

研究报告

产碱杆菌在水产养殖体系中的分布及其异养氨氧化特性

蒋天慧^{1,2,3}, 贾伟彬^{2,3}, 邓文芳^{2,3}, 黄友达^{*2,3}, 杨山^{2,3}, 麦智源^{2,3}, 吴海珍^{*1}, 许玫英^{2,3}

1 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070

3 广东省环境保护微生物与区域生态安全重点实验室, 广东 广州 510070

蒋天慧, 贾伟彬, 邓文芳, 黄友达, 杨山, 麦智源, 吴海珍, 许玫英. 产碱杆菌在水产养殖体系中的分布及其异养氨氧化特性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2870-2887.

JIANG Tianhui, JIA Weibin, DENG Wenfang, HUANG Youda, YANG Shan, MAI Zhiyuan, WU Haizhen, XU Meiyong. Distribution and heterotrophic ammonia-oxidizing characteristics of *Alcaligenes* sp. in aquaculture systems[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2870-2887.

摘要:【背景】随着水产养殖集约化程度的不断提高, 养殖水体环境中氮素污染及富营养化问题日益加剧, 严重抑制自养型氨氧化菌的功能活性, 因此深入解析产碱杆菌这类潜在的异养型氨氧化功能微生物在水产养殖系统中的分布特点及其氨氧化功能特性对于解决氮素污染问题具有重要意义。

【目的】调查研究水产养殖区域中产碱杆菌的分布情况, 分离选育具有高效氮转化能力的产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp.), 明确其氨氧化功能特性, 为养殖尾水高效脱氮提供菌种资源和理论指导。【方法】通过 16S rRNA 基因高通量测序技术分析产碱杆菌在广东沿海四大水产养殖主产区中的分布情况, 并从养殖鱼塘底泥样品中分离获得一株具有较强异养氨氧化能力的产碱杆菌 CHO6, 采用单因素分析法, 探究菌株 CHO6 的异养氨氧化特性及其关键影响因素。【结果】广东沿海四大水产养殖主产区中广泛分布着产碱杆菌; 从广州市养殖鱼塘底泥样品中分离得到的产碱杆菌 CHO6 能够在 48 h 内将 10 mmol/L 氨氮完全去除, 其氨氧化能力优异且受到碳源、温度、pH、C/N、溶解氧、初始氨氮浓度等因素的影响。【结论】产碱杆菌的普遍存在表明其对水产养殖环境具有较强的适应性, 产碱杆菌 CHO6 具有较强的氨氧化能力, 能够耐受较高浓度的氨氮, 可为水产养殖水体中的氮素去除提供功

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA0910300); 华南应用微生物国家重点实验室开放基金(SKLAM006-2021); 国家自然科学基金(32300095); 广东省重点领域研发计划(2020B202080005)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0910300), the Open Fund of State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China (SKLAM006-2021), the National Natural Science Foundation of China (32300095), and the Key Realm Research and Development Program of Guangdong Province (2020B202080005).

*Corresponding authors. E-mail: HUANG Youda, huangyd@gdim.cn; WU Haizhen, hzhwu2@scut.edu.cn

Received: 2024-02-06; Accepted: 2024-03-29; Published online: 2024-04-26

能菌种资源支持, 对水产养殖尾水治理具有重要意义。

关键词: 水产养殖; 异养氨氧化; 产碱杆菌; 16S rRNA 基因高通量测序

Distribution and heterotrophic ammonia-oxidizing characteristics of *Alcaligenes* sp. in aquaculture systems

JIANG Tianhui^{1,2,3}, JIA Weibin^{2,3}, DENG Wenfang^{2,3}, HUANG Youda^{*2,3}, YANG Shan^{2,3}, MAI Zhiyuan^{2,3}, WU Haizhen^{*1}, XU Meiyong^{2,3}

1 School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

3 Guangdong Provincial Key Laboratory of Environmental Protection Microbiology and Regional Ecological Security, Guangzhou 510070, Guangdong, China

Abstract: [Background] As the intensification in aquaculture keeps increasing, nitrogen pollution and eutrophication in aquaculture water have become increasingly serious, which inhibit the activity of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. Therefore, it is of great significance to understand the distribution and functional characteristics of heterotrophic ammonia-oxidizing microorganisms such as *Alcaligenes* sp. in aquaculture systems to address nitrogen pollution. [Objective] We studied the distribution of *Alcaligenes* sp. in aquaculture areas, isolated the strain with efficient nitrogen conversion ability, and characterized the ammonia oxidation of the strain screened out, aiming to provide strain resources and theoretical guidance for the efficient nitrogen removal from aquaculture tail water. [Methods] The high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene was employed to reveal the distribution of *Alcaligenes* sp. in the aquaculture areas in Guangdong. *Alcaligenes* sp. strain CHO6 with strong heterotrophic ammonia-oxidizing capacity was isolated from an aquaculture sediment sample by continuous enrichment culture. The single factor tests were carried out to explore the factors influencing the heterotrophic ammonia-oxidizing capacity of the strain CHO6. [Results] *Alcaligenes* sp. widely existed in the aquaculture areas in Guangdong. *Alcaligenes* sp. CHO6 isolated from an aquaculture sediment sample completely removed 10 mmol/L ammonia nitrogen within 48 h. The ammonia-oxidizing capacity of the strain CHO6 was influenced by a variety of factors including carbon source, temperature, pH, C/N ratio, dissolved oxygen, and initial ammonia nitrogen. [Conclusion] The prevalence of *Alcaligenes* sp. indicates strong adaptability to the aquaculture environment. *Alcaligenes* sp. CHO6 as a heterotrophic strain had strong ammonia-oxidizing capacity and resistance to high concentrations of ammonia nitrogen. This study provides strain resources for the removal of nitrogen in aquaculture environments, which is of great significance for the management of aquaculture tail water.

Keywords: aquaculture; heterotrophic ammonia oxidation; *Alcaligenes* sp.; high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene

现代工农业的迅速扩张导致了水质的严重恶化, 水体富营养化现象日益加剧^[1], 而未经处理或未达标的含氮废水是导致水体富营养化的主要原因, 主要来源包括市政污水、工业废水、垃圾渗透液、养殖尾水及农业污水等^[2]。其中, 水产养殖尾水往往含有较高浓度的氨氮和有机物^[3], 尤其是在目前的高密度养殖模式下, 养殖体系中产生大量的残饵、粪便及药物残留, 导致严重的氨氮污染问题^[4], 严重影响水产品的质量和产量, 威胁生态环境安全。因此, 亟须开展水产养殖尾水高效脱氮技术的研发与应用, 这对保护生态环境平衡、发展工农业经济和保障人类健康都具有十分重要的意义。

凭借成本低、操作简单、二次污染风险小等优势, 基于氨氧化菌、反硝化菌等菌的生物脱氮技术^[5]在污水氮素去除中被广泛应用。传统的氨氧化途径一般是由化能自养微生物驱动, 然而这类微生物生长缓慢, 易受到环境中有机物含量及环境温度等外界条件的影响^[6-7]。有研究表明当 C/N 过高时, 异养微生物成为优势种群, 从而间接抑制了自养氨氧化细菌的活动^[8]; 当氨氮浓度较高时, 游离氨会对自养氨氧化细菌产生毒害作用^[9]。因此, 传统自养氨氧化细菌由于自身的局限性不适合用于含高氨氮和高有机物的养殖废水。但近年研究发现有一类化能异养微生物也可以发挥氨氧化作用, 即异养氨氧化细菌, 相较于自养氨氧化细菌, 异养氨氧化细菌能在好氧条件下将氨氮氧化为其他形式的氮, 如硝氮、亚硝态氮^[10], 并且受外界条件影响较小、生长速率快、活性高。因此针对养殖废水中高氨氮和高碳氮比的环境, 异养氨氧化菌更具优势, 可以利用养殖废水中的有机物生长并对氨氮进行有效去除。

产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)是环境中一种

重要的功能微生物, 可以降解环境中的多种有机污染物^[11-13], 具有代谢多样、抗逆性强的特点, 广泛分布于土壤、水体、沉积物和活性污泥等^[14]。此外, 有多株具有异养氨氧化功能的产碱杆菌被报道可以利用环境中有机物生长的同时有效去除环境中的氨氮。例如, 粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*) No. 4^[15]和粪产碱菌(*A. faecalis*) WY01^[16]均能耐受废水中较高的氨氮浓度且表现出良好的脱氮效果。Cao 等^[17]发现在氨氮初始浓度为 1 300 mg/L 条件下培养 60 h 时水生产碱菌(*A. aquatilis*) AS1 对氨氮的去除率达到 95.1%。此外, Wu 等^[18]鉴定了产碱杆菌的一个氨氧化菌新种 *Alcaligenes ammonioxydans* sp. nov., 并发现了一个新的氨氧化途径, 即直接氨氧化, 在有氧条件下将氨氮氧化为羟胺, 羟胺直接被转化为氮气, 在氨氧化阶段实现氮的去除; Xu 等^[19]在粪产碱菌(*A. faecalis*) JQ135 中同样发现了相似的途径。因此, 产碱杆菌作为一种潜在的异养氨氧化菌, 在含氨氮的水产养殖尾水的修复处理方面具有极大的应用潜能。然而, 产碱杆菌属在水产养殖体系中的相关研究仍较为缺乏, 其在水产养殖体系中分布情况尚不清楚。因此, 明晰产碱杆菌在水产养殖环境中的分布情况, 挖掘水产养殖环境的产碱杆菌菌种资源, 对水产养殖业的可持续发展具有重要的意义。

本研究对产碱杆菌在广东沿海的 4 个典型海洋渔业养殖基地的分布特征进行调查分析, 并对广州市养殖鱼塘底泥进行富集培养, 期望得到具有高效脱氮功能的菌株, 并对其培养条件进行优化, 探究在不同温度、pH、C/N、转速、碳源、初始氨氮浓度等不同培养条件下的脱氮特性, 为其在水产养殖尾水中氨氮去除的应用奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 样品

从广东沿海的 4 个典型海洋渔业养殖基地——潮州市饶平县(23°39'50"N, 117°0'14"E)、珠海市斗门区(22°12'32"N, 113°17'48.22"E)、阳江市阳东区(21°57'8.56"N, 112°7'9.48"E)以及湛江市坡头区(21°14'41"N, 110°27'19"E)采集了 22 份水样和 22 份底泥样品, 具体样品信息见表 1。

在离水面 0.2 m 的深度收集了约 2.0 L 的水样, 并放入 2.0 L 的消毒瓶中。收集到的水样通过混合纤维膜(孔径 0.22 μm)过滤去除颗粒物。过滤后的混合纤维膜保存于-80 °C 冰箱中用于提取 DNA, 水样用于测量理化参数。

根据 Huang 等^[20]所描述的方法, 用抓斗桶

从水-沉积物界面下的 0-10 cm 层收集沉积物样本。采集的沉积物样品在实验室中进行均质化, 分为两组, 一组样品集中保存于 4 °C 冰箱中, 用于后续理化参数的测量; 另一组保存于-80 °C 冰箱, 用于 DNA 的提取。

富集培养的样品来源: 广州市某养殖鱼塘底泥。

1.2 主要试剂和仪器

Power Water DNA 提取试剂盒和 Power Soil DNA 提取试剂盒, MoBio 公司; 非发酵细菌生化编码鉴定管, 广东环凯微生物科技有限公司; 2×PCR *Taq* Master Mix 和 FastPure Microbiome DNA Isolation Kit, 诺唯赞生物科技有限公司。超微量分光光度计, 赛默飞世尔科技公司。

表 1 采样点环境理化信息

Table 1 Environmental physical and chemical information of sampling sites

Site	Sediment samples	Water samples	Salinity (%)	Dissolved oxygen (mg/L)	pH	Temperature (°C)
Zhuhai	M1	M25	3.0	8.6	8.3	32.6
Zhuhai	M2	M26	1.5	6.6	7.9	31.6
Zhuhai	M3	M27	2.0	6.3	8.9	32.1
Zhuhai	M4	M28	3.5	9.7	8.9	33.1
Zhuhai	M5	M29	5.0	11.2	9.0	31.8
Zhuhai	M6	M30	5.0	15.6	9.2	32.2
Zhuhai	M7	M31	2.0	9.7	8.7	33.3
Zhuhai	M8	M32	4.5	8.9	8.6	33.8
Zhuhai	M9	M33	3.0	8.1	8.2	33.0
Zhuhai	M10	M34	2.0	5.5	7.5	32.4
Zhuhai	M11	M35	1.0	5.7	7.5	32.3
Zhuhai	M12	M36	2.0	4.2	7.6	31.4
Yangjiang	M13	M37	9.0	12.0	8.5	34.2
Yangjiang	M14	M38	5.0	12.2	9.2	35.9
Yangjiang	M15	M39	4.0	7.1	8.5	34.7
Yangjiang	M16	M40	5.0	10.1	9.1	35.2
Zhanjiang	M18	M42	26.0	6.7	8.4	32.7
Zhanjiang	M19	M43	25.0	6.1	8.0	32.3
Zhanjiang	M20	M44	26.5	5.5	8.1	32.5
Chaozhou	M21	M49	27.5	6.2	8.6	23.2
Chaozhou	M22	M50	28.0	7.2	8.2	23.3
Chaozhou	M23	M51	28.0	6.8	8.8	23.2

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 5.0。富集驯化培养基(g/L): 硫酸铵 0.66, 氯化钠 2.25, 硫酸镁 0.20, 丁二酸钠 8.00, 添加微量元素 2.00 mL/L, pH 7.50。分离培养基为富集驯化培养基中添加 15.00 g/L 琼脂粉。氮氮培养基(g/L): 硫酸铵 0.66, 丁二酸钠 4.72, 七水硫酸镁 0.20, 氯化钠 10.00, 磷酸二氢钾 0.50, 磷酸氢二钠 1.50, 添加微量元素 2.00 mL/L, pH 7.50。微量元素(g/L): 四水氯化锰 1.00, 二水钼酸钠 0.50, 六水氯化钙 0.01, 七水硫酸锌 0.50, 五水硫酸铜 0.10, 七水硫酸亚铁 0.50。

1.4 样品微生物群落分析

利用 Power Water DNA 提取试剂盒提取过滤水样后的混合纤维膜的 DNA, 同时利用 Power Soil DNA 提取试剂盒提取底泥样品的 DNA。提取的 DNA 样品经超微量分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度, 采用细菌可变区 (V3-V4)通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAG GCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGT WTCTAAT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μ L): 2 \times PCR *Taq* Master Mix 12.5 μ L, DNA (100 ng/ μ L) 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 70 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物送百迈客生物科技有限公司进行 16S rRNA 基因高通量测序。

使用 q2-demux (<https://github.com/qiime2/q2-demux>)及 QIIME2 (2020.8)^[21]对原始测序数据进行修正、拼接、组装及过滤, 得到高质量的 tags 数据(clean tags)。同时使用 q2-dada2 plugin 鉴定并去除嵌合体序列^[22-23], 得到最终有效数据(effective tags)。随后基于 Silva 数据库(<https://www.arb-silva.de/>)^[24]利用 QIIME2 q2-feature-classifier

(<https://github.com/qiime2/q2-feature-classifier>)对扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)进行聚类和物种注释。基于 ASV 的物种注释结果对样品中产碱杆菌属的相对丰度进行统计分析, 从而对产碱杆菌属在广东沿海地区养殖环境中的分布进行初步研究。原始测序数据已上传至 NCBI SRA 数据库, 登录号为 PRJNA747833。

1.5 产碱杆菌的分离筛选

将 10 g 养殖鱼塘底泥样品接入 100 mL 富集驯化培养基中, 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 3 d 后按 10%接种量将富集液接种至新的富集驯化培养基中, 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 继续培养 3 d, 重复转接 3 次后得到最后一次富集液。将富集液用生理盐水梯度稀释至 10⁻⁸制成悬液, 吸取 100 μ L 各个浓度的样品涂布于分离培养基, 将涂好的平板倒置放入培养箱中, 30 $^{\circ}$ C 培养 2-3 d, 挑取单菌落划线, 多次重复直至纯化为纯菌, 将纯化后的单菌株 CHO6 接种于 LB 培养基中培养, 培养得到的菌悬液按 1:1 加入 30%无菌甘油, 保存至-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱。

1.6 菌株的鉴定

1.6.1 菌株的分子生物学鉴定

利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAT-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。使用 FastPure Microbiome DNA Isolation Kit 提取细菌 DNA, PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times PCR *Taq* Master Mix 12.5 μ L, 细菌 DNA (100 ng/ μ L) 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。获得的扩增产物经 0.75%琼脂糖凝胶电泳验证后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序结果在 EzBioCloud 数据库中进行 16S rRNA 基因同源性比对分析^[25], 并以 MEGA 7.0.14 中

的 neighbor-joining 法构建系统发育树^[26]。

1.6.2 菌株的形态学和生理生化特性鉴定

用平板划线法和透射电镜观察菌株的形态。平板划线法观察菌落形态步骤如下：将保存的菌株 CHO6 菌液在 LB 平板上进行三区划线，并将平板放置于 30 °C 培养箱中倒置培养 3 d 后观察平板上单菌落的形态。透射电镜观察步骤如下：在纯化后的平板上挑选长势优良的单个菌落，将其接种至 LB 液体培养基中，30 °C 培养 3 d，培养好的菌液送至广东省科学院微生物研究所进行透射电镜观察，得到电镜照片后观察其形态结构。

测定菌株对不同种类碳源的利用。配制含不同碳源的氨氮培养基，其 C/N 比固定为 10，选取的碳源分别有丁二酸钠、丙酮酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、乳酸钠、葡萄糖、蔗糖、鼠李糖、甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、阿东糖醇、甘露醇、山梨醇及肌醇。将菌株 CHO6 预先在 LB 培养基中培养 12 h，在 6 000 r/min 离心 5 min 的条件下反复离心 3 次后重悬，加入 5 mL 含不同碳源的氨氮培养基中，于 30 °C、180 r/min 培养 3 d，观察培养基是否浑浊，每个碳源实验设置 3 个重复。

使用非发酵细菌生化编码鉴定管进行细菌生化特性的鉴定，在 LB 培养基中预先培养 CHO6 菌液，之后按照鉴定试剂盒说明书进行操作，48 h 后观察结果。

1.7 菌株 CHO6 全基因组测序

在纯化后的平板上挑选单菌落，将其接种至装有 LB 培养基的试管中 30 °C 培养 3 d，将培养好的菌液使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。提取的 DNA 样品采用微量分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度，测定合格的 DNA 样品送至美格生物科技有限公司利用 Illumina NovaSeq 600 平台对菌株进行全

基因组测序。

获取菌株 CHO6 基因组原始数据后通过质控、过滤去除低质量的 reads，获得 clean data。随后使用 Spades 进行基因组的拼装，并使用 CheckM 评价基因组的完整性与污染度，使用 Prokka 对拼装完成后的基因组进行基因的预测及初步注释，随后利用 eggNOG (<http://eggnog-mapper.embl.de/>)及 RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) 在线进一步注释，从而进一步确定菌株 CHO6 基因组中的氮代谢相关基因。菌株 CHO6 拼装后的基因组草图已上传至 NCBI，登录号为 JBANCI010000000。

1.8 菌株 CHO6 的生长及氨氧化特性

以丁二酸钠为唯一碳源，将菌株 CHO6 接种到 100 mL 氨氮培养基(C/N=10)中，设定氨氮浓度为 10 mmol/L，培养基 pH 7.5，初始 OD_{600} 为 0.06，30 °C、180 r/min 培养 48 h。每隔 4 h 取样测定 OD_{600} 、羟胺(NH₂OH)浓度、氨氮(NH₄⁺-N)浓度及亚硝态氮(NO₂⁻-N)浓度。每个实验组设置 3 个重复。

1.9 菌株 CHO6 脱氮性能的影响因素

在氨氮培养基的基础上，按照单因素试验原理，分别改变氨氮培养基(100 mL)中的碳源种类(水杨酸钠、丁二酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、葡萄糖、山梨醇)，C/N (2、5、10、15、20)，温度(20、25、30、37、50 °C)，pH (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)，转速(0、50、100、180、220 r/min)，以及初始氨氮浓度(10、20、40、100、150、200 mmol/L)。对菌株 CHO6 进行脱氮性能的影响因素探究实验，30 °C、180 r/min 摇床培养 24 h 后取样检测 OD_{600} 、羟胺浓度、氨氮浓度和亚硝态氮浓度，并计算氨氮的去除率。每个实验组设置 3 个重复。

1.10 分析方法

所有样品检测前均须使用 0.22 μm 水系滤

膜过滤, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 等指标按照国家标准方法测定。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的测定采用纳氏试剂分光光度法^[27]; $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的测定采用紫外分光光度法^[28]; OD_{600} 采用紫外分光光度计测定, NH_2OH 采用分光光度法进行测定^[29]。

2 结果与分析

2.1 产碱杆菌在水产养殖环境中的分布特点

本研究通过高通量测序技术测定了广东沿海 4 个海洋渔业养殖基地(潮州市饶平县、珠海市斗门区、阳江市阳东区及湛江市坡头区)养殖环境中 22 个水样及 22 个底泥样品中产碱杆菌属的丰度。通过 16S rRNA 基因序列比对, 发现在 9 个水样及 9 个底泥样品中均能检测到产碱杆菌属的存在(图 1)。结果显示, 产碱杆菌属在不同地区养殖体系的水样和底泥样品中分布不均。对于珠海地区来说, 产碱杆菌更多地存在于底泥中, 水样中的最高丰度达到 0.046 0%, 底泥中的最高丰度为 0.030 7%; 而对于阳江地

区、潮州地区和湛江地区来说, 产碱杆菌则更多地在水样中检测到, 在这 3 个地区的取样点中, 产碱杆菌在水样中最高丰度为 0.030 6%, 在底泥中最高丰度为 0.019 2%。这可能是受不同养殖环境中各种影响因子如溶解氧、温度、pH 和氨氮浓度不同的影响, 不同地区的不同地理环境也可能对产碱杆菌的分布造成一定影响。

总的来说, 在 4 个不同地区的养殖体系中, 均能检测到产碱杆菌的存在, 表明产碱杆菌是养殖废水中一种较为常见的微生物, 能较好地适应养殖废水的环境, 能够在养殖废水这样复杂的体系中稳定存在并遗传, 这意味着产碱杆菌在养殖废水的氨氮去除方面具有一定的应用潜能。

2.2 菌株 CHO6 的鉴定结果

2.2.1 菌株 CHO6 的分子生物学鉴定结果

从广州市养殖鱼塘采集回来的底泥样品经过富集、分离、纯化、培养等步骤后, 筛选出一株可以高效去除氨氮的菌株 CHO6, 经 16S rRNA 基因序列鉴定后, 确定菌株 CHO6 为产

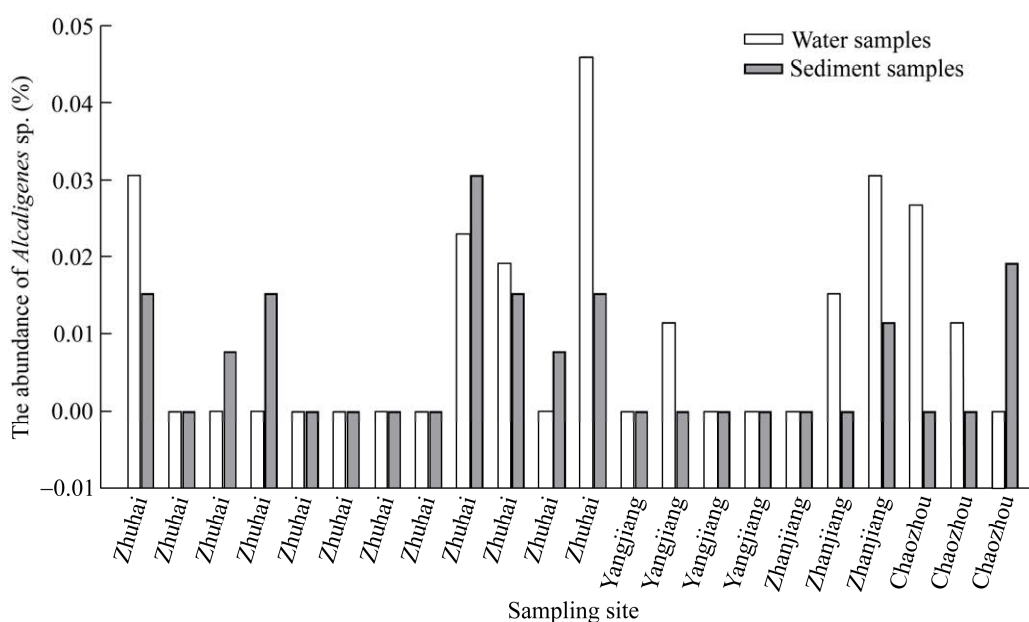


图 1 产碱杆菌在养殖水体环境中的分布

Figure 1 Distribution of *Alcaligenes* sp. in the aquaculture water environment.

碱杆菌属, 其 16S rRNA 基因序列大小约为 1 400 bp。将 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud 数据库中进行比对后, 使用 MEGA 7.0.14 软件构建系统发育树(图 2)。结果显示该菌株与 *Alcaligenes ammonioxydans* 亲缘关系最相近, 相似度超过 99.5%。菌株 CHO6 的 16S rRNA 基因序列已上传至 NCBI, 登录号为 PP346174。

2.2.2 菌株 CHO6 的形态学鉴定结果

菌株 CHO6 于 30 °C 培养 3 d 后的菌落形态

呈圆形、乳白色、不透明、黏稠感、凸起、边缘完整等特征(图 3A)。菌株革兰氏染色反应呈阴性, 透射电镜观察到菌体为短杆状, 长约 1.8 μm, 直径约为 0.8 μm, 有多条鞭毛(图 3B)。

2.2.3 菌株 CHO6 的生理生化鉴定结果

单一碳源的利用结果: 菌株 CHO6 可以利用丁二酸钠、丙酮酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、乳酸钠、甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸等有机酸和氨基酸类碳源进行生长, 但不能利用葡萄糖、蔗糖、

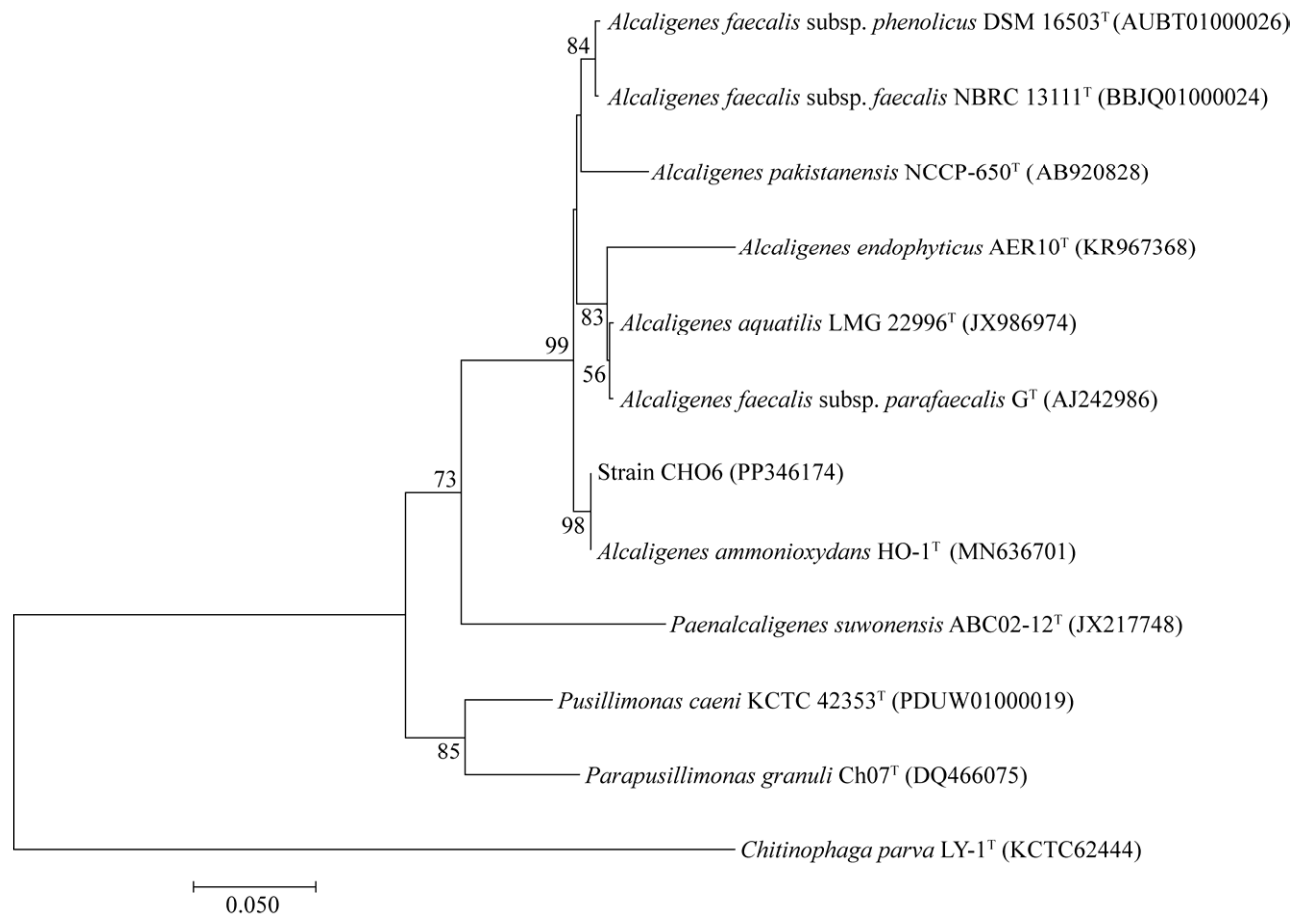


图 2 菌株 CHO6 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 发育树节点数值表示 bootstrap 值; 发育树标尺为 0.05, 表示平均每个核苷酸位置有 0.05 个差异; 括号内序号表示菌株 GenBank 登录号
Figure 2 Phylogenetic tree of strain CHO6 based on 16S rRNA gene sequence. The values of developmental tree nodes represent the bootstrap values and the developmental tree scale was 0.05, indicating an average difference of 0.05 per nucleotide position. Serial numbers in parentheses indicate GenBank accession number.

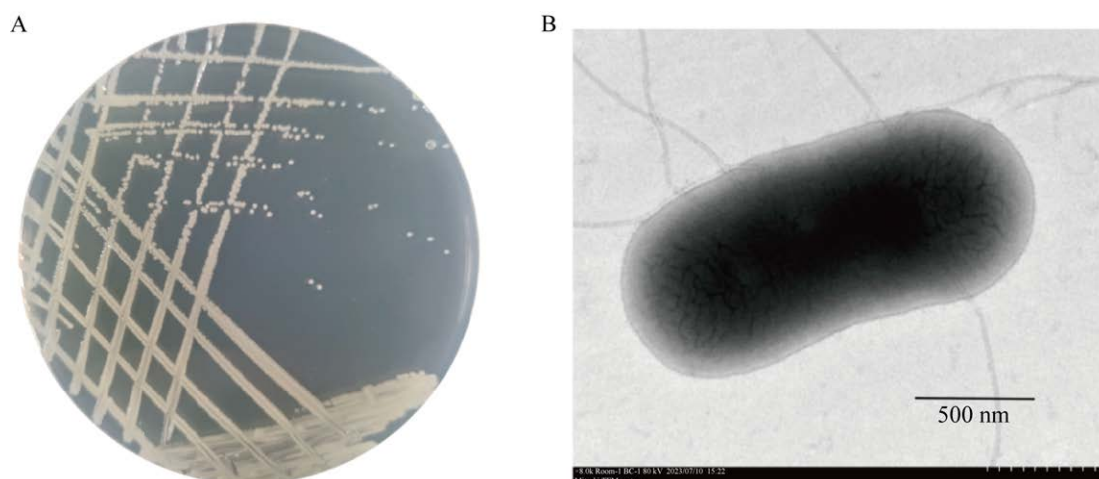


图3 菌株 CHO6 的形态学特征 A: 平板菌落形态. B: 透射电镜图

Figure 3 Morphological features of strain CHO6. A: Morphology of plate colony. B: Micrograph of transmission electron microscope.

鼠李糖、阿东糖醇、甘露醇、山梨醇、肌醇等糖类和醇类碳源。具体信息可登录国家微生物数据中心查阅, 编号为 NMDCX0000276。

细菌生化指标鉴定结果: 菌株 CHO6 具有赖氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶及氧化酶活性, 硝酸盐还原试验、硫化氢试验结果为阴性, 可以利用西蒙氏柠檬酸盐、七叶苷及 β -半乳糖苷。具体信息可登录国家微生物数据中心查阅, 编号为 NMDCX0000276。

2.3 菌株 CHO6 全基因组测序结果分析

基于 Illumina 平台获得的有效数据, 对样品 clean data 进行组装, 经多次调整后获得最优组装结果(具体信息可登录国家微生物数据中心查阅, 编号为 NMDCX0000276)。菌株 CHO6 基因组大小为 3.77 Mb, 基因组 G+C 含量为 57.1%。菌株 CHO6 的 16S rRNA 基因序列系统发育分析结果显示其与 *A. ammonioxydans* HO-1^T 亲缘关系最相近, 通过在基因组层面进一步分析发现菌株 CHO6 与菌株 HO-1 之间的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)为 99.48%, 平均氨基酸一致性(average amino acid identity,

AAI)为 99.32%, 数字 DNA-DNA 杂交值(digital DNA-DNA hybridization value, dDDH)为 95.3%, 均高于物种分类阈值(ANI>95%–96%, AAI>95%–96%, dDDH>70%), 因此确定菌株 CHO6 为 *A. ammonioxydans* CHO6。进一步对菌株 CHO6 的氮代谢相关基因进行注释后发现, 在菌株 CHO6 的基因组中存在 *nirK* (编码硝酸盐还原酶)、*nosZ* (编码一氧化二氮还原酶)、*dnfT1RT2ABCD* (参与直接氨氧化途径)和 *amtB* (编码氨转移酶)等一系列氮代谢基因, 具有较强的氮代谢潜能。

2.4 菌株 CHO6 的生长及氨氧化性能分析

菌株 CHO6 属于异养好氧菌, 能在有机碳源丁二酸钠上生长。关于菌株 CHO6 在氨氮培养基中的生长情况和氨氮去除效果如图 4 所示。菌株 CHO6 接种到新的培养环境中需要时间适应新环境, 在 0–8 h 菌株的生长较为缓慢, 氨氧化反应也较弱, 氨氮浓度几乎未下降(图 4A), 羟胺 4 h 后开始积累, 亚硝态氮几乎未产生(图 4B); 8–48 h, 细菌呈指数生长, 该阶段菌株对氨氮的去除速率最快, 48 h 后氨氮去除率达到 100%

(图 4A), 在这过程中羟胺的浓度先快速积累, 并于 12 h 达到最高值, 之后快速下降, 在这过程中伴随着亚硝态氮的积累(图 4B), 推测在此反应中不仅发生了直接氨氧化作用, 而且发生了硝化作用。

2.5 菌株 CHO6 氨氧化作用的影响因素

2.5.1 不同碳源的影响

碳源种类对菌株的生长和氨氮去除效率影响较大; 常见的碳源有糖类、有机酸类、醇类和氨基酸类等, 由于微生物活动所产生酶系的差异, 不同的微生物可利用的碳源也不同^[30]。菌株 CHO6 对不同碳源的利用存在着明显差异(图 5A), 不同碳源下氨氮的去除效果、羟胺及亚硝态氮的积累也有较大差异(图 5A、5B)。当菌株 CHO6 以水杨酸钠、葡萄糖和山梨醇为碳源时, 菌体几乎不生长且不能对氨氮进行有效去除(图 5A)。当碳源为丁二酸钠、乙酸钠和柠檬酸钠时, 菌株 CHO6 生长迅速, 且 24 h 氨氮的平均去除速率分别为 5.2、4.5、5.1 mg/(L·h), 去除率分别为 96.1%、83.8%、96.3% (图 5A)。当以丁二酸钠为碳源时, 无羟胺的积累, 亚硝

态氮的积累量也较低(图 5B)。综上, 选取丁二酸钠作为菌株的最佳生长碳源。

2.5.2 不同 C/N 的影响

碳源和氮源作为微生物生长繁殖的重要因素, 其含量比例将直接影响菌株的生长及其对氨氮去除效率^[31]。不同的 C/N 对菌株 CHO6 的生长及脱氮特性的影响如图 6 所示。随着 C/N 的升高, 菌株的 OD_{600} 呈现出先升高后下降的趋势, 当 C/N=15 时, 菌体浓度达到最大值为 0.85。菌株对氨氮去除率的变化趋势与菌株的生长变化趋势一致, 均为先上升后降低。当 C/N 为 10 与 15 时, 菌株 CHO6 对氨氮去除效果最好, 两者无显著差异, 并且 24 h 氨氮的平均去除速率分别为 4.92 mg/(L·h) 和 4.95 mg/(L·h), 去除率分别为 96.1% 和 95.5%, 并且无羟胺的积累, 同时亚硝态氮的积累也较低。综上, 在 C/N=10 的条件下, 菌株 CHO6 的氨氮去除率最高。

2.5.3 不同 pH 的影响

环境 pH 是影响微生物生长的重要因素之一, pH 过高或过低均会对菌株的生长状态产生不利影响, 产碱杆菌属大多数属于中性和耐碱

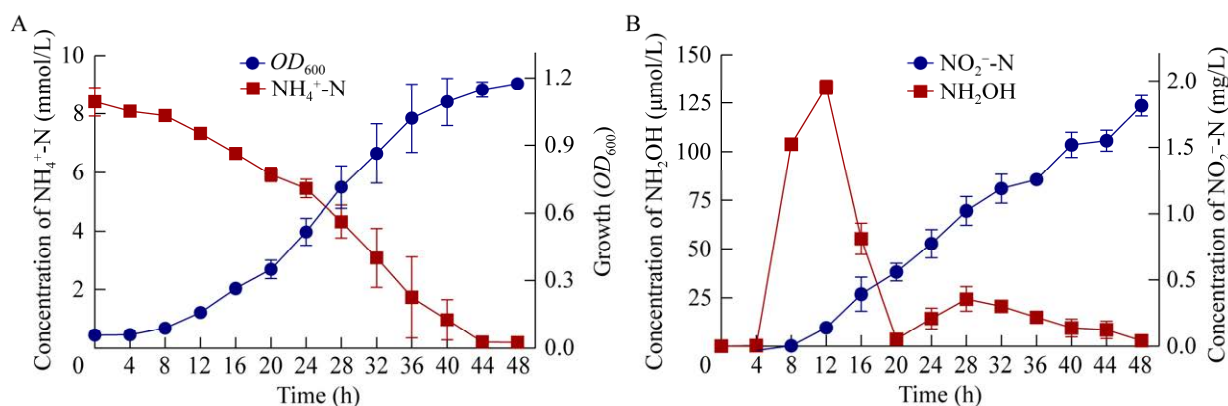


图 4 菌株 CHO6 的生长特性及氨氧化特性 A: 菌株 CHO6 OD_{600} 及氨氮浓度随时间变化. B: 羟胺及亚硝态氮浓度随时间变化

Figure 4 Growth characteristics and ammonia-oxidizing characteristics of strain CHO6. A: The changes of concentration of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and strain CHO6 OD_{600} with time. B: Concentration of $\text{NO}_2^-\text{-N}$ and NH_2OH as a function of time.

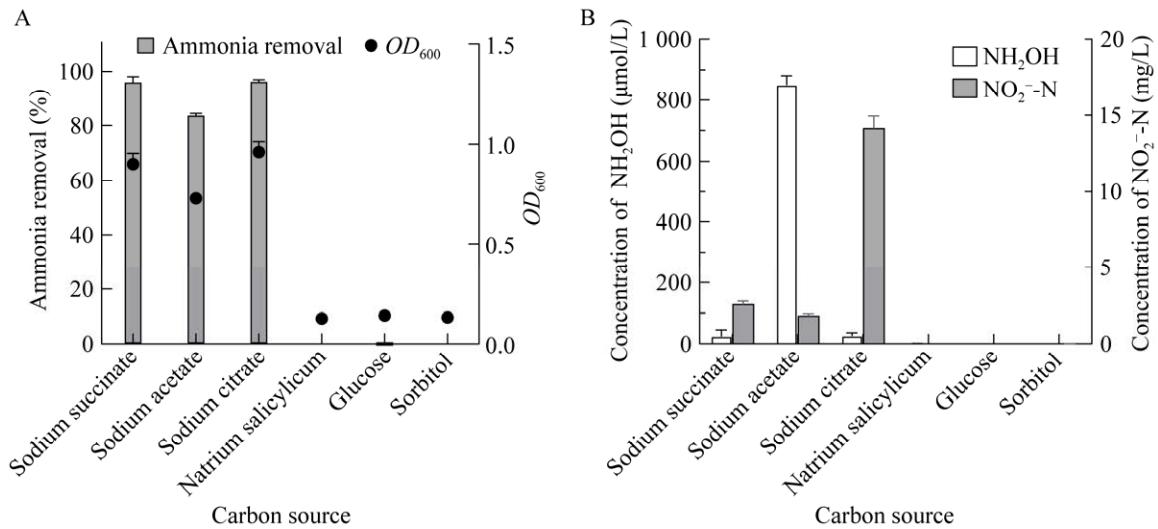


图 5 不同碳源条件下菌株 CHO6 的生长情况、氨氮去除率(A)及羟胺、亚硝态氮浓度(B)

Figure 5 Growth, ammonia nitrogen removal rate (A), hydroxylamine concentration and nitrite nitrogen concentration (B) of strain CHO6 under different carbon source conditions.

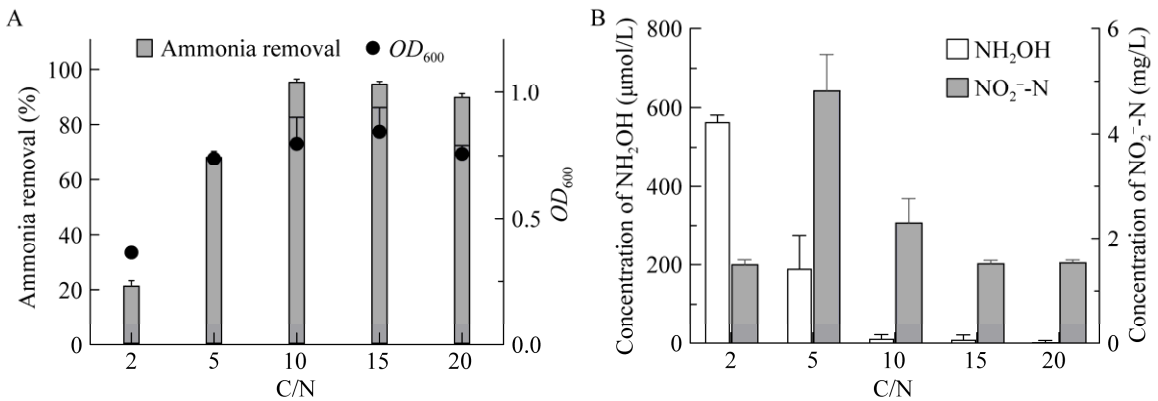


图 6 不同 C/N 条件下菌株 CHO6 的生长情况、氨氮去除率(A)及羟胺、亚硝态氮浓度(B)

Figure 6 Growth, ammonia nitrogen removal rate (A), hydroxylamine concentration and nitrite nitrogen concentration (B) of strain CHO6 under different C/N.

性的微生物^[32]。本研究探讨了初始 pH 5.0–9.0 时菌株 CHO6 的生长及其对氨氮的去除效果。结果表明, 当 pH 6.0–9.0 时, 菌株 CHO6 的生长并未受到明显的影响(图 7A), 这与 Zhang 等^[33]的结论一致, 即大部分微生物通常都可以在一个较宽的 pH 范围内生长。在 pH 6.0、7.0、8.0、9.0 时菌株 CHO6 生长情况良好, 并且 24 h 氨氮的平均去

除速率分别为 5.9、5.3、5.0、4.9、4.3 mg/(L·h), 去除率均在 95% 以上(图 7A)。然而当 pH 5.0 时, 菌株生长受明显抑制, 氨氮浓度几乎不减少, 也未观察到羟胺和亚硝态氮的积累(图 7B), 可见菌株 CHO6 不适合在较低酸性条件下生长。因此, 菌株 CHO6 在弱酸性、中性和碱性条件下可以生长, 并且表现出较好的氨氮去除能力。

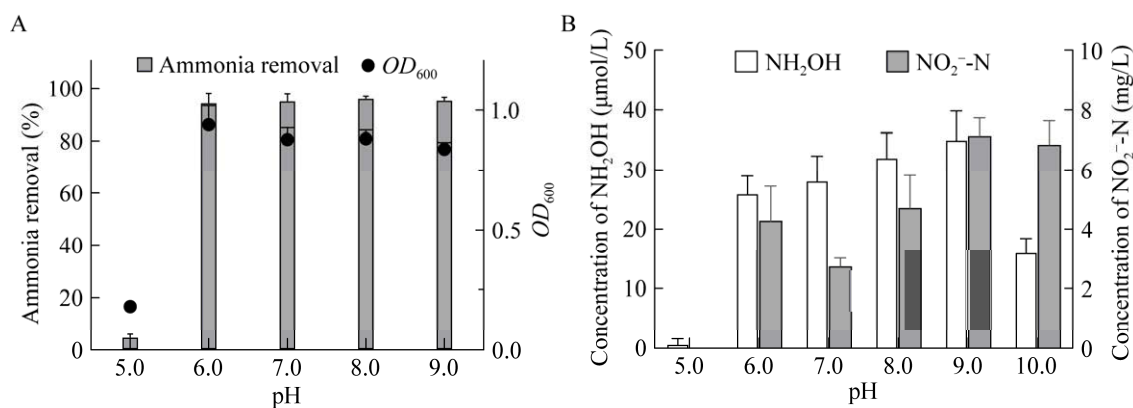


图 7 不同 pH 条件下菌株 CHO6 的生长情况、氨氮去除率(A)及羟胺、亚硝态氮浓度(B)

Figure 7 Growth, ammonia nitrogen removal rate (A), hydroxylamine concentration and nitrite nitrogen concentration (B) of strain CHO6 under different pH.

2.5.4 不同温度的影响

温度对微生物的繁殖和生长代谢具有较大影响,大多数硝化细菌的最佳温度为 28–37 °C^[34]。温度较低时细胞的生长和相关酶的催化活性会受到限制^[35],温度过高时则会引发核酸和蛋白质的失活变性,并导致细菌代谢受阻甚至死亡^[36-37]。本研究探讨了培养温度对菌株 CHO6 的生长和脱氮速率影响,结果如图 8 所示。在 25、30、37 °C 条件下,培养 24 h 后,氨氮的平均去除速率分别为 5.0、5.1、5.1 mg/(L·h),菌株 CHO6 对氨氮的去除率分别为 98.3%、97.6%、97.6% (图 8);而当温度为 20 °C 时,24 h 氨氮的平均去除速率为 3.3 mg/(L·h),氨氮的去除率为 66.5% (图 8);在温度为 50 °C 时,菌株 CHO6 不生长,甚至氨氮出现了增加的现象(图 8),猜测高温导致了菌株 CHO6 的死亡并出现了裂解,从而释放出菌体内的氨氮。综上,选择 30 °C 作为菌株的最佳培养温度。

2.5.5 不同摇床转速的影响

溶解氧是细菌生长的重要因素,菌株生长过程中不同的溶解氧浓度对菌株的代谢也会产生不同的影响,从而导致其氨氧化性能的变化^[38-39]。研究表明,培养基内的溶解氧浓度在达到饱和和

前与摇床转速呈线性关系^[40],本研究通过改变摇床转速调控培养基中溶解氧的浓度。结果表明,不同摇床转速条件下菌株 CHO6 的生长和氨氮去除效果不同(图 9)。低转速条件下,菌株 CHO6 的生长较慢,其氨氮去除率也较低,随着转速的增加,菌株 CHO6 的 OD₆₀₀ 不断增加,其氨氮去除率也不断增加。当转速增加至 100、180、220 r/min 时,培养 24 h 后,菌株 CHO6 的生长和氨氮去除率无明显差异,氨氮的平均去除速率均为 4.9 mg/(L·h) 以上,氨氮的去除率分别为 98.2%、98.0%、97.5%。

2.5.6 不同初始氨氮浓度的影响

在培养体系中,氨氮作为供菌株 CHO6 生长的唯一氮源,培养基中氨氮初始浓度的不同对菌株 CHO6 的生长和氨氮的去除有着较大的影响。过高浓度的氨氮会对微生物细胞产生毒害作用,而过低的氨氮浓度达不到菌株的生长要求^[41]。不同初始氨氮浓度下菌株 CHO6 的生长情况和氨氮去除率如图 10 所示。当菌株 CHO6 在氨氮起始浓度为 10 mmol/L 的条件下培养时,24 h 后氨氮去除率为 98.01%。随着起始氨氮浓度的增加,菌株 CHO6 能够进一步生长,氨氮去除率虽然逐渐降低,但其氨氮的平

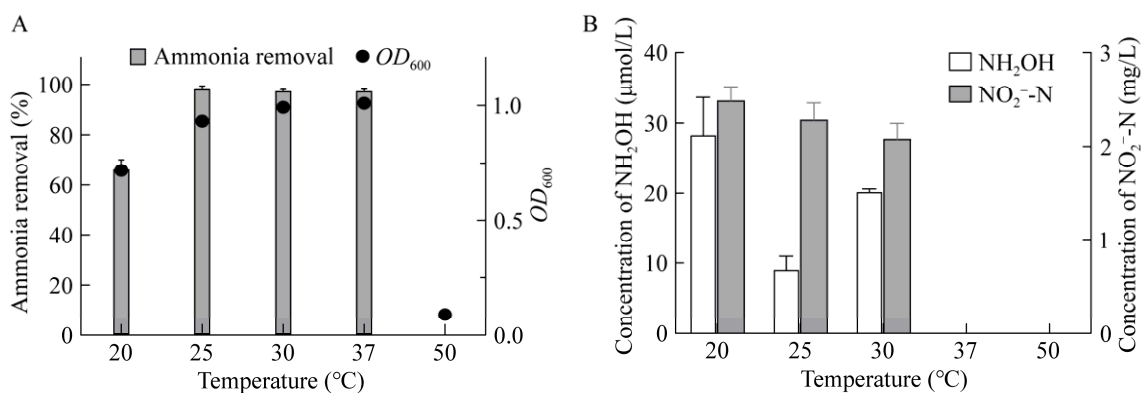


图 8 不同温度条件下菌株 CHO6 的生长情况、氨氮去除率(A)及羟胺、亚硝态氮浓度(B)

Figure 8 Growth, ammonia nitrogen removal rate (A), hydroxylamine concentration and nitrite nitrogen concentration (B) of strain CHO6 under different temperature.

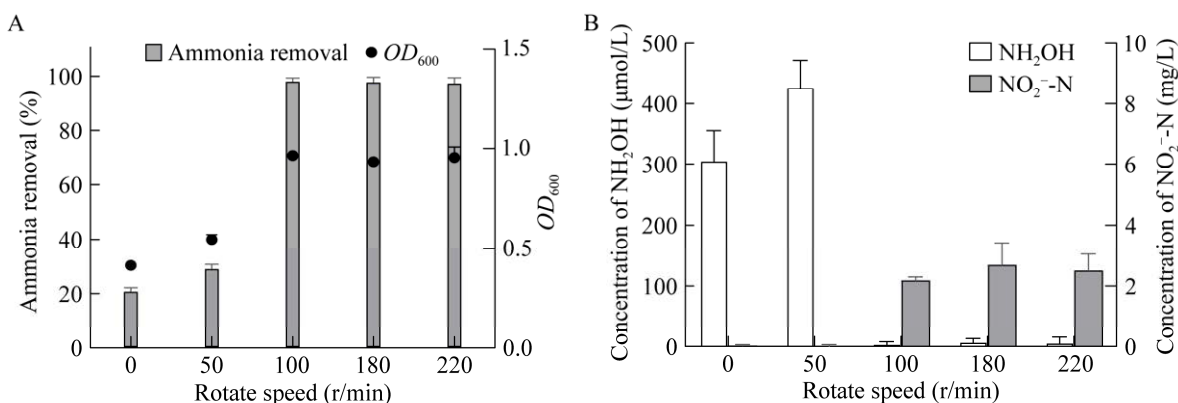


图 9 不同摇床转速条件下菌株 CHO6 的生长情况、氨氮去除率(A)及羟胺、亚硝态氮浓度(B)

Figure 9 Growth, ammonia nitrogen removal rate (A), hydroxylamine concentration and nitrite nitrogen concentration (B) of strain CHO6 under different rotate speed.

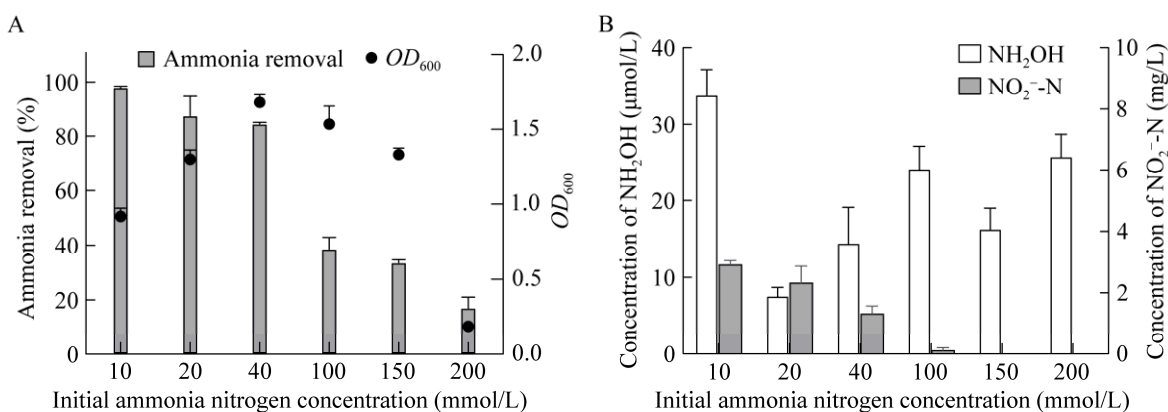


图 10 不同初始氨氮浓度下菌株 CHO6 的生长情况、氨氮去除率(A)及羟胺、亚硝态氮浓度(B)

Figure 10 Growth, ammonia nitrogen removal rate (A), hydroxylamine concentration and nitrite nitrogen concentration (B) of strain CHO6 under different initial ammonia nitrogen concentration.

均去除速率逐渐增加。当初始氨氮浓度分别为 20 mmol/L 和 40 mmol/L 时, 24 h 氨氮的平均去除速率分别为 10.0 mg/(L·h)和 26.0 mg/(L·h), 其去除率分别为 87.5%和 84.5%, 虽然氨氮去除率略有降低, 但是从菌株的生长情况和氨氮去除率可以推测, 如果培养处理时间较为充足, 菌株 CHO6 可能会进一步对氨氮进行去除, 表明菌株 CHO6 在高氨氮的条件下仍具有良好的氨氮去除能力。当起始氨氮浓度为 150 mmol/L 培养 24 h 时 OD_{600} 达到 1.3 氨氮的平均去除速率达到 106.0 mg/(L·h), 表明在高氨氮浓度下菌株的去除氨氮活性依然较高, 此时培养时间的限制是导致氨氮去除率偏低的主要原因。而当起始氨氮浓度达到 200 mmol/L 时, 菌株 CHO6 几乎不生长, 但是仍具备氨氮去除能力。上述结果表明, 在较宽范围的氨氮负荷条件下, 菌株 CHO6 均能生长良好, 具有较强的高氨氮适应能力, 其在一些高浓度氨氮废水(如养殖尾水)的处理修复方面有潜在的应用价值。

3 讨论

随着水产养殖业不断发展, 水产养殖尾水中氮、磷污染程度愈发严重, 从而导致水体富营养化, 严重制约水产养殖业的发展^[42]。微生物是水产养殖尾水中氨氮去除的主力军^[43], 但是针对富营养化水体, 更需要异养化微生物的参与。产碱杆菌属作为一种潜在的异养氨氧化细菌, 广泛存在于各种环境中^[14], 参与自然界的氮素循环、生物降解^[13]等。但是关于其在水产养殖环境中的研究较少, 特别是针对产碱杆菌在海水养殖环境中的分布特征尚不明确。在本研究中, 在广东沿海的 4 个典型海洋渔业养殖基地的水体和底泥样品中, 均检测到了产碱杆菌的存在, 预示其在水产养殖环境中可能具有比较重要的生态功能, 尤其是其氨氮去除潜能。

在本研究中, 通过连续富集培养, 在水产养殖鱼塘底泥样品中分离得到一株能够高效去除氨氮的产碱杆菌 CHO6。通过对菌株 CHO6 的全基因组测序结果进行分析, 发现菌株 CHO6 基因组编码 *nirk* (亚硝酸盐还原酶)、*norBC* (一氧化氮还原酶)和 *nosZ* (一氧化二氮还原酶)等, 代表了亚硝酸盐的完整反硝化途径。另外, 在 CHO6 基因组中还存在新近发现的 *dnfTIRT2ABCD* 基因簇, 该基因簇编码的酶可以参与直接氨氧化途径, 能够将氨氮氧化为羟胺, 随后直接转化为氮气^[18], 直接氨氧化途径作为一种高效的氨氮去除新途径具有广阔的应用前景^[44], 但目前报道较少且均存在于产碱杆菌中, 如 *Alcaligenes ammonioxydans* HO-1^[18]、*Alcaligenes faecalis* JQ135^[19]。菌株 CHO6 的全基因组分析结果表明菌株 CHO6 同时具有亚硝酸盐还原能力和直接氨氧化能力, 然而在实验中发现菌株 CHO6 在 48 h 内不断积累亚硝酸盐, 表明其可能具有较高的氨转化能力但亚硝酸盐还原能力可能较弱, 因此后续在水产养殖尾水实际处理中, 可以考虑将菌株 CHO6 与亚硝酸盐还原能力较强的微生物组成复合菌剂。

通过对菌株 CHO6 氨氧化性能影响因素的研究, 发现菌株 CHO6 可以代谢多种有机物, 最适碳源为丁二酸钠, 但是不能利用糖类和醇类物质进行生长。Cao 等^[17]研究发现水生产碱杆菌(*A. aquatilis*) AS1 可以在以琥珀酸盐、乙酸盐或柠檬酸盐为碳源的培养基中生长, 而葡萄糖、蔗糖则不能支持菌株生长, 同时也没有氨氮的去除。Xia 等^[45]和 Chen 等^[46]也分别在不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) ND7 和施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) SDU10 中发现了相同的现象。菌株对碳源利用的偏好可能是因为作为唯一碳源的丁二酸钠、乙酸钠和柠檬酸钠是三羧酸循环过程中的中间产物, 更易被菌株利用,

直接用于生物合成。而且菌株 CHO6 在弱酸性、中性或碱性条件下均具有较好的氨氮去除能力,同时在高氨氮和高 C/N 比的条件下仍能保持良好的生长情况和较高的氨氮去除率。陈均利等^[47]通过响应面分析预测,认为分离得到的粪产碱菌(*A. faecalis*) WT14 在 C/N 10.8 时脱氮效率最佳;陈青云等^[48]分离得到的 *A. faecalis* Ni3-1 在氨氮浓度为 1 000 mg/L 时,24 h 平均氨氮去除率为 34.5%。相较于菌株 WT14 和菌株 Ni3-1,菌株 CHO6 在 C/N 为 10、15 时,氨氧化效果最好;在初始氨氮浓度达到 150 mmol/L 时,培养 24 h,其 OD_{600} 达到 1.3,氨氮的平均去除率达到 38.7%。一系列结果表明菌株 CHO6 具有较为广泛的应用范围,对高氨氮及高 C/N 均具有良好的适应能力,能适应养殖废水特殊复杂的生理环境,在水产养殖尾水的处理修复中具有良好的应用前景。

综上所述,产碱杆菌作为潜在的异养氨氧化微生物,广泛分布于广东省水产养殖环境中,在水产养殖环境中具有重要的生态功能及氨氮去除的潜能。同时从养殖鱼塘底泥中分离得到的产碱杆菌 CHO6,具有较强的异养氨氧化功能,环境适应性强,可以适应较为宽泛的碳源、C/N、pH、温度、溶解氧和初始氨氮浓度范围,是水产养殖尾水中氨氮去除的重要菌株资源。

4 结论

本研究发现产碱杆菌在广东省水产养殖环境中广泛存在,在水产养殖尾水中氨氮去除方面可能具有一定的应用潜能。从广州市养殖鱼塘底泥中分离得到一株具有优异氨氧化功能的产碱杆菌 CHO6,可在 48 h 内将 10 mmol/L 的氨氮完全去除,其最适碳源为丁二酸钠,在 C/N 为 10、pH 7.0、培养温度为 30 °C 的条件下,其氨氧化能力最佳,在培养基中对氨氮去除率最高达 100%,可以耐受高氨氮和高碳氮比,对环

境的适应力强。菌株 CHO6 优异的异养氨氧化能力及对复杂环境较强的适应性,使其在处理水产养殖尾水这一高氨氮和高有机物废水方面具有较大的应用潜力,本研究为产碱杆菌在水产养殖环境中氨氮处理的应用提供了菌种资源支持和技术支撑,对水产养殖业的健康持续发展具有重要意义。

REFERENCES

- [1] ZHANG M, TASHIRO Y, ASAKURA Y, ISHIDA N, WATANABE K, YUE SY, AKIKO MN, SAKAI KJ. Lab-scale autothermal thermophilic aerobic digestion can maintain and remove nitrogen by controlling shear stress and oxygen supply system[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, 132(3): 293-301.
- [2] 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.
- [3] HOANG PH, NGUYEN TM, LE NCT, PHAN KS, MAI TTT, HA PT. Characterization of isolated aerobic denitrifying bacteria and their potential use in the treatment of nitrogen-polluted aquaculture water[J]. *Current Microbiology*, 2022, 79(7): 209.
- [4] CRAB R, AVNIMELECH Y, DEFOIRDT T, BOSSIER P, VERSTRAETE W. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production[J]. *Aquaculture*, 2007, 270(1/2/3/4): 1-14.
- [5] REN JL, CHENG XW, MA HJ, MA XN. Characteristics of a novel heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium and its bioaugmentation performance in a membrane bioreactor[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 125908.
- [6] 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.
- [7] POCHANA K, KELLER J, LANT P. Model development for simultaneous nitrification and denitrification[J]. *Water Science and Technology*, 1999, 39(1): 235-243.
- [8] BAKER LA. Design considerations and applications for wetland treatment of high-nitrate waters[J]. *Water*

- Science and Technology, 1998, 38(1): 389-395.
- [9] KENT TR, SUN YW, AN ZH, BOTT CB, WANG ZW. Mechanistic understanding of the NOB suppression by free ammonia inhibition in continuous flow aerobic granulation bioreactors[J]. Environment International, 2019, 131: 105005.
- [10] PAPAN H, von BERG R. A most probable number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil[J]. Plant and Soil, 1998, 199(1): 123-130.
- [11] QIU JG, ZHAO LL, XU SQ, CHEN Q, CHEN L, LIU B, HONG Q, LU ZM, HE J. Identification and characterization of a novel *pic* gene cluster responsible for picolinic acid degradation in *Alcaligenes faecalis* JQ135[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(16): e00077-19.
- [12] 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.
- [13] HUANG YS, AN Q, ZHAO B, LV QH, GUO JS. Potential for aerobic NO₂⁻ reduction and corresponding key enzyme genes involved in *Alcaligenes faecalis* strain NR[J]. Archives of Microbiology, 2018, 200(1): 147-158.
- [14] QIU JG, LIU B, ZHAO LL, ZHANG YT, CHENG D, YAN X, JIANG JD, HONG Q, HE J. A novel degradation mechanism for pyridine derivatives in *Alcaligenes faecalis* JQ135[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(15): e00910-18.
- [15] JOO HS, HIRAI M, SHODA M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(2): 184-191.
- [16] WANG Y, CHEN H, LIU YX, REN RP, LV YK. Effect of temperature, salinity, heavy metals, ammonium concentration, pH and dissolved oxygen on ammonium removal by an aerobic nitrifier[J]. RSC Advances, 2015, 5(97): 79988-79996.
- [17] CAO XH, ZHAO BH, WU YM, HUANG J, WANG HZ, SUN XY, LI SJ. Characterization of *Alcaligenes aquatilis* as a novel member of heterotrophic nitrifier-aerobic denitrifier and its performance in treating piggery wastewater[J]. Bioresource Technology, 2022, 354: 127176.
- [18] WU MR, HOU TT, LIU Y, MIAO LL, AI GM, MA L, ZHU HZ, ZHU YX, GAO XY, HERBOLD CW, WAGNER M, LI DF, LIU ZP, LIU SJ. Novel *Alcaligenes ammonioxydans* sp. nov. from wastewater treatment sludge oxidizes ammonia to N₂ with a previously unknown pathway[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(11): 6965-6980.
- [19] XU SQ, QIAN XX, JIANG YH, QIN YL, ZHANG FY, ZHANG KY, HONG Q, HE J, MIAO LL, LIU ZP, LI DF, LIU SJ, QIU JG. Genetic foundations of direct ammonia oxidation (direct nitrification) to N₂ and MocR-like transcriptional regulator DnfR in *Alcaligenes faecalis* strain JQ135[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(6): e0226121.
- [20] HUANG YD, WANG B, YANG YG, YANG S, DONG MJ, XU MY. Microbial carriers promote and guide pyrene migration in sediments[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 424(Pt A): 127188.
- [21] CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK, FIERER N, PEÑA AG, GOODRICH JK, GORDON JI, HUTTLEY GA, KELLEY ST, KNIGHTS D, KOENIG JE, LEY RE, LOZUPONE CA, McDONALD D, MUEGGE BD, PIRRUNG M, REEDER J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [22] CALLAHAN BJ, McMURDIE PJ, HOLMES SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis[J]. The ISME Journal, 2017, 11(12): 2639-2643.
- [23] CALLAHAN BJ, McMURDIE PJ, ROSEN MJ, HAN AW, JOHNSON AJA, HOLMES SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature Methods, 2016, 13: 581-583.
- [24] BOKULICH NA, CHUNG J, BATTAGLIA T, HENDERSON N, JAY M, LI HL, LIEBER AD, WU F, PEREZ-PEREZ GI, CHEN Y, SCHWEIZER W, ZHENG XH, CONTRERAS M, DOMINGUEZ-BELLO MG, BLASER MJ. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life[J]. Science Translational Medicine, 2016, 8(343): 343ra82.
- [25] KIM OS, CHO YJ, LEE K, YOON SH, KIM M, NA H, PARK SC, JEON YS, LEE JH, YI HN, WON S, CHUN J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 3): 716-721.
- [26] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and

- Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [27] 环境保护部. 水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法: HJ 535—2009[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2009. Ministry of Ecology and Environment of China. Water quality, determination of ammonia nitrogen, Nessler's reagent spectrophotometry: HJ 535—2009[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2009 (in Chinese).
- [28] 国家环境保护局. 水质 亚硝酸盐氮的测定 分光光度法: GB/T 7493—1987[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987. Ministry of Ecology and Environment of China. Water quality: determination of nitrogen (nitrite): spectrophotometric method: GB/T 7493—1987[S]. Beijing: China Standards Press, 1987 (in Chinese).
- [29] FREAR DS, BURRELL RC. Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants[J]. Analytical Chemistry, 1955, 27(10): 1664-1665.
- [30] 王梓宇, 王佳丽, 唐德富, 孙旭春, 韩向敏, 孙丽坤. 一株水生碱杆菌(*Alcaligenes aquatilis*)的分离鉴定及其氨氧化效果[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2002-2016. WANG ZY, WANG JL, TANG DF, SUN XC, HAN XM, SUN LK. Isolation, identification, and deamination characterization of a strain of *Alcaligenes aquatilis*[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2002-2016 (in Chinese).
- [31] 连红民, 邱忠平, 何昆明, 周文秀. 一株好氧反硝化-异养硝化菌的筛选及脱氮特性研究[J]. 生物技术通报, 2015, 31(6): 138-143. LIAN HM, QIU ZP, HE KM, ZHOU WX. Screening and denitrification characteristics of an aerobic denitrifying-heterotrophic nitrification bacterium[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(6): 138-143 (in Chinese).
- [32] THANGAM EB, RAJKUMAR GS. Studies on the production of extracellular protease by *Alcaligenes faecalis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16(7): 663-666.
- [33] ZHANG Q, ZHU YN, YUAN CB, ZHANG C, CUI ML, ZHAO TT. Nitrogen removal and mechanism of an extremely high-ammonia tolerant heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Alcaligenes faecalis* TF-1[J]. Bioresource Technology, 2022, 361: 127643.
- [34] WU ZS, XU F, YANG C, SU XX, GUO FC, XU QY, PENG GL, HE Q, CHEN Y. Highly efficient nitrate removal in a heterotrophic denitrification system amended with redox-active biochar: a molecular and electrochemical mechanism[J]. Bioresource Technology, 2019, 275: 297-306.
- [35] YANG M, LU DW, QIN BD, LIU QL, ZHAO YM, LIU HL, MA J. Highly efficient nitrogen removal of a coldness-resistant and low nutrient needed bacterium, *Janthinobacterium* sp. M-11[J]. Bioresource Technology, 2018, 256: 366-373.
- [36] 杨秀玲, 杨宗政, 庞金钊, 王宗华. 具有硝化作用的异养菌脱除氨氮的性能研究[J]. 天津科技大学学报, 2005, 20(1): 24-26, 48. YANG XL, YANG ZZ, PANG JZ, WANG ZH. Study on removal of NH₃-N using nitrification and heterotrophic bacteria[J]. Journal of Tianjin University of Science and Technology, 2005, 20(1): 24-26, 48 (in Chinese).
- [37] 邵勇, 邓敬轩, 任洪艳, 黄振兴, 阮文权. 一株 *Agrobacterium* sp. 异养硝化菌的分离鉴定及其氨氧化性能[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(2): 325-331. TAI Y, DENG JX, REN HY, HUANG ZX, RUAN WQ. Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying strain of *Agrobacterium* sp. and its ammonification performance[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(2): 325-331 (in Chinese).
- [38] QIN W, LI WG, GONG XJ, HUANG XF, FAN WB, ZHANG DY, YAO P, WANG XJ, SONG Y. Seasonal-related effects on ammonium removal in activated carbon filter biologically enhanced by heterotrophic nitrifying bacteria for drinking water treatment[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(24): 19569-19582.
- [39] SUN YL, LI A, ZHANG XN, MA F. Regulation of dissolved oxygen from accumulated nitrite during the heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of *Pseudomonas stutzeri* T13[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(7): 3243-3248.
- [40] JOO HS, HIRAI M, SHODA M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. Water Research, 2006, 40(16): 3029-3036.
- [41] 张彬, 邓佳, 陈杨武, 孟丹, 谭周亮. 游离氨对硝化过程的影响与定量表征[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(5): 1260-1267. ZHANG B, DENG J, CHEN YW, MENG D, TAN ZL. Effect and quantitative characterization of free ammonia on nitrification process[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(5): 1260-1267 (in Chinese).
- [42] 朱金浩, 张戈, 杨可, 朱银浩, 郑恩楠, 孟凡香. 养殖废水中氮元素处理技术的研究进展[J]. 应用化工, 2022, 51(5): 1480-1484.

- ZHU JH, ZHANG G, YANG K, ZHU YH, ZHENG EN, MENG FX. Treatment technologies for elemental nitrogen in farm wastewater a review[J]. Applied Chemical Industry, 2022, 51(5): 1480-1484 (in Chinese).
- [43] XIA ZG, NG HY, XU D, BAE S. Lumen air pressure regulated multifunctional microbiotas in membrane-aerated biofilm reactors for simultaneous nitrogen removal and antibiotic elimination from aquaculture wastewater[J]. Water Research, 2024, 251: 121102.
- [44] PAN Y, LIU DF. Tapping the potential of wastewater treatment with direct ammonia oxidation (dirammox)[J]. Environmental Science & Technology, 2023, 57(18): 7106-7108.
- [45] 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.
- [46] CHEN LF, LIN JQ, PAN D, REN YL, ZHANG J, ZHOU B, CHEN LX, LIN JQ. Ammonium removal by a newly isolated heterotrophic nitrification: aerobic denitrification bacteria *Pseudomonas stutzeri* SDU10 and its potential in treatment of piggery wastewater[J]. Current Microbiology, 2020, 77(10): 2792-2801.
- [47] 陈均利, 张苗苗, 张树楠, 肖润林, 吴金水, 刘锋. *Alcaligenes faecalis* WT14 的异养硝化-好氧反硝化特性及对高氨废水处理潜力[J]. 环境工程, 2021, 39(2): 27-32, 40.
- CHEN JL, ZHANG MM, ZHANG SN, XIAO RL, WU JS, LIU F. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification characteristics of *alcaligenes faecalis* wt14 and its potential application in ammonia-rich wastewater[J]. Environmental Engineering, 2021, 39(2): 27-32, 40 (in Chinese).
- [48] 陈青云, 江林峰, 陈建奇, 赵稳, 毛涛, 李利, 余知和. 高效异养硝化细菌 *Alcaligenes faecalis* Ni3-1 的分离及其脱氨特性研究[J]. 环境工程, 2015, 33(5): 48-53.
- CHEN QY, JIANG LF, CHEN JQ, ZHAO W, MAO T, LI L, YU ZH. Isolation and NH_4^+ -N removal characteristics of a high-efficient heterotrophic nitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* Ni3-1[J]. Environmental Engineering, 2015, 33(5): 48-53 (in Chinese).