

海南东寨港红树林聚磷菌的筛选及其特性*

伍思宇 周志如 尤青 张文飞 徐达 李特伦 姚琦 张起畅 吴红萍 王锐萍**

热带动植物生态学省部共建教育部重点实验室, 海南师范大学生命科学学院 海口 571158

摘要 海南东寨港红树林自然保护区生态环境与聚磷菌的聚磷过程好氧-厌氧交替环境高度一致. 为获得高效聚磷菌, 本研究随机采集该区域134份淤泥样品, 通过BCIP蓝白斑筛选法、异染颗粒和PHB颗粒染色以及测定聚磷能力相结合的方法进行筛选. 总共获得185株初筛菌株, 其中42株菌的聚磷能力达20%以上, 最高可达69.5%, 有效聚磷菌株分离率为22.7%. 利用Biolog微生物鉴定系统和16S rRNA基因序列分析鉴定菌株, 发现所筛聚磷菌多为不动杆菌属 (*Acinetobacter*), 也有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 并且表现出一定的差异性. 本研究表明东寨港红树林具有丰富的聚磷微生物资源, 可为修复磷富营养化水体恢复生态平衡提供有效的候选菌种. (图3 表3 参28)

关键词 水体富营养化; 红树林; 聚磷菌; 菌株筛选; 不动杆菌属

CLC X172

Screening and characterization of soil phosphate accumulating bacteria from Dongzhaigang mangrove wetlands in Hainan, China*

WU Siyu, ZHOU Zhiru, YOU Qing, ZHANG Wenfei, XU Da, LI Telun, YAO Qi, ZHANG Qichang, WU Hongping & WANG Ruiping**

Ministry of Education Key Laboratory for Tropical Animal and Plant Ecology, College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158, China

Abstract Dongzhaigang Mangrove Forest Nature Reserve, located in northeastern Hainan Island, is the major mangrove wetlands in China. The mangroves are evergreen trees that grow along the tropical or sub-tropical tidal shores or river estuaries. At high tide, they are totally submerged or only their tops are visible; when the tide recedes, they show themselves as dense thickets. The mangroves are periodically submerged by seawater, which have the same eco-environment of accumulation of large quantities of polyphosphate within their cells and the removal of phosphorus by Phosphorus Accumulating Organisms (PAOs). Thus, PAOs are selectively enriched in the bacterial community within the activated sludge of mangrove wetlands. In the present study, we screened 134 sludge samples isolated from the mangrove wetlands in Dongzhaigang and obtained 185 isolates of PAOs through the methods of BCIP blue-and white-colored screening, Albert staining and Nile Blue staining, which determined if the polyP or polyhydroxybutyrate (PHB) is on accumulation. The results showed a phosphorus removal rate of 42 PAOs as higher than 20%, and the maximum removal efficiency for phosphorus higher than 80%. Biolog phenotype microarrays and 16S rDNA sequences analysis were conducted to identify the isolates of PAOs. The result showed the populations of PAOs constituted by the bacterial genera of *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp. genera etc., with *Acinetobacter* being dominant in the entire communities. In our study, Dongzhaigang Mangrove Forest Nature Reserve is rich in PAO strains resources with good diversity. In this study, PAOs isolated from Dongzhaigang Mangrove Forest Nature Reserve are important in enhanced biological phosphorus removal and can be a candidate strain for preventing eutrophication in water bodies.

Keywords water eutrophication; mangrove; phosphorus accumulating organisms; screening; *Acinetobacter*

近年来,大量的氮、磷、钾等元素被排入各种水体的速度远远超过其被消耗速度,水体的有机物不断积累,水生生态平衡被打破,水体富营养化已成为全球问题并日趋恶化^[1]. 在所有的营养元素中,磷对藻类生长尤为重要^[2],以磷为限

制因子,当总磷浓度超过0.1 mg/L,藻类就会过度繁殖^[3]. 然而,无限制排放的磷进入水体生态系统后,还会发生复杂的吸附、固定和再释放过程,使污染水体更加难以治理^[4]. 因此,除去水体中积聚的磷是富营养化防治中亟待解决的关键问题.

近年来,生物除磷工艺的研究得到了迅速发展,生物除磷是利用活性污泥中的聚磷微生物厌氧释磷和好氧(缺氧)超量吸磷的特性,通过厌氧和好氧阶段的交替培养达到除

收稿日期 Received: 2015-11-11 接受日期 Accepted: 2015-12-16

*国家自然科学基金项目(41366001)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (41366001)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wrp@hainnu.edu.cn)

磷的效果. 在厌氧条件下PAOs降解体内的聚磷颗粒(Poly-P)产生能量、释放出磷酸盐,同时吸收水中的有机物,并将其转化为聚 β -羟基链烷酸盐(PHAs)贮存于细胞内^[5-7]. 为实现微生物除磷工艺的有效实施,筛选出除磷能力较强的聚磷微生物(Phosphorus accumulating organisms, PAOs)是首要目标. 聚磷菌是对具有“超量吸磷”特征的一类微生物的总称. 所谓“超量吸磷”,是指它们可以把多余的磷以多聚磷酸盐的形式储藏在体内,以备在不良环境中提供营养与能量^[8]. 1975年, Fuhs和Chen等首次从过量除磷的Baltimore Back River污水厂的活性污泥中分离得到了几株聚磷菌,经鉴定分别为不动杆菌属(*Acinetobacter*)和莫拉氏菌属(*Moraxella*)^[9]. 至今已有多种具备聚磷能力的微生物被筛选出来. 多项研究表明,常见的聚磷微生物菌群主要分布在不动杆菌属、气单胞菌属(*Aeromonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)^[10-13].

海南海口东寨港红树林自然保护区是我国面积较大、种类较多的典型分布区^[14]. 研究发现东寨港红树林湿地生态系统蕴含着丰富的微生物资源,不同植被下土壤微生物群落结构和多样性存在显著性差异^[15]. 红树林微生物与植物的相互作用,在环境修复和净化环境等方面发挥着不同程度的作用^[16-17],尤其是红树林为滩涂湿地生物群落,长期遭受海水周期性浸淹,其生态环境与聚磷菌的聚磷过程好氧-厌氧交替环境高度一致,为聚磷菌提供了生息繁衍的环境. 本研究着重挖掘东寨港红树林土壤中蕴藏的聚磷微生物资源,以期能够筛选到高效聚磷微生物^[18],为进一步将其应用到富营养化水体的修复,解决水体磷富营养化问题,恢复生态平衡提供有效菌种资源.

1 材料与方法

1.1 样品采集

试验淤泥样品若干份,分别于2013年11月至2015年3月在海南海口东寨港红树林(110°32'-110°37'E, 19°51'-20°1'N)随机采集. 退潮后,去除淤泥表面约3-5 cm厚的薄层;用铁铲取得深度为5-10 cm的淤泥样品,将采集的淤泥拣去根系后,装入样品袋中,并记录样品编号、采集时间、采集地点等.

1.2 培养基

YG培养基、葡萄糖-MOPS固体培养基、合成废水培养基,培养基的配置参考文献[19-20].

1.3 聚磷菌的筛选

称取5 g淤泥样品置于含玻璃珠和100 mL无菌水的锥形瓶中,振荡10 min,直至淤泥全部打散. 在无菌条件下,将混合液梯度稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 的悬液,各取200 μ L涂布于YG固体培养基上,28 $^{\circ}$ C倒置培养16-24 h. 从平板中挑出形态不同的菌落,在YG固体培养基的平板上进行点板,置于28 $^{\circ}$ C恒温倒置培养16 h.

在葡萄糖-MOPS限磷和过磷平板上均涂布100 μ L 5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐(BCIP),待晾干后,将目标菌转接至限磷平板和过磷平板上,同一菌株的位置一一对应,再分别倒置于28 $^{\circ}$ C厌氧和好氧培养箱中,培养16 h. 选取在限磷和过磷平板上都产生蓝斑的菌株划线纯化,最后得到的纯化菌

株为初筛聚磷菌^[21]. 为进一步鉴定是否为聚磷菌,对初筛菌株进行PHB颗粒和异染颗粒染色来辅助检验菌株特性^[22-23].

1.4 聚磷能力的测定

将待测菌株接种于5 mL LB培养基中,于28 $^{\circ}$ C下振荡培养过夜. 将菌液按1%的比例转接至合成废水培养基中,于28 $^{\circ}$ C好氧培养16 h后,取菌液于6 000 r/min离心15 min,测定上清中总磷浓度,与原始培养基比较以得到菌株的聚磷能力. 采用钼锑抗分光光度法^[24]测定上清液中磷浓度. 将分别在厌氧和好氧条件下能观察到PHB或poly P的菌株进行聚磷能力的测定,筛选具有较高聚磷能力的菌株. 除磷率=[(ATP-BTP)/ATP] $\times$ 100%. 式中,ATP为未接种聚磷菌合成废水培养液中的总磷浓度,BTP为接菌好氧培养后合成废水培养液中的总磷浓度.

1.5 菌株鉴定

菌株的形态鉴定参照文献[25],并制备菌株扫描电镜玻片,喷金后观察其形态,制备方法参考文献[26]. 利用Biolog系统对菌株的生理生化特性进行鉴定^[27]. 同时对分离的聚磷菌进行16S rDNA序列分析,采用试剂盒法提取菌株DNA,利用细菌16S rDNA序列通用引物F27/R1492进行PCR扩增,并对纯化的PCR产物进行序列测定(上海生工生物工程公司). 测序结果用BLAST软件与GenBank中已登录的16S rDNA序列进行同源性分析,同时运用MEGA5.0和Clustalx1.83构建进化树.

2 结果与分析

2.1 聚磷菌株的筛选

微生物淤泥样品的采集需要考虑采集的时间、气候、采集点的植被以及受污染的严重程度等因素. 为保证尽量能收集不同生境的淤泥样品,本研究在2013年11月至2015年3月期间,在海南海口东寨港红树林保护区内进行了10次采样,每次采集10-15份样品. 经过稀释涂布平板,从YG固体培养基上挑选不同形态的菌落,经多次分离纯化和BCIP蓝白斑筛选后,如果发现在限磷和过磷平板上均显蓝斑的菌株即初步判定分离株为聚磷菌,总共获得185株初筛菌株,通过聚磷率测定,其中有42株菌株的聚磷能力达20%以上,有效聚磷菌株分离率为22.7% (分离率=有效聚磷菌株总数/初筛菌株总数 $\times$ 100%).

东寨港红树林复杂的生态环境以及周围生活污水和虾塘养殖废水的无限排放,使得每次采集的淤泥样品必须及时处理,否则会影响出菌率,并且菌种的聚磷能力也会有所下降,所以采取少量多次的采集方式,以最大限度的筛选到有效聚磷菌.

2.2 聚磷菌形态及内聚物染色的观察

在YG固体培养基上,菌落多呈淡黄色,表面光滑湿润,边缘整齐;有些菌落呈乳白色,粘性较强. 菌体形态观察照片见图1,所筛菌株均为革兰氏阴性菌,形态各异,大部分呈短杆状,也有长杆状和球形菌.

研究表明,BCIP蓝白斑筛选法用于检测所筛菌株中是否含有多聚磷酸盐激酶(PPK),而菌株能否在好氧培养条件下合成poly P颗粒以及在厌氧条件下合成PHB颗粒,也

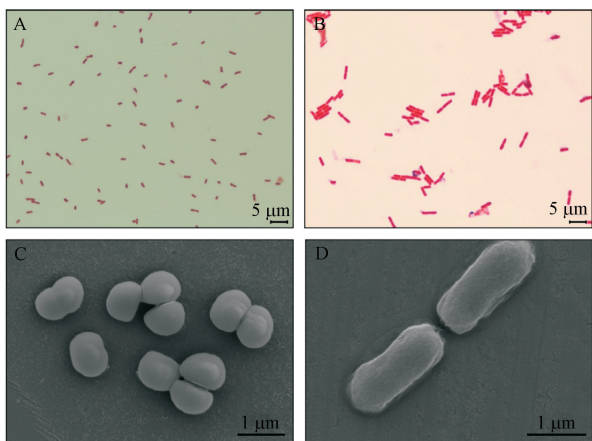


图1 筛选菌体形态观察. 革兰氏染色: A-菌株SC36, B-菌株SC24; 扫描电镜: C-菌株MS31, D-菌株SC24.

Fig. 1 Observation of bacterial isolates under the optical microscope and scanning electron microscope. Gram staining: A- strain SC36, B- strain SC24; SEM micrographs: C- strain MS31, D- strain SC24.

是鉴定所筛菌株是否具有聚磷能力的重要因素. 通过好氧-厌氧培养菌株, 进而分别对菌株进行poly P颗粒和PHB 颗粒染色来检测poly P和PHB合成情况. Poly P染色结果如图2A、2B, 菌体呈浅蓝色, 异染颗粒呈深蓝色; PHB染色结果如图2C、2D, 菌体呈红色, 类脂粒呈蓝黑色.

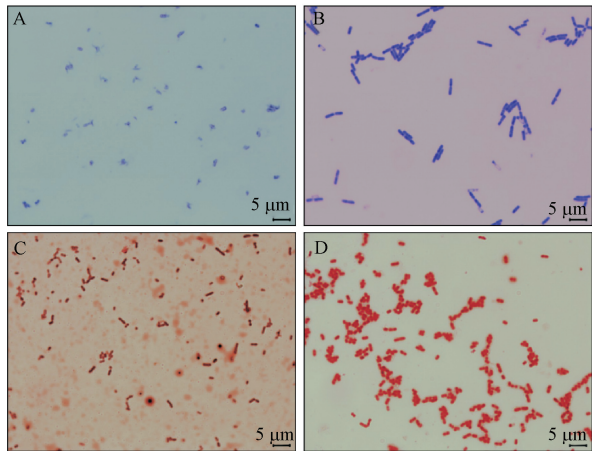


图2 聚磷菌内聚物的染色. Poly P 染色: A-菌株SC36, B-菌株SC24; PHB 染色: C-菌株SE64, D-菌株SC45.

Fig. 2 Result of dying inclusion of phosphate accumulating bacterial. Poly P staining: A- strain SC36, B- strain SC24; PHB staining: C- strain SE64, D- strain SC45.

2.3 聚磷菌的聚磷能力

聚磷菌在好氧阶段能大量吸收培养液中溶解性的磷酸盐, 在体内合成多聚磷酸盐, 但在相同的条件下不同细菌超量吸收磷酸盐的能力是不同的, 通过对菌株一定时间的有氧培养后测定培养液中剩余磷的多少来确定优势聚磷菌. 在所筛42株有效聚磷菌中, 有26株菌株的除磷率在20%-30%, 13株菌株的除磷率在30%-40%, 3株菌株的除磷率在50%以上, 其中磷的去除率最高可达到69.5%(表1).

2.4 聚磷菌株的鉴定

Biolog微生物鉴定系统利用微生物对不同碳源进行呼吸

表1 部分聚磷菌的聚磷能力测定 (起始浓度: 184.57 μmol/L)
Table 1 Phosphorus removal ability of some PAOs (initial concentration: 184.57 μmol/L)

菌株 Strain	$D_{600\text{ nm}}$	上清总磷量 Total phosphorus in supernatant ($c_p/\mu\text{mol L}^{-1}$)	除磷量 Phosphorus removal amount ($c_R/\mu\text{mol L}^{-1}$)	除磷率 Phosphorus removal rate ($r/\%$)
SC36	0.380	56.26	128.31	69.5
DT12C	0.175	113.76	70.81	38.4
SE63	0.299	117.38	67.19	36.4
ONE4	0.213	122.16	62.41	33.8
SC24	0.184	127.31	57.26	31.0
SE65	0.235	131.53	53.04	28.7
MS31	0.265	133.62	50.95	27.6
YC6	0.267	134.08	50.49	27.4
SC3T	0.285	134.26	50.31	27.3
YE10	0.268	135.82	48.75	26.4
SC45	0.316	137.41	47.16	25.6
DT11A	0.258	137.59	46.98	25.5
YC4	0.206	140.04	44.53	24.1
YC11	0.278	140.53	44.04	23.9
SD23	0.292	143.16	41.41	22.4
YB3	0.235	143.30	41.27	22.4
YA3	0.270	143.62	40.95	22.2
YB7	0.222	144.33	40.24	21.8
YA2	0.290	144.75	39.82	21.6
YE2	0.218	145.96	38.61	20.9

代谢的差异对菌株进行鉴定, 能够鉴定超过2 650种常见的好氧细菌、厌氧菌、酵母和丝状真菌等微生物, 几乎覆盖了所有重要的与人类、动物、植物相关的微生物. 研究发现所筛聚磷菌多为不动杆菌属, 也有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 和假单胞菌属 (表2). 据研究发现, 不动杆菌属为聚磷菌较优势的菌群, 而其他种群也相继被发现具有聚磷能力^[10-13].

表2 利用Biolog系统鉴定菌株结果
Table 2 Identification of strains by Biolog Phenotype MicroArrays

菌株 Strain	匹配菌株 Species ID	可能 PROB	相似性 SIM	位距 DIST
DT11A	<i>Acinetobacter tandoii</i>	0.876	0.603	4.429
DT2C	<i>Bacillus oleronius</i>	0.697	0.697	4.372
MS31	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0.689	0.689	4.499
ONE4	<i>Acinetobacter tandoii</i>	0.689	0.689	4.47
SC24	<i>Acinetobacter venetianus</i>	0.711	0.711	4.111
SC36	<i>Acinetobacter tandoii</i>	0.881	0.64	3.838
SC3T	<i>Acinetobacter baumannii</i> /gs 3	0.689	0.689	4.393
SD23	<i>Acinetobacter tandoii</i>	0.772	0.526	4.538
SE63	<i>Acinetobacter tandoii</i>	0.603	0.603	4.734
SE65	<i>Acinetobacter tandoii</i>	0.674	0.674	4.632
YA1	<i>Acinetobacter ursingii</i>	0.667	0.667	4.761
YA2	<i>Acinetobacter tandoii</i>	0.653	0.653	4.934
YA3	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	0.575	0.575	4.982
YB7	<i>Acinetobacter baumannii</i> /gs 3	0.617	0.617	4.915
YC4	<i>Pseudomonas putida</i> biotype B	0.689	0.689	4.482
YC6	<i>Acinetobacter tandoii</i>	0.582	0.582	4.579
YC11	<i>Acinetobacter tandoii</i>	0.689	0.689	4.479
YE10	<i>Acinetobacter tandoii</i>	0.653	0.653	4.953

16S rDNA可以作为最常用的系统进化标记分子, 越来越多微生物的16S rDNA序列被测定并收入国际基因数据库中. 为分析所筛聚磷菌之间的亲缘性以及多样性, 克隆测序18株细菌分离株的16S rDNA序列, 将获得的16S

rRNA基因序列提交到GenBank数据中, 获得相应的序列号 (DT11A: KU353544; DT12C: KU353545; MS31: KU353546; ONE4: KU353547; SC3T: KU353548; SC24: KU353549; SC36: KU353550; SD23: KU353551; SE63: KU353552; SE65: KU353553; YA1: KU353554; YA2: KU353555; YB3: KU353556; YB7: KU353557; YC4: KU353558; YC6: KU353559; YC11: KU353560; YE10: KU353561). 对18株细菌的16S rDNA序列进行聚类并采用邻接法构建系统发育树 (图3), 发现18株分离菌株主要有5个分支, 除菌株DT12C、SC24、SE65和YC4均独立形成一个分支外, 其他菌株之间具有较高的相似性, 均属于不动杆菌属, 故而聚在一起. 虽然采样点集中在东寨港红树林保护区, 但因为采样时间和具体位置的不一致, 所获得的聚磷菌也表现出一定的差异性, 说明东寨港红树林聚磷微生物资源具有很好的多元性. 经BLAST软件与GenBank中已登录的16S rDNA序列进行比对, 发现所筛菌株与其匹配菌株同源性多为98%, 可以认为是新菌株, 其中菌株SE63与*Acinetobacter tandoii*的同源性为96% (表3), 很可能是一个新种^[28].

3 结论

聚磷菌的发现为解决水体中无机磷的富集问题起到了至关重要的作用, 国内外学者相继筛选了很多具有聚磷能力的微生物, 但一般都是从污水处理厂的活性淤泥中筛选得

表3 利用16S rDNA 序列鉴定菌株结果 Table 3 Identification of strains by 16S rDNA sequence analysis				
菌株 Strain	标准菌株 Standard strain	覆盖率 Query cover (r/%)	相似度 Similarity (P/%)	
DT11A	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	100	98	
DT12C	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> stain IAM 12423	100	99	
MS31	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	99	98	
ONE4	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	100	98	
SC24	<i>Bacillus anthracis</i> strain Ames	100	99	
SC36	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	100	98	
SC3T	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	99	98	
SD23	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	100	98	
SE63	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	99	96	
SE65	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> strain LMG 2683	99	99	
YA1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> stain ATCC 17909	99	99	
YA2	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	100	98	
YB3	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	100	98	
YB7	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	99	98	
YC4	<i>Pseudomonas putida</i> stain FI	99	99	
YC6	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	99	98	
YC11	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	99	98	
YE10	<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	99	98	

到, 对红树林淤泥聚磷菌的研究鲜见报道. 本研究表明东寨港红树林可培养的优势聚磷菌群为不动杆菌属, 也发现有芽孢杆菌属、寡养单胞菌属和假单胞菌属的菌株, 筛选的聚磷菌株的聚磷能力最高能达到69.5%. 从红树林获得的聚磷菌株可为富营养化水体的快速、高效处理提供有效的菌种资

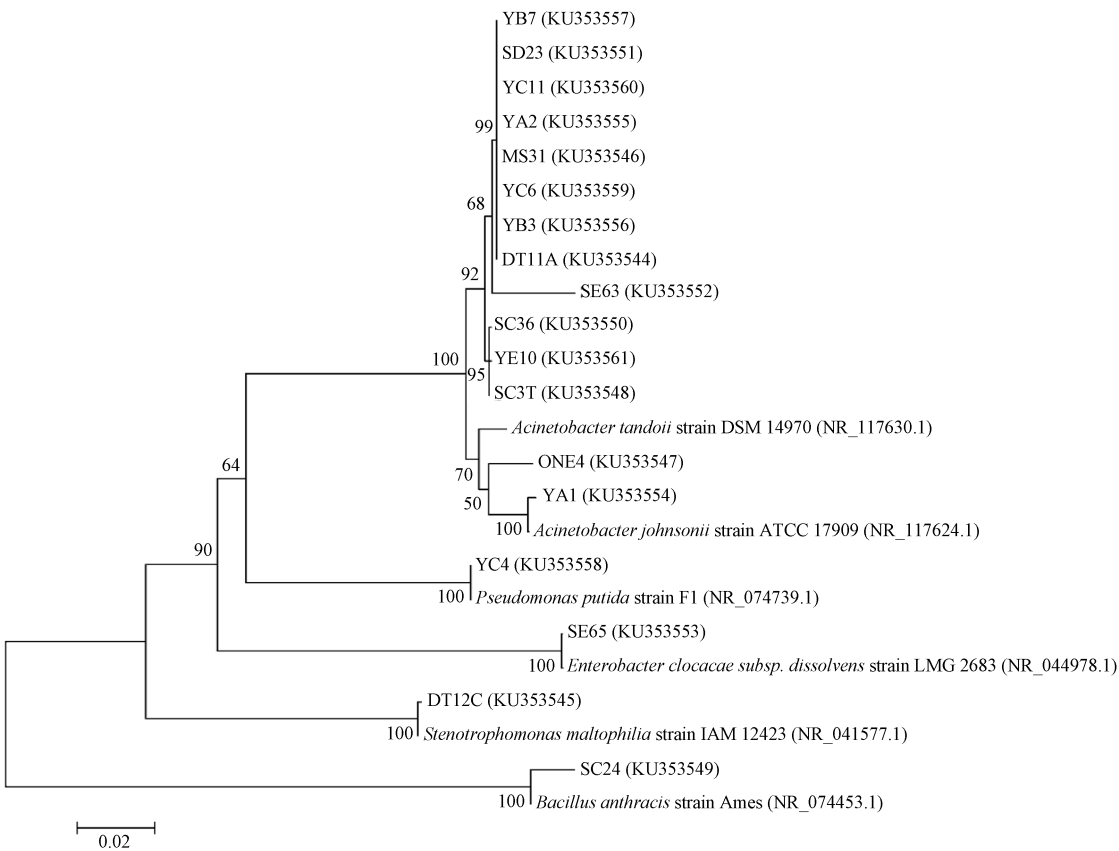


图3 利用16S rDNA序列构建的部分聚磷菌的系统发育树.
Fig. 3 Phylogenetic relationship between some PAOs based on the 16S rDNA sequences.

源,同时可以对筛选的聚磷菌株进行条件优化使得菌株表现出更高的聚磷效果.我们利用*illumina*第二代测序已经对聚磷菌株SC36的基因组进行测序,鉴定克隆了3个*ppk*基因(数据未列出),为后续利用基因工程手段进一步构建高效聚磷工程菌用于各种富营养化水体的处理提供了获选基因资源.与此同时,对东寨港红树林聚磷微生物资源进行调查,也为认识微生物在红树林生态系统中所扮演的角色,以及环境保护中海洋磷循环的作用提供了必要的理论依据.

参考文献 [References]

- Yang XE, Wu X, Hao HL, He ZL. Mechanisms and assessment of water eutrophication [J]. *J Zhejiang Univ B*, 2008, **3** (3): 197-209
- 林晓, 刘靖, 徐厚坤. 富营养化水体中磷的控制方法初探[J]. 城镇供水, 2003, **2** (1): 29-30
- Abell JM, Özkundakci D, Hamilton DP. Nitrogen and phosphorus limitation of phytoplankton growth in New Zealand lakes: implications for eutrophication control [J]. *Ecosystems*, 2010, **13** (7): 966-977
- 郑金伟, 冉炜, 钟增涛, 何健. 增强型生物除磷过程中聚磷酸盐积累微生物的研究进展[J]. 应用生态学报, 2004, **15** (8): 1487-1490 [Zheng JW, Ran W, Zhong ZT, He J. Research advance in polyphosphate-accumulating microorganisms in enhanced biological phosphorus removal process. *Chin J Appl Ecol*, 2004, **15** (8): 1487-1490]
- Seralathan P, Rajkumar MS, Sunilkumar V, Anandaraj N. Interstitial water chemistry of mangrove sediments, Kerala [J]. *J Geol Soc India*, 2006, **68** (2): 251-258
- 李玲玲, 郑西来, 吴俊文, 李梅, 赵淑梅. 亚硝酸盐对聚磷菌好氧摄磷的影响研究[J]. 环境科学, 2006, **27** (8): 1574-1579 [Li LL, Zheng XL, Wu JW, Li M, Zhao SM. Effect of nitrite on aerobic phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Environ Sci*, 2006, **27** (8): 1574-1579]
- 马斌, 彭永臻, 王淑莹, 葛士建, 杨莹莹, 祝贵兵. 强化生物除磷系统中聚磷菌菌群特性[J]. 化工学报, 2010, **61** (5): 1282-1285 [Ma B, Peng YZ, Wang SY, Ge SJ, Yang YY, Zhu GB. Characterization of polyphosphate-accumulating bacteria community structure in enhanced biological phosphorus removal reactor [J]. *CIESC J*, 2010, **61** (5): 1282-1285]
- 李海峰, 李志建, 屈建航. 高效聚磷菌的分离、筛选与构建的研究进展[J]. 生物技术, 2012, **22** (4): 93-97 [Li HF, Li ZJ, Qu JH. Research progress of isolation, screening and building of High-efficient polyphosphate-accumulating organisms [J]. *Biotechnology*, 2012, **22** (4): 93-97]
- Fuhs GW, Chen M. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater [J]. *Micmb Ecol*, 1975(2): 119-138
- Meganck M, Malnou D, Flohie PL, Faup GM, Rovel JM. The importance of the acidogenic microflora in biological phosphorus removal [J]. *Waterence Technol*, 1985, **17** (11-12): 199-212
- Cai TM, Guan LB, Chen LW, Cai S, Li XD, Cui ZL, Li SP. Enhanced biological phosphorus removal with *Pseudomonas putida* GM6 from activated sludge [J]. *Pedosphere*, 2007, **17** (5): 624-629
- 刘亚男, 于水利, 薛罡, 赵方波, 郭思远. 聚磷菌PAO1-1的筛选及除磷特性仁[J]. 中国给水排水, 2005, **21** (10): 13-17 [Liu YN, Yu SL, Xue G, Zhao FB, Guo SY. Study on separation and screening of phosphate accumulating bacterial strain PAO1-1 and characteristics of phosphorus removal. *China Water Wastewater*, 2005, **21** (10): 13-17]
- 张培玉, 孙梦, 张晨. 环境因素对3株嗜盐聚磷菌除磷性能的影响[J]. 山东大学学报(理学版), 2015, **50** (5): 88-50 [Zhang PY, Sun M, Zhang C. Environmental factors influence on phosphorus removal of three halophilic phosphate accumulating bacteria strains [J]. *J Shandong Univ (Nat Sci)*, 2015, **50** (5): 88-50]
- Lin P. Mangrove Ecosystem in China [M]. Beijing: Science Press, 1999: 21-23, 67-68
- 任健, 阎冰, 洪葵. 海南东寨港红树林不同植被土壤微生物群落结构比较[J]. 微生物学报, 2012, **52** (6): 736-743 [Ren J, Yan B, Hong K. Comparison of bacterial and archaeal community of mangrove soil under different vegetation in Dongzhaigang, Hailan Island. *Acta Microbiol Sin*, 2012, **52** (6): 736-743]
- 陈桂珠. 研究保护和开发利用红树林生态系统[J]. 生态科学, 1991, **1**: 116-119
- 曹启民, 郑康振, 陈耿, 陈桂珠. 红树林生态系统微生物学研究进展[J]. 生态环境, 2008, **17** (2): 839-845 [Cao QM, Zheng KZ, Chen G, Chen GZ. A review of Studies on microsiology of mangrove ecosystems *Ecol Environ*, 2008, **17** (2): 839-845]
- Dahdouh-Guebas F, Collin S, Lo Seen D, Ronnback P, Depommier D, Ravishankar T, Kocdahn N. Analysing ethnobotanical and fishery-related importance of mangroves of the East-Godavari Delta (Andhra Pradesh, India) for conservation and management purposes [J]. *J Ethnobiol Ethnomed*, 2006, **8** (2): 24
- Kuroda A, Takiuchi N, Gotanda T, Nomura K, Kato J, Ikeda T, Ohtake H. A simple method to release polyphosphate from activated sludge for phosphorus reuse and recycling [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **78** (3): 333-338
- Neidhardt FC, Bloch PL, Smith DF. Culture medium for enterobacteria [J]. *J Bacteriol*, 1974, **119** (3): 736-747
- Morohoshi T, Yamashita T, Kato J, Ikeda T, Takiuchi N, Ohtake H, Kuroda A. A method for screening polyphosphate-accumulating mutants which remove phosphate efficiently from synthetic wastewater [J]. *J Biosci Bioeng*, 2003, **95** (6): 637-640
- 陈接锋, 许旭萍, 余晨兴, 李惠珍. 合成聚 β -羟基丁酸(PHB)鞘细菌的分离、鉴定与筛选[J]. 工业微生物, 2003, **33** (4): 23-26 [Chen JF, Xu XP, She CX, Li HZ. Isolation, identification and screening of Sheathed bacteria synthesizing poly-hyclorxybntyric acid (PHB). *Ind Microbiol*, 2003, **33** (4): 23-26]
- 刘长秀, 罗海华, 周红, 江丽芳, 李彩霞, 郑树森. 白喉杆菌异染颗粒Neisser法染色的新探讨[J]. 热带医学杂志, 2006, **6** (2): 165-166 [Liu CX, Luo HH, Zhou H, Jiang LF, Li CX, Zheng SS. Neisser stain of the metachromatic granules of *C.diphtheriae* [J]. *J Trop Med*, 2006, **6** (2): 165-166]
- 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
- 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. 电子显微学报, 2005, **24** (4): 440-440
- 程池, 杨梅, 李金霞, 姚粟, 胡海蓉. Biolog微生物自动分析系统-细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, **32** (5): 50-54 [Cheng C, Yang M, Li JX, Yao S, Hu HR. Biolog microbial ideritificatron system—study on the operating regulation of Bacteria iden tification. *Food Ferment Ind*, 2006, **32** (5): 50-54]
- Devereux R, He SH, Doyle CL, Orkland S, Stahl DA, Legall J, Whitman WB. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol*, 1990, **172** (7): 3609-3619