

文章编号: 1674-5566(2015)04-0632-08

## 一株高效好氧反硝化细菌的分离与鉴定

彭志兰<sup>1</sup>, 柳敏海<sup>2</sup>, 郭海波<sup>1</sup>, 罗海忠<sup>2</sup>, 薛超波<sup>1</sup>, 吴益春<sup>1</sup>, 罗海军<sup>1</sup>, 夏枫峰<sup>3</sup>

(1. 舟山市食品药品检验检测研究院, 浙江 舟山 316000; 2. 舟山市水产研究所, 浙江 舟山 316000; 3. 舟山市水产技术推广站, 浙江 舟山 316000)

**摘要:** 采用选择性培养基通过定量增加亚硝酸盐含量来富集筛选好氧反硝化细菌, 经过选择性培养基初步筛选, 测定  $\text{NO}_2^-$ -N 与  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率, 再通过反硝化培养基复筛选出同时具有去除  $\text{NO}_2^-$ -N 与  $\text{NO}_3^-$ -N 能力的目的菌。通过 16S rRNA 基因序列分析及同源性比对以及与其他已筛选出的部分硝化细菌与反硝化细菌的比对构建系统发育树, 结合菌株的生理生化鉴定试验, 鉴定出目的菌株。在好氧、28℃ 培养条件下, 在反硝化培养基中, 该菌株 5 d 内将  $\text{NO}_2^-$ -N 由 3 570 mg/L 降至 22 mg/L, 去除率达 99.4%, 将与  $\text{NO}_3^-$ -N 由 2 464 mg/L 降至 27 mg/L, 去除率达 98.9%。通过形态学、生理生化反应以及 16S rRNA 序列测定鉴定菌株 DB-6 为阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*), 命名为 DB-6。新筛选的阴沟肠杆菌反硝化能力较强, 具有生物脱氮的应用潜质, 有望应用于海水养殖水质净化。

**研究亮点:** 首次从海水养殖循环水生物滤池中的滤料附着物上, 筛选与鉴定出一株能够高效去除硝基氮与亚硝基氮的细菌 DB-6, 采用选择性培养基通过定量增加亚硝酸盐含量来富集筛选好氧反硝化细菌, 经过选择性培养基初步筛选, 测定  $\text{NO}_2^-$ -N 与  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率, 再通过反硝化培养基复筛选出同时具有去除  $\text{NO}_2^-$ -N 与  $\text{NO}_3^-$ -N 能力的目的菌。从研究结果看出, DB-6 既有高效去除  $\text{NO}_2^-$ -N 又有高效去除  $\text{NO}_3^-$ -N 的能力, 且最终无反弹现象。本研究筛选与鉴定的菌株 DB-6 阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 具备制成脱氮制剂的潜质。

**关键词:** 好氧反硝化细菌; 筛选; 鉴定; 阴沟肠杆菌

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

目前国内水产养殖主要采取高密度集约化的养殖生产模式, 水体中过量的饲料残渣与水生动物的排泄物导致水体中亚硝酸盐氮超标严重, 可能会诱发细菌病、病毒病, 给水产养殖业造成不可估量的经济损失。因此, 养殖水体中亚硝酸盐氮的有效去除是水产业亟需解决的问题之一。

反硝化是硝酸盐或亚硝酸盐被还原成  $\text{NO}_2$  或  $\text{N}_2$  的过程, 是自然界氮素循环的一个重要途径之一, 传统的理论认为细菌的反硝化是一个严格的厌氧过程。然而, 好氧反硝化细菌的发现, 突破了传统的理论知识, 其为污水生物脱氮技术

注入了新的活力, 提供了新的方法。好氧反硝化细菌克服了传统的反硝化细菌只能在缺氧条件下进行反硝化的缺点, 进行有氧生长且生长周期短, 对高浓度的氮耐受力很强<sup>[1]</sup>。

20 世纪 80 年代, LESLEY 等报道了好氧反硝化细菌和好氧反硝化酶系的存在<sup>[2]</sup>, 并证实了泛养硫球菌 (*Thiosphaera pantotrophica*) (现更名为脱氮副球菌 *Paracoccus denitrificans*)<sup>[3]</sup> 在生长过程中,  $\text{O}_2$  和  $\text{NO}_3^-$  共同存在时, 其生长速率比两者单独存在时都高。自好氧反硝化菌发现后, 不断有新的好氧反硝化菌株被发现, 目前被发现的反

收稿日期: 2014-10-22 修回日期: 2015-03-20

基金项目: 浙江省重大科技专项重点农业项目(2013C02029); 质检公益性行业科研专项(201210060)

作者简介: 彭志兰(1980—), 女, 硕士, 研究方向为水产动物微生物学。E-mail: zhilanpeng520@163.com

通信作者: 柳敏海, E-mail: okso1125@aliyun.com

硝化细菌主要存在于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)<sup>[4-5]</sup>、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)<sup>[1,6]</sup>、副球菌属 (*Paracoccus*)<sup>[7]</sup> 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*)<sup>[8-11]</sup> 等。

本研究材料取自舟山市水产研究所循环水生物滤池毛刷滤料上的少量污泥,通过富集培养筛选出一种好氧反硝化细菌 DB-6,在其部分生物学特性及反硝化性能进行研究的基础上,确定该菌分类学和系统发育地位,旨在为丰富好氧反硝化细菌种质资源的同时,为该菌在养殖水体的实际应用提供理论基础和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

舟山市水产研究所海水养殖循环水生物滤池中附着在毛刷滤料上的少量污泥。

#### 1.1.2 培养基及检测试剂

(1) 选择性培养液 (g/L): 葡萄糖 24.0, 柠檬酸钠 14.7, 硝酸钾 6.7, 氯化铵 4.7, 磷酸二氢钾 1.8, 陈海水 1 000 mL。(2) 分离培养基 (g/L): 葡萄糖 10.0, 柠檬酸钠 5.0, 醋酸钠 1.5, 氯化铵 1.0, 硝酸钾 1.0, 磷酸氢二钠 0.6, 磷酸二氢钾 0.4, 硫酸镁 0.1, 氯化亚铁 0.1, 酵母膏 0.5, 琼脂粉 20, 陈海水 1 000 mL, pH 7.6~8.2, 121 °C 灭菌 20 min; (3) 亚硝酸盐还原培养基 (g/L): 牛肉膏 10.0, 蛋白胨 5.0, 亚硝酸钠 1.0, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.3~7.4, 121 °C 灭菌 15 min。(4) 硝酸盐还原培养基 (g/L): 牛肉膏 10.0, 蛋白胨 5.0, 硝酸钾 1.0, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.6, 121 °C 灭菌 15 min。(5) 反硝化培养基 A (g/L): 葡萄糖 36.0, 酵母膏 0.5, 亚硝酸钠 2.1, 陈海水 1 000 mL, pH 7.6~8.2, 121 °C 灭菌 15 min。(6) 反硝化培养基 B: (g/L, 葡萄糖 36, 酵母膏 0.5, 硝酸钠 2.6, 陈海水 1 000 mL, pH 7.6~8.2, 121 °C 灭菌 15 min。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 好氧反硝化细菌的筛选

采样与富集: 取舟山市水产研究所海水养殖循环水生物滤池中毛刷, 放入采样袋, 带回实验室, 用灭菌过的海水冲洗毛刷上的附着物即可得到细菌原液。取 2.0 mL 细菌原液接种于装有 98 mL 选择培养基的 250 mL 锥形瓶中, 用 5 层纱布

包裹锥形瓶口, 28 °C, 100 r/min 振荡培养。培养 1 d 天后添加亚硝酸钠, 使之浓度为 10 mg/L, 之后稳定提高, 依次为 50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L 最终为 200 mg/L。期间 2 d 更换一次培养基, 以便于有效地富集好氧反硝化细菌。

初筛和复筛: 取亚硝酸钠浓度最高的细菌培养液, 接种于分离培养基平板上, 28 °C 恒温培养 2 d, 待菌落长出后, 经多次划线纯化后分别接入亚硝酸盐与硝酸盐还原培养基中, 28 °C, 100 r/min 振荡培养 2 d, 每 8 h 取培养后的菌液 8 000 r/min 离心 5 min, 分别测定亚硝酸盐与硝酸盐的浓度, 将筛选出的菌株至于斜面 4 °C 保存。将初筛的好氧反硝化菌株先经液体活化培养基 (除不加琼脂外其余成分与分离培养基相同) 活化, 待细胞浓度达到 10<sup>6</sup> CFU/mL, 取 2% 的量接种到反硝化培养基 A 中与反硝化培养基 B 中, 28 °C, 100 r/min 振荡培养, 以一组不添加菌液作为对照, 进行反硝化性能的测定。每间隔 24 h 定期测定反硝化培养基中的硝态氮 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)、亚硝态氮 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N) 的浓度, 连续测定 5 d。

#### 1.2.2 分析方法

硝酸盐测定: 采用 GB17378.4-2007 镉柱还原法; 亚硝酸盐测定: N-1-萘乙二胺分光光度法; 亚硝酸盐标准曲线:  $y = 18.207x + 0.0014$  ( $x$  为样品浓度 mg/L;  $y$  为吸光值, 相关系数  $r = 0.9999$ ); 亚硝酸盐含量计算公式:  $y_1 = c_1 \times x$  ( $c_1$  为测定吸光值时提取液的稀释倍数); 硝酸盐含量计算公式:  $y_2 = c_2 \times x - c_1 \times x$  ( $c_2$  为测定吸光值时提取液的稀释倍数)。

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 去除率 (%) 计算公式:

$$y_3 = \frac{d_0 - d_5}{d_0} \times 100\% \quad (1)$$

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除率 (%) 计算公式:

$$y_4 = \frac{d_0 - d_5}{d_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $d_0$  表示第 0 天培养基中亚硝酸盐氮、硝酸盐氮浓度;  $d_5$  表示第 5 天培养基中亚硝酸盐氮、硝酸盐氮浓度。

#### 1.2.3 菌株的形态学鉴定

将菌株进行革兰氏染色, 然后在光学显微镜下观察其菌体形态。

#### 1.2.4 生理生化鉴定

参照文献 [12] 进行形态特征和生理生化特

征测定,采用半固体穿刺法检测细菌的需氧性和运动性。

### 1.2.5 菌株的 16S rRNA 序列分析及系统发育研究

用于 16S rRNA PCR 反应的引物为通用引物,正向引物为:27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'),反向引物为:1492R(5'-AAGTCGTAACAAGGTAACC-3'),由上海生物工程有限公司合成,构建 25  $\mu$ L 的反应体系:10  $\times$  buffer 2.5  $\mu$ L, dNTP 1.0  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  2.0  $\mu$ L, 27F 1.0  $\mu$ L, 1492R 1.0  $\mu$ L, DNA 1.0  $\mu$ L, TagE 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 16.0  $\mu$ L, PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 变性 5 min 一次;92  $^{\circ}$ C 1 min, 58  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 2 min 30 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 10 min;取 PCR 产物在 0.8% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,采用 PCR 回收试剂盒回收纯化后送上海生工测序。

将所得序列在 GenBank 中进行 BLAST 分析,通过 Bioedit 7.0 和 MEGA 5.0 等软件进行多重序列比对分析,并以 Neighbor-Joining 构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 反硝化细菌的分离与筛选

通过富集与分离,初筛与复筛,通过还原培养基初筛得 5 种菌株,经复筛得到 1 株既能去除  $NO_2^-$ -N 又能去除  $NO_3^-$ -N 的高效好氧反硝化菌

株,且无硝酸盐与亚硝酸盐的积累,基本在一周之内即可去除(表 1)。

表 1 5 菌株对  $NO_2^-$ -N 与  $NO_3^-$ -N 的去除率  
Tab.1 The removal efficiency of 5 strains for  $NO_2^-$ -N and  $NO_3^-$ -N

菌株 strain	$NO_2^-$ -N 去除率/% removal efficiency for nitrite	$NO_3^-$ -N 去除率/% removal efficiency for nitrate
DB-5	25.8	0
DB-6	99.4	98.9
DB-8	0	42.6
DB-9	0	98.7
DB-11	58.5	0

### 2.2 DB-6 菌株的反硝化能力

#### 2.2.1 反硝化培养基 A 筛选结果

以亚硝酸盐氮作为唯一氮源,测定菌体生长过程中  $NO_2^-$ -N 和  $NO_3^-$ -N 浓度随时间变化,确定菌株在好氧条件下的反硝化能力,从图 1 对比看出,空白对照硝酸盐氮和亚硝酸盐氮均升高,DB-6 号菌具有较强的反硝化能力,亚硝酸盐氮的含量除了在培养第 48 h 有升高外,其他时间均无升高现象,由于培养体系中硝酸盐氮转化成亚硝酸盐氮。之后随着硝酸盐氮、亚硝酸盐氮的降低,亚硝酸盐氮从最初的 3 570 mg/L 降至 22 mg/L,去除率达到了 99.4%。可以有效还原培养基中的亚硝酸盐氮,且最终无反弹现象。

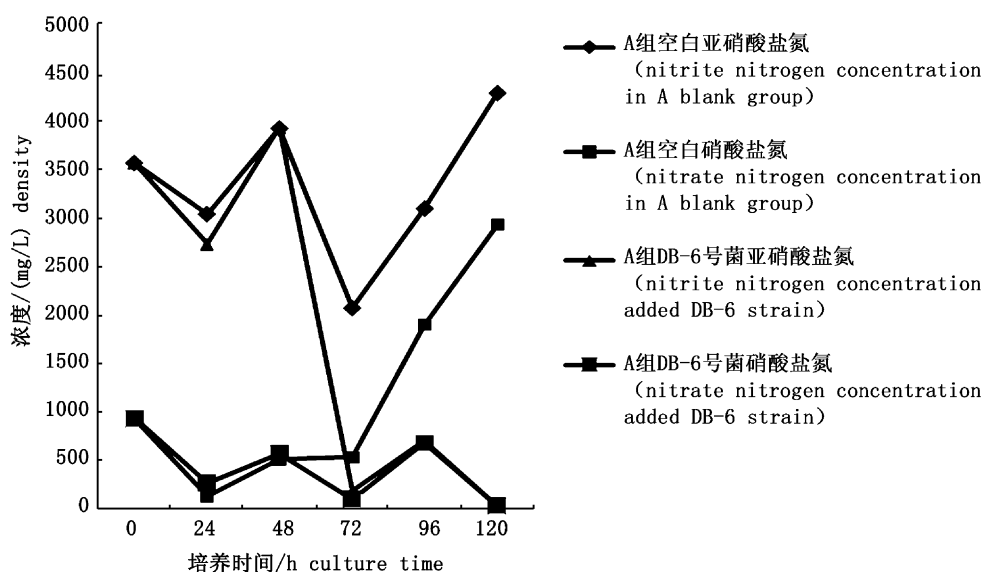


图 1 空白对照与 DB-6 号菌在 A 培养基内硝酸盐氮与亚硝酸盐氮的浓度变化

Fig.1 The changes of concentration of nitrate nitrogen and nitrite nitrogen of control in the culture A

### 2.2.2 反硝化培养基 B 筛选结果

以硝酸盐氮作为唯一氮源,测定菌体生长过程中  $\text{NO}_2^-$ -N 和  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度随时间的变化具体见图 2。从图中可以对比看出,DB-6 号菌对该反硝化培养基具有较强的反硝化能力,可以有效还原培养基中的硝酸盐氮、亚硝酸盐氮,在培养的

第 24 h,硝酸盐氮少许增加,但亚硝酸盐氮急剧上升,说明此时的硝酸盐氮大部分转化成亚硝酸盐氮,24 h-48 h 之间硝酸盐氮急剧降低,亚硝酸盐氮增大达最大值,之后直线下降。且无反弹现象,硝酸盐氮从最初的 2 464 mg/L 降至 27 mg/L,去除率达到 98.9%。

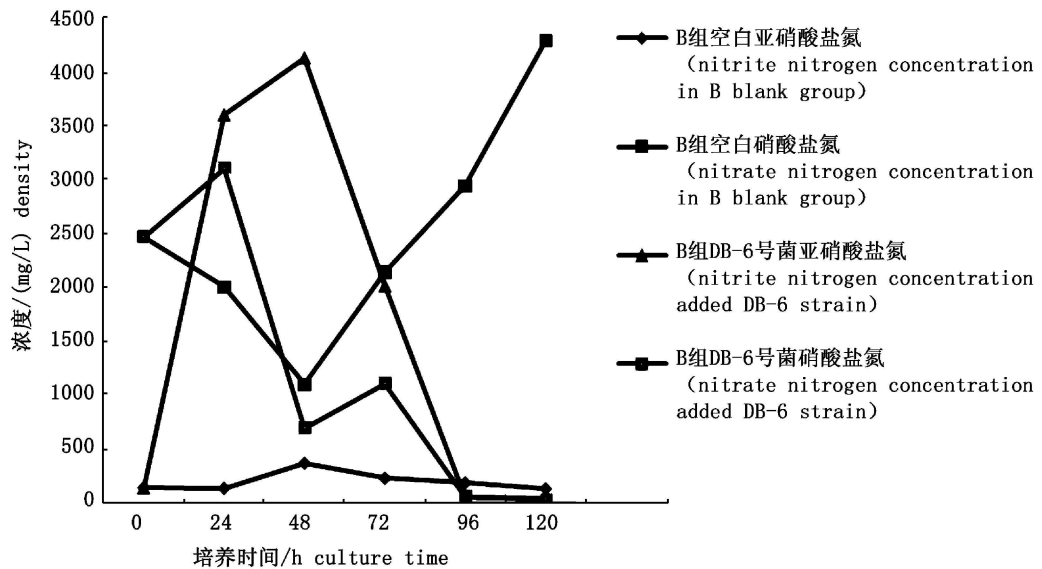


图 2 空白对照与 DB-6 号菌在 B 培养基内硝酸盐氮与亚硝酸盐氮的浓度变化

Fig. 2 The changes of concentration of nitrate nitrogen and nitrite nitrogen of control and DB-6 strain in the culture B

### 2.3 好氧反硝化细菌鉴定结果

#### 2.3.1 DB-6 菌株的形态和生态特征

结合平板上的菌落形态和镜检结果以及生理生化特征,DB-6 在平板上形成直径 3~5 mm 的圆形菌落,菌落表面光滑,隆起,呈淡粉色。经革兰氏染色,单细胞呈短杆状,革兰氏阴性,无芽孢和荚膜(图 3,图 4)。采用半固体穿刺法对其需氧和运动性测定发现,菌株沿着穿刺线自

上而下穿透培养基扩散生长,表明该菌株是兼性菌。生理生化鉴定特征见表 2。

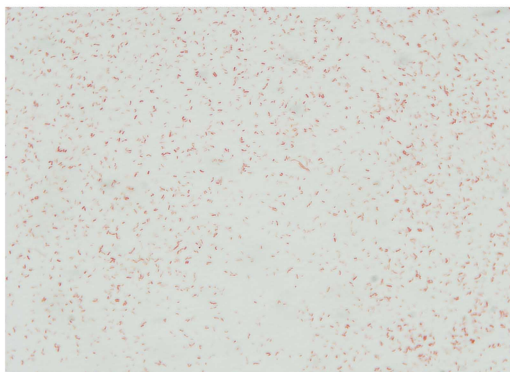


图 3 DB-6 革兰氏染色图

Fig. 3 DB-6 gram diagram

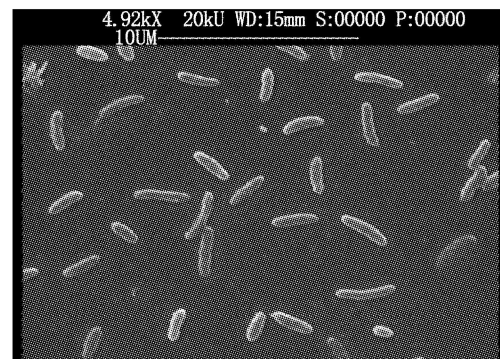


图 4 DB-6 菌扫描电镜图

Fig. 4 Scanning electron micrographs of DB-6

#### 2.3.2 DB-6 菌株的 16S rRNA 的序列测定及系统进化树

获得目的菌株 16S rRNA 序列长度为 1 445 bp,在 Genbank 登录号为 KM406493,同时,该菌的 16S rRNA 序列通过 Blast 检索程序分析,结果

表明,与阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)的同源性达 99%,初步鉴定为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)。选取 GenBank 中部分阴沟肠杆菌属和已知好氧反硝化细菌及部分硝化细菌采用 Bioedit 7.0 进行多重比对,用 MEGA 5.0 软件中的 NJ 方法构建系统发育树结果如图 5 所示。用

于系统发育树构建的相关参比菌株的细菌名称、菌株编号和序列登录号见表 3。从系统发育树可以看出 DB-6 (KM406493) 与肠杆菌属 *Enterobacter* sp SD-A 与 *Enterobacter hormaechei* XJUHX-4 在同一分支上,亲缘关系最近。

表 2 菌株 DB-6 的生理生化特征

Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of strain DB-6

指标 indexes	结果 results	指标 indexes	结果 results		
d-蜜二糖	MEL	+	d-苦杏仁苷	AMY	+
阿拉伯糖	ARA	+	柠檬酸盐利用	CIT	+
明胶	GEL	-	d-葡萄糖	GLU	+
硫化氢产生	H <sub>2</sub> S	-	肌醇	IND	-
肌醇	INO	-	精氨酸双水解酶	ADH	+
d-甘露醇	MAN	+	VP 试验	VP	+
鸟氨酸脱羧酶	ODC	+	$\beta$ -半乳糖苷酶	ONPG	+
氧化酶	OX	-	L-鼠李糖	RHA	+
蔗糖	SAC	+	d-山梨醇	SOR	+
色氨酸脱羧酶	TDA	-	尿素酶	URE	+
赖氨酸脱羧酶	LDC	-	动力	SIM	+

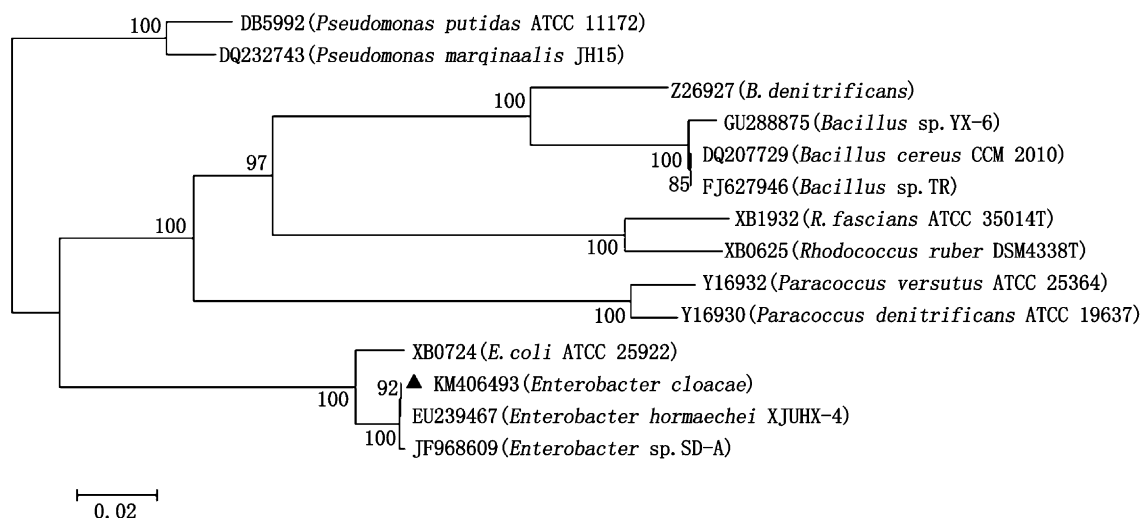


图 5 以 N-J 法构建菌株 DB-6 与其他细菌间基于 16S rRNA 序列同源性的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree generated from an alignment of 16S rRNA of strain DB-6 and other bacteria based on Neighbor-joining method

### 3 讨论

由于好氧反硝化细菌在环境中本来很少且很难成为优势菌,故采用一般筛选方法不易将其筛选出来。本研究通过定量增加亚硝酸盐的含量来驯化反硝化细菌,增加了好氧反硝化细菌转化为优势菌的可能性。从而提高了在好氧条件

下反硝化细菌对硝酸盐和亚硝酸盐的去除率,实现了在好氧条件下的反硝化作用。

生物滤池在工厂化循环水养殖系统中起着净化水质作用,其工艺原理为:在滤池中填装一定量的滤料,如毛刷、生化球、陶瓷环等,一些反硝化细菌在其表面附着,待污水流经时,滤料表面生长的硝化细菌与反硝化细菌去除养殖污水

中的氨氮、亚硝酸盐等。LESLEY 等<sup>[2]</sup>通过间歇曝气分离筛选出好氧反硝细菌 *T. p antotropha* LMD82. 5, 吕锡武等<sup>[13]</sup>和孔庆鑫等<sup>[14]</sup>采用间歇曝气对污水处理中的活性污泥进行驯化,发现了好氧反硝化细菌。在实验中,我们发现这种方法是比较有效的,经富集发现多个有好氧反硝化功能的细菌。本文筛选与鉴定的阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 具有反硝化功能,在国内外尚属首次报道。

表 3 用于系统发育树构建的相关参比菌株的信息

Tab. 3 The information of phylogenetic trees for the relevant reference strains

细菌名称 name of bacterium	菌株编号 number of strain	序列登录号 GenBank accession
<i>Enterobacter cloacae</i>	DB-6	KM406493
<i>Enterobacter hormaechei</i>	XJUH-X-4	EU239467
<i>Enterobacter</i> sp	SD-A	JF968609
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	X80724
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 11172	D85992
<i>Pseudomonas marginalis</i>	JH15	DQ232743
<i>Paracoccus denitrificans</i>	ATCC 19367	Y16930
<i>Paracoccus versutus</i>	ATCC 25364	Y16932
<i>Rhodococcus ruber</i>	DSM43338T	X80625
<i>Rhodococcus fascians</i>	ATCC 35014T	X81932
<i>Bacillus denitrificans</i>	DSM466	Z26927
<i>Bacillus</i> sp	YX-6	GU288875
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010	DQ207729
<i>Bacillus</i> sp	TR	FJ627946

HUNG-SOO 等<sup>[15]</sup>利用菌种 *Alealigene faecalis* strain No. 4 在好氧状态下处理具有高浓度氨氮 (2 000 mg/L) 的猪舍废水,反硝化率超过 65%,并在控制一定的碳氮比和 pH 的连续处理状况下,COD 和氨氮的去除率达到 100%;廖绍安等<sup>[16]</sup>从淡化养殖虾池筛选到一株活性较高的好氧反硝化菌,在 10 h 内能将亚硝酸盐氮由 26.18 mg/L 降至 0;邵晴和余晓斌<sup>[17]</sup>从湖水中分离出来的一株好氧反硝化细菌,能去除水体中 99% 的亚硝酸盐氮。郭端强等<sup>[18]</sup>利用 BTB 培养基从水中富集培养筛选出一株好氧反硝化细菌 N22,培养 40 h 硝酸盐氮去除率达 86.39%;杨基先等<sup>[19]</sup>等利用驯化活性污泥的方式筛选出的 G3,在溶氧为 4.0 mg/L 的条件下,24 h 内对  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率为 91.09%,但对  $\text{NO}_2^-$ -N 的累积量达到了 12.03 mg/L。

从本实验结果可以看出,在反硝化培养基 A 中,在起始阶段  $\text{NO}_2^-$ -N 有升高趋势,是因为在培养反应过程中部分  $\text{NO}_3^-$ -N 转化成  $\text{NO}_2^-$ -N,最后两者都下降比较快;在反硝化培养基 B 中,在起始阶段  $\text{NO}_2^-$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N 都有升高趋势,之后  $\text{NO}_3^-$ -N 先急剧下降, $\text{NO}_2^-$ -N 仍在增加,然后又急剧下降,经过富集培养刷选出的目的菌株对亚硝酸盐氮去除率达 99.4%,硝酸盐氮去除率也高达 98.9%,该目的菌株既能有效还原  $\text{NO}_2^-$ -N 又能有效还原  $\text{NO}_3^-$ -N,具有高效的反硝化能力,且无硝酸盐与亚硝酸盐的累积,最终无反弹现象,具备制成脱氮制剂的潜质。

#### 参考文献:

- [1] JOO H S,HIRAL M,SHODA M. Characteristics of alnroomium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alealigene faecalis* No. 4 [J]. Journal of Bioscience and bioengineering 2005, 100(2):184-191.
- [2] LESLEY A, ROBERTSON L A, KUENEN J G. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulfur bacterium [J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129:2847-2855.
- [3] LUKOW T, DIEKMANN H. Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TLI [J]. Biotechnology Letters, 1997, 11(19):1157-1159.
- [4] TAKAAYA N, MARIA A B, YASUSHIN S, et al. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide [J]. Applied and environmental microbiology, 2003, 69(6):3152-3157.
- [5] SU J J, LIU B Y, LIU C Y. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the active sludge of a piggery wastewater treatment system [J]. Applied and environmental microbiology, 2001, 90(3):457-462.
- [6] SHWU L P, CHONG N M, CHEN C H. Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in wastewater treatment [J]. Biore Technol, 1999, 68(2):179-185.
- [7] PATUREAU D, ZUMSTEIN E, DELGENES J P. Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems [J]. Microbial Ecol, 2000, 39(2):145-152.
- [8] JOONG K K, KYOUNG J P, KYOUNG S C. Aerobic nitrification denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains [J]. Biore Technol, 2005, 96(17):1897-1906.
- [9] 杨希, 刘德立, 邓灵福. 蜡状芽孢杆菌好氧反硝化特性研究[J]. 环境科学研究, 2008, 21(3):155-159.  
YANG X, LIU D L, DENG L. Study on aerobic denitrification characteristics of *Bacillus cereus* [J]. Research of Environmental Sciences, 2008, 21(3):155-159.

- [10] 马放,王弘宇,周丹丹. 好氧反硝化菌株 X31 的反硝化特性[J]. 华南理工大学学报,2005,33(7):42-46.  
MA F, WANG H Y, ZHOU D D. Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas chloritidismutans* strain X31 [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2005, 33(7):42-46.
- [11] 周丹丹,马放,王宏宇. 关于好氧反硝化菌筛选方法的研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(6):837-838.  
ZHOU D D, MA F, WANG H Y. Study on screening method of aerobic denitrifiers [J]. Acta Microbiologica Sinica 2004, 44(6):837-838.
- [12] 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.  
DONG X Z, CAI M Y. Common bacterial system identification manual[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [13] 吕锡武,李丛娜,稻森悠平. 溶解氧及活性污泥浓度对同步硝化反硝化的影响[J]. 城市环境与城市生态, 2001, 14(1):33-35.  
LU X W, LI C N, INARNORI Y H, et al. Effect of DO concentration and MLSS on simultaneous nitrification and denitrification [J]. Urban Environment & Urban Ecology, 2001, 14(1):33-35.
- [14] 孔庆鑫,李君文,王新为,等. 一种新的好氧反硝化菌筛选方法的建立及新菌株的发现[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(2):222-225.  
KONG Q X, LI J W, WANG X W, et al. A new screening method for aerobic denitrification bacteria and isolation of a novel strain [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2005, 11(2):222-225.
- [15] HUNG-SOO J, MITSUYO H, MAKOTO S. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification [J]. Water Research, 2006, 40(16):3029-3036.
- [16] 廖绍安,郑桂丽,王安利,等. 养虾池好氧反硝化细菌新菌株的分离鉴定及特征[J]. 生态学报,2006,26(11):3718-3725.  
LIAO S A, ZHENG G L, WANG A L, et al. Isolation and characterization of a novel aerobic denitrifier from shrimp pond [J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(11):3718-3725.
- [17] 邵晴,余晓斌. 好氧反硝化细菌的筛选及反硝化特性研究[J]. 生物技术,2008,18(3):63-65.  
SHAO Q, YU X B. Isolation and characterization of a strain denitrobacteria [J]. Biotechnology, 2008, 18(3):63-65.
- [18] 郭端强,刘海龙,万亚涛. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化特性研究[J]. 生物技术通报, 2012(10):1994-2013.  
GUO D Q, LIU H L, WAN Y T. Isolation and identification of an aerobic denitrifier and its denitrifying characteristic [J]. Biotechnology Bulletin, 2012(10):1994-2013.
- [19] 杨基先,高珊珊,马放. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化能力[J]. 环境科学学报,2008,28(7):1994-2012.  
YANG J X, GAO S S, MA F. Identification and phylogenetic analysis of an isolated aerobic denitrifier [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 28(7):1994-2012.

## Isolation and identification of an efficient aerobic denitrifier

PENG Zhilan<sup>1</sup>, LIU Minhai<sup>2</sup>, GUO Haibo<sup>1</sup>, LUO Haizhong<sup>2</sup>, XUE Chaobo<sup>1</sup>, WU Yichun<sup>1</sup>, LUO Haijun<sup>1</sup>, XIA Fengfeng<sup>3</sup>

(1. Fisheries Institute of Zhoushan, Zhoushan 316000, Zhejiang, China; 2. Food and Drug Testing Institute of Zhoushan, Zhoushan 316000, Zhejiang, China; 3. Fisheries Technology Extension Station of Zhoushan, Zhoushan 316000, Zhejiang, China)

**Abstract:** Isolation and identification of an efficient aerobic denitrifying bacteria strain by using the selective medium to isolate and screen aerobic denitrifying bacteria through the quantitative increase of nitrite content, after a preliminary screening, and then second screening through denitrification performance testing for bacterial isolation. Physiological and biochemical tests and 16S rRNA gene amplification and blasting in GenBank, and phylogenetic tree construction were used to identify the selected strain. Only the DB-6 with effective denitrification. During 5 days,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  was decreased from 3 570 mg/L to 22 mg/L, the removal efficiency was 99.4%,  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  was decreased from 2 464 mg/L to 27 mg/L, the removal efficiency was 98.9% and without nitrite accumulation. The strain was identified as *Enterobacter cloacae* DB-6 according to its morphological, physiological and biochemical characters. In order to further confirm the result, 1 445 bp sequence of DB-6 16S rRNA was amplified and blasted in GenBank. Homology analysis study showed that DB-6 has the highest similarity to *Enterobacter cloacae* with 99% identity. And phylogenetic tree was constructed together with the discovered nitrifying bacteria, denitrifying bacteria and *Enterobacter cloacae*. It was suggested that *Enterobacter cloacae* DB-6 be a novel strain of aerobic denitrifying bacteria, which will be helpful in nitrogen removal of mariculture water.

**Key words:** aerobic denitrifying bacteria; screening; identifying; *Enterobacter cloacae*