



植物叶际好氧反硝化细菌的筛选及其脱氮性能研究

张建云¹, 谷立坤^{1*}, 王亚西¹, 李潇扬¹, 宁志琪¹, 孙淼焜¹, 张欣¹, 白志辉²

1 河南工程学院环境与生物工程学院, 河南 郑州 451191

2 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

张建云, 谷立坤, 王亚西, 李潇扬, 宁志琪, 孙淼焜, 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 Jianyun, GU Likun, WANG Yaxi, LI Xiaoyang, NING Zhiqi, SUN Miaokun, ZHANG Xin, BAI Zhihui. Aerobic denitrifying bacteria in the phyllosphere: screening and characterizing of nitrogen removal performance[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1521-1537.

摘要: 【目的】探索叶际微生物协同植物削减大气氮氧化物的机制, 了解叶际可培养好氧反硝化细菌的存在及多样性, 获得高效的叶际好氧反硝化细菌资源。【方法】采用富集培养结合格里斯试剂检测、溴百里酚蓝(bromothymol blue, BTB)培养基筛选的方法从景观植物叶际分离筛选好氧反硝化细菌, 对好氧反硝化细菌的 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析, 并选取其中一株高效好氧反硝化细菌进行脱氮性能研究。【结果】从 6 种景观植物石楠、女贞、木樨、樟树、卫矛冬青、荷花玉兰的叶际中分离到好氧反硝化细菌 13 株, 经 16S rRNA 基因序列分析发现, 13 株细菌分别属于 4 门 7 科 7 属, 其中 4 株为肠杆菌属(*Enterobacter*), 3 株为无色杆菌属(*Achromobacter*), 2 株为假单胞菌属(*Pseudomonas*), 其余 4 株分别属于鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、微杆菌属(*Microbacterium*)和假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*)。定量分析发现菌株 SF 的反硝化效果较好。通过单因素试验和响应面设计试验, 对菌株 SF 的脱氮性能进行了一系列研究, 探究了碳源、温度、初始 pH、碳氮比和转速等因素对菌株 SF 脱氮效果的影响。结果表明, 菌株 SF 的最佳脱氮条件: 碳源为葡萄糖, 初始 pH 值为 7.5, 碳氮比为 9.7, 转速 180 r/min, 温度为 33.5 °C。在此条件下, 当初始硝酸盐浓度为 361 mg/L 时, 72 h 总氮去除率可达到 93.3%。【结论】景观植物叶际中存在较多种类的可培养好氧反硝化细菌, 丰富了叶际氮循环相关微生物的类型, 为探索叶际微生物协同削减大气氮氧化物的机制奠定了基础。通过高效脱氮菌株的筛选,

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(42177111); 河南工程学院协同育人基金(2022XT-2021GHZ001)

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (42177111) and the Collaborative Education Fund of Henan University of Engineering (2022XT-2021GHZ001).

*Corresponding author. E-mail: gulikun1@163.com

Received: 2023-11-24; Accepted: 2024-02-21; Published online: 2024-02-26

为进一步应用微生物协同植物削减空气氮氧化物污染提供了候选菌株。

关键词：叶际；好氧反硝化细菌；分离与鉴定；脱氮；反硝化特性

Aerobic denitrifying bacteria in the phyllosphere: screening and characterizing of nitrogen removal performance

ZHANG Jianyun¹, GU Likun^{1*}, WANG Yaxi¹, LI Xiaoyang¹, NING Zhiqi¹, SUN Miaokun¹, ZHANG Xin¹, BAI Zhihui²

1 College of Environment and Biological Engineering, Henan University of Engineering, Zhengzhou 451191, Henan, China

2 Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Abstract: [Objective] To identify efficient aerobic denitrifying bacteria in the phyllosphere and provide new ideas for the prevention and control of air pollution by phytoremediation. [Methods] We used the enrichment culture method combined with the Griess reagent and bromothymol blue to isolate aerobic denitrifying bacteria from the phyllosphere and analyzed the phylogenetic relationship of the isolates based on the 16S rRNA gene sequences. Efficient aerobic denitrifying bacteria were screened out and their denitrification conditions were optimized. [Results] Thirteen strains were isolated from the phyllosphere of six landscape plant species: *Photinia serratifolia*, *Ligustrum lucidum*, *Osmanthus fragrans*, *Camphora officinarum*, *Euonymus japonicus*, and *Magnolia grandiflora*. According to the 16S rRNA gene sequences, the 13 strains were classified into 7 genera, 7 families of 4 phyla. Specifically, 4, 3, and 2 strains belonged to *Enterobacter*, *Achromobacter*, and *Pseudomonas*, respectively, and the remaining 4 strains belonged to *Acinetobacter*, *Sphingobacterium*, *Microbacterium*, and *Pseudarthrobacter*. The comparative analysis revealed that strain SF outperformed the other strains in denitrification. The factors (carbon source, temperature, initial pH, C/N ratio, and rotational speed) influencing the denitrification performance of SF were optimized by single factor tests and response surface methodology. The denitrification conditions of SF were optimized as follows: glucose as the carbon source, initial pH 7.5. C/N ratio of 9.7, rotational at 180 r/min, and temperature of 33.5 °C. Under the optimized conditions, the total nitrogen removal rate reached 93.3% in 72 h when the initial nitrate concentration was 361 mg/L. [Conclusion] The rich culturable aerobic denitrifying bacteria in the phyllosphere of landscape plants laid a foundation for phytoremediation. It is feasible to synergistically reduce nitrogen oxide pollution in the air by screening efficient denitrifying strains and improve the denitrifying performance by optimizing the culture conditions.

Keywords: phyllosphere; aerobic denitrifying bacteria; isolation and identification; nitrogen removal; denitrification characteristics

空气污染问题已经成为人们关注的热点, 氮氧化物的排放作为空气污染的原因之一, 已经成为环境领域不可忽略的问题^[1]。植物对空气中的氮氧化物的净化发挥着重要的作用^[2-3]。全球植物地上部分总表面积大约为 10^9 km^2 (大多数为叶表面), 在叶面上分布着大量的微生物, 其中细菌的平均含量为 10^6-10^7 个细菌细胞/ cm^2 叶片表面积^[4]。除了叶面上, 在植物的茎、花、果等组织表面也包含大量的微生物, 定殖在这些部位的微生物通称为叶际微生物(*phylloplane microorganism*)^[5-6]。研究表明, 叶际微生物具有重要的生态功能^[7-8], 与植物关系密切, 参与植物固氮^[9-10], 促进植物生长^[11], 参与植物健康调节^[12]。同时, 一些针对土壤污染物如抗生素、农药等^[13]和空气污染物如臭氧^[14]等环境胁迫导致的叶际微生物群落结构和多样性的变化的研究, 有助于理解叶际微生物其他的潜在功能。叶际微生物数量巨大且功能多样, 这些微生物是否参与大气氮氧化物的净化, 以及如何协同植物进行大气氮氧化物净化的问题, 尚缺乏系统的研究。

反硝化作用是生物地球化学循环中重要的生态过程, 是去除硝态氮的途径之一^[15]。在传统理论中, 反硝化被认为是一种严格的厌氧过程。然而, 自从 20 世纪 80 年代 Robertson 等^[16]首次分离出好氧反硝化细菌以来, 研究人员逐渐从不同的环境中分离出多种可以进行好氧反硝化的细菌^[17-20], 好氧反硝化细菌的发现为水体的生物脱氮技术提供了新的研究方向, 但也会使土壤损失硝酸盐, 降低土壤的营养。目前已分离纯化出的好氧反硝化细菌多来自湿地、水库、土壤、湖泊沉积物、污废水、活性污泥和池塘当中^[17], 对于植物叶际可培养的好氧反硝化细菌的研究却鲜有报道。

好氧反硝化细菌在叶际中是否存在, 在植物削减氮氧化物的过程中是否发挥作用, 如何发挥作用, 这是本文及后续研究需要揭示的问题。王月等^[21]研究表明, 在环境湿度达到一定程度后, 植物叶面会附着一层水膜, 空气中的气态 NO_2 可能会溶于水膜形成硝酸盐。周敏等^[22]测得大气颗粒物中水溶性 NO_3^- 的含量在 $0.61-15.34 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 之间, 而植物表面的微观结构能够有效吸附自然沉降到叶面的微小颗粒物^[22], 这是叶面硝酸盐的另一个来源。在 2023 年的 3 月到 5 月, 我们课题组对景观植物石楠和女贞的叶片硝酸盐含量和亚硝酸盐含量进行了持续监测, 测得的硝酸盐含量与周敏等^[22]的结果相近。基于以上结果, 我们提出以下假设: 大气中的氮氧化物溶解于叶际表面的水膜形成的硝酸盐和来源于微颗粒物中的可溶性硝酸盐成为叶面硝酸盐利用菌或反硝化细菌的氮源, 其中的一部分被细菌同化用于合成细菌的菌体, 另一部分通过反硝化途径将叶际硝酸盐还原为无害的氮气释放到空气中, 从而达到协同植物削减大气氮氧化物的目的。

为了验证该假设, 采用富集培养结合格里斯试剂检测、溴百里酚蓝(*bromothymol blue*, *BTB*)平板筛选的方法从 6 种校园景观植物石楠、女贞、木樨、樟树、卫矛冬青、荷花玉兰中分离纯化出 13 株好氧反硝化细菌, 对其进行 16S rRNA 基因序列分析和种属鉴定, 对反硝化途径的关键基因周质硝酸盐还原酶基因 *napA* 进行检测, 并对其中的一株高效好氧反硝化细菌 SF 进行了系统的脱氮性能的研究。

景观植物叶际好氧反硝化细菌资源的挖掘, 为探索叶际微生物协同削减大气氮氧化物的机制奠定了工作基础, 为进一步应用微生物协同植物削减空气氮氧化物污染提供了候选菌株。

1 材料与方 法

1.1 样 点

本研究选取 6 种典型景观植物作为研究对象, 从其叶表面筛选好氧反硝化细菌, 地点在河南工程学院西校区院内, 分别为 2 号教学楼道路两侧的卫矛树、2 号教学楼后面的樟树、学校南门附近的木樨树、大西门道路两侧的女贞树、3 号实验楼后面的荷花玉兰树、6 号教学楼附近的石楠树(文中用 WF 表示从卫矛冬青中筛选出的细菌, SF 代表从石楠中筛选出的细菌, MF 代表从木樨中筛选出的细菌, ZF 代表从樟树中筛选出的细菌, NF 代表女贞中筛选出的细菌, HF 代表荷花玉兰中筛选出的细菌)。

1.2 培 养 基

富集培养基^[23] (g/L): 牛肉膏 3.00, 蛋白胨 5.00, KNO₃ 1.00, pH 7.0–7.6。

分离培养基^[23] (BTB 培养基, g/L): KNO₃ 1.00, 柠檬酸三钠 1.00, KH₂PO₄ 1.00, FeSO₄·7H₂O 0.05, CaCl₂ 0.20, MgSO₄·7H₂O 1.00, 1%溴百里香酚蓝 1.00 mL, 琼脂 20.00, pH 6.8。

反硝化性能测定培养基^[24] (g/L): 柠檬酸三钠 1.31, 乙酸钠 1.10, KNO₃ 0.36, MgSO₄·7H₂O 0.02, KH₂PO₄ 1.00, K₂HPO₄ 5.00, NaCl 0.50, 微量元素溶液 1.00 mL。

微量元素溶液(g/L): EDTA-Na₂ 30.00, ZnSO₄ 2.20, CaCl₂ 5.50, MnCl₂·4H₂O 5.06, FeSO₄·7H₂O 5.00, CuSO₄·7H₂O 1.57, CoCl₂·6H₂O 1.61, pH 调至 7.0–7.5。

1.3 好氧反硝化细菌的富集、分离和筛选

1.3.1 好氧反硝化细菌的富集培养

分别摘取学校 2 号教学楼道路东侧的石楠、卫矛和樟树的树叶以及南大门附近的木樨、女贞和荷花玉兰的树叶, 放在密封袋中, 写上标签。每种样品均称取 10 g, 分别加到 90 mL

无菌水中, 200 r/min 振荡 3 h, 静置 1 h 后, 取 10 mL 上清液到 90 mL 反硝化富集培养基中, 置于 30 °C、150 r/min 的恒温摇床中进行培养。设置两组平行样品。

1.3.2 格里斯试剂的定性检测

每天使用格里斯试剂^[24]定性检测培养基中亚硝酸盐含量。取 2 mL 样品, 滴加一滴格里斯试剂观察颜色变化。出现粉红色或棕色证明有亚硝酸盐产生。当检测到亚硝酸盐产生时, 准备富集一代的样品直接进行 BTB 固体培养基涂布^[25]。准备富集三代的样品吸取 10 mL 富集液到 250 mL 锥形瓶中, 再向其中加入 90 mL 新配制的富集培养基, 继续培养。重复以上操作, 富集 3 次后进行 BTB 固体培养基涂布操作。

1.3.3 BTB 固体显色培养基的快速筛选

取 6 种样品富集一代和富集三代的富集液 1 mL, 用无菌水对每个样品进行系列梯度稀释, 稀释梯度分别为 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 倍。取不同稀释倍数的稀释液 100 μL 涂布于 BTB 反硝化固体培养基上, 30 °C 恒温培养 2–3 d。在选择培养基变蓝色的平板上, 挑取形态差别比较明显的菌落进行平板划线获取单菌落。共分离得到 16 株菌株, 按照来源和富集代数分别命名为 MF11、MF12、WF11、ZF11、ZF12、ZF31、HF12、HF、NF、NF31、NF32、SF、TF31、TF12、TF13 和 SF3。其中 3 株来源于景观林区土壤, 作为筛选过程中的对照样品, 其余 13 株来源于景观植物叶际。TF 代表从林区土壤中筛选出的菌株。

1.3.4 好氧反硝化细菌反硝化效率的测定^[25]

将分离纯化好的好氧反硝化细菌转接于以 KNO₃ 为唯一氮源的反硝化培养基中, 在 30 °C、150 r/min 条件下恒温培养, 每隔 4 h 取少量菌液(取样前摇匀)测定 600 nm 下的吸光度, 确定其生长曲线。以对数生长期的菌液为种子培养基,

按 1% 的接种量转接于反硝化性能测定培养基中, 测定菌液 0、12、24、36、48、72 h 的硝态氮含量、亚硝态氮含量、 OD_{600} 数值和菌液总氮含量。定量判断菌株好氧反硝化能力的强弱。

1.4 菌株鉴定

从形态学、生理生化实验、分子生物学、功能学等几个方面对菌株进行鉴定。通过平板划线和革兰氏染色法观察菌落形态及菌体形态。细菌生理生化鉴定主要参考《常见细菌系统鉴定手册》^[26]。分子生物学鉴定采用 16S rRNA 基因序列分析法。细菌总 DNA 的提取: 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司)进行提取, 方法参考试剂盒说明书。

1.4.1 16S rRNA 基因序列的扩增^[27]

引物采用 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTA CGACTT-3')。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 总延伸 10 min。

1.4.2 反硝化途径关键基因硝酸盐还原酶^[28-29] *napA* 的扩增

引物采用上游引物(5'-TCTGGACCATGG GCTTCAACCA-3') 和下游引物(5'-ACGACGAC CGGCCAGCGCAG-3')。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 65 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 总延伸 10 min。

1.4.3 16S rRNA 基因序列测序及分析

扩增得到的 16S rRNA 基因序列由河南尚亚生物技术有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行序列比对, 使用 MEGA 7.0 软件的邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树。*napA* 基因序列由河南尚亚生物技术有限公司测序, 基于 *napA* 基因序列的系统发育树使用 MEGA 7.0 软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建。

菌株反硝化能力的测定通过监测培养基中硝酸盐和亚硝酸盐含量的变化来确定。

1.5 好氧反硝化细菌脱氮性能研究

从前期筛选的菌株中选取了一株表现出良好脱氮能力的好氧反硝化细菌, 进行脱氮性能研究。先采用单因素实验探究不同环境因子[碳源、温度、溶解氧、碳氮比(C/N ratio, C/N)和初始 pH]对好氧反硝化性能的影响, 在此基础上用响应面法进行脱氮条件优化, 以确定最佳脱氮条件。

1.5.1 单因素对菌株脱氮的影响

按体积分数 2% 接种量将处于对数生长期的菌液(OD_{600} 为 1.0) 接到反硝化培养基(总体积为 100 mL) 中, 通过调节温度^[30] (25、30、35、40 °C)、pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)、C/N^[31] (3、6、8、10、15)、碳源^[32-33] (甲醇、丁二酸钠、柠檬酸钠、酒石酸钾钠、蔗糖和葡萄糖) 和转速^[34-35] (0、100、120、150 和 180 r/min) 摇床培养, 每隔 12 h 测定培养液中菌体生长量和总氮(total nitrogen, TN) 含量。考察不同的因子对脱氮效果的影响。除温度实验外, 其余均在 30 °C 下培养, 实验设 3 个重复。

1.5.2 响应面优化脱氮效率条件

采用响应面分析方法中的 Box-Behnken 设计(Box-Behnken design, BBD) 试验设计原理来优化脱氮条件^[36]。这种设计方法基于单因素试验设计, 其中包括中心值(表示为“0”)、低水平(表示为“-1”)和高水平(表示为“+1”)。选择对脱氮过程影响最大的主要因素作为自变量, 并以 TN 的去除效率作为响应值(Y), 进行实验设计。综合考虑多个因素对脱氮效率的影响, 并找到最佳的脱氮条件。最后用设计得到的最佳脱氮条件来验证菌株的脱氮效果。将根据响应面模型的预测脱氮结果与菌株在验证实验中的 TN 去除率进行比较, 以验证响应面模型的可靠性。

1.6 检测方法

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盐酸萘乙二胺分光光度法 GB 7493—87^[38], 总氮的测定采用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法 HJ 636—2012^[39]。

2 结果与分析

2.1 好氧反硝化细菌筛选结果及多样性分析

经富集培养基培养后的培养液经梯度稀释, BTB 培养基分离、纯化, 反硝化培养基定性复筛, 从 6 种景观植物石楠、女贞、木樨、樟树、卫矛冬青和荷花玉兰的叶片中共分离 13 株高效好氧反硝化细菌, 其中女贞 3 株、石楠 2 株、荷花玉兰 2 株、卫矛冬青 1 株、木樨 2 株和樟树 3 株。对 13 株细菌进行了 DNA 提取、16S rRNA 基因测序、序列分析。结果显示, 来自景

观植物叶际的 13 株好氧反硝化细菌分属于 4 个不同的门[拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)]；7 个不同的科[鞘氨醇杆菌科(*Sphingobacteriaceae*)、产碱杆菌科(*Alcaligenaceae*)、假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)、奈瑟氏菌科(*Neisseriaceae*)、微球菌科(*Micrococcaceae*)、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)和微杆菌科(*Microbacteriaceae*)]；7 个不同的属[鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*^[40])、无色杆菌属(*Achromobacter*^[41])、假单胞菌属(*Pseudomonas*^[25,42-44])、假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*^[45])、不动杆菌属(*Acinetobacter*^[35,46-48])、肠杆菌属(*Enterobacter*^[28,49-50])和微杆菌属(*Microbacterium*^[51])]，表 1 列出 16 株好氧反硝化细菌, 其中 3 株来源于景观林区的土壤中, 作为筛选过程中的对照样品。本研究从 6 种景观植物中筛选到的 13 株好氧反硝化细

表 1 叶际好氧反硝化细菌的 16S rRNA 基因序列的 BLAST 结果

Table 1 The BLAST results and aerobic denitrifying bacteria isolated from the phyllosphere

Strains	Nearest phylogenetic neighbor in GenBank	Similarity (%)	Genus and species of the strains	Isolated place	Detection of <i>napA</i>
ZF11	<i>Sphingobacterium mizutaii</i> strain DSM 11724	96.00	<i>Sphingobacterium</i> sp.	<i>Cinnamomum camphora</i>	+
ZF12	<i>Achromobacter insolitus</i> strain CCUG 47057	97.46	<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Cinnamomum camphora</i>	+
ZF31	<i>Achromobacter insolitus</i> strain CCUG 47057	96.79	<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Cinnamomum camphora</i>	+
MF11	<i>Pseudomonas furukawaii</i> strain KF707	100.00	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Melilotus</i>	+
MF12	<i>Achromobacter dolens</i> strain LMG 26840	100.00	<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Melilotus</i>	+
WF11	<i>Acinetobacter radioresistens</i> strain NBRC 102413	95.86	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Euonymus alatus</i>	+
TF12	<i>Achromobacter insolitus</i> strain LMG 6003	99.52	<i>Achromobacter</i> sp.	Forest soil	N
TF13	<i>Cupriavidus</i> sp. strain HBUM200019	97.78	<i>Cupriavidus</i> sp.	Forest soil	N
TF31	<i>Pseudomonas</i> sp. strain CMF-14	95.60	<i>Pseudomonas</i> sp.	Forest soil	+
HF12	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> strain DSM 20119	95.52	<i>Pseudarthrobacter</i> sp.	<i>Magnolia lotus</i>	+
HF	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> strain 10-17	99.65	<i>Enterobacte</i> sp.	<i>Magnolia lotus</i>	+
NF31	<i>Pseudomonas veronii</i> strain CIP 104663	99.50	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Ligustrum</i>	+
NF32	<i>Enterobacter quasihormaechei</i> strain WCHes120003	99.65	<i>Enterobacte</i> sp.	<i>Ligustrum</i>	+
NF	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain HN18447	99.00	<i>Enterobacte</i> sp.	<i>Ligustrum</i>	+
SF	<i>Enterobacter cloacae</i> strain ATCC 13047	99.86	<i>Enterobacte</i> sp.	<i>Photinia</i>	+
SF3	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> strain DSM 8609	95.47	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Photinia</i>	+

napA: Periplasmic nitrate reductase gene; +: The detection of *napA* gene is positive; N: Not detected.

菌, 分别属于 4 门 7 科 7 属, 而且这 7 个属的微生物都已经被发现具有好氧反硝化功能^[41-51], 其中大多数是从污泥、土壤和水体的环境中分离得到的。

从分析结果来看, 景观植物叶际可培养的好氧反硝化细菌的多样性较好, 由于所选定的景观植物种类有限, 且微生物的种类与植物种类、植物生长环境、季节都有关系, 因此, 对于景观植物可培养好氧反硝化细菌的多样性的研究工作还需持续深入。目前对于景观植物叶际是否有好氧反硝化细菌, 以及它们在叶际表面的生理功能尚无相关报道, 该结果拓展了叶际好氧反硝化细菌的定殖和潜在应用范围。

2.2 菌株的反硝化效率测定

对 12 种好氧反硝化细菌的反硝化效率测定结果如图 1 所示。从定量实验结果上看, 菌株 ZF11、MF11、WF11 和 SF 的硝态氮去除率较高, 均在 80% 以上, 以硝态氮的去除率指标为标准, 筛选出菌株 WF11 和 SF, 并对其反硝化特性进行深入研究。菌株 WF11 的 16S rRNA 基因与

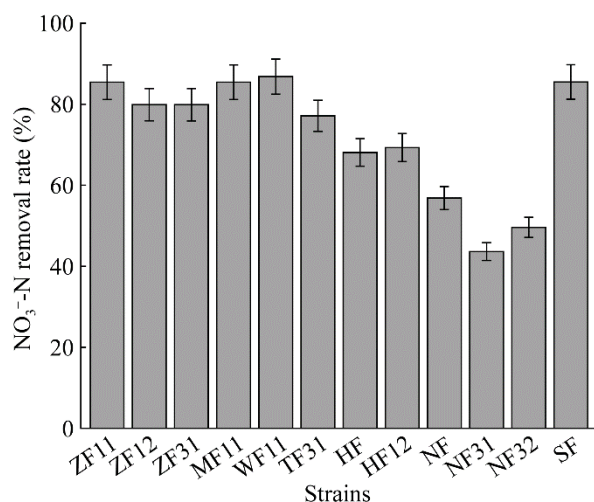


图 1 12 种好氧反硝化细菌的硝酸盐去除率
Figure 1 Nitrate removal rates of 12 aerobic denitrifying bacteria. Data were expressed as the average of triplicate replica \pm standard deviation.

抗辐射不动杆菌 (*Acinetobacter radioresistens*) NBRC 102413 的一致性最高, 且硝态氮去除率较高, 叶际微生物区别于土壤微生物的一个典型特征是抗辐射性和抗逆性要好。因此, 本研究选择菌株 SF 作为出发菌株, 进而对其脱氮特性进行研究。

2.3 菌株 SF 鉴定

2.3.1 形态学特征及部分生理生化结果

菌种 SF 的菌落为乳白色不透明黏稠状、表面光滑; 细胞为革兰氏阴性、短杆状。菌株 SF 能够在以葡萄糖、蔗糖、丁二酸钠和柠檬酸钠为唯一碳源的无机盐培养基上生长良好, 在 LB 培养基上生长状态更好, 在以丁二酸钠和柠檬酸钠为唯一碳源的无机盐培养基中可以生长, 但菌体浓度不高, 在以甲醇、酒石酸钾钠为唯一碳源的培养基中几乎不生长。吲哚实验阴性、甲基红实验阴性、V-P 试验阳性。其形态学特征与生理生化特征与《常见细菌系统鉴定手册》^[26]中所述的肠杆菌属中的阴沟肠杆菌特征一致。

2.3.2 分子生物学鉴定结果

扩增得到的菌株 SF 部分 16S rRNA 基因长 1 413 bp, 经测序及其同源性分析, 菌株 SF 与阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) ATCC 13047 的一致性最高, 达到 99.86%, 且在系统发育树上聚为一支。结合形态特征、部分生理生化特性以及 16S rRNA 基因的同源性分析, 表明该菌株为肠杆菌属 (*Enterobacter*), 且可能为肠杆菌属中的阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)。

张进等^[50]证实该实验室保藏的阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) F2 具有良好的异养硝化-好氧反硝化能力, 对于高 C/N 含 Cu²⁺ 污水可以表现良好的处理效果。Padhi 等^[49]从生活污水中分离出一株异养细菌阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) CF-S27, 该菌株在高浓度羟胺存在下同时表现出硝化和需氧的反硝化作用。Zhao 等^[28]

从城市污水处理厂的活性污泥中分离出阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) HNR, 当 NO_3^- -N 浓度为 200、300 和 500 mg/L 时, 该菌株对 NO_3^- -N 的去除率分别为 83.0%、74.5% 和 75.0%, 具有较好的反硝化脱氮能力, 他们还从该菌株扩增出 *napA* 基因。

参考了 Zhao 等^[28]的方法也从 SF 菌株中成功扩增出与脱氮作用有关的关键基因硝酸还原酶基因 *napA*, 该基因大小为 880 bp 左右, 与预期大小一致(图 2)。这些结果表明筛选出的菌株 SF 也可能具有好氧反硝化特性, 符合预期筛选结果。

napA 基因编码的周质硝酸还原酶(periplasmic nitrate reductase, NAP)催化 NO_3^- -N 还原为 NO_2^- -N, 是好氧反硝化途径的关键酶。将来源于菌株 SF 的 *napA* 基因和其余 6 株好氧反硝化细菌的 *napA* 基因与 GenBank 上公布的 4 株菌的 *napA* 基因进行比较并作了系统发育分析(图 3)。结果显示, 从无色杆菌属(*Achromobacter*)的菌株

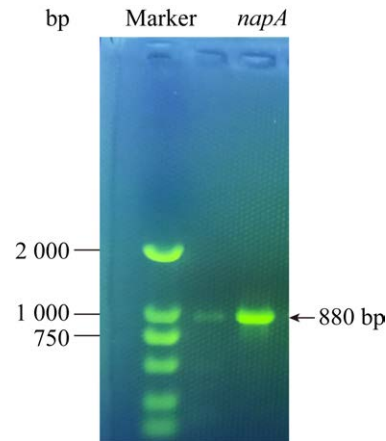


图 2 周质硝酸盐还原酶基因 *napA* 的 PCR 检测结果

Figure 2 The detection of *napA* gene by PCR.

Z12、Z31、M12 和不动杆菌属(*Acinetobacter*)的菌株 W11 以及假单胞菌属(*Pseudomonas*)的菌株 M11 中扩增出的 *napA* 基因序列高度一致, 聚在同一分支上; 来自肠杆菌属(*Enterobacter*)的菌株 SF 与已公布的肠杆菌(*Enterobacter* sp.) (MT197112.1)亲缘关系最近, 且与假单胞菌

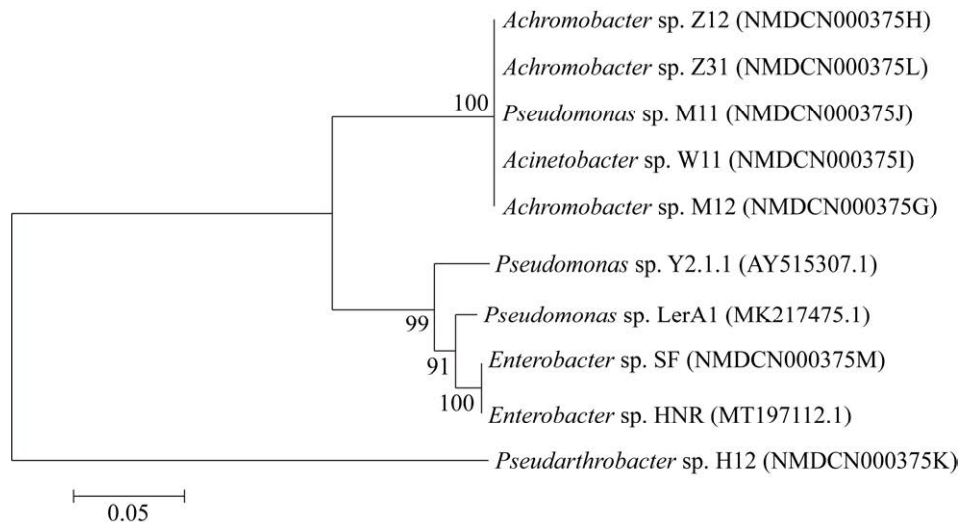


图 3 基于邻接法的周质硝酸还原酶基因 *napA* 的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic analysis by neighbor-joining method based on nitrate reductase genes. The numbers in the brackets are accession numbers of *napA* gene in National Microbiology Data Center (Z12, Z31, M11, W11, SF, H12, M12) or GenBank (Y2-1-1, LerA1, HNR). Values at branch nodes represent bootstrap values. The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.05.

(*Pseudomonas* sp.) (AY515307.1, MK217475.1) 聚在一个大的分支里。从假节杆菌属 (*Pseudarthrobacter*) 的菌株 H12 中扩增出的 *napA* 基因序列与其他几株菌株的 *napA* 基因序列差异较大, 进化关系较远。Zhao 等^[28]对阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) HNR 的 *napA* 基因的系统发育分析结果显示, 其与来源于门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*) LerA1 的 *napA* 基因序列聚类到同一分支上, 具有高度的一致性, 这与我们的结果较为符合。从细菌的分类学分析, 无色杆菌属(*Achromobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) 和肠杆菌属(*Enterobacter*)都属于变形菌门, 形态结构和生态功能较为相近, 因而它们的功能基因 *napA* 基因序列一致性较高; 而假节杆菌属 (*Pseudarthrobacter*)属于放线菌门, 因此 H12 的 *napA* 基因序列与其他几株细菌的差异较大, 进化关系较远。

2.3.3 功能学鉴定结果

由 NAP 酶催化, 使硝酸态氮向亚硝酸态氮转变是好氧反硝化反过程的关键一步^[29]。由图 4 可知, 随菌株 SF 的生长, 培养基中硝酸态氮含量降低, 亚硝酸态氮先升高后降低, 可能是起始 NAP 酶活性较强使硝酸态向亚硝酸态氮转变, 造

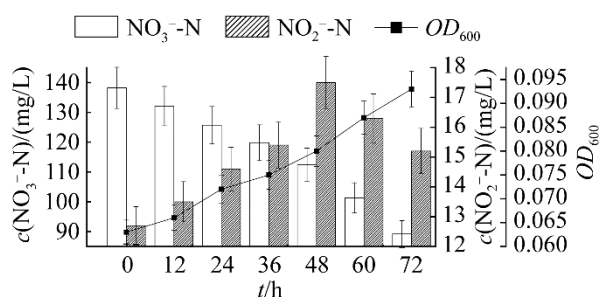


图 4 菌株 SF 的反硝化特性

Figure 4 The denitrification performance of strain SF. Data were expressed as the average of triplicate replica \pm standard deviation.

成亚硝酸态氮的积累, 随着亚硝酸盐还原酶活性增强, 亚硝酸态氮又被去除。实验结果从功能学的角度验证菌株 SF 具备反硝化功能。

2.4 单因素试验结果

2.4.1 碳源对菌株 SF 脱氮效率的影响

碳源对微生物生长有着重要意义, 主要的碳源有糖类、小分子有机酸、醇类等^[29], 如图 5A、5B 所示, 该菌株 SF 在糖类物质中, 具有较快的生长量和生长速度, 反硝化效率也较好。其中在蔗糖中 72 h 总氮去除率达到 91.22%, 在葡萄糖中达到 92.80%。而在小分子有机酸中如图 5C、5D 所示, 丁二酸钠仅为 71.69%, 柠檬酸钠为 61.42%, 值得注意的是, 当使用小分子酸时, 细菌的生长与脱氮效果并不一致, 可能在小分子有机酸作碳源时, 微生物把氮源更多地用于反硝化途径。如图 5E、5F 所示, 在酒石酸钾钠和甲醇中微生物几乎不生长。因此, 采用葡萄糖作为后续实验中最合适的碳源。

2.4.2 C/N 对菌株脱氮效率的影响

碳源与氮源的供应比值对微生物的生长有着重要意义, 如图 6 所示, 随着 C/N 从 3 增加到 15, 菌株 SF 的脱氮效率先升高或降低, 在 C/N 为 8 时最高为 93.04%。而 C/N 为 3 时, 去除率仅达到 55.74%。Zhao 等^[52]的研究表明, 好氧反硝化菌最佳 C/N 在 10–15 之间, 适当提高 C/N 有利于好氧反硝化过程的进行; Jia 等^[53]在研究菌株 DQ01 时发现, 该菌株的最佳 C/N 为 7.5, 对总氮的去除率为 94.21%, 均与本研究结论较为相似。

2.4.3 pH 对菌株脱氮效率的影响

培养基初始 pH 对菌株进行好氧反硝化有重要意义, pH 不仅影响酶的活性, 在反硝化过程中会产氢, 也会对反硝化过程造成影响。如图 7 所示, 菌株 SF 在 pH 值为 7.0–8.0 时, 脱氮效率达到最大为 93.50%, 该菌株在 pH 值为

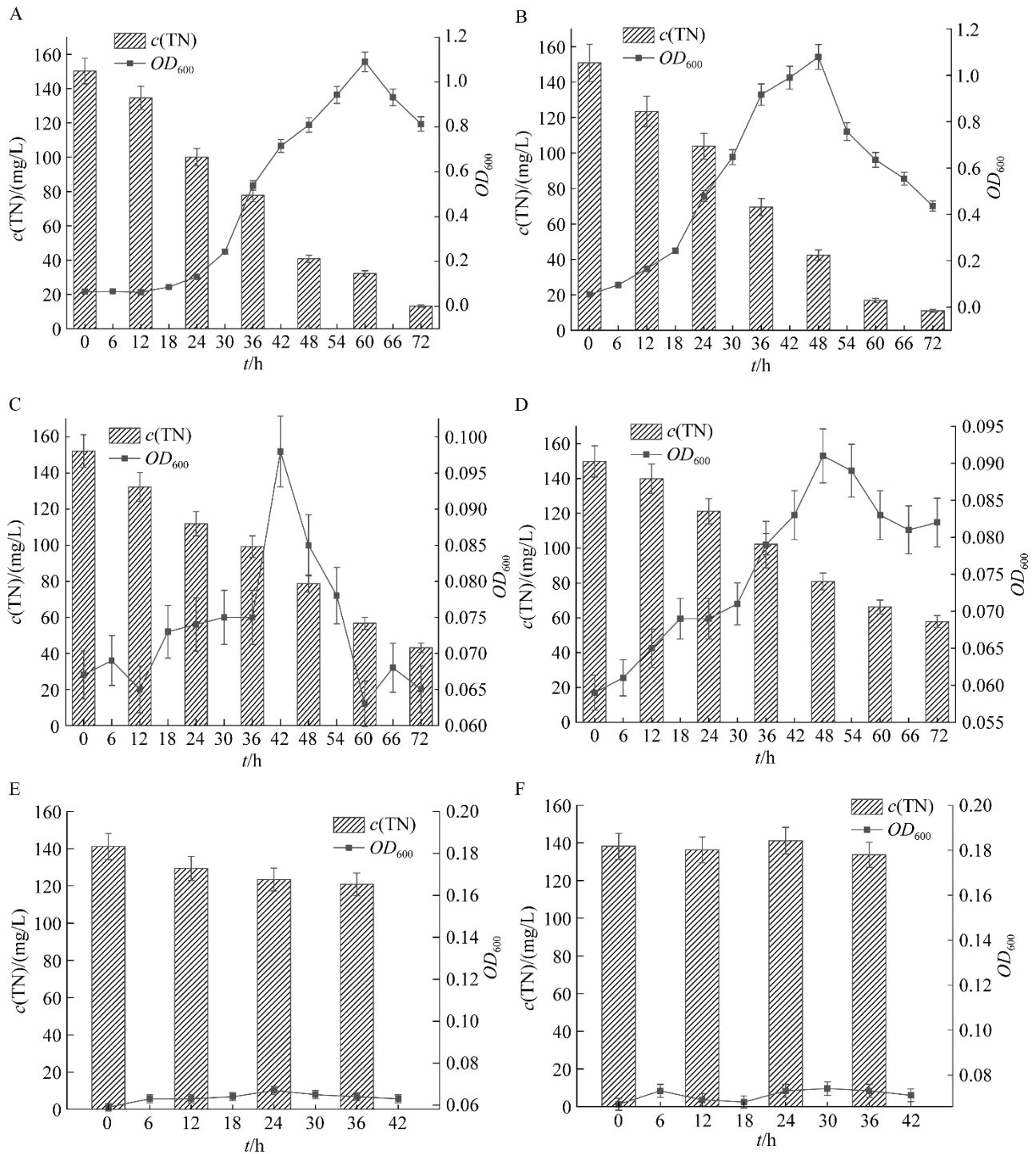


图5 不同碳源蔗糖(A)、葡萄糖(B)、丁二酸钠(C)、柠檬酸钠(D)、酒石酸钾钠(E)、甲醇(F)对菌株 SF 脱氮效率的影响

Figure 5 Effect of different carbon sources sucrose (A), glucose (B), sodium succinate (C), sodium citrate (D), potassium sodium tartrate (E), methanol (F) on the nitrogen removal of strain SF. Data were expressed as the average of triplicate replica \pm standard deviation.

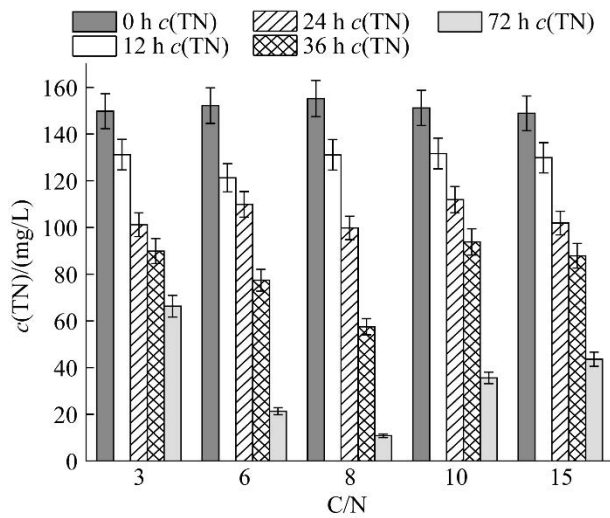


图 6 不同 C/N 下的脱氮效率
 Figure 6 The nitrogen removal at different C/N ratios. Data were expressed as the average of triplicate replica ± standard deviation.

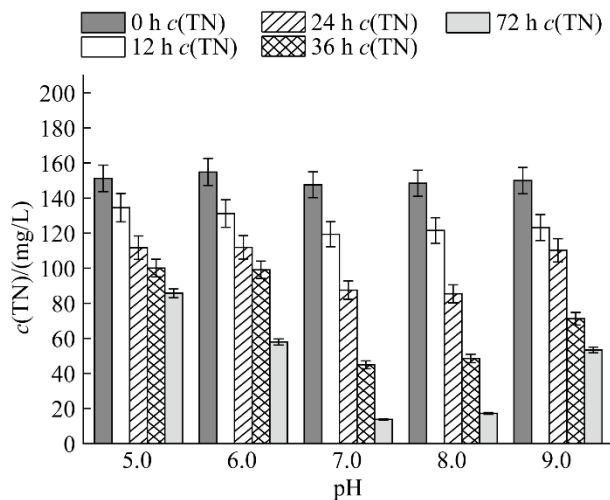


图 7 不同 pH 下的脱氮效率
 Figure 7 The nitrogen removal at different pH. Data were expressed as the average of triplicate replica ± standard deviation.

7.0–8.0 的中碱性环境中表现出了最优脱氮性能，这与谷氨酸杆菌属 (*Glutamicibacter* sp.) WS1 的最佳脱氮 pH 值范围相近^[54]。验证了该菌种在中性偏碱性的环境中有着更强的生理活性。Zheng 等^[44]发现施氏假单胞菌 (*Pseudomonas*

stutzeri) PCN-1 对酸性环境敏感，在 pH 为 6.0 的条件下反硝化效率低下，但对碱性环境具有一定的耐受性。

2.4.4 溶解氧对菌株脱氮效率的影响

摇床的转速反映了摇瓶中溶解氧的浓度。研究表明，氧的增加可以加速氧气和硝酸盐氮之间的传质效率，增强菌株与底物的接触，从而提高脱氮效率^[54-55]。如图 8 所示，随着转速逐步地提高，培养基中溶氧量随之提高，菌株 SF 的脱氮效率逐步提高，在 180 r/min 时，菌株的 72 h 脱氮效率达到了 92.10%。

2.4.5 温度对菌株脱氮效率的影响

一般情况下，温度是影响好氧反硝化的一个重要因素。在不同的温度下，微生物的流动性、生物大分子的活力都会发生变化，从而对微生物的生命行为产生一定的影响，温度过高和过低都会对好氧反硝化过程的发挥作用的酶的活性造成影响^[17]。如图 9 所示，在 25 °C 下菌株的脱氮率仅为 64.08%，在 35 °C 时达到最大为 92.22%，在 40 °C 时菌株活性又受到抑制，脱氮效率降为 69.60%。

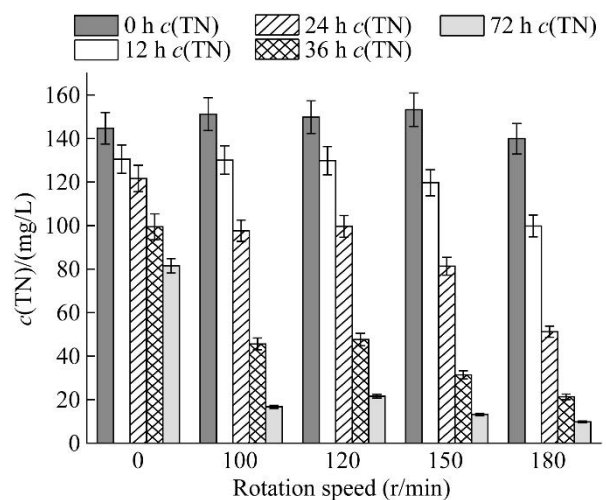


图 8 不同转速下的脱氮效率
 Figure 8 The nitrogen removal at different rotational speeds. Data were expressed as the average of triplicate replica ± standard deviation.

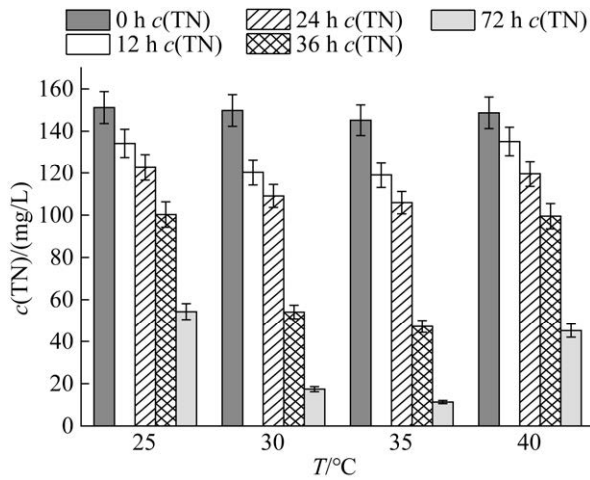


图9 不同温度下的脱氮效率

Figure 9 The nitrogen removal at different temperatures. Data were expressed as the average of triplicate replica \pm standard deviation.

单因素试验结果显示, 菌株 SF 在碳源为葡萄糖, KNO_3 为唯一氮源的液体培养基中, 当 C/N 为 8, 摇床转速为 180 r/min, 温度为 35 °C, 脱氮效率最优。

2.5 响应面实验分析

根据以上单因素试验对菌株 SF 脱氮能力的分析结果, 确定响应面试验的因素和水平, 采用 Box-Behnken 中心组合进行三因素三水平的响应面设计。利用软件 Design Expert 13.0 对实验结果进行分析拟合, 得出在最大去除率时各因素的最佳值: pH 为 7.5, 温度为 33.5 °C, C/N 为 9.7 时, 在 72 h 的脱氮效率为 93.3%。根据以上分析的结果, 用最佳条件和另外随机选取了 2 组预测结果进行验证实验。结果显示预测值与实际值的差异很小(相对误差在 2.62%以内), 这表明预测模型能够准确地反映各种因素对菌株 SF 脱氮效率的影响。

3 讨论与结论

从 6 种植物石楠、女贞、木樨、樟树、

卫矛冬青和荷花玉兰的叶际中分离到好氧反硝化细菌 13 株, 经 16S rRNA 基因测序及序列分析, 13 株菌分别属于 4 门(拟杆菌门、放线菌门、变形菌门和厚壁菌门) 7 科 7 属, 其中 4 株为肠杆菌属, 3 株为无色杆菌属, 2 株为假单胞菌属, 其余 4 株分别属于鞘氨醇杆菌属、不动杆菌属、假节杆菌属和微杆菌属。结果提示植物叶际存在着种类丰富的可培养的好氧反硝化细菌。

这个结果初步支持了关于叶际微生物协同削减大气氮氧化物机制的假设: 大气中的氮氧化物溶解于叶面的水膜形成的硝酸盐和来源于微颗粒物中的可溶性硝酸盐成为叶面硝酸盐利用菌或反硝化细菌的氮源, 其中的一部分可以通过叶际微生物的反硝化途径将硝酸盐还原为无害氮气释放到空气中, 从而达到协同植物削减大气氮氧化物的目的。这为研究叶际微生物协同消减大气氮氧化物污染的机制提供了新的思路。

自 1983 年报道第一株好氧反硝化细菌以来, 已分离得到超过 50 个属的好氧反硝化细菌, 主要来源于湿地、水库、土壤、湖泊沉积物、污废水、活性污泥和池塘^[17], 但来源于景观植物的好氧反硝化细菌鲜有报道。王永霞等^[20]从滇池沉积物和水体样品中分离出 260 株好氧反硝化细菌, 经 16S rRNA 基因序列分析, 260 株菌分属于 2 个门(变形菌门、厚壁菌门) 13 科 14 属 59 种, 其中假单胞菌属为优势属, 菌株数量占总细菌数量的 46.9%, 其次是不动杆菌属, 占 21.2%。张明霞^[56]从不同养殖水体的 60 份样本中分离筛选获得潜在好氧反硝化细菌 714 株, 分布于 4 个门(变形菌门、放线菌门、拟杆菌门和厚壁菌门), 假单胞菌属为优势属, 菌株数量占总细菌数量的 33.8%, 其次为无色杆菌属, 占 10.5%。本研究从 6 种植物的叶际分离到的 13 株好氧反硝化细菌却归属于 4 个门, 这

表明在叶际可能存在着丰富多样的不同于水生环境的好氧反硝化细菌及硝酸盐还原酶基因资源, 值得进一步深入挖掘和研究。由于本研究所选的景观植物种类有限, 筛选的叶际好氧反硝化细菌资源有限, 对于景观植物可培养好氧反硝化细菌的多样性的研究工作还需持续深入。

从筛选方法上来看, 张明霞^[56]使用反硝化选择培养基初筛后, 直接采用菌落 PCR 的方法, 使用细菌通用引物 27F/1492R 对初筛的单菌落进行 16S rRNA 基因序列扩增和种属鉴定, 并依据该结果分析获得菌株资源的物种分布, 因而其获得的只是潜在的好氧反硝化细菌资源; 王永霞等^[20]则是采用富集培养结合 BTB 培养基筛选和格里斯试剂复筛的方法获得菌株资源; 本研究除了使用格里斯试剂初筛和 BTB 培养基复筛的方法, 还通过对反硝化途径的关键基因 *napA* 的扩增, 对筛选到的好氧反硝化菌株进行功能基因水平上的确认, 其筛选结果的可靠程度更高。

此外, 叶际微生物的固氮作用^[9-10]已较多地被研究, 但叶际微生物的反硝化作用尚鲜有报道。本研究已发现叶际含有多样的好氧反硝化细菌, 但这些好氧反硝化细菌能把多大比例的叶际硝酸盐通过反硝化途径转化为 N_2 排放到空气中? 与土壤的反硝化作用相比, 叶际微生物的反硝化作用在自然界的氮循环中所占的比例能否被忽略? 这些研究内容都值得关注。

从景观植物石楠叶面分离出一株具有高效反硝化能力的菌株 SF, 结合形态特征、生理生化特性以及 16S rRNA 基因的同源性分析, 表明该菌株为肠杆菌属, 且与阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) ATCC 13047 的一致性最高, 达到 99.86%。通过单因素因素试验可知菌株 SF 脱氮的最适碳源为葡萄糖, 最适宜 C/N 为 8, 最适转速为 180 r/min, 最佳反硝化温度

为 35 °C。利用响应面分析方法进一步探究多因素对菌株 SF 好氧反硝化能力的影响, 结果表明菌株 SF 最佳的脱氮条件为初始 pH 值为 7.5, C/N 为 9.7, 转速 180 r/min, 温度 33.5 °C, 在此条件下, 当培养基中初始硝酸盐浓度为 361 mg/L 时, 72 h 脱氮率可达到 93.3%, 说明该菌株有较好的脱氮能力, 有一定的应用潜力。

叶际由于直接暴露于大气中, 生活在叶际内的微生物经常遭受营养不良、干旱、紫外线辐射、高温、冷冻等不良环境的胁迫^[8]。叶际好氧反硝化细菌 SF 已经被证实在实验室条件下具有反硝化作用, 北方城市冬天比较寒冷, 冬季日平均气温都处于冰点上下, 此时, 在户外裸露的叶际好氧反硝化细菌是否仍然能够起到反硝化作用, 值得关注。研究表明, 低温会抑制酶的活性从而减缓细菌的生长速度, 同延迟好氧反硝化途径中关键基因的表达^[57], 从而降低好氧反硝化细菌的脱氮效率, 因而筛选耐低温的好氧反硝化细菌是提高低温条件下污染废水脱氮效果的重要途径之一^[58]。董怡华等^[59]从寒冷地区的河水底泥中分离到一株气单胞菌 (*Aeromonas* sp.) Z6, 在 12 °C 时对硝酸盐氮的 60 h 去除率可以达到 89.72%。杨倩^[60]从高山冻土样品中分离得了一株耐冷简单芽孢杆菌 (*Bacillus simplex*) H-b, 在 5 °C 时培养 168 h 对培养基中的硝酸盐氮的去除率可以达到 40.07%。这些研究为北方地区低温废水的生物脱氮提供了菌种资源, 也为研究低温环境中叶际反硝化细菌的生理功能提供了经验借鉴。低温条件下, 叶际反硝化细菌是否能够正常发挥作用, 如何发挥作用? 挖掘叶际特殊的好氧反硝化细菌资源(耐辐射、耐高温、耐低温等), 研究不同环境条件下处于优势地位的好氧反硝化细菌的群落特征, 将为叶际好氧反硝化细菌在实践中的应用建立工作基础。

参考文献

- [1] 王军霞, 李曼, 敬红, 吕卓. 我国氮氧化物排放治理状况分析及建议[J]. 环境保护, 2020, 48(18): 24-27.
WANG JX, LI M, JING H, LÜ Z. Analysis and suggestions on nitrogen oxide emission control in China[J]. *Environmental Protection*, 2020, 48(18): 24-27 (in Chinese).
- [2] 龚诚. 植物对城市空气氮氧化物的净化功能: 基于稳定同位素方法的研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2020.
GONG C. Purification function of plants for nitrogen oxides in urban air: a study based on stable isotope method[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of University of Science and Technology of China, 2020 (in Chinese).
- [3] GONG C, XIAN CF, SU YB, OUYANG ZY. Estimating the nitrogen source apportionment of *Sophora japonica* in roadside green spaces using stable isotope[J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 689: 1348-1357.
- [4] VORHOLT JA. Microbial life in the phyllosphere[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10: 828-840.
- [5] LINDOW SE, BRANDL MT. Microbiology of the phyllosphere[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 1875-1883.
- [6] LINDOW SE, LEVEAU JHJ. Phyllosphere microbiology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(3): 238-243.
- [7] REDFORD AJ, BOWERS RM, KNIGHT R, LINHART Y, FIERER N. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(11): 2885-2893.
- [8] 吴松, 周甜, 杨立宾, 江云兵, 潘虹, 刘永志, 杜君. 基于VOSviewer的叶际微生物研究现状可视化分析[J]. 中国农学通报, 2023, 39(1): 142-150.
WU S, ZHOU T, YANG LB, JIANG YB, PAN H, LIU YZ, DU J. VOS viewer-based visual analysis on research status of phyllosphere microorganisms[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2023, 39(1): 142-150 (in Chinese).
- [9] 沙小玲, 梁胜贤, 庄绪亮, 韩庆莉, 白志辉. 植物叶际固氮菌研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(10): 2443-2451.
SHA XL, LIANG SX, ZHUANG XL, HAN QL, BAI ZH. Nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(10): 2443-2451 (in Chinese).
- [10] ZHU YG, PENG JJ, CHEN C, XIONG C, LI SL, GE AH, WANG ET, LIESACK W. Harnessing biological nitrogen fixation in plant leaves[J]. *Trends in Plant Science*, 2023, 28(12): 1391-1405.
- [11] HE YH, ADKAR-PURUSHOTHAMA CR, ITO T, SHIRAKAWA A, YAMAMOTO H, KASHIWAGI A, TATEWAKI A, FUJIBAYASHI M, SUGIYAMA S, YAGINUMA K, AKAHIRA T, YAMAMOTO S, TSUSHIMA S, MATSUSHITA Y, SANO T. Microbial diversity in the phyllosphere and rhizosphere of an apple orchard managed under prolonged “natural farming” practices[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(10): 2056.
- [12] CHEN T, NOMURA K, WANG XL, SOHRABI R, XU J, YAO LY, PAASCH BC, MA L, KREMER J, CHENG YT, ZHANG L, WANG N, WANG ET, XIN XF, HE SY. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere[J]. *Nature*, 2020, 580: 653-657.
- [13] XU NH, QU Q, ZHANG ZY, YUAN WT, CUI HZ, SHEN YJ, LIN W, LU T, QIAN HF. Effects of residual S-metolachlor in soil on the phyllosphere microbial communities of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 748: 141342.
- [14] LIU JY, SONG MJ, WEI XY, ZHANG HZ, BAI ZH, ZHUANG XL. Responses of phyllosphere microbiome to ozone stress: abundance, community compositions and functions[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(4): 680.
- [15] 杨丽, 何腾霞, 张漫漫, 杨露. 好氧反硝化细菌碳氮代谢特点及途径的研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(12): 4781-4797.
YANG L, HE TX, ZHANG MM, YANG L. Research progress in the characteristics and pathways of carbon and nitrogen metabolism of aerobic denitrifying bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4781-4797 (in Chinese).
- [16] ROBERTSON LA, KUENEN JG. Aerobic denitrification—old wine in new bottles?[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1984, 50(5): 525-544.
- [17] 白洁, 陈琳, 黄潇, 胡春辉, 赵阳国, 李岍然. 1株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌 *Zobellella* sp. B307 的分离及脱氮特性[J]. 环境科学, 2018, 39(10): 4793-4801.
BAI J, CHEN L, HUANG X, HU CH, ZHAO YG, LI KR. Isolation and nitrogen removal characteristics of salt-tolerant heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria *Zobellella* sp. B307[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(10): 4793-4801 (in Chinese).
- [18] 史印杰. 水库好氧反硝化细菌脱氮特性与种群结构研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学硕士学位论文, 2022.
SHI YJ. Study on nitrogen removal characteristics and

- population structure of aerobic denitrifying bacteria in reservoirs[D]. Xi'an: Master's Thesis of Xi'an University of Architecture and Technology, 2022 (in Chinese).
- [19] GUO LY, CHEN QK, FANG F, HU ZX, WU J, MIAO AJ, XIAO L, CHEN XF, YANG LY. Application potential of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier for nitrate and ammonium removal of eutrophic lake water[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 45-51.
- [20] 王永霞, 霍晴晴, 李亚平, 肖炜, 赖泳红, 和树庄, 崔晓龙. 滇池可培养好氧反硝化细菌多样性及其脱氮特性[J]. *微生物学报*, 2018, 58(10): 1764-1775.
WANG YX, HUO QQ, LI YP, XIAO W, LAI YH, HE SZ, CUI XL. Diversity and nitrogen removal efficiency of culturable aerobic denitrifying bacteria in the sediment and water in Dianchi Lake[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(10): 1764-1775 (in Chinese).
- [21] 王月, 滕志远, 张秀丽, 车延辉, 孙广玉. 大气 NO₂ 影响植物生长与代谢的研究进展[J]. *应用生态学报*, 2019, 30(1): 316-324.
WANG Y, TENG ZY, ZHANG XL, CHE YH, SUN GY. Research progress on the effects of atmospheric nitrogen dioxide on plant growth and metabolism[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(1): 316-324 (in Chinese).
- [22] 周敏, 陈长虹, 王红丽, 黄成, 苏雷燕, 陈宜然, 李莉, 乔月珍, 陈明华, 黄海英, 张钢锋. 上海市秋季典型大气高污染过程中颗粒物的化学组成变化特征[J]. *环境科学学报*, 2012, 32(1): 81-92.
ZHOU M, CHEN CH, WANG HL, HUANG C, SU LY, CHEN YR, LI L, QIAO YZ, CHEN MH, HUANG HY, ZHANG GF. Chemical characteristics of particulate matters during air pollution episodes in autumn of Shanghai, China[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32(1): 81-92 (in Chinese).
- [23] 刘胜格. 高效好氧反硝化细菌的筛选、鉴定及其脱氮性能的研究[D]. 曲阜: 曲阜师范大学硕士学位论文, 2018.
LIU SG. Isolation, identification and characteristic of an aerobic denitrifying bacteria with high nitrogen removal efficiency[D]. Qufu: Master's Thesis of Qufu Normal University, 2018 (in Chinese).
- [24] 常允康, 贾莹莹, 王丽华, 王涵, 樊惠原, 居润成, 徐娜. 一株好氧反硝化芽孢杆菌的筛选鉴定及脱氮特性研究[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2022, 53(6): 819-824.
CHANG YK, JIA YY, WANG LH, WANG H, FAN HY, JU RC, XU N. Screening and identification of an aerobic denitrification *Bacillus* strain and its nitrogen removal characteristics[J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2022, 53(6): 819-824 (in Chinese).
- [25] 胡金星, 汤江武, 王新, 姚晓红, 吴逸飞, 葛向阳. 一株反硝化细菌的鉴定、功能基因检测及其反硝化特性[J]. *环境科学与技术*, 2012, 35(12): 27-32.
HU JX, TANG JW, WANG X, YAO XH, WU YF, GE XY. Study on a denitrifier strain: its identification, functional genes detection and denitrification characteristics[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 35(12): 27-32 (in Chinese).
- [26] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 294-348.
DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 294-348 (in Chinese).
- [27] 张建云, 谷立坤, 彭更, 史永胜, 赵维文, 崔方凯, 臧亚奇. 一株甲醇利用菌的分离、鉴定及特性研究[J]. *中国酿造*, 2021, 40(5): 140-146.
ZHANG JY, GU LK, PENG G, SHI YS, ZHAO WW, CUI FK, ZANG YQ. Isolation, identification and growth characterization of a strain of methanol-utilizing bacteria[J]. *China Brewing*, 2021, 40(5): 140-146 (in Chinese).
- [28] ZHAO B, DAN Q, GUO LJ, AN Q, GUO JS. Characterization of an aerobic denitrifier *Enterobacter cloacae* strain HNR and its nitrate reductase gene[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(7): 1775-1784.
- [29] 袁会兰. 好氧反硝化途径关键酶基因克隆与功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2016.
YUAN HL. Cloning and function of key enzymes of aerobic denitrification pathway[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016 (in Chinese).
- [30] 刘方剑. 一株高效异养硝化: 好氧反硝化细菌 WZ17 的筛选及其脱氮特性研究[D]. 温州: 温州大学硕士学位论文, 2019.
LIU FJ. Screening of an efficient heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium WZ17 and its denitrification characteristics[D]. Wenzhou: Master's Thesis of Wenzhou University, 2019 (in Chinese).
- [31] XI HP, ZHOU XT, ARSLAN M, LUO ZJ, WEI J, WU ZR, GAMAL EL-DIN M. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification process: promising but a long way to go in the wastewater treatment[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 805: 150212.
- [32] TAN X, YANG YL, LI X, ZHOU ZW, LIU CJ, LIU YW, YIN WC, FAN XY. Intensified nitrogen removal by heterotrophic nitrification aerobic denitrification

- bacteria in two pilot-scale tidal flow constructed wetlands: influence of influent C/N ratios and tidal strategies[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 302: 122803.
- [33] SUN YL, LI A, ZHANG XN, MA F. Regulation of dissolved oxygen from accumulated nitrite during the heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of *Pseudomonas stutzeri* T13[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(7): 3243-3248.
- [34] ZHAO B, HE YL, ZHANG XF. Nitrogen removal capability through simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Bacillus* sp. LY[J]. *Environmental Technology*, 2010, 31(4): 409-416.
- [35] 文刚, 王彤, 黄廷林, 万琪琪, 曹瑞华, 寇莉青, 杨尚业. 贫营养好氧反硝化菌株的脱氮特性及氮/碳平衡分析[J]. *环境科学*, 2020, 41(5): 2339-2348.
- WEN G, WANG T, HUANG TL, WAN QQ, CAO RH, KOU LQ, YANG SY. Nitrogen removal performance and nitrogen/carbon balance of oligotrophic aerobic denitrifiers[J]. *Environmental Science*, 2020, 41(5): 2339-2348 (in Chinese).
- [36] 张智维, 刘婷, 张海群. 响应面法优化 γ -聚谷氨酸发酵条件[J]. *中国调味品*, 2015, 40(7): 56-60.
- ZHANG ZW, LIU T, ZHANG HQ. Optimization of fermentation conditions for γ -PGA with response surface method[J]. *China Condiment*, 2015, 40(7): 56-60 (in Chinese).
- [37] 水质 硝酸盐氮的测定 紫外分光光度法(试行): 标准号: HJ/T 346—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- State Environmental Protection Administration, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of nitrate nitrogen in water by Ultraviolet spectrophotometry (Trial), HJ/T 346—2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 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—1987[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987.
- State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China. Water quality; Determination of nitrogen (nitrite); Spectrophotometric method: GB 7493—1987[S]. Beijing: Standards Press of China, 1987 (in Chinese).
- [39] 国家环境保护总局, 中国国家标准化委员会. 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: 中国标准出版社, 2012.
- State Environmental Protection Administration, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of total nitrogen in water quality, alkaline potassium persulfate digestion, ultraviolet spectrophotometry, HJ 636—2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012 (in Chinese).
- [40] 刘辉, 韦璐璐, 朱龙发, 韦豪, 白云霞, 刘小玲, 李树波. 鞘氨醇单胞菌的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(6): 2738-2752.
- LIU H, WEI LL, ZHU LF, WEI H, BAI YX, LIU XL, LI SB. Research progress of *Sphingomonas*[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(6): 2738-2752 (in Chinese).
- [41] 卢晓燕. 一株 *Achromobacter denitrificans* 的异养硝化-好氧反硝化脱氮效能研究[D]. 兰州: 兰州交通大学硕士学位论文, 2018.
- LU XY. Study on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification efficiency of *Achromobacter denitrificans*[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou Jiatong University, 2018 (in Chinese).
- [42] 李文甫, 杜柳冰, 刘思莹, 翁美遂, 舒璇, 陈琼华. 一株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮性能研究[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(9): 202-209.
- LI WF, DU LB, LIU SY, WENG MS, SHU H, CHEN QH. Isolation and identification of an efficient aerobic denitrifying bacterium[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9): 202-209 (in Chinese).
- [43] 蔡茜, 何腾霞, 冶青, 李振轮. 耐冷嗜碱蒙氏假单胞菌 H97 的鉴定及其好氧反硝化特性[J]. *环境科学*, 2018, 39(7): 3314-3320.
- CAI X, HE TX, YE Q, LI ZL. Identification and characterization of a hypothermic alkaliphilic aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas monteilii* strain H97[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(7): 3314-3320 (in Chinese).
- [44] ZHENG MS, HE D, MA T, CHEN Q, LIU ST, AHMAD M, GUI MY, NI JR. Reducing NO and N₂O emission during aerobic denitrification by newly isolated *Pseudomonas stutzeri* PCN-1[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 162: 80-88.
- [45] 孙玲, 葛清莲, 曹文平, 张惠芳, 张建昆, 张慧, 董玉玮, 李倩囡, 汪银梅. 一株好氧反硝化菌的筛选鉴定与特性研究[J]. *河南理工大学学报(自然科学版)*, 2017, 36(3): 79-85.
- SUN L, GE QL, CAO WP, ZHANG HF, ZHANG JK, ZHANG H, DONG YW, LI QN, WANG YM. Screening and characterization study on an aerobic denitrifying bacteria[J]. *Journal of Henan Polytechnic University (Natural Science Edition)*, 2017, 36(3): 79-85 (in Chinese).
- [46] 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, LING 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).
- [47] 杨世东, 崔鑫鑫. 好氧反硝化菌 *Acinetobacter* sp. A2 在主要环境影响条件下的 NO₃⁻ 去除动力学研究[J]. *东北电力大学学报*, 2019, 39(4): 68-75.
YANG SD, CUI XX. Kinetics of aerobic denitrification strain *Acinetobacter* sp. A2 under restrictive conditions[J]. *Journal of Northeast Electric Power University*, 2019, 39(4): 68-75 (in Chinese).
- [48] CHEN HJ, ZHOU WZ, ZHU SN, LIU F, QIN L, XU C, WANG ZM. Biological nitrogen and phosphorus removal by a phosphorus-accumulating bacteria *Acinetobacter* sp. strain C-13 with the ability of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 322: 124507.
- [49] PADHI SK, TRIPATHY S, MOHANTY S, MAITI NK. Aerobic and heterotrophic nitrogen removal by *Enterobacter cloacae* CF-S27 with efficient utilization of hydroxylamine[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 232: 285-296.
- [50] 张进, 叶坚, 彭焕龙, 李达, 徐梁, 张煜光, 徐海星, 梁咏梅, 刘伟. 1 株耐受 Cu²⁺好氧反硝化菌及其饥饿特性[J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(S2): 43-50.
ZHANG J, YE J, PENG HL, LI D, XU L, ZHANG YG, XU HX, LIANG YM, LIU W. A strain of aerobic denitrifying bacteria tolerant to Cu²⁺ and its starvation characteristics[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 41(S2): 43-50 (in Chinese).
- [51] 王弘宇, 田俊, 孙宇翀. 一株铁基质自养反硝化微杆菌及其应用: CN103232958B[P]. 2014-08-13.
WANG H, TIAN J, SUN YC. Iron matrix autotrophic denitrification microbacterium strain and application thereof: CN103232958B[P]. 2014-08-13 (in Chinese).
- [52] ZHAO B, TIAN M, AN Q, YE J, GUO JS. Characteristics of a heterotrophic nitrogen removal bacterium and its potential application on treatment of ammonium-rich wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 226: 46-54.
- [53] JIA YT, ZHOU MM, CHEN YC, HU YY, LUO J. Insight into short-cut of simultaneous nitrification and denitrification process in moving bed biofilm reactor: effects of carbon to nitrogen ratio[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 400: 125905.
- [54] 魏渤惠, 罗晓, 吕鹏翼, 马文凯, 苏金卫, 李伟, 崔建升. 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 BH, LUO X, LÜ PY, MA WK, SU JW, LI W, CUI JS. Nitrogen removal characteristics and metabolism mechanism of high-efficiency cold-tolerant heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Glutamicibacter* sp. WS1 for various nitrogen sources at low temperature[J]. *Environmental Science*, 2023, 44(9): 5006-5016 (in Chinese).
- [55] 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).
- [56] 张明霞. 养殖水体好氧反硝化细菌多样性及其脱氮功能研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2022.
ZHANG MX. Diversity and nitrogen removal functions of the aerobic denitrifying bacteria from aquaculture water[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2022 (in Chinese).
- [57] SALEH-LAKHA S, SHANNON KE, HENDERSON SL, GOYER C, TREVORS JT, ZEBARTH BJ, BURTON DL. Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(12): 3903-3911.
- [58] YANG M, LU DW, QIN BD, LIU QL, ZHAO YM, LIU HL, MA J. Highly efficient nitrogen removal of a coldness-resistant and low nutrient needed bacterium, *Janthinobacterium* sp. M-11[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 256: 366-373.
- [59] 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).
- [60] 杨倩. 耐冷简单芽孢杆菌好氧反硝化脱氮及耐冷机制解析[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2023.
YANG Q. Research on the aerobic denitrification and cold adaptation mechanism of a psychrotrophic *Bacillus simplex*[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2023 (in Chinese).