

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2024.09.010

基于酿酒废水碳源的脱氮效能及微生物作用机理

唐欣¹, 李彦澄^{1,2}, 钟雄¹, 陈晨¹, 李江^{1,2}, 杨爱江^{1,2}

(1. 贵州大学资源与环境工程学院 喀斯特地质资源与环境教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州喀斯特环境生态系统教育部野外科学观测研究站, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 针对低C/N生活污水,采用高浓度酿酒废水作为液体碳源,构建反硝化脱氮生物处理系统,研究容积负荷、溶解氧和停曝比对脱氮效能的影响,并通过三维荧光光谱、扫描电子显微镜和宏基因组分析系统的微生物作用机理。结果表明,系统的最佳容积负荷为0.111 kgCOD/(m³·d)、溶解氧为1~2 mg/L、停曝比为3:1;通过三维荧光光谱分析发现,系统对类溶解性微生物代谢产物的去除效果较为明显,对类色氨酸蛋白质物质、类富里酸物质、类黑精物和类木质纤维素物质等有一定的降解;采用扫描电子显微镜发现,微生物主要为球状、杆状、丝状和螺旋状;通过宏基因组技术发现系统中的优势属分别为微白霜菌属(*Micropruina*)、丙酸菌属(*Propionibacterium*)、中村氏菌属(*Nakamurella*)。基于KEGG数据库功能注释结果显示,代谢功能占主导地位,系统中与氮代谢相关的完整路径有6条,其中以反硝化功能为主;与碳代谢相关的完整路径有47条,其中以三羧酸(TCA)循环为主。

关键词: 酿酒废水; 液体碳源; 生物脱氮; 宏基因组; 代谢路径

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2024)09-0056-07

Nitrogen Removal Performance and Microbial Degradation Mechanism of Carbon Source from Brewing Wastewater

TANG Xin¹, LI Yan-cheng^{1,2}, ZHONG Xiong¹, CHEN Chen¹, LI Jiang^{1,2}, YANG Ai-jiang^{1,2}

(1. Key Laboratory of Karst Geological Resources and Environment <Ministry of Education>, College of Resources and Environmental Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Karst Environmental Ecosystems Observation and Research Station <Ministry of Education>, Guiyang 550025, China)

Abstract: This paper constructed a biological denitrification system for treating low C/N ratio domestic sewage with high-concentration brewing wastewater as liquid carbon source, investigated the effects of volumetric loading rate, dissolved oxygen and air pump on/off ratio on nitrogen removal efficiency, and analyzed the microbial degradation mechanism of the system by three-dimensional fluorescence spectrum, scanning electron microscopy and metagenomics. The optimal operational parameters were as follows: the volumetric loading rate was 0.111 kgCOD/(m³·d), the dissolved oxygen was 1~2 mg/L, and the air pump on/off ratio was 3:1. The three-dimensional fluorescence spectrum

基金项目: 中央引导地方科技发展资金资助项目(黔科中引地[2021]4019); 贵阳市科技计划项目(筑科合同[2024]2-38号)

通信作者: 李彦澄 E-mail: ycli3@gzu.edu.cn

analysis showed that the system had obvious effect on the removal of dissolved microbial metabolites, and had certain degradation ability of tryptophan-like protein substances, fulvic acid-like substances, melanoid-like substances and lignocellulose-like substances. The scanning electron microscopy results showed that the shape of microorganisms was mainly spherical, rod-shaped, filamentous and helical. The dominant genera in the system were *Micropruina*, *Propionibacterium* and *Nakamurella* as analyzed by metagenomic technology. The annotation results based on KEGG database showed that the dominant function was metabolism, and there were 6 complete pathways related to nitrogen metabolism in the system, among which denitrification was the main pathway. In addition, there were 47 complete pathways related to carbon metabolism, among which tricarboxylic acid (TCA) cycle was the main one.

Key words: brewing wastewater; liquid carbon source; biological nitrogen removal; metagenome; metabolic pathway

由于部分城镇地区的污水收集管网不完善,导致污水处理厂进水C/N较低,不能有效实现生物脱氮^[1]。因此,污水处理厂常采用外加碳源的方式来满足微生物代谢需求^[2],常用碳源包括甲醇、乙酸、乙醇和葡萄糖等^[3],但均存在运行成本高、资源浪费等问题^[4]。此外,有研究利用活性污泥发酵液^[5]、柠檬酸生产废水的浓缩液^[6]、蓝藻发酵液^[7]等高浓度有机废水作为碳源,取得了一定的脱氮效果。Fu等^[8]认为利用某些高浓度工业废水作为碳源,具有资源利用率高、生物降解性好的优势。

高浓度白酒酿酒废水的COD较高,富含小分子醇类、酸类和醛类等物质,可生化性好,是一种优质的反硝化碳源。笔者采用高浓度白酒酿酒废水作为液体碳源^[9],构建反硝化生物处理系统,并研究容积负荷、溶解氧和停曝比对脱氮效能的影响,进一步通过三维荧光光谱、扫描电子显微镜和宏基因组分析系统的微生物作用机理,旨在为酿酒废水的资源化利用和低C/N生活污水处理提供技术支撑,实现“以废治废”^[10]。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

采用移动床生物膜反应器(MBBR)接种污水处理厂浓缩池污泥,通过混合废水(COD=350 mg/L、 NH_4^+-N =37.5 mg/L、TN=40 mg/L、TP=4 mg/L)培养3 d,待系统挂膜完成后开始处理污水。进水采用人工模拟低C/N生活污水(COD=65 mg/L、 NH_4^+-N =35 mg/L、TN=35 mg/L、TP=2 mg/L),加入白酒酿酒废水(COD=270 000 mg/L、 NH_4^+-N =2 500 mg/L、TN=6 500 mg/L、TP=2 400 mg/L)作为碳源,并添加微生物所需

营养物质: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ =0.15 mg/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ =0.3 mg/L、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ =0.06 mg/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ =0.06 mg/L、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ =0.12 mg/L、 H_3BO_3 =0.15 mg/L、KI=0.15 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ =0.12 mg/L、 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ =0.06 mg/L、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ =0.15 mg/L。

第一阶段,控制溶解氧浓度为5~6 mg/L,反应器内温度为 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$,采用间歇式运行方式(23.5 h反应+0.5 h换水),通过单因素实验研究容积负荷对系统脱氮效能的影响;第二阶段,在最佳容积负荷条件下,通过单因素实验研究溶解氧浓度对系统脱氮效能的影响;第三阶段,在最佳容积负荷和最佳溶解氧浓度条件下,研究停曝比对系统脱氮效能的影响。

1.2 实验方法

1.2.1 水质理化指标测定

NH_4^+-N 采用纳氏试剂分光光度法测定,TN采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定,TP采用钼酸铵分光光度法测定,COD采用快速消解分光光度法测定,pH和DO采用HACH便携式多参数数字化分析仪测定。

1.2.2 三维荧光光谱分析

三维荧光光谱采用荧光光谱仪测定,激发光源为150 W 氙灯,固定激发波长狭缝为5 nm,扫描速度为12 000 nm/min,激发波长 λ_{ex} =250~800 nm,发射波长 λ_{em} =250~800 nm,光电倍增管(PMT)电压为700 V,响应时间为自动。

将所测得的光谱图案按特定激发、发射波长划分为7个区域^[11],各区域位置及其所代表的荧光物质如表1所示。

表1 荧光区域代表物质划分

Tab.1 Division of substance represented by fluorescence

荧光区域	λ_{Ex}/nm	λ_{Em}/nm	代表物质
I	200 ~ 260	200 ~ 330	类酪氨酸蛋白质物质
II	200 ~ 260	330 ~ 400	类色氨酸蛋白质物质
III	260 ~ 310	290 ~ 400	类溶解性微生物代谢产物
IV	200 ~ 260	400 ~ 500	类富里酸物质
V	260 ~ 310	400 ~ 550	类糖化蛋白质物质
VI	310 ~ 380	330 ~ 600	类黑精物和类木质纤维素物质
VII	380 ~ 580	400 ~ 600	类腐殖酸物质

1.2.3 扫描电子显微镜分析

采集最佳反应条件下反应器中的生物膜,参考李彦澄等^[12]的实验方法对生物膜进行离心、固定、清洗、脱水、置换、镀金处理后,采用扫描电子显微镜观察并拍照。

1.2.4 宏基因组分析

采集反应器中的生物膜保存于无菌EP管,并立即置于 -80°C 超低温冰箱内冷冻保存,然后在冷冻条件下送至上海某生物公司进行宏基因组测序,主要流程为:使用Fast DNA Spin Kit For Soil试剂盒抽提样品DNA,采用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA完整性,采用基因组剪切仪对检测合格的DNA片段进行剪切,打断为约400 bp的片段,构建PE文库后进行桥式PCR扩增和Illumina测序。最后利用宏基因组云平台对得到的原始数据进行分析,包括物种种类、功能丰度和代谢通路分析等。

2 结果与讨论

2.1 污染物去除效能

当容积负荷分别为0.044、0.067、0.089和0.111 $\text{kgCOD}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ 时,对应进、出水污染物平均浓度及去除率如图1(a)所示。在不同容积负荷条件下, NH_4^+-N 去除率均高于90%;当容积负荷为0.111 $\text{kgCOD}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ 时,TN和COD的去除率均最高,说明该系统的最佳容积负荷为0.111 $\text{kgCOD}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ 。

在系统容积负荷为0.111 $\text{kgCOD}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ 的条件下,溶解氧分别控制为1~2、2~3、3~4、4~5 mg/L ,结果如图1(b)所示。在不同溶解氧条件下,系统对COD和 NH_4^+-N 的去除率均高于90%,且不随溶解氧浓度的变化而出现较大波动,但TN去除率随溶解氧浓度的增加而降低。当溶解氧为1~2 mg/L 时,TN

去除效果最好,说明该系统的最佳溶解氧为1~2 mg/L ,在该条件下,系统同时具有较好的硝化与反硝化效能。

在容积负荷为0.111 $\text{kgCOD}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ 、溶解氧为1~2 mg/L 的条件下,采用间歇曝气方式,控制停曝比分别为4:1、3:1、2:1和1:1,结果如图1(c)所示。在不同停曝比条件下,系统对COD的去除率均为94%左右; NH_4^+-N 去除率随停曝比的减小呈升高趋势,当停曝比为1:1时, NH_4^+-N 去除率高达 $(90.9\pm 2.7)\%$;但TN去除率随停曝比的减小呈先升高后降低的趋势,在停曝比为3:1时,TN去除率最高,说明系统的最佳停曝比为3:1。

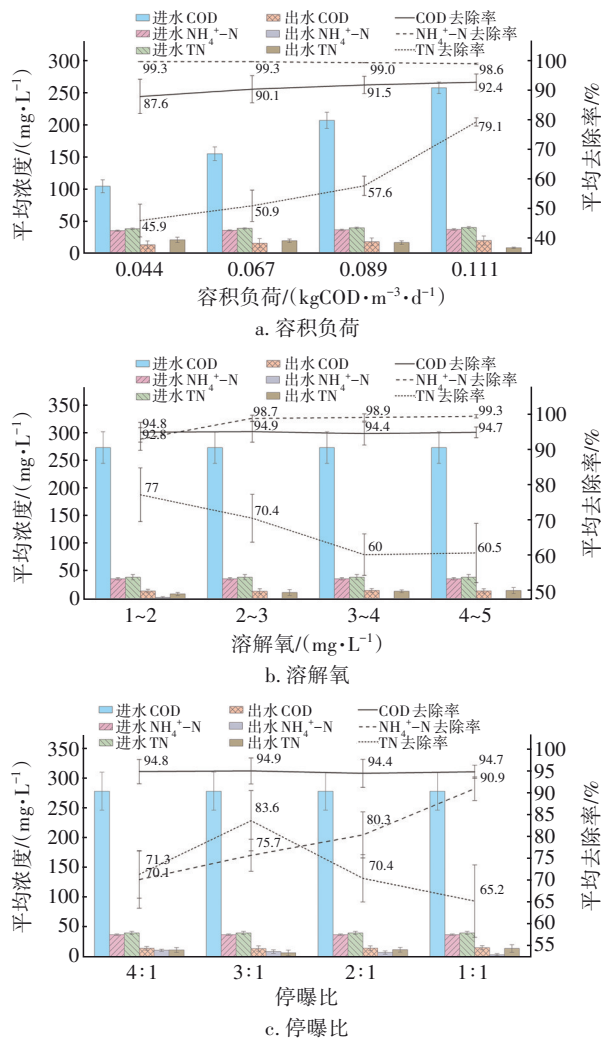


图1 污染物去除效能

Fig.1 Pollutant removal efficiency

2.2 溶解性有机物分析

通过三维荧光光谱分析系统进、出水溶解性有机物的变化,了解微生物对其利用情况。采集最佳

控制条件下的系统进、出水进行三维荧光光谱分析,结果如图2所示。进水均在Ⅲ区检测到荧光峰,且荧光强度最高,在Ⅱ、Ⅳ和Ⅵ区也出现一定强度的荧光带,说明进水主要为类溶解性微生物代谢产物,也有一定浓度的类色氨酸蛋白质物质、类富里酸物质、类黑精物和类木质纤维素物质。出水荧光谱图中Ⅲ区的荧光强度明显减弱,荧光峰明显降低甚至消失,说明酿酒废水中的类溶解性微生物代谢产物被系统中微生物较好地利用。此外,出水在Ⅱ、Ⅳ和Ⅵ区检测到的荧光强度均有所降低,说明出水中类色氨酸蛋白质物质、类富里酸物质、类黑精物和类木质纤维素物质在一定程度上被系统中的微生物降解。

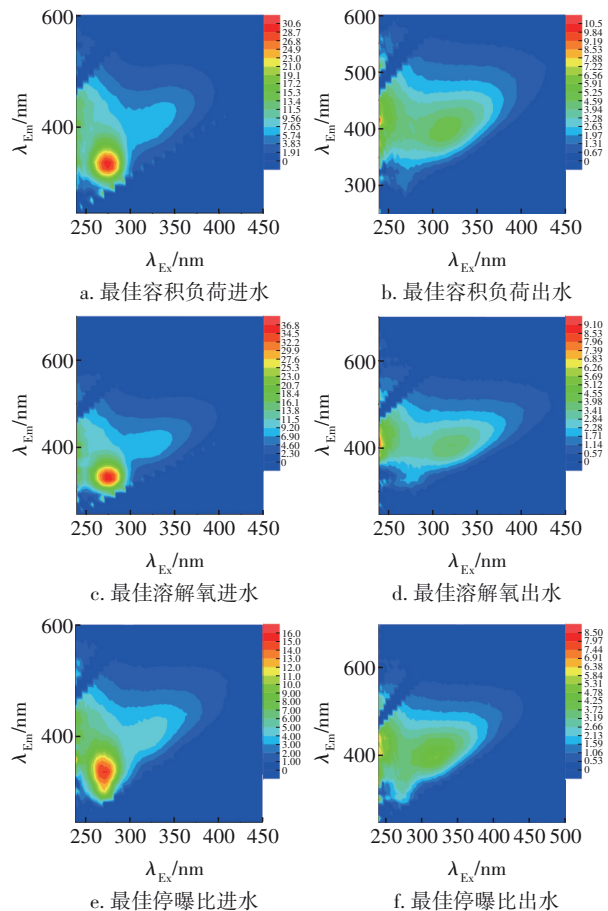


图2 最佳控制条件下进、出水三维荧光光谱

Fig.2 Three-dimensional fluorescence spectra of influent and effluent under optimal control conditions

2.3 微生物形态分析

通过扫描电子显微镜观察最佳控制条件下反应器中的生物膜形态,结果如图3所示。可知,系统中的微生物主要呈球状、杆状、丝状和螺旋状,这与

Fan等^[13]研究中观察到的微生物形态类似。好氧生物膜的微生物通常呈丝状、杆状和球状,这些细菌参与同步硝化反硝化过程。丝状菌在生物膜骨架中能为微生物附着提供有利环境,聚集更多微生物;球状菌为NO₂⁻-N的积累提供了可能;杆状菌可作为NH₄⁺-N氧化的交换通道^[13]。此外,硝化菌和反硝化菌多为杆状菌,如硝化杆菌、芽孢杆菌等。因此,合理控制容积负荷和溶解氧浓度有利于系统中微生物发生同步硝化反硝化作用,这主要是因为适量的碳源能为微生物提供电子供体,而在适宜的溶解氧浓度下,生物膜外层好氧区的微生物能较好地实现硝化作用,内层缺氧区则有利于微生物进行反硝化。

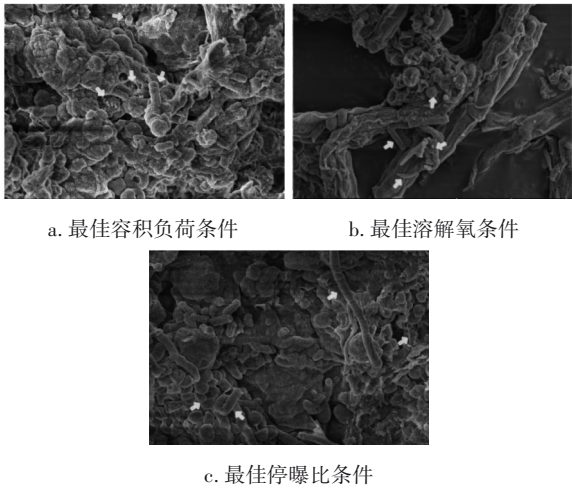


图3 最佳控制条件下生物膜的扫描电镜照片

Fig.3 SEM photos of biofilm under optimal control conditions

2.4 宏基因组分析

选取接种污泥(S0)、最佳容积负荷(S1)、最佳溶解氧浓度(S2)和最佳停曝比(S3)阶段的微生物样本进行宏基因组分析,各样本序列的组装拼接结果统计如表2所示(序列数分别为743 040、598 680、563 910、577 205)。

表2 组装拼接结果统计

Tab.2 Statistics of assemble splicing result bp

样本	总序列长度	N50	N90	最长序列	最短序列
S0	475 403 824	654	347	60 712	300
S1	392 990 964	661	347	413 511	300
S2	397 102 369	735	353	230 639	300
S3	399 719 754	721	352	75 170	300

由表2可知,在4组样本中,S0的序列数和总序

氮代谢相关的完整路径有 6 条,包括反硝化作用、异化硝酸盐还原、完全硝化、硝酸盐同化作用、固氮作用、硝化作用,其中反硝化作用占主导地位。

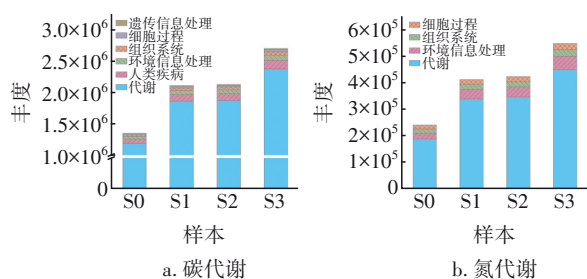


图 5 属水平上 KEGG 物种功能注释丰度

Fig.5 Genus functional annotation abundance of KEGG species at genus level

3 结论

采用高浓度白酒酿酒废水作为反硝化液体碳源,当容积负荷为 $0.111 \text{ kgCOD}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 、溶解氧浓度为 $1 \sim 2 \text{ mg/L}$ 、停曝比为 3:1 时,系统的脱氮效率最高。通过三维荧光光谱分析发现,系统对类溶解性微生物代谢产物的去除效果较为明显,对类色氨酸蛋白质物质、类富里酸物质、类黑精物和类木质纤维素物质等有一定的降解。采用扫描电子显微镜发现,微生物主要为球状、杆状、丝状和螺旋状。通过宏基因组分析发现,系统中的优势属为 *Micropruina*、*Propionibacterium*、*Nakamurella*。基于 KEGG 数据库功能注释结果显示,代谢功能占主导地位,系统中与氮代谢相关的完整路径有 6 条,其中以反硝化功能为主;与碳代谢相关的完整路径有 47 条,其中以 TCA 循环为主。

参考文献:

[1] LI D, LI W, ZHANG K, *et al.* Nutrient removal by full-scale Bi-Bio-Selector for nitrogen and phosphorus removal process treating urban domestic sewage at low C/N ratio and low temperature conditions[J]. Process Safety and Environmental Protection, 2020, 140: 199–210.

[2] CARRERA J, VICENT T, LAFUENTE J. Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(12): 2035–2041.

[3] 王伟, 赵中原, 张鑫, 等. 不同外碳源对尾水极限脱氮性能及微生物群落结构的影响[J]. 环境科学, 2022, 43(9): 4717–4726.

WANG Wei, ZHAO Zhongyuan, ZHANG Xin, *et al.* Effects of external carbon sources on ultimate nitrogen removal performance and microbial community in secondary effluent treating process [J]. Environmental Science, 2022, 43(9): 4717–4726 (in Chinese).

[4] MAREK S, JACEK M, KRZYSZTOF C, *et al.* Comparison of the effects of conventional and alternative external carbon sources on enhancing the denitrification process [J]. Water Environment Research, 2009, 81(9): 896–906.

[5] WANG X, ZHANG Y, ZHANG T, *et al.* Waste activated sludge fermentation liquid as carbon source for biological treatment of sulfide and nitrate in microaerobic conditions [J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 283: 167–174.

[6] LIU W, ZHENG Z, SUN F, *et al.* Valorization of citric acid production wastewater as alternative carbon source for biological nutrients removal: a pilot-scale case study [J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 258: 120576.

[7] 李子阳, 陆东亮, 华天予, 等. 蓝藻发酵液中氮磷回收及其作为反硝化碳源研究[J]. 环境化学, 2020, 39(12): 3562–3573.

LI Ziyang, LU Dongliang, HUA Tianyu, *et al.* Recovery of nitrogen and phosphorus from fermentation liquid of cyanobacteria and its application as a carbon source for denitrification [J]. Environmental Chemistry, 2020, 39(12): 3562–3573 (in Chinese).

[8] FU X R, HOU R R, YANG P, *et al.* Application of external carbon source in heterotrophic denitrification of domestic sewage: a review [J]. Science of the Total Environment, 2022, 817: 153061.

[9] AKINPELU E A, NTWAMPE S K O, FOSSO-KANKEU E, *et al.* Comparative analysis of brewing wastewater and lactate as carbon sources for microbial community treating acid mine drainage in anaerobic MBBR systems [J]. Environmental Technology, 2020, 42(25): 1–8.

[10] TANG J, WANG X C, HU Y, *et al.* Nutrients removal performance and sludge properties using anaerobic fermentation slurry from food waste as an external carbon source for wastewater treatment [J]. Bioresource Technology, 2018, 271: 125–135.

[11] JIMENEZ J, GONIDEC E, RIVERO J A C, *et al.* Prediction of anaerobic biodegradability and bioaccessibility of municipal sludge by coupling sequential extractions with fluorescence spectroscopy:

- towards ADM1 variables characterization [J]. Water Research, 2014, 50: 359–372.
- [12] 李彦澄, 杨娅男, 刘邓平, 等. 基于好氧甲烷氧化菌的反硝化效能及微生物群落研究[J]. 中国环境科学, 2019, 39(10): 4387–4393.
- LI Yancheng, YANG Yanan, LIU Dengping, *et al.* Denitrification efficiency and microbial community research in an aerobic methanotroph-based system [J]. China Environmental Science, 2019, 39(10): 4387–4393 (in Chinese).
- [13] FAN Y J, ZHANG M, CHENG J L, *et al.* Elucidating nitrifying performance, nitrite accumulation and microbial community in a three-stage plug flow moving bed biofilm reactor (PF-MBBR) [J]. Chemosphere, 2022, 297: 134087.
- [14] 钟雄, 艾佳, 李彦澄, 等. 基于MBBR技术的白酒窖底废水与低C/N生活污水协同处理系统的构建及功能微生物分析[J]. 环境工程学报, 2022, 16(3): 1008–1018.
- ZHONG Xiong, AI Jia, LI Yancheng, *et al.* Construction of a MBBR-based synergic treatment system for Baijiu pits bottom wastewater and low C/N domestic sewage and analysis on its functional microbes [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(3): 1008–1018 (in Chinese).
- [15] ZHANG F, SHAO J, YANG H, *et al.* Effects of biomass pyrolysis derived wood vinegar on microbial activity and communities of activated sludge [J]. Bioresource Technology, 2019, 279: 252–261.
- [16] ALEXANDER D, OSCAR M V, SJEF B, *et al.* *Propionibacterium freudenreichii* thrives in microaerobic conditions by complete oxidation of lactate to CO₂ [J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(6): 3116–3129.
- [17] 马思佳, 顾卓江, 丁丽丽, 等. 碳源对活性污泥微生物细胞膜特性和群落结构影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44(3): 561–573.
- MA Sijia, GU Zhuojiang, DING Lili, *et al.* Effects of carbon sources on cell membrane properties and microbial community of activated sludge [J]. Microbiology China, 2017, 44(3): 561–573 (in Chinese).
- [18] MA S, DING L, HUANG H, *et al.* Effects of DO levels on surface force, cell membrane properties and microbial community dynamics of activated sludge [J]. Bioresource Technology, 2016, 214: 645–652.
- [19] SEUNGDAE O, YOUNGJUN K. Machine learning application reveal dynamic interaction of polyphosphate-accumulating organism in full-scale wastewater treatment plant [J]. Journal of Water Process Engineering, 2021, 44: 102417.
- [20] 杨文焕, 毋凡琛, 申涵, 等. 冰封期内蒙古南海湖细菌菌群结构特征分析[J]. 灌溉排水学报, 2020, 39(10): 75–81.
- YANG Wenhuan, WU Fanchen, SHEN Han, *et al.* Structure of bacteria community in the Nanhai Lake at frozen [J]. Journal of Irrigation and Drainage, 2020, 39(10): 75–81 (in Chinese).
- [21] 鲍林林. 反硝化聚磷菌特性与反硝化除磷工艺研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2008: 71–79.
- BAO Linlin. Study on the Microbiological Characteristics and Processes of Denitrifying Phosphorus Removal [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2008: 71–79 (in Chinese).
- [22] 吴芳磊, 贺航运, 陈博涵, 等. 低C/N进水城镇污水厂低溶解氧运行效能及微生物变化[J]. 环境工程学报, 2022, 16(8): 2711–2719.
- WU Fanglei, HE Hangyun, CHEN Bohan, *et al.* The efficiency and microbial community change of urban sewage plant with low C/N influent based on low DO strategy [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(8): 2711–2719 (in Chinese).
- [23] HOU R R, YUAN R F, CHEN R, *et al.* Metagenomic analysis of denitrifying phosphorus removal in SBR system: comparison of nitrate and nitrite as electron acceptors [J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 446: 137225.
- [24] HOPE T, SHANMUGAM M, DAVID S, *et al.* Complete genome sequence of *Nakamurella multipartita* type strain (Y-104) [J]. Standards in Genomic Sciences, 2010, 2(2): 168–175.

作者简介: 唐欣(1997–), 女, 贵州贵阳人, 硕士研究生, 主要研究方向为污水生物处理技术。

E-mail: 1298152119@qq.com

收稿日期: 2022-10-13

修回日期: 2022-12-08

(编辑: 沈靖怡)