

海洋异养硝化菌株的快速筛选

王光玉, 孙洋洋, 陈雷, 张健

(哈尔滨工业大学(威海)海洋科学与技术学院, 264209 山东 威海)

摘要: 目前尚缺乏有效地系统分离获得异养硝化菌的方法, 为此, 利用海洋养殖废水, 采用前期自养后期异养的混养富集方法, 获得具有异养脱氮能力的菌群. 通过异养培养基分离获得纯菌株, 利用特异性引物扩增分离菌株的氨单加氧酶(AMO)基因 *amoA* 和周质硝酸盐还原酶(NAR)亚基基因 *napA*, 快速筛选具有潜在异养硝化或异养硝化好氧反硝化能力的菌株. 通过氮素转化试验确认菌株的氮代谢特性. 共分离获得异养细菌 22 株, 其中 11 株细菌 *amoA* 基因呈阳性, 7 株细菌 *amoA* 基因和 *napA* 基因同时显阳性, 氮素转化试验证明 9 株细菌具有异养脱氮能力.

关键词: 混养富集; 异养硝化细菌; 好氧反硝化细菌; 氨单加氧酶基因(*amoA*); 周质硝酸盐还原酶亚基基因(*napA*)

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2012)12-0061-06

Rapid screening of marine heterotrophic nitrobacteria

WANG Guang-yu, SUN Yang-yang, CHEN Lei, ZHANG Jian

(School of Marine Science and Technology, Harbin Institute of Technology at Weihai, 264209 Weihai, Shandong, China)

Abstract: Method of mixed culture, earlier autotrophic condition and later heterotrophic condition, was used to enrich heterotrophic nitrifying bacteria and aerobic denitrifying bacteria from marine aquaculture wastewater. Heterotrophic nitrifying bacteria and aerobic denitrifying bacteria were isolated and purified by the heterotrophic culture medium. Using the special PCR primers, the bacteria were rapidly screened by amplifying Ammonia monooxygenase encoding gene (*amoA*) and a subunit of periplasmic nitrate reductase (NAR) encoding gene (*napA*). Those bacteria were identified by the denitrifying test. 22 heterotrophic bacteria strains were isolated, 11 strains had the *amoA* gene, 7 strains had both of the two genes, and there were 9 strains which had nitrifying ability.

Key words: mixed culture enrichment; heterotrophic nitrifying bacteria; aerobic denitrifying bacteria; *amoA* gene; *napA* gene

工厂化循环水养殖成败的关键是控制工厂化养殖系统中的水质, 而产生的废水中主要污染物为含氮化合物, 尤其是氨氮^[1]. 大量排放的养殖废水造成近岸海域生态系统失衡、赤潮频发、病害滋生, 最终导致养殖生物质量和产量的大幅下降. 传统脱氮工艺常采用自养硝化和厌氧反硝化作用

来脱除水中的氮元素, 自养硝化作用是整个氮素转化过程的限速步骤^[2]. 异养硝化细菌与自养硝化细菌相比生长速率快, 对环境变化的适应能力强, 能耐受高有机负荷和低溶解氧环境^[3]. 针对海水养殖废水有机物含量高等特点, 研究发现了一些可同时进行异养硝化和好氧反硝化的特殊细菌, 并分离出相关的微生物^[4-7].

目前, 异养硝化细菌的分离方法主要是富集稀释分离法^[8]和普通的平板分离法^[9]. 这些方法都是直接从环境中进行分离筛选, 微生物种类多, 工作量大. 本研究旨在建立一种新的快速筛选方法, 对海洋异养硝化细菌进行系统地富集驯化和

收稿日期: 2012-05-14.

基金项目: 哈尔滨工业大学科研创新基金资助项目(IMOQ10110001); 威海市科技攻关计划项目(IMJQ01110012); 博士启动基金资助项目(IMJQ10100025).

作者简介: 王光玉(1972—), 男, 副教授.

通信作者: 王光玉, wanggy18_2007@163.com.

分离筛选. 在富集驯化和分离筛选的各个阶段, 给微生物提供良好的生活条件, 显著增加硝化细菌数量, 然后利用分子生物学方法快速、准确地筛选异养硝化细菌.

1 实 验

1.1 菌种来源

菌种来源于威海市北海水产养殖有限公司大菱鲆养殖池的养殖废水.

1.2 培养基

分离培养基 2216E: 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 磷酸高铁 0.1 g, 陈海水 1 L, pH 7.6 ~ 7.8.

硝化能力测定培养基: 蛋白胨 1 g, 乙酸钠 1.1 g, 磷酸高铁 0.01 g, 陈海水 1 L, pH 7.7.

1.3 实验方法

1.3.1 硝化细菌的混养富集驯化

向一个容积为 60 L 的缸内注入 40 L 养殖废水, 混养富集驯化试验装置及控制过程按文献[10]的设计进行.

富集驯化分为两个阶段: 前期自养富集 70 d, 期间每天先检测驯化液中的氨氮和亚硝态氮质量浓度, 再向缸内流加氨氮, 使其质量浓度达 0.5 mg/L, 一旦硝化速率稳定就逐步提高驯化液的氨氮质量浓度达 8 mg/L; 后期异养驯化 10 d, 期间每天先检测水中氨氮和亚硝态氮的质量浓度, 并固定每天加 8 mg/L 的氨氮, 同时向缸内加 20 mL 质量浓度为 10 g/L 的鱼饵浸出液, 硝化速率稳定后提高流加的浸出液量最终达 100 mL.

1.3.2 海洋异养细菌的分离纯化

分别在富集驯化前、自养富集驯化结束和异养驯化结束 3 个时间点用 2216E 培养基进行海洋异养细菌的分离纯化.

1.3.3 异养硝化菌株的快速筛选

分别采用氨单加氧酶基因 *amoA*^[5] 和周质硝酸盐还原酶亚基基因 *napA*^[11] 保守区的一部分序列作为引物, 扩增 *amoA* 基因和 *napA* 基因. 引物名称及序列见表 1, 引物由上海生工生物工程公司合成.

模板提取选用煮沸裂解法, 从平板上挑取单菌落, 溶于 20 μ L 双蒸水中, 在水浴锅内煮沸 10 min. *amoA* 基因和 *napA* 基因扩增的反应体系如下: 反应总体积, 20 μ L; 10 $\times$ PCR Buffer, 2.0 μ L; MgCl₂ (1.5 mmol/L), 1.4 μ L; dNTP (10 mmol/L), 0.4 μ L; 上游引物 (20 μ mol/L), 0.5 μ L; 下游引物 (20 μ mol/L), 0.5 μ L; Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), 0.2 μ L; ddH₂O,

14.0 μ L; 模板, 1.0 μ L.

表 1 引物序列

功能基因	名称	序列(5'-3')
<i>amoA</i>	AMO1F	GGGGTTCTACTGGTGCT
	AMO2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC
<i>napA</i>	V66	TAYTTYTNHSNAARATHATGTA
	V67	DATNGGRTGCATYTCNGCCATRTT

扩增 *amoA* 和 *napA* 基因的热循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s; 48 $^{\circ}$ C 复性 60 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s; 扩增 29 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min.

将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 在凝胶图像分析系统中观察拍照.

1.3.4 硝化能力测定

通过氮素转化试验来判断基因扩增呈阳性的菌株是否具有硝化能力. 首先制备种子液, 将种子液分成两部分, 一部分灭活后接种到 6 瓶培养基中, 分别在 0 和 36 h 测定固体和液体的含氮量, 以确定试验前后氮素总量的变化, 保证试验的可行性; 另一部分不灭活接种到剩下的 6 瓶培养基中, 同样在 0 和 36 h 测定固体和液体的含氮量, 考察菌株的异养硝化能力.

1.3.5 水质分析方法

水质分析方法均依照文献[12]进行, 氨氮采用靛酚蓝分光光度法, 亚硝态氮采用萘乙二胺分光光度法, 有机氮采用凯氏定氮法.

2 结果与分析

2.1 混养富集过程水质检测结果

在维持温度和溶解氧的驯化条件下, 盐度始终处于 35‰ 左右, pH 经调整在 7.54 ~ 8.35 波动. 自养富集阶段体系中氨氮、亚硝态氮的质量浓度变化见图 1.

自养驯化第 2、3 周氨氮有少量的累积, 最高浓度达 0.502 0 mg/L, 第 4 周开始, 氨氮质量浓度迅速降低, 几乎为零. 这 3 周自养菌数量明显增多, 约为富集驯化前自养菌数目的 10 倍, 说明经过 3 周的富集驯化, 氨氧化细菌增殖, 氨氮质量浓度逐渐降低, 氨氧化细菌在系统中培养成熟. 氨氮降低的同时亚硝酸盐质量浓度逐渐升高, 在该过程中, 亚硝酸盐氧化细菌开始增殖. 当亚硝酸盐质量浓度开始降低时, 说明亚硝化能力总体提升, 亚硝酸盐氧化菌在系统中也培养成熟^[13].

自养驯化前 6 周, 系统内亚硝态氮质量浓度持续升高, 说明在海洋环境中亚硝态氮的积累是常见现象^[14], 因为亚硝酸盐氧化细菌和氨氧化细菌相比在系统中自然形成更为缓慢.

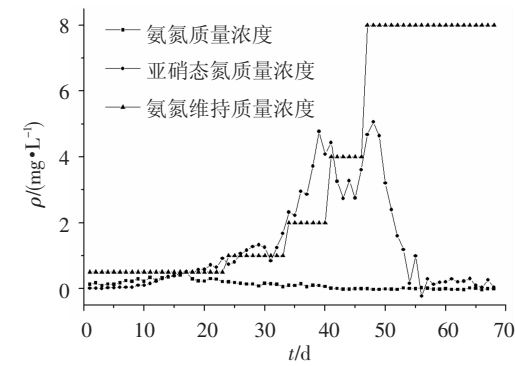


图 1 自养富集驯化过程中氨氮和亚硝态氮的变化

自养驯化后期,亚硝态氮质量浓度不稳定,从第 8 周开始,亚硝态氮的质量浓度迅速下降,从 5 mg/L 降到 0.2 mg/L 左右.说明经过长时间的驯化,硝化细菌能够适应高质量浓度的亚硝酸盐,逐渐恢复并提高亚硝酸盐氧化能力^[15].自养富集结束后,富集驯化体系的硝化能力明显提高,说明这段时间脱氮细菌得到了富集,也淘汰了一部分没有自养能力的菌.

异养富集阶段,在每天流加鱼饵浸出液的同时,检测环境因子、氨氮以及亚硝态氮的质量浓度,结果见图 2.

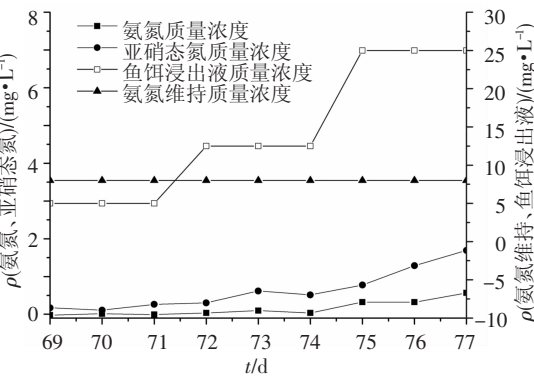


图 2 异养富集驯化过程中氨氮和亚硝态氮的变化

异养驯化阶段,每天加 8 mg/L 的氨氮,随着鱼饵浸出液流加量逐渐增大,检测到的氨氮质量浓度仍维持在 0.1 mg/L 以下,并且有少量亚硝酸盐的积累,说明异养微生物在氧化高浓度有机质的同时,对氨氮也有较高的去除率^[16],并且亚硝态氮是异养硝化菌进行氮素转化时的中间产物.当鱼饵浸出液加到 25 mg/L 时氨氮略有上升,然后又迅速被去除.说明有机物的存在使一部分专性自养硝化细菌生长受到抑制,经过适应后,有异养硝化能力的细菌增长,氧化氨盐和亚硝酸盐的能力加强.

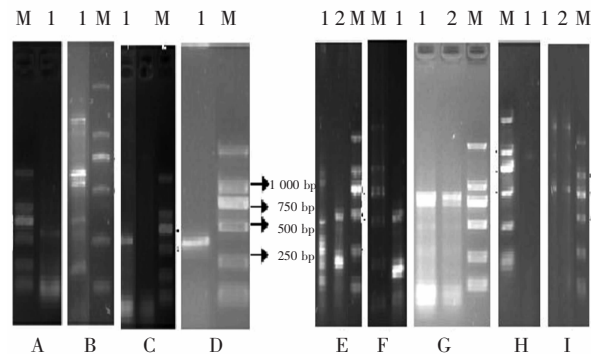
2.2 海洋异养细菌的分离结果

通过平板稀释分离计数可知,富集驯化前异养细菌的数目为 $6.4 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,自养驯化结束后异养细菌的数目为 $7.6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,异养驯化后异养细菌数目为 $1.22 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$.自养驯化结束后,异养细菌的数目减少了约 1 个数量级,而异养驯化结束后,异养细菌的数目增加到 20 倍.长期的自养富集将异养细菌淘汰,而短期的异养富集使自养细菌中具有异养生长和硝化能力的细菌迅速增长.

未进行富集驯化时分离得到 8 株菌落形态各异的异养菌,分别编号为 W01 ~ W08,经过富集驯化后分离得到 14 株细菌,其中自养富集后得到 8 株,分别编号为 S11 ~ S18,异养富集后得到 6 株,分别编号为 S21 ~ S26.

2.3 amoA 基因扩增结果与分析

由于不同种属的氨氧化细菌的 *amoA* 基因略有不同,可以将 *amoA* 基因作为有效的分子标记对环境样品中的氨氧化细菌种群进行鉴定并对系统发育进化关系进行研究.混养富集过程中分离的 22 株菌经 PCR 扩增后,产物电泳结果见图 3.



M: DL2000;
养殖废水中, A1: W05; B1: W07; C1: W01.
自养驯化结束, D1: S11; E1: S14; E2: S15; F1: S16.
异养驯化结束, G1: S21; G2: S22; H1: S24; I1、I2: S27.

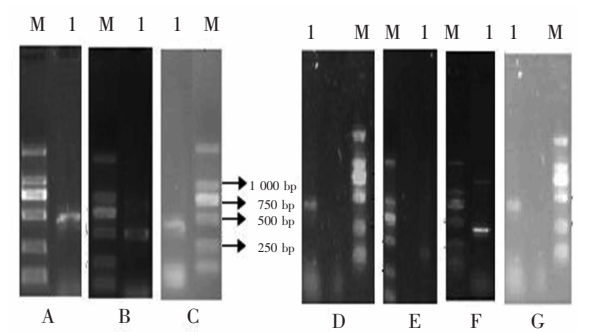
图 3 氨单加氧酶基因扩增产物电泳图谱

富集驯化前的养殖废水中分离出 8 株异养菌,用引物 *amo1F/amo2R* 能扩增出特异性条带的有 3 株,大小在 500 ~ 750 bp,分别是 W01, W05, W07.自养富集驯化结束后分离的 8 株异养菌中,引物 *amo1F/amo2R* 能扩增出条带的有 4 株,分别是 S11, S14, S15, S16,电泳条带特异性不高,但在 490 bp 左右都有条带.异养富集结束后分离的 6 株异养菌中,引物 *amo1F/amo2R* 能扩增出特异性条带的有 4 株,大小在 750 ~ 1 000 bp,分别是 S21, S22, S24, S27.共有 11 株菌扩增后能得到 PCR 产物.

上述结果可以看出,同样的引物扩增出的产物大小不同,并且特异性不高,这可能是因为引物的特异性不高,也可能跟菌种不同有关. 宋琴等^[17]研究了异养硝化作用的相关酶类,结果表明,菌株不同,异养硝化菌的 *amo* 基因存在很大的差别. 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) (异养硝化菌)的 *amo* 基因和欧洲亚硝化单胞菌 (*N. europaea*) (自养硝化细菌)的 *amoA* 存在明显的序列相似性,而异养硝化菌脱氮副球菌 Pd1222 与自养硝化细菌又存在较大差异. 胡安谊等^[18]研究的氨氧化古菌中的 *amoA* 基因大小在 650 bp 左右, Jia You 等^[19]的研究表明氨氧化古菌的 *amoA* 基因大小为 635 bp,这与 W01、W05、W07 号菌株的 PCR 产物大小相似. J H Rotthauwe 等^[20]在研究自养氨氧化细菌时扩增出的 *amoA* 片段为 491 bp,与本试验自养富集后细菌扩增出的条带大小接近.

2.4 *napA* 基因扩增结果与分析

硝酸盐还原酶有两种存在形式,一种镶嵌于细胞膜内,称为膜结合硝酸盐还原酶,另一种游离于细胞膜外周质中,称为周质硝酸盐还原酶,后者的表达与活性对氧分子的抑制不敏感,好氧反硝化反应正是由这种特殊酶来催化的. 通过检验菌株是否有表达周质硝酸盐还原酶的基因片段即可初步判断其是否具有好氧反硝化能力. 结果见图 4.



M: DL2000;
养殖废水中, A1: W01; B1: W05; C1: W07.
自养驯化结束后, D1: S16; E1: S15.
异养驯化结束后, F1: S21; G1: S22.

图 4 周质硝酸盐还原酶亚基基因扩增产物电泳图谱

用引物 V66/V67 从已分离的菌株中筛选可能含有 *napA* 基因的菌株,产物电泳后都能得到特异性条带,且与目的片段(414 bp)的大小相近. 富集驯化前有 3 株,分别是 W01, W05, W07;自养富集后有 2 株,分别是 S15, S16;异养富集后有 2 株,分别是 S21, S22.

多数能够进行好氧反硝化作用的菌株都有

napA 基因,但是,一些菌株即使存在 *napA* 基因,也不能进行表达. 3 个阶段分离的菌株中,共有 7 株扩增后能得到 PCR 产物,有 *napA* 基因的菌株都能扩增出 *amoA* 基因,但含有 *amoA* 基因的菌株不一定能扩增出 *napA* 基因. 这说明能够进行好氧反硝化的菌株通常都有异养硝化能力^[21].

2.5 硝化能力测定结果与分析

两种基因扩增结果显阳性的共有 11 株菌,将这 11 株菌接种到硝化能力测定培养基中,在 24、48、72 h 时检测亚硝态氮增加的质量浓度,如图 5 所示. 可以看出, *amoA* 和 *napA* 基因扩增显阳性的菌株均能进行异养硝化作用,因为 11 株菌中亚硝态氮质量浓度均有升高,异养硝化能力存在一定的差异. 比较 3 个时期的菌株,养殖废水中的 W07 和自养富集后的 S11、S15 在 24 h 时亚硝态氮质量浓度较高,48 h 时质量浓度有明显的下降,72 h 时基本转化完毕. 而异养富集后菌株 S21、S22、S27 的硝化速率没有前两个时期高,但是能够进行硝化作用的菌株数量增多. 单位生物量的异养菌氧化氨氮的速率比传统自养菌慢 2~3 个数量级,但异养菌的生长速率快,能够较好地适应环境,故其总体氨氧化速率并不比自养菌慢. 6 株菌异养硝化效果较好,分别是 W07、S11、S15、S21、S22、S27.

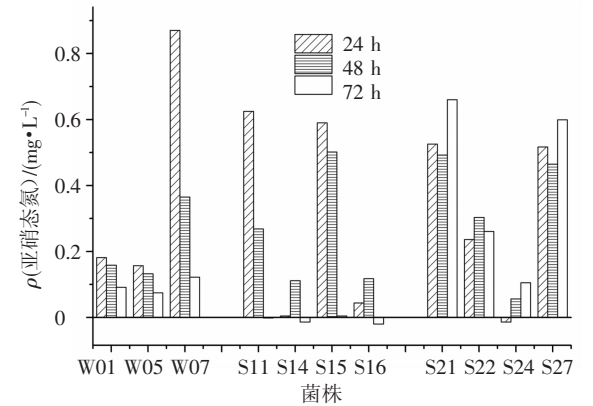


图 5 异养细菌硝化能力鉴定

试验中没有检测硝态氮,故不能因为没有亚硝态氮的产生就判定菌株非异养脱氮细菌,试验过程中氨氮、有机氮、亚硝态氮的 24 h 变化量如表 2 所示,可得 3 种氮总的变化情况.

氨氮、亚硝态氮以及有机氮总的变化量, W01、W05、W07、S11、S14、S21、S22 这 7 株菌均有不同程度的降低,而降低的这部分氮只可能变成硝态氮或气态氮,无论是哪种转变都能说明这几株菌具有硝化或脱氮能力.

表 2 培养过程中氨氮、有机氮和亚硝态氮的变化量 mg · L⁻¹

菌株	氨氮变化量	有机氮变化量	亚硝态氮变化量	3 种氮总变化量
W01	- 9. 31 ± 0. 12	1. 15 ± 0. 09	0. 18 ± 0. 01	- 7. 99
W05	- 8. 09 ± 0. 33	1. 23 ± 0. 06	0. 16 ± 0. 01	- 6. 70
W07	- 7. 13 ± 0. 25	1. 43 ± 0. 05	0. 87 ± 0. 03	- 4. 83
S11	- 6. 65 ± 0. 15	0. 14 ± 0. 01	0. 62 ± 0. 03	- 5. 89
S14	- 5. 83 ± 0. 26	0. 42 ± 0. 02	0. 00 ± 0. 01	- 5. 41
S15	- 0. 12 ± 0. 03	0. 34 ± 0. 02	0. 59 ± 0. 01	0. 80
S16	- 1. 47 ± 0. 19	2. 44 ± 0. 09	0. 04 ± 0. 00	1. 01
S21	- 9. 90 ± 0. 41	0. 35 ± 0. 02	0. 53 ± 0. 02	- 9. 03
S22	- 21. 99 ± 0. 79	0. 19 ± 0. 01	0. 24 ± 0. 01	- 21. 56
S24	5. 49 ± 0. 14	0. 59 ± 0. 01	- 0. 01 ± 0. 01	6. 07
S27	- 1. 47 ± 0. 32	0. 78 ± 0. 02	0. 52 ± 0. 01	- 0. 17

表 3 总结了基因扩增结果以及菌株的脱氮能力,可以看出,除了 S16 和 S24 外,凡是基因扩增呈阳性的菌株均具有硝化或脱氮能力,初步判定该方法可以筛选到具有异养脱氮能力的菌株.

表 3 基因扩增结果及菌株的硝化能力

菌株	<i>amoA</i>	<i>napA</i>	硝化能力
W01	+	+	+
W05	+	+	+
W07	+	+	+
S11	+	-	+
S14	+	-	+
S15	+	+	+
S16	+	+	-
S21	+	+	+
S22	+	+	+
S24	+	-	-
S27	+	-	+

注:“+”:基因扩增呈阳性或有硝化能力;“-”:基因扩增呈阴性或无硝化能力.

3 结 论

1)提出了高效富集驯化海洋硝化细菌的方法,并确定了富集驯化的工艺条件,温度(25 ± 2)℃,DO > 5 mg/L,在自养富集后期进行异养驯化,可以驯化出具有混养特性的异养硝化细菌和好氧反硝化细菌.

2)在富集驯化前、自养驯化结束、异养驯化结束时进行异养细菌的分离,得到的菌株数目分别是 8 株、8 株和 6 株.

3)富集驯化前分离的 8 株异养菌中 *amoA* 基

因扩增为阳性的有 3 株,*napA* 基因扩增呈阳性的有 3 株,自养富集结束后分离的 8 株异养菌和异养富集结束后分离的 6 株异养菌中,*amoA* 基因扩增为阳性的均为 4 株,*napA* 基因扩增呈阳性的均有 2 株.

4)快速筛选出的基因扩增呈阳性的 11 株菌中,9 株具有处理氨氮的能力,可以将氨氮转化成硝化产物(亚硝态氮、硝态氮)或反硝化产物(气态氮).

参 考 文 献:

[1] CAO Ling, WANG Weimin, YANG Yi, *et al.* Environmental impact of aquaculture and countermeasures to aquaculture pollution in china[J]. Environmental Science & Pollution Research, 2007, 14(7): 452 - 462.

[2] MARTENS-HABBENA W, M. BERUBE P, URAKAWA H. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria [J]. Nature, 2009, 461: 976 - 981.

[3] QU Yang, ZHANG Peiyu, YANG Ruixia, *et al.* Characteristics of removal nitrogen and halotolerance of halotolerant heterotrophic nitrifying strain qy18 and moderately halophilic heterotrophic nitrifying strain gs2[J]. Marine Environmental Science, 2011, 30(3): 337 - 341.

[4] GAO Xiyao, LIU Ying, ZHENG Haiyan, *et al.* Identification and characteristics of a marine aerobic denitrifying bacterium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(9): 1164 - 1171.

[5] JIN Min, WANG Jingfen, KONG Qingxin, *et al.* Isolation and denitrification mechanism of an aerobic heterotrophic bacterium *Acinetobacter* sp. YY - 5[J]. Chinese Journal Applied Environmental Biology, 2009, 15(5):

- 692 – 697.
- [6] WANG Chenglin, ZHOU Qiaohong, WANG Yafen, *et al.* Studies on the identification and nitrosification of a heterotrophic nitrifier bacterial strain[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008, 27(3): 1146 – 1150.
- [7] YANG Hang, HUANG Jun, LIU Bo. Advances in research of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain *paracoccus pantotrophus* ATCC 35512[J]. Chinese Journal Applied Environmental Biology, 2008, 14(4): 585 – 592.
- [8] LIU Fangfang, ZHOU Deping, WU Shuhang, *et al.* Isolation and identification of heterotrophic nitrifiers from cultivation wastewater [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(11): 2232 – 2237.
- [9] WANG Hongyu, MA Fang, YANG Kai, *et al.* Ammonia removal by two strains of heterotrophic nitrifying bacteria [J]. China Environmental Science, 2009, 29(1): 47 – 52.
- [10] WANG Guangyu, YANG Jixian, MA Fang, *et al.* Ammonia conversion characteristics in a closed recirculating aquaculture system [C]//Environmental Pollution and Public Health Special Track within iCBBE. Beijing: Engineering in Medicine and Biology Society, 2009.
- [11] SMITH C J, NEDWELL D B, DONG Liangfeng, *et al.* Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in Estuarine Sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(11): 3612 – 3622.
- [12] 中国国家标准化管理委员会. GB17378.4—2007 海洋监测规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [13] KONG Xiaorong. Effect of nitrifying bacteria on construction of nitrification function in marine aquarium and analysis of related factors[D]. Qindao: Qingdao Technological University, 2010.
- [14] MANTHE D P, MALONE R F. Chemical addition for accelerated biological filter acclimation in closed blue crab shedding systems [J]. Aquaculture, 1987, 6: 227 – 236.
- [15] GAO Dawen, PENG Yongzhen, QING Yang, *et al.* Application of real time control for achieving and stabilizing short-cut nitrification and denitrification[J]. China Water & Wastewater, 2003, 19(12): 1 – 5.
- [16] WANG Libao, XU Xihe, XU Pu, *et al.* Investigation on heterotrophic nitrification of sediments in marine culture ponds[J]. Marine Fisheries, 2006, 28(2): 147 – 151.
- [17] SONG Qin, XU Lei. Advancement of enzymology of heterotrophic nitrification [J]. Biochnology Bulletin, 2008, 5: 60 – 66.
- [18] 胡安谊, 乔念志. 氨氧化古菌—环境微生物生态学研究的一个前沿热点[J]. 自然科学进展, 2009, 19(4): 370 – 378.
- [19] YOU J, DAS A, DOLAN E M, *et al.* Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal [J]. Water Research, 2009, 43(7): 1801 – 1809.
- [20] ROTTHAUWE J H, WITZEL K P, LIESACK W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations [J]. Applied and Environment Microbiology, 1997, 63(12): 4704 – 4712.
- [21] BRIEYLEY E D R, WOOD M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterization of a nitrifying bacterium [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33(10): 1403 – 1409.

(编辑 刘 彤)