

研究报告

焦化废水 O/H/O 生物处理工艺二级好氧生物反应器的微生物结构和功能

谭智杰¹, 张宝善¹, 谢君婷¹, 林月霞¹, 吴海珍², 任源³, 韦朝海^{*3}, 朱爽^{*1}

1 广东药科大学生命科学与生物制药学院 广东省生物技术候选药物研究重点实验室, 广东 广州 510006

2 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

3 华南理工大学环境与能源学院, 广东 广州 510006

谭智杰, 张宝善, 谢君婷, 林月霞, 吴海珍, 任源, 韦朝海, 朱爽. 焦化废水 O/H/O 生物处理工艺二级好氧生物反应器的微生物结构和功能[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4549-4566

Tan Zhijie, Zhang Baoshan, Xie Junting, Lin Yuexia, Wu Haizhen, Ren Yuan, Wei Chaohai, Zhu Shuang. Microbial structure and functions in the second aerobic bioreactor of O/H/O coking wastewater treatment system[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4549-4566

摘要:【背景】焦化废水O/H/O生物处理工艺的二级好氧生物反应器O₂具有剩余污染物矿化和完全硝化功能,对废水的达标排放有重要作用。【目的】阐明O₂生物反应器的微生物结构和功能。【方法】利用16S rRNA基因测序,研究O₂生物反应器的微生物多样性和组成并进行功能预测,揭示其共现性特征和环境影响因子。【结果】O₂的优势菌门以变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、绿菌门(*Chlorobi*)为主。主要菌属中红游动菌属(*Rhodoplanes*)、溶杆菌属(*Lysobacter*)、硫杆菌属(*Thiobacillus*)等参与化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)、酚类(phenols)和硫氰酸盐(thiocyanate, SCN⁻)等剩余污染物的去除,亚硝化弧菌属(*Nitrosovibrio*)和硝化螺菌属(*Nitrospira*)分别作为氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和主要的亚硝酸盐氧化细菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)。功能预测结果显示苯甲酸酯降解、氨基苯甲酸酯降解、氯烷烃和氯乙烯的降解、氟代苯甲酸酯降解和硝基甲苯降解是外源物质生物降解和代谢的前五大通路,广泛分布在主要菌属中,验证了微生物降解剩余污染物的作用。基因*pmoA/B/C-amoA/B/C*、*hao*和*nxrA/B*编码相关的酶,组成了完整的硝化途径。共现网络结果揭示溶杆菌属、*Candidatus Solibacter*和红游动菌属在O₂生态中的重要地位。通过冗余分析(redundancy analysis, RDA)表明COD和NH₃是影响O₂微生物群落的主要因素。【结论】红游动菌属和溶杆菌属是O₂中最核心的功能菌属,在污染物矿化和维持

基金项目: 广东省自然科学基金(2021A1515012256); 广东省科技计划(2018A050506009)

Supported by: Natural Science Foundation of Guangdong Province (2021A1515012256); Science and Technology Project of Guangdong Province (2018A050506009)

*Corresponding authors: E-mail: WEI Chaohai: cechwei@scut.edu.cn; ZHU Shuang: zhushuang@gdpu.edu.cn

Received: 2022-03-25; Accepted: 2022-05-29; Published online: 2022-06-20

群落生态稳定上有重要作用。亚硝化弧菌属和硝化螺菌属是硝化作用的核心菌属。O₂中的代谢通路以剩余污染物矿化和完全硝化为主，微生物群落主要受COD和NH₃的影响。本研究阐明了O₂的微生物结构与功能，为焦化废水O/H/O生物处理工艺的改进提供了微生物学上的依据。

关键词： 焦化废水；好氧生物反应器；16S rRNA 基因高通量测序；微生物结构；功能预测

Microbial structure and functions in the second aerobic bioreactor of O/H/O coking wastewater treatment system

TAN Zhijie¹, ZHANG Baoshan¹, XIE Junting¹, LIN Yuexia¹, WU Haizhen², REN Yuan³, WEI Chaohai^{*3}, ZHU Shuang^{*1}

1 Guangdong Province Key Laboratory for Biotechnology Drug Candidates, School of Life Sciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2 School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

3 School of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

Abstract: [Background] The second aerobic bioreactor O₂ of the oxic-hydrolytic-oxic (O/H/O) system contributes to the biomineralization and complete nitrification of residual pollutants, which is important for the standard discharge of wastewater. **[Objective]** To elucidate the structure and functions of the microbial community in bioreactor O₂. **[Methods]** The 16S rRNA gene was sequenced to investigate the microbial diversity and composition, predict the microbial functional pathways, and reveal the microbial co-occurrence and the environmental driving factors in bioreactor O₂. **[Results]** *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Chlorobi* were the dominant phyla in the bioreactor. Among the dominant genera, *Rhodoplanes*, *Lysobacter*, and *Thiobacillus* were involved in the degradation of residual pollutants, such as chemical oxygen demand (COD), phenols, and thiocyanate (SCN⁻), and *Nitrosovibrio* and *Nitrospira* were the ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and the dominant nitrite-oxidizing bacteria (NOB), respectively. Functional profiling suggested that the benzoate degradation, aminobenzoate degradation, chloroalkane and chloroalkene degradation, eluorobenzoate degradation, and nitrotoluene degradation were the top five pathways in the xenobiotics biodegradation and metabolism. These major functional pathways were distributed widely in the dominant genera, implying their roles in biodegradation of residual pollutants. The *pmoA/B/C-amoA/B/C*, *hao*, and *nxrA/B* encoding related enzymes constituted the nitrification pathway. According to the result of microbial co-occurrence network, *Lysobacter*, *Candidatus Solibacter*, and *Rhodoplanes* occupied an important position in the O₂ ecosystem. Redundancy analysis (RDA) suggested that the microbial community in the bioreactor was mainly affected by COD and NH₃. **[Conclusion]** *Rhodoplanes* and *Lysobacter* were the key genera for biomineralization and ecological stability of the community. *Nitrosovibrio* and *Nitrospira* played an important part in nitrification. The metabolic pathways in O₂ were dominated by biomineralization and complete nitrification of residual pollutants. COD and ammonia (NH₃) were the main influencing

environmental factors. This study illustrates the structure and functions of microorganisms in bioreactor O₂, which is expected to lay a microbial basis for improving the treatment of coking wastewater by O/H/O system.

Keywords: coking wastewater; aerobic bioreactor; high-throughput sequencing of 16S rRNA gene; microbial structure; functional profiling

焦化废水是煤炭焦化过程中产生的一种工业废水, 主要来源于焦炭淬火热回收、焦炉煤气净化和煤炭衍生物回收过程等^[1]。焦化废水主要含有氨、氰化物(cyanide, CN⁻)、酚类(phenols)和多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)等污染物。这使得焦化废水成为一种难降解、毒性高的有机废水。焦化废水处理工艺涉及众多技术, 其中, 生物工艺是目前焦化废水处理中最核心的工艺^[2], 其依靠复杂的微生物群落, 以更高的效率和较低的能耗对污染物进行消除^[3]。因此, 研究焦化废水生物处理工艺的微生物结构和功能具有重要意义, 有助于工艺的改进。

16S rRNA 基因普遍存在于细菌和古菌中, 独特的结构使得 16S rRNA 基因成为原核生物分类和多样性分析的一种分子标志物^[4]。目前, 16S rRNA 基因测序已经被用于研究水处理工艺中的微生物组成和功能。Wu 等研究了共基质苯酚促进苯并[a]芘(benzo[a]pyrene, BaP)降解下微生物群落的变化, 发现苯酚作为共基质促进了微生物群落对 BaP 的适应, 而且通过功能预测发现了与 BaP 降解相关的伯克氏菌属(*Burkholderia*)等^[5]; Begmatov 等研究了莫斯科多个污水处理厂的微生物群落结构, 确定变形菌门(*Proteobacteria*)等是共同的主导菌门, 并发现亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)和 *Tetrasphaera* 等分别是除氮和除磷的类群^[6]; 李黔花等研究了好氧颗粒污泥在处理印染废水中微生物的组成, 发现 *Magnetospirillum* 对染料降解和化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)去除有重要作用^[7]。

目前, 应用于焦化废水处理的生物工艺主

要有 A/O、A/A/O、A/O/O、A/O/H/O 及 O/H/O 等^[1]。其中, O/H/O 工艺具有高效除碳脱氮、运行稳定和能耗少等特点, 有良好的应用前景^[8]。O/H/O 生物处理工艺由一级好氧生物反应器 O₁、水解生物反应器 H 和二级好氧生物反应器 O₂ 组成(图 1)。O₁ 作为 O/H/O 工艺的第 1 个生物反应器, 承担主要的污染物和毒性去除, 其对含氮污染物的去除将释放出 NH₃; H 在缺氧环境下通过接受 O₂ 硝化液的回流进行高效地反硝化脱氮, 同时还能酸化水解难降解污染物, 提高废水的可生化性; 经前 2 个反应器处理后, 废水毒性显著降低, 保证了 O₂ 中硝化细菌的完全硝化, 经 O₂ 处理后的硝化液回流到 H 中, 为 H 的反硝化提供底物, 从而实现脱氮^[9]。此外, O₂ 在前 2 个反应器的基础上进行残余污染物的最终去除^[9]。

本文将首先通过标准方法检测 O₂ 进出水中主要污染物的浓度并对长期稳定运行期间的运行参数进行监测; 利用 16S rRNA 基因测序获得 O₂ 生物反应器的微生物结构; 利用软件 Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt2), 基于京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)进行功能预测; 利用 R 语言构建共现网络来揭示微生物之间潜在的互作关系, 并利用冗余分析(redundancy analysis, RDA)发掘环境因子和细菌群落之间潜在的相关性。最终为焦化废水 O/H/O 生物处理工艺的改进提供微生物学上的依据。

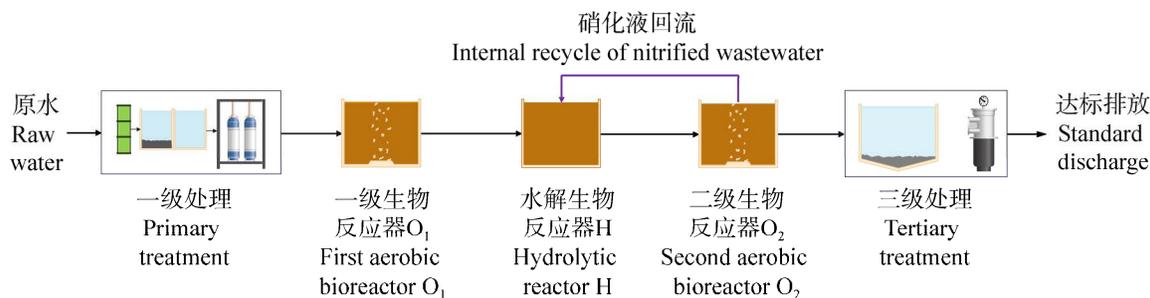


图 1 焦化废水 O/H/O 生物处理系统流程

Figure 1 Flow of the O/H/O coking wastewater treatment system.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒 PowerSoil™, MoBio 公司; 琼脂糖, Biowest 公司; 16S rRNA 基因扩增引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司。便捷式溶氧测定仪, YSI 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.1.2 样品来源

活性污泥样品均来自河北省涉县天津钢铁集团有限公司。为避免突发的事件影响废水处理, 该公司的处理系统包含了 2 个独立并行的子系统, 分别为南池和北池。该处理系统已稳定运行了 8 年。样品于 2021 年 5 月进行采集, 于 5 月 22、23、24 日对处理系统的二级好氧生物反应器 O₂ 南北池的进出水进行取样。活性污泥样品一经收集后立即放入装有冰袋的冷藏箱中, 待所有样品采集完成后迅速运回实验室。在采样的同时使用便携式溶氧测定仪测定溶氧量。样品运回实验室后, 对其进行解冻并混合。取 2–3 mL 的样品, 为样品①, 剩余的为样品②。将样品①于 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 用磷酸盐缓冲液(120 mmol/L, pH 8.0)洗涤 2 次后于 –20 °C 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 水质指标分析和运行参数

样品②在 3 500×g 下离心 3 min, 取上清液

通过 0.45 μm 滤膜后进行水质分析。为防止样品中污染物浓度随时间发生变化, 送达实验室的样品要在 24 h 内完成水质指标的分析。按照《水和废水监测分析方法测定(第 4 版)》^[10], 对如下的污染物指标进行分析: pH 值、COD、生化需氧量(biochemical oxygen demand, BOD)、酚类、CN[–]、硫氰酸盐(thiocyanate, SCN[–])、总氮(total nitrogen, TN)、NH₃、总磷(total phosphorus, TP)、总悬浮固体(total soluble solid, TSS)、总有机碳(total organic carbon, TOC)、硫化物(sulfides, S^{2–})、油(oil)和 PAHs。天津钢铁集团有限公司的 O/H/O 生物处理工艺采用了一种内循环三相气升式流化床反应器, 其设计保证了高效的混合和低能耗^[11]。在 O₂ 生物反应器中, 温度保持在 19 °C 左右; pH 值约为 7.01; DO 约为 3.47; 水力停留时间(hydraulic retention time, HRT)为(20±4) h; 污泥停留时间(sludge retention time, SRT)为(18±3) d; 混合液悬浮物(mixed liquid suspended solids, MLSS)为(2 900±310) g/L; O₂ 的运行参数如表 1 所示。

1.2.2 DNA 提取及测序

采用 DNA 提取试剂盒对样品①进行 DNA 提取, 提取方法参照说明书进行。用 1%琼脂糖凝胶电泳检验提取质量, 质量合格后方可进行下一步实验。参照 Deng 等^[12]的方法, 在 16S rRNA 基因的 V4 高变区, 使用引物 F515 (5'-GT

表 1 O₂ 生物反应器的运行参数Table 1 Operational parameters of the second aerobic bioreactor O₂

| Temperature (°C) | pH | DO (mg/L) | HRT (h) | SRT (d) | MLSS (mg/L) | Volume (m ³) | COD load rate (kg/(m ³ ·d)) | COD removal rate (kg/(m ³ ·d)) |
|------------------|-----------|-----------|---------|---------|-------------|--------------------------|--|---|
| 19 (18–21) | 7.01±0.16 | 3.47±0.35 | 20±4 | 18±3 | 2 900±310 | 1 800 | 0.62 | 0.47 |

GCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3')进行 PCR 扩增后送样至广东美格基因科技有限公司, 使用 Illumina MiSeq PE300 测序平台对提取得到的 DNA 样品进行测序。测序所得的原始序列信息已上传至国家微生物科学数据中心, 生物项目编号为 NMDC10018073。

1.2.3 序列分析与功能预测

经过测序得到了细菌的原始双端序列, 使用 Mothur^[13]和 QIIME V1.7 软件^[14]进行序列拼接和过滤低质量序列, 得到的高质量序列进行聚类获得可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。OTU 通过 Ribosomal Database Project (RDP)分类器, 基于 GreenGenes 数据库比对得到物种分类信息。通过 QIIME 计算 α 多样性指数, 通过 PICRUST2 软件^[15]进行功能预测。

表 2 O₂ 生物反应器的水质理化指标Table 2 Characteristics of wastewater in the second aerobic bioreactor O₂

| Item | Influent-N | Influent-S | Effluent-N | Effluent-S |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|
| COD (mg/L) | 536±34 | 517±33 | 217±23 | 189±22 |
| BOD (mg/L) | 113±21 | 103±17 | 5±3 | 4±3 |
| Phenols (mg/L) | 0.9±0.2 | 0.7±0.3 | 0.1±0.1 | 0.1±0.1 |
| CN ⁻ (mg/L) | 0.80±0.40 | 0.70±0.30 | 0.15±0.05 | 0.14±0.05 |
| SCN ⁻ (mg/L) | 21.0±7.0 | 17.0±9.0 | 0.2±0.1 | 0.2±0.1 |
| TN (mg/L) | 95±8 | 93±9 | 48±16 | 42±12 |
| NH ₃ (mg/L) | 91.00±9.00 | 83.00±8.00 | 1.14±0.13 | 1.18±0.11 |
| TP (mg/L) | 0.56±0.12 | 0.41±0.11 | 0.55±0.23 | 0.48±0.24 |
| TSS (mg/L) | 45±8 | 43±4 | 16±5 | 11±6 |
| TOC (mg/L) | 206±19 | 190±16 | 25±4 | 17±6 |
| S ²⁻ (mg/L) | 3.00±0.90 | 2.00±0.80 | 0.16±0.04 | 0.08±0.02 |
| Oil (mg/L) | 9.00±2.00 | 7.00±2.00 | 0.98±0.13 | 0.75±0.14 |
| PAHs (μg/L) | 114±17 | 108±16 | 57±11 | 53±9 |

1.2.4 数据处理及可视化

通过 ImageGP 网站^[16]绘制微生物丰度柱状图。利用 R 语言 V4.1.2 的 Statnet 包和 circlize 包对代谢通路进行可视化。利用 vegan 包进行 RDA 分析, 并通过 ggplot2 包进行美化。基于 OTU 的绝对丰度, 利用 igraph 包、psych 包和 Hmisc 包, 根据斯皮尔曼(Spearman)相关系数进行相关性网络的构建, 并利用 Gephi V0.9.2 进行可视化。

2 结果与分析

2.1 O₂ 的水质指标结果

通过 COD、BOD、酚类、CN⁻、SCN⁻、TN、NH₃、TP、TSS、TOC、S²⁻、油和 PAHs 共 13 项指标分析 O₂ 进出水的水质(表 2)。进出水的浓度差异显示, 在经过 O₂ 的处理后, 大部分污染物浓度均出现了显著的下降。其中, BOD、SCN⁻

和 NH_3 的下降程度最高。TP 的浓度在北池无明显变化, 在南池中有所上升。酚类、TN 和 TSS 等的浓度也呈现了一定的下降。

2.2 微生物群落结构

2.2.1 微生物群落多样性指数

通过高通量测序和数据处理, 从 6 个样品中得到了 131 652 条有效序列、7 145 个 OTU。根据 OTU 进行统计分析, 得到微生物多样性指数(表 3)。Good's coverage 能表示样品测序的深度。从结果可以看出, 样品的 Good's coverage 平均为 98.22%, 表明测序深度已足够代表微生物群落的多样性。ACE 和 Chaol 指数表示样本中微生物的丰富度, 香农指数(H')和辛普森指数(1-D)表示样本中物种的多样性, 均与样本微生物的丰富度和多样性呈正相关。 O_2 的 ACE 和 Chaol 指数平均为 1 460.76 和 1 378.89, 香农指数(H')和辛普森(1-D)指数平均为 5.80 和 0.94。以香农指数比较 O_2 与其他环境的微生物多样性发现, O_2 的微生物多样性高于同一工艺下的 O_1 (香农指数为 3.37)^[12], 低于市政污水处理厂(香农指数为 6.50)^[17], 并且介于土壤(香农系数约为 9.0–10.8)^[18-19]和以深海热泉(香农系数为 1.93)^[20]为代表的极端环境之间。

2.2.2 门水平的微生物组成

为了揭示 O_2 的微生物群落和功能, 将通过门和属水平对得到的序列分类信息进行分析。在门水平上, 共鉴定出 32 个细菌门, 定

义相对丰度大于 0.5%的菌门是主要菌门, 相对丰度小于 0.5%的菌门是稀有菌门(图 2A)。主要菌门共有 7 个, 其中, 变形菌门在 O_2 中占绝对优势, 为 69.64%。对变形菌门进行纲水平的分析, α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)和 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)的相对丰度均高于 0.5%, 分别为 27.9%、32.6%和 9.1%。第二大菌门为拟杆菌门(*Bacteroidetes*), 其相对丰度为 14.46%。绿菌门(*Chlorobi*)的相对丰度位居第 3, 为 3.93%。其余菌门按照相对丰度大小依次为放线菌门(*Actinobacteria*, 相对丰度为 3.48%)、酸杆菌门(*Acidobacteria*, 相对丰度为 2.22%)、*Thermi* (相对丰度为 1.54%)和浮霉菌门(*Planctomycetes*, 相对丰度为 1.51%)。

2.2.3 属水平的微生物组成

属水平分析结果显示, 在 O_2 中共有 160 个细菌属, 定义相对丰度大于 0.1%的为主要菌属, 相对丰度小于 0.1%的为稀有菌属(图 2B)。共得到 18 个主要菌属。红游动菌属(*Rhodoplanes*)是相对丰度最高的菌属, 为 8.92%。其次是溶杆菌属(*Lysobacter*)和硫杆菌属(*Thiobacillus*), 相对丰度分别为 3.61%和 3.22%。其余主要菌属和丰度依次为 *Alicyclophilus* (相对丰度为 0.16%)、白色杆菌属(*Leucobacter*, 相对丰度为 1.91%)、B-42 (相对丰度为 1.54%)、慢生瘤根菌属(*Bradyrhizobium*, 相对丰度为 1.49%)、

表 3 O_2 生物反应器活性污泥样本中的微生物多样性指数

Table 3 Diversity indexes of microbial communities in the second aerobic bioreactor O_2

| Samples | 有效序列 Number of quality reads | OTUs | Good's coverage (%) | ACE index | Chaol index | Shannon index (H') | Simpson index (1-D) |
|------------------|---------------------------------|-------|------------------------|-----------|-------------|---------------------------|------------------------|
| O_2 -N1 | 25 746 | 1 267 | 98.42 | 1 520.17 | 1 479.06 | 5.79 | 0.94 |
| O_2 -N2 | 16 816 | 984 | 97.96 | 1 309.47 | 1 181.22 | 5.75 | 0.94 |
| O_2 -N3 | 17 828 | 1 071 | 98.05 | 1 334.32 | 1 196.64 | 5.86 | 0.94 |
| O_2 -S1 | 24 277 | 1 328 | 98.25 | 1 588.78 | 1 557.51 | 5.88 | 0.94 |
| O_2 -S2 | 22 473 | 1 228 | 98.25 | 1 482.48 | 1 415.02 | 5.73 | 0.93 |
| O_2 -S3 | 24 517 | 1 267 | 98.38 | 1 529.40 | 1 425.90 | 5.76 | 0.94 |

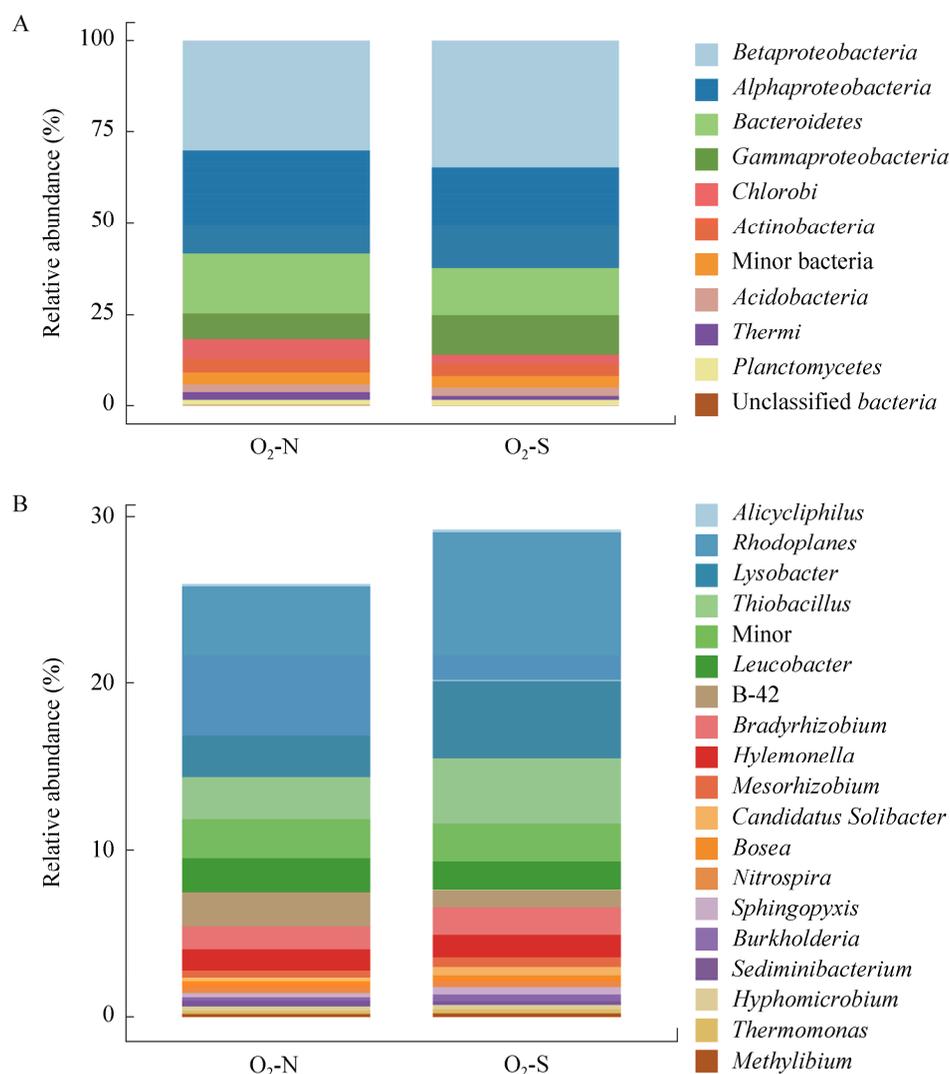


图 2 O₂ 生物反应器中门水平(A)和属水平(B)的微生物结构

Figure 2 Structure of microorganism phyla (A) and genera (B) in the second aerobic bioreactor O₂.

Hylemonella (相对丰度为 1.30%)、中慢生瘤根菌属(*Mesorhizobium*, 相对丰度为 0.50%)、*Candidatus Solibacter* (相对丰度为 0.38%)、*Bosea* (相对丰度为 0.37%)、硝化螺菌属(*Nitrospira*, 相对丰度为 0.36%)、*Sphingopyxis* (相对丰度为 0.35%)、伯克氏菌属(相对丰度为 0.31%)、*Sediminibacterium* (相对丰度为 0.28%)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*, 相对丰度为 0.24%)、热单胞菌属(*Thermomonas*, 相对丰度为 0.23%)和 *Methylibium* (相对丰度为 0.15%)。稀有菌属的

总相对丰度为 3.28%。除主要和稀有菌属外, 还有大量未被鉴别的菌属, 相对丰度为 72.40%。

2.3 O₂ 生物反应器的微生物功能预测

利用 PICRUST2 软件, 基于 KEGG 数据库进行功能预测。Nearest-sequenced taxon index (NSTI 值)可以衡量功能预测结果的准确性, O₂ 中的 NSTI 为 0.106 ± 0.010 , 吕锡斌等研究的赤水河流域的 NSTI 为 0.12^[21], 因此, 本次样本为微生物功能分析提供了一个较适合 PICRUST2 预测的数据集。

2.3.1 基于 KEGG 数据库的二级代谢通路丰度分布

基于功能预测的结果,共得到 43 条二级代谢通路(图 3)。碳水化合物降解(carbohydrate

metabolism)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)、辅助因子和维生素的代谢(metabolism of cofactors and vitamins)、能量代谢(energy metabolism)和膜转运(membrane transport)是二级代谢通路中

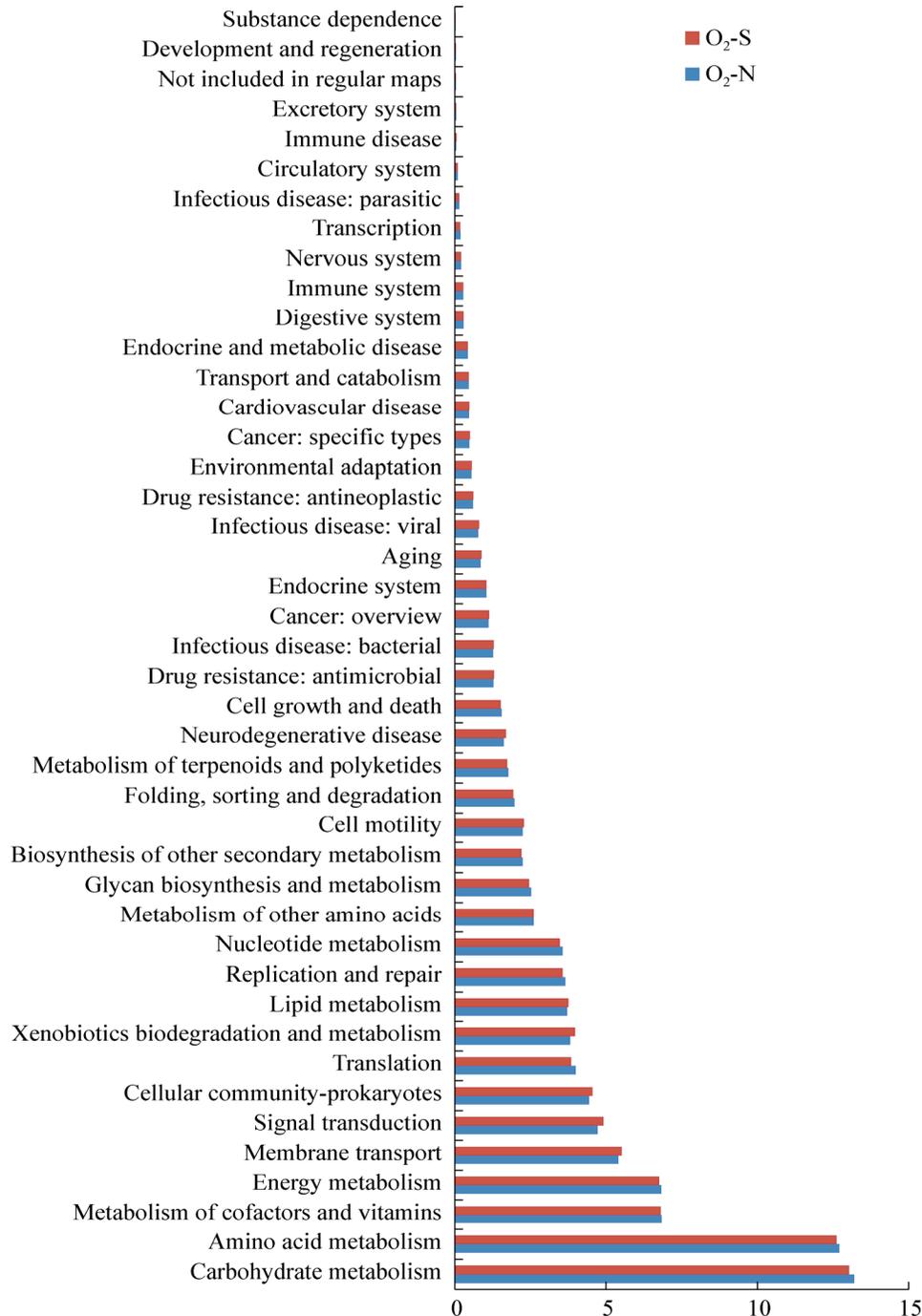


图 3 O₂ 生物反应器中微生物二级代谢通路的分布

Figure 3 Distribution of microbial metabolic level pathways in the second aerobic bioreactor O₂.

的前五大通路, 相对丰度依次为 13.11%、12.66%、6.82%、6.79%和 5.46%。氮代谢(nitrogen metabolism)是能量代谢下的三级代谢通路, 与氮循环相关。外源物质生物降解和代谢(xenobiotics biodegradation and metabolism)是第九大二级通路, 相对丰度为 3.89%, 暗示 O₂ 中潜在的有机污染物代谢能力。鉴于 O₂ 在剩余污染物矿化和硝化的功能, 后续将分别对外源物质生物降解和代谢通路及能量代谢中的氮代谢通路进行分析。

2.3.2 O₂ 中的外源物质生物降解和代谢通路分析

对外源物质生物降解和代谢通路进行深入分析发现, 在得到的 20 条子通路(图 4)中, 苯甲酸酯降解(benzoate degradation)、氨基苯甲酸酯降解(aminobenzoate degradation)、氯烷烃和氯烯烃的降解(chloroalkane and chloroalkene degradation)、氟代苯甲酸酯降解(fluorobenzoate degradation)和硝基甲苯降解(nitrotoluene degradation)是前五大代谢通路, 相对丰度分别

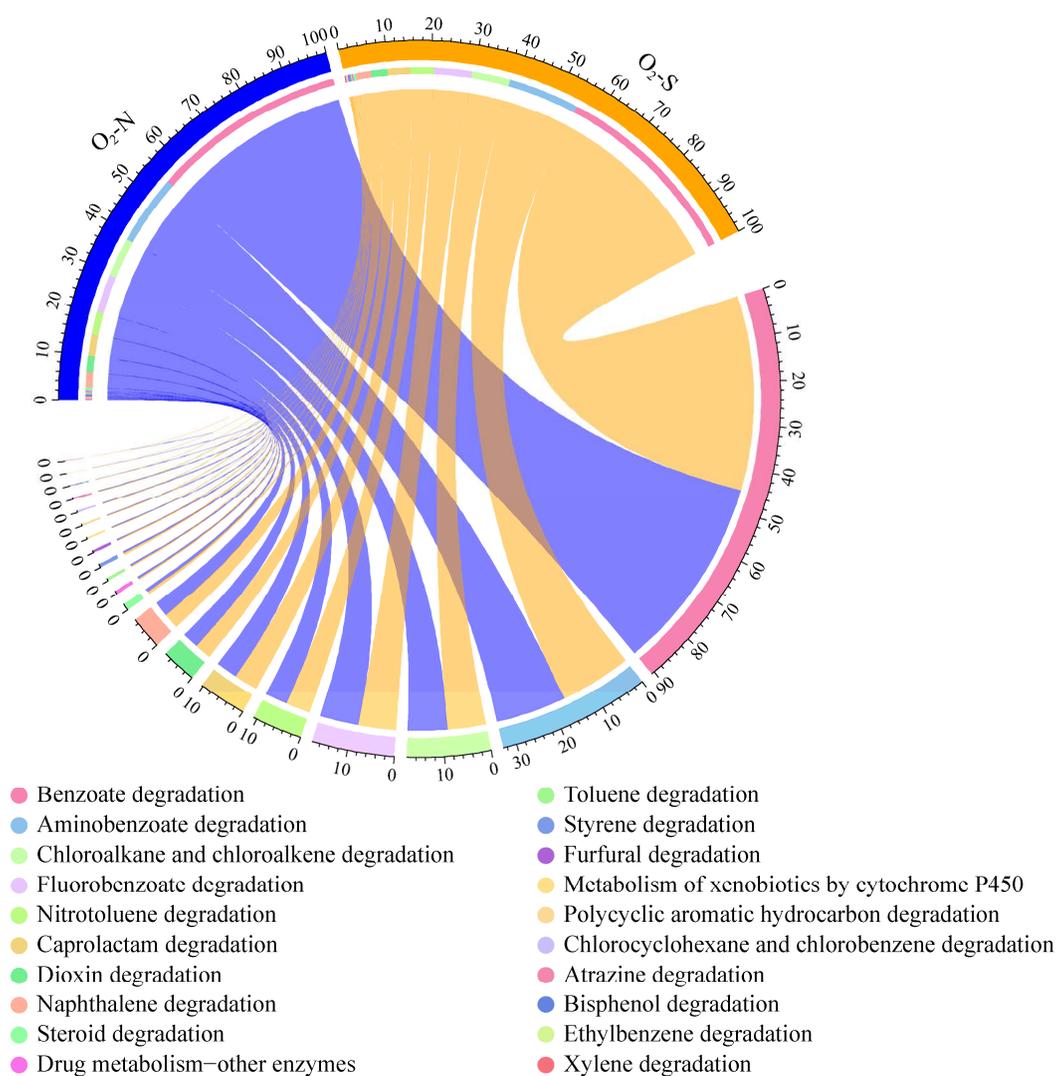


图 4 O₂ 生物反应器中外源物质生物降解和代谢的分布

Figure 4 Distribution of xenobiotics biodegradation and metabolism in the second aerobic bioreactor O₂.

为 45.30%、16.41%、9.00%、8.82%和 5.38%。特定的外源物质代谢通路揭示了微生物对焦化废水中特定污染物的降解作用。

2.3.3 O₂ 中的脱氮功能基因结果

本研究从 O₂ 中预测了 27 个与脱氮相关的基因(图 5)。其中参与硝化作用的基因为 *pmoA-amoA*、*pmoB-amoB*、*pmoC-amoC*、*hao*、*nxrA* 和 *nxrB*，在氮代谢通路中的相对丰度分别为 0.21%、0.21%、0.78%、0.34%、0.51%和 0.52%。基因 *narG/H/I*、*napA/B*、*nirK*、*nirS*、*norB/C* 和 *nosZ* 参与反硝化途径，将 NO₃⁻ 转化为氮气。另外，还发现了异化硝酸盐还原、同化硝酸盐还原和固氮途径，使硝酸盐和氮气还原为氨。

2.4 O₂ 微生物群落共现网络分析

为了探索 O₂ 中微生物潜在的相互作用，构建了微生物共现网络。定义相对丰度大于 0.1% 的 OTU 为主要 OTU，小于 0.1% 的 OTU 为稀有 OTU。本研究利用 86 个主要 OTU 构建了共现网络(图 6)。节点的大小与对应 OTU 的绝对丰度成正比，边表示节点之间具有的相互关系，绿色的边代表正相关，红色的边代表负相关。该共现网络共有 77 个节点和 237 条边，正相关的边占 94.09%，负相关的边占 5.91%，负相关主要表现在模块 I 与模块 III 之间。该网络的模块化指数为 0.759，大于 0.4，表明其具有明显的模块化特征。

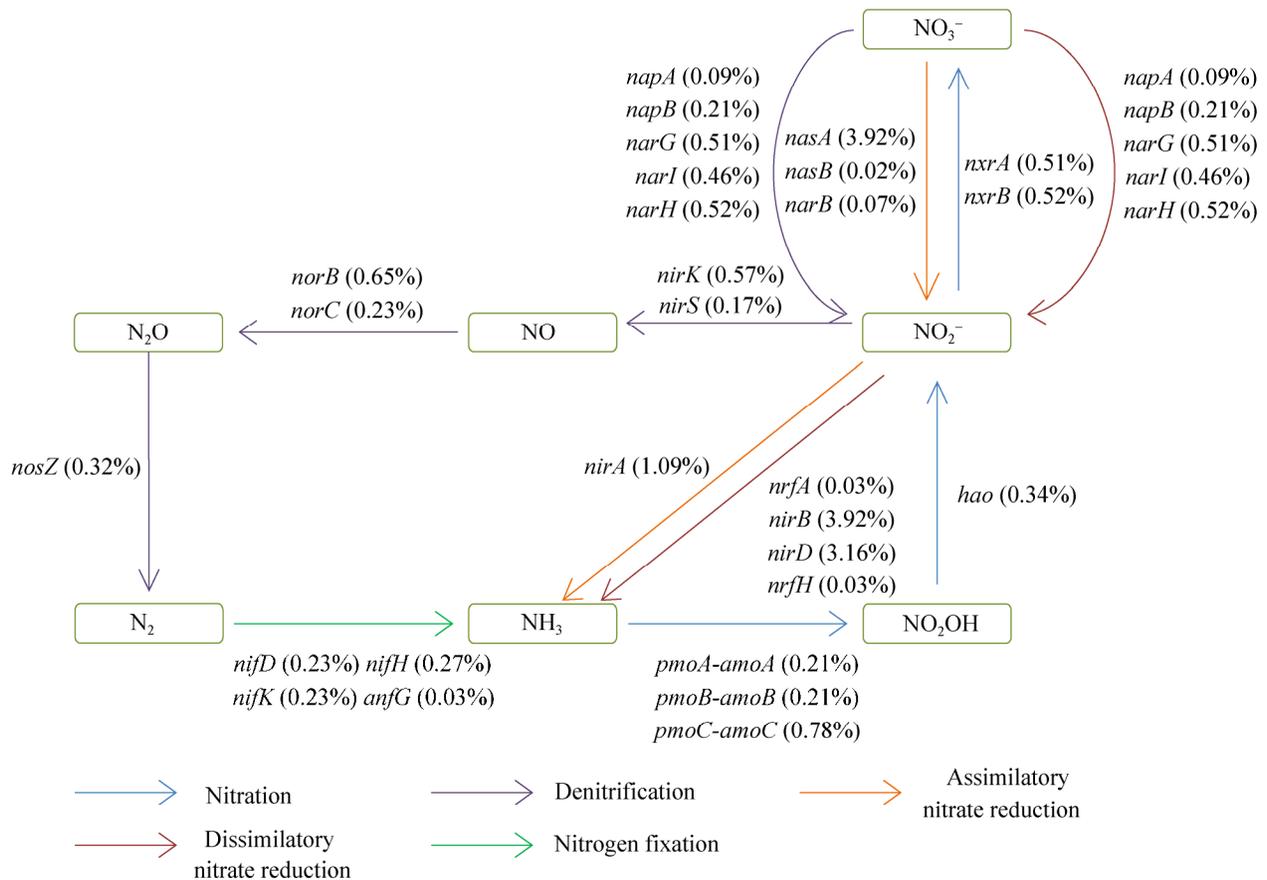


图 5 O₂ 生物反应器中氮循环途径和相关基因的相对丰度

Figure 5 Nitrogen transformation pathways and relative abundance of related genes in the second aerobic bioreactor O₂.

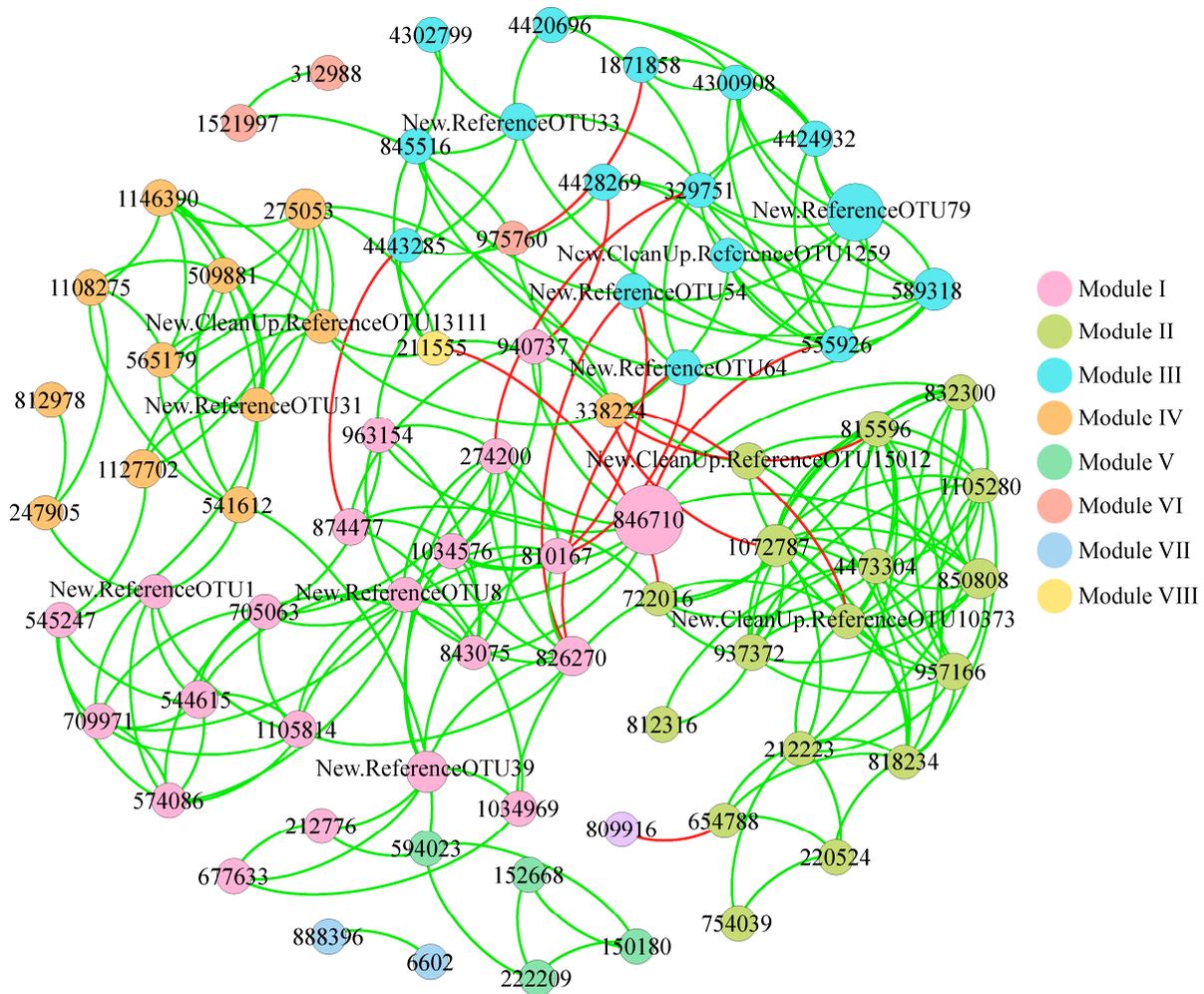


图 6 O₂ 中微生物互作网络分析

Figure 6 Microbial co-occurrence network analysis in the second aerobic bioreactor O₂.

度(degree)表示节点之间的连接数量,是判断关键类群指标。OTU1072787、OTU815596和 New.CleanUp.ReferenceOTU10373 是模块 II 至网络中度最高的 OTU,均为 12,表明这 3 个 OTU 是模块 II 整个网络的核心 OTU,其中前 2 个 OTU 分别属于溶杆菌属和 *Candidatus Solibacter*,第 3 个 OTU 的属无法鉴别。模块 IV 核心 OTU 为 OTU275053 和 New.CleanUp.ReferenceOTU13111,度均为 8,均属于红游动菌属。模块 I 和 III 的关键 OTU 分别为 New.ReferenceO-TU8 和 OTU329751,度分别为 11 和 10,均无法鉴别其菌属。

2.5 环境因子与微生物菌群的相关性

基于 COD、酚类、CN⁻、SCN⁻和 NH₃ 这 5 种环境因子与主要菌属进行相关性分析。首先在 R 语言中对菌属的数据进行去趋势对应分析(detrended correspondence analysis, DCA),结果显示 Axis Lengths 的第一轴为 0.22,因此决定使用 RDA 分析。RDA 分析结果(图 7)中,蓝色带箭头线段表示环境因子,红色的表示主要菌属,线段长度表示相关性大小,红蓝线段所成夹角的角度越小表示正相关性越大。结果显示,除 B-42、*Sediminibacterium* 和硝化螺菌属外,环境因子 COD、SCN⁻、CN⁻和酚类与所

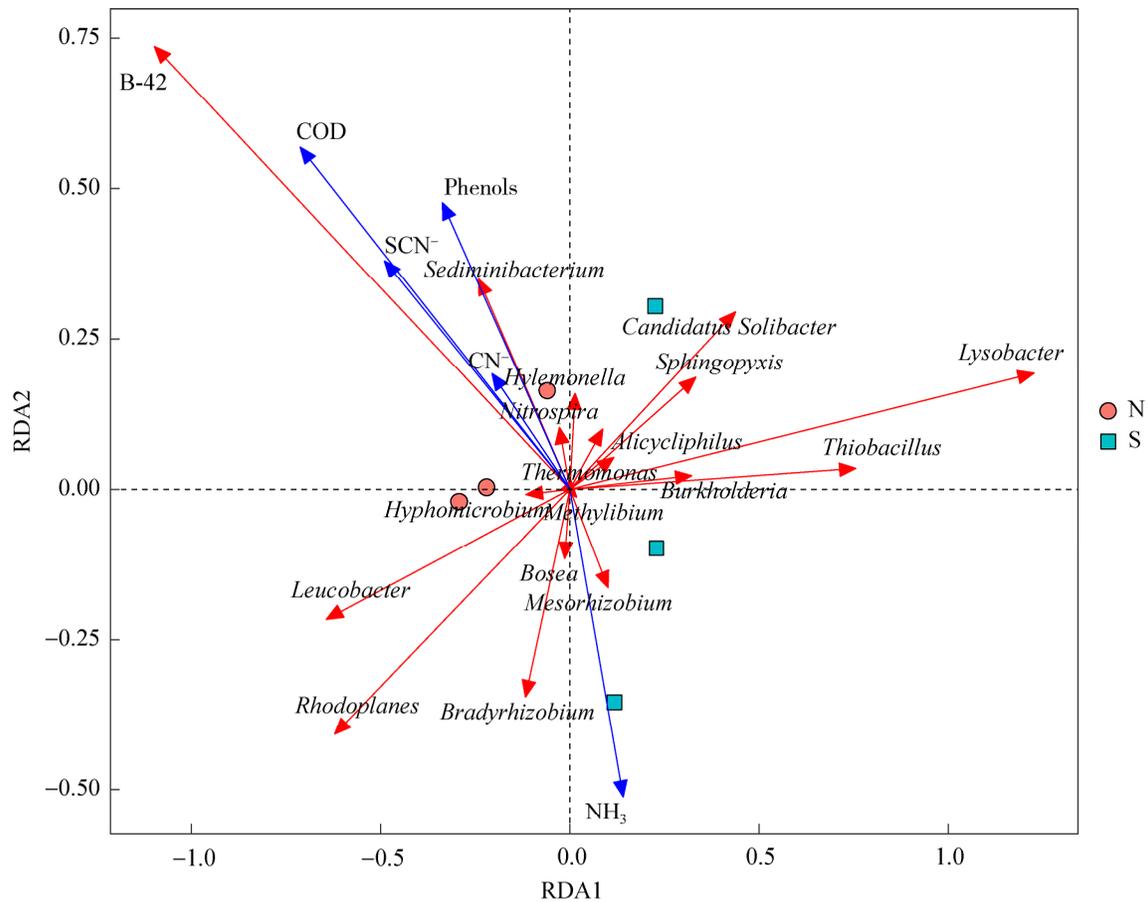


图 7 O_2 生物反应器中优势菌属与环境因子的 RDA 分析

Figure 7 The relationship between major genera and environmental factors in the second aerobic bioreactor O_2 .

有菌属皆呈负相关。 NH_3 与中慢生根瘤菌属呈正相关，与其余菌属呈负相关。*Hylemonella*、*Alicyclophilus*、*Sphingopyxis*、*Candidatus Solibacter*、热单胞菌属、白色杆菌属和 *Bosea* 等主要菌属与 5 种环境因子均呈负相关。

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 O_2 的水质指标和功能分析

进出水的水质结果反映了 O_2 的降解残留污染物和硝化功能。COD 和 BOD 分别降低了 61.44% 和 95.83%，BOD/COD 比值为 0.02，表明在 O_2 中几乎实现了可生物降解污染物的彻

底去除，显示出 O_2 的高效污染物矿化能力。酚类、 CN^- 和 SCN^- 分别消除了 87.50%、80.67% 和 98.95%，这些毒性污染物的去除能促进硝化细菌的生长^[3,9,22]，提高 O_2 的硝化效率。在硝化方面， O_2 中 NH_3 的浓度下降了 98.67%，这得益于硝化细菌的氨氧化作用。另外，TN 在 O_2 也得到了 52.13% 的消除。总之，根据进出水口污染物指标的检测，表明 O_2 具有高效的污染物降解和完全硝化作用，有助于废水的达标排放和工艺的脱氮。

3.1.2 O_2 的微生物组成特征

α 多样性能表示一个群落中微生物个体、数量和分布情况，同时也能用于群落间的比较。

基于 OTU 的组成, 利用 QIIME 计算 O_2 的 α 多样性指数。比较同一工艺下的 O_1 , 其香农指数为 3.37, 而 O_2 为 5.80, 这表明 O_2 的微生物多样性高于 O_1 , 推测 O_1 作为工艺的首个反应器, 接受高毒性的一级处理出水, 导致 O_1 的物种组成趋向单一。与香农指数为 6.50 的市政污水处理厂比较表明, 尽管 O_2 的毒性较低, 但其中的工业污染物对微生物仍具有一定的毒害作用, 使得 O_2 的微生物多样性比市镇污水低。综合土壤(香农指数约为 9 到 10.8)和以深海热泉(香农指数约为 1.93)为代表的极端环境的比较表明, O_2 的微生物多样性处于中下水平。

门水平分析显示, 在 O_2 中存在 7 个主要菌门, 分别为变形菌门、拟杆菌门、绿菌门、放线菌门、酸杆菌门、*Thermi* 和浮霉菌门。变形菌门占据最优势的地位, 该菌门下的 α -变形菌纲、 β -变形菌纲和 γ -变形菌纲均能对有机物进行消除^[23-24], 在污染物降解中发挥作用。拟杆菌门的相对丰度仅次于变形菌门, 有研究^[25]表明其具有降解酚类的能力, 这有助于硝化细菌的活动。绿菌门的相对丰度为 3.93%, 是一类不产氧的光合生物, 有研究显示其具有氧化还原硫化物的能力^[26]。通过结合水质分析和门水平分析, 我们推测变形菌门以其绝对的丰度和降解有机物的能力成为主要的 COD 和 BOD 降解类群, 拟杆菌门和绿菌门参与了酚类和 S^{2-} 的降解。通过门水平分析证明了 O_2 废水中主要菌门参与了剩余污染物的降解。

属水平结果表明, 红游动菌属是 O_2 中最优势的细菌属, 该菌属可能降解酚类、 S^{2-} 和 SCN^- ^[27]。溶杆菌属为次主要菌属, 研究表明该菌属能降解焦化废水中的石油烃, 有助于 COD 的消除^[28]。硫杆菌属在污染物降解中发挥重要作用, 能够降解 SCN^- , 并且进行反硝化和难降解有机物的降解^[29]。从微生物组成结果来看,

可以推测主要菌门和菌属是 O_2 进行 COD、 SCN^- 和酚类等剩余污染物降解的类群。

参与硝化的细菌一般分为 2 种, 即氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和亚硝酸盐氧化细菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)。亚硝化弧菌属是主要的 AOB^[30], 其相对丰度为 0.02%, 属于稀有菌属。对于 NOB, 硝化螺菌属是唯一与硝化相关的主要菌属, 另外还有相对丰度为 0.005%的硝化杆菌属(*Nitrobacter*)^[30]。由于相对丰度较大, 我们推测硝化螺菌属是 O_2 中主要的 NOB。鉴于亚硝化弧菌属丰度较小, 而且最近的研究表明部分硝化螺菌属是全程氨氧化细菌, 能独立完成整个硝化过程, 即同时具有氨氧化和亚硝酸盐氧化功能^[31]。因此我们在此提出了 2 个假设: (1) 在 O_2 中, 硝化螺菌属具备 AOB 和 NOB 的功能; (2) 在 O_2 中, 亚硝化弧菌属是主要的 AOB, 硝化螺菌属是主要的 NOB。这 2 个假设将在接下来对功能预测结果的分析中得到验证。

最后需要注意的是, 属水平分析结果中可预测的菌属不足 30%, 仍有约 70%是未被鉴定的菌属, 其中可能蕴含着丰富的微生物资源。

3.1.3 O_2 的微生物功能分析

利用 PICRUST2, 基于 KEGG 数据库进行功能预测, 可以验证 O_2 中的功能类群对污染物的代谢作用。根据二级通路预测的结果, 碳水化合物降解、氨基酸代谢、辅助因子和维生素的代谢、能量代谢和膜转运的相对丰度最高。由于与细菌的生命活动息息相关, 因此这 5 条二级代谢通路丰度最高。在外源物质生物降解和代谢通路中, 前五大代谢通路为苯甲酸酯降解、氨基苯甲酸酯降解、氯烷烃和氯烯烃的降解、氟代苯甲酸酯降解和硝基甲苯降解。在苯甲酸酯降解通路中, *catA* 和 *ligA* 的相对丰度分别为 4.97%和 4.45%, 能介导邻苯二酚和 3,4-

二羟基苯甲酸的开环。氨基苯甲酸酯降解通路中 *abmG* 的相对丰度为 12.32%，能脱去邻氨基苯甲酸的羧羟基并加上辅酶 A，最终进入苯甲酸降解途径。在氟代苯甲酸酯降解通路中，K01061 对应坎利酮水解酶，能介导 5-氟粘康酸内酯和 4-氟粘康酸内酯的开环。*nemA* 在硝基甲苯降解通路中参与三硝基甲苯降解的起始反应，还原其上任一硝基。上述的基因广泛分布在主要菌属中，红游动菌属、中慢生根瘤菌属、慢生根瘤菌属和伯克氏菌属均具有上述基因。通过对外源生物降解和代谢通路的分析，证明多个主要菌属参与酚类和难降解 COD 的去除。

氮代谢的功能预测结果包含了 23 个与脱氮相关的基因，组成了多个氮循环途径。在 O_2 中，硝化作用使 NH_3 得到了 98.67% 的降解，这体现了硝化基因的作用。*pmoA/B/C-amoA/B/C* 编码的氨单加氧酶将氨转化为羟基氨，*hao* 编码羟胺脱氢酶将羟基氨氧化为 NO_2^- ，完成氨氧化过程。*nxrA/B* 编码硝酸盐氧化还原酶将 NO_2^- 氧化为 NO_3^- ，完成亚硝酸盐氧化，实现 O_2 的完全硝化作用。预测结果还显示，亚硝化弧菌属只具有 *pmoA/B/C-amoA/B/C* 和 *hao*，硝化螺菌属和硝化杆菌属只具有 *nxrA/B*。其中，硝化螺菌属在 NOB 中对 *nxrA/B* 的贡献率均为 87%，表明硝化螺菌属是主要的 NOB。这验证了微生物组成分析中提出的假设(2)， O_2 中的硝化螺菌属不属于全程氨氧化细菌，即亚硝化弧菌属和硝化螺菌属分别作为 O_2 中的 AOB 和主要的 NOB。虽然从结果来看，亚硝化弧菌属的相对丰度较小，而且硝化基因的丰度与其他氮循环基因，尤其是氨化基因的丰度相比无明显优势，但有研究表明硝化基因的表达活性远高于其他氮循环途径的基因^[32]，因此 O_2 中氨氮的去除率高达 98.67%。

根据 TN 去除的效果，我们认为 O_2 中 TN

的去除主要通过 2 个途径：一是同步硝化反硝化，这是由于污泥中存在好氧反硝化细菌和污泥絮凝体能形成微缺氧区执行厌氧反硝化功能^[33]。功能预测结果显示， O_2 存在反硝化基因 *napA/B*、*narG/H/I*、*nirK*、*nirS*、*norB/C* 和 *nosZ*。*napA/B* 和 *narG/H/I* 编码硝酸盐还原酶(Nap 和 Nar)，将 NO_3^- 还原成 NO_2^- 。*nirK* 和 *nirS* 编码亚硝酸盐还原酶(Nir)将 NO_2^- 还原为 NO，*norB/C* 编码 NO 还原酶(Nor)还原 NO 为 N_2O ，最终由 *nosZ* 编码 N_2O 还原酶(Nos)将 N_2O 还原为氮气。Nap 受氧气影响较小，Nar 的活性则容易受到氧气的抑制^[34]，分别是好氧和厌氧反硝化细菌参与反硝化的关键酶。功能预测结果还显示，*napA/B* 分布在中慢生瘤根菌属^[35]和假单胞菌属(*Pseudomonas*，相对丰度为 0.04%，为稀有菌属)^[34]中，这些菌属都属于好氧反硝化细菌。*narG/H/I* 则分布在脱氮杆菌属(*Denitrobacte*，相对丰度为 0.02%，为稀有菌属)等厌氧反硝化菌中^[36]。另一 TN 去除途径是微生物同化作用^[9]，基因 *glnA* 的存在能印证该作用，该基因编码的酶能将 NH_3 转化为左旋谷氨酰胺。反硝化和微生物同化的共同作用使得 O_2 具备了一定程度的 TN 消除能力。

3.1.4 微生物共现网络结果分析

本研究构建了微生物共现网络，能预测群落中微生物的互作关系，确定核心物种。共现网络结果显示正相关的边占比较大，表明 O_2 微生物的相互关系主要以协同共生为主。网络中的核心 OTU 属于溶杆菌属、*Candidatus Solibacter* 和红游动菌属。溶杆菌属在植物病害的防治上具有良好的应用前景，其具有广谱的微生物拮抗作用，能抑制真菌、细菌及线虫的活性^[37]。然而，在本研究中却发现溶杆菌属与其他菌属多呈协同共生的关系，而非拮抗作用，这表明在 O_2 中，溶杆菌属可能为适应特殊的环境而改变了其与其他细菌的关系。与溶杆菌属类

似, *Candidatus Solibacter* 也在网络中与其他细菌呈协同共生的关系。有研究表明 *Candidatus Solibacter* 具有抗重金属的作用^[38], 另外也有研究表明该菌属能降解砷^[39]。对于红游动菌属, 我们在微生物组成特征和功能的分析中已经证明了其具有降解酚类和 SCN^- 等毒性污染物的能力。因此, 推测 *Candidatus Solibacter* 和红游动菌属能减轻污染物的毒害作用, 提高其他微生物的活性, 从而表现出协同共生关系。

总而言之, 尽管存在无法鉴别的 OTU, 但至少可以确定溶杆菌属、*Candidatus Solibacter* 和红游动菌属在 O_2 生态中占有关键地位。同时未知 OTU 的存在也表明 O_2 这一特殊的生境孕育了独特的微生物群落, 其中蕴含着潜在而丰富的微生物资源。

3.1.5 主要菌属与环境因子的相关性分析

通过相关性分析, 能够阐明菌属对污染物的降解作用, 同时也能揭示环境因子对菌属的促进或抑制关系。结果显示, 红游动菌属、溶杆菌属等菌属与酚类、 CN^- 、 SCN^- 等污染物呈负相关, 硝化螺菌属与 NH_3 呈负相关, 显示出主要菌属对污染物的降解作用, 与前人的研究相一致。从整体上看, COD 和 NH_3 与菌属的相关性最高, 这说明 O_2 的微生物群落主要受到 COD 和 NH_3 的影响。COD 与大部分菌属呈现的负相关性, 一方面是由于酚类、 SCN^- 和 S^{2-} 为 COD 的主要组成, 微生物通过降解这些物质来获得生长所需的物质和能量; 另一方面是酚类和 SCN^- 对微生物尤其是硝化细菌有毒害作用^[40-41]。然而, 本研究的 RDA 结果却显示硝化螺菌属与 COD 呈较小的正相关, 推测硝化螺菌属可能适应了高毒性的焦化废水, 这或许能为废水处理提供一种具有耐受性的 NOB。 NH_3 与大部分菌属呈负相关, 因为高浓度的 NH_3 对微生物具有抑制作用^[42], 这抑制了 O_2 的剩余污染

物降解作用。主要菌属中只有中慢生根瘤菌属与 NH_3 有正相关性, 该菌属是一种固氮细菌^[43], 其将氮气转化为 NH_3 , 影响了 O_2 的硝化性能, 但该菌属也验证了 H 生物反应器的反硝化效能。

3.2 结论

通过 16S rRNA 基因测序组学分析, 我们揭示了焦化废水 O/H/O 生物处理工艺中二级好氧生物反应器 O_2 的微生物结构和功能特征。

(1) O_2 中变形菌门占绝对优势, 主要菌属红游动菌属、溶杆菌属、硫杆菌属是负责剩余污染物矿化的主要功能类群。亚硝化弧菌属和硝化螺菌属分别是主要的 AOB 和 NOB。

(2) O_2 的外源物质生物降解和代谢通路中主要涉及苯甲酸酯降解、氨基苯甲酸酯降解、氯烷烃和氯烯烃的降解、氟代苯甲酸酯降解和硝基甲苯降解, 这些功能通路与 COD 和酚类等污染物的降解有关, 验证了 O_2 降解剩余污染物的作用。氮代谢中, 基因 *pmoA/B/C-amoA/B/C*、*hao* 和 *nxrA/B* 组成了完整的硝化途径, 验证了 O_2 的硝化作用。

(3) 共现网络结果表明溶杆菌属、*Candidatus Solibacter* 和红游动菌属是 O_2 生态中的重要菌属, 可能通过抑制污染物的毒性促进其他微生物的生长, 与其他微生物构成协同共生关系。

(4) RDA 分析显示 COD 和 NH_3 是影响 O_2 微生物群落最主要的环境因子, 这 2 种环境因子的浓度将影响 O_2 微生物的丰度及其对污染物的降解。

REFERENCES

- [1] Tamang M, Paul KK. Advances in treatment of coking wastewater-a state of art review[J]. Water Science and Technology, 2022, 85(1): 449-473
 - [2] 潘建新. 废水处理脱氮自调节模式: OHO 工艺实验及原理研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2018
- Pan JX. Self-regulation mode of nitrogen removal in

- wastewater treatment—study of experiments and principle on OHO process[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2018 (in Chinese)
- [3] Zhu S, Wu HZ, Wei CH, Zhou L, Xie JT. Contrasting microbial community composition and function perspective in sections of a full-scale coking wastewater treatment system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(2): 949-960
- [4] 黄志强, 邱景璇, 李杰, 许东坡, 刘箐. 基于 16S rRNA 基因测序分析微生物群落多样性[J]. *微生物学报*, 2021, 61(5): 1044-1063
Huang ZQ, Qiu JX, Li J, Xu DP, Liu Q. Exploration of microbial diversity based on 16S rRNA gene sequence analysis[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(5): 1044-1063 (in Chinese)
- [5] Wu HZ, Wang M, Zhu S, Xie JT, Preis S, Li FS, Wei CH. Structure and function of microbial community associated with phenol co-substrate in degradation of benzo[a]pyrene in coking wastewater[J]. *Chemosphere*, 2019, 228: 128-138
- [6] Begmatov S, Dorofeev AG, Kadnikov VV, Beletsky AV, Pimenov NV, Ravin NV, Mardanov AV. The structure of microbial communities of activated sludge of large-scale wastewater treatment plants in the city of Moscow[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 3458
- [7] 李黔花, 李志华, 岳秀, 于广平, 王慧娟. 好氧颗粒污泥处理印染废水的效能及其微生物特征[J]. *工业水处理*, 2020, 40(3): 43-48
Li QH, Li ZH, Yue X, Yu GP, Wang HJ. Efficiency and microbial characteristics of aerobic granular sludge for textile dyeing wastewater treatment[J]. *Industrial Water Treatment*, 2020, 40(3): 43-48 (in Chinese)
- [8] Wei CH, Li ZM, Pan JX, Fu BB, Wei JY, Chen B, Yang XZ, Ye GJ, Wei C, Luo P, et al. An oxic-hydrolytic-oxic process at the nexus of sludge spatial segmentation, microbial functionality, and pollutants removal in the treatment of coking wastewater[J]. *ACS ES&T Water*, 2021, 1(5): 1252-1262
- [9] 孙晓雪, 韦聪, 罗培, 杨兴舟, 叶国杰, 韦朝海, 彭亚环, 邱光磊, 平武臣. OHO-MBR 组合工艺处理实际焦化废水的可行性[J]. *环境工程学报*, 2021, 15(8): 2759-2769
Sun XX, Wei C, Luo P, Yang XZ, Ye GJ, Wei CH, Peng YH, Qiu GL, Ping WC. Feasibility test of OHO-MBR combined process for actual coking wastewater treatment[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2021, 15(8): 2759-2769 (in Chinese)
- [10] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
State Environmental Protection Administration of China. *Monitoring and Analysis Methods for Water and Wastewater*[M]. 4th ed. Beijing: China Environment Science Press, 2002 (in Chinese)
- [11] Zhang T, Wei CH, Feng CH, Zhu JL. A novel airlift reactor enhanced by funnel internals and hydrodynamics prediction by the CFD method[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 104: 600-607
- [12] Deng JS, Zhang BS, Xie JT, Wu HZ, Li ZM, Qiu GL, Wei CH, Zhu S. Diversity and functional prediction of microbial communities involved in the first aerobic bioreactor of coking wastewater treatment system[J]. *PLoS One*, 2020, 15(12): e0243748
- [13] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541
- [14] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [15] Douglas G M, Maffei V J, Zaneveld J R, Yurgel S N, Brown J R, Taylor C M, Huttenhower C, Langille M G I. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(6): 685-8.
- [16] Chen T, Liu YX, Huang LQ. ImageGP: an easy-to-use data visualization web server for scientific researchers[J]. *iMeta*, 2022: e5
- [17] Qiu GL, Zhang S, Srinivasa Raghavan DS, Das S, Ting YP. Towards high through-put biological treatment of municipal wastewater and enhanced phosphorus recovery using a hybrid microfiltration-forward osmosis membrane bioreactor with hydraulic retention time in sub-hour level[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 219: 298-310
- [18] 宋国庆, 李辉, 马克, 赵雪莹, 沈忆文, 谢建辉, 周怀谷. 基于 16S rRNA 基因序列对不同土壤细菌群落的差异性分析[J]. *法医学杂志*, 2019, 35(2): 187-193
Song GQ, Li H, Ma K, Zhao XY, Shen YW, Xie JH, Zhou HG. Difference analysis based on 16S rRNA sequencing of different soil bacterial communities[J].

- Journal of Forensic Medicine, 2019, 35(2): 187-193 (in Chinese)
- [19] 张凯煜, 谷洁, 王小娟, 高华. 微生物有机肥对樱桃园土壤细菌群落的影响[J]. 中国环境科学, 2019, 39(3): 1245-1252
Zhang KY, Gu J, Wang XJ, Gao H. Effects of bio-organic fertilizer on the soil bacterial community in a cherry orchard[J]. China Environmental Science, 2019, 39(3): 1245-1252 (in Chinese)
- [20] Campbell BJ, Polson SW, Zeigler Allen L, Williamson SJ, Lee CK, Wommack KE, Cary SC. Diffuse flow environments within basalt- and sediment-based hydrothermal vent ecosystems harbor specialized microbial communities[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 182
- [21] 吕锡斌, 吴云成, 陈良强, 刘明庆, 杨帆, 王蒙蒙, 田伟, 王莉. 赤水河流域浮游细菌群落特征及其与水质的关系[J]. 环境科学学报, 2021, 41(11): 4596-4605
Lü XB, Wu YC, Chen LQ, Liu MQ, Yang F, Wang MM, Tian W, Wang L. Characteristics of the bacterioplankton community and their relationships with water quality in Chishui River Basin[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2021, 41(11): 4596-4605 (in Chinese)
- [22] 邓锦思. 焦化废水 AOHO 生物处理系统微生物群落的结构与功能研究[D]. 广州: 广东药科大学硕士学位论文, 2021
Deng JS. The structure and function of microbial communities in the coking wastewater AOHO biological treatment system[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangdong Pharmaceutical University, 2021 (in Chinese)
- [23] Cydzik-Kwiatkowska A, Zielińska M. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 32(4): 66
- [24] Tang P, Li JL, Li T, Tian L, Sun Y, Xie WC, He QP, Chang HQ, Tiraferri A, Liu BC. Efficient integrated module of gravity driven membrane filtration, solar aeration and GAC adsorption for pretreatment of shale gas wastewater[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 405: 124166
- [25] Viggor S, Jõesaar M, Soares-Castro P, Ilmjärv T, Santos PM, Kapley A, Kivisaar M. Microbial metabolic potential of phenol degradation in wastewater treatment plant of crude oil refinery: analysis of metagenomes and characterization of isolates[J]. Microorganisms, 2020, 8(5): 652
- [26] Hiras J, Wu YW, Eichorst SA, Simmons BA, Singer SW. Refining the phylum *Chlorobi* by resolving the phylogeny and metabolic potential of the representative of a deeply branching, uncultivated lineage[J]. The ISME Journal, 2016, 10(4): 833-845
- [27] Wu YX, Song QM, Wu JH, Zhou JY, Zhou LL, Wu WC. Field study on the soil bacterial associations to combined contamination with heavy metals and organic contaminants[J]. Science of the Total Environment, 2021, 778: 146282
- [28] Lee YY, Lee SY, Lee SD, Cho KS. Seasonal dynamics of bacterial community structure in diesel oil-contaminated soil cultivated with tall fescue (*Festuca arundinacea*)[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022, 19(8): 4629
- [29] Huang C, Liu Q, Li ZL, Ma XD, Hou YN, Ren NQ, Wang AJ. Relationship between functional bacteria in a denitrification desulfurization system under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions[J]. Water Research, 2021, 188: 116526
- [30] 王彤, 汪涵, 周明达, 冉小川, 王伟刚, 吴敏, 王亚宜. 污水脱氮功能微生物的组学研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4844-4870
Wang T, Wang H, Zhou MD, Ran XC, Wang WG, Wu M, Wang YY. Advances in omics of functional microorganisms for nitrogen removal in wastewater[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4844-4870 (in Chinese)
- [31] 张亮, 于静仪, 李朝阳, 彭永臻. 污水生物处理系统中全程氨氧化菌的研究进展[J]. 北京工业大学学报, 2020, 46(4): 402-411
Zhang L, Yu JY, Li ZY, Peng YZ. Progress and prospects of the research of complete ammonia oxidizers in biological wastewater treatment[J]. Journal of Beijing University of Technology, 2020, 46(4): 402-411 (in Chinese)
- [32] 张雪, 乔雪姣, 苏佳, 张立羽, 余珂. 垃圾渗滤液处理厂活性污泥微生物种群结构和功能分析[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2021, 57(5): 927-937
Zhang X, Qiao XJ, Su J, Zhang LY, Yu K. Microbial structure and function of activated sludge in landfill leachate treatment plant[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 2021, 57(5): 927-937 (in Chinese)
- [33] 王强. 膜生物反应器同步硝化与反硝化的研究[D]. 太原: 太原理工大学硕士学位论文, 2008
Wang Q. The study on simultaneous nitrification and denitrification in membrane bioreactor (MBR)[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Taiyuan University of

- Technology, 2008 (in Chinese)
- [34] 牛晓倩, 周胜虎, 邓禹. 脱氮微生物及脱氮工艺研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(10): 3505-3519
Niu XQ, Zhou SH, Deng Y. Advances in denitrification microorganisms and processes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(10): 3505-3519 (in Chinese)
- [35] Yu Q, He JY, Zhao QQ, Wang XF, Zhi YN, Li XN, Li XJ, Li LJ, Ge BS. Regulation of nitrogen source for enhanced photobiological H₂ production by co-culture of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Mesorhizobium sangaii*[J]. Algal Research, 2021, 58: 102422
- [36] 王芬, 段洪利, 刘亚飞, 王天弋. 人工湿地处理含盐富营养化水的植物根际与非根际菌群分析[J]. 环境工程学报, 2020, 14(7): 1844-1851
Wang F, Duan HL, Liu YF, Wang TY. Analysis of bacterial community at the rhizosphere and non-rhizosphere of plants in constructed wetland treating brackish eutrophic water[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2020, 14(7): 1844-1851 (in Chinese)
- [37] 王婷. 两株溶杆菌属细菌(*Lysobacter* spp.)的次生代谢产物及活性研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2019
Wang T. Studies on the secondary metabolites and activities of two strains from the genus *Lysobacter*[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2019 (in Chinese)
- [38] Puthusseri RM, Nair HP, Johny TK, Bhat SG. Insights into the response of mangrove sediment microbiomes to heavy metal pollution: ecological risk assessment and metagenomics perspectives[J]. Journal of Environmental Management, 2021, 298: 113492
- [39] Li BQ, Xu R, Sun XX, Han F, Xiao EZ, Chen L, Qiu L, Sun WM. Microbiome-environment interactions in antimony-contaminated rice paddies and the correlation of core microbiome with arsenic and antimony contamination[J]. Chemosphere, 2021, 263: 128227
- [40] 李明润. 含典型酚类化合物废水微生物降解工艺调控及运行研究[D]. 济南: 济南大学硕士学位论文, 2020
Li MR. Regulation and operation of microbial degradation process for wastewater containing typical phenolic compounds[D]. Ji'nan: Master's Thesis of University of Ji'nan, 2020 (in Chinese)
- [41] 肖小双, 安雪姣, 叶晗媛, 王林平, 钟斌, 张庆华. 废水中硫氰酸盐的微生物降解研究进展[J]. 生物技术通报, 2021, 37(2): 224-235
Xiao XS, An XJ, Ye HY, Wang LP, Zhong B, Zhang QH. Research progress on microbial degradation of thiocyanate in wastewater[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(2): 224-235 (in Chinese)
- [42] 刘国新, 吴海珍, 孙胜利, 胡肖怡, 吴晓英, 陈华勇, 范一文, 胡成生, 韦朝海. 市政污泥接种焦化废水好氧降解能力及微生物群落演替的响应分析[J]. 环境科学, 2017, 38(9): 3807-3815
Liu GX, Wu HZ, Sun SL, Hu XY, Wu XY, Chen HY, Fan YW, Hu CS, Wei CH. Aerobic degradation and microbial community succession of coking wastewater with municipal sludge[J]. Environmental Science, 2017, 38(9): 3807-3815 (in Chinese)
- [43] 王婧仪. 中慢生根瘤菌 MAFF₃₀₃₀₉₉ 共生固氮相关基因筛选及功能验证[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2021
Wang JY. Screening and functional verification of genes related to symbiotic nitrogen fixation in *Mesorhizobium* MAFF₃₀₃₀₉₉[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2021 (in Chinese)