

贝壳砂改良土壤中反硝化细菌的分析

张小远¹ 肖瑶¹ 田浩¹ 王芸¹ 刘彬彬² Asa Frostegard² 赵立平¹ 张晓君^{1*}

(1. 上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

(2. 挪威生命科学大学 化学、生物技术及食品科学系 奥斯 N-1432 挪威)

摘要:【目的】通过对一处经过长期使用贝壳砂进行改良的土壤中的反硝化细菌的多样性和细菌分离分析, 研究该土壤中反硝化细菌的组成特征。【方法】采用 454 焦磷酸测序的方法分析了土壤样品中微生物群落的组成, 选用 Giltay 培养基培养、鉴定从土壤中挑选的分离物的反硝化能力, 并对具有反硝化能力的微生物进行了 16S rRNA 基因鉴定。【结果】该土壤样品中占据优势地位的为 Proteobacteria、Acidobacteria、Bacteroidetes、Chloroflexi 等门的微生物, 属的水平上则有近 70% 尚未确立分类地位。所分离的细菌中, 共得到 12 株厌氧条件下具有较高硝酸盐去除效率的微生物, 分属 *Pseudomonas*、*Aeromonas*、*Serratia* 和 *Acinetobacter*, 均为 γ 变形菌纲的微生物。【结论】该土壤中具有较高的微生物多样性, 包括很多未知类型的微生物和众多类型的反硝化细菌; 分离到了 11 株具有反硝化能力的菌株, 可用于该土壤的反硝化过程的进一步研究。

关键词: 土壤, 反硝化, 高通量测序, 群落, 分离鉴定

Analysis of denitrifying bacteria in a long-term shell sand amended soil

ZHANG Xiao-Yuan¹ XIAO Yao¹ TIAN Hao¹ WANG Yun¹ LIU Bin-Bin²
ASA Frostegard² ZHAO Li-Ping¹ ZHANG Xiao-Jun^{1*}

(1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Science, Ås N-1432, Norway)

Abstract: [Objective] Analysis of the denitrifying bacteria composition in a long-term amended soil by pyrosequencing and isolating functional bacteria. [Methods] Microbial community structure was analyzed by 454 pyrosequencing of 16S rRNA gene, Giltay medium was used to cultivate and screen denitrifying bacteria from the isolates obtained from the soil, 16S rRNA genes of the detected denitrifying bacteria were also identified. [Results] Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi were dominant in the soil sample and nearly 70% sequences were unclassified in genus level. Among 1 344 isolates, 12 isolates were found that could efficiently remove nitrate under anaerobic condition and were affiliated to *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia* and *Acinetobacter*.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41230856, 21177086); 上海市国际合作项目(No. 12230706800)

*通讯作者: Tel: 86-21-34204878; ✉: xjzhang68@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2013-06-12; 接受日期: 2013-09-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

[Conclusion] The results showed a high microbial diversity in the soil and most of them were unclassified bacteria. Eleven strains of denitrifying bacteria were identified via nitrate removal and gas formation. These strains could be used for studying the denitrification property.

Keywords: Soil, Denitrification, High through-put sequencing, Community, Isolation

氮元素是农作物生长需要的重要元素之一,土壤中氮素的流失一直是农业生产中密切关注的问题。过量的氮素会因为淋溶等作用进入到水体中而造成富营养化,反硝化作用可将硝酸根和亚硝酸根还原为 NO、N₂O、N₂ 等气体,已成为土壤中氮素流失最主要的途径之一^[1],其中 N₂O 又是温室气体,其温室效应约为 CO₂ 的 300 倍^[2]。土壤作为反硝化作用最为强烈的场所之一,在温室效应和氮素循环方面起着重要作用,因此,土壤反硝化微生物的研究受到了日益重视^[3-4]。

不同结构、物理化学特性的土壤或土壤聚集体常常会为不同的反硝化微生物提供合适的生长环境,因此改变耕种农作物,或者经过特定方式改良的土壤中会拥有特定的反硝化微生物多样性^[5]。了解这些土壤的反硝化细菌的多样性并获得分离培养物,一方面可以为我们增加反硝化微生物的新资源,在水体和土壤污染治理中加以利用;另一方面,这些分离菌株的研究还有助于我们理解该环境土壤的反硝化机制。

由于土壤微生物群落复杂的组成,试图充分了解群落中微生物的结构与作用往往比较困难。近年来高通量测序技术的发展为解决这一问题提供了新的方法。Demaneche 等采用分子筛选结合焦磷酸测序的方法从一个土壤元基因组学文库里鉴定出了包括 *nosZ*、*nirS*、*nirK* 等在内的 9 个反硝化基因簇,表明元基因组学的方法能够让我们克服培养方法的限制,研究相关基因的多样性^[6]; Ishii 等采用高通量测序技术分析了水稻土中的细菌群落结构,并通过比较强反硝化作用和无反硝化作用的土壤群落结构,发现了一些可能在硝酸盐代谢中起着关键作用的微生物,其中大部分属于 *Burkholderiales* 和 *Rhodocyclales*^[7]。这些研究提示我们借用高通量测序的深度,能够更好地了解微生

物群落的组成与功能。

本研究所用的土壤来自一处挪威农业发展中心长期改良土壤项目的实验田,通过向每公顷添加 800 m³ 贝壳砂的办法,经过三十余年的改良后,土壤的 pH 从 4 上升到了 8 左右, Liu 等在研究谷氨酸盐对土壤中 NO、N₂O 和 N₂ 等气体产生的影响时发现,该土壤样品在厌氧条件下添加谷氨酸盐进行培养时,会引起反硝化效率的指数增长,最终将几乎所有的氮源转化为 N₂^[8],表明该土壤样品有高效反硝化作用的潜能,为此对该样品中的反硝化微生物进行了研究和分离。我们应用 454 高通量测序的方法分析了样品的细菌群落组成,并选用 Giltay 培养基从该样品中分离反硝化细菌,分析了具有显著反硝化作用的细菌菌株的特征。

1 材料与方法

1.1 土壤

实验所用土壤样品为来自于挪威西部沿海地区的一处实验地。1978 年挪威农业发展中心开始对这片土壤添加不同浓度的贝壳砂进行改良,土壤 pH 从 4 左右上升到不同的程度^[9],本文中所用土壤为每公顷添加 800 m³ 的贝壳砂,pH 在改良后上升到了 8 左右,该土壤样品为泥炭土,最初的有机碳含量为 45%,有机氮含量为 2%,经过改良后有机碳氮含量大幅下降^[8]。

1.2 微生物富集和培养分离

1 g 土壤悬浮于盛满基本培养基^[10] (K₂HPO₄·3H₂O 3.275 g/L, NaH₂PO₄·2H₂O 1.146 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L, CaCl₂ 0.018 g/L, NaNO₃ 1 mmol/L, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 3 mg/L, MnSO₄·H₂O 0.560 mg/L, CuSO₄·5H₂O 0.782 mg/L, FeCl₃ 0.5 mg/L) 的 100 mL 培养瓶中,以丁基橡胶和中空铝盖封口,静置 7 d 后转接 1 mL 再培养 7 d。富集

的菌液倍比稀释后取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释梯度各 200 μL , 涂布于 1/20 TSA 固体培养基平板(胰蛋白胨 0.75 g/L, 大豆胨 0.25 g/L, NaCl 0.25 g/L, 1.2% 琼脂)表面, 倒置于加入 Microbiology Anaerocult A 厌氧试剂的厌氧罐中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后挑取不同形态菌落鉴定分析。

1.3 Giltay 培养基鉴定筛选

A 溶液: KNO_3 1 g, 天冬酰胺 1 g, 1% BTB 酒精溶液 5 mL, 定容至 500 mL; B 溶液: 柠檬酸钠 8.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 定容至 500 mL。A、B 两溶液等体积混合后调节 pH 为 7.0–7.2, 其中 NO_3^- 的浓度为 9.9 mmol/L, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。用牙签挑取分离得到的单菌落, 接种于 5 mL Giltay 培养基中振荡培养 7 d, 其间观察颜色变化并测定硝酸盐降解率。厌氧培养时将分离物接种于装满 Giltay 培养基的 10 mL 培养瓶中, 以丁基橡胶和中空铝环封口, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 5 d 后测定硝酸盐氮的降解率。硝酸盐氮的测定参照国家标准 HJ/T 346-2007《水质硝酸盐氮的测定紫外分光光度法》。

1.4 分离菌株产气情况测试

将分离物接种于装有 Giltay 培养基的 20 mL 培养瓶中, 按照 1.3 的方法分别在好氧和厌氧的条件下 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 7 d 后, 收集产生的气体, 采用气相色谱分析其中的 N_2 和 N_2O 。气相色谱仪为 Agilent 7890A, 条件为载气流量 He 4.110 mL/min, 柱温 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, N_2 经 Haysep Q 柱和 Molsieve 柱后采用热传导检测器($250\text{ }^{\circ}\text{C}$)检测, N_2O 经 Haysep Q 和 PLOT 柱后采用电子捕获检测器($330\text{ }^{\circ}\text{C}$)检测。

1.5 DNA 提取、PCR 程序和测序

采用机械击打与酚氯仿抽提相结合的方法从土壤样品或菌液中提取 DNA, 详见文献[11]。454 测序以带有 ID-tag 的引物扩增土壤总 DNA 样品 16S rRNA 基因 V3 区, 测序、划分操作分类单元 (Operative taxonomy units, OTUs) 等数据分析方法详见文献[12]。分离得到的菌落提取 DNA 后, 扩

增 16S rRNA 基因, 使用 Promega 公司的 pGEM-T Easy vector 试剂盒连接转化, 获得阳性克隆后以 T7 和 SP6 引物进行了测序(上海生工)。

2 结果与分析

2.1 土壤菌群结构

土壤样本 DNA 经扩增后, 以 FLX titanium (Roche) 平台进行测序, 从返回的原始数据中提取出 892 条属于该样品的高质量序列(序列已提交至 SRA 数据库, 序列号为 SRA062802), 样品的稀疏曲线和 Shannon 多样性指数如图 1 所示。稀疏曲线表明随着测序量的增加, 样品中的可操作分类单元超过 350, 但是从 Shannon 多样性指数上来看已基本达到平台期, 测序结果已经能够反映该样品的细菌多样性特征, 可用于后续的分析。

采用 RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) 来评估 OTU 的分类地位, 分析原始土壤样品在门的水平上的组成如图 2 所示, 其中 Proteobacteria 占到了 50% 以上, 是土壤细菌群落中最为优势的一个门, 可能与土壤中的整体代谢功能有关。Acidobacteria 和 Bacteroidetes 也占到了 10% 以上。如果不考虑丰度, 样品的多样性组成与其它报道的土壤细菌组成结构类似^[13]。

进一步在属的水平上对群落结构进行分析, 结果表明, 未鉴定到属的 OTU 的比例达到了 69% 以上(图 3), 说明该土壤样品中尚有较多微生物没有明确的分类地位, 不仅多样性高, 而且含有较为丰富的新颖未知的细菌类型。占据优势地位的细菌属包括 *Haliscomenobacter*、*Pseudolabrys*、*Flavobacterium*、*Sphaerobacter*、*Lawsonia*、*Aquicella*、*Legionella* 等, 丰度均在 1% 以上, 常见的具有多种降解能力的 *Pseudomonas* 属也处于相对优势的地位, 占总序列数的 0.90%。

2.2 反硝化细菌的分离与筛选

在不同菌液稀释倍数的 1/20 TSA 培养基上挑取了 1 344 个菌落, 将所得菌落接种于液体 Giltay 培养基中培养。由于 Giltay 培养基中添加了溴百里酚蓝, 根据颜色变化共从中筛选得到 38 个可能具

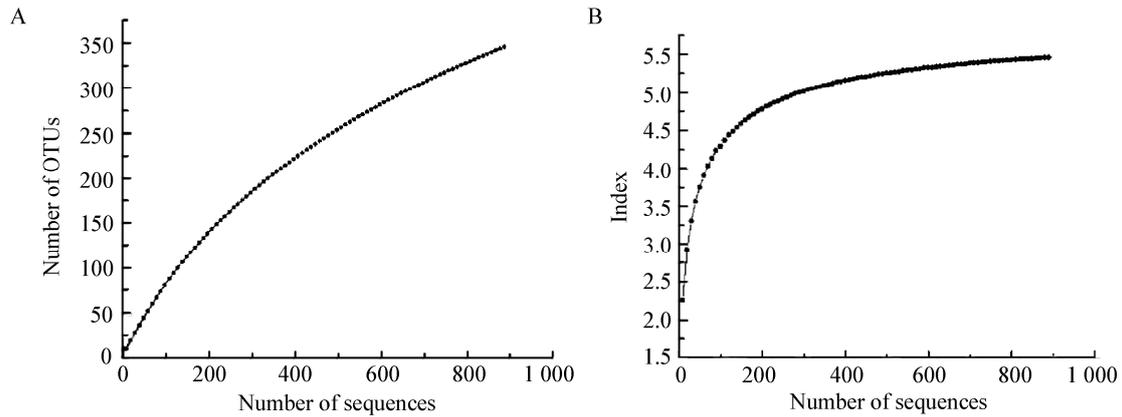


图1 Rarefaction (A)和 Shannon-Wiener (B)曲线
Figure 1 Rarefaction (A) and Shannon-Wiener (B) curve

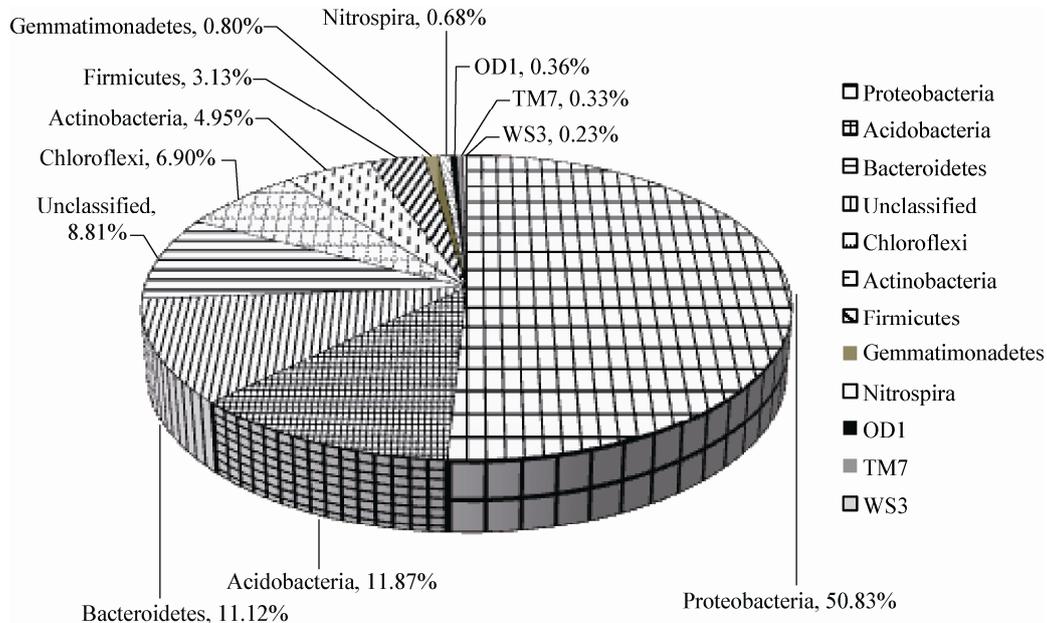


图2 土壤样品在门的水平上的细菌组成
Figure 2 Bacteria composition of soil sample in phylum level

有反硝化能力的分离物。将这些分离物进一步在厌氧条件下测定硝酸盐去除率，其中的 12 株分离株可以较为有效的利用硝酸盐(图 4)，硝酸盐降解率为 15.56%–59.79%。为了进一步确认这些菌株的反硝化能力，对这 12 株分离物进一步进行产气情况的测试，结果如表 1 所示，其中除 33 号以外的 11

株分离物在厌氧条件下均可以产生 N_2 和 N_2O ，表明这 11 株细菌都是反硝化细菌。其中有 2 株分离物(13 和 25 号菌株)在好氧条件下也可以产生 N_2O ，暗示这两株分离物可能具有好氧反硝化的能力。

将 12 株分离物的 16S rRNA 基因克隆测序后结果如表 2 所示。序列比对结果表明分离得到的这

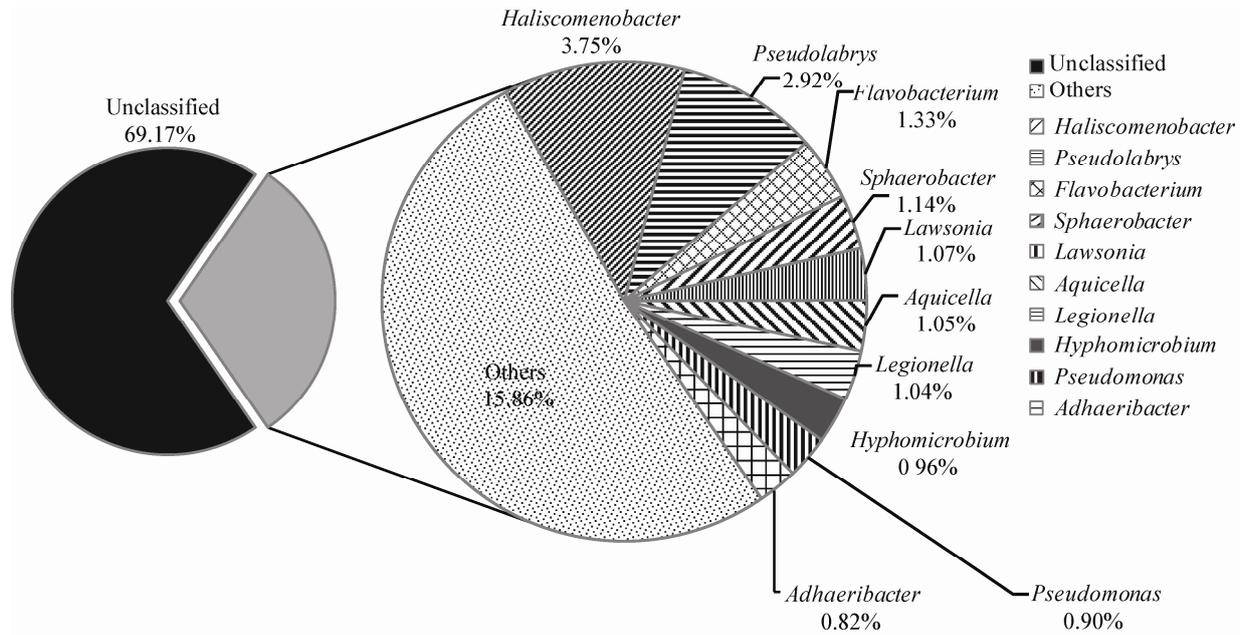


图 3 土壤样品在属的水平上的细菌组成
Figure 3 Bacteria composition of soil sample in genus level

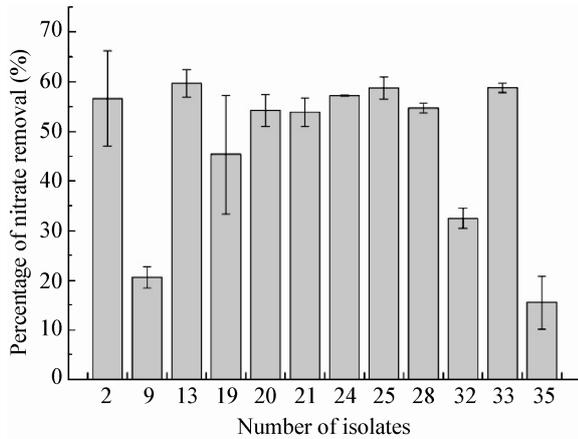


图 4 厌氧条件下部分分离物在 Giltay 培养基中的硝酸盐去除率
Figure 4 Anaerobic nitrate removal efficiency of isolates cultured in Giltay medium

12 株细菌分属于 *Pseudomonas*、*Aeromonas*、*Serratia* 和 *Acinetobacter*，均为 γ 变形菌纲的微生物。

将分离得到的菌株的 16S rRNA 基因序列与土壤样品 454 焦磷酸测序结果比对后发现，后者划分 OTU 得到的代表序列中没有能够与前者完全匹配的序列，而且 454 测序结果划分的 OTU 中未发现

分离物编号 Isolate No.	好氧条件 Aerobic		厌氧条件 Anaerobic	
	N ₂ O	N ₂	N ₂	N ₂ O
2	-	+	+	+
9	-	+	+	+
13	+	+	+	+
19	-	+	+	+
20	-	+	+	+
21	-	+	+	+
24	-	+	+	+
25	+	+	+	+
28	-	+	+	+
32	-	+	+	+
33	-	-	-	-
35	-	+	-	-

注：-：未产生相应气体；+：产生相应气体。
Note: -: Negative; +: Positive.

表 2 分离物序列比对结果
Table 2 Sequence blast results of selected isolates

分离物编号 Isolate No.	最近邻居(登录号) Closest neighbor from database (accession No.)	相似度 Similarity (%)	登录号 Accession No.
2	<i>Pseudomonas putida</i> strain CGMCC3830 (JQ086574.1)	98	KC339711
9	<i>Aeromonas</i> sp. P1D3 (FR775969.1)	99	KC339712
13	<i>Serratia</i> sp. W2Feb10A (JN106429.1)	99	KC339713
19	<i>Pseudomonas</i> sp. W15Feb18 (EU681002.1)	98	KC339714
20	<i>Aeromonas media</i> strain 975a (EU488684.1)	99	KC339715
21	<i>Aeromonas</i> sp. REm-amp_80 (JX899610.1)	98	KC339716
24	<i>Aeromonas media</i> strain CLY101 (FJ940840.1)	98	KC339717
25	<i>Serratia</i> sp. W2Feb10A (JN106429.1)	99	KC339718
28	<i>Acinetobacter</i> sp. C25 (JX177713.1)	99	KC339719
32	<i>Pseudomonas</i> sp. W15Feb18 (EU681002.1)	99	KC339720
33	<i>Pseudomonas</i> sp. s52 (EU099607.1)	97	KC339721
35	<i>Pseudomonas putida</i> strain CGMCC3830 (JQ086574.1)	99	KC339722

Serratia 和 *Aeromonas* 属细菌。454 测序结果中 *Pseudomonas* 和 *Acinetobacter* 属分别占总序列数的 0.90%和 0.11%。33 号菌株与 2、19、32、35 号菌株都同属于 *Pseudomonas* 属,但是,只有 33 号菌株不具有反硝化作用,其余均为反硝化细菌。综合以上分析表明,可培养的反硝化微生物在原始土样中的丰度均较低,可能与该土壤氮源供给较为贫乏有关,生态条件可能不利于反硝化细菌的生长,但仍然蕴藏着多样的反硝化细菌。分离得到的反硝化细菌尽管在原始样品中的丰度低于本文中的检测水平,但通过富集培养筛选分离的方法可以分离得到。

3 讨论

泥炭土因为含水量高、结构疏松、通气不足、承载力低等缺点而在现代高强度机械化农业生产中产量并不高,为此人们从 17 世纪起就开始向其中添加矿物质土壤来改进其性能^[9]。在挪威农业发展中心长期改良土壤的一个项目中,通过向每公顷添加 800 m³ 贝壳砂的办法,经过三十余年的改良后,土壤的理化性质和氮循环过程发生了极显著的变化。这种改良土壤中反硝化细菌的多样性及其反硝化能力是值得研究的问题。

细菌的 16S rRNA 基因由于其高保守性,多被作为进化和分类地位分析中有力的工具。本文通过高通量测序的方法获取土壤样品中的 16S rRNA 基因 V3 区序列,来分析群落中细菌的组成。结果发现其中变形菌门的比例占到了一半以上,而在属的水平上有 69%以上未能得到分类,表明土壤中的微生物群落组成相对复杂,较多的物种尚未得到充分的研究,样品中可能蕴藏着新的微生物资源。然而,应该注意到,研究发现细菌内 16S rRNA 基因的拷贝数并不是唯一的,且有些细菌基因组内 16S rRNA 基因也有一定异质性^[14],因此,基于 16S rRNA 基因分析群落组成时可能会高估了群落中 OTU 的数目。Sun 等分析了 16S rRNA 基因多个保守区在不同相似性水平下,由于其异质性所导致的对群落多样性高估的程度,结果表明 V3 区序列在 97%的水平下的高估程度为 5.2%^[15]。本研究的 V3 区测序分析结果可能也会受此一定的影响。但是综合考虑到 16S rRNA 基因 V3 区序列具有大量的参考数据,且探索未知细菌群落时异质性的不可去除,本研所得的结果仍具有重要的参考价值。

土壤样品中能够确立分类地位的丰度最高的属为 *Haliscomenobacter* 属,该属微生物最初从活性污泥中分离得到,能够在细胞表面产生透明的

鞘。目前尚未发现该属微生物具有反硝化能力,然而对 rRNA 小亚基序列的分析表明该属微生物与 *Flavobacterium* 属具有一定的亲缘关系^[16],可能也具有一定的反硝化潜能。

本研究以稀释的丰富培养基从土壤样品中分离了 1 344 株细菌,并从中筛选出 12 株可在厌氧条件下去除硝酸盐的菌株,分属于 *Pseudomonas*、*Aeromonas*、*Serratia* 和 *Acinetobacter* 4 个属,均来自于土壤样品中丰度最高的变形菌纲。经过气体成分分析,确认其中 11 株分离物可在厌氧条件下把硝酸盐还原为 N_2O 和 N_2 ,只有属于 *Pseudomonas* 属的一株细菌 33 号菌不能产生这两种气体,不具有反硝化功能。13 和 25 号两株分离物可能具有好氧反硝化能力。

本研究从样品中分离得到了 5 株硝酸盐去除效率各异的 *Pseudomonas* 属的菌株。*Pseudomonas* 属为土壤样品中丰度较高的微生物,Gamble 等对包括 19 处土壤样品在内的不同地区环境样品中优势地位的反硝化微生物研究分离后发现,绝大部分分离物均属于 *Pseudomonas* 属和 *Flavobacterium* 属^[17],表明这两个属的微生物可能在多种类型的环境样本中均为主要的反硝化微生物。*Pseudomonas* 属是常见的降解杂环化合物优势菌,特别是在反硝化条件下对苯酚、甲苯等污染物的降解等。土壤中的 *Pseudomonas putida* 能够水解有机磷酯、氨基甲酸酯类农药、BTEX 等^[18-20]。*Aeromonas* 属的微生物广泛存在于水生环境、食物、土壤等^[21]中,具有厌氧和好氧反硝化的能力^[22-23]。*Serratia* 属微生物从水体、土壤、动植物中均曾经分离到,具有抗真菌的能力^[24],能够降解土壤中的有机磷类农药污染物,且能够在反硝化条件下高效地降解含磷污染物^[25-26]。本次实验中分离得到两株 *Serratia* 属微生物在好氧条件下也能够产生 N_2O ,暗示该属微生物可能具有好氧反硝化的能力,在之前的研究中还尚未报道过,仍有待进一步的研究。*Acinetobacter* 属微生物为有机物污染土壤中重要的微生物群落,是多类油脂的初级降解

者,也是一类在土壤中分布广泛的微生物^[27]。Kim 等在研究高效降解有机磷的 *Acinetobacter* 属微生物时发现,282 株分离物中只有 35 株具有反硝化能力,可能由于这些微生物多从降解磷元素的反应器中分离得到,而磷的代谢途径会与反硝化作用竞争所致^[28]。

在分离反硝化微生物的过程中,得到了一些原始样品中丰度较低,甚至低于检测水平的细菌菌株。说明本研究中的土壤样品中的可培养反硝化细菌的丰度相对较低,在富集条件下,可以得到增殖和分离培养。同时,也可以看到该土壤样品中还有许多微生物有待研究,可能还需要进一步富集,或者采用其它的辅助手段进行分离,如本实验室参照 Svenning、Ferrari 等构建的土壤基质膜系统^[29-30],以 Transwell 为基础设计了模拟原位环境分离微生物的方法,已成功从一个反硝化喹啉降解反应器中分离得到之前未能分离的丰度较低的反硝化微生物。这些方法也可用于土壤中微生物的分离。

参 考 文 献

- [1] Robertson GP, Vitousek PM. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource[J]. Annual Review of Environment and Resources, 2009, 34: 97-125.
- [2] Smeets EM, Bouwman LF, Stehfest E, et al. Contribution of N_2O to the greenhouse gas balance of first-generation biofuels[J]. Global Change Biology, 2009, 15(1): 1-23.
- [3] Singh BK, Bardgett RD, Smith P, et al. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(11): 779-790.
- [4] Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle[J]. Science, 2010, 330(6001): 192-196.
- [5] Dell EA, Bowman D, Rufty T, et al. The community composition of soil-denitrifying bacteria from a turf grass environment[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(5): 315-325.
- [6] Demaneche S, Philippot L, David MM, et al. Characterization of denitrification gene clusters of soil bacteria via a metagenomic approach[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(2): 534-537.
- [7] Ishii S, Yamamoto M, Kikuchi M, et al. Microbial populations responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil, as revealed by comparative 16S rRNA gene analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(22): 7070-7078.
- [8] Liu B, Morkved PT, Frostegard A, et al. Denitrification

- gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72(3): 407-417.
- [9] Sognnes LS, Fystro G, Øpstad SL, et al. Effects of adding moraine soil or shell sand into peat soil on physical properties and grass yield in western Norway[J]. Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science, 2006, 56(3): 161-170.
- [10] 仲汇慧, 张晓君, 岳思青, 等. 喹啉废水反硝化反应器中优势菌的代谢功能分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 645-650.
- [11] Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3854-3859.
- [12] Zhang C, Zhang M, Wang S, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice[J]. The ISME Journal, 2009, 4(2): 232-241.
- [13] Fulthorpe RR, Roesch LF, Riva A, et al. Distantly sampled soils carry few species in common[J]. The ISME Journal, 2008, 2(9): 901-910.
- [14] Pei AY, Oberdorf WE, Nossa CW, et al. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(12): 3886-3897.
- [15] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity in 16S rRNA genes causes over estimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969.
- [16] Gherna R, Woese CR. A partial phylogenetic analysis of the "flavobacter-bacteroides" phylum: basis for taxonomic restructuring[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1992, 15(4): 513-521.
- [17] Gamble TN, Betlach MR, Tiedje JM. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977, 33(4): 926-939.
- [18] Chanika E, Georgiadou D, Soueref E, et al. Isolation of soil bacteria able to hydrolyze both organophosphate and carbamate pesticides[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3184-3192.
- [19] You Y, Shim J, Cho CH, et al. Biodegradation of BTEX mixture by *Pseudomonas putida* YNS1 isolated from oil-contaminated soil[J]. Journal of Basic Microbiology, 2012, 53(5): 469-475.
- [20] de las Heras A, de Lorenzo V. *In situ* detection of aromatic compounds with biosensor *Pseudomonas putida* cells preserved and delivered to soil in water-soluble gelatin capsules[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 400(4): 1093-1104.
- [21] Aravena-Román M, Harnett GB, Riley TV, et al. *Aeromonas aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be misidentified as *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(8): 3006-3008.
- [22] Carter JP, Hsaio YH, Spiro S, et al. Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(8): 2852-2858.
- [23] Senga Y, Mochida K, Fukumori R, et al. N₂O accumulation in estuarine and coastal sediments: The influence of H₂S on dissimilatory nitrate reduction[J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2006, 67(1): 231-238.
- [24] Kamensky M, Ovadis M, Chet I, et al. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(2): 323-331.
- [25] Cycon M, Wojcik M, Piotrowska-Seget Z. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil[J]. Chemosphere, 2009, 76(4): 494-501.
- [26] Lacko N, Drysdale GD, Bux F. Anoxic phosphorus removal by denitrifying heterotrophic bacteria[J]. Water Science & Technology, 2003, 47(11): 17-22.
- [27] Ji G, Wang R, Zhi W, et al. Distribution patterns of denitrification functional genes and microbial floras in multimedia constructed wetlands[J]. Ecological Engineering, 2012, 44: 179-188.
- [28] Kim MH, Hao OJ, Wang NS. Acinetobacter isolates from different activated sludge processes: characteristics and neural network identification[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 23(3): 217-227.
- [29] Svenning MM, Warttinen I, Hestnes AG, et al. Isolation of methane oxidising bacteria from soil by use of a soil substrate membrane system[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44(3): 347-354.
- [30] Ferrari BC, Winsley T, Gillings M, et al. Cultivating previously uncultured soil bacteria using a soil substrate membrane system[J]. Nature Protocols, 2008, 3(8): 1261-1269.