

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (3) :264 - 272; 4 March 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140329

反硝化聚磷菌的脱氮除磷机制及其在废水处理中的应用

余鸿婷, 李敏*

福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350108

摘要: 水体富营养化是当前水污染治理的重点关注对象, 利用微生物脱氮除磷开展富营养化水体治理是一种重要的技术。基于反硝化细菌和聚磷菌的脱氮除磷功能, 兼具反硝化和聚磷功能的微生物研究及其在污水工艺中的应用越来越广泛。在厌氧和好氧/缺氧环境中, 反硝化聚磷菌的脱氮除磷机制有很大差别, 且在化学和酶学方面都有所体现。其中, 质子驱动力/电子受体理论能够很好地解释反硝化聚磷的化学过程, 而反硝化酶系和多聚磷酸盐激酶是酶学过程的主要参与者。当前研究已明确在不同氧含量环境中氮素对磷去除的影响机制, 但是否存在磷对除氮作用的影响仍有待进一步研究。在此基础上, 本文以氮-磷的偶联过程为切入点, 分别从反硝化聚磷的化学过程和酶学机制方面进行简要综述。此外, 介绍了反硝化聚磷菌在实验室以及工厂化污水处理中的应用近况, 并提出了今后的研究重点与方向, 以期反硝化聚磷菌在环境修复中的进一步开发应用提供理论依据。

关键词: 富营养化, 反硝化聚磷菌, 基因编码, 酶, 废水治理

中图分类号: X172; X703.1 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 03-0264-09

水资源与人类的生存和发展密切相关。随着经济社会的发展, 水资源短缺伴随着水体富营养问题不仅对生态环境造成了严重的破坏, 也对人类健康及经济社会的可持续发展提出了新的挑战。水体富营养化治理的关键在于氮、磷的去除, 成本低廉且无二次污染的微生物修复技术是解决水体富营养化的有效途径之一^[1]。传统的生物脱氮除磷过程中, 反硝化细菌和聚磷菌之间往往因碳源竞争、泥龄适应不统一等问题导致氮、磷的去除效率不高。随着脱氮除磷技术的不断发展, 人们筛选到能以 O_2 、 NO_2^- 或 NO_3^- 作为电子受体的反硝化聚磷菌 (Denitrifying phosphorus accumulating organisms, DPAOs)。该菌不仅能通过代谢作用完成反硝化和有效聚磷的双重目

的, 与传统的反硝化细菌-聚磷菌联合脱氮除磷工艺相比, 这类微生物还能节约 50% 的碳源、30% 的曝气量并降低 50% 的污泥产量^[2]。将筛选到的 DPAOs 用于污水处理是一种高效、低能耗及可持续的稳定技术, 对水体富营养化的治理具有巨大潜力及重要意义^[3]。本文就 DPAOs 的脱氮除磷机制及其在废水处理中的应用作一简要综述。

1 反硝化聚磷菌

1.1 反硝化聚磷菌的发现

生物除磷系统中有 3 类聚磷菌: 第 1 类是仅利用 O_2 作为电子受体的传统聚磷菌; 第 2 类是既可利

基金项目: 福建省财政厅资助项目 (20130421)

* 通信作者。Tel: + 86-591-22867555; E-mail: mli@fjnu.edu.cn

作者简介: 余鸿婷 (1989 -), 女, 福建福清人, 硕士研究生, 主要从事生物技术水环境修复研究。E-mail: grace_fjsfdx@sina.com

收稿日期: 2014-06-24; 修回日期: 2014-09-22

用 O_2 也可利用 NO_2^- 作为电子受体的短程 DPAOs; 第 3 类是既能以 O_2 作为电子受体, 也能利用 NO_3^- 、 NO_2^- 作为电子受体的 DPAOs。其中, 第 2 类和第 3 类在吸磷的同时能进行反硝化作用^[3-4]。Kuba 等^[2] 发现在厌氧-缺氧的序批式反应器中存在以 NO_3^- 作为电子受体的稳定聚磷微生物。有趣的是, Carvalho 等^[5] 研究发现聚磷假丝酵母菌 (*Candidatus Accumulibacter phosphatis*, 简称 *A. phosphatis*) 仅有亚硝酸还原酶基因, 缺乏编码硝酸盐还原酶的基因, 没有利用 NO_3^- 作为电子受体的能力, 但可利用 NO_2^- 并将硝态氮还原成 N_2 。他们认为, 这可能是通过强化生物除磷系统中其它微生物将 NO_3^- 还原成 NO_2^- 后, *A. phosphatis* 利用 NO_2^-

作为电子受体进行反硝化聚磷作用的结果。这说明, 微生物在发挥反硝化聚磷作用时, 不仅存在单一的反硝化聚磷过程, 还可能涉及到不同功能微生物之间的互作效应。

1.2 反硝化聚磷菌的种类

DPAOs 广泛分布于红环菌科、芽孢杆菌科、莫拉菌科、假单胞菌科、肠杆菌科、红杆菌科等, 如表 1 所示, 迄今为止国内外研究者已筛选分离出大量具有良好反硝化聚磷能力的菌株。研究者发现 *A. phosphatis* 是强化生物除磷系统中对反硝化磷去除起主要贡献的微生物, 并且在活性污泥中大量存在^[5]。

表 1. 部分已报道的反硝化聚磷菌

Table 1. Some denitrifying phosphorus accumulating organisms (DPAOs) that have been reported

Classification		Sample sources	The initial concentration and removal efficiency of NO_3^- ($mg \cdot L^{-1} / \%$)	The initial concentration and removal efficiency of PO_4^{3-} ($mg \cdot L^{-1} / \%$)	Reference
Family	Genus or species				
<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>	SBR	545 ^{1*} /82	17.5 /92	[3]
	<i>Paracoccus</i> sp.	Activated sludge	1.5 /79	24.5 /87	[6]
<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i>	Activated sludge	50/100	12/100	[7]
	<i>Thauera mechrenichensis</i>	SBR	-	-	[8]
	<i>Azoarcus toluolyticus</i>	SBR	-	-	[8]
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus cereus</i>	SBR	30/90	24.5 /87	[9]
<i>Xanthomonas Campestris</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Surface sediments	100 /75	175 /79	[10]
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Surface sediments	100 /77	175 /78	[10]
	<i>Acinetobacter</i> sp.	The wastewater of food factory	614/38	19/64	[11]
<i>Synechococcaceae</i>	<i>Synechococcus elongatus</i>	Shrimp aquaculture wastewater	23/44	6.7 /88	[12]
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Wastewater of Daqing wetland	360 / >98	95.1 / >97	[13]
	<i>Pseudomonas</i> sp.	The biological fluidized bed reactor	336 ^{1*} /100	279/100	[14]
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia</i> sp.	The wastewater of food factory	614/40	19/66	[11]
	<i>Rahnella aquatilis</i>		614/40	19/58	[11]
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonas aquatica</i>	Surface sediments	100 /78	175/82	[10]
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Hyphomicrobium</i> sp.	Activated sludge	-	-	[15]
<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Aminobacter</i> sp.	Activated sludge	-	-	[15]

* 1 The initial concentration of $NH_4^+ -N$ ($mg \cdot L^{-1}$).

2 反硝化聚磷的作用机理

2.1 反硝化作用与微生物聚磷过程

反硝化作用是氮素生物地球化学循环的一部分。反硝化细菌在自然界中普遍存在, 它可将水体

中溶解性的氮包括 NO_3^- 、 NO_2^- 作为电子受体经一系列酶的催化作用还原为 N_2/N_2O 返回到大气中^[16]。自然界中还存在某些能够在体内聚集高浓度胞内聚磷化合物的异养聚磷菌, 它在厌氧状态下能够摄取环境中的挥发性脂肪酸 (Volatile fatty acids, VFA) 并以聚羟基烷酸 (Polyhydroxyalkanoates,

PHA) 的形式储存于细胞内, 在好氧条件下又能利用分解储存物所产生的能量过量的吸收环境中的无机磷酸盐, 并以多聚磷酸盐 (Poly-P) 的形式贮存在体内^[3]。相较于非聚磷菌细胞中占细胞干重 3% 生物质磷, 聚磷菌细胞内的生物质磷含量可达 12%^[17]。部分聚磷菌还能在缺氧的条件下利用 NO_3^- 或 NO_2^- 作为电子受体吸收环境中的无机磷酸盐合成 Poly-P。

2.2 反硝化聚磷的化学过程

DPAOs 能够在厌氧条件下利用质子驱动力通过主动运输的方式将乙酸等 VFA 运输入细胞, 并在乙酰辅酶 A 合成酶的作用下活化生成乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA, AcCoA), 随后 AcCoA 被转化并以 PHA 的形式储存^[18]。厌氧阶段乙酸和丙酸被转化后以 4 种 PHAs 的类型存在, 主要以聚- β -羟基丁酸 (PHB) 和聚羟基戊酸 (PHV) 形式存在。其中, PHB 仅由 AcCoA 形成, PHV 及其同分异构体聚羟基-2-甲基丁酸 (PH2MB) 由 AcCoA 和丙酰辅酶 A (Propionyl-CoA) 形成, 聚羟基-2-甲基戊酸 (PH2MV) 仅由 Propionyl-CoA 形成^[19]。在这个过程中 DPAOs 利用体内 Poly-P 的水解所形成的 ATP 为 PHA 的合成提供能量, 主要通过糖原的降解为 PHA 的合成提供还原力 NADH_2 。糖原降解的途径主要有糖酵解途径 (Embden-Meyerhof-Parnas pathway, EMP) 和 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖途径 (Entner-Doudoroff, ED), 前者能够产生更多的 ATP。但不同菌株存在代谢方式的差异, Martin 等^[19] 在 *A. phosphatis* 中发现 EMP 以及三羧酸循环 (Tricarboxylic acid cycle, TCA) 所需的全部基因, 但是缺乏 ED 途径的基因。Hesselmann 等^[20] 通过对属于变形纲菌中的 1 种革兰氏阴性菌进行 ^{13}C 原子示踪标记以及酶催化的研究发现了 ED 途径的存在。DPAOs 也能通过 TCA 为 PHA 的合成提供 NADH_2 。有报道显示, *A. phosphatis* 基因组编码的 1 个新型的细胞色素允许厌氧条件下 TCA 的进行^[19]。此外, Pereria 等^[21] 通过同位素标记研究发现厌氧阶段 PHV 合成过程中 30% 的还原力由 TCA 循环提供。

在好氧条件下, DPAOs 能以 O_2 作为电子受体分解菌体细胞内储存的 PHA 生成 AcCoA 或 Propionyl-CoA 进入 TCA, 产生的能量大部分为微生物的生长和糖原的合成提供能量。另一部分则用于过量摄取环境中的无机磷酸盐, 并以 Poly-P 的形式

贮存于菌体细胞内。PHA 作为内源性的聚合物在反硝化和磷吸收的过程中起着非常重要的作用, 它不仅能为磷吸收提供能量, 同时也能作为反硝化过程的碳源^[19], 图 1 是反硝化聚磷的原理示意图。

DPAOs 多为兼性厌氧菌, 在缺氧条件下它可利用硝态氮或亚硝态氮作为电子受体, 通过氧化 PHA 产生能量来维持生命活动, 并过量摄取环境中的 PO_4^{3-} 以 Poly-P 的形式贮存于细胞内^[18]。同时, 这类微生物能将 NO_3^- 或 NO_2^- 还原, 使吸磷和反硝化过程得到了统一^[18]。此外, 研究表明, 好氧条件下的磷吸收比缺氧条件下快^[22]。缺氧条件下单位 NADH_2 产生的 ATP 也比好氧时少了 40% 且需要消耗更多的 PHB, 但污泥产量和耗氧量大大减少^[23]。在缺氧阶段末期, 将经过缺氧磷吸收的含有 DPAOs 的活性污泥排放, 可以达到同时脱氮除磷的目的。

2.3 反硝化聚磷的酶学过程

2.3.1 反硝化作用酶系: 缺氧条件下, PHA 降解成 AcCoA 进入 TCA 后被代谢, 生成 NADH_2 并将电子传递给 O_2 、 NO_3^- 或 NO_2^- 。 NO_3^- 还原为 NO_2^- , NO_2^- 再依次被还原成 NO 、 N_2O 和 N_2 ^[16]。这个过程分别由硝酸还原酶 (Nitrate reductase, Nar)、亚硝酸还原酶 (Nitrite reductase, Nir)、一氧化氮还原酶 (Nitric oxide reductase, Nor) 和一氧化二氮还原酶 (Nitrous oxide reductase, Nos) 催化完成^[24]。其中分离自中华根瘤菌的铜型亚硝酸还原酶由 nirK 基因编码, 在无氧条件下才能表达^[25]。膜结合硝酸还原酶和 Nos 对氧分子敏感, 其余反硝化作用酶在有氧无氧条件下均能表达^[24-27]。Han 等^[16] 也通过亚基基因的扩增证实了耐盐好氧反硝化施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri* YHA-13) 中周质硝酸还原酶基因的存在。

2.3.2 多聚磷酸盐激酶: 在好氧或缺氧条件下微生物的聚磷过程是由多聚磷酸盐激酶 (Polyphosphate kinase, PPK) 催化完成的^[28]。PPK 能够催化 ATP 末端上的 γ 磷酸聚合到 Poly-P 上, PPK 同样可催化该反应的逆反应, 反应过程如下^[28]:



迄今为止研究者已从大肠杆菌中获得了纯的 PPK 及其编码基因, 但将大肠杆菌直接用于水体治理可能会带来二次污染。Du 等^[29] 利用恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida* KT2440) 作为宿主, 将来源于铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的 PPK 基因

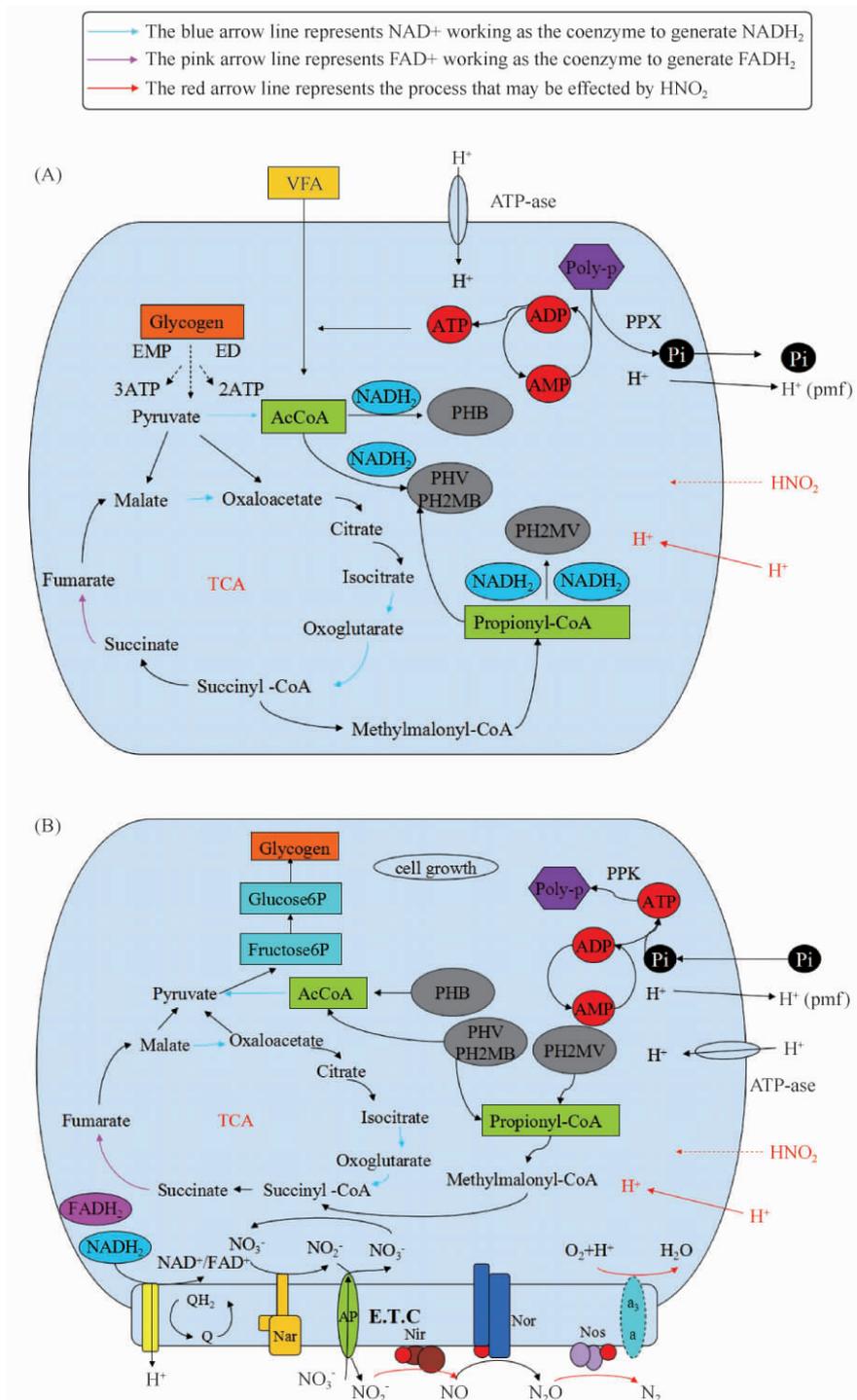
图 1. 反硝化聚磷原理示意图^[18-19]

Figure 1. The schematic diagram of the mechanisms in the denitrifying phosphorus accumulating process^[18-19]. A: Anaerobic phase; B: Aerobic phase/oxygen deficient phase (black dotted lines stand for either one of the two pathways). VFA, Volatile fatty acids; EMP, Embden-Meyerhof-Parnas pathway; ED, Entner-Doudoroff; NADH_2 , Nicotinamide adenine dinucleotide; FADH_2 , Flavin adenine dinucleotide; PHB, polyhydroxybutyrate; PHV, polyhydroxyvalerate; PH2MB, polyhydroxy-2-methylbutyrate; PH2MV, polyhydroxy-2-methylvalerate; ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; ATP-ase, ATP synthase; Poly-P, polyphosphates; Pi, orthophosphate; AcCoA, Acetyl-CoA; Propionyl-CoA, propionyl coenzyme A; PPX, exopolyphosphatase; PPK, polyphosphate kinase; pmf, proton motive force; E. T. C, electron transport chain; AP, transporters; Nar, Nitrate reductase; Nir, Nitrite reductase; Nor, Nitric oxide reductase; Nos, Nitrous oxide reductase.

插入广宿主载体 pBBR1MCS-2 多克隆位点区构建质粒后获得基因工程菌 *Pseudomonas putida* KTPPK。序批式生物膜反应器 (SBBR) 实验结果表明,投入了 KTPPK 的 SBBR 的磷去除率比对照组高 10% - 20%,氮的去除率也明显提升,且 KTPPK 在 SBBR 中能够稳定遗传。Jung 等^[28] 研究发现,在磷酸核糖酰胺转移酶 *purF* 突变体大肠杆菌细胞中 PPK 基因的表达大大增加,而嘌呤会限制由磷酸核糖酰胺转移酶 *purF* 突变而增加的 PPK 基因的转录,因此嘌呤缺陷可能是大肠杆菌 PPK 基因表达的良好诱导物。值得注意的是,PPK 存在于生命体多个领域的细胞中,在细菌中 PPK 广泛分布,古生菌和真核生物中少见报道。

3 微生物反硝化与聚磷作用的协同效应机制

反硝化聚磷酶系的存在,使得 DPAOs 能通过不同酶系的协同作用在单一微生物中同步完成反硝化与聚磷过程、实现氮和磷的去除。氮的主要存在形式 NO_3^- 、 NO_2^- 不仅可作为同步脱氮聚磷过程的电子受体,也可能作为反硝化功能基因与 PPK 基因表达的刺激响应子,通过对基因表达的调控影响反硝化聚磷效果。Lv 等^[30] 通过高通量测序法测得以 NO_3^- 、 NO_2^- 、 O_2 作为电子受体的活性污泥磷去除率分别为 84.8%、78.5% 和 87.4%;与 NO_2^- 相比,以 NO_3^- 作为电子受体的反硝化聚磷过程对电子的利用率更高。

亚硝态氮在好氧、缺氧、厌氧条件下均会影响反硝化聚磷过程。Saito 等^[31] 观察到好氧磷吸收对 NO_2^- 很敏感。 NO_2^- 浓度接近 2 mg N/L 时开始对好氧磷吸收发生抑制作用,在 6 mg N/L 时则完全被抑制。另一项研究表明游离亚硝酸才是真正的抑制剂,在好氧条件下对聚磷菌的生长、磷吸收以及糖原的产生都会产生严重的抑制,并且对 PHA 的降解也产生一定的抑制作用^[32]。如图 1-B 的电子传递链所示,作者认为游离亚硝酸与 N_2O 还原酶含铜的活性位点结合引起 N_2O 还原的竞争性抑制。

早期 Hu 等^[4] 对 NO_3^- 、 NO_2^- 、 O_2 这 3 种不同电子受体存在条件下的反硝化除磷情况进行了研究,结果表明当反应器中 NO_2^- 的浓度低于 115 mg/L 时, NO_2^- 能替代 O_2 、 NO_3^- 作为电子受体,缺氧磷吸

收并不会被抑制。随后有研究者发现游离亚硝酸浓度从 0.002 增加到 0.02 mg/L,缺氧磷吸收速率下降,反硝化速率也降低了大约 40%^[33]。当游离亚硝酸的浓度达到 0.02 mg/L 时,磷吸收则完全被抑制^[33]。游离亚硝酸对缺氧条件下反硝化作用的影响存在几种假说(如图 1-B 所示):第 1 种认为游离亚硝酸是一种解耦联剂,能够通过细胞膜并提高质子透过膜的穿梭性能从而破坏质子的跨膜梯度,使得氧化与磷酸化解耦联,ATP 的产生减少,为了维持质子驱动力,需要加快反硝化速率从而产生更多的质子。第 2 种认为游离亚硝酸抑制了磷吸收和微生物生长使得能量需求变低,需要通过质子驱动力合成 ATP 减少,随即反硝化速率变慢。第 3 种认为游离亚硝酸可能使 Nir 在 mRNA 的翻译水平发生移位或者错误的折叠,在高浓度游离亚硝酸存在的条件下已合成的 Nir 也可能因构象的改变而失活直接导致反硝化速率降低^[33]。游离亚硝酸还会破坏细胞膜并进入细胞,通过对 PPK 的破坏对 Poly-P 的合成产生抑制,影响吸磷过程。并且,随着反硝化作用被游离亚硝酸抑制,能量的产生减少,为了维持细胞内的能量平衡,Poly-P 发生分解,磷吸收的能量受到限制最终也会导致吸磷的速率降低^[33]。

同样,在厌氧条件下游离亚硝酸也会作为解耦联剂破坏质子驱动力,使 ATP 的产生减少影响了 VFA 的主动运输与 PHA 的合成,DPAOs 需要分解 Poly-P 释放更多的 P 为 VFA 的吸收提供能量(如图 1-A)。

另外,也有研究者发现磷的化合物形式 3,4-二甲基吡啶磷酸盐在同步硝化-反硝化脱氮与反硝化聚磷的活性污泥中会通过氨氧化即硝化作用的直接抑制减少了 NO_3^- 、 NO_2^- 的产生,间接性的抑制了反硝化作用,进而对反硝化聚磷过程造成影响^[34]。最近的研究显示,ZnO、 SiO_2 等金属纳米粒子会通过抑制对 Nar、Nir、PPX、PPK 抑制作用,影响了氮的去除和磷的释放与吸收^[35]。有趣的是,Cu 纳米粒子则会提高 Nar、Nir 的活性,使氮的去除率提高^[36]。因此,关于磷对氮以及金属纳米粒子等因素对反硝化聚磷过程的具体调控机制还处于探索阶段,需要我们进一步深入研究。

4 反硝化聚磷菌的工程应用

目前基于 DPAOs 开发的多种工艺主要用于城

市生活污水、工业废水的处理以及湖泊湿地等富营养化水体的实验室内模拟研究。采用单污泥系统的 MUCT 分段进水脱氮除磷工艺处理低 COD/N 的污水其短程反硝化除磷率比以 NO_3^- 为电子受体的反硝化除磷率高 30%^[37]。Zafiriadis 等^[38]用双污泥系统的 Dephanox 工艺处理城市污水发现,该装置不仅影响 PHA 的含量,还能促进 DPAOs 的富集,相比之下双污泥系统运行更稳定,处理效果也更好。

采用聚乙烯醇和海藻酸钠等包埋固定经富集驯化的 DPAOs 或其活性污泥不仅可以维持菌体数量且便于菌体的再回收,此外,固定化条件能提高菌体抵御外界环境变化的能力^[1]。固定化小球内部还能形成缺氧状态,有利于反硝化聚磷作用的进行。研究者将分离鉴定的菌株用海藻酸钙固定后处理采自湿地的富营养化水样,对硝态氮和磷的去除率分别达 98.48% 和 97.46%^[13]。本文作者所在课题组以聚乙烯醇和海藻酸盐制备的微生物固定化小球对含氮磷的人工废水显示出良好的净化效果,结果显示,脱氮除磷过程以微生物作用为主,且固定化材料本身对氮磷也具有一定的吸附作用^[39]。

富营养化水体治理的实验室模拟方面,研究人员已取得了一定的成绩,但直接将微生物投放于富营养化的江河湖泊进行原位修复有可能带来二次污染。因此将 DPAOs 用于富营养化水体的生物修复仍有待进一步研究。另一方面由于现有研究技术的局限性,关于反硝化功能基因、多聚磷酸盐激酶基因之间具体的联系及其表达调控的研究较少。

5 展望

明确反硝化聚磷机理与反硝化聚磷酶系有助于从微生物代谢、电子传递链及基因编码等角度深入了解反硝化聚磷的各个过程及反硝化作用与聚磷作用的联系。鉴于已有的研究基础和目前尚未解决的问题,未来的研究可从以下几个方面展开:(1)发掘优良的种质资源,在江河湖泊等常见生境甚至是海洋低氧区、沉积物等环境中不断筛选和驯化出高效的 DPAOs 还可进行基因工程菌的构建与改造,并对其功能基因的遗传和表达调控进行深入研究;(2)深入了解 DPAOs 的生长特性及其对氮磷等环境因素的响应关系,探索反硝化聚磷过程中发挥作用的酶是如何偶联的;(3)考察 DPAOs 固定化处理在实

际应用中的可行性,分析固定化基质对 DPAOs 的影响及其本身在脱氮聚磷过程中的作用;(4)将更多的 FISH-MAR、PCR-T-RFLP 等现代分子生物学技术运用到 DPAOs 的研究中;(5)采用植物-微生物等联合修复技术,提高 DPAOs 的脱氮除磷效率。

致谢:感谢南京大学环境学院生物地球化学与环境修复实验室的韩永和博士,在文章框架设计、文稿撰写、修改及英文摘要润色等方面提供的帮助。

参考文献

- [1] Han Y, Zhang W, Lu W, Zhou Z, Zhuang Z, Li M. Co-immobilization of *Pseudomonas stutzeri* YHA-13 and *Alcaligenes* sp. ZGED-12 with polyvinyl alcohol-alginate for removal of nitrogen and phosphorus from synthetic wastewater. *Environmental Technology*, 2014, 35 (22): 2813-2820.
- [2] Kuba T, Smolders G, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Water Science & Technology*, 1993, 27 (5-6): 241-252.
- [3] Liu H, Sun Y, Jia X, Li J, Zhou K, Qu X, Tao X, Chen Y. Identification and metabolic mechanism of non-fermentative short-cut denitrifying phosphorus-removing bacteria. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2013, 21 (3): 332-340.
- [4] Hu JY, Ong SL, Ng WJ, Lu F, Fan XJ. A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Research*, 2003, 37 (14): 3463-3471.
- [5] Carvalho G, Lemos PC, Oehmen A, Reis MAM. Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure. *Water Research*, 2007, 41 (19): 4383-4396.
- [6] Lee HW, Park YK. Characterizations of denitrifying polyphosphate-accumulating bacterium *Paracoccus* sp. strain YKP-9. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18 (12): 1958-1965.
- [7] Kim JM, Lee HJ, Lee DS, Jeon CO. Characterization of the denitrification-associated phosphorus uptake properties of "*Candidatus Accumulibacter phosphatis*" clades in sludge subjected to enhanced biological phosphorus removal. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (6): 1969-1979.
- [8] Tsuneda S, Miyauchi R, Ohno T, Hirata A.

- Characterization of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge based on nitrite reductase gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99 (4) : 403-407.
- [9] Zhang Q, Wang H, San W, Li M, Yang K, Ma F. Identification of a denitrifying polyphosphate-accumulating organism (DPAO) and study on its denitrifying functional genes. *Environmental Science*, 2013, 34 (7) : 2876-2881. (in Chinese)
张倩, 王弘宇, 桑稳姣, 李孟, 杨开, 马放. 1株反硝化除磷菌的鉴定及其反硝化功能基因研究. *环境科学*, 2013, 34(7) : 2876-2881.
- [10] Lu Z, Ji C, Su Q, Wang H. Isolation and identification of 3 denitrifying phosphate-accumulating organisms. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2009, 3 (8) : 1405-1408. (in Chinese)
吕志堂, 纪翠平, 苏强, 王涵. 3株反硝化聚磷菌的分离与鉴定. *环境工程学报*, 2009, 3(8) : 1405-1408.
- [11] Yang Z, Qiu Y, Li X, Shi H, Liu Y. Screening of some denitrifying polyphosphate-accumulation organisms and identifying of their biological characteristics. *Journal of Suzhou University of Science and Technology (Natural Science)*, 2009, 26 (3) : 42-48. (in Chinese)
杨志愿, 邱业先, 李孝坤, 时海平, 刘玉荣. 几株反硝化聚磷菌的筛选及其生理生化特性的鉴定. *苏州科技学院学报(自然科学版)*, 2009, 26(3) : 42-48.
- [12] Aguilar-May B, del Pilar Sánchez-Saavedra M. Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21 (3) : 353-360.
- [13] Mu Q, Wen B, Bei L, Wan Z, Yang L. Nitrogen and phosphorus removal ability of a denitrifying phosphate-accumulating bacteria and its immobilization on water purification. *Wetland Science*, 2013, 11 (2) : 227-232. (in Chinese)
慕庆峰, 文波龙, 贝丽霞, 王智慧, 杨丽娟. 一株反硝化聚磷菌的脱氮, 除磷能力及其固定化净化水体的研究. *湿地科学*, 2013, 11(002) : 227-232.
- [14] Barak Y, van Rijn J. Relationship between nitrite reduction and active phosphate uptake in the phosphate-accumulating denitrifier *Pseudomonas* sp. strain JR 12. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (12) : 5236-5240.
- [15] Kondo T, Tsuneda S, Ebie Y, Inamori Y, Xu K. Characterization of the microbial community in the anaerobic/oxic/anoxic process combined with sludge ozonation and phosphorus adsorption. *Journal of Water and Environment Technology*, 2009, 7 (3) : 155-162.
- [16] Han Y, Zhang W, Zhou Z, Zhuang Z, Xu X, Li M. Isolation and characterization of the salt-tolerant aerobic denitrifying bacterial strain A-13. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (1) : 47-58. (in Chinese)
韩永和, 章文贤, 庄志刚, 周志华, 许旭萍, 李敏. 耐盐好氧反硝化菌 A-13 菌株的分离鉴定及其反硝化特性. *微生物学报*, 2013, 53(1) : 47-58.
- [17] Nielsen PH, Saunders AM, Hansen AA, Larsen P, Nielsen JL. Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater—a model system in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23 (3) : 452-459.
- [18] He S, McMahon KD. Microbiology of ‘*Candidatus Accumulibacter*’ in activated sludge. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4 (5) : 603-619.
- [19] Martín HG, Ivanova N, Kunin V, Warnecke F, Barry KW, McHardy AC, Yeates C, He S, Salamov AA, Szeto E, Dalin E, Putnam NH, Shapiro HJ, Pangilinan JL, Rigoutsos I, Kyrpides NC, Blackall LL, McMahon KD, Hugenholtz P. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nature Biotechnology*, 2006, 24 (10) : 1263-1269.
- [20] Hesselmann RPX, Von Rummell R, Resnick SM, Hany R, Zehnder AJB. Anaerobic metabolism of bacteria performing enhanced biological phosphate removal. *Water Research*, 2000, 34 (14) : 3487-3494.
- [21] Perreira H, Lemos PC, Reis MAM, Crespo JPSG, Carrondo MJT, Santos H. Model for carbon metabolism in biological phosphorus removal processes based on in vivo ¹³C-NMR labeling experiments. *Water Research*, 1996, 30 (9) : 2128-2138.
- [22] Merzouki M, Delgenes JP, Bernet N, Moletta R, Benlemlih M. Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. *Current Microbiology*, 1999, 38 (1) : 9-17.
- [23] Filipe CDM, Daigger GT. Evaluation of the capacity of phosphorus-accumulating organisms to use nitrate and oxygen as final electron acceptors: A theoretical study on population dynamics. *Water Environment Research*, 1999, 71 (6) : 1140-1150.
- [24] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of

- denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61 (4) : 533-616.
- [25] Ferroni FM, Guerrero SA, Rizzi AC, Brondino CD. Overexpression, purification, and biochemical and spectroscopic characterization of copper-containing nitrite reductase from *Sinorhizobium meliloti* 2011. Study of the interaction of the catalytic copper center with nitrite and NO. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012, 114: 8-14.
- [26] Lalucat J, Bennisar A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni NJ. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70 (2) : 510-547.
- [27] Philippot L. Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2002, 1577 (3) : 355-376.
- [28] Jung S, Lee MS, Kim SK, Wanner BL. Effect of purine limitation caused by an amidophosphoribosyl transferase (purF) mutation on polyphosphate kinase 1 (ppk1) gene expression. *Genes & Genomics*, 2012, 34 (1) : 27-34.
- [29] Du H, Yang L, Wu J, Xiao L, Wang X, Jiang L. Simultaneous removal of phosphorus and nitrogen in a sequencing batch biofilm reactor with transgenic bacteria expressing polyphosphate kinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96 (1) : 265-272.
- [30] Lv X, Shao M, Li C, Li J, Liu D, Gao X, Xia X. Operation performance and microbial community dynamics of phosphorus removal sludge with different electron acceptors. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41 (7) : 1099-1108.
- [31] Saito T, Brdjanovic D, Van Loosdrecht MCM. Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Research*, 2004, 38 (17) : 3760-3768.
- [32] Pijuan M, Ye L, Yuan Z. Free nitrous acid inhibition on the aerobic metabolism of poly-phosphate accumulating organisms. *Water Research*, 2010, 44 (20) : 6063-6072.
- [33] Zhou Y, Pijuan M, Yuan Z. Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by poly-phosphate accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98 (4) : 903-912.
- [34] Weiske A, Benckiser G, Herbert T, Ottow JCG. Influence of the nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in comparison to dicyandiamide (DCD) on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3 years of repeated application in field experiments. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 34 (2) : 109-117.
- [35] Zheng X, Su Y, Chen Y. Acute and chronic responses of activated sludge viability and performance to silica nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46 (13) : 7182-7188.
- [36] Chen Y, Wang D, Zhu X, Zheng X, Feng L. Long-term effects of copper nanoparticles on wastewater biological nutrient removal and N₂O generation in the activated sludge process. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46 (22) : 12452-12458.
- [37] Zeng W, Wang X, Li B, Bai X, Peng Y. Nitritation and denitrifying phosphorus removal via nitrite pathway from domestic wastewater in a continuous MUCT process. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 187-195.
- [38] Zafiriadis I, Ntougias S, Nikolaidis C, Kapagiannidis AG, Aivasidis A. Denitrifying polyphosphate accumulating organisms population and nitrite reductase gene diversity shift in a DEPHANOX-type activated sludge system fed with municipal wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 111 (2) : 185-192.
- [39] Zhuang Z, Han Y, Zhang W, Zhou Z, Chen J, Li M. Isolation, identification and phosphorus-removal characterization of bacteria *Alcaligenes* sp. ED-12 for phosphorus-accumulation. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34 (3) : 678-687. (in Chinese)
- 庄志刚, 韩永和, 章文贤, 周志华, 陈佳兴, 李敏. 高效聚磷菌 *Alcaligenes* sp. ED-12 菌株的分离鉴定及其除磷特性. *环境科学学报*, 2014, 34 (3) : 678-687.

Denitrifying and phosphorus accumulating mechanisms of denitrifying phosphorus accumulating organisms (DPAOs) for wastewater treatment – A review

Hongting Yu, Min Li*

School of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China

Abstract: Eutrophication has raised increasing concerns due to its adverse effects on creatures. It is widely accepted that microbes are capable of removing nitrogen (N) and phosphate (P) via denitrification and P accumulation. So far, several strains can do this work. Therefore, more studies are focused on looking for micro-organisms that have both denitrification and P accumulation ability. Whether exposed to aerobic or anaerobic environment, microbial N and P removal mechanisms differ. Proton Motive Force and Electron Acceptor Theory are involved in the chemical process, whereas denitrifying enzymes polyphosphate kinases are regarded as the leading participators in the enzymatic systems. Studies have shown the influences of N on P accumulation, but further investigation should identify the influences of P on N removal. Here we reviewed the aspects of N and P removal mechanisms in denitrifying phosphorus accumulating organisms (DPAOs) and their potential to remove N and P from water system. Moreover, future works on clarifying denitrifying phosphorus accumulating mechanisms in depth and improving efficiency of removing N and P by DPAOs are provided.

Keywords: eutrophication, denitrifying phosphorus accumulating organisms (DPAOs), gene coding, enzymes, wastewater treatment

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Funded Project of Finance Department of Fujian Province (20130421)

* Corresponding author. Tel: + 86-591-22867555; E-mail: mli@fjnu.edu.cn

Received: 24 June 2014/ Revised: 22 September 2014