

一株脱氮细菌鉴定及其效果研究

迟冉¹, 李伟英^{2*}, 温朵²

(1. 上海水源地建设发展有限公司, 上海 200433; 2. 同济大学 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092)

摘要 针对传统人工湿地治理污染河湖水工艺中存在的脱氮效率低、环境安全性差等问题, 从污水处理厂生化池污泥中分离纯化获得菌株 TY (CGMCC1.18865, 该菌种已于 2020 年在中国普通微生物菌种保藏中心入库), 通过配水试验, 验证菌株脱氮特性, 并进一步以火山岩为填料, 采用湿地模拟系统装置对比附配 TY 菌的湿地系统与传统湿地系统对污染水体的脱氮效果的差异; 通过 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定获得的菌株 TY, 同时对其表现出的反硝化作用进行分析研究。结果表明: 分离获得的 TY 菌株为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。配水试验中对氨氮和总氮的去除率分别为 84.2% 和 93.6%。通过对模拟湿地系统出水氨氮、总氮和化学需氧量 (COD) 监测, 发现 30 d 平均去除率分别可提升至 94.3%、88.0% 和 82.3%, 较传统湿地分别提高 27.9%、28.8% 和 7.3%。研究表明, TY 菌脱氮过程中有少量的硝态氮和亚硝态氮的积累, 可降低对环境的不利影响、有利于脱氮反应连续进行, 从而提高人工湿地脱氮效率, 具有进一步探究的前景。

关键词 人工湿地; 反硝化菌; 假单胞菌属; 反硝化作用; 脱氮菌

中图分类号 Q93-331 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2023)03-0080-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-7021.2023.03.009

Identification and Effect of a Denitrifying Bacterial Strain

CHI Ran¹, LI Wei-ying^{2*}, WEN Duo²

(1. Shanghai Water Res. Construc. & Develop. Co., Ltd., Shanghai 200433;

2. Key Lab. of Yangtze River Water Environ't, Minist. of Educ., Tongji Uni., Shanghai 200092)

Abstract In order to solve the problems of low efficiency of nitrogen removal and poor environmental safety in the traditional constructed wetlands for treating polluted water. The strain TY was isolated and purified from sludge in biochemical treatment plant of sewage treatment plant (CGMCC1.18865. The strain was put into storage in China General Microbiological Culture Collection Center in 2020), through the water distribution test, the denitrification characteristics of the strain were verified, and the volcanic rock was used as the wetland filler, and the wetland simulation system with volcanic rock as filler was used to compare the denitrification effect between the wetland system with TY bacteria and the traditional wetland system; TY strain was identified by 16S rRNA gene sequence analysis, and its denitrification was analyzed and studied. The results showed that the isolated TY bacteria were *Pseudomonas* sp., and the removal rates of ammonia nitrogen and total nitrogen in water distribution test were 84.2% and 93.6%. Through the monitoring of ammonia nitrogen, total nitrogen and chemical oxygen demand (COD) in the effluent of the simulated wetland system, it is found that the average removal rate in 30 days can increase to 94.3%, 88.0% and 82.3%, which is 27.9%, 28.8% and 7.3% higher than those of the traditional wetland. The research showed that there was a small amount of nitrate and nitrite accumulation in the denitrification process of TY bacteria, which can reduce the adverse impact on the environment and facilitate the continuous denitrification reaction, so as to improve the denitrification efficiency of constructed wetland, which has the prospect of further exploration.

Keywords constructed wetland; denitrifying strain; *Pseudomonas*; denitrification; denitrifying bacteria

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (51979194); 中国工程院院地合作项目 (2019-CQ-ZD-4)

作者简介: 迟冉 女, 工程师, 硕士。从事生态环境工程技术工作。Tel: 021-55133090, E-mail: 51451623@qq.com

* 通讯作者: 女, 教授, 博士, 博士生导师。研究方向为微生物稳定性及控制技术。E-mail: 123lwyktz@tongji.edu.cn

收稿日期: 2022-11-05

传统的脱氮理论认为脱氮反应严格地区分为好氧阶段和厌/缺氧阶段。其中,好氧阶段由自养硝化细菌将氨氮氧化为亚硝态氮和硝态氮,厌/缺氧阶段由反硝化细菌将亚硝态氮和硝态氮反硝化为气态氮脱除^[1]。然而在1972年,Verstraete等分离出第一株异养硝化菌(*Arthrobacter* sp.)^[2],而后多位研究学者筛选出芽胞杆菌属(*Bacillus* sp.)、副球菌属(*Paracoccus* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonaceae* sp.)的异养硝化菌,并在实际应用过程中发现这些硝化菌同时存在硝化和反硝化功能^[3],同时具有便于培养的特点,因而具备更加广阔的研究和应用前景。人工湿地是人为建造具有与天然湿地相似结构和功能的可控复合体,利用湿地系统中基质、微生物、水生植物及生物膜,通过理化、生物途径实现污水净化的生态水处理系统^[4-6]。湿地中微生物的固氮、氨化、硝化和反硝化作用实现水体的脱氮^[7]。传统的人工湿地系统构建过程中,由于群落数量、溶氧及载体等因素的影响,湿地中微生物自然繁殖速度缓慢、活性低,结合已经报道的硝化菌株可以发现,利用人工湿地处理污染水体存在耗时较长、脱氮效果不佳、亚硝酸盐积累多、尾水氨氮残留等较多问题^[8-9]。本研究从好氧反硝化发生集中的活性污泥中分离筛选出一株去氮功能的菌株TY,采用湿地模拟试验对该菌的脱氮特性进行分析,进一步验证湿地组合工艺对污染水体的脱氮能力^[10]。同时对菌株进行基因鉴定,为流域污染治理工程实践提供理论支持和实践指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分离源 试验污泥样品取自无锡市某污水处理厂生化池、附近河道及垃圾处理厂好氧池。

1.1.2 培养基 ①液体选择性培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.47 g/L, $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4$ 5.62 g/L, 微量元素溶液 50 mL/L, pH 7.0~7.2。微量元素溶液(g/L): K_2HPO_4 5.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5, NaCl 2.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 培养基采用加压蒸汽灭菌(100 kPa, 30 min)^[8]。②固体培养基: 在液体培养基中加入琼脂 20.0 g/L^[11]。

1.1.3 试验用水 参考某河流排口水实测比例

值,向地表水中加入一定量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 和 K_2HPO_4 制成试验用水(C/N=10),使其氨氮含量为 (18.0 ± 1.0) mg/L,总氮含量为 (20.0 ± 1.0) mg/L, COD 含量为 (200.0 ± 5.0) mg/L^[11]。

1.1.4 湿地填料 直径0.8~1.0 cm的火山岩填料。

1.1.5 主要试剂与仪器设备 无菌水 2 mol/L 氯化钠溶液,95%乙醇,二苯胺溶液, Gelstain 核酸染料,10×buffer 缓冲液, QIAquick 凝胶提取试剂盒(德国 QIAGEN),1%琼脂糖胶,TAE 缓冲液,1×TAE电泳液,PCR 引物等。分光光度计(722N, 上海精科);显微镜(CX33, OLYMPUS);PCR 仪(LEPGEN96, 乐普);琼脂糖水平电泳仪(DYCP-31DN)。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选 向收集得到的分离源中加入异养硝化培养基,每隔24 h测定培养液氨氮含量,当其含量降至0 mg/L时,需要向其中补加培养基^[12]。在富集培养7~10 d后,取富集培养液进行梯度稀释(10^{-1} ~ 10^{-5}),采用平板稀释涂布法分离目标菌株^[13]。培养48 h,挑选不同的菌落分别进行纯化培养。以培养液中氨氮含量和平板中菌落数量为参考依据,选取活性强、繁殖快的菌株进行分类鉴定和功能试验^[14]。

1.2.2 菌株脱氮特性测定 以1%(体积分数)的接种量至液体培养基(氨氮含量为 (10.0 ± 0.5) mg/L, C/N=10)中,35℃条件下,180 r/min 培养48 h制成发酵液,空白组不加发酵液,其他操作完全相同。期间每8 h检测培养液中氨氮、总氮及中间产物的亚硝态氮和硝态氮的含量,验证菌株脱氮效果及特性^[15]。

1.2.3 配菌模拟湿地系统处理效果 ①淋洗液: 空白组为纯水,试验组1为灭活发酵液,试验组2为菌株发酵液。②模拟湿地系统(以下简称“系统”)装置: 制作3个长×宽×高=50 cm×50 cm×60 cm的方槽,各装入50 kg火山岩,分别置于3个相同的700 L容积水箱中,3套系统装置均安装推流设备加速系统内淋洗液流动,淋洗液由方槽顶部淋入,底部渗出。装置在 (25.0 ± 2.0) ℃室温条件下,循环淋洗48 h后中止推流再静止浸润12 d,期间每天更换50%的对应淋洗液^[16-18]。第15天时,将系统中淋洗液全部排出,

换入 500 L 试验用水,重新启动推流设备进入运行期,期间每 48 h 取水样检测氨氮、总氮和 COD 的含量,并更换试验用水,维持运行 30 d^[19-21]。

1.2.4 形态观察 纯化培养后,观察菌落形态的特征,进行革兰染色并用光学显微镜观察。

1.2.5 菌株测序及演化分析 采用生工生物工程(上海)股份有限公司(上海生工) SK8255 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取待鉴菌株的基因组 DNA,并以细菌的通用引物 7f 1540R (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCTAGGAGGTGA-TCCAGCCGCA-3') 和 27f1492R (5'-AGTTTGATC-MTGGCTCAGGGTTACCTTGTACGACTT-3') 进行 16S rRNA 的 PCR 扩增。PCR 扩增采用 50 μ L 反应体系,其中包括 0.5 μ L DNA 模板 2.5 μ L 10 $\times$ Buffer 1 μ L dNTP 0.2 μ L 酶 0.5 μ L 上游引物,0.5 μ L 下游引物 25 μ L ddH₂O。反应条件:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 45 s 55 $^{\circ}$ C 45 s 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min^[8]。纯化 PCR 产物,使用 1% 琼脂糖胶在 TAE 缓冲液中,150 V、100 mA 条件下电泳 30 min,电泳后琼脂糖胶使用凝胶成像系统的 UV 激发光检测条带并拍照。测序委托上海生工进行。测得的序列与 GenBank 中已有的模式菌株序列进行在线比对,并下载同源性较高的序列,通过 MEGA 7.0 算法构建菌株系统发育树,用 Bootstrap 分析评估树的稳定性^[22]。

2 结果与分析

2.1 生长曲线

从图 1 可以看出,菌株 TY 经过 8 h 的迟缓期后进入指数期,并在 32 h 时 OD_{600} 值达到了最大 1.401。因此,选取在 8~32 h 处于指数生长期的菌体作为试验用菌。

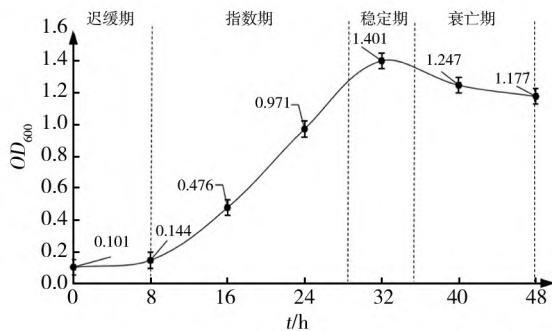


图 1 菌株 TY 生长曲线

Fig. 1 The growth curve of TY bacteria

2.2 菌株 TY 脱氮特性

图 2~图 4 反映了加入菌株 TY 的发酵液中氨氮、总氮含量的变化情况。可以看出,指数期(培养 8~32 h)氨氮的降解速度快,这是由于菌株的繁殖和生长,将更多的氮转化为细胞原生质成分。随着培养的进行,进入稳定期氨氮含量降低速度减缓,这是由于反应末期部分菌体死亡后自溶释放氨氮造成的。菌株 TY 对总氮的去除率为 84.2%,氨氮去除率 93.6%。

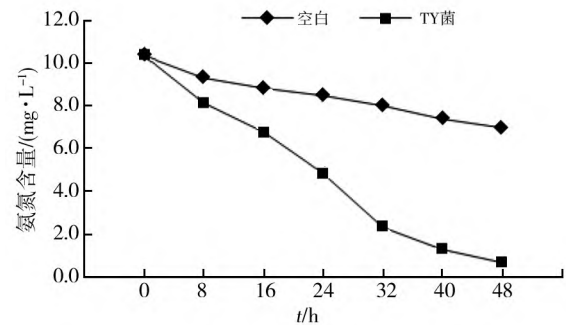


图 2 菌株 TY 对水中氨氮的降解作用

Fig. 2 Degradation of ammonia nitrogen in water by TY bacteria

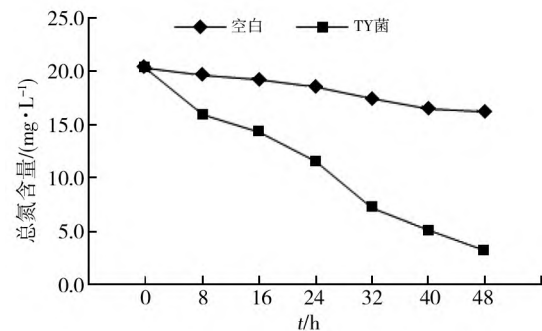


图 3 菌株 TY 对水中总氮的降解作用

Fig. 3 Degradation of total nitrogen in water by TY bacteria

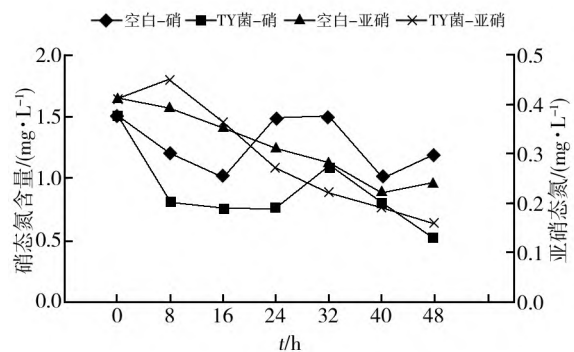


图 4 菌株 TY 脱氮中间产物含量

Fig. 4 Content of intermediate products in denitrification process of TY bacteria

在整个反应过程中,需要检测硝化产物硝态氮和亚硝态氮的含量来探究菌株的硝化特性。图4可以看出,菌株TY可将硝酸盐快速转化成亚硝酸盐,并进一步转化,作为中间产物硝态氮和亚硝态氮仅有少量积累,低浓度的亚硝态氮能促进反硝化酶的反应速度^[23],且硝态氮降解速度快,反映出相关转化酶类活性高,降低了脱氮中间产物对生物细胞产生的毒害作用。

2.3 配菌系统处理效果

采用系统对比试验,进一步验证菌株TY对污染水体的净化效果。经12 d的静止浸润,试验组2形成的生物膜较多,空白组和试验组1基质表面形成生物膜量极少。三组系统中氨氮、总氮和COD的含量变化如图5~图7所示。

如图5所示,在25℃室温条件下,系统平稳运行30 d,试验组2对系统中氨氮的去除效果最好,且趋势较为稳定。经过计算,试验组2运行期平均氨氮去除率为94.3%,空白组和试验组1平均氨氮去除率分别为75.9%和66.4%。

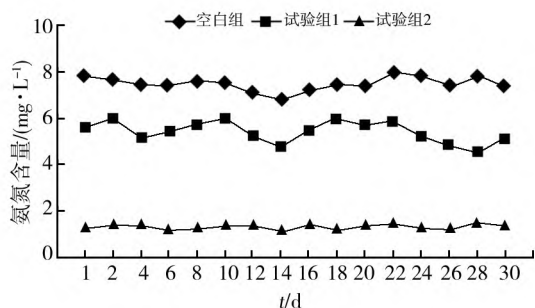


图5 运行期系统中氨氮含量变化

Fig. 5 The content change of ammonia nitrogen in the system during operation

由图6可以看出,试验组2对系统中总氮的去除效果较试验组1和空白组有明显优势。经过计算,试验组2、试验组1和空白组运行期平均去除率分别为88.0%、59.2%和25.1%,试验组2的平均去除率分别高于试验组1和空白组28.8%和62.8%。

试验组2对系统中COD的去除率也最高,平稳运行30 d后,如图7所示,空白组、试验组1和试验组2出口水样COD的平均去除率分别为68.3%、75.0%和82.3%。随着时间的延长,试验组2的去除量在逐渐升高,去除率稳定在86%以上。

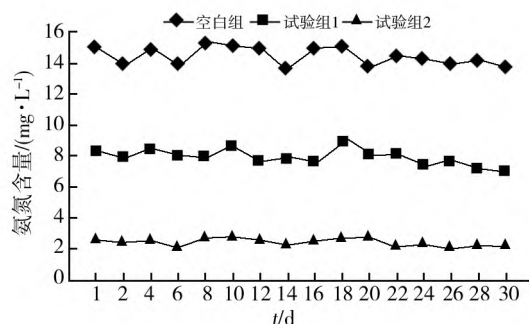


图6 运行期系统中总氮含量变化

Fig. 6 The content change of total nitrogen in the system during operation

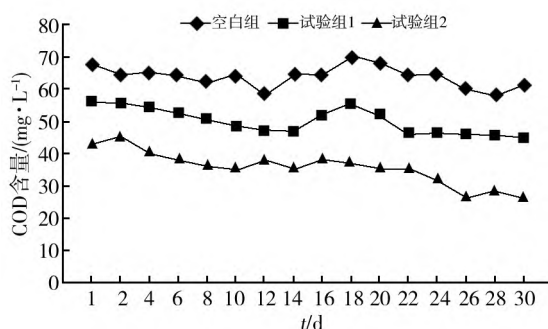


图7 运行期系统中COD含量变化

Fig. 7 The content change of COD in the system during operation

2.4 菌株形态特征

经筛选纯化后,获得菌株TY在35℃条件下恒温培养48 h,培养基上出现圆形菌落,浅粉透明,表面光滑、湿润,无凸起,直径约1~1.5 mm,易挑起(图8)。菌株TY革兰染色呈红色(图9),判断菌株为革兰阴性菌。菌体细胞呈略弯曲杆状,两端钝圆,大小为(0.7~1.0) μm × (1.2~3.0) μm,具端生鞭毛,无芽胞。

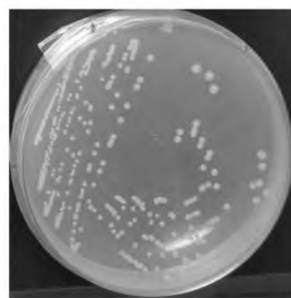


图8 菌株TY菌落形态

Fig. 8 Colony morphology of TY bacteria

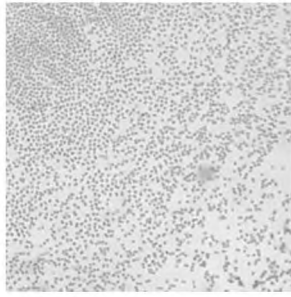


图9 菌株TY革兰染色结果

Fig. 9 The results of the Gram-staining

2.5 菌株的鉴定

经过分离筛选,从生化池污泥中筛选出一株可提高湿地除氮效率的菌株,并命名为TY。利用细菌通用引物扩增菌株TY的16SrRNA基因片

段,可得长度为1 508 bp的核酸序列(图10)。

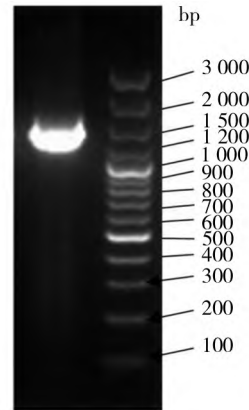


图10 菌株TY 16S rRNA 基因片段电泳

Fig. 10 Electrophoresis of strain TY 16S rRNA gene fragment

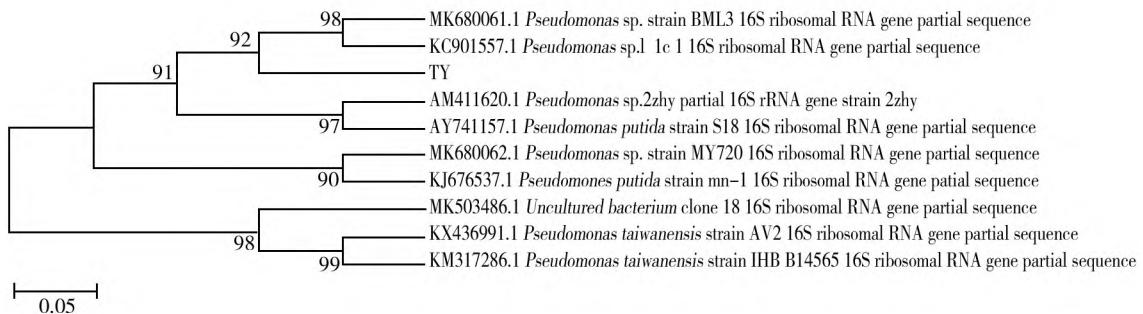


图11 菌株TY系统发育树

Fig. 11 The phylogenetic tree of TY strain

将菌株的16S rRNA序列输入GenBank数据库中进行BLASTN比对。在GenBank数据库中对比得到的10株菌株基因序列有9株都属于*Pseudomonas*,1株为未知菌属,登录号分别为CP041933.1、MK680062.1、MK680061.1、MK503486.1、KC901557.1、AM411620.1、AY741157.1、KX436991.1、KM817286.1、KJ676537.1,并通过Neighbor-joining算法绘制系统发育树,结果如图11所示,菌株TY与假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)同源性达99%,亲缘关系较近,在演化上按先后出现的顺序,菌株TY在演化上出现的较早。

3 讨论

通过生理生化实验和16S rRNA序列比对,确定了从长期运行的污水处理厂生化池底污泥中

分离获得的菌株TY属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。曾有学者得出假单胞菌属具有去除污水中氨氮功能的结论^[24-25],如刘万鑫在2017年发表的文章中明确指出,养殖场排水道底泥中筛选出的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),在发酵72 h时可将培养液中的氨氮含量降低96.09%^[26-27]。而菌株TY仅在48 h的去除率便与之接近持平,为93.6%,与此同时,菌株TY还可降低培养液中84.2%的总氮含量,说明菌株TY在去除污染水中的氨氮、总氮含量方面有较为明显的优势。此外,菌株TY在菌液发酵过程中产生的硝态氮和亚硝态氮积累量很少,说明菌株TY可转化中间硝态氮和亚硝态氮。导致这种情况可能的原因,一是由于菌株TY中存在某种可以将氨氮直接转化的酶;二是硝态氮和亚硝态氮作为底物参与了菌株TY的反硝化反应,这在某

些层面上解释了菌株 TY 具有一定的反硝化能力。这一推测也与 Richardson 等对细菌脱氮及相关性酶的研究中总结出的脱氮途径假说过程极其相似^[6]。好氧反硝化的第一步是由周质硝酸盐还原酶将硝酸盐转化成 NO_2^- , 再由亚硝酸盐还原酶 Nir 将其还原成 NO, 由 NO 还原酶(膜结合酶 Nor) 进一步催化生成 N_2O ; 则经过其他酶的作用, 最终变成 L-谷氨酸, 进入谷氨酸代谢途径。本研究初步验证菌株 TY 具备上述特性, 但还需要对菌株相关功能酶的基因序列进行测定, 进而判断脱氮相关酶的基因是否存在。附配菌株 TY 的模拟湿地系统(试验组 2) 可利用污染水中含氮化合物进行反硝化反应, 提高人工湿地系统对氨氮和总氮的去除效果。据 Huang 等^[28]、卢少勇等^[29]、何腾霞等^[30] 报道, 假单胞菌属的反硝化细菌还可以氧化硫化物。因此, 进一步深入研究菌株 TY 的功能, 不仅有助于同步实现并提高人工湿地脱氮除硫效果, 更为治理水体污染、修复水环境生态领域提供基础支持和新的思路。

参考文献:

- [1] Huang F, Pan L, Lü N, et al. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification [J]. *Journal Bio-science & Bioengineering* 2017, 124(5): 564-571.
- [2] Zhang XY, Zheng SK, Zhang HY, et al. Autotrophic and heterotrophic nitrification-anoxic denitrification dominated the anoxic/oxic sewage treatment process during optimization for higher loading rate and energy savings [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 263: 84-93.
- [3] 邵勇, 邓敬轩, 任洪艳, 等. 一株 *Agrobacterium* sp. 异养硝化菌的分离鉴定及其氨氧化性能 [J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(2): 325-331.
- [4] 张思, 宁国辉, 李昊阳, 等. 地下渗滤基质中微生物空间分布与污水净化效果相关分析 [J]. *水处理技术*, 2014, 40(7): 63-66, 79.
- [5] 黄德锋. 人工湿地净化富营养化景观水的效果及机理研究 [D]. 上海: 同济大学, 2007.
- [6] 牛永华. 人工湿地对景观水域处理效果研究 [J]. *山西水利科技* 2019, 214(4): 43-45, 87.
- [7] 邓敬轩, 周润杰, 单晓红, 等. 携菌新型生物质基材用于微污染水体治理 [J]. *中国给水排水* 2021, 37(11): 1-8.
- [8] 张望月, 高健, 张超, 等. 五种假单胞菌的分离鉴定及其生物活性 [J]. *微生物学报* 2013, 53(9): 957-965.
- [9] 杨长明, 张翔, 郝彦璋, 等. 人工湿地污水生态处理技术研究现状、挑战与展望 [J]. *工业水处理* 2021, 41(9): 18-25.
- [10] 冯亮, 袁春燕, 杨超, 等. 好氧反硝化生物脱氮技术的研究进展 [J]. *微生物学通报* 2020, 47(10): 3342-3354.
- [11] 翟茜, 汪苹, 李秀婷, 等. 活性污泥中好氧反硝化菌的富集筛选及鉴别 [J]. *环境科学与技术* 2007(1): 17-19, 120.
- [12] 孟会贤, 齐树亭, 李亮, 等. 脱氮菌的筛选鉴定及性能研究 [J]. *河北工业大学学报* 2016, 45(1): 57-62.
- [13] 谢晓娜, 张正波, 欧阳秋飞, 等. 好氧反硝化细菌的分离鉴定及其应用研究 [J]. *工业用水与废水* 2021, 52(4): 15-19.
- [14] 汤默然, 李茹莹. 异养硝化-好氧反硝化菌株的分离筛选及复配菌剂对河水的净化效果 [J]. *环境科学学报* 2021, 41(7): 2657-2663.
- [15] 李忠徽. 脱氮细菌的筛选及其对养殖池塘环境的修复效果 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- [16] 李秋芬, 康传磊, 张艳, 等. 高效脱氮菌强化挂膜生物滤器对海水养殖尾水净化效果研究 [J]. *中国水产科学* 2021, 28(5): 614-623.
- [17] 姚力, 信欣, 周迎芹, 等. 好氧反硝化菌强化序批式活性污泥反应器处理生活污水 [J]. *环境污染与防治* 2014, 36(3): 73-77.
- [18] 姜鑫. 改性火山岩作人工湿地基质对 N、P 削减效果及其规律研究 [D]. 苏州: 苏州科技大学, 2019.
- [19] 吕文轩. 人工湿地填料火山岩对氮的深度去除特征及机理研究 [D]. 绵阳: 西南科技大学, 2021.
- [20] 方媛媛, 戴国飞, 杨平, 等. 不同填料组合对污水中氮磷去除效果的研究 [J]. *应用化工* 2020, 49(10): 2475-2477, 2482.
- [21] 常雅军, 姚东瑞, 韩士群, 等. 基于基质吸附法与生物协同作用的强化生态浮床对不同富营养化水体的净化效果 [J]. *江苏农业学报* 2017, 33(2): 7.
- [22] 王永强, 李偲, 范培超, 等. 1 株鸵鸟铜绿假单胞菌的分离鉴定与进化树分析 [J]. *中国生物制品学杂志* 2020, 33(10): 1111-1116.
- [23] 魏佳明. 表流湿地细菌及反硝化细菌群落结构研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2017.
- [24] 刘万鑫, 杜荣斌, 由翠荣, 等. 几株异养硝化细菌与好氧反硝化细菌的分离与鉴定 [J]. *烟台大学学报(自然科学与工程版)* 2017, 30(3): 249-254.
- [25] 陈思宇, 张绍青, 陈鹏, 等. 基于短程反硝化的生物脱氮技术研究进展 [J]. *环境工程* 2021, 39(5): 38-44.
- [26] 汤茵琪, 李阳, 常素云, 等. 好氧反硝化菌强化生态浮床对水体氮与有机物净化机理 [J]. *生态学杂志* 2017, 36(2): 569-576.
- [27] 余里洁. 强化生态浮床在河道水体修复中脱氮除磷效果研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2019.
- [28] Huang F, Pan LQ, He ZY, et al. Identification, interactions, nitrogen removal pathways and performances of culturable heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria from mariculture water by using cell culture and metagenomics [J]. *Science of the Total Environment* 2020, 732(C).
- [29] 卢少勇, 万正芬, 康兴生, 等. 《人工湿地水质净化技术指南》编制思路与体系 [J]. *环境工程技术学报* 2021, 11(5): 829-836.
- [30] 何腾霞, 陈梦苹, 丁晨雨, 等. 微生物脱氮过程中氧化亚氮的释放机理及减排措施 [J]. *生物资源* 2021, 43(1): 17-25.