



## 研究报告

## 深海沉积物高效脱氮菌筛选分离及其脱氮特性研究

姚雨欣<sup>1</sup> 钟新华<sup>1</sup> 李慧贤<sup>1</sup> 范蔚林<sup>1,2,3</sup> 项琪<sup>1,2,3</sup> 黄亚东<sup>\*1,2,3</sup>

1 暨南大学生命科学技术学院 广东 广州 510632

2 暨南大学生物医药研究院 广东省生物工程药物重点实验室 广东 广州 510632

3 暨南大学医药生物技术研究开发中心 广东 广州 510632

**摘要:**【背景】深海海域具有高压、低温、无光等环境条件,蕴含着丰富而独特的微生物资源。【目的】从深海沉积物中定向分离、筛选脱氮效率高的好氧脱氮菌株资源,并揭示其脱氮特性,为开发水体脱氮微生物技术提供物质基础。【方法】以东太平洋、南大西洋、西南印度洋共10个站位的深海沉积物为研究材料,在28℃下使用无机氮源连续进行两轮富集培养,然后定性筛选可以脱除氨氮、亚硝态氮和硝态氮的菌株,并通过形态学和16S rRNA基因序列分析进行初步分类鉴定;对优选得到的功能菌株,分别采用以氨氮、亚硝态氮、硝态氮为唯一氮源的培养基定量研究其生长和脱氮性能。【结果】从10份大洋深海沉积物样品中共分离得到49株好氧反硝化菌,其中3株在有氧条件下反硝化效率较高,分别命名为*Pseudomonas* sp. G111、*Pseudomonas* sp. G112和*Dietzia maris* W023a,其中菌株G111和G112与模式菌株博岑假单胞菌*Pseudomonas bauzanensis* BZ93<sup>T</sup>的16S rRNA基因序列相似度为99.2%,菌株W023a与模式菌株海洋迪茨氏菌*Dietzia maris* ATCC35013<sup>T</sup>的16S rRNA基因序列相似度为99.9%。菌株G111、G112和W023a培养48 h后,对氨氮的脱除率分别为98.0%、85.2%和97.6%;对亚硝态氮的脱除率分别为71.9%、67.5%和34.7%;对硝态氮的脱除率分别为66.0%、52.6%和56.3%。菌株G111、G112和W023a均为异养硝化-好氧反硝化菌,可通过好氧反硝化作用将亚硝态氮和硝态氮还原为含氮气体,也可通过异养硝化-好氧反硝化作用将氨氮转化为含氮气体。【结论】从深海沉积物中分离筛选得到3株高效好氧反硝化菌,所获得的菌株在水体净化、污水处理、生态系统修复等领域具有应用潜力。

**关键词:** 深海沉积物, 脱氮菌, 好氧反硝化, 脱氮性能

**Foundation items:** Leading Talents of Science and Technology Innovation of Guangdong Special Support Plan (2015TX01R067); National Innovation and Entrepreneurship Training Program for Undergraduate of China (202110559080); Innovation and Entrepreneurship Training Program for Undergraduate of Jinan University (CX21179)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-20-85563234; E-mail: tydhuang@jnu.edu.cn

**Received:** 28-02-2021; **Accepted:** 28-05-2021; **Published online:** 23-07-2021

**基金项目:** 广东省特支计划科技创新领军人才计划(2015TX01R067); 国家级大学生创新创业训练计划(202110559080); 暨南大学大学生创新创业训练计划(CX21179)

**\*通信作者:** Tel: 020-85563234; E-mail: tydhuang@jnu.edu.cn

**收稿日期:** 2021-02-28; **接受日期:** 2021-05-28; **网络首发日期:** 2021-07-23

## Isolation and characterization of high efficient denitrifying bacteria from deep sea sediments

YAO Yuxin<sup>1</sup> ZHONG Xinhua<sup>1</sup> LI Huixian<sup>1</sup> FAN Weilin<sup>1,2,3</sup> XIANG Qi<sup>1,2,3</sup>  
HUANG Yadong<sup>\*1,2,3</sup>

1 College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Bioengineering Medicine, Institute of Biomedicine, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

3 Biopharmaceutical R&D Center of Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

**Abstract: [Background]** With the environmental features of high pressure, low temperature and no light, deep sea areas contain abundant and characteristic microbial resources. **[Objective]** This study aims to isolate and screen aerobic denitrification bacteria strains with high denitrification efficiency from deep sea sediments, and reveal their denitrification characteristics, so as to provide material basis for the development of water denitrification microtechnology. **[Methods]** In this paper, deep-sea sediments from 10 stations in the East Pacific Ocean, South Atlantic Ocean and Southwest Indian Ocean were used as research materials. Two consecutive rounds of enrichment culture were carried out with inorganic nitrogen at 28 °C. The strains capable of removing ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and nitrate nitrogen were isolated, purified and screened by their qualitative denitrification capacities. The obtained strains were preliminary identified and classified through morphological and 16S rRNA gene sequence analysis. The growth and denitrification performance of the obtained strains were quantitatively studied in the media with ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and nitrate nitrogen as the only nitrogen source, respectively. **[Results]** A total of 49 aerobic denitrifying bacteria were isolated from 10 deep-sea sediment samples, of which 3 strains, designated *Pseudomonas* sp. G111, *Pseudomonas* sp. G112 and *Dietzia maris* W023a, showed high denitrifying efficiency under aerobic conditions. Strains G111 and G112 shared 16S rRNA gene similarities of 99.2% with *Pseudomonas bauzanensis* BZ93<sup>T</sup>. The 16S rRNA gene similarity between strain W023a and *Dietzia maris* ATCC 35013<sup>T</sup> was 99.9%. After strains G111, G112 and W023a were cultured for 48 hours, their removal rates of ammonia nitrogen were 98.0%, 85.2% and 97.6%, respectively; their removal rates of nitrite nitrogen were 71.9%, 67.5% and 34.7%, respectively; their removal rates of nitrate nitrogen were 66.0%, 52.6% and 34.7%, respectively. Strains G111, G112 and W023a are three heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria. These strains could reduce nitrite or nitrate to nitrogenous gases by using aerobic denitrification, and convert ammonia nitrogen to nitrogenous gases by using heterotrophic nitrification-aerobic denitrification. **[Conclusion]** In this study, three strains of highly efficient aerobic denitrifying bacteria were isolated from deep-sea sediments, and the obtained strains have application potential in water purification, sewage treatment, ecosystem restoration.

**Keywords:** deep sea sediments, denitrifying bacteria, aerobic denitrification, nitrogen removal performance

海洋是固定态氮素的最终归属地和主要脱除地, 栖息在海洋沉积物中的微生物是脱除固定态氮素的主力, 约 50%–70% 的固定态氮素被海洋沉积物中丰富多样的微生物脱除释放<sup>[1-3]</sup>。近年来研究发现, 大量有机废水流入海洋后, 导致水体富营养化, 海洋沉积物中反硝化细菌的种类和数量都大大增加, 深海沉积物中很有可能蕴藏着具有高效好氧

反硝化能力的微生物资源<sup>[4]</sup>。此外, 深海属于极端环境, 迥异于内陆水体, 具有高压、低温、高盐等特征, 塑造了独特的深海微生物代谢多样性和功能多样性<sup>[5]</sup>。深海微生物对盐度、温度、pH 等的适应范围广, 在模拟内陆水体环境的培养基筛选下有望获得高适应性、脱氮能力强的菌株<sup>[6]</sup>。在深海沉积物这一极端环境中生存的反硝化菌群, 其脱氮性

能和脱氮机制值得深入研究<sup>[7]</sup>。

微生物脱氮具有经济、高效、无残留污染等优点,在污水处理和环境工程领域已成为应用最为广泛的脱氮技术<sup>[8]</sup>。传统微生物脱氮工艺中联合利用硝化菌的硝化作用和反硝化菌的反硝化作用将氨态氮转化为氮气,从而实现水体脱氮,但由于硝化作用和反硝化作用发生的条件存在较大差异,大大增加了工艺的复杂度和运行成本<sup>[9-10]</sup>。同步硝化反硝化技术是一种新型脱氮技术,将硝化、反硝化反应置于同一反应器或反应阶段内进行,以减少工艺流程和成本<sup>[11]</sup>。与传统微生物脱氮工艺相比,同步硝化反硝化技术成功运行的物质基础之一是具有异养硝化和好氧反硝化功能的菌株,如 *Alcaligenes faecalis*、*Providencia rettgeri*、*Acinetobacter* 和 *Bacillus* 等<sup>[12-15]</sup>。这些菌株能在较高的氧分压下利用硝态氮和/或亚硝态氮作为电子受体进行好氧反硝化反应,实现异养硝化和好氧反硝化的偶联,使氨氮在好氧条件下可直接转化成气态产物(N<sub>2</sub>、NO 和 N<sub>2</sub>O)。然而,当前已获得的异养硝化-好氧反硝化菌株资源较少,大多分离自工农业废水、污水处理厂、淡水沉积物、活性污泥和养殖水体等样品<sup>[16-17]</sup>,普遍存在脱氮功能差、活性机制不明确及抗逆性、适应性和定殖力弱等问题,导致使用效果不稳定<sup>[18-19]</sup>。因此,从深海沉积物中

分离筛选高效好氧脱氮菌,不仅可为微生物脱氮研究提供理论和技术支撑,还可为脱氮菌剂研发和应用提供物质基础。

本研究以大洋深海沉积物为对象,分离纯化和筛选具有好氧反硝化能力的脱氮菌,并对其脱氮性能研究,以期为水体脱氮技术开发提供脱氮性能优越的功能菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 深海沉积物样品

在我国大洋科考第 26、32、39 和 40 航次期间,大洋一号、海洋六号和向阳红 10 号科考船从东太平洋、南大西洋、西南印度洋等海域采集深海沉积物 10 份,样品于 4 °C 保存待用。详细样品信息见表 1。

### 1.2 培养基

培养基配方参考 Zhang 等<sup>[20]</sup>,具体如下:

富集培养基(g/L): 琥珀酸钠 2.5, 二水合柠檬酸钠 2.5, NaNO<sub>2</sub> 1.0, KNO<sub>3</sub> 2.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2。pH 7.4, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min, 冷却后添加 1% (体积分数)的复合碳源、0.2% (体积分数)的复合维生素溶液、0.2% (体积分数)的微量元素混合液。制备固体平板时添加琼脂至 1.7% (质量体积分数)。

表 1 大洋深海沉积物信息

Table 1 The information of ocean deep sea sediments

Samples No.	Territory	Longitude	Latitude	Depth (m)
S08	Southwest Indian Ocean	E 50°21.6'	S 37°7.0'	1 902
S06	Southwest Indian Ocean	E 46°58.1'	S 38°42.9'	2 969
S18	Southern Atlantic Ocean	W 14°31.0'	S 13°35.6'	3 051
G12	Southern Atlantic Ocean	W 12°42.0'	S 18°28.8'	2 146
MAB	Eastern Pacific Ocean	E 157°46.4'	N 13°13.6'	5 848
W02	Eastern Pacific Ocean	E 162°12.9'	N 15°34.7'	2 687
S85	Southwest Indian Ocean	E 54°18.0'	S 34°48.2'	3 272
S88	Southwest Indian Ocean	E 49°47.9'	S 37°56.1'	1 535
S16	Southwest Indian Ocean	E 52°56.3'	S 35°54.1'	2 813
G11	Southwest Indian Ocean	E 52°59.1'	S 35°58.6'	2 645

复合碳源: D-葡萄糖 6.9 g, D-果糖 6.9 g, D-乳糖 6.9 g, 醋酸钠 9.5 g, 90%乳酸 6.4 mL, 甘露醇 7.0 g, 无水乙醇 7.0 mL, 甘油 6.3 mL, 苯甲酸钠 4.8 g, 水杨酸 4.6 g, 溶于 500 mL 水中, pH 7.4, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。

复合维生素溶液: 生物素(Vh) 0.05 g, 叶酸(Vb9) 0.50 g, 吡哆醇(Vb6) 0.50 g, 硫胺素(Vb1) 1.00 g, 烟酸(Vb3) 1.00 g, 泛酸钙(Vb5) 0.50 g, 钴胺素(Vb12) 0.01 g, 核黄素(Vb2) 0.10 g, 硫辛酸 0.10 g, EDTA-Na 0.40 g, 溶于 1 000 mL 水中, pH 7.5, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。

微量元素混合液:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.10 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.40 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1.24 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.50 g,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.50 g,  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.02 g,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.40 g, KI 0.20 g,  $\text{CaCl}_2$  5.00 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.10 g, EDTA-Na 10.00 g, 溶于 1 000 mL 水中, pH 7.4, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。

亚硝态氮筛选培养基: 不含  $\text{KNO}_3$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的富集培养基, 而且  $\text{NaNO}_2$  浓度调整为 0.69 g/L, 即亚硝态氮浓度为 140 mg/L。

硝态氮筛选培养基: 不含  $\text{NaNO}_2$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的富集培养基, 而且  $\text{KNO}_3$  浓度调整为 1.01 g/L, 即硝态氮浓度为 140 mg/L。

氨氮筛选培养基: 不含  $\text{NaNO}_2$  和  $\text{KNO}_3$  的富集培养基, 而且  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度调整为 0.66 g/L, 即硝态氮浓度为 140 mg/L。

亚硝态氮定量培养基: 亚硝态氮筛选培养基、琥珀酸钠和二水合柠檬酸钠各 5.00 g, 不添加复合碳源。

硝态氮定量培养基: 硝态氮筛选培养基、琥珀酸钠和二水合柠檬酸钠各 5.00 g, 不添加复合碳源。

氨氮定量培养基: 氨氮筛选培养基、琥珀酸钠和二水合柠檬酸钠各 5.00 g, 不添加复合碳源。

### 1.3 深海沉积物微生物连续富集

取大洋深海沉积物样品 3.0 g/份, 分别重悬于

100 mL 富集培养基中。28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 7 d, 将富集液按 1:100 的体积比再次转接至新的装有富集培养基的锥形瓶中, 于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 再次振荡培养 7 d。

### 1.4 脱氮菌株资源分离、纯化与保藏

取二次富集液, 依次稀释至  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  浓度。取  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  浓度的稀释液 100  $\mu\text{L}$  涂布于富集培养基平板上, 置于 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 5 d。观察平板上菌落的颜色、大小、形态、质地等特征, 挑取单菌落划线纯化。将纯化后的菌株进行编号并保藏。

### 1.5 脱氮菌筛选

分别接种已纯化的菌株至装有亚硝态氮定性筛选培养基、硝态氮定性筛选培养基和氨态氮定性筛选培养基的试管(装有倒置杜氏管)中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 2 d 观察产气情况, 分别采用格里斯试剂显色法、二苯胺显色法和纳氏试剂显色法检测培养液中  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 的存在情况, 筛选高效脱除  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 的菌株<sup>[21-23]</sup>。

### 1.6 脱氮菌株初步鉴定

观察、记录对数生长期的菌落形态。挑取单菌落在生理盐水中制成菌悬液, 结晶紫染色后使用光学显微镜观察细胞形态。采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取其基因组 DNA<sup>[24]</sup>。采用通用引物 27F/1492R 扩增菌株 16S rRNA 基因并测序<sup>[25]</sup>, 所得序列与 EzBioCloud 数据库中的 16S rRNA 基因序列进行比对分析, 使用 MEGA 7.0.28 软件和 Neighbor-Joining (NJ)法构建系统发育树。

### 1.7 菌株脱氮特性研究

挑取单菌落, 分别接种于 4 mL 硝态氮定量培养基、亚硝态氮定量培养基、氨氮定量培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养。当菌液浓度达到  $OD_{600}$  为 0.8 左右时, 取培养物 1 mL, 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 分别用上述 3 种培养基清洗

2次并重悬作为种子液。按4% (体积分数) 接种量分别接于装有100 mL上述3种培养基的锥形瓶中, 28 °C、180 r/min 振荡培养。培养不同时间后测定培养液的 $OD_{600}$ 值, 另取培养物1 mL于8 000 r/min 离心1 min 取上清液, 使用格里斯试剂分光光度法、紫外分光光度法、纳氏试剂分光光度法分别定量检测其中亚硝态氮、硝态氮、氨氮的质量浓度, 上清液中的总氮以及菌体氮的质量浓度均采用过硫酸钾氧化紫外分光光度法确定<sup>[11,26-31]</sup>。

将菌株接种到装有亚硝态氮定量培养基和倒置杜氏管的试管中 28 °C、180 r/min 振荡培养48 h。将试管转移至装有无菌蒸馏水的大烧杯中, 取出杜氏管并保持倒置(上端是气泡)。取无菌注射器1支、顶空瓶1个, 分别浸入烧杯内的水中, 用水赶出注射器和顶空瓶中的空气。使用注射器吸取杜氏管中的气泡, 然后注入倒置浸没在水中的顶空瓶中, 在水下压紧顶空瓶的盖子。气相色谱仪检测收集到的气体, 载气为氦气, 恒压100 kPa, 进样口温度150 °C, 柱温105 °C, 检测器温度150 °C。使用空气作为对照。进样体积100  $\mu$ L, 重复进样3次。

## 2 结果与分析

### 2.1 脱氮菌分离筛选

经过2轮富集、稀释涂布、菌落形态观察和划线纯化, 从10份大洋深海沉积物样品中共分离得到49株好氧反硝化菌。将其分别接入含有硝态氮、亚硝态氮和氨氮作为唯一氮源的3种筛选培养基中培养, 定性检测它们对3种氮素的脱除情况(表2)。结果表明, 这49株好氧反硝化菌在硝态氮筛选培养基中都能够还原硝态氮, 产生中间产物亚硝态氮; 但在亚硝态氮筛选培养基中, 只有G111、G112和W023a能够脱除亚硝态氮, 而且菌株G111和G112在脱除亚硝态氮的过程中释放气体。接种24 h后菌株G111和G112可将140 mg/L的亚硝态氮脱除干净; 接种48 h后,

菌株W023a可将筛选培养基中140 mg/L的硝态氮脱除干净, 但是菌株W023a在去除亚硝态氮时不产生气体。

### 2.2 脱氮菌的鉴定

通过形态学和16S rRNA基因序列分析进行分类鉴定(表3)。在富集培养基平板上, 菌株G111菌落呈乳白色, 圆形凸起, 边缘规则, 表面湿润光滑, 半透明, 光学显微镜和透射电镜下细胞呈短杆状, 极端生鞭毛, 大小为(0.5–0.6)  $\mu$ m $\times$ (0.7–0.8)  $\mu$ m; G112菌落呈灰白色, 圆形不凸起, 边缘不规则, 表面干燥, 不透明, 光学显微镜和透射电镜下细胞呈短杆状, 极端生鞭毛, 大小为(0.5–0.6)  $\mu$ m $\times$ (0.7–0.8)  $\mu$ m; 菌株W023a菌落呈橘红色, 圆形, 边缘规则, 表面湿润光滑, 光学显微镜和透射电镜下细胞呈长杆状, 无鞭毛, 大小为(0.4–0.5)  $\mu$ m $\times$ (1.2–1.6)  $\mu$ m (图1)。

菌株G111、G112与模式菌株博岑假单胞菌*Pseudomonas bauzanensis* BZ93<sup>T</sup>的16S rRNA基因序列相似性最高, 相似度为99.2%, 其16S rRNA基因序列已提交至NCBI公共数据库中, GenBank登录号分别为MW617256和MW617257。以菌株G111、G112及其近缘菌株的16S rRNA基因构建系统发育树(图2A)。结果表明, 菌株G111和G112位于假单胞菌属模式种组成的进化分支中, 而且与*Pseudomonas bauzanensis* BZ93<sup>T</sup>亲缘关系最近。然而根据文献报道, *Pseudomonas bauzanensis* BZ93<sup>T</sup>无硝酸盐还原能力<sup>[20]</sup>。因此, 综合考虑16S rRNA基因序列相似度和硝酸盐还原能力差异, 暂将上述2株反硝化菌命名为*Pseudomonas* sp. G111和*Pseudomonas* sp. G112。菌株W023a与模式菌株海洋迪茨氏菌*Dietzia maris* ATCC 35013<sup>T</sup>的16S rRNA基因序列相似性最高, 相似度为99.9%, 因此暂命名为*Dietzia maris* W023a (图2B), 其16S rRNA基因序列已提交至NCBI公共数据库中, GenBank登录号为MW624378。

表 2 49 株分离自大洋深海沉积物的脱氮菌株脱氮能力定性分析

Table 2 Qualitative analysis of denitrification capacity of 49 denitrifying bacteria which were isolated from deep sea sediments

Strains	140 mg/L NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N				140 mg/L NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N				140 mg/L NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N			
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Gas	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Gas	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Gas
S061	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S062	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S063	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S064	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
MAB1	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
MAB2	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
MAB3	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
MAB4	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
MAB5	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S081	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S082	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S083	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S083a	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S084	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S084a	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S084b	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S085	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S086	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S086a	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S088	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S181	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S182	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S183	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S851	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S854	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S854a	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S855	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S856	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S8510a	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S8512	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
G111	+++	+	-	+	-	-	-	+	+++	-	-	-
G112	+++	+	-	+	-	-	-	+	+++	-	-	-
G113	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
G121	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
G122	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
G124	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S883	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S884	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S885	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S181	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S182	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S183	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S183	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S184	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S184a	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
W021	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
W022	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
W023	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
W023a	-	+	-	-	+	-	-	-	+++	-	-	-

注: 不同数量的+表示不同程度的阳性(存在); -: 阴性(不存在)

Note: Different amounts of +: Different degrees of positive (presence); -: Negative (absence)

表 3 3 株脱氮菌株菌落形态及分类鉴定

Table 3 The colonial morphologies and taxonomic identification of the three denitrifying bacteria

Strains	Colonial morphology	Type strain	Similarity (%)
<i>Pseudomonas</i> sp. G111	Milk white, circular, convex, smooth, regularity, semi-transparent	<i>Pseudomonas bauzanensis</i> BZ93 <sup>T</sup>	99.2
<i>Pseudomonas</i> sp. G112	Off-white, roughness, irregular, non-transparent	<i>Pseudomonas bauzanensis</i> BZ93 <sup>T</sup>	99.2
<i>Dietzia maris</i> W023a	Salmon pink, circular, convex, smooth, regularity, semi-transparent	<i>Dietzia maris</i> ATCC 35013 <sup>T</sup>	99.9

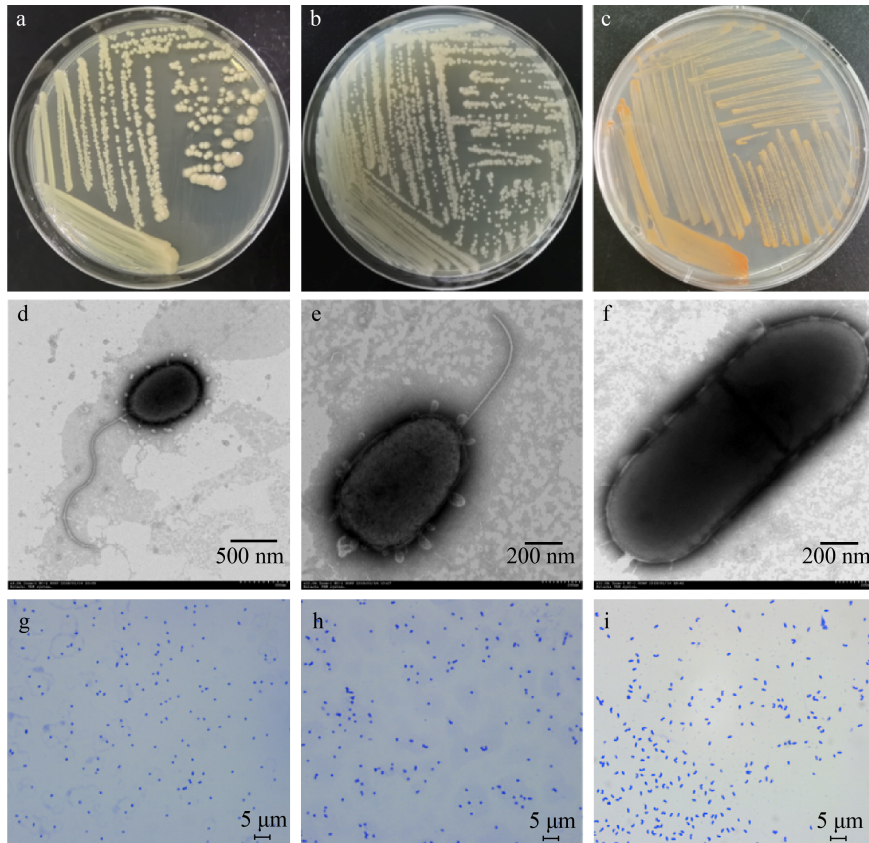


图 1 菌株 G111、G112 和 W023a 的菌落及细胞形态

Figure 1 The colonies and cells morphology of strains G111, G112 and W023a

注: a、b、c: G111 G112 和 W023a 菌落形态; d、e、f: 透射电镜下 G111、G112 和 W023a 的细胞形态; g、h、i: 光学显微镜下 G111、G112 和 W023a 的细胞形态

Note: a, b, c: Colonies of strains G111, G112 and W023a; d, e, f: Cells of strains G111, G112 and W023a under the transmission electron microscope; g, h, i: Cells of strains G111, G112 and W023a under the optical microscope

### 2.3 菌株 G111、G112 和 W023a 脱氮特性研究

将菌株 G111、G112 和 W023a 分别接种于亚硝态氮定量培养基、硝态氮定量培养基、氨氮定量培养基中, 不同培养时间后检测培养物的  $OD_{600}$ , 测定其中亚硝态氮、硝态氮、氨氮浓度。图 3A 结果显示, 菌株 G111 在 140.8 mg/L  $NO_2^-$ -N 为唯一

氮源条件下培养 48 h 时, 培养基上清液中  $NO_2^-$ -N 浓度降低至 39.6 mg/L, 总氮降低至 37.0 mg/L, 即该菌株对  $NO_2^-$ -N 的脱除率为 71.9%, 此过程中无  $NO_3^-$ -N 或  $NH_4^+$ -N 的产生, 其中转化为菌体氮的量为 59.6 mg/L; 氮平衡(初始上清液总氮+初始菌体氮=最终上清液总氮+最终菌体氮+气态氮)分析表明,

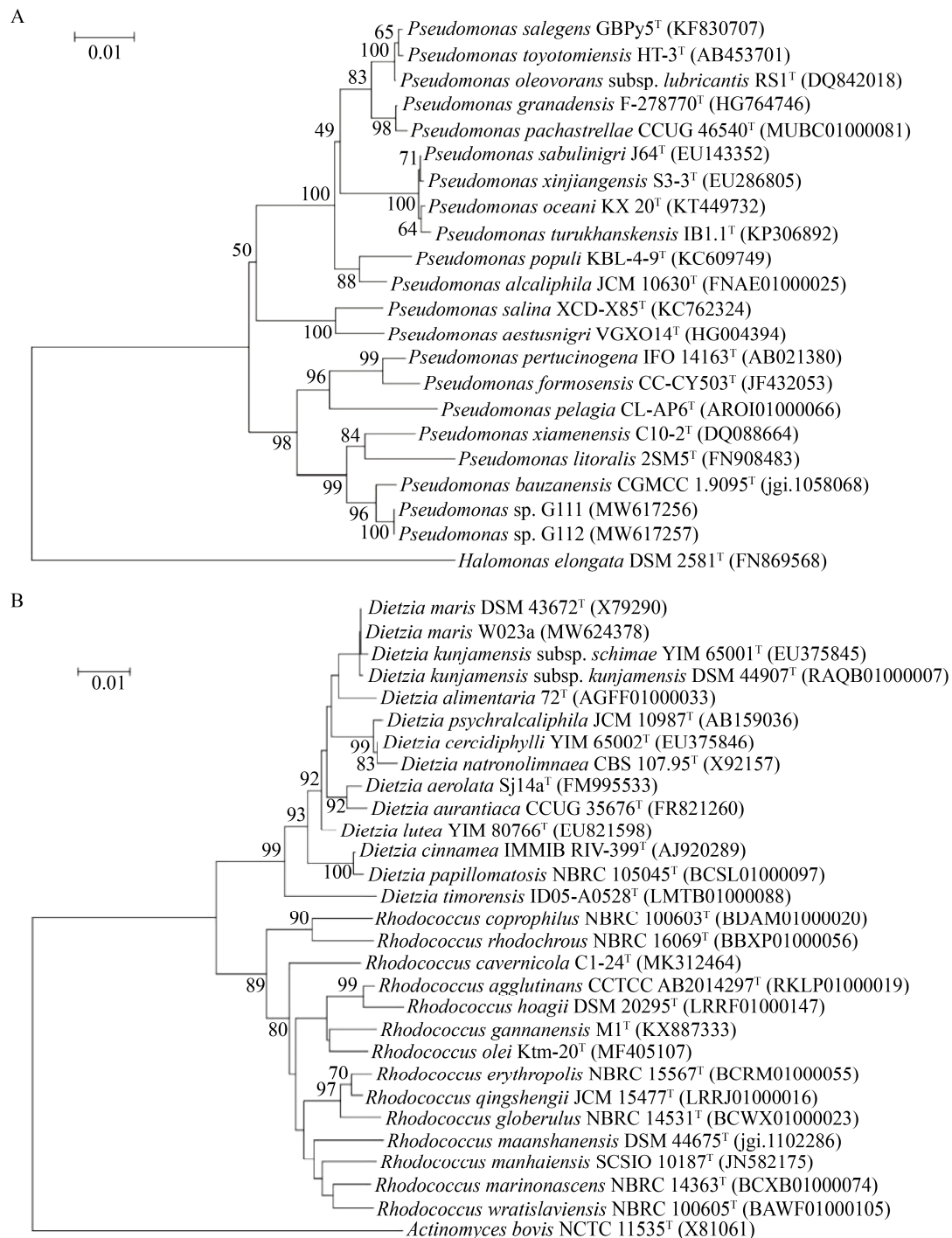


图2 菌株 G111、G112 和 W023a 的系统发育树

Figure 2 The phylogenetic trees of strains G111, G112 and W023a

注: A: 菌株 G111、G112 和近缘菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育树; B: 菌株 W023a 和近缘菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育树。采用 NJ 法建树。Bootstrap 自展 1 000 次计算进化树拓扑结构置信度。使用 *Actinomyces bovis* NCTC 11535<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因作为外参

Note: A: Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence of strains G111, G112 and related strains; B: Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence of strain W023a and related strains. NJ method was used to build the tree. Bootstrap self-unfolds 1 000 times to calculate the confidence of evolutionary tree topology. The 16S rRNA gene of *Actinomyces bovis* NCTC 11535<sup>T</sup> was used as the external reference



菌株 G111 在进行  $\text{NO}_2^-$ -N 脱除时,最终减少总氮的 54.0%和 46.0%分别转化为菌体氮和气态氮。图 3B 结果显示,菌株 G111 在 144.4 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 为唯一氮源条件下培养 48 h 时,培养基上清液中  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度降低至 49.1 mg/L,总氮降低至 50.0 mg/L,即该菌株对  $\text{NO}_3^-$ -N 的脱除率为 66.0%,此过程中无  $\text{NO}_2^-$ -N 或  $\text{NH}_4^+$ -N 的产生,其中转化为菌体氮的量为 53.0 mg/L;氮平衡分析表明,菌株 G111 在进行  $\text{NO}_3^-$ -N 脱除时,最终减少总氮的 55.2%和 44.8%分别转化为菌体氮和气态氮。图 3C 结果显示,菌株 G111 在以 141.6 mg/L  $\text{NH}_4^+$ -N 为唯一氮源条件下培养 48 h 时,培养基上清液中  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度降低至 2.8 mg/L,总氮降低至 26.5 mg/L,即该菌株对  $\text{NH}_4^+$ -N 的脱除率为 98.0%,此过程中无  $\text{NO}_2^-$ -N 或  $\text{NO}_3^-$ -N 的产生,其中转化为菌体氮的量为 67.7 mg/L;氮平衡分析表明,菌株 G111 在分别进行  $\text{NH}_4^+$ -N 脱除时,最终减少总氮的 57.9%和 42.1%分别转化为菌体氮和气态氮。

图 3D 结果显示,菌株 G112 在 138.7 mg/L  $\text{NO}_2^-$ -N 为唯一氮源条件下培养 48 h 时,培养基上清液中  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度降低至 45.1 mg/L,总氮降低至 49.3 mg/L,即该菌株对  $\text{NO}_2^-$ -N 的脱除率为 67.5%,此过程中无  $\text{NO}_3^-$ -N 或  $\text{NH}_4^+$ -N 的产生,其中转化为菌体氮的量为 57.4 mg/L;氮平衡分析表明,菌株 G112 在进行  $\text{NO}_2^-$ -N 脱除时,最终减少总氮的 58.6%和 41.4%分别转化为菌体氮和气态氮。图 3E 结果显示,菌株 G112 在 142.5 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 为唯一氮源条件下培养 48 h 时,培养基上清液中  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度降低至 67.6 mg/L,总氮降低至 72.3 mg/L,即该菌株对  $\text{NO}_3^-$ -N 的脱除率为 52.6%,此过程中无  $\text{NO}_2^-$ -N 或  $\text{NH}_4^+$ -N 的产生,其中转化为菌体氮的量为 52.7 mg/L;氮平衡分析表明,菌株 G112 在进行  $\text{NO}_3^-$ -N 脱除时,最终减少总氮的 71.1%和 28.9%分别转化为菌体氮和气态氮。图 3F 结果显示,菌株 G112 在 135.1 mg/L  $\text{NH}_4^+$ -N 为唯一氮源条件下培养 48 h 时,培养基上清液中  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度降低至 20.0 mg/L,总氮降低至 29.7 mg/L,即

该菌株对  $\text{NH}_4^+$ -N 的脱除率为 85.2%,此过程中无  $\text{NO}_2^-$ -N 或  $\text{NO}_3^-$ -N 的产生,其中转化为菌体氮的量为 67.7 mg/L;氮平衡分析表明,菌株 G112 在分别进行  $\text{NH}_4^+$ -N 脱除时,最终减少总氮的 59.5%和 40.5%分别转化为菌体氮和气态氮。

图 3G 结果显示,菌株 W023a 在 142.7 mg/L  $\text{NO}_2^-$ -N 为唯一氮源条件下培养 48 h 时,培养基上清液中  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度降低至 93.2 mg/L,总氮降低至 98.5 mg/L,即该菌株对  $\text{NO}_2^-$ -N 的脱除率为 34.7%,此过程中无  $\text{NO}_3^-$ -N 或  $\text{NH}_4^+$ -N 的产生,其中转化为菌体氮的量为 47.9 mg/L;氮平衡分析表明,菌株 W023a 在进行  $\text{NO}_2^-$ -N 脱除时,最终减少总氮的 95.2%和 4.8%分别转化为菌体氮和气态氮。图 3H 结果显示,菌株 W023a 在 149.6 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 为唯一氮源条件下培养 48 h 时,培养基上清液中  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度降低至 65.4 mg/L,总氮降低至 72.9 mg/L,即该菌株对  $\text{NO}_3^-$ -N 的脱除率为 56.3%,此过程中无  $\text{NO}_2^-$ -N 或  $\text{NH}_4^+$ -N 的产生,其中转化为菌体氮的量为 51.9 mg/L;氮平衡分析表明,菌株 W023a 在进行  $\text{NO}_3^-$ -N 脱除时,最终减少总氮的 69.8%和 30.2%分别转化为菌体氮和气态氮。图 3I 结果显示,菌株 W023a 在 148.1 mg/L  $\text{NH}_4^+$ -N 为唯一氮源条件下培养 48 h 时,培养基上清液中  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度降低至 3.6 mg/L,总氮降低至 27.9 mg/L,即该菌株对  $\text{NH}_4^+$ -N 的脱除率为 97.6%,该过程中无  $\text{NO}_2^-$ -N 或  $\text{NO}_3^-$ -N 的产生,其中转化为菌体氮的量为 89.7 mg/L;氮平衡分析表明,菌株 W023a 在分别进行  $\text{NH}_4^+$ -N 脱除时,最终减少总氮的 75.7%和 24.3%分别转化为菌体氮和气态氮。

菌株 G111 和 G112 在脱除硝态氮时不产生氨氮。根据表 2 和图 3,菌株 G111 和 G112 脱除硝态氮的中间产物是亚硝态氮,但亚硝态氮迅速被进一步还原,并不积累。菌株 G111 和 G112 能够高效脱除亚硝态氮并释放气体,而且不产生硝态氮和氨氮。气相色谱鉴定结果表明(图 4,表 4),菌株 G111 和 G112 在亚硝酸盐培养基中产生的气体成分为氮气。

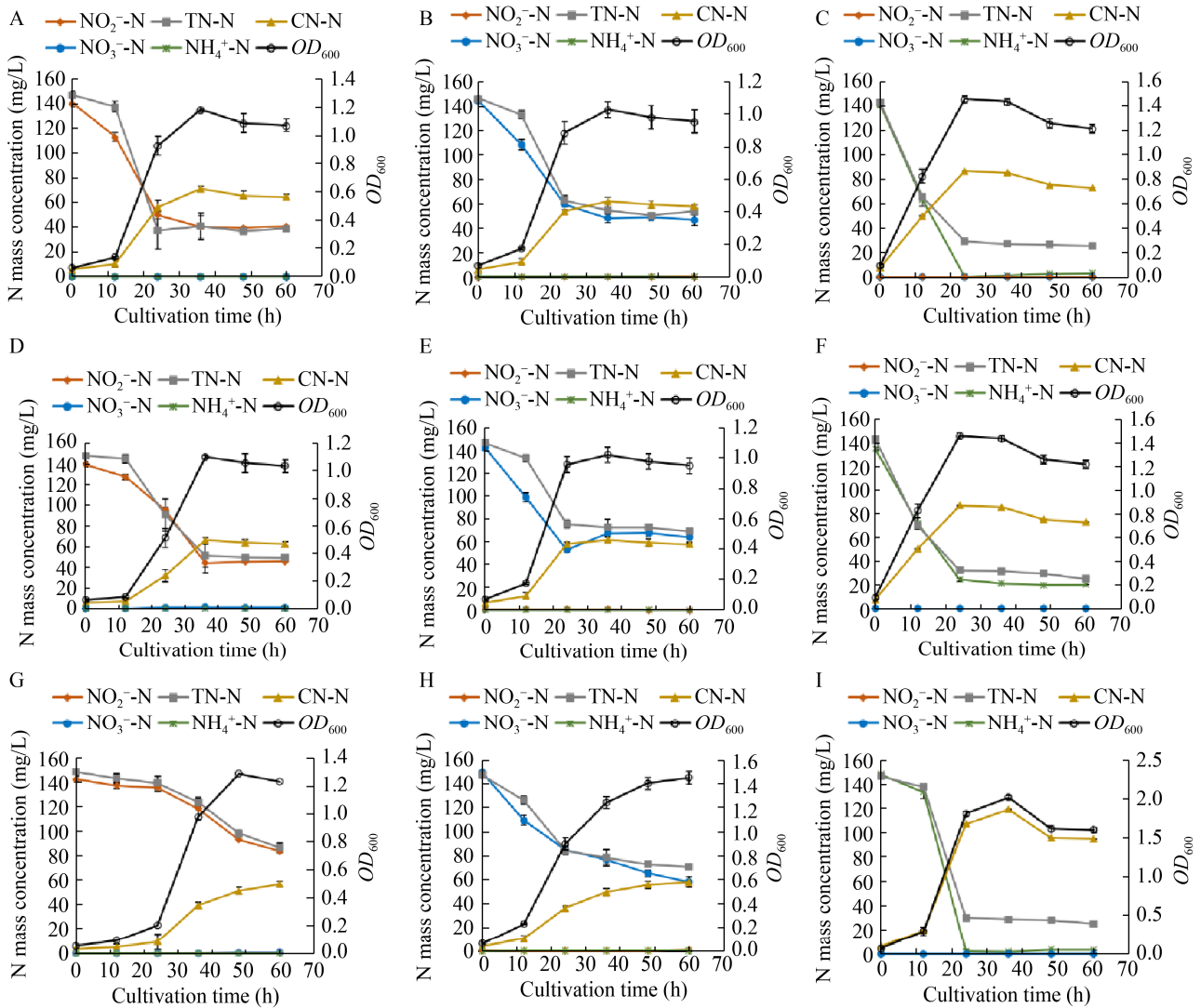


图 3 3 株脱氮菌在  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 培养基中生长趋势及脱氮特性

Figure 3 The growth trend and nitrogen removal characteristics of the three strains in  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N and  $\text{NH}_4^+$ -N culture medium

注: a、b、c: 菌株 G111 分别在  $\text{NO}_2^-$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 培养基中生长趋势及脱氮特性; d、e、f: 菌株 G112 分别在  $\text{NO}_2^-$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 培养基中生长趋势及脱氮特性; g、h、i: 菌株 W023a 分别在  $\text{NO}_2^-$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 培养基中生长趋势及脱氮特性

Note: a, b, c: The growth trend and nitrogen removal characteristics of the strain G111 in  $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{NH}_4^+$ -N culture medium, respectively; d, e, f: The growth trend and nitrogen removal characteristics of the strain G112 in  $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{NH}_4^+$ -N culture medium, respectively; g, h, i: The growth trend and nitrogen removal characteristics of the strain W023a in  $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{NH}_4^+$ -N culture medium

### 3 讨论与结论

海洋沉积物是固定态氮素脱除的主要场所,但是目前对深海沉积物中脱氮菌资源的开发和研究极少。Duan 等从厦门海域沉积物中分离到菌株 *Vibrio diabolicus* SF16, 在 3.0% 盐度下培养 48 h

可使氨氮从 119.8 mg/L 降至 11.0 mg/L, 脱除率达 90.9%<sup>[32]</sup>。本研究从 10 份大洋深海沉积物中富集、分离得到 49 株好氧反硝化菌, 证明深海沉积物中蕴藏着丰富的脱氮菌资源, 与“海洋沉积物是生物地球化学循环中氮素释放到大气这一过程的重要

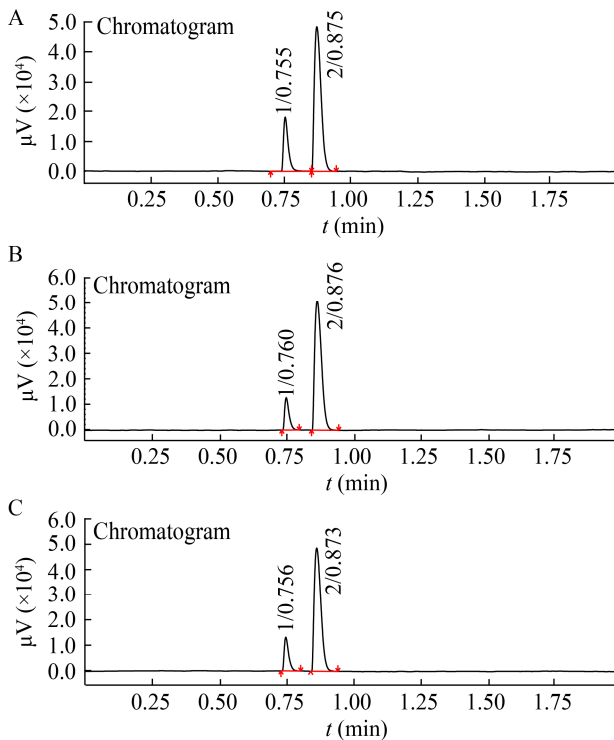


图4 气相色谱法鉴定菌株 G111、G112 在亚硝酸盐培养基中产生的气体

Figure 4 Identification of gas produced by strains G111 and G112 in nitrite medium by gas chromatography

注: A: 对照组, 进样样品为空气; B: 菌株 G111 在亚硝酸盐培养基中产生的气体; C: 菌株 G112 在亚硝酸盐培养基中产生的气体

Note: A: Control group, the sample is air; B: Gas produced by strain G111 in nitrite medium; C: Gas produced by strain G112 in nitrite medium

反应场所”的论断相呼应, 具有重要的理论意义。虽然深海沉积物中孕育的微生物可能会由于废水生物脱氮的场景不同而使其不能有效应用, 但本文旨在从深海沉积物中分离获得新型高效脱氮菌株, 并通过研究高效脱氮菌株对 3 种无机氮

表4 菌株 G111 和 G112 在亚硝酸盐培养基中产生的气体成分及比例

Table 4 Composition and proportion of gas produced by strain G111 and G112 in nitrite medium (%)

Samples	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
Air	78.92±0.32	21.08±0.32
Gas produced by G111	85.72±0.26	14.28±0.26
Gas produced by G112	84.53±0.27	15.47±0.27

素的脱除效果, 明确菌株脱氮特性, 为其应用于实际废水脱氮提供指导。

经过定性筛选, 从 49 株好氧反硝化菌中得到 3 株高性能脱氮菌进行深入分析。*Pseudomonas* sp. G111、*Pseudomonas* sp. G112 和 *Dietzia maris* W023a 可在好氧条件下脱除氨氮、硝态氮和亚硝态氮, 而且在无机氮素脱除过程中不积累其他有害含氮中间产物。

根据氮平衡分析, 菌株 G111 和 G112 在进行氮素脱除时, 其脱氮特性较为相似, 即在好氧条件下进行亚硝态氮和硝态氮脱除时, 最终能够将 50% 左右的总氮转化为含氮气体排出。由此推测, 菌株 G111 和 G112 具有完整的反硝化途径, 即:  $\text{NO}_3^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 。此外, 该 2 株菌能够将氨氮转化为含氮气体排出, 由此说明了它们是异养硝化-好氧反硝化功能菌。菌株 W023a 在进行亚硝态氮脱除时, 脱除的总氮大部分 (95.2%) 转化为菌体氮, 即脱除的总氮以有机氮的形式存留于培养基中, 不能有效地进行氮素的脱除。该菌株在进行硝态氮和氨氮脱除时, 最终也是大部分总氮转化为菌体氮 (75% 左右), 而少部分 (25% 左右) 则转化为含氮气体排出。由此推测, 菌株 W023a 可能也具有完整的反硝化途径, 即  $\text{NO}_3^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ , 而且在该途径中  $\text{NO}_3^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N}$  过程可能对亚硝酸盐进一步还原为含氮气体具有促进作用。此外, 由菌株 W023a 能够将氨氮转化为含氮气体的结果推测, 该菌株也是一株异养硝化-好氧反硝化功能菌。

尽管本研究分离筛选得到的 3 株异养硝化-好氧反硝化菌来源于海洋环境, 但本研究所用试验溶液含盐量近似淡水环境, 说明这 3 株菌能在淡水环境中发挥良好的脱氮性能, 推测其对盐度的耐受范围较大, 更进一步说明菌株 G111、G112 和 W023a 在水体净化、污水处理、生态系统修复等领域具有良好的应用潜力。目前, 菌株 G111、G112 和 W023a 具体的脱氮机制尚未明确, 仍需

更深入的研究来确定, 后续可以从基因组测序及注释分析、脱氮过程中氮循环基因的表达等方面进行研究。

致谢: 感谢大洋一号和海洋六号考察船采集和中国大洋样品馆(生物)提供本研究所用样品。

## REFERENCES

- [1] Huang D, Zhang ZY, Sun MM, Feng ZY, Ye M. Characterization and ecological function of bacterial communities in seabed sediments of the southwestern Yellow Sea and northwestern East China Sea, Western Pacific[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 761: 143233
- [2] Qiao ZX, Sun R, Wu YG, Hu SH, Liu XY, Chan JW, Mi XH. Characteristics and metabolic pathway of the bacteria for heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in aquatic ecosystems[J]. *Environmental Research*, 2020, 191: 110069
- [3] Rajta A, Bhatia R, Setia H, Pathania P. Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(5): 1261-1278
- [4] Hoshino T, Doi H, Uramoto GI, Wörmer L, Adhikari RR, Xiao N, Morono Y, D'Hondt S, Hinrichs KU, Inagaki F. Global diversity of microbial communities in marine sediment[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(44): 27587-27597
- [5] 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)  
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
- [6] Tsubouchi T, Koyama S, Mori K, Shimane Y, Usui K, Tokuda M, Tame A, Uematsu K, Maruyama T, Hatada Y. *Brevundimonas denitrificans* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from deep seafloor sediment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt\_11): 3709-3716
- [7] Gao MH, Liu JW, Qiao YL, Zhao MX, Zhang XH. Diversity and abundance of the denitrifying microbiota in the sediment of Eastern China marginal seas and the impact of environmental factors[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 73(3): 602-615
- [8] Li XY, Kong J, Zhao F, Yang MJ. A review of studies on nitrogen pollution of aquaculture water and treatment method[J]. *Guizhou Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 40(5): 59-64 (in Chinese)  
李小义, 孔杰, 赵凤, 杨明举. 养殖水体氮素污染及治理方法的研究进展[J]. *贵州畜牧兽医*, 2016, 40(5): 59-64
- [9] Zhang W, Shu JK. Research on status of nitrogen wastewater treatment technology[J]. *Journal of Hunan City University: Natural Science*, 2018, 27(2): 20-24 (in Chinese)  
张伟, 舒金锴. 含氮废水处理技术研究现状[J]. *湖南城市学院学报: 自然科学版*, 2018, 27(2): 20-24
- [10] 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)  
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
- [11] Chen JL, Xu J, Zhang SN, Liu F, Peng JW, Peng YX, Wu JS. Nitrogen removal characteristics of a novel heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria, *Alcaligenes faecalis* strain WT14[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 282: 111961
- [12] Ye J, Zhao B, An Q, Huang YS. Nitrogen removal by *Providencia rettgeri* strain YL with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. *Environmental Technology*, 2016, 37(17): 2206-2213
- [13] 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
- [14] Huang F, Pan LQ, Lv N, Tang XM. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 124(5): 564-571
- [15] Fu LZ. Research progress of nitrogen containing wastewater treatment process[J]. *West Leather*, 2017, 39(14): 25 (in Chinese)  
傅玲子. 含氮废水处理工艺研究进展[J]. *西部皮革*, 2017, 39(14): 25
- [16] Lv P, Luo JX, Zhuang XL, Zhang DQ, Huang ZB, Bai ZH. Diversity of culturable aerobic denitrifying bacteria in the sediment, water and biofilms in Liangshui River of Beijing, China[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 10032
- [17] Feng Y, Feng J, Shu QL. Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* strains from various environments[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(5): 1195-1211
- [18] Li GZ, Lai QL, Shao ZZ, Yan PS. Research progress of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria[J]. *Biotic Resources*, 2018, 40(5): 419-429 (in Chinese)  
李贵珍, 赖其良, 邵宗泽, 闫培生. 异养硝化-好氧反硝化细菌的研究进展[J]. *生物资源*, 2018, 40(5): 419-429

- [19] Wang YG, Wang X, Zhang JE, Dong J, Zhang N, Li MW. Progress in the research and application of aerobic denitrification bacteria[J]. *Industrial Water Treatment*, 2017, 37(2): 12-17 (in Chinese)  
王永刚, 王旭, 张俊娥, 董婧, 张楠, 李明蔚. 好氧反硝化细菌研究及应用进展[J]. *工业水处理*, 2017, 37(2): 12-17
- [20] Zhang MX, Li AZ, Yao Q, Wu QP, Zhu HH. Nitrogen removal characteristics of a versatile heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas bauzanensis* DN13-1, isolated from deep-sea sediment[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 305: 122626
- [21] Studt JL, Campbell ER, Westrick D, Kinnunen-Skidmore T, Marceau AH, Campbell WH. Non-toxic total nitrogen determination using a low alkaline persulfate digestion[J]. *MethodsX*, 2020, 7: 100791
- [22] He LJ, Zhang KG, Wang CJ, Luo XL, Zhang SS. Effective indirect enrichment and determination of nitrite ion in water and biological samples using ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(23): 3595-3600
- [23] Wang X. Study on the suitable conditions for the determination of ammonia nitrogen in water by Nessler's Reagent colorimetry[J]. *Journal of Green Science and Technology*, 2021, 23(2): 106-107,116 (in Chinese)  
王醒. 纳氏试剂比色法测定水中氨氮含量适宜条件研究[J]. *绿色科技*, 2021, 23(2): 106-107,116
- [24] Huang X, Duan N, Xu H, Xie TN, Xue YR, Liu CH. CTAB-PEG DNA extraction from fungi with high contents of polysaccharides[J]. *Molecular Biology*, 2018, 52(4): 621-628
- [25] Avşar C, Aras ES. Community structures and comparison of *nosZ* and 16S rRNA genes from culturable denitrifying bacteria[J]. *Folia Microbiologica*, 2020, 65(3): 497-510
- [26] Su B. Isolation, identification and nitrogen removal characteristics of a marine heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application[D]. Xiamen: Master's Thesis of Jimei University, 2014 (in Chinese)  
苏兵. 一株海洋异养硝化—好氧反硝化菌的分离鉴定、脱氮特性及应用[D]. 厦门: 集美大学硕士学位论文, 2014
- [27] Zhang ZW, Han JY, Wen X, Xing FX, Ruan JM, Zhang L. Determination of nitrate nitrogen in water by micro volume spectrophotometry with 2-isopropyl-5-methylphenol[J]. *Chinese Preventive Medicine*, 2016, 17(1): 16-18 (in Chinese)  
张振伟, 韩嘉艺, 温馨, 邢方潇, 阮建明, 张岚. 麝香草酚-微量分光光度法测定水中硝酸盐氮[J]. *中国预防医学杂志*, 2016, 17(1): 16-18
- [28] Zhang ZY. Comparative study on continuous flow analysis and Nessler's Reagent spectrophotometry in determination of ammonia nitrogen in surface water[J]. *Environment and Development*, 2020, 32(11): 87-88 (in Chinese)  
张臻宇. 连续流动分析法和纳氏试剂分光光度法测定地表水氨氮的比较研究[J]. *环境与发展*, 2020, 32(11): 87-88
- [29] Yang JA, Han SQ, Yang JA. Determination of ammonia nitrogen in aquaculture seawater by continuous flow analysis method[J]. *Tianjin Science & Technology*, 2020, 47(9): 35-37 (in Chinese)  
杨璟爱, 韩少强, 杨健安. 连续流动分析法测定养殖海水氨氮的研究[J]. *天津科技*, 2020, 47(9): 35-37
- [30] Wang ZF. Determination of ammonia nitrogen in water by Nessler's Reagent spectrophotometry[J]. *Tianjin Chemical Industry*, 2019, 33(5): 30-32 (in Chinese)  
王作芬. 纳氏试剂分光光度法对水中氨氮的测定研究[J]. *天津化工*, 2019, 33(5): 30-32
- [31] Liu L, Gao XQ, Miao ZH, Yang F, Huang HY, Li L. Comparison between ion-chromatography and spectrophotometry for determining nitrite in water[J]. *China Water & Wastewater*, 2016, 32(2): 93-96 (in Chinese)  
柳玲, 高晓庆, 苗振华, 杨峰, 黄华宇, 李璐. 离子色谱法与分光光度法测定水中亚硝酸盐含量的对比[J]. *中国给水排水*, 2016, 32(2): 93-96
- [32] Duan JM, Fang HD, Su B, Chen JF, Lin JM. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 421-428