

耐盐好氧反硝化菌 A-13 菌株的分离鉴定及其反硝化特性

韩永和, 章文贤, 庄志刚, 周志华, 许旭萍, 李敏*

福建师范大学生命科学学院, 福州 350108

摘要: 【目的】筛选高效好氧脱氮的反硝化细菌, 对菌株进行多项鉴定及条件优化, 为后续富营养化人工湖水体治理提供理论依据。【方法】利用反硝化培养基分离筛选好氧反硝化细菌, 通过形态、生理生化、16S rRNA 基因序列分析、周质硝酸还原酶亚基基因 (*napA*) 同源性分析进行菌株鉴定; 通过反硝化培养基, 对菌株生长及反硝化的最适 pH、温度、碳源、溶解氧、接种量等进行了考察。【结果】从福州市闽侯县上街镇高岐村某排污口分离出 1 株耐盐高效好氧反硝化细菌 A-13, 多项鉴定表明该菌株为 *Pseudomonas stutzeri*, 与 *Pseudomonas stutzeri* DSM 50283 亲缘关系最近。菌株生长及反硝化的最适 pH 为 6.5, 最适温度为 33℃, 最适碳源为丁二酸钠, 最适摇床转速为 150 r/min, 最适接种量为 5%。在此条件下, 最大可去除 NO_3^- 浓度约为 1900 mg/L。该菌能够在高盐培养基 (10% NaCl) 中良好生长。对人工废水的净化效果表明, 该菌具有一定的工程应用价值。【结论】分离所得好氧反硝化细菌为 *Pseudomonas stutzeri*, 将其命名为 *P. stutzeri* YHA-13。具备高耐盐性的好氧反硝化功能的 *P. stutzeri* 未见报道。这对含盐废水/富营养化水体的工程应用有一定的潜在价值。

关键词: 耐盐性, 好氧反硝化细菌, 脱氮能力, 富营养化

中图分类号: X172; X703.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 01-0047-12

反硝化过程是氮素生物地球化学循环的一部分, 空气中的氮通过生物或化学固定进入生物圈, 经过微生物的反硝化后又以 N_2 的形式回到大气中^[1]。随着城市化与工业化的发展, 饮用水及地表水的硝酸盐浓度严重超标。大量研究表明, 植物对水体中 NO_3^- 的去除具有良好的效果。但植物生长周期长, 培植成本高, 腐败的植物体还会导致水体发生富营养化等二次污染^[2-5]。基于微生物除氮技术的研究屡见报道^[6-7], 利用菌粉或菌剂修复富营养化水体使批量、快速除氮成为了可能^[2]。然而, 普通的微生物除氮只限于对氮素的生长利用, 除氮效率受到了一定的限制。因此, 筛选获得多途径除氮功能的

微生物成为了当前研究的热点。

传统的微生物脱氮包括硝化和反硝化作用。硝化作用一般为好氧过程, 反硝化作用为好氧或兼性厌氧过程^[8]。单纯的硝化作用不能从根本上解决水体总氮含量超标的问题, 而反硝化过程是去除水体 NO_3^- 的重要途径之一, 将硝化细菌与反硝化细菌组合应用于富营养化水体能够较好地实现治标治本的目的。有报道显示, 有多种细菌能够实现以上过程^[9-10]。目前国内外报道的好氧反硝化菌主要有芽胞杆菌属 (*Bacillus*)^[11], 假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[12-14], 副球菌属 (*Paracoccus*)^[15], 产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)^[16] 等。这些细菌能够进行异

基金项目: 福建省环境保护厅资助项目 (FJHK200912); 福建省大学生创新创业训练项目 (sjexcy2012-022); 福建师范大学拔尖人才训练项目 (201004)

* 通信作者。Tel: +86-591-22867555; E-mail: mli@fjnu.edu.cn

作者简介: 韩永和 (1986-), 男, 福建龙岩人, 硕士研究生, 主要从事生物技术水环境修复研究。E-mail: hanyonghe0423@163.com

收稿日期: 2012-07-20; **修回日期:** 2012-09-23

养生长去除部分 NO_3^- , 且在生长过程中会分泌出硝酸还原酶, 实现 NO_3^- 的反硝化。

本研究从排污口淤泥中筛选出两株具有高效去除 NO_3^- 和 NO_2^- 能力的菌株, 并选择除氮能力最强的 A-13 为目标菌株。在此基础上, 研究了 A-13 的形态特征、生理生化特性、菌种类别及在不同条件下菌体的生长情况和除氮能力; 同时, 考察了菌株 A-13 对人工废水的净化能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 从福州市闽侯县上街镇高岐村某排污口和溪源溪采集淤泥及水样, 立即进行分离筛选。

1.1.2 培养基: 富集培养基 (g/L): NaNO_3 0.85, Casamino acid 2.84, KH_2PO_4 1.36, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.19, pH 7.0。筛选培养基^[17]、反硝化培养基^[18]、微量元素溶液^[18]均按参考文献说明配制。人工废水 (g/L): NaNO_3 0.28, NaNO_2 0.23, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.44, 蛋白胨 0.6, 牛肉膏 0.41, 尿素 0.1, NaCl 0.03, KH_2PO_4 0.1, KCl 0.014, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.018, pH 7.2。

1.2 好氧反硝化细菌的筛选

1.2.1 富集驯化: 称取 0.5 g 新鲜淤泥, 用无菌水水洗后 $7015 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 此过程重复 3 次。将处理后的样品 (水样组直接取 3 mL) 转入装有 30 mL 富集培养基的 150 mL 三角瓶中, 无菌膜封口后于 30°C , 150 r/min 摇床振荡培养。待培养基浑浊后取 1.5 mL 菌悬液于新鲜的富集培养基中, 重复 3-4 次, 获得能够在高浓度 NO_3^- 中生长的菌群。

1.2.2 分离纯化: 反硝化细菌在反硝化过程中由于 NO_3^- 的消耗, 培养基的 pH 不断升高, 从而使溴百里酚蓝从黄色变为蓝色。因此, 可以根据菌落的颜色进行反硝化细菌的分离纯化^[18]。取 1 mL 富集液按 $10^{-1} - 10^{-7}$ 梯度进行稀释, 涂布平板。挑取有蓝色晕圈的单菌落, 在液体筛选培养基中继续培养, 24 h 后划线, 挑取形态较特殊的单菌落进行复筛实验。

1.2.3 复筛: 复筛方法根据李平设计的方法进行^[17]。即从纯的筛选平板挑选出形态较特殊的单菌落, 实验前于 LB 培养基中前培养 12 h (30°C , 150 r/min), 按 5% 的接种量接种于装有 30 mL 反硝化培养基的 150 mL 三角瓶中, 150 r/min 30°C 培养 24

h, 测定培养基中 NO_3^- 和 NO_2^- 的浓度, 计算反硝化率。根据反硝化特性, 确定 A-13 为后续实验菌株。

1.3 菌株 A-13 的生长及反硝化特性

将前期获得的优势菌株 A-13 按 1.2.3 方法进行前培养, 接入液体筛选培养基, 于 30°C 、150 r/min 摇床振荡培养。定期取样测定 OD_{600} 及 NO_3^- 浓度, 并绘制菌株的生长曲线图。

1.4 理化因素对菌株 A-13 生长及脱氮能力的影响

按 1.2.3 复筛方法, 对 A-13 菌株进行前培养, 按 5% 接种量接入反硝化培养基中, 研究菌株在不同初始 pH、温度、碳源、溶解氧、接种量、 NO_3^- 浓度等条件下菌体的生长情况及对硝态氮的去除能力。

1.5 菌株 A-13 对人工废水的净化能力

培养菌株 A-13 的一级种子液, 以 10% 接种量将前培养的菌液接入人工废水中, 在 33°C 、150 r/min 条件下培养, 每隔 2 h 取样, 测定人工废水中的 COD、 NH_4^+-N 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、pH 和 OD_{600} 等指标。

1.6 高效好氧反硝化菌 A-13 菌株的鉴定

1.6.1 形态观察: 将菌株 A-13 于 LB 培养基中过夜培养, 按以下步骤制备扫描电镜样品: 2.5% 戊二醛固定 4 h → 磷酸缓冲液洗涤 3 次 → 乙醇梯度脱水 (分别为 30%、50%、70%、85%、90% 乙醇各 1 次, 100% 乙醇 2 次, 15 min/次) → 乙酸异戊酯置换乙醇 2 次 (20 min/次), 每一步完成后经 $7015 \times g$ 离心 5 min。将样品分别在 -20°C 、 -40°C 和 -80°C 下冷冻 12 h, 于冷冻干燥仪中干燥 12 h, 备用。扫描电镜观察后根据《伯杰细菌鉴定手册》^[19] 确定菌株的基本形态。

1.6.2 生理生化鉴定: 菌株的生理生化试验根据《常见细菌系统鉴定手册》^[20] 进行。

1.6.3 16S rRNA 测序和系统发育分析: (1) 用离心柱型 DNA 提取试剂盒提取 DNA, PCR 反应引物为 16S rRNA 通用引物。其中, 正向引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。PCR 反应体系 (25 μL): 2 \times MIX 12.5 μL (含有 2 \times Taq DNA Polymerase, 2 \times PCR Buffer, 2 \times dNTP), 正向和反向引物各 0.5 μL , 模板 1 μL , 重蒸水 11 μL 。PCR 程序如下: 94°C 2 min; 94°C 35 s, $55 - 60^\circ\text{C}$ 30 s, 72°C 80 s, 循环 35 次; 72°C 5 min。测序由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司完成。(2) 系统发育分析: 测序所获序列信息提交 GenBank 核酸数据库, 用

BLAST 进行比对, 搜索同源性较高的相关序列用 MEGA 4.0 软件进行系统发育分析。首先用 Clustal X 进行多序列匹配, 按 Kimura 2-parameter 计算进化距离, 最后构建 Neighbour-Joining (NJ) 系统发育树, 进化树分支稳定性用 Bootstrap 分析, 重复 1000 次。

1.6.4 周质硝酸还原酶亚基基因 (napA) 的扩增: 为进一步确定菌株 A-13 对 NO₃⁻ 的利用包括反硝化作用, 扩增了菌株 A-13 的周质硝酸还原酶亚基基因 (napA)。引物为该基因保守序列的通用引物^[14, 21], 正向引物为 nap1: 5'-TCTGGACCATGGGCTTCAACCA-3'; 反向引物为 nap2: 5'-ACGACGACCGGCCAGGCAG-3'。PCR 反应体系及程序同 1.6.3。取 5 μL 样品进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。引物合成及测序由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司完成, 所得序列提交 GenBank 数据库, 并用 ORF Finder 和 PFAM 等在线软件分析基因产物。

1.7 分析方法

硝态氮 (NO₃⁻) 的测定采用麝香草酚分光光度法^[22], 亚硝态氮 (NO₂⁻) 的测定采用甲基橙褪色分光

光度法^[23]; 氨氮 (NH₄⁺-N) 的测定采用纳氏试剂光度法, COD 的测定采用快速密闭催化消解-滴定法^[24]; 菌体生长测定采用浊度法 (OD₆₀₀)。所有实验做 3 个平行, 结果取平均值。

2 结果和分析

2.1 高效好氧反硝化细菌菌株的分离和筛选

从福州市两个取样点采集样品, 按 Naoki Takaya 设计的方法进行筛选^[18], 在 BTB 平板上选出 18 个阳性克隆, 对其进行反硝化能力实验。反硝化过程的第一步是将 NO₃⁻ 还原为 NO₂⁻, 以剩余 NO₃⁻ 和产生的 NO₂⁻ 为依据, 复筛得到 5 株具有较强反硝化能力的菌株 (表 1)。其中, A-13 菌株除 NO₃⁻ 能力很强, 且不会产生 NO₂⁻, 12 h 内对总氮的去除率可达 99.68%。在以 NaNO₂ 作为唯一氮源的培养基中, 菌株 A-13 也能够较好地生长, 因此该菌株是理想的好氧反硝化菌株, 选定其作进一步研究。

表 1 好氧反硝化细菌的反硝化能力* (起始浓度: 620 mg/L)

Table 1 The denitrifying ability * of aerobic denitrifying bacteria (initial concentration: 620 mg/L)

Strain	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Removal efficiency / %	Strain	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Removal efficiency / %
A-1-1	8.95	0	98.54	C-2-1	581.11	0	5.25
A-1-2	6.05	0	99.01	C-2-2	562.59	0	8.27
A-1-3	1.98	0	99.68	C-2-3	570.00	2.13	6.60
B-1-1	1.40	424.47	5.49	E-2-1	4.57	263.83	41.28
B-1-2	4.88	426.60	5.46	E-2-2	2.72	271.28	39.94
B-1-3	4.30	422.34	6.49	E-2-3	2.72	94.68	78.75
C-1-1	505.47	14.89	14.31	F-1-1	5.19	2.84	98.54
C-1-2	552.00	2.13	9.53	F-1-2	32.35	362.77	15.00
C-1-3	534.53	0	12.85	F-1-3	37.28	358.51	15.14

* The denitrifying ability means the total nitrogen removal efficiency including NO₃⁻ and NO₂⁻

2.2 菌株 A-13 的生长及反硝化特性

菌株 A-13 在 30℃、150 r/min 条件下培养, 每隔 2 h 测定 OD₆₀₀ 及对 NO₃⁻ 的去除率, 结果如图 1 所示。由于反硝化细菌对 NO₃⁻ 的去除过程包括生长利用及还原作用^[8], 起始阶段 NO₃⁻ 主要供菌体代谢所用。随后, 菌体代谢与还原作用同时进行, 对 NO₃⁻ 的去除率可在短时间内达到 90% 以上。在 16 h 内, NO₃⁻ 浓度从 620 mg/L 下降到 5.05 mg/L 左右, 去除率达 99.18%。整个过程没有 NO₂⁻ 的积累, 说明菌株 A-13 具有较强的反硝化能力。

2.3 不同因素对菌株 A-13 的生长及除氮能力的影响

2.3.1 起始 pH 对菌株 A-13 的生长及除氮能力的影响: 环境中的 pH 值对微生物的生命活动影响很

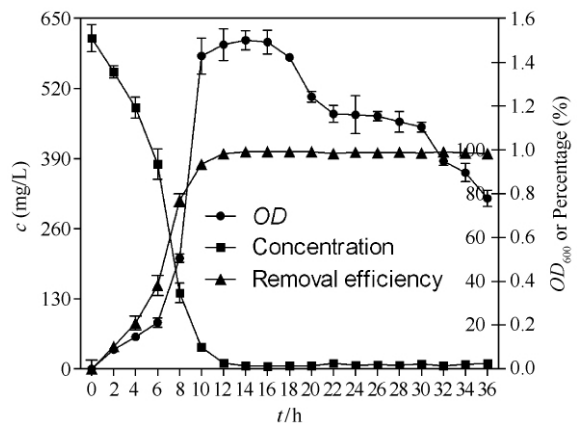


图 1 菌株 A-13 的好氧反硝化生长曲线

Fig. 1 Growth curve of aerobic denitrifying strain A-13.

大,主要在于引起细胞膜的电荷变化,从而影响微生物对营养物质的吸收^[21]。本实验考察了不同 pH 条件下,菌体在不同时间段的生长情况及对 NO_3^- 的去除能力。

由表 2 可知,菌体在 pH 5.0 - 9.0 都有不同程度的生长,但起始 pH 过高或过低都不利于菌体生长。观察发现,起始 pH 7.0,时间为 6 h 时,菌体积聚成团并发生部分沉淀,此时的 pH 为 7.96。由于反硝化过程是一个不断产碱的过程,pH 会逐渐上升,这对菌体的生长造成了较大的影响^[14-15, 18]。pH 6.5 - 7.5 时,菌体能够在较短时间内达到较高的 OD_{600} ,但 pH 上升过快导致菌体在 6 - 8 h 时便开始发生不同程度的沉淀。因此,pH 低有助于缓慢地调节培养基中的 pH,使菌体生长处于一个较适宜的 pH 范围内。从表 2 中可知,起始 pH 为 6.5 时,在 6 h 内对 NO_3^- 的去除率可达 95.30% ;

12 h 后,pH 5.0 - 7.0 的各组基本都达到了 90% 以上的去除率,其他组分去除效果较差。考察所有 pH 梯度下的生长量与去除率,发现二者之间趋势基本相同。

根据 pH 5.5 时, $OD_{600 \text{ max}} = 2.121$ (10 h); pH 6.0 时, $OD_{600 \text{ max}} = 2.126$ (8 h); pH 6.5 时, $OD_{600 \text{ max}} = 2.130$ (6 h),此时的终 pH 分别为 7.14、7.16 和 7.23。说明菌株 A-13 生长的最适 pH < 7.23。Timmermans 等研究表明,细菌生长及反硝化酶活性的最适 pH 值是中性或微碱性,pH 值过高或过低均会对菌株生长及反硝化性能的发挥产生影响^[25]。因此,为了提高硝态氮的去除效率,应保持 pH 在中性条件下。但反硝化过程产碱,起始 pH 不应太高。本实验结论为:将起始 pH 维持在 5.5 - 7.0 有助于菌株 A-13 的生长及反硝化作用的快速进行,菌株 A-13 生长与反硝化的最适起始 pH 为 6.5。

表 2 起始 pH 对菌株 A-13 生长及反硝化能力的影响

Table 2 Influence of initial pH on the growth and denitrifying ability of strain A-13

t/h	Item	Initial pH								
		5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
2	OD_{600}	0.078	0.302	0.342	0.383	0.352	0.174	0.074	0.032	0.027
4		0.146	1.057	1.321	1.371	1.153	0.793	0.468	0.266	0.062
6		0.271	1.747	2.017	2.130	1.759	1.429	0.938	0.698	0.105
8		0.769	2.021	2.126	2.070	1.763	1.411	0.938	0.777	0.118
10		1.387	2.121	2.083	1.977	1.729	1.369	0.879	0.731	0.107
12		1.783	2.102	1.921	1.829	1.651	1.309	0.833	0.623	0.109
2	Removal efficiency (%)	6.05	16.84	32.60	33.28	29.42	21.06	11.85	8.59	5.41
4		12.13	35.96	62.87	69.40	58.66	53.71	25.87	15.99	9.53
6		41.14	67.65	91.66	95.30	88.32	77.07	45.24	32.05	10.55
8		74.18	84.20	95.10	97.85	91.44	81.35	46.32	38.35	12.73
10		87.09	91.13	97.04	99.27	95.09	85.96	46.18	39.05	12.34
12		91.65	96.22	99.28	99.26	99.30	89.05	46.80	39.97	12.97
2	Final pH	5.25	5.76	6.26	6.82	7.09	7.43	8.15	8.56	9.18
4		5.28	6.12	6.82	7.08	7.58	7.87	8.53	8.78	9.41
6		5.31	6.52	7.05	7.23	7.96	8.11	8.80	8.91	9.51
8		5.78	6.91	7.16	7.28	8.17	8.28	8.92	9.03	9.65
10		6.20	7.14	7.28	7.36	8.19	8.36	9.00	9.08	9.72
12		6.77	7.26	7.31	7.45	8.29	8.42	9.04	9.18	9.73

2.3.2 温度对菌株 A-13 的生长及除氮能力的影响:温度是菌体生长的重要因素之一,多数反硝化细菌的最适生长温度为 20℃ - 35℃^[21]。反硝化细菌的生物量及反硝化过程中所需酶的活性都会受到温度的影响,从而影响脱氮效率。如图 2-A 和 2-B 所示,菌体在 28℃ - 40℃ 之间都能够生长,对 NO_3^- 也

都有一定的去除效果。温度大于 38℃ 或小于 33℃ 时,菌体的生长量及除氮能力都较低。介于 33℃ - 38℃ 时,菌体能够较好地生长,并维持着较高的 NO_3^- 去除率 (>85%)。由图 2 可知,最适菌体生长及除氮的温度为 33℃,在此条件下,10 h 时菌株对 NO_3^- 的去除率为 98.64%,12 h 时为 100%。

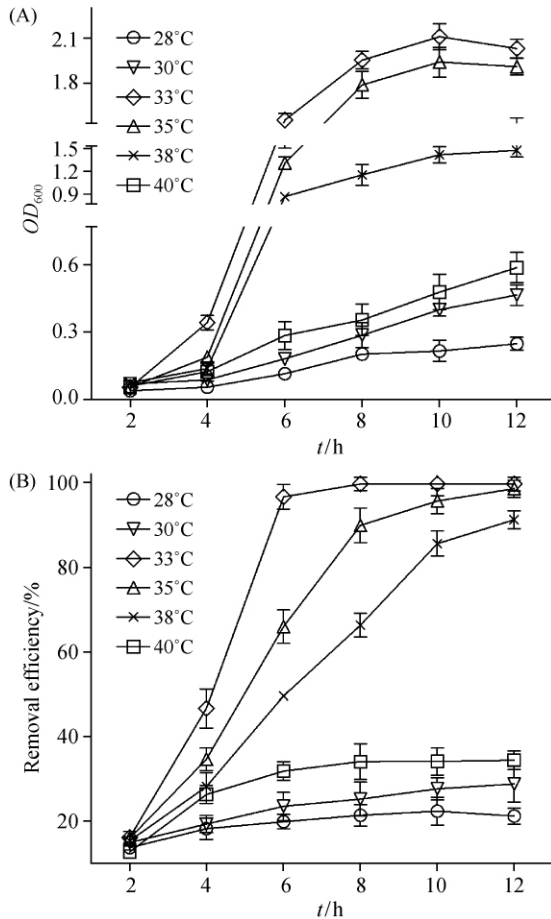


图2 不同温度对菌株 A-13 生长 (A) 及反硝化能力 (B) 的影响

Fig.2 Influence of different temperature on the growth (A) and denitrifying ability (B) of strain A-13.

2.3.3 碳源对菌株 A-13 的生长及除氮能力的影响

有机碳源是反硝化细菌生长及反硝化过程中的必须能源和电子供体。 NO_3^- 被反硝化细菌还原的过程,除了被菌体生长所利用及完成呼吸作用外,还在反硝化过程中充当硝酸盐和亚硝酸盐中氧原子的电子供体,从而完成脱氮作用^[21]。本实验以柠檬酸钠、乙酸钠、酒石酸钾钠、丁二酸钠、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖和乳糖等为碳源,分别考察了不同碳源条件下菌体的生长情况及除氮特性。结果如图3所示。

结果表明,在相同的 pH 和温度等条件下,不同碳源对菌体生长及除氮能力影响较大。其中,菌体在以丁二酸钠和糖为碳源的培养基中生长较好,在柠檬酸钠和乙酸钠培养基中基本不生长。以葡萄糖和丁二酸钠为碳源,对 NO_3^- 的去除率可在 8 h 内达到 99% 以上,而在柠檬酸钠、乙酸钠和酒石酸钾钠

为碳源的培养基中最高去除率只有 30% 左右。据文献报道,碳源的化学结构和分子量对反硝化效率的影响很大^[21, 26]。本研究结论与此相符,即结构越简单,分子量越小的碳源越有利于反硝化的进行。以丁二酸钠为碳源,即使菌体密度不如葡萄糖组,但二者的去除率无明显差别,再一次说明菌体对 NO_3^- 的利用包括多种途径^[8, 21]。考虑到在处理样品时葡萄糖易被浓硫酸焦炭化,而丁二酸钠无此现象且成本较低,后续实验选用了丁二酸钠为最佳碳源。

2.3.4 摇床转速对菌株 A-13 生长及除氮能力的影响

溶解氧是好氧反硝化细菌生长及除氮的重要因素之一。在 25°C 1.01 × 10⁵ Pa 下,水溶液中的溶解氧大约为 8.3 mg/L,只要 7–8 mg 的有机物质就可以把 25°C 时空气所饱和的 1 L 水中的氧全部消耗殆尽。且水中没有化学反应可以提供氧气,除了光合作用外,必须来自大气^[27]。本节通过改变摇床转速来改变培养基中的溶解氧,以此探讨溶解氧对菌体生长及反硝化作用的影响。

如图4-A所示,不同的摇床转速对菌体生长的影响较大。2–8 h 时,转速 > 150 r/min 条件下的菌体密度相当;静置组和 50 r/min 条件下的菌体只有微弱的生长。由图可知,菌体在过高的转速条件下不一定长势好,因为氧浓度过高不仅会使生物膜受损,还会抑制多种酶活及氧自由基的作用^[21, 28]。菌体对 NO_3^- 的去除效果与生长趋势基本相同,由图4-B可知,菌株 A-13 对 NO_3^- 的去除即使在转速很低的情况下也能发生,而较高的转速未必能够增强去除效率。据报道,反硝化细菌存在两种硝酸还原酶:微氧条件下有些反硝化细菌存在与细胞膜相连的还原酶,该酶对氧的抑制作用比较敏感;而好氧反硝化细菌主要以周质硝酸还原酶将 NO_3^- 还原成 NO_2^- ^[21, 29–30]。Liu 等的研究表明,在同时有硝化和反硝化细菌的培养基中,反硝化细菌在底层的浓度是硝化细菌的 1.8 倍^[31]。另一项研究表明,通过好氧发酵后的反硝化细菌在微氧条件下对 NO_3^- 的反硝化能力很强^[32];而 Feng 等的研究证实了溶氧太高反而会抑制总氮去除的可能性^[33]。根据本实验结果可以推测,在一定范围内,溶氧的增高有助于菌株 A-13 的生长和反硝化作用的进行,转速约为 150 r/min 条件下的溶解氧最适合菌株的生长和反硝化作用。

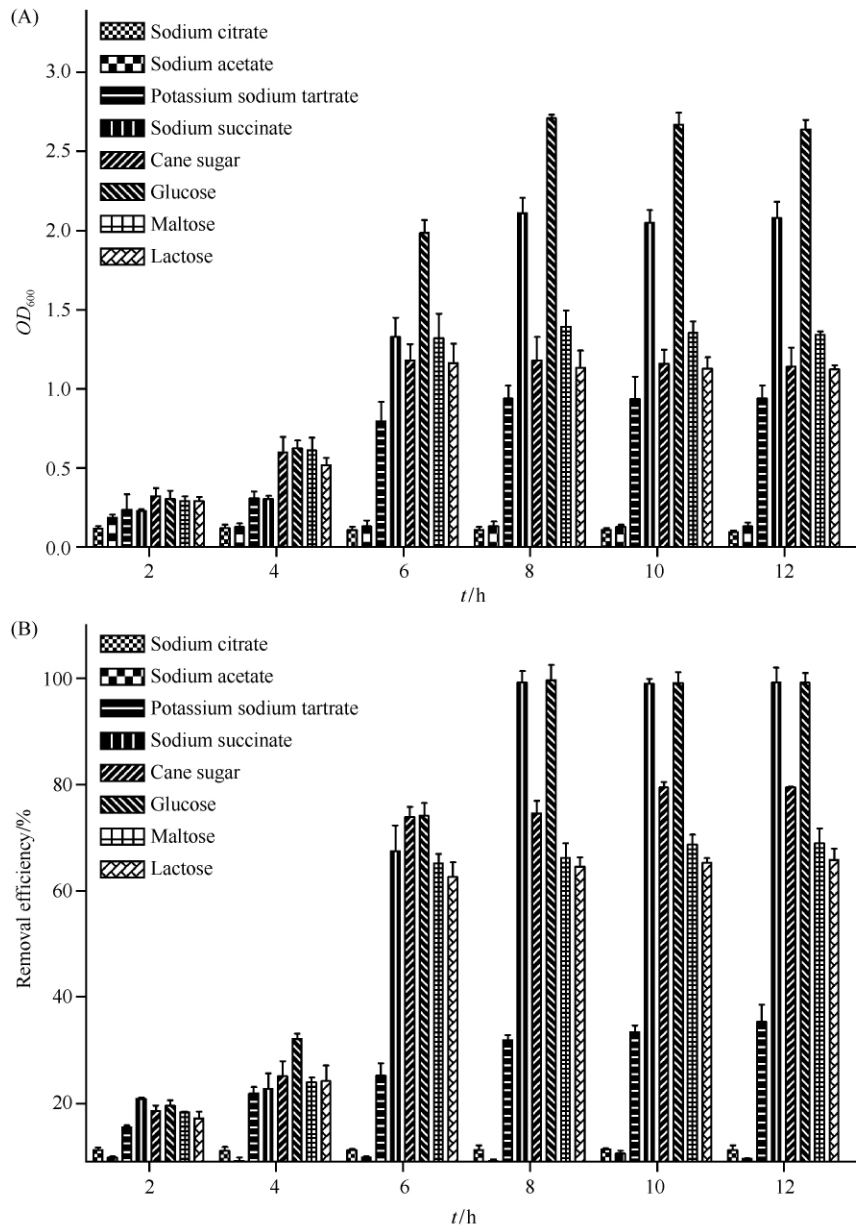


图3 不同碳源对菌株 A-13 生长(A)及反硝化能力(B)的影响

Fig. 3 Influence of different carbon source on the growth (A) and denitrifying ability (B) of strain A-13.

2.3.5 接种量对 NO_3^- 去除效果的影响: 好氧反硝化细菌的生长过程需要消耗部分的 NO_3^- , 并在适宜条件下合成多种还原酶, 将 NO_3^- 还原成其他形态的氮^[1]。因此, 好氧反硝化细菌菌体的多少直接关系到 NO_3^- 的去除效率。通过研究不同菌体接种量对 NO_3^- 的去除情况, 可以判断菌体密度与去除率的关系, 确定最佳的接种量对该菌在实际应用中也有一定的参考价值。本实验以不同的接种量 (1% -

10%, $OD_{\text{起始}} = 0.137$) 探讨了菌株 A-13 对 NO_3^- 的去除能力, 结果如图 5 所示。

由图 5-A 可知, 当接种量 < 5% 时, 菌株 A-13 在 12 h 内均无明显的生长, 对 NO_3^- 的去除率也很低 (如图 5-B)。当接种量为 5% 时, 该菌在 10 h 内可以除去 99% 以上的 NO_3^- ; 而接种量 > 5% 时, 在 8 h 甚至 6 h 内即可完全去除起始浓度为 620 mg/L 的 NO_3^- 。说明菌株 A-13 对 NO_3^- 的去除与菌体的密度

成正相关,但菌体生长所消耗的 NO_3^- 与被硝酸还原酶还原的 NO_3^- 之间的关系有待进一步研究。

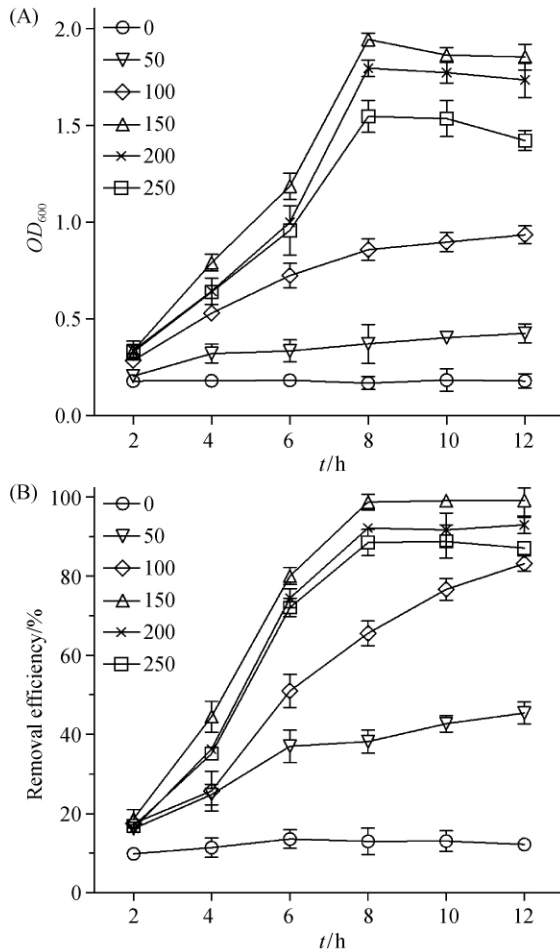


图4 不同摇床转速对菌株 A-13 生长(A)及反硝化能力(B)的影响

Fig. 4 Influence of different shaking speed on the growth (A) and denitrifying ability (B) of strain A-13.

2.3.6 菌株 A-13 对不同浓度 NO_3^- 的去除效果: 前述各结论表明,菌株 A-13 对 NO_3^- 具有很强的去除能力,当条件适宜时菌株可在 12 h 内完全去除起始浓度为 620 mg/L 的 NO_3^- 。为进一步研究该菌株的除氮能力,本实验设置了不同浓度梯度的 NO_3^- , 实验条件为前述各实验的优化值 (pH 6.5, 温度 33℃, 转速 150 r/min, 接种量 5%), 探讨了 20 h 内菌株 A-13 对起始浓度为 300 - 3000 mg/L 的 NO_3^- 的去除情况。如图 6 所示,菌株对不同浓度梯度的 NO_3^- 都具有较强的去除能力。当 $C_{起} \leq 900$ mg/L 时,菌株 A-13 对 NO_3^- 的去除率在 4 h 内可达 90% 以上,且没有 NO_2^- 的积累;4 h 时,菌株对 NO_3^- 的最大去除浓度

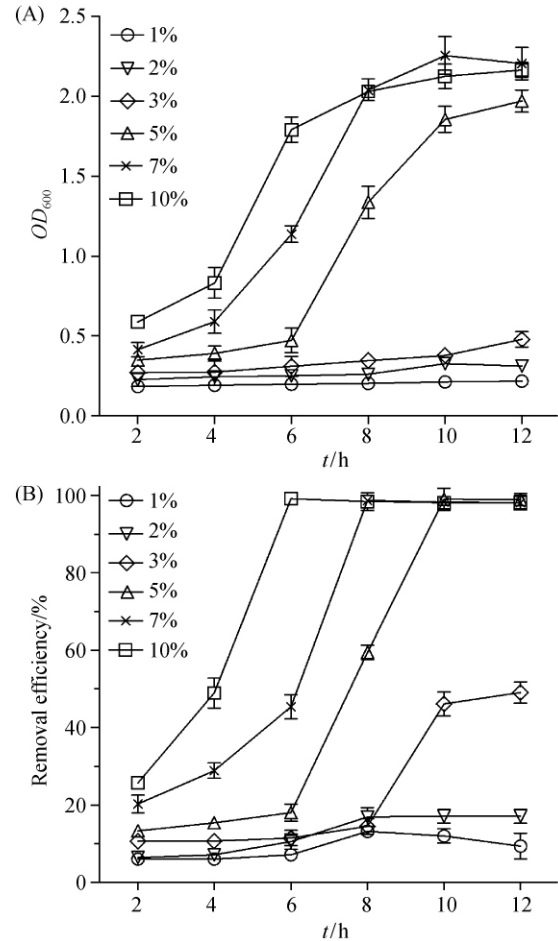


图5 不同接种量对菌株 A-13 生长(A)及对 NO_3^- 去除效果(B)的影响

Fig.5 Influence of different inoculating ratio on growth (A) and NO_3^- removing efficiency (B) of strain A-13.

约为 1035 mg/L,去除率为 86.32%;12 h 之后,不同浓度梯度下的菌体都发生了不同程度的衰亡, OD_{600} 逐渐降低,但仍维持着较高的去除能力。结果显示,当起始 NO_3^- 浓度为 3000 mg/L 时,菌株 A-13 在 16 h 内可以实现对 NO_3^- 的有效去除 ($\approx 62\%$),此后去除趋势趋于缓和,最终可去除约 1900 mg/L 的 NO_3^- 。因此,菌株 A-13 是一种除氮能力很强的好氧反硝化细菌,其应用前景非常可观。

2.4 菌株 A-13 对人工废水的净化效果

由表 3 可知,人工废水的 pH 随着时间的推移不断升高。pH 较低时,菌体生长较快,过高的 pH 会抑制菌体的生长,从而抑制其进一步对人工废水的净化。正如 2.3.1 所述,其结果表明 pH 对菌株 A-13 的生长及反硝化过程有较明显的影响。6 h 时, OD_{600} 达到最大值,此后菌体发生了部分沉淀。

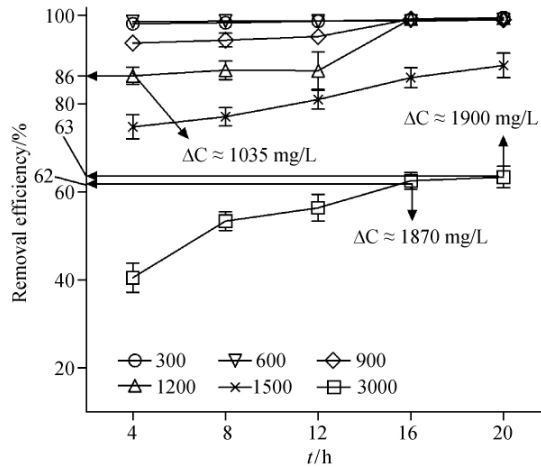


图6 菌株 A-13 对不同浓度 NO_3^- 的去除效果

Fig.6 Removing efficiency for different concentration of NO_3^- by strain A-13.

处理 12 h 后, NH_4^+-N 、 NO_3^- 、 NO_2^- 浓度由初始的 91.30、201.98 和 149.46 mg/L 分别降至 85.38、134.31 和 104.03 mg/L, 除氮效率分别为 6.48%、33.50% 和 30.40%; 同时, 菌株 A-13 对 COD 也有一定的去除效果, 该菌在工业化应用中具有广阔的前景。但由于菌株 A-13 耐碱性较差, 且在除氮过程中会产碱, 为了更好地达到治理实际污水的要求, 通过适时调整污水的 pH 以实现水体中有机物质的高效去除是必要的。

表3 菌株 A-13 对人工废水的净化效果

Table 3 Purifying effect for artificial wastewater by strain A-13 (mg/L)

t/h	COD	NH_4^+-N	NO_3^-	NO_2^-	pH	OD_{600}
0	1123.66	91.30	201.98	149.46	7.23	0.262
2	1113.30	88.99	175.52	122.28	7.48	0.531
4	1079.24	86.89	154.88	105.98	7.99	0.548
6	1077.05	86.19	142.97	104.17	8.01	0.551
8	1062.43	85.42	133.69	104.11	8.21	0.531
10	1066.39	85.27	134.23	103.98	8.24	0.536
12	1060.21	85.38	134.31	104.03	8.25	0.528

2.5 菌株 A-13 的鉴定

2.5.1 形态学鉴定: 菌株 A-13 革兰氏染色阴性, 细胞呈直或弯曲杆状, 大小为 $(0.30 \mu\text{m} - 0.39 \mu\text{m}) \times (0.51 \mu\text{m} - 1.26 \mu\text{m})$, 无鞭毛, 无芽孢。菌落在 BTB 培养基上呈深蓝色, 普通培养基上呈亮黄色, 不规则圆形, 扁平状, 表面粗糙。以上特性与典型的施氏假单胞菌相符^[30]。

2.5.2 生理生化特性: 菌株 A-13 的生理生化特性

为: 兼性厌氧, 乙酰胺、尿素、西蒙氏枸橼酸盐、硝酸盐还原、硝酸盐产气、亚硝酸盐产气阳性; 3 种氨基酸 (鸟氨酸、精氨酸、赖氨酸) 脱羧酶阳性, 精氨酸双水解酶、DNA 酶阴性, 吡啶试验阴性; 硫化氢、七叶苷、 β -半乳糖苷阴性; 半固体培养有扩散现象; 能够利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖产酸, 不能利用侧金盏花醇、果糖、木糖、海藻糖、鼠李糖、甘露醇和甘露糖产酸。该菌株能够在盐度为 0% - 10% 的培养液中生长, 在盐度 > 10% 的培养液中不生长, 最适生长盐度为 0.5% - 7%; 生长最适的温度范围为 33°C - 38°C, 最适 pH 为 6.5 - 8.0。

2.5.3 16S rRNA 测序及系统发育分析: 经测序, 获得片段长度为 1457 bp 的部分 16S rRNA 基因序列, GenBank 登录号为 JX 157127。在 NCBI 数据库的比对结果表明, 该菌株与 *P. stutzeri* 的相似性达 99% 以上, 结合菌株的形态学和生理学特性, 推测其为 *P. stutzeri*。选择序列相关性较高的 69 个 16S rRNA 序列, 用 Clustal X 序列分析软件分析其与 A-13 的序列同源可靠性, 选 8 个可信度较高的序列用 MEGA 4.0 软件通过 N-J 法构建系统发育树, 确定 A-13 的进化地位, 结果如图 7 所示。

2.5.4 周质硝酸还原酶亚基基因 (napA) 的扩增: 通常认为, 好氧反硝化过程需要将 NO_3^- 还原成 NO_2^- , 再将 NO_2^- 依次还原成 NO 、 N_2O 和 N_2 。因此, 是否存在硝酸还原酶是判断该菌是否具有反硝化功能的直接依据^[1]。

对菌株 A-13 进行 napA 基因扩增, 扩增得特异条带为 854 bp, GenBank 登录号为 JX 173293。通过与 GenBank 数据库中 napA 基因核苷酸序列比对, 结果表明该序列与登录号为 EIK51477、EHY77244、YP005937950 等 *P. stutzeri* 的 napA 基因同源性 > 89%。ORF Finder 在线软件分析结果表明, 该序列基因产物存在周质硝酸还原酶的氨基酸序列, PFAM 蛋白质在线分析软件分析显示该酶属于钼蝶类氧化还原酶 (Molybdoprotein oxidoreductase) 家族的成员之一, 是典型的周质硝酸还原酶, 这与现有的报道相符^[30, 34-35]。以上结论说明菌株 A-13 存在周质硝酸还原酶基因, 具备反硝化能力。

3 讨论

P. stutzeri 自 1895 年由 Burri 等报道以来, 已得

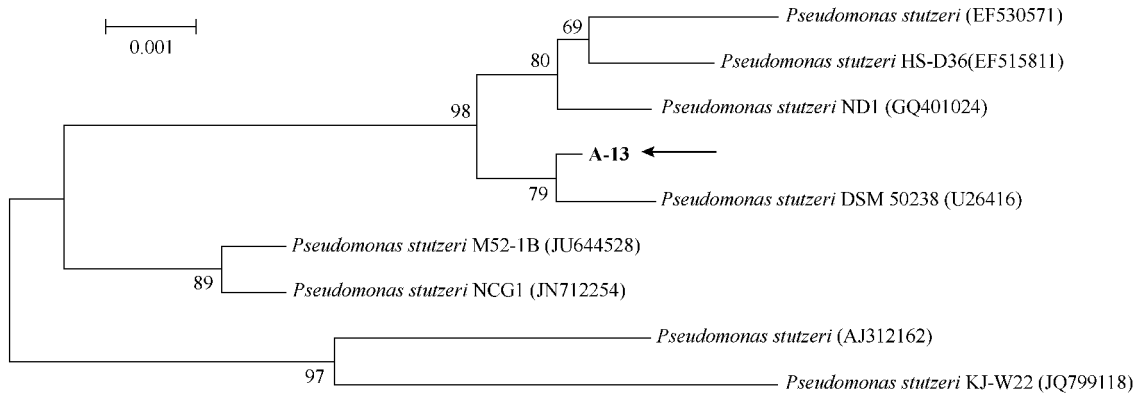


图 7 基于 16S rRNA 序列同源性构建的菌株 A-13 和亲缘性相近的其他细菌的系统发育树

Fig. 7 Unrooted phylogenetic trees based on the 16S rRNA sequence of strain A-13 and related strains. The tree rooted was constructed by Neighbor-Joining method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node that indicate the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets after each bacterial name are 16S rRNA gene sequence accession numbers in GenBank. (Bar, 1% sequence divergence)

到了广泛研究与应用。作为一种典型的好氧反硝化细菌,一些因子如溶解氧、pH、温度、有机碳源及硝态氮或氨氮浓度对 *P. stutzeri* 的反硝化过程具有重要的影响^[33]。不同菌株其生长及反硝化的最适条件也存在差异。一般而言,该菌在 4℃ - 45℃ 都能生长,最适温度为 35℃。有作者认为,菌株耐高温与否,与基因组中的 (G + C) % 密切相关^[36]。(G + C) % 接近 62 时不能耐 43℃ 高温,而 (G + C) % 在 65 - 66 之间时,在 43℃ 甚至更高温条件下都可以生长。由于反硝化过程产碱,该菌在现有研究中都具有较宽的 pH 适应能力;但 Lalucat 等对 *P. stutzeri* 的综述表明,pH < 4.5 时仍能生长的菌株尚未见报道^[30]。此外,富氧条件对好氧反硝化细菌的生长及反硝化作用都具有一定的促进作用。对于具备固氮作用的反硝化菌而言,微氧条件下也能生长^[30]。本研究所得菌株 A-13 能够在 pH 5.0 - 9.0 之间生长,最适 pH 为 6.5;在 23 - 40℃ 时,菌株 A-13 都能生长,33℃ 时菌体的生长量及对 NO₃⁻ 的去除率都达到最大值;碳源实验表明,该菌株以丁二酸钠和葡萄糖为碳源时长势较好,对 NO₃⁻ 的去除效果较理想。通常认为,NO₃⁻ 的去除包括反硝化、类反硝化和氨同化等过程^[1],在这些过程中有 napA、napB、napD、napE、nirC、nirB、nirK、nirS 等多种基因的酶产物参与。这些酶多数位于细胞膜与细胞壁的周质间,其酶活的发挥需要氧的供给。大量研究表明,反硝化过程是一个“协同呼吸”与“反硝化酶系”同时进行的过程^[1, 8, 30]。本研究结果显示,溶解氧对菌株 A-

13 的生长及反硝化作用具有明显的影响,且菌株 A-13 存在周质硝酸还原酶基因 (napA)。该结论在一定程度上验证了“协同呼吸”与“反硝化酶系”理论。通过不同摇床转速改变培养基中的溶解氧,结果表明 150 r/min 对菌体的生长及对 NO₃⁻ 的去除效果最好。以上结论与现有关于 *P. stutzeri* 的报道基本吻合。16S rDNA 测序及系统发育分析表明菌株 A-13 与 *P. stutzeri* DSM 50238 亲缘关系最近,且存在典型的周质硝酸还原酶亚基基因 (napA)。结合生理生化特性,初步鉴定菌株 A-13 为施氏假单胞菌 (*P. stutzeri*),将其命名为 *P. stutzeri* YHA-13。

近年来,具备反硝化能力的多种细菌得到了广泛、深入的研究。如杨小龙等从鱼塘分离筛选出 1 株反硝化不动杆菌 C-4,该菌株在分别以 KNO₃、(NH₄)₂SO₄ 和 NaNO₂ 为唯一氮源的培养基中,可在 24 h 内将培养基中的 NO₃⁻ N 从 161.61 mg/L 降至 55.69 mg/L,15 h 内将 NH₄⁺ -N 由 220.24 mg/L 降至 14.78 mg/L,12 h 内将 NO₂⁻ N 浓度由 101.27 mg/L 降至 21.85 mg/L。在反硝化除氮过程中无 NO₂⁻ 的累积,且对总氮浓度为 96.75 mg/L 池塘污水 48 h 净除氮率达 73.04%^[8];杨基先和李平等分别从污泥和养猪场废水中筛选出了 3 株反硝化细菌,其中,菌株 G-3 (*P. stutzeri*) 对起始浓度为 236 mg/L NO₃⁻ 的去除率达 72.91%,但会产生大量的 NO₂⁻^[14]。而菌株 HS-043 (*D. acidovorans*) 和 HS-047 (*P. pseudoalcaligenes*) 除氮能力很强,在 12 h 内可将 620 mg/L 的 NO₃⁻ 全部出去,且无亚硝酸根积累^[17]。但

同时具备多种除氮途径且效果明显的 *P. stutzeri* 未见报道。本研究所得菌株 A-13 除氮能力强,对起始浓度分别为 620 mg/L、570 mg/L 和 545 mg/L 的 NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ -N 其去除率在 12 h 内可分别达 99.68%、90.7% 和 67.74%,具有适应能力强、生长速度快、除氮效率高、无亚硝酸盐累积等特点,明显优于其他好氧反硝化细菌。因此,该菌株的发现及其除氮特性的研究可为微生物除氮工艺提供一定的参考,对人工废水除氮能力实验表明该菌株在水体治理中具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] WG Z. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61 (4) :533-616.
- [2] 韩永和, 李敏. 植物-微生物联合修复技术治理水体富营养化. 水处理技术 (*Water Treatment Technology*), 2012, 38 (3) :1-6,11.
- [3] Jiang FY, Chen X, Luo AC. A comparative study on the growth and nitrogen and phosphorus uptake characteristics of 15 wetland species. *Chemistry and Ecology*, 2011, 27 (3) :263-272.
- [4] Li EH, Li W, Wang XL, Xue HP, Xiao F. Experiment of emergent macrophytes growing in contaminated sludge: Implication for sediment purification and lake restoration. *Ecological Engineering*, 2010, 36 (4) :427-434.
- [5] Ye C, Li CH, Yu HC, Song XF, Zou GY, Liu J. Study on ecological restoration in near-shore zone of a eutrophic lake, Wuli Bay, Taihu Lake (short communication). *Ecological Engineering*, 2011, 37 (9) :1434-1437.
- [6] Zhang W, Zhao J, Lang X, Li X, Kuang D. Study on the removal of nitrogen from wastewater using *nitrobacteria* at different temperature. *Environmental Science and Management*, 2010, 35 (6) :83-86.
- [7] Li H, Zhao HP, Hao HL, Liang J, Zhao FL, Xiang LC, Yang XE, He ZL, Stoffella PJ. Enhancement of nutrient removal from eutrophic water by a plant-microorganisms combined system. *Environmental Engineering Science*, 2011, 28 (8) :543-554.
- [8] 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除氮特性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2011, 51 (8) :1062-1070.
- [9] Qiu XF, Wang TW, Zhong XM, Du GC, Chen J. Screening and characterization of an aerobic nitrifying-denitrifying bacterium from activated sludge. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17 (2) :353-360.
- [10] De Sousa Carvalho G, Meyer R, Yuan Z, Keller J. Differential distribution of ammonia-and nitrite-oxidising bacteria in flocs and granules from anitrifying/denitrifying sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 39 (7) :1392-1398.
- [11] Yang XP, Wang SM, Zhang DW, Zhou LX. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (2) :854-862.
- [12] Miyahara M, Kim SW, Zhou S, Fushinobu S, Yamada T, Ikeda-ohtsubo W, Watanabe A, Miyauchik K, Endo G, Wakagi T. Survival of the aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2 during co-culture with activated sludge under denitrifying conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2012, 76 (3) :495-500.
- [13] Yang Y, Zhu H, Colvin VL, Alvarez PJ. Cellular and transcriptional response of *Pseudomonas stutzeri* to quantum dots under aerobic and denitrifying conditions. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45 (11) :4988-4994.
- [14] 杨基先, 高珊珊, 马放, 苏俊峰, 王强. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化能力. 环境科学学报 (*Acta Scientiae Circumstantiae*), 2008, 28 (7) :1302-1307.
- [15] 刘燕, 甘莉, 黄哲强, 陈祖亮, 程迎, 林晨. 脱氮副球菌 YF1 的反硝化特性研究. 水处理技术 (*Water Treatment Technology*), 2010, 36 (10) :61-65.
- [16] Wang X, Li TL, Dong MY, Xia HC, Jin ZH. Reducing nitrate in groundwater by stabilized iron nanoparticles and denitrifying bacteria. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30 (4) :739-745.
- [17] 李平. 好氧反硝化细菌的分离鉴定及其应用研究. 华中师范大学, 硕士学位论文, 2005.
- [18] Takaya N, Catalan-Sakairi MAB, Sakaguchi Y, Kato I, Zhou Z, Shoun H. Aerobic denitrifying bacteria that

- produce low levels of nitrous oxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (6) :3152-3157.
- [19] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 1984, 374, 626.
- [20] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001, 370-386; 390-391.
- [21] 修海峰, 朱仲元, 丁爱中, 郑蕾, 赵轩. 好氧反硝化菌种 DF2 的分离鉴定及生理生化特性分析. *环境学报 (Ecology and Environmental Sciences)*, 2011, 20 (8-9) :1307-1314.
- [22] 赵灿方, 李中贤, 李琳, 王立忠, 郑春贤. 两种方法测定水中硝酸盐氮的比较分析. *河南科学 (Henan Science)*, 2011, 29 (8) :917-919.
- [23] 李兆君, 胡奇林. 甲基橙褪色分光光度法测定亚硝酸根的动力学及机理探究. *石油化工应用 (Petrochemical Industry Application)*, 2008, 27 (4) :74-75.
- [24] 国家环境保护总局. 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, 368-370.
- [25] Timmermans P, Van Haute A. Denitrification with methanol: Fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp. *Water Research*, 1983, 17 (10) :1249-1255.
- [26] Her JJ, Huang JS. Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough. *Bioresource Technology*, 1995, 54 (1) :45-51.
- [27] 王晓蓉. 天然水的性质和组成 // 王晓蓉. 环境化学. 第一版. 南京: 南京大学出版社, 1993, 16-17.
- [28] 王郅媛, 王友升, 李丽萍. 抗衰老研究新模型-酵母细胞活性氧代谢研究进展. *食品科学 (Food Science)*, 2012, 33 (7) :354-358.
- [29] Van Alst NE, Sherrill LA, Iglewski BH, Haidaris CG. Compensatory periplasmic nitrate reductase activity supports anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in the absence of membrane nitrate reductase. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55 (10) :1133-1144.
- [30] Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, Garcia-Valdes E, Palleroni NJ. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70 (2) :510-547.
- [31] Liu S, Wang G, Xie X, Wu L, Li X. Effect of matrix on denitrification efficiency and distribution of nitrifying and denitrifying bacteria in constructed wetlands. *Journal of Southeast University Natural Science Edition*, 2011, 41 (2) :400-405.
- [32] Zhu X, Chen Y. Reduction of N₂O and NO generation in anaerobic-aerobic (low dissolved oxygen) biological wastewater treatment process by using sludge alkaline fermentation liquid. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45 (6) :2137-2143.
- [33] Feng LJ, Xu J, Xu XY, Zhu L, Ding W, Luan J. Enhanced biological nitrogen removal via dissolved oxygen partitioning and step feeding in a simulated river bioreactor for contaminated source water remediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 71 :72-79.
- [34] 宋琴. 一株新型氨氮降解菌株的分离鉴定及相关功能基因的克隆. 中国农业科学院, 硕士学位论文, 2008.
- [35] Klatte T, Evans L, Whitehead RN, Cole J. Four PCR primers necessary for the detection of periplasmic nitrate reductase genes in all groups of *Proteobacteria* and in environmental DNA. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39 (1) :321-326.
- [36] Palleroni NJ, Doudoroff M, Stanier RY, Solanes RE, Mandel M. Taxonomy of the aerobic *Pseudomonads*: the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. *Journal of General Microbiology*, 1970, 60 (2) :215-231.

Isolation and characterization of the salt-tolerant aerobic denitrifying bacterial strain A-13

Yonghe Han, Wenxian Zhang, Zhigang Zhuang, Zhihua Zhou, Xuping Xu, Min Li*
College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

Abstract: [Objective] This study is aimed to isolate and identify an aerobic denitrifying bacterium with high ability for nitrogen removing, and optimize its growing and denitrifying conditions to obtain the theory basis for controlling the eutrophic artificial lake. [Methods] Aerobic denitrifying bacterium strain A-13 was screened by denitrifying medium. Strain identification was carried out through morphological, biochemical and physiological characteristics, 16S rRNA gene and periplasm nitrate reductase gene analysis. The optimal pH, temperature, carbon source, dissolved oxygen (DO), inoculum ratio were tested as well. [Results] Strain A-13 isolated from a drain outlet located in Gaoqi village, Shangjie town, Minhou county, Fuzhou, China, was a member of *Pseudomonas stutzeri* and its DNA sequence was most closely related to *Pseudomonas stutzeri* DSM 50283. The optimal conditions for its growth and denitrification were followed as: pH 6.5, 33°C, 150 r/min, 5% inoculum rate and the best carbon source was sodium succinate. Under these conditions, the maximum removal capacity for NO_3^- was approximately 1900 mg/L. The strain could grow well in the medium with high salinity (10%) and could also use NO_2^- and NH_4^+-H as the sole nitrogen source. [Conclusion] The isolated *P. stutzeri*, A-13 is a potential strain to treat wastewater with high salinity and/or eutrophication.

Keywords: Salt tolerance, aerobic denitrifying bacterium, nitrogen removal ability, eutrophication

(本文责编:张晓丽)

Supported by the State Department of Environmental Protection Item of Fujian Province (sjexcy200912), by the Innovative Entrepreneurial Training Plan for College Students of Fujian Province (sjexcy2012-022) and by the Research Training Item of Top-notch Biological Students of Fujian Normal University (201004)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-591-22867555, E-mai: mli@fjnu.edu.cn

Received: 20 July 2012 / Revised: 23 September 2012

《微生物学报》投稿方式

2012年3月修订

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执:编辑部看到远程投稿后,当日或者次日给作者发“收稿回执”,通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审:编辑看到远程投稿后,还要对稿件进行内审。内审会有2个结果,直退或受理,请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 介绍信:为了保护知识产权,请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板),要求责任作者(即通信作者)亲笔签名,并盖有公章。
- (5) 受理费:150元(2011年3月由原来的100元调为150元)。