

好氧反硝化聚磷菌的筛选及菌群构建优化

潘超^{#1}, 过志鹏^{#1}, 付贵萍^{*1}, 唐佳², 赵林¹

1 深圳大学生命与海洋科学学院 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室, 广东 深圳 518055

2 深圳市汉宇环境科技有限公司, 广东 深圳 518034

潘超, 过志鹏, 付贵萍, 唐佳, 赵林. 好氧反硝化聚磷菌的筛选及菌群构建优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4751-4769.

PAN Chao, GUO Zhipeng, FU Guiping, TANG Jia, ZHAO Lin. Screening and combination of aerobic denitrifying phosphorus-accumulating bacteria for waste removal[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 4751-4769.

摘要:【背景】近年来,随着海水养殖规模的扩大,养殖产品产生的排泄物与残留的饲料大量积累,导致养殖水域的氮磷元素含量上升,水体富营养化加剧并对环境造成危害。【目的】从红树林人工湿地中筛选出好氧反硝化聚磷菌株并研究各菌株的最佳除氮除磷效率,随后通过响应面法构建菌群,进一步强化菌株去除污染物的能力。【方法】将前期筛选出的5株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌通过异染颗粒染色和聚-β-羟基丁酸(poly-β-hydroxybutyric acid, PHB)染色进行好氧反硝化聚磷菌的筛选,通过单因素试验明确各菌株的最佳除氮除磷条件,并利用 Design-Expert 软件和 Box-Behnken 响应面法进行配比试验。【结果】经过筛选获得3株耐盐好氧反硝化聚磷菌,分别为肺无色杆菌(*Achromobacter pulmonis*) strain E43、氧化木糖无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*) strain J1 和食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*) strain F2,发现菌株 E43 具有聚磷功能,确定了耐盐好氧反硝化聚磷菌群的最优降解投加比例为 E43:J1:F2=1:1:4,验证结果显示该菌群的平均氨氮(NH₄⁺-N)去除率和磷酸盐(PO₄³⁻-P)去除率分别为 91.28%和 93.03%。【结论】菌群的构建提升了 PO₄³⁻-P 的平均去除率,为后续在实际含盐污水中的应用提供了前期基础。本研究是对好氧反硝化聚磷菌群构建的有效尝试,为构建高效功能混合菌群提供一种科学的方法。

关键词: 氮; 磷; 好氧反硝化聚磷菌; 细菌菌群; 响应面法

资助项目: 国家自然科学基金(32271704); 广东省基础与应用基础研究基金(2022A1515010562)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32271704) and the Basic and Applied Basic Research Foundation of Guangdong Province (2022A1515010562).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: fuggp@szu.edu.cn

Received: 2023-03-14; Accepted: 2023-04-08; Published online: 2023-06-04

Screening and combination of aerobic denitrifying phosphorus-accumulating bacteria for waste removal

PAN Chao^{#1}, GUO Zhipeng^{#1}, FU Guiping^{*1}, TANG Jia², ZHAO Lin¹

1 Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresources and Ecology, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518055, Guangdong, China

2 Shenzhen Hanyu Environmental Technology Limited Company, Shenzhen 518034, Guangdong, China

Abstract: [Background] In recent years, the expansion of mariculture has caused the massive accumulation of excrement and residual feed, which has increased nitrogen and phosphorus content in aquaculture waters, aggravating eutrophication and causing harm to the environment. **[Objective]** To screen out the aerobic denitrifying phosphorus-accumulating strains from mangrove constructed wetlands, determine the optimal nitrogen and phosphorus removal efficiency of each strain, and then optimize the strain combination by response surface methodology to further improve pollutant removal. **[Methods]** From the 5 strains of salt-tolerant heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria isolated in our previous study, the aerobic denitrifying phosphorus-accumulating bacteria were screened by metachromatic granules staining and poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) staining. The optimal nitrogen and phosphorus removal conditions of each strain were determined by single factor test. Box-Behnken design was performed in Design-Expert to optimize the strain combination. **[Results]** Three strains of salt-tolerant aerobic denitrifying phosphorus-accumulating bacteria were screened out, which were *Achromobacter pulmonis* strain E43, *Achromobacter xylosoxidans* strain J1, and *Pseudomonas oleovorans* strain F2, respectively. E43 was found for the first time to have the function of phosphorus accumulation. The optimal strain combination was determined as E43:J1:F2=1:1:4. The average removal rates of ammonia nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) and phosphate ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) by this combination were 91.28% and 93.03%, respectively. **[Conclusion]** The bacterial strain combination improved the average removal rate of $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, which provided a preliminary basis for the subsequent application in the actual treatment of saline wastewater. This study is an effective attempt for the assembly of aerobic denitrifying phosphorus-accumulating bacteria and provides a feasible method for the assembly of efficient functional bacteria.

Keywords: nitrogen; phosphorus; aerobic denitrifying phosphorus-accumulating bacteria; bacterial flora; response surface methodology

随着海水养殖规模的扩大, 养殖产品产生的排泄物与残留的饲料大量积累, 导致养殖水域的氮、磷元素含量上升, 水体富营养化加剧并对环境造成危害^[1-2], 所以对于海水养殖中氮、磷污染物的去除已迫在眉睫。传统的化学、

物理技术治理氮、磷污染存在成本高、具有二次污染且适用性低等问题^[3-4], 所以现阶段更多利用活性污泥技术, 但是活性污泥法中的微生物在高盐浓度下(>10%)脱水或跨细胞膜渗透压差异下分解, 导致微生物活性降低或丧失,

污染物的去除率会下降^[5]。因此对于海水养殖污水的处理,盐度成为重要的限制因素。同时,活性污泥法中由于菌群对碳源的竞争,反硝化细菌会利用挥发性脂肪酸作为反硝化作用的电子供体以实现硝酸盐的去除,而挥发性脂肪酸是磷聚菌在厌氧阶段的能量物质,能量不足会影响磷的持续厌氧释放,从而抑制微生物固磷的作用,进一步限制了生物同时脱氮除磷的效率^[6]。好氧反硝化聚磷菌(aerobic denitrifying phosphorus accumulating organisms, ADPAO)则能在好氧条件下以 NO_x^- -N 为电子受体,利用聚- β -羟基丁酸(poly- β -hydroxybutyric acid, PHB)提供能量,将环境中吸收的无机磷酸盐在体内固定为多聚磷酸盐,即同时完成反硝化和聚磷两个独立的过程^[7-8],因此好氧反硝化聚磷菌的发现突破了传统微生物脱氮除磷的限制。目前,国内外学者陆续从 A/O/A-SBR 反应器的活性污泥^[9]、对虾养殖池水与底泥^[10]、好氧生物反应池^[11]中发现并鉴定出好氧反硝化聚磷菌,并通过单因素试验确定了其特性。

好氧反硝化聚磷菌包括多种菌株,如假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)^[12-16]、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)^[17-20]、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)^[21-22]和气单胞菌(*Aeromonas* sp.)等^[13,23],以往的研究主要集中在单株菌的脱氮除磷的功能上,然而不同菌株之间存在多种交互作用,包括互利共生、侵害和竞争等,因此,筛选多株具有协同作用的好氧反硝化聚磷菌,采用合适的方法构建高效的好氧反硝化聚磷菌群,利用菌株的协同作用增强菌群的代谢潜力,使菌群对污染物的去除效果更加显著是提高菌群对污染物去除能力的一种有效方法^[24-25]。

响应面法(response surface methodology, RSM)是一种回归分析方法,将多个二次回归方程应用于试验设计,研究多个因素之间的相互

作用,以找到整个区域的影响因素和响应值的最佳组合^[26]。目前,响应面法已成熟地应用于探究微生物对污染物去除的最优环境条件组合方面,用于解析不同环境因素对污染物去除的影响。安卫娟等^[27]利用响应面法探讨了沙雷氏菌在硫酸铵浓度、pH 及乙烯雌酚浓度等因素下对乙烯雌酚去除的最优环境条件;刘有华等^[28]利用响应面法探究了聚磷菌 P6-1 在温度、pH 和装液量 3 个因素下的最大除磷率,发现三因素的作用强度依次为温度>pH>装液量;Yang 等^[29]通过修正的响应面法探讨了微藻处理废水的最佳工艺,并根据模型估算出在自然条件下处理废水所需的微藻数量。然而少见利用响应面法研究混合菌群构建中不同菌种配比的报道。目前,对于菌群的构建主要是通过不同菌种混合培养来实现,通过对比单一菌种进行菌群功能的验证。这种菌群构建方法一方面不能确定不同菌株之间是否为协同作用;另一方面也未考虑菌株间的最优配比。因此,本研究在前期筛选、纯化出的多株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌的基础上进一步筛选具有聚磷功能的菌株,通过单因素试验确定各菌株的最佳除氮除磷效率,随后利用响应面法调节不同菌株的配比,构建高效耐盐好氧反硝化聚磷菌群,用于提高海水养殖等含盐污水中氮、磷的去除效率。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

为同步实现反硝化和聚磷两个独立的过程,从前期构建的红树林人工湿地试验系统中筛选纯化到 5 株互不拮抗的耐盐异养硝化-好氧反硝化细菌^[30],通过特异性染色验证其是否具有聚磷功能,5 株菌分别为锡那罗州弧菌(*Vibrio sinaloensis*) W37 (MT605274)、肺无色杆菌

(*Achromobacter pulmonis*) E43 (MT669639)、脱氮卓贝尔氏菌 (*Zobellella denitrificans*) A63 (MT669820)、食油假单胞菌 (*Pseudomonas oleovorans*) F2 (MT669819)和氧化木糖无色杆菌 (*Achromobacter xylosoxidans*) J1 (MT669818)。

筛选鉴定的阳性对照菌则选用具有聚磷能力的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) NCIB 3610。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

异染颗粒染色液：甲液：甲苯胺蓝 0.15 g，孔雀绿 0.2 g，冰醋酸 1 mL，95%酒精 2 mL，用超纯水稀释至 100 mL；乙液：碘 2 g，碘化钾 3 g，超纯水稀释至 300 mL。

尼罗蓝-丙酮储备染液：10 mg 尼罗蓝试剂溶于 0.5 mL 丙酮中，并用超纯水稀释至 20 mL 备用。

LB 液体培养基(g/L)：蛋白胨 10.0，酵母提取物 5.0，氯化钠 5.0，pH 7.2。LB 固体培养基是在 LB 液体培养基的基础上加入 15–20 g/L 的琼脂，121 °C 灭菌 20 min。

富氮富磷培养基(g/L)：CH₃COONa 3.090，NH₄Cl 0.509，K₂HPO₄ 0.044，MgSO₄ 0.100，NaCl 20.000，微量元素溶液 2.0 mL，pH 7.0–7.5，121 °C 灭菌 30 min。

缺磷培养基(g/L)：CH₃COONa 3.090，NH₄Cl 0.509，MgSO₄ 0.100，NaCl 20.000，微量元素溶液 2.0 mL，pH 7.0–7.5，121 °C 灭菌 30 min。

富磷培养基(g/L)：CH₃COONa 3.090，NH₄Cl 0.509，K₂HPO₄ 0.150，MgSO₄ 0.100，NaCl 20.000，微量元素溶液 2.0 mL，pH 7.0–7.5，121 °C 灭菌 30 min。

微量元素溶液配制：准确称取 50.0 g EDTA、2.2 g ZnSO₄、5.5 g CaCl₂、5.06 g MnCl₂、5.0 g FeSO₄、1.57 g CuSO₄、1.61 g CoCl₂，加 1 L 超纯水溶解，pH 7.0。

EDTA、乙酸钠和氯化铵，上海麦克林生化科技股份有限公司。高压灭菌锅，上海申安医

疗器械厂；笔式盐度计，衡欣科技(深圳)股份有限公司；流动注射分析仪，DeChem-Tech. GmbH 公司。

1.2 方法

1.2.1 好氧反硝化聚磷菌株的筛选与鉴定

异染颗粒是聚磷菌的营养贮藏物，贮藏高能磷酸盐，主要组成部分是多聚偏磷酸，因其对碱性染料亲和性强，通过异染颗粒染色液染色后可观察到清晰的黑色物质，从而可判断菌株是否具有聚磷作用^[31]。聚-β-羟基丁酸(poly-β-hydroxybutyric acid, PHB)则属于类脂质的碳源类储存物，是聚磷菌用以合成储能物质，PHB 的降解代谢为生物合成提供碳源，并通过三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)，为细胞活动和聚对苯二甲酰对苯二甲胺(poly-p-phenylene terephthamide, Poly-P)大量合成提供能量^[32-33]。尼罗蓝是一种荧光染料，能特异性地对 PHB 进行染色，通过荧光显微镜观察荧光的强弱来判断 PHB 的含量。因此通过异染颗粒和 PHB 染色共同鉴定所筛选菌为好氧反硝化聚磷菌。

异染颗粒染色：在超净台中将涂片固定，加甲液染 5 min，倒去甲液，用乙液冲去甲液，用乙液染 1 min，水洗，吸干后进行镜检。

PHB 定性染色：将尼罗蓝的丙酮溶液稀释至 0.25 mg/L，将细胞涂于载玻片上，用火焰固定。冷却后加入一滴尼罗蓝溶液，放入 50 °C 烘箱中，待烘干后用 8%冰醋酸脱色 1 min，然后用蒸馏水清洗，加盖玻片后置于荧光显微镜的激发白光 WB 的 450–480 nm 波长下观察^[34]。

将经过异染颗粒和 PHB 染色鉴定后，对具有黑色颗粒和荧光的菌株进行聚磷性能的初步鉴定。将菌株 E43、J1 和 F2 分别接种于 LB 液体培养基中，30 °C、200 r/min 培养 24 h 制备种子液，确保种子液的 OD₆₀₀≈0.5。随后取 2 mL

种子液接种在富磷培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 30 h, 之后取 5 mL 培养菌液在 8 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min, 收集上清液测定培养液中剩余 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的浓度。

1.2.2 好氧反硝化聚磷菌最佳除氮除磷效率所需环境条件的确定

将菌株 E43、J1 和 F2 分别接入缺磷培养基中进行预培养, 培养物在摇床上 30 °C、200 r/min 预培养 24 h 后 8 000 r/min 离心 10 min, 用无菌超纯水洗涤菌体细胞, 再次离心后菌液保存备用。

活化种子液制备: 取少量目标细菌菌液接种于 25 mL 异养硝化培养基中, 200 r/min、30 °C 培养过夜, 制备目标细菌活化种子液($OD_{600}\approx 0.5$)。

首先于超净台中分别接种 3 mL 种子液, 采用单因素试验法设置各菌株在不同类型碳源(葡萄糖、蔗糖、果糖、乙酸钠和柠檬酸钠)、初始盐度(0‰、10‰、20‰和 30‰)、碳氮比(C/N)(2、4、6、8 和 10)、氮源(NH_4Cl 、 KNO_3 和 NaNO_2)、氮磷比(N/P)(5、15、30 和 60)等因素下 30 °C、200 r/min 振荡培养 48 h, 每隔 8 h 取 5 mL 培养菌液在 8 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min, 收集上清液测定培养液中剩余的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的浓度, 每组试验做 3 个重复。

1.2.3 响应面优化菌群配比设计

利用筛选鉴定到的耐盐好氧反硝化聚磷菌, 根据耐盐好氧反硝化聚磷菌最佳除氮除磷效率的环境条件, 运用 Design-Expert 10.0.7.0

软件设计响应面实验方案, 分别选择菌株 E43、J1、F2 的接种量为自变量, 以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率为响应值, 采用 Box-Behnken 法设计三因素三水平的响应面配比分析试验, 每种菌的最低添加比例和最高添加比例均为 1% 和 5%。具体步骤为添加不同比例的菌株种子液于富氮富磷培养基中, 在 30 °C、200 r/min 条件下振荡培养, 48 h 后取 5 mL 培养菌液在 8 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min 收集上清液, 测定培养液中剩余 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的浓度来计算每个配比方案菌群的除氮、除磷率。

1.2.4 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 含量的测定与数据分析

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的含量均使用流动注射分析仪进行测定, 所得数据均利用 Excel 与 Origin 2021b 计算分析。

2 结果与分析

2.1 好氧反硝化聚磷菌的筛选鉴定

本研究中 5 株菌均为实验室前期鉴定出的异养硝化-好氧反硝化菌, 通过异染颗粒染色和 PHB 染色验证是否为聚磷菌, 结果见图 1。

五株菌中 E43、F2 和 J1 的异染颗粒染色和 PHB 染色均出现黑色颗粒和荧光, 即可确定菌株 E43、F2 与 J1 具有聚磷能力。在前期的研究中这 3 株菌均被鉴定为耐盐的异养硝化-好氧反硝化菌^[30], 因此可将这 3 株菌鉴定为好氧反硝化聚磷菌。

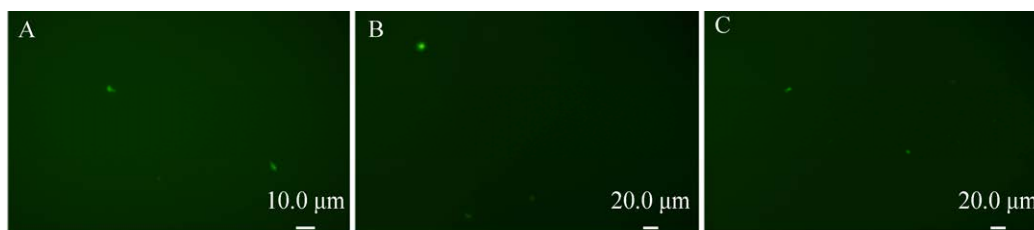


图 1 菌株 E43 (A)、J1 (B) 和 F2 (C) 的 PHB 染色结果

Figure 1 PHB staining results of strain E43 (A), J1 (B) and F2 (C).

随后对 3 株菌及阳性对照菌聚磷性能进行比较研究,发现菌株 E43、J1 和 F2 的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率分别为 $(71.03\pm 0.24)\%$ 、 $(77.04\pm 0.42)\%$ 和 $(73.50\pm 3.10)\%$, 阳性对照菌的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率则为 $(66.04\pm 0.88)\%$, 即可初步判断除磷能力大小为 $\text{J1} > \text{F2} > \text{E43} > \text{阳性对照菌}$ 。

2.2 好氧反硝化聚磷菌的单因素试验结果

2.2.1 不同碳源对菌株除氮除磷的效果

对比 E43、J1 和 F2 这 3 株菌对碳源(葡萄糖、蔗糖、果糖、乙酸钠和柠檬酸钠)的利用情况(图 2, 图 3)可知,乙酸钠更利于菌株进行脱氮除磷,3 株菌的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的平均降解率达到

94.70%, 对于 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的平均降解率达到 95.77%。乙酸钠作为小分子碳源更容易为微生物所利用,3 株菌均在以乙酸钠为碳源时实现了最佳的除氮除磷效率且无亚硝酸的累积,说明菌株的硝化与反硝化作用较强。本研究结果与蔡曼莎等^[35]、鲍林林等^[36]的研究结果一致。可见菌株 E43、J1 和 F2 的最佳碳源为乙酸钠。

2.2.2 不同氮源对菌株除氮除磷的效果

对比 E43、J1 和 F2 这 3 株菌对不同氮源(NH_4Cl 、 KNO_3 和 NaNO_2)的利用情况(图 4)可知,在以 NH_4Cl 为氮源时,3 株菌的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 平均降解率能达到 96.70%,3 种氮源中最佳;同时,

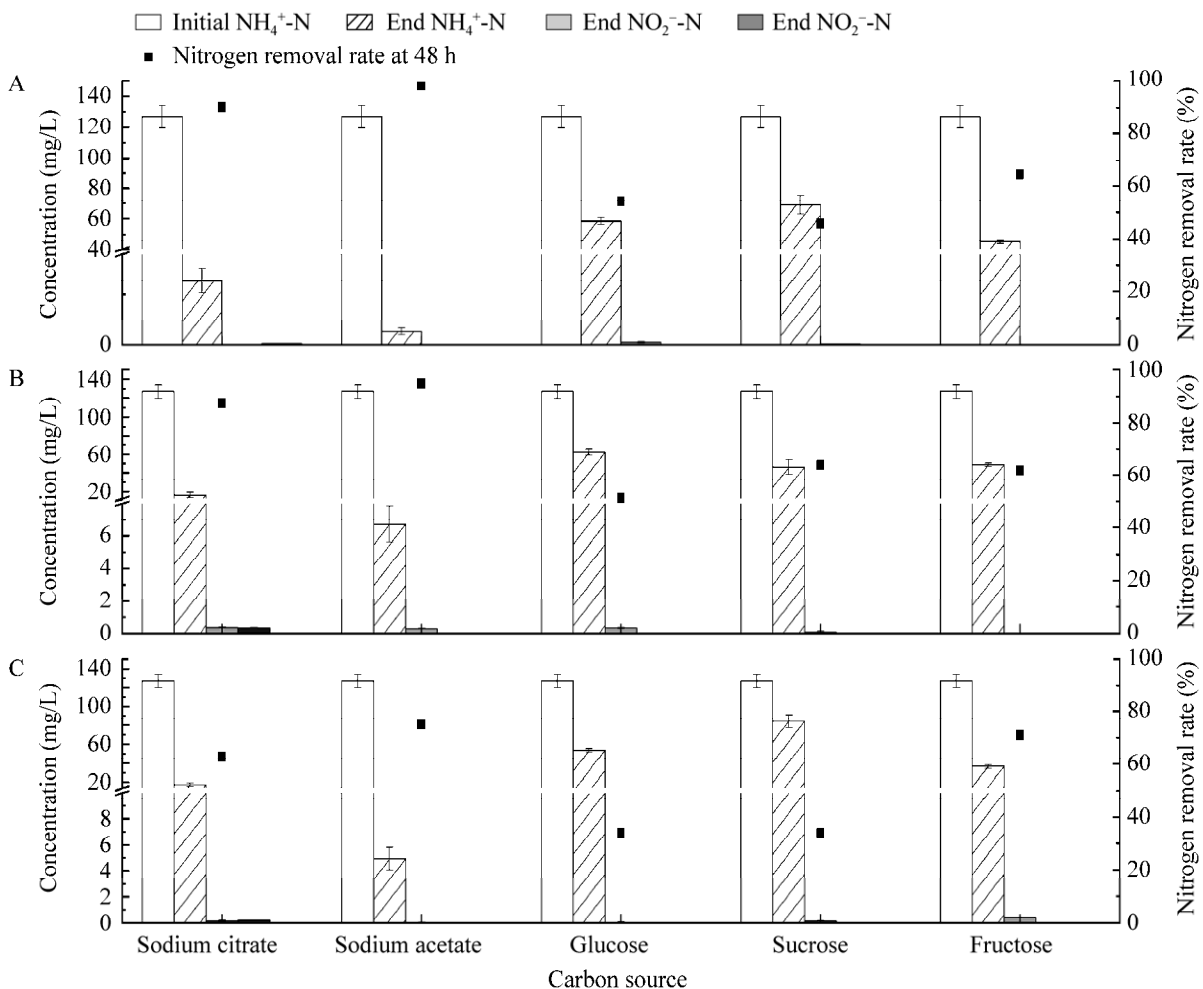


图 2 不同碳源对菌株 E43 (A)、J1 (B)和 F2 (C)脱氮效率的影响

Figure 2 The effects of different carbon sources on nitrogen removal rate of strain E43 (A), J1 (B) and F2 (C).

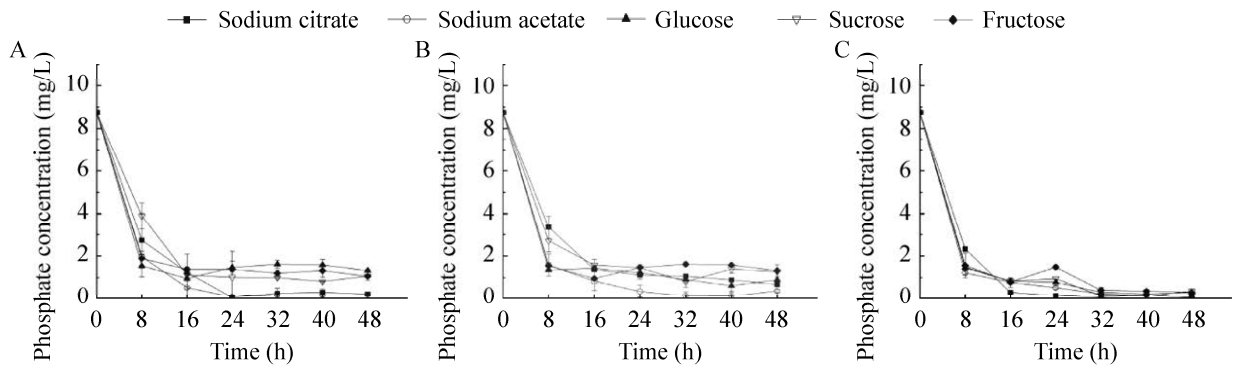


图 3 不同碳源对菌株 E43 (A)、J1 (B)和 F2 (C)这 3 株菌除磷效率的影响

Figure 3 The effects of different carbon sources on phosphorus removal rate of strain E43 (A), J1 (B) and F2 (C).

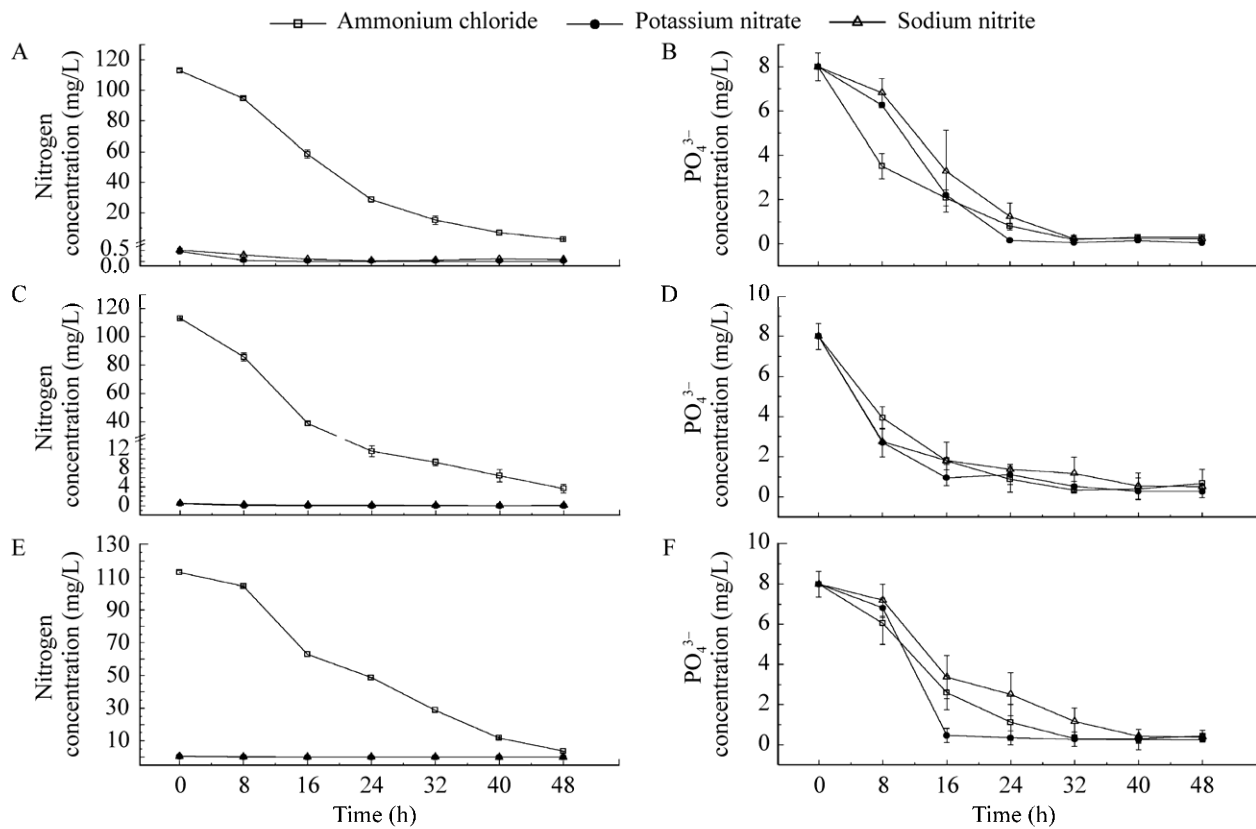


图 4 不同氮源对菌株 E43 (A、B)、J1 (C、D)和 F2 (E、F)除氮、除磷效率的影响 A、B: 分别为不同氮源条件下菌株 E43 的除氮和除磷效率. C、D: 分别为不同氮源条件下菌株 J1 的除氮和除磷效率. E、F: 分别为不同氮源条件下菌株 F2 的除氮和除磷效率.

Figure 4 The effects of different nitrogen sources on nitrogen and phosphorus removal rate of strain E43 (A, B), J1 (C, D) and F2 (E, F). A, B: The nitrogen and phosphorus removal rate of strain E43 under different nitrogen source conditions. C, D: The nitrogen and phosphorus removal rate of strain J1 under different nitrogen source conditions. E, F: The nitrogen and phosphorus removal rate of strain F2 under different nitrogen source conditions.

3种氮源对于菌株 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的去除效率相近, 平均降解率达到 96.57%。在不同氮源条件下, 由于微生物体内利用 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的酶具有高效的催化作用, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 作为无机氮源会比其他氮源更容易被微生物快速利用, 从而满足细菌快速生长的需求^[37]。本研究结果与肖倩^[38]的研究结果一致。可见菌株 E43、J1 和 F2 的最佳氮源为 NH_4Cl 。

2.2.3 碳氮比对菌株除氮除磷的效果

当 C/N 从 2 逐渐升至 6 时, E43、J1 和 F2 这 3 株菌对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除作用不断增强且平均降解率达到 90.00%, 其中菌株 E43 和 J1 能达到 96.00% 以上, 但升至 8 时 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除效率有所下降(图 5), 除氮的研究结果与 Xu 等^[39]相似。E43、J1 和 F2 这 3 株菌在 C/N 为 2 时除磷效果均不佳, 平均降解率分别为 76.55%、68.86%

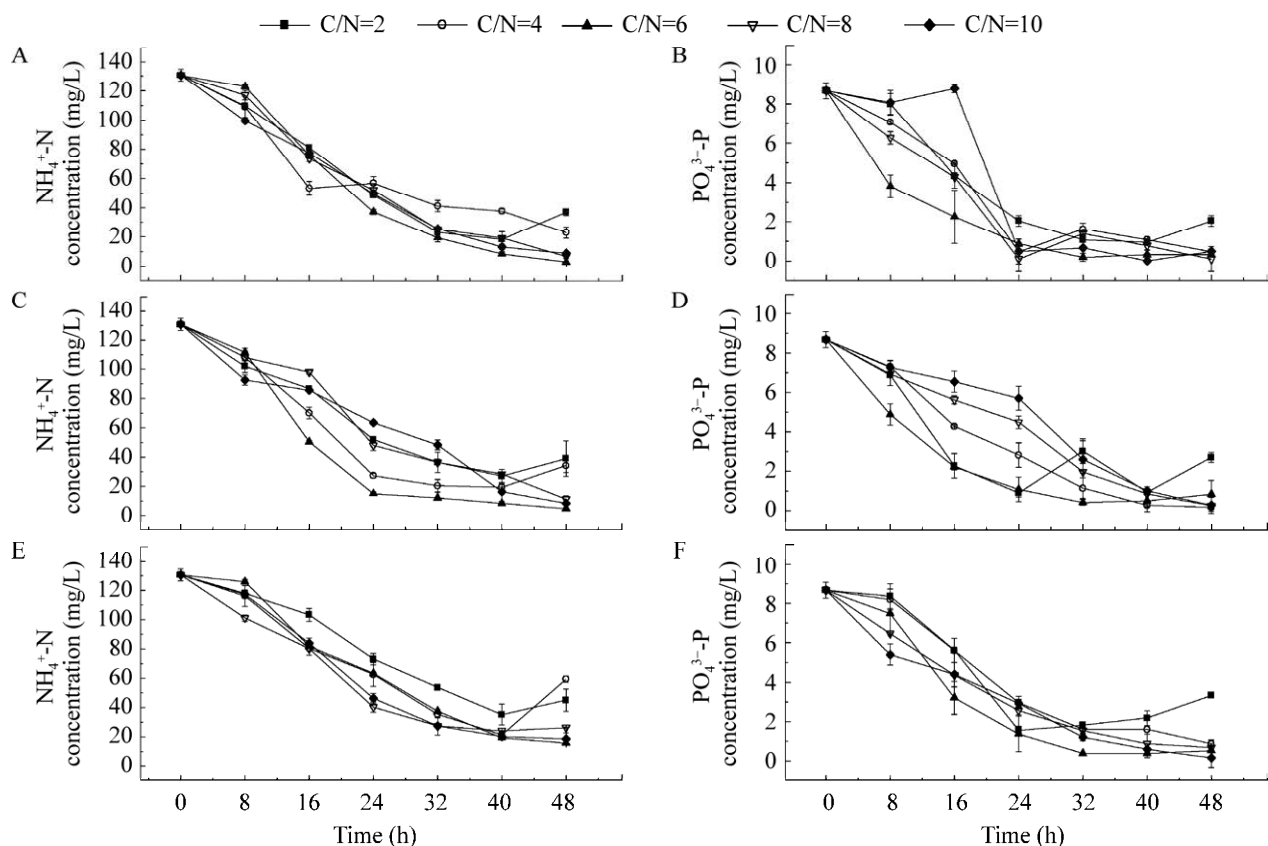


图 5 不同碳氮比对菌株 E43 (A、B)、J1 (C、D) 和 F2 (E、F) 除氮、除磷效率的影响 A、B: 分别为菌株 E43 在不同碳氮比下对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的除氮和除磷效率. C、D: 分别为菌株 J1 在不同碳氮比下对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的除氮和除磷效率. E、F: 分别为菌株 F2 在不同碳氮比下对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的除氮和除磷效率

Figure 5 The effects of different C/N ratio on nitrogen and phosphorus removal rate of strain E43 (A, B), J1 (C, D) and F2 (E, F). A and B represent the nitrogen and phosphorus removal rate of strain E43 on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ under different carbon to nitrogen ratios. C and D represent the nitrogen and phosphorus removal rate of strain J1 on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ under different carbon to nitrogen ratios. E and F represent the nitrogen and phosphorus removal rate of strain F2 on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ under different carbon to nitrogen ratios.

和 61.60%, 但随着 C/N 的不断增加, 除磷效率有所增高但变化不大, 均能达到 89.93% 以上。综合比较后选择 C/N 为 6 作为 3 株菌的最佳碳氮比。

2.2.4 氮磷比对菌株除氮除磷的效果

如图 6 所示, 当 N/P 逐渐升高时, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的降解率能达到 100%, 说明当环境中存在充足的电子受体时, 好氧反硝化聚磷菌可以实现对

$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的高效去除, 但与此同时也会大幅降低对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的降解率(图 6)。当 N/P 为 60 时, E43、J1 和 F2 这 3 株菌对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的平均降解率分别只有 63.84%、60.82% 和 72.65%; 而当 N/P 为 15 时, 此时 E43、J1 和 F2 这 3 株菌的除氮、除磷效果得到较好的平衡, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的平均降解率能达到 97.00% 和 84.00%。综合比较后选择 N/P 为 15 作为 3 株菌的最佳氮磷比。

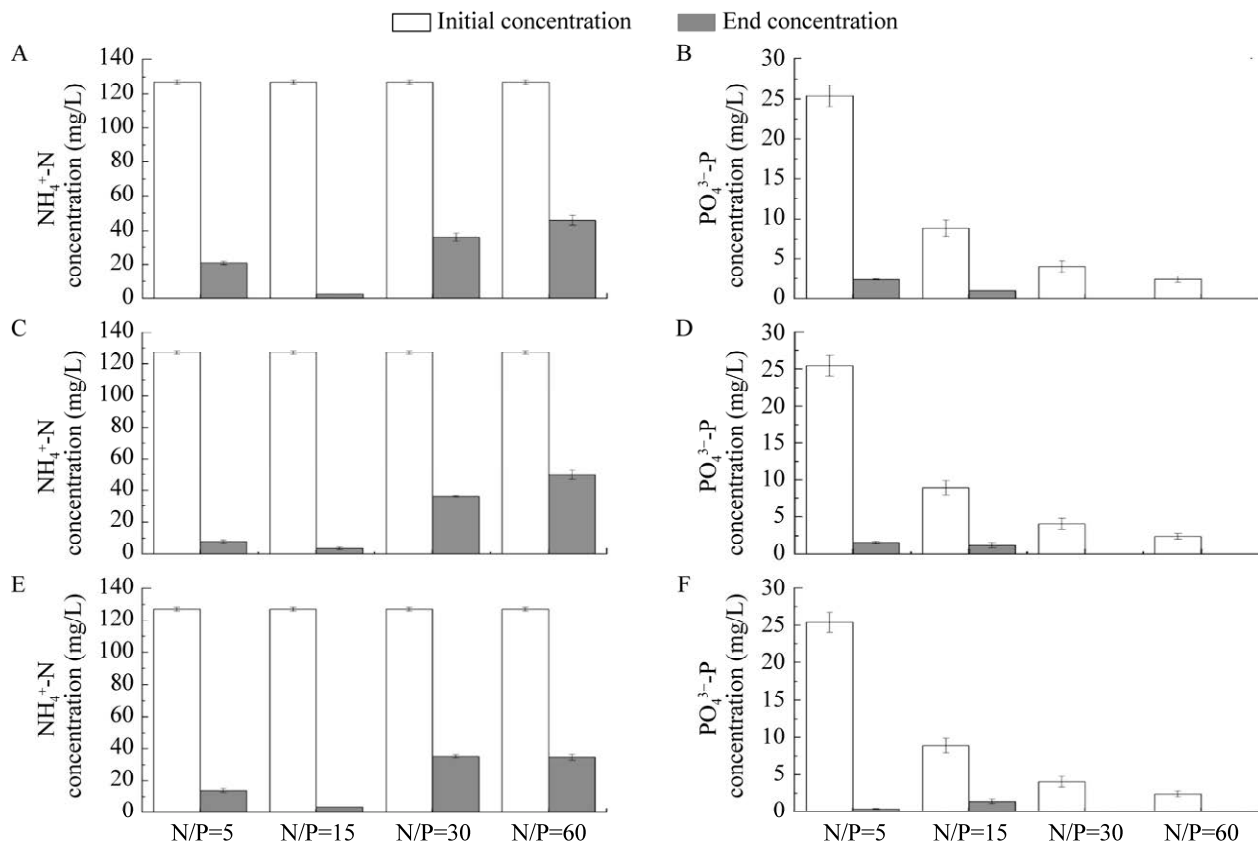


图 6 不同氮磷比对菌株 E43 (A、B)、J1 (C、D) 和 F2 (E、F) 除氮、除磷效果的影响 A、B: 分别为菌株 E43 在不同氮磷比时对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的除氮和除磷效率. C、D: 分别为菌株 J1 在不同氮磷比时对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的除氮和除磷效率. E、F: 分别为菌株 F2 在不同氮磷比时对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的除氮和除磷效率

Figure 6 The effects of different N/P ratios on nitrogen and phosphorus removal rate of strain E43 (A, B), J1 (C, D) and F2 (E, F). A, B: The nitrogen and phosphorus removal rate of strain E43 on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ at different nitrogen to phosphorus ratios. C, D: The nitrogen and phosphorus removal rate of strain J1 on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ at different nitrogen to phosphorus ratios. E, F: The nitrogen and phosphorus removal rate of strain F2 on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ at different nitrogen to phosphorus ratios.

2.2.5 盐度对菌株除氮除磷的效果

E43、J1 和 F2 这 3 株菌在盐度范围为 0‰–30‰之间均能生长, 在盐度为 0‰时, 除氮除磷效率并不高, 随着盐度的升高, 除氮除磷效率也在上升, 在盐度为 20‰时, 48 h 时

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的平均降解率达到最大值, 分别为 94.82%、96.00%以上(图 7), 但在盐度为 30‰下, 除氮除磷效率开始下降。本研究结果与张培玉等^[40]的研究结果一致。可见菌株 E43、J1 和 F2 的最佳盐度为 20‰。

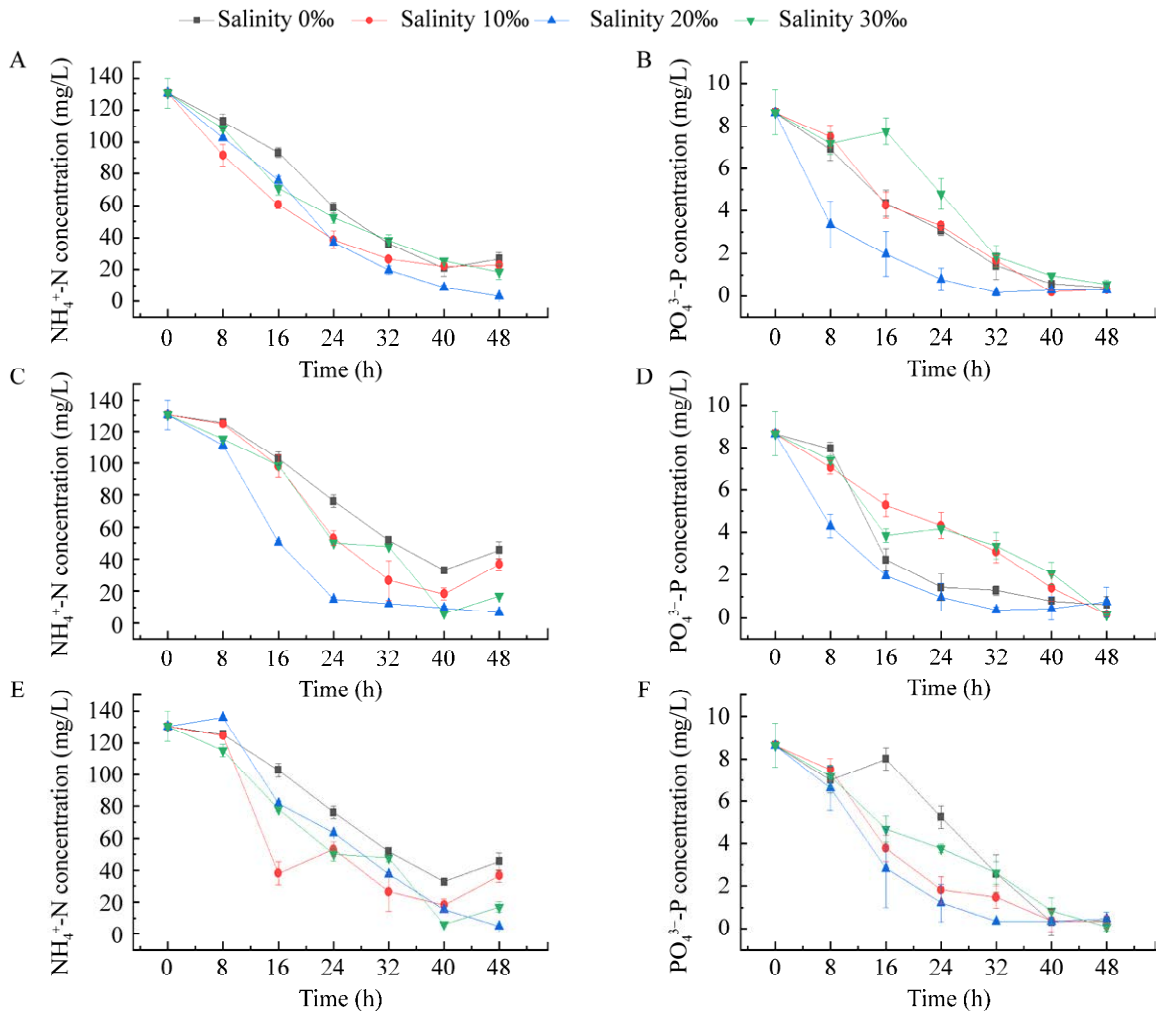


图 7 不同盐度对菌株 E43 (A、B)、J1 (C、D)和 F2 (E、F)除氮、除磷效果的影响 A、B: 分别为菌株 E43 在不同盐度时对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的除氮和除磷效率. C、D: 分别为菌株 J1 在不同盐度时对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的除氮和除磷效率. E、F: 分别为菌株 F2 在不同盐度时对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的除氮和除磷效率

Figure 7 The effects of different salinities on nitrogen and phosphorus removal rate of strain E43 (A, B), J1 (C, D) and F2 (E, F). A, B: The nitrogen and phosphorus removal rate of strain E43 on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ at different salinities. C, D: The nitrogen and phosphorus removal rate of strain J1 on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ at different salinities. E, F: The nitrogen and phosphorus removal rate of strain F2 on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ at different salinities.

综合以上结果可知 E43、J1、F2 这 3 株菌的最佳脱氮除磷条件为: 碳源为乙酸钠、盐度为 2%、C/N 为 6、氮源为 NH_4Cl 、N/P 为 15。在该条件下, 初始 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度为 (113.03 ± 1.13) mg/L、初始 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度为 (7.99 ± 0.64) mg/L 时, E43 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率为 98.02%, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率为 88.76%; J1 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率为 97.12%, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率为 86.52%; F2 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率为 97.07%, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率为 84.27%。3 株菌 E43、J1 和 F2 对环境条件的要求相似, 这为构建菌群提供了有利条件。

2.3 响应面试验结果分析

2.3.1 Box-Behnken 试验结果

Box-Behnken 试验结果如表 1 所示, 共 17 组试验。17 个试验点可分为 2 种类型: 一种是析因点, 共有 12 个不同的析因点; 另一种是

以零点为中心进行 5 次零点试验, 以此来估算试验的误差。

2.3.2 响应面优化数据分析

利用 Design-Expert 10.0.7.0 软件对响应面试验结果进行二次线性回归拟合, 得到 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ [公式(1)]和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ [公式(2)]去除率数学模型式, 响应模型方程如下:

$$Y(N) = 62.31 - 3.06A - 7.55B - 4.22C + 4.01AB + 1.86AC - 6.65BC + 2.05A^2 + 11.55B^2 - 1.56C^2 \quad (1)$$

$$Y(P) = 88.23 - 11.45A + 1.23B + 2.17C + 11.23AB + 14.80AC - 22.06BC - 7.70A^2 - 13.98B^2 - 9.59C^2 \quad (2)$$

式中 $Y(N)$ 和 $Y(P)$ 为菌群对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率的预测响应值; 自变量 A 、 B 和 C 分别为菌株 E43、J1 和 F2 接种比例。

两个回归模型的方差分析结果见表 2。表 2 中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率的回归模型 $P=0.0094$ (<0.01) 且 $F=6.87$, 说明该模型是极显著的。

表 1 响应面分析试验方案与结果

Table 1 Experimental scheme and results of RSM

方案 Programme	A: 菌株 E43 添加比例 A: Addition proportion of strain E43 (%)	B: 菌株 J1 添加比例 B: Addition proportion of strain J1 (%)	C: 菌株 F2 添加比例 C: Addition proportion of strain F2 (%)	除氮率 Nitrogen removal rate (%)	除磷率 Phosphorus removal rate (%)
1	5	5	3	69.71	67.15
2	3	5	5	54.04	43.65
3	5	3	1	58.88	42.72
4	5	3	5	56.82	79.23
5	3	3	3	59.37	85.99
6	3	1	5	79.44	87.44
7	3	3	3	54.38	86.47
8	5	1	3	79.81	40.10
9	3	3	3	65.94	89.86
10	1	3	5	63.02	69.57
11	3	5	1	78.47	85.99
12	3	3	3	65.94	88.89
13	3	3	3	65.94	89.92
14	1	5	3	63.99	70.53
15	3	1	1	77.25	41.55
16	1	1	3	90.15	88.41
17	1	3	1	72.51	92.27

表 2 除氮率与除磷率方差分析

Table 2 Variance analysis of nitrogen and phosphorus removal rate

来源 Source	平方和 Sum of squares		自由度 Degree of freedom		方差 Variance		F 值 F value		P 值 Prob>F P value		显著性 Significance	
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
Model	1 523.61	6 042.66	9	9	169.29	671.41	6.87	87.56	0.009 4	<0.000 1	**	**
A: E43	74.74	1 048.47	1	1	74.74	1 048.47	3.04	136.74	0.125 0	<0.000 1		**
B: J1	456.59	12.08	1	1	456.59	12.08	18.54	1.58	0.003 5	0.249 7	**	
C: F2	142.77	37.66	1	1	142.77	37.66	5.80	4.91	0.046 9	0.062 2	*	
AB	64.47	504.62	1	1	64.47	504.62	2.62	65.81	0.149 7	<0.000 1		**
AC	13.77	876.67	1	1	13.77	876.67	0.56	114.33	0.479 0	<0.000 1		**
BC	177.13	1 946.43	1	1	177.13	1 946.43	7.19	253.84	0.031 5	<0.000 1	*	**
A ²	17.75	249.37	1	1	17.75	249.37	0.72	32.52	0.424 0	0.000 7		**
B ²	561.51	823.43	1	1	561.51	823.43	22.80	107.39	0.002 0	<0.000 1	**	**
C ²	10.25	386.90	1	1	10.25	386.90	0.42	50.46	0.539 4	0.000 2		**
Error	172.38	53.67	7	7	24.63	7.67						
Lack of fit	61.37	39.63	3	3	20.46	13.21	0.74	3.76	0.582 4	0.116 5		
Pure error	111.01	14.04	4	4	27.75	3.51						
Total	1 695.99	6 096.33	16	16								

*: $P < 0.05$, 差异显著; **: $P < 0.01$, 差异极显著; N: 除氮率; P: 除磷率. 下同

*: Significant value ($P < 0.05$); **: Extremely significant value ($P < 0.01$); N for nitrogen removal rate; P for phosphorus removal rate. The same below.

失拟项(lack of fit) Prob>F 为 0.582 4 (>0.05), 失拟项不显著。模型中的 B 和 B² 对除氮率影响极显著($P < 0.01$), 而 C 和 BC 对除氮率影响显著($P < 0.05$)。PO₄³⁻-P 去除率的回归模型 $P < 0.000 1$ 且 $F = 87.56$, 说明该模型是极显著的。失拟项 Prob>F 为 0.116 5 (>0.05), 失拟项不显著。模型中的 A、AB、AC、BC、A²、B² 和 C² 对除磷率影响极显著($P < 0.01$), 而 B 和 C 对除磷率影响不显著($P > 0.05$)。以上数据表明除氮率和除磷率的回归模型在整个回归区域的拟合度很好, 接近真实的响应曲面情况, 模型建立合理。

两个回归模型的可信性分析结果见表 3。CV (变异系数) 表示模型的精确度, CV 值越高, 模型可信度越低。如表 3 所示, 本试验的除氮率模型中 CV=7.30%, 小于 10%, 说明模型精确度可信; Adeq Precision 为测量信噪比, 其大于 4 的比例为理想。本试验的 NH₄⁺-N 去除率模

型比率为 9.635, 表示信号充足, 说明该模型可行。除磷率模型中 CV=3.77%, 小于 10%, 说明模型精确度可信; $R^2 = 0.991 2$ 说明模型拟合度较好, Adj $R^2 = 0.979 9$, Pred $R^2 = 0.892 4$, 二者相差小于 0.2, 且模型的测量信噪比为 26.288,

表 3 除氮与除磷模型可信性分析

Table 3 Reliability analysis of nitrogen and phosphorus removal models

Factor	N	P
Std. Dev.	4.96	2.77
Mean	67.98	73.51
CV (%)	7.30	3.77
PRESS	1 155.41	656.06
-2 Log-likelihood	87.62	67.79
R ²	0.898 4	0.991 2
Adj R ²	0.767 7	0.979 9
Pred R ²	0.318 7	0.892 4
Adeq Precision	9.635	26.288
BIC	115.96	96.12
AICc	144.29	124.46

说明该模型可信度高。

随后利用 Design-Expert 10.0.7.0 软件绘制菌群配比条件的三维响应曲面图, 响应面图中的等高线形状和曲面坡度可以直接反映出两个因素之间交互作用的强弱, 等高线越接近椭圆形且曲面坡度越陡, 两者之间的交互作用就越显著, 等高线越接近圆形且曲面坡度平缓, 两者之间的相互作用就越小^[28]。由图 8-10

可以看出, 菌株 E43、J1 和 F2 两两之间的等高线都为椭圆形, 说明相互之间均对 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率影响显著。响应面图均为开口向下的凸面, 因此响应值 R 存在极大值。因此, 根据 Design-Expert 软件得出菌群 E43:J1:F2 最佳降解投加比例为 1.000:1.017:3.945, 模型对于菌群的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率预测值分别为 90.15%和 90.37%。

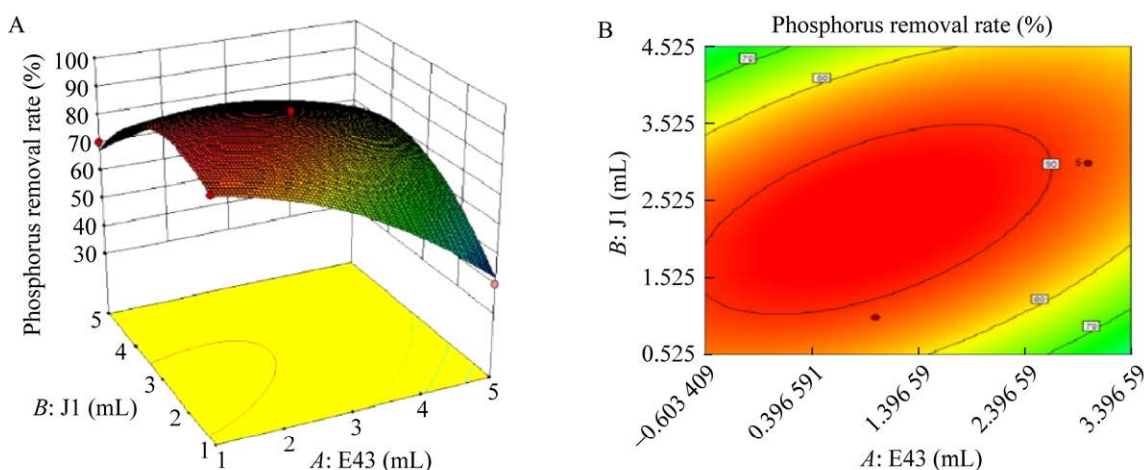


图 8 E43 与 J1 投加量交互影响除磷率的响应面图(A)及等高线图(B)

Figure 8 Response surface (A) and interaction contour (B) of the interaction of E43 and J1 dosage on phosphorus removal rate.

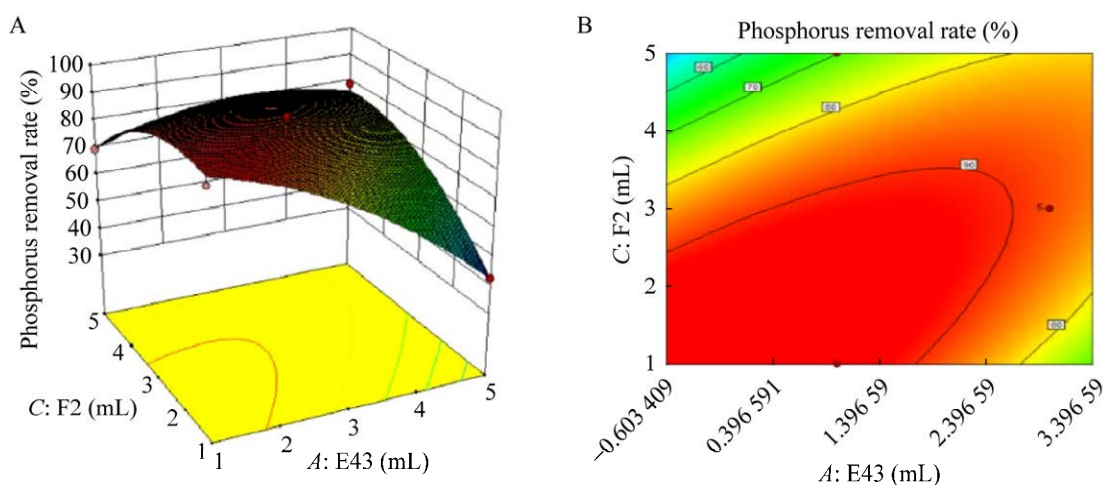


图 9 E43 与 F2 投加量交互影响除磷率的响应面图(A)及等高线图(B)

Figure 9 Response surface (A) and interaction contour (B) of the interaction of E43 and F2 dosage on phosphorus removal rate.

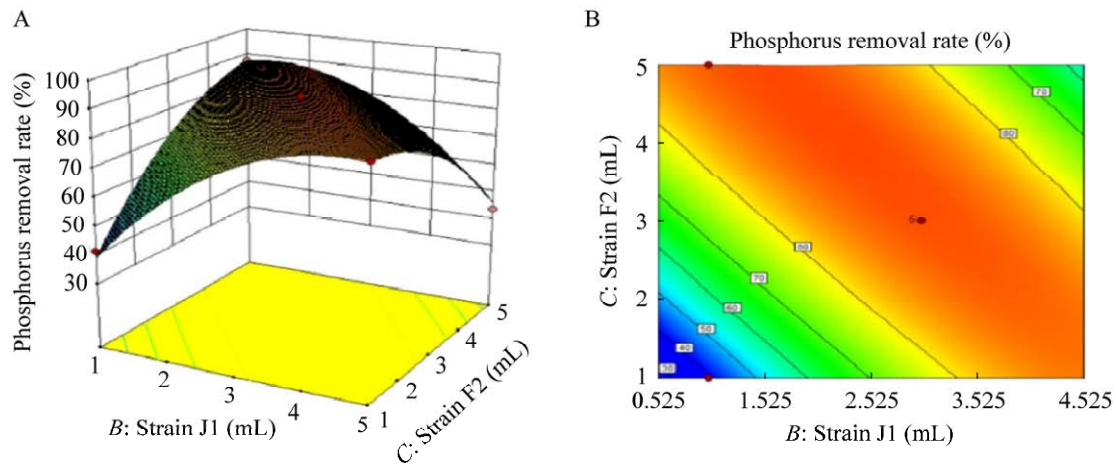


图 10 J1 与 F2 投加量交互影响除磷率的响应面图(A)及等高线图(B)

Figure 10 Response surface (A) and interaction contour (B) of the interaction of J1 and F2 dosage on phosphorus removal rate.

2.3.3 试验结果验证

为了进一步验证该结果的可靠性, 将最佳的菌群配比优化为 E43:J1:F2=1:1:4, 重复 3 次试验。验证结果显示: 优化配比的菌群的平均 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率分别为 91.28% 和 93.03%, 与模型的预测结果拟合度良好。

3 讨论与结论

将前期筛选的 5 株异养硝化-好氧反硝化菌中通过异染颗粒及 PHB 颗粒染色试验, 获得 3 株好氧反硝化聚磷菌株, 分别为肺无色杆菌 (*Achromobacter pulmonis*) E43、食油假单胞菌 (*Pseudomonas oleovorans*) F2 和氧化木糖无色杆菌 (*Achromobacter xylosoxidans*) J1。目前好氧反硝化聚磷菌的单一菌株大部分是从污水处理厂各阶段污泥或城市河道中筛选得到^[41], 而本研究中的 3 株菌 E43、F2 与 J1 是从红树林人工湿地系统中筛选得到, 在前期试验中也证明具有异养硝化-好氧反硝化的功能, 此前未见从红树林人工湿地中筛选出该特定功能菌株的报道^[30]。反硝化聚磷菌的最适生长 pH 值在

7.0–8.0 之间^[42], 红树林人工湿地中 pH 范围则完全符合好氧反硝化聚磷菌的生长, 同时由于前期试验中红树林人工湿地作为筛选环境, 在运行过程中额外添加了充足的碳源为菌株的反硝化过程提供充足的电子受体, 以及充足的氮源来满足菌株的繁殖, 且人工湿地的上层是属于好氧环境, 具有充足的溶解氧, 使菌株能完整地实现反硝化脱氮和过量摄磷 2 个过程。可见, 正是由于红树林人工湿地中适宜的环境条件筛选到具有耐盐能力的好氧反硝化聚磷菌。在本研究中菌株 E43 被发现具有聚磷功能, 有研究表明菌株 E43 可降解石油^[43]并具有反硝化作用^[34], 但未见报道其具有聚磷功能。本研究丰富了该种属的生物信息, 为生物脱氮除磷提供了一个可利用的生物资源。然而对于菌株 F2 和 J1, 目前已有研究证明 F2 和 J1 可以同时脱氮除磷^[44-47]。

菌株 E43、J1 和 F2 在乙酸钠为唯一碳源、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为最佳氮源、盐度为 2%、C/N 比为 6、N/P 为 15 的环境条件下, 实现了最佳除氮、除磷效果。靳茹^[6]从某生活污水处理厂好氧池分离

出一株好氧反硝化聚磷菌 *Escherichia coli* J16, 在最佳培养条件下, 富氮富磷培养基的上清液 NO_3^- -N 浓度从 69.31 mg/L 降低到 4.08 mg/L, 脱氮率最高可达 94.11%; 上清液 PO_4^{3-} -P 浓度从 8.9 mg/L 降低到 0.35 mg/L, 除磷率最高可达 96.06%。与其他研究相比, 菌株 E43、J1 和 F2 可以在初始 NH_4^+ -N 浓度为(113.03±1.13) mg/L、初始 PO_4^{3-} -P 浓度为(7.99±0.64) mg/L, 在初始氮浓度更高的情况下, 也可以达到较好的除氮、除磷效果; 同时 3 株菌具有良好的耐盐能力, 在 2% 的盐度条件下仍能高效地去除 NH_4^+ -N 和 PO_4^{3-} -P, 去除率与淡水内进行好氧反硝化聚磷菌特性试验的马放等^[9]和 Xu 等^[11]的研究结果相近。

本研究利用响应面法对筛选出的 3 株好氧反硝化聚磷菌进行分析, 通过 Design-Expert 软件设计出 17 组不同菌群配比的试验方案, 分别得出菌群配比对 NH_4^+ -N 去除效率与除磷效率的二次回归模型, 分析菌株 E43、J1 和 F2 的交互影响, 确定最优降解投加量为 E43:J1:F2 体积比为 1:1:4, NH_4^+ -N 和 PO_4^{3-} -P 的去除率分别为 91.28% 和 93.03%。相较于单一菌株, 菌群的构建提高了对 PO_4^{3-} -P 的去除率。

菌群的构建, 特别是针对具有特定功能菌群的构建是目前的研究热点, 随着微生物组学技术的发展, 已经成为了一个新兴的研究方向。将具有特定功能且无拮抗作用的菌株进行组合, 通过不同菌株间的功能互补构建高效的菌群, 在污染物的去除方面存在较大的潜力^[24]。相较于单一菌种, 菌群具备更多的优势, 如能够提高对环境污染物的去除效率; 通过菌种间的相互协同作用能够降低单一菌种的代谢负担; 能够提高对环境条件变化的抵抗能力, 减轻环境条件的胁迫等^[48]。聂毅磊等^[49]从养猪场

污水中筛选到 2 株好氧反硝化聚磷菌并应用于人工污水的处理中, 发现随着污水中的磷浓度增加, 2 株菌的磷去除率明显下降, 但 2 株等量配比复合菌的磷去除率高于单株菌; 齐世鑫等^[50]构建了对好氧活性污泥具有强化作用的优势菌群(*B. subtilis*:*B. cereus*:*V. pantothenicus* 质量比为 35%:50%:15%), 当优势菌群投加量为 0.3 g/L 时, 对于 COD_C 的去除率达到 72.9%, 空白组仅有 51.8%, 且缩短了废水处理周期。响应面法是对菌群构建的一次有效尝试, 本研究中构建菌群后提高了对 PO_4^{3-} -P 的去除率, 为后续的应用提供了试验基础, 比如在生物接触氧化池、红树林人工湿地或者活性污泥中进一步开展应用研究。

响应面法在构建菌群方面具有独特的优势, 首先通过三维响应曲面图预测菌株之间交互作用的强弱, 并判断出菌株间的交互作用能否对特定污染物的降解具有显著影响, 从而预测菌群对特定污染物的降解效率; 其次根据响应面法的回归方程预测菌群中各菌株的配比, 并通过验证试验得出菌群的最优配比。随着微生物法处理各类环境污染的广泛应用, 响应面法则可以通过对菌群配比的优化, 在针对重金属污染、高氮磷污染和复杂有机物污染等不同场景实现高效功能菌群的构建与应用。但在实际污染环境中, 各种环境因素都会对菌群功能产生影响, 所以对于菌群的功能稳定性还需要进一步的研究。

科学地构建菌群能带来诸多优势, 但菌群的构建面临着较多的挑战, 如何构建高效的菌群并保持菌群的高效性, 仍存在较多需要解决的问题:(1) 如何获取和筛选具有特定功能的单一菌株;(2) 如何构建菌群及调控不同菌株间的相互关系, 提高菌群的代谢能力;(3) 自然环境

条件如何保持菌群的稳定性;(4) 污水中微生物成分复杂, 如何降低其他微生物种类对菌群的干扰等。

致谢

感谢深圳大学生命与海洋科学学院仪器设备共享平台的支持。

REFERENCES

- [1] 马志洲, 欧小华. 广东省海水养殖现状与持续发展[J]. 海洋与渔业, 2018(7): 90-93.
MA ZZ, OU XH. Present situation and sustainable development of marine aquaculture in Guangdong Province[J]. Ocean and Fishery, 2018(7): 90-93 (in Chinese).
- [2] CAMPBELL B, PAULY D. Mariculture: a global analysis of production trends since 1950[J]. Marine Policy, 2013, 39: 94-100.
- [3] HE HJ, CHEN YJ, LI X, CHENG Y, YANG CP, ZENG GM. Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: a review[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017, 119: 520-527.
- [4] ZHANG HN, WANG HQ, JIE MR, ZHANG KF, QIAN YX, MA JQ. Performance and microbial communities of different biofilm membrane bioreactors with pre-anoxic tanks treating mariculture wastewater[J]. Bioresource Technology, 2020, 295: 122302.
- [5] DINÇER AR, KARGI F. Effects of operating parameters on performances of nitrification and denitrification processes[J]. Bioprocess Engineering, 2000, 23(1): 75-80.
- [6] 靳茹. 高效好氧反硝化聚磷菌的分离鉴定及脱氮除磷影响因素分析[D]. 太原: 太原科技大学硕士学位论文, 2018
JIN R. Isolation and identification of efficiently aerobic denitrifying phosphorus removing bacteria and analysis of the factors influencing denitrification and phosphorus removal[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Taiyuan University of Science and Technology, 2018 (in Chinese).
- [7] KUBA T, SMOLDERS G, van LOOSDRECHT MCM, HEIJNEN JJ. Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor[J]. Water Science and Technology, 1993, 27(5-6): 241-252.
- [8] KUBA T, LOOSDRECHT M, HEIJNEN JJ. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system[J]. Water Research, 1996, 30(7): 1702-1710.
- [9] 马放, 杨菲菲, 张倩, 李昂, 姜欣欣, 张晓昕. 一株高效反硝化聚磷菌的筛选及脱氮除磷效能[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2011, 43(12): 42-47.
MA F, YANG FF, ZHANG Q, LI A, JIANG XX, ZHANG XX. Isolation and identification of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms and its nitrogen and phosphorus removal[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2011, 43(12): 42-47 (in Chinese).
- [10] 安健, 伏光辉, 阮记明, 陈百尧, 龚琪本, 唐兴本, 杨先乐. 反硝化除磷菌筛选及其特性研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 162-171.
AN J, FU GH, RUAN JM, CHEN BY, GONG QB, TANG XB, YANG XL. Studies on the screening of denitrifying and phosphorus removal bacteria and its characteristics[J]. Microbiology China, 2012, 39(2): 162-171 (in Chinese).
- [11] XU HY, JIN R, ZHANG C, WU YP, WANG XH. Isolation and identification of an aerobic denitrifying phosphorus removing bacteria and analysis of the factors influencing denitrification and phosphorus removal[J]. Water Science and Technology: a Journal of the International Association on Water Pollution Research, 2018, 78(11): 2288-2296.
- [12] BAO LL, LI D, LI XK, HUANG RX, ZHANG J, LV Y, XIA GQ. Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system[J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19(4): 391-395.
- [13] 王强, 王继华, 张晓琦, 姜欣欣, 杜丛, 马放. 一株反硝化聚磷菌生长及脱氮除磷特性[J]. 化工学报, 2010, 61(6): 1540-1544.
WANG Q, WANG JH, ZHANG XQ, JIANG XX, DU C, MA F. Growth and characteristics of nitrogen and phosphorus removal of a denitrifying phosphate accumulating bacteria[J]. Ciesc Journal, 2010, 61(6): 1540-1544 (in Chinese).
- [14] DIEP CN, CAM PM, VUNG NH, LAI TT, MY NTX. Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of

- catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(16): 3787-3791.
- [15] LI HF, LI BZ, WANG ET, YANG JS, YUAN HL. Removal of low concentration of phosphorus from solution by free and immobilized cells of *Pseudomonas stutzeri* YG-24[J]. *Desalination*, 2012, 286: 242-247.
- [16] PAULO AMS, PLUGGE CM, GARCÍA-ENCINA PA, STAMS AJM. Anaerobic degradation of sodium dodecyl sulfate (SDS) by denitrifying bacteria[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 84: 14-20.
- [17] VERSALOVIC J, KOEUTH T, LUPSKI R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [18] WANG L, LI J, -L KANG W. Bioremediation of eutrophicated water by *Acinetobacter Calcoaceticus*[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, 78(6): 527-530.
- [19] VANECHOUTTE M, de BAERE T, NEMEC A, MUSÍLEK M, van der REIJDEN TJK, DIJKSHOORN L. Reclassification of *Acinetobacter grimontii* carr et al. 2003 as a later synonym of *Acinetobacter junii* Bouvet and grimont 1986[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(Pt 4): 937-940.
- [20] NEMEC A, MUSÍLEK M, MAIXNEROVÁ M, de BAERE T, van der REIJDEN TJK, VANECHOUTTE M, DIJKSHOORN L. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(Pt 1): 118-124.
- [21] 张千. 基于固相反硝化和吸附除磷的低碳源污水脱氮除磷技术研究[D]. 重庆: 重庆大学博士学位论文, 2016.
- ZHANG Q. Research on nitrogen and phosphorus removal technology of low carbon source wastewater based on solid phase nitrification and adsorption phosphorus removal[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Chongqing University, 2016 (in Chinese).
- [22] 谢蔚鹏, 陈敏. 反硝化聚磷菌株 YH12 的鉴定及脱氮除磷特性[J]. *杭州师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 18(2): 141-145.
- XIE WP, CHEN M. Identification and characteristics of denitrifying phosphate accumulating organisms YH12[J]. *Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 18(2): 141-145 (in Chinese).
- [23] 李慧, 刘丹丹, 陈文清. 反硝化聚磷菌的筛选及脱氮除磷特性[J]. *环境工程*, 2016, 34(4): 25-28, 90.
- LI H, LIU DD, CHEN WQ. Screening of denitrifying phosphate accumulating organisms and its characteristics of nitrogen and phosphorus removal[J]. *Environmental Engineering*, 2016, 34(4): 25-28, 90 (in Chinese).
- [24] 蔡文娟. 强化生物处理生活污水的高效混合菌群筛选及降解特性实验研究[D]. 兰州: 兰州理工大学硕士学位论文, 2021.
- CAI WJ. Experimental study on screening and degradation characteristics of high efficient mixed bacteria for bioaugmentation treatment of domestic sewage[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [25] CHEN R, DOU J. Biofuels and bio-based chemicals from lignocellulose: metabolic engineering strategies in strain development[J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(2): 213-221.
- [26] KHURI AI, MUKHOPADHYAY S. Response surface methodology[J]. *WIREs Computational Statistics*, 2010, 2(2): 128-149.
- [27] 安卫娟, 钟敏, 张庆华, 邹金琦, 柯淑芬, 罗咏琪, 钟春燕, 安雪姣. 响应面分析法优化沙雷氏菌(*Serratia* sp.) AXJ-M 对己烯雌酚的降解[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(11): 4006-4018.
- AN WJ, ZHONG M, ZHANG QH, ZOU JQ, KE SF, LUO YQ, ZHONG CY, AN XJ. Degradation of diethylstilbestrol by *Serratia* sp. AXJ-M was optimized by response surface methodology[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(11): 4006-4018 (in Chinese).
- [28] 刘有华, 王倩楠, 皮乔木, 徐思琪, 安贤惠, 李联泰. 响应面法优化聚磷菌 P6-1 除磷条件研究[J]. *江苏海洋大学学报(自然科学版)*, 2020(3): 13-18.
- LIU YH, WANG QN, PI QM, XU SQ, AN XH, LI LT. Optimization of phosphorus removal conditions by phosphorus-accumulating bacteria P6-1 by response surface methodology[J]. *Journal of Jiangsu Ocean University (Natural Science Edition)*, 2020(3): 13-18 (in Chinese).
- [29] YANG LM, GENG YN, CUI D, LIU ZC, XIONG ZS,

- PAVLOSTATHIS SG, SHAO PH, LUO XB. Corrected response surface methodology for microalgae towards optimized ammonia nitrogen removal: a case of rare earth mining tailings wastewater in Southern Jiangxi, China[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2022, 343: 130998.
- [30] ZHAO L, FU GP, TANG J, WU JF, PANG WC, GUO ZP. Efficient nitrogen removal of mangrove constructed wetlands: enhancing heterotrophic nitrification-aerobic denitrification microflora through quorum sensing[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 430: 133048.
- [31] WIDRA A. Metachromatic Granules of microorganisms[J]. *Journal of Bacteriology*, 1959, 78(5): 664-670.
- [32] 毛世丽, 代群威, 郭军, 李相邑, 李佳, 黄云碧. 1株高效聚磷菌的分离鉴定及固定化应用[J]. *水处理技术*, 2021, 47(1): 59-63.
- MAO SL, DAI QW, GUO J, LI XY, LI J, HUANG YB. Isolation, identification and immobilization of a high-efficiency phosphorus accumulating bacteria[J]. *Technology of Water Treatment*, 2021, 47(1): 59-63 (in Chinese).
- [33] MISRA AK, THAKUR MS, SRINIVAS P, KARANTH NG. Screening of poly-beta-hydroxybutyrate-producing microorganisms using Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22(15): 1217-1219.
- [34] 薛林贵, 赵旭, 景春娥, 常思静. 尼罗蓝在筛选 PHB 高产菌株中的应用研究[J]. *生物技术通报*, 2010(3): 181-184.
- XUE LG, ZHAO X, JING CE, CHANG SJ. Study on the application of Nile blue in selecting of high yielding PHB strain[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(3): 181-184 (in Chinese).
- [35] 蔡曼莎, 吴苇杰, 莫少庆, 李苏琳, 陈鹏, 武昭昌, 王冬, 王少坡. 两种碳源对聚磷菌种群结构及除磷脱氮性能的影响[J]. *环境监测管理与技术*, 2021, 33(4): 65-67, 71.
- CAI MS, WU WJ, MO SQ, LI SL, CHEN P, WU ZC, WANG D, WANG SP. Impact of two carbon sources on PAOs population structure and phosphorus and nitrogen removal performance[J]. *The Administration and Technique of Environmental Monitoring*, 2021, 33(4): 65-67, 71 (in Chinese).
- [36] 鲍林林, 李相昆, 张杰. 碳源类型对反硝化除磷系统的影响[J]. *环境工程学报*, 2011, 5(7): 1567-1571.
- BAO LL, LI XK, ZHANG J. Effect of carbon sources on denitrifying phosphorus removal system[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(7): 1567-1571 (in Chinese).
- [37] FISHER SH. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence![J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(2): 223-232.
- [38] 肖倩. 兼具脱氮除磷功能异养硝化细菌 *Pseudomonas putida* strain NP5 的代谢机制研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学硕士学位论文, 2019.
- XIAO Q. Study on metabolic mechanism of heterotrophic nitrifying bacteria *Pseudomonas putida* strain NP5 with nitrogen and phosphorus removal functions[D]. Xi'an: Master's Thesis of Xi'an University of Architecture and Technology, 2019 (in Chinese).
- [39] 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)[J]. *Environmental Research*, 2021, 195: 110797.
- [40] 张培玉, 孙梦, 张晨. 环境因素对 3 株嗜盐聚磷菌除磷性能的影响[J]. *山东大学学报(理学版)*, 2015, 50(5): 88-94.
- ZHANG PY, SUN M, ZHANG C. Environmental factors influence on phosphorus removal of three halophilic phosphate accumulating bacteria strains[J]. *Journal of Shandong University (Natural Science)*, 2015, 50(5): 88-94 (in Chinese).
- [41] 孙玲, 钱雨荷, 张惠芳, 张雁秋. 反硝化聚磷菌研究进展[J]. *节水灌溉*, 2015(2): 40-44.
- SUN L, QIAN YH, ZHANG HF, ZHANG YQ. Advance of research on denitrifying phosphorus accumulating organisms[J]. *Water Saving Irrigation*, 2015(2): 40-44 (in Chinese).
- [42] 刘有华, 王思婷, 杨乔乔, 韩迎亚, 王倩楠, 安贤惠, 李联泰. 国内外水体富营养化现状及聚磷菌研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(9): 26-35.
- LIU YH, WANG ST, YANG QQ, HAN YY, WANG QN, AN XH, LI LT. Present situation of water eutrophication at home and abroad and research progress of phosphorus-accumulating bacteria[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2021, 49(9): 26-35 (in Chinese).

- [43] KHALIFA AY, ALDAYEL MF. Metabolic diversity of the diesel-oil-degrading bacterium, *Achromobacter pulmonis* HDK3, obtained from eastern region of Saudi Arabia[J]. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Science, 2018, 20(3): 778-785.
- [44] GÓMEZ-GUZMÁN A, JIMÉNEZ-MAGAÑA S, GUERRA-RENTERÍA AS, GÓMEZ-HERMOSILLO C, PARRA-RODRÍGUEZ FJ, VELÁZQUEZ S, AGUILAR-USCANGA BR, SOLIS-PACHECO J, GONZÁLEZ-REYNOSO O. Evaluation of nutrients removal (NO₃-N, NH₃-N and PO₄-P) with *Chlorella vulgaris*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus* and a consortium of these microorganisms in the treatment of wastewater effluents[J]. Water Science and Technology, 2017, 76(1): 49-56.
- [45] YANG L, WANG X, CUI S, REN YX, YU J, CHEN N, XIAO Q, GUO LK, WANG RH. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5[J]. Bioresource Technology, 2019, 285: 121360.
- [46] OVES M, KHAN MS, QARI HA. Chromium-reducing and phosphate-solubilizing *Achromobacter xylosoxidans* bacteria from the heavy metal-contaminated soil of the Brass city, Moradabad, India[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2019, 16(11): 6967-6984.
- [47] MA Y, RAJKUMAR M, FREITAS H. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*[J]. Journal of Environmental Management, 2009, 90(2): 831-837.
- [48] 黄佳城, 张瑗琤, 付友思, 方柏山. 功能性菌群构建的研究进展[J]. 合成生物学, 2022(1): 155-167.
- HUANG JC, ZHANG AH, FU YS, FANG BS. Research progress in construction of functional microbial communities[J]. Synthetic Biology Journal, 2022(1): 155-167 (in Chinese).
- [49] 聂毅磊, 贾纬, 曾艳兵, 罗立津, 陈星伟, 庄鸿, 陈宏. 两株好氧反硝化聚磷菌的筛选、鉴定及水质净化研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(3): 116-121.
- NIE YL, JIA W, ZENG YB, LUO LJ, CHEN XW, ZHUANG H, CHEN H. Screening and identification of two aerobic denitrifying phosphorus-accumulating strains, and denitrifying biological phosphorus removal[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(3): 116-121 (in Chinese).
- [50] 齐世鑫, 杨达, 张浩, 蓝惠霞. 优势菌群强化好氧活性污泥处理制浆中段废水的研究[J]. 中国造纸学报, 2020, 35(1): 54-58.
- QI SX, YANG D, ZHANG H, LAN HX. Study on enhanced aerobic activated sludge treatment of mid-stage pulping wastewater by dominant flora[J]. Transactions of China Pulp and Paper, 2020, 35(1): 54-58 (in Chinese).