

反硝化细菌 *Klebsiella* sp. DB-1 的分离鉴定与活性研究

刘咏¹, 钱家忠², 魏兆军¹, 王璐璐²

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009; 2. 合肥工业大学资源与环境工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要:从巢湖芦苇湿地分离筛选出一株异养反硝化细菌, 对其进行鉴定, 并进行了反硝化活性研究, 目的是为了研究地下水硝酸盐污染的生物修复机理. 用酒石酸钾钠培养基从湿地土壤中富集并分离出反硝化细菌, 对该菌株进行了 16S rDNA 鉴定及系统发育分析, 并研究了单一碳源、碳氮比对其反硝化活性的影响, 以及其对水中硝酸盐氮含量的适应性. 分离出了一株异养反硝化细菌, 具有较高的反硝化活性, 命名为 *Klebsiella* sp. DB-1, 革兰氏阴性球形, 兼性厌氧, 16S rDNA 序列分析表明, 该菌株与 *Klebsiella* sp. 的相似性为 99.6% 以上; 该菌株利用乙酸钠为碳源, 采用碳氮比 (C/N) 为 3, 水中初始硝酸盐氮含量在 100 mg/L 以内, 120 h 几乎完全去除水中硝酸盐氮. 菌株 *Klebsiella* sp. DB-1 为异养反硝化细菌, 具有较广的碳源谱, 能够有效地去除水中硝酸盐氮.

关键词:异养反硝化细菌; 16S rDNA 序列鉴定; 活性研究

中图分类号: X172

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.0253-2778.2011.01.003

Identification and denitrification activity of an isolated denitrifier

LIU Yong¹, QIAN Jiazhong², WEI Zhaojun¹, WANG Lulu²

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. School of Resources and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: In order to research the mechanism of nitrate-contaminated groundwater bioremediation, a heterotrophic denitrifier was isolated and identified from the reed-wetland in Chaohu lake, and its denitrification activity was studied. Denitrifier was isolated on sodium potassium tartrate agar, and 16S rDNA identification and phylogenetic analysis of the strain were performed. The influence of solo carbon source and C/N ratio on the denitrification activity was studied and the suitability of the strain for nitrate content in water was researched. A heterotrophic denitrifier with high denitrification activity was isolated and named DB-1. The isolated strain was gram negative, a facultative anaerobe, and a micrococcus bacterium. The 16S rDNA sequence analysis revealed that strain DB-1 had a similarity of 99.6% to *Klebsiella* sp. When sodium acetate was used as carbon source, NO_3^- -N could be removed almost completely from water at 120 h while keeping C/N ratio of 3 and the initial nitrate concentration was 100 mg/L. The strain DB-1 was a heterotrophic denitrifier, with extensive carbon source scope and capable of removing nitrate effectively from water.

Key words: heterotrophic denitrifier; 16S rDNA sequence identification; activity research

收稿日期: 2010-04-09; 修回日期: 2010-08-17

基金项目: 国家自然科学基金(40872166, 40672154), 新世纪优秀人才计划(NCET-06-0541)资助.

作者简介: 刘咏, 女, 1968年生, 硕士, 副教授. 研究方向: 环境生物学与资源综合利用. E-mail: liuy99999@163.com

通讯作者: 钱家忠, 博士/教授. E-mail: qjiazhong@gmail.com

0 引言

自从20世纪70年代以来,地下水硝酸盐污染已经成为世界上许多国家或地区所面临的一个重要的环境问题;一方面,过量硝酸盐的摄入危及人类健康,导致蓝色婴儿综合症和胃癌;另一方面,过量的硝酸盐随地下水补给地表水体,引起富营养化发生^[1-3].地下水的脱氮,已经成为研究热点^[4-6].目前已经报道的方法很多^[7-9],其中利用微生物进行原位或异位修复因其简单、经济而最受关注.已经从自然界中分离出许多生物反硝化细菌,绝大部分是异养的,包括一些兼性厌氧的变形杆菌属、微球菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属、产碱杆菌属、葡萄球菌、黄杆菌属的一些种类^[10].传统理论认为反硝化细菌是异养厌氧的,在无氧或厌氧条件下,某些兼性厌氧微生物利用硝酸盐作为呼吸链的最终受体,把它还原成亚硝酸、NO、N₂O直至N₂的过程,称为反硝化作用.在这个过程中NO₃⁻或NO₂⁻代替氧作为末端电子受体,并且产生ATP.当电子从供体转移到受体时,获得能量,用于合成新的细胞物质和维持现有细胞的生命活动.

异养型反硝化细菌需要有机碳源进行反硝化作用,地下水中溶解的有机碳源较少,要想使反硝化反应能够进行,必需投加有机碳作为碳源和电子供体.菌种是生物反应的根本,分离获得高活性的反硝化菌株,不仅有助于揭示生物脱氮机理,优化生物脱氮工艺性能,还可为生物脱氮工艺提供生产菌种,促进该工艺的推广应用.

本文从巢湖芦苇湿地分离出一株新菌株,拟鉴定其分类地位并研究其生物脱氮活性.

1 材料与方法

1.1 材料

菌株来源:从合肥市巢湖芦苇湿地地下0.5~1.5 m取土样,用于分离筛选反硝化细菌.

培养基:①富集培养基^[10]:蛋白胨10 g, KNO₃ 1 g,蒸馏水1 000 mL, pH7.2~7.6;②分离培养基:在富集培养基中添加琼脂18 g/L;③反硝化细菌培养基^[11]: KNO₃ 2 g, 酒石酸钾钠 20 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, K₂HPO₄ 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.2.

1.2 菌株的筛选

取湿地土样,将1 g土样溶入100 mL的富集培

养基中培养得到富集菌液,采用系列平板稀释涂布及划线法分离菌株.培养过程置于厌氧培养箱中,30℃恒温培养.用格利斯试剂^[11]、奈氏试剂^[11]定性检测菌株的反硝化能力,筛选出一株能力强的反硝化细菌.反复划线培养后,根据菌落形态的一致性,判断菌株的纯化情况,选取纯化菌株进行16S rDNA鉴定及反硝化活性研究.

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态观察与生理生化试验

进行革兰氏染色^[10],在显微镜下观察该菌株的形态特征.

将菌株在半固体穿刺培养基中进行穿刺培养,根据培养生长特征确定其与分子氧的关系,并将菌株在液体反硝化培养基中30℃培养,分别进行糖发酵试验、接触酶试验、明胶水解试验、淀粉水解试验、反硝化反应等生理生化试验.

1.3.2 16S rDNA序列测定

从平板中挑取一个菌落,接种到15 mL液体富集培养基中培养48 h,离心后收集细胞.按照试剂盒说明书,利用基因组DNA抽提试剂盒(TaKaRa公司,大连)抽提基因组DNA,作为模板来扩增16S rDNA.扩增的引物为16sF(5'-GCGGCGTGCCTAATACATGC-3')和16sR(5'-GCGTCAGTTARGCAGACCAGA-3')(上海生物工程公司合成).PCR反应条件为:94℃预变性5 min;94℃变性40 s,55℃复性90 s,72℃延伸2 min,35个循环;72℃延伸10 min. PCR反应后,在紫外条件下用刀片切出目的条带,利用琼脂糖凝胶DNA试剂盒(Axygen公司)回收目的16S rDNA片段.回收的PCR产物连接到pMD18-T载体(TaKaRa公司,大连),转化到EcoR I XL-1细胞株,利用PCR方法鉴定出阳性克隆后,进行序列测定,序列测定由上海生物工程公司完成.测序后,得到长度为1 423 bp菌株的16S rDNA的序列,与GenBank数据库中已有的16S rDNA序列进行相似性比较分析,并构建系统进化树.

1.3.3 构建系统发育树

从GenBank(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库下载不同类型菌株的16S rDNA序列,利用DNAstar软件对序列进行加工,保留同样的区域的序列.分子系统树的构建采用MEGA 3.1软件完成.依据核苷酸序列及采用邻接法(NJ)构建进化树,进行1 000次自举检验,得到的置信度数值标在

各个分支点处,为了简化算法,所有的序列变化均被视为无序特征,DNA 序列变异中的转换和颠换赋予相同的加权值.用于系统发育树构建的相关菌株见表 1.

表 1 用于系统发育树构建的分离菌株和相关参比菌株的细菌名称、菌株编号和序列登录号

Tab. 1 Names, strain number and accession number of sequences of strains and the related bacteria used in the construction of the phylogenetic tree

names of bacteria	number of strains	accession number
<i>Klebsiella</i>	TS34	EU073100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HDDMM07	EU723828
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	K30	EU661377
<i>Klebsiella granulomatis</i>	K22-14	EU333881
<i>Klebsiella</i>	XJ1	EU872412
<i>Klebsiella</i>	DB-1	FJ711772
Uncultured bacterium clone	P6D23-687	EF510907
Uncultured bacterium clone	P4D7-420	EF509861
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>		M75039
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		M75083
Uncultured bacterium clone	P4D7-395	EF509891
<i>Actinobacillus succinogenes</i>		AF024525
<i>Actinobacillus hominis</i>		L06076

1.4 反硝化活性

1.4.1 利用单一碳源的反硝化活性

采用 KNO_3 作为唯一的氮源,以酒石酸钾钠反硝化细菌培养基为基础,按照硝酸盐氮 100 mg/L 加 KNO_3 ,采用 C/N 3 : 1,分别以柠檬酸钠、乙醇、乙酸钠、甲酸钠、乙酰胺、甲醇等碳源替换反硝化细菌培养基中的酒石酸钾钠,配制不同碳源的培养基各 100 mL,分装在 250 mL 的三角瓶中,按 2% (体积分数)接种量接种加入富集 48 h 菌液(OD 值均调整到 0.5,下同),接种混匀后将三角瓶放入厌氧箱恒温 30 °C 培养 5 d,根据培养液中硝酸盐氮含量的变化,研究菌株利用碳源进行反硝化作用情况.

1.4.2 C/N 对菌株反硝化作用的影响

采用 1.4.1 确定的较优碳源,研究 C/N 对菌株反硝化活性的影响,按照不同 C/N 比(1,3,5,7,9,11)分别添加碳源,以不加碳源的培养基作对照,每种培养基(初始硝酸盐氮 100 mg/L)配制 100 mL,按 2% (体积分数)接种量接种富集 48 h 菌液,将培养液放入厌氧培养箱恒温 30 °C 培养 5 d,根据硝酸盐氮的含量变化研究 C/N 对菌株反硝化作用的影响.

1.4.3 菌株对水中硝酸盐氮浓度的适应性

采用最佳碳源及 C/N,改变反硝化培养基中初始硝酸盐氮含量(分别为 30,50,70,100 mg/L),各配制 100 mL,按 2% (体积分数)接种量接种富集 48 h 菌液,放入厌氧培养箱恒温 30 °C 培养,在接种后的 0 h,12 h,24 h,48 h,72 h,96 h 和 120 h 时取样检测硝酸盐氮含量变化.

1.5 分析方法^[12]

$\text{NO}_3^- - \text{N}$: 采用酚二磺酸光度法测定; $\text{NO}_2^- - \text{N}$: 采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定.

1.6 试验结果的统计分析

试验结果用平均值±标准方差($n=3$)表示,采用 Duncan's 多重检验分析试验结果平均值的差异显著性,设差异水平 $\alpha=0.05$ ($P<0.05$ 为差异显著).

2 结果与分析

2.1 反硝化细菌的筛选结果

巢湖野生芦苇湿地的土壤细菌经分离纯化后,在反硝化培养基上长出三种明显不同的菌落形态.将这三种菌分别进行划线纯化后,得到单菌落.

分别挑取三种菌落在试管内进行液体培养.厌氧培养 24 h 后,用格利斯试剂和奈氏试剂进行菌株反硝化能力的定性检测,结果列于表 2.

表 2 三种细菌的菌落形态与显色反应

Tab. 2 Colonial morphology of the three strains and color reaction

strain	colonial morphology	griess reagent	nessler reagent
1	圆形,乳白色,表面光滑,边缘整齐	绛红色	黄色
2	圆形,微黄色,边缘粗糙	红色	黄色
3	圆形,暗黄色,边缘较整齐	粉红色	黄色

由表 2 可知,三种细菌的反硝化能力有所差别.格利斯试剂检测结果表明,1 号菌株在培养 24 h 后的发酵液中产生了较多的亚硝酸盐,而另外两种菌的颜色反应不太明显,说明菌液中的亚硝酸盐含量较少.另外,经奈氏试剂检测后,所有被检测试样的颜色反应都较弱,说明有少量的 NH_4^+ 产生.综合分析知 1 号菌株能够进行异养反硝化能力最强,命名为 DB-1,对该菌株进行形态、种属鉴定及反硝化活性实验.

2.2 菌株的形态观察与生理生化试验结果

用显微镜观察筛选出来的反硝化细菌,革兰氏

染色法对细菌染色后观察结果如图 1. 结果显示, 此反硝化细菌呈球形, 革兰氏阴性.

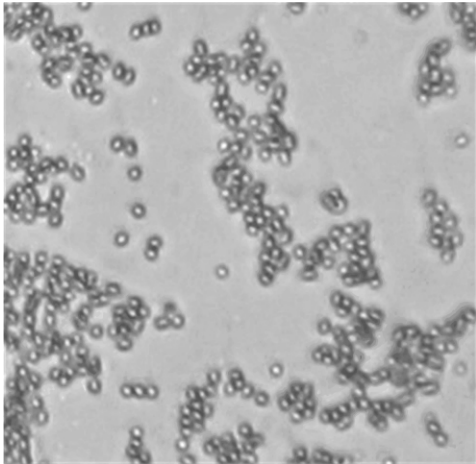


图 1 菌株 DB-1 的革兰氏染色结果
Fig. 1 Result of gram stain of DB-1 strain

生理生化试验结果表明, 该菌株能在 30 ℃ 生长, 在厌氧条件下以硝酸盐为唯一氮源的培养基能产气, 能水解明胶, 不能水解淀粉, 明胶试验漏斗状, 糖发酵产酸产气, 接触酶产气. 在穿刺培养基中穿刺培养, 细菌全线生长, 试管的底部出现气泡, 表明该菌株为兼性厌氧菌.

2.3 分离菌株 16S rDNA 序列测定及鉴定

利用好的菌种的 16S rDNA 的序列, 在 NCBI 数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行

Blast 分析, 根据所测菌株与数据库已知序列菌株的同源性高低, 确定我们分离菌株的种类.

序列联配的结果表明, 分离菌株与 *Klebsiella* 16S rDNA 的相似率达 99.6% 以上, 结合菌株的形态学和生理学特性, 可确定分离的菌株为 *Klebsiella* sp., 命名为 *Klebsiella* sp. DB-1 (GenBank 登录号: FJ711772). 与以往文献报道的反硝化菌株相比, 是一株新的反硝化菌株类型. 其系统发育树如图 2 所示.

2.4 菌株 DB-1 反硝化活性

2.4.1 菌株利用单一碳源的反硝化结果

不同碳源条件下, 菌株在 120 h 内去除硝酸盐氮的情况如图 3 所示. 由图 3 可以看出, 该菌株利用这几种碳源进行反硝化作用去除水中硝酸盐氮的效果都不错, 根据水中硝酸盐氮的去除率看, 乙酸钠的效果最好, 在 0~120 h 硝酸盐氮的含量由初始的 101.80 mg/L 降到 0.82 mg/L, 去除率为 99.2%. 其他几种碳源效果也很明显, 硝酸盐氮的去除率均达到 98% 以上.

图 4 是菌株利用碳源进行生物反硝化, 在 0 h 和 120 h 检测到水中亚硝酸盐氮的含量. 菌株反硝化作用将硝酸盐还原为亚硝酸盐, 由于亚硝酸盐不稳定, 变成 N_2O 或 N_2 气体溢出, 水中残留亚硝酸盐接近饮用水标准 (0.03 mg/L). 由此看来, 菌株能够利用这几种碳源作电子供体进行生物反硝化, 乙酸

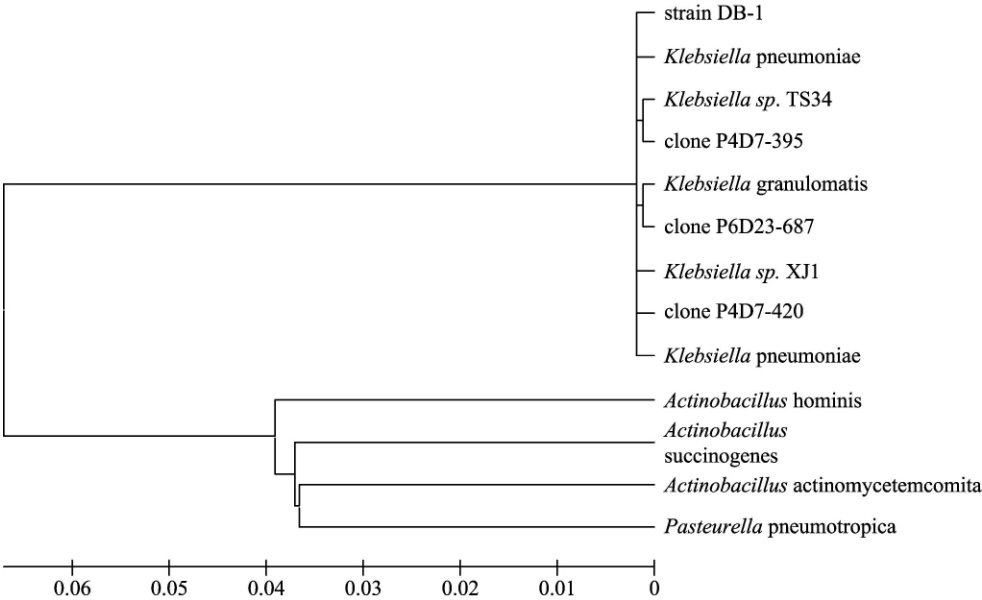


图 2 基于 16S rDNA 序列同源性构建的无根系统发育树
Fig. 2 Unrooted phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of strain DB-1 and related species

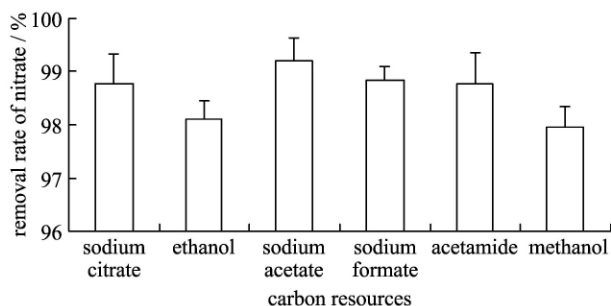


图 3 不同碳源下硝酸盐氮的去除率

Fig. 3 The removal rate of nitrate-nitrogen under different carbon resources

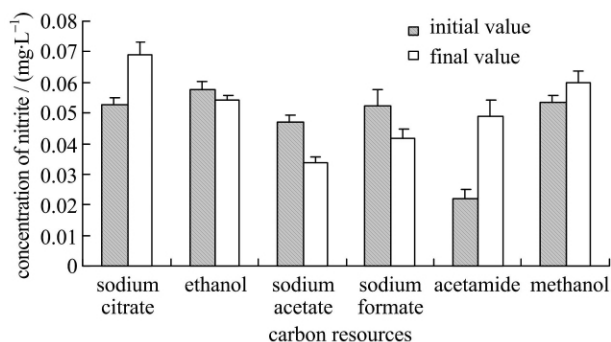


图 4 亚硝酸盐氮的变化情况

Fig. 4 The change of nitrite

钠作碳源 120 h 时水中的亚硝酸盐氮的含量最低,随着时间的延长,水中亚硝酸盐氮含量还会继续降低。

由以上结果可以得出,该分离菌株 DB-1 能够利用的碳源广泛,利用柠檬酸钠、乙醇、乙酸钠、甲酸钠、乙酰胺、甲醇作电子供体进行生物反硝化作用,效果都较好,其中利用乙酸钠作碳源时,菌株 DB-1 的硝酸盐还原酶活性最强,也最容易被微生物利用,去除水中硝酸盐的效果非常显著,这与王弘宇等^[13]的研究结果一致。

2.4.2 C/N 对菌株反硝化活性的影响

以乙酸钠为唯一碳源,硝酸钾为唯一氮源,固定硝酸盐氮含量为 100 mg/L 时,通过改变乙酸钠含量调整 C/N,以不添加碳源(C/N 为 0)作为对照,菌株反硝化过程对碳源的需求结果如图 5 所示。

由图 5 可以看出,该反硝化菌株为异养型,碳源对菌株的反硝化作用影响很大。培养液中不含碳源时,硝酸盐氮几乎没有什么变化,当 C/N 为 1 时,在 120 h 内硝酸盐氮的去除率达到 64.2%,当 C/N 为 3 时,反硝化进行基本完全,硝酸盐氮的去除率达到

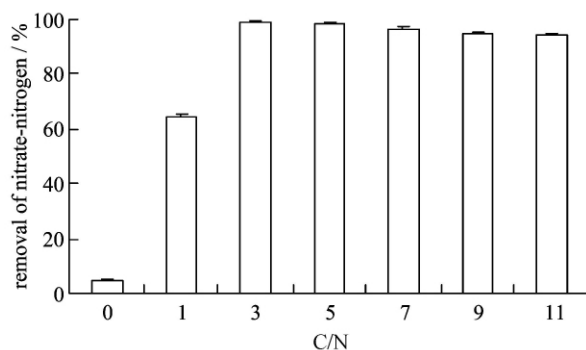


图 5 C/N 对硝酸盐氮去除率的影响

Fig. 5 Influence of C/N ratio on nitrate removal rate

98.9%。而当 C/N 大于 3 以后,对菌株的反硝化作用无明显影响,硝酸盐氮的去除率基本不变。

有机碳源浓度对菌株的生长及生物反硝化活性有较大的影响,碳源不足,则无足够的能量供微生物生长,菌株的反硝化活性得不到发挥;而碳源浓度过高时,碳源已不成为反硝化的限制性因素,对菌株的反硝化效率也不会有大的影响。另外过量的碳源进入水中,会造成浪费与二次污染。因此对于该菌株 DB-1 来说,培养液中 C/N 为 3 左右较好。此值比理论上异养型菌株生物反硝化所需的 C/N 稍高(理论值为 1.08),可能是由于菌株的特异性生长需求所致。

2.4.3 初始硝酸盐氮浓度对菌株反硝化活性的影响

在菌株 DB-1 接种量相同、C/N 为 3 时,改变培养液中初始硝酸盐氮含量,培养液中硝酸盐氮的去除情况如图 6 所示。

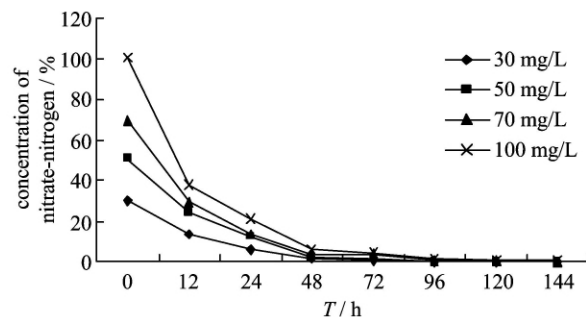


图 6 在不同初始硝酸盐氮浓度下菌株 DB-1 去除硝酸盐氮

Fig. 6 Nitrate removal of strain DB-1 at different initial nitrate concentrations

由图 6 可以看出,菌株反硝化作用主要发生在 48 h 以内,48 h 时培养液中硝酸盐氮已经明显降低,

硝酸盐氮的去除率分别为达到 94.0%, 96.1%, 94.8% 和 94.3%。随着时间的延长, 水中的硝酸盐氮含量继续降低, 到 144 h 时基本完全去除。这表明在实验接种量及 C/N 为 3 时, 菌株 DB-1 能够适应水中初始硝酸盐氮含量为从 30 mg/L 到 100 mg/L, 并能迅速去除完全, 反硝化作用显著。

不同初始硝酸盐氮含量下, 菌株 DB-1 反硝化过程培养液中亚硝酸盐氮含量变化如图 7 所示。

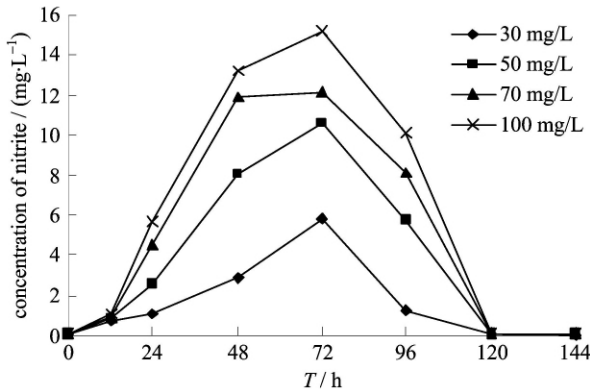


图 7 菌株 DB-1 在反硝化过程亚硝酸盐氮的积累

Fig. 7 Concentration of accumulated nitrite-nitrogen in denitrifying process of strain DB-1

由图 7 可见, 菌株 DB-1 是通过反硝化途径去除水中硝酸盐氮, 在去除硝酸盐氮的过程中产生了一定数量的亚硝酸盐氮。亚硝酸盐氮的产生主要发生在菌株的对数生长期, 从 48 h 开始水中亚硝酸盐氮开始逐渐积累, 至 72 h 时左右达到最高值, 硝酸盐氮含量在此时期内急剧下降。由于 NO_2^- 还原酶与 NO_3^- 还原酶的合成并不是协同调节的, NO_2^- 还原酶的大量合成落后于 NO_3^- 还原酶, 所以出现了亚硝酸盐的积累。而 NO_2^- 还原酶的合成滞后可能是由于其合成需要一定量的亚硝酸根离子的诱导作用。

在 72 h 后水中硝酸盐氮基本被去除, 亚硝酸盐氮含量开始急剧下降, 至 144 h 培养结束时降至 0.039 ~ 0.068 mg/L。说明了亚硝酸盐氮的去除主要发生在菌株生长的稳定期和衰亡期。此时亚硝酸盐还原酶已经得到大量的合成, 并将亚硝酸盐还原成 NO 或 N_2O , 再经过 NO 还原酶、 N_2O 还原酶的作用还原成 N_2 。

由此看出, 分离菌株 DB-1 具有高效的反硝化活性, 能够在较短时间内将水中过量的硝酸盐去除。

3 结论

(I) 从巢湖湿地土壤中所分离的菌株 DB-1 为

革兰氏阴性球形菌, 兼性厌氧, 经 16S rDNA 鉴定为 *Klebsiella* sp., 命名为 *Klebsiella* sp. DB-1, 它与目前报道的反硝化细菌均不同, 表明了自然界中生物反硝化细菌的生物多样性。

(II) 菌株 DB-1 能分别以适当浓度的柠檬酸钠、乙醇、乙酸钠、甲酸钠、乙酰胺、甲醇为碳源进行生物反硝化作用将水中的硝酸盐还原为氮气, 表明该菌株具有较广的碳源谱, 使得该菌株适应性强, 可用于饮用水及污水的生物反硝化脱氮。

(III) 菌株 DB-1 利用乙酸钠为碳源, 采用 C/N 为 3, 在 120 h 内几乎完全去除水中硝酸盐氮; 在 C/N 为 3, 水中初始硝酸盐氮含量在 100 mg/L 以内, 均能够在 48 h 内被基本去除, 达到饮用水标准。

上述成果在地下水硝酸盐污染生物修复、湖泊富营养化防治等方面具有广阔的应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Rivett M O, Buss S R, Morgan P, et al. Nitrate attenuation in groundwater: A review of biogeochemical controlling processes [J]. Water Research, 2008, 42: 4 215-4 232.
- [2] Haugen K S, Semmens M J, Novak P J. A novel in situ technology for the treatment of nitrate contaminated groundwater[J]. Water Research, 2002, 36: 3 497-3 506.
- [3] Moreno B, Gómez M A, González-López J, et al. Inoculation of a submerged filter for biological denitrification of nitrate polluted groundwater: A comparative study [J]. Journal of Hazardous Materials, 2005, B117: 141-147.
- [4] Bandpi M A, Elliott D J, Memeny-Mazdek A. Denitrification of groundwater using acetic acid as a carbon source[J]. Water Science and Technology, 1999, 40 (2): 53-59.
- [5] Green M, Schnizer M, Tarre S, et al. Groundwater denitrification using an upflow sludge blanket reactor [J]. Water Research, 1994, 28 (3): 631-637.
- [6] Lin Y F, Jing S R, Wang T W, et al. Effects of macrophytes and external carbon sources on nitrate removal from groundwater in constructed wetlands[J]. Environmental Pollution, 2002, 119: 413-420.
- [7] 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 Research, 2003, 37: 3 463-3 471.
- [8] Kariminiaae-Hamedaani H, Kanda K, Kato F.

(下转第 61 页)

- [6] Campbell J M, Ellis R K. Update on vector boson pair production at hadron colliders[J]. Phys Rev D, 1999, 60: 113006;doi: 10.1103/PhysRevD.60.113006.
- [7] Dixon L, Kunszt Z, Signer A. Vector boson pair production in hadronic collisions at $O(\alpha_s)$: Lepton correlations and anomalous couplings[J]. Phys Rev D, 1999, 60: 114037; doi: 10.1103/PhysRevD.60.114037.
- [8] LHC Experiments Committee. ATLAS detector and physics performance: Technical Design Report [R]. Geneva;CERN, 1999;1-460.
- [9] Frixione S, Webber B R. Matching NLO QCD computations and parton shower simulations [J]. Journal of High Energy Physics, 2002, 2002: 029;doi: 10.1088/1126-6708/2002/06/029.
- [10] Frixione S, Nason P, Webber B R. Matching NLO QCD and parton showers in heavy flavour production [J]. Journal of High Energy Physics, 2003, 2003:007; doi: 10.1088/1126-6708/2003/08/007.
- [11] Marchesini G, Webber B R, Abbiendi G, et al. HERWIG 5.1 — a Monte Carlo event generator for simulating hadron emission reactions with interfering gluons [J]. Comput Phys Commun, 1992, 67: 465-508.
- [12] Corcella G, Knowles I G, Marchesini G, et al. HERWIG 6: an event generator for hadron emission reactions with interfering gluons (including supersymmetric processes) [J]. Journal of High Energy Physics, 2001, 2001: 010.
- [13] Sjöstrand T, Edén P, Lönnblad L, et al. High-energy-physics event generation with PYTHIA 6.1 [J]. Comput Phys Commun, 2001, 135: 238-259.
- [14] Hagiwara K, Hikask K, Nakamura K, et al. Review of Particle Physics[J]. Phys Rev D, 2002, 66:010001 (R); doi:1103/PhysRevD.66.010001.

(上接第 21 页)

- Denitrification activity of the bacterium pseudomonas sp. ASM-2-3 isolated from the Ariake Sea Tideland [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004, 97 (1): 39-44.
- [9] Rocca C D, Belgiorno V, Meric S. Heterotrophic/ autotrophic denitrification (HAD) of drinking water: Prospective use for permeable reactive barrier [J]. Desalination, 2007, 210: 194-204.
- [10] 乐毅全, 王士芬. 环境微生物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 170-172.
- Le Y Q, Wang S F. Environmental Microbiology[M]. Beijing: Chemistry Industry Press, 2005: 170-172.
- [11] 马放, 任南琪, 杨基先. 污染控制微生物学实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2002: 39-43.
- Ma F, Ren N Q, Yang J X. Microbiology Experiment of Pollution Control[M]. Haerbin: Haerbin Institute of Technology Press, 2002: 39-43.
- [12] 魏复盛. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2003: 211-274.
- Wei F S. Method of Analyzing and Monitoring the Water and Wastewater [M]. 4ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2003: 211-274.
- [13] 王弘宇, 马放, 苏俊峰, 等. 不同碳源和碳氮比对一株好氧反硝化细菌脱氮性能的影响[J]. 环境科学学报, 2007, 27(6): 968-972.
- Wang H Y, Ma F, Su J F, et al. Influence of carbon source and C/N ratio on nitrogen removal of aerobic denitrifier[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27 (6): 968-972.