

一株耐盐脱硫脱氮施氏假单胞菌的筛选及其对硫氮污染的控制

刘磊¹, 赵阳国^{1,2*}, 张彦超¹, 王荣晓¹, 刘剑楠¹

1 中国海洋大学 环境科学与工程学院, 山东 青岛

2 中国海洋大学, 海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛

刘磊, 赵阳国, 张彦超, 王荣晓, 刘剑楠. 一株耐盐脱硫脱氮施氏假单胞菌的筛选及其对硫氮污染的控制[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1482-1497.

LIU Lei, ZHAO Yangguo, ZHANG Yanchao, WANG Rongxiao, LIU Jiannan. Screening of a halotolerant desulfurizing and denitrifying bacterium *Stutzerimonas stutzeri* with control effect on sulfide and nitrate pollution[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(4): 1482-1497.

摘要:【目的】为更好地控制海水养殖尾水中的硝酸盐和硫化物污染,降低其排放对生态环境造成的风险,本研究旨在筛选出能够进行同步脱硫脱氮的耐盐菌株,并研究其生长特性。【方法】采用稀释涂布-叠皿夹法分离筛选耐盐脱硫脱氮菌株,并通过观察形态和 16S rRNA 基因序列对比加以鉴定。以单因素试验为基础,分析影响脱硫脱氮效果的关键因子(碳源、温度、盐度、pH 值和接种比例),并探究菌株对硫化物(S^{2-})的耐受阈值。【结果】从硫基混养反硝化污泥中筛选出一株施氏假单胞菌(*Stutzerimonas stutzeri*) D1-2,该菌株能够在有机碳源条件下,同步去除环境中的硫化物和硝酸盐。菌株 D1-2 以乳酸钠为最优碳源,最佳接种比例为 1.5%,在温度 15–35 °C、盐度 10‰–50‰、初始 pH 值 6.0–8.0 的条件下,对硫代硫酸盐和硝态氮的去除率均大于 80%。当 S^{2-} 初始浓度为 50 mg/L 时,菌株 D1-2 表现出显著的耐受性,对 S^{2-} 和 NO_3^- -N 的去除率分别达到 97.91% 和 94.67%。【结论】本研究关于 *S. stutzeri* 能够进行异养硫氧化的相关报道,表明耐盐菌株 *S. stutzeri* D1-2 具有高效的同步脱硫脱氮效果,在海水养殖尾水的氮硫污染控制中具有潜在的应用价值。

关键词: 施氏假单胞菌; 海水养殖尾水; 硫化物; 硝酸盐; 生物修复

资助项目: 国家自然科学基金(41977315); 中央高校基本科研业务费(201964004)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41977315) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (201964004).

*Corresponding author. E-mail: ygzhaoh@ouc.edu.cn

Received: 2024-11-08; Accepted: 2025-02-05; Published online: 2025-03-11

Screening of a halotolerant desulfurizing and denitrifying bacterium *Stutzerimonas stutzeri* with control effect on sulfide and nitrate pollution

LIU Lei¹, ZHAO Yangguo^{1,2*}, ZHANG Yanchao¹, WANG Rongxiao¹, LIU Jiannan¹

¹ College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, China

² Key Lab of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, China

Abstract: [Objective] To better control the pollution of nitrate and sulfide in mariculture tailwater and reduce the ecological risks caused by the discharge of the tailwater, this study screened a halotolerant desulfurizing and denitrifying bacterial strain and studied its growth characteristics. **[Methods]** A dilution coating-repeat dish sandwich culture method was used to isolate and screen halotolerant desulfurizing and denitrifying bacterial strains, which were identified by morphological observation and 16S rRNA gene sequence comparison. Based on single factor experiments, the key factors affecting desulfurizing and denitrifying effects, including carbon source, temperature, salinity, pH, and inoculation amount, were optimized, and the strain tolerance threshold to sulfide (S^{2-}) was explored. **[Results]** A strain *Stutzerimonas stutzeri* D1-2 was isolated from sulfur-based mixotrophic denitrifying sludge. This strain was able to simultaneously remove sulfide and nitrate from the environment with organic carbon sources. With sodium lactate as the optimal carbon source, strain D1-2 showed the best performance at an inoculation amount of 1.5%. The strain showed the removal rates of $S_2O_3^{2-}$ and NO_3^- -N both greater than 80% at 15–35 °C, salinities of 10‰–50‰, and initial pH 6.0–8.0. It demonstrated significant tolerance at an initial S^{2-} concentration of 50 mg/L, with the removal rates of S^{2-} and NO_3^- -N reaching 97.91% and 94.67%, respectively. **[Conclusion]** This study reports the heterotrophic sulfur-oxidizing capacity of *S. stutzeri*. The halotolerant strain *S. stutzeri* D1-2 capable of simultaneously desulfurizing and denitrifying has a potential application value in the control of sulfide and nitrate pollution in mariculture tailwater.

Keywords: *Stutzerimonas stutzeri*; mariculture tailwater; sulfide; nitrate; bioremediation

近年来, 随着集约化养殖规模和密度的不断扩大, 海水养殖尾水所引起的环境问题日益受到广泛关注^[1-3]。尤其是未被消耗的饲料及鱼类排泄物, 导致养殖尾水中硫(硫化物和 S^{2-})、氮(硝酸盐和 NO_3^- -N)污染物含量显著增加, 对水生生态系统和人类健康构成重大威胁^[4-5]。未经处理的海水养殖尾水直接排放到沿海水域,

很容易导致接收水体的富营养化以及其他潜在生态风险^[6]。

与物理化学处理技术相比, 生物法去除 S^{2-} 和 NO_3^- -N 的成本更低廉, 对环境更为友好, 因此常采用生物法去除海水养殖尾水中的 S^{2-} 和 NO_3^- -N^[7]。生物法脱硫脱氮通常通过自养/异养反硝化系统, 将 S^{2-} 氧化为单质硫(S^0)或多硫化

合物, 将硝酸盐还原为氮气(N_2), 从而实现氮、硫污染物的同步去除, 同时减少二次污染的产生^[7-9]。在众多具有硫氧化及硝酸盐还原功能的微生物中, 异养硫氧化-硝酸盐还原细菌(heterotrophic sulfur-oxidizing nitrate-reducing bacteria, h-soNRB)因其独特的生理功能而受到关注^[10-11]。一方面, h-soNRB 能够以有机碳为电子供体, 将硝酸盐转化为 N_2 进行脱除^[12], 另一方面, h-soNRB 利用 S^{2-} 氧化成 S^0 或多硫化物产生的电子进行自养反硝化过程, 从而实现对碳、氮、硫的同步去除^[13]。与自养硫氧化细菌(sulfur-oxidizing bacteria, SOB)相比, h-soNRB 的异养繁殖使其具有更快的生长速率和更高的代谢效率^[10]。现有报道中, 盐单胞菌属(*Halomonas* sp.) AEB2^[14]在有机碳源条件下, 培养 4 h 后进入对数生长期, 12 h 可去除 100 mg/L 的 S^{2-} ; h-soNRB 菌株固氮弯曲菌属(*Azoarcus* sp.) A2^[12]在 7.5 h 内即可去除 100 mg/L 的 S^{2-} , 同时可去除 50 mg/L 的 NO_3^- -N。相比之下, SOB 菌株海杆菌属(*Marinobacter* sp.) SDSWS8^[15]、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) GHWS3^[16]分别在培养 8 h、12 h 后才进入对数生长期, 去除 100 mg/L 的 S^{2-} 则分别需要 16 h、52 h。相比之下, h-soNRB 更有利于在复杂环境中占据生态位, 对 S^{2-} 和 NO_3^- -N 的去除效率更高。目前, 已有研究报道了多个属的 h-soNRB, 包括 *Pseudomonas*^[10]、气单胞菌属(*Aeromonas*)^[17]、贪铜菌属(*Cupriavidus*)^[18]和 *Halomonas*^[14]等, 它们在不同环境条件下展现出优异的脱硫和脱氮性能。然而, 当前筛选出的 h-soNRB 多源自淡水生态系统^[19]。针对海水养殖尾水高盐度的特性, 筛选出能够耐高盐的 h-soNRB 菌株具有重要意义。

基于此, 本研究筛选并鉴定了一株具有同步脱硫脱氮功能的菌株 D1-2, 探讨了菌株 D1-2

对 S^{2-} 和 NO_3^- -N 的去除特性, 以及不同条件(碳源、温度、盐度、pH 和接种比例)对菌株 D1-2 的影响, 并评估了不同条件下该菌株对硫化物和硝酸盐的去除效率, 以期海水养殖尾水中同步脱氮除硫的研究提供理论和数据支持。

1 材料与方法

1.1 样品来源

从本课题组硫基混养反硝化(sulfur-based mixotrophic denitrification, SMD)反应器^[20]中采集 5.0 g 污泥样品, 用于分离耐盐脱硫脱氮菌。

1.2 培养基

本研究使用的培养基成分如表 1 所示^[7,21], 其中微量元素使用 0.22 μ m 的无菌滤膜进行过滤除菌。将配制好的液体培养基分装至密闭的血清瓶中, 通入高纯 N_2 进行吹脱, 随后于 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。待培养基冷却后, 立即使用灭菌后的橡胶塞进行封口, 以确保培养环境的密闭性。同时测定培养基内的溶解氧(dissolved oxygen, DO)浓度, 结果显示 DO 的初始浓度维持在 0.39–0.50 mg/L, 满足实验所需的缺氧条件。

1.3 菌株的纯化和筛选

取 5.0 g 污泥于 10 mL 基础培养基中, 充分

表1 三种培养基的成分

Table 1 Components in three types of medium (mg/L)

Components	Enriched medium	S1	S2
$Na_2S \cdot 9H_2O$	0.00	0.00	0.75
$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	5.00	1.00	0.00
$NaHCO_3$	2.00	2.00	2.00
NH_4Cl	1.00	1.00	1.00
KNO_3	1.00	0.72	0.72
K_2HPO_4	1.20	1.20	1.20
KH_2PO_4	1.20	1.20	1.20
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.20	1.20	1.20
$CaCl_2$	0.08	0.08	0.08
$NaCl$	30.00	30.00	30.00
Trace element (mL/L)	5.00	5.00	5.00

振荡 30 min 后静置。待污泥与上清液分层后, 取上清液 1 mL 接种于含 100 mL 富集培养基的血清瓶中, 在 30 °C、120 r/min 的条件下富集培养 14 d。待培养基浑浊后, 使用无菌注射器按照菌液的体积分数为 1% 的接种比例将菌液转接到 S1 液体培养基中, 继续富集培养 5 d。之后, 采用稀释涂布-叠皿夹法进行纯菌的筛选^[21]。待长出单菌落后, 用无菌手术刀将其切下接种到 S1 液体培养基中进行扩增培养。重复 3 个周期, 直至分离出单一菌落。选择对 S^{2-} 、 $S_2O_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 去除效果最优的 1 株细菌开展进一步实验研究。

1.4 菌株的鉴定

对纯化后的菌种进行平板划线, 30 °C 静置培养 48 h 后观察菌落形态。进行革兰氏染色, 并在光学显微镜下观察。通过扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察菌株的形态并测定菌体大小。

挑取单菌落于 S1 液体培养基中培养至对数期 (OD_{600} 值为 0.50) 后, 取 2 mL 菌液送至青岛派森诺基因生物技术有限公司进行 16S rRNA 基因序列分析鉴定。将测序序列输入 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 通过 BLAST 与 GenBank 基因序列进行同源性对比, 并在 MEGA 11.0 中使用邻接 (neighbor-joining) 法构建系统发育树^[7]。

1.5 生长曲线的测定

将活化后的菌液 OD_{600} 值调整至 0.5 后, 以 1% 的比例接种到新的 S1 液体培养基中, 于 30 °C、120 r/min 振荡培养 72 h, 每 12 h 取样, 测定菌液的 OD_{600} 值, 以此表征菌株的生长情况。

1.6 菌株的脱硫脱氮性能

为了评估菌株对不同环境条件的适应性, 在不同碳源、温度、盐度、初始 pH 值和接种比例下测定了菌株的生长状况和脱硫脱氮能力。

通过固定碳氮比 (C/N) 为 9.28 和 NO_3^- -N 浓度 (100 mg/L) 来确定每种碳源的添加量, 有机碳源分别设置为乙酸钠、乳酸钠、柠檬酸钠和葡萄糖; 温度分别设置为 5、15、20、25、30、35 °C; 盐度分别设置为 10‰、20‰、30‰、40‰、50‰; 初始 pH 值分别设置为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0; 接种比例分别设置为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、3.0%。除变量外, 所有条件均设置为 30 °C、30‰ 盐度、初始 pH 7.0、1.0% 接种比例、初始 OD_{600} 值为 0.05、120 r/min 振荡培养 72 h。实验所用菌液均为培养 24 h 时的新鲜菌液, 以不含菌株的培养基为对照组 (CK 组)。定期测定菌液的 OD_{600} 值, 以及 $S_2O_3^{2-}$ 、 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的含量。使用无菌注射器进行接种和取样, 以减少实验过程中的气体交换。

1.7 菌株对毒性硫化物的耐受阈值

将过量 $Na_2S \cdot 9H_2O$ 溶解于灭菌的去离子水中, 使用 1 mol/L NaOH 溶液将其 pH 值调至 9.0, 利用亚甲基蓝分光光度法测量溶液中 S^{2-} 浓度, 以此制成 S^{2-} 母液。通过添加 S^{2-} 母液使 S2 培养基的初始 S^{2-} 浓度分别为 0、25、50、100、150、300、500 mg/L, 以不含菌株的培养基为 CK 组。于 30 °C 恒温培养箱中静置培养 96 h, 定期测定培养基中的 OD_{600} 值, 以及 S^{2-} 、 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的含量。

$Na_2S \cdot 9H_2O$ 溶液添加方法: 用无菌注射器吸取稍过量的 S^{2-} 母液, 以减少操作过程中硫化物挥发造成的损失, 随后通过 0.22 μm 的无菌滤膜缓慢加入到冷却后的无菌培养基中。采用上下颠倒的方式使 S^{2-} 母液与培养基充分混匀, 随后抽取样品进行 S^{2-} 浓度检测, 以作为该实验的初始 S^{2-} 浓度。

1.8 分析方法

采用分光光度法测定 OD_{600} 值。采用便携式

多参数仪(HACH 公司)测定培养基中的 pH 和 DO。参考文献[20]的方法,使用离子色谱测定 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的浓度。 S^{2-} 、 NO_3^- -N 与 NO_2^- -N 的测定参考文献[21]的方法, S^{2-} 采用亚甲基蓝分光光度法, NO_3^- -N 采用紫外分光光度法, NO_2^- -N 采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法。

实验均设置 3 组重复,采用 SPSS 21.0 进行单因素方差分析以及 Tukey's HSD 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义的显著水平,采用 OriginPro 2021 对数据作图。

2 结果与讨论

2.1 功能菌株的分离

对 SMD 污泥样品进行富集培养后,经分离纯化得到 2 株菌落形态各异的细菌,分别命名为 D1-2 和 D2-2。以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 或 Na_2S 作为硫源,通过分析比较 OD_{600} 值以及 S^{2-} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 NO_3^- -N 的去除率和 NO_2^- -N 的浓度变化趋势,筛选出 1 株高效脱硫脱氮菌株,结果如图 1 所示。

以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为代谢能源时生长良好的微生物往往具有较好的硫氧化能力^[22-23],因此研究了以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为硫源时菌株的生长及脱硫脱氮效能。如图 1A 所示,菌株 D1-2 在 6 h 首先进入对数生长期,且培养至 24 h 时 D1-2 和 D2-2 的 OD_{600} 值存在显著性差异($P < 0.05$),分别为 0.47、0.16。 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 的去除率如图 1B 所示,菌株 D1-2 在第 6–48 h 对硫氮污染物进行同步去除,随后达到稳定;相比之下,菌株 D2-2 对 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的快速去除延滞到第 24 h。 NO_2^- -N 作为反硝化过程的中间产物,其毒性远高于 NO_3^- -N^[24]。许多研究表明,循环水养殖系统中亚硝酸盐的积累对鱼类以及其他水生生物具有一定的毒害作用^[25-26]。因此本研究对不同培养时间的 NO_2^- -N 浓度进行了测定。如图 1C 所示,菌株 D2-2 在 24 h 时积累了 75 mg/L 的 NO_2^- -N,

相比之下菌株 D1-2 仅有 16 mg/L 的 NO_2^- -N,随后 NO_2^- -N 被完全去除。本研究得到的 2 株菌在含有机碳的培养条件下均可以对 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 进行同步去除,因此都属于 h-soNRB^[27]。

尽管 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的代谢途径与 Na_2S 较为相近,但其生物毒性相对于 Na_2S 来说更低^[28],因此并不能准确评价菌株对毒性 H_2S 的耐受能力。如图 1D、1E 所示,在硫化物胁迫下,研究了 2 株菌的脱硫脱氮效能。

如图 1D 所示,初始浓度为 100 mg/L 的 S^{2-} 对菌株 D2-2 产生明显的毒害作用,其生长代谢被显著抑制,整个培养过程中菌株 D2-2 的 OD_{600} 值几乎为 0。菌株 D1-2 的生长未受到明显影响,其 OD_{600} 值最高可达 0.60。然而,菌株 D1-2 存在 48 h 的生长停滞期,可能归因于硫化物胁迫诱导其代谢途径调整,从而影响细胞的正常增殖过程^[29]。对于菌株 D1-2 而言,反应体系中 S^{2-} 的去除率呈现先升高后降低的趋势(图 1E),可能是由于菌株 D1-2 培养过程中产生的大量絮状物将部分 S^{2-} 包裹在其中,而后衰亡期细胞死亡并裂解,将未利用的 S^{2-} 再次释放到反应体系中^[30]。与 CK 组相比,菌株 D1-2 对 S^{2-} 的去除率显著提高了 40%。Guo 等^[31]研究发现,硫化物促进 *Pseudomonas* sp. C27 氮代谢的相关蛋白进行上调,进而提高其脱氮效能。本研究同样发现,相较于 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (图 1B),在 Na_2S 胁迫下,菌株 D1-2 能够在生长停滞期结束后的 24 h 内将 90% 的 NO_3^- -N 去除,且无 NO_2^- -N 的积累。综上所述,结合菌株对硝酸盐的去除效能以及对毒性硫化物的耐受能力,确定菌株 D1-2 作为后续实验的研究对象。

2.2 菌株 D1-2 的鉴定

革兰氏染色结果表明,菌株 D1-2 为革兰氏阴性菌。D1-2 的菌落形态如图 2A 所示,菌落呈圆形,淡黄色半透明状,表面平整、湿润,

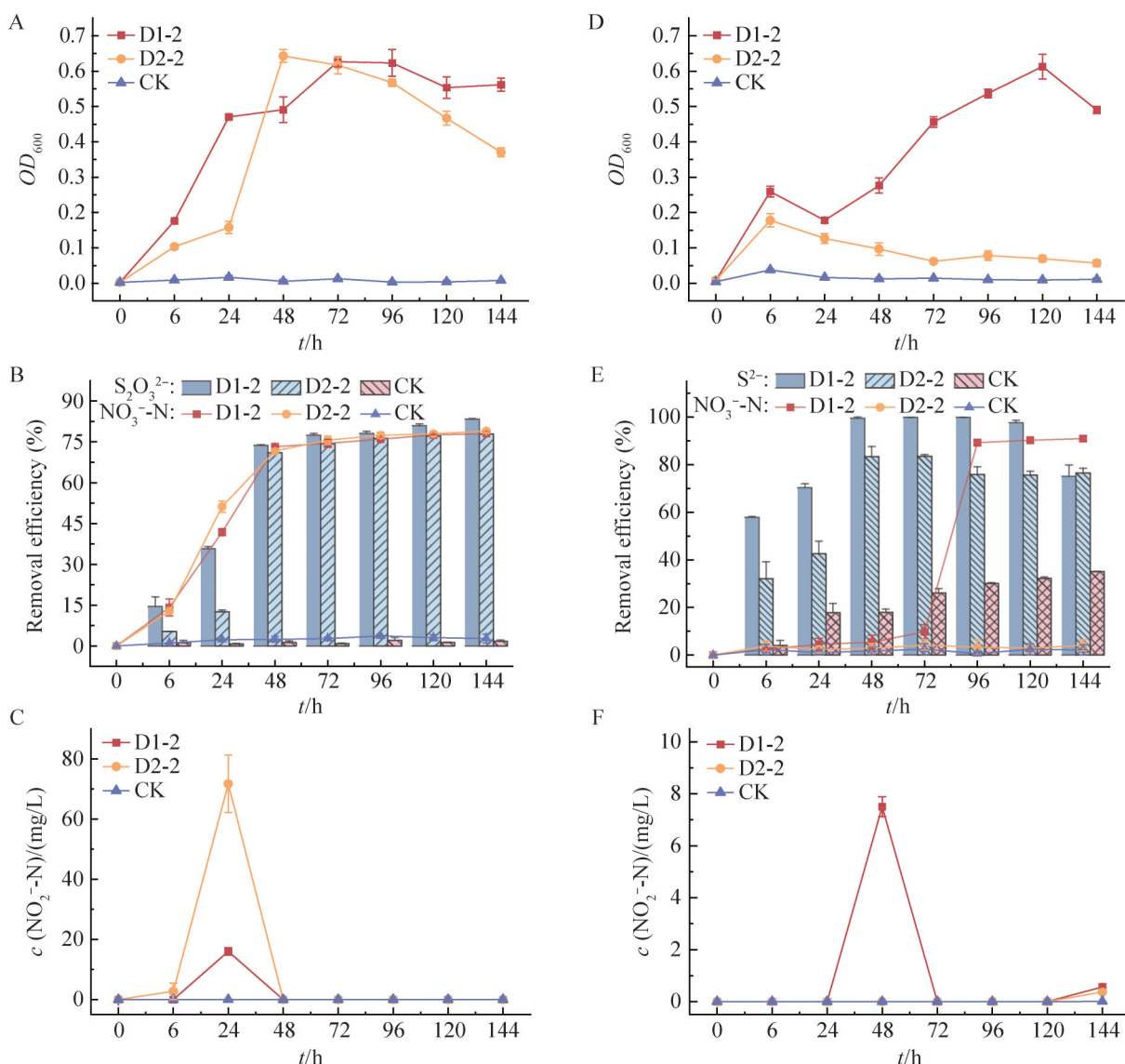


图1 两菌株在 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (A-C)和 Na_2S (D-F)中的生长情况及污染物去除效率

Figure 1 Growth and pollutant removal efficiency of two strains under different sulfur source conditions. Under the condition of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ as sulfur source: A: The growth curves; B: Removal efficiency of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ and NO_3^- -N; C: Nitrite accumulation. Under the condition of Na_2S as sulfur source: D: The growth curves; E: Removal efficiency of S^{2-} and NO_3^- -N; F: Nitrite accumulation. Error bars in figure represent standard deviation.

中间凸起, 边缘不规则, 直径约 1–2 mm。SEM 的观察结果如图 2B 所示, 该菌株的细胞呈短杆状, 而在细胞分裂过程中呈球形, 表面有大量分泌物, 大小为 $(0.5\text{--}1.2)\ \mu\text{m}\times(0.4\text{--}0.5)\ \mu\text{m}$ 。

对菌株 D1-2 进行扩增测序后得到长度为 1 440 bp 的 16S rRNA 基因序列, 提交至 NCBI

GenBank 后获得登录号为 PQ481976。通过 BLAST 的同源性检索表明菌株 D1-2 与 *S. stutzeri* ROD048 具有较高的序列同源性 (99.86%)。基于邻接法构建系统发育树(图 2C), 进一步证实菌株 D1-2 为施氏假单胞菌 (*Stutzerimonas stutzeri*)。施蒂泽氏单胞菌属

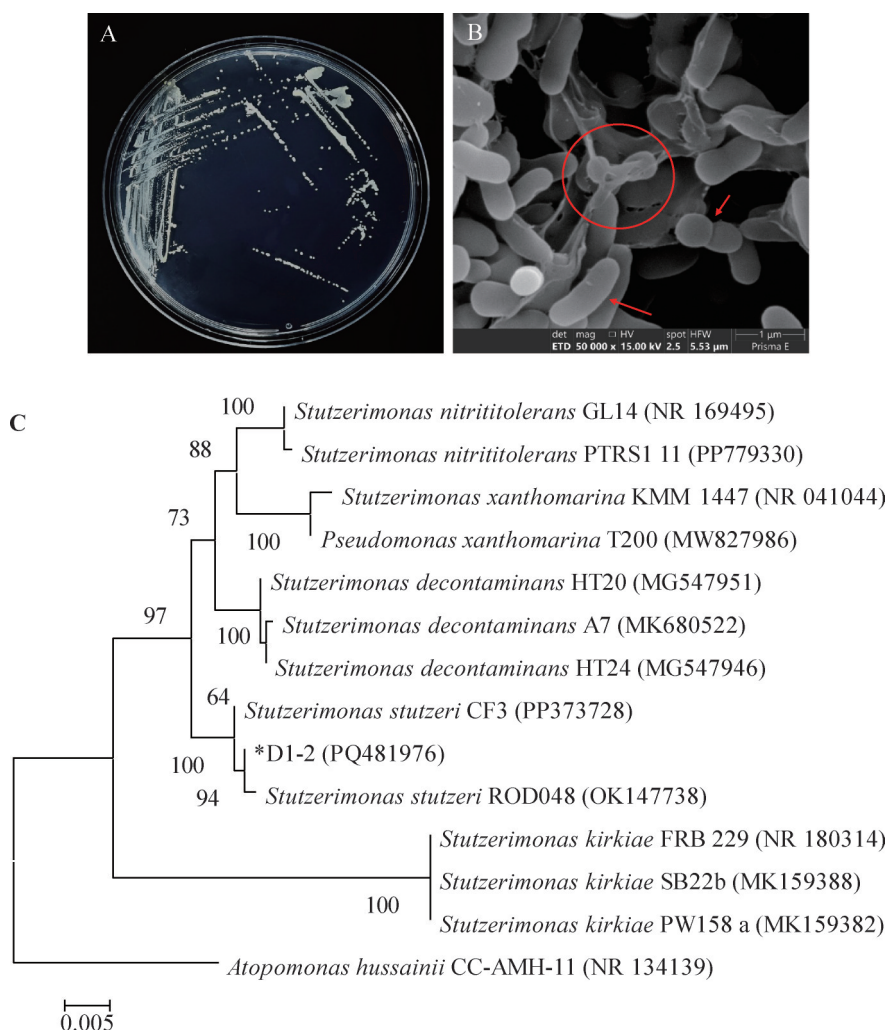


图2 菌株D1-2的鉴定。A: 菌落形态; B: 单菌落SEM图; C: 基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树。

Figure 2 Identification of strain D1-2. A: Colony morphology; B: SEM micrograph of strain D1-2 (Red circles show extracellular products secreted by bacteria; Arrows show mature cells and dividing cells); C: Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence (*: Labeled the strain screened. Bootstrap values were expressed as a percentage of 1 000 replications. Numbers in brackets represent the sequences of accession numbers in GenBank; Bar 0.005 represents sequence divergence).

(*Stutzerimonas* sp.)细菌以前被认为是假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)的一种, 近几年被重新归类为一个独立的属^[32], 是一类在好氧条件下具有反硝化、固氮等特性的微生物^[32-34]。近年来, 很多关于 *S. stutzeri* 进行好氧反硝化^[35-36]以及生物固氮^[37]的研究被报道, 但 *S. stutzeri* 在缺氧条件

下进行同步脱硫脱氮的功能尚未见报道。

2.3 菌株 D1-2 的生长曲线

菌株 D1-2 在 30 °C、30‰ 盐度及 120 r/min 条件下的生长曲线和 pH 值变化趋势如图 3A 所示。菌株 D1-2 在第 6 h 进入对数生长期, 并在培养 36 h 后进入稳定期。细菌进入对数生长期

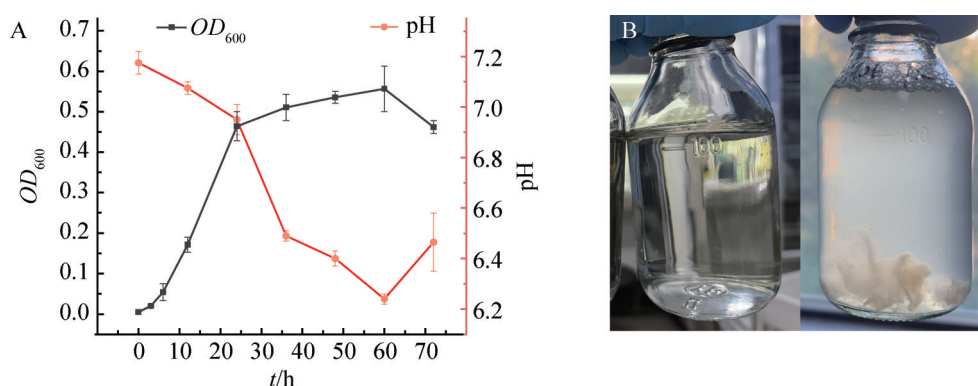


图3 菌株D1-2的生长情况

Figure 3 The growth of strain D1-2. A: Growth curves and the trend of pH value of strain D1-2 (Error bars in figure represent standard deviation); B: Growth of strain D1-2 in serum vial.

后, 培养体系的 pH 值显著下降。培养 60 h 后 pH 值由 7.2 降至 6.2, 这可能是由于硫化物氧化过程产生的副产物质子(H^+)的积累, 最终导致培养液的 pH 值降低^[38]。

如图 3B 所示, 培养过程中观察到菌液由无色逐渐变为乳白色, 顶部有明显气体产生, 并且底部产生大量淡黄色絮状物。Fan 等^[39]研究表明可能是由于硫化物刺激菌株产生大量絮状物, 从而增强对环境的适应能力^[30]。Wang 等^[40]研究表明, 化学硫的颜色为黄色, 而生物硫通常呈现乳白色。因此, “黄色”絮状物中可能包裹着硫化物氧化过程中产生的 S^0 以及多硫化物^[18,39]。当硫化物被消耗后, 化学硫转化为生物硫溶于培养液中。同时观察到气泡的产生, 这可能是菌株 D1-2 在氧化硫化物的过程中, 同时去除水体中的碳和氮, 将 COD 转化为 CO_2 、硝酸盐转化为 N_2 等气体^[13,41]。综上所述, 本研究所获得的菌株 D1-2 是一株能以有机碳源为电子供体, 同步进行硫化物氧化以及硝酸盐还原的细菌。根据菌株 D1-2 的生长曲线, 并结合其对 $S_2O_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 的去除效果, 确定生长条件优化实验的培养时间为 72 h。

2.4 菌株 D1-2 生长条件优化

硫化物微生物在 S^{2-} 和 $S_2O_3^{2-}$ 条件下具有相似的硫代谢途径^[42-43], 因此, 为避免 Na_2S 自身的氧化和挥发对实验条件的影响, 使用 $Na_2S_2O_3$ 作为还原性硫化物对菌株 D1-2 生长条件的优化进行研究。

2.4.1 碳源

异养细菌通过利用有机碳以获得细胞活动所需的能量, 不同碳源能够显著影响细菌的脱硫脱氮效果^[44-45]。碳源对菌株 D1-2 的生长以及 $S_2O_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 去除率的影响如图 4 所示。

菌株 D1-2 对碳源的利用情况及其生长代谢存在显著性差异。以乳酸钠、柠檬酸钠和葡萄糖为碳源时, 菌株 D1-2 的生长无显著性差异 ($P>0.05$), OD_{600} 值均可达到 0.45。其中以乳酸钠为碳源时, $S_2O_3^{2-}$ 、 NO_3^- -N 的去除率最高, 分别达到 82.55%、91.57%, 并且过程中积累的 NO_2^- -N 可被快速去除。当乙酸钠为碳源时, 菌株 D1-2 的生长及硫化物氧化效果最差, 最大 OD_{600} 值仅为 0.23, 仅有 29.10% 的 $S_2O_3^{2-}$ 被去除; NO_3^- -N 的去除虽无显著性差异, 但存在 52.7 mg/L 的 NO_2^- -N 积累(图 4C), 对环境造成不利影响^[28]。这可能与不同碳源的氧化还原电

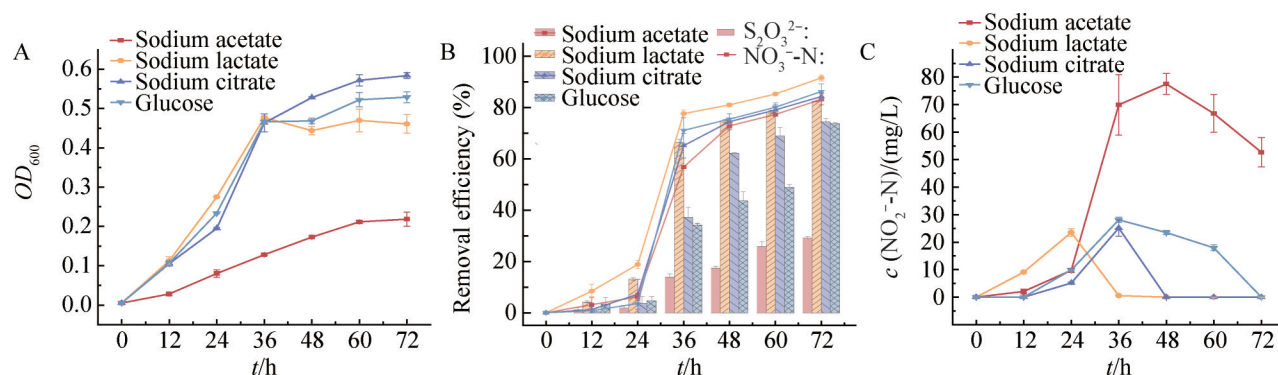


图4 不同碳源对菌株D1-2的生长和污染物去除效率的影响

Figure 4 Effects of different carbon sources on the growth and pollutant removal efficiency of strain D1-2. A: Growth curves; B: Removal efficiencies of $S_2O_3^{2-}$ and NO_3^-N ; C: Concentration of NO_2^-N . Error bars in figure represent standard deviation.

位有关,乙酸钠通常表现出氧化性,而葡萄糖、乳酸钠和柠檬酸钠可被用作还原剂,因此在反硝化过程中更容易被菌株氧化^[46-47]。结合硫、氮的去除率分析,本研究确定乳酸钠为菌株D1-2脱硫脱氮的最佳碳源。

2.4.2 温度

研究不同温度对菌株D1-2的生长和脱硫脱氮效能的影响,结果如图5A、5B所示。菌株D1-2的生长在不同温度下表现出显著性差异($P<0.05$)。菌株在30℃下生长最快,12 h的 OD_{600} 值可达到0.21;在30–35℃下,最大 OD_{600} 值均可达到0.53。在较低温度(15–25℃)下,菌株的生长缓慢,0–48 h内对环境存在明显的适应期;而在5℃时,菌株可能进入休眠状态,无明显生长。本研究结果与Dou等^[15]和Xi等^[16]的结论一致,低温对微生物的生长代谢有显著的抑制作用,甚至会迫使菌株改变代谢途径以适应环境。温度过低时,细菌的胞内酶活性受到抑制,几乎无法生长;温度过高时,细菌体内的蛋白质失活导致特异性酶系统遭到破坏,难以发挥作用^[40]。Wang等^[40]在研究温度对微生物脱硫的影响时发现,反应器温度从30℃降至20℃后,硫化物氧化相关微生物群落

的丰度降低,硫化物的去除效率也明显下降。在本研究中,30–35℃时菌株D1-2对 $S_2O_3^{2-}$ 和 NO_3^-N 的去除率均能达到85%。在较低温度(15–25℃)下,36 h内对 $S_2O_3^{2-}$ 和 NO_3^-N 的去除性能虽被显著抑制($P<0.05$),但在培养72 h后,对硫、氮的去除率仍可达75%,且无 NO_2^-N 积累。

在以往的报道中,几乎所有主要养殖物种的最适生长温度均在15–40℃范围内,而海水养殖尾水处理反应器的水温通常低于20℃^[48-49]。与嗜热水弧菌(*Hydrogenovibrio thermophilus*) TT^[7]和*Pseudomonas* sp. C27^[10]相比,后者的最适生长温度分别为30–40℃和25–30℃,而菌株D1-2即使在15℃时仍表现出优异的生长和脱硫脱氮性能,显示出一定的抗低温胁迫能力。综上所述,菌株D1-2最适脱硫脱氮温度为35℃,且在15–35℃范围内表现出良好的生长及代谢活性,其广泛的耐温性使其在海水养殖尾水处理领域具有广阔的应用前景。

2.4.3 盐度

盐度也是影响菌株硫氧化功能的一个重要因子。Van Den Bosch等^[50]研究表明,即使嗜盐

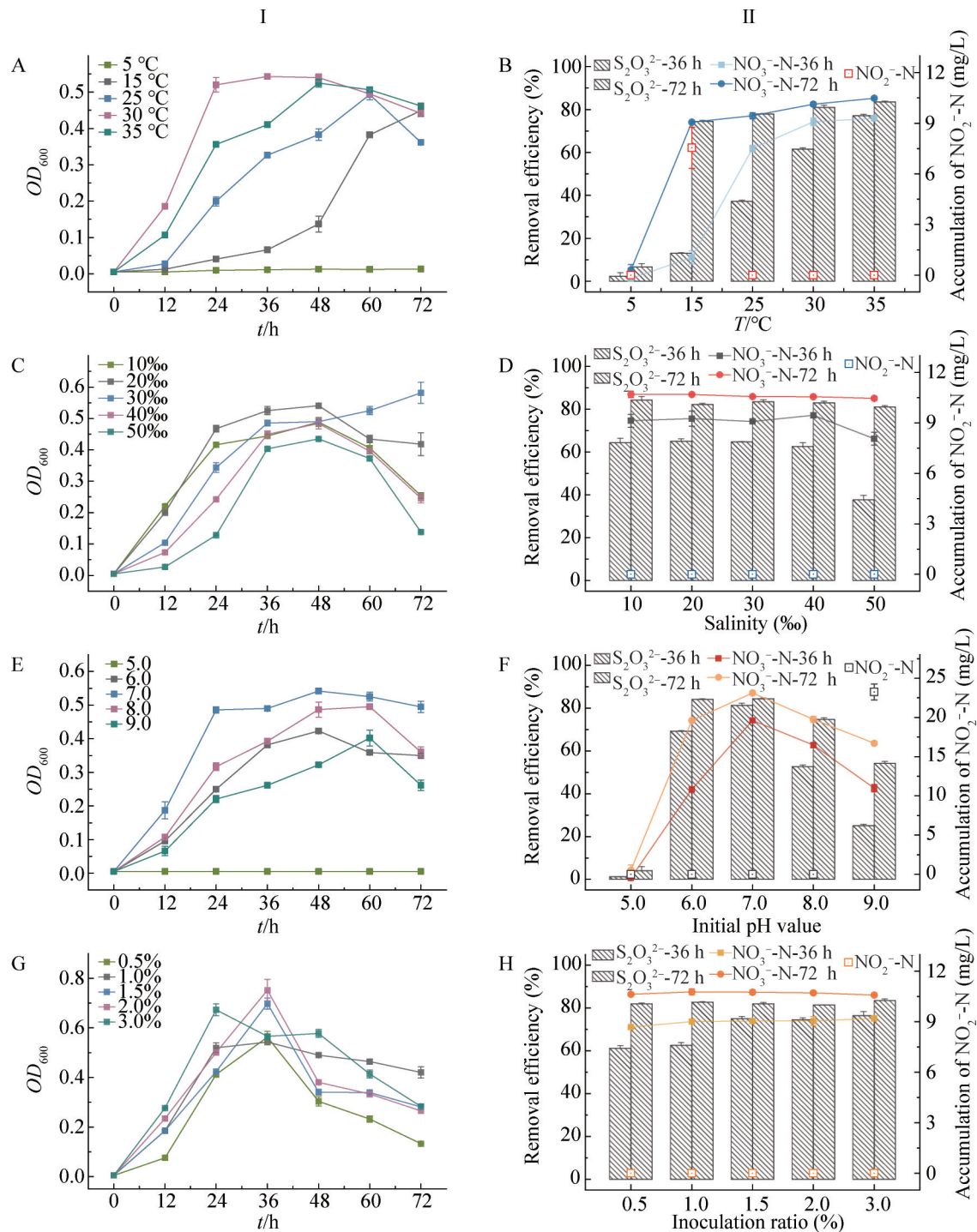


图5 不同条件下菌株D1-2的生长曲线(组I)以及对污染物的去除效能(组II)

Figure 5 Effects of different factors on the growth curves (Group I) and pollutant removal efficiencies (Group II) by strain D1-2. A, B: The effects of different temperature; C, D: The effects of different salinity; E, F: The effects of different pH; G, H: The effects of different inoculation ratio. Error bars in figure represent standard deviation.

菌在高盐度环境中, 部分菌株的生长代谢也会受到抑制。考虑到海水养殖尾水中不同盐度可能对菌株的生长和脱硫脱氮性能造成影响, 研究了菌株 D1-2 对不同盐度的适应性, 结果如图 5C、5D 所示。

当体系盐度为 10‰–40‰ 时, 菌株 D1-2 的 OD_{600} 值、 $S_2O_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 的去除率分别大于 0.50、80% 和 85%, 且无 NO_2^- -N 积累。当体系盐度为 50‰ 时, 对菌株的 OD_{600} 值有显著影响 ($P<0.05$), OD_{600} 的最大值仅为 0.43; 虽然 $S_2O_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 的去除速率略有下降, 但 72 h 后各盐度下菌株对硫、氮的去除率无显著性差异 ($P>0.05$)。这与 Xi 等^[16]的研究结果一致, 可能是由于细胞在高盐环境中活性下降, 需要一定的适应期, 使得菌株的脱硫脱氮存在延滞期。研究表明, 高盐度会显著降低 SOB 的硫化物去除效率^[50], 但也有研究筛选出嗜盐或耐盐的硫氧化菌。例如, 李向园等^[51]筛选出一株嗜盐硫氧化菌 BDL05, 其最适钠盐浓度可达 47‰。本研究分离的菌株 D1-2 在 50‰ 盐度时对硫、氮的去除率均可达到 80%, 说明 D1-2 具有一定程度的耐盐性, 可在高盐环境下进行脱硫脱氮。综上所述, 菌株 D1-2 对盐度具有广泛的适应性, 在 10‰–50‰ 盐度范围的废水处理领域具有很大的应用潜力。

2.4.4 初始 pH 值

pH 通过影响微生物体内的各种关键酶活性以及水体中 H_2S 的毒性, 从而对微生物的生长及代谢活性造成影响^[2]。 H_2S 在水体中以未解离形式(H_2S)和解离形式(HS^-)存在, 而低 pH 值会使未解离形式的硫化物比例增高, 加剧其生物毒性^[52]。因此, 研究菌株 D1-2 在不同 pH 值条件下的生长和脱硫脱氮效能尤为重要。

如图 5E 所示, 最大 OD_{600} 值随初始 pH 值的增大呈现先升后降的趋势。当初始 pH 值为

7.0 时 OD_{600} 值最高, 可达到 0.54; 而初始 pH 值为 9.0 时, 最大 OD_{600} 值仅为 0.40。当初始 pH 值为 5.0 时, 几乎检测不到菌体的生长。这可能是由于生长环境酸化, 菌体无法进行生长及代谢活动^[50]。在不同初始 pH 值条件下, 菌株 D1-2 对 $S_2O_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 的去除率分别如图 5F 所示, 在初始 pH 值为 7.0 时, $S_2O_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 的去除率最高, 分别为 85.79% 和 90.01%。初始 pH 值为 9.0 时, 菌株对 $S_2O_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 的去除率分别降至 54.30% 和 63.60%。此外, 随着初始 pH 值的升高, D1-2 对 NO_2^- -N 的积累量升高, 72 h 后初始 pH 值为 9.0 的条件下仍有 23.2 mg/L 的 NO_2^- -N 积累。这可能是由于 pH>9.0 时影响了亚硝酸盐还原酶的活性, 进而使得反硝化过程减弱, NO_2^- -N 无法向 N_2 或其他含氮气体转化^[53]。林栋青等^[54]分离出一株硫代硫酸盐氧化菌, 该菌最适生长的初始 pH 值为 3.0–5.0; 于淑豪等^[14]筛选出 SOB 菌株 *Halomonas* sp. AEB2 的最适 pH 值为 8.2; 李向园等^[51]分离出一株嗜碱硫氧化菌, $S_2O_3^{2-}$ 去除率最高时 pH 值为 9.3, 由此可知不同的硫氧化菌最适 pH 值范围有较大差异。在本研究中, 菌株 D1-2 最适生长的 pH 值范围为 6.0–8.0, 说明菌株在中性环境中脱氮脱硫能力较强。

2.4.5 接种比例

接种比例关系到菌株在培养液中的生长密度和速度^[55], 因此, 不同接种比例会对菌株 D1-2 的生长以及脱硫脱氮性能产生影响。将菌株 D1-2 活化 3 代后, 分别按照 0.5%–3.0% 的接种比例将其接入 S1 液体培养基中进行培养。

如图 5G、5H 所示, 当接种比例为 0.5%–1.0% 时, 菌株 D1-2 的最大 OD_{600} 值可达 0.55 左右, 相较于接种比例为 1.5%–3.0% 时显著降低 ($P<0.05$)。赵栩宁等^[21]研究发现, 菌株

Desulfovibrio sp. NH-1 的生长量与接种比例呈正相关关系, 与本研究结果一致。然而, 不同接种比例下, 菌株 D1-2 对 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 的去除率无显著差异($P>0.05$), 均高于 80% 和 85%。此外, 随着接种比例的升高, NO_2^- -N 的积累量在 24 h 内呈现先降后升的趋势, 而后无 NO_2^- -N 积累。综上所述, 最佳接种比例为 1.5%。

2.5 菌株 D1-2 对毒性硫化物的耐受阈值

高浓度的硫化物可以抑制关键酶的活性, 甚至整个细菌的生长代谢^[52]。因此, 以 Na_2S 作为硫源, 研究了不同初始浓度硫化物对菌株

D1-2 的生长及脱硫脱氮性能的影响。

如图 6 所示, 菌株 D1-2 的生长及代谢活性随着硫化物浓度的增加而降低, 这一现象与 Dou 等^[15]的研究结果一致。在水产养殖环境中, 硫化物浓度通常在 1–10 mg/L 之间, 但在一些高密度养殖系统中, 硫化物浓度可超过 100 mg/L^[56]。此外, 在胶州湾部分站位的表层沉积物中, 溶解性硫化物的浓度最高可达 740 mg/kg^[2]。本研究发现, 高浓度硫化物(100–500 mg/L)显著抑制了菌株 D1-2 的生长活性, OD_{600} 值在 0.06–0.17 之间($P<0.05$), 其硫氧化和硝酸盐还原活性也受到显著抑制。如图 6B 所示, 当硫化物浓度为

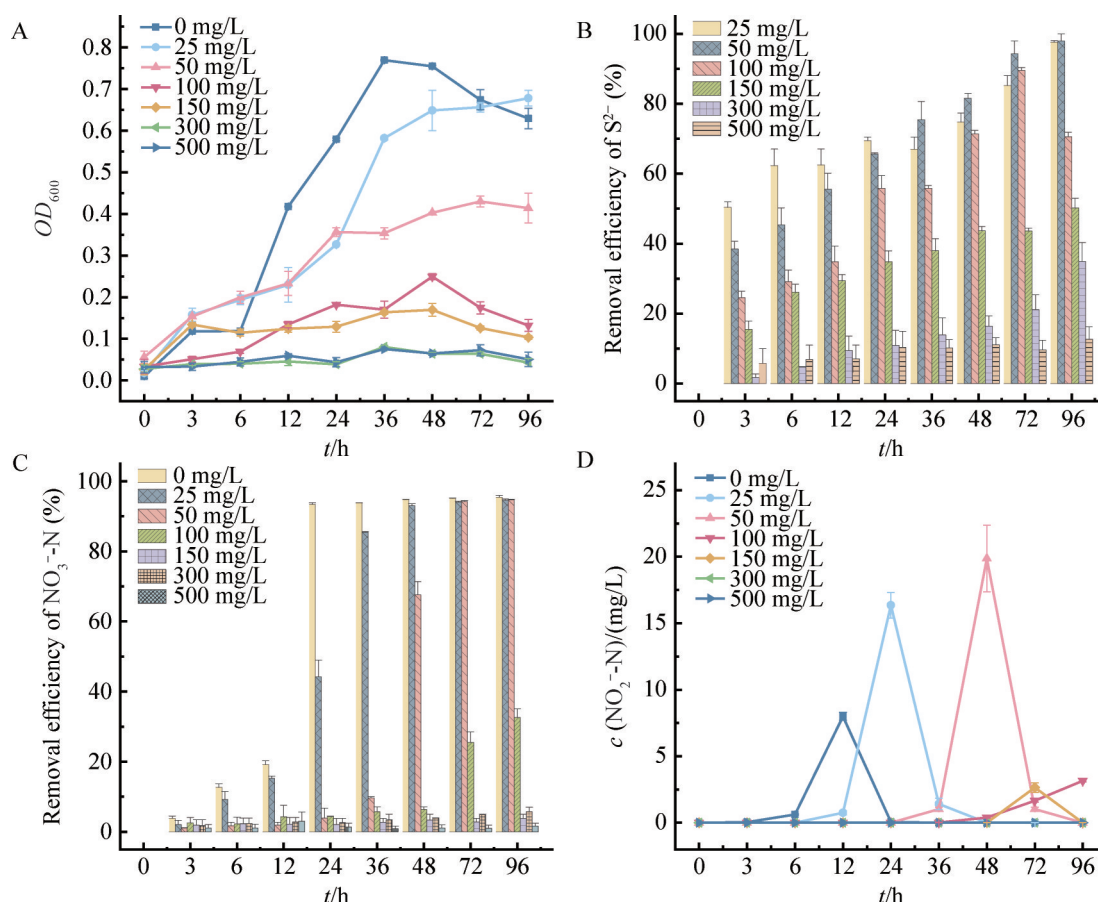


图6 不同 Na_2S 浓度对菌株D1-2的生长及污染物去除效率的影响

Figure 6 Effects of different concentrations of Na_2S on the growth and pollutant removal efficiency of strain D1-2. A: Growth curves; B: Removal efficiency of S^{2-} ; C: Removal efficiency of NO_3^- -N; D: Concentration of NO_2^- -N. Error bars in figure represent standard deviation.

25–50 mg/L 时, 菌株 D1-2 的硫化物去除率超过 95%。结合 NO_3^- -N 的去除率可知, 在 50 mg/L 的硫化物浓度下, 菌株 D1-2 对 NO_3^- -N 的去除率也超过 95%。这些结果表明, 菌株 D1-2 能够耐受高达 50 mg/L 的硫化物毒性, 并表现出高效的脱硫脱氮效率。在此条件下, 菌株 D1-2 能够满足海水养殖环境中氮、硫污染物的去除需求, 并实现稳定高效的效果。

3 结论

本研究从 SMD 反应器的污泥中筛选出一株具有高效硫氧化和硝酸盐去除能力的菌株 D1-2, 并对其生长特性进行了研究。

(1) 菌株 D1-2 为兼性厌氧菌, 能够以有机碳为电子供体, 同步去除硫化物和硝酸盐。通过菌落形态及 16S rRNA 基因序列分析鉴定, 该菌株为施氏假单胞菌(*Stutzerimonas stutzeri*), 命名为 *Stutzerimonas stutzeri* D1-2。

(2) 通过单因素试验分析了碳源、温度、盐度、初始 pH 值及接种比例对菌株 D1-2 生长和脱硫脱氮性能的影响。确定其最优碳源为乳酸钠, 最佳接种比例为 1.5%。在温度为 30–35 °C、初始 pH 值为 6.0–8.0、盐度为 10‰–50‰ 的条件下, 菌株 D1-2 表现出良好的脱硫脱氮性能, 培养 72 h 后对 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 和 NO_3^- -N 的去除率分别可超过 80% 和 85%。

(3) 该菌株最高可耐受 50 mg/L 的硫化物毒性胁迫, 在此条件下仍能高效进行硫氧化和反硝化作用, 从而去除 S^{2-} 和 NO_3^- -N。因此, 菌株 D1-2 在海水养殖尾水的氮硫污染控制中具有潜在的应用价值。

作者贡献声明

刘磊: 实验及论文撰写; 赵阳国: 论文修

改和润色; 张彦超: 协助实验操作、论文讨论与润色; 王荣晓: 协助实验操作、论文讨论; 刘剑楠: 论文讨论与修改。

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] KANG X, LIU S, NING X. Reduced inorganic sulfur in sediments of the mariculture region of Sanggou Bay, China[J]. Aquaculture Environment Interactions, 2016, 8: 233-246.
- [2] 赵阳国, 汤海松, 周弋铃, 高孟春, 郭亮, 王君鹏. 海水养殖生境中硫化物污染及控制技术研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(3): 37-43.
ZHAO YG, TANG HS, ZHOU YL, GAO MC, GUO L, WANG JP. Research progress of sulfide pollution and control technology in mariculture habitat[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(3): 37-43 (in Chinese).
- [3] LI ZR, LIU QQ, SHENG YQ. Effect of organic matter on the environmental behavior of sulfur and heavy metals in mariculture sediments during the aging process[J]. Marine Pollution Bulletin, 2024, 203: 116420.
- [4] AHMAD AL, CHIN JY, MOHD HARUN MHZ, LOW SC. Environmental impacts and imperative technologies towards sustainable treatment of aquaculture wastewater: a review[J]. Journal of Water Process Engineering, 2022, 46: 102553.
- [5] TOM AP, JAYAKUMAR JS, BIJU M, SOMARAJAN J, IBRAHIM MA. Aquaculture wastewater treatment technologies and their sustainability: a review[J]. Energy Nexus, 2021, 4: 100022.
- [6] ZHENG LN, LIU Q, LIU JJ, XIAO JN, XU GJ. Pollution control of industrial mariculture wastewater: a mini-review[J]. Water, 2022, 14(9): 1390.
- [7] WANG XQ, ZHAO YG, WANG JP, ZHANG M, BAI J, GUO L, GAO MC. Characteristics of sulfide removal by *Hydrogenovibrio thermophilus* strain TT in mariculture system[J]. Journal of Ocean University of China, 2019, 18(5): 1185-1192.
- [8] 杨萌, 赵阳国, 王晓琼, 王君鹏. 固定化硫氧化菌对海水养殖生境中硫化物的控制效果研究[J]. 海洋环境科学, 2020, 39(1): 66-74.
YANG M, ZHAO YG, WANG XQ, WANG JP. Control of sulfide in aquaculture water by immobilized sulfur-oxidizing bacteria[J]. Marine Environmental Science, 2020, 39(1): 66-74 (in Chinese).
- [9] WANG X, WANG JP, ZHAO YG, MAQBOOL F, GUO L, GAO MC, JIN CJ, JI JY. Control of toxic sulfide in

- mariculture environment by iron-coated ceramsite and immobilized sulfur oxidizing bacteria[J]. Science of the Total Environment, 2021, 793: 148658.
- [10] CHEN C, HO KL, LIU FC, HO M, WANG AJ, REN NQ, LEE DJ. Autotrophic and heterotrophic denitrification by a newly isolated strain *Pseudomonas* sp. C27[J]. Bioresource Technology, 2013, 145: 351-356.
- [11] ZHANG RC, CHEN C, SHAO B, WANG W, XU XJ, ZHOU X, XIANG YN, ZHAO L, LEE DJ, REN NQ. Heterotrophic sulfide-oxidizing nitrate-reducing bacteria enables the high performance of integrated autotrophic-heterotrophic denitrification (IAHD) process under high sulfide loading[J]. Water Research, 2020, 178: 115848.
- [12] 马晓丹, 高灵芳, 谭文博, 远野, 黄聪, 赵友康, 徐熙俊, 盛涛, 王爱杰. 一株异养脱硫反硝化菌株的筛选及其生物脱硫脱氮特性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(5): 853-857.
- MA XD, GAO LF, TAN WB, YUAN Y, HUANG C, ZHAO YK, XU XJ, SHENG T, WANG AJ. Isolation and characterization of a functional strain with the highly efficient of biological desulfurization and denitrification[J]. Microbiology China, 2015, 42(5): 853-857 (in Chinese).
- [13] 陈川, 张雨, 张权, 樊凯丽. 基于硫源介导的低碳脱氮技术研究进展[J]. 环境科学研究, 2023, 36(12): 2221-2234.
- CHEN C, ZHANG Y, ZHANG Q, FAN KL. Recent advances in sulfur-based low carbon nitrogen removal technology[J]. Research of Environmental Sciences, 2023, 36(12): 2221-2234 (in Chinese).
- [14] 于淑豪, 翟中威, 沈丰菊, 梁军锋, 张克强, 李明堂, 王锐. 硫氧化菌筛选及生物氧化特征研究[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(10): 2287-2297.
- YU SH, ZHAI ZW, SHEN FJ, LIANG JF, ZHANG KQ, LI MT, WANG R. Screening of sulfur-oxidizing bacteria and biological oxidation characteristics[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2022, 41(10): 2287-2297 (in Chinese).
- [15] DOU L, ZHANG MY, PAN LQ, LIU LP, SU ZP. Sulfide removal characteristics, pathways and potential application of a novel chemolithotrophic sulfide-oxidizing strain, *Marinobacter* sp. SDSWS8[J]. Environmental Research, 2022, 212: 113176.
- [16] XI ZY, DOU L, ZHANG MY, PAN LQ. Desulfurization properties, pathways, and potential applications of two novel and efficient chemolithotrophic sulfur-oxidizing strains of *Pseudomonas* sp. GHWS₃ and *Sphingobacterium* sp. GHWS5[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2024, 31(3): 3495-3511.
- [17] 王金英, 秦玉莹, 陈华晶, 田来明, 李明堂. 菹草内生硫氧化细菌的分离鉴定及对鸡粪中硫化氢的减释作用[J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(2): 176-182.
- WANG JY, QIN YY, CHEN HJ, TIAN LM, LI MT. Isolation and identification of endogenous sulfur-oxidizing bacteria of *Potamogeton crispus* and reduced release of H₂S in chicken manure[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2017, 39(2): 176-182 (in Chinese).
- [18] XIN YF, GAO R, CUI FF, LÜ CJ, LIU HL, LIU HW, XIA YZ, XUN LY. The heterotrophic bacterium *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 oxidizes sulfide to sulfate with thiosulfate as a key intermediate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(22): e01835-20.
- [19] 徐冉, 崔建东, 郜爽, 黄聪. 反硝化硫氧化工艺中功能菌株的筛选、识别及验证[J]. 环境工程, 2023, 41(12): 123-130.
- XU R, CUI JD, GAO S, HUANG C. Screening, identification, and validation of functional bacterial strains in denitrification and desulfurization process[J]. Environmental Engineering, 2023, 41(12): 123-130 (in Chinese).
- [20] ZHU YS, ZHAO YG, LIU JN, CHEN Y, GAO MC, GUO L, MUPINDU P. Rapid conversion of heterotrophic denitrification to autotrophic denitrification in mariculture wastewater treatment: denitrification performance and microbial communities under antibiotic stress[J]. Journal of Water Process Engineering, 2024, 62: 105391.
- [21] 赵栩宁, 马冬雪, 赵阳国. 海水养殖生境中硫酸盐还原菌活性的抑制机制[J]. 微生物学报, 2022, 62(8): 3048-3061.
- ZHAO XN, MA DX, ZHAO YG. Sulfide-producing activity inhibition of sulfate-reducing bacteria in mariculture[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(8): 3048-3061 (in Chinese).
- [22] LEE EY, LEE NY, CHO KS, RYU HW. Removal of hydrogen sulfide by sulfate-resistant *Acidithiobacillus thiooxidans* AZ11[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(4): 309-314.
- [23] 杜瑞, 于敏, 程景广, 张静静, 田晓荣, 张晓华. 冲绳海槽热液区可培养硫氧化细菌多样性及其硫氧化特性[J]. 微生物学报, 2019, 59(6): 1036-1049.
- DU R, YU M, CHENG JG, ZHANG JJ, TIAN XR, ZHANG XH. Diversity and sulfur oxidation characteristics of cultivable sulfur oxidizing bacteria in hydrothermal fields of Okinawa Trough[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(6): 1036-1049 (in Chinese).
- [24] 石永辉, 张益豪, 秦哲, 史天茜, 武新颖, 赵春霞, 路达. 亚硝氮对厌氧氨氧化EGSB反应器启动的影响[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2023, 43(6): 595-602.
- SHI YH, ZHANG YH, QIN Z, SHI TX, WU XY, ZHAO CX, LU D. Effect of nitrite on start-up of anammox EGSB reactor[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2023, 43(6): 595-602 (in Chinese).
- [25] LEWIS WM Jr, MORRIS DP. Toxicity of nitrite to fish: a review[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1986, 115(2): 183-195.
- [26] KOCOUR KROUPOVÁ H, VALENTOVÁ O, SVOBODOVÁ Z, ŠAUER P, MÁCHOVÁ J. Toxic effects of nitrite on freshwater organisms: a review[J]. Reviews in Aquaculture, 2018, 10(3): 525-542.
- [27] 胡欣, 刘纪化, 刘怀伟, 庄光超. 异养细菌硫代谢及其在海洋硫循环中的作用[J]. 中国科学(地球科学), 2018, 48(12): 1540-1550.
- HU X, LIU JH, LIU HW, ZHUANG GC. Sulfur

- metabolism by marine heterotrophic bacteria involved in sulfur cycling in the ocean[J]. *Scientia Sinica (Terrae)*, 2018, 48(12): 1540-1550 (in Chinese).
- [28] ZHANG MY, DUGBARTEY GJ, JURIASINGANI S, SENER A. Hydrogen sulfide metabolite, sodium thiosulfate: clinical applications and underlying molecular mechanisms[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(12): 6452.
- [29] 吴根福, 高海春. 兼性厌氧细菌硫化氢的产生机理及其生理功能[J]. *微生物学报*, 2017, 57(2): 170-178.
WU GF, GAO HC. Endogenous production and physiological functions of hydrogen sulfide in facultative anaerobic bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(2): 170-178 (in Chinese).
- [30] LIMOLI DH, JONES CJ, WOZNAK DJ. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function[J]. *Microbiology Spectrum*, 2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-10.1128/microbiolspe0011-2014.
- [31] GUO HL, CHEN C, LEE DJ, WANG AJ, REN NQ. Sulfur-nitrogen-carbon removal of *Pseudomonas* sp. C27 under sulfide stress[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, 53(1): 6-12.
- [32] LALUCAT J, GOMILA M, MULET M, ZARUMA A, GARCÍA-VALDÉS E. Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: proposal of *Stutzerimonas* gen. nov.[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2022, 45(1): 126289.
- [33] GOMILA M, MULET M, GARCÍA-VALDÉS E, LALUCAT J. Genome-based taxonomy of the genus *Stutzerimonas* and proposal of *S. frequens* sp. nov. and *S. degradans* sp. nov. and emended descriptions of *S. perfectamarina* and *S. chloritidismutans*[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(7): 1363.
- [34] GUO J, XU SS, LIU YT, ZHANG CL, HOU SW. Complete genome sequence of *Stutzerimonas stutzeri* strain SOCE 002, a marine bacterium isolated from the surface seawater of Dapeng Bay[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2023, 12(5): e0015023.
- [35] 邱梦瑶, 苏应兵, 周焱. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮性能研究[J]. *江西农业大学学报*, 2024, 46(3): 809-818.
QIU MY, SU YB, ZHOU Y. Isolation and identification of an aerobic denitrifying bacteria and its denitrification performance[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis (Natural Sciences Edition)*, 2024, 46(3): 809-818 (in Chinese).
- [36] LI RT, GAO SC, FAN XX, MA YM, REN XP, GAO TP, LIU Y. Enhanced nitrate removal through autotrophic denitrification using microbial fuel cells via bidirectional extracellular electron transfer[J]. *Microchemical Journal*, 2024, 204: 111026.
- [37] GAO N, ZHANG HH, HU C, LI Q, LI LM, LEI P, XU H, SHEN WS. Inoculation with *Stutzerimonas stutzeri* strains decreases N₂O emissions from vegetable soil by altering microbial community composition and diversity[J]. *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(5): e0018624.
- [38] ALSANEA A, BOUNAGA A, DANOUCHE M, LYAMLOULI K, ZEROUAL Y, BOULIF R, ZHOU C, RITTMANN B. Optimizing autotrophic sulfide oxidation in the oxygen-based membrane biofilm reactor to recover elemental sulfur[J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(51): 21736-21743.
- [39] FAN KL, XU XJ, XU F, SHI J, SUN K, FEDOROVA I, REN NQ, LEE DJ, CHEN C. A novel intra- and extracellular distribution pattern of elemental sulfur in *Pseudomonas* sp. C27-driven denitrifying sulfide removal process[J]. *Environmental Research*, 2022, 213: 113674.
- [40] WANG JJ, XUE FH, CHENG ZW, WANG JD, CHEN DZ, ZHAO JK, QIU SK. Temperature and pH on microbial desulfurization of sulfide wastewater: from removal performance to gene regulation mechanism[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2023, 53: 103720.
- [41] GUO HL, CHEN C, LEE DJ. Nitrogen and sulfur metabolisms of *Pseudomonas* sp. C27 under mixotrophic growth condition[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 293: 122169.
- [42] LUO JF, TIAN GL, LIN WT. Enrichment, isolation and identification of sulfur-oxidizing bacteria from sulfide removing bioreactor[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2013, 25(7): 1393-1399.
- [43] YANG ZD, LIU ZH, SKŁODOWSKA A, MUSIALOWSKI M, BAJDA T, YIN HQ, DREWNIAK L. Microbiological sulfide removal from microorganism isolation to treatment of industrial effluent[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(3): 611.
- [44] 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).
- [45] GAO S, LI ZL, HOU YN, WANG AJ, LIU Q, HUANG C. Effects of different carbon sources on the efficiency of sulfur-oxidizing denitrifying microorganisms[J]. *Environmental Research*, 2022, 204: 111946.
- [46] 杨欣雨, 刘玉香. 异养硝化-好氧反硝化菌群 YQS 脱氮及聚集特性研究[J]. *现代化工*, 2024, 44(S2): 234-240.
YANG XY, LIU YX. Study on nitrogen removal and aggregation characteristics of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacteria YQS[J]. *Modern Chemical Industry*, 2024, 44(S2): 234-240 (in Chinese).
- [47] LI CE, YANG JS, WANG X, WANG ET, LI BZ, HE RX, YUAN HL. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 182: 18-25.
- [48] 付雨潼, 王帅杰, 叶菲, 王露, 张颖超, 齐海云. 耐盐好氧反硝化菌 *Vibrio alginolyticus* YT-3 的固定化及对海水养殖废水的脱氮处理[J]. *水处理技术*, 2023, 49(9):

- 64-70.
FU YT, WANG SJ, YE F, WANG L, ZHANG YC, QI HY. Immobilization of a halotolerant aerobic denitrifier *Vibrio alginolyticus* YT-3 and its application in denitrification of mariculture wastewater[J]. Technology of Water Treatment, 2023, 49(9): 64-70 (in Chinese).
- [49] ZHANG YP, ZHANG L, LI LH, CHEN GH, JIANG F. A novel elemental sulfur reduction and sulfide oxidation integrated process for wastewater treatment and sulfur recycling[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 342: 438-445.
- [50] Van den BOSCH PL, van BEUSEKOM OC, BUISMAN CJN, JANSSEN AJH. Sulfide oxidation at halo-alkaline conditions in a fed-batch bioreactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 97(5): 1053-1063.
- [51] 李向园, 杨茂华, 穆廷桢, 刘金龙, 赵国群, 邢建民. 一株嗜盐嗜碱硫氧化菌的筛选、鉴定及硫氧化特性[J]. 微生物学通报, 2020, 47(8): 2372-2381.
LI XY, YANG MH, MU TZ, LIU JL, ZHAO GQ, XING JM. Screening, identification and sulfide oxidation characteristics of a haloalkaliphilic sulfur oxidizing bacterium[J]. Microbiology China, 2020, 47(8): 2372-2381 (in Chinese).
- [52] POKORNA D, ZABRANSKA J. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(6): 1246-1259.
- [53] 万雨轩, 王鑫. 废水处理中异化硝酸盐还原为铵的研究进展[J]. 土木与环境工程学报(中英文), 2021, 43(6): 134-144.
WAN YX, WANG X. Research progress of dissimilatory nitrate reduction to ammonium in wastewater treatment[J]. Journal of Civil and Environmental Engineering, 2021, 43(6): 134-144 (in Chinese).
- [54] 林栋青, 张彦科, 顾向阳. 硫代硫酸盐氧化菌 TX 的分离、鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(11): 1638-1644.
LIN DQ, ZHANG YK, GU XY. Isolation, identification and characterization of thiosulfate-oxidizing bacterium TX[J]. Microbiology China, 2009, 36(11): 1638-1644 (in Chinese).
- [55] GAO CH, CAO H, CAI P, SØRENSEN SJ. The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity[J]. The ISME Journal, 2021, 15(1): 29-40.
- [56] THULASI D, MURALIDHAR M, SARASWATHY R. Effect of sulphide in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* under varying oxygen and pH levels[J]. Aquaculture Research, 2020, 51(6): 2389-2399.