

脱氮除磷假单胞菌的筛选及定量检测

杨继伟 杨海麟 冯守帅 梁洪杰 王武*

(教育部工业微生物技术重点实验室 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】筛选具有较强脱氮除磷能力的细菌,建立结合 S1 酶保护分析的分子探针技术,以分析该菌在发酵过程中的数量变化情况。【方法】采用缺磷培养基厌氧培养、富磷培养基好氧培养和硝酸盐还原产气实验进行脱氮除磷菌筛选。通过 16S rRNA 基因序列分析及同源性比对,结合菌株的生理生化鉴定试验,鉴定筛选株。设计相应的 16S rRNA 探针组,建立结合 S1 酶保护分析的分子探针技术。【结果】筛选的菌株被鉴定为假单胞菌 *Pseudomonas* sp., 命名为 LY10。菌株 LY10 在富磷培养基中好氧培养 24 h, 总磷去除率达 90.01%。在反硝化聚磷培养基中培养 48 h, 总氮和总磷去除率分别为 84.71% 和 89.37%。针对假单胞菌 16S rRNA 基因序列设计了一组用于结合 S1 酶保护分析的分子探针 Probe-P.sp, 该探针具有很高的甄别灵敏度, 能够将 LY10 与丛毛单胞属(*Comamonas*)等 5 种细菌区分开; 分子探针定量分析假单胞菌 LY10, 其细胞量与吸光值呈线性关系, 检测的线性范围为 10^3 – 10^6 cells/mL, 线性方程为: $y = -0.967\ 87 + 0.372\ 99x$ ($R^2 = 0.996\ 7$, $n = 5$)。【结论】新筛的假单胞菌 LY10 的脱氮除磷能力较强, 具有生物脱氮除磷的工业化应用潜质。所建立的结合 S1 酶保护分析的分子探针技术的特异性和灵敏度良好, 有望应用于混菌体系中的假单胞菌的定性定量分析。

关键词: 脱氮除磷菌, 假单胞属, 定量检测, S1 酶保护分析, 16S rRNA

Screening and detecting of denitrifying phosphorus-removing *Pseudomonas* sp.

YANG Ji-Wei YANG Hai-Lin FENG Shou-Shuai LIANG Hong-Jie WANG Wu*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] We selected a strain with high capability of denitrifying and phosphorus removal. Besides we established an assay of sandwich hybridization with S1 nuclease protection to analyze the microbial community of this strain in fermentation process. [Methods] We used anaerobic culture in a phosphorus deficient medium, aerobic culture in a phosphorus-rich medium and nitrate-reducing experiment for bacterial isolation. Physiological and biochemical tests and 16S rRNA gene probing technique were used to identify the selected strain. A set of DNA probe was synthesized and used in quantification. [Results] The selected strain was identified as *Pseudomonas*

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021302)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918119; 信箱: wangwu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2013-12-30; 接受日期: 2014-02-21; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-26

sp. and named as LY10. The phosphorus removal rate of LY10 was 90.31% under aerobic condition in 24 hours, the denitrifying and phosphorus removal rate were 84.71% and 89.37%, respectively, under anoxic condition in 48 hours. Bacterial detection with the reported technique showed LY10 could be well identified from other strains such as *Commonas* with the probe Probe-P.sp. which was complementary to the conservative region of 16S rRNA of *Pseudomonas* genus. The cell density range was from 10^3 to 10^6 cells per milliliter and the equation was $y = -0.967\ 87 + 0.372\ 99x$ ($R^2 = 0.996\ 7$, $n = 5$).

[Conclusion] The selected strain showed strong activity on removing compounds with N and P, thus it can have potential application in industrial bio-denitrifying and phosphorus removal.

Keywords: Denitrifying phosphorus-removing bacteria, *Pseudomonas*, Quantitative detection, S1 nuclease protection assay, 16S rRNA

由水体中氮、磷过量引起的水体富营养化问题给环境和人类的生活带来了很大危害^[1]。如何降低水体的氮、磷含量及污水的脱氮除磷逐渐受到人们的重视。同时脱氮除磷微生物开始走进人们的视野: 2003 年, Koji 等^[2]分离出的高效脱氮除磷菌为假单胞属 (*Pseudomonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和寡营养单包属 (*Stenotrophomonas*); 2006 年, 王春丽等^[3]分离出一株肠杆菌属 (*Enterobacter*) 的高效脱氮除磷菌; 2009 年, 吕志堂等^[4]分离出丛毛单胞属 (*Comamonas*) 的高效脱氮除磷菌; 2010 年, 蔡天明等^[5]分离到的高效脱氮除磷菌为 *Pseudomonas grimontii*。脱氮除磷菌主要是指能够在缺氧条件下^[6-8], 以硝酸盐氮(NO_3^- -N)取代 O_2 作为电子受体^[9]进行除磷的一类细菌, 它们能够将脱氮和除磷这两个彼此独立的过程有机地结合在一起完成^[10]。本文依据 BTB 平板培养显蓝色、好氧除磷效果及硝酸盐还原产气等特点进行筛选。

在污水的生物除氮磷过程中, 功能菌群的数量会影响污水处理效果。国内外的研究主要集中在确定不同脱氮除磷工艺中脱氮除磷菌的种类^[11-13]方面, 主要采用的方法有: 荧光原位杂交^[14]、DGGE-PCR^[15]及活性污泥总 DNA 提取^[16]等方法。这些方法操作复杂, 费用较高并且定量效果不显著。本文尝试将结合 S1 酶保护分析的分子探针技术应用用于脱氮除磷假单胞菌的定量检测, 建立了假单胞菌的检测稀释标准曲线。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 污泥来源: 无锡硕放污水处理厂好氧池中取得污泥样。

1.1.2 培养基和检测试剂: (1) LB 培养基参照文献^[6]。(2) YG 培养基(g/L): 酵母浸膏 1.00, 葡萄糖 1.00, K_2HPO_4 0.30, KH_2PO_4 0.25, MgSO_4 0.20, pH 7.2–7.4 (固体培养基: 2%琼脂)。(3) BTB (溴百里酚蓝) 培养基(g/L): 琼脂 20.0, KNO_3 1.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, 丁二酸钠 8.5, BTB (1%溶于酒精) 1 mL, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 7.0–7.3。(4) 硝酸盐还原产气培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 5.0, KNO_3 1.0, pH 7.4。(5) 缺磷培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, CaCl_2 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, KCl 0.2, pH 7.0。(6) 富磷培养基(g/L): 葡萄糖 10.00, CaCl_2 0.20, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.00, KCl 0.20, KH_2PO_4 0.25, pH 7.0。(7) 反硝化聚磷培养基(g/L): 丁二酸钠 3.00, KNO_3 0.75, MgSO_4 0.50, KH_2PO_4 0.25, CaCl_2 0.20。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化: 吸取污泥样品 10 mL, 加入装有 90 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中, 加入玻璃珠若干, 28 °C、220 r/min 培养 2 h。取 1.0 mL 混合液于装有 9.0 mL 无菌水的试管中, 混匀, 制成浓度梯度为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 菌悬液。取各浓度菌悬液 0.1 mL 涂布于 YG 平板, 每个浓度做 3 个重复, 28 °C 培养 2–3 d。

挑取形态不同的单菌落在 YG 平板上划线纯化。将得到的单菌落接种于 LB 斜面 28 °C 培养 2 d 4 °C 保存。

1.2.2 菌株的筛选: (1) 从 LB 平板上挑取单菌落点接到 BTB 平板上, 28 °C 培养 2 d 后, 挑选周围培养基出现蓝色的菌株。(2) 将得到的菌株接种到缺磷培养基中进行厌氧培养, 挑选能够在厌氧条件下良好生长的菌株单菌落接种于富磷培养基中, 28 °C、170 r/min 培养 24 h, 检测上清液中的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 含量。(3) 将除磷能力好的菌株按 1% 接种量接种到装有 100 mL 反硝化聚磷培养基中, 28 °C、170 r/min 培养 2 d, 每 4 h 取培养后的菌液 8 000 r/min 离心 5 min, 分别测定上清液中总氮及总磷的含量, 上清液中氮磷含量均降低的菌株即为具备同时脱氮除磷能力的菌株。

1.2.3 分析方法: 总磷含量测定: 钼钼抗分光光度法; 总氮含量测定: 紫外分光光度法。

1.2.4 菌种的鉴定: (1) 形态观察: 菌落形态观察。(2) 生理生化鉴定: 参照文献[17-18]进行。(3) 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及结果分析: 以 LY10 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 5' 端引物为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 3' 端引物为 5'-TACCTTGTACGACTT-3'。扩增反应体系: ddH₂O 39.5 μL , 10 \times Taq 聚合酶反应缓冲液 5 μL , dNTPs (20 mmol/L) 1.0 μL , 5' 端引物 (25 pmol/L) 1.0 μL , 3' 端引物 (25 pmol/L) 1.0 μL , Taq DNA 聚合酶 (5 U/L) 0.5 μL , DNA 模板 2.0 μL , 总体积为 50 μL 。反应条件为: 94 °C 10 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送测序公司做基因测序。

1.2.5 假单胞菌的探针设计^[19]: 一组探针包括 S1 酶保护分析探针、捕获探针和信号探针 3 条寡核苷酸链。在 NCBI 中检索假单胞菌属菌株的 16S rRNA 基因序列信息, 将这些序列和 LY10 的测序结果进行同源性分析, 找到假单胞菌属 16S rRNA 基因序列中的保守片段, 经 BLASTn 比较后确定特异性好的保守片段, 设计出 S1 酶保护分析探针。

1.2.6 酶标板的包被与封闭: 将 2 g/mL 的 SA 加

入酶标板, 每孔 100 μL , 37 °C 温育 16 h, 至包被液完全干燥^[20]。用 PBS 洗 3 次。向包被好的微孔中加入 250 μL 封闭液, 37 °C、600 r/min 封闭 1 h。用含 0.5 % Tween-20 的 PBS 洗 3 次备用。

1.2.7 捕获探针的固定: 向制备好的酶标板微孔中加入 5 nmol/L 的捕获探针 100 μL , 37 °C、600 r/min 反应 2 h, PBS 洗 3 次备用。

1.2.8 细菌计数及裂解: 取培养到对数期的假单胞菌 LY10 培养液 14 mL 离心弃上清后, 加入 14 mL 裂解液 (80% Formamide, 450 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Na₂EDTA, 1% SDS, pH 6.4), 超声处理 (300 W, 50% 占空比, 10 s/10 s, 4 min)。处理后的样品 -20 °C 条件保存。

1.2.9 S1 酶保护分析: 取裂解液 27 μL 加入装有 3 μL S1 酶保护分析探针的离心管中, 每管加入 50 μL 石蜡油 94 °C 处理 15 min 后于 30 °C、600 r/min 杂交 1 h。向杂交液中加入 30 μL S1 酶 (60 U) 的 S1 酶缓冲液 (22.5 mmol/L ZnSO₄, 250 mmol/L NaAc, 1.4 mol/L NaCl, pH 4.5) 37 °C 处理 60 min。向 S1 酶处理后的混合液中加入 150 μL 终止液 (6.25 mmol/L NaOH, 35.98 mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O, 13.99 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O, 2.98 mmol/L EDTA, pH 7.2), 94 °C 处理 15 min。

1.2.10 夹心杂交: 取 1.2.9 中得到的混合液 100 μL 加入固定有捕获探针的微孔中反应 1 h (42.5 °C, 600 r/min), 用含 0.5% Tween-20 的 PBS 洗 4 次; 每孔加入 100 μL 含有 5 nmol/L 信号探针的缓冲液 (4 \times SSC, 10% Formamide, 0.02% SDS, pH 7.2) 反应 30 min (42.5 °C, 600 r/min) 后洗 4 次。每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的抗荧光素抗体 37 °C 反应 30 min 后洗 6 次; 每孔加入 100 μL TMB 显色液 (1 mmol/L TMB, 200 mmol/L 柠檬酸钾, pH 4.0, 3 mmol/L H₂O₂), 37 °C 处理 15 min 后, 每孔加入 50 μL 终止液 (2 mol/L H₂SO₄) 终止反应。测定 450 nm 和 630 nm 双波长吸光值。

1.2.11 探针 Probe-P.sp 的特异性验证实验: 按照 1.2.8 中的方法制备假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.

LY10)、丛毛单胞菌(*Commonas* sp.)、气单胞菌(*Aeromonas* sp.)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)的细胞裂解液。其中,菌株是 1.2.1 中分离得到的。菌液制备:从 LB 平板上挑取以上 6 种细菌的单菌落,接种到 LB 培养基中,28 °C、170 r/min 培养至对数期,此时细菌细胞浓度约为 10⁸ cells/mL。

1.2.12 假单胞菌检测稀释曲线的建立:取培养至对数期的 LY10 培养液,按照 1.2.8 中的方法制备细胞裂解液。用裂解液 5 倍稀释上述细胞裂解液,得到 8 个浓度梯度。按照 1.2.9 和 1.2.10 中的方法进行检测实验,其中每个梯度做 3 个平行。细菌细胞浓度采用血球平板计数法确定。

2 结果与分析

2.1 脱氮除磷菌的分离及筛选

从涂布污泥稀释样的 YG 平板上共分离出 144 个形态不同的菌落,不排除其中有相同的菌株。将这些菌株点接到 BTB 平板上培养 2 d 后,其中 49 个菌落周围培养基出现蓝色。将上述 49 株菌接种于缺磷平板进行厌氧培养 3 d,其中 10 株能够在厌氧环境下良好生长,将这 10 株分别命名为 LY1–LY10。分别挑取缺磷平板上 LY1–LY10 的单菌落接种在富磷培养基中,28 °C、170 r/min 培养 24 h 后测定各培养液上清中磷含量,结果如图 1 所示:其中 LY1、LY3 和 LY10 去除磷的能力较好,分别达到 90.41%、95.29%和 90.06%。

将上述 10 株菌进行硝酸盐还原产气实验,其

中 3 株结果为阳性,具有反硝化能力;7 株结果为阴性,不具备反硝化能力(表 1)。

综合除磷实验及硝酸盐还原实验,将 LY1、LY3 和 LY10 接种到反硝化聚磷培养基,测定其去除氮磷的能力,结果如表 2 所示。由表 2 可知,3 株菌都具备同时去除氮磷的能力,但是 LY10 同时去除氮磷的能力最好,分别达到 84.71%和 89.37%,可确定其为脱氮除磷菌。

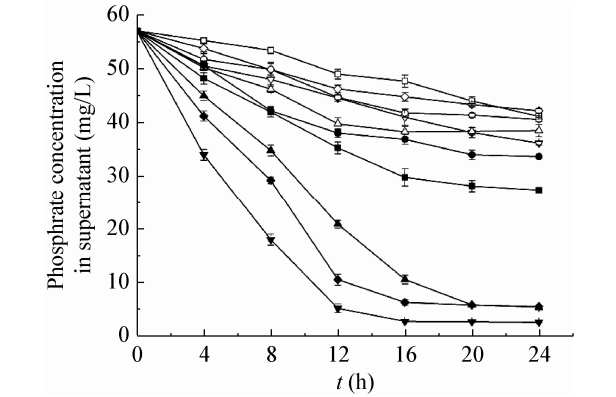


图 1 初选菌株除磷能力测定
Figure 1 Determination of phosphorus removal ability of primary strains
Note: ▲: LY1; ◆: LY2; ●: LY3; ▤: LY4; ⊕: LY5; ⊖: LY6; △: LY7; ⊗: LY8; ▼: LY9; ■: LY10.

表 1 硝酸盐还原产气实验结果 Table 1 Results of nitrate reduction test	
硝酸盐还原产气实验结果 Results of nitrate reduction test	菌株号 Strain number
阳性 Positive	LY1、LY3、LY10
阴性 Negative	LY2、LY4、LY5、LY6、LY7、LY8、LY9

表 2 反硝化聚磷培养实验结果 Table 2 Results of denitrifying phosphorus culture test						
菌株 Strain	上清液磷 Phosphate in supernatant			上清液硝酸盐 Nitrate in supernatant		
	起始浓度 Start concentration (mg/L)	结束浓度 End concentration (mg/L)	去除率 Removal rate (%)	起始浓度 Start concentration (mg/L)	结束浓度 End concentration (mg/L)	去除率 Removal rate (%)
LY1	58.45	10.57	81.98	106.28	45.54	60.74
LY3	58.45	4.56	92.11	106.28	36.33	65.81
LY10	58.45	6.21	89.37	106.28	16.25	84.71

2.2 脱氮除磷菌 LY10 的生理生化鉴定

菌株 LY10 在 LB 固体培养基上培养，菌落及革兰氏染色照片如图 2 所示。LY10 是革兰氏阴性菌，菌落为黄色圆形，表面光滑湿润，边缘整齐，有黏性。LY10 的生理生化鉴定结果如表 3 所示，生理特征与假单胞菌相符^[17-18]。

2.3 LY10 的 16S rRNA 基因序列分析及同源性比较

将测序结果在 NCBI 数据库中做 BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alignInfo>) 比对，发现它与假单胞菌属 *Pseudomonas* 的一致性最高，达到 99%。结合生理生化鉴定结果，可将 LY10 鉴定为假单胞菌属菌^[17-18]，通过 ClustalX 2 及 MEGA 4.0 软件建立系统发育树，结果如图 3 所示。

2.4 假单胞属 *Pseudomonas* 探针设计

按照 1.2.5 中探针的设计要求，假单胞属 *Pseudomonas* 的检测探针设计结果如表 4 所示，其中 Probe-P.sp 是 S1 酶保护分析探针，大小为 57 bp，GC 含量 50.9%，不含严重的二级结构；CP 为捕获探针，与 S1 酶保护分析的 3'末端互补，大小为 21 bp，GC 含量 42.9%，5'端标记生物素；SP 为信号探针，与 S1 酶保护分析探针的 5'端互补，大小为 20 bp，GC 含量 45.0%，3'端标记荧光素。

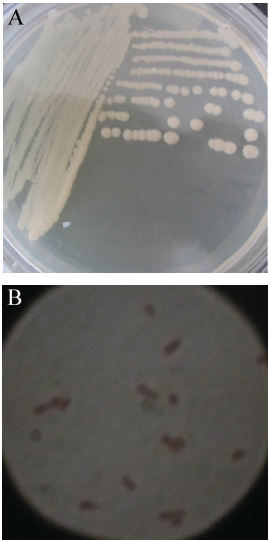


图 2 菌株 LY10 的菌落(A)和革兰氏染色(B)照片
Figure 2 Photos of strain LY10 colonies (A) and Gram staining (B)

表 3 菌株的生理生化特征 Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain		
指标 Indexes	结果 Results	
革兰氏染色 Gram test	—	
甲基红 Methyl red	—	
Vopes-prokauer test	—	
明胶液化 Gelatin liquidized	—	
氧化酶 Oxidase	+	
接触酶 Catalase	+	
赖氨酸脱羧基 Lysine	—	

2.5 假单胞菌探针 Probe-P.sp 特异性验证实验结果

按照 1.2.9、1.2.10 和 1.2.11 中的方法进行实验，每种菌做 3 个平行，空白对照用不添加任何菌液的裂解液。假单胞菌探针 Probe-P.sp 的特异性验证实验结果如图 4 所示。其中 Sample1–7 分别是 LY10、*Aeromonas* sp.、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Acinetobacter* sp.、*Comamonas* sp.和空白对照。加有假单胞菌 LY10 的孔显色明显， $OD_{450/630}$ 值超过 2.2，而加有其它属菌的孔显色不明显， $OD_{450/630}$ 值与空白对照相当，不超过 0.25；血球板计数结果显示除空白对照孔外，每孔细菌细胞浓度均达到 10^7 cells/mL。说明探针能够很好地区分假单胞菌与实验中的其它 5 种菌，具有良好的特异性。图 5 是探针 Probe-P.sp 序列与 LY10 及其它 5 株细菌 16S rRNA 基因序列比对图。

2.6 分子探针检测假单胞菌菌属(以 LY10 为例)

为了能够定量检测水样中假单胞菌，首先要建立其稀释标准曲线。本文采用 5 倍逐级稀释 LY10 细胞裂解液，按照 1.2.12 中的步骤及条件进行实验，得到如图 6 所示的稀释曲线。从图中可以看出，菌的数量在 10^3 – 10^6 量级时线性较好，线性方程为 $y=-0.967\ 87+0.372\ 99x$ ($R^2=0.996\ 7$ ， $n=5$)。

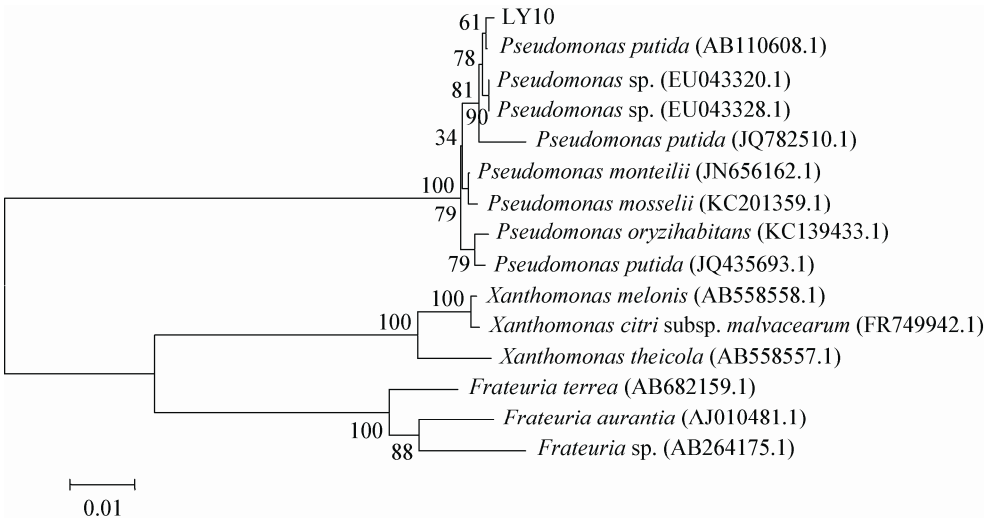


图 3 基于 16S rRNA 基因构建的 LY10 系统发育树
Figure 3 16S rRNA gene-based phylogenic tree of LY10

表 4 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> 探针 Table 4 Probes for <i>Pseudomonas</i>			
探针名称 Probe name	序列 Sequence (5'→3')	长度 Length (bp)	GC%
Probe-P.sp	cggctagttgacatcggttacggcgtggactaccagggtatctaatcctgtttgctc	57	50.9
CP	Biotin-gagcaaacaggattagatacc	21	42.9
SP	Fluorescein-taaacgatgtcaactagccg	20	45.0

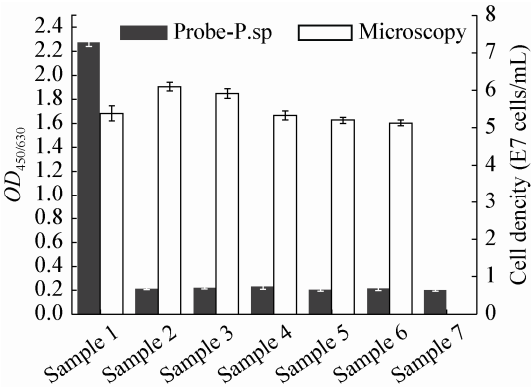


图 4 假单胞菌探针 Probe-P.sp 特异性验证
Figure 4 Specificity of Probe-P.sp of *Pseudomonas*

3 结论

(1) 从城市污水处理厂好氧池的污泥样中，筛选到一株能够高效脱氮除磷的细菌 LY10，经生理生化鉴定和 16S rRNA 基因序列同源性分析，将菌株 LY10 鉴定为假单胞属(*Pseudomonas* sp.)。

(2) LY10 在反硝化聚磷培养基中培养 48 h 后，培养基上清液中总氮含量从 106.28 mg/L 下降到 16.25 mg/L，脱氮率达 84.71%；培养基上清液中总磷含量从 58.45 mg/L 下降到 6.21 mg/L，除磷率为 89.37%。结果表明，LY10 具有高效脱氮除磷能力，具备制成脱氮除磷菌制剂的潜质。

(3) 本文尝试将结合 S1 酶保护分析的分子探针技术用于假单胞菌属的定量分析，结果发现：探针 Probe-P.sp 能够很好地将假单胞菌 LY10 与丛毛单胞属(*Commonas* sp.)等 5 种细菌区分开，具有较好的特异性及定性效果。

(4) 当 LY10 的细胞密度在 10^3 – 10^6 cells/mL 时，检测信号强度与细菌细胞个数的自然对数成线性关系，线性方程为 $y=-0.967\ 87+0.372\ 99x$ ($R^2=0.996\ 7$ ， $n=5$)，表明该方法可用于假单胞菌的定量分析。

1. GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTGATTGGAG
 2. GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTGACTTGGAG
 3. GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTT
 4. GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCG
 5. TACTGAGTCAAGTTAAGACCCAACAACAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAG
 6. GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCG
 7. GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCG

图5 探针 Probe-P.sp 序列与其他细菌 16S rRNA 基因序列比对图

Figure 5 The blasted result between probe Probe-P.sp and other bacterial target 16S rRNA region

Note: 1: *Aeromonas* sp.; 2: *Escherichia coli*; 3: *Bacillus subtilis*; 4: *Acinetobacter* sp.; 5: *Comamonas* sp.; 6: LY10; 7: Probe-P.sp. The black background represent the mismatch sites with the probe NPA-P.sp.

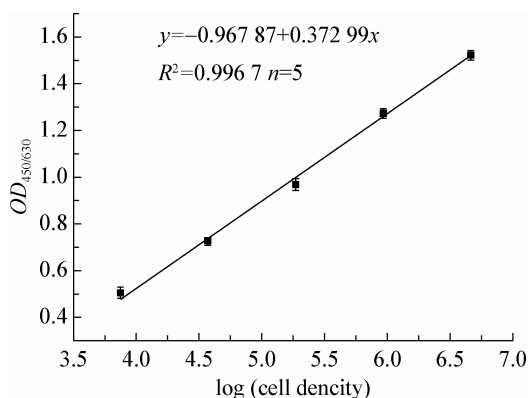


图6 逐级稀释获得的检测曲线

Figure 6 Detection curve obtained by serial dilution

参考文献

- [1] 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[J]. 应用与环境微生物学报, 2005, 11(2): 222-225.
- [2] Koji H, Takahiro K. Isolation of the denitrifying phosphate-accumulating organisms using alternating anaerobic-anoxic screening method [J]. Environment Engineering Research, 2003, 40(1): 53-61.
- [3] Shi HP, Lee CM. Combining anoxic denitrifying ability with aerobic-anoxic phosphorus-removal examination to screen denitrifying phosphorus-removing bacteria[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2006, 57: 121-128.
- [4] 王春丽, 马放, 刘慧, 等. 反硝化聚磷菌株分离筛选方法的研究[J]. 吉林建筑工程学院学报, 2006, 23(3): 5-8.
- [5] 吕志堂, 季翠平, 苏强, 等. 3株反硝化聚磷菌的分离与鉴定[J]. 环境工程学报, 2009, 3(8): 1045-1048.
- [6] 蔡天明, 陈立伟, 吴守中, 等. 1株脱氮除磷菌的筛选及其特性研究[J]. 环境科学, 2010, 31(10): 2487-2492.
- [7] Lee DS, Jeon CO, Park JM. Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system[J]. Water Research, 2011, 35(16): 3968-3976.
- [8] Ahn J, Daidou T, Tsuneda S. Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated

under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay[J]. Water Research, 2002, 36: 403-412.

- [9] Johwan A, Tomotaka D, Satoshi T, et al. Metabolic behavior of denitrifying phosphate-accumulating organisms under nitrate and nitrite electron acceptor conditions[J]. Bioscience & Bioengineering, 2001, 92(5): 442-446.
- [10] Hu JY, Ong SL, Ng WJ, et al. A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors[J]. Water Research, 2003, 37(14): 3463-3471.
- [11] Satoshi T, Takashi O, Koichi S, et al. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal using denitrifying phosphate-accumulating organisms in a sequencing batch reactor[J]. Biochemical Engineering, 2006, 27: 191-196.
- [12] Wachtmeister A, Kuba T, Van Loosdrecht MCM, et al. A sludge characterization assay for aerobic and denitrifying phosphorus removing sludge[J]. Water Research, 1997, 31(3): 471-478.
- [13] Hemant JP, Atya K, Aditi A, et al. A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants[J]. Microbiological Methods, 2003, 52: 315-323.
- [14] Mamoru K, Hideo T, Takahiro K, et al. *In situ* identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotided probes and 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration[J]. Water Research, 1998, 33(1): 257-265.
- [15] 王峰, 傅以钢, 夏四清, 等. PCR-DGGE 技术在城市污水化学生物絮凝处理中的特点[J]. 环境科学, 2004, 25(6): 74-79.
- [16] 郭劲松, 黄天寅, 龙腾锐. 生物脱氮除磷工艺中微生物及其相互关系[J]. 环境污染治理技术与设备, 2000, 1(1): 8-15.
- [17] 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.
- [18] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [19] 甄毓. 双特异分子探针技术的建立及对十二种常见赤潮藻的检测[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2006.
- [20] 刘宾, 汤汉文, 魏华琳, 等. 酶联反应板包被链霉亲和素的优化方法[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(2): 137-139.