



# Zn(II)对好氧反硝化菌 *Acinetobacter* sp. JR-142 的代谢活性影响

朱婉瑜<sup>1,2</sup>, 侍浏洋<sup>2</sup>, 赵维<sup>2</sup>, 黄志勇<sup>2</sup>, 马安周<sup>3</sup>, 王兴彪<sup>2\*</sup>

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 工业生物系统与过程工程重点实验室, 天津 300308

3 中国科学院生态环境研究中心, 环境生物技术重点实验室, 北京 100085

朱婉瑜, 侍浏洋, 赵维, 黄志勇, 马安周, 王兴彪. Zn(II)对好氧反硝化菌 *Acinetobacter* sp. JR-142 的代谢活性影响. 微生物学报, 2022, 62(1): 275–290.

Zhu Wanyu, Shi Liuyang, Zhao Wei, Huang Zhiyong, Ma Anzhou, Wang Xingbiao. Effects of Zn(II) on metabolic activity of aerobic denitrifier *Acinetobacter* sp. JR-142. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 275–290.

**摘要:**【目的】研究不同 Zn(II)浓度对好氧反硝化菌 *Acinetobacter* sp. JR-142 生理活性, 尤其是反硝化代谢特性的影响。【方法】筛选一株好氧反硝化菌, 优化了最佳活性条件; 分析了不同 Zn(II)浓度对生长曲线和反硝化效率的影响以及对细胞形态的影响; 明晰了不同 Zn(II)浓度条件下, 细胞特征活性酶-硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的活性变化情况, 分析了不同活性同关键酶的编码基因 *napA* 和 *nirS* 的相对表达量之间的规律。【结果】获得一株具有好氧反硝化功能的菌株, 命名为 JR-142, 经鉴定为不动杆菌 *Acinetobacter* sp.。在以琥珀酸钠为碳源, C/N 为 6, pH 为 7.0, 温度 30 °C, 转速为 180 r/min 的条件下, 好氧反硝化活性最高。结果表明当 Zn(II)浓度为 3.25 mg/L 时, 对菌株的生长及好氧反硝化速率有促进作用; 当 Zn(II)浓度为 52 mg/L 以上浓度时, 菌株的生长及反硝化速率均受到抑制。酶活及关键基因 *napA*、*nirS* 的定量分析结果显示, 对照组及 JR+0.05 处理组的硝酸盐还原酶 NR、亚硝酸盐还原酶 NiR 活性均高于 JR+0.8 处理组, 在 24 h 时, JR+0.05 Zn(II)处理组中, 细胞的关键好氧反硝化基因 *napA* 及 *nirS* 的相对表达量显著高于对照组,

**基金项目:** 国家重点研发项目(2018YFA0901200); 国家自然科学基金(41977200); 中国科学院环境生物技术重点实验室开放课题(中国科学院环境生物技术重点实验室)(kf2019005)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901200), by the National Natural Science Foundation of China (41977200) and by the Open Fund of Ministry of Key Experiment of Environmental Biotechnology, Chinese Academy of Sciences (kf2019005)

\*Corresponding author. Tel: +86-22-84861930; E-mail: wang\_xb@tib.cas.cn

Received: 2 April 2021; Revised: 2 June 2021; Published online: 8 November 2021

这进一步说明 3.25 mg/L Zn(II)可以促进好氧反硝化过程,而在 24 h 及 32 h 时对照组及 JR+0.05 处理组的基因相对表达量远高于 JR+0.8 处理组,也说明 52 mg/L Zn(II)则会对反应产生抑制。

**【结论】**探究并系统分析了不同 Zn(II)浓度对不动杆菌 *Acinetobacter* sp. JR-142 生长繁殖以及和在重金属锌离子存在的情况下影响好氧反硝化生理活性的影响,为后续硝酸盐-重金属复合污染废水的生物处理技术提供了数据指导。

**关键词:** 好氧反硝化; 不动杆菌; Zn(II)耐受; 代谢活性; 氮-重金属复合污染

## Effects of Zn(II) on metabolic activity of aerobic denitrifier *Acinetobacter* sp. JR-142

ZHU Wanyu<sup>1,2</sup>, SHI Liuyang<sup>2</sup>, ZHAO Wei<sup>2</sup>, HUANG Zhiyong<sup>2</sup>, MA Anzhou<sup>3</sup>, WANG Xingbiao<sup>2\*</sup>

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Key Laboratory of Industrial Biology System and Process Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

**Abstract:** **[Objective]** To study the effects of different concentrations of Zn(II) on the metabolic activities, especially the denitrification of the aerobic denitrifier *Acinetobacter* sp. JR-142. **[Methods]** An aerobic denitrifier was screened out and its growth conditions were optimized. The growth curve, denitrifying efficiency, and cell morphology of the strain were measured in the presence of Zn(II) at different concentrations. We measured the activities of cell characteristic enzymes (nitrate reductase and nitrite reductase) exposed to different concentrations of Zn(II), and then analyzed the relationship between *napA* & *nirS* expression levels and enzyme activities. **[Results]** An aerobic denitrifying strain was obtained and identified as *Acinetobacter* sp. JR-142. Under the conditions of sodium succinate as carbon source, C/N ratio of 6, pH 7.0, temperature at 30 °C, shaking speed of 180 r/min, the aerobic denitrifier showed the highest activity. Zn(II) at the concentration of 3.25 mg/L promoted the cell growth and aerobic denitrification, while that at the concentration higher than 52 mg/L showed inhibitory effects. The nitrate reductase and nitrite reductase activities in the control group and JR+0.05 treatment group were higher than those in the JR+0.8 treatment group. At the time point of 24 h, the relative expression levels of aerobic denitrifying genes *napA* and *nirS* in JR+0.05 treatment group were significantly higher than those in control group, which further indicated that 3.25 mg/L Zn(II) can promote aerobic denitrification. At the time points of 24 h and 32 h, the relative expression levels of the two genes in the control group and JR+0.05 treatment group were much higher than those in the JR+0.8 treatment group, which indicated that 52 mg/L Zn(II) can inhibit the reaction. **[Conclusion]** This study systematically analyzed the effects of Zn(II) at different concentrations on the growth and aerobic denitrification of *Acinetobacter* sp. JR-142 for the first time. It provides a data basis for the biological treatment of wastewater with nitrate-heavy metal combined pollution.

**Keywords:** aerobic denitrification; *Acinetobacter* sp.; Zn(II) tolerance; metabolic activity; nitrate-heavy metal combined pollution

随着我国工农业的快速发展, 环境污染问题愈发严重, 水污染程度和广度情况逐年加剧, 污水处理成为人们关注的焦点。硝酸盐( $\text{NO}_3^-$ -N)是一种在工业废水和生活污水中均广泛存在的氮污染物<sup>[1]</sup>, 水体中  $\text{NO}_3^-$ -N 含量超标, 对环境有很大的危害, 如水体富营养化等, 进而导致高铁血红蛋白症、癌症, 严重威胁人体健康<sup>[2]</sup>。生物法脱氮是近几年使用最广泛的脱氮方法, 具有效率高、成本低和污染少等优点<sup>[3]</sup>。这其中, 好氧反硝化又因其操作简便、脱氮效率高而备受关注<sup>[4]</sup>。

但另一方面, 多数情况下含氮废水中硝酸盐不是唯一污染物, 还存在重金属<sup>[5]</sup>。重金属不能被生物降解, 一些低浓度重金属(如当 Cu 浓度为 0.05 mg/L 时)可以提高微生物反硝化效率<sup>[6]</sup>, 但高浓度重金属会破坏细胞膜、改变酶的特异性、抑制微生物代谢活动<sup>[1]</sup>, 对生物反硝化过程造成了很大障碍。也有研究表明, 微生物具有特定的、耐受重金属的机制, 如通过抗氧化酶去除过氧化物来抵御重金属离子<sup>[7]</sup>、通过依赖性代谢机制产生有助于沉淀的化合物来减弱重金属的损害<sup>[8]</sup>。不同微生物、不同重金属离子以及污染程度, 会导致不同的微生物生理活性和耐受性能。Zn 是一种广泛应用的重金属, 也大范围存在于含氮废水中<sup>[9]</sup>, 养殖、冶炼、化肥等多种工业都有涉及<sup>[10]</sup>, 猪场废水 Zn(II)浓度可高达 1.5–30.0 mg/L<sup>[10]</sup>, 除此之外, 在人类生活产生的垃圾渗透液、生活污水中也存在着 Zn(II)和  $\text{NO}_3^-$ -N<sup>[1,11]</sup>。因此, 研究 Zn(II)对好氧反硝化的生理活性的影响具有重要的技术指导意义。

研究者们对反硝化酶的活性及其基因表达对重金属影响反硝化的机理研究多数基于厌氧反硝化过程<sup>[12]</sup>, 在厌氧反硝化过程中, 添加低浓度的 Zn(II), 可以上调基因 *nirK* 的表达量, 但

当 Zn(II)达到 10 mg/L 后, 表达量就会降低<sup>[13]</sup>。由于好氧反硝化微生物发现时间短, 应用少, 好氧反硝化复合重金属污染的代谢机制还不明确。目前已知的是, 好氧反硝化过程中的关键酶是硝酸盐还原酶(nitrate reductase, NR,  $\text{NO}_3^-$ -N $\rightarrow$  $\text{NO}_2^-$ -N)和亚硝酸盐还原酶(nitrite reductases, NiR,  $\text{NO}_2^-$ -N $\rightarrow$ NO), 是由硝酸盐还原酶基因 *napA* 和亚硝酸盐还原酶基因 *nirS* 编码的<sup>[14]</sup>。在好氧反硝化过程中, Zn(II)如何影响微生物细胞的代谢特征以及相关功能基因表达情况还有待研究

本研究旨在探讨 Zn(II)浓度对 *Acinetobacter* sp. JR-142 好氧反硝化过程的影响。为此, 探究了不同 Zn(II)浓度对 (1) 细菌生长情况和  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效率的影响; (2) 细胞形态的影响; (3) 硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶活性的影响; (4) 关键基因 *napA*、*nirS* 的相对表达量的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

所有培养基使用前都经过灭菌处理。主要使用的培养基为好氧反硝化培养基 1 (aerobic denitrification, AD1)<sup>[3]</sup>, 成分如下: 每 1 000 mL 蒸馏水中加  $\text{CH}_3\text{COONa}$  2.6 g、 $\text{KNO}_3$  0.722 g、1.113 g 基础培养基和微量元素溶液 2 mL。好氧反硝化培养基 2<sup>[3]</sup>用于优化培养条件, 每 1 000 mL 蒸馏水中加:  $\text{CH}_3\text{COONa}$  2.6 g、 $\text{NaNO}_2$  0.25 g、1.113 g 基础培养基和微量元素溶液 2 mL; 异养硝化培养基<sup>[3]</sup>用于优化培养条件, 每 1 000 mL 蒸馏水中加:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.472 g、 $\text{CH}_3\text{COONa}$  2.6 g、1.113 g 基础培养基和微量元素溶液 2 mL。采用溴百里酚蓝培养基(bromothymol blue, BTB)对好氧反硝化菌进行初筛, 培养基组成如下: 每 1 000 mL 蒸馏水中加入  $\text{CH}_3\text{COONa}$  1.3 g、

KNO<sub>3</sub> 1 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g、FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.05 g、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.02 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g、1% BTB 5 mL, 维持 pH 在 7.0–7.2 范围内<sup>[3]</sup>。

微量元素溶液(g/L)<sup>[15]</sup>: EDTA 50.0、ZnSO<sub>4</sub> 2.2、CaCl<sub>2</sub> 5.5、MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 5.06、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.1、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.57、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.61。所有的固体培养基都是在液体培养基原有成分基础上, 加入琼脂(15 g/L)制成的。

## 1.2 菌株的获得

从焦化工厂的活性污泥中筛选出一株活性菌株, 能通过好氧反硝化有效去除水中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N。筛选过程如下: 将活性污泥充分分散后, 涂于配置好的溴百里酚蓝培养基, 置于 30 °C 培养。挑取反应阳性菌株, 即周围培养基变蓝色, 表示具有反硝化性能。接种于装有好氧反硝化培养基 1 的试管中, 30 °C、120 r/min 条件下振荡培养 48 h, 选取反硝化性能较佳的菌株, 接种于含 32.5 mg/L Zn(II)的 AD1 培养基中, 置于 30 °C、120 r/min 条件下振荡培养 48 h, 最终选取 Zn(II)耐受能力最好且反硝化性能最佳的菌株进行鉴定并保存。

## 1.3 菌株的鉴定

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取菌株基因组 DNA, 并以为之模板, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-AAGGAGGT GATCCAGCCCGCA-3')进行 PCR 扩增, 将产物送至擎科生物科技有限公司测序。依据得到的 16S rRNA 序列, 从 NCBI 上进行同源性比较, 鉴定好氧反硝化菌的种属, 并利用 MEGA X 软件构建进化树。PCR 体系(50 μL)为: Mix 25 μL, 27F 2 μL, 1492R 2 μL, 模板 DNA 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 19 μL。

## 1.4 优化菌株培养条件

采用单因素(摇瓶实验)实验的方法, 保持氮源浓度不变, 探究了不同碳源、C/N、pH、温度、及溶氧对菌株反硝化速率的影响。分别以乙酸钠、海藻糖、丁二酸钠、葡萄糖、糖蜜为碳源, 保持其他条件不改变, 进行碳源优化实验。以乙酸钠为碳源, 分别探究了不同 pH (6.5、7.0、7.5、8.0、8.5)、C/N (5、6、7、8、9)、温度(25、30、35、40 °C)、转速(0、80、120、180、240 r/min)对菌株反硝化性能的影响, 在培养过程中同时保持其他优化条件固定不变, pH 为 7, C/N 为 6, 转速为 120 r/min。每个实验 3 个平行, 分别测其培养 48 h 时的 OD<sub>600</sub>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的浓度。

## 1.5 Zn(II)浓度对菌株活性的影响

分别设置 Zn(II)浓度为 3.25 mg/L (0.05 mmol/L), 6.5 mg/L (0.1 mmol/L), 13 mg/L (0.2 mmol/L), 26 mg/L (0.4 mmol/L), 39 mg/L (0.6 mmol/L), 52 mg/L (0.8 mmol/L), 65 mg/L (1.0 mmol/L), 初始 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度相同, 接种量均为 1% (V/V), 每个实验 3 个平行, 在最佳条件下培养 48 h 时, 测定其 OD<sub>600</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的浓度。观察 Zn(II)浓度不同时, 菌株 JR-142 的生长情况及反硝化效率。

选取低浓度(3.25 mg/L) Zn(II)和高浓度(52 mg/L) Zn(II)进行进一步实验, 分别将菌株转接至 AD1 培养基、AD1 培养基+0.05、AD1 培养基+0.8 三种培养基中, 接种量均为 1% (V/V), 每个实验有 3 个平行, 在最佳条件下培养 60 h。每 4 h 于 600 nm 处测定吸光度, 然后以 8 000 r/min 离心 3 min, 取上清, 测定 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的浓度。测量 OD<sub>600</sub> 使用分光光度计法, 测量 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 采用哈希 8039 镉还原法, 测量 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 采用哈希 8507 重氮化法。计算其去除效率和去除率, 公式如下所示<sup>[3]</sup>。

$$\text{去除效率(\%)} = [(C_{\text{初}} - C_t) / C_{\text{初}}] \times 100$$

$$\text{去除率(mg/L}\cdot\text{h)} = (C_{\text{初}} - C_t) / t$$

$C_{\text{初}}$ : 初始浓度;  $C_t$ : 在  $t$  时刻的浓度;  $t$ : 菌株培养时间。

## 1.6 细胞形态检测

使用扫描电镜的方法观察细胞形态, 分别通过取样、戊二醛固定、乙醇梯度脱水、临界点干燥、铂金镀膜等步骤<sup>[2]</sup>, 制成样品, 使用扫描电镜(Hitachi HT7700, 日本)进行观察。

## 1.7 酶活测定

采用硝酸还原酶(NR)测试盒和亚硝酸还原酶(NiR)测试盒(苏州科铭生物有限公司)测量硝酸盐还原酶及亚硝酸盐还原酶的活性<sup>[2]</sup>。具体操作如下: 收集菌体, 加入 1 mL 缓冲液, 混匀; 冰浴超声破碎细胞后置于离心机中, 8 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 取上清; 测量硝酸盐还原酶活性时在处理好的样液中加入 NR 检测液反应 30 min; 再加入显色剂反应 20 min, 于 540 nm 处测定吸光度。在测量亚硝酸盐还原酶时加入 NiR 检测液反应 60 min, 显色剂混匀, 于 540 nm 处测定吸光度。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of qPCR

Primers	F (5'→3')	R (5'→3')
<i>nirS</i> 1-2	CTTGGCTTATGACCGCGTAC	CACCATGATTCGTCGTCACC
<i>napA</i> 1-2	ACGGTACAGTCTTAGAGGCG	CCACGGCGTAAATACTTGGG
16S rRNA	ACAATGGGCGAAAGCCTGAT	GATTAACGCTCGCACCTCT

表 2 qPCR 反应条件(按照 SYBR™ Select Master Mix 试剂盒说明书操作流程)

Table 2 Reaction conditions of qPCR

Steps	T/°C	Duration	Cycles
UDG activation	50	2 min	
Ampli Taq® Fast DNA Polymerase	95	2 min	
Denature	95	15 s	40
Anneal/Extend	60	1 min	

## 1.8 好氧反硝化基因的扩增及分析

根据得到 16S rDNA 基因的序列, 在 NCBI 数据库中进行比对, 获得同属菌株 *Acinetobacter johnsonii* XBB1 的相关基因序列, 用 Primer3 设计荧光定量 PCR 所需的引物, 序列如表 1 所示。

分别采用培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒和 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(天根生化科技有限公司)提取细菌总 RNA 并将其合成为 cDNA。利用 Applied Biosystems™ 的 SYBR™ Select Master Mix 试剂盒进行荧光定量 PCR 反应。反应条件如表 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株鉴定

提取细菌基因组 DNA 并扩增其 16S rRNA 基因, 对扩增的基因进行测序后, 将得到的序列与 NCBI 数据库中的 16S rRNA 基因序列进行比对, 并构建了菌株的系统发育树, 如图 1 所示。结果显示, 筛选到的 JR-142 与 *Acinetobacter johnsonii* YH16108 (GenBank 登录号为 KY767497) 相似度为 99.79%, 属于不动杆菌(*Acinetobacter*)。

### 2.2 最适生长条件单因素优化

#### 2.2.1 碳源

由图 2A 可看出, 不同的碳源对细胞的反硝化活性影响显著。以琥珀酸钠和乙酸钠为碳源时, 菌株对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的去除效率分别为 98.3%、87.7%、99.0% 和 89.8%、82.5%、99.2%, 可以看出琥珀酸钠和乙酸钠更易于被微生物细胞吸收转化, 推测的原因是其

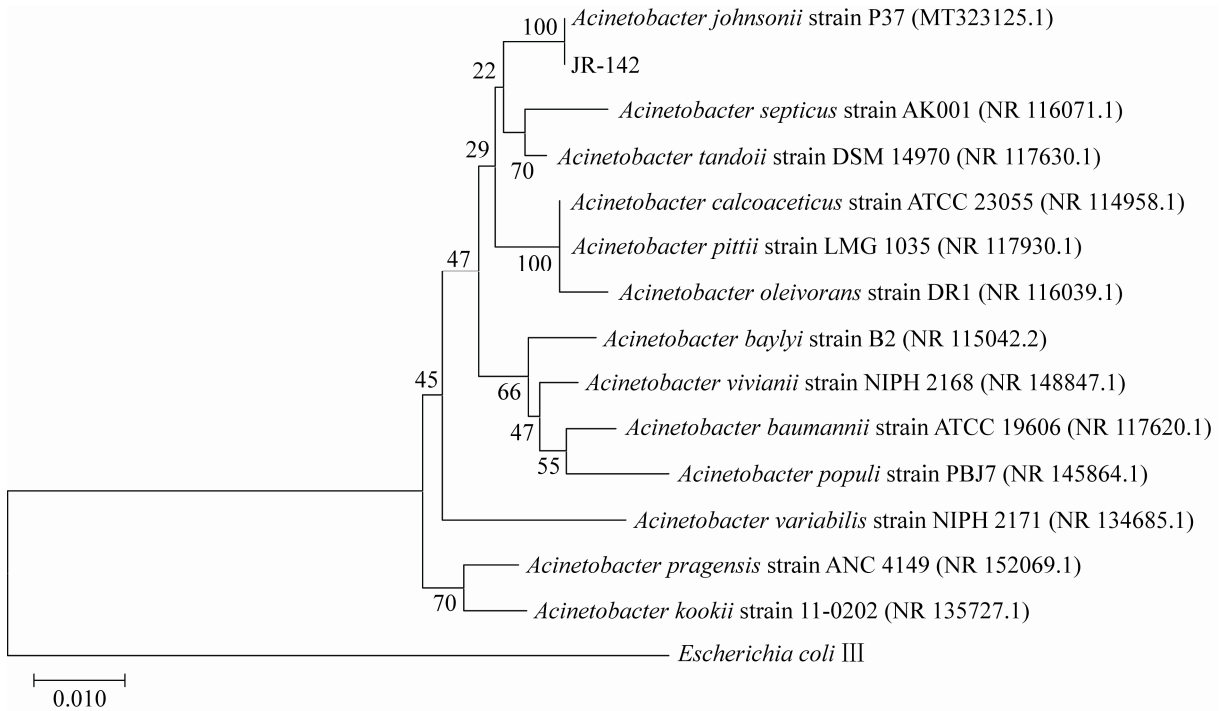


图 1 约氏不动杆菌 *Acinetobacter johnsonii* JR-142 的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of *Acinetobacter johnsonii* JR-142. GenBank accession numbers are given in parentheses; numbers at branch points are percentage bootstrap values (based on 1 000 replicates); the scale bar represents 0.01 changes per nucleotide.

分子量小<sup>[16]</sup>，并且琥珀酸是三羧酸循环的中间代谢产物，能够更快地进入到细胞能量转化系统中去，更快转化成细胞的组成部分，表现为更高的  $\text{NO}_3^-$ -N 还原活性。当以葡萄糖为碳源时，菌株吸光度仅为 0.202，反硝化速率仅为 25.7%，显示了较低水平，说明多碳类碳源需要先转化为较简单的化合物，而后才可被细胞转化利用<sup>[17-18]</sup>。同时也验证了其他碳源，糖蜜和海藻糖的效果均较差。所以，选择琥珀酸钠作为最佳碳源进行后续研究。

### 2.2.2 不同 C/N 优化情况

在保证氮源供应的情况下，碳源越多，C/N 越高，细胞可利用的营养物质越多，理论上应该继续生长，细胞浓度增加，但由图 2B 可看出，随着 C/N 的增加，菌株对  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NH}_4^+$ -N 和

$\text{NO}_2^-$ -N 的去除效率没有明显变化，反而细胞浓度伴随 C/N 的升高有所下降，说明在这个范围内，碳氮比对于细胞的繁殖速率并没有影响。Yang 等<sup>[19]</sup>研究菌株 *Bacillus subtilis* A1 时发现，C/N 为 6 和 12 时，对  $\text{NH}_4^+$ -N 和 TN 的去除率影响不明显，说明在这一碳氮源比例范围之内，碳源的供应足以满足细胞生长和对氮源的去除，保持细胞处于较高的活性，而环境中，大部分含氮废水的 C/N 均不高，在 4 与 8 之间<sup>[20-21]</sup>。从细胞繁殖速率和  $\text{NO}_3^-$ -N 还原活性相结合角度，选择 C/N 6 作为菌株的最佳 C/N。

### 2.2.3 不同 pH 优化情况

由图 2C 可知，pH 从 7.0 至 8.5 时， $\text{NO}_3^-$ -N 去除率分别达到 97.8%、97.5%、97.0%、96.5%，在这一 pH 范围内，氨氮去除活性区别不明显。

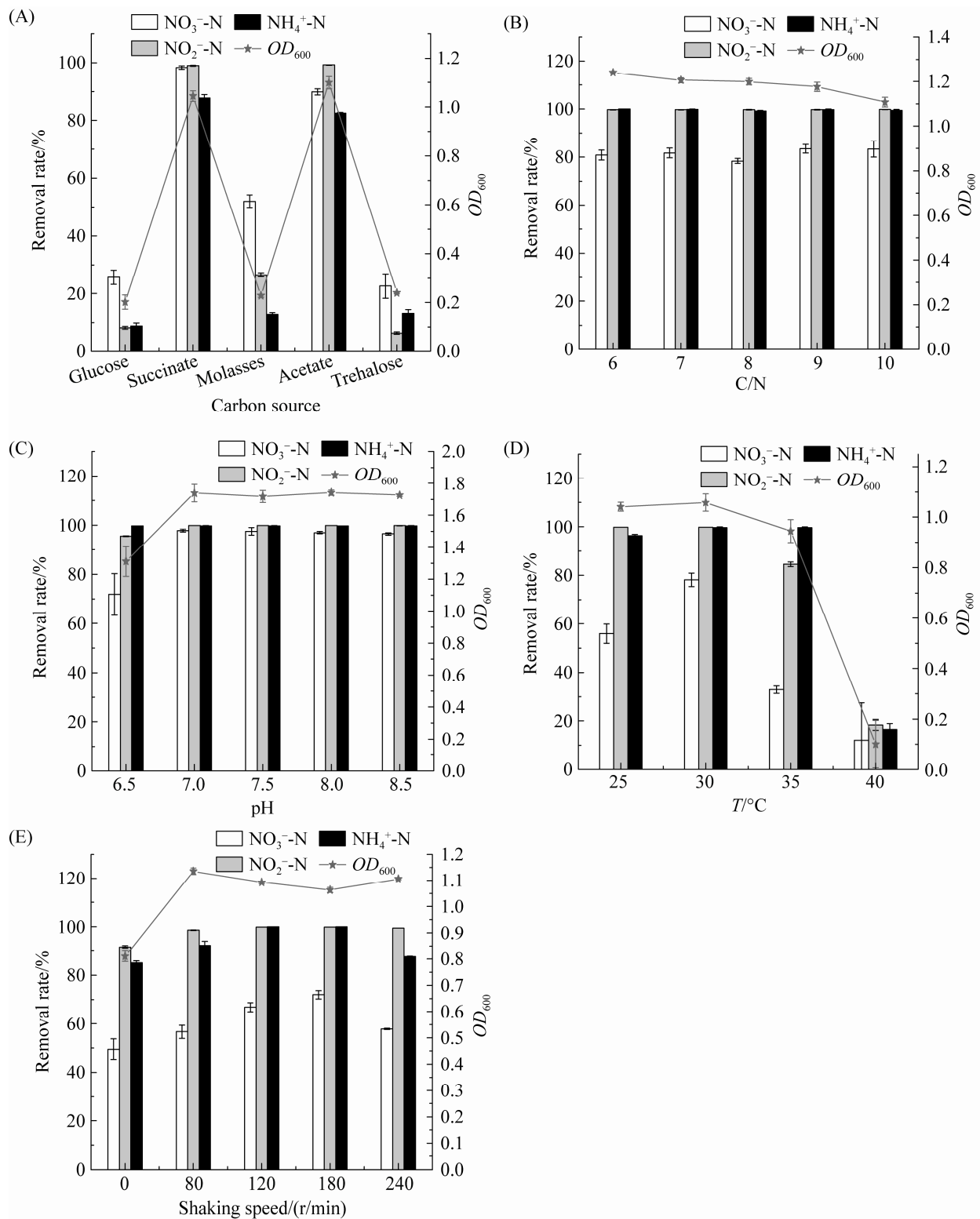


图2 不同因素对不动杆菌 JR-142 好氧反硝化速率的影响

Figure 2 Effects of different factors on aerobic denitrification efficiency by *Acinetobacter* sp. JR-142. A: carbon sources; B: C/N; C: pH; D: temperature; E: shaking speed.

当 pH 为 6.5 时,  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除效率明显降低, 为 71.8%, 而当 pH 为 5.0 时, 菌株受到严重抑制, 吸光度与反硝化速率均为 0; 当 pH 大于 9.0 时, 菌株仍具有活性, 反硝化速率明显开始下降,  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效率为 56.8%, 仅为最高反硝化速率的 58%, 当 pH 为 12.0 时, 菌株停止生长, 生长速率及  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效率均为 0。这说明菌株 JR-142 更加耐受碱性条件, 推测碱性培养基中有更多的游离氨, 促进了异养硝化过程<sup>[3]</sup>, 现有文献中大部分活性菌剂的最适 pH 为 7.0–8.0<sup>[22]</sup>, 也说明了这一点。综合考虑环境因素和实验结果, 最终确定 pH 7.0 为菌株 JR-142 的最佳活性条件, 用于后续实验。

#### 2.2.4 不同温度优化情况

图 2D 可看出不同温度对于菌株生长和对氮源去除率的影响。在 25–35 °C, 菌株对  $\text{NH}_4^+$ -N 和  $\text{NO}_2^-$ -N 的去除效率相当, 均能维持在 90% 以上; 在 25–30 °C 时对  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效果较 35–40 °C 高。当温度为 30 °C 时, 菌株的各项去除效率最高,  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NH}_4^+$ -N 和  $\text{NO}_2^-$ -N 的去除率分别为 78.2%、99.8% 和 99.9%, 当温度为 40 °C 时, 细胞浓度及  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NH}_4^+$ -N 和  $\text{NO}_2^-$ -N 的去除效率都显著降低,  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率仅为 12.2%, 活性不足最高活性的 16%, 说明菌株在长期进化过程中, 已经适应了氮源污染的大多数温度条件: 25–35 °C。

#### 2.2.5 不同溶氧优化情况

图 2E 展现了不同溶氧对菌株的影响, 采用控制转速的方法来控制溶氧的不同。当转速为 0、80、120、180 r/min 时, 测得的溶氧分别为 0.28、0.47、3.47、8.21 mg/L, 随着溶氧的增加, 菌株的反硝化速率也逐渐增加, 转速为 180 r/min 时, 菌株 JR-142 的  $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NO}_2^-$ -N 去除率最高, 分别为 100.0%、72.0%、99.9%。较高的溶解氧促进了  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NH}_4^+$ -N 和  $\text{NO}_2^-$ -N

的去除, 说明菌株为好氧菌, 持续的溶解氧供应对于菌株还原  $\text{NO}_3^-$ -N 具有明显的促进作用。但当转速提升至 240 r/min 时, 溶氧为 8.56%, 各项去除率没有升高,  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NH}_4^+$ -N 和  $\text{NO}_2^-$ -N 的去除率有所下降, 分别为 57.8%、87.6%、99.4%, 因为过高的溶解氧会导致细菌活力降低, 并且随着转速的升高, 剪切力变大, 细胞可能受到了机械损伤。结果显示  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效率的降低比  $\text{NH}_4^+$ -N 更明显, 因为还原  $\text{NO}_3^-$ -N 比去除  $\text{NH}_4^+$ -N 需要更低的氧浓度<sup>[23]</sup>。

由以上实验结果可知, 当琥珀酸钠为碳源, C/N 为 6, pH 为 7.0, 温度为 30 °C, 转速为 180 r/min 时, 菌株 JR-142 的生长速率和  $\text{NO}_3^-$ -N 还原速率最佳, 后续实验中均采用这些培养条件。

### 2.3 不同浓度的 Zn(II)对 JR-142 好氧反硝化活性的影响

#### 2.3.1 JR-142 在不同 Zn(II)浓度条件下的生长情况

探究了不同 Zn(II)浓度对好氧反硝化的影响。在反硝化培养基中分别加入 0.65、3.25、6.50、13.00、26.00、39.00、52.00、65.00 mg/L 的 Zn(II)。从图 3 中可以看出, Zn(II)浓度小于 26.00 mg/L 时, 对好氧反硝化效率的影响不大,  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率保持在 76% 以上。并且 Zn(II)浓度为 0.65 mg/L 和 3.25 mg/L 时, 对好氧反硝化过程还有促进作用。从 39.00 mg/L 开始, Zn(II)对菌株的抑制作用逐渐增强。而 65.00 mg/L Zn(II)对菌株的生长和反硝化有较强的抑制作用, 此时生长吸光度仅为 0.2, 去除率仅为 12%, 不足最高活性的 15%。当 Zn(II)浓度为 3.25 mg/L 时, 对  $\text{NO}_3^-$ -N 去除的促进作用最为明显, 而过高的 Zn(II)浓度对菌株的生长及活性抑制严重, 基于此, 选择 Zn(II)浓度为 3.25 mg/L 和 52.00 mg/L 的条件分析重金属离子影响细胞去除  $\text{NO}_3^-$ -N 的代谢特征, 记为 JR+0.05 处理组和 JR+0.8 处理组。



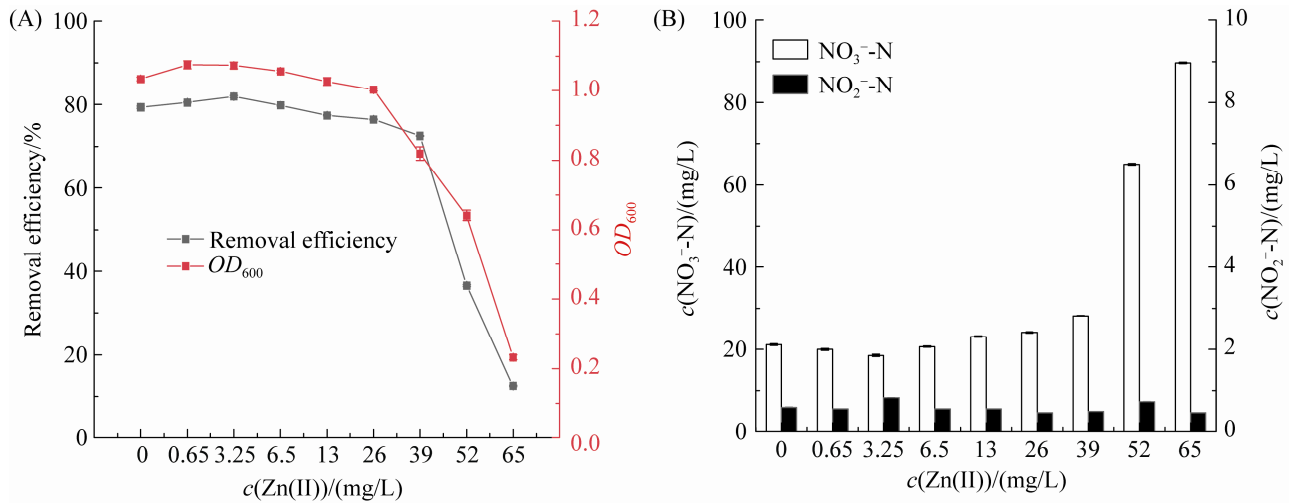


图3 不同浓度 Zn(II)对 JR-142 好氧反硝化效率的影响

Figure 3 Effect of different concentrations of Zn(II) on aerobic denitrification efficiency of JR-142.

### 2.3.2 Zn(II)对菌株代谢周期活性变化的影响

由图 4A 可以看出, 从培养 20 h 开始, 对照组和 JR+0.05 处理组开始进入对数生长期, 在 32 h 细胞生长过程达到稳定期, 而且 JR+0.05 处理组的细胞浓度在 32 h 后均高于对照组, 说明 3.25 mg/L Zn(II)并未对细菌的生长产生抑制。但 JR+0.8 处理组从 32 h 才开始生长, 这是由于环境胁迫过大, 导致细胞生长出现了明显的滞后期, 说明微生物细胞处于不利于繁殖和活性释放的环境时, 需要一定的时间来调节自身代谢过程, 适应环境条件<sup>[2]</sup>。

图 4B 和 4C 揭示了 Zn(II)对好氧反硝化过程的影响。从图 4B 可以看出对照组在 24 h 时, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 开始降低, 最高去除率为 79%; JR+0.05 处理组中, 低浓度的 Zn(II)对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除并没有抑制作用, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 在 24 h 开始降低, 最高去除率为 84%, 高于对照组; 对照组和 JR+0.05 处理组的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度均在 44 h 之后开始趋于稳定。JR+0.8 处理组中, 高浓度的 Zn(II)明显抑制了 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 在 40 h 开始降低, 最高去除率为 53%, 并在 56 h 达到稳定,

仅为最高活性的 63%。

图 4C 可以看出, 对照组和 JR+0.05 处理组在 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度降低的过程中, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的浓度并没有出现明显升高, 而是处于波动状态, 说明该菌在好氧反硝化过程中亚硝酸盐被较快去除, 没有明显的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 积累。JR+0.8 处理组中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的浓度没有明显升高, 是因为菌株在前期并没有活性, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 并未被还原成 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, 而在后期, 亚硝酸盐被去除较快, 没有积累。

### 2.4 细胞形态变化

基于活性的变化, 推测不同浓度的 Zn(II)对细胞的形态及生长速度有影响。为了检验此推测, 设计了扫描电镜实验。在 Zn(II)浓度分别为 0、3.25、52.00 mg/L 的处理体系中培养 60 h 后, 对菌体细胞的形态进行扫描电镜观察, 如图 5 所示。可以看出, 对照组与 JR+0.05 处理组的细胞形态没有区别, 菌体完整, 细胞表面光滑, 无破损; JR+0.8 处理组的菌体明显变小, 但细胞表面没有损伤, 依然光滑完整, 这说明虽然 52.00 mg/L Zn(II)对细菌有一定的抑制作用, 但只是抑制了细胞的生长, 并未对细

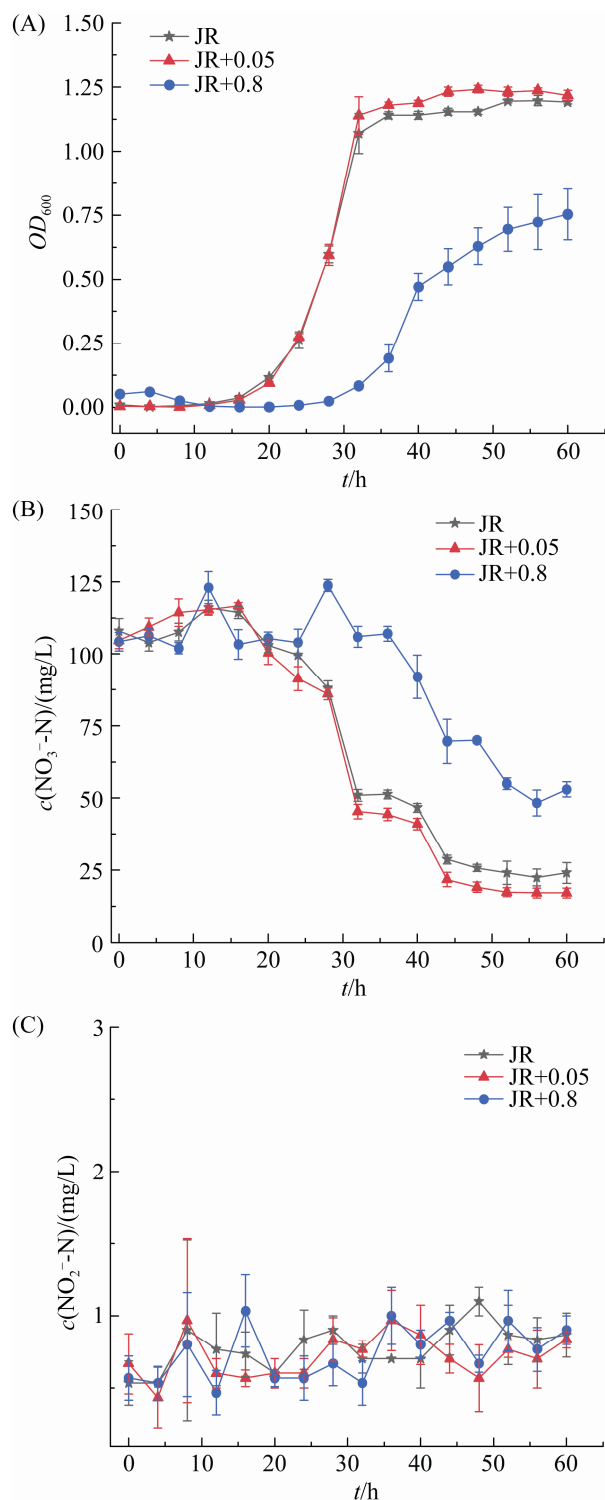


图 4 Zn(II)对好氧反硝化过程中  $OD_{600}$  (A)、 $NO_3^-$ -N (B)和  $NO_2^-$ -N (C)的影响

Figure 4 Effect of Zn(II) on  $OD_{600}$  (A),  $NO_3^-$ -N (B) and  $NO_2^-$ -N (C) in aerobic denitrification.

胞膜等结构造成严重的损伤,同时也说明,52.00 mg/L的Zn(II)浓度对于细胞的生长繁殖速率产生了明显的抑制,导致细胞去除 $NO_3^-$ -N活性受到了抑制,最终表现为 $NO_3^-$ -N去除量减少、繁殖速率降低,细胞最终浓度降低。且这一影响在细胞生长的中后期更加显著。

## 2.5 酶活实验

从图6A可以看出,对照组中,NR(硝酸还原酶)在20 h时开始表达,28 h达到最高表达量,为 $0.658 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ,NR活性的升高导致了 $NO_3^-$ -N浓度在28–32 h内的急剧降低,与此同时,菌株的吸光度也在此时间段内急速上升,在32 h时,吸光度达到最高;JR+0.05处理组中,NR(硝酸还原酶)的活性并没有受到Zn(II)的抑制,也在20 h时开始表达,并且在28 h表达量最高,为 $0.695 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ,略高于对照组,与之对应的,在 $NO_3^-$ -N去除过程中,JR+0.05处理组的 $OD_{600}$ 和去除效率也略高于对照组;在JR+0.8处理组中,52.00 mg/L Zn(II)明显抑制了NR(硝酸还原酶)的活性,NR在28 h时才开始表达,时间上有延迟,并且最高表达量也仅有 $0.408 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ,这与菌株对 $NO_3^-$ -N的去除规律相符合,在JR+0.8处理组中, $NO_3^-$ -N浓度在32 h才开始降低,并且去除率最高仅有53%。

如图6B所示,NiR(亚硝酸还原酶)在前28 h基本没有活性,从32 h开始表达活性,但其活性很高,对照组中NiR的活性最高可达 $18.800 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ,而JR+0.05处理组中亚硝酸盐还原酶的活性最高可达 $21.500 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ,酶活远高于NR,这也解释了为何在好氧反硝化过程中,并没有明显的硝酸盐积累,因为产生的亚硝酸盐很快被NiR还原。JR+0.8处理组中,NiR在36 h时活性达到最高,为 $22.500 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ ,但在后续反应中,其活性一直低于对照组及JR+0.05处理组,说明52.00 mg/L Zn(II)对菌株

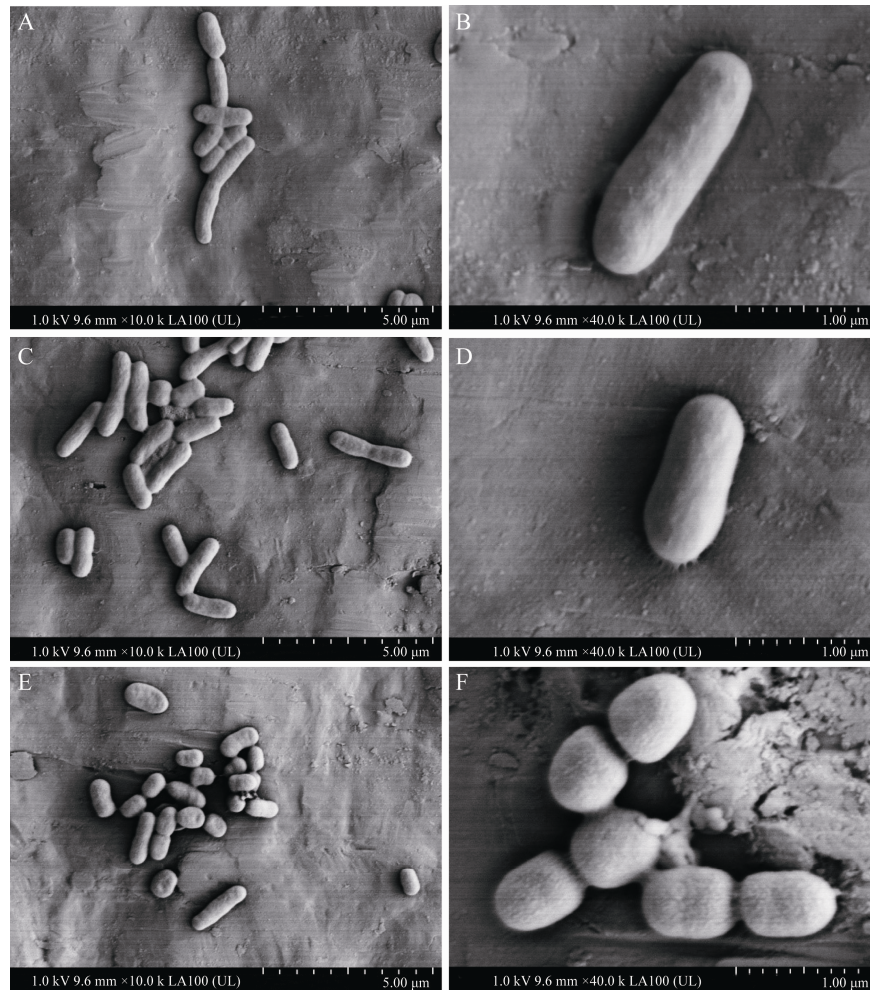


图 5 扫描电镜结果图

Figure 5 SEM images. A, B: control treatment; C, D: JR+0.05 treatment; E, F: JR+0.8 treatment.

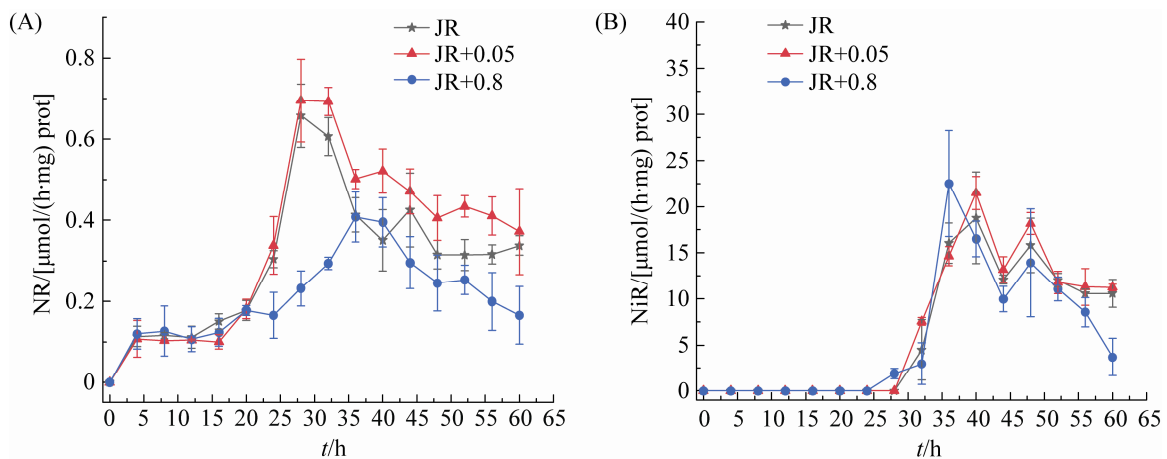


图 6 Zn(II)对好氧反硝化过程中 NR (A)和 NiR (B)的影响

Figure 6 Effect of Zn(II) on NR (A) and NiR (B) during aerobic denitrification.

还是有一定的抑制作用,但抑制作用并没有 NR 明显。

## 2.6 好氧反硝化基因 *napA* 和 *nirS* 表达量分析

由图 7A 可以看出,在 24 h 和 32 h 时,对照组和 JR+0.05 处理组的 *napA* 相对表达量均较高,这与 NR 在 24 h 开始具有活性,并在 28 h 活性最高的实验结果相符合。24 h 时 JR+0.05 处理组的 *napA* 表达量高于对照组,是对照组的 1.5 倍,说明微量的 Zn(II)上调了 *napA* 基因的表达量,从而使 JR+0.05 处理组的好氧反硝化效率高于对照组。并且这 2 组实验的 *napA* 相对表达量远高于 JR+0.8 处理组,对照组和 JR+0.05 处理组的 *napA* 表达量是 JR+0.8 处理组的 300 倍和 516 倍。在 32 h 时,对照组 JR 和 JR+0.05 处理组的 *napA* 表达量均下降,仍显著高于 JR+0.8 处理组。这说明较高浓度的 Zn(II)抑制了 *napA* 基因的表达,也解释了为何在前 32 h 内 JR+0.8 处理组的 NR 没有活性并且  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率基本为 0。从 40 h 开始,对照组和 JR+0.05 处理组的 *napA* 表达量基本为 0,而 JR+0.8 处理组的 *napA* 基因开始表达,但表达量非常低,在 48 h 和 56 h 时, JR+0.8 处理组的 *napA* 基因在持续表达,表达量均低于 24 h 的对照组和 JR+0.05 处理组。这说明较高浓度的 Zn(II)能够抑制 *napA* 基因的表达,使基因表达产生滞后,并且降低了基因的相对表达量。这也解释了为何在 60 h 时 JR+0.8 处理组的  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率仅为对照组的 63%。该结果与之前, JR+0.8 处理组的硝酸盐还原酶 NR 的活性在 36 h 达到最高值,  $\text{NO}_3^-$ -N 在 40 h 开始降解的结果都相匹配。

图 7B 是亚硝酸盐还原酶基因 *nirS* 的相对表达情况,从图中可以看出, *nirS* 的相对表达情况与 *napA* 相似,在 24 h 和 32 h 时,对照组

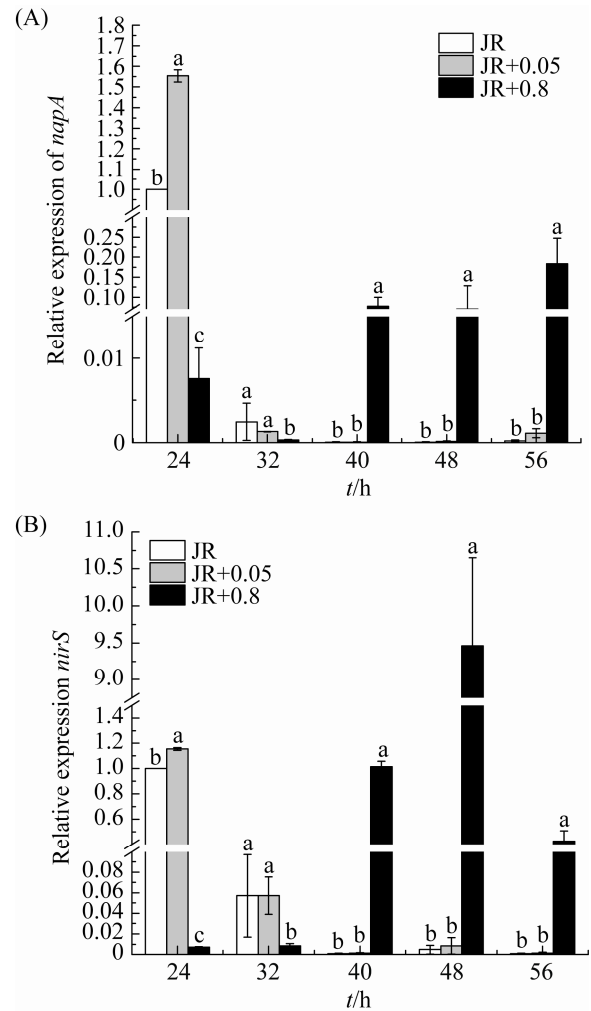


图 7 Zn(II)对好氧反硝化过程中关键基因 *napA* (A)和 *nirS* (B)的影响

Figure 7 Effects of Zn(II) on genes *napA* (A) and *nirS* (B) during aerobic denitrification. The lowercase letter means the difference is significant at the levels of 0.05.

与 JR+0.05 处理组的基因均在表达,而 JR+0.8 处理组基本没有表达。并且, JR+0.05 处理组基因表达水平在整个过程中均高于对照组,进一步说明低浓度的 Zn(II)可以略微上调基因的表达量。JR+0.8 处理组的 *nirS* 基因在 32–40 h 之间开始表达,48 h 时表达量为最高。高浓度的 Zn(II)虽然能使 *nirS* 基因表达产生滞后,但并未

抑制其相对表达量, *nirS* 基因在 3 个处理组中均能正常进行表达, 说明 Zn(II)对 *napA* 基因的抑制作用要强于 *nirS* 基因。这也可以很好地解释为何在对照组和实验组中, 均没有大量的  $\text{NO}_2^-$ -N 积累。

### 3 讨论

本研究从焦化厂污泥中成功筛到一株具有好氧反硝化功能的菌株 JR-142, 经鉴定为不动杆菌, 首次从生理代谢层面探究了 Zn(II)对其好氧反硝化过程的影响。

通过单因素试验确定了菌株的最佳生长条件。葡萄糖是使用最广泛的速效碳源, 而糖蜜是一种廉价的碳源, 可以大量应用于工业中, 乙酸钠和琥珀酸钠则是小分子碳源, 易被利用<sup>[24]</sup>。实验结果显示, 菌株可以有效利用琥珀酸钠作为碳源, 这与 Zhang 等<sup>[25]</sup>、Yu 等<sup>[26]</sup>的研究结果都相似。不同碳源的脱氮效率与其氧化还原电位、分子结构和菌株自身的偏好也有关<sup>[22,26]</sup>, 琥珀酸钠是氧化性最高的碳源, 又是结构简单的小分子碳源, 所以更易被利用。C/N 对菌体生长和反硝化作用都有很重要的作用, 如果无法提供足够的碳源, 菌株就无法获得足够的能源生长, 导致其反硝化速率降低, 但当所提供的碳源远高于菌体的需求时, 过量的碳源并不会为菌株的生长带来额外的益处, 反而会增高水中的 COD<sup>[24]</sup>。菌株 JR-142 最佳的 C/N 为 6, 低于大多数好氧反硝化菌所需的最佳 C/N, 这为其在以后的应用提供了优势。许多好氧反硝化菌所需的最佳 C/N 均高于 10<sup>[20,24]</sup>, *Klebsiella* sp. TN-10<sup>[27]</sup>在 C/N 小于 6 时, 去除率及  $OD_{600}$  均很低, C/N 为 14 时, 才达到菌株的最佳 C/N。pH 对好氧反硝化过程的影响也很大, 该菌株对碱的耐受性较高, 这与其他实验结果一致, Zhang

等<sup>[25]</sup>、Rout 等<sup>[3]</sup>均发现, 好氧反硝化菌在中性和弱碱性条件下的生长比酸性条件下更好。值得注意的是当培养基为弱酸性时, 菌株对硝酸盐的去除效率明显下降, 但对亚硝酸盐的去除效率并未有太大改变, 说明氮源不同可能会导致菌株对环境 pH 的耐受度不一样。不同的温度和转速, 均会导致菌株的生长情况及反硝化效率不同。实验发现, JR-142 的最适温度与大部分好氧反硝化菌 *Pseudomonas putida* ZN1<sup>[28]</sup>、*Pseudomonas putida* NP5<sup>[29]</sup>的最适温度相同, 为 30 °C。其耐受温度范围为 25–35 °C, 囊括了大部分高氮废水的温度范围, 但在 40 °C 时, 菌株的各项活性都受到了严重的抑制, 这是因为过高的温度抑制了关键酶的活性以及细胞代谢。由这些实验结果也可以看出, 菌株 JR-142 可以适应大部分的环境, 包括不同的 pH、溶氧、温度、C/N 等。

探究了 Zn(II)浓度对菌株好氧反硝化的影响, 发现 3.25 mg/L 的 Zn(II)可以促进  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除, 当 Zn(II)浓度为 52 mg/L 时, 菌株虽然受到了抑制, 但仍具有好氧反硝化活性, 可以去除体系中 53%的  $\text{NO}_3^-$ -N, 表现出了较好的耐受性。*Pseudomonas stutzeri* PCN-1<sup>[12]</sup>当 Zn(II)浓度高于 25.0 mg/L 时, 菌株的好氧反硝化过程就受到了抑制; *Aeromonas* sp. HN-02<sup>[30]</sup>可以耐受 8 mg/L 的 Zn(II)。养殖废水等含有 Zn(II)的高氮废水中, Zn(II)浓度一般为 1.5–30 mg/L<sup>[10]</sup>, 远低于 52 mg/L, 说明 JR-142 可以耐受大部分含氮废水中的 Zn(II)。

通过探究 Zn(II)对 NR 和 NiR 活性的影响, 发现其结果与 Zn(II)对菌株生长及反硝化效率的影响结果相匹配。Lu 等在研究 *Paracoccus* sp. YF1<sup>[2]</sup>时, 同时研究了 Cu(II)对好氧反硝化速率的影响和对其好氧反硝化关键酶活性的影响,

发现  $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NO}_2^-$ -N 的减少与 NR 和 NiR 的表达量呈正相关, 随着 Cu(II)浓度的逐渐增加, NR 和 NiR 的活性逐渐降低, 反硝化速率也逐渐降低。这些都说明重金属离子能通过影响关键酶的活性来影响好氧反硝化的效率。

之前有研究表明, 重金属对好氧反硝化过程的影响与基因表达的程度密切相关, 好氧反硝化基因 *napA* 和 *nirS* 随着 Zn(II)浓度的增加, 有不同程度的抑制<sup>[12]</sup>。Zn(II)是氮循环过程中许多酶类(氨单加氧酶、一氧化二氮还原酶和亚硝酸盐还原酶)的重要辅因子<sup>[31]</sup>, 金属离子可以从代谢位点取代必需金属, 从而影响相关酶的活性或功能<sup>[13]</sup>, 进一步影响好氧反硝化的过程。所以, 本实验采用 qPCR 技术, 测量了硝酸盐和亚硝酸盐还原酶的表达基因 *napA* 及 *nirS* 的相对表达量, 发现相关基因的表达结果与酶活测定的结果相吻合, Zn(II)可以通过影响关键基因的表达来影响其编码酶的活性, 进而影响菌株的生长及反硝化速率。高浓度(52 mg/L)的 Zn(II)会抑制基因的表达, 导致表达的延迟和表达量的下降, 进而影响相关酶的活性。而 JR+0.05 处理组中, *napA* 及 *nirS* 的相对表达量又略高于对照组, 因为 Zn(II)是相关酶的关键活性位点, 所以微量的 Zn(II)可能会上调基因的表达量<sup>[13]</sup>。

## 4 结论

本文研究筛选到一株好氧反硝化菌 *Acinetobacter* sp. JR-142, 探究了 Zn(II)浓度对其生长情况和反硝化过程代谢活性的影响。采用单因素试验法优化了其最佳生长条件, 发现当以丁二酸钠为碳源、C/N 为 6、pH 为 7.0、温度为 30 °C、转速为 180 r/min 时, 好氧反硝化活性最高。通过研究 Zn(II)浓度对菌株好氧反

硝化的影响, 发现 3.25 mg/L 的 Zn(II)可以促进  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除, 而 52 mg/L 的 Zn(II)则对菌株的活性有抑制作用。分析了反应过程中关键酶(NR 和 NiR)的活性, 以及关键酶的编码基因 *napA* 和 *nirS* 的相对表达量, 探究了 Zn(II)对菌株好氧反硝化的生理代谢层面的影响, 为更深入了解重金属影响好氧反硝化过程的作用机制和  $\text{NO}_3^-$ -N 废水-重金属复合污染的生物处理技术进步提供了科学依据。

## 参考文献

- [1] Cheng YF, Li GF, Liu YY, Zhu BQ, Zhang Q, Xue Y, Zhang ZZ, Jin RC. Evaluating the effects of Zn(II) on high-rate biogranule-based denitrification: performance, microbial community and sludge characteristics. *Bioresource Technology*, 2019, 279: 393–397.
- [2] Lu ZY, Gan L, Lin JJ, Chen ZL. Aerobic denitrification by *Paracoccus* sp. YF<sub>1</sub> in the presence of Cu(II). *Science of the Total Environment*, 2019, 658: 80–86.
- [3] Rout PR, Bhunia P, Dash RR. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereus* GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal. *Bioresource Technology*, 2017, 244: 484–495.
- [4] Cai X, Li KL, He TX, Wang YX, Zhang X, Xie EY, Ding NN, Li ZL. Characteristics of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Arthrobacter nicotianae* D51 strain in the presence of copper. *Water*, 2019, 11(3): 434.
- [5] Li HY, Yao H, Zhang DY, Zuo LS, Ren J, Ma JY, Pei J, Xu YR, Yang CY. Short- and long-term effects of manganese, zinc and copper ions on nitrogen removal in nitrification-anammox process. *Chemosphere*, 2018, 193: 479–488.
- [6] Gui MY, Chen Q, Ma T, Zheng MS, Ni JR. Effects of heavy metals on aerobic denitrification by strain *Pseudomonas stutzeri* PCN-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(4): 1717–1727.
- [7] 唐家全, 郝大志, 李婷婷, 张慧, 陈捷. 棘孢木霉菌对钠胁迫的生理响应机制. *微生物学通报*, 2021, 48(1): 23–34.

- Tang JQ, Hao DZ, Li TT, Zhang H, Chen J. Physiological response of *Trichoderma asperellum* to Na<sup>+</sup> stress. *Microbiology China*, 2021, 48(1): 23–34. (in Chinese)
- [8] Gaur N, Flora G, Yadav M, Tiwari A. A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environmental Science Processes & Impacts*, 2014, 16(2): 180–193.
- [9] Zhang XJ, Chen Z, Ma YP, Zhou Y, Zhao SY, Wang LN, Zhai HF. Influence of elevated Zn(II) on anammox system: microbial variation and zinc tolerance. *Bioresource Technology*, 2018, 251: 108–113.
- [10] Xu LZJ, Shi ZJ, Guo Q, Bai YH, Shen YY, Jin LY, Zhao YH, Zhang JT, Jin RC. Performance and microbial community responses of the partial nitrification process to tetracycline and Zn(II). *Separation and Purification Technology*, 2019, 229: 115810.
- [11] Li GB, Puyol D, Carvajal-Arroyo JM, Sierra-Alvarez R, Field JA. Inhibition of anaerobic ammonium oxidation by heavy metals. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2015, 90(5): 830–837.
- [12] Gui MY, Chen Q, Ma T, Zheng MS, Ni JR. Effects of heavy metals on aerobic denitrification by strain *Pseudomonas stutzeri* PCN-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(4): 1717–1727.
- [13] Kapoor V, Li X, Elk M, Chandran K, Impellitteri CA, Santo Domingo JW. Impact of heavy metals on transcriptional and physiological activity of nitrifying bacteria. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(22): 13454–13462.
- [14] Ji B, Yang K, Zhu L, Jiang Y, Wang HY, Zhou J, Zhang HN. Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 20(4): 643–651.
- [15] Li YX, Ling JY, Chen PC, Chen JL, Dai RZ, Liao JS, Yu JJ, Xu YB. *Pseudomonas mendocina* LYX: a novel aerobic bacterium with advantage of removing nitrate high effectively by assimilation and dissimilation simultaneously. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2020, 15(4): 1–10.
- [16] Huang XF, Li WG, Zhang DY, Qin W. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification at low temperature. *Bioresource Technology*, 2013, 146: 44–50.
- [17] Liu YX, Hu TT, Song YJ, Chen HP, Lv Y. Heterotrophic nitrogen removal by *Acinetobacter* sp. Y1 isolated from coke plant wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 120(5): 549–554.
- [18] 温海婷, 陈彦霖, 张俊亚, 郁达伟, 柳蒙蒙, 柴玉峰, 魏源送, 陈梅雪. 中长链脂肪酸为碳源的 *Pseudomonas veronii* 和 *Pseudomonas alcaliphila* 反硝化途径亚硝酸盐累积特性. *环境科学学报*, 2019, 39(6): 1723–1730.
- Wen HT, Chen YL, Zhang JY, Yu DW, Liu MM, Chai YF, Wei YS, Chen MX. Nitrite accumulation properties of denitrification in *Pseudomonas veronii* and *Pseudomonas alcaliphila* with fatty acids. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, 39(6): 1723–1730. (in Chinese)
- [19] Yang XP, Wang SM, Zhang DW, Zhou LX. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 854–862.
- [20] 王宏伟, 张国珍, 武福平, 明驹, 闵芮, 严婉辑, 程锦. 改良多级 A/O 对低 C/N 生活污水强化除磷效果研究. *化工进展*, 2020, 39(S2): 379–384.
- Wang HW, Zhang GZ, Wu FP, Ming J, Min R, Yan WE, Cheng J. Study on enhanced phosphorus removal effect of improved multi-stage A/O on low C/N domestic sewage. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2020, 39(S2): 379–384. (in Chinese)
- [21] 荣懿, 刘小钗, 何音旋, 章武首, 金鹏康. A<sup>2</sup>/O 流量分配处理低 C/N 污水性能与微生物结构优化. *环境科学*, 2019, 40(9): 4113–4120.
- Rong Y, Liu XC, He YX, Zhang WS, Jin PK. Enhanced nutrient removal and microbial community structure in a step-feed A<sup>2</sup>/O process treating low-C/N municipal wastewater. *Environmental Science*, 2019, 40(9): 4113–4120. (in Chinese)
- [22] 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. *生物工程学报*, 2019, 35(6): 942–955.
- Yuan JH, Zhao TT, Peng XY. Advances in heterotrophic nitrification-aerobic denitrifying bacteria for nitrogen removal under extreme conditions. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(6): 942–955. (in Chinese)
- [23] Wan WJ, He DL, Xue ZJ. Removal of nitrogen and phosphorus by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a denitrifying phosphorus-accumulating bacterium *Enterobacter cloacae* HW-15. *Ecological*

- Engineering*, 2017, 99: 199–208.
- [24] 王弘宇, 马放, 苏俊峰, 左薇, 张献旭, 张佳. 不同碳源和碳氮比对一株好氧反硝化细菌脱氮性能的影响. *环境科学学报*, 2007, 27(6): 968–972.  
Wang HY, Ma F, Su JF, Zuo W, Zhang XX, Zhang J. Influence of carbon source and C/N ratio on nitrogen removal of aerobic denitrifier. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(6): 968–972. (in Chinese)
- [25] Zhang X, Yan JW, Luo XT, Zhu YF, Xia L, Luo LX. Simultaneous ammonia and Cr(VI) removal by *Pseudomonas aeruginosa* LX in wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 157: 107551.
- [26] Yu X, Jiang YM, Huang HY, Shi JJ, Wu KJ, Zhang PY, Lv J, Li HL, He H, Liu P, Li XK. Simultaneous aerobic denitrification and Cr(VI) reduction by *Pseudomonas brassicacearum* LZ-4 in wastewater. *Bioresource Technology*, 2016, 221: 121–129.
- [27] Yang XP, Wang SM, Zhang DW, Zhou LX. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 854–862.
- [28] Zhang N, Chen H, Lyu YK, Wang Y. Nitrogen removal by a metal-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* ZN1, capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2019, 94(4): 1165–1175.
- [29] 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 NP<sub>5</sub>. *Bioresource Technology*, 2019, 285: 121360.
- [30] Chen MX, Wang WC, Feng Y, Zhu XH, Zhou HZ, Tan ZL, Li XD. Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02. *Bioresource Technology*, 2014, 167: 456–461.
- [31] Cheng YF, Li GF, Liu YY, Zhu BQ, Zhang Q, Xue Y, Zhang ZZ, Jin RC. Evaluating the effects of Zn(II) on high-rate biogranule-based denitrification: performance, microbial community and sludge characteristics. *Bioresource Technology*, 2019, 279: 393–397.

(本文责编 李磊)