

兼性好氧反硝化嗜盐菌海杆菌属 W-8 的脱氮性能及其机制

汪恩旭¹, 曾一帆², 李振轮^{1*}, 杨裕然¹, 李佳冰¹

1 西南大学 资源环境学院, 界面过程与土壤健康重庆市重点实验室, 重庆

2 西南大学 含弘学院, 重庆

汪恩旭, 曾一帆, 李振轮, 杨裕然, 李佳冰. 兼性好氧反硝化嗜盐菌海杆菌属 W-8 的脱氮性能及其机制[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1812-1823.

WANG Enxu, ZENG Yifan, LI Zhenlun, YANG Yuran, LI Jiabing. Denitrification characteristics and mechanism of a facultative aerobic denitrifying halophilic bacterial strain *Marinobacter* sp. W-8[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(4): 1812-1823.

摘要:【目的】针对高盐高硝态氮废水脱氮效率低的难题, 分离筛选高效脱氮的耐盐菌株, 对其进行鉴定, 并挖掘其高效脱氮的机制。【方法】利用形态学观察和 16S rRNA 基因测序进行菌种分类鉴定; 通过不同形态氮的测定评价菌株的脱氮性能; 通过 RT-qPCR 检测和电子传递链酶活的测定, 探究菌株在低氧或低氧低 C/N 比条件下高效脱氮的机制。【结果】从高盐土壤中筛选到一株兼性好氧反硝化嗜盐菌, 命名为 W-8, 鉴定为海杆菌属(*Marinobacter* sp.)。该菌在好氧和厌氧条件下均能进行反硝化, 尤其在低氧环境(溶解氧浓度<1.2 mg/L)中展现出优异的反硝化能力。静置培养 48 h 后, 对 97.85 mg/L NO₃⁻-N 的去除率达到 95.56%, 总氮去除率为 87.63%。低氧条件下, *narG* 和 *narI* 基因表达显著上调, 电子传递链复合体 I 和 II 的活性增强, 促进了 NO₃⁻ 的高效还原; *norB* 基因表达显著上调, 促进了 NO 的还原。在低氧条件下, 低 C/N 比进一步增强了复合体 II 的活性, 降低了菌株对碳源的需求。W-8 在厌氧条件下以反硝化代谢为主, 生成气态氮的比例达到 87.63%; 而在好氧条件下, 反硝化与同化作用共同参与脱氮过程。【结论】*Marinobacter* sp. W-8 兼具耐盐和高效反硝化的能力, 无需曝气或严格厌氧条件, 对碳源需求低, 能够显著减少污泥产生, 这为高效、低成本脱氮提供了理论和实践依据。

关键词: 兼性好氧反硝化; 脱氮性能; 基因表达; 电子传递链

资助项目: 国家自然科学基金(42077217)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42077217).

*Corresponding author. E-mail: lizhenlun4740@sina.com

Received: 2024-12-30; Accepted: 2025-02-16; Published online: 2025-03-14

Denitrification characteristics and mechanism of a facultative aerobic denitrifying halophilic bacterial strain *Marinobacter* sp. W-8

WANG Enxu¹, ZENG Yifan², LI Zhenlun^{1*}, YANG Yuran¹, LI Jiabing¹

1 Chongqing Key Laboratory of Interface Process and Soil Health, College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing, China

2 Hanhong College, Southwest University, Chongqing, China

Abstract: [Objective] To address the low denitrification efficiency in high-salinity, and high-nitrate nitrogen wastewater, this study aimed to isolate and identify salt-tolerant denitrifying a strain with high efficiency. And elucidate its underlying mechanisms for enhanced nitrogen removal. [Methods] Morphological characterization and the analysis of its 16S rRNA gene sequence were employed for strain identification. Denitrification performance of bacterial strains was evaluated by measuring different forms of nitrogen. Exploring the mechanism of efficient denitrification of bacterial strains through the RT-qPCR analysis and the measurement of electron transport chain enzyme activity under low oxygen or low oxygen and low C/N ratio conditions. [Results] A halotolerant, facultative aerobic denitrifying bacterium, named W-8, was isolated from saline soil. The strain was identified as *Marinobacter* sp. This strain can perform denitrification under both aerobic and anaerobic conditions, particularly demonstrating a significant denitrifying activity under low-oxygen conditions (dissolved oxygen concentration < 1.2 mg/L). After 48 h of culture under static conditions, W-8 achieved the NO₃⁻-N (97.85 mg/L) removal efficiency of 95.56% and the total nitrogen removal efficiency of 87.63%. Under low dissolved oxygen, the expression of *narG* and *narI* was significantly upregulated, and the activities of electron transport chain complex I and II were enhanced, which promoted the efficient reduction of NO₃⁻. The expression of *norB* was significantly upregulated, promoting the reduction of NO. Under low-oxygen conditions, W-8 further improved the activity of the complex II under a low C/N ratio, reducing carbon source requirements. Under anaerobic conditions, W-8 mainly metabolized NO₃⁻-N through denitrification, with a gaseous nitrogen production ratio of 87.63%. Under aerobic conditions, this strain achieved nitrogen removal through denitrification combined with assimilation. [Conclusion] *Marinobacter* sp. W-8 demonstrates exceptional salt tolerance and high-efficiency denitrification. It can significantly reduce sludge production without the need for aeration or strict anaerobic conditions and has a lower demand for carbon sources. It shows great application potential and provides a theoretical and practical basis for efficient, low-cost denitrification.

Keywords: facultative aerobic denitrification; denitrification performance; gene expression; electronic transport chain

反硝化脱氮工艺是目前生物法处理污水的主要技术之一, 具有效率高、工艺流程简单、

节能环保、无须投加化学药剂、成本低等显著优势^[1-3]。然而, 随着新兴行业的发展, 废水成

分日趋复杂。例如,海水循环水养殖系统产生的养殖废水不仅盐度高(3%),还伴随着硝酸盐的累积(NO_3^- -N 浓度高达 400–500 mg/L)^[4];石油和天然气的开采与精炼产生的废水含有多种无机盐离子,其盐度是海水的 3 倍或更高,同时富含大量硝态氮^[5–6]。在高盐高硝态氮废水中,高浓度的无机盐离子会破坏微生物细胞内外的渗透压平衡、降低酶活性,从而抑制微生物的脱氮功能,甚至导致微生物脱水死亡,完全丧失脱氮能力^[7]。如何有效处理这些复杂废水已成为当前污水处理面临的难题。已有研究表明,通过引入耐盐或嗜盐微生物,或逐步增加盐度驯化微生物以增强其耐盐能力,可以显著改善盐分对微生物活性的抑制作用^[8–9]。例如,中度嗜盐异养硝化-好氧反硝化菌盐单胞菌(*Halomonas* sp.) DN3 在好氧条件下 72 h 内可完全去除氨态氮、硝态氮,或去除 96.61%–100% 的亚硝态氮^[10]。然而,其氮代谢途径主要以氮同化为主,通过硝化和反硝化排放的气体氮较少,占总氮(total nitrogen, TN)的 14.23%–25.02%。耐盐好氧反硝化菌 *Marinobacter* sp. strain B108 表现出高效的好氧反硝化能力,在最适条件下,24 h 内对 102.86 mg/L 的 NO_3^- -N 去除率为 100%,TN 去除率为 98.89%^[11]。然而,该菌株未表现出在厌氧条件下进行反硝化的能力,其硝酸盐还原途径主要为同化还原途径和好氧反硝化异化还原途径。耐盐反硝化菌栖植物潘隆尼亚碱湖杆菌(*Pannonibacter phragmitetus*) F1 可耐受高达 7% 的 NaCl 浓度,在最适条件下对 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 的去除率分别达到 99% 和 95%,但其培养周期较长,需耗时 5 d,处理效率较低^[12]。在污水反硝化处理中,碳源的添加成本占比较大,因此筛选能够在低碳氮比条件下高效反硝化的耐盐菌,对有效处理高盐高硝氮复杂废水具有重要价值。

本研究从高盐浓度土壤中分离获得一株兼性好氧反硝化嗜盐菌株 W-8,分析其生理生化特性及反硝化特性,并探讨其氮循环途径;利用 RT-qPCR 技术探究其在好氧和厌氧条件下的反硝化基因转录变化,同时研究其在低氧低 C/N 条件下的电子传递链相关酶活性变化,以期为 W-8 菌株在实际污水处理中的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

样品来自中国山东省邹平市某榨菜厂附近的土壤。

1.1.2 培养基

富集培养基(enrichment medium, EM, g/L): 葡萄糖 5.0, NaCl 60.0, KNO_3 2.0, MgSO_4 0.2, KH_2PO_4 4.0, K_2HPO_4 6.0, 调 pH 至 7.2。

LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 60.0, 调 pH 至 7.2。

溴百里酚蓝选择性培养基(bromothymol blue medium, BTB, g/L)^[13]: KNO_3 1.00, KH_2PO_4 1.00, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00, 琥珀酸钠 8.50, NaCl 60.00, BTB (1.5% 溴百里酚蓝溶于无水乙醇) 1 mL, 调 pH 至 7.0。

反硝化培养基(denitrification medium, DM) (g/L)^[14]: 乙酸钠 3.420, KNO_3 0.722, KH_2PO_4 1.500, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.059, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.100, NaCl 60.000, 调 pH 至 7.0。

以上培养基均在 121 °C 下灭菌 30 min, 冷却后备用; 固体培养基中加入 2% 琼脂。

1.2 菌株分离筛选与鉴定

取 5 g 土壤样品放入 100 mL EM 培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 3 d 后, 取培养液 5 mL 接种至 100 mL 新的 EM 培养基中, 继续培养 3 d,

重复 3 次。将富集后的培养液进行梯度稀释 (10^{-4} – 10^{-7}), 并涂布于 BTB 平板上, 30 °C 培养 2–3 d。挑取使培养基变蓝的单菌落, 转接至新的 BTB 平板上进行划线纯化培养。筛选出 NO_3^- -N 去除率最高的菌株 W-8 作为本研究对象, 并将其保存于 30% 甘油溶液中 (–80 °C、–20 °C)。使用扫描电子显微镜(株式会社日立制作所)和光学显微镜(重庆奥特光学仪器有限责任公司)进行形态观察。利用 PCR 扩增单菌落的 16S rRNA 基因序列, 引物为细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 由北京擎科生物科技股份有限公司完成。测序结果通过 BLAST 同源性检索比对, 并上传至 NCBI 数据库。

1.3 溶解氧和 C/N 比对菌株 W-8 反硝化的影响

经单因素试验确定, 菌株 W-8 的最适好氧反硝化条件为: 以乙酸钠为碳源, 盐度 6%, pH 7.0–8.0, 温度 30 °C。在此基础上, 探究溶解氧和 C/N 比对菌株 W-8 反硝化的影响。将接种于 LB 培养基中培养 36 h 的菌悬液按体积分数 1% 的接种量接种于 DM 培养基中, 在不同溶解氧条件下(厌氧、0、50、100、150 r/min), 30 °C 连续培养 48 h, 每 12 h 测定培养液的 OD_{600} 、pH、溶解氧 (dissolved oxygen, DO)、TN、离心总氮 (centrifugal total nitrogen, CTN)、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N、 NH_2OH 浓度。

将体积分数 1% 的菌悬液接种于不同 C/N 比的 DM 培养基中, 分别在 0 r/min (C/N 比为 0、2、4、6、8、10) 或 150 r/min (C/N 比为 5、10、15、20、25) 条件下, 30 °C 恒温连续培养, 测定 0 h 和 48 h 培养液的 OD_{600} 、TN、CTN、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N 浓度。

1.4 菌株的反硝化脱氮性能、电子传递链酶活性及氮平衡分析

将体积分数 1% 的菌悬液接种于 DM 培养基中, 分别在 0 r/min 和 150 r/min 条件下, 30 °C 恒温连续培养 48 h, 每 12 h 测定培养液的 OD_{600} 、pH、TN、CTN、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N、 NH_2OH 浓度。计算菌株 W-8 的反硝化性能, 并推测其氮代谢途径。细胞氮、气态氮和脱氮效率计算方法参考文献[15]。在 12、24、36 h 时取适量菌液进行细胞破碎, 采用 G084F24 试剂盒(苏州格锐思生物科技有限公司)测定复合体 I、II、III 和 IV 的活性。

1.5 厌氧和好氧条件下菌株的反硝化功能基因水平分析

将体积分数 1% 的菌悬液接种至 DM 培养基中, 分别以 0 r/min 和 150 r/min 条件下培养至对数生长期 (OD_{600} 约为 0.60), 采用 B518655 试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取菌株 W-8 的 RNA, 用 9PIA280 试剂盒(Promega 公司)进行反转录得到菌株的 cDNA。对硝酸盐还原酶(nitrate reductase, NAR)、亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, NIR)、一氧化氮还原酶(nitric oxide reductase, NOR)、氧化亚氮还原酶(nitrous oxide reductase, NOS)的编码基因 *narG*、*narI*、*nirS*、*norBC* 和 *nosZ* 分别进行 RT-qPCR 扩增。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行数据处理^[16], 以 16S rRNA 基因为内参基因。引物序列见表 1。

1.6 分析方法

采用 OD_{600} 测定菌浓度; 使用 pHS-3E (上海欧史拓尔实业有限公司)测定菌液 pH。使用便携溶解氧仪(上海欧史拓尔实业有限公司)测定 DO。不同氮形态的含量测定参照《水和废水监测分析方法》第 4 版^[17]: TN 和 CTN、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N 分别采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法、紫外分光光度法、N-(1-萘基)-乙

表1 RT-qPCR引物列表

Table 1 RT-qPCR primer sequences list

基因名称 Gene symbol	引物序列 Primer sequences (5'→3')
<i>narG</i>	F-GCCCTGATTGTAAGTGTGTCG R-ATCACCAGTACACCGACGTG
<i>narI</i>	F-TTATACAAGCGCGCCGAAAC R-TAGCGAGGTAGCGGTACATTTT
<i>nirS</i>	F-AAGCGCGTTCTGTTGAAACC R-CGATGATTTTCTTCGGCTCCAG
<i>norB</i>	F-GCATTCTTCGTCCTGTTGTTCC R-GTTGTTCTCCACAGGTGTTTG
<i>norC1</i>	F-TTTCTGGTGGCTGAACATCG R-TGCAGTATGTCGCTTTGCAG
<i>norC2</i>	F-TGGTTTGTGGTTCACCTGTG R-TGGCAATGATCACGTACAGC
<i>nosZ</i>	F-TTGCCGATGCCATCAAACAC R-AAGAACCACCAGCCATTTGC
16S rRNA	F-TCTCGCTTACCAAACCACCTAC R-TACCCATGAGGCTTGACGTTAC

二胺光度法、靛酚蓝比色法测定。 NH_2OH 含量采用硫酸铁铵-邻菲罗啉分光光度计间接法测定^[18]。采用 SPSS 25.0 软件对数据进行分析。

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选与鉴定

从土壤样本中分离出 19 株能够在高盐含氮环境中生长的菌株，其中脱氮效果最佳的菌株为 W-8。W-8 在 LB 平板上呈乳白色、圆形、半透明；革兰氏染色阴性；细菌形态为杆状，直径 0.2–0.3 μm ，长度 2.0–3.0 μm 。菌株 W-8 的 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号为 PQ386400。菌株 W-8 与海洋杆菌属 (*Marinobacter* sp.) 的相似性最高(99.86%)，因此鉴定 W-8 菌株属于 *Marinobacter* 属，命名为 *Marinobacter* sp. W-8。通过探究不同盐度对 W-8 反硝化的影响，明确 W-8 不能在无 NaCl 的 DM 中生长，是嗜盐细菌，且在盐度 12% 时

可以生长，其反硝化适宜盐度为 3%–9% (数据未展示)。

2.2 溶解氧和 C/N 比对菌株 W-8 反硝化的影响

2.2.1 溶解氧对菌株 W-8 反硝化的影响

利用厌氧瓶和摇床转速创造厌氧-好氧培养条件，探究不同溶解氧对菌株 W-8 反硝化性能的影响，结果如图 1 所示。在厌氧条件下，W-8 表现出优异的反硝化效能，48 h 内 NO_3^- -N 的去除率高达 97.00%，TN 和 CTN 的去除率分别为 91.44% 和 96.52%。未检测到 NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 的积累，但检测到微量羟胺(0.03 mg/L)。在溶解氧浓度较低(0.1–1.2 mg/L，转速 0–50 r/min)时，尽管 W-8 生长缓慢，但反硝化效果显著优于好氧条件，TN 和 CTN 的去除率均高于 80%。反硝化过程中检测到 NO_2^- -N (0.01 mg/L 和 3.49 mg/L) 和微量羟胺(0.04 mg/L 和 0.05 mg/L)。在溶解氧浓度较高(1.8–2.5 mg/L，转速 100–150 r/min)时，尽管菌株生长速率快， OD_{600} 能达到 0.80，但其反硝化作用被明显抑制，TN 的去除率分别为 27.19% 和 43.48% (NH_4^+ -N 和羟胺数据未展示)。溶解氧的增加增强了 W-8 的同化作用，但减弱了反硝化作用。然而，溶解氧对 W-8 反硝化的影响并非线性，W-8 在 150 r/min 转速下的反硝化能力优于 100 r/min。推测在更高转速时，W-8 的生长能力增强，较快进入对数生长期后，同化作用减弱，进而减轻了对反硝化作用的抑制。

W-8 在厌氧或低氧条件下能高效进行反硝化脱氮，区别于传统的厌氧反硝化菌，W-8 不需要在严格的厌氧环境中进行反硝化，也不同于现有研究中好氧反硝化菌在缺氧环境中的低效反硝化。例如，同属菌株 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* RAD-2 在静置培养下 NO_3^- -N 去除效率为 54.41%，而在转速 100 r/min

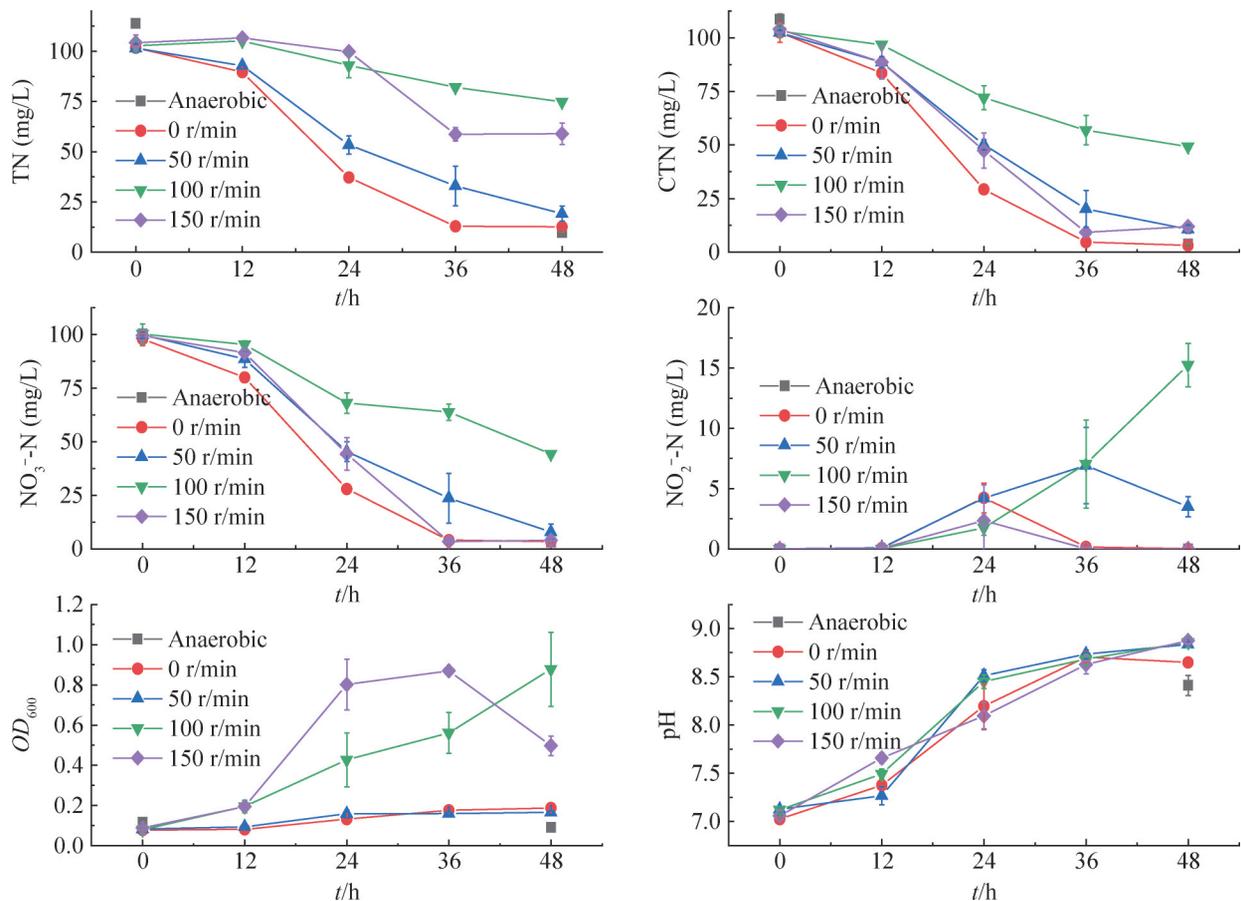


图1 溶解氧对W-8反硝化的影响

Figure 1 Effects of dissolved oxygen on the denitrification performance of W-8.

和 150 r/min 时 NO_3^- -N 去除效率分别达到 92.02% 和 97.70%^[19]。此外, W-8 在低氧条件下进行反硝化后生成的生物量较少。例如, 厌氧反硝化菌株 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* NY-4 厌氧培养 48 h, NO_3^- -N 被快速消耗, 且生长迅速, 生物量达到约 4×10^8 个/mL (OD_{600} 约 0.50)^[20]。W-8 厌氧培养 48 h 后, OD_{600} 仅为 0.09, 静置培养 48 h 之后 OD_{600} 为 0.19, 远低于 NY-4。因此, 菌株 W-8 在实际污水处理中不需要曝气或严格的厌氧处理, 且污泥生成量较少, 能够显著节约处理成本与时间。

2.2.2 C/N 比对 W-8 反硝化的影响

C/N 比是影响生物脱氮的关键因素, 不同

C/N 比对 W-8 的生长状况和反硝化过程的影响如图 2 所示。在低溶解氧条件下, 缺乏碳源时, W-8 无法正常生长脱氮, 表明 W-8 为非自养菌。当 C/N 比为 2 时, W-8 生长速率极慢, 48 h 后 OD_{600} 为 0.12。然而, 此时 W-8 表现出极强的反硝化能力, NO_3^- -N 去除率为 91.76%, TN 去除率达 82.42%, 有 2.66 mg/L 的 NO_2^- -N 积累。当 C/N 比增高到 4 时, W-8 的氮去除率略有提高, 48 h 后 NO_3^- -N 几乎完全去除(剩余浓度 1.80 mg/L), TN 去除率为 88.97%, 且无 NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 的积累。随着有机碳浓度继续增加, W-8 的脱氮效率趋于稳定, 且无 NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 的积累。

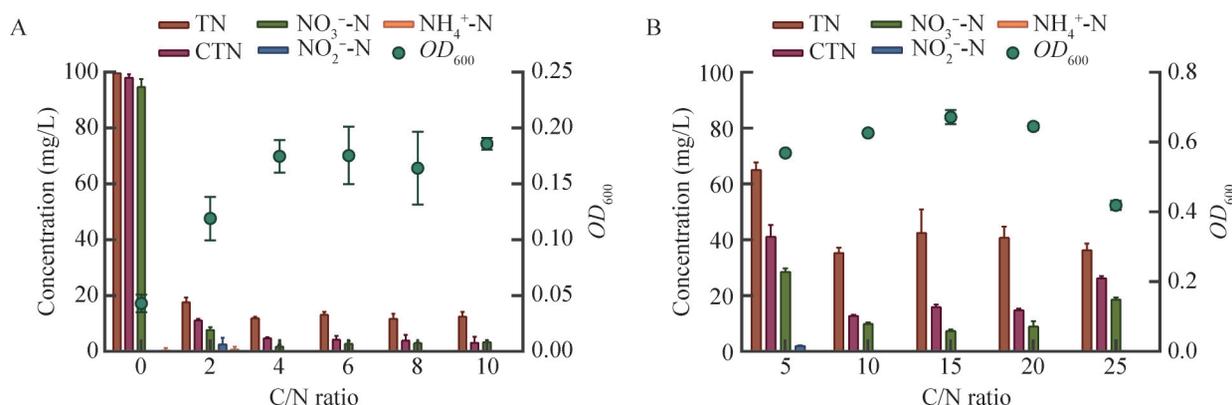


图2 C/N比对W-8反硝化的影响

Figure 2 Effect of C/N ratio on the denitrification performance of W-8. A: 0 r/min; B: 150 r/min.

在好氧条件下, 当 C/N 比低于 5 时, W-8 的脱氮效果较差。随着有机碳浓度的增加, 反硝化菌 W-8 的氮去除率显著提高。当 C/N 比为 10 时, W-8 的 NO_3^- -N、TN 和 CTN 去除率分别达到 90.11%、64.66% 和 87.23%。当 C/N 比大于 10 后, W-8 的脱氮效果未进一步提升, 且当 C/N 比达到 25 时, W-8 的 OD_{600} 值大幅下降(0.42), 反硝化效率也随之下降。C/N 比通过影响电子传递和酶活性进而影响脱氮效率。在低 C/N 比条件下, 细胞无法获得足够能量, 相关氮代谢酶活性较低^[21-22]。适宜的 C/N 比可以提高 NADH 和 ATP 水平, 增强电子传递系统的活性。然而, 持续提高 C/N 比时, 尽管 NADH 和 ATP 浓度增加, 反硝化相关酶和电子传递链相关酶的活性并不会持续增强, 反而可能导致电子传递链“过载”^[23]; 或者多余的有机碳源嵌入 Nar、Nir 等还原酶结构, 影响酶的活性, 抑制反硝化作用的进行^[24]。与厌氧反硝化菌株 *Marinobacter* sp. B3 相比^[25], 在 C/N 比为 5 时, B3 不仅生长受到抑制, 脱氮效率较低(TN 去除率约 30%), 还产生了 NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 的积累; 而当 C/N 比为 10 或 15 时, B3 快速生长, 脱氮效率提高。相比之下, W-8 在低氧条件下, 只要存在碳源, 在

极低的 C/N 比条件下也能实现高效脱氮, 在实际污水处理中无须添加大量外加碳源, 从而节约成本。

2.3 菌株 W-8 的反硝化脱氮性能

以 NO_3^- -N 为唯一氮源时, W-8 的脱氮性能如图 3 所示。在 0 r/min 转速下, W-8 生长缓慢(48 h 后 OD_{600} 为 0.19), 但对 NO_3^- -N 的去除能力极强, NO_3^- -N、TN 和 CTN 的去除率分别为 96.55%、87.64% 和 95.95%。 NO_2^- -N 在 24 h 时达到最大累积量 4.22 mg/L, 随后被完全去除。同时, 24 h 后检测到微量羟胺, 48 h 后浓度达 0.04 mg/L。在好氧条件下, W-8 能够正常生长, 12 h 后进入对数生长期, 36 h 后 OD_{600} 达到最大值 0.87, 随后细菌开始死亡。此时, NO_3^- -N、TN 和 CTN 的去除率分别为 96.12%、49.52% 和 88.47%。 NO_2^- -N 从 24 h 开始积累, 48 h 后仍能检测到。这可能是由于好氧环境影响了亚硝酸盐还原酶的活性^[26], 而 NO_2^- -N 的存在对细菌具有毒害作用, 若不能及时去除, 可能抑制菌株的反硝化效率^[27]。同样地, 24 h 后出现微量羟胺的积累, 至 48 h 后浓度达 0.09 mg/L。最终检测到 1.59 mg/L 的 NH_4^+ -N, 推测为菌株死亡释放的。推测在厌氧条件下, W-8 主要通过反硝化作用去除水体中的 NO_3^- -N, 同化作用较弱;

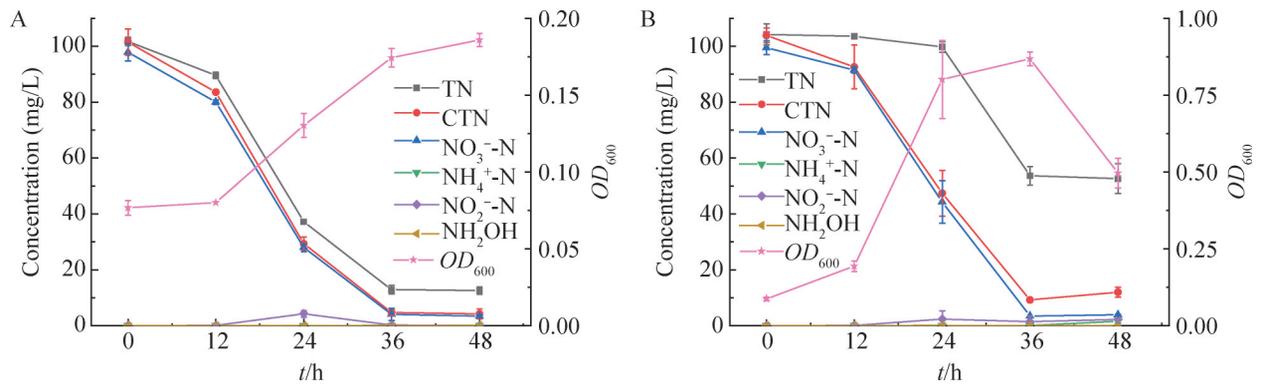


图3 菌株W-8的反硝化脱氮性能

Figure 3 Denitrification performance of strain W-8. A: 0 r/min; B: 150 r/min.

而在好氧条件下, W-8 通过反硝化和同化共同作用来去除 NO₃⁻-N。

采用氮平衡法分析以 NO₃⁻-N 为唯一氮源条件下菌株 W-8 的反硝化途径。如表 2 所示, 在好氧条件下, 38.99% 的 NO₃⁻-N 转化为细胞氮, 49.53% 转化为气态氮。在厌氧条件下, 87.63% 的 NO₃⁻-N 转化为气态氮, 仅有 8.26% 转化为细胞氮, 反硝化率显著高于好氧条件。结果表明, 在好氧条件下菌株 W-8 通过反硝化和同化共同作用来代谢 NO₃⁻-N; 而在厌氧条件下, 菌株 W-8 主要通过反硝化作用去除水体中的 NO₃⁻-N, 同化作用较弱。这与之前的推测一致。W-8 在实际高盐废水处理中能够有效去除无机氮, 尤其在厌氧环境下可显著减少污泥产量, 具备较好的应用前景。

2.4 反硝化功能基因 RT-qPCR 的扩增

菌株 W-8 已完成全基因组测序, 完整基因组已上传至 NCBI, 登录号为 CP172297。全基因组分析发现, 菌株 W-8 具有 7 个与反硝化相关的基因, 其 KEGG 氮代谢途径如图 4A 所示。进一步通过 RT-qPCR 探究了这些基因在低溶解氧条件下的表达情况(图 4B)。结果显示, *narG*、*narI* 和 *norB* 基因分别上调了 (3.62±0.52) 倍、(1.38±0.44) 倍和 (2.17±0.78) 倍。通过上调 *narG*、*narI* 和 *norB* 基因, W-8 在低氧条件下表现出更强的反硝化能力, 促进了 NO₃⁻ 和 NO 的高效还原。*nirS* 基因的表达在两处理间不显著, *nirS* 的正常表达使生成的 NO₂⁻ 可迅速转化为 NO, 避免了 NO₂⁻ 积累对反硝化过程的抑制。

膜内 *nar* 基因的主要功能是在厌氧或低氧条

表2 菌株W-8反硝化的氮平衡分析

Table 2 Nitrogen balance analysis of strain W-8 with different nitrogen sources

溶解氧条件 Dissolved oxygen conditions	氮源 Nitrogen source	浓度 Concentration (mg/L)			反硝化率 Denitrification removal efficiency (%)	同化效率 Assimilation efficiency (%)	离心总氮去除率 Centrifugal total nitrogen removal rate (%)
		离心总氮 Centrifugal total nitrogen	气态氮 Gaseous nitrogen	细胞氮 Cell nitrogen			
好氧 Aerobic	NO ₃ ⁻ -N	11.97±1.81	51.63±8.99	40.65±7.13	49.53	38.99	88.52
厌氧 Anaerobic	NO ₃ ⁻ -N	4.18±1.75	89.14±2.79	8.40±3.06	87.63	8.26	95.89

件下通过硝酸盐呼吸作用完成脱氮，对 O_2 敏感，通常在厌氧反硝化菌中发挥主要作用^[28]。本研究结果表明，低氧条件促进了菌株 W-8 *nar* 基因的表达，与上述功能一致。将 NO_2^- -N 转化为 NO 的过程是反硝化过程中的限速步骤^[29]，有研究表明 O_2 的存在会抑制 NO_2^- -N 的转化速率^[26]。然而，W-8 的 *nirS* 基因在好氧和厌氧条件下的表达差异较小，表明该基因在好氧、厌氧条件下均能发挥重要作用。功能基因 *nosZ* 负责将 N_2O 转化为 N_2 ，虽然部分研究表明 O_2 的存在会抑制 *nos* 的活性，但也有研究表明 *nos* 对 O_2 不敏感，甚至在好氧条件下的表达丰度高于

厌氧条件^[26]。本研究的结果支持这一结论。

2.5 电子传递链酶活性的测定

细菌电子传递呼吸链包含多个氧化还原酶，其中复合物 I (NADH 脱氢酶)、II (琥珀酸脱氢酶) 和 III (细胞色素 *bc1*) 负责将电子从内质网膜的 NADH 或细胞膜的 $FADH_2$ 运输到末端氧化酶。有氧呼吸和反硝化作用分别依赖复合物 IV (末端氧化酶)、细胞色素 *c*、辅酶 Q 等反硝化酶构建完整的电子传递链^[30]。因此，电子传递的效率直接影响反硝化性能，是微生物反硝化中的关键因素^[31]。图 5 显示了菌株 W-8 在不同培养条件下电子传递链的酶活性变化情况。实验检测

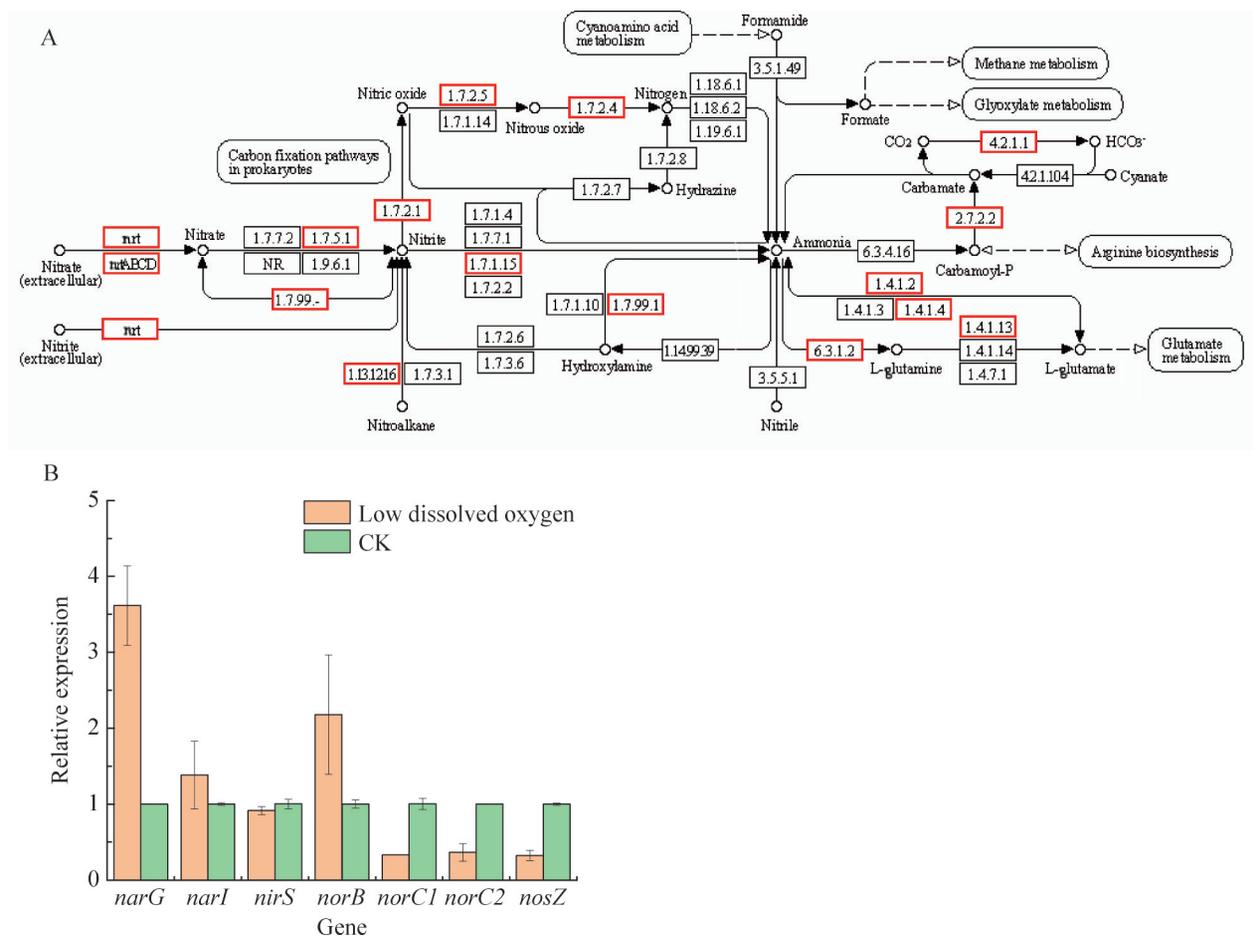


图4 反硝化功能基因。A: W-8的KEGG氮代谢途径; B: 低溶解氧条件下W-8反硝化基因的表达情况。

Figure 4 Denitrification functional genes. A: Nitrogen metabolism pathways of W-8; B: Expression of W-8 denitrification genes under low dissolved oxygen conditions.

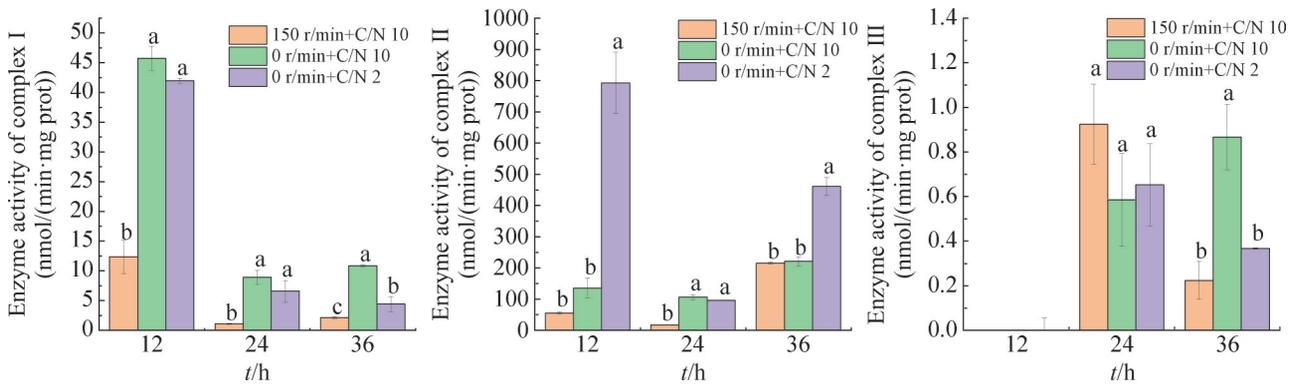


图5 溶解氧和C/N比对W-8反硝化呼吸链的影响

Figure 5 Effect of dissolved oxygen or C/N ratio on W-8 denitrification respiratory chain.

到复合物 I、II 和 III 的活性，但未检测到复合物 IV 的活性。

在整个培养过程中，0 r/min 转速下复合物 I 的活性显著高于 150 r/min，且在培养 12 h 时达到最大值[45.77 nmol/(min·mg prot)和 41.98 nmol/(min·mg prot)]。随着培养时间延长，复合物 I 的活性均降低。推测是由于碳源充足时产生大量 NADH 和 ATP，后期碳源消耗导致复合物 I 活性下降。该推测与 Lu 等^[32]的研究结果一致。12 h 时，复合物 II 的活性在 0 r/min、C/N 比为 2 的条件下显著高于其他条件[792.49 nmol/(min·mg prot)]。此时 0 r/min、C/N 比为 10 的条件下活性也显著高于 150 r/min。在培养 24 h 时，各条件下复合物 II 的活性均有降低，但 0 r/min 条件下的酶活性依旧显著高于 150 r/min。36 h 时，C/N 比为 2 的条件下复合物 II 的酶活性再次达到较高值[461.0 nmol/(min·mg prot)]。结果表明，低氧和低 C/N 条件可能促进复合物 II 的活性。复合物 III 在培养初期未检测到活性，后期活性较低且差异不显著。36 h 时 0 r/min、C/N 比为 10 的条件下复合物 III 的活性显著高于其他条件[0.87 nmol/(min·mg prot)]。复合物 IV 是好氧反硝化过程中接受来自细胞色素 c 或醌池的电子的

关键酶^[33]。然而，本研究未检测到其活性，可能是电子传递链受到某些因素抑制，导致 W-8 在好氧条件下的反硝化能力低于静置培养条件。

Xi 等^[34]研究表明，缓解复合物 I 的抑制可以间接增强硝酸盐还原酶活性，从而加速反硝化过程。在缺氧条件下，电子通过复合物 I 和泛醌/泛醇从 NADH 高效转移至硝酸盐还原酶，解释了 0 r/min 时复合物 I 活性显著较高的现象，同时伴随着硝酸盐还原酶基因表达的上调，提高了反硝化效率。

3 结论

(1) 从高盐土壤中筛选出一株兼性好氧反硝化嗜盐菌，鉴定为海洋杆菌属 (*Marinobacter* sp.)，命名为 *Marinobacter* sp. strain W-8，为耐盐反硝化微生物菌种库提供了新的菌株资源。

(2) 菌株 W-8 在好氧和厌氧条件下均能进行反硝化，尤其在低氧环境中展现出优异的反硝化能力。静置培养 48 h 后，对 97.85 mg/L 的 NO_3^- -N 去除率为 95.56%，总氮去除率为 87.63%。无 NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 积累， OD_{600} 值较低，能够显著减少污泥产生。在兼性厌氧条件下，即使 C/N 比为 2 时，W-8 也能高效脱氮。其对碳源需求低，在处理污水时无须添加大量

外加碳源，有助于降低污水处理成本。

(3) 在厌氧条件下，W-8 主要通过反硝化代谢将 NO_3^- -N 转化为气态氮，生成气态氮的比例达到 87.63%；而在好氧条件下，反硝化与同化作用共同参与脱氮。

(4) 低溶解氧条件下，菌株 W-8 的 *narG*、*narI* 和 *norB* 基因表达显著上调，促进了 NO_3^- -N 和 NO 的高效还原。同时，菌株 W-8 增强了电子传递链复合体 I 和 II 的活性，低 C/N 比条件进一步促进了复合体 II 的活性。菌株 W-8 在污水处理中无需曝气或严格厌氧条件，能够显著减少污泥产生，有望在高盐废水中实现高效、低成本的脱氮。

作者贡献声明

汪恩旭：设计并执行实验，分析数据，撰写及修改论文；曾一帆：执行实验，处理数据，修改论文；李振轮：指导设计实验，修改论文；杨裕然：指导并执行实验，修改论文；李佳冰：执行实验，处理数据。

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] ZHANG FF, MA CJ, HUANG XF, LIU J, LU LJ, PENG KM, LI SY. Research progress in solid carbon source-based denitrification technologies for different target water bodies[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 782: 146669.
- [2] CHEN ZH, DOLFING J, ZHUANG SY, WU YH. Periphytic biofilms-mediated microbial interactions and their impact on the nitrogen cycle in rice paddies[J]. *Eco-Environment & Health*, 2022, 1(3): 172-180.
- [3] 柴文云, 郭亚南, 杨铮, 朱焯, 侯俊, 苗令占. 固相碳源的特性对生物反硝化脱氮技术的影响研究进展[J]. *环境工程技术学报*, 2024, 14(3): 963-972.
- CHAI WY, GUO YN, YANG Z, ZHU Y, HOU J, MIAO LZ. Research progress on the influence of solid carbon source characteristics on biological denitrification technology[J]. *Journal of Environmental Engineering Technology*, 2024, 14(3): 963-972 (in Chinese).
- [4] 王鹰瀚, 孙喆, 王磊, 强志民. 循环海水养殖系统固相反硝化工艺研究进展[J/OL]. *环境保护科学*, 2023. <http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=HJBH20230504002&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- WANG YH, SUN Z, WANG L, QIANG ZM. Research progress of solid-phase nitrification process in circulating mariculture system[J/OL]. *China Industrial Economics*, 2023. <http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=HJBH20230504002&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ> (in Chinese).
- [5] NOOR A, KUTTY SRM, BALOO L, ALMAHBASHI NMY, KUMAR V, GHALEB AAS. Bio-kinetics of organic removal in EAAS reactor for co-treatment of refinery wastewater with municipal wastewater[J]. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2021, 1092(1): 012068.
- [6] LEFEBVRE O, MOLETTA R. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review[J]. *Water Research*, 2006, 40(20): 3671-3682.
- [7] WANG JL, ZHOU J, WANG YM, WEN YH, HE L, HE Q. Efficient nitrogen removal in a modified sequencing batch biofilm reactor treating hypersaline mustard tuber wastewater: the potential multiple pathways and key microorganisms[J]. *Water Research*, 2020, 177: 115734.
- [8] XIA Y, JIANG XB, WANG YX, HUANG Q, CHEN D, HOU C, MU Y, SHEN JY. Enhanced anaerobic reduction of nitrobenzene at high salinity by betaine acting as osmoprotectant and regulator of metabolism[J]. *Water Research*, 2022, 223: 118982.
- [9] 张佳, 侯雅男, 申邵恒, 黄聪. 耐盐菌海洋单胞菌 GK1 基因组尺度代谢网络模型的构建[J/OL]. *环境工程*, 2024. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2097.X.20240520.1801.005.html>.
- ZHANG J, HOU YN, SHEN SH, HUANG C. Construction of a genome-scale metabolic network model of the halotolerant bacterium *Oceanimonas* sp. GK1[J/OL]. *Environmental Engineering*, 2024. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2097.X.20240520.1801.005.html> (in Chinese).
- [10] XIE YM, TIAN XL, HE Y, DONG SL, ZHAO K. Nitrogen removal capability and mechanism of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Halomonas* sp. DN3[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 387: 129569.
- [11] 王娇, 林久淑, 王文鑫, 王福海, 穆明浩, 洪波, 季军远. 耐盐好氧反硝化菌 *Marinobacter* sp. strain B108 的分离及脱氮特性[J]. *环境科学与技术*, 2023, 46(8): 134-143.
- WANG J, LIN JS, WANG WX, WANG FH, MU MH, HONG B, JI JY. Isolation and denitrification characteristics of salt-tolerant aerobic denitrifier *Marinobacter* sp. strain B108[J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 46(8): 134-143 (in Chinese).
- [12] WANG XY, ZHU H, SHUTES B, FU BR, YAN BX, YU XF, WEN HY, CHEN X. Identification and denitrification characteristics of a salt-tolerant denitrifying bacterium *Pannonibacter phragmitetus* F1[J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 193.
- [13] GUO Y, ZHOU XM, LI YG, LI K, WANG CX, LIU JF, YAN DJ, LIU YL, YANG DH, XING JM. Heterotrophic

- nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(12): 2045-2049.
- [14] SONG ZF, AN J, FU GH, YANG XL. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds[J]. *Aquaculture*, 2011, 319(1/2): 188-193.
- [15] ZHANG N, ZHANG YT, BOHU T, WU SH, BAI ZH, ZHUANG XL. Nitrogen removal characteristics and constraints of an *Alphaproteobacteria* with potential for high nitrogen content heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 235.
- [16] ZHOU XQ, WANG YL, TAN X, SHENG YQ, LI YB, ZHANG Q, XU JL, SHI ZS. Genomics and nitrogen metabolic characteristics of a novel heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium *Acinetobacter oleivorans* AHP123[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 375: 128822.
- [17] 魏复盛, 国家环境保护总局, 水和废水监测分析方法编委会编. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [18] HUANG XJ, XU Y, HE TX, JIA HJ, FENG M, XIANG SD, WANG ST, NI JP, XIE DT, LI ZL. Ammonium transformed into nitrous oxide via nitric oxide by *Pseudomonas putida* Y-9 under aerobic conditions without hydroxylamine as intermediate[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 277: 87-93.
- [19] KONG DD, LI WB, DENG YL, RUAN YJ, CHEN GS, YU JH, LIN FC. Denitrification-potential evaluation and nitrate-removal-pathway analysis of aerobic denitrifier strain *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* RAD-2[J]. *Water*, 2018, 10(10): 1298.
- [20] LI RP, ZI XL, WANG XF, ZHANG X, GAO HF, HU N. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* NY-4, a novel denitrifying, moderately halophilic marine bacterium[J]. *SpringerPlus*, 2013, 2: 346.
- [21] GU X, LENG JT, ZHU JT, ZHANG K, ZHAO JQ, WU P, XING QY, TANG KJ, LI XL, HU B. Influence mechanism of C/N ratio on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 343: 126116.
- [22] 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]. *Science of the Total Environment*, 2022, 805: 150212.
- [23] ROBERTSON LA, KUENEN JG. Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha*: oxygen uptake and enzyme studies[J]. *Microbiology*, 1988, 134(4): 857-863.
- [24] 毕墨涵, 徐斐, 郭富成, 陈一. 响应面优化香蒲生物炭促进反硝化影响因素[J]. *环境科学与技术*, 2021, 44(2): 97-103.
- BI MH, XU F, GUO FC, CHEN Y. Optimization of influence factors of cattail biochar stimulated denitrification by surface optimization methodology[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 44(2): 97-103 (in Chinese).
- [25] 滕峪, 汪鲁, 王占英, 崔正国. 一株嗜碱兼性好氧反硝化菌 *Marinobacter* sp. B3 的分离鉴定及脱氮性能研究[J]. *海洋与湖沼*, 2024, 55(2): 419-430.
- TENG Y, WANG L, WANG ZY, CUI ZG. Isolation and identification of an alkalophilic facultative aerobic denitrification strain *Marinobacter* sp. B3 and its denitrification performance[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2024, 55(2): 419-430 (in Chinese).
- [26] 康鹏亮, 陈胜男, 黄廷林, 张海涵, 商潘路, 钊珍芳, 王跃, 谭欣林. 好/厌氧条件下反硝化细菌脱氮特性与功能基因[J]. *环境科学*, 2018, 39(8): 3789-3796.
- KANG PL, CHEN SN, HUANG TL, ZHANG HH, SHANG PL, ZHAO ZF, WANG Y, TAN XL. Denitrification characteristics and functional genes of denitrifying bacteria under aerobic or anaerobic conditions[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(8): 3789-3796 (in Chinese).
- [27] BARATHI S, MENG YB, YU Z, NI SQ, MENG FG. Roles of nitrite in mediating the composition and metacommunity of multispecies biofilms[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 40: 101764.
- [28] ASAMOTO CK, REMPFERT KR, LUU VH, YOUNKIN AD, KOPF SH. Enzyme-specific coupling of oxygen and nitrogen isotope fractionation of the nap and nar nitrate reductases[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(8): 5537-5546.
- [29] 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.
- [30] WEI Q, ZHANG JS, LUO FZ, SHI DH, LIU YC, LIU S, ZHANG Q, SUN WZ, YUAN JL, FAN HT, WANG HC, QI L, LIU GH. Molecular mechanisms through which different carbon sources affect denitrification by *Thauera linaloolentis*: electron generation, transfer, and competition[J]. *Environment International*, 2022, 170: 107598.
- [31] SU XX, WANG YY, HE Q, HU XB, CHEN Y. Biochar remediates denitrification process and N₂O emission in pesticide chlorothalonil-polluted soil: role of electron transport chain[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 370: 587-594.
- [32] LU JY, TAN Y, TIAN SH, QIN YX, ZHOU M, HU H, ZHAO XH, WANG ZF, HU B. Effect of carbon source on carbon and nitrogen metabolism of common heterotrophic nitrification-aerobic denitrification pathway[J]. *Chemosphere*, 2024, 361: 142525.
- [33] MARÉCHAL A, XU JY, GENKO N, HARTLEY AM, HARAUX F, MEUNIER B, RICH PR. A common coupling mechanism for a-type heme-copper oxidases from bacteria to mitochondria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(17): 9349-9355.
- [34] XI ZH, GUO JB, LIAN J, LI HB, ZHAO LJ, LIU XY, ZHANG CX, YANG JL. Study the catalyzing mechanism of dissolved redox mediators on bio-denitrification by metabolic inhibitors[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 140: 22-27.