

DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2025.04.007

异养菌强化下的黄铁矿基自养反硝化系统脱氮效果及机理

赵联芳^{1,2}, 禹颖^{1,2}, 薛柳莹^{1,2}, 王莉^{1,2}

(1. 河海大学浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 江苏 南京 210098; 2. 河海大学环境学院, 江苏 南京 210098)

摘要: 针对黄铁矿基铁自养反硝化与硫自养反硝化脱氮对比研究不足、脱氮效率较低的问题, 以黄铁矿作为硫自养和铁自养反硝化电子供体, 对比研究其对低碳氮比(C/N)污水的脱氮效果及异养菌的强化作用机制。结果表明, 黄铁矿基铁自养反硝化系统的脱氮性能高于硫自养反硝化系统, 且添加适量异养菌能够强化脱氮效果; 当异养污泥与自养污泥的体积比为 1:1 时, 相同进水条件下黄铁矿基铁自养系统 48 h 的出水 TN 和 NO_3^- -N 质量浓度分别为 0.26、0 mg/L, 显著低于黄铁矿基硫自养系统(3.94、2.61 mg/L); *Thermomonas*、*Geothrix*、*Ferritrophicum*、*Acidovorax*、*Pseudomonas*、*Brachymonas* 等脱氮菌属均能利用还原态铁作为电子供体参与反硝化脱氮, 在黄铁矿基铁自养反硝化系统中的相对丰度均高于黄铁矿基硫自养反硝化系统; 向系统中添加异养污泥可引入异养反硝化菌 *Thauera*, 与硫自养菌相比, 铁自养菌能与异养菌发挥更好的协同反硝化脱氮作用。

关键词: 黄铁矿; 铁自养反硝化; 硫自养反硝化; 异养菌; 低 C/N 污水

中图分类号: X703

文献标志码: A

文章编号: 1000-1980(2025)04-0056-09

Effects and mechanisms of nitrogen removal in pyrite-based autotrophic denitrification system enhanced by heterotrophic bacteria

ZHAO Lianfang^{1,2}, YU Ying^{1,2}, XUE Liuying^{1,2}, WANG Li^{1,2}

(1. Key Laboratory of Integrated Regulation and Resource Development on Shallow Lakes, Ministry of Education, Hohai University, Nanjing 210098, China;

2. College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: In view of the limited comparative research of pyrite-based iron autotrophic denitrification and sulfur autotrophic denitrification and low efficiency in nitrogen removal, pyrite was utilized as an electron donor for both sulfur autotrophic denitrification and iron autotrophic denitrification. Moreover, their performance in removing nitrogen from wastewater with a low carbon/nitrogen ratio (C/N) and the enhancement mechanisms involving heterotrophic bacteria were compared and investigated. The results show that the pyrite-based iron autotrophic denitrification system achieves higher nitrogen removal efficiency than the sulfur autotrophic denitrification system, and adding an appropriate amount of heterotrophic bacteria can enhance the nitrogen removal effect. At a heterotrophic-to-autotrophic sludge volume ratio of 1:1, the pyrite-based iron autotrophic denitrification system yields effluent TN and NO_3^- -N concentrations of 0.26 and 0 mg/L after 48 h, which were significantly lower than those of the sulfur autotrophic denitrification system (3.94 and 2.61 mg/L) under identical influent conditions. *Thermomonas*, *Geothrix*, *Ferritrophicum*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, *Brachymonas*, and other denitrifying bacteria can use reduced iron as an electron donor to participate in denitrification, and their relative abundance in the pyrite-based iron autotrophic denitrification system is all higher than that in the sulfur autotrophic denitrification system. Furthermore, the addition of heterotrophic sludge into the system can introduce *Thauera*. Compared with sulfur autotrophic bacteria, iron autotrophic bacteria and heterotrophic bacteria can exert a better synergistic denitrification and nitrogen removal effect.

Key words: pyrite; iron autotrophic denitrification; sulfur autotrophic denitrification; heterotrophic bacterium; wastewater with low C/N

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFC3202702, 2023YFC3208004)

作者简介: 赵联芳(1972—), 女, 副教授, 博士, 主要从事水体污染控制与生态修复技术研究。E-mail: lfzhao@hhu.edu.cn

引用本文: 赵联芳, 禹颖, 薛柳莹, 等. 异养菌强化下的黄铁矿基自养反硝化系统脱氮效果及机理[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2025, 53(4): 56-64.

ZHAO Lianfang, YU Ying, XUE Liuying, et al. Effects and mechanisms of nitrogen removal in pyrite-based autotrophic denitrification system enhanced by heterotrophic bacteria [J]. Journal of Hohai University(Natural Sciences), 2025, 53(4): 56-64.

污水中大量的氮排放至水体中会引起富营养化,威胁受纳水体的生态安全^[1-3]。传统的生物脱氮技术需要足够的有机碳源保证生物反硝化过程的顺利进行,如何提高低碳氮比(C/N)污水的脱氮效能是目前生物脱氮技术的难点和热点。自养反硝化不需要添加额外的有机碳,具有运行成本低、二次污染少、污泥产量少等优点^[4],受到越来越多的关注。黄铁矿是地壳中储量最丰富的矿物之一,其主要成分是FeS₂,理论上可以提供还原态硫和还原态铁用于自养反硝化^[5-6]。近年来,黄铁矿作为有机碳源的可代替电子供体被逐渐应用于自养反硝化的研究^[7]。

目前,关于黄铁矿自养反硝化的研究多是将其作为硫源进行研究:Pang等^[7]以黄铁矿为唯一电子供体,将经Na₂S₂O₃驯化培养后的沉积物接种入系统,研究其自养反硝化脱氮机理;周娅等^[8]的研究表明,黄铁矿的自养反硝化较单质硫能减少碱度消耗和硫酸盐产生。黄铁矿作为铁源用于铁自养菌介导的自养反硝化研究目前还较少,Zhao等^[4,9]的研究表明,基于黄铁矿的铁自养反硝化是可行的,但缺乏基于黄铁矿的硫自养反硝化与铁自养反硝化脱氮的对比研究。虽然自养反硝化具有无需外加有机碳源的优点,但其启动时间长、脱氮效率低^[10]的缺点制约了其应用。Wang等^[11-12]的研究表明,异养反硝化菌可以与自养反硝化菌协同共生,且异养菌对自养反硝化系统的脱氮具有强化作用。目前,关于异养菌对黄铁矿基自养反硝化系统脱氮效果影响的研究较少。虽然异养菌可以强化黄铁矿基铁自养反硝化脱氮效果^[4],但异养菌对黄铁矿硫自养与铁自养反硝化系统脱氮效果的强化有何区别尚需进一步探讨。

本文以黄铁矿为自养反硝化电子供体,以低C/N污水中少量的碳源作为异养反硝化电子供体,将异养菌作为生物强化剂与自养菌混合,启动异养-自养反硝化系统,比较黄铁矿基铁自养反硝化和硫自养反硝化的脱氮性能,分析异养菌对脱氮效果的强化作用,同时根据矿石表面微生物形貌和元素含量变化及各系统中脱氮功能微生物种群的特点分析异养菌强化脱氮的机理。

1 材料与方法

1.1 污泥驯化

本文所用活性污泥取自南京QB污水处理厂。将污泥分为异养反硝化污泥、铁自养反硝化污泥和硫自养反硝化污泥,分别加入培养液。异养反硝化菌培养液^[13]组成如下:CH₃COONa、KNO₃、NH₄Cl、KH₂PO₄、FeSO₄·7H₂O、MgSO₄·7H₂O的质量浓度分别为2.730、0.870、0.306、0.149、0.006、0.100 g/L;铁自养反硝化菌培养液^[14]组成如下:FeSO₄·7H₂O、KNO₃、NH₄Cl、KH₂PO₄、NaHCO₃、CaCl₂·2H₂O、MgSO₄·7H₂O的质量浓度分别为6.000、0.870、0.227、0.250、2.500、0.010、0.500 g/L;硫自养反硝化菌^[15]培养液组成如下:Na₂S₂O₃·5H₂O、KNO₃、NaHCO₃、NH₄Cl、KH₂PO₄、CaCl₂·2H₂O、FeSO₄·7H₂O、MgSO₄·7H₂O的质量分数分别为2.500、0.870、2.500、0.500、2.000、0.006、0.007、0.800 g/L。

培养液用NaHCO₃和(1+9)HCl调节pH为7.0±0.2,并通入高纯氩气(纯度大于等于99.999%)20 min去除溶解氧。驯化过程持续1月,2 d更换一次培养液。驯化后期,检测到异养反硝化污泥、铁自养反硝化污泥和硫自养反硝化污泥的NO₃⁻-N去除率分别为93.67%±2.91%、90.32%±3.27%和90.44%±1.37%,可视作驯化完成。驯化完成的各污泥质量浓度分别为13.7、18.0、14.9 g/L。对驯化完成的污泥进行处理,使得各浓度都为4 g/L后再按相应体积比加入到各系统中。

1.2 试验进水

进水采用人工配水,其中微量元素储备液的用量为1 mL/L。COD来源为CH₃COONa,NO₃⁻-N来源为KNO₃。综合考虑实际、试验目的,并参照前人研究^[16],进水COD质量浓度固定为10 mg/L,进水C/N为0.5。合成废水和微量元素组成见表1。

1.3 试验方案

为对比研究不同投加量异养菌对黄铁矿基自养反硝化脱氮效果的影响,污泥驯化完成后,取用不同比例的异养污泥和铁、硫自养污泥混合放入装填相同质量黄铁矿

(粒径为3~8 mm)的厌氧瓶中。试验所用黄铁矿购自河南豫中新材料有限公司。各试验组名称及异养污泥

表 1 合成废水和微量元素组成
Table 1 Composition of synthetic wastewater and trace element

合成废水		微量元素	
物质	质量浓度/(g/L)	物质	质量浓度/(g/L)
CH ₃ COONa	0.013	EDTA	3.000
KNO ₃	0.144	ZnCl ₂	0.070
NaHCO ₃	2.500	MnCl ₂ ·2H ₂ O	0.500
KH ₂ PO ₄	0.088	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.190
CaCl ₂	0.008	H ₃ BO ₃	0.010
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.010	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.040
		NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.020
		CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.020

和铁、硫自养污泥具体比例和体积见表 2。试验装置如图 1 所示。

表 2 试验方案

Table 2 Experiment scheme

组名	黄铁矿/g	硫自养污泥/mL	铁自养污泥/mL	异养污泥/mL	异养污泥与自养污泥的体积比
C	100	0	0	0	0
H	100	0	0	100	1 : 0
F	100	0	100	0	0 : 1
S	100	100	0	0	0 : 1
FH1	100	0	100	25	0.25 : 1
FH2	100	0	100	50	0.50 : 1
FH3	100	0	100	100	1 : 1
FH4	100	0	100	125	1.25 : 1
SH1	100	100	0	25	0.25 : 1
SH2	100	100	0	50	0.50 : 1
SH3	100	100	0	100	1 : 1
SH4	100	100	0	125	1.25 : 1

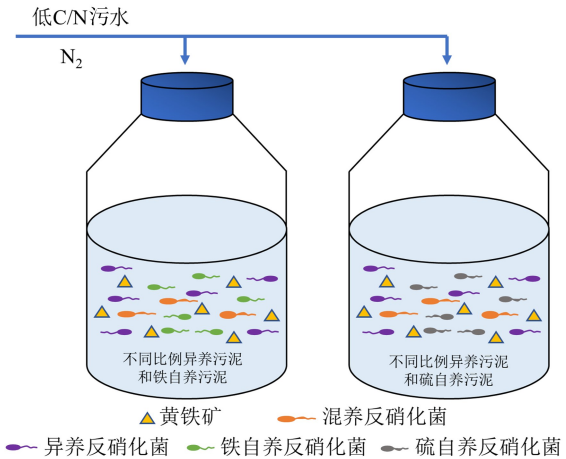


图 1 试验装置示意图

Fig. 1 Experimental setup

进水用 NaHCO_3 和 $(1+9)\text{HCl}$ 调节 pH 为 7.0 ± 0.2 , 并通入高纯氮气 20 min 以去除溶解氧, 后将厌氧瓶密封放置于黑暗恒温摇床中, 温度为 30°C , 转速为 140 r/min。在 0、4、8、12、24、36、48 h 分别进行取样, 测定 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 及 TN 的质量浓度。

为研究异养菌强化下的黄铁矿基自养反硝化脱氮效果的长效性, 以自养污泥与异养污泥体积比为 1 : 1 的系统进行研究, 试验共持续 60 d。控制进水 C/N 为 0.5、进水 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 质量浓度为 20 mg/L、水力停留时间 (HRT) 为 48 h、初始 pH 为 7.0、温度为 30°C , 检测各系统 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、TN 的质量浓度等水质指标。

1.4 采样与分析

取水样前, 使反应器停止振荡并沉淀 20 min。所取水样使用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 水系滤膜进行过滤, 根据标准检测方法^[17]测定 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 、TN、 Fe^{3+} 的质量浓度等水质指标。

污染物去除率 R 、体积去除效率 V_{RR} 分别为

$$R = \frac{\rho_i - \rho_e}{\rho_i} \times 100\%$$

(1)

$$V_{\text{RR}} = (\rho_i - \rho_e) V_i / Vt$$

(2)

式中: ρ_i 为进水中污染物质量浓度; ρ_e 为出水中污染物质量浓度; V_i 为进水量; V 为反应器有效容积; t 为反应时间。

SO_4^{2-} 通过离子色谱仪 (ICS-2100, Dionex, USA) 进行测定, TOC 通过 TOC 仪 (V CPN, Shimadzu, Japan) 进行测定。试验结束后, 从各系统中取出黄铁矿, 喷金后用 SEM (Quanta FEG 250, USA) 技术观察和分析矿石表面微生物的形貌特点, 并通过 EDS 分析矿石表面元素含量变化, 各系统均选定相同元素进行 EDS 分析, 元素含量为质量分数。

1.5 高通量测序分析和环境因子的 RDA 分析

在长期试验中, 在第 8、34、60 天分别采集各系统的污泥样品, 采用 CTAB/SDS 法提取样本基因组 DNA, 所得 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。初检合格的 DNA 将其原始样品送至上海凌恩生物科技有限公司进行 V3-V4 变量区的高通量测序。

选用运行第 8、34、60 天时的 TN 去除率、TOC 去除率、 Fe^{3+} 产生量和 SO_4^{2-} 产生量这 4 个环境因子和系统中 top15 的微生物优势菌属进行 RDA 分析。

2 结果与分析

2.1 异养菌对黄铁矿基自养反硝化系统脱氮效果的影响

由表 3 可知, 仅添加铁自养污泥的 F 组 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 和 TN 体积去除效率比仅添加硫自养污泥的 S 组高。随异养菌投加量的增大, 两系统的脱氮效率均提高, 且 FH 组的脱氮效率总是高于 SH 组。当自养污泥与异养

污泥体积比为 1 : 1 时,脱氮效率均达到最高,与陈一帆等^[18-19]的研究结果相近。此外,当异养污泥与自养污泥体积比大于等于 1 时,FH 组与 SH 组 TN 体积去除率的差值比两者 NO₃⁻-N 体积去除率的差值大,而异养污泥与自养污泥体积比小于 1 时则相反,表明异养菌的添加对两系统氮转化过程的影响不同。为分析这种差异,图 2 给出了异养污泥与自养污泥体积比为 0.5 : 1、1 : 1 和 1.25 : 1 时及 3 个纯污泥对照组的氮转化过程。

由图 2 可知,各试验组氮转化过程明显不同。当异养菌投加量较少时(图 2(a)),FH2 组的 NO₃⁻-N 质量浓度随时间持续快速下降,至 48 h 时降至 3.32 mg/L,显著低于 SH2 组(6.12 mg/L),但由于生成了较高质量浓度的 NO₂⁻-N,仅使 FH2 组的 TN 体积去除效率(5.76 g/(m³·d))略高于 SH2 组(4.90 g/(m³·d))。当异养菌投加量较多时(图 2(b)(c)),FH 组 NO₃⁻-N 质量浓度快速下降而 SH 组下降缓慢,FH3 组和 FH4 组 NO₃⁻-N 浓度在 24 h 分别降为 0、0.33 mg/L,而 SH3 和 SH4 组至 48 h 才分别降至 2.61、2.48 mg/L。且与异养菌投加量较少时系统中 NO₂⁻-N 质量浓度几乎不变的情况不同,此条件下 FH 和 SH 组中生成的 NO₂⁻-N 质量浓度达到峰值后均缓慢下降,试验结束时 FH 组的 NO₂⁻-N 质量浓度比 SH 组低,从而使 FH 和 SH 组 TN 体积去除效率的差值高于二者 NO₃⁻-N 体积去除效率差值。一般认为,反硝化过程分为两步,第一步是由 NO₃⁻-N 还原为 NO₂⁻-N,第二步是由 NO₂⁻-N 还原为 N₂。在自养反硝化过程中,第一步的反应速率大于第二步的反应速率^[20],从而导致 NO₂⁻-N 的积累,而异养反硝化则相反,不会导致 NO₂⁻-N 的积累。综上,适量的异养菌对铁自养菌 NO₃⁻-N 还原为 NO₂⁻-N 及 NO₂⁻-N 进一步转化的强化效果均高于对硫自养菌的效果,异养菌和铁自养菌能发挥更好的反硝化协同作用,表现出更高的 TN 体积去除效率。

表 3 异养菌对黄铁矿基铁自养和硫自养反硝化系统 NO₃⁻-N 和 TN 体积去除效率的影响

Table 3 Influence of heterotrophic bacteria on volumetric removal efficiency of NO₃⁻-N and TN in pyrite-based iron and sulfur autotrophic denitrification systems

组名	$V_{RR}/(g/(m^3 \cdot d))$	
	NO ₃ ⁻ -N	TN
H	2.64±0.28	2.47±0.26
F	5.22±0.26	3.65±0.30
S	3.78±0.30	2.86±0.30
FH1	5.77±0.16	4.03±0.18
FH2	7.68±0.32	5.76±0.30
FH3	8.88±0.20	8.87±0.25
FH4	8.64±0.30	8.46±0.30
SH1	4.89±0.32	3.91±0.35
SH2	6.23±0.24	4.90±0.28
SH3	7.19±0.25	6.58±0.26
SH4	7.02±0.36	6.24±0.32

与异养菌投加量较少时系统中 NO₂⁻-N 质量浓度几乎不变的情况不同,此条件下 FH 和 SH 组中生成的 NO₂⁻-N 质量浓度达到峰值后均缓慢下降,试验结束时 FH 组的 NO₂⁻-N 质量浓度比 SH 组低,从而使 FH 和 SH 组 TN 体积去除效率的差值高于二者 NO₃⁻-N 体积去除效率差值。一般认为,反硝化过程分为两步,第一步是由 NO₃⁻-N 还原为 NO₂⁻-N,第二步是由 NO₂⁻-N 还原为 N₂。在自养反硝化过程中,第一步的反应速率大于第二步的反应速率^[20],从而导致 NO₂⁻-N 的积累,而异养反硝化则相反,不会导致 NO₂⁻-N 的积累。综上,适量的异养菌对铁自养菌 NO₃⁻-N 还原为 NO₂⁻-N 及 NO₂⁻-N 进一步转化的强化效果均高于对硫自养菌的效果,异养菌和铁自养菌能发挥更好的反硝化协同作用,表现出更高的 TN 体积去除效率。

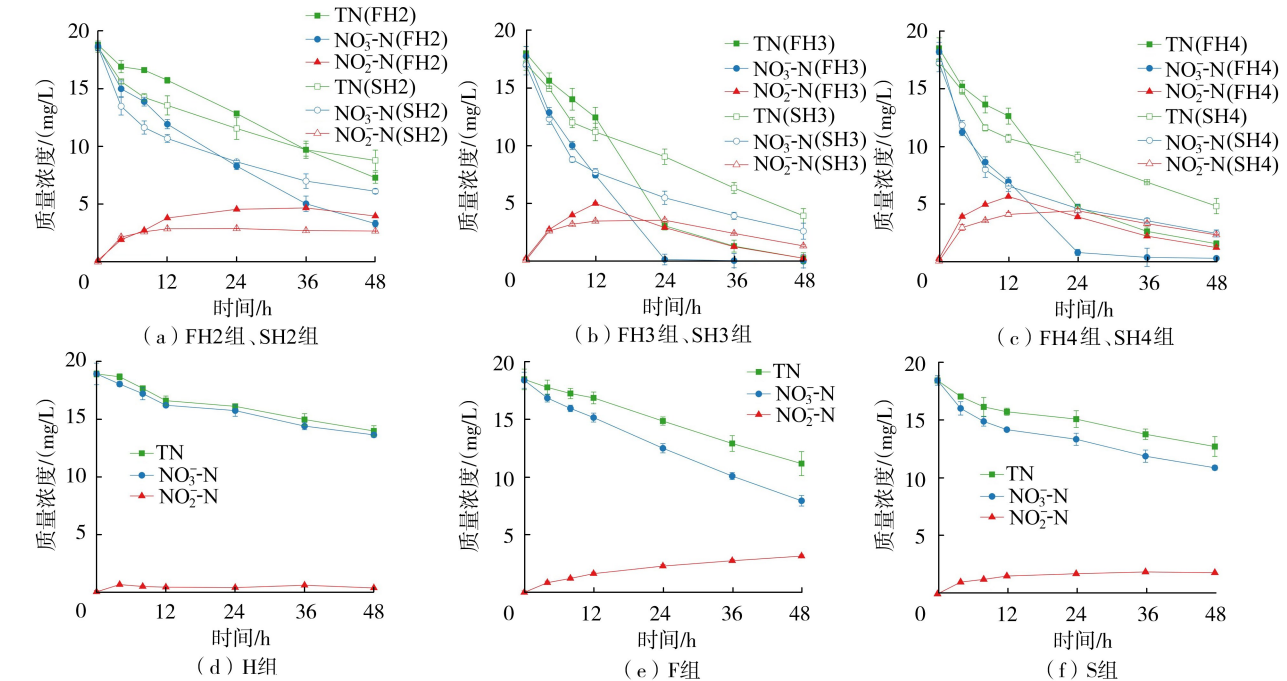


图 2 各试验组中氮转化过程

Fig. 2 Nitrogen transformation in each experimental group

硝酸盐反硝化和硝酸盐异化还原为铵(DNRA)是 2 种相互竞争的硝酸盐还原途径。在使用有机碳源作

为电子供体时,硝酸盐还原主要是通过反硝化,而在以铁或硫作为电子供体时 DNRA 发生率会增加^[21]。本文各试验组均未检测到 $\text{NH}_4^+\text{-N}$,表明没有明显的 DNRA 反应发生,硝酸盐还原主要是通过反硝化途径,这可能是因为本文试验采用的 C/N 过低限制了 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的产生^[22-23]。

为进一步了解异养菌对系统强化效果的长期性,对异养污泥与自养污泥体积比为 1 : 1 时的 FH3 与 SH3 组进行为期 60 d 的试验,并以 H、F 和 S 组为对照,结果如图 3 所示。

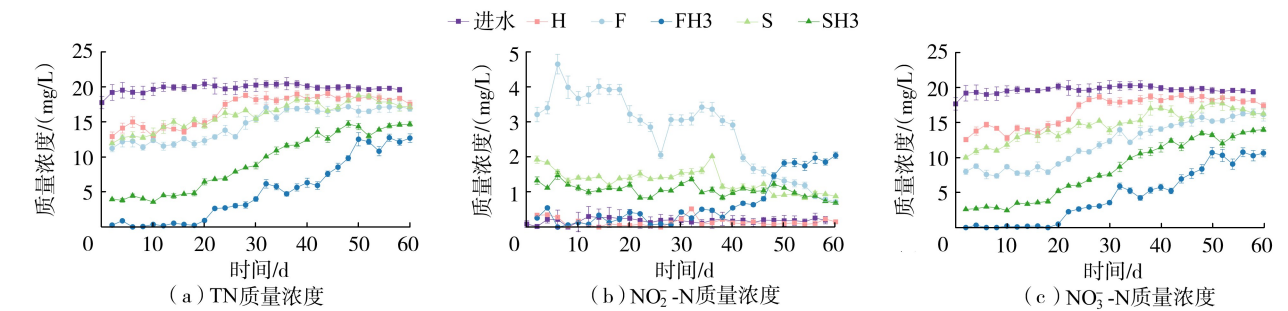


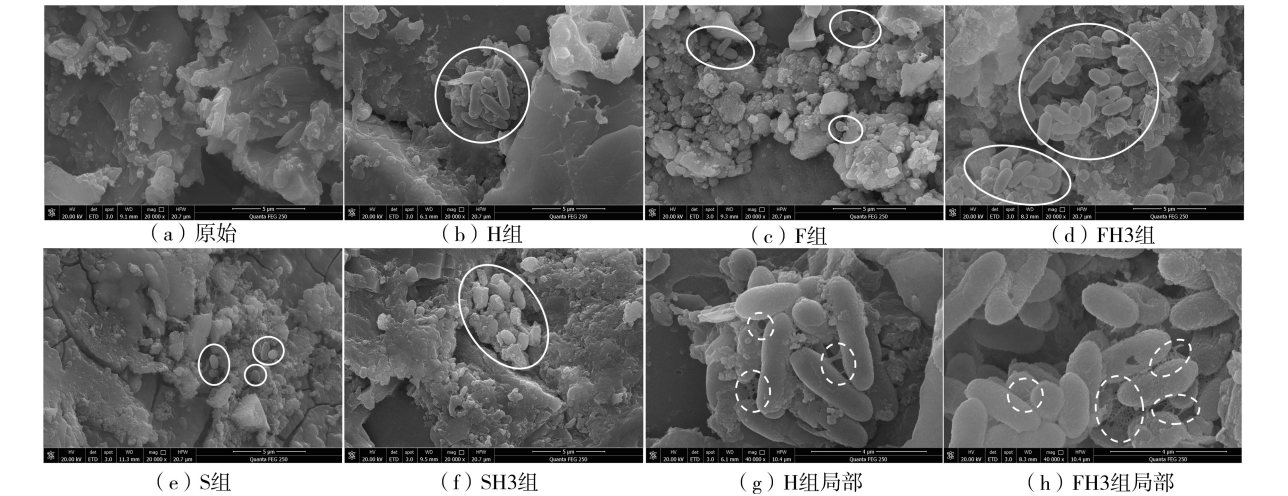
图 3 各试验组长期进水、出水中氮质量浓度变化

Fig. 3 Long-term changes in nitrogen concentration in influent and effluent of each experimental group

由图 3(a)可知,各试验组出水 TN 质量浓度均随时间逐渐上升,异养菌强化下的 FH3、SH3 组出水均较 H、F、S 组的低,表明投加适量异养菌对自养反硝化系统脱氮的强化具有一定的长效性。此外 FH3 组出水 TN 质量浓度一直低于 SH3 组,但从第 50 天开始,两者差距降低。由图 3(b)可知,从第 40 天开始,FH3 组出水 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 质量浓度快速上升,至第 50 天, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 质量浓度为 5 个试验组中最高,系统中发生了 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 积累。且由图 3(c)可知,从第 50 天开始,FH3、SH3 组出水 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 质量浓度差距降低。表明随着运行时间的延长,反硝化微生物的活性降低或死亡,造成异养菌与铁自养菌的协同反硝化作用下降,也意味着在极低的 C/N 进水条件下,仅依靠启动期投加异养菌强化脱氮长效性较为有限。

2.2 矿石表面的微生物形貌和元素含量变化

由图 4 可知,原始矿石呈现出矿石的典型微观形貌,没有观察到任何微生物,而添加污泥后的各试验组中矿石表面均出现了微生物附着,形态主要为球状和杆状。H 组、FH3 组和 SH3 组的微生物都呈现成堆聚集的状态,而 S 组和 F 组的微生物却较为分散,未出现明显富集成堆现象,且微生物外形较小、丰度较低,这种差异可能是由于加入异养菌强化后带来的效果。营养充足的异养菌能分泌出较多具有黏性的 EPS^[24],这些黏性物质可以使微生物聚集成团、联系紧密。在 H 组和 FH3 组的微生物局部放大图(图 4(g)(h))中,可以看到微生物间存在黏性丝状物,推测 FH3 组中看到的黏性物质为 EPS,EPS 将异养菌和铁自养菌一起黏附在矿石表面,增加了微生物细胞与矿石的直接接触^[25],有助于增强微生物的反硝化效率。而在 SH3 组中



注:实线圈内为微生物,虚线圈内为黏性物质。

图 4 原始铁矿石和各试验组中铁矿石表面 SEM 图

Fig. 4 Surface SEM images of raw pyrite and pyrite in each experimental group

未能观察到此类黏性物质,可能是因为酸碱度、Fe³⁺离子质量浓度、营养物质质量浓度等影响了 EPS 的含量和成分^[26-27],从而导致 EPS 在 SH3 组中的表达有差异;也有可能是因为随着运行时间的延长,SH3 组中异养菌分泌的 EPS 逐渐消失,不易被观察到,具体原因尚需后续进一步研究。

由表 4 可知,与原始铁矿石相比,其余各组运行 60 d 后铁矿石表面的 Fe 元素和 S 元素的含量(质量分数,下同)都有所下降。其中,F 组和 FH3 组铁矿石表面 Fe 元素下降最多,S 组和 SH3 组中铁矿石 S 元素下降最多,表明 F 组和 FH3 组中的自养反硝化主要利用黄铁矿中的 Fe 作为电子供体,S 组和 SH3 组中的自养反硝化主要利用黄铁矿中的 S 元素作为电子供体。H 组铁矿石表面 Fe 元素和 S 元素含量略有降低,可能是 H 组中存在少量兼养微生物能够利用还原态 Fe 和 S 作为电子供体。值得注意的是,由于铁矿石表面的 Fe 元素和 S 元素在系统运行过程中被不断消耗,电子供体供应量的减少会造成系统长期脱氮效率的降低。

表 4 原始矿石和各试验组中矿石表面元素质量分数
Table 4 Surface elemental composition of raw pyrite and pyrite in each experimental group

组名	元素质量分数/%										
	C	O	Na	Mg	Al	Si	P	S	K	Ca	Fe
原始	4.02	15.56	—	—	—	0.96	5.77	33.85	—	1.17	38.68
H	1.50	30.48	2.57	0.25	0.19	0.09	5.66	20.83	0.35	2.03	36.05
F	1.02	48.68	—	5.02	—	0.57	3.51	16.03	—	20.83	4.33
FH3	0.00	34.54	—	3.25	—	0.36	3.37	20.83	—	24.56	13.07
S	0.80	48.76	3.03	7.88	3.05	4.76	5.62	0.55	0.87	11.40	13.29
SH3	3.59	43.18	—	9.40	—	0.44	4.24	6.41	—	11.73	21.02

注:“—”表示未检出。

2.3 功能微生物作用分析

各组在启动阶段添加的微生物不同,随着运行时间的延长,微生物群落结构发生演替,进而影响氮的去除及 C、Fe 和 S 等电子供体的利用。图 5 列出了各组在不同运行阶段(第 8、34、60 天,H-8 代表 H 组运行的第 8 天)属水平的微生物群落聚类热图,图 6 为各组中 top15 的微生物优势菌属与 TN 去除率、TOC 去除率、Fe³⁺产生量和 SO₄²⁻产生量的 RDA 分析结果。

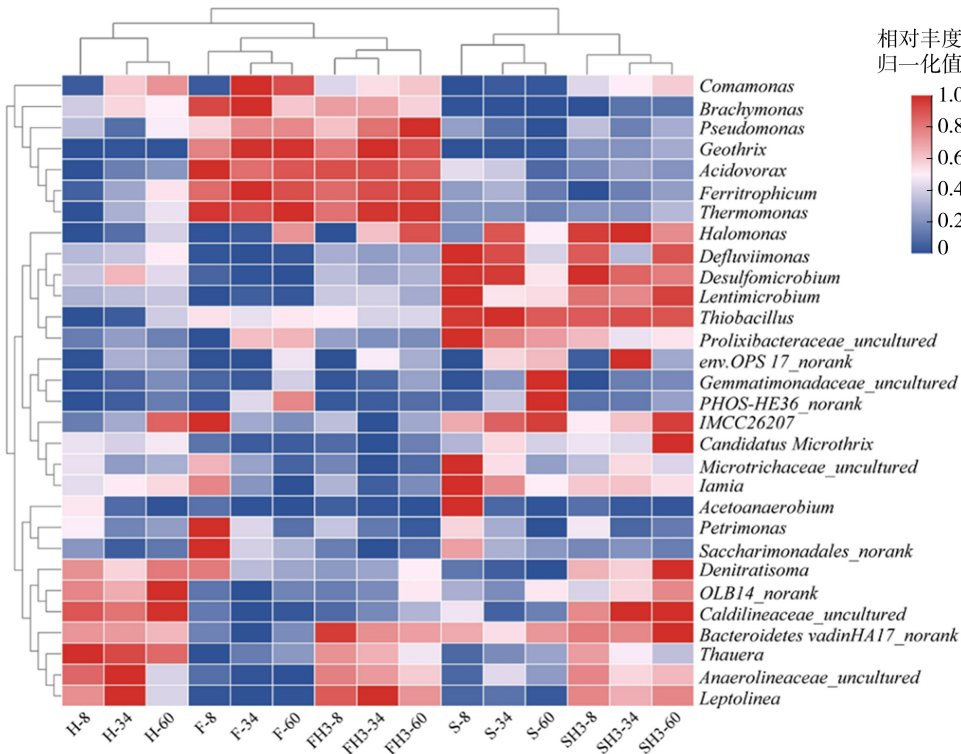
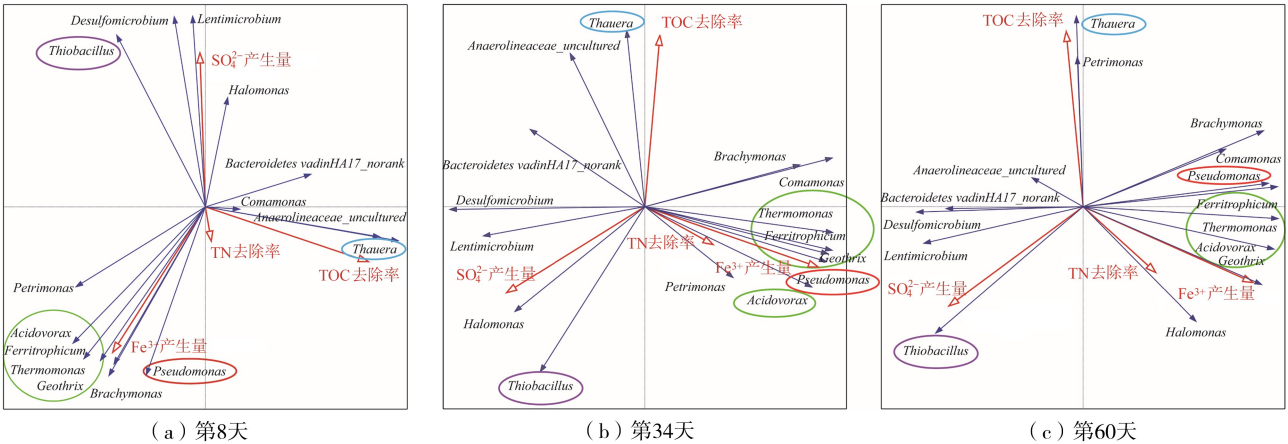


图 5 微生物属水平聚类热图

Fig. 5 Heat map of microbial genus level clustering



注：蓝圈、绿圈、紫圈、红圈中分别为异养反硝化菌、铁自养反硝化菌、硫自养反硝化菌、混养反硝化菌。

图 6 微生物与环境因子的 RDA 分析

Fig. 6 RDA of microbes and environmental factors

由图 5 可知,各微生物群落在各试验组不同时段具有很高的相似性,但各试验组间差距较大,说明启动时系统中的优势微生物对后续影响深远。*Thauera* 是典型的异养反硝化菌属^[28],在 H 组中的相对丰度高达 17.2% 以上,在 FH3 组和 SH3 组中均为优势菌属,相对丰度分别为 6.5%~13.3% 和 4.7%~12.4%,明显高于 F 组和 S 组(F 组为 1.6%~3.3%,S 组为 2.0%~3.6%)。由图 6(a) 可知,运行初期(第 8 天) *Thauera* 与 TN、TOC 去除率之间的夹角为锐角,说明其与 TN、TOC 去除率呈正相关关系,其对系统中有机碳源的消耗主要用于脱氮反硝化,这可能是前述混养反硝化系统的脱氮性能高于单纯自养反硝化系统的主要原因。随着反应的进行,长期低碳源进水条件下,FH3 组和 SH3 组中 *Thauera* 的相对丰度逐渐下降,其与 TN 去除率之间呈钝角关系,可能因为此阶段 TN 的去除主要是自养菌发挥作用。

Thiobacillus 是一种能够利用还原态硫的自养反硝化菌属^[29],它能够以黄铁矿作为电子供体还原硝酸盐^[30]。本文中,*Thiobacillus* 是 S 组和 SH3 组中的优势菌属,相对丰度分别为 9.2%~11.7% 和 9.1%~10.0%,在 F 组和 FH3 组中相对丰度较低,分别为 2.2%~3.1% 和 1.9%~2.8%。整个试验过程中,*Thiobacillus* 与 SO_4^{2-} 的生成都呈正相关关系(图 6),但是 SO_4^{2-} 的生成与大多数优势菌属呈负相关关系,这可能是由于硫酸盐积累会对微生物的生长代谢有不利影响^[31],进而可能影响系统的脱氮效率。

Thermomonas、*Ferritrophicum*、*Geothrix* 都是与硝酸盐还原铁(Ⅱ)氧化相关的菌属^[32-34],是 F 组和 FH3 组中的优势菌种,相对丰度范围 5.2%~9.8%,在 S 组、SH3 组中的相对丰度低。*Acidovorax* 和 *Pseudomonas* 是可利用有机碳源^[35-36]、还原态铁^[37-38]和还原态硫^[39]的兼养微生物,在 F 组及 FH3 组中的相对丰度高于其他组。*Brachymonas*、*Petrimonas*、*Comamonas* 都具有脱氮功能,在各试验组中均有分布,其中 *Brachymonas* 在 F 组和 FH3 组的相对丰度(3.2% 以上)高于其在 S 组及 SH3 组中的相对丰度(0.3% 以下)。由图 6 可知,*Thermomonas*、*Geothrix*、*Ferritrophicum*、*Acidovorax*、*Pseudomonas*、*Brachymonas* 等菌属均与 Fe^{3+} 生成和 TN 去除率呈正相关关系,表明它们能利用系统中的还原态铁作为电子供体用于 TN 的去除,这些菌属在 F 组和 FH3 组中的相对丰度均高于 S 组和 SH3 组,这可能是 F 组和 FH3 组的 TN 去除效果高于 S 组和 SH3 组的主要原因之一。

3 结 论

a. 无论是否添加异养菌,黄铁矿基铁自养反硝化系统的脱氮性能均高于黄铁矿基硫自养反硝化系统;适量异养菌的添加对黄铁矿基铁自养反硝化系统脱氮性能的强化效果高于黄铁矿基硫自养反硝化系统。当异养污泥与自养污泥体积比为 1 : 1 时,铁自养系统的 TN 和 NO_3^- -N 体积去除效率分别为 8.87、8.88 g/($\text{m}^3 \cdot \text{d}$),高于硫自养系统(6.58、7.19 g/($\text{m}^3 \cdot \text{d}$));长期运行过程中,各试验组的脱氮性能都有所下降,但铁自养系统脱氮效果仍优于硫自养系统。

b. SEM 结果表明异养-铁自养系统中存在黏性物质,微生物聚集成团、联系紧密;EDS 结果表明随着试验运行,黄铁矿石表面的 Fe、S 元素减少,添加铁自养反硝化污泥的黄铁矿主要提供还原态铁作电子供体,添

加硫自养反硝化污泥的黄铁矿主要提供还原态硫作电子供体。

c. 黄铁矿基铁自养反硝化系统中 *Thermomonas*、*Geothrix*、*Ferritrophicum*、*Acidovorax*、*Pseudomonas*、*Brachymonas* 等脱氮菌属的相对丰度均高于硫自养反硝化系统;添加异养菌可向黄铁矿基自养反硝化系统中引入相对丰度较高的异养反硝化菌 *Thauera*,与自养菌协同反硝化脱氮,但随运行时间增加 *Thauera* 的相对丰度会逐渐下降。

参考文献:

[1] 蔡奕,邢婧文,阮西科,等. 河流潜流带氮素迁移转化数值模拟研究进展[J]. 水资源保护,2023,39(1):181-189. (CAI Yi, XING Jingwen, RUAN Xike, et al. Advances in the numerical simulation of the migration and transformation of nitrogen in hyporheic zones of rivers[J]. Water Resources Protection,2023,39(1):181-189. (in Chinese))

[2] 王锦旗,宋玉芝,薛艳. 气候变化诱导水体富营养化研究进展[J]. 水资源保护,2022,38(4):145-155. (WANG Jinqi, SONG Yuzhi, XUE Yan. Research progress of water eutrophication induced by climate change[J]. Water Resources Protection,2022,38(4):145-155. (in Chinese))

[3] 沈春颖,张宗亮,王铭明,等. 异龙湖流域水源污染调查及原位降氮关键技术研究[J]. 水利水电科技进展,2024,44(6):71-78. (SHEN Chunying, ZHANG Zongliang, WANG Mingming, et al. Investigation of water source pollution and key technologies for in-situ nitrogen reduction in Yilong Lake[J]. Advances in Science and Technology of Water Resources,2024,44(6):71-78. (in Chinese))

[4] ZHAO Lianfang, XUE Liuying, WANG Li, et al. Simultaneous heterotrophic and FeS₂-based ferrous autotrophic denitrification process for low-C/N ratio wastewater treatment: nitrate removal performance and microbial community analysis[J]. Science of the Total Environment,2022,829:154682.

[5] 路青,刘宏雁,郑博英,等. 硫自养反硝化的污水脱氮技术研究[J]. 环境工程,2023,41(增刊2):60-61. (LU Qing, LIU Hongyan, ZHENG Boying, et al. Research on sewage denitrification technology based on sulfur autotrophic denitrification[J]. Environmental Engineering,2023,41(Sup2):60-61. (in Chinese))

[6] CARBONI M F, ARRIAGA S, LENS P N L. Simultaneous nitrification and autotrophic denitrification in fluidized bed reactors using pyrite and elemental sulfur as electron donors[J]. Water Science and Engineering,2023,16(2):143-153.

[7] PANG Yunmeng, WANG Jianlong. Insight into the mechanism of chemoautotrophic denitrification using pyrite (FeS₂) as electron donor[J]. Bioresource Technology,2020,318:124105.

[8] 周娅,买文宁,梁家伟,等. 硫磺/硫铁矿自养反硝化系统脱氮性能[J]. 环境科学,2019,40(4):1885-1891. (ZHOU Ya, MAI Wenning, LIANG Jiawei, et al. Nitrogen removal performance of a sulfur/pyrite autotrophic denitrification system [J]. Environmental Science,2019,40(4):1885-1891. (in Chinese))

[9] WANG Li, ZHAO Lianfang, HE Li. Solid-phase Fe(II)-mediated autotrophic denitrification for nitrate removal from wastewater with a low carbon-to-nitrogen ratio[J]. Journal of Environmental Engineering,2020,146(7):04020070.

[10] LIU Hong, ZENG Wei, FAN Zhiwei, et al. Effect of iron on enhanced nitrogen removal from wastewater by sulfur autotrophic denitrification coupled to heterotrophic denitrification under different substrate ratios[J]. Chemical Engineering Journal,2021,421:129828.

[11] WANG Ru, ZHENG Ping, ZHANG Meng, et al. Bioaugmentation of nitrate-dependent anaerobic ferrous oxidation by heterotrophic denitrifying sludge addition: a promising way for promotion of chemoautotrophic denitrification[J]. Bioresource Technology,2015,197:410-415.

[12] LI Rui, FENG Chuanping, HU Weiwu, et al. Woodchip-sulfur based heterotrophic and autotrophic denitrification (WSHAD) process for nitrate contaminated water remediation[J]. Water Research,2016,89:171-179.

[13] YAO Shuo, NI Jinren, CHEN Qian, et al. Enrichment and characterization of a bacteria consortium capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature[J]. Bioresource Technology,2013,127:151-157.

[14] ZHANG Meng, ZHENG Ping, LI Wei, et al. Performance of nitrate-dependent anaerobic ferrous oxidizing (NAFO) process: a novel prospective technology for autotrophic denitrification[J]. Bioresource Technology,2015,179:543-548.

[15] BELLER H R. Anaerobic, nitrate-dependent oxidation of U(IV) oxide minerals by the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus denitrificans*[J]. Applied and Environmental Microbiology,2005,71(4):2170-2174.

[16] CHENG Yimei, JIA Linchun, XUE Gang, et al. Fe⁰-mediated mixotrophic denitrification enhanced by carbon fiber for secondary effluent with low C/N ratio[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering,2024,12(4):113206.

[17] 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]. 4版. 北京:中国环境科学出版社,2002.

[18] 陈一帆,王梦男,路建平,等. 人工湿地反应性填料开发及其脱氮除磷性能研究[J]. 微生物学报,2023,63(6):2233-2244. (CHEN Yifan,WANG Mengnan,LU Jianping,et al. Development of reactive fillers in constructed wetland and its performance of nitrogen and phosphorus removal[J]. Acta Microbiologica Sinica,2023,63(6):2233-2244. (in Chinese))

[19] ZHOU Qi,JIA Lixia,WU Weilong,et al. Introducing PHBV and controlling the pyrite sizes achieved the pyrite-based mixotrophic denitrification under natural aerobic conditions:low sulfate production and functional microbe interaction[J]. Journal of Cleaner Production,2022,366:132986.

[20] SAHINKAYA E,DURSUN N,KILIC A,et al. Simultaneous heterotrophic and sulfur-oxidizing autotrophic denitrification process for drinking water treatment:control of sulfate production[J]. Water Research,2011,45(20):6661-6667.

[21] RAHMAN M M,ROBERTS K L,GRACE M R,et al. Role of organic carbon,nitrate and ferrous iron on the partitioning between denitrification and DNRA in constructed stormwater urban wetlands[J]. Science of the Total Environment,2019,666:608-617.

[22] 李勇,单雅洁,李娜,等. 太湖潜流带有机质含量对硝酸盐还原途径的影响[J]. 河海大学学报(自然科学版),2022,50(1):44-51. (LI Yong,SHAN Yajie,LI Na,et al. Effects of organic matter content on nitrate reduction pathway in the hyporheic zone of Lake Taihu[J]. Journal of Hohai University (Natural Sciences),2022,50(1):44-51. (in Chinese))

[23] 郑绍智,刘会娟,彭剑峰,等. 异养-自养耦合深度脱氮系统的生物脱氮性能研究[J]. 环境科学研究,2020,33(2):385-391. (ZHENG Shaozhi,LIU Huijuan,PENG Jianfeng,et al. Biological nitrogen removal performance of heterotrophic-autotrophic coupling deep denitrification system[J]. Research of Environmental Sciences,2020,33(2):385-391. (in Chinese))

[24] YAN Lilong,ZHANG Xiaolei,HAO Guoxin,et al. Insight into the roles of tightly and loosely bound extracellular polymeric substances on a granular sludge in ammonium nitrogen removal[J]. Bioresource Technology,2016,222:408-412.

[25] HARNEIT K,GÖKSEL A,KOCK D,et al. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*[J]. Hydrometallurgy,2006,83(1/4):245-254.

[26] JIN Juntao,GUAN Yuntao. The mutual co-regulation of extracellular polymeric substances and iron ions in biocorrosion of cast iron pipes[J]. Bioresource Technology,2014,169:387-394.

[27] ZHANG Jing,PENG Yongzhen,ZHANG Linhua,et al. Improving the resistance of Anammox granules to extreme pH shock:the effects of denitrification sludge EPS enhanced by a fluctuating C/N ratio cultivation on granules[J]. Science of the Total Environment,2021,763:144610.

[28] LIU Binbin,ZHANG Feng,FENG Xiaoxi,et al. *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison[J]. FEMS Microbiology Ecology,2006,55(2):274-286.

[29] ZOU G,PAPIRIO S,LAKANIEMI A M,et al. High rate autotrophic denitrification in fluidized-bed biofilm reactors[J]. Chemical Engineering Journal,2016,284:1287-1294.

[30] BOSCH J,LEE K Y,JORDAN G,et al. Anaerobic,nitrate-dependent oxidation of pyrite nanoparticles by *Thiobacillus denitrificans* [J]. Environmental Science & Technology,2012,46(4):2095-2101.

[31] LI Wei,LIN Jianguo,ZHANG Libo,et al. Mixotrophic denitrification desulfurization wastewater treatment process:bioreactor performance and analysis of the microbial community[J]. Polish Journal of Environmental Studies,2016,25(6):2491-2497.

[32] ZHANG Meng,ZHANG-ZHU Gucheng,WEN Shuxian,et al. Chemolithotrophic denitrification by nitrate-dependent anaerobic iron oxidizing (NAIO) process:insights into the evaluation of seeding sludge[J]. Chemical Engineering Journal,2018,345:345-352.

[33] CHEN Hong,ZHAO Xuhao,CHENG Yuying,et al. Iron robustly stimulates simultaneous nitrification and denitrification under aerobic conditions[J]. Environmental Science & Technology,2018,52(3):1404-1412.

[34] ZHU Tingting,CHENG Haoyi,YANG Lihui,et al. Coupled sulfur and iron(II) carbonate-driven autotrophic denitrification for significantly enhanced nitrate removal[J]. Environmental Science & Technology,2019,53(3):1545-1554.

[35] KISKIRA K,PAPIRIO S,VAN HULLEBUSCH E D,et al. Fe(II)-mediated autotrophic denitrification:a new bioprocess for iron bioprecipitation/biorecovery and simultaneous treatment of nitrate-containing wastewaters[J]. International Biodeterioration & Biodegradation,2017,119:631-648.

[36] WEN Shulong,HU Keqiang,CHEN Yuancai,et al. The effects of Fe²⁺ on sulfur-oxidizing bacteria (SOB) driven autotrophic denitrification[J]. Journal of Hazardous Materials,2019,373:359-366.

[37] STRAUB K L,BENZ M,SCHINK B,et al. Anaerobic,nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron[J]. Applied and Environmental Microbiology,1996,62(4):1458-1460.

[38] MUEHE E M,GERHARDT S,SCHINK B,et al. Ecophysiology and the energetic benefit of mixotrophic Fe(II) oxidation by various strains of nitrate-reducing bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology,2009,70(3):335-343.

[39] 张若晨. 自养-异养联合反硝化系统中功能菌群互作规律及代谢机制[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2019.