



## 研究报告

一株耐盐的卓贝儿氏菌(*Zobellella* sp.)的分离鉴定及其硝酸盐还原能力赵林<sup>1,2</sup> 付贵萍<sup>\*1,2</sup> 武金发<sup>1,2</sup> 庞伟程<sup>1,2</sup> 莫少聪<sup>1,2</sup> 祝子旺<sup>1,2</sup>

1 深圳大学生命与海洋科学学院 广东 深圳 518055

2 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室 广东 深圳 518055

**摘要:**【背景】好氧反硝化是指在有氧条件下进行反硝化作用,使得硝化和反硝化过程能够在同一反应器中同时发生,是废水脱氮最具竞争力的技术。红树林湿地中蕴藏着丰富的微生物资源,分布着大量好氧反硝化微生物。【目的】了解耐盐微生物的脱氮机制,为含盐废水生物脱氮的工程实践提供理论依据,对一株分离于红树林湿地中的耐盐好氧细菌 A63 的硝酸盐异化还原能力进行分析。【方法】利用形态学特征及 16S rRNA 基因序列测定分析,对其种属进行了鉴定,采用单因子实验测定该菌在不同环境因子下的硝酸盐还原能力,并对其反硝化脱氮条件进行了优化。【结果】初步判定该菌株为卓贝儿氏菌(*Zobellella* sp.),其能在盐度 0%–10%、pH 5.0–10.0、温度 20–40 °C 范围内进行反硝化脱氮和硝酸盐异化还原为氨(dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)作用。菌株 A63 最适生长碳源为柠檬酸钠(1.2 g/L),适宜脱氮盐度为 3%、pH 7.0–7.5、温度 30–35 °C,且 C/N 为 10。在最适脱氮条件下,该菌株 12 h 内能将培养基中 208.8 mg/L 硝态氮降至 0,且仅有少量铵态氮生成,无亚硝态氮积累,脱氮率高达 99%。此外,该菌株在高盐度、低 C/N 比、弱酸性和低温等不利生境中 DNRA 作用显著。【结论】细菌 A63 生长范围宽,脱氮效率显著,适用于海水养殖废水处理。研究为今后开发高效含盐废水生物脱氮工艺奠定了基础,对于加深氮素转化规律的认识、丰富生物脱氮理论有着重要意义。

**关键词:** 硝酸盐还原, 好氧反硝化, 硝酸盐异化还原为氨, 含盐污水, 生物脱氮

Isolation, identification and nitrate reduction ability of a salt-tolerant strain of *Zobellella* sp.ZHAO Lin<sup>1,2</sup> FU Gui-Ping<sup>\*1,2</sup> WU Jin-Fa<sup>1,2</sup> PANG Wei-Cheng<sup>1,2</sup> MO Shao-Cong<sup>1,2</sup> ZHU Zi-Wang<sup>1,2</sup>

1 College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518055, China

2 Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresource and Eco-environmental Science, Shenzhen, Guangdong 518055, China

**Abstract:** [Background] Aerobic denitrification is carried out under aerobic conditions, so that

**Foundation item:** Shenzhen Science and Technology Projects (JCYJ20180305123947858)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-755-26418375; E-mail: fupg@szu.edu.cn

**Received:** 19-06-2019; **Accepted:** 05-12-2019; **Published online:** 03-01-2020

**基金项目:** 深圳市科技项目(JCYJ20180305123947858)

**\*通信作者:** Tel: 0755-26418375; E-mail: fupg@szu.edu.cn

**收稿日期:** 2019-06-19; **接受日期:** 2019-12-05; **网络首发日期:** 2020-01-03

nitrification and denitrification can occur at the same time in the same reactor, which is the most competitive technology for nitrogen removal from wastewater. Mangrove wetlands are rich in microbial resources and a large number of aerobic denitrifying microorganisms are distributed. **[Objective]** In order to understand the denitrification mechanism of salt-tolerant microorganisms and provide a theoretical basis for the engineering practice of biological denitrification of salt-bearing wastewater, a salt-tolerant aerobic bacteria A63 was isolated from the mangrove wetland and its nitrate reduction ability was analyzed. **[Methods]** The species were identified by morphological characteristics and 16S rRNA gene sequencing. The nitrate reduction ability of the strain under different environmental factors was determined by single factor experiment, and its denitrification performance was optimized. **[Results]** It was preliminarily determined that the strain belonged to the *Zobellella* sp. The strain can carry out denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) action in the range of salinity 0%–10%, pH 5.0–10.0 and temperature 20–40 °C. The optimum growth carbon source is sodium citrate (1.2 g/L), and the optimum salinity 3.0%, the pH is 7.0–7.5, the temperature is 30–35 °C and C/N is 10. Under the optimum denitrification condition, the strain could reduce 208.8 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N to 0 in the medium within 12 hours, and only a small amount of ammonium nitrogen was produced. There was no accumulation of nitrite nitrogen, and the denitrification rate was as high as 99%. Furthermore, the strain had a significant effect on DNRA in adverse habitats such as high salinity, low C/N ratio, weak acidity and low temperature. **[Conclusion]** The strain A63 has a wide range of growth and remarkable nitrogen removal efficiency, so it is suitable for the treatment of mariculture wastewater. The present study lays a foundation for the development of high efficiency biological nitrogen removal process for salty wastewater in the future, and is of great significance to deepen the understanding of nitrogen transformation law and enrich the theory of biological nitrogen removal.

**Keywords:** Nitrate reduction, Aerobic denitrification, Dissimilatory nitrate reduction to ammonium, Salty sewage, Biological removal of nitrogen

海水养殖水体中, 氮元素常以-3 至+5 各价态在生物与非生物之间存在, 各价态形式的氮在水体内不断迁移转化, 形成一个复杂的动态循环<sup>[1]</sup>。硝态氮( $\text{NO}_3^-$ -N)是养殖水体中一种常见的氮赋存形式, 在厌氧条件下极易被还原<sup>[2]</sup>。由于微生物种类和氧( $\text{O}_2$ )条件的差异,  $\text{NO}_3^-$ -N 还原可分为同化还原和异化还原途径。同化还原途径是微生物利用  $\text{NO}_3^-$ -N 合成细胞物质, 整个过程既无  $\text{NO}_2^-$ -N 的积累, 也无  $\text{NH}_4^+$ -N 的产生。异化还原过程可根据产物的不同分为两种途径, 一种途径以  $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2$  为产物, 称为反硝化; 另一种途径以  $\text{NH}_4^+$ -N 为产物, 称为硝酸盐异化还原为氨(dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)<sup>[3-6]</sup>。

传统观点认为在低氧或无氧条件下,  $\text{NO}_3^-$ -N 易被环境中的厌氧反硝化细菌还原<sup>[3]</sup>。但近年来, 在污水处理领域有大量关于好氧反硝化细菌

的报道。好氧反硝化细菌不仅可以促进水体中的反硝化作用达到  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除, 更无需严格的厌氧环境<sup>[7]</sup>。相较于厌氧反硝化细菌, 好氧反硝化细菌具有两大优势: (1) 好氧反硝化细菌能在有氧条件下进行反硝化, 使得硝化过程和反硝化过程能够在同一反应器中同步进行, 节省反应空间和工程建设成本<sup>[8]</sup>; (2) 硝化和反硝化过程产生的酸碱相互抵消, 基本无需调节系统 pH, 可大幅度降低运行成本<sup>[9]</sup>。除此之外, 好氧反硝化细菌具有耐盐能力强, 生长速度快, 反硝化效率高等优点<sup>[10]</sup>。因此, 近年来国内外众多学者开展了耐盐好氧反硝化细菌的研究工作, 司圆圆等<sup>[11]</sup>从虾池过滤口筛选出一株脱氮性能较高的好氧反硝化细菌 X12, 其在最适脱氮条件下对亚硝态氮的去除率高达 96.5%; 石小彤等<sup>[12]</sup>从对虾养殖池底泥中分离出一株好氧反硝化细菌 F1, 初步鉴定为盐单胞

菌(*Halomonas* sp.), 该菌能在好氧条件下, 40 h 内高效地将硝酸盐浓度由 442.28 mg/L 降至 58.28 mg/L, 亚硝酸盐浓度由 32.79 mg/L 降至 0.98 mg/L; 无独有偶, 唐婧等<sup>[13]</sup>从处理高盐废水的活性污泥中也分离出一株好氧反硝化细菌 F10, 该菌为盐单胞菌(*Halomonas* sp.), 在盐度为 3% 的反硝化培养基中 24 h 内对  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率高达 92.6%, 36 h 基本完全去除; He 等<sup>[14]</sup>从污水处理厂筛选出一株好氧反硝化细菌 TJPU04, 经鉴定其是假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)的一种, 此外具有耐盐性能的好氧反硝化微生物类群还包括: 陶厄氏菌(*Thauera* sp.)<sup>[15]</sup>、产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)<sup>[16]</sup>、气单胞菌(*Aeromonas* sp.)<sup>[17]</sup>、肠杆菌(*Enterobacter* sp.)<sup>[18]</sup>和不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)<sup>[19]</sup>等。随着研究的逐渐深入, 有学者发现某些好氧反硝化细菌还同时存在硝酸盐异化还原为氨(DNRA)的作用, 其主要分为两个步骤: (1) 硝酸盐还原为亚硝酸盐; (2) 亚硝酸盐再进一步被还原为铵。反硝化和 DNRA 过程是硝态氮异化还原过程的重要环节, 两者在底物和发生环境等方面较为相似, 在同一菌株内存在两种途径更是罕见。因此, 开展同种菌株的硝态氮异化还原机制及其影响因素的研究, 对于加深氮素转化规律的认识, 丰富生物脱氮理论和技术有着重要意义。

本实验从处理海水养殖污水的秋茄型人工湿地小试系统中优选出一株高效的具有好氧反硝化和 DNRA 能力的细菌, 通过形态、生理生化特征和 16S rRNA 基因测序对其进行了鉴定, 并考察了不同条件下菌株的生长和异化硝酸盐还原特性, 以期含盐废水生物脱氮工艺提供高效的微生物资源和最佳工艺运行参数。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的来源

富集用的样品来源于实验室处理高盐污水的红树人工湿地小试系统的中上层基质<sup>[7]</sup>。

### 1.2 培养基

富集培养基(g/L): 葡萄糖 1.00,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  2.50,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.00,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $\text{CaCl}_2$  0.02,  $\text{NaCl}$  10.00–30.00, pH 7.60–8.20。102.80–122.90 kPa 灭菌 30.00 min, 冷却后添加一定体积用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜<sup>[20]</sup>过滤除菌的  $\text{NaNO}_3$  溶液作为唯一氮源, 其中  $\text{NaNO}_3$  质量浓度为 1.50 g/L。

分离培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.00, 酵母提取物 5.00,  $\text{NaCl}$  30.00, 琼脂粉 15.00, pH 7.30–7.50。102.80–122.90 kPa 灭菌 30.00 min。

反硝化基础培养基(g/L):  $\text{CH}_3\text{COONa}$  1.54,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.10,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  6.00,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.50,  $\text{NaCl}$  30.00, 微量元素<sup>[21]</sup> 2.00 mL, pH 7.30–7.50, 102.80–122.90 kPa 灭菌 30.00 min, 冷却后添加质量浓度为 1.44 g/L 过滤除菌的  $\text{KNO}_3$  作为唯一氮源。

### 1.3 主要试剂和仪器

硝普钠、苯酚、磺胺, 国药集团化学试剂有限公司; 其余化学试剂均为国产分析纯; Omega-GEN 试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; 细菌通用 PCR 引物、DNA Marker 和 *Taq* DNA 聚合酶, 广州艾基生物技术有限公司。

流动注射分析仪, Dechem-Tech.GmbH 公司; PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 凝胶成像系统, 上海复日科技有限公司; Sunrise 酶标仪, 帝肯(上海)贸易有限公司; 高分辨扫描电镜, FEI 公司; 荧光倒置显微镜 DMI1, 莱卡公司。

### 1.4 耐盐菌株的富集和分离

富集驯化: 取盐度为 1.80% 的人工湿地系统基质为供筛土壤, 去除植物根系及杂物, 研磨后风干 1–2 d。取 10 g 风干样本接种于 200 mL 的富集培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养, 当 80% 的  $\text{NaNO}_3$  消耗完后, 以 1% 的体积转接至新鲜培养基中, 进行二次富集<sup>[22]</sup>。前后共转接富集 3 次, 其中培养基含盐量由 10 g/L 逐步提高到 30 g/L。

分离纯化: 富集培养后, 采用梯度稀释平板涂布法, 在分离培养基上进行单菌落的纯化与分离。

### 1.5 菌株的鉴定

采用 Omega-GEN 试剂盒提取细菌 A63 全基因组 DNA, 并采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTG TTACGACTT-3')对 DNA 进行扩增<sup>[23]</sup>。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 32 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳确定条带后交由广州艾基生物有限公司进行序列测定。将序列信息提交 GenBank 核酸信息库进行 BLAST 比对, 利用 MEGA 7.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 法构建菌株的系统发育树<sup>[24]</sup>。

### 1.6 菌株的硝酸盐还原性能优化实验

以硝酸盐(200 mg/L)为唯一氮源, 采用单一变量方法在反硝化基础培养基中测定菌株在不同类型和分子量碳源(葡萄糖、蔗糖、甘露糖、乙酸钠、草酸钠和柠檬酸钠)、不同盐度(0%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、7.0%、10.0%)、不同初始 C/N (2.0、4.0、6.0、8.0、10.0)、不同初始 pH 值(5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0)和不同温度值(20.0、25.0、27.0、30.0、33.0、35.0、40.0), 160 r/min 振荡培养 48 h 的氮代谢情况, 取样测定培养液中剩余的  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 浓度和  $\text{NH}_4^+$ -N 的生成量, 分析不同条件下的总氮(total nitrogen, TN)去除效率和 DNRA 效率, 每组实验做 3 个重复。

### 1.7 最佳脱氮性能实验

把菌株 A63 用 LB 液体培养基进行扩培, 4 °C、8 200×g 离心 5 min 收集对数生长期的细菌, 用无菌人工海水重悬, 调节  $OD_{600}$  至  $1.5 \pm 0.05$ , 以 2% 的接种量接种到反硝化基础培养基中, 在以乙酸钠为唯一碳源的最优条件下进行培养, 每隔 6 h 取样检测  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度, 绘制氮代谢曲线并对该菌的脱氮性能进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 耐盐好氧反硝化菌株 A63 的分离及鉴定

通过富集、分离, 共得到 3 株耐盐并能高效去除  $\text{NO}_3^-$ -N 的细菌, 选取一株优势菌株作为后续实验菌株, 并命名为 A63。如图 1 所示, 菌株 A63 为革兰氏阴性细菌, 在扫描电子显微镜下观察其呈杆状, 长约 1.5–2.5  $\mu\text{m}$ , 宽 0.6–0.8  $\mu\text{m}$  (图 1B), 37 °C 下培养 24–48 h, 在琼脂平板上产生直径为 0.15–0.40 mm 的圆形白色菌落, 并且表面光滑, 边缘整齐(图 1A)。为了分类鉴定 A63 菌株, 通过 PCR 的方法获得了一个 1 381 bp 的 16S rRNA 基因片段, 并对其进行了序列测定。相关序列信息已上传至 GenBank 数据库, 并获得登录号: MN093321。利用 MEGA 7.0 软件<sup>[23]</sup>, 以 Neighbor-Joining 法构建菌株的系统发育树, 如图 2 所示。结果表明, 菌株 A63 与菌株 *Zobellella denitrificans* strain F13-1 (CP012621)有 99.5% 的相似性, 结合细胞的形态特征, 可初步确定菌株 A63 为卓贝儿氏菌(*Zobellella* sp.)。

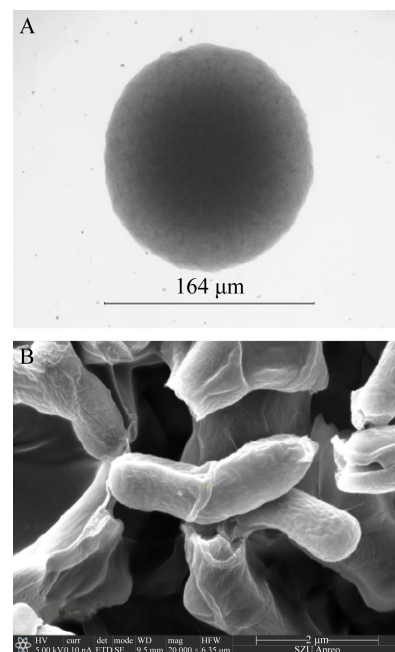


图 1 菌株 A63 的形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of strain A63

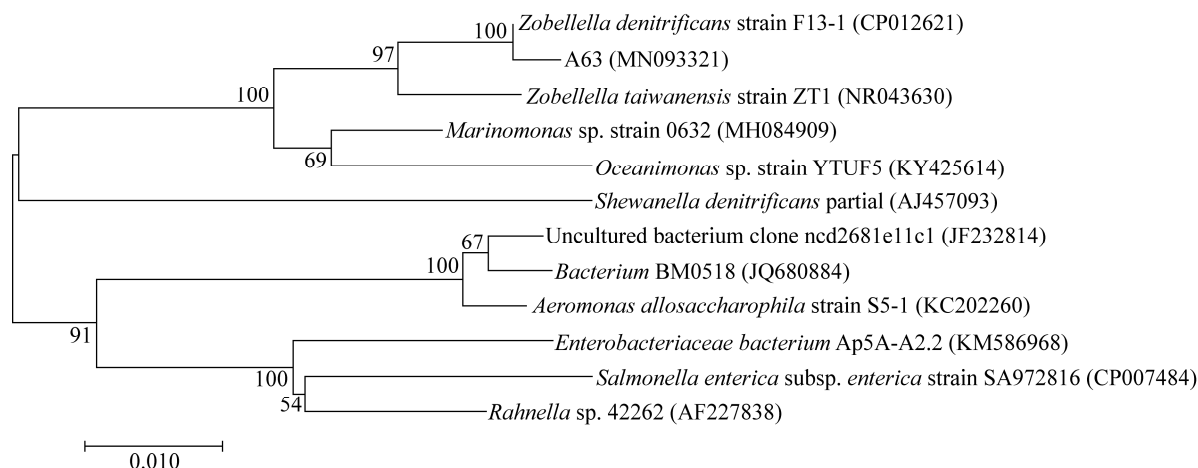


图2 菌株 A63 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain A63 based on the partial 16S rRNA gene sequence

注：括号中的序号表示该菌在 GenBank 数据库中的登录号；分支点上的数字表示置信度；标尺代表遗传变异系数。

Note: The serial number in parentheses indicates GenBank accession number; The number at the branch represents the confidence interval; The scale represents the coefficient of genetic variation.

## 2.2 菌株 A63 的氮代谢条件优化

### 2.2.1 碳源对 A63 菌株硝酸盐还原性能的影响

碳源的化学结构和分子量对反硝化效率有着重要影响<sup>[25]</sup>，不同类型碳源对微生物的 DNRA 过程也有着不同影响。如图 3 所示，在以柠檬酸钠为唯一碳源时，好氧反硝化作用最强，TN 去除率高达 97%，基本无  $\text{NO}_2^-$ -N 积累，仅有 6.05 mg/L 的  $\text{NH}_4^+$ -N 生成，这说明柠檬酸钠作为唯一碳源能有效提供 A63 细菌反硝化所需的电子，促进反硝化脱氮作用，与此同时 DNRA 作用也不强烈；当碳源为蔗糖时，TN 去除效果有所下降，脱氮率仅为 50.5%，反应结束有 30.7% 的  $\text{NO}_3^-$ -N 未降解，基本无  $\text{NO}_2^-$ -N 积累，但有 34.1 mg/L 的  $\text{NH}_4^+$ -N 生成，这说明在蔗糖作为唯一碳源下，菌株 A63 的 DNRA 作用有所增强；当碳源为乙酸钠时，TN 去除率进一步下降(31.9%)，反应结束后有大量  $\text{NO}_2^-$ -N 积累和部分  $\text{NH}_4^+$ -N 的生成，分析认为乙酸钠为易被降解的小分子有机碳源，能够快速地被微生物利用，导致培养后期碳源不足，硝酸盐还原过程无法进行；当唯一碳源为葡萄糖和甘露糖时，TN 去除效果最差，脱氮率仅为 15.3% 和 18.0%，反应结束后分别有 71.3% 和 71.5% 的  $\text{NO}_3^-$ -N 未降解，虽然

仅有少量  $\text{NO}_2^-$ -N 积累，但有较多  $\text{NH}_4^+$ -N 的生成。唐婧等<sup>[13]</sup>从处理高盐废水的生物接触氧化池的活性污泥中分离得到的一株好氧反硝化假单胞菌 F10，研究发现其在以乙酸钠为碳源时反硝化效果最好，脱氮率达 92.71%，且只有微量  $\text{NO}_2^-$ -N 积累。此外，安健等<sup>[26]</sup>研究发现，耐盐好氧反硝化菌 YX-16 在小分子碳源乙酸钠的生长环境下降解速率高于大分子碳源蔗糖的生长环境；但我们的研究发现 A63 在以柠檬酸钠或蔗糖为碳源的生长环境中脱氮效率均高于小分子碳源乙酸钠的生长环境，这是因为不同种菌株对同种碳源的利用度往往不同，导致即使在同种碳源下反硝化效率各不相同。我们的研究与司圆圆等<sup>[11]</sup>对耐盐好氧反硝化细菌 X12 的研究发现较为相似，X12 在以柠檬酸钠、葡萄糖和乙酸钠为唯一碳源时均能进行好氧反硝化，且在以柠檬酸钠为碳源时的脱氮效率大于 95.0%，显著高于以乙酸钠为碳源时的脱氮效率。综上所述，A63 的反硝化脱氮和 DNRA 作用受有机碳源的调控，在盐度为 3.0%，C/N 为 6.0，pH 7.0，温度为 35.0 °C 的实验条件下，其最适反硝化碳源为柠檬酸钠。

碳源对 A63 生长的影响方面分析结果如图 4 所

示。在以蔗糖为唯一碳源时, 菌株生长快速, 接种 6 h 后  $OD_{600}$  达到最高值, 为 1.34, 随后有所下降, 进入稳定期, 这是因为蔗糖是菌株较易利用的简单分子, 同时降解速率较快, 导致在反应后期碳源几乎被完全利用; 在以柠檬酸钠为唯一碳源时, 菌株生长效果最佳, 接种 18 h 后进入稳定期,  $OD_{600}$  达 1.38; 在以乙酸钠为碳源时, 菌株在接种 12 h 后进入稳定期,  $OD_{600}$  在 0.78 左右波动,

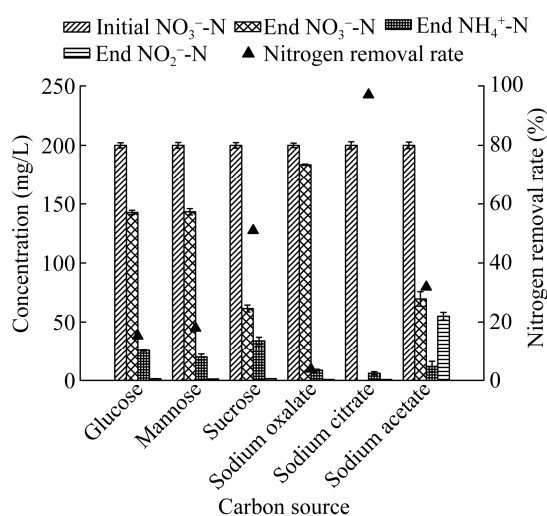


图 3 不同碳源下菌株 A63 的异化硝酸盐还原特性  
Figure 3 Dissimilation nitrate reduction characteristics of strain A63 under different conditions

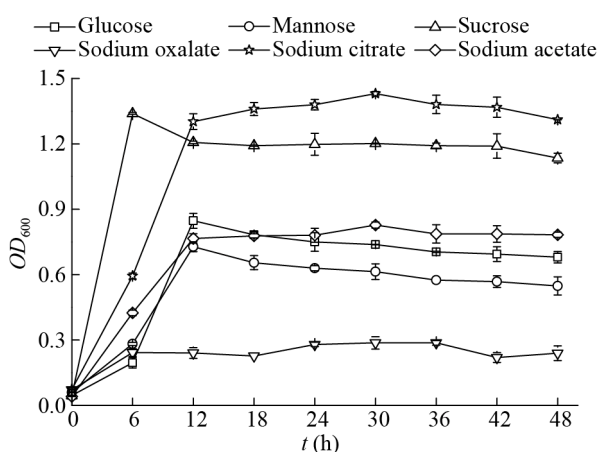


图 4 不同碳源对菌株 A63 生长的影响  
Figure 4 Effects of different carbon sources on the growth of strain A63

长势一般; 在以葡萄糖和甘露糖为碳源时, 接种 12 h 后  $OD_{600}$  达到最大值, 分别为 0.85 和 0.73, 随后进入衰亡期, 这是因为葡萄糖和甘露糖是易于生物降解的有机物, 反应后期碳源不能满足菌株生长的需求, 导致菌株死亡; 以草酸钠为碳源时, 菌株生长效果最差, 生长趋势始终平缓, 接种 48 h 后  $OD_{600}$  仅为 0.24。因此, 结合菌株 A63 的生长曲线和脱氮效果, 确定在盐度为 3%, C/N 为 6, pH 7.0, 温度为 35 °C 的实验条件下, 其最适碳源为柠檬酸钠。有机碳源作为反硝化细菌生长过程中必需的能源, 不同的化学结构和分子量会影响微生物体内的一系列酶促反应, 导致微生物在不同种碳源环境中有不同的生长速率<sup>[27-28]</sup>。柠檬酸钠作为一种小分子碳源在为 A63 提供有效的反硝化电子供体的同时, 还能被其同化吸收, 是菌株 A63 生长和进行反硝化的一种有利碳源。

## 2.2.2 盐度对菌株 A63 硝酸盐还原性能的影响

含盐废水的盐度范围广, 一般在 1%–20% 之间, 因此确定菌株 A63 的最适盐度范围对其应用至关重要。从图 5 可知, 在盐度为 0% 时, 菌株 A63 能进行生长和氮代谢, 接种 48 h 后 TN 去除率达 54.1%, 且 DNRA 作用也较弱, 仅有 6.42 mg/L  $NH_4^+$ -N 生成; 盐度逐步提高到 1.0%、2.0% 和 3.0% 时, TN 去除率在逐渐提高, 分别为 57.3%、59.4% 和 63.4%, 且存在一定量的  $NO_2^-$ -N 积累和  $NH_4^+$ -N 的生成; 随着盐度进一步升高到 4.0%、5.0%、7.0% 和 10.0%, TN 去除率开始逐渐下降, 分别为 50.2%、30.0%、23.8% 和 8.2%, 且存在大量  $NO_2^-$ -N 的积累, DNRA 作用也随着盐度升高明显增强, 在盐度为 10% 时, 反应结束生成了 18.97 mg/L 的  $NH_4^+$ -N。由此可见, 菌株 A63 在淡水和盐度为 1.0%–10.0% 的环境中都能生长并发挥脱氮作用, 且随盐度升高, 其反硝化脱氮效率先升高后逐渐降低, DNRA 作用逐渐增强。菌株 A63 的适宜盐度为 3.0%, 在适宜盐度下脱氮效果不够理想的主要原因是碳源的不足限制了反硝化的进行。唐婧等<sup>[13]</sup>对假单胞菌(*Halomonas* sp.)的一株耐盐好氧反硝化



细菌 F10 的研究也有类似发现,随着盐度的升高 F10 脱氮效率呈先升高后降低的趋势,其在盐度为 0%、10%和 13%时几乎未生长。虽然本研究的菌株 A63 在盐度为 0%环境下具有一定的脱氮能力,但在盐度为 10%时菌株生长缓慢, TN 去除率仅为 8.2%。菌株 A63 虽具有良好的耐盐能力,但不适宜在高盐环境中生长和降解污染物。综上可知,菌株 A63 的适宜反硝化盐度为 3.0%,且低盐度更有利于 A63 反硝化脱氮过程的发生。

### 2.2.3 C/N 对菌株 A63 硝酸盐还原性能的影响

我国的化工废水、养殖废水和部分城市污水的 C/N 都较低,实际处理过程中往往需要投加有机碳源来提高 C/N 以实现氮的高效去除<sup>[29-31]</sup>。考察 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 五个不同 C/N 比条件下,菌株 A63 的硝酸盐异化还原性能。结合图 6 可知,当 C/N 比从 2.0 提高到 10.0, TN 去除率也在逐步提高,从 6.38% 增加到 96.5%。当 C/N 比为 2.0、4.0、6.0、8.0 时,接种 48 h 后均有一定  $\text{NO}_2^-$ -N 积累和  $\text{NH}_4^+$ -N 生成,其中 C/N 比为 6.0 时,  $\text{NO}_2^-$ -N 积累最显著,  $\text{NH}_4^+$ -N 生成量也最大,反应结束分别有 60.99 mg/L 和 12.6 mg/L。有关研究表明,仅有效 C 作为限制因子时,反硝化过程比 DNRA 更具有竞争性,随着 C 源的添加能有效促进反硝化过程的发生<sup>[32]</sup>。当 C/N 比提高到 10.0 时,仅有 7.1 mg/L  $\text{NH}_4^+$ -N 生成,无  $\text{NO}_2^-$ -N 的积累。张翠月等<sup>[33]</sup>研究了不同 C/N 条件下好氧反硝化菌群 LHJ-1 的脱氮性能,结果发现随着 C/N 从 4.0 上升到 16.0, TN 和  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率同步升高,这与 A63 随着 C/N 的升高所表现出的反硝化脱氮特性相一致。由上可知, A63 的好氧反硝化作用在电子受体充分的环境中占具优势,而其 DNRA 作用在低 C/N 环境中更具优势。从实验可知,以乙酸钠为碳源,在盐度为 3.0%, pH 7.0, 温度为 35.0 °C 的实验条件下,菌株 A63 最佳反硝化脱氮 C/N 为 10.0。对于特定菌株,应根据其新陈代谢特征和面临的环境因素选择合适的 C/N 比。

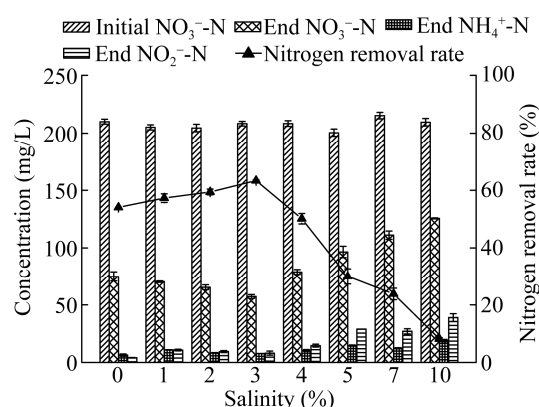


图 5 不同盐度(以 NaCl 计)下菌株 A63 的异化硝酸盐还原特性

Figure 5 Dissimilation nitrate reduction characteristics of strain A63 under different salinity (measured by NaCl)

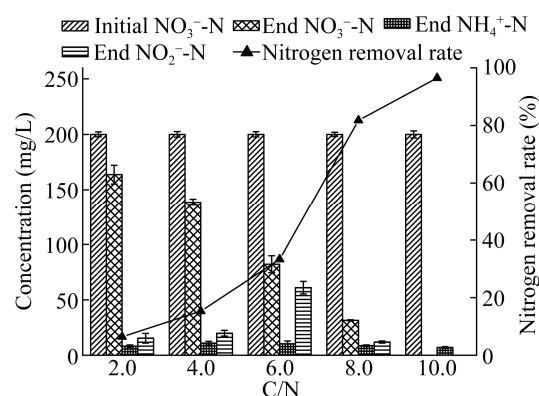


图 6 不同 C/N 比下菌株 A63 的异化硝酸盐还原特性

Figure 6 Dissimilation nitrate reduction characteristics of strain A63 under different carbon-nitrogen ratio

### 2.2.4 初始 pH 对菌株 A63 硝酸盐还原性能的影响

pH 过高或过低均会对菌株的硝酸盐的异化还原过程产生严重影响。考察 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0 八个不同初始 pH 值对菌株 A63 硝酸盐异化还原性能的影响。由图 7 可知,在 pH 为 5.0、6.0 和 6.5 的弱酸性条件下,菌株 A63 的脱氮效果很差, TN 去除率仅为 3.8%、5.3%和 24.1%,反应结束有 80%–90%左右的  $\text{NO}_3^-$ -N 剩余及 10 mg/L 左右的  $\text{NH}_4^+$ -N 生成;在初始 pH 为 7.0 和 7.5 时, TN 去除率进一步提高到 49.3%和最高点 54.1%,且仅有极少量  $\text{NO}_2^-$ -N

积累, DNRA 作用也相对较弱, 仅有约 7.0 mg/L 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  生成; 随着 pH 进一步提高到 8.0 和 9.0, TN 去除率下降到 30% 左右, 且  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  积累量迅速提高到 26.0 mg/L 左右, 但  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的生成量依然较低; 当 pH 提到 10.0 时, TN 去除率进一步下降到 14.3%, 且依然有大量  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的积累。前人的研究表明好氧反硝化细菌对中性 and 弱碱性环境适应性较强, 脱氮效果较好<sup>[34-35]</sup>。在 pH 7.0–10.0 范围内, DNRA 作用不强烈, 仅有少量  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  生成, 这说明在中性和碱性环境下 A63 的 DNRA 作用不强烈, 且菌株 A63 在碱性条件下的脱氮率远高于酸性环境, 这是因为在氧化还原电位处于还原态时反硝化反应才能进行, 而 pH 值对氧化还原电位有直接影响, 当 pH 值过低时, 培养基中的  $\text{H}^+$  浓度增加, 氧化还原电位提高, 同时酶活性大大降低, 影响反硝化效果<sup>[36]</sup>。由于反硝化与 DNRA 过程中亚硝态氮还原酶(Nir)不同, pH 通过对 Nir 活性的影响可导致二者呈现出不同的竞争优势<sup>[37]</sup>。低 pH 会显著降低反硝化速率; 而高 pH 能促进 DNRA 作用; DNRA 作用相对增强的同时, 反硝化程度会削弱<sup>[38]</sup>。但本研究中细菌 A63 在碱性环境下的 DNRA 作用也并未有所增强, 这与以往的研究有所不同。由本结果分析可知, pH 值的变化对菌株 A63 的氮代谢特性影响很大, 其适宜脱氮 pH 范围为 7.0–7.5。细菌 A63 在中性和弱碱性条件下的脱氮率显著高于弱酸性环境, 这与目前大多数好氧反硝化细菌的研究结果相似。Yang 等<sup>[34]</sup>从松花江筛选到一株好氧反硝化细菌 *Janthinobacterium* sp. M-11, 该菌在中性和弱碱性(pH 7.0–9.0)条件下的脱氮效率显著高于弱酸性环境(pH 5.0–7.0); 无独有偶, 司圆圆等<sup>[11]</sup>对好氧反硝化细菌 X12 的研究也有此发现, 该菌在 pH 为 7.0 时反硝化脱氮效率最高, 随着 pH 逐渐提高到 8.2, 脱氮效率逐渐降低, 但始终高于 pH 为 5.6 和 6.2 时的脱氮效率。

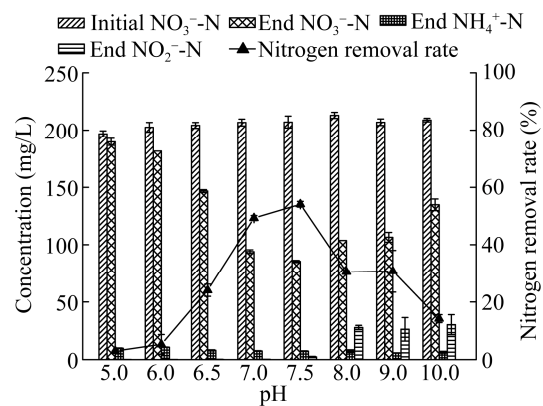


图 7 不同初始 pH 下菌株 A63 的异化硝酸盐还原特性  
Figure 7 Dissimilation nitrate reduction characteristics of strain A63 under different initial pH

#### 2.2.5 温度对菌株 A63 硝酸盐还原性能的影响

温度对反硝化细菌的生物量和介导反硝化过程所需酶的活性有着重要影响, 进而影响其反硝化效率, 多数反硝化细菌的最适生长温度是 20.0–35.0 °C<sup>[26]</sup>。选取 20.0、25.0、27.0、30.0、33.0、35.0 和 40.0 °C 7 个不同温度对 A63 的硝酸盐异化还原性能进行了研究。结果如图 8 所示, 温度小于 33.0 °C 时, 随着温度的升高, TN 去除率逐渐提高, 33.0 °C 达到最高 55.7%, 这主要是因为随着温度的逐渐升高, 介导反硝化过程有关酶的活性逐渐增加, 导致反硝化效率逐渐提升; 当温度逐渐大于适宜温度 33.0 °C 时, TN 去除率显著下降, 这一方面是因为温度“过高”, 导致相关酶的活性降低, 反硝化效率降低; 另一方面是因为菌株 A63 在前期增殖较快, 消耗了大量有机碳源, 导致后期反硝化效果不完全, 积累了大量  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ; 当温度进一步提高到 40.0 °C 时,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的积累量高达 86.66 mg/L, TN 去除率仅为 1.8%。司圆圆等<sup>[11]</sup>对好氧反硝化细菌 X12 的研究发现, 当温度小于 30.0 °C 时, 随温度上升 TN 去除效率逐步提高, 至 30 °C 时达到最高为 96.5%, 此后随着温度的升高, TN 去除效率有所下降, 这主要是因为菌株随温度升高增殖较快, 提前达到对数期, 菌株竞争性地利用营养物质, 导致反硝化速率下降。此



外, 我们发现在不同温度条件下, DNRA 作用都有发生, 且低温和高温等不利生境更有利于 DNRA 作用的表达, 这可能是因为受到温度的胁迫, 细菌的一种自发行为。研究表明, 当温度偏离 33.0 °C 时 (30.0 °C 或 35.0 °C), 脱氮效果都有所降低, 温度的变化直接影响微生物的酶活、生长速度, 导致不同温度下菌株 A63 硝酸盐异化还原特性的差异。由以上分析可知, 以乙酸钠为碳源, 在盐度为 3.0%, C/N 为 6.0, pH 7.0 的实验条件下, 菌株 A63 的适宜脱氮温度范围为 30.0–35.0 °C。

### 2.3 最优条件下菌株 A63 的生长和脱氮性能

通过上述单因子研究, 以乙酸钠为碳源时, 菌株 A63 的适宜脱氮条件为: C/N 值为 10.0, 盐度为 3.0%, pH 为 7.0–7.5, 温度为 30.0–35.0 °C。以乙酸钠为碳源, 对最适条件下 A63 的脱氮性能进行了研究。结果如图 9 所示, 菌株 A63 生长速度快, 接种 6 h 后即进入对数生长期, 12 h 后  $OD_{600}$  达到最大值 1.69, 培养液中  $NO_3^-$ -N 浓度从 208.8 mg/L 降至 0, TN 去除率高达 99%, 培养过程中检测到少量  $NH_4^+$ -N (2 mg/L), 且仅在 6 h 检测到 19.51 mg/L  $NO_3^-$ -N, 随后再无  $NO_3^-$ -N 检出。这说明在最佳条件下, 菌株 A63 的 DNRA 作用较弱, 反硝化作用得到了加强, 能在短时间内完成反硝化脱氮。

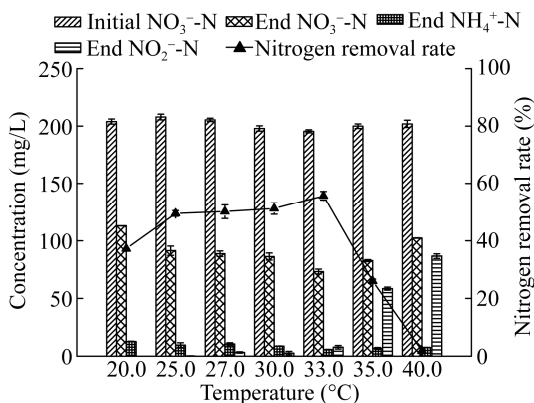


图 8 不同温度下菌株 A63 的异化硝酸盐还原特性

Figure 8 Dissimilation nitrate reduction characteristics of strain A63 under different temperatures

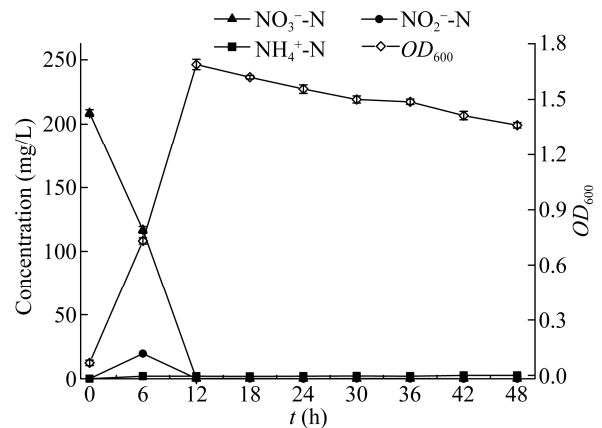


图 9 最佳条件下菌株 A63 的生长曲线及反硝化脱氮性能

Figure 9 Growth curve and denitrification performance of strain A63 under the optimum conditions

在自然界中反硝化菌和 DNRA 菌协同竞争, 它们可以在多种生境中共存, 有相同的电子受体, 利用碳源氧化提供的电子, 共同还原基质硝酸盐。这种竞争机制受周围环境因子的制约和相关微生物的影响, 属于此消彼长的关系<sup>[1]</sup>。一般认为 DNRA 作用在氮源缺乏、碳源丰富而不稳定的偏碱性环境中更容易发生, 且随着盐度、温度的升高而增强。但在同一好氧菌株内两种异化硝酸盐还原途径的关系如何还未知。目前仅有李小义等<sup>[22]</sup>利用测序技术对分离的一株好氧反硝化菌 F13-1 的基因组进行了研究, 发现其具有反硝化和 DNRA 的完整基因, 但各种环境因子对菌株反硝化和 DNRA 过程的影响还不清楚。本研究中发现菌株 A63 在适宜的生长环境中 DNRA 作用基本不表达, 而在“逆境”(如高盐度、低 pH、低 C/N、低温和高温)中 DNRA 作用显著。由于 DNRA 作用是以  $NO_3^-$ -N 为底物形成  $NH_4^+$ -N 的还原过程, 硝化过程是以  $NH_4^+$ -N 为底物形成  $NO_3^-$ -N 的氧化过程, 而 A63 的好氧反硝化是以  $NO_3^-$ -N 为底物最终形成  $N_2$  的还原过程, 推测 DNRA 作用很有可能是菌株 A63 处于“逆境”中的一种生存策略, 把  $NO_3^-$ -N 还原为  $NH_4^+$ -N, 再由环境中的其他氨氧化微生物把  $NH_4^+$ -N 氧化为  $NO_3^-$ -N 供自身生长代谢。菌株 A63

的 DNRA 和好氧反硝化氮代谢途径与环境因子及实际环境中其他微生物的相互关系还需要进行深入的研究。

### 3 结论

本研究从红树林人工湿地小试系统基质中富集分离到菌株 A63, 结合形态学特征及 16S rRNA 基因序列分析, 初步鉴定其为卓贝儿氏菌(*Zobellella* sp.)。随后对该菌的反硝化特性和 DNRA 特性进行了初步研究。结果表明:

(1) 菌株 A63 生长条件广泛, 在盐度 0%–10.0%, pH 值 5.0–10.0, 温度 20.0–40.0 °C 范围内均能生长。菌株 A63 最适反硝化碳源为柠檬酸钠, 以乙酸钠为碳源时, 适宜脱氮盐度为 3.0% (以 NaCl 计), pH 为 7.0–7.5, 温度为 30.0–35.0 °C, C/N 值为 10.0。

(2) 菌株 A63 在不利生存环境下 DNRA 作用明显, 其在高盐度、低 C/N、弱酸性和低温等“逆境”条件下 DNRA 作用显著。

(3) 菌株 A63 脱氮效率高, 在以乙酸钠为碳源的最优条件下, 菌株 A63 在 12 h 内基本能把 208.8 mg/L 的  $\text{NO}_3^-$ -N 去除完全, TN 去除率高达 99% 以上, 菌株 A63 在含盐废水的生物脱氮中具有巨大的应用价值。

### REFERENCES

- [1] Murphy AE, Anderson IC, Smyth AR, et al. Microbial nitrogen processing in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) aquaculture sediments: the relative importance of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA)[J]. *Limnology and Oceanography*, 2016, 61(5): 1589-1604
- [2] Preena PG, Manju NJ, Deepesh V, et al. Genetic diversity of nitrate reducing bacteria in marine and brackish water nitrifying bacterial consortia generated for activating nitrifying bioreactors in recirculating aquaculture systems[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(12): 5729-5740
- [3] Sun YH, De Vos P, Willems A. Influence of nitrate and nitrite concentration on  $\text{N}_2\text{O}$  production via dissimilatory nitrate/nitrite reduction to ammonium in *Bacillus paralicheniformis* LMG 6934[J]. *Microbiology Open*, 2018, 7(4): e00592
- [4] Tao YL, Wen DH. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium: the potential and impacts in estuarine regions[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(1): 172-181 (in Chinese)
- 陶怡乐, 温东辉. 细菌硝酸盐异化还原成铵过程及其在河口生态系统中的潜在地位与影响[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(1): 172-181
- [5] Yang S, Wu SJ, Cai YJ, et al. The synergetic and competitive mechanism and the dominant factors of dissimilatory nitrate reduction processes: a review[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(5): 1224-1232 (in Chinese)
- 杨杉, 吴胜军, 蔡延江, 等. 硝态氮异化还原机制及其主导因素研究进展[J]. *生态学报*, 2016, 36(5): 1224-1232
- [6] Chen T, Li JF, Zou ZJ, et al. Effects of redox potential and pH on the effect of dissimilatory nitrate reduction to ammonium in bioretention system[J]. *Science Technology and Engineering*, 2018, 18(4): 368-373 (in Chinese)
- 陈韬, 李剑洋, 邹子介, 等. 氧化还原电位和 pH 对生物滞留系统硝酸盐异化还原为氨作用的影响[J]. *科学技术与工程*, 2018, 18(4): 368-373
- [7] Fu GP, Yu TY, Huangshen LK, et al. The influence of complex fermentation broth on denitrification of saline sewage in constructed wetlands by heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacterial communities[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 290-298
- [8] Huang TL, Guo L, Zhang HH, et al. Nitrogen-removal efficiency of a novel aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri* strain ZF31, isolated from a drinking-water reservoir[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 196: 209-216
- [9] Ji B, Yang K, Zhu L, et al. Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 20(4): 643-651
- [10] Wang ZC, Gao MC, She ZL, et al. Effects of salinity on performance, extracellular polymeric substances and microbial community of an aerobic granular sequencing batch reactor[J]. *Separation and Purification Technology*, 2015, 144: 223-231
- [11] Si YY, Chen XH, Xu KH, et al. Isolation and denitrification characteristics of salt-tolerant aerobic denitrifying bacterial strain X12[J]. *Agricultural Engineering*, 2017, 7(2): 68-71 (in Chinese)
- 司圆圆, 陈兴汉, 许开航, 等. 耐盐好氧反硝化细菌 X12 的分离及反硝化特性[J]. *农业工程*, 2017, 7(2): 68-71
- [12] Shi XT, Li YQ, Xing GW, et al. Screening and primary identification of an aerobic denitrifier isolate with salt tolerance[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(3): 175-180 (in Chinese)
- 石小彤, 李彦芹, 邢国伟, 等. 一株耐盐好氧反硝化细菌的分离筛选及鉴定[J]. *生物技术通报*, 2013(3): 175-180
- [13] Tang J, Xiao YN, Qu SS, et al. Identification and denitrification characteristics of a strain of halophilic denitrifying bacteria[J]. *Chinese Journal of Environmental*

- Engineering, 2014, 8(12): 5499-5506 (in Chinese)
- 唐婧, 肖亚男, 屈姗姗, 等. 一株耐盐好氧反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮特性[J]. 环境工程学报, 2014, 8(12): 5499-5506
- [14] He XL, Sun Q, Xu TY, et al. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel halotolerant bacterium *Pseudomonas mendocina* TJPU04[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, 42(5): 853-866
- [15] Yao S, Ni JR, Chen Q, et al. Enrichment and characterization of a bacteria consortium capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature[J]. Bioresource Technology, 2013, 127: 151-157
- [16] Geed SR, Prasad S, Kureel MK, et al. Biodegradation of wastewater in alternating aerobic-anoxic lab scale pilot plant by *Alcaligenes* sp. S<sub>3</sub> isolated from agricultural field[J]. Journal of Environmental Management, 2018, 214: 408-415
- [17] Chen MX, Wang WC, Feng Y, et al. 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
- [18] Fu GP, Han JY, Yu TY, et al. The structure of denitrifying microbial communities in constructed mangrove wetlands in response to fluctuating salinities[J]. Journal of Environmental Management, 2019, 238: 1-9
- [19] Zhan H, Wang GJ, Chen CX. Identification and denitrification ability of an aerobic denitrifier[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2017, 24(2): 44-48 (in Chinese)
- 战海, 王广军, 陈成勋. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化能力初测[J]. 天津农学院学报, 2017, 24(2): 44-48
- [20] Xu JZ, Chen B, Du BH, et al. Isolation and biological characteristics of a *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(3): 71-77 (in Chinese)
- 徐敬昭, 陈贝, 杜秉海, 等. 一株嗜麦芽寡养单胞菌的分离及其生物学特性[J]. 生物技术通报, 2019, 35(3): 71-77
- [21] Yang HF, Tang JY, Hu AH, et al. Identification and denitrification characteristics of a denitrifier[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2014, 8(1): 366-371 (in Chinese)
- 杨浩锋, 唐佳琦, 胡安辉, 等. 一株反硝化细菌的分离鉴定及其反硝化特性[J]. 环境工程学报, 2014, 8(1): 366-371
- [22] Li XY, Wang LP, Lai QL, et al. Preliminary study on aerobic denitrification characteristics of *Zobellella* sp. F13-1[J]. Journal of Applied Oceanography, 2016, 35(1): 122-129 (in Chinese)
- 李小义, 王丽萍, 赖其良, 等. 一株卓贝尔氏菌 F13-1 好氧反硝化特性及其反硝化基因的初步研究[J]. 应用海洋学学报, 2016, 35(1): 122-129
- [23] Fu GP, Zhao L, Huangshen LK, et al. Isolation and identification of a salt-tolerant aerobic denitrifying bacterial strain and its application to saline wastewater treatment in constructed wetlands[J]. Bioresource Technology, 2019, 290: 121725
- [24] Ahmadi M, Jorfi S, Kujlu R, et al. A novel salt-tolerant bacterial consortium for biodegradation of saline and recalcitrant petrochemical wastewater[J]. Journal of Environmental Management, 2017, 191: 198-208
- [25] Xu ZS, Dai XH, Chai XL. Effect of different carbon sources on denitrification performance, microbial community structure and denitrification genes[J]. Science of the Total Environment, 2018, 634: 195-204
- [26] An J, Song ZF, Yang XL, et al. Characteristics of aerobic denitrifying strain YX-6 and identification[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 561-569 (in Chinese)
- 安健, 宋增福, 杨先乐, 等. 好氧反硝化细菌 YX-6 特性及鉴定分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(3): 561-569
- [27] Han YH, Zhang WX, Zhuang ZG, et al. Isolation and characterization of the salt-tolerant aerobic denitrifying bacterial strain A-13[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(1): 47-58 (in Chinese)
- 韩永和, 章文贤, 庄志刚, 等. 耐盐好氧反硝化菌 A-13 菌株的分离鉴定及其反硝化特性[J]. 微生物学报, 2013, 53(1): 47-58
- [28] Fu LJ, Guo DZ, Shi CL, et al. Effect of carbon source and C/N ratio on heterotrophic denitrification of pure culture[J]. Rural Eco-Environment, 2005, 21(2): 42-45 (in Chinese)
- 傅利剑, 郭丹钊, 史春龙, 等. 碳源及碳氮比对异养反硝化微生物异养反硝化作用的影响[J]. 农村生态环境, 2005, 21(2): 42-45
- [29] Zhang YM, Wang XC, Cheng Z, et al. Effect of fermentation liquid from food waste as a carbon source for enhancing denitrification in wastewater treatment[J]. Chemosphere, 2016, 144: 689-696
- [30] Kim H, Kim J, Shin SG, et al. Continuous fermentation of food waste leachate for the production of volatile fatty acids and potential as a denitrification carbon source[J]. Bioresource Technology, 2016, 207: 440-445
- [31] Hang QY, Wang HY, Chu ZS, et al. Application of plant carbon source for denitrification by constructed wetland and bioreactor: review of recent development[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(9): 8260-8274
- [32] Shan J, Yang PP, Shang XX, et al. Anaerobic ammonium oxidation and denitrification in a paddy soil as affected by temperature, pH, organic carbon, and substrates[J]. Biology and Fertility of Soils, 2018, 54(3): 341-348
- [33] Zhang CY, Ding Y, Huang MS. Screening of heterotrophic nitrification-aerobic denitrifying bacteria and its nitrogen removal characteristics[J]. Journal of East China normal University (Natural Science), 2018(6): 22-31, 87 (in Chinese)

- 张翠月, 丁钰, 黄民生. 异养硝化-好氧反硝化细菌的筛选及其脱氮性能研究[J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2018(6): 22-31, 87
- [34] Yang M, Lu DW, Qin BD, et al. Highly efficient nitrogen removal of a coldness-resistant and low nutrient needed bacterium, *Janthinobacterium* sp. M-11[J]. Bioresource Technology, 2018, 256: 366-373
- [35] Zhang HH, Zhao ZF, Li SL, et al. Nitrogen removal by mix-cultured aerobic denitrifying bacteria isolated by ultrasound: performance, co-occurrence pattern and wastewater treatment[J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 372: 26-36
- [36] Xu ZS, Dai XH, Chai XL. Effect of influent pH on biological denitrification using biodegradable PHBV/PLA blends as electron donor[J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 131: 24-30
- [37] Zhang JB, Lan T, Müller C, et al. Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium (DNRA) plays an important role in soil nitrogen conservation in neutral and alkaline but not acidic rice soil[J]. Journal of Soils and Sediments, 2015, 15(3): 523-531
- [38] Fernandes SO, Bonin PC, Michotey VD, et al. Nitrogen-limited mangrove ecosystems conserve N through dissimilatory nitrate reduction to ammonium[J]. Scientific Reports, 2012, 2: 419

(上接 p.1331)

## 征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

## 4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式(即各种文字、各种介质)的版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>