

硫自养-异养反硝化深度脱氮系统构建及电子分配特征研究

朱 健¹, 刘淑怡^{2,3}, 丁新春², 卞小锋⁴, 李嘉晨¹,
黄开龙^{2,5}, 王德朋^{2,*}, 张徐祥^{2,*}

(1. 上海市净化技术装备成套有限公司, 上海 200120; 2. 南京大学环境学院水污染控制与资源绿色循环全国重点实验室, 江苏南京 210023; 3. 广州市生态环境局番禺分局, 广东广州 511400; 4. 亚同环保水处理江阴有限公司, 江苏无锡 214400; 5. 南京江岛环境科技研究院有限公司, 江苏南京 210019)

摘要: 针对城市污水厂二级出水深度脱氮的需求, 构建了一种分段式硫自养-异养反硝化协同系统, 探究了不同耦合顺序对脱氮效能和 N₂O 排放的影响, 并解析了系统中电子分配的特征。结果表明, 硫自养反硝化前置的协同系统(R1)实现了硫自养段硝酸盐高效还原(去除率>75%)和亚硝酸盐累积(6~8 mg/L), 随后异养段进一步深度去除剩余氮基质, 使最终出水总氮浓度降至 4~5 mg/L, 去除率达 75.5%。相比之下, 异养反硝化前置的协同系统(R2)中并未发现明显的反硝化中间产物累积。同时, R1 系统的 N₂O 排放因子仅为 0.12%, 显著低于 R2 系统的 0.64%。进一步的批次实验表明, R1 系统中硫自养段电子优先分配给硝酸盐还原酶(NAR 占比 45.36%), 而异养段电子更多流向反硝化下游酶(NIR、NOR 和 NOS), 这可能促进了 N₂O 的还原去除。2 个系统中的功能微生物组成较为相似, 硫自养段均以硫杆菌属(*Thiobacillus*, 54.25%~69.00%)为主导, 异养段则为伯克霍尔德菌科(*Burkholderiaceae*, 15.82%~24.21%)和陶厄氏菌属(*Thauera*, 5.87%~16.45%)占优势。本研究为城市污水厂二级出水高效深度脱氮与 N₂O 控制提供了新思路。

关键词: 硫自养反硝化; 异养反硝化; 电子分配; 氧化亚氮; 群落结构

中图分类号: X703

文献标识码: A

Construction and Electron Distribution Characteristics of the Sulfur Autotrophic-Heterotrophic Denitrification System for Advanced Nitrogen Removal

ZHU Jian¹, LIU Shuyi^{2,3}, DING Xinchun², BIAN Xiaofeng⁴, LI Jiachen¹,
HUANG Kailong^{2,5}, WANG Depeng^{2,*}, ZHANG Xuxiang^{2,*}

(1. Shanghai Purification Technology Equipment Complete Co., Ltd., Shanghai 200120, China; 2. State Key Laboratory of Water Pollution Control and Green Resource Recycling, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China; 3. Panyu Branch of Guangzhou Municipal Ecological Environment Bureau, Guangzhou 511400, China; 4. Yatong Environmental Water Treatment Jiangyin Co., Ltd. Wuxi

收稿日期: 2025-08-11

修回日期: 2025-09-11

接受日期: 2025-09-13

DOI: 10.20078/j.eep.20250908

基金项目: 江苏省碳达峰碳中和科技创新专项资金资助项目(BE2022861); 国家自然科学基金青年基金资助项目(52100068); 上海市机械设

备成套(集团)有限公司应用性研究类资助项目(2023RD-06)

第一作者: 朱 健(1982—)男, 江苏昆山人, 高级工程师, 主要研究方向为污水处理厂运营管理及新技术的推广应用。

E-mail: 32967319@qq.com

*通讯作者: 王德朋(1991—), 男, 山东聊城人, 副研究员, 主要研究方向为污水生物脱氮技术与微生物学调控研究。

E-mail: dpwang@nju.edu.cn

张徐祥(1978—), 男, 安徽天长人, 教授, 主要研究方向为水环境高风险污染物识别与控制理论、技术与装备。

E-mail: zhangxx@nju.edu.cn

214400, China; 5. Nanjing Jiangdao Institute of Environment Research Co., Ltd., Nanjing 210019, China)

Abstract: Stringent nitrogen discharge standards necessitate advanced treatment technologies for secondary effluent from municipal wastewater treatment plants (WWTPs). Conventional heterotrophic denitrification faces limitations, such as dependence on organic carbon and potential emissions of nitrous oxide (N_2O), a potent greenhouse gas. To address these challenges, this study established and systematically evaluated a novel staged denitrification system that integrates sulfur autotrophic and heterotrophic processes. The primary objective was to investigate the effects of different coupling patterns, i.e., sulfur autotrophic followed by heterotrophic (R1) versus heterotrophic followed by sulfur autotrophic (R2), on overall nitrogen removal efficiency, N_2O emission dynamics, and the underlying electron distribution patterns within the microbial consortia. Results demonstrated that the R1 configuration exhibited superior nitrogen removal performance. In the initial sulfur autotrophic stage, high nitrate removal efficiency ($> 75\%$) was achieved, accompanied by consistent nitrite accumulation (6–8 mg/L), indicating incomplete denitrification. This intermediate was subsequently utilized in the downstream heterotrophic stage, facilitating the near-complete removal of residual nitrogen substrates. Consequently, the R1 system produced a final effluent with a remarkably low total nitrogen (TN) concentration of 4–5 mg/L and a TN removal efficiency of 75.5%. In contrast, the R2 system, initiating with heterotrophic denitrification, demonstrated negligible accumulation of denitrification intermediates but achieved lower overall TN removal. Critically, the R1 configuration demonstrated a significantly lower N_2O emission factor (0.12% of the removed TN) compared to the R2 system (0.64%), highlighting its environmental advantage in mitigating greenhouse gas emissions. To elucidate the mechanistic basis for these performance differences, targeted batch experiments were conducted to quantify electron flux distribution among key denitrifying enzymes. Results indicated that in the sulfur autotrophic stage of R1, electrons were preferentially channeled towards nitrate reductase (NAR), accounting for 45.36% of the total electron flux. Conversely, in the subsequent heterotrophic stage, a substantially larger proportion of electrons was allocated to the downstream enzymes nitrite reductase (NIR), nitric oxide reductase (NOR), and nitrous oxide reductase (NOS). This electron allocation pattern in the heterotrophic phase likely promoted the efficient reduction and removal of N_2O , contributing to the lower emissions observed in the R1 system. Microbial community analysis revealed structural similarities between the systems, with the sulfur autotrophic stage dominated by the genus *Thiobacillus* (54.25%–69.00%), renowned for its sulfur-oxidizing denitrification capability. The heterotrophic stages were primarily colonized by members of the family *Burkholderiaceae* (15.82%–24.21%) and the genus *Thauera* (5.87%–16.45%). This study provides compelling evidence that the staged sulfur autotrophic-heterotrophic denitrification system, particularly with autotrophy preceding heterotrophy (R1), is a highly effective and sustainable strategy. It simultaneously achieves advanced nitrogen removal and significantly reduces N_2O emissions, offering a promising solution for enhancing the environmental sustainability of municipal WWTPs.

Keywords: Sulfur autotrophic denitrification; Heterotrophic denitrification; Electron distribution; Nitrous oxide; Microbial community

0 引 言

目前,城市污水处理厂二级出水总氮浓度普遍较高^[1],且其主要成分为硝酸盐,这导致受纳水体存在潜在的氮素污染风险。同时,我国城市污

水普遍具有低碳氮比特性($C/N < 3$),难以满足生物脱氮的碳源需求,因而可能在反硝化脱氮时使中间产物亚硝酸盐氮($NO_2^- - N$)和氧化亚氮(N_2O)累积^[2]。亚硝酸盐具有潜在的致癌、致畸风险^[3], N_2O 是一种强温室气体,其全球变暖潜能值是

CO₂ 的 265 倍^[4-5]。面对日益严格的排放标准,深度脱氮已成为污水处理工艺升级的必然选择^[6]。

生物异养反硝化作为主流脱氮工艺,在处理低 C/N 污水时需投加大量外碳源,导致污泥产量高、运行成本高^[7],且过量碳源可能引发出水 COD 超标。为解决该问题,基于无机电子供体的自养反硝化技术应运而生。其中,硫自养反硝化以单质硫(S⁰)、硫化物或硫代硫酸盐为电子供体,无需外加有机碳源且污泥产量低^[8]。然而,硫自养反硝化过程中优先选择NO₃⁻-N 作为电子受体,进而导致中间产物(亚硝酸盐、N₂O)积累^[9-10]。为协同解决碳源依赖与中间产物积累问题,硫自养-异养反硝化耦合工艺通过构建双电子供体协同代谢网络,有效实现了功能菌群互补。其中,通常由硫氧化菌(SOB)主导自养反硝化,异养反硝化菌(HD)降解有机物^[11]。

近年来,硫自养-异养耦合工艺的相关研究主要聚焦于混合营养型系统的构建与优化。例如,陈俊等^[12]设计了固相碳源与硫磺共填的生物滤池,KOJU 等^[13]使用甘油和木质素将自养反硝化细菌与元素硫共固定化。由于自养与异养反硝化速率的差异,二者存在竞争关系^[14],进而影响反硝化过程的协同效率。同时,多种功能菌或功能酶的特性差异、竞争大于合作等因素影响,电子流向无法按照理想状态进行。因此,这类耦合系统中依然存在NO₂⁻-N 和 N₂O 等中间产物积累^[15]。相比之下,通过不同功能区分别构建硫自养和异养反硝化过程,有望实现不同的生态位,充分发挥硫自养与异养反硝化过程的优势,进而从“电子争夺”到“电子定向分配”转变。电子定向分配可能在减少反硝化中间代谢产物积累方面具有优势,有望促进整个系统的N₂O 减排^[16-17]。

因此,本研究构建硫自养前置与异养前置 2 种耦合模式的分段式硫自养-异养反硝化系统,评估脱氮效能、N₂O 排放及微生物群落结构,考察其影响规律。同时,通过批次实验定量分析电子分布特征,并解析不同耦合模式下电子分配特征。本研究为实现系统高效脱氮与 N₂O 排放控制提供新思路。

1 材料与amp;方法

1.1 反应器装置与运行策略

本研究构建的硫自养-异养反硝化滤池主体由有机玻璃材料加工而成,分为上下 2 层,每层有

效高度为 21 cm,层间以带小孔的有机玻璃孔板分隔。下层底部设进水口,上层顶部配备三相分离器以收集气体,于各层高 18 cm 处设有出水口用于液相分析取样、高 11 cm 处设有填料取样口用于获取生物膜样本。滤池内径 12 cm,外部设有保温层,外径 18 cm。

实验设置 R1 与 R2 2 组反应器:R1 为下层硫自养段、上层异养段;R2 为下层异养段、上层硫自养段。硫自养段均填充 300 mL(堆积体积)硫滤料(单质硫为主要硫源,硫含量 90%,粒径 3~6 mm,堆积密度 1.05~1.15 g/cm³),异养段自下而上均配置 40 mL 聚羟基丁酸戊酸共聚酯(PHBV)颗粒(粒径 3~6 mm,堆积密度 1.06 g/cm³)和 260 mL 陶粒。

反应器挂膜阶段,硫自养段连续接种硫自养反硝化菌液 14 d,以完成生物膜定殖,异养段接种南京某城市污水厂活性污泥。系统进水NO₃⁻-N 浓度为 20 mg/L,水力停留时间(HRT)设定为 2 h,通过保温层维持反应温度在(26 ± 1) °C。本研究模拟城市污水处理厂二级生化出水作为反硝化滤池的进水,将其NO₃⁻-N 浓度控制在 20 mg/L。污水具体成分见表 1,微量元素浓缩液成分见表 2。

表 1 反应器进水成分

Table 1 Reactor influent composition

成分	浓度
NaNO ₃	121 mg/L
NaHCO ₃	250 mg/L
KH ₂ PO ₄	50 mg/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5 mg/L
FeSO ₄ ·6H ₂ O	1 mg/L
微量元素浓缩液	1 mL/L

表 2 微量元素浓缩液成分

Table 2 Composition of trace element concentrate

成分	浓度/(g·L ⁻¹)
EDTA·2Na	10.00
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.15
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.12
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.12
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.03
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.06
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.40
H ₃ BO ₃	0.15

1.2 检测与分析方法

1.2.1 水质指标

水样中总有机碳(TOC)采用 TOC 分析仪 (TOC-L cph, 岛津, 日本)测定; NO_3^- -N、 NO_2^- -N 和硫酸盐浓度采用离子色谱(ICS-1000, Dionex, 美国)测定。

气态 N_2O 使用气体采样袋收集; 溶解态 N_2O 使用一次性真空管从出水口采集 5 mL 含 N_2O 水样, 振荡后 4 °C 冷藏静置 24 h, 使 N_2O 达到气液平衡后收集顶空气体。

N_2O 采用安捷伦 7890B 气相色谱仪测定, 所用色谱柱为 HayeSep Q 填充柱 6Ft 1/8, 色谱条件为柱温箱 60 °C, 流量恒压模式 275 kPa; 火焰离子化检测器(FID)的检测条件为 250 °C, 空气流量 450 mL/min, 氢气流量 45 mL/min, 尾吹氮气流量 25 mL/min; 电子捕获检测器(ECD)的检测条件为 300 °C, 尾吹氩甲烷气流量 5 mL/min。催化过程中镍催化剂 375 °C, 运行时间 7.5 min。

$$C_L = C_G \left(\frac{\beta RT}{22.4} + \frac{V_G}{V_L} \right) \quad (1)$$

式中: C_L 为平衡前液相中待测气体的浓度 ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); C_G 为平衡后气相中待测气体的浓度 ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); β 为待测气体的 Bunsen 溶解度 (6.66 Pa^{-1}); R 为气体常数 ($8.31 \text{ L}\cdot\text{kPa}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$); T 为绝对温度(K); 22.4 为 N_2O 气体的摩尔体积 ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$); V_G 为顶空体积(L); V_L 为待测水样体积(5 mL)。

$$EF_{\text{N}_2\text{O}} = \frac{E_{\text{N}_2\text{O}}}{L_{\text{TNR}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中, $EF_{\text{N}_2\text{O}}$ 为 N_2O 排放因子(%); $E_{\text{N}_2\text{O}}$ 为 N_2O 每天产量 ($\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$); L_{TNR} 为总氮去除负荷 ($\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$)。

1.2.2 高通量测序与数据处理方法

在反应器的运行初期和运行稳定后的末期, 分别从 R1 与 R2 反应器的硫自养层、异养层采集 3 份的污泥平行样, 利用 FastDNA Soil Kit (MP Biomedicals CA, USA) 试剂盒提取总 DNA。将提取的微生物 DNA 样品委托北京诺禾致源科技股份有限公司, 在 Novaseq-PE250 平台上对 16S rRNA 基因 V4 高变区进行扩增子测序, 所用引物对为 515F 和 806R。

原始测序数据采用 QIIME 2 (v2024.2) 平台进行分析。首先使用 DADA2 方法进行质量控制和降噪处理, 生成高质量的特征表和代表性序列。然后将代表性序列与 Greengenes2 数据库进行比对, 获得物种分类信息。最后使用 Vegan 包分析

α 多样性 (Shannon 指数和 Chao1 指数) 和 β 多样性。使用 R 语言程序包 ggplot2 进行数据可视化。

1.3 批次实验设计与方法

在反应器连续稳定运行结束后, 采用批次实验对硫自养-异养耦合系统中电子分配特征进行系统性解析。本研究共设计 3 组不同电子受体的实验, 详细条件见表 3。

表 3 各组批次实验进水氮素组成

Table 3 Nitrogen composition of influent in each group of batch experiments

组别	氮素
a	20 mg/L NO_3^- -N
b	20 mg/L NO_2^- -N
c	10 mg/L NO_3^- -N, 10 mg/L NO_2^- -N

定时取样监测实验出水中 NO_3^- 、 NO_2^- 和 N_2O 浓度, 绘制浓度曲线, 并计算反硝化各阶段电子分配率, 具体计算方法参考已有研究^[18-19]。

氮氧化物的表观比还原速率 ($r_{\text{NO}_3^-,a}$ 、 $r_{\text{NO}_2^-,a}$ 和 $r_{\text{N}_2\text{O},a}$) 通过最大消耗速率除以反应器中的 MLVSS 浓度计算得到。氮氧化物的真实比还原速率计算如下:

$$r_{\text{NO}_3^-} = r_{\text{NO}_3^-,a} \quad (3)$$

$$r_{\text{NO}_2^-} = r_{\text{NO}_2^-,a} + r_{\text{NO}_3^-} \quad (4)$$

$$r_{\text{NO}} = r_{\text{NO},a} + r_{\text{NO}_2^-} \quad (5)$$

$$r_{\text{N}_2\text{O}} = r_{\text{N}_2\text{O},a} + r_{\text{NO}} \quad (6)$$

式中: $r_{\text{NO}_3^-}$ 、 $r_{\text{NO}_2^-}$ 、 r_{NO} 和 $r_{\text{N}_2\text{O}}$ 分别为 NO_3^- 、 NO_2^- 、 NO 和 N_2O 的真实比还原速率 ($\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{VSS}\cdot\text{h})$)。由于 NO 对细菌细胞有毒性, 在生物反硝化过程中, NO 会被优先还原, 因此, N_2O 的真实比还原速率可以按式(7)计算:

$$r_{\text{N}_2\text{O}} = r_{\text{N}_2\text{O},a} + r_{\text{NO}_2^-} \quad (7)$$

利用式(8)~(11)计算反硝化步骤中还原酶的比电子消耗速率:

$$r_{\text{NAR},e} = \frac{r_{\text{NO}_3^-}}{14} \times 2 \quad (8)$$

$$r_{\text{NIR},e} = \frac{r_{\text{NO}_2^-}}{14} \times 1 \quad (9)$$

$$r_{\text{NOR},e} = \frac{r_{\text{NO}}}{14} \times 1 \quad (10)$$

$$r_{\text{NOS},e} = \frac{r_{\text{N}_2\text{O}}}{14} \times 1 \quad (11)$$

式中: $r_{\text{NAR},e}$ 、 $r_{\text{NIR},e}$ 、 $r_{\text{NOR},e}$ 和 $r_{\text{NOS},e}$ 分别表示硝酸盐氮还原酶(NAR)、亚硝酸盐氮还原酶(NIR)、一氧化氮还原酶(NOR)和氧化亚氮还原酶(NOS)的比电

子消耗速率($\text{mmol-e}/(\text{g-VSS}\cdot\text{h})$)。

电子分布为反硝化酶的比电子消耗率与总电子消耗率的比值,计算如下:

$$ED = \frac{r_{\text{NOred,e}}}{r_{\text{NAR,e}} + r_{\text{NIR,e}} + r_{\text{NOR,e}} + r_{\text{NOS,e}}} \times 100\% \quad (12)$$

式中: ED 表示反硝化过程中电子分布率(%); $r_{\text{NOred,e}}$ 表示反硝化酶的比电子消耗速率($\text{mmol-e}/(\text{g-VSS}\cdot\text{h})$)。

2 结果与讨论

2.1 不同耦合模式下反应器脱氮性能

2.1.1 氮浓度

通过连续 672 h 的运行实验,对比分析了 2 种耦合模式反应器系统的脱氮效能及亚硝酸盐积累的规律,如图 1 所示。R1 下层硫自养段主要还原硝酸盐,出水 NO_3^- -N 浓度低于 5 mg/L,而 NO_2^- -

N 积累 6~8 mg/L。随后,上层异养段通过有机碳源代谢将 NO_2^- -N 浓度降至 3~5 mg/L,并维持最终出水 NO_3^- -N 平均浓度约为 1 mg/L。最终,出水总氮浓度降至 4~5 mg/L,去除率达 75.5%。相比之下,R2 则呈现完全反硝化特征^[20],异养段出水的 NO_3^- -N 浓度(13.8 ± 2.1)mg/L,且无明显 NO_2^- -N 积累(< 2 mg/L);上层硫自养段进一步将 NO_3^- -N 浓度降至 2 mg/L 以下。

R1 中 NO_2^- -N“下层积累-上层去除”的变化表明其耦合模式实现了电子供体的定向利用,即下层硫自养段电子优先流向硝酸盐氮还原酶,驱动 NO_3^- -N 的高效转化,上层异养段的电子则更多地流向亚硝酸盐氮还原酶,完成 NO_2^- -N 的深度去除。R2 系统各段均未出现 NO_2^- -N 积累,暗示该耦合模式未形成电子传递的分层级调控,硫自养段与异养段可能表现出相似电子分配特征。

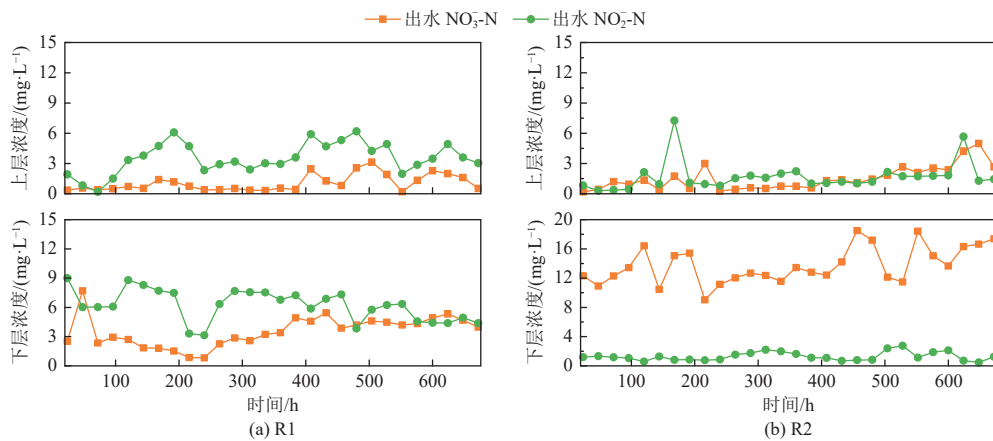


图 1 反应器 R1 和 R2 出水氮氧化物浓度

Fig. 1 Nitrogen oxide concentrations in the effluent from reactors R1 and R2

2.1.2 N_2O 排放特征

除 NO_2^- -N 外, N_2O 排放特征是反硝化过程碳排放量化的关键指标。为评估硫自养-异养耦合体系对 N_2O 排放的影响,本研究在系统稳定期定量检测了 2 种反应器的气、液两相 N_2O ,结果如图 2 所示。其中,由于下层溶解态的 N_2O 会流经上层,而上层反硝化过程同时产生和还原去除 N_2O ,因此反应器总体 N_2O 排放浓度为气态 N_2O 与上层溶解态 N_2O 之和。

R2 总体 N_2O 排放浓度($120.26 \mu\text{g/L}$,其中气态 $18.06 \mu\text{g/L}$,上层溶解态 $102.20 \mu\text{g/L}$)显著高于 R1($18.86 \mu\text{g/L}$,其中气态 $7.67 \mu\text{g/L}$,上层溶解态 $11.19 \mu\text{g/L}$),前者约为后者的 6.4 倍。相应地,R2 排放因子(0.64%)也远高于 R1(0.12%),为 R1

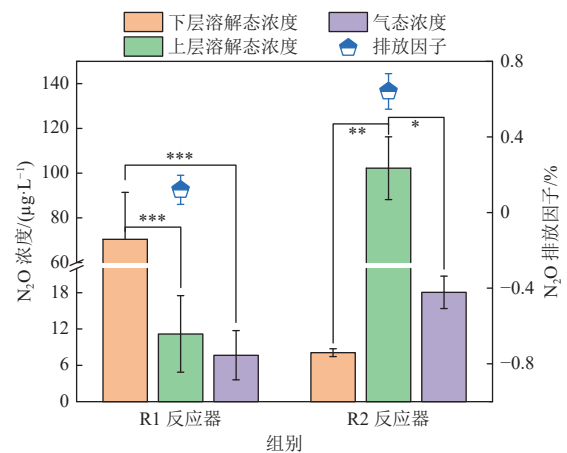


图 2 总 N_2O 排放因子,包括气态 N_2O 及不同层溶解态 N_2O 浓度

Fig. 2 N_2O emission factors, including gaseous N_2O and dissolved N_2O concentrations from different layers

的 5.3 倍。值得注意的是, 2 个反应器均呈现溶解态 N_2O 占比优势(R1: 59.3%, R2: 85.0%), 因此, 可以通过追踪反应器各层出水中溶解态 N_2O 浓度来进一步探究其排放的空间分布特征。

N_2O 空间分布特征解析表明, R1 下层硫自养段的溶解态 N_2O 浓度高达 70.38 $\mu\text{g/L}$, 而 R2 下层异养段仅 8.09 $\mu\text{g/L}$, 证实 N_2O 主要在硫自养区域生成。事实上, R1 反应器硫自养段的亚硝酸盐积累显著驱动了 N_2O 的释放, 主要是由于电子供体/受体不匹配: 当硫氧化速率(电子供给速率)与硝酸盐还原为亚硝酸盐的速率相对较快, 但亚硝酸盐进一步还原为氮气的速率相对较慢时, 会导致亚硝酸盐在系统中积累。类似地, R2 上层硫自养段 N_2O 浓度较 R1 下层高 45%。与 NO_2^- -N 变化规律类似, N_2O 在 R1 系统中呈现的“积累-去除”变化进一步证实了其电子供体的流向。这有效降低了 N_2O 逃逸释放, 为氮素转化过程中温室气体的控制提供了新思路和实验依据。

2.1.3 TOC 浓度

出水 TOC 结果显示(图 3), 硫自养段(R1 下层与 R2 上层)均值 4~5 mg/L , 异养段(R1 上层与 R2 下层)均值 8~9 mg/L , 均远低于文献所报道的 39.75~82.42 mg/L ^[21], 这可能归因于反应器设计中固相碳源投配量与水力参数的不同。值得注意的是, FENG 等^[22]在相近 PHBV 投加量下的碳源释放动力学实验表明, 单位质量碳源释放的溶解性有机物仅 0.19 mg/g (折算 TOC 浓度约为 7.6 mg/L), 与本研究数值相近。这些研究表明, 通过精准调控固相碳源填装比例, 可在满足反硝化碳需求的同时, 有效控制溶解性有机物残留, 避免因过量释放导致的二次污染风险。

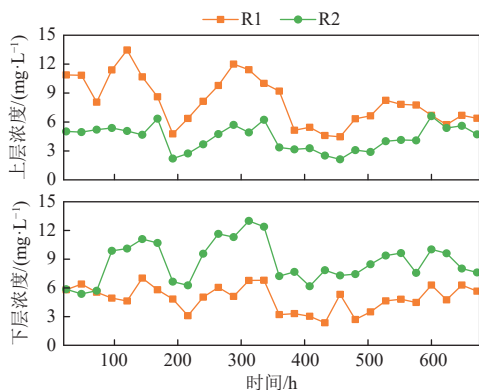


图 3 反应器 R1 和 R2 出水 TOC 浓度

Fig. 3 TOC concentrations in the effluent from reactors R1 and R2

2.2 微生物群落结构分析

采用 16S rRNA 高通量技术分析了硫自养-异养耦合系统初始时期与稳定期的微生物群落结构差异。其中, C0 和 S0 分别为初始时期异养段、硫自养段的样品, R1-C、R2-C、R1-S 和 R2-S 分别为稳定期的 R1 异养段、R2 异养段、R1 硫自养段和 R2 硫自养段。图 4 展示了微生物主要的 11 个门的菌群相对丰度。

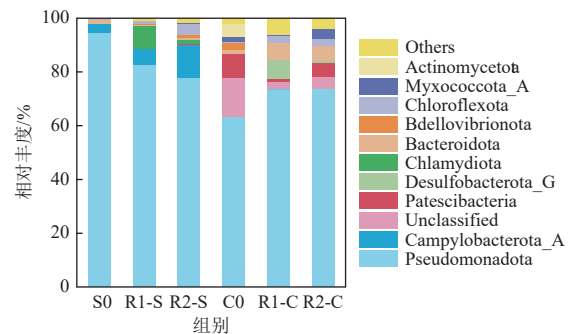


图 4 耦合系统中门水平群落结构

Fig. 4 Microbial community structure at phylum level of the coupled system

在硫自养段中, 初期主导的假单胞菌门(Pseudomonadota, 94.50%)在稳定运行后其丰度显著下降, 而异养段该菌门丰度从初始的 63.10% 升至 R1-C 的 73.75% 和 R2-C 的 73.79%。这反映假单胞菌门具有可塑性, 其下属的硫杆菌属(*Thiobacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)分别主导硫自养与异养反硝化过程^[23-24]。

此外, 硫自养段中的弯曲菌门(Campylobacterota)为标志性硫氧化脱氮菌^[25]; 绿弯菌门(Chloroflexota)的代谢活动与硫自养段的 N_2O 积累密切相关^[26]。异养段中的骸骨细菌门(Patescibacteria)和拟杆菌门(Bacteroidota)丰度与 NO_2^- -N 还原效率呈正相关^[27], 因此二者在 R2 中的较高丰度有效抑制了 NO_2^- -N 积累。此外, 有机碳源促进了异养菌粘球菌门(Myxococcota)和放线菌门(Actinomycetota)在 R2 中显著富集^[28-30]。

属水平微生物群落结构如图 5 所示。硫杆菌属(*Thiobacillus*)作为典型的硫自养反硝化菌^[31-32], 在 S0、R1-S、R2-S 中占绝对优势(相对丰度分别为 72.93%、69.00% 和 54.25%)。在初始群落中, 具有 N_2O 还原优势的热单胞菌属(*Thermomonas*)丰度显著降低^[33], 其生态位可能由硫单胞菌属(*Sulfurimonas*)替代。脱硫芽孢杆菌属(*Desulfobacillus*)作为还原硫酸盐的细菌^[34], 在

R2 中丰度比 R1 高,证明 R2 上层硫自养段受残留有机碳的影响而发生硫酸盐还原过程。

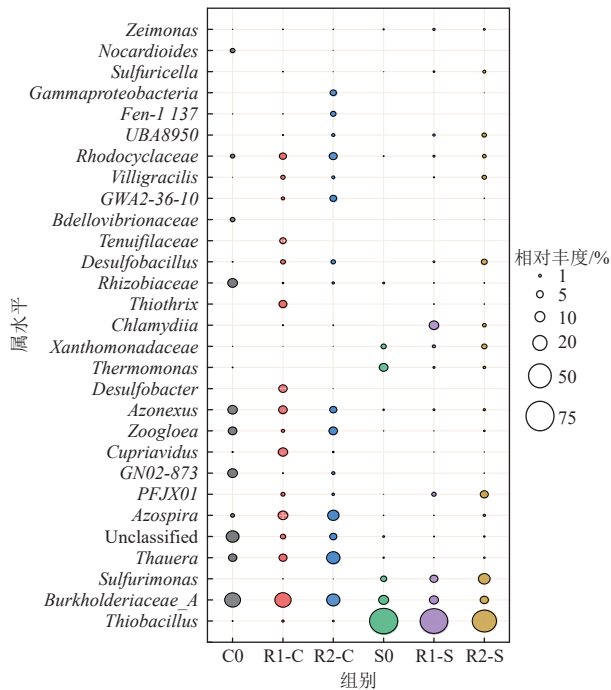


图 5 耦合系统中属水平群落结构变化

Fig. 5 Variations of the community structure at genus level of the coupled system

异养段中,隶属于伯克霍尔德菌科的菌属 (*Burkholderiaceae_A*)、陶厄氏菌属 (*Thauera*) 和固

氮螺菌属 (*Azospira*) 构成核心微生物群落。其中,相对于初始时期(22.98%),*Burkholderiaceae_A* 在 R1 中相对丰度上升(24.21%),在 R2 中下降(15.82%),表明其可能偏好利用亚硝酸盐进行异养反硝化。*Thauera* 在 R2 的丰度(16.45%)显著高于 R1(5.87%),其富集可能增强全程反硝化过程^[35],减少 R2 下层出水中的 NO_2^- -N 积累。此外,*Azospira_A* 在稳定期丰度显著提升(初期时期 1.38%,稳定期 R1 为 8.28%,R2 为 11.54%),动胶菌属 (*Zoogloea*) 在 R1 中丰度不足 1.00%,在 R2 中维持 6.7% 不变。此趋势与 TONG 等^[36] 以乙酸盐作碳源的系统中一致。

群落的 α 多样性如图 6 所示,长期运行显著提升了各反应器微生物群落的 α 多样性。异养段 Shannon 指数增幅分别为 3.43%(R1) 和 6.57%(R2),Chao1 指数增长 19.44%(R1) 和 18.74%(R2)。硫自养段的多样性提升更为显著,Shannon 指数增幅分别达 16.16%(R1) 和 68.45%(R2),Chao1 指数升高 63.15%(R1) 和 113.88%(R2)。这表明稳定运行能有效促进微生物群落结构复杂化,且硫自养系统的多样性增幅更大。R2 的硫自养段群落比 R1 展现出更为显著的多样性,可能与溶解性有机物密切相关,促使反应器具有混合营养特性,从而提高微生物多样性^[24]。

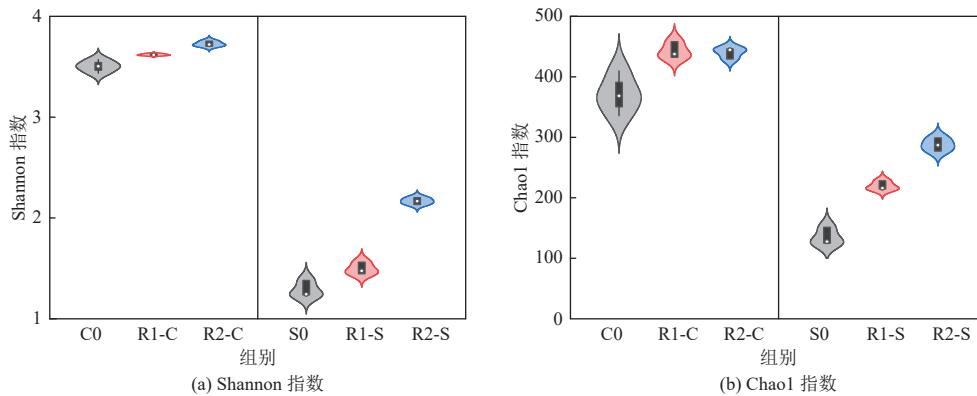


图 6 耦合系统中群落的 α 多样性

Fig. 6 α diversity of the community in the coupled system

2.3 电子分配特征

为探究硫自养-异养耦合系统的电子分布特征与耦合模式,本研究通过批次实验对比了 2 种耦合模式下的氮还原速率和电子分布规律。由于反硝化中间产物的动态转化会影响表观动力学特征,因此采用真实比还原速率和电子分布指标反映电子在多步还原反应中的竞争与分配行为。

如图 7 所示,2 种反应器各反应层中氮氧化物真实比还原速率与反硝化酶电子分布呈现显著差异。在 R1 中,下层硫自养段单一 NO_3^- 组(a 组)的 NO_3^- 的真实比还原速率(1.35 $\text{mg}/(\text{g-VSS}\cdot\text{h})$)是单一 NO_2^- 组(b 组)中 NO_2^- (0.77 $\text{mg}/(\text{g-VSS}\cdot\text{h})$) 的 1.75 倍,表明硫自养段中 NO_3^- 对电子的竞争能力更强。类似地,上层异养段在 a 组的 NO_3^- 真实比还

原速率(1.0 mg/(g-VSS·h))为 b 组 NO_2^- (0.70 mg/(g-VSS·h)) 的 1.42 倍,表明异养对底物的适应性更高。需要注意的是, a 组中硫自养段的 NO_3^- 真实比还原速率为异养段的 1.35 倍,与通常认为的异养反硝化速率更高相矛盾^[37]。这是因为本研究使用可降解高聚物 PHBV 作为有机碳源,并非传统

反硝化滤池中最优或易降解的碳源。高聚物 PHBV 在被反硝化菌利用之前,需要被水解酸化菌降解为小分子有机物,因而限制了异养反硝化速率^[38]。相比之下, R1 反应器中硫单质滤料显著高于进水中 NO_3^- -N 浓度,电子供体浓度相对充足,因而增强了自养反硝化速率。

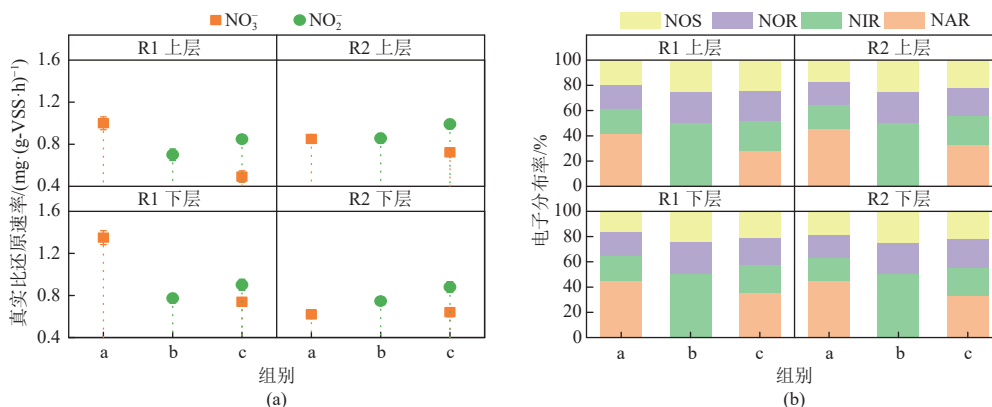


图 7 不同氮氧化物组成下 (a) NO_3^- 、 NO_2^- 真实比还原速率和 (b) NAR、NIR、NOR 和 NOS 酶的电子分布
Fig. 7 (a) True specific reduction rates of NO_3^- and NO_2^- and (b) electron distributions in NAR, NIR, NOR, and NOS under different nitrogen oxide compositions

混合电子受体组(c组)硫自养段和异养段的 NO_3^- 真实比还原速率均低于 NO_2^- ,符合热力学规律, NO_2^- 比 NO_3^- 具有更低的负标准吉布斯自由能^[39]。其中,异养段 NO_2^- 真实比还原速率(0.85 mg/(g-VSS·h))比 NO_3^- (0.49 mg/(g-VSS·h))高 73%,而硫自养段的 NO_2^- 真实比还原速率(0.90 mg/(g-VSS·h))仅比 NO_3^- (0.74 mg/(g-VSS·h))高 21%。因此, a 组实验以硝酸盐氮为电子受体时,硫自养段流向 NAR 的电子比例高达 45.36%。同时, c 组中硫自养段流向 NAR 的电子(35.68%)高于异养段(27.99%),后者更多的电子流向了 NIR、NOR 和 NOS,这与 LIU 等^[40]曾报道的反硝化生物膜/絮凝体系统电子分配规律一致。

相比之下, R2 电子分配呈现出不同的特征。下层异养段 b 组的 NO_2^- 真实比还原速率(0.75 mg/(g-VSS·h))是 a 组 NO_3^- (0.62 mg/(g-VSS·h))的 1.2 倍,进一步证实了异养段 NIR 酶对电子的竞争力更强。上层硫自养段 a、b 组的真实比还原速率相近,无显著电子受体偏好性,这解释了 2.1.1 节中 R2 硫自养段出水中 NO_2^- -N 浓度低的现象。电子分布数据进一步显示, R2 硫自养段和异养段的电子分布比例差异小(<1%),且 NAR 酶始终占主导(a 组占 46%, c 组占 33%),该结果与非碳源限制条件下的电子分布一致^[41]。

对比 2 个系统, R1 在混合电子受体条件下的 NO_3^- 真实比还原速率降幅显著(c 组相较于 a 组),而 R2 保持稳定。从理论上讲,在电子供体充足时, NO_3^- 真实比还原速率不受其他电子受体影响,只有在电子供应受到限制时,电子受体种类增加才会导致电子竞争加剧,进而导致 NO_3^- 真实比还原速率下降^[18]。此处表现差异可以归因于 2 种滤料电子供给方式和耦合模式的不同。R1 系统中仅有硫滤料表面微生物直接获电子,呈现受限状态;而 R2 系统中有机碳源 PHBV 通过酶解/物理解双重途径释碳,能够缓解传递限制,呈现电子供体充足的状态^[42]。同时, R2 下层释放的溶解性有机物为上层提供辅助电子源,使其 NO_3^- 真实比还原速率降幅(15%)远低于 R1(51%)。此外, R1 上层异养段的 NO_3^- 真实比还原速率显著下降可能与长期接收含 NO_2^- -N 的进水导致群落结构变化有关。

不同反应器间的同种工艺段对比显示,单一电子受体条件下, R1 的硫自养段和异养段 NO_3^- 真实比还原速率均显著高于 R2,但其 NO_2^- 真实比还原速率略低于 R2,与 R1 出水亚硝酸盐氮残留现象相关。R2 的总 NO_3^- 还原速率和 NO_2^- 还原速率相近,更可能源于固相碳源释碳作用,而非层级间电子分配互补。综上,尽管 R1 总氮去除率低于

R2,但其层级间电子分布呈现互补特征,初步实现了耦合系统可以针对性调控电子分配。

3 结 论

(1)硫自养段前置的 R1 系统实现了较高的脱氮效能和良好的 N₂O 减排。其中,硫自养段优先还原 NO₃⁻-N(出水浓度低于 5 mg/L, NO₂⁻-N 6~8 mg/L, N₂O 积累 70.38 μg/L),异养段进一步去除硝酸盐氮和中间产物,最终总氮去除率达 75.5%, N₂O 总排放浓度 18.86 μg/L,排放因子低至 0.12%。相比之下,异养段前置的 R2 系统未表现出电子定向分配的效果,且最终 N₂O 总浓度 120.26 μg/L,排放因子为 0.64%。

(2)硫自养段均以 *Thiobacillus* 为主导(R1 为 69.00%, R2 为 54.25%),异养段由 *Burkholderiaceae*_A(R1 为 24.21%, R2 为 15.82%) 和 *Thauera*(R1 为 5.87%, R2 为 16.45%) 主导。R1 硫自养段中更高度富集的优势菌可能促进了单质硫电子供体的定向分配。

(3)批次实验验证了 R1 中存在电子定向分配。R1 硫自养段电子分配至 NAR 酶的比例达到 45.36%,异养段中电子更易分配至反硝化下游功能酶(NAR 酶利用的电子仅占 27.99%),形成反硝化不同步骤之间的互补。R2 硫自养段和异养段的电子分配比例高度一致,未表现出电子分配的偏好性。

参考文献 (References) :

- [1] 曾思雨,李甜,万剑梅,等.三级AO+深度处理组合工艺在中小型城镇污水厂中的应用[J].净水技术,2024,43(7):183-189+205.
ZENG Siyu, LI Tian, WAN Jianmei, et al. Application of combined process of three stage AO+advanced treatment in small and medium sized urban WWTPs[J]. Water Purification Technology, 2024, 43(7): 183-189+205.
- [2] GRUBER W, VON KÄNEL L, VOGT L, et al. Estimation of countrywide N₂O emissions from wastewater treatment in Switzerland using long-term monitoring data[J]. *Water Research X*, 2021, 13: 100122.
- [3] 聂铭,李振轮.水体中亚硝酸盐积累的生物过程及影响因素研究进展[J].生物工程学报,2020,36(8):1493-1503.
NIE Ming, LI Zhenlun. Bioprocess of nitrite accumulation in water - A review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(8): 1493-1503.
- [4] AN Zeming, GAO Xinjie, SHAO Baishuo, et al. Synchronous achievement of advanced nitrogen removal and N₂O reduction in the anoxic zone in the AOA process for low C/N municipal wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2024, 58(5): 2335-2345.
- [5] RAVISHANKARA A R, DANIEL J S, PORTMANN R W. Nitrous oxide (N₂O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century[J]. *Science*, 2009, 326(5949): 123-125.
- [6] CAO Shenbin, DU Rui, ZHOU Yan. Coupling anammox with heterotrophic denitrification for enhanced nitrogen removal: A review[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2021, 51(19): 2260-2293.
- [7] 刘超,范心韵,张学萌,等.绿色电子供给和细胞代谢调控型反硝化研究[J].能源环境保护,2024,38(1):12-23.
LIU Chao, FAN Xinyun, ZHANG Xuemeng, et al. Denitrification research based on green electron supply and cell metabolism regulation[J]. *Energy Environmental Protection*, 2024, 38(1): 12-23.
- [8] DI CAPUA F, PIROZZI F, LENS P N L, et al. Electron donors for autotrophic denitrification[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 362: 922-937.
- [9] CHEN Fangmin, LI Xiang, GU Chenwei, et al. Selectivity control of nitrite and nitrate with the reaction of S⁰ and achieved nitrite accumulation in the sulfur autotrophic denitrification process[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 266: 211-219.
- [10] SUN Yimin, NEMATI M. Evaluation of sulfur-based autotrophic denitrification and denitrification for biological removal of nitrate and nitrite from contaminated waters[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 114: 207-216.
- [11] WANG Tong, LI Xiang, WANG Han, et al. Sulfur autotrophic denitrification as an efficient nitrogen removals method for wastewater treatment towards lower organic requirement: A review[J]. *Water Research*, 2023, 245: 120569.
- [12] 陈俊,刘锋,冯震,等.PHBV异养/硫自养协同反硝化滤池强化硝酸盐去除[J].水处理技术,2022,48(5):136-140.
CHEN Jun, LIU Feng, FENG Zhen, et al. Enhanced nitrate removal by PHBV heterotrophic/sulfur autotrophic denitrification filter[J]. *Technology of Water Treatment*, 2022, 48(5): 136-140.
- [13] KOJU R, CHENG Yu, GAO Shujia, et al. High-performance and short-process sulphur autotrophic denitrification from low-C/N wastewater using novel suspended bio-S⁰ filters[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2025, 495: 145083.
- [14] LI Yingying, LIU Ling, WANG Hongjie. Mixotrophic denitrification for enhancing nitrogen removal of municipal tailwater: Contribution of heterotrophic/sulfur autotrophic denitrification and bacterial community[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 814: 151940.

- [15] ZHANG Ruochen, XU Xijun, CHEN Chuan, et al. Interactions of functional bacteria and their contributions to the performance in integrated autotrophic and heterotrophic denitrification[J]. *Water Research*, 2018, 143: 355–366.
- [16] SUN Shanshan, LIU Jie, ZHANG Manping, et al. Thio-sulfate-driven autotrophic and mixotrophic denitrification processes for secondary effluent treatment: Reducing sulfate production and nitrous oxide emission[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 300: 122651.
- [17] WANG Yingmu, XIE Shikang, ZHOU Jian, et al. Sulfur cycle contributes to stable autotrophic denitrification and lower N₂O accumulation in electrochemically integrated constructed wetlands: Electron transfers patterns and metagenome insights[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 451: 138658.
- [18] OBEROI A S, HUANG Haiqin, KHANAL S K, et al. Electron distribution in sulfur-driven autotrophic denitrification under different electron donor and acceptor feeding schemes[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 404: 126486.
- [19] ZHU Tingting, DING Jiazeng, LIU Yingrui, et al. The effect of organic sources on the electron distribution and N₂O emission in sulfur-driven autotrophic denitrification biofilters[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 903: 166126.
- [20] YANG Zhongchen, SUN Haimeng, ZHOU Qi, 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.
- [21] 周鹏, 刘鹰, 苏鑫, 等. 可生物降解聚合物作为固相反硝化碳源的研究进展 [J]. *环境化学*, 2024, 43(6): 2047–2057.
- ZHOU Peng, LIU Ying, SU Xin, et al. Research progress in biodegradable polymers as the carbon sources of solid-phase denitrification process[J]. *Environmental Chemistry*, 2024, 43(6): 2047–2057.
- [22] FENG Yuna, WANG Lu, YIN Zhendong, et al. Comparative investigation on heterotrophic denitrification driven by different biodegradable polymers for nitrate removal in mariculture wastewater: Organic carbon release, denitrification performance, and microbial community[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1141362.
- [23] 周淼, 周立昌, 程伯夷, 等. 单质硫强化城市污水反硝化除磷效能研究 [J]. *能源环境保护*, 2025, 39(1): 181–190.
- ZHOU Miao, ZHOU Lichang, CHENG Boyi, et al. Study on the efficiency of denitrification and phosphorus removal in municipal wastewater enhanced by elemental sulfur[J]. *Energy Environmental Protection*, 2025, 39(1): 181–190.
- [24] HUANG Cong, LIU Qian, LI Zhiling, et al. Relationship between functional bacteria in a denitrification desulfurization system under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions[J]. *Water Research*, 2021, 188: 116526.
- [25] LIN Xiaolan, HETHARUA B, LIN Lian, et al. Mangrove sediment microbiome: Adaptive microbial assemblages and their routed biogeochemical processes in Yunxiao mangrove national nature reserve, China[J]. *Microbial Ecology*, 2019, 78(1): 57–69.
- [26] LEI Liusheng, GU Jie, WANG Xiaojuan, et al. Effects of phosphogypsum and medical stone on nitrogen transformation, nitrogen functional genes, and bacterial community during aerobic composting[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 753: 141746.
- [27] LI Jiaping, LOU Juqing, LYU Jiao. The effect of sulfate on nitrite-denitrifying anaerobic methane oxidation (nitrite-DAMO) process[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 731: 139160.
- [28] LUO Zhiwen, ZHONG Qiuping, HAN Xingguo, et al. Depth-dependent variability of biological nitrogen fixation and diazotrophic communities in mangrove sediments[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 212.
- [29] HUANG Huiling, ZAN Shuaijun, SHAO Kuishuang, et al. Spatial distribution characteristics and interaction effects of DOM and microbial communities in kelp cultivation areas[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 920: 170511.
- [30] WANG Xiaonan, LI Jiahao, ZHENG Jieyan, et al. Polysaccharide preferred minority-dominant community assembly and exoenzyme enrichment in transparent exopolymer particles: Implication for global carbon cycle in water[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 914: 169976.
- [31] PENG Chong, FAN Xuan, XU Yujin, et al. Microscopic analysis towards rhamnolipid-mediated adhesion of *Thiobacillus denitrificans*: A QCM-D study[J]. *Chemosphere*, 2021, 271: 129539.
- [32] LU Yusheng, GU Wenjie, XU Peizhi, et al. Effects of sulphur and *Thiobacillus thio-parus* 1904 on nitrogen cycle genes during chicken manure aerobic composting[J]. *Waste Management*, 2018, 80: 10–16.
- [33] LIU Xuzhen, ZHAO Changsheng, XU Tongtong, et al. Pyrite and sulfur-coupled autotrophic denitrification system for efficient nitrate and phosphate removal[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 384: 129363.
- [34] SUI Qianwen, DI Fei, ZHONG Hui, et al. Molecular insight into the allocation of organic carbon to heterotrophic bacteria: Carbon metabolism and the involvement in nitrogen and phosphorus removal[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 933: 173302.
- [35] HOU Zilong, DONG Wenyi, WANG Hongjie, et al. Response of nitrite accumulation to elevated C/NO₃⁻-N ratio during partial denitrification process: Insights of extracellular

- lar polymeric substance, microbial community and metabolic function[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 384: 129269.
- [36] TONG Hui, LI Jiahui, CHEN Manjia, et al. Iron oxidation coupled with nitrate reduction affects the acetate-assimilating microbial community structure elucidated by stable isotope probing in flooded paddy soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2023, 183: 109059.
- [37] 周小国, 郭小雪, 郭春麟, 等. 硫自养/异养反硝化协同处理含硝氮废水技术的现状与展望 [J]. *水资源研究*, 2022(4): 407-415.
ZHOU Xiaoguo, GUO Xiaoxue, GUO Chunlin, et al. Present situation and prospect of synergetic treatment of sulfur autotrophic/heterotrophic denitrification in the treatment of nitrate-containing wastewater[J]. *Journal of Water Resources Research*, 2022(4): 407-415.
- [38] QIAN Feiyue, LIU Yaru, HE Lingli, et al. Metagenomic insights into microbial metabolic mechanisms of a combined solid-phase denitrification and anammox process for nitrogen removal in mainstream wastewater treatment[J]. *Journal of Environmental Management*, 2024, 366: 121797.
- [39] DOĞAN E C, TÜRKER M, DAĞAŞAN L, et al. Simultaneous sulfide and nitrite removal from industrial wastewaters under denitrifying conditions[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17(3): 661-668.
- [40] LIU Yingrui, HE Yanying, CHEN Feng, et al. Flocs enhance nitrous oxide reduction capacity in a denitrifying biofilm-based system: Mechanism of electron competition [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 455: 140599.
- [41] LIU Yingrui, HE Yanying, REN Shuqi, et al. Selective organic carbon enrichment influences nitrous oxide reduction by denitrifiers: Electron competition insights[J]. *ACS ES& T Water*, 2022, 2(7): 1265-1275.
- [42] 罗方周, 齐鲁. 固体碳源用于污水深度脱氮的研究进展 [J]. *中国给水排水*, 2024, 40(8): 34-39.
LUO Fangzhou, QI Lu. Research progress on solid carbon source for advanced nitrogen removal in sewage treatment[J]. *China Water & Wastewater*, 2024, 40(8): 34-39.