睢双铭,宋依琳,李莹莹,等.一株异养硝化-好氧反硝化陶厄氏菌的脱氮特性研究 [J]. 中国环境科学, 2025,45(9):5176-5189.
Sui S M, Song Y L, Li Y Y, et al. Studies on the nitrogen metabolism characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying *Thauera butanivorans.* Strain [J]. China Environmental Science, 2025,45(9):5176-5189.

一株异养硝化-好氧反硝化陶厄氏菌的脱氮特性研究

睢双铭[1],宋依琳[1],李莹莹[1],张维晋[1],李 祝[1,2],廖明军[1,2*] (1.湖北工业大学土木建筑与环境学院,环境岩土与河湖生态修复湖北省重点实验,湖北 武汉 430068；2.工业发酵省部共建协同创新中心,湖北 武汉 430068)

摘要：通过富集分离的方法,从香料废水中获得一株具有异养硝化-好氧反硝化功能的菌株 SVT,经菌落形态以及 16S rDNA 分析鉴定为陶厄氏菌 *Thauera butanivorans* SVT.提取菌株基因组 DNA 并进行全基因组测序,分析和预测其氮代谢通路;以 100mg/L 的 NH_4^+-N、NO_3^--N 或 NO_2^--N 为唯一氮源研究了菌株 SVT 的氮代谢特征,并研究了不同单一碳源(无水乙酸钠、柠檬酸钠、琥珀酸钠、蔗糖和葡萄糖)、C/N 比(1、5、10、15、30)温度(10、20、30、40 和 50℃)和 pH(4.0、6.5、7.5、8.5、10.0)对该菌株异养硝化-好氧反硝化性能的影响.结果表明,该菌株以 NH_4^+-N、NO_3^--N 和 NO_2^--N 为唯一氮源时,48h 内的 TN 去除率分别为(86.96±1.03)%、(60.52±4.70)%和(64.32±1.40)%;菌株 SVT 在所设置的不同碳源、C/N 比、温度和 pH 值条件下均能够生长和异养硝化-好氧反硝化脱氮,最适条件为以无水乙酸钠为碳源,温度 30℃,C/N=10,pH 值为 7.5.通过基因组测序,发现菌株 SVT 含有 6 种氮代谢相关功能酶的基因(*napAB*、*nxrAB*、*nirBD*、*nirS*、*norBC* 和 *nosZ*),结合 KEGG 数据库比对和单一氮源氮代谢特征结果推测其氮代谢途径包括:NH_4^+-N 同化途径(NH_4^+-N→L-谷氨酸盐→L-谷氨酸)、硝化途径(NH_4^+-N→NO_2^--N→NO_3^--N)、反硝化途径(NO_3^--N→NO_2^--N→NO→N_2O→N_2)和 DNRA 途径(NO_3^--N→NO_2^--N→NH_4^+-N).研究表明菌株 SVT 具有高效的异养硝化-好氧反硝化能力,在废水处理中具有广阔的应用前景.

关键词：陶厄氏菌；异养硝化-好氧反硝化；脱氮；基因组测序；氮代谢途径
中图分类号：X172 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2025)09-5176-14

Studies on the nitrogen metabolism characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying *Thauera butanivorans.* strain.

SUI Shuang-ming[1], SONG Yi-lin[1], LI Ying-ying[1], ZHANG Wei-jin[1], LI Zhu[1,2], LIAO Ming-jun[1,2*] (1.School of Civil Engineering, Architecture and Environment, Hubei University of Technology,Hubei Key Laboratory of Ecological Remediation for Rivers-Lakes and Algal Utilization, Wuhan 430068, China；2.Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Ministry of Education & Hubei Province, Wuhan 430068, China). *China Environmental Science*, 2025,45(9)：5176~5189

Abstract：A heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium, identified as Thauera butanivorans SVT, was isolated from spice wastewater. Genomic DNA of the isolate was extracted for whole-genome sequencing to analyze and predict nitrogen metabolic pathways. The nitrogen metabolism characteristics were investigated using 100mg/L NH_4^+-N, NO_3^--N, or NO_2^--N as sole nitrogen sources. The effects of different carbon sources (sodium acetate anhydrous, sodium citrate, sodium succinate, sucrose, and glucose), C/N ratios (1, 5, 10, 15, 30), temperatures (10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C), and pH levels (4.0, 6.5, 7.5, 8.5, 10.0) on its heterotrophic nitrification-aerobic denitrification performance were systematically investigated. Results showed total nitrogen removal rates of (86.96±1.03)%, (60.52±4.70)%, and (64.32±1.40)% within 48hours when using NH_4^+-N, NO_3^--N, and NO_2^--N as sole nitrogen sources, respectively. Strain SVT demonstrated growth and nitrogen removal capabilities under all tested conditions, with optimal performance achieved using sodium acetate anhydrous as carbon source at 30°C, C/N=10, and pH 7.5. Genomic analysis identified six nitrogen metabolism-related functional enzyme genes (*napAB, nxrAB, nirBD, nirS, norBC, and nosZ*). Combined with KEGG database alignment and single nitrogen source metabolism results, the proposed nitrogen metabolic pathways include: ammonium assimilation (NH_4^+-N→L-glutamate→L-glutamine), nitrification (NH_4^+-N→NO_2^--N→NO_3^--N), denitrification (NO_3^--N→NO_2^--N→NO→N_2O→N_2), and DNRA pathway (NO_3^--N→NO_2^--N→NH_4^+-N). This study demonstrates that strain SVT exhibits efficient heterotrophic nitrification-aerobic denitrification capabilities, showing promising potential for wastewater treatment applications.

Key words：*Thauera*；heterotrophic nitrification-aerobic denitrification；genomic sequencing；nitrogen removal；nitrogen metabolic pathway

收稿日期：2025-02-24
基金项目：国家自然科学基金资助项目(51579092);中国能源建设股份有限公司重大科技项目(CEEC2023-ZDYF-09)
* 责任作者, 副教授, lmj1112@163.com

2022 年中国环境统计年鉴显示,我国的工业废水处理能力已经达到日处理污水 1.8 亿 t,废水治理设施共有 72848 套,其中生物脱氮在工业废水处理中应用广泛[1].废水处理系统中主要的脱氮微生物类群有:硝化细菌、反硝化细菌和厌氧氨氧化菌等[2-8],目前研究报道的微生物脱氮类群大量集中在反硝化细菌,特别是利用其好氧反硝化能力进行脱氮[9].而随着研究的不断深入发现异养硝化好氧反硝化菌打破了传统的生物脱氮理论,能够利用有机物进行硝化反应,同时在好氧条件下发挥反硝化作用,能在同一反应器内实现完整的硝化-反硝化脱氮反应[10-11],这样可以节约大量的投资成本和土地[12].近年来,基于异养硝化好氧反硝化的脱氮工艺引起了越来越广泛的关注[13].

陶厄氏菌属(*Thauera*)是*β*-变形菌纲下的一类革兰氏阴性菌.众多研究显示陶厄氏菌属在污水处理系统中是一类优势菌群[14-16],在以硝酸钠为氮源,乙酸钠为碳源的污泥系统中较为常见.该菌属的存在对反硝化脱氮能力的提升有较大贡献,在污水反硝化脱氮中起着关键作用[17]从现有的对分离出陶厄氏菌纯菌株的研究来看,对陶厄氏菌脱氮性能的研究主要集中在反硝化能力[18-20],其他的研究主要涉及具有芳香族化合物降解的功能以及具有碳、硫、磷等多种功能代谢途径[14,21-22].目前国内外研究中鲜有关于陶厄氏菌异养硝化能力的报道,对陶厄氏菌的纯菌株硝化能力的报道仅有 1 例:*Thauera* sp SND5[23],研究发现该菌株 SND5 有同步硝化反硝化脱氮的现象,但缺少对适应环境范围的探究以及对相关脱氮机制的研究.总的来说,缺乏关于陶厄氏菌氮代谢以及脱氮的影响因素的详细研究,因此开展相关的研究将有助于解释陶厄氏菌在污水处理系统微生物群落中居优势地位的内在机制,从而更好地优化废水处理系统生物脱氮工艺.

本研究拟分离获得陶厄氏菌株,研究其异养硝化-好氧反硝化性能,结合全基因组测序预测其氮代谢途径,并探究影响其脱氮性能的环境因子,解析其脱氮机制,为陶厄氏菌在污水脱氮工艺中的应用提供理论依据.

1　材料与方法

1.1　培养基

富集培养基(EM)[24](g/L):$MgSO_4$ 0.2、NH_4Cl 0.38、$NaHCO_3$ 1、NaCl 2、K_2HPO_4 0.1、CH_3COONa 3.4、$FeSO_4·7H_2O$ 0.05、微量元素 1mL,蒸馏水 1000mL,pH 7~8.

微量元素(g/L):$CuSO_4$ 0.075、$ZnSO_4$ 0.3、$CoCl_2$ 0.375、$MnCl_2$ 0.3、EDTA 0.5、$NaMoO_4$ 0.22、H_3BO_4 0.014.

在培养基中按 2%的体积比加入琼脂粉以制备琼脂平板,以上培养基均需要在高压灭菌锅 103.4kpa、121℃条件下灭菌 20min,待冷却至室温后使用.

1.2　富集培养及分离纯化

污泥样品取自香料废水污水处理厂采集的好氧活性污泥.取 10mL 污泥置于 250mL 锥形瓶中,并添加 100mL 富集培养基,在 30℃、100r/min 条件下进行恒温振荡培养,每 24h 监测 NH_4^+-N 和 TN 浓度;当氨氮浓度低于 10mg/L 时,将培养液按 1%的比例(v/v)转接至新鲜液体培养基中继续富集.

连续富集 5 轮后,采用平板划线的方法分离菌株.经过连续 5 轮平板划线后,挑取单个菌落接种到装有 10mL 液体富集培养基的试管中,于 30℃、100r/min 下培养,用于后续实验.

1.3　16S rDNA 序列测定及系统发育分析

采用 16S rDNA 测序技术对目标菌株进行种属鉴定.以提取的菌株基因组 DNA 为模板,选用通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 作为扩增引物,进行 16S rDNA 基因片段的 PCR 扩增.PCR 扩增程序设置如下:初始阶段 94℃预变性 4min;随后进行 25 个循环的扩增反应,每个循环包括 94℃变性 25s、72℃退火 30s 和 72℃延伸 30s;最后 72℃终延伸 5min.扩增结束后,取 2μL 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析,以验证扩增片段的质量和完整性.经质量检测合格的 PCR 产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序分析.

将获得的 16S rDNA 序列与 NCBI 核酸数据库中的核糖体 RNA 序列(包括细菌和古菌)进行 Blast 同源性比对.采用 MEGA 11.0 分析软件,基于 Neighbor-Joining 算法构建系统发育进化树,以确定菌株的系统分类地位.

1.4　全基因组测序分析推测氮代谢途径

采用磁珠法提取菌株基因组 DNA,送到上海美吉生物医药科技有限公司进行基因组测序.采用 Illumina 二代平台和 PacBio 三代平台相结合的方式构建菌株基因组文库,进行 Illumina 测序.随后进行基因注释与预测,并与各大数据库(GO、KEGG、COG、NR、Pfam、TCDB 和 Swiss-Prot)进行对比,对菌株预测到的编码序列进行基因功能注释,通过 KEGG pathway 绘制代谢通路图.

1.5 菌株的脱氮性能研究

将对数生长期(OD_{600} 大于 0.5)的菌液按照 0.1%(v/v)接种量接种于含有 100mL EM 培养基的 250mL 锥形瓶中培养,检测菌株异养硝化能力.设置 3 个平行样,在温度为 30℃、初始 pH 值为 7.5、转速为 100r/min 的条件下培养.每隔 12h 取菌液 2mL,4500r/min 离心 15min,取上清液,测定其中的 NH_4^+-N、NO_3^--N、NO_2^--N,同时取 2mL 未离心的菌液测定 TN 和 OD_{600}.

用 $NaNO_3$(0.72g/L)替换 EM 培养基中的 NH_4Cl 配制好氧反硝化培养基-1(DM-1),用 $NaNO_2$(0.49g/L)替换 EM 培养基中的 NH_4Cl 配制好氧反硝化培养基-2(DM-2).分别用 DM-1 和 DM-2 培养基替换 EM 培养基检测菌株的好氧反硝化能力,接种、培养条件,取样、检测指标等均与异养硝化实验相同.

1.6 菌株脱氮特性的影响因素研究

改变培养基中的碳源、C/N 比、温度和初始 pH 值,测试菌株在不同培养条件下的生长和异养硝化特性.将对数生长期(OD_{600} 大于 0.5)的菌液按照 0.1%(*v*/*v*)接种量接种于含有 100mL EM 培养基的 250mL 锥形瓶中培养,分别用柠檬酸钠(3.58g/L)、琥珀酸钠(3.38g/L)、蔗糖(2.37g/L)和葡萄糖(2.5g/L)替换 EM 培养基中的无水乙酸钠,研究碳源对菌株脱氮性能的影响.设置 3 个平行样,在 C/N 比为 10、温度为 30℃、初始 pH 值为 7.5、转速为 100r/min 的条件下培养.每隔 12h 取菌液 2mL,4500r/min 离心 15min,取上清液,测定其中的 NH_4^+-N,同时取 2mL 未离心的菌液测定 TN 和 OD_{600}.

研究菌株在不同C/N比的脱氮性能,改变EM培养基中的碳源浓度,设置成不同的 C/N 比,C/N 比值分别为 1、5、10、15、30.接种、培养条件,取样、检测指标等均与碳源实验相同.

研究菌株在不同培养温度下的脱氮性能,使用EM培养基在不同温度下培养,设置培养温度分别为10、20、30、40 和 50℃.接种、培养条件,取样、检测指标等均与碳源实验相同.

研究菌株在不同初始 pH 值的脱氮性能,使用 EM 培养基在不同初始 pH 值下培养,设置初始 pH 值分别为 4.0、6.5、7.5、8.5、10.0.接种、培养条件,取样、检测指标等均与碳源实验相同.

1.7 分析方法

1.7.1 水质指标的测定与计算 NH_4^+-N 的测定方法为纳氏试剂分光光度法;NO_2^--N 的测定方法为 N-(1-奈基)-乙二胺分光光度法;NO_3^--N 的测定方法为氨基磺酸-紫外分光光度法;TN 的测定方法为碱性过硫酸钾紫外分光光度法[25],OD_{600} 为各浓度菌液在 600nm 波长处的吸光度.

1.比增长速率 $\mu(h^{-1})$:

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_1 - t_2} \tag{1}$$

式中:N_1 表示为初始时刻(t_1)的 OD_{600} 值,N_2 表示在终了时刻(t_2)的 OD_{600} 值,t_1-t_2 为所经历的时间间隔.

2.去除率 R(%)

$$R = \frac{c_1 - c_2}{c_1} \times 100\% \tag{2}$$

式中:C_1 表示初始氮浓度(mg/L),C_2 表示反应中某点氮浓度(mg/L).

3.去除速率 V(mg/(L·h))

$$V = \frac{c_{t2} - c_{t1}}{t_1 - t_2} \tag{3}$$

式中:C_{t1} 代表第 t_1h 氮浓度(mg/L),C_{t2} 代表第 t_2h 氮浓度(mg/L),t_1-t_2 为所经历的时间间隔.

1.7.2 数据统计和作图 采用 Origin 2023 作图(误差量均以 SD 表示),使用 SPSS 26 进行单因素方差分析(多重比较采用 LSD 法),通过 Origin 2023 进行拟合求解作图[26].

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

通过平板划线分离获得了 1 株在富集培养基中生长良好的菌株,该菌株在琼脂平板上的菌落为圆形,呈淡黄色,表面湿润光滑,边缘形状规则(图 1(a));扫描电镜图像显示,该菌株菌体呈杆状,细胞长度为

0.8~1.7μm(图 1(b)).



图 1　菌株 SVT 的形态观察

Fig.1　Morphological observation of strain SVT

扩增获得的菌株 16S rDNA 基因序列片段长度为 1443bp 核苷酸序列,通过 Blast 比对结果显示该菌株与 GenBank 中的菌株 *Thauera butanivorans* NBRC 103042 相似性达 100%,构建系统发育树如图 2,因此将该菌株命名为陶厄氏菌 SVT(*Thauera butanivorans* SVT).

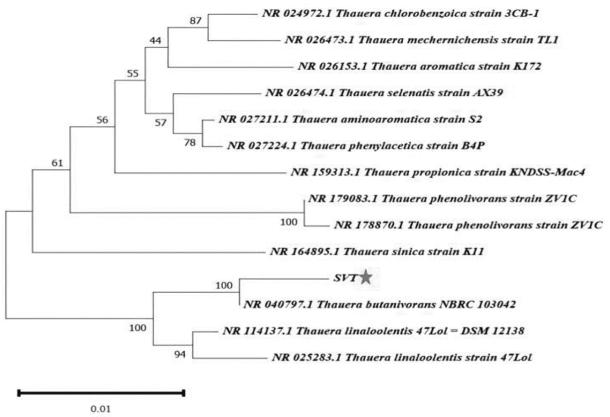


图 2　基于菌株 SVT 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig.2　A Phylogenetic tree constructed based on the 16S rDNA gene sequence of strain SVT

2.2　菌株 SVT 氮代谢途径预测

全基因组数据结果显示,菌株 SVT 基因组总共含有 4457 个编码基因,基因组总长为 4790293bp,基因平均长度为 966.74bp,基因的平均 GC 含量 66.11%,在 KEGG 数据库中注释到有 3319 个编码基因.通过与 KEGG 数据库进行比对分析,注释到菌株 SVT 参与 HN-AD 脱氮途径的关键功能基因有 6 个(表 1),预测到菌株 SVT 氮代谢的途径主要有 4 个:将 NO_2^--N 氧化为 NO_3^--N 的硝化途径,将 NO_3^--N 还原成 N_2 的反硝化途径,将 NO_3^--N 还原成 NH_4^+-N 的异化硝酸盐还原成铵途径(DNRA),将 NH_4^+-N 转化成谷氨酸的同化途径(图 3).

菌株 SVT 在硝化途径方面预测到能将 NO_2^--N 氧化为 NO_3^--N 的亚硝酸盐氧化还原酶的编码基因(*nxrAB*),使 NO_2^--N→NO_3^--N.

菌株 SVT 在反硝化途径方面预测到相应的反硝化基因:硝酸盐还原酶的编码基因(*napAB*),亚硝酸盐还原酶的编码基因(*nirS*),一氧化氮还原酶的编码基因(*norBC*),一氧化二氮还原酶的编码基因(*nosZ*),组成了完整的反硝化通路:NO_3^--N→NO_2^--N→NO→N_2O→N_2.

菌株 SVT 的异化硝酸盐还原成铵途径(DNRA)中,预测到硝酸盐还原酶的编码基因(*napAB*)和亚硝酸盐还原酶的编码基因(*nirBD*),所组成的异化硝酸盐还原成铵途径(DNRA)为 NO_3^--N→NO_2^--N→NH_4^+-N.

菌株 SVT 将 NH_4^+-N 转化成自身生长所需的 NH_4^+-N 同化途径中,预测到同化硝酸还原酶的编码基因(*nasAB*)、同化亚硝酸盐还原酶的编码基因(*nirBD*)、谷氨酸脱氢酶的编码基因(*gdhA*)、谷氨酰胺合成酶的编码基因(*glnA*)和谷氨酸合成酶的编码基因(*gltB*)这些基因都位于氮同化途径中,形成相应的酶,使 NH_4^+-N→L-谷氨酸盐→L-谷氨酸.

表 1　菌株 SVT 氮代谢基因信息

Table 1　Information on nitrogen metabolism genes of strain SVT

基因名字	KO 编号	催化反应	功能
亚硝酸盐氧化酶基因(*nxrAB*)	K00370 K00371	NO_2^--N→NO_3^--N	硝化
硝酸盐还原酶编码基因(*napAB*)	K02567 K02568	NO_3^--N→NO_2^--N	反硝化
亚硝酸盐还原酶编码基因(*nirS*)	K15864	NO_2^--N→NO	反硝化
一氧化氮还原酶编码基因(*norBC*)	K04561 K02305	NO→N_2O	反硝化
氧化亚氮还原酶编码基因(*nosZ*)	K00376	N_2O→N_2	反硝化
亚硝酸盐还原酶编码基因(*nirBD*)	K00362 K00363	NO2-N→NH4+-N	异化硝酸盐还原

2.3　菌株 SVT 的异养硝化性能

在以 NH_4^+-N 为唯一氮源的培养条件中,菌株 SVT 的生长和脱氮情况如图 4 所示.在 0~12h 时,菌株生长相对缓慢,12h 后生长进入对数生长期,最大比增长速率为 0.05h^{-1},36h 到达稳定期,最大 OD_{600}

为 1.31.菌株 SVT 对 NH_4^+-N 的去除主要发生在对数生长期,36h NH_4^+-N 去除率达到 100%,NH_4^+-N 最大去除速率为(3.58±0.02) mg/(L·h),TN 去除率为(86.96±1.03)%.0~24h,检测到有(5.58±0.54)mg/L 的 NO_3^--N 积累,在 24~36h 时,NO_3^--N 积累量逐渐降至 0mg/L.在整个培养过程中,没有 NO_2^--N 的积累.

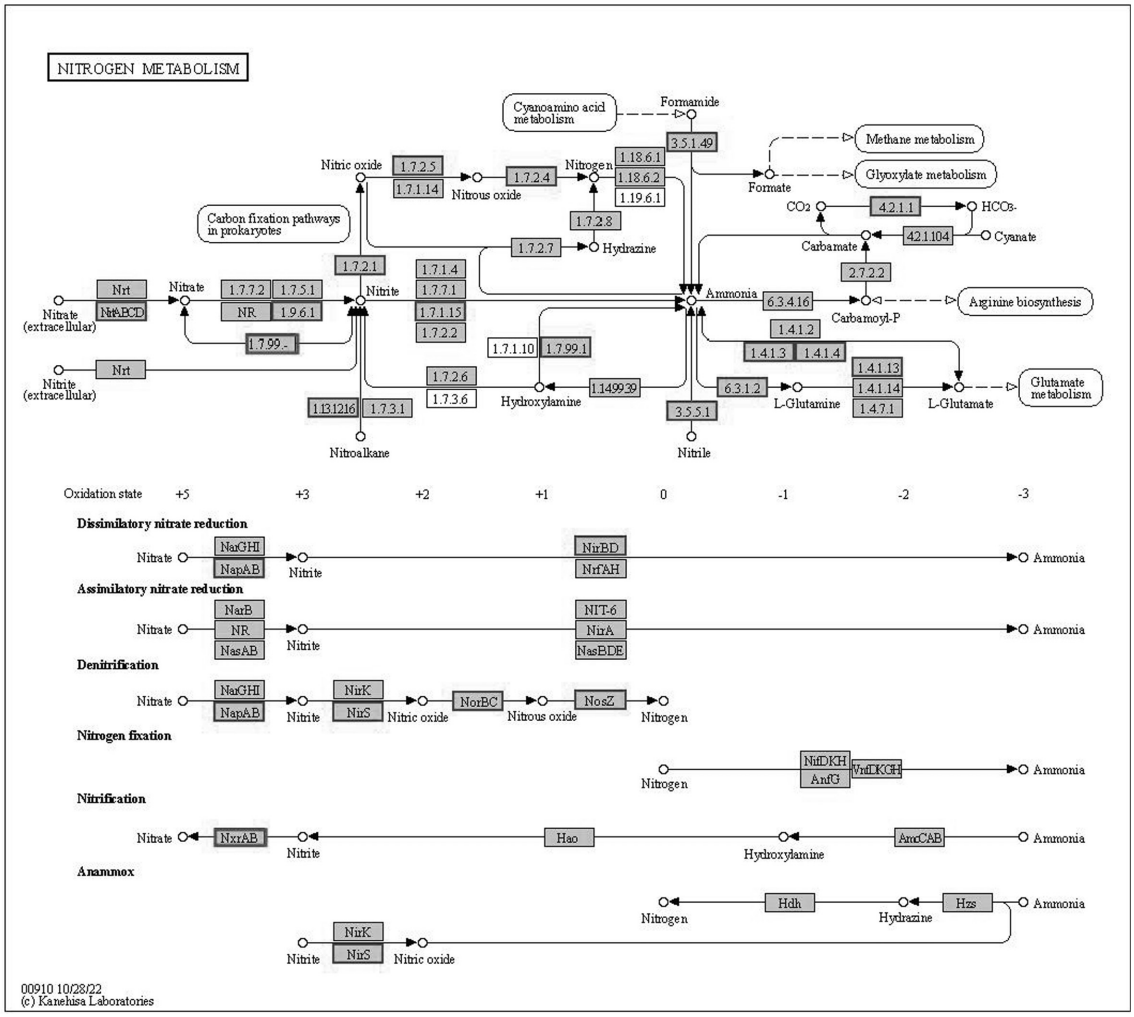


图 3 KEGG 氮代谢途径

Fig.3 Pathram of nitrogen metabolism in KEGG

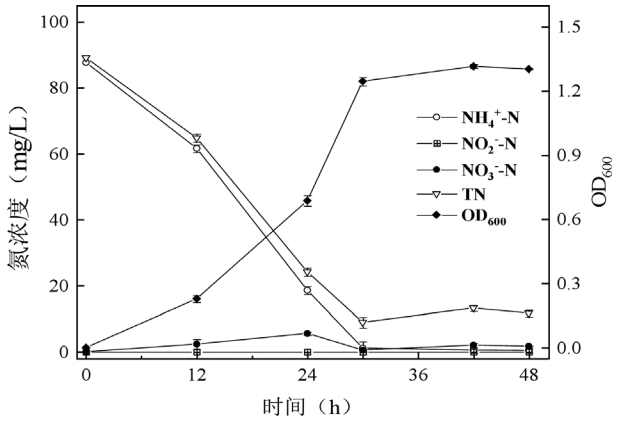


图 4 NH_4^+-N 为氮源时菌株 SVT 的生长曲线和脱氮特性

Fig.4 Growth curve and nitrogen removal characteristics of strain SVT with NH_4^+-N as nitrogen Source

2.4 菌株 SVT 的好氧反硝化性能

在以 NO_3^--N 为唯一氮源的培养条件中,菌株 SVT 的生长和脱氮情况如图 5 所示.菌株 SVT 从 12h 之后进入对数生长期,最大比增长速率为 $0.13h^{-1}$.在 24h 时,OD_{600} 达到最大值,为 1.14,之后菌株生长进入稳定期.48h 内 NO_3^--N 去除率为 88.71±0.90%,TN 去除率达到(60.52±4.70)%,NO_3^--N 最大去除速率为(3.15±0.90) mg/(L·h).在 0~12h 时,检测到有(2.60±0.07)mg/L NH_4^+-N 积累,12~24h 时 NH_4^+-N 积累量下降至 0mg/L.整个培养过程中,没有 NO_2^--N 积累.

在以 NO_2^--N 为唯一氮源的培养条件中,菌株 SVT 的生长和脱氮情况如图 6 所示.在 0~12h,菌株

SVT 的 OD_{600} 从 0.02 迅速上升至 0.6,该时段内菌株的延迟期表现不明显,生长迅速,其最大比增长速率为 0.05h^{-1}.在 24h 时,菌株 SVT 进入稳定期,此时最大 OD_{600} 为 1.06.在 0h~12h 时,NO_2^--N 的去除速率达到最大,为(5.95±0.19) mg/(L·h).在 48h 内,本菌株对 NO_2^--N 的去除率为(94.09±0.37)%,TN 去除率达到(64.32±1.40)%. 在 0~12h 内,NO_2^--N 的浓度从 89.65mg/L 降到 17.63mg/L,与此同时,NO_3^--N 的浓度从 0mg/L 升到 36.45mg/L,TN 仅下降了 3.12mg/L. 然后在 12~30h 时,NO_3^--N 几乎被完全去除,TN 的去除量达到了 58.45mg/L,NO_2^--N 也下降至 5.4mg/L.

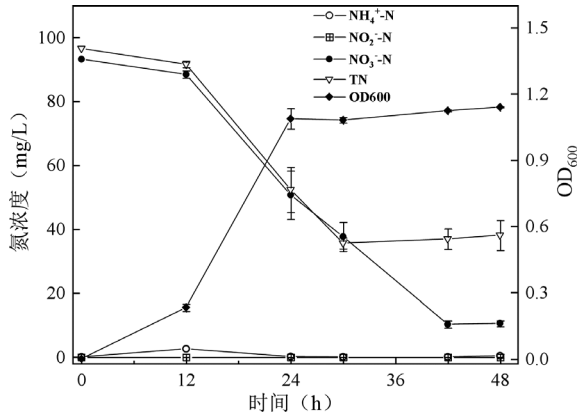


图 5　NO_3^--N 为氮源时菌株 SVT 的生长曲线和脱氮特性

Fig.5　Growth curve and nitrogen removal characteristics of strain SVT with NO_3^--N as nitrogen source

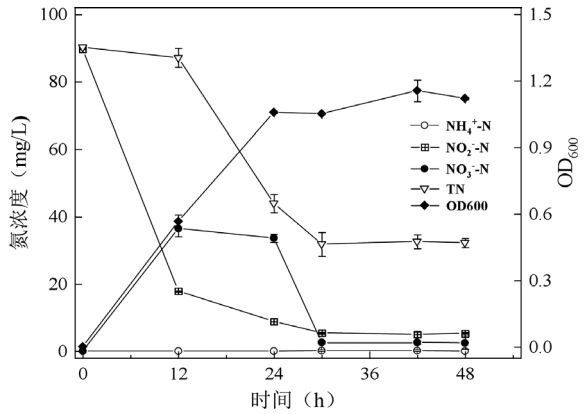


图 6　NO_2^--N 为氮源时菌株 SVT 的生长曲线和脱氮特性

Fig.6　Growth curve and nitrogen removal characteristics of strain SVT with NO_2^--N as nitrogen source

2.5　碳源对菌株生长和脱氮特性的影响

菌株 SVT 在以无水乙酸钠、柠檬酸钠、琥珀酸钠、蔗糖和葡萄糖为唯一碳源时均能生长(图 7(a)). 以无水乙酸钠、柠檬酸钠和琥珀酸钠为唯一碳源时,菌株的比增长速率要显著高于以蔗糖和葡萄糖为唯一碳源时的比增长速率(P<0.05).以无水乙酸钠为碳源时,最大比增长速率为 0.05h^{-1}.菌株 SVT 在分别以蔗糖和葡萄糖为碳源时,最大比增长速率分别为 0.004h^{-1} 和 0.008h^{-1}.

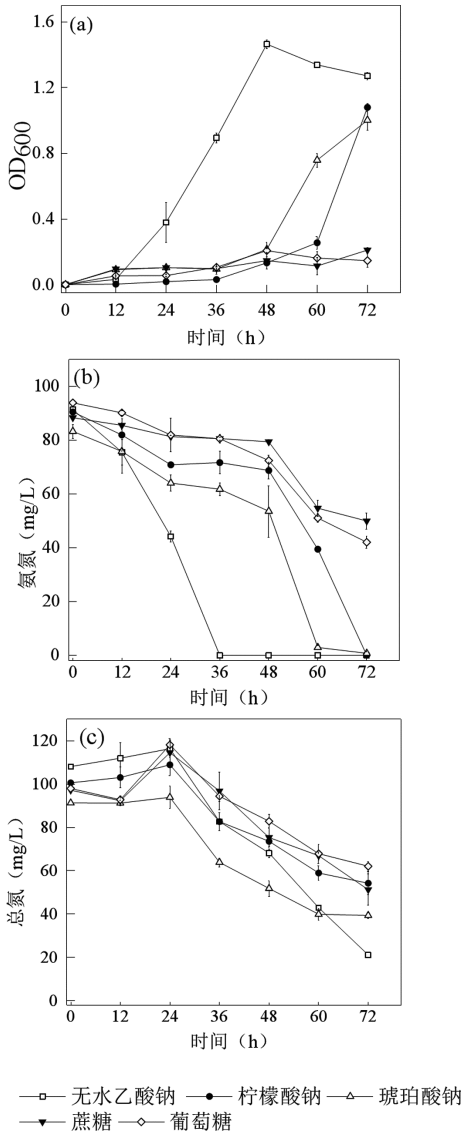


图 7　碳源对菌株 SVT 生长和脱氮能力的影响

Fig.7　Effect of carbon source on the growth and denitrification capacity of strain SVT

由图 7(b)可知,菌株 SVT 利用无水乙酸钠作为碳源时,对 NH_4^+-N 的去除速率显著优于其他四种碳源(P<0.05),在 36h 内将 NH_4^+-N 完全去除,其间最大去除速率为(3.68±0.22) mg/(L·h).菌株利用蔗糖作为碳源时,对 NH_4^+-N 的去除效果最差,NH_4^+-N 的去除率为(43.49±2.95)%.

菌株 SVT 利用五种碳源对脱除 TN 的情况(图

7(c)).利用无水乙酸钠作为碳源时,对 TN 的脱除效果最佳,去除率为(80.46±1.02)%.其次是利用琥珀酸钠作为碳源时,TN 去除率为(56.88±1.26)%.而以柠檬酸钠、蔗糖和葡萄糖作为碳源时,TN 去除率分别为 (46.09±5.11)% 、 (47.27±1.84)% 和 (36.67±2.04)%.

2.6 C/N 比对菌株生长和脱氮特性的影响

不同 C/N 比对菌株 SVT 生长情况的影响如图 8(a).菌株 SVT 在 0~12h 处于生长停滞期,12~24h 进入对数增长期.C/N 比为 15 时生长最佳,最大比增长速率为 0.24h^{-1},最大 OD_{600} 为 1.82.菌株 SVT 对 NH_4^+-N 的去除情况如图 8(b)所示,C/N 比为 10、15 和 30 时,菌株 SVT 在 36h 内完全去除 NH_4^+-N,且 C/N 比为 10 时去除速率最大(3.51±2.95) mg/(L·h).菌株 SVT 对 TN 的去除情况如图 8(c)所示,C/N 比为 10、15 和 30 时,TN 去除效果显著优于 C/N 比为 1 和 5(P<0.05),其中 C/N 比为 15 时 TN 去除率最高(66.44±1.11)%.

根据菌株 SVT 的比增长速率和脱除 NH_4^+-N 和 TN 速率,做出的拟合曲线分析得出(图 8(d), R^2=0.99,P<0.05),菌株的最大比增长速率随 C/N 比增加先升高后降低,在 C/N 比为 14.94 时达到峰值.NH_4^+-N 最大去除速率在 C/N 比为 1~10 时呈指数上升,C/N 比为 10~30 时趋于稳定.TN 最大去除速率在 C/N 比为 1~15 时呈指数上升,C/N 比为 15~30 时趋于稳定.总体而言,菌株的最大比增长速率和 TN 最大去除速率的最适 C/N 比为 15 左右,NH_4^+-N 最大去除速率的最适 C/N 比为 10.

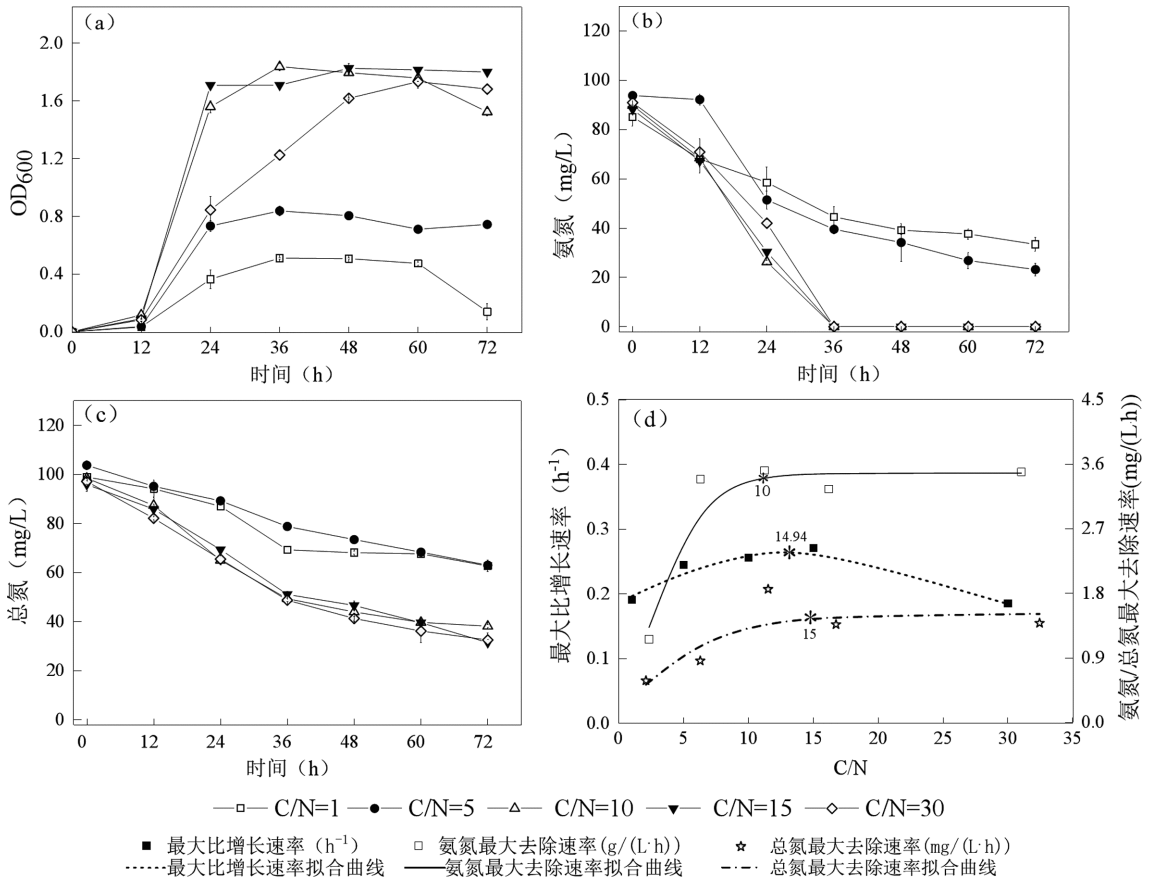


图 8 不同 C/N 比对菌株 SVT 生长和脱氮能力的影响及最大比增长速率和最大脱氮速率拟合曲线

Fig.8 Effect of different C/N ratios on the growth and denitrification capacity of strain SVT and fitting curves of maximum specific growth rate and maximum denitrification rate

2.7 温度对菌株生长和脱氮特性的影响

温度对菌株 SVT 生长情况的影响如图 9(a).菌株 SVT 在 30 和 40℃时的比增长速率显著高于 10 和 50℃(P<0.05),其中 40℃时最大比增长速率达到 0.13h^{-1},在 30℃时有最大 OD_{600}(1.60),而在 10 和 50℃时生长受到抑制.菌株 SVT 对 NH_4^+-N 的去除情

况如图 9(b)所示,30 和 40℃时菌株 SVT 对 NH_4^+-N 的去除率显著高于 10 和 20℃(P<0.05),且在 36h 内完全去除.10℃时去除率最低,为(25.80±0.91)%.菌株 SVT 对 TN 的去除情况如图 9(c)所示,30℃时 TN 去除效果显著优于 10℃(P<0.05),TN 最大去除率为(73.26±2.67)%.

根据菌株 SVT 的比增长速率和脱除 NH_4^+-N 和 TN 速率,做出的拟合曲线分析得出(图 9(d),R^2=0.96,P<0.05),最大比增长速率随温度增加先升高后降低,在温度为 36.77℃时达到峰值.NH_4^+-N 最大去除速率和 TN 的最大去除速率也随温度增加先升高后降低,在温度分别为 35.78 和 35.50℃时达到峰值.总的来说,菌株 SVT 最大比增长速率、NH_4^+-N 最大去除速率和 TN 最大去除速率拟合曲线得出最适温度约为 35℃.

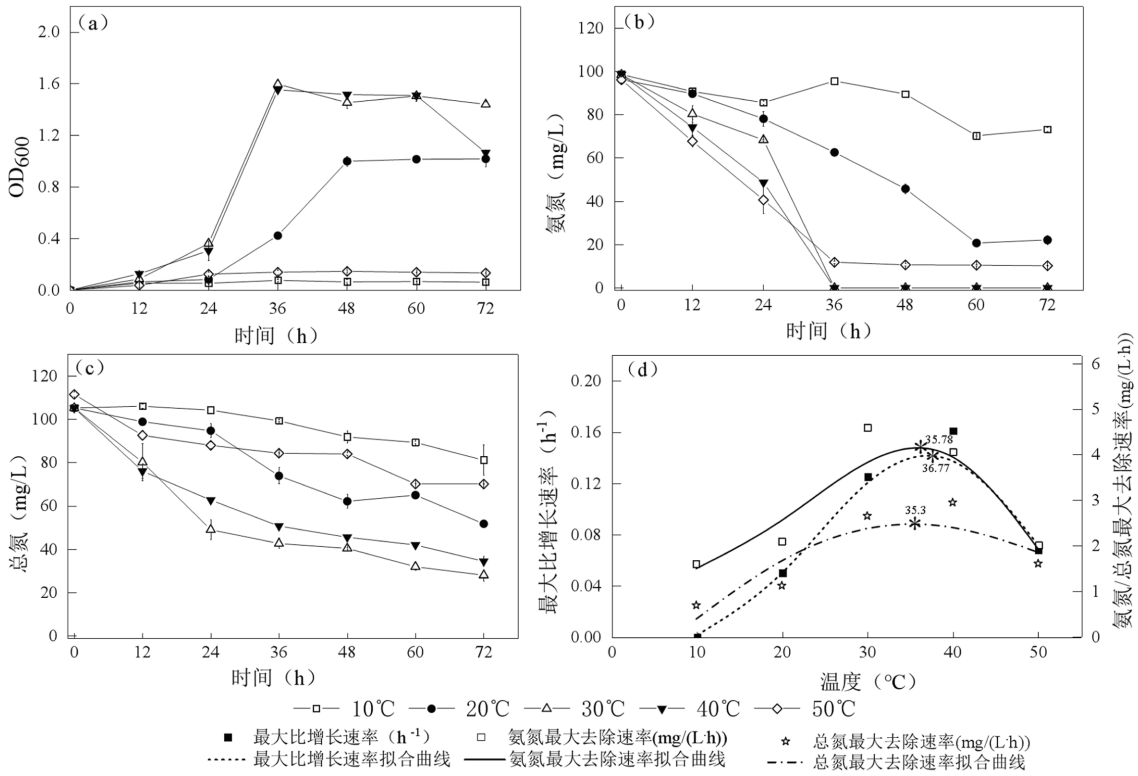


图 9　温度对菌株 SVT 生长和脱氮性能的影响及最大比增长速率和最大脱氮速率拟合曲线

Fig.9　Effect of temperature on the growth and denitrification performance of strain SVT and fitting curves of the maximum specific growth rate and the maximum denitrification rate

2.8　初始 pH 值对菌株生长和脱氮特性的影响

初始 pH 值对菌株 SVT 生长情况的影响如图 10(a).菌株 SVT 在 pH 值为 6.5~10 时能保持较好的生长状态,而在 pH 值为 4 时生长受到显著抑制(P<0.05).当 pH 值为 8.5 时,菌株 SVT 的最大比增长速率达到 0.16h^{-1}.当 pH 值为 7.5 时,菌株 SVT 有最大 OD_{600},为 1.60.菌株 SVT 对 NH_4^+-N 的去除情况如图 10(b)所示,pH 为 7.5 时,菌株 SVT 在 36h 内对 NH_4^+-N 完全去除,且最大去除速率为(4.07±1.5)mg/(L·h).pH 值为 4 时,菌株 SVT 的脱氮性能在酸性环境中受到抑制,NH_4^+-N 去除率仅为(6.05±0.44)%.菌株 SVT 对 TN 的去除情况如图 10(c)所示,pH 值为 4 时,菌株 SVT 对 TN 的去除率显著低于其他 pH 值条件(P<0.05);在 pH 值为 7.5 时,TN 去除率达到最大值,为(68.39±1.67)%.

根据菌株 SVT 的比增长速率和脱除 NH_4^+-N 和 TN 速率,做出的拟合曲线分析得出(图 10(d),R^2=0.92,P<0.05),菌株 SVT 的最大比增长速率在 pH 值为 4~10 范围内呈先升高后降低的趋势,最适 pH 值为 7.07.NH_4^+-N 最大去除速率拟合曲线显示,pH 值为 4~8.5 时,NH_4^+-N 最大去除速率呈指数上升,并在 pH 值为 8.5 时趋于稳定.TN 最大去除速率拟合曲线显示,TN 最大去除速率在 pH 值为 4~10 范围内先升高后降低,最适 pH 值为 7.9.总体而言,菌株 SVT 的

最大比增长速率、氨氮最大去除速率和总氮最大去除速率的最适 pH 值范围为 7~8.5.

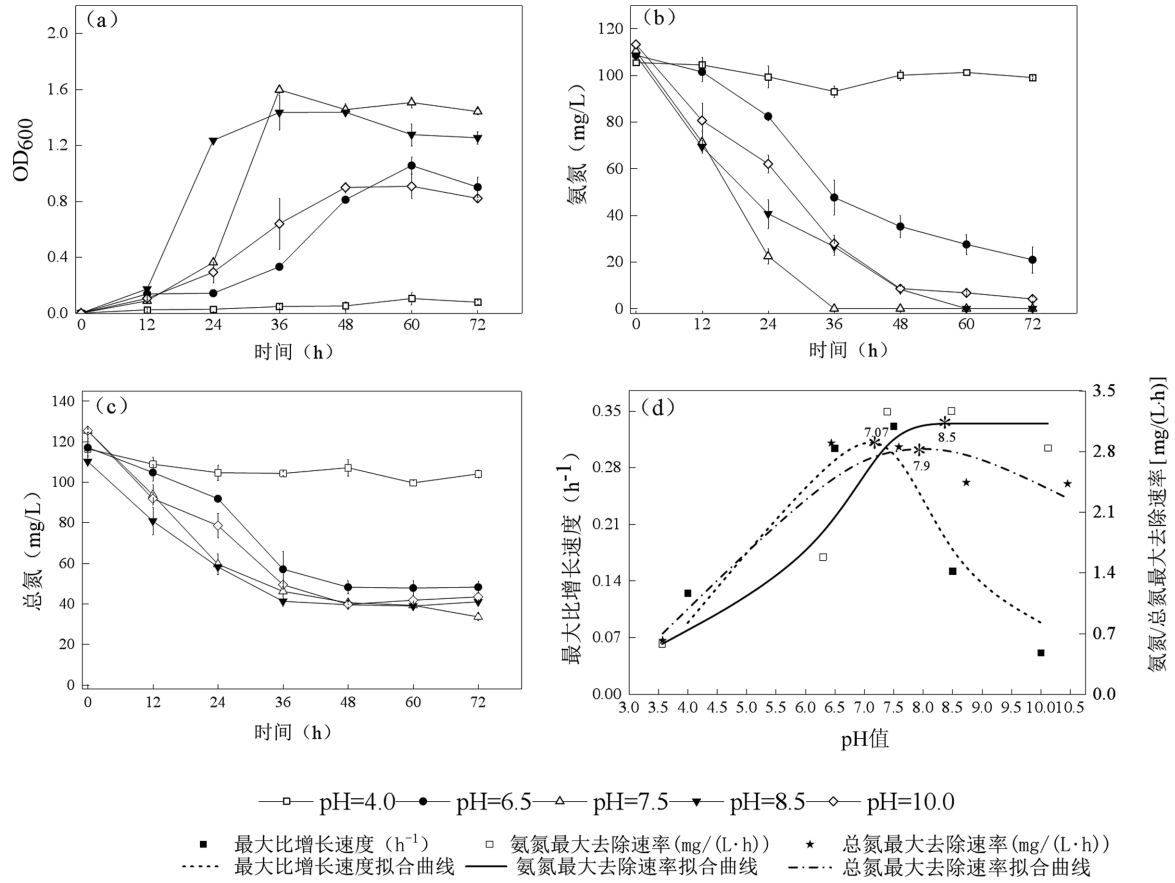


图 10 初始 pH 值对菌株 SVT 生长和脱氮能力的影响及最大比增长速率和最大脱氮速率拟合曲线

Fig.10 Effect of initial pH on the growth and denitrification capacity of strain SVT and fitting curves of the maximum specific growth rate and the maximum denitrification rate

3 讨论

3.1 菌株 SVT 具有异养硝化好氧反硝化能力

菌株 SVT 在以 NH_4^+-N 为唯一氮源的培养条件下表现出较强的脱总氮能力,TN 去除率可达 86.96%.根据微生物脱氮的一般通路[27]推测其具有异养硝化能力.虽然培养过程中没有检测到 NO_2^--N 的积累,但是有 5.58mg/L 的 NO_3^--N 积累,也可以证实菌株 SVT 具有从 NH_4^+-N 起始的硝化途径.传统的硝化过程由 AMO(*amoA*、*amoB* 和 *amoC* 基因编码)和 HAO(由 *hao* 基因编码)介导.但在本研究中,菌株 SVT 基因组中没有注释到硝化过程中的 *amo* 和 *hao* 基因,这可能表明菌株的硝化途径不同于传统的硝化途径.Wang[23]研究的 *Thauera* sp. SND5 同步硝化反硝化能力中,基因组检测中也没有注释到这两个基因;在其他 HN-AD 菌中如 *Pseudomonas stutzeri* UFV5[28]、*Klebsiella pneumoniae* EGD-HPI9-C[29]、*Acinetobacter oleivorans* AHP123[30]和 *Klebsiella* sp. KSND[31]都具有 HN-AD 能力,但未注释到 NH_4^+-N 的硝化途径有关的 *amo* 基因和 *hao* 基因.研究表明,编码 HAO 酶和 AMO 酶的基因的缺失可能是因为来自 HN-AD 菌的编码基因与自养硝化菌的编码基因存在相当大的差异,而这些分析又是基于之前研究的自养硝化菌的酶的已知序列进行的,或者是因为该基因在这个分离株的基因组中并不存在[28],所以导致无法鉴定出编码 AMO 酶和 HAO 酶的基因.后续研究中,需要进一步研究针对硝化过程中编码 AMO 酶和 HAO 酶的基因在转录、翻译和翻译后水平的调控机制,进一步揭示参与调控过程的特定转录因子或调控元件.此外,菌株 SVT 在利用 NH_4^+-N 过程中未出现 NO_2^--N 积累现象,而是直接生成 NO_3^--N. 这一特性与 *Acinetobacter* sp.ND7[32]、

Acinetobacter sp.HA2[33]、*Ochrobactrum anthropic* LJ81[34]和 *Diaphorobacter polyhydroxybutyrativorans* SL-205[35]的报道结果一致,可能与 NH_4^+-N 的硝化途径中的 *amo* 基因和 *hao* 基因、亚硝酸盐氧化过程中 *nxrAB* 基因以及反硝化过程中 *nirK* 基因有关.研究分析,在 NH_4^+-N 的硝化过程中,若 *amo* 基因和 *hao* 基因的表达量低或者酶活性不足,可能导致 NH_4^+-N 氧化不完全,减少或者 NO_2^--N 中断生成[36].在亚硝酸盐氧化过程,*nxrAB* 基因的高表达可加速 NO_2^--N 转化,避免其积累[37].在反硝化过程中,菌株同时携带 *nxrAB* 和 *nirK*,且 *nxrA* 活性占优,则 NO_2^--N 会优先转化为 NO_3^--N[38].由此可推断菌株 SVT 在去除 NH_4^+-N 的过程,亚硝酸盐氧化或还原的速率分别快于氨氧化或硝酸盐还原的速率[34].菌株在 NH_4^+-N 代谢中积累 NO_3^--N 而非 NO_2^--N 的核心机制,源于功能基因的表达失衡(*nxrA* 过表达或 *hao* 缺失)或途径竞争(反硝化基因干扰).未来研究可通过单细胞组学技术,解析同一菌群中 *amoA* 与 *nxrA* 基因的时空表达差异来验证这一机制.

大量研究表明陶厄氏菌属具有反硝化能力[39-41],而本研究结果同样证实菌株 SVT 在氮代谢方面拥有完整的反硝化基因,组成了完整的反硝化通路:NO_3^--N→NO_2^--N→NO→N_2O→N_2.本研究发现菌株 SVT 分别以 NO_3^--N 和 NO_2^--N 作为唯一氮源进行反硝化时,都能脱除 TN,此现象在之前研究中[42]已被证实.在本研究中,以 NO_3^--N 为氮源时,任何时段均无 NO_2^--N 的积累,在 12h 时检测到有 2.60mg/L NH_4^+-N 积累,但 24h 时 NH_4^+-N 被完全去除.原因可能是在培养初期(前 12h),环境条件适宜的情况下,菌株 SVT 具备异化硝酸盐还原为铵(DNRA)的能力,利用硝酸盐还原酶(NapAB)将 NO_3^--N 逐步还原为 NO_2^--N 并进一步还原为 NH_4^+-N.但由于菌株对新环境的适应过程,使得菌株对 NH_4^+-N 的同化作用的启动相对缓慢.此时,菌株 SVT 通过 DNRA 途径产生 NH_4^+-N 的速度大于其同化利用 NH_4^+-N 的速度,从而造成 NH_4^+-N 在体系中的积累.在 12~24h 时段菌株 SVT 持续进行代谢活动,并逐渐适应环境,对营养物质的需求促使其同化作用增强.菌株 SVT 通过同化作用利用 NH_4^+-N 合成谷氨酸,从而导致 NH_4^+-N 被完全去除.在本研究中未检测到 NO_2^--N 积累,推断亚硝酸盐氧化或还原的速率快于硝酸盐还原的速率.此现象与 Wang[23]研究的 *Thauera sp* SND5 和 Patel[43]研究的 *Thauera* sp.V14 研究结果类似.但与 Lu[42]研究的 *Thauera* sp. FDN-01 研究结果相反,菌株 FDN-01 以 NO_3^--N 为氮源时,未检测到 NH_4^+-N 的积累,但有 NO_2^--N 积累.上述现象表明,不同种类的陶厄氏菌在反硝化作用中表现出显著的多样性.这种多样性可能源于多种因素,包括反硝化还原酶基因的转录调控、转录后修饰以及反硝化过程中间产物水平的差异等[19].然而,目前对于其内在的反硝化作用机制仍不清楚,需要进一步研究以揭示其具体的分子调控途径和代谢网络.

菌株 SVT 以 NO_2^--N 为唯一氮源培养至 12h 时,NO_2^--N 快速降解,NO_3^--N 积累到最高(36.45mg/L),TN 仅下降了 3.12mg/L.本研究还检测到菌株 SVT 基因组中有 *nxrAB* 基因编码的亚硝酸盐氧化酶(NXR),这表明菌株 SVT 利用亚硝酸盐氧化酶(NXR)发生了硝化作用,将 NO_2^--N 氧化为 NO_3^--N,造成了 NO_2^--N 的降解和 NO_3^--N 的大量积累.在 Lin Xia[44]研究的 *Acinetobacter* sp.ND7 中也有类似现象,但仅观察到 3.22mg/L 的 NO_3^--N 积累,这可能由于其研究中未检测到 *nxrAB* 基因编码的亚硝酸盐氧化酶(NXR)的原因.此外,菌株 SVT 进一步经过同化作用将 NO_3^--N 转化为生物体内的氮,造成 TN 下降不明显.菌株 SVT 培养至 12~30h 期间,积累的 NO_3^--N 从 36.45mg/L 降低到了 2.41mg/L,NO_3^--N 去除速率超过 NO_2^--N,TN 骤降了 58.45mg/L.此结果归因于菌株 SVT 反硝化功能在该时段发挥主导作用,菌株 SVT 利用基因编码的硝酸盐还原酶(NapAB)、亚硝酸盐还原酶(NirS)、一氧化氮还原酶(NorBC)、一氧化二氮还原酶(NosZ)将 NO_3^--N 还原生成 N_2,实现了脱氮.从 NO_3^--N 积累到几乎被完全去除的过程中,类似的现象在先前的研究也有报道:zhang[10]研究的 *Pseudomonas stutzeri* YZN-001 和 Lei[34]研究的 *Ochrobactrum anthropic* LJ81.有研究表明可能是由于硝酸盐还原酶基因(*napAB*)的表达可能受到抑制或延迟,使硝酸盐还原酶(NapAB)的活性降低[34-45],导致部分 NO_2^--N 被亚硝酸盐氧化酶(NXR)氧化为 NO_3^--N.随着培养时间的延长,*napAB* 基因逐渐表达,NO_3^--N 被进一步还原为 N_2O 和 N_2.进一步研究其基因组功能注释、转录组分析和酶活性测定,将有助于揭示这一现象的具体分子机制.

根据本研究内容,列举了 4 种具有脱氮能力的陶厄氏菌株和其他具有 HN-AD 能力的菌株进行脱氮效率对比(表 2).在同菌属中,只有 *Thauera* sp.SND5[23]具有硝化和反硝化能力,其他 3 种菌株只有反硝化能力.本菌株硝化速率、反硝化速率均大于 *Thauera* sp SND5[23].本菌株反硝化速率高于 *Thauera* sp.FDN-01[42] 和 *Thauera*.S1[44],但低于 *Thauera* sp.V14[46](NO_3^--N:10.63mg/(L·h))的反硝化去除速率.在相似的环境条件下,与其他菌属的异养菌株本菌株的硝化速率高于 *Glutamicibacter* sp. WS1[47]、*Ochrobactrum anthropic* LJ81[34]和 *Klebsiella* sp[48];反硝化速率也高于 *Glutamicibacter* sp.WS1[47]、*Acinetobacter* sp.ND7[32]和 *Klebsiella* sp[48].总的来说,菌株 SVT 的硝化速率和反硝化速率在与多种不同菌属菌株对比中表现突出,这些特性有助于在污水处理等实际应用场景中,高效处理含氮废水.

表 2 不同菌株的硝化和反硝化速率比较

Table 2 Comparison of nitrification and denitrification ratefor different strains

菌名	来源	碳源	硝化速率	反硝化速率
Thauera butanivorans.SVT(本文)	香料废水污水处理厂活性污泥	无水乙酸钠	NH_4^+-N 去除速率 3.58mg/(L·h)	NO_3^--N、NO_2^--N 去除速率分别为 3.15 和 5.95mg/(L·h)
Thauera sp.SND5[23]	废水处理厂(WWTPs)	乳酸	NH_4^+-N 去除速率 2.42mg/(L·h)	NO_3^--N、NO_2^--N 去除速率分别为 1.98 和 2.85mg/(L·h)
Thauera sp.V14[46]	活性污泥	乙酸钠	无	NO_3^--N 去除速率 10.63mg/(L·h)
Thauera sp.FDN-01[42]	上海某城市污水处理厂剩余污泥接种的 SBBR	丁二酸钠	无	NO_3^--N 去除速率 1.29mg/(L·h)
Thauera.S1[44]	厌氧污泥	碳酸氢钠	无	NO_3^--N 去除速率 1.00mg/(L·h)
Glutamicibacter sp. WS1[47]	污水处理厂 A_2O 工艺的好氧池活性污泥	柠檬酸钠	NH_4^+-N 去除速率 1.26mg/(L·h)	NO_3^--N、NO_2^--N 去除速率分别为 3.36 和 2.13mg/(L·h)
Acinetobacter sp.ND7[32]	市政污水	无水乙酸钠	NH_4^+-N 去除速率 3.81mg/(L·h)	NO_3^--N、NO_2^--N 去除速率分别为 2.7 和 4.17mg/(L·h)
Ochrobactrum anthropic LJ81[34]	污水处理厂	蔗糖	NH_4^+-N 去除速率 1.89mg/(L·h)	NO_3^--N、NO_2^--N 去除速率分别为 4.16 和 4.12mg/(L·h)
Pseudomonas putida.NP5[49]	活性污泥	六水合丁二酸钠	NH_4^+-N 去除速率 9.96mg/(L·h)	NO_3^--N、NO_2^--N 去除速率分别为 7.96 和 8.59mg/(L·h)
Klebsiella sp.[48]	生活污水	葡萄糖	NH_4^+-N 去除速率 1.87mg/(L·h)	NO_3^--N 去除速率 1.64mg/(L·h)

3.2 菌株 SVT 脱氮特性的影响因素

菌株 SVT 在以琥珀酸钠、无水乙酸钠和柠檬酸钠作为唯一碳源的条件下,其生长和脱氮能力显著优于以葡萄糖和蔗糖为唯一碳源时的表现.之前研究证明琥珀酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠等有机酸或有机酸盐相比葡萄糖、蔗糖分子结构小且简单,又都是三羧酸循环的中间代谢物,所以 HN-AD 菌更倾向利用有机酸或有机酸盐作为碳源[50].经基因组检测,菌株 SVT 中存在完整的三羧酸循环.该菌株通过利用琥珀酸钠直接进入三羧酸循环为微生物供能和提供碳骨架,也可以将乙酸钠轻易转化为乙酰辅酶 A,亦可将柠檬酸钠转化为草酰乙酸等三羧酸循环中间产物.该菌株利用葡萄糖和蔗糖脱氮性能差的原因可能是葡萄糖需先经糖酵解转化为丙酮酸,再进一步转化为可参与三羧酸循环和脱氮相关代谢途径的物质,此过程相对复杂且涉及多种酶的参与.蔗糖是一种二糖,需要蔗糖酶将其水解为葡萄糖和果糖.该菌株利用蔗糖进行脱氮时需要经过多个代谢步骤,而这些步骤会消耗大量的能量[51],然而蔗糖代谢中获得的能量不足以补偿脱氮过程所消耗的能量[49],故以蔗糖作为碳源时脱氮速率差.*Pseudomonas putida* NP5[49]与本菌株结果类似,该菌株 NP5 在异养硝化过程中以琥珀酸钠为碳源时,菌株 NP5 的生长和脱氮效率强,而在以蔗糖和葡萄糖为碳源的情况下,菌株 NP5 的生长和脱氮速率差.

本研究中由最大比增长速率拟合曲线分析得出菌株 SVT 的最适 C/N 比为 14.94.而依据氨氮最大去除速率拟合曲线可知,当 C/N 比达到 10 时该菌株便可获得最大 NH_4^+-N 去除速率.这表明该菌株的生长和脱氮功能对 C/N 比的要求存在差异.本研究菌株在实际应用中,若以促进菌株生长作为主要目标,可以将 C/N 比控制在 14.94 左右;若侧重于提高去除

NH_4^+-N 效率,则将 C/N 比维持在 10 则更为合适.这样对于污水生物脱氮处理工艺而言,有助于更加精准地把控碳源的投加量,避免出现碳源过度投加的情况,进而有效降低处理成本[52].

菌株 SVT 能够适应的范围为 20~40℃,当温度处于 10℃以下或 50℃以上时,其生长和脱氮效率会受到抑制.此最适温度范围与降解苯酚的陶厄氏菌 ZV1CT[53]以及陶厄氏菌 FDN-01[42]适应温度范围重合.在 30 和 40℃条件下,菌株 SVT 对 NH_4^+-N 的去除率能够达到 100%,但在 10℃时,其对 NH_4^+-N 的去除率仅为 25.74%.这一情况与恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* NP5[49]培养温度表现相似,该菌在 30 和 37℃条件下,NH_4^+-N 去除率达到 100%,但当培养温度调整为 10℃时,NH_4^+-N 去除率仅有 14.55%.此外,也有研究发现部分陶厄氏菌生长最适温度为高温或者低温,如陶厄氏菌 GD-2T[54]最佳生长温度为 45~50℃;南极细菌调查中发现[55]陶厄氏菌等微生物在低温环境中也可正常生长.

由拟合曲线结果所得菌株最适 pH 值范围为 7.0~8.5.此 pH 值范围与降解苯酚的陶厄氏菌 ZV1CT[53](pH 7.0~7.5)以及陶厄氏菌 FDN-01[42](pH 值为 7.5)的最适 pH 值范围重合.而且,通常在 pH 值为弱碱性时 HN-AD 菌的脱氮效果最佳[9].如 *Acinetobacter* sp. ND7[32]、*Pseudomonas chloritidismutans*. K14[50]、*Arthrobacter arilaitensis* Y-10[56]、*Vibrio* sp. Y1-5[57]和在 *Enterobacter cloacae* HNR[58]在弱碱性环境更有利于 HN-AD 作用,因为在弱碱性环境中部分 NH_4^+会转化为游离态氨,更有利于细菌氨氮加氧酶的催化利用.

4　结论

4.1　从香料废水活性污泥中分离得到一株具有异养硝化好氧反硝化能力的细菌,经形态特征和分子鉴定,确定为陶厄氏菌(*Thauera butanivorans*),命名为 SVT.

4.2　以 NH_4^+-N 为氮源时菌株 SVT 的最大脱氮速率为 3.58mg/(L·h);NO_3^--N 为氮源时,最大脱氮速率为 3.15mg/(L·h);NO_2^--N 为氮源时,最大脱氮速率为 5.95mg/(L·h).NH_4^+-N、NO_3^--N 和 NO_2^--N 的去除率分别为 100%、88.71%和 94.09%.

4.3　菌株 SVT 最适脱氮性能条件:碳源为无水乙酸钠,C/N 比为 10,pH 值为 7.5,温度为 35℃,72h 内菌株对 NH_4^+-N 和 TN 的最大去除率分别达 100%和 86.96%.

4.4　全基因组测序和基因注释分析表明菌株 SVT 含有多种与脱氮相关的基因,结合对不同氮源的利用实验证实菌株 SVT 具有完整的 HN-AD 氮代谢途径.

参考文献:

[1] 国家统计局,生态环境部.2022 年中国环境统计年鉴 [M]. 北京:中国统计出版社, 2022:120-125.
National Bureau of Statistics, Ministry of Ecology and Environment. China statistical yearbook on environment-2022 [M]. Beijing: China Statistics Press, 2022:120-125.

[2] Yan X F, Feng J G, Ling K P, et al. Temporal dynamics of bacterial communities and predicted nitrogen metabolism genes in a full-scale wastewater treatment plant [J]. RSC Advances, 2017,7(89):56317-56327.

[3] Duan S, Zhang Y, Zheng S. Heterotrophic nitrifying bacteria in wastewater biological nitrogen removal systems: A review [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2022,52(13): 2302-2338.

[4] Pai S L, Chong N M, Chen C H. Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in wastewater treatment [J]. Bioresource technology, 1999,68(2):179-185.

[5] He H C, Yang H, Liu Z Y, et al. Denitrification performance and bacterial flora analysis of immobilized denitrification filler in industrial wastewater [J]. Science of The Total Environment, 2021, 764:142837.

[6] Chu Z, Wang K, Li X, et al. Microbial characterization of aggregates within a one-stage nitritation–anammox system using high-throughput amplicon sequencing [J]. Chemical Engineering Journal, 2015,262:41-48.

[7] Terada A,Zhou S,Hosomi M.Presence and detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and appraisal of anammox process for high-strength nitrogenous wastewater treatment: a review [J]. Clean Technologies and Environmental Policy, 2011,13(6):759-781.

[8] Jiehui X, Jia Y, Huixian H, et al. Evaluation of the key factors to dominate aerobic ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2021,164.

[9] Ji B, Yang K, Zhu L, et al. Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2015,20(4):643-651.

[10] Zhang J, Wu P, Hao B, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001 [J]. Bioresource Technology, 2011,102(21):9866-9869.

[11] Yang L, Ren Y X, Liang X, et al. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater [J]. Bioresource technology, 2015,193:227-233.

[12] Yang P, Yao T, Liu X, et al. Efficient heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by a novel bacterium *Ralstonia pickettii* J4: Isolation, identification, and application [J]. Biochemical Engineering Journal, 2024,210:109417.

[13] Song T, Zhang X, Li J, et al. A review of research progress of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification microorganisms (HNADMs) [J]. Science of the Total Environment, 2021,801:149319.

[14] Patel J R, Nerurkar S A. *Thauera* sp. for efficient nitrate removal in continuous denitrifying moving bed biofilm reactor [J]. Bioprocess and biosystems engineering, 2024,47(3):429−442.

[15] 姜 鹏,曾小伦,邹嘉豪,等.产聚羟基脂肪酸酯的活性污泥驯化及细菌群落结构研究 [J]. 环境科学与技术, 2020,43(10):85−89.
Jiang P, Zeng X L, Zou J H, et al. Acclimation of activated sludge for polyhydroxyalkanoates production and bacterial community structure analysis [J]. Environmental Science & Technology, 2020,43(10):85−89.

[16] 唐素琴,郭婷婷,李一鑫,等.同步硝化反硝化菌处理高氨氮污水脱氮研究 [J]. 工业微生物, 2023,53(5):97−103.
Tang S Q, Guo T T, Li Y X, et al. Nitrogen removal from high−ammonia wastewater by simultaneous nitrification and denitrification bacteria [J]. Industrial Microbiology, 2023,53(5):97−103.

[17] 仇潇洒.陶厄氏菌属(Thauera)富集的 SBR 系统脱氮性能研究 [D]. 西安:长安大学, 2020.
Qiu X S. Study on nitrogen removal performance of an SBR system enriched with *Thauera* [D]. Xi′an: Chang′an University, 2020.

[18] Andreolli M, Scerbacov V, Frison N, et al. *Thauera* sp. Sel9, a new bacterial strain for polyhydroxyalkanoates production from volatile fatty acids [J]. New Biotechnology, 2022,72:71−79.

[19] Liu B, Mao Y, Bergaust L, et al. Strains in the genus *Thauera* exhibit remarkably different denitrification regulatory phenotypes [J]. Environmental microbiology, 2013,15(10):2816−2828.

[20] Ren T, Chi Y, Wang Y, et al. Diversified metabolism makes novel *Thauera* strain highly competitive in low carbon wastewater treatment [J]. Water research, 2021,206:117742.

[21] Danh D H. Anaerobic degradation of 2,4−dichlorophenoxyacetic acid by *Thauera* sp. DKT. [J]. Biodegradation, 2018,29(5):499−510.

[22] Qiao N, Xi L, Zhang J, et al. *Thauera sinica* sp. nov., a phenol derivative−degrading bacterium isolated from activated sludge [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2018,111(6):945−954.

[23] Wang Q, He J. Complete nitrogen removal via simultaneous nitrification and denitrification by a novel phosphate accumulating *Thauera* sp. strain SND5 [J]. Water Research, 2020,185:116300.

[24] He T, Li Z, Sun Q, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y−11without nitrite accumulation during nitrogen conversion [J]. Bioresource Technology, 2016,200:493−499.

[25] 国家环境保护总局.水和废水监测分析方法 [M]. 第四版.北京:中国环境科学出版社, 2002:271−281.
State Environmental Protection Administration. Methods for monitoring and analysis of water and wastewater [M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002:271−281.

[26] 郭 佳,唐雅丽,雷腊梅,等.Origin 软件在“微生物学”实验教学中的应用——以细菌生长曲线的测定实验为例 [J]. 教育教学论坛, 2024,(11):21−24.
Guo J, Tang Y L, Lei L M, et al. Application of origin software in microbiology laboratory teaching: A case study on bacterial growth curve determination [J]. Education Teaching Forum, 2024,(11):21−24.

[27] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen−cycling network [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018,16(5):263−276.

[28] Fidélis C L S, Santiago H L, Oliveira D A T M, et al. Physicochemical characterization of *Pseudomonas stutzeri* UFV5and analysis of its transcriptome under heterotrophic nitrification/aerobic denitrification pathway induction condition. [J]. Scientific reports, 2020,10(1):2215.

[29] Pal R R, Khardenavis A A, Purohit H J. Identification and monitoring of nitrification and denitrification genes in *Klebsiella pneumoniae* EGD−HP1 9−C for its ability to perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification [J]. Funct Integr Genomics, 2015,15(1):63−76.

[30] Zhou X, Wang Y, Tan X, et al. Genomics and nitrogen metabolic characteristics of a novel heterotrophic nitrifying−aerobic denitrifying bacterium *Acinetobacter oleivorans* AHP123 [J]. Bioresource technology, 2023,375.

[31] Jin P, Chen Y, Yao R, et al. New insight into the nitrogen metabolism of simultaneous heterotrophic nitrification−aerobic denitrification bacterium in mRNA expression [J]. Journal of hazardous materials, 2019,371:295−303.

[32] Xia L,Li X,Fan W, et al.Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge [J]. Bioresource Technology, 2020, 301122749.

[33] Yao S, Ni J, Ma T, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2 [J]. Bioresource technology, 2013,139:80−86.

[34] Lei X, Jia Y, Chen Y, et al. Simultaneous nitrification and denitrification without nitrite accumulation by a novel isolated *Ochrobactrum anthropic* LJ81 [J]. Bioresource technology, 2019, 272:442−450.

[35] Zhang S, Sun X, Fan Y, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Diaphorobacter polyhydroxybutyrativorans* SL−205using poly (3−hydroxybutyrate−co−3−hydroxyvalerate) as the sole carbon source [J]. Bioresource Technology, 2017,241:500−507.

[36] Arp D J, Sayavedra−Soto L A, Hommes N G. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* [J]. Archives of microbiology, 2002,178:250−255.

[37] Daims H, Lebedeva E V, Pjevac P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria [J]. Nature, 2015,528(7583):504−509.

[38] Yan L, Liu S, Liu Q, et al. Improved performance of simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in an oxygen−limited SBR by alternating the DO [J]. Bioresource technology, 2019,275:153−162.

[39] Scholten E, Lukow T, Auling G, et al. *Thauera mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1999,49(3):1045−1051.

[40] Dichosa A E K, Davenport K W, Li P E, et al. Draft genome sequence of *Thauera* sp. strain SWB20, isolated from a Singapore wastewater treatment facility using gel microdroplets [J]. Genome Announcements,

2015,3(2):10.1128/genomea. 00132-15.

[41] Jiang K, Sanseverino J, Chauhan A, et al. Complete genome sequence of *Thauera aminoaromatica* strain MZ1T [J]. Standards in genomic sciences, 2012,6(3):325-335.

[42] Lu L, Wang B, Zhang Y, et al. Identification and nitrogen removal characteristics of *Thauera* sp. FDN-01 and application in sequencing batch biofilm reactor [J]. Science of the Total Environment, 2019, 690:61-69.

[43] Patel J R, Nerurkar S A. *Thauera* sp. for efficient nitrate removal in continuous denitrifying moving bed biofilm reactor [J]. Bioprocess and biosystems engineering, 2024,47(3):429-442.

[44] Xia L, Li X, Fan W, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge [J]. Bioresource Technology, 2020, 301122749.

[45] Wittorf L, Jones M C, Bonilla-Rosso G, et al. Expression of nirK and nirS genes in two strains of Pseudomonas stutzeri harbouring both types of NO-forming nitrite reductases [J]. Research in Microbiology, 2018,169(6):343-347.

[46] 余　静,周　艳,颜　椿,等.一株氢自养反硝化菌去除地下水硝酸盐的实验研究 [J]. 工业水处理, 2018,38(10):29-33.
Yu J, Zhou Y, Yan C, et al. Experimental study on nitrate removal from groundwater by a hydrogenotrophic denitrifying bacterium [J]. Industrial Water Treatment, 2018,38(10):29-33.

[47] 魏渤惠,罗　晓,吕鹏翼,等.高效异养硝化-好氧反硝化菌 *Glutamicibacter* sp. WS1 低温下对多种氮源的脱氮特性及氮代谢机制 [J]. 环境科学, 2023,44(9):5006-5016.
Wei B H, Luo X, Lyu P Y, et al. Nitrogen removal characteristics and metabolic mechanisms of *Glutamicibacter* sp. WS1, an efficient heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, under low-temperature conditions with multiple nitrogen sources [J]. Environmental Science, 2023,44(9):5006-5016.

[48] Jin P, Chen Y, Xu T, et al. Efficient nitrogen removal by simultaneous heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium in a purification tank bioreactor amended with two-stage dissolved oxygen control [J]. Bioresource Technology, 2019,281:392-400.

[49] Yang L, Wang X, Cui S, et al. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5 [J]. Bioresource Technology, 2019,285121360.

[50] Hou P, Sun X, Fang Z, et al. Simultaneous removal of phosphorous and nitrogen by ammonium assimilation and aerobic denitrification of novel phosphate-accumulating organism Pseudomonas chloritidismutans K14 [J]. Bioresource technology, 2021,340:125621.

[51] Kolman A M, Nishi N C, Perez-Cenci M, et al. Sucrose in Cyanobacteria: From a Salt-Response Molecule to Play a Key Role in Nitrogen Fixation [J]. Life, 2015,5(1):102-126.

[52] 朱泽沅,于德爽,李　津.C/N 比对 ANAMMOX 与反硝化协同脱氮性能影响及其动力学 [J]. 环境工程学报, 2016,10(6):2813-2818.
Zhu Z Y, Yu D S, Li J. Effect of C/N ratio on synergistic nitrogen removal by ANAMMOX and denitrification and its kinetics [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016,10(6):2813-2818.

[53] Yajie Y, Yanan W, Wei T, et al. *Thauera phenolivorans* sp. nov., a phenol degrading bacterium isolated from activated sludge [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2017,110(12):1681-1690.

[54] Lan Y, Baota J M, Meng M W, et al. *Thauera hydrothermalis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from hot spring [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018,68(10): 3163-3168.

[55] Bottos E M, Scarrow J W, Archer S D J, et al. Bacterial community structures of Antarctic soils [M]. Antarctic terrestrial microbiology: physical and biological properties of Antarctic soils. Springer, 2014: 9-33.

[56] He T, Xie D, Li Z, et al. Ammonium stimulates nitrate reduction during simultaneous nitrification and denitrification process by *Arthrobacter arilaitensis* Y-10 [J]. Bioresource Technology, 2017, 239:66-73.

[57] Li Y, Wang Y, Fu L, et al. Aerobic-heterotrophic nitrogen removal through nitrate reduction and ammonium assimilation by marine *bacterium Vibrio* sp. Y1-5 [J]. Bioresource Technology, 2017,230: 103-111.

[58] Bin Z, Qiao D, Jie L G, et al. Characterization of an aerobic denitrifier *Enterobacter cloacae* strain HNR and its nitrate reductase gene. [J]. Archives of microbiology, 2020,202(7):1775-1784.

作者简介：睢双铭(1999-),女,四川内江人,湖北工业大学硕士研究生,主要从事环境微生物学相关研究.发表论文数 1 篇.1217930386@qq.com.