

DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2021.02.005

具有异养硝化-好氧反硝化功能的水产养殖生物絮团菌的分离鉴定及其性能研究

李哲^{1,2}, 吕剑², 张宇轩², 武君³, 于晓斌², 崔德杰¹

- (1. 青岛农业大学资源与环境学院, 山东 青岛 266109;
2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 山东 烟台 264003;
3. 鲁东大学资源与环境工程学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 从水产养殖生物絮团中分离出一株具有异养硝化-好氧反硝化功能的菌株 L3, 研究该菌株的生长影响因子及其脱氮性能。对菌株 L3 进行 16S rRNA 基因同源性分析, 表明此株菌为假单胞菌。研究表明, 菌株 L3 生长的最佳 pH 为 6~8, 最佳温度范围为 25~35℃, 最适宜碳源为丁二酸钠, 最佳 C/N 为 10~15, 且菌株能耐受高浓度氨氮负荷。通过研究菌株异养硝化-好氧反硝化特性发现, 菌株优先利用氨氮进行异养硝化并具有良好的好氧脱氮效果。
关键词: 生物絮团; 异养硝化-好氧反硝化; 假单胞菌; 生长影响因子; 脱氮性能
中图分类号: X714 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1980(2021)02-0127-07

Separation, identification and performance of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria from bioflocs in aquacultural system

LI Zhe^{1, 2}, LYU Jian², ZHANG Yuxuan², WU Jun³, YU Xiaobin², CUI Dejie¹

- (1. Resources and environment college of Qingdao agricultural university, Qingdao 266109, China;
2. Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China;
3. Resources and environment engineering college of Ludong university, Yantai 264025, China)

Abstract: A heterotrophic nitrification and aerobic denitrification strain L3 was separated and identified from bioflocs in the aquacultural system, to investigate the influential factors of bacterial growth and the denitrification performance. The result of 16S rRNA gene sequence analysis showed that the strain L3 was *Pseudomonas*. The optimum pH for the growth of strain L3 was 6 to 8, the suitable carbon source was sodium succinate, and the optimum temperature was 25–35℃, with the optimum C/N from 10 to 15. The strain L3 could tolerate the high ammonia concentration. By studying the characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification, the strain L3 was found to preferentially remove ammonia and had good aerobic denitrification performance.
Key words: bioflocs; heterotrophic nitrification and aerobic denitrification; *Pseudomonas*; influence factor of growth; denitrification performance

水产养殖过程中, 未被利用的残饵以及水生动物产生的粪便直接排入水体, 使养殖水体中氮素含量和有机物含量较高, 造成水体富营养化。水质恶化产生的亚硝态氮等会毒害水生生物, 使病害频发, 增加养殖成本^[1]。因此, 降低养殖水体中的氮浓度是目前养殖废水处理的研究热点^[2]。生物脱氮被认为是去除养殖废水中氮元素最经济有效的方式, 且无二次污染^[3-5]。生物絮团是由细菌、原生动物、微藻、有机碎屑等形成的絮状物质^[6], 能够通过细菌的氨化、硝化、反硝化及同化作用等将水产养殖废水中的无机氮转化为自身的营

基金项目: 国家自然科学基金(41877131); 泰山学者工程专项(tsqn201812116); 中国科学院科技服务网络计划(STS)区域重点项目(KFJ-STG-QYZX-114); 烟台市“双百计划”项目(Y739011021)
作者简介: 李哲(1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事环境微生物研究。E-mail: lk1209593982@163.com
通信作者: 吕剑, 研究员。E-mail: jlu@yic.ac.cn
引用本文: 李哲, 吕剑, 张宇轩, 等. 具有异养硝化-好氧反硝化功能的水产养殖生物絮团菌的分离鉴定及其性能研究[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2021, 49(2): 127-133.
LI Zhe, LYU Jian, ZHANG Yuxuan, et al. Separation, identification and performance of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria from bioflocs in aquacultural system[J]. Journal of Hohai University(Natural Sciences), 2021, 49(2): 127-133.

养物质^[7],降低有害氮素对水体的污染,实现养殖水的循环利用,因此利用生物絮团调节水产养殖污水得到了普遍关注。

在传统的污水处理过程中,利用微生物脱氮时,硝化过程和反硝化过程必须分开进行且必须保证严格的好氧和厌氧环境^[8-9]。近年来,研究人员已发现并分离出一些同步进行异养硝化和好氧反硝化的细菌^[10],突破了对传统脱氮理论的认识。在同一反应容器中,异养硝化-好氧反硝化菌在硝化作用中将氨氮转化为硝态氮或亚硝态氮甚至直接转化成氮气去除^[11],在反硝化过程中,可以将硝态氮转化成亚硝态氮最后变成气态氮脱除^[12]。由于不涉及厌氧条件,减少了生物处理系统体积并且降低运行所需能量,从而降低了运行的成本,所以异养硝化-好氧反硝化菌在生物脱氮方面具有巨大的优势^[13]。生物絮团是微生物的集合体,异养菌在生物絮团的脱氮功能中起着重要作用,其中异养硝化-好氧反硝化菌能同步进行硝化和反硝化作用,因此,生物絮团中的异养硝化-好氧反硝化菌有待进一步研究。

本文试验从水产养殖生物絮团分离出一株异养硝化-好氧反硝化菌,并研究温度、pH 等因素对其生长状况的影响以及菌株的脱氮性能,以期增加对生物絮团中的异养硝化-好氧反硝化菌种类和性能的认识,为其在将来的应用提供理论支持。

1 试验方法

1.1 培养基

0.5 g 硫酸铵、2.17 g 琥珀酸钠和 50 mL 维氏盐溶液溶解后定容至 1 L,配成富集培养基;6.5 gK₂HPO₄·3H₂O、2.5 gMgSO₄·7H₂O、2.5 gNaCl、0.05 gFeSO₄·7H₂O 和 0.04 gMnSO₄·H₂O 溶解后定容至 1 L,配成维氏盐溶液^[14]。异养硝化培养基、好氧反硝化培养基、异养硝化好氧反硝化培养基均含有 3.38 g 琥珀酸钠、50 mL 维氏盐溶液、950 mL H₂O,溶液 pH 为 7.0。此外,异养硝化培养基含有 0.5 g (NH₄)₂SO₄,好氧反硝化培养基(亚硝酸盐培养基)含有 0.49 g NaNO₂,好氧反硝化培养基(硝酸盐培养基)含有 0.61 g NaNO₃,异养硝化好氧反硝化培养基(氨氮亚硝态氮培养基)含有 0.25 g (NH₄)₂SO₄、0.25 g NaNO₂,异养硝化好氧反硝化培养基(氨氮硝态氮培养基)含有 0.25 g (NH₄)₂SO₄、0.31 g NaNO₃,以上培养基均置于高压灭菌锅中灭菌^[15]。

1.2 分析方法

OD₆₀₀用北京普析公司 TU-1810 紫外分光光度计进行测定;pH 用美国 Thermo 公司 310P-01A pH 仪进行测定;氨氮(NH₄⁺-N)用纳氏试剂光度法(GB/T 7479—1987)进行测定;亚硝酸盐氮(NO₂⁻-N)用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法(GB/T 7493—1987)进行测定;硝酸盐氮(NO₃⁻-N)用紫外分光光度法进行测定^[16];羟胺(NH₂OH)用间接分光光度法进行测定^[17];总有机碳(TOC)用日本 Shimadu 公司 TOC-VCPh 总有机碳分析仪进行测定,总氮(TN)用德国 Seal 公司 AutoAnalyzer III 连续流动分析仪进行测定。

1.3 菌株的分离鉴定

取罗非鱼养殖系统中的生物絮团至富集培养基,在摇床中以温度 28℃,转速 170 r/min 培养 72 h,然后从中吸取 10% 至新的培养基,重复 3 次。取 1 mL 溶液,以 10 倍浓度梯度将溶液分别稀释至 10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰,从中各取 0.1 mL 涂布于固体异养硝化培养基,选出优势菌落摇床培养 48 h,然后用接种环划线分离接种到异养硝化固体培养基上,连续纯化 3 次得到单菌。将分离得到的单菌接种到异养硝化液体培养基,若氨氮浓度降低则菌株有异养硝化功能,后将菌株分别接种到亚硝酸盐反硝化培养基和硝酸盐反硝化培养基中,若亚硝态氮和硝态氮的浓度降低则菌株具有好氧反硝化功能,从而筛选出脱氮效果良好的异养硝化-好氧反硝化菌。

将目的菌株活化后稀释涂布至反硝化培养基,观察菌落形态特征。使用 TIANGEN 基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取,16S rRNA 基因的 PCR 扩增采用通用引物 27F:5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3',1492R:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'进行,将获得的 PCR 产物送至华大基因进行测序,得到测序结果后在 NCBI 中进行 Blast 分析,通过 MEGA X 软件构建系统进化树。

1.4 菌株的异养硝化影响因素研究

研究菌株不同的异养硝化影响因素时,均将 1 mL 菌株接种到 100 mL 配置的培养基中,在摇床中培养 72 h,每 6 h 取一次样测 OD₆₀₀,另外取 2 mL 样进行离心,检测上清液中的氨氮含量,其余各项试验条件如下(每个条件下设置 3 组平行试验)。

pH:配置 pH 分别为 5、6、7、8、9 的液体培养基,丁二酸钠为碳源,硫酸铵为氮源,C/N=10(质量比)。设置摇床为温度 28℃,转速为 170 r/min。

温度:设置摇床温度分别为 15℃、25℃、35℃,转速为 170 r/min。配置 pH=7.0,丁二酸钠为碳源,硫酸铵为氮源,C/N=10 的培养基。

碳源:配置碳源分别为葡萄糖、蔗糖、乙酸钠、丁二酸钠、柠檬酸钠、淀粉、碳酸氢钠,硫酸铵为氮源,C/N=10,pH=7.0 的培养基。设置摇床为温度 28℃,转速为 170 r/min。

C/N:配置碳氮比分别是 0、5、10、15、20、25、30,pH=7.0,丁二酸钠为碳源,硫酸铵为氮源的培养基。设置摇床为温度 28℃,转速为 170 r/min。

氨氮浓度:配置氨氮质量浓度分别是 50 mg/L、200 mg/L、500 mg/L、1 000 mg/L,pH=7.0,丁二酸钠为碳源,硫酸铵为氮源,C/N=10 的培养基。设置摇床为温度 28℃,转速为 170 r/min。

1.5 菌株在异养硝化-好氧反硝化培养基中的脱氮特性研究

将 1 mL 菌株接种到 100 mL 异养硝化-好氧反硝化培养基中,放置于摇床,28℃、170 r/min 条件下培养 72 h,每 12 h 取一次样,测定 OD₆₀₀,然后离心 6 min,测定上清液中的 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N、NH₂OH、TN、TOC 含量。每个条件下设置 3 组平行试验。

2 结果与分析

2.1 菌株的鉴定

菌株 L3 在固体培养基上培养 24 h 后,菌落呈圆形、乳白色,且表面光滑。对菌株 L3 的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增,得到长度为 1401 bp 的序列。将菌株 L3 的 16S rRNA 基因序列经 BLAST 比对分析,发现菌株 L3 与假单胞菌同源性最高。利用 MEGA X 软件对菌株 L3 构筑系统发育树,结果如图 1 所示。菌株 L3 与假单胞菌在同一发育地位,确定菌株 L3 为假单胞菌。

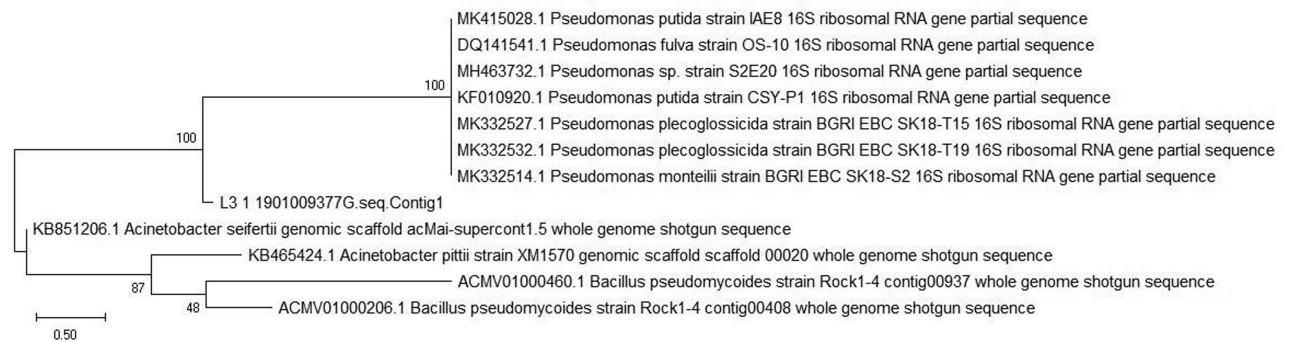


图1 基于 16S rRNA 基因同源性构建菌株 L3 与相关好氧反硝化菌的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic trees of strain L3 based on partial 16S rRNA gene sequences with neighbor-joining analysis

2.2 pH 对菌株生长和硝化性能的影响

pH 影响细菌的生物活性,适宜的 pH 是细菌具有良好硝化特性的重要条件之一。由图 2 可知,菌株 L3 在 pH 为 5~9 这一范围内均能生长。当菌株培养 30 h,相比于其他几种条件,pH=5 时菌株的生长速度缓慢,菌株到达生长峰值所需时间更长,且氨氮的去除速率最慢,推测知酸性条件不利于该菌株的生长及氨氮的去除。pH 为 6~9 时,氨氮的最大去除率达到 88.5%~94.2%,但当菌株培养 24 h,pH=9 条件下氨氮的去除速率明显低于其他 3 种 pH 条件下的氨氮去除速率。所以,保证菌株 L3 生长以及良好硝化作用的最适 pH 为 6~8,与方海洋等^[18]研究中菌株 Alcaligenes faecalis No.4 所得结果相同。

2.3 温度对菌株生长和硝化性能的影响

温度的改变可以通过影响蛋白质的合成、微生物的代谢以及基因调控等过程对微生物造成广泛的影响^[19]。由图 3 可知,在菌株 L3 培养 30 h 时,15℃ 条件下菌株生长缓慢,方开始进入指数增长期,而 25℃ 条件下菌株即将达到生长峰值,35℃ 条件下菌株已经达到生长峰值。此外,15℃ 条件下氨氮的最大去除率为 72.0%,同样低于 25℃ 时的 97.1% 和 35℃ 时的 97.7%,温度为 15℃ 时不利于菌株 L3 生长及对氨氮的去除。因此,适合菌株 L3 生长的最适温度是 25~35℃,与姜磊等^[20]研究中 YX-6 菌所得适宜温度范围一致。

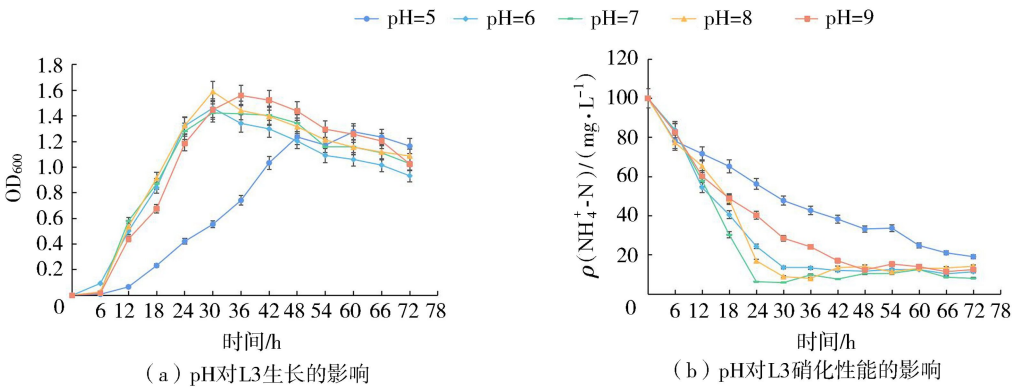


图 2 pH 对菌株 L3 生长和硝化性能的影响

Fig. 2 Effect of pH on growth and nitrifying capacity of strain L3

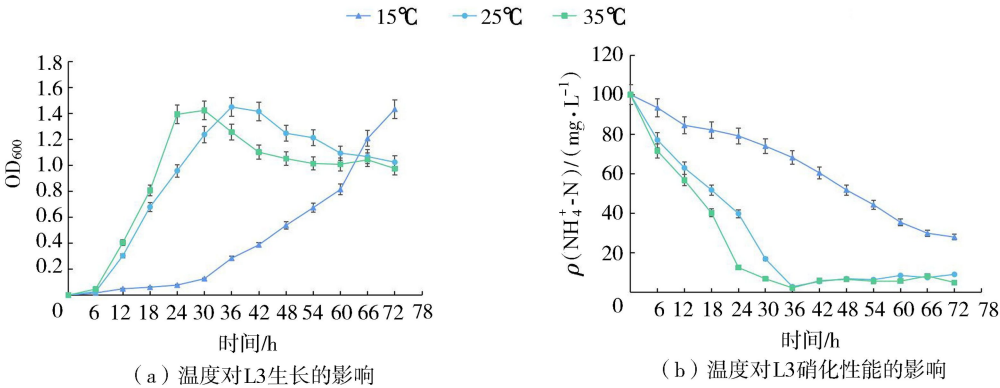


图 3 温度对菌株 L3 生长和硝化性能的影响

Fig. 3 Effect of temperature on growth and nitrifying capacity of strain L3

2. 4 碳源对菌株生长和硝化性能的影响

碳源是菌株硝化过程中的电子供体,同时为菌株生命活动提供所需能量^[21]。由图 4 可知,菌株 L3 在以葡萄糖、乙酸钠、丁二酸钠、柠檬酸钠为唯一碳源时均能生长,其中丁二酸钠作碳源时菌株 L3 的 OD_{600} 最高,柠檬酸钠次之,但两者数值相近,以蔗糖、淀粉为唯一碳源时, OD_{600} 很小,推测是由于不同碳源有不同的分子结构,有机酸相较于糖类更易于被菌株利用^[22]。以碳酸氢钠为唯一碳源时,菌株不生长。以丁二酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠为唯一碳源时,氨氮的去除率较高,最高去除率分别为 96.1%、87.5% 和 74.7%。以葡萄糖、蔗糖、淀粉、碳酸氢钠为唯一碳源时,氨氮的去除率小于 27.5%。由此推知,适宜菌株 L3 生长的最佳碳源是丁二酸钠,与王田野等^[23]研究菌株 SQ2 得到的结果一致。

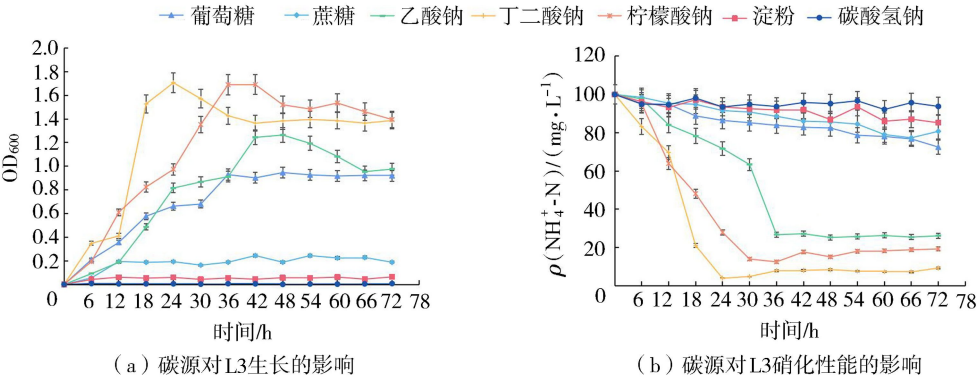


图 4 碳源对菌株 L3 生长和硝化性能的影响

Fig. 4 Effect of carbon source on growth and nitrifying capacity of strain L3

2.5 C/N 对菌株生长和硝化性能的影响

由图 5 可知,C/N=0 时,菌株 L3 不生长,C/N=5 时,菌株 L3 生长量较低,且氨氮去除量较低,由于没有足够的能量供菌株生长,影响了菌株的异养硝化特性^[24]。C/N 为 10~30 时,氨氮的最大去除率达到 88.8%~96.8%。培养 72 h 时,尽管 C/N=30 时菌株 OD₆₀₀ 最高,但是碳氮比过高时会造成资源浪费,当菌株培养 6~18 h,C/N 为 10 和 15 条件下,氨氮的去除速率明显高于其他碳氮比条件下的去除速率。综合考虑,菌株 L3 生长的适宜 C/N 为 10~15。

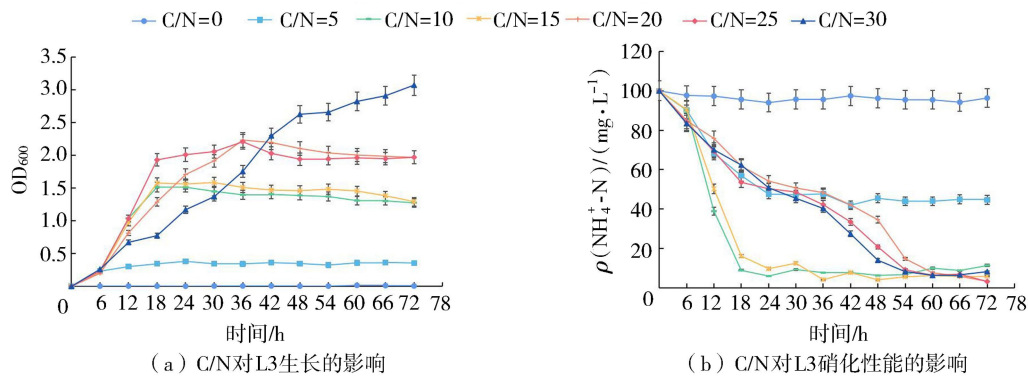


图 5 C/N 对菌株 L3 生长和硝化性能的影响
Fig.5 Effect of C/N on growth and nitrifying capacity of strain L3

2.6 氨氮负荷对菌株生长和硝化性能的影响

相比自养菌,异养菌通常可以适应高浓度氨氮废水^[25]。如图 6 所示,氨氮初始质量浓度为 50 mg/L 时,菌株 OD₆₀₀ 最低为 1.1,在高氨氮浓度下,菌株 L3 均生长良好,说明菌株耐受氨氮负荷范围广泛。试验中因异养菌利用外部碳源,TOC 浓度较初始浓度大幅降低。亚硝态氮几乎无积累,硝态氮与羟胺有少量积累。在 50 mg/L、200 mg/L 氨氮负荷下,氨氮最大去除率分别高达 98.5% 和 93.9%,在 500 mg/L、1 000 mg/L 氨氮负荷下,氨氮去除率分别为 51.9% 和 39.8%。尽管随着氨氮初始浓度的增高,氨氮去除率有所降低,但菌株 L3 生长并未受到影响,且高于颜薇芝等^[22]研究中的菌株 YN3 的氨氮耐受范围,所以菌株 L3 有潜在的实际应用价值。

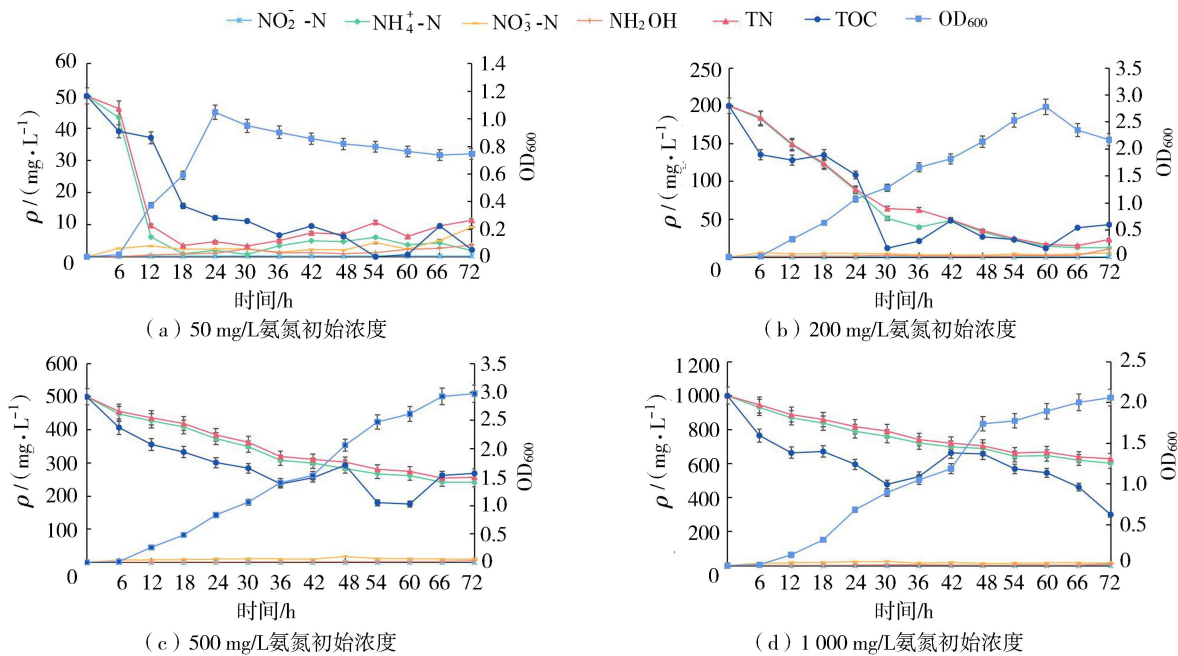


图 6 氨氮负荷对菌株 L3 生长和硝化性能的影响
Fig.6 Effect of ammonia nitrogen loading on growth and nitrifying capacity of strain L3

2.7 菌株的异养硝化-好氧反硝化特性研究

为研究菌株的异养硝化-好氧反硝化特性,将菌株分别接种到含有硫酸铵亚硝酸钠以及含有硫酸铵硝酸钠的培养基中,结果见图7。在含有硫酸铵和亚硝酸钠的培养基中,0~30 h内,菌株一直处在迅速生长状态,OD₆₀₀最大值为1.5,此时总氮、氨氮和亚硝态氮均处于迅速去除阶段,这3种物质最大去除率分别为88.3%、95.8%和95.4%。0~6 h,亚硝态氮含量不断增加,推测原因为菌株优先利用氨氮。在含有硫酸铵和硝酸钠的培养基中,OD₆₀₀最大值为1.5,亚硝态氮有少量积累。硝态氮的去除速率在0~12 h较低,而后升高,推测是由于菌株优先进行硝化作用。总氮、氨氮和硝态氮的最大去除率分别是90.6%、93.9%、97.7%。由此推知,菌株L3在2种培养基中均能优先利用氨氮进行异养硝化作用,且都有良好的脱氮效果。

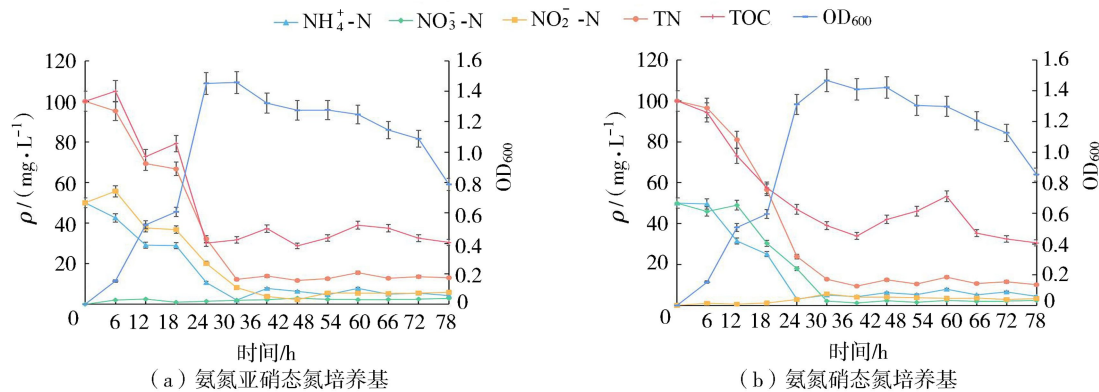


图7 菌株L3在同步硝化反硝化过程中的物质变化曲线

Fig. 7 Changing curves of substances during the process of bacterial simultaneous nitrification and denitrification

3 结 语

笔者从水产养殖生物絮团中分离出一株异养硝化-好氧反硝化细菌L3,通过对其进行形态学观察和16S rRNA基因序列分析,确定此菌株为假单胞菌。通过对不同影响因素下菌株的异养硝化能力进行研究,得到适宜菌株生长的最佳pH为6~8,最适宜温度是25~35℃,最佳碳源是丁二酸钠,最佳碳氮比为10~15,菌株能耐受高浓度氨氮负荷。对菌株脱氮性能的研究表明,在异养硝化-好氧反硝化培养基中,菌株优先利用氨氮进行异养硝化反应且有良好的脱氮效果。因此,从水产养殖生物絮团中分离得到的具有异养硝化-好氧反硝化功能的菌株L3有运用到未来实际生产工作的巨大潜力。

参考文献:

[1] 肖玉冰, 冯骞, 江峰, 等. 有效微生物(EM)在中华绒螯蟹养殖中的应用[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2014, 42(5):404-409. (XIAO Yubing, FENG Qian, JIANG Feng, et al. Application of effective microorganisms (EM) to Eriocheir sinensis culture[J]. Journal of Hohai University(Natural Sciences), 2014, 42(5): 404-409. (in Chinese))

[2] 吕剑, 于晓斌, 张宇轩, 等. 多层纤维球生物滤池净化工厂化养殖循环水处理[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2019, 47(4): 304-309. (LYU Jian, YU Xiaobin, ZHANG Yuxuan, et al. Treatment of recirculating aquaculture water using biological filter with multi-layer fiber ball[J]. Journal of Hohai University(Natural Sciences), 2019, 47(4): 304-309. (in Chinese))

[3] LYU Jian, JIN Qiang, HE Yiliang, et al. Biodegradation of nonylphenol ethoxylates by Bacillus sp. LY capable of heterotrophic nitrification[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 280: 28-33.

[4] JIN Qiang, LYU Jian, WU Jun, et al. Simultaneous removal of organic carbon and nitrogen pollutants in the Yangtze estuarine sediment: the role of heterotrophic nitrifiers[J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2017, 191:150-156.

[5] 赵娟, 吕剑, 何义亮, 等. 异养脱氮菌株 Bacillus sp. LY 降解有毒有机污染物的研究[J]. 环境科学, 2007, 28(12): 2838-2842. (ZHAO Juan, LYU Jian, HE Yiliang, et al. Biodegradation of toxic organic pollutants by Bacillus sp. LY with heterotrophic nitrogen removal ability[J]. Environmental Science, 2007, 28(12):2838-2842. (in Chinese))

[6] AZIM M E, LITTLE D C, BRON J E. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C : N ratio in feed and the implications for fish culture[J]. Bioresource Technology, 2007, 99(9): 3590-3599.

[7] 王涛,刘青松,李华,等. 生物絮团技术在水产养殖水处理系统中作用与管理的研究进展[J]. 海洋湖沼通报, 2019, 166(1):121-127. (WANG Tao, LIU Qingsong, LI Hua, et al. Research progress on the application and management of biofloc technology in aquaculture water treatment [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2019, 166 (1): 121-127. (in Chinese))

[8] HE Tengxia, LI Zhenlun, SUN Quan, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion[J]. Bioresource Technology, 2016, 200: 493-499.

[9] 李晓晨,杨敏,王超,等. 城市污水 H-A-O 生物脱氮工艺研究[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2006, 34(4):370-373. (LI Xiaochen, YANG Min, WANG Chao, et al. H-A-O process for bio-nitrogen removal from urban wastewater. Journal of Hohai University(Natural Sciences), 2006, 34(4):370-373. (in Chinese))

[10] ZHOU Maohong, YE Hairen, ZHAO Xiaowei. Ammonium removal by a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* KTB from wastewater[J]. Water Quality Research Journal of Canada, 2015, 50(3): 219-227.

[11] 何霞,吕剑,何义亮,等. 异养硝化机理的研究进展[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 844-847. (HE Xia, LYU Jian, HE Yiliang, et al. Study progress on the mechanism of heterotrophic nitrification[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(5): 844-847. (in Chinese))

[12] BERNAT K, WOJNOWSKA-BARYA I. Carbon source in aerobic denitrification[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 36(2):116-122.

[13] ZOU Shiqiang, YAO Shuo, NI Jinren. High-efficient nitrogen removal by coupling enriched autotrophic-nitrification and aerobic-denitrification consortiums at cold temperature[J]. Bioresource Technology, 2014, 161: 288-296.

[14] 陈咄圳,王立刚,王迎春,等. 异养硝化-好氧反硝化菌的筛选及脱氮性能的实验研究[J]. 环境科学, 2009,30(12): 3614-3618. (CHEN Peizhen, WANG Ligang, WANG Yingchun, et al. Screening and denitrification characteristics of a heterotrophic nitrification- aerobic denitrifier bacteria[J]. Environmental Science, 2009,30(12):3614-3618. (in Chinese))

[15] 杨垒. 高效异养硝化细菌的脱氮特性及其处理高氨氮废水研究[D]. 西安:西安建筑科技大学, 2016.

[16] 陈京京. 紫外分光光度法与气相分子吸收光谱法测定水中硝酸盐氮的比较[J]. 环境与发展, 2017(10):161,163. (CHEN Jingjing. Comparison of Ultraviolet spectrophotometry and gas-phase molecular absorption spectrometry for Determining nitrate nitrogen in water[J]. Environment and Development, 2017(10):161,163. (in Chinese))

[17] 袁君君. 紫尿酸-Fe(Ⅲ)分光光度法测定盐酸羟胺[J]. 化学分析计量, 2014(6):49-51. (YUAN Junjun. Determination of hydroxylamine hydrochloride by violuric acid-Fe(Ⅲ) spectrophotometry[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2014(6):49-51. (in Chinese))

[18] 方海洋,王智,李建华,等. 异养硝化-好氧反硝化菌粪产碱杆菌的脱氮特性[J]. 环境工程学报, 2015, 9(2):983-988. (FANG Haiyang, WANG Zhi, LI Jianhua, et al. Denitrifing characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain *Alcaligenes faecalis* No.4[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(2):983-988. (in Chinese))

[19] 游海. 一株异养硝化-好氧反硝化菌的分离,鉴定及降解特性研究[D]. 武汉:武汉科技大学. 2013.

[20] 姜磊,徐成斌,马溪平,等. 1株好氧反硝化菌的分离鉴定和反硝化特性研究[J]. 环境科学与技术, 2013,36(3):12-15. (JIANG Lei, XU Chengbin, MA Xiping, et al. Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitrifier[J]. Environmental Science & Technology, 2013,36(3):12-15. (in Chinese))

[21] LYU Jian, JIN Qiang, HE Yiliang, et al. Simultaneous removal of phenol and ammonium using *Serratia* sp. LJ-1 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. Water, Air & Soil Pollution, 2014, 225:2125-2135.

[22] 颜薇芝,张汉强,余从田,等. 1株异养硝化好氧反硝化不动杆菌的分离及脱氮性能[J]. 环境工程学报, 2017, 11(7): 4419-4428. (YAN Weizhi, ZHANG Hanqiang, YU Congtian, et al. Isolation of *Acinetobacter* sp. YN3 and its Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification characters[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2017, 11(7):4419-4428. (in Chinese))

[23] 王田野,魏荷芬,胡子全,等. 一株异养硝化好氧反硝化菌的筛选鉴定及其脱氮特性[J]. 环境科学学报, 2017(3): 945-953. (WANG Tianye,WEI Hefen,HU Ziquan, et al. Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying strain and its denitrification characteristics[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017(3):945-953. (in Chinese))

[24] GUO Liyun, CHEN Qiankun, FANG Fei, et al. Application potential of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier for nitrate and ammonium removal of eutrophic lake water[J]. Bioresource Technology, 2013, 142: 45-51.

[25] JOO H S, HIRAI M, SHODA M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. Water Research, 2006, 40(16):3029-3036.