

研究报告

两株耐重金属普罗维登斯菌属异养硝化好氧反硝化菌的分离及脱氮特性

马咏琪, 张引弟, 管文平, 漆文瑞, 姜云鹏, 安亮嘉, 王佳丽, 孙丽坤*

甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070

马咏琪, 张引弟, 管文平, 漆文瑞, 姜云鹏, 安亮嘉, 王佳丽, 孙丽坤. 两株耐重金属普罗维登斯菌属异养硝化好氧反硝化菌的分离及脱氮特性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4485-4501.

MA Yongqi, ZHANG Yindi, GUAN Wenping, QI Wenrui, JIANG Yunpeng, AN Liangjia, WANG Jiali, SUN Likun. Isolation and nitrogen removal characteristics of two heavy metal-tolerant heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying strains of *Providencia*[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4485-4501.

摘要:【背景】近年来,随着畜禽养殖规模的扩大,产生大量富含重金属离子的养殖污水,导致传统脱氮技术受到限制,降低污水脱氮效率。【目的】从污水处理厂污水和污泥中分离筛选耐重金属异养硝化-好氧反硝化细菌,研究其脱氮效率。【方法】通过菌落和细胞形态特征观察、16S rRNA 基因序列鉴定菌种。分别以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 为唯一氮源考察菌株的硝化及反硝化性能,并考察在重金属(Cu、Zn、Cd、Cr、Pb)存在下菌株的氨氮去除能力。【结果】从污水和污泥中筛选出 2 株异养硝化-好氧反硝化菌 WS-A 和 WH-K,经鉴定为普罗维登斯菌属(*Providencia*)。菌株 WS-A、WH-K 均能在以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、 NaNO_2 为唯一氮源的培养基中生长,并且 48 h 内 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率为 84.93%和 84.48%,好氧反硝化作用 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的去除率分别为 82.5%和 86.7%, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 去除率分别为 93.60%和 93.84%。100 mg/L Zn^{2+} 胁迫下菌株 WS-A、WH-K 氨氮去除率达 80%以上,1 000 mg/L 的 Cu^{2+} 和 80 mg/L Cr^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 胁迫下菌株 WS-A、WH-K 氨氮去除率为 56%–77%。【结论】筛选出 2 株在 5 种重金属离子胁迫下仍表现良好脱氮性能的异养硝化好氧反硝化(heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying, HNAD)菌,初步探测了菌株的重金属耐受性,以便更好地为实际应用提供技术指导。

关键词: 异养硝化-好氧反硝化细菌; 重金属抗性; 脱氮性能; 普罗维登斯菌

资助项目: 国家自然科学基金(32160756); 甘肃农业大学“伏羲杰出人才”培育计划(GAUfx-04J03); 甘肃农业大学青年研究生导师扶持计划专项(06190301)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160756), the “Fuxi Outstanding Talent” Cultivation Plan of Gansu Agricultural University (GAUfx-04J03), and the Gansu Agricultural University Young Graduate Tutor Support Program (06190301).

*Corresponding author. E-mail: sunlk_baby@126.com

Received: 2024-03-21; Accepted: 2024-06-12; Published online: 2024-07-29

Isolation and nitrogen removal characteristics of two heavy metal-tolerant heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying strains of *Providencia*

MA Yongqi, ZHANG Yindi, GUAN Wenping, QI Wenrui, JIANG Yunpeng, AN Liangjia, WANG Jiali, SUN Likun*

College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: [Background] In recent years, with the expansion of the animal farming scale, a large amount of breeding sewage rich in heavy metal ions is produced. The conventional nitrogen removal technologies have limitations in treating such sewage, demonstrating reduced nitrogen removal efficiency. [Objective] To isolate and screen heavy metal-tolerant heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria from sewage and sludge of a sewage treatment plant and study the nitrogen removal efficiency of the isolates. [Methods] We identified the strains by observing the morphological characteristics of colonies and cells and analyzing the 16S rRNA gene sequences. With NH_4^+ -N, NO_3^- -N, and NO_2^- -N as the only nitrogen sources, the nitrification and denitrification performance of the strains, as well as the removal capacity of ammonia nitrogen in the presence of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Cr, and Pb), was investigated. [Results] Two strains of heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria were isolated from sewage and sludge, identified as *Providencia* sp., and named WS-A and WH-K. Both WS-A and WH-K could grow in the media with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , or NaNO_2 as the only nitrogen source, with the NH_4^+ -N removal rates of 84.93% and 84.48% within 48 h, the NO_3^- -N removal rates of 82.5% and 86.7%, and the NO_2^- -N removal rates of 93.60% and 93.84%, respectively. WS-A and WH-K showcased the ammonia nitrogen removal rate more than 80% in the presence of 100 mg/L Zn^{2+} and the ammonia nitrogen removal rate within the range of 56% to 77% in the presence of 1 000 mg/L Cu^{2+} or 80 mg/L Cr^{3+} , Cd^{2+} , and Pb^{2+} . [Conclusion] We screened out two strains of heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria showing good nitrogen removal performance under the stress of five heavy metal ions and examined their heavy metal tolerance. The findings provide technical guidance for practical application.

Keywords: heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria; heavy metal tolerance; nitrogen removal performance; *Providencia* sp.

随着当前家畜饲养规模不断扩大, 畜禽养殖污染物急剧上升。在养殖废水里, 有大量的有机物质, 同时也包括众多的细菌、重金属和抗生素, 这些有毒物质会持续对附近的水源和土壤造成污染^[1]。在生产养殖中通常添加剂、

抗生素、重金属等成分提高动物生产能力^[2], 但由于其中的营养成分无法被动物充分消化吸收, 因此多数会随家畜的粪便排出体外。例如在饲料中适量添加铜(200–250 mg/kg)和锌(200–400 mg/kg)能够改善动物的繁殖能力, 然

而, 家畜对这些金属的吸收率较低, 约 95% 以上的重金属会随动物的粪便和尿液排出体外^[3]。畜禽养殖污水中的常见重金属主要有 Cu、Zn、Cd、Pb、Cr 等^[4]。由于饲料以及饲养方式的不同, 畜禽粪便中产生重金属离子类型不同, 浓度不同, 对异养硝化好氧反硝化菌株氨氮去除率产生影响也不相同。Zhang 等^[5]研究发现当 Cu^{2+} 达到 800 mg/L 仍有 62.1% 的氨氮能被异养硝化好氧反硝化菌株有效去除; Wei 等^[6]研究发现在 0–50 mg/L 的 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 金属离子胁迫下对异养硝化好氧反硝化菌的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除作用几乎无影响(去除率均接近 100%), 当 Cr^{3+} 浓度高于 120 mg/L 时, 硝化菌的活性会受到明显的降低, 功能基因表达受到抑制^[7]。

当这些含重金属离子的养殖污水不进行处理直接排入河道, 会影响水环境的 pH 值, 导致河道水体自净能力降低, 而且污水中的重金属离子会消耗河道水体中的溶解氧, 导致河道中的生物窒息而亡, 若人、畜禽等长时间饮用会引起机体中毒^[8]。为防止养殖污水干扰生态环境, 对环境质量产生严重威胁, 养殖废水的规模化处理刻不容缓。目前, 养殖污水常通过吸附法、离子交换法等减轻重金属离子对污水处理系统的损害, 但处理成本高, 处理效果不理想, 经济效益低下^[9]。

异养硝化好氧反硝化(heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying, HNAD)菌是一种能在有氧条件下进行同步异养硝化和好氧反硝化的功能微生物^[10]。近年来, 研究人员从养殖污水中分离出不同 HNAD 菌, 常见的 HNAD 菌包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、副球菌属(*Paracoccus*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、嗜盐单胞菌属(*Halomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等属的细菌, 主要为革兰氏阴性菌^[11]。HNAD 菌利用氨

氮、亚硝氮或硝氮作为氮源进行同化, 将其转化为细胞所需的有机氮; 同时, 它们还通过异化作用将氮素转化为含氮气体^[12]。新型的生物脱氮技术, 特别是以 HNAD 菌株为代表, 已经受到了广泛关注。这种技术解决了传统生物脱氮过程中硝化和反硝化需分别在不同反应器中进行的问题, 使得生物脱氮可以在单一反应器内完成, 大幅度减少了废水处理中的脱氮成本, 并显著提高了脱氮效率, 实现污水处理的高效环保^[13]。并且由于异养硝化好氧反硝化细菌分离源广泛, 生长速率快, 可利用有机物满足生长需求^[14], 对外界环境的适应能力强。有研究证实了 HNAD 菌在极端环境如高氨氮^[15]、高盐^[16]、高或低温^[17-18]和重金属离子存在环境^[19]依旧能保持高效的脱氮能力, 证明了其应用前景。但实际污水成分复杂多样, 所含重金属离子种类丰富, 大多数研究集中在一类重金属环境下 HNAD 菌株的筛选和脱氮能力, 多种重金属胁迫对异养硝化好氧反硝化菌影响的研究仍然缺乏。

本实验以城市污水处理厂的污水污泥为分离源筛选具有高效脱氮能力的 HNAD 细菌, 分别添加不同种类重金属离子研究菌株的脱氮性能, 旨在分离出多种重金属环境胁迫下仍具有良好脱氮性能的 HNAD 菌, 并探究其作用机理, 以期为废水脱氮提供良好的菌种来源, 为后续该类菌在实际养殖污水中的应用提供参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

污水和好氧污泥采集于甘肃省兰州市丰泉环保电力有限公司。

1.1.2 培养基

富集(LB)培养基(g/L)^[20]: 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 5.0。

分离培养基(硝化) (basal medium, BM)^[5] (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.94, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 12.76, NaH_2PO_4 0.25, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.98, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, pH 7.0。反硝化培养基(denitrification medium, DM) (g/L): NaNO_3 0.61 (NaNO_2 0.49), 其他成分同 BM 培养基。

重金属培养基: 在 BM 培养基中添加不同浓度重金属离子 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Cd^{2+} 。 Cu^{2+} : 0、200、400、600、800、1 000 mg/L, Zn^{2+} : 0、20、40、60、80、100 mg/L, Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} : 0、20、40、60、80 mg/L。

液体培养基加 18 g/L 琼脂制备成固体培养基。培养基统一进行 121 °C、20 min 蒸汽灭菌后使用。

1.1.3 主要试剂和仪器

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 等, 国药集团化学试剂有限公司。紫外分光光度计, 苏州安原仪器有限公司; 显微镜, 北京塞百奥科技有限公司; 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM), HITACHI 公司。

1.2 菌株的富集与初筛

取 10 g 样品与 90 mL LB 培养基混合, 30 °C、140 r/min 持续培养 3 d, 取 5 mL 培养液转接, 重复富集 3 次。然后按 1%接种量将富集培养基中的培养液转移到分离培养基中, 30 °C、140 r/min 持续培养 3 d, 当菌液 OD_{600} 达 1.0 左右时, 再次取 1%转接到新的分离培养基中, 重复以上操作 3 次。取最后一次分离培养基中菌液进行梯度稀释, 以 10^{-3} 、 10^{-4} 的梯度稀释后涂布在固体分离培养基上, 30 °C 培养 3 d, 在菌落生长后选择不同颜色和大小菌落在平板上重复划线, 直到获得纯化的 HNAD 细菌。选择具有优异脱氮能力的菌株将其命名为 WS-A、WH-K 进行深入研究。

1.3 HNAD 菌株的鉴定

1.3.1 菌株的形态学鉴定

将菌株接种到 LB 培养基, 30 °C 培养 72 h, 待培养基出现单菌落后观察菌株形态, 并对其进行革兰氏染色确定革兰氏染色特性及镜检。

1.3.2 菌株的分子生物学鉴定

采用扫描电子显微镜观察 1.2 筛选出的 WS-A、WH-K 菌体形态。

采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')扩增菌株 WS-A、WH-K 的 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(50 μL): DNA 模板 2 μL , $2 \times \text{Taq PCR Master Mix}$ 25 μL , 正、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2.5 μL , ddH₂O 18 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 0.5%琼脂糖凝胶电泳检测后送擎科生物有限公司测序, 测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 相似性比对分析并将序列提交至 NCBI 的 GenBank 数据库, 确定其种属名。再采用 MEGA 7.0 构建系统发育树。

1.4 菌株的脱氮性能

按 1%接种量将菌液接种至以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 为碳源的 BM 培养基中, 30 °C、140 r/min 连续培养 48 h, 每 12 h 取样测定 OD_{600} 、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N 浓度并分析其硝化性能。

按 1%接种量将菌液接种至以 NaNO_3 、 NaNO_2 分别为唯一氮源, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 为碳源的 DM 培养基, 30 °C、140 r/min 连续培养 48 h, 每 12 h 取样测定 OD_{600} 、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N 浓度并分析其反硝化性能。

1.5 不同浓度重金属离子对菌株 WS-A、WH-K 脱氮性能的影响

在 BM 培养基中分别添加 1 000 mg/L Cu^{2+} 、

100 mg/L Zn^{2+} 、80 mg/L Cr^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} ，以不添加上述金属离子的 BM 培养基为对照于 30 °C、140 r/min 恒温振荡连续培养 48 h，每 12 h 测定 OD_{600} 、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N 浓度。

1.6 数据分析方法

脱氮率采用公式(1)计算，脱氮速率采用公式(2)计算。

$$R=(C_0-C_1)/C_0\times 100\% \quad (1)$$

$$V=(C_0-C_1)/t \quad (2)$$

式(1)中： R ：氮素去除率(%)； C_0 ：初始氮素浓度(mg/L)； C_1 ：结束时氮素浓度(mg/L)。式(2)中： V ：氮素去除速率[mg/(L·h)]； C_0 ：初始氮素浓度(mg/L)； C_1 ：结束时氮素浓度(mg/L)； t ：时间(h)。

试验数据均采用 SPSS 27.0 进行单因素方差分析， $P<0.05$ 表示结果具有显著性差异，并且使用 Origin 2022 软件设计图表。 OD_{600} 利用分光光度法测定。 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N、分别采用紫外分光光度法、N-(1-萘基)-乙二胺光度法、钠氏试剂光度法。

2 结果与分析

2.1 菌株分离鉴定结果

菌株 WS-A 在 BM 培养基上显示为乳白色，菌落稍微隆起且菌落边缘规则。菌株 WH-K 在 BM 琼脂培养基中产生白斑，边缘规则。革兰氏染色均为革兰氏阴性菌。图 1 为菌株 WS-A、

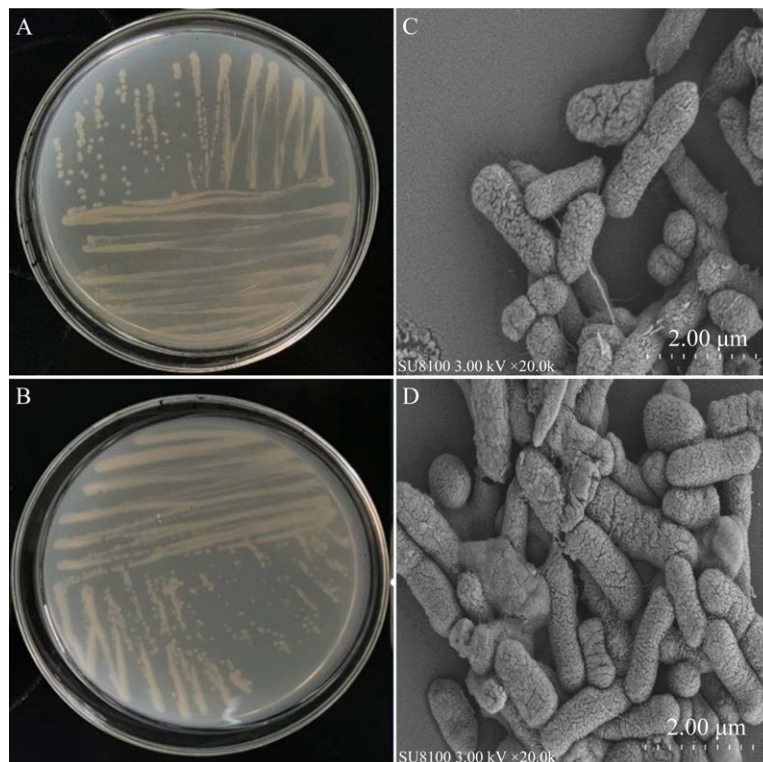


图 1 菌株 WS-A (A)和菌株 WH-K (B)平板培养图、扫描电镜图 A：菌株 WS-A 平板培养图(左)、扫描电镜图(右)。B：菌株 WH-K 平板培养图(左)、扫描电镜图(右)

Figure 1 Plate culture and scanning electron microscopy of strain WH-A and strain WH-K. A: Strain WS-A plate culture (left), scanning electron microscope (right). B: Strain WH-K plate culture (left), scanning electron microscope (right).

WH-K 细菌分离图和扫描电镜图。扫描电镜照片观察到菌株 WS-A、WH-K 均呈棒杆状,大小为 $1 \mu\text{m} \times (1.5\text{--}2.0) \mu\text{m}$ 。将测序得到的序列提交到 NCBI,使用 BLAST 进行同源性比对。菌株 WS-A、WH-K 的 16S rRNA 基因序列与普罗维登斯菌属 (*Providencia*) (GenBank 登录号为 OR816100、OR984764)相似性达 99%,采用 MEGA 7.0 以 neighbor-joining 法绘制 16S rRNA 基因系统发育树(图 2),进一步确定菌株归属为 *Providencia*。

2.2 菌株 WS-A、WH-K 的异养硝化好氧反硝化性能

2.2.1 菌株的异养硝化作用

在以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源的 BM 培养基中,菌株 WS-A、WH-K 的生长曲线和氮素浓度变化情况如图 3 所示,菌株 WS-A、WH-K 在 12–36 h 进入对数生长期, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度急剧下降,在 48 h 时 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率分别达到 84.93%和 84.48%, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 平均去除速率为 $4.17 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 和

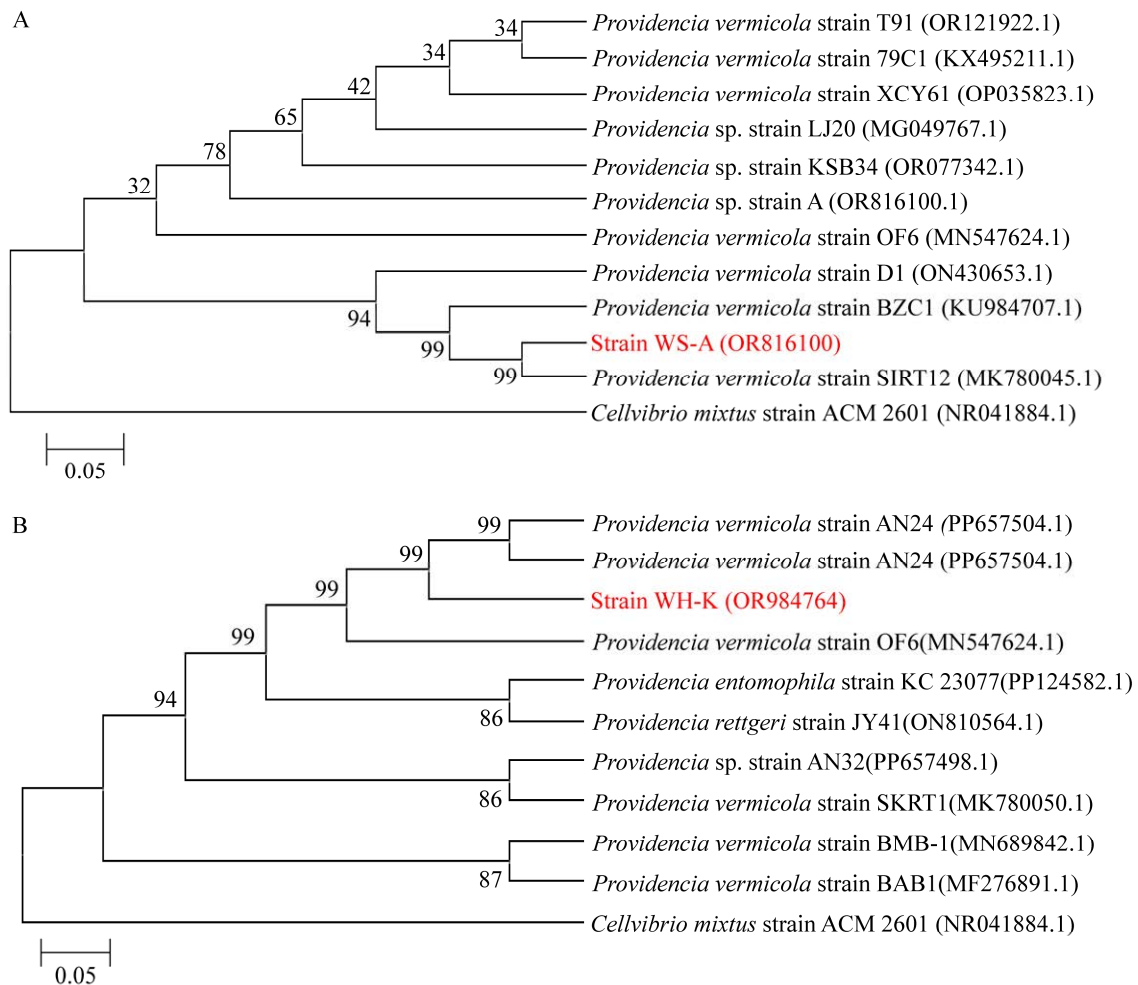


图 2 菌株 WS-A (A)和菌株 WH-K (B)基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 节点处的数字代表树的自举值;括号内的数字为 GenBank 登录号;标尺: 0.05 序列差异度

Figure 2 Constructed phylogenetic trees of WS-A (A) and WH-K (B) 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: 0.05 sequence divergence.

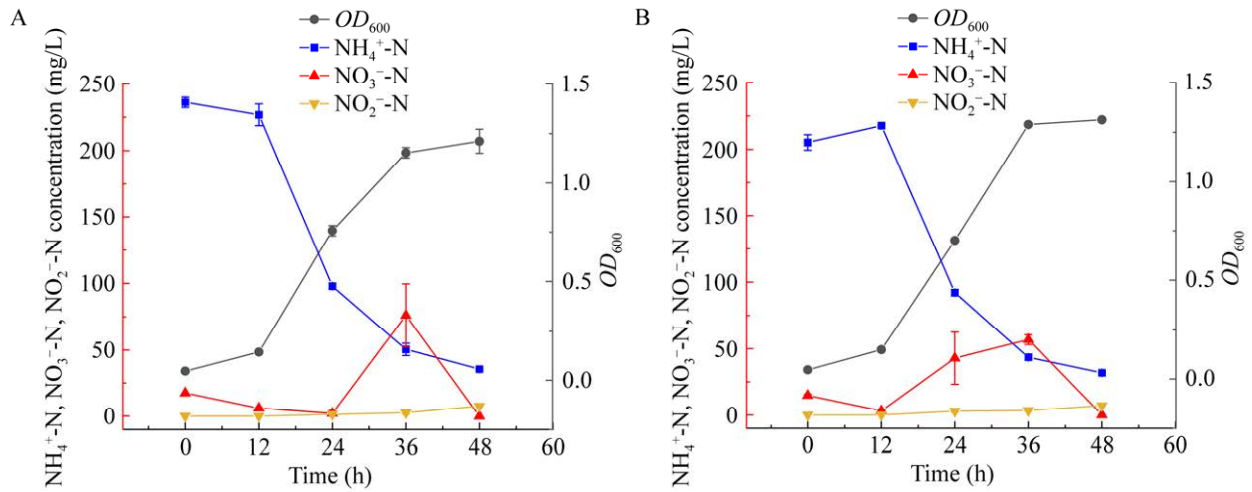


图3 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源时菌株 WS-A (A)、WH-K (B)的生长特性及异养硝化性能

Figure 3 Growth characteristics and heterotrophic nitrification performance of strains WS-A (A) and WH-K (B) with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as the only nitrogen source.

3.61 mg/(L·h), 氨氮的去除与菌株的生长基本同步, 优于阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) HNR (氨氮去除率 77%)^[21]。在整个反应过程中, 几乎没有 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 累积, 36 h 时观察到 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度达到峰值为 75.99 mg/L 和 56.96 mg/L, 随后 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度降低, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 去除通常被认为是反硝化过程开始的标志^[22], 初步表明菌株 WS-A、WH-K 在进行硝化作用的同时进行反硝化。

2.2.2 菌株的好氧反硝化作用

如图 4 所示, 以 NaNO_3 为唯一氮源的 DM 培养基中 0–48 h 内菌株快速生长, 在 48 h 时 OD_{600} 达到最高; 在 12–48 h $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 最大去除率分别为 82.5% 和 86.7%, 最大去除速率为 1.89 mg/(L·h) 和 1.79 mg/(L·h), 优于假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) ADN-42 [1.38 mg/(L·h)]^[23]。在整个培养过程中, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 少量累积, 菌株 WS-A 在 48 h 亚硝氮浓度最高为 3.07 mg/L, 菌株 WH-K 在 36 h 亚硝氮浓度最高为 12.24 mg/L, 说明菌株 WS-A、WH-K 进行反硝化作用。此外, 在 48 h 时观察到 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度略有升高, 这可能是由 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 经同化或异化作用被还原为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 所

致^[24]。结果表明菌株 WS-A、WH-K 具有良好的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 去除能力。

如图 5 所示, 以 NaNO_2 为唯一氮源的 DM 培养基中, 12–24 h 菌株快速生长, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 快速去除, 菌株 WS-A、WH-K 的 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 去除率为 93.60%、93.84%, 去除速率为 2.29 mg/(L·h) 和 2.34 mg/(L·h), 高于菌株根瘤菌(*Rhizobium* sp.) WS7 的 2.16 mg/(L·h)^[20]。相较于以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为唯一氮源, 菌株 WS-A、WH-K 在以 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 为唯一氮源的培养基中生长速度较慢, 可能是因为高浓度的 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 可能对菌株的生长产生毒害作用^[25]。综上, 菌株 WS-A、WH-K 兼具异养硝化和好氧反硝化特性, 后续可适用于含氮废水的处理。

2.3 重金属离子存在下菌株 WS-A、WH-K 的脱氮性能

2.3.1 不同浓度 Zn^{2+} 对菌株 WS-A、WH-K 脱氮性能的影响

锌是动物体内近 300 种酶的组成成分或辅助因子, 可以调控细胞酶的结构和功能, 进而影响机体生命代谢过程^[26]。锌含量过少或过多

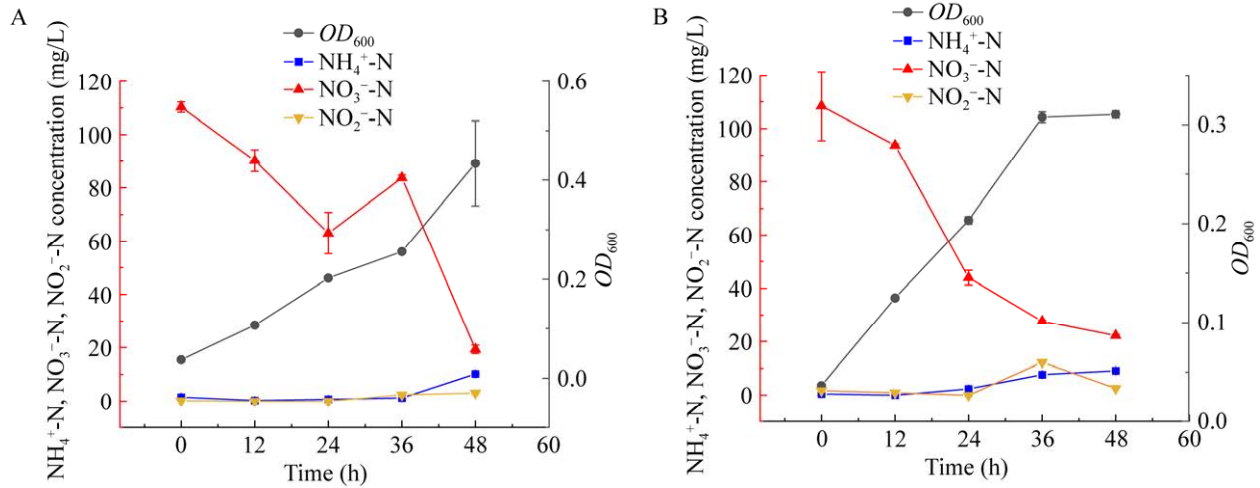


图4 以 NaNO_3 为唯一氮源时菌株 WS-A (A)、WH-K (B) 的生长特性及好氧反硝化性能

Figure 4 Growth characteristics and aerobic denitrification performance of strains WS-A (A) and WH-K(B) with NaNO_3 as the only nitrogen source.

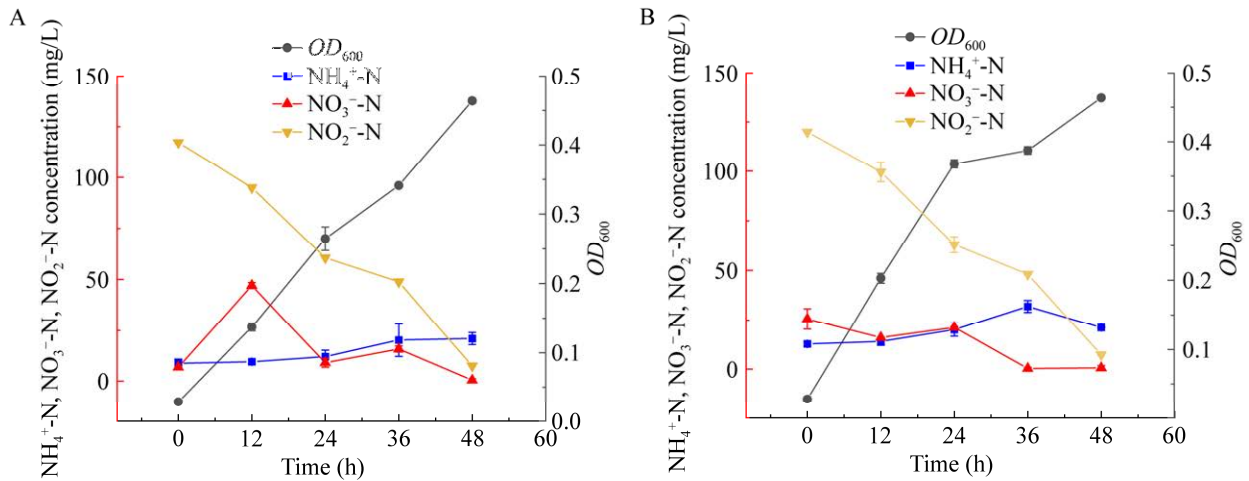


图5 以 NaNO_2 为唯一氮源时菌株 WS-A (A)、WH-K (B) 的生长特性及好氧反硝化性能

Figure 5 Growth characteristics and aerobic denitrification performance of strains WS-A (A) and WH-K (B) with NaNO_2 as the only nitrogen source.

都会对细菌生长代谢产生严重威胁。如图 6 所示, 浓度在 0 到 100 mg/L 范围内的 Zn^{2+} 对菌株 WS-A 和 WH-K 的异养硝化无显著影响。然而, 随着 Zn^{2+} 浓度的增加, 菌株 WS-A 和 WH-K 的 OD_{600} 值呈现下降趋势。培养 48 h 后, 对照组菌株 WS-A、WH-K 氨氮去除率为 89.00%、89.97%,

100 mg/L Zn^{2+} 胁迫下菌株 WS-A、WH-K 氨氮相应的最大去除率分别为 88.75%、84.60%, 氨氮最大去除速率分别为 5.474 mg/(L·h) 和 4.683 mg/(L·h); 研究表明, 在浓度 8 mg/L 的 Zn^{2+} 胁迫条件下菌株气单胞菌属 (*Aeromonas* sp.) HN-02 的氨氮去除率为 94.60%^[27]; 20 mg/L 的 Zn^{2+} 对菌株 S1 的

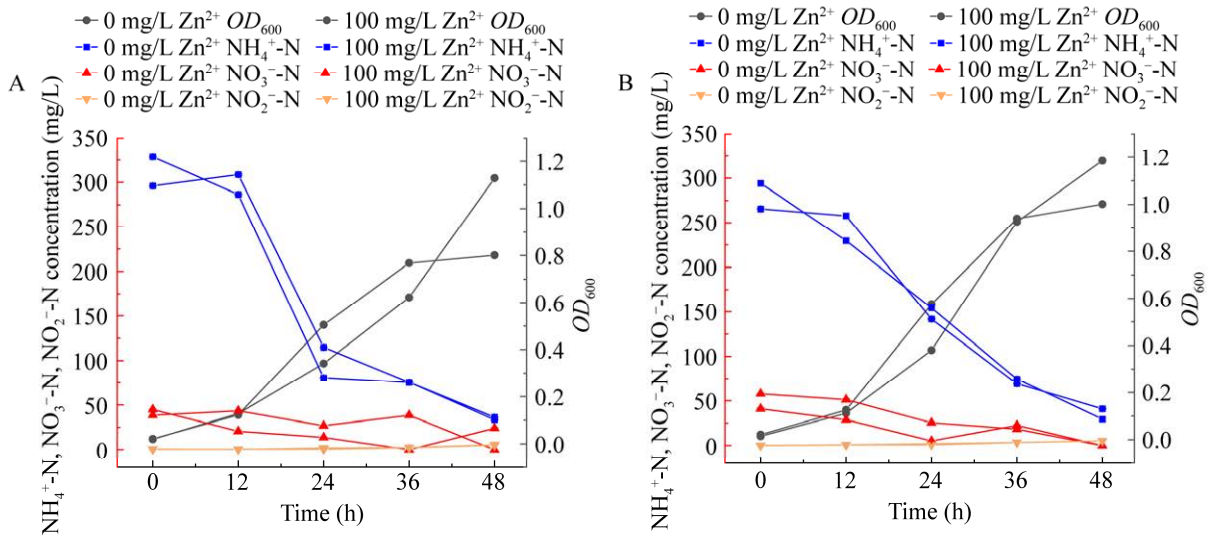


图 6 0、100 mg/L Zn²⁺环境下菌株 WS-A (A)、WH-K (B) 的生长曲线及氮素变化趋势

Figure 6 Growth curve and nitrogen change trend of strains WS-A (A) and WH-K (B) under 0 and 100 mg/L Zn²⁺ environment.

异养硝化性能几乎无影响, 此时的氨氮去除率仍高达 97.40%^[28]。总之, 不同的异养硝化细菌对 Zn²⁺的敏感性不同, 菌株 WS-A、WH-K 展现出较高的 Zn²⁺耐受性。

2.3.2 不同浓度 Cu²⁺对菌株 WS-A、WH-K 脱氮性能的影响

铜锌超氧化物歧化酶作为超氧阴离子自由基的清除剂, 对细胞起到保护作用^[29]。畜牧生产中高剂量铜的应用对动物生长、畜禽产品及生态环境都存在一定程度的危害^[30]。如图 7 所示, 对照组 OD₆₀₀ 分别为 1.197、1.285, 随着铜离子浓度增大对菌株 WS-A、WH-K 的 OD₆₀₀ 抑制作用增强, 48 h 后菌株 WS-A、WH-K 的 OD₆₀₀ 值下降分别是 0.741、0.436, 表明 Cu²⁺ 过量对微生物产生毒害作用, 抑制菌株的生长。不同浓度的铜离子对氨氮培养基内菌降解氨氮造成不同程度的影响, 对照组氨氮去除率为 85.40%、85.39%, 1 000 mg/L 的 Cu²⁺ 氨氮去除率为 65.86%、56.79%, 氨氮去除速率维持在 4.28 mg/(L·h) 和 2.79 mg/(L·h)。

另一方面, 菌株生长情况直接影响 NO₃⁻-N、NO₂⁻-N 的积累情况, 当 Cu²⁺ 浓度达到 1 000 mg/L, 12–36 h 时硝氮积累量达到最大, 分别为 38.059 mg/L 和 47.400 mg/L, 随后下降, 高浓度的 Cu²⁺ 抑制反硝化过程, 并且此时观察到亚硝氮有少量积累之后出现下降。适当量的铜离子可以提升一氧化氮还原酶的效能, 进而促进菌株 WS-A 和 WH-K 将亚硝氮转化为气态氮^[31]。Chen 等^[27]的研究表明, 相比于 Zn²⁺, *Aeromonas* sp. HN-02 对 Cu²⁺ 更加敏感。Zhang 等^[5]发现当 Cu²⁺ 浓度达到 800 mg/L 时, 对菌株恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) ZN1 氨氮去除率产生明显抑制作用。先前的研究一直显示 Cu²⁺ 对异养硝化细菌有强烈的抑制作用。然而, 即使在 Cu²⁺ 浓度达到 1 000 mg/L 时, 菌株 WS-A 和 WH-K 仍然能够生长并去除氮源。因此推测, 这些菌株可能具备高度耐受 Cu²⁺ 的能力, 可能是由于它们体内含有特定的铜抗性基因, 这些基因可以在特定环境下表达相关的抗铜蛋白^[5]。

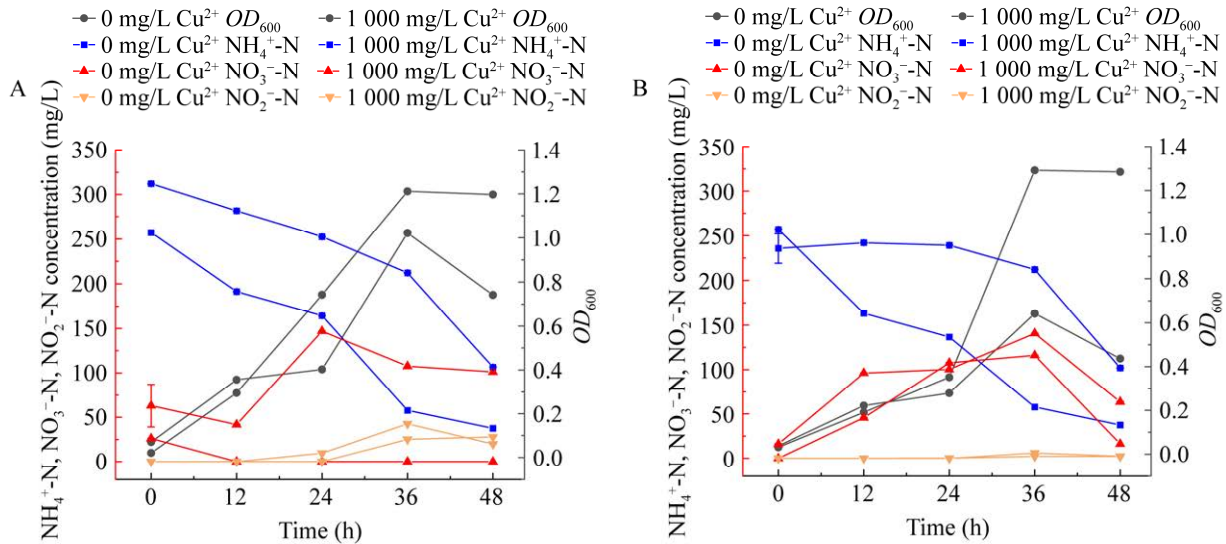


图7 0、1000 mg/L Cu^{2+} 环境下菌株 WS-A (A)、WH-K (B)的生长曲线及氮素变化趋势

Figure 7 Growth curve and nitrogen change trend of strains WS-A (A) and WH-K (B) under 0 and 1000 mg/L Cu^{2+} environment.

2.3.3 不同浓度 Cr^{3+} 对菌株 WS-A、WH-K 脱氮性能的影响

铬是一种极具毒性的重金属，通常以铬酸盐或重铬酸盐的形式存在，同时有致突变性、致癌性和致畸性^[32]。0–80 mg/L 的 Cr^{3+} 对菌株 WS-A、WH-K 脱氮性能的影响如图 8 所示，随着 Cr^{3+} 浓度增加，细菌生长性能逐渐变弱， OD_{600} 值略下降为 1.204、1.284。48 h 后对照组氨氮最大去除率为 80.71%、82.04%，添加了 80 mg/L Cr^{3+} 后菌株 WS-A、WH-K 的最大氨氮去除率为 77.60%、68.02%。与对照组相比，36 h 时高浓度 Cr^{3+} 出现短暂硝氮积累，随后被逐渐去除。由于铬的毒性或 NO_3^- -N 和铬之间电子供体的竞争， NO_3^- -N 还原在铬存在时会显著下降^[33]。氨氮的抑制可能是由于氨与铬之间的电子竞争以及铬所产生的生物毒性所致^[34]。

Sun 等^[28]研究发现 10 mg/L 的 Cr^{6+} 就会完全抑制菌株 S1 的异养硝化能力。涂李欣^[35]发现当 Cr^{3+} 浓度为 50、100 mg/L 时，菌株 *Pseudomonas*

putida strain LX1 对 NH_4^+ -N 去除率极低。总之，菌株 WS-A、WH-K 显示出对 Cr^{3+} 的高耐受性，当 Cr^{3+} 浓度低于 80 mg/L 时，它们的异养硝化活性受其影响较小，但 Cr^{3+} 浓度达到 100 mg/L 时完全抑制它们的生长性能及对氨氮的去除能力。

2.3.4 不同浓度 Cd^{2+} 对菌株 WS-A、WH-K 脱氮性能的影响

镉属于一种环境污染物质，当出现镉污染，镉会在生物体内累积，通过食物链传递引起机体慢性中毒^[36]。0–80 mg/L 的 Cd^{2+} 对菌株 WS-A、WH-K 脱氮性能的影响，如图 9 所示，对照组 OD_{600} 分别为 1.428、1.109，添加 80 mg/L 的 Cd^{2+} 对细胞产生明显的毒害作用，抑制细胞生长，菌株 WS-A、WH-K 的 OD_{600} 下降为 0.49、0.37。高浓度的 Cd^{2+} 对细胞生长和氨的去除具有明显作用。对照组氨氮去除率为 82.90%、80.78%，80 mg/L 的 Cd^{2+} 最大氨氮去除率为 57.63%、61.59%，显著高于 Liu 等^[37]的研究。 Cd^{2+} 浓度超过 10 mg/L

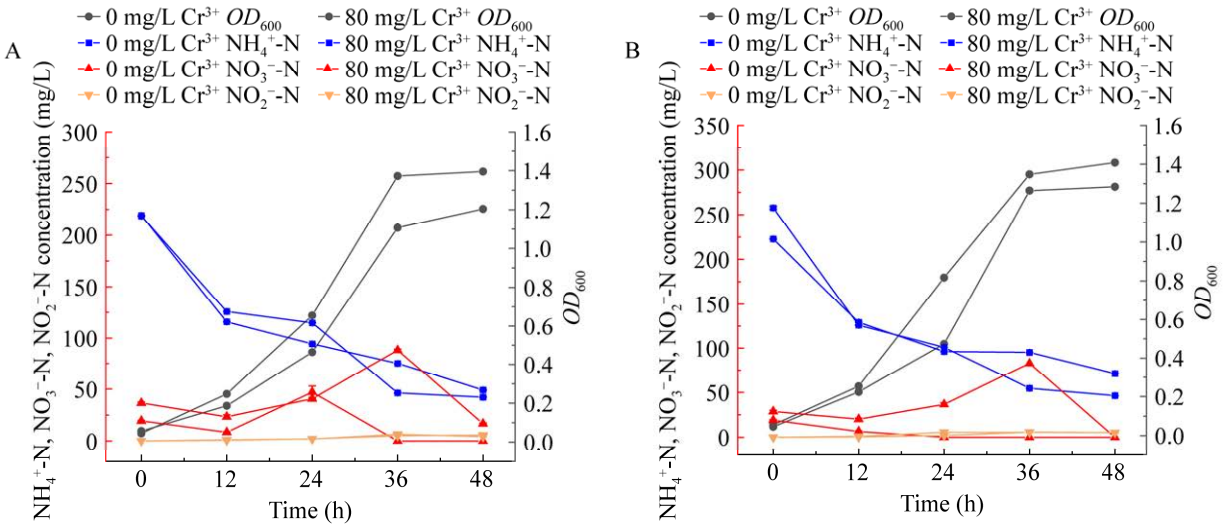


图 8 0、80 mg/L Cr³⁺胁迫下菌株 WS-A (A)、菌株 WH-K (B)的生长曲线及氮素变化趋势

Figure 8 Growth curve and nitrogen change trend of strains WS-A (A) and WH-K (B) under 0 and 80 mg/L Cr³⁺ environment.

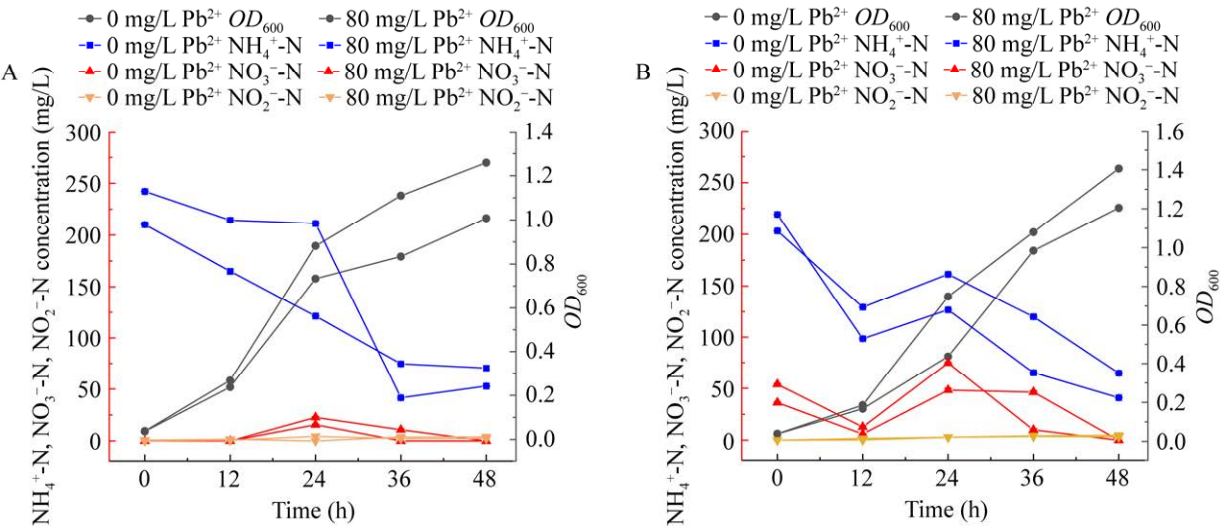


图 9 0、80 mg/L Cd²⁺环境下菌株 WS-A (A)、WH-K (B)的生长曲线及氮素变化趋势

Figure 9 Growth curve and nitrogen change trend of strains WS-A (A) and WH-K (B) under 0 and 80 mg/L Cd²⁺ environment.

时，显著抑制 NH₄⁺-N 的去除，去除率仅为 48.72%^[38]。He 等^[39]发现 Cd²⁺浓度超过 5.0 mg/L 时对菌株 Y-10 的脱氮效率产生明显抑制。

重金属离子对微生物硝化、反硝化等氮转化过程存在显著影响，而这些影响会由于重金属

离子的种类或者浓度不同存在着显著的差异^[40]。Wei 等^[41]发现菌株 P-1 可能通过调节信号转导来适应环境变化，并通过改变细胞膜的膜转运体来控制金属离子的进入，从而对 Cd²⁺胁迫做出反应。Cd²⁺通过影响氧化还原酶的活性、胞

内多羟基烷酸盐以及糖原的转化,从而抑制生物的氨氮去除过程^[42]。

2.3.5 不同浓度 Pb^{2+} 对菌株 WS-A、WH-K 脱氮性能的影响

重金属离子铅对细胞具有毒害作用且无任何有益的功能^[43]。0–80 mg/L 的 Pb^{2+} 对菌株 WS-A、WH-K 脱氮性能的影响,如图 10 所示,对照组 OD_{600} 分别为 1.26、1.41,添加 80 mg/L 的 Pb^{2+} 对菌株生长抑制作用并不明显,菌株 WS-A、WH-K 的 OD_{600} 下降为 1.01、1.20。对照组氨氮去除率为 78.20%和 81.37%,氨氮去除率受到一定影响,80 mg/L 的 Pb^{2+} 最大氨氮去除率为 66.52%、68.12%。在此过程中并未出现明显的硝氮和亚硝氮的积累。 Pb^{2+} 对细胞生长和氨的去除均有显著影响,尤其是高浓度的重金属离子。添加量越高,效果越显著。在本实验中 100 mg/L 的 Pb^{2+} 显著抑制细胞生长和脱氮性能。此结论与 Wei 等^[18]的 Pb^{2+} 浓度低于 100 mg/L 时对氨氮去除未产生明显抑制作用的研究结果相一致。

较低浓度的重金属能刺激抗氧化酶的生

成,从而消除活性氧,帮助细胞对抗其毒性,然而,高浓度的重金属可能严重损害细胞生长及功能,抑制机体关键酶的合成^[44]。与 Li 等^[45]研究一致,尽管 Pb^{2+} 通过抑制酶活性影响了菌株 WS-A 和 WH-K 的生长和硝化作用,但抗氧化酶系统的存在一定程度上保持了这些菌株的正常生长和新陈代谢。这表明抗氧化系统可能有助于这些菌株在高浓度重金属条件下保持生存能力^[46]。

2.3.6 在不同重金属离子胁迫下菌株 WS-A、WH-K 氨氮去除率比较

如图 11 所示,比较不同重金属离子胁迫下菌株 WS-A、WH-K 的氨氮去除率,结果表明 100 mg/L Zn^{2+} 刺激下菌株 WS-A、WH-K 氨氮去除效率在 80%以上,1 000 mg/L 的 Cu^{2+} 和 80 mg/L Cr^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 胁迫下对菌株 WS-A、WH-K 氨氮去除率产生抑制作用,导致氨氮去除率的范围在 56%–77%之间。菌株 WS-A、WH-K 可以利用氨氮、硝氮和亚硝氮进行生长代谢,加入 100 mg/L Zn^{2+} 、1 000 mg/L 的 Cu^{2+} 、80 mg/L

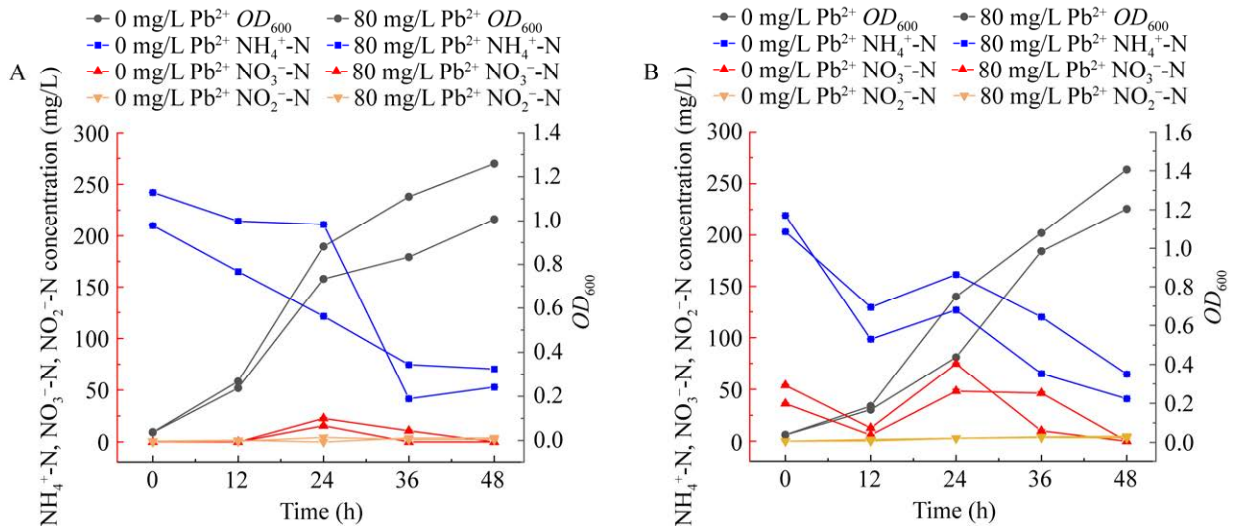


图 10 0、80 mg/L Pb^{2+} 环境下菌株 WS-A (A)、WH-K (B)的生长曲线及氮素变化趋势

Figure 10 Growth curve and nitrogen change trend of strains WS-A (A) and WH-K (B) under 0 and 80 mg/L Pb^{2+} environment.

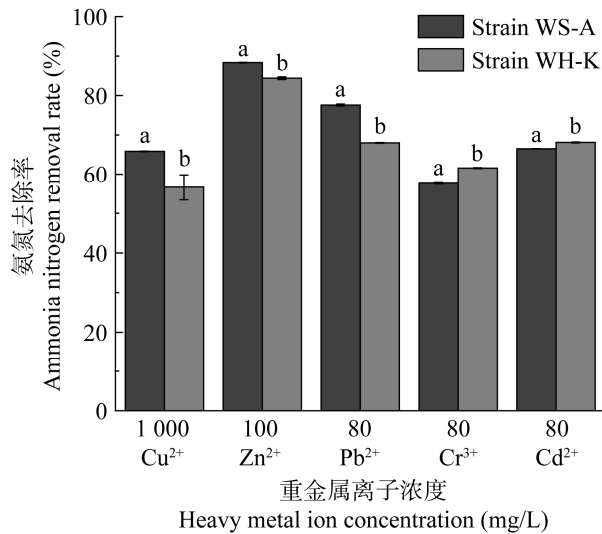


图 11 不同重金属离子胁迫菌株 WS-A、WH-K 氨氮去除率比较 不同小写字母表示差异显著

Figure 11 Comparison of ammonia nitrogen removal rates of WS-A and WH-K strains stressed by different heavy metal ions. Different lowercase letters indicate significant differences.

Cr³⁺、Cd²⁺、Pb²⁺氨氮去除率产生不同程度抑制,综合对比了 5 种金属离子独立作用时对菌株 WS-A、WH-E 异养硝化性能的影响,以便更全面地评估菌株的重金属耐受性,通过比较不同试验组与对照组氨氮去除率差值,结果表明本试验中所添加重金属离子对菌株 WS-A、WH-K 氨氮去除率的抑制作用为 Cu²⁺>Cd²⁺>Pb²⁺>Cr³⁺>Zn²⁺。Sun 等^[28]研究 10.0 mg/L 的 Cu²⁺或 Cr⁶⁺对菌株生长和氨氮去除表现出显著的抑制作用,其抑制效果高于 Zn²⁺,在这些重金属中, Cr⁶⁺的毒性最强,而 Zn²⁺的毒性则较轻。Chen 等^[27]指出 0.5 mg/L Cu²⁺或 8.0 mg/L Zn²⁺对气单胞菌(*Aeromonas* sp.) HN-02 氨氮去除能力有很强的抑制作用,当 Cu²⁺添加量增加到 1.5 mg/L 时,氨氮的去除能力几乎被完全抑制。在重金属冲击对 HNAD 菌影响的相关研究中,发现 Zn²⁺对菌株的生长影响较小,低浓度的 Zn²⁺会促进菌株生长,同时对硝酸盐降解过程的影响

也较小,而 Cu²⁺、Cr³⁺、Cd²⁺、Pb²⁺对硝酸盐的降解有很强的抑制作用^[47]。

3 讨论

本研究筛选出 2 株在多种高浓度重金属离子胁迫下仍然表现出良好的脱氮性能的 HNAD 菌——*Providencia* sp. WS-A 和 WH-K。研究结果显示,这 2 株菌在生长对数期表现出快速生长的同时,也能够高效去除水中的氨氮、硝氮和亚硝氮。这表明它们的硝化-反硝化活性与其生长速率密切相关,特别是在富含氮物质的条件下,这些菌株表现出了优越的生长和去氮能力。氮转化和细菌同化是去除亚硝氮的主要机制,研究表明亚硝酸盐浓度大于 30 mg/L 就会对细胞产生毒性^[48]。菌株 WS-A、WH-K 异养代谢去除 NH₄⁺-N 过程中均无 NO₂⁻-N、NO₃⁻-N 的积累,类似的 HNAD 菌,如恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) strain NP5^[33]、贪铜菌属 (*Cupriavidus* sp.) S1^[28]等在降解 NH₄⁺-N 时也没有 NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 的积累,一方面这可能是因为菌株的硝化和反硝化作用的不平衡导致的,并且 NO₃⁻-N 的短时积累及最终消除也进一步表明该菌株通过 HNAD 途径脱氮^[34]。另一方面推测与菌株的氮代谢途径有关,即异化硝酸还原或同化硝酸还原将硝酸盐转化为亚硝酸盐,再将亚硝酸盐进一步转化为氨^[23],后续会通过检测在氮代谢过程中的无机氮分布情况深入分析菌株的氮代谢途径。

在处理含氮废水时,常见的微生物通常无法承受高浓度重金属离子的影响,导致这类废水中的生物脱氮效率不高实际养殖污水重金属离子成分复杂多样,可同时耐受多重高浓度重金属离子的 HNAD 菌鲜有报道。若水体中出现过量的重金属会对微生物产生严重的毒性效应,抑制它们的生长和代谢活动,从而降低脱

氮效率甚至破坏脱氮系统^[49]。不同种类的重金属对同一株菌的抑制作用有所差异。在 5 种重金属胁迫条件下,观察到氨氮降解过程和中间产物的变化情况表明,菌株 WS-A 和 WH-K 可以利用氨氮为唯一氮源进行生命活动。未加任何重金属的空白对照组实验结果显示硝氮和亚硝氮均无明显积累,加入高浓度重金属离子的实验组硝氮会出现短暂积累而后逐渐去除,亚硝氮无明显积累。硝氮积累推测可能是高浓度的重金属离子短暂抑制了硝氮的还原过程,而后菌株逐渐适应高浓度重金属环境,亚硝氮的不明显积累可能是菌株 WS-A、WH-K 能够直接利用产生的硝酸盐和亚硝酸盐作为反硝化底物,同时亚硝酸盐还原酶能迅速去除产生的亚硝酸盐^[23]。尽管高浓度重金属离子会抑制酶活性从而影响菌株生长与硝化作用,但细菌通过抗氧化作用在一定程度上能够维持正常的生长代谢,具备一系列潜在的重金属解毒细胞机制^[50]。可能是因为重金属胁迫下许多应激蛋白基因能被诱导和表达,进而去除变性蛋白质,使细胞继续有序代谢,提高其对有毒重金属的抵抗力^[51]。

4 结论

从污水处理厂污水和好氧污泥中分离到两株异养硝化好氧反硝化菌株,命名为 WS-A、WH-K,归属为普罗维登斯菌属(*Providencia*)。菌株 WS-A、WH-K 可以利用氨氮、硝氮和亚硝氮进行生长代谢,同步进行异养硝化好氧反硝化作用。加入 100 mg/L Zn²⁺、1 000 mg/L 的 Cu²⁺和 80 mg/L Cr³⁺、Cd²⁺、Pb²⁺氨氮去除率产生不同程度抑制, Cu²⁺>Cd²⁺>Pb²⁺>Cr³⁺>Zn²⁺。菌株 WS-A、WH-K 在多种高浓度重金属胁迫下仍能生长并进行脱氮作用。后续通过响应面试验获得菌株 WS-A、WH-K 的最优生长条件,并对

菌株代谢无机氮的途径展开深入研究,通过基因敲除等手段进一步明确部分关键酶编码基因在菌株氮代谢过程中的作用,利用多组学手段分析在重金属环境胁迫下菌株 WS-A、WH-K 仍具有良好脱氮性能的机理。

REFERENCES

- [1] 李晓晖, 艾仙斌, 吴永明, 黄凯, 辛在军. 畜禽污水中抗生素和重金属无害化处理技术研究进展[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2020, 46(1): 19-25.
LI XH, AI XB, WU YM, HUANG K, XIN ZJ. Review on harmless treatment technology for antibiotics and heavy metals contamination in livestock and poultry wastewater[J]. Journal of Southwest Minzu University (Natural Science Edition), 2020, 46(1): 19-25 (in Chinese).
- [2] 刘红恩, 聂兆君, 刘世亮, 王文亮, 韩燕来, 赵鹏, 常丹娜, 李金峰, 杨喜田. 养殖污水灌溉对土壤养分和重金属含量的影响[J]. 环境科学与技术, 2016, 39(S1): 47-51.
LIU HE, NIE ZJ, LIU SL, WANG WL, HAN YL, ZHAO P, CHANG DN, LI JF, YANG XT. Effects of aquaculture sewage irrigation on soil nutrients and heavy metals content[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 39(S1): 47-51 (in Chinese).
- [3] 章杰, 王永, 马力, 文勇立, 陈世忠, 杨克美, 蔡自建, 廖远勤. 种养结合循环利用模式下养殖废水污染物分析[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2011, 37(2): 222-227.
ZHANG J, WANG Y, MA L, WEN YL, CHEN SZ, YANG KM, CAI ZJ, LIAO YQ. Study on waste water pollutant from planting and breeding recycled model[J]. Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition), 2011, 37(2): 222-227 (in Chinese).
- [4] 戴婷, 章明奎. 长期畜禽养殖污水灌溉对土壤养分和重金属积累的影响[J]. 灌溉排水学报, 2010, 29(1): 36-39.
DAI T, ZHANG MK. Effects of long-term irrigation of livestock farm wastewater on nutrients and heavy metals in agricultural soils[J]. Journal of Irrigation and Drainage, 2010, 29(1): 36-39 (in Chinese).
- [5] ZHANG N, CHEN H, LYU YK, WANG Y. Nitrogen removal by a metal-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* ZN1, capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. Journal of Chemical

- Technology & Biotechnology, 2019, 94(4): 1165-1175.
- [6] WEI R, HUI C, ZHANG YP, JIANG H, ZHAO YH, DU LN. Nitrogen removal characteristics and predicted conversion pathways of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* P-1[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(6): 7503-7514.
- [7] FARABEGOLI G, CARUCCI A, MAJONE M, ROLLE E. Biological treatment of tannery wastewater in the presence of chromium[J]. Journal of Environmental Management, 2004, 71(4): 345-349.
- [8] 黄常亮. 电化学技术在电镀重金属污水处理中的应用研究[J]. 皮革制作与环保科技, 2023, 4(20): 22-24.
HUANG CL. Application of electrochemical technology in sewage treatment of electroplating heavy metals[J]. Leather Manufacture and Environmental Technology, 2023, 4(20): 22-24 (in Chinese).
- [9] 付永胜, 赵君凤, 王群, 万俐. 木质素离子交换树脂对重金属离子的吸附效能[J]. 环境工程学报, 2016, 10(8): 4314-4318.
FU YS, ZHAO JF, WANG Q, WAN L. Adsorption efficiency of lignin-based ion exchange resin on heavy metal ions[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(8): 4314-4318 (in Chinese).
- [10] 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]. The Science of the Total Environment, 2021, 801: 149319.
- [11] 马咏琪, 台喜生, 王佳丽, 姜云鹏, 安亮嘉, 孙丽坤. 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. Extreme water quality conditions of heterotrophic nitrification and aerobic denitrifying microorganism research progress[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 743-757 (in Chinese).
- [12] JIN P, CHEN YY, YAO R, ZHENG ZW, DU QZ. New insight into the nitrogen metabolism of simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium in mRNA expression[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 371: 295-303.
- [13] ZHAI TR, ZHAO TT, ZHONG YH, CHEN PP, LI GJ. Research on the application of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria in membrane bioreactor (MBR). Biotechnology letters, 2024. <https://doi.org/10.1007/s10529-024-03529-5>.
- [14] 乔森, 刘雪洁, 周集体. 异养硝化-好氧反硝化在生物脱氮方面的研究进展[J]. 安全与环境学报, 2014, 14(2): 128-135.
- QIAO S, LIU XJ, ZHOU JT. Research progress of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification in biological denitrification[J]. Journal of Safety and Environment, 2014, 14(2): 128-135 (in Chinese).
- [15] 李晨晨, 靳静晨, 郑燕英, 高雅娟, 高宇轩, 张国伟, 胡凌康, 杨永宇, 张闻天, 张利军, 靳永胜. 耐高氨氮的水生产碱菌 BJ17 的筛选和脱氮特性[J]. 北京农学院学报, 2023, 38(1): 13-21.
LI CC, JIN JC, ZHENG YY, GAO YJ, GAO YX, ZHANG GW, HU LK, YANG YY, ZHANG WT, ZHANG LJ, JIN YS. Screening and denitrification characteristics of *Alcaligenes aquatilis* strain BJ17 resistant to high ammonia nitrogen concentration[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2023, 38(1): 13-21 (in Chinese).
- [16] 侯冬梅, 张兰, 李春成, 陈露童, 邹建平. 一株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌 *Rhodococcus* sp. LS-2 的分离鉴定与脱氮性能研究[J]. 南昌航空大学学报(自然科学版), 2023, 37(3): 50-58, 102.
HOU DM, ZHANG L, LI CC, CHEN LT, ZOU JP. Isolation, identification and nitrogen removal performance of a halotolerant heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria *Rhodococcus* sp. LS-2[J]. Journal of Nanchang Hangkong University (Natural Sciences Edition), 2023, 37(3): 50-58, 102 (in Chinese).
- [17] 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).
- [18] 张苗, 黄少斌. 高温好氧反硝化菌的分离鉴定及其反硝化性能研究[J]. 环境科学, 2011, 32(1): 259-265.
ZHANG M, HUANG SB. Identification and denitrification characteristics of a thermophilic aerobic denitrifier[J]. Environmental Science, 2011, 32(1): 259-265 (in Chinese).
- [19] 张霓. 异养硝化-好氧反硝化细菌 *Pseudomonas putida* ZN1 的脱氮及耐重金属特性研究[D]. 太原: 太原理工大学硕士学位论文, 2019.
ZHANG N. Nitrogen removal and heavy-metal resistance characteristics of heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas putida*

- ZN1[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Taiyuan University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [20] WEI BH, LUO X, MA WK, LV PY. Biological nitrogen removal and metabolic characteristics of a novel cold-resistant heterotrophic nitrification and aerobic denitrification *Rhizobium* sp. WS7[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 362: 127756.
- [21] MA TF, CHEN YP, YAN P, FANG F, SHEN Y, MAO Z, GUO JS, ZHAO B, FENG L. Adaptation mechanism of aerobic denitrifier *Enterobacter cloacae* strain HNR to short-term ZnO nanoparticle stresses[J]. *Environmental Research*, 2021, 197: 111178.
- [22] XI HP, ZHOU XT, ARSLAN M, LUO ZJ, WEI J, WU ZR, EL-DIN MG. 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.
- [23] 刘天琪, 金若菲, 周集体, 黄剑宇. 异养硝化-好氧反硝化菌 ADN-42 的脱氮特性[J]. *环境工程学报*, 2015, 9(2): 989-996.
- LIU TQ, JIN RF, ZHOU JT, HUANG JY. Nitrogen-removal characteristic of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium ADN-42[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(2): 989-996 (in Chinese).
- [24] LAN MC, YIN QD, WANG JX, LI M, LI Y, LI BA. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification performance of a novel strain, *Pseudomonas* sp. B-1, isolated from membrane aerated biofilm reactor[J]. *Environmental Research*, 2023, 220: 115199.
- [25] WANG XJ, WANG WQ, ZHANG Y, SUN ZT, ZHANG J, CHEN GH, LI J. Simultaneous nitrification and denitrification by a novel isolated *Pseudomonas* sp. JQ-H3 using polycaprolactone as carbon source[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 288: 121506.
- [26] 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.
- [27] CHEN MX, WANG WC, FENG Y, ZHU XH, ZHOU HZ, TAN ZL, LI XD. Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 167: 456-461.
- [28] SUN ZY, LV YK, LIU YX, REN RP. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. S1[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 220: 142-150.
- [29] 邓科敏, 李前勇, 张德志, 王钟翊. 高铜对畜禽养殖及其产品安全的影响[J]. *四川畜牧兽医*, 2008, 35(2): 30-31, 33.
- DENG KM, LI QY, ZHANG DZ, WANG ZY. Effect of high copper on livestock and poultry breeding and product safety[J]. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2008, 35(2): 30-31, 33 (in Chinese).
- [30] 晏家友, 张纯, 唐凌, 邝声耀. 不同铜源在畜禽养殖生产中的研究与应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(12): 3227-3231.
- YAN JY, ZHANG C, TANG L, KUANG SY. Research and application of different copper sources in livestock production[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 43(12): 3227-3231 (in Chinese).
- [31] OCHOA-HERRERA V, LEÓN G, BANIHANI Q, FIELD JA, SIERRA-ALVAREZ R. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems[J]. *The Science of the Total Environment*, 2011, 412/413: 380-385.
- [32] WAN YN, HUANG QQ, WANG Q, YU Y, SU DC, QIAO YH, LI HF. Accumulation and bioavailability of heavy metals in an acid soil and their uptake by paddy rice under continuous application of chicken and swine manure[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 384: 121293.
- [33] YANG L, WANG XH, CUI S, REN YX, YU J, CHEN N, XIAO Q, GUO LK, WANG RH. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 285: 121360.
- [34] HE D, ZHENG MS, MA T, LI C, NI JR. Interaction of Cr(VI) reduction and denitrification by strain *Pseudomonas aeruginosa* PCN-2 under aerobic conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 185: 346-352.
- [35] 涂李欣. 异养硝化细菌 *Pseudomonas putida* strain LX1 对重金属离子的耐受性及其作用机制研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学硕士学位论文, 2022.
- TU LX. Tolerance and mechanism of heterotrophic nitrifying bacteria *Pseudomonas putida* strain LX1 to heavy metal ions[D]. Xi'an: Master's Thesis of Xi'an University of Architecture and Technology, 2022 (in Chinese).
- [36] 吴二社, 张松林, 刘焕萍, 刘在平, 卢强. 农村畜禽养殖与土壤重金属污染[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(3): 285-288.

- WU ES, ZHANG SL, LIU HP, LIU ZP, LU Q. Livestock and poultry breed aquatics in rural areas and soil heavy metal pollutions[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(3): 285-288 (in Chinese).
- [37] LIU WX, WANG Q, WANG YG, ZHAN WH, WU ZQ. Effects of Cd(II) on nitrogen removal by a heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacterium *Pseudomonas* sp. XF-4[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024, 280: 116588.
- [38] 周宇, 张华, 黄健, 王晓辉, 孙雷, 吴铠臣. 镉离子对养殖废水生物脱氮性能及功能基因的影响[J]. 水处理技术, 2024, 50(1): 80-84.
- ZHOU Y, ZHANG H, HUANG J, WANG XH, SUN L, WU KC. Effects of Cd²⁺ on biological nitrogen removal performance and functional genes of livestock wastewater[J]. Technology of Water Treatment, 2024, 50(1): 80-84 (in Chinese).
- [39] HE TX, XIE DT, NI JP, LI ZL. Ca(II) and Mg(II) significantly enhanced the nitrogen removal capacity of *Arthrobacter arilaitensis* relative to Zn(II) and Ni(II)[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 368: 594-601.
- [40] AFZAL M, YU MJ, TANG CX, ZHANG LJ, MUHAMMAD N, ZHAO HC, FENG JY, YU L, XU JM. The negative impact of cadmium on nitrogen transformation processes in a paddy soil is greater under non-flooding than flooding conditions[J]. Environment International, 2019, 129: 451-460.
- [41] WEI R, HUI C, ZHANG YP, XU LG, ZHAO YH, DU LN, JIANG H. Response of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Pseudomonas aeruginosa* P-1 to Cd²⁺ and Pb²⁺ on ammonium removal performance, physiology, and transcriptome analysis[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2021, 165: 105326.
- [42] CHEN HB, WANG DB, LI XM, YANG Q, LUO K, ZENG GM, TANG ML. Effects of Cd(II) on wastewater biological nitrogen and phosphorus removal[J]. Chemosphere, 2014, 117: 27-32.
- [43] 郭健, 姚云, 赵小旭, 柳家鹏, 王涛, 刘美辰, 蒙少华. 粮食中重金属铅离子、镉离子的污染现状及对人体的危害[J]. 粮食科技与经济, 2018, 43(3): 33-35, 85.
- GUO J, YAO Y, ZHAO XX, LIU JP, WANG T, LIU MC, MENG SH. Pollution status of lead and cadmium ions in grain and its harm to human[J]. Grain Science and Technology and Economy, 2018, 43(3): 33-35, 85 (in Chinese).
- [44] SHI YC, GOU F, CHEN AL, XING ZLIN, ZHANG Q. Influence and mechanism of typical transition metal ions on the denitrification performance of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria[J]. Environmental Research, 2024, 258: 119460.
- [45] LI XZ, WANG YJ, PAN YS, YU H, ZHANG XL, SHEN YP, JIAO S, WU K, LA GX, YUAN Y, ZHANG SM. Mechanisms of Cd and Cr removal and tolerance by macrofungus *Pleurotus ostreatus* HAU-2[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 330: 1-8.
- [46] SINHA S, SAXENA R, SINGH S. Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes[J]. Chemosphere, 2005, 58(5): 595-604.
- [47] ZHENG LL, LIN H, DONG YB, LI B, LU YR. A promising approach for simultaneous removal of ammonia and multiple heavy metals from landfill leachate by carbonate precipitating bacterium[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 456: 131662.
- [48] 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.
- [49] GAO Y, ZHU JW, WANG KY, MA Y, FANG J, LIU G. Discovery of a heterotrophic aerobic denitrification *Pseudomonas* sp. G16 and its unconventional nitrogen metabolic pathway[J]. Bioresource Technology, 2023, 387: 129670.
- [50] KAPOOR V, PHAN D, PASHA ABMT. Effects of metal oxide nanoparticles on nitrification in wastewater treatment systems: a systematic review[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2018, 53(7): 659-668.
- [51] CHENG YF, LI GF, LIU YY, ZHU BQ, ZHANG Q, XUE Y, ZHANG ZZ, JIN RC. Evaluating the effects of Zn(II) on high-rate biogranule-based denitrification: performance, microbial community and sludge characteristics[J]. Bioresource Technology, 2019, 279: 393-397.