



农业资源与环境学报

中文核心期刊
中国科技核心期刊

JOURNAL OF AGRICULTURAL RESOURCES AND ENVIRONMENT

欢迎投稿 <http://www.aed.org.cn>

一株异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及其对养殖废水中氮的去除特性

陈猛, 李安章, 张明霞, 朱红惠

引用本文:

陈猛, 李安章, 张明霞, 等. 一株异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及其对养殖废水中氮的去除特性[J]. 农业资源与环境学报, 2020, 37(2): 270-279.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13254/j.jare.2019.0059>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

利用上流式双层厌氧滤器启动厌氧氨氧化研究

姚利, 付龙云, 王艳芹, 郭洪海, 袁长波, 张柏松, 罗加法

农业资源与环境学报. 2018, 35(2): 133-138 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2017.0221>

黄鸢尾对牛场养殖废水肥用过程中的耐受性研究

丁飞飞, 张克强, 渠清博, 赵芙, 杨鹏, 沈晨

农业资源与环境学报. 2019, 36(2): 214-220 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2018.0224>

藻菌共培养体系优势菌株筛选及沼液处理

王书亚, 李志, 高仪璠, 孙利芹, 李丹, 孙中亮, 姜玫如

农业资源与环境学报. 2019, 36(1): 121-126 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2018.0068>

发酵床垫料中高效纤维素降解菌的分离与筛选

王震, 许丽娟, 刘标, 杜东霞, 尹红梅, 贺月林

农业资源与环境学报. 2015(4): 383-387 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2015.0007>

多级处理模式下粪污中氮、磷削减规律及其农田可消纳量——以苏南水网地区规模猪场为例

靳红梅, 吴华山, 郭瑞华, 黄红英

农业资源与环境学报. 2018, 35(3): 237-244 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2017.0312>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

陈 猛, 李安章, 张明霞, 等. 一株异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及其对养殖废水中氮的去除特性[J]. 农业资源与环境学报, 2020, 37(2): 270–279.

CHEN Meng, LI An-zhang, ZHANG Ming-xia, et al. Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying strain and its removal characteristics of nitrogen in breeding wastewater[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2020, 37(2): 270–279.

一株异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及其对养殖废水中氮的去除特性

陈 猛^{1,2}, 李安章^{1,3}, 张明霞¹, 朱红惠^{1*}

(1. 广东省微生物研究所/省部共建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/广东省微生物菌种保藏中心, 广州 510070; 2. 广东博沃特生物科技有限公司, 广东 肇庆 526040; 3. 广州王道生物科技有限公司, 广州 510663)

摘 要: 为了获得养殖废水中高效脱氮的菌株, 采用富集培养分离的方法, 从猪粪水自然曝气池污水中筛得一株具有较好脱氮功能的异养硝化-好氧反硝化菌株 ZF2-3, 经形态学和生理生化鉴定、16S rRNA 基因序列分析、系统发育树构建和特征性扩增片段分析, 鉴定其为 *Bacillus subtilis*。在分别以硫酸铵和硝酸钠为唯一氮源的人工废水培养基中, 菌株 ZF2-3 对氨氮和硝态氮的去除率分别为 85.7% 和 87.2%, 且不积累中间产物。优化条件后发现, 菌株 ZF2-3 脱除氨氮最适碳源是蔗糖, 最适碳氮比为 15。将菌株 ZF2-3 应用于养殖废水脱氮, 发现无论在氨氮浓度相对较低的水产养殖废水还是氨氮浓度较高的猪粪废水中, 菌株 ZF2-3 均有较好的处理效果, 使水体氨氮、总氮浓度分别降低 37.7%、67.4% 和 34.6%、30.4%, 且无中间产物累积。研究表明, 菌株 ZF2-3 对养殖废水脱氮具有良好的应用潜力。

关键词: 芽孢杆菌; 异养硝化; 好氧反硝化; 养殖废水; 脱氮

中图分类号: X703

文献标志码: A

文章编号: 2095-6819(2020)02-0270-10

doi: 10.13254/j.jare.2019.0059

Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying strain and its removal characteristics of nitrogen in breeding wastewater

CHEN Meng^{1,2}, LI An-zhang^{1,3}, ZHANG Ming-xia¹, ZHU Hong-hui^{1*}

(1. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Microbial Culture Collection Center, Guangzhou 510070, China; 2. Guangdong Bowote Biological Technology Co., Ltd., Zhaoqing 526040, China; 3. Guangzhou Wangdao Biological Technology Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

Abstract: In order to obtain a highly efficient nitrogen-removing strain from sewage, an enrichment culture separation method was employed. A heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterial strain ZF2-3 with high nitrogen removal efficiency was isolated from a sewage sample collected from a naturally aerated pond of liquid swine manure. Strain ZF2-3 was identified as *Bacillus subtilis* based on morphology, physiological and biochemical characteristics, 16S rRNA gene sequence identity, phylogenetic analysis, and specific amplification fragment identification. In artificial wastewater media containing ammonium sulfate or sodium nitrate as sole nitrogen source, the re-

收稿日期: 2019-01-28 录用日期: 2019-03-11

作者简介: 陈 猛 (1991—), 男, 安徽六安人, 硕士, 研究实习员, 从事养殖废水生物治理与修复研究。E-mail: chenm0564335@163.com

*通信作者: 朱红惠 E-mail: zhuhh@gdim.cn

基金项目: 肇庆市科技计划项目 (2018N003); 广东省科学院项目 (2019GDASYL-0401002); 广东省自然科学基金项目 (2018A030313476); 广州市珠江科技新星专项 (201806010065)

Project supported: The Science and Technology Plan Project of Zhaoqing City (2018N003); GDAS' Special Project of Science and Technology Development (2019GDASYL-0401002); The Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (2018A030313476); Pearl River S&T Nova Program of Guangzhou (201806010065)

removal rates of ammonia nitrogen and nitrate nitrogen by strain ZF2-3 were 85.7% and 87.2%, respectively, and no intermediates were accumulated. According to the results of conditional optimization, the optimum carbon source for the removal of ammonia nitrogen was sucrose. In aquaculture wastewater with relatively low concentration of ammonia nitrogen, the optimum carbon-nitrogen ratio was 15. Subsequently, strain ZF2-3 was used to denitrify breeding swine manure sewage with high ammonia nitrogen content, and exhibited a satisfactory treatment effect, significantly reducing the concentration of ammonia nitrogen and total nitrogen in the sewage. The ammonia nitrogen and total nitrogen concentrations were reduced by 37.7%, 67.4%, 34.6%, and 30.4%, respectively. Moreover, no intermediate accumulation was detected during the treatment process. The results indicate that strain ZF2-3 has excellent application potential in denitrification of breeding wastewater.

Keywords: *Bacillus subtilis*; heterotrophic nitrification; aerobic denitrification; cultivation sewage; nitrogen removal

目前,我国养殖业正向规模化、集约化方向迅速发展,在促进农业经济发展、提高人民生活水平的同时,也带来很多环境问题和生态危机^[1]。养殖废水中含有大量氮化物,其通过地表径流以及土壤渗滤进入地表水体和地下水层,引起水体富营养化、水生生物死亡和生态系统失衡^[2],不仅制约了我国养殖业的健康可持续发展,还造成严重的食品安全和环境安全问题^[3]。因此,养殖废水脱氮已成为养殖业亟待解决的关键问题之一。

微生物脱氮因其经济、高效和无二次污染等优点被广泛应用于养殖废水处理^[4-5]。异养硝化-好氧反硝化菌既能对有机或无机氮化物进行异养硝化,又具有好氧反硝化能力,可将氨氮直接转化为氮的气态产物^[6]。因此,与传统两个相对独立的好氧硝化、厌氧反硝化过程生物脱氮相比,近年来异养硝化-好氧反硝化菌受到越来越多的关注。

目前,国内外学者已分离到的异养硝化-好氧反硝化菌包括不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)^[7]、粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)^[8]、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)^[9]、无色杆菌(*Achromobacter* sp.)^[10]、卓贝尔氏菌(*Zobellia* sp.)^[11]、黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)^[12]、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)^[13]等。从整体来看,当前国内外对异养硝化-好氧反硝化菌的研究尚处于实验室阶段,包括资源挖掘、脱氮特性研究、脱氮机理研究及无菌条件下模拟污水的脱氮效果评估等,而养殖水体的实际应用研究较少^[14-15]。钱春园等^[16]研究了一株异养硝化菌株在甲鱼养殖废水处理中的应用,虽有较好的脱氮效果,但有少量亚硝态氮和硝态氮的积累。刘树彬等^[17]研究了枯草芽孢杆菌 HAINUP40 对模拟污水和养殖污水的净化效果,结果显示接种菌剂对两种水样化学需氧量和氮的脱除都有较好的效果,但在养殖污水处理中氨氮脱除效果不佳。此外,对于含高氨氮、高悬浮物的畜禽养殖废水,目前主要采用培育活

性污泥的方式进行脱氮脱磷净化水质,直接应用异养硝化-好氧反硝化菌开展相关水体脱氮研究的报道还很少^[18-19]。上述结果表明,异养硝化-好氧反硝化菌对实际养殖污水的处理应用研究还很欠缺。因此,继续加强高效异养硝化-好氧反硝化脱氮菌的分离、筛选和鉴定,并重点研究其在实际养殖废水处理中的脱氮特性,对于促进养殖业可持续发展、保障我国食品安全和环境安全具有重要意义。

本研究从自然曝气猪粪水中分离得到一株具有高效脱氮能力的异养硝化-好氧反硝化菌株 ZF2-3,对其进行分子鉴定及生理生化分析,研究了菌株脱氮特性,并将该菌株应用于水产养殖废水和畜禽养殖废水脱氮试验,以期为养殖废水脱氮处理提供脱氮性能优越、环境适应性强的功能菌株。

1 材料与方法

1.1 样品和培养基

1.1.1 样品来源

样品为水泡粪固液分离并初步曝气后的粪水;采集自广东省汕尾市金瑞丰生态农业有限公司养猪场水泡粪粪水一级自然曝气池塘。经检测,样品氨氮、硝态氮、亚硝态氮和总氮浓度分别为 481.83、15.37、0 mg·L⁻¹ 和 578.55 mg·L⁻¹。

1.1.2 培养基

(1) 富集培养基: NH₄Cl 0.4 g, NaNO₂ 0.25 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, Na₂CO₃ 0.4 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 121 °C 高压湿热灭菌 20 min。

(2) 氨氮人工废水培养基: 丁二酸钠 2.5 g, 二水合柠檬酸钠 2.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.66 g, K₂HPO₄ 1 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, pH 7.4, 蒸馏水定容至 1000 mL, 121 °C 高压湿热灭菌 20 min。添加无菌过滤后的复合碳源 1%(V/V)、复合维生素 0.2%(V/V)、复合微量元素 0.2%(V/V)。复合碳源液: 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 g, 无水乙醇 7 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, 调至 pH 7.4, 0.22 μm 滤膜过滤除菌。复合维生素液: 生物素/Vh 10 mg, 叶酸/Vb9 100 mg, 吡哆醇/Vb6 100 mg, 硫胺素/Vb1 200 mg, 烟酸 200 mg, 泛酸钙 100 mg, Vb12 2 mg, 核黄素/Vb2 20 mg, 硫辛酸 20 mg, EDTA-Na 400 mg, 调 pH 至 7.5, 0.22 μm 滤膜过滤除菌。复合微量元素混合液: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, H_3BO_3 1.24 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, KI 0.2 g, CaCl_2 5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 g, EDTA-Na 10 g, 溶于 1000 mL 水, 调 pH 至 7.4, 0.22 μm 滤膜过滤; 配制对应的固体培养基时, 添加琼脂至 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(3) 硝态氮人工废水培养基: 用 NaNO_3 代替氨氮培养基中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 其他成分相同, 硝态氮浓度 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(4) 营养肉汤琼脂(NA培养基): 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, 氯化钠 5 g, 溶于 1000 mL 水, 调 pH 至 7.3, 添加 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂, 121°C 灭菌 20 min。

1.2 仪器与测定方法

1.2.1 实验仪器

高压蒸汽灭菌锅 HVE-50(Hirayama, 日本), 洁净工作台 SW-CJ-2FD(苏净安泰, 苏州), 超纯水机 RM-220(先河, 湖州), 梯度 PCR 仪 GSX1(Eppendorf, 德国), 电泳仪(六一, 北京), PHS-3C 型 pH 计(雷磁, 上海), 小型高速冷冻离心机 5424(Eppendorf, 德国), 超低温冰箱 MDF-682(Panasonic, 日本), 生化培养箱 LRH-250(浦东荣丰, 上海), 紫外/可见分光光度计 Ultrospec 6300 pro(GE Healthcare, 英国), 凝胶成像系统(BIO-RAD, 美国), 光学显微镜 DM6(Leica, 德国)。

1.2.2 测定方法

氨氮浓度测定采用纳氏试剂分光光度法(HJ 535—2009); 亚硝态氮浓度测定采用 4-氨基苯磺酰胺分光光度法(GB 7493—1987); 硝态氮浓度测定采用紫外分光光度法(HJ/T 346—2007); 总氮浓度测定采用碱性过硫酸钾消解-紫外分光光度法(HJ 636—2012)。

1.3 富集培养及菌株分离

取 10 mL 粪水样品, 置于 250 mL 锥形瓶中, 加入 90 mL 无菌富集培养基, 于 30°C 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中富集培养 24 h; 重复富集一次。将富集液进行梯度稀释(10^{-4} ~ 10^{-7})涂布于氨氮固体培养基上, 30°C 培养箱中培养至出现明显的单菌落。挑取单菌落, 经多次划

线纯化后, 接入 NA 液体培养基中, 30°C 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养至对数生长期, 转移至冻存管中, 加甘油至终浓度 20%(V/V), -80°C 保存备用。

1.4 菌种鉴定

(1) 形态学鉴定: 将分离获得的菌株涂布于 NA 平板上, 30°C 培养 24 h 后, 观察其菌落特征; 挑取单菌落, 对菌株进行革兰氏染色, 显微镜下观察其细胞形态。

(2) 生理生化指标鉴定: 菌株的生理生化特征检测方法参照《伯杰细菌鉴定手册》^[20]和《常见细菌系统鉴定手册》^[21]进行。用于生理生化特征检测的指标主要包括 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化发酵、吲哚产生、Voges-Proskauer(V-P) 试验、淀粉水解、蛋白酶、明胶液化、色氨酸脱氨酶、脲酶等。

(3) 16S rRNA 基因分子鉴定: 采用 CTAB 法^[22]提取待鉴定菌株的基因组 DNA, 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-TACGACTTAACCCCAATCGC-3') 进行 PCR 扩增, 扩增体系及程序参见文献[23]。扩增产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序。将测序结果提交 GenBank 和 EzBioCloud 进行比对分析, 并选取同属内近缘种的 16S rRNA 基因序列, 以同科菌株 *Aeribacillus* sp. N.8(LT594972) 的 16S rRNA 基因为外参, 采用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。

(4) 初步比对结果为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 但由于 *B. subtilis* 与解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) 在菌落形态、生理生化指标、16S rRNA 基因序列等方面几乎一致, 无法有效区分, 因此以 *B. subtilis* 特异性引物和 *B. amyloliquefaciens* 特异性引物分别进行 PCR 扩增并鉴定。提取所得菌株和阳性对照菌株(*B. amyloliquefaciens* GDMCC 1.19, *B. subtilis* ATCC 6633) 的基因组 DNA, 选择表 1 中的物种特异性引物, 进行 PCR 扩增, 并将产物进行电泳、观察条带。

1.5 菌株 ZF2-3 的脱氮特性

1.5.1 菌株 ZF2-3 对氨氮和硝态氮的脱除效果验证

接种菌株 ZF2-3 至氨氮和硝态氮液体培养基中(氨氮浓度为 $140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硝态氮浓度为 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 30°C 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温摇床培养, 根据菌株 ZF2-3 在这两种培养基中生长速率差异, 在氨氮培养基中分别于培养 0、8、12、24、48 h 后取样, 在硝态氮培养基中分别于培养 0、12、24、36、48、60 h 后取样。一部分样品用于检测 OD_{600} 值, 另一部分培养液离心取上清, 定量检测上清液中氨氮、硝态氮和亚硝态氮浓度。

菌株 ZF2-3 的 OD_{600} 值与细菌浓度之间的关系确

表 1 枯草芽孢杆菌与解淀粉芽孢杆菌特异性扩增引物及目的片段长度

Table 1 Specific amplification primers and target fragment length of <i>B. subtilis</i> and <i>B. amyloliquefaciens</i>			
目标菌株 The target strains	引物 Primers	序列 Sequences	扩增片段长度 Amplified fragment length/bp
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	Bsu-man-1F ^[24]	正向 5'-CAGGCTCACACTTTGTCTTG-3'	1287
	Bsu-man-1R ^[24]	反向 5'-TGAACACAGTCCTGGGTTAG-3'	
解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	L100 ^[25]	正向 5'-AAATCTGCCCGTATCGTCG-3'	736
	R836 ^[25]	反向 5'-GCGTCACGGCGRATCTCAA-3'	

定:稀释调节 OD 值为 1 的菌液为 7 个稀释度,检测 OD 值,范围为 0.4~1.0,用标准稀释涂布平板法对每个稀释梯度的菌液计数。建立 OD₆₀₀ 值与细菌浓度之间的关系曲线,得到 OD 值与细菌浓度之间关系式为 $y=65.95x-7.65$ (y 为活菌数, 10^7 mL $\cdot$ cfu $^{-1}$; x 为 OD 值; $R^2=0.9914$)。

1.5.2 不同碳源对菌株 ZF2-3 脱氮性能的影响

分别以葡萄糖、蔗糖、乙酸钠、甘露醇、柠檬酸钠、丁二酸钠为唯一碳源配制氨氮液体培养基,氨氮浓度 140 mg $\cdot$ L $^{-1}$,计算不同碳源的添加量使得碳氮比固定为 10。115 ℃ 灭菌 15 min 后,将菌株 ZF2-3 的菌悬液分别按 1% 的接种量接入培养基中,每种培养基 3 个重复,30 ℃、180 r $\cdot$ min $^{-1}$ 恒温摇床培养 48 h 后,测定氨氮的残留浓度,并换算成氨氮脱除率。

1.5.3 不同碳氮比对菌株 ZF2-3 脱氮性能的影响

以葡萄糖为唯一碳源配制氨氮液体培养基,氨氮浓度 140 mg $\cdot$ L $^{-1}$,加入适量的葡萄糖调节碳氮比为 2.5、5、10、15、20、25、30。115 ℃ 灭菌 15 min 后,将菌株 ZF2-3 的菌悬液按 1% 的接种量接入培养基中,每种培养基 3 个重复,30 ℃、180 r $\cdot$ min $^{-1}$ 恒温摇床培养 48 h 后,测定氨氮的残留浓度,并换算成氨氮脱除率。

1.6 菌株 ZF2-3 在养殖废水处理中的应用

1.6.1 菌株 ZF2-3 对水产养殖废水的净化作用

供试水样采集自广东省广州市南沙区万顷沙镇水产养殖废水塘。经检测,废水中氨氮质量浓度为 35.4 mg $\cdot$ L $^{-1}$,硝态氮质量浓度 0.75 mg $\cdot$ L $^{-1}$,亚硝态氮未检出。

将水样用葡萄糖调节碳氮比为 10,不灭菌。按 1% 接种量接入菌株 ZF2-3 悬液,对照接入等体积无菌水。每个处理 3 个重复。30 ℃、180 r $\cdot$ min $^{-1}$,培养 48 h 后,检测水体氨氮、亚硝态氮、硝态氮和总氮浓度。

1.6.2 菌株 ZF2-3 对高氨氮粪水的净化作用

供试样品为自然曝气的水泡粪粪水;采集自汕尾市金瑞丰生态农业有限公司养猪场水泡粪粪水一级自然曝气池塘。经检测,粪水样品中氨氮质量浓度为

475 mg $\cdot$ L $^{-1}$,硝态氮质量浓度 4.93 mg $\cdot$ L $^{-1}$,总氮质量浓度 565 mg $\cdot$ L $^{-1}$,亚硝态氮未检出。

将粪水样品用葡萄糖调节碳氮比为 10,在 115 ℃ 灭菌 15 min。按 1% 接种量接入菌株 ZF2-3 悬液,对照接入等体积无菌水。每个处理 3 个重复,30 ℃、180 r $\cdot$ min $^{-1}$ 培养 48 h 后检测氨氮和总氮的浓度。

2 结果与讨论

2.1 菌株分离鉴定

2.1.1 形态学观察

本研究以氨氮为唯一氮源对粪水中的微生物进行富集和分离筛选,得到一株疑似脱氮菌 ZF2-3。在 NA 平板上,菌株 ZF2-3 菌落表现为白色、不透明、表面粗糙、边缘不规则,革兰氏染色结果为阳性,有鞭毛(图 1 和图 2)。

2.1.2 生理生化检测

菌株 ZF2-3 的生理生化指标见表 2。结果表明,该菌株的 β -半乳糖苷酶、精氨酸水解、赖氨酸脱羧、柠檬酸钠利用、脲酶、V-P 反应、蛋白酶、纤维素酶、淀粉水解、明胶液化、甘露醇发酵为阳性;鸟氨酸脱羧、产硫化氢、色氨酸脱氨酶、产吡啶、葡萄糖发酵为阴性。综上,菌株 ZF2-3 生理生化特征与《伯杰细菌鉴

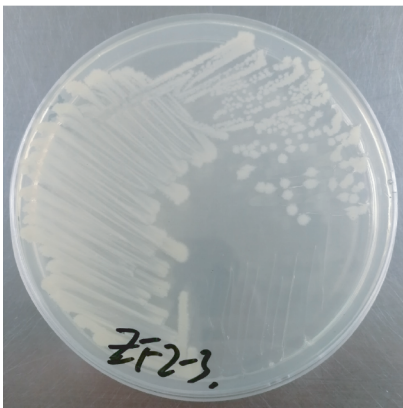


图 1 菌株 ZF2-3 的菌落形态

Figure 1 The colonial morphology of strain ZF2-3

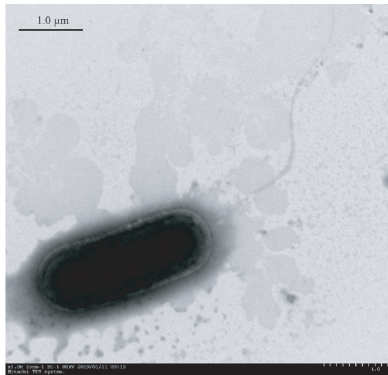


图2 菌株ZF2-3的透射电镜图

Figure 2 Transmission electron microscopy of strain ZF2-3

定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》中描述的枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌基本一致。

2.1.3 16S rRNA 基因鉴定

使用通用引物 27F/1492R 扩增菌株 ZF2-3 的 16S rRNA 基因,测序得片段长度为 1419 bp。对该序列在 NCBI 和 EzBioCloud 数据库中进行分析、比对,选取同属内近缘种的 16S rRNA 基因序列,采用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。如图 3 所示,菌株 ZF2-3 与 *B. subtilis*、*B. amyloliquefaciens*、*B. siamensis* 聚在一个分支上,但与枯草芽孢杆菌亲缘关系更近,初步鉴定为枯草芽孢杆菌。

表2 菌株ZF2-3生理生化指标

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain ZF2-3

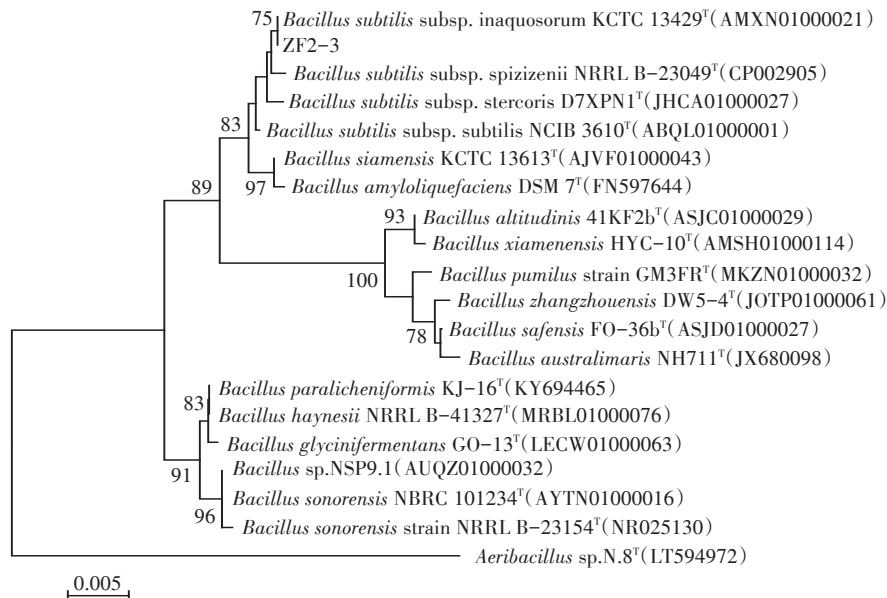
鉴定指标 Identification indexs	结果 Result
β-半乳糖苷酶	+
精氨酸水解	+
赖氨酸脱羧	+
鸟氨酸脱羧	-
柠檬酸钠利用	+
硫化氢试验	-
脲酶	+
色氨酸脱氨酶	-
吲哚产生	-
V-P 试验	+
蛋白酶	+
纤维素酶	+
淀粉水解	+
明胶液化	+
葡萄糖发酵	-
甘露醇发酵	+

注: +代表阳性; -代表阴性。

Note: + means positive; - means negative.

2.1.4 特异性引物扩增结果

B. siamensis 菌落表面皱褶,边缘翘起,中间内陷^[26],与本研究菌株 ZF2-3 菌落形态明显不同,故先



以 Kimura-2 模型计算遗传距离,以邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 建树,bootstrap 自展 1000 次检验进化树拓扑结构置信区间。The genetic distance is calculated by the Kimura-2 model, and the neighboring method (Neighbor-Joining, NJ) is used to establish the tree. The bootstrap self-expanded 1000 times is to test the evolutionary tree topology confidence interval.

图3 基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

排除。

鉴于枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌在16S rRNA基因、系统发育关系和生理生化特征方面非常接近,难以区分,因此本研究使用特异性引物扩增特征性片段来进一步鉴定菌株ZF2-3。图4中CK为无模板PCR结果,Marker自上而下分别为2000、1000、750、500、200 bp和100 bp。图4a为*B. amyloliquefaciens*的特异性引物扩增结果,可以看出,标准菌株*B. amyloliquefaciens* GDMCC 1.19用*B. amyloliquefaciens*特异性引物扩增得到一条带,片段大小与750 bp Marker相近,应为*B. amyloliquefaciens*特征性扩增片段(736 bp)。该阳性对照扩增可以得到目的片段,结合阴性对照组未得到任何条带的结果,说明扩增体系和条件没有问题。以菌株ZF2-3基因组DNA为模板,以*B. amyloliquefaciens*特异性引物PCR扩增后无条带,说明菌株ZF2-3非*B. amyloliquefaciens*。

图4b为*B. subtilis*的特异性引物扩增结果,可以看出,标准菌株*B. subtilis* ATCC 6633用*B. subtilis*特异性引物扩增可以得到片段,片段位于1000 bp Marker条带偏上位置,应为*B. subtilis*特征性扩增片段(1287 bp)。该阳性对照可以扩增得到目的片段,结合阴性对照组未得到任何条带的结果,说明扩增体系和条件没有问题。以菌株ZF2-3基因组DNA为模板,以*B. subtilis*特异性引物PCR扩增得到特征性片段,说明菌株ZF2-3应为*B. subtilis*。本结果与刘勇等^[24]的研究结果一致,其运用类似特异性引物PCR方法有效区分了枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌。

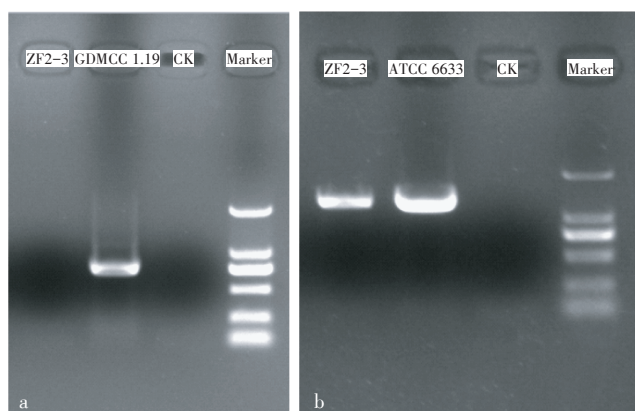


图4 *B. amyloliquefaciens*和*B. subtilis*特异性引物扩增结果

Figure 4 Specific-primer amplification of *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis*

2.2 菌株ZF2-3的脱氮特性研究

2.2.1 菌株ZF2-3对氨氮的脱除效果

虽然菌株ZF2-3是从氨氮为唯一氮源的培养基中分离得到的,但其对氨氮脱除能力和特性还不清楚,需要进一步验证。如图5所示,接种菌株ZF2-3后,随着时间的推移,培养物OD值不断提高,至24 h左右进入稳定期,OD值最高为1.5左右;培养过程中,氨氮浓度不断下降,从开始的 $140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,到24 h后下降至 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,氨氮脱除率达到85.7%。在此脱氮过程中,未检测到亚硝态氮产生,有很少量的硝态氮产生,后又消失。盛建海等^[27]对异养硝化-好氧反硝化菌xt1的异养硝化特性研究中也产生此现象,他们在一个更长的取样时间(84 h)内检测,硝态氮有微弱的产消起伏。这可能是由于异养硝化-好氧反硝化菌在同步硝化反硝化过程中有些中间副产物短时间内未代谢完全。24 h后氨氮浓度趋于稳定,硝态氮、亚硝态氮均未检出。这表明以氨氮为唯一氮源时,菌株ZF2-3可快速生长和脱氮,几乎没有延迟期,与王越等^[28]研究结果类似。此外,本研究的初始氨氮浓度设置较高,达到 $140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而许多研究对初始氨氮浓度设置较低,约为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[28],这可能对高脱氮效率产生了负面影响。

2.2.2 菌株ZF2-3对硝态氮的脱除效果

菌株ZF2-3是从以氨氮为唯一氮源的培养基中分离得到的,对其好氧反硝化能力还不清楚,需要进一步验证。如图6所示,接种菌株ZF2-3后,随着时间的推移,培养物OD值不断提高,至48 h左右进入稳定期,OD值最高为1.3左右;培养过程中,从12 h

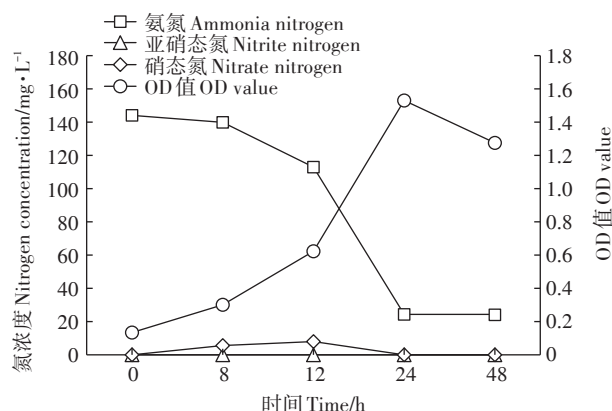


图5 菌株ZF2-3生长趋势与氨氮脱除曲线

Figure 5 Growth trend and ammonia nitrogen removal curve of strain ZF2-3

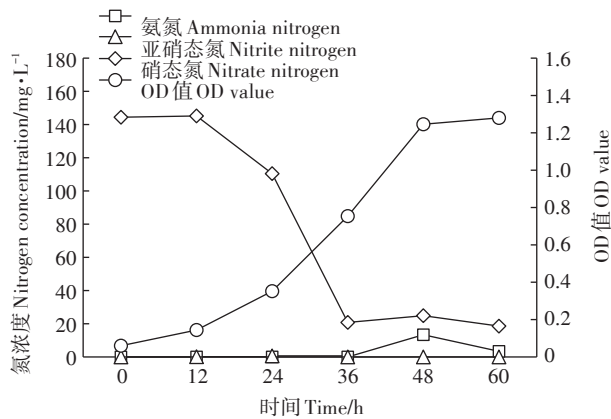


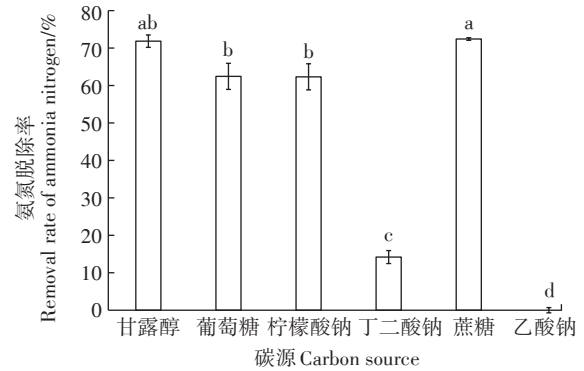
图6 菌株ZF2-3生长趋势与硝态氮脱除曲线

Figure 6 Growth trend and nitrate nitrogen removal curve of strain ZF2-3

开始硝态氮浓度不断下降,从开始的 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,到36 h后下降至 $20.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,硝态氮脱除率达到87.2%。在此反硝化过程中,未检测到亚硝态氮产生,在36 h后有少量的氨氮产生,后又消失,这可能是由于菌株培养到36 h后,培养基中有机氮浓度有一定累积,此时硝态氮已经处于一个较低水平,菌株开始利用有机氮,产生了部分氨氮,而当培养基中氨氮增加到一定浓度时,菌株又开始优先利用氨氮,所以在48 h后氨氮浓度又开始下降。一般来说,不同菌种的生物脱氮可以发生在菌体生长的不同时期。本研究的菌种反硝化过程发生在菌体生长的对数增长前期,且与氨氮唯一氮源培养相比,菌体生长延迟期较长(0~24 h),24~48 h才为对数增长期。本研究菌株ZF2-3的反硝化效率较高,周影茹等^[9]分离到的好氧反硝化菌株RWX31在初始硝态氮浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的模拟废水中,硝态氮脱除效率为75%,且随着初始硝态氮浓度的提高,菌株的反硝化效率不断下降;颜薇芝等^[7]分离得到的一株异养硝化-好氧反硝化不动杆菌在初始硝态氮浓度为 $88.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中,培养36 h后硝态氮质量浓度下降到 $14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,发现产物同时伴有微量亚硝酸盐和氨氮的积累,整个反硝化过程硝酸盐去除率为83.5%。

2.2.3 不同碳源对菌株ZF2-3脱氮性能的影响

研究表明,碳源种类影响着细菌的硝化、反硝化反应速度和脱除率,同时,不同菌株脱氮的最佳碳源也可能不同^[29-30]。图7表明,不同的碳源对菌株ZF2-3的脱氮性能具有重要的影响。以甘露醇、蔗糖、葡萄糖、柠檬酸钠为碳源时,氨氮脱除率分别达到了71.84%、72.42%、62.44%、62.32%;当碳源是丁二酸钠



不同字母表示差异达5%显著水平。下同
Different letters mean significant difference at 5% level. The same below
图7 不同碳源对菌株ZF2-3脱氮性能的影响
Figure 7 Effect of different carbon sources on denitrifying performance of strain ZF2-3

或乙酸钠时,氨氮降低不明显。该结果与张小玲等^[31]研究相类似,其研究结果表明 *Bacillus* sp. H2以葡萄糖为碳源时,脱氮效率最高。据报道,碳源的化学结构和分子量对脱氮效率的影响很大,菌株偏好利用乙酸钠、丁二酸钠等化学结构简单、分子量小的碳源^[32-33]。但本研究结果显示,菌株ZF2-3以甘露醇、蔗糖和葡萄糖为碳源时生长最好、脱氮效率最高,而以分子量较小、化学结构简单的乙酸钠和丁二酸钠为碳源时脱氮率很低,说明不同菌株脱氮时对碳源的偏好性存在差异。

2.2.4 不同碳氮比对菌株ZF2-3脱氮性能的影响

碳源的控制不仅包括碳源种类的选择,还包括碳源的供给量。碳氮比是好氧反硝化反应的主要限制因素^[34]。如图8所示,本研究中不同的碳氮比对菌株ZF2-3的脱氮性能影响非常显著。随着碳氮比增大,菌株ZF2-3对氨氮的脱除效率呈现出先增加后减小的

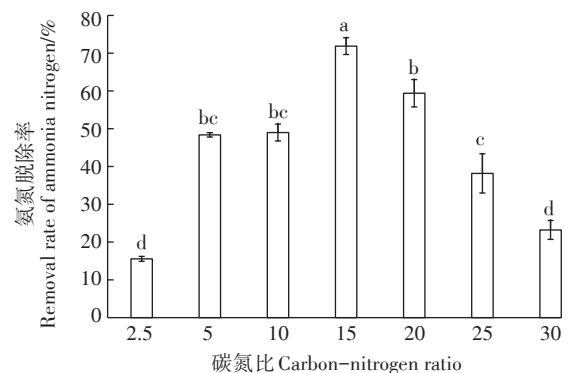


图8 碳氮比对菌株ZF2-3脱氮性能的影响

Figure 8 Effect of carbon-nitrogen ratio on the denitrifying performance of strain ZF2-3

的趋势。在碳氮比为15时,氨氮脱除率达到最大,为71.87%。当碳氮比增大到20后,氨氮脱除效率显著下降。这种先升后降的趋势与许多研究结果^[35-36]相似。一般认为,当碳源浓度高于菌体生长所需时,碳源成为非限制因素,过多的碳源会嵌入酶结构导致酶活性降低,硝化能力也随之下降^[7]。本研究发现菌株ZF2-3脱除氨氮的最佳碳氮比为15,低于王越等^[28]报道的花津滩芽孢杆菌(*Bacillus hwajinpoensis*) SLWX₂最佳碳氮比25。实际应用过程中,较低的碳氮比能减少碳源添加量,节约成本,有很高的实用价值。

2.3 菌株ZF2-3在养殖废水中的脱氮效果

2.3.1 菌株ZF2-3对水产养殖废水的净化作用

实际水产养殖废水与试验模拟废水的水质条件差距较大,前者水质成分复杂,富含杂菌,以致许多试验筛选的高效脱氮菌株在处理实际养殖废水时效果大为降低。如钱春园等^[16]在培养基中接种菌株经过96 h培养后,氨氮去除率为61.8%,而在实际甲鱼养殖废水中,达到与之持平的氨氮去除率(64.3%)却需216 h的培养,菌株脱氮效率受到严重影响。刘树彬等^[17]研究表明,其筛选脱氮枯草芽孢杆菌菌株HAIN-UP40在氨氮培养基中对氨氮的降解效果显著,在试验的第4 d时氨氮去除率可达57.58%,但在实际养殖水的应用中氨氮质量浓度却呈上升趋势。

将所得枯草芽孢杆菌ZF2-3应用于实际水产养殖废水,脱氮效果如图9所示,与对照组CK(添加等量生理盐水)相比,试验组经ZF2-3处理后,水产养殖废水中氨氮、硝态氮和总氮浓度均大幅降低。其中,总氮和氨氮浓度显著降低($P<0.05$, t -test),分别下降

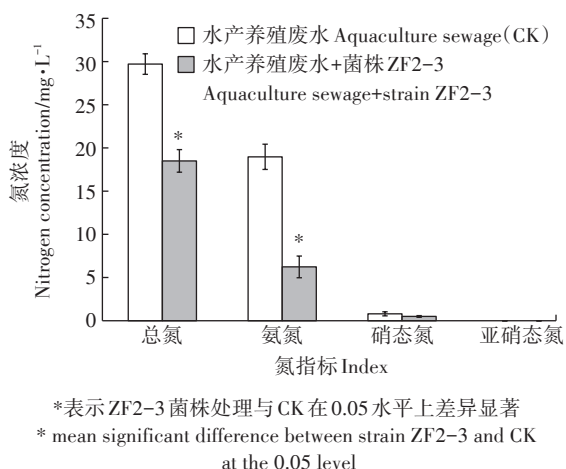


图9 菌株ZF2-3在水产养殖废水中的脱氮效果

Figure 9 Denitrifying effect of strain ZF2-3 in aquaculture sewage

了37.7%和67.4%,且不累积亚硝态氮和硝态氮,水质得到了较大改善。

2.3.2 菌株ZF2-3对高氨氮浓度粪水的净化作用

猪粪水的生物脱氮是一大难题,因为猪粪水中含有的高浓度氨氮往往对脱氮菌的反硝化过程有很大程度的抑制作用;目前,将菌株发酵菌剂直接用于猪粪污水的研究鲜有报道。本研究将筛选得到的菌株ZF2-3添加到含高浓度氨氮的猪粪水(氨氮质量浓度475 mg·L⁻¹)中,结果(图10)表明,接菌处理48 h后,试验组氨氮和总氮浓度均极显著降低($P<0.01$, t -test),其中总氮浓度降低34.6%,氨氮浓度降幅30.4%,说明菌株ZF2-3在高浓度氨氮废水处理领域具有良好的实际应用潜力。

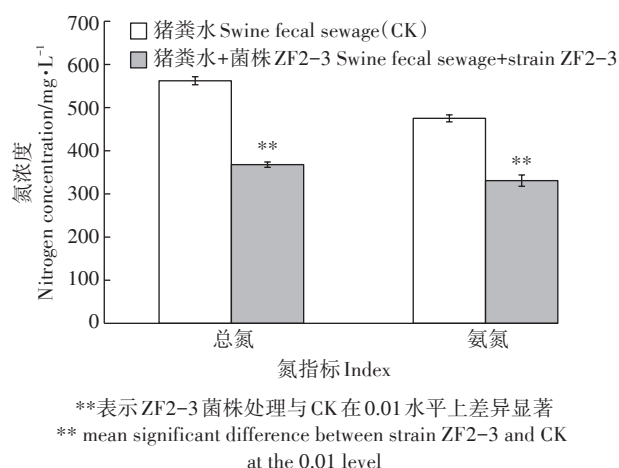


图10 菌株ZF2-3在含高浓度氨氮的猪粪水中的脱氮效果

Figure 10 Denitrifying effect of strain ZF2-3 in swine fecal sewage with high concentration of ammonia nitrogen

3 结论

(1)从自然曝气猪粪水池塘中筛得一株有较好脱氮功能的异养硝化-好氧反硝化菌株ZF2-3,经形态学和生理生化鉴定、16S rRNA基因序列分析、系统发育树构建和特征性扩增片段分析,确定其为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

(2)在氨氮和硝态氮液体培养基中,分别接种培养24 h和36 h后,菌株ZF2-3对氨氮和硝态氮脱除率分别为85.7%和87.2%,且不积累其他无机氮副产物。

(3)碳源种类和碳氮比是影响菌株脱氮性能的重要因素。在温度30℃、pH 7.4条件下,菌株ZF2-3硝化作用最适碳源是蔗糖,最适碳氮比为15。

(4)菌株ZF2-3在养殖废水中的应用结果表明,无论在氨氮浓度相对较低的水产养殖废水还是氨氮

浓度较高的猪粪水中,菌株ZF2-3均有较好的脱氮效果,且不积累亚硝态氮和硝态氮,在实际养殖废水脱氮处理中具有良好的应用潜力。

本研究分离得到了一株很有实际应用潜力的异养硝化-好氧反硝化功能菌株,并且在对于水中氮的去除特性研究上,直接采用实际水产养殖和畜禽养殖污水作为试验水样,比该类群菌种已有研究所用的模拟污水脱氮试验结果更加具有实际参考价值。此外,对于猪粪水的生物脱氮,考虑到猪粪水环境的复杂性,单独使用异养硝化-好氧反硝化菌处理,在实际应用中可能仍然达不到预期效果。因此,在将来的研究中,将异养硝化-好氧反硝化菌与其他工程技术手段相结合也需要重点考虑。

参考文献:

- [1] 王 伟. 中国水资源利用现状与水污染治理对策研究[J]. 山东工业技术, 2018(20):42.
WANG Wei. Current situation of water resources utilization in China and countermeasures for water pollution control[J]. *Shandong Industrial Technology*, 2018(20):42.
- [2] Gao M, Chang J, Li S, et al. Modeling nitrogen loading from a watershed consisting of cropland and livestock farms in China using manure-DNDC[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2014(185): 88-98.
- [3] 张 燕, 刘雪兰, 王月明, 等. 中国规模化畜禽养殖污水处理中人工湿地的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2016, 39(1):87-92.
ZHANG Yan, LIU Xue-lan, WANG Yue-ming, et al. Research progress of constructed wetland treating intensive livestock and poultry wastewater in China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 39(1):87-92.
- [4] Ahmed M B, Zhou J L, Ngo H H, et al. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 323(Part A):274-298.
- [5] 夏宏生, 陈师楚. UASB-O/A/O组合工艺对规模化养猪场废水的生物脱氮除磷研究[J]. 环境工程, 2018, 36(1):11-14.
XIA Hong-sheng, CHEN Shi-chu. Biological nitrogen and phosphorus removal from large scale piggery wastewater by UASB-O/A/O combined process[J]. *Environmental Engineering*, 2018, 36(1):11-14.
- [6] Su J J, Liu B Y, Liu C Y. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 90(3):457-462.
- [7] 颜薇芝, 张汉强, 余从田, 等. 1株异养硝化好氧反硝化不动杆菌的分离及脱氮性能[J]. 环境工程学报, 2017, 11(7):4419-4428.
YAN Wei-zhi, ZHANG Han-qiang, YU Cong-tian, et al. Isolation of *Acinetobacter* sp. YN3 and its heterotrophic nitrification-aerobic denitrification characters[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(7):4419-4428.
- [8] Zhao B, An Q, He Y, et al. N_2O and N_2 production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 116:379-385.
- [9] 周影茹, 陆玉芳, 施卫明. 好氧反硝化菌RWX31强化污染废水脱氮的研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(10):2047-2054.
ZHOU Ying-ru, LU Yu-fang, SHI Wei-ming. Bioaugmentation on nitrate removal from simulated wastewater by aerobic denitrifying bacterium RWX31[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(10):2047-2054.
- [10] Chen Q, Ni J. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by novel isolated bacteria[J]. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 2011, 38(9):1305-1310.
- [11] 李小义, 王丽萍, 赖其良, 等. 一株卓贝尔氏菌F13-1好氧反硝化特性及其反硝化基因的初步研究[J]. 应用海洋学学报, 2016(1):122-129.
LI Xiao-yi, WANG Li-ping, LAI Qi-liang, et al. Preliminary study on aerobic denitrification characteristics of *Zobellella* sp. F13-1[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2016(1):122-129.
- [12] Wang T, Dang Q, Liu C, et al. Heterotrophic nitrogen removal by a newly-isolated alkalitolerant microorganism, *Serratia marcescens* W5[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 211:618-627.
- [13] Zhang Q, Liu Y, Ai G, et al. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylophilus* strain L7[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 108:35-44.
- [14] 李 兵, 林炜铁. 1株好氧反硝化芽孢杆菌的脱氮特性研究[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(3):48-52.
LI Bing, LIN Wei-tie. Study on aerobic denitrification characteristics of *Bacillus* strain D5[J]. *Journal of Hydroecology*, 2009, 2(3):48-52.
- [15] Zhao B, Tiao M, An Q, et al. Characteristics of a heterotrophic nitrogen removal bacterium and its potential application on treatment of ammonium-rich wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 226:46-54.
- [16] 钱春园, 郭晓泽, 高 锋. 异养硝化菌的分离及在养殖废水处理中的应用[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2017, 36(6):481-486.
QIAN Chun-yuan, GUO Xiao-ze, GAO Feng. Isolation of the heterotrophic nitrification bacteria and its application in aquaculture wastewater treatment[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University(Natural Science)*, 2017, 36(6):481-486.
- [17] 刘树彬, 王新锐, 林壮其, 等. 枯草芽孢杆菌HAINUP40水质净化作用的研究[J]. 水产科学, 2018, 37(2):159-166.
LIU Shu-bin, WANG Xin-rui, LIN Zhuang-qi, et al. Purification of aquaculture effluent by *Bacillus subtilis* HAINUP40[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(2):159-166.
- [18] Waki M, Yasuda T, Fukumoto Y, et al. Treatment of swine wastewater in continuous activated sludge systems under different dissolved oxygen conditions: Reactor operation and evaluation using modelling[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250:574-582.
- [19] 翟一帆, 袁青彬, 胡 南. 养猪废水处理系统微生物群落结构变化

- 及影响因素研究[J]. 水资源保护, 2018(1):88-94.
- ZHAI Yi-fan, YUAN Qing-bin, HU Nan. Study on structure variation and influencing factors of microbial community in swine wastewater treatment system[J]. *Water Resources Protection*, 2018(1):88-94.
- [20] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's manual of systemaic bacteriology[M]. Beijing: Science Publishing House, 1984.
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001:409-412.
- DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Common bacteria system identification manual[M]. Beijing: Science Publishing House, 2001:409-412.
- [22] Yang Q, Franco C, Zhang W, et al. Sponge-associated actinobacterial diversity: Validation of the methods of actinobacterial DNA extraction and optimization of 16S rRNA gene amplification[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(20):8731-8740.
- [23] 冯广达, 陈美标, 羊宋贞, 等. 用于PCR扩增的细菌DNA提取方法比较[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(3):439-442.
- FENG Guang-da, CHEN Mei-biao, YANG Song-zhen, et al. A comparative study on bacteria DNA extraction methods used for PCR amplification[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2013, 34(3):439-442.
- [24] 刘 勇, 李 辉, 李金霞, 等. 特异PCR方法对枯草芽孢杆菌群的鉴定区分[J]. 饲料工业, 2010, 31(4):52-54.
- LIU yong, LI hui, LI jin-xia, et al. Identification of *Bacillus subtilis* population by specific PCR method[J]. *Feed Industry*, 2010, 31(4):52-54.
- [25] 曹凤明. 芽孢杆菌PCR鉴定方法的建立和应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- CAO Feng-ming. Establishment and application of PCR identification method for *Bacillus*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007.
- [26] 许本宏, 林俊芳, 叶志伟, 等. 带鱼肠道中芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵液抗菌性质研究[J]. 水产科学, 2018, 37(2):193-200.
- XU Ben-hong, LIN Jun-fang, YE Zhi-wei, et al. Isolation and identification of *Bacillus* from gastrointestinal tract of hairtail (*Trichiurus haumela*) and antibacterial characteristics of their fermented liquids[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(2):193-200.
- [27] 盛建海, 韩 涛, 王骥腾, 等. 源自生物絮团产絮凝剂的异养硝化-好氧反硝化菌xt1的鉴定及其脱氮特性[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(2):375-383.
- SHENG Jian-hai, HAN Tao, WANG Ji-teng, et al. Identification and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain xt1 with flocculation ability isolated from bio-floc[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(2):375-383.
- [28] 王 越, 成 钰, 李秋芬, 等. 不同氮源和环境因子对天津津芽孢杆菌SLWX₂脱氮性能的影响[J]. 渔业科学进展, 2019, 40(1):133-140.
- WANG Yue, CHENG Yu, LI Qiu-fen, et al. Effects of different nitrogen sources and environmental factors on the nitrogen remove performance of *Bacillus hwajinpoensis* SLWX₂[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1):133-140.
- [29] 李卫芬, 傅罗琴, 邓 斌, 等. 1株好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究[J]. 环境科学, 2011, 32(8):2403-2408.
- LI Wei-fen, FU Luo-qin, DENG Bin, et al. Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitrifier[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(8):2403-2408.
- [30] 田雪雪, 程玉立, 张圆圆, 等. 一株异养硝化-好氧反硝化功能菌的分离鉴定及其脱氮特性[J]. 环境工程学报, 2017, 11(2):1269-1275.
- TIAN Xue-xue, CHENG Yu-li, ZHANG Yuan-yuan, et al. Isolation, identification and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(2):1269-1275.
- [31] 张小玲, 张 霞. 好氧反硝化菌 *Bacillus* sp. H2脱氮特性研究[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(10):53-57.
- ZHANG Xiao-ling, ZHANG Xia. Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium *Bacillus* sp. H2[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 34(10):53-57.
- [32] 陈 玲, 白 洁, 赵阳国, 等. 分离于河口区芦苇湿地1株好氧反硝化菌的鉴定及其反硝化特性[J]. 微生物学报, 2016, 56(8):1314-1325.
- CHEN Ling, BAI Jie, ZHAO Yang-guo, et al. Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitrifier in estuary phragmites wetland[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(8):1314-1325.
- [33] 修海峰, 朱仲元, 丁爱中, 等. 好氧反硝化菌种DF2的分离鉴定及生理生化特性分析[J]. 生态环境学报, 2011, 20(8/9):1307-1314.
- XIU Hai-feng, ZHU Zhong-yuan, DING Ai-zhong, et al. Isolation and identification of the aerobic denitrifying strain DF2 and its physiological and biochemical analysis[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(8/9):1307-1314.
- [34] Huang H K, Tseng S K. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55(1):90-94.
- [35] 王田野, 魏荷芬, 胡子全, 等. 一株异养硝化好氧反硝化菌的筛选鉴定及其脱氮特性[J]. 环境科学学报, 2017, 37(3):945-953.
- WANG Tian-ye, WEI He-fen, HU Zi-quan, et al. Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying strain and its denitrification characteristics[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(3):945-953.
- [36] 孙庆花, 于德爽, 张培玉, 等. 1株海洋异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及其脱氮特性[J]. 环境科学, 2016, 37(2):647-654.
- SUN Qing-hua, YU De-shuang, ZHANG Pei-yu, et al. Identification and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain isolated from marine environment[J]. *Environmental Science*, 2016, 37(2):647-654.