

文章编号: 1000-8608(2019)05-0455-07

脱氮硫杆菌利用 FeS 自养反硝化过程研究

周 翔, 张 玉*, 孙超越, 苏志强, 孙利剑

(大连理工大学 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 辽宁 大连 116024)

摘要: 以硫化亚铁(FeS)为电子供体的自养反硝化反应对水体中硝酸盐的去除有重要贡献。以菌株 *Thiobacillus (T.) denitrificans* ATCC 25259 为对象,首次研究了脱氮硫杆菌以 FeS 为底物的自养反硝化过程。结果表明,以 FeS 作为唯一电子供体时, *T. denitrificans* 可以将 NO_3^- -N($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 彻底还原为 N_2 。同时,FeS 中的硫元素经自养反硝化过程转化为 SO_4^{2-} ,而铁元素与培养基中 PO_4^{3-} 反应生成沉淀物 $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 。通过对相关数据拟合发现自养反硝化过程遵循零级反应动力学($R^2 > 0.93$),随着 FeS 加入量的增大, NO_3^- 和 NO_2^- 的还原速率均增大,但 NO_3^- 的还原速率增大更多,使中间产物 NO_2^- 的累积量增大。

关键词: 脱氮硫杆菌; 硫化亚铁(FeS); 自养反硝化; 反应动力学

中图分类号:X172

文献标识码:A

doi:10.7511/dllgxb201905003

0 引言

硝酸盐是自然水体和生活废水中常见的污染物,不仅会导致水体的富营养化,还对饮用水安全造成严重威胁^[1]。生物反硝化作用是水中脱除硝酸盐的主要途径^[2],特别是以硫铁基质(黄铁矿(FeS_2)、硫化亚铁(FeS))为底物的自养反硝化反应,因其在自然水体和废水脱氮中起重要作用受到研究者的关注^[3-4]。

FeS 是磁黄铁矿的主要成分,在水底的沉积物和厌氧污泥中大量存在,在厌氧条件下由 SO_4^{2-} 被还原产生的 S^{2-} 与铁矿物作用生成^[5]。国内外研究表明,FeS 对自然水体和废水的脱氮有重大影响。Schippers 等^[6] 研究了 8 处海底沉积物中硫铁矿物的厌氧氧化,在微生物作用下,FeS 能和硝酸盐反应而黄铁矿不能和 NO_3^- 反应。有研究者对参与 FeS 氧化和 NO_3^- 还原的菌群进行了分析,Haaijer 等^[4] 向土壤中加入 FeS 之后,富集了以硫杆菌为主要功能菌的菌群,推断硫杆菌属是湖泊中硫铁矿物氧化和硝酸盐还原的关键因素。脱氮硫杆菌是严格自养菌,有研究表明硫铁矿物为底物的废水脱氮中脱氮硫杆菌占主导地位。例

如 Li 等^[7] 使用磁黄铁矿生物脱氮时发现优势菌是脱氮硫杆菌,付炳炳等^[8] 将以 FeS 为主要成分的硫铁化学污泥用于焦化废水脱氮,生物群落分析表明脱氮硫杆菌是主要功能菌,反应后丰度增加。

以往的研究表明脱氮硫杆菌利用 FeS 进行反硝化反应对自然水体和废水的脱氮贡献了重要作用,脱氮硫杆菌是典型的硫氧化硝酸盐还原细菌,还具有氧化二价铁的能力^[9]。Trouve 等^[10] 研究了脱氮硫杆菌利用 FeS 还原硝酸盐的速率,Haaijer 等^[11] 利用 FISH 技术证明了在富含硫铁矿物的淡水环境中脱氮硫杆菌能利用 FeS 进行自养反硝化。但脱氮硫杆菌利用 FeS 自养反硝化过程中硫铁氮元素的转化尚不明确。本文在 FeS 为唯一电子供体的情况下,利用菌株 *Thiobacillus (T.) denitrificans* ATCC 25259 还原 NO_3^- ,研究硫铁氮元素的转化过程和自养反硝化的反应动力学。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

实验所用菌株 *Thiobacillus (T.) denitrificans* ATCC 25259 购自美国菌种保藏中心(ATCC),

收稿日期: 2019-04-10; 修回日期: 2019-07-30。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51578106)。

作者简介: 周 翔(1995-),男,硕士生,E-mail:zx16176@163.com; 张 玉*(1973-),男,副教授,博士生导师,E-mail:zhangyu@dlut.edu.cn。

是从德克萨斯州的土壤中筛选而来的,美国菌种保藏中心的保藏编号为 25259。

基础培养基: KH_2PO_4 , 1 g · L⁻¹; NaHCO_3 , 1 g · L⁻¹; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g · L⁻¹; CaCl_2 , 0.1 g · L⁻¹; 微量元素溶液, 1 mL · L⁻¹. 在 0.1 MPa, 121 °C 下灭菌 20 min, 过 0.22 μm 滤膜备用. *T. denitrificans* 在细菌培养基^[12] 培养 48 h, 温度 30 °C, 接种前用 PBS 溶液洗涤 2 次.

1.2 颗粒 FeS 的制备和 XRD 表征

FeS(AR) 购自天津大茂化学试剂厂, 在 N₂ 的保护下使用粉碎机(运邦, YB-2500A) 粉碎, 筛分出粒径 75~150 μm 的 FeS 颗粒备用. 在 200 W 和 10 kV 条件下, 2θ 为 5°~80°, 使用 X 射线衍射仪(Rigaku, Smartlab 9 kW) 进行表征.

1.3 菌株 *T. denitrificans* ATTC 25259 利用 FeS 自养反硝化过程研究

实验组在 500 mL 基础培养基中加入 10 g FeS(75~150 μm), 曝气 20 min, 并加 NaNO₃ 使初始 NO₃⁻-N 浓度为 30 mg · L⁻¹, 接种 *T. denitrificans* 使菌体蛋白浓度为 50 mg · L⁻¹, 调节 pH 为 7, 密封后在 30 °C、150 r/min 的摇床中反应. 设置没有接种 *T. denitrificans* 的同批次对照组实验. 实验组和对照组每隔 1 d 在无菌厌氧箱中取样并测定 NO₃⁻、NO₂⁻、NH₄⁺、SO₄²⁻、Fe³⁺、Fe²⁺ 和菌体蛋白浓度. 同时设置所有条件完全相同的同批次实验, 用于测定顶空的气相成分.

1.4 FeS 加入量对菌株 *T. denitrificans* ATTC 25259 反硝化影响

在添加有 NO₃⁻-N 浓度为 30 mg · L⁻¹ 的 100 mL 基础培养基中分别加入 0、0.25、0.5、1、2 和 3 g 的 FeS(75~150 μm), 曝气 20 min, 接种 *T. denitrificans* 使菌体蛋白浓度为 50 mg · L⁻¹, 调节 pH 为 7. 密封后在 30 °C、150 r/min 的摇床中反应. 每隔 1 d 在无菌厌氧箱中取样测定 NO₃⁻ 和 NO₂⁻.

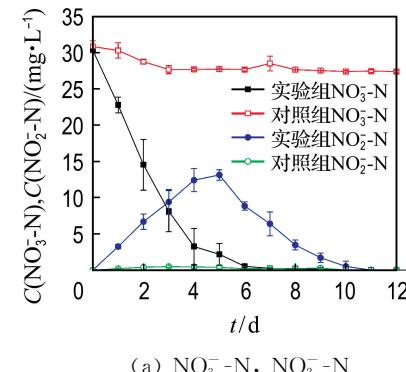
1.5 分析方法

NO₃⁻、NO₂⁻ 和 SO₄²⁻ 采用离子色谱法测定(Dionex, ICS-1100), 顶空的气相组分采用气相色谱仪测定(上海天美, GC9700). Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 采用邻菲啰啉分光光度法测定^[13], NH₄⁺ 采用水杨酸-次氯酸钠法测定^[13], 菌体蛋白浓度采用考马斯亮蓝法测定^[14].

2 结果与讨论

2.1 菌株 *T. denitrificans* 以 FeS 为底物的反硝化过程分析

如图 1(a) 所示, 在 0~6 d, 接种 *T. denitrificans* 的实验组 NO₃⁻-N 浓度从 (30.33±0.15) mg · L⁻¹ 下降至 (0.51±0.11) mg · L⁻¹, 与此同时, NO₂⁻ 浓度迅速上升, 在第 5 d 积累至 (13.13±0.72) mg · L⁻¹, 第 11 d 被完全还原. 图 1(b) 表示实验组和对照组的密闭顶空中气相成分的变化, 实验组顶空气相中 N₂ 在 0~12 d 从 (0.075±0.016) mmol 上升至 (0.648±0.021) mmol, 在实验过程中, 气相中始终未检出 N₂O. 而对照组的顶空中 N₂ 无明显变化.



(a) NO₃⁻-N, NO₂⁻-N

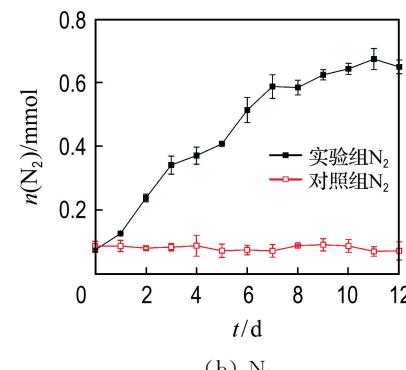
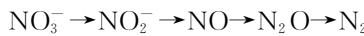


图 1 菌株 *T. denitrificans* 使用 FeS 反硝化过程氮元素的转化

Fig. 1 Conversion of nitrogen in autotrophic denitrification process by strain *T. denitrificans* utilizing FeS

在第 12 d, 实验组中的 NO₃⁻ 的去除率超过 99%, 而对照组的 NO₃⁻ 浓度几乎不变, 这证明实验组绝大部分 NO₃⁻ 通过 *T. denitrificans* 的反硝化作用被还原. *T. denitrificans* 是严格自养菌, 利用硫化物和单质硫自养反硝化还原 NO₃⁻.

所遵循的过程^[2]如下:



目前的研究认为, 反硝化过程中 NO_3^- 、 NO_2^- 、NO 和 N_2O 的还原同时发生, 彼此独立进行并相互竞争电子^[15]. 有研究报道, 硝酸盐还原酶 *Nar* 对电子的竞争能力高于亚硝酸盐还原酶 *Nir*^[16]. 在本实验中, 当部分 NO_3^- 被还原为 NO_2^- 后, 两者共存并相互竞争电子, 但 NO_3^- 的还原速率大于 NO_2^- 的还原速率, 因此造成 NO_2^- 累积. Torrento 等^[17] 研究脱氮硫杆菌以黄铁矿为底物的渗流脱氮实验中同样出现 NO_2^- 累积的现象, 同位素示踪分析结果表明 NO_2^- 的来源是 NO_3^- , 研究者认为高浓度 NO_3^- 会抑制 NO_2^- 还原从而导致 NO_2^- 累积.

如图 2 所示, 对照组 NH_4^+ 浓度从 $(0.02 \pm 0.03) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升至 $(1.28 \pm 0.19) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验组 NH_4^+ 浓度没有上升, 排除实验组通过硝酸盐异化还原为铵(DNRA)去除 NO_3^- 的可能. 对照组 NH_4^+ 浓度小幅上升的原因是 NO_3^- 与 FeS 发生化学反应^[18]. 相比于对照组, 实验组的 NH_4^+ 浓度更低, 这可能是微生物同化作用利用了少量 NH_4^+ ^[19]. 实验组菌体蛋白浓度 C_p 小幅上升之后下降, 表明细菌生长受到抑制. 这可能是因为以 FeS 为唯一底物的反硝化速率较慢, 且反应后期的电子供体量不足, 使细菌生长代谢受到抑制.

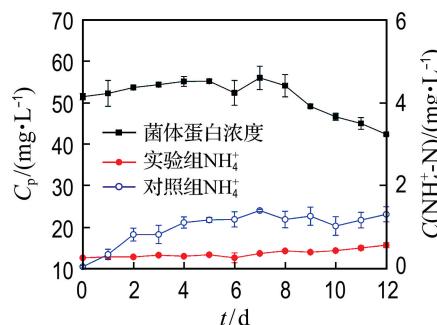


图 2 菌株 *T. denitrificans* 使用 FeS 反硝化过程氨氮浓度和菌体蛋白浓度的变化

Fig. 2 Concentration changes of NH_4^+ -N and bacterial protein in autotrophic denitrification process conducted by strain *T. denitrificans* utilizing FeS

如图 3 所示, 在实验组中, SO_4^{2-} 浓度从 $(55.10 \pm 2.57) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升至 $(128.88 \pm$

$10.63) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 在对照组中, SO_4^{2-} 浓度从 $(53.51 \pm 1.63) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升至 $(62.17 \pm 2.12) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 且均没有检测出 SO_3^{2-} 与 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. 对照组的 SO_4^{2-} 可能是取样过程中混入的少量的 O_2 与 FeS 发生化学氧化产生(式(1))^[6]. 第 0~12 d, 相比对照组 SO_4^{2-} 的累积量, 实验组中 SO_4^{2-} 累积量多出 $65.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 结合实验组的总无机氮(TIN)去除率和 SO_4^{2-} 的累积量呈正相关(图 3)可以推断, 这部分 SO_4^{2-} 是脱氮硫杆菌利用 FeS 进行自养反硝化过程产生的. 研究证明脱氮硫杆菌能够利用 S^{2-} 或 $\text{Fe}(\text{II})$ 作为电子供体进行自养反硝化^[2], 以 FeS 为底物的自养反硝化的化学计量式^[7] 如式(2)所示. 根据式(2), 还原 $30.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ -N 所产生 SO_4^{2-} 的理论值应为 $115.54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验组产生的 SO_4^{2-} 量小于计算值, 这可能是反硝化过程中部分硫元素转化为硫单质或者部分 SO_4^{2-} 发生沉淀, 这与 Wang 等^[20] 研究发现脱氮硫杆菌在一定条件下能将 S^{2-} 氧化成硫单质的结果一致. 此外, 培养基中加入的 CaCl_2 可能和 SO_4^{2-} 产生沉淀, 导致 SO_4^{2-} 的累积量小于化学计量式的计算量^[21].

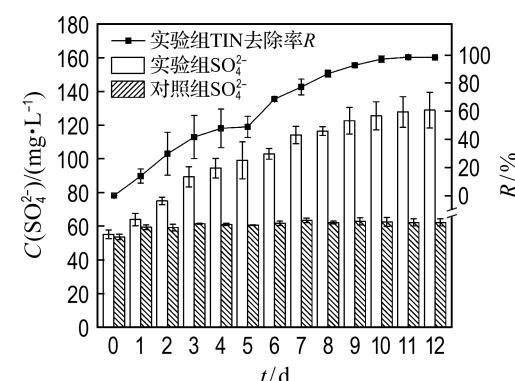
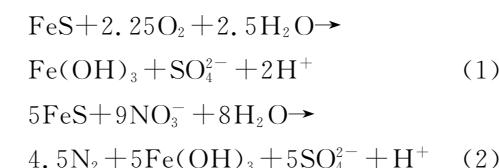


图 3 实验组与对照组中 SO_4^{2-} 累积浓度变化和实验组的 TIN 去除率

Fig. 3 Concentration changes of SO_4^{2-} in the experimental group and the control group and removal rate of TIN in the experimental group



为定性确定反应前后固相中物质成分变化, 采用 X 射线衍射仪(XRD)对经冷冻干燥处理的

反应前后的固体沉淀进行表征。结果如图 4 所示，反应前的 FeS 在 2θ 为 43.19° 、 53.12° 、 33.67° 和 29.91° 处有明显的衍射峰，这与 JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) 的 FeS 标准卡片 (No. 65-3356) 相吻合，衍射峰形完整，几乎无杂峰，这证明实验所用的粉末 FeS 的结晶度好，纯度高。反应后实验组 XRD 结果显示，在 2θ 为 11.15° 、 13.14° 和 27.77° 等出现新的衍射峰，与 JCPDS 标准卡片 $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (No. 53-0854) 相吻合，表明反应后出现新的产物 $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ，而反应后的对照组 XRD 结果与初始结果无明显差异。实验组和对照组的液相中几乎无 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} ，对照组在第 0 d, Fe^{2+} 浓度为 $(0.94 \pm 0.10) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Fe^{3+} 的浓度为 $(0.36 \pm 0.22) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，第 2 d 之后 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的浓度在检出限 ($0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 附近，实验组的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 浓度也在检出限附近。在其他研究中同样发现使用硫铁矿物作为基质脱氮会产生磷酸铁或磷酸亚铁沉淀^[7,22]，这是由于 $\text{Fe}(\text{II}, \text{III})$ 以及 $\text{Fe}(\text{II}, \text{III})$ 的氢氧化物能与 PO_4^{3-} 发生沉淀作用^[23]。周彦卿等^[24]认为硫铁共基质脱氮的过程中产生 $\text{FeO}(\text{OH})$ 和 $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 等中间物质，最终生成 $\text{Fe}_4(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_3$ 。本实验的实验组中，脱氮硫杆菌利用 FeS 进行自养反硝化，底物 FeS 经过生物反应后，其中硫元素转化为 SO_4^{2-} ，铁元素与培养基中的 PO_4^{3-} 发生沉淀作用生成 $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 。实验组反应后的 XRD 结果

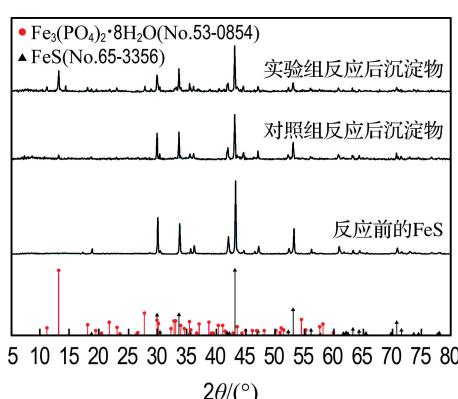
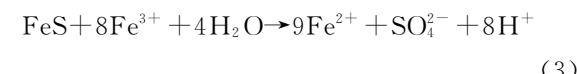


图 4 实验组和对照组反应前后沉淀物的 XRD 谱图

Fig. 4 XRD patterns of the precipitate in the experimental group and the control group before and after the reaction

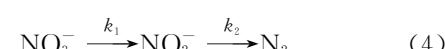
没有发现与 $\text{Fe}(\text{III})$ 相关的特征峰，这可能是生成的 $\text{Fe}(\text{III})$ 与硫铁矿物能进一步发生氧化还原反应而生成 $\text{Fe}(\text{II})$ 。有研究表明 $\text{Fe}(\text{III})$ 能氧化 FeS ，这是以 FeS 为主要成分的磁黄铁矿化学氧化的重要反应^[25]， FeS 与 $\text{Fe}(\text{III})$ 的反应如式(3)^[26]。因此，本实验中通过生物自养反硝化和化学氧化所产生的 $\text{Fe}(\text{III})$ 与 FeS 进一步反应生成 $\text{Fe}(\text{II})$ ，随后 $\text{Fe}(\text{II})$ 与培养基中的 PO_4^{3-} 发生沉淀反应，固相中的主要产物为 $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 。



2.2 不同 FeS 加入量对 *T. denitrificans* 反硝化过程的影响

微生物的酶促反应中底物浓度影响反应速率，而电子供体的量是影响生物反应速率的重要因素^[2]。在未加入 FeS 的实验中，观察到 NO_3^- 浓度无明显的变化 (图 5(a))，证明在没有外加电子供体的条件下，*T. denitrificans* 没有利用内源物质代谢 NO_3^- 的能力。当加入的 FeS 从 0.5 g 增加至 3 g，*T. denitrificans* 将 NO_3^- 和 NO_2^- 完全还原的时间分别从 15 d 和 30 d 减少至 6 d 和 13 d。随着加入 FeS 量的增加， NO_2^- 的累积量变大，达到最大累积量的时间和被完全还原所需的时间缩短。在加入 0.25 g FeS 体系中，第 20 d 后自养反硝化反应停止，剩余 NO_2^- 和 NO_3^- 的浓度分别为 $(6.18 \pm 1.08) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(10.01 \pm 2.48) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在加入不同 FeS 量的批实验中，如图 5(a) 和图 5(b) 所示， NO_3^- 和 NO_2^- 的还原去除与反应时间保持不变的梯度，表明反应遵循零级反应动力学。其他的研究也表明，使用黄铁矿 (FeS_2) 或 FeS 进行反硝化作用遵循零级反应动力学^[8,17,27]。自养反硝化过程的动力学分析采用简化的脱氮模型，根据零级动力学方程式^[28]：



$$C_1 = C_0 - k_1 t \quad (5)$$

$$C_2 = k_1 t - k_2 t \quad (6)$$

式中： C_1 为 NO_3^- -N 浓度， $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ； C_2 为 NO_2^- -N 浓度， $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ； C_0 为初始 NO_3^- -N 浓度， $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ； k_1 为 NO_3^- -N 还原速率常数， $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ ； k_2 为 NO_2^- -N 还原速率常数， $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ 。

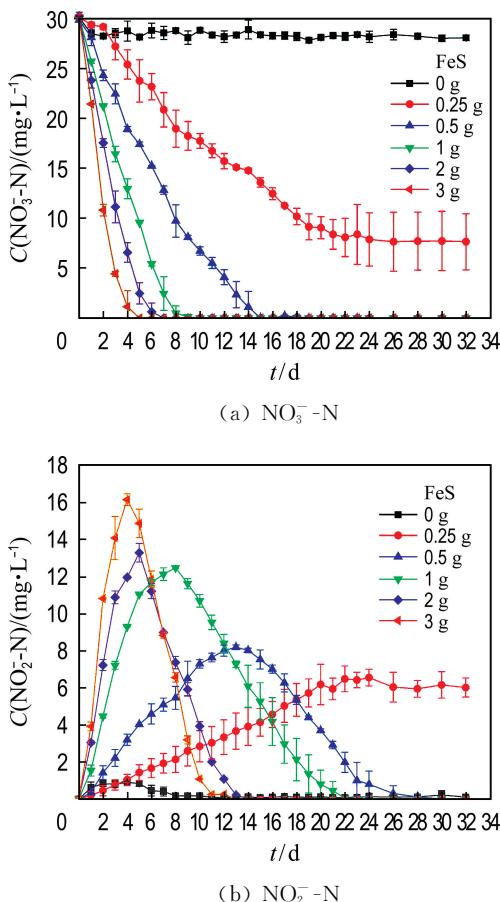


图 5 不同 FeS 加入量对菌株 *T. denitrificans* 自养反硝化的影响

Fig. 5 Effects of different amounts of FeS on autotrophic denitrification conducted by strain *T. denitrificans*

对 NO_3^- 和 NO_2^- 还原阶段的数据均使用线性回归方程拟合,计算反应速率常数和对应的 R^2 ,结果如表 1 所示,线性回归拟合效果较好($R^2 > 0.93$). 反应速率常数 k_1 和 k_2 随着 FeS 加入量的增大而增大,表明加大 FeS 量对微生物自养反硝化反应有明显的促进作用.这是因为更多的 FeS 具有更大的表面积,有利于细菌的附着,同时有利于固体向溶液传质^[17]. 随着 FeS 量的增大, NO_3^- 还原速率 k_1 比 NO_2^- 还原速率 k_2 增大更多,这导致了 NO_2^- 的累积量上升. 在加入 3 g FeS 的体系中 NO_2^- 的累积量最大,达到最大累积量的时间最短,在第 4 d 最大为(16.15±0.31) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,在第 10 d 还原完毕. 在加入 0.25 g 的体系中, NO_3^- 与 NO_2^- 未被完全还原,但根据式(1)计算以 FeS 为电子供体还原所有的 NO_3^- 为 N_2 所需要的 FeS 的理论质量小于 0.25 g.

NO_3^- 未被完全还原的原因可能是沉淀物阻隔了反应的进行. Miot 等^[29] 研究发现铁基质的反硝化过程中生成的固体沉淀物附着在细胞壁上,影响细胞与溶液之间离子的传递. 在微生物使用硫铁矿石自养反硝化的研究中,研究者发现,硫铁矿物会在表面生成新的更稳定的沉淀,阻碍微生物与反应物接触^[7].

表 1 在不同 FeS 加入量下的反硝化反应动力学
Tab. 1 Kinetics of denitrification reaction under different amounts of FeS

| $m(\text{FeS})/\text{g}$ | $k_1/(\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1})$ | $k_2/(\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1})$ |
|--------------------------|--|--|
| 0.25 | $1.13(R^2=0.997)$ | $0.70(R^2=0.932)$ |
| 0.5 | $2.33(R^2=0.991)$ | $1.16(R^2=0.970)$ |
| 1 | $3.91(R^2=0.999)$ | $1.41(R^2=0.960)$ |
| 2 | $5.30(R^2=0.978)$ | $2.52(R^2=0.980)$ |
| 3 | $8.54(R^2=0.995)$ | $2.77(R^2=0.990)$ |

3 结 论

(1) 菌株 *T. denitrificans* ATCC 25259 能够使用 FeS 作为唯一电子供体进行自养反硝化反应, NO_3^- 能够被该菌株完全还原, 反硝化过程中出现中间产物 NO_2^- 的积累, 最终被还原为 N_2 . 在此过程中, FeS 中的硫元素经自养反硝化转化为 SO_4^{2-} , 而铁元素通过与培养基中的 PO_4^{3-} 反应生成沉淀物 $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$.

(2) 菌株 *T. denitrificans* ATCC 25259 利用 FeS 进行的自养反硝化反应遵循零级反应动力学, 加大 FeS 量使得反应速率加快, 完全还原 NO_3^- 和 NO_2^- 的时间均变短. FeS 量对 NO_3^- 还原速率的影响大于对 NO_2^- 还原速率的影响, 随着 FeS 的加入量增大, NO_2^- 的累积量增大. 而当加入的 FeS 量较少时, 反硝化反应受到沉淀物的阻隔逐渐变缓至停止, 此时 NO_3^- 和 NO_2^- 未被完全还原.

参 考 文 献:

- [1] REZVANI F, SARRAFZADEH M H, EBRAHIMI S, et al. Nitrate removal from drinking water with a focus on biological methods: a review [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(2): 1124-1141.
- [2] DI CAPUA F, PIROZZI F, LENZ P N. Electron donors for autotrophic denitrification [J]. Chemical

- Engineering Journal**, 2019, **362**: 922-937.
- [3] JORGENSEN C J, JACOBSEN O S, ELBERLING B, *et al.* Microbial oxidation of pyrite coupled to nitrate reduction in anoxic groundwater sediment [J]. **Environmental Science & Technology**, 2009, **43**(13): 4851-4857.
- [4] HAAIJER S M, LAMERS L M, SMOLDERS A P, *et al.* Iron sulfide and pyrite as potential electron donors for microbial nitrate reduction in freshwater wetlands [J]. **Geomicrobiology Journal**, 2007, **24**(5): 391-401.
- [5] CHOPPALA G, BUSH R, MOON E, *et al.* Oxidative transformation of iron monosulfides and pyrite in estuarine sediments: Implications for trace metals mobilisation [J]. **Journal of Environmental Management**, 2017, **186**(2, SI): 158-166.
- [6] SCHIPPERS A, JORGENSEN B B. Biogeochemistry of pyrite and iron sulfide oxidation in marine sediments [J]. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 2002, **66**(1): 85-92.
- [7] LI Ruihua, MORRISON L, COLLINS G, *et al.* Simultaneous nitrate and phosphate removal from wastewater lacking organic matter through microbial oxidation of pyrrhotite coupled to nitrate reduction [J]. **Water Research**, 2016, **96**: 32-41.
- [8] 付炳炳, 潘建新, 马景德, 等. 采用含硫铁化学污泥作为反硝化电子供体进行焦化废水中总氮深度去除 [J]. **环境科学**, 2018, **39**(7): 3262-3270.
- FU Bingbing, PAN Jianxin, MA Jingde, *et al.* Evaluation of advanced nitrogen removal from coking wastewater using sulfide iron-containing sludge as a denitrification electron donor [J]. **Environmental Science**, 2018, **39**(7): 3262-3270. (in Chinese)
- [9] STRAUB K L, BENZ M, SCHINK B, *et al.* Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996, **62**(4): 1458-1460.
- [10] TROUVE C, CHAZAL P M, GUEROUX B, *et al.* Denitrification by new strains of *Thiobacillus denitrificans* under non-standard physicochemical conditions. Effect of temperature, pH, and sulphur source [J]. **Environmental Technology**, 1998, **19**(6): 601-610.
- [11] HAAIJER S C, VAN DER WELLE M E, SCHMID M C, *et al.* Evidence for the involvement of betaproteobacterial *Thiobacilli* in the nitrate-dependent oxidation of iron sulfide minerals [J]. **FEMS Microbiology Ecology**, 2006, **58**(3): 439-448.
- [12] BELLER H R. Anaerobic, nitrate-dependent oxidation of U(IV) oxide minerals by the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus denitrificans* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, **71**(4): 2170-2174.
- [13] 国家环境保护总局. 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.
- State Environmental Protection Administration. **Monitoring and Analysis Method of Water and Waster Water** [M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002. (in Chinese)
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, **72**(1/2): 248-254.
- [15] PAN Yuting, NI Bingjie, BOND P L, *et al.* Electron competition among nitrogen oxides reduction during methanol-utilizing denitrification in wastewater treatment [J]. **Water Research**, 2013, **47**(10): 3273-3281.
- [16] LU Huijie, CHANDRAN K, STENSEL D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment [J]. **Water Research**, 2014, **64**: 237-254.
- [17] TORRENTO C, CAMA J, URMENETA J, *et al.* Denitrification of groundwater with pyrite and *Thiobacillus denitrificans* [J]. **Chemical Geology**, 2010, **278**(1/2): 80-91.
- [18] GORDON A D, SMIRNOV A, SHUMLAS S L, *et al.* Reduction of nitrite and nitrate on nano-dimensional FeS [J]. **Origins of Life and Evolution of Biospheres**, 2013, **43**(4/5): 305-322.
- [19] RIVETT M O, BUSS S R, MORGAN P, *et al.* Nitrate attenuation in groundwater: A review of biogeochemical controlling processes [J]. **Water Research**, 2008, **42**(16): 4215-4232.
- [20] WANG A J, DU D Z, REN N Q, *et al.* An innovative process of simultaneous desulfurization and denitrification by *Thiobacillus denitrificans* [J]. **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, 2005, **40**(10): 1939-1949.
- [21] TONG Shuang, RODRIGUEZ-GONZALEZ L C, FENG C A. Comparison of particulate pyrite

- autotrophic denitrification (PPAD) and sulfur oxidizing denitrification (SOD) for treatment of nitrified wastewater [J]. *Water Science and Technology*, 2017, **75**(1): 239-246.
- [22] ZHANG Yongwei, WEI Dongyang, MORRISON L, et al. Nutrient removal through pyrrhotite autotrophic denitrification: Implications for eutrophication control [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, **662**: 287-296.
- [23] LI Ruihua, NIU Jianmin, ZHAN Xinmin, et al. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorus from wastewater by means of FeS-based autotrophic denitrification [J]. *Water Science and Technology*, 2013, **67**(12): 2761-2767.
- [24] 周彦卿, 郝瑞霞, 刘思远, 等. 新型硫铁复合填料强化再生水深度脱氮除磷 [J]. 环境科学, 2017, **38**(10): 4309-4315.
- ZHOU Yanqing, HAO Ruixia, LIU Siyuan, et al. Improving nitrogen and phosphorus removal from reclaimed water using a novel sulfur/iron composite filler [J]. *Environmental Science*, 2017, **38**(10): 4309-4315. (in Chinese)
- [25] JANZEN M P, NICHOLSON R V, SCHARER J M. Pyrrhotite reaction kinetics: reaction rates for oxidation by oxygen, ferric iron, and for nonoxidative dissolution [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, **64**(9): 1511-1522.
- [26] DUINEA M I, COSTAS A, BAIBARAC M A. Mechanism of the cathodic process coupled to the oxidation of iron monosulfide by dissolved oxygen [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016, **467**: 51-59.
- [27] VACLAVKOVA S, JORGENSEN C J, JACOBSEN O S, et al. The importance of microbial iron sulfide oxidation for nitrate depletion in anoxic Danish sediments [J]. *Aquatic Geochemistry*, 2014, **20**(4): 419-435.
- [28] GLASS C, SILVERSTEIN J. Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation [J]. *Water Research*, 1998, **32**(3): 831-839.
- [29] MIOT J, MACLELLAN K, BENZERARA K, et al. Preservation of protein globules and peptidoglycan in the mineralized cell wall of nitrate-reducing, iron (II)-oxidizing bacteria: a cryo-electron microscopy study [J]. *Geobiology*, 2011, **9**(6): 459-470.

Study of autotrophic denitrification process conducted by *Thiobacillus denitrichicans* utilizing FeS

ZHOU Xiang, ZHANG Yu*, SUN Chaoyue, SU Zhiqiang, SUN Lijian

(Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, MOE, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The autotrophic denitrification reaction with ferrous sulfide (FeS) as the electron donor plays a significant role in nitrate removal in water body. The strain *Thiobacillus* (*T.*) *denitrichicans* ATCC 25259 is novelly applied to investigate the process of autotrophic denitrification with FeS as substrate. The results exhibit that NO_3^- -N ($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) is finally reduced to N_2 by *T. denitrichicans* utilizing FeS as the sole electron donor. The elemental sulphur in FeS is converted to SO_4^{2-} via autotrophic denitrification, whereas the elemental iron is precipitated with PO_4^{3-} as the form of $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. Besides, according to the fitted curves, this autotrophic denitrification process is demonstrated to accord with the zero-order kinetics ($R^2 > 0.93$). As the rising amount of FeS, both the reduction rates of NO_2^- and NO_3^- increase. Additionally, the reduction rate of NO_3^- grows even more sharply, which accounts for the improved accumulation concentration of NO_2^- as intermediates.

Key words: *Thiobacillus denitrichicans*; ferrous sulfide (FeS); autotrophic denitrification; reaction dynamics