



好氧反硝化细菌碳氮代谢特点及途径的研究进展

杨丽, 何腾霞*, 张漫漫, 杨露

贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室,
贵州 贵阳 550025

杨丽, 何腾霞, 张漫漫, 杨露. 好氧反硝化细菌碳氮代谢特点及途径的研究进展. 微生物学报, 2022, 62(12): 4781–4797.
Yang Li, He Tengxia, Zhang Manman, Yang Lu. Research progress in the characteristics and pathways of carbon and nitrogen metabolism of aerobic denitrifying bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4781–4797.

摘要: 好氧反硝化作用的发现打破了反硝化只能在严格厌氧条件下进行的传统认知, 为生物脱氮提供了一条新的途径, 已成为近些年的研究热点。碳源可为好氧反硝化过程提供能量和电子供体, 其代谢难易程度直接影响着好氧反硝化细菌的脱氮效率, 因此有必要明确碳源在好氧反硝化脱氮过程中的代谢机理。基于此, 本文阐述了好氧反硝化细菌的种类及其对硝态氮与亚硝态氮的代谢途径; 系统分析了不同好氧反硝化细菌对碳氮源代谢的差异与代谢机理; 综合分析了碳代谢差异对好氧反硝化脱氮过程的影响, 并对未来的研究方向进行了展望, 旨在深入理解好氧反硝化细菌同时去除碳氮的机理, 为提高废水生物脱氮除碳效率提供理论依据。

关键词: 好氧反硝化细菌; 碳代谢; 氮代谢; 机理; 途径

基金项目: 贵州省科技计划(黔科合基础-ZK[2021]一般 233); 国家自然科学基金(42007223, 42167019); 贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2021]086); 贵州大学培育项目(贵大培育[2019]50号); 贵州省研究生教育教学改革重点课题[黔教合 YJSCXJH(2020)016]

Supported by the Guizhou Science and Technology Program (Guizhou Science and Technology Foundation-ZK[2021] General 233), by the National Natural Science Foundation of China (42007223, 42167019), by the Growth Project of Young Scientific and Technological Talents in General Colleges and Universities in Guizhou (Guizhou Jiaohe KY Word [2021]086), by the Cultivation Project of Guizhou University ([2019] No. 50) and by the Key Projects of Postgraduate Education and Teaching Reform in Guizhou Province [Guizhou Jiaohe YJSCXJH(2020)016]

*Corresponding author. E-mail: txhe@gzu.edu.cn

Received: 9 April 2022; Revised: 25 June 2022; Published online: 14 July 2022

Research progress in the characteristics and pathways of carbon and nitrogen metabolism of aerobic denitrifying bacteria

YANG Li, HE Tengxia*, ZHANG Manman, YANG Lu

Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), College of Life Sciences/Institute of Agro-Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: The discovery of aerobic denitrification has broken the traditional cognition that the denitrification only occurs under strictly anaerobic conditions. The aerobic denitrification provides a new way for biological denitrification and becomes a research hotspot in recent years. Carbon source can provide energy and electron donors for aerobic denitrification. The metabolism of carbon sources directly influences the nitrogen removal efficiency of aerobic denitrifying bacteria. Therefore, it is necessary to clarify the metabolic mechanism of carbon sources during aerobic denitrification. In this review, we summarized the known aerobic denitrifying bacteria and elaborated their metabolism pathways for nitrate and nitrite. Further, we systematically compared the mechanisms of different aerobic denitrifying bacteria in metabolizing carbon and nitrogen sources and comprehensively analyzed the effects of carbon metabolism differences on aerobic denitrification. Finally, we prospected the future research directions. With this review, we aim to deeply understand the mechanism of aerobic denitrifying bacteria in simultaneous removal of carbon and nitrogen and to provide a theoretical basis for improving the efficiencies of biological method for removing nitrogen and carbon from wastewater.

Keywords: aerobic denitrifying bacteria; carbon metabolism; nitrogen metabolism; mechanism; pathway

氮化合物如铵态氮、硝态氮和亚硝态氮等在自然环境中广泛存在，在物质循环中起着关键性作用，但其过度积累会造成水体富营养化，溶解氧含量降低，进而引起水生生物中毒甚至死亡^[1]。另外，氮污染也会威胁人类健康，如饮用被硝酸盐或亚硝酸盐污染的水体后，可能导致婴儿患高铁血红蛋白血症，在人体内形成亚硝胺，该物质具有致癌与传播疾病的作用^[2]。同样，造纸、化工农药、印染等工业生产与人类生活所产生的含碳废水中含有成分复杂且难降解的有机物，当它们流入环境且超过环境自我净化能力后会造成环境污染、生态系统退化、人类患病率提高等恶劣影响^[3]。因此，去除或减少

水体中的氮与碳化合物成为亟待解决的问题。

目前常见的污水处理方法有化学法、物理法、物理化学法和生物法，其中生物法是利用微生物的新陈代谢将污水中的有机物或无机物降解为气态物质或使其沉淀而实现污水净化^[4]。与物理、化学的方法相比，生物法具有成本低廉、能耗小、效率高、没有副反应产物和二次污染等特点，且微生物种类繁多，来源广泛，因此，采用微生物法治理污水受到了广泛青睐^[5]。在脱氮方面，传统的生物除氮包括自养硝化和厌氧反硝化过程，由于对氧气浓度需求不同，二者不能在同一系统中发生，这就导致传统生物脱氮技术存在耗时长、效率低、成本高等缺

陷。新型生物脱氮技术的出现克服了传统技术的这一缺点,常用的方法包括厌氧氨氧化、短程硝化反硝化和好氧反硝化,但前两者对反应条件要求极其严格,实际应用比较困难,且厌氧氨氧化细菌是自养菌,该类细菌增殖速度慢,很容易受污染而被淘汰,很难大面积应用^[6]。目前我国对于自养菌的纯培养和标准培养技术还不成熟,对这方面的研究还处于探索阶段^[7],并且在除碳方面,国内外对厌氧氨氧化和短程硝化反硝化除碳的研究较少。

好氧反硝化细菌基本都是异养菌,耐氧能力和生长速率均高于自养细菌^[8]。有研究发现,一些细菌的好氧反硝化总氮去除率略低于厌氧反硝化,且好氧反硝化的终产物以一氧化二氮(nitrous oxide, N_2O)为主,不如厌氧反硝化(终产物是 N_2)反应彻底^[9],原因可能是:(1) 在好氧条件下仅有周质硝酸盐还原酶(NAP)起作用,但在厌氧条件下膜结合硝酸盐还原酶(NAR)和NAP都可发挥作用催化反硝化过程^[10];(2) 高浓度溶解氧会抑制亚硝酸盐还原酶和氧化亚氮还原酶的活性^[9],导致亚硝酸盐积累, N_2O 也不能进一步被还原为 N_2 。但相比于厌氧反硝化,好氧反硝化工艺仍存在许多优势:(1) 节约成本。好氧反硝化消除了厌氧反硝化的单独储罐要求,同时降低了污泥产量;(2) 不需要额外加碱。反硝化反应产生的碱可以中和硝化反应产生的酸而稳定系统pH值^[11],有利于各类无机氮的去除;(3) 部分细菌兼具异养硝化与好氧反硝化功能,可在有氧条件下同时代谢铵盐和硝酸盐,使硝化与反硝化在同一系统内发生,进而降低成本,为污水处理提供了新的思路^[12]。另外,研究发现大多数好氧反硝化细菌都具有较强的脱碳能力^[13],可以将环境中的氮素和有机物作为自身的氮碳源,同时去除碳和氮^[14],碳源可为好氧反硝化过程提供能源和电子供

体,明确其代谢机理对提高好氧反硝化细菌除氮能力有重大意义。基于此,本文对好氧反硝化细菌种类、脱氮除碳特点及机理进行了详细论述,为后期研究如何提高好氧反硝化细菌同时去除碳与氮的效率提供理论参考。

1 好氧反硝化细菌的脱氮除碳特点

1.1 好氧反硝化细菌及脱氮特点

自1984年Robertson和Kuenen^[15]报道了细菌*Thiosphaera pantotropha* (*Paracoccus denitrificans*, 脱氮副球菌)具有好氧反硝化功能后,越来越多的好氧反硝化细菌被分离报道,主要属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[16]、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)^[17]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[18]和副球菌属(*Paracoccus*)^[19]等,这些好氧反硝化细菌能将水体中的硝态氮和亚硝态氮还原为气态氮而从根本上解决污水中无机氮含量超标的问题。目前发现大部分好氧反硝化细菌具备生长繁殖速度快、环境适应能力强和反硝化效率高等优点,部分细菌在初始氮浓度较低条件下仍然表现出良好的好氧反硝化能力,如菌株XD-11-6-2在初始硝态氮浓度为15 mg/L时,该菌的脱氮效率可达94.31%^[13],又如本课题组分离获得的菌株*Arthrobacter arilaitensis* Y-10^[20],当初始亚硝酸盐浓度为10.31 mg/L时,培养48 h后,该菌对亚硝酸盐去除率达到100%,表明一些好氧反硝化细菌具备治理微污染废水的潜能。由于反硝化相关酶活性受氧气浓度的制约,部分细菌的好氧反硝化效率受到溶解氧(dissolved oxygen, DO)浓度的影响,主要分为两种情况:(1) 在一定DO浓度范围内脱氮效率受到的影响极小,DO浓度下降后脱氮效率显著升高。如Patureau等^[21]研究发现当DO浓度高于4.5 mg/L时,菌株*Microvirgula aerodenitrificans*的反硝化效率变化不大,氮去除率在5.3%左右,当DO

浓度低于 4.5 mg/L 时, 反硝化效率开始急剧提高, 如 DO 为 0.2 mg/L 时的氮去除率高达 85.8%。马放等^[22]也发现了类似的现象。(2) 细菌的好氧反硝化效率在某一 DO 浓度达到峰值时, 高于或低于该浓度, 反硝化效率都会下降。如 Lv 等^[23]发现菌株 *Pseudomonas* sp. 41 在以硝态氮为唯一氮源及 DO 浓度为 6.9 mg/L 时的总氮去除率(94.33%)显著高于 DO 为 5.4 mg/L (72.54%) 和 7.6 mg/L (80.41%) 时的总氮去除率。但近年来, 越来越多不受 DO 浓度限制的耐氧反硝化菌株被报道, 如 Ji 等^[24]发现菌株 *Pseudomonas stutzeri* X31 在 DO 浓度高达 17.5 mg/L 时仍能去除 93.7% 的硝态氮。由此可见, 探明 DO 浓度如何影响好氧反硝化效率及影响程度是十分有必要的, 耐氧高效脱氮菌的分离报道对好氧

反硝化处理污水也有着深远的意义, 今后可加深对此类细菌反硝化酶系及相关基因的研究, 阐明耐氧机理, 促进好氧反硝化污水净化工艺的发展。另外, 好氧反硝化细菌在脱氮过程中还会受到碳源、C/N 比、温度和 pH 等环境因素的影响, 这可能是很多细菌在实验室条件下脱氮效率高, 实际应用到自然环境时脱氮效率低的原因, 目前对好氧反硝化细菌的实际应用研究较少。好氧反硝化微生物因其独特的脱氮优势已成为近些年氮污染废水治理的重要研究方向, 表 1 列举了近年来报道的好氧反硝化细菌的种类、脱氮特点及氮代谢条件。

1.2 好氧反硝化细菌的除碳特点

与氮化合物类似, 大量排放的有机碳已成为环境恶化的主要污染物, 在好氧反硝化过程

表 1 好氧反硝化细菌的脱氮特点

Table 1 Nitrogen removal characteristics of aerobic denitrifying bacteria

Strain	Genus	Separation point	Carbon source	T/°C	Initial material	Initial concentration/(mg/L)	Removal rate/%	References
XS-18	<i>Pseudomonas</i>	Activated sludge	Sodium citrate	25	NO ₃ ⁻ -N	48.96	100.00	[25]
PCN-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Landfill leachate	Sodium succinate	30	NO ₃ ⁻ -N	99.11	100.00	[26]
RAD-2	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Denitrification reactor biofilm	Sodium acetate	25-40	NO ₂ ⁻ -N	303.69	99.83	[27]
RAD-17	<i>Pseudomonas balearica</i>	Denitrifying reactor	Sodium acetate	25	NO ₂ ⁻ -N	302.27	99.81	[28]
T13	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Activated sludge	Sodium succinate	30	NO ₂ ⁻ -N	161.71	52.94	[29]
KK99	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Reservoir sediment	Sodium succinate	30	NO ₃ ⁻ -N	128.00	99.47	[9]
S1	<i>Bacillus pumilus</i>	Activated sludge	Sodium acetate	37	NO ₃ ⁻ -N	70.00	99.71	[30]
S3	<i>Arthrobacter</i> sp.	Activated sludge	Sodium acetate	37	NO ₃ ⁻ -N	70.00	98.98	[30]
C3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Activated sludge	Sodium succinate	30	NO ₃ ⁻ -N	120.00	95.80	[31]
Y1	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Aquaculture plant	Glucose	30	NO ₃ ⁻ -N	140.00	83.51	[32]
YL-1	<i>Dietzia</i> sp.	Activated sludge	Sodium acetate	30	NO ₃ ⁻ -N	115.30	100.00	[33]
PJ21	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aquifer porous media	Trisodium citrate	28	NO ₃ ⁻ -N	276.95	95.55	[34]

中扮演着重要角色, 不可或缺。好氧反硝化细菌对碳的去除有以下特点: (1) 有机碳如柠檬酸钠、葡萄糖和琥珀酸钠等可作为好氧反硝化细菌的能源物质, 同时为氮化合物的还原提供电子, 因此, 好氧反硝化细菌具备同时去除废水中有机碳和氮的能力^[10]; (2) 一些好氧反硝化细菌不仅可以利用易降解有机物(如葡萄糖、琥珀酸钠、乙酸钠等), 也能利用难降解芳香族有机物(如苯酚、吡啶和喹啉等)。如崔杰^[35]发现菌株 *Diaphorobacter* sp. PDB-3 能以苯酚为唯一碳源进行好氧反硝化去除硝酸盐。然而, 好氧反硝化细菌去除芳香族类有机物的相关研究较少, 而很多工厂排放的废水中又含有大量难降解的芳香族污染物, 好氧反硝化细菌是否能利用这类芳香族污染物进行高效生物脱氮还不清楚, 值得深入研究; (3) 好氧反硝化细菌混合培养体系的总有机碳(total organic carbon, TOC)去除率高于单一菌株。混合菌群中含有多种类的细菌, 各物种间的相互作用可提高废水中有机碳和氮的去除率。李苏霖^[36]从环境中筛选得到了 3 个菌群 D14、X21 和 CL, 它们都是由 9–21 株好氧反硝化菌株组成, 其中绝大多数菌株脱氮效果并不

理想, 但研究发现这 3 个混合培养菌群的总有机碳的去除率都可达 93%以上, 硝态氮的去除率可达 98%以上, 高于许多单一好氧反硝化菌株对碳氮的去除率。另外, 相比于单一菌株, 菌群 D14、X21 和 CL 在好氧反硝化过程中具有更高的气态氮损失量和更低的细胞内氮转化量, 这可能是由于菌群中不同种属细菌之间的相互作用形成了完整而有效的氮碳代谢途径, 提高了代谢效率, 改善了气态氮的代谢通量。然而混合菌群菌株间的相互作用也不一定都是有利的, 目前在菌株互作机理以及某些互作是否会产生负作用等方面的研究较为缺乏。表 2 列举了近年报道的好氧反硝化细菌的除碳能力及特点。

2 好氧反硝化细菌的脱氮机制

2.1 好氧反硝化细菌的脱氮机理

对于好氧反硝化细菌的脱氮机理, 目前大部分报道支持的观点是生物学理论, 即协同呼吸和电子传递理论^[36]。如 Robertson 等^[15]认为好氧反硝化细菌可以进行硝酸盐与氧气的共代谢, 即协同呼吸, 硝酸盐和氧都可以作为电子受体。过去研究报道认为硝酸盐和亚硝酸盐的

表 2 好氧反硝细菌的除碳特点

Table 2 Carbon removal characteristics of aerobic denitrification bacteria

Strain	Genus	Separation point	Carbon source	T/°C	Initial TOC concentration/(mg/L)	Removal rate/%	References
ZW23	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Paddy soil	Sodium citrate	37	2 756	90.91	[37]
HNR	<i>Enterobacter cloacae</i>	Activated sludge	Glucose	30	1 100	83.00	[38]
XD-11-6-2	<i>Streptomyces</i> sp.	Drinking water reservoir	Soluble starch	30	150	90.34	[13]
AD-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Activated sludge	Sodium succinate	30	3 000	100.00	[39]
ZW27	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Activated sludge	Sodium citrate	37	2 756	89.32	[37]
GF3	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	Contaminated soil	Anthraquinone	30	50	100.00	[40]
GA	<i>Acinetobacter</i>	Activated sludge	Sodium citrate dihydrate	25	1 000	25.17	[14]
ZMF5	<i>Acinetobacter junii</i>	Reservoir surface sediment	Sodium acetate	30	29.89	92.00	[41]

得电子能力远弱于氧气，所以在有氧条件下，反硝化细菌会优先把电子传递给氧进行呼吸作用，从而抑制了硝酸盐与亚硝酸盐的反硝化作用^[42]。另外，Robertson 等^[43]还发现，在传统的反硝化过程中，电子向氧传递的过程存在“瓶颈”，但他们发现好氧反硝化细菌可以通过细胞色素 c (cytochrome c, Cyt_c)以及细胞色素 a 和细胞色素 a₃ 的复合体(Cytaa₃)传递电子，克服了该“瓶颈”，实现硝酸盐与氧气的共代谢。在电子传递上，Wilson 等^[44]提出了好氧反硝化作用的电子传递模型，即好氧反硝化细菌代谢有机物后产生电子供体 NAD(P)H 将电子依次递送给辅酶 Q、细胞色素 b (cytochrome b, Cyt_b)和 Cyt_c，最终传递给氧气、硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶和 N₂O 还原酶催化反硝化过程。好氧反硝化细菌使得氧气和硝酸盐同时成为电子受体，但电子在反硝化过程中的分布情况，即多少电子流向氧气，多少电子流向反硝化酶系还需要探究，深入了解电子流的分布情况有利于阐明好氧反硝化过程中有机物和氮源的代谢机理，促进生物脱氮技术的发展。

另外，温度、pH 和重金属等环境条件变化会影响细菌对营养物质的吸收利用而影响其生长增殖，同时还会影响反硝化酶的活性^[45]。为了适应不同环境，好氧反硝化细菌表现出耐高/低温、耐酸碱和耐重金属等能力，目前对这些细菌的研究主要集中在脱氮能力和环境耐受机制上，对不同类型好氧反硝化细菌的脱氮机理差异几乎未见报道，只有个别研究对脱氮途径进行了分析，如 Lv 等^[23]从耐冷菌 *Pseudomonas* sp. 41 中扩增出了反硝化功能基因 *napA*、*nirS*、*norB* 和 *nosZ*，结合氮平衡分析推断该菌株的好氧反硝化途径为 $\text{NO}_3^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 。经关键酶活性分析和有关基因扩增证实耐重金属菌株 *Pseudomonas putida* ZN1^[6]

也通过上述途径完成好氧反硝化过程。但杨墨^[46]分离的耐冷菌 *Janthinobacterium* sp. M-11 中没有氧化亚氮还原酶编码基因 *nosZ*，因此该菌株的好氧反硝化产物仅为 N₂O，不能进一步被转化为 N₂。由此可推测细菌种类不同、对环境耐受性、编码反硝化酶的基因种类和表达丰度均具有差异性，最终导致不同类型好氧反硝化细菌的脱氮效率、机理和途径均不相同，因此，不同类型好氧反硝化细菌的脱氮机理与环境耐受机制之间的具体关联有待进一步研究探讨。

2.2 好氧反硝化细菌的氮代谢途径

目前报道的好氧反硝化细菌对氮的代谢途径主要包括将硝态氮和亚硝态氮异化转化为气态氮，或同化转化为生物量氮。部分好氧反硝化细菌还可利用铵态氮作为氮源同时发生异养硝化反应^[47]，具体代谢途径如图 1 所示。对氮代谢途径的研究方法有很多，常用的有氮平衡分析、酶活性测定、氮代谢相关基因的扩增、转录表达差异分析和 KEGG 氮代谢通路分析等。氮平衡的分析结果可以直观明了地展示细菌的氮代谢特征，如本研究团队通过测定米氏链霉菌(*Streptomyces mediolani*) EM-B2 在好氧反硝化过程中的氮平衡阐明了无机氮的去向，当菌株 EM-B2 以硝酸盐为唯一氮源时，约有 36.62%和 51.54%的初始总氮分别被转化为气态氮和生物量氮，反硝化效率显著高于部分已报道的好氧反硝化细菌，以亚硝酸盐为唯一氮源时也得到了类似的结果，表明菌株 EM-B2 在好氧反硝化过程中主要通过同化生物量氮途径去除无机氮^[48]；此外，氮代谢过程依赖于酶的催化作用，酶活性对氮代谢的途径和效率有着决定性的影响，如本课题组分离到的台湾假单胞菌(*Pseudomonas taiwanensis*) EN-F2^[49]的硝酸盐还原酶 NR 的比酶活性为 0.42 U/mg 蛋白质，显著高于阿斯节杆菌(*Arthrobacter arilaitensis*)

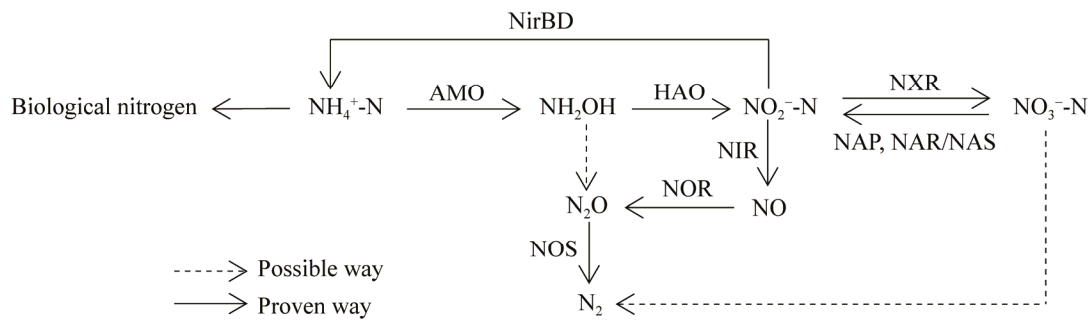


图1 好氧反硝化细菌氮代谢途径(改编自文献[11])

Figure 1 Nitrogen metabolism pathway of aerobic denitrifying bacteria (adapted from reference [11]).

Y-10 (0.004 9 U/mg 蛋白质)^[50], 相应地, 菌株 EN-F2的硝酸盐去除速率[4.13 mg/(L·h)]也远高于菌株 Y-10 [1.40 mg/(L·h)]。由此可见, 生物脱氮相关酶活性越强, 脱氮速率也就越高; 在分子层面, 通过扩增编码氮代谢相关酶的功能基因, 根据扩增结果判断该基因是否存在, 进而判断是否存在这种代谢途径, 如 Zeng 等^[32]利用 PCR 技术扩增了菌株 *Sporidiobolus pararoseus* Y1 的硝化反硝化酶基因, 发现菌株 Y1 中存在 *nirK* 和 *napA* 基因, 可以判断该菌株能通过好氧反硝化过程代谢硝酸盐和亚硝酸盐; 对氮代谢相关基因转录表达差异分析, 可从分子水平阐明快速去除无机氮的关键途径。另外, 通过测序获得菌株全基因组序列, 经功能基因注释后利用 KEGG 数据库可以绘制 KEGG 氮代谢通路图, 如本课题组通过基因组测序并利用 KEGG 数据库确定了台湾假单胞菌 J488 存在关键脱氮基因 *nirB*, 其编码亚硝酸盐还原酶 Nir 催化脱氮过程^[51]。结合多种研究方法, 多方面验证分析, 明确微生物的脱氮途径。

以硝态氮和亚硝态氮为氮源, 细菌的代谢途径包括:(1) 经好氧反硝化作用逐步将硝态氮或亚硝态氮转化为气态氮。如 Xu 等^[52]根据氮去除特性、氮平衡、酶活测定和功能基因扩增结果, 确定了苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)

WXN-23 在转速为 120 r/min 的好氧条件下, 该菌的反硝化代谢途径为 $\text{NO}_3^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 。甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*) L7^[45]和施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) XL-2^[53]分别在 DO 浓度为 4.82 mg/L 和 5.90 mg/L 时具有同样的反硝化代谢途径;(2) 通过好氧反硝化将 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 直接转化为含氮气体。在好氧反硝化过程中, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 会先被还原为 $\text{NO}_2^- \text{-N}$, 随后被还原为 N_2 , 因此, 大部分已报道的好氧反硝化细菌在去除 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的过程中均会出现 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 浓度先升高后下降的现象。但也有去除 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 不积累 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 的研究报道, 如周丹丹等^[54]分离的菌株 X31 在 DO 浓度为 8–10 mg/L 的好氧条件下, 反硝化过程的中间产物 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 的浓度一直为 0, 故推测菌株 X31 的反硝化途径可能不经过 $\text{NO}_2^- \text{-N}$, 直接由 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 还原为 N_2 ; 本课题组也发现菌株 *Pseudomonas taiwanensis* J488 以硝酸盐作为唯一氮源, 在转速为 150 r/min 的条件下进行好氧反硝化, 整个过程中均没有亚硝酸盐积累, 且检测到了中间产物 N_2O , 因此推测菌株 J488 存在 $\text{NO}_3^- \text{-N} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ 的反硝化途径, 但目前没有从分子层面上证明该途径存在^[55];(3) 反硝化脱氮的同时, 好氧反硝化细菌可通过同化作用将无机氮转化为蛋白质和核酸等生长

增殖所必需的含氮物质^[11]；(4) NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 还会被还原为铵，该途径又分为同化还原为铵(assimilatory nitrate reduction to ammonia, ANRA)和异化还原为铵(dissimilatory nitrate reduction to ammonia, DNRA)。过去的研究认为 DNRA 只能在厌氧条件下发生，但近几年已有研究报道证实 DNRA 在好氧条件下也能发生，如 Huang 等^[56]利用全基因组扫描、同源重组和 ^{15}N 同位素标记等技术进行研究，发现恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) Y-9 在好氧条件(DO 浓度为 4–8 mg/L)下能同时进行 DNRA 和反硝化作用。ANRA 和 DNRA 是分别在同化硝酸盐还原酶 NAS 和硝酸盐还原酶 NAP、NAR 的作用下将硝酸盐同化还原成亚硝酸盐，再经亚硝酸盐还原酶 NirBD 还原成铵，可进一步同化为生物量氮^[57]，代谢途径可总结为 NO_3^- -N \rightarrow NO_2^- -N \rightarrow NH_4^+ -N \rightarrow 生物量氮，然而关于 ANRA 的报道极少，其具体途径和相关酶还需进一步验证；(5) 部分好氧反硝化菌具有同时硝化与反硝化功能，如本课题组分离到的菌株 *Streptomyces mediolani* EM-B2 在 DO 浓度为 7.4 mg/L 的好氧条件下可以同时硝化反硝化去除羟胺和亚硝酸盐^[58]，该菌的完整氮代谢途径为 NH_4^+ -N \rightarrow NH_2OH \rightarrow NO_2^- -N \rightarrow NO_3^- -N \rightarrow NO_2^- -N \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2 ；此外，在 DO 浓度为 7.35–7.66 mg/L 时，Ouyang 等^[59]发现菌株 *Acinetobacter tandoii* MZ-5 也通过该途径进行生物脱氮。值得注意的是， N_2O 是反硝化过程的中间产物，由于 N_2O 还原酶活性受氧气和自身浓度影响，因此，好氧反硝化的脱氮产物主要是 N_2O ，然而， N_2O 是一种强烈的温室气体，应尽量控制其产生^[11]；总之，好氧反硝化脱氮途径是多样的，随着越来越多的好氧反硝化菌种被分离报道，一些新的氮代谢途径也逐渐被挖掘出来，但许多新途径还需要进一步验证阐明。

好氧反硝化细菌脱氮的主导途径受菌种类别及培养条件的影响。(1) 从菌属类别上看：如 Chen 等^[60]通过对嗜硫副球菌(*Paracoccus thiophilus*) LSL 251 的好氧反硝化能力和氮平衡进行分析发现，21.14%的初始 NO_3^- -N 用于细胞合成，74.66%的初始 NO_3^- -N 以气态氮的形式损失，表明该菌株以反硝化途径为主，可广泛用于含氮污水的处理，类似脱氮特点的还有链霉菌(*Streptomyces* sp.) M5 和 M6^[61]。另外，部分好氧反硝化细菌主要通过同化作用去除无机氮，仅有少量无机氮被转化为气态氮。如不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) YT03^[62]以 NO_2^- -N 为唯一氮源时，在转速为 150 r/min 的好氧条件下，约有 55.55%的初始亚硝态氮被转化为生物量氮，仅有 28.33%被还原为气态氮；(2) 在培养条件方面：如不动杆菌(*Acinetobacter junii*) ZMF5^[41]以琥珀酸钠为碳源好氧培养时，约有 29.81%的硝态氮转化为生物量氮，38.81%转化为气态氮，但以葡萄糖为碳源时，同化形成的生物量氮占初始硝态氮浓度的 36.13%，气态氮占 20.56%；然而，其他因素如温度、DO、pH 和 C/N 等对脱氮终产物的影响鲜见报道，后续可设计实验并利用氮平衡分析技术探明这些环境因素和各因素之间的交互作用对好氧反硝化除氮的主导途径能否产生影响，以及具体的影响机制。对氮污染废水的处理，反硝化微生物可通过同化作用将无机氮转化为生物量氮，随后通过剩余污泥排出而净化水体。与同化为生物量氮相比，好氧反硝化可还原无机氮为气态氮，更有利于净化水环境，因此，深入研究影响好氧反硝化细菌主导脱氮途径的环境因素，以便于改变相应的培养条件以控制脱氮菌去除硝态氮与亚硝态氮的主导途径，优化除氮工艺从而提高无机氮转化为气态氮的效率。

基于以上论述，好氧反硝化细菌的最佳除

氮方式是通过反硝化途径产生 N_2 释放到大气, 因此, 采用好氧反硝化细菌处理氮污染废水时, 应全面掌握其除氮机理及影响除氮产物的环境因素, 通过调控环境条件以减少生物氮的积累、降低硝态氮与亚硝态氮在水体中的滞留、控制 N_2O 的释放、提高 N_2 的产率。

3 好氧反硝化细菌的除碳机理

碳源在好氧反硝化细菌氮代谢过程中兼负供能和供电子两项重任。碳源种类与碳氮比均会影响反硝化效率, 过高或过低的碳氮比均会导致细菌的好氧反硝化效率降低, 如 Kim 等^[63]报道了恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) AD-21 在碳氮比等于 2 时的反硝化效率低于 20%, 等于 10 时约为 30%, 均显著低于碳氮比为 8 时的反硝化效率(70%)。然而, 目前对好氧反硝化细菌碳代谢的研究较少, 主要集中于探究中心碳代谢通路和碳代谢活性两方面。其中, 细菌的中心碳代谢途径包括糖酵解途径(glycolytic pathway, EMP)、磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PP)、2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸途径(ED)、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)和乙醛酸循环(GAC)等。胞内碳代谢途径研究较多的是一些模式微生物, 如大肠杆菌、酿酒酵母和枯草芽孢杆菌等^[36], 只有少数研究探索了好氧反硝化的碳代谢途径, 但对于好氧反硝化细菌脱碳过程中具体的电子供应机制、碳代谢途径选择的原因及影响因素等鲜有研究报道。

3.1 好氧反硝化细菌的中心碳代谢通路

中心碳代谢(central carbon metabolism, CCM)过程是通过一系列酶的作用, 将糖代谢为生物合成前体如丙酮酸、乙酰辅酶 A 和草酰乙酸等, 这些前体再进一步被用来产生细胞的生物量, 同时产能^[64]。对中心碳代谢流量的研究有助于深入理解特定条件下生物体不同碳代谢

过程之间的关联, 如细菌通过何种途径代谢有机物产生能量和电子供给硝化反硝化过程。现今常用 ^{13}C 稳定同位素标记技术和 ^{13}C 代谢通量分析(^{13}C -MFA)技术研究碳代谢通路, 同时, 利用气相色谱-质谱(GS-MS)对碳代谢的衍生物进行定性和定量分析^[8,65]这有利于理解细菌细胞内复杂的碳代谢网络以及精确量化碳通量^[66]。

细菌的碳代谢过程可以分为两个阶段, 代谢早期和代谢后期。碳代谢早期细菌将葡萄糖摄取到细胞内, 在己糖激酶的作用下被磷酸化生成葡萄糖-6-磷酸(glucose-6-phosphate, G6P), G6P 通过 ED 途径、EMP 途径或 PP 途径被代谢生成丙酮酸(pyruvic acid, PYR), 在此过程中会产生大量的生物量、 CO_2 、 H^+ 、ATP 和 $NADH_2$ ^[64,67]。前期的大量研究都表明 EMP 途径是大多数微生物糖代谢的主要途径, 如枯草芽孢杆菌^[68]、链霉菌^[69]和酿酒酵母^[70]等均依赖于 EMP 途径代谢葡萄糖, 少量碳通量涉及 PP 途径, 但现在许多研究发现有不少细菌会依赖 ED 途径代谢葡萄糖, 如 6 株专性需氧嗜酸细菌被发现通过 ED 和 PP 途径代谢葡萄糖, 没有检测到 EMP 途径^[71]; Fuhrer 等^[72]研究 7 株细菌对葡萄糖的代谢过程时, 也发现了类似的代谢途径, 且 PP 途径仅有生物合成的功能。此外, 已报道的好氧反硝化细菌也主要是以 ED 途径代谢葡萄糖, 如 Chen 等^[60]研究了嗜硫副球菌(*Paracoccus thiophilus*) LSL 251 对葡萄糖的代谢过程, 结果显示吸收进入细胞的葡萄糖中有 96%通过 ED 途径被分解, 14%由 PP 途径分解, 但没有观察到 EMP 途径存在。相似的结果也在脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*) Z195^[8]中被观察到, 其中 95%的葡萄糖经 ED 途径代谢, 3%经 EMP 途径、2%经 PP 途径代谢。实际上 EMP 途径产生的 ATP 是 ED 途径的 2 倍^[73], 但即便如此, ED 途径仍是目前多数细菌的首选, 原因在于在

相同的糖代谢通量下 ED 途径需要的酶蛋白量比 EMP 途径少 3–5 倍^[74], 可以支持微生物大量生长, 由此表明细菌在选用糖代谢路径时会在能量生成和所耗蛋白量之间权衡, 通常会采取消耗最少的途径代谢碳源, 后续可加深对好氧反硝化菌株糖代谢主导途径的研究。

葡萄糖经早期代谢产生的丙酮酸会在代谢后期进入三羧酸循环(TCA)。好氧反硝化细菌 *Paracoccus thiophilus* LSL 251^[60]和 *Paracoccus denitrificans* Z195^[8]的 TCA 循环都十分活跃, 几乎所有的碳通量都参与了该循环。除了葡萄糖的代谢, 还有一些芳香族有机物经过初步分解后也进入 TCA 循环, 进一步被代谢, 如枯草芽孢杆菌^[75]和假单胞菌^[76]分别对萘和萘的代谢。TCA 循环在有机物代谢中起着重要作用, 是需氧生物普遍存在的代谢途径, 其代谢过程可产生大量的 NAD(P)H、FADH₂、GTP 和 ATP^[73], 以此作为能量代谢枢纽为生命活动供能。其次, 有机碳经 ED 途径、EMP 途径、PP 途径和 TCA 循环可产生大量电子供体 NADH, 为氧和反硝化还原酶提供大量电子, 促进有氧呼吸作用和氮的还原, 实现碳和氮的同时去除。

由此可见, ED 途径和 TCA 循环能为好氧反硝化过程提供关键的辅助因子。同时, 一些研究人员发现碳分解产生的高水平代谢产物可以提高细菌对环境的耐受能力, 故推测现代细菌采用非传统的中心碳代谢途径(即以 ED 取代 EMP)是细菌不断进化、降解环境污染物和不断适应环境的结果^[77]。另外, 在嗜硫副球菌(*Paracoccus thiophilus*) LSL 251^[60]的代谢通路中还观察到了乙醛酸循环(GAC)分流, 虽然不活跃, 但 GAC 可为 TCA 循环提供中间产物(如琥珀酸), 作为回补反应维持 TCA 循环的稳定^[77]。图 2 总结了好氧反硝化细菌碳氮代谢过程中电子的传递特征。现阶段对好氧反硝化细菌中心碳代谢途径的研究均以葡萄糖为碳源, 这可能与其自身性质如化学结构与氧化还原电位有关, 后续可增加碳源种类, 从代谢途径、NAD(P)H 产量和流向反硝化酶系的电子数量等方面研究好氧反硝化菌株对不同碳源的代谢差异。

目前, 国内外对好氧反硝化细菌碳代谢的研究不够深入, 在好氧反硝化细菌除碳过程的影响因素、相关酶活性及功能基因表达情况等方面的研究匮乏, 未来可以加强这些方面的研

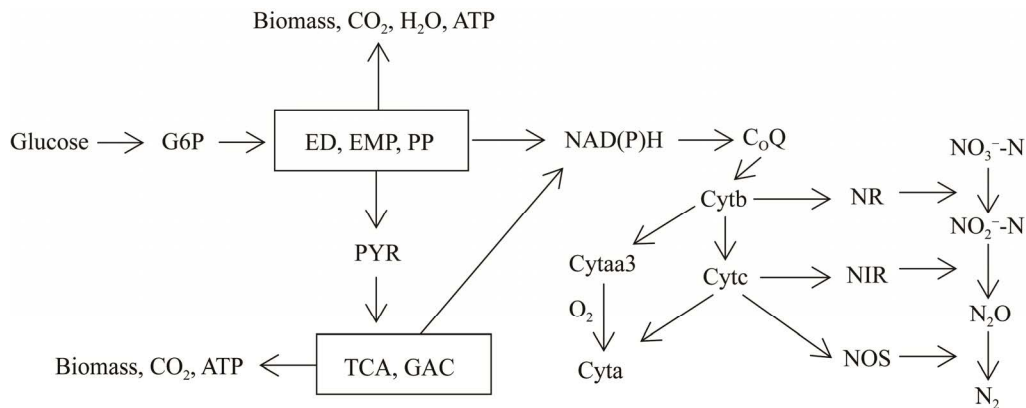


图 2 好氧反硝化细菌碳氮代谢电子传递图(改编自文献[36])

Figure 2 Electron transfer diagram of carbon and nitrogen metabolism in aerobic denitrifying bacteria (adapted from reference [36]).

究并尝试利用分子生物学技术优化菌株的脱碳能力, 进一步提高好氧反硝化菌株对复杂环境的适应能力。

3.2 碳代谢活性及其对除氮的影响

目前, Biolog-ECO 微平板技术常被用于好氧反硝化细菌活性和碳代谢活性的研究, 该技术采用单一碳源培养细菌, 通过 AWCD 值(平均颜色变化率)反映细菌对不同碳源的利用程度, AWCD 值越大表明细菌在该碳源下的活性越强, 细菌密度越大^[13]。好氧反硝化细菌的碳代谢活性研究主要从细菌在不同增殖阶段的代谢活性和对不同碳源的代谢能力两个方面开展: (1) 在不同增殖阶段的碳代谢活性: 好氧反硝化细菌在对数生长期对碳源的利用能力远远强于迟缓期, 这一现象在菌株 *Streptomyces* sp. M5、M6^[61]中得到证实。在实际应用时, 如果菌株对环境的适应期过长, 而对数增长期短, 会降低脱氮除碳效率, 因此可选用繁殖速率快和环境适应能力强的菌株来提高脱氮除碳效率。此外, 可直接接种处于对数期(最适种龄)的菌株, 以缩短或消除迟缓期并延长对数增长期, 从而增强碳代谢活性产生更多的电子供给反硝化过程。(2) 不同碳源的代谢能力: 为了适应不同的环境, 绝大多数好氧反硝化细菌都具备代谢多种碳源的能力, 但对不同碳源的利用情况各不相同。如链霉菌(*Streptomyces* sp.) XD-11-6-2 的碳代谢能力由强到弱为氨基酸>酯>醇>胺>碳水化合物>羧酸^[13], 这可能与碳源的还原性、分子结构、菌株和碳源之间的互利性有关; 阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) HNR^[38]对碳水化合物(葡萄糖)的利用能力强于羧酸盐类碳源(如琥珀酸盐和柠檬酸盐), 这可能是因为葡萄糖还原性更强, 分子结构更简单, 更利于菌株 *Enterobacter cloacae* HNR 的代谢, 且该菌

株可产生足够的酶进行葡萄糖代谢。由此, 不同微生物对不同碳源的代谢能力具有差异性, 可根据废水中碳污染种类投加相应的菌源, 实现除碳效率最大化。

另外, 碳源是好氧反硝化过程的电子来源, 碳源种类差异会影响反硝化效率, 这主要与氧化还原电位和碳源自身性质有关。如本研究团队发现, 相比于蔗糖, 柠檬酸钠更有利于菌株 *Pseudomonas putida* Y-12 进行好氧反硝化除氮, 该菌株以柠檬酸钠为唯一碳源时对亚硝酸盐去除率达 99%以上, 显著高于以蔗糖为唯一碳源时的亚硝酸盐去除率(20%)^[78]。又如 Jia 等^[79]发现菌株 DQ01 以葡萄糖为碳源时细胞的生长速率优于柠檬酸钠, 但以琥珀酸钠或柠檬酸钠为唯一碳源时的总氮去除率高于葡萄糖, 虽然葡萄糖的氧化还原电位更高, 但它不能直接参与呼吸链, 经初步代谢后生成的丙酮酸的还原能力弱于琥珀酸, 且琥珀酸钠可直接参与 TCA 循环。这些结果表明, 好氧反硝化细菌的碳源利用能力受多方面因素的影响, 但更倾向于能直接参与 TCA 循环且同时提供更多电子的碳源, 以便为自身生长增殖和硝化反硝化过程提供最多的能量与电子。由此, 在培养好氧反硝化细菌时, 应选择多种碳源进行比对研究, 以便筛选出最优碳源进而提高脱氮菌的反硝化效率。

除了碳源种类会影响除氮效果之外, 碳氮比也是一个重要的影响因素。前人研究发现过低或过高的 C/N 比均会阻碍细菌生长, 降低反硝化效率, 而适宜的碳氮比是好氧反硝化顺利进行的关键条件之一。不同细菌的最适碳氮比高低不等, 各不相同, 有的细菌最适碳氮比低至 2^[80], 而有的细菌最适碳氮比高达 30^[81]。从机理上看, C/N 比是通过影响电子传输和酶活

性来影响反硝化效率。如 Gu 等^[81]研究发现在低碳氮比下, 氨单加氧酶 AMO、羟胺氧化酶 HAO、硝酸盐还原酶 NR 与亚硝酸盐还原酶 NIR 的活性明显低于最适碳氮比时的活性, 其原因是低碳氮比条件下电子流过低, 不能为细胞生长提供足够能量, 而适宜碳氮比可以提高 NADH、ATP 水平并增强电子传递系统(ETSA)活性。持续提高 C/N 比时, 虽然 NADH 和 ATP 的浓度也会随之升高, 但好氧反硝化相关酶和 ETSA 活性不会持续增强, 且会导致电子传递链“过载”^[82], 这可能是好氧反硝化细菌在 C/N 过高的条件下反硝化效率不会进一步提高反而降低的原因。综上所述, 选择合适的碳源及碳氮比对好氧反硝化细菌的生长增殖与脱氮能力均有促进作用, 但目前在碳氮比影响脱氮效率的具体机理以及造成不同细菌最适碳氮比悬殊较大的原因方面研究得不够深入, 且好氧反硝化效率的影响因素是多方面的, 如 DO 浓度、pH 值和温度等均能改变细菌对碳氮的代谢能力, 各因素之间也可能相互作用, 因此对提高好氧反硝化细菌脱碳除氮效率方面的研究需要结合各个因素综合考虑。

4 结语与展望

目前关于好氧反硝化细菌脱氮除碳的研究主要聚焦在碳氮代谢能力测定方面, 对脱氮除碳的机理、代谢途径和影响因素等方面的研究还不够深入, 而探明细菌的脱氮除碳机理有助于提高废水净化效率, 对环境污水处理具有重要意义。本文系统地综述了好氧反硝化细菌的种类、氮碳代谢能力和代谢途径, 以及氮与碳代谢之间的关联性。发现当前的研究还存在许多未解决的问题, 需要后续研究者进一步探究:

(1) 进一步挖掘证实生物脱氮的途径。如探究 NO_3^- -N 是否可以直接转化为 N_2 , 挖掘更多

未被发现的氮代谢途径。

(2) 考虑实际应用。现阶段分离出的好氧反硝化细菌基本在实验室条件下表现出了良好的脱氮效果, 而实际环境废水的成分远比实验室条件复杂, 如可能含有重金属、无机盐、有机污染物(如氰化物和氟化物)、病毒等有毒有害物质会阻碍微生物的生长与功能表达。因此, 有必要验证脱氮除碳菌在实际环境中的应用潜力。此外, 当前混合菌剂共培养是一个新颖且具有良好前景的脱氮除碳技术, 通过菌株的互作可能提高环境适应能力和脱氮除碳效率, 后续可加强菌株间互作机理、是否会产生负作用以及如何避免负作用的相关研究。

(3) 增加细菌对多种碳源利用情况的研究。目前的研究主要使用的都是葡萄糖、琥珀酸钠、柠檬酸钠等易降解的碳源, 然而, 一些纺织厂、印染厂和化学化工厂等排出的废水中还含有大量难降解的芳香族污染物, 已获得的高效脱氮菌是否能利用这些难降解的碳源进行反硝化作用有待进一步研究。此外, 后续可从被芳香族化合物污染的环境中分离筛选生物脱氮菌进行研究, 增强好氧反硝化细菌对有毒有害物质的耐受性和降解能力。

(4) 优化好氧反硝化细菌除碳能力的研究方法。可增加对碳代谢相关酶活性的测定, 对碳平衡和电子传递流量分布的研究, 加强对碳代谢活性影响因素的探究, 深入分析细菌选择碳代谢途径的原因, 如现今许多好氧反硝化细菌选用 ED 途径代谢葡萄糖, 颠覆了人们一直以来认为细菌主要依赖 EMP 途径进行糖代谢的认知, 但对其深层次的原因研究不足。

(5) 通过人工手段如利用合成生物学和分子生物学方法优化细菌的碳氮代谢途径。如增加碳代谢过程 ATP 和电子供体 NAD(P)H 的产生, 进而实现高效脱氮除碳过程。

参考文献

- [1] Ibrahim RS, Sabeen AH, Zainon Noor Z, Ahmad Mutamim NS. Comparative study of suspended and attached growth in membrane bioreactors for wastewater treatment. *Water and Environment Journal*, 2019, 34: 273–289.
- [2] Hamdani A, Mountadar M, Assobhei O. Simultaneous nitrate and organic matter removal from a dairy effluent by bionitrification. *Revue Des Sciences De l'Eau*, 2018, 31(2): 97–107.
- [3] 杜漫漫, 莫颖慧. 反硝化生物阴极耦合电催化反应器除碳脱氮研究. *水处理技术*, 2021, 47(11): 54–59. Du MM, Mo YH. Study on carbon and nitrogen removal by denitrifying biocathode coupled electrocatalytic reactor. *Technology of Water Treatment*, 2021, 47(11): 54–59. (in Chinese)
- [4] 张漫漫, 何腾霞, 丁晨雨, 陈梦苹, 吴启凤. 生物脱氮中工程纳米颗粒的毒害作用及减毒措施的研究进展. *生物技术通报*, 2022, 38(2): 227–236. Zhang MM, He TX, Ding CY, Chen MP, Wu QF. Research progress of the toxic effects and detoxification measures of engineered nanoparticles in biological nitrogen-removing process. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(2): 227–236. (in Chinese)
- [5] Dalsgaard T, Thamdrup B, Fariás L, Revsbech NP. Anammox and denitrification in the oxygen minimum zone of the eastern South Pacific. *Limnology and Oceanography*, 2012, 57(5): 1331–1346.
- [6] 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. 太原理工大学硕士学位论文, 2019.
- [7] 周志勤. 锁磷剂联合固定化好氧反硝化菌修复富营养化水体实验研究. 华中科技大学硕士学位论文, 2019.
- [8] Zhang HH, Li SL, Ma B, Huang TL, Qiu H, Zhao ZF, Huang X, Liu KW. Nitrate removal characteristics and ^{13}C metabolic pathways of aerobic denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans* Z195. *Bioresource Technology*, 2020, 307: 123230.
- [9] 康鹏亮, 陈胜男, 黄廷林, 张海涵, 商潘路, 钊珍芳, 王跃, 谭欣林. 好/厌氧条件下反硝化细菌脱氮特性与功能基因. *环境科学*, 2018, 39(8): 3789–3796. Kang PL, Chen SN, Huang TL, Zhang HH, Shang PL, Zhao ZF, Wang Y, Tan XL. Denitrification characteristics and functional genes of denitrifying bacteria under aerobic or anaerobic conditions. *Environmental Science*, 2018, 39(8): 3789–3796. (in Chinese)
- [10] Ji B, Yang K, Zhu L, Jiang Y, Wang HY, Zhou J, Zhang HN. Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2015, 20(4): 643–651.
- [11] 何腾霞, 李振轮, 杨珊. 好氧反硝化细菌及其去除亚硝酸盐的作用机理研究进展. *过程工程学报*, 2015, 15(1): 174–180. He TX, Li ZL, Yang S. Research progress in aerobic denitrifier and its removing mechanism of nitrite. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2015, 15(1): 174–180. (in Chinese)
- [12] 王欢, 汪苹, 刘晶晶. 好氧反硝化菌的异养硝化性能研究. *环境科学与技术*, 2008, 31(11): 45–47, 119. Wang H, Wang P, Liu JJ. Characteristics of heterotrophic nitrification by aerobic denitrifiers. *Environmental Science & Technology*, 2008, 31(11): 45–47, 119. (in Chinese)
- [13] Zhang HH, Ma B, Huang TL, Shi YJ. Nitrate reduction by the aerobic denitrifying actinomycete *Streptomyces* sp. XD-11-6-2: performance, metabolic activity, and micro-polluted water treatment. *Bioresource Technology*, 2021, 326: 124779.
- [14] Guo Y, Yang RL, Zhang ZJ, Wang XJ, Ye X, Chen SH. Synergy of carbon and nitrogen removal of a co-culture of two aerobic denitrifying bacterial strains, *Acinetobacter* sp. GA and *Pseudomonas* sp. GP. *RSC Advances*, 2018, 8(38): 21558–21565.
- [15] Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology*, 1984, 139(4): 351–354.
- [16] Gao JQ, Gao D, Liu H, Cai J, Zhang JQ, Qi ZL. Biopotentiality of high efficient aerobic denitrifier *Bacillus megaterium* S379 for intensive aquaculture water quality management. *Journal of Environmental Management*, 2018, 222: 104–111.
- [17] 林敏, 尤崇杓. 粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)的反硝化及固氮作用. *核农学报*, 1987, 1(3): 3–10. Lin M, You CB. Denitrification and nitrogen fixation by *Alcaligenes faecalis*. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 1987, 1(3): 3–10. (in Chinese)
- [18] 李文甫, 杜柳冰, 刘思莹, 翁美遂, 舒琥, 陈琼华. 一株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮性能研究. *生物技术通报*, 2019, 35(9): 202–209. Li WF, Du LB, Liu SY, Weng MS, Shu H, Chen QH. Isolation and identification of an efficient aerobic denitrifying bacterium. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9): 202–209. (in Chinese)

- [19] Medhi K, Mishra A, Thakur IS. Genome sequence of a heterotrophic nitrifier and aerobic denitrifier, *Paracoccus denitrificans* strain ISTOD1, isolated from wastewater. *Genome Announcements*, 2018, 6(15): e00210–e00218.
- [20] He TX, Xie DT, Li ZL, Ni JP, Sun Q. Ammonium stimulates nitrate reduction during simultaneous nitrification and denitrification process by *Arthrobacter arilaitensis* Y-10. *Bioresource Technology*, 2017, 239: 66–73.
- [21] Patureau D, Bernet N, Delgenès JP, Moletta R. Effect of dissolved oxygen and carbon-nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(4): 535–542.
- [22] 马放, 王弘宇, 周丹丹, 左微. 好氧反硝化菌株 X31 的反硝化特性. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2005, 33(7): 42–46.
Ma F, Wang HY, Zhou DD, Zuo W. Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas chloritidismutans* strain X31. *Journal of South China University of Technology: Natural Science*, 2005, 33(7): 42–46. (in Chinese)
- [23] Lv PY, Wei BH, Ma WK, Luo X. Nitrogen removal characteristics of a cold-tolerant aerobic denitrification bacterium, *Pseudomonas* sp. 41. *Catalysts*, 2022, 12(4): 412.
- [24] Ji B, Wang HY, Yang K. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O₂ concentrations. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(4): 719–722.
- [25] Yan LL, Wang CX, Jiang JS, Liu S, Zheng YQ, Yang MY, Zhang Y. Nitrate removal by alkali-resistant *Pseudomonas* sp. XS-18 under aerobic conditions: performance and mechanism. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126175.
- [26] Zheng MS, Da He, Ma T, Chen Q, Liu ST, Ahmad M, Gui MY, Ni JR. Reducing NO and N₂O emission during aerobic denitrification by newly isolated *Pseudomonas stutzeri* PCN-1. *Bioresource Technology*, 2014, 162: 80–88.
- [27] Kong DD, Li WB, Deng YL, Ruan YJ, Chen GS, Yu JH, Lin FC. Denitrification-potential evaluation and nitrate-removal-pathway analysis of aerobic denitrifier strain *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* RAD-2. *Water*, 2018, 10(10): 1298.
- [28] Ruan YJ, Taherzadeh MJ, Kong DD, Lu HF, Zhao HP, Xu XY, Liu Y, Cai L. Nitrogen removal performance and metabolic pathways analysis of a novel aerobic denitrifying halotolerant *Pseudomonas balearica* strain RAD-17. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 72.
- [29] Sun YL, Li A, Zhang XN, Ma F. Regulation of dissolved oxygen from accumulated nitrite during the heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of *Pseudomonas stutzeri* T13. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(7): 3243–3248.
- [30] Elkarrach K, Merzouki M, Atia F, Laidi O, Benlemlih M. Aerobic denitrification using *Bacillus pumilus*, *Arthrobacter* sp., and *Streptomyces lusitanus*: novel aerobic denitrifying bacteria. *Bioresource Technology Reports*, 2021, 14: 100663.
- [31] Ji B, Yang K, Wang HY, Zhou J, Zhang HN. Aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* C3 incapable of heterotrophic nitrification. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(2): 407–409
- [32] Zeng JY, Liao SA, Qiu M, Chen MF, Ye JM, Zeng JY, Wang AL. Effects of carbon sources on the removal of ammonium, nitrite and nitrate nitrogen by the red yeast *Sporidiobolus pararoseus* Y1. *Bioresource Technology*, 2020, 312: 123593.
- [33] 郭艳丽, 张培玉, 于德爽, 曲洋, 郭沙沙, 成广勇. 一株轻度嗜盐反硝化菌的分离鉴定及特性. 应用与环境生物学报, 2010, 16(3): 394–398.
Guo YL, Zhang PY, Yu DS, Qu Y, Guo SS, Cheng GY. Isolation, identification and characteristics of a slightly halophilic denitrifying bacterium. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2010, 16(3): 394–398. (in Chinese)
- [34] 朱晓明, 赵东华, 阮晓红. 一株分离于含水层介质的好氧反硝化菌脱氮性能研究. 环境污染与防治, 2020, 42(3): 275–279, 286.
Zhu XM, Zhao DH, Ruan XH. Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium isolated from aquifer porous media. *Environmental Pollution & Control*, 2020, 42(3): 275–279, 286. (in Chinese)
- [35] 崔杰. *Diaphorobacter* 菌脱氮同时降解苯酚特性研究. 太原理工大学硕士学位论文, 2016.
- [36] 李苏霖. 典型好氧反硝化细菌脱氮除碳的代谢机制研究. 西安建筑科技大学硕士学位论文, 2020.
- [37] 朱晓宇, 王世梅, 梁剑茹, 周立祥. 两株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮效率. 环境科学学报, 2009, 29(1): 111–117.
Zhu XY, Wang SM, Liang JR, Zhou LX. Isolation and

- identification of two aerobic denitrifiers with high efficiency in the removal of N from simulated wastewater. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(1): 111–117. (in Chinese)
- [38] Guo LJ, Zhao B, An Q, Tian M. Characteristics of a novel aerobic denitrifying bacterium, *Enterobacter cloacae* strain HNR. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(5): 947–959.
- [39] Qing H, Donde OO, Tian CC, Wang CB, Wu XQ, Feng SS, Liu Y, Xiao BD. Novel heterotrophic nitrogen removal and assimilation characteristic of the newly isolated bacterium *Pseudomonas stutzeri* AD-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 126(3): 339–345.
- [40] Lu H, Wang XL, Zang MM, Zhou JT, Wang J, Guo WQ. Degradation pathways and kinetics of anthraquinone compounds along with nitrate removal by a newly isolated *Rhodococcus pyridinivoran* GF₃ under aerobic conditions. *Bioresource Technology*, 2019, 285: 121336.
- [41] 文刚, 王彤, 黄廷林, 万琪琪, 曹瑞华, 寇莉青, 杨尚业. 贫营养好氧反硝化菌株的脱氮特性及氮/碳平衡分析. *环境科学*, 2020, 41(5): 2339–2348.
Wen G, Wang T, Huang TL, Wan QQ, Cao RH, Kou LQ, Yang SY. Nitrogen removal performance and nitrogen/carbon balance of oligotrophic aerobic denitrifiers. *Environmental Science*, 2020, 41(5): 2339–2348. (in Chinese)
- [42] 刘方剑. 一株高效异养硝化-好氧反硝化细菌 WZ17 的筛选及其脱氮特性研究. 温州大学硕士学位论文, 2020.
- [43] Robertson LA, Van Niel EW, Torremans RA, Kuenen JG. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of thiosphaera pantotropa. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(11): 2812–2818.
- [44] Wilson LP, Bouwer EJ. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1997, 18(2/3): 116–130.
- [45] Zhang QL, Liu Y, Ai GM, Miao LL, Zheng HY, Liu ZP. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresource Technology*, 2012, 108: 35–44.
- [46] 杨墨. 耐冷菌 *Janthinobacterium* sp. M-11 的异养硝化好氧反硝化特性及耐冷机制研究. 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2019.
- [47] 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). *Science of the Total Environment*, 2021, 801: 149319.
- [48] He TX, Zhang MM, Ding CY, Wu QF, Chen MP, Mou SL, Cheng DJ, Duan SJ, Wang Y. New insight into the nitrogen removal capacity and mechanism of *Streptomyces mediolani* EM-B2. *Bioresource Technology*, 2022, 348: 126819.
- [49] Zhang MM, He TX, Chen MP, Wu QF. Ammonium and hydroxylamine can be preferentially removed during simultaneous nitrification and denitrification by *Pseudomonas taiwanensis* EN-F2. *Bioresource Technology*, 2022, 350: 126912.
- [50] He TX, Xie DT, Ni JP, Li Z, Li ZL. Characteristics of nitrogen transformation and intracellular nitrite accumulation by the hypothermia bacterium *Arthrobacter arilaitensis*. *The Science of the Total Environment*, 2020, 701: 134730.
- [51] He TX, Chen MP, Ding CY, Wu QF, Zhang MM. Hypothermia *Pseudomonas taiwanensis* J488 exhibited strong tolerance capacity to high dosages of divalent metal ions during nitrogen removal process. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125785.
- [52] Xu N, Liao M, Liang YQ, Guo JW, Zhang YH, Xie XM, Fan QY, Zhu YQ. Biological nitrogen removal capability and pathways analysis of a novel low C/N ratio heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium (*Bacillus thuringiensis* strain WXN-23). *Environmental Research*, 2021, 195: 110797.
- [53] Zhao B, Cheng DY, Tan P, An Q, Guo JS. Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate removal. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 564–573.
- [54] 周丹丹, 马放, 王弘宇, 董双石. 关于好氧反硝化菌筛选方法的研究. *微生物学报*, 2004, 44(6): 837–839.
Zhou DD, Ma F, Wang HY, Dong SS. Study on screening method of aerobic denitrifiers. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(6): 837–839. (in Chinese)
- [55] He TX, Xie DT, Ni JP, Li Z, Li ZL. Nitrous oxide produced directly from ammonium, nitrate and nitrite during nitrification and denitrification. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 388: 122114.

- [56] Huang XJ, Weisener CG, Ni JP, He BH, Xie DT, Li ZL. Nitrate assimilation, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, and denitrification coexist in *Pseudomonas putida* Y-9 under aerobic conditions. *Bioresource Technology*, 2020, 312: 123597.
- [57] 赵天涛, 陈沛沛, 张晟, 封丽. 异养硝化-好氧反硝化菌氮代谢机理的研究进展. 重庆理工大学学报: 自然科学, 2022, 36(1): 194–203.
Zhao TT, Chen PP, Zhang S, Feng L. Research progress on nitrogen metabolism mechanism of heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria. *Journal of Chongqing University of Technology: Natural Science*, 2022, 36(1): 194–203. (in Chinese)
- [58] He TX, Wu QF, Ding CY, Chen MP, Zhang MM. Hydroxylamine and nitrite are removed effectively by *Streptomyces mediolani* strain EM-B2. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 224: 112693.
- [59] Ouyang L, Wang KJ, Liu XY, Wong MH, Hu ZL, Chen HR, Yang XW, Li SF. A study on the nitrogen removal efficacy of bacterium *Acinetobacter tandoii* MZ-5 from a contaminated river of Shenzhen, Guangdong province, China. *Bioresource Technology*, 2020, 315: 123888.
- [60] Chen SN, Li SL, Huang TL, Yang SY, Liu KW, Ma B, Shi YJ, Miao YT. Nitrate reduction by *Paracoccus thiophilus* strain LSL 251 under aerobic condition: performance and intracellular central carbon flux pathways. *Bioresource Technology*, 2020, 308: 123301.
- [61] Ma B, Zhang HH, Ma ML, Huang TL, Guo HH, Yang WQ, Huang YW, Liu X, Li HY. Nitrogen removal by two strains of aerobic denitrification actinomycetes: denitrification capacity, carbon source metabolic ability, and raw water treatment. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126176.
- [62] Li B, Lv R, Xiao Y, Hu W, Mai YL, Zhang JW, Lin L, Hu XY. A novel nitrite-base aerobic denitrifying bacterium *Acinetobacter* sp. YT03 and its transcriptome analysis. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2580.
- [63] Kim M, Jeong SY, Yoon SJ, Cho SJ, Kim YH, Kim MJ, Ryu EY, Lee SJ. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(5): 498–502.
- [64] Noor E, Eden E, Milo R, Alon U. Central carbon metabolism as a minimal biochemical walk between precursors for biomass and energy. *Molecular Cell*, 2010, 39(5): 809–820.
- [65] Cordova LT, Antoniewicz MR. ^{13}C metabolic flux analysis of the extremely thermophilic, fast growing, xylose-utilizing *Geobacillus* strain LC300. *Metabolic Engineering*, 2016, 33: 148–157.
- [66] Abernathy M, Wan N, Shui WQ, Tang YJ. Dynamic ^{13}C labeling of fast turnover metabolites for analysis of metabolic fluxes and metabolite channeling. *Methods in Molecular Biology: Clifton, N J*, 2019, 1859: 301–316.
- [67] Eylem CC, Reçber T, Waris M, Kır S, Nemutlu E. State-of-the-art GC-MS approaches for probing central carbon metabolism. *Microchemical Journal*, 2022, 172: 106892.
- [68] Goldman M, Blumenthal HJ. Pathways of glucose catabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1963, 86(2): 303–311.
- [69] Wang CH, Bialy JJ, Klungsoyr S, Gilmour CM. Studies on the biochemistry of *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, 1958, 75(1): 31–37.
- [70] Blank LM, Sauer U. TCA cycle activity in *Saccharomyces cerevisiae* is a function of the environmentally determined specific growth and glucose uptake rates. *Microbiology: Reading, England*, 2004, 150(Pt 4): 1085–1093.
- [71] Shuttleworth KL, Unz RF, Wichlacz PL. Glucose catabolism in strains of acidophilic, heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50(3): 573–579.
- [72] Fuhrer T, Fischer E, Sauer U. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(5): 1581–1590.
- [73] Edirisinghe JN, Weisenhorn P, Conrad N, Xia FF, Overbeek R, Stevens RL, Henry CS. Modeling central metabolism and energy biosynthesis across microbial life. *BMC Genomics*, 2016, 17: 568.
- [74] Flamholz A, Noor E, Bar-Even A, Liebermeister W, Milo R. Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *PNAS*, 2013, 110(24): 10039–10044.
- [75] 姚俊, 喻婵, 靳竞男. 一株枯草芽孢杆菌对芘的降解特性及代谢途径的研究. 化学与生物工程, 2014, 31(5): 10–12, 27.
Yao J, Yu C, Jin JN. Study on degradation characteristics and metabolic pathway of a pyrene-degrading *Bacillus subtilis* strain. *Chemistry & Bioengineering*, 2014, 31(5): 10–12, 27. (in Chinese)

- [76] 张丹, 李兆格, 包新光, 李江波, 梁海华, 段康民, 沈立新. 细菌降解萘、菲的代谢途径及相关基因的研究进展. *生物工程学报*, 2010, 26(6): 726–734.
Zhang D, Li ZG, Bao XG, Li JB, Liang HH, Duan KM, Shen LX. Recent advances in bacterial biodegradation of naphthalene, phenanthrene by bacteria: a review. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2010, 26(6): 726–734. (in Chinese)
- [77] Sudarsan S, Dethlefsen S, Blank LM, Siemann-Herzberg M, Schmid A. The functional structure of central carbon metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(17): 5292–5303.
- [78] 何腾霞, 李振轮, 徐义. 耐冷亚硝酸盐型反硝化细菌 *Pseudomonas putida* Y-12 脱氮特性. *环境科学学报*, 2015, 35(10): 3071–3077.
He TX, Li ZL, Xu Y. Denitrification characteristics of a hypothermia nitrite-denitrifier *Pseudomonas putida* Y-12. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(10): 3071–3077. (in Chinese)
- [79] Jia YT, Zhou MM, Chen YC, Luo J, Hu YY. Carbon selection for nitrogen degradation pathway by *Stenotrophomonas maltophilia*: based on the balances of nitrogen, carbon and electron. *Bioresource Technology*, 2019, 294: 122114.
- [80] Huang XF, Li WG, Zhang DY, Qin W. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification at low temperature. *Bioresource Technology*, 2013, 146: 44–50.
- [81] Gu X, Leng JT, Zhu JT, Zhang K, Zhao JQ, Wu P, Xing QY, Tang KJ, Li XL, Hu B. Influence mechanism of C/N ratio on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process. *Bioresource Technology*, 2022, 343: 126116.
- [82] Robertson LA, Kuenen JG. Heterotrophic nitrification in thiosphaera pantotropha: oxygen uptake and enzyme studies. *Microbiology*, 1988, 134(4): 857–863.