

## 研究报告

耐盐产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) WM27 的特征、脱氮性能及固定化

许敬轩<sup>1,2</sup>, 尹鹏<sup>2</sup>, 刘凤坤<sup>1,2</sup>, 郑雅之<sup>1,2</sup>, 孙慧明<sup>2</sup>, 鲁慧杰<sup>2</sup>, 阮灼豪<sup>2</sup>, 郭慧<sup>1</sup>, 朱喜锋<sup>3</sup>, 戴睿智<sup>4</sup>, 廖劲松<sup>4</sup>, 代洁玉<sup>4</sup>, 黄文<sup>\*1,2</sup>

1 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088

2 广东省农业科学院动物科学研究所 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室 农业农村部华南动物营养与饲料重点实验室, 广东 广州 510640

3 广州飞禧特生物科技有限公司, 广东 广州 510640

4 筠诚和瑞环境科技集团股份有限公司, 广东 云浮 527300

许敬轩, 尹鹏, 刘凤坤, 郑雅之, 孙慧明, 鲁慧杰, 阮灼豪, 郭慧, 朱喜锋, 戴睿智, 廖劲松, 代洁玉, 黄文. 耐盐产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) WM27 的特征、脱氮性能及固定化[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2530-2544.

XU Jingxuan, YIN Peng, LIU Fengkun, ZHENG Yazhi, SUN Huiming, LU Huijie, RUAN Zhuohao, GUO Hui, ZHU Xifeng, DAI Ruizhi, LIAO Jinsong, DAI Jieyu, HUANG Wen. Characteristics, denitrification performance, and immobilization of *Klebsiella oxytoca* WM27[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2530-2544.

**摘要:** 【背景】好氧反硝化细菌在水产养殖尾水处理中显现出广泛的应用潜力。然而, 大多数好氧反硝化细菌在高盐环境中的脱氮性能有限。【目的】筛选出耐盐好氧反硝化细菌, 并对其脱氮性能进行评估。【方法】从养殖池塘底泥中富集筛选出 1 株新型高效好氧反硝化细菌, 通过 16S rRNA 基因测序及生理生化试验鉴定菌种; 采用动物试验和药敏试验对分离菌进行毒力和耐药性检测, 设置不同的环境因素探寻最佳脱氮条件并进行优化, 利用固定化技术提高其应用能力。【结果】经鉴定, 菌株 WM27 为产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*), 有较高的抗生素敏感性及其较好的生物安全性。以琥珀酸钠为碳源, 菌株 WM27 在 C/N=10、pH 7.0、温度 25 °C 的条件下具有较强的脱氮能力, 对总氮(total nitrogen, TN)、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除率可达到 90% 以上。该菌株在 3% 的盐度环境下具有良好的脱氮能力, TN、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的去除率仍有 88% 以上; 经固定化菌株 WM27 的脱氮处理, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 48 h 的降解效果可分别达到

资助项目: 广东省农业科学院协同创新中心项目(202138, XT202301); 广东省乡村振兴战略专项资金种业振兴项目(2024-SPY-00-006); 广东省农业科学院人才项目(R2020YJ-QG001, R2022PY-QY008)

This work was supported by the Guangdong Academy of Agricultural Sciences Collaborative Innovation Center Project (202138, XT202301), the Guangdong Rural Revitalization Strategy Special Fund Seed Industry Revitalization Project (2024-SPY-00-006), and the Talent Project of Guangdong Academy of Agricultural Sciences (R2020YJ-QG001, R2022PY-QY008).

\*Corresponding author. E-mail: huangwen549@126.com

Received: 2024-10-13; Accepted: 2025-01-27; Published online: 2025-03-05

98.62%–99.46%、98.26%–100%和 98.34%–100%。【结论】菌株 WM27 是一株耐盐、安全且高效的好氧反硝化细菌，在高盐养殖尾水处理中具有潜在的应用价值。

关键词：产酸克雷伯氏菌；好氧反硝化；固定化；水产养殖尾水处理；耐盐

## Characteristics, denitrification performance, and immobilization of *Klebsiella oxytoca* WM27

XU Jingxuan<sup>1,2</sup>, YIN Peng<sup>2</sup>, LIU Fengkun<sup>1,2</sup>, ZHENG Yazhi<sup>1,2</sup>, SUN Huiming<sup>2</sup>, LU Huijie<sup>2</sup>, RUAN Zhuohao<sup>2</sup>, GUO Hui<sup>1</sup>, ZHU Xifeng<sup>3</sup>, DAI Ruizhi<sup>4</sup>, LIAO Jinsong<sup>4</sup>, DAI Jieyu<sup>4</sup>, HUANG Wen<sup>\*1,2</sup>

1 College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science in South China of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

3 Guangzhou Fishtech Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 510640, Guangdong, China

4 Juncheng Herui Environmental Technology Group Co., Ltd., Yunfu 527300, Guangdong, China

**Abstract: [Background]** Aerobic denitrifying bacteria have shown a wide range of application potential in the treatment of aquaculture tail water. However, most aerobic denitrifying bacteria have limited denitrification performance in high-salt environments. **[Objective]** To screen out salt-tolerant aerobic denitrifying bacteria and evaluate their denitrification performance. **[Methods]** A novel, efficient aerobic denitrifying bacterial strain was selected from the bottom sediment of the aquaculture pond, and the strain was identified by 16S rRNA sequencing and physiological and biochemical tests. Animal tests and antimicrobial susceptibility tests were conducted to examine the virulence and antibiotic resistance of the isolate. Environmental factors affecting the denitrification performance were optimized, and the immobilization technology was employed to improve its application. **[Results]** Strain WM27 was identified as *Klebsiella oxytoca*, which had high antibiotic sensitivity and good biosafety. With sodium succinate as the carbon source, strain WM27 had strong denitrification performance under the conditions of C/N=10, pH 7.0, and 25 °C, with the removal rates of TN, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N reaching more than 90%. The strain had good denitrification ability at 3‰, with the removal rates of TN, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N still more than 88%. The degradation effects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N for 48 h were 98.62%–99.46%, 98.26%–100%, and 98.34%–100%, respectively. **[Conclusion]** Strain WM27 is a salt-tolerant, safe, and efficient aerobic denitrifying bacterium, demonstrating a potential application value in the treatment of high-salt aquaculture tail water.

**Keywords:** *Klebsiella oxytoca*; aerobic denitrification; immobilization; treatment of aquaculture tail water; salt tolerance

随着水产养殖模式由传统的粗放式逐渐转变为现代的集约化和高密度式,产能显著提升,然而这一转变也导致了水体污染问题日益严重<sup>[1]</sup>。水体中氮元素因水生动物残饵和粪便的积累而严重超标,导致水环境富营养化,这已成为制约当前水产养殖业发展的难题<sup>[2]</sup>。因此,高效去除水中的氮是养殖水体污染治理的研究热点。

近年来,生物脱氮技术展现出了显著的效果,是环保且高效的技术手段。传统的脱氮过程依赖多种细菌的参与,而每种细菌具有不同的生化和生理需求,这增加了技术实施的复杂性<sup>[3]</sup>。异养硝化-好氧反硝化细菌可以在有氧环境下同时进行硝化与反硝化,具有繁殖迅速、可利用多种底物等优势。这些特点使其能够高效提升反应效率、降低成本,从而突破传统生物脱氮技术的局限性<sup>[4]</sup>。然而,高盐度的海水环境对于大多数好氧反硝化菌是一个巨大的挑战<sup>[5]</sup>。随着渗透压的增高,微生物生长与代谢能力被逐渐抑制<sup>[6]</sup>。因此,筛选和鉴定具有耐盐异养硝化-好氧反硝化细菌,对治理咸淡水和海水养殖尾水具有重要意义。

固定化微生物技术是一种生物强化技术,通过特定的固定化方法将具有催化活性的微生物限制在生物反应器的有限区域内<sup>[7]</sup>。常用固定化材料有无机载体如活性炭、SiO<sub>2</sub>等,天然高分子载体如海藻酸钠、琼脂等,以及人工合成聚合物载体如聚乙烯醇、聚丙烯酰胺等<sup>[8]</sup>。游离微生物在应用时易被水稀释流失,需大量投加微生物,造成浪费和增加成本<sup>[9]</sup>。相较于直接应用游离微生物,微生物固定化技术具有多种优势:为微生物提供物理屏障,增强水力耐受性<sup>[10]</sup>;维持高生物量,提升尾水降解效率;易与水分离,可重复利用便于控制和使用;同时固定化多种微生物等优点<sup>[11]</sup>。因此,微生物固定化技术在水产养殖尾水处理中得到广泛应用。

本研究从养殖池塘底泥中分离筛选出一株好氧反硝化菌株,探索其脱氮性能与脱氮特性,并评估固定化微生物对养殖尾水脱氮的效果,

以期脱氮菌种质资源库提供新的菌株,并为未来该菌株在实际生产中的开发利用提供理论依据和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

实验样品取自广东省佛山市三水区某加州鲈养殖池塘底泥。斑马鱼,广东省广州市某市场。实验经广东省农业科学院动物科学研究所(水产研究所)实验动物伦理委员会批准,批准号为GY2025001。

### 1.2 培养基

富集培养基与溴麝香草酚蓝(bromothymol blue, BTB)培养基按照付雨潼等<sup>[6]</sup>的方法配制。配制固体培养基时要在液体培养基的基础上加入15 g/L的琼脂。

氮源发酵培养基按照Huang等<sup>[12]</sup>的方法配制并进行了调整,设置为复合氮源。氮源发酵培养基(g/L):葡萄糖5.12, NH<sub>4</sub>Cl 0.1, NaNO<sub>3</sub> 0.05, NaNO<sub>2</sub> 0.05。

实际养殖尾水来自广东省农业科学院动物科学研究所罗非鱼养殖鱼塘,鱼塘内水体TN达到15 mg/L后取养殖水体进行灭菌处理。

### 1.3 主要试剂和仪器

通用型DNA小量提取试剂盒,广州迈宝生物科技有限公司; SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒、聚乙烯醇、海藻酸钠,生工生物工程(上海)股份有限公司; 2×Unique™ Taq Master Mix (With Dye)热稳定性聚合酶,天津诺禾致源生物科技有限公司。

扫描电镜,卡尔蔡司光学(中国)有限公司; 超微量微孔板分光光度计、梯度PCR仪,伯腾仪器有限公司; 电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司; 凝胶成像分析仪,北京市六一仪器厂; 振荡培养箱,上海旻泉仪器有限公司; 紫外分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司。

### 1.4 菌株的分离

取20 g底泥与钢珠一同放入生理盐水中,

30 °C、180 r/min 振荡 1 h 变成泥水混合液。取该混合液 20 mL 与 200 mL 的富集培养基混合, 培养 48 h, 取富集培养基梯度稀释( $10^{-4}$ – $10^{-7}$ ) 并取 100  $\mu$ L 不同梯度稀释液均匀涂布在 BTB 培养基上, 培养 24 h 后挑取蓝色菌落在 BTB 培养基上进一步纯化培养 24 h, 选取反硝化效果最明显的 1 株细菌命名为 WM27 并保存。

### 1.5 形态学分析及生理生化鉴定

将菌株 WM27 接种于固体富集培养基中, 30 °C 培养 24 h。观察菌落的形态并挑取单菌落进行革兰氏染色, 利用显微镜油镜(10×100)观察菌株的染色形态。通过扫描电镜(5 000×)对菌株 WM27 的形态进行观察并记录。生理生化试验参照文献[13–14]。

### 1.6 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树的构建

菌体 DNA 的提取参照 DNA 提取试剂盒说明书进行。使用 2×Unique™ Taq Master Mix (With Dye) 热稳定性聚合酶、细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3') 进行 16S rRNA 基因扩增。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): DNA (27 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu$ L, 正向引物 27F (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 反向引物 1492R (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 2×Unique™ Taq Master Mix (With Dye) 25  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 次循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。用琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果, 并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将所得测序结果上传至 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 获得登录号, 使用 MEGA 11.0 软件采用邻接法构建系统发育树<sup>[15]</sup>。

### 1.7 药敏测试

按照参考文献[16]进行药敏试验, 将菌株 WM27 活化后取 100  $\mu$ L 菌液均匀涂布在固体富集培养基上, 将药敏纸片轻置于平板中部。每种抗生素设置 3 组平行, 30 °C 培养 24 h 后取出,

使用游标卡尺测量并记录抑菌圈直径大小<sup>[17]</sup>。

### 1.8 安全性评估

选取体长为 (4.0±1.0 cm) 的健康斑马鱼 180 条, 随机平均分配到 20 L 养殖缸中, 设置实验组与空白组, 每组 3 个平行。将菌株 WM27 接种在发酵培养基, 30 °C、180 r/min 培养 18 h 后制备成悬浊液, 根据生长曲线调节悬浊液浓度, 使实验组水体菌液浓度维持在  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 空白组添加等量的灭菌水。实验周期内每 3 d 换 1 次水并加入菌液, 实验共持续 15 d, 每天定时投喂, 统计斑马鱼存活情况<sup>[18]</sup>。

### 1.9 菌株脱氮条件优化

探究不同的环境因子(碳源、C/N、pH、温度)对菌株 WM27 的生长和脱氮能力的影响。分别设置葡萄糖(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)、柠檬酸钠(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>)、草酸钠(Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)、琥珀酸钠(C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)和乙酸钠(CH<sub>3</sub>COONa)为单一碳源; 设置 C/N 为 5、10、20、30、40; 设置温度梯度为 20、25、30、35 °C; 设置 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0。培养基为氮源发酵培养基、C/N 10、pH 7.0、转速 180 r/min 和温度 30 °C 为对照条件, 实验过程中控制单一变量。起始菌液浓度 OD<sub>600</sub> 为 1.0, 培养基体积 1% 的接种量, 实验持续 48 h, 分别于 0、6、12、24、48 h 取样, 测量 OD<sub>600</sub> 后 5 000 r/min 离心 5 min, 检测上层清液的各项指标。

### 1.10 菌株 WM27 对高盐度模拟尾水的耐受性

为探究菌株是否具备处理高盐度模拟尾水的能力, 采用氮源发酵培养基为基础配方制备人工尾水, 通过添加不同浓度氯化钠设置盐度为 0%、1%、3%、4% 和 5%。其他变量保持一致, 每组实验设置 3 个平行。起始菌液浓度 OD<sub>600</sub> 为 1.0, 培养基体积 1% 的接种量, 实验持续 48 h, 分别于 0、6、12、24、48 h 取样。测定模拟尾水中的 OD<sub>600</sub> 后 5 000 r/min 离心 5 min 取上清液检测氮源浓度, 验证菌株对高盐度模拟尾水的耐受性。

### 1.11 菌株的固定化与应用

使用聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)和海藻酸钠(sodium alginate, SA)固定菌株。将菌株在 30 °C、180 r/min 的条件下培养 16 h 并取 20 mL 制备为细菌悬浮液, 并与 80 mL 含有 PVA 和 SA 的灭菌基质混合搅拌, 制备成含菌基质(8% PVA; 5% SA; W/V)。将含菌基质滴入质量分数为 3% 的氯化钙饱和硼酸溶液中交联固化成珠子, 固定后冲洗, 同时制备不含微生物的珠子作为对照<sup>[19]</sup>。

将上述固定化微生物珠接种到复合氮源发酵培养基中, 30 °C、180 r/min 处理。半连续实验设为 3 个重复周期实验, 每个周期处理培养 48 h, 分别在 0、6、12、24、48 h 取样, 测定  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的含量, 3 组循环实验累计持续进行 6 d。

将固定化微生物珠接种到水产养殖实际尾水中, 水产养殖尾水取自广东省农业科学院水产研究所水产养殖尾水暂存池, 经过 121 °C 高温灭菌 20 min。每组尾水投加 1% 的固定化微生物珠并培养 48 h, 分别在 0、6、12、24、48 h 取样, 测定总氮(total nitrogen, TN)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的含量。

### 1.12 检测及分析方法

检测方法: 氨氮( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )采用纳氏试剂分光光度法(HJ 535—2009)<sup>[20]</sup>检测, 亚硝酸盐氮( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )采用分光光度法(GB 7493—87)<sup>[21]</sup>测定, 硝酸盐氮( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )采用紫外分光光度法(HJ/T 346—2007)<sup>[22]</sup>测定, TN 采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(HJ 636—2012)<sup>[23]</sup>检测。去除率的计算公式如下:

$$\eta(\%) = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100$$

其中  $C_0$  表示 0 h 的氮源浓度(mg/L),  $C_1$  表示培养后某时间相应的氮源浓度(mg/L)。

分析方法: 本研究数据均为 3 组重复的均值±标准差。采用 GraphPad Prism 10.0 软件和 Origin 2021 软件进行数据分析和图表绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株形态、生理生化及 16S rRNA 基因序列分析鉴定结果

菌株 WM27 菌落在固体富集培养基上呈圆形, 颜色为有光泽的淡黄色, 表面光滑边缘整齐平滑(图 1A); 经革兰氏染色为红色(图 1B), 表明菌株 WM27 为革兰氏阴性菌; 电镜下菌株 WM27 呈短杆状(图 1C、1D)。根据参考文献[13-14]并对照已发表菌株克雷伯氏菌(*Klebsiella*) sp. Y5<sup>[24]</sup>对菌株 WM27 进行生理生化鉴定, 初步鉴定为克雷伯氏菌属(表 1)。对菌株 WM27 测序并将得到的 16S rRNA 基因序列上传至 GenBank 数据库(登录号为 OR438297)。通过构建系统发育树发现菌株 WM27 与克雷伯氏菌属的产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)亲缘关系最近, 并在同一个分支上, 相似性高达 99.93% (图 2)。可判断菌株 WM27 是产酸克雷伯氏菌, 并将该菌命名为 *Klebsiella oxytoca* WM27。

### 2.2 药敏测试及安全性评估

通过药敏测试观察到菌株 WM27 对 10 种常用抗生素中的氯霉素、四环素、庆大霉素、头孢曲松、头孢他啶、复方新诺明、环丙沙星、诺氟沙星这些常见药品表现为敏感, 对链霉素、红霉素呈现中介状态(图 3, 表 2), 并且在生物安全性评价中斑马鱼成活率为 100% (图 4), 表明菌株 WM27 的环境安全性较高。

### 2.3 最适脱氮条件的筛选优化

#### 2.3.1 不同碳源对菌株 WM27 脱氮效果的影响

当以琥珀酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、葡萄糖为碳源时, 48 h 内的 TN 去除率分别为 94.78%、93.93%、92.50% 和 87.16%, 证明菌株可以利用多种碳源生长。在琥珀酸钠中 TN、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的去除效率分别达到了 97.34%、97.80% 和 98.91%, 在利用琥珀酸钠时生长性能与脱氮效率最高, 表明菌株 WM27 的最佳培养碳源为琥珀酸钠(图 5A)。

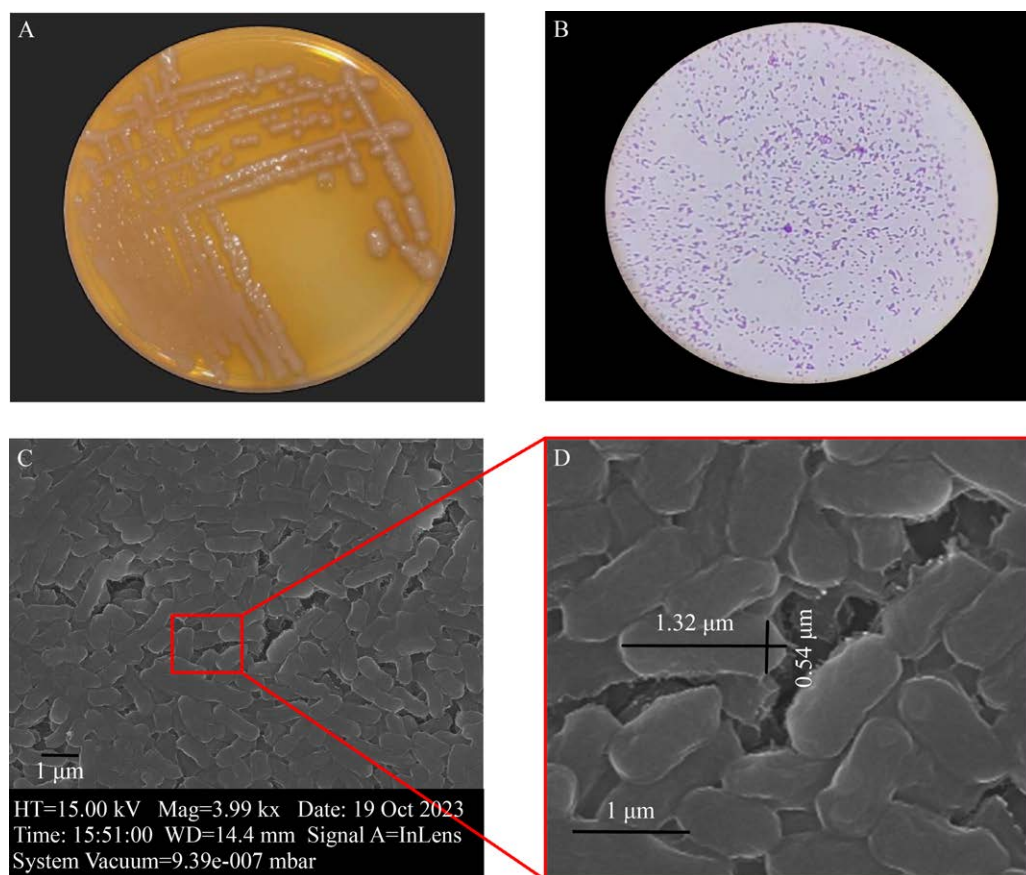


图 1 菌株 WM27 的形态鉴定结果 A: 菌株 WM27 的外观形态; B: 菌株 WM27 的革兰氏染色; C: 菌株 WM27 的电镜扫描结果; D: 菌株 WM27 的电镜扫描局部放大图。

Figure 1 Phylogenetic tree construction and morphological identification. A: Appearance and morphology of strain WM27; B: Gram staining of strain WM27; C: Electron microscope scanning of strain WM27; D: Partial magnification of electron microscope scanning of strain WM27.

表 1 菌株 WM27 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain WM27

| Physiological and biochemical index | <i>Klebsiella</i> sp. Y5 <sup>[24]</sup> | <i>Klebsiella oxytoca</i> WM27 |
|-------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|
| Ornithine decarboxylase             | –                                        | –                              |
| Lysine decarboxylase                | +                                        | +                              |
| Glucose utilization                 | –                                        | +                              |
| Cellobiose utilization              | +                                        | +                              |
| Sorbitol utilization                | +                                        | +                              |
| Rhamnose utilization                | +                                        | +                              |
| Xylose utilization                  | +                                        | +                              |
| Sucrose utilization                 | +                                        | +                              |
| Arabinose utilization               | +                                        | +                              |

+: Positive reaction; –: Negative reaction.

### 2.3.2 不同 C/N 对菌株 WM27 脱氮效果的影响

随着 C/N 不断增加, 生长性能( $OD_{600}$ )逐渐升高, 但是当 C/N 达到 10 以上后, 反硝化性能就不会有较大的变化并且当 C/N=10 时, 菌株去除 TN 效果最好, 去除率为 98.66%。菌株 WM27 的最适 C/N=10 (图 5B)。

### 2.3.3 不同 pH 对菌株 WM27 脱氮效果的影响

菌株 WM27 在 pH 6.0–8.0 时均能保持正常生长与代谢, 当 pH 7.0 时, 生长性能( $OD_{600}$ )最佳,  $NH_4^+-N$ 、 $NO_2^- -N$  和  $NO_3^- -N$  的去除率分别为 88.71%、99.51%和 90.02% (图 5C)。

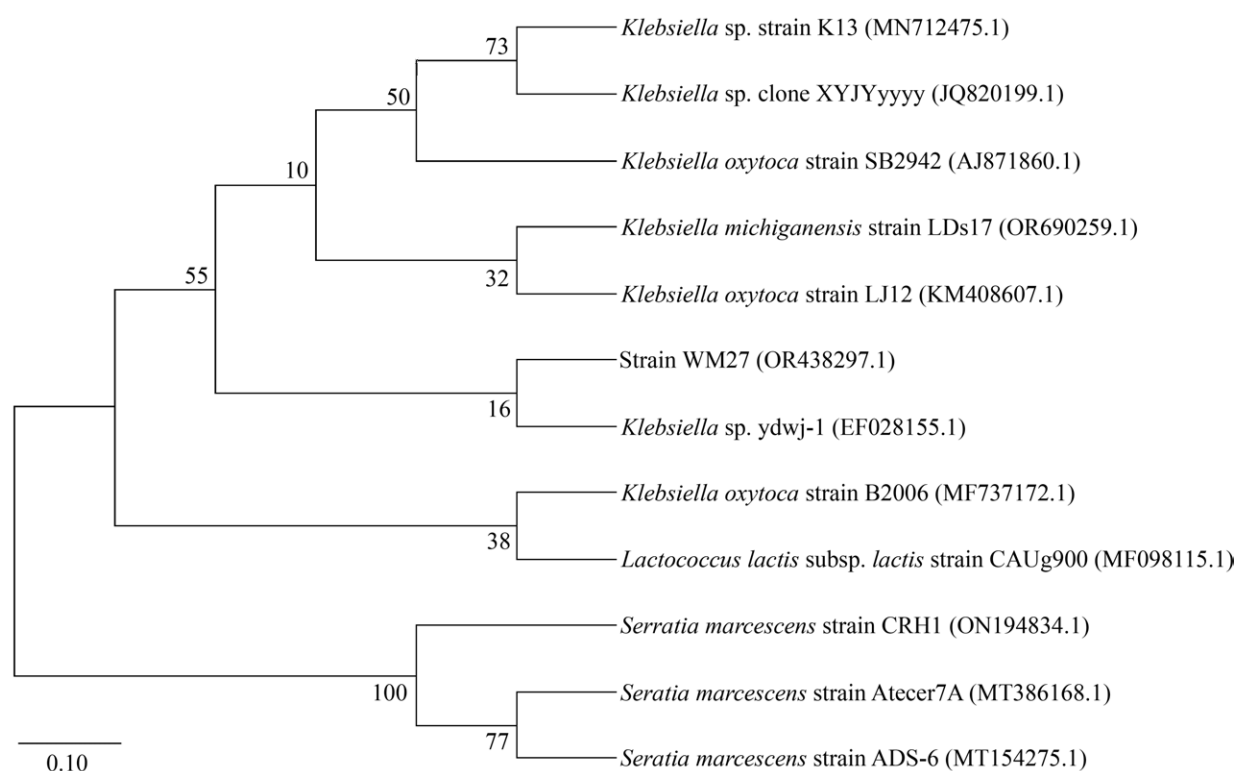


图2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 WM27 的系统发育树 节点处的数字代表树的自举值(目标分支在所有自举样本中重复出现的百分比); 括号内的数字为 GenBank 登录号; 标尺 0.10: 序列差异度。

Figure 2 Constructed a phylogenetic tree of strain WM27 based on 16S rRNA gene sequence. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap; The number in the parentheses are the GenBank accession number; Bar 0.10: Sequence divergence.

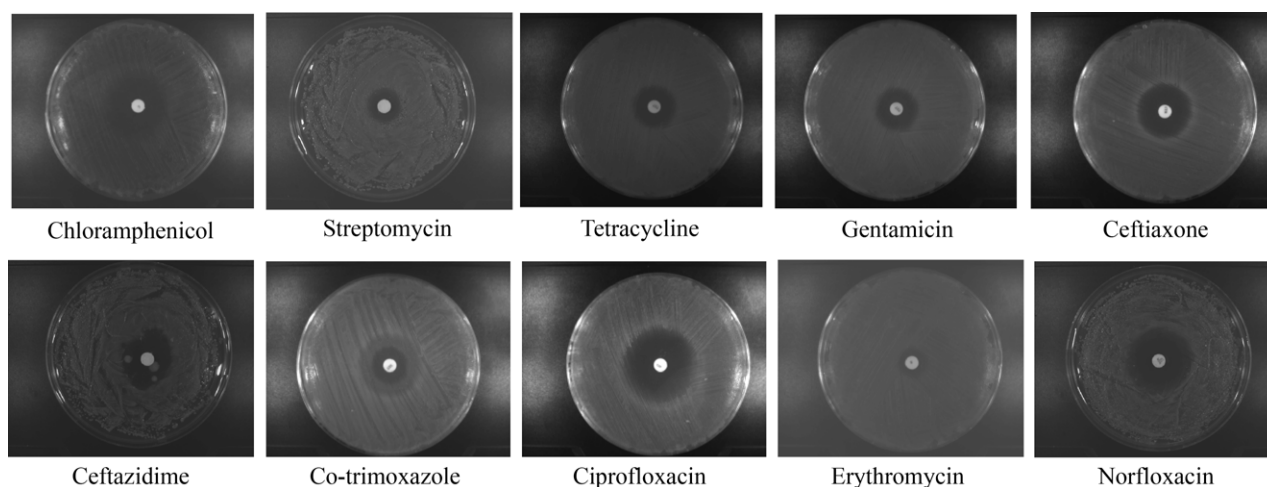


图3 菌株 WM27 的药敏测试

Figure 3 Drug susceptibility test of strain WM27.



表 2 菌株 WM27 对不同药品的耐药性结果

Table 2 Resistance results of strain WM27 to different drugs

| Drug            | Size of inhibition ring (mm) | Sensitive level |
|-----------------|------------------------------|-----------------|
| Chloramphenicol | 29.3±2.3                     | S               |
| Tetracycline    | 23.2±2.1                     | S               |
| Gentamicin      | 23.5±1.5                     | S               |
| Ceftriaxone     | 26.5±0.9                     | S               |
| Streptomycin    | 13.5±1.1                     | I               |
| Ceftazidime     | 24.6±2.2                     | S               |
| Co-trimoxazole  | 23.9±2.8                     | S               |
| Ciprofloxacin   | 34.7±1.2                     | S               |
| Erythromycin    | 12.3±0.7                     | I               |
| Norfloxacin     | 32.4±1.6                     | S               |

R: Resistance; I: Intermediary; S: Sensitivity.

### 2.3.4 不同温度对菌株 WM27 脱氮效果的影响

当温度从 20 °C 提升至 35 °C 时, 其生长性能和对 TN、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 去除率呈先升后降的趋势, 而在 35 °C 时, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除率最低。在 25 °C 时 OD<sub>600</sub> 达到最大, TN、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除率分别为 89.11%、94.18%、97.42% 和 89.52% (图 5D)。

### 2.4 菌株 WM27 对高盐度模拟废水的耐受性结果

在盐度为 0 时 TN、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 从 60、20、20、20 mg/L 降低到

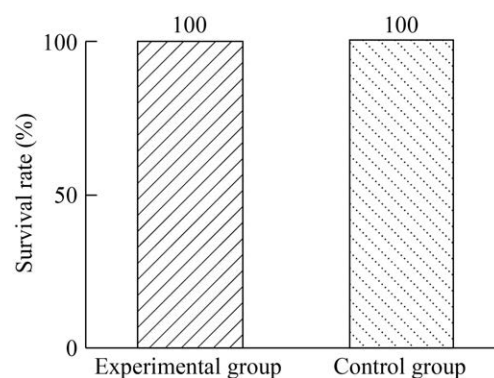


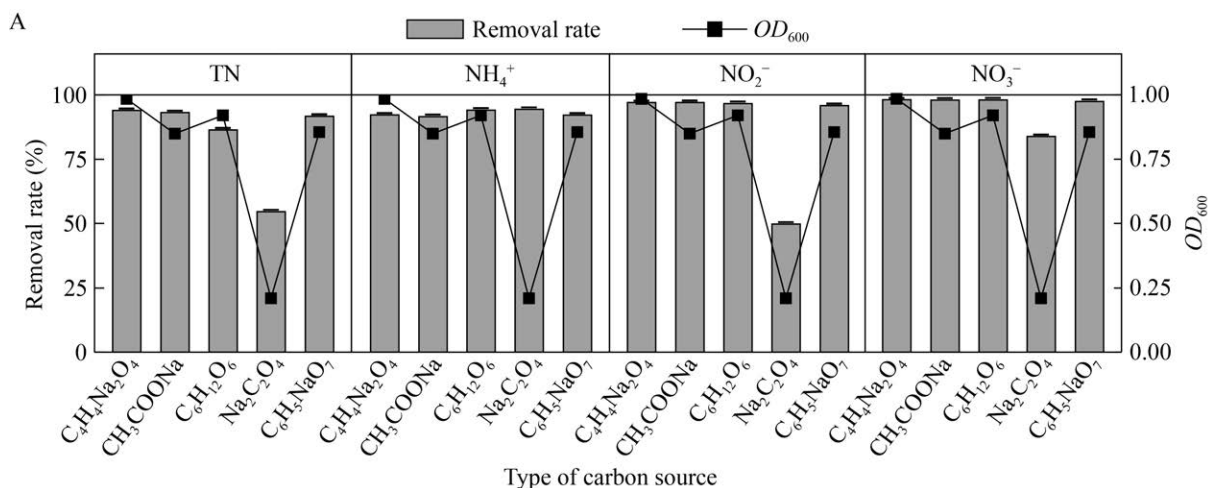
图 4 菌株 WM27 浸泡处理后斑马鱼存活率

Figure 4 Survival rate of zebrafish soaked with strain WM27.

(6.302±0.206)、(0.349±0.032)、(0.136±0.004)、(0.070±0.002) mg/L, 当盐度在 3% 时, TN、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除率仍有 88.12%、93.63%、96.45% 和 93.85%, 仍能表现出较强的脱氮能力。当盐度为 5% 时 TN、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 只能降低到 (52.279±1.795)、(8.644±0.871)、(6.491±0.112)、(6.316±0.205) mg/L, 证明随着盐度的增加, 菌株的生长性能与脱氮性能不断下降(图 6)。

### 2.5 固定化与应用结果

本研究探讨了菌株 WM27 在固定化培养体系中对养殖尾水中无机氮去除效果的影响。将菌株 WM27 制备成固定化小球作为实验组, 将不含微生物的空白小球作为对照组。实验共设





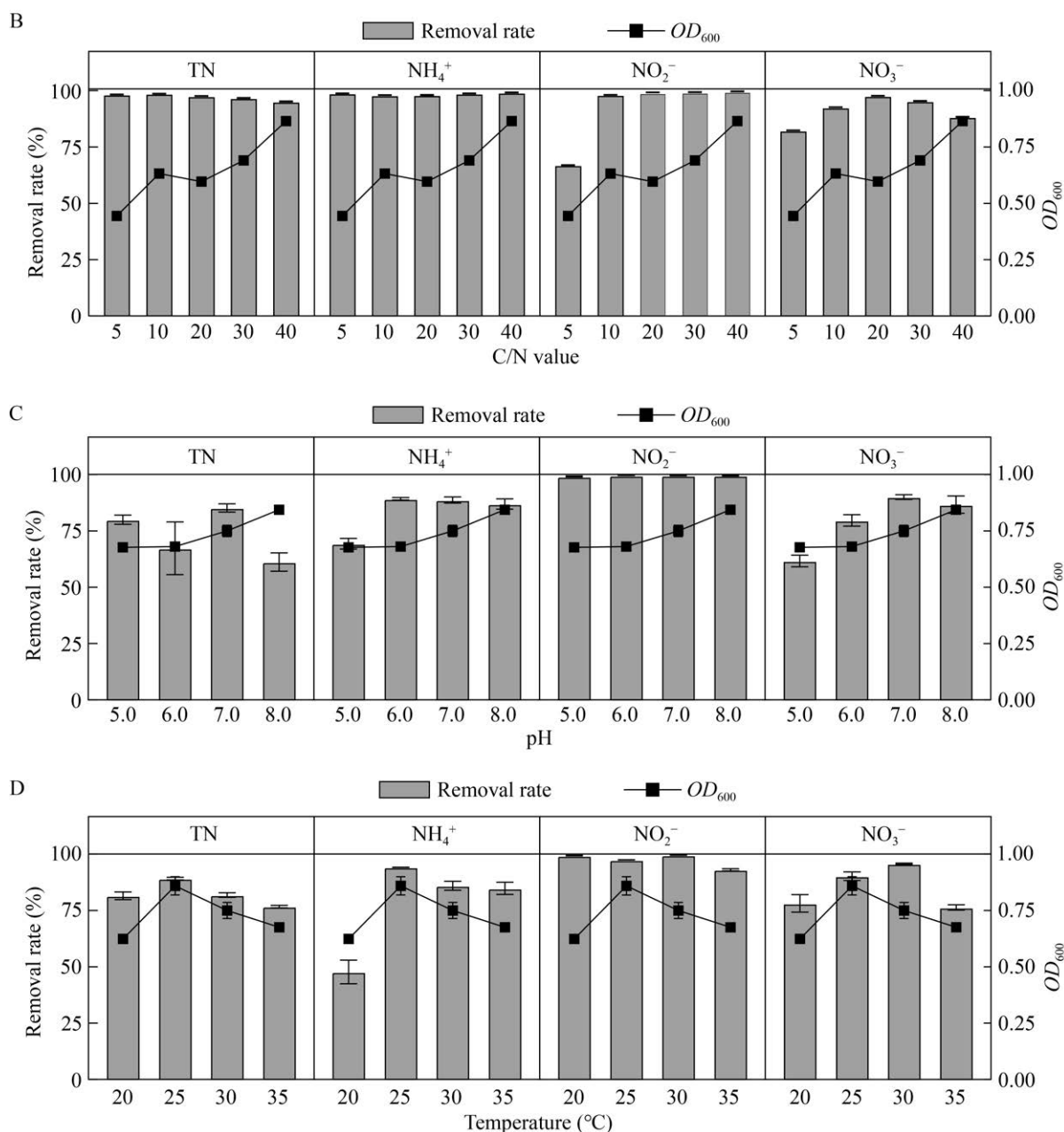


图5 环境因子对菌株 WM27 生长和脱氮性能的影响 A: 碳源; B: C/N; C: pH; D: 温度。

Figure 5 Effects of environmental factors on the growth and nitrogen removal performance of strain WM27. A: Carbon sources; B: C/N; C: pH; D: Temperatures.

置 3 个循环, 每个循环处理 48 h, 并在 0 h 开始每隔 12 h 测定 1 次水体中的 3 种无机氮元素。结果如图 7 所示, 其中 A、B、C 图为 3 次循环实验中固定化小球分别对 3 种无机氮的降解效果。在 48 h 内, 第 1 次循环实验中  $NH_4^+$ -N、

$NO_3^-$ -N、 $NO_2^-$ -N 的降解率分别为 98.93%、100% 和 100%; 第 2 次循环中分别为 99.46%、98.49% 和 98.34%; 第 3 次循环中分别为 98.69%、98.26% 和 98.56%。实验结果表明, 固定化小球在 3 次循环实验中对无机氮元素表现出高效的

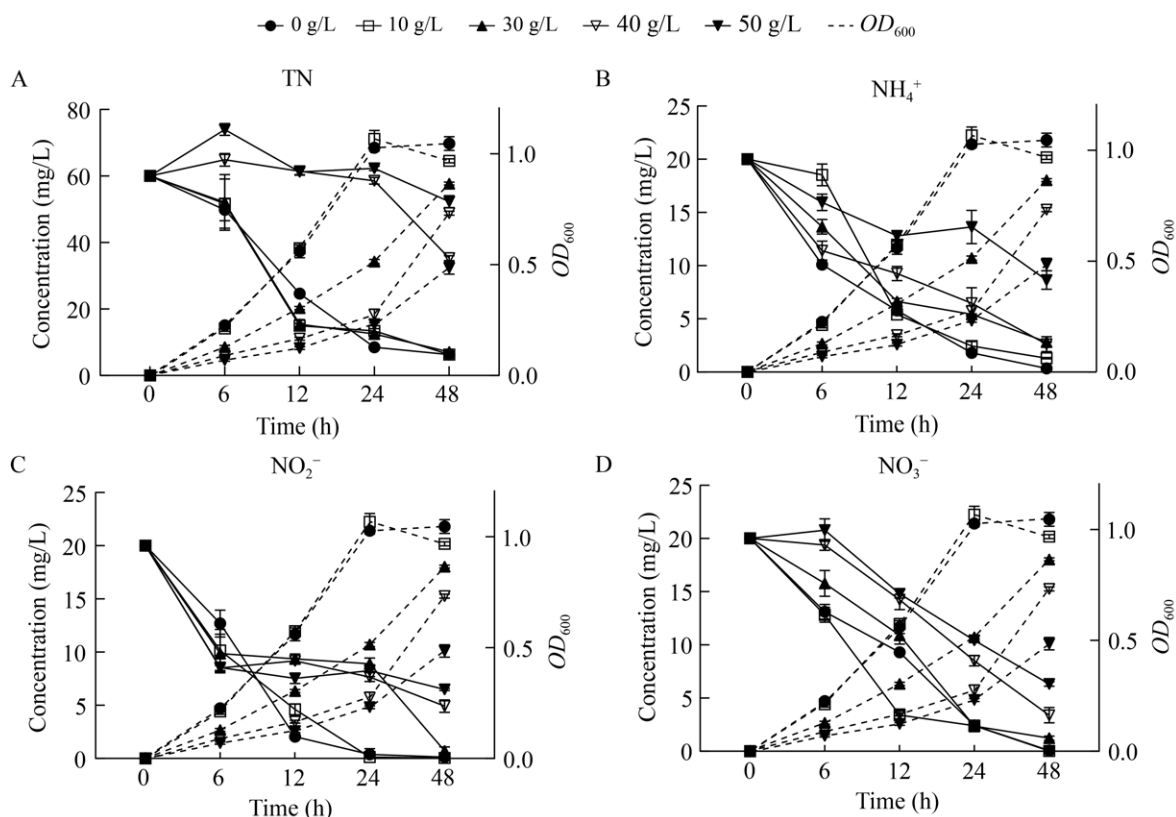


图 6 盐度对菌株 WM27 脱氮性能的影响

Figure 6 The effect of different temperatures on nitrogen removal efficiency of strain WM27. A: TN; B:  $\text{NH}_4^+$ ; C:  $\text{NO}_2^-$ ; D:  $\text{NO}_3^-$ .

去除效果, 固定化小球处理系统具有良好的稳定性和重复使用的潜力。

固定化 WM27 对养殖尾水的脱氮处理结果如图 8 所示, TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度明显持续下降。到第 48 h, TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的浓度分别为  $(4.385 \pm 0.127)$ 、 $(1.105 \pm 0.027)$ 、 $(1.754 \pm 0.103)$ 、 $(1.527 \pm 0.052)$  mg/L, 去除率分别为 77.04%、74.73%、71.28% 和 55.78%。

### 3 讨论

本研究通过形态学、生理生化指标及 16S rRNA 基因序列测定等方法, 将前期从养殖池塘中分离出来的菌株 WM27 鉴定为产酸克雷伯氏菌, 并将其命名为 *Klebsiella oxytoca* WM27。菌株被应用于生态环保及污染控制前, 必须对

其进行环境安全评价<sup>[25]</sup>。药物敏感性测试结果显示, 该菌株对常用药物未表现出显著的耐药性, 并且在斑马鱼生物安全性实验中存活率达到 100%, 表明 *Klebsiella oxytoca* WM27 具有良好的生物安全性。

#### 3.1 不同环境条件对菌株 WM27 脱氮性能的影响

好氧反硝化细菌在水产养殖尾水脱氮中发挥着关键作用, 细菌的活性会受到温度、碳源、pH 值和 C/N 比等多种环境因素的影响<sup>[26]</sup>。研究发现一些特定的菌株具有较强的环境适应能力, 可以在广泛的 C/N 比、pH 和温度条件下保持良好的生长性能与脱氮效果, 在水体净化中具有较强的应用潜力<sup>[27]</sup>。因此, 通过筛选和优化这些菌株的应用条件, 可以有效提升好氧反硝化细菌的脱氮效率。在本研究中, *Klebsiella oxytoca*

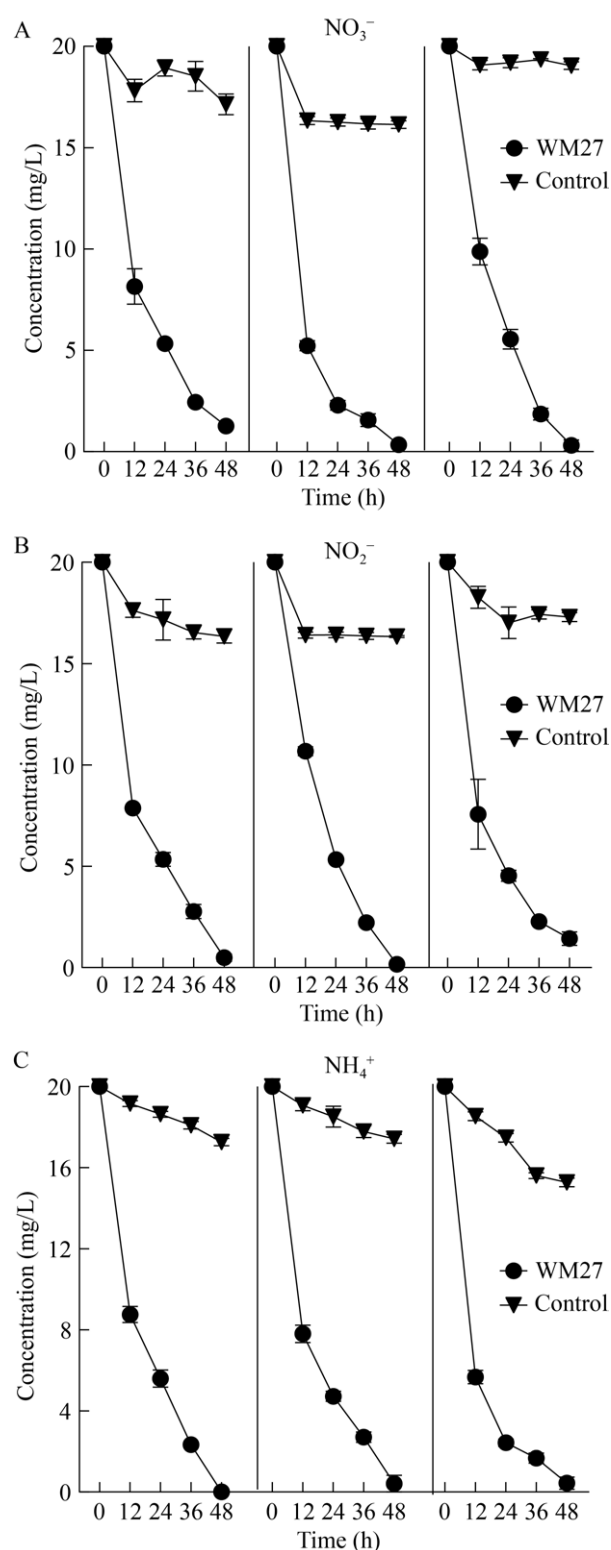


图7 菌株 WM27 半连续实验

Figure 7 Semi-continuous treatment strains WM27. A:  $\text{NO}_3^-$ -N; B:  $\text{NO}_2^-$ -N; C:  $\text{NH}_4^+$ -N.

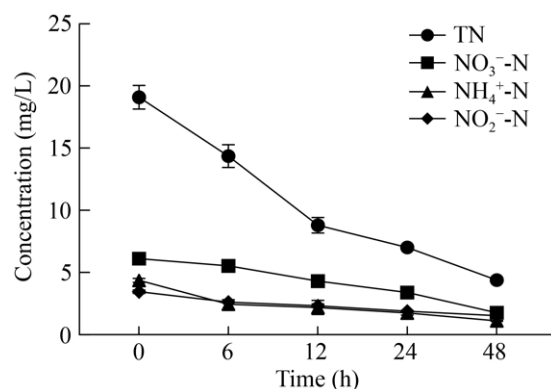


图8 固定化菌株 WM27 对实际海水养殖废水中 TN、 $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NO}_2^-$ -N 的去除

Figure 8 Removal of TN,  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{NO}_2^-$ -N from the actual mariculture wastewater by immobilized strain WM27.

WM27 可利用琥珀酸钠、葡萄糖等多种碳源，但在利用琥珀酸钠时生长性能与脱氮效率最高，该结果与李艳丽等<sup>[19]</sup>对 *Burkholderia* sp. ZH8 的研究结果一致。而造成这种情况的原因可能是由于琥珀酸钠的分子量较小，更有利于好氧反硝化细菌的吸收<sup>[28]</sup>。增加电子供体可促进好氧反硝化过程，这些电子供体通常由内部碳源和外部的有机碳源提供<sup>[24]</sup>，因此 C/N 是影响脱氮效率的重要影响因素。在不同的 C/N 实验中，随着 C/N 的不断提高，菌株 WM27 的生长量虽然有显著提高，但氨氮去除效果在 C/N 为 20 时达到顶峰。这与 Kim 等<sup>[29]</sup>的研究结果类似。

pH 值不仅能够调节细胞内部酶的催化活性，还能动态地调控溶液中的各种化学物质浓度。这种调控机制使得菌株在特定的 pH 条件下展现出最佳的脱氮性能。当溶液的 pH 接近 7.0 时，*Klebsiella oxytoca* WM27 表现出最高效的氮去除能力，这一现象与 Li 等<sup>[30]</sup>的研究成果相吻合。温度是影响菌株活性的重要环境因素之一，低温会延缓反硝化关键酶基因的表达抑制酶活性，减缓微生物生长并破坏细菌细胞膜，增加细胞死亡率，导致反硝化作用显著降低<sup>[31]</sup>。Ji 等<sup>[32]</sup>发现大多数好氧反硝化菌株的最适生长

温度范围为 25–37 °C。菌株 WM27 在 25 °C 时的综合脱氮效率最高, 该结果与 Ji 等的结果一致。

本研究发现菌株 WM27 的适宜生长和脱氮条件为 C/N=10、pH 7.0、温度 25 °C, 这些结果与 Song 等<sup>[33]</sup>发现大多数好氧反硝化菌在 C/N 为 5–10、pH 7.0–8.0、温度 25–37 °C 的条件下工作的结果类似, 证明了该菌株具有在广东沿海地区应用于养殖尾水脱氮工程的潜力。

### 3.2 菌株 WM27 对高盐度模拟废水的耐受性

研究表明, 当盐度超过 3% 会显著降低微生物的生长和去除  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的能力<sup>[34]</sup>。高盐度会影响化合物在培养基和细胞间的运输并导致细胞脱水和裂解、改变微生物代谢过程以及直接影响氨氧化速率<sup>[11]</sup>。本文的研究中, 菌株 WM27 可以在 0–5% 的盐度中生长, 而盐度大于 3% 后, 尽管菌株 WM27 去除 TN 与  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的性能降低, 但仍能有效去除  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的仍有一定去除能力。 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  在盐度 3%、4%、5% 的去除率分别为 96.45%、75.40%、67.54%,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  在盐度 3%、4%、5% 的去除率分别为 93.85%、83.03%、68.42%。该实验结果与 Shu 等<sup>[35]</sup>对门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*) A4 的研究结果类似, 说明该菌株可在咸淡水及低盐度海水养殖尾水治理中具有潜在的应用价值。

### 3.3 菌株固定化应用前景

固定化技术和固定化微生物在养殖尾水处理领域的应用已受到广泛关注<sup>[36]</sup>。其中, 利用 SA 制备的固定化珠子在保护微生物免受水体中其他微生物的捕食和竞争方面展现出显著优势<sup>[37]</sup>。这种保护机制确保了固定化微生物的稳定性和活性, 从而提高了菌株在尾水处理中的脱氮效率<sup>[38]</sup>。关于固定化小球的制作, PVA 和 SA 的浓度配比是关键因素之一。不同的配比会对固定化颗粒的脱氮性能及内部结构产生显著影响<sup>[39]</sup>。通过优化 PVA 和 SA 的浓度配比, 可以制作出具有良好脱氮效果和内部结构的固定化颗粒, 从而提高尾水处理的效率<sup>[40]</sup>。本研究

采用 8% PVA 与 5% SA 混合后在 3%  $\text{CaCl}_2$  中进行交联 1 h 的方法对菌株进行固定化。实验结果表现出了高效且稳定的无机氮元素去除效果。这种固定化方法不仅提高了微生物的脱氮效率, 还增强了其在实际应用中的稳定性和持久性。经过固定化菌株 WM27 的脱氮处理后, 实际养殖尾水中 TN 的浓度由 13.932 8 mg/L 降至 4.385 mg/L, 达到《广东省水产养殖尾水排放标准》(DB 44/2462—2024)<sup>[41]</sup>中的二级标准 (5 mg/L)。此外, Tang 等<sup>[42]</sup>发现, 将氧化石墨烯分散到 PVA-SA 凝胶珠中可以提高在低温 (6–8 °C) 条件下荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) Z03 的脱氮效率。因此, 固定化技术和固定化微生物在养殖尾水处理中具有巨大的应用潜力。通过进一步优化固定化条件和方法, 可以开发出更加高效、环保的尾水处理技术, 为养殖业的可持续发展提供有力支持。

## 4 结论

本研究从佛山市三水区加州鲈养殖池塘中筛选鉴定出 1 株安全性较高的耐盐好氧反硝化细菌 *Klebsiella oxytoca* WM27; 在碳源是琥珀酸钠、C/N=10、pH=7.0、温度在 25 °C 的条件下, 菌株 WM27 具有最强的脱氮性能; 菌株在较宽的盐度范围内 (0%–3%) 具有良好的脱氮性能, 当盐度在 3% 时, TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的去除率仍有 88.12%、93.63%、96.45% 和 93.85%。利用 PVA-SA 固定的 *Klebsiella oxytoca* WM27 在固定化半连续培养实验中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  去除率均可达到 100%, 在实际尾水中去除率达到 68.52%, 展现了其在固定化条件下的持续高效脱氮性能。综上所述, 产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) WM27 具有应用于养殖尾水脱氮工程的潜力。

### 作者贡献声明

许敬轩: 实验实施、数据收集与分析、稿件撰写与修改; 尹鹏: 稿件润色修改; 刘凤坤:

实验实施；郑雅之：数据收集与分析；孙慧明：实验实施、数据收集与分析；鲁慧杰：指导实验设计、审查与编辑；阮灼豪：监督指导数据分析；郭慧：文章选题；朱喜锋：前期调查；戴睿智、廖劲松：获取基金，提供资源；代洁玉：部分数据整理与分析；黄文：实验方案设计、经费支持、监督指导。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明绝无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。

## REFERENCES

- [1] 唐俊逸, 邓炜华, 罗育池, 蒋婧媛. 广东省海水养殖污染负荷估算及污染防治对策研究[J]. 海洋环境科学, 2023, 42(1): 97-103.  
TANG JY, DENG WH, LUO YC, JIANG JY. A study on pollution load estimation and pollution prevention countermeasures of mariculture in Guangdong province[J]. Marine Environmental Science, 2023, 42(1): 97-103 (in Chinese).
- [2] YUN L, YU ZH, LI YY, LUO P, JIANG X, TIAN YS, DING XQ. Ammonia nitrogen and nitrite removal by a heterotrophic *Sphingomonas* sp. strain LPN080 and its potential application in aquaculture[J]. Aquaculture, 2019, 500: 477-484.
- [3] DENG M, ZHAO XL, SENBATI Y, SONG K, HE XG. Nitrogen removal by heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas* sp. DM02: Removal performance, mechanism and immobilized application for real aquaculture wastewater treatment[J]. Bioresource Technology, 2021, 322: 124555.
- [4] SHAO Y, ZHONG H, MAO X, ZHANG H. Biochar-immobilized *Sphingomonas* sp. and *Acinetobacter* sp. isolates to enhance nutrient removal: potential application in crab aquaculture[J]. Aquaculture Environment Interactions, 2020, 12: 251-262.
- [5] HE XL, SUN Q, XU TY, DAI M, WEI DS. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel halotolerant bacterium *Pseudomonas mendocina* TJPU04[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, 42(5): 853-866.
- [6] 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).
- [7] COVARRUBIAS SA, DE-BASHAN LE, MORENO M, BASHAN Y. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2669-2680.
- [8] YU X, SHI JJ, KHAN A, YUN H, ZHANG PY, ZHANG P, KAKADE A, TIAN YR, PEI YX, JIANG YM, HUANG HY, WU KJ, LI XK. Immobilized-microbial bioaugmentation protects aerobic denitrification from heavy metal shock in an activated-sludge reactor[J]. Bioresource Technology, 2020, 307: 123185.
- [9] MEHROTRA T, DEV S, BANERJEE A, CHATTERJEE A, SINGH R, AGGARWAL S. Use of immobilized bacteria for environmental bioremediation: a review[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021, 9(5): 105920.
- [10] WANG J, FAN YC, CHEN YP. Nitrogen removal performance and characteristics of gel beads immobilized anammox bacteria under different PVA: SA ratios[J]. Water Environment Research, 2021, 93(9): 1627-1639.
- [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] HUANG TL, GUO L, ZHANG HH, SU JF, WEN G, ZHANG K. Nitrogen-removal efficiency of a novel aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri* strain ZF31, isolated from a drinking-water reservoir[J]. Bioresource Technology, 2015, 196: 209-216.
- [13] 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.  
DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [14] BERGEY DH, WHITMAN WB, GOODFELLOW M, KÄMPFER P, BUSSE H. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 5, The Actinobacteria[M]. 2nd ed. New York: Springer, 2012.
- [15] SHU H, SUN HM, HUANG W, ZHAO Y, MA YH, CHEN W, SUN YP, CHEN XY, ZHONG P, YANG HR, WU XP, HUANG MW, LIAO ST. Nitrogen removal characteristics and potential application of the heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria *Pseudomonas mendocina* S16 and *Enterobacter cloacae* DS'5 isolated from aquaculture wastewater ponds[J]. Bioresource Technology, 2022, 345: 126541.
- [16] 中华人民共和国上海出入境检验检疫局. 动物及其制品中细菌耐药性的测定 纸片扩散法: SN/T 1944—2007[S]. 行业标准-商品检验, 2007.  
Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of P.R.C. Detection of antimicrobial resistance of the bacteria in animal and animal products-Disk diffusion testing: SN/T 1944—2007[S]. Industry Standard-Product Inspection, 2007 (in Chinese).
- [17] 赵洋, 孙慧明, 林浩澎, 罗娉婷, 朱雅婷, 陈琼华,

- 舒琥. 一株安全高效的好氧反硝化菌 *Pseudomonas stutzeri* DZ11 的生物安全性及脱氮性能研究[J]. 生物技术通报, 2022, 38(10): 226-234.
- ZHAO Y, SUN HM, LIN HP, LUO PT, ZHU YT, CHEN QH, SHU H. Biosafety and nitrogen removal performance of a safe and efficient aerobic denitrifying *Pseudomonas stutzeri* DZ11[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(10): 226-234 (in Chinese).
- [18] DOU L, CHEN WB, PAN LQ, HUANG F. Characterization of *Vibrio* sp. strain AB15 and strain NB14 from the biofloc of shrimp culture ponds capable of high ammonia and nitrite removal efficiency[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2021, 52(4): 843-858.
- [19] 李艳丽, 杨垒, 张志昊, 李玉彩, 孟红艳, 任勇翔. 好氧反硝化细菌 *Burkholderia* sp. ZH8 的脱氮特性与生物强化作用[J]. 中国环境科学, 2024, 44(8): 4282-4291.
- LI YL, YANG L, ZHANG ZH, LI YC, MENG HY, REN YX. Nitrogen removal characteristics and bioenhancement effects of aerobic denitrifying bacteria *Burkholderia* sp. ZH8[J]. China Environmental Science, 2024, 44(8): 4282-4291 (in Chinese).
- [20] 王有志. 水质分析技术[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2018: 133-148.
- WANG YZ. Water Quality Analysis Technology[M]. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2018: 133-148 (in Chinese).
- [21] 国家环保总局. 水质-亚硝酸盐氮的测定-分光光度法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1987: 149-153.
- State Environmental Protection Administration. Water Quality-Determination of Nitrogen (Nitrate) Spectrophotometric Method[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1987: 149-153 (in Chinese).
- [22] 国家环保总局. 水质-硝酸盐氮的测定-紫外分光光度法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007: 1-16.
- State Environmental Protection Administration. Water Quality-Determination of Nitrate Nitrogen-Ultraviolet Spectrophotometry[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2007: 1-16 (in Chinese).
- [23] 刘凤坤, 赵吉臣, 许敬轩, 郑雅之, 鲁慧杰, 孙育平, 阮灼豪, 郭慧, 杨俊贤, 黄文. 耐盐好氧反硝化菌黏质沙雷氏菌 HL4 的分离鉴定及脱氮性能[J]. 广东海洋大学学报, 2024, 44(4): 38-46.
- LIU FK, ZHAO JC, XU JX, ZHENG YZ, LU HJ, SUN YP, RUAN ZH, GUO H, YANG JX, HUANG W. Characterization and nitrogen removal performance of a salt-tolerant aerobic denitrifying bacterium *Serratia marcescens* HL4[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2024, 44(4): 38-46 (in Chinese).
- [24] 任丽芳, 巩有奎, 孙洪伟. 碳氮比对 AOA-SBR 同步脱氮除磷性能及  $N_2O$  释放的影响[J]. 环境工程, 2024, 42(5): 1-9.
- REN LF, GONG YK, SUN HW. Characteristics of denitrifying phosphorus removal and  $N_2O$  emission of an Aoa-sbr under different carbon to nitrogen ratios (C/N)[J]. Environmental Engineering, 2024, 42(5): 1-9 (in Chinese).
- [25] 国家环境保护总局. 环保用微生物菌剂环境安全评价导则: HJ/T 415—2008[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2008.
- State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China. Guide of Safety-Assessment on Application of Microbial Blends in the Environmental Protection: HJ/T 415—2008[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2008 (in Chinese).
- [26] 冯亮, 袁春燕, 杨超, 皮珊珊, 马放, 杨基先, 李昂. 好氧反硝化生物脱氮技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3342-3354.
- FENG L, YUAN CY, YANG C, PI SS, MA F, YANG JX, LI A. Research progress in nitrogen removal by aerobic denitrification[J]. Microbiology China, 2020, 47(10): 3342-3354 (in Chinese).
- [27] 马咏琪, 台喜生, 王佳丽, 姜云鹏, 安亮嘉, 孙雨坤. 极端水质条件下异养硝化-好氧反硝化微生物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 743-757.
- MA YQ, TAI XS, WANG JL, JIANG YP, AN LJ, SUN LK. Research progress in heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria under extreme water quality conditions[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 743-757 (in Chinese).
- [28] CHEN AL, SU X, XING ZL, XU FQ, CHEN SJ, XIANG JX, LI J, LIU H, ZHAO TT. Effect mechanism of individual and combined salinity on the nitrogen removal yield of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria[J]. Environmental Research, 2022, 214: 113834.
- [29] KIM M, JEONG SY, YOON SJ, CHO SJ, KIM YH, KIM MJ, RYU EY, LEE SJ. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 106(5): 498-502.
- [30] LI B, LV R, XIAO Y, HU W, MAI YL, ZHANG JW, LIN L, HU XY. A novel nitrite-base aerobic denitrifying bacterium *Acinetobacter* sp. YT03 and its transcriptome analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2580.
- [31] WANG F, CUI Q, LIU WA, JIANG WQ, AI SS, LIU WQ, BIAN DJ. Synergistic denitrification mechanism of domesticated aerobic denitrifying bacteria in low-temperature municipal wastewater treatment[J]. NPJ Clean Water, 2024, 7: 6.
- [32] JI B, YANG K, ZHU L, JIANG Y, WANG HY, ZHOU J, ZHANG HN. Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2015, 20(4): 643-651.
- [33] SONG T, ZHANG XL, LI J, WU XY, FENG HX, DONG WY. A review of research progress of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification microorganisms (HNADMs)[J]. Science of The Total Environment, 2021, 801: 149319.
- [34] 董文迅, 李俊峰, 滕峪, 崔正国, 崔鸿武, 梁生康, 赵梦娟. 一株耐盐耐冷异养硝化-好氧反硝化菌的脱氮特性[J]. 环境科学与技术, 2023, 46(7): 1-7.
- DONG WX, LI JF, TENG Y, CUI ZG, CUI HW, LIANG SK, ZHAO MJ. Nitrogen removal characteristics of a salt-tolerant and cold-tolerant heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium WD0301[J]. Environmental Science & Technology, 2023, 46(7): 1-7 (in Chinese).
- [35] SHU H, MA YH, LU HJ, SUN HM, ZHAO JC, RUAN ZH, ZHOU JY, LIU YT, LIU FK, XU JX, ZHENG YZ, GUO H, CHEN QH, HUANG W. Simultaneous aerobic nitrogen and phosphate removal capability of novel

- salt-tolerant strain, *Pseudomonas mendocina* A4: Characterization, mechanism and application potential[J]. Bioresource Technology, 2024, 393: 130047.
- [36] LIU J, SU JF, ALI A, WANG Z, CHEN CL, XU L. Role of porous polymer carriers and iron-carbon bioreactor combined micro-electrolysis and biological denitrification in efficient removal of nitrate from wastewater under low carbon to nitrogen ratio[J]. Bioresource Technology, 2021, 321: 124447.
- [37] 程海娜, 储雪妍, 陈祝, 陈辉, 周洪波, 王玉光. 固定化异养硝化-好氧反硝化菌在污水生物强化中的研究进展[J]. 水处理技术, 2024, 50(3): 13-19.
- CHENG HN, CHU XY, CHEN Z, CHEN H, ZHOU HB, WANG YG. Research progress of wastewater treatment by immobilized heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria[J]. Technology of Water Treatment, 2024, 50(3): 13-19 (in Chinese).
- [38] LONG ZE, HUANG YH, CAI ZL, CONG W, OUYANG F. Immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by a PVA-boric acid method for ferrous sulphate oxidation[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(12): 2129-2133.
- [39] 廉哲, 胡安杨, 张毅, 叶林, 黎园. 聚乙烯醇/海藻酸钠互穿网络水凝胶结构与性能研究[J]. 高分子通报, 2014(2): 156-161.
- LIAN Z, HU AY, ZHANG Y, YE L, LI Y. Structure and property of polyvinyl alcohol/sodium alginate IPN hydrogel[J]. Polymer Bulletin, 2014(2): 156-161 (in Chinese).
- [40] XU XY, JIN ZX, WANG B, LV CP, HU BB, SHI DZ. Treatment of high-strength ammonium wastewater by polyvinyl alcohol-sodium alginate immobilization of activated sludge[J]. Process Biochemistry, 2017, 63: 214-220.
- [41] 广东省市场监督管理局, 广东省生态环境厅. 水产养殖尾水排放标准: DB44/2462—2024[S]. 广东省: 广东省生态环境厅: 1-5.
- Design specifications for hazard removal and reinforcement of reservoir earth-rock dams: DB44/2462—2024[S]. Guangdong Province: Guangdong Provincial Department of Ecology and Environment: 1-5 (in Chinese).
- [42] TANG MZ, JIANG J, LV QL, YANG B, ZHENG MN, GAO X, HAN JD, ZHANG YJ, YANG YW. Denitrification performance of *Pseudomonas fluorescens* Z03 immobilized by graphene oxide-modified polyvinyl-alcohol and sodium alginate gel beads at low temperature[J]. Royal Society Open Science, 2020, 7(3): 191542.