

孟红艳,杨 垒,李玉彩,等.异养硝化细菌 *Pseudomonas stutzeri* strain 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 H Y, Yang L, Li Y C, et al. 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.

异养硝化细菌 *Pseudomonas stutzeri* strain NP3 的同步脱氮除磷特性及代谢机制

孟红艳^{1,2},杨 垒^{1,2*},李玉彩^{1,2},张胜静^{1,2},路颖琪^{1,2},梁 攀^{1,2},任勇翔^{1,2} (1.西安建筑科技大学,陕西省环境工程重点实验室,陕西 西安 710055; 2.西安建筑科技大学,西北水资源与环境生态教育部重点实验室,陕西 西安 710055)

摘要: 针对同步脱氮除磷工艺流程复杂、基建与运行费用高等问题,从活性污泥中分离出一株兼具同步脱氮除磷能力的异养硝化细菌 NP3,经 16S rRNA 鉴定为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*),并对其脱氮除磷特性及作用机制进行研究.结果表明,在好氧条件下,菌株 NP3 能够以氨氮、硝酸盐和亚硝酸盐作为单一氮源进行脱氮除磷,反应过程中间产物积累较少,氮、磷主要以同化作用去除,其生长和代谢速率 $\text{NH}_4^+-\text{N} > \text{NO}_2^--\text{N} > \text{NO}_3^--\text{N}$.在碳源为柠檬酸钠、C/N 为 10、温度为 30°C、pH 值为 7、转速为 160r/min 的最佳生长条件下,该菌株最大氨氮和磷酸盐去除率均接近 100%.同时,反硝化和聚磷功能基因(*nosZ*、*nirS*、*ppk*)的成功扩增,进一步证明菌株 NP3 具有同步脱氮除磷能力.此外,胞外聚合物(EPS)在磷去除中起到重要作用,去除占比达到 45% 以上. X 射线光电子能谱(XPS)分析证实 EPS 的表面官能团可以吸附 C-PO₃/P-O、PO₄³⁻/HPO₄²⁻等不同形式的磷,充当磷转移站.³¹P 核磁共振(NMR)结果进一步表明 EPS 对磷的赋存形态存在较大影响,其中焦磷酸盐是 EPS 存在时的主要磷物种,而正磷酸盐和磷酸二酯是提取 EPS 后的主要磷形式.

关键词: 异养硝化; 好氧反硝化; 同步脱氮除磷; 胞外聚合物

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2025)04-1901-10

Simultaneous nitrogen and phosphorus removal characteristics and metabolic mechanism of heterotrophic nitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* Strain NP3. MENG Hong-yan^{1,2}, YANG Lei^{1,2*}, LI Yu-cai^{1,2}, ZHANG Sheng-jing^{1,2}, LU Hao-qi^{1,2}, LIANG Pan^{1,2}, REN Yong-xiang^{1,2} (1. Shaanxi Key Laboratory of Environmental Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 2. Key Laboratory of Northwest Water Resource, Environment and Ecology, Ministry of Education, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China). *China Environmental Science*, 2025,45(4): 1901~1910

Abstract: In order to address the issues of complex processes and high infrastructure and operational costs in simultaneous nitrogen and phosphorus removal, a heterotrophic nitrifying strain NP3 exhibiting simultaneous nitrogen and phosphorus removal capabilities was isolated from activated sludge in this study. Strain NP3 was identified as *Pseudomonas stutzeri* by 16S rRNA sequence analysis, and its nitrogen and phosphorus removal characteristics and mechanisms were investigated. It was showed that strain NP3 was able to utilize ammonium, nitrate, and nitrite as the sole nitrogen source for efficient nitrogen and phosphorus removal under aerobic conditions. The accumulation of intermediate products during the reaction process was minimal, and nitrogen and phosphorus were primarily removed through assimilation. The growth and metabolic rates followed the order: $\text{NH}_4^+-\text{N} > \text{NO}_2^--\text{N} > \text{NO}_3^--\text{N}$. Under the optimal growth conditions of sodium citrate as the carbon source, C/N=10, $T=30^\circ\text{C}$, pH=7, and $r=160\text{r/min}$, the maximum removal rates of ammonia nitrogen and phosphate were almost 100%. Furthermore, successful amplification of denitrification and polyphosphate genes (*nosZ*, *nirS*, *ppk*) further confirmed the simultaneous nitrogen and phosphorus removal capability of strain NP3. X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) analysis demonstrated that the functional groups on the extracellular polymeric substances (EPS) surface could adsorb different forms of phosphorus such as C-PO₃/P-C, PO₄³⁻/HPO₄²⁻, acting as phosphorus transfer stations.³¹P nuclear magnetic resonance (NMR) results further indicated that there was a large effect of EPS on phosphorus fugitive morphology, with pyrophosphate being the main phosphorus species in the presence of EPS, whereas orthophosphate and orthophosphate diester were the major phosphorus forms after EPS extraction.

Key words: heterotrophic nitrification; aerobic denitrification; simultaneous nitrogen and phosphorus removal; extracellular polymeric substances

污水中的氮、磷导致水体富营养化,引发藻类过度繁殖、水质恶化以及水生态系统崩溃等问题.城镇污水处理厂脱氮除磷通常采用 A²O 工艺,但由于硝化、反硝化和聚磷过程的分离,该工艺存在能耗高、

收稿日期: 2024-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(52300216,52270169);西安建筑科技大学前沿交叉领域培育专项(X20230076)

* 责任作者, 副教授, yangleigps@xauat.edu.cn

工艺复杂、稳定性差等问题^[1].近年来,新型同步生物脱氮除磷技术备受关注,通过单一反应器可实现氮、磷高效去除,大幅减少处理流程、降低基建费用和运行成本,因此成为污水处理领域研究热点之一^[2].

自 20 世纪 80 年代以来,研究人员已从不同环境条件下筛选出多种属的异养硝化-好氧反硝化(HN-AD)细菌,该类菌株生长速率快、增殖底物广泛、环境适应性强,能够有效去除污水中的污染物^[3].目前,部分 HN-AD 细菌已被证实具有高效的异养硝化、好氧反硝化和聚磷能力.菌株 *Pseudomonas stutzeri* ADP19 在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的初始浓度为 100mg/L 和 20mg/L 的条件下,其最大去除率分别为 3.44 和 0.41mg/(L·h)^[4].Huang 等^[5]人研究好氧反硝化菌 *Pseudomonas aeruginosa* SNDPR-01 在最佳条件下对氨氮和磷酸盐的去除率分别达到 87%和 97%,其脱氮途径为: $\text{NH}_4^+\rightarrow\text{NH}_2\text{OH}\rightarrow\text{NO}_2^-\rightarrow\text{NO}_3^-\rightarrow\text{NO}_2^-\rightarrow\text{NO}\rightarrow\text{N}_2\text{O}\rightarrow\text{N}_2$.目前,研究人员针对 HN-AD 细菌脱氮除磷途径开展大量研究,但仍存在诸多分歧,特别是对于除磷机制的理解尚不明确.先前研究报道 HN-AD 细菌除磷主要是基于胞外聚合物(EPS)的吸附和细胞的同化作用.与传统生物除磷过程不同,菌株 *Bacillus subtilis* GHSP10 的除磷过程可以在完全好氧条件下完成,其能量来自于外部碳源的氧化^[6].在连续的有氧循环中,菌株 *Diutina rugosa* BL3 可以实现高效除磷,去除的磷大部分储存在 EPS 中^[7].有相关研究分析表明,在不同的初始磷浓度下,细胞和 EPS 对磷去除的贡献在 55%~66%和 34%~45%之间^[5].EPS 中富含羟基、羧基、磺酸盐等丰富的官能团,可以通过离子交换和氢键直接吸附磷,同时也可以分泌多种蛋白质酶参与生物除磷过程^[8].然而,现有研究主要关注胞内磷的变化,对于 EPS 在除磷过程中的作用了解仍然不足.因此,加强 HN-AD 细菌脱氮除磷机制研究,对于丰富生物脱氮除磷理论知识,推动新型同步脱氮除磷工艺发展具有重要意义.

本研究从活性污泥中筛选出 HN-AD 菌株 NP3,开展其菌株鉴定、脱氮除磷特性及影响因子分析,并通过功能基因、X 射线光电子能谱(XPS)和固体核磁共振技术(NMR)深入探析其脱氮除磷机制.

1 材料与方法

1.1 培养基

异养硝化培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.47, $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.62, $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.15,维氏盐溶液 50.00mL, pH=7.0.

亚硝酸盐培养基(g/L): NaNO_2 0.49, $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.62, $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.15,维氏盐溶液 50.00mL, pH=7.0.

硝酸盐培养基(g/L): KNO_3 0.72, $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.62, $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.15,维氏盐溶液 50.00mL, pH=7.0.

维氏盐溶液(g/L): NaCl 2.50, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.50, $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05.

以上 3 种培养基均调至 pH 值 7.0,电导率 10~11 $\mu\text{S}/\text{cm}$,浊度 0.6~0.7NTU.

1.2 菌株的分离与鉴定

通过梯度稀释和平板划线法从活性污泥中分离目标菌株,经纯化后,测试各类型单菌落的异养硝化和聚磷能力.筛选出具有较高同步硝化反硝化除磷能力(SNDPR)的菌株,并采用甘油冷冻法保存.对纯化后的菌株进行革兰氏染色,并对其菌体形貌和生理生化特性进行分析.采用上海生工生物技术有限公司的细菌基因组提取试剂盒提取 DNA 并进行 PCR 扩增,正反向引物分别为 27F:5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCTAG-3'和 1492R:5'-GGTTACCT-TGTTACGACTT-3'.同时,对反硝化和聚磷过程相关功能基因(*nirS*、*nosZ* 和 *ppk*)进行 PCR 扩增,具体 PCR 引物和反应条件参考菌株 *Pseudomonas aeruginosa* YZN-001^[9].将扩增 PCR 产物送至上海生工科技股份有限公司进行测序分析.所得序列与 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列进行核苷酸同源性比较,应用 MEGA 10.0 软件构建该菌株的系统发育树.

1.3 菌株 NP3 的脱氮除磷性能及物质平衡

分别以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为单一氮源,探究菌株 NP3 的脱氮除磷性能.将 1mL 活化后的菌液接种在 99mL 无菌 BM 培养基中,在 30℃和 160r/min 的条件下摇床培养 48h.培养过程中,每隔 4h 取样测定菌体生长吸光度(D_{600})、TN、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的浓度变化.同时,气态氮测定采用橡胶塞密封锥形瓶,使用 1000 μL 气密注射器定期采集 N_2O 、 O_2 和 N_2 ^[10].为了分析磷在不同组分中的分布,通过改进的加热法提取 EPS^[11].然

后分别分析上清液、EPS、细胞内、细胞膜中总磷的浓度。

1.4 单因素试验优化菌株 NP3 培养条件

为考察碳源、温度、pH 值、C/N 比和转速对菌株 NP3 脱氮除磷性能的影响,在初始 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度为 100mg/L , $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度为 20mg/L 的条件下进行了单因素摇瓶试验.以柠檬酸钠、乙酸钠、葡萄糖和蔗糖为碳源;将温度设定为 10, 20, 30, 37°C ;pH 值调整为 5, 6, 7, 8, 9 和 10;C/N 比为 2, 5, 10 和 15;摇床转速分别为 80, 120, 160 和 200r/min .上述试验均在 250mL 锥形瓶中接种 1mL 细菌悬浮液和 99mL 无菌培养基中进行.除单因素调整外,其他因素保持不变,反应 24h 后取样测定氮、磷浓度和 D_{600} .

1.5 X 射线光电子能谱和 ^{31}P 核磁共振分析

将完整的菌体和提取 EPS 后的菌体混合液冷冻干燥成粉末后,采用 XPS 分析细菌在提取 EPS 前后表面官能团的变化,利用 ^{31}P 核磁共振测定细菌在提取 EPS 前后磷的类型变化.XPS 全谱能量范围选择 $1200\sim 0\text{eV}$,使用 $\text{C}_{1s}=284.8\text{eV}$ 结合能作为能量标准进行电荷校正,对 C_{1s} 、 N_{1s} 、 O_{1s} 、 P_{2p} 跃迁采集了高分辨率光谱,测试参数如下:扫描周期为 2 周,范围为 $200\mu\text{m}$,能量步长为 0.05eV .运用 Avantage 软件进行数据分析.NMR 使用 85% H_3PO_4 作为外部标准,通过与标准化物种比较化学位移,从而确定不同的磷物种.使用 MestNova 9.0 软件对检测光谱进行积分来计算峰面积.

1.6 分析方法和统计方法

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、TN 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度均采用标准方法测定; D_{600} 采用吸光度法测定; N_2O 、 O_2 和 N_2 采用气相色谱法(GC)测定.所有试验均一式三份,结果表示为平均值 \pm 标准差.菌株 NP3 的生长特征采用 logistic 模型拟合,如式(1)^[12]所示; $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_3^-\text{-P}$ 降解采用一级动力学模拟,如式(2)^[13]所示.

$$y(t) = \frac{a}{1 + b e^{-kt}} \quad (1)$$

式中: y 为某时刻 D_{600} 值; t 是反应时间, h; a 、 b 、 k 均为 Logistic 生长方程常数; e 为自然常数.

$$S(t) = e^{-k(t+b)} \quad (2)$$

式中: S 为某时刻氮、磷浓度, mg/L ; t 是反应时间, h; k 和 b 是动力学常数; e 为自然常数.

2 结果与讨论

2.1 菌株的鉴定

菌株 NP3 的菌落为圆形,直径约 1.5mm ,呈黄色,表面光滑,凸起,不透明,革兰氏染色为阴性.通过扫描电镜观察,细胞形态为杆状,大小约为 $(0.4\sim 0.5)\mu\text{m} \times (1.0\sim 1.5)\mu\text{m}$,无鞭毛(图 1).该菌株能够还原硝酸盐和亚硝酸盐,但不具有产氨能力(表 1).

表 1 菌株 NP3 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characterization of strain NP3

检测项目	结果	检测项目	结果
V.P 测定	-	亚硝酸盐还原试验	+
吲哚	-	产氨试验	-
甲基红	-	柠檬酸盐利用	+
接触酶	+	明胶液化	-
硝酸盐还原试验	+	H_2S 试验	-

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性.

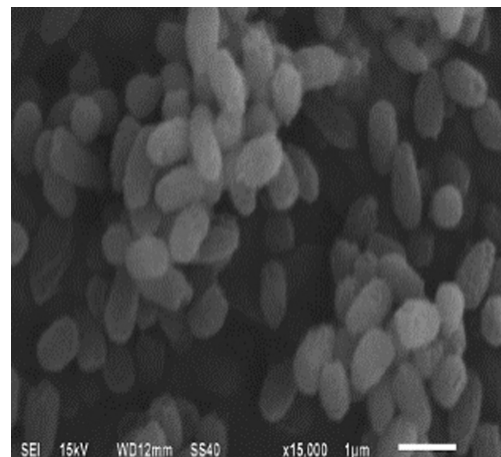


图 1 菌株 NP3 的扫描电镜图片

Fig.1 Scanning electron microscope image of strain NP3

经过 16S rRNA 测序比对,初步确定菌株 NP3 为假单胞菌属,将菌株 NP3 与同源性较高的假单胞菌和其他异养硝化菌属进行系统发育分析(图 2),NP3 与 *Pseudomonas stutzeri* YZN-001 的相似度极高^[9],进一步确定菌株 NP3 为施氏假单胞菌(序列号: MG917742.1).此外,成功扩增并测序了 *nirS*(序列号: PP061276),*nosZ*(序列号: PP061275)和 *ppk*(序列号: PP061274)基因的完整序列,其中 *nirS* 编码亚硝酸盐还原酶,负责将亚硝酸盐还原为一氧化氮(NO);*nosZ* 编码一氧化氮还原酶,负责将 NO 还原为

N_2 ; *ppk* 编码多磷酸激酶,负责催化三磷酸腺苷(ATP) 末端磷酸转化为 Poly-P,保持细菌细胞中 Poly-P 的

稳定性,进一步证实了 NP3 具有好氧反硝化和聚磷能力。

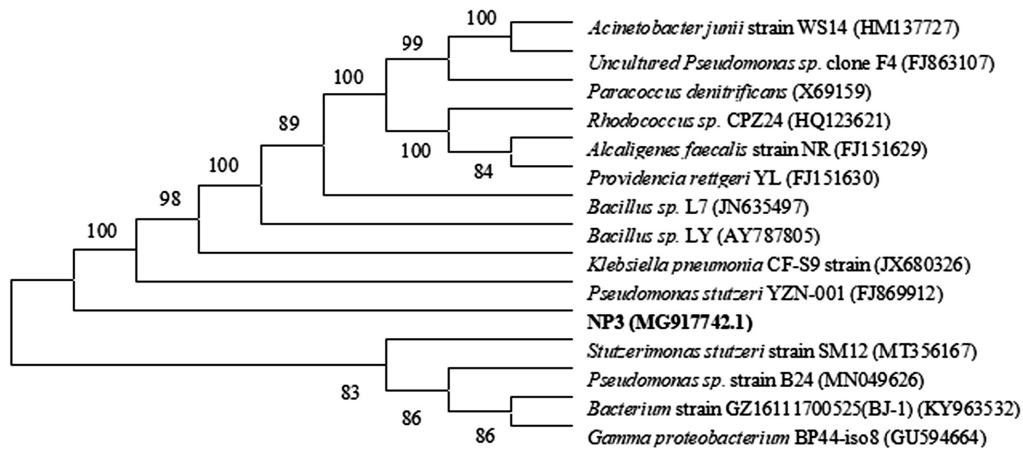


图2 基于 16S rDNA 序列同源性构建菌株 NP3 的系统发育树
Fig.2 Unrooted phylogenetic trees based on the 16S rDNA sequences of strain NP3

2.2 菌株 NP3 的异养硝化和好氧反硝化特性

2.2.1 异养硝化特性 如图 3a 所示,菌株 NP3 的生长经历了 4h 的停滞阶段后进入对数增长期,在 32h 时达到稳定, D_{600} 增长到 1.21.同时, NH_4^+-N 浓度从 100mg/L 迅速降至 0mg/L, NH_4^+-N 平均去除速率为 3.13mg/(L·h),远高于菌株 *Pseudomonas tolaasii* Y-11(2.04mg/(L·h))^[14] 和 *Vibrio diabolicus* SF16 (2.29mg/(L·h))^[10].在 8~12h 内, NH_4^+-N 最大去除速率达到 5.74mg/(L·h). $PO_4^{3-}-P$ 的浓度变化与 NH_4^+-N 相似,32h 内也几乎完全去除,最大去除速率为 1.10mg/(L·h). NH_4^+-N 和 $PO_4^{3-}-P$ 降解趋势一致,表明 NH_4^+-N 的去除和 P 的积累是同步进行的.此外,由于衰亡菌体内源代谢的影响, NH_4^+-N 和 $PO_4^{3-}-P$ 的浓度略有增加^[12].在反应过程中,没有检测到 $NO_2^- -N, NO_3^- -N$ 最终积累量为 16.62mg/L,该结果与

菌株 *Acinetobacter* sp. T1 的异养硝化特性一致^[15].

如图 3b 所示,在培养过程中,随着 O_2 的消耗, N_2 含量在 48h 内从 0 增加到 1.22mg.仅检测到极少量的 N_2O ,在 8h 时达到最大值 0.82 μ g,体现出 NP3 菌株的环境友好性,有利于温室气体的控逸.氮平衡分析表明,约 64.33%的 NH_4^+-N 被同化为胞内氮,12.17% 转化为气态氮,其余转化为硝化中间产物.磷平衡分析表明,在反应结束时,溶液中的大部分磷逐渐转化至细胞膜、细胞内和 EPS 区域.大约 17%的磷转移至细胞质中,30%的磷存在于细胞膜中,48%的磷吸附在 EPS 中,进一步表明 EPS 在磷去除中占重要作用.一些好氧除磷菌株,如 *Shewanella* sp. CF8-6^[11], *Diutina rugosa* BL3^[7], *Seudomonas aeruginosa* strain SNDPR-01^[5]也主要在 EPS 中积累磷酸盐,占 40%~70%.

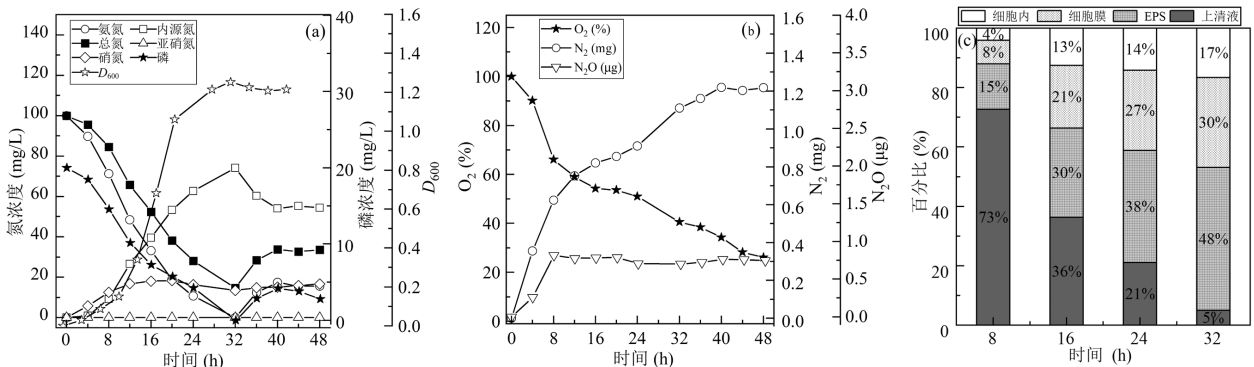


图3 以 NH_4^+-N 为唯一氮源时菌株 NP3 的生长及异养硝化特性

Fig.3 Growth and heterotrophic nitrification performance of strain NP3 with NH_4^+-N as the sole nitrogen source

2.2.2 好氧反硝化特性 菌株 NP3 的好氧反硝化能力如图 4 所示.当以硝酸盐为唯一氮源时,菌株适应期较长,培养 24h 后,菌株快速增殖, D_{600} 在 40h 达到峰值 1.08,最大生长速率为 $0.08\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$. NO_3^- -N 的消耗与细胞生长速度密切相关,在 48h 内从 $105\text{mg}/\text{L}$ 降至 $10.68\text{mg}/\text{L}$,去除率约 89.82%,最大去除速率为 $5.02\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$,高于菌株 *Exiguobacterium mexicanum* strain SND-01($3.63\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$)^[16].同时, PO_4^{3-} -P 最大去除速率在 8~12h 内达到 $0.89\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$.整个反应过程中,未出现 NO_2^- -N 的积累,TN 的降解趋势与 NO_3^- -N 几乎一致,TN 最终去除率为 89.82%.此现象与菌株 *Pseudomonas* sp. JQ-H3^[17]和 *Vibrio* sp. Y1-5^[18]的研究结果相同.

当以亚硝酸盐为唯一氮源时,菌株的适应期缩短,16h 后 D_{600} 快速增加.反应 48h 后,约 92.68%的 NO_2^- -N 被去除,平均去除速率为 $2.26\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$,高于菌株 *Pseudomonas* sp.yy7($0.76\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$)^[19],*Bacillus methylotrophicus* strain L7 ($0.24\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$)^[20].同时, PO_4^{3-} -P 的最终去除效率为 88.56%,最大去除速率在 24~28h 内达到 $1.03\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$.通常, NO_2^- -N 会对微生物产生毒害作用,尤其在高浓度条件下会严重抑制反硝化过程^[21].然而,菌株 NP3 在 NO_2^- -N 初始浓度为 $117\text{mg}/\text{L}$ 时,仍能快速增殖,表现出良好的好氧反硝化能力.结合培养过程中 NO_3^- -N 的积累,推测菌株 NP3 通过将部分 NO_2^- -N 转化为 NO_3^- -N,消除 NO_2^- -N 的毒性以实现自我保护^[22].此外,24h 后出现 NH_4^+ -N 的迅速积累,这可能是通过亚硝酸盐的异化还原产生的^[23].TN 的最终去除率为 71.02%,略低于以 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 作为单一氮源时的去除效率.

总之,NP3 菌株可以使用 NH_4^+ -N, NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 作为唯一的氮源,并表现出高效的好氧反硝化-好氧反硝化性. Logistic 和一级动力学模型可以较好地模拟 NP3 菌株的生长(图 5a)和氮磷降解特性(图 5b 和图 5c). 相比而言,NP3 对氮源的利用顺序为 NH_4^+ -N > NO_2^- -N > NO_3^- -N,对应最大 D_{600} 值分别为 1.21, 1.11, 1.07,表明菌株异养硝化能力优于好氧反硝化能力.

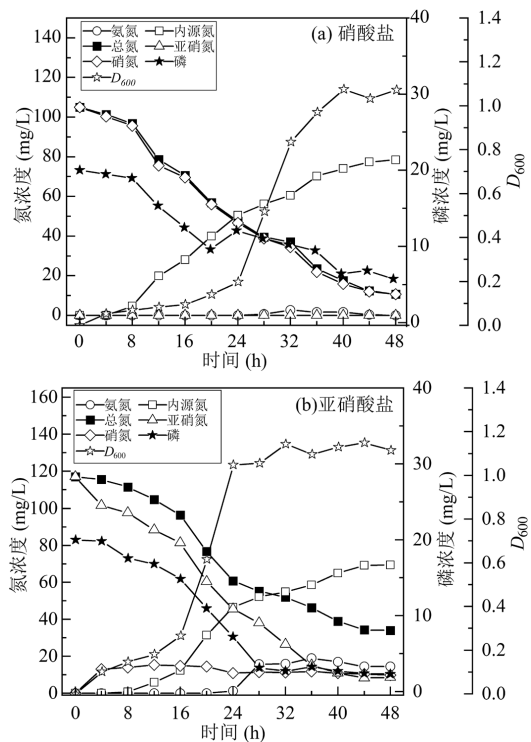


图 4 以 NO_3^- -N(a)和 NO_2^- -N(b)为唯一氮源时菌株 NP3 的生长及异养硝化特性

Fig.4 Growth and heterotrophic nitrification performance of strain NP3 with NO_3^- -N(a) and NO_2^- -N(b) as the sole nitrogen source

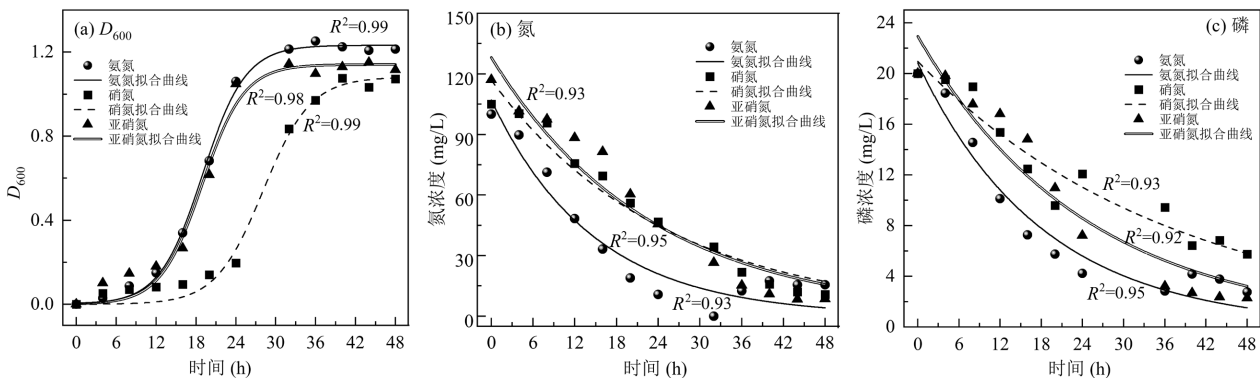


图 5 不同氮源条件下菌株 NP3 的降解动力学模型

Fig.5 The kinetic models of strain NP3 under different nitrogen source conditions

2.3 不同培养条件下的脱氮除磷效果

2.3.1 碳源 如图 6a 和 6b 所示,柠檬酸钠是最佳碳源,在 24h 内,菌株生长迅速,氨氮和磷的去除率分别达到 89.24%和 99.89%.当以乙酸钠作为碳源时,氨氮去除效率没有显著变化,磷的去除率降至 79.60%.同时,氮平衡分析表明去除氨氮主要转化为内源氮和 NO_3^- -N, N_2 占比仅为 10.37%.当使用葡萄糖和蔗糖为碳源时,菌株生长和营养物质去除明显受到抑制,氨氮去除效率仅为 53.44%和 5.32%,磷去除效率为 58.70%和 4.70%.以上结果表明,在 NP3 的异养硝化过程中,有机酸优于糖类,可能是由于有机酸分子量小且结构简单,更容易参与三羧酸循环为细胞提供能量^[24].

2.3.2 C/N C/N 对菌株 NP3 异养硝化的影响如图

6c 和 6d 所示,菌株在较高 C/N 比条件下表现出更高的生物量和脱氮除磷效率.当 C/N 比为 2 时,菌株 NP3 生长速率缓慢,在 24h 内仅去除了 34.92%的氨氮和 45.15%的磷.随着 C/N 比从 5 增加到 10,氨氮和磷的去除率分别从 66.44%和 69.95%增加到 89.24%和 99.89%.当 C/N 比超过 10 后,去除效率有所下降,可能是因为过量的碳源抑制了微生物生长和反硝化过程的电子传递.在菌株 *Acinetobacter calcoaceticus* TY1^[25]和 *Pseudomonas stutzeri* ADP-19^[4]中也发现了类似的现象.整个反应过程中,氮同化率变化不大,保持在 57.53%~72.25%之间,但在 C/N=2 时, N_2 转化率较高,为 19.73%.综合考虑成本效益,C/N=10 为最佳工艺条件.

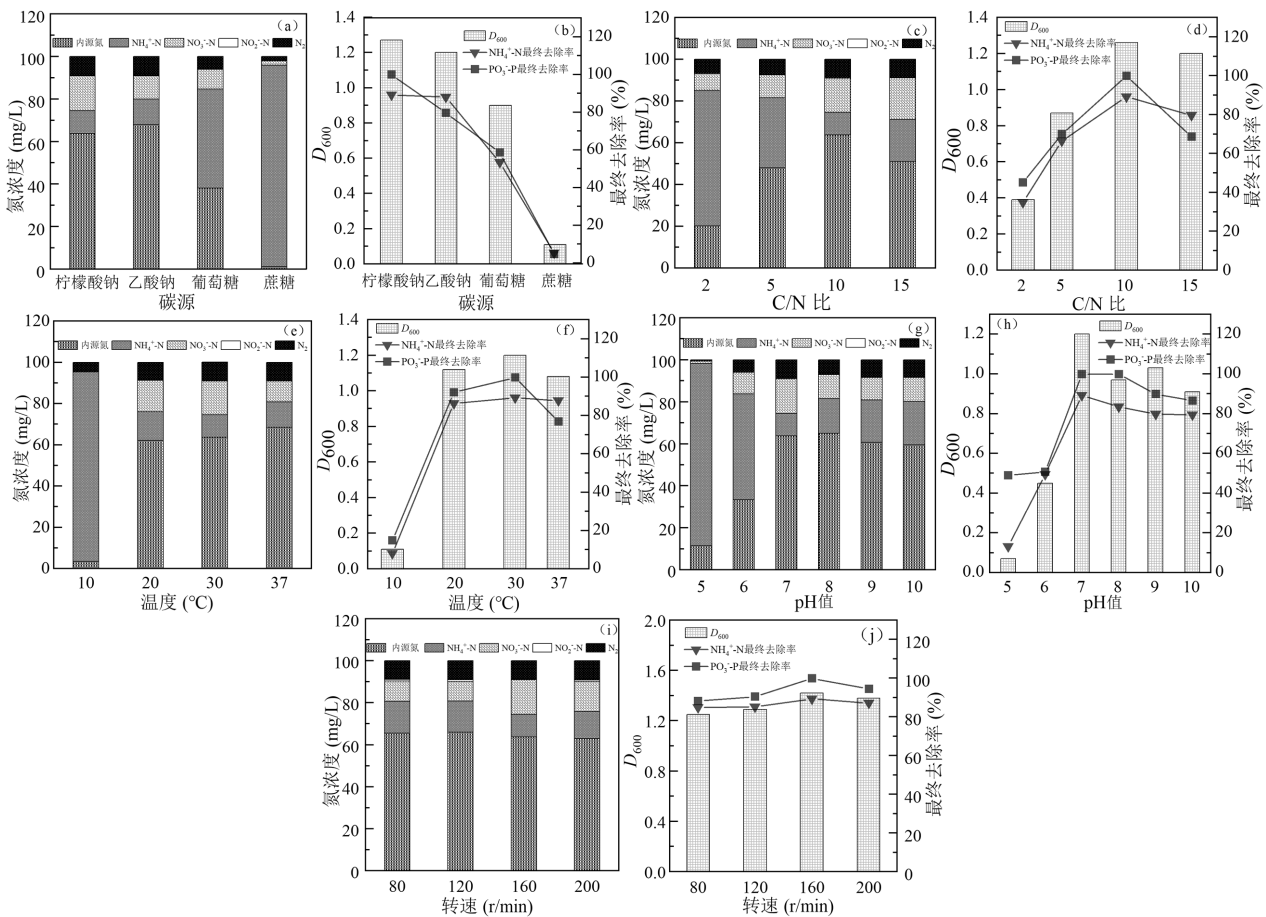


图 6 不同环境因子对菌株 NP3 生长及同步脱氮除磷特性影响

Fig.6 Effects of different environmental factors on growth and simultaneous nitrogen and phosphorus removal of strain NP3

2.3.3 温度 菌株 NP3 在 20~37℃ 下生长迅速,脱氮除磷效果良好(图 6e 和 6f).当温度为 10℃,低温直接影响了菌株生长和功能酶的活性,氮、磷去除率受到显著抑制,未检测到硝化产物.经比较,

30℃ 是菌株 NP3 脱氮除磷的最适温度,氨氮和磷的最终去除率分别为 89.24%和 99.89%,这一结果与先前对 *Acinetobacter* sp. FYF8^[26] 和 *Pseudomonas balearica* UFV3^[27] 的研究结果一致.

当温度增至 37℃时, D_{600} 值降低,除磷效率下降明显,但脱氮效果稳定.结果表明,菌株 NP3 和大部分 HN-AD 细菌一样,适宜在温暖的环境下生长繁殖,并不适应于寒冷地区.

2.3.4 pH 值 菌株 NP3 可以在较宽的 pH 值范围内(6~9)快速生长并去除营养物质(图 6g 和 6h).当 pH=7 时,菌株的生物量最高,氨氮和磷的最终去除率分别达到了 89.24%和 99.89%.当 pH 值升至 9 时,脱氮除磷效果略有下降,但仍保持在较高水平,24h 内氨氮和磷酸盐去除率分别为 79.82%和 89.81%,表明即使是在弱碱性条件下菌株 NP3 也能表现出良好的脱氮除磷效果,优于先前报道的 *Acinetobacter calcoaceticus* TY1(6~8)^[25],*Pseudomonas stutzeri* T13(6~8)^[28]等菌株.当 pH<6 时,菌株 NP3 的生长速度和脱氮除磷效率降低,主要原因是极端酸性条件阻碍了菌株的代谢和生长,表明菌株 NP3 更倾向于中性、弱碱性环境.在不同的 pH 值条件下,氮转化形式没有太大差异,同化作用为主要氮去除途径, NH_4^+ -N 转化为内源氮占比在 67.23%~86.63%之间.

2.3.5 溶解氧 通过调节转速来评估溶解氧对菌

株 NP3 异养硝化性能的影响.在不同的转速条件下,微生物的生长和脱氮除磷效率均表现良好(图 6i 和 6j).随着转速从 80r/min(DO=4.3mg/L)增加到 120r/min(DO=5.7mg/L),在 24h 内,磷酸盐的去除效率从 88.15%增加到 90.50%,氨氮去除率则从 84.90%提高至 85.21%.当转速为 160r/min(DO=6.5mg/L)时,菌株 NP3 的细胞生长量最高, D_{600} 值达到 1.42,氨氮和磷的去除率分别为 89.24%和 99.89%.这可归因于提高的转速加快了氧分子与氨氮的传质速率,并促进了细菌与底物之间的接触^[29].当转速继续提高到 200r/min(DO=6.2mg/L)时,菌株 NP3 的营养物去除效率没有进一步提高,微生物生长速度略有下降,可能是转速过高会产生过量的自由基,容易破坏菌体组织,对细菌不利^[4].

综上所述,菌株 NP3 的最佳生长和异养硝化条件:以柠檬酸钠为碳源,C/N=10,温度为 30℃,pH=7,转速为 160r/min(DO=6.5mg/L).此时的氮平衡分析结果表明,在 24h 内,去除的 NH_4^+ -N 中约 71.40%通过同化作用转化为胞内氮,10.21%转化为气态氮,其余转化为硝态氮.

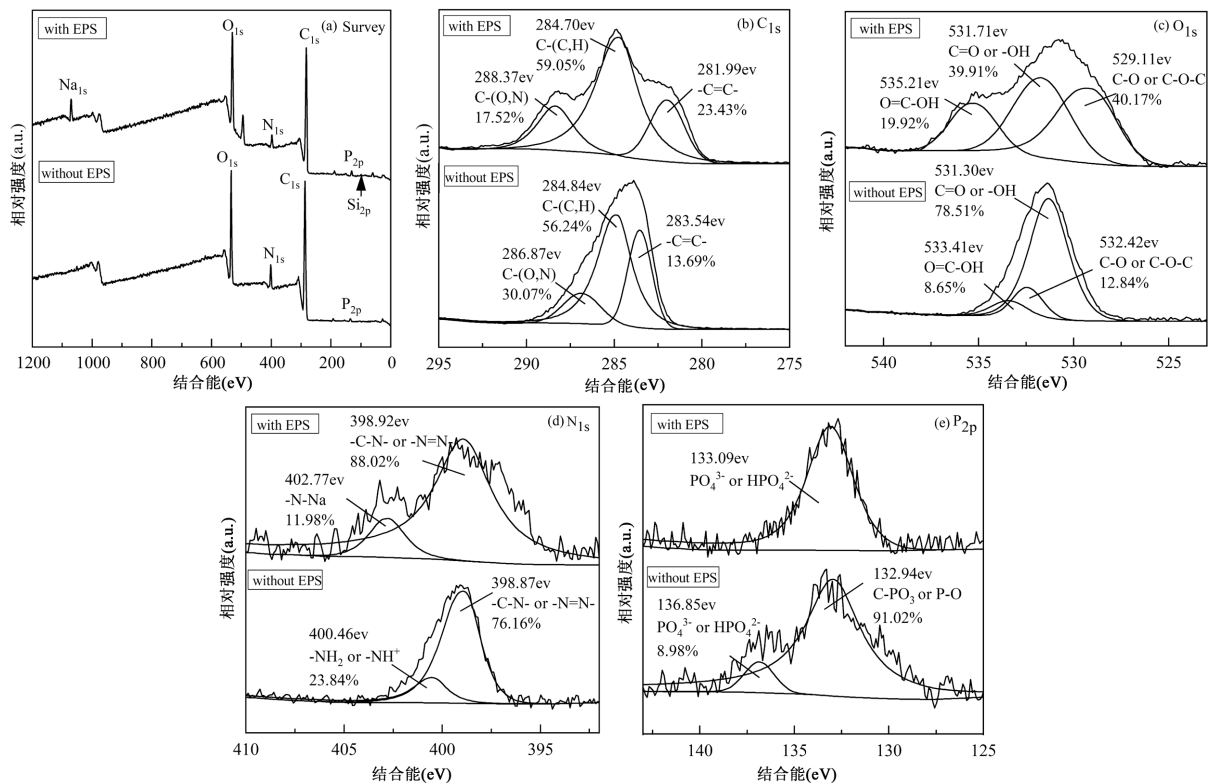


图 7 有无胞外聚合物(EPS)的细菌 XPS 光谱

Fig.7 XPS spectra of bacteria with and without extracellular polymerization substrate

2.4 X 射线光电子能谱分析

对 NP3 细菌细胞进行 XPS 分析发现,总谱中缺

失了 Na 和 Si 元素, C_{1s} 、 O_{1s} 、 N_{1s} 和 P_{2p} 峰的形状发生了不同程度的变化(图 7)。图中清楚地显示了 C_{1s} 分为三个峰:在 281.99eV 处的峰归属于 C=C 基团;在 284.70eV 处的峰与脂质或氨基酸侧链的 C-(C,H)基团有关,即 C-(C,H),其占最大比例(59.05%);在 288.37eV 处的峰来自醇和酰胺的氧或氮键合的碳,即 C-(O,N)^[30]。提取 EPS 后,C=C 和 C-(C,H)基团的含量分别从 23.43%和 59.05%降至 13.69%和 56.24%,C-(O,N)基团的含量则从 17.52%增加到 30.07%,这是细胞内碳源合成和降解的结果^[31]。 O_{1s} 也分解为三个峰:在 529.11eV 处的峰是与一个碳或两个碳结合的氧,即 C-O/C-O-C,占到 40.17%;在 531.71eV 处的峰由 C=O 或 -OH 基团如羧酸酯、羰基、酯或酰胺形成;在 535.21eV 处的峰归属于 O=C-OH 基团^[32]。提取 EPS 后,C-O/C-O-C 和 O=C-OH 基团的含量都有所下降,C=O/-OH 基团的含量有显著的升高,说明氧原子周围的电子密度发生了改变,在 EPS 提取的过程中存在离子交换^[33]。 N_{1s} 分为两个峰:在 398.92eV 处的峰来自于 C-N 或 N=N 基团,在 402.77eV 处的峰来自于 N-Na 基团。提取 EPS 后,N-Na 基团消失,出现了归属于 -NH₂/-NH⁺基团的新峰。与此不同,提取 EPS 前, P_{2p} 仅在 133.09eV 处存在来自于磷酸盐基团的特征峰,即 PO_4^{3-}/HPO_4^{2-} 。提取 EPS 后,在 132.94eV 处的峰发现有与碳和氧结合的磷,即 C- PO_3 /P-O,源自 DNA、RNA 和磷脂^[34],占到 91.02%,说明胞内有机磷占主要部分,用于细菌生长代谢。

通过分析 NP3 细菌提取 EPS 前后的 XPS 数据,可以确定 EPS 表面的官能团可以吸附各种不同形态的磷,通过膜蛋白转移到细菌细胞中,用于细菌生长。此外,磷在 EPS 和细胞中会不断迁移,磷含量也在时刻发生变化,说明 EPS 可以储存磷,在细菌除磷过程中发挥着重要作用。

2.5 ³¹P 核磁共振分析

为深入了解细菌的磷代谢途径,通过 ³¹P NMR 光谱分析了提取 EPS 前后细菌中磷的赋存类型。如图 8 所示,提取 EPS 前,细菌的 ³¹P NMR 光谱中观察到两种信号:磷酸盐 (24.99×10^{-6}) 和焦磷酸盐 (-4.03×10^{-6})。其中,焦磷酸盐是主要磷形式,占提取磷的 99.36%。这与 XPS 中磷基团分析一致。提取 EPS 后,细菌的 ³¹P NMR 光谱同样显示有两种形式的磷:正磷酸盐 (6.17×10^{-6}) 和正磷酸盐二酯 ($-2.84 \times$

10^{-6})^[35],分别占提取磷的 47.10%和 52.90%。据报道,主要以磷酸盐形式存在(如铁和钙结合的无机磷),是活细菌的主要营养素^[36]。磷酸二酯是磷脂、磷酸盐、核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)的主要化合物,用于遗传物质的合成^[37]。此结果与其他已报道菌株略有不同,在菌株 *Diutina rugosa* BL3 的 EPS 中存有正磷酸盐、磷酸单酯、磷酸二酯、焦磷酸盐和多磷酸盐^[7],而菌株 *Pseudomonas aeruginosa* SNDPR-01 在 EPS 中只检测到磷酸单酯^[5]。

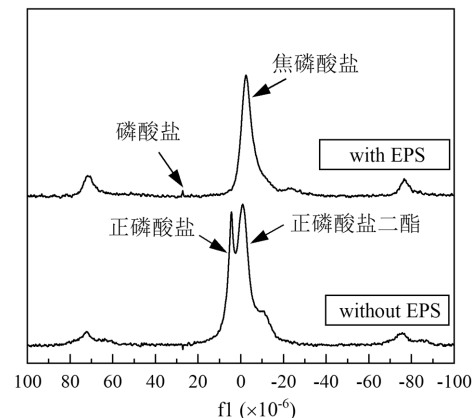


图 8 有无胞外聚合物的细菌 ³¹P NMR 光谱
Fig.8 ³¹P NMR spectra of bacteria with and without extracellular polymerization substrate

2.6 脱氮除磷代谢途径分析

现有研究表明异养硝化菌大致有两种不同的脱氮途径:一种是在好氧条件下能将 NH_4^+ -N 转化成 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N,然后再将产生的 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 作为电子受体从而达到脱氮作用^[38];另一种途径则是在好氧的条件下先将 NH_4^+ -N 转化成 NH_2OH ,然后直接转化成气态氮^[4]。本研究中,基于菌株 NP3 对不同氮源的利用转化、中间产物的生成规律以及功能基因(*nirs*、*nosz*)的成功表达,推测菌株 NP3 脱氮过程经历了完整的硝化和反硝化过程,即脱氮途径为 $NH_4^+ \rightarrow NH_2OH \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ (图 9)。

此外,结合 XPS 和核磁共振数据结果,推断出 EPS 可能的磷转化机制(图 9):在需氧的条件下,由于 EPS 中含有大量带电官能团,废水中大部分的磷(正磷酸盐)易于被 EPS 所吸附^[39]。EPS 吸附的磷进一步通过细胞膜上的转运蛋白转移到细胞中,用于细菌的快速生长,其中对数阶段下通过 PHA 的降解以

ATP 的形式提供能量^[6]。同时,在细胞质中,正磷酸盐被转化为膜磷脂、磷酸二酯等不同形式的磷,而 EPS 中正磷酸盐也可以转化为焦磷酸盐和其他磷酸盐形式。此外,随着代谢废物的排泄或细胞自溶,细胞中的磷可能会重新释放到 EPS 中。当细菌进入衰退期后,为满足细胞的营养需求,部分磷会重新返回到细胞中,能量来自于糖原降解产生的 ATP^[40]。在细菌除磷过程中,EPS 充当中间转移站,PHA 和糖原是能量来源,未来仍需进一步研究在除磷过程中 PHAs 与糖原相互作用的机制以及能量代谢途径。

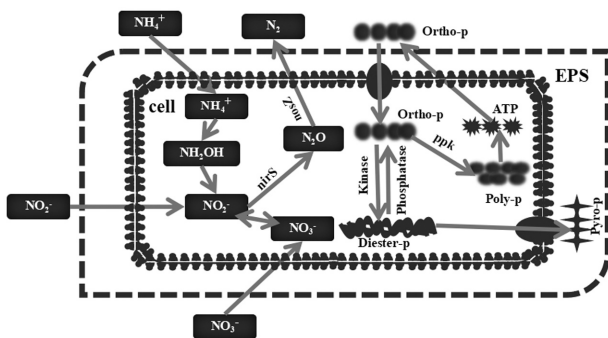


图9 菌株 NP3 的脱氮除磷代谢途径

Fig.9 The metabolic pathway diagram of nitrogen and phosphorus removal by strain NP3

3 结论

3.1 从活性污泥中分离筛选出一株高效 HN-AD 菌株 NP3,鉴定为施氏假单胞菌属。同时,该菌株成功扩增功能基因 *ppk*、*nirs* 和 *nosz*,表明分离菌株具有同步的脱氮和聚磷能力。

3.2 在不同氮源(氨氮、硝酸盐和亚硝酸盐)条件下,菌株 NP3 均展现出优异的 HN-AD 能力。NP3 的最佳生长和脱氮除磷条件为:柠檬酸钠为碳源,C/N=10,温度为 30°C,pH=7,转速为 160r/min,此时氨氮和硝酸盐最高去除率分别为 89.24%和 99.89%。

3.3 结合 X 射线光电子能谱和 ³¹P 核磁共振的磷形态特征,表明胞外聚合物(EPS)具有吸附多种形态的磷并将其转移到细菌细胞中的能力,同时 EPS 在细菌的磷代谢过程中扮演着储存和迁移磷的关键角色。

参考文献:

[1] Xu N, Liao M, Liang Y, et al. 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) [J]. Environmental Research, 2021,195:110797.

[2] 刘妍,袁林江,陈希,等.一株异养硝化-好氧反硝化-积累磷的细菌 *Klebsiella pneumoniae* A15 的筛选及其特性研究 [J]. 中国环境科学, 2024,44(4):2286-2296.

Liu Y, Yuan L J, Chen X, et al. Sieving and characterization of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying-phosphorus-accumulating bacterial strain, *Klebsiella pneumoniae* A15 [J]. China Environmental Science, 2024,44(4):2286-2296.

[3] 李艳丽,杨垒,张志昊,等.好氧反硝化细菌 *Burkholderia* sp. ZH8 的脱氮特性与生物强化作用 [J]. 中国环境科学, 2024,44(8):4282-4291.

Li Y L, Yang L, Zhang Z H, et al. Nitrogen removal characteristics and bioenhancement effects of aerobic denitrifying bacteria *Burkholderia* sp. ZH8 [J]. China Environmental Science, 2024,44(8):4282-4291.

[4] Li B, Jing F, Wu D, et al. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorus by a novel aerobic denitrifying phosphorus-accumulating bacterium, *Pseudomonas stutzeri* ADP-19 [J]. Bioresource Technology, 2021,321:124445.

[5] Huang M, Cui Y, Huang J, et al. A novel *Pseudomonas aeruginosa* strain performs simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification and aerobic phosphate removal [J]. Water Research, 2022,221:118823.

[6] Zhang M, Pan L, Su C, et al. Simultaneous aerobic removal of phosphorus and nitrogen by a novel salt-tolerant phosphate-accumulating organism and the application potential in treatment of domestic sewage and aquaculture sewage [J]. Science of the Total Environment, 2021,758:143580.

[7] Sun S, Han J, Hu M, et al. Removal of phosphorus from wastewater by *Diutina rugosa* BL3: Efficiency and pathway [J]. Science of the Total Environment, 2021,801:149751.

[8] Tan X, Gao W, Duan Z, et al. Synthesis of novel algal extracellular polymeric substances (EPS)-based hydrogels for the efficient removal and recovery of phosphorus from contaminated waters: Development, characterisation, and performance [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2023,11:109044.

[9] Zhang J, Wu P, Hao B, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001 [J]. Bioresource Technology, 2011,102(21):9866-9869.

[10] Duan J, Fang H, Su B, et al. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater [J]. Bioresource Technology, 2015,179:421-428.

[11] Jiang L, Wang M, Wang Y, et al. The condition optimization and mechanism of aerobic phosphorus removal by marine bacterium *Shewanella* sp [J]. Chemical Engineering Journal, 2018,345:611-620.

[12] Yang L, Wang X, Cui S, et al. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorus by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5 [J]. Bioresource Technology, 2019,285:121360.

[13] Yang L, Lu H, Wang Y, et al. Nitrogen removal characteristics and Cr(VI) tolerance mechanisms of heterotrophic nitrifying bacterium *Pseudomonas putida* strain LX1 [J]. Journal of Water Process Engineering, 2024,64:105647.

[14] He T, Li Z, Sun Q, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic

- denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion [J]. *Bioresource Technology*, 2016,200:493-499.
- [15] Chen S, He S, Wu C, 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.
- [16] Cui Y, Cui Y W, Huang J L. A novel halophilic *Exiguobacterium mexicanum* strain removes nitrogen from saline wastewater via heterotrophic nitrification and aerobic denitrification [J]. *Bioresource Technology*, 2021,333:125189.
- [17] Wang X, Wang W, Zhang Y, et al. Simultaneous nitrification and denitrification by a novel isolated *Pseudomonas* sp. JQ-H3 using polycaprolactone as carbon source [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 288:121506.
- [18] Li Y, Wang Y, Fu L, et al. Aerobic-heterotrophic nitrogen removal through nitrate reduction and ammonium assimilation by marine bacterium *Vibrio* sp. Y1-5 [J]. *Bioresource Technology*, 2017,230: 103-111.
- [19] Wan C, Yang X, Lee D J, et al. Aerobic denitrification by novel isolated strain using NO_2^- -N as nitrogen source [J]. *Bioresource Technology* 2011,102(15):7244-7248.
- [20] Zhang Q L, Liu Y, Ai G M, et al. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7 [J]. *Bioresource Technology*, 2012,108: 35-44.
- [21] Zhou Y, Oehmen A, Lim M, et al. The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants [J]. *Water Research*, 2011, 45(15):4672-4682.
- [22] Chen J, Gu S, Hao H, et al. Characteristics and metabolic pathway of *Alcaligenes* sp. TB for simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016,100(22):9787-9794.
- [23] Wei B, Luo X, Ma W, et al. Biological nitrogen removal and metabolic characteristics of a novel cold-resistant heterotrophic nitrification and aerobic denitrification *Rhizobium* sp. WS7 [J]. *Bioresource Technology*, 2022,362:127756.
- [24] Xia L, Li X, Fan W, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge [J]. *Bioresource Technology*, 2020,301: 122749.
- [25] Wu L, Ding X, Lin Y, et al. Nitrogen removal by a novel heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* TY1 under low temperatures [J]. *Bioresource Technology*, 2022,353:127148.
- [26] Fan Y, Su J, Zheng Z, et al. Denitrification performance and mechanism of a novel isolated *Acinetobacter* sp. FYF8 in oligotrophic ecosystem [J]. *Bioresource Technology*, 2021,320:124280.
- [27] Carneiro Fidélis Silva L, Santiago Lima H, Antônio de Oliveira Mendes T, et al. Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization [J]. *Journal of Environmental Management*, 2019,248:109294.
- [28] Ma F, Sun Y, Li A. et al. Activation of accumulated nitrite reduction by immobilized *Pseudomonas stutzeri* T13 during aerobic denitrification [J]. *Bioresource Technology*, 2015,187:30-36.
- [29] Rout P R, Bhunia P, Dash R R. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereus* GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal [J]. *Bioresource Technology* 2017,244:484-495.
- [30] Wu C, Chen Y, Qian Z, et al. The effect of extracellular polymeric substances (EPS) of iron-oxidizing bacteria (*Ochrobactrum* EEELCW01) on mineral transformation and arsenic (As) fate [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2023,130:187-196.
- [31] Hou R, Yang P, Qian S, et al. Understanding the mechanism of denitrifying phosphorus removal from the perspective of intracellular carbon source and extracellular polymeric substances characteristics [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2022,367:133115.
- [32] Yuan S J, Sun M, Sheng G P, et al. Identification of key constituents and structure of the extracellular polymeric substances excreted by *Bacillus megaterium* TF10 for their flocculation capacity [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011,45(3):1152-1157.
- [33] Zheng C, Wu Q, Hu X, et al. Adsorption behavior of heavy metal ions on a polymer-immobilized amphoteric biosorbent: Surface interaction assessment [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021,403:123801.
- [34] Yan H, Huang M, Wang J, et al. Difference in calcium ion precipitation between free and immobilized *Halovibrio mesolongii* HMY2 [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2022,122:184-200.
- [35] Li L, Pang H, He J, et al. Characterization of phosphorus species distribution in waste activated sludge after anaerobic digestion and chemical precipitation with Fe^{3+} and Mg^{2+} [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019,373:1279-1285.
- [36] Huang W, Cai W, Huang H, et al. Identification of inorganic and organic species of phosphorus and its bio-availability in nitrifying aerobic granular sludge [J]. *Water Research*, 2015,68:423-431.
- [37] Jørgensen C, Jensen H S, Andersen F Ø, et al. Occurrence of orthophosphate monoesters in lake sediments: significance of myo- and scyllo-inositol hexakisphosphate [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011,13(8):2328-2334.
- [38] Wang Q, He J. Complete nitrogen removal via simultaneous nitrification and denitrification by a novel phosphate accumulating *Thauera* sp. strain SND5 [J]. *Water Research*, 2020,185:116300.
- [39] Long X, Tang R, Fang Z, et al. The roles of loosely-bound and tightly-bound extracellular polymer substances in enhanced biological phosphorus removal [J]. *Chemosphere*, 2017,189:679-688.
- [40] Han J, Qiu Q, Gao M, et al. Phosphorus removal from municipal wastewater through a novel *Trichosporon asahii* BZ: Performance and mechanism [J]. *Chemosphere*, 2022,298:134329.

作者简介: 孟红艳(2000-),女,河北沧州人,西安建筑科技大学硕士研究生,主要从事污水生物处理理论与技术研究.1853433579@qq.com.