

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2024.21.002

两种生物-光敏材料耦合体系的低碳源脱氮效能

王亚彤¹, 赵媛¹, 艾恒雨¹, 于天池¹, 解嘉兴²

(1. 哈尔滨理工大学 材料科学与化学工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 大连理工大学 环境学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 为减少污水处理过程中的碳排放量,探索低碳污水处理新途径,分离出一种新的电学活性反硝化菌 XJ2-7,将其分别与光敏材料硫化镉(CdS)和蒽醌-2-磺酸钠(AQS)偶联,用于无外碳源或低外碳源脱氮。序批试验结果表明,当初始 NO_3^- -N浓度为69.00 mg/L时,在光照无外碳源条件下,XJ2-7/CdS体系和XJ2-7/AQS体系的24 h总氮去除率分别为40.40%和52.03%,碳源量增至碳氮比为3.75时,两者的总氮去除率分别为64.40%和52.23%;在低碳源条件下,相比无光照,紫外光照射可使两种体系的总氮去除率分别提高13.72%和11.62%;在低碳源和紫外光照射条件下,乳酸钠可使两种体系的反硝化脱氮率分别提高14.48%和8.91%。推测无碳源条件下,菌株XJ2-7利用光生电子进行胞外呼吸的电子转移途径依赖于细胞色素C捕获电子并传递给电子受体,或是通过具有电容功能的H-AQS向菌体释放电子。

关键词: 反硝化; 外碳源; 光敏材料; 电子转移

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2024)21-0009-06

Nitrogen Removal Efficiency of Two Bio-photosensitive Material Coupled Systems under Low External Carbon Sources

WANG Ya-tong¹, ZHAO Yuan¹, AI Heng-yu¹, YU Tian-chi¹, XIE Jia-xing²

(1. School of Material Science and Chemical Engineering, Harbin University of Science and Technology, Harbin 150040, China; 2. School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: In order to reduce carbon emissions in the process of sewage treatment and explore a new way of low-carbon sewage treatment, a new electrochemically active denitrifying bacterium XJ2-7 was isolated and coupled with the photosensitive materials cadmium sulfide (CdS) and sodium anthraquinone-2-sulfonate (AQS) for denitrification with or without low external carbon sources. The results of sequential batch experiments showed that under the condition that there was no external carbon source in the light when the initial NO_3^- -N concentration was 69.00 mg/L, the 24 hours total nitrogen removal rates of XJ2-7/CdS and XJ2-7/AQS were 40.40% and 52.03%, respectively. When the carbon source increased to a C/N ratio of 3.75, the total nitrogen removal rates of the two were 64.40% and 52.23%, respectively. Under the condition of low carbon source, ultraviolet light irradiation could increase the total nitrogen removal rate of the two systems by 13.72% and 11.62%, respectively. Under

基金项目: 黑龙江省生态环境保护科研项目(HST2022TR007)

通信作者: 艾恒雨 E-mail: aihengyu@126.com

the conditions of low carbon source and ultraviolet irradiation, sodium lactate could increase the denitrification rates of the two systems by 14.48% and 8.91%, respectively. It is speculated that the electron transfer pathway of strain XJ2-7 using photogenerated electrons for extracellular respiration under the condition of no carbon source depends on cytochrome C to capture electrons and transfer them to electron acceptors, or to release electrons to the cell through capacitive H-AQS.

Key words: denitrification; external carbon source; photosensitive material; electron transfer

目前我国污水处理厂普遍存在进水碳氮比(C/N)较低的问题,例如北京首创股份有限公司运营的120多座污水处理厂中,80%以上的污水处理厂进水平均COD浓度低于200 mg/L^[1]。在日益严格的氮排放阈值下,进水C/N低会导致污水处理厂大量使用外加碳源来实现出水达标排放,这不仅使运行成本大幅攀升,还会增加间接碳排放量^[2]。除此之外,低C/N还会导致脱氮效果不稳定^[3]。

微生物-光电反硝化是一种新型的脱氮技术,通过构建光敏材料与微生物的耦合体系,在光照作用下,电化学活性脱氮菌可以利用光敏材料产生的光生电子进行细胞外呼吸,即在厌氧条件下将氧化有机物产生的电子跨膜转移到细胞外电子受体上,或将细胞外电子反向转移到细胞内部^[4],从而为脱氮菌的反硝化过程提供电子,实现生物脱氮。该技术克服了传统反硝化消耗大量外碳源和产生大量剩余污泥的问题^[5-8],同时满足低碳战略发展要求。Chen等^[9]构建了*Thiobacillus denitrificans*-CdS杂交体系,以N₂O为目标产物时硝酸盐氮的转化效率超过72.1%,证实了微生物光电反硝化过程的存在。

笔者利用电化学活性微生物XJ2-7与光敏材料构建生物-光敏材料耦合体系,在无碳源或低碳源条件下利用光生电子对污水中的硝酸盐进行生物脱氮,考察耦合体系的脱氮效果及其影响因素,提出了污水厂低碳生物脱氮的新途径,推测出了微生物耦合光敏材料进行生物脱氮时的电子转移途径,并对脱氮过程中的电子传递机理进行分析。

1 材料与方法

1.1 微生物的分离与驯化

从哈尔滨某啤酒厂污水处理站的沉淀污泥中取样并稀释,水样混匀后取5 mL置于100 mL锥形瓶中,加入45 mL无菌LB培养基,置于30℃、120 r/min的摇床中培养。培养2 d后,将菌体富集液按照其与无菌水的体积比为10⁻²、10⁻³、10⁻⁴的比例进行梯

度稀释,之后涂布于BTB固体培养基上,放入28℃恒温箱中培养,直至长出明显的菌落。将外周出现明显蓝色晕圈的单菌挑出,接种于LB液体培养基中,在30℃、120 r/min的恒温摇床中培养12 h。之后采用DYY-7C电泳设备对目标菌株进行电化学活性驯化,输出电压为5 V,输出电流为10 mA,电泳槽内液体为不含碳源的电化学试验用培养基,驯化周期为7 d。驯化完成后以1%的接种量将各个菌株(调节细菌密度OD₆₀₀为1.0)接种至以硝酸钾为氮源的硝化液培养基中,在30℃、150 r/min的摇床中继续培养48 h后,取5 mL不同硝化液培养基中的菌液以8 000 r/min离心5 min,收集上清液并测定硝酸盐氮和亚硝酸盐氮含量,将硝酸盐氮去除率高且亚硝酸盐氮积累量少的菌株作为目标菌株,并命名为XJ2-7。

选取XJ2-7液体培养基的悬浮溶液,在4 000 r/min下离心10 min,之后用0.9%的NaCl溶液清洗3次以去除微生物菌体表面杂质,再采用2.5%戊二醛溶液固定过夜,完成后分别采用25%、50%、75%、95%、100%的乙醇浸泡15 min进行梯度脱水处理,将脱水处理后的样品进行冷冻干燥,收集干燥后的微生物样品进行喷金导电处理,最后采用扫描电镜观察其形态。结果表明,该细菌长1~2 μm,宽0.3~0.6 μm,呈棒状,表面无鞭毛,有纤毛,结合基因鉴定确定该菌为铜绿假单胞菌。

1.2 生物-光敏材料耦合体系的构建

1.2.1 XJ2-7/CdS耦合体系

将目标菌株XJ2-7接种至液体种子培养基中,在30℃、150 r/min恒温摇床培养,当悬浮溶液的OD₆₀₀为0.8±0.05时,向悬浮溶液中加入谷胱甘肽溶液和CdCl₂溶液,使得溶液中谷胱甘肽的浓度为0.1%、CdCl₂的浓度为10 mmol/L,培养至悬浮溶液呈明显的亮黄色时,取悬浮溶液在4 000 r/min条件下离心10 min,得到体表负载CdS的菌体,形成

XJ2-7/CdS耦合体系。

1.2.2 XJ2-7/AQS耦合体系

将目标菌株XJ2-7接种至液体种子培养基中,在30℃、150 r/min恒温摇床培养,当悬浮溶液的OD₆₀₀为0.8±0.05时,取悬浮溶液在4 000 r/min条件下离心10 min,得到浓缩的XJ2-7菌液,并在光照前10 min内向该菌液中加入0.1%的乳酸钠(SL)溶液和10 mmol/L的萘酰-2-磺酸钠(AQS)溶液,形成XJ2-7/AQS耦合体系。

1.3 试验方法

光生电子的光源选用400 nm波长紫外(UV)灯带,选取无色透明的玻璃瓶作为生化反应器,黑暗试验以棕色玻璃瓶作为生化反应器。试验前向各玻璃瓶中加入浓度为0.5 g/L的KNO₃溶液20 mL和2 mL菌株XJ2-7的耦合体系,部分试验中加入1%乳酸钠溶液1 mL以促进电子转移,之后用氮气驱赶瓶内的空气,驱赶后立即进行试验。在无碳源时添加0.01%核黄素溶液1 mL作为电子载体,有碳源试验中碳源采用柠檬酸钠,添加量为20 mg,配制硝化液的初始C/N为3.75——低于《室外排水设计标准》(GB 50014—2021)中生物脱氮时的最小碳氮比要求,使水体呈现出低C/N特征。由于SL的添加量较少,忽略其带入的碳源量。试验设计如表1所示。

表1 生物-光敏材料耦合体系脱氮试验设计

Tab.1 Design of denitrification experiment for bio-photosensitive material coupled system

项 目	柠檬酸钠/ mg	无菌水/ mL	核黄素/ mL	乳酸钠/ mL
2 mL AQS+紫外光	20	—	—	1
CdS+紫外光	20	2	—	1
2 mL AQS+紫外光	20	1	—	—
CdS+紫外光	20	3	—	—
2 mL AQS+紫外光	—	—	1	1
CdS+紫外光	—	2	1	1
2 mL AQS+黑暗	20	—	—	1
CdS+黑暗	20	2	—	1

2 结果与讨论

2.1 碳源与光敏材料的影响

为考察紫外光照条件下,外碳源的加入是否对生物-光敏材料耦合体系的脱氮效果产生有益影响,分别进行了有碳源和无外碳源的序批式脱氮试验,结果如图1所示(有碳源试验中的硝化液初始C/N为3.75)。

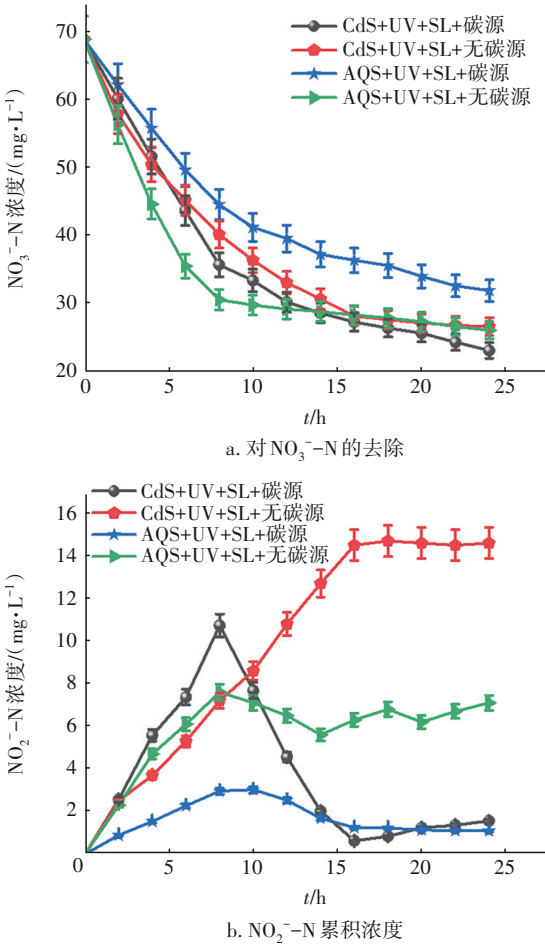


图1 碳源及光敏材料对脱氮效能的影响

Fig.1 Effect of carbon sources and photosensitive materials on nitrogen removal efficiency

在UV和SL参与反硝化过程的条件下,当无碳源时,XJ2-7/CdS和XJ2-7/AQS体系的NO₃⁻-N浓度由初始的69.00 mg/L分别下降至26.52、26.00 mg/L,24 h后其NO₂⁻-N累积浓度分别为14.60、7.10 mg/L,总氮去除率分别为40.40%和52.03%;当有碳源时,XJ2-7/CdS和XJ2-7/AQS体系中的NO₃⁻-N浓度分别下降至23.01、31.87 mg/L,24 h后两种体系的NO₂⁻-N累积浓度分别为1.56、1.09 mg/L,总氮去除率分别为64.40%和52.23%。分析以上数据可以发现,在无碳源条件下,两种光敏材料CdS与AQS对电化学活性菌XJ2-7降解NO₃⁻-N速度影响不大,但对降解NO₂⁻-N的速度影响较大,后者更快,NO₂⁻-N的累积浓度仅为前者的48.63%。与无碳源相比,低碳源条件下XJ2-7/CdS体系的总氮去除率提高了24%,XJ2-7/AQS体系的总氮去除率仅提高了0.2%,两者总氮去除率的提高皆因为NO₂⁻-N累积

浓度的降低,这表明外碳源的加入提高了 NO_2^- -N的反硝化速率,减轻了 NO_2^- -N积累对表达反硝化基因*NirS*和*NosZ*的抑制作用^[10],提高了脱氮率。

值得注意的是,在没有外碳源条件下, NO_3^- -N浓度也会随着反硝化时间的延长而降低,这是由于当外部有机碳源不足时,XJ2-7菌体进行内源性代谢消耗其内部碳源物质并利用其进行还原,当内部碳源耗尽时(约16 h后), NO_3^- -N浓度基本不再下降, NO_2^- -N累积浓度则基本不再上升。当存在碳源时, NO_3^- -N去除率相较于无碳源时变化不明显,但是 NO_2^- -N最终积累量显著降低,总体来说,低碳源条件下耦合体系的脱氮效率更高,其中XJ2-7/CdS体系的脱氮效率提高得更为明显。这是由于碳源既可以作为电子供体,又可以作为底物促进细菌的生长为反硝化提供能量。

2.2 光照的影响

为探究两种耦合体系在无光照条件下是否也具有脱氮效能,选择400 nm波长的紫外光作为光源,进行光照和黑暗试验,结果见图2。

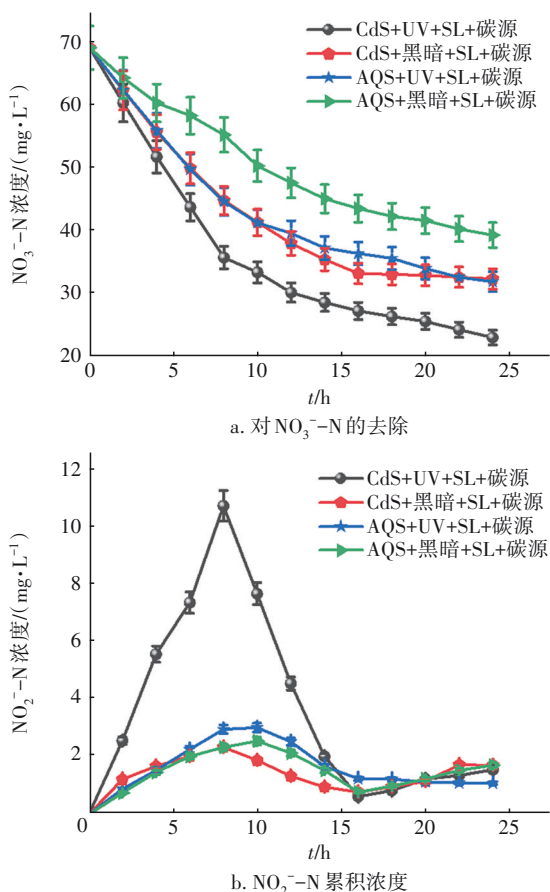


图2 光照对脱氮效能的影响

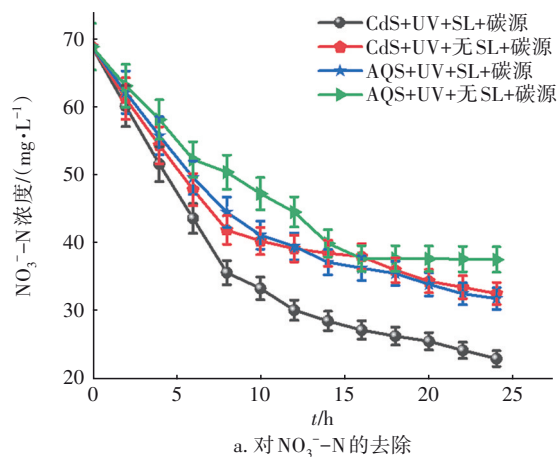
Fig.2 Effect of light on nitrogen removal efficiency

由图2可见,在紫外光照射下,XJ2-7/CdS和XJ2-7/AQS两种耦合体系的 NO_3^- -N浓度由最初的69.00 mg/L分别下降至23.01、31.87 mg/L,24 h后其 NO_2^- -N累积浓度分别为1.56、1.09 mg/L,总氮去除率为64.40%和52.23%;在黑暗条件下,XJ2-7/CdS体系和XJ2-7/AQS体系的 NO_3^- -N浓度分别下降至32.32、39.26 mg/L,24 h后两种耦合体系的 NO_2^- -N累积浓度均为1.72 mg/L,其总氮去除率分别为50.68%和40.61%。

与无光照相比,紫外光照射条件下XJ2-7/CdS和XJ2-7/AQS耦合体系的总氮去除率分别提高了13.72%和11.62%,分析认为,这是由于紫外光激发光敏材料产生光电子供给微生物进行反硝化,使得两种体系的 NO_3^- -N去除率显著上升。其中XJ2-7/CdS体系对 NO_3^- -N的去除效果更好,而XJ2-7/AQS体系在光照条件下的 NO_3^- -N去除率仅比XJ2-7/CdS体系在黑暗条件下的去除率高0.65%,这说明XJ2-7/AQS体系的光生电子转移与利用效率较低,这也与CdS黏附在菌体表面,而AQS游离在硝化液中不易被菌株捕获有关。分析图2(b)发现,两种体系在黑暗与光照条件下的 NO_2^- -N最终积累量无明显差距,这预示着相对于 NO_3^- -N,XJ2-7菌株更倾向还原 NO_2^- -N以获得能量,并且,在还原 NO_2^- -N时优先利用碳源电子,而非光生电子。

2.3 乳酸钠的影响

乳酸钠可以吸收一定范围波长的光并转化为激发态,提高光在光电转换过程中的传递效率;而且它还可以作为牺牲试剂填补空穴,促进电子-空穴分离,从而增强光生电子的产生^[9]。为探究在光照条件下两种耦合体系的电子转移机理,进行了添加乳酸钠与不添加乳酸钠的对比试验,结果见图3。



a. 对 NO_3^- -N的去除

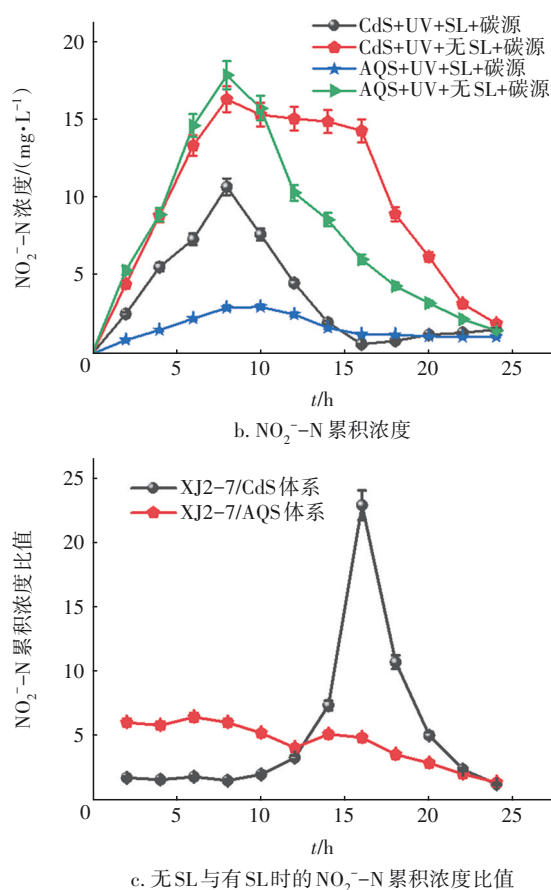


图3 乳酸钠对脱氮效能的影响

Fig.3 Effect of sodium lactate on nitrogen removal efficiency

由图3可知,在有SL参与生化反应的条件下,培养24 h后XJ2-7/CdS体系和XJ2-7/AQS体系中的 NO_3^- -N浓度由初始的69.00 mg/L分别下降至23.01、31.87 mg/L, NO_2^- -N累积浓度分别为1.56、1.09 mg/L,总氮去除率分别为64.40%和52.23%;在无SL条件下,XJ2-7/CdS体系和XJ2-7/AQS体系中 NO_3^- -N浓度由69.00 mg/L分别下降至32.61、37.61 mg/L,24 h后两种体系的 NO_2^- -N累积浓度分别为1.95、1.50 mg/L,其总氮去除率分别为49.92%和43.32%。

与无SL相比,SL的加入使得XJ2-7/CdS和XJ2-7/AQS耦合体系的总氮去除率分别提高了14.48%和8.91%,可见SL对总氮的去除影响很大,尤其是在 NO_2^- -N反硝化过程中,SL的促进作用更为明显。分析 NO_2^- -N浓度的变化情况,发现当试验进行到6 h时无乳酸钠XJ2-7/AQS耦合体系中 NO_2^- -N积累量是有乳酸钠的6.4倍,达到最大值,之后逐渐下降;对XJ2-7/CdS体系而言,该值在16 h

时达到最大(23倍),之后急剧下降,24 h后两种体系的 NO_2^- -N累积浓度接近。分析原因认为,随着生化反应时间的延长 NO_2^- -N的生成速度减小,其累积量也降到了一个较低的水平。

2.4 耦合体系的电子传递机理分析

对光生电子过程、反硝化菌的电子利用途径以及XJ2-7/CdS和XJ2-7/AQS的试验结果分析,推测无外碳源时XJ2-7利用光敏材料产生的电子进行胞外呼吸反硝化的过程如图4所示。在XJ2-7/CdS体系中,紫外光激发CdS(沉积在微生物XJ2-7表面)产生电子,这些电子被XJ2-7外膜(或电子穿梭体)上的细胞色素(Cyt C)转移到细胞外电子受体,并穿过细胞膜进入到胞内,然后在NAR、NIR、Nor、 N_2OR 等生物酶的催化作用下,获得电子的硝态氮被转化为 N_2 。与此同时,另一部分硝态氮被XJ2-7同化为自身细胞组成物质,这种结合异化和同化的双重脱氮过程有效实现了对氮的去除。牺牲试剂SL在XJ2-7/CdS系统中发挥了重要作用,有效地补充了CdS中由于UV激发电子而产生的空穴。这种互补机制有助于电子和空穴的有效分离,显著提高了电子的传递速度,提高了体系的整体脱氮速率。

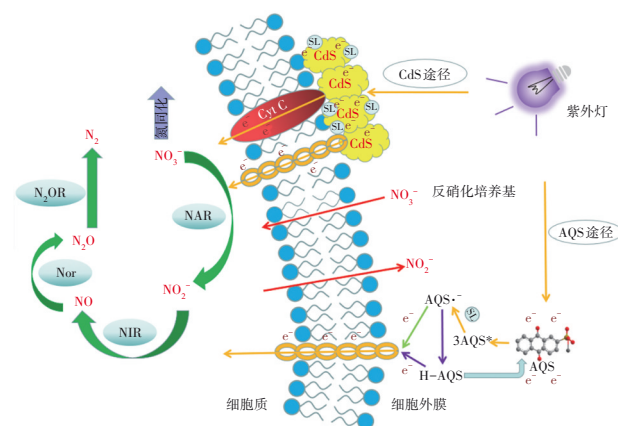


图4 耦合体系的底物转化和电子传递机理

Fig.4 Substrate transformation and electron transfer mechanism of bio-photosensitive material coupled system

与XJ2-7/CdS体系不同,XJ2-7/AQS体系中AQS不与细菌直接接触。基态AQS受紫外光激发,经系统间转换迅速转变为三重态AQS,并进一步与SL反应形成AQS自由基阴离子 $\text{AQS}\cdot^-$ 。 $\text{AQS}\cdot^-$ 通过细胞外电子受体经呼吸链将电子转移给XJ2-7或通过质子转移最终形成蒽醌-2-磺酸盐(H-AQS)用来储存未使用的光生电子,然后H-AQS将电子释放给

XJ2-7并返回到基态AQS,XJ2-7通过利用AQS \cdot^- 和H-AQS中的电子实现硝酸盐还原和物质生成。

3 结论

① 无外碳源条件下,电化学活性菌XJ2-7与光敏材料CdS或AQS组成的耦合体系在400 nm紫外光照射下具有较好的反硝化脱氮能力,脱氮效果不仅受微生物电化学活性的影响,还受光敏材料类型、外加剂乳酸钠的影响。

② 光生电子在不同体系中具有不同的传递路径,在XJ2-7/CdS体系中,UV激发CdS生成电子,这些电子通过Cyt C转移到胞外电子受体上,继而被XJ2-7利用,且SL可以提高电子-空穴分离效率;在XJ2-7/AQS体系中,基态AQS被UV激发形成具有电容功能的H-AQS,H-AQS向微生物释放电子返回到基态AQS,电子被转移到细胞外电子受体上并通过呼吸链进入细胞质。

参考文献:

- [1] 吴远远,郝晓地,许雪乔,等. 低碳源污水的好氧颗粒污泥脱氮除磷中试研究[J]. 中国给水排水, 2019, 35(23): 12-16.
WU Yuanyuan, HAO Xiaodi, XU Xueqiao, *et al.* Pilot study on nitrogen and phosphorus removal of aerobic granular sludge from low-carbon source sewage [J]. China Water & Wastewater, 2019, 35(23): 12-16 (in Chinese).
- [2] 冯浩,韩芸,周梦雨,等. 低碳氮比低运行负荷污水处理厂碳排放特征[J/OL]. 中国给水排水, [2024-07-21]. <https://link.cnki.net/urlid/12.1073.TU.20240204.1757.002>.
FENG Hao, HAN Yun, ZHOU Mengyu, *et al.* Carbon emission characteristics of low-carbon nitrogen ratio and low-load sewage treatment plant [J/OL]. China Water & Wastewater, [2024-07-21]. <https://link.cnki.net/urlid/12.1073.TU.20240204.1757.002> (in Chinese).
- [3] 张芸蓓,马民,宫玲,等. A/A/O污水处理工艺脱氮效果模拟及优化[J]. 中国给水排水, 2022, 38(1): 88-94.
ZHANG Yunbei, MA Min, GONG Ling, *et al.* Simulation and optimization of denitrification effect of A/A/O sewage treatment process [J]. China Water & Wastewater, 2022, 38(1): 88-94 (in Chinese).
- [4] 靖宪月,陈姗姗,周顺桂. 吸收胞外电子的电活性微生物[J]. 微生物学报, 2018, 58(1): 19-27.
JING Xian Yue, CHEN Shanshan, ZHOU Shungui. Electroactive microorganisms that absorb extracellular electrons [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(1): 19-27 (in Chinese).
- [5] CHEN M, ZHOU X, CHEN X, *et al.* Mechanisms of nitrous oxide emission during photoelectrotrophic denitrification by self-photosensitized *Thiobacillus denitrificans* [J]. Water Research, 2020, 172: 115501.
- [6] CHEN X, FENG Q, CAI Q, *et al.* Mn₃O₄ nanzyme coating accelerates nitrate reduction and decreases N₂O emission during photoelectrotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*-CdS [J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(17): 10820-10830.
- [7] CHEN X, YANG J, ZENG R J, *et al.* Reactive oxygen species promote nitrous oxide (N₂O) emissions from soil/sediment during the anoxic-oxic transition [J]. Environmental Science & Technology, 2023, 57(1): 801-809.
- [8] HUANG S, CHEN M, DIAO Y, *et al.* Dissolved organic matter acting as a microbial photosensitizer drives photoelectrotrophic denitrification [J]. Environmental Science & Technology, 2022, 56(7): 4632-4641.
- [9] CHEN M, ZHOU X F, YU Y Q, *et al.* Light-driven nitrous oxide production via autotrophic denitrification by self-photosensitized *Thiobacillus denitrificans* [J]. Environment International, 2019, 127: 353-360.
- [10] 何腾霞,李振轮,徐义. 耐冷亚硝酸盐型反硝化细菌 *Pseudomonas putida* Y-12 脱氮特性[J]. 环境科学学报, 2015, 35(10): 3071-3077.
HE Tengxia, LI Zhenlun, XU Yi. Denitrification characteristics of a hypothermia nitrite-denitrifier *Pseudomonas putida* Y-12 [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2015, 35(10): 3071-3077 (in Chinese).

作者简介:王亚彤(2000-),女,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,研究方向为微生物水处理技术。

E-mail:919430318@qq.com

收稿日期:2024-08-09

修回日期:2024-08-24

(编辑:李德强)