



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202212017 中图分类号 X703 文献标识码 A

张雨薇, 阿蓉, 黎佳茜, 等. 不同分子量聚乳酸的异养反硝化脱氮性能及脱氮反应机制[J]. 环境工程学报, 2023, 17(5): 1599-1611.
[ZHANG Yuwei, A Rong, LI Jiaxi, et al. Heterotrophic denitrification and denitrification mechanism of polylactic acid with different molecular weight[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2023, 17(5): 1599-1611.]

不同分子量聚乳酸的异养反硝化脱氮性能及脱氮反应机制

张雨薇^{1,2}, 阿蓉^{1,3}, 黎佳茜¹, 李杰^{2,4}, 刘雪瑜¹, 魏东洋^{5,✉}

1. 中国环境科学研究院水生态环境研究所, 北京 100012; 2. 兰州交通大学环境与市政工程学院, 兰州 730070;
3. 西北师范大学化学化工学院, 兰州 730070; 4. 甘肃省膜科学技术研究院有限公司, 兰州 730020; 5. 生态环境部环境发展中心, 北京 100029

摘要 聚乳酸 (PLA) 是一种发展潜力巨大的反硝化固体碳源。为探究不同分子量 PLA 反硝化脱氮路径及机制, 以不同分子量 PLA 为固体碳源研究了 PLA 的静态释碳性能和反硝化脱氮效果, 考察了反硝化出水溶解性有机质 (DOM) 组分和微生物群落结构。结果表明: PLA 释碳稳定, 在清水和脱氮反应器中出水 COD 均能稳定在 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; PLA 分子量越低, 脱氮效果越好, $5000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 分子量 PLA 的 $\text{NO}_3^- \cdot \text{N}$ 去除率和反硝化速率达到 100% 和 $1.29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。PLA 脱氮路径有 2 条: 一是反硝化功能菌群利用水解微生物分解 PLA 释放的小分子碳源作为电子供体进行异养反硝化作用; 二是微生物利用溶解性微生物代谢产物等有机物进行反硝化脱氮。该研究结果可为 PLA 固体碳源在反硝化脱氮工艺中的高效应用提供参考。

关键词 固体碳源; 聚乳酸; 异养反硝化; 三维荧光光谱; 微生物群落结构

城镇污水处理厂生化尾水深度净化脱氮常采用异养反硝化工艺, 安全廉价的碳源是该工艺高效运行的关键。与常用液态碳源相比, 可生物降解型人工合成聚合物固体碳源因运输安全、释碳稳定而成为反硝化脱氮领域的研究热点。聚乳酸 (Polylactic acid PLA)、3-羟基丁酸/戊酸酯共聚物 (Polyhydroxy-butyrates-co-valerates PHBV)^[1]、聚己内酯 (Poly(ϵ -caprolactone) PCL)^[2] 和聚丁二酸丁二醇酯 (Poly(Butylene Succinate) PBS)^[3] 等聚合物具有良好释碳性能。但 PHBV, PCL 和 PBS 等聚合物在合成过程中存在聚合条件苛刻、催化剂毒性高等问题^[4-5], 存在安全隐患。PLA 能够由乳酸直接缩聚而成, 合成方法简单、价格低廉, 被认为是最具有发展潜力的可生物降解聚合物^[6-7]。

目前, 关于 PLA 作为固体碳源进行反硝化脱氮的研究多以工程应用为主。FAN 等^[8] 研究了 PLA 反硝化脱氮的污泥培养时间 (35 d) 与适宜温度 ($30 \sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$)。彭书林等^[9] 优化了 PLA 反硝化系统的适宜进水 pH 范围为 7.8~10.1。TAKAHASHI 等^[10] 从 PLA 水解产物角度判断了不同分子量 PLA 的脱氮效果, 指出低分子量 PLA 脱氮效果更好。但是不同分子量 PLA 的脱氮路径及相应机制尚不清晰, 这是异养微生物脱氮过程高效调控的理论基础。

收稿日期: 2022-12-03; 录用日期: 2023-03-23

基金项目: 深圳市科技计划协同创新专项-承接国家重大科技项目 (CJGJZD2020061710260200); 国家重点研发计划项目 (2021YFC3201505-02)

第一作者: 张雨薇 (1998—), 女, 硕士研究生, 913259544@qq.com; ✉通信作者: 魏东洋 (1975—), 男, 博士, 研究员, waterdy@163.com

本研究选取分子量为 5 000 g·mol⁻¹、10 000 g·mol⁻¹ 和 50 000 g·mol⁻¹ 的 PLA，在探究其释碳性能和反硝化效果的基础上，通过分析出水溶解性有机质 (DOM) 组分及微生物群落结构，揭示不同分子量 PLA 反硝化脱氮路径与机制，以期为 PLA 应用于低碳脱氮提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验原料

本实验选用直接聚合法^[11]合成的 PLA。该方法流程简单成本较低，合成的 PLA 分子量在 5 000~50 000 g·mol⁻¹^[12-13]。因此，本实验选取分子量为 5 000 g·mol⁻¹、10 000 g·mol⁻¹、50 000 g·mol⁻¹ 的 PLA 进行研究。PLA 的形态为白色椭圆形颗粒，其直径为 2~3 mm、长为 3~4 mm。其他试剂均采用分析纯。模拟废水的制备方法：在自来水中加入 NaNO₃ 和 KH₂PO₄，使 NO₃⁻-N 质量浓度为 30 mg·L⁻¹，PO₄³⁻-P 质量浓度为 6 mg·L⁻¹；微量元素溶液按 1 mL·L⁻¹ 体积分数添加，其组分如表 1 所示^[9]。

表 1 微量元素溶液成分组成
Table 1 Composition of trace element solution

成分	质量浓度/(g·L ⁻¹)	成分	质量浓度/(g·L ⁻¹)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.6
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.6	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5.5	NiSO ₄ ·6H ₂ O	0.42
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5.0	EDTA	5.0

1.2 实验方法

1) 聚乳酸 PLA 静态释碳研究方法。取 3 只 500 mL 锥形瓶，分别加入 300 mL 去离子水，并加入 100 g 分子量为 5 000 g·mol⁻¹、10 000 g·mol⁻¹、50 000 g·mol⁻¹ 的 PLA，瓶口密封，放置于 35 ℃、80 r·min⁻¹ 恒温培养箱中。每 24 h 取样并更换去离子水，连续更换 17 d^[14]。之后，测定水样 COD，并计算 PLA 的累计释碳率 (cumulative carbon release rate)。

2) 聚乳酸 PLA 反硝化研究方法。取 3 只 500 mL 锥形瓶，加入 300 mL 模拟废水和 150 mL 活性污泥 (MLSS 为 3 g·L⁻¹)，分别加入 100 g 分子量为 5 000 g·mol⁻¹、10 000 g·mol⁻¹、50 000 g·mol⁻¹ 的 PLA，瓶口密封，放置于 35 ℃、80 r·min⁻¹ 恒温培养箱中。每 24 h 取样并更换 300 mL 模拟废水，连续更换 36 d，并于第 1 天、第 17 天和第 37 天取样分析 DOM 组分，于第 37 天取样分析微生物群落结构。测定水样 NO₃⁻-N、NO₂⁻-N、NH₄⁺-N、COD，并计算反硝化速率 (Denitrification rate)。

3) PLA 累计释碳率计算。PLA 累计释碳率可用 CR 来表示，计算如式 (1) 所示。

$$CR_d = \frac{\sum_{i=1}^d \left(\frac{C_i}{2.67} \right) * V}{TC} \quad (1)$$

式中：CR_d 为第 d 天的累计释碳率；C_i 为第 i 天的 COD，mg·L⁻¹；V 为实验溶液体积，L；TC 为释碳实验所使用 PLA 总含碳量，mg。

4) PLA 反硝化速率计算。反硝化速率可以用 DR 表示，如式 (2)^[2] 所示。

$$DR = \frac{C_0 - C_c}{HRT} \quad (2)$$

式中：DR 为反硝化速率，mg·L⁻¹·h⁻¹；C₀ 和 C_c 分别为 NO₃⁻-N 初始浓度和出水质量浓度，mg·L⁻¹。本研究中水力停留时间 (HRT) 统一为 24 h。

1.3 分析测试方法

水样经 0.45 μm 膜滤膜过滤后测定相关参数。其中, NO_3^- -N 采用紫外分光光度法测定; NO_2^- -N 采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定; NH_4^+ -N 采用纳氏试剂法测定; COD 采用快速消解分光光度法 (DR-1900, 哈希, 美国) 测定。三维荧光光谱采用日立 (Hitachi) F-7000 荧光分光光度计测定, 激发波长 (λ_{ex}) 扫描范围: 200~450 nm, 发射波长 (λ_{em}) 扫描范围: 250~600 nm; 狭缝宽带: $\lambda_{\text{ex}}=5$ nm, $\lambda_{\text{em}}=5$ nm; 扫描速度 2 400 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ 。三维荧光光谱 (3D-EEM) 根据激发波长和发射波长的不同范围分为 5 个区域。这 5 个区域分别为 I 区 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=(200\sim250\text{ nm})/(250\sim330\text{ nm})$, 类酪氨酸物质)、II 区 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=(200\sim250\text{ nm})/(330\sim380\text{ nm})$, 类色氨酸物质)、III 区 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=(200\sim250\text{ nm})/(380\sim550\text{ nm})$, 类富里酸物质)、IV 区 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=(250\sim400\text{ nm})/(250\sim380\text{ nm})$, 溶解性微生物代谢产物物质)、V 区 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=(250\sim400\text{ nm})/(380\sim550\text{ nm})$, 类腐殖酸物质)^[15]。按照荧光区域积分 (FRI) 分析法, 通过 Origin9.1 计算荧光区域的积分体积 Φ_i ; 对荧光区域的积分体积进行标准化, 得到区域 i 的标准化积分体积 $\Phi_{i,n}$; 再计算总荧光区域标准化积分体积 $\Phi_{T,n}$; 最后计算区域 i 标准化积分体积占总标准化积分体积之比 $P_{i,n}$ ^[16]。

微生物群落结构采用 16SrRNA 高通量测序进行分析。污泥样品采集后置于 10 mL 离心管内, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 随后进行样品 DNA 提取, 采用通用引物 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) 和 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) 对样品 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增。PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 定量系统 (美国 Promega 公司) 检测定量后, 最后利用 Illumina Miseq PE300 平台进行测序。使用 Uparse 软件 (version 11), 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类。利用 RDP classifier (version 2.13) 对每条序列进行物种分类注释, 比对 Silva 16S rRNA 数据库 (version 138), 设置比对阈值为 70%, 并在门、科和属水平上统计不同样本的群落组成。

2 结果与讨论

2.1 PLA 静态释碳性能

分子量为 5 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、10 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 和 50 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 PLA 静态释碳性能如图 1 所示。PLA 的分子量增大, 其释碳稳定性越好。分子量为 5 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、10 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 PLA 释碳表现出明显的两阶段性: 第 1 天为快速释碳阶段, COD 分别降为 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 33 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 第 2~17 天为缓慢释碳阶段, 每天稳定释放 COD 约 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分子量 50 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 PLA 未见明显的阶段性, 而周期内 COD 释放量每天保持约 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。不同分子量 PLA 在 17 d 内累计释放率稳定增长, 且不超过 0.1%。

性能良好的固体碳源在清水中释碳能力较弱, 可在微生物作用下释放反硝化脱氮所需碳源^[17]。上述数据表明, 不同分子量的 PLA 均可长时间进行低量释放碳源, 为一种性能良好的固体碳源。这归因于 PLA 的水溶性差, 在清水中可长时间低量释碳 (约为 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 与 PCL、PHBV 等人工合成碳源释碳量相近 (13.35~26.70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)^[18-19], 远低于玉米芯和花生壳等天然碳源 (200~300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)^[20]; 而固体碳源静态释碳过高, 应用脱氮系统中会造成出水有机物含量超标。

2.2 PLA 反硝化脱氮性能

当 PLA 分子量分别为 5 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、10 000

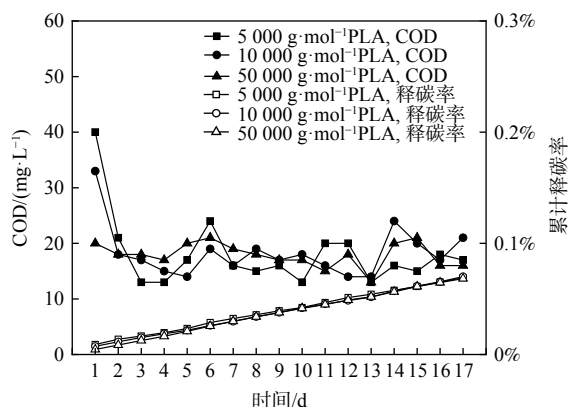


图 1 不同分子量 PLA 释碳性能

Fig. 1 Carbon release properties of PLA with different molecular weights

$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 和 $50\,000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时, 出水 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 质量浓度变化、去除率和反硝化速率如图 2 所示, 副产物 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 质量浓度和不同形态 N 比例变化如图 3。

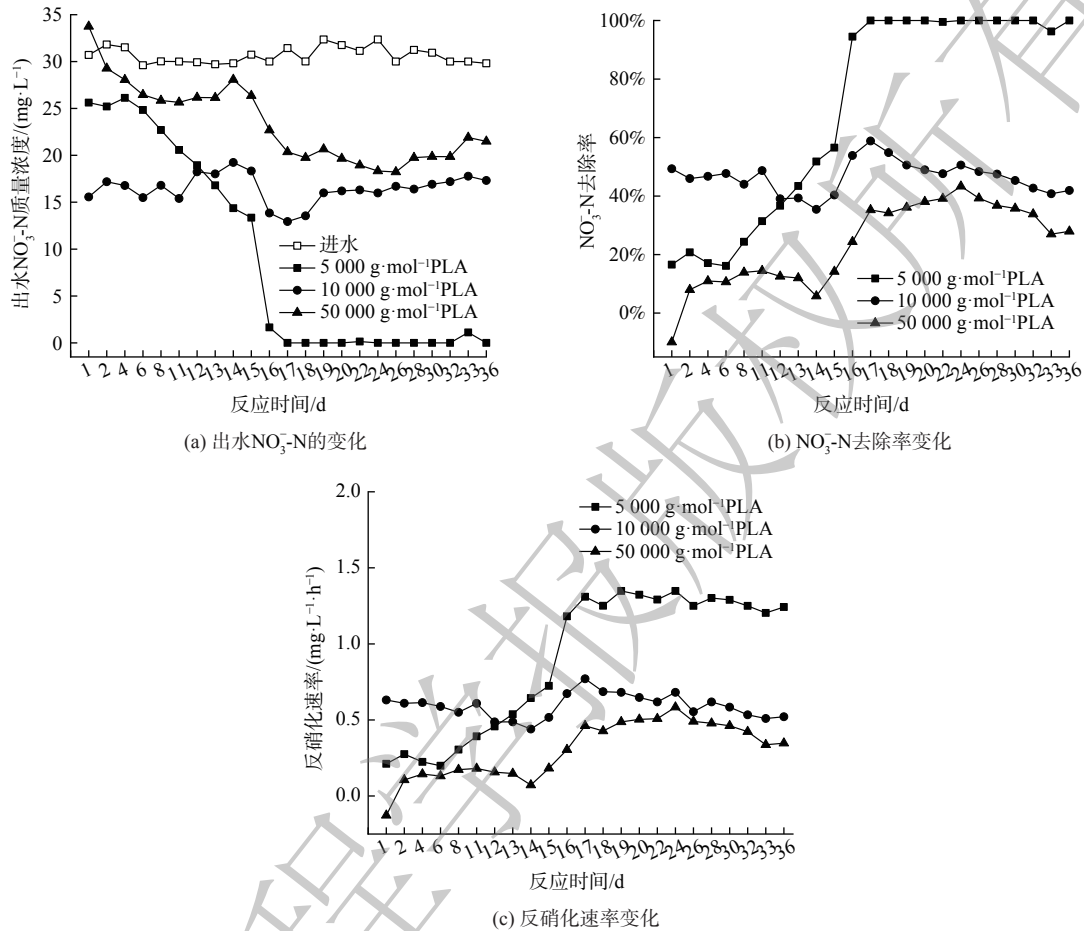


图 2 不同分子量 PLA 的脱氮性能对比

Fig. 2 Comparison of PLA denitrification properties of different molecular weights

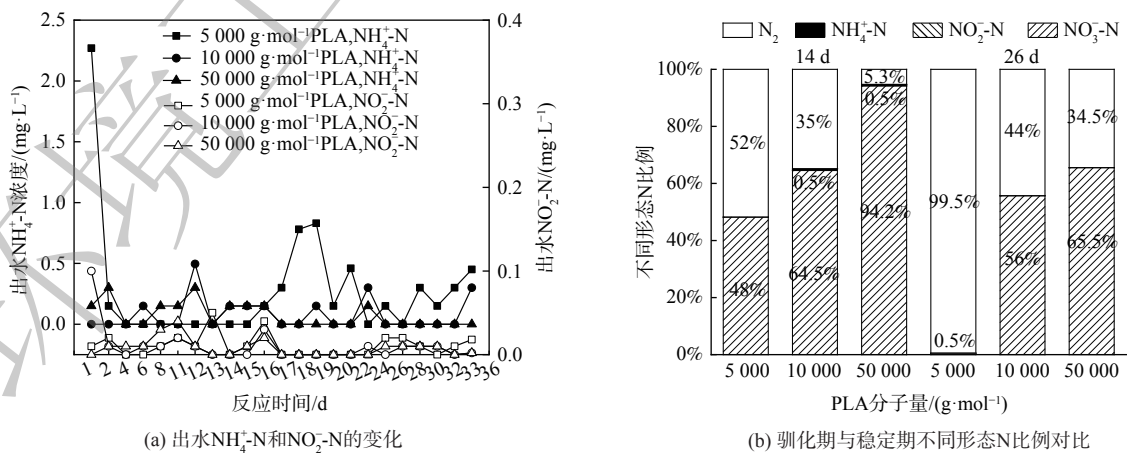


图 3 不同分子量 PLA 反硝化实验出水 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 质量浓度、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 质量浓度和不同形态 N 比例

Fig. 3 Concentrations of $\text{NH}_4^+ \text{-N}$, $\text{NO}_2^- \text{-N}$ and different morphological N ratios in denitrification effluent from PLA with different molecular weights

随着 PLA 分子量的增加, 出水 NO_3^- -N 质量浓度增大, 去除率和反硝化速率降低。第 1~16 天, 不同分子量 PLA 的出水 NO_3^- -N 质量浓度均随时间逐渐下降, 去除率和反硝化速率逐渐升高; 第 17~36 天, 不同分子量 PLA 出水 NO_3^- -N 质量浓度、去除率和反硝化速率均呈稳定趋势, $5\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 分子量 PLA 的 NO_3^- -N 去除率和反硝化速率可分别达到 100% 和 $1.29\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。分析其原因, 在反硝化过程中, 微生物无法直接利用 PLA 颗粒, 而是以 PLA 的水解产物作为碳源^[10]。PLA 会在微生物分泌的胞外水解酶作用下, 发生内部酯键水解而形成小分子有机酸^[21-22], 胞外水解酶会优先催化水解 PLA 的非晶区^[7, 21-22]。PLA 水解出小分子有机物的能力也与其分子量密切相关。低分子量 PLA 主要以非晶区存在更容易被胞外酶催化水解提供有效碳源^[23-24], 故其反硝化效果更好。

由图 3 (a) 可知, 在反应过程中, PLA 分子量分别为 $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $50\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时, NH_4^+ -N 无明显积累 ($<0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。PLA 分子量为 $5\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时, 反应 1 d 时出水 NH_4^+ -N 质量浓度为 $2.27\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这可能是由于 PLA 分子量为 $5\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时, 反应器的接种污泥释放了在污水处理厂吸附的铵^[25]; 而在后续实验阶段, NH_4^+ -N 稍有积累, 最高质量浓度为 $0.83\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 这可能是由于反应器内发生了硝酸盐异化还原为铵 (dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA) 的反应^[26]。PLA 分子量为 $5\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时, NH_4^+ -N 积累量大于 PLA 分子量为 $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 和 $50\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时。这是因为 PLA 分子量为 $5\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时, 能释放更多碳源并加强 DNRA 作用^[27]。DNRA 作用常见于固体碳源脱氮过程, 但 NH_4^+ -N 积累量会随不同种类碳源变化。一般情况下, 天然固体碳源的效果会优于聚合物类固体碳源。而本实验结果表明, PLA 为固体碳源时, 其出水 NH_4^+ -N 积累量 ($<0.83\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 会低于 PHBV ($1.14\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 等其他聚合物碳源^[28-29]。不同分子量 PLA 反硝化实验出水 NO_2^- -N 无明显积累 ($<0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。异养反硝化反应以有机物为电子供体, 分为 NO_3^- -N 被还原为 NO_2^- -N 与 NO_2^- -N 被还原为 N_2 两步, 分别由硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶催化进行。出水 NO_2^- -N 无明显积累表明以 PLA 为固体碳源的反硝化反应的限速步骤为 NO_3^- -N 被还原为 NO_2^- -N 过程, 而 NO_2^- -N 能迅速被亚硝酸盐还原酶还原为 N_2 。

由图 3 (b) 可知, 稳定期 (第 17~36 天) 不同分子量 PLA 反硝化氮气转化率均高于驯化期 (第 1~16 天), $5\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 分子量 PLA 稳定期氮气转化率达到 99%, 且不同分子量 PLA 反硝化出水 NO_2^- -N 无明显积累。这表明 $5\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 分子量的 PLA 能实现完全反硝化, 几乎不生成 NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 等副产物。

2.3 PLA 反硝化脱氮机制

1) PLA 反硝化电子供体有机质来源。分子量分别为 $5\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 和 $50\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 PLA 对应反硝化出水 COD 的变化如图 4 所示, 溶解性有机质 (DOM) 组分变化如图 5、6 和 7 所示。

由图 4 可知, 分子量为 $5\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 和 $50\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 PLA 对应的反硝化实验出水 COD 较稳定, 平均 COD 分别为 $16.26\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $15.35\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $14.17\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。固体碳源反硝化系统内 COD 主要取决于微生物作用下碳源释放过程与异养反硝化等碳源利用过程^[30]。图 4 中出水 COD 稳定表明脱氮系统内碳源的释放与利用达到平衡, 即在脱

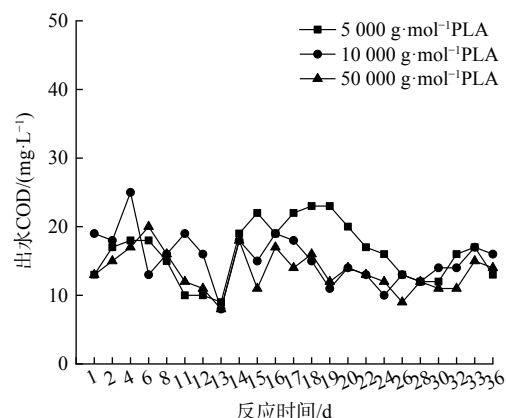


图 4 不同分子量 PLA 反硝化实验出水 COD

Fig. 4 Concentrations of COD in denitrification effluent of PLA with different molecular weights

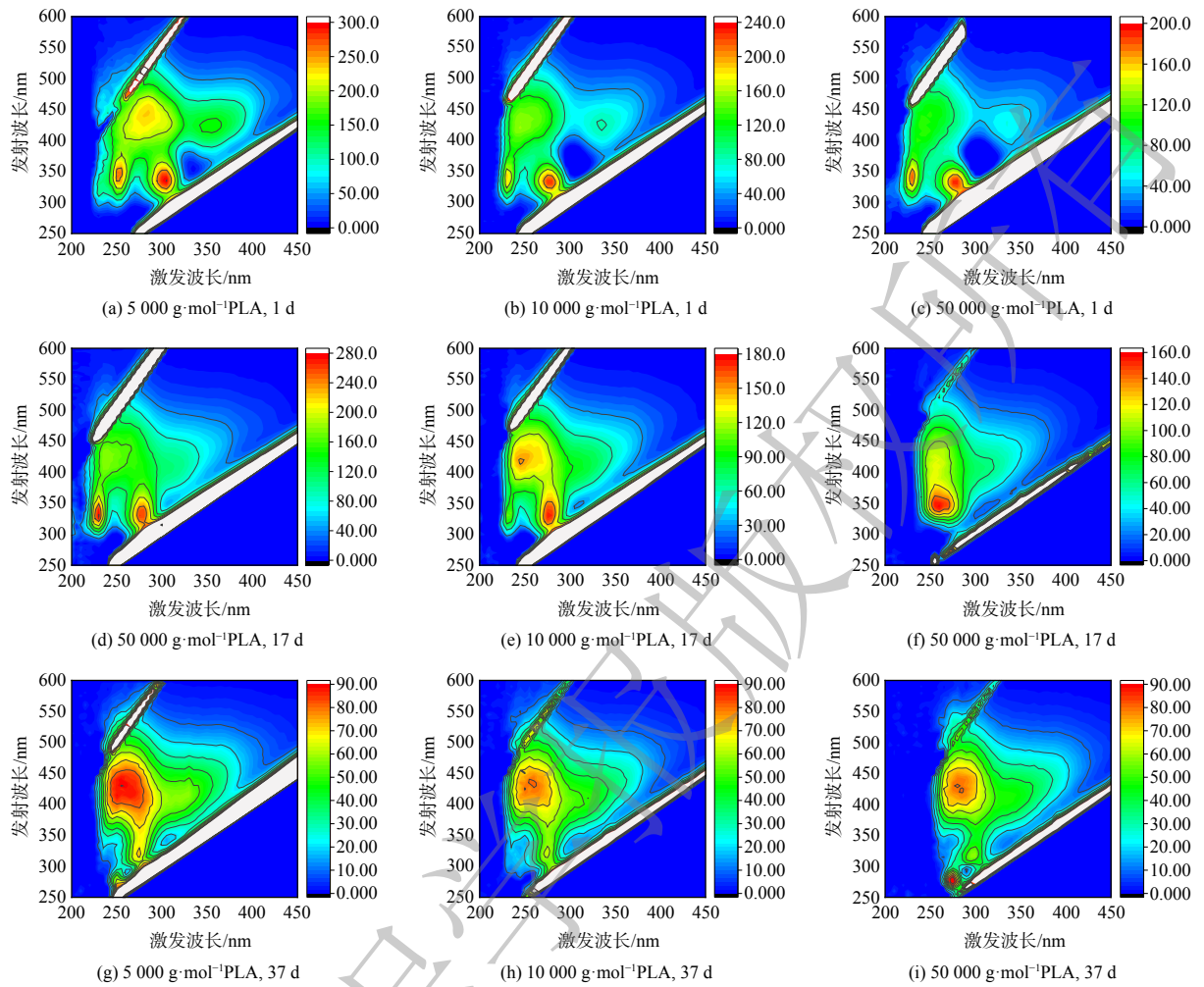


图 5 不同分子量 PLA 反硝化实验 1 d、17 d、37 d 出水三维荧光光谱 (3D-EEM) 图

Fig. 5 Three-dimensional fluorescence spectra (3D-EEM) of effluent from denitrification experiments with different molecular weights at 1 d, 17 d and 37 d

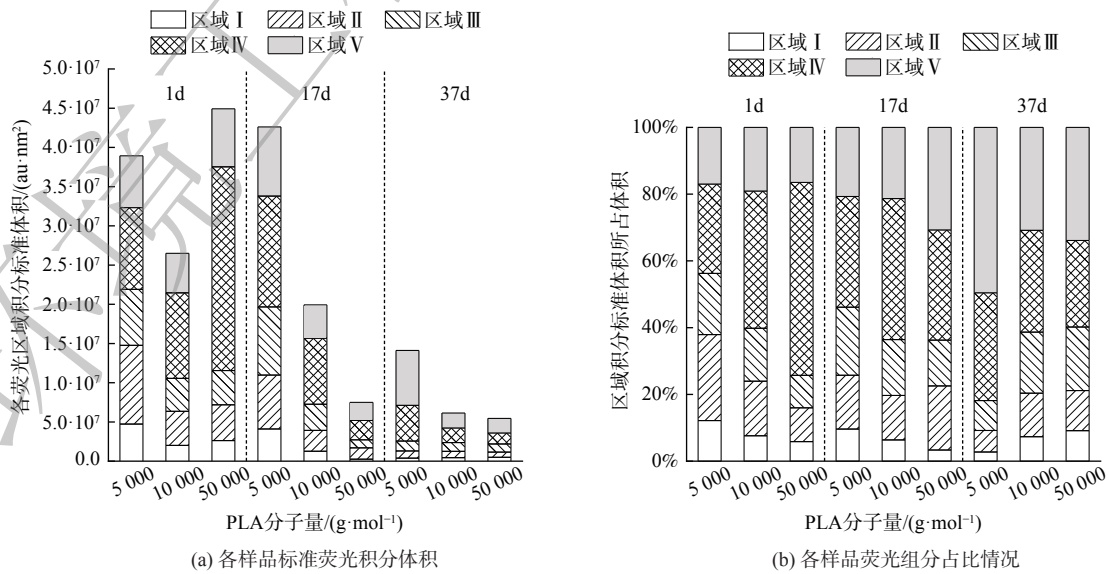


图 6 各样品 DOM 定量分析

Fig. 6 DOM quantitative analysis of water samples

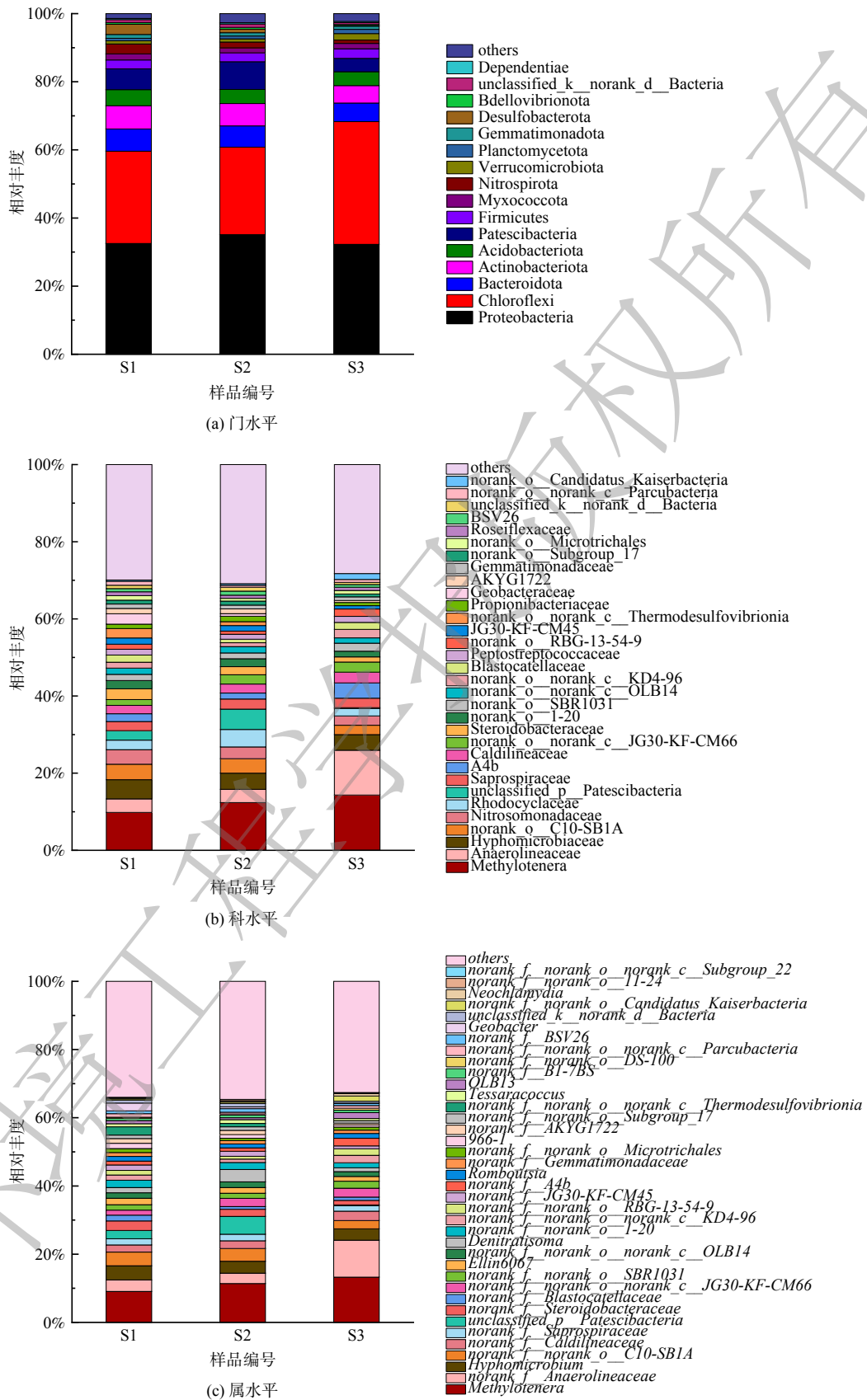


图 7 不同样品微生物门水平 (a)、科水平 (b) 和属水平 (c) 群落结构

Fig. 7 Microbial phylum level (a), family level (b) and genus level (c) in different samples

氮过程中微生物水解 PLA 释放的碳源会被微生物菌群迅速用于反硝化脱氮及自身生长繁殖。

根据三维荧光光谱 (3D-EEM) 的特定波长荧光强度数据, 能显示水中溶解性有机质 (DOM) 的组分特征。由三维荧光光谱 (图 5) 可知, 不同分子量 PLA 反硝化出水中 DOM 组分主要为溶解性微生物代谢产物、腐殖酸类、富里酸类及少量蛋白质类物质。为进一步探究 DOM 的荧光特性, 运用荧光光谱 FRI 对 DOM 的三维荧光光谱进行定量分析。各样品的总积分标准体积见图 6 (a)。随着实验的进行, 反应器中 DOM 的荧光强度逐渐降低。这说明 PLA 异养反硝化能去除水中 DOM。各荧光组分占比见图 6 (b)。随着反硝化时间的延长, 反应器内溶解性微生物代谢产物和类蛋白质物质组分占比降低, 而腐殖酸类和富里酸类物质组分占比升高。这是因为溶解性微生物代谢产物等易降解有机物在反硝化过程中会逐渐转化为腐殖酸类和富里酸类等难降解有机物^[31], A²O 工艺的缺氧池中也存在以微生物代谢产物为电子供体的反硝化过程, 同时产生腐殖酸^[32]。因此, PLA 反硝化脱氮电子供体来源不仅有 PLA 释放的小分子碳源, 还有溶解性微生物代谢产物等有机物。

2) PLA 脱氮微生物学机制分析。分子量分别为 5 000 g·mol⁻¹、10 000 g·mol⁻¹ 和 50 000 g·mol⁻¹ 的 PLA 对应的反硝化脱氮系统微生物群落多样性分析结果: α 多样性指数如表 2 所示, 微生物门、科和属水平群落结构如图 7 和 8 所示。

表 2 微生物群落 α 多样性指数

Table 2 α diversity index of microbial community

样品编号	序列数目	OTUs	Shannon 指数	Chao 指数	coverage
S1	43 896	1 205	5.50	1 375.29	0.99
S2	36 628	1 273	5.47	1 402.56	0.99
S3	40 559	1 172	5.41	1 298.73	0.99

注: 5 000 g·mol⁻¹ 分子量 PLA 反应器 37 d 污泥样品 S1; 10 000 g·mol⁻¹ 分子量 PLA 反应器 37 d 污泥样品 S2; 50 000 g·mol⁻¹ 分子量 PLA 反应器 37 d 污泥样品 S3。

表 2 表明, 所有样品覆盖率 (coverage) 均为 0.99, 代表测序结果真实可靠。反应器中 Shannon 和 Chao 指数基本无变化并保持在较高数值, 证明 PLA 分子量对微生物群落丰富度和多样性影响不大, 且 PLA 反应器内微生物活性较高, 同时也表明 PLA 可作为反硝化固体碳源。

不同污泥样品在门水平上的分布如图 7 (a) 所示, 主要优势门主要有变形菌门 (Proteobacteria) (32.28%~35.12%)、绿弯菌门 (Chloroflexi) (25.67%~36.00%)、放线菌门 (Actinobacteriota) (5.11%~6.82%)、CPR 细菌 (Patescibacteria) (3.92%~8.14%) 和拟杆菌门 (Bacteroidota) (5.47%~6.27%)。常见的还原硝酸盐的反硝化菌属大多在变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidota) 下^[33-34], 不同分子量 PLA 反应器内变形菌门 (Proteobacteria) 与拟杆菌门 (Bacteroidota) 相对丰度之和为 37.75%~41.38%。这表明各反应器内这 2 种菌门为优势菌门。绿弯菌门 (Chloroflexi) 下的微生物能在厌氧条件下吸收来自细胞裂解的肽聚糖等物质, 其部分属能利用细胞释放的微生物代谢产物作为电子供体进行反硝化作用^[35], S3 样品内绿弯菌门 (Chloroflexi) 相对丰度 (36.00%) 明显高于 S1 (27.97%)、S2 (25.67%) 样品。推测这是由于分子量 50 000 g·mol⁻¹ 的 PLA 无法释放出足够碳源以供微生物生长所需, 使得微生物细胞裂解释放肽聚糖, 造成绿弯菌门 (Chloroflexi) 等菌群相对丰度的增加。放线菌门 (Actinobacteriota) 与 CPR 细菌 (Patescibacteria) 常见于城市污水处理厂活性污泥内^[36-37]。

由图 8 (a) 可知, S1 样品拟杆菌门 (Bacteroidota)、放线菌门 (Actinobacteriota) 和酸杆菌门 (Acidobacteriota) 相对丰度均高于 S2 和 S3 样品。拟杆菌门 (Bacteroidota) 下的微生物可以降解纸浆等有机物从而释放碳源^[34], 放线菌门 (Actinobacteriota) 下的微生物能合成胞外水解酶降解大分子有机物^[38], 其部分属能够水解 PLA^[21]。随着 PLA 分子量的升高, 拟杆菌门 (Bacteroidota) 和放线菌门

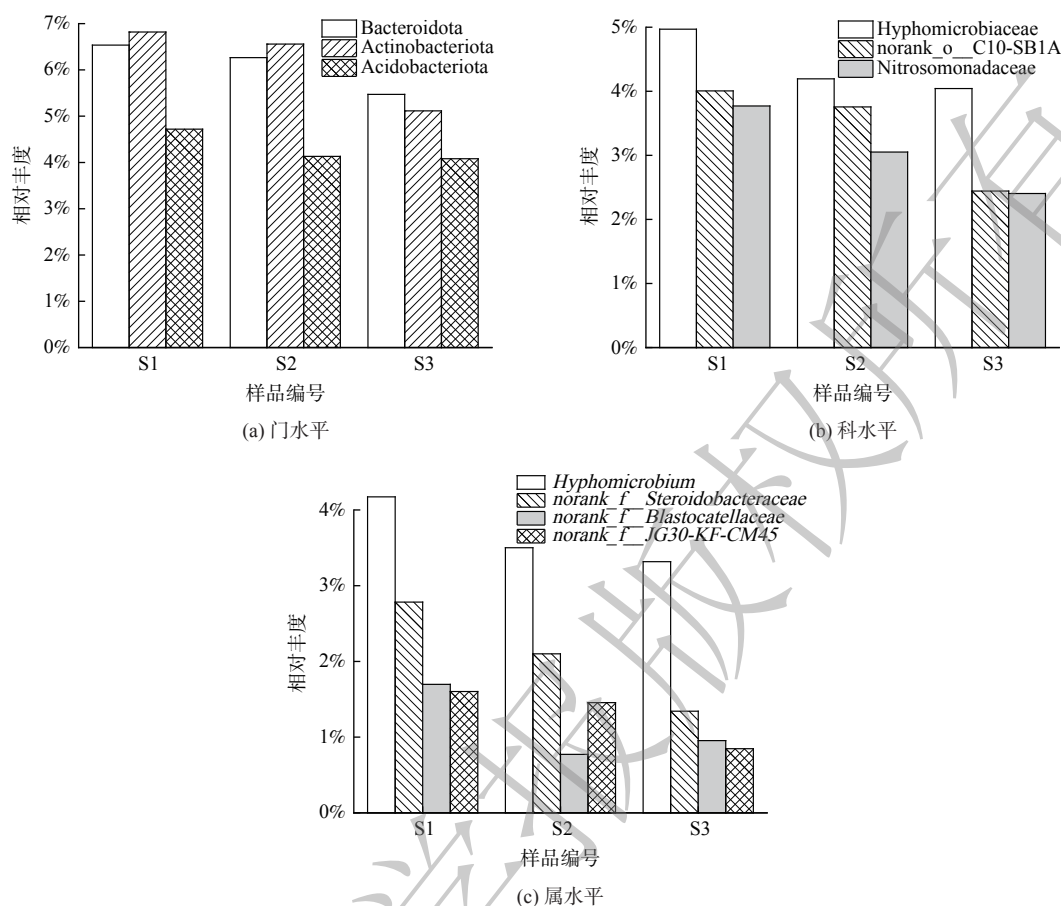


图 8 不同分子量 PLA 影响的主要菌群门水平 (a)、科水平 (b) 和属水平 (c)

Fig. 8 Major microbial phylum (a), family level (b) and genus level (c) affected by PLA of different molecular weights

(Actinobacteriota) 丰度降低。这表明 $5\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 分子量 PLA 更容易富集 PLA 水解相关菌门，从而释放更多碳源。酸杆菌门 (Acidobacteriota) 中的微生物带有 narG、nirK 和 nirS 等多种反硝化功能基因能够编码合成硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶，并能在厌氧条件下利用乙酸等有机物还原硝酸盐^[39-40]。

样品在科水平上的分布如图 7 (b) 所示，样品中共检测出 32 个科。前十个主要优势科是：嗜甲基菌科 (Methylophilaceae)(9.82%~14.32%)、厌氧绳菌科 (Anaerolineaceae)(3.44%~11.62%)、生丝微菌科 (Hyphomicrobiaceae)(4.04%~4.97%)、norank_o_C10-SB1A(2.44%~3.76%)、亚硝化单胞菌科 (Nitrosomonadaceae)(2.40%~3.77%)、红环菌科 (Rhodocyclaceae)(1.96%~4.53%)、unclassified_p_Patescibacteria(0.18%~5.25%)、腐败螺旋菌科 (Saprospiraceae)(2.37%~2.63%)、A4b(1.56%~3.94%)、暖绳菌科 (Caldilineaceae)(2.18%~2.80%)。嗜甲基菌科 (Methylophilaceae)、厌氧绳菌科 (Anaerolineaceae)、生丝微菌科 (Hyphomicrobiaceae)、红环菌科 (Rhodocyclaceae) 和暖绳菌科 (Caldilineaceae) 均为硝酸盐还原菌^[41-43]；亚硝化单胞菌科 (Nitrosomonadaceae) 是一种氨氧化菌 (ammonia oxidizing bacterium, AOB)，能氧化氨氮为亚硝酸盐^[44]；腐败螺旋菌科 (Saprospiraceae) 是一种亚硝酸盐还原菌^[45]。上述各菌科均为反硝化脱氮过程的关键功能科，广泛存在于全球各地废水脱氮反应器中。norank_o_C10-SB1A 为硝酸盐异化还原为氨 (DNRA) 功能菌群^[46]。A4b 曾在含有 PLA 的反硝化系统中检测出，是一种能降解大分子有机物的微生物^[47]。

如图 8 (b) 所示，S1 样品生丝微菌科 (Hyphomicrobiaceae)、norank_o_C10-SB1A 和亚硝化单胞菌

科 (Nitrosomonadaceae) 相对丰度高于 S2 和 S3 样品。这表明含有 $5\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 分子量 PLA 的反应器中起主要反硝化作用的菌科为生丝微菌科 (Hyphomicrobiaceae), 且该菌生物活性较高, 能在相对丰度小于 5% 的情况下, 完成反硝化脱氮。norank_o_C10-SB1A 和亚硝化单胞菌科 (Nitrosomonadaceae) 丰度较高, 可能是由于 $5\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 分子量 PLA 能够释放较多碳源以致 DNRA 菌群 (norank_o_C10-SB1A) 繁殖^[48], 使得短时间内 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 得到积累, 促进了以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为基质的亚硝化单胞菌科 (Nitrosomonadaceae) 的生长。因此, 尽管 norank_o_C10-SB1A 相对丰度较高, 出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 却未见明显积累。

样品在属水平上的分布如图 7 (c) 所示, 共检测出 38 个属。前十个主要优势属为: 甲基孢养杆菌属 (*Methylothera*) (9.09%~13.26%)、norank_f_Anaerolineaceae (3.03%~10.85%)、生丝微菌属 (*Hyphomicrobium*) (3.50%~4.17%)、norank_f_norank_o_C10-SB1A (2.44%~4.00%)、norank_f_Caldilineaceae (2.10%~2.74%)、norank_f_Saprospiraceae (1.65%~1.91%)、unclassified_p_Patescibacteria (0.18%~5.25%)、norank_f_Steroidobacteraceae (1.34%~2.78%)、norank_f_Blastocatellaceae (0.18%~1.70%)、norank_f_norank_o_norank_c_JG30-KF-CM66 (1.49%~2.62%)。其中, 甲基孢养杆菌属 (*Methylothera*) 和生丝微菌属 (*Hyphomicrobium*) 是典型反硝化菌属具有还原硝酸盐的作用, 常见于反硝化活性污泥^[49-50]。norank_f_Anaerolineaceae、norank_f_Blastocatellaceae、norank_f_norank_o_norank_c_JG30-KF-CM66 和 norank_f_Steroidobacteraceae 属均与复杂有机物代谢有关^[51-54]。norank_f_Caldilineaceae 和 norank_f_Saprospiraceae 属是通过消耗有机物进行反硝化作用的功能细菌^[55-56]。norank_f_norank_o_C10-SB1A 为 norank_o_C10-SB1A 科下的细菌为 DNRA 作用的关键功能属。

如图 8 (c) 所示, S1 样品中生丝微菌属 (*Hyphomicrobium*)、norank_f_Steroidobacteraceae、norank_f_Blastocatellaceae 和 norank_f_JG30-KF-CM45 属相对丰度高于 S2 和 S3 样品。生丝微菌属 (*Hyphomicrobium*) 是隶属于生丝微菌科 (*Hyphomicrobiaceae*) 的微生物, 是反硝化作用的关键细菌。norank_f_JG30-KF-CM45 属也是反硝化功能属, 丰度与有机物浓度成正比^[55]。norank_f_Blastocatellaceae 属参与代谢有机高分子物质, 可能与聚合物水解过程有关^[54]。norank_f_Steroidobacteraceae 属参与木质素生物降解和解聚过程^[52], 也可水解有机聚合物。属水平结果表明 $5\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 分子量 PLA 能富集更多水解功能菌群。

总体来说, 不同分子量 PLA 脱氮系统内微生物在门、科和属水平上的分布不同。 $5\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 分子量的 PLA 更有利于富集水解功能菌群。PLA 反硝化生物脱氮路径主要有两条: 反硝化功能菌群利用水解大分子有机物的微生物分解 PLA 释放的小分子碳源作为电子供体进行异养反硝化作用; 微生物利用溶解性微生物代谢产物等有机物进行反硝化脱氮。

3 结论

1) PLA 作为固体碳源, 在清水中能够长期稳定释放碳源, 反硝化脱氮过程中释碳主要依靠生物作用。PLA 反硝化脱氮效果表明, PLA 分子量越低, 脱氮效率越高。不同分子量 PLA 出水 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 等副产物均未见明显积累。 $5\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 分子量的 PLA 作为反硝化固体碳源更具有优势。

2) DOM 组分和微生物测序结果表明, $5\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 分子量的 PLA 更有利于富集水解相关功能菌群。PLA 脱氮路径有两条: 一是反硝化功能菌群利用水解微生物分解 PLA 释放的小分子碳源作为电子供体进行异养反硝化作用; 一是微生物利用溶解性微生物代谢产物等有机物进行反硝化脱氮。

参考文献

- [1] XU Z S, CHAI X L. Effect of weight ratios of PHBV/PLA polymer blends on nitrate removal efficiency and microbial community during solid-phase denitrification[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 116: 175-183.
- [2] JIANG L, WU A Q, FANG D X, et al. Denitrification performance and microbial diversity using starch-polycaprolactone blends as external solid carbon source and biofilm carriers for advanced treatment[J]. *Cheosphere*, 2020, 255: 126901.
- [3] 芦婷, 杨璐华, 杨飞飞, 等. 高效反硝化菌强化固相碳源生物脱氮特性研究[J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2017, 53(5): 957-963.
- [4] 陕洁, 牟芬, 王新芳, 等. 可生物降解塑料的合成及其改性[J]. *聚酯工业*, 2021, 34(3): 23-26.
- [5] 李静, 刘景江. 聚(β -羟基丁酸酯)和 β -羟基丁酸酯- β -羟基戊酸酯共聚物与可生物降解高分子共混改性研究进展[J]. *高分子通报*, 2003(6): 33-43.
- [6] 林世东, 杜国强, 顾君, 等. 我国生物基及可降解塑料发展研究[J]. *塑料工业*, 2021, 49(3): 10-12+37.
- [7] PANG X, ZHUANG X L, TANG Z H, et al. Polylactic acid (PLA): research, development and industrialization[J]. *Biotechnology Journal*, 2010, 5(11): 1125-1136.
- [8] FAN Z X, HU J, WANG J L. Biological nitrate removal using wheat straw and PLA as substrate[J]. *Environmental Technology*, 2012, 33(21): 2369-2374.
- [9] 彭书林, 赵丹. 进水pH值对PLA反硝化系统的影响[J]. *塑料工业*, 2021, 49(10): 158-162.
- [10] TAKAHASHI M, YAMADA T, TANNO M, et al. Nitrate removal efficiency and bacterial community dynamics in denitrification processes using poly (l-lactic acid) as the solid substrate[J]. *Microbes and Environments*, 2011, 26(3): 212-219.
- [11] 许明奕, 逢宇帆, 刑涛等. 聚乳酸合成方法的研究进展及市场分析[J]. *应用化工*, 2022, 51(12): 3614-3618+3624.
- [12] 夏璐, 黄鹏, 刘丹丹等. 磷钨杂多酸直接法催化合成聚乳酸[J]. *当代化工*, 2010, 39(06): 628-631.
- [13] 刘斌基. 聚乳酸的合成过程的影响因素[J]. *新疆有色金属*, 2015, 38(06): 49-51.
- [14] 杨惠兰, 张丹, 兰书焕, 等. 聚己内酯复合固体碳源的制备及其深度脱氮性能研究[J]. *环境科学学报*, 2022, 42(05): 263-273.
- [15] GAO L J, HAN F, ZHANG X W, et al. Simultaneous nitrate and dissolved organic matter removal from wastewater treatment plant effluent in a solid-phase denitrification biofilm reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 314: 123714.
- [16] 姚璐璐, 涂响, 于会彬等. 三维荧光区域积分评估城市污水中溶解性有机物去除[J]. *环境工程学报*, 2013, 7(02): 411-416.
- [17] 陈思. 生物脱氮固体碳源筛选及初步脱氮效果[D]. 重庆: 重庆大学, 2013.
- [18] 汪鲁, 刘军, 李永富, 等. 基于固态碳源的同步硝化反硝化反应器对海水养殖废水中氮的去除性能[J]. *环境工程学报*, 2022, 16(6): 2001-2009.
- [19] YANG M, WANG X N, LIU S, et al. Carbon release behaviour of polylactic acid/starch-based solid carbon and its influence on biodenitrification[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 155.
- [20] 王玥, 秦帆, 唐燕华, 等. 农业废弃物作为反硝化脱氮外加碳源的研究[J]. *林业工程学报*, 2019, 4(5): 146-151.
- [21] 孙策, 吕闪闪, 张化腾等. 聚乳酸及其复合材料降解的研究进展[J]. *塑料*, 2018, 47(6): 114-117.
- [22] 任永琳, 王达, 刘合等. 聚乳酸水解机理及水解性能改进方法研究进展[J]. *石油化工*, 2022, 51(09): 1129-1136.
- [23] 焦旗, 田广华, 杨坚, 等. 聚丙烯结晶性能研究[J]. *工程塑料应用*, 2015, 43(7): 109-113.
- [24] 樊新, 陈剑, 阮建明, 等. 聚乳酸类生物可降解材料研究进展[J]. *粉末冶金材料科学与工程*, 2008(4): 187-194.
- [25] 梁捷, 缪恒锋, 任洪艳, 等. 以聚己内酯作为生物反硝化固体碳源的研究[J]. *环境工程学报*, 2015, 9(2): 633-638.
- [26] SHEN Z Q, ZHOU Y X, WANG J L. Comparison of denitrification performance and microbial diversity using starch/polylactic acid blends and ethanol as electron donor for nitrate removal[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 131: 33-39.
- [27] VAN DEN BERG E M, BOLEIJ M, KUENEN J G, et al. DNRA and denitrification coexist over a broad range of acetate/N-NO₃(-/-) ratios, in a chemostat enrichment culture[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1842.
- [28] HU R T, ZHENG X L, ZHENG T Y, et al. Effects of carbon availability in a woody carbon source on its nitrate removal behavior in solid-phase denitrification[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 246: 832-839.
- [29] YANG Z C, SUN H M, ZHOU Q, et al. Nitrogen removal performance in pilot-scale solid-phase denitrification systems using novel biodegradable blends for treatment of waste water treatment plants effluent[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 305: 122994.
- [30] LI J, TABASSUM S. Remediation of nitrate-contaminated groundwater by a combined treatment method of novel Mass Bio System and solid organic carbon sources: In-depth study[J]. *Cleaner Engineering and Technology*, 2021, 4.
- [31] WU L N, ZHANG L Y, XU Y Y, et al. Advanced nitrogen removal using bio-refractory organics as carbon source for biological treatment of landfill leachate[J]. *Separation and Purification Technology*, 2016, 170: 306-313.
- [32] 万鹏亮, 刘玉玲, 朱妮平, 等. A2O工艺处理城市污水过程中DOM组分变化分析[J]. *西安建筑科技大学学报(自然科学版)*, 2021, 53(5): 765-772.

- [33] CHEN D, WANG H Y, YANG K, et al. Performance and microbial communities in a combined bioelectrochemical and sulfur autotrophic denitrification system at low temperature[J]. *Chemosphere*, 2018, 193: 337-342.
- [34] ZHAO J M, FENG C P, TONG S, et al. Denitrification behavior and microbial community spatial distribution inside woodchip-based solid-phase denitrification (W-SPD) bioreactor for nitrate-contaminated water treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 869-879.
- [35] MIURA Y, WATANABE Y, OKABE S, et al. Significance of Chloroflexi in performance of submerged membrane bioreactors (MBR) treating municipal wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41: 7787-7794.
- [36] FUJII N, KURODA K, NARIHIRO T, et al. Metabolic potential of the superphylum Patescibacteria reconstructed from activated sludge samples from a municipal wastewater treatment plant[J]. *Microbes and Environments*, 2022, 37 (3).
- [37] YE L, SHAO M F, ZHANG T, et al. Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing[J]. *Water Research*, 2011, 45(15): 4390-4398.
- [38] VETROVSKY T, STEFFEN K T, BALDRIAN P. Potential of cometabolic transformation of polysaccharides and lignin in lignocellulose by soil Actinobacteria[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): 89108.
- [39] 周星煜, 张金松. 活性污泥反硝化速率与功能基因活性关联分析[J/OL]. 给水排水: 1-7
2-11-24].
- [40] KRISTENSEN J M, SINGLETON C, CLEGG L A, et al. High diversity and functional potential of undescribed "Acidobacteriota" in Danish wastewater treatment plants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 643950.
- [41] 肖晶晶, 郭萍, 霍炜洁, 等. 反硝化微生物在污水脱氮中的研究及应用进展[J]. *环境科学与技术*, 2009, 32(12): 97-102.
- [42] CAO J S, ZHANG T, WU Y, et al. Correlations of nitrogen removal and core functional genera in full-scale wastewater treatment plants: influences of different treatment processes and influent characteristics[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 297: 122455.
- [43] RISSANEN A J, OJALA A, FRED T, et al. Methylophilaceae and Hyphomicrobium as target taxonomic groups in monitoring the function of methanol-fed denitrification biofilters in municipal wastewater treatment plants[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44(1): 35-47.
- [44] WANG Z Y, ZHENG M, MENG J, et al. Robust nitrification sustained by acid-tolerant ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(3): 2048-2056.
- [45] KONDROTAITE Z, VALK L C, PETRIGLIERI F, et al. Diversity and ecophysiology of the genus OLB8 and other abundant uncultured Saprospiraceae genera in global wastewater treatment systems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 917553.
- [46] ZHANG S Q, KONG Z, WANG H, et al. Enhanced nitrate removal by biochar supported nano zero-valent iron (nZVI) at biocathode in bioelectrochemical system (BES)[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 433.
- [47] SUN H M, ZHOU Q, ZHAO L, et al. Enhanced simultaneous removal of nitrate and phosphate using novel solid carbon source/zero-valent iron composite[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 289.
- [48] 张鹏程, 李晓玲, 王晓婷等. 活性污泥体系中C/N/S对硝酸盐还原过程的影响[J]. *中国环境科学*, 2021, 41(5): 2117-2122.
- [49] MARTINEAU C, MAUFFREY F, VILLEMUR R. Comparative analysis of denitrifying activities of Hyphomicrobium nitrativorans, Hyphomicrobium denitrificans, and Hyphomicrobium zavarzinii[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(15): 5003-5014.
- [50] ZHANG Y P, DOUGLAS G B, KAKSONEN A H, et al. Microbial reduction of nitrate in the presence of zero-valent iron[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 646: 1195-1203.
- [51] JIA L X, ZHOU Q, LI Y, et al. Integrated treatment of suburb diffuse pollution using large-scale multistage constructed wetlands based on novel solid carbon: nutrients removal and microbial interactions[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 326: 116709.
- [52] LEVY-BOOTH D J, NAVAS L E, FETHEROLF M M, et al. Discovery of lignin-transforming bacteria and enzymes in thermophilic environments using stable isotope probing[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(8): 1944-1956.
- [53] SUOMINEN S, VAN VLIET D M, SANCHEZ-ANDREA I, et al. Organic matter type defines the composition of active microbial communities originating from anoxic baltic sea sediments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 628301.
- [54] ZHANG L, HAO S W, WANG Y P, et al. Rapid start-up strategy of partial denitrification and microbially driven mechanism of nitrite accumulation mediated by dissolved organic matter[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125663.
- [55] HUANG X, YAO K, YU J H, et al. Nitrogen removal performance and microbial characteristics during simultaneous chemical phosphorus removal process using Fe^{3+} [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 127972.
- [56] YIN Y N, HU Y M, WANG J L. Co-fermentation of sewage sludge and lignocellulosic biomass for production of medium-chain fatty acids[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 361: 127665.

(责任编辑: 靳炜)

Heterotrophic denitrification and denitrification mechanism of polylactic acid with different molecular weight

ZHANG Yuwei^{1,2}, A Rong^{1,3}, LI Jiayi¹, LI Jie^{2,4}, LIU Xueyu¹, WEI Dongyang^{5,*}

1. Department of Urban Water Environmental Research, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China; 2. Department of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China; 3. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China; 4. Gansu Membrane Science and Technology Research Institute Co, Ltd, Lanzhou 730020, China; 5. Environmental Development Center, Ministry of Ecology and Environment, Beijing 100029, China

*Corresponding author, E-mail: waterwdy@163.com

Abstract Polylactic acid (PLA) is a kind of denitrification solid carbon source with great potential. In order to explore the denitrification pathway and mechanism of PLA with different molecular weights, the static carbon release performance and denitrification efficiency of PLA with different molecular weights were studied, and the effluent of dissolved organic matter (DOM) components and the microbial community structure were analyzed. The results showed that PLA carbon release performance was stable, and the effluent COD concentration in both deionized water and nitrogen removal reactors could be stabilized at $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The lower the molecular weight of PLA was, the better the nitrogen removal efficiency was. The NO_3^- -N removal rate and denitrification rate of $5\ 000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ molecular weight PLA reached 100% and $1.29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. There were two pathway for PLA denitrification, one was that denitrifying bacteria used the small molecule weight carbon source released by hydrolyzed microorganisms PLA as electron donor for heterotrophic denitrification, the other one was that microorganisms used organic matter such as dissolved microbial metabolites for denitrification. The research results can provide a theoretical basis for the efficient application of PLA as solid carbon source in denitrification process.

Keywords solid carbon source; polylactic acid; heterotrophic denitrification; three-dimensional fluorescence spectroscopy; microbial community structure