

克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.) WH-E 的筛选及脱氮机制

巩璐琳¹, 马咏琪¹, 张爱文², 张艳丽³, 孙旭春⁴, 张引弟¹, 漆文瑞¹,
薛媛¹, 孙丽坤^{1*}

- 1 甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃 兰州
- 2 甘肃省畜牧技术推广总站, 甘肃 兰州
- 3 平凉市农产品质量安全与检验检测中心, 甘肃 平凉
- 4 临夏回族自治州畜牧技术推广站, 甘肃 临夏

巩璐琳, 马咏琪, 张爱文, 张艳丽, 孙旭春, 张引弟, 漆文瑞, 薛媛, 孙丽坤. 克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.) WH-E 的筛选及脱氮机制[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2174-2190.

GONG Lulin, MA Yongqi, ZHANG Aiwen, ZHANG Yanli, SUN Xuchun, ZHANG Yindi, QI Wenrui, XUE Yuan, SUN Likun. Screening and denitrification mechanisms of *Klebsiella* sp. WH-E[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(5): 2174-2190.

摘要:【目的】畜禽养殖污水排放量激增, 环境污染问题日益凸显。筛选高效异养硝化好氧反硝化菌株并探究其脱氮机制, 对解决养殖污水氮素污染问题具有重要的理论与实践意义。【方法】从猪场活性污泥中筛选一株异养硝化-好氧反硝化(heterotrophic nitrification-aerobic denitrification, HN-AD)能力优异的菌株, 采用响应面法优化其培养条件; 通过测定菌株对单一和混合氮源的利用效率, 借助氮平衡分析方法, 评估其对无机氮的转化能力; 结合气相色谱法测定 N₂O、N₂ 以验证反硝化过程的完整性; 结合全基因组分析解析菌株 WH-E 的脱氮途径及机制。【结果】成功分离出一株克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.) WH-E, 该菌株具有优异的异养硝化好氧反硝化性能。经优化试验确定其最适生长参数为: 碳源为柠檬酸钠, 温度为 34.18 °C, 初始 pH 为 7.1, C/N 为 14.53, 摇床转速为 159.59 r/min。菌株以氨氮、硝氮、亚硝氮为单一氮源培养时氮素去除率分别为 99.80%、81.54%、80.00%; 以氨氮为唯一氮源时, 35.84% 和 35.91% 的氮分别被转化为细胞氮和气态氮。以氨氮和硝氮为混合氮源培养时氮素去除率均为 100.00%; 以氨氮和亚硝氮为混合氮

资助项目: 甘肃省自然科学基金(24JRRA644); 甘肃省科技技术创新引导计划-东西部科技协作专项(25CXNA029); 甘肃农业大学伏羲杰出人才项目(GAUfx-04J03); 甘肃甘味生猪优势特色产业科技支撑和技术研发服务项目(GNKJ-2024-46); 甘肃省现代农业产业技术体系建设专项资金(GSARS02)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (24JRRA644), the Gansu Science and Technology Innovation Guidance Plan-Eastern-Western Regional Science and Technology Cooperation Initiative (25CXNA029), the Fuxi Outstanding Talent Program of Gansu Agricultural University (GAUfx-04J03), the Research and Application of Supporting Technologies for Gansu Gansi Pork Advantageous and Characteristic Industry Cluster (GNKJ-2024-46), and the Special Fund for the Construction of the Modern Agricultural Industry Technology System in Gansu Province (GSARS02).

*Corresponding author. E-mail: sunlk_baby@126.com

Received: 2025-09-24; Accepted: 2026-01-26; Published online: 2026-02-24

源培养时, 氨氮去除率为 100.00%, 亚硝氮去除率为 91.97%。全基因组测序分析发现 *glnB*、*norVWR*、*narGHI*、*nasBC*、*nirBD* 等多个与氮代谢相关的功能基因。【结论】*Klebsiella* sp. WH-E 有 3 种氮代谢途径, 包括氨同化途径、硝化反硝化途径和硝酸盐同化与异化途径。本研究证实了 HN-AD 菌株在实际养殖废水脱氮处理中的应用潜力, 并为其工程化实施提供了理论支撑。

关键词: 异养硝化好氧反硝化菌; 克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.) WH-E; 脱氮性能; 氮代谢; 全基因组

Screening and denitrification mechanisms of *Klebsiella* sp. WH-E

GONG Lulin¹, MA Yongqi¹, ZHANG Aiwen², ZHANG Yanli³, SUN Xuchun⁴, ZHANG Yindi¹,
QI Wenrui¹, XUE Yuan¹, SUN Likun^{1*}

1 College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, China

2 Gansu Provincial Animal Husbandry Technology Promotion Station, Lanzhou, Gansu, China

3 Pingliang Inspection and Testing Center of Agricultural Product Quality and Safety, Pingliang, Gansu, China

4 Animal Husbandry Technology Extension Station of Linxia Hui Autonomous Prefecture, Linxia, Gansu, China

Abstract: [Objective] The rapid increase in wastewater discharge from animal husbandry has caused severe environmental pollution. Identifying efficient heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria and investigating their denitrification mechanisms are of great theoretical and practical importance for mitigating nitrogen pollution in the wastewater. **[Methods]** A strain exceling in heterotrophic nitrification-aerobic denitrification (HN-AD) was isolated and from activated sludge in pig farms. Culture conditions were optimized by response surface methodology. We evaluated the inorganic nitrogen-transforming capacity of the strain by assessing its utilization efficiency of single and mixed nitrogen sources and through nitrogen balance analysis. The completeness of the denitrification process was confirmed *via* gas chromatographic measurements of N₂ and N₂O. Finally, the nitrogen removal pathways and underlying mechanisms were elucidated through whole-genome analysis. **[Results]** The successfully isolated strain *Klebsiella* sp. WH-E exhibited excellent HN-AD capabilities. The growth conditions of the strain were optimized as follows: sodium citrate as the carbon source, 34.18 °C, initial pH 7.1, a C/N ratio of 14.53, and a shaking speed of 159.59 r/min. When the strain was cultured with ammonium, nitrate, or nitrite as the sole nitrogen source, the nitrogen removal rates were 99.80%, 81.54%, and 80.00%, respectively. Furthermore, when ammonium was the sole nitrogen source, 35.84% and 35.91% of nitrogen were converted into cellular nitrogen and gaseous nitrogen, respectively. When ammonia nitrogen was combined with nitrate nitrogen as mixed nitrogen sources, the nitrogen removal rate was 100.00%; When ammonia nitrogen was combined with nitrite nitrogen as mixed nitrogen sources, the ammonia nitrogen removal rate was 100.00%, and the nitrite nitrogen removal rate was 91.97%, respectively. Whole-genome sequencing identified several nitrogen metabolism-related functional genes, including *glnB*, *norVWR*, *narGHI*, *nasBC*, and *nirBD*. **[Conclusion]** *Klebsiella* sp.

WH-E possesses three nitrogen metabolism pathways: ammonium assimilation, nitrification-denitrification, and nitrate assimilation and dissimilation. This study confirms the applicability of *Klebsiella* sp. WH-E for nitrogen removal from full-scale piggery wastewater and establishes a solid theoretical foundation for its engineering applications.

Keywords: heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria; *Klebsiella* sp. WH-E; denitrification performance; nitrogen metabolism; whole genome

畜禽的集约化发展导致污水排放量急剧增加, 给生态环境造成了巨大压力。《第二次全国污染源普查公报》指出, 畜禽养殖废水中氨氮(ammonium nitrogen, $\text{NH}_4^+\text{-N}$)的排放量为 $7.50 \times 10^4 \text{ t}^{[1]}$ 。高浓度的有机氮不仅会影响水体的自净能力, 还会危及人或动物的健康^[2]。因此, 去除水中的有机氮、维护水体健康和可持续性, 已成为重要的研究方向。

生物脱氮因脱氮效率高、成本低且无二次污染, 成为当前养殖废水脱氮的核心技术^[3], 其关键在于利用微生物转化实现氮素去除。异养硝化好氧反硝化(heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying, HN-AD)菌的发现为生物脱氮提供了新思路, 此类微生物因其硝化和反硝化在时间和空间上能够同步进行而受到广泛关注, 且在高氨氮废水的处理中体现出显著的环境和经济价值^[4]。目前已发现包括克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)^[5]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[6]和不动杆菌属(*Acinetobacter*)^[7]在内的多种菌株具有HN-AD能力。其氮代谢途径主要有2种: (1) 完全硝化反硝化途径[$\text{NH}_4^+\text{-N} \rightarrow$ 氢氧化胺(hydroxy lamine, NH_2OH) \rightarrow 硝酸盐氮/亚硝酸盐氮(nitrate nitrogen/nitrite nitrogen, $\text{NO}_2^-\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$) \rightarrow 氮气(nitrogen gas, N_2)], 如菌株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[8]; (2) NH_2OH 还原脱氮途径[$\text{NH}_4^+\text{-N} \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow$ 一氧化二氮(nitrous oxide, $\text{N}_2\text{O})/\text{N}_2$], 如菌株盐单胞菌属(*Halomonas* sp.) DN3^[9]。近年来, 研究发现 *Klebsiella* sp. TN-10^[10]对硝酸盐和亚硝酸盐的去除效率分别为95.44%和99.87%; *Klebsiella* sp. TSH15^[11]和 *Candida boidinii* L21^[12]等菌株的全基因组分析也

证实其具有氨同化和同化/异化硝酸盐还原代谢途径。然而, 针对异养硝化好氧反硝化菌对畜禽养殖废水中不同氮源的高效脱氮菌株的研究, 以及对其多重脱氮机制的全面解析仍存在不足, 特别是对脱氮终产物气态氮的定量验证研究较少。

与 *Klebsiella* sp. TN-10^[10]和 *Klebsiella* sp. TSH15^[11]等仅开展单因素试验或初步基因组分析的菌株研究相比, 本研究通过筛选脱氮性能优异的HN-AD菌并采用响应面法优化其培养条件, 定量分析各类无机氮的浓度变化及 N_2 的生成量来评估脱氮能力, 同时结合全基因组数据分析其脱氮途径, 明确并定量解析了菌株在多重氮源条件下的脱氮性能与气态氮转化途径。本研究的创新点在于结合气态氮定量和全基因组注释阐明多条氮代谢机制, 为实际养殖废水脱氮提供理论依据和菌种资源。

1 材料与amp;方法

1.1 样品来源

污水样本采自甘肃省三利众合农业开发有限公司的猪场。

1.2 培养基

富集(LB)培养基, 参考马咏琪等^[13]的研究。

硝化培养基(basal medium, BM)、反硝化培养基(denitrification medium, DM)、同步异养硝化好氧反硝化培养基(heterotrophic nitrification and aerobic denitrification medium, HM), 均参考马咏琪^[14]的研究。

后续所有试验均设置3个重复, 并以不接种菌液的培养基作为对照。

1.3 菌株的筛选与鉴定

参考马咏琪^[14]的研究, 筛选并鉴定具备高效脱氮能力的菌株, 成功获得一株性能优异的菌株, 命名为 WH-E, 用于后续深入探究。

1.4 菌株的脱氮性能测定

将菌液按 1% 的体积分数分别接入 BM 与 DM 培养基后, 在碳源为柠檬酸钠、pH 为 7.0、C/N 为 15、温度为 30 °C、转速为 140 r/min 的培养条件下培养 48 h。每隔 12 h 取样, 测定 OD_{600} 、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N 浓度, 并计算氮素去除率。测定方法和计算公式参考马咏琪^[14]和 Zhang 等^[15]的研究。

1.5 菌株培养条件优化

1.5.1 单因素试验

涉及 5 种常见环境因子, 包括碳源(葡萄糖、柠檬酸钠、丁二酸钠、蔗糖、乙酸钠)、C/N (5-25)、pH (5.0-10.0)、温度(20-40 °C)、转速(100-180 r/min)。鉴于畜禽养殖废水中 NH_4^+ -N 是主要的污染形态, 本研究选择以 NH_4^+ -N 作为目标氮源进行条件优化。将菌悬液接入 BM 培养基中, 每隔 12 h 取样, 测定 OD_{600} 、 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 浓度, 并计算 NH_4^+ -N 去除率。测定方法与计算公式同 1.4 节。

1.5.2 响应面优化

采用 Box-Behnken 构建以柠檬酸钠为碳源的四因素三水平响应面模型, 考察因素与范围为 C/N 比 15-25、初始 pH 7.0-9.0、温度 25-35 °C、转速 140-180 r/min。在 250 mL 锥形瓶中培养 48 h, 分别于试验起始与结束时取样, 检测 NH_4^+ -N 变化并计算其去除率。

1.6 氮代谢特性分析

将对数生长期的 WH-E 菌悬液分别接入 BM、DM 及 HM 培养基中, 在碳源为柠檬酸钠、pH 为 7.0、C/N 为 15、温度为 30 °C、转速为 180 r/min 的最佳培养条件下培养 48 h。每隔 12 h 取样, 测定 OD_{600} 后 4 000 r/min 离心 10 min, 并检测上清中 OD_{600} 、 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N、 NO_2^- -

N、羟胺(hydroxy lamine, NH_2OH -N)、总氮(total nitrogen, TN)、细胞氮(cellular nitrogen, Cell-N)、总溶解态氮(total dissolved nitrogen, DTN)浓度, 同时计算氮素去除率, 计算公式同 1.4 节。 OD_{600} 、 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 测定方法同 1.4 节。 NH_2OH -N 采用间接分光光度法测定, TN、Cell-N、DTN 采用碱性过硫酸钾紫外分光光度法。Cell-N 浓度计算公式参考 Liu 等^[16], 如公式(1)所示。

$$C=C_{TN}-C_{DTN} \quad (1)$$

式中: C 为细胞氮浓度(mg/L), C_{TN} 为总氮浓度(mg/L), C_{DTN} 为总溶解态氮浓度(mg/L)。

1.7 氮代谢途径中气体产物检测

分别以 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N 与 NO_2^- -N 作为唯一氮源, 将 WH-E 菌悬液接入 500 mL 厌氧血清瓶中进行培养, 培养基体积为 200 mL。使用纯氧置换法排净瓶内气体并密封, 在最佳培养条件下培养 48 h。培养结束时借助气密性注射器抽取 100 mL 顶空气体于铝箔集气袋。气体收集装置如图 1 所示。最后采用配备电子捕获检测器(electron capture detector, ECD)的气相色谱设备测定 N_2O , 配备热导检测器(thermal conductivity detector, TCD)的气相色谱设备测定 N_2 、氧气(oxygen, O_2), 实际进样时使用 1 000 μ L 微量进样器自气体密封袋中取样测定。

1.8 全基因组测试

将菌液接种至 BM 培养基中培养至对数生长期, 于 4 °C、1 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 经 PBS 缓冲液漂洗 3 次后, 委托上海美吉生物医药科技有限公司完成全基因组测序工作。采用 Illumina 第二代测序平台和 PacBio 第三代测序技术联合策略构建菌株基因组文库, 并实施 Illumina 高通量测序。对获得的序列进行基因注释与预测, 基于 GO (<https://geneontology.org/>)、KEGG (<https://www.kegg.jp/>)、COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)、NR (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/nrdb/>)、Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)、

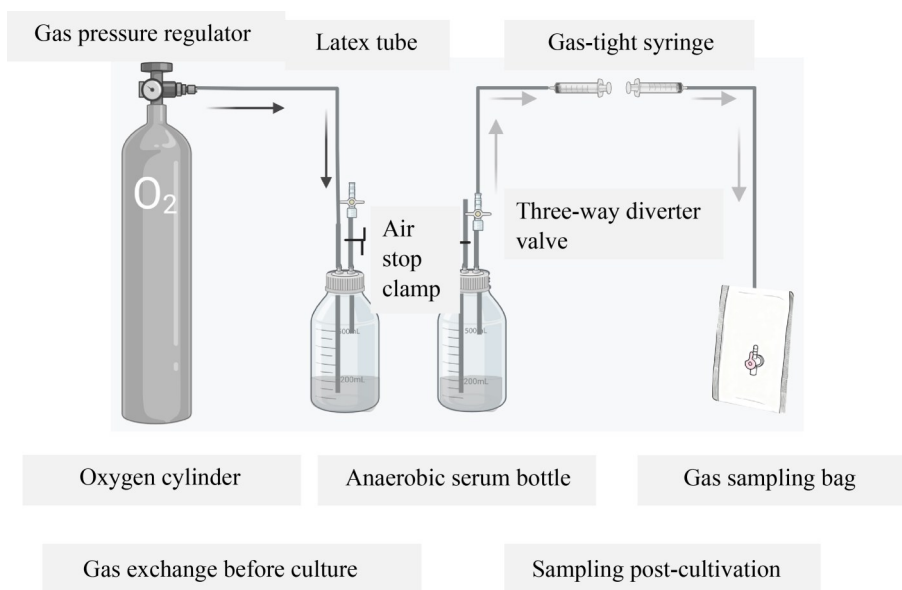


图1 气体收集装置图

Figure 1 Schematic of the gas sampling assembly.

TCDB (<http://www.tcdb.org/>)和 Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>)等数据库对编码序列进行基因功能注释。

1.9 数据分析方法

使用 Excel 2019 与 SPSS 27.0 分别进行数据整理与统计分析, 结果用平均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, 所有图表均用 Origin 2022 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与鉴定

在平板上, 菌株 WH-E 菌落呈现淡黄色, 微隆起, 边缘整齐(图 2A)。经革兰氏染色鉴定, 该菌株属于革兰氏阴性菌。通过扫描电子显微镜观察, 细胞形态为棒杆状, 大小约为 $1.0 \mu\text{m} \times (1.5-2.0) \mu\text{m}$ (图 2B)。如图 2C 所示, 菌株 WH-E 应归属于克雷伯氏菌属 (*Klebsiella* sp.), 其 16S rRNA 基因序列与该菌株(GenBank 登录号为 OR816101)的相似度达到 99%。

2.2 单一氮源时菌株的脱氮性能

如图 3 所示, 在以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源

时, WH-E 在 12-36 h 进入对数生长期, 培养结束时, 有 90.59% 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 被去除。以 NaNO_3 为唯一氮源时, 菌株 OD_{600} 在 48 h 时达到峰值, 同时 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的去除率为 86.65%。在以 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 为唯一氮源的体系中, 菌株在 12-24 h 进入快速生长期, 并于 48 h $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 被利用 92.58%。

2.3 *Klebsiella* sp. WH-E 培养条件优化

2.3.1 单因素分析

如图 4-6 所示, 菌株利用柠檬酸钠的效果显著高于其余碳源 ($P < 0.05$), 其 OD_{600} 峰值达 0.9, 且 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除效率最高, 为 80.47%。以柠檬酸钠为碳源时, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的积累量分别为 7.30 mg/L 和 1.04 mg/L, 均低于其他碳源条件, 表明该菌株的最优碳源为柠檬酸钠。当 C/N 设定为 15、20 和 25 时, 培养 48 h 时对应的菌株 OD_{600} 值和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率均显著高于 C/N 为 5 和 10 ($P < 0.05$); $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的积累量分别为 0.50、0.63、0.65 mg/L, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的积累量分别为 1.65、2.90、2.79 mg/L。因此, 菌株 WH-E 的最佳 C/N 为 15。在 30°C 条件下菌株生长速度和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率显著优于其他温度条件 ($P <$

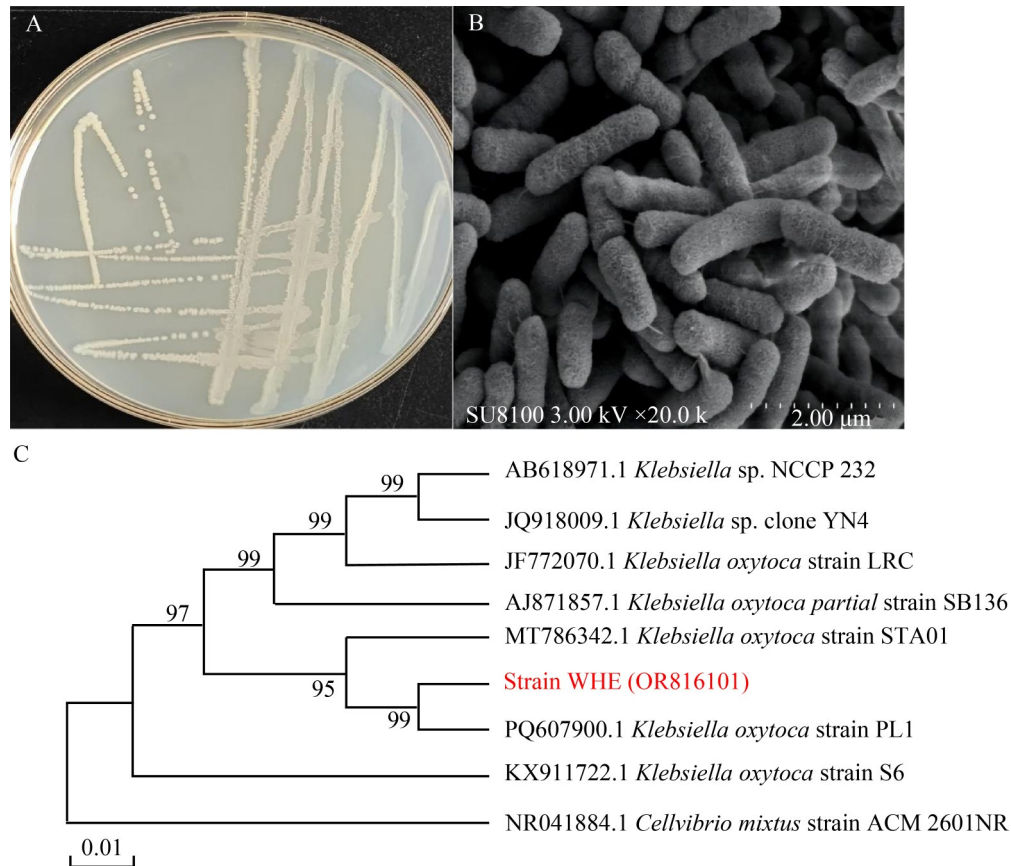


图2 菌株WH-E的表征与系统发育分析

Figure 2 Characterization and phylogenetic analysis of strain WH-E. A: Plate culture; B: Scanning electron microscopy; C: Phylogenetic tree of strain WH-E based on the 16S rRNA gene sequence.

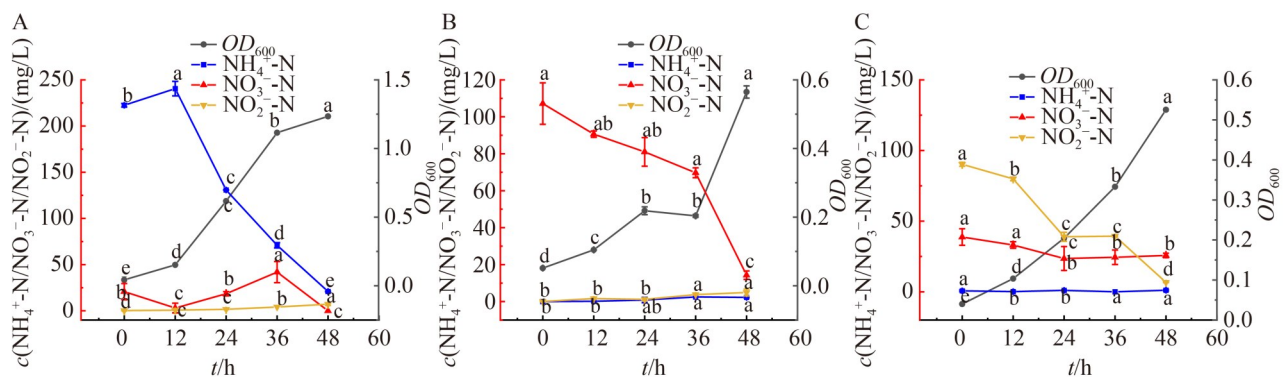


图3 单一氮源时Klebsiella sp. WH-E的脱氮性能

Figure 3 Denitrification performance of *Klebsiella* sp. WH-E using a single nitrogen source. A: $\text{NH}_4^+\text{-N}$; B: $\text{NO}_3^-\text{-N}$; C: $\text{NO}_2^-\text{-N}$.

0.05), 48 h 时 OD_{600} 为 1.4, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率为 86.11%, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的积累量分别为

1.17 mg/L 和 1.40 mg/L, 表明该菌的最适温度为 30 °C。转速试验表明, 提高转速有利于菌株生

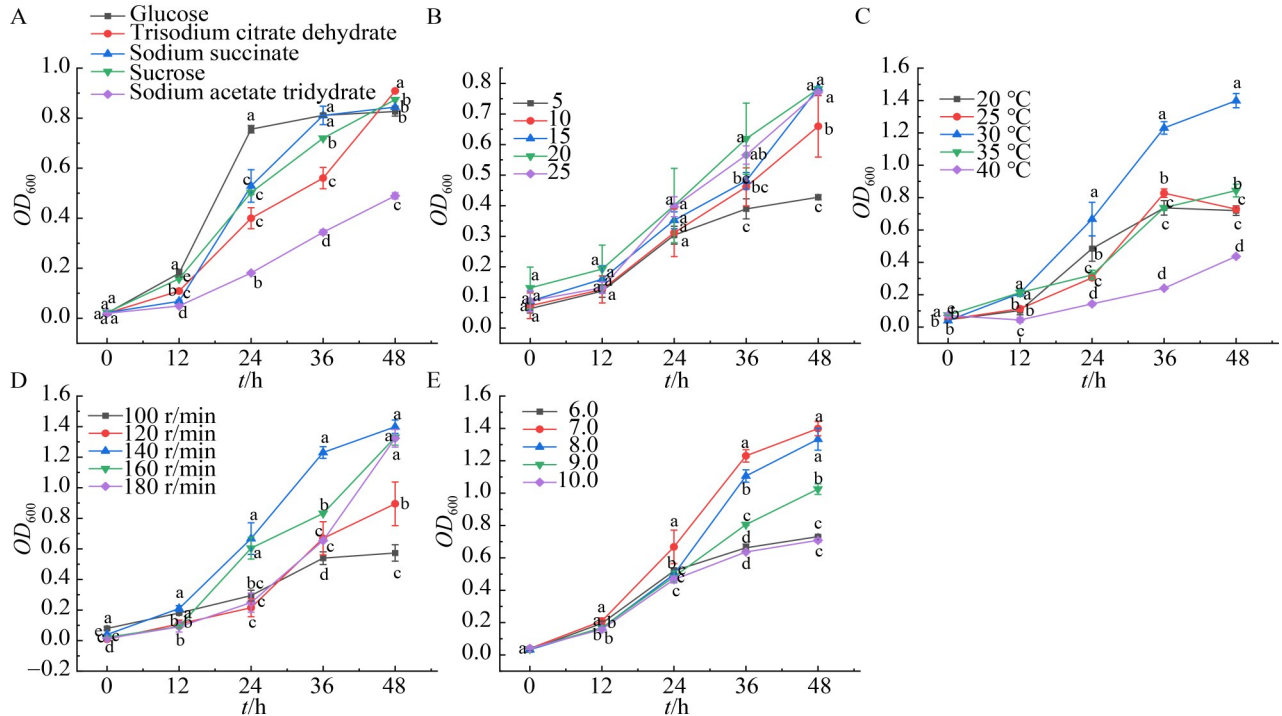


图4 不同环境因子对*Klebsiella sp.* WH-E生长能力的影响

Figure 4 The effect of various environmental factors on the growth capacity of *Klebsiella sp.* WH-E. A: Carbon source; B: C/N; C: Temperature; D: Shaking speed; E: pH.

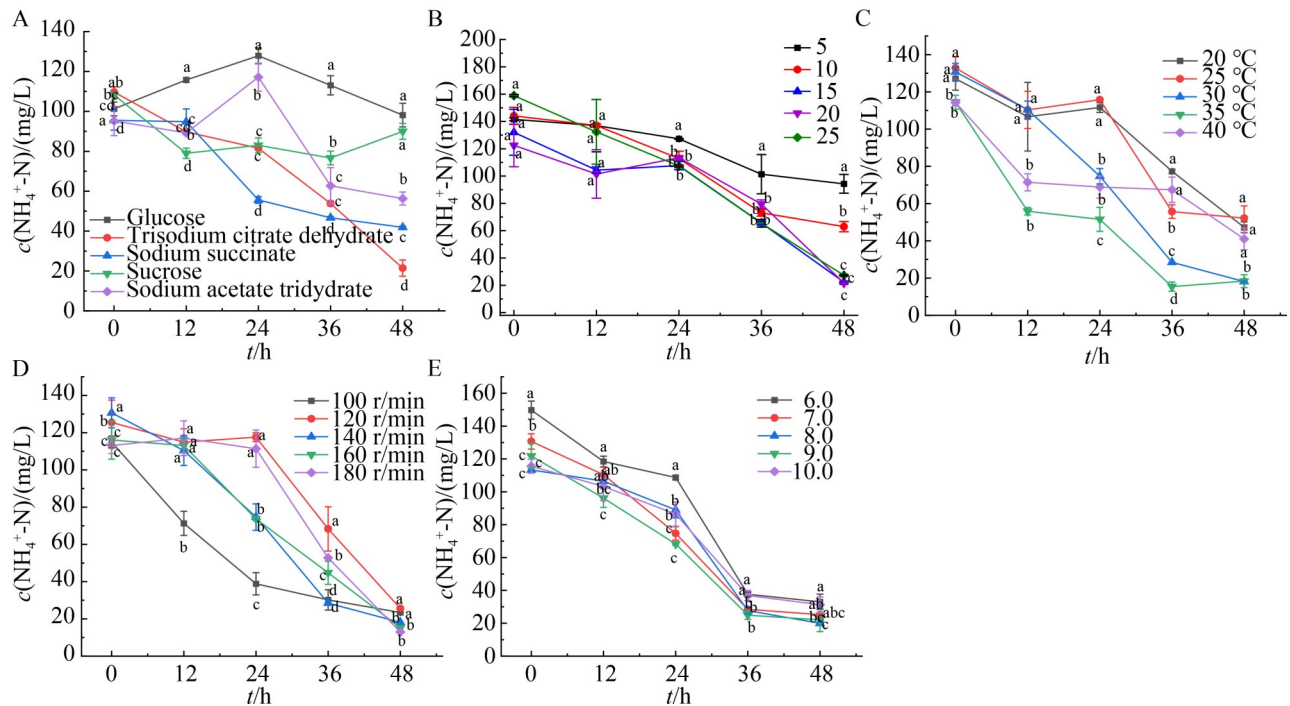


图5 不同环境因子对*Klebsiella sp.* WH-E脱氮能力的影响

Figure 5 The effect of various environmental factors on the denitrification ability of *Klebsiella sp.* WH-E. A: Carbon source; B: C/N; C: Temperature; D: Shaking speed; E: pH.

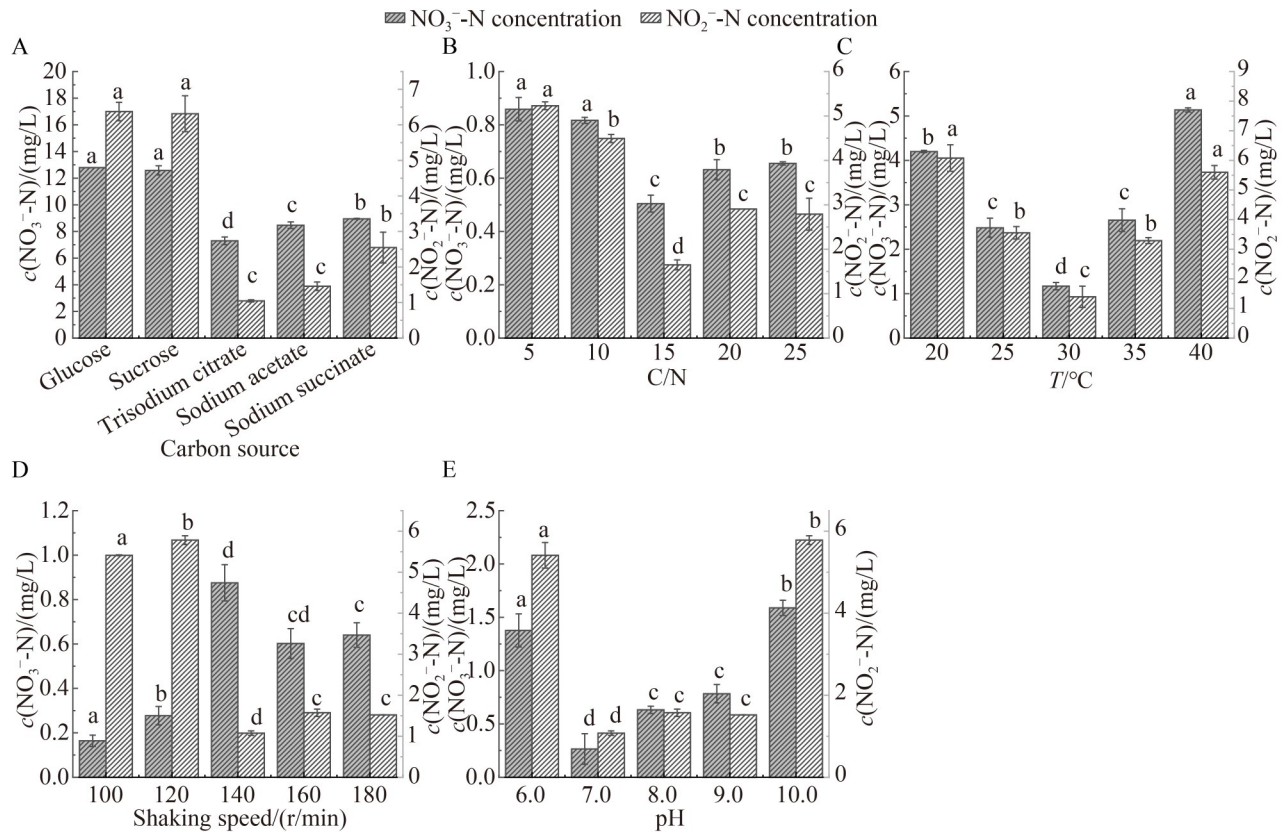


图6 不同环境因子对*Klebsiella sp.* WH-E NO_3^- -N和 NO_2^- -N积累量的影响

Figure 6 The effect of various environmental factors on NO_3^- -N and NO_2^- -N accumulation of *Klebsiella sp.* WH-E. A: Carbon source; B: C/N; C: Temperature; D: Shaking speed; E: pH.

长与脱氮, 在 140、160、180 r/min 时, 48 h 时菌株 OD_{600} 分别为 1.4、1.3 和 1.3, NH_4^+ -N 去除率分别为 86.12%、86.83% 和 88.53%, 显著优于 100 r/min 和 120 r/min ($P < 0.05$); NO_3^- -N 的积累量分别为 0.53、0.63、0.72 mg/L, NO_2^- -N 的积累量分别为 1.07、1.57、1.52 mg/L。因此, 最佳摇床转速为 180 r/min。pH 范围为 7.0–9.0 时 $OD_{600} \approx 1.0$, NH_4^+ -N 去除率均维持在较高水平。pH 7.0 时 NH_4^+ -N 去除率达到最高值 86.11%。 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的积累量分别为 0.27 mg/L 和 1.08 mg/L。因此, WH-E 的最佳 pH 为 7.0。为便于后续响应面试验有一个能够有效捕捉因素交互作用与潜在非线性效应的优化区间, 选取 C/N 为 15–25、温度为 25–35 °C、转速为 140–180 r/min、pH 为 7.0–9.0 作为考察

范围。

2.3.2 响应面分析

依据单因素试验结果, 基于 Box-Behnken 设计对 C/N、初始 pH、温度、转速 4 个关键变量进一步优化(表 1)。构建以 NH_4^+ -N 去除率为响应值的二次回归模型, 方程如下:

$$Y(\%) = 96.55 + 4.81A + 2.31B + 1.41C + 0.96D - 0.75AB - 3.07AC - 1.33AD - 1.40BC + 0.36BD + 2.44CD - 10.65A^2 - 7.45B^2 - 7.33C^2 - 7.91D^2, R^2 \text{ 为 } 0.9394.$$

方差分析结果如表 2 所示, 各因素对菌株脱氮性能的影响程度依次为: 温度 > pH > C/N > 转速。由图 7 可知, 不同环境因子表现出显著的交互效应。模型模拟得出最佳培养参数: 在以柠檬酸钠为有机碳源, 温度为 34.18 °C, 初始 pH 为 7.1, C/N 为 14.53, 转速为 159.59 r/min

表1 响应面试验设计

Table 1 Response surface experimental design

Test number	Level				NH ₄ ⁺ -N removal efficiency/%
	T/°C	pH	C/N	Shaking speed/(r/min)	
1	25	7.0	15	180	71.55
2	25	7.0	20	160	78.62
3	25	6.0	15	160	71.41
4	25	7.0	15	140	70.13
5	25	8.0	15	160	79.59
6	25	7.0	10	160	69.85
7	30	6.0	20	160	81.44
8	30	6.0	15	180	80.86
9	30	7.0	20	180	89.17
10	30	6.0	15	140	79.59
11	30	6.0	10	160	76.55
12	30	8.0	15	180	82.81
13	30	7.0	10	140	79.54
14	30	7.0	15	160	96.87
15	30	7.0	15	160	99.97
16	30	7.0	15	160	94.03
17	30	7.0	15	160	92.88
18	30	7.0	15	160	99.01
19	30	8.0	10	160	84.42
20	30	7.0	20	140	78.43
21	30	8.0	15	140	80.94
22	30	7.0	10	180	80.52
23	30	8.0	20	160	83.71
24	35	7.0	15	180	82.72
25	35	6.0	15	160	80.00
26	35	7.0	15	140	86.61
27	35	8.0	15	160	85.20
28	35	7.0	20	160	80.43
29	35	7.0	10	160	83.94

的条件下, NH₄⁺-N 去除率的理论预测值是 93.29%。通过 3 组平行验证试验, 实际去除率为 93.30%, 与理论值偏差为 0.10%, 充分证实所构建的模型具备高度的精确性。

2.4 *Klebsiella sp.* WH-E 氮代谢特性

结合菌株对氮平衡分析(表 3)和不同氮源的利用情况(图 8)可知, 以 NH₄⁺-N 为唯一氮源培养时, 菌株在 0–12 h 进入对数生长期, 48 h 时有 99.80% 的 NH₄⁺-N 被去除。同时检测到 8.55 mg/L 的 NO₃⁻-N 和 1.01 mg/L 的 NO₂⁻-N 以及 41.89 mg/L 的 Cell-N, 通过氮平衡计算, 有

35.84% 和 35.91% 的氮分别被转化为 Cell-N 和气态氮。以 NO₃⁻-N 为唯一氮源时, 培养 48 h 时菌株 OD₆₀₀ 达到 1.1, 同时, 81.54% 的 NO₃⁻-N 被降解, NO₂⁻-N 的累积量为 31.04 mg/L, 有 44.84% 的氮被转化为 Cell-N, 含量为 48.52 mg/L; 20.90% 的氮被转化为气态氮。以 NO₂⁻-N 为唯一氮源时, 菌株在 36 h 内呈现快速生长趋势, NO₂⁻-N 浓度同步降低, 48 h 去除率达 80.00%, 有 18.99% 的氮被转化为气态氮; 41.32% 的氮被转化为 Cell-N, 含量为 47.84 mg/L。上述不同氮源下菌株的代谢特性证明了硝化反硝化、同化或异化 NO₃⁻-N 还原和氨同化途径的存在。

表2 响应面二次回归模型的方差分析表

Table 2 ANOVA table for response surface quadratic model

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value	Significant
Model	1 664.76	14	118.91	15.51	<0.000 1	**
A-temperature	277.99	1	277.99	36.25	<0.000 1	**
B-pH	63.88	1	63.88	8.33	0.012 0	*
C-C/N	23.98	1	23.98	3.13	0.098 7	-
D-shaking speed	11.06	1	11.06	1.44	0.249 7	-
AB	2.23	1	2.23	0.29	0.598 2	-
AC	37.69	1	37.69	4.92	0.043 7	*
AD	7.03	1	7.03	0.92	0.354 5	-
BC	7.81	1	7.81	1.02	0.329 9	-
BD	0.53	1	0.53	0.07	0.796 4	-
CD	23.83	1	23.83	3.11	0.099 8	-
A ²	736.20	1	736.20	96.01	<0.000 1	**
B ²	360.13	1	360.13	46.97	<0.000 1	**
C ²	348.39	1	348.39	45.43	<0.000 1	**
D ²	405.52	1	405.52	52.89	<0.000 1	**
Residual	107.35	14	7.67	-	-	-
Lack of fit	69.68	10	6.97	0.74	0.682 6	-
Pure error	37.67	4	9.42	-	-	-
Cor total	1 772.11	28	-	-	-	-

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为混合氮源时, 12 h $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率为 80.86%, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 去除率为 23.66%。48 h 时菌株 OD_{600} 为 1.5, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 被完全去除。在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 共存时, 12 h $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率达 75.14%, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 去除率为 53.73%。48 h 后 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率为 100.00%, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 去除率为 91.97%。综上所述, 说明菌株 WH-E 在混合氮源条件下优先利用 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 进行硝化作用。

2.5 *Klebsiella* sp. WH-E 脱氮途径的推测

全基因组圈图如图 9 所示, 注释结果表明, 菌株 WH-E 的 G+C 含量为 55.21%, 并含有 2 个质粒。经编码序列预测, 共识别出 5 283 个蛋白编码基因, 其编码区总长度达 708 664 bp, 单个基因平均长度为 961.83 bp, 编码区域占整个基因组的 87.80%。将菌株 WH-E 测序数据上传至 NCBI, 获得基因登录号 PRJNA1262665。

通过基因组功能分析, 在 *Klebsiella* sp. WH-

E 中鉴定到 *gdhA*、*glnA*、*glnB*、*nxrAB*、*norVWR*、*narGHI*、*nasBC*、*nirBD* 等 30 余个氮代谢相关基因, 并系统阐明了具体的氮代谢途径(图 10)。氨同化途径主要通过 2 条通路实现: (1) 谷氨酸脱氢酶途径, 由 *gdhA* 基因编码的谷氨酸脱氢酶直接催化 α -酮戊二酸和氨生成谷氨酸; (2) 谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合成酶途径, 由 *glnA* 基因编码的谷氨酰胺合成酶催化氨与谷氨酸合成谷氨酰胺, 随后该产物在谷氨酸合成酶的催化下重新转化为谷氨酸, 实现氨的同化过程。其中, *glnA* 基因的转录活性由 *glnB*、*glnL* 和 *glnG* 基因调节, 维持氮代谢的平衡^[17]。*gltB* 和 *gltD* 基因通过催化谷氨酰胺合成谷氨酸, 参与氮素循环和贮存, 并转化为 α -酮戊二酸, 进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)释放能量^[18]。

硝化反硝化途径: 在硝化过程中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 依次转化为 NH_2OH 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$, 其中亚硝酸盐还原步骤由 *nxrAB* 基因编码的亚硝酸盐还原酶催化; 在反硝化阶段, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 通过由

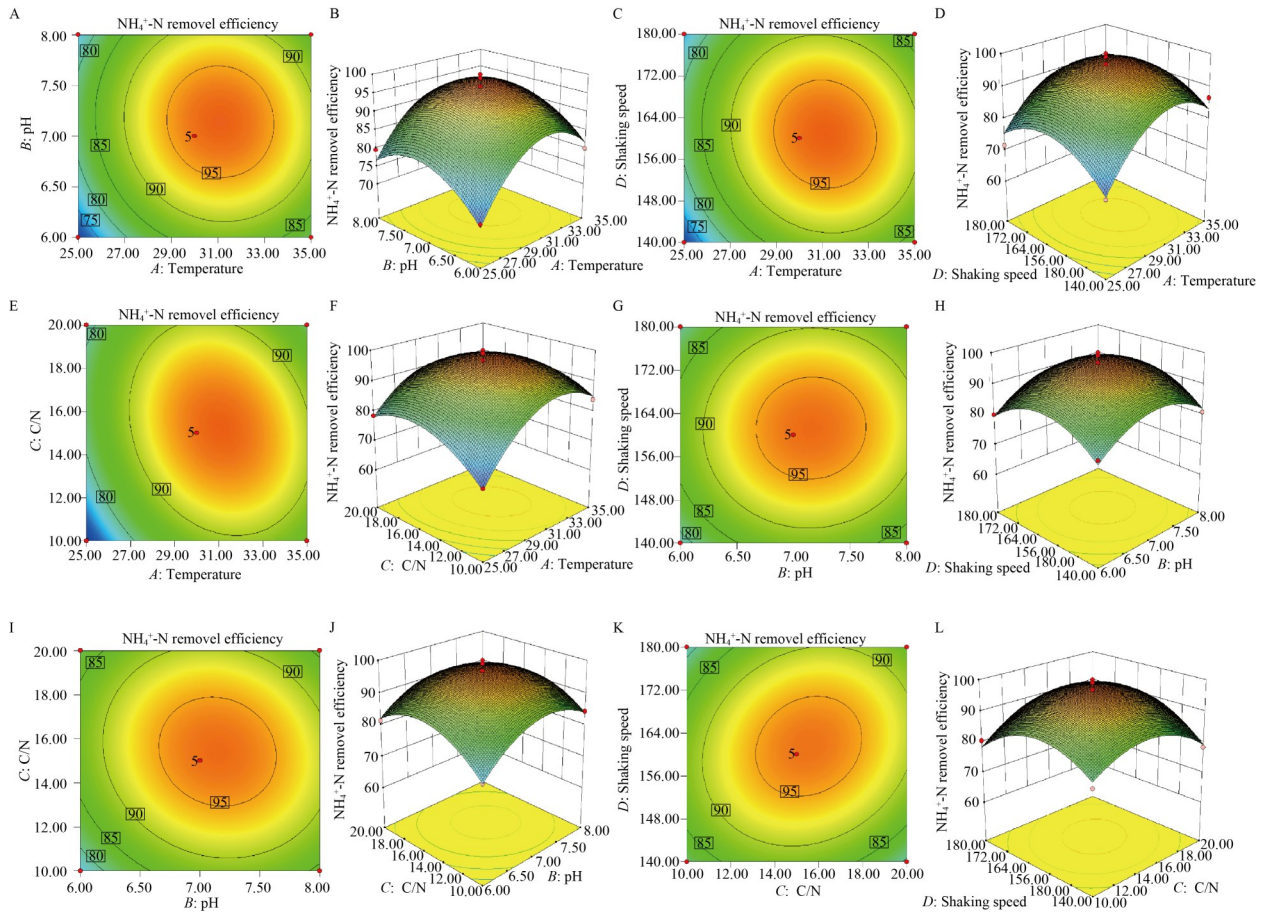


图7 *Klebsiella sp.* WH-E对NH₄⁺-N去除能力的响应面曲线图

Figure 7 Response surface curve illustrating the NH₄⁺-N removal efficiency by *Klebsiella sp.* WH-E. A, B: Temperature and pH; C, D: Temperature and shaking speed; E, F: Temperature and C/N; G, H: pH and shaking speed; I, J: pH and C/N; K, L: Shaking speed and C/N.

表3 菌株*Klebsiella sp.* WH-E去除氨氮、硝态氮和亚硝态氮的氮平衡分析

Table 3 Nitrogen balance of strain *Klebsiella sp.* WH-E in removing ammonia nitrogen, nitrate nitrogen, and nitrite nitrogen

Nitrogen source	Initial nitrogen concentration/(mg/L)			c(TN)/(mg/L)		Cell-N		Gaseous-N (N ₂ +N ₂ O)	
	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N	Initial	Final	c(Cell-N)/(mg/L)	Proportion/%	c (Gaseous-N)(mg/L)	Proportion/%
NH ₄ ⁺ -N	134.07±0.27	10.77±0.17	0.72±0.36	116.87±4.85	64.09±0.21	41.89±1.71	35.84	41.97	35.91
NO ₃ ⁻ -N	2.98±1.08	98.35±3.17	0.22±0.04	108.21±6.45	81.18±0.42	48.52±0.39	44.84	22.62	20.90
NO ₂ ⁻ -N	11.57±2.24	0.00±0.00	91.81±6.28	115.77±0.27	83.45±0.32	47.84±1.73	41.32	21.98	18.99

All experimental data were replicated three times, and the results are presented as the mean±standard error (SE).

nrtABC 基因编码的硝酸盐-亚硝酸盐转运系统进入细胞, 并在由 *narGHIL* 基因编码的硝酸盐还

原酶作用下被还原为 NO₂⁻-N, 随后由一氧化氮还原酶(*norVWR*)基因催化生成一氧化氮(nitric

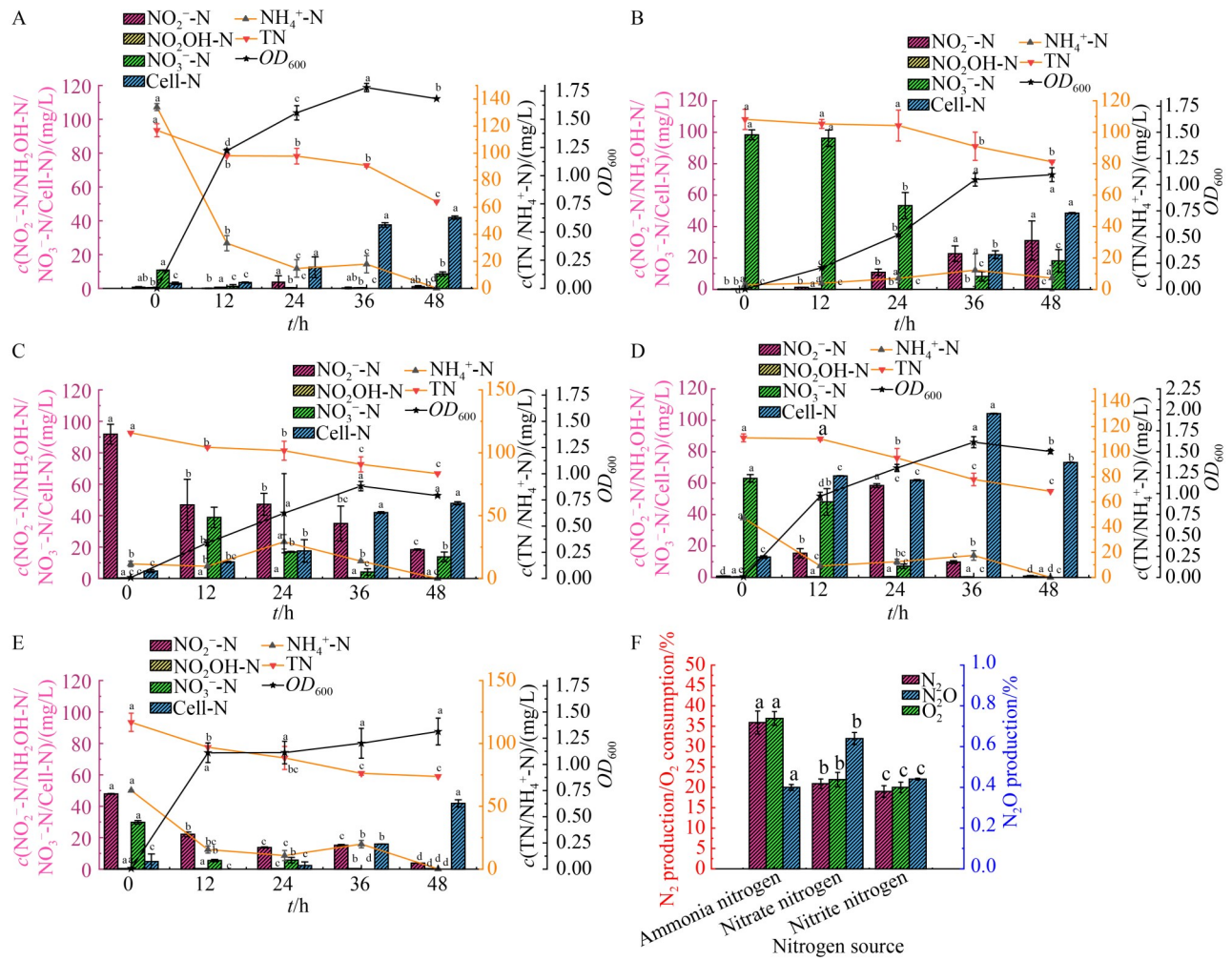


图8 *Klebsiella sp.* WH-E对不同碳源的利用情况及气体产物分析

Figure 8 Utilization of various carbon sources and gas product analysis by *Klebsiella sp.* WH-E. A: NH₄⁺-N; B: NO₃⁻-N; C: NO₂⁻-N; D: NH₄⁺-N and NO₃⁻-N; E: NH₄⁺-N and NO₂⁻-N; F: Gas production by *Klebsiella sp.* WH-E using a single nitrogen source.

oxide, NO)、N₂O, 最后转化为 N₂ 释放。然而, 在该菌株基因组中未发现反硝化过程所必需的关键基因 *nirK/nirS* 和 *nosZ* 基因, 这提示菌株 WH-E 反硝化途径在基因组构成上不同于典型菌株, 可能存在新的途径或酶系统参与菌株的氮代谢^[7,11,19], 功能试验证实了其具备将氮氧化物还原为 N₂ 的活性。综上所述, WH-E 拥有一条非典型的反硝化途径。

硝酸盐同化与异化途径: 通过对硝酸盐还

原相关基因的功能注释解析可知, NO₃⁻-N 可经过硝酸盐还原酶/亚硝酸盐氧化还原酶基因 (*narGHI*)或同化性硝酸盐还原酶基因(*nasBC*)转化为 NO₂⁻-N, 并通过亚硝酸盐还原酶基因 (*nirBD*)还原为 NH₄⁺-N。 *narGHI/nirBD* 基因以及 *nasA* 基因分别被认定为是异化硝酸盐还原和同化硝酸盐还原过程的核心功能基因。因此, WH-E 可能同时具备上述 2 条硝酸盐还原通路。

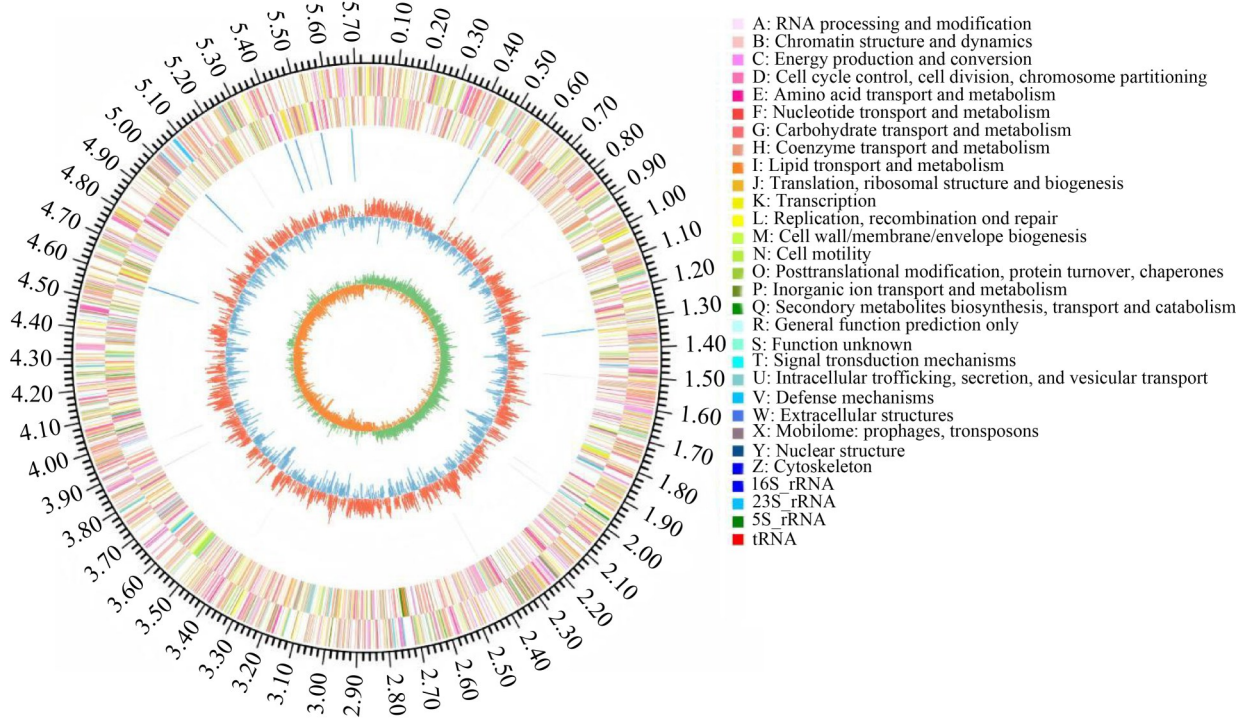


图9 菌株WH-E全基因组圈图

Figure 9 Whole genome circle map of strain WH-E. The outermost circle displays the genomic coordinates in base pairs (bp). The second and third circles illustrate coding sequences (CDS) on the positive and negative strands, respectively, color-coded according to COG functional categories. The fourth circle highlights rRNA and tRNA genes. The fifth circle represents G+C content, while the innermost circle shows G+C-skew.

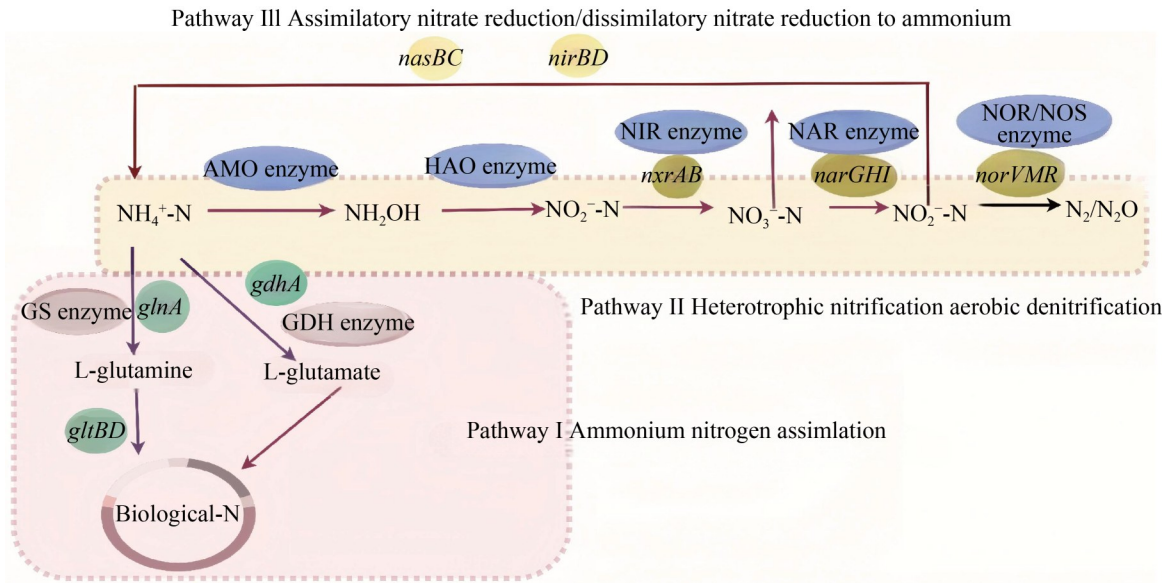


图10 菌株WH-E氮代谢途径

Figure 10 Nitrogen metabolic pathway of strain WH-E.

3 讨论

3.1 *Klebsiella* sp. WH-E 脱氮特性的影响因素

柠檬酸钠是 WH-E 菌株的最适碳源, 可直接进入 TCA 供能并合成中间体^[20], 其分解产物有助于维持 pH 稳定^[21], 相比糖酵解途径代谢的葡萄糖和蔗糖等碳源更有利于菌株脱氮。本研究中最适 C/N 比处于 HN-AD 菌的适宜 C/N 比 10–15 范围^[22], 与琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*) YB 在 C/N=15 时脱氮性能最优^[23]的报道一致, 表明此范围可平衡碳氮供给, 避免反硝化不完全或出现资源浪费与菌群抑制现象^[24–25]。菌株 WH-E 在 34.18 °C 时脱氮性能最佳, 该温度处于 HN-AD 菌株最适范围(20–40 °C)内^[26], 既能维持较高的酶活性, 又能避免蛋白质变性^[27], 有利于菌株生长和脱氮性能的发挥。菌株的最适转速为 159.59 r/min, 此转速可提供适宜的溶氧水平, 既能满足好氧代谢需求, 又能避免溶氧不足或剪切力过高对菌体造成不利影响^[28], 从而保障高效脱氮。菌株 WH-E 在初始 pH 7.1 时表现最优, 该值处于 HN-AD 菌最适 pH 范围(7.0–7.5)内^[29], 有助于维持代谢活性和酶功能, 优化其脱氮性能。为进一步揭示溶氧水平对脱氮产物的调控作用, 后续将构建在线 DO 监测与控制系统, 动态解析溶解氧对菌株氮代谢的影响。

3.2 *Klebsiella* sp. WH-E 氮代谢途径的机制分析

结合菌株 WH-E 在培养过程中的氮素含量变化、气态产物生成情况以及全基因组分析结果, 推断菌株 WH-E 主要具备 3 种氮代谢途径。在分别以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 为氮源的培养条件下, 培养 48 h 后检测到 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 N_2 、 N_2O 和 Cell-N 的累积, 说明 WH-E 能够将 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化为 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$, 并将 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 依次转化为 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、

N_2O 和 N_2 。此外, 还可能存在着同化或异化 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原途径, 将 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 还原为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$, 随后通过氨同化过程将其固定为生物氮。基因组中含有氨同化相关基因, 这表明 *Klebsiella* sp. WH-E 能够利用 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 进行同化作用合成蛋白质和核酸, 以维持基础代谢和支持细胞生长^[30]。该途径可在养殖废水处理中避免亚硝酸盐的累积。基因组中存在的异化 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原途径的关键酶基因(*narGHI* 和 *nirBD*)和同化还原途径的关键酶基因(*nasA*)^[31], 表明该菌株可通过同化或异化途径还原 $\text{NO}_3^-\text{-N}$, 合成微生物并获取能量^[32], 能够灵活选择代谢途径以提高脱氮效率。菌株 WH-E 虽然表现出良好的 HN-AD 能力, 但全基因组数据中部分硝化和反硝化关键基因缺失, 表明其具有不完全的反硝化途径。这与 *Pseudomonas* sp. G16^[33]、食油不动杆菌(*Acinetobacter oleivorans*) AHP123^[7]和 *Klebsiella* sp. TSH15^[11]的情况类似。由此推测, 该菌株可能通过非典型氮转化途径实现脱氮, 并且可能有未明确的基因取代了传统硝化-反硝化途径的关键基因, 从而形成了独特的氮代谢机制。

3.3 *Klebsiella* sp. WH-E 脱氮优势

研究表明, 多数 HN-AD 菌采用与典型的自养硝化-反硝化路径高度相似的全程硝化反硝化作为代谢通路^[34]。部分 HN-AD 菌采用直接氨氧化途径和同化/异化硝酸盐还原途径等其他氮代谢途径, 这与 *Halomonas* sp. DN3^[9]和施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) T13^[29]菌株的情况一致。如表 4 所示, *Klebsiella* sp. WH-E 比其他 HN-AD 菌表现出更高的脱氮效率。首先, 菌株 WH-E 具备氨同化以及同步实现硝化和反硝化的功能, 无需满足传统脱氮工艺过程中对缺氧环境和复杂时空分区的要求, 提高了氮素去除的效率^[38]。其次, 该菌可通过同化/异化硝酸盐还原途径来维持能量代谢^[39], 并能根据外界环境因子的改变动态调节硝化作用和氨同化之间的比重, 进而增强其生态适应力和生存优势。这凸显了 *Klebsiella* sp. WH-E 在高氮负荷废水处理

表4 异养硝化好氧反硝化菌的脱氮效率及机制比较

Table 4 Comparison of nitrogen removal efficiency and mechanisms in heterotrophic nitrifying aerobic denitrifying bacteria

Bacterial genus name	NH ₄ ⁺ -N removal efficiency/%	NO ₃ ⁻ -N removal efficiency/%	NO ₂ ⁻ -N removal efficiency/%	N ₂ production	Genes related to nitrogen metabolism	References
<i>Acinetobacter oleivorans</i> AHP123	97.93	-	-	Heterotrophic nitrification: 12.4 mg/L Aerobic denitrification: 18.33 mg/L	<i>nar</i> , <i>amt</i> , <i>glnK</i> , <i>gltB</i> , <i>gdhA</i> , <i>gam</i> , <i>glnA</i> , <i>ncd2</i> , <i>ncd1</i> , <i>nirB</i> , <i>nasA</i>	[7]
<i>Klebsiella</i> sp. TSH15	92.55	91.43	-	-	<i>amt</i> , <i>glnA</i> , <i>gdhA</i> , <i>nirB</i> , <i>narG</i> , <i>napA</i> , <i>nasA</i> , <i>nirK/S</i> , <i>norB</i> , <i>nosZ</i>	[11]
<i>Candida boidinii</i> L21	96.00	98.00	-	-	-	[12]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WS-03	95.81	94.00	100.00	-	<i>narB</i> , <i>glnA</i> , <i>gdhA</i> , <i>nirB</i> , <i>nirA</i> , <i>napA</i> , <i>gltB</i>	[19]
<i>Acinetobacter</i> ZQ-A1	84.84	87.13	92.63	-	-	[35]
<i>Pseudomonas</i> sp. Y-5	97.26	99.34	95.81	-	-	[36]
<i>Pseudomonas mendocina</i> TJPU04	98.00	93.00	100.00	-	-	[37]
<i>Klebsiella</i> sp. WH-E	99.80	81.54	80.00	With NH ₄ ⁺ -N as the sole nitrogen source: 35.91% With NO ₂ ⁻ -N as the sole nitrogen source: 20.90% With NO ₃ ⁻ -N as the sole nitrogen source: 18.99%	<i>glnB</i> , <i>glnL</i> , <i>glnG</i> , <i>gdhA</i> , <i>norVWR</i> , <i>narGHI</i> , <i>nasBC</i> , <i>nirBD</i>	

中的应用价值，并为后续的工程化菌剂开发提供了坚实的理论支撑。

4 结论

本研究从猪场污泥中筛选出一株脱氮性能良好的 HN-AD 菌 *Klebsiella* sp. WH-E，其最适培养参数为：碳源为柠檬酸钠，温度为 34.18 °C，pH 为 7.1，C/N 为 14.53，转速为 159.59 r/min。基因组分析证实 *Klebsiella* sp. WH-E 具备氨同化途径、硝化反硝化途径和同

化/异化硝酸盐还原途径 3 条主要的氮代谢通路，表现出在畜禽养殖污水脱氮处理中的应用潜力。然而，相关代谢途径尚缺乏关键功能基因，且脱氮性能评估仍局限于纯培养体系。后续可结合基因编辑技术解析非典型氮代谢途径中的关键功能基因，并推动在真实废水体系中的应用验证，深入探究其脱氮机制。

作者贡献声明

巩璐琳：数据分析整理，撰写论文；马咏琪：试

验设计, 并对数据进行了初步的分析; 张爱文: 协助试验设计; 张艳丽: 对论文讨论部分的论点、结论提出修改意见; 孙旭春: 参与了试验结果的讨论, 并提供了修改意见; 张引弟: 参与了论文的修订工作; 漆文瑞: 数据收集; 薛媛: 协助试验操作; 孙丽坤: 资金获取, 修改论文。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 国家统计局. 关于发布《第二次全国污染源普查公告》[EB/OL]. 2020-06-08. https://www.mee.gov.cn/xxgk/xxgk01/202006/t20200610_783547.html. National Bureau of Statistics. Announcement on the Release of the "Bulletin of the Second National Pollution Source Census" [EB/OL]. 2020-06-08. https://www.mee.gov.cn/xxgk/xxgk01/202006/t20200610_783547.html (in Chinese).
- [2] Tian YJ, Li JZ, Fan YY, Li JL, Meng J. Performance and nitrogen removal mechanism in a novel aerobic-microaerobic combined process treating manure-free piggery wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 345: 126494.
- [3] Fang JK, Liao SA, Zhang SS, Li L, Tan SM, Li WZ, Wang AL, Ye JM. Characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification yeast, *Barnettozyma californica* K1[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 339: 125665.
- [4] Xi HP, Zhou XT, Arslan M, Luo ZJ, Wei J, Wu ZR, Gamal El-Din M. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification process: promising but a long way to go in the wastewater treatment[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 805: 150212.
- [5] Feng Y, Feng J, Shu QL. Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* strains from various environments[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(5): 1195-1211.
- [6] Shu H, Sun HM, Huang W, Zhao Y, Ma YH, Chen W, Sun YP, Chen XY, Zhong P, Yang HR, Wu XP, Huang MW, Liao ST. Nitrogen removal characteristics and potential application of the heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria *Pseudomonas mendocina* S16 and *Enterobacter cloacae* DS'5 isolated from aquaculture wastewater ponds[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 345: 126541.
- [7] Zhou XQ, Wang YL, Tan X, Sheng YQ, Li YB, Zhang Q, Xu JL, Shi ZS. Genomics and nitrogen metabolic characteristics of a novel heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium *Acinetobacter oleivorans* AHP123[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 375: 128822.
- [8] Huang MQ, Cui YW, Huang JL, Sun FL, Chen S. A novel *Pseudomonas aeruginosa* strain performs simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification and aerobic phosphate removal[J]. *Water Research*, 2022, 221: 118823.
- [9] Xie YM, Tian XL, He Y, Dong SL, Zhao K. Nitrogen removal capability and mechanism of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Halomonas* sp. DN3[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 387: 129569.
- [10] Li D, Liang XH, Jin Y, Wu CD, Zhou RQ. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Klebsiella* sp. TN-10[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 188(2): 540-554.
- [11] Ren JL, Tang JJ, Min HP, Tang DD, Jiang R, Liu YC, Huang X. Nitrogen removal characteristics of novel bacterium *Klebsiella* sp. TSH15 by assimilatory/dissimilatory nitrate reduction and ammonia assimilation[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 394: 130184.
- [12] Fang JK, Liao SA, Gu TP, Lu WH, Lu XH, Yu MR, Li BX, Ye JM. Efficient nitrogen removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification yeast *Candida boidinii* L21: performance, pathway and application[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 414: 131621.
- [13] 马咏琪, 张引弟, 管文平, 漆文瑞, 姜云鹏, 安亮嘉, 王佳丽, 孙丽坤. 两株耐重金属普罗维登斯菌属异养硝化好氧反硝化菌的分离及脱氮特性[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(11): 4485-4501. Ma YQ, Zhang YD, Guan WP, Qi WR, Jiang YP, An LJ, Wang JL, Sun LK. Isolation and nitrogen removal characteristics of two heavy metal-tolerant heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying strains of *Providencia*[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(11): 4485-4501 (in Chinese).
- [14] 马咏琪. *Klebsiella* sp. WH-E 氮代谢途径及锌胁迫下脱氮性能和机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2025. Ma YQ. Study on nitrogen metabolism pathway of *Klebsiella* sp. WH-E and nitrogen removal performance and mechanism under zinc stress[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2025 (in Chinese).
- [15] Zhang N, Zhang YT, Bohu T, Wu SH, Bai ZH, Zhuang XL. Nitrogen removal characteristics and constraints of an alphaproteobacteria with potential for high nitrogen content heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 235.
- [16] Liu GX, Vijayaraman SB, Dong YJ, Li XF, Andongmaa BT, Zhao LJ, Tu JG, He J, Lin L. *Bacillus velezensis* LG37: transcriptome profiling and functional verification of GlnK and MnrA in ammonia assimilation[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 215.
- [17] Zhang WJ, Ni K, Long LZ, Ruan JY. Nitrogen transport and assimilation in tea plant (*Camellia sinensis*): a review[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1249202.
- [18] 孟红艳, 杨垒, 李玉彩, 张胜静, 路颖琪, 梁攀, 任勇翔. 异养硝化细菌 *Pseudomonas stutzeri* NP3 的同步脱氮除磷特性及代谢机制[J]. *中国环境科学*, 2025, 45(4): 1901-1910.

- Meng HY, Yang L, Li YC, Zhang SJ, Lu HQ, Liang P, Ren YX. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal characteristics and metabolic mechanism of heterotrophic nitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain NP3[J]. *China Environmental Science*, 2025, 45(4): 1901-1910 (in Chinese).
- [19] Wei XY, Li SS, Li C, Liao J, Yang YC, He ZM, Dong K, Lee SS. Characterization and genomic insights into the nitrogen metabolism of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* WS-03[J]. *Journal of Environmental Management*, 2025, 376: 124405.
- [20] Dong YH, Wang ZY, Li L, Zhang XY, Chen F, He JH. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification characteristics of the psychrotolerant *Pseudomonas peli* NR-5 at low temperatures[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2023, 46(5): 693-706.
- [21] Xie FX, Thiri M, Wang H. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel isolated *Pseudomonas mendocina* X49[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 319: 124198.
- [22] Huang F, Pan LQ, He ZY, Zhang MY, Zhang MZ. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification characteristics and antibiotic resistance of two bacterial consortia from *Marinomonas* and *Halomonas* with effective nitrogen removal in mariculture wastewater[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 279: 111786.
- [23] Yang L, Ren YX, Liang X, Zhao SQ, Wang JP, Xia ZH. 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.
- [24] Chen MP, He TX, Wu QF, Zhang MM, He K. Enhanced heterotrophic nitrification and aerobic denitrification performance of *Glutamicibacter arilaitensis* EM-H8 with different carbon sources[J]. *Chemosphere*, 2023, 323: 138266.
- [25] Fu XR, Hou RR, Yang P, Qian ST, Feng ZQ, Chen ZB, Wang F, Yuan RF, Chen HL, Zhou BH. Application of external carbon source in heterotrophic denitrification of domestic sewage: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 817: 153061.
- [26] Zhang N, Chen H, Lyu YK, Wang Y. Nitrogen removal by a metal-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* ZN1, capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2019, 94(4): 1165-1175.
- [27] Lin ZY, Huang W, Zhou J, He XJ, Wang JL, Wang XT, Zhou J. The variation on nitrogen removal mechanisms and the succession of ammonia oxidizing archaea and ammonia oxidizing bacteria with temperature in biofilm reactors treating saline wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 314: 123760.
- [28] Ren JL, Ma HJ, Liu Y, Ruan YJ, Wei CZ, Song J, Wu YH, Han R. Characterization of a novel marine aerobic denitrifier *Vibrio* spp. AD2 for efficient nitrate reduction without nitrite accumulation[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2021, 28(24): 30807-30820.
- [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[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(7): 3243-3248.
- [30] Wang T, Jiang ZZ, Dong WB, Liang XY, Zhang LH, Zhu YM. Growth and nitrogen removal characteristics of *Halomonas* sp. B01 under high salinity[J]. *Annals of Microbiology*, 2019, 69(13): 1425-1433.
- [31] Marzocchi U, Thorup C, Dam AS, Schramm A, Risgaard-Petersen N. Dissimilatory nitrate reduction by a freshwater cable bacterium[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(1): 50-57.
- [32] Chen X, Liu CM, Zhu BL, Wei WX, Sheng R. The contribution of nitrate dissimilation to nitrate consumption in narG- and napA-containing nitrate reducers with various oxygen and nitrate supplies[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(6): e0069522.
- [33] Gao Y, Zhu JW, Wang KY, Ma Y, Fang J, Liu G. Discovery of a heterotrophic aerobic denitrification *Pseudomonas* sp. G16 and its unconventional nitrogen metabolic pathway[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 387: 129670.
- [34] Huan CC, Yan ZY, Sun J, Liu Y, Zeng Y, Qin W, Cheng YP, Tian XP, Tan ZL, Lyu QY. Nitrogen removal characteristics of efficient heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and application in biological deodorization[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 128007.
- [35] Cao Z, Huang F, Zhang RY, Zhao XY, Wang Y, Wu YB, Liao XD, Feng YY, Ma JY, Lan T. Nitrogen removal characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* ZQ-A1 and community characteristics analysis of its application in pig farm wastewater[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30(47): 104029-104042.
- [36] Zhang XY, Xia YX, Zeng YW, Sun X, Tao RD, Mei YJ, Qu MJ. Simultaneous nitrification and denitrification by *Pseudomonas* sp. Y-5 in a high nitrogen environment[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29(46): 69491-69501.
- [37] He XL, Sun Q, Xu TY, Dai M, Wei DS. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel halotolerant bacterium *Pseudomonas mendocina* TJPU04[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019, 42(5): 853-866.
- [38] Qiu JG, Liu SJ. Dirammox (direct ammonia oxidation) to nitrogen (N₂): discovery, current status, and perspectives[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2025, 83: 102565.
- [39] Yang RC, Cui YW, Li ZY, Li MT, Jiang LX, Mi YN, Sui Y, Liang HK. Molecular identification of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria: from methods development to application demonstration[J]. *Water Research*, 2025, 280: 123542.