

净水技术前沿与热点综述

包丽婧, 陈东辉, 朱艳彬, 等. 废水硫自养反硝化的电子供体与功能基因研究进展[J]. 净水技术, 2024, 43(3):7-15, 28.

BAO L J, CHEN D H, ZHU Y B, et al. Research progress of electron donors and functional genes for sulfur autotrophic denitrification in wastewater treatment[J]. Water Purification Technology, 2024, 43(3):7-15, 28.

废水硫自养反硝化的电子供体与功能基因研究进展

包丽婧¹, 陈东辉¹, 朱艳彬¹, 包茵舟¹, 黄满红^{1,2,*}

(1. 东华大学环境科学与工程学院, 纺织行业污染治理与减排技术重点实验室, 上海 201620; 2. 上海污染控制与生态安全研究院, 上海 200092)

摘要 由于含氮废水的排放和含氮肥料的大量使用, 氮污染成为一个日益严重的问题。生物处理的效率高、成本低、对环境友好, 是废水脱氮的主要处理技术之一。硫自养反硝化由于不需要额外的碳源、产泥量少等特点而得到广泛关注。文章对单质硫、硫化物、硫代硫化物作为电子供体进行反硝化脱氮的研究进展进行了综述, 探讨了硫自养反硝化的代谢途径和影响机制, 对几种硫自养反硝化的影响因子进行了概述。在此基础上分析了硫自养反硝化微生物以及 *nar*、*nir*、*nor*、*nos* 等几种反硝化功能基因, 并对反硝化工艺的发展和联用技术提出展望。

关键词 硫自养反硝化 功能基因 功能酶 电子供体 含氮污染物

中图分类号: X703 文献标识码: A 文章编号: 1009-0177(2024)03-0007-10

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2024.03.002

Research Progress of Electron Donors and Functional Genes for Sulfur Autotrophic Denitrification in Wastewater Treatment

BAO Lijing¹, CHEN Donghui¹, ZHU Yanbin¹, BAO Yinzhou¹, HUANG Manhong^{1,2,*}

(1. Key Laboratory of Pollution Control and Emission Reduction Technology for Textile Industry, College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China;

2. Shanghai Institute of Pollution Control and Ecological Security, Shanghai 200092, China)

Abstract Nitrogen pollution has become an increasingly serious problem due to the discharge of nitrogen containing wastewater and the extensive use of nitrogen containing fertilizers. Biological denitrification is one of the main treatment technologies for wastewater denitrification because of the high efficiency, low cost and environmental friendliness of biological treatment. Sulfur autotrophic denitrification has received widespread attention because it does not require an additional carbon source and produces less sludge. In this paper, progress of denitrification by elemental sulfur, sulfide and thiosulfate as electron donors are introduced, the metabolic pathways and influence mechanisms of sulfur autotrophic denitrification are explored, and an overview of several influencing factors for sulfur autotrophic denitrification is given. On this basis, sulfur autotrophic denitrification bacteria as well as several types of functional genes of denitrification such as *nar*, *nir*, *nor* and *nos* are analyzed, with a view to offering an outlook on the development of denitrification processes and co-location technologies.

Keywords sulfur autotrophic denitrification functional gene functional enzyme electron donor nitrogen pollutant

[收稿日期] 2023-04-09

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2019YFC0408304)

[作者简介] 包丽婧(1999—), 女, 硕士, 研究方向为反硝化处理技术, E-mail: Happyblj@126.com。

[通信作者] 黄满红, 教授, E-mail: huangmanhong@dhu.edu.cn。

污水处理中的生物反硝化根据微生物所需电子供体的不同, 可以分为异养反硝化和自养反硝化。大部分反硝化微生物都是异养型, 能够以 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 作氮源, 繁殖迅速, 脱氮效果显著。异养反硝化需要有机物作为电子供体, 才能够有效地支持

NO₃⁻-N 向最终产物转化。由于大部分污水中有机物的含量不足以持续地维持异养反硝化,需要不间断地外加碳源,通常是添加甲醇或乙酸钠,使进水的 C/N 维持在 3~5,这无疑会增加城市污水处理厂的投入成本[1],并且有可能会产生有机碳源的二次污染[2]。

随着国家对废水中脱氮要求的提高以及“双碳”理念的深入,亟需发展更加高效和低碳的水处理方式。自养反硝化利用无机化合物作为电子供体,通过自养微生物氧化无机化合物,包括氢、还原性硫化物、Fe²⁺和硫化亚砷酸盐等[3-4],能够解决外加碳源带来的二次污染和额外的成本[5],减少碳排放,契合“双碳”发展目标。硫自养反硝化是近年来研究较多的自养反硝化类型,因其产泥量少[6]、运营成本较低[7]等原因而受到广泛关注。由 Web of Science 检索可知(图 1),2002 年—2022 年,关于硫自养反硝化文献数量总体呈现出上升的趋势,其中对硫自养反硝化过程中电子供体和功能基因的研究也逐渐增加,主要研究了电子供体在实际中的应用,以及功能基因在反硝化过程中的作用。不同电子供体驱动的硫自养反硝化工艺各有利弊,其中对单质硫(S⁰)、硫化物(S²⁻)和硫代硫化物(S₂O₃²⁻)的研究最多。不同的电子供体提供了不同的营养条件,各营养条件下细菌功能群之间存在差异性[3],因此,代谢产物不同,产生的反硝化效果也会有不同。

目前,国内外对于硫自养反硝化电子供体及功

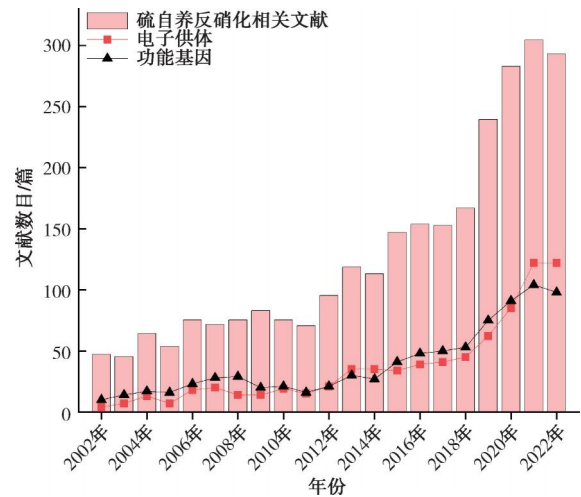


图 1 硫自养反硝化近 20 年发表论文数量 (Web of Science)

Fig. 1 Number of Papers Published in Last 20 Years on Sulfur Autotrophic Denitrification (Web of Science)

能基因的研究进展较少,本文综述了自养反硝化中 3 种常见的电子供体,对相关的功能基因和功能酶进行了阐述,以期对未来高效绿色反硝化处理提供参考。

1 硫自养反硝化的电子供体

多种形式的硫能够充当硫自养反硝化的电子供体,常见的形式为 S⁰、S²⁻和 S₂O₃²⁻。不同硫源进行反硝化的反应式如表 1 所示。当这些硫源都存在时,它们的有效性顺序为 S²⁻>S₂O₃²⁻>S⁰[8],除了可用性,浓度也决定了对硫源利用的先后关系。S²⁻反应的吉布斯自由能最小,因此,S²⁻作为电子供体的有效性最高。

表 1 不同硫源进行反硝化的反应式

Tab. 1 Reaction Equations for Denitrification from Different Sources of Sulfur

硫源	反应式	吉布斯自由能 ΔG ⁰
S ⁰ [9-10]	$S^0 + 1.2NO_3^- + 0.4H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 0.6N_2 + 0.8H^+$	- 547.6 kJ/mol (- 91.3 kJ/e ⁻)
S ²⁻ [10]	$S^{2-} + 2.67NO_3^- + 2.67H^+ \rightarrow SO_4^{2-} + 1.33N_2 + 1.33H_2O$	- 920.3 kJ/mol (- 115.0 kJ/e ⁻)
S ₂ O ₃ ²⁻ [11]	$S_2O_3^{2-} + 1.6NO_3^- + 0.2H_2O \rightarrow 2SO_4^{2-} + 0.8N_2 + 0.4H^+$	- 765.7 kJ/mol

S²⁻能够被完全氧化为硫酸盐,即每个硫原子转移 8 个电子,因此,S²⁻是最适合作为化能自养微生物的能源之一[12],在废水处理中具有巨大的应用潜力。硫源发生氧化的过程为反硝化提供电子,使得各反应能在功能酶的调控下正常进行。当 S²⁻[13-14]和 S₂O₃²⁻[15]作为电子供体参与反硝化反应时,首先被氧化成 S⁰,在进一步反应中 S⁰再被氧化为 S₂O₃²⁻和 S₂O₄²⁻[16],可能会产生硫酸盐污染。因此,有的研究通过控制反应条件,例如温度[17]、pH[18]、DO 等,

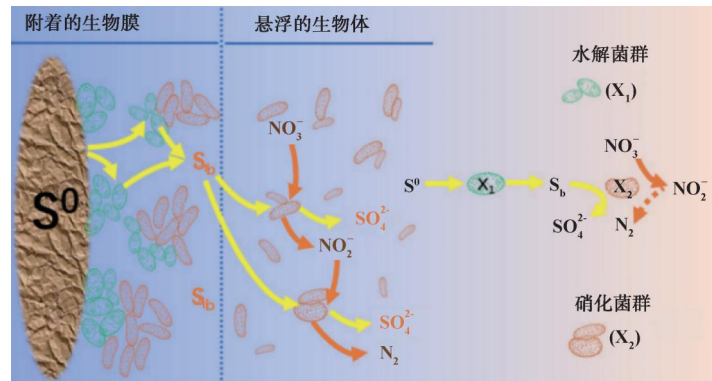
在进行反硝化的同时回收元素硫,从而避免产生硫酸盐积累。

1.1 S⁰

S⁰无毒并且容易获得,通常被用于自养反硝化研究[19],利用 S⁰氧化 1 mg NO₃⁻-N 可产生 7.83 mg SO₄²⁻[20]。Liu 等[21]发现 S⁰更有利于亚硝酸盐的还原,S⁰可以作为生物质载体,支持生物膜的生长,从而提高生物质保留率,提高硫氧化和硝酸盐还原的整体性能。Li 等[22]发现使用 S⁰可获得

95 g N/(m³·d)反硝化率。Sahinkaya 等^[23]在膜生物反应器中开发了一种 S⁰ 驱动的自养反硝化工艺,用于去除饮用水中的硝酸盐,并几乎实现了硝酸盐的完全去除。S⁰ 驱动的自养反硝化过程被认为是零级或半级动力学反应^[24],反应的稳定性比较高,

反应过程如图 2 所示。由于 S⁰ 的水溶性比较低,可能会限制总的反硝化速率,但是通过施加负电位能够改善硫的转化和转移^[25],将 S⁰ 转化为溶解态的 S²⁻,或者将固相 S⁰ 附着在外膜表面以加速传质,从而促进硫自养反硝化。



注: S_b 为生物可利用性硫。

图 2 S⁰ 驱动自养反硝化步骤^[24]

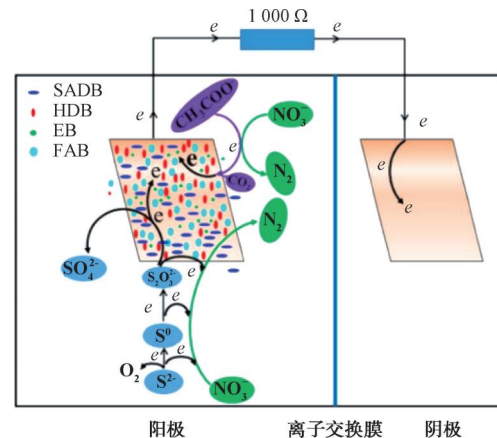
Fig. 2 Steps of S⁰-Based Denitrification^[24]

S⁰ 的颗粒大小和形态也会对处理效果产生影响。0.5~16 mm 粒径的 S⁰ 常用于实验室和中试规模的研究^[24],因为较小的颗粒可以达到相对较高的反硝化速率和传质效率,并为生物膜的生长提供更大的面积。Hao 等^[26]使用 S⁰ 粉末进行序批式反应获得种子生物膜,接种到 S⁰ 填料床反应器中,硝酸盐去除率高达 93.0%。由于生物源 S⁰ 颗粒的亲水表面和特殊结构能够提高胶体稳定性,其表面亲水性的长链聚合物能够使 S⁰ 更容易分散在水中。因此,与化学合成的 S⁰ 粉末相比,使用生物源 S⁰ 作为硫自养反硝化的电子供体时,NO₃⁻-N 去除速率更高^[27]。

1.2 S²⁻

S²⁻ 完全氧化产生的 SO₄²⁻ 比 S⁰ 产生的少,每氧化 1 mg/L NO₃⁻-N 仅产生 5.58 mg/L SO₄²⁻^[20],但是,近年来对 S²⁻ 的研究逐渐深入,发现其作为电子供体具有很高的潜力。与 S⁰ 相比,S²⁻ 对反硝化菌的生物利用度更高^[20],并且完全氧化 S²⁻ 在热力学上更容易进行。S²⁻ 很容易通过电化学氧化和生物催化进行氧化,Ai 等^[28]利用阳极混合营养反硝化微生物燃料电池处理低碳氮生活污水(图 3),其中 S²⁻ 充当了反硝化和发电的有效电子供体,达到了 100% 的 S²⁻ 去除率和 91% 的硝酸盐去除效率。

S²⁻ 以溶解态和固态两种形式为自养反硝化提



注: SADB 为硫自养反硝化菌; HDB 为异养反硝化菌; EB 为产电菌; FAB 为兼性自氧菌。

图 3 S²⁻ 自养反硝化微生物燃料电池^[28]

供电子。由于溶解态 S²⁻ 是一种反硝化抑制剂,对微生物具有一定毒性,研究重点逐渐转移到固态硫,即黄铁矿(FeS₂)上,FeS₂ 被认为是实现自养反硝化的硫源替代品^[29],FeS₂ 自养反硝化利用 FeS₂ 尾矿进行反硝化,能实现废物资源再利用^[30]。利用硫和 FeS₂ 结合作为电子供体,NO₃⁻-N 作为电子受体,在实现去除 NO₃⁻-N 的同时,磷酸盐也可以通过形成磷酸铁沉淀来去除^[31],从而达到了高效的脱氮除磷效果。

1.3 $S_2O_3^{2-}$

Liu 等^[21]发现 $S_2O_3^{2-}$ 提供的电子, 主要用于还原硝酸盐为亚硝酸盐。与 S^0 和 S^{2-} 相比, 可溶性的 $S_2O_3^{2-}$ 的传质效率更高, 具有更高的生物利用度和更好的脱氮速率^[5]。Zhang 等^[32]在 S^0 自养反硝化中添加 $S_2O_3^{2-}$ 作为补偿电子供体, 由于提供了更多电子、消耗更多 DO, 反硝化细菌的总丰度从 24.24% 增加到 36.62%, 脱氮效率也得到提升。Gao 等^[5]发现 $S_2O_3^{2-}$ 能够同时促进自养和异养反硝化细菌的生长。然而废水中 $S_2O_3^{2-}$ 的含量一般都很低或者没有^[33], 需要适当地补加, 而利用 $S_2O_3^{2-}$ 氧化 1 mg NO_3^- -N 会产生 11.067 mg SO_4^{2-} ^[20], 一定程度上引入了更多的硫酸盐以及会产生相应的处理费用。所以目前对于 $S_2O_3^{2-}$ 用于自养反硝化更多地停留在实验室阶段。

不同电子供体用于反硝化的成本^[20]如表 2 所示, 可以发现, 硫自养反硝化的成本普遍较低, 大大减少了碳源的投加造成的费用, 并且避免了二次碳污染, 生物量的减少还能够降低后续污泥处

理的成本。对比不同的硫源可知, S^{2-} 的处理成本最低, 尽管 $S_2O_3^{2-}$ 适用性更强, 但其成本约为 S^{2-} 和 S^0 的 6 倍。总体而言, 硫自养反硝化存在较好的利用前景。

表 2 不同电子供体用于反硝化的成本

电子供体	(电子供体/氮转化量)/ ($kg \cdot kg^{-1}$)	成本/(元· kg^{-1})
CH_3OH	2.5	12.4~15.9
CH_3COOH	3.6	54.6
S^0	2.6	1.8
S^{2-}	1.9	1.7
$S_2O_3^{2-}$	6.5	9.7~11.7

2 硫自养反硝化微生物

2.1 硫自养反硝化主要菌属

最常见的硫自养脱氮微生物主要是 *Thiobacillus* (脱氮硫杆菌属) 和 *Sulfurimonas* (硫单胞菌属), 表 3 列举了几种常见的反硝化优势菌属以及它们能够利用的电子供体。

表 3 硫自养反硝化微生物和主要的电子供体

Tab. 3 Microbe of Sulfur Autotrophic Denitrification and Main Electronic Donor

菌属	电子供体	电子受体	适宜温度/ $^{\circ}C$	适宜 pH 值	参考文献
<i>Beggiatoa</i>	$S^0, S_2O_3^{2-}$	O_2, NO_3^- -N	25~38	6~9	[10]
<i>Thiothrix</i>	$S^0, S^{2-}, S_2O_3^{2-}$	O_2, NO_3^- -N	25~30	6.5~8.5	[10]
<i>Thioalkalispira</i>	$S^{2-}, S_2O_3^{2-}$	O_2, NO_3^- -N	30	10	[10]
<i>Thioalkalivibrio</i>	$S_2O_3^{2-}$	NO_3^- -N, NO_2^- -N	40	7.5~10.5	[10]
<i>Thionulum</i>	$S^0, S^{2-}, S_2O_3^{2-}$	O_2, NO_3^- -N	>15	/	[10]
<i>Thiomicrospira</i>	$S^0, S^{2-}, S_2O_3^{2-}$	O_2, NO_3^- -N, NO_2^- -N	5~35	5.5~8.5	[11]
<i>Thiohalobacter</i>	$S^0, S^{2-}, S_2O_3^{2-}$	NO_3^- -N	30	8~9	[24]
<i>Sulfurimonas</i>	$S^0, S^{2-}, S_2O_3^{2-}$	NO_3^- -N, NO_2^- -N	22~35	5.4~8.5	[34]
<i>Thiobacillus</i>	$S^0, S^{2-}, S_2O_3^{2-}$	O_2, NO_3^- -N, NO_2^- -N	28~32	6.8~7.4	[34~35]
<i>Feritrophicum</i>	S^0, S^{2-}, Fe^{2+}	NO_3^- -N	20~30	7.4~8.1	[34~36]
<i>Paracoccus</i>	$S^{2-}, S_2O_3^{2-}$	NO_3^- -N	25~37	6.5~8.5	[36]
<i>Agrobacterium</i>	S^0	NO_3^- -N	28	7.5	[36]
<i>Thauera</i>	$S^0, S^{2-}, S_2O_3^{2-}$	NO_3^- -N	30	7.5	[36]
<i>Pseudomonas</i>	S^0, S^{2-}	NO_3^- -N, NO_2^- -N	25~30	8~9	[36]

可以发现 S^0 在硫自养反硝化领域具有广泛的研究前景, 因为几乎所有的硫相关的菌属都可以利

用 S^0 。硫自养微生物利用 S^0, S^{2-} 和 $S_2O_3^{2-}$ 作为电子供体进行反硝化(图 4), 在氧化硫的同时将硝酸盐

还原为氮气。硫自养反硝化微生物特有的功能基因表达后,产生相应的功能酶催化反应的进行,环境条件也会在此过程产生影响^[6],从而改变微生物的反硝化效率。

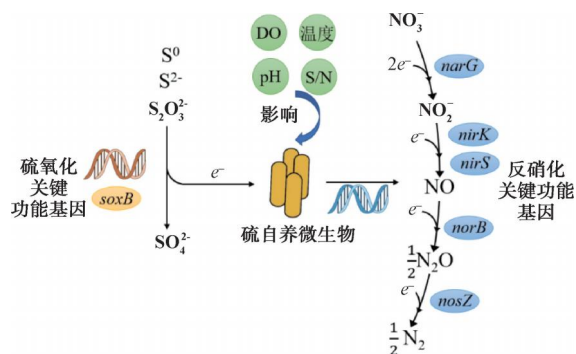


图4 硫自养微生物进行反硝化过程

Fig. 4 Denitrification Process of Sulfur Autotrophic Microorganisms

2.2 硫自养反硝化细菌环境因子

硫自养反硝化微生物的活性同时受到 pH、温度、DO 等多个因素的影响,一般来说,硫自养反硝化的最适 pH 值为 6.5~7.5,最适温度为 20~40 °C,在此范围内大部分硫自养微生物能够正常生长^[37]。较高浓度的 DO 会在一定程度上影响微生物群落,抑制脱氮酶的合成。微需氧条件(DO 质量浓度为 0.1~0.3 mg/L)下,硫氧化菌和硝酸盐还原菌的活性都能得到显著提高^[38],硝酸盐的去除效率可达 90%。Li 等^[39]发现 DO 浓度较低时,利用 S⁰ 和 FeS₂ 混合填料生成的 S₂O₃²⁻ 更少。pH 会影响微生物对硫源的利用,刺激有机物的水解和降解^[13],酸性 pH 增加了 N₂O 等中间产物的浓度,过碱则会导致矿物沉淀。Qian 等^[40]发现高 pH 会导致 NO₂-N 积累,NO₃-N 的还原速率也会受到抑制。S²⁻ 和 S₂O₃²⁻ 在 pH 值为 5~8 时能够发挥较大的作用,而 S⁰ 在 pH 值>6 时处理效果更好。

冬天较低的温度会显著降低脱氮的效果,从而限制硫自养反硝化的应用。Hao 等^[26]将 S⁰ 自养生物膜接种到 15 °C 的低温条件下进行试验,发现由于微生物在低温下产生了紧密结合的胞外聚合物(EPS),其中蛋白质含量的增加能够保护微生物免受低温影响,使得整个反应对低温的适应能力更强,脱氮性能更优。Vacková 等^[41]培养出了一种能够在 10 °C 以下进行反硝化的混合菌种,并且取得了较好

的反硝化效率。越来越多的研究拓宽了硫自养反硝化的应用范围,使得低温高效脱氮成为可能。

此外,NO₃-N 去除率与 S/N 呈正相关,而硫自养微生物 *Sulfurovum*、*Thiobacillus* 和 *Thermomonas* 丰度也与 S/N 呈高度正相关。当 S/N 较小时,由于缺乏电子供体反应无法完全进行;若 S/N 过高时,则会额外增加处理成本。因此,需要控制适当的 S/N。以 S²⁻ 驱动的自养反硝化在 S/N 接近化学计量值(2.63)时,实现了最高的自养反硝化率和总氮去除效率^[42]。Capua 等^[27]在以 S₂O₃²⁻ 为硫源的试验中,发现 S/N 为 1.8 时达到了最高的反硝化速率[52.5 g N/(m³·d)]。

3 反硝化代谢途径功能基因

微生物反硝化反应源于微生物在代谢污染物过程中产生的各类酶以及编码这些酶的相关功能基因。反硝化作用从 NO₃-N 到 N₂ 主要分为 4 步,分别受到不同功能基因的控制,图 5 描述了硫自养反硝化过程中硫和氮的转化过程。

硫氧化过程为反硝化过程提供电子供体,随着 *nap* 基因和硝酸还原酶(*Nar*)被识别,硝酸盐转化为亚硝酸盐,接着由 *nir* 基因编码的亚硝酸盐还原酶(*Nir*)将亚硝酸盐还原为 NO,因此,这类微生物有减少亚硝酸盐的能力。一氧化氮还原酶(*Nor*)和一氧化二氮还原酶(*Nos*)也是自养反硝化过程中重要的功能酶。表 4 列举了与反硝化相关的重要功能基因和酶,除了反硝化功能基因外,硫氧化基因 *sqr*、*soxB* 和 *dsrA* 的丰度在硫自养反硝化过程中也会对反硝化去除率产生一定的影响^[9,43-44],S²⁻ 通过生物电化学过程部分氧化为 S⁰,随后氧化为硫酸盐,在这过程中 *sox* 基因的丰度明显增加,从而促进反应快速进行。

然而硫自养反硝化也存在着一些缺陷,研究^[45]发现,硫驱动的自养反硝化会使系统 pH 降低,当 pH 较低时,会严重抑制 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化菌,含 *nosZ* 的反硝化菌的转录活性和生长也会受到影响,从而对反硝化造成不良影响,投加石灰石、牡蛎壳和碳酸氢钠提供碱度,能够平衡这种影响。此外,S²⁻ 具有生物毒性,会影响微生物的活性,S²⁻ 会使细胞质中的细胞色素 c(*CytC*)变性,阻碍细胞色素 c 传递电子,影响末端的氧化酶进行反硝化脱氮。因此,在用 S²⁻ 为电子供体前需要对微生物进行驯化,不断

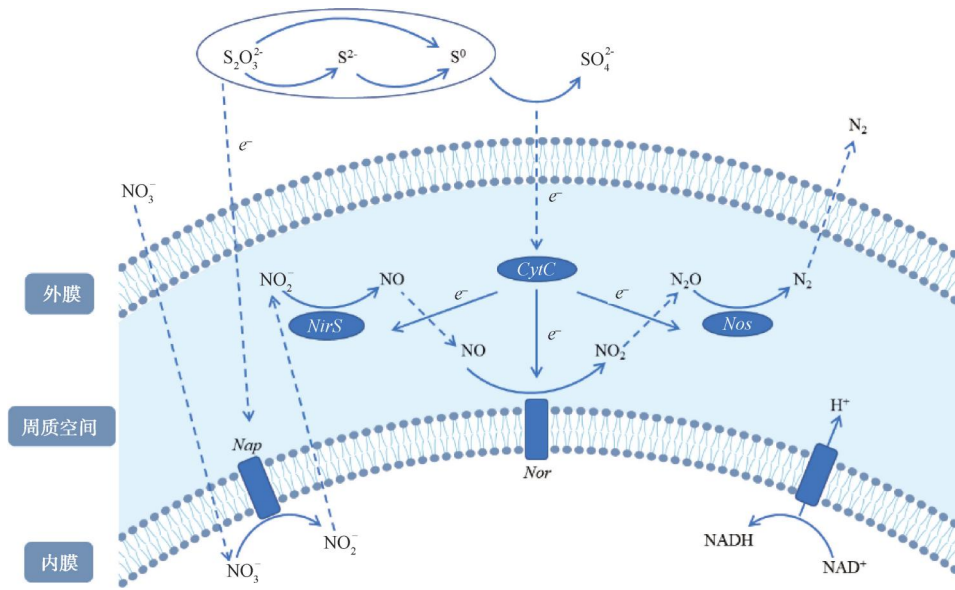


图5 反硝化过程中硫和氮的转化途径过程

Fig. 5 Pathways of Sulfur and Nitrogen during Denitrification

表4 反硝化与硫化相关的功能基因

Tab. 4 Functional Genes Associated with Denitrification and Sulphur Oxidation

类型	基因	酶	反应
反硝化基因	<i>narG</i>	膜结合型硝酸盐还原酶	$\text{NO}_3^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N}$
	<i>napA</i>	可溶性细胞质硝酸盐还原酶	
	<i>nirK</i>	含铜离子的亚硝酸盐还原酶	$\text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}$
	<i>nirS</i>	含细胞色素 cd1 亚硝酸盐还原酶	
	<i>norB</i>	NO 还原酶	$\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$
	<i>nosZ</i>	N_2O 还原酶	$\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$
	硫化基因	<i>sqr</i>	硫醌氧化酶
<i>soxB</i>		硫氧化酶	$\text{S}^{2-} / \text{S}^0 / \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$
<i>sor</i>		硫氧化酶	$\text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_3^{2-}$
<i>dsrA</i>		亚硫酸盐还原酶	$\text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_3^{2-}$

提高微生物对于 S^{2-} 毒性的耐受。

为了更好地发展和深入对反硝化代谢功能基因的研究,以确定功能性微生物在脱氮脱硫系统中的作用和相互作用,通常使用梯度凝胶电泳、基因高通量测序、宏基因组学、聚合酶链反应(PCR)(表5)等现代分子生物学手段^[46]。

反硝化功能基因是脱氮过程的关键参与者,有效管理这些功能基因以实现工艺的可靠和可持续运行,通过对特定功能基因的设计有助于提高反硝化系统的效率和稳定性。随着对硫自养反硝化微生物

功能基因研究的逐渐深入,将发现更多新的功能微生物群落和新的功能基因,有助于增强对反硝化相关过程的理解,并为系统设计提供有效、可靠和预测性的信息。

4 结论和展望

本文总结了自养反硝化过程中硫源电子供体的氧化过程及自养反硝化的主要菌种,并在此基础上分析了反硝化代谢过程中功能基因和功能酶的作用形式,以为硫自养反硝化的实际应用和改进提供参考。未来的研究与发展重点应包括以下内容。

表 5 反硝化相关功能基因的 PCR 引物
Tab. 5 PCR Primers for Denitrification-Related Functional Genes

功能基因	引物	引物序列 (5'~3')	产物长度/bp	参考文献
<i>narG</i>	narG 2179F	TACWTSCTSAAGTACCTSCT	300	[47]
	narG 3154R	GGTGRCTCTGGWAGAACT		
	narG 2488R	CBTTGTAGATCTCCARTC		
	narG 1960m2f	TA(CT)GT(GC)GGGCAGGA(AG)AAACTG	110	[48]
	narG 2050m2r	CGTAGAAGAAGCTGCTGCTT		
<i>napA</i>	napA z3F	CGGGAACAAGCTGATGAAGG	110	[49]
	napA z3R	AAGATCATCGGGATGTCGGC		
	napA fl	CTGGACIATGGGYTTIAACCA	492	[50]
	napA r1	CCTTCYTTYTCIACCCACAT		
	napA V67F	TAYTTYTNHSNAARATHATGTAYGG	414	[51]
	napA V67R	DATNGGRTGCATYTCNGCCATRTT		
<i>nirK</i>	nirK 1F	GGMATGGTKCCSTGGCA	514	[52]
	nirK 5R	GCCTCGATCAGRTRTGTGTT		
<i>nirS</i>	nirS cd3aF	G TSAACG TSAAGGARACSGG	514	[49]
	nirS R3ed	GASTTCGGRTGSGCTCTTGA		
	SenirS 372F	TGTAGCCAGCATTGTAGCGT	473	[53]
	SenirS 845R	TCAAGCCAGACCCATTTGCT		
	AnnirS 379F	TCTATCGTTGCATCGCATT	442	[53]
	AnnirS 821R	GGATGGTCTTGATAAACA		
<i>norB</i>	enorB 2F	GACAAGNNNTACTGGTGGT	389	[52]
	enorB 6R	GAANCCCANACNCCNGC		
	enorB Z1F	GCGATGATCACGTAGAGCCA	389	[49]
	enorB Z1R	CGCTGTTCHTCGACAGYCA		
<i>nosZ</i>	nosZ 1527F	CGCTGTTCHTCGACAGYCA	389	[49]
	nosZ 1773R	ATRTCGATCARCTGBTCGTT		
	nosZ F	CGYTGTTTCMTCGACAGCCAG	453	[52]
	nosZ R	CGSACCTTSTTGCSTYGGG		
<i>soxB</i>	soxB 710F	ATCGGYCAGGCYTTYCCSTA	511	[43,54]
	soxB 1184R	MAVGTGCCGTTGAARTTGC		
<i>dsrA</i>	dsr 1 F+	ACSCACTGGAAGCACGGCGG	221	[43]
	dsr R	GTGGMRCCTGCAKRTTGG		

(1) 硫自养反硝化中的微生物强化研究。继续深入对自养反硝化微生物作用机理的研究,通过投加特定的菌剂、基因增强等生物强化法以使硫自养微生物更好地利用硫源进行高效反硝化。

(2) 异养和自养反硝化混合营养形式。实际处理中投加少量碳源以增加碱度,通过有机碳刺激硫的转化,多种电子供体协同作用能够实现高效的脱

氮,降低出水硫酸盐浓度和出水硬度。

(3) 硫自养反硝化与其他工艺耦合。随着对水质处理要求的提高和对低碳低能耗的要求,越来越多的研究聚焦于硫自养反硝化与其他工艺耦合,硫自养-人工湿地、硫自养-电化学、硫驱动脱硝-厌氧氨氧化耦合都具有良好的应用前景,采用这些耦合工艺,能够充分利用中间产物,提高实际可行性。

参考文献

- [1] 余琴芳,余太平,杜敬,等. 污水处理反硝化滤池的应用综述[J]. 净水技术, 2021, 40(6): 35-41, 106.
YU Q F, YU T P, DU J, et al. Application review on denitrification filter in wastewater treatment [J]. Water Purification Technology, 2021, 40(6): 35-41, 106.
- [2] TONG S, ZHANG B G, FENG C P, et al. Characteristics of heterotrophic/biofilm-electrode autotrophic denitrification for nitrate removal from groundwater[J]. Bioresource Technology, 2013, 148: 121-127. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.146.
- [3] HUANG C, LIU Q, LI Z L, et al. Relationship between functional bacteria in a denitrification desulfurization system under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions [J]. Water Research, 2021, 188: 116526. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116526.
- [4] TIAN T, YU H Q. Denitrification with non-organic electron donor for treating low C/N ratio wastewaters [J]. Bioresource Technology, 2019, 299: 122686. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122686.
- [5] GAO L, ZHOU W L, WU S Q, et al. Nitrogen removal by thiosulfate-driven denitrification and plant uptake in enhanced floating treatment wetland[J]. Science of the Total Environment, 2018, 621: 1550-1558. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.073.
- [6] HUANG S, ZHENG Z M, WEI Q Q, et al. Performance of sulfur-based autotrophic denitrification and denitrifiers for wastewater treatment under acidic conditions [J]. Bioresource Technology, 2019, 294: 122176. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122176.
- [7] ERKAN S, NESRIN D. Use of elemental sulfur and thiosulfate as electron sources for water denitrification [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(3): 531-541.
- [8] FAN C Z, ZHOU W L, HE S B, et al. Sulfur transformation in sulfur autotrophic denitrification using thiosulfate as electron donor [J]. Environmental Pollution, 2021, 268: 115708. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115708.
- [9] ZHANG L, QIU Y Y, ZHOU Y, et al. Elemental sulfur as electron donor and/or acceptor; Mechanisms, applications and perspectives for biological water and wastewater treatment [J]. Water Research, 2021, 202: 117373. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117373.
- [10] LIN S, MACKEY H R, HAO T W, et al. Biological sulfur oxidation in wastewater treatment: A review of emerging opportunities [J]. Water Research, 2018, 143: 399-415. DOI: 10.1016/j.watres.2018.06.051.
- [11] CUI Y X, BISWAL B K, GUO G, et al. Biological nitrogen removal from wastewater using sulphur-driven autotrophic denitrification [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(15): 6023-6039.
- [12] SHAO M F, ZHANG T, FANG H. Sulfur-driven autotrophic denitrification: Diversity, biochemistry, and engineering applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(5): 1027-1042.
- [13] YIN Z X, XIE L, ZHOU Q. Effects of sulfide on the integration of denitrification with anaerobic digestion [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 120(4): 426-431.
- [14] PANG Y, WANG J. Insight into the mechanism of chemoautotrophic denitrification using pyrite (FeS₂) as electron donor [J]. Bioresource Technology, 2020, 318: 124105. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124105.
- [15] DENG Y F, EKAMA G A, CUI Y X, et al. Coupling of sulfur (thiosulfate)-driven denitrification and anammox process to treat nitrate and ammonium contained wastewater [J]. Water Research, 2019, 163: 114854. DOI: 10.1016/j.watres.2019.114854.
- [16] LIN W M, FENG J, HU K Q, et al. Sulfidation forwarding high-strength Anammox process using nitrate as electron acceptor via thiosulfate-driven nitrate denitrification [J]. Bioresource Technology, 2021, 344: 126335. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126335.
- [17] SPOSOB M, BAKKE R, DINAMARCA C. Metabolic divergence in simultaneous biological removal of nitrate and sulfide for elemental sulfur production under temperature stress [J]. Bioresource Technology, 2017, 233: 209-215. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.122.
- [18] XU J L, FAN Y M, LI Z X. Effect of pH on elemental sulfur conversion and microbial communities by autotrophic simultaneous desulfurization and denitrification [J]. Environmental Technology, 2016, 37(23): 3014-3023.
- [19] 王旦梅,周琪. 废水中硝酸盐的硫自养反硝化工艺处理研究与进展 [J]. 净水技术, 2017, 36(3): 32-37.
WANG D M, ZHOU Q. Research and progress of sulfur-autotrophic denitrification processes of nitrate removal in wastewater treatment [J]. Water Purification Technology, 2017, 36(3): 32-37.
- [20] CAPUA F D, PIROZZI F, LENS P N L, et al. Electron donors for autotrophic denitrification [J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 362: 922-937. DOI: 10.1016/j.cej.2019.01.069.
- [21] LIU Y H, WANG Y M, FAN G D, et al. Metagenomics reveals functional species and microbial mechanisms of an enriched thiosulfate-driven denitrification consortia [J]. Bioresource Technology, 2021, 341: 125916. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125916.
- [22] LI M, DUAN R, HAO W, et al. High-rate nitrogen removal from carbon limited wastewater using sulfur-based constructed wetland: Impact of sulfur sources [J]. Science of the Total Environment, 2020, 744: 140969. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140969.

- [23] SAHINKAYA E, YURTSEVER A, UCAR D. A novel elemental sulfur-based mixotrophic denitrifying membrane bioreactor for simultaneous Cr (VI) and nitrate reduction [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 324: 15–21. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.02.032.
- [24] GUO G, LI Z L, CHEN L, et al. Advances in elemental sulfur-driven bioprocesses for wastewater treatment: From metabolic study to application[J]. *Water Research*, 2022, 213: 118143. DOI: 10.1016/j.watres.2022.118143.
- [25] HAO W, MIAO B, LIU P P, et al. Potential regulation accelerates element sulfur metabolism in sulfur autotrophic denitrification[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 228: 94–100. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.04.221.
- [26] HAO W, LI Q C, LIU P P, et al. A new inoculation method of sulfur autotrophic denitrification reactor for accelerated start-up and better low-temperature adaption [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 823: 153657. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153657.
- [27] CAPUA F D, AHORANTA S H, PAPIRIO S, et al. Impacts of sulfur source and temperature on sulfur-driven denitrification by pure and mixed cultures of *Thiobacillus* [J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(10): 1576–1584.
- [28] AI T, ZHAN H, ZOU L Z, et al. Potential applications of endogenous sulfide for enhanced denitrification of low C/N domestic wastewater in anodic mixotrophic denitrification microbial fuel cell; The mechanism of electrons transfer and microbial community [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 722: 137830. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137830.
- [29] TONG S, STOCKS J L, RODRIGUEZ-GONZALEZ L C, et al. Effect of oyster shell medium and organic substrate on the performance of a particulate pyrite autotrophic denitrification (PPAD) process [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244: 296–303. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.109.
- [30] CHEN X Y, YANG L, CHEN F, et al. High efficient bio-denitrification of nitrate contaminated water with low ammonium and sulfate production by a sulfur/pyrite-based bioreactor[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 346: 126669. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126669.
- [31] LI H B, LI Y F, GUO J B, et al. Effect of calcinated pyrite on simultaneous ammonia, nitrate and phosphorus removal in the BAF system and the Fe²⁺ regulatory mechanisms; Electron transfer and biofilm properties [J]. *Environmental Research*, 2021, 194: 110708. DOI: 10.1016/j.envres.2021.110708.
- [32] ZHANG X N, ZHU L, LI Z R, et al. Thiosulfate as external electron donor accelerating denitrification at low temperature condition in S⁰-based autotrophic denitrification biofilter [J]. *Environmental Research*, 2022, 210: 113009. DOI: 10.1016/j.envres.2022.113009.
- [33] QIAN J, ZHANG M K, JING R, et al. Thiosulfate as the electron acceptor in sulfur bioconversion-associated process (SBAP) for sewage treatment [J]. *Water Research*, 2019, 163: 114850. DOI: 10.1016/j.watres.2019.07.017.
- [34] ZHOU Y, CHEN F X, CHEN N, et al. Denitrification performance and mechanism of biofilter constructed with sulfur autotrophic denitrification composite filler in engineering application [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125699. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125699.
- [35] GUO G, EKAMA G A, WANG Y Y, et al. Advances in sulfur conversion-associated enhanced biological phosphorus removal in sulfate-rich wastewater treatment: A review [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 285: 121303. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.142.
- [36] WANG J J, HUANG B C, LI J, et al. Advances and challenges of sulfur-driven autotrophic denitrification (SDAD) for nitrogen removal [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2020, 31(10): 2567–2574.
- [37] LIU L H, KOENIG A. Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification: Batch experiments [J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37(8): 885–893.
- [38] WANG X W, ZHANG Y, ZHANG T T, et al. Effect of dissolved oxygen on elemental sulfur generation in sulfide and nitrate removal process: Characterization, pathway, and microbial community analysis [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100: 2895–2905. DOI: 10.1007/s00253-015-7146-4.
- [39] LI Y, GUO J, LI H, et al. Effect of dissolved oxygen on simultaneous removal of ammonia, nitrate and phosphorus via biological aerated filter with sulfur and pyrite as composite fillers [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 296: 122340. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122340.
- [40] QIAN W T, MA B, LI X Y, et al. Long-term effect of pH on denitrification: High pH benefits achieving partial-denitrification [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 278: 444–449. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.01.105.
- [41] VACKOVÁ L, SRB M, STLOUKA R, et al. Comparison of denitrification at low temperature using encapsulated *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens* and mixed culture [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(7): 4661–4666.
- [42] XUE M, NIE Y T, CAO X W, et al. Deciphering the influence of S/N ratio in a sulfite-driven autotrophic denitrification reactor [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 836: 155612. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.155612.
- [43] PANG Y M, WANG J L. Inhibition of ferrous iron (Fe²⁺) to sulfur-driven autotrophic denitrification: Insight into microbial community and functional genes [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 125960. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125960.

(下转第 28 页)

- [59] YIN R, GUO W, DU J, et al. Heteroatoms doped graphene for catalytic ozonation of sulfamethoxazole by metal-free catalysis: Performances and mechanisms [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 317: 632–639. DOI: 10.1016/j.cej.2017.01.038.
- [60] WANG Y, CAO H, CHEN C, et al. Metal-free catalytic ozonation on surface-engineered graphene: Microwave reduction and heteroatom doping [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 355: 118–129. DOI: 10.1016/j.cej.2018.08.134.
- [61] JOTHINATHAN L, HU J. Kinetic evaluation of graphene oxide based heterogenous catalytic ozonation for the removal of ibuprofen[J]. *Water Research*, 2018, 134: 63–73. DOI: 10.1016/j.watres.2018.01.033.
- [62] WANG Y, XIE Y, SUN H, et al. Efficient catalytic ozonation over reduced graphene oxide for p-hydroxybenzoic acid (pHBA) destruction: Active site and mechanism [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(15): 9710–9720.
- [63] DU T, ADELEYE A S, ZHANG T, et al. Effects of ozone and produced hydroxyl radicals on the transformation of graphene oxide in aqueous media [J]. *Environmental Science: Nano*, 2019, 6(8): 2484–2494.
- [64] ANDREOZZI R, INSOLA A, CAPRIO V, et al. The use of manganese dioxide as a heterogeneous catalyst for oxalic acid ozonation in aqueous solution[J]. *Applied Catalysis A: General*, 1996, 138(1): 75–81.
- [65] BELTRAN F J, RIVAS F J, MONTERO-DE-ESPINOSA R. Ozone-enhanced oxidation of oxalic acid in water with cobalt catalysts. 2. Heterogeneous catalytic ozonation[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2003, 42(14): 3218–3224.
- [66] SUI M, SHENG L, LU K, et al. FeOOH catalytic ozonation of oxalic acid and the effect of phosphate binding on its catalytic activity [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2010, 96(1/2): 94–100. DOI: 10.1016/j.apcatb.2010.02.005.

(上接第 15 页)

- [44] LI W, LIU J M, ZHEN Y M, et al. Simultaneous removal of nitrite and organics in a biofilm-enhanced high-salt wastewater treatment system via mixotrophic denitrification coupled with sulfate reduction [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 40: 101976. DOI: 10.1016/j.jwpe.2021.101976.
- [45] KRISTOF B, PETER D, GESCHE B. pH-driven shifts in overall and transcriptionally active denitrifiers control gaseous product stoichiometry in growth experiments with extracted bacteria from soil[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 961. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00961.
- [46] 张凯煜. 养殖场废弃物厌氧发酵过程中反硝化功能基因变化机理研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019.
- ZHANG K Y. Variation mechanism of denitrification genes during anaerobic digestion with livestock waste[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2019.
- [47] ASTORELLI R, PICCOLO R, SIMONCINI S, et al. New primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of nitrate-reducing bacterial community in soil [J]. *Pedosphere*, 2013, 23(3): 340–349.
- [48] LÓPEZ-GUTIÉRREZ J C, HENRY S, HALLET S, et al. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 57(3): 399–407.
- [49] LIU S F, WANG M, LI T T, et al. Response of an aerobic denitrifier to titanium dioxide nanoparticles exposure [J]. *Environmental Technology*, 2020, 41(11): 1446–1454.
- [50] FENG W, LIU J, GU J, et al. Nitrate-reducing community in production water of three oil reservoirs and their responses to different carbon sources revealed by nitrate-reductase encoding gene (*napA*) [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(7): 1081–1086.
- [51] SMITH C J, NEDWELL D B, DONG L F, et al. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nfA*), and their transcripts in estuarine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(11): 3612–3622.
- [52] JUNG J, IYEOM J, HAN J, et al. Seasonal changes in nitrogen-cycle gene abundances and in bacterial communities in acidic forest soils [J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(3): 365–373.
- [53] HAN P, KLÜMPER U, WONG A, et al. Assessment of molecular detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in different environmental samples using PCR primers based on 16S rRNA and functional genes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(20): 7689–7702.
- [54] MARIA T, PAUL M, LEO C, et al. Links between sulphur oxidation and sulphur-oxidising bacteria abundance and diversity in soil microcosms based on *soxB* functional gene analysis [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(3): 538–549.