

废水生物处理过程中污泥的微生物种群结构和 PAHs 降解菌研究进展^{*}

张玉秀¹, 柴团耀^{2†}

(1 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院环境与生物工程系, 北京 100083; 2 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049)
(2015 年 3 月 23 日收稿; 2015 年 5 月 11 日收修改稿)

Zhang Y X, Chai T Y. Microbial community structure and PAHs-degrading bacteria of activated sludge in biological wastewater treatment process[J]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2016, 33(1):1-8.

摘 要 含有难降解有机物的工业废水严重威胁生态和人类健康. 活性污泥法是工业废水处理的核心技术, 细菌种群在其中发挥重要作用. 研究污泥的微生物群体结构不仅为废水处理厂的稳定运行提供指导, 而且可以提高废水处理效率. 基于高通量序列分析的细菌门/属分类或操作分类单元聚类分析研究表明, 市政污泥的微生物多样性存在地域性差异; 不同的工业废水污泥的微生物群体组成各有特点, 在门/纲分类水平上明显不同于市政污泥; 焦化废水污泥微生物种群结构在门分类水平上具有相似的微生物组成; 水质是微生物种群结构形成的主要驱动力, 环境条件也有一定的影响; 此外, 多种多环芳烃降解菌已经被鉴定, 并分析了其降解途径和关键酶基因. 本文主要综述这几方面的研究进展.

关键词 细菌种群结构; 污泥; 废水; 多环芳烃

中图分类号: Q938. 1 文献标志码: A doi: 10. 7523/j. issn. 2095-6134. 2016. 01. 001

Microbial community structure and PAHs-degrading bacteria of activated sludge in biological wastewater treatment process

ZHANG Yuxiu¹, CHAI Tuanyao²

(1 Department of Environmental & Biological Engineering, School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining & Technology (Beijing), Beijing 100083, China;

2 College of Life Science, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Industrial wastewater containing refractory organics has posed serious threat towards ecology and human health. The activated sludge methods for biological treatment are regarded as the core treatment units for industrial wastewater purification, and bacteria in activated sludge wastewater treatment bioreactors play a central role. A better understanding of microbial communities in sludge can not only provide important guidance in stable operation of wastewater treatment systems, but also improve the removal of pollutants. The clear geographical differences of microbial community diversity among the activated sludge in domestic wastewater treatment processes were

^{*} 国家自然科学基金(31370281)和中国矿业大学(北京)中央高校基本科研业务费专项基金(2010YH05)资助

[†] 通信作者, E-mail: tychai@ucas.ac.cn

revealed by cluster analyses based on abundances of the operational taxonomic units or the genus/phyla assigned by pyrosequencing of 16S rDNA. Each industrial activated sludge system exhibited a unique bacterial community composition, which was clearly distinct from the common profile of bacterial phyla/classes observed in municipal plants. The community structures of activated sludge in coking wastewater treatment plants exhibited a similar community composition at each taxonomic level. The wastewater characteristics are likely to be the major determinant that drives bacterial composition at high taxonomic ranks. The operational parameters have a great impact on the bacterial community structure. In addition, a variety of PAHs-degrading bacteria are identified, and the key enzyme and pathway involved in PAH degradation are characterized. These results have potential applications for strengthening the biological degradation. This review highlights several promising areas to be explored in future.

Key words bacterial community structure; sludge; wastewater; PAHs

工业废水含有多种有机物,其水质特征因生产产品和过程的不同而不同.含有难降解有机物的工业废水,其处理难度大,是水环境领域研究的重大问题.与市政污水处理相似,多数工业废水经过适当的预处理后,也主要依靠活性污泥法处理.焦炭行业是中国经济发展的重要支柱产业,然而,在其推动经济发展的同时,也带来了严重的大气、水和土壤等环境污染.焦化废水是煤在高温干馏、煤气净化和副产品回收和精制过程中产生的有毒/难降解工业废水,除含有高浓度的氨、氰化物、硫氰化物和氟化物等无机污染物外,还含有酚类、吡啶、喹啉、多环芳烃(PAHs)及其衍生物等有机污染物,其中的PAHs及其含氮、氧和硫的杂环衍生物多达270多种,但主要为2~4环PAHs,如萘、蒽、芴、菲、荧蒽和芘等,萘含量(36%~86%)最大.焦化废水约占全国工业废水排放量的2%,2006年酚类和苯并芘随焦化废水的排放量分别达24 000 t和1 602 t(中华人民共和国国家发展与改革委员会.2006.焦化行业污染现状及对策建议. http://www.ndrc.gov.cn/gzdt/t20060907_83519.htm),是重要的PAHs排放源.焦化废水经预处理、生物处理和混凝沉淀后,其中的大部分PAHs得以去除,而生物过程是主要的去除单元,但是处理后的废水中所有控制污染物都超过国际公共健康及环境组织规定的PAHs污染标准,特别是苯并[a]芘高于国标GB 8978—1996《污水综合排放标准》中的排放限值^[1].所以,焦化废水是一种难降解处理的工业废水.吡啶和喹啉是2个有毒的含氮杂环芳香族化合物,除存在于焦化废水外,还广泛分布在炼油和制药等废水中,在废水

生物处理过程中可以转化为氨.进水中吡啶和喹啉的负荷冲击过高,导致生物工艺运行稳定性失衡,出水不达标,外排则导致水体环境富营养化.

难降解有机物污染废水处理是世界性的难题,由于生物法成本低、技术简单和持续高效的处理能力,因而是难降解有机物处理最有效的方法之一,特别是活性污泥法是生物法处理废水的核心单元.活性污泥是一个悬浮的微生物聚集体,是由原生动物和真菌、细菌、古细菌和病毒等组成的一个高度复杂的生物系统.其中的细菌类群占主导地位,可以通过微生物有机体的代谢反应去除废水中的有机物,且其生长与有机物的降解作用紧密相关.活性污泥法处理废水的过程,实际上是一个微生物群体吸附、代谢和利用有机物的过程.首先是污染物吸附到活性污泥上,然后由微生物降解;吸附是废水有机物去除的直接结果,而持续的去除则依赖于微生物的降解代谢作用.

废水生物处理功能的稳定性,主要依靠优势微生物的活性和高度多样性群体的相互作用,而微生物的群落结构多样性和波动,最终会影响污水处理效率^[2-3],包括脱氮除磷、毒素和有机物降解和污泥稳定性等.尽管活性污泥的微生物种群在废水生物处理中有重要作用,但是微生物对污泥的形成、发育和功能的影响知之不多^[2],特别是对于含有PAHs的难降解有机工业废水.污泥中硝化菌和反硝化菌在脱氮中起重要作用,聚磷菌可以增强磷的去除作用,细菌的功能决定生物处理中的脱氮除磷效率;喹啉、吡啶和PAHs等有机物的去除依赖于其降解菌种群;水质和运行参数的改变导致微生物种群变化,进而影响污染物

的去除效率. 研究污泥的微生物种群结构,可为污水处理系统的稳定运行和生物强化作用提供技术指导.

利用传统培养方法在活性污泥中已分离鉴定出一些氨氧化菌、硝化菌、聚磷菌,以及难降解有机物(苯酚、喹啉、吡啶、萘或茈)降解菌^[4-5],然而,由于多数细菌不能培养,其功能无法鉴定;而不需生物培养的分子生物学技术,为揭示污泥的生物群体结构和功能提供了基础,包括荧光原位杂交(fluorescence situ hybridization, FISH)、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、末端限制性片段长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、克隆文库(clone library)等技术. 由于这些技术主要是基于 PCR (polymerase chain reaction) 方法,存在测定序列短、分辨率低、克隆数目少和物种丰富度(species richness)覆盖率低等局限性,很少能获得低丰度到中度丰度的微生物类群信息,其结果只能展示出优势种群成员的一个点,难以全面揭示复杂的微生物群体结构多样性信息. 基于 16S rDNA 基因的高通量测序等技术,可以更加完整和准确地阐明微生物种群的特征. 目前,高通量测序技术已用于分析海水、河流底泥和土壤的微生物种群结构分析^[6],并探索了市政废水、工业废水和模拟生物反应器等污泥微生物种群结构和污染物处理效率的关系. 焦化废水是一种典型的难降解有机废水,而对焦化废水污泥微生物种群的研究才刚刚开始. 本文主要综述废水生物处理过程中,污泥的微生物种群结构和难降解有机物 PAHs 降解菌研究进展.

1 市政污泥微生物的种群结构研究

污泥微生物的种群结构与脱氮除磷. 污泥微生物群体结构可以反映污水处理工艺、脱氮除磷能力、负荷冲击和地域性等差异. 16S rDNA 基因高通量序列分析表明:在处理市政氮磷污水的 A²/O 工艺中, A1/A2/O 3 个单元污泥中主要的细菌种群是变形菌(Proteobacteria)和拟杆菌(Bacteroidetes)门,并检测出脱氮除磷的聚磷菌、氨氧化菌和亚硝酸还原菌种属,不同单元污泥的细菌种群没有显著的区别^[7];推测可能是因为二沉池污泥回流到厌氧池,菌群得以交流和适应不同环境的原因. 在实验室规模处理城市污水的

MBR (membrane bioreactor) 系统中,实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 分析表明,氨氧化 β -变形菌(Betaproteobacteria)、亚硝酸氧化菌(Nitrospira-like)和反硝化菌(N₂O-reducers)等群体特定的基因丰度和转录水平,随春、夏、秋等 3 个季节变化而增加,形成一个稳定的脱氮菌群结构;多因素分析显示氨氧化菌(AOB)种群丰度与污泥挥发性悬浮物的积累、NH₄⁺ 浓度和废水的 C/N 比等环境参数成正相关,而硝化菌和反硝化菌与之成负相关^[8],说明脱氮菌群体的丰度对负荷冲击和环境变化具有快速的反应和适应能力. 此外,基于操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)的聚类分析和主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA 或 PCO)研究表明:亚洲和北美 14 个市政活性污泥中的微生物种群存在明显的地域性差异,每个污泥样品都具有其独特的细菌种群;同时,多个样品共同拥有一些优势或核心的种属,其中包括常报道的 2 个属(Zoogloea 和 Dechloromonas),不常报道的 3 个属(Prostheobacter、Caldilinea 和 Tricoccus),以及目前描述很少的 3 个属(Acidobacteria 中 Gp4、Gp6 和 Verrucomicrobia 中分类地位未定的 Subdivision)^[9]. 这些结果表明,高通量测序技术可以揭示污泥群体中的脱氮除磷菌群结构组成和丰度,探测到过去难以探测到的微小菌群,甚至在分类学上难以归于类的种群.

污泥中稀有和常见(或核心)的 2 组细菌类群具有不同的时间动态变化模式. 稀有和常见的细菌类群在自然生态系统具有不同作用,常见的类群对自然生态功能起主要作用,而稀有的类群作为种子库起次要作用^[10]. 16S rRNA 基因分析 2 年全程运行的生活污水处理厂(只有好氧池,处理效率低)好氧活性污泥中稀有和常见细菌类群种属的时空动态变化规律,结果表明多数 OTUs 归于稀有类群(89.6%),而根据序列的丰度分析表明,稀有类群只占微生物群体的一小部分(28.6%);相对于常见类群 OTUs 丰度的时空变化,稀有类群 OTUs 显示具有高度多样性和较大的波动变化;常见类群和稀有类群丰度变化受不同的参数变量影响,进水 BOD 和溶解氧(DO)等参数显著($P < 0.05$)影响常见类群丰度的变化,而温度则显著影响稀有类群丰度的变化,其波动模式随季节性温度变化而变化;此外,常见类群在

运行期间比稀有类群持续时间长,如常见类群周转慢^[11],说明常见类群和稀有类群具有不同的时空动态变化模式;常见类群在水处理过程对污染物的去除起重要作用,而稀有类群作为种子库随环境变化可以转变为常见类群对水处理过程起作用;稀有类群对总的细菌种群影响大于常见类群.进一步表明自然环境中的生态现象在污泥微生物种群生态中也同样适用有效,为了解活性污泥的细菌生态学提供了基础.

2 工业污泥微生物的种群结构研究

工业与市政活性污泥是否具有共同的细菌种群?工业污泥的细菌群落结构与运行参数有何关系?7个工业(纺织印染、炼油厂、丙烯酸类聚合、制药、乳清加工和食品工业等)废水处理系统活性污泥的细菌种群分析结果表明:每个工业活性污泥均具有其独特的细菌种群组成,在门或属分类水平上没有检测到一个共同的核心的细菌种群;工业污泥的细菌种群在门或纲分类水平上明显不同于市政污泥共有的细菌种群;约束主坐标分析(constrained analysis of principal coordinates, CAP)显示不同工业活性污泥细菌群落组成之间的差异部分是由于废水处理系统中 DO 和 pH 值的不同所致^[12].此外,随着工业废水浓度梯度的提高,活性污泥反应器中发挥关键作用的微生物种群组分随之增加^[13],废水的特性可能是驱动细菌种群组成变化的决定因素^[12-13].

用 16S rRNA 基因克隆库分析方法,在集成的厌氧-好氧-人工湿地制革废水处理系统不同单元污泥中鉴定了 32 种细菌种群,其优势的细菌门依次为:梭状芽胞杆菌(Clostridia)(33%)、 β -变形菌(Betaproteobacteria)(10%)、拟杆菌(Bacteroidia)(10%)、 δ -变形菌(Deltaproteobacteria)(9%)和 γ -变形菌(Gammaproteobacteria)(6%);尽管厌氧、好氧和人工湿地根际等污泥共有一些细菌种属,但 3 段污泥细菌群体显著不同^[14]. Clostridiales 门是严格厌氧的细菌,一般存在于厌氧池污泥中,其中的 *Proteiniclasticum*、*Tissierella*、*Eubacterium* 和 *Acidaminobacter* 可能参与芳香烃四氯乙烯的厌氧降解. Betaproteobacteria 主要存在于好氧池和湿地污泥中,其中的 *Azospira*、*Thauera* 和 *Hydrogenophaga* 成员可能在降解脂肪族和芳香族化合物起重要的作用. Bacteroidetes 是众所周知的

降解复杂碳化合物的细菌^[15],是染料废水处理和含氯代苯酚活性污泥微生物群落中的优势菌成员^[16],因此,可能涉及在降解制革后鞣制过程中的芳族化合物^[14].这些结果说明微生物种群结构的动态变化与不同工业废水的污染物成分和浓度特征相关,不同单元的水质和去除作用不同,污泥的微生物种群组成也不同.

3 焦化污泥微生物的种群结构研究

吸附材料和高效降解菌可促进焦化污泥微生物种群结构的转变,提高焦化废水处理效率.在沸石曝气生物滤池(Z-BAFs)焦化废水处理系统中,添加吡啶(*Paracoccus* sp.)和喹啉(*Pseudomonas* sp.)高效降解菌和沸石吸附材料,可有效去除吡啶、喹啉、TOC 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ ^[17]. 16S rDNA 序列分析表明,当吡啶和喹啉负荷增加时,生物强化作用可使生物膜中的细菌种群丰富度和多样性得以恢复,加速细菌群体结构转变到一个不同于起始的新群体结构组成;克隆文库分析表明,焦化废水中的喹啉和吡啶对土著菌中 Bacteroidetes 的毒害作用较大,而生物强化可促进生物膜中土著菌 Planctomycetes 的生长;Bacteroidetes、Planctomycetes 和 Proteobacteria 是活性污泥和生物膜中的优势菌,而添加的生物强化菌群在生物膜中不能保持优势地位,表明土著菌在喹啉和吡啶污染物去除方面具有最重要作用;同时,还鉴定了一些与重要的苯酚降解菌食酸菌(*Acidovorax*)高度相似的优势种群^[17].在沸石序批式反应器(SBR)中添加吡啶(*Paracoccus* sp. 和 *Shinella zoogloeoides*)和喹啉降解菌群,焦化废水中超过 99% 吡啶和喹啉、85% TOC、65% COD 和 95% $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 可去除,且抗负荷冲力能力提高^[18]. T-RFLP 分析表明,生物强化作用可以提高污泥细菌的多样性,加速群体结构快速转变;典范对应分析(canonical correspondence analysis, CCA)表明吡啶和喹啉、TOC 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 等环境参数与生物强化作用成紧密的负相关关系,而 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 COD 是影响细菌群体结构变化和废水处理效率的 2 个主要因素;此外,在新建立的细菌群体结构中未发现强化菌的基因片段,表明虽然强化菌群不是新菌群体结构中的优势菌,但可以促进细菌群体结构的适应性变化^[18]. 实验室规模的厌氧/缺氧/沸石生物滤池-膜生物反应器(A1/A2/ZB-MBR)

焦化废水处理系统,可产出稳定的 COD(158.5 ± 21.8 mg/L)和 $\text{NH}_3\text{-N}$ (8.56 ± 7.30 mg/L)出水^[19]. 高通量序列分析表明:尽管 A2 和 ZB-MBR 污泥的细菌种群组成明显不同,但 Proteobacteria 门和 Flavobacteria 纲通常是优势种群;沸石可促进生物膜细菌群体的改变,使亚硝化菌 *Nitrosomonas* 和硝化杆菌属 *Nitrobacter* 分别渐变为占主导地位的氨氧化菌(AOB)和亚硝酸氧化菌(NO₂-OB),更有利于稳定氨氮的去除,而一些新类群的出现有助于 ZB-MBR 系统的运行^[19];此外,发现一些很少报道或描述的种属,如 *Ignavibacteriales*、*Truepera* 和 *Naxibacter* 属,也检测出一些具有特殊功能的种属,如 *Thiobacillus* 和 *Sulfurimonas* 是响应 SCN^- 的反硝化和转化作用^[20-21], *Shinella* 是吡啶降解菌^[22]. 表明高通量测序技术在焦化污泥中检测到传统测序技术很难检测到的多数低丰度细菌种群^[19],为研究焦化废水污泥的生物多样性研究提供了技术支持.

氰化物浓度影响污泥的微生物种群结构,进而影响焦化废水的脱氮效率. 研究表明,在 A/O 焦化废水处理工艺中, CN^- 浓度不影响苯酚的降解,而抑制 SCN^- 的生物降解;NO₂-OB 比 AOB 对 CN^- 浓度更加敏感;T-RFLP 和 qPCR 分析表明, *Nitrosomonas europaea* 是好氧池活性污泥细菌群体中优势的 AOB,但是 CN^- 负荷冲击后 AOB 菌群多样性显著改变,导致 *Nitrosospira* sp. 成为优势菌;NO₂-OB 中 *Nitrospira* 和 *Nitrobacter* 种群的平衡也发生改变,*Nitrobacter* 超过 *Nitrospira* 成为优势菌;qPCR 表明缺氧池活性污泥中亚硝酸还原菌功能基因(*nirS*)占优势,其丰度与 CN^- 负荷冲击无关^[20],表明氰化物显著影响污泥中起硝化作用的菌群结构,从而影响焦化废水的脱氮效率.

焦化活性污泥中含有共同的优势细菌菌群. 焦化废水是一种不同于其他工业的工业废水,焦化活性污泥的微生物种群组成与市政和其他工业污泥有何不同? 不同处理工艺的焦化活性污泥微生物种群结构是否相似? 比较分析 9 个不同工艺的焦化废水处理厂活性污泥的菌群结构表明^[23]: 不同焦化废水处理厂好氧池活性污泥的菌群结构相似,6 个污泥中共同拥有的优势细菌属比例依次为: *Thiobacillus* (20.83%)、*Comamonas* (6.58%)、*Thauera* (4.02%)、*Azoarcus* (7.78%) 和 *Rhodoplanes* (1.42%) 等;而市政污泥相中的一些

核心属在焦化污泥中变为微小种群,如 *Zoogloea*、*Prostheobacter* 和 Gp6;qPCR 和 FISH 技术,表明化能自养的 AOB 和 NO₂-OB 种群丰度意外的低;分层聚类(Hierarchical clustering)与典范对应分析表明,焦化废水处理厂的运行模式、流速和温度可能是细菌群体形成关键因素^[23]. 焦化污泥最大的优势种群是 *Thiobacillus* 属,其中鉴定的 *Thiobacillus denitrificans* 是一个兼性厌氧菌,可以耦合反硝化脱氮作用与无机硫化物的氧化^[24],在工业废水脱氮和硫氰酸降解过程中有重要作用^[19,25],而焦化废水中高浓度的硝态氮与硫氰酸盐可能是 *Thiobacillus* sp 生长的基础^[23]. *Comamonas* 是一种能降解酚醛树脂、PHAs 和杂环芳香族等的多功能降解菌,如吡啶、喹诺酮和吡嗪,在好氧条件下可以发挥硝化和反硝化作用^[25-26]; *Comamonas* 在市政和其他工业废水中的比例很低,其出现可能与焦化废水中高浓度的苯酚、多环芳香族化合物和氨的去除相关^[23]. *Azoarcus* 和 *Thauera* 2 个属细菌群常一起出现,是活性污泥中具有重要脱氮功能的反硝化菌^[27],也参与焦化废水处理芳香族化合物的降解,如 *Thauera* 菌株可以降解焦化废水中苯酚、甲酚和吡啶^[28]. 最近研究表明, *Thauera* 是颗粒污泥系统的优势微生物,具有完美的硝化能力^[29],这些细菌潜在的硝化能力为废水中氨的去除提供了多种途径^[23]. 焦化污泥中其他核心种属包括 *Kineosporia*、*Ensifer* 和 *Rhodoplanes*,其作用目前很少报道^[23]. 以上结果表明,活性污泥中存在多种脱氮和 PAHs 降解菌群,而焦化废水处理工艺、流速和温度是影响细菌群体的组成的关键因素. 不同工艺或不同单元的污泥微生物菌群不同,且 PAHs 主要是在 A²/O 工艺中的厌氧池污泥中被吸附去除,有关厌氧污泥的微生物种群未见报道,而目前鉴定的 PAHs 降解菌多数是好氧降解菌,对其降解途径也相对了解较多.

4 PAHs 降解菌的降解基因研究

废水中 PAHs 的去除效率依赖于高效的 PAHs 降解菌群,所以,分离鉴定高效的 PAHs 降解菌群,研究其降解途径和降解关键酶基因,为利用基因工程拓宽 PAHs 降解谱、降解能力,以及生物强化作用提供基础. 目前,利用单一培养方法在焦化污泥、污染土壤和河流底泥中分离鉴定多种

高效的 PAHs 降解菌, 包括分枝杆菌 (*Mycobacterium*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、*Thauera* 和产碱杆菌 (*Alcaligenes*) 等, 其中在从焦化废水污泥中分离的茈高效降解细菌杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) CY4 和施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) CY7, 可以降解高分子量 (HWM) PAHs, 并能以多种难降解有机物为唯一碳源, 包括以水杨酸、邻苯二酚、邻苯二甲酸和 1-羟基-2-萘酸等 PAHs 转化产物, 苯酚和吡啶、吡啶和喹啉等杂化芳烃和吡啶等杂化芳烃, 以及蒽、菲和茈等 PAHs^[30]; *Mycobacterium* CM32 可以降解菲、蒽和茈等 PAHs^[31]; 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) B-1 在 pH 为 4 ~ 11 可保持良好的茈降解能力^[32]; 粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*) W-1 对茈的降解效率达到 87.8%, 可以同时降解的茈、蒽和菲等 PAHs^[33]. 表明焦化废水污泥中含有多种高效的 PAHs 降解菌, 且具有广谱性的 PAHs 降解能力, 具有用于强化焦化废水中 HWM PAHs 降解的潜力. O_2 的供应决定其 PAHs 降解途径, 在 A^2/O 水处理工艺中, PAHs 的降解涉及厌氧和好氧降解 2 种降解途径. 利用基因克隆、酶活性测定和 GC-MS 分析代谢物方法, 揭示了多种降解菌的 PAHs 降解途径和关键基因^[34].

在好氧条件下, *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1^[35]、*Pseudomonas aeruginosa* RS1^[36]、*Pseudomonas* sp. Jpyr-1^[37] 和 *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1^[38] 等细菌在降解多种 HMW PAHs (如菲、茈和苯并茈等) 时, 首先通过环羟基化双加氧酶 (ring-hydroxylating dioxygenase, RHD) 启动降解作用, 将 O_2 中的 2 个 O 原子同时结合到苯环分子上形成二氧化合物中间产物, 继而氧化为顺式二氢二醇中间产物; 然后, 依次利用双加氧酶和脱氢酶逐步开环, 降解为邻苯二甲酸或水杨酸; 二者进一步降解, 最后进入三羧酸 (TCA) 循环, 彻底矿化成 CO_2 ^[35]. RHD 是菲、茈和苯并茈等降解的限速酶, 其基因可以用于检测污染环境的 PAHs 降解菌群^[39-40]. 邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (C23O) 能催化苯环的邻位裂解, 是 PAHs 降解的一个关键酶. 茈可诱导 *Pseudomonas* sp. BP10 的 C23O 活性提高^[41]; *Pseudomonas aeruginosa* BDP01 可以降解蒽和蒽, 纯化的 C23O 具有降解邻苯二酚底物的活力^[42], 表明该酶在茈

的降解过程有重要作用. 此外, *Thauera* 是重要的 PAHs 厌氧降解菌, 从焦化废水缺氧池生物膜中分离的 3 个 *Thauera* 菌株 (Q4、Q20-C 和 3-35) 在有氧条件下可以降解苯酚、甲酚和吡啶, 而在缺氧条件下不能降解; 这 3 菌株菌 16S rDNA 序列相同, 但基因组的结构不同, 苯酚羟化酶 (LmPH) 基因序列也不同, 对苯酚降解率的大小依次为: Q4 > 3-35 > Q20-C, 表明 LmPH 在降解 PAHs 方面也具有重要作用^[28]; 同时, 说明 16S rDNA 序列只能鉴定细菌的种属, 而无法判断其对有机物降解特性.

厌氧菌由于分离培养困难, PHAs 的厌氧降解途径、降解酶及其基因报道很少. 一个兼性厌氧菌株 *Pseudomonas* sp. JP1 在厌氧条件下可以降解多种 HMW PAHs, 如苯并[α]-茈 (BaP)、蒽和菲, 尽管 GC/MS 鉴定了 BaP 降解的代谢产物, 揭示了其厌氧降解的途径, 但是参与 BaP 降解的酶和基因还没有报道^[43]. *Thauera* 是重要的 PAHs 厌氧降解菌, 在厌氧条件下 *Thauera* 首先通过不同的途径将苯酚和甲酚转化为苯甲酰辅酶 A 中央代谢的中间产物, 进而通过相同的中央代谢途径进一步分解苯甲酰基-CoA^[28]. 最近, 蒽的厌氧降解途径取得了突破性进展, 蒽羧化酶可催化蒽羧基化为 2-萘甲酸, 进而被 2-萘辅酶 A 还原酶 (NCR) 激活为 2-萘甲戊二酰辅酶 A (NCOA); 然后, 萘环可逐步通过还原的方式开环降解^[44]. NCR 是迄今了解的 PHAs 厌氧途径降解的唯一特征酶和关键酶, 根据 NCR 基因序列设计引物, 目前, 利用 PCR 技术在多个纯培养和环境富集的硫酸还原菌群中得到了 NCR 基因, 为检测厌氧 PAHs 降解菌群提供强有力的工具.

5 展望

污水中的 N、P 化合物以及多种有机物的去除, 可以防止其外排引起水体的富营养化或地下水污染, 难降解有机物 (PAHs) 的去除可以降低废水的毒性和对人类的健康伤害. 废水生物处理的工艺有 A/O 、 A/O^2 和 A^2/O 等. 污泥的微生物种群结构决定废水的处理效率和工艺运行的稳定性, 其中细菌种群起决定作用. 好氧池活性污泥微生物种群结构分析表明, 废水的特征可作为驱动力定向性地影响细菌群落的组成和动态变化; 提高废水的浓度梯度和增加负荷冲击, 起决定性作

用的微生物种群成员随之增加;环境条件、工艺运行参数和水质的波动等影响微生物种群结构.今后,有以下几个方面需要加强研究:针对不同的工业废水和处理工艺,要系统研究废水处理厂厌氧池、缺氧池和好氧池等污泥微生物群体结构的差异性,确定其核心微生物种群;研究水质、工艺参数和温度与微生物种群结构动态变化的关系;鉴定难降解有机物降解菌的种群,富集驯化降解菌;揭示 PAHs 降解菌的降解途径和关键酶,为现有工艺的稳定运行和利用生物强化作用,提高废水生物处理效率提供技术支持.

参考文献

- [1] Zhang W H, Wei C H, Yan B, et al. Identification and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater treatment processes from coke production plants [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2013, 20: 6 418-6 432.
- [2] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13:218-227.
- [3] Werner J, Knights D, Garcia M L, et al. Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences USA, 2011, 108:4 158-4 163.
- [4] Jia R, Zhang Y, Zhang Q, et al. Isolation and degradation kinetics of the quinoline degradation bacterium strains from coking wastewater[J]. Advanced Materials Research, 2014, 864-867: 209-212.
- [5] 张玉秀,蒙小俊,柴团耀. 苯酚降解菌红球菌(*Rhodococcus* sp.) P1 的鉴定及其在焦化废水中的应用[J]. 微生物学报, 2013, 53(10):1 117-1 124.
- [6] Bacosa H P, Inoue C. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 11 (283): 689-697.
- [7] Kim B C, Kim S, Shin T, et al. Comparison of the bacterial communities in anaerobic, anoxic, and oxic chambers of a pilot A (2) O process using pyrosequencing analysis [J]. Current Microbiol, 2013, 66(6):555-565.
- [8] Gómez-Silván C, Vilchez-Vargas R, Arévalo J, et al. Quantitative response of nitrifying and denitrifying communities to environmental variables in a full-scale membrane bioreactor [J]. Bioresource Technology, 2014, 169:126-133.
- [9] Zhang T, Shao M F, Ye L. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants[J]. ISME Journal, 2012, 6(6):1 137-1 147.
- [10] Pedros-Alio C. Marine microbial diversity: can it be determined [J]. Trends in Microbiology, 2006, 14(6):257-263.
- [11] Kim T S, Jeong J Y, Wells G F, et al. General and rare bacterial taxa demonstrating different temporal dynamic patterns in an activated sludge bioreactor [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(4):1 755-1 765.
- [12] Ibarbalz F M, Figuerola E L, Erijman L. Industrial activated sludge exhibit unique bacterial community composition at high taxonomic ranks[J]. Water Research, 2013, 47(11):3 854-3 864.
- [13] Van der Gast C J, Ager D, Lilley A K. Temporal scaling of bacterial taxa is influenced by both stochastic and deterministic ecological factors [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(6):1 411-1 418.
- [14] Desta A F, Assefa F, Leta S, et al. Microbial community structure and diversity in an integrated system of anaerobic-aerobic reactors and a constructed wetland for the treatment of tannery wastewater in Modjo, Ethiopia [J]. PLOS One, 2014, 26:9(12):e115576.
- [15] Burns A S, Pugh C W, Segid Y T, et al. Performance and microbial community dynamics of a sulfate-reducing bioreactor treating coal generated acid mine drainage[J]. Biodegradation, 2012, 23: 415-429.
- [16] Zhang L, Sun Y, Guo D, et al. Molecular diversity of bacterial community of dye wastewater in an anaerobic sequencing batch reactor[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6:6 444-6 453.
- [17] Bai Y, Sun Q, Sun R, et al. Bioaugmentation and adsorption treatment of coking wastewater containing pyridine and quinoline using zeolite-biological aerated filters [J]. Environmental Science Technology, 2011, 45 (5): 1 940-1 948.
- [18] Zhang J, Wen D, Zhao C, et al. Bioaugmentation accelerates the shift of bacterial community structure against shock load: a case study of coking wastewater treatment by zeolite-sequencing batch reactor [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(2):863-873.
- [19] Zhu X, Tian J, Liu C, et al. Composition and dynamics of microbial community in a zeolite biofilter-membrane bioreactor treating coking wastewater [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(19):8 767-8 775.
- [20] Kim Y M, Lee D S, Park C, et al. Effects of free cyanide on microbial communities and biological carbon and nitrogen removal performance in the industrial activated sludge process [J]. Water Research, 2011, 45(3):1 267-1 279.
- [21] Park S, Yu J, Byun I, et al. Microbial community structure and dynamics in a mixotrophic nitrogen removal process using recycled spent caustic under different loading conditions[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(15):7 265-7 271.
- [22] Bai Y H, Sun Q H, Zhao C, et al. Aerobic degradation of pyridine by a new bacterial strain, *Shinella zoogloeoides*

- BC026 [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(11):1 391-1 400.
- [23] Ma Q, Qu Y, Shen W, et al. Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing [J]. Bioresource Technology, 2015, 179:436-443.
- [24] Beller H R, Chain P S G, Letain T E, et al. The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans* [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188 (4):1 473-1 488.
- [25] Felfoldi T, Székely A J, Gorál R, et al. Polyphasic bacterial community analysis of an aerobic activated sludge removing phenols and thiocyanate from coke plant effluent [J]. Bioresource Technology, 2010, 101 (10):3 406-3 414.
- [26] Chen Q, Ni J. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by novel isolated bacteria [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38 (9):1 305-1 310.
- [27] Thomsen T R, Kong Y, Nielsen P H. Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 60 (3):370-382.
- [28] Mao Y, Zhang X, Xia X, et al. Versatile aromatic compound-degrading capacity and microdiversity of *Thauera* strains isolated from a coking wastewater treatment bioreactor [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010, 37(9):927-934.
- [29] Zhao Y, Huang J, Zhao H, et al. Microbial community and N removal of aerobic granular sludge at high COD and N loading rates [J]. Bioresource Technology, 2013, 143: 439-446.
- [30] 王蕾, 裴麦茜, 杨学福, 等. 高效芘降解细菌的筛选、鉴定及其基本特性研究 [J]. 西安建筑科技大学学报: 自然科学版, 2011, 43(6):859-863, 881.
- [31] 伍凤姬, 张梦露, 郭楚玲, 等. 菌源对多环芳烃降解菌的筛选及降解性能的影响 [J]. 环境工程学报, 2014, 8(8): 3 511-3 518.
- [32] 唐玉斌, 王晓朝, 陈芳艳, 等. 一株芘降解菌的分离鉴定及其对多环芳烃的降解广谱性研究 [J]. 环境工程学报, 2011, 5(2):467-471.
- [33] 唐玉斌, 马姗姗, 王晓朝, 等. 一株芘的高效降解菌的选育及其降解性能研究 [J]. 环境工程学报, 2011, 5(1):48-54.
- [34] Debruy J M, Cheuning C S, Sayler G S. Comparative quantitative prevalence of *Mycobacteria* and functionally abundant *nidA*, *nahAc*, and *nagAc* dioxygenase genes in coal tar contaminated sediments [J]. Environmental Science and Technology, 2007, 41(15):5 426-5 432.
- [35] Kim S J, Kweon O, Jones R C, et al. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology [J]. Journal Bacteriology, 2007, 189(2):464-472.
- [36] Ghosh I, Jasmine J, Mukherji S. Biodegradation of pyrene by a *Pseudomonas aeruginosa* strain RS1 isolated from refinery sludge [J]. Bioresource Technology, 2014, 166:548-558.
- [37] Ma J, Xu L, Jia L. Characterization of pyrene degradation by *Pseudomonas* sp. strain Jpyr-1 isolated from active sewage sludge [J]. Bioresource Technology, 2013, 140:15-21.
- [38] Lyu Y, Zheng W, Zheng T, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 [J]. PLOS One, 2014, 9(7):e101438.
- [39] Gallego S, Vila J, Tauler M, et al. Community structure and PAH ring-hydroxylating dioxygenase genes of a marine pyrene-degrading microbial consortium [J]. Biodegradation, 2014, 25(4):543-556.
- [40] Ding G C, Heuer H, Zühlke S, et al. Soil type-dependent responses to phenanthrene as revealed by determining the diversity and abundance of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes by using a novel PCR detection system [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 76(14):4 765-4 771.
- [41] Singh S N, Kumari B, Upadhyay S K, et al. Bacterial degradation of pyrene in minimal salt medium mediated by catechol dioxygenases: enzyme purification and molecular size determination [J]. Bioresource Technology, 2013, 133: 293-300.
- [42] 杨轩, 张威, 李师翁, 等. 多环芳烃降解菌的分离鉴定及其生理特性研究 [J]. 环境科学学报, 2012, 32(5):1 033-1 040.
- [43] Liang L, Song X, Kong J, et al. Anaerobic biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a facultative anaerobe *Pseudomonas* sp [J]. Biodegradation, 2014, 25(6):825-833.
- [44] Morris B E, Gissibl A, Kümmel S, Richnow H H, Boll M. A PCR-based assay for the detection of anaerobic naphthalene degradation [J]. FEMS Microbiology Letter, 2014, 354(1): 55-59.