

好氧反硝化菌株强化人工湿地脱氮效能研究

王佳¹, 杨涵¹, 陈磊², 高斐¹, 姚琼¹

¹兰州新区城市矿产循环产业发展有限公司, 甘肃 兰州

²甘肃东兴嘉宇新材料有限公司, 甘肃 嘉峪关

收稿日期: 2025年3月21日; 录用日期: 2025年4月15日; 发布日期: 2025年4月29日

摘要

为了提高冬季人工湿地脱氮效率, 本研究采用添加好氧反硝化菌*Pseudomonas silesiensis* JL1的方式强化人工湿地对氮污染物处理。研究结果表明, 外源菌液的添加有效提高了人工湿地对氨氮、硝氮、总氮的去除效率, 即使平均气温下降至-1.8℃, 各形态氮平均去除率均分别达到97.03%、92.97%和91.63%。通过微生物生信分析发现: 外源菌液的添加增加了*Pseudomonas*、*Azoarcus*和*Hydrogenophaga*物种的丰度。同时促进了参与硝化过程(*amoA*, *amoB*, *amoC*)和反硝化过程(*narG*, *narH*, *narI*, *napA*, *napB*, *nirS*, *norB*)相关基因的表达。研究证实通过添加外源菌液可有效增强人工湿地的低温脱氮能力, 为寒冷地区污水生态处理系统优化提供了创新性解决方案。

关键词

人工湿地, 生物强化, 好氧反硝化, 脱氮, 根际微生物

Study on Aerobic Denitrification Bacterial Strains to Enhance Denitrification Efficiency in Constructed Wetlands

Jia Wang¹, Han Yang¹, Lei Chen², Fei Gao¹, Qiong Yao¹

¹Lanzhou New Area Urban Mineral Recycling Industry Development Company Limited, Lanzhou Gansu

²Gansu Dongxing Jiayu New Material Company Limited, Jiayuguan Gansu

Received: Mar. 21st, 2025; accepted: Apr. 15th, 2025; published: Apr. 29th, 2025

Abstract

In order to improve the nitrogen removal efficiency of constructed wetlands in winter, this study used the addition of aerobic denitrification bacteria *Pseudomonas silesis* JL1 to strengthen the

treatment of nitrogen pollutants in constructed wetlands. The research results show that the addition of exogenous bacterial solution effectively improves the removal efficiency of ammonia nitrogen, nitrate nitrogen and total nitrogen in the constructed wetland. Even if the average temperature drops to -1.8°C , the average removal rates of all forms of nitrogen reach 97.03%, 92.97% and 91.63% respectively. Microbial bioassay found that the addition of exogenous bacterial liquid increased the abundance of *Pseudomonas*, *Azoarcus* and *Hydrogenophaga* species. It also promotes the expression of genes involved in the nitrification process (amoA, amoB, amoC) and denitrification process (narG, narH, narI, napA, napB, nirS, norB). Research has confirmed that the low-temperature denitrification capacity of constructed wetlands can be effectively enhanced by adding exogenous bacterial liquid, providing innovative solutions for optimizing sewage ecological treatment systems in cold areas.

Keywords

Constructed Wetland, Bioaugmentation, Aerobic Denitrification, Denitrification, Rhizosphere Microorganisms

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着企业生产和人民生活水平的提高，氮排放量不断增加，这将引起水环境污染和破坏生态平衡，从而制约生态环境保护和高质量发展[1]。因此提升水环境质量、解决水污染问题任重道远。

与活性污泥法和生物膜法等传统污水处理工艺相比，人工湿地系统凭借其低能耗特性、建设运行成本优势及生态景观价值，逐渐成为分散式污水处理的重要选择[2][3]。微生物作用在人工湿地脱氮过程中起主导地位[4]，然而在我国北方地区，冬季寒冷，严重抑制微生物活性从而导致人工湿地对氮去除效率显著降低，这已成为制约人工湿地技术在低温地区推广的关键瓶颈。

不同于传统的生物脱氮过程，好氧反硝化的发现颠覆了脱氮只能在厌氧条件下进行的传统认识，使得硝化和反硝化过程可在时间和空间上同步进行，突破氧环境对传统生物脱氮的固有限制，将有效降低处理设施的占地面积、工程造价和运行成本[5]。同时好氧反硝化细菌生长速率快、增殖底物广泛，具有耐低温、耐酸碱、耐盐等的极强的环境适应能力和功能[6]。如今，人工湿地中好氧反硝化细菌的研究主要集中在分离高效脱氮菌株和解析纯菌机理方面[7][8]。然而，对于筛选耐冷型好氧反硝化菌株并将其添加到人工湿地中进行生物强化脱氮的研究鲜见报道。本研究将分离筛选得到的耐低温好氧反硝化菌株 *Pseudomonas silesiensis* JL1，以菌液的形式添加到人工湿地进行生物强化，探究外源菌的加入对人工湿地处理效果的影响。通过高通量测序技术，探究外源菌液的添加对微生物群落结构和多样性变化的影响。初步探究外源菌剂加入对人工湿地微生物群落脱氮功能基因的影响。本研究为外源菌剂强化冬季人工湿地脱氮效能提供依据，为实现高效、经济、稳定的污染物净化提供技术支撑。

2. 材料与方法

2.1. 菌株来源

从甘肃省兰州市榆中县马衔山区域土壤中分离筛选得到一株耐低温好氧反硝化菌株命名为 *Pseudomonas silesiensis* JL1，该菌株的最适培养条件：丁二酸钠为碳源、C/N 比 15、中性至弱碱性 pH 环

境及 120 r/min 振荡培养体系。

2.2. 人工湿地试验系统构建

试验进水为人工配置污水, 其中 COD: 326 mg/L、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$: 31 mg/L、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$: 31 mg/L, 配置好后定量加至潜流人工湿地装置。人工湿地反应器选用 DN150 有机玻璃, 单个装置表面积为 0.0177 m^2 。湿地床深 0.6 m, 其中填料床下层为深 40 cm 砾石填料, 上层为深 20 cm 细沙。装置顶部设置进水口和溢流口控制湿地进水和运行水位, 底部设置出水管, 配备止水夹。试验植物选用美人蕉, 每种装置设置三组平行反应器, 分别为不加菌液对照组、接种 150 mL 培养至对数生长期的 JL1 菌液试验组。运行期间水力停留时间(HRT)为 3 天, 共运行 69 天, 水力负荷为 0.030 $\text{m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$ 。

2.3. 水质检测方法

采集每个周期运行完毕后的水样, 装入 150 mL 聚乙烯瓶子后迅速带回实验室及时测定水质指标。TN 采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法; $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 采用纳氏试剂分光光度法; $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 采用紫外分光光度法; $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法[9]。

2.4. 生物信息学分析

人工湿地系统运行结束后, 取 15 g 带土根系置于含 0.86% NaCl 灭菌液的 50 ml 离心管, 立即送实验室冰浴 30 分钟(每 5 分钟摇匀)。弃根系后 4℃、4000 rpm 离心 30 分钟, 取沉淀存于-80℃。采用 OMEGA Soil DNA Kit 提取总 DNA, 以 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGT WTCTAAT-3')引物扩增细菌 16S rRNA V3~V4 区[9] (委托南京派森诺公司完成)。基于 QIIME2 (2019.4) 平台执行 dada2 生物信息学流程, 涵盖原始序列质控、去噪、嵌合体剔除、ASV 特征表生成及物种注释。通过 α 多样性指数解析微生物群落特征, 采用 PICRUST2 算法对 16S rRNA 扩增子数据进行功能注释, 基于 KEGG 数据库完成氮代谢基因相对丰度预测。

2.5. 数据分析方法

本文绘图所需的软件由 Origin 2021 完成。

3. 结果与讨论

3.1. 人工湿地出水理化特征

电导率作为反映水体中溶解性离子浓度的关键指标。如图 1(a)所示, 运行初期(0~15 d), 电导率显著升高, 可能与外源菌剂引入的微生物快速代谢释放离子(如 NH_4^+ 、 NO_3^-)有关, 运行至稳定期, 电导率逐渐下降。人工湿地系统出水 pH 值动态变化呈现阶段性特征, 如图 2(b)所示。试验组在运行初期(0~15 d)出水 pH 值高于对照组, 其波动范围为 8.17~9.12, 可能与外源菌剂代谢活动引发的碱性物质释放有关。运行至第 21 d 后, 试验组 pH 值趋于稳定, 表明系统内酸碱缓冲机制逐步建立, 微生物群落与环境达到动态平衡。推测湿地基质的缓冲作用主导了长期 pH 调控, 而外源菌剂对酸碱平衡的影响局限于系统启动阶段。

3.2. 人工湿地污染物去除特性

如图 2 所示, 人工湿地启动初期 1~18 d 内平均温度 17℃, 较适宜微生物活动。添加菌液湿地系统对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、TN 除效率随着运行时间的延长逐渐增加, 平均去除率分别为 96.20%、77.13%、82.78%, 相较于对照组污染物去除效率分别提高了 9.98%、18.53%、13.56%。由于系统处于启动阶段, 微生物群

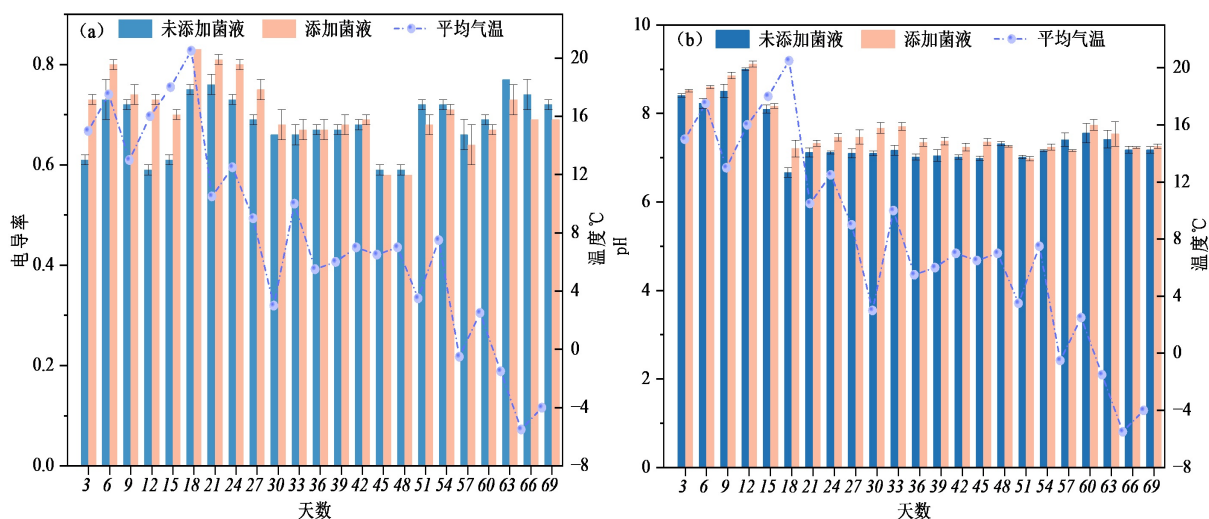


Figure 1. Change characteristics of electrical conductivity and pH of constructed wetlands

图 1. 人工湿地电导率、pH 变化特征

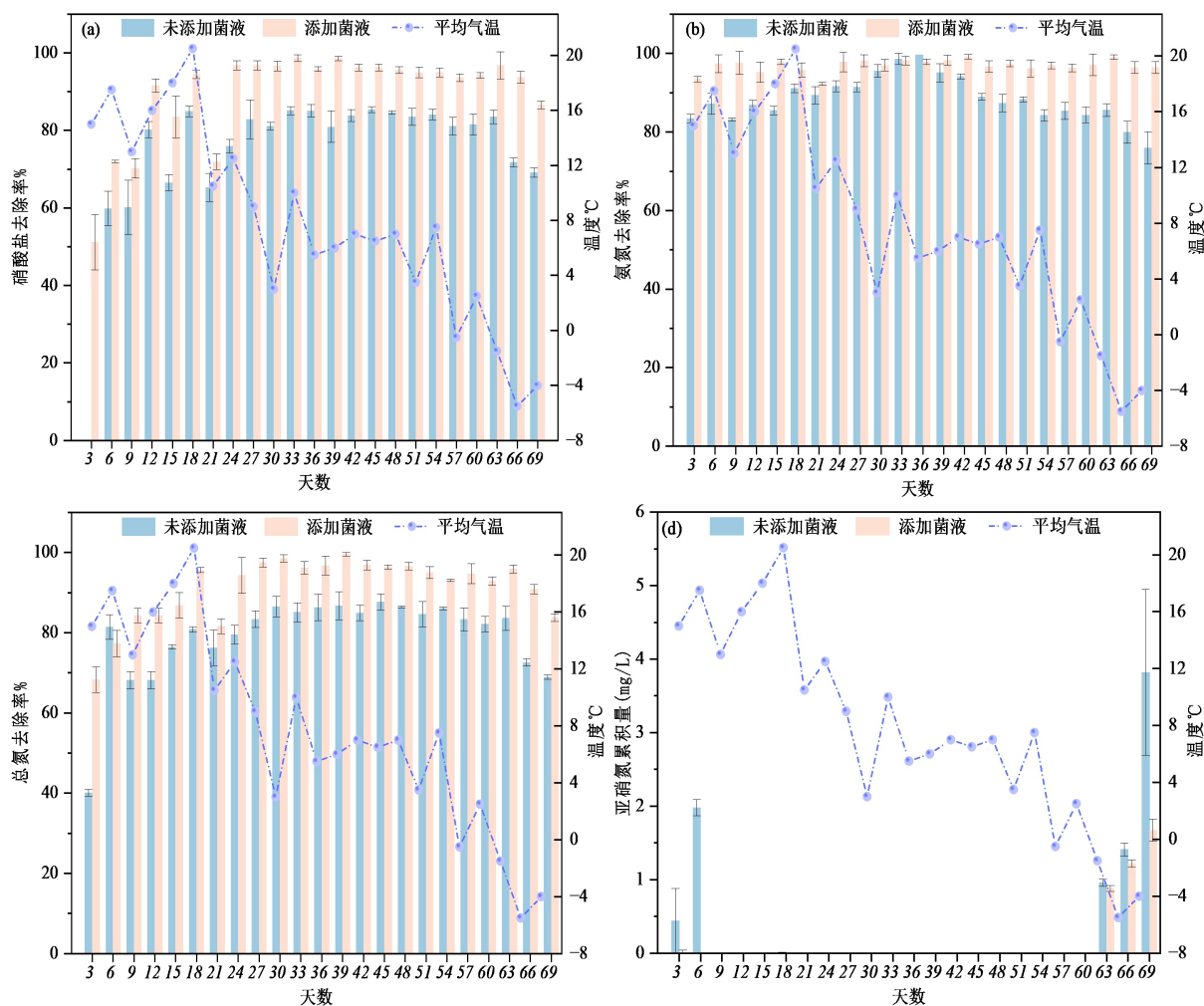


Figure 2. Pollutant removal characteristics of constructed wetlands

图 2. 人工湿地污染物去除特性

落尚未完全建立，两组湿地的污染物去除效率均较低，且未添加菌液湿地系统阶段出现亚硝酸盐累积现象，说明反硝化不完全。人工湿地运行到 21~54 d 时，湿地系统处于稳定阶段，此阶段平均温度 7.3℃，试验对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、TN 去除率分别为 97.16%、94.41%、95.20%，相较于对照组污染物去除效率分别提高了 5.15%、12.94%、10.73%，且全程硝化与反硝化协同作用，无 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 累积。人工湿地运行到 57~69 d 时，平均温度下降至 -1.8℃，添加菌液湿地系统表现出卓越的低温适应性，各形态氮去除率均维持在 90% 以上，其中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 去除率(92.97%)显著高于对照组(77.38%)。相对于对照组 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、TN 去除率分别提高了 14.80%、15.59%、15.37%，值得注意的是，低温环境下对照组和试验组在此阶段皆出现亚硝态氮二次累积，这可能与低温条件抑制代谢有关[10]。通过定向投加耐冷脱氮功能菌剂，可有效提高低温环境下人工湿地脱氮效率。

3.3. 人工湿地植物根际微生物 Alpha 多样性分析

微生物群落的多样性与丰富度是维持人工湿地系统运行稳定性的关键生态因子[11] [12]。通过 α 多样性指数对人工湿地运行结束后根际土壤微生物群落特征进行评价，结果如表 1 所示。供试样本的 Good's coverage 指数均高于 0.99，表明测序深度充分，能够可靠反映微生物群落的多样性特征。Chao1 指数显示，未添加菌液组的平均值为 2795.653，显著高于添加菌液组(1385.564，降幅达 50.4%)，表明外源菌剂的引入导致根际土壤微生物物种丰富度显著降低($p < 0.05$)。Shannon 指数进一步验证了这一趋势，添加菌液组的平均值(6.844)较未添加组(8.283)下降 17.4%，说明外源菌液添加不仅减少了物种数量，还降低了群落的均匀度和多样性水平。可能原因是菌液引入的优势微生物抑制了本地微生物的生长，改变了根际微环境的理化性质，间接影响微生物群落的组成与功能。

Table 1. Alpha diversity analysis of rhizosphere soil microorganisms after operation of different wetlands
表 1. 不同湿地运行结束后的根际土壤微生物 Alpha 多样性分析

Sample	Chao1	Good's_coverage	Simpson	Shannon
未添加菌液 1	2323.170	0.997	0.957	7.312
未添加菌液 2	3411.230	0.997	0.986	9.130
未添加菌液 3	2652.560	0.997	0.983	8.406
平均值	2795.653	0.997	0.975	8.283
添加菌液 1	1515.040	0.998	0.970	6.863
添加菌液 2	940.703	0.999	0.967	6.377
添加菌液 3	1700.950	0.998	0.972	7.293
平均值	1385.564	0.998	0.970	6.844

3.4. 人工湿地植物根际微生物物种组成分析

外源生物添加改变人工湿地系统微生物丰富度及多样性，研究根际微生物分布可以更清晰地揭示生物强化作用下人工湿地微生物的演替机制。未添加菌液和添加菌液湿地系统根际微生物门水平分布如图 3(a)所示。门水平下的优势菌群分别为：变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)、疣微菌门(*Verrucomicrobiota*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)以及蛭弧菌门(*Bdellovibrionota*)。变形菌门是常见的反硝化菌门，如氢氧化细菌、亚硝酸盐氧化细菌等脱氮功能菌均属于变形菌门。作为人工湿地微生物群落中的优势菌门，变形菌门在系统脱氮除磷过程中发挥着核心生物功能群作用[13]。值得注意的是，定量分析显示不同

处理组间变形菌门绝对丰度存在显著差异($p < 0.05$), 其中添加菌液湿地系统的丰度均值较对照组提升10%。进一步分析表明, 这种微生物群落结构的改变与系统反硝化效能的提升呈显著正相关($p < 0.05$), 可能是通过强化反硝化功能基因的表达来实现的。厚壁菌门能够降解各种有机污染物, 可作为反硝化菌参与氮循环过程, 同时促进水生植物的生长[14], 其平均丰度高于添加菌液湿地系统。其余优势菌群在两个湿地系统中丰度表达差异不大。属水平下的根际微生物分布如图3(b)所示。其中排名前五的优势物种为: 假单胞菌属(*Pseudomonas*)、弯曲固氮菌属(*Azoarcus*)、噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)、食酸菌属(*Acidovorax*)及陶厄氏菌属(*Thauera*)。观察不同湿地组的微生物相对含量分布特征, 假单胞菌属丰度在实验组中增加37%, 该菌属不仅具备高效异养硝化-好氧反硝化(HN-AD)能力, 同时促进植物对氮的吸收, 进一步强化了“微生物-植物”耦合脱氮途径[10]。添加菌液湿地系统中弯曲固氮菌属平均丰度高于未添加菌液湿地系统。综上, 外源微生物 *Pseudomonas silesiensis* JL1 的添加显著重构了人工湿地根际生态系统的菌群结构及其丰度水平, 同时耐低温好氧反硝化菌株的定殖使得湿地系统低至 -1.8°C 时, 脱氮效率仍能维持90%以上, 有效提高人工湿地在低温环境下的运行稳定性。

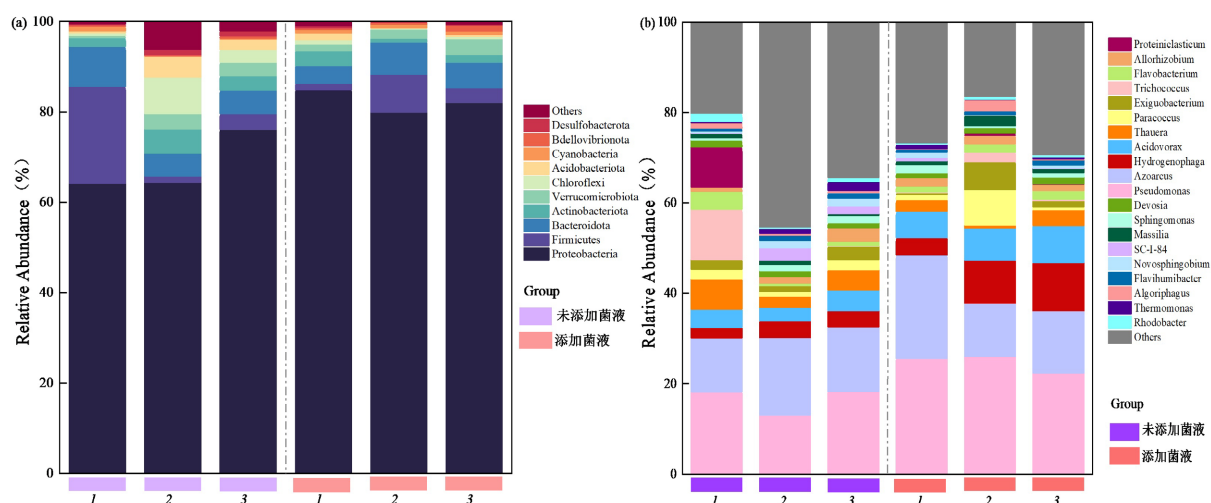


Figure 3. Species composition of artificial rhizosphere microorganisms at phylum level (a) and genus level (b)

图3. 人工根际微生物门水平(a)、属水平(b)物种组成

3.5. 氮素转化功能基因在人工湿地中的表达

本研究对关键氮代谢途径的功能基因丰度进行预测分析(图4)。结果表明, 外源菌液添加显著影响氮循环相关基因的表达模式, 具体如下: 1) 硝化途径基因表达特征: 氨氧化过程主要由氨单加氧酶基因(*amoA*、*amoB*、*amoC*)及羟胺氧化酶基因(*hao*)驱动[5][15]。处理组中 *amoA*、*amoB* 及 *amoC* 的相对丰度较对照组大幅提升, 表明外源菌液通过强化氨氧化功能菌群的活性, 促进 $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^-$ 的转化效率。2) 反硝化途径基因差异表达呈现显著组间差异。硝酸盐还原阶段: 膜结合型硝酸还原酶基因(*narG*、*narH*、*narI*)及周质硝酸还原酶基因(*napA*、*napB*)在处理组的相对丰度分别为对照组的 1.12 倍和 1.29 倍, 好氧反硝化菌的引入优先激活周质硝酸盐还原通路($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$), 可能与其对溶解氧波动的适应性相关[16]。亚硝酸盐还原阶段: 细胞色素 *cd1* 型(*nirS*)亚硝酸盐还原酶基因的丰度在处理组显著高于对照组, 有效避免了亚硝酸盐(NO_2^-)的中间积累(运行稳定期出水 $\text{NO}_2^- \text{-N} < 0.1 \text{ mg/L}$)。一氧化氮还原酶基因(*norB*、*norC*)及一氧化二氮还原酶基因(*nosZ*)的协同表达, 确保了反硝化途径的完整性($\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), 减少温室气体 N_2O 的释放风险。3) 硝酸盐异化还原至铵(DNRA)途径中, 亚硝酸盐还原酶基因(*nirB*、*nirD*)在处

理组的丰度较对照组略有提高,表明根际微生物通过调控 DNRA 过程影响氮素分配。此外,异养硝化功能菌(如 *Pseudomonas*)的富集,推测人工湿地中氨氮转化主要由异养硝化途径主导,而非传统自养硝化[17]。

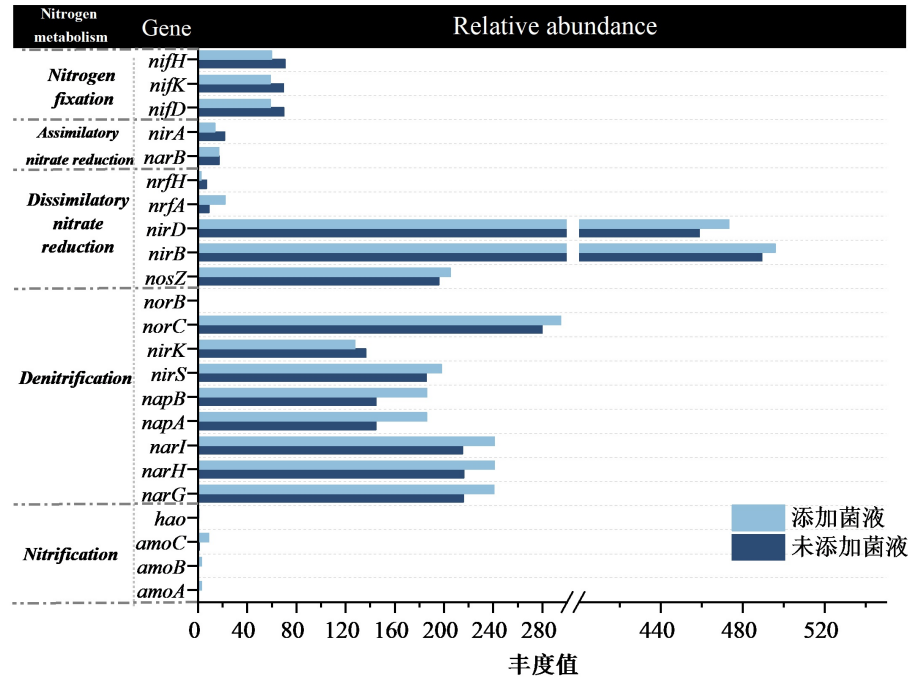


Figure 4. Relative abundance of functional genes in nitrogen transformation pathway of artificial rhizosphere microorganisms
图 4. 人工根际微生物氮转化途径中功能基因的相对丰度

4. 结论

- 1) 通过添加好氧反硝化菌 *Pseudomonas silesiensis* JL1 可有效强化人工湿地低温脱氮效能。在冬季低温条件下(平均气温-1.8℃),处理组对氨氮、硝态氮及总氮的去除率分别达到 97.03%、92.97%和 91.63%,较对照组提升 14.80%、15.57%和 15.37%。
- 2) 添加菌液人工湿地与对照组微生物群落结构与组成存在明显差异,导致 *Pseudomonas*、*Azoarcus* 和 *Hydrogenophaga* 物种的相对丰度显著增加,这些兼具异养硝化-好氧反硝化能力的菌群协同作用,形成高效脱氮微生态系统。
- 3) 从分子机制层面解析发现,菌剂添加促进参与硝化过程(amoA, amoB, amoC)和反硝化过程(narG, narH, narI, napA, napB, nirS, norB)关键功能基因的表达,构建完整的硝酸盐还原通路。

基金项目

2024 年甘肃省级人才项目“耐低温好氧反硝化——人工湿地的构建及氮强化去除机制研究”。

参考文献

[1] 杨长明, 张翔, 郝彦璋, 等. 人工湿地污水生态处理技术研究现状、挑战与展望[J]. 工业水处理, 2021, 41(9): 18-25.
[2] Zhao, L., Fu, G., Wu, J., Pang, W. and Hu, Z. (2021) Bioaugmented Constructed Wetlands for Efficient Saline

- Wastewater Treatment with Multiple Denitrification Pathways. *Bioresource Technology*, **335**, Article 125236. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125236>
- [3] Parde, D., Patwa, A., Shukla, A., Vijay, R., Killedar, D.J. and Kumar, R. (2021) A Review of Constructed Wetland on Type, Treatment and Technology of Wastewater. *Environmental Technology & Innovation*, **21**, Article 101261. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101261>
 - [4] Zhang, M., Huang, J., Sun, S., Rehman, M.M.U., He, S. and Zhou, W. (2021) Nitrogen Removal through Collaborative Microbial Pathways in Tidal Flow Constructed Wetlands. *Science of The Total Environment*, **758**, Article 143594. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143594>
 - [5] 冯亮, 袁春燕, 杨超, 等. 好氧反硝化生物脱氮技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3342-3354.
 - [6] Xi, H., Zhou, X., Arslan, M., Luo, Z., Wei, J., Wu, Z., *et al.* (2022) Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification Process: Promising but a Long Way to Go in the Wastewater Treatment. *Science of The Total Environment*, **805**, Article 150212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150212>
 - [7] 崔看利, 张丹, 方展明, 等. 人工湿地中异养硝化-好氧反硝化菌分离及脱氮除磷特性的研究[J]. 天津农学院学报, 2023, 30(4): 39-45.
 - [8] 董文迅, 李俊峰, 滕峪, 等. 一株耐盐耐冷异养硝化-好氧反硝化菌的脱氮特性[J]. 环境科学与技术, 2023, 46(7): 1-7.
 - [9] Zhang, J., Yan, Q., Bai, G., Guo, D., Chi, Y., Li, B., *et al.* (2023) Inducing Root Redundant Development to Release Oxygen: An Efficient Natural Oxygenation Approach for Subsurface Flow Constructed Wetland. *Environmental Research*, **239**, Article 117377. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117377>
 - [10] Ji, M., Hu, Z., Hou, C., Liu, H., Ngo, H.H., Guo, W., *et al.* (2020) New Insights for Enhancing the Performance of Constructed Wetlands at Low Temperatures. *Bioresource Technology*, **301**, Article 122722. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122722>
 - [11] 周俊威, 王强强, 蔡贤雷, 等. 风车草对人工湿地基质微生物多样性的影响[J]. 浙江农业科学, 2022, 63(4): 767-771.
 - [12] 余俊霞, 陈双荣, 刘凌言, 等. 复合人工湿地系统对低污染水总氮的净化效果及其微生物群落结构特征[J]. 环境工程, 2022, 40(1): 13-20.
 - [13] Zhang, M., Peng, Y., Yan, P., Huang, J., He, S., Sun, S., *et al.* (2022) Molecular Analysis of Microbial Nitrogen Transformation and Removal Potential in the Plant Rhizosphere of Artificial Tidal Wetlands across Salinity Gradients. *Environmental Research*, **215**, Article 114235. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114235>
 - [14] Li, Z., Cheng, R., Chen, F., Lin, X., Yao, X., Liang, B., *et al.* (2021) Selective Stress of Antibiotics on Microbial Denitrification: Inhibitory Effects, Dynamics of Microbial Community Structure and Function. *Journal of Hazardous Materials*, **405**, Article 124366. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124366>
 - [15] Yang, J., Feng, L., Pi, S., Cui, D., Ma, F., Zhao, H., *et al.* (2020) A Critical Review of Aerobic Denitrification: Insights into the Intracellular Electron Transfer. *Science of The Total Environment*, **731**, Article 139080. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139080>
 - [16] Song, T., Zhang, X., Li, J., Wu, X., Feng, H. and Dong, W. (2021) A Review of Research Progress of Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification Microorganisms (HNADMs). *Science of the Total Environment*, **801**, Article 149319. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149319>
 - [17] Yang, X., Chen, Y., Guo, F., Liu, X., Su, X. and He, Q. (2020) Metagenomic Analysis of the Biototoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles to Microbial Nitrogen Transformation in Constructed Wetlands. *Journal of Hazardous Materials*, **384**, Article 121376. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121376>