环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV
HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心
■ 出版 科学出版社

2020
Vol.41 No.5
第41卷 第5期

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第41卷 第5期
2020年5月15日

目 次

环 境 科 学
Environmental Science
第41卷第5期 2020年5月
Vol.41, No.5 May, 2020

贫营养好氧反硝化菌株的脱氮特性及氮/碳平衡分析

文刚[1,2], 王彤[1,2], 黄廷林[1,2], 万琪琪[1,2], 曹瑞华[1,2], 寇莉青[1,2], 杨尚业[1,2]
(1. 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西北水资源与环境生态教育部重点实验室, 西安 710055; 2. 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 陕西省环境工程重点实验室, 西安 710055)

摘要: 针对生物法处理贫营养水源水存在脱氮效率不高,脱氮过程电子转移不清楚等问题,以具有高效脱氮功能的贫营养好氧反硝化菌 *Acinetobacter junii* ZMF5 为研究对象,探究了菌株脱氮性能、环境适应性及反硝化过程中的电子转移. 结果表明: ① 菌株 ZMF5 具有高效的异养硝化和好氧反硝化能力,氨氮和硝氮去除速率分别为 0.211 mg·(L·h)$^{-1}$ 和 0.236 mg·(L·h)$^{-1}$,并且在反应过程中无中间产物的累积;② 通过氮素去除率以及菌株生长动力学分析,菌株 ZMF5 对不同类型的碳源均有一定的利用效果,在低 C/N、低 pH、低温的条件下仍表现出较好的氮去除性能;③ 氮平衡分析可知,比起碳水化合物羧酸盐化合物更能促进好氧反硝化过程的发生,使菌株脱氮途径发生变化,转化为气态氮(38.81%)的比例大于同化作用的氮(29.81%);④ 碳平衡分析可得,在反硝化过程中大部分碳源用于电子供体,而用于硝氮还原的电子较少,不同类型的碳源通过不同的还原势、电子供体的丰度和分子量来调节电子向硝酸盐呼吸链的转移. 琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii* ZMF5)将为微污染水源水体氮污染控制工程提供一定的菌源保障.

关键词: 贫营养水源; 脱氮; 好氧反硝化; 氮平衡; 碳平衡
中图分类号: X172 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2020)05-2339-10 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.201911201

Nitrogen Removal Performance and Nitrogen/Carbon Balance of Oligotrophic Aerobic Denitrifiers

WEN Gang[1,2], WANG Tong[1,2], HUANG Ting-lin[1,2], WAN Qi-qi[1,2], CAO Rui-hua[1,2], KOU Li-qing[1,2], YANG Shang-ye[1,2]
(1. Key Laboratory of Northwest Water Resource, Environment and Ecology, Ministry of Education, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 2. Shaanxi Key Laboratory of Environmental Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: Due to the problems of low nitrogen removal efficiency and unclear electron transfer during biological denitrification treatment of an oligotrophic drinking water reservoir, the nitrogen removal characteristics, environmental adaptability, and electron transfer during denitrification were systematically studied using the aerobic denitrifier *Acinetobacter junii* ZMF5, which has efficient nitrogen removal ability. The results showed that: ① Strain ZMF5 exhibited efficient heterotrophic nitrification and aerobic denitrification ability, with an ammonia removal rate of 0.211 mg·(L·h)$^{-1}$ and a nitrate removal rate of 0.236 mg·(L·h)$^{-1}$, and the nitrification intermediates were not accumulated during the treatment process. ② According to analysis of the nitrogen removal efficiency and growth kinetics of strain ZMF5, the strain can effectively utilize different types of carbon source, and show efficient nitrogen removal efficiency under the conditions of low C/N, low pH, and low temperature. ③Analysis of nitrogen balance showed that carboxylate compound, compared with carbohydrate, could promote the process of aerobic denitrification and change the nitrogen removal pathway of strain ZMF5, i.e., 38.81% of nitrogen was transformed into gas, higher than the 29.81% for assimilation. ④Analysis of carbon balance indicated that most carbon sources were used as electron donors in the denitrification process, but fewer electrons were used for nitrate reduction, and with respect to different carbon sources, electron transfer to the nitrate respiratory chain was regulated by different reduction potentials, electron donor abundance, and molecular weight. *Acinetobacter junii* ZMF5 could be used to control nitrogen pollution in drinking water reservoirs.

Key words: oligotrophic drinking water reservoir; nitrogen removal; aerobic denitrification; nitrogen balance; carbon balance

全国的水库大约有 8 万多座,水源水库是饮用水的重要水源,水源水库由于水流动性差,营养盐含量高,每到夏秋季节藻类水华现象频发[1]. 其中,硝酸盐含量超标是全国水源水库面临的共性问题[2]. 因此,如何减少饮用水水库中氮素污染成为了水环境领域急需解决的问题. 其中,生物脱氮法以其高效率、低成本和无二次污染的特点备受关注[3,4]. 但是,传统的反硝化过程在有氧气存在的条件下会受到抑制,很难在天然水体中发挥作用[5~7]. 好氧反硝化生物脱氮技术可以弥补传统反硝化技术的不足,利用碳源作为电子供体,氧和硝酸盐作为电子受体,同时去除水体中的碳和氮,为天然水体中氮素的去除提供了新思路[8]. 对于水源水库,缺氧条件会促

收稿日期: 2019-11-22; **修订日期**: 2019-12-02
基金项目: 国家自然科学基金项目(51678472, 51978557); 陕西省杰出青年科学基金项目(2018JC-026); 陕西省重点研发计划项目(2018ZDXM-SF-020); 陕西高校青年创新团队项目
作者简介: 文刚(1983~), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为饮用水水源水质安全保障, E-mail: hitwengang@163.com

进沉积物中污染物(铁、锰、氮和磷)的释放,导致水质反复恶化[9]. 因此,探究好氧反硝化生物脱氮技术在水源水库中的应用是解决水库水体氮素污染的关键技术.

近年来,越来越多的贫营养好氧反硝化细菌被筛分[10],有 *Janthino bacterium* sp. M-11[11]、*Acinetobacter harbinensis* HITLi7^T[12]、*Acinetobacter johnsonii* WGX-9[13] 和 *Pseudomonas stutzeri* ZF31[14] 等多个种属的高效好氧反硝化细菌. 目前关于贫好氧反硝化细菌的研究大都集中于菌株的分离鉴定、脱氮特性、最佳条件与脱氮机制的研究. 然而,对于好氧反硝化细菌脱氮机理的研究只停留在氮的转化这一方面. 碳源不仅可作为好氧反硝化细菌的生长代谢的营养物质,还为其反硝化过程提供能量和电子,但对于实际脱氮途径中碳的转移认识仍不明确,需进一步探究[15]. 此外,对于菌株生长动力学的研究大都集中在单因素底物的影响[16],仅有 Zheng 等[12]研究了在多底物(氮源和碳源)同时存在条件下对好氧反硝化细菌生长动力学的影响. 因此,加强贫营养环境好氧反硝化细菌特性和反应机制的研究,不仅有助于为微污染水体氮污染控制工程提供一定的技术支持,而且对丰富好氧反硝化脱氮理论具有重要的意义.

本研究以山东省枣庄市周村水库(117°41′E, 34°57′N)表层沉积物中分离出的高效反硝化细菌 *Acinetobacter junii* ZMF5 为研究对象,对该菌株进行 16S rRNA 分子鉴定和功能基因的扩增,探究了该菌株脱氮特性和环境适应性,并通过氮平衡和碳平衡分析该菌株好氧反硝化脱氮过程中的脱氮途径和电子转移途径,以期为菌株 ZMF5 在微污染水体中的实际应用提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

好氧反硝化菌株 *Acinetobacter junii* ZMF5 从饮用水水库沉积物中分离纯化得到,用冷冻法(-80℃)保存在实验室,使用前富集培养.

异养硝化培养基:CH_3COONa 0.1 g·L^{-1},NH_4Cl 0.02 g·L^{-1},$K_2HPO_4·3H_2O$ 0.02 g·L^{-1},$CaCl_2$ 0.01 g·L^{-1},$MgCl_2·6H_2O$ 0.01 g·L^{-1},微量元素 2 mL,pH 为 7.0~7.5.

好氧反硝化培养基:CH_3COONa 0.1 g·L^{-1},$NaNO_3$ 0.02 g·L^{-1},$K_2HPO_4·3H_2O$ 0.02 g·L^{-1},$CaCl_2$ 0.01 g·L^{-1},$MgCl_2·6H_2O$ 0.01 g·L^{-1},微量元素 2 mL,pH 为 7.0~7.5.

微量元素:EDTA 100 mg·L^{-1},$ZnSO_4$ 4.4 mg·L^{-1},$MnCl_2·4H_2O$ 10.2 mg·L^{-1},$FeSO_4·7H_2O$ 10 mg·L^{-1},$(NH_4)_6Mo_7O_{24}·4H_2O$ 2.2 mg·L^{-1}[17].

1.2 鉴定及功能基因的扩增

采用细菌基因组提取试剂盒(Omega,USA)提取菌株的 DNA 进行 16S rRNA 测序. 采用琼脂糖凝胶电泳分离检测 PCR 产物,产物测序由上海美吉桑格生物医药科技有限公司完成. 所得同源性最高的序列与 GenBank 中已登录的 16S rRNA 序列进行核苷酸同源性比较,然后用 MEGA 5.0 软件构建该菌株系统发育树. 分别以反硝化功能基因 *napA*(周质硝酸盐还原酶基因)和 *nosZ*(氧化亚氮还原酶基因)为 PCR 的扩增基因[14,18]. *napA* 和 *nosZ* 基因 PCR 扩增所用引物序列和反应条件如表 1 所示.

表 1 基因扩增引物序列

Table 1 Gene amplification primer sequences

基因	引物序列	反应条件
16S rRNA	27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 1492R TACGGYTACCTTGTTACGACTT	预变性 5 min(95℃),变性 30 s(95℃),退火 30 s(56℃),延伸 90 s(72℃),循环 35 次,延伸 10 min(72℃)
napA	*nap*1 TCTGGACCATGGGCTTCAACCA *nap*2 ACGACGACCGGCCAGCGCAG	预变性 6 min(95℃),变性 30 s(95℃),退火 30 s(60℃),延伸 90 s(72℃),循环 35 次,延伸 5 min(72℃)
nosZ	F0706 GGTAACCTTGACAACACCGA R1757 ATGACGAAGCCGTGAGACA	预变性 6 min(95℃),变性 30 s(95℃),退火 30 s(60℃),延伸 90 s(72℃),循环 35 次,延伸 5 min(72℃)

1.3 菌株异养硝化与好氧反硝化特性分析

将活化的菌株 ZMF5 的菌液按体积比 5% 接种至装有 150 mL 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中进行反硝化脱氮实验. 以乙酸钠(29.89 mg·L^{-1})为唯一碳源,分别采用氨氮和硝酸盐作为唯一氮源,氨氮和硝氮初始浓度均为 3.31 mg·L^{-1}. 将装有培养基和菌液的锥形瓶在 30℃、130 r·min^{-1}的恒温振荡培养箱中培养 48 h,分别做 3 组平行($n=3$),定时测定其总细菌数(total cell counts, TCC)、氨氮(NH_4^+-N)、硝氮(NO_3^--N)、亚硝氮(NO_2^--N)、总氮(total nitrogen, TN)和总有机碳(total organic carbon, TOC)的浓度.

1.4 环境适应性分析

进一步研究了菌株在不同条件下的好氧反硝化

能力，包括碳源的类型、C/N、pH 和温度. 在不同碳源类型的实验中，分别以人造有机物（乙酸钠和葡萄糖），天然有机物（腐殖酸和富里酸），藻类胞内有机物（intracellular organic matter）IOM（铜绿微囊藻和小球藻）为碳源；在 C/N 比实验中，加入不同量的乙酸钠和恒定浓度（3.31 $mg \cdot L^{-1}$）的硝酸盐将 C/N 调整为 1.5、3、5、7、10 和 13；在 pH 实验中，将 pH 调整为 5、7、8、9 和 11；在温度实验中，将温度调整为 8、15、20、25、30 和 35℃. 在所有单因素实验中，除了改变上述条件，菌株培养于 130 $r \cdot min^{-1}$、30℃的恒温振荡培养箱. 培养过程中，定时取样，测定 TCC、NO_3^--N、TN 和溶解性总氮（total dissolved nitrogen，TDN）的浓度.

1.5　动力学分析

研究表明，Monod-Contois 模式适用于模拟以硝氮-TOC 为底物类型时菌株的生长动力学. 分别利用 Monod 方程和 Contois 方程分析氮源和碳源对菌株 ZMF5 在不同培养条件下生长动力学的影响[12].

Monod 方程：

$$V = \frac{V_{max} S_n}{K_s + S_n} \tag{1}$$

式中，V 和 V_{max} 分别为菌株的比生长速率和最大生长速率；K_s 为硝氮的半饱和常数；S_n 为限制因素硝氮的浓度.

Contois 方程：

$$V = \frac{V_{max} S_t}{B_s \times x + S_t} \tag{2}$$

式中，V 和 V_{max} 分别为菌株的比生长速率和最大生长速率；x 为生物量的浓度；B_s 为碳源的半饱和系数；S_t 为限制因素 TOC 的浓度.

根据公式：

$$\frac{V}{V_{max}} = [V(S_1)] \times [V(S_2)] \times \cdots \times [V(S_i)] \tag{3}$$

适用于菌株 ZMF5 在硝氮-TOC 多底物条件下菌株的生长动力学模型为：

$$V = V_{max} \times \frac{S_n}{K_s + S_n} \times \frac{S_t}{B_s \times x + S_t} \tag{4}$$

1.6　菌株好氧反硝化氮平衡分析

有研究表明，碳源的特性对氮源的利用机制有显著影响. 琥珀酸钠和葡萄糖是两种常见的用于好氧反硝化细菌的碳源，且为两种不同类型（羧酸盐或碳水化合物）的碳源[15]. 因此本文选取琥珀酸钠和葡萄糖为碳源来研究菌株 ZMF5 在好氧反硝化过程中的氮/碳平衡.

为了分析菌株 ZMF5 在好氧反硝化过程中的氮平衡，将菌液接种至装有 150 mL 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中，在 130 $r \cdot min^{-1}$ 和 30℃的恒温振荡培养箱进行培养. 以琥珀酸钠（羧酸盐的典型代表）和葡萄糖（碳水化合物的典型代表）为唯一碳源分别培养 48 h. 通过初始的总氮减去反应结束后剩余的总氮计算菌株反硝化的总氮去除率. 在菌株 ZMF5 利用硝氮过程中，部分氮通过同化作用进入菌体内部，为确保剩余总氮测定含菌体内部氮，样品采用超声波细胞粉碎机（JY92-ⅢD，新芝生物，中国）破碎，使菌体内部氮释放出来. 样品经 0.22 μm 醋酸纤维滤膜过滤，过滤得到的滤液用来测定剩余的 TDN、NO_3^--N、NH_4^+-N 和 NO_2^--N. 各氮素浓度计算方法如下[19].

$$\text{有机氮} = \text{溶解性总氮} - \text{硝氮} - \text{亚硝氮} - \text{氨氮} \tag{5}$$

$$\text{细胞内部氮} = \text{总氮} - \text{溶解性总氮} \tag{6}$$

$$\text{氮损失} = (\text{初始总氮} - \text{剩余硝氮} - \text{剩余亚硝氮} - \text{剩余氨氮} - \text{剩余有机氮} - \text{剩余细胞体内氮}) \div \text{初始总氮} \times 100\% \tag{7}$$

1.7　菌株好氧反硝化碳平衡分析

碳源在好氧反硝化过程中不仅提供细菌生长所需要的能量，还为反硝化过程提供电子. 为了研究碳源在反硝化过程中作为能源物质及电子供体的分布比例，分别以琥珀酸钠（羧酸盐的代表）和葡萄糖（碳水化合物的代表）为唯一碳源分别培养 48 h，测定其氮素和 TOC 的变化，根据以下方程式计算[20].

（1）以琥珀酸钠为碳源时

好氧呼吸：

$$2C_4H_4O_4^{2-} + 7O_2 = 4\ CO_2 + 4HCO_3^- + 2H_2O \tag{8}$$

反硝化作用：

$$3C_4H_4O_4^{2-} + 14NO_3^- = 8CO_3^{2-} + 4HCO_3^- + 14NO + 4H_2O \tag{9}$$

同化作用：

$$2\ C_4H_4O_4^{2-} + NO_3^- = C_5H_7NO_2 + 2CO_3^{2-} + HCO_3^- \tag{10}$$

（2）以葡萄糖为碳源时

好氧呼吸：

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O \tag{11}$$

反硝化作用：

$$C_6H_{12}O_6 + 8\ NO_3^- + 2H_2O = 2CO_3^{2-} + 4HCO_3^- + 8NO \tag{12}$$

同化作用：

$$7\ C_6H_{12}O_6 + 6\ NO_3^- = 6C_5H_7NO_2 + 6HCO_3^- + 6CO_2 + 18H_2O \tag{13}$$

1.8 测定方法

NH_4^+-N、NO_3^--N、NO_2^--N、TN 和 TDN 采用气相分子吸收光谱仪测定(GMA3376,上海北裕,中国). 总细菌数采用流式细胞仪计数法测定, 500 μL 的样品和 5 μL SYBR Green I 核酸染色剂,混合后在黑暗及 30℃ 的条件下反应 10 min 后用流式细胞分析仪(AccuriC6, BD 公司,美国)来测定[21]. TOC 采用总有机碳测定仪分析(TOC-L,岛津公司,日本). 本实验数据采用单因素方差分析方法进行分析($P<0.05$),采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计分析,并用 Origin Pro 2019 软件进行绘图和动力学的拟合. 每组实验重复 3 次.

2 结果与讨论

2.1 菌株鉴定及功能基因扩增

经过 16S rRNA 测序比对,初步确定菌株 ZMF5 为不动杆菌(*Acinetobacter junii*). 将菌株 ZMF5 与同源性较高的不动杆菌和其他好氧反硝化细菌进行系统发育分析(图 1),该菌株与琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*)有 100% 的相似性,因此命名为 *Acinetobacter junii* strain ZMF5.

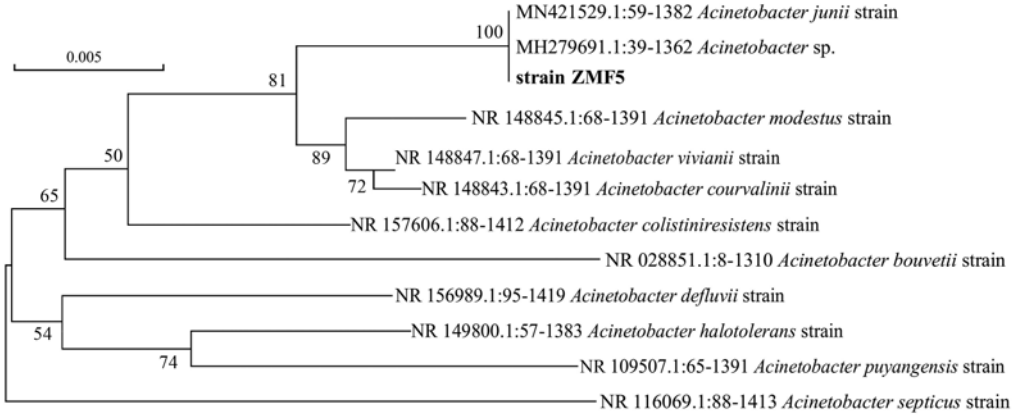


图 1 菌株 ZMF5 的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of strain ZMF5

对菌株 ZMF5 的 *napA* 和 *nosZ* 基因进行扩增,有研究表明 *napA* 基因在有氧条件下催化反硝化的第一步反应,可以在好氧的条件下将硝酸盐还原,常被用来作为好氧反硝化过程的功能基因;*nosZ* 基因催化由N_2O至 N_2 的过程,常被用于检测可进行完全反硝化作用(终产物为 N_2)的微生物[22,23]. 由图 2 可知,通过对菌株 ZMF5 的 DNA 样品进行扩增,得到明显的目标条带,特异性条带出现在 300 bp 和 1 500 bp左右,表明菌株 ZMF5 具有 *napA* 和 *nosZ* 基因. 进一步证实了菌株 ZMF5 可以表达周质硝酸盐还原酶基因,是典型的好氧反硝化细菌,好氧条件下由周质硝酸盐还原酶基因来还原硝酸盐,且最终反硝化产物为 N_2. 本文中 *napA* 和 *nosZ* 基因的成功表达可以证明菌株 ZMF5 具有完整的编码反硝化酶的基因及好氧反硝化的能力.

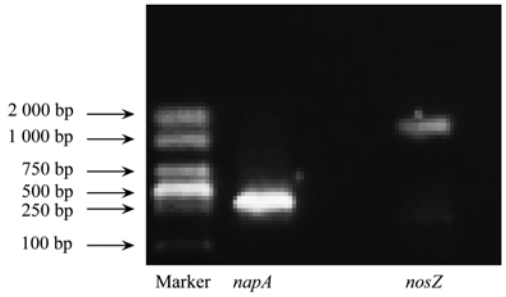


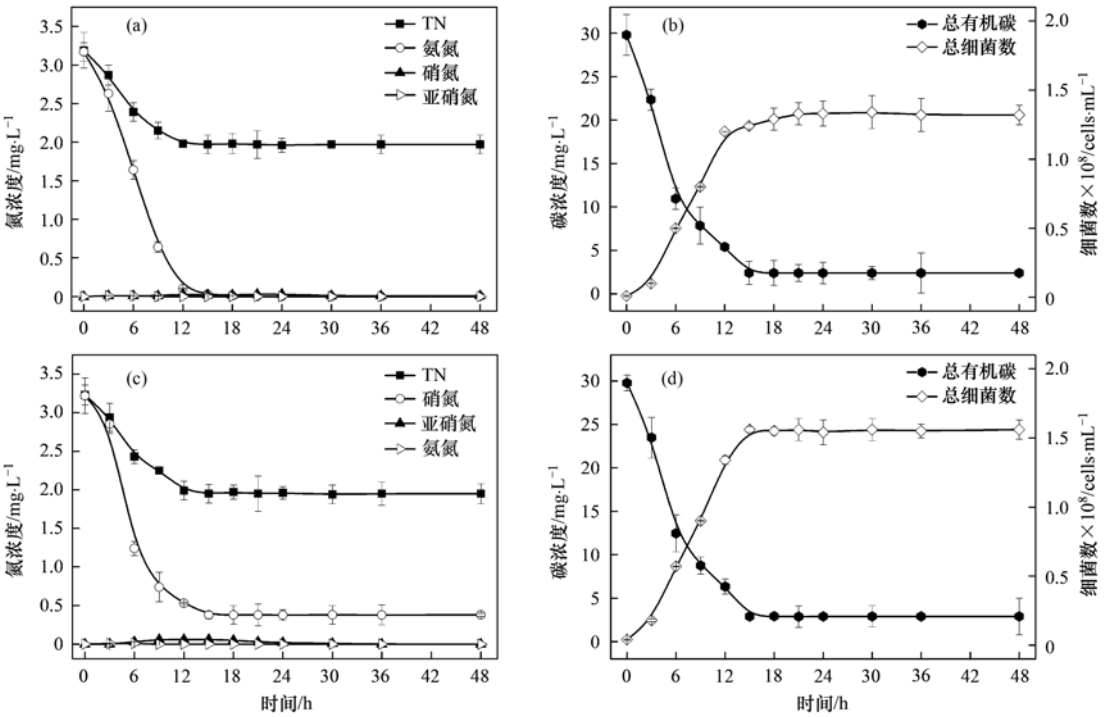
图 2 菌株 ZMF5 功能基因的 PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of functional genes of strain ZMF5 by PCR

2.2 菌株的异养硝化-好氧反硝化特性

2.2.1 异养硝化特性

菌株 ZMF5 异养硝化特性及生长曲线如图 3(a)和 3(b)所示. 由分析可知,在 0 ~ 3 h 内菌株处于适应期,生长较为缓慢. 在 3 ~ 18 h,菌株处于对数增长期,总细菌数迅速增加,在 18 h 达到稳定,细菌总数达到 1.33×10^8 cells·mL^{-1},有 100.00% 的氨氮被去除,TOC 的下降趋势与氨氮类似,最大去除率达 92.00%. 18 ~ 24 h 细菌生长缓慢,氨氮和 TOC 的浓度变化较小. 在 0 ~ 24 h 阶段,菌株 ZMF5 硝化速率为 0.211 mg·(L·h)$^{-1}$,高于 *Janthinobacterium* sp. M-11 [0.170 mg·(L·h)$^{-1}$][11] 和 *Acinetobacter harbinensis* HITLi7^T [0.076 mg·(L·h)$^{-1}$][12]等异养硝化菌. 随后菌株的生长进入衰亡阶段,TOC 和总氮的变化基本处于稳定. 在整个硝化反应过程中,随着氨氮的降低,没有硝氮和亚硝氮的累积,此现象与之前的研究相一致[22]. 这些结果表明,在贫营养条件下,氨氮主要用于菌株的生长和硝化,显示出较高的去除率,因此表明菌株 ZMF5 在微污染水体中对于氨氮的去除有很大的应用潜力.



氨氮为氮源：(a) 氮素；(b) 菌株生长和 TOC；硝氮为氮源：(c) 氮素；(d) 菌株生长和 TOC

图 3　菌株 ZMF5 以氨氮为唯一氮源时的异养硝化特性和硝氮为唯一氮源时的好氧反硝化特性

Fig. 3　Heterotrophic nitrification characteristics using ammonia nitrogen as the sole nitrogen source and aerobic denitrification performance using nitrate as the sole nitrogen source of strain ZMF5

2.2.2　好氧反硝化特性

以硝氮为唯一氮源，菌株 ZMF5 的好氧反硝化特性及生长曲线如图 3(c)和 3(d)所示. 从中可知，硝氮和总氮的去除趋势与 TOC 的降解具有一致性，与异养硝化过程相一致. 在 3 ~ 15 h，菌株处于对数增长期，细菌数达到 1.53×10^8 cells·mL^{-1}，硝氮由 3.09 mg·L^{-1} 降解至 0.37 mg·L^{-1}，去除率为 88.02%，TOC 由 23.49 mg·L^{-1}降解至 2.90 mg·L^{-1}，去除率为 87.65%. 在 15 h 时，硝氮和 TOC 降解效率达到最大，分别为 88.23% 和 90.23%，随后菌株进入稳定生长阶段. 在 0 ~ 15 h，菌株 ZMF5 反硝化速率为 0.236 mg·(L·h)$^{-1}$，高于在相同贫营养培养条件下的 *Acinetobacter johnsonii* WGX-9 [0.200 mg·(L·h)$^{-1}$][13]，说明菌株 ZMF5 具有较强的好氧反硝化性能. 在整个好氧反硝化过程中，随着硝氮浓度的降低，没有氨氮的生成，亚硝氮在 9 h 出现了少量的累积(0.07 mg·L^{-1})随即逐渐降低至 0.01 mg·L^{-1}，这与之前的研究结果一致[23,24]，可能是由于反硝化初期硝氮去除率较高造成亚硝氮的少量积累，随着硝氮去除达到平衡，累积的亚硝氮的逐渐降低，达到稳定.

结果表明，菌株 ZMF5 在贫营养培养条件下具有较好的异养硝化能力和好氧反硝化能力，对氨氮和硝氮有一定的去除效果. 菌株 ZMF5 可以为微污染水源富营养化控制和总氮原位削减工程应用提供一定的菌源保障.

2.3　菌株在不同培养条件下的适应性

2.3.1　碳源

不同碳源具有不同的氧化还原电位，是好氧反硝化过程中的电子供体和能源物质，也是影响好氧反硝化菌株脱氮特性的重要因素[25]. 图 4(a)展示了菌株 ZMF5 在不同类型碳源下的氮素的去除率，可以看出当碳源为人造碳源时，硝氮的去除率可达到 84.42% 和 66.43%. 对于水体中天然存在的有机物，菌株的利用效果相对较差. 当腐殖酸，富里酸作为唯一碳源时，硝氮去除率为 19.87% 和 23.78%；当藻类胞内有机物(铜绿微囊藻 IOM 和小球藻 IOM)为碳源时，硝氮去除率可达到 31.22% 和 32.44%. TN 和 TDN 的去除率及菌株 ZMF5 的生长显示出相同的趋势，说明菌株 ZMF5 不仅可以利用小分子人造有机物，还可以利用水体存在的天然有机物[13]. 结合双重底物降解模型动力学可知(表 2)，当碳源为乙酸钠时，菌株的比生长速率最大，当以水库中存在的其它有机物为碳源时，菌株也有一定的比生长速率. 综上可以得出，菌株 ZMF5 对不同类型的碳源，特别是对水源水库中实际存在的有机物也有较高的利用效果，为菌株 ZMF5 在天然水体中的原位脱氮提供了一定的理论依据.

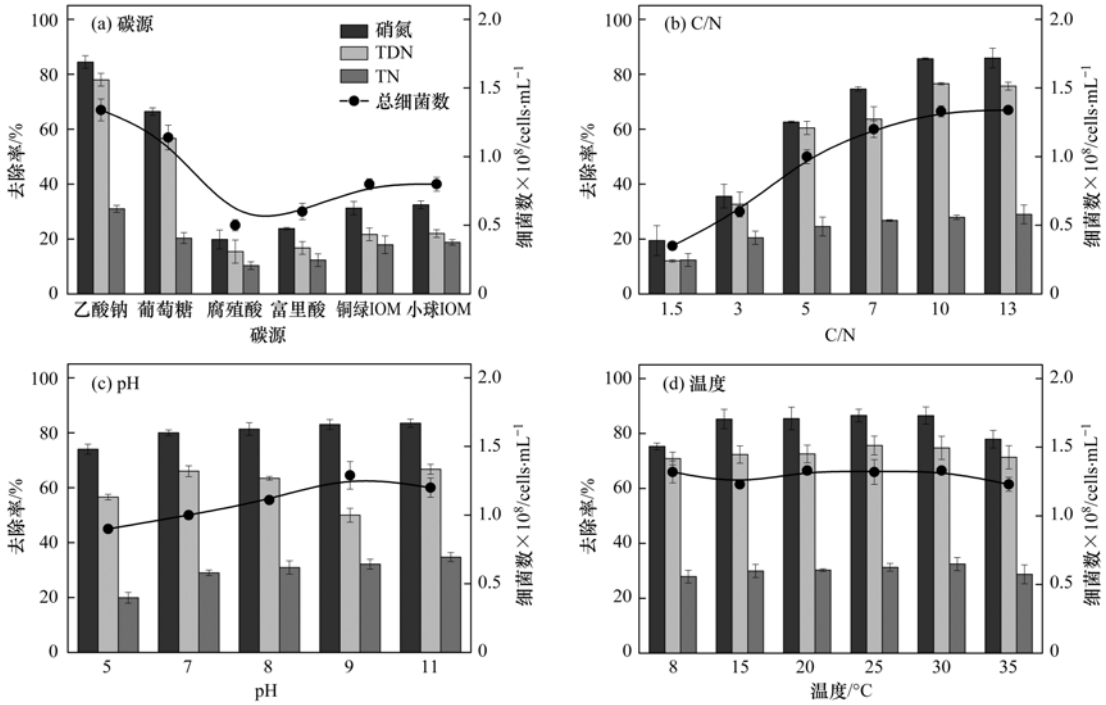


图 4 菌株 ZMF5 在不同环境条件下的氮去除性能及菌株生长性能

Fig. 4 Nitrogen removal ability and growth performance of strain ZMF5 under different environmental conditions

2.3.2 C/N

碳和氮作为细菌生长过程的基本营养物质,其配比不同直接影响着好氧反硝化细菌的脱氮效率,是提高好氧反硝化菌脱氮能力且节约资源的重要环节[25,26]. 如图 4(b)所示,随着 C/N 从 1.5 增加到 10,硝氮去除率从 19.45% 增加到 85.65%. 由表 2 所示,菌株的比生长速率变化也有相同的趋势,在 C/N 为 10 时达到最大值,和大部分微生物适宜的生长条件相类似. 此外,可以看出,菌株在 C/N 为 5 时,表现出较好的硝氮去除率(64.62%)和菌株比生长速率(0.039 h^{-1}),高于 *Diaphorobacter* sp. PDB3[27] 和 *Acinetobacter harbinensis* HITLi7^{T}[12] 等好氧反硝化细菌的脱氮效率,这说明菌株 ZMF5 在低 C/N 的条件下也具有较好的脱氮性能. 表明菌株 ZMF5 可以适应更低的 C/N,有一定的潜力应用于水源水库中进行生物脱氮.

2.3.3 pH

微生物的生长需要适宜的 pH 环境,不同的 pH 环境可使细胞膜上的电荷发生变化,进而影响其生长和好氧反硝化性能[25]. 如图 4(c)所示,pH 对菌株的好氧反硝化性能影响较小,pH 在 5 ~ 11 范围内硝氮去除率均高于 75.00%. 弱碱性条件(pH 为 7 ~ 9)下菌株的氮去除率和比生长速率较高(表 2),这一结果与大部分的好氧反硝化菌都能在中性或偏碱性条件生长的结果相一致. 过低和过高的 pH 值会导致核酸和微生物表面蛋白的水解变质,抑制微生物的生长代谢,在 pH 为 5 和 11 的条件下,大部分菌株如 *Janthinobacterium* sp. M-11[11] 和 *Marinobacter* strain NNA5[28],显示出较低的氮去除性能,而菌株 ZMF5 的氮去除性能较好,硝氮去除率分别可达到 75.88% 和 83.47%,说明菌株 ZMF5 的 pH 耐受范围更广. 从表 2 可以看出,菌株的比生长速率显示出相同的变化趋势. 结果表明,菌株 ZMF5 对 pH 波动较大的水体具有较好的适应性.

2.3.4 温度

如图 4(d)所示,菌株 ZMF5 在温度为 8℃时,硝氮的去除率为 75.32%,高于大多数已报道的好氧反硝化菌株[14, 28]. 但从表 2 看出,菌株的比生长速率在低温条件时较小. 在温度为 15 ~ 30℃时,菌株显示出较好的脱氮性能,其硝氮的去除率均大于 85.00%,菌株的比生长速率基本相同,均大于低温条件,此结果与所报道的大多数好氧反硝化细菌所适宜的温度(20 ~ 30℃)相一致[25]. 可以看出,温度对好氧反硝化细菌的去除效率影响不大,但对菌株的生长影响较大[29]. 值得注意的是,菌株 ZMF5 在低温的条件下具有较好的脱氮性能,其氮去除率高于大部分好氧反硝化菌株[23],在低温环境下较强的适应能力有利于其在实际应用中脱氮潜力的发挥,为水源水生物脱氮提供了高效菌源.

2.4 菌株氮平衡的分析

菌株 ZMF5 好氧反硝化脱氮过程的氮平衡结果如表 3 所示. 菌株 ZMF5 在反应后不同类型氮所占

表 2　菌株 ZMF5 在不同环境条件下的增长动力学

Table 2　Kinetic of growth by strain ZMF5 under different environmental conditions

环境因子	指标/数值	V_{max}/h^{-1}	R^2	环境因子	指标/数值	V_{max}/h^{-1}	R^2
碳源	乙酸钠	0.051	0.987	C/N	1.5	0.011	0.956
	葡萄糖	0.047	0.877		3	0.022	0.997
	腐殖酸	0.020	0.887		5	0.039	0.987
	富里酸	0.024	0.795		7	0.045	0.921
	铜绿 IOM	0.030	0.974		10	0.050	0.876
	小球 IOM	0.031	0.923		13	0.044	0.933
pH	5	0.035	0.987	温度/℃	8	0.017	0.876
	7	0.037	0.876		15	0.024	0.882
	8	0.040	0.992		20	0.033	0.987
	9	0.047	0.914		25	0.040	0.996
	11	0.049	0.934		30	0.048	0.932
	—	—	—		35	0.039	0.999

的比例如图 5 所示. 在以琥珀酸钠为唯一碳源,硝氮为唯一氮源的培养条件下,菌株 ZMF5 有 0.96 mg·L^{-1}的硝氮约 29.81% 转化为细胞内的氮, 18.01%的氮转化为有机氮存在于反应体系中,氨氮和亚硝氮的含量较少,剩余 18.01%的硝氮未被利用, 38.81%的硝氮转化为气态氮. 以葡萄糖为唯一碳源,硝氮为唯一氮源的反应体系中,结果与琥珀酸钠为碳源有所差异, 36.13%的氮转化为胞内氮, 9.66%的氮转化为有机氮, 33.33%的硝氮未被利用, 20.56%的氮源转化为气态氮. 结果表明在琥珀酸反应体系中,同化作用脱氮所占的比例以及未被利用的硝氮百分比小于葡萄糖反应系统,另外转化为气态氮的百分比高于葡萄糖反应系统. Zhang[30]等的研究发现与葡萄糖相比,琥珀酸钠是较为理想的好氧反硝化碳源,这与 *Pseudomonas* sp. N6[31]和 *Acinetobacter junii* YB[32, 33]对有机酸的利用率高于糖类的结论一致.

在整个好氧反硝化过程中,硝氮的利用说明菌株具有较好的好氧反硝化性能. 且以琥珀酸钠为碳源的反应体系中,其转化为气态氮的比例高于胞内氮的比例,表明菌株脱氮主要是通过反硝化作用完成,而不是同化作用.

表 3　菌株 ZMF5 在不同类型碳源下好氧反硝化过程的氮平衡分析

Table 3　Nitrogen balance analysis during the aerobic denitrification process of strain ZMF5 under different carbon source

碳源	氮源	初始氮浓度/mg·L^{-1}	最终氮浓度/mg·L^{-1}				
			硝氮	氨氮	亚硝氮	有机氮	细胞体内氮
琥珀酸钠	硝氮	3.22	0.41	0.01	0.01	0.58	0.96
葡萄糖		3.21	1.07	0.01	0	0.31	1.16

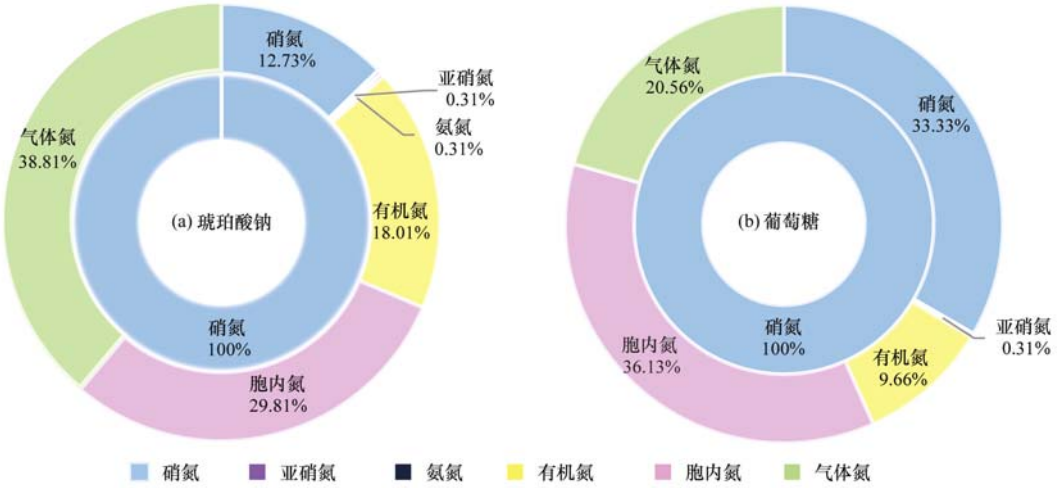


图 5　菌株 ZMF5 在不同类型碳源下 48 h 后各种氮所占的比例

Fig. 5　Proportion of nitrogen at 48 h of strain ZMF5 under different carbon sources

2.5　菌株碳平衡及电子流的分布

以琥珀酸钠为碳源,硝氮为氮源为例,根据监测的 TOC 含量和氮平衡计算,电子转移的详细计算如下.

$$生物碳 = \frac{生物氮}{14} \times 5 = 0.34\ mmol \cdot L^{-1} \quad (14)$$

$$用于电子供体 = (\Delta TOC - 生物碳) \times \frac{7}{2} = 6.65\ mmol \cdot L^{-1} \quad (15)$$

$$电子给硝氮 = \frac{NO_2^-}{14} \times 3 + \frac{NO}{14} \times 2 = 0.27\ mmol \cdot L^{-1} \quad (16)$$

$$电子给氧气 = 6.65 - 0.27 = 6.38\ mmol \cdot L^{-1} \quad (17)$$

菌株 ZMF5 在琥珀酸钠和葡萄糖为唯一碳源的条件下培养 48 h 后,电子和碳的分布如图 6 所示. 当琥珀酸钠为碳源时,有 0.34 $mmol \cdot L^{-1}$ 的碳(14.37%)用于生物合成($C_5H_7NO_2$),约 6.65 $mmol \cdot L^{-1}$的电子(75.86%)从琥珀酸氧化反应中释放出来,在这 6.65 $mmol \cdot L^{-1}$ 的电子中,0.27 $mmol \cdot L^{-1}$的电子用于硝氮的还原,6.38 $mmol \cdot L^{-1}$ 的电子通过三磷酸循环用于生物氧化和 ATP 合成,分别占所转移电子的 4.07% 和 95.93%,剩余约有 9.77% 的碳. 在葡萄糖为碳源时,16.68% 的碳用于生物的合成,5.78 $mmol \cdot L^{-1}$的碳(66.56%)用于电子供体,约 0.15 $mmol \cdot L^{-1}$的电子(2.60%)和 5.63 $mmol \cdot L^{-1}$的电子(97.40%)分别流向硝氮的还原和通过糖酵解途径用于生物氧化和 ATP 的合成,有 16.78% 的碳剩余在反应体系中. 此现象与之前的研究结果相一致[20, 34]. 结果表明,用于硝氮还原的电子较少,这可能是因为在反硝化过程中,除了 NADH 脱氢酶和细胞色素 c 等核心酶外,还需要其他复合酶(硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶和一氧化氮还原酶等),而有氧呼吸只需要一种酶,因此导致底物转化率较低[35].

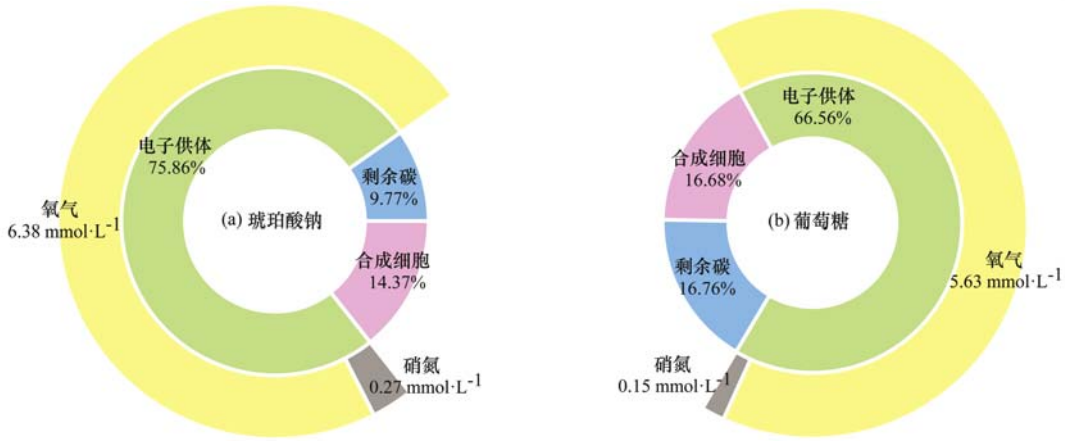


图 6 菌株 ZMF5 在不同类型碳源下培养 48 h 后电子和碳的分布

Fig. 6 Distribution of electron and carbon flow at 48 h of strain ZMF5 under different carbon sources

与葡萄糖相比,琥珀酸更有利于菌株 ZMF5 的好氧反硝化. 可能有以下原因:① 在琥珀酸体系中,由于自碱化作用,有更加丰富的游离氨,使得羧酸盐体系的好氧反硝化过程更容易发生[36];② *nap* 操纵子的转录启动与碳源的类型有很大的联系,*nap* 活性与碳基的氧化态相关,碳底物体系的还原性越高,所对应的 *Nap* 活性越高. 此研究中,虽然葡萄糖具有更高的还原电位,但直接进入呼吸链的是丙酮酸而不是葡萄糖,另一方面,琥珀酸不仅直接参与呼吸链,而且比丙酮酸具有更高的还原能力,因此在琥珀酸体系中保持了较高的 *nap* 活性[37];③ 相比于葡萄糖,琥珀酸具有较小的分子量,且小分子量有机物可以更好地被微生物所利用,促进好氧反硝化细菌的脱氮性能[11];④ 琥珀酸是微生物将复杂有机物(如糖类、蛋白质和脂类)转化为简单小分子有机物时三羧酸循环过程中的中间产物,能够直接用于生物合成[13, 38]. 这些结果表明,相比于碳水化合物,菌株 ZMF5 更容易利用羧酸盐化合物,与之前的相类似,且通过调节碳源的种类,可以调节电子向硝酸盐呼吸链的转移途径.

3 结论

(1)菌株 ZMF5 具有高效的异养硝化能力,氨氮去除速率为 0.211 $mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$,反应过程只有少量的硝化中间产物累积. 同时,菌株 ZMF5 具有良好的好氧反硝化特性,能够利用硝酸盐进行生长代谢,硝氮去除速率为 0.236 $mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$,且氨氮和亚硝氮在此过程中没有积累.

(2)菌株 ZMF5 好氧反硝化最适宜的条件是:乙酸钠为碳源,C/N = 10,pH = 8,温度为 30℃. 此外,菌株 ZMF5 有较好的环境适应能力,能利用不同类型的有机物,在低 C/N,低 pH 和低温的条件下均显示出较好的氮去除性能与细菌增长性能,表明菌株 ZMF5 有很大的潜力应用于贫营养水源水库中进行

生物原位脱氮.

(3)氮平衡分析表明,羧酸盐比碳水化合物更能促进好氧反硝化过程的发生,在琥珀酸钠和葡萄糖为唯一碳源的反应系统中,菌株 ZMF5 反硝化除氮占总氮的去除率约为 38.81% 和 20.56%,同化作用氮所占比例分别为 29.81% 和 36.13%. 表明羧酸盐类化合物使得菌株 ZMF5 脱氮主要是反硝化作用,而不是同化作用.

(4)碳平衡结果表明,在羧酸盐和碳水化合物为唯一碳源的反应系统中,有 75.86% 和 66.56% 的碳源用于电子供体,但用于硝氮还原的电子较少,仅占转移电子的 4.07% 和 2.60%. 表明碳源的还原势、电子供体的丰度以及有机物的分子量可以调节电子的转移途径.

参考文献:

[1] Huang T L, Li X, Rijnaarts H, *et al*. Effects of storm runoff on the thermal regime and water quality of a deep, stratified reservoir in a temperate monsoon zone, in Northwest China[J]. Science of the Total Environment, 2014, **485-486**: 820-827.

[2] Zhang H H, Zhao Z F, Li S L, *et al*. Nitrogen removal by mix-cultured aerobic denitrifying bacteria isolated by ultrasound: Performance, co-occurrence pattern and wastewater treatment [J]. Chemical Engineering Journal, 2019, **372**: 26-36.

[3] Zheng H Y, Liu Y, Sun G D, *et al*. Denitrification characteristics of a marine origin psychrophilic aerobic denitrifying bacterium[J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, **23**(11): 1888-1893.

[4] Cao S B, Du R, Li B K, *et al*. Nitrite production from partial-denitrification process fed with low carbon/nitrogen (C/N) domestic wastewater: performance, kinetics and microbial community[J]. Chemical Engineering Journal, 2017, **326**: 1186-1196.

[5] Wang H Y, Wang T, Yang S Y, *et al*. Nitrogen removal in oligotrophic reservoir water by a mixed aerobic denitrifying consortium: influencing factors and immobilization effects[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019, **16**(4): 583.

[6] 汪旭晖, 杨垒, 任勇翔, 等. 异养硝化细菌 *Pseudomonas putida* YH 的脱氮特性及降解动力学[J]. 环境科学, 2019, **40**(4): 1892-1899.
Wang X H, Yang L, Ren Y X, *et al*. Nitrogen removal by heterotrophic nitrifying bacterium *Pseudomonas putida* YH and its kinetic characteristics[J]. Environmental Science, 2019, **40**(4): 1892-1899.

[7] 康鹏亮, 张海涵, 黄廷林, 等. 湖库沉积物好氧反硝化菌群脱氮特性及种群结构[J]. 环境科学, 2018, **39**(5): 2431-2437.
Kang P L, Zhang H H, Huang T L, *et al*. Denitrification characteristics and community structure of aerobic denitrifiers from lake and reservoir sediments[J]. Environmental Science, 2018, **39**(5): 2431-2437.

[8] Huang T L, Zhou S L, Zhang H H, *et al*. Nitrogen removal characteristics of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier from oligotrophic drinking water reservoir, *Zoogloea* sp. N299 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, **16**(5): 10038-10060.

[9] Huang Y W, Yang C, Wen C C, *et al*. S-type dissolved oxygen distribution along water depth in a canyon-shaped and algae blooming water source reservoir: reasons and control [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019, **16**(6): 987.

[10] Zhou S L, Huang T L, Zhang H H, *et al*. Nitrogen removal characteristics of enhanced in situ indigenous aerobic denitrification bacteria for micro-polluted reservoir source water [J]. Bioresource Technology, 2016, **201**: 195-207.

[11] Yang M, Lu D W, Qin B D, *et al*. Highly efficient nitrogen removal of a coldness-resistant and low nutrient needed bacterium, *Janthinobacterium* sp. M-11 [J]. Bioresource Technology, 2018, **256**: 366-373.

[12] Zheng Z J, Zhang D Y, Li W G, *et al*. Substrates removal and growth kinetic characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter harbinensis* HITLi7^T at 2℃ [J]. Bioresource Technology, 2018, **259**: 286-293.

[13] Wen G, Wang T, Li K, *et al*. Aerobic denitrification performance of strain *Acinetobacter johnsonii* WGX-9 using different natural organic matter as carbon source: Effect of molecular weight[J]. Water Research, 2019, **164**: 114956.

[14] Huang T L, Guo L, Zhang H H, *et al*. 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.

[15] Xu Z H, Dai X H, Chai X L. Effect of different carbon sources on denitrification performance, microbial community structure and denitrification genes[J]. Science of the Total Environment, 2018, **634**: 195-204.

[16] 杨世东, 崔鑫鑫. 好氧反硝化菌 *Acinetobacter* sp. A2 在主要环境影响条件下的 NO_3^- 去除动力学研究[J]. 东北大学电力学报, 2019, **39**(4): 68-75.
Yang S D, Cui X X. Kinetics of aerobic denitrification strain *Acinetobacter* sp. A2 under restrictive conditions[J]. Journal of Northeast Electric Power University, 2019, **39**(4): 68-75.

[17] 黄廷林, 赵金亚, 张海涵, 等. 一株异养硝化-好氧反硝化菌 JY78 的筛选及其脱氮特性研究[J]. 安全与环境学报, 2016, **16**(4): 325-331.
Huang T L, Zhao Y J, Zhang H H, *et al*. Isolation and identification of JY78, a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrification bacterium and its denitrifying features[J]. Journal of Safety and Environment, 2016, **16**(4): 325-331.

[18] Zhao B, Cheng D Y, Tan P, *et al*. Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate removal[J]. Bioresource Technology, 2018, **250**: 564-573.

[19] 康鹏亮, 陈胜男, 黄廷林, 等. 好/厌氧条件下反硝化细菌脱氮特性与功能基因[J]. 环境科学, 2018, **39**(8): 3789-3796.
Kang P L, Cheng S N, Huang T L, *et al*. Denitrification characteristics and functional genes of denitrifying bacteria under aerobic or anaerobic conditions[J]. Environmental Science, 2018, **39**(8): 3789-3796.

[20] Jia Y T, Zhou M M, Chen Y C, *et al*. Carbon selection for nitrogen degradation pathway by *Stenotrophomonas maltophilia*: based on the balances of nitrogen, carbon and electron[J]. Bioresource Technology, 2019, **294**: 122114.

[21] Wen G, Kötzsch S, Vital M, *et al*. BioMig—a method to evaluate the potential release of compounds from and the formation of biofilms on polymeric materials in contact with drinking water[J]. Environmental Science & Technology, 2015,

49(19): 11659-11669.

[22] 苏兵. 一株海洋异养硝化—好氧反硝化菌的分离鉴定、脱氮特性及应用[D]. 厦门: 集美大学, 2014.
Su B. Isolation, identification and nitrogen removal characteristics of a marine heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application[D]. Xiamen: Jimei University, 2014.

[23] 郭琳. 水源水库中好氧反硝化菌的筛选及脱氮性能研究——以周村水库为例[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2015.
Guo L. Study on the screening of aerobic denitrifiers from source water reservoir and the corresponding denitrification performance——A case study in Zhoucun reservoir[D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2015.

[24] Fu G P, Zhao L, Huangshen L K, *et al*. Isolation and identification of a salt-tolerant aerobic denitrifying bacterial strain and its application to saline wastewater treatment in constructed wetlands[J]. Bioresource Technology, 2019, **290**: 121725.

[25] 白洁, 陈琳, 黄潇, 等. 1 株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌 *Zobellella* sp. B307 的分离及脱氮特性[J]. 环境科学, 2018, **39**(10): 4793-4801.
Bai J, Chen L, Huang X, *et al*. Isolation and nitrogen removal characteristics of salt-tolerant heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria *Zobellella* sp. B307 [J]. Environmental Science, 2018, **39**(10): 4793-4801.

[26] Chen S H, He S Y, Wu C J, *et al*. Characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* sp. T1 and its application for pig farm wastewater treatment[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, **127**(2): 201-205.

[27] 许涛, 王国英, 岳秀萍. *Diaphorobacter* sp. PDB3 菌好氧反硝化脱氮特性[J]. 中国环境科学, 2018, **38**(6): 2321-2328.
Xu T, Wang G Y, Yue X P. The nitrogen removal characteristics of aerobic denitrification by *Diaphorobacter* sp. PDB3[J]. China Environmental Science, 2018, **38**(6): 2321-2328.

[28] Liu Y, Ai G M, Miao L L, *et al*. *Marinobacter* strain NNA5, a newly isolated and highly efficient aerobic denitrifier with zero N_2O emission[J]. Bioresource Technology, 2016, **206**: 9-15.

[29] 梁贤, 任勇翔, 杨垒, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 YL 的脱氮特性[J]. 环境科学, 2015, **36**(5): 1749-1756.
Liang X, Ren Y X, Yang L, *et al*. Characteristics of nitrogen removal by a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium YL[J]. Environmental Science, 2015, **36**(5): 1749-1756.

[30] Zhang H H, Zhao Z F, Kang P L, *et al*. Biological nitrogen removal and metabolic characteristics of a novel aerobic denitrifying fungus *Hanseniaspora uvarum* strain KPL108 [J]. Bioresource Technology, 2018, **267**: 569-577.

[31] 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 L, Xu C B, Ma X P, *et al*. Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitirfier [J]. Environmental Science & Technology, 2013, **36**(3): 12-15.

[32] Ren Y X, Yang L, Liang X. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB[J]. Bioresource Technology, 2014, **171**: 1-9.

[33] Yang L, Ren Y X, Liang X, *et al*. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater[J]. Bioresource Technology, 2015, **193**: 227-233.

[34] Bai H, Liao S A, Wang A L, *et al*. High-efficiency inorganic nitrogen removal by newly isolated *Pannonibacter phragmitetus* B1 [J]. Bioresource Technology, 2019, **271**: 91-99.

[35] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, **61**(4): 533-616.

[36] Liu Y W, Ngo H H, Guo W S, *et al*. The roles of free ammonia (FA) in biological wastewater treatment processes: a review[J]. Environment International, 2019, **123**: 10-19.

[37] Ellington M J K, Bhakoo K K, Sawers G, *et al*. Hierarchy of carbon source selection in *Paracoccus pantotrophus*: strict correlation between reduction state of the carbon substrate and aerobic expression of the *nap* operon[J]. Journal of Bacteriology, 2002, **184**(17): 4767-4774.

[38] Xu Z S, Chai X L. Effect of weight ratios of PHBV/PLA polymer blends on nitrate removal efficiency and microbial community during solid-phase denitrification [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017, **116**: 175-183.

HUANJING K0EXUE Vol. 41 No. 5
Environmental Science (monthly) May 15, 2020

CONTENTS