

耐碱反硝化菌株的分离鉴定与功能检测

王茹, 郑平*, 厉巍, 陈慧, 陈婷婷, Abbas Ghulam

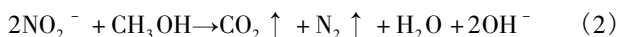
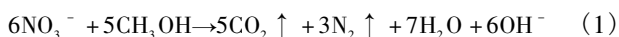
浙江大学环境与资源学院环境工程系, 杭州 310058

摘要: 【目的】分离获得耐碱反硝化菌株, 确定其反硝化活性和耐碱能力。【方法】分离、纯化, 获得耐碱反硝化菌株; 通过形态观察、生理生化试验和 16S rRNA 基因测序分析, 确定菌株分类地位; 试验起始硝酸盐浓度和起始 pH 对分离菌株反硝化活性的影响。【结果】从实验室稳定运行的高效反硝化反应器中分离获得耐碱反硝化菌株 R9, 经鉴定归于 *Diaphorobater nitroreducens*; 菌株 R9 能够以甲醇为电子供体、硝酸盐为电子受体进行异养生长, 当起始硝氮浓度为 50 mg/L、起始 pH 为 9.0 时, 288 h 内硝氮去除率达 93.25%; 高浓度硝氮可抑制其反硝化活性, 半抑制常数 K_i 为 202.73 mg N/L; 菌株 R9 的耐碱性良好, 起始 pH 为 11.0 时的硝氮去除率是 pH 为 9.0 时的 86%。【结论】菌株 R9 归于 *Diaphorobater nitroreducens*, 最适生长 pH 为 9.0 左右, 是一株耐碱反硝化菌。

关键词: 反硝化菌, 分离鉴定, 耐碱性能

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 04-0372-07

含氮化合物的过量排放是水体污染及富营养化的重要致因, 废水脱氮有利于控制水体污染。反硝化作用是废水生物脱氮的关键环节, 开发高效反硝化反应器有利于节能减排^[1-2]。反硝化菌是反硝化反应器的功能之源, 高活性的反硝化菌是开发高效反硝化反应器的重要基础^[3]。若以甲醇作为电子供体, 反硝化菌的反硝化作用见式 1 和 2。



反硝化作用是致碱反应, 1 g 硝氮产生 3.57 g 碱度(以 CaCO_3 计)^[4]。据高景峰等^[5]报道, 采用 SBR 法进行反硝化作用, 反应液 pH 可在 20 min 内由 7.26 升高至 9.16。因此, 筛选耐碱反硝化菌对于高负荷反硝化反应器的稳定运行具有重要的现实

意义。

目前文献报道反硝化反应器的最高容积去除速率为 $25 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 本课题组已将容积去除速率提升到 $26.8 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ ^[6]。但迄今为止, 有关耐碱反硝化菌的分离研究则未见文献报道。笔者从本课题组高效反硝化反应器中分离了一个反硝化菌株, 鉴定了其分类地位, 并试验了其耐碱能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌源: 实验室稳定运行的反硝化反应器, 工况见表 1。

基金项目: 浙江省重点自然科学基金(Z5110094); 国家自然科学基金(51278457)

* 通信作者。Tel: +86-571-88982819; E-mail: pzhen@zju.edu.cn

作者简介: 王茹(1989-), 女, 山西长治人, 研究方向为环境微生物。E-mail: wangru890501@163.com

收稿日期: 2012-11-22; **修回日期:** 2013-01-10

表 1. 实验室反硝化反应器运行情况
Table 1. Performance of the lab-scale denitrification reactor

Influent NO_3^- -N (mg/L)	Effluent NO_3^- -N (mg/L)	NO_3^- -N removal rate (%)	Volumetric loading rate ($\text{kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$)	Influent pH	Effluent pH
1300	0.300	99.97	27.99	7.17	8.99

1.1.2 培养基:①反硝化培养基: NaNO_3 304 mg/L, KH_2PO_4 5.5 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mg/L, NH_4Cl 24 mg/L, CH_3OH 0.26 mL/L, 微量元素液 50 mg/L。②微量元素液: CaCl_2 5500 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5000 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3000 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50 mg/L, EDTA 50 mg/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 36 mg/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{21} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 21 mg/L, H_3BO_3 20 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10.2 mg/L, ZnSO_4 2.2 mg/L。

1.1.3 试剂与仪器: DNA 抽提试剂盒、柱式 DNA 胶回收试剂盒、厌氧菌鉴定试剂盒。岛津 UV-2450 紫外分光光度计、TECNAI 10 透射电子显微镜、THERMO 生物安全柜、依莱泰科厌氧培养箱、BIO-RAD PCR 仪、pHS-9V 型酸度计、细菌浊度仪。

1.2 样品预处理

取 10 mL 活性污泥样品,置于 90 mL 反硝化培养基中,加入玻璃珠,在 30℃、150 r/min 摇床上振荡培养 5 h,分散颗粒污泥。

1.3 分离纯化

对活性污泥样品进行 10 倍梯度稀释至 10^{-8} 浓度,取 100 μL 稀释液涂布于反硝化固体培养基平板上,37℃ 厌氧培养箱中培养 6 d,挑取单菌落进行纯化。

1.4 菌株形态学观察

肉眼观察平板上的菌落形态;显微镜下观察革兰氏染色反应;TECNAI 10 透射电子显微镜下观察单个菌体的形态。

1.5 生理生化试验

采用 API 鉴定系统,测定菌株的生理生化特性。

1.6 菌株 16S rRNA 基因序列测定

采用通用引物 11F (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1387R (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3') 进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增^[7]。扩增体系 (25 μL): 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL , dNTPs 2 μL , 模板 DNA 2 μL , 正反向引物各 1 μL , Taq polymerase 0.2 μL , 超纯水 16.3 μL 。扩增条件: 94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 52℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 5 min。测序委托华大基因研

发中心进行。将测得的 16S rRNA 基因序列输入 NCBI GenBank 数据库 (National Center for Biotechnology Information, NCBI), 进行 BLAST 比对。利用 MEGA4.1 软件中基于 Kimura 2-parameter 模型的 NJ 邻接法来建立系统发育树,并用 bootstrap 法 (replication 值为 1000) 进行检验^[8]。

1.7 生长特性

采用 65 mL 血清瓶培养,考察菌株生长特性。分别接种 2 mL 菌悬液于 48 mL 起始硝氮浓度为 50 mg/L 的液体反硝化培养基中,一组置于 37℃ 厌氧培养箱中培养,每 24 h 取样测定 OD_{600} 值;另一组置于 37℃ 恒温培养箱中培养,每 12 h 取样测定 OD_{600} 值。以时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标绘制菌株生长曲线,并计算菌株倍增时间。

1.8 氧浓度对菌株反硝化活性影响

采用 65 mL 血清瓶培养,测定反硝化活性。分别接种 2 mL 菌悬液于 48 mL 起始硝氮浓度为 50 mg/L 的液体反硝化培养基中,一组置于 37℃ 厌氧培养箱中培养,另一组置于 37℃ 恒温培养箱中培养,每 24 h 取样测定硝氮浓度。

1.9 硝酸盐耐受性

设置起始硝氮浓度分别为 20、50、100、150、200 mg/L,起始 pH = 9.0,以 2% 的接种量接种菌悬液于培养基中,在 37℃ 厌氧培养箱中培养,每 48 h 取样测定硝氮浓度,计算硝氮去除速率,利用基质自抑制模型拟合菌株的半抑制浓度。

1.10 pH 耐受性

设置起始 pH 值分别为 8.0、9.0、10.0、11.0、12.0,起始硝氮浓度 50 mg/L 的反硝化培养基,以 2% 的接种量接种菌悬液于培养基中。在 37℃ 厌氧培养箱中培养 6 d,测定硝氮浓度及终止 pH 值,并计算硝氮去除率。

1.11 常规分析项目及方法

NO_3^- -N: 紫外分光光度法^[9]; NO_2^- -N: N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法^[9]; NH_4^+ -N: 纳氏试剂分光光度法^[9]。

2 结果和分析

2.1 形态特征

经分离纯化,获得一株能够以硝酸盐为电子受体、甲醇为电子供体的菌株,命名为 R9。37℃,反硝化固体培养基上厌氧培养 6 d(图 1-A),观察平板上

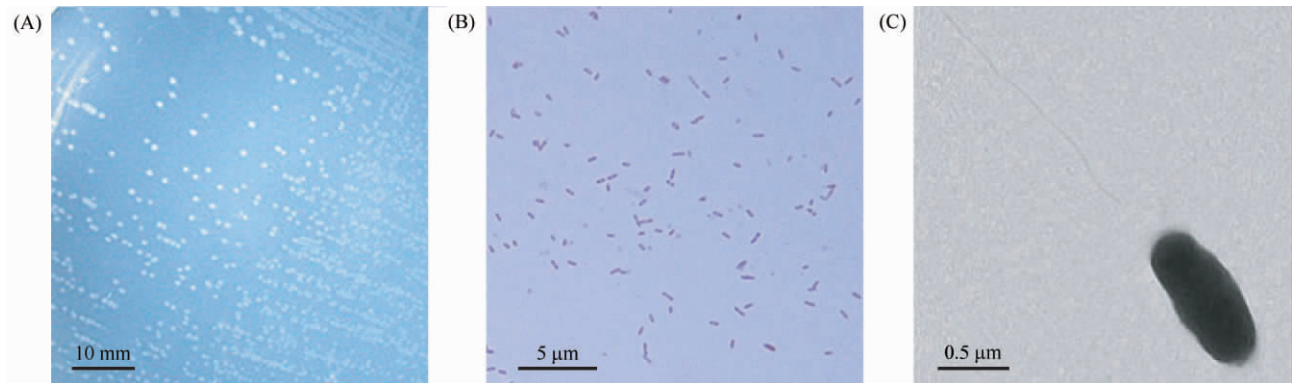


图 1. R9 菌株照片

Figure 1. photograph of strain R9. A: colonies; B: gram staining; C: electron scanning micrograph.

2.2 生理生化特性

利用 API 试剂条测验菌株 R9 的生理生化特性,结果见表 2。

表 2. R9 菌株基质利用特性

Table 2. Substrate utilization of strain R9

Substrate	Utilization	Substrate	Utilization
Indole	-	Gelatin	-
Urease	-	Esculin	-
Glucose	-	Rhamnose	-
Mannose	+	Trehalose	+
Lactose	-	Arabinose	-
Sucrose	+	Melezitose	+
Maltose	-	Raffinose	+
Cellobiose	-	Xylose	-
Sorbitol	-	Glycerol	-
Mannitol	-	Willow alcohol	-

Note: + : positive; - : negative.

菌株 R9 兼性厌氧,可分解过氧化氢,可还原硝酸盐。从表 2 结果看,菌株 R9 的吲哚、明胶、脲酶、七叶灵反应呈阴性;菌株 R9 能利用甘露糖、海藻糖、蔗糖、松叁糖、棉子糖,但不能利用葡萄糖、鼠李糖、乳糖、阿拉伯糖、麦芽糖、纤维二糖、木糖、山梨醇、甘油、甘露醇及柳醇。

2.3 16S rRNA 基因序列分析

采用 DNA 抽提试剂盒提取菌株 DNA,PCR 扩

的培养物发现,该菌菌落较小,直径约为 0.5 - 1 mm;早期菌落透明,后期变为乳白色,最终呈现米黄色;菌落凸起成圆形,表面光滑,边缘不整齐;革兰氏染色反应阴性(图 1-B)。经磷钨酸负染,菌株 R9 的电镜照片(图 1-C)所示,菌体细胞呈杆状,两端钝圆,大小为(0.3 - 0.5) μm \times (0.7 - 1.0) μm ,端生鞭毛,可运动。

增,获得 1381 bp 的 DNA 片段;采用 pMD C 19-T 载体,导入大肠杆菌,进行克隆,并对克隆 DNA 测序;将测序结果输入 GenBank 数据库(NCBI 序列号为 JX966536)作 BLAST 比对;比对结果显示,菌株 R9 可归于 *Diaphorobacter* 属^[10],与 *Diaphorobacter nitroreducens* NA10B 的序列相似性高达 99%,系统进化树(图 2)中也与 NA10B 菌株聚类在一起。

2.4 菌株生长特性

分别在厌氧及好氧条件下培养,考察菌株 R9 的生长特性。结果表明,菌株可在好氧及厌氧条件下生长(图 3)。由图可见,有氧条件下,菌株经 48 h 左右培养进入对数期,经 100 h 左右培养进入稳定期;无氧条件下,菌株经 78 h 左右培养进入对数期,经 208 h 左右培养进入稳定期。从图中对数生长期的数据可以计算出菌株 R9 在好氧条件下的比生长速率 μ 为 0.049 h^{-1} ,倍增时间为 14.17 h。

2.5 培养条件对菌株反硝化活性的影响

分别在无氧及有氧条件下测定菌株 R9 的反硝化活性,图 4 的结果表明,在有氧条件下培养时,菌株 R9 没有反硝化活性;无氧培养时,菌株利用甲醇作为电子供体、硝酸盐作为电子受体进行生长代谢。在整个无氧培养过程中,硝酸盐浓度逐渐下降,但未检测到亚硝氮。起始硝氮浓度为 50 mg/L 时,288 h

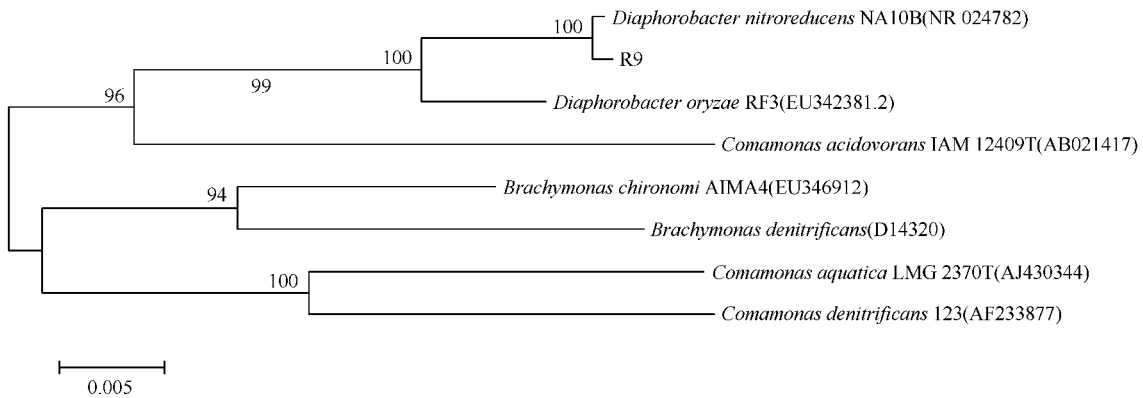


图 2. 菌株 R9 系统进化发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of strain R9. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap (1000 re-samplings). Bar: 0.5% sequence divergence.

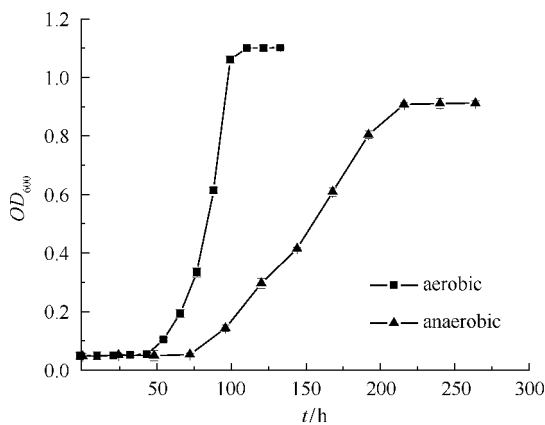


图 3. 菌株 R9 在不同条件下的生长曲线

Figure 3. Growth curve of strain R9.

内菌株 R9 对硝氮的去除率为 93.25%。

2.6 硝酸盐耐受性

通过改变起始硝酸盐浓度,考察了硝酸盐对菌株 R9 反硝化活性的影响。设置起始硝氮分别为 20、50、100、150、200 mg/L,96 h 后取样测定硝氮浓度,计算硝氮去除速率,结果表明,起始硝氮浓度为 150 mg/L 时,菌株 R9 的硝氮去除速率最大,为 12.62 mg/(L·h);起始硝氮浓度提升为 200 mg/L 时,菌株 R9 的硝氮去除速率降为 12.45 mg/(L·h)。以起始硝氮浓度为横坐标、硝氮去除率为纵坐标可作图 5,菌株 R9 反硝化活性与基质浓度的关系符合基质自抑制方程^[11]:

$$r_i = \frac{r_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i}}$$

根据拟合结果,菌株 R9 的硝酸盐半饱和和常数

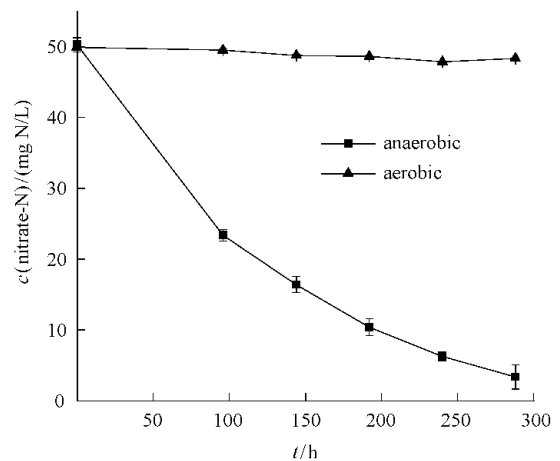


图 4. 培养条件对菌株 R9 反硝化活性的影响

Figure 4. Effects of oxygen concentration on denitrification activity of strain R9.

K_m 为 107.76 mg N/L,半抑制常数 K_i 为 202.73 mg N/L。

2.7 pH 耐受性

通过设置不同起始 pH 值,考察了 pH 对菌株 R9 反硝化活性的影响。当起始硝氮浓度为 50 mg/L,初始 pH 为 9.0 时,菌株在 288 h 内的硝氮去除率为 93.25%,去除速率为 3.88 mg/(L·d)。以初始 pH 9.0 时的硝氮去除率为基准,试验了 144 h 内初始 pH 分别为 8.0、10.0、11.0、12.0 条件下的相对硝氮去除率。如图 6 所示,菌株 R9 能够适应较宽的高 pH 范围,在 pH 分别为 8.0、10.0、11.0 时的相对硝氮去除率均达到 80% 以上;只有在 pH 高于 11.0 之后,菌株 R9 的硝氮去除率才明显下降;即使 pH 高达 12.0,硝氮去除率也有 pH 9.0 时的 20%。

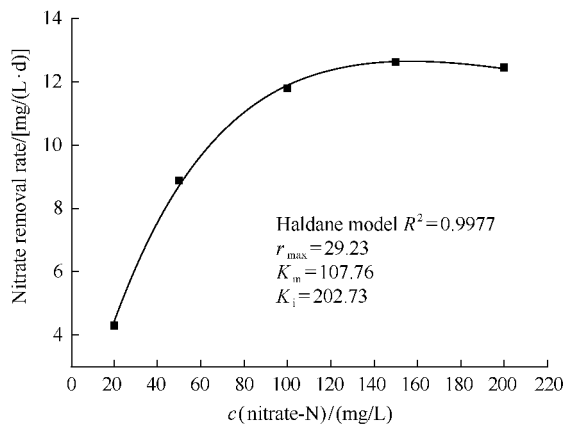


图 5. 硝氮对菌株 R9 反硝化活性的抑制作用

Figure 5. Inhibition of nitrate on denitrification activity of strain R9.

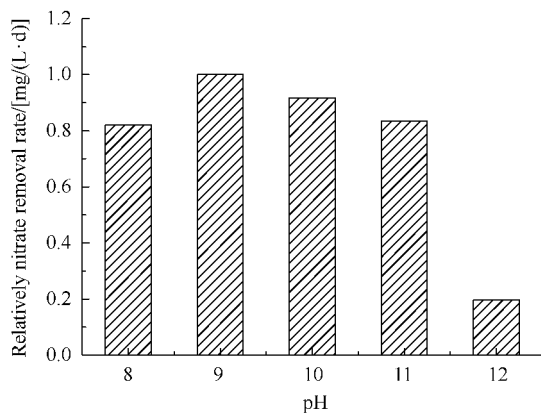


图 6. pH 对菌株 R9 反硝化活性的影响

Figure 6. Effects of pH on denitrification activity of strain R9.

3 讨论

3.1 菌种活性

笔者从实验室高效反硝化反应器中分离获得了一个耐碱反硝化菌株 R9。经鉴定,其归于 *Diaphorobacter* 属。据文献报道, *Diaphorobacter* 属包含 *Diaphorobacter oryzae*^[12] 和 *Diaphorobacter nitroreducens*^[13] 两个种。 *D. nitroreducens* 具有反硝化活性,能分解 PHB(聚-β-羟丁酸)和 PHBV(3-羟基丁酸酯和 3-羟基戊酸酯的共聚物)。菌株 R9 与 *D. nitroreducens* NA10B 的 16S rRNA 基因序列相似性高达 99%。从生理生化试验看,菌株 R9 具有丰富基质多样性,适用于废水生物脱氮。在厌氧培养中,菌株 R9 的硝氮去除率为 93.25%,显著高于文献报道值 85.84%^[14]、66.43%^[15]、65.53%^[16];菌

株 R9 的倍增时间为 14.17 h,短于文献报道值 18-25 h^[17]、0.74-1.34 d^[18]、19.2 h^[19]。菌株 R9 具有较高的工程利用价值。

3.2 菌种适应性

由于反硝化作用是致碱反应,1 g 硝氮产生 3.57 g 碱度(以 CaCO₃ 计)^[4],对于高负荷反应器,反应液 pH 极易超过 9.0 而对反硝化菌产生抑制。因此,要求功能菌不仅有高活性,而且有耐碱性。目前文献报道的反硝化反应器的最高容积去除速率为 25 kg/(m³·d)。经过努力,本课题组已将其提升到 26.8 kg/(m³·d)。菌株 R9 的最适生长 pH 为 9.0,且有较宽的高 pH 适应范围。在 pH 为 11.0 条件下,菌株 R9 的硝氮去除率仍可达 pH 9.0 时的 86%。菌株 R9 对硝酸盐有较强耐受性,硝酸盐半抑制常数 K_i 为 202.73 mg N/L。菌株 R9 属于兼性厌氧菌,在有氧条件下进行好氧呼吸,在无氧条件下进行厌氧呼吸(以硝酸盐作为电子受体),对氧浓度也有较强的适应性。

4 结论

从实验室高效反硝化反应器中分离获得耐碱反硝化菌株 R9。通过形态观察、生理生化试验和 16S rDNA 测序分析,其归于 *Diaphorobacter* 属。

菌株 R9 具有丰富基质多样性,能利用甘露糖、海藻糖、蔗糖、松叁糖、棉子糖等多种碳源。菌株 R9 具有较高的生长速率,倍增时间为 14.17 h,短于文献报道的其他菌株。菌株 R9 具有较高的反硝化活性,硝氮去除率为 93.25%。

菌株 R9 的最适生长 pH 为 9.0,且有较宽的高 pH 适应范围。菌株 R9 对硝酸盐有较强的耐受性,硝酸盐半抑制常数 K_i 为 202.73 mg N/L。菌株 R9 属于兼性厌氧菌,对氧也有较强的适应性。

参考文献

- [1] Jetten MSM, Logemann S, Muyzer G, Robertson LA, Vries S, Loosdrecht MCM, Kuenen JG. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, 71: 75-93.
- [2] Khin T, Annachhatre AP. Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances*, 2004, 22(7): 519-532.
- [3] 郑平,徐向阳,胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术. 北

- 京:科学出版社,2004.
- [4] 邓康. 反硝化脱氮及其微生物特性研究. 华南理工大学硕士学位论文. 2010.
- [5] Gao JF, Peng YZ, Wang SY. Law of changes in pH during processes of nitrification, denitrification and organism removal by SBR. *Environmental Engineering*, 2001, 19(5): 21-24. (in Chinese)
高景峰,彭永臻,王淑莹. SBR法去除有机物、硝化和反硝化过程中pH变化规律. 环境工程,2001, 19(5): 21-24.
- [6] Li W, Zheng P, Xie ZF. Performance of high-rate denitrifying compartmentalized anoxic reactor [OL]. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2012. 11. 22. (in Chinese)
厉巍,郑平,谢作甫. 高效反硝化分段组合式反应器运行性能 [OL]. 化工学报,2012. 11. 22.
- [7] Cai J, Jiang JX, Zheng P. Isolation and identification of bacteria responsible for simultaneous anaerobic ammonium and sulfate removal. *Scientia Sinica Chimica*, 2010, 40(4): 421-426. (in Chinese)
蔡靖,蒋坚祥,郑平. 一株硫酸盐型厌氧氨氧化菌的分离和鉴定. 中国科学:化学,2010,40(4):421-426.
- [8] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [9] 国家环保总局,水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京:中国环境科学出版社,2002.
- [10] Garrity GM, Benner DJ, Krieg NR, Staley JT. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9th eds. New York: Springer, 2005.
- [11] 郑平,冯孝善. 废物生物处理. 北京:高等教育出版社,2006.
- [12] Pham VH, Park SJ, Roh Y. *Diaphorobacter oryzae* sp. nov., isolated from a thiosulfate-oxidizing enrichment culture. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 218-221.
- [13] Khan ST, Hiraishi A. *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly (3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2002, 48: 299-308.
- [14] Ma F, Zhou DD, Wang HY, Dong SS. Characteristics of psammophytes of an aerobic denitrifier. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2006, 38(4): 575-577. (in Chinese)
马放,周丹丹,王宏宇,董双石. 一株好氧反硝化细菌生理生态特征的研究. 哈尔滨工业大学学报,2006,38(4):575-577.
- [15] Zhu XY, Wang SM, Liang JR, Zhou LX. Isolation and identification of two aerobic denitrifiers with high efficiency in the removal of N from simulated wastewater. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(1): 111-117. (in Chinese)
朱晓宇,王世梅,梁剑茹,周立祥. 两株高效好养反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮效率. 环境科学学报,2009,29(1):111-117.
- [16] Yang XL, Li WM, Chen Y, Cao YS. Identification and denitrification of an aerobic bacterium. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1062-1070. (in Chinese)
杨小龙,李文明,陈燕,曹郁生. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及其脱氮特性. 微生物学报,2011,51(8): 1062-1070.
- [17] Haggblom M, Young LY. Anaerobic degradation of 3-halobenzoates by a denitrifying bacterium. *Archives of Microbiology*, 1999, 171: 230-236.
- [18] Sun WJ, Sierra R, Field JA. Anoxic oxidation of arsenite linked to denitrification in sludges and sediments. *Water Research*, 2008, 42: 4569-4577.
- [19] Rauschenbach I, Bini E, Haggblom MM, Yee N. Physiological response of *Desulfurispirillum indicum* S5 to arsenate and nitrate as terminal electron acceptors. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 81: 156-162.

Identification and function test of an alkali-tolerant denitrifying bacterium

Ru Wang, Ping Zheng^{*}, Wei Li, Hui Chen, Tingting Chen, Abbas Ghulam

Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: [Objective] We obtained an alkali-tolerant denitrifying bacterium, and determined its denitrifying activity and alkali-tolerance. [Methods] An alkali-tolerant denitrifying bacterial strain was obtained by isolation and purification. We identified the bacterial strain by morphological observation, physiological test and 16S rRNA analysis. We determined the denitrifying activity and alkali-tolerance by effects of initial nitrate concentration and initial pH on denitrification. [Results] An alkali-tolerant denitrifier strain R9 was isolated from the lab-scale high-rate denitrifying reactor, and it was identified as *Diaphorobacter nitroreducens*. The strain R9 grew heterotrophically with methanol as the electron donor and nitrate as the electron acceptor. The nitrate conversion was 93.25% when strain R9 was cultivated for 288 h with initial nitrate concentration 50 mg/L and initial pH 9.0. The denitrification activity could be inhibited at high nitrate concentration with a half inhibition constant of 202.73 mg N/L. Strain R9 showed a good alkali tolerance with the nitrate removal rate at pH 11.0 remained 86% of that at pH 9.0. [Conclusion] Strain R9 was identified as *Diaphorobacter nitroreducens*, and it was an alkali-tolerant denitrifying bacterium with optimum pH value of 9.0.

Keywords: Denitrifying bacterium, Isolation and Identification, Alkali-tolerance

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Z5110094) and by the National Natural Science Foundation of China (51278457)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-571-88982819; E-mail: pzheng@zju.edu.cn

Received: 22 November 2012/Revised: 10 January 2013

系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour - Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作 [参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应标明“树”上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为“Time New Roman”,字号为“8p”。可以选用两种方式——(A)文件格式为“*.Tif”,分辨率为 600 线;(B)文件格式为“word”,画出树,输入文字。