

脱氮硫杆菌的检测方法及应用研究进展

王诣婧

(福建工程学院 生态环境与城市建设学院, 福建 福州 350118)

摘要: 脱氮硫杆菌作为自养反硝化菌的代表菌种, 由于其不同于常规废水脱氮的异养反硝化过程可节省碳源而得到关注。文章介绍脱氮硫杆菌的反硝化功能基因和主要的硫氧化功能基因, 分析自养反硝化菌的群落分布特征, 对目前脱氮硫杆菌的检测方法和应用现状进行综述, 讨论目前研究中存在的问题及今后的研究趋势, 以期为进一步研究自养反硝化菌群落结构提供参考。

关键词: 脱氮硫杆菌; 功能基因; 自养反硝化菌; 检测

中图分类号: X703

文献标志码: A

文章编号: 1672-4348(2016)03-0249-06

Progress of detection methods and applications of *Thiobacillus denitrificans*

Wang Yijing

(College of Eco-Environment and Urban Construction, Fuzhou 350118, China)

Abstract: *Thiobacillus denitrificans*, a representative autotrophic denitrifying bacteria which is different from heterotrophic denitrifiers, has drawn increasing attention. The denitrifying functional genes and key genes putatively associated with sulfur-compound oxidation in *T. denitrificans* were described. The character of the colony distribution (community structure) of NR-SOB was analysed. The detection measures and the application state of *T. denitrificans* in wastewater field were reviewed. Issues to be resolved in the present research were discussed along with the prospects (trend) of the future study.

Keywords: *Thiobacillus denitrificans*; functional gene; autotrophic denitrifiers; detection

1904 年, Beijerinck 首先分离得到脱氮硫杆菌 (*Thiobacillus denitrificans*), 脱氮硫杆菌是以硝酸盐为电子受体, 以各种类型的含硫化合物为电子供体 (nitrate-reducing, sulfide-oxidising bacteria, NR-SOB) 进行生长的自养型反硝化菌。研究参与这一过程的微生物对于废水生物脱氮、去除高浓度 S^{2-} 废水及减少碳源投加降低反硝化的运行成本均有重要意义。

本文从脱氮硫杆菌这一典型的自养反硝化微生物入手, 主要介绍了其氧化硫还原氮的功能基因及其在废水处理中的研究进程, 并和其他 NR-SOB 在环境样品中的分布进行了比较。以脱氮

硫杆菌作为模型菌, 收集基础资料, 为自养反硝化微生物进行较为深入全面的研究打下基础。

1 脱氮硫杆菌的基本生理特性及代谢特征

目前证实的硫杆菌属有 8 种, 分别为脱氮硫杆菌 (*Thiobacillus denitrificans*)、排硫硫杆菌 (*Thiobacillus thioparus*)、那不勒斯硫杆菌 (*Thiobacillus naples*)、氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*)、新型硫杆菌 (*Thiobacillus novellas*)、中间硫杆菌 (*Thiobacillus intermedius*)、代谢不全硫杆菌 (*Thiobacillus perometabolis*)。在硫杆菌属中,

只有脱氮硫杆菌具有在缺氧条件下反硝化的能力。脱氮硫杆菌属于革兰氏阴性变形菌的β亚纲,短杆状,长 $0.5\times(1.0\sim3.0)\mu\text{m}$,具有单根极生鞭毛,专性自养,兼性厌氧。可在 $10\sim37\text{℃}$, $\text{pH}4.0\sim9.5$ 的条件下生长,最适生长温度为 $28\sim30\text{℃}$,最适 pH 为 $6.5\sim7.0$ 。

在硫循环体系中,好氧条件下,脱氮硫杆菌以氧为电子受体氧化硫化化合物(如 $\text{HS}^- \rightarrow \text{S}_0$, $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-}/\text{SO}_3^{2-}/\text{SO}_4^{2-}$, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$, $\text{SO}_3^{2-} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$),从中获得能量^[1]。缺氧条件下,脱氮硫杆菌以反硝化的方式同时参与硫、氮循环,表 1 列出了脱氮硫杆菌在缺氧条件下氧化各种形态的硫同时以硝酸盐作为电子受体获取能量的反应。

表 1 不同硫源的反硝化反应

Tab.1 Denitrification reaction of different surphuric sources	
电子供体	计量反应方程式
HS^-	$5\text{HS}^- + 8\text{NO}_3^- + 3\text{H}^+ \longrightarrow 5\text{SO}_4^{2-} + 4\text{N}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$
S	$5\text{S} + 6\text{NO}_3^- + 4\text{OH}^- \longrightarrow 5\text{SO}_4^{2-} + 3\text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	$5\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 8\text{NO}_3^- + 2\text{OH}^- \longrightarrow 10\text{SO}_4^{2-} + 4\text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$
SO_3^{2-}	$5\text{SO}_3^{2-} + 2\text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 5\text{SO}_4^{2-} + \text{N}_2 + 2\text{OH}^-$

2 脱氮硫杆菌的功能基因

目前,脱氮硫杆菌基因测序工作已经完成。脱氮硫杆菌具有完成反硝化全过程的 4 个关键的还原酶(图 1):硝酸盐还原酶(nitrate reductase, Nar)、亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, Nir)、氧化氮还原酶(nitric oxidereductase, Nor)和氧化亚氮还原酶(nitrous oxide reductase, Nos),相应编码基因分别为 nar、nir、nor、nos。其中,膜结合硝酸盐还原酶由 nar 基因簇 narKK₂GHJI(Tbd1401-1406)编码。自然界中存在两种亚硝酸盐还原酶,即由 nirK 编码的 Cu 型亚硝酸盐还原酶和由 nirS 编码的细胞色素 cd1 型亚硝酸盐还原酶,通常这两种基因不会同时存在于一个菌株内,而 nirS 基因相对更广泛地存在于反硝化细菌菌株中^[2],脱氮硫杆菌即属于此范畴。编码一氧化氮还原酶有 2 个基因簇,RT-qPCR 的分析结果显示 norCB(Tbd0562-Tbd0561)的基因表达水平比 norCB(Tbd0822-Tbd0823)高 50 倍之多,因此前者在还原 NO 过程中具有更重要的作用。低表达

基因 Tbd0822 所合成的酶 NorC 比高表达基因 Tbd0562 所合成的酶的碳末端氨基酸残基多了 120 个^[3],这可能是造成两种基因虽具有相同功能基因簇却有不同表达水平的原因。

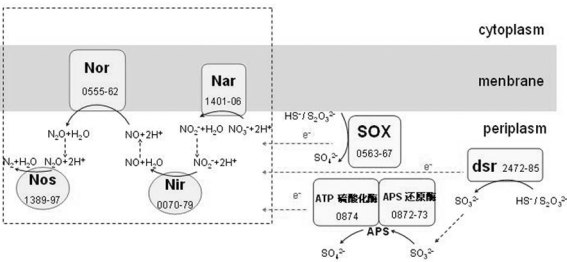


图 1 脱氮硫杆菌脱氮脱硫相关功能酶作用机制简图
Fig.1 The mechanism schematic of the desulfuration and denitrification functional enzymes of Thiobacillus denitrificans

一般认为,在好氧条件下,氧气会抑制反硝化还原酶的活性,相对于其他 3 个反硝化还原酶(Nar, Nir, Nor),Nos 对氧气最为敏感^[4],因此将 N₂O 还原成 N₂常成为反硝化全过程的限制步骤。在缺氧状态下,反硝化还原酶功能基因都呈现上调状态。Harry R. Beller 等人^[5]利用反转录定量 PCR(polymerase chain reaction)证实了脱氮硫杆菌反硝化基因表达水平的相对上调强度顺序为 nar>nir>nor>nos。有趣的是,脱氮硫杆菌的 nos 基因在反硝化状态下上调水平极不明显,尤其是 nosZ 基因在好氧和厌氧状态下均呈现出较高的表达水平,这与在其他反硝化菌株中观察到的现象不一致^[6-7]。

脱氮硫杆菌中与硫化物氧化有关的基因多达 50 多种,主要有 sox 基因,dsr 基因和依赖 AMP 将硫化物氧化成硫酸盐的相关基因(如 APS 还原酶、ATP 硫酸化酶等)。

自然界中硫氧化细菌采用 2 种途径氧化硫化物:一种是在多酶复合物参与下,将还原态硫完全催化氧化成硫酸盐(Sox 途径);另一种是在氧化过程中,亚硫酸盐或单质硫作为中间产物,形成颗粒态的硫单质。若硫氧化菌 sox 基因簇含有 soxCD,则只能利用 Sox 途径,不形成单质硫^[8],如与脱氮硫杆菌同样具有脱氮氧化硫功能的脱氮硫微螺菌(Thiomicrospira denitrificans)^[9]即属于此类硫氧化菌。对于脱氮硫杆菌而言,其基因簇 soxXYZAB 不含 soxCD,因此可以同时利用两条途

径进行硫化物氧化(图1)。*soxB*是参与催化硫氧化途径一系列酶的重要组成,它是氧化硫代硫酸盐的多酶复合物,在反应中心包含一个非巯基的锰簇和一个二价锰的活性位点,催化与半胱氨酸结合的硫代硫酸盐转化成硫酸盐并从结合的蛋白上释放出来。

3 脱氮硫杆菌的检测

早期脱氮硫杆菌的检测方法采用最大可能菌数计数法,刘玲花等人^[10]测量硫/石灰石滤柱滤料上脱氮硫杆菌的活菌数为 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL,异养反硝化菌为脱氮硫杆菌的1/10。但在自然界中可培养的微生物仅占微生物总数的1%,因此该方法具有较大的误差和局限性。

对16S rRNA基因进行特异扩增后对核苷酸序列进行测定,并与已知菌种16S rRNA进行比较,以此进行的微生物鉴定是目前比较准确的方法之一。赵阳国等人^[11]在脱氮硫杆菌16S rRNA基因V3可变区中发现一条27bp的特异序列设计反向引物Thi-d,以16S rRNA基因通用引物BSR8/20为正向引物进行PCR扩增和引物特异性评价,证实该引物的高度专一性。Zhang M等人^[12]针对脱氮硫杆菌16s rDNA设计了有高度特异性的引物T-De-F(AAACGGTACGCGCTAACA)和T-De-R(TTGCTTAATAATCCGCCTG)。Nuria Fernandez等人^[13]基于16s rDNA设计了寡核苷酸探针TBD1419(ACCTCTGCCAGATTCCAC)用于检测脱氮硫杆菌,TBD121(CTCGGTACGTTCCGACGC)用于检测脱氮硫杆菌和排硫杆菌,TMD131(TCCCAGTCTTTGAGGTAC)用于检测*Thiomicrospira denitrificans*。

脱氮硫杆菌*sox*基因簇与其他硫氧化菌的相似性范围在28%~55%之间。在*sox*基因簇中,*soxB*是唯一可以用来比较 α 、 β 和 γ 变形菌纲之间亲缘关系的目的片段^[14]。有文献报道就利用引物对*soxB*693FK39:*soxB*1164B^[15]和*soxB*693F:*soxB*1446^[16]检测到脱氮硫杆菌,并绘制出基于硫氧化功能基因构建的进化树。

4 脱氮硫杆菌在废水处理中的应用

废水脱氮的常规方法是生物硝化处理后再进行异养反硝化,在处理过程中常因缺少电子供体而额外投加适量有机物如甲醇维持异养反硝化,

而脱氮硫杆菌作为严格自养兼性菌可利用硫化物作为电子供体获取能量,同时还还原硝酸盐为氮气实现反硝化。

脱氮硫杆菌存在于土壤、泥土、淡水和海洋沉积物、市政污水、工厂污水处理池和消化池中。从厌氧污泥中筛选出的脱氮硫杆菌具有良好的生长繁殖和反硝化能力。底泥富集的菌株相比湖水、土壤也有较好的反硝化效果^[17]。值得一提的是,理化因素如pH、温度、硝酸盐浓度、搅拌速度等会影响菌体生长和反硝化效果^[18-19]。

目前关于硫磺/石灰石自养反硝化系统的研究比较多。Tian C Z等人^[20]研究发现,当硫磺和石灰石的体积比为3:1时,脱氮硫杆菌自养反硝化反应体系达到最佳状态。硫化物浓度和 S^{2-}/NO_3^- 是影响脱氮除硫效率的关键因素,控制硫化物浓度小于300 mg/L以及 S^{2-}/NO_3^- 比值在5/3~5/2范围内,可以达到较好的脱硫和反硝化效果^[21-22]。刘玲花等人利用SLAD系统去除地下水中硝酸盐,出水 $NO_3^- - N$ 含量为0.03 mg/L,去除率达到98%^[10]。Koenig利用自养反硝化系统处理 $NO_3^- - N$ 浓度高达400 mg/L的垃圾渗滤液,当水力停留时间为5.17 h时氮去除率接近100%^[23]。脱氮硫杆菌由于自身基因,可以根据调控硫化物与硝酸盐的比例来决定最终生成硫单质或者硫酸盐。

需要注意的是,接种脱氮硫杆菌的上流式厌氧污泥床(up-flow anaerobic sludge bed, UASB)反应器长期运行中发现颗粒污泥有解体的趋势^[13,24],因此需进一步优化运行条件防止污泥上浮,否则将限制脱氮硫杆菌作为工程菌投入实际运行。

5 脱氮硫杆菌反应器自养反硝化菌群落结构分析

观察人为控制的自养反硝化反应器中群落发展变化也是近年来的研究方向之一。常玉梅等人^[25]在对北京污水厂活性污泥强化自养反硝化菌的研究中,以硫磺作为电子供体进行驯化培养,观察污泥中的群落结构变化,结果发现污泥的增率为0.177 g/(L·d),污泥中细菌类群主要为 β -变形菌纲、 δ -变形菌纲、 γ -变形菌纲和未分类细菌,其中 β -变形菌纲类细菌占主导地位。在成熟的反硝化污泥中,*Thiobacillus denitrificans*所占

比例达 48.65%。Nuria Fernandez 等人^[13]将产甲烷颗粒污泥接种到 UASB 中观察化能自养反硝化污泥群落结构的动态变化。在成熟的反硝化反应器中确认 α 、 β 、 γ -变形菌是优势菌种。脱氮硫杆菌从接种初期占全部染色细胞的 1% 增长到 35%, 从初期没有分离到克隆子增长到占总克隆子数的 15%, 而 *Thiomicrospira denitrificans* 在污泥中仅有很小一部分, 占染色细胞的 4%。上述研究结果表明, 在利于自养反硝化菌生长的条件下, 在系统稳定后, 脱氮硫杆菌均能成为优势菌种, 但同时其数量仅占细菌总数 40% 左右, 这说明脱氮硫杆菌作为工程菌的效率还有提高的空间。

在以硫源为电子供体的自养反硝化反应器中, *Thiobacillus denitrificans* 和 *Thiomicrospira denitrificans* 是最常见的 NR-SOB, 此外 NR-SOB 还包括 *Arcobacter* sp., *Thiohalophilus thiocyanoxidans*, *Sulfuricurvum kujiense*, *Thiosphaera pantotropha*, *Sulfurimonas paralvinellae* 和 *Thiomicrospira* sp. CVO 等。*Thiomicrospira* sp. CVO 既能以 CO_2 为碳源、硫化物为电子供体进行自养生长, 也能以有机碳为碳源和电子供体进行异养生长。*Thiomicrospira denitrificans* 和 *Thiomicrospira* sp. CVO 同属于 ϵ 变形菌纲, 不同之处在于 *Thiomicrospira denitrificans* 通过 sox 途径将硫化物氧化成硫酸盐, 没有硫单质的生成, 而 *Thiomicrospira* sp. CVO 将硫化物氧化成单质硫和硫酸盐取决于硫化物和硝酸盐的比率^[26]。*Sulfuricurvum kujiense* 在厌氧条件下反硝化的反应方程是 $\text{S}^{2-} + 4\text{NO}_3^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 4\text{NO}_2^-$, 该菌不能生长在海洋中。*Thiohalophilus thiocyanoxidans* 是从内陆盐湖中分离出来的第一株嗜盐的自养反硝化菌, 但当硝酸盐含量高于 4~5 mmol/L 时其生长也会被抑制。在海洋沉积物样品中检测到 *Thiomicrospira denitrificans* 和 *Thiohalophilus thiocyanoxidans* 为主要的自养反硝化菌群, 没有检测到脱氮硫杆菌^[27]。虽然脱氮硫杆菌固定 CO_2 的能力是 *Thiomicrospira denitrificans* 的两倍, 但在特定环境中, 仍有未知的因素, 如底物的亲和性、高盐度的耐受性, 影响两者的竞争生长。也有文献指出^[28], 脱氮硫杆菌对高盐度环境的适应性不强, 如当 SO_4^{2-} 浓度超过 250 mmol/L 时, 由于总离子强度的升高, 其生长将受到抑制。在 UASB 反应器中, 虽然脱氮硫杆菌与 *Thiomicrospira denitrificans* 竞争相同的底物和电

子受体, 但是前者数量超出后者许多^[24]。可能的原因在于 *Thiomicrospira denitrificans* 是海洋细菌, 在反应器盐度较低的环境中, 由于其碳同化效率仅为脱氮硫杆菌的一半而处于竞争中的弱势。因此, 在一般自养反硝化反应器中, 脱氮硫杆菌为优势菌种, 几乎不存在 *Thiomicrospira denitrificans*, 而在海洋沉积物等高盐浓度的环境中, 有 *Thiomicrospira denitrificans* 而不能检测到脱氮硫杆菌。

6 存在的问题

基于 16S rRNA 绘制的系统进化树可以比较亲缘相近的菌种^[29], 但不能鉴定环境中具有某一特定生理特性的一类微生物, 因此利用 16S rRNA 测序的方法研究自养反硝化菌存在困难。反硝化菌不能按传统的分类学方法被划分为某些特定种群, 即脱氮显型不能从系统发育进行推断。如 *Thiobacillus denitrificans* 和 *Thiobacillus thioparus* 同属于硫杆菌属, *Thiobacillus thioparus* 的 16S rRNA 与 *Thiobacillus denitrificans* 有高达 98% 的相似度^[30], 二者都能利用无机硫化物进行化能自养生长, 但 *Thiobacillus thioparus* 没有反硝化功能。与相对保守的 16S rRNA 相比, 功能基因的序列变化丰富, 可以利用功能基因鉴定生态功能相同但亲缘较远的微生物种群, 如反硝化菌^[31]。目前, 根据 4 种反硝化功能基因设计引物调查种群多样性的工作已展开。以 nirS 基因为例, Gesche Braker 等人^[32]根据 nirS 基因 6 个相对保守的区域设计的引物对 nirS1F-nirS6R 已成功应用于多种环境样品^[33]。Throbäck 等人^[34]评价了多对 nirS 基因引物后指出应用 cd3aF : R3cd 能鉴定出更多种类的反硝化菌。然而, 在各种环境样品反硝化菌种群多样性的分析中均没有看到利用功能基因检测到脱氮硫杆菌的报道, 可能的原因是脱氮硫杆菌的反硝化功能基因同其他反硝化菌的相似性低, 一般功能基因的通用引物难以有效地识别脱氮硫杆菌的目的片段。同样地, 鉴定自养反硝化菌群群落结构的瓶颈也在于寻找该类菌种的通用引物。黎乾等人^[35]以功能基因 nirS 为分子标记考察了 4 次回灌过程中反应器内反硝化微生物群落结构变化, 结果表明, 4 次回灌反应器内的反硝化微生物大部分与 β -变形菌纲细菌相似, 少数属于非培养微生物 (uncultured bacteria), 其中, 脱氮硫杆菌和甲基苯反硝化降解菌 (*Azoarcus*

tolulyticus) 是反硝化过程的主要功能微生物。通过标记功能基因反映 NR-SOB 的多样性和数量,这对于实际废水处理的工程应用具有重要意义。这类功能菌基因保守区域相似性比较有待进一步研究,以期开发出能识别脱氮氧化硫这一特殊微生物类群的引物或探针。

7 结语

从部分反应器运行数据看来,脱氮硫杆菌虽然为优势菌种,但这种杆菌占全部活菌数的比重还有较大的提高空间。对工程应用而言,通过分

离出活性更高、脱氮稳定性更好的高效工程菌株,优化反应器参数条件等手段提高反硝化率是下一步工作的重点。对于自养反硝化菌分子生态学分析而言,基于 16S rRNA 技术定性定量分析自养反硝化菌群落结构和分布特征的工作已经展开。功能基因数据库的建设是反硝化群落分子生态学研究最基础的需要,今后的研究可以利用脱氮硫杆菌作为模型菌,进一步研究基于 NR-SOB 功能基因的自养型反硝化菌的群落结构演替,对丰富自养型反硝化菌群落生态认识有积极意义,同时也为该功能菌的工程化应用提供科学依据。

参考文献:

- [1] Hosono T, Alvarez K, Lin I T, et al. Nitrogen, carbon, and sulfur isotopic change during heterotrophic (*Pseudomonas aureofaciens*) and autotrophic (*Thiobacillus denitrificans*) denitrification reactions[J]. Journal of Contaminant Hydrology, 2015 (183):72-81.
- [2] Yoshie S, Noda N, Tsuneda S, et al. Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(5):3152-3157.
- [3] Beller H R, Chain P S G, Letain T E, et al. The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(4):1473-1488.
- [4] Richardson D, Felgate H, Watmough N, et al. Mitigating release of the potent greenhouse gas N_2O from the nitrogen cycle—could enzymic regulation hold the key? [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(7):388-397.
- [5] Beller H R, Letain T E, Chakicherla A, et al. Whole-genome transcriptional analysis of chemolithoautotrophic thiosulfate oxidation by *Thiobacillus denitrificans* under aerobic versus denitrifying conditions[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(19):7005-7015.
- [6] Honisch U, Zumft W G. Operon structure and regulation of the nos gene region of *Pseudomonas stutzeri*, encoding an ABC-type ATPase for maturation of nitrous oxide reductase[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(6):1895-1902.
- [7] Baumann B, Snozzi M, Zehnder A J B, et al. Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(15):4367-4374.
- [8] Welte C, Hafner S, Kratzer C, et al. Interaction between Sox proteins of two physiologically distinct bacteria and a new protein involved in thiosulfate oxidation[J]. FEBS Letters, 2009, 583(8):1281-1286.
- [9] Sievert S M, Scott K M, Klotz M G. Genome of the epsilonproteobacterial chemolithoautotroph *Sulfurimonas denitrificans* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(4):1145-1156.
- [10] 刘玲花,王占生,王志石.硫/石灰石滤柱去除地下水中硝酸盐的研究[J].环境工程,1995,13(3):11-15.
- [11] 赵阳国,王爱杰,任南琪,等.脱氮硫杆菌特异引物/探针的设计和评价[J].微生物学通报,2009,36(5):652-657.
- [12] Zhang M, Zhang T, Shao M F, et al. Autotrophic denitrification in nitrate-induced marine sediment remediation and *Sulfurimonas denitrificans*-like bacteria[J]. Chemosphere, 2009, 76(5):677-782.
- [13] Fernandez N, Sierra-Alvarez R, Field J A, et al. Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge[J]. Chemosphere, 2008, 70(3):462-474.
- [14] Petri R, Podgorsek L, Imhoff J F. Phylogeny and distribution of the soxB gene among thiosulfate-oxidizing bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 197(2):171-178.
- [15] Krishnani K K, Gopikrishna G, Pillai S M, et al. Abundance of sulphur-oxidizing bacteria in coastal aquaculture using soxB gene analyses[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(9):1290-1301.
- [16] Meyer B, Imhoff J F, Kuever J. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the soxB gene among sulfur-oxidizing bacteria evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(12):2957-2977.

- [17] 牛建敏, 李睿华. 不同环境中脱氮硫杆菌的分离、培养及其去除硝酸盐的研究[J]. 环境工程, 2009, 27(S1): 226-229.
- [18] 贡俊, 张肇铭, 王玉芬, 等. 一株高效脱硫菌的分离鉴定和脱硫特性研究[J]. 环境工程学报, 2009, 3(11): 2031-2036.
- [19] 牛建敏, 李睿华. 理化因素对脱氮硫杆菌自养反硝化的影响[J]. 中国环境科学, 2010, 30(1): 76-81.
- [20] Tian C Z, David G L. Sulfur; limestone autotrophic denitrification processes for treatment of nitrate contaminated water: batch experiments[J]. Water Research, 1999, 33(3): 599-608.
- [21] Wang Aijie, Du Dazhong, Ren Nanqi, et al. An innovative process of simultaneous desulfurization and denitrification by *Thiobacillus denitrificans*[J]. Environmental Science and Health, 2005, 40(10): 1939-1949.
- [22] 王爱杰, 杜大仲, 任南琪. 脱氮硫杆菌同步脱硫反硝化技术的关键因素研究[J]. 地球科学进展, 2004, 19(S1): 533-536.
- [23] Koenig A, Liu L H. Autotrophic denitrification of landfill leachate using elemental sulphur[J]. Water Science Technology, 1996, 34(5/6): 469-476.
- [24] Sanchez I, Fernandez N, Amils R, et al. Assessment of the addition of *Thiobacillus denitrificans* and *Thiomicrospira denitrificans* to chemolithoautotrophic denitrifying bioreactors[J]. International Microbiology, 2008, 11(3): 179-184.
- [25] 常玉梅, 杨琦, 郝春博, 等. 城市污水厂活性污泥强化自养反硝化菌研究[J]. 环境科学, 2011, 32(4): 1210-1216.
- [26] Gevertz D, Telang A J, Voordouw G, et al. Isolation and characterization of strains CVO and FWKO B, two novel nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria isolated from oil field brine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2491-2501.
- [27] Shao Mingfei, Zhang Tong, Herbert H, et al. Autotrophic denitrification and its effect on metal speciation during marine sediment remediation[J]. Water Research, 2009, 43(12): 2961-2968.
- [28] 冯策, 暴海霞, 郎序菲, 等. 脱氮硫杆菌的生物学特性及应用研究进展[J]. 金属世界, 2009(S1): 80-82.
- [29] Wang C, Xie B, Han L, et al. Study of anaerobic ammonium oxidation bacterial community in the aged refuse bioreactor with 16S rRNA gene library technique[J]. Bioresource Technology, 2013, 145(4): 65-70.
- [30] Boden R, Cleland D, Green P N, et al. Phylogenetic assessment of culture collection strains of *Thiobacillus thioautotrophicus*, and definitive 16S rRNA gene sequences for *T. thioautotrophicus*, *T. denitrificans*, and *Halothiobacillus neapolitanus*[J]. Arch Microbiol, 2012, 194(3): 187-195.
- [31] 梁丽华, 左剑恶. 反硝化功能基因—检测反硝化菌种群结构的分子标记[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 627-633.
- [32] Braker G, Fesefeldt A, Witzel K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3769-3775.
- [33] 方芳, 陈少华. 功能基因在反硝化菌群生态学研究中的应用[J]. 生态学杂志, 2010, 29(9): 1836-1845.
- [34] Throckmorton I N, Enwall K, Jarvis A, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49(3): 401-417.
- [35] 黎乾, 吴松维, 吴伟祥, 等. 回灌渗滤液 C/N 对填埋垃圾生物反应器反硝化特性的影响[J]. 环境科学, 2011, 32(11): 3386-3393.

(责任编辑: 肖锡湘)