

文章编号:0253-9993(2011)08-1375-06

# 生物净化烟气 $\text{NO}_x$ 填料塔生物膜的细菌优势种群

邹平<sup>1</sup> 毕晓伊<sup>1</sup> 孙珮石<sup>1</sup> 宋兆齐<sup>2</sup> 李文均<sup>2</sup> 周恩民<sup>2</sup>

(1. 云南大学 工程技术研究院, 云南 昆明 650091; 2. 云南大学 微生物研究所, 云南 昆明 650091)

**摘要:**利用免培养的变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)这一分子生物学手段,研究了脱氮塔中生物膜细菌的种群结构。发现其优势种群分属于:硝化杆菌属 *Nitrobacter* sp.、热单胞菌属 *Thermomonas* sp.、不动杆菌属 *Acinetobacter* sp.、绿弯菌属 *Chloroflexus* sp.。实验结果表明:将  $\text{NO}_x$  氧化为  $\text{NO}_3^-$  的功能菌主要是亚硝酸盐氧化菌 *Nitrobacter* sp.;起硝化作用的自养菌与异养菌共生在填料塔生物膜中。异养菌除解除了自养菌的有机产物抑制外,还发挥了反硝化作用,生成了易挥发的  $\text{N}_2$ ,导致了脱氮系统的 N 元素损失,同时也产生了碱性物质。在分子水平从种群组成的角度揭示了生物净化烟气  $\text{NO}_x$  的部分机理。

**关键词:**生物净化烟气;  $\text{NO}_x$ ; 生物膜; 细菌优势种群; PCR-DGGE; 硝化与反硝化作用

中图分类号:TQ534.9 文献标志码:A

## Dominant bacteria in biofilms of biotrickling filter for the bio-purification $\text{NO}_x$ in the coal-fired flue gas

ZOU Ping<sup>1</sup>, BI Xiao-yi<sup>1</sup>, SUN Pei-shi<sup>1</sup>, SONG Zhao-qi<sup>2</sup>, LI Wen-jun<sup>2</sup>, ZHOU En-min<sup>2</sup>

(1. Research Institute of Engineering and Technology, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** Bacterial population composition of biofilms in biotrickling filter was analyzed with one culture-independent method by denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). It is found that *Nitrobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Thermomonas* sp. and *Chloroflexus* sp. are the dominant species of the biofilms. Nitrobacteria are the primary bacteria which oxidize  $\text{NO}_x$  into  $\text{NO}_3^-$ . Autotrophic bacteria that act on the nitrification are symbiotic with heterotrophic microbes. The heterotrophic bacteria besides can relieve organic production inhibition against autotrophic bacteria, but also make the denitrification by generating  $\text{N}_2$  etc. and simultaneously produced alkaline production. The part mechanism of bio-purification  $\text{NO}_x$  in the coal-fired flue gas in the view of bacterial community at molecular level is disclosed.

**Key words:** bio-purification coal-fired flue gas;  $\text{NO}_x$ ; biofilms; dominant bacteria; PCR-DGGE; nitrification and denitrification

$\text{NO}_x$  的排放主要来源于煤炭的燃烧。它是目前工业环境中污染十分严重的气体,是形成酸雨的主要因素之一。微生物净化含  $\text{NO}_x$  的燃煤烟气较物理化学法显示出独有的优势,其效率高、工艺设备简单、能耗和运行费用低、二次污染少,迅速成为目前国内外生物法脱氮的发展新趋势<sup>[1]</sup>。

在微生物净化烟气  $\text{NO}_x$  的实验中发现,进出脱

氮塔的 N 元素不平衡。在一个生物周期的中后期,规律性地出现循环液 pH 值升高、脱氮率不降反升的情况。为了揭示脱氮塔的脱氮机理,了解 N 元素不平衡的原因,以进一步巩固和提高脱氮塔的脱氮效率,本文利用分子生物学免培养的变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE)这一分子生物学手段,研究了脱氮填料塔陶

收稿日期:2010-11-15 责任编辑:张晓宁

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2007AA06Z312);国家青年基金资助项目(51008264)

作者简介:邹平(1964—),女,重庆市人,副研究员,博士。E-mail: zouping6668@sina.com。联系人:孙珮石(1957—),E-mail: sunps2003@163.com

粒表面生物膜细菌的种群结构,在分子水平从种群组成的角度了解了生物膜优势菌群结构,为随后调节细菌生长的最佳工艺参数,最终使细菌发挥最大的生物净化作用创造条件。

## 1 实验材料

研究对象是脱氮塔中吸附在填料陶粒表面的生物膜。该生物膜的形成过程:以昆明某污水处理厂的活性污泥为菌种,通过循环液上下位循环的方式直接在填料陶粒上动态挂膜。在挂膜开始,即向脱氮塔 pH = 7.5 左右的循环液中添加适量脱氮菌生长繁殖必需的无机营养物质,同时按一定的流速连续通入混有定量含空气的 NO<sub>x</sub> 尾气。适量循环液以一定流速循环。在连续运转 20 多天后,填料陶泥表面已长出一层肉眼明显可见的湿润的淡黄色生物膜。通过监测脱氮塔 NO<sub>x</sub> 的脱除率来判断生物膜是否挂膜成功,本实验在 NO<sub>x</sub> 脱除率达到 85% 及以上时即可视为挂膜成功。

## 2 实验和分析方法

### 2.1 平衡实验

实验方法:向脱氮塔加入 4 L 含有适量无机营养物质的新鲜循环液,循环液初始 pH = 7.5 左右,并以一定的流速在填料塔上下位循环。往塔内通入一定流速的混有定量空气的含有 NO<sub>x</sub> 的人工模拟生成的燃煤烟气。每小时测量一次脱氮塔进出口 NO<sub>x</sub> 的质量浓度,连续测量 36 h,实验结束时分析脱氮塔循环液中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的质量浓度。

实验条件:脱氮塔进口气体 NO<sub>x</sub> 的质量浓度为 1 841 ~ 3 452 mg/m<sup>3</sup>,气体流量  $Q$  为 0.07 m<sup>3</sup>/h,循环液流量  $L$  为 10 ~ 12 L/h,温度  $T$  为 21 ~ 23 °C,循环液 pH = 7.5 左右。

假设被生物膜填料塔净化的 NO<sub>x</sub> 全部转化为循环液中的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>,依测量的数据逐小时计算 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的生成量,每小时生成的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的量之和即为实验时间内理论上 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的生成量。将理论生成量与循环液中实际化学分析值进行比较即可知道 N 元素的走向。

### 2.2 种群结构的研究方法

#### 2.2.1 细菌样品的采集

用无菌操作在脱氮塔的恰当位置取黏附着较厚生物膜的陶泥若干,装入已灭菌的 50 mL 离心管中,另取循环液适量,用该液反复震荡清洗陶粒,使陶粒上的生物膜脱落。9 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀备用。

#### 2.2.2 基因组 DNA 的提取

将离心管中的细菌沉淀按土壤样品微生物总 DNA 的提取方法提取<sup>[2]</sup>。DNA 粗提物由胶纯化试剂盒(OMEGA BIO-TEK)纯化。

#### 2.2.3 PCR 扩增

利用 16S rRNA 基因的一对加了 GC 发夹的通用引物<sup>[3-5]</sup>进行 PCR 扩增,引物序列见表 1,PCR 扩增反应体系组成见表 2。

表 1 DGGE 引物<sup>[3-5]</sup>

Table 1 The sequences of two set primers of DGGE

Primer	Sequence(5' to 3')	Target site/bp
341F	5 - GC - clamp <sup>①</sup> CCTACGGGAGGCAGCAG - 3	341 ~ 358
803R	5 - CTACCAGGGTATCTAATCC - 3	803 ~ 822

注:①表示 5' - GCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGC - CGCCCCGCCCCG - 3'。

表 2 PCR 扩增反应体系组成

Table 2 Composition of the PCR reaction system

反应体系组成	体积
10 × Ex - Taq buffer	5 μL
2.5 mmol/L dNTP	4 μL
Model	0.5 μL
P1:341F	2 μL
P2:803R	2 μL
Ex - Taq DNA polymerase	0.3 μL
Deionized water	to 50 μL
石蜡油	1 滴

PCR 反应条件:采用热启动 PCR 策略,预变性条件为 95 °C、5 min,80 °C 加入酶液,95 °C、1 min,56 °C、1 min,72 °C、2 min;最后在 72 °C 下延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

#### 2.2.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

(1) DGGE 相关试剂的配制。含变性梯度为 35% 和 60% (7 mol/L 尿素和 40% 甲酰胺为 100% 的变性剂浓度)的 10% 聚丙烯酰胺凝胶浓度,电泳缓冲液、上样缓冲液的配制见表 3。

(2) 变性梯度胶的配制。分别量取 9 mL 的高浓度和低浓度变性胶液于 2 个小烧杯中,各加入过硫酸铵(10%) 40 μL 和 TEMED(N,N,N,N'-四甲基乙二胺) 9 μL,混匀,快速灌胶,然后插入梳子,聚合约 30 min,胶凝固后,拔去梳子,用缓冲液冲洗加样孔。

(3) DNA 电泳。① 将胶和相关设备移至含有已经预热到 60 °C 的缓冲液电泳槽内,调节缓冲液高度,使其刚刚超过胶上加样孔。② 连上热循环换热器使缓冲液能从槽内流至顶部槽内。③ 向胶顶部的加样孔中加入 20 μL 浓缩 PCR 产品,其中包括 20 μL

的上样染料。60 °C ,初始电压 20 V ,20 min ,随后直到终点均为 100 V ,电泳时间 12 h。

表 3 变性梯度为 35% 和 60% 的聚丙烯酰胺、电泳缓冲液、上样缓冲液的组成

Table 3 Composition of 35% ,60% denaturing gel , gel loading dye and electrophoresis buffers

40% Acrylamide/ Bis - acrylamide	电泳缓冲液	上样缓冲液	变形梯度为 35% 的聚丙烯酰胺	变形梯度为 60% 的聚丙烯酰胺
Acrylamide 38 g; Bis-acrylamide 2 g; Deionized water to 100 mL	Tris base 2 mol/L; 0.5 mol/L EDTA pH = 8.0; Final conc. 50 mmol/L; Acetic acid glacial 1 mol/L	2% Bromophenol blue 0.25 mL; 2% Xylene cyanol 0.25 mL; 10% Glycerol 7.0 mL; Deionized water 2.5 mL	40% Acrylamide/Bis-acryl- amide 15 mL; 50 × Tae buffer 2 mL; Formamide( deionized) 12 mL; Urea 14.7 g; Deionized water to 100 mL	40% Acrylamide/Bis-acryl- amide 15 mL; 50 × Tae buffer 2 mL; Formamide( deionized) 12 mL; Urea 25.2 g; Deionized water to 100 mL

(4) 染色与成像。将电泳后的胶浸泡于含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溴化乙锭的 1 × TAE 缓冲液中染色 20 min ,再转入 1 × TAE 缓冲液中浸泡 15 min ,以紫外凝胶成像系统进行成像。

(5) DGGE 胶回收、PCR 扩增及序列测定分析。将 DGGE 电泳图上的条带分别进行回收(同一位置的条带割一条即可) ,放入离心管中 ,加入 25  $\mu\text{L}$  的 TE ,放置 12 h 后 ,12 000 r/min 离心 2 min ,取其上清液 ,以此作为模板进行 PCR 的再次扩增 ,条件同前。再次 PCR 的产物纯化后 ,经连接转化 ,获得阳性克隆 ,交由生物公司进行测序。

### 2.3 分析方法

用 KM940 英国产烟气分析仪分析  $\text{NO}$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{O}_2$  和温度;用水杨酸比色法定性和定量分析  $\text{NO}_3^-$ ;用转子流量计测量气体流量;用量筒和秒表定时测量循环液流量;用精密 pH 试纸测量 pH 值。

## 3 实验结果及讨论

### 3.1 N 元素平衡实验

从表 4 可知 ,在脱氮塔 N 元素平衡实验中 ,扣除细菌利用量和实验误差 ,循环液中  $\text{NO}_3^-$  质量浓度的分析结果与理论计算结果相差较大。脱氮塔循环液中  $\text{NO}_3^-$  的理论生成量与产物量不平衡。这说明脱氮塔吸收的  $\text{NO}_x$  并没有全部转化为  $\text{NO}_3^-$  ,在实验系统完全密闭不可泄漏的情况下 ,根据物质不灭定律 ,有一部分 N 元素被转化成了易挥发成分如  $\text{N}_2$  ,导致了 N 元素的损失。

在长期的脱氮实验中还发现:在一个生物周期的中后期 ,会规律性地出现循环液 pH 值升高、脱氮率不降反升的情况。循环液 pH 值升高意味着脱氮系统有碱性物质产生 ,脱氮率上升表明有  $\text{NO}_x$  的转化。据文献[6]可知:在微生物作用下 ,反硝化反应在脱氮的同时能生成碱性产物。

表 4 平衡实验结果

Table 4 Equilibrium experiments of the elements

组 别	$\text{NO}_3^-$ 的质量浓度/( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	
	测定值	计算值
实验 24 h 循环液	0.51	1.23
实验 36 h 循环液	0.74	1.71

### 3.2 种群结构的研究

为了验证上述推断 ,对脱氮生物膜进行了形态学、主要生理生化特征及分子生物学的实验研究。

#### 3.2.1 形态学和主要生理生化特征

从图 1 可知 ,脱氮塔生物膜细菌在挂膜前期以杆状细菌为主 ,有少数椭圆形、球状细菌;在挂膜中后期 ,以椭圆型细菌为主 ,有少量球状、杆状菌;  $G^-$  菌 ,好氧 ,生长最适 pH = 7.5 ,pH 值范围 6.0 ~ 9.0 ,30 ~ 40 °C 时的生长速度快于 30 °C 以下 ,能将  $\text{NO}_x$  转化为  $\text{NO}_3^-$ 。

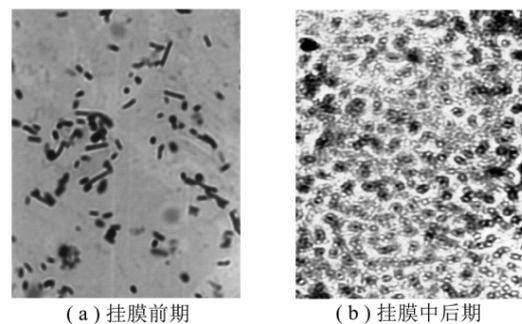


图 1 脱氮塔生物膜细菌显微形貌(×1 000)

Fig. 1 Bacterial morphology of biological trickling filter purifying  $\text{NO}_x$  in flue gas(×1 000)

#### 3.2.2 细菌基因组总 DNA 的提取

利用酶法提取脱氮塔生物膜细菌基因组总 DNA 图 2 为脱氮塔生物膜细菌基因组总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳。

#### 3.2.3 PCR 扩增

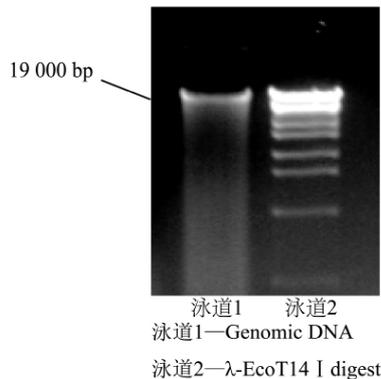


图2 脱氮塔生物膜细菌基因组总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of bacterial culture genomic DNA of biological trickling filter purifying  $\text{NO}_x$  in flue gas

利用带有 GC 发夹 (40 bp) 的 DGGE 专有引物热启动 PCR 扩增 16S rRNA 基因 V3 ~ V6 高可变区片段。为了检测 PCR 产物的纯度及片段长度是否符合下一步 DGGE 需要,上述 PCR 结束后,通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。图 3 为 16S rRNA 基因 V3 ~ V6 区 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱。从图 3 可知,PCR 扩增的 V3 ~ V6 区片段条带大小约为 500 bp,且只有一个清晰的条带,片段纯度和长度符合要求,随后进行 DGGE 电泳。

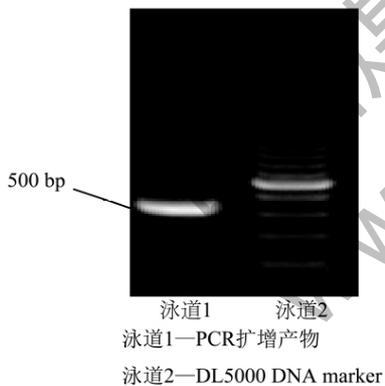


图3 16S rRNA 基因 V3 ~ V6 区 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products about 16S rRNA (V3 ~ V6) gene

### 3.2.4 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

将上述合格的 PCR 产物进行 DGGE,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10%,变性胶梯度为 35% ~ 60%,电泳:初始电压 20 V、5 min,随后直至终点电压保持 100 V,电泳时间为 12 h。图 4 为脱氮塔生物膜细菌变性梯度凝胶电泳。

在 DGGE 图谱中每条带代表一个不同的微生物物种。从图 4 可知,共有 7 个位置出现明显条带,从下而上分别命名为 band6、band14、band21、band27、band26、band25、band24 及 band23。

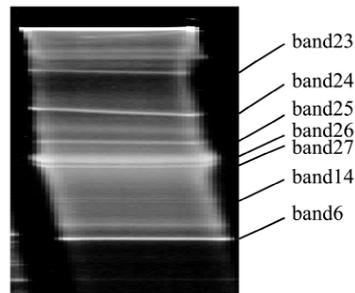


图4 脱氮塔细菌变性梯度凝胶电泳

Fig. 4 DGGE patterns of PCR amplified 16S rRNA (V3 ~ V6) gene of biological trickling filter purifying  $\text{NO}_x$  in flue gas

### 3.2.5 DGGE 条带的回收及序列测定分析

将 DGGE 电泳图上的 7 个条带分别进行回收。以此 7 条带的 DNA 为模板分别再次进行 PCR 扩增,再次扩增的引物无 GC 发夹。其产物经过纯化,通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测目的条带,如图 5 所示。从图 5 可知,再次 PCR 扩增的片段条带大小约为 460 bp,均为单一条带。片段纯度和长度符合要求,随后进行克隆测序分析。

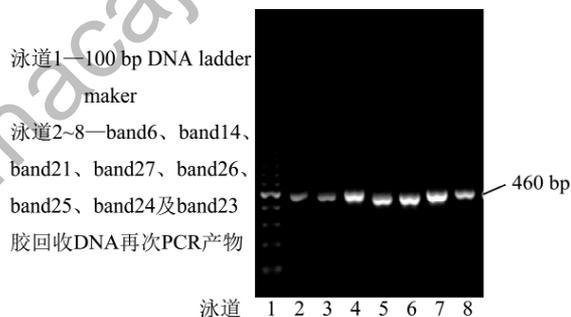


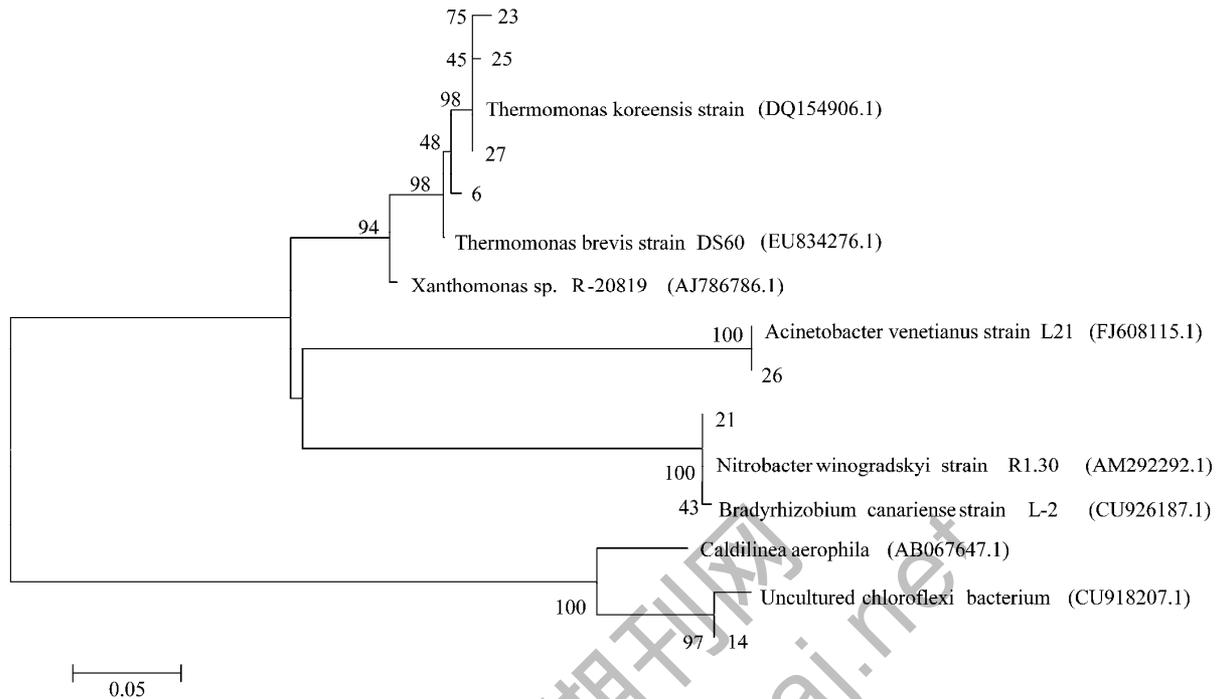
图5 DGGE 胶回收 DNA 再次 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified recycling product about 16S rRNA (V3 ~ V6) gene from DGGE gel

将经过纯化的再次 PCR 产物分别进行克隆测序,将所测得的序列提交 NCBI,通过 Blast 比对。利用 DNASTar、Clustal 1.83 及 Mega4.0 软件对上述各条带所对应的菌株与 GeneBank 中相关的菌株一起构建了系统进化树,如图 6 所示。从图 6 系统进化树可知,band21 克隆序列与已知菌 *Nitrobacter winogradskyi* strain R1.30 (AM292292.1) 16 rRNA 基因序列相似性为 100%; band26 克隆序列与已知菌 *Acinetobacter venetianus* strain L21 (FJ608115.1) 的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%; band27 克隆序列与已知菌 *Thermomonas koreensis* strain KO06 (DQ154906.1) 的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%; band23、band25 克隆序列与已知菌 *Thermomonas koreensis* strain KO06 (DQ154906.1) 的 16S rRNA 基因序列相似性均为 99%; band6 克隆序列与已知菌 *Thermomonas bre-*

vis strain DS60( EU834276.1) 的 16S rRNA 基因序列相似性为 99%; band14 克隆序列与 Uncultured chlo-

roflexi bacterium( CU918207.1) 的 16S rRNA 基因序列相似性为 99%。



注: 采用Neighbor-Joining方法构建系统进化树, Band标记表示从DGGE重新扩增条带的16S rDNA序列; 节点数字表示经过1 000次Bootstrap分析所得到的结果; 标尺表示每100个核苷酸中有5个碱基替换。

图 6 以 16S rRNA 基因(V3 ~ V6) 序列为基础的脱氮塔细菌样品克隆系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the colonies based on the 16S rRNA( V3 ~ V6) gene sequence of DGGE of biological trickling filter purifying  $\text{NO}_x$  in flue gas

结果表明, 脱氮塔生物膜细菌的优势种群分属于: 硝化杆菌属 *Nitrobacter* sp.、热单胞菌属 *Thermomonas* sp.、不动杆菌属 *Acinetobacter* sp.、绿弯菌属 *Chloroflexus* sp.。

通常把氨氧化为亚硝酸盐和硝酸盐的生物反应称为硝化作用(Nitrification)<sup>[7]</sup>, 把参与硝化作用的细菌统称为硝化细菌。硝化作用是一个序列反应, 先由氨氧化细菌将氨氧化成亚硝酸盐, 再由亚硝酸盐氧化细菌将亚硝酸盐氧化成硝酸盐。在生态学上, 一般认为氨氧化细菌与亚硝酸盐氧化细菌之间存在互生(Synergism)关系。前者为后者提供基质, 后者为前者解除产物抑制, 两者共同生活, 更有利于双方生长。但在本研究中却发现脱氮塔优势菌群中仅有亚硝酸盐氧化细菌——硝化杆菌属细菌 *Nitrobacter* sp., 由该类细菌发生硝化作用, 成为主要的功能菌, 这无疑是由底物  $\text{NO}_x$  的选择性压力所致。

热单胞菌、不动杆菌、绿弯菌等均为异养菌。本实验中, 无论是在挂膜期还是在运行期都没有向脱氮塔内添加任何有机物, 目的是尽可能营造功能菌——自养硝化菌良好的生长环境。添加的主要营养成分

是适量无机物。但实验证明: 脱氮塔中还有多种异养菌的生长。

异养菌生长的原因: 随着前期硝化细菌的大量生长繁殖, 其有机代谢产物逐渐积累, 累积的有机物可作为异养菌生长繁殖的基质, 有机代谢产物一旦累积到一定程度, 异养菌大量生长, 一般在生物周期的中后期, 随着异养菌的生长繁殖, 循环液中的有机物逐渐减少, 从而又为硝化细菌的生长创造了较好的“无机”条件, 本研究中的异养菌与硝化细菌存在共生关系, 异养菌能够为硝化细菌解除有机代谢产物的抑制。

据文献[8]介绍: 异养菌以自养菌的有机代谢产物为食, 在无人为添加有机物的前提下, 它们只有在自养菌生长旺盛时才能生长起来。所以本研究在每个生物周期的中后期才规律性地出现循环液 pH 值上升、脱氮率不降反升的状况。

除此之外, 结合脱氮塔循环液中  $\text{NO}_3^-$  的质量浓度测定结果与计算得出的理论结果不一致的现象, 推断脱氮系统 N 元素损失的原因是塔内的异养菌——热单胞菌、不动杆菌、绿弯菌还发生了反硝化作用, 生

成了易挥发的  $N_2$ 。据文献 [9] 记载: 与硝化细菌不同, 反硝化细菌在分类上没有专门的类群, 它们分散于原核生物的众多属中。热单胞菌属归属于黄色单胞菌科 (Xanthomonadaceae), 不动杆菌归属于假单胞菌科 (Pseudomonadaceae), 已知这些类群的细菌有众多菌株具有反硝化作用, 一些具有反硝化作用的细菌类群还在不断被发现<sup>[10]</sup>。

通常反硝化是厌氧酶的一个系统, 但目前已知的能好氧反硝化的细菌有 *Pseudomonas* spp. 等多种类群<sup>[11-13]</sup>。本实验人工生成模拟烟气含有 20% 左右的氧气, 所以发挥反硝化作用的异养菌应是好氧反硝化菌。实验证明: 硝化菌和反硝化菌在一个脱氮塔中共生。硝化过程的产物即为反硝化过程的反应物, 反硝化过程所产生的碱度又是硝化过程所必需的<sup>[14]</sup>, 所以在单一反应器内能够实现上述 2 个过程对生物脱氮十分有利。

#### 4 结 论

(1) 生物净化烟气  $NO_x$  的生物膜填料塔中的微生物优势种群分属于: 硝化杆菌属 *Nitrobacter* sp.、热单胞菌属 *Thermomonas* sp.、不动杆菌属 *Acinetobacter* sp.、绿弯菌属 *Chloroflexus* sp.。将  $NO_x$  氧化成  $NO_3^-$  的功能菌主要有亚硝酸盐氧化菌。

(2) 自养硝化菌与多种异养菌共生。异养菌除解除了自养菌的有机产物抑制外, 还发挥了反硝化作用, 生成了易挥发的  $N_2$ , 导致脱氮系统的 N 元素损失, 同时也产生了碱性物质, 循环液 pH 值在生物周期的中后期升高。

(3) 发挥反硝化作用的异养菌是好氧反硝化菌。

#### 参考文献:

- [1] 邓永强, 谭庆锋. 国外烟气同时脱氮脱硫技术研究现状 [J]. 江西化工, 2006(1): 33-36.  
Deng Yongqiang, Tan Qingfeng. The study status of simultaneous desulfurization and denitrification from flue gas abroad [J]. Jiangxi Chemical Industry, 2006(1): 33-36.
- [2] Chen Jian, Liu He, Li Xiufen, et al. Protocols of environmental microbiology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008.
- [3] Casamayor E O, Pedros Alio C, Muyzer G, et al. Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial population from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68(4): 1706-1714.
- [4] Muyzer G, Brinkhoff T, Nubel U, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology [M]. New York: Molecular Microbial Ecology Manual, 1996: 1-27.
- [5] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用 [J]. 生态学报, 2003, 23(8): 1570-1575.  
Luo Haifeng, Qi Hongyan, Xue Kai, et al. A preliminary application of PCR-DGGE to study microbial diversity in soil [J]. Acta Ecologica Sinica, 2003, 23(8): 1570-1575.
- [6] 张唯. 生物法净化低浓度  $NO_x$  废气的基础应用研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2005: 1-20.  
Zhang Wei. The basic study on biopurification low concentrations of  $NO_x$  from flue gas [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2005: 1-20.
- [7] 郑平, 徐向阳, 胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.  
Zheng Ping, Xu Xiangyang, Hu Baolan. New theory and technology about biological denitrogenation [M]. Beijing: Science Press, 2004.
- [8] 张在海, 王淀佐, 邱冠周, 等. 细菌浸矿的细菌学原理 [J]. 湿法冶金, 2000, 19(3): 16-21.  
Zhang Zaihaj, Wang Dianzuo, Qiu Guanzhou, et al. The bacteriological fundamental of bacterial leaching [J]. Hydrometallurgy, 2000, 19(3): 16-21.
- [9] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1984: 112-1207.  
Buchanan R E, Gibbons N E. Taxonomic outline of the prokaryotes berger's manual systematic bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 1984: 112-1207.
- [10] 梁丽华, 左剑. 现代非培养技术在反硝化微生物种群结构和功能研究中的应用 [J]. 环境科学学报, 2008, 28(4): 599-605.  
Liang Lihua, Zuo Jian. Review of modern culture-independent methods used to study community structure and function of denitrifying microorganisms [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 28(4): 599-605.
- [11] Klasson K T, Davison B H. Effect of temperature on biofiltration of nitric oxide [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2001, 91-93(1-9): 205-211.
- [12] Stepanov A L, Korpela T K. Microbial basis for the biotechnological removal of nitrogen oxides from flue gases [J]. Biotechnol. Appl. Biochem., 1997, 25: 97-104.
- [13] 张鸥, 周转, 屈计宁, 等. 同时硝化与反硝化研究进展 [J]. 重庆环境科学, 2001, 23(6): 20-24.  
Zhang Ou, Zhou Zhuan, Qu Jining, et al. Review of simultaneous nitrification and denitrification [J]. Chongqing Environmental Science, 2001, 23(6): 20-24.
- [14] Menoud P, Wong C H, Robinson H A, et al. Simultaneous nitrification and denitrification using siporax<sup>TM</sup> packing [J]. Water Sci. Technol., 1999, 40(4-5): 153-160.