

1 株脱氮除磷菌的 H 及其特性研究

蔡天明, 陈立伟, 吴守中, 钱丽花, 任倩

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要: 采用 YG 培养基, 结合蓝白斑筛选、异染粒染色及好氧除磷能力检测等实验, 从城市生活污水处理厂好氧生化池的活性污泥中分离出 7 株好氧除磷菌; 再经硝酸盐还原产气和缺氧培养实验, 筛选出 1 株高效脱氮除磷菌; 通过 16S rRNA 基因同源性比较和生理生化鉴定, 初步将其鉴定为 *Pseudomonas grimontii*, 命名为 C18。菌株 C18 在好氧培养 24 h 后, 培养基中上清液磷浓度从 38.7 mg/L 降低到 2.28 mg/L, 除磷率达 94.1%。C18 在缺氧培养 24 h 后, 培养基中上清液磷浓度从 44.5 mg/L 降低到 5.21 mg/L, 除磷率达 88.3%; 上清液硝酸盐氮浓度从 184.2 mg/L 降低到 30.6 mg/L, 脱氮率达 83.4%。菌株 C18 最适脱氮除磷温度为 30℃; 最适脱氮除磷 pH 为 7.5。

关键词: 脱氮除磷菌; 分离; 鉴定; 生理生化特性; 脱氮除磷效率

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)10-2487-06

Selection of Denitrifying Phosphorus-Removing Bacteria and Its Characteristic

CAI Tian-ming, CHEN Li-wei, WU Shou-zhong, QIAN Li-hua, REN Qian

(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Using YG culture medium, combined with the experiments of blue-and white-colored screening, Albert staining and detection of phosphorus removal capacity, seven phosphorus-removing bacterium were isolated from activated sludge collected from aerobic biochemical pool of wastewater treating factory. After nitrate reducing and anoxic culturing experiment, a strain with high capability of denitrifying and phosphorus removing was selected. With the study of its physiology and biochemistry and the analysis of its 16S rRNA gene, this strain was identified as *Pseudomonas grimontii*, and named of C18. The phosphorus removal rate of C18 was 94.1% under aerobic condition in 24 hours (The phosphorus concentration in supernatant was 38.7 mg/L to 2.28 mg/L). The phosphorus removal rate of C18 was 88.3% under anoxic condition in 24 hours (the phosphorus concentration in supernatant was 44.5 mg/L to 5.21 mg/L), and the denitrifying rate of C18 was 83.4% under anoxic condition in 24 hours (the nitrate concentration in supernatant was 184.2 mg/L to 30.6 mg/L). The optimal temperature of C18 denitrifying and phosphorus removing was 30℃; The optimal pH of C18 denitrifying and phosphorus removing was 7.5.

Key words: denitrifying phosphorus-removing bacteria; isolation; identification; physiological and biochemical characteristics; denitrifying and phosphorus removing efficiency

同步脱氮除磷技术是当前水污染控制领域的研究热点, 其功能菌群——脱氮除磷菌 (denitrifying phosphorus-removing bacterium, DPBs) 能在缺氧条件下^[1-5], 以硝酸盐氮取代 O₂ 作为电子受体进行除磷^[6-8], 即 DPBs 能将反硝化脱氮和除磷这 2 个彼此独立的过程有机地结合在一起^[9-12]。目前, 国内外在脱氮除磷菌的分离筛选方面的研究已有一定进展: 2003 年, Koji 等^[13]分离出 3 株高效脱氮除磷菌, 分别为: 寡营养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*); 2006 年, Shi 等^[14]分离出副球菌属 (*Paracoccus*) 的高效脱氮除磷菌; 2006 年, 王春丽等^[15]分离出肠杆菌属 (*Enterobacter*) 的高效脱氮除磷菌; 2009 年, 吕志堂等^[16]分离出的高效脱氮除磷菌为丛毛单胞菌属 (*Comamonas*)。本研究依据除磷能力、硝酸盐还原产气及异染粒染色等特征, 对 DPBs 进行分离、筛选, 大大提高了筛选效率; 对其生

物学特性的研究能充分发挥脱氮除磷菌的功能, 提高废水脱氮除磷工艺的效率。本研究旨在从脱氮除磷菌的筛选及其特性入手, 以为废水同步脱氮除磷工艺进一步提供理论依据及技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基

(1) LB 培养基^[17,18]: 酵母浸膏 5 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、水 1 000 mL、pH 7.0 ~ 7.2。

(2) YG 培养基^[18]: 酵母浸膏 1 g、葡萄糖 1 g、K₂HPO₄ 0.3 g、KH₂PO₄ 0.25 g、MgSO₄ 0.2 g、水 1 000 mL。

收稿日期: 2009-12-19; 修订日期: 2010-02-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30970099); 江苏省省级环保科技项目 (2009001)

作者简介: 蔡天明 (1965~), 男, 副教授, 高级工程师, 主要研究方向为污水处理及其相关基因的克隆, E-mail: ctm@njau.edu.cn

(3) MOPS 培养基^[17,18]: 100 mL 的 10 × MOPS 混合物[8.372 g MOPS + 0.717 g tricine + 30 mL 去离子水, 10 mol/L 的 KOH 调节 pH 至 7.4, 总体积到 44 mL; 1 mL 新制的 0.01% FeSO₄ 溶液, 按下列顺序加溶液: 1.9 mol/L NH₄Cl (5 mL), 0.276 mol/L K₂SO₄ (1 mL), 0.02 mol/L CaCl₂ · 2H₂O (0.025 mL), 2.5 mol/L MgCl₂ · 7H₂O (0.21 mL), 5 mol/L NaCl (10 mL), 0.02 mL 微量元素混合液, 38.7 mL 去离子水, 0.1 g 葡萄糖], 分别取 50 mL 置于 2 个三角瓶中, 向一个三角瓶中加入 0.008 66 g K₂HPO₄, 成为限磷培养基; 向另一个三角瓶中加入 0.173 2 g K₂HPO₄, 成为过磷培养基. 向 2 种培养基中均加入 0.1 g/mL 的 thiamine 溶液 0.01 mL, 定容至 500 mL, 用细菌滤器过滤后, 取 100 mL 分装于已灭菌的 150 mL 的三角瓶中.

微量元素配方: (NH₄)₆(MO₇)₂₄ 0.09 g, H₃BO₃ 0.62 g, CoCl₂ 0.18 g, CuSO₄ 0.06 g, MnCl₂ 0.40 g, ZnSO₄ 0.07 g.

(4) 硝酸盐还原产气实验培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 5 g, KNO₃ 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4.

(5) 缺氧培养基^[14]: 葡萄糖 10 g, KNO₃ 0.72 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, MgSO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.25 g, CaCl₂ 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0.

1.1.2 合成废水

葡萄糖 0.6 g, 蛋白胨 0.1 g, 酵母粉 0.01 g, 乙酸钠 0.50 g, 氯化钠 0.05 g, 三水合磷酸氢二钾 0.09 g, 七水硫酸镁 0.40 g, 氯化铵 0.18 g, 蒸馏水 1 000 mL.

1.1.3 污泥样品

南京江心洲污水处理厂好氧生化池活性污泥.

1.1.4 染色试剂

Albert 异染粒染色: ①甲液: 甲苯胺蓝 0.15 g, 孔雀绿 0.20 g, 冰醋酸 1 mL, 酒精(95%) 2 mL, 蒸馏水 100 mL. ②乙液: 碘 2 g, 碘化钾 3 g, 蒸馏水 300 mL.

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化

吸取污泥样品 10 mL 置于含 100 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中, 加入若干玻璃珠, 于 30℃ 摇床振荡 30 min. 取混合液 0.5 mL 于盛有 4.5 mL 无菌水的试管中, 振荡混匀, 制成浓度梯度为 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 的悬液. 取不同梯度的悬液 0.1 mL 涂布于 YG 平板上, 每个稀释度各做 3 块平板, 30℃ 培养 2~3 d. 从平板中挑选出形态不同的

菌落, 在 YG 平板上划线纯化; 将纯化的菌转接至 LB 斜面培养基上, 30℃ 培养 2 d, 于 4℃ 条件下保存.

1.2.2 菌株的筛选

①蓝白斑初筛^[18]: 将从平板中挑出的形态不同的菌落, 分别点接于限磷和过磷量培养基上, 30℃ 培养 2 d. 选择在限磷和过磷培养基上均呈蓝斑的菌株. ②将上述筛选出的菌株好氧培养后, 进行 Albert 异染粒染色, 选择具有异染粒颗粒的菌株. ③将上述筛选出的菌株接入 LB 试管, 30℃、180 r·min⁻¹ 振荡培养 12 h 后, 离心收集菌体, 调整菌液 D₆₀₀ = 1.0, 即为种子液. 按 1% 的接种量接种于含 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 30℃、180 r·min⁻¹ 好氧培养 24 h, 在不同的生长阶段即 0、4、8、12、16、20、24 h 分别取培养后的菌液于 12 000 r/min 离心 1 min, 以野生型大肠杆菌 (*E. coli*) 为对照菌, 测定上清液磷浓度以确定菌体好氧除磷的能力. ④将好氧除磷能力较强的菌株接种于硝酸盐还原产气培养基中, 30℃ 培养 24 h, 观察结果, 凡在硝酸盐蛋白胨水培养基中的小倒管内有气体产生者, 即为阳性, 表明该菌可还原硝酸盐并将硝酸盐分解产生氮气, 即该菌具有反硝化能力. ⑤将好氧除磷能力较强且具有反硝化能力的菌株按 1% 的接种量接种于含有 100 mL 缺氧培养基的 250 mL 锥形瓶中, 锥形瓶内通 N₂ 维持缺氧条件, 30℃、180 r·min⁻¹ 培养 24 h, 在不同的生长阶段即 0、4、8、12、16、20、24 h 分别取培养后的菌液于 12 000 r/min 离心 1 min, 测定上清液中磷和硝酸盐氮浓度的变化, 上清液中磷和硝酸盐氮浓度都降低说明菌株具有同时脱氮除磷能力^[19].

1.2.3 分析方法

测定上清液中磷浓度: 钼锑抗分光光度法; 测定上清液中硝酸盐氮浓度: 紫外分光光度法.

1.2.4 高效聚磷菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及分析^[22]

引物: 5' 端引物为 5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3' (*Escherichia coli* bases 8 to 27), 3' 端引物为 5'-TACCTTGTTACGACTT-3' (*Escherichia coli* bases 1507 to 1492). 扩增反应体系为: 10 × Taq 聚合酶反应缓冲液 5 μL, dNTP (20 mmol·L⁻¹) 5 μL, 5' 端引物 (25 pmol·μL⁻¹) 2 μL, 3' 端引物 (25 pmol·μL⁻¹) 2 μL, Mg²⁺ (25 mmol·L⁻¹) 6 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U·μL⁻¹) 0.5 μL, H₂O 29.5 μL, 模板 DNA 50 μL, 以 C18 总 DNA 为模板扩增. 反应条件为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃

1 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min. 扩增产物经试剂盒纯化后,与 pMD19-T vector 酶连,将酶连产物转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,将阳性克隆送 invitrogen 公司测序,并分析测序结果.

1.2.5 菌株的生理生化鉴定

生理生化鉴定参照文献[20,21]进行.

1.2.6 温度对 C18 脱氮除磷效果的影响

实验设置 15、25、30、35、45℃ 共 5 种不同的温度,将 C18 按 1% 接种量接种至含有 100 mL 缺氧培养基的 250 mL 锥形瓶中,锥形瓶内通 N₂ 维持缺氧条件,在不同温度下 180 r·min⁻¹ 培养 24 h 后,测定各上清液中磷和硝酸盐氮的浓度变化,比较不同培养温度下 C18 脱氮除磷能力的差异.

1.2.7 pH 对 C18 脱氮除磷效果的影响

调节缺氧培养基 pH 为 5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0,将菌株 C18 按 1% 接种量接种至含有 100 mL 不同 pH 缺氧培养基的 250 mL 锥形瓶中,锥形瓶内通 N₂ 维持缺氧条件,30℃、180 r·min⁻¹ 培养 24 h,测定各上清液中磷和硝酸盐氮的浓度变化,比较不同培养 pH 下 C18 脱氮除磷能力的差异.

2 结果与分析

2.1 C18 的筛选

将污泥样稀释涂布于 162 块平板上,共挑出形态不同的菌落 108 个,其中不排除有相同菌株.将上述挑选出的菌株分别接种至限磷和过磷培养基上,进行蓝白斑筛选,在低磷和高磷平板上均呈白斑的有 20 个菌落;在过磷平板呈蓝斑,限磷呈白斑的有 14 个菌落;在限磷平板上呈蓝斑,过磷呈白斑的有 41 个菌落;在过磷和限磷平板上均显蓝色的 33 个菌落.将 2 种平板上均呈蓝斑的 33 个菌落挑选出,

命名为 C1-C33.对 C1-C33 进行异染粒色,染色结果表明,有 7 株菌体(C2、C3、C18、C27、C28、C31、C33)体内含有有 poly-P 颗粒.

将上述筛选出的 7 株菌于 LB 液体培养基中好氧培养 24 h 后,各菌株除磷效果见图 1.由图 1 可知,C18 在好氧培养 24 h 后上清液磷浓度最低,只有 2.28 mg/L,磷去除率达到了 94.1%,C28 与 C31 的除磷效果也较好,分别达到 74.9% 和 85.7%.

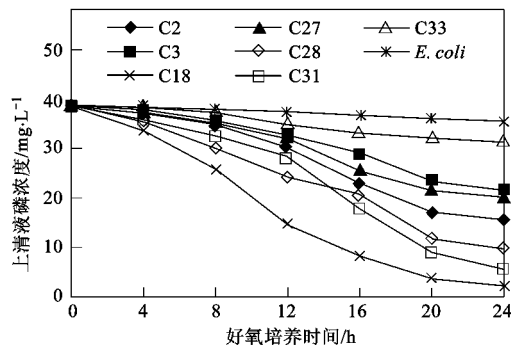


图 1 初选菌株好氧培养实验结果
Fig. 1 Results of aerobic training of strains

将 7 株好氧培养的菌株进行硝酸盐还原产气实验,其中有 4 株菌结果为阳性,具有反硝化能力;3 株为阴性,不具反硝化能力.结果如表 1 所示.

表 1 硝酸盐还原产气实验结果

硝酸盐还原产气实验结果		菌株号
阳性		C18、C27、C28、C31
阴性		C2、C3、C33

结合好氧培养实验和硝酸盐还原产气实验结果,将 C18、C28、C31 菌株进行缺氧培养实验.结果见表 2.

表 2 缺氧培养实验结果

Table 2 Results of anoxic training

菌株	上清液磷浓度/mg·L ⁻¹				上清液硝酸盐浓度/mg·L ⁻¹			
	起始	结束	去除量	去除率/%	起始	结束	去除量	去除率/%
C18	44.5	5.21	39.29	88.3	184.2	30.6	136.9	83.4
C28	44.5	42.6	1.9	4.17	184.2	18.6	165.6	89.9
C31	44.5	41.1	3.4	7.64	184.2	14.6	169.6	92.1

由表 2 可知,C18 能同时降低磷和硝酸盐氮浓度,去除率均较高,分别达到 88.3% 和 83.4%,C28 和 C31 菌虽然硝酸盐去除率均较高,但缺氧除磷效果不明显.本研究将菌株 C18 确定为脱氮除磷菌.

2.2 C18 的特性研究

2.2.1 C18 蓝白斑显色

菌株 C18 在限磷和过磷培养基上蓝白斑显色结果如图 2 所示,C18 在 2 种培养基平板上均显蓝斑.

2.2.2 C18 异染粒染色

菌株 C18 菌体 Albert 异染粒染色结果见图 3,从中可知,C18 体内好氧培养后体内含有 poly-P 颗粒.

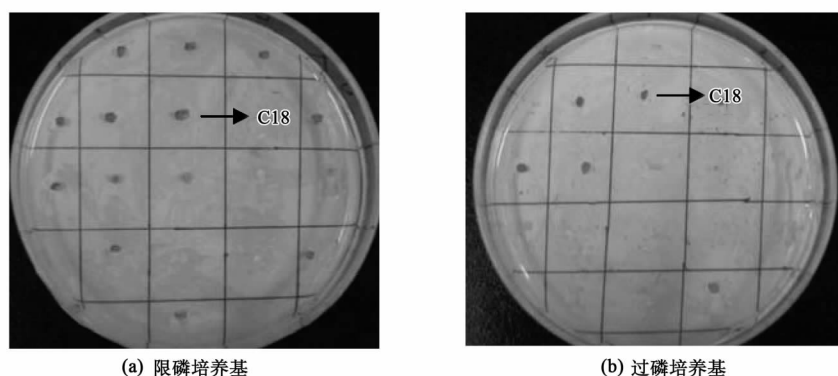


图 2 C18 蓝白斑显色

Fig. 2 Photo of strain C18 with blue-and white-colored colonies



图 3 菌株 C18 poly-P 颗粒染色

Fig. 3 Poly-P staining photo of strain C18

2.2.3 C18 脱氮除磷效果

将菌株 C18 缺氧培养 24 h, 其脱氮除磷效率随时间的变化结果见图 4. 由图 4 可知, 在缺氧培养 24 h 过程中, 上清液中磷和硝酸盐氮的含量逐渐降低, 上清液中磷的浓度从起始的 44.5 mg/L 降低到 5.21 mg/L, 上清液中硝酸盐氮的浓度从 184.2 mg/L 降低到 30.6 mg/L, 去除率分别达到 88.3% 和 83.4%.

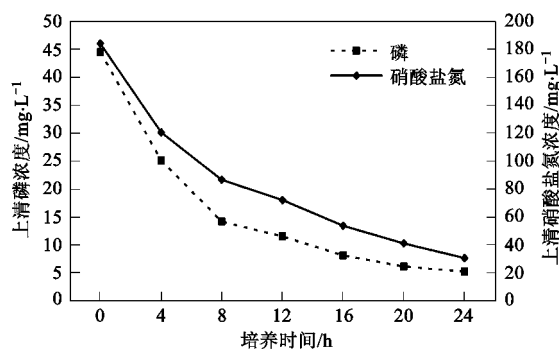


图 4 C18 缺氧培养实验

Fig. 4 Anoxic training result of C18

2.2.4 16S rRNA 基因序列分析及同源性比较

将测序结果在 RDP 的比对程序中进行核苷酸同源性比较, 结果发现与已报道的 *Pseudomonas grimontii* CFML 96-170; AF064457 的 16S rRNA 基因序列同源性达到 99%, 并通过 BioEdit 及 MEGA4.0 软件建立系统发育树(图 5).

2.2.5 C18 的生理生化鉴定

对菌株 C18 进行形态观察和生理生化特性测定的结果见表 3. 16S rRNA 基因序列分析结果, 将菌株 C18 鉴定为 *Pseudomonas grimontii*.

表 3 C18 菌株生理生化鉴定¹⁾

Table 3 Biological and chemical identification of strain C18

项目	鉴定结果	项目	鉴定结果
菌体形状	杆状	淀粉水解	+
菌落形态	光滑、乳黄色、有光泽、边缘规则、无褶皱	V-P 试验	+
革兰氏染色	-	吡啶试验	+
鞭毛染色	偏端单生鞭毛	反硝化试验	+
4℃ 生长	+	赖氨酸脱羧酶试验	-
41℃ 生长	-	果聚糖	+

1) + : 阳性反应; - : 阴性反应

2.3 温度对 C18 脱氮除磷能力的影响

由图 6 可以看出, 菌株 C18 在缺氧培养 24 h 后, 在 15 ~ 30℃ 范围内脱氮除磷效率逐渐增高, 30℃ 时脱氮除磷效率最高, 分别达到 81.3% 和 88.5%, 高于 30℃ 后脱氮除磷效率明显下降.

2.4 pH 对 C18 脱氮除磷能力的影响

由图 7 可以看出, 菌株 C18 在缺氧培养 24 h 后, 在 pH 7.5 ~ 8.0 范围内脱氮除磷效率较高, pH 7.5 时脱氮除磷效率最高, 分别达到 79.4% 和 83.1%, 高于 pH 8.0 后脱氮除磷效率变化不明显. 可知, 菌株 C18 在酸性条件下脱氮除磷效率较低.

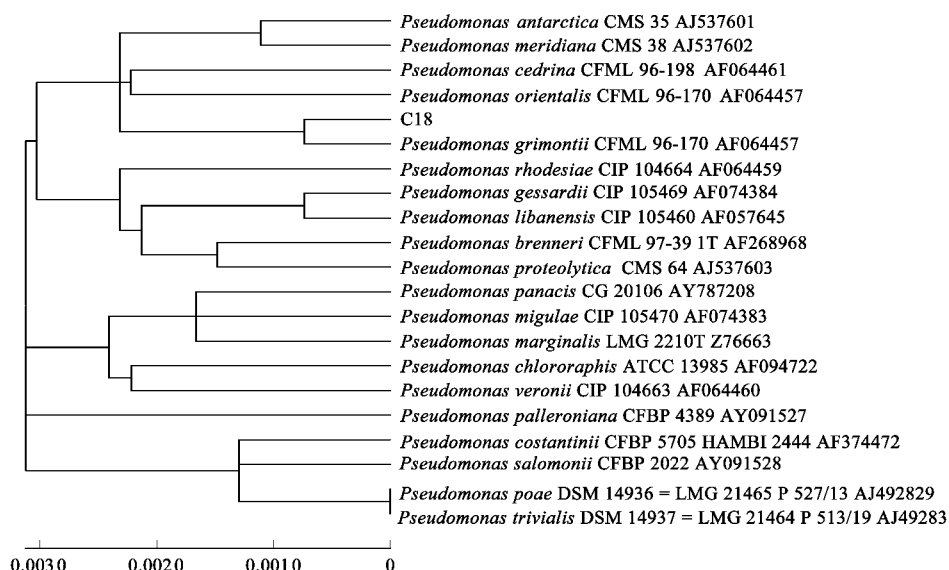


图5 基于 16S rRNA 基因构建的 C18 系统发育树

Fig.5 16S rRNA gene-based phylogenetic tree of strain C18

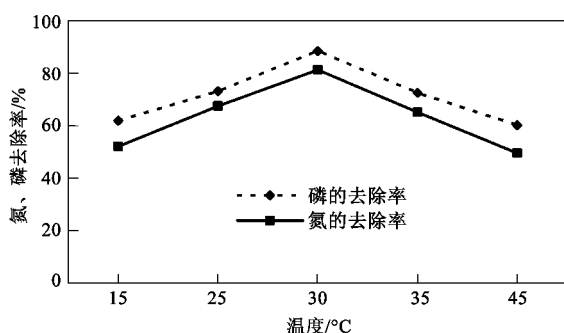


图6 温度对 C18 缺氧脱氮除磷效率的影响

Fig.6 Effect of temperature on the ability of C18 denitrifying and polyphosphate-accumulating

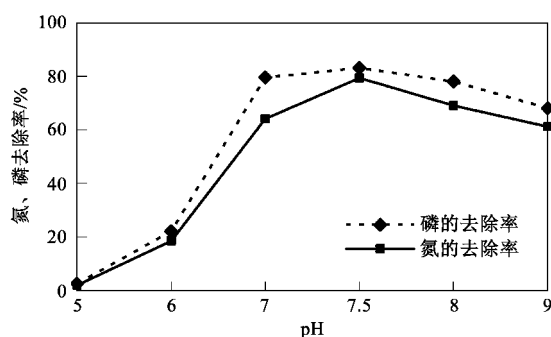


图7 pH 对 C18 缺氧脱氮除磷效率的影响

Fig.7 Effect of pH on the ability of C18 denitrifying and polyphosphate-accumulating

3 结论

(1) 从城市生活污水处理厂的活性污泥中筛选

出 1 株脱氮除磷菌 C18, 经 16S rRNA 基因序列分析及生理生化实验, 初步鉴定菌株 C18 为 *Pseudomonas grimontii*.

(2) 菌株 C18 在好氧培养 24 h 后, 培养基中上清液磷浓度从 38.7 mg/L 降低到 2.28 mg/L, 除磷率达 94.1%. C18 在缺氧培养 24 h 后, 培养基中上清液磷浓度从 44.5 mg/L 降低到 5.21 mg/L, 除磷率达 88.3%; 上清液硝酸盐氮浓度从 184.2 mg/L 降低到 30.6 mg/L, 脱氮率达 83.4%.

(3) C18 最适脱氮除磷温度为 30°C; 最适脱氮除磷 pH 为 7.5.

参考文献:

- [1] Lee D S, Jeon C O, Park J M. Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system [J]. Water Res, 2001, 35 (16): 3968-3976.
- [2] 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 Res, 2002, 36: 403-412.
- [3] Kuba T, Van Loosdrecht M C M, Heijnen J J. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrify dephosphatation and denitrification in a two-sludge system [J]. Water Res, 1996, 30 (7): 1702-1710.
- [4] Merzouki M, Bernet N, Delgenes J P, et al. Biological denitrifying phosphorus removal in SBR: effect of added nitrate concentration and sludge retention time [J]. Water Sci Technol,

- 2001, **43**(3): 191-194.
- [5] 裴湛. 污水反硝化除磷技术研究进展[J]. 污染防治技术, 2009, **22**(3): 79-82.
- [6] Kuba T, Van Loosdrecht M C M, Brandsebe F A, *et al.* Occurrence of denitrifying phosphorus removing bacteria in modified UCT-type wastewater treatment plants[J]. Water Res, 1997, **31**(4): 777-786.
- [7] Wachtmeister A, Kuba T, Van Loosdrecht M C M, *et al.* A sludge characterization assay for aerobic and denitrifying phosphorus removing sludge[J]. Water Res, 1997, **31**(3): 471-478.
- [8] Hu J Y, Ong S L, Ng W J, *et al.* A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors[J]. Water Res, 2003, **37**(14): 3463-3471.
- [9] Ng W J, Ong S L, Hu J Y. Denitrifying phosphorus removal by anaerobic / anoxic sequencing batch reactor[J]. Water Sci Technol, 2001, **43**(3): 139-146.
- [10] Tsuneda S, Ohno T, Soejima K, *et al.* Simultaneous nitrogen and phosphorus removal using denitrifying phosphate-accumulating organisms in a sequencing batch reactor[J]. Biochem Eng J, 2006, **27**(3): 191-196.
- [11] Zeng R J, Lemaire R, Yuan Z, *et al.* Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor[J]. Biotechnol Bioeng, 2003, **84**(2): 170-178.
- [12] Merzouki M, Berneta N, Delgenès J P, *et al.* Effect of prefermentation on denitrifying phosphorus removal in slaughterhouse wastewater[J]. Bioresour Technol, 2005, **96**(12): 1317-1322.
- [13] Koji H, Takahiro K, Takahiro K, *et al.* Isolation of the denitrifying phosphate-accumulating organisms using alternating anaerobic-anoxic screening method[J]. Pro Envir Eng Res, 2003, **40**(1): 53-61.
- [14] Shi H P, Lee C M. Combining anoxic denitrifying ability with aerobic-anoxic phosphorus-removal examinations to screen denitrifying phosphorus-removing bacteria[J]. Int Biodeterior Biodegrad, 2006, **57**:121-128.
- [15] 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.
- [16] 吕志堂,纪翠平,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.
- [17] Neidhardt F C, Bloch P L, Smith D F. Culture medium for enterobacteria[J]. J Bacteriol, 1974, **119**(3): 736-747.
- [18] Morohoshi T, Onuki M, Kato J, *et al.* A Method for screening polyphosphate-accumulating mutants which remove phosphate efficiently from synthetic wastewater[J]. Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi, Saitama, 2002, **95**: 637-640.
- [19] 罗宁,罗固源,吉方英,等. 新型双泥生物反硝化除磷脱氮系统中微生物的组成[J]. 给水排水,2003,**29**(8):33-35.
- [20] 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.
- [21] 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. 114-115, 125-127.
- [22] 沈萍,范秀容,李广武,等. 微生物学实验[M]. (第三版). 北京:高等教育出版社,1999. 97-99, 221.