

别绮雯,王进,马丁,等.一株耐盐反硝化菌的分离及脱氮特性[J].环境科学与技术,2025,48(5):97-109. Bie Qiwen, Wang Jin, Ma Ding, et al. Isolation and denitrification characteristics of a saline-tolerant denitrifying bacterial strain[J]. Environmental Science & Technology, 2025, 48(5): 97-109.

一株耐盐反硝化菌的分离及脱氮特性

别绮雯, 王进*, 马丁, 江一凡,
岳正波, 张露

(合肥工业大学资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要:为克服高盐环境对生物反硝化的抑制作用,该研究从某化工园区污水处理厂活性污泥中分离出1株耐盐反硝化菌,对其进行了物种鉴定,探究了不同环境因子对菌株耐盐反硝化的影响,分析了氮平衡转化,并对全基因组测序进行了解析。该菌株被鉴定并命名为 *Stutzerimonas degradans* BP。在4%盐度胁迫下,以150 mg/L的硝酸盐为唯一氮源培养,菌株BP最适的反硝化碳源为乙酸钠,C/N比为4,pH值为7,温度为35℃,48 h硝酸盐还原率超过了94%,72 h参与还原的硝酸盐全部还原为氮气脱除。京都基因与基因组百科全书(KEGG)注释结果表明,菌株BP反硝化的代谢通路为 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$,耐盐机制为 K^+ 的摄入及相容性溶质脯氨酸、谷氨酸和海藻糖的合成。菌株BP为高盐废水生物脱氮处理提供了高效的菌种资源,显示出广阔的应用前景。

关键词:耐盐; 反硝化; 环境因子; 氮平衡; KEGG

中图分类号:X703 **文献标志码:**A **doi:**10.19672/j.cnki.1003-6504.2127.24.338 **文章编号:**1003-6504(2025)05-0097-13

Isolation and Denitrification Characteristics of a Saline-tolerant Denitrifying Bacterial Strain

BIE Qiwen, WANG Jin*, MA Ding, JIANG Yifan,
YUE Zhengbo, ZHANG Lu

(School of Resources and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: In order to overcome the inhibitory effect of high-saline environment on biological denitrification, a saline-tolerant denitrifying bacterial strain was isolated from the activated sludge of a wastewater treatment plant in a chemical industry park, its species identification was carried out, the effects of different environmental factors on saline-tolerant denitrification of the strain were explored, nitrogen balance transformation and whole genome sequencing was analyzed. The strain was identified and named as *Stutzerimonas degradans* BP. Incubated under 4% salinity stress and with 150 mg/L nitrate as the sole nitrogen source, the optimal denitrifying carbon source of strain BP was sodium acetate, C/N ratio was 4, pH was 7, and temperature was 35℃, the rate of nitrate reduction was more than 94% after 48 h, and all nitrate involved in the reduction was reduced to nitrogen after 72 h. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) annotation results showed that the metabolic pathway of denitrification of strain BP was $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$, and the saline-tolerant mechanisms were the uptake of K^+ and the synthesis of the compatible solutes of proline, glutamate and alginate. Strain BP provides an efficient strain resource for biological denitrification treatment of high-saline wastewater and shows a broad application prospect.

Key words: salinity; denitrification; environmental factors; nitrogen balance; KEGG

随着工业化进程加快,高盐废水的排放量正以每年2%的速度增长,其主要来源于化工、纺织、造纸、食品加工等行业^[1]。这些废水中含有大量的氯化物、硫酸盐、碳酸盐等溶解性盐,会对水生生物的生长代谢产生抑制作用,大大降低了传统生物处理技术

对污染物的去除效果。因此,开发出能够有效抗盐胁迫的生物处理技术,对于污染的处理与资源化具有重要意义^[2]。

氮是水环境污染主要控制的污染物之一,高浓度硝酸盐会对人体健康造成严重危害^[3]。近年来,硝酸

盐废水越来越呈现高盐的特点^[4]。生物脱氮的效果与所使用微生物的特性密切相关^[5]。废水中高浓度的无机盐离子对淡水微生物的生长代谢有抑制和毒害作用,引起微生物细胞脱水,降低酶的活性,使得传统的生物脱氮技术难以达到预期效果^[6]。相比之下,耐盐微生物能够在高盐环境中生长,通过离子平衡、相容性溶质积累等方式克服高盐环境对自身生长代谢的抑制,实现污染物的去除^[7]。有研究表明,在盐度为5%的条件下,耐盐反硝化菌对两级生物接触氧化反应器(TBOR)中 NH_4^+-N 的去除率和移动床生物膜反应器(MBBR)中TN的去除率分别提高了26.05%和15.90%^[8]。利用耐盐反硝化菌剂,通过梯度盐度驯化,能够快速启动序批式生物膜反应器(SBBRs)^[6]。由此可见,耐盐反硝化菌的筛选十分必要。通过分离筛选出能耐受高盐环境的反硝化菌株,能够为生物法处理高盐氮污染废水提供有效的菌种资源,简化高盐废水的预处理,降低工艺成本,提高高盐废水的生物脱氮效率,为脱氮处理工艺及生物强化菌剂的开发和应用提供理论依据和技术支持^[9,10]。

近年来,好氧型耐盐反硝化研究取得了显著进展,已鉴定出大量的菌种资源以用于工程实践,包括 *Vibrio* sp. LV-Q1^[11]、*Rhodococcus pyridinivorans* RL-GZ01^[12]、*Zobellella endophytica* W14^[13]、*Pseudomonas stutzeri* JI-2^[14]等。好氧反硝化产物多为一氧化二氮,会加剧温室效应,而传统的厌氧或兼性厌氧型反硝化能进一步将氮氧化物还原为氮气,不引发二次污染。目前关于传统反硝化对盐度适应性的研究进展缓慢^[15],尤其是对于兼性厌氧环境中的氮污染处理,耐盐性菌种资源缺口较大,如用于净化河口和沿海湿地的反硝化型厌氧甲烷氧化过程^[16],农业土壤 N_2O 的生物减排技术^[17]和处理化工废水的硝化反硝化发酵降解芳烃工艺^[18]等。

本研究从某化工园区污水处理厂活性污泥中分离出一株耐盐反硝化菌 *Stutzerimonas degradans* BP,利用单因素实验探究了不同环境因子对菌株耐盐反硝化能力的影响,进行了氮平衡分析,并通过全基因组测序揭示了菌株的反硝化通路及耐盐机制,为高盐废水生物脱氮提供了高效的菌种资源,为菌株未来的工程应用提供了研究基础和开发方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

某化工园区污水处理厂活性污泥。

1.1.2 培养基

(1)高盐CM培养基(g/L)^[19]。酵母浸粉 10,蛋白胨 7.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.42, KCl 2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, NaCl 40; pH 7。

(2)改良的反硝化DM培养基(g/L)^[20,21]。 KNO_3 1.08, CH_3COONa 4.1, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 6.26, KH_2PO_4 1.24, MgSO_4 0.2, NaCl 40; 微量元素溶液 2 mL/L, pH 7。

(3)微量元素溶液(g/L)。 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.04, H_3BO_3 0.03, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05。

各培养基需要在121℃下高压蒸气灭菌20 min,固体培养基的配制需要在液体培养基的基础上加入2%的琼脂。

1.2 方法

1.2.1 耐盐反硝化菌的分离与筛选

(1)耐盐菌的分离。用10 mmol/L PBS缓冲液对活性污泥进行梯度稀释,取稀释了 10^4 、 10^5 、 10^6 倍的菌液100 μL 涂布于高盐CM固体平板上^[22],在好氧、30℃条件下倒置培养48 h,挑取形态不同的菌落,四区划线纯分,直到菌落形态一致,镜检菌体形态一致,得到耐盐菌纯菌。

(2)反硝化菌的筛选。从纯化的耐盐菌中筛选反硝化菌^[23]。将固体平板单菌落接种到装有50 mL高盐CM培养基的锥形瓶中,30℃、150 r/min震荡培养24 h至对数期后期($\text{OD}_{600}=1$),将菌悬液于3 500 r/min下离心10 min,弃上清,沉淀用PBS重悬,重复1次,制备成菌悬液($\text{OD}_{600}=2$)。筛选反硝化菌采用高盐反硝化DM培养基,内含2 mL/L的微量元素溶液,盐度设置为4%,pH值调节为7,接种5%菌悬液,将初始 OD_{600} 控制在0.1。分别探究细菌的好氧反硝化和厌氧反硝化的能力。好氧筛选于150 mL锥形瓶内加入100 mL DM培养基,于30℃、150 r/min条件下,培养3 d。厌氧筛选于50 mL医用玻璃输液瓶内加入30 mL DM培养基,曝入氮气15 min除氧,于30℃下静置培养3 d。分别测定好氧及厌氧条件下反硝化前后 NO_3^--N 、 NO_2^--N 、 NH_4^+-N 和TN的含量。筛选出耐盐反硝化效果最好的菌株作为目标菌株进行后续实验。

1.2.2 菌种鉴定

(1)形态学观察。将菌株接种到高盐CM固体培养基中,30℃倒置培养48 h,观察菌落形态,并进行革兰氏染色确定染色情况。取生长对数期后期菌液,经2.5%戊二醛固定,酒精梯度脱水和真空冷冻干燥后,利用扫描电镜观察菌体形态。

(2)分子生物学鉴定。采用FastDNA®Spin Kit for Soil试剂盒提取细菌基因组DNA,用微量分光光度计检测DNA的质量。委托上海派森诺生物科技股份有

限公司进行对细菌的16S rDNA基因进行扩增并测序。将拼接序列上传至NCBI数据库,利用BLAST进行同源性比对,并利用Mega 11软件构建系统发育树。

1.2.3 不同环境因子对菌株耐盐反硝化的影响

通过单因素实验,探究碳源种类(乙酸钠、丁二酸钠、柠檬酸钠、葡萄糖、蔗糖)、C/N比(2、4、8、12、16)、盐度(0%、2%、4%、6%、8%)、温度(20、25、30、35、40℃)和pH值(5、6、7、8、9)对菌株耐盐反硝化的影响^[21]。周期设定为72 h,期间每12 h取1次样,采用不放回式,每个取样点设置3个平行样,测定OD₆₀₀、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N、NH₄⁺-N和TN^[24,25]。

1.2.4 氮平衡分析

用氩气替换除氧的氮气。测定反应起始和终止NO₃⁻-N、NO₂⁻-N、NH₄⁺-N、TN、胞内氮和N₂^[14]。

1.2.5 全基因组测序及功能注释

本项目采用全基因组鸟枪法,构建不同插入片段的文库,利用第二代测序技术,基于Illumina NovaSeq测序平台,对这些文库进行双末端测序。采用fastp(<https://github.com/OpenGene/fastp>)对数据进行质量控制。采用A5-MiSeq和SPAdes对去除接头序列的测序数据进行从头拼装。对得到的拼装结果进行评估和比较,并使用Pilon软件进行碱基校正。将分子网络的相关信息进行KO跨物种注释,后将KO映射到相应的KEGG Pathway通路上。

1.2.6 分析测试方法

(1)OD₆₀₀采用可见分光光度法。水样经0.22 μm微孔滤膜过滤后,采用紫外分光光度法测定NO₃⁻-N,采用盐酸α-萘胺分光光度法测定NO₂⁻-N,采用纳氏试剂分光光度法测定NH₄⁺-N,采用碱性过硫酸钾消

解紫外分光光度法测定TN。

(2)溶解性有机氮的测定方法。溶解性有机氮=TN-(NO₃⁻-N)-(NO₂⁻-N)-(NH₄⁺-N)。

(3)胞内氮的测定方法^[26]。收集反应起始和终止的细胞悬浮液,用超声波细胞破碎仪处理菌液,释放菌体内部的氮素。在2 mL离心管中加入1.5 mL菌悬液,选择变幅杆为2,功率设定为200 W,超声波一个工作周期设置4 s脉冲,6 s暂停,进行10个超声循环,然后将样品在8 000 r/min下离心10 min,超声及离心均在4℃下进行,上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤后测定TN,则胞内氮=超声处理后TN-超声处理前可溶性TN。

(4)N₂的检测方法^[27]。收集瓶内上空N₂,利用SP6890气相色谱测定N₂的浓度,钢瓶氩气输出压力为0.5 MPa,色谱载气Ⅰ 0.02 MPa,载气Ⅱ 0.2 MPa,柱温70℃,汽化Ⅰ 120℃,检测Ⅲ 120℃,选择热导检测器(TCD),N₂保留时间约0.6 s,进样量为60 μL。

2 结果与分析

2.1 耐盐反硝化菌的分离与筛选

经分离得到9株耐盐菌,从9株耐盐菌中筛选具有反硝化能力的菌株,得到耐盐反硝化能力最强的菌株BP,其耐盐反硝化效果如表1所示。BP在好氧条件下不具备反硝化能力,但在厌氧条件下经过3 d培养,总氮的去除率达到96.43%,耐盐反硝化脱氮彻底,未检测到NO₂⁻-N和NH₄⁺-N的产生,由此推断,BP的反硝化能力受到氧气浓度的抑制,氧气浓度越高,抑制作用越强。因此后续实验选择菌株BP作为目标菌株在厌氧条件下开展。

表1 耐盐反硝化菌筛选结果					
Table 1 Screening results of saline-tolerant denitrifying bacteria					
氧气条件	初始NO ₃ ⁻ -N	培养3 d			
		NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N	NH ₄ ⁺ -N	有机氮
好氧	150.58±1.09	150.67±1.21	—	—	—
厌氧		4.08±0.16	—	—	—

注:—表示未检出。下同。

2.2 形态学观察

对菌株BP进行形态学观察,菌落形态如图1(a)所示,菌落颜色为浅褐色,呈圆形,微隆起,表面光滑,边缘完整,革兰氏染色结果如图1(b)所示,菌体呈红色,鉴定为革兰氏阴性菌,扫描电镜图如图1(c)所示,菌体呈杆状,两端钝圆,大小为(3~4) μm×(8~14) μm。

2.3 分子生物学鉴定

将菌株的16S rDNA基因序列在NCBI中进行Blast比对,基于同源性构建系统发育树,结果如图2所示。

与菌株同源较高的为*Pseudomonas*和*Stutzerimonas*,*Stutzerimonas*为*Pseudomonas*部分物种转移的新属^[26],二者同源性很高。菌株与*Stutzerimonas degradans*亲缘关系最近,推测菌株为*Stutzerimonas degradans*,将其命名为*Stutzerimonas degradans* BP。

2.4 不同环境因子对菌株BP耐盐反硝化的影响

2.4.1 碳源种类对菌株BP耐盐反硝化的影响

碳源种类对菌株BP耐盐反硝化的影响结果如图3所示。

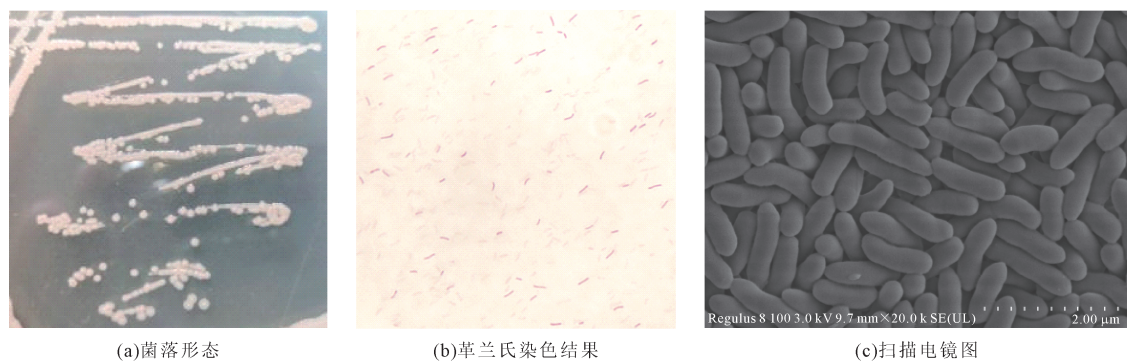


图1 菌株BP的形态学特征
Fig.1 Morphological characterization of strain BP

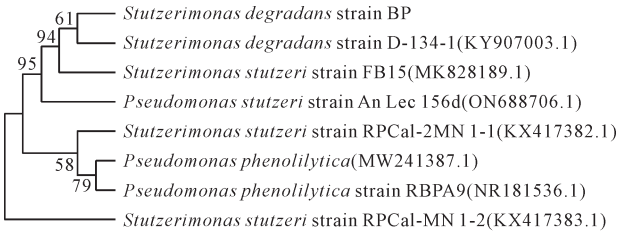


图2 基于16S rDNA基因序列同源性构建的系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree constructed based on 16S rDNA gene sequence homology

菌株BP以乙酸钠、丁二酸钠和柠檬酸钠为碳源

时,72 h 对 NO_3^- -N 和 TN 的去除率均大于 90%。其中,当以乙酸钠为碳源时,BP 的菌浓(OD_{600})达到最大值 0.20,反硝化脱氮效率也最高,48 h 硝酸盐还原率达到 94.79%,72 h 对 TN 的去除率达到 96.43%。当以葡萄糖为碳源时,BP 的反硝化能力较差,经过 72 h 培养,虽然 NO_3^- -N 基本得到还原,但积累了 85.66 mg/L 的 NO_2^- -N。当以蔗糖为碳源时,BP 不能进行反硝化,且 BP 的菌浓持续下降,推断 BP 无法利用蔗糖进行生长代谢。

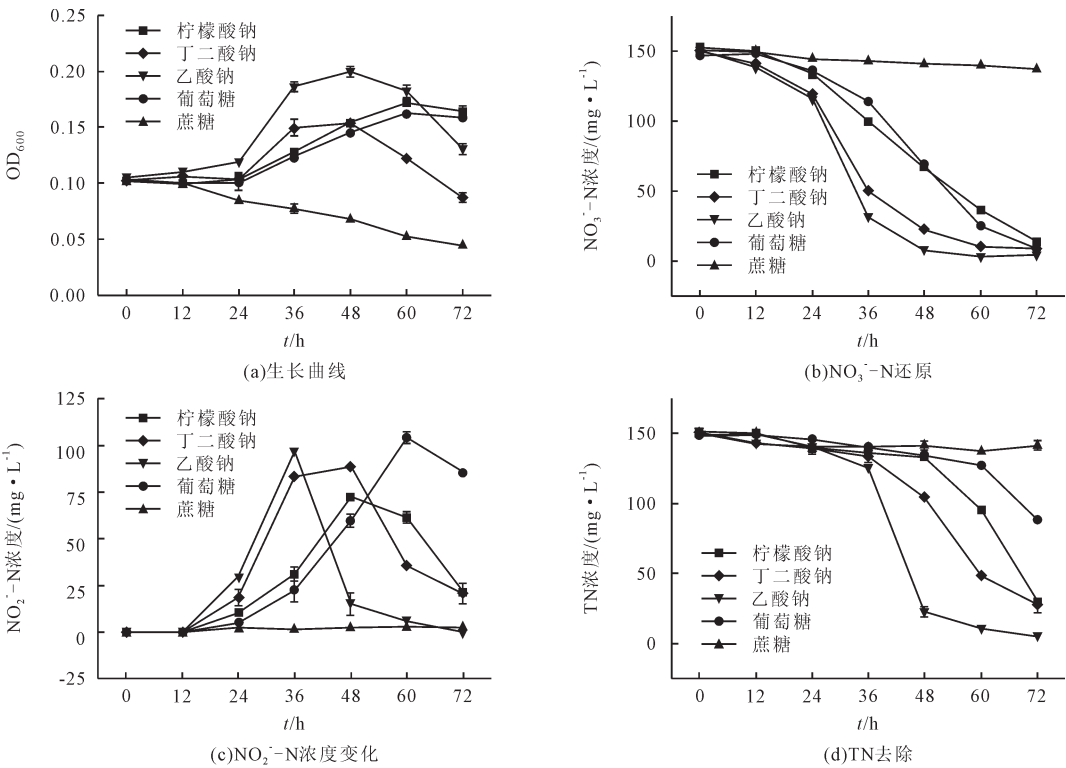


图3 碳源种类对菌株BP耐盐反硝化的影响
Fig.3 Effect of carbon source species on saline-tolerant denitrification of strain BP

2.4.2 C/N 比对菌株BP耐盐反硝化的影响

C/N 比对菌株BP耐盐反硝化的影响结果如图4所示。当C/N比为2时,菌株BP生长受到限制,碳源不足,亚硝酸盐还原过程缺少电子供体,且亚硝酸盐还原酶对电子供体的竞争力弱于硝酸盐还原酶^[29],故反

硝化终点 NO_3^- -N 还原完毕,但积累了一定的 NO_2^- -N,浓度趋于 23 mg/L。当C/N比增加到4,在补充缺少的碳源后,经过72 h培养,TN的去除率达到96.12%。当C/N比增加为8时,脱氮效率略有降低。当C/N比超过8时,脱氮效率显著降低。

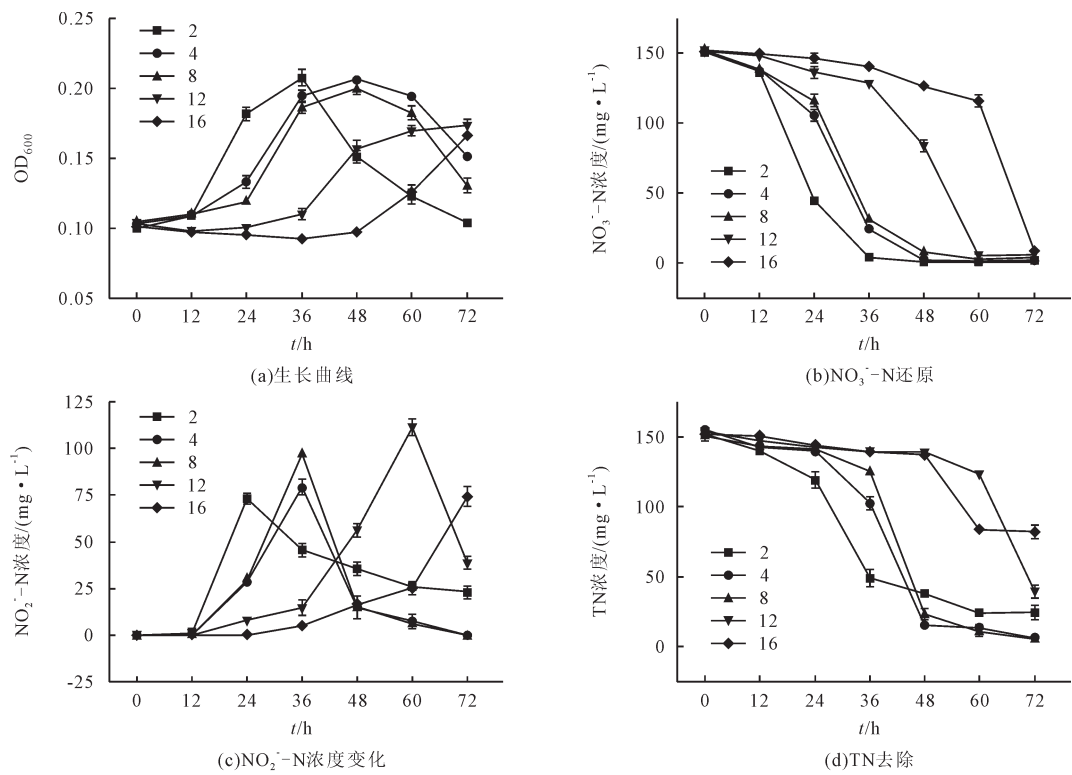


图4 C/N比对菌株BP耐盐反硝化的影响
Fig.4 Effect of C/N ratio on saline-tolerant denitrification of strain BP

2.4.3 盐度对菌株BP耐盐反硝化的影响

盐度对菌株BP耐盐反硝化的影响结果如图5所示。当盐度为0%~2%时,菌株BP经24 h对TN的去除率大于97%,具有较强的反硝化能力。0%盐度组

BP菌浓的增量与硝酸盐还原效率均为2%盐度组的一半,表明过低的盐度条件不利于BP的生长和氮代谢。随着盐度进一步上升到4%,BP生长开始受到高盐抑制,适应期增长为24 h,反硝化在前24 h受到抑

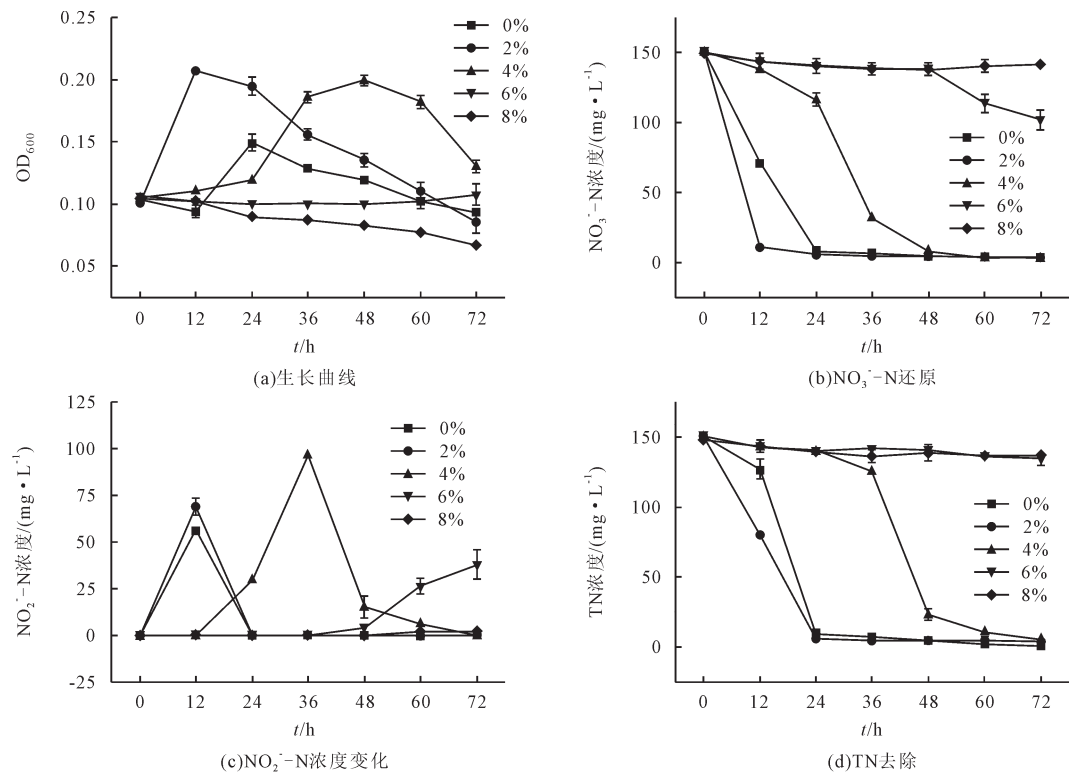


图5 盐度对菌株BP耐盐反硝化的影响
Fig.5 Effect of salinity on saline-tolerant denitrification of strain BP

制,硝酸盐还原率仅为 23.02%,24 h 后随着 BP 进入生长对数期,大量 $\text{NO}_3^- \text{--} \text{N}$ 被还原为 $\text{NO}_2^- \text{--} \text{N}$,且在 36 h 积累到最高值 96.73 mg/L,反应进行至 72 h 基本完成对 TN 的脱除。当盐度为 6‰ 时,BP 的生长受到 48 h 的抑制,经过 72 h,硝酸盐还原率仅为 31.90%。而当盐度增加至 8‰ 时,过高的盐度破坏了细胞膜的功能及细胞内外的渗透压平衡,细胞逐渐衰亡。

2.4.4 温度对菌株 BP 耐盐反硝化的影响

温度对菌株 BP 耐盐反硝化的影响结果如图 6 所示。当培养温度为 30~40 ℃ 时,菌株 BP 具有较高的

耐盐反硝化效率,且随着温度升高,脱氮效率呈现先升高后降低的趋势。BP 在 35 ℃ 条件下培养,24 h 菌浓便达到 0.195,36 h 硝酸盐还原率为 94.78%,60 h 去除了 97.24% 的 TN。温度在 30 ℃ 和 40 ℃ 条件下,72 h TN 的去除率分别为 96.43% 和 73.00%,当温度过高达到 40 ℃ 时,BP 出现负增长,12 h 菌浓由初始的 0.10 降低为 0.054,脱氮完成之前,菌浓稳定在 0.05 左右,说明 40 ℃ 下 BP 生长稳定期的菌浓能够保持在 0.05 左右。当温度小于 30 ℃ 时,反硝化效率随温度的降低而降低,当温度降低到 20 ℃ 时,BP 无法进行正常的生长代谢。

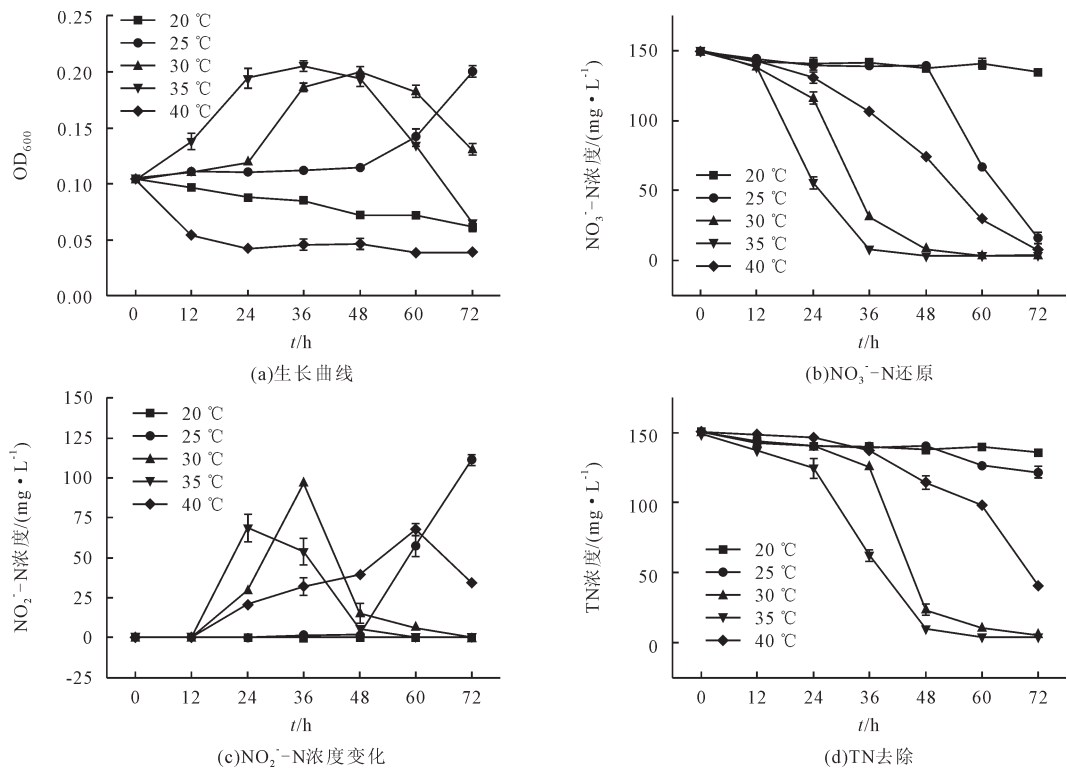


图6 温度对菌株BP耐盐反硝化的影响
Fig.6 Effect of temperature on saline-tolerant denitrification of strain BP

2.4.5 pH对菌株BP耐盐反硝化的影响

pH对菌株BP耐盐反硝化的影响结果如图7所示。在初始pH值为7~8时,菌株BP反硝化效果较好,经过72 h培养,TN的去除率大于90%,尤其当pH为7时,48 h对TN的去除率能达到84.73%。与pH为7相比,pH为8时,BP菌浓在小幅度上升为0.11后平稳下降,最终稳定在0.08左右,反硝化效率有所降低,但72 h TN的去除率仍能达到93.24%。当pH上升到9时,BP在培养24 h后菌浓下降为0.044,并稳定在0.04左右,72 h的硝酸盐还原率仅为24.03%。当pH小于7时,BP无法进行反硝化,细胞的生长随着pH值的下降而下降,没有稳定的趋势。

2.5 氮平衡分析

菌株BP经过72 h培养后, $\text{NO}_3^- \text{--} \text{N}$ 的转化情况如

表2所示。溶解性 $\text{NO}_3^- \text{--} \text{N}$ 的初始浓度为150.58 mg/L,参与反硝化过程的 $\text{NO}_3^- \text{--} \text{N}$ 有146.50 mg/L,剩余4.08 mg/L的 $\text{NO}_3^- \text{--} \text{N}$ 未参与还原。参与还原的 $\text{NO}_3^- \text{--} \text{N}$ 主要转化为 N_2 ,占比达到99.41%,极少量转化为胞内氮,胞内氮的含量与菌浓呈正相关,反应结束后溶液中未检测到 $\text{NO}_2^- \text{--} \text{N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{--} \text{N}$ 和有机氮。

2.6 菌株BP全基因组的功能注释特征及耐盐脱氮机制分析

全基因组原始数据已上传至SRA数据库,登录号为PRJNA1180705。

2.6.1 菌株BP基因组的KEGG功能注释

KEGG数据库侧重于反应各种代谢通路,统计结果如图8所示。KEGG将代谢通路分为细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、新陈代谢、有

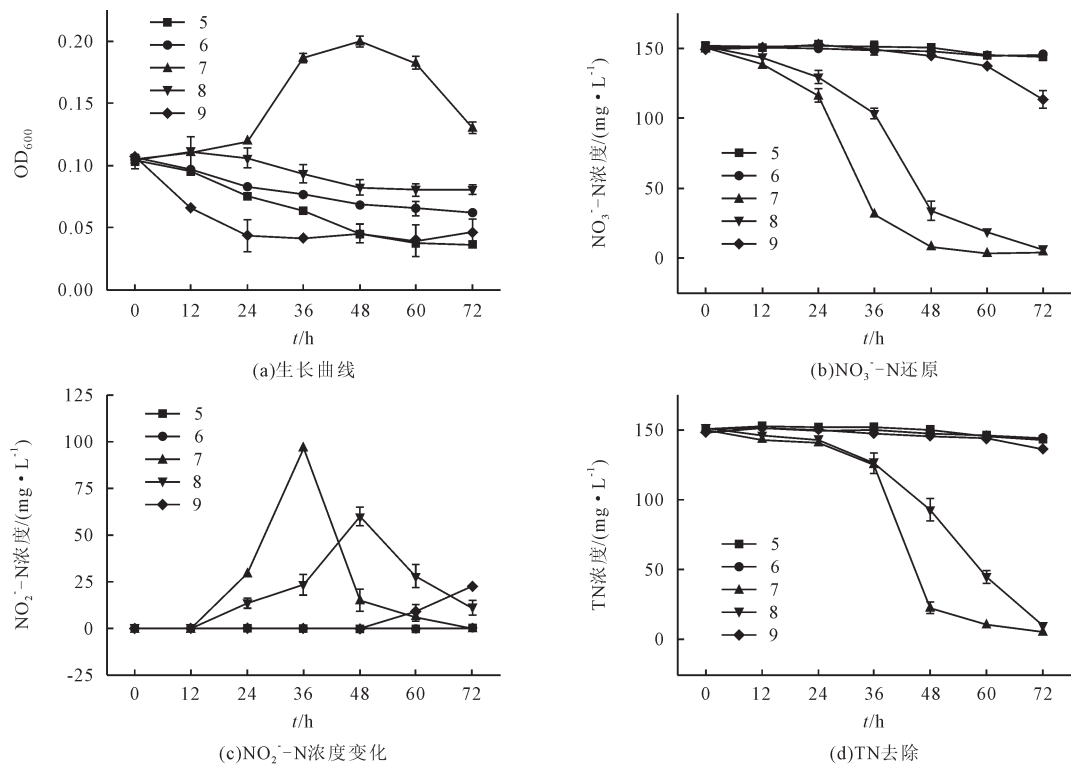


图7 pH对菌株BP耐盐反硝化的影响
Fig.7 Effect of pH on saline-tolerant denitrification of strain BP

表2 菌株BP的氮平衡分析
Table 2 Nitrogen balance analysis of strain BP

t/h	溶解性氮/(mg·L ⁻¹)				胞内氮/(mg·L ⁻¹)	N ₂ /(mg·L ⁻¹)	NO及N ₂ O/(mg·L ⁻¹)	OD ₆₀₀
	NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N	NH ₄ ⁺ -N	有机氮				
0	150.58±1.09	—	—	—	4.53±1.65	—	—	0.105±0.001
72	4.08±0.16	—	—	—	5.89±2.12	145.63±6.54	—	0.130±0.003

机系统六大类,另存在层次结构及非通路和层次结构两部分。在被KEGG注释到的3 706个基因中,与新陈代谢通路相关的数量最多,有1 418个,占编码基因总数的38.26%。其中,参与碳水化合物代谢和氨基酸代谢的基因数量最多,分别达到301个和277个。结果表明,新陈代谢是菌株BP维持生命活动的基础,碳水化合物和氨基酸是重要的物质组成和能量来源,对细胞的生长代谢至关重要。

2.6.2 氮代谢通路及相关基因

菌株BP的KEGG氮代谢通路如图9所示,KEGG注释到完整的同化硝酸盐还原、异化硝酸盐还原和反硝化通路,说明BP具有同化硝酸盐还原、异化硝酸盐还原或反硝化的潜力。同化硝酸盐还原是细胞利用无机氮源合成胞内有机氮化合物的重要过程,微生物将NO₃⁻-N吸收到体内,在体内将NO₃⁻-N还原为NH₄⁺-N,然后参与合成细胞的含氮组分。异化硝酸盐还原是指,微生物将NO₃⁻-N先还原为NO₂⁻-N,进而直接还原为NH₄⁺-N的过程。反硝化是指微生物对NO₃⁻-N进行一系列还原,最终转化为N₂的过程,具体路径为NO₃⁻-N→NO₂⁻-N→NO→N₂O→N₂。

表3为KEGG注释到的与反硝化功能相关的基因,其中,编码硝酸盐还原酶的基因包括周质硝酸盐还原酶基因(*napA/B*)和膜内硝酸盐还原酶基因(*narG/H/I*)。相关研究表明,*napA/B*既能在好氧环境中表达又能在厌氧环境中表达^[30],而*narG/H/I*对氧气敏感,主要在厌氧环境中表达^[31],菌株BP在厌氧条件下发挥耐盐反硝化作用,推测是2种硝酸盐还原酶基因共同作用的结果。感应器(NarX)响应信号,并通过磷酸化反应将信号传递到胞内的反应调节蛋白NarL上,NarL发生构象变化,从而激活*narG*、*narH*、*narI*及*narJ*的表达。此外,KEGG注释到编码硝酸盐和亚硝酸盐通道蛋白的基因*nrt*。

2.6.3 耐盐相关基因

现有关于耐盐菌的渗透压调节机制主要有2种:一是K⁺进入细胞以增强胞内渗透压^[32],排出胞内过量的Na⁺^[33],减少对细胞的毒害作用;二是向胞内积累或合成相容性溶质,平衡渗透压,稳定细胞结构,维持细胞功能^[34],目前发现的相容性溶质主要包括海藻糖、脯氨酸、谷氨酸、甜菜碱、四氢嘧啶等^[35]。

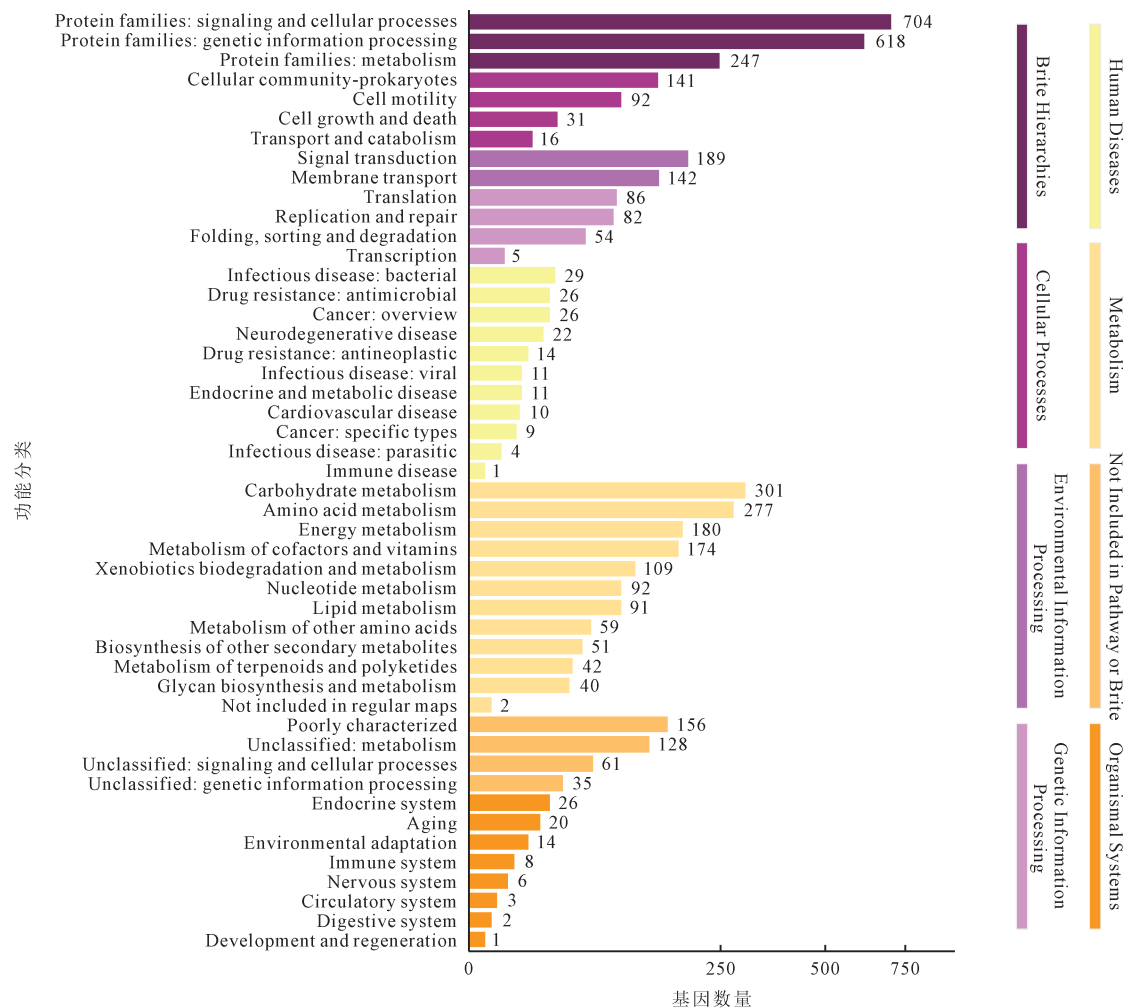


图8 菌株BP基因组的KEGG注释
Fig.8 KEGG annotation of strain BP genome

表4为KEGG注释到与耐盐相关的基因,涵盖上述2种机制,与K⁺摄入相关的有编码离子通道电压门控钾通道的基因 *kch*、编码转运蛋白系统钾吸收蛋白的基因 *trkH* 和 *trkA*、编码K⁺/H⁺逆向转运蛋白的基因 *cvrA*,以及编码双组分信号传导系统组氨酸激酶的基因 *kdpD* 和 KDP 操纵子反应调节蛋白的基因 *kdpE*。KEGG 并未注释到与Na⁺排出相关的基因。此外,KEGG 注释到催化脯氨酸、谷氨酸和海藻糖合成的酶蛋白的相关基因,包括 *proC*、*gudB*、*gdhA*、*gltB*、*gltD*、*putA* 和 *treZ*。

3 讨论

本研究从某化工园区污水处理厂活性污泥中分离得到一株兼性厌氧的耐盐反硝化菌,经鉴定为 *Stutzerimonas degradans*,将其命名为 *Stutzerimonas degradans* BP。菌株BP暴露于有氧环境,24 h内不会受到氧气浓度抑制,有利于实现菌种扩培。在厌氧环境下,进行高效的耐盐反硝化,克服了传统反硝化菌受到的盐度抑制问题。

有机碳源在细菌的反硝化过程中,为NO₃⁻-N和NO₂⁻-N的还原提供电子。BP利用有机酸盐类进行反硝化脱氮的能力,明显优于葡萄糖和蔗糖等糖类,且乙酸钠为BP进行耐盐反硝化的最优碳源,这可能是因为是在厌氧条件下,有机酸(尤其是乙酸)可以被细胞迅速利用,而糖类物质需要经过多步分解(如糖酵解)转化成细胞可直接利用的简单分子^[36]。在利用不同碳源进行反硝化的过程中,均存在中间产物NO₂⁻-N先积累后脱除的过程,NO₂⁻-N的积累表明,在反硝化过程中硝酸盐还原速率大于亚硝酸盐还原,这可能是由于反硝化过程中亚硝酸盐还原酶对电子供体的竞争力弱于硝酸盐还原酶^[29]。此外,以乙酸钠为碳源时,BP耐盐反硝化适宜的C/N比为4,当C/N比小于4时,硝酸盐还原过程缺少电子供体;当C/N比大于4时,菌株的生长及脱氮能力降低,过高和过低的C/N比均不利于BP的生长和反硝化,这与菌株 *Acinetobacter* sp. Z1 的研究结果一致^[37]。传统反硝化细菌对碳源有很高的亲和力^[38],高碳氮比意味着电子供体丰富而电子受体相对匮乏,从而阻碍了细菌反硝化的电子传递过

表 4 KEGG 注释到与耐盐相关的基因
Table 4 KEGG annotations to genes associated with salt tolerance

基因	基因 ID	功能注释	代谢通路
<i>kch</i>	K10716	电压门控钾离子通道	运输系统
<i>trkH</i>	K03498	trk 系统钾摄取蛋白	
<i>trkA</i>	K03499	trk 系统钾摄取蛋白	
<i>cvrA</i>	K11105	细胞体积调节蛋白 A	
<i>kdpD</i>	K07646	传感器组氨酸激酶	双组分系统
<i>kdpE</i>	K07667	KDP 操作子反应调节器	
<i>proC</i>	K00286	吡咯啉-5-羧酸还原酶	精氨酸和脯氨酸代谢
<i>gudB</i>	K00260	谷氨酸脱氢酶	
<i>gdhA</i>	K00262	谷氨酸脱氢酶(NADP ⁺)	丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢
<i>glbB</i>	K00265	谷氨酸合成酶(NADPH)大链	
<i>glbD</i>	K00266	谷氨酸合成酶(NADPH)小链	
<i>putA</i>	K13821	RHH 型转录调节器、脯氨酸利用调节子抑制因子/脯氨酸脱氢酶/ δ1-吡咯啉-5-羧酸脱氢酶	
<i>treZ</i>	K01236	麦芽寡糖三卤水合酶	

和 K⁺/Na⁺, 当 Na⁺ 浓度过低时, 离子平衡被打破, 影响细胞正常的生长代谢^[11,39,40]。当盐度大于 6% 时, 大于 BP 调节的阈值, 细胞脱水, 无法维持细胞结构的稳定, 酶蛋白失活, 细胞膜功能丧失。BP 可应用于盐度为 0%~6% 废水的反硝化脱氮处理。0%~4% 盐度范围内, 反硝化过程中 NO₂⁻-N 积累浓度随着盐度的增加而增加, Ozturk^[41] 的研究也有相似的结果。这表明盐度对亚硝酸盐还原酶的抑制作用大于硝酸盐还原酶, 且呈正相关, Gui 等^[42] 研究表明, 亚硝酸盐还原酶基因对盐度的敏感程度大于硝酸盐还原, 进一步从基因表达层面佐证了这一点。指导 BP 应用于实际脱氮中遇盐度较高时, 应强化亚硝酸盐还原过程。例如通过引入硫酸盐还原、自养/异养反硝化耦合的方式, 实现高盐废水中 NO₂⁻-N 的高效去除^[43]。

反硝化菌通常为嗜温菌^[21], BP 也是一株嗜温菌, 最适温度为 35 ℃, 在 20~40 ℃ 的温度范围内, 随着温度升高, BP 的脱氮效率呈现先升高后下降的趋势。温度升高一定程度上会增加细菌及酶的活性, 但过高的温度反而会降低细菌的生长速率并导致酶的失活^[44], 从而影响 BP 的反硝化能力。亚硝酸盐还原酶和硝酸盐还原酶受到温度的影响程度不同, 低温环境下, 亚硝酸盐还原酶活性受到的抑制作用更明显^[45], 推测这是 BP 在越低的温度下, 中间过程 NO₂⁻-N 浓度积累越高的原因。BP 适用于中性及弱碱性环境。当初始 pH 为 7~9 时, 随着 pH 升高, BP 菌浓虽有所下降, 但最终能够稳定在生长平台期, 且具有一定的反硝化能力。尤其是 pH 为 8 时, BP 菌浓几乎没有上升, 但 72 h TN 的去除率能大于 90%, 说明微碱环境下, BP 将更多的能量用于氮代谢而非自身的生长繁殖^[46]。而当 pH 小于 7 时, 随着 pH 降低, BP 菌浓持续下降, 且不具备反硝化能力。现有反硝化菌大多适用于中性或弱碱性环

境, 在酸性和强碱性环境中的活性往往受到抑制^[47]。

在以 NO₃⁻-N 为 BP 厌氧耐盐反硝化唯一氮源的情况下, BP 硝酸盐还原的产物主要为 N₂, 菌株 *Pseudomonas* sp. XS-18^[48] 和 *Vibrio* sp. LV-Q1^[11] 的脱氮产物也有类似的特点。此类微生物在脱氮过程中能够将氮转化为 N₂, 不产生温室气体 N₂O, 其开发利用对于环境保护具有积极意义。

分析基因组测序结果, 虽然 KEGG 氮代谢注释到完整异化硝酸盐还原为铵、同化硝酸盐还原为铵和反硝化通路, 但根据氮平衡分析结果, BP 参与还原的 NO₃⁻-N 几乎全部转化为 N₂, 表明在硝酸盐还原过程中, 反硝化占主导地位。在硝酸盐还原过程中, 并未检测到 NH₄⁺-N 的产生, 推测在厌氧条件下, 反硝化更有利于 BP 的生长代谢, BP 倾向于选择表达反硝化代谢途径, 而在好氧条件下, 微生物可能倾向于进行异化硝酸盐还原为铵的过程^[49]。在实际应用过程中, 异化硝酸盐还原为铵的氮转化过程既与反硝化过程竞争 NO₃⁻-N 和电子供体, 又影响硝化过程, 整体制约了生物脱氮过程^[49], 菌株 BP 以反硝化为主导的氮代谢途径展现出独特的优势。随着脱氮过程结束, 氮源不足, 细菌进入衰亡期, 几乎未检测到胞内氮的积累, 该条件下, 同化硝酸盐还原可能作为一个中间过程或未发生。

通过对耐盐基因的挖掘, BP 的耐盐机制可能包括, K⁺ 的摄入以及合成脯氨酸、谷氨酸和海藻糖以平衡高盐环境下细胞内外的渗透压, 具体还需要进一步研究, BP 生产相容性溶质的潜力为相容性溶质的工业化生产提供了新的来源。Zhang 等^[50] 研究表明, 外源添加相容性溶质可以减轻盐度抑制, 在实际应用中可以通过外加脯氨酸、谷氨酸和海藻糖等强化 BP 的耐盐性。

4 结论

(1)从某化工园区污水处理厂活性污泥中分离得到一株耐盐反硝化菌 *Stutzerimonas degradans* BP,经单因素实验探究发现,BP在4%盐度下反硝化脱氮的最佳碳源为乙酸钠,C/N比为4,温度为35℃,pH值为7。

(2)在4%盐度下,BP经48 h的硝酸盐还原率大于94%,72 h对TN的去除率大于96%,表现出优良的耐盐反硝化能力。后续可继续研究BP与其他微生物的协同作用,开发复合菌剂,应用于不同类型高盐废水的生物处理。此外,基于此开发出更高效、经济和环保的工艺或设备。

(3)氮平衡分析表明,BP参与还原的NO₃⁻-N有99%以上转化为N₂,无二次污染。

(4)全基因组KEGG注释结果表明,菌株BP的反硝化代谢通路为NO₃⁻-N→NO₂⁻-N→NO→N₂O→N₂,耐盐机制可能为K⁺的摄入以及相容性溶质脯氨酸、谷氨酸和海藻糖的合成。

【参考文献】

[1] Huang Z Y, Yi G P, Wang Q D, et al. Improving microbial activity in high-salt wastewater: a review of innovative approaches[J]. Science of the Total Environment, 2024, 954: 176278.

[2] Song Q, Chen X G, Hua Y, et al. Biological treatment processes for saline organic wastewater and related inhibition mechanisms and facilitation techniques: a comprehensive review[J]. Environmental Research, 2023,239:117404.

[3] Fei Y M, Zhang B G, Zhang Q H, et al. Multiple pathways of vanadate reduction and denitrification mediated by denitrifying bacterium *Acidovorax* sp. strain BoFeN1[J]. Water Research, 2024,257:121747.

[4] Zhang L F, Huang X D, Chen W T, et al. Microalgae-assisted heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process for cost-effective nitrogen and phosphorus removal from high-salinity wastewater: performance, mechanism, and bacterial community[J]. Bioresource Technology, 2023, 390: 129901.

[5] Jin Y, Liu D, Xiong W, et al. Enhancing nitrogen removal performance using immobilized aerobic denitrifying bacteria by modified polyvinyl alcohol/sodium alginate (PVA/SA) [J]. Chemosphere, 2024,357:141954.

[6] Feng L J, Wu G Y, Zhang Z L, et al. Improving denitrification performance of biofilm technology with salt-tolerant denitrifying bacteria agent for treating high-strength nitrate and sulfate wastewater from lab-scale to pilot-scale[J]. Bioresource Technology, 2023,387:129696.

[7] Sun S M, Wang S, Yin Y L, et al. Competitive mechanism

of salt-tolerance/ degradation-performance of organic pollutant in bacteria: Na⁺/H⁺ antiporters contribute to salt-stress resistance but impact phenol degradation[J]. Water Research, 2024,255:121448.

[8] Chen W, Qin S M, Yang C X, et al. Bioaugmentation using salt-tolerant bacteria in a dual-stage process for high-salinity wastewater treatment: performance, microbial community, and salt-tolerance mechanism[J]. Journal of Water Process Engineering, 2024,57:104620.

[9] Zhang Q, Qin S M, Yuan C B, et al. A novel biofilm reactor startup with HN-AD bacteria inoculation for high ammonia-salt wastewater treatment: performance, microbial characteristics and salt-tolerant mechanism[J]. Journal of Water Process Engineering, 2024,59:105032.

[10] Huang M L, Zhang H N, Ren M, et al. The synthesis of ectoine enhance the assimilation of ammonia nitrogen in hypersaline wastewater by the salt-tolerant assimilation bacteria sludge[J]. Science of the Total Environment, 2024,913: 169694.

[11] Gao Z X, Wang Y, Chen H, et al. Biological nitrogen removal characteristics and mechanisms of a novel salt-tolerant strain *Vibrio* sp. LV-Q1 and its application capacity for high-salinity nitrogen-containing wastewater treatment[J]. Journal of Water Process Engineering, 2024,59:105098.

[12] Ren L, Guo Z Z, Zhang L L, et al. A novel aerobic denitrifying phosphate-accumulating bacterium efficiently removes phthalic acid ester, total nitrogen and phosphate from municipal wastewater[J]. Journal of Water Process Engineering, 2023,52:103532.

[13] Hu N, Li Y N, Yin J H, et al. A novel *Zobellella endophytica* W14 strain for nitrogen removal from hypersaline wastewater through simultaneous nitrification and denitrification [J]. Journal of Environmental Management, 2024, 371: 123171.

[14] Yan L L, Jiang J S, Liu S, et al. Performance and mechanism of nitrate removal by the aerobic denitrifying bacterium JI-2 with a strong autoaggregation capacity[J]. Bioresource Technology, 2022,365:128111.

[15] Chen Z, Jiang Y L, Chang Z Q, et al. Denitrification characteristics and pathways of a facultative anaerobic denitrifying strain, *Pseudomonas denitrificans* G1[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020,129(6):715-722.

[16] Niu Y H, Zheng Y L, Hou L J, et al. Microbial dynamics and activity of denitrifying anaerobic methane oxidizers in China's estuarine and coastal wetlands[J]. Science of the Total Environment, 2022,806:150425.

[17] Jonassen K R, Orm sen I, Duffner C, et al. A dual enrichment strategy provides soil- and digestate-competent nitrrous oxide-respiring bacteria for mitigating climate forcing in agriculture[J]. mBio, 2022,13(3):e0078822.

- [18] Li Z L, Zhu Y Q, Ren Z C, et al. Enhancing biochemical degradation for phenol wastewater: a preliminary study on bioaugmentation technique of anaerobic digestion and simultaneous nitrification–denitrification coupled with fermentation[J]. Journal of Water Process Engineering, 2024, 66: 105921.
- [19] 仇植. 铁炭微电解/Fenton 氧化联合生物强化技术处理环氧树脂高盐废水[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2020.
- Qiu Zhi. Treatment of High-salt Wastewater from Epoxy Resin by Iron-carbon Microelectrolysis/Fenton Oxidation Combined with Biological Enhancement Technology[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2020.
- [20] Zhang H H, Niu L M, Ma B, et al. Novel insights into aerobic denitrifying bacterial communities augmented denitrification capacity and mechanisms in lake waters[J]. Science of the Total Environment, 2023, 864: 161011.
- [21] Li B T, Jing F Y, Wu D S, et al. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorus by a novel aerobic denitrifying phosphorus-accumulating bacterium, *Pseudomonas stutzeri* ADP-19[J]. Bioresource Technology, 2021, 321: 124445.
- [22] 张志昊. 好氧反硝化细菌 *Burkholderia* sp. ZH8 的脱氮机理及生物强化应用研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2022.
- Zhang Zhihao. Mechanism on Denitrification and Application on Bioenhancement of Aerobic Bacteria *Burkholderia* sp. ZH8[D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2022.
- [23] 杨婷. *Bacillus subtilis* JD-014 好氧反硝化脱氮与调控机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- Yang Ting. Study on the Nitrogen Removal Characteristic and Aerobic Denitrification Mechanism of *Bacillus subtilis* JD-014[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [24] 冯亮. 好氧反硝化菌 *Pseudomonas stutzeri* T13 的脱氮特性及机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2021.
- Feng Liang. Characteristics and Mechanisms of Nitrogen Removal of Aerobic Denitrifier *Pseudomonas stutzeri* T13 [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2021.
- [25] 赵薇. 极地环境中分离及筛选好氧反硝化耐冷微生物的试验研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2022.
- Zhao Wei. Experimental Study on Isolation and Screening of Aerobic Denitrifying Cold-tolerant Microorganisms in Polar Environment[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2022.
- [26] Ren J L, Wei C Z, Ma H J, et al. The nitrogen-removal efficiency of a novel high-efficiency salt-tolerant aerobic denitrifier, *Halomonas alkaliphila* HRL-9, isolated from a seawater biofilter[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019, 16(22): 4451.
- [27] 赵亮. 异养硝化—好氧反硝化菌 *Acinetobacter* sp. Z1 的生理评价及其强化养猪废水处理的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2022.
- Zhao Liang. Physiological Evaluation of Heterotrophic Nitrifying–Aerobic Denitrifying Bacteria *Acinetobacter* sp. Z1 and Its Enhanced Treatment of Swine Wastewater[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2022.
- [28] Lalucat J, Gomila M, Mulet M, et al. Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2022, 45(1): 126289.
- [29] Zhang M, Tan Y F, Fan Y J, et al. Insights into nitrite accumulation and microbial structure in partial denitrification (PD) process by the combining regulation of C/N ratio and nitrate concentration[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2023, 11(3): 109891.
- [30] Ji B, Yang K, Zhu L, et al. Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 20(4): 643–651.
- [31] Bell L C, Richardson D J, Ferguson S J. Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiostreptomyces* pantotropha: the periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification[J]. FEBS Letters, 1990, 265(1/2): 85–87.
- [32] 顾頔. 中度嗜盐菌 *Brachybacterium muris* 生物学特性、盐胁迫应答的相容性溶质分子鉴定及其作用机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- Gu Di. Elucidation of the Biological Characteristics, Molecular Identification of Compatible Solutes and Its Mechanism in Response to Salt Stress from Moderately Halophilic Bacteria *Brachybacterium muris*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [33] 尚佳. 四个盐单胞菌新种的鉴定及耐盐机制分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2023.
- Shang Jia. Identification and Salt Tolerance Mechanism Analysis of Four New Species of Halomonas[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2023.
- [34] 郭雷. 外源性海藻糖强化处理高盐高氮废水脱氮性能及微生物代谢研究[D]. 重庆: 重庆理工大学, 2023.
- Guo Lei. Study on Nitrogen Removal Performance and Microbial Metabolism of Exogenous Trehalose in Enhanced Treatment of High Salt and Nitrogen Wastewater[D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2023.
- [35] 张傲洁. 苯酚降解菌 *Alcaligenes faecalis* JF101 的耐盐特性及机理研究[D]. 南宁: 广西大学, 2023.
- Zhang Aojie. Halotolerance Characteristics and Mechanism of Phenol-degrading Bacterium *Alcaligenes faecalis* JF101 [D]. Nanning: Guangxi University, 2023.
- [36] Kou Q S, Yuan Q, Chen S, et al. Alkaline pre-fermentation promotes anaerobic digestion of enhanced membrane coagulation (EMC) sludge: performance and microbial community response[J]. Water, 2024, 16(14): 2057.
- [37] Zhou X T, Zhao L, Wang X, et al. Organic and inorganic

- nitrogen removals by an ureolytic heterotrophic nitrification and aerobic denitrification strain *Acinetobacter* sp. Z1: elucidating its physiological characteristics and metabolic mechanisms[J]. *Bioresource Technology*, 2022,362:127792.
- [38] Pandey C B, Kumar U, Kaviraj M, et al. DNRA: a short-circuit in biological N-cycling to conserve nitrogen in terrestrial ecosystems[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 738:139710.
- [39] Tan C, Zhang W D, Wei Y N, et al. Insights into nitrogen removal and microbial response of marine anammox bacteria-based consortia treating saline wastewater: from high to moderate and low salinities[J]. *Bioresource Technology*, 2023,382:129220.
- [40] 张灿. *Pseudomonas putida* Y-9 生长和氮转化对钠钾比的响应[D]. 重庆:西南大学, 2021.
- Zhang Can. Growth and Nitrogen Transformation of *Pseudomonas putida* Y-9 in Response to Na/K[D]. Chongqing: Southwest University, 2021.
- [41] Ozturk A. The influence of salinity in drinking water on nitrate/nitrite removal through sulfur-driven autotrophic denitrification[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2024, 58:104835.
- [42] Gui M Y, Chen Q, Ni J R. Effect of NaCl on aerobic denitrification by strain *Achromobacter* sp. GAD-3[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017,101(12):5139-5147.
- [43] Li W, Liu J M, Zhen Y M, et al. Simultaneous removal of nitrite and organics in a biofilm-enhanced high-salt wastewater treatment system via mixotrophic denitrification coupled with sulfate reduction[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021,40:101976.
- [44] 胡杰. 新型好氧反硝化菌的耐盐脱氮特性及机理研究[D]. 武汉:武汉大学, 2022.
- Hu Jie. Characteristics and Mechanism of Halotolerance and Nitrogen Removal of a Novel Aerobic Denitrification Bacterium[D]. Wuhan: Wuhan University of Science and Technology, 2022.
- [45] Zhou J M, Ding L, Cui C Z, et al. High nitrite accumulation in hydrogenotrophic denitrification at low temperature: transcriptional regulation and microbial community succession[J]. *Water Research*, 2024,263:122144.
- [46] Sui Q W, Di F, Zhong H, et al. Molecular insight into the allocation of organic carbon to heterotrophic bacteria: carbon metabolism and the involvement in nitrogen and phosphorus removal[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 933: 173302.
- [47] Yan L L, Yin M Y, Miao J W, et al. Removal of nitrate nitrogen by *Pseudomonas* JI-2 under strong alkaline conditions: performance and mechanism[J]. *Bioresource Technology*, 2023,388:129755.
- [48] 王彩蓓. 耐碱硝酸盐还原菌 *Pseudomonas* sp. XS-18 去除硝酸盐特性研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2022.
- Wang Caixu. Study on *Pseudomonas* sp. XS-18, Alkali-resistant Nitrate Reducing Bacterium Nitrate Removal Characteristics[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2022.
- [49] Deng Y D, Ye X Y, Du X Q. Predictive modeling and analysis of key drivers of groundwater nitrate pollution based on machine learning[J]. *Journal of Hydrology*, 2023, 624: 129934.
- [50] Zhang L, Zhu K Y, Li A M. Differentiated effects of osmoprotectants on anaerobic syntrophic microbial populations at saline conditions and its engineering aspects[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016,288:116-125.