

研究报告

一株高氯酸盐还原细菌的分离鉴定与代谢特性

罗文勇^{1,2}, 王皓明^{2,3,4}, 胡光荣^{2,3,4}, 李福利^{2,3,4}, 李捷^{*1}

1 青岛理工大学 环境与市政工程学院, 山东 青岛 266520

2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101

3 山东能源研究院, 山东 青岛 266101

4 青岛新能源山东省实验室, 山东 青岛 266101

罗文勇, 王皓明, 胡光荣, 李福利, 李捷. 一株高氯酸盐还原细菌的分离鉴定与代谢特性[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 152-167.

LUO Wenyong, WANG Haoming, HU Guangrong, LI Fuli, LI Jie. Isolation, identification and characterization of a perchlorate-reducing bacterium[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 152-167.

摘要: 【背景】高氯酸盐是新型的水体污染物, 利用微生物对含高氯酸盐的工业废液进行无害化处理具有高效、经济和环境友好性的特点。【目的】挖掘生长速度快、活性强、还原效率高的本土高氯酸盐还原细菌资源。【方法】从活性污泥中分离筛选高氯酸盐还原细菌, 使用分子生物学技术对其进行种属鉴定, 并通过微生物培养实验探究分离菌株的生理代谢特性。【结果】最终分离得到一株高氯酸盐还原细菌 QD19-16, 经过 16S rRNA 基因分析鉴定其属于布鲁氏杆菌 (*Brucella* sp.)。菌株 QD19-16 属于兼性厌氧菌, 最适生长温度为 30 °C, 最适 pH 7.0。菌株 QD19-16 是异养微生物, 表现出多样的代谢能力, 可以利用多种电子供体, 如乙酸盐、酵母提取物和乳酸等, 能够利用的电子受体包括硝酸盐、高氯酸盐、氯酸盐、硫酸盐和氧气等。在厌氧条件下, 以高氯酸盐作为电子受体生长时, 菌株 QD19-16 的最大比生长速率(μ_{\max})为 0.279 d⁻¹, 对高氯酸盐的半饱和常数(K_s)为 0.294 mmol/L。【结论】菌株 QD19-16 是布鲁氏菌属中第一株被发现的高氯酸盐还原菌, 扩大了变形菌门(*Proteobacteria*)中高氯酸盐还原菌的分布, 能够应用于厌氧生物反应器中高氯酸盐还原微生物菌群的构建。

关键词: 高氯酸盐; 布鲁氏杆菌; 代谢特性; 电子受体; 生物还原

资助项目: 国防科技创新特区项目

This work was supported by the National Defense Science and Technology Innovation Zone Foundation of China.

*Corresponding author. E-mail: jli1972@sina.com

Received: 2024-04-08; Accepted: 2024-06-23; Published online: 2024-08-23

Isolation, identification and characterization of a perchlorate-reducing bacterium

LUO Wenyong^{1,2}, WANG Haoming^{2,3,4}, HU Guangrong^{2,3,4}, LI Fuli^{2,3,4}, LI Jie^{*1}

1 School of Environmental and Municipal Engineering, Qingdao University of Technology, Qingdao 266520, Shandong, China

2 Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

3 Shandong Energy Institute, Qingdao 266101, Shandong, China

4 Qingdao New Energy Shandong Laboratory, Qingdao 266101, Shandong, China

Abstract: [Background] Perchlorate is a new water pollutant, and using microorganisms for harmless treatment of industrial wastewater containing perchlorate has high efficiency, low costs, and environmental friendliness. [Objective] However, the resources of local perchlorate-reducing bacteria with fast growth, strong activity, and high reduction efficiency are extremely scarce and urgently need to be explored. [Methods] In this study, we isolated and screened perchlorate-reducing bacteria from activated sludge, identified their species using molecular biology techniques, and explored the physiological and metabolic characteristics of the isolated strains through microbial culture experiments. [Results] Finally, a perchlorate-reducing bacterial strain QD19-16 was isolated and identified as *Brucella* sp. by 16S rRNA gene analysis. Strain QD19-16 was an anaerobic facultative bacterium, with optimal growth at 30 °C and pH 7.0. Strain QD19-16 demonstrated a variety of metabolic activities and showed the ability to use acetate, yeast extract, and lactic acid as electron donors and perchlorate, chlorate, sulfate, and oxygen as electron acceptors. Under anaerobic conditions, the maximum specific growth rate (μ_{\max}) of strain QD19-16 using perchlorate as an electron acceptor was 0.279 d⁻¹, with a half-saturation constant (K_s) of 0.294 mmol/L for perchlorate. [Conclusion] *Brucella* sp. QD19-16 is the first reported perchlorate-reducing bacterium of *Brucella*, expanding the distribution of perchlorate-reducing bacteria of *Proteobacteria*. Strain QD19-16 can be applied in assembling the microbial communities for perchlorate reduction in anaerobic bioreactors.

Keywords: perchlorate; *Brucella* sp.; metabolic characteristics; electron acceptor; bioreduction

高氯酸盐作为强氧化剂,广泛应用于军事、航空航天及烟花等工业生产,由于其化学性质稳定且极易溶于水并随之迁移扩散,从而导致水体污染^[1]。高氯酸根(ClO₄⁻)的电荷和离子半径与碘离子十分相近,会竞争性抑制甲状腺对碘的摄取和使用,减少甲状腺激素的分泌与合成^[2],对胎儿和婴儿的神经发育会产生潜在影响^[3]。2022年最新发布的生活饮用水卫生标准规定饮用水中高氯酸盐的限值为0.07 mg/L^[4]。目

前,研究人员已经在饮用水^[5]、婴幼儿奶粉^[6]、饮料^[7]、蔬果^[8]、茶叶^[9]等食品中检测到低浓度的高氯酸盐,应当引起关注。高氯酸盐的处理技术主要有活性炭吸附、膜分离、离子交换、化学还原法和生物还原法等^[1,10],其中,物化处理法耗资较大且需要二次处理。相较于物理或化学方法,微生物法可以将高氯酸盐完全还原为Cl⁻和O₂,并且工艺成本低适合处理大规模废水,具有非常广阔的应用前景。此外,还有一

些将微生物法与其他物化法结合的高氯酸盐去除工艺^[11-12],也都具有不错的去除效果。

自然环境中高氯酸盐的还原主要是部分细菌在厌氧条件下以高氯酸盐为电子受体,通过呼吸作用将其还原为氯离子,这些细菌被称为异化高氯酸盐还原细菌(dissimilatory perchlorate-reducing bacteria, DPRB)^[13]。第一株 DPRB 菌株发现于 1976 年,目前已有 100 余种 DPRB 被报道,主要分布在变形菌门(*Proteobacteria*)^[10]和厚壁菌门(*Firmicutes*)^[14-15]中,多数属于变形菌门的 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)。近年来,部分古菌^[16]也被发现具有还原高氯酸盐的能力。DPRB 在细胞周质中利用 2 种酶催化高氯酸盐还原为氯离子^[17]:高氯酸盐还原酶(perchlorate reductase, Pcr)以高氯酸盐/氯酸盐作为底物,将高氯酸盐逐步还原为氯酸盐(ClO_3^-)和亚氯酸盐(ClO_2^-),后者在亚氯酸盐歧化酶(chlorite dismutase, Cld)催化下生成氯离子和 O_2 。

编码高氯酸盐还原酶的 *pcr* 操纵子(*pcrABCD*)和编码亚氯酸盐歧化酶的 *cld* 基因结合在一起形成的基因簇被称为高氯酸盐还原基因组岛(perchlorate reduction genomic island, PRI)。除了 *pcrABCD* 和 *cld* 外, PRI 还含有几个附属基因,包括转录调控因子、电子转运、氧胁迫抗性和含钼辅因子等^[18]。PRI 在插入位点附近存在着转座因子和反向重复序列,表明 PRI 能够插入到宿主基因组中^[18-21],而且 PRI 的水平转移可以发生在同一生境的远缘细菌物种中^[22]。由于 PRI 中包含了完整的高氯酸盐厌氧呼吸电子传递链的必需基因,细菌细胞通过水平基因转移获得 PRI 后就会得到还原高氯酸盐的能力^[18]。因此,广义的 DPRB 可以被认为是细菌宿主得到 PRI 后的结果。

多数 DPRB 菌株都是革兰氏阴性兼性厌氧菌,能够使用有机质,如各种脂肪酸和二羧酸

作为电子供体^[16]。除了高氯酸盐外,还可以使用氧气、硝酸盐和锰(IV)作为电子受体^[23]。利用包含 DPRB 的微生物菌群,已成功地在连续搅拌釜反应器中实现了对含高强度高氯酸盐的工业废液的去除^[24]。利用微生物对含高氯酸盐的工业废液进行无害化处理具有高效、经济和环境友好性的特点,但是急需生长速度快、稳定性强、还原效率高的本土高氯酸盐还原细菌资源。

在本研究中,我们从中国山东省青岛市尼布湾污水处理厂的厌氧池活性污泥样本中筛选高氯酸盐还原细菌,并对分离菌株的生理代谢特性、高氯酸盐还原能力进行研究,以期得到还原高氯酸盐的高效菌株,并为构建厌氧生物反应器中高氯酸盐还原微生物菌群奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

活性污泥来自山东省青岛市尼布湾污水处理厂厌氧池。

1.1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 纯化试剂盒、2×EasyTaq PCR SuperMix、EasyII 蛋白质定量试剂盒,北京全式金生物技术有限公司。紫外分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;恒温摇床,上海博彩生物科技有限公司;厌氧工作站, Coy Laboratory Products 公司;超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;离子溅射仪、扫描电子显微镜, HITACHI 公司;光学氧气计, PyroScience GmbH 公司;离子色谱仪, Dionex 公司;高效液相色谱仪, Agilent Technologies 公司。

1.1.3 培养基

改良 ATCC 2106 培养基(g/L): NH_4Cl 0.25, NaH_2PO_4 0.60, NaHCO_3 2.50, KCl 0.10,

NaClO₄·H₂O 1.40, CH₃COONa 0.82, 氨三乙酸 0.015, MgSO₄·7H₂O 0.03, MnSO₄·H₂O 0.005, NaCl 0.01, FeSO₄·7H₂O 0.001, CoCl₂·6H₂O 0.001, CaCl₂ 0.001, ZnSO₄·7H₂O 0.001, CuSO₄·5H₂O 0.000 1, AlK(SO₄)₂·12H₂O 0.000 1, H₃BO₃ 0.000 1, Na₂MoO₄·2H₂O 0.000 1, 生物素 2.0×10⁻⁵, 叶酸 2.0×10⁻⁵, 盐酸吡哆醇 1.0×10⁻⁴, 硫胺素 5.0×10⁻⁵, 核黄素 5.0×10⁻⁵, 烟酸 5.0×10⁻⁵, 泛钙酸 5.0×10⁻⁵, 钴胺素 1.0×10⁻⁶, 对氨基苯甲酸 5.0×10⁻⁵, 硫辛酸 5.0×10⁻⁵。

LB 固体培养基(g/L): 预混合 LB 培养基 25.0, 琼脂粉 18.0。

1.2 高氯酸盐还原菌的富集、分离与纯化

将样品以 10%的接种量接种于装有 20 mL ATCC 2106 培养基的厌氧瓶中, 以乙酸钠(10 mmol/L)作为电子供体和碳源、以高氯酸钠(10 mmol/L)作为电子受体。初次接种污泥后将厌氧瓶置于培养箱中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 10 d。然后, 将初步富集菌液按 10%接种量接种到新鲜培养基中按同样条件培养。多次转接培养后厌氧瓶中溶液呈浑浊状后停止富集步骤。从厌氧瓶中取 0.1 mL 菌液涂布在 2106 固体培养基上, 30 °C厌氧箱中培养 3–5 d, 待菌落出现后, 挑取单菌落至 2106 固体培养基上划线分离, 30 °C厌氧箱中培养 3–5 d, 重复 2–3 次后挑取单菌落在 LB 琼脂平板上进行划线分离获得纯菌株, 将其命名为 QD19-16。

1.3 16S rRNA 基因测序与系统发育树的构建

使用细菌基因组 DNA 纯化试剂盒提取纯化菌株的基因组 DNA。以 DNA 为模板使用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增其 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(20 μL): 正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, 2×EasyTaq

Mix 7 μL, DNA 模板(20 ng/μL) 1 μL, 无菌水 10 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。扩增产物送至擎科生物科技股份有限公司进行测序。

通过 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜索与菌株 QD19-16 的 16S rRNA 基因序列相似的序列。将菌株 QD19-16 与其他细菌的 16S rRNA 基因序列组成数据集。使用 Clustal Omega^[25]对上述 16S rRNA 基因序列进行多序列比对(multiple sequence alignment, MSA), 删除序列两边杂峰, 并使用 Gblocks 0.91^[26]确定 MSA 数据集中的信息位点。根据 ModelFinder^[27]选择的 DNA/蛋白质数据集的替代模型, 使用 W-IQ-TREE web 服务器^[28]利用最大似然法在线构建系统发育树, 使用 UFBoot2^[29]对系统发育树进行自举法(bootstrap)检验, 重复值设为 1 000。用 FigTree 1.4.4 可视化系统发育树。

1.4 菌株形态观察

1.4.1 革兰氏染色

取少量菌液滴加于载玻片上, 干燥固定后滴加少量结晶紫染液, 1–2 min 后倾去染液, 水洗至流出液变为无色。以碘液冲洗, 覆盖 1 min 后倾去碘液, 水洗至流出液变为无色。除去残留水, 以 95%乙醇脱色 30 s, 至流出液无色时, 水洗去乙醇。然后用番红染液染色 2 min, 水洗、晾干。在油镜下镜检观察。

1.4.2 扫描电镜观察

细菌细胞样品在 4 °C用 2%戊二醛固定 12 h, 然后用 pH 7.2 的 PBS 缓冲液冲洗 3 次。随后使用 1%四氧化二锇溶液固定 12 h, 然后用 PBS 缓冲液轻轻洗涤 3 次。随后, 使用乙醇梯度溶液(50%、70%、80%、90%和 100%)脱水, 每步 15 min。干燥后的细胞样品经离子溅射镀膜后使用扫描电子显微镜观察。

1.5 菌株的生理代谢特性

1.5.1 菌株 QD19-16 的生长特性

以乙酸钠(10 mmol/L)作为碳源和电子供体,以高氯酸钠(10 mmol/L)作为电子受体,研究菌株 QD19-16 的最佳生长 pH 和温度。测试温度设置为 25、30、37 °C。为了制备不同 pH 的培养基,将 ATCC 2106 培养基中的 NaH_2PO_4 和 NaHCO_3 替换为 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液,并使用 HCl 或 NaOH 调节 pH (5.0、6.0、7.0、8.0)。所有分析均重复 2 次。

1.5.2 菌株 QD19-16 的代谢多样性研究

以高氯酸钠(10 mmol/L)作为电子受体,在厌氧条件下检测菌株 QD19-16 对不同电子供体的利用能力。在 ATCC 2106 培养基中添加其他电子供体取代乙酸钠,所试验的电子供体包括:苯甲酸钠 10 mmol/L、丙酸钠 10 mmol/L、甲醇 5 mmol/L、乙醇 5 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、果糖 10 mmol/L、乳酸 10 mmol/L、酵母提取物 1 g/L。使用分光光度计测试样品的生长。为了确定菌株 QD19-16 是否利用了测试的电子供体,在接种时和 6 d 后取样,使用离子色谱仪分析高氯酸盐的消耗。菌株利用电子供体的能力由高氯酸盐的消耗和细菌浊度(OD_{600})的变化来确定^[30],当高氯酸盐减少和细菌浊度增加则认为菌株可以利用该电子供体。

以乙酸钠(10 mmol/L)作为唯一的电子供体和碳源,在厌氧条件下分析菌株对电子受体的利用情况。用不同的电子受体取代高氯酸钠添加到 ATCC 2106 培养基中,所试验的电子受体包括:硝酸钠 10 mmol/L、氯酸钠 10 mmol/L、硫酸钠 10 mmol/L、亚硫酸钠 2 mmol/L、苹果酸 10 mmol/L。通过测量接种时和 6 d 后乙酸盐的消耗来确定电子受体的减少。菌株利用电子受体的能力由乙酸钠的消耗和细菌浊度(OD_{600})的变化同时来确定,当乙酸钠被消耗和细菌浊

度增加则认为菌株可以利用该电子受体。ATCC 2106 培养基中虽然存在磷酸盐和硫酸盐,但根据前人的研究结果^[31],磷酸盐并不是高氯酸盐还原细菌的电子受体,且不会对其他电子受体产生竞争,而硫酸盐的浓度则较低(SO_4^{2-} , 0.15 mmol/L),因此忽略它们对实验结果的影响。

以上电子供体和受体均进行 3 次重复分析。

1.5.3 菌株 QD19-16 在不同浓度高氯酸盐中的生长及反应动力学分析

将菌株 QD19-16 接种于 LB 培养基,30 °C、200 r/min 培养过夜至 OD_{600} 值为 2.0 左右,4 °C、6 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,用 ATCC 2106 培养基洗涤并重悬于 10 mL ATCC 2106 培养基中。将浓缩的培养物注射到密封的厌氧培养管中,每个厌氧管中含有 20 mL ATCC 2106 培养基,其中含有不同浓度的高氯酸钠(分别为 5、10、15、20 mmol/L)和乙酸钠(10 mmol/L)作为底物,初始 OD_{600} 值为 0.1,30 °C、200 r/min 振荡培养。每隔 24 h 取样以确定细菌生长曲线和高氯酸盐浓度。所有分析均进行 2 次重复。

为了衡量菌株 QD19-16 在高氯酸盐中的生长速率和还原能力,将实验数据与 Monod 方程拟合,得到菌株 QD19-16 的反应动力学参数最大比生长速率(μ_{\max})和高氯酸盐的半饱和常数(K_s):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

其中: S 是高氯酸盐的浓度,单位是 mmol/L; μ 是比生长速率,单位是 d^{-1} ; μ_{\max} 是最大比生长速率,单位是 d^{-1} ; K_s 是半饱和常数,单位是 mmol/L。

比生长速率 μ 由以下公式计算得到:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (2)$$

其中: N 是细菌生物量; t 是时间,单位是 d。

1.6 高氯酸盐污水处理反应器的启动

使用来自青岛尼布湾污水处理厂厌氧池的

活性厌氧污泥构建高氯酸盐处理反应器,所使用的反应器为序批式反应器(sequencing batch reactor, SBR),总体积 5 L,工作体积 3 L,加热棒控温维持在 30 °C, pH 值控制在 7.0。活性污泥的接种量为 10%,通过机械搅拌器使泥水混合均匀。使用模拟高氯酸盐废水: $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1–10 mmol/L) 0.14–1.42 g/L,以 CH_3COONa 为电子供体和碳源, $n(\text{ClO}_4^-):n(\text{CH}_3\text{COO}^-)=1:1.5\text{--}3$ 。

反应器运行周期参数如下:进水 10 min,反应时间随着实验结果和运行阶段进行调整,污泥沉降 30 min,出水 10 min。进水 2 L,反应器中留水及污泥 1 L, ClO_4^- 最终浓度以 3 L 混合体积计算。

1.7 分析方法

ClO_4^- 和 ClO_3^- 的浓度通过离子色谱法测量。使用 Dionex ICS-3000 离子色谱仪和 Dionex IonPac AS16 色谱柱(4 mm×250 mm),样品的进样量为 10 μL ,使用 35 mmol/L NaOH 溶液作为流动相,流速为 1.0 mL/min。抑制控制器(Dionex ASRS 系统)设置为 80 mA。

乙酸盐的浓度采用高效液相色谱法(HPLC)测定。分析仪器为 Agilent 1260 Infinity II,色谱柱为 Poroshell 120 SB-C18 (2.7 μm , 4.6 mm×100 mm),使用紫外-可见光检测器(Agilent 1260 DAD WR),波长为 210 nm。流动相为甲醇溶液(甲醇:水体积比为 1:9, pH 1.8),流速 1.0 mL/min。

2 结果与分析

2.1 高氯酸盐还原菌的分离和鉴定结果

高氯酸盐还原菌在自然环境中广泛存在,通过逐步地富集和纯化,来自青岛尼布湾污水处理厂厌氧池的活性污泥中分离得到一株能够还原高氯酸盐的细菌,命名为 QD19-16。将菌株 QD19-16 的 16S rRNA 基因序列提交至美

国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库, GenBank 登录号为 OP393902。菌株已经提交中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),编号为 CGMCC 1.61870。根据 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树显示(图 1),菌株 QD19-16 属于 α 变形菌纲中的布鲁氏菌属(*Brucella*)。菌株 QD19-16 的 16S rRNA 基因序列与小麦布鲁氏菌(*Brucella tritici*) WJB3 相似性达到 100%,因此菌株 QD19-16 被命名为 *Brucella* sp. QD19-16。菌株 QD19-16 是 α -变形菌纲布鲁氏菌科布鲁氏菌属中第一个报道的 DPRB。

菌株 QD19-16 在 LB 固体培养基上形成的菌落为圆形乳白色,菌落中等大小,表面光滑,中间凸起,质地较湿润,呈黏液状。该菌株革兰氏染色为阴性,细胞为短杆状,长 1.1–1.5 μm ,宽 0.5–0.6 μm ,无鞭毛(图 2)。

2.2 高氯酸盐还原菌的生理代谢特性

2.2.1 菌株 QD19-16 的生长和高氯酸盐还原

菌株 QD19-16 是兼性厌氧细菌,可以在有氧和厌氧条件下生长。在有氧条件下,细菌在 LB 培养基上生长时,24 h 后进入指数生长期,72 h 后达到平稳期。在 7 d 培养期内, OD_{600} 最高达到 3.7 (图 3A)。而在厌氧条件下,以乙酸钠(10 mmol/L)作为碳源和电子供体、以高氯酸钠(10 mmol/L)作为电子受体时,细菌生长缓慢,48 h 进入指数生长期,96 h 后达到平稳期, OD_{600} 最大值为 0.18(图 3B)。

菌株 QD19-16 对高氯酸盐的还原曲线如图 3B 所示,培养基中 ClO_4^- 浓度降低, Cl^- 浓度增加(图 3B),表明菌株 QD19-16 在生长过程中可以利用乙酸钠作为电子供体,将 ClO_4^- 还原为 Cl^- 。在 144 h 的培养中,菌株 QD19-16 对高氯酸盐的还原率达到 85%,导致 8.5 mmol/L 高氯

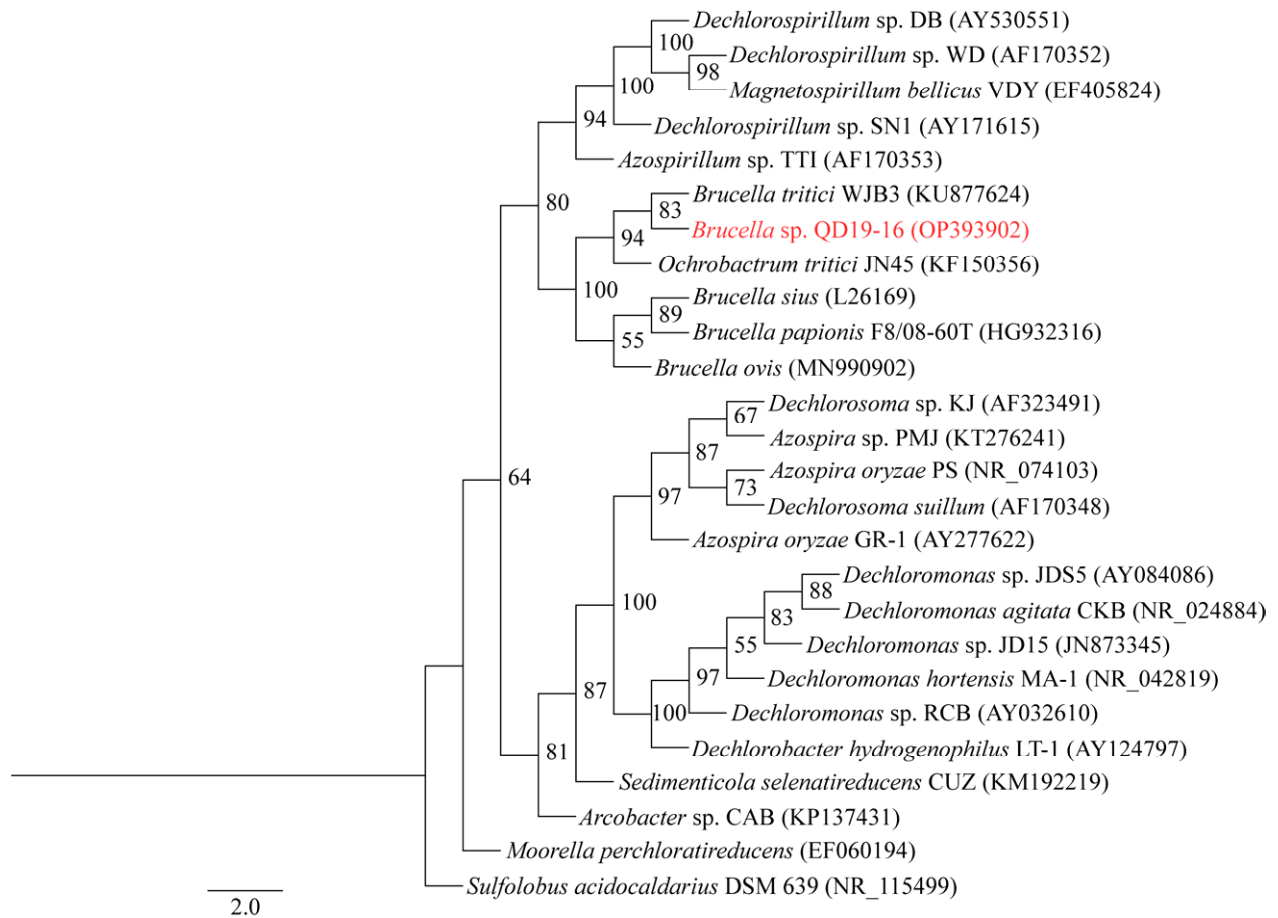


图1 基于16S rRNA基因序列构建的菌株QD19-16系统发育树 括号内的序号为GenBank登录号；节点处的数字为bootstrap支持度；距离标尺表示物种间差异数值的单位长度。

Figure 1 Phylogenetic tree of strain QD19-16 constructed based on 16S rRNA gene sequence. The serial number in parentheses is the GenBank login number; The number at the node is the bootstrap support; The distance scale represents the unit length of species differences.

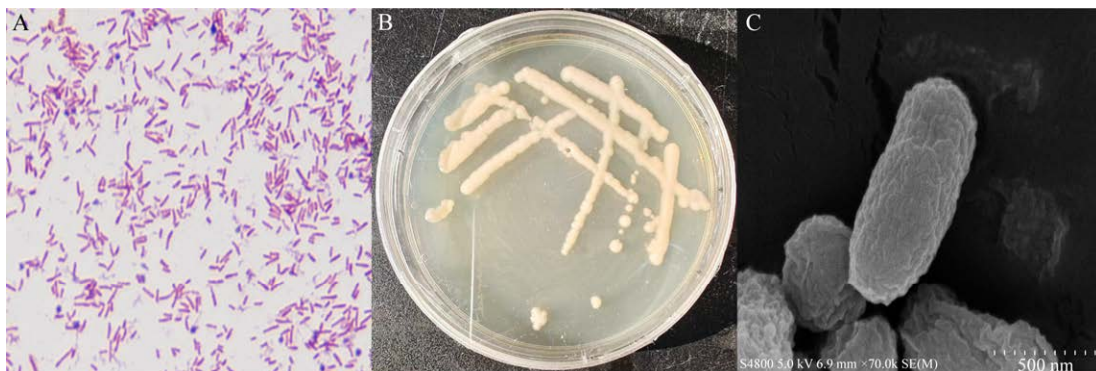


图2 菌株QD19-16的革兰氏染色(A)、菌落形态(B)及扫描电子显微镜图像(C)

Figure 2 Gram staining (A), colony morphology (B), and SEM image (C) of strain QD19-16.

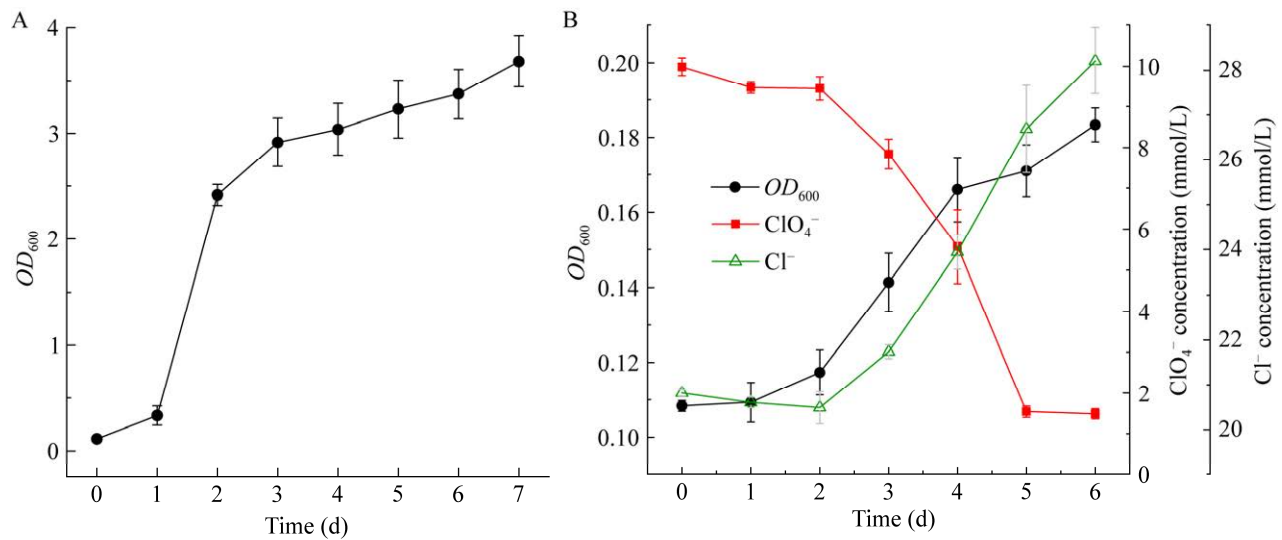


图3 菌株 QD19-16 在有氧(LB 培养基) (A)和厌氧(2106 培养基) (B)条件下的生长

Figure 3 Growth of strain QD19-16 under aerobic (LB medium) (A) and anaerobic (2106 medium) (B) conditions.

酸盐的减少并形成 7.7 mmol/L Cl⁻，并且在过程中未检测到 ClO₃⁻，这表明高氯酸盐最终被菌株 QD19-16 还原为 Cl⁻。

2.2.2 菌株 QD19-16 的最适生长条件

在 ATCC 2106 培养基中，通过设置不同的温度和 pH 值，研究了温度、pH 对细菌生长的影响。大多数高氯酸盐还原菌的最适生长温度为 28–30 °C，少部分为 35–42 °C^[31–36]，除此之外，也报道过一株嗜热菌 An10 在 40–70 °C 生长并还原 ClO₄⁻^[14]，其最适生长温度为 55–60 °C。在 25、30、37 °C 培养菌株 QD19-16，结果表明(图 4A、4B)，细菌在 25 °C 和 30 °C 生长良好，高氯酸盐在 96 h 内完全还原，而在 37 °C 的生长受到明显的抑制，高氯酸盐也没有明显的消耗。Cl⁻ 浓度变化显示(图 4C)，在 25 °C 和 30 °C 条件下，Cl⁻ 浓度增加约 10 mmol/L，与 ClO₄⁻ 还原量一致，表明 ClO₄⁻ 被完全还原为 Cl⁻，而 37 °C 条件下，Cl⁻ 浓度无变化，印证了 ClO₄⁻ 未被还原。此外，菌株 QD19-16 在 30 °C 下的生

长优于在 25 °C 下，因此其最适生长温度为 30 °C，与大多数高氯酸盐还原菌的生长温度相同。

pH 是影响细菌生长和生理功能的重要因素。对于大多数高氯酸盐还原菌来说，可以在 pH 5.0–9.0 的环境中生长，但是一般情况下，在 6.5–7.5 的 pH 范围内，微生物对高氯酸盐的还原效果最佳^[31,37–38]。分别在 pH 5.0、6.0、7.0、8.0 的条件下测试 pH 值对菌株 QD19-16 的生长和还原高氯酸盐能力的影响。使用磷酸盐缓冲液配制 2106 培养基，保持反应过程中 pH 的恒定。菌株 QD19-16 在 pH 7.0 条件下生长最好，在 pH 值 8.0 的环境下也能生长，但迟滞期较长，在 5.0 和 6.0 的 pH 下不能生长(图 4D)。菌株 QD19-16 对高氯酸盐的还原趋势与生长曲线相符合(图 4E)，在 pH 7.0 时，高氯酸盐在 96 h 内完全还原，pH 8.0 时，高氯酸盐在 144 h 完全还原，而在 pH 5.0 和 6.0 时，高氯酸盐未减少。Cl⁻ 浓度增加与 ClO₄⁻ 浓度减少趋势一致(图 4F)。结果表明，菌株 QD19-16 的最适 pH 值为 7.0。

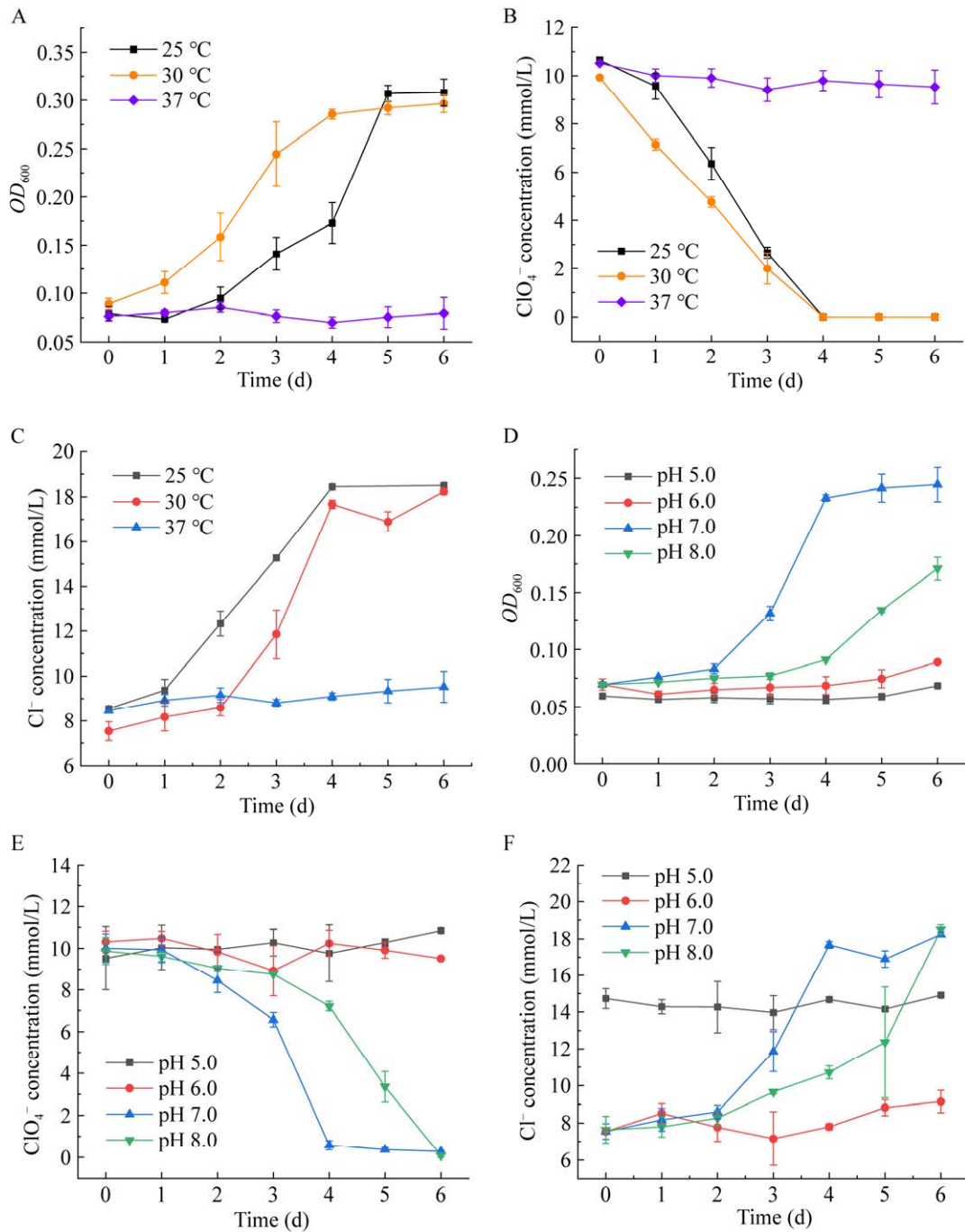


图 4 不同温度和不同 pH 对菌株 QD19-16 的生长和还原高氯酸盐的影响 A-C: 菌株 QD19-16 在不同温度中的生长以及培养基中 ClO_4^- 和 Cl^- 浓度变化; D-F: 菌株 QD19-16 在不同 pH 中的生长以及培养基中 ClO_4^- 和 Cl^- 浓度变化。

Figure 4 Effects of different temperatures and pH on the growth and perchlorate reduction of strain QD19-16. A-C: The growth of strain QD19-16 at different temperatures and the variation of ClO_4^- and Cl^- concentrations in the culture medium; D-F: The growth of strain QD19-16 at different pH and the variation of ClO_4^- and Cl^- concentrations in the culture medium.

2.2.3 菌株 QD19-16 对不同电子供体和电子受体的代谢能力

乙酸盐是高氯酸盐还原菌最常用的电子供体^[39], 菌株 QD19-16 除了能够利用乙酸盐外, 还可以使用许多不同的电子供体, 包括苯甲酸盐、丙酸盐、乳酸、酵母提取物、果糖、葡萄糖、乙醇、甲醇(图 5A、5B)。其中酵母提取物和乳酸是利用较好的电子供体。

在电子受体利用情况方面, 与大多数高氯酸盐还原菌一样^[13,16], 除了氧气和高氯酸盐外, 菌株 QD19-16 还可以利用氯酸盐和硝酸盐作为

替代电子受体(图 5C、5D)。但是在等摩尔量的高氯酸盐与硝酸盐同时存在的情况下, 菌株 QD19-16 优先还原硝酸盐, 而高氯酸盐未被还原, 氯离子浓度也无变化(图 6)。除此之外, 菌株 QD19-16 还可以利用硫酸盐和亚硫酸盐作为电子受体。

2.2.4 菌株 QD19-16 还原高氯酸盐的反应动力学参数

分别以含有 5、10、15、20 mmol/L 浓度高氯酸盐的 2106 培养基培养细菌, 10 mmol/L 乙酸钠作电子供体, 研究了菌株 QD19-16 还原不

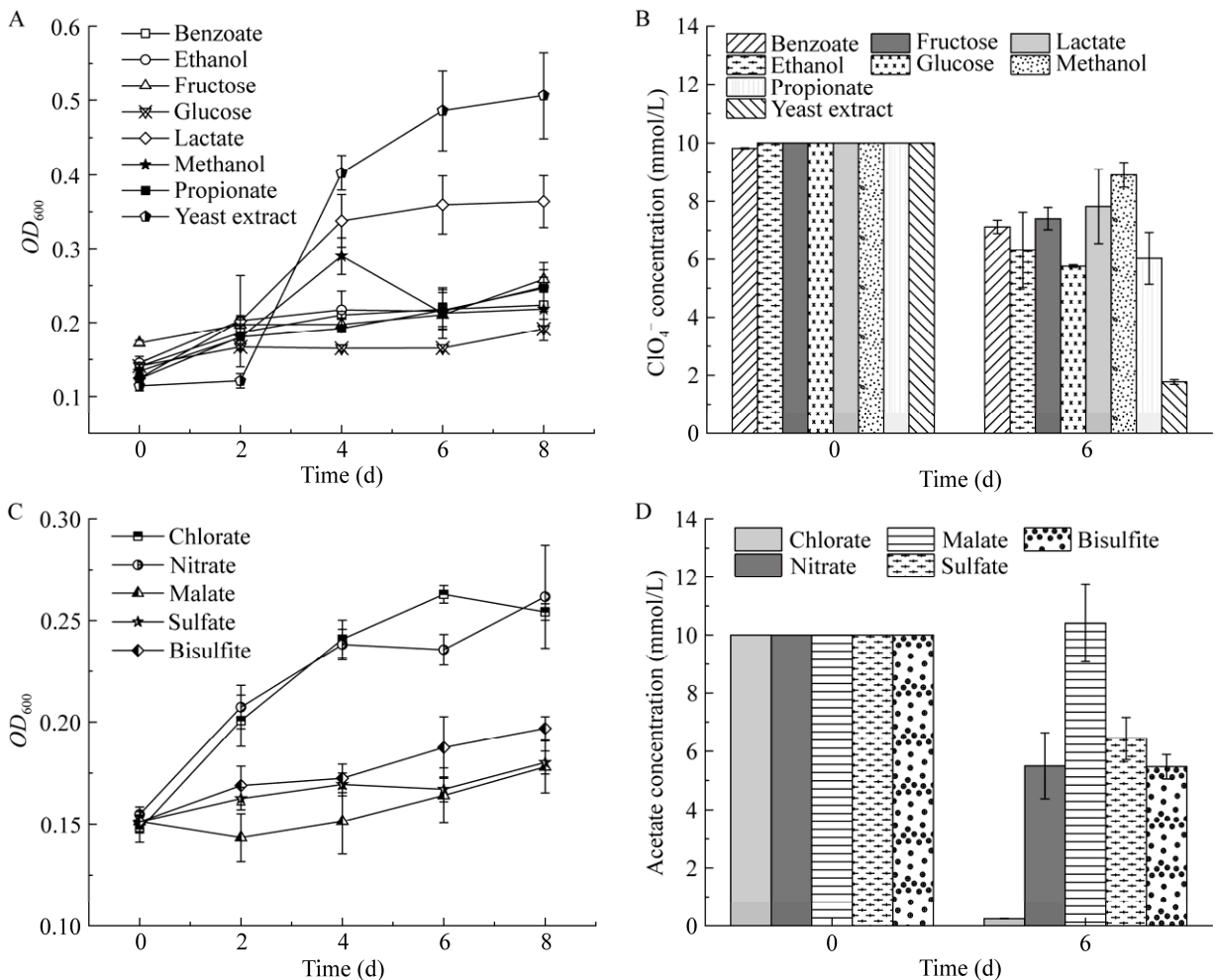


图 5 菌株 QD19-16 利用不同电子供体(A, B)和电子受体(C, D)时的生长和底物消耗

Figure 5 Growth and substrate consumption of strain QD19-16 using different electron donors and acceptors.

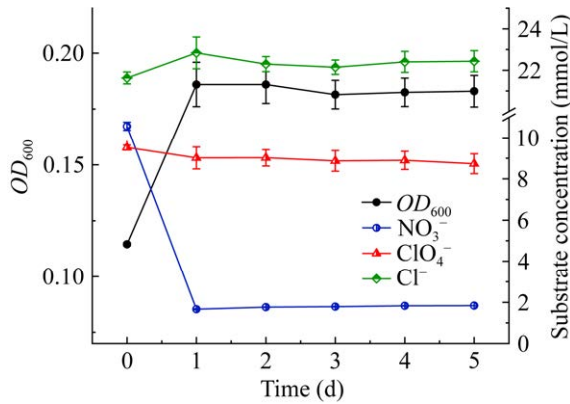


图 6 高氯酸盐和硝酸盐同时存在时菌株 QD19-16 的生长和底物消耗

Figure 6 Growth of strain QD19-16 and substrate consumption in the presence of both perchlorate and nitrate.

同浓度高氯酸盐的能力。实验结果表明(图 7), 4 个浓度高氯酸盐下的菌株 QD19-16 均正常生长, 但在 5 mmol/L 浓度下 OD_{600} 值较低, 推测可能是由于底物(ClO_4^-)浓度不足导致生长受限, 其余 3 个浓度下细菌生长的最大 OD_{600} 值一致。在 5、10、15 mmol/L 浓度下, 高氯酸盐被完全还原, 而 20 mmol/L 浓度的高氯酸盐的还原率为 64.8%, 可能是由于电子供体(乙酸钠)受限所致。 Cl^- 的增长与 ClO_4^- 的减少同步发生且变化量一致, 表明 ClO_4^- 被细菌完全还原为 Cl^- 。

以指数生长阶段的数据来计算比生长速率, 然后与 Monod 方程拟合, 得到细菌的最大比生长速率 μ_{max} 为 $0.279\ d^{-1}$ (相当于 $0.012\ h^{-1}$)

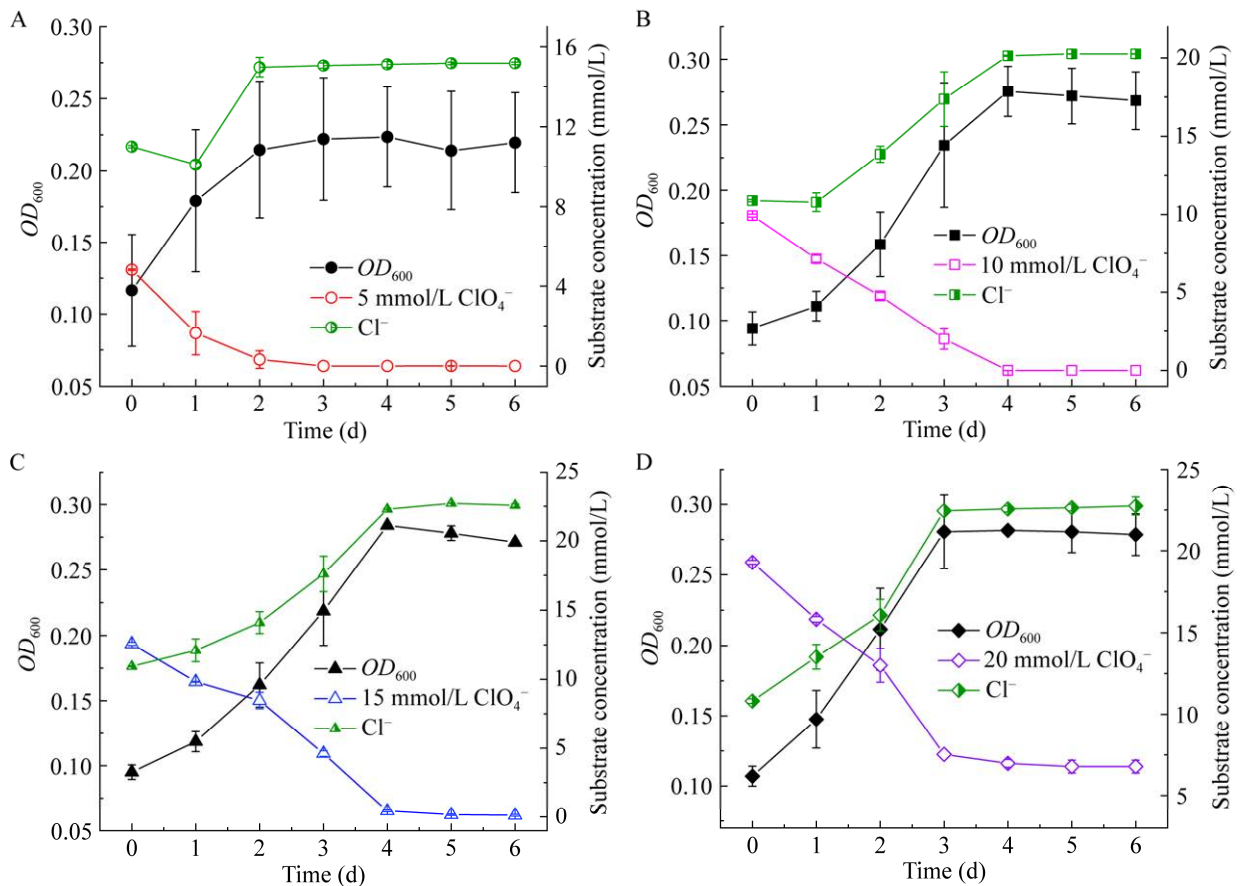


图 7 菌株 QD19-16 在不同浓度高氯酸盐中的生长和底物浓度变化

Figure 7 Growth of strain QD19-16 and substrate concentration changes in different concentrations of perchlorate.

和对高氯酸盐的半饱和常数 K_s 为 0.294 mmol/L (相当于 29.3 mg/L ClO_4^-) (图 8)。与之前报道的高氯酸盐还原菌的 μ_{\max} 和 K_s 值相比(表 1), 菌株 QD19-16 的 μ_{\max} 值较低, 表明其在厌氧条件下生

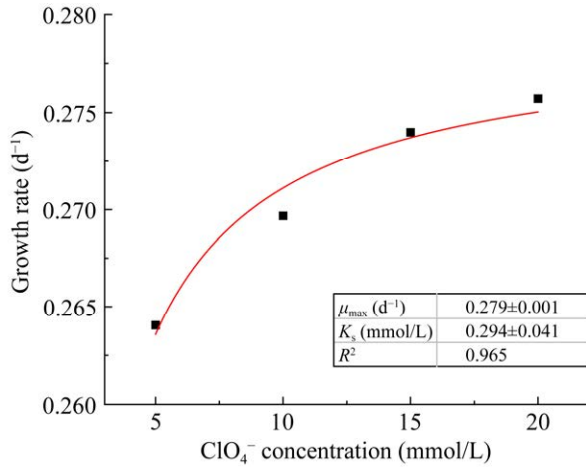


图 8 菌株 QD19-16 还原高氯酸盐的反应动力学
Figure 8 Kinetics of strain QD19-16 in reducing perchlorate.

表 1 菌株 QD19-16 以及其他高氯酸盐还原菌的高氯酸盐还原动力学参数

Table 1 Perchlorate reduction kinetic parameters for strain QD19-16 and other perchlorate reducing bacteria

Isolate	μ_{\max} (h^{-1})	K_s (mg/L)	Reference
<i>Brucella</i> sp. QD19-16	0.012±0.000 1	29.3±4.0	This study
<i>Dechlorosoma</i> sp. KJ	0.200±0.070	33.0±9.0	[40]
<i>Dechlorosoma</i> sp. PDX	0.240±0.030	12.0±4.0	[40]
<i>Azospirillum</i> sp. SN1A	0.069±0.009	2.2±2.8	[41]
<i>Azospirillum</i> sp. ABL1	0.086±0.007	4.8±0.9	[41]
<i>Dechloromonas</i> sp. INS	0.067±0.007	18.0±5.2	[41]
<i>Dechloromonas</i> sp. RC1	0.085±0.005	12.0±2.4	[41]
<i>Dechloromonas agitata</i> CKB	0.280	–	[42]
Perlace	0.070	–	[43]
GR-1	0.100	–	[23]

长缓慢, 而 K_s 值与高氯酸盐还原菌 *Dechlorosoma* sp. KJ [(33±9) mg/L]^[24]相似, 属于较高水平。高 K_s 值表明对高氯酸盐的亲合力低, 但另一方面, 高 K_s 值表明菌株对高氯酸盐的耐受浓度较高, 可以在处理高浓度高氯酸盐方面发挥有效作用。*Dechlorosoma* sp. KJ 已经被应用于处理含高氯酸盐的废水。因此, 菌株 QD19-16 也具有作为处理含高氯酸盐废水的潜力。

2.3 菌株 QD19-16 在高氯酸盐处理反应器中的应用

在反应器中接种 10%活性污泥, 进行高氯酸盐废水处理试运行, 经过 2 个周期的运行后发现(图 9), 高氯酸盐未被降解, 可能是由于活性污泥中的高氯酸盐还原菌含量较少。随后分别设置 3 个反应器 R1、R2、R3。为了增强活性污泥还原 ClO_4^- 的能力, 加快反应器启动速度, 向 3 个反应器 R1、R2 和 R3 中接种菌株 QD19-16 的纯培养菌液进行生物强化, 接种量分别为 0.05%、0.10%和 0.10%, 搅拌速度分别设置为 90、90 和 180 r/min。

在反应器运行初期(图 10, C1-C3 周期), 反应器 R2 对 ClO_4^- 去除能力最强, 可以将进水

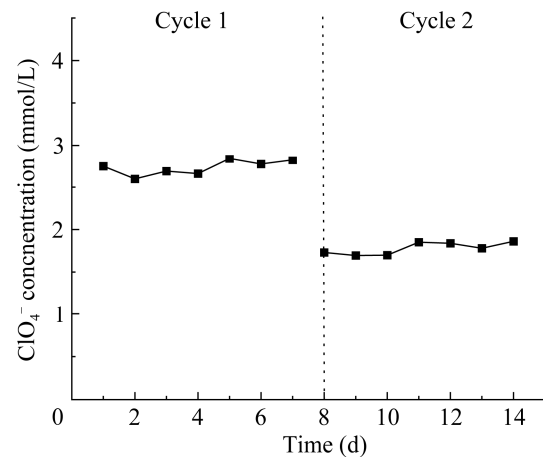


图 9 高氯酸盐废水处理反应器试运行
Figure 9 Trial operation of the perchlorate wastewater treatment reactor.

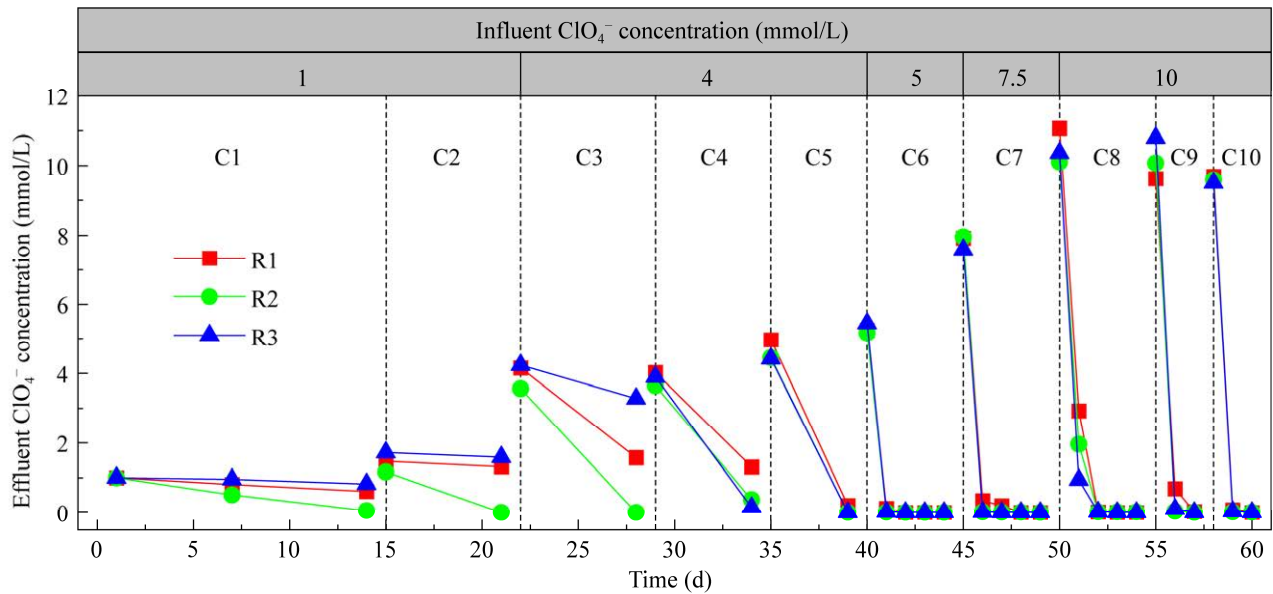


图 10 高氯酸盐废水处理反应器的启动 R1、R2、R3 为 3 个反应器；C1–C10 为反应器驯化的 10 个批次；1.0、4.0、5.0、7.5、10.0 为随着反应器驯化逐渐提高的高氯酸盐浓度，单位为 mmol/L。

Figure 10 Startup of the perchlorate wastewater treatment reactor. R1, R2, and R3 are three reactors; C1–C10 are 10 batches of reactor acclimation; 1.0, 4.0, 5.0, 7.5, and 10.0 are the gradually increasing concentrations of perchlorate as the reactor acclimates, with the unit being mmol/L.

中的 ClO_4^- 完全还原，而 R1 和 R3 中 ClO_4^- 的去除率则较低。反应器 R2 的高氯酸盐去除率高于反应器 R1，是由于 R2 的菌液接种量高于 R1，这表明菌株 QD19-16 可以在高氯酸盐废水处理中发挥其高氯酸盐还原能力。反应器 R3 的高氯酸盐还原率较低，是由于其搅拌速度相对于其他 2 个反应器较高，水中溶解氧含量高，抑制了高氯酸盐的厌氧还原。

随着活性污泥驯化的进行(C4–C10 周期)，3 个反应器的高氯酸盐还原能力趋于一致，均实现较高的高氯酸盐还原率。

3 讨论

高氯酸盐还原细菌在自然环境中广泛存在，迄今为止，大多数高氯酸盐还原菌株分离自被高氯酸盐污染的环境^[1,13,44]。通过使用针对 16S rRNA 基因的 DNA 探针^[45-46]和蛋白质探针^[47]，

证明了同一栖息环境中高氯酸盐还原菌的多样性。我们曾使用一组特异性引物^[22]从污泥样品中扩增了 16S rRNA 基因的特殊片段，并检测到同时存在 3 种类型的高氯酸盐还原菌，这表明高氯酸盐还原菌在自然环境中普遍存在且具有多样性。然而，只有菌株 QD19-16 被分离和纯化，这表明许多潜在的高氯酸盐还原菌在富集和分离过程中丢失。同样地，Melnyk 等^[18]对已报道的 DPRB 进行系统发育分析发现，虽然高氯酸盐还原作用广泛分布在变形菌门的 4 个不同类别中，但这些类别中分离菌株的分类范围很窄；文章认为，分离和富集方法可能偏向于某些快速生长的 DPRB，从而导致筛选出的菌株聚集于部分分支。在 *Alphaproteobacteria* 中，高氯酸盐还原菌仅在红螺菌(*Rhodospirillaceae*)中被报道^[18]，菌株 QD19-16 是目前布鲁氏菌属中第一株被报道具有高氯酸盐还原能力的细菌。

菌株 QD19-16 作为一株兼性厌氧细菌,能够在有氧和厌氧条件下生长,在以氧为电子受体的有机培养基中的有氧生长速率显著高于以高氯酸盐为电子受体的厌氧生长速率(图 3),并且在厌氧条件下高氯酸盐的消耗与细菌生长同步,表明菌株 QD19-16 的厌氧生长与其他高氯酸盐还原菌一样由高氯酸盐呼吸途径提供能量^[44]。菌株 QD19-16 在 30 °C、pH 7.0 的条件下生长优良,具有最佳的高氯酸盐还原效率(图 4)。此外,与大多数高氯酸盐还原菌一样^[16],菌株 QD19-16 显示出多样的电子供体、受体利用能力(图 5)。

与其他高氯酸盐还原菌一样,菌株 QD19-16 也能够利用硝酸盐。但是在高氯酸盐与硝酸盐同时存在的情况下,菌株 QD19-16 优先还原硝酸盐,而高氯酸盐未被还原(图 6)。这与菌株脱氯菌(*Dechlorosoma suillum*)^[33]、伯克氏菌(*Burkholderia* sp.) AG^[31]情况一致,但与脱氯单胞菌(*Dechloromonas agitata*) CKB^[42]不同,硝酸盐对其高氯酸盐还原无抑制作用。

菌株 QD19-16 的最大比生长速率为 0.012 h⁻¹, 小于高氯酸盐还原菌 GR-1 (0.100 h⁻¹)和 perclace (0.070 h⁻¹), 也远小于菌株 CKB、KJ、PDX (0.280、0.200、0.240 h⁻¹) (表 1)。菌株 QD19-16 的半饱和常数 K_s 与 DPRB 菌株 KJ、INS、RC1 等处于同一水平(12–33 mg/L), 高于从受高氯酸盐污染的场地中分离的 DPRB 菌株 SN1A 和 ABL1 (2.2 mg/L 和 4.8 mg/L) (表 1)。*Dechlorosoma* sp. KJ 作为较早发现的高氯酸盐还原细菌,已经在工程化的填充床式反应器(packed bed reactor, PBR)中用于去除地下水中的高氯酸盐^[24]。在用于高氯酸盐废水处理的 SBR 反应器运行初期,向反应器中接种菌株 QD19-16 的纯培养菌液,实验结果表明,菌株 QD19-16 可以在高氯酸盐废水处理中发挥其高氯酸盐还原能力,提高反应器的高氯酸盐还原率。

4 结论

本研究成功从山东省青岛市泥布湾污水处理厂的活性污泥中分离和鉴定出一株新的高氯酸盐还原细菌 *Brucella* sp. QD19-16, 是布鲁氏菌属中第一株报道的高氯酸盐还原菌。菌株 QD19-16 为革兰氏阴性、短杆状、兼性厌氧菌,表现出明显的高氯酸盐还原能力,其最适生长温度为 30 °C、最适 pH 7.0。同时,菌株 QD19-16 表现出代谢多样性,其中酵母提取物和乳酸是生长利用较好的电子供体,而氧气和硝酸盐、硫酸盐也可用作电子受体,但硝酸盐会抑制其对高氯酸盐的还原。对菌株 QD19-16 的高氯酸盐还原动力学分析表明,菌株 QD19-16 可以耐受较高浓度的高氯酸盐,具有作为厌氧生物反应器中高氯酸盐还原活性污泥微生物菌群基石的潜力。*Brucella* sp. QD19-16 的发现扩展了高氯酸盐还原菌在系统发育中的分布,对高氯酸盐还原菌的研究具有重大意义,为高氯酸盐去除工艺的研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 闻自强, 郑雯静, 沈昊宇, 胡美琴. 高氯酸盐的危害、水污染现状与去除技术研究进展[J]. 环境化学, 2019, 38(1): 209-216.
WEN ZQ, ZHENG WJ, SHEN HY, HU MQ. Research progress on the hazards, water pollution status and removal technique of perchlorate[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(1): 209-216 (in Chinese).
- [2] PEARCE EN. Endocrine disruptors and thyroid health[J]. Endocrine Practice: Official Journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists, 2024, 30(2): 172-176.
- [3] 宁钧宇, 肖文, 魏洪鑫, 毛伟峰, 张磊, 李国君. 高氯酸盐的危害评估[J]. 毒理学杂志, 2021, 35(3): 198-206, 214.
NING JY, XIAO W, WEI HX, MAO WF, ZHANG L, LI GJ. Hazard assessment of the perchlorate[J]. Journal of Toxicology, 2021, 35(3): 198-206, 214 (in Chinese).
- [4] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 生活饮用水卫生标准: GB 5749—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
Standardization Administration of the People's Republic of China. Standards for drinking water quality: GB 5749—2022[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022 (in Chinese).

- [5] 宗诗淼, 雍莉, 江阳, 秦岭, 孙莉, 余小平, 郭虹雨. 岷江、嘉陵江流域饮用水中高氯酸盐的污染水平及健康风险评估[J]. 预防医学情报杂志, 2024, 40(4): 424-429.
ZONG SM, YONG L, JIANG Y, QIN L, SUN L, YU XP, GUO HY. Pollution levels and health risk assessment of perchlorate in drinking water in the Minjiang and Jialing River Basins[J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2024, 40(4): 424-429 (in Chinese).
- [6] 黄彬红. 婴幼儿配方奶粉中氯酸盐和高氯酸盐污染情况的调查分析[J]. 中国乳品工业, 2024, 52(3): 30-35.
HUANG BH. Investigation analysis of pollution of chlorate and perchlorate in infant formula[J]. China Dairy Industry, 2024, 52(3): 30-35 (in Chinese).
- [7] 陈东, 李倩, 刘平, 陈忠辉, 谢响, 许秀丽, 张晶, 张峰. 超高效液相色谱-串联质谱法测定饮料中高氯酸盐和氯酸盐[J]. 卫生研究, 2024, 53(1): 102-108.
CHEN D, LI Q, LIU P, CHEN ZH, XIE Y, XU XL, ZHANG J, ZHANG F. Determination of perchlorate and chlorate in drinks by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Hygiene Research, 2024, 53(1): 102-108 (in Chinese).
- [8] 冷安芹, 袁悦, 薛莹, 雍莉. 2022年四川省市售蔬果中高氯酸盐和氯酸盐检测结果分析[J]. 预防医学情报杂志, 2023, 39(12): 1508-1512, 1519.
LENG AQ, YUAN Y, XUE Y, YONG L. Test results of perchlorate and chlorate in the vegetables and fruits in Sichuan Province[J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2023, 39(12): 1508-1512, 1519 (in Chinese).
- [9] 杨青, 张雅静, 郑丹, 张仙, 陶明芳, 夏珍珍. 基于近红外光谱的茶叶高氯酸盐污染水平研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(17): 95-101.
YANG Q, ZHANG YJ, ZHENG D, ZHANG X, TAO MF, XIA ZZ. Research on perchlorate contamination levels in tea based on near-infrared spectroscopy[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(17): 95-101 (in Chinese).
- [10] HU JP, XIAN YP, WU YL, CHEN RQ, DONG H, HOU XC, LIANG M, WANG B, WANG L. Perchlorate occurrence in foodstuffs and water: analytical methods and techniques for removal from water: a review[J]. Food Chemistry, 2021, 360: 130146.
- [11] 谭心. 改性农作物秸秆吸附联用生物还原去除水体中高氯酸根的效果研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2013.
TAN X. Removal of perchlorate by modified wheat straw adsorption and bio-reduction[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2013 (in Chinese).
- [12] LV PL, JIA C, WEI CH, ZHAO HP, CHEN R. Efficient perchlorate reduction in microaerobic environment facilitated by partner methane oxidizers[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 466: 133683.
- [13] COATES JD, ACHENBACH LA. Microbial perchlorate reduction: rocket-fuelled metabolism[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2: 569-580.
- [14] BALK M, van GELDER T, WEELINK SA, STAMS AJM. (Per)chlorate reduction by the thermophilic bacterium *Moorella perchloratireducens* sp. nov., isolated from underground gas storage[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(2): 403-409.
- [15] BALK M, MEHBOOB F, VAN GELDER AH, RIJPSTRA WIC, DAMSTÉ JSS, STAMS AJM. (Per)chlorate reduction by an acetogenic bacterium, *Sporomusa* sp., isolated from an underground gas storage[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(2): 595-603.
- [16] LIEBENSTEINER MG, OOSTERKAMP MJ, STAMS AJM. Microbial respiration with chlorine oxyanions: diversity and physiological and biochemical properties of chlorate- and perchlorate-reducing microorganisms[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2016, 1365(1): 59-72.
- [17] VEGA M, NERENBERG R, VARGAS IT. Perchlorate contamination in Chile: legacy, challenges, and potential solutions[J]. Environmental Research, 2018, 164: 316-326.
- [18] MELNYK RA, COATES JD. The perchlorate reduction genomic island: mechanisms and pathways of evolution by horizontal gene transfer[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 862.
- [19] MELNYK RA, ENGELBREKTSON A, CLARK IC, CARLSON HK, BYRNE-BAILEY K, COATES JD. Identification of a perchlorate reduction genomic island with novel regulatory and metabolic genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(20): 7401-7404.
- [20] MELNYK RA, CLARK IC, LIAO A, COATES JD. Transposon and deletion mutagenesis of genes involved in perchlorate reduction in *Azospira suillum* PS[J]. mBio, 2013, 5(1): e00769-13.
- [21] BARNUM TP, FIGUEROA IA, CARLSTRÖM CI, LUCAS LN, ENGELBREKTSON AL, COATES JD. Genome-resolved metagenomics identifies genetic mobility, metabolic interactions, and unexpected diversity in perchlorate-reducing communities[J]. The ISME Journal, 2018, 12: 1568-1581.
- [22] WANG HM, HU GR, LUO WY, LI FL. The horizontal gene transfer of perchlorate reduction genomic island in three bacteria from an ecological niche[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 108(1): 22.
- [23] RIKKEN GB, KROON AGM, van GINKEL CG. Transformation of (per)chlorate into chloride by a newly isolated bacterium: reduction and dismutation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 45(3): 420-426.
- [24] HATZINGER PB. Perchlorate biodegradation for water treatment[J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(11): 239A-247A.
- [25] MADEIRA F, PEARCE M, TIVEY ARN, BASUTKAR P, LEE J, EDBALI O, MADHUSOODANAN N, KOLESNIKOV A, LOPEZ R. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(W1): W276-W279.
- [26] TALAVERA G, CASTRESANA J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments[J]. Systematic Biology, 2007, 56(4): 564-577.
- [27] KALYAANAMOORTHY S, MINH BQ, WONG TKF, von HAESLER A, JERMIIN LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates[J]. Nature Methods, 2017, 14: 587-589.
- [28] TRIFINOPOULOS J, NGUYEN LT, von HAESLER A, MINH BQ. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic

- tool for maximum likelihood analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W232-W235.
- [29] HOANG DT, CHERNOMOR O, von HAESLER A, MINH BQ, VINH LS. UFBBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(2): 518-522.
- [30] CARLSTRÖM CI, LOUVEY DE, WANG OW, ENGELBREKTSON A, CLARK I, LUCAS LN, SOMASEKHAR PY, COATES JD. Phenotypic and genotypic description of *Sedimenticola selenitireducens* strain CUZ, a marine (per)chlorate-respiring gammaproteobacterium, and its close relative the chlorate-respiring *Sedimenticola* strain NSS[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(8): 2717-2726.
- [31] GHOSH A, PAKSHIRAJAN K, GHOSH PK, SAHOO NK. Perchlorate degradation using an indigenous microbial consortium predominantly *Burkholderia* sp.[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 187(1/2/3): 133-139.
- [32] JU XM, SIERRA-ALVAREZ R, FIELD JA, BYRNES DJ, BENTLEY H, BENTLEY R. Microbial perchlorate reduction with elemental sulfur and other inorganic electron donors[J]. *Chemosphere*, 2008, 71(1): 114-122.
- [33] CHAUDHURI SK, O'CONNOR SM, GUSTAVSON RL, ACHENBACH LA, COATES JD. Environmental factors that control microbial perchlorate reduction[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4425-4430.
- [34] 钱慧静, 奚胜兰, 何平, 徐新华. 生物法降解高氯酸盐及其优化研究[J]. *环境科学*, 2009, 30(5): 1402-1407.
QIAN HJ, XI SL, HE P, XU XH. Biological reduction of perchlorate and optimization[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(5): 1402-1407 (in Chinese).
- [35] WU DL, HE P, XU XH, ZHOU M, ZHANG Z, HOUDA ZD. The effect of various reaction parameters on bioremediation of perchlorate-contaminated water[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 150(2): 419-423.
- [36] 吴春笃, 郭静, 许小红. 高氯酸盐降解菌的分离鉴定及特性研究[J]. *生态环境学报*, 2010, 19(2): 281-285.
WU CD, GUO J, XU XH. Isolation and identification of perchlorate-degrading bacteria and its characteristics[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(2): 281-285 (in Chinese).
- [37] YU XY, AMRHEIN C, DESHUSSES MA, MATSUMOTO MR. Perchlorate reduction by autotrophic bacteria in the presence of zero-valent iron[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(4): 1328-1334.
- [38] WANG C, LIPPINCOTT L, MENG XG. Kinetics of biological perchlorate reduction and pH effect[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 153(1/2): 663-669.
- [39] COATES JD, MICHAELIDOU U, BRUCE RA, O'CONNOR SM, CRESPI JN, ACHENBACH LA. Ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5234-5241.
- [40] LOGAN BE, ZHANG H, MULVANEY P, MILNER MG, HEAD IM, UNZ RF. Kinetics of perchlorate- and chlorate-respiring bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2499-2506.
- [41] WALLER AS, COX EE, EDWARDS EA. Perchlorate-reducing microorganisms isolated from contaminated sites[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(5): 517-527.
- [42] BRUCE RA, ACHENBACH LA, COATES JD. Reduction of (per)chlorate by a novel organism isolated from paper mill waste[J]. *Environmental Microbiology*, 1999, 1(4): 319-329.
- [43] GIBLIN T, FRANKENBERGER WT Jr. Perchlorate and nitrate reductase activity in the perchlorate-respiring bacterium *perclace*[J]. *Microbiological Research*, 2001, 156(4): 311-315.
- [44] YOUNGBLUT MD, WANG OW, BARNUM TP, COATES JD. (per)chlorate in biology on earth and beyond[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2016, 70: 435-457.
- [45] ZHANG H, LOGAN BE, REGAN JM, ACHENBACH LA, BRUNS MA. Molecular assessment of inoculated and indigenous bacteria in biofilms from a pilot-scale perchlorate-reducing bioreactor[J]. *Microbial Ecology*, 2005, 49(3): 388-398.
- [46] VIGLIOTTA G, MOTTA O, GUARINO F, IANNECE P, PROTO A. Assessment of perchlorate-reducing bacteria in a highly polluted river[J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2010, 213(6): 437-443.
- [47] BANSAL R, DEOBALD LA, CRAWFORD RL, PASZCZYNSKI AJ. Proteomic detection of proteins involved in perchlorate and chlorate metabolism[J]. *Biodegradation*, 2009, 20(5): 603-620.