

研究报告

耐冷菌水生从毛单胞菌(*Comamonas aquatilis*) NY3 的高效脱氮特性及其 Cu²⁺耐受性

尹梦圆, 刘晓雨, 陈伟伟, 袁玉兰, 何腾霞*, 熊玉芬, 雷洪雪, 杨露

贵州大学 生命科学学院 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

尹梦圆, 刘晓雨, 陈伟伟, 袁玉兰, 何腾霞, 熊玉芬, 雷洪雪, 杨露. 耐冷菌水生从毛单胞菌(*Comamonas aquatilis*) NY3 的高效脱氮特性及其 Cu²⁺耐受性[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 134-149.

YIN Mengyuan, LIU Xiaoyu, CHEN Weiwei, YUAN Yulan, HE Tengxia, XIONG Yufen, LEI Hongxue, YANG Lu. Nitrogen removal characteristics and Cu²⁺ tolerance of psychrotolerant *Comamonas aquatilis* NY3[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 134-149.

摘要:【背景】低温条件下含重金属废水的生物脱氮处理面临严峻挑战, 其中铜离子(Cu²⁺)会显著影响微生物的脱氮效率, 目前关于耐冷脱氮菌在 Cu²⁺胁迫下的脱氮特性及其耐受机制的研究尚不充分。【目的】探究耐冷脱氮菌水生从毛单胞菌(*Comamonas aquatilis*) NY3 的脱氮特性和 Cu²⁺耐受性, 为低温含 Cu²⁺废水的生物处理提供理论指导。【方法】通过批量试验研究了不同浓度 Cu²⁺对菌株 NY3 脱氮效率的影响, 在高浓度 Cu²⁺下研究该菌株转化无机氮过程中的电子传递系统活性与氮代谢关键酶的活性变化, 同时测定外源硫化物添加是否有助于缓解 Cu²⁺对该菌株生长和代谢的抑制。【结果】Cu²⁺显著影响了菌株 NY3 的脱氮能力, 当不添加 Cu²⁺时, 菌株 NY3 对铵态氮、硝态氮和亚硝态氮的去除率分别为 99.98%、100.00%、100.00%, 添加 8.0 mg/L Cu²⁺后, 其去除率分别降低至 51.56%、55.70%、0, 同时, 电子传递系统活性也从 0.306、0.115、0.124 μg/(g·min) 降至 0, 氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO)和硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)活性分别从 0.260 U/mg 和 0.610 U/mg 降低到 0.250 U/mg 和 0.260 U/mg。添加 45.0 mg/L NaHS 和 50.0 mg/L Na₂S 后, 可显著缓解菌株 NY3 在 Cu²⁺胁迫下的生长和代谢抑制作用, 145 mg/L NaHS 使菌株对铵态氮和硝态氮的去除率分别提高了 48.17%和 70.94%。【结论】菌株 NY3 对 Cu²⁺胁迫具有一定的耐受性, 过量 Cu²⁺对菌株 NY3 的异养硝化和好氧反硝化脱氮有抑制作用, 可通过添加适量的外源硫缓解 Cu²⁺对菌株 NY3 的抑制强度, 从而增加 Cu²⁺胁迫下的脱氮效率, 可为低温环境下采用微生物

资助项目: 国家自然科学基金(42167019); 贵州大学科研创新团队项目(贵大科创团[2024]06号); 贵州省研究生教育教学改革项目(2024YJSJGXM017)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42167019), the Scientific Research and Innovation Team Program of Guizhou University ([2024]06), and the Postgraduate Education and Teaching Reform Program of Guizhou Province (2024YJSJGXM017).

*Corresponding author. E-mail: txhe@gzu.edu.cn

Received: 2025-04-22; Accepted: 2025-06-29; Published online: 2025-07-28

处理含有 Cu²⁺的氮污染废水提供理论依据。

关键词: 生物脱氮; 水生从毛单胞菌; 铜离子耐受性; 外源硫化物

Nitrogen removal characteristics and Cu²⁺ tolerance of psychrotolerant *Comamonas aquatilis* NY3

YIN Mengyuan, LIU Xiaoyu, CHEN Weiwei, YUAN Yulan, HE Tengxia*, XIONG Yufen, LEI Hongxue, YANG Lu

The Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: [Background] Bionitrification of wastewater containing heavy metals under low temperature conditions is facing severe challenges. Copper ions (Cu²⁺) can significantly affect the denitrification efficiency of microorganisms. At present, the research remains limited regarding the denitrification characteristics and tolerance mechanism of psychrotolerant denitrifiers under Cu²⁺ stress. **[Objective]** To investigate the denitrification characteristics and Cu²⁺ tolerance of *Comamonas aquatilis* NY3, providing theoretical guidance for the biological treatment of low temperature wastewater containing Cu²⁺. **[Methods]** We conducted batch experiments to study the effects of different concentrations of Cu²⁺ on the nitrogen removal efficiency of strain NY3. The activities of the electron transfer system and the key enzymes in nitrogen metabolism during the transformation of inorganic nitrogen by strain NY3 were studied under high-concentration Cu²⁺. In addition, we determined whether exogenous sulphide addition helped to alleviate the inhibition on the growth and metabolism of this strain by Cu²⁺. **[Results]** Cu²⁺ significantly affected the nitrogen removal ability of strain NY3. When Cu²⁺ was not added, the removal rates of ammonium nitrogen, nitrate nitrogen, and nitrite nitrogen by strain NY3 were 99.98%, 100.00%, and 100.00%, respectively. After the addition of 8.0 mg/L Cu²⁺, the removal rates decreased to 51.56%, 55.70%, and 0, respectively. At the same time, the activity of the electron transfer system also decreased from 0.306, 0.115, and 0.124 μg/(g·min) to 0. The activities of ammonia monooxygenase and nitrate reductase decreased from 0.260 U/mg and 0.610 U/mg to 0.250 U/mg and 0.260 U/mg, respectively. The addition of 45.0 mg/L NaHS and 50.0 mg/L Na₂S significantly alleviated the inhibition of Cu²⁺ stress on the growth and metabolism of strain NY3. Specifically, 145 mg/L NaHS increased the removal rates of ammonium nitrogen and nitrate nitrogen by 48.17% and 70.94%, respectively. **[Conclusion]** Strain NY3 has certain tolerance to Cu²⁺ stress. Excessive Cu²⁺ has inhibitory effects on heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of strain NY3. The inhibition of strain NY3 by Cu²⁺ can be alleviated by the addition of appropriate amounts of exogenous sulphur, which thereby increases the denitrification efficiency under Cu²⁺ stress. The findings provide a theoretical basis for the treatment of nitrogen-contaminated wastewater containing Cu²⁺ by microorganisms in a low-temperature environment.

Keywords: bionitrification; *Comamonas aquatilis*; copper ion tolerance; exogenous sulfides

随着城市化和工业化进程的加快,水体中氮污染日益严峻^[1]。未经有效处理的含氮废水排放到河流或海洋中会引起水体富营养化,导致鱼类和水生动物死亡,并干扰氮的生物地球化学循环,甚至威胁人体健康,因此氮污染废水的处理至关重要^[2-3]。生物脱氮技术因其环境友好、成本低廉、无二次污染等优势,已成为治理水体无机氮污染(包括铵态氮、硝态氮和亚硝态氮)的重要方法^[4]。然而,脱氮微生物对环境条件敏感,尤其是温度对脱氮效率的影响较大。常规脱氮微生物的最适温度范围为 28–37 °C^[5],而随着温度降低,微生物的生长和酶活性受到的抑制也逐渐增强,导致污染物降解效率持续下降。研究表明,当温度降低至 10 °C 以下时,降解效率较最适温度会降低 50%以上^[6]。耐冷微生物是一类能够耐受较低温度,在低温环境下可正常生长与代谢的微生物,是开发低温废水处理技术的理想菌种资源。例如假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) NY3^[4]、简单芽孢杆菌(*Bacillus simplex*) H-b^[7]、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) Y-12、微杆菌(*Microbacterium* sp.) SFA13^[8]等可在低温环境下(5–15 °C)正常生长代谢,是低温条件下污染物处理的重要菌种资源。

铜离子(Cu^{2+})作为微生物生长和代谢所必需的微量元素,可作为辅助因子参与微生物体内多种关键酶的催化反应,促进电子传递链中氧分子的还原,从而增强细胞的氧化磷酸化^[9-10]。然而 Cu^{2+} 会阻碍脱氮微生物的生存和代谢,如改变硝化和反硝化菌的菌群丰度,抑制反硝化酶和电子传递系统的活性,最终降低生物脱氮效率^[11]。据报道,电镀废水、蚀刻漂洗废水、锂离子电池生产废水及光伏蚀刻废水中均面临高浓度的重金属 Cu^{2+} 和氨氮污染,如半导体行业废水中 Cu^{2+} 浓度高达 5–100 mg/L,矿山开采和冶炼排放的废水中铜浓度达到 50–1 550 mg/L^[12],而这类废水往往伴随高浓度的氨氮污染,其浓度高达 40–380 mg/L^[12-13],此类废水对传统生物脱

氮工艺构成严峻挑战。研究表明, Cu^{2+} 对硝化反硝化功能菌群的氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO)活性具有浓度依赖性抑制作用,在 Cu^{2+} 浓度高于 5 mg/L 的条件下,AMO 活性通常下降超过 70%,脱氮效率随之显著衰减^[14]。更复杂的是,废水中高浓度的 Cu^{2+} 与 NH_3 形成的 $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ 络合物会阻碍化学沉淀法对氨氮的去除^[15],因此开发兼具 Cu^{2+} 抗性、脱氮功能稳定的功能菌株,成为实现高负荷重金属-氨氮废水绿色处理的重要途径之一。

目前,有关缓解 Cu^{2+} 对微生物抑制作用的研究主要聚焦在微生物内源抗性调控、外源干预及环境因子优化三方面。微生物内源抗性调控是通过微生物自身的强化机制进行,部分微生物通过携带铜抗性基因(如 *cop* 操纵子、*cus* 系统)主动外排或区室化隔离 Cu^{2+} ^[16];其次,微生物通过分泌富含多糖、蛋白质及核酸的胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)形成生物膜,其表面负电荷基团(如羧基、磷酸基)可高效吸附并络合 Cu^{2+} ,降低其对微生物的毒害作用^[17];微生物还能通过内源性合成金属硫蛋白和谷胱甘肽来应对铜胁迫,这两种物质均能与 Cu^{2+} 结合,从而维持细胞内环境的稳定^[18]。外源干预主要是通过添加化学试剂如 EDTA 等螯合剂的配位作用,降低游离 Cu^{2+} 浓度^[8];抗坏血酸(维生素 C)、硫代硫酸钠等抗氧化剂可直接清除 ROS,阻断 Cu^{2+} 诱导的氧化损伤级联反应^[19];补充碳源、氮源等营养成分促进微生物能量代谢,缓解 Cu^{2+} 对微生物的抑制作用。而调节 pH、添加生物炭、氧化石墨烯等吸附材料可以优化环境因子,减少 Cu^{2+} 的有效浓度,减轻其对微生物的毒害作用。另外,有研究指出硫化物的添加可有效减缓 Cu^{2+} 的毒害作用来保护微生物免受 Cu^{2+} 的危害^[17,20-21],但已有硫化物- Cu^{2+} 互作研究多聚焦常温菌(如大肠杆菌、假单胞菌)。在低温环境下,硫化物的溶解度通常升高,并且相较于常温,低温下菌株的膜流动性、酶活性及代谢通路具有显著差异,这些因

素都可能影响硫化物在低温下的解毒机制及其对微生物生理的效应。此外,前人研究多关注硫化物对 Cu²⁺的化学沉淀作用,忽视其对微生物氮代谢关键酶(如 AMO、NR)活性的调控。因此,系统研究耐冷脱氮菌在 Cu²⁺胁迫下的脱氮特性及硫化物对其减毒效应的具体机制(尤其是对氮代谢关键酶活性的影响),将填补低温、Cu²⁺、硫化物多因素交互作用下微生物脱氮机理认知的空白,对于含铜废水中生物脱氮技术的开发具有重要的理论和应用价值。

本研究以实验室前期分离筛选获得的耐冷高效脱氮菌水生丛毛单胞菌(*Comamonas aquatilis*) NY3^[22]为研究对象,通过批量试验研究不同 Cu²⁺浓度对菌株 NY3 脱氮效率的影响,在高浓度 Cu²⁺下,研究该菌株转化无机氮过程中的电子传递系统活性与氮代谢相关酶的活性变化,同时测定高浓度 Cu²⁺胁迫下,添加外源硫化物对该菌株脱氮效率的影响。本研究通过量化低温条件下硫化物投加量-Cu²⁺毒性-脱氮效率及关键酶活性的剂量效应关系,旨在阐明硫化物对耐冷脱氮菌的减毒机制及其对氮代谢的影响,为低温含铜-氨氮工业废水的生物处理提供关键的理论依据与技术储备。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

本研究所采用的菌株 *Comamonas aquatilis* NY3 是实验室前期分离筛选所保存的耐冷脱氮菌株^[22],其在 0-25 °C 范围内能生长和代谢,并且最佳脱氮温度为 15 °C。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L)^[23]: 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 10.0, pH 8.0 (固体培养基另加入 1.8%的琼脂)。该培养基用于菌株的活化及扩大培养。

硝化培养基(g/L)^[24]: C₄H₄Na₂O₄ 2.026, (NH₄)₂SO₄ 0.236, CaCl₂ 0.014, K₂HPO₄ 5.590, KH₂PO₄ 0.513, Fe₂(SO₄)₃ 0.009, MgSO₄ 0.040,

pH 8.0。该培养基用于测定菌株的异养硝化能力。

反硝化培养基(g/L)^[24]: C₄H₄Na₂O₄ 2.026, KNO₃ 0.361/NaNO₂ 0.250, CaCl₂ 0.014, K₂HPO₄ 5.590, KH₂PO₄ 0.513, Fe₂(SO₄)₃ 0.009, MgSO₄ 0.040, pH 8.0。该培养基用于测定菌株的好氧反硝化能力。

1.3 主要试剂和仪器

BCA 蛋白浓度测定试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;碘硝基四唑紫(iodine nitrotetrazole violet, INT),上海麦克林生化科技股份有限公司。恒温培养振荡箱,上海智城分析仪器制造有限公司;紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;超声细胞破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技公司;高压灭菌锅,致微(厦门)仪器有限公司。

1.4 Cu²⁺对菌株 NY3 脱氮特性的检测

实验室前期通过批量的单因素试验确定了菌株 NY3 脱氮的最佳条件:温度 15 °C、pH 8.0、C/N=15、初始接菌种量为 0.5×10⁸ CFU (细菌密度,用 OD₆₀₀ 值表示)、转速 150 r/min、碳源为丁二酸钠^[22]。在此条件下,分别以 50.0 mg/L (NH₄)₂SO₄、KNO₃ 和 NaNO₂ 作为氮源的硝化和反硝化模拟废水,并添加不同浓度的 Cu²⁺ (0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/L),接种菌株 NY3 后进行培养,同时设置不添加菌液的空白对照组。硝化试验每间隔 1 h 取样,反硝化试验每间隔 3 h 取样,先测定样品中 OD₆₀₀ 值,剩余样品于 6 500 r/min 离心 5 min 后取上清液检测铵态氮、硝态氮及亚硝态氮的含量,从而计算相应的脱氮效率。计算公式如(1)和(2)所示:

$$E_f = (R_1 - R_2) / R_1 \quad (1)$$

$$E_v = (R_1 - R_2) / h \quad (2)$$

式中, E_f、R₁、R₂、E_v 和 h 分别表示脱氮效率、初始氮浓度、最终氮浓度、脱氮速率和培养时间^[4]。

1.5 Cu²⁺对电子传递系统活性的检测

将 0.5 mL 的 NY3 菌液与 2.0 mL、0.2% INT

混合, 在 15 °C 培养 6 h (以铵态氮为唯一氮源) 和 18 h (分别以硝态氮和亚硝态氮为唯一氮源) 后避光处反应 25 min。加入 0.2 mL 甲醛 10 000 r/min 离心 5 min。沉淀用 4.0 mL 96% 甲醇溶解, 以 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清在 495 nm 处测量吸光度^[25], 电子传递系统活性 (electron transport system activity, ETSA) 的计算如公式(3) 所示:

$$ETSA [\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})] = \frac{1}{2} \times \frac{Ab \times V \times M}{\epsilon_{495} \times S \times t} \quad (3)$$

式(3)中, ϵ_{495} 、 S 、 t 、 Ab 、 V 和 M 分别表示摩尔消光系数 ($\epsilon_{495}=15.9 \text{ mmol}/\text{cm}$)、样品体积 (mL)、反应时间 (min)、495 nm 处吸光度、甲醇体积 (mL) 和 O_2 分子质量 ($M=32$)。

1.6 Cu^{2+} 对酶活性的检测

采用 AMO、硝酸还原酶 (nitrate reductase, NR) 和亚硝酸还原酶 (nitrite reductase, NIR) 活性测定法, 研究了 Cu^{2+} 对菌株 NY3 脱氮过程中关键酶活性的影响。将菌株 NY3 在以 50 mg/L 的铵态氮、硝态氮和亚硝态氮分别培养 6、15、15 h 后, 取样于 15 °C、6 500 r/min 离心 5 min, 并使用超声波破碎 (300 W, 5 min) 与裂解溶液接触, 提取粗酶液^[26]。其中 AMO 反应体系 20.0 mL, 由 20.0 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酶提取物、0.2 mmol/L NADH 和 10.0 mmol/L Tris-HCl 组成。在 15 °C 条件下培养 15 min 后, 以减少的铵态氮浓度来计算混合体系中的 AMO 活性。NR 反应体系 20.0 mL, 由酶提取物、0.2 mmol/L NADH、20.0 mg/L KNO_3 和 10.0 mmol/L Tris-HCl 组成。NIR 反应体系由酶提取物、0.2 mmol/L NADH、20.0 mg/L KNO_2 和 10.0 mmol/L Tris-HCl 组成。以硝态氮和亚硝态氮的减少量来计算混合体系中 NR 和 NIR 的酶活性^[27]。

一个酶活力单位 (U) 的定义为: 在特定条件下, 每分钟转化 1.0 μmol 底物所需的酶量。酶的比活性 (U/mg) 的定义为每 1.0 mg 蛋白质所含的酶活力单位数。对照组不含酶提取物。

1.7 添加外源硫化物对菌株 NY3 Cu^{2+} 耐受的检测

为了探索缓解耐冷脱氮菌 NY3 的 Cu^{2+} 抑制的方法, 分别以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KNO_3 作为唯一的氮源制作了含高浓度 Cu^{2+} (8.0 mg/L) 的硝化和反硝化模拟废水, 接种菌株 NY3 并分别向模拟废水中添加 NaHS (0、10.0、45.0、80.0、110.0、145.0 mg/L) 和 Na_2S (0、10.0、30.0、50.0 mg/L), 通过测定实验开始和结束时的细菌密度、各无机氮含量研究 2 种不同的外源硫化物缓解 Cu^{2+} 对菌株 NY3 异养硝化和好氧反硝化脱氮抑制的作用效果^[12-13]。

1.8 检测与分析方法

铵态氮测定方法为靛酚蓝比色法; 羟胺测定方法为 8-羟基喹啉紫外分光光度法; 硝酸盐测定方法为紫外分光光度法; 亚硝酸盐测定方法为 N-(1-萘基)-乙二胺光度法; 总氮测定方法为碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法; OD_{600} 测定方法为比浊法^[28]。本研究所有处理均重复 3 次, 使用 Excel、SPSS Statistics 19.0 和 Origin 8.6 软件对实验数据进行统计分析与作图。

2 结果与分析

2.1 Cu^{2+} 对菌株 NY3 脱氮效率的影响

Cu^{2+} 是微生物生长繁殖所必需的微量元素, 在低浓度下可促进菌体生长, 但 Cu^{2+} 浓度过高不仅可能会抑制微生物的活性, 还会导致菌株脱氮效率下降^[29-30]。为明确缓解耐冷脱氮菌株 NY3 的 Cu^{2+} 抑制方法, 本研究将该菌接种至添加了不同浓度 Cu^{2+} 的硝化和反硝化模拟废水中。

如图 1A 所示, 培养不同浓度 Cu^{2+} 胁迫下的菌株 NY3 6 h, 在 0 和 0.1 mg/L Cu^{2+} 条件下, 菌株 NY3 对铵态氮的去除率均接近完全, 分别为 99.98% 和 100.0%。然而, 随着 Cu^{2+} 浓度升高至 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/L, 6 h 时的铵态氮去除率相应下降至 99.57%、90.18%、93.03%、71.91%、51.56%。同时, 总氮去除率

变化趋势与铵态氮基本一致(图 1B), 对应去除率分别为 90.75%、86.65%、88.12%、80.99%、83.76%、65.80%、51.43%。此外, 亚硝态氮几乎没有积累(<0.060 mg/L), 但是硝态氮有少量残留(0.120–0.720 mg/L) (图 1C)。综合结果表明, 在 0.1–4.0 mg/L Cu²⁺浓度范围内, 菌株 NY3 仍具有较高的铵态氮去除能力, 当 Cu²⁺浓度超过 8.0 mg/L 后, 菌株 NY3 的脱氮效率会受到严重抑制。这种现象与 Yang 等^[4]的研究结果相似。

另外, 即使在 8.0 mg/L Cu²⁺的强胁迫条件下培养 6 h, 菌株 NY3 仍保持了 51.56%的铵态氮去除率。这表明菌株 NY3 对 Cu²⁺胁迫具有显著的耐受能力。相比之下, 气单胞菌(*Aeromonas* sp.) HN-02^[31]在 1.5 mg/L Cu²⁺胁迫条件下及假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) NY1^[4]在 4.0 mg/L Cu²⁺胁迫条件下即已完全丧失脱氮活性, 铵态氮去除率为 0。这一对比凸显了菌株 NY3 在耐受高浓度 Cu²⁺胁迫方面具有明显优势。

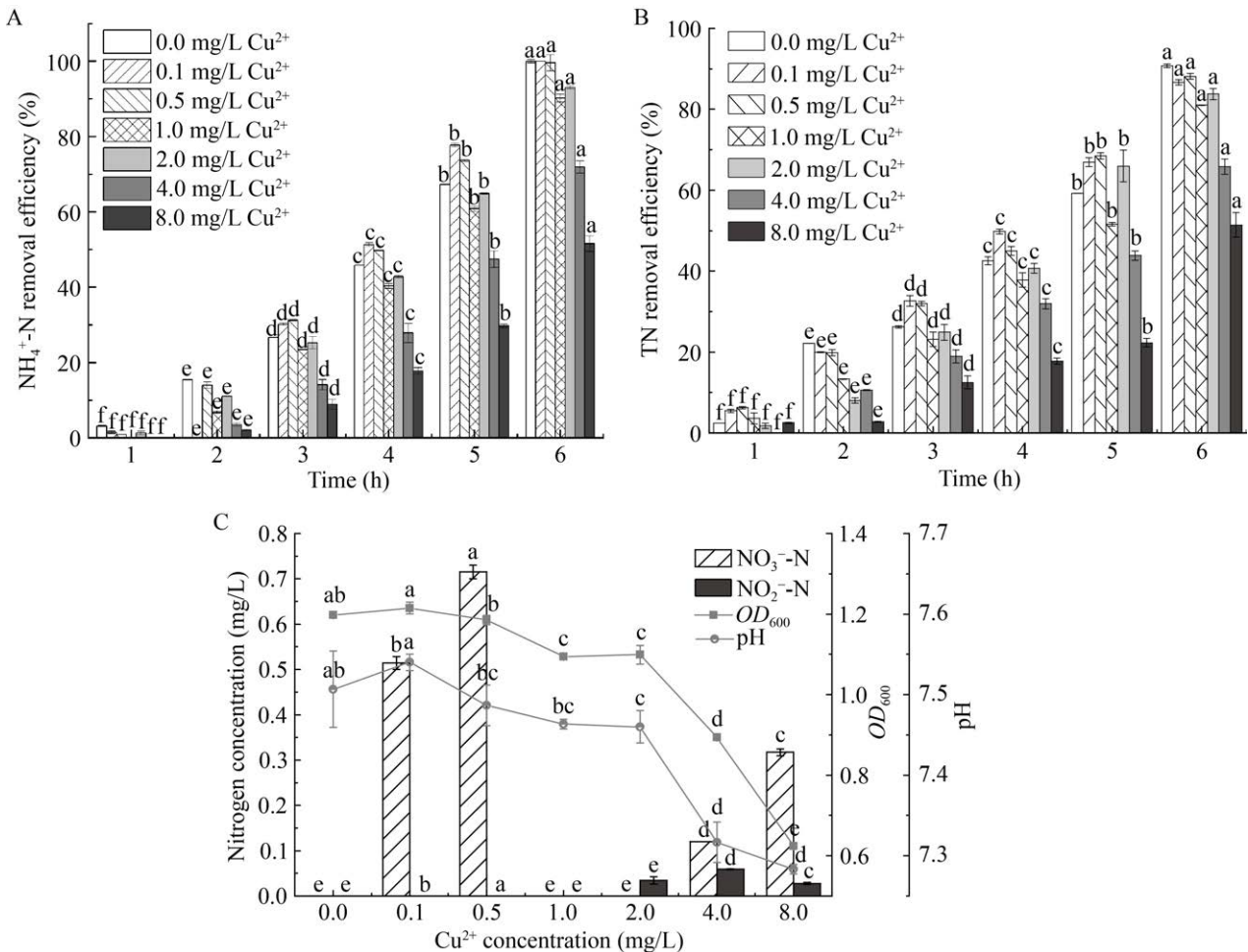


图 1 不同 Cu²⁺浓度对菌株 NY3 铵态氮去除率的影响 A: 铵态氮去除率; B: 总氮去除率; C: Cu²⁺对铵态氮去除过程的中间产物及细胞生长的影响。不同小写字母表示差异显著。下同。

Figure 1 The NH₄⁺-N removal performances of strain NY3 under different concentrations of Cu²⁺. A: Removal rate of NH₄⁺-N; B: Removal rate of total nitrogen (TN); C: Effect of Cu²⁺ on intermediates and cell growth in NH₄⁺-N removal process. Different lowercase letters indicate significant differences. The same below.

以硝态氮为唯一氮源时,菌株 NY3 在不同 Cu^{2+} 浓度下的脱氮效率变化如图 2 所示。当 Cu^{2+} 浓度 $\leq 4.0 \text{ mg/L}$ 的条件下培养 18 h 后,菌株对硝态氮的去除率高达 99.61%–100.0% (图 2A),总氮去除率达 90.68%–94.93% (图 2B)。然而,当 Cu^{2+} 浓度升高至 8.0 mg/L 时,菌株 NY3 的脱氮效率受到明显抑制,硝态氮和总氮去除率分别大幅降低至 55.70% 和 51.16%,这与 He 等^[32]报道的 Cu^{2+} 抑制效应一致。此外,在整个脱氮过程中未观察到中间产物的积累(图 2C),说明

菌株 NY3 能高效地将硝态氮转化为气态氮释放到大气中^[28]。

以亚硝态氮为唯一氮源,进一步研究不同 Cu^{2+} 浓度对菌株 NY3 反硝化能力的影响。结果如图 3 所示,添加 Cu^{2+} 后菌株 NY3 去除亚硝态氮(图 3A)和总氮(图 3B)的能力受到抑制,菌株 NY3 在 0–6 h 内亚硝态氮含量无显著变化,表明菌株暂处于延滞期。在 0.1–2.0 mg/L Cu^{2+} 浓度下,菌株 NY3 表现出优异的亚硝态氮去除能力,培养 18 h 后对亚硝态氮的去除率达 100.0%

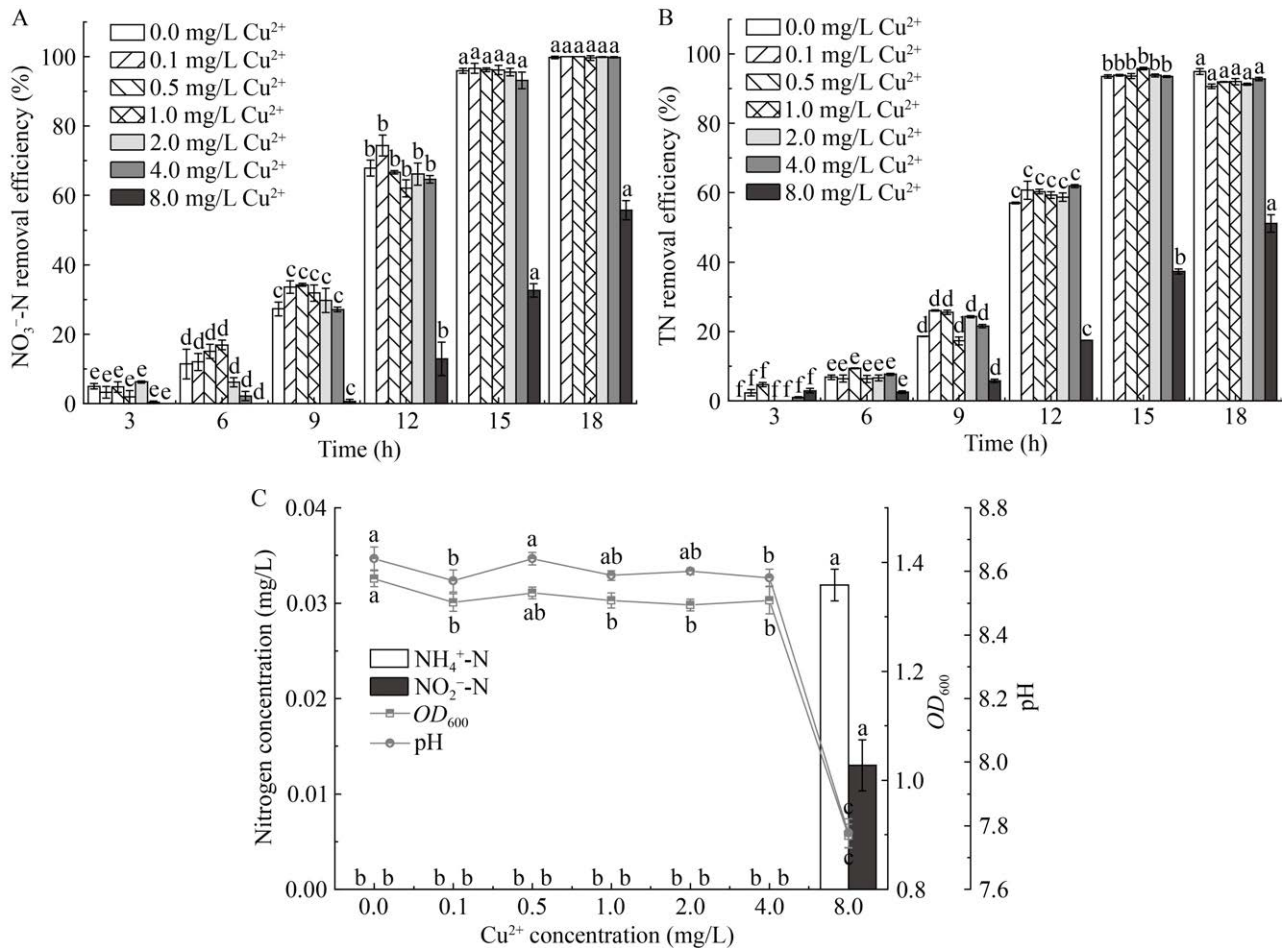


图 2 不同 Cu^{2+} 浓度对菌株 NY3 硝态氮去除率的影响 A: 硝态氮去除率; B: 总氮去除率; C: Cu^{2+} 对硝态氮去除过程的中间产物及细胞生长的影响。

Figure 2 The NO_3^- -N removal performances of strain NY3 under different concentrations of Cu^{2+} . A: Removal rate of NO_3^- -N; B: Removal rate of total nitrogen (TN); C: Effect of Cu^{2+} on intermediates and cell growth in NO_3^- -N removal process.

(图 3A)。当 Cu^{2+} 浓度大于 2.0 mg/L 时, 菌株 NY3 的反硝化能力受到显著抑制, 8.0 mg/L Cu^{2+} 可完全抑制该菌去除亚硝态氮过程。这一现象与文献[33-34]报道的低浓度 Cu^{2+} 会促进反硝化的结果存在显著差异。总的来说, 菌株 NY3 的反硝化过程对 0.1–2.0 mg/L Cu^{2+} 具有耐受性, 其硝态氮和亚硝态氮的去除率均达 100.0%。此外, 在 Cu^{2+} 浓度为 4.0 mg/L 和 8.0 mg/L 的条件下, 菌株 NY3 的 OD_{600} 值分别降至 0.45 和 0.40 (图 3C), 这一现象表明菌株 NY3 的细胞可能出现了死亡与裂解情况。与此同时, Cu^{2+} 浓

度在 0–2.0 mg/L 时 pH 值均高于 8.7, 而 Cu^{2+} 浓度为 4.0 mg/L 和 8.0 mg/L 时 pH 值分别为 8.1 和 7.9 (图 3C), 推测 Cu^{2+} 可能是通过破坏膜脂质双分子层的完整性, 导致胞内物质发生泄漏, 其中胞内有机酸(像乳酸等)的释放便是引发 pH 值降低的一个重要因素^[35-36]。在细胞发生裂解之后, 原本存在于细胞内的氮源(例如蛋白质、核酸等)会被分解转化为铵态氮, 而溶解氧的存在使这些铵态氮又会经过微生物的硝化作用进一步转化为硝态氮。实验结果中产生了大量的硝态氮, 同时也存在一定量的铵态氮(图 3C),

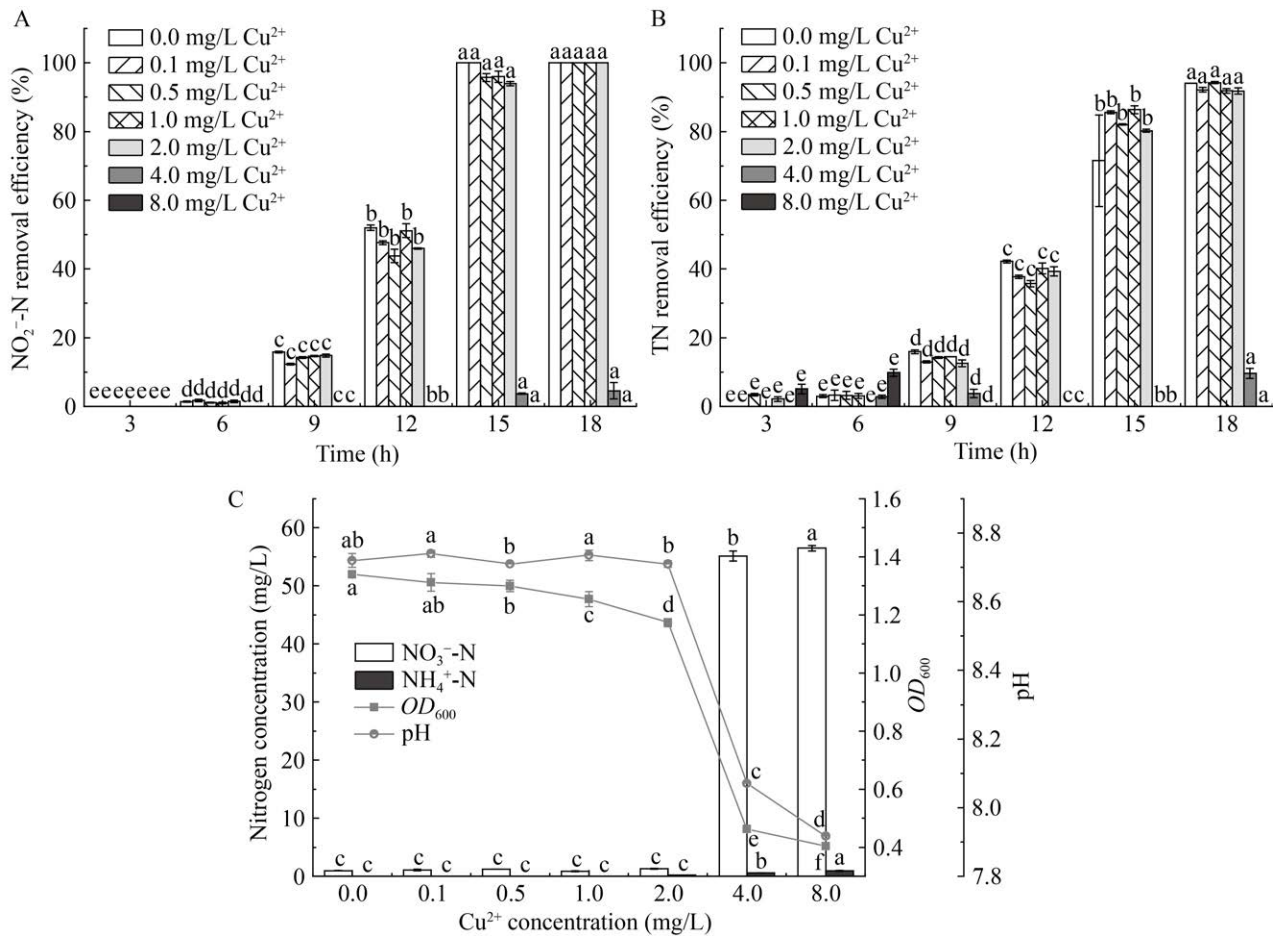


图 3 不同 Cu^{2+} 浓度对菌株 NY3 亚硝态氮去除率的影响 A: 亚硝态氮去除率; B: 总氮去除率; C: Cu^{2+} 对亚硝态氮去除过程的中间产物及细胞生长的影响。

Figure 3 The NO_2^- -N removal performances of strain NY3 under different concentrations of Cu^{2+} . A: Removal rate of NO_2^- -N; B: Removal rate of total nitrogen (TN); C: Effect of Cu^{2+} on intermediates and cell growth in NO_2^- -N removal process.

这为细胞裂解释放氮源的推测提供了有力的依据。

总之,上述结果表明,在本研究条件下,菌株 NY3 异养硝化-好氧反硝化过程对 Cu^{2+} 具有一定的耐受性,但高浓度的 Cu^{2+} 会抑制菌株 NY3 的脱氮过程,其脱氮过程的 Cu^{2+} 敏感性大小依次为亚硝态氮去除>铵态氮去除>硝态氮去除。

2.2 Cu^{2+} 对电子传递系统活性的影响

微生物脱氮过程本质上是一系列依赖电子传递的生物还原反应。已有研究表明, Cu^{2+} 的存在会影响脱氮过程中微生物的电子传递系统活性,进而影响脱氮效率^[37-39]。ETSA 可以反映微生物的电子传递效率和微生物代谢活性^[40],进一步探究 Cu^{2+} 对微生物脱氮过程中电子传递的影响,本研究在 15 °C、 Cu^{2+} 浓度为 8.0 mg/L 条件下对菌株 NY3 进行 ETSA 检测。结果如图 4 所示,菌株 NY3 在以铵态氮为唯一氮源培养 6 h 后,未添加 Cu^{2+} 时 ETSA 值为 0.306 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$,添加 8 mg/L Cu^{2+} 后 ETSA 急剧下降至 0.027 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$;菌株 NY3 分别在以硝态氮和亚硝态氮为唯一氮源培养 15 h 后,未添加 Cu^{2+} 时的 ETSA 值分别为 0.115 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 和

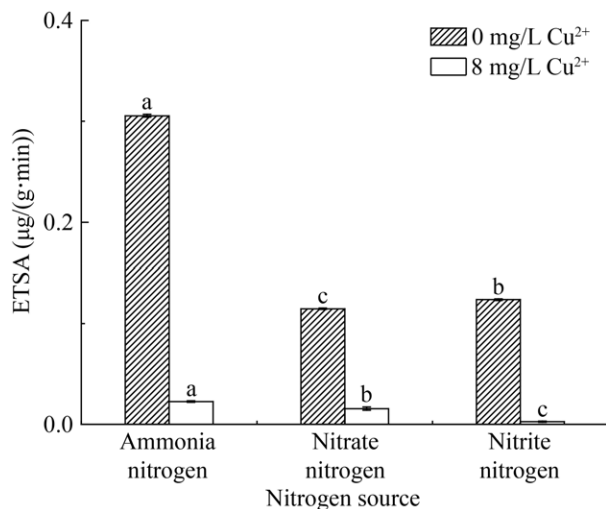


图 4 Cu^{2+} 对菌株 NY3 电子传递系统活性的影响
Figure 4 The effect of Cu^{2+} on the electron transport system activity of strain NY3.

0.124 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$,添加 8.0 mg/L Cu^{2+} 后 ETSA 急剧下降至 0.016 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 和 0.003 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。结果显示,添加 8.0 mg/L Cu^{2+} 显著抑制了菌株 NY3 的 ETSA 活性,并且高浓度 Cu^{2+} 对细菌电子传递系统活性的抑制趋势与其对菌株 NY3 脱氮效率的抑制趋势一致,表明高浓度的 Cu^{2+} 可通过抑制参与电子传递关键酶的活性,从而抑制细菌脱氮效率并对细胞产生毒害作用^[11,41]。

2.3 Cu^{2+} 对菌株 NY3 酶活性的影响

微生物的生长和代谢过程高度依赖于关键酶的催化作用,AMO 负责铵的氧化,NR 和 NIR 分别负责硝酸盐和亚硝酸盐的还原^[42]。为进一步探究 Cu^{2+} 对菌株 NY3 脱氮特性的影响,本研究在 15 °C添加 8.0 mg/L Cu^{2+} 的条件下检测了 AMO、NR、NIR 的酶活性,结果如表 1 所示, Cu^{2+} 胁迫对 AMO 活性影响不显著,添加 8.0 mg/L Cu^{2+} 和未添加 Cu^{2+} 条件下的 AMO 活性分别为 0.250 U/mg 和 0.260 U/mg。相比之下,添加 8.0 mg/L Cu^{2+} NR 的酶活性显著下降至 0.260 U/mg,但仍高于其他几种已报道的菌株,如农杆菌(*Agrobacterium* sp.) LAD9 (0.094 U/mg)^[43]、米兰链霉菌(*Streptomyces mediolani*) EM-B2 (0.120 U/mg)^[37]和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) NP5 (0.021 U/mg)^[44]。以上结果进一步表明高浓度 Cu^{2+} 会抑制菌株 NY3 异养硝化-好氧反硝化过程,并且其硝化过程对于 Cu^{2+} 的耐受性更强。

表 1 Cu^{2+} 对菌株 NY3 酶活性的影响

Table 1 The effect of Cu^{2+} on the specific enzyme activities of strain NY3

Enzyme	Specific activities (U/mg)	
	0 mg/L Cu^{2+}	8.0 mg/L Cu^{2+}
Ammonia monooxygenase (AMO)	0.260	0.250
Nitrate reductase (NR)	0.610	0.260
Nitrite reductase (NIR)	—	—

—: 未检测到酶活性。

—: No enzyme activity detected.

2.4 添加外源硫对菌株 NY3 Cu^{2+} 耐受的影响

研究表明, NaHS 不仅可与 Cu^{2+} 反应生成 CuS 沉淀, 减少水中游离的 Cu^{2+} 含量, 还可显著提高细胞抗氧化酶的活性, 以减轻 Cu^{2+} 胁迫下细胞产生的活性氧对自身的损伤, 从而提高含铜废水的生物修复效率^[45-46]。因此, 为明确 NaHS 能否缓解 Cu^{2+} 对耐冷脱氮菌 NY3 的抑制, 在含高浓度 Cu^{2+} 的模拟废水中添加不同浓度的 NaHS, 浓度分别为 10.0、45.0、80.0、110.0、145.0 mg/L。结果显示, 接种菌株 NY3 培养 15 h 后, 相较于未添加 NaHS 的铵态氮去除率 (17.74%), 添加 NaHS 后铵态氮的去除率分别提高了 37.29%、36.71%、45.56%、40.63%、48.17% (图 5A)。硝态氮去除率相较于添加 NaHS 前的 28.94% 分别增加了 62.78%、71.06%、70.79%、70.75% 和 70.94% (图 5B)。此外, 相较于未添加 NaHS, 添加 NaHS 后细菌的 OD_{600} 值显著增加。上述结果证明了添加 NaHS 能不同程度地缓解 Cu^{2+} 对耐冷脱氮菌 NY3 的抑制作用, 从而提高其在高浓度 Cu^{2+} 胁迫下的异养硝化和好氧

反硝化效率。

EPS 中的巯基在微生物重金属吸附过程中发挥重要作用, 而 Na_2S 可诱导 EPS 产生更多巯基, 从而提高微生物对重金属离子的耐受能力^[21,47]。此外, Na_2S 也可与 Cu^{2+} 反应生成 CuS 沉淀减少游离 Cu^{2+} 对细菌的胁迫。本研究向含高浓度 Cu^{2+} 的模拟废水中分别添加不同浓度 (0.0、10.0、30.0、50.0 mg/L) 的 Na_2S , 探索 Na_2S 能否减轻高浓度 Cu^{2+} 对菌株 NY3 脱氮的毒害作用。结果表明, 以铵态氮为唯一氮源, 添加 10.0 mg/L 的 Na_2S 对菌株 NY3 的 OD_{600} 值和铵态氮去除率均有小幅提升; 当 Na_2S 浓度为 30.0–50.0 mg/L 时, 菌株 NY3 的 OD_{600} 值和铵态氮的去除率相较于未添加 Na_2S 的对照组均有所显著提高, 并在 Na_2S 浓度为 50.0 mg/L 时 OD_{600} 值和去除率升高至 0.8 和 58.0% (图 6A), 尽管仍远低于无胁迫水平。以硝态氮为唯一氮源时, 添加 Na_2S 可显著减轻高浓度 Cu^{2+} 对菌株 NY3 反硝化过程的抑制作用, 并促进细胞生长, 提高菌株的反硝化脱氮效率。当 Na_2S 浓度为 30.0 mg/L 时, 菌株 NY3 的生长和脱

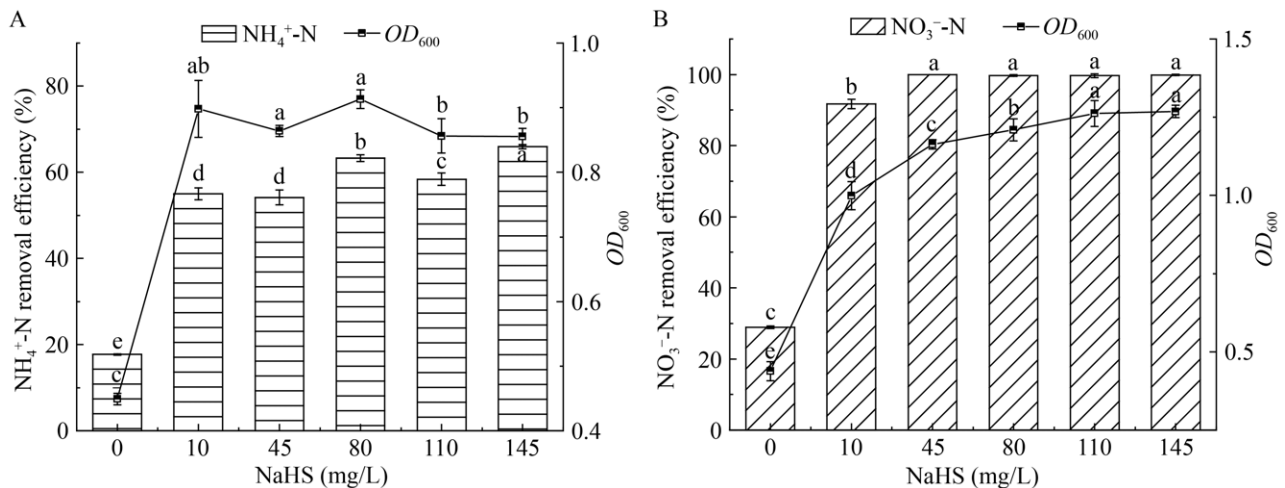


图 5 NaHS 对菌株 NY3 脱氮效率的影响 A: NaHS 对菌株 NY3 铵态氮去除的影响; B: NaHS 对菌株 NY3 硝态氮去除的影响。

Figure 5 Effect of NaHS on nitrogen removal efficiency of strain NY3. A: The effect of NaHS on the removal of ammonium nitrogen; B: The effect of NaHS on nitrate nitrogen removal.

氮效率达到最高,其 OD_{600} 值为 1.190,硝酸盐去除率高达 99.92% (图 6B),与其在低浓度 Cu^{2+} (0–2.0 mg/L)下并且无外源硫添加时的硝酸盐去除率相当。上述结果表明,外源 Na_2S 的添加可有效缓解 Cu^{2+} 对该菌株的胁迫强度,并减轻高浓度 Cu^{2+} 对 NY3 异养硝化和好氧反硝化过程的抑制作用。

另外,在本研究的实验组中 NH_2OH 浓度均低于检测限,表明其作为中间产物未在体系中积累。这可能是在 Cu^{2+} 胁迫下,菌株 NY3 通过调控代谢优先将电子传递至 NIR,而非羟胺的氧化路径,进一步减少了 NH_2OH 的生成。

3 讨论

在氮污染废水处理过程中,常规微生物通常无法耐受高浓度 Cu^{2+} 的毒性作用,导致生物脱氮效率显著降低。实际工业废水和农业污水中 Cu^{2+} 浓度普遍较高,其中工业废水 Cu^{2+} 浓度从几毫克每升到数百毫克每升不等,如半导体行业废水中 Cu^{2+} 浓度(5–100 mg/L)更是远超欧盟国际标准规定的 0.05 mg/L^[29]。然而,目前关于耐受高浓度 Cu^{2+} 的耐冷脱氮菌研究报道仍然十分有限。本文利用耐冷高效脱氮菌 *Comamonas aquatilis* NY3 探究不同浓度的

Cu^{2+} 对其脱氮过程的影响及增强 Cu^{2+} 耐受性的方法。

3.1 菌株 NY3 在 Cu^{2+} 影响下的脱氮特性及耐受机制

研究结果显示,高浓度 Cu^{2+} (8.0 mg/L)会显著抑制菌株 NY3 的代谢活性,使其对铵态氮、硝态氮的去除率分别降至 51.56%和 55.70%,亚硝态氮的去除被完全抑制,同时 ETSA 和相关酶的活性也明显下降,这一结果表明高浓度的 Cu^{2+} 对菌株 NY3 的脱氮功能产生了严重的干扰,原因可能在于 Cu^{2+} 能够进入微生物细胞内部,与蛋白质或酶表面的巯基(-SH)发生化学反应,干扰细菌中各种酶的正常功能,进而使微生物丧失正常的生物功能,最终导致脱氮效率的降低^[48]。而相较于已报道的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) W13^[49],菌株 NY3 在高浓度 Cu^{2+} 胁迫下仍展示出一定的铵态氮和硝态氮去除能力,表现出更强的 Cu^{2+} 耐受性。具体为 *Pseudomonas* sp. W13 在 5 mg/L Cu^{2+} 胁迫下对铵态氮和硝态氮的去除率低于 20.0%^[49],而菌株 NY3 在 8.0 mg/L Cu^{2+} 胁迫下,铵态氮和硝态氮去除率仍大于 50%,这表明菌株 NY3 具有更强的 Cu^{2+} 耐受性,同时,该菌的铵态氮和硝态氮去除能力明显优于亚硝态氮去除能力。

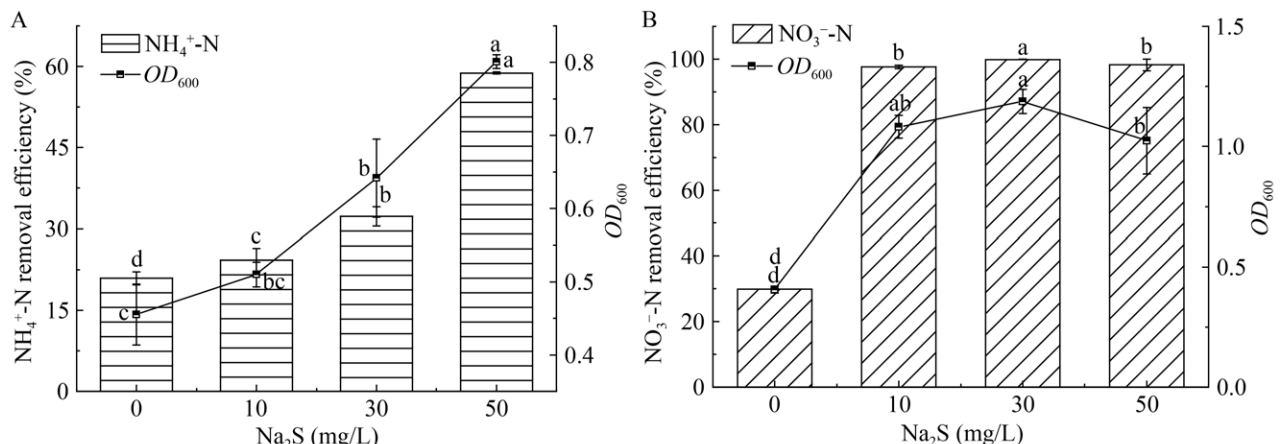


图 6 Na_2S 对菌株 NY3 脱氮效率的影响 A: 铵态氮去除率; B: 硝态氮去除率。

Figure 6 Effect of Na_2S on nitrogen removal efficiency of strain NY3. A: Removal rate of ammonium nitrogen; B: Removal rate of nitrate nitrogen.

此外,在 8.0 mg/L Cu^{2+} 胁迫下, NR 与 NIR 的活性受到显著抑制,甚至丧失活性,尽管 AMO 活性也受到抑制,由 0.260 U/mg 蛋白下降至 0.250 U/mg 蛋白,但抑制程度相对较低。该菌脱氮酶对 Cu^{2+} 的敏感性为 $\text{NIR} > \text{NR} > \text{AMO}$ 。这解释了为何在高浓度 Cu^{2+} 下,硝化过程(依赖 AMO)仍能部分维持,而反硝化过程(尤其依赖 NIR)受抑制严重。当 Cu^{2+} 浓度在 0–4.0 mg/L 时,图 2C 显示亚硝酸盐积累量很少,未添加 Cu^{2+} 处理组检测不到 NIR 活性,结合图 3A 低浓度 Cu^{2+} 下高效的亚硝态氮还原,推测该菌的 NIR 可能为含铜型 NIR,需要以 Cu^{2+} 作为辅因子才能完成催化中心的组装^[50],当无 Cu^{2+} 时,酶蛋白可能因缺乏金属辅因子无法正确折叠,丧失活性,导致无 Cu^{2+} 处理组检测不到 NIR 活性;适量浓度 Cu^{2+} 时能激活 NIR,支持 NO_2^- -N 高效还原;而过量 Cu^{2+} 与酶活性中心过度结合,改变酶的构象,降低其活性^[51]。此外,据报道,部分反硝化菌的 NIR 需底物(NO_2^- -N)或胁迫因子(如重金属)激活相关基因(如 *nirS* 或 *nirK*)^[50,52],诱导 NIR 表达,因此在未添加 Cu^{2+} 的条件下检测不到亚硝酸盐酶的活性。有关菌株 NY3 对 Cu^{2+} 耐受性,可能与微生物的外排泵系统强化、抗氧化防御的激活及 EPS 的屏障作用等机制有关,未来需要通过基因和蛋白分析进一步验证。

3.2 硫化物缓解 Cu^{2+} 抑制菌株 NY3 的效果及机制

现有研究多采用添加有机物的方法来缓解 Cu^{2+} 对微生物的毒害作用,其机制是在 Cu^{2+} 胁迫下,微生物会产生 EPS 以抵抗其毒害作用^[17]。然而,目前关于无机硫化物增强耐冷脱氮菌 Cu^{2+} 耐受性的研究报道较少。本研究通过添加无机硫化物 NaHS 和 Na_2S ,探索其对缓解菌株 NY3 的 Cu^{2+} 抑制。结果表明,添加无机硫化物 NaHS 和 Na_2S 均可有效提升菌株 NY3 在高浓度 Cu^{2+} 下的脱氮性能,其中 Na_2S 对菌株 NY3 的

铵态氮和硝态氮去除率的促进作用更为显著,添加 50.0 mg/L Na_2S 时菌株 NY3 的 OD_{600} 值和铵态氮去除率达到最高,而 NaHS 需要 145.0 mg/L 才能达到相近效果。这一差异可能源于 Na_2S 能更有效地与 Cu^{2+} 形成 CuS 沉淀,而 NaHS 过量时会产生 H_2S 气体^[53],表明 Na_2S 的添加效果优于 NaHS。另外,30.0 mg/L Na_2S 对硝态氮去除的促进效果最佳,这表明针对不同氮源需优化硫化物添加量。

据报道,目前硫化物缓解 Cu^{2+} 对菌株的抑制作用主要有以下几种机制:(1)硫化物(如 NaHS 和 Na_2S)加入后,会与 Cu^{2+} 发生化学反应生成难溶的 CuS 沉淀^[54],使水体中游离 Cu^{2+} 浓度显著降低,减少了 Cu^{2+} 与耐冷脱氮菌 NY3 接触的几率,进而降低了 Cu^{2+} 对菌体的毒害风险,有效缓解了其毒性。(2)NaHS 进入菌体后能显著提高细胞抗氧化酶(如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等)的活性。在 Cu^{2+} 胁迫下,菌体会产生大量活性氧自由基,这些自由基会对细胞造成氧化损伤,而抗氧化酶活性的提升,使得菌体能及时清除这些活性氧自由基,从而减轻氧化损伤,维持细胞的完整性和稳定性,进而增强菌株对 Cu^{2+} 的耐受性^[45-46]。(3) Na_2S 可诱导菌株细胞表面的 EPS 产生更多巯基。巯基具有与重金属离子(如 Cu^{2+})结合的能力,通过这种结合作用,可将 Cu^{2+} 固定在细胞表面或 EPS 层,阻止 Cu^{2+} 进一步进入细胞内部,减轻其对细胞内部生理活动的干扰和抑制,也可提高菌株对 Cu^{2+} 的耐受能力^[21,47]。本研究体系的创新之处在于并非单纯依靠化学沉淀法先去除 Cu^{2+} ,再由耐冷脱氮菌执行脱氮功能。而是在含有高浓度 Cu^{2+} 的模拟废水中同时添加硫化物和接种菌株 NY3。硫化物的加入一方面通过化学沉淀作用减少游离 Cu^{2+} 的浓度;另一方面,通过后两种机制直接增强菌株 NY3 对 Cu^{2+} 的耐受性,使菌株能在相对较高的 Cu^{2+} 胁迫环境下正常生

长并发挥脱氮功能, 实现硫化物添加后对 Cu^{2+} 毒性的缓解和脱氮效率的提升。

本研究在耐冷脱氮菌中, 揭示了 Cu^{2+} 胁迫下菌株 NY3 的脱氮性能及 Cu^{2+} 对氮代谢过程的影响, 将无机硫化物引入耐冷脱氮菌的 Cu^{2+} 抗性调控体系中, 揭示了其“化学-生物”协同减毒机制, 为高铜低温废水的生物脱氮强化处理提供了新策略。后续将开展更全面深入的影响机制研究, 如 EPS 含量、酶活性测定实验, ^{15}N 同位素追踪实验, 明确菌株的氮转化途径, 深入了解硫化物添加对耐冷脱氮菌 NY3 脱氮功能的影响机制。开展基因敲除实验, 并针对与 Cu^{2+} 耐受性相关基因进行敲除, 观察敲除后的菌株在含不同浓度梯度的 Cu^{2+} 和硫化物环境中的生长和脱氮特性变化, 从而明确这些基因在硫化物缓解 Cu^{2+} 毒性过程中的作用。构建硫化物-菌株 NY3 耦合工艺的动态模型, 并评估硫化物在实际废水中的工程适用性, 以期通过上述一系列严谨的实验研究, 能够更加全面详细地阐明硫化物缓解 Cu^{2+} 对耐冷脱氮菌 NY3 抑制的机制, 为该领域的研究提供更深入的理论支持。

4 结论

本研究探究了耐冷高效脱氮菌 *Comamonas aquatilis* NY3 在 Cu^{2+} 胁迫下的脱氮特性及其调控机制。结果表明, 菌株 NY3 对 Cu^{2+} 具有显著耐受性, 在 0.1–4.0 mg/L Cu^{2+} 浓度范围内, 菌株 NY3 具有较高的铵态氮去除能力, 在 8.0 mg/L Cu^{2+} 条件下仍能保持 51.56% 的铵态氮去除率和 55.70% 的硝态氮去除率, 但其电子传递系统活性和 NR 的酶活性显著下降。通过添加外源硫化物可显著缓解 Cu^{2+} 对菌株 NY3 抑制强度, 从而促进高浓度 Cu^{2+} 胁迫下菌株 NY3 的硝化和反硝化能力, 145.0 mg/L NaHS 和 30.0 mg/L Na_2S 下其硝态氮去除率分别为 99.88% 和 99.92%, 可为低温季节氮污染和重金属污染废水生物处理

提供新的思路, 同时为废水治理新工艺的研发提供理论依据。

作者贡献声明

尹梦圆: 实验操作, 数据收集与分析, 撰写稿件, 修改稿件; 刘晓雨: 实验操作; 陈伟伟: 数据收集与分析; 袁玉兰: 修改稿件, 润色, 数据收集与分析; 何腾霞: 方案设计, 获取基金, 监督指导; 熊玉芬: 实验数据校对, 结果可视化; 雷洪雪: 数据处理; 杨露: 实验操作, 数据收集与处理。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] CHENG YF, LI GF, LIU YY, ZHU BQ, ZHANG Q, XUE Y, ZHANG ZZ, JIN RC. Evaluating the effects of Zn(II) on high-rate biogranule-based denitrification: performance, microbial community and sludge characteristics[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 279: 393-397.
- [2] AHLSTRÖM H, CORNELL SE. Governance, polycentricity and the global nitrogen and phosphorus cycles[J]. *Environmental Science & Policy*, 2018, 79: 54-65.
- [3] ZHU ZQ, YANG Y, FANG AR, LOU Y, XIE GJ, REN NQ, XING DF. Quorum sensing systems regulate heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by changing the activity of nitrogen-cycling enzymes[J]. *Environmental Science and Ecotechnology*, 2020, 2: 100026.
- [4] YANG L, HE TX, YUAN YL, XIONG YF, LEI HX, ZHANG MM, CHEN MP, YANG L, ZHENG CX, WANG CR. Enhancement of cold-adapted heterotrophic nitrification and denitrification in *Pseudomonas* sp. NY1 by cupric ions: performance and mechanism[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 414: 131574.
- [5] 魏渤惠, 罗晓, 吕鹏翼, 马文凯, 苏金卫, 李伟, 崔建升. 高效异养硝化-好氧反硝化菌 *Glutamicibacter* sp. WS1 低温下对多种氮源的脱氮特性及氮代谢机制[J]. *环境科学*, 2023, 44(9): 5006-5016.
WEI BH, LUO X, LÜ PY, MA WK, SU JW, LI W, CUI JS. Nitrogen removal characteristics and metabolism mechanism of high-efficiency cold-tolerant heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Glutamicibacter* sp. WS1 for various nitrogen sources at low temperature[J]. *Environmental Science*, 2023, 44(9): 5006-5016 (in Chinese).
- [6] MORLING S, PLAZA E. Biological nitrogen removal at low water temperatures: long term experience[J].

- Desalination and Water Treatment, 2011, 25(1/2/3): 226-232.
- [7] YANG Q, YANG T, SHI Y, XIN Y, ZHANG L, GU ZH, LI YR, DING ZY, SHI GY. The nitrogen removal characterization of a cold-adapted bacterium: *Bacillus simplex* H-b[J]. Bioresource Technology, 2021, 323: 124554.
- [8] 袁建华, 赵天涛, 彭绪亚. 极端条件下异养硝化-好氧反硝化菌脱氮的研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(6): 942-955.
YUAN JH, ZHAO TT, PENG XY. Advances in heterotrophic nitrification-aerobic denitrifying bacteria for nitrogen removal under extreme conditions[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(6): 942-955 (in Chinese).
- [9] YANG Y, LI M, CHEN G, LIU SY, GUO HQ, DONG XW, WANG K, GENG HE, JIANG J, LI X. Dissecting copper biology and cancer treatment: 'activating cuproptosis or suppressing cuproplasia'[J]. Coordination Chemistry Reviews, 2023, 495: 215395.
- [10] ZHAO SY, SU XX, WANG YY, YANG XY, BI MH, HE Q, CHEN Y. Copper oxide nanoparticles inhibited denitrifying enzymes and electron transport system activities to influence soil denitrification and N₂O emission[J]. Chemosphere, 2020, 245: 125394.
- [11] ZHANG YC, LI J, PANG Y, SHU YL, LIU S, SANG PC, SUN XH, LIU JX, YANG YF, CHEN ML, HONG P. Systematic investigation of simultaneous copper biosorption and nitrogen removal from wastewater by an aerobic denitrifying bacterium of auto-aggregation[J]. Environmental Research, 2023, 235: 116602.
- [12] MISHRA VK, UPADHYAYA AR, PANDEY SK, TRIPATHI BD. Heavy metal pollution induced due to coal mining effluent on surrounding aquatic ecosystem and its management through naturally occurring aquatic macrophytes[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(5): 930-936.
- [13] MOOSAVIRAD SM, SARIKHANI R, SHAHSAVANI E, MOHAMMADI SZ. Removal of some heavy metals from inorganic industrial wastewaters by ion exchange method[J]. Journal of Water Chemistry and Technology, 2015, 37(4): 191-199.
- [14] YANG GF, NI WM, WU K, WANG H, YANG B, JIA XY, JIN RC. The effect of Cu(II) stress on the activity, performance and recovery on the anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) process[J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 226: 39-45.
- [15] 石聪, 郑文杰, 薛中飞, 王琳, 周江汉, 张志遥, 李佳辉. 基于微生物诱导磷酸盐沉淀和硝化-反硝化同步修复铜和氨氮污染[J/OL]. 土木工程学报, 2024: 1-12. (2024-12-17). <https://link.cnki.net/doi/10.15951/j.tmgcxb.24080655>.
SHI C, ZHENG WJ, XUE ZF, WANG L, ZHOU JH, ZHANG ZY, LI JH. Simultaneous remediation of (Cu) and (NH₄⁺-N) pollution based on microbial-induced phosphate precipitation and nitrification-denitrification[J/OL]. China Civil Engineering Journal, 2024: 1-12. (2024-12-17). <https://link.cnki.net/doi/10.15951/j.tmgcxb.24080655> (in Chinese).
- [16] 董欣楠, 邓思敏, 宋厚辉, 徐加利, 程昌勇. 细菌金属离子外排系统及金属稳态调控[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 672-686.
DONG XN, DENG SM, SONG HH, XU JL, CHENG CY. Bacterial metal ion efflux systems and metal homeostasis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 672-686 (in Chinese).
- [17] WU D, FENG M, WANG ZX, QIAO K, TACHIBANA H, CHENG XJ. Molecular and biochemical characterization of key enzymes in the cysteine and serine metabolic pathways of *Acanthamoeba castellanii*[J]. Parasites & Vectors, 2018, 11(1): 604.
- [18] HAO ZY, LOU HB, ZHU RF, ZHU JH, ZHANG DM, ZHAO BS, ZENG SZ, CHEN X, CHAN J, HE C, CHEN PR. The multiple antibiotic resistance regulator MarR is a copper sensor in *Escherichia coli*[J]. Nature Chemical Biology, 2013, 10(1): 21-28.
- [19] 郭超峰, 郑文杰, 胡文乐, 康农波. 螯合剂强化电动去除黄土中铜铅金属的试验与机理研究[J]. 岩土工程学报, 2024, 46(10): 2183-2191.
GUO CF, ZHENG WJ, HU WL, KANG NB. Experimental study and mechanism analysis of chelating agent enhanced on electrokinetic removal of copper and lead from loess[J]. Chinese Journal of Geotechnical Engineering, 2024, 46(10): 2183-2191 (in Chinese).
- [20] ZHANG H, HU LY, HU KD, HE YD, WANG SH, LUO JP. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(12): 1518-1529.
- [21] LI QH, SONG WF, SUN MG, LI JY, YU ZF. Composition change and adsorption performance of EPS from *Bacillus vallismortis* sp. induced by Na₂S[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 185: 109679.
- [22] 杨露. Cu²⁺胁迫下耐冷菌 *Pseudomonas* sp. NY1 高效脱氮机理研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2024.
YANG L. Study on the mechanism of efficient nitrogen removal by the cold-tolerant bacterium *Pseudomonas* sp. NY1 under Cu²⁺ stress[D]. Guiyang: Guizhou University, 2024 (in Chinese).
- [23] HE TX, YE Q, SUN Q, CAI X, NI JP, LI ZL, XIE DT. Removal of nitrate in simulated water at low temperature by a novel psychrotrophic and aerobic bacterium, *Pseudomonas taiwanensis* strain J[J]. BioMed Research International, 2018, 2018(1): 4984087.
- [24] 何腾霞. *Arthrobacter arilaitensis* Y-10 的脱氮过程及金属离子对其脱氮作用的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
HE TX. Nitrogen removal process and the effect of metals on its nitrogen removal capacity of *Arthrobacter arilaitensis* Y-10[D]. Chongqing: Southwest University, 2019 (in Chinese).
- [25] LIAO YH, LI SJ, ZHU XF, DANG ZZ, TANG SY, JI

- GD. The promotion and inhibition effect of graphene oxide on the process of microbial denitrification at low temperature[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125636.
- [26] CHEN MP, HE TX, WU QF, ZHANG MM, HE K. Enhanced heterotrophic nitrification and aerobic denitrification performance of *Glutamicibacter arilaitensis* EM-H8 with different carbon sources[J]. *Chemosphere*, 2023, 323: 138266.
- [27] 谢尧旭, 张漫漫, 何腾霞, 卢海凤, 陈亚. *Pseudomonas oryzae* EN-F4 菌株的脱氮特征及羟胺对其脱氮过程的促进作用[J]. *微生物学报*, 2023, 63(10): 3858-3875.
- XIE YX, ZHANG MM, HE TX, LU HF, CHEN Y. Nitrogen removal characteristics of *Pseudomonas oryzae* EN-F4 with/without the supplementation of hydroxylamine[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(10): 3858-3875 (in Chinese).
- [28] LIANG XW, GAN LZ, HE TX, CHEN MP, ZHANG MM, WU QF. The coexisted nitrate and nitrite as a driving force for the aerobic denitrification of *Peribacillus* sp. EM-C3[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2023, 32: 103299.
- [29] FENG QL, WU J, CHEN GQ, CUI FZ, KIM TN, KIM JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 52(4): 662-668.
- [30] 蔡茜. 铁与铜离子对 *Arthrobacter nicotianae* D51 异养硝化和好氧反硝化作用的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- CAI X. Effects of iron and copper ions on the heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of *Arthrobacter nicotianae* D51[D]. Chongqing: Southwest University, 2019 (in Chinese).
- [31] CHEN MX, WANG WC, FENG Y, ZHU XH, ZHOU HZ, TAN ZL, LI XD. Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 167: 456-461.
- [32] HE TX, XIE DT, NI JP, CAI X, LI ZL. Investigating the effect of copper and magnesium ions on nitrogen removal capacity of pure cultures by modified non-competitive inhibition model[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 170: 479-487.
- [33] ZENG M, YANG XJ, QIN YJ. Inhibition effect of Cu(II) on nitrogen removal in anammox-denitrification couple system[J]. *Science of The Total Environment*, 2024, 941: 173723.
- [34] LI HY, YAO H, ZHANG DY, ZUO LS, REN J, MA JY, PEI J, XU YR, YANG CY. Short- and long-term effects of manganese, zinc and copper ions on nitrogen removal in nitrification-anammox process[J]. *Chemosphere*, 2018, 193: 479-488.
- [35] SUWALSKY M, UNGERER B, QUEVEDO L, AGUILAR F, SOTOMAYOR CP. Cu²⁺ ions interact with cell membranes[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1998, 70(3/4): 233-238.
- [36] AMMENDOLIA DA, BEMENT WM, BRUMELL JH. Plasma membrane integrity: implications for health and disease[J]. *BMC Biology*, 2021, 19(1): 71.
- [37] WEI Q, ZHANG JS, LUO FZ, SHI DH, LIU YC, LIU S, ZHANG Q, SUN WZ, YUAN JL, FAN HT, WANG HC, QI L, LIU GH. Molecular mechanisms through which different carbon sources affect denitrification by *Thauera linaloolentis*: electron generation, transfer, and competition[J]. *Environment International*, 2022, 170: 107598.
- [38] BERKS BC, FERGUSON SJ, MOIR JW, RICHARDSON DJ. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1995, 1232(3): 97-173.
- [39] CHEN JW, STROUS M. Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2013, 1827(2): 136-144.
- [40] HU B, WANG YL, QUAN JN, HUANG K, GU X, ZHU JT, YAN Y, WU P, YANG LW, ZHAO JQ. Effects of static magnetic field on the performances of anoxic/oxic sequencing batch reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 309: 123299.
- [41] CHEN PP, ZHANG FP, ZHANG LJ, LIU H, ZHANG Q, XING ZL, ZHAO TT. Characterization of a novel salt-tolerant strain *Sphingopyxis* sp. CY-10 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 358: 127353.
- [42] HE TX, ZHANG MM, DING CY, WU QF, CHEN MP, MOU SL, CHENG DJ, DUAN SJ, WANG Y. New insight into the nitrogen removal capacity and mechanism of *Streptomyces mediolani* EM-B2[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 348: 126819.
- [43] CHEN Q, NI JR. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by novel isolated bacteria[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(9): 1305-1310.
- [44] YANG L, WANG XH, CUI S, REN YX, YU J, CHEN N, XIAO Q, GUO LK, WANG RH. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 285: 121360.
- [45] HUANG ZZ, HE K, SONG ZX, ZENG GM, CHEN AW, YUAN L, LI H, CHEN GQ. Alleviation of heavy metal and silver nanoparticle toxicity and enhancement of their removal by hydrogen sulfide in *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Chemosphere*, 2019, 224: 554-561.
- [46] SALAH I, PARKIN IP, ALLAN E. Copper as an antimicrobial agent: recent advances[J]. *RSC Advances*, 2021, 11(30): 18179-18186.
- [47] LI QH, SONG WF, SUN MG, LI JY, YU ZF. Response of *Bacillus vallismortis* sp. EPS to exogenous sulfur stress/induction and its adsorption performance on Cu(II)[J]. *Chemosphere*, 2020, 251: 126343.

- [48] MA WJ, CHENG YF, JIN RC. Comprehensive evaluation of the long-term effect of Cu²⁺ on denitrifying granular sludge and feasibility of *in situ* recovery by phosphate[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 422: 126901.
- [49] 张子绚. 乌梁素海耐冷异养硝化—好氧反硝化菌筛选与脱氮性能研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023.
- ZHANG ZX. Screening and nitrogen removal performance of cold-resistant heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria from Ulansuhai[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [50] 何腾霞, 尹梦圆, 江龙, 王侧容, 金城涛, 彭益丹, 周歧敏. 微生物异化硝酸盐还原产铵的环境驱动因子及其强化技术研究进展[J]. 贵州大学学报(自然科学版), 2025, 42(2): 11-26.
- HE TX, YIN MY, JIANG L, WANG CR, JIN CT, PENG YD, ZHOU QM. Research progress on environmental driving factors and strengthening techniques for dissimilatory nitrate reduction to ammonium by microbial dissimilation[J]. Journal of Guizhou University (Natural Sciences), 2025, 42(2): 11-26 (in Chinese).
- [51] 张存滢, 曾虹燕, 熊龙斌, 刘学英, Gohi A, 蔡西玲, 陈泽新. 双金属 Hg²⁺和 Cu²⁺对木瓜蛋白酶活性与构象的影响[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2013, 44(6): 2207-2213.
- ZHANG CY, ZENG HY, XIONG LB, LIU XY, GOHI A, CAI XL, CHEN ZX. Effect of bimetal Hg²⁺ and Cu²⁺ on activity and conformation of papain[J]. Journal of Central South University (Science and Technology), 2013, 44(6): 2207-2213 (in Chinese).
- [52] 陈吉吉, 荆红卫, 曹文超, 陶蕾, 王敬国. 亚硝酸盐添加对土壤硝化和反硝化基因转录活性及 N₂O 排放的影响[J]. 土壤学报, 2023, 60(3): 726-737.
- CHEN JJ, JING HW, CAO WC, TAO L, WANG JG. Effects of nitrite addition on transcription activity of nitrification and denitrification functional genes and N₂O emission in soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(3): 726-737 (in Chinese).
- [53] 王雷. 重金属酸性废水处理(一): 分步硫化回收砷和铜的工艺研究[J]. 中外能源, 2020, 25(3): 87-93.
- WANG L. Heavy metal acidic wastewater treatment-part 1: study on step-by-step vulcanization process for arsenic and copper recovery[J]. Sino-Global Energy, 2020, 25(3): 87-93 (in Chinese).
- [54] SHENG YX, CAO HB, LI YP, ZHANG Y. Effects of sulfide on sulfate reducing bacteria in response to Cu(II), Hg(II) and Cr(VI) toxicity[J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(9): 862-868.