



## 耐低温好氧反硝化菌 *Aeromonas* sp. 的分离鉴定及脱氮条件优化

董怡华<sup>1,2</sup>, 张雪莹<sup>2</sup>, 邹立安<sup>3</sup>, 王子洋<sup>2</sup>, 陈锋<sup>2</sup>, 李亮<sup>4\*</sup>

1 沈阳大学区域污染环境生态修复教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110044

2 沈阳大学环境学院, 辽宁 沈阳 110044

3 华东理工大学资源与环境工程学院, 上海 200237

4 东北大学资源与土木工程学院, 辽宁 沈阳 110004

董怡华, 张雪莹, 邹立安, 王子洋, 陈锋, 李亮. 耐低温好氧反硝化菌 *Aeromonas* sp. 的分离鉴定及脱氮条件优化. 微生物学报, 2022, 62(6): 2038–2052.

Dong Yihua, Zhang Xueying, Zou Li'an, Wang Ziyang, Chen Feng, Li Liang. Isolation and identification of a cold-tolerant and aerobic denitrifying bacterium *Aeromonas* sp. and optimization of denitrification conditions. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(6): 2038–2052.

**摘要:**【目的】从冬季活性污泥和河水底泥中分离筛选得到耐低温好氧反硝化菌, 并对影响脱氮的关键因子进行优化, 以提高低温条件下的脱氮效果。【方法】采用富集纯化法分离筛选耐低温好氧反硝化菌株。通过形态观察和 16S rRNA 基因系统发育分析等方法对筛选菌株进行菌种鉴定。以  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率为响应目标, 采用 Box-Behnken 试验设计及响应面回归分析法优化影响脱氮效果的关键因子(C/N、温度、pH 和摇床转速), 确定最佳培养条件。【结果】从东北寒冷地区冬季河水底泥样品中分离得到的一株耐低温好氧反硝化菌 Z6, 菌落呈白色半透明圆形, 菌体细胞为短杆状, 大小为  $(0.8\text{--}1.6)\ \mu\text{m} \times (0.6\text{--}0.8)\ \mu\text{m}$ , 革兰氏染色阴性。与气单胞菌属(*Aeromonas*) 的 16S rRNA 基因序列高度同源, 鉴定该菌为气单胞菌。采用响应面分析方法得到菌株 *Aeromonas* sp. Z6 的最佳脱氮条件为: C/N 5.9, 温度  $12\ ^\circ\text{C}$ , pH 6.8, 摇床转速 155 r/min, 在此条件下对  $\text{NO}_3^-$ -N

**基金项目:** 沈阳市科技计划(21-108-9-25); “十三五”国家水体污染控制与治理科技重大专项(2018ZX07601-002); 辽宁省博士启动基金(2019-BS-087)

Supported by the Shenyang Science and Technology Plan Fund Project (21-108-9-25), by the China Major Science and Technology Program for Water Pollution Control and Treatment (2018ZX07601-002) and by the Liaoning Doctoral Research Start-up Fund (2019-BS-087)

\*Corresponding author. E-mail: harvesttime@163.com

Received: 11 March 2022; Revised: 14 April 2022; Published online: 5 May 2022

的去除率为 89.72%，与预测值(90.34%)无显著差别。【结论】首次报道气单胞菌(*Aeromonas* sp.) 在低温条件下具有高效反硝化脱氮性能，为寒冷地区低温废水的生物脱氮提供思路、借鉴和菌种资源。

**关键词：**产气单胞菌；好氧反硝化；耐低温菌；响应面法；生物脱氮

## Isolation and identification of a cold-tolerant and aerobic denitrifying bacterium *Aeromonas* sp. and optimization of denitrification conditions

DONG Yihua<sup>1,2</sup>, ZHANG Xueying<sup>2</sup>, ZOU Li'an<sup>3</sup>, WANG Ziyang<sup>2</sup>, CHEN Feng<sup>2</sup>,  
LI Liang<sup>4\*</sup>

1 Key Laboratory of Eco-Restoration of Regional Contaminated Environment, Ministry of Education, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

2 College of Environment, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

3 School of Resources and Environment Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

4 School of Resources and Civil Engineering, Northeastern University, Shenyang 110004, Liaoning, China

**Abstract: [Objective]** To isolate and screen out the cold-tolerant and aerobic denitrifying bacteria from activated sludge and river sediment in winter, and optimize the key factors that influence denitrification, so as to improve the effect of denitrification at low temperature. **[Methods]** Cold-tolerant and aerobic denitrifying bacteria were isolated and screened out by enrichment and purification method. Morphological observation and 16S rRNA gene sequence phylogenetic analyses were used to identify the species of the newly isolated strain. Taking the removal rate of  $\text{NO}_3^-$ -N as the response target, the key factors affecting denitrification, including carbon-nitrogen ratio, temperature, pH and shaking speed, were optimized by Box-Behnken design and response surface regression analysis to determine the optimal culture conditions. **[Results]** A cold-tolerant and aerobic denitrifying bacterium Z6 was obtained from the river sediment in the cold area of northeast China in winter. The round colony of the strain was white and translucent, and the cell was short rod-shaped, with the size of  $(0.8\text{--}1.6)\ \mu\text{m}\times(0.6\text{--}0.8)\ \mu\text{m}$ . Gram staining was negative. The strain Z6 was identified as *Aeromonas* sp. due to the high homology with the 16S rRNA gene sequences of the genus *Aeromonas* sp.. Based on the response surface analysis, the optimal denitrification conditions of *Aeromonas* sp. Z6 were 5.9 of carbon-nitrogen ratio at pH 6.8 and 12 °C with 155 r/min shaking table speed. Under the optimum conditions, the removal rate of  $\text{NO}_3^-$ -N was 89.72%, which was not significantly different from the predicted rate (90.34%). **[Conclusion]** *Aeromonas* sp. had high denitrification performance under low-temperature conditions, which provided references for biological denitrification of low-temperature wastewater in cold areas.

**Keywords:** *Aeromonas* sp.; aerobic denitrification; cold-tolerant bacteria; response surface analysis; biological denitrification

随着社会经济的快速发展、农业技术的不断进步和城镇化水平的大幅度提高,工业、农业和生活污水中氮含量急剧增加,大量含氮废水排入水体后极易造成水体污染负荷过量,引起水体富营养化,进而对生态环境以及人体健康造成严重威胁<sup>[1]</sup>。因此,高效去除水中氮已经成为水污染治理领域的研究热点。常见的水中除氮方法主要有物理法(吸附<sup>[2]</sup>、电渗析<sup>[3]</sup>)、化学法(絮凝沉淀<sup>[4]</sup>、离子交换<sup>[5]</sup>)和生物法(微生物法<sup>[6]</sup>、植物修复<sup>[7]</sup>)等。其中,微生物脱氮技术因具有高效、经济、无二次污染等优点而被认为是治理水体中氮污染最有效的途径之一<sup>[8]</sup>。传统的微生物脱氮须在硝化和反硝化的共同作用下实现,其中硝化作用是在好氧条件下将氨氮转变为硝态氮<sup>[9]</sup>,反硝化作用则是在厌氧或兼性厌氧条件下将硝态氮转化为氮气<sup>[10]</sup>,这会导致硝化、反硝化过程无法同步实现,从而影响了污水的脱氮效率。

好氧反硝化作用是指在好氧条件下,微生物经过一系列细胞内酶催化的还原作用,逐步将硝酸盐氮转化为 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2$ 的过程<sup>[11]</sup>。1984年,Robertson和Kuenen<sup>[12]</sup>首次从废水中分离出了一株具有好氧反硝化作用的副球菌(*Paracoccus* sp.),该菌的发现打破了反硝化作用只能在缺氧或厌氧条件下进行的传统观点,为实现同步硝化反硝化工艺奠定了重要的微生物学基础。此后,研究者们开展了大量好氧反硝化菌的分离筛选鉴定工作,例如产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)<sup>[13]</sup>、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)<sup>[14]</sup>、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)<sup>[15]</sup>和芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)<sup>[16]</sup>等,并在处理生活污水<sup>[17]</sup>、工业废水<sup>[18]</sup>、城市黑臭水体<sup>[19]</sup>等方面得到了广泛的应用。然而,在我国北方寒冷地区,冬季水体温度可降至 $6\text{--}15\text{ }^\circ\text{C}$ ,甚至低于 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 。大部分好氧反硝化菌属于中温菌,最

适生长温度为 $20\text{--}37\text{ }^\circ\text{C}$ ,一般在 $25\text{--}30\text{ }^\circ\text{C}$ 下脱氮效果良好<sup>[20]</sup>。 $15\text{ }^\circ\text{C}$ 以下的低温环境会显著抑制好氧反硝化菌的生长速率和自身酶的代谢活性,严重阻碍了功能菌的脱氮作用,从而导致对废水的脱氮效果不佳<sup>[21]</sup>。耐低温菌因其独特的生理功能得以适应低温环境,在实际推广应用中具有显著的经济效应和环境效益<sup>[22]</sup>。国内外大多数文献报道的耐低温菌主要集中在针对低浓度含氮废水进行好氧反硝化脱氮的研究<sup>[23–24]</sup>,而对于高氮废水处理的研究鲜有报道。因此,从低温自然环境中分离、筛选出能够高效处理高氮废水的耐低温好氧反硝化菌是提高寒冷地区低温季节氮污染废水治理效果的重要途径。

本研究从寒冷地区冬季河水底泥中分离、筛选得到一株耐低温好氧反硝化菌,对该菌株进行16S rRNA基因序列分析和系统发育树分类鉴定,并研究了其生长特性及最佳碳源。在此基础上,利用响应面法对影响脱氮效果的关键因子C/N、温度、pH和摇床转速进行优化试验,从而确定菌株的最佳脱氮条件。本研究的开展为我国北方寒冷地区低温废水的生物脱氮提供理论依据和菌种资源,为高氮废水的高效生物脱氮提供思路、借鉴和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 样品来源

2021年1月采集辽宁省沈阳市某污水处理厂二沉池的活性污泥、河水及底泥,采集的样品保存于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中。

#### 1.1.2 培养基

(1) 牛肉膏蛋白胨培养基(g/L)<sup>[25]</sup>: 牛肉膏3.0, 蛋白胨10.0, NaCl 5.0, pH 7.0–7.2。该培养基用于细菌菌落的形态观察和保存。(2) 富

集培养基(g/L)<sup>[26]</sup>:  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.5,  $\text{NaNO}_3$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.8,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4,  $\text{NaCl}$  0.4,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.04,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.03, pH 7.0–7.2。该培养基用于好氧反硝化菌的富集培养。

(3) 参照曾庆梅等<sup>[27]</sup>并有所改进的脱氮培养基(denitrification medium, DM):  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  5.0,  $\text{NaNO}_3$  1.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{NaCl}$  0.5, pH 7.0–7.2, 微量元素溶液 1 mL。其中, 微量元素溶液组成(g/L):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1.5,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.06,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.8,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{KI}$  0.18。该培养基用于好氧反硝化菌的筛选及脱氮条件优化研究。

上述各种培养基中加入 3%琼脂即得对应的固体培养基, 均在接种前于 121 °C、 $1.0 \times 10^5$  Pa 条件下灭菌 20 min。

### 1.1.3 主要仪器与试剂

Motic Type102M 电子显微镜(徕卡仪器有限公司), Apreo 2 扫描电子显微镜(Thermo Scientific 公司), TS-80C 恒温摇床(上海天呈仪器有限公司), DR6000 紫外-可见分光光度计(HACH 公司), 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 SK8255 [生工生物工程(上海)股份有限公司], 试验所涉及化学药品纯度>99%, 均购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 耐低温好氧反硝化菌的分离与纯化

取 150 mL 活性污泥或 150 mL 河水与 5 g 底泥的混合物置于灭菌后的 250 mL 锥形瓶中, 放入数粒无菌玻璃珠, 于 10 °C、140 r/min 的恒温摇床中振荡培养 3 h, 使活性污泥或河水底泥混合物充分悬浮分散后, 取 10 mL 污泥或底泥样品接入 100 mL 富集培养基中, 于 10 °C、140 r/min 振荡培养 3 d, 使微生物快速生长, 达到富集的作用。相同步骤连续富集培养 3 次后, 取培养液 1 mL, 用无菌水按照  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、

$10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  的浓度梯度进行稀释, 取  $10^{-3}$ – $10^{-6}$  的菌液分别均匀涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 并于 10 °C 恒温培养箱中倒置培养 7 d, 定期观察菌体的生长情况和菌落的形态变化。挑取形态差异明显的单菌落进一步划线分离培养, 反复数次划线培养直到在光学显微镜下观察确定为纯菌后, 于 4 °C 的冰箱中保存备用。

### 1.3 耐低温好氧反硝化菌的筛选

用接种环挑取分离纯化后的各单菌落以相同接种量( $1 \times 10^6$  CFU/mL)分别接种于 100 mL DM 液体培养基中, 于 10 °C、140 r/min 振荡培养 5 d, 每隔 12 h 取样, 将培养液于 10 °C、6 000 r/min 离心 5 min 后测定上清液  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 和 TN 的质量浓度, 设置 3 组平行试验, 并计算  $\text{NO}_3^-$ -N 和 TN 的平均去除率, 从中筛选出脱氮效果最高且  $\text{NO}_2^-$ -N 残留量最少的菌株开展进一步的研究试验。

### 1.4 菌株的细胞形态观察

采用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察菌株的细胞形态, 并进行革兰氏染色。SEM 观察的预处理过程: 取 2 mL 菌株培养液于 6 000 r/min 离心 5 min 后倒掉上清液。离心后的菌体中加入 2 mL 在 4 °C 下预冷的 2.5%戊二醛溶液固定 24 h, 利用 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液清洗 3 次后于 6 000 r/min 离心 5 min; 利用 30%、50%、70%、85%、95%的乙醇分别进行梯度脱水 1 次, 100%的乙醇脱水 2 次, 每次 15 min, 乙酸异戊酯置换 2 次, 每次 20 min; 然后真空冷冻干燥 2 h 后通过扫描电镜观察菌株的细胞形态。

### 1.5 菌种的鉴定

利用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 SK8255 提取待测菌株的基因组 DNA。采用细菌鉴定通用引物 27F (5'-AGTTTGATCMTGG

CTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACG ACTT-3')对菌株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 混合物 2  $\mu\text{L}$ , 正向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )、反向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 0.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 循环 30 次; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 降温至 4  $^{\circ}\text{C}$  后终止反应。16S rRNA 基因测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 将测序结果通过 BLAST 软件与 GenBank 基因数据库中已有模式菌株的 16S rRNA 基因序列进行同源性比对, 选择序列相似度高的菌株, 利用 MEGA 6.0 软件和邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树。

### 1.6 生长曲线的测定

用接种环挑取 3 环筛选得到的好氧反硝化菌单菌落, 接种到 150 mL DM 液体培养基中, 于 10  $^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 振荡培养 36 h, 得到活化后的种子液。将种子液按 10%的接种量接种至 150 mL DM 液体培养基中, 于 10  $^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 条件下振荡培养 7 d, 每 12 h 取样在紫外-可见分光光度计中测定培养液的  $OD_{600}$ 。设置 3 组平行试验, 以培养时间为横坐标, 培养液的  $OD_{600}$  平均值为纵坐标绘制好氧反硝化菌株的生长曲线。

### 1.7 碳源影响

在 DM 培养基中采用葡萄糖、柠檬酸钠、乙酸钠、蔗糖分别作为碳源, 通过固定碳氮比(C/N) ( $W/W$ )为 5.6 和恒定硝态氮浓度( $\text{NO}_3^-$ -N, 247 mg/L)来确定每种碳源的添加量, 培养基其他成分含量保持不变。将活化后的种子液按照 10%的接种量接种至 100 mL 不同碳源的 DM 液体培养基中, 于 10  $^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 条件下振荡培养 60 h 后, 测定培养液的  $OD_{600}$ , 同时将培

养液于 10  $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 5 min 后测定上清液中  $\text{NO}_3^-$ -N 的质量浓度。每种碳源设置 3 组平行试验, 计算  $OD_{600}$  平均值和  $\text{NO}_3^-$ -N 的平均去除率。

### 1.8 脱氮条件的优化试验设计

以  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率为响应目标, 利用响应面法(response surface methodology, RSM)中的 Box-Behnken 试验设计对影响菌株脱氮效果的关键影响因子(C/N、温度、pH 和摇床转速)进行优化。设计四因素三水平优化试验, 如表 1 所示, 通过试验数据拟合响应面数学模型, 预测影响因子的最佳值, 并进行试验验证预测的准确性, 最终确定菌株脱氮的最佳工艺条件。固定 DM 培养基中  $\text{NaNO}_3$  浓度, 通过改变柠檬酸钠的质量浓度来改变 C/N。在各组试验中, 将活化后的种子液按照 10%的接种量接种至 100 mL DM 液体培养基中, 连续培养 60 h 后测定  $\text{NO}_3^-$ -N 的质量浓度, 设置 3 个平行试验, 计算  $\text{NO}_3^-$ -N 的平均去除率。数据分析采用 Design Expert 10.0.软件进行试验设计、计算和线性拟合等。

### 1.9 分析方法

(1)  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度采用紫外分光光度法测定<sup>[28]</sup>,  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法测定<sup>[28]</sup>。TN 浓度采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定<sup>[28]</sup>。

**表 1 Box-Behnken 试验设计的因素与水平表**  
Table 1 Factors and levels in Box-Behnken experimental design

Factors	Symbol	Coding levels		
		-1	0	1
C/N	A	4.5	5.5	6.5
Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	B	7	10	13
pH	C	6.0	7.0	8.0
Shaker speed/(r/min)	D	120	140	160

(2)  $\text{NO}_3^-$ -N 和 TN 的去除率按照公式(1)计算。

$$\text{去除率 } \eta \text{ (\%)} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

其中,  $C_0$  和  $C_t$  分别为  $\text{NO}_3^-$ -N 或 TN 的初始质量浓度和培养  $t$  时间后的质量浓度。

(3) 采用 Origin Pro 2021 软件(Origin Lab Corp)对数据作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 耐低温好氧反硝化菌的分离与筛选

活性污泥和河水底泥样品经过富集培养和多次划线分离后初步筛选出 7 株能够在低温( $10^\circ\text{C}$ )条件下生长,且菌落形态特征各异的菌株,分别命名为 Z1–Z7。培养 5 d 内的各菌株培养液中  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 和 TN 质量浓度以及  $\text{NO}_3^-$ -N 和 TN 去除率的变化趋势如图 1 所示。

由图 1A 和图 1B 可知, 7 株菌的培养液中  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 和 TN 质量浓度的整体变化趋势较为相似。 $\text{NO}_3^-$ -N 和 TN 的浓度随着培养时间的延长均呈现下降趋势,而在培养 12 h 以后的各菌株培养液中均检测出少量的  $\text{NO}_2^-$ -N,且随着培养时间的延长,  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度变化均呈现先增长后下降的趋势。说明  $\text{NO}_3^-$ -N 作为唯一氮源被各菌株利用的同时,产生了代谢中间产物  $\text{NO}_2^-$ -N,表明这 7 株菌对  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除有好氧反硝化作用的参与。随着菌株的生长,  $\text{NO}_2^-$ -N 也作为氮源被细菌所利用。这与郭超等<sup>[29]</sup>和 Sun 等<sup>[30]</sup>的研究结果一致。他们认为好氧反硝化菌可以在有氧环境下将硝态氮和亚硝态氮作为电子受体,直接将硝态氮转化为氮气,从而减少亚硝态氮的产生和积累。

由图 1C 可知, 各菌株对  $\text{NO}_3^-$ -N 和 TN 的

去除率差异较大,代谢中间产物  $\text{NO}_2^-$ -N 的积累浓度也有明显不同。培养 120 h 后, Z2 和 Z6 脱氮效果最好,对  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率分别为 91.0% 和 96.1%,对 TN 的去除率分别为 90.9%和 96.1%,此时 Z2 培养液中残留的  $\text{NO}_2^-$ -N 为 0.3 mg/L,而 Z6 培养液中未检出  $\text{NO}_2^-$ -N 残留,这可能是由于培养前期产生的微量  $\text{NO}_2^-$ -N 被菌株分泌的亚硝酸盐还原酶消耗殆尽,表明菌株 Z6 具有较强的反硝化能力。因此,通过本实验确定菌株 Z6 为后续实验的研究对象,该菌株是从冬季河水底泥样品中分离得到的。

### 2.2 菌株的鉴定

在牛肉膏蛋白胨固体培养基上于  $10^\circ\text{C}$  条件下培养得到菌株 Z6 的菌落呈白色半透明,边缘规则整齐呈圆形,直径约为 2–3 mm,表面光滑湿润且中间隆起(图 2A)。该菌株的革兰氏染色为阴性。扫描显微镜下观察菌体细胞呈短杆状,表面有少量分泌物,大小为  $(0.8\text{--}1.6) \mu\text{m} \times (0.6\text{--}0.8) \mu\text{m}$  (图 2B)。

菌株 Z6 基因组 DNA 经 PCR 扩增并测序获得 16S rRNA 基因序列长度为 1 431 bp,测序结果在 GenBank 中的登录号为 OM909164。将菌株 Z6 的序列与 NCBI-nucleotide 数据库中已有的基因序列进行 BLAST 同源性比对,结果表明该菌与气单胞菌(*Aeromonas* sp.)一致性达 99%以上。采用 MEGA 7.0 软件以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建菌株 Z6 的系统发育树(图3),结果表明该菌株与气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)的亲缘关系最为相近。因此,结合菌株的细胞形态学特征,初步鉴定该菌为气单胞菌(*Aeromonas* sp.),命名为 *Aeromonas* sp. Z6。目前国内对气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)在低温条件下作为好氧反硝化菌的研究尚未见报道。

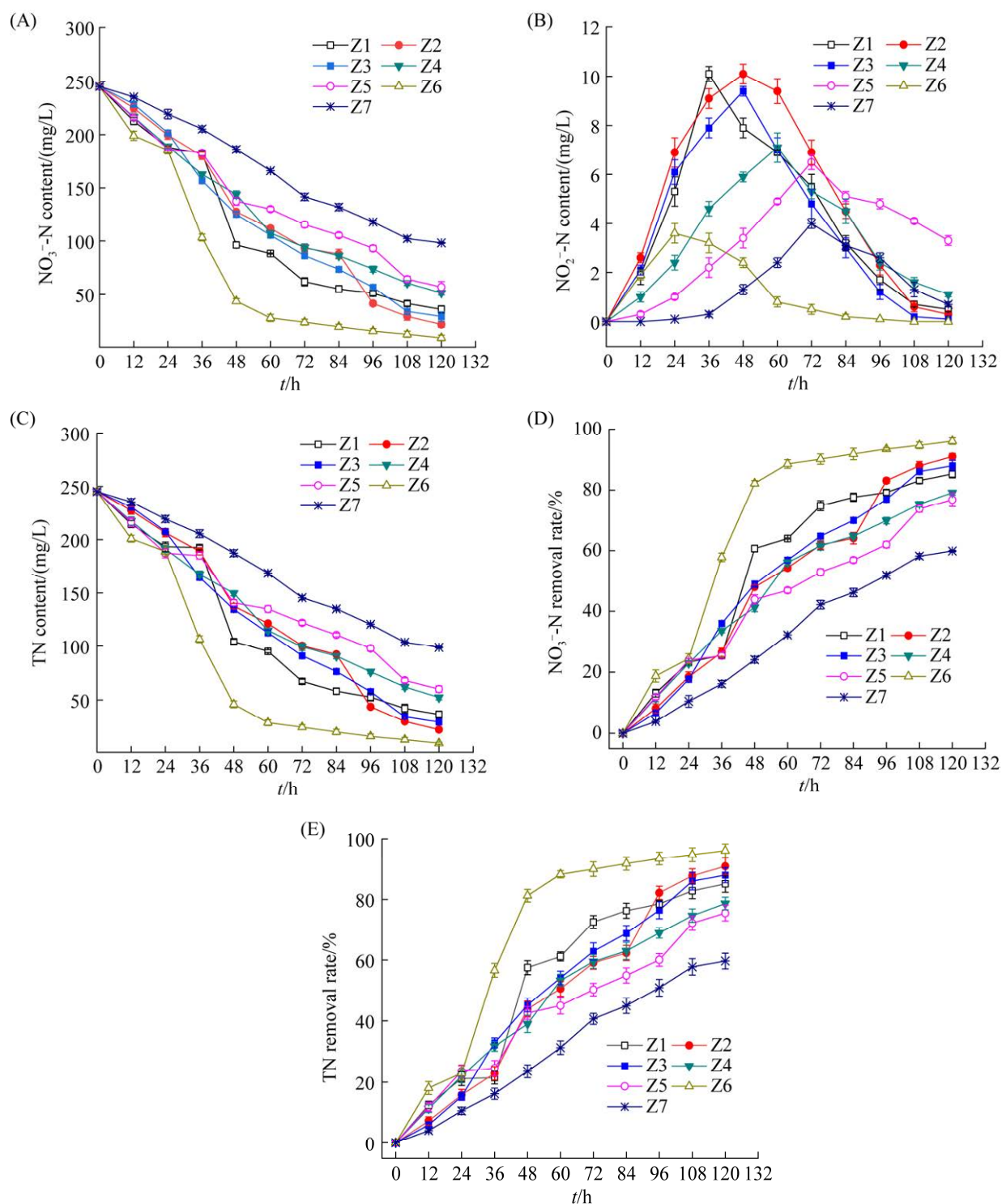


图1 各菌株培养过程中  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 和 TN 的浓度及  $\text{NO}_3^-$ -N、TN 的去除率变化

Figure 1 Changes in the N content and the N removal rate during the culture of each strain. A: change of  $\text{NO}_3^-$ -N content; B: change of  $\text{NO}_2^-$ -N content; C: change of TN content; D: change of  $\text{NO}_3^-$ -N removal rate; E: change of TN removal rate. Error bars in figure represent standard deviation.



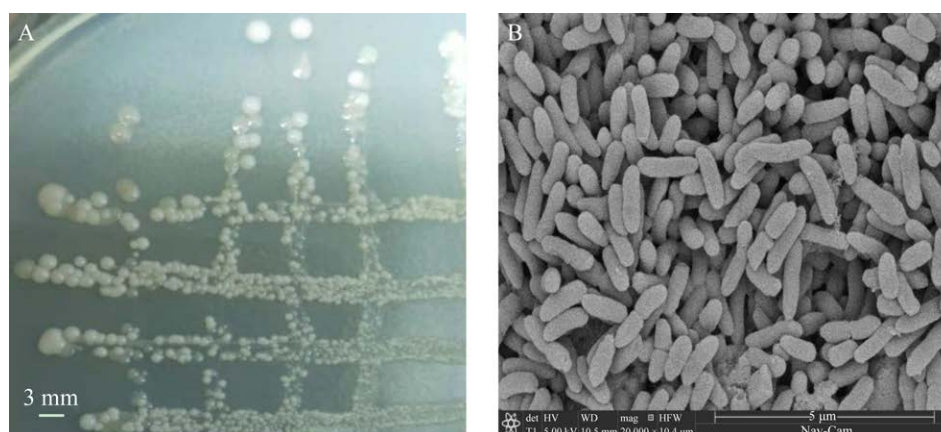


图 2 菌株 Z6 的菌落形态和细胞形态

Figure 2 Colony morphology and cell morphology of strain Z6. A: colony morphology of strain Z6; B: cell morphology of strain Z6.

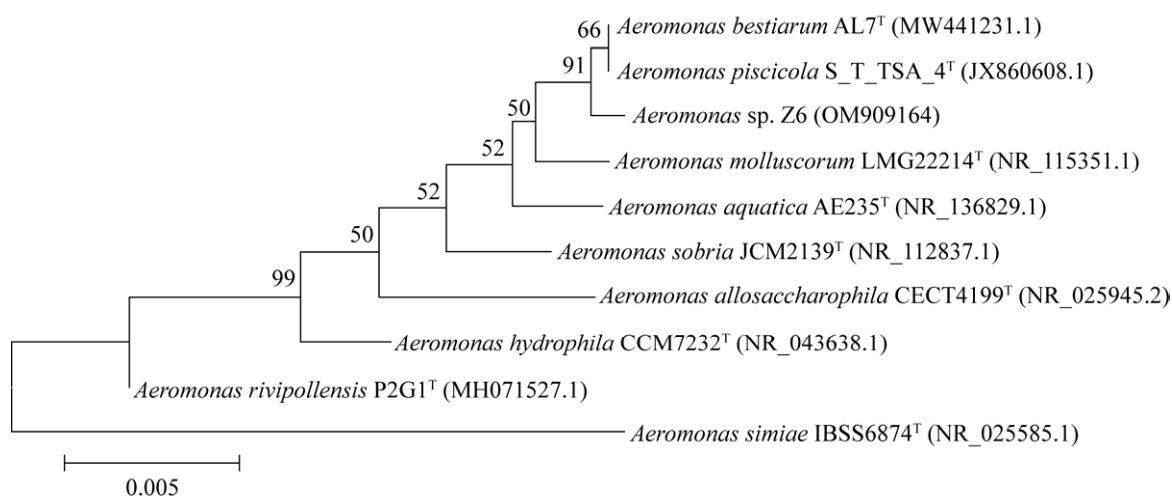


图 3 基于 16S rRNA 基因同源序列构建菌株 Z6 的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain Z6 based on 16S rRNA gene homologous sequence. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank; numbers at the nodes indicate the bootstrap values on NJ analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.005 represent sequence divergence.

### 2.3 菌株 Z6 的生长曲线

菌株 Z6 在 10 °C、140 r/min 条件下的生长曲线变化如图 4 所示。

由图 4 可知, 在低温好氧条件下菌株 Z6 的生长停滞期为 0–12 h, 此时生长较为缓慢。培养 12 h 后菌株的生长速度明显加快, 进入指数生长期, 并于 60 h 达到最大生长量, 之后逐

渐进入稳定期。研究表明, 好氧反硝化盐单胞菌 *Halomonas* sp. Y8 在 30 °C 下的生长停滞期为 8 h<sup>[29]</sup>。而好氧反硝化菌 *Cupriavidus* sp. S1 在 30 °C 下的停滞期为 6 h<sup>[30]</sup>。与大部分中温好氧反硝化菌相比, 菌株 Z6 在低温条件下的停滞期较长。分析原因, 可能是由于低温条件会抑制细菌的酶活力, 导致细胞新陈代谢活动减弱,



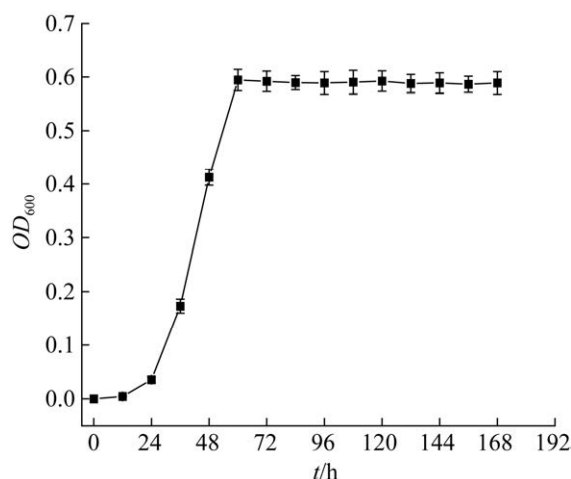


图4 菌株 Z6 的生长曲线

Figure 4 Strain Z6 growth curve. Error bars in figure represent standard deviation.

从而减缓了菌株的生长速率<sup>[31]</sup>。然而相比其他耐低温好氧反硝化菌<sup>[32]</sup>, Z6 进入对数生长期的时间较短, 说明该菌株在低温条件下具有相对较高的生长速率和较短的世代时间, 这对于低温废水的处理具有重要的意义。根据菌株 Z6 的生长曲线, 结合其对  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除效果, 确定后续脱氮条件优化试验的培养时间为 60 h。

## 2.4 碳源的影响

碳源不仅可以为菌株生长代谢活动提供能量, 也为好氧反硝化过程提供电子受体。不同碳源的化学结构和分子量会对菌株的生长和脱氮效果产生不同影响<sup>[33]</sup>。此外, Richardson 等<sup>[34]</sup>研究发现, 好氧反硝化菌的硝酸盐还原酶活性受碳源种类影响较大。本研究考察了菌株 Z6 利用不同碳源在 10 °C 条件下培养 60 h 后的生长状况及对  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率, 如图 5 所示。

由图 5 可知, 菌株 Z6 对 4 种碳源的利用程度和脱氮效果差异较大。其中, 蔗糖作为碳源时, 菌株 Z6 的生长情况和脱氮效果较差,  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率仅为 7.2%, 表明蔗糖作为大分子碳源不能被该菌很好地利用。而菌株 Z6 在利

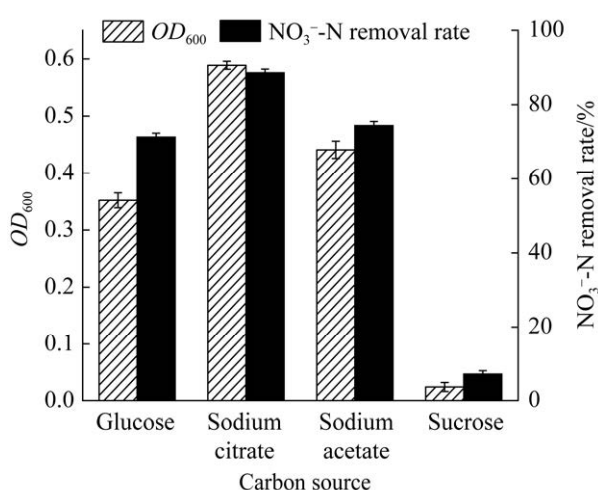


图5 碳源种类对菌株 Z6 生长和  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率的影响

Figure 5 Effects of carbon source on the growth of strain Z6 and the  $\text{NO}_3^-$ -N removal rate. Error bars in figure represent standard deviation.

用柠檬酸钠、乙酸钠和葡萄糖时生长量和对  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除效果均较好, 尤其是以柠檬酸钠为碳源时, 培养 60 h 后对  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率可达 88.6%, 说明柠檬酸钠作为碳源更有利于菌株的生长和对  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除, 这与 *Pseudomonas stutzeri* DZ11<sup>[35]</sup>和 *Achromobacter* sp. L16<sup>[36]</sup>以柠檬酸钠作为最佳碳源的研究结果一致。这是因为柠檬酸钠作为细菌呼吸作用时三羧酸循环的中间代谢产物, 更容易被细菌直接利用, 同时还能增强硝酸盐还原酶的活性<sup>[37]</sup>。因此, 确定菌株 Z6 的最佳碳源为柠檬酸钠。

## 2.5 响应面分析法优化脱氮条件

先前的研究表明, C/N、温度、pH 和摇床转速是影响微生物生长及脱氮效果的重要因素<sup>[38-40]</sup>。本研究根据响应面分析法中的 Box-Behnken 中心组合设计原理, 以  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率为响应值, 对影响菌株 Z6 脱氮效果的 4 个主要因素, 即 C/N、温度、pH 和摇床转速进行优化, 设计了四因素三水平的响应面试验组合, 结果如表 2 所示。

表 2 菌株 Z6 的 Box-Behnken 试验设计和响应值  
Table 2 Box-Behnken experimental design and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N removal response

Run	C/N	T/°C	pH	Shaker speed/(r/min)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N removal rate/%
1	5.5	7	6	140	80.5
2	5.5	13	6	140	88.8
3	6.5	10	7	120	88.1
4	5.5	10	6	120	85.6
5	5.5	10	6	160	85.9
6	5.5	10	7	140	88.6
7	5.5	13	7	120	88.7
8	6.5	10	6	140	87.9
9	4.5	10	8	140	86.6
10	5.5	13	8	140	88.7
11	6.5	7	7	140	82.4
12	5.5	7	7	160	81.6
13	5.5	7	8	140	82.2
14	4.5	10	7	120	86.1
15	5.5	10	7	140	88.3
16	5.5	10	7	140	88.9
17	4.5	10	6	140	84.2
18	6.5	10	7	160	88.5
19	4.5	13	7	140	88.3
20	5.5	10	8	120	85.8
21	4.5	7	7	140	81.1
22	5.5	10	7	140	88.5
23	5.5	7	7	120	82.3
24	6.5	10	8	140	87.2
25	5.5	10	7	140	88.9
26	5.5	10	8	160	88.3
27	5.5	13	7	160	89.8
28	4.5	10	7	160	86.3
29	6.5	13	7	140	90.2

利用 Design Expert 10.0 对试验结果进行二次多项回归拟合, 得到 4 个影响因素与菌株 Z6 对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除率之间的回归方程模型为:

$$Y=88.64+0.98A+3.70B+0.49C+0.32D+0.15AB-0.77AC+0.05AD-0.45BC+0.45BD+0.55CD-0.75A^2-2.29B^2-1.40C^2-0.74D^2 \quad (2)$$

式中,  $Y$  表示 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除率;  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$  分别表示 C/N、温度(°C)、pH 值、转速(r/min)。

对回归方程模型进行方差分析(analysis of variance, ANOVA), 结果如表 3 所示。

由表 3 可知, 该模型  $P<0.0001$ , 表明拟合得到的方程极为显著, 模型在被研究回归区域内拟合性很好。模型失拟项(lack of fit)用来表示所用模型与实验值的拟合程度, 即二者的差异程度。该拟合模型中失拟项为  $0.2527>0.0500$ , 差异不显著, 表明无失拟因素存在。因此, 可以用该回归方程代替试验真实数值对试验结果进行分析。同时结合图 6 中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除率的试验实际值与模型预测值之间的拟合关系可知, 二者之间具有很好的拟合度。另外, 模型决定系数  $R^2=0.9926$ , 表明 99.26% 的实验数据可用该模型进行揭示, 说明方程可信度高且回归有效。综合以上分析, 该回归方程模型可以用来分析和预测菌株 Z6 对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除效果及最佳脱氮条件。

根据表 3 中数据分析可知, C/N ( $A$ )、温度 ( $B$ )、pH ( $C$ ) 和转速 ( $D$ ) 的  $P$  值均小于 0.01, 表明它们对模型的影响极其显著。另外, 交互项  $AC$ 、 $BC$ 、 $BD$ 、 $CD$  影响显著 ( $P<0.05$ ), 表明 C/N 与 pH、温度与 pH、温度与摇床转速、pH 与摇床转速之间的交互作用显著。

根据回归方程作响应面图, 分析 C/N、温度、pH 和摇床转速对菌株 Z6 去除 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的影响, 结果如图 7 所示。由图 7 可知, 6 个响应面均为开口向下的凸形曲面, 其倒映的等高线图形形状反映了两因素的交互作用强弱。等高线越接近圆形, 2 个因素间的交互作用越不显著, 而等高线越接近椭圆形, 则表示 2 个因素间的交互作用越显著<sup>[41]</sup>。图 7 中(B)、(D)、(E)和(F)的响应面等高线接近椭圆形, (A)和(C)的等高

表 3 菌株 Z6 去除  $\text{NO}_3^-$ -N 回归方程模型的方差分析Table 3 ANOVA for the fitted quadratic polynomial model of  $\text{NO}_3^-$ -N removal by strain Z6

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	F values	P values (prob>F)	Significant
Model	225.80	14	16.13	134.71	<0.000 1	**
A-C/N	11.41	1	11.41	95.28	<0.000 1	**
B-temperature	164.28	1	164.28	1 372.13	<0.000 1	**
C-pH	2.90	1	2.90	24.23	0.000 2	**
D-shaker speed	1.20	1	1.20	10.05	0.006 8	**
AB	0.09	1	0.09	0.75	0.400 6	
AC	2.40	1	2.40	20.07	0.000 5	**
AD	0.01	1	0.01	0.08	0.776 8	
BC	0.81	1	0.81	6.77	0.020 9	*
BD	0.81	1	0.81	6.77	0.020 9	*
CD	1.21	1	1.21	10.11	0.006 7	**
$A^2$	3.68	1	3.68	30.75	<0.000 1	**
$B^2$	34.04	1	34.04	284.32	<0.000 1	**
$C^2$	12.77	1	12.77	106.69	<0.000 1	**
$D^2$	3.56	1	3.56	29.73	<0.000 1	**
Residual	1.68	14	0.12			
Lack of fit	1.40	10	0.14	2.06	0.252 7	
Pure error	0.27	4	0.07			
Total deviation	227.48	28				

\*\* : very significant difference,  $P < 0.01$ ; \* : significant difference,  $P < 0.05$ .

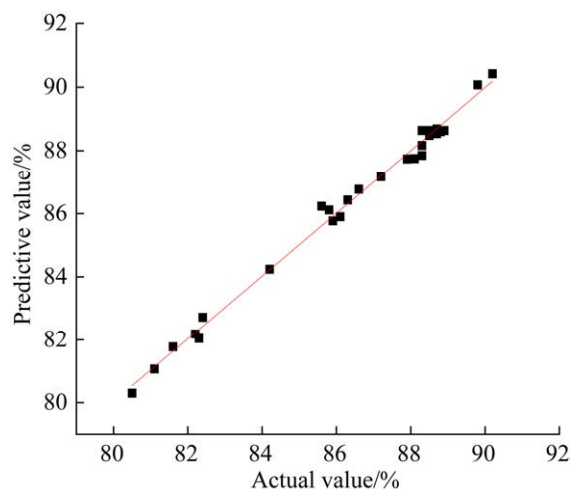
图 6 回归模型  $\text{NO}_3^-$ -N 平均去除率预测值与实际值的关系

Figure 6 Relationship between predictive value and actual value of regression model.

线呈近似圆形, 这表明 C/N 和 pH、温度和 pH、温度和摇床转速、pH 和摇床转速之间的交互作用较强, 而 C/N 和温度、C/N 和摇床转速之间的交互作用较弱, 这与表 3 的交互项显著性分析相对应。

对构建的回归方程模型进行偏导微分处理, 得到菌株 Z6 脱氮的最佳条件为 C/N=5.91; 温度=12.00 °C; pH=6.84; 转速=156.39 r/min。此时, 菌株 Z6 对  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率的最大预测值为 90.34%。考虑到实际操作方便, 将最佳脱氮条件修正为 C/N=5.9, 温度=12 °C, pH=6.8, 转速=155 r/min。为验证模型预测的准确性和有效性, 在预测的最佳脱氮条件下进行了 3 组平行试验, 得到培养 60 h 后菌株 Z6 对  $\text{NO}_3^-$ -N 的平

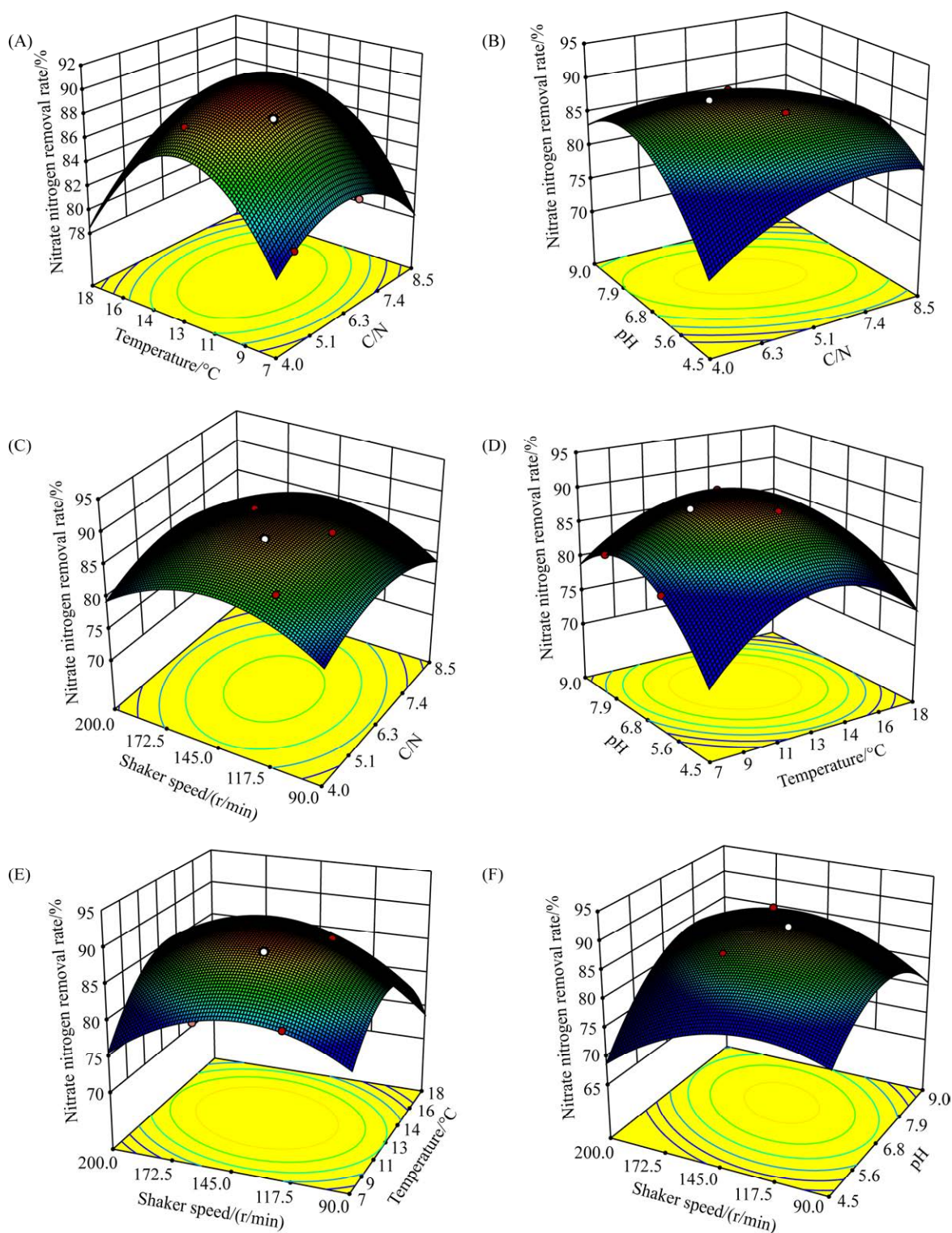


图 7 四因素交互作用的三维响应面

Figure 7 Three-dimensional response surface plots for the effect of four factors interactions on  $\text{NO}_3^-$ -N removal. A: temperature and C/N; B: pH and C/N; C: shaker speed and C/N; D: pH and temperature; E: shaker speed and temperature; F: shaker speed and pH.

均去除率为 89.72%，与预测值非常接近，误差仅为 0.62%。并且，在培养液中未检测出  $\text{NO}_2^-$ -N 的残留。上述试验结果表明，回归方程比较准确地预测了各因素对菌株 Z6 脱氮效果的影响。

### 3 结论

(1) 从寒冷地区冬季河水底泥中分离得到一株耐低温好氧反硝化菌 Z6，结合菌落形态及 16S rRNA 基因同源性分析鉴定该菌株属于气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)，其在 10 °C 低温条件下培养 120 h 后对初始浓度为 247 mg/L 的  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率可达 96.1%，且无  $\text{NO}_2^-$ -N 残留。

(2) 采用葡萄糖、柠檬酸钠、乙酸钠、蔗糖作为碳源的结果表明，柠檬酸钠作为菌株 *Aeromonas* sp. Z6 的最佳碳源更有利于菌株的生长和好氧反硝化作用。

(3) 通过响应面优化设计法确定菌株 *Aeromonas* sp. Z6 的最佳脱氮条件为：C/N 5.9，温度 12 °C，pH 6.8，摇床转速 155 r/min。在此最佳条件下培养 60 h 后该菌对  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率为 89.72%。

### 参考文献

- [1] Zhang XW, Hu Z, Ngo HH, Zhang J, Guo WS, Liang S, Xie HJ. Simultaneous improvement of waste gas purification and nitrogen removal using a novel aerated vertical flow constructed wetland. *Water Research*, 2018, 130: 79–87.
- [2] Huang X, Bai J, Li KR, Zhao YG, Tian WJ, Hu CH. Preparation of clay/biochar composite adsorption particle and performance for ammonia nitrogen removal from aqueous solution. *Journal of Ocean University of China*, 2020, 19(3): 729–739.
- [3] Xiong JH, Guo SC, Hou YP, Dai Z, Zhu HX, Wang SF, Chen GN. Using the modified sugarcane bagasse cellulose cation membrane as a separator in the electrodialysis device for ammonia nitrogen removal. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2019, 13(4): 475–483(9).
- [4] 杜雯倩, ZHANG Jon, 李靖, 蒋昌旺, 施万胜, 阮文权. 絮凝强化磷酸铵镁沉淀法对垃圾渗滤液中氨氮的去除特性研究. *环境污染与防治*, 2019, 41(11): 1304–1308.  
Du WQ, Jon Z, Li J, Jiang CW, Shi WS, Ruan WQ. Insight into the removal characteristics of ammonia nitrogen from landfill leachate by flocculation enhanced magnesium ammonium phosphate precipitation. *Environmental Pollution & Control*, 2019, 41(11): 1304–1308. (in Chinese)
- [5] Xiang SY, Liu YH, Zhang GM, Ruan R, Wang YP, Wu XD, Zheng HL, Zhang Q, Cao LP. New progress of ammonia recovery during ammonia nitrogen removal from various wastewaters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(10): 1–20.
- [6] Hu ZF, Liu JY, Zheng WY, Li DS, Liu YH, Yao H. Highly-efficient nitrogen removal from domestic wastewater based on enriched aerobic/anoxic biological filters and functional microbial community characteristics. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 238(C): 117867.
- [7] Ting WHT, Tan IAW, Salleh SF, Wahab NA. Application of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for phytoremediation of ammoniacal nitrogen: a review. *Journal of Water Process Engineering*, 2018, 22: 239–249.
- [8] Yuan HG, Huang SB, Yuan JQ, You YY, Zhang YQ. Characteristics of microbial denitrification under different aeration intensities: performance, mechanism, and co-occurrence network. *Science of the Total Environment*, 2021, 754: 141965.
- [9] Yuan JJ, Dong WY, Sun FY, Zhao K. Low temperature effects on nitrification and nitrifier community structure in V-ASP for decentralized wastewater treatment and its improvement by bio-augmentation. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(7): 6584–6595.
- [10] Wang C, Yu GC, Yang FL, Wang JL. Formation of anaerobic granules and microbial community structure analysis in anaerobic hydrolysis denitrification reactor. *Science of the Total Environment*, 2020, 737(prepublish): 139734.
- [11] Hu B, Quan JN, Huang K, Zhao JQ, Xing GH, Wu P, Chen Y, Ding XQ, Hu YS. Effects of C/N ratio and dissolved oxygen on aerobic denitrification process: a mathematical modeling study. *Chemosphere*, 2021, 272(prepublish): 129521.
- [12] Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: a

- controversy revived. *Archives of Microbiology*, 1984, 139(4): 351–354.
- [13] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(2): 184–191.
- [14] Cui XY, Ruan XY, Yin J, Wang MZ, Li N, Shen DS. Regulation of las and rhl quorum sensing on aerobic denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Current Microbiology*, 2021, 78(2): 659–667.
- [15] Ke X, Liu C, Tang SQ, Guo TT, Pan L, Xue YP, Zheng YG. Characterization of *Acinetobacter indicus* ZJB20129 for heterotrophic nitrification and aerobic denitrification isolated from an urban sewage treatment plant. *Bioresource Technology*, 2021, 347: 126423.
- [16] Yang T, Xin Y, Zhang L, Gu ZH, Li YR, Ding ZY, Shi GY. Characterization on the aerobic denitrification process of *Bacillus* strains. *Biomass and Bioenergy*, 2020, 140: 105677.
- [17] Xi HP, Zhou XT, Muhammad A, Luo ZJ, Wei J, Wu ZR, Mohamed GED. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification process: promising but a long way to go in the wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 2022, 805: 150212.
- [18] Hu J, Yan JB, Wu L, Bao YZ, Yu DQ, Li J. Isolated heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium for treating actual refinery wastewater with low C/N ratio. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, 132(1): 41–48.
- [19] 张萌, 毕江涛. 一株反硝化细菌对黑臭水体净化修复效果初探. *环境工程*, 2019, 37(8): 32–36.
- Zhang M, Bi JT. Preliminary study on effect of a denitrifying bacterium on purifying and remediation for black and odorous water bodies. *Environmental Engineering*, 2019, 37(8): 32–36. (in Chinese)
- [20] Rajta A, Setia H, Shukla S, Bhatia R. Heterotrophic aerobic denitrification by novel bacterium *Georgenia daeguensis* ARB2 for treatment of nitrate contaminated waters. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2022, 19(4): 3133–3144.
- [21] 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. *Bioresource Technology*, 2018, 256: 366–373.
- [22] Zhao TT, Chen PP, Zhang LJ, Zhang L, Gao YH, Ai S, Liu H, Liu XY. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. TAC-1 at low temperature and high ammonia nitrogen. *Bioresource Technology*, 2021, 339: 125620.
- [23] 张艺冉, 李再兴, 孙悦, 周石磊. 耐冷好氧反硝化菌脱氮技术研究进展. *环境工程*, 2019, 37(12): 22–28, 48.
- Zhang YR, Li ZX, Sun Y, Zhou SL. Research progress on nitrogen removal of cold resistance aerobic denitrifying bacteria. *Environmental Engineering*, 2019, 37(12): 22–28, 48. (in Chinese)
- [24] Qu J, Zhao RJ, Chen YY, Li YY, Peng J, Zheng ZW. Enhanced nitrogen removal from low-temperature wastewater by an iterative screening of cold-tolerant denitrifying bacteria. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2022, 45: 381–390.
- [25] 周英萍, 唐美珍, 曹彦雪, 周高洁, 陈娟娟, 马文秀. 一株耐冷异养硝化菌的分离鉴定及脱氮特性. *湖泊科学*, 2019, 31(3): 746–754.
- Zhou YP, Tang MZ, Cao YX, Zhou GJ, Chen JJ, Ma WX. Isolation and denitrification characteristics of a psychrotrophic and heterotrophic nitrification bacterium. *Journal of Lake Sciences*, 2019, 31(3): 746–754. (in Chinese)
- [26] 郭万茹. 脱氮微生物选育优化及其在黑臭水体修复中的应用. 合肥工业大学硕士学位论文, 2020.
- [27] 曾庆梅, 司文攻, 李志强, 靳靖, 吴聪, 魏春燕, 黄博英. 一株高效异养硝化菌的选育、鉴定及其硝化条件. *微生物学报*, 2010, 50(6): 803–810.
- Zeng QM, Si WG, Li ZQ, Jin J, Wu C, Wei CY, Huang BY. Isolation, identification and characterization of a high-efficient heterotrophic nitrifier. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(6): 803–810. (in Chinese)
- [28] APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. *Choice Reviews Online*, 2012, 49(12): 49–6910.
- [29] 郭超, 尹辉, 范奎, 陈张娜, 李燕敏. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及脱氮特性研究. *安全与环境工程*, 2020, 27(4): 41–47.
- Guo C, Yin H, Fan K, Chen ZN, Li YM. Isolation, identification and nitrogen removal characteristics of aerobic denitrifying bacteria. *Safety and Environmental Engineering*, 2020, 27(4): 41–47. (in Chinese)
- [30] Sun ZY, Lv YK, Liu YX, Ren RP. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. S1. *Bioresource Technology*, 2016, 220: 142–150.
- [31] Yang L, Ren YX, Zhao SQ, Liang X, Wang JP. Isolation and characterization of three heterotrophic



- nitrifying-aerobic denitrifying bacteria from a sequencing batch reactor. *Annals of Microbiology*, 2016, 66(2): 737–747.
- [32] 何腾霞, 倪九派, 李振轮, 孙权, 冶青, 徐义. 1 株 *Arthrobacter arilaitensis* 菌的耐冷异养硝化和好氧反硝化作用. *环境科学*, 2016, 37(3): 1082–1088.  
He TX, Ni JP, Li ZL, Sun Q, Ye Q, Xu Y. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of the hypothermia aerobic denitrification bacterium: *Arthrobacter arilaitensis*. *Environmental Science*, 2016, 37(3): 1082–1088. (in Chinese)
- [33] Meiklejohn J. Aerobic denitrification. *Annals of Applied Biology*, 2008, 27(4): 558–573.
- [34] Richardson DJ, Wehrfritz JM, Keech A, Crossman LC, Roldan MD, Sears HJ, Butler CS, Reilly A, Moir JW, Berks BC, Ferguson SJ, Thomson AJ, Spiro S. The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Biochemical Society Transactions*, 1998, 26(3): 401–408.
- [35] 赵洋, 孙慧明, 林浩澎, 罗娉婷, 朱雅婷, 陈琼华, 舒璇. 一株安全高效的好氧反硝化菌 *Pseudomonas stutzeri* DZ11 的生物安全性及脱氮性能研究. *生物技术通报*, 2022, 38(10): 1–9.  
Zhao Y, Sun HM, Lin HP, Luo PT, Zhu YT, Chen QH, Shu H. Biosafety and nitrogen removal performance of a safe and efficient aerobic denitrifying *Pseudomonas stutzeri* DZ11. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(10): 1–9. (in Chinese)
- [36] 李思琦, 杨静丹, 刘琳, 刘二佳, 王晓慧. 好氧反硝化菌 *Achromobacter* sp. L16 的脱氮特性. *生物技术通报*, 2020, 36(6): 93–101.  
Li SQ, Yang JD, Liu L, Liu EJ, Wang XH. Denitrification characteristics of aerobic denitrifying bacteria *Achromobacter* sp. L16. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(6): 93–101. (in Chinese)
- [37] 朱云, 龚望宝, 谢骏, 王广军, 余德光, 李志斐, 张凯, 田晶晶. 好氧反硝化细菌的鉴定及其脱氮特性研究. *水生生物学报*, 2020, 44(4): 895–903.  
Zhu Y, Gong WB, Xie J, Wang GJ, Yu DG, Li ZF, Zhang K, Tian JJ. Identification and denitrification characteristics of the aerobic denitrifying bacteria *Pseudomonas furukawaii* zs1. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(4): 895–903. (in Chinese)
- [38] 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 Bioprocess Engineering*, 2015, 20(4): 643–651.
- [39] Chen SH, He SY, Wu CJ, Du DY. Characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* sp. T1 and its application for pig farm wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 127(2): 201–205.
- [40] 杜丛, 崔崇威, 邓凤霞, 李昂, 马放. 基于响应面法对一株好氧反硝化菌脱氮效能优化. *微生物学通报*, 2015, 42(5): 874–882.  
Du C, Cui CW, Deng FX, Li A, Ma F. Identification of a highly efficient aerobic denitrifier and denitrification optimization using response surface method. *Microbiology China*, 2015, 42(5): 874–882. (in Chinese)
- [41] Li LP, Zhang J, Tian Y, Zhan W, Lin QY, Li H, Zuo W. Optimization of nutrient removal of novel electrochemically active carriers by response surface methodology. *Bioresource Technology*, 2019, 292(C): 122000.



**李亮**, 1979 年 5 月生, 东北大学资源与土木工程学院工学博士, 沈阳大学环境学院教授, 硕士生导师, 辽宁省教学名师, 沈阳市拔尖人才。主要从事环境工程微生物技术、水污染治理及生态修复技术等相关领域的研究。近年来承担了国家水体污染控制与治理科技重大专项, 国家科技支撑计划项目、辽宁省自然科学基金、沈阳市科技计划等二十余项国家、省、市级科研课题的研究工作。在国内外环境污染治理领域的 SCI、EI 及 CSCD 期刊发表科研论文 30 余篇, 获得授权国家职务发明专利 6 项, 实现专利成果转化 1 项, 获得省、市级科学技术进步奖 2 项, 获得辽宁省自然科学学术成果奖 2 项, 编著教材 3 部。