

不同类型电子供体驱动的反硝化脱氮效果与机制

王京京

贵州民族大学

DOI:10.32629/eep.v9i3.3122

[摘要] 随着水污染问题的日益严重和生态环境保护的迫切需要,污水中硝态氮去除效率的提升迫在眉睫且已成为氮去除的主要瓶颈。本研究通过添加有机电子供体和无机电子供体分别促发自养反硝化和异养反硝化过程对比两种类型电子供体对硝态氮去除效率的影响。结果表明,有机电子供体通过显著提升反硝化全流程功能基因(如narG、nirK、nosZ)丰度,实现了更为高效的反硝化速率和硝态氮去除效率(50%以上),其持续电子供给能力及碳源特性驱动了有机碳降解相关微生物群落的演替。无机电子供体虽可激活反硝化前期基因表达,但因电子供应间断性和氧化微环境导致反硝化过程的不彻底,最终导致亚硝态氮积累,反硝化速率和硝态氮去除效率明显低于有机电子供体实验组,但部分无机电子供体的氧化过程可驱动磷的化学吸附(磷去除效率提升20%以上),表现出氮磷协同去除特性。无机电子供体的添加显著富集氧化菌的功能菌群。因此,有机供体仍是当前强化反硝化脱氮的优选策略,而无机供体需通过优化电子传递体系提升反硝化过程的完整性,其多污染协同去除特性为废水处理提供了新的技术方向。

[关键词] 有机电子供体; 无机电子供体; 反硝化

中图分类号: Q939.11+1 **文献标识码:** A

Effects and Mechanisms of Denitrification Driven by Different Types of Electron Donors

Jingjing Wang

Guizhou Minzu University

[Abstract] As water pollution issues are getting increasingly severe and the urgent need for ecological environmental protection is arising, it is imperative to enhance the removal efficiency of nitrate nitrogen from wastewater, which has become a major constraint in nitrogen removal. By adding organic electron donors and inorganic electron donors, this study compares the effects of two types of electron donors on the removal efficiency of nitrate nitrogen, triggering autotrophic denitrification and heterotrophic denitrification processes, respectively. The results indicate that organic electron donors significantly enhance the abundance of functional genes (such as narG, nirK, and nosZ) throughout the denitrification process, achieving more efficient denitrification rates and nitrate nitrogen removal efficiency (over 50%). Their sustained electron supply capability and carbon source characteristics drive the succession of microbial communities related to organic carbon degradation. Despite inorganic electron donors can activate the expression of early denitrification genes, the intermittent electron supply and oxidative microenvironment lead to an incomplete denitrification process, ultimately resulting in the accumulation of nitrite nitrogen. The denitrification rate and nitrate nitrogen removal efficiency are significantly lower than those of the organic electron donor experimental group, but the oxidative processes of some inorganic electron donors can drive the chemical adsorption of phosphorus (with phosphorus removal efficiency increased by over 20%), demonstrating a synergistic removal characteristic for nitrogen and phosphorus. The addition of inorganic electron donors significantly enriches the functional community of oxidizing bacteria. Therefore, organic donors remain the preferred strategy for enhancing denitrification and nitrogen removal, while inorganic donors need to optimize electron transfer systems to improve the completeness of the denitrification process. Their multi-pollutant synergistic removal characteristics offer new technological directions for wastewater treatment.

[Key words] Organic electron donor; Inorganic electron donor; Denitrification

1 引言

随着工业化和城镇化进程的加速推进,全球的水体正日益受到氮污染的威胁^[1-2]。氮污染的来源复杂且多样,主要包括农业生产过程中大量使用的化肥、畜禽养殖过程中排放的废水、各类工业生产产生的废水以及城市生活污水的排放^[3-4]。这些来源共同导致了水体中氮污染的多样性,形成了以铵态氮、硝态氮及亚硝态氮为主的污染格局。其中,硝态氮因其高度的溶解性和较强的迁移性,成为导致水体富营养化的主要驱动因素之一,严重影响着水生态系统的健康和稳定^[5]。因此,控制和去除水体中的硝态氮污染显得尤为紧迫。

目前,硝态氮去除技术主要包括化学还原、物理吸附、生物反硝化和膜分离等^[6]其中,生物反硝化技术因其成本相对较低、适用范围广、去除效果稳定等优点而成为绝大多数污水处理厂采用的主流硝态氮末端处理技术^[7]。生物硝化反硝化技术相比于厌氧氨氧化、短程反硝化等技术而言具有技术成熟、应用领域广泛、操作管理经验丰富、适用于各种类型污水且脱氮效果好的优点,但由于在处理低碳氮比污水过程中需要额外添加价格昂贵的有机碳源如甲醇、乙酸钠等为反硝化过程提供电子供体,这大大增加了污水处理厂的处理成本^[8]。

本研究构建室内模拟装置,模拟污水处理厂反硝化阶段的厌氧环境,选择无机物(Fe^{2+} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、黄铁矿和有机物(茭白叶、干牛粪、菌棒废料)作为电子供体,研究构建的系统对氮磷的去除效果,并分析系统内的反硝化速率、微生物群落结构、功能基因(包括氧化过程、反硝化过程、有机碳降解过程等),探寻不同类型电子供体驱动的反硝化过程的机制,提出最佳的电子供体类型和未来的研究方向,为硝态氮去除效率的提升提供技术支撑。

2 材料与方法

2.1 实验装置与设计

为研究有机和无机电子供体对反硝化脱氮的效果,构建一套室内模拟装置。该装置为直径152mm、高度1205mm的树脂玻璃圆柱体实验柱,在实验柱底部从上向下依次添加碎石(100mm)、石英砂(100mm)、细沙(100mm),然后在上方添加一层由取自武汉市洪山区污水处理厂的活性污泥和电子供体的混合层(300mm),最上层为陶粒层(400mm),以隔绝空气为电子供体层提供缺氧环境。电子供体分为有机电子供体和无机电子供体实验组,其中有有机电子供体从三类常见农业固废中选取干牛粪(畜牧养殖类)、茭白叶(农业秸秆类)和平菇菌棒(真菌养殖类),无机电子供体类选择硫代硫酸钠、氯化亚铁、黄铁矿。同时设置空白组(无电子供体添加),合计7个实验组,每组设置3个平行。实验开始前试运行一周,每日注入实验柱中自来水,冲刷系统内的杂质。随后,每日注入模拟污水(1mg/L P: KH_2PO_4 ; 3.2mg/L N: KNO_3 ; 1.6mg/L N: NH_4Cl),滞留时间1小时,连续运行三个月。每三日监测进水 and 出水碳氮磷相关指标,实验结束后取电子供体层基质测定反硝化速率及宏基因组。

2.2 氮磷相关指标及DOC浓度测定

TP用过硫酸钾高温消解(121℃, 30min)后钼蓝比色法测定(GB11893-89),溶解反应性磷(SRP)浓度用钼蓝比色法测定^[9]。 NO_3^- -N浓度用紫外分光光度法, NO_2^- -N用磺胺和乙酸萘乙二胺试剂法, NH_4^+ -N用靛酚蓝比色法^[10]。TN用碱性过硫酸钾消解(121℃, 30min)后紫外分光光度法测定(GB11894-89)。将水样通过GF/C滤纸(Whatman)过滤后,使用TOC分析仪(Multi N/C 2100)分析水样中的溶解性有机碳(DOC)含量。

2.3 反硝化速率

根据Risgaard-Petersen^[11]和Hou, L.^[12]的研究,沉积物反硝化和厌氧氨氧化速率采用氮同位素追踪技术进行测定。

2.4 宏基因分析

使用E. Z. N. A.®土壤DNA试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U. S.)从沉积物样本中提取总基因组DNA。用TBS-380和NanoDrop2000分别测定提取DNA的浓度和纯度。在1%琼脂糖凝胶上检测DNA提取物的质量。

DNA提取物使用Covaris M220(基因公司,中国)碎片化至平均大小约400 bp,以便进行双端文库构建。双端文库使用NEXTFLEX Rapid DNA-Seq(Bioo Scientific,美国德克萨斯州奥斯汀)进行构建。

数据在Majorbio云平台(www.majorbio.com)的免费在线平台上进行分析。简而言之,成对端Illumina读数被修剪掉适配体,低质量读数(长度<50 bp或质量值<20或有N个碱基)被fastp^[13]去除。

元基因组学数据使用MEGAHIT^[14]进行组装。选择长度 ≥ 300 bp的等位基因作为最终组装结果,然后将等位基因用于进一步的基因预测和注释。

使用Prodigal^[15]/MetaGene^[16]预测了每个组装序列的开放阅读框(ORF)。利用NCBI翻译表检索长度 ≥ 100 bp的预测ORF,并将其翻译成氨基酸序列。

2.5 统计分析方法

在本研究中,用SPSS20软件进行斯伯曼相关系数分析与威尔科克森(Wilcoxon)秩和检验,数据可视化与数据拟合(包括伪一级动力学方程拟合与线性拟合)用Origin2022软件完成,统计分析的置信水平皆为95%($p < 0.05$)。

3 结果与讨论

3.1 不同类型电子供体对氮磷去除的效果对比

整体而言,随着实验天数的增加,磷去除效果逐渐减弱。相比于实验初期的SRP接近100%去除率,实验末期各实验组SRP去除率维持在80%上下,除了无机电子供体中添加氯化亚铁实验组中,其SRP去除率始终维持在95%以上(图1),这可能是由于 Fe^{2+} 经过氧化还原反应后生成 Fe^{3+} , Fe^{3+} 水解生成 $\text{Fe}(\text{OH})_3$,絮状 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 对于磷有一定吸附作用^[17]。不同有机电子供体对于磷的去除率接近,其中较好的为菌棒废料,总磷去除率最高可达96.1%。对比有机电子供体和无机电子供体,实验柱内添加无机电子供体的磷去除效果明显优于有机电子供体(图1),这可能是由于有机电子供体释放碳源的过程中伴有一定的磷释放过程,这一现象在实验中期最为明显^[18]。

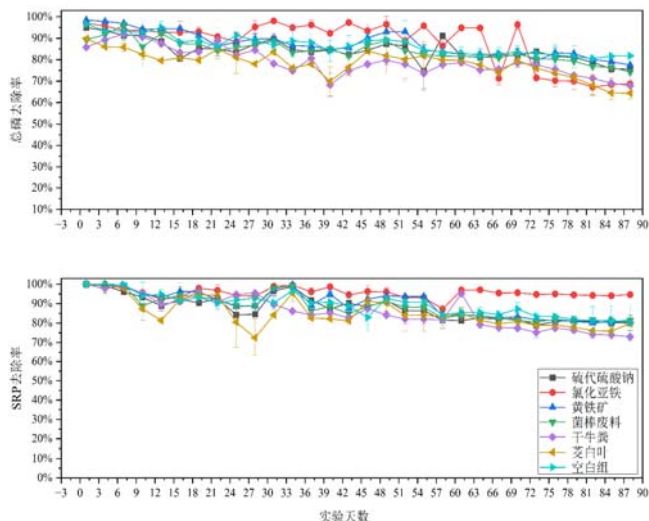


图1 不同实验组磷相关指标浓度变化

总氮的去除率呈现先上升后下降的趋势。整体来看, 茭白叶实验组总氮去除率最高, 而氯化亚铁总氮去除率最低, 这可能是氯化亚铁实验组出现了铁涂层现象^[19-20], 引起主要的硝化盐还原菌、二价铁氧化菌活性下降, 进而导致氯化亚铁实验组总氮去除率下降且在实验中后期最为明显。

硝态氮去除率呈现茭白叶>干牛粪>菌棒废料>氯化亚铁>黄铁矿>硫代硫酸钠的趋势且随时间逐步下降, 去除效果有机电子供体整体上明显优于无机电子供体(图2), 相比于无机电子供体, 有机电子供体实验组中所添加的有机物分解所释放的能量要大于无机电子供体氧化所释放的能量, 更高的能量的供给能促进异养反硝化菌的快速合成ATP 用于快速生长和合成反硝化酶(如硝酸盐还原酶narG、亚硝酸盐还原酶nirS), 使得有机电子供体实验组中反硝化细菌的密度及活性高于无机电子供体实验组^[21]。相比于有机电子供体实验组, 无机电子供体实验组电子传递链较长、传递效率同时也受限于酶活性。(如硫氧化需依赖多酶复合体、Fe²⁺氧化依赖细胞色素c、黄铁矿需要解开稳定的Fe-S键)^[22]。从生物角度来看细菌易附着固相碳源颗粒表面生长形成细菌膜, 细菌膜的形成有利于细菌群落的稳定、增强细菌整体的抗负荷冲击能力, 细菌膜内部的固相碳源释放出的有机物可以直接被外层细菌膜充分的利用, 提高了传质效率^[23]。

整体实验组中的铵态氮的去除率较高, 所有实验组的铵态氮去除率均能达到93%以上(图2), 这可能归功于所加陶粒的吸附作用。

在实验的初始阶段, 亚硝态氮的浓度极低, 未形成亚硝态氮积累。在实验中期, 亚硝态氮浓度逐渐增加, 出现亚硝态氮的积累现象。无机电子供体相比有机电子供体, 无机电子供体的亚硝态氮积累量多、积累速率快且持续时间长(图2), 说明无机电子供体未能为硝态氮还原提供足够的电子供体, 导致反硝化过程的不彻底,^[24]在实验后期同样出现亚硝态氮积累情况, 进而使得实验组反硝化速率降低。

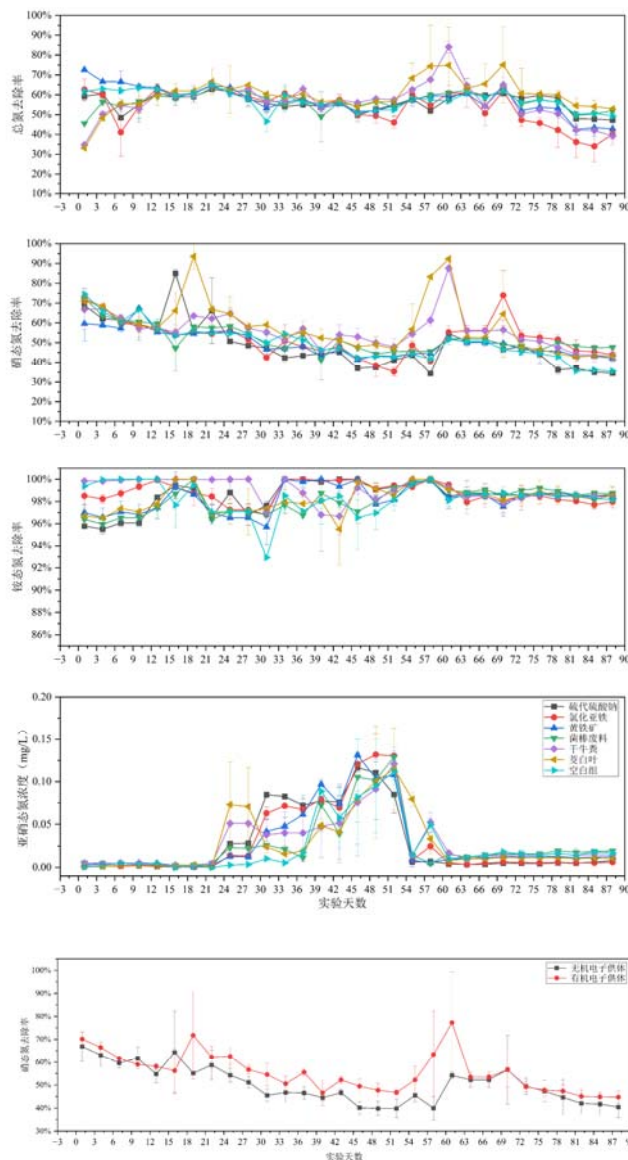


图2 不同实验组的氮相关指标去除率及浓度变化

3.2 不同类型电子供体驱动的反硝化速率与功能基因对比

有机电子供体实验组的反硝化速率远远高于无机电子供体实验组(图3), 说明添加有机电子供体后产生的小分子碳源和氨基酸等物质更加适宜反硝化细菌的生长^[25]。另外, 有机电子供体实验组中介导反硝化的功能基因丰度远远多于无机电子供体实验组(图3), 这与反硝化速率和硝态氮去除效率的结果相一致。值得注意的是, 介导硝态氮转化成亚硝态氮过程相关基因(narGHI、napAB)丰度要依次大于亚硝态氮转化为一氧化氮过程相关基因(nirKS)、一氧化氮转化为一氧化二氮过程相关基因(norBC), 介导一氧化二氮转化为氮气过程相关基因(nosZ)丰度最低, 这暗示反硝化过程的限速步骤主要发生在后期, 这在无机电子供体实验组中体现地尤为明显(图4)。

反硝化速率最高的为菌棒废料实验组, 最低的为干牛粪实验组(图3), 这可能是因为干牛粪中的小分子物质已被分解耗尽,

剩余的为牛胃中无法分解木质素-纤维素复合体的大分子物质难以被细菌利用^[26],从而影响了与脱氮相关细菌的生长和繁殖,导致菌种密度下降和反硝化速率降低。无机电子供体实验组中添加硫代硫酸钠的反硝化速率要大于氯化亚铁实验组和黄铁矿实验组(图3),从电子供体溶解性及可利用性而言,硫代硫酸钠易溶,能够快速扩散到微生物表面被直接利用且其释放出的电子当量大,氯化亚铁可溶但其稳定性差,易被氧化,黄铁矿难溶,需要微生物分泌胞外酶或通过表面接触并破坏Fe-S键缓慢释放 Fe^{2+} 和硫化物(S^{-1}),传质阻力较大,路径较长,这一现象符合溶解性电子供体>可溶性但低效电子供体>固体电子供体的普遍规律。图中不难看出有机电子供体反硝化速率远大于无机电子供体,这是由于相比于无机电子供体,有机电子供体中的有机碳源经分解后形成小分子有机物如乙酸、甲醇可以直接进入代谢途径,立即为硝态氮还原提供电子,而无机电子供体硫代硫酸钠虽可溶,但需通过多步氧化($S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$)释放电子; Fe^{2+} 易氧化为 Fe^{3+} 并沉淀,降低有效浓度;黄铁矿为固体,需缓慢蚀变释放 Fe^{2+} 和 S^{-1} ,代谢路径较长。每摩尔有机物所提供的电子远大于无机物,释放电子当量高。且异养反硝化菌因生长速率快,适应能力强,反硝化环境要求低。无机电子供体实验组中反硝化相关基因丰度最高的是Na2S2O3实验组,而Na2S2O3添加同样导致反硝化速率的提升,但硝酸盐去除速率并不高,说明无机电子供体在促进反硝化脱氮方面仍然存在诸多环节需要解决(图2,3和4)。

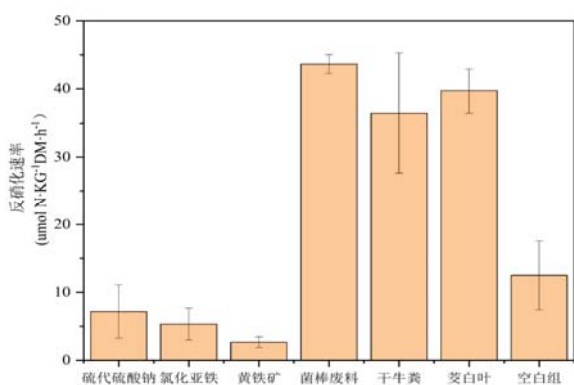


图3 不同实验组之间反硝化速率

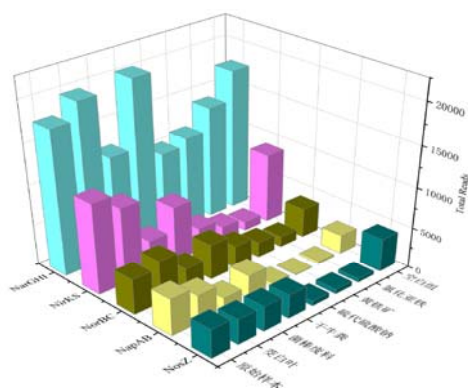


图4 反硝化相关的基因表达丰度三维柱状图

4 总结

有机电子供体添加能明显提高介导反硝化整个过程的相关功能基因,进而提升反硝化速率和硝酸盐的去除效率。无机电子供体则主要提高介导反硝化前期过程的相关功能基因,对反硝化后期过程的功能基因丰度未有明显改善,这导致其反硝化速率明显偏低,最终硝酸盐去除效率不高。究其原因,无机电子供体提供电子的能力和持续性较弱,且其营造的环境多为氧化状态,这促发了硝化作用,而反硝化作用则因电子供体供应不足导致进行不完全,进而产生亚硝酸盐的累积。与此同时,二价铁处理组明显提升了系统对磷的去除效率。

因此,有机电子供体仍然是目前提升反硝化作用的主要类型,而无机电子供体则需解决如何提升氧化还原反应增加电子的供应以维持完全反硝化作用的持续发生,且无机电子供体可以实现氮磷协同去除的目标,有很大的应用潜力。

[参考文献]

- [1]Boyle,E.(2017)Nitrogen pollution knows no bounds.Science 356(6339),700-701.
- [2]Gruber,N.and Galloway,J.N.(2008)An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle.Nature 451(7176),293-296.
- [3]Kanter,D.R.,Bartolini, F., Kugelberg, S., Leip, A., Oenema, O. and Uwizeye, A.(2020) Nitrogen pollution policy beyond the farm.Nature Food 1(1),27-32.
- [4]Wick,K.,Heumesser, C. and Schmid, E. (2012) Groundwater nitrate contamination:Factors and indicators.Journal of Environmental Management 111,178-186.
- [5]Hornung, M.(1999) Managing Risks of Nitrates to Humans and the Environment. Wilson, W.S.,Ball,A.S.and Hinton, R.H. (eds), pp.155-174,Woodhead Publishing.
- [6]Rezvani,F.,Sarrafzadeh,M.H.,Ebrahimi,S.and Oh,H.M.(2019) Nitrate removal from drinking water with a focus on biological methods:a review. Environ Sci Pollut Res Int 26(2),1124-1141.
- [7]Wu,H.,Cui,M.,Yang,N.,Liu,Y.,Wang,X.,Zhang,L.and Zhan,G.(2022) Aerobic biocathodes with potential regulation for ammonia oxidation with concomitant cathodic oxygen reduction and their microbial communities.Bioelectrochemistry 144,107997.
- [8]刘超,刘运东,王志刚.低碳氮比条件下生物脱氮成本控制方法分析应用给水排水[J].给水排水,2022,58(12):37-41.
- [9]Murphy,J.and Riley,J.P.(1962)A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters.Analytica Chimica Acta 27,31-36.
- [10]国家环保局本书编委会.水和废水监测分析方法[M].中国环境科学出版社,1989.
- [11]Risgaard-Petersen,N.,Nielsen,L.P.,Rysgaard,S.,Dalgaard, T.,Meyer,R.L.J.L. and Methods, O. (2003) Application of the isotope pairing technique in sediments where anammox and denitrification coexist.Limnology and Oceanography:Methods 63-73.

- [12]Hou,L.,Liu,M.,Carini,S.A.and Gardner,W.S.(2012)Transformation and fate of nitrate near the sediment - water interface of Copano Bay.Continental Shelf Research 35,86-94.
- [13]Chen,S.,Zhou,Y.,Chen,Y.and Gu,J.(2018)fastp:an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics 34(17), i884-i890.
- [14]Li,D.,Liu, C.M., Luo, R., Sadakane, K. and Lam, T.W. (2015) MEGAHIT:an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. Bioinformatics 31(10),1674-1676.
- [15]Hyatt, D.,Chen, G.L., Locascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W.and Hauser,L.J.(2010)Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification.BMC Bioinformatics 11,119.
- [16]Noguchi,H.,Park,J.and Takagi,T.(2006)MetaGene: prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences.Nucleic Acids Res 34(19),5623-5630.
- [17]Oikonomidis,I.,Burrows, L.J. and Carlisle-Marquet, C.M. (2010) Mode of action of ferric and ferrous iron salts in activated sludge.85(8),1067-1076.
- [18]Ugwu,S.N.and Enweremadu,C.C.(2023)Optimization of iron-enhanced anaerobic digestion of agro-wastes for biomethane production and phosphate release. Environ Technol 44(5), 721-738.
- [19]Bradley, J.M., Svistunenko, D.A., Wilson, M.T., Hemmings, A.M.,Moore,G.R.and Le Brun,N.E.(2020)Bacterial iron detoxification at the molecular level. Journal of Biological Chemistry 295(51),17602-17623.
- [20]Jia, W.,Wang,Q.,Zhang,J.,Yang,W.and Zhou,X.(2016)Nutrients removal and nitrous oxide emission during simultaneous nitrification,denitrification, and phosphorus removal process: effect of iron. Environmental Science and Pollution Research 23(15),15657-15664.
- [21]Miao,L.,Chai,W.,Luo, D., Adye], T.M., Wu, J., Kong, M., Wang, W. and Hou,J.(2023) Effects of released organic components of solid carbon sources on denitrification performance and the related mechanism. Bioresource Technology 389,129805.
- [22]Zhan,Y.,Yang,M.,Zhang, S., Zhao, D., Duan, J., Wang, W. and Yan,L.(2019)Iron and sulfur oxidation pathways of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. World J Microbiol Biotechnol 35(4),60.
- [23]Fan,Z.,Hu,J.and Wang,J.(2012)Biological nitrate removal using wheat straw and PLA as substrate. Environ Technol 33(19-21),2369-2374.
- [24]Liang,J.,Chen,N.,Tong,S.,Liu, Y.and Feng,C.(2018)Sulfur autotrophic denitrification(SAD)driven by homogeneous composite particles containing CaCO₃-type kitchen waste for groundwater remediation.Chemosphere 212,954-963.
- [25]Li,Y.,Liu,L.and Wang,H.(2022)Mixotrophic denitrification for enhancing nitrogen removal of municipal tailwater: Contribution of heterotrophic/sulfur autotrophic denitrification and bacterial community. Science of The Total Environment 814,151940.
- [26]Haroun,B.,El-Qelish,M.,Kianizadeh,S.,Muller,C.,Bronstad, E., Oza,S.,Kakar, F., Bell, K.Y., Wells, M.J.M. and Nakhla, G. (2025) Long term impact of lignin accumulation in cattle manure digesters on biomass activity and chemical post treatment. Energy Conversion and Management 327,119581.

作者简介:

王京京(1995--),男,安徽人,硕士研究生,研究方向: 水污染处理方向。