H2; B: The vegetative of strain H2

*subtilis* str. 168 和 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 的 16S rDNA 序列具有 100% 同源性。初步鉴定该菌株为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。

#### 2.4 菌株 H2 在模拟养殖水体中的脱氮活性研究

从图 3 中可以看出, 菌株 H2 加快了试验池中亚硝酸盐的降解速率。试验池中的亚硝酸盐在试验的第 7 天就基本降解完毕, 之后未再出现升高现象, 最高降解速率为 0.885 mg/L·d, 出现在试验的第 2 天~第 4 天, 说明菌株 H2 在该试验条件下可迅速发挥作用; 对照池中的亚硝酸盐在试验的第 10 天被完全降解, 较试验组晚了 3 d, 最大的降解速率为 0.625 mg/(L·d), 较试验组降低了 0.26 mg/(L·d)。且

对照池中的亚硝酸盐含量在试验的第 1 天有小幅上升, 从第 2 天开始下降, 而试验组的亚硝酸盐含量则一直处于下降状态。说明在此实验条件下, 菌株 H2 可将水体进行硝化作用时所产生的亚硝酸盐迅速降解或转化, 避免了亚硝酸盐的积累。这在生产应用时是极为有利的。

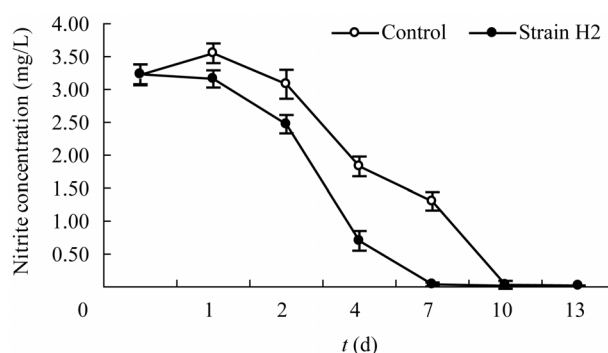


图3 亚硝酸盐降解曲线  
Fig. 3 Curve of nitrite concentration

从图 4 中可以看出, 菌株 H2 对池中硝酸盐的浓度变化有很大影响。试验缸中硝酸盐的浓度变化比较剧烈: 试验初期(第 1 天~第 4 天), 硝酸盐含量缓慢上升, 从第 5 天开始急剧下降, 从 3.13 mg/L 下降到第 10 天的 0.5 mg/L, 最高降解速率为 0.46 mg/L·d。推测试验前期池水中发生了硝化作用, 产生了硝酸盐, 而试验后期, 反硝化作用明显增强, 硝酸盐被大量降解。对照池中硝酸盐的变化较之试验组明显缓和: 初期缓慢上升, 从第 3 天开始小幅下降。说明养殖水体中的微生物群落自身也具有一

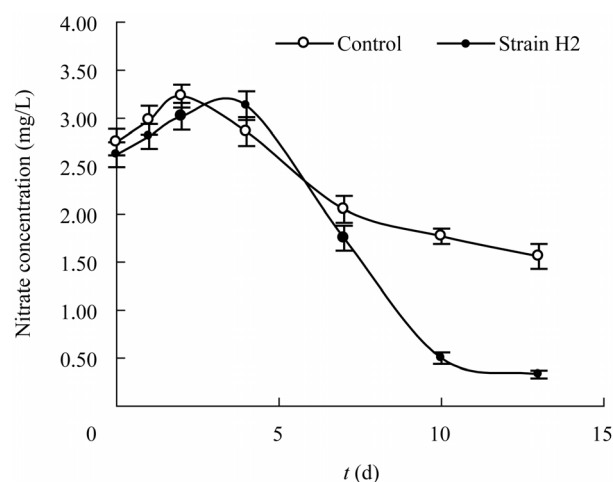


图4 硝酸盐浓度变化图  
Fig. 4 Curve of nitrate concentration

定的脱氮活性,但作用并不强烈。试验结束时,对照池中硝酸盐的去除率(包括同化作用和脱氮作用的影响)约为 51.7%。而试验池中硝酸盐的去除率(包括同化作用和脱氮作用的影响)约为 89.5%,较对照组提高了 37.8%。

结合图 3 所示亚硝酸盐的降解曲线可知,菌株 H2 在该试验条件下降解硝酸盐时并未产生亚硝酸盐的积累,这一点和实验室的研究结果一致,说明菌株 H2 在实际应用时是安全的。

表 3 总氮浓度变化 Table 3 Concentration of the total nitrogen in aquaculture water			
	Original (TN) mg/L	Final (TN) (mg/L)	TN removal rate (%)
对照组 (Control)	10.22 ± 0.23	7.86 ± 0.12	23.1
菌株 H2 组 (Strain H2)	10.16 ± 0.15	5.57 ± 0.09	45.2

从表 3 可以看出,菌株 H2 可显著提高水体的总氮去除率。试验期末,试验池的总氮去除率为 45.2%,较对照组提高了 22.1%。

3 讨论

3.1 好氧反硝化菌的筛选方法研究

好氧反硝化菌为好氧细菌或兼性好氧细菌,其在自然界中的含量很少,采用一般微生物筛选方法很难将其从环境微生物中分离出来。因此自上世纪 80 年代好氧反硝化菌被首次发现以来,其筛选方法一直是研究的热点<sup>[16]</sup>。经历了近 30 年的探索,目前该类细菌的筛选方法主要有 4 种:(1) 间歇曝气法:该方法利用好氧反硝化菌可同时使用 O<sub>2</sub> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>作为电子受体的特性,营造出好氧、厌氧的环境使其获得生长优势。最先发现的好氧反硝化菌 *Paracoccus denitrificans* 就是 Robertson 等<sup>[5]</sup>通过间歇曝气法筛选到的;(2) 选择性培养基法:该方法适用于定向进行某种具有特殊营养需求的好氧反硝化菌的筛选。如 Gupta 等<sup>[17]</sup>将培养基中的 MgSO<sub>4</sub> 浓度升高到 0.3 mg/mL 以定向进行典型好氧反硝化菌—脱氮副球菌的富集;(3) 呼吸抑制剂法:该方法由孔庆鑫等<sup>[18]</sup>首次于 2005 年报道。该方法利用呼吸抑制剂 KCN 阻断呼吸链中电子向 O<sub>2</sub> 的传递,抑制好氧菌的生长,并结合间歇曝气法,最终使具有好氧反硝

化作用的细菌成为富集液中的优势菌群。(4) 酸碱指示剂法<sup>[6]</sup>:该方法利用反硝化作用可使 pH 升高的特性,在培养基中加入酸碱指示剂溴百里酚蓝(BTB)以指示菌落周围的 pH,挑选平板上的蓝色菌落作为初筛菌株。

本研究中,我们在好氧反硝化菌的筛选方法上进行了新的尝试,即将多种被证明有效的筛选方式进行合理组合以提高筛选效率。其具体做法如下:采用间歇曝气方式对样品进行富集后,将富集液稀释至 10<sup>7</sup> 倍,然后将各梯度稀释液再次富集,选取脱氮效率最高的稀释液在 BTB 选择性培养基上进行划线分离。这种模式在间歇曝气富集后增加了一个“极限稀释”环节,降低富集液单位体积中的细菌浓度,使好氧反硝化菌更易获得生长优势,脱氮性能得到增强,进而更易被分离出来。研究结果表明,“间歇曝气 极限稀释 BTB 培养基”筛选模型对于好氧反硝化菌的选育是相当有效的。我们从 62 株初筛菌株中共获得 5 株具有良好好氧反硝化功能的菌株,筛选效率达到 8.06%,得到了明显提高。

3.2 好氧反硝化菌在养殖水体中的应用

目前,好氧反硝化菌的研究大多集中于菌株的脱氮特性和生理生化研究<sup>[12,13,20-22]</sup>,其作用效果也多是以反硝化培养基作为试验用水,在实验室条件下得到的。渔业养殖水环境与反硝化培养基相比,不但营养条件有很大差异,而且前者含有的丰富微生物还会与反硝化菌株产生复杂的相互作用。与实验室相比,菌株在养殖水体中的实际效果存在很多不确定因素,这也是目前在反硝化菌的应用中经常遇到的问题。本研究以渔业养殖水作为试验用水,并添加池塘底泥来模拟养殖水环境,使试验池和对照池的各项水质指标基本一致,在此基础上进行菌株的效果试验。这种方法既可为菌株提供与生产应用无差别的养殖水营养环境,又考察了菌株与养殖水体自身微生物间的相互作用对其作用效果的影响,得到的结果更接近菌株的实际应用效果。

研究结果表明,菌株 H2 在室内模拟水体中可有效加快亚硝酸盐及硝酸盐的降解速率,其最高降解速率可分别达到 0.885 mg/(L·d)和 0.46 mg/(L·d),且可有效避免水体中亚硝酸盐的积累,增强了水体的脱氮能力,总氮的最终去除率可达 45.2%,较对照提高了 22.1%。初步说明菌株 H2 在天然养殖水体中可顺利发挥其好氧反硝化活性,且使用较为安

全。加之菌株 H2 可形成芽孢, 具有较强的生命力和繁殖能力, 耐运输和贮存, 对各种水体适应能力较强, 具有开发成微生态制剂的巨大潜力。

## 参 考 文 献

- [1] 胡家文, 姚维志. 养殖水体富营养化及其防治. 水利渔业, 2005, 25(6): 74–76.
- [2] 魏泰莉, 余瑞兰, 聂湘平, 等. 水中亚硝酸盐对彭泽鲫血红蛋白及高铁血红蛋白的影响. 大连水产学院学报, 2001, 16(1): 67–71.
- [3] Li P, Zhang S, Liu DL. Study progress of bacterial aerobic denitrification. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(1): 60–64.
- [4] Ferguson SJ. Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1994, 66: 89–110.
- [5] Robertson LA, van Neil EWJ, Torremans RAM, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotroph*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 11(54): 2812–2818.
- [6] Naoki T, Maria AB, Yasushi S, et al. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3152–3157.
- [7] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* N<sub>0</sub>4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(2): 184–191.
- [8] Joong KK, Kyoung JP, Kyoung SC, et al. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strain. *Bioresource Technology*, 2005, 96: 1897–1906.
- [9] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002, pp.69–77, 251–266.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.62–65.
- [11] Joseph Sambrook, David W Russell. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Harbor Laboratory Press, 2001, pp.27–30.
- [12] 周丹丹, 马 放, 王弘宇, 等. 关于好氧反硝化菌筛选方法的研究. 微生物学报, 2004, 44(6): 837–839.
- [13] 张小玲, 梁运祥. 一株反硝化细菌的筛选及其反硝化特性的研究. 淡水渔业, 2006, 36(5): 28–32.
- [14] Blaszczyk M. Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 3951–3953.
- [15] Kucera I, Matyasek R. Aerobic adaptation of *Paracoccus denitrificans*: sequential formation of denitrification pathway and changes in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 1670–1676.
- [16] 王 薇, 蔡祖聪, 钟文辉, 等. 好氧反硝化菌的研究进展. 应用生态学报, 2007, 18(11): 2618–2625.
- [17] Gupta SK, Mona K. Quantitative estimation of *Thiosphaeta pantotropha* from aerobic mixed culture. *Water Research*, 2000, 34(15): 3765–3768.
- [18] 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. 应用与环境生物学报, 2005, 11(2): 222–225.
- [19] 孔庆鑫. 一种新型脱氮微生物的分离鉴定及其脱氮机制. 中国人民解放军军事医学科学院硕士学位论文, 2004.
- [20] 于爱茸, 李 尤, 俞吉安. 一株耐氧反硝化细菌的筛选及脱氮特性研究. 微生物学杂志, 2005, 25(3): 77–81.
- [21] 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. 环境科学学报, 2007, 27(6): 968–972.
- [22] 黄运红, 龙中儿, 许 杨. 一株好氧反硝化细菌的筛选及初步鉴定. 食品科学, 2007, 28(8): 266–268.