

1 株具硫酸盐还原功能的柠檬酸杆菌的分离及其生理特性研究

杨丽平^{1 2 3 4}, 郑小红^{1 2 3}, 曾国驱^{1 2 3 5}, 许玫英^{1 2 3}, 孙国萍^{1 2 3 *}

(1. 广东省微生物研究所, 广州 510070; 2. 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070; 3. 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070; 4. 江西农业大学生物科学与工程学院, 南昌 330045; 5. 中山大学环境科学与工程学院, 广州 510275)

摘要:从处理高浓度硫酸盐废水的厌氧上升流污泥床反应器(UASB)污泥中分离、纯化出 1 株具有硫酸盐还原功能的菌株 SR3。经形态、生理生化特征试验和 16S rDNA 序列分析, 该菌株 SR3 归属于柠檬酸杆菌(*Citrobacter* sp.)。其特性为:在厌氧和微氧条件下均可还原硫酸盐, 同时用硫酸盐还原功能特异性基因引物可扩增到异化亚硫酸盐还原酶基因(*dsr* 基因);在好氧条件下不能还原硫酸盐但菌体生长速率最高, 在厌氧条件下菌株生长的最适温度为 37℃, 最适起始 pH 值为 8.0, 在 Cr(VI) 初始浓度为 0.4~0.8 mmol/L 范围内能同时还原 SO_4^{2-} 和 Cr(VI)。对 Cr(VI) 的耐受能力达 1 mmol/L。这是首次报道在兼性厌氧的柠檬酸杆菌中发现硫酸盐还原功能并携带硫酸盐还原酶基因的菌株。

关键词:硫酸盐还原; 柠檬酸杆菌; 特性; 异化亚硫酸盐还原酶基因

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)03-0815-06

Isolation and Characterization of a Sulfate Reducing *Citrobacter* sp. Strain SR3

YANG Li-ping^{1 2 3 4}, ZHENG Xiao-hong^{1 2 3}, ZENG Guo-qu^{1 2 3 5}, XU Mei-ying^{1 2 3}, SUN Guo-ping^{1 2 3}

(1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China; 3. Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China; 4. College of Bioscience & Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 5. School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A sulfate reducing bacterium, designated strain 'SR3', was isolated from sludge of a sulfate-reducing up-flow anaerobic sludge bed (UASB) reactor for treating high concentration sulfate wastewater. It was identified as *Citrobacter* sp. based upon the phenotypic characteristics and physiological properties as well as the analysis of the sequence of 16S rDNA. The strain could reduce sulfate under anaerobic and micro-aerobic conditions. The dissimilatory sulphite reductase gene (*dsr*) was also amplified from this strain's genomic DNA using specific *dsr* gene primers. In aerobic conditions, the strain couldn't reduce sulfate, but exhibited a highest growth rate. In anaerobic conditions, the optimal growth conditions for this stain were temperature 37℃ and initial pH 8.0. Under this conditions, the strain could reduced both SO_4^{2-} and Cr(VI) at initial Cr(VI) concentrations of 0.4-0.8 mmol/L synchronously. Its tolerance ability to Cr(VI) concentrations reaches 1.0 mmol/L. This is the first report about an facultative anaerobe with sulfate reducing function and dissimilatory sulphite reductase gene (*dsr*).

Key words: sulfate-reducing; *Citrobacter* sp.; characteristics; dissimilatory sulphite reductase gene(*dsr*)

味精厂、制药厂、印染厂、糖蜜酒精厂、采用传统生产工艺的钛白粉厂等排放的工业废水中含高浓度 SO_4^{2-} 。硫酸盐本身虽然无害,但是它遇到厌氧环境会在硫酸盐还原菌(SRB)作用下产生硫化氢(H_2S),会严重腐蚀金属构件和排水管道,另外 H_2S 气味恶臭,浓度达到一定时能引起人神经中毒,而且能与大气层中臭氧发生反应生成硫酸^[1],这是酸雨的成因之一。 SO_4^{2-} 污染一旦大面积形成,治理是相当困难的。因此,近年来对硫酸盐污染治理的研究倍受重视。对此,人们积极探索用各种方法予以处理。与物理化学方法相比较,生物治理方法具有成本较低、环境友好、不造成二次污染的特点,因此更具优

势。生物法处理原理主要是利用严格厌氧的硫酸盐还原菌(sulfate reducing bacteria, SRB)将 SO_4^{2-} 还原为 H_2S 等硫化物,核心催化功能在 SRB^[2]。据不完全统计,SRB 已有脱硫弧菌(*Desulfovibrio*)、脱硫肠状菌(*Desulfotomaculum*)和脱硫单胞菌(*Desulfomonas*)等 12 个属近 40 多个种^[3]。国内外学

收稿日期 2009-04-28; 修订日期 2009-07-10

基金项目 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA06Z322); 广东省重大专项(2005A30401002); 广州市科技成果推广(2008C13G041); 广东省自然科学基金研究团队项目(9351007002000001)

作者简介 杨丽平(1985~),男,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物, E-mail: yaking85@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: guopingsun@163.com

者对硫酸盐还原菌研究做了大量的工作,包括 SRB 的分离及筛选、生态分布特性、毒理学研究及其污染与防治方法、处理工艺及反应器等^[4~8]。但具硫酸盐还原能力的柠檬酸杆菌鲜有报道。在 1932 年,由于 Werkman 等^[9]将一群能利用柠檬酸盐和发酵乳糖的大肠杆菌进行了重新分类,首次单独列为柠檬酸杆菌属,其模式菌株为弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)。到目前为止,根据生理生化 and 分子生物学的鉴定,柠檬酸杆菌属共有 13 个种,其中绝大部分是从人体分离的致病菌^[10~12]。在 2007 年,由 Barton 等^[13]编著的“Sulphate-Reducing Bacteria”书中亦未提及柠檬酸杆菌具有硫酸盐还原功能。本研究从硫酸盐还原反应器活性污泥中分离到 1 株具硫酸盐还原活性的兼性厌氧菌株 SR3,生理生化和分子生物学鉴定的结果表明该菌株归属于柠檬酸杆菌属。这一菌株不但对细菌硫酸盐还原的研究具有重要的理论意义,而且对于硫酸盐废水处理中的应用具有广泛的指导意义。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

样品采自处理硫酸盐废水的上流式厌氧污泥床反应器(UASB)装置。

1.2 培养基

培养基成分为:K₂HPO₄ 0.5 g;NH₄Cl 1.0 g;无水 Na₂SO₄ 0.5 g;无水 CaCl₂ 0.1 g;MgSO₄ 2.0 g;乳酸钠 3.5 g;酵母膏 1.0 g。将上述试剂溶解在 1 000 mL 水中,121℃ 高压灭菌 20 min。冷却后再加入经过滤除菌的硫酸盐亚铁铵 0.03 g,维生素 C 0.01 g。

1.3 菌株富集

取 1 mL 待分离样品置于预先灭菌的 250 mL 的厌氧瓶中,加入 100 mL 培养基,用氮气进行吹脱 3 min。旋紧后放入厌氧工作站(Bugbox,UK)中 30℃ 静置富集培养,直到培养液由澄清变黑后转接。共转接 5 次,每次接种量为 1%。

1.4 分离与纯化

将富集培养后的菌液稀释成 $10^{-2} \sim 10^{-8}$ 涂平板,密封后置厌氧工作站(Bugbox,UK)中 30℃ 下培养。5~6 d 后长出外表黑色菌落从中挑取长势良好、浓黑色的单菌落,作进一步的纯化。

1.5 菌株的鉴定

分离的菌株进行形态观察和生理生化特性试验,并参照文献[14]和 16S rDNA 序列分析进行鉴定。

1.5.1 菌株的菌落形态特征

菌落形态观察:接种菌液在培养基(不加硫酸亚铁铵)平板上划线,置厌氧工作站(Bugbox,UK)中 30℃ 下培养 72 h 后观察菌落形态。

电镜扫描观察:将菌液接种于培养基上,置厌氧工作站(Bugbox,UK)中 30℃ 下培养至对数期时制样,用电镜观察并拍照。

1.5.2 菌株的生理生化特性特征

淀粉水解、氧化酶等生化试验参照文献[14],其它生化指标采用 BIOLOG 细菌自动鉴定系统进行鉴定。

1.5.3 菌株的 16S rDNA 和特异性基因 *dsrAB* 序列分析

菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列测定:取对数生长期新鲜菌液,离心收集菌体,按文献[15]的方法提取基因组 DNA。采用细菌 16S rDNA 通用引物 27F 与 1492R 进行 PCR 扩增菌株的 16S rDNA^[16],采用针对硫酸盐还原过程中的异化亚硫酸盐还原酶基因(dissimilatory sulphite reductase gene, *dsr* 基因)的特异性引物对 DSR1F (5'-ACSCACTGGAAGCAGC-3') 和 DSR4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3') 对菌株的特异性功能基因 *dsrAB* 进行 PCR 扩增^[17]。PCR 反应产物直接进行测序。

序列分析:利用 BLAST 将所测得的序列与 GenBank/EMBL/DDBJ 数据库中已登录的序列进行同源性比较,采用 ClustalX 进行比对,通过邻接(Neighbour Joining)法构建系统发育树(PHYL IP, Version 315)^[18]。

1.6 菌株的特性

1.6.1 环境因子对菌株生长的影响试验

根据环境因子的变化,使用厌氧工作站、静置和 150 r·min⁻¹ 摇床培养的方式调节溶解氧、调节培养温度、初始 pH 值等条件下进行培养,测定培养基中的硫酸盐含量和菌株的 D_{600} 值。测量菌的 D_{600} 值时不加硫酸亚铁铵,防止菌液变黑影响测量结果。

1.6.2 菌株耐受六价铬[Cr(VI)]和还原铬的功能

分别配制含有 0.4、0.8、1.0、1.2 和 1.6 mmol 铬[Cr(VI)]的 200 mL 培养基,接种量为 1% 培养 7 d,分别测量 Cr(VI)和硫酸盐残留量。

1.7 检测方法

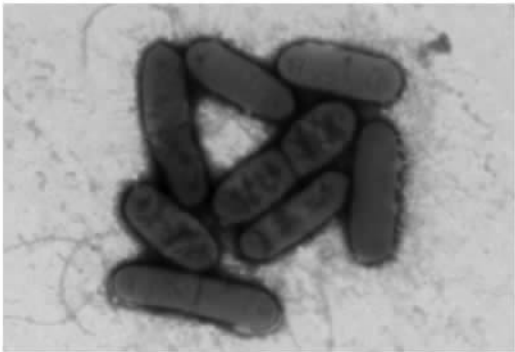
硫酸盐、Cr(VI)、pH 值采用国家标准方法测定^[19]。

2 结果与分析

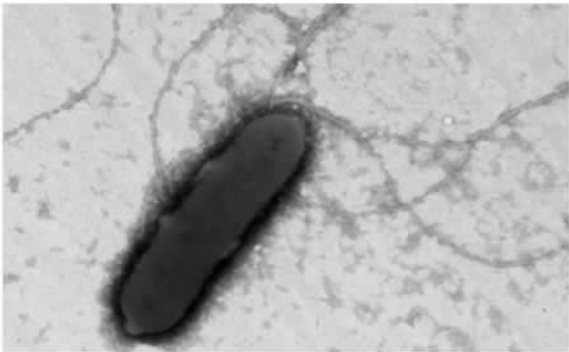
2.1 硫酸盐还原功能菌的分离筛选

经过富集、分离得到几株外表呈黑色的单菌落。其中 1 株具有很强硫酸盐还原功能,菌株命名为 SR3。该菌株做下述各项试验。

2.2 菌株 SR3 的鉴定



(a) ×2 500



(b) ×4 000

图 1 菌株 SR3 的电镜图
Fig.1 Electron micrograph of SR3

菌株 SR3 的主要生理生化特征为 :兼性厌氧生长,过氧化氢酶、硫化氢、甲基红、乙酰、利用柠檬酸均为阳性。氧化酶、淀粉水解、吲哚试验均为阴性。4℃ 不能生长,45℃ 能生长。Biolog 细菌自动鉴定系统进行鉴定的结果发现,菌株 SR3 能发酵葡萄糖,可利用柠檬酸、D-半乳糖、D,L-果糖、α-D-葡萄糖、糊精、D,L-丝氨酸、L-脯氨酸、肌苷、尿苷、甘油等多种有机物做为碳源。菌株 SR3 与 BIOLOG 系统数据库中的柠檬酸杆菌相似性比较表明,与无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)相似性值最高,为 0.56,而与其它柠檬酸杆菌相似性值较低。

2.2.3 菌株的 16S rRNA 序列分析

利用 BLAST 将所测得的菌株 SR3 的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库序列进行同源性比较,结果见图 2(a),菌株 SR3 与 *Citrobacter amalonaticus* 相似性最高为 95%。

同时还利用 BLAST 将所测得的菌株 SR3 的特异性基因 *dsr* 序列与 GenBank 数据库序列进行同源性比较,结果见图 2(b),菌株 SR3 的硫酸盐还原功能基因 *dsr* 序列与 *Desulfovibrio desulfuricans* 相似性最高为 99%。

由 16S rDNA 的序列比对可知,SR3 属于柠檬酸杆菌属。其中特异性基因与 *Desulfovibrio desulfuricans* 中的脱硫基因相似度可高达 99%,而目前尚鲜见报

2.2.1 形态特征

菌株 SR3 在置厌氧工作站中30℃ 下培养 3 d 菌落形态为浅黄色,边缘整齐,凸状隆起,粘稠,大小为 1~2 mm。细胞为革兰氏染色阴性,杆状,大小为 (0.5~0.6) μm ×(2.0~2.2) μm,周生鞭毛(如图 1 所示)。细胞无芽孢,不积累 PHB。

2.2.2 生理生化特征

道柠檬酸杆菌属中有类似功能基因,该基因可能是通过基因漂移等途径进化而来。

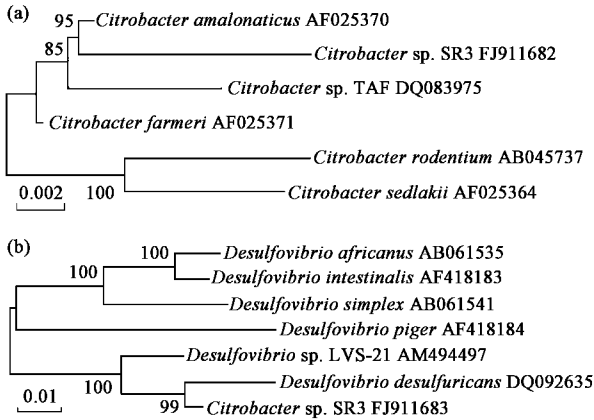


图 2 以 16S rDNA 和 *dsr* 基因为基础的菌株 SR3 的系统进化分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of strains of SR3 based on 16S rDNA and *dsr* gene

2.3 菌株 SR3 的特性

通过试验环境因子对硫酸盐还原的影响,研究硫酸盐还原功能菌株 SR3 的特性。

2.3.1 溶解氧对 SR3 菌株还原硫酸盐的影响

以好氧、微氧条件下进行溶解氧对菌株 SR3 还原硫酸盐影响的研究,在初始硫酸盐含量为 20 mmol 的条件下培养 7 d,结果见图 3~5。硫酸盐还

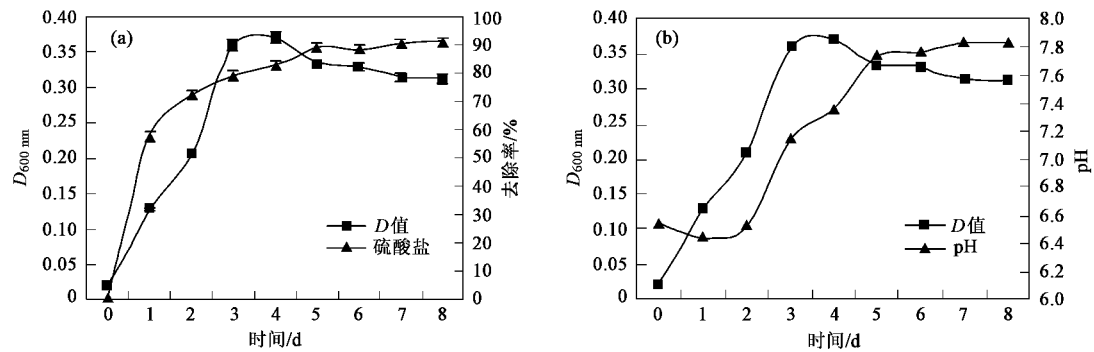


图 3 厌氧条件下菌株生长与硫酸盐去除率、pH 随时间的变化情况

Fig.3 Growth of SR3 and sulfate removal rate ,pH as a function of time in anaerobic condition

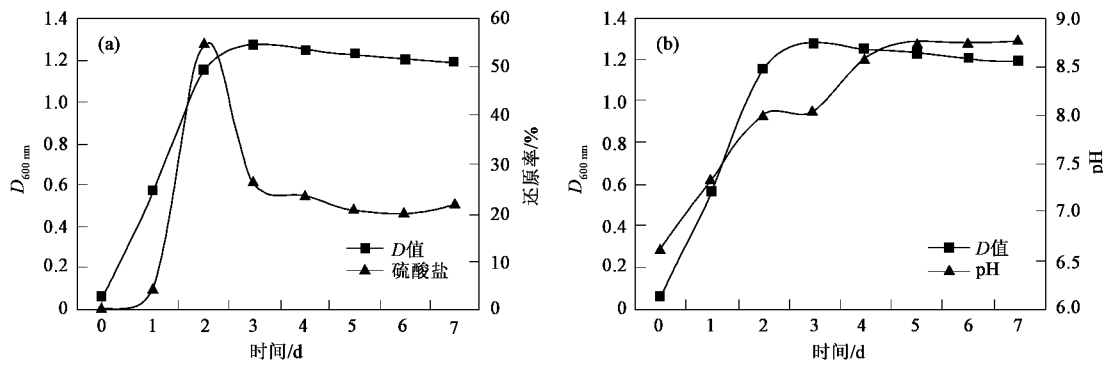


图 4 微氧条件下菌株生长与硫酸盐去除率、pH 随时间的变化情况

Fig.4 Growth of SR3 and sulfate removal rate ,pH as a function of time in micro-aerobic condition

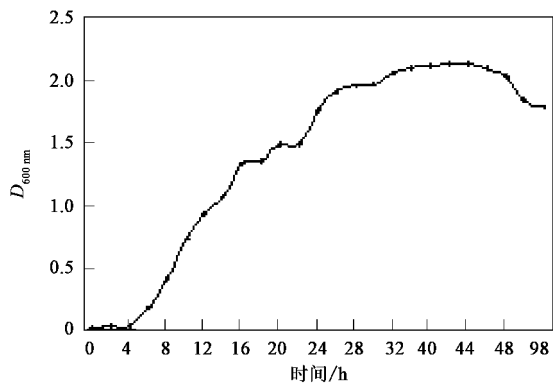


图 5 好氧条件下菌株生长情况

Fig.5 Growth of SR3 in aerobic condition

原作用在厌氧和微氧条件下均可进行,但在好氧情况下不能进行. 厌氧条件下的硫酸盐还原率为 92%,而微氧条件下培养 2 d 时硫酸盐还原率达到 54%,继续培养后又回落并稳定至 20%. 这可能是在菌株生长对数期造成相对厌氧的状态使得发生硫酸盐还原作用,之后菌株生长相对缓慢,部分硫化物被氧化成硫酸盐或亚硫酸盐. 在好氧情况下则完全

不发生硫酸盐还原作用. 从菌的生长情况看,在厌氧条件下培养 3 d, D_{600} 达到最高值为 0.36,微氧条件下培养 3 d 后 D_{600} 达到最高值为 1.3,好氧条件下培养 42 h D_{600} 达到最高值为 2.1. 结果显示菌株在好氧情况下生长更快. 同时测试了在厌氧和微氧情况下 pH 值随培养时间的变化. 在厌氧情况下培养 7 d, pH 由 6.6 升高至 7.8;在微氧情况下培养 7 d, pH 由 6.6 升高至 8.8. 在这 2 种情况下,随着菌株培养时间的延长而导致了 pH 的升高. 主要原因为菌株的生长消耗了培养基中的乳酸,释放出 Na^+ 、 SO_4^{2-} 被还原成 HS^- 、 S^{2-} 和 H_2S 等,同时释放出 Na^+ . 使得培养基中总的 Na^+ 占优势呈现碱性.

2.3.2 温度对 SR3 菌株生长的影响

在不同温度(20、30、37、40 和 45 $^{\circ}\text{C}$)下,用液体培养基厌氧培养 72 h,取样测定培养液 D_{600} 值. 图 6 的结果表明菌株生长最佳温度为 37 $^{\circ}\text{C}$.

2.3.3 培养基初始 pH 值对 SR3 菌株生长的影响

将菌株接种于不同 pH 值(4、5、6、7、8、9)的培养基中厌氧培养 72 h. 初始 pH 值对菌株生长的影

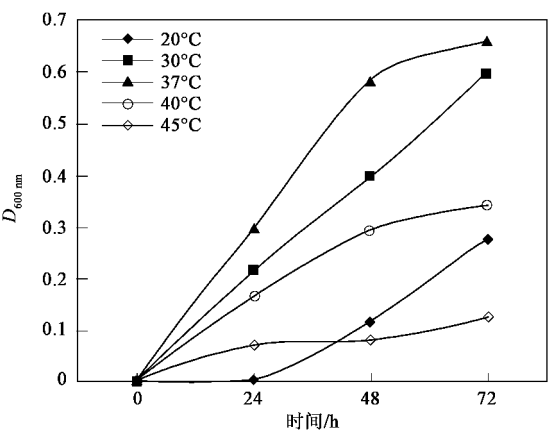


图 6 温度对菌株生长的影响

Fig.6 Effects of temperature on growth of SR3

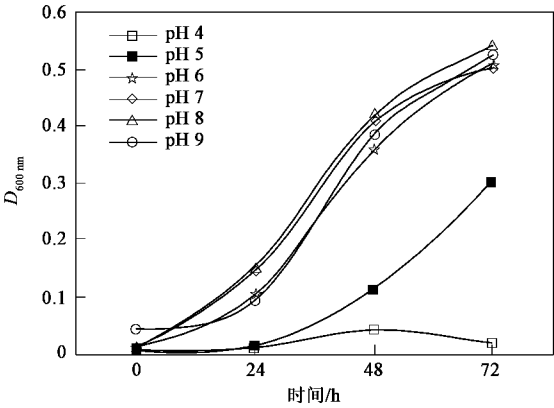


图 7 初始 pH 值对菌株生长的影响

Fig.7 Effects of pH value on growth of SR3

响如图 7 所示.结果显示,菌株生长的合适 pH 值条件为 6~9,在 pH 值为 4 时,菌株的生长受严重抑制,几乎不生长

2.3.4 菌株的铬[Cr(VI)]耐受能力

分别配制 Cr(VI)梯度浓度的培养基,接入菌液在厌氧条件下培养 7 d,结果见图 8.在 Cr(VI)≤0.8 mmol 时,培养 7 d 后,培养基的 Cr(VI)检测不到,而硫酸盐的还原率则随 Cr(VI)含量的增加而有所降低,由 87.7% 降到 47.5%.从电子竞争方面分析,由 $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{S}^{2-}$ 需要 8e,当 SO_4^{2-} 还原率从 87.7% 降到

47.5% 时, SO_4^{2-} 少利用了 64.16 mmol 的电子.而 $\text{Cr(VI)} \rightarrow \text{Cr(III)}$ 时需要 3e, Cr(VI)由 0.4 mmol 增加至 0.8 mmol 时只多耗 1.2 mmol 电子.从之间的差距可以看出 Cr(VI)不仅是竞争电子还对硫酸盐还原有抑制作用.在培养基中 Cr(VI)=1.0 mmol 时,培养 7 d 后,硫酸盐和 Cr(VI)的含量依然均有所降低,分别降 11% 和 16%,同时可以看出 Cr(VI)抑制作用增大.当 Cr(VI)的含量达到 1.2 mmol 时菌株的硫酸盐还原作用被完全抑制,培养 7 d 后硫酸盐和 Cr(VI)的含量都没有降低.

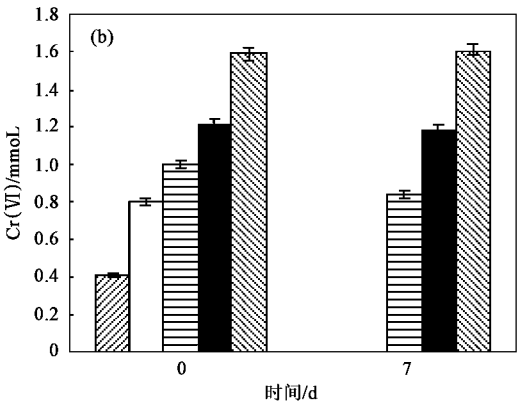
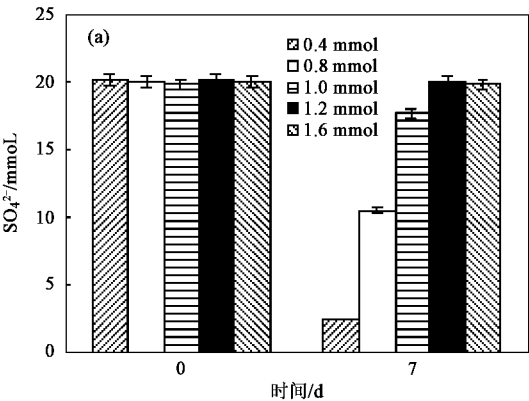


图 8 不同 Cr(VI)浓度下硫酸盐和 Cr(VI)变化情况

Fig.8 Variation of sulfate and Cr(VI) under different concentration of Cr(VI)

3 讨论

对于细菌的硫酸盐还原作用,前人已经做了广泛的研究,分离鉴定的硫酸盐还原菌已达 40 个属^[13].但具硫酸盐还原能力的柠檬酸杆菌的报道极为鲜见. Angeles-Cha 等^[20]发现一些 *Citrobacter* sp. 在厌氧环境下产 H_2 及 CO_2 ,为硫酸盐还原细菌

(SRB)提供能量及碳源. Neria-Gonzalez 等^[21]曾分离得到该属菌株,声称该菌株具有产 H_2S 的能力.但都没有明确证明 *Citrobacter* sp. 有硫酸盐还原功能.近期 Qiu 等^[22]分离到 1 株 *Citrobacter* sp. 菌株,并发现该菌在厌氧条件下能还原硫酸盐,且能沉淀 Cu.但未提出硫酸盐还原菌的特异性基因是否存在的证据.在厌氧条件下的硫酸盐还原的情况与本研究比

较一致,好氧条件下 SR3 不能还原硫酸盐,微氧条件下能还原部分硫酸盐. 本研究在 SR3 菌株扩增到了硫酸盐还原菌的特异性基因. 特异性基因与 *Desulfovibrio desulfuricans* 中的脱硫基因相似度高达 99%,而柠檬酸杆菌属的细菌从来未报道有类似的基因,该基因可能是通过基因漂移等途径进化而来. 由 16S rDNA 的序列比对可知,SR3 与 *Citrobacter amalonaticus* 相似性最高仅为 95%,可能为柠檬酸杆菌属中的一个新种,除了硫酸盐还原功能外还能够耐受 1mmol 浓度的 Cr(VI). SR3 菌株和常规硫酸盐还原菌要求十分严格的厌氧环境、合适的 pH 值范围较窄明显不同,其适应环境的能力很强,可为微生物与处理工艺的搭提供更多的选择,适合于各种生物处理系统和污染环境中的应用.

4 结 论

(1)从处理含高浓度硫酸盐的 UASB 活性污泥中分离到 1 株具有硫酸盐还原功能的菌株 SR3. 从形态、生理生化特征和 16S rDNA 的分析,初步鉴定为柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* sp.)的细菌;从 SR3 菌株扩增到了硫酸盐还原菌的特异性基因.

(2)该菌株在厌氧和微氧条件下均可还原硫酸盐,好氧条件下不能还原硫酸盐,但菌体生长速率最高. 在厌氧条件下菌株生长的最适温度为 37℃,合适的 pH 值条件为 6~9,可耐受浓度为 1.0 mmol 的 Cr(VI),在 Cr(VI)浓度为 0.4~0.8 mmol 范围内能同时地还原 SO_4^{2-} 和 Cr(VI). 特别适宜用于处理含 Cr(VI)的高浓度硫酸盐废水.

参考文献:

[1] Sipma J ,Janssen A J H ,Hulshoff-Pol L W ,et al. Development of a novel process for the biological conversion of H₂S and methanethiol to elemental sulfur[J]. Biotechnol Bioeng ,2003 ,**82** (1) :1-11.

[2] 缪应祺. 废水生物脱硫机理及技术[M]. 北京 :化学工业出版社 ,2004.

[3] 任南琪 ,王爱杰. 厌氧生物技术原理与应用[M]. 北京 :化学工业出版社 ,2004. 300-301.

[4] Kaksonen A H , Riekkola-Vanhanen M L , Puhakka J A. Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater[J]. Water Res ,2003 ,**37** (2) : 255-266.

[5] Foucher S ,Battaglia F ,Ignatiadis I ,et al. Treatment by sulfate-reducing bacterial of chess acid-mine drainage and metals recovery[J]. Chem Eng Sci 2001 ,**56** :1639-1641.

[6] 李新荣 ,沈德中. 硫酸盐还原菌的生态特性及其应用[J]. 应用环境微生物学报 ,1999 ,**5** (10) :15-17.

[7] 王玮 ,许武林 ,刘健. 硫酸盐还原菌的污染与防治方法[J]. 环境污染与防治 ,2000 ,**22** (5) :31-32.

[8] 刘宏芳 ,黄茁 ,许立铭. 不同种类硫酸盐还原菌的鉴定方法探讨[J]. 华中理工大学学报 ,1999 ,**27** (7) :111-113.

[9] Werkman C M ,Gillen G F. Bacteria producing trimethylene glycol [J]. J Bacteriol ,1932 ,**23** (2) :167-182.

[10] Brenner D J ,Grimont P A D ,Steigerwalt A G ,et al. Classification of citrobacteria by DNA hybridization : designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov. ,*Citrobacter youngae* sp. nov. ,*Citrobacterbraakii* sp. nov. ,*Citrobacter werkmanii* sp. nov. ,*Citrobacter sedlakii* sp. nov. ,and three unnamed *Citrobacter* genomospecies[J]. Int J Syst Bacteriol ,1993 ,**43** :645-658.

[11] Ewing W H , Davis B R. Biochemical characterization of *Citrobacter diversus* (Burkey) Werkman and Gillen and designation of the neotype strain[J]. Int J Syst Bacteriol ,1972 ,**22** :12-18.

[12] Underwood S , Matthew B A. *Citrobacter koseri* and *Citrobacteramalonaticus* isolates carry highly divergent β -lactamase genes despite having high levels of biochemical similarity and 16S rRNA sequence homology [J]. J Antimicrob Chemoth 2004 ,**53** :1076-1080.

[13] Barton L L , Hamilton W A. Sulphate-Reducing Bacteria : Environmental and Engineered Systems [M]. Cambridge : Cambridge University Press. 2007.

[14] 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.

[15] Zhou J ,Bruns M A ,Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol ,1996 ,**62** (2) : 316-322.

[16] Edwards U ,Rogall T ,Blocker H ,et al . Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA[J]. Nucleic Acids Res ,1989 ,**17** (19) :7843-7853.

[17] Foti M ,Sorokin D Y ,Lomans B ,et al. Diversity b , Activity and abundance of Sulfate-Reducing Bacteria in Saline and Hypersaline Soda Lakes [J]. Appl Environ Microbiol ,2007 ,**73** (7) :2093-2100.

[18] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) ,Version 315c[M]. Seattle : Department of Genetics , University of Washington ,1993.

[19] 中国标准出版社第二编辑室. 中国环境保护标准汇编水质分析方法[M]. 北京 :中国标准出版社 ,2001.

[20] Angeles-Cha C ,Mora-Mendoza L R ,García-Esquivel R , et al. Microbiologically influenced corrosion by *Citrobacter* in sour gas pipelines[J]. Mater Performance ,2002 ,**41** :50-55.

[21] Neria-Gonzalez I ,Wang E T ,Ramírez F ,et al. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico[J]. Anaerobe ,2006 ,**12** : 122-133.

[22] Qiu R L ,Zhao B L , Liu J L , et al. Sulfate reduction ,copper precipitation by a *Citrobacter* sp. isolated from a mining area[J]. J Hazard Mater 2009 ,**164** :1310-1315.