

海草根际沉积物好氧反硝化菌 S22 的筛选、脱氮特性及基因组分析

刘晨^{1,2}, 孙延瑜¹, 刘青^{1,2}, 胡晓珂^{1,3*}

1 中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台

2 中国科学院大学, 北京

3 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛

刘晨, 孙延瑜, 刘青, 胡晓珂. 海草根际沉积物好氧反硝化菌 S22 的筛选、脱氮特性及基因组分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3487-3507.

LIU Chen, SUN Yanyu, LIU Qing, HU Xiaoke. Screening, denitrification characterization, and genomic analysis of an aerobic denitrifying bacterium S22 from seagrass rhizosphere sediments[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(7): 3487-3507.

摘要: 近岸海域富营养化导致的过量氮输入是全球海草床退化的关键环境压力因素。【目的】从海草床生态系统中筛选、鉴定高效好氧反硝化菌株, 解析其脱氮特性与脱氮机制, 为缓解氮负荷压力、修复富营养化海草床提供微生物资源。【方法】采用富集驯化培养和溴百里酚蓝指示剂筛选法从烟台芝罘湾海草根际沉积物中分离筛选好氧反硝化菌株, 并通过 16S rRNA 基因序列鉴定菌株的分类地位。结合脱氮性能测定选取一株高效好氧反硝化细菌, 利用单因素实验和正交试验方法优化其脱氮条件, 通过氮平衡实验与全基因组测序阐明其脱氮途径及关键功能基因。【结果】从烟台芝罘湾海草床根际沉积物中分离获得 34 株反硝化菌株, 经鉴定优势菌属为假单胞菌属(*Pseudomonas*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)。基于脱氮性能筛选获得一株高效好氧反硝化菌株 *Pseudomonas* sp. S22, 通过单因素实验与正交试验优化, 确定其最适脱氮条件为以丁二酸钠为碳源、C/N=15、pH 9.0、盐度(salinity, S)=30‰、 $T=28^{\circ}\text{C}$ 。在此条件下, 菌株对 140 mg/L 硝态氮的 36 h 去除率达 99.99%, 展现出高效脱氮能力。氮平衡实验结果表明约 59.64% 的硝态氮被转化为气态氮, 证明反硝化为其主导脱氮途径。基因组测序进一步揭示菌株 S22 携带包括 *napA* 和 *nirS* 等好氧反硝化关键功能基因, 从分子水平为其脱氮表型提供了遗传基础。【结论】本研究系统分离鉴定了来源于我国北方海草床的好氧反硝化菌株, 菌株 S22 具有优异的脱氮性能和环境适应性, 氮平衡和基因组分析证实其以反硝化为主要脱氮途径, 且携带好氧反硝化关键功能基因。菌株 S22 可作为海草床氮负荷削减的潜在微生物资源, 为后续开发“微生物-海草”协同修复技术提

资助项目: 国家自然科学基金(32070112); 科技基础资源调查专项(2019FY100705); 山东省“泰山学者”建设工程项目(tspd20210317)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070112), the Specific Survey of Basic Science and Technology Resources (2019FY100705), and the Taishan Scholar Project of Shandong Province (tspd20210317).

*Corresponding author. E-mail: xkhu@yic.ac.cn

Received: 2025-10-27; Accepted: 2026-03-12; Published online: 2026-03-27

供菌种资源和理论依据。

关键词：好氧反硝化；生物脱氮；基因组；海草床；假单胞菌属

Screening, denitrification characterization, and genomic analysis of an aerobic denitrifying bacterium S22 from seagrass rhizosphere sediments

LIU Chen^{1,2}, SUN Yanyu¹, LIU Qing^{1,2}, HU Xiaoke^{1,3*}

1 Key Laboratory of Coastal Biology and Bio-resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

3 Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao, Shandong, China

Abstract: Excessive nitrogen input caused by eutrophication in nearshore waters is a major environmental stressor driving the global degradation of seagrass beds. **[Objective]** To screen and identify efficient aerobic denitrifying bacteria from seagrass bed ecosystems and elucidate their nitrogen removal performance and mechanisms, thus providing microbial resources for alleviating nitrogen loading and restoring eutrophic seagrass beds. **[Methods]** Aerobic denitrifying bacteria were isolated and screened from seagrass rhizosphere sediments in Zhifu Bay, Yantai by enrichment-domestication culture and bromothymol blue assay. The taxonomic status of the strains was determined by 16S rRNA gene sequencing. On the basis of nitrogen removal performance, an efficient aerobic denitrifying strain was selected. Single-factor and orthogonal experiments were conducted to optimize its denitrification conditions, and nitrogen balance experiments and whole-genome sequencing were employed to elucidate its nitrogen removal pathways and key functional genes. **[Results]** A total of 34 denitrifying strains were isolated from seagrass rhizosphere sediments in Zhifu Bay, Yantai. The dominant genera were *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. A strain designated as *Pseudomonas* sp. S22 with high denitrification performance was selected. The denitrification conditions of this strain were optimized as follows: sodium succinate as the carbon source, C/N=15, pH 9.0, salinity (*S*)=30‰, and *T*=28 °C. Under these conditions, the strain achieved a removal rate of 99.99% for 140 mg/L nitrate nitrogen within 36 h, demonstrating excellent nitrogen removal efficiency. Nitrogen balance analysis revealed that approximately 59.64% of the initial nitrate nitrogen was converted to gaseous nitrogen, confirming that denitrification was the dominant nitrogen removal pathway. Genomic sequencing revealed that strain S22 carried key functional genes for aerobic denitrification, including *napA* and *nirS*, providing a genetic basis for its denitrification phenotype at the molecular level. **[Conclusion]** This study systematically isolated and identified aerobic denitrifying bacteria from seagrass beds in northern China. Strain S22 exhibits outstanding nitrogen removal performance and environmental

adaptability. Nitrogen balance and genomic analyses confirm that denitrification is its primary nitrogen removal pathway and the strain carries key functional genes for aerobic denitrification. Strain S22 can serve as a potential microbial resource for reducing nitrogen loading in seagrass beds. This study provides both a valuable strain and a theoretical basis for the future development of microbe-seagrass synergistic remediation technologies.

Keywords: aerobic denitrification; biological nitrogen removal; genome; seagrass bed; *Pseudomonas*

近岸海域富营养化是全球海洋生态环境面临的重要问题之一^[1]。工农业活动和城市化进程带来的陆源输入以及大气沉降,使氮、磷等营养物质过量输入近海,引发一系列连锁性生态效应,导致水体透明度下降、海洋酸化、海底缺氧以及生物多样性降低^[2]。海草床生态系统受此类环境变化影响较大。作为典型的近海海洋生态系统,它具有极高的生态服务功能,能为海洋生物提供栖息地、庇护所和育幼场,还可提高水质、巩固及防护海床底质和海岸线,同时具有重要的碳捕获和碳储存功能。氮和磷是海草生长的必需营养元素,水体中适量存在这些元素是维持海草正常生理功能的基础。硝态氮、铵态氮和有机氮均为海草可吸收利用的氮源。然而,过量氮输入会对海草产生胁迫。硝态氮持续增加会导致海草组织内部营养盐供给失衡,长期暴露于 3.5 $\mu\text{mol/L}$ (约 0.05 mg/L)及以上浓度的硝态氮时可对海草碳平衡产生负面影响^[3-4];较高浓度的铵态氮会对海草产生毒性,海水中铵态氮浓度超过 125 $\mu\text{mol/L}$ (约 1.75 mg/L)时可导致海草枝茎密度显著降低;在 25 $\mu\text{mol/L}$ (约 0.35 mg/L)的较低浓度下长期暴露也可能威胁海草生存;而 9 $\mu\text{mol/L}$ (约 0.13 mg/L)的铵态氮则相对安全^[5]。在全球范围内,富营养化导致海草大规模死亡,海草床生态系统功能丧失^[6-9]。在海草床生态系统中,大型藻类、浮游植物及附生藻类比海草具有更高的养分吸收率^[10]。营养负荷的增加通常会刺激这些竞争者过度增殖并形成藻华,使其在与海草竞争光照和空间资源时占据优势。其次,营养盐输入导

致沉积物再悬浮加剧,减弱了海草所获得的光照强度,产生光限制效应^[11]。营养盐富集还会导致沉积到海底的过量有机质在分解过程中大量消耗氧气,使沉积物环境缺氧,促进硫酸盐还原菌产生对海草有毒害作用的硫化物^[12]。海草根和茎的结构使其更容易受到营养物增加和光限制的协同侵害,有害影响的累积导致海草数量减少,最终可能导致海草床消亡^[13]。

全球海草床正面临严峻的退化形势^[14-15],近岸水域的富营养化进程导致海草覆盖率下降,损失速度加快^[14]。对于大多数海草种类而言,与硝态氮相比,海草更容易吸收铵态氮和有机氮^[16]。硝酸盐作为富营养化的标志性污染物,因其在水体中具有高溶解性,在海草床中持续累积形成氮负荷压力。对于此类氮素负荷水体,传统物理化学修复手段(如曝气、底泥疏浚、化学药剂投加)通常能够快速降低营养盐浓度,在应急治理中具有重要地位,但这类方法在海草床区域应用时存在一定局限,例如底泥疏浚施工过程中易对底栖生境造成物理扰动,化学试剂可能具有生物毒性等^[17]。相比之下,基于微生物反硝化作用的生物修复技术主要通过强化或引入功能微生物群,更适用于大范围且生态敏感的海草床修复。然而,该技术也面临功能菌株环境适应性、定殖稳定性以及与土著微生物竞争等挑战。传统的生物脱氮技术依赖反硝化菌,长期以来被认为只在厌氧或缺氧条件下进行脱氮,这与海草床环境以及水体中的富氧条件相悖,限制了其应用。好氧反硝化细菌(aerobic denitrifying bacteria, ADB)的发现打破了

这一认知局限。1983 年, Robertson 和 Kuenen 等^[18-19]从废水处理厂分离出第一株能够在有氧条件下进行反硝化的细菌全食副球菌(*Paracoccus pantotrophus*)。此后, 大量好氧反硝化菌陆续从各类环境中被分离和鉴定报道, 包括污水处理系统^[20-21]、湖泊^[22-23]、湿地^[24-25]以及海水中^[26-27]。海洋环境中的好氧反硝化菌主要来源于沉积物、养殖区、河口及红树林湿地, 对于海草床和海草环境中可培养的好氧反硝化细菌鲜有报道。好氧反硝化菌的大量发现拓展了生物脱氮的应用场景。目前, 好氧反硝化技术已在污水处理领域展现出应用潜力^[28-33], 其应用模式包括构建好氧生物膜反应器、与微藻形成菌藻共生体系进行水处理, 以及与大型水生植物联合修复等。好氧反硝化菌能够通过周质硝酸盐还原酶(periplasmic nitrate reductase, Nap)和亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, Nir)的协同作用, 在有氧条件下完成脱氮过程^[34]。海草自身具备强大的吸收和转化营养盐的能力, 若能将其与高效的好氧反硝化菌株联合, 有望形成一种“微生物-海草”协同修复系统, 针对性地缓解海草床的氮负荷压力。

好氧反硝化菌在环境修复中展现出良好前景, 但其菌种资源在海草床这一生态系统中尚未得到系统性挖掘, 对海洋来源好氧反硝化菌的功能特性缺乏基因组水平的解析, 这限制了其在实际环境中应用潜力的准确预测和高效利用。本研究从黄渤海海草床生态系统的根际沉积物中分离筛选高效的好氧反硝化细菌菌株, 通过单因素实验、正交试验优化其脱氮性能条件, 并通过氮平衡分析结合全基因组测序技术解析其脱氮路径及反硝化功能基因的组成, 为“微生物-海草”协同修复海草床氮污染提供微生物资源与理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

菌种分离样品采自山东省烟台市芝罘岛

(37°36'N, 121°21'E)。取海草根际沉积物装入采样袋, 置于 4 °C 保存, 并于 24 h 内开展后续实验。

1.2 培养基

2216E 培养基(g/L): 蛋白胨 5.000 0, 酵母浸粉 1.000 0, $C_6H_5FeO_7$ 0.100 0, NaCl 19.450 0, $MgCl_2$ 5.980 0, Na_2SO_4 3.240 0, $CaCl_2$ 1.800 0, KCl 0.550 0, K_2CO_3 0.160 0, KBr 0.080 0, $SrCl_2$ 0.034 0, H_3BO_3 0.022 0, Na_2SiO_3 0.004 0, NaF 0.002 4, NH_4NO_3 0.001 6, Na_2HPO_4 0.008 0。

反硝化驯化培养基(g/L): CH_3COONa 1.30, NaCl 30.00, KH_2PO_4 0.09, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20, KNO_3 0.72, 微量元素溶液 2 mL。

溴百里酚蓝(bromothymol blue, BTB)固体培养基(g/L): KNO_3 1.00, KH_2PO_4 0.75, K_2HPO_4 0.75, $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.15, $CaCl_2 \cdot 7H_2O$ 0.02, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20, 柠檬酸钠 3.60, 1 mL 1% BTB 乙醇溶液(0.10 g BTB 溶于 10 mL 无水乙醇), 琼脂 15.00。

反硝化培养基(g/L): 六水合丁二酸钠 7.75, KNO_3 1.00, NaCl 30.00, KH_2PO_4 0.09, K_2HPO_4 0.09, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20, 微量元素溶液 2 mL。

微量元素溶液(g/L): $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 29.00, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 3.26, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.80, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.00, $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 0.11, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.10, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.10, $NaSO_3$ 0.05。

所有培养基 pH 调整为 7.0, 经 121 °C、20 min 蒸汽灭菌后使用。

1.3 菌株的分离与筛选

取 5 g 沉积物样品于灭菌海水中振荡混匀 30 min, 按 5% 接入 2216E 培养基, 30 °C、140 r/min 富集培养 48 h, 之后以 2% 转接至驯化培养基培养 48 h, 待培养基液体变浑浊后再次转接至新鲜驯化培养基中, 重复转接 3 次以上。将驯化后的菌悬液梯度稀释, 取 10^{-6} – 10^{-8} 梯度稀释液 100 μ L 涂布于溴百里酚蓝固体培养基, 30 °C 恒温培养 48 h。挑选具有蓝色晕圈的

菌落于 2216E 固体培养基上进行三区划线, 重复划线纯化 3-4 次至获得单一菌落。纯化菌株按 1 μ L 点接至 BTB 固体培养基进行复筛, 培养 48 h 后根据菌落周围蓝色晕圈的大小确定其脱氮能力, 并初步选取 6 株脱氮能力较强的菌株。将 6 株纯化菌株以 1% 接种至反硝化培养基中, 48 h 取样测定 OD_{600} , 并以 5 000 r/min 离心 10 min 取上清液测定 NO_3^- -N 浓度, 选取 NO_3^- -N 去除率高的菌株作为目标菌株。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 形态特征鉴定

将纯化后的菌株接种至 2216E 固体培养基, 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 48 h, 对菌落形状、颜色、透明度等形态特征进行观察。使用透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察细菌形态及有无鞭毛。

1.4.2 分子生物学鉴定

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)的使用方法提取获得纯培养菌株的 DNA, 采用细菌 16S rRNA 基因序列扩增通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μ L): 2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 补至 25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至青岛睿博测序分析公司进行测序。将测序分析后的 16S rRNA 基因序列上传到 EzBioCloud (www.ezbiocloud.net/identify) 数据库进行比对, 确定其种属。使用 MEGA 11 软件构建菌株的系统发育树, 并将序列上传至 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 数据库。

1.5 基因组测序

将纯化后的菌株接种至 2216E 液体培养基

中, 30 $^{\circ}$ C、140 r/min 培养至对数期(OD_{600} 约为 0.8)。取 15 mL 新鲜菌液, 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 无菌水洗涤沉淀菌体, 重复 3 次。样品送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行细菌基因组测序。

1.6 菌株生长曲线的测定

将纯培养菌株接种至 2216E 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、140 r/min 进行连续培养, 每间隔 2 h 取混匀菌液测定其 OD_{600} 值。设置 3 组平行实验并取平均值, 利用 Origin 软件以培养时间为横坐标, 以 OD_{600} 值为纵坐标绘制菌株的生长曲线。

1.7 菌株脱氮影响因素研究

1.7.1 单因素对菌株脱氮的影响

从前期筛选分离得到的菌株中选取一株具有较好脱氮能力的菌株 S22, 对其进行脱氮性能研究。采用单因素实验探究碳源、碳氮比、初始 pH、温度、盐度以及不同初始浓度硝氮等因素对菌株生长和脱氮的影响, 对菌株的脱氮条件进行优化。所有实验均以反硝化培养基[初始硝酸盐浓度为 140 mg/L, 碳源为丁二酸钠, C/N=10, pH 7.0, 盐度 (salinity, S)=30‰, T=30 $^{\circ}$ C]为基础。当探究某一因素时, 仅改变该因素水平, 其余条件均与培养基保持一致。分别调整培养基的碳源种类为乙酸钠、柠檬酸钠、蔗糖、葡萄糖、丁二酸钠, C/N 为 5、8、10、15、20, 初始 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 培养温度为 10、20、25、30、40 $^{\circ}$ C, 盐度为 0、10‰、20‰、30‰、40‰, 初始硝氮浓度为 50、140、200、300、500 mg/L。将处于对数生长期的菌液按 1% 的接种量接种至反硝化培养基中, 除温度实验外, 其余均在 30 $^{\circ}$ C、140 r/min 进行连续培养, 每隔 12 h 取样测定 OD_{600} , 并以 5 000 r/min 离心 10 min 取上清液测定 NO_3^- -N 浓度, 设置 3 个重复。

1.7.2 正交试验优化菌株脱氮效率条件

基于单因素实验结果, 选择对脱氮效率影响显著且具优化潜力的 3 个因素进行优化:

C/N、初始 pH 和培养温度，各因素分别设置 3 个水平(表 1)，设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。C/N 比通过调节碳源(丁二酸钠)用量实现，初始 pH 用 1 mol/L HCl 或 NaOH 溶液精确调节，培养基其他成分固定不变(碳源为丁二酸钠， $S=30\%$)。将活化的菌株 S22 种子液以 1% 接种量接入各组培养基，于 140 r/min 摇床中在设定温度下培养 48 h。以 NO_3^- -N 去除率为分析依据，确定菌株 S22 最佳脱氮条件。根据分析结果得出的理论最优组合配制培养基，于 140 r/min 培养 36 h，每隔 6 h 取样测定菌液 OD_{600} ，5 000 r/min 离心 10 min 取上清液测定 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 浓度，进行独立实验，分析菌株 S22 脱氮特性并确认其脱氮性能。

1.8 菌株的氮平衡分析

参照文献[35-36]的方法开展以硝酸钾为唯一氮源的氮平衡实验。在反硝化培养基条件基础上，将菌液以 1% 接种量接入培养基中，30 °C、140 r/min 连续培养 36 h。分别于培养起始(0 h)与实验结束(36 h)收集菌液，样品一部分经 10 000 r/min 离心 5 min 取上清液，经过 0.22 μm 滤膜过滤后用于测定培养基内可溶性总氮(dissolved total nitrogen, DTN)浓度以及硝态氮(NO_3^- -N)、亚硝态氮(NO_2^- -N)和氨氮(NH_4^+ -N)浓度。另一部分样品使用超声波细胞破碎机进行超声破碎(功率 300 W，工作 6 s/间隔 4 s，15 min)，破碎后的菌液经过 0.45 μm 滤膜过滤后用于测定总氮(total nitrogen, TN)浓度。氮平衡计算如公式(1)所示。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Level table of orthogonal experimental factors

Level	Factors		
	A (C/N)	B (pH)	C (T/°C)
1	9	7.0	28
2	12	8.0	30
3	15	9.0	32

细胞内生物氮 = TN - DTN

气体氮 = $\text{TN}_0 - \text{TN}_t$

同化效率 = 细胞内生物氮/DTN₀ × 100% (1)

脱氮效率 = (气体氮 + 细胞内生物氮)/DTN₀ × 100%

式中：DTN₀ 为时间为 0 时的可溶性总氮浓度，TN₀ 和 TN_t 为时间为 0 和 t 时的总氮浓度。

1.9 氮元素的检测方法及分析方法

硝酸盐氮的测定采用紫外分光光度法 HJ/T 346—2007^[37]，亚硝酸盐氮的测定采用分光光度法 GB 7493—87^[38]，氨氮的测定采用纳氏试剂分光光度法 HJ 535—2009^[39]，总氮的测定采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法 HJ 636—2012^[40]， OD_{600} 的测定采用紫外分光光度计。

去除率计算如公式(2)所示。

$$R = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中：C₀ 和 C_t 为时间为 0 和 t 时的氮浓度。

2 结果与分析

2.1 反硝化细菌筛选结果

经过前期富集、驯化，以及 BTB 培养基筛选和分离纯化，从海草根际沉积物中分离得到 34 株菌。对这 34 株菌进行 16S rRNA 基因测序，并将序列上传至 EzBioCloud 数据库进行比对，结果显示 34 株菌分别归属于莫拉氏菌科(*Moraxellaceae*)、假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)和丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)，对应不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和丛毛单胞菌属(*Comamonas*)，共鉴定出 14 个不同的物种。BTB 固体培养基定性实验结果显示，34 株菌周围均有大小不一的蓝色晕圈，初步表明其具备反硝化能力，并根据菌落周围蓝色晕圈大小筛选出 6 株反硝化能力较强的菌株。为定量比较 6 株菌的反硝化能力，将其接种至反硝化培养基中，培养 48 h 后测定 NO_3^- -N 浓度。如图 1 所示，连续培养 48 h 后菌株 S22 对 NO_3^- -N 的去除率为 78.38%，高于另外 5 株菌，表现出较强的脱氮能力，因此选取菌株 S22 作

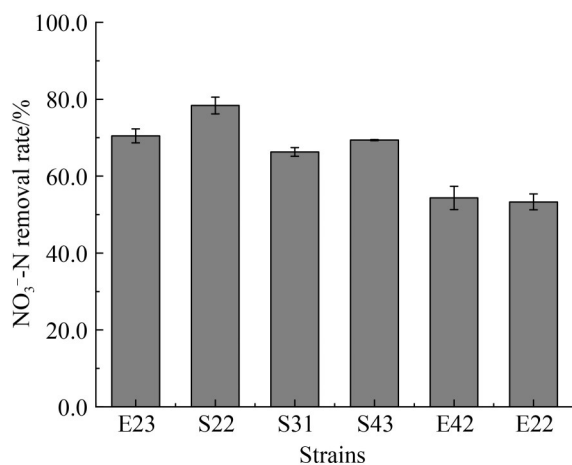


图1 菌株的反硝化能力筛选

Figure 1 Screening of bacterial strains for denitrification capacity.

为研究对象。

2.2 菌种鉴定

菌株 S22 在 2216E 固体培养基上培养 48 h 后形成的菌落形态如图 2A 所示, 菌落呈均一的乳白色、不透明; 菌落直径约 1.0–1.5 mm, 呈圆形轮廓, 边缘规则; 菌落呈凸起状, 表面湿润光滑。如图 2B 所示, 菌株 S22 长度为

2.4–2.6 μm , 宽度为 0.9–1.1 μm , 长宽比约为 2.5:1; 该菌株为杆菌形态, 其表面具有丛生鞭毛。

菌株 S22 基因组 DNA 经 PCR 扩增并测序后得到长度为 1 406 bp 的 16S rRNA 基因序列, 并上传至 GenBank 数据库, 登录号为 PV164359。将菌株 S22 的基因序列与 EzBioCloud 数据库中的已有序列进行同源性比对, 结果显示菌株 S22 与库鲁内格勒假单胞菌(*Pseudomonas kurunegalensis*) RW1P2^T 的相似性为 99.93%, 与别样恶臭假单胞菌(*Pseudomonas alloputida*) Kh7^T 的相似性为 99.72%。使用 MEGA 11 软件的邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树(图 3), 该菌株归属于假单胞菌属, 且与 *P. kurunegalensis* RW1P2^T 和 *P. alloputida* Kh7^T 的亲缘关系最近。

2.3 菌株 S22 生长特性

菌株 S22 在 2216E 液体培养基中的生长动力学研究结果见图 4, 其生长曲线呈现典型的 4 个阶段特征: 菌株 S22 在 0–2 h 处于延滞期, 此时菌体处于代谢适应状态, 在 2 h 时 OD_{600} 维持在 0.1, 生长速度缓慢; 2 h 后进入对数生长期, 生物量呈指数增长, 培养至 20 h 时 OD_{600}

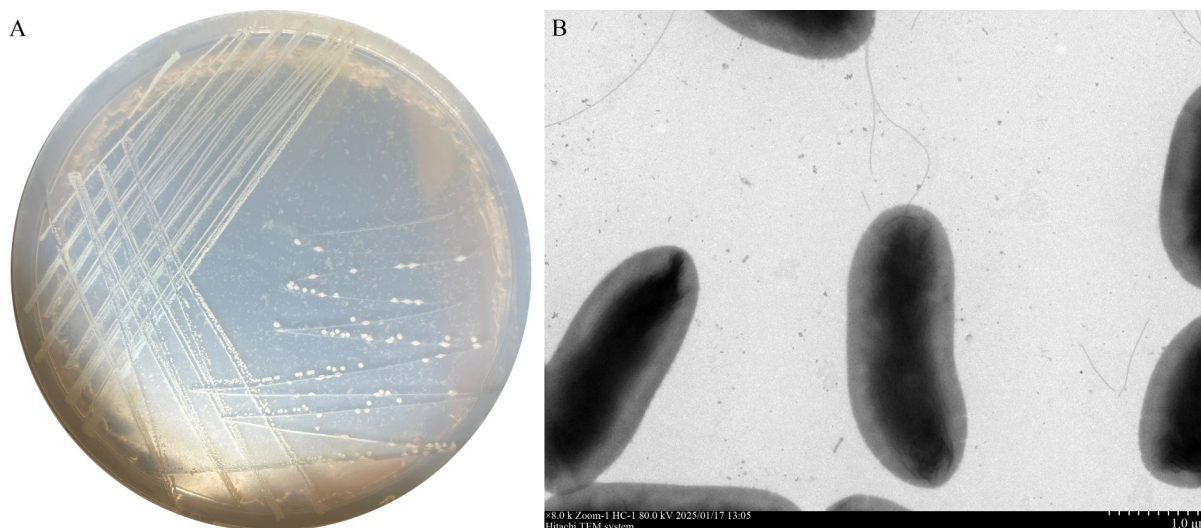


图2 菌株S22的菌落形态和透射电镜照片

Figure 2 Colony morphology of strain S22 and TEM image. A: Colony morphology of strain S22; B: Cell morphology of strain S22.

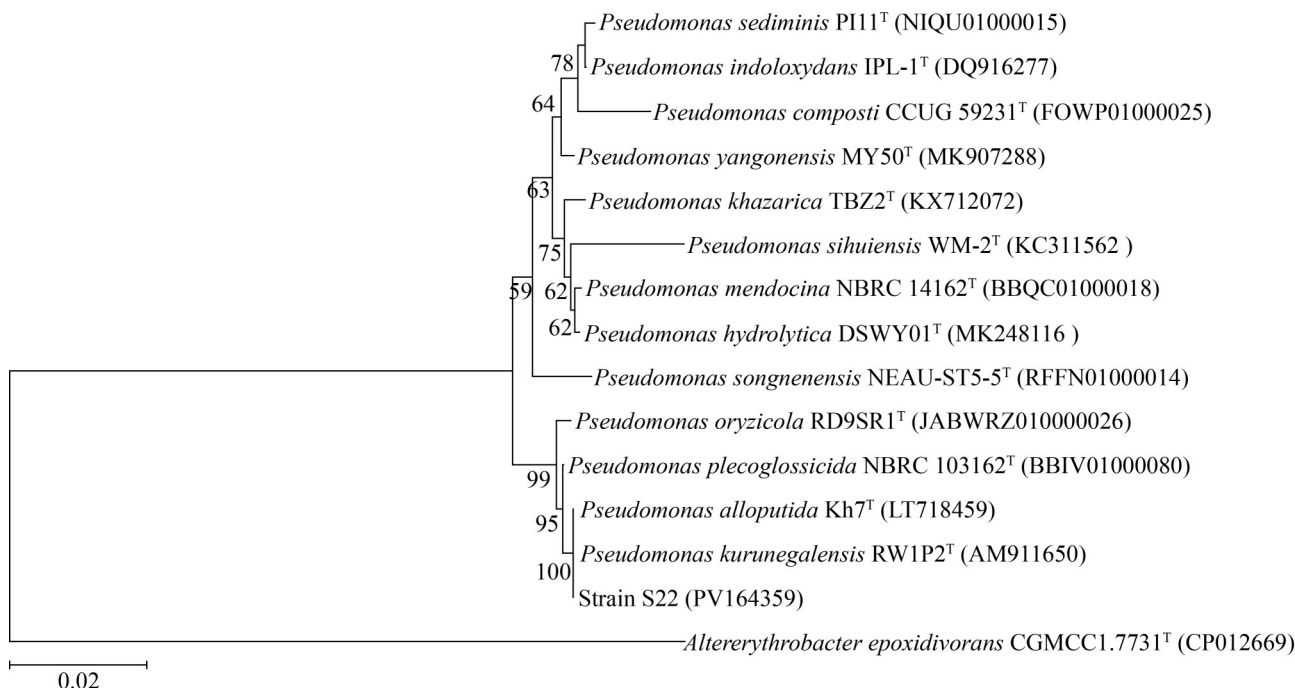


图3 菌株S22基于16S rRNA基因序列同源性构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain S22 based on 16S rRNA gene sequence homology. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank; Numbers at the nodes indicate the bootstrap values; The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.02.

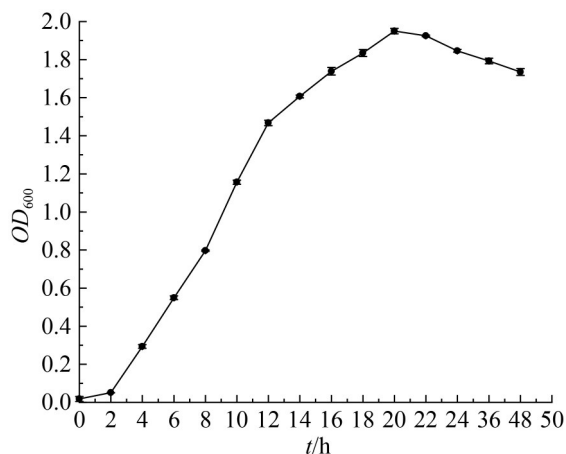


图4 菌株S22生长曲线

Figure 4 Growth curve of strain S22.

达到峰值(2.0); 20 h 后生长变缓, 进入稳定期, OD_{600} 波动范围较小; 24 h 后菌株进入衰亡期, 因营养耗尽, OD_{600} 逐渐下降, 培养至 48 h 时 OD_{600} 为 1.7。与已报道的反硝化细菌相比, 菌株

S22 在生长速率和生物量积累方面表现出一定优势。例如, 硝基还原假单胞菌 (*Pseudomonas nitroreducens*) PHB18^[41] 在反硝化培养条件下延滞期长达 6 h, 21 h 达到 OD_{600} 峰值为 0.7, 均低于菌株 S22。

2.4 单因素实验结果

2.4.1 碳源对菌株 S22 生长和脱氮能力的影响

碳源为微生物生长代谢提供能量, 并在好氧反硝化过程中作为电子供体。不同类型碳源的化学结构不同, 导致微生物对其利用度存在差异, 进而影响反硝化细菌的生长和脱氮能力。本研究中, 利用不同碳源培养 48 h 后的菌株 S22 的生长情况和 NO_3^- -N 去除率如图 5 所示, 当以柠檬酸钠、葡萄糖和丁二酸钠为碳源时, 菌株 S22 在 48 h NO_3^- -N 去除率均较高, 分别达到 71.95%、76.66%、76.83%, 其中以丁二酸钠

为碳源时效果最佳。乙酸钠作为唯一碳源时, 菌株 S22 在前 24 h 的生长情况和脱氮效果较差, 可能是由于前期碳源吸收和代谢启动延迟, 导致碳源利用效率低; 但在 48 h 时生长量快速上升, NO_3^- -N 去除率达到 61.95%。以蔗糖为碳源时, 菌株 S22 的生长和脱氮情况最差, 24 h 和 48 h 的 NO_3^- -N 去除率分别为 14.96%、3.66%, 这可能与菌体在蔗糖条件下生长受抑制及后期代谢活性下降有关, 表明菌株 S22 对蔗糖的利用效率显著低于其余 4 种碳源。因此, 选择丁二酸钠作为菌株 S22 的最适碳源。

2.4.2 碳氮比对菌株 S22 生长和脱氮能力的影响

不同碳氮比对菌株 S22 的生长量和脱氮特性有显著影响。在 C/N 为 5–20 的范围内研究菌株的生长和脱氮能力, 如图 6 所示, 菌株 S22 的生长量和脱氮能力随 C/N 的增加而提高。低 C/N (5) 时, 48 h NO_3^- -N 去除率仅为 43.01%, 而

高 C/N (15、20) 时去除率分别达到 97.45%、98.87%, 这是因为较低的 C/N 导致碳源不足, 电子供体受限, 菌株生长受限, 脱氮能力下降。在 C/N 为 15、20 的条件下, 菌株 S22 在 48 h 内持续生长并保持较高活性, OD_{600} 达到峰值的时间延长; 48 h NO_3^- -N 去除率均接近 100%。在微生物脱氮及生长效果相当的情况下, 考虑节约成本, 因此选用 C/N 为 15 作为菌株 S22 的最佳碳氮比。

2.4.3 初始 pH 对菌株 S22 生长和脱氮能力的影响

初始 pH 可直接调控酶活性, 并间接影响细菌生理, 从而影响其脱氮和生长能力。如图 7 所示, 在不同 pH 条件下, 菌株 S22 对 NO_3^- -N 的去除率呈上升趋势, 并在 36 h 后去除率趋于平缓。该菌株在 pH 6.0–9.0 范围内具有良好的生长量和脱氮能力, 在 pH 为 8.0 时反硝化能力最高, 12 h 和 48 h 的 NO_3^- -N 去除率分别为 48.4%、78.99%。

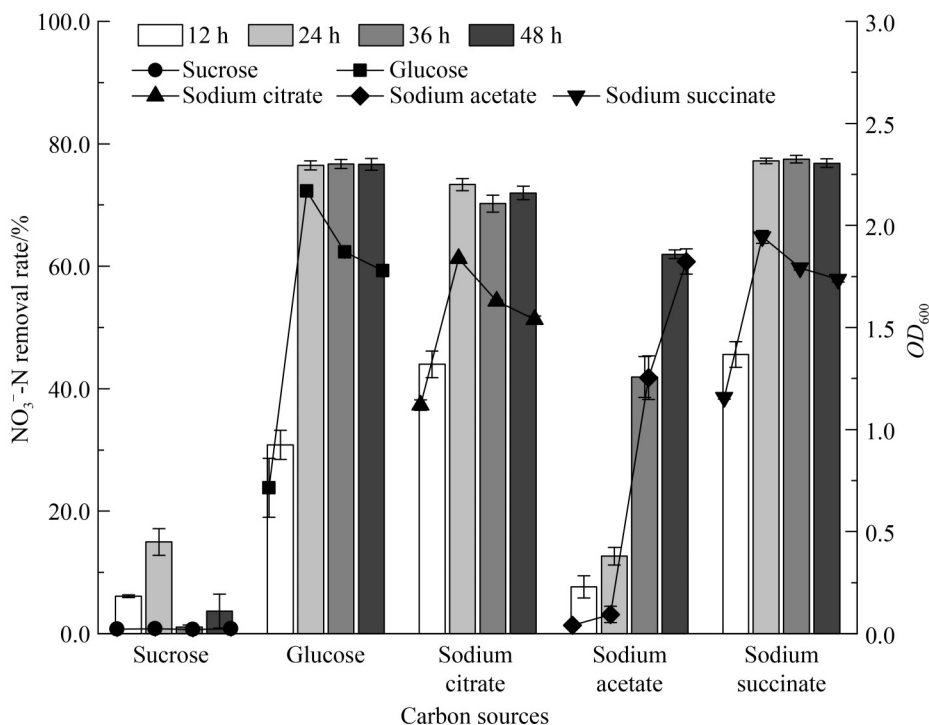


图5 碳源对菌株S22生长性能和脱氮效率的影响

Figure 5 Effects of carbon sources on the growth performance and nitrogen removal efficiency of strain S22.

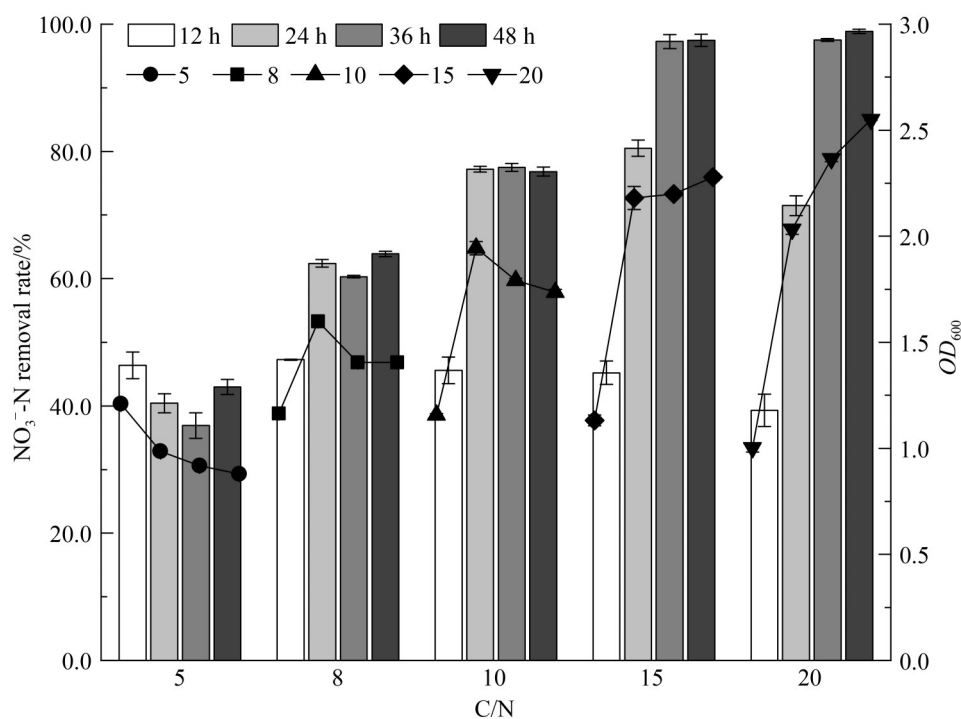


图6 碳氮比对菌株S22生长性能和脱氮效率的影响

Figure 6 Effects of C/N ratio on the growth performance and nitrogen removal efficiency of strain S22.

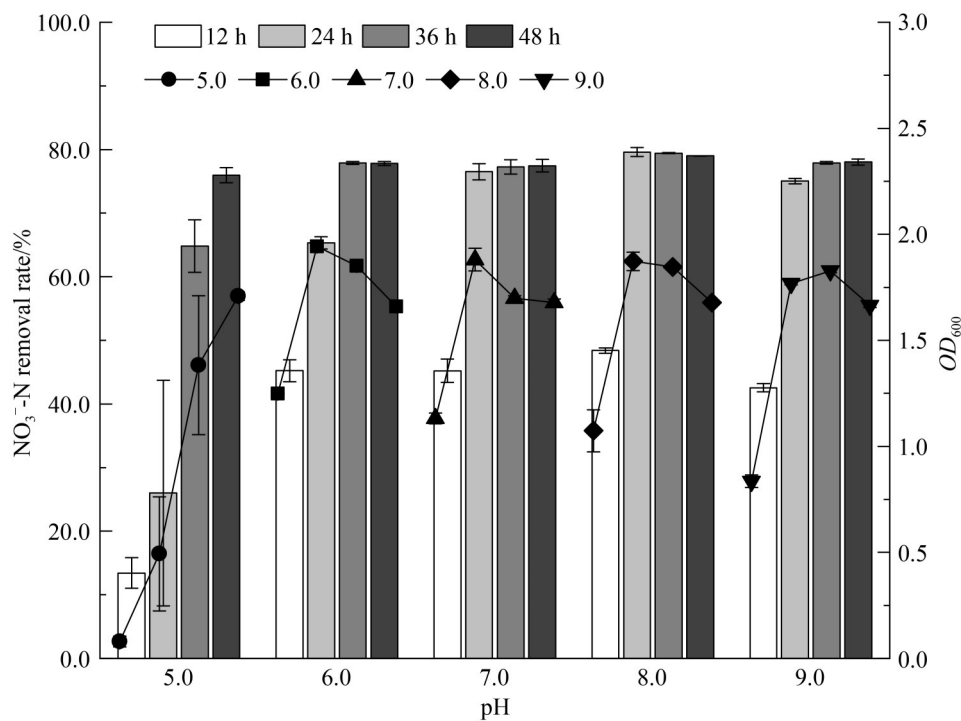


图7 pH对菌株S22生长性能和脱氮效率的影响

Figure 7 Effects of pH on the growth performance and nitrogen removal efficiency of strain S22.

pH 为 5.0 时菌株 S22 前期生长量较低, 脱氮效果较差, 但 48 h NO_3^- -N 去除率达到 75.94%, 这可能是由于前期酸性环境抑制了细菌的生长代谢活动, 导致其生长缓慢和脱氮性能降低。

2.4.4 温度对菌株 S22 生长和脱氮能力的影响

温度是调控细菌代谢活动和酶动力学的重要环境因子, 不仅影响细菌生长速率, 还会影响反硝化酶的活性和稳定性。如图 8 所示, 菌株 S22 在 20–30 °C 时脱氮性能较好, 48 h 的 NO_3^- -N 去除率分别为 77.17%、78.07%、77.98%。当温度为 25–30 °C 时, 24 h 的去除率即可达到 70%。高温 40 °C 时菌株 S22 几乎不生长, 48 h 内硝态氮去除量接近于 0; 在低温 10 °C 条件下菌株生长缓慢, 24 h 和 48 h 的 NO_3^- -N 去除率仅为 6.02% 和 20.94%, 主要是因为高低温会抑制或降低酶活性, 使代谢速率下降, 从而影响其生长和脱氮能力。

2.4.5 盐度对菌株 S22 生长和脱氮能力的影响

将盐度分别调整为 0、10‰、20‰、30‰、40‰, 研究菌株 S22 在不同盐度条件下的生长情况和脱氮能力, 结果见图 9。在 30‰ 盐度下, 菌株 S22 脱氮能力最强, 48 h 的 NO_3^- -N 去除率为 78.96%。盐度范围为 0–20‰ 时, 菌株在培养初期呈现出一定的生长与代谢延迟, 脱氮启动相对缓慢, 经过适应后仍能达到较高的最终脱氮水平, 48 h 的 NO_3^- -N 去除率分别为 72.25%、74.52%、76.94%, 略低于 30‰ 盐度组。在 40‰ 盐度条件下, 菌株在 24 h 内表现出更为明显的生长滞后与脱氮延迟, 12 h 和 24 h 的 NO_3^- -N 去除率仅为 2.28%、20.40%, 表明高盐环境对其初始代谢活性产生了一定抑制, 然而随着培养时间延长菌株展现出良好的适应能力与恢复能力, 其最终生物量和脱氮效率与较低盐度组(0–20‰)结果相近。

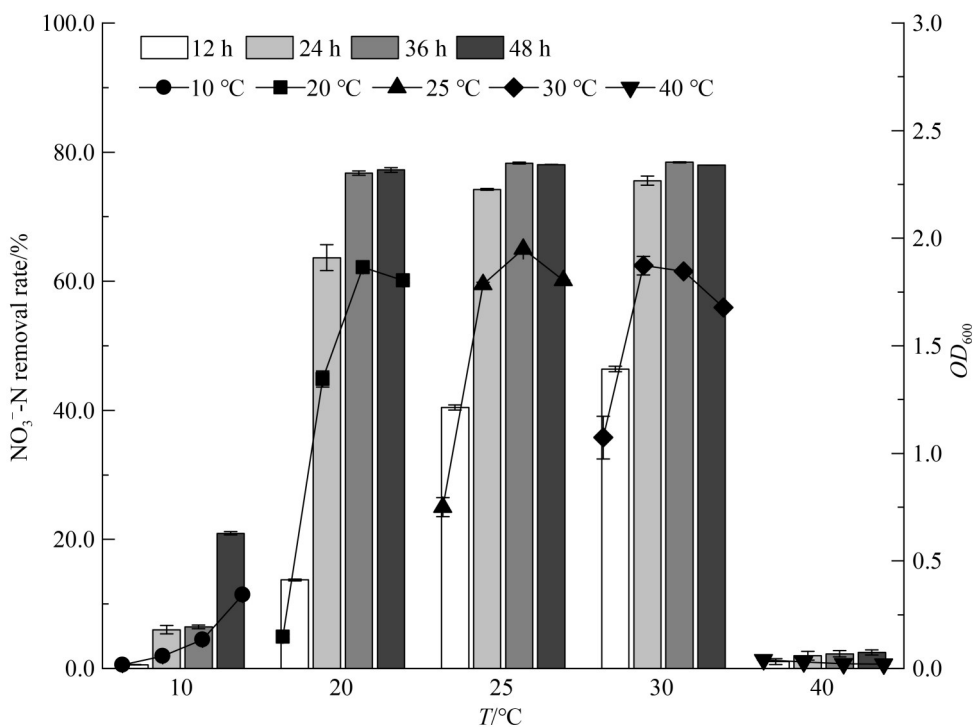


图8 温度对菌株S22生长性能和脱氮效率的影响

Figure 8 Effects of temperature on the growth performance and nitrogen removal efficiency of strain S22.

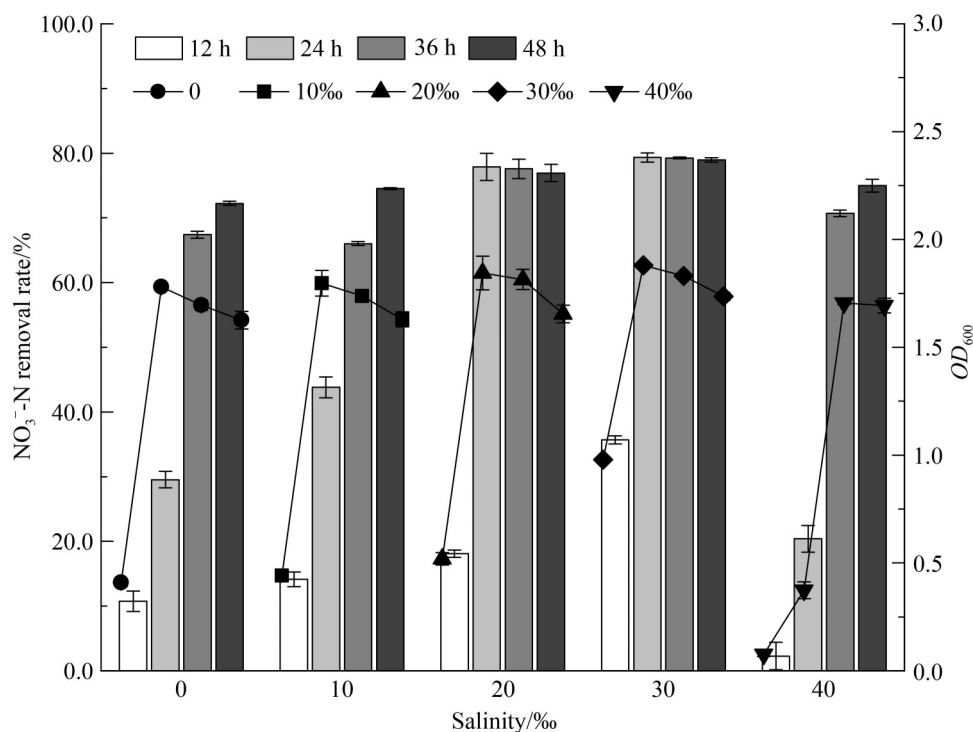


图9 盐度对菌株S22生长性能和脱氮效率的影响

Figure 9 Effects of salinity on the growth performance and nitrogen removal efficiency of strain S22.

2.4.6 初始硝氮浓度对菌株 S22 生长和脱氮能力的影响

改变反硝化培养基中的氮负荷(50、140、200、300、500 mg/L), 探究初始硝态氮质量浓度对菌株生长和反硝化能力的影响(图 10)。菌株对硝态氮的去除能力随着氮浓度增加而明显降低。在 50 mg/L 的初始硝态氮质量浓度下培养 12 h, 菌株 S22 对硝态氮的去除率即达到 100%。硝态氮浓度从 50 mg/L 提升到 300 mg/L 时, 随着培养基中初始硝氮浓度逐渐增加, 菌株 S22 的最大生长量也随之提高, 但其脱氮能力明显降低。初始硝氮浓度为 140 mg/L 和 200 mg/L 时, 24 h 的 NO₃⁻-N 去除率分别为 75.59%、55.84%, 48 h 的 NO₃⁻-N 去除率分别为 77.99%、65.41%。当初始硝氮浓度达到 300 mg/L 和 500 mg/L 时, 硝氮去除速率缓慢, 48 h 的 NO₃⁻-N 去除率分别为 36.82%、18.35%。由此可见, 菌株 S22 适宜在低浓度硝态氮条件下生长, 具有较高的硝氮

去除率。

2.5 正交试验结果与分析

为优化菌株 S22 的脱氮性能, 采用 L₉(3⁴)正交表对 C/N、初始 pH 和培养温度 3 个主要因素进行实验, 以 NO₃⁻-N 去除率为分析依据, 正交试验结果见表 2。不同因素水平下 48 h NO₃⁻-N 去除率介于 66.25%–99.64% 之间, 表明培养条件对脱氮效率影响显著。极差分析显示, C/N 的极差值最大为 23.31, 培养温度的极差值次之为 12.61, 各因素对硝态氮去除率影响的主次顺序为 C/N>培养温度>初始 pH。对正交试验结果进行方差分析表明, C/N 与培养温度对菌株 S22 的硝态氮去除率均有显著影响($P<0.05$), 而初始 pH 的影响未达显著水平($P>0.05$), 各因素影响的主次顺序为 C/N>培养温度>pH, 与极差分析结论一致。通过比较均值(K 值)可以得出理论最优条件组合为 A₃B₃C₁, 即 C/N 为 15、初始 pH 为 9.0、培养温度为 28 °C。

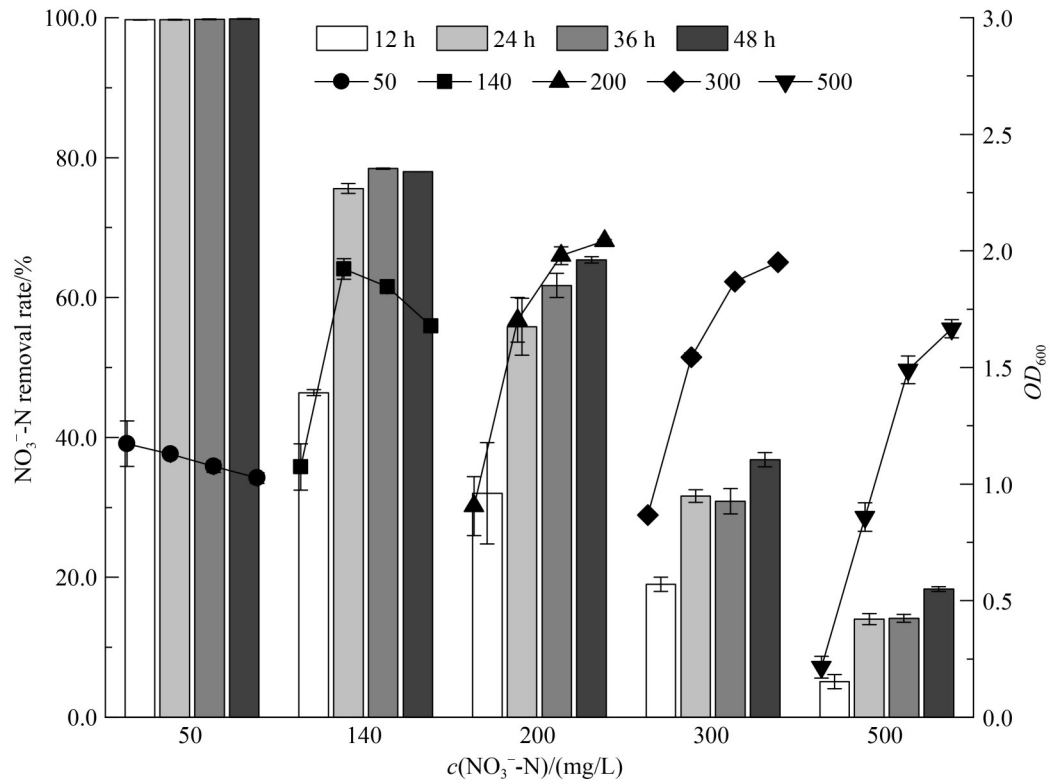


图10 初始硝氮浓度对菌株S22生长性能和脱氮效率的影响

Figure 10 Effects of initial nitrate concentration on the growth performance and nitrogen removal efficiency of strain S22.

表2 硝态氮正交试验直观分析表

Table 2 The orthogonal experiment intuitive analysis table of nitrate nitrogen

Factors	A (C/N)	B (pH)	C (T/°C)	Nitrate nitrogen removal/%
Experiment 1	1	1	1	72.00
Experiment 2	1	2	2	72.36
Experiment 3	1	3	3	66.25
Experiment 4	2	1	2	87.10
Experiment 5	2	2	3	76.39
Experiment 6	2	3	1	90.97
Experiment 7	3	1	3	82.14
Experiment 8	3	2	1	99.64
Experiment 9	3	3	2	98.76
K_1	70.20	80.41	87.54	
K_2	84.82	82.80	86.07	
K_3	93.51	85.33	74.93	
R	23.31	4.92	12.61	

以硝酸钾为唯一氮源,在正交试验最优条件下探究菌株 S22 对硝态氮的去除效果(图 11)。在初始硝氮浓度为 140 mg/L 的情况下,菌株 S22 经 6 h 迟缓期生长缓慢,随后进入对数生长期快速生长,6–30 h 菌株 S22 生物量快速增加,硝态氮也被快速去除。6–24 h 菌株生长速度最快,硝酸盐氮浓度也迅速下降, NO_3^- -N 去除率为 85.55%,去除速率达到 6.03 mg/(L·h)。培养至 30 h 时 OD_{600} 达到峰值 2.5,30 h 后菌体密度呈下降趋势,进入衰退期,此时 NO_3^- -N 去除率为 98.74%,在 36 h 时 NO_3^- -N 去除率达到 99.99% 以上。整个培养过程中,亚硝酸盐氮少量积累,在 12 h 亚硝酸盐氮浓度最高为 27.74 mg/L,随后逐渐降低,可能是因为前期硝态氮转化速率较快所致。经验证,在此优化条件下菌株 S22 对硝态氮的最大去除率可达 99.99%,高于正交表中实验组最大去除率,说明此次正交试验结果具有有效性与可靠性。

2.6 菌株 S22 氮平衡分析

以硝酸钾为唯一氮源,初始 NO_3^- -N 浓度为 141.83 mg/L,菌株 S22 在好氧条件下培养 36 h 后对底物脱氮过程中的氮平衡进行分析。结果表明,菌株 S22 将 84.59 mg/L 的初始 NO_3^- -N 转化为气态氮,占 59.64%;体系中细胞内生物氮为 21.74 mg/L,菌株 S22 的生物同化比例为 15.33%。

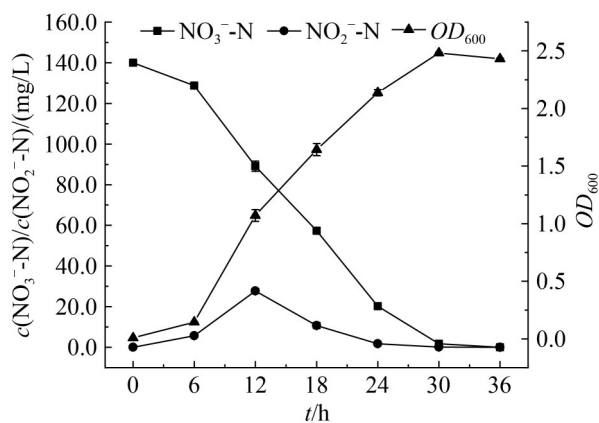


图11 正交试验验证结果

Figure 11 Orthogonal test validation.

培养结束时,残留的 NO_3^- -N 为 27.78 mg/L, NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 的积累量分别为 0.34 mg/L 和 2.13 mg/L;菌株 S22 的总脱氮效率为 74.95%。菌株 S22 主要通过反硝化作用去除水体中的 NO_3^- -N,同时伴有生物同化作用,且中间产物积累较低,表现出高效脱氮能力。

2.7 菌株 S22 氮代谢相关基因及通路

菌株 S22 通过二代测序获得高质量基因组序列,并通过 Nanopore 测序平台测定其全基因组序列,获得 1 168.32 Mb 的 clean data 用于组装。菌株 S22 基因组基本特征见表 3,基因组大小为 5 874 473 bp,经过序列拼接得到 33 个 scaffold (>500 bp),G+C 含量为 62.65%。预测该菌株含有 5 355 个蛋白编码基因,编码基因总长度为 5 170 947 bp,编码基因平均长度为 966 bp,编码基因总长度占基因组总长度的比例为 88.02%。预测到 rRNA 基因 14 个,包括 7 个 5S rRNA 基因、4 个 16S rRNA 基因、3 个 23S rRNA 基因,tRNA 基因 69 个,sRNA 基因 19 个。平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)的结果显示,菌株 S22 的基因组序列与 *P. kurunegalensis* RW1P2^T 基因组的 ANI 为 96.39%,由此菌株 S22 被归类为 *P. kurunegalensis* S22。

将菌株 S22 预测的蛋白序列进行功能注释后,基于 KO 注释结果映射至 KEGG 参考代谢通路,筛选与氮代谢过程相关的基因,同时结合关键功能基因进行同源序列比对,并据此绘

表3 基因组组装结果

Table 3 Genome assembly results

Items	Results
Genome size/bp	5 874 473
Scaffold number	33
Max length/bp	722 119
Min length/bp	976
Sequence G+C/%	62.65
N50/bp	415 540
N90/bp	155 810

制菌株 S22 氮代谢路径图(图 12)。通过上述方法共确定了 24 个与氮代谢相关的基因, 包括反硝化基因: 周质型硝酸盐还原酶基因 *napA*、亚硝酸盐还原酶基因 *nirS*、一氧化氮还原酶基因 *norB* 和 *norC*。此外, 还鉴定了硝酸盐转运蛋白编码基因 *nrt*, 以及亚硝酸盐还原酶基因 *nirB* 和 *nirD*。菌株 S22 通过硝酸盐转运体(nitrate transporter, NRT)将细胞外的硝酸盐转运至胞内,

在周质硝酸盐还原酶的催化作用下还原生成亚硝酸盐, 随后在细胞色素 *cd₁* 型亚硝酸盐还原酶催化作用下还原为一氧化氮, 并由一氧化氮还原酶(nitric oxide reductase, Nor)进一步还原为氧化亚氮气体, 从而去除水体中的氮素。然而, 因基因组中未注释到一氧化二氮还原酶基因(*nosZ*), 基因组分析结果显示, 菌株 S22 无法完全将硝酸盐还原为氮气, 反硝化过程终止于一氧化二

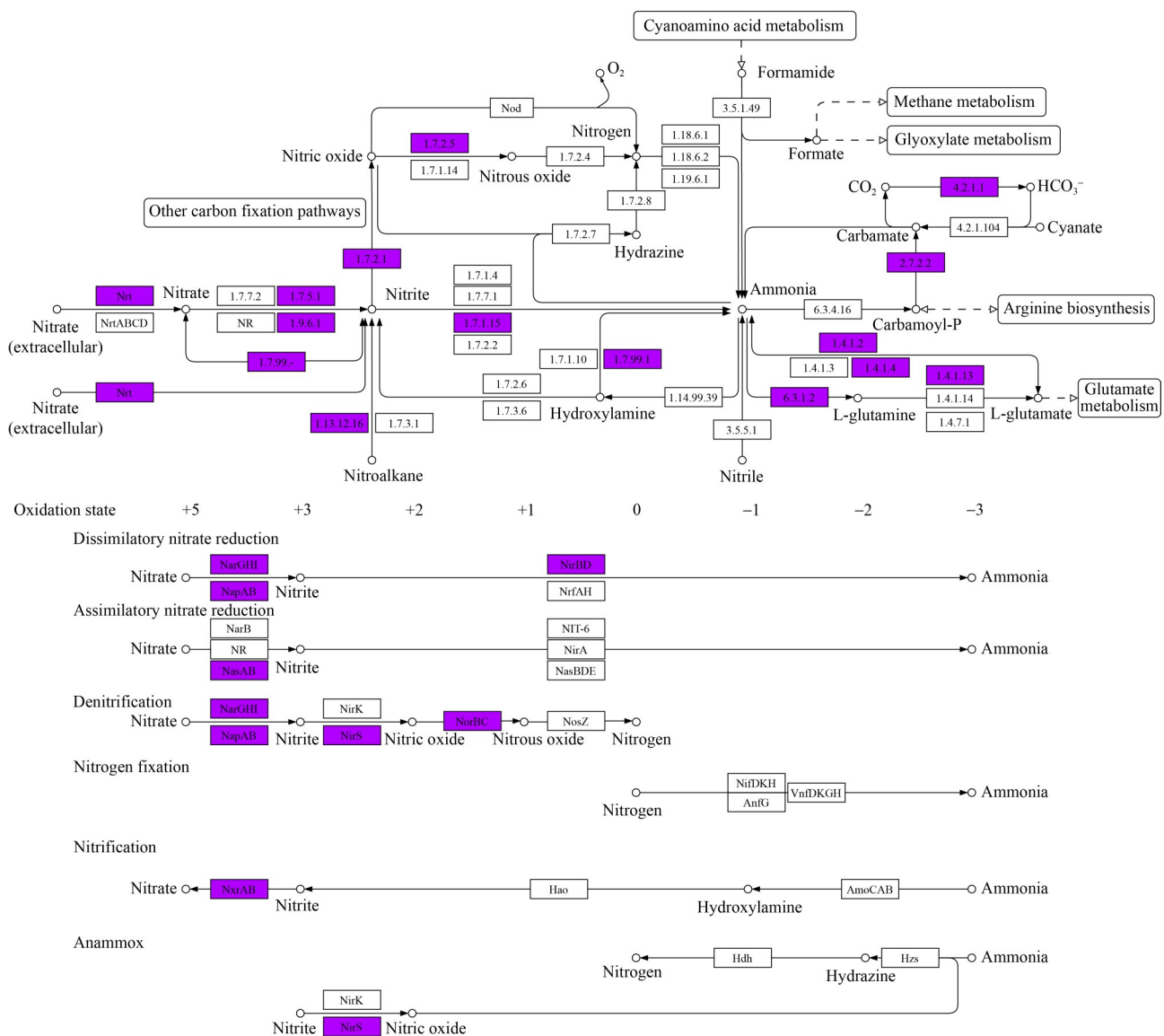


图12 菌株S22的KEGG氮代谢路径

Figure 12 Nitrogen metabolism pathway of strain S22.

氮阶段。基于现有基因组数据,菌株 S22 中并未发现编码氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, Amo)和羟胺氧化还原酶(hydroxylamine oxidoreductase, Hao)的关键基因,因此其是否具备硝化功能有待进一步研究。

3 讨论

3.1 海草根际好氧反硝化菌的多样性

本研究从烟台芝罘湾海草根际沉积物中分离筛选得到 34 株反硝化细菌,经 16S rRNA 基因鉴定,这些菌株分别属于 3 科 3 属。其中,假单胞菌属(19 株)和不动杆菌属(12 株)为优势菌属,丛毛单胞菌属(3 株)为次要菌属。自 1983 年以来,已有大量好氧反硝化菌被分离并报道,菌属类别超过 50 个^[42],其来源包括污水处理系统、水体、沉积物等不同环境。从北京凉水河不同生态位分离出 116 株好氧反硝化菌,涵盖假单胞菌属、莱茵海默氏菌属(*Rheinheimera*)、芽殖杆菌属(*Gemmobacter*)等 14 个属,其中假单胞菌属是凉水河主要的可培养好氧反硝化菌属^[43]。此外,已有超过 16 个属的海洋来源好氧反硝化菌被报道,这些菌株大多分离自河口、海洋沉积物、红树林生态系统和海水养殖区等环境^[44]。从海水养殖水体中分离出 25 株嗜盐性好氧反硝化菌,分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)等 10 个属^[45]。本研究筛选结果与从淡水河流和海水养殖系统中分离到的优势菌属一致,表明这些属是好氧反硝化功能微生物中的核心类群,具有广泛的环境适应性。海草根际是一个独特的微环境,其菌株可能因长期与海草互作而进化出特殊的适应性机制。目前海草床生态系统来源的可培养好氧反硝化菌资源尚未被系统挖掘,本研究系统地从海草床生态系统中分离鉴定好氧反硝化菌,不仅对已知功能菌属进行了生境拓展验证,更挖掘了潜在的本地适应性菌种资源。这些菌株因长期适应海草根际环境,

可能进化出独特的代谢特性,为后续开展“海草-微生物”联合原位修复提供了不可替代的菌种资源。本研究菌株分离自烟台芝罘湾海草床,未来可通过研究不同地理区域、不同海草物种乃至退化海草床的菌群,更深入地了解该生态系统中好氧反硝化细菌的多样性及生态功能。

3.2 菌株 S22 的脱氮影响因素研究及条件优化

对优势菌株 S22 进行系统的脱氮特性研究。假单胞菌属作为反硝化微生物群落的重要类群,其代谢多样性、环境适应性和高效脱氮能力为生物脱氮技术提供了重要资源。好氧反硝化菌可利用的碳源范围广泛,包括小分子有机酸盐类(如乙酸钠、柠檬酸钠、丁二酸钠等)以及糖类(如葡萄糖、蔗糖等),部分研究还报道少数菌株能够利用苯酚等难降解有机物作为碳源^[46]。本研究中菌株 S22 能够利用乙酸钠、柠檬酸钠、丁二酸钠以及葡萄糖等多种常规碳源进行反硝化,展现出良好的代谢灵活性,这种特性有助于其在天然环境中竞争资源并维持功能稳定。其中,以丁二酸钠为碳源时菌株 S22 生长状况最佳,硝酸盐去除率最高。菌株的代谢差异性导致其对碳源种类的选择存在差异,例如从活性污泥中分离出的反硝化菌葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.) SY-D-22 的最佳外接碳源为柠檬酸钠^[47];嗜线虫沙雷氏菌(*Serratia nematodiphila*) HL3 以琥珀酸钠和葡萄糖为唯一碳源时总氮的去除率分别为 81.33% 和 79.22%^[48]。这种碳源利用的多样性有利于好氧反硝化菌在不同环境条件下的竞争与应用^[49]。碳氮比能够显著影响细菌反硝化能力,好氧反硝化菌对碳氮比的适应范围较广,在一定范围内菌株的脱氮能力与碳氮比成正比。本研究中菌株 S22 具有较高的碳氮比适应性,在 C/N 为 5–20 范围内均能够生长并进行脱氮,且效率随 C/N 升高而增强。这与部分已报道菌株的变化趋势有所不同,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) U1

随着碳氮比增加其氮去除率下降^[50]；耐盐菌株盐单胞菌(*Halomonas* sp.) 5505 在 2–32 C/N 条件下均有脱氮能力，随着 C/N 增加呈先增后减的趋势^[51]。这表明菌株 S22 能适应更广泛的营养条件，尤其在碳源相对充足时能发挥最大效能。温度和 pH 是重要的环境因素，好氧反硝化细菌的最适温度为 25–37 °C^[52]，例如菌株 S22、约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*) N26^[53]以及 *P. nitroreducens* PHB18^[41]。然而也有一些反硝化菌能够适应低温或高温，耐低温好氧反硝化菌气单胞菌(*Aeromonas* sp.) Z6 在 10 °C 条件下对硝态氮去除率达到 96.10%^[54]。最佳 pH 为中性或碱性(7.0–8.0)^[52]，pH 影响微生物代谢主要是通过影响酶活性和细胞表面电荷^[55]。不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) ZH7 在 pH 为 10.0 时菌株生长和脱氮能力均受到抑制^[56]，菌株 S22 在 pH 为 6.0–9.0 范围内具有良好的生长与脱氮能力。单因素实验初步确定了其脱氮的适宜条件范围。为进一步提升条件优化的科学性，本研究通过正交试验对 C/N、初始 pH 和培养温度进行多因素交互作用分析。结果表明，C/N 是对脱氮效率影响最显著的因素，其影响程度大于温度和 pH，并获得了理论最优条件组合(C/N=15, pH 9.0, *S*=30‰, 温度 28 °C)。验证实验表明该组合具有良好的可靠性，凸显了多因素优化相较于单因素实验在获取全局最优组合的优势。菌株 S22 展现出了广泛的代谢灵活性与环境耐受性，能够利用多种碳源；在 C/N=5–20 范围内均能有效脱氮；对硝酸盐耐受范围宽(50–500 mg/L)，在 140 mg/L 浓度下 36 h 内去除率达到 99.99%。特别值得注意的是，其最适温度范围 20–30 °C 和最适 pH 范围 8.0–9.0，与我国北方近海海草床的环境特征(如季节性水温、弱碱性海水)高度吻合。这与许多从污水处理系统(最适温度常为 30–37 °C)或淡水湖泊分离的菌株形成对比，凸显了其作为海草床本地菌株的环境适配性与原位应用潜力。

3.3 菌株 S22 脱氮机制初步解析

为阐明菌株 S22 的脱氮途径，本研究通过氮平衡实验对输入氮元素代谢去向进行了定量分析。在好氧培养条件下，菌株 S22 将约 59.64% 的初始 NO₃⁻-N 转化为气态氮，同时大约 15.33% 的初始 NO₃⁻-N 被同化为细胞内生物氮，而亚硝酸盐和铵盐积累量极低。这表明反硝化是菌株 S22 去除硝态氮的主导途径，其代谢通路畅通，环境风险低。这一高效的反硝化能力是其应用于海草床氮负荷削减的核心功能基础。

通过基因组测序和组装得到菌株 S22 完整的基因组信息，本研究从遗传基础上揭示了其高效好氧反硝化能力的分子机制。结果表明其基因组中含有好氧反硝化途径的关键功能基因，包括编码周质硝酸盐还原酶的 *napA* 基因、编码亚硝酸盐还原酶的 *nirS* 基因，以及编码一氧化氮还原酶的 *norBC* 基因。这些基因调控菌株 S22 在有氧条件下高效启动并完成硝酸盐还原过程，从分子层面佐证了其表型功能。在好氧反硝化过程中，*napA* 基因编码的 Nap 发挥着关键作用。与厌氧条件下主导的 Nar 不同，Nap 定位于细胞周质空间，其电子传递链与氧呼吸链相对独立，因而对氧气不敏感，能够在有氧条件下将硝酸盐还原为亚硝酸盐。这一机制是菌株 S22 在持续振荡培养的好氧环境中仍能高效启动反硝化过程的分子基础。随后，*nirS* 基因编码的亚硝酸盐还原酶(Nir)催化亚硝酸盐还原为一氧化氮，该步骤为反硝化过程的关键限速步骤。*norBC* 基因编码的一氧化氮还原酶(Nor)将一氧化氮还原为气态氮，最终实现水体中硝酸盐的去除。

napA 与 *nirS* 基因不仅是反硝化途径的核心功能基因，还具有重要的分子标记价值。在好氧条件下，调控 Nar 合成和表达的转录因子失活则 Nar 的基因表达受到抑制^[57]，而 Nap 优先在好氧条件下表达。亚硝酸盐还原酶催化亚硝酸盐转化为一氧化氮，是反硝化作用有别于其

他硝酸盐代谢的标志性反应, *nirS* 和 *nirK* 基因在大多数反硝化微生物中互斥存在, 且主要存在于反硝化菌群中。*napA* 基因可用于快速筛选好氧反硝化菌资源, *nirS* 基因则广泛用于研究环境样本中反硝化菌群的群落结构与动态变化。

3.4 应用于海草床修复的潜力与展望

近海海草床生态系统具有提高水质等多种生态功能, 海草床中反硝化速率约为无植被沉积物的 5 倍^[2], 但富营养化会对海草的存活和生长产生显著的负面效应^[58], 改变其关键功能过程, 阻碍重新定植^[2]。基于本研究结果, 菌株 S22 作为海草床生境菌种资源, 具有高效的反硝化能力, 展现出应用于该生境的潜力。为实现其“微生物-海草”协同修复功能, 需探讨可行的技术路径。结合现有微生物修复研究, 可将菌株 S22 制备成固定化菌剂, 吸附于生物炭等环境友好型载体, 通过人工投放于氮污染海草床的沉积物表面。接种剂量需通过后续微宇宙模拟实验确定, 依据目标氮负荷进行优化确定, 在修复过程中需兼顾经济性与生态安全性。未来的应用研究应着力于开展微宇宙实验及原位实验验证菌株的定殖能力、功能持久性及对海草生长和生态功能的实际促进效果, 评估其与复杂土著微生物群落的互作关系。通过将实验室成果与生态修复技术相结合, 为富营养化造成的退化海草床修复提供可持续解决方案, 实现长效生态恢复。

4 结论

本研究系统地从海草根际沉积物中分离筛选出好氧反硝化细菌菌群, 共获得 34 株菌, 以假单胞菌属和不动杆菌属为优势菌属, 丰富了该特殊生境功能微生物资源。对优势菌株 *Pseudomonas* sp. S22 的研究表明, 其具有高效的反硝化能力(140 mg/L NO₃⁻-N, 36 h 去除率达到 99.99%)和良好的环境适应性。最适温度范围 20–30 °C 和最适 pH 范围 8.0–9.0 与其来源环境

特征相匹配, 通过正交试验优化获得了其最优脱氮条件组合(C/N=15, pH 9.0, T=28 °C)。氮平衡实验表明, 菌株 S22 能将约 59.64% 的硝态氮通过反硝化途径转化为气态氮, 且中间产物积累极少, 表明其脱氮过程高效且环境风险较低。基因组分析发现其携带 *napA*、*nirS*、*norBC* 等好氧反硝化关键基因, 为表型提供了分子水平支持。菌株 S22 作为从海草床原位分离的功能菌株, 对富营养化海草床的微生物修复具有重要应用潜力。

作者贡献声明

刘晨: 设计并执行实验, 分析数据, 撰写及修改论文; 孙延瑜: 指导设计实验, 修改论文; 刘青: 指导设计实验; 胡晓珂: 指导设计实验, 修改论文。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Nixon SW. Coastal marine eutrophication: a definition, social causes, and future concerns[J]. *Ophelia*, 1995, 41(1): 199-219.
- [2] Duarte CM, Krause-Jensen D. Intervention options to accelerate ecosystem recovery from coastal eutrophication[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2018, 5: 470.
- [3] Burkholder JM, Mason KM, Glasgow HB Jr. Water-column nitrate enrichment promotes decline of eelgrass *Zostera marina*: evidence from seasonal mesocosm experiments[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1992, 81: 163-178.
- [4] Touchette BW, Burkholder JM, Glasgow HB. Variations in eelgrass (*Zostera marina* L.) morphology and internal nutrient composition as influenced by increased temperature and water column nitrate[J]. *Estuaries*, 2003, 26(1): 142-155.
- [5] Van Katwijk MM, Vergeer L, Schmitz G, Roelofs J. Ammonium toxicity in eelgrass *Zostera marina*[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1997, 157: 159-173.
- [6] Schmidt AL, Wysmyk JKC, Craig SE, Lotze HK. Regional-scale effects of eutrophication on ecosystem structure and services of seagrass beds[J]. *Limnology and Oceanography*, 2012, 57(5): 1389-1402.
- [7] Govers LL, de Brouwer JHF, Suykerbuyk W, Bouma TJ, Lamers LPM, Smolders AJP, van Katwijk MM. Toxic effects of increased sediment nutrient and organic matter

- loading on the seagrass *Zostera noltii*[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 155: 253-260.
- [8] Whitfield AK. Coastal lagoons-critical habitats of environmental change[J]. Marine Biology Research, 2011, 7(4): 416-417.
- [9] Thomsen E, Herbeck LS, Jennerjahn TC. The end of resilience: Surpassed nitrogen thresholds in coastal waters led to severe seagrass loss after decades of exposure to aquaculture effluents[J]. Marine Environmental Research, 2020, 160: 104986.
- [10] Pedersen MF, Borum J, Leck Fotel F. Phosphorus dynamics and limitation of fast- and slow-growing temperate seaweeds in Oslofjord, Norway[J]. Marine Ecology Progress Series, 2010, 399: 103-115.
- [11] Orth RJ, Carruthers TJB, Dennison WC, Duarte CM, Fourqurean JW, Heck KL, Hughes AR, Kendrick GA, Kenworthy WJ, Olyarnik S, Short FT, Waycott M, Williams SL. A global crisis for seagrass ecosystems[J]. BioScience, 2006, 56(12): 987.
- [12] Holmer M, Pedersen O, Krause-Jensen D, Olesen B, Hedegård Petersen M, Schopmeyer S, Koch M, Lomstein BA, Jensen HS. Sulfide intrusion in the tropical seagrasses *Thalassia testudinum* and *Syringodium filiforme*[J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2009, 85(2): 319-326.
- [13] Cebrian J, Corcoran D, Lartigue J. Eutrophication-driven shifts in primary producers in shallow coastal systems: implications for system functional change[J]. Estuaries and Coasts, 2014, 37(S1): 180-197.
- [14] Waycott M, Duarte CM, Carruthers TJB, Orth RJ, Dennison WC, Olyarnik S, Calladine A, Fourqurean JW, Heck KL Jr, Hughes AR, Kendrick GA, Kenworthy WJ, Short FT, Williams SL. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(30): 12377-12381.
- [15] Du JG, Chen B, Nagelkerken I, Chen SQ, Hu WJ. Protect seagrass meadows in China's waters[J]. Science, 2023, 379(6631): 447.
- [16] 刘伟妍, 韩秋影, 唐玉琴, 孙西艳. 营养盐富集和全球温度升高对海草的影响[J]. 生态学杂志, 2017, 36(4): 1087-1096.
- Liu WY, Han QY, Tang YQ, Sun XY. Review of nutrient enrichment and global warming effects on seagrasses[J]. Chinese Journal of Ecology, 2017, 36(4): 1087-1096 (in Chinese).
- [17] 唱彤, 酈建强, 陈文学, 郭旭宁, 刘为锋, 李云玲, 吴凤燕. 湖泊生态系统修复理论与技术研究进展[J]. 水科学进展, 2024, 35(6): 1005-1020.
- Chang T, Li JQ, Chen WX, Guo XN, Liu WF, Li YL, Wu FY. Research progress in theories and approaches for lake ecosystem restoration[J]. Advances in Water Science, 2024, 35(6): 1005-1020 (in Chinese).
- [18] Robertson LA, Kuenen JG, Kleijntjens R. Aerobic denitrification and heterotrophic nitrification by *Thiosphaera pantotropha*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1985, 51(4): 445.
- [19] Robertson LA, Kuenen JG. Further evidence for aerobic denitrification by *Thiosphaera pantotropha*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1985, 51(5/6): 561.
- [20] 徐彬丽, 陈小煌, 贾丽萍, 黄旭光, 邹毅彬. 1株好氧反硝化菌的筛选及其脱氮能力分析[J]. 闽南师范大学学报(自然科学版), 2025, 38(2): 92-101.
- Xu BL, Chen XH, Jia LP, Huang XG, Zou YB. Screening one aerobic denitrifying bacterial strain and characterization of its denitrification capacity[J]. Journal of Zhangzhou Teachers College (Natural Science Edition), 2025, 38(2): 92-101 (in Chinese).
- [21] 别绮雯, 王进, 马丁, 江一凡, 岳正波, 张露. 一株耐盐反硝化菌的分离及脱氮特性[J]. 环境科学与技术, 2025, 48(5): 97-109.
- Bie QW, Wang J, Ma D, Jiang YF, Yue ZB, Zhang L. Isolation and denitrification characteristics of a saline-tolerant denitrifying bacterial strain[J]. Environmental Science & Technology, 2025, 48(5): 97-109 (in Chinese).
- [22] Xu ZY, Xiao KY, Li XS, Zhang XL, Ban YH, Jiang YH. Study on screening and denitrification characteristics of highly efficient aerobic denitrifying bacteria from lake sediments[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2024, 235(3): 195.
- [23] 吴蒙蒙, 孔勇, 舒凤月, 周晶. 南四湖沉积物中反硝化细菌的分离筛选及发酵条件优化[J]. 现代农业科技, 2025(11): 127-131.
- Wu MM, Kong Y, Shu FY, Zhou J. Isolation, screening and fermentation conditions optimization of denitrifying bacteria from sediments in nansi lake[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2025(11): 127-131 (in Chinese).
- [24] 王春萍, 汪稼琪, 李冰雪, 许淑芹, 郭宏宇, 王银华. 天津滨海湿地一株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮特性研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2024, 57(6): 33-38.
- Wang CP, Wang JQ, Li BX, Xu SQ, Guo HY, Wang YH. Isolation, identification and nitrogen removal characteristics of a bacteria strain with high-efficient aerobic denitrifying ability from Tianjin coastal wetland[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis (Natural Science Edition), 2024, 57(6): 33-38 (in Chinese).
- [25] 武金发, 陈朕. 一株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌 *Vibrio sinoensis* W37 的分离及脱氮特性[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2025, 34(2): 30-37.
- Wu JF, Chen Z. Isolation and denitrification characteristics of a salt tolerant heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Vibrio sinoensis* W37[J]. Journal of Jiangsu Ocean University (Natural Science Edition), 2025, 34(2): 30-37 (in Chinese).
- [26] Zheng HY, Liu Y, Sun GD, Gao XY, Zhang QL, Liu ZP. Denitrification characteristics of a marine origin psychrophilic aerobic denitrifying bacterium[J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(11): 1888-1893.
- [27] 朱宝兴, 王翌涵, 白洁, 陈晓红, 李屹, 陈田田, 李辉, 晨曦. 一株耐盐高效异养硝化-好氧反硝化菌 *Oceanisphaera* sp. BX1 的分离鉴定及脱氮性能研究[J]. 海洋湖沼通报(中英文), [2026-05-30]. <https://link.cnki.net/urlid/37.1141.P.20250819.1501.006>.
- Zhu BX, Wang YH, Bai J, Chen XH, Li Y, Chen TT, Li H, Chen X. Efficient heterotrophic nitrification-aerobic

- denitrification by a salt-tolerant and novel bacterium *Oceanisphaera* sp. BX1: isolation, identification, and nitrogen removal[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, [2026-05-30]. <https://link.cnki.net/urlid/37.1141.P.20250819.1501.006> (in Chinese).
- [28] Wang F, Fan YY, Jiang WQ, Sun XJ, Zhang Y, Liu SL, Bian DJ. Analysis of treatment effect and microbial degradation pathway of municipal wastewater by multi-stage micro pressure internal circulation mud membrane coupling process[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2025, 13(5): 117931.
- [29] 付嘉辰, 王静, 赵乙颖, 文辉燕, 安晓, 陈玉成, 周忠波. 微藻驱动的好氧甲烷氧化耦合反硝化光生物膜反应器的脱氮性能[J]. *环境工程*, 2023, 41(8): 18-25.
- Fu JC, Wang J, Zhao YY, Wen HY, An X, Chen YC, Zhou ZB. Nitrogen removal performance by algal-driven aerobic methane oxidation coupled with denitrification in a photo-biofilm reactor[J]. *Environmental Engineering*, 2023, 41(8): 18-25 (in Chinese).
- [30] Fallahi A, Rezvani F, Asgharnejad H, Khorshidi Nazloo E, Hajinajaf N, Higgins B. Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: a review[J]. *Chemosphere*, 2021, 272: 129878.
- [31] Zhang LF, Huang XD, Chen WT, Fu GK, Zhang Z. Microalgae-assisted heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process for cost-effective nitrogen and phosphorus removal from high-salinity wastewater: Performance, mechanism, and bacterial community[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 390: 129901.
- [32] 高胜寒. 水生植物与好氧反硝化菌联合脱氮除磷效果的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2023.
- Gao SH. Effect of nitrogen and phosphorus removal by aquatic plant combined with aerobic denitrifying bacteria[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2023 (in Chinese).
- [33] 田秀芳, 李平. 水生植物联合反硝化菌对黑臭水体的修复研究[J]. *广东化工*, 2023, 50(20): 116-118.
- Tian XF, Li P. Research on the restoration of black and odorous water body by the symbiosis of aquatic plants and denitrifying bacteria[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2023, 50(20): 116-118 (in Chinese).
- [34] 郭丽芸, 时飞, 杨柳燕. 反硝化菌功能基因及其分子生态学研究进展[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(4): 583-590.
- Guo LY, Shi F, Yang LY. Advances in functional genes and molecular ecology in denitrifiers[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(4): 583-590 (in Chinese).
- [35] Zhang N, Zhang YT, Bohu T, Wu SH, Bai ZH, Zhuang XL. Nitrogen removal characteristics and constraints of an alphaproteobacteria with potential for high nitrogen content heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 235.
- [36] Yi MM, Wang H, Ma XN, Wang C, Wang M, Liu ZG, Lu MX, Cao JM, Ke XL. Efficient nitrogen removal of a novel *Pseudomonas chengduensis* strain BF6 mainly through assimilation in the recirculating aquaculture systems[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 379: 129036.
- [37] 国家环境保护总局. 水质 硝酸盐氮的测定 紫外分光光度法(试行): HJ/T 346—2007[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007.
- State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China. Water quality—determination of nitrate-nitrogen—ultraviolet spectrophotometry: HJ/T 346—2007[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2007 (in Chinese).
- [38] 国家环境保护总局. 水质 亚硝酸盐氮的测定 分光光度法: GB 7493—87[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 1987.
- State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China. Water quality—determination of nitrogen (nitrite)—spectrophotometric method: GB 7493—87[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 1987 (in Chinese).
- [39] 环境保护部. 水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法: HJ 535—2009[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2009.
- State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China. Water quality—determination of ammonia nitrogen—Nessler's reagent spectrophotometry: HJ 535—2009[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2009 (in Chinese).
- [40] 环境保护部. 水质 总氮的测定 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法: HJ 636—2012[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
- State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China. Water quality—determination of total nitrogen—alkaline potassium persulfate digestion UV spectrophotometric method: HJ 636—2012[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2012 (in Chinese).
- [41] 裴晗博, 王秀杰, 朱云鹏, 冯楷民, 孙志涛, 郭伟. 好氧反硝化菌 *Pseudomonas nitroreducens* PHB18 的鉴定及其脱氮特性[J]. *内蒙古工业大学学报(自然科学版)*, 2025, 44(3): 210-216.
- Pei HB, Wang XJ, Zhu YP, Feng KM, Sun ZT, Guo W. Identification of the aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas nitroreducens* PHB18 and its characteristics of nitrogen removal[J]. *Journal of Inner Mongolia University of Technology (Natural Science Edition)*, 2025, 44(3): 210-216 (in Chinese).
- [42] 张建云, 谷立坤, 王亚西, 李潇扬, 宁志琪, 孙森焜, 张欣, 白志辉. 植物叶际好氧反硝化细菌的筛选及其脱氮性能研究[J]. *微生物学报*, 2024, 64(5): 1521-1537.
- Zhang JY, Gu LK, Wang YX, Li XY, Ning ZQ, Sun MK, Zhang X, Bai ZH. Aerobic denitrifying bacteria in the phyllosphere: screening and characterizing of nitrogen removal performance[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(5): 1521-1537 (in Chinese).
- [43] Lv PY, Luo JX, Zhuang XL, Zhang DQ, Huang ZB, Bai ZH. Diversity of culturable aerobic denitrifying bacteria in the sediment, water and biofilms in Liangshui River of Beijing, China[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 10032.
- [44] 齐睿洁, 王健鑫. 海洋环境异养硝化-好氧反硝化菌的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(1): 66-76.
- Qi RJ, Wang JX. Advances in heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria in marine environment[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(1): 66-76 (in Chinese).
- [45] Huang F, Pan LQ, He ZY, Zhang MY, Zhang MZ. Identification, interactions, nitrogen removal pathways and performances of culturable heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria from mariculture water by

- using cell culture and metagenomics[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 732: 139268.
- [46] Ge QL, Yue XP, Wang GY. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at high initial phenol concentration by isolated bacterium *Diaphorobacter* sp. PD-7[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2015, 23(5): 835-841.
- [47] 张宇红, 刘香宇, 董先博, 许家琪, 徐子凌. 好氧反硝化细菌 SY-D-22 的分离、优化及脱氮机理[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(5): 1815-1825.
- Zhang YH, Liu XY, Dong XB, Xu JQ, Xu ZL. Aerobic denitrifying bacterium SY-D-22: isolation, optimization of denitrification conditions, and characterization of denitrification mechanism[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(5): 1815-1825 (in Chinese).
- [48] 刘凤坤, 赵吉臣, 许敬轩, 阮灼豪, 杨岚心, 郭慧, 黄文. 一株好氧反硝化细菌 HL3 的鉴定及脱氮性能研究[J]. *环境科学与技术*, 2024, 47(S2): 123-132.
- Liu FK, Zhao JC, Xu JX, Ruan ZH, Yang LX, Guo H, Huang W. Identification and nitrogen removal performance of an aerobic denitrifying bacterium HL3[J]. *Environmental Science & Technology*, 2024, 47(S2): 123-132 (in Chinese).
- [49] 丁钰, 张婷月, 黄民生, 何岩, 曹承进. 好氧反硝化菌及其在污水处理和环境修复中的研究进展[J]. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2018(6): 1-11, 67.
- Ding Y, Zhang TY, Huang MS, He Y, Cao CJ. Aerobic denitrifiers and the state of research in their use for sewage treatment and environmental remediation[J]. *Journal of East China Normal University (Natural Science)*, 2018(6): 1-11, 67 (in Chinese).
- [50] 高雅娟, 靳静晨, 高洁, 高宇轩, 吴慧娟, 张闻天, 李晨晨, 张国伟, 靳永胜. 耐高浓度氨氮的异养硝化好氧反硝化菌株 U1 的鉴定及其脱氮特性[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(7): 2442-2456.
- Gao YJ, Jin JC, Gao J, Gao YX, Wu HJ, Zhang WT, Li CC, Zhang GW, Jin YS. Identification and denitrification characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification strain U1 resistant to high concentrations of ammonia nitrogen[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(7): 2442-2456 (in Chinese).
- [51] 谢卓斌, 王芸, 蒋刚强, 李雨薇, 李文昌, 刘一帆, 吴张秀, 黄媛媛, 唐蜀昆. 一株中度嗜盐异养硝化-好氧反硝化盐单胞菌 5505 的分离和氮转化特性[J]. *生物工程学报*, 2025, 41(6): 2467-2482.
- Xie ZB, Wang Y, Jiang GQ, Li YW, Li WC, Liu YF, Wu ZX, Huang YY, Tang SK. Isolation and nitrogen transformation characterization of a moderately halophilic nitrification-aerobic denitrification strain *Halomonas* sp. 5505[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2025, 41(6): 2467-2482 (in Chinese).
- [52] 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[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2015, 20(4): 643-651.
- [53] 夏远舰, 杨小丽, 李海华, 赵博. 异养硝化-好氧反硝化菌 *Acinetobacter johnsonii* sp. N26 的脱氮性能及代谢途径[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(4): 1374-1395.
- Xia YJ, Yang XL, Li HH, Zhao B. Optimization of nitrogen removal performance and metabolic pathway of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterial strain *Acinetobacter johnsonii* sp. N26[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(4): 1374-1395 (in Chinese).
- [54] 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[J]. *微生物学报*, 2022, 62(6): 2038-2052.
- Dong YH, Zhang XY, Zou LA, Wang ZY, Chen F, Li L. Isolation and identification of a cold-tolerant and aerobic denitrifying bacterium *Aeromonas* sp. and optimization of denitrification conditions[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(6): 2038-2052 (in Chinese).
- [55] 吕鹏翼, 李小曼, 罗晓, 刘云琦, 林冬庆. 极端环境中异养硝化-好氧反硝化微生物的研究进展[J]. *微生物学报*, 2024, 64(12): 4681-4700.
- Lyu PY, Li XM, Luo X, Liu YQ, Lin DQ. Heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying microorganisms in extreme environments[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(12): 4681-4700 (in Chinese).
- [56] 杨宗政, 孟珠, 焦永杰, 闫慧娟, 左梓涵, 张晶, 吴志国. 异养硝化-好氧反硝化菌 ZH7 的分离鉴定及脱氮特性研究[J]. *生物学杂志*, 2024, 41(5): 34-41.
- Yang ZZ, Meng Z, Jiao YJ, Yan HJ, Zuo ZH, Zhang J, Wu ZG. Isolation, identification and nitrogen removal characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium ZH7[J]. *Journal of Biology*, 2024, 41(5): 34-41 (in Chinese).
- [57] Durand S, Guillier M. Transcriptional and post-transcriptional control of the nitrate respiration in bacteria[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 667758.
- [58] 李诗奇, 张彦浩, 李政, 张沛东. 大叶藻对氮磷营养盐的吸收动力学特征[J]. *植物生态学报*, 2020, 44(7): 772-781.
- Li SQ, Zhang YH, Li Z, Zhang PD. Uptake kinetics of nitrogen and phosphorus by *Zostera marina*[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2020, 44(7): 772-781 (in Chinese).