

单细胞视角下污水反硝化聚磷菌资源挖掘与代谢机制的研究进展

孙鹏城^{1,2}, 潘慧慧², 荆玉姝⁴, 夏文香¹, 任义尚², 荆晓艳^{2,3*}

1 青岛理工大学 环境与市政工程学院, 山东 青岛

2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 单细胞中心, 山东 青岛

3 青岛科技大学 生物工程学院, 山东 青岛

4 青岛水务集团环境能源有限公司, 山东 青岛

孙鹏城, 潘慧慧, 荆玉姝, 夏文香, 任义尚, 荆晓艳. 单细胞视角下污水反硝化聚磷菌资源挖掘与代谢机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1650-1666.

SUN Pengcheng, PAN Huihui, JING Yushu, XIA Wenxiang, REN Yishang, JING Xiaoyan. Advances in resource exploration and metabolic mechanism of denitrifying phosphorus-accumulating organisms in wastewater from a single-cell perspective[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(4): 1650-1666.

摘要: 随着水体富营养化和水资源短缺问题的加剧, 高效污水处理技术的开发变得尤为迫切。传统脱氮除磷工艺因微生物间的污泥龄差异和碳源竞争难以实现氮和磷的高效同步去除。反硝化聚磷菌(denitrifying phosphorus-accumulating organisms, DPAOs)具备同时去除氮和磷的能力, 展现出显著的污水处理潜力。然而, 基于群体水平的研究往往忽视了细胞间的异质性, 导致对 DPAOs 脱氮除磷机制的理解不够深入。采用传统的“先养后筛”法获得的高效 DPAOs 菌株数量有限, 且在实际污水处理环境中其稳定性和适应性面临诸多挑战。单细胞分析技术为深入理解微生物的生态位和代谢机制提供了全新视角。非破坏性单细胞表型识别技术, 如单细胞拉曼光谱技术(single cell Raman spectroscopy, SCRS)与培养技术耦合, 为 DPAOs 菌株的挖掘开辟了新途径。本文综述了 DPAOs 菌株资源挖掘及其代谢机制的研究现状与进展, 重点探讨了单细胞技术在揭示 DPAOs 脱氮除磷机制及资源挖掘中的潜力, 为 DPAOs 的研究和实际应用提供了新的理论基础和技术支持, 从而推动高效污水处理技术的发展。

关键词: 单细胞技术; 反硝化聚磷菌; 拉曼光谱; 微生物资源挖掘; 代谢机制

资助项目: 国家自然科学基金(32270109)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270109).

*Corresponding author. Tel: +86-532-80662653; E-mail: jingxy@qibebt.ac.cn

Received: 2024-10-21; Accepted: 2024-12-09; Published online: 2025-02-12

Advances in resource exploration and metabolic mechanism of denitrifying phosphorus-accumulating organisms in wastewater from a single-cell perspective

SUN Pengcheng^{1,2}, PAN Huihui², JING Yushu⁴, XIA Wenxiang¹, REN Yishang², JING Xiaoyan^{2,3*}

1 School of Environmental and Municipal Engineering, Qingdao University of Technology, Qingdao, Shandong, China

2 Single Cell Center, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong, China

3 College of Biological Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong, China

4 Qingdao Water Group Environmental Energy Co., Ltd., Qingdao, Shandong, China

Abstract: Amidst the escalating issues of water eutrophication and water resource scarcity, the development of high-efficiency wastewater treatment technologies has become increasingly imperative. Traditional nitrogen and phosphorus removal processes face challenges in achieving efficient simultaneous elimination of nitrogen and phosphorus due to the disparities in sludge age and the competition for carbon sources among microorganisms. Denitrifying phosphorus-accumulating organisms (DPAOs) possess the capability to remove both nitrogen and phosphorus, demonstrating significant potential in wastewater treatment. However, population-level studies often overlook cellular heterogeneity, leading to an inadequate understanding of the nitrogen and phosphorus removal mechanisms of DPAOs. Moreover, the “traditional culture-first, screen-second” method yields a limited number of efficient DPAO strains, the stability and adaptability of which face challenges in actual wastewater treatment environments. Single-cell analysis technologies provide new perspectives for a deeper understanding of microbial ecological niches and metabolic mechanisms. Coupling non-destructive single-cell phenotypic identification technologies, such as single-cell Raman spectroscopy (SCRS), with the culture method paves new avenues for the exploration of DPAO strains. This review summarizes the research status and progress in the exploration of DPAO strain resources and their metabolic mechanisms, focusing on the potential of single-cell technologies in revealing the mechanisms of nitrogen and phosphorus removal by DPAOs and in the exploration of DPAO resources. The aim is to provide a new theoretical foundation and technical support for the research and application of DPAOs, thereby promoting the development of efficient wastewater treatment technologies.

Keywords: single-cell technology; denitrifying phosphorus-accumulating organisms; Raman spectrum; microbial resource mining; metabolic mechanism

水体富营养化是指水中氮、磷等营养元素超标所引发的环境污染现象。藻类的过度繁殖不仅导致水生生物死亡,还会释放藻毒素,对人类健康构成严重威胁。城市化进程的加速使

得用水量急剧增加,大量未经处理或处理不达标的污水被排入自然水体,进一步加剧了水体富营养化问题。因此,对污水进行脱氮和除磷处理后再排放,成为缓解水体富营养化的必要

措施^[1]。生物法利用微生物的代谢活动降解污染物,具有经济、高效、无二次污染等优点,被广泛应用于城市污水的脱氮和除磷处理。然而,传统的脱氮和除磷过程是由反硝化菌(denitrifying bacteria, DB)和聚磷菌(phosphorus accumulating organisms, PAOs) 2种不同类群的微生物分别完成的,这2种微生物适宜于不同的环境条件,在同一污水处理系统中,由于污泥龄、溶解氧条件的差异以及对碳源的竞争,导致脱氮和除磷效率难以兼顾,已无法满足实际的污水处理需求^[2]。

反硝化聚磷菌(denitrifying phosphorus-accumulating organisms, DPAOs)的发现克服了传统生物脱氮除磷中DB与PAOs在碳源竞争和污泥龄矛盾方面的问题。DPAOs能以硝酸盐(NO_3^-)或亚硝酸盐(NO_2^-)作为电子受体,同时实现氮、磷的高效去除。由DPAOs理论发展而来的反硝化除磷(denitrifying phosphorus removal, DPR)技术,具有高脱氮除磷效率和低能耗的特点,与传统生物脱氮除磷工艺相比,可节约30%的曝气能耗、50%的污泥产出以及50%的碳源投加^[3],尤其在当前城市低碳源进水的条件下,具有巨大的应用潜力。

DPAOs的发现和应用使得污水处理更为经济和高效。然而,在实际应用中,废水成分和流量波动等环境因素常常导致DPR效果不稳定,甚至引发工艺崩溃^[4]。一些DPAOs菌株在受控的实验室条件下表现出良好的脱氮除磷性能,但在实际污水环境中的适应性和效能尚未得到充分验证^[5]。此外,已培养的菌株在污泥系统中的比例较小,可能无法充分代表DPAOs的核心种群,如具有特定功能的菌属如脱氯单胞菌属(*Dechloromonas*)和 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 在可培养的菌群中所占比例极低^[6]。基于菌群分析的功能变化,可能无法精确反映

单个微生物的代谢动态^[7],这种不确定性增加了揭示DPAOs代谢机制的复杂性。因此,采用单细胞分辨率对污水中原位DPAOs进行研究显得尤为重要。

单细胞分析技术的发展为DPAOs的原位研究开辟了新途径,并为菌株资源的挖掘提供了创新视角。该技术能够在不依赖微生物培养的情况下,直接对单细胞进行分析,从而揭示原位环境中细胞群体的内部异质性;非破坏性的单细胞分析技术,如SCRS能够在不破坏细胞的情况下识别微生物的形态与代谢物等特异性表型,这为与下游培养或单细胞基因测序等技术的整合提供了可能性^[8]。结合表型与基因型分析,研究人员可以更加全面地理解细胞的代谢状态及其在原位环境中的生态功能。SCRS通过特异性识别与非侵入性特点可实现“先筛后养”的策略。在无污染的液相分选环境中,细胞活性得以最大限度保持。拉曼图谱为分选后的单细胞提供了明确的身份识别,结合微流控芯片和光镊操作系统,能够精准控制和分选目标细胞。分选后的细胞采用单管单细胞培养,可有效避免非目标细胞对营养物质的竞争,从而更容易挖掘被忽视的原位菌种资源。

1 DPAOs的资源挖掘现状

1.1 DPAOs菌株的分离与鉴定

传统获得DPAOs菌株的方法通常采用“先养后筛”的策略。首先,在平板上无差别地分离和纯化菌株,然后通过溴麝香草酚蓝(bromothymol blue, BTB)染色、硝酸盐还原产气进行反硝化功能的初筛^[9]。随后,在厌氧和好氧条件下分别对聚 β -羟基丁酸盐(poly- β -hydroxybutyrate, PHB)和多聚磷酸盐(polyphosphate, Poly-P)进行染色,以验证聚磷功能^[10]。最后,通过在模拟人工废水中培养并检测氮、磷含量^[11],评估菌

株的脱氮和除磷性能。截至目前, 研究人员已在多种生态环境中筛选和分离出 DPAOs 菌株, 主要包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[12-15]、假黄单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)^[16]、柔武氏菌属(*Raoultella*)^[5]、代尔夫特菌属(*Delftia*)^[17]、芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[18]、索氏菌属(*Thauera*)^[19]、埃希氏菌属(*Escherichia*)^[20]、农杆菌属(*Agrobacterium*)^[21]、肠杆菌属(*Enterobacter*)^[22]、不动杆菌属(*Acinetobacter*)^[23]等。表 1 展示了一些 DPAOs 菌株的脱氮和除磷特性, 它们在实验室条件下表现出高效的脱氮和除磷性能。例如, 从养猪场废水中分离的菌株解鸟氨酸柔武氏菌(*Raoultella ornithinolytica*) YX-4 在最佳培养条件下, NO_3^- 和 NO_2^- 的去除率分别达到 97% 和 93%^[5]。这些数据表明, 这种菌株在废水处理中具有巨大的潜力和广阔的应用前景。

分子生物学的进步推动了对未培养 DPAOs 菌的鉴定。根据 *ppk* 基因, *Ca. Accumulibacter* 可分为 I 型和 II 型 2 种类型, 每种类型都有多个具有不同代谢特性的分支; 在这些分支中, I 型的特定分支 IC 表现出强大的反硝化能力, 能够利用 O_2 、 NO_2^- 和 NO_3^- 作为电子受体进行磷酸盐(PO_4^{3-})摄取^[24]。尽管 *Ca. Accumulibacter* 属在污水处理厂中普遍存在, 并且在实验室规模的反应器中进行了富集研究, 但目前仍未实现其培养。同样地, *Dechloromonas* 属已被证实为活跃的 DPAOs, 在污水处理中积极参与 DPR^[25]。一项针对丹麦及全球范围内 24 个污水处理厂的研究揭示了 *Dechloromonas* 属的丰度和分布情况, 发现 12 种不同的 *Dechloromonas*, 但大多数是新发现且未培养的物种^[26]。这些结果表明, 污水处理厂中仍存在大量未被挖掘的微生物资源。

1.2 DPAOs 资源挖掘的挑战

尽管分子生物学的发展有助于研究人员识

别未培养的 DPAOs 菌属, 但基于标记基因推断的功能和性状与实际表现并不完全一致^[27]。这表明, 仍需深入挖掘和综合研究功能菌株。传统的“先养后筛”方法虽为 DPAOs 菌株的培养提供了方法学依据, 但也存在一些限制。首先, 平板上的无差别培养和纯化菌株耗时耗力, 大量稀释涂布可能导致非目标细胞的生长^[11]。其次, 在筛选方法上, BTB 染色虽可验证反硝化产碱特性, 但 pH 升高也可能是其他代谢过程的结果, 特异性仍需提高^[9]。此外, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色法虽能对 Poly-P 进行特异性染色, 但同时可能对细胞有毒害作用, 可能影响细胞培养的活性^[28]。最后, 由于人工培养基难以模拟实际污水组分, 实验室的功能评估可能失真, DPAOs 菌株在实际污水环境中的适应性和效能未充分验证^[5]。因此, 迫切需要开发特异性、无损、非标记的方法, 以挖掘原位 DPAOs 菌种资源, 并准确评估它们在自然环境中的活性和功能。

2 DPAOs 的代谢机制研究现状

2.1 DPR 机制

在厌氧条件下, DPAOs 利用糖原提供的还原力将细胞内的 Poly-P 水解以产生能量, 并主动从环境中吸收挥发性脂肪酸, 将其转化为 PHB 储存在细胞内, 同时释放 PO_4^{3-} 到环境中^[29]。其中, 糖原的降解主要通过糖酵解途径进行, 糖原分解产生的电子和腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)主要用于将乙酰辅酶 A 转化为 PHB, 剩余的电子则在电子传递链(electron transport chain, ETC)中积累, 并作为信号分子控制氧化还原电位, 从而驱动 Poly-P 的水解^[30]。在缺氧条件下, DPAOs 氧化细胞内的 PHB 以产生电子和 ATP, 促使细胞利用 NO_3^- 或 NO_2^- 作为电子受体, 从而超量吸收环境中的

表1 DPAOs脱氮除磷特性及其生境

Table 1 Characterization of nitrogen and phosphorus removal by DPAOs and their habitats

Genus	Strain	Sample source	Nitrogen source	Carbon source	7/°C	pH	t/h	Nitrogen removal efficiency (%)	Phosphorus removal efficiency (%)	C/N	Initial nitrogen content (mg/L)	Initial phosphorus content (mg/L)	References
<i>Raoultella</i>	YX-4	Wastewater treatment pond at the pig farm	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	Disodium succinate	25	7.0	96	99.0	85.0	15	200.0	100.0	[5]
<i>Pseudomonas</i>	ADP-19	Polluted sediments and kimchi processing wastewater	NH ₄ ⁺	Sodium acetate	30	7.0–8.0	48	96.5	73.3	4	100.0	20.0	[12]
	YG-24	Eutrophic sediments from lake Taihu	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	Sodium carbonate	25	7.2	24	88.1	51.2	8	33.9	2.3±0.1	[13]
<i>Pseudoxanthomonas</i>	ZK-2	A city wastewater treatment facility in Guangzhou	NH ₄ ⁺	Sodium acetate	–	7.0	–	82.6	87.2	–	35.4±1.9	5.2±0.9	[14]
	K14	Sediment accumulation in freshwater farms in Tianjin	NH ₄ ⁺	Sodium pyruvate	27	7.5	24	99.8	98.0	10	110.1	26.2	[15]
	YPI	Sequencing batch reactor (SBR) for aerobic treatment of particulate matter	NO ₃ ⁻	Sodium citrate	30	8.0	20	75.3	–	–	30.0	8.0	[16]
<i>Delftia</i>	ZK-1	Exit of the aeration tank at a wastewater treatment facility in Guangzhou	NH ₄ ⁺	Sodium acetate	26±1	7.8	8	98.7	90.7	–	14.0	10.0	[17]
<i>Bacillus</i>	GHSP10	Wastewater generated by aquaculture operations	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	Glucose, sodium acetate	28	7.5	48	99.5	–	20	50.0	–	[18]
<i>Thauera</i>	SND5	Anoxic treatment tank at a sewage treatment plant in Singapore	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	Lactic acid	30	7.5	26	100.0	–	10	83.4	–	[19]
<i>Escherichia</i>	J16	Aerobic biological tanks at the Taiyuan city wastewater treatment facility	NO ₃ ⁻	Glucose, peptone, sodium acetate	30	7.2–8.0	24	94.5	96.0	–	69.3	8.9	[20]
<i>Agrobacterium</i>	LAD9	Liquid waste from the landfill	NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	Disodium succinate	30	7.0	24	100.0	76.6	8	100.0	10.0	[21]
<i>Enterobacter</i>	HW-15	Phosphorus-laden river water in southwestern Hubei Province, China.	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	Sodium acetate	30	7.2	24	93.2	62.0	8	100.0	35.6	[22]
<i>Acinetobacter</i>	C-13	SBR for laboratory use	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	Sodium acetate	30	7.5	24	100.0	69.7	–	100.0	4.4	[23]

– indicates no relevant data in the literature. In addition, the values for nitrogen removal efficiency only reflect results under optimal nitrogen source conditions.

PO_4^{3-} , 并将其以 Poly-P 的形式存储在细胞内^[31]。PHB 作为一种内源性聚合物, 在 DPR 过程中发挥着双重作用, 它不仅在 PO_4^{3-} 的积累过程中提供 ATP, 还通过在 ETC 中提供电子, 形成质子驱动力, 从而驱动 NO_3^- 或 NO_2^- 的反硝化还原反应^[32]。此外, PHB 的氧化降解速度比外部碳源慢, 这意味着它可以伴随整个除磷过程^[33]。DPAOs 能够同时实现 DPR, 总能耗低于独立的 PAOs 和 DB 之和, 因此可节约 50% 的碳源消耗和 30% 的曝气能耗。同时, 内源性代谢微生物的生长速度较慢, 污泥产生量也可以减少 50%^[3]。

Diaz 等^[34]研究表明, 胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)在 DPR 过程中起着重要作用。EPS 是一种细胞分泌的高分子聚合物, 通常在物质转移、细胞结构保护和絮凝过程中起关键作用^[35]。Hou 等^[36]发现, EPS 中含有高达 60%–80% 的磷, 表明 EPS 作为 DPR 活性污泥中的胞外磷储存库。Bahgat 等^[37]研究发现, 在缺氧阶段 DPAOs 对 PO_4^{3-} 的去除效果与 EPS 中磷的积累密切相关。Wang 等^[38]指出, EPS 中的金属离子(如 Cu^{2+} 、 K^+ 和 Mg^{2+})能够诱导 PO_4^{3-} 的络合, 形成沉淀并被吸附, EPS 对 PO_4^{3-} 去除的贡献高达 27%。此外, EPS 还通过转化和运输磷, 与细胞内 Poly-P 的积累代谢过程及 PO_4^{3-} 的沉淀过程同步进行^[39]。

2.2 DPR 的酶学过程

反硝化过程涉及一系列酶的协同催化, 包括硝酸盐还原酶(nitrate reductase, Nar)、亚硝酸盐还原酶(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), 其反应路径为 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ^[40]。该过程可以分为 4 个主要步骤: 第一步是在 Nar 的催化下, NO_3^- 被还原为 NO_2^- 。根据酶的位置, Nar 分为

膜结合型和周质型(periplasmic nitrate reductase, Nap)。相较于 Nap, Nar 在细胞质中还原 NO_3^- , 并释放质子以提供能量, 这种方式更加节能^[41]。第二步是在 Nir 催化下将 NO_2^- 还原为 NO。虽然 Nir 通常用作反硝化的标记基因标识, 但并不是唯一的, 因为一些厌氧氨氧化细菌(anaerobic ammonium oxidation, Anammox)缺乏 Nir 基因, 却仍能还原 NO_2^- 为 NO^[42]。第三步是在 Nor 的催化下将 NO 还原为 N_2O 。其中, N_2O 是一种强效温室气体, 温室效应是二氧化碳的 298 倍, 因此, 在反硝化过程中应尽量避免 N_2O 的积累^[29,42]。第四步是在 Nos 的催化下将 N_2O 转化为 N_2 。然而, Nos 对环境变化敏感, 例如, 游离亚硝酸(free nitrous acid, FNA)可能抑制 Nos 的活性, 进而导致 N_2O 的累积^[43–45]。Zhang 等^[46]研究表明, 适当保持 NO_2^- 浓度可以增强 DPAOs 的 FNA 耐受性, 并减少反硝化过程中 N_2O 的积累。此外, Gao 等^[47]的宏基因组学研究表明, 富含 DPAOs 的菌群中异常高水平的 N_2O 积累与非 DPAOs 微生物的存在相关。这些微生物的脱氮途径不完整, 可能导致 N_2O 的积累, 而不能完全转化为 N_2 。Ribera-Guardia 等^[43]发现, 不同反硝化酶之间的电子竞争是影响反硝化过程的重要因素, 因为反硝化过程中的所有步骤都需要电子供给还原力, 尤其在仅依赖外部碳源作为电子供体时, 供体不足可能会加剧这种竞争^[43]。

在 PO_4^{3-} 的代谢过程中, 有 2 种酶控制 Poly-P 的积累和水解^[48]。Poly-P 的积累由多磷酸激酶(polyphosphate kinase, PPK)催化, 负责将 ATP 末端的 PO_4^{3-} 残基转移到不断增长的 Poly-P 链上。PPK 分为 PPK1 和 PPK2, PPK1 负责转移 ATP 上的 PO_4^{3-} 残基, 而 PPK2 则负责转移三磷酸鸟苷或 ATP 上的 PO_4^{3-} 残基^[49]。Poly-P 的水解由内切聚磷酸酶(endopolyphosphatase, PPN)和外切聚磷酸酶(exopolyphosphatase, PPX)催化。

其中, PPN 催化 Poly-P 链分解为较短的链, 而 PPX 则进一步催化释放 Poly-P 链末端的 PO_4^{3-} , 同时释放能量^[50]。基于以上内容, DPAOs 脱氮除磷的酶学过程如图 1 所示。

2.3 DPR 代谢机制研究挑战

基因型构成了生物体潜在性状的遗传蓝图, 而表型反映了这些性状在特定环境条件下的实际表现。分析微生物的基因型和表型是理解其代谢机制的必要手段^[51-52]。然而, 在研究 DPAOs 的代谢机制时, 传统方法仍面临诸多挑战。一方面, 传统生理学方法依赖于细菌的可培养性来研究 DPAOs 的代谢机制, 但大量 DPAOs 尚未被识别或成功培养^[34]。为了研究这些微生物, 许多研究采用合成废水或实验室规模的序批式反应器 (sequencing batch reactor, SBR) 来富集 DPAOs 菌群。然而, 与原位环境相比, 实验室环境更为简单且易于调控, 这种环境差异可能影响细胞特定性状的表达, 从而导致代谢机制研究结果的失真^[6]。另一方面, 尽管

分子生物学技术在一定程度上促进了原位代谢机制的研究, 但荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 等技术仅适用于已鉴定的 DPAOs^[53]。宏基因组学及其他群体水平的研究方法仍然无法明确特定微生物在 DPR 过程中的具体贡献^[54]。此外, 这些分子技术通常具有破坏性, 无法对 DPAOs 细胞进行后续研究。因此, 对于 DPR 代谢机制的理解只能依赖于大量相关底物的测量进行间接推断。这种间接方法的局限性表明, 传统方法在研究 DPAOs 代谢机制时仍面临诸多挑战。

3 单细胞技术在 DPAOs 研究中的应用

单细胞技术是一系列用于分析和研究单个细胞的方法, 这些方法将研究的精度从群体细胞水平提升至单细胞水平, 从而揭示细胞群体中的微小差异, 有助于理解细胞的代谢功能和环境适应机制等过程^[55]。多种非破坏性的单细

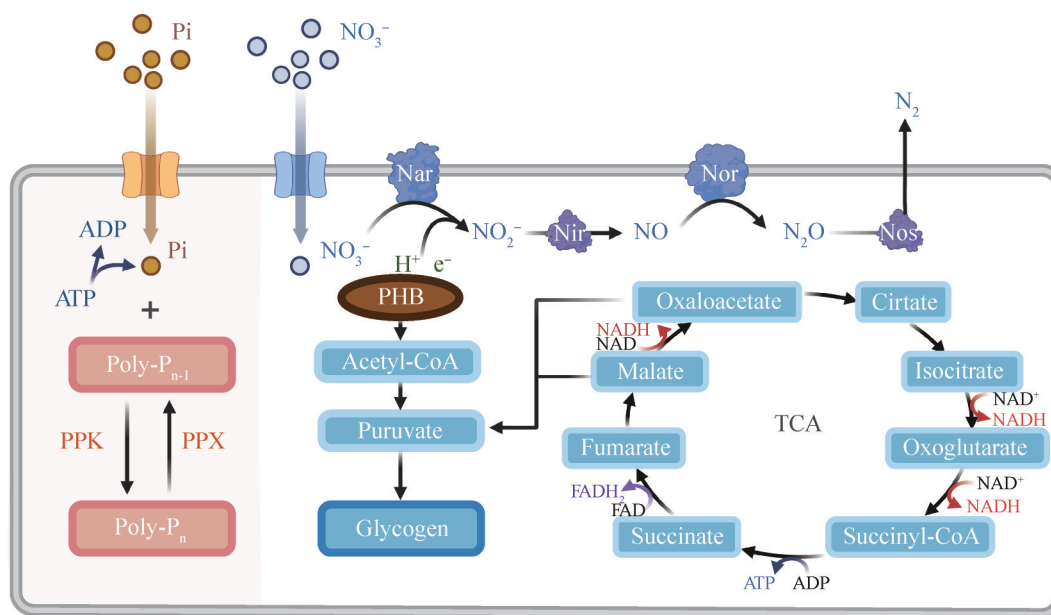


图1 DPAOs脱氮除磷的酶学过程

Figure 1 Enzymatic processes of denitrification and phosphorus removal by DPAOs.

胞技术可以结合使用, 例如先研究细胞表型, 再耦合后续的培养与测序, 这种方法被称为“新一代微生物生理学研究方法”^[8]。单细胞技术主要包括样品预处理、单细胞的识别分选、测序和培养等几个方面。在应用单细胞技术进行培养之前, 关键是能够分离出完整的活性单细胞^[56-57]。因此, 对于污水和土壤等环境样品的预处理, 可以采用温和的碘海醇密度梯度离心法来分离和纯化微生物^[58]。该方法已被证实能够获得高活性的细胞富集物, 同时结合超纯水充分洗样以去除环境背景干扰。此外, 在实验过程中需严格遵循无菌操作, 并设置空白对照, 以排除外来微生物的污染。具体可参考中国科学院青岛生物能源与过程研究所单细胞中心自主研发的单细胞拉曼分选耦合测序(single-cell raman-activated sorting and sequencing, scRACS-Seq)技术, 该技术能够快速、精准地将具有不同拉曼表型的细菌单细胞从菌群中分离出来, 同时保证单细胞拉曼光谱的质量, 分选准确性高达100%; 使用来自靶标细胞周围水相的空液滴作为阴性对照, 发现靶标细胞序列被菌群中其他细胞DNA污染的概率极低^[59]。这些工作充分证明了scRACS-Seq技术的灵敏度、特异性和可靠性。

3.1 单细胞技术在环境微生物资源挖掘中的应用

在单细胞培养过程中, 需结合单细胞表型技术以识别目标细胞; 随后, 可利用光镊或微流控技术直接将目标细胞直接从细胞群体中出来, 避免其他细胞的干扰; 最后, 在优化的培养基中进行培养, 这一完整流程被称为“先筛后养”策略^[8]。根据细胞表型识别方法, 可分为间接检测和直接检测2种类型。间接检测依赖于外部荧光标记或分子作为识别信号, 常见的方法包括荧光激活细胞分选(fluorescence

activated cell sorting, FACS)和磁性活化细胞分离(magnetic-activated cell sorting, MACS)^[60]。例如, Liang等^[61]通过监测荧光信号, 并结合激光诱导前向转移技术(laser induction front transfer, LIFT), 成功地从复杂的土壤微生物群落中分离和培养表达绿色荧光蛋白的*E. coli* JM1099。Xuan等^[62]利用磁性纳米颗粒筛选和富集具有乙腈降解活性的功能细菌, 并结合液滴微流控的单细胞分离方法, 成功实现了乙腈降解功能细菌的原位分离; 与传统方法相比, “先筛后养”技术能在物种层面上分离出更多的功能菌株。尽管基于标记的方法具有高度特异性的识别能力, 但仍可能对细胞造成损伤。如果可以直接根据细胞内在特性进行分选, 不仅能避免细胞损伤, 还能减少设计新标记物所需的时间和成本。细胞形态作为细胞特性的外在表现, 在细胞分选中的应用并不广泛, 这主要是因为研究人员尚不确定如何将细胞形态与功能相结合; 然而, 已有研究开始关注形态学与反硝化功能之间的关系, 为基于细胞形态筛选功能菌株提供了新的依据^[63]。近年来, SCRS的出现提供了一种非侵入性、无标记的方法, 用于直接检测细胞内在信息。SCRS基于拉曼散射效应, 能够探测生物细胞的分子振动, 提供丰富的细胞化学特征。超过1 000个拉曼峰对应不同的细胞化合物, 如蛋白质、核酸、脂质和碳水化合物, 形成独特的拉曼指纹图谱^[64]。例如, Jing等^[58]利用拉曼激活细胞分选(Raman-activated cell sorting, RACS)技术耦合分选培养, 成功实现了原位解磷菌的单细胞识别、分选和培养, 展示了该技术在环境菌群资源挖掘中的巨大潜力。Wang等^[65]和刁志钿等^[66]将RACS与微流控技术相结合, 研发了流式拉曼分选仪(flow-mode raman-activated cell sorter, FlowRACS), 进一步提高了单细胞分选的通量和效率, 为生命暗物

质的功能探测和资源挖掘提供了强有力的工具。不同细胞分选技术的比较见表 2。

3.2 单细胞拉曼在 DPAOs 资源挖掘中的应用前景

SCRS 在单细胞表型分析和培养中具有明显优势，有效克服了传统培养方法的不足，因而在 DPAOs 资源的挖掘中前景广阔。研究表明，DPR 过程中的关键代谢产物包括聚合物 Poly-P、PHB、糖原以及电子受体 NO_3^- 和 NO_2^- [67-68]，这些代谢产物均具有特定的拉曼特征峰。

Poly-P 是由数十至上百个磷酸基团聚合而成的生物大分子，能够在具备聚磷能力的细胞内大量积累，其储存量可达非 PAOs 细胞的 4-10 倍。Poly-P 的拉曼特征峰包括 P-O-P 振动波段 $690-700\text{ cm}^{-1}$ 和 PO_2^- 伸缩波段 $1168-1177\text{ cm}^{-1}$ [69]。因此，Poly-P 的拉曼特征

峰可作为评估聚磷能力的生物标志峰。

PHB 是 DPAOs 在厌氧条件下积累的一种内源性碳源，既为摄取 PO_4^{3-} 提供能量，又作为反硝化过程的电子供体 [70]。研究表明，PHB 的储备含量与反硝化性能密切相关，当细胞内 PHB 含量降低至 5% 以下时，反硝化活性会显著下降，甚至可能停止 [32]。Ding 等 [71] 研究表明，PHB 可提高反硝化过程中关键酶 Nar、Nir、Nor 和 Nos 的表达，增强反硝化效率，同时受 PHB 调控的主要群落具有良好的反硝化能力。因此，利用 PHB 识别内源反硝化过程是一种有效策略。PHB 的特征波段分别为 434 、 839 和 1723 cm^{-1} ，Gelder 等 [72] 通过检测 PHB 在 1730 cm^{-1} 的拉曼特征峰，实现了对细菌细胞中 PHB 含量的快速且无创监测。

NO_3^- 和 NO_2^- 作为 DPR 过程中的电子受体，

表2 不同细胞分选技术的比较

Table 2 Comparison of different cell sorting techniques

Technology	Signal type	Sorting speed (events/s) ^a	Advantages	Disadvantages	References
FACS	Intrinsic fluorescence and external labeling	>10 000	Rapid cell sorting technology that can process large sample volumes	Relatively few cells exhibit natural incidental fluorescence, and external fluorescent labeling may influence cellular metabolic activity	[60-61]
MACS	Magnetic response	2-10, >2 000	Facilitates the enrichment of target cells	Insufficient capacity for accurate single-cell sorting, only highly enriched, external magnetic labelling may impair cell activity, small range of applications	[60,62]
RACS	Cellular components/isotopic labelling	2-5	Directly sorts individual cells from environmental samples without labeling or disruption, making it ideal for precise single-cell sorting	Raman signal is susceptible to fluorescence interference, low throughput, high instrument cost	[58,66]
FlowRACS	Cellular components/isotopic labelling	>600	Utilizing RACS in conjunction with microfluidics enables high-throughput sorting of environmental flora	Raman signal is susceptible to fluorescence interference, high instrument cost	[65-66]

^a: The unit of measurement here refers to the rate, indicating the number of cells that can be sorted per second. The sorting speed data in the table is based on general performance indicators, and actual speeds may vary based on factors such as equipment model, sample characteristics, and experimental conditions.

是区分 DPAOs 与 PAOs 的重要依据。它们的拉曼特征峰分别位于 $1\,048\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,358\text{ cm}^{-1}$, 且强度与细胞中 NO_3^- 和 NO_2^- 的浓度成正比^[73]。然而, NO_3^- 和 NO_2^- 经过异化还原后最终以 N_2 形式排出, 可能使其在细胞内的积累量非常少^[47]。因此, 即使存在拉曼特征峰, 也必须考虑 NO_3^- 和 NO_2^- 在细胞内的浓度。

此外, 研究表明 DPAOs 的细胞形态与其功能之间存在关联。Yun 等^[74]的研究通过在厌氧/好氧和厌氧/缺氧的 SBR 中驯化富集 PAOs 与 DPAOs, 发现颗粒污泥中形成了不同形态的微生物, DPAOs 主要由杆状微生物组成, 而 PAOs 则以球形微生物为主; 他们认为不同的电子受体(O_2 、 NO_3^- 或 NO_2^-)可能促使微生物形成特定的形态。Carvalho 等^[75]的研究发现, 在以乙酸为碳源的 SBR 中球形菌占主导, 而以丙酸为碳源的 SBR 中杆状菌占主导; 他们认为, 不同电子供体影响微生物对电子受体的偏好, 从而导致细胞形态的差异^[75]。这些形态学差异可能反映了细胞内部反硝化代谢活动和电子传递效率的差异^[76]。因此, 通过形态识别反硝化功能是一种潜在的方法。

综上所述, 聚磷功能可以通过 Poly-P 的拉曼特征峰进行检测, 而反硝化功能则可以尝试利用 NO_3^- 、 NO_2^- 、PHB 的拉曼特征峰或细胞形态进行识别。单细胞分选技术提供了一种“先筛后养”的新策略, 不仅提高了 DPAOs 功能识别的准确性, 还能减少对细胞染色的依赖, 避免染色方法对细胞造成的毒性和活性损失。基于 SCRS 挖掘的原位功能菌, 对原位环境具有更好的适应性, 可以减少与土著菌的竞争抑制, 从而更容易实现定殖应用。高通量流式拉曼分选仪 FlowRACS 能够进一步提高分选通量, 满足复杂环境样本的大规模研究, 有助于筛选出低丰度的稀有菌株。同时, 结合单细胞基因组

扩增技术, 可以对难以培养的 DPAOs 菌株进行单细胞精度下的代谢途径和功能基因分析。这些优势将显著促进 DPAOs 资源的挖掘与功能研究, 使研究人员能够更深入地了解特定微生物的代谢特性和环境适应性, 从而优化污水处理工艺。

3.3 单细胞技术在环境微生物代谢机制中的应用

单细胞技术将研究精度从群体细胞水平提升至单细胞水平, 使研究者能够更加直观和深入地了解种群内部不同细胞的异质性, 包括形态结构、代谢状态和功能等。非破坏性的单细胞分析技术, 尤其是 SCRS, 能够无损地识别和分析细胞, 已成为连接表型和基因型的关键工具, 并在环境微生物代谢机制的研究中展现出巨大潜力。

无创光学显微镜和拉曼光谱能够表征细胞的形态及其内部代谢物。通过观察细胞在特定时刻所表达的表型特征, 研究人员能够动态监测细胞的代谢变化及其对环境的响应机制。例如, Fu 等^[77]通过光学显微镜动态观察微生物污泥形态变化及颗粒破碎的过程, 揭示了甲烷传质过程对反硝化厌氧甲烷菌和 Anammox 形态的影响机制。SCRS 检测可以形成细胞独特的“指纹图谱”, 包含约 1 000 条特征峰, 每条特征峰对应特定化学键的信息, 通过与已知的拉曼特征峰图谱数据库对比, 研究者可以快速识别菌株身份。Liu 等^[78]利用 SCRS 成功实现了海洋微生物的快速鉴定, 准确率达到 95%。

SCRS 与 FISH 技术联用, 可将特定微生物身份与细胞内代谢分析关联, 已用于原位功能细胞类群代谢机制研究。FISH 技术通过设计特异性探针对目标细胞进行杂交, 能够精确追踪和表征其分布。随后, 通过检测目标细胞的拉曼光谱分析其生化成分。Wang 等^[79]成功将

SCRS-FISH 技术应用于原位海水中未培养古细菌的研究, 揭示了古细菌之间生成脂肪酸能力的差异。

SCRS 与稳定同位素探测 (stable isotope probing, SIP) 技术联用, 可以更细致地了解细胞的代谢与功能, 常用的同位素包括 ^{15}N 、 ^{13}C 和 ^2H ^[80]。Cui 等^[81]通过 ^{15}N 诱导的细胞色素 c 拉曼偏移, 量化了复杂土壤菌群中细菌对 N_2 固定的贡献。Jing 等^[82]利用 ^{13}C 诱导的类胡萝卜素拉曼偏移, 检测并追踪了黄海海水中固定 CO_2 的微生物群体。Xu 等^[83]通过 SCRS 结合 ^2H , 在单细胞水平上研究了碳底物的代谢途径, 他们发现 SCRS 在 $2\,070\text{--}2\,300\text{ cm}^{-1}$ 范围内存在清晰且强烈的 C-D 振动带, 这为评估微生物的碳利用和代谢活性提供了新的依据。

SCRS 的非破坏性单细胞表型分析能够保持细胞活性, 使其可以直接对接测序, 这对于难培养微生物代谢机制的研究尤为重要。房安然等^[84]利用 SCRS 成功获得了尚不可培养的 Anammox 细菌纯菌株, 并在单细胞水平上解析了 Anammox 菌的基因组, 重构了其代谢通路。Zhang 等^[85]首次将高通量单细胞测序应用于活性污泥微生物研究, 揭示了与宏基因组结果一致的群落组成变化; 此外, 在单细胞扩增的基因组中, 27.5% 的基因在物种水平上是新的, 表明单细胞测序可以弥补宏基因组在揭示细胞基因组异质性方面的不足。然而, 由于单细胞基因组的完整度和覆盖率有限, 许多新见解可能被隐藏, 因此, 需要提高单细胞测序的通量。最近, 一种高通量单细胞技术——epicPCR 成功在单细胞水平上融合了功能基因与系统发育基因, 并能够一次性对数百万个液滴进行测序, 具备高特异性和高通量的优势; Wei 等^[86]通过设计特异性引物和优化 PCR 步骤改进了该技术, 使其能够更准确地扩增融合抗生素耐药基因

(antibiotic resistance gene, ARG) 和 16S rRNA 基因片段中的 ARG 序列, 成功应用于 ARG 宿主细胞的特异性追踪及 ARG 在污水处理厂中的传播机制研究。

综上所述, 光学显微镜和拉曼光谱以单细胞精度的高分辨率, 允许研究人员细致观察微生物细胞形态及胞内成分的代谢变化。SCRS 提供的丰富指纹图谱为细胞鉴定奠定了重要基础, 同时 FISH 技术支持微生物细胞身份识别, SCRS-FISH 联用技术已成功应用于原位环境中特定微生物类群的研究。SIP 技术能详细追踪细胞内部物质的代谢变化, 有助于深入解析其代谢过程。SCRS 的非破坏性特质使分选后的细胞能够无缝对接下游测序技术, 为表型与基因型之间的关联分析搭建了有效桥梁。此外, 近年来高通量单细胞测序技术的发展有效弥补了宏基因组在揭示细胞基因组异质性方面的不足。这些多样化的单细胞技术不仅深化了对微生物代谢过程的理解, 还为环境微生物的代谢机制分析提供了新的视角和思路。

3.4 单细胞技术在 DPAOs 代谢机制中的应用潜力

单细胞技术作为前沿的生物分析工具, 正逐步揭开微生物代谢机制的面纱。尽管尚未直接应用于 DPAOs 的代谢机制研究, 但从在 PAOs 和 DB 研究中的成功案例来看, 单细胞技术在探索 DPAOs 的聚磷和反硝化功能方面展现出了出众的研究潜力。

SCRS 能够直接检测细胞内关键聚合物的变化, 从而解析其代谢动力学。传统的聚磷机制主要源于对 *Ca. Accumulibacter* 的研究。然而, 由于尚未实现其纯培养, 细胞内聚合物的动力学只能通过检测相关底物的变化来间接推测^[87]。相比之下, SCRS 通过探测细胞内部的分子振动, 为生成每个细胞独特的“指纹图谱”, 通过

分析图谱中特征峰的变化,可以有效地反映细胞内化合物的相互作用^[64]。例如, Majed 等^[88]首次将 SCRS 应用于评估 EBPR 过程中的 PAOs 代谢动力学,揭示了厌氧条件下 PAOs 胞内 Poly-P 的消耗及好氧条件下的恢复过程。同时,基于 *Ca. Accumulibacter* 建立的聚磷代谢模型显然无法代表所有 PAOs。Fernando 等^[26]利用 FISH-SCRS 技术对污水处理厂中的 *Tetrasphaera* 属 PAOs 进行原位动力学研究,证明 *Tetrasphaera* 具有完全不同的聚磷代谢模式,且不会积累 PHB,这打破了传统聚磷代谢机制的固有观念。因此,原位环境中的 PAOs 可能具有多样化的聚磷代谢方式,而 SCRS 为深入探索聚磷代谢机制提供了有力的工具。

SCRS 还可作为表征 EBPR 性能的潜在指标。目前,该技术已成功应用于复杂环境中细胞内聚合物 PHB、糖原和 Poly-P 的识别与定量,有效评估了影响 EBPR 性能与稳定性的主要功能群体 PAOs 和 GAOs 的相对丰度^[89]。此外,先前观察到的 PO_4^{3-} 摄取与释放现象实际上源于不同 Poly-P 含量细胞丰度的变化^[90]。因此,通过 SCRS 检测具有 Poly-P 表型细胞丰度的变化,可以实时反映污水中的 EBPR 性能状态,从而指导污水处理工艺的调整与优化。

FISH-SCRS 技术能够精确评估污水处理厂中不同 PAOs 对磷去除的贡献。由于污水处理厂的水质条件和工艺流程存在差异,主导除磷的 PAOs 也会有所不同。识别本土优势 PAOs 并深入研究其代谢机制,以相应调控工艺参数促进其富集,从而提升污水的 EBPR 性能。PAOs 对总磷去除的贡献取决于细胞数量和细胞内最大饱和 Poly-P 含量^[88]。FISH-SCRS 技术能够将细胞身份与胞内聚合物直接关联分析,从而准确评估不同 PAOs 的磷去除贡献。例如, Petriglieri 等^[91]发现,在单细胞水平上, *Ca. Accumulibacter*

的最大饱和 Poly-P 含量优于 *Dechloromonas* 和 *Tetrasphaera*。然而, Fernando 等^[26]对 8 个污水处理厂中的 PAOs 进行研究发现, *Tetrasphaera* 在 6 个污水处理厂中的总磷去除贡献超过了 *Ca. Accumulibacter*,这可能归因于 *Tetrasphaera* 通过发酵获取能量的特殊能力,从而在污水中形成了竞争优势。因此, FISH-SCRS 技术有助于研究人员识别本土优势 PAOs 类群,有针对性地调控运行参数,从而提高污水 EBPR 的稳定性。

D_2O -SCRS 技术可用于研究反硝化过程中的电子转移机制。反硝化是指异养微生物在相关酶的催化作用下,通过 ETC 将初始电子供体的电子转移至最终电子受体 NO_3^- 或 NO_2^- 以产生能量^[92]。电子传递效率直接影响反硝化性能,但由于电子转移速度极快且缺乏实时检测手段,电子转移机制至今仍不明确^[93]。近年来, D_2O -SCRS 技术为单细胞层面上胞内物质转化提供了原位、非破坏性且实时的研究方法。Liu 等利用该技术发现,纳米级零价铁是通过增加细胞色素 c 含量来促进电子向酶转移,从而实现与 DB 的协同效应;另外,纳米级零价铁的添加通过降低 DB 的代谢活性,提高了 ATP 在反硝化过程中的可用性,使反硝化效率高达 99.8%^[94]。在特定条件下,代谢活性的降低可能并不妨碍反硝化,甚至可能带来积极影响。郭中瑞等^[95]进一步确认了 DB 的代谢活性与脱氮效率之间存在不同步性,展示了 D_2O -SCRS 技术在探索电子转移机制及代谢与反硝化效率关系中的应用潜力。

综上所述,单细胞技术的应用深化了对聚磷和反硝化代谢机制的理解。通过单细胞层面的细致观察和测量,揭示了代谢过程中的异质性与多样性,从而挑战了基于群体水平的推断,并提供了更准确、更深入的生物过程理解。尽

管当前研究主要集中于聚磷和反硝化代谢机制的单独分析,但 SCRS 的成功应用表明,未来可以探索 DPAOs 在聚磷和反硝化代谢机制方面的综合表现。通过结合这 2 种功能,有望全面揭示 DPAOs 在原位环境中的代谢机制。

4 总结与展望

DPAOs 作为能够同时去除氮和磷的微生物资源,在缓解水体富营养化及应对水资源短缺方面展现出巨大潜力。挖掘 DPAOs 菌株并探究其代谢机制,以理解其在不同生态环境下的代谢途径,对于提升其在原位条件下的适应性和稳定性至关重要。基于前人文献,本文系统分析了 DPAOs 菌株资源挖掘及代谢机制的研究现状,并强调了单细胞技术在揭示 DPAOs 脱氮除磷机制及其资源挖掘中的潜力,总结如下:

- (1) 通过 SCRS 检测胞内聚合物 Poly-P 是识别 DPAOs 聚磷功能的直接有效方法,反硝化功能的潜在识别方法可利用与其关系密切的内源电子供体 PHA,以及通常呈杆状的菌株形态;
- (2) FISH-SCRS 技术能直接将细胞身份与胞内聚合物关联分析,但需获取目标细胞序列以设计探针;
- (3) D₂O-SCRS 技术能够实时检测反硝化过程中的电子转移,有助于揭示反硝化异化还原过程与细胞代谢活性之间的代谢机制;
- (4) 单细胞测序可弥补宏基因组在揭示细胞基因组异质性方面的不足。

尽管单细胞技术展现出巨大的潜力,但在 DPAOs 研究中仍处于起步阶段,亟须进一步验证其有效性。此外,高成本和技术难度限制了单细胞技术的广泛应用。我们期待未来的创新能够降低分析成本,并与基因组学、代谢组学等领域结合,系统性探讨 DPAOs 的资源挖掘与代谢调控,为提升其在污水处理中的应用和工艺优化提供理论与技术支持。

作者贡献声明

孙鹏城:综述的整体构思和初稿的撰写,整合所有作者的贡献;潘慧慧:提供了重要的学术建议和修改文稿;荆玉姝:提供了重要的实验样本;夏文香:参与讨论;任义尚:协助“DPAOs 的脱氮除磷的酶学过程图”的设计与制作;荆晓艳:负责对内容进行细致的审查和指导。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] ZUO J, XIAO P, HEINO J, TAN FJ, SOININEN J, CHEN HH, YANG J. Eutrophication increases the similarity of cyanobacterial community features in lakes and reservoirs[J]. *Water Research*, 2024, 250: 120977.
- [2] ZHAO Q, LI XY, ZHANG L, LI JW, JIA TP, ZHAO Y, WANG LY, PENG YZ. Partial denitrifying phosphorus removal coupling with anammox (PDPRA) enables synergistic removal of C, N, and P nutrients from municipal wastewater: a year-round pilot-scale evaluation[J]. *Water Research*, 2024, 253: 121321.
- [3] KUBA T, VAN LOOSDRECHT MCM, 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.
- [4] SUN YW, PENG YZ, CHEN YH, ZHANG Q, LI XY. Insights into the denitrifying phosphorus removal decay processes by profiling of the response mechanism of denitrifying phosphate-accumulating organisms to starvation stress[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 357: 127352.
- [5] FU WL, ZHAO YX, WANG Q, YU X, SONG ZY, DUAN PF, XU MJ, ZHANG X, RAO ZM. Characterization of simultaneous removal of nitrogen and phosphorus by novel *Raoultella ornithinolytica* strain YX-4 and application in real farm wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 391: 129922.
- [6] LI SQ, GUO Y, ZHANG X, FENG L, YONG XL, XU J, LIU YC, HUANG X. Advanced nitrogen and phosphorus removal by the symbiosis of PAOs, DPAOs and DGAOs in a pilot-scale A²O/A+MBR process with a low C/N ratio of influent[J]. *Water Research*, 2023, 229: 119459.
- [7] WU T, YANG SS, ZHONG L, PANG JW, ZHANG LY, XIA XF, YANG F, XIE GJ, LIU BF, REN NQ, DING J. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal: what have we done so far and how do we need

- to do in the future?[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 856: 158977.
- [8] HATZENPICHLER R, KRUKENBERG V, SPIETZ RL, JAY ZJ. Next-generation physiology approaches to study microbiome function at single cell level[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(4): 241-256.
- [9] 袁野, 周佳, 屈建航, 张博源, 罗宇, 李海峰. 高效反硝化聚磷菌的筛选及其脱氮除磷条件和性能研究[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(7): 266-276.
- YUAN Y, ZHOU J, QU JH, ZHANG BY, LUO Y, LI HF. Screening of an efficient denitrifying phosphorus-accumulating bacterium and its denitrification and phosphorus removal[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(7): 266-276 (in Chinese).
- [10] SUN L, CAO WP, ZHANG HF, DONG YW, ZHANG JK, TU BJ, ZHANG YQ, LI QN. Optimal growth conditions and nutrient removal characteristic of a denitrifying phosphorus-accumulating organism[J]. *Desalination and Water Treatment*, 2016, 57(52): 25028-25035.
- [11] SUN L, ZHAO XX, ZHANG HF, ZHANG YQ. Biological characteristics of a denitrifying phosphorus-accumulating bacterium[J]. *Ecological Engineering*, 2015, 81: 82-88.
- [12] LI BT, JING FY, WU DS, XIAO B, HU ZQ. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorus by a novel aerobic denitrifying phosphorus-accumulating bacterium, *Pseudomonas stutzeri* ADP-19[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 321: 124445.
- [13] LI CE, YANG JS, WANG X, WANG ET, LI BZ, HE RX, YUAN HL. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 182: 18-25.
- [14] LIU H, WANG Q, SUN YF, ZHOU KQ, LIU W, LU Q, MING CB, FENG XD, DU JJ, JIA XS, LI J. Isolation of a non-fermentative bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, using intracellular carbon for denitrification and phosphorus-accumulation and relevant metabolic mechanisms[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 211: 6-15.
- [15] HOU PF, SUN XL, FANG ZM, FENG YY, GUO YY, WANG QK, CHEN CX. Simultaneous removal of phosphorous and nitrogen by ammonium assimilation and aerobic denitrification of novel phosphate-accumulating organism *Pseudomonas chloritidis* K14[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125621.
- [16] WANG HY, ZHANG W, YE YP, HE QL, ZHANG SL. Isolation and characterization of *Pseudoxanthomonas* sp. strain YP1 capable of denitrifying phosphorus removal (DPR)[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2018, 35(6): 537-543.
- [17] LI HK, LIU H, ZENG QQ, XU MY, LI YY, WANG W, ZHONG YM. Isolation and appraisal of a non-fermentative bacterium, *Delftia tsuruhatensis*, as denitrifying phosphate-accumulating organism and optimal growth conditions[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2020, 36: 101296.
- [18] ZHANG MY, PAN LQ, SU C, LIU LP, DOU L. 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.
- [19] WANG QK, HE JZ. Complete nitrogen removal via simultaneous nitrification and denitrification by a novel phosphate accumulating *Thauera* sp. strain SND5[J]. *Water Research*, 2020, 185: 116300.
- [20] 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*, 2018, 78(11): 2288-2296.
- [21] MA T, CHEN Q, GUI MY, LI C, NI JR. Simultaneous denitrification and phosphorus removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 under varying oxygen concentration[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(7): 3337-3346.
- [22] WAN WJ, HE DL, XUE ZJ. Removal of nitrogen and phosphorus by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a denitrifying phosphorus-accumulating bacterium *Enterobacter cloacae* HW-15[J]. *Ecological Engineering*, 2017, 99: 199-208.
- [23] CHEN HJ, ZHOU WZ, ZHU SN, LIU F, QIN L, XU C, WANG ZM. Biological nitrogen and phosphorus removal by a phosphorus-accumulating bacteria *Acinetobacter* sp. strain C-13 with the ability of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 322: 124507.
- [24] CAMEJO PY, OWEN BR, MARTIRANO J, MA J, KAPOOR V, SANTO DOMINGO J, McMAHON KD, NOGUERA DR. Candidatus Accumulibacter phosphatis clades enriched under cyclic anaerobic and microaerobic conditions simultaneously use different electron acceptors[J]. *Water Research*, 2016, 102: 125-137.
- [25] LI HK, ZHONG YM, HUANG H, TAN ZX, SUN Y, LIU H. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal by interactions between phosphate accumulating organisms (PAOs) and denitrifying phosphate accumulating organisms (DPAOs) in a sequencing batch reactor[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 744: 140852.
- [26] FERNANDO EY, MCILROY SJ, NIERYCHLO M, HERBST FA, PETRIGLIERI F, SCHMID MC, WAGNER M, NIELSEN JL, NIELSEN PH. Resolving the individual contribution of key microbial populations to enhanced biological phosphorus removal with Raman-FISH[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(8): 1933-1946.
- [27] MCDANIEL EA, VAN STEENBRUGGE JJM, NOGUERA DR, McMAHON KD, RAAIJMAKERS JM, MEDEMA MH, OYSERMAN BO. TbasCO: trait-based comparative 'omics identifies ecosystem-level and niche-differentiating adaptations of an engineered microbiome[J]. *ISME Communications*, 2022, 2: 111.
- [28] ASCHAR-SOBBI R, ABRAMOV AY, DIAO C, KARGACIN ME, KARGACIN GJ, FRENCH RJ, PAVLOV E. High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach[J]. *Journal of Fluorescence*, 2008, 18(5): 859-866.
- [29] DAI HL, HAN T, SUN TS, ZHU H, WANG XG, LU XW. Nitrous oxide emission during denitrifying phosphorus removal process: a review on the mechanisms and influencing factors[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021,

- 278: 111561.
- [30] ZHAO JQ, XIE ST, LUO YH, LI XL. NADH accumulation during DPAO denitrification in a simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal system[J]. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2021, 7(10): 1819-1827.
 - [31] WANG QY, YU DS, WANG XX, CHU GY, HE TH, ZHAO J. Development of novel denitrifying nitrite accumulation and phosphorus removal (DNAPR) process for offering an alternative pretreatment to achieve mainstream Anammox[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 319: 124164.
 - [32] SUN YW, PENG YZ, ZHANG JH, LI XY, ZHANG Q, ZHANG L. Effect of endogenous metabolisms on survival and activities of denitrifying phosphorus removal sludge under various starvation conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 315: 123839.
 - [33] THIRD KA, BURNETT N, CORD-RUWISCH R. Simultaneous nitrification and denitrification using stored substrate (PHB) as the electron donor in an SBR[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 83(6): 706-720.
 - [34] DIAZ R, MACKEY B, CHADALAVADA S, KAINTHOLA J, HECK P, GOEL R. Enhanced bio-P removal: past, present, and future: a comprehensive review[J]. *Chemosphere*, 2022, 309: 136518.
 - [35] YIN ZY, YUAN YC, ZHANG R, GAN JT, YU L, QIU XH, CHEN RP, WANG Q. Understanding *Bacillus* response to salt stress: growth inhibition, enhanced EPS secretion, and molecular adaptation mechanisms[J]. *Process Biochemistry*, 2024, 146: 412-422.
 - [36] HOU RR, YANG P, QIAN ST, YUAN RF, CHEN ZB, ZHOU BH, CHEN HL. 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.
 - [37] BAHGAT N, WILFERT P, PICKEN SP, LIN YM, KORVING L, VAN LOOSDRECHT MCM. Impact of phosphorus on the functional properties of extracellular polymeric substances recovered from sludge[J]. *Water Research*, 2025, 274: 123019.
 - [38] WANG YY, QIN J, ZHOU S, LIN XM, YE L, SONG CK, YAN Y. Identification of the function of extracellular polymeric substances (EPS) in denitrifying phosphorus removal sludge in the presence of copper ion[J]. *Water Research*, 2015, 73: 252-264.
 - [39] HUANG L, JIN YN, ZHOU DH, LIU LX, HUANG SK, ZHAO YQ, CHEN YC. A review of the role of extracellular polymeric substances (EPS) in wastewater treatment systems[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(19): 12191.
 - [40] ZENG W, ZHANG J, WANG AQ, PENG YZ. Denitrifying phosphorus removal from municipal wastewater and dynamics of "*Candidatus Accumulibacter*" and denitrifying bacteria based on genes of *ppk1*, *narG*, *nirS* and *nirK*[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 207: 322-331.
 - [41] WANG CR, HE TX, ZHANG MM, ZHENG CX, YANG L, YANG L. Review of the mechanisms involved in dissimilatory nitrate reduction to ammonium and the efficacies of these mechanisms in the environment[J]. *Environmental Pollution*, 2024, 345: 123480.
 - [42] KUYPERS MMM, MARCHANT HK, KARTAL B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263-276.
 - [43] RIBERA-GUARDIA A, MARQUES R, ARANGIO C, CARVALHEIRA M, OEHMEN A, PIJUAN M. Distinctive denitrifying capabilities lead to differences in N₂O production by denitrifying polyphosphate accumulating organisms and denitrifying glycogen accumulating organisms[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 219: 106-113.
 - [44] ZHOU Y, GANDA L, LIM M, YUAN ZG, KJELLEBERG S, NG WJ. Free nitrous acid (FNA) inhibition on denitrifying poly-phosphate accumulating organisms (DPAOs) [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(1): 359-369.
 - [45] ZUO ZQ, ZHENG M, LIU T, PENG YZ, YUAN ZG. New perspectives in free nitrous acid (FNA) uses for sustainable wastewater management[J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2023, 18(2): 26.
 - [46] ZHANG RM, HE JG, WANG MF, DUAN SY, ZHANG J. Nitrate and nitrite utilization during denitrifying phosphorus removal: electron acceptor preference and feasible process combinations[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 406: 131081.
 - [47] GAO H, MAO YP, ZHAO XT, LIU WT, ZHANG T, WELLS G. Genome-centric metagenomics resolves microbial diversity and prevalent truncated denitrification pathways in a denitrifying PAO-enriched bioprocess[J]. *Water Research*, 2019, 155: 275-287.
 - [48] NI M, CHEN Y, PAN Y, HUANG Y, LI DP, LI L, HUANG B, SONG ZW. Study on community structure and metabolic mechanism of dominant polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) and glycogen-accumulating organisms (GAOs) in suspended biofilm based on phosphate recovery[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 815: 152678.
 - [49] PAULA FS, CHIN JP, SCHNÜRER A, MÜLLER B, MANESIOTIS P, WATERS N, MACINTOSH KA, QUINN JP, CONNOLLY J, ABRAM F, McGRATH JW, O'FLAHERTY V. The potential for polyphosphate metabolism in Archaea and anaerobic polyphosphate formation in *Methanosarcina mazei*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 17101.
 - [50] RANGARAJAN ES, NADEAU G, LI YG, WAGNER J, HUNG MN, SCHRAG JD, CYGLER M, MATTE A. The structure of the exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 suggests a binding mode for long polyphosphate chains[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 359(5): 1249-1260.
 - [51] ACKERMANN M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(8): 497-508.
 - [52] DOWELL RD, RYAN O, JANSEN A, CHEUNG D, AGARWALA S, DANFORD T, BERNSTEIN DA, ROLFE PA, HEISLER LE, CHIN B, NISLOW C, GIAEVER G, PHILLIPS PC, FINK GR, GIFFORD DK, BOONE C. Genotype to phenotype: a complex problem[J]. *Science*, 2010, 328(5977): 469.

- [53] OEHMEN A, CARVALHO G, FREITAS F, REIS MAM. Assessing the abundance and activity of denitrifying polyphosphate accumulating organisms through molecular and chemical techniques[J]. *Water Science and Technology*, 2010, 61(8): 2061-2068.
- [54] LI YF, GE SH, LUAN JL, WANG YZ, ZHUANG LL, ZHANG J. Optimization and mechanism of strengthened biological contact oxidation for rural domestic wastewater treatment[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2024, 65: 105788.
- [55] BAYSOY A, BAI ZL, SATIJA R, FAN R. The technological landscape and applications of single-cell multi-omics[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24(10): 695-713.
- [56] TANG XS, WU QY, SHANG LD, LIU KX, GE Y, LIANG P, LI B. Raman cell sorting for single-cell research[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 12: 2296-4185.
- [57] NITTA N, IINO T, ISOZAKI A, YAMAGISHI M, KITAHAMA Y, SAKUMA S, SUZUKI Y, TEZUKA H, OIKAWA M, ARAI F, ASAI T, DENG DH, FUKUZAWA H, HASE M, HASUNUMA T, HAYAKAWA T, HIRAKI K, HIRAMATSU K, HOSHINO Y, INABA M, et al. Raman image-activated cell sorting[J]. *Nature Communications*, 2020, 11:3452.
- [58] JING XY, GONG YH, PAN HH, MENG Y, REN YS, DIAO ZD, MU RZ, XU T, ZHANG J, JI YT, LI YD, WANG C, QU LY, CUI L, MA B, XU J. Single-cell Raman-activated sorting and cultivation (scRACS-culture) for assessing and mining *in situ* phosphate-solubilizing microbes from nature[J]. *ISME Communications*, 2022, 2(1): 106.
- [59] JING XY, GONG YH, XU T, MENG Y, HAN X, SU XL, WANG JM, JI YT, LI YD, JIA ZJ, MA B, XU J. One-cell metabolic phenotyping and sequencing of soil microbiome by Raman-activated gravity-driven encapsulation (RAGE)[J]. *mSystems*, 2021, 6(3): e0018121.
- [60] FONG CY, PEH GSL, GAUTHAMAN K, BONGSO A. Separation of SSEA-4 and TRA-1-60 labelled undifferentiated human embryonic stem cells from a heterogeneous cell population using magnetic-activated cell sorting (MACS) and fluorescence-activated cell sorting (FACS)[J]. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2009, 5(1): 72-80.
- [61] LIANG P, LIU B, WANG Y, LIU KX, ZHAO YP, HUANG WE, LI B. Isolation and culture of single microbial cells by laser ejection sorting technology[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(3): e0116521.
- [62] XUAN YY, YIN M, SUN YJ, LIU MJ, BAI GM, DIAO ZD, MA B. Magnetic nanoparticle-mediated enrichment technology combined with microfluidic single cell separation technology: a technology for efficient separation and degradation of functional bacteria in single cell liquid phase[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 401: 130686.
- [63] LI MQ, XU J, ROMERO-GONZALEZ M, BANWART SA, HUANG WE. Single cell Raman spectroscopy for cell sorting and imaging[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(1): 56-63.
- [64] WANG DQ, HE PS, WANG ZJ, LI GY, MAJED N, GU AZ. Advances in single cell Raman spectroscopy technologies for biological and environmental applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 64: 218-229.
- [65] WANG XX, REN LH, DIAO ZD, HE YH, ZHANG JP, LIU M, LI YD, SUN LJ, CHEN RZ, JI YT, XU J, MA B. Robust spontaneous raman flow cytometry for Single-Cell metabolic phenome profiling via pDEP-DLD-RFC[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(16): 2207497.
- [66] 刁志钊, 王喜先, 孙晴, 徐健, 马波. 单细胞拉曼光谱测试分选装备研制及应用进展[J]. *合成生物学*, 2023, 4(5): 1020-1035.
- DIAO ZD, WANG XX, SUN Q, XU J, MA B. Advances and applications of single-cell Raman spectroscopy testing and sorting equipment[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(5): 1020-1035 (in Chinese).
- [67] KOCEVSKA S, MAGGIONI GM, CROUSE SH, PRASAD R, ROUSSEAU RW, GROVER MA. Effect of ion interactions on the Raman spectrum of NO_3^- : toward monitoring of low-activity nuclear waste at Hanford[J]. *Chemical Engineering Research and Design*, 2020, 181: 173-194.
- [68] WANG PX, SUN Y, LI X, SHAN JR, XU Y, LI GL. One-step chemical reaction triggered surface enhanced Raman scattering signal conversion strategy for highly sensitive detection of nitrite[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2021, 113: 103221.
- [69] OEHMEN A, CARVALHO G, LOPEZ-VAZQUEZ CM, VAN LOOSDRECHT MCM, REIS MAM. Incorporating microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms[J]. *Water Research*, 2010, 44(17): 4992-5004.
- [70] COATS ER, BRINKMAN CK, PETERS C, MACINNIS C, BOYD B. Phosphorus removal from fermented dairy manure concurrent with polyhydroxybutyrate-co-valerate synthesis under aerobic conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 402: 130789.
- [71] DING K, XU LG, CHEN YL, LI WX, CHAI XL, DAI XH, WU BR. Mechanistic insights into polyhydroxyalkanoate-enhanced denitrification capacity of microbial community: evolution of community structure and intracellular electron transfer of nitrogen metabolism[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 856: 159147.
- [72] GELDER JD, WILLEMSE-ERIX D, SCHOLTES MJ, SANCHEZ JI, MAQUELIN K, VANDENABEELE P, BOEVER PD, PUPPELS GJ, MOENS L, VOS PD. Monitoring poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(6): 2155-2160.
- [73] SADERGASKI LR, HAGER TJ, ANDREWS HB. Design of experiments, chemometrics, and Raman spectroscopy for the quantification of hydroxylammonium, nitrate, and nitric acid[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(8): 7287-7296.
- [74] YUN G, LEE H, HONG Y, KIM S, DAIGGER GT, YUN Z. The difference of morphological characteristics and population structure in PAO and DPAO granular sludges[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2019, 76: 388-402.
- [75] CARVALHO G, LEMOS PC, OEHMEN A, REIS MAM.

- Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure[J]. *Water Research*, 2007, 41(19): 4383-4396.
- [76] GUISASOLA A, QURIE M, del MAR VARGAS M, CASAS C, BAEZA JA. Failure of an enriched nitrite-DPAO population to use nitrate as an electron acceptor[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(7): 689-695.
- [77] FU L, ZHANG F, BAI YN, LU YZ, DING J, ZHOU DD, LIU Y, ZENG RJ. Mass transfer affects reactor performance, microbial morphology, and community succession in the methane-dependent denitrification and anaerobic ammonium oxidation co-culture[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 651: 291-297.
- [78] LIU YY, XU JJ, TAO Y, FANG T, DU WB, YE AP. Rapid and accurate identification of marine microbes with single-cell Raman spectroscopy[J]. *The Analyst*, 2020, 145(9): 3297-3305.
- [79] WANG Y, XU JB, CUI DY, KONG LC, CHEN SZ, XIE W, ZHANG CL. Classification and identification of Archaea using single-cell Raman ejection and artificial intelligence: implications for investigating uncultivated microorganisms[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(51): 17012-17019.
- [80] WANG Y, HUANG WE, CUI L, WAGNER M. Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 41: 34-42.
- [81] CUI L, YANG K, LI HZ, ZHANG H, SU JQ, PARASKEVAIDI M, MARTIN FL, REN B, ZHU YG. Functional single-cell approach to probing nitrogen-fixing bacteria in soil communities by resonance Raman spectroscopy with $^{15}\text{N}_2$ labeling[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(8): 5082-5089.
- [82] JING XY, GONG YH, XU T, DAVISON PA, MACGREGOR-CHATWIN C, HUNTER CN, XU L, MENG Y, JI YT, MA B, XU J, HUANG WE. Revealing CO_2 -fixing SAR11 bacteria in the ocean by Raman-based single-cell metabolic profiling and genomics[J]. *Biodesign Research*, 2022, 2022: 9782712.
- [83] XU JB, ZHU D, IBRAHIM AD, ALLEN CCR, GIBSON CM, FOWLER PW, SONG YZ, HUANG WE. Raman deuterium isotope probing reveals microbial metabolism at the single-cell level[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(24): 13305-13312.
- [84] 房安然. 厌氧氨氧化快速启动及其代谢途径重构与机制[D]. 黑龙江: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2021.
FANG AR. Mechanism of rapid start-up and metabolic pathway reconstruction of Anammox[D]. Heilongjiang: Doctor Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2021 (in Chinese).
- [85] ZHANG YL, XUE BJ, MAO YP, CHEN X, YAN WF, WANG YR, WANG YL, LIU L, YU JL, ZHANG XJ, CHAO S, TOPP E, ZHENG WS, ZHANG T. High-throughput single-cell sequencing of activated sludge microbiome[J]. *Environmental Science and Ecotechnology*, 2025, 23: 100493.
- [86] WEI ZY, FENG K, WANG ZJ, ZHANG Y, YANG M, ZHU YG, VIRTÀ MPJ, DENG Y. High-throughput single-cell technology reveals the contribution of horizontal gene transfer to typical antibiotic resistance gene dissemination in wastewater treatment plants[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(17): 11824-11834.
- [87] BUCCI V, MAJED N, HELLWEGGER FL, GU AZ. Heterogeneity of intracellular polymer storage states in enhanced biological phosphorus removal (EBPR): observation and modeling[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(6): 3244-3252.
- [88] MAJED N, MATTHAUS C, DIEM M, GU AZ. Evaluation of intracellular polyphosphate dynamics in enhanced biological phosphorus removal process using Raman microscopy[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(14): 5436-5442.
- [89] MAJED N, GU AZ. Application of Raman microscopy for simultaneous and quantitative evaluation of multiple intracellular polymers dynamics functionally relevant to enhanced biological phosphorus removal processes[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(22): 8601-8608.
- [90] WANG DQ, HAN I, MCCULLOUGH K, KLAUS S, LEE J, SRINIVASAN V, LI GY, WANG ZL, BOTT CB, MCQUARRIE J, STINSON BM, DEBARBADILLO C, DOMBROWSKI P, BARNARD J, GU AZ. Side-stream enhanced biological phosphorus removal (S2EBPR) enables effective phosphorus removal in a pilot-scale A-B stage shortcut nitrogen removal system for mainstream municipal wastewater treatment[J]. *Water Research*, 2024, 251: 121050.
- [91] PETRIGLIERI F, SINGLETON C, PECES M, PETERSEN JF, NIERYCHLO M, NIELSEN PH. “*Candidatus* Dechloromonas phosphorotropha” and “*Ca. D. phosphorivorans*”, novel polyphosphate accumulating organisms abundant in wastewater treatment systems[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(12): 3605-3614.
- [92] 陈甜甜, 王先宝, 张雨笛, 高楚玥, 谢怡俐, 张安龙. 氧化还原介体强化生物反硝化脱氮研究进展[J]. *环境化学*, 2021, 40(10): 3199-3206.
CHEN TT, WANG XB, ZHANG YD, GAO CY, XIE YL, ZHANG AL. Enhanced biological denitrification by redox mediators: a review[J]. *Environmental Chemistry*, 2021, 40(10): 3199-3206 (in Chinese).
- [93] CHEN JW, STROUS M. Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2013, 1827(2): 136-144.
- [94] LIU CL, GUO ZR, ZHANG HR, LI JF, ZHU C, ZHU GB. Single-cell Raman spectra reveals the cytochrome c-mediated electron transfer in nanoscale zero-valent iron coupled denitrification process[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 454: 140241.
- [95] 郭中瑞, 朱超, 张涵瑞, 刘春雷, 祝贵兵. 重水标记-单细胞拉曼光谱表征反硝化菌代谢活性与电子传递[J]. *环境科学学报*, 2023, 43(4): 228-235.
GUO ZR, ZHU C, ZHANG HR, LIU CL, ZHU GB. Heavy water-labeled single-cell Raman spectroscopy characterizes the metabolic activity and electron transport of denitrifying bacteria[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2023, 43(4): 228-235 (in Chinese).