

# 厌氧发酵液中溶解性有机物对活性污泥合成聚羟基脂肪酸酯影响的研究进展

董锦云<sup>1</sup>, 方芳<sup>1</sup>, 张佳玲<sup>1</sup>, 徐润泽<sup>1</sup>, 翁佳玉<sup>1</sup>, 操家顺<sup>1,2</sup>

1 河海大学 环境学院 浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 江苏 南京 210098

2 国河环境研究院 (南京) 有限公司, 江苏 南京 210048

董锦云, 方芳, 张佳玲, 等. 厌氧发酵液中溶解性有机物对活性污泥合成聚羟基脂肪酸酯影响的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(1): 149-162.

Dong JY, Fang F, Zhang JL, et al. A review on polyhydroxyalkanoates synthesis in activated sludge system: the effects of dissolved organic compounds by using anaerobic fermentation liquid from waste activated sludge. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 149-162.

**摘 要:** 利用活性污泥微生物将剩余污泥发酵液中的挥发性脂肪酸 (Volatile fatty acids, VFAs) 转化为聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHA) 是目前环境生物技术领域的研究热点。但针对发酵液中非 VFAs 物质 (主要是溶解性有机物, Dissolved organic matter, DOM) 对活性污泥合成 PHA 的影响目前仍未有统一的结论, 需要进行较全面的分析和总结。因此, 文中首先介绍了剩余污泥发酵液中 DOM 的主要特性及常见分析方法, 然后从微生物学、代谢调控、污泥性质等角度分析了 DOM 中几种主要组分 (多聚糖、蛋白类物质、腐殖质) 对活性污泥合成 PHA 的影响。综合各研究结果表明高浓度 DOM 不利于 PHA 的生产, 但适量 DOM 的存在有利于污泥性质的稳定, 同时能降低 PHA 提纯成本。最后提出了相应的策略来实现对活性污泥利用 DOM 合成 PHA 的调控, 以期高效利用厌氧发酵液中 DOM 实现 PHA 合成提供解决思路。

**关键词:** 厌氧发酵, 溶解性有机物, 聚羟基脂肪酸酯, 活性污泥, 代谢途径

**Received:** April 13, 2020; **Accepted:** July 2, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 51878244, 51578210), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. B200202101), Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province, China (No. KYCX20\_0555).

**Corresponding author:** Fang Fang. Tel: +86-25-83786701; E-mail: ffang65@hhu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 51878244, 51578210), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. B200202101), 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (No. KYCX20\_0555) 资助。

网络出版时间: 2020-08-13

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200812.1042.002.html>

# A review on polyhydroxyalkanoates synthesis in activated sludge system: the effects of dissolved organic compounds by using anaerobic fermentation liquid from waste activated sludge

Jinyun Dong<sup>1</sup>, Fang Fang<sup>1</sup>, Jialing Zhang<sup>1</sup>, Runze Xu<sup>1</sup>, Jiayu Weng<sup>1</sup>, and Jiashun Cao<sup>1,2</sup>

*1 Key Laboratory of Integrates Regulation and Resource Development on Shallow Lakes, Ministry of Education, College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, Jiangsu, China*

*2 Guohe Environmental Research Institute (Nanjing) Co., Ltd, Nanjing 210048, Jiangsu, China*

**Abstract:** Polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis by activated sludge using volatile fatty acids (VFAs) in fermentation liquid of excess sludge as carbon source is a hotspot in the field of environmental biotechnology. However, there is no unified conclusion on the effects of non-VFAs, mainly dissolved organic matter (DOM), on PHA production. Thus, this critical review mainly introduces the main characteristics and common analysis methods of DOM in anaerobic fermentation liquid. The effects of DOM on PHA production are analyzed from the aspects of microbiology, metabolic regulation and sludge properties. The results of different studies showed that high concentration of DOM is bad for PHA production, but an appropriate amount of DOM is conducive to the stability of sludge properties, reducing the final PHA purification cost. Finally, suitable strategies were proposed to regulate the PHA synthesis by activated sludge with DOM for PHA production by anaerobic fermentation liquid.

**Keywords:** anaerobic fermentation, dissolved organic matter (DOM), polyhydroxyalkanoates (PHA), activated sludge, metabolic pathway

据估计, 目前每年流入海洋的塑料垃圾达  $4.8 \times 10^6 - 1.27 \times 10^7$  t, 到 2025 年这一数字仍会大幅度增加<sup>[1]</sup>。巨量的塑料垃圾带来的白色污染以及微塑料污染等环境问题正备受关注, 寻找可代替石油塑料材料和具有可生物降解性质的聚合物成为热点研究方向<sup>[2-4]</sup>。聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHA) 作为一种可以在自然条件下完全降解的生物塑料, 不仅在理化性质方面与传统石化工业材料合成的塑料相类似, 还可通过改性以满足不同的性能要求, 因此受到研究者的广泛关注<sup>[4-5]</sup>。但目前 PHA 的主要生产方式为传统的纯种微生物发酵, 由于生产过程中需要灭菌, 以及原料主要是葡萄糖或是价格较昂贵的乙酸、丙酸等有机底物, PHA 产品的价格远高于传统石油塑料。这一缺点限制了 PHA 的大规模应用。

随着我国人口的日益增长和经济的快速发

展, 城镇生活污水产量持续增加, 城镇污水处理厂的数量不断攀升。城市污水处理厂在处理污水的同时会产生大量的剩余污泥<sup>[6]</sup>。研究表明, 剩余污泥中含有大量可回收利用的有机物, 可以对剩余污泥进行厌氧发酵产生有价值的挥发性脂肪酸 (Volatile fatty acids, VFAs)。这样可以在实现污泥减量化的同时, 将产生的 VFAs 用于微生物合成 PHA<sup>[7-8]</sup>。

为了降低 PHA 的生产成本, 利用活性污泥中混合菌群吸收廉价碳源合成 PHA 的工艺过程得到了广泛研究。但是, 对于活性污泥微生物利用实际发酵液作为碳源时底物利用速率较低以及 PHA 产率不佳等问题的机理解释及解决措施的研究较少。尤其是以实际发酵液为底物时, 发酵液中的主要非 VFAs 物质, 即溶解性有机物 (Dissolved organic matter, DOM) 对于活性污泥微生物合成 PHA 的影响研究较少。而深入研究

DOM 在活性污泥合成 PHA 中的作用, 有助于提高厌氧发酵液合成 PHA 生产工艺设计的准确性, 优化系统运行效率, 增强整体稳定性。

本文首先综述剩余污泥发酵液中 DOM 的特性和分析方法; 其次对在好氧动态底物投加工艺条件下活性污泥合成 PHA 的代谢机制的基础上, 几种主要的 DOM (多聚糖、蛋白类物质、腐殖质) 在活性污泥合成 PHA 过程中的影响进行综述; 最后, 提出通过调控微生物电子传递速率以解决 DOM 对活性污泥合成 PHA 的影响, 并分析相关应用的前景与展望。

## 1 剩余污泥厌氧发酵液中 DOM 的主要特性

剩余污泥厌氧发酵液成分复杂, 除了含有 VFAs 之外, 同时存在着 DOM 等其他成分。DOM 是一类由不同分子量大小的溶解性有机质组成的混合物, 其种类繁多, 物质结构复杂、难以确定<sup>[9]</sup>。目前人们采用生物降解性、粒度分布、分子量大小以及亲/疏水性等特性对 DOM 进行了不同的划分<sup>[10]</sup>。由于 DOM 表面具有许多极性以及

非极性官能团, 会影响 DOM 与污泥之间的结合和污泥性质, 从而影响 PHA 的产生。因此, 本文重点关注 DOM 的亲/疏水性特性 (图 1)<sup>[11]</sup>。目前认为剩余污泥厌氧发酵液中 DOM 的主要组分为多聚糖、蛋白类物质及腐殖质。其中, 疏水部分主要为类腐殖酸和类富里酸, 而亲水部分主要为多聚糖与蛋白类物质。

然而, 不同的发酵工艺条件(温度、pH 等)及预处理方式等都会使得剩余污泥厌氧发酵液中多聚糖、蛋白类物质及腐殖质组分的含量、分子量大小及结构特性发生变化, 且有可能对后续工艺的出水水质产生不利影响。Ma 等<sup>[12]</sup>研究表明, 当剩余污泥碱性厌氧发酵, pH 值增加到 10 时, 类色氨酸和酪氨酸类物质的水解作用显著增强, 小分子量的蛋白类物质含量增加 ( $P < 0.05$ ), 促进了酸化率, 但是同时也会产生大量难降解的含氮有机物。Lu 等<sup>[13]</sup>发现对剩余污泥进行碱性-超声波破碎预处理后, DOM 中的小分子物质、难生物降解的腐殖质与复杂大分子蛋白类物质的含量有所增加。

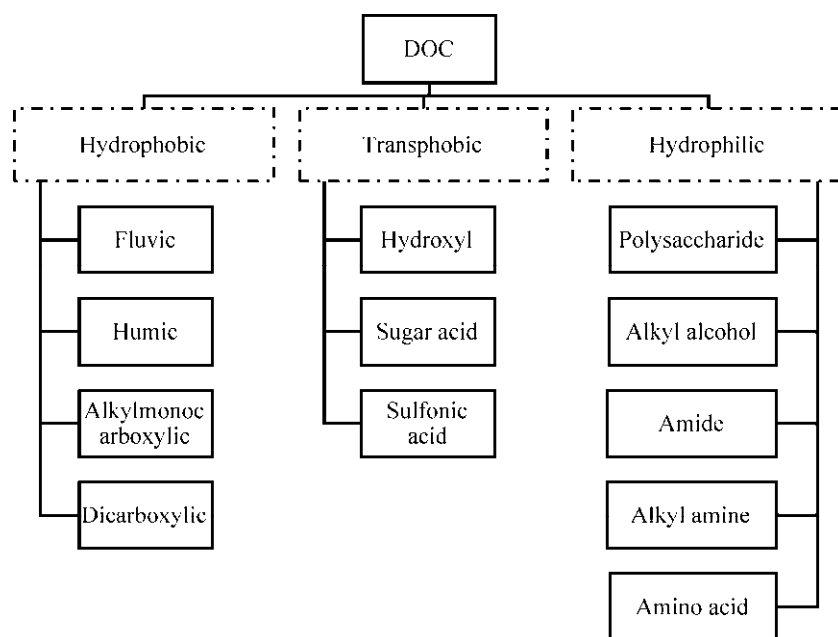


图 1 厌氧发酵液中 DOM 主要种类<sup>[11]</sup>

Fig. 1 Different fractions of DOM and their constituents<sup>[11]</sup>.

另外剩余污泥厌氧发酵液中残留的 DOM 会对下游工艺如脱氮除磷等工艺效率产生影响。Cao 等<sup>[14]</sup>分别利用 NaOH、Ca(OH)<sub>2</sub> 及两者的混合物调节 pH, 在碱性条件下 (pH 8.5–10) 进行剩余污泥厌氧发酵, 并利用水解酸化后的发酵液作为反硝化碳源。研究发现碱性条件下反应器内 VFAs 浓度高于对照组 (未调节 pH), 但在反硝化过程中氮的去除效率却不如未调节组。推测是碱性发酵时发酵液中产生了大量难降解类 DOM (大分子蛋白类物质和大分子碳水化合物), 最终抑制了反硝化速率。因此, 活性污泥将厌氧发酵液作为底物合成 PHA 时, 需要研究发酵液中 DOM 对于活性污泥合成 PHA 的影响。

## 2 剩余污泥厌氧发酵液中 DOM 的主要分析方法

目前 DOM 的常用分析方法如表 1 所示, 可

分为 3 个层次: 数量描述、组分描述以及结构描述<sup>[15]</sup>。由于 DOM 种类繁多, 故在进行 DOM 的数量描述时, 通常以过 0.45 μm 滤膜的剩余污泥发酵液中溶解有机碳 (DOC) 的浓度来表示。另外, 紫外吸光度也是表征剩余污泥发酵液中 DOM 数量的指标之一<sup>[16]</sup>。由于 DOM 中含有芳香族和双键共轭体系的有机化合物在紫外线吸收波长 254 nm (UV<sub>254</sub>) 处对紫外线具有强烈吸收特征, 例如木质素、腐殖质等, 因此利用这一原理可以表征发酵液中 DOM 的芳香构造特征以及 DOM 的浓度。这两种测定方法简单快捷, 但能提供的 DOM 信息较少。

在进行 DOM 组分描述时, 运用最多的是体积排阻色谱法 (Size exclusion chromatography, SEC), 其原理是通过溶质分子在流动相溶液中的流动, 根据分子尺寸变化, 改变保留时间, 从而对不同分子量的 DOM 进行分离<sup>[17]</sup>。Fukano 等<sup>[18]</sup>

表 1 溶解性有机物的常见分析方法

Table 1 Common analysis methods for dissolved organic compounds

Description level	Method	Detected features
Quantity description	DOC <sup>[20]</sup>	Dissolved organic carbon in water, after filtration through 0.45 μm filter
	UV-light (UV <sub>254</sub> ) <sup>[21]</sup>	Quantitative measurement of all compound in the sample which adsorb UV <sub>254</sub> -light. SUVA=100 UV <sub>254</sub> /DOC represents the amount of aromatic carbon present in DOM
Component description	Size exclusion chromatography (SEC) <sup>[13, 20]</sup>	Fractionates DOM on the basis of molecular sizes of organic compounds present
	Membrane filtration	The separation by membranes may be dependent on molecular structures in DOM as well as the size
	Resin fractionation	Fractionates DOM on basis of hydrophilic and hydrophobic of organic compounds present
Structure description	Three-dimensional fluorescence (3D EEM) <sup>[20, 22-23]</sup>	Molecules of the sample are excited by irradiation at a certain wavelength and the emitted radiation is measured at a different wavelength. Conjugated double bonds at aromatic rings, -OH and -NH <sub>2</sub> enhance fluorescence, while -COOH diminishes. Three major groups: tryptophan-, humic- and fulvic-like fluorophores
	Elemental analysis	H/C, C/N, O/C ratios qualitatively reflect the aromatic degree of organic matter, the degree of humification, the proportion of oxygen-containing functional groups, etc.
	Nuclear magnetic resonance (NMR, <sup>1</sup> H NMR, <sup>13</sup> C NMR, <sup>15</sup> N NMR)	Bonding state of corresponding atoms ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N) in organic matter
	FTICR-MS <sup>[12]</sup>	Molecular species, exact masses and molecular formulae of compounds on DOM

在此基础上,开发出将 SEC 色谱柱应用到高效液相色谱 (HPLC) 上的 HPSEC。此外,还有基于滤膜截留不同分子量 DOM 的超滤膜分离技术与基于亲疏水性不同的组分分离原理的树脂分离技术<sup>[15]</sup>。

在进行 DOM 结构描述时,三维荧光光谱技术 (Excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy, EEMs)、元素分析、核磁共振光谱(NMR) 以及傅里叶变换离子回旋共振质谱(FTICR-MS) 都是常用的技术手段。EEMs 不仅可以定性分析 DOM 的组分,还可以结合数学分析手段定量分析 DOM 中特定的荧光物质 (蛋白质类、腐殖酸类、富里酸类)<sup>[19]</sup>。元素分析可以确定 DOM 中存在的元素 (例如碳、氢、氮、卤化物和硫)及每种元素的含量。另外元素分析仪或电感耦合等离子体原子发射光谱法也可以测定 DOM 的元素组成。FTICR-MS 作为一种强有力的结构分析方法,可以区分来源相似的复杂有机质中特定的分子结构。Ma 等<sup>[12]</sup>利用 FTICR-MS 与 EEMs 技术研究剩余污泥碱性发酵产酸过程中 DOM 特征变化情况。此外,将多维 NMR 与 FTICR-MS 相结合,可作为研究 DOM 分子结构的新技术方向<sup>[15]</sup>。

### 3 DOM 对污泥菌群富集驯化及 PHA 合成的影响

利用活性污泥中混合菌群将剩余污泥厌氧发酵液按照“三段式”工艺合成 PHA 已成为大家普遍认可的模式。该工艺模式包括底物合成段、产 PHA 菌富集段和 PHA 积累合成段。底物合成段即为剩余污泥厌氧发酵阶段,然后将产生的发酵液作为底物分别向产 PHA 菌富集段和 PHA 积累合成段提供,因此剩余污泥厌氧发酵液中的 DOM 会对 2 个阶段产生不同程度的影响。但目前,DOM 对于活性污泥合成 PHA 影响的研究较少且结论不一。大部分研究认为 DOM 不仅会降低 PHA 产率,还会导致活性污泥系统中污泥膨胀,使得整个工

艺无法稳定运行<sup>[24]</sup>。而 Liao 等<sup>[8]</sup>选用剩余污泥在不同温度下热水解发酵液为碳源,发现用热水解发酵液合成的 PHA 含量最高,占菌体干重 24.1%。因此认为微生物可以同时利用 VFAs 和 DOM 作为 PHA 合成的碳源。另外, Tu 等<sup>[24]</sup>通过实验发现 DOM 的存在会抑制 PHA 的降解速率,从而可以提高菌体内 PHA 的含量。因此,本文对 DOM 是否影响活性污泥合成 PHA 的研究成果进行了汇总。迄今研究表明 DOM 对于活性污泥合成 PHA 的影响主要有以下几个方面。

#### 3.1 DOM 对 PHA 合成菌富集机制的影响

活性污泥系统中微生物群落复杂且微生物多样性会随着废水的组成、反应器的运行条件以及所在区域分布而产生变化<sup>[25]</sup>。本小节重点关注 DOM 对 PHA 合成菌微生物群落结构及 PHA 合成菌富集机制的影响。

目前在富集 PHA 合成菌的工艺中,主要采用的是好氧动态底物补料工艺,也被称为饱食-饥饿 (Feast-Famine, F-F) 模式。该模式中 Feast-Famine 时长比(F/F)被认为是能直观反映 F-F 富集系统的核心作用力的选择压力参数。F/F 越大,代表微生物合成 PHA 能力越差。Fernando 等<sup>[26]</sup>认为 DOM 的存在会延长碳源充盈富营养段 (Feast period), 增大 F/F, 影响储存 PHA 微生物的压力选择机制, 进而不利于 PHA 合成菌的富集及 PHA 的合成。Zhang 等<sup>[27]</sup>也通过实验发现, 活性污泥利用剩余污泥热水解发酵液作为基质合成 PHA 时, PHA 最大积累量仅为干细胞的 (25–43.6) wt%。他们认为是底物中的 DOM (约占 SCOD 的 50%) 使得 PHA 合成菌的能力减弱。虽然在长期富集下, 菌群最终可以适应富含 DOM 的底物并且能够维持较高的 PHA 合成能力, 但由于 PHA 合成菌生长受到抑制, 产量的降低将不利于 PHA 工艺的整体运行<sup>[28]</sup>。

另外, 如表 2 所示, 不同组成和结构的 DOM 对不同 PHA 合成菌的影响也不同。Yu 等<sup>[29]</sup>发现

表 2 利用不同底物选择和富集活性污泥中的可合成 PHA 的优势菌种

Table 2 The selected and enriched dominant bacteria for PHA-storing with different substrates

Sr No.	Substrate	PHA yield/ Accumulation	Dominant bacterial cultures		Polymer produced
			Phylum and class	Genus and species or other classification	
1	Waste-activated sludge fermentation <sup>[30]</sup>	60%–65%	<i>Proteobacteria/Bacteroidetes/Firmicutes, Acidobacteria/Candidatus Saccharibacteria</i>	<i>Paracoccus/Thauera</i>	PHA
2	Thermal hydrolyzed sludge <sup>[27]</sup>	34.60%	<i>Selenomonadales/Anaerobaculum/Coprothermobacter</i>	n.s.	PHA
3	Thermophilic fermented valerate-dominant sludge hydrolysate <sup>[31]</sup>	68.4, 23.7, 7.9 mmol C%	79.80% <i>Proteobacteria</i> /14.41% <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>	52.90% <i>Corynebacterium</i> /9.19% <i>Lysinibacillus</i> /6.74% <i>Brevundimonas</i> /2.53% <i>Petrimonas</i>	3HB, 3HV, 3H2MV
4	Alkaline-fermented WAS liquor <sup>[32]</sup>	73.5, 24.3, 2.2 mmol C%	<i>Proteobacteria</i> : 42% <i>Gammaproteobacteria</i> , 16% <i>Alphaproteobacteria</i> , 15% <i>Betaproteobacteria</i> , 3% <i>Epsilonproteobacteria</i> / <i>Bacteroidetes</i> : 5% <i>Bacteroidetes</i> , 2% <i>Sphingobacteria</i> /4% <i>Chloroflexi</i>	<i>Gammaproteobacteria</i> : 24.1% unknown genus, 17% <i>Thiothrix</i> sp./ <i>Alphaproteobacteria</i> : 6.3% <i>Meganema</i> sp., 4.5% <i>Rhodobacter</i> sp./ <i>Betaproteobacteria</i> : <i>Hydrogenophaga</i> sp.	3HB, 3HV, 3H2MV
5	Fermented liquid from mixed primary sludge and WAS <sup>[33]</sup>	1.44 g/L	n.s.	<i>Betaproteobacteria</i> : 62.5% <i>Thauera</i> , 8.2% <i>Zoogloea</i> , 2.7% <i>Propionivibrio</i> , 0.5% <i>Dechloromonas</i> /20.5% Others/ <i>Bacteroidetes</i> : 2.3% <i>Flexibacter</i> , 0.5% <i>Saprosiraceae</i> / <i>Alphaproteobacteria</i> : 0.5% <i>Rhodobacter</i> / <i>Chloroflexi</i> : 0.4% <i>Anaerolineaceae</i>	PHBV, HV
6	Glucose <sup>[34-35]</sup>	40.3%	<i>Proteobacteria</i> (2 strains)/ <i>Firmicutes</i> (5 strains)	<i>Gammaproteobacteria</i> : <i>Serratia ureilytica</i> , <i>Pseudomonas otitidis</i> / <i>Firmicutes</i> : <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus badius</i> , <i>Bacillus tequilensis</i> , <i>Staphylococcus arlettae</i> , <i>Enterococcus italicus</i>	P3 (HB-co-HV)]
		39.6%	<i>Gammaproteobacteria</i> (5 bands), <i>Betaproteobacteria</i> (1 band), <i>Deltaproteobacteria</i> (1 band), <i>Epsilonproteobacteria</i> (1 band), <i>Bacteroidia</i> (3 bands), <i>Firmicutes</i> (1 band)	<i>Gammaproteobacteria</i> : <i>Pseudomonas</i> spp. (2 bands), <i>Aeromonas</i> spp. (2 bands), <i>Acinetobacter</i> spp./ <i>Bacteroidia</i> : <i>Uncultured bacteria</i> (2 bands), <i>Dysgonomonas</i> spp./ <i>Betaproteobacteria</i> : <i>Alcaligenes</i> spp./ <i>Deltaproteobacteria</i> : <i>Bacteriovorax</i> spp./ <i>Epsilonproteobacteria</i> : <i>Arcobacter</i> spp./ <i>Firmicutes</i> : <i>Bacillus</i> sp.	P3 (HB-co-HV)]
7	Starch <sup>[36]</sup>	n.s.	<i>Actinobacteria</i> (40%)/ <i>Proteobacteria</i> : <i>Gammaproteobacteria</i> (22%), <i>Betaproteobacteria</i> (15%), <i>Alphaproteobacteria</i> (3%)/ <i>Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes</i> (15%)/other (5%)	<i>Filamentous</i> (13%)	n.s.
8	Cheese whey <sup>[37]</sup>	6.09 and 2.55 g-PHA/(L·d)	<i>Proteobacteria/Firmicutes/Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium/Lampropedia/Leucobacter</i>	PHA
9	Paper industry wastewater and synthetic media <sup>[38]</sup>	34%	n.s.	<i>Plasticicumulans acidivorans</i>	PHA

n.s., not specified.

DOM 中蛋白类物质及多聚糖等组成对 PHA 合成菌的影响不同。其中,蛋白类物质对微生物的影响最为显著,其次是多聚糖和富含羟基、氨基官能团的成分。

### 3.2 DOM 对活性污泥合成 PHA 代谢途径的影响

剩余污泥厌氧发酵液作为底物进入活性污泥系统后,活性污泥微生物除了吸收 VFAs 以外,也会对其中可生物降解的 DOM 进行分解代谢,从而对活性污泥合成 PHA 产生影响。此外,有研究认为 DOM 能够吸附在微生物细胞壁上,极大地影响了营养物质的运输和电子传递,从而影响了微生物的代谢活性<sup>[39-40]</sup>。因此,本文对多聚糖、蛋白类物质、腐殖质 3 种典型 DOM 物质影响活性污泥合成 PHA 的代谢途径进行了评述<sup>[41]</sup>。

#### 3.2.1 多聚糖

多聚糖是由多个单糖分子脱水聚合,以糖苷键连接而成。在厌氧发酵水解过程中,通过胞外酶(糖分解酶)水解成葡萄糖等单糖后,再进一步转化为 VFAs<sup>[42]</sup>。由于大部分相关研究直接利用葡萄糖探讨活性污泥系统合成 PHA 的代谢机制,因此本文以葡萄糖为糖类代表,综述糖类对活性污泥合成 PHA 代谢途径的影响。微生物以葡萄糖为底物时合成的 PHA 主要为聚 3-羟基丁酸酯(PHB)<sup>[43]</sup>。其代谢途径如图 2 所示,葡萄糖等单糖通过糖酵解途径被催化生成乙酰辅酶 A,然后 2 个乙酰 CoA 在  $\beta$ -酮基硫解酶催化下缩合成乙酰乙酰 CoA,通过消耗 1 分子 NADPH,在乙酰乙酰 CoA 还原酶的催化下,乙酰乙酰 CoA 生成(R)-3-羟基丁酰 CoA,最后在 PHA 合酶(*phaC* 编码)的催化下,(R)-3-羟基丁酰辅酶 A 聚合生成 PHB。也有一些微生物以葡萄糖为底物时合成 3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸的共聚物(PHBV)。另外利用代谢工程等技术手段,可以拓宽葡萄糖合成 PHA 的代谢途径。李正军等<sup>[44]</sup>利用大肠杆菌构建了葡萄糖合成 3-羟基丁酸共聚酯的代谢途径,此时 PHA 最高积累量可达菌体干重的 55.9%。

葡萄糖的糖酵解途径对于活性污泥系统的代谢过程及 PHA 合成代谢机制具有非常重要的影响:一方面为代谢过程提供 ATP 和电子载体(NADH、NADPH 和  $FADH_2$ );另一方面,糖酵解以及后续的糖有氧分解涉及的相关代谢途径中的多组中间产物可作为合成 PHA 及其他物质的前体物<sup>[45]</sup>,如乙酰 CoA 和还原力 NADPH。乙酰 CoA 在 PHA 合成代谢机制中起着关键作用,乙酰 CoA 主要来自于糖酵解途径,丙酮酸进入线粒体转变为乙酰 CoA,这是连接糖酵解和三羧酸循环的纽带。此外还可以来自其他途径的分解代谢,如脂肪酸- $\beta$  氧化。NADPH 是细胞内重要的递氢体,主要是葡萄糖在胞液通过磷酸戊糖途径代谢产生<sup>[46]</sup>。在好氧条件下,乙酰乙酰 CoA 还原酶活性很大程度上依赖于还原力 NADPH。从上文有关 PHB 合成途径的描述中可知,乙酰乙酰 CoA 还原酶及 NADPH 在乙酰乙酰 CoA 转化为 3-羟基丁酰 CoA 过程中起着关键作用。综上所述,PHA 前体物乙酰 CoA 和 NADPH 的供给在一定程度上决定了 PHA 的产量,而这两个前体物与葡萄糖存在很大的关联。

当系统内葡萄糖浓度过高时,葡萄糖可能并不用于 PHA 合成,反而转化为糖原保存起来。其次,有可能会造成代谢中间产物积累,例如导致活性污泥系统中 NADH/NAD<sup>+</sup> 的比值升高,影响 NAD<sup>+</sup> 的再生和葡萄糖消耗,降低三羧酸循环途径的通量,细胞生长会受到明显抑制。另外,微生物中存在着碳代谢物阻遏效应,微生物在含有葡萄糖和其他碳源的混合底物中,首先会利用葡萄糖进行生长,当葡萄糖耗尽后才能够代谢其他碳源,且混合糖类底物利用率低<sup>[47]</sup>。因此,当微生物利用含有较高含量葡萄糖的混合底物时,在 PHA 合成菌富集阶段,由于 F/F 值变大,不利于富集 PHA 合成菌,且细胞生长受到抑制,PHA 合成菌的生物量无法维持在较高水平;而在 PHA 合成阶段,造成微生物合成 PHA 产率降低。综合

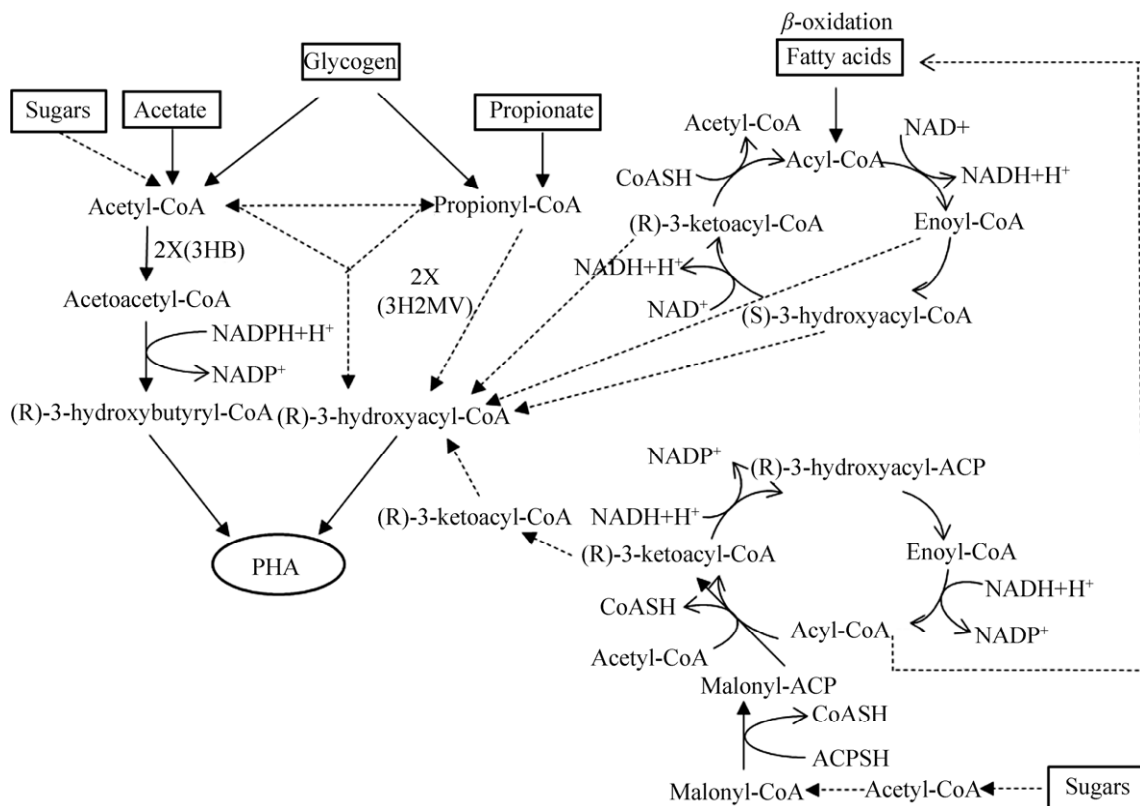


图 2 活性污泥菌群中可能的 PHA 代谢途径<sup>[41]</sup>

Fig. 2 Inferred pathway of PHA metabolism in bacterial consortium of activated sludge<sup>[41]</sup>.

所述,在剩余污泥厌氧发酵液复杂成分的体系下,葡萄糖对 PHA 合成菌群的富集以及 PHA 合成产生的影响与多聚糖浓度密切相关且较为复杂,需要进一步研究。

### 3.2.2 蛋白类物质

蛋白类物质是剩余污泥中的主要有机组分(占有有机质的 50%–60%)<sup>[48]</sup>,由于污泥中的蛋白类物质厌氧消化降解率普遍较低,使得在剩余污泥发酵液中仍然存在着较多的蛋白类物质。

在活性污泥代谢途径中,与多聚糖类似,微生物需氧细胞内蛋白质(氨基酸)通过自身的分解途径也同样会形成还原性辅酶,经过电子传递途径被重新氧化产生能量。而在微生物生长过程中由于合成氨基酸和其他物质时需要消耗大量的 NADPH,所以通过外源添加复合氮源或氨基酸等物质能够减少生长过程中 NADPH 的消耗,为

PHA 的合成提供更多的 NADPH,进一步提高 PHA 产量<sup>[47,49]</sup>。Lee 等<sup>[50]</sup>在重组大肠杆菌 *Escherichia coli* 的培养基中分别补充 20 种不同类型的氨基酸,其中发现胱氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸或脯氨酸 4 种氨基酸的加入促进了 PHB 的合成。利用分批补料工艺,通过补充少量的异亮氨酸、蛋氨酸和脯氨酸,PHB 浓度最高可达 70 g/L。

但是,蛋白类物质浓度过高可能会导致氮元素的积累从而抑制 PHA 的合成。研究表明增加碳氮比可以增强活性污泥合成 PHA 的能力,而氮浓度过高则会抑制 PHA 的合成<sup>[51]</sup>。

### 3.2.3 腐殖质

剩余污泥中的腐殖质来源于污水中夹杂的蔬菜残渣、厕纸、纸屑、杂草树叶等以及雨水冲刷带来的土壤腐殖质。此外,木质素及其降解产物(酚类、醌类及脂肪族化合物)也是腐殖质形成的



重要前体物质<sup>[52]</sup>。腐殖质因来源、形成路径、前体物聚合方式等不同,组分千差万别。剩余污泥中的腐殖质与土壤腐殖质相比,含有较少的C元素、芳香族和羧基官能团,但其中H、N元素、脂肪族和酚羟基官能团含量较多<sup>[53]</sup>。

在传统活性污泥工艺中,污水中腐殖质主要(67%–84%)通过吸附作用吸附于活性污泥表面而随同污泥从污水中分离出来。腐殖质随剩余污泥进入厌氧消化系统后,一部分被吸附的腐殖质会在污泥水解过程中解吸而溶入发酵液中<sup>[54]</sup>。

虽然腐殖质难以被微生物降解,但是在厌氧条件下,腐殖质可作为微生物和水体污染物的电子中间体或直接作为微生物厌氧呼吸电子受体参与厌氧消化电子传递过程<sup>[55]</sup>。另外,当腐殖质遇到硝酸盐等高氧化还原电位物质时,腐殖质本身亦可作为电子供体<sup>[56-57]</sup>。

研究证实腐殖酸可以加强微生物的好氧活性,但是当腐殖酸含量高于2 g/L,会显著减少对微生物的供氧能力,从而降低了微生物的有氧活性<sup>[58-59]</sup>。目前有关腐殖质对于富集PHA合成菌群以及合成PHA工艺的影响的研究较少,需要加强对这一方面影响和机理的探究。

从发酵液中3种常见的DOM的代谢途径来看,它们除了部分可以直接作为碳源用于合成PHA以及细胞增长,其复杂的代谢中间产物对于PHA合成代谢机制、相关酶活性及电子传递速率也存在着很大的影响,因此需要后续进一步的深入研究。

### 3.3 DOM对合成PHA菌污泥结构的影响

活性污泥胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)含有多种阴离子官能团,使得活性污泥具有一定的吸附作用。DOM中多聚糖、蛋白类物质及腐殖质等表面具有多种功能性基团,可以与EPS发生相互作用,使得水相中的部分DOM不断从水相迁移到EPS中,导致DOM在活性污泥系统水相和泥相中的分配比例

以及活性污泥EPS中各组分的含量都会发生变化,从而影响活性污泥的结构。Li等<sup>[60]</sup>利用不同浓度的模拟发酵液作为底物合成PHA时,发现EPS中蛋白质与多聚糖相对含量的变化会引起PHA产量和污泥絮体大小的变化。EPS中蛋白质相对含量的提高会使污泥絮体体积增大,导致污泥的比表面积变小,传质速率降低,抑制活性污泥微生物活性,不利于合成PHA。另外,蛋白类物质作为剩余污泥中主要的疏水性物质,会影响活性污泥脱水性能。根据EPS的双电层理论,污泥絮体中蛋白质含量降低和表面负电荷增加会增强静电排斥力,从而阻碍污泥絮体的絮凝和沉降,这样不利于PHA提纯阶段的固液分离效率,从而增大了实际生产成本。

腐殖质对活性污泥结构也具有重要影响。腐殖质可通过吸收、聚集和沉淀等方式来调控有机分子和微生物的迁移性<sup>[61]</sup>,从而改变污泥结构。Xu等<sup>[62]</sup>论证了腐殖质可以改变污泥中生物聚合物的空间构型,增强了污泥结构的稳定性。

因此,在合成PHA工艺过程中,需控制DOM浓度与种类维持在较合适的水平,从而可以提高PHA产率,同时加强污泥结构的稳定性、沉降性,降低实际生产成本。

## 4 改善DOM对PHA合成工艺影响的新策略

由于DOM会影响PHA的合成,因此人们尝试通过各种不同的措施来提高PHA的合成能力。Korkakaki等<sup>[63]</sup>发现底物的复杂性阻碍了微生物的新陈代谢,通过利用不含有DOM的模拟VFAs溶液富集PHA合成菌,可以消除DOM对PHA合成菌富集过程的影响,从而使得最终合成的PHA含量高达78%。Campanari等<sup>[64]</sup>利用橄榄油厂废水发酵产酸合成PHA时发现通过去除碳源匮乏(Famine period)阶段时反应器内的DOM可以促进PHA产量,且PHA最终浓度约为2 500 mg COD/L。Oliveira等<sup>[37]</sup>设计了一种非耦合碳氮利用策略,

在微生物处于碳源充盈阶段时使用仅含有碳源的底物,而在接下来的碳源匮乏阶段使用仅含有营养元素的底物,从而将 PHA 产量从最初的 2.55 g/(L·d) 增大到 6.09 g/(L·d)。Tu 等<sup>[24]</sup>则是将稀释过的实际发酵液与无 DOM 的模拟 VFAs 溶液混合,作为底物用于 PHA 菌富集和 PHA 的合成,在磷限制条件下,PHA 最大含量为 61.4 wt%。

除了通过稀释或直接移除来降低发酵液中 DOM 浓度,还可针对 PHA 合成菌富集阶段与 PHA 合成阶段,利用调控 pH、温度、SRT、补料模式、溶解氧等参数,来满足菌群的富集以及合成代谢的需求。GuerraBlanco 等<sup>[65]</sup>在 PHA 合成菌富集阶段通过调控培养条件(氮匮乏、控制 pH)改变微生物群落结构,减少非 PHA 合成菌的占比,PHA 含量可达 44.5 wt%。郑裕东等<sup>[66]</sup>通过研究证实,控制曝气量可以促进微生物积累 PHA。曝气会提高溶解氧(电子受体)浓度,有利于微生物电子传递,从而促进微生物对 DOM 的利用。

因此,可以通过加速微生物电子传递速率来加强活性污泥合成 PHA 工艺的整体效率<sup>[67]</sup>。微生物电子传递在微生物的代谢过程起着非常重要的作用,微生物电子传递可以被分为胞内电子传递和胞外电子传递。前者以氧气、硝酸盐、硫酸盐等可进入细胞内的物质为电子受体;后者以腐殖质、固态金属氧化物等难以进入细胞内的物质为电子受体。若能加快 PHA 合成菌的底物利用率,减少富集阶段饱食-饥饿的比例 (Feast-Famine ratio, F/F),则有利于 PHA 合成菌的富集及 PHA 的合成。

目前关于加速 PHA 合成菌富集阶段和 PHA 合成阶段的电子传递速率的方法可分为 3 种:一是添加除氧气外的电子受体,例如硝酸盐。硝酸盐呼吸可以加速  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  氧化还原循环,加速糖酵解途径,继而减轻 DOM 中糖类物质对于 PHA 代谢途径的影响,但是硝酸盐的供应缓解了氮饥饿,也会抑制 PHB 的合成<sup>[68]</sup>,因此硝酸盐的

投加需要控制在一定的浓度范围内。二是通过电化学途径加强胞外电子传递。Nishio 等<sup>[67]</sup>通过在电化学系统中使用生物相容介质来加速胞外电子转移,使胞内电子转移到胞外阳极,使得真氧产碱杆菌 *Ralstonia eutropha* 的 PHB 产量提高了 60%。三是通过投加外源物质,加强胞内电子转移,例如磁铁矿。该部分研究目前仍处于实验求证阶段。由于磁铁矿具有优良的导电性,电子能迅速在 2 种氧化态的铁中转移<sup>[69]</sup>。其中,磁铁矿纳米颗粒 ( $\text{nanoFe}_3\text{O}_4$ ) 已经广泛应用于催化<sup>[70]</sup>、生物医学<sup>[71]</sup>、环境领域<sup>[72]</sup>等。Fu 等<sup>[69]</sup>利用巴氏甲烷八叠球菌 *Methanosarcina barkeri*,通过添加  $\text{nanoFe}_3\text{O}_4$  作为电子穿梭体,发现 Fe (II) 和 Fe (III) 混合价的  $\text{nanoFe}_3\text{O}_4$  对甲烷生成的促进作用最为显著。在此过程中  $\text{nanoFe}_3\text{O}_4$  作为电子穿梭体促进活性污泥中的电子传递,那么对于 PHA 合成菌在合成 PHA 过程中的胞内电子传递速率也有可能通过此途径得以提高。

## 5 总结与展望

活性污泥利用厌氧发酵液作为底物进行 PHA 的生物合成符合可持续发展的趋势。但是,DOM 对于活性污泥微生物利用厌氧发酵液作为底物合成 PHA 的影响有着两面性。一方面,过量的 DOM 对 PHA 合成菌的富集以及 PHA 合成有抑制作用;另一方面,DOM 在一定条件下可直接作为碳源合成 PHA,同时有利于污泥性质的稳定,降低最终 PHA 提纯段成本。因此,在实际生产工艺中,可控制 DOM 浓度与种类维持在较合适的水平。

此外,DOM 对于活性污泥合成 PHA 中活性污泥结构、代谢调控方面的研究还有待进一步深入。这方面现阶段的研究多限于纯菌条件,对于活性污泥系统的研究并不多;另外通过加速微生物电子传递速率提高 PHA 的合成能力具有较广阔的研究应用背景。

## REFERENCES

- [1] Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 2015, 347(6223): 768-771.
- [2] 邱石正, 李佳益, 杨景辰, 等. 低成本合成聚羟基脂肪酸酯(PHAs)的研究进展. *生物技术通报*, 2019, 35(9): 45-52.  
Qiu SZ, Li JY, Yang JC, et al. Research progress of low-cost method of synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Biotechnol Bull*, 2019, 35(9): 45-52 (in Chinese).
- [3] Sun J, Dai XH, Wang QL. Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal. *Water Res*, 2019, 152: 21-37.
- [4] Rodriguez-Perez S, Serrano A, Panti6n AA, et al. Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *J Environ Manag*, 2018, 205: 215-230.
- [5] Valentino F, Morgan-Sagastume F, Campanari S, et al. Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *New Biotechnol*, 2017, 37(Pt A): 9-23.
- [6] Liu N, Jiang JG, Yan F, et al. Enhancement of volatile fatty acid production and biogas yield from food waste following sonication pretreatment. *J Environ Manag*, 2018, 217: 797-804.
- [7] Kumar M, Ghosh P, Khosla K, et al. Recovery of polyhydroxyalkanoates from municipal secondary wastewater sludge. *Bioresour Technol*, 2018, 255: 111-115.
- [8] Liao QR, Guo L, Ran YH, et al. Optimization of polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis with heat pretreated waste sludge. *Waste Manag*, 2018, 82: 15-25.
- [9] Wei ZM, Zhang X, Wei YQ, et al. Fractions and biodegradability of dissolved organic matter derived from different composts. *Bioresour Technol*, 2014, 161: 179-185.
- [10] Tran NH, Ngo HH, Urase T, et al. A critical review on characterization strategies of organic matter for wastewater and water treatment processes. *Bioresour Technol*, 2015, 193: 523-533.
- [11] Shon HK, Vigneswaran S, Snyder SA. Effluent organic matter (EfOM) in wastewater: constituents, effects, and treatment. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 2006, 36(4): 327-374.
- [12] Ma SJ, Hu HD, Wang JF, et al. The characterization of dissolved organic matter in alkaline fermentation of sewage sludge with different pH for volatile fatty acids production. *Water Res*, 2019, 164: 114924.
- [13] Lu D, Xiao KK, Chen Y, et al. Transformation of dissolved organic matters produced from alkaline-ultrasonic sludge pretreatment in anaerobic digestion: From macro to micro. *Water Res*, 2018, 142: 138-146.
- [14] Cao SB, Qian TT, Zhou Y. New insights on the sludge fermentation liquid driven denitrification: Evaluation of the system performance and effluent organic matter (EfOM). *Bioresour Technol*, 2019, 289: 121621.
- [15] Matilainen A, Gjessing ET, Lahtinen T, et al. An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemospher*, 2011, 83(11): 1431-1442.
- [16] 何伟, 白泽琳, 李一龙, 等. 溶解性有机质特性分析与来源解析的研究进展. *环境科学学报*, 2016, 36(2): 359-372.  
He W, Bai ZL, Li YL, et al. Advances in the characteristics analysis and source identification of the dissolved organic matter. *Acta Sci Circumst*, 2016, 36(2): 359-372 (in Chinese).
- [17] 董存存. 城市水环境代谢系统中溶解性有机物的特性表征[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2016.  
Dong CC. Characterization of dissolved organic matter in the metabolic system of the urban water[D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2016 (in Chinese).
- [18] Fukano K, Komiya K, Sasaki H, et al. Evaluation of new supports for high-pressure aqueous gel permeation chromatography: TSK-GEL SW type columns. *J Chromatogr A*, 1978, 166(1): 47-54.
- [19] Li L, Wang Y, Zhang WJ, et al. New advances in fluorescence excitation-emission matrix spectroscopy for the characterization of dissolved organic matter in drinking water treatment: A review. *Chem Eng J*, 2020, 381: 122676.
- [20] Cao SB, Sun FQ, Lu D, et al. Characterization of the refractory dissolved organic matters (rDOM) in

sludge alkaline fermentation liquid driven denitrification: Effect of HRT on their fate and transformation. *Water Res*, 2019, 159: 135-144.

- [21] Zhou YX, Xie YP, Wang M, et al. *In-situ* characterization of dissolved organic matter removal by coagulation using differential UV-Visible absorbance spectroscopy. *Chemosphere*, 2020, 242: 125062.
- [22] Carstea EM, Popa CL, Baker A, et al. *In situ* fluorescence measurements of dissolved organic matter: A review. *Sci Total Environ*, 2020, 699: 134361.
- [23] Li L, Wang Y, Zhang WJ, et al. New advances in fluorescence excitation-emission matrix spectroscopy for the characterization of dissolved organic matter in drinking water treatment: A review. *Chem Eng J*, 2020, 381: 122676.
- [24] Tu WM, Zou Y, Wu MH, et al. Reducing the effect of non-volatile fatty acids (non-VFAs) on polyhydroxyalkanoates (PHA) production from fermented thermal-hydrolyzed sludge. *Int J Biol Macromol*, 2019, 155: 1317-1324.
- [25] Zhang T, Shao MF, Ye L. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J*, 2012, 6(6): 1137-1147.
- [26] Morgan-Sagastume F, Karlsson A, Johansson P, et al. Production of polyhydroxyalkanoates in open, mixed cultures from a waste sludge stream containing high levels of soluble organics, nitrogen and phosphorus. *Water Res*, 2010, 44(18): 5196-5211.
- [27] Zhang DD, Jiang HL, Chang J, et al. Effect of thermal hydrolysis pretreatment on volatile fatty acids production in sludge acidification and subsequent polyhydroxyalkanoates production. *Bioresour Technol*, 2019, 279: 92-100.
- [28] 郭子瑞. 基于动态间歇排水瞬时补料的活性污泥合成 PHA 新工艺研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.  
Guo ZR. Research on new progress of PHA production using activated sludge based on dynamic pulse discharge-aerobic dynamic feeding mode[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2016 (in Chinese).
- [29] Yu MD, Liu SJ, Li GW, et al. Municipal wastewater effluent influences dissolved organic matter quality and microbial community composition in an urbanized stream. *Sci Total Environ*, 2020, 705: 135952.
- [30] Huang L, Chen ZQ, Wen QX, et al. Insights into Feast-Famine polyhydroxyalkanoate (PHA)-producer selection: Microbial community succession, relationships with system function and underlying driving forces. *Water Res*, 2018, 131: 167-176.
- [31] Hao JX, Wang XJ, Wang H. Overall process of using a valerate-dominant sludge hydrolysate to produce high-quality polyhydroxyalkanoates (PHA) in a mixed culture. *Sci Rep-Uk*, 2017, 7(1): 6939.
- [32] Jiang YM, Chen YG, Zheng X. Efficient polyhydroxyalkanoates production from a waste-activated sludge alkaline fermentation liquid by activated sludge submitted to the aerobic feeding and discharge process. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(20): 7734-7741.
- [33] Chen YG, Li M, Meng FS, et al. Optimal poly (3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate) biosynthesis by fermentation liquid from primary and waste activated sludge. *Environ Technol*, 2014, 35(13/14): 1791-1801.
- [34] Reddy MV, Mohan SV. Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment. *Bioresour Technol*, 2012, 114: 573-582.
- [35] Reddy MV, Mohan SV. Influence of aerobic and anoxic microenvironments on polyhydroxyalkanoates (PHA) production from food waste and acidogenic effluents using aerobic consortia. *Bioresour Technol*, 2012, 103(1): 313-321.
- [36] Ciggin AS, Rossetti S. Extent of intracellular storage in single and dual substrate systems under pulse feeding. *Environmental Science & Pollution Research*, 2013, 20(3): 1225-1238.
- [37] Oliveira CSS, Silva CE, Carvalho G, et al. Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. *New Biotechnol*, 2017, 37: 69-79.
- [38] Tamis, Jelmer, Mulders, et al. Pilot-scale

- polyhydroxyalkanoate production from paper mill wastewater: process characteristics and identification of bottlenecks for full-scale implementation. *J Environ Eng*, 2018, 144(10): 4018107.
- [39] Alibardi L, Cossu R. Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Manag*, 2016, 47: 69-77.
- [40] Shen DS, Yin J, Yu XQ, et al. Acidogenic fermentation characteristics of different types of protein-rich substrates in food waste to produce volatile fatty acids. *Bioresour Technol*, 2017, 227: 125-132.
- [41] Serafim LS, Lemos PC, Albuquerque MGE, et al. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(4): 615-628.
- [42] Ma HJ, Liu H, Zhang LH, et al. Novel insight into the relationship between organic substrate composition and volatile fatty acids distribution in acidogenic co-fermentation. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 137.
- [43] 尹进, 车雪梅, 陈国强. 聚羟基脂肪酸酯的研究进展. *生物工程学报*, 2016, 32(6): 726-737.  
Yin J, Che XM, Chen GQ. Progress on polyhydroxyalkanoates (PHA). *Chin J Biotechnol*, 2016, 32(6): 726-737 (in Chinese).
- [44] Li ZJ, Qiao KJ, Shi WC, et al. Biosynthesis of poly(glycolate-co-lactate-co-3-hydroxybutyrate) from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2016, 35: 1-8.
- [45] Zhou Y, Pijuan M, Oehmen A, et al. The source of reducing power in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs)- a mini-review. *Water Sci Technol*, 2010, 61(7): 1653-1662.
- [46] Ling C, Qiao GQ, Shuai BW, et al. Engineering NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in *Halomonas bluephagenesis* for enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHA). *Metab Eng*, 2018, 49: 275-286.
- [47] 霍广鑫. 代谢工程改造利用混合糖生产聚 3-羟基丁酸酯和乙偶姻[D]. 天津: 天津大学, 2017.  
Huo GX. Metabolic engineering of poly(3-hydroxybutyrate) and acetoin production from sugar mixture[D]. Tianjin: Tianjin University, 2017 (in Chinese).
- [48] 陈思思, 杨殿海, 庞维海, 等. 污泥中蛋白类物质厌氧转化影响因素及其促进策略研究进展. *化工进展*, 2020, 39(5): 1992-1999.  
Chen SS, Yang DH, Pang WH, et al. Advances in research on factors affecting anaerobic conversion of proteinaceous materials in sludge and their promotion strategies. *Chem Ind Eng Progr*, 2020, 39(5): 1992-1999 (in Chinese).
- [49] Lee IY, Kim MK, Park Y H, et al. Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and enzyme activities on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 52(6): 707-712.
- [50] Lee SY, Lee YK, Chang HN. Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. *J Fermentat Bioeng*, 1995, 79(2): 177-180.
- [51] Montiel-Jarillo G, Carrera J, Suárez-Ojeda ME. Enrichment of a mixed microbial culture for polyhydroxyalkanoates production: effect of pH and N and P concentrations. *Sci Total Environ*, 2017, 583: 300-307.
- [52] 唐兴. 腐殖质对污泥厌氧消化的影响及其屏蔽方法研究[D]. 北京: 北京建筑大学, 2017.  
Tang X. Study on the effects of humic substances on anaerobic digestion of excess sludge and the approaches to being shielded[D]. Beijing: Beijing University of Civil Engineering and Architecture, 2017 (in Chinese).
- [53] Hernández MT, Moreno JI, Costa F, et al. Structural features of humic acidlike substances from sewage sludge. *Soil Sci*, 1990, 149(2): 63-68.
- [54] Liu K, Chen YG, Xiao ND, et al. Effect of humic acids with different characteristics on fermentative short-chain fatty acids production from waste activated sludge. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(8): 4929-4936.
- [55] Lovley DR, Blunt-Harris EL. Role of humic-bound iron as an electron transfer agent in dissimilatory Fe(III) reduction. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(9): 4252-4254.
- [56] Lovley DR, Fraga JL, Coates JD, et al. Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ Microbiol*, 1999, 1(1): 89-98.
- [57] Bruce RA, Achenbach LA, Coates JD. Reduction of

- (per)chlorate by a novel organism isolated from paper mill waste. *Environ Microbiol*, 1999, 1(4): 319-329.
- [58] Lipczynska-Kochany E, Kochany J. Humic substances in bioremediation of industrial wastewater-mitigation of inhibition of activated sludge caused by phenol and formaldehyde. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2008, 43(6): 619-626.
- [59] Lipczynska-Kochany E, Kochany J. Respirometric studies on the impact of humic substances on the activated sludge treatment: mitigation of an inhibitory effect caused by diesel oil. *Environ Technol*, 2008, 29(10): 1109-1118.
- [60] Li H, Zhang JF, Shen L, et al. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge: correlation with extracellular polymeric substances and characteristics of activated sludge. *Chem Eng J*, 2019, 361: 219-226.
- [61] Baalousha M, Motelica-Heino M, Le Coustumer P. Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*, 2006, 272(1/2): 48-55.
- [62] Xu Y, Lu YQ, Zheng LK, et al. Effects of humic matter on the anaerobic digestion of sewage sludge: New insights from sludge structure. *Chemosphere*, 2020, 243: 125421.
- [63] Korkakaki E, Mulders M, Veeken A, et al. PHA production from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Overcoming the inhibitory matrix. *Water Res*, 2016, 96: 74-83.
- [64] Campanari S, Augelletti F, Rossetti S, et al. Enhancing a multi-stage process for olive oil mill wastewater valorization towards polyhydroxyalkanoates and biogas production. *Chem Eng J*, 2017, 317: 280-289.
- [65] Guerra-Blanco P, Cortes O, Poznyak T, et al. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production by photoheterotrophic microbial consortia: Effect of culture conditions over microbial population and biopolymer yield and composition. *Eur Polym J*, 2018, 98: 94-104.
- [66] 郑裕东, 钟青华, 马文石, 等. 厌氧-好氧驯化活性污泥生物合成 PHA 的研究. *环境科学研究*, 2001, 14(2): 41-44.  
Zheng YD, Zhong QH, Ma WS, et al. Biosynthesis of PHA from anaerobic-aerobic activated sludge process. *Res Environ Sci*, 2001, 14(2): 41-44 (in Chinese).
- [67] Nishio K, Kimoto Y, Song J, et al. Extracellular electron transfer enhances polyhydroxybutyrate productivity in *Ralstonia eutropha*. *Environ Sci Technol Lett*, 2013, 1(1): 40-43.
- [68] Zhao LM, Han D, Yin ZC, et al. Biohydrogen and polyhydroxyalkanoate production from original hydrolyzed polyacrylamide-containing wastewater. *Bioresour Technol*, 2019, 287: 121404.
- [69] Fu L, Zhou T, Wang JY, et al. NanoFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> as solid electron shuttles to accelerate acetotrophic methanogenesis by *Methanosarcina barkeri*. *Front Microbiol*, 2019, 10: 388.
- [70] Hudson R, Feng YT, Varma RS, et al. Bare magnetic nanoparticles: sustainable synthesis and applications in catalytic organic transformations. *Green Chem*, 2014, 45(16): 4493-4505.
- [71] Mohammed L, Goma HG, Ragab D, et al. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, 2017, 30: 1-14.
- [72] Su CM. Environmental implications and applications of engineered nanoscale magnetite and its hybrid nanocomposites: A review of recent literature. *J Hazard Mater*, 2017, 322: 48-84.

(本文责编 陈宏宇)