

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2024.11.017

超声联合生物酶强化污泥发酵产酸及微生物群落分析

王昊龙¹, 赵瑜涵², 周立山^{1,2}, 韩恩山², 刘丽强¹

(1. 中海油天津化工研究设计院有限公司, 天津 300131; 2. 河北工业大学 化工学院, 天津 300401)

摘要: 为探究超声和生物酶联用强化剩余污泥发酵产酸的效果,通过分析污泥性质、VSS去除率、挥发性脂肪酸(VFAs)产量和组成以及微生物群落变化,确定最佳污泥处理条件。结果表明,经超声处理后,上清液SCOD、TN和TP浓度显著提高,污泥粒径减小,比表面积增大。超声联合复合酶促进污泥水解和产酸效果最佳,VSS去除率最高达到44.2%,VFAs产量达1 209.2 mg/L,其中乙酸为736.3 mg/L。微生物测序结果表明,经超声联合生物酶(复合酶和溶菌酶)处理后的微生物丰度和多样性明显降低。从门水平上看,厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)等水解产酸菌门在复合酶污泥中占主导地位;从属水平上看,梭状芽孢杆菌属(*Clostridium-sensu-stricto-11*)、丙酸螺菌属(*Propionispira*)和醋酸杆菌属(*Acetobacter*)等水解产酸菌属的丰度均与空白对照组有显著差异。

关键词: 剩余污泥; 发酵; 产酸; 超声; 生物酶; 微生物群落; 挥发性脂肪酸

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2024)11-0115-06

Acid Production and Microbial Community of Sludge Fermentation Enhanced by Ultrasound Combined with Bioenzymes

WANG Hao-long¹, ZHAO Yu-han², ZHOU Li-shan^{1,2}, HAN En-shan², LIU Li-qiang¹

(1. CNOOC Tianjin Chemical Research and Design Institute Co. Ltd., Tianjin 300131, China;

2. College of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China)

Abstract: This paper determined the optimal sludge treatment conditions by analyzing the sludge properties, VSS removal rate, volatile fatty acids (VFAs) yield, composition and microbial community changes, so as to investigate the acid production in the fermentation of excess sludge enhanced by ultrasound combined with bioenzymes. After ultrasonic treatment, the SCOD, TN and TP in the supernatant increased significantly, the particle size of sludge decreased, and the specific surface area of sludge increased. Ultrasound combined with composite enzymes demonstrated the best performance for promoting sludge hydrolysis and acid production. The VSS removal rate reached 44.2%, and the VFAs concentration was 1 209.2 mg/L, of which the acetic acid concentration was 736.3 mg/L. The results of microbial sequencing showed that the abundance and diversity of microorganisms decreased significantly after ultrasound combined with bioenzymes (composite enzyme and lysozyme) treatment. At the phylum level, the sludge treated with composite enzyme were dominated by hydrolytic acid-producing bacteria such as *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*. At the genus level, the abundances of hydrolytic

基金项目: 中海油能源发展股份有限公司重点科技攻关项目(HFKJ-ZDGG-TJY-2021-05)

通信作者: 周立山 E-mail: zhoulishan@tsinghua.org.cn

acid-producing bacteria such as *Clostridium_sensu_stricto_11*, *Propionispira* and *Acetobacter* were significantly different from those of the blank group.

Key words: excess sludge; fermentation; acid production; ultrasound; bioenzyme; microbial community; volatile fatty acids

污泥作为污水处理的末端产物,其总量不断增加,如果随意排放会对环境造成严重污染,因此,采用合理的方法解决污泥问题成为当下研究的重点^[1]。卫生填埋法和焚烧法均对环境有一定的危害,而厌氧消化作为一种环境友好型污泥处理手段,其中间产物挥发性脂肪酸(VFAs)是一种高附加值的小分子有机碳物质,不仅可以用于污水脱氮除磷,解决污水处理厂碳源不足的问题,还可作为合成生物可降解塑料(PHAs)的原材料,对环境污染小且应用价值高^[2]。因此,污泥厌氧发酵产VFAs在污泥资源化处理中应用更为广泛^[3]。

水解过程是污泥厌氧发酵产酸的限速步骤,生物酶法和超声处理均可以加快污泥水解进程,且整个过程绿色环保,无二次污染。超声产生的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和瞬时高温高压,可以有效分解污泥中微生物的胞外聚合物(EPS)和细胞壁,已有报道表明超声在污泥减量中实现了工业化应用,然而高能耗是限制该技术发展的重要因素^[4]。生物酶对微生物降解具有高效催化性,Luo等^[5]利用淀粉酶和蛋白酶强化剩余污泥的溶胞水解及污泥减量,最佳酶投加量为60 mg/gTS,VSS去除率高达39.70%,且复合酶(蛋白酶:淀粉酶=3:1)效果优于单一酶,VFAs产量为空白对照组的2.04倍。

生物酶和超声对污泥处理均有一定优势,然而关于两种技术联用的报道较少。超声可以实现污泥絮体和微生物的初步解体,然后通过生物酶强化污泥厌氧水解产酸过程,两种技术联用在发挥各自优势的同时能够降低系统能耗。笔者采用超声联合生物酶技术强化剩余污泥有机质水解和产VFAs,并通过高通量测序对厌氧发酵过程中微生物群落的结构变化进行分析,从生物学角度揭示超声和生物酶联用技术强化污泥厌氧发酵产酸机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料及设备

实验所用剩余污泥取自天津市某污水处理厂二沉池,该污水厂采用的是活性污泥法。剩余污泥

静置24 h后,弃去表层上清液,于4℃冰箱中保存。污泥性质如下:pH=7.32,TSS=7 332 mg/L,VSS=4 671 mg/L,TCOD=6 232 mg/L,SCOD=89 mg/L,TN=12 mg/L,TP=0.8 mg/L。所用生物酶为纤维素酶、 α -淀粉酶、溶菌酶和复合酶(纤维素酶: α -淀粉酶:溶菌酶=1:1:3)。

1.2 实验方法

实验控制参数参考文献[6],将1 800 mL剩余污泥投入2 000 mL烧杯,置于超声破碎仪处理5 min,其中超声振幅为80%,频率为20 kHz。将处理后的污泥投入厌氧发酵反应器中,生物酶投加量为污泥干质量的2.5%,充入氮气,机械搅拌速度维持为 (90 ± 10) r/min。厌氧发酵反应器置于恒温水浴锅中,温度维持在35℃左右,设置发酵时间为14 d,每48 h取样一次,经0.45 μm 滤膜后测定VFAs,每次实验做3组平行。发酵结束后,取产酸量最佳的样品和对照组污泥置于-25℃冰箱中储存,后续进行微生物群落分析。

1.3 检测方法

TSS和VSS根据标准方法测定^[7],SCOD、TN和TP等采用哈希试剂法测定,pH采用pH计测定,污泥粒径采用激光粒度分析仪检测。

VFAs采用气相色谱法测定,取样后经0.45 μm 滤膜过滤,酸化至pH<4,最后进样测量,采用氢火焰离子化检测器和Agilent19091J-413色谱柱(30 m \times 320 $\mu\text{m}\times$ 0.25 μm)。色谱条件如下:设置进样口温度为260℃,初始柱温为80℃,进样体积为0.2 μL ;检测器温度为280℃,分流比为30:1。最后按照乙酸为1.07、丙酸为1.51、正丁酸和异丁酸为1.82、正戊酸和异戊酸为2.04的换算系数,将溶解性脂肪酸(SCFAs)浓度转化为COD浓度。

微生物多样性分析采用Illumina公司的MiSeq PE300/NovaSeq PE 250进行测序,使用快速DNASPIN试剂盒提取污泥DNA,采用真/古细菌兼容通用前端引物341F(5'-CCTACGGGRBGCAG-CAG-3')和后端引物806R(5'-GGACTACHVGGG-

TATCTA-3')对细菌16S rRNA基因的V3-V4区进行PCR扩增。

2 结果与讨论

2.1 超声对污泥性能的影响

超声处理前污泥上清液中SCOD、TN和TP浓度分别为89、12和0.8 mg/L,处理后分别为338、104和4.3 mg/L,相较于处理前分别增加了279.8%、766.7%和437.5%。原因在于低频超声的机械剪切力和空化效应可以充分破坏污泥絮体和微生物细胞,在较短的处理时间内(5 min)污泥溶出有机质浓度明显上升。

处理前污泥的比表面积为 $0.279 \text{ m}^2/\text{g}$,处理后为 $0.413 \text{ m}^2/\text{g}$,表明超声可以有效解体污泥的絮体结构,导致单位质量污泥的表面积增大。超声处理后污泥的 D_{90} (90%颗粒粒径)由低于 $470.86 \mu\text{m}$ 降至 $258.90 \mu\text{m}$ 以下,同时污泥的 D_{50} (平均粒径)由 $80.908 \mu\text{m}$ 下降至 $43.362 \mu\text{m}$,推测超声破坏了污泥菌胶团结构,导致丝状菌破裂,由丝状菌连接的微生物细胞和EPS被分散。因此,超声预处理可以有效破坏污泥的表观结构,增大污泥比表面积,降低污泥粒径,同时促进内溶有机质释放,为生物酶强化污泥发酵产酸降低传质阻力。

2.2 生物酶对剩余污泥VSS去除率的影响

VSS去除率可表示颗粒有机物的水解效果,剩余污泥VSS去除率随发酵时间的变化见图1。

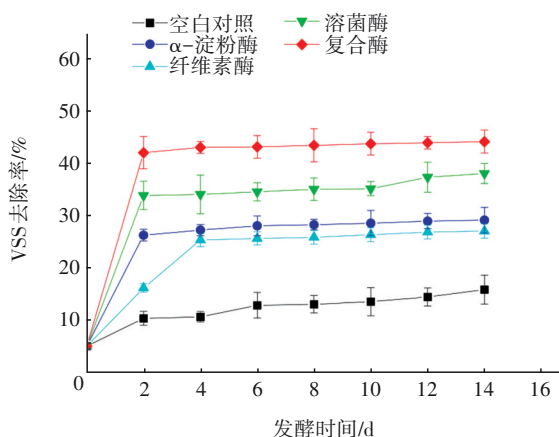


图1 剩余污泥VSS去除率随发酵时间的变化

Fig.1 Change of VSS removal rate in excess sludge with fermentation time

由图1可知,与空白对照相比,超声联合生物酶对污泥水解有显著促进作用,其效果排序为:复合酶>溶菌酶> α -淀粉酶>纤维素酶>空白对照,其中复

合酶作用下的污泥VSS去除率最高达到44.2%。在整个发酵过程中,VSS去除率在0~2 d明显提高,其中复合酶作用下的VSS去除率增加幅度最大即37%,空白对照增加幅度最小即5.3%。原因是复合酶可以从多个活性点位水解污泥,破坏污泥絮体结构,促进污泥中微生物细胞和EPS降解,有效实现污泥减量。这与Yang等^[8]研究结果相似,Yang等发现相较于单一酶,混合酶(蛋白酶:淀粉酶=1:3)对污泥的溶解效果更好,在温度为 50°C 时,污泥水解效率由10%(对照实验)提高到68.43%。

2.3 生物酶对剩余污泥VFAs的影响

VFAs由乙酸、丙酸、异丁酸、正丁酸、异戊酸和正戊酸组成,图2为不同生物酶处理下剩余污泥VFAs随发酵时间的变化。

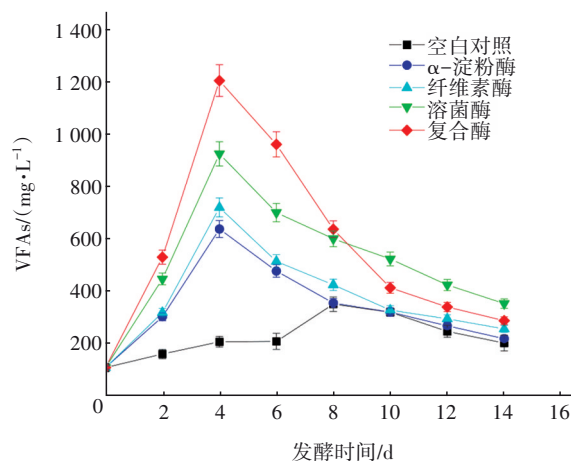


图2 剩余污泥VFAs随发酵时间的变化

Fig.2 Change of VFAs in excess sludge with fermentation time

由图2可知,在整个发酵过程中,VFAs浓度先升高后降低,除对照组外,均在第4天达到峰值,VFAs浓度排序为:复合酶>溶菌酶>纤维素酶> α -淀粉酶>空白对照,分别为1209.2、929.4、724.3、641.9和192.6 mg/L。其原因在于经超声联合生物酶处理后的污泥发酵系统中,污泥絮体破碎,有机质大量溶出,同时产酸菌群在生物酶的催化作用下高效地将有机质转化为VFAs。在第4天后,VFAs浓度显著降低,这主要是由于随着发酵时间的延长,产甲烷菌将VFAs转化为 CO_2 、甲烷等气体。

2.4 VFAs组成分析

生物酶污泥处理系统产酸累积量的最大值出现在第4天,因此有必要对第4天VFAs的组成进行分析,结果见图3。

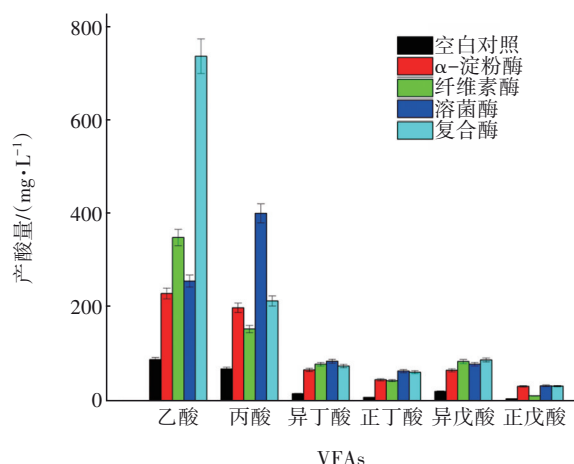


图3 第4天VFAs组成分析

Fig.3 Composition of VFAs on 4th day

表1 Alpha多样性指数

Tab.1 Alpha diversity index

项目	序列数	Chao	Simpson	Shannon	Observed-species	Coverage
空白对照组	182 385	3 545	0.989 5	8.620 2	3 540	0.999 0
溶菌酶系统	184 808	2 533	0.847 1	5.586 0	2 493	0.997 8
复合酶系统	190 957	2 558	0.860 6	5.270 4	2 503	0.997 3

由表1可知,第4天空白对照组、溶菌酶系统和复合酶系统的序列数均大于20 000;Coverage是反映测序深度的指数,其值均大于0.99,两者说明所收集的基因序列可以很好地代表污泥中的微生物群落^[9],足以反映样品的大部分信息。空白对照组的Chao指数高于溶菌酶和复合酶系统,说明空白对照组污泥的微生物丰度更高。Simpson和Shannon指数反映了样品中微生物的多样性^[10],溶菌酶和复合酶系统污泥的两个指数均低于空白对照组,可能是因为超声联合生物酶处理过程强化了与水解酸化相关的功能微生物,而关联度较小的微生物被淘汰,使得生物酶系统表现出相对较低的物种丰度。

2.5.2 操作分类单元(OTUs)韦恩图分析

微生物群落的OTUs韦恩图见图4,其中A1、B1、C1分别代表空白对照组、溶菌酶系统、复合酶系统。

由图4可知,相较于溶菌酶和复合酶系统,空白对照组的OTUs数分别增加了1 047和1 042,说明生物酶系统中污泥的微生物丰度较低。空白对照组和复合酶系统的OTUs共享数在空白对照组总数中占比较小,表明污泥中微生物群落随超声和生物酶的作用而发生改变,表现出较大差异。复合酶和溶菌酶系统单独所有的OTUs数分别占总数的

由图3可知,在复合酶污泥系统中,乙酸浓度最大即736.3 mg/L,远高于其他酸的浓度,且在所有发酵系统中,复合酶系统所产生的乙酸量最高,说明超声联合复合酶处理加快了污泥水解进程,增大了剩余污泥中有机物浓度,促进了丙酸、丁酸和戊酸等向小分子乙酸转化,使污泥水解更为彻底^[8]。乙酸作为污泥发酵过程产生的优质有机碳,可以在发酵液的后续利用中直接用于补充污水处理系统的碳源。

2.5 微生物群落分析

2.5.1 Alpha多样性指数分析

第4天微生物群落的Alpha多样性指数分析结果见表1。

27.24%和27.17%,表明超声联合复合酶与溶菌酶对污泥的作用效果存在一定差别,不同生物酶使得污泥中微生物的种类和数量发生改变。

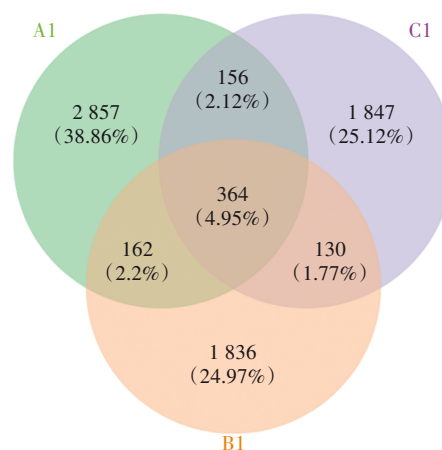


图4 OTUs韦恩图

Fig.4 OTUs Venn diagram

2.5.3 门水平物种组成

为进一步阐明联合处理后污泥的厌氧发酵产酸机理,就复合酶系统(C1)、溶菌酶系统(B1)和空白对照组(A1)进行了门水平上的微生物群落分析,其物种组成见图5。

由图5可以看出,在复合酶系统中,厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门

(*Bacteroidetes*)占主导地位,为总序列的 93.2%;在溶菌酶系统中,*Firmicutes* 和 *Proteobacteria* 占主导地位,为总序列的 87.9%;而空白对照组物种分布较为均匀,*Proteobacteria* 占比最高为 40.3%,*Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 仅占 1.5%和 4.8%。由此可见,超声联合生物酶的作用改变了微生物丰度,提高了 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 的占比。*Firmicutes* 中大部分微生物与碳水化合物的水解和产酸活性相关,能够将纤维素等复杂碳水化合物降解为乙酸和丁酸等小分子有机物。*Bacteroidetes* 能够产生纤维素酶、蛋白酶等水解酶,将有机物转化为 CO_2 、葡萄糖和乙酸^[11],此为本研究中复合酶系统污泥产 VFAs 和乙酸量大的主要原因。相比之下,溶菌酶系统中 *Firmicutes* 丰度最高,*Bacteroidetes* 丰度较低。相较于空白对照,联合处理后污泥中 *Proteobacteria* 的占比降低,*Proteobacteria* 在厌氧消化过程中会消耗生成的短链脂肪酸^[12],其丰度的降低有利于 VFAs 的累积。

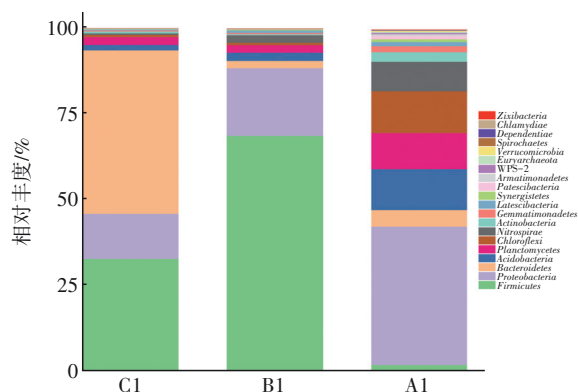


图 5 门水平上的物种组成

Fig.5 Species composition at the phylum level

2.5.4 属水平物种组成

图 6 为属水平物种组成热图。相比空白对照,经超声联合生物酶处理后的污泥微生物种类和丰度发生了明显变化,在复合酶系统中,梭状芽孢杆菌属(*Clostridium_sensu_stricto_11*)、普氏菌属(*Prevotella_7*)、丙酸螺菌属(*Propionispira*)、小杆菌属(*Dialister*)和醋酸杆菌属(*Acetobacter*)等水解产酸菌属丰度显著提高。其中部分 *Clostridium_sensu_stricto_11* (如丁酸梭菌)可分解碳水化合物产生有机酸,如乙酸、丙酸和丁酸等^[13]。*Prevotella_7* 可以淀粉为生长底物,同时也能加速蛋白质的代谢。*Dialister* 可以促进污泥产酸产气,*Propionispira* 和 *Acetobacter* 均可以利

用糖类,并将其转化为乙酸。由此可知,在超声联合复合酶的作用下,污泥中产乙酸菌属占据优势地位,VFAs 和乙酸累积量明显增加。

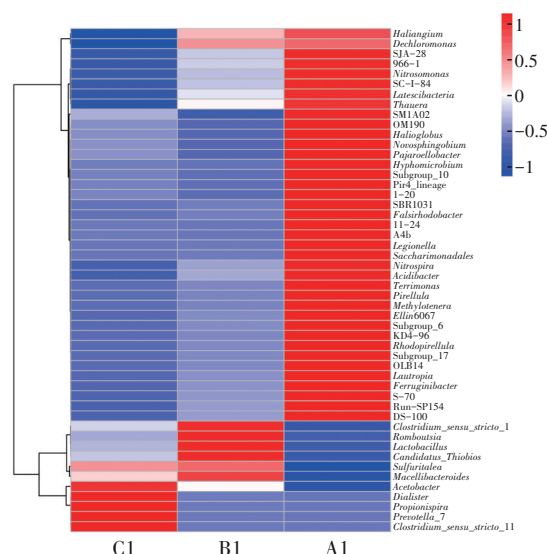


图 6 属水平物种组成热图

Fig.6 Heat map of species composition at the genus level

相比之下,在溶菌酶系统中,屠场杆菌属(*Macellibacteroides*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)和严格梭菌属(*Clostridium_sensu_stricto_1*)等丰度显著提高。*Macellibacteroides* 作为拟杆菌属的一种,可以利用葡萄糖和其他碳水化合物产生乙酸、正丁酸和异丁酸等。*Lactobacillus*、*Romboutsia* 和 *Clostridium_sensu_stricto_1* 均具有较强的代谢碳水化合物和蛋白质的能力,可以促进 VFAs 的生成。

3 结论

① 超声对污泥性质影响显著,经超声处理后,污泥上清液溶出 SCOD、TN 和 TP 浓度明显提高,污泥粒径减小,比表面积增大,有利于污泥的厌氧发酵水解和产酸过程。

② 超声联合生物酶促进污泥水解和产酸,其中复合酶的效果最佳,污泥 VSS 去除率最高可达 44.2%,VFAs 最大产量为 1 209.2 mg/L,其中乙酸量为 736.3 mg/L。

③ 微生物测序结果表明,经超声联合复合酶和溶菌酶处理后的污泥微生物丰度和多样性与空白对照呈现明显差异。从门水平来看,*Firmicutes*、*Proteobacteria* 和 *Bacteroidetes* 等水解产酸菌门在复合酶系统污泥中占主导地位;从属水平上来看,

Clostridium_sensu_stricto_11、*Propionispira* 和 *Acetobacter* 等水解产酸菌属丰度相较于空白对照均明显增加。

参考文献:

- [1] 黄慧, 高磊. 污水处理厂污泥处理处置现状及利用分析[J]. 能源与节能, 2022, 9: 46-48.
HUANG Hui, GAO Lei. Treatment situation and utilization of sludge in sewage treatment plants [J]. Energy and Energy Conservation, 2022, 9: 46-48 (in Chinese).
- [2] 郭思晓. 浅析污泥处理处置及资源化途径与新技术[J]. 中国资源综合利用, 2019, 37(12): 68-70.
GUO Sixiao. Research on sludge treatment and recycling approaches and new technologies [J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2019, 37(12): 68-70 (in Chinese).
- [3] 齐利格娃, 李伟, 高金华, 等. 污泥高含固厌氧消化研究进展[J]. 中国给水排水, 2021, 37(18): 14-19.
QI Ligewa, LI Wei, GAO Jinhua, et al. Research progress on high-solids anaerobic digestion of sewage sludge [J]. China Water & Wastewater, 2021, 37(18): 14-19 (in Chinese).
- [4] WANG Z, LI X, LIU H, Bioproduction and applications of short-chain fatty acids from secondary sludge anaerobic fermentation: a critical review [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2023, 183: 113502.
- [5] LUO K, YANG Q, YU J, et al. Combined effect of sodium dodecyl sulfate and enzyme on waste activated sludge hydrolysis and acidification [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(14): 7103-7110.
- [6] 赵瑜涵, 王昊龙, 周立山, 等. 超声联合生物酶强化剩余污泥厌氧产酸性能研究[J]. 工业水处理, 2023, 43(11): 181-188.
ZHAO Yuhan, WANG Haolong, ZHOU Lishan, et al. Anaerobic acid production characteristics of excess sludge enhanced by ultrasound and biological enzymes [J]. Industrial Water Treatment, 2023, 43(11): 181-188 (in Chinese).
- [7] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
State Environmental Protection Administration. The

Monitoring and Analyzing Methods of Water and Wastewater [M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002 (in Chinese).

- [8] YANG Q, LUO K, LI X, et al. Enhanced efficiency of biological excess sludge hydrolysis under anaerobic digestion by additional enzymes [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(9): 2924-2930.
- [9] LUO J, FENG L, ZHANG W, et al. Improved production of short-chain fatty acids from waste activated sludge driven by carbohydrate addition in continuous-flow reactors: influence of SRT and temperature [J]. Applied Energy, 2014, 113: 51-58.
- [10] 范子奇, 王应军, 任垠安. CaO_2 联合热预处理对污泥产酸的影响及菌群分析[J]. 中国给水排水, 2021, 37(15): 21-27.
FAN Ziqi, WANG Yingjun, REN Yin'an. Effect of calcium peroxide combined with thermal pretreatment on acid production of sludge and analysis of bacterial community [J]. China Water & Wastewater, 2021, 37(15): 21-27 (in Chinese).
- [11] ZIGANSHIN M, LIEBETRAU J, PRÖTER J, et al. Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(11): 103-108.
- [12] TANG Y, SHIGEMASTU T, MORIMURA S, et al. Microbial community analysis of mesophilic anaerobic protein degradation process using bovine serum albumin (BSA)-fed continuous cultivation [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 99(2): 150-164.
- [13] YANG X, LAU F, TANG D, et al. Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5709-5718.

作者简介: 王昊龙(1993—), 男, 河南濮阳人, 博士, 工程师, 主要从事水处理材料及功能聚合物研发工作。

E-mail: wanghaolong2018@163.com

收稿日期: 2023-03-15

修回日期: 2023-05-19

(编辑: 沈靖怡)