

DOI: 10.11835/j.issn.2096-6717.2021.103



开放科学(资源服务)标识码(OSID):



水铁矿驱动 Feammox 处理污泥消化液中的氨氮

梁松, 杨亚飞, 张耀斌

(大连理工大学 环境学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 异化铁还原耦合厌氧氧化(Feammox)是自然环境中普遍存在的氨氮去除途径,但该过程在污水处理领域的研究及应用还比较少。以含氨氮的污泥消化液为对象,研究其在厌氧条件下由水铁矿驱动 Feammox 进行脱氮的效果。结果表明:经过 48 d 厌氧处理后, NH_4^+ -N 去除率和总氮去除率分别为 72.4% 和 57.5%,而未投加水铁矿的对照组中 NH_4^+ -N 去除率和总氮去除率分别为 7.6% 和 2.5%;在投加水铁矿的反应器内检测到 Fe(II) 的持续产生;以同位素标记的 $^{15}\text{NH}_4^+$ -N 进料,在投加水铁矿的反应器顶空中检出 $^{30}\text{N}_2$,证明了 Feammox 的发生;实时定量 PCR(qPCR)结果显示,Feammox 功能微生物 *Acidimicrobiaceae* A6 菌表达活跃。高通量测序表明,在投加水铁矿的反应器内富集了多种铁还原菌;同时,向反应器内投加水铁矿和腐殖质后, NH_4^+ -N 去除率达 88.35%,总氮去除率达 73.75%,对反应器内铁氧化物组成和形态分析发现,腐殖质减弱了铁氧化物钝化速度,有利于水铁矿保持活性并持续参与 Feammox 脱氮。

关键词: 含氮废水;生物脱氮;异化铁还原;铁氨氧化

中图分类号: X703.1 文献标志码: A 文章编号: 2096-6717(2022)01-0168-09

Removing ammonia in sludge digester liquor by driving Feammox with ferrihydrite

LIANG Song, YANG Yafei, ZHANG Yaobin

(School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, P. R. China)

Abstract: Dissimilar iron reduction coupled with anaerobic oxidation (Feammox) is a common pathway to oxidize ammonia nitrogen in natural environment, which however has been rarely reported in sewage treatment. In this study, the sludge digester liquor was used as the NH_4^+ -N source to study the NH_4^+ -N removal during Feammox driven by adding ferrihydrite under anaerobic conditions. The results showed that after 48 days of anaerobic incubation, the NH_4^+ -N removal efficiency and total nitrogen removal efficiency were 72.4% and 57.5%, respectively, while the NH_4^+ -N removal efficiency and total nitrogen removal efficiency in the reactor without adding ferrihydrite were 7.6% and 2.5%, respectively. The continuous production of Fe(II) was detected in the ferrihydrite-added reactor. After feeding with isotope-labeled $^{15}\text{NH}_4^+$ -N as the NH_4^+ -N source, $^{30}\text{N}_2$ was detected in the headspace of the ferrihydrite-added reactor,

收稿日期: 2021-05-04

基金项目: 国家自然科学基金(21777016)

作者简介: 梁松(1995-),女,主要从事厌氧水处理研究, E-mail: elle_liang@163.com.

张耀斌(通信作者),男,教授,博士生导师, E-mail: zhangyb@dlut.edu.cn.

Received: 2021-05-04

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21777016)

Author brief: LIANG Song (1995-), main research interest: anaerobic water treatment, E-mail: elle_liang@163.com.

ZHANG Yaobin (corresponding author), professor, doctoral supervisor, E-mail: zhangyb@dlut.edu.cn.

which proved the occurrence of Feammox. Real-time quantitative PCR (qPCR) results showed that *Acidimicrobiaceae* A6 expressed actively. High-throughput 16S rDNA showed that a variety of iron-reducing bacteria were significantly enriched. After simultaneously adding ferrihydrite and humus into the reactor, the removal efficiency of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ further increased to 88.35%, and the removal efficiency of total nitrogen reached 73.75%. The analysis of the composition and morphology of iron oxides added in the reactors showed that humus weakened the passivation rate of iron oxides, which was beneficial for ferrihydrite to maintain activity and continue to participate in Feammox.

Keywords: nitrogen containing wastewater; biological nitrogen removal; dissimilated iron reduction; Feammox

硝化-反硝化是常用的废水生物脱氮工艺,但硝化反应需要曝气,反硝化反应在处理低 C/N 废水时需要外加碳源^[1]。厌氧氨氧化 (Anammox) 是以 NO_2^- 为电子受体将 NH_4^+ 氧化的生物脱氮工艺,能耗低且污泥产量少,但 Anammox 的功能菌增殖缓慢且对环境敏感^[2]。上述不足使两者在工程应用中均存在不同的局限性。异化铁还原耦合厌氧氨氧化 (Feammox),是指微生物以 Fe(III) 为最终电子受体将 NH_4^+ 氧化成 N_2 、 NO_2^- 或 NO_3^- ^[3] 的过程,是一种广泛存在于自然环境中的脱氮途径。Feammox 过程无需曝气和专门的 Anammox 微生物,是一种区别于硝化-反硝化和厌氧氨氧化的新型生物脱氮方式。

目前,有关 Feammox 的研究主要集中于自然环境中的物质迁移转化和元素循环^[3-6]。但在废水脱氮方面,由于 Feammox 发现较晚,目前的少量报道主要以人工配制废水为主^[7-8],且缺乏 ^{15}N 标记同位素等手段进行证实。另一方面,Feammox 与异化铁还原密切相关^[9]。据报道^[10],腐殖质结构上具有的羟基/醌基可用作电子穿梭体,提高异化铁还原效率。但腐殖质是否可以用于加快 Feammox 的报道较少。

笔者将稀释后的污泥消化液作为处理对象,向厌氧反应器内投加水铁矿,尝试驱动 Feammox 过程并探究其对氮去除效果的影响;利用同位素标记、微生物群落分析等方法研究脱氮与 Feammox 的相关性;投加腐殖质探究其对 Feammox 脱氮的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 引种污泥及其驯化 引种污泥取自大连市某污泥处理厂的厌氧消化污泥 ($\text{VS } 35 \pm 0.2 \text{ g/L}$)。为消耗引种污泥中所含的有机物,避免其与废水中

的 NH_4^+ 竞争投加到反应器中的水铁矿,以及避免引种污泥中的蛋白质在分解过程中释放出的氨氮造成实验反应器中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度产生较大波动,实验前在上流式厌氧污泥床 (UASB) 中对引种污泥进行连续流进水厌氧驯化,直至反应器的出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度不再变化。

1.1.2 水铁矿合成 使用的水铁矿根据 Cornell 等^[11] 的方法合成,即在磁力搅拌条件下向 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液中逐滴加入 1 mol/L NaOH 溶液,调节 pH 值为 7.0~7.6,得到褐色悬浮状水铁矿后静置并吸去上清液,用去离子水重复洗涤离心 (8 000 r/min, 10 min) 3 次,去除多余的去离子水后冷冻干燥,获得实验所用水铁矿。

1.1.3 污泥消化液 实验所用的污泥消化液同样取自大连市某污泥处理厂,稀释 20 倍后 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度为 91.03 mg/L, TCOD 浓度为 71.23 mg/L, pH 值为 6.8~7.2。主要初始指标如表 1 所示。

表 1 实验所用污泥消化液的主要初始指标

Table 1 Main initial indicators of the biogas liquid used in the experiment

TCOD/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\text{NH}_4^+\text{-N}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\text{NO}_2^-\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	总氮/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
71.23±3.13	91.03±1.71	0	0	101.43±0.85

1.1.4 腐殖质 实验所用腐殖质为阿拉丁试剂 (上海) 有限公司所生产的腐植酸,主要成分为黄腐酸, CAS 为 1415-93-6。

1.2 实验方案及测试方法

1.2.1 实验设置 实验开始前,将无菌缺氧的去离子水与经过驯化后的引种污泥按照体积比 3:1 的比例充分混合,在黑暗于 25 °C 预培养 3 d,以去除背景氮氧化物,去除上清液后的污泥用作实验接种污泥,主要初始指标如表 2 所示。向 100 mL 血清瓶中

加入 7 mL 已去除上清液的接种污泥和 70 mL 稀释后的污泥消化液。设置实验方法(每组 9 个血清瓶):1)未投加水铁矿的对照组;2)投加水铁矿的水铁矿组;3)投加水铁矿和腐殖质的腐殖质组。用丁基橡胶隔片密封血清瓶,并用铝盖压盖后用超高纯氩气冲洗血清瓶以排出空气,然后将其置于充满氩气的厌氧手套箱中,该手套箱放置于恒温房中。

表 2 实验所用接种污泥的主要初始指标

Table 2 Main initial indicators of inoculated sludge

Fe(II)/(mg·L ⁻¹)	Fe(III)/(mg·L ⁻¹)	总铁/(mg·L ⁻¹)
1 921.09±11.18	472.60±2.21	2 393.69±8.05

每间隔 2 d 从血清瓶中进行破坏性采样,每个血清瓶采样 2 次后丢弃。取样前,剧烈摇晃血清瓶以混匀样品,取样在充满氩气的厌氧手套箱中操作。

1.2.2 ¹⁵N 同位素标记实验 同位素标记培养所使用的培养基组分为:MgCl₂·6H₂O(0.4 g/L)、CaCl₂·H₂O(0.1 g/L)、¹⁵NH₄Cl(0.1 g/L)和 KH₂PO₄(0.6 g/L)、1 mL/L 维生素溶液、1 mL/L 微量元素溶液、30 mmol/L 碳酸氢盐缓冲液和 2 mmol/L 乙酸盐^[12]。所有实验的接种污泥处理方法和实验方法设置全部一致。同位素标记培养基在厌氧手套箱中培养 30 d 后,使用配有质谱分析仪的气相色谱仪(GC/MS, QP2020)检测厌氧反应器顶空气中³⁰N₂的生成(色谱柱类型为 SH-RXI-5silMS,气体手动进样,进样口温度 280 °C,质谱扫描范围 12~32 m/z,全扫描)。顶空气中的 N₂体积通过带有热导检测器(TCD)的气相色谱仪(Tianmei, GC-7900P/TCD, 中国)进行测定。

1.2.3 分析仪器和测试方法 采用纳氏试剂法测定 NH₄⁺-N 浓度,N-(1-萘基)-乙二胺法测定 NO₂⁻-N,紫外分光光度法测定 NO₃⁻-N,过硫酸钾分光光度法测定总氮^[13]。反应器内铁氧化物的晶体形态采用 X 射线衍射(XRD)鉴定。XRD 衍射仪(SmartLab 9 kW,日本)配备有 Cu-Kα 辐射,电压为 45 kV,电流为 200 mA。根据 Ding 等^[9]的方法测定反应器中的 Fe(II)和 Fe(III),即在室温下用 5 mL 0.5 mol/L 的 HCl 提取 1 mL 泥水混合物 2 h,然后以 8 000 r/min 离心 5 min,通过 0.22 mm 过滤器过滤后用邻菲罗啉分光光度法测定上清液的 Fe(II)含量。

采用分步提取法对反应器内不同铁氧化物进行提取并对其各自所占比例进行计算^[14-16]。

第 48 天的对照组和水铁矿组反应器内的污泥样品委托上海美吉生物公司通过高通量 16S rDNA 测序进行微生物群落分析:根据 E. Z. N. A. © soil DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U. S.) 说明书进行微生物群落总 DNA 抽提,使用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增,扩增之后的产物经过回收纯化和检测定量后利用 Illumina 公司的 Miseq PE300/NovaSeq PE250 平台进行测序。

同时委托上海美吉生物公司进行基于 RNA 的实时定量 PCR 分析(qPCR),用于进一步确定某些功能性基因的绝对数量和活性^[17]。使用引物组 1055f/1392r 对 16S rRNA 基因进行总细菌定量表示。使用引物组 Amx368f/Amx820r 鉴定量化 *Anammox* 功能菌,Feammox 功能微生物 *Geobacteraceae* 和 *Acidimicrobiaceae* A6 细菌分别使用引物组 Geo494F/Geo825R 和 acm342f/439r 进行鉴定量化^[18-19]。具体的引物信息如表 3 所示。

表 3 用于扩增的实时定量 PCR 引物

Table 3 Real-time PCR primers used for the amplification

基因	引物	序列(5'-3')
16S rRNA	1055f	ATGGCTGTCTCGTCAGCT
	1392r	ACGGGGCGGTGTGTAC
<i>Geobacteraceae</i>	Geo494F	AGGAAGCACCGGCTAACTCC
	Geo825R	TACCCGCRACACCTAGT
<i>Anammox</i>	Amx368f	TTCGCAATGCCGAAAGG
	Amx820r	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC
<i>Acidimicrobiaceae</i>	acm342f	GCAATGGGGGAAACCCTGAC
A6	acm439r	ACCGTCAATTTCTGTCCTGC
<i>Acidimicrobiaceae</i>	acm362f	CGGTCCAGACTCCTACGGGA
family	acm539r	GACAGGGTTTTACAGTCCGAAGA

2 试验结果与讨论

2.1 投加水铁矿对氨氮去除的影响

如图 1(a)所示,经过 48 d 处理后,水铁矿组中 NH₄⁺-N 的浓度从初始的 91.03 mg/L 降至 25.11 mg/L,而未投加水铁矿或离子态 Fe(III)的对照组中 NH₄⁺-N 浓度只略微降低至 86.62 mg/L。即,水铁矿组中 NH₄⁺-N 的去除率约为 72.4%,而对照中

的去除率仅为 7.6%。在热力学上,有机物比 NH_4^+ 更具有优势成为 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原的电子供体^[20]。可以看出,在反应前期 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度下降并不明显。这是因为污泥消化液的 TCOD 为 71.23 mg/L,其中的少量有机物会与氨氮竞争电子受体水铁矿;随着有机物被消耗, NH_4^+ 才更多地被用作异化 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原,因此,图 1(a)中投加水铁矿组的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度下降存在滞后。另外,相关功能微生物的富集过程可能也是导致滞后的原因之一。

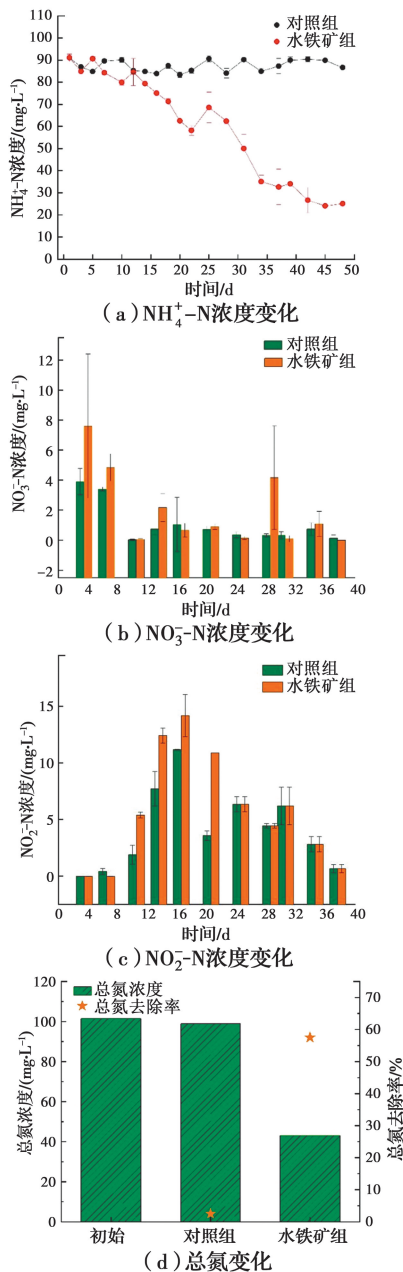


图 1 实验过程中氨氮及硝态氮的浓度变化
Fig. 1 Changes in the concentration of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_x^-\text{-N}$ during the experiment

为考察反应器内是否生成了 Feammox 产物 NO_3^- 和 NO_2^- , 在实验过程中不定期测定了反应器内 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 含量, 结果如图 1(b)、(c) 所示。在反应器中检测到 NO_3^- 和 NO_2^- , 且水铁矿组中的浓度总是高于对照组(图 1(b)、(c)), 这与图 1(a)中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度的变化差异是一致的, 表明投加水铁矿促进了 NH_4^+ 的转化。可以看到, 反应器中 NO_3^- 和 NO_2^- 浓度均较低, 这是因为 N_2 是 Feammox 过程中的主要转化产物, 占 Feammox 总产物的 67%~78%^[9], 所以, NO_2^- 和 NO_3^- 的产量较小; 同时, 厌氧条件下的 NO_2^- 和 NO_3^- 可被 $\text{Fe}(\text{II})$ 分别以化学反硝化以及硝酸盐依赖型铁氧化 (NO_3^- dependent $\text{Fe}(\text{II})$ oxidation, NDFO) 的方式被还原^[21], 因此, NO_2^- 和 NO_3^- 难以大量存在, 同时, 这两种物质作为中间物质, 含量波动变化, 与反应时间无明显线性关系。需要指出的是, 对照组中所检测到的 NO_x^- 以及少量氨氮损失(图 1(a))也来自 Feammox。原因是对照组中的污泥也含有 0.047% 的背景 $\text{Fe}(\text{III})$, 这大部分来自污泥调理过程中的铁絮凝剂。

为了进一步研究投加水铁矿对氮去除的影响, 对实验前后的总氮进行测定(图 1(d))。结果表明, 水铁矿组的总氮去除率为 57.5%, 而对照组仅为 2.5%, 表明向厌氧反应器中投加水铁矿可以显著提高氮的去除率。

2.2 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度变化

$\text{Fe}(\text{II})$ 作为 Feammox 的水铁矿还原产物, 可以间接反映异化铁还原和脱氮的程度。图 2 描述了实验过程中 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度的变化。水铁矿组中, $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度从 388.58 mg/L 逐渐增加至 1 917.27 mg/L, 最后一天降至 1 138.33 mg/L。 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度的增加与图 1(a)中水铁矿组中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除结果相呼应。而对照组中 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度基本保持在 400 mg/L 左右, 这是接种污泥中背景 $\text{Fe}(\text{III})$ 参与异化铁还原的结果, 但接种污泥在实验前经过驯化, 其中的背景 $\text{Fe}(\text{III})$ 被自身所含的有机物消耗, 导致其含量不高且多难以被微生物利用, 因此, 对照组中的 $\text{Fe}(\text{II})$ 含量基本不变。水铁矿组的 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度上升与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度下降, 表明反应器中 NH_4^+ 转化率的提高与异化 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原有关, 即投加水铁矿驱动了 Feammox 过程进行脱氮。

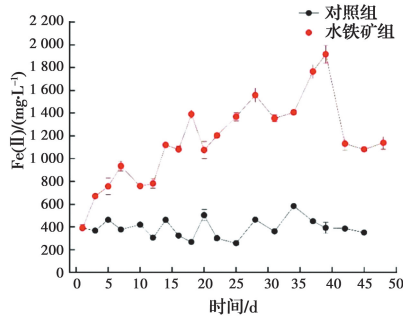


图 2 实验过程中 Fe(II) 浓度变化

Fig. 2 Changes of Fe(II) concent during the experiment

另外,第 42 天水铁矿组中 Fe(II) 浓度急剧下降。Boland 等^[22]指出,在水溶液态 Fe(II) 的存在下,水铁矿可以化学转化为晶型更为稳定的铁矿物。从实验结束时水铁矿组污泥冷冻干燥后的 XRD 图谱(图 3)可以看出,在加了水铁矿的反应器中形成了磁铁矿。Yang 等^[23]也在实验终止后投加有水铁矿的反应器污泥中检测到磁铁矿(Fe₃O₄)和纤铁矿(FeOOH)。也就是说,反应器内的水铁矿转化成了微生物难以利用的磁铁矿,可被利用还原的 Fe(III) 越来越少,Fe(II) 生成量越来越少,同时,又存在 Fe(II) 被 NO₃⁻ 氧化的过程,Fe(II) 生成量少于消耗量,导致了 Fe(II) 浓度的下降。

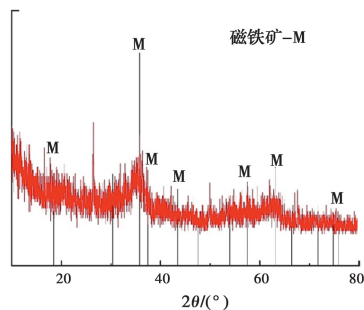


图 3 实验后水铁矿组中污泥的 XRD 图谱

Fig. 3 XRD pattern of the sludge in the ferrihydrite group after the experiment

2.3 同位素标记结果分析

为了进一步证实 Feammox 过程的脱氮作用,采用 N-15 标记的 NH₄⁺ 和水铁矿在相同的接种污泥中混合培养。该培养全程在厌氧手套箱中进行,严格厌氧消除有氧硝化的可能性。在厌氧条件下,Feammox 可以直接生成³⁰N₂(3Fe(OH)₃ + 5H⁺ + ¹⁵NH₄⁺ → 3Fe²⁺ + 9H₂O + 0.5³⁰N₂),或者利用 Feammox 生成的¹⁵NO₃⁻ 和¹⁵NO₂⁻ 通过 Anammox 或反硝化生成³⁰N₂^[24]。从表 4 可知,所有潜在的

³⁰N₂ 生成途径都必须以 Feammox 发生为前提。因此,如在反应器的顶空气中检测到³⁰N₂,可以证明厌氧反应器中发生 Feammox。

表 4 厌氧条件下产生³⁰N₂和²⁹N₂的可能的途径^[24]

Table 4 Possible processes for ³⁰N₂ and ²⁹N₂ generation under anaerobic conditions

产物	N 原子来源 1	N 原子来源 2	过程
³⁰ N ₂	¹⁵ NH ₄ ⁺	¹⁵ NH ₄ ⁺	Feammox
	¹⁵ NH ₄ ⁺	Feammox- ¹⁵ NO ₃ ⁻	Anammox
	Feammox- ¹⁵ NO ₃ ⁻	Feammox- ¹⁵ NO ₃ ⁻	反硝化
²⁹ N ₂	¹⁵ NH ₄ ⁺	背景 ¹⁴ NH ₄ ⁺	Feammox
	¹⁵ NH ₄ ⁺	背景 ¹⁴ NO ₃ ⁻	Anammox
	Feammox- ¹⁵ NO ₃ ⁻	背景 ¹⁴ NH ₄ ⁺	Anammox
	Feammox- ¹⁵ NO ₃ ⁻	背景 ¹⁴ NO ₃ ⁻	反硝化

经检测,对照组中³⁰N₂的总产量约为 0.013 μmol,而水铁矿组总产量约为 65.69 μmol,是未投加水铁矿的对照组总产量的 5 000 倍以上(图 4)。在水铁矿组反应器顶空气中检测到³⁰N₂以及两组³⁰N₂生成量的巨大差距证明了向厌氧反应器中投加 Fe(III) 驱动了 Feammox 过程发生。同时,在后续微生物群落分析中 Anammox 菌未被检测到,即进一步排除了反应器内的 NH₄⁺ 通过 Anammox 途径被去除的可能。

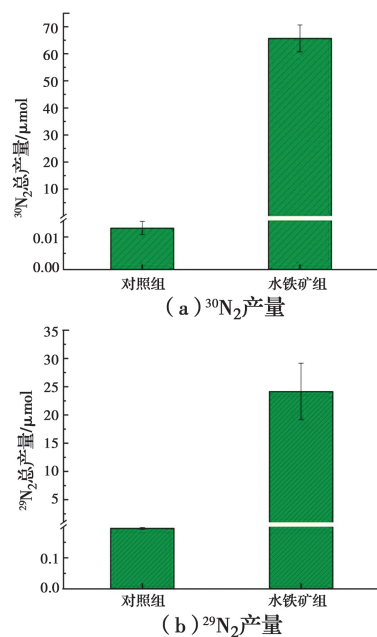


图 4 同位素标记培养实验中³⁰N₂和²⁹N₂产量

Fig. 4 Production of ³⁰N₂ and ²⁹N₂ in the isotope-labeled culture experiment

此外, $^{29}\text{N}_2$ 在水铁矿组中也大量累积,表 4 中显示了几种潜在的 $^{29}\text{N}_2$ 生成途径,包括通过 Feammox 直接生成,或者利用 Feammox 生成的 $^{15}\text{NO}_x^-$ 与背景 $^{14}\text{NH}_4^+$ 或 $^{14}\text{NO}_x^-$ 通过 Anammox 或反硝化生成 $^{29}\text{N}_2$ 。Yang 等^[24]利用同位素标记法在热带土壤中证明 Feammox 时也发现了添加 Fe(III)和 $^{15}\text{NH}_4^+$ 后,除 $^{30}\text{N}_2$ 外, $^{29}\text{N}_2$ 的产量也显著提高,认为添加 Fe(III)后对 $^{29}\text{N}_2$ 产生的刺激表明,无论 $^{29}\text{N}_2$ 的生成机制是什么,Feammox 在 NH_4^+ 的厌氧氧化中有重要作用。本研究中投加水铁矿后 $^{29}\text{N}_2$ 产量的激增也说明 Feammox 在厌氧 NH_4^+ 氧化中发挥了重要作用。

2.4 微生物群落分析

到目前为止,Feammox 的功能性微生物尚未被完全阐明,大多数研究认为铁还原菌是 Feammox 的功能微生物^[12, 25]。在本研究中,水铁矿组中的铁还原菌被富集。对比对照组和水铁矿组,在属水平, *Geobacter* 在水铁矿组中的相对丰度为 0.54%,而在对照组中仅为 0.0036%,相差约 150 倍。

表 5 对照组与水铁矿组内部分铁还原菌的相对丰度

Table 5 Relative abundance of some iron-reducing bacteria of the control and ferrihydrite

属名	相对丰度	
	对照组/%	水铁矿组/%
<i>Geobacter</i>	0.0036	0.54
<i>Desulfovibrio</i>	0.11	0.61
<i>Thiobacillus</i>	0.04	4.75

此外,Huang 等^[19]在河岸湿地中发现了另一种在 Feammox 中起重要作用的微生物 (*Acidimicrobiaceae* A6 菌),其被确认为是 Feammox 的功能微生物。在本研究中,尽管在 16S rDNA 高通量测序中未检测到 *Acidimicrobiaceae* A6 细菌,但基于 RNA 的实时定量 PCR 分析(qPCR)结果显示,在水铁矿组和对照组中 *Acidimicrobiaceae* A6 细菌的拷贝数分别为 4.15×10^7 和 4.90×10^6 ,这一差距表明,作为 Feammox 功能微生物的 *Acidimicrobiaceae* A6 细菌在投加 Fe(III)的厌氧反应器中表达得更为活跃。

特别地,16S rDNA 高通量测序结果和 qPCR 中均未检测到 Anammox 菌或 Anammox 基因,进一步

证明了氨氮的去除并非由 Anammox 导致。

2.5 投加腐殖质对脱氮效果的影响

异化铁还原过程中,微生物将电子传递至胞外不溶性铁氧化物,是其呼吸代谢的制约性步骤。同时,反应过程中生成的 Fe(II)不断沉积在铁氧化物表面并与其进行电子交换,导致次生矿物生成,铁氧化物晶型不断向更稳定状态转化,使微生物难以利用。上述原因导致了异化铁还原的速率逐步降低。一般说来,小分子有机物可作为有机碳源被微生物吸收用于生长,而腐殖质为大分子有机物,难以进入细胞内部为微生物提供生长所需碳源。据报道^[10],腐殖质以电子穿梭体的作用存在于异化铁还原过程中。为探究腐殖质在 Feammox 过程中的作用,在投加水铁矿的同时向反应器内投加腐殖质。

经过 48 d 厌氧培养,投加有腐殖质的反应器内 NH_4^+-N 浓度由最初的 91.03 mg/L 降至 10.16 mg/L, NH_4^+-N 去除率和总氮去除率分别为 88.35% 和 73.75%,对比只投加水铁矿的反应器的 72.4% 和 57.54%,分别提高了 15.95% 和 16.21%,说明向反应器内投加腐殖质后进一步促进了 Feammox 厌氧脱氮。

在厌氧培养 48 d 后,水铁矿组和腐殖质组反应器内 Fe(II)浓度最终分别为 1138.33、1839.18 mg/L,相应的 Fe(II)生成率分别为 23.72、38.32 mg/(L·d),反应器内 Fe(II)的生成速率提高了近一倍。根据第 48 天两组反应器内二价铁浓度对铁还原率进行核算,结果如图 5 所示,水铁矿组和腐殖质组反应器内的铁还原率分别为 46.18% 和 89.36%,铁还原率提高了 40% 以上。结果表明,投加腐殖质后,通过促进异化铁还原过程提高了 Feammox 的反应速率。

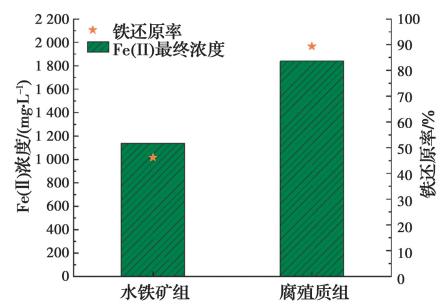


图 5 反应器内最终 Fe(II) 浓度及铁还原率

Fig. 5 Final Fe(II) concentration and iron reduction ratio in reactors

图 6 为单独投加水铁矿和同时投加水铁矿和腐

殖质组内样品的扫描电子显微镜(SEM)图像,可以看到,未投加腐殖质的反应器内块状磁铁矿颗粒更清晰,体积更大,数量较多,分布更密集;而投加了腐殖质的反应器内混合物的形态更为蓬松,颗粒状晶型不明显,数量少,分布散,体积也更小。结果表明,向反应器内投加腐殖质可以减缓反应器内结构松散的铁氧化物向结构密实的高结晶态铁氧化物的转化进程。

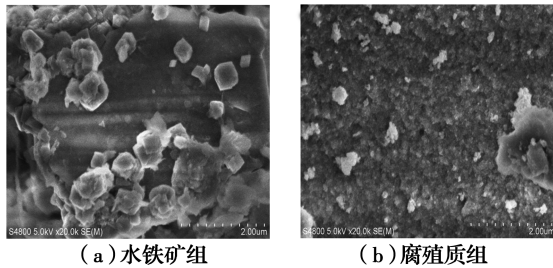


图 6 第 48 天反应器内铁氧化物形态

Fig. 6 Iron oxide form in the reactor on the 48th day

X 射线光电子能谱(XPS)分峰拟合结果如图 7 所示,水铁矿组样品的 Fe 2p 图谱在 723.1、710.61 eV 处出现两个峰,分别对应了 Fe_3O_4 的 Fe 2p_{1/2} 和 Fe 2p_{3/2} 自旋轨道跃迁^[26],说明反应器内生成了高结晶态的磁铁矿,而腐殖质组样品的 Fe 2p 图谱在 724.6、710.8 eV 处出现两个峰,对应了 Fe_2O_3 的存在,该结果与 SEM 结果吻合,表明投加腐殖质可减慢水铁矿的晶型转变速度。

此外,对比两组样品的 Fe 2p 扫描图谱可以发现,水铁矿组样品的图谱更为平滑,而腐殖质组样品的图谱上有许多噪音信号,说明该样品表面的含铁量较少,而腐殖质的投加并不会改变样品表面的含铁量,原因可能是腐殖质覆盖在铁氧化物的表面并与其结合,这种作用会加速电子传递,进而提高反应速率。

对反应结束后的水铁矿组和腐殖质组内不同铁氧化物进行提取,确定其各自占总量的比例,结果如图 8 所示。两组样品中主要以易还原的羟基氧化铁(水铁矿和纤铁矿)和结晶态的铁氧化物形式存在,水铁矿组和腐殖质组内易被还原态的铁氧化物占比分别为 41.92% 和 52.44%,结晶态的铁氧化物占比分别为 55.21% 和 41.63%。可以看到,在投加了腐殖质的反应器内易被还原形态的铁氧化物所占比例最高,而未投加腐殖质的反应器内高结晶态铁氧化物含量最高,表明腐殖质在一定程度上可以阻止部

分铁氧化物向晶型更为稳定的铁矿物转化。

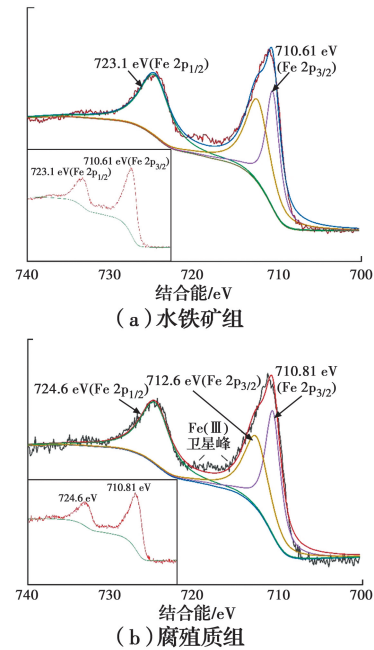


图 7 第 48 天反应器内样品 Fe 2p 扫描 XPS 图谱
Fig. 7 Scanning XPS spectrum of Fe 2p in the reactor on the 48th day

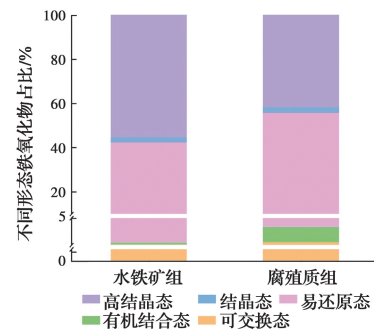


图 8 反应器内铁氧化物的形态分布

Fig. 8 The form composition of iron oxides in reactor

3 结论

向污泥消化液中投加水铁矿驱动厌氧反应器中 Feammox 过程发生,研究投加 Fe(III) 对氮去除效果的影响,得到以下主要结论:

1) 48 d 后,水铁矿组的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率为 72.4%, 比对照组提高了 64.8%, 总氮去除率提高了 50% 以上; 投加腐殖质后, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率为 88.35%, 总氮去除率为 73.75%, 对比水铁矿组分别提高了 15.95% 和 16.25%, 说明投加 Fe(III) 后提高了厌氧反应器中氮的去除率, 腐殖质的投加进一步促进了 NH_4^+ 的转化。

2) 使用同位素标记的 $^{15}\text{NH}_4^+$ 进料, 在投加了

Fe(III)的反应器顶空气体中检出³⁰N₂,证明在厌氧反应器中发生了 Feammox。

3)微生物群落分析结果表明,投加水铁矿后在反应器内富集了 *Geobacter* 等多种铁还原菌;qPCR 结果表明,投加水铁矿的反应器内 Feammox 功能微生物 *Acidimicrobiaceae* A6 菌表达活跃,说明反应器内的氮去除与 Feammox 有关。

4)反应器内的铁氧化物组成及形态分析表明,腐殖质除了以电子穿梭体进行作用外,还可通过减缓铁氧化物钝化,增强异化铁还原而提高 Feammox 效率。

利用水铁矿驱动了 Feammox 脱氮,而腐殖质进一步促进了该过程,氮去除率进一步提高。需要指出的是,Feammox 过程中氨氮去除需要较长反应时间,这可能与 Feammox 的自养方式有关,也与异化铁还原的胞外电子传递相关。可以在微生物富集、强化,以及提高胞外电子传递等方面进一步开展研究。

区别于传统生物脱氮方式,该方法可在厌氧消化器内实现脱氨氮,前提是需要 Fe(III)的持续投加。连续投加 Fe(III)看似不易,但对于富含 Fe(III)的芬顿污泥,可将其用作三价铁源。尤其对具备较长处理时间条件的垃圾填埋场,Feammox 可以作为一种有较好应用前景的生物脱氮技术。

参考文献:

- [1] 郑平,徐向阳,胡保兰. 新型生物脱氮理论与技术 [M]. 北京:科学出版社,2004.
ZHENG P, XU X Y, HU B L. New biological denitrification theory and technology [M]. Beijing: Science Press, 2004. (in Chinese)
- [2] DALSGAARD T, THAMDRUP B, CANFIELD D E. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment [J]. *Research in Microbiology*, 2005, 156(4): 457-464.
- [3] 易博. 稻田土壤厌氧氨氧化协同铁还原为途径的气态氮素损失过程及其机理的研究[D]. 杭州:浙江大学,2019.
YI B. Nitrogen losses through iron reduction coupled with anaerobic ammonium oxidation from paddy soils [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019. (in Chinese)
- [4] DING B J, CHEN Z H, LI Z K, et al. Nitrogen loss through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction from ecosystem habitats in the Taihu estuary region [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 662: 600-606.
- [5] YAO Z B, WANG F, WANG C L, et al. Anaerobic ammonium oxidation coupled to ferric iron reduction in the sediment of a eutrophic lake [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2019, 26(15): 15084-15094.
- [6] LI H, SU J Q, YANG X R, et al. RNA stable isotope probing of potential feammox population in paddy soil [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(9): 4841-4849.
- [7] LI X, HUANG Y, LIU H W, et al. Simultaneous Fe(III) reduction and ammonia oxidation process in Anammox sludge [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 64: 42-50.
- [8] 姚海楠,张立秋,李淑更,等. 厌氧铁氨氧化处理模拟垃圾渗滤液的影响因素研究[J]. *环境科学学报*, 2019, 39(9): 2953-2963.
YAO H N, ZHANG L Q, LI S G, et al. Study on the factors affecting simulated landfill leachate treatment by anaerobic ferric ammonia oxidation [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, 39(9): 2953-2963. (in Chinese)
- [9] DING L J, AN X L, LI S, et al. Nitrogen loss through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction from paddy soils in a chronosequence [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(18): 10641-10647.
- [10] 迟光宇,张兆伟,陈欣,等. 土壤 Fe(III)异化还原机理及影响因素研究进展[J]. *生态学杂志*, 2007, 26(12): 2075-2080.
CHI G Y, ZHANG Z W, CHEN X, et al. Research advances in the mechanisms and affecting factors of soil Fe(III) dissimilatory reduction [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(12): 2075-2080. (in Chinese)
- [11] CORNELL R M, SCHWERTMANN U. The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrences and uses [M]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.
- [12] ZHOU G W, YANG X R, LI H, et al. Electron shuttles enhance anaerobic ammonium oxidation coupled to iron (III) reduction [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(17): 9298-9307.
- [13] 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.
- Water and wastewater monitoring and analysis methods [M]. 4th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [14] POULTON S W, CANFIELD D E. Development of a sequential extraction procedure for iron: Implications for iron partitioning in continentally derived particulates [J]. *Chemical Geology*, 2005, 214(3/4): 209-221.
- [15] LEERMAKERS M, MBACHOU B E, HUSSON A, et al. An alternative sequential extraction scheme for the determination of trace elements in ferrihydrite rich sediments [J]. *Talanta*, 2019, 199: 80-88.
- [16] SHEPPARD R Y, MILLIKEN R E, RUSSELL J M, et al. Characterization of iron in lake Towuti sediment [J]. *Chemical Geology*, 2019, 512: 11-30.
- [17] HUANG S, CHEN C, JAFFÉ P R. Seasonal distribution of nitrifiers and denitrifiers in urban river sediments affected by agricultural activities [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 642: 1282-1291.
- [18] HUANG S, CHEN C, PENG X C, et al. Environmental factors affecting the presence of Acidimicrobiaceae and ammonium removal under iron-reducing conditions in soil environments [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 98: 148-158.
- [19] HUANG S, JAFFÉ P R. Characterization of incubation experiments and development of an enrichment culture capable of ammonium oxidation under iron-reducing conditions [J]. *Biogeosciences*, 2015, 12(3): 769-779.
- [20] LOVLEY D R, PHILLIPS E J. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 51(4): 683-689.
- [21] PICARDAL F. Abiotic and microbial interactions during anaerobic transformations of Fe(II) and NO_3^- [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 112.
- [22] BOLAND D D, COLLINS R N, MILLER C J, et al. Effect of solution and solid-phase conditions on the Fe(II)-accelerated transformation of ferrihydrite to lepidocrocite and goethite [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(10): 5477-5485.
- [23] YANG Y F, JIN Z, QUAN X, et al. Transformation of nitrogen and iron species during nitrogen removal from wastewater via Feammox by adding ferrihydrite [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(11): 14394-14402.
- [24] YANG W H, WEBER K A, SILVER W L. Nitrogen loss from soil through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction [J]. *Nature Geoscience*, 2012, 5(8): 538-541.
- [25] BAO P, LI G X. Sulfur-driven iron reduction coupled to anaerobic ammonium oxidation [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(12): 6691-6698.
- [26] WU Z L, WANG Y P, XIONG Z K, et al. Core-shell magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@Zn/Co\text{-ZIFs}$ to activate peroxymonosulfate for highly efficient degradation of carbamazepine [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2020, 277: 119136.

(编辑 黄廷)