

研究报告

异养硝化-好氧反硝化菌 *Acinetobacter johnsonii* sp. N26 的脱氮性能及代谢途径

夏远舰, 杨小丽*, 李海华, 赵博

华北水利水电大学环境与市政工程学院, 河南 郑州 450011

夏远舰, 杨小丽, 李海华, 赵博. 异养硝化-好氧反硝化菌 *Acinetobacter johnsonii* sp. N26 的脱氮性能及代谢途径[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1374-1395.

XIA Yuanjian, YANG Xiaoli, LI Haihua, ZHAO Bo. Optimization of nitrogen removal performance and metabolic pathway of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterial strain *Acinetobacter johnsonii* sp. N26[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1374-1395.

摘要: 【背景】水体中含氮物质的大量累积会造成水体富营养化、水生生物死亡等问题, 严重威胁水生态环境, 制约我国环境保护的持续发展。【目的】为去除生活污水中的含氮污染物, 从羊粪堆肥中筛选出了一株具有异养硝化-好氧反硝化功能的细菌——约氏不动杆菌 *Acinetobacter johnsonii* sp. N26, 研究其脱氮性能和代谢途径。【方法】测定菌株 N26 在氨氮和硝态氮中的生长和脱氮曲线, 通过单因素试验对其脱氮性能进行优化, 通过氮平衡分析和功能基因鉴定研究其脱氮代谢途径。【结果】生长和脱氮曲线表明, 菌株 N26 对初始浓度均为 50 mg/L 的氨氮和硝态氮的去除速度快、效率高, 其中 9 h 内对氨氮的去除效率为 95.5%, 最大去除速率为 5.330 mg/(L·h); 15 h 内对硝态氮的去除效率为 93.6%, 最大去除速率为 3.147 mg/(L·h), 且最终仅有少量硝酸盐、亚硝酸盐积累。脱氮性能优化结果表明, 该菌株的最适氮源为氯化铵, 最适碳源为丁二酸钠, 最适温度为 30 °C, 最适接种量为 15%, 最适 pH 值为 8.0–9.0, 最适碳氮比为 15, 最适转速为 120 r/min, 最适氮负荷 ≤300 mg/L (氨氮)。氮平衡分析和功能基因鉴定结果表明, 该菌种的脱氮不仅是异养硝化-好氧反硝化过程, 还是一个短程硝化-反硝化过程, 其脱氮代谢途径为 $\text{NH}_4^+-\text{N} \rightarrow \text{NO}_2^--\text{N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 和 $\text{NO}_3^--\text{N} \rightarrow \text{NO}_2^--\text{N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 。【结论】*Acinetobacter johnsonii* sp. N26 菌株具有优异的脱氮特性, 在治理水体氨氮污染方面具备应用潜力, 该结果可为异养硝化-好氧反硝化微生物应用于生活污水的生物脱氮处理提供理论依据。

关键词: 异养硝化-好氧反硝化; 约氏不动杆菌; 生长曲线; 碳源; 脱氮途径; 功能基因

资助项目: 河南省水环境模拟与治理重点实验室开放研究基金(KFJJ201903); 国家自然科学基金(51708215)

This work was supported by the Open Research Foundation of Henan Key Laboratory of Water Environment Simulation and Treatment (KFJJ201903) and the National Natural Science Foundation of China (51708215).

*Corresponding author. E-mail: yangxiaoli@ncwu.edu.cn

Received: 2022-08-05; Accepted: 2022-10-06; Published online: 2022-11-14

Optimization of nitrogen removal performance and metabolic pathway of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterial strain *Acinetobacter johnsonii* sp. N26

XIA Yuanjian, YANG Xiaoli*, LI Haihua, ZHAO Bo

School of Environmental and Municipal Engineering, North China University of Water Resources and Electric Power, Zhengzhou 450011, Henan, China

Abstract: [Background] The accumulation of nitrogenous substances in water bodies will cause problems such as eutrophication and death of aquatic organisms, which seriously threatens the aquatic environment and restricts the environmental protection for the sustainable development of China. [Objective] To study the nitrogen removal performance and metabolic pathway of *Acinetobacter johnsonii* sp. N26, a bacterial strain with heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying function and screened out from sheep manure compost, for the removal of nitrogen pollutants in domestic sewage. [Methods] The growth and nitrogen removal curves of N26 in the media with ammonia nitrogen and nitrate nitrogen were established. The nitrogen removal performance of the strain was optimized by single factor experiment, and the metabolic pathway was studied by nitrogen balance analysis and functional gene identification. [Results] The growth and nitrogen removal curves illustrated that N26 rapidly removed ammonia nitrogen and nitrate nitrogen (initial concentration of 50 mg/L) with high efficiency. For the removal of ammonia nitrogen, the strain showed the removal efficiency of 95.5% and the maximum removal rate of 5.330 mg/(L·h) within 9 h. For the removal of nitrate nitrogen, the strain showed the removal efficiency of 93.6% and the maximum removal rate of 3.147 mg/(L·h) within 15 h, and only a small amount of nitrate and nitrite were accumulated in the end. The strain had the optimum nitrogen removal performance in the medium with ammonium chloride as the nitrogen source and sodium succinate as the carbon source at 30 °C, the inoculum amount of 15%, pH 8.0–9.0, C/N ratio of 15, rotating speed of 120 r/min, and nitrogen load ≤ 300 mg/L (ammonia nitrogen). The results of nitrogen balance analysis and functional gene identification indicated that the nitrogen removal process of this strain was not only in line with heterotrophic nitrification-aerobic denitrification but also a short-range nitrification-denitrification process. The metabolic pathways of this strain for nitrogen removal were $\text{NH}_4^+ - \text{N} \rightarrow \text{NO}_2^- - \text{N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ and $\text{NO}_3^- - \text{N} \rightarrow \text{NO}_2^- - \text{N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$. [Conclusion] *A. johnsonii* sp. N26 has excellent performance of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification and application potential in the treatment of ammonia nitrogen pollution in water bodies. The results can provide a theoretical basis for the application of heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying microorganisms to the biological removal of nitrogen in domestic sewage.

Keywords: heterotrophic nitrification-aerobic denitrification; *Acinetobacter johnsonii*; growth curve; carbon source; nitrogen removal pathway; functional genes

生活污水和工农业废水中含氮物质的处理一直是城市污水处理中能耗最高、技术难度最大的关键环节,也是污水处理行业节能降耗、减少碳排放的关键,因此脱氮技术一直是水处理领域的热门研究内容^[1]。目前一般采用物理法、化学法、生物法等来处理废水中的含氮物质,其中生物法由于处理成本相对较低,应用最为广泛^[2]。传统的生物法一般需要经历 2 个步骤,即自养菌的好氧硝化过程和异养菌的厌氧反硝化过程^[3],这 2 个步骤对外界条件的需求不一致,致使完整脱氮过程难以在同一容器中进行,造成污水处理建设成本和资源消耗高等一系列问题^[4-5];并且由于自养硝化细菌生长缓慢、产能较低、世代时间长、在冬季难以维持较高的生物浓度,致使硝化效果不佳^[6]。

传统生物法脱氮在现实应用中存在许多不足,因此需要探求一种高效、新型的方法,其中就包括分离筛选出新型脱氮菌种。该菌种的特性在于能挣脱传统生物脱氮理论的束缚,即在异养和自养、厌氧和好氧微生物之间,选择既符合生物科学基础,又能够满足实际工程需要的合适菌种,并在确定该菌种的种属的基础上研究其脱氮特性和脱氮机理^[7]。Robertson 等^[8]在 1983 年从废水中发现了特殊菌种 *Paracoccus pantotrophus*,与传统生物脱氮菌种不同的是,该菌种能够在硝化过程中利用外界碳源作为能量基础,并且可以同时完成好氧反硝化,因此提出了异养硝化-好氧反硝化(heterotrophic nitrification-aerobic denitrification, HN-AD)的概念。此后,中外研究者依据这个概念筛选、分离出了众多 HN-AD 菌种,如 *Acinetobacter junii* WZ17^[9]、*Acinetobacter junii* YB^[10]、*Pseudomonas stutzeri* T13^[11]、*Fusarium* sp. A60^[12]等。HN-AD 菌种分布广泛,在细菌、真菌的多个种属均有发现,目前已鉴定出了 20 多个功能属,这些微

生物以其对氨氮的高耐受性、高效的脱氮能力和较强的 pH 适应性而受到越来越多的关注^[13]。它们不仅具有比自养硝化菌更快的生长速度,而且还可以利用碳源作为好氧条件下硝化-反硝化的能量和电子来源^[14]。此外,HN-AD 菌异养硝化的产物可以作为好氧反硝化的反应物,因此硝化-反硝化可以在同一容器内同步进行,从而使同步硝化-反硝化成为可能^[15];硝化产生的中间产物在短时间内作为反应物直接被反硝化,从根本上避免了硝酸盐和亚硝酸盐的积累带来的问题^[16-17]。总而言之,HN-AD 菌较适合应用于处理大规模水体氮元素的污染,具有节约处理时间、提高去除效率、节省建设成本等优点^[18]。然而,异养硝化-好氧反硝化需要全程投加碳源,这也使得该方法面临物料成本增加和额外的 COD 污染等问题;并且不同菌种的脱氮性能和所需的施加条件不一,需要研究者在研究中总结;另外,研究者对这类微生物的研究仍处于初始阶段,而对于脱氮机理及理论的研究则更为少见,想要发挥此类菌种的最大优势,仍需要大量的研究来实现^[19]。

为研究某一高效 HN-AD 菌的脱氮性能和代谢途径,作者首先对自然界一些潜在的具有硝化活性能力的菌种进行筛选,经过筛选认为其中一株在亲缘上最接近不动杆菌属的 *Acinetobacter johnsonii* sp. N26 最具备研究价值。本文主要研究 *Acinetobacter johnsonii* sp. N26 的异养硝化-好氧反硝化脱氮性能和代谢途径,活化菌种 N26 并对其进行功能基因鉴定,通过功能基因鉴定结果和氮平衡分析研究该菌种的代谢途径,揭示该菌种的氮代谢机理。

本文的重点与难点在于,通过将表观的生长及脱氮表现与内在的功能基因及关键酶建立联系,构建菌种的脱氮路径,分析菌种的脱氮机理。赵天涛等^[7]认为,目前关于 HN-AD 菌的

研究主要集中在菌株的分离鉴定、脱氮影响因素和关键酶分析等方面, 具体的脱氮机制尚缺乏系统清晰的认识和总结。Song 等^[20]认为, 一些异养硝化-好氧反硝化菌种存在同时的短程硝化-反硝化行为, 该表述为作者研究其脱氮途径提供了思路。异养硝化-好氧反硝化是一种具有广阔前途的脱氮方法, 但目前仅停留在理论研究和实验测试阶段, 优化其脱氮性能并揭示其脱氮途径, 有助于为未来异养硝化-好氧反硝化的理论完善和实际应用提供参考^[21-23]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

实验菌种采集于河南省某养殖场羊粪堆肥, 通过实验室的富集培养和菌株分离, 鉴定为不动杆菌属, 命名为 *Acinetobacter johnsonii* sp. N26, 保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC), 保藏编号为 CCTCC M 2022462。

1.1.2 培养基

基础培养基(g/L): 蛋白胨 10.00, 牛肉膏 3.00, 氯化钠 5.00, 琼脂 15.00, pH 7.3±0.1; 富集培养基(g/L): 氯化铵 0.10, 乙酸钠 1.34, 另加维氏盐溶液 50 mL, pH 7.0; 氨氮培养基(g/L): 氯化铵 0.19, 丁二酸钠 4.22, 另加维氏盐溶液 50 mL (初始氨氮浓度 50 mg/L, C/N 为 15), pH 7.0±0.2; 硝酸盐氮培养基(g/L): 硝酸钠 0.30, 丁二酸钠 4.22, 另加维氏盐溶液 50 mL (初始硝酸盐氮浓度 50 mg/L, C/N 为 15), pH 7.0±0.2。维氏盐溶液(g/L): 磷酸氢二钾 5.00, 七水硫酸镁 2.50, 氯化钠 2.50, 七水硫酸亚铁 0.05, 四水硫酸锰 0.05。

以上培养基用 250 mL 锥形瓶装液 100 mL, 用高压灭菌锅于 0.11 MPa 灭菌 20 min, 用稀盐酸溶液和氢氧化钠溶液调整至需要的 pH 值,

备用。

1.1.3 主要试剂和仪器

化学试剂均为国产分析纯; PrimeScriptTM RT Reagent Kit (Perfect Real Time), TaKaRa 公司; HieffTM qPCR SYBR Green Master Mix (low Rox), 上海翊圣生物科技有限公司; PCR 引物, 苏州金唯智生物科技有限公司。水浴恒温振荡器, 常州金坛旭日实验仪器厂; 洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 高压蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 基因扩增仪, 杭州博日科技股份有限公司; 荧光定量 PCR 仪, 赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

1.2.1 生长与脱氮曲线的测定

挑取 N26 单菌落接种于富集培养基中, 用摇床 30 °C、120 r/min 培养 24 h, 作为菌种活化液备用。将菌种活化液摇匀, 按 15%接种量接种至 100 mL 氨氮培养基和硝酸盐氮培养基中, 30 °C、120 r/min 培养 36 h, 每 3 h 取样检测。以同类型的空白培养液作为空白对照, 测定样品的 OD_{600} 、氨氮、硝态氮、亚硝态氮、总氮(浊液)和总氮(清液)的浓度, 其中总氮(浊液)为直接取样后进行消解、测定, 总氮(清液)为取样后用真空抽滤机过滤掉水中悬浮物和沉淀, 然后进行消解、测定^[24]。

1.2.2 脱氮性能的优化

在上述培养基成分和实验操作的基础上, 按照单因素试验的原理, 分别改变氨氮培养基的氮源种类(尿素、氯化铵、硫酸铵、蛋白胨); 氨氮、硝酸盐氮培养基的碳源种类(无碳源、葡萄糖、蔗糖、丁二酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠), 温度(10、20、30、40、50 °C), 接种量(1%、5%、10%、15%、20%、25%), pH (4.0、5.0、6.0、

7.0、8.0、9.0、10.0), C/N (0、5、10、15、20、25), 转速(0、30、60、90、120、150 r/min), 氮负荷(50、100、150、200、300、400、800 mg/L), 对菌株 N26 进行培养条件优化实验, 摇床培养 72 h, 每 12 h 取样检测 OD_{600} 以及氨氮、硝态氮的浓度, 并计算氨氮、硝态氮相对 0 h 时的去除率。

1.2.3 功能基因的鉴定

功能基因的鉴定委托复旦大学上海复达检测集团完成。用荧光定量 PCR 扩增的方法鉴定功能基因, 检测的功能基因有 *amoA*、*narG*、*napA*、*nirS/nirK*、*nor*、*norB* 及 *nosZ* 等, 分别采用 *amoA-F1/amoA-R1*、*narG-F1/narG-R1*、*napA-F3/napA-R3*、*nirS-F1/nirS-R1*、*nor-F1/nor-R1*、*norB-F1/norB-R1*、*nosZ-F1/nosZ-R1* 等作为扩增引物, 引物序列如表 1 所示。

总 RNA 抽提: 使用 TaKaRa 的试剂盒 PrimeScriptTM RT Reagent Kit (perfect real time) 进行总 RNA 的抽提。将经过前处理的样品进行相分离, 然后将沉淀、洗涤后的 RNA 沉淀空气

干燥 5 min, 加入适量 DEPC 处理水溶解 RNA 沉淀, 用分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。

反转录 PCR 反应体系: 5×PrimeScript Buffer (for real time) 4 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μL, 引物 Oligo dT (50 μmol/L) 1 μL, Random 6 mers (100 μmol/L) 1 μL, 总 RNA 样品 1 μg, RNase Free dH₂O 补足 20 μL。在 37 °C 反应 15 min, 85 °C 反应 5 s, -20 °C 保存备用。

定量 PCR 反应体系: HieffTM qPCR SYBR Green Master Mix (low Rox) 10 μL, Forward primer 和 Reverse primer (10 μmol/L) 各 0.4 μL, cDNA (稀释比 1:10) 2 μL, RNase Free ddH₂O 补足 20 μL。定量 PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环, 然后进行荧光采集。反应结束后, 进行 60–90 °C 熔解曲线分析。

1.3 分析方法

NH₄⁺-N 的测定采用纳氏试剂分光光度法^[25]; NO₃⁻-N 的测定采用紫外分光光度法^[26]; NO₂⁻-N 的测定采用分光光度法^[27]; TN 的测定采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法^[28]; OD_{600} 采用紫外分光光度计测定^[29]。

2 结果与分析

2.1 生长曲线与脱氮曲线

测定菌株 N26 在液体氨氮培养基和硝酸盐氮培养基中不同时刻的 OD_{600} , 以及氨氮、硝态氮、亚硝态氮、总氮的浓度, 绘制菌株 N26 的生长曲线与脱氮曲线。其中总氮的测定分为总氮(清液)和总氮(浊液)两个部分, 总氮(清液)的浓度是指水中可溶性含氮物质的浓度, 总氮(浊液)的浓度是指水中所有含氮物质的浓度, 浊液减去清液的差值约等于水中细胞体的含氮量。

由图 1A 可见, 以氨氮为唯一氮源时, 初始 OD_{600} 为 0.075; 在 0–15 h, 微生物进入对数

表 1 PCR 扩增目的基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of the target genes amplified by PCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>amoA-F1</i>	CCCTCATCATGGACACCGTC
<i>amoA-R1</i>	CAGGAAGCCGGTGTAGTCAG
<i>narG-F1</i>	TGTCCATGGTCTCCTACGCA
<i>narG-R1</i>	TAGAAGCTCATGCAGACGCC
<i>napA-F3</i>	AGAGAAAGAGGGCGCTTACG
<i>napA-R3</i>	GGCGGGAGAACTGGACTAAC
<i>nirS-F1</i>	TCAACAACCTGCAGGAGACC
<i>nirS-R1</i>	CACCTTGTCGGACTGGTTGG
<i>nor-F1</i>	CGAGTGGATTCCGATCCAGG
<i>nor-R1</i>	CGATGAAGTACGGCACCTGA
<i>norB-F1</i>	ACCCGCGACAAGTTCTACTG
<i>norB-R1</i>	GCACCCATGATCAGTTCCCA
<i>nosZ-F1</i>	TGTCGGTCTCCAAGTTGACG
<i>nosZ-R1</i>	CTCACGATTGCATCATGGCG

生长期, N26 菌株的数量迅速增加, 15 h 时 OD_{600} 值为 1.055; 随后在 15–24 h 进入稳定期, OD_{600} 保持稳定, 期间最大数值为 1.085; 在 24–36 h 进入衰亡期, 细胞的分解代谢大于合成代谢, 细菌死亡速度大于新生成的速度, 整个群体出现负增长。氨氮浓度在 0–9 h 急剧下降, 从 0 h 的 50.253 mg/L 下降到 9 h 的 2.282 mg/L, 最大去除速率为 5.330 mg/(L·h), 9 h 去除效率为 95.5%; 在此后的 27 h, 培养基中的氨氮浓度一直维持在 1 mg/L 以下的状态, 36 h 的氨氮去除率几乎达到 100%。硝态氮(NO_3^- -N)从 0 h 到 36 h 一直保持浓度接近为零的状态, 变化起伏不大。亚硝态氮(NO_2^- -N)在 0–3 h 内从 0 上升到 13.187 mg/L 随后逐渐降低, 直到 21 h 几乎完全去除。总氮(清液)在 0–12 h 内从 56.184 mg/L 迅速下降到 9.874 mg/L, 去除速率为 3.859 mg/(L·h); 随后在 12–21 h 去除速率降低, 去除速率为 0.848 mg/L; 总氮(清液)在 21 h 去除率已经达到 96.0%, 36 h 去除率则为 98.4%, 总氮(清液)的低残留率标志着在 36 h 氨氮、硝态氮、亚硝态氮等水中溶解态氮几乎被同步去除, 并且该

去除过程与菌体的快速生长保持同步。总氮(浊液)在 0–36 h 保持稳定下降的趋势, 从 0 h 的 56.188 mg/L 下降到 36 h 的 37.913 mg/L, 去除速率为 0.507 mg/(L·h), 去除效率为 32.5%。

由图 1B 可见, 以硝态氮为唯一氮源时, OD_{600} 初始为 0.075, 在 0–15 h, 微生物进入对数生长期, N26 菌株的数量迅速增加, 15 h 时 OD_{600} 值为 1.025; 在 15–18 h 进入短暂的稳定期, 生长增速放缓, OD_{600} 从 1.025 增至 1.085; 随后在 18–36 h 进入衰亡期, 整个微生物群体一直保持负增长的态势, 最终在 36 h 的 OD_{600} 为 0.72。氨氮在 36 h 内浓度无明显变化, 一直维持在接近为零的状态。硝态氮浓度的降低与菌株的快速生长保持同步, 从 0 h 的 50.418 mg/L 迅速下降到 15 h 的 3.210 mg/L, 最大去除速率为 3.147 mg/(L·h), 15 h 去除效率为 93.6%; 在此后的 21 h, 硝态氮维持在 3.000 mg/L 以下的低浓度, 36 h 去除率几乎达到 100%^[30]。亚硝态氮在 0–15 h 内从 0 上升到 14.918 mg/L, 随后逐渐降低, 直到 30 h 几乎完全去除。总氮(清液)在 0–9 h 迅速下降, 去除速率为 2.713 mg/L,

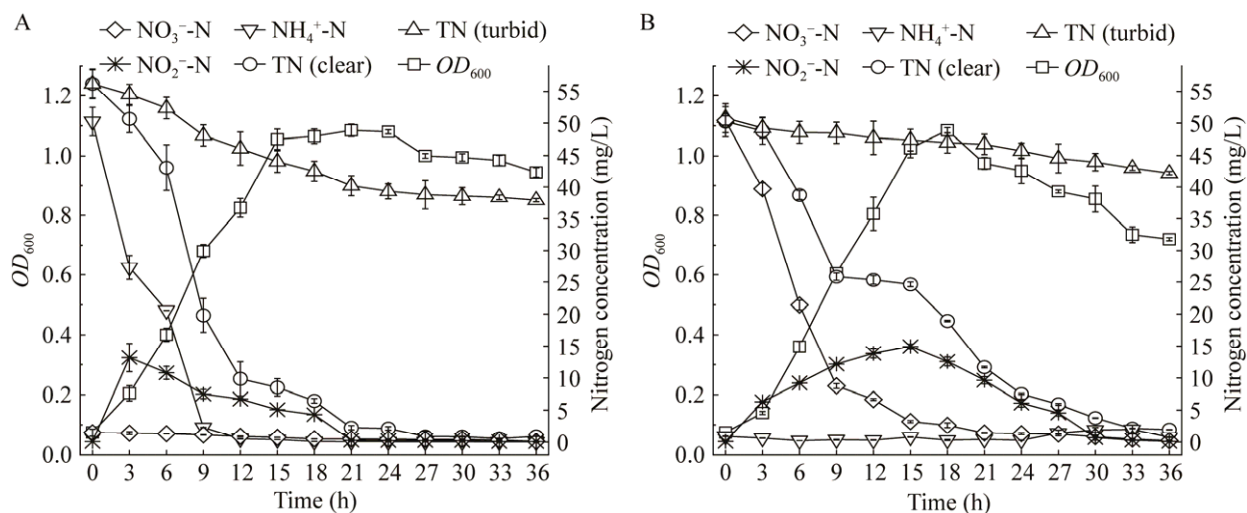


图 1 以氨氮(A)、硝态氮(B)为氮源时菌株 N26 的生长和脱氮曲线

Figure 1 The growth and nitrogen removal curve of strain N26 when NH_4^+ -N (A), NO_3^- -N (B) as nitrogen source.

这是因为随着菌株的快速增殖,其硝化-反硝化能力也处于最强的阶段,中间产物亚硝态氮被迅速反硝化去除;在 9–15 h 阶段,随着培养基中亚硝态氮的持续增加,总氮(清液)的降速放缓;随着亚硝态氮在 15 h 达到最大值后持续下降,总氮(清液)在 15–36 h 也加大了下降的趋势,直到降到 36 h 的 1.939 mg/L,36 h 去除率为 96.1%。总氮(浊液)在 0–36 h 保持稳定下降的趋势,从 0 h 的 50.802 mg/L 下降到 36 h 的 42.214 mg/L,去除速率为 0.239 mg/(L·h),去除效率为 16.9%。

2.2 脱氮性能优化结果

2.2.1 不同氮源对脱氮性能的影响

由于水体氮污染的初始污染因子主要是氨氮,因此选取尿素、氯化铵、硫酸铵及蛋白胨作为初始氮源,碳源统一为丁二酸钠,通过调整氮源投加量,使初始氨氮、总氮含量基本相同(蛋白胨的投加量为折算结果)。尿素、蛋白胨为常见的有机氮污染物,氯化铵、硫酸铵为常见的氨氮污染物,这 4 种含氮物质可基本代表水体氮污染的初始形态。由图 2 可见,菌株 N26 在不同氮源中生长和脱氮情况各有异同。相同之处是:细菌数量均总体呈现先升高再降低的过程,菌株 N26 在 0–36 h 进入生长期,36 h 后

进入稳定期和衰亡期;在菌株生长的同时,氨氮的去除率也随之上升,72 h 的氨氮去除率就接近 100%。不同之处是:菌株 N26 以氯化铵为氮源时的生长情况最好,以尿素为氮源时的生长情况最差;菌株 N26 以氯化铵为氮源时的硝化能力最好,以蛋白胨为氮源时的硝化能力最差。菌株 N26 在尿素中的活性较低,可能是缺少代谢尿素的酶,而尿素则对菌株的生长有毒害作用;蛋白胨作为有机氮,要先经历氨化过程才能被转化为 NH_4^+ ,这影响了菌株 N26 的脱氮代谢过程;在氮源种类均为氨氮的情况下,菌株在氯化铵的生长和脱氮效果优于硫酸铵。综合分析认为以氯化铵为氮源时,菌株 N26 的生长和脱氮能力达到最佳。

2.2.2 不同碳源对脱氮性能的影响

通过改变氨氮培养基、硝酸盐氮培养基的碳源种类(无碳源、葡萄糖、蔗糖、丁二酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠^[31]),研究碳源对脱氮性能的影响。能否利用外界碳源是判别微生物为异养还是自养的标准,通过监测菌株 N26 分别在有、无碳源液体培养基中的生长和脱氮情况,判断其是否为异养微生物。在异养微生物的生长繁殖过程中,需要利用外界碳源为细胞的生长

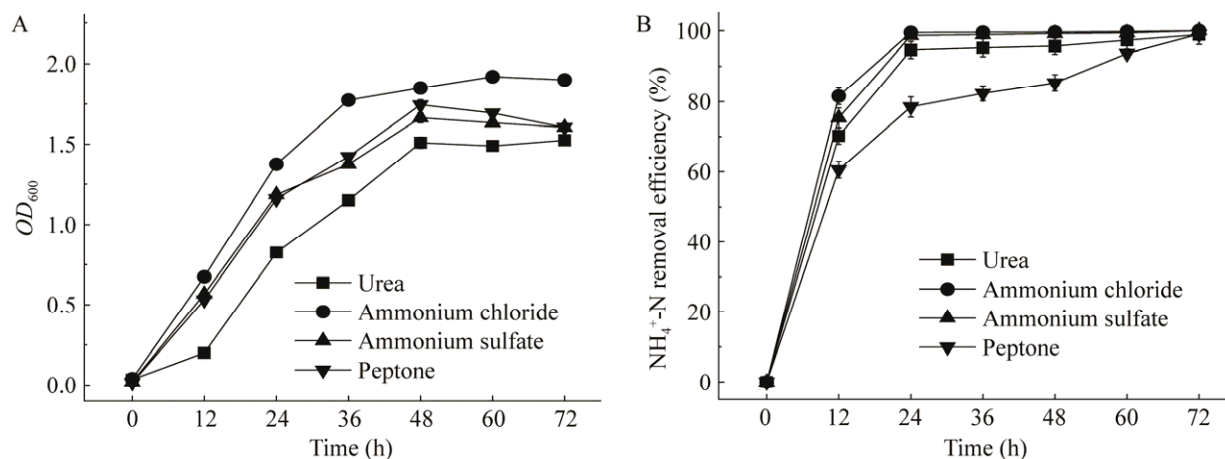


图 2 氮源对菌株 N26 生长(A)及脱氮(B)的影响

Figure 2 Effects on strain N26 growth (A) and nitrogen removal (B) by nitrogen sources.

提供骨架和生命活动所需的能量, 为微生物的正常生长繁殖提供物质基础。不同碳源的化学构成存在差异, 因此微生物对碳源的利用程度也不同, 选择最适碳源有利于使菌株的生长和脱氮达到最佳效果, 缩短反应时间, 节约投加成本。由图 3A 和图 3B 可见, 菌株 N26 在含碳源的培养基中生长情况好于无碳源时, 并且在氨氮中的生长情况总体上好于硝态氮, 说明菌株 N26 利用外界碳源增殖并完成脱氮, 是异养硝化过程^[32]。在 5 种不同碳源的培养基中, 菌株 N26 的生长均呈现快速增殖到保持稳定的趋势。在氨氮环境下, 菌株 N26 利用葡萄糖作为碳源时生长情况最好, 其次是丁二酸钠, 利用乙酸钠时生长情况最差; 在硝态氮环境下, 菌株 N26 对葡萄糖、蔗糖、丁二酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠等碳源的利用情况相差不大, 其中以丁二酸钠最好。结果表明, 不同碳源对菌株 N26 生长的影响效果不同; 其中葡萄糖和蔗糖为大分子有机碳源, 丁二酸钠、柠檬酸钠和乙酸钠为小分子有机碳源, 菌株 N26 更倾向于利用小分子有机物作为碳源并展现高效的脱氮效率^[33]。由图 4A 和图 4B 可见, 菌株 N26 利用以上 5 种碳

源对氨氮和硝态氮的 72 h 去除率均能达到 79% 以上, 其中以利用丁二酸钠的效果最好, 氨氮的 24、48、72 h 去除率分别为 95.4%、99.6%、99.8%, 几乎达到 100% 去除; 硝态氮的 24、36、72 h 去除率分别为 84.2%、90.4%、95.9%; 在不添加碳源时, 72 h 的氨氮和硝态氮去除率仅为 15.7% 和 4.2%。综合以上数据及分析, 菌株 N26 在生长中的脱氮过程是异养硝化-反硝化过程, 以丁二酸钠作为碳源时, 菌株 N26 的生长及脱氮效果最好^[34]。菌株 N26 在利用葡萄糖时生长迅速, 但脱氮效果却不如丁二酸钠和柠檬酸钠的原因可能是: 菌株利用葡萄糖将溶解态氮大量转化为胞内氮, 胞内氮在菌体凋亡解体之后又重新被释放到水中; 另一种可能是菌株利用大分子有机物所产生的代谢产物对氨氮的测定造成了一定干扰^[35]。

2.2.3 不同温度对脱氮性能的影响

温度对微生物的生理活性造成影响, 在生物法处理含氮废水时, 需要严格控制反应的温度, 使其达到最佳效果。只改变氨氮培养基、硝酸盐氮培养基的外界温度(10、20、30、40、50 °C), 研究温度对脱氮性能的影响。由图 5A 和图 5B

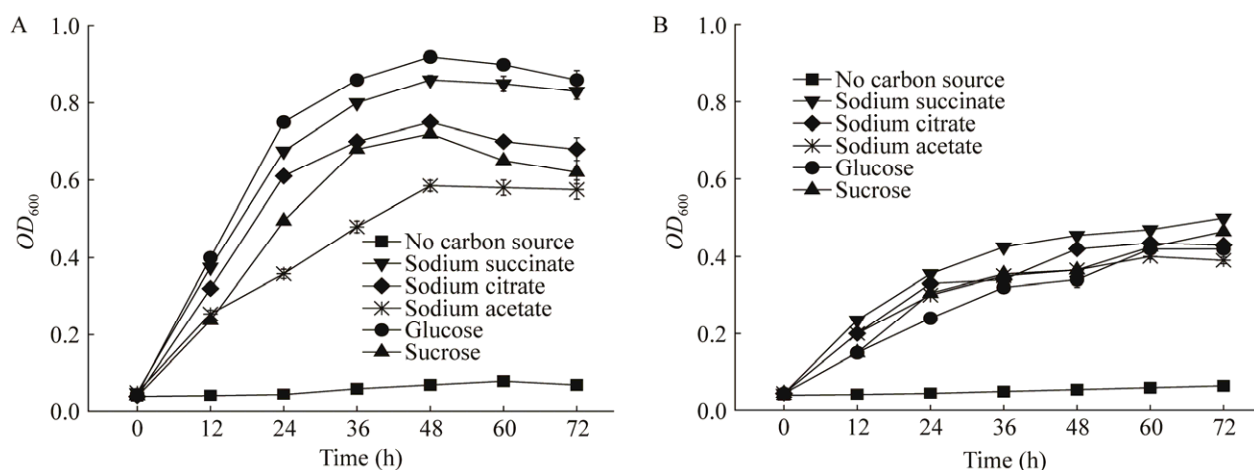


图 3 碳源对菌株 N26 生长的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 3 Effects of growth on strain N26 by carbon sources. A: NH₄⁺-N. B: NO₃⁻-N.

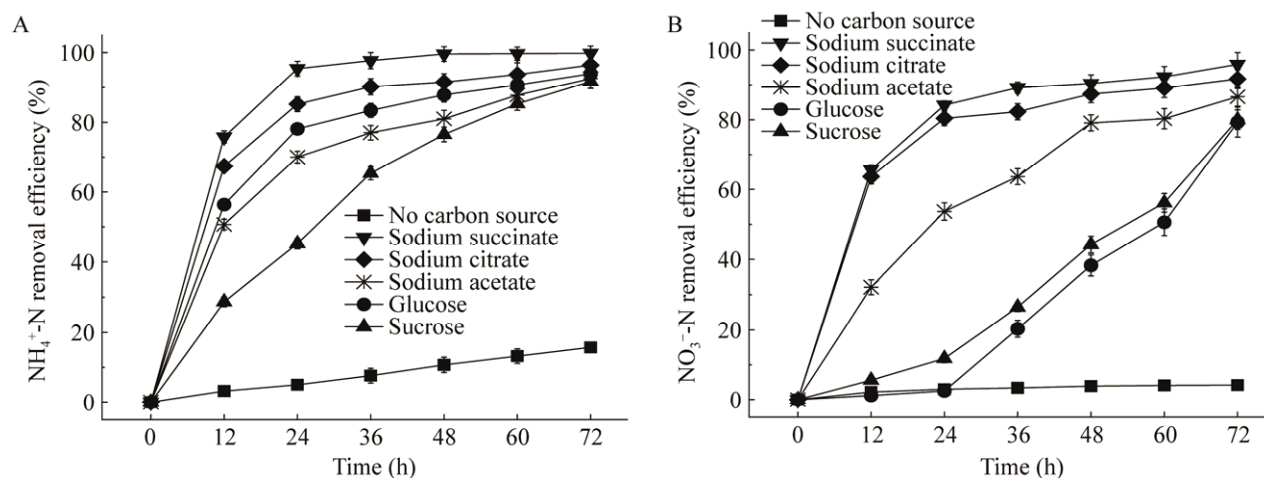


图4 碳源对菌株 N26 脱氮的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 4 Effects of nitrogen removal on strain N26 by carbon sources. A: NH₄⁺-N. B: NO₃⁻-N.

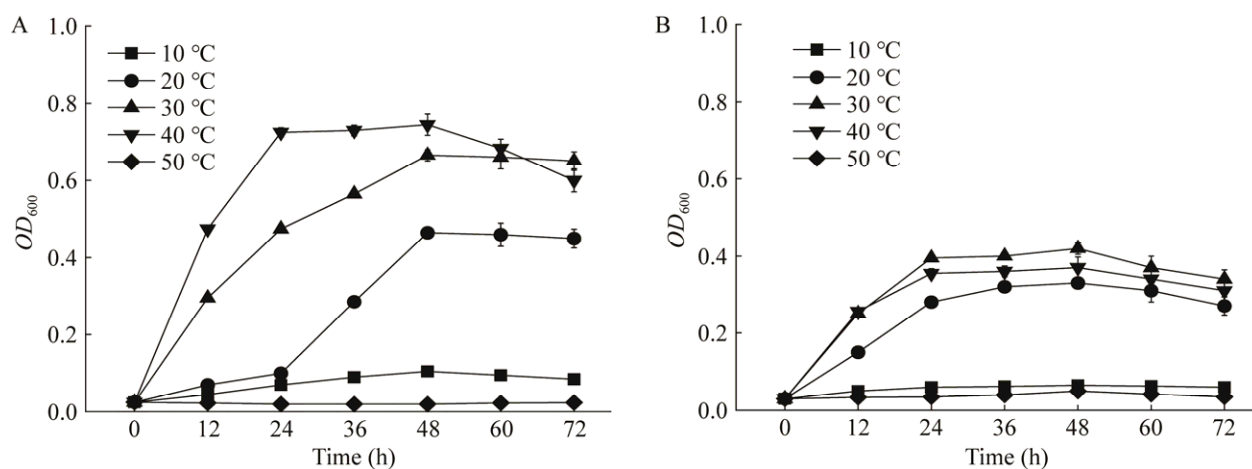


图5 温度对菌株 N26 生长的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 5 Effects of growth on strain N26 by temperature. A: NH₄⁺-N. B: NO₃⁻-N.

可见, 菌株 N26 在温度为 20–40 °C 时生长情况较好, 其中在氨氮环境下, 40 °C 为最适生长温度, 在硝态氮环境下, 30 °C 为最适生长温度; 当温度过低 (10 °C) 和温度过高 (50 °C) 时, 菌株 N26 在氨氮和硝态氮环境下均无明显增殖。在同一温度下, 菌株 N26 在氨氮环境下的生长情况比在硝态氮环境下更好。由图 6A 可见, 在温度为 20–40 °C 时, 菌株 N26 硝化能力较强, 72 h 氨氮去除率在 98% 以上, 其中当温度为 30–40 °C 时, 24 h 氨氮去除率即可达到 89%, 去除速率

较快, 20 °C 时则较为缓慢; 当温度过低 (10 °C) 和温度过高 (50 °C) 时, 菌株 N26 硝化能力变弱, 10 °C、50 °C 时 72 h 氨氮去除率分别仅为 32.4%、4.9%。由图 6B 可见, 当温度为 30 °C 时, 菌株 N26 的反硝化效果最好, 24、48、72 h 硝态氮去除率分别为 71.8%、78.8%、83.0%, 当温度过低 (10 °C) 和温度过高 (50 °C) 时, 菌株 N26 反硝化能力较弱, 10 °C、50 °C 时 72 h 硝态氮去除率分别仅为 19.3%、4.8%。由于菌株 N26 的硝化和反硝化的最适温度不一, 虽然 40 °C 最适合

硝化作用,但一定程度上也会抑制反硝化作用,而 30 °C 时菌株 N26 的硝化能力与 40 °C 时基本持平,因此认为 30 °C 为菌株 N26 硝化和反硝化的最适温度。综合以上数据及分析,30 °C 是菌株 N26 生长和脱氮的最适温度。

2.2.4 不同接种量对脱氮性能的影响

通过只改变氨氮培养基、硝酸盐氮培养基的接种量(1%、5%、10%、15%、20%、25%),研究接种量对脱氮性能的影响。由图 7A 和图 7B 可见,随着接种量的增加,菌株 N26 的密度总体呈现先上升再降低的趋势,当接种量

为 15% 时,菌株 N26 在氨氮和硝态氮的环境下生长效果最好;当接种量为 20% 时,由于菌株 N26 初始浓度过高,造成溶解氧和营养物质不足使细菌生长缓慢。在同一接种量时,菌株 N26 在氨氮环境下的生长情况比在硝态氮环境下更好。由图 8A 可见,当接种量在 5%–20% 之间时,菌株 N26 硝化能力基本持平,12 h 氨氮去除率 68.3%–80.2% 之间,24 h 氨氮去除率最低为接种 5% 时的 89.2%,最高为接种 15% 时的 98.9%;当接种量为 1% 时,菌株 N26 硝化速率缓慢,24、72 h 氨氮去除率分别为 35.2%、83.2%。由

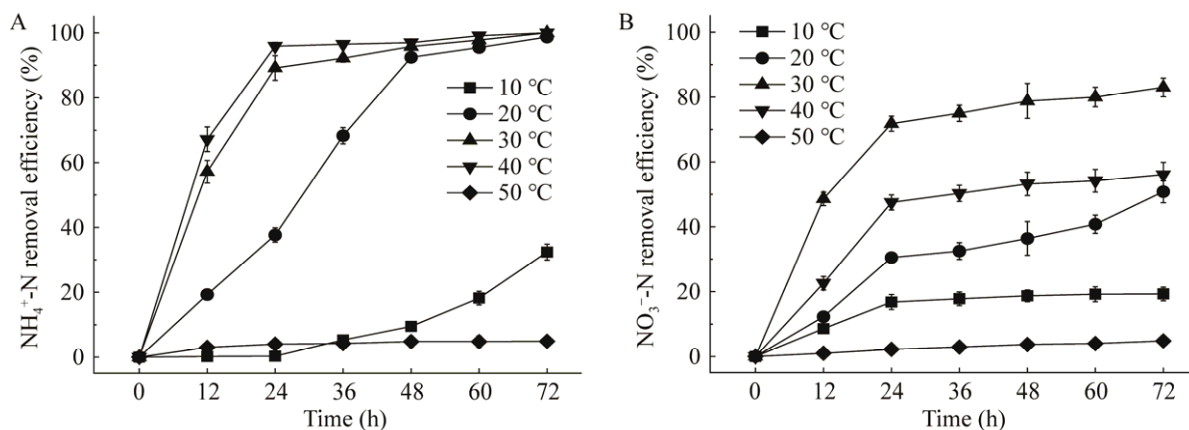


图 6 温度对菌株 N26 脱氮的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 6 Effects of nitrogen removal on strain N26 by temperature. A: $\text{NH}_4^+\text{-N}$. B: $\text{NO}_3^-\text{-N}$.

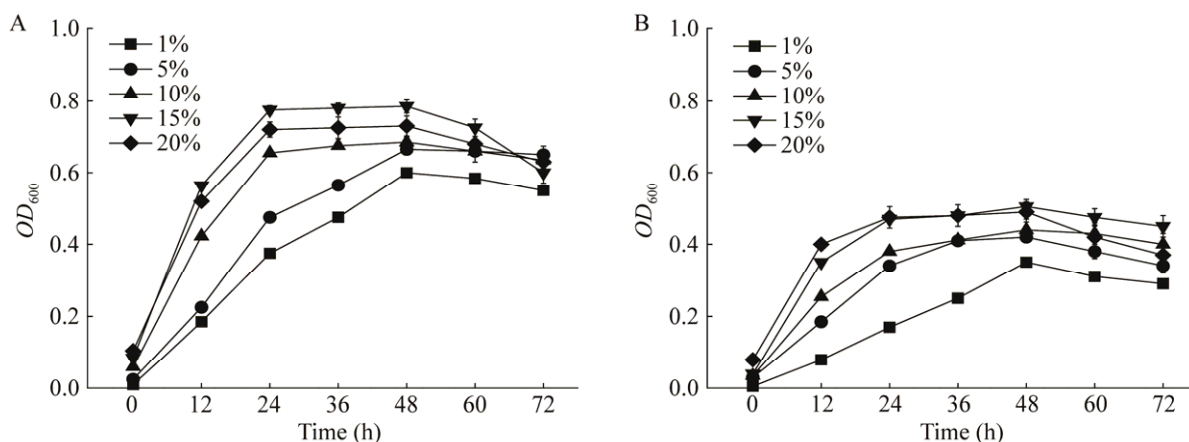


图 7 接种量对菌株 N26 生长的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 7 Effects of growth on strain N26 by inoculation volume. A: $\text{NH}_4^+\text{-N}$. B: $\text{NO}_3^-\text{-N}$.

图 8B 可见, 随着接种量的增加, 菌株 N26 的反硝化能力总体上呈现先上升后下降的趋势, 当接种量在 15% 时, 反硝化能力最强, 12、24、48 h 硝态氮的去除率分别为 64.6%、87.9%、91.1%; 当接种量为 1% 时, 菌株 N26 反硝化速率缓慢, 24、72 h 硝态氮去除率分别为 32.8%、70.9%。综合以上数据及分析, 15% 是菌株 N26 生长和脱氮的最佳接种量。

2.2.5 不同 pH 对脱氮性能的影响

通过只改变氨氮培养基、硝酸盐氮培养基的 pH 值 (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0),

研究 pH 对脱氮性能的影响。由图 9A、9B 可见, 在同一时刻, 当外界环境的 pH 值从 4.0 上升到 10.0 时, 菌株 N26 在氨氮和硝态氮环境下的生长情况均呈现先上升后降低的趋势, 其中在氨氮环境下 pH 8.0 时生长情况最好, 在硝态氮环境下 pH 9.0 时生长情况最好。由图 10A、10B 可见, pH<7.0 或 pH 10.0 时, 菌株 N26 的硝化和反硝化能力较差; 在氨氮环境下 pH 8.0 时硝化能力最强, 12、24、48 h 氨氮去除率分别为 87.3%、98.7%、99.6%; 在硝态氮环境下 pH 9.0 时反硝化能力最强, 12、24、48 h 硝态氮去除

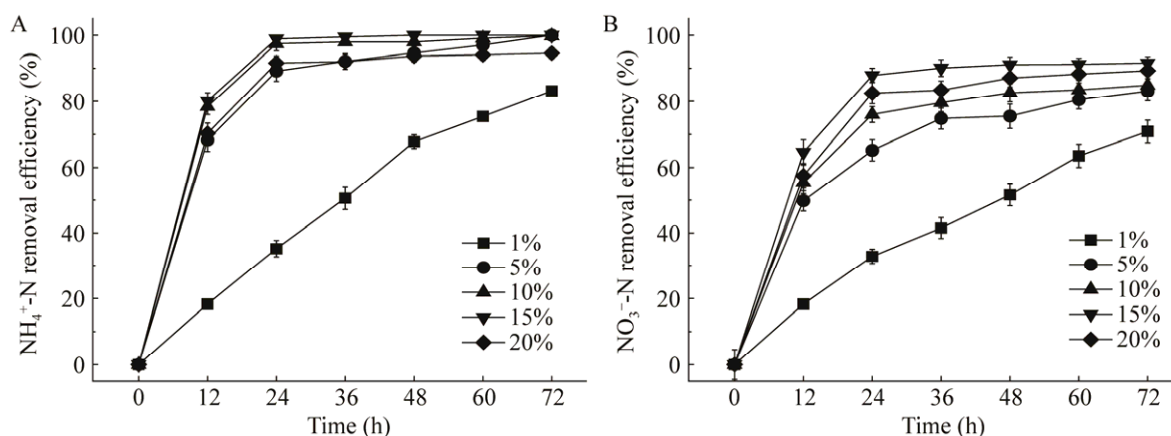


图 8 接种量对菌株 N26 脱氮的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 8 Effects of nitrogen removal on strain N26 by inoculation volume. A: $\text{NH}_4^+\text{-N}$. B: $\text{NO}_3^-\text{-N}$.

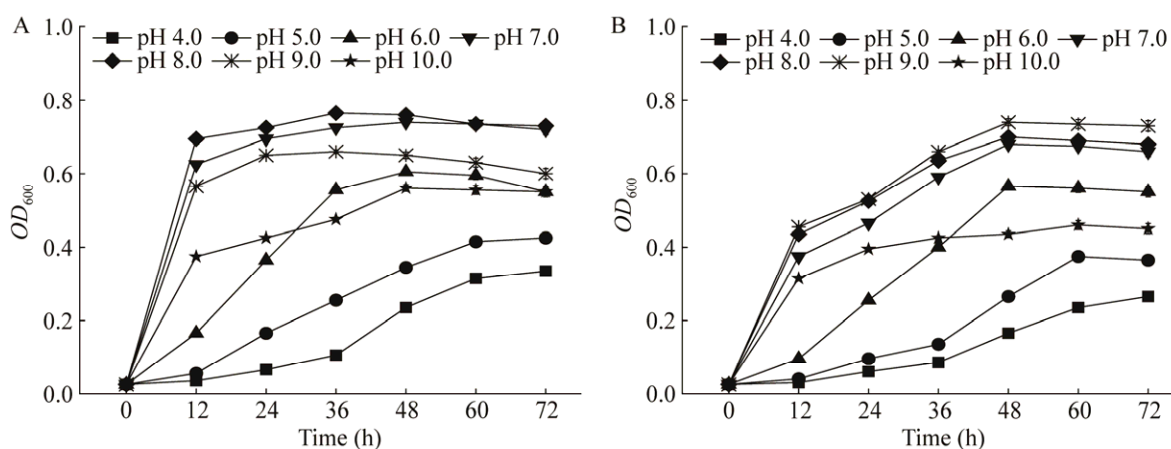


图 9 pH 对菌株 N26 生长的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 9 Effects of growth on strain N26 by pH. A: $\text{NH}_4^+\text{-N}$. B: $\text{NO}_3^-\text{-N}$.

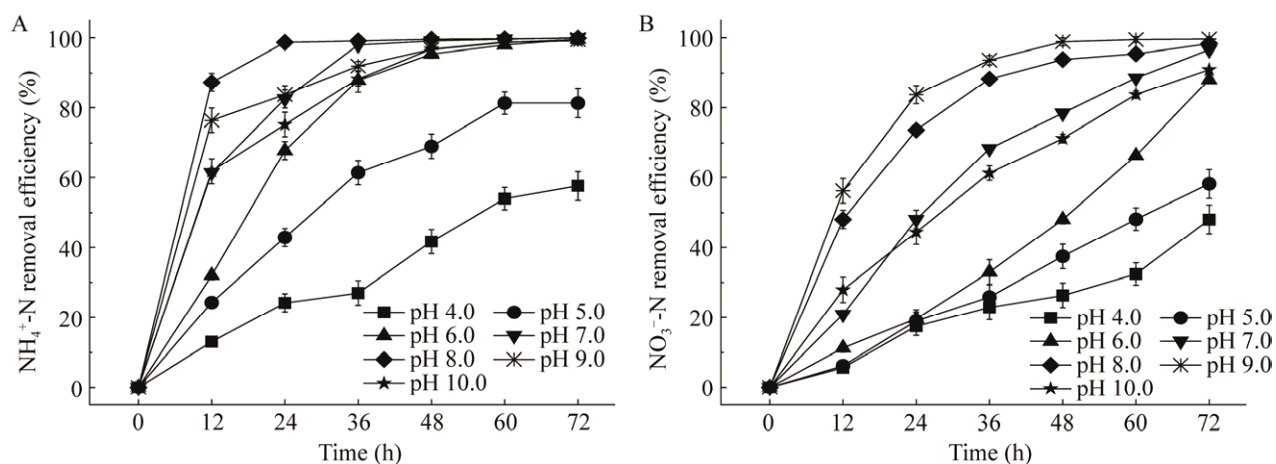


图 10 pH 对菌株 N26 脱氮的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 10 Effects of nitrogen removal on strain N26 by pH. A: $\text{NH}_4^+\text{-N}$. B: $\text{NO}_3^-\text{-N}$.

率分别为 56.2%、83.7%、98.9%。由图 11A、11B 可见, 当初始 pH 值在 4.0–10.0 之间时, 经过 72 h 的硝化和反硝化作用, 外界环境的 pH 值均变为 8.7–8.9 左右(硝态氮环境下 pH 4.0 时除外), 因此认为菌株 N26 适于在弱碱环境中生长。在酸性环境下, 菌株 N26 的活性较低, 环境 pH 变化缓慢, 但随着菌株数量的缓慢增长, 菌体代谢产生的碱性物质缓慢提升水体环境的 pH, 当整体环境达到偏碱性时, 菌株 N26 的生长速率明显上升。综合以上数据及分析, 8.0–9.0 是菌株 N26 生长和脱氮的最佳 pH 区间。

2.2.6 不同 C/N 对脱氮性能的影响

C/N 是指培养基中碳的总含量与氮的总含量的比值, 是生物法处理含氮废水的重要指标, 选择合适的 C/N 有利于微生物发挥最大功效^[36]。通过只改变氨氮培养基、硝酸盐氮培养基的 C/N (0、5、10、15、20、25), 研究 C/N 对脱氮性能的影响。由图 12A、12B 可见, 随着 C/N 的上升, 菌株 N26 在氨氮和硝态氮中的生长情况均呈现先上升后下降的趋势; 当 C/N 在 15–25 之间时, 菌株 N26 的生长情况较为接近, C/N 为 25 时出现了细菌凋亡速率较快的情况, 分析

认为有以下 3 种可能: (1) C/N 过高抑制了相关还原酶的活; (2) C/N 过高为其他菌种的生长提供了充足碳源, 抑制了菌株 N26 的增殖, Pan 等^[37]的报道认为, 随着环境中碳源的过剩, 其他异养细菌的丰度随着 C/N 的增加而增加; (3) C/N 过高造成中间产物的累积, 刘天琪等^[21]对 *Pseudomonas* ADN-42 的报道与之类似; 当 $\text{C/N} \leq 10$ 时, 菌株 N26 的生长速度较为缓慢, 最终的菌液密度也比较低, 无碳源时则细菌几乎无增殖。因此认为过高或过低的 C/N 均不利于菌株 N26 的生长, 较适宜的 C/N 为 15–20。由图 13A、13B 可见, 随着 C/N 的上升, 菌株 N26 的硝化和反硝化能力逐渐提升, 并在 C/N 为 15–25 维持稳定; C/N 为 15 时, 氨氮环境下 12、24、48 h 氨氮去除率分别为 86.5%、96.4%、98.3%, 硝态氮环境下 12、24、48 h 硝态氮去除率分别为 60.3%、80.3%、87.3%; C/N 为 10 时, 72 h 氨氮和硝态氮去除率分别为 96.3%、64.9%, 氨氮虽然接近 100% 去除, 但水中的硝态氮仍维持较高的水平。无碳源时硝态氮出现反向增加的情况, 分析认为是细菌的凋亡分解, 菌体内的含氮物质进入水中而影响硝酸盐氮的

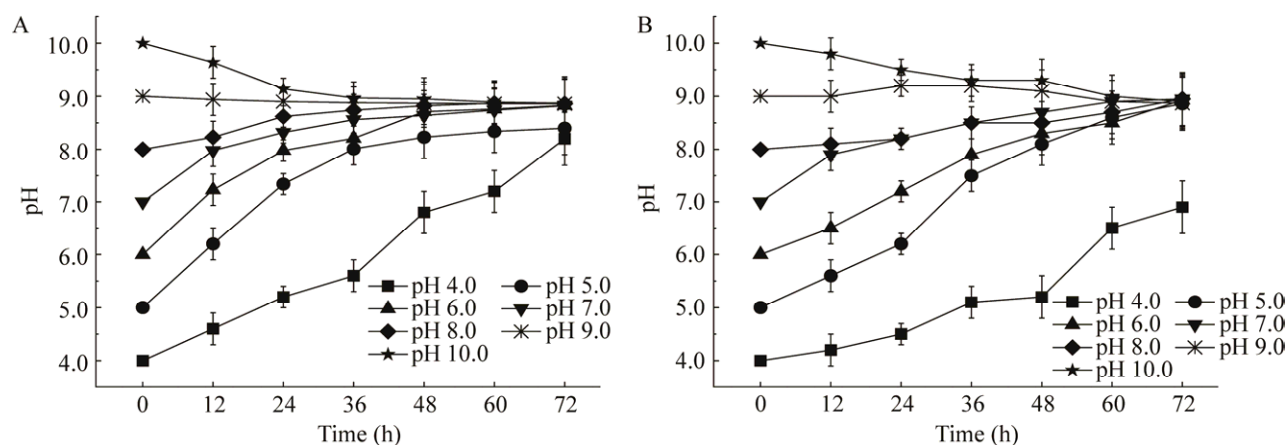


图 11 不同初始 pH 下, 环境 pH 随着脱氮进程的变化情况 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 11 The change of pH with nitrogen removal process under different initial pH. A: $\text{NH}_4^+\text{-N}$. B: $\text{NO}_3^-\text{-N}$.

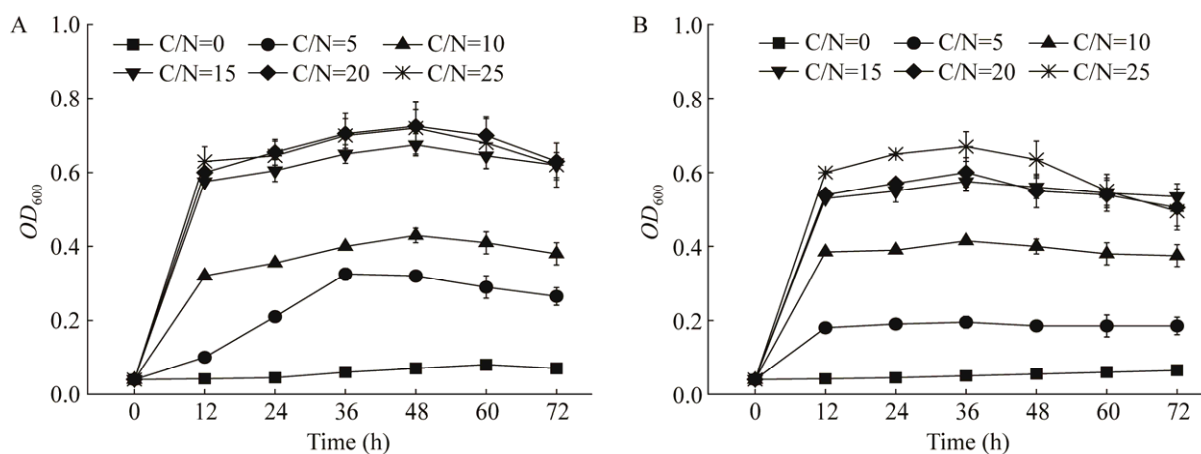


图 12 C/N 对菌株 N26 生长的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 12 Effects of growth on strain N26 by C/N. A: $\text{NH}_4^+\text{-N}$. B: $\text{NO}_3^-\text{-N}$.

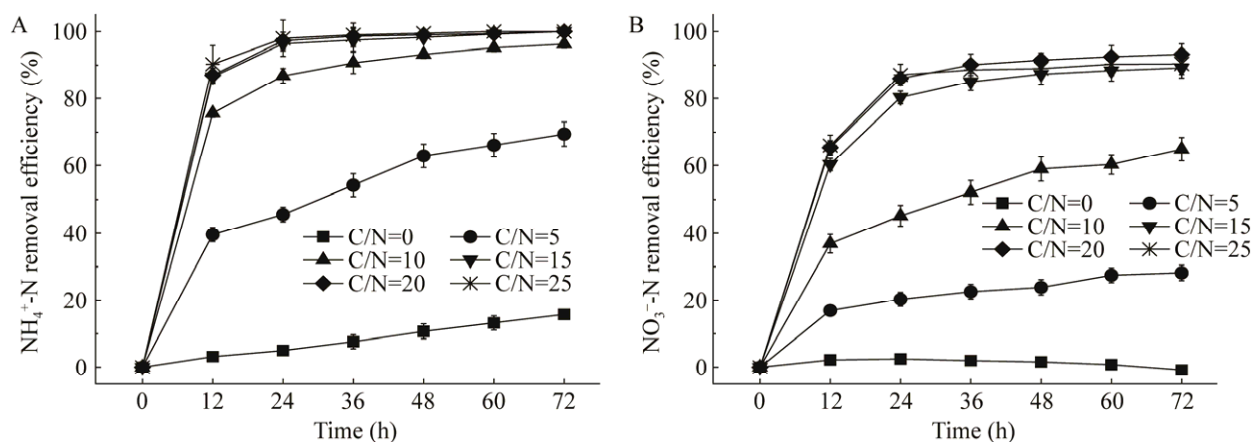


图 13 C/N 对菌株 N26 脱氮的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 13 Effects of nitrogen removal on strain N26 by C/N. A: $\text{NH}_4^+\text{-N}$. B: $\text{NO}_3^-\text{-N}$.

浓度测定^[4]。综合以上数据及分析, 菌株 N26 生长和脱氮的最佳 C/N 区间为 15–20, 由于 C/N 的上升会带来成本增加和残留 COD 等问题, 因此认为菌株 N26 生长和脱氮的最佳 C/N 等于 15。

2.2.7 不同转速对脱氮性能的影响

通过只改变氮氮培养基、硝酸盐氮培养基的外部摇床转速(0、30、60、90、120、150 r/min), 研究转速对脱氮性能的影响。在 0–150 r/min 的转速区间内, 摇床转速与摇瓶的溶解氧浓度呈正相关(图 14)。由图 15A 和图 15B 可见, 转速为 0 时, 水中溶解氧(dissolved oxygen, DO)对应含量为 4.9 mg/L, 此时菌株 N26 的生长处于被抑制状态; 随着 DO 的上升, 菌株 N26 的生长情况逐渐变好, 证明菌株 N26 的生长是好氧过程。菌株 N26 生长的最适转速为 120 r/min, 对应的 DO 含量为 7.2 mg/L, Chen 等^[23]报道的 *Agrobacterium* sp. LAD9 最适 DO 范围为 7–8 mg/L, 与之类似。当转速从 120 r/min 上升到 150 r/min 时, 菌株 N26 的生长出现了放缓甚至减弱的情况, 分析认为水中 DO 饱和使细菌生长放缓或转速过大产生的较大剪切力使菌体受到物理损害。由图 16A、16B 可见, 转速为 0 时, 水中 DO 含

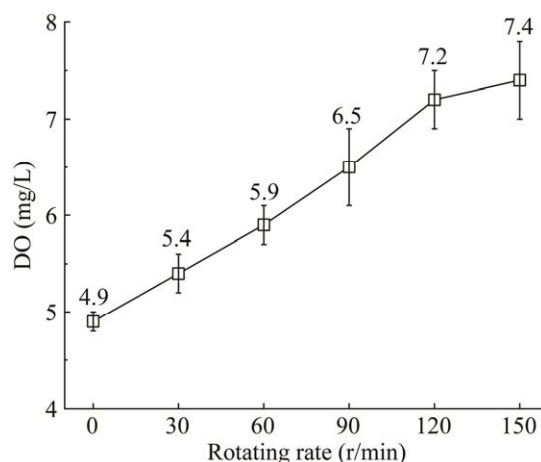


图 14 摇床转速与 DO 的关系

Figure 14 Relationship between rotating rate and DO.

量较低, 菌株 N26 的硝化和反硝化能力较弱, 随着 DO 含量的上升, 硝化和反硝化能力得到提高, 证明菌株 N26 的脱氮是好氧硝化-反硝化过程。由于转速过高时细菌的生长放缓或减弱, 因此相应转速下去除氨氮和硝态氮的能力也受到抑制。转速为 120 r/min 时, 氨氮环境下 12、24、48 h 氨氮去除率分别为 75.2%、89.2%、98.1%, 硝态氮环境下 12、24、48 h 硝态氮去除率分别为 38.6%、65.0%、83.0%; 转

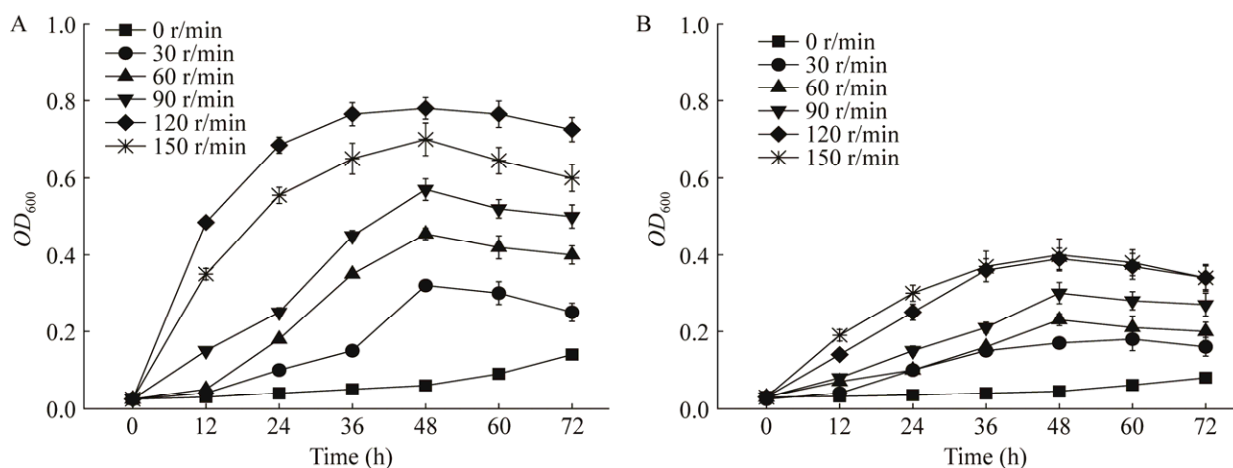


图 15 转速对菌株 N26 生长的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 15 Effects of growth on strain N26 by rotating rate. A: $\text{NH}_4^+\text{-N}$. B: $\text{NO}_3^-\text{-N}$.

速上升到 150 r/min,同一时刻氨氮去除率下降,硝态氮去除率小幅度提高^[38]。综合以上数据及分析,菌株 N26 在生长中的脱氮过程是异养硝化-好氧反硝化过程,120 r/min 是菌株 N26 生长和脱氮的最佳转速,对应的 DO 含量约为 7.2 mg/L。

2.2.8 不同氮负荷对脱氮性能的影响

通过只改变氨氮培养基的氮负荷(50、100、150、200、300、400、800 mg/L),研究菌株 N26 的最适氮负荷。由图 17A 可见,低氨氮环

境下,随着初始氨氮浓度上升,菌株 N26 的生长情况逐渐变好,氨氮浓度 ≥ 200 mg/L 时,菌种密度已趋于饱和;高氨氮环境下抑制菌株 N26 的生长,细菌活性降低。由图 17B 可见,当初始氨氮浓度分别为 50、100、150、200 mg/L 时,菌株 N26 脱氮效率较高,12 h 氨氮去除率分别为 75.3%、67.2%、59.7%、49.4%,24 h 氨氮去除率分别为 94.9%、91.8%、88.6%、64.6%,72 h 氨氮去除率均在 95%以上;24 h 氨氮去除速率分别为 1.981、3.799、5.516、5.328 mg/(L·h)。

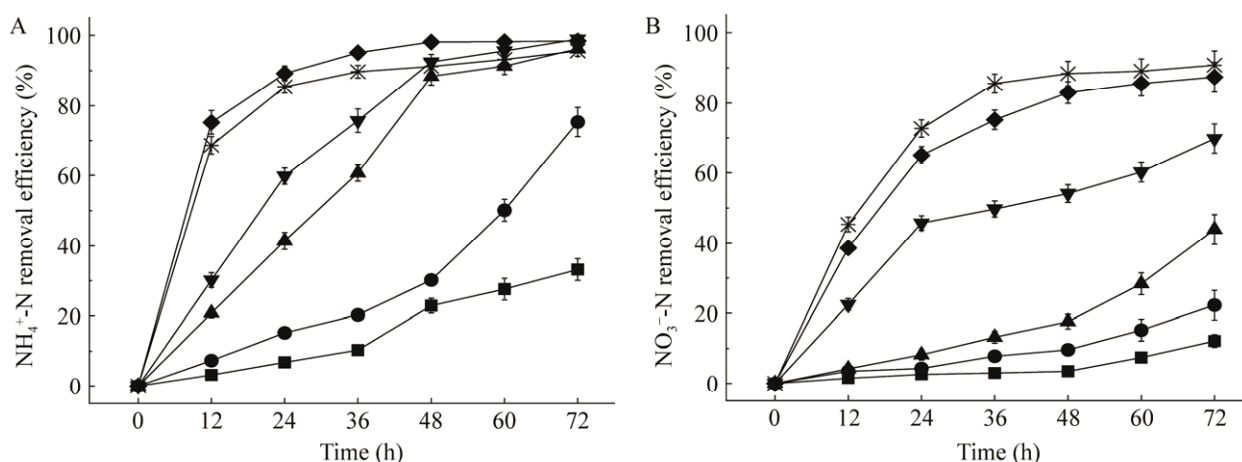


图 16 转速对菌株 N26 脱氮的影响 A: 氨氮. B: 硝态氮

Figure 16 Effects of nitrogen removal on strain N26 by rotating rate. A: $\text{NH}_4^+\text{-N}$. B: $\text{NO}_3^-\text{-N}$.

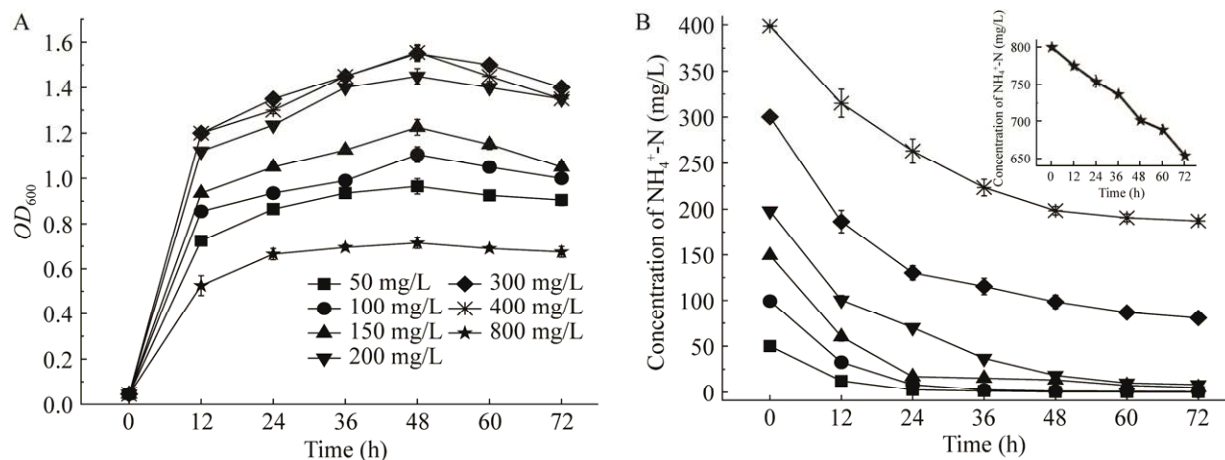


图 17 氮负荷对菌株 N26 生长(A)及脱氮(B)的影响

Figure 17 Effects on strain N26 growth (A) and nitrogen removal (B) by nitrogen load.

当初始氨氮浓度 ≥ 300 mg/L 时, 氨氮去除速率较为缓慢, 当初始氨氮浓度分别为 300、400、800 mg/L 时, 12 h 氨氮去除率分别为 37.9%、21.0%、3.1%, 24 h 氨氮去除率分别为 56.6%、34.0%、5.8%; 72 h 氨氮去除率分别为 73.1%、53.0%、18.2%, 24 h 氨氮去除速率分别为 7.083、5.640、1.931 mg/(L·h)。由此可以看出, 菌株 N26 适宜在低氨氮的环境下生存, 当氨氮浓度过高时, 菌株 N26 的生长和硝化能力未得到提升。实验表明, 菌株 N26 在低氨氮浓度(≤ 300 mg/L)条件下有较高的氨氮去除率, 且能在高氨氮浓度(800 mg/L)环境生长脱氮, 但高浓度氨氮会抑制菌株 N26 的生长速率和脱氮效率^[39]。

2.3 脱氮途径的分析

研究菌株 N26 的脱氮途径是开发其脱氮性能的重要一环, 该环节主要通过表观的氮平衡分析和微观的功能基因鉴定来实现。在生物法处理含氮废水的过程中, 含氮物质主要有被同化为胞内氮、被异化为气态氮以及作为溶解态氮残留在水中 3 个去向, 通过定量分析水中氮的去向, 建立 0–36 h 的氮平衡, 可以得知 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的利用效率、利用能力的先后顺序。通过功能基因鉴定, 不但能够进一步确定菌株 N26 是否为异养硝化-好氧反硝化菌, 还能根据特定功能基因的关键酶分析 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的转化方向。氮的生物代谢途径多种多样, 好氧环境下氨氮被异养菌代谢时, 脱氮途径有全程反硝化和短程

反硝化两种^[40], 目前已成功分离的全程反硝化菌种有 *Bacillus cereus* GS-5^[41]和 *Acinetobacter* sp. ND7^[3]等, 而 *Acinetobacter johnsonii* sp. N26 是一种可能的短程反硝化菌。

由表 2 可见, 氨氮、硝态氮作为氮源时, 36 h 残留硝酸盐浓度分别为 0.096、0.214 mg/L, 亚硝酸盐浓度分别为 0.079、0.097 mg/L, 最终水中保持较低的硝酸盐和亚硝酸盐积累水平, 表明菌株 N26 具有高效的脱氮能力。在生物脱氮过程中, 氮的转化途径有两条: 一是被微生物同化成胞内氮; 二是被微生物异化成气态氮。水中含氮物质被异化成气态氮越多, 水中剩余的总氮就越少。通过比较 0 h 与 36 h 各部分氮的变化, 分析了菌株 N26 脱氮的氮平衡。根据氮平衡计算, 当氮源为氨氮时, 初始 TN 的 32.5%转化为气态氮, 65.9%同化为胞内氮, 只有 1.6%作为溶解氮留在水中; 当氮源为硝态氮时, 初始 TN 的 16.9%转化为气态氮, 79.3%同化为胞内氮, 只有 3.8%作为溶解氮留在水中。由此可以看出菌株 N26 的异化效率上氨氮>硝态氮。

由表 3 可见, 菌株 N26 在异化过程中, *amoA* 是氨单加氧酶的功能基因, *nirS/nirK* 是亚硝酸盐还原酶的功能基因, *nor* 是亚硝酸盐氧化还原酶的功能基因^[42], 菌株 N26 具有 *amoA* 和 *nirS/nirK*, 但无 *nor*, 表明菌株 N26 直接将氨氮硝化为亚硝态氮, 无中间产物硝态氮, 表明氨氮的硝化过程遵循 $\text{NH}_4^+\text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^-\text{-N} \rightarrow \text{NO}$ 的转化途径。*napA* 是周质硝酸盐还原酶的功能基因^[43], *narG*

表 2 菌株 N26 去除氨氮、硝态氮的氮平衡

Table 2 Nitrogen balance of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ removed by strain N26

Nitrogen source	Time (h)	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/L)	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg/L)	$\text{NO}_2^-\text{-N}$ (mg/L)	TN (turbid) (mg/L)	Intracellular-N (mg/L)	Proportion (%)	Gaseous-N (mg/L)	Proportion (%)
NH_4Cl	0	50.253 \pm 2.231	1.467 \pm 0.513	0.079 \pm 0.000	56.188 \pm 2.104	0.004	0.0	0.000	0.0
	36	0.018 \pm 0.037	0.096 \pm 0.032	0.079 \pm 0.031	37.913 \pm 0.254	37.028	65.9	18.275	32.5
NaNO_3	0	0.900 \pm 0.231	50.418 \pm 1.543	0.097 \pm 0.000	50.802 \pm 2.254	0.553	0.0	0.000	0.0
	36	0.753 \pm 0.033	0.214 \pm 0.037	0.097 \pm 0.036	42.214 \pm 0.255	40.275	79.3	8.588	16.9

表 3 菌株 N26 的功能基因鉴定结果

Table 3 Results of functional gene identification of strain N26

Functional genes	Key enzymes	Functions	Direction	Identification results
<i>amoA</i>	Ammonia monooxygenase	$\text{NH}_4^+ \text{-NO}_2^-$	Dissimilation	+
<i>narG</i>	Respiratory nitrate reductase	$\text{NO}_3^- \text{-NO}_2^-$ (anaerobic)	Dissimilation	-
<i>napA</i>	Periplasmic nitrate reductase	$\text{NO}_3^- \text{-NO}_2^-$ (aerobic)	Dissimilation	+
<i>nirS/nirK</i>	Nitrite reductase	$\text{NO}_2^- \text{-NO}$	Dissimilation	+
<i>nor</i>	Nitrite oxidoreductase	$\text{NO}_2^- \text{-NO}_3^-$	Dissimilation	-
<i>norB</i>	Nitric oxide reductase	$\text{NO-N}_2\text{O}$	Dissimilation	+
<i>nosZ</i>	Nitrous oxide reductase	$\text{N}_2\text{O-N}_2$	Dissimilation	+
<i>GDH</i>	Ammonium-assimilating enzyme	$\text{NH}_4^+ \text{-biological nitrogen}$	Assimilation	/
<i>nasA</i>	Assimilated nitrate reductase	$\text{NO}_3^- \text{-NO}_2^-$	Assimilation	/
<i>nirB</i>	Assimilated nitrite reductase	$\text{NO}_2^- \text{-NH}_4^+$	Assimilation	/

+: 阳性; -: 阴性; /: 未检测

+: Positive; -: Negative; /: Not identified.

是呼吸硝酸盐还原酶的功能基因, 菌株 N26 具有 *napA* 但无 *narG*, 表明菌株 N26 通过好氧途径将硝态氮转化为亚硝态氮, 硝态氮的转化途径为 $\text{NO}_3^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}$ ^[44]; Padhi 等^[45]的研究指出, 经 PCR 扩增出的 *nap* 基因为 *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 异养硝化-好氧反硝化提供了额外的证据。菌株 N26 有 *norB* 和 *nosZ*, 表明其在反硝化过程中遵循 $\text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 的转化途径。生长和脱氮曲线证明菌株 N26 硝化氨氮的能力强于硝化硝态氮的能力, 氮平衡分析证明氨氮被异化为含氮气体的效率高于硝态氮, 硝态氮被同化为胞内氮的比例高于氨氮,

由此推测 *amoA* 功能基因的表达能力强于 *napA* 功能基因。菌株 N26 在同化过程中, 通过 *GDH* 控制的氨同化酶直接吸收氨氮到细胞内, 氨氮被硝化成亚硝态氮后, 部分亚硝态氮通过功能基因 *nirB* 被还原成氨氮仍被同化, 而功能基因 *nasA* 和 *nirB* 则将硝态氮还原为氨氮再将其同化^[7]。

通过生长和脱氮曲线、氮平衡分析和功能基因鉴定, 确定菌株 N26 的异化代谢途径为 $\text{NH}_4^+ \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ (图 18), 这是一个短程硝化-反硝化过程, 同时证明菌株 N26 具有优良的脱氮性能, 在好氧条件下仅有少量亚硝酸盐积累^[46-47]。

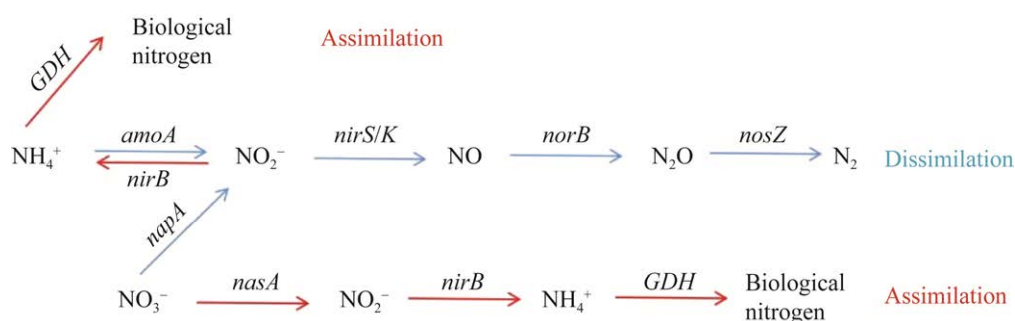


图 18 菌株 N26 的代谢途径

Figure 18 Metabolic pathway of strain N26.

3 讨论

通过生长与脱氮曲线的研究, 结果表明: 氨氮和硝态氮的去除与菌株 N26 的快速增殖在时间上保持一致, 说明硝化-反硝化作用主要发生在对数生长期, 菌体的生长需要大量含氮物质; 菌株 N26 能够快速去除水中的氨氮和硝态氮, 且水中最终保持较低的硝酸盐和亚硝酸盐积累水平; 菌株 N26 在氨氮环境下生长速度和硝化能力强于在硝态氮环境下, 对氨氮的处理优先程度高于硝态氮, Zhu 等^[48]研发的 *Pseudomonas mendocina* 3-7 与之类似, 而杨云龙等^[49]的研究发现, 螯台球菌 TAD1 在硝态氮和亚硝态氮同时存在时优先利用硝态氮。菌株 N26 硝化过程中只有亚硝态氮短暂增多, 而硝态氮则不会增多, 说明脱氮过程中的中间产物是亚硝态氮, 在硝化氨氮和硝态氮时都出现了中间产物亚硝态氮, 但在氨氮环境下亚硝态氮的最大值和停留时间均比较低, 文刚等^[50]对 *Acinetobacter junii* ZMF5、He 等^[51]对 *Pseudomonas mendocina* TJPU04 及 Padhi 等^[45]对 *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 的研究均证明亚硝态氮为异养硝化-好氧反硝化的唯一中间产物。在处理硝态氮时由于亚硝态氮的长时间积累, 使得菌株 N26 的菌株数量下降较多, 说明亚硝酸盐对该菌株有毒害作用, 进而影响其反硝化性能, 该现象与 Almeida 等^[52]的报道相类似。菌株 N26 在氨氮环境下的 36 h 总氮去除率高于在硝态氮环境下, 但总体上总氮的去除效率均不高, 随着培养时间的延长, 总氮将下降到一稳定值, 总氮的高残留率是异养硝化-好氧反硝化领域仍需解决的薄弱环节, 而对这一部分的研究则鲜见报道。

通过脱氮性能优化的研究, 得出该菌株的最适氮源为氯化铵, 最适碳源为丁二酸钠, 最

适温度为 30 °C, 最适接种量为 15%, 最适 pH 值为 8.0–9.0, 最适 C/N 为 15, 最适转速为 120 r/min, 最适氮负荷为 ≤ 300 mg/L (氨氮)。该结果表明不动杆菌 N26 是一种适合应用于污水和废水中氨氮处理的微生物, 胡丹等^[53]研发的神户肠杆菌 HD-NAH 在脱氮条件的选择性上与菌株 N26 相似, 其最适 C/N 为 18, 生长最适宜的环境 pH 值为 7.0–10.0; 单一氮源下, 神户肠杆菌 HD-NAH 的去除速率和去除率表现为亚硝态氮 > 氨氮 > 硝态氮, 结合菌株 N26 在硝化-反硝化过程中仅出现中间产物亚硝态氮这一现象可知, 菌株 N26 的去除速率和去除率表现应与之相同。此外, Ye 等^[19]研发的 *Pseudomonas putida* Y-12, 其对 208.1 mg/L 氨氮的 72 h 处理效率为 98.8%; 雷强等^[54]研发的 *Klebsiella oxytoca* YZ-12 的最适氨氮负荷 ≤ 150 mg/L。

通过脱氮途径的分析, 初步确定不动杆菌 N26 脱氮时遵循一种短程硝化-反硝化路径, 其他经报道有相同或类似脱氮代谢途径的菌种有: Chen 等^[13]发现的产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.) TB 对氨氮的脱氮路径与菌株 N26 相同; Xu 等^[55]发现的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) WXN-23 对硝态氮的脱氮路径与菌株 N26 相同。应该指出, 微生物对氨氮或硝态氮的短程硝化-反硝化并不局限于以上路径, 有些菌种在处理含硝态氮废水过程中无中间产物亚硝酸盐产生, 证明硝态氮不经过亚硝态氮直接被还原为含氮气体, 但对该脱氮方式及菌种的研究, 目前的信息还十分有限。

4 结论

从羊粪堆肥中分离获得的一株细菌 *Acinetobacter johnsonii* sp. N26, 能够快速去除水中的氨氮和硝态氮, 且最终保持较低的硝酸盐和亚硝酸盐积累水平, 其对初始浓度 50 mg/L

的氨氮、硝态氮的 36 h 去除效率均达到 99.5% 以上, 最大去除速率分别为 5.330、3.147 mg/(L·h)。菌株 N26 在氨氮环境下生长速度和硝化能力强于在硝态氮环境下, 中间产物亚硝酸盐对菌株的生长有毒害作用。在无碳源或 0 转速时, 菌株 N26 的生长和脱氮效果十分微弱, 功能基因鉴定结果表明菌株 N26 没有或不表达控制呼吸硝酸盐还原酶的功能基因 *narG*, 而可以表达控制周质硝酸盐还原酶的功能基因 *napA*, 说明 *Acinetobacter johnsonii* sp. N26 是一株异养硝化-好氧反硝化不动杆菌。菌株 N26 异养硝化-好氧反硝化的最佳条件为: 氮源为氯化铵; 碳源为丁二酸钠; 温度为 30 °C; 接种量为 15%; pH 8.0–9.0; C/N 为 15; 转速为 120 r/min; 氮负荷 ≤ 300 mg/L。异养硝化-好氧反硝化菌 N26 的脱氮代谢途径为 $\text{NH}_4^+-\text{N} \rightarrow \text{NO}_2^--\text{N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 和 $\text{NO}_3^--\text{N} \rightarrow \text{NO}_2^--\text{N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$, 是一种短程硝化-反硝化过程。菌株 N26 的生长和脱氮曲线、氮平衡分析以及功能基因鉴定, 表明菌株 N26 是一株高效、节能的异养硝化-好氧反硝化菌种, 可为后续异养硝化-好氧反硝化的理论研究与实际应用提供参考。

REFERENCES

- [1] 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.
- [2] 张丹华. 含氮废水生物处理及其微生物群落分析[D]. 上海: 上海师范大学硕士学位论文, 2014.
ZHANG DH. Biological treatment of nitrogen-containing wastewater and its microbial community analysis[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Normal University, 2014 (in Chinese).
- [3] XIA L, LI XM, FAN WH, WANG JL. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge[J]. Bioresource Technology, 2020, 301: 122749.
- [4] 葛辉. 异养硝化与好氧反硝化细菌的筛选、培养及综合除氮研究[D]. 苏州: 苏州科技大学硕士学位论文, 2011.
GE H. Screening, cultivation and comprehensive nitrogen removal of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria[D]. Suzhou: Master's Thesis of Suzhou University of Science and Technology, 2011 (in Chinese).
- [5] 刘石虎. 压力管道式生物膜反应器处理城镇污水试验研究[D]. 重庆: 重庆大学硕士学位论文, 2006.
LIU SH. Experimental study on treatment of urban sewage by pressure pipeline biofilm reactor[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University, 2006 (in Chinese).
- [6] ZHANG QY, YANG P, LIU LS, LIU ZJ. Formulation and characterization of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification synthetic microbial community and its application to livestock wastewater treatment[J]. Water, 2020, 12: 218.
- [7] 赵天涛, 陈沛沛, 张晟, 封丽. 异养硝化-好氧反硝化菌氮代谢机理的研究进展[J]. 重庆理工大学学报(自然科学), 2022(1): 194-203.
ZHAO TT, CHEN PP, ZHANG S, FENG L. Research progress on nitrogen metabolism mechanism of heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria[J]. Journal of Chongqing University of Technology (Natural Science), 2022(1): 194-203 (in Chinese).
- [8] ROBERTSON LA, KUENEN JG. Aerobic denitrification: old wine in new bottles?[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1984, 50(5/6): 525-544.
- [9] 刘方剑, 杨海龙, 周化斌. 异养硝化细菌 *Acinetobacter junii* WZ17 的脱氮特性及动力学研究[J]. 环境科学学报, 2021, 41(3): 951-959.
LIU FJ, YANG HL, ZHOU HB. Nitrogen removal and kinetics research by heterotrophic nitrification bacterium *Acinetobacter junii* WZ17[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2021, 41(3): 951-959 (in Chinese).
- [10] YANG L, REN YX, LIANG X, ZHAO SQ, WANG JP, XIA ZH. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater[J]. Bioresource Technology, 2015, 193: 227-233.
- [11] FENG L, YANG JX, MA F, PI SS, XING LL, LI A. Characterisation of *Pseudomonas stutzeri* T13 for

- aerobic denitrification: stoichiometry and reaction kinetics[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 717: 135181.
- [12] 杨晓华. 一株异养硝化好氧反硝化真菌的筛选及特性研究[D]. 太原: 太原理工大学硕士学位论文, 2012.
YANG XH. Screening and characterization of a heterotrophic nitrifying aerobic denitrifying fungus[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Taiyuan University of Technology, 2012 (in Chinese).
- [13] CHEN J, GU SY, HAO HH, CHEN JM. Characteristics and metabolic pathway of *Alcaligenes* sp. TB for simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(22): 9787-9794.
- [14] 陈雪琪. 废水脱硫脱氮工艺效能调控及生物强化策略研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2020.
CHEN XQ. Study on efficiency regulation and biological enhancement strategy of wastewater desulfurization and denitrification process[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2020 (in Chinese).
- [15] 郑猛, 张培玉, 王积伟, 陈舒. 废水生物脱氮机制研究进展[J]. *环境工程*, 2011, 29(S1): 17-21.
ZHENG M, ZHANG PY, WANG JW, CHEN S. The research and development of the mechanism of biological nitrogen removal in waste water[J]. *Environmental Engineering*, 2011, 29(S1): 17-21 (in Chinese).
- [16] 杨垒. 高效异养硝化细菌的脱氮特性及其处理高氨氮废水研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学博士学位论文, 2016.
YANG L. Study on nitrogen removing characteristics of high-efficiency heterotrophic nitrifying bacteria and its treatment of high ammonia nitrogen wastewater[D]. Xi'an: Doctoral Dissertation of Xi'an University of Architecture and Technology, 2016 (in Chinese).
- [17] 赵爽. 还原性铁粉处理低浓度硝酸盐废水的研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2018.
ZHAO S. Study on treatment of low concentration nitrate wastewater with reducing iron powder[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [18] 高雅娟, 靳静晨, 高洁, 高宇轩, 吴慧娟, 张闻天, 李晨晨, 张国伟, 靳永胜. 耐高浓度氨氮的异养硝化好氧反硝化菌株 U1 的鉴定及其脱氮特性[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(7): 2442-2456.
GAO YJ, JIN JC, GAO J, GAO YX, WU HJ, ZHANG WT, LI CC, ZHANG GW, JIN YS. Identification and denitrification characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification strain U1 resistant to high concentrations of ammonia nitrogen[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(7): 2442-2456 (in Chinese).
- [19] YE Q, LI KL, LI ZL, XU Y, HE TX, TANG WH, XIANG SD. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification performance of strain Y-12 under low temperature and high concentration of inorganic nitrogen conditions[J]. *Water*, 2017, 9: 835.
- [20] SONG T, ZHANG XL, LI J, WU XY, FENG HX, DONG WY. A review of research progress of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification microorganisms (HNADMs)[J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 801: 149319.
- [21] 刘天琪, 金若菲, 周集体, 黄剑宇. 异养硝化-好氧反硝化菌 ADN-42 的脱氮特性[J]. *环境工程学报*, 2015, 9(2): 989-996.
LIU TQ, JIN RF, ZHOU JT, HUANG JY. Nitrogen-removal characteristic of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium ADN-42[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(2): 989-996 (in Chinese).
- [22] 周宁一. 异养硝化细菌的生物脱氮[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2330.
ZHOU NY. The involvement of heterotrophic nitrification bacteria in biological nitrogen removal[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(10): 2330 (in Chinese).
- [23] CHEN Q, NI JR. Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(5): 619-623.
- [24] LI X, ZHU XM, QIU LY. Constructing aptamer anchored nanovesicles for enhanced tumor penetration and cellular uptake of water soluble chemotherapeutics[J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, 35: 269-279.
- [25] 生态环境部. 纳氏试剂分光光度法[S]. 2009.
Ministry of Ecology and Environment of China. Water quality-determination of ammonia nitrogen-Nessler's reagent spectrophotometry[S]. 2009 (in Chinese).
- [26] 生态环境部. 紫外分光光度法[S]. 2007.
Ministry of Ecology and Environment of China. Water quality-determination of nitrate-nitrogen-Ultraviolet spectrophotometry[S]. 2007 (in Chinese).
- [27] 生态环境部. 分光光度法[S]. 1987.
Ministry of Ecology and Environment of China. Water quality-determination of nitrogen (nitrite)-

- Spectrophotometric method[S]. 1987 (in Chinese).
- [28] 生态环境部. 碱性过硫酸钾紫外分光光度法[S]. 2012. Ministry of Ecology and Environment of China. Water quality-determination of total nitrogen-Alkalinepotassium persulfate digestion UV spectrophotometric method[S]. 2012 (in Chinese).
- [29] 苏斌, 史正涛, 叶燎原, 凌祯, 冯泽波, 肖冬冬. 宝象河雨季径流过程氮素输移特征及来源示踪[J]. 环境化学, 2019, 38(3): 686-696.
SU B, SHI ZT, YE LY, LING Z, FENG ZB, XIAO DD. Nitrogen transport characteristics and sources apportionment during Baoxiang River runoff process in rainy season[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(3): 686-696 (in Chinese).
- [30] 张小玲, 张卫东, 张玲, 李清丽, 郭国军, 华开, 张霞. 好氧反硝化菌的选育及其初步应用[J]. 微生物学通报, 2008, 35(10): 1556-1561.
ZHANG XL, ZHANG WD, ZHANG L, LI QL, GUO GJ, HUA K, ZHANG X. Selection of an aerobic denitrifying bacterium and its preliminary application in A quarium water[J]. Microbiology China, 2008, 35(10): 1556-1561 (in Chinese).
- [31] 王印. 生物质碳源强化人工湿地削减尾水污染物技术研究[D]. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 2020.
WANG Y. Study on the technology of reducing tailwater pollutants in constructed wetland strengthened by biomass carbon source[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [32] ZHANG N, CHEN H, LÜ YK, Wang Y. Nitrogen removal by a metal-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* ZN1, capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2019, 94(4): 1165-1175.
- [33] 谭俊杰, 李立君, 李雪洁, 韩天放, 胡筱敏, 赵鑫. 异养硝化-好氧反硝化菌株 GNR 选育及对猪场废水脱氮实验[J]. 环境工程, 2021, 39(2): 21-26.
TAN JJ, LI LJ, LI XJ, HAN TF, HU XM, ZHAO X. Isolation of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrifying strain gnr and its application of ammonia removal of swine wastewater[J]. Environmental Engineering, 2021, 39(2): 21-26 (in Chinese).
- [34] 王强. 磁强化好氧反硝化菌的生物脱氮机制与效能[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2010.
WANG Q. Biological nitrogen removal mechanism and efficiency of enhanced magnetic aerobic denitrifying bacteria[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2010 (in Chinese).
- [35] 陈赵芳, 尹立红, 浦跃朴, 李先宁, 谢祥峰. 一株异养硝化菌的筛选及其脱氮条件[J]. 东南大学学报(自然科学版), 2007, 37(3): 486-490.
CHEN ZF, YIN LH, PU YP, LI XN, XIE XF. Screening of a heterotrophic nitrifying bacterium strain and its optimal conditions for nitrogen removing[J]. Journal of Southeast University (Natural Science Edition), 2007, 37(3): 486-490 (in Chinese).
- [36] 冯亮, 袁春燕, 杨超, 皮姗姗, 马放, 杨基先, 李昂. 好氧反硝化生物脱氮技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3342-3354.
FENG L, YUAN CY, YANG C, PI SS, MA F, YANG JX, LI A. Research progress in nitrogen removal by aerobic denitrification[J]. Microbiology China, 2020, 47(10): 3342-3354 (in Chinese).
- [37] PAN ZL, ZHOU J, LIN ZY, WANG YM, ZHAO PC, ZHOU J, LIU SH, HE XJ. Effects of COD/TN ratio on nitrogen removal efficiency, microbial community for high saline wastewater treatment based on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process[J]. Bioresource Technology, 2020, 301: 122726.
- [38] 刘哲. 空间与时间曝气对垂直潜流人工湿地氮净化能力影响[D]. 南京: 南京大学硕士学位论文, 2019.
LIU Z. Effect of time and space aeration on nitrogen purification capacity of vertical subsurface flow constructed wetland[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University, 2019 (in Chinese).
- [39] 胡锦涛, 肖春桥, 邓祥意, 刘雪梅, 冯健, 池汝安. 稀土浸矿场地土壤异养硝化-好氧反硝化菌株 K3 的分离及脱氮研究[J]. 稀土, 2021, 42(5): 1-12.
HU JG, XIAO CQ, DENG XY, LIU XM, FENG J, CHI RA. Isolation and denitrification of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterial strain K3 from soil in rare earth leaching sites[J]. Chinese Rare Earths, 2021, 42(5): 1-12 (in Chinese).
- [40] 陈均利, 彭英湘, 刘锋, 罗沛, 张树楠, 张苗苗, 胡廉成, 吴金水. 异养硝化-好氧反硝化菌脱氮特性研究进展[J]. 环境科学与技术, 2020, 43(5): 41-48.
CHEN JL, PENG YX, LIU F, LUO P, ZHANG SN, ZHANG MM, HU LC, WU JS. Research advances in denitrification property of the heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 43(5): 41-48 (in Chinese).
- [41] ROUT PR, BHUNIA P, DASH RR. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereus* GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal[J]. Bioresource

- Technology, 2017, 244(Pt 1): 484-495.
- [42] 苏晓轩. 农药百菌清胁迫下土壤微生物反硝化及 N_2O 释放机制研究[D]. 重庆: 重庆大学博士学位论文, 2019.
- SU XX. Study on denitrification and N_2O release mechanism of soil microbes under chlorothalonil stress[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Chongqing University, 2019 (in Chinese).
- [43] 毛念佳, 嵇鸿民, 许柯, 任洪强. 铁离子对厌氧氨氧化污泥富集培养的影响[J]. 净水技术, 2018, 37(1): 22-29.
- MAO NJ, JI HM, XU K, REN HQ. Effect of ferric iron on enrichment cultivation process of anammox sludge[J]. Water Purification Technology, 2018, 37(1): 22-29 (in Chinese).
- [44] ZHANG MY, PAN LQ, SU C, LIU LP, DOU L. Simultaneous aerobic removal of phosphorus and nitrogen by a novel salt-tolerant phosphate-accumulating organism and the application potential in treatment of domestic sewage and aquaculture sewage[J]. The Science of the Total Environment, 2021, 758: 143580.
- [45] PADHI SK, TRIPATHY S, SEN R, MAHAPATRA AS, MOHANTY S, MAITI NK. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 78: 67-73.
- [46] 王紫琪. 异养硝化好氧反硝化菌 X1-L 的筛选鉴定及脱氮特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2020.
- WANG ZQ. Screening, identification and denitrification characteristics of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria X1-L[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2020 (in Chinese).
- [47] REN JL, BAI XY, LIU YC, HUANG X. Simultaneous nitrification and aerobic denitrification by a novel isolated *Ochrobactrum anthropi* HND19[J]. Bioresource Technology, 2021, 340: 125582.
- [48] ZHU L, DING W, FENG LJ, DAI X, XU XY. Characteristics of an aerobic denitrifier that utilizes ammonium and nitrate simultaneously under the oligotrophic niche[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2012, 19(8): 3185-3191.
- [49] 杨云龙, 黄少斌, 许辅乾, 黄慧星, 张永清. 螯台球菌 TAD1 在高温曝气生物滤池中的异养硝化-反硝化性能[J]. 环境化学, 2012, 31(5): 610-614.
- YANG YL, HUANG SB, XU FQ, HUANG HX, ZHANG YQ. Heterotrophic nitrification-denitrification of *Chelatococcus daeguensis* TAD1 in an aerating biofilter at high temperature[J]. Environmental Chemistry, 2012, 31(5): 610-614 (in Chinese).
- [50] 文刚, 王彤, 黄廷林, 万琪琪, 曹瑞华, 寇莉青, 杨尚业. 贫营养好氧反硝化菌株的脱氮特性及氮/碳平衡分析[J]. 环境科学, 2020, 41(5): 2339-2348.
- WEN G, WANG T, HUANG TL, WAN QQ, CAO RH, KOU LQ, YANG SY. Nitrogen removal performance and nitrogen/carbon balance of oligotrophic aerobic denitrifiers[J]. Environmental Science, 2020, 41(5): 2339-2348 (in Chinese).
- [51] HE XL, SUN Q, XU TY, DAI M, WEI DS. 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.
- [52] ALMEIDA JS, REIS MA, CARRONDO MJ. Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1995, 46(5): 476-484.
- [53] 胡丹, 何富强, 杜全能, 王刚, 兰时乐. 一株异养硝化-好氧反硝化神户肠杆菌的鉴定及脱氮特性[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(10): 70-74.
- HU D, HE FQ, DU QN, WANG G, LAN SL. Identification of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrifying bacterium and its removal characteristics of nitrogen[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2022, 50(10): 70-74 (in Chinese).
- [54] 雷强, 张燕, 孙燕, 刘啟明. 异养硝化-好氧反硝化菌 YZ-12 的脱氮性能及其对养殖废水的处理效果[J]. 环境工程学报, 2022, 16(1): 301-310.
- LEI Q, ZHANG Y, SUN Y, LIU QM. Denitrification performance and aquaculture wastewater treating effects of heterotrophic nitrifying aerobic denitrifying bacteria YZ-12[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(1): 301-310 (in Chinese).
- [55] XU N, LIAO M, LIANG YQ, GUO JW, ZHANG YH, XIE XM, FAN QY, ZHU YQ. Biological nitrogen removal capability and pathways analysis of a novel low C/N ratio heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium (*Bacillus thuringiensis* strain WXN-23)[J]. Environmental Research, 2021, 195: 110797.