

# 包埋固定化微生物的硫自养反硝化实验研究

欧阳丽华, 周伟丽\*, 张振家, 王晖

(上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240)

**摘要:** 采用升流式颗粒污泥床, 外加  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  作为电子供体, 在室温下连续运行 220 d, 结合硫自养反硝化与固定化包埋技术进行脱氮实验, 考察包埋颗粒的驯化条件、影响因素和最佳运行条件。进水负荷 (以 N 计) 维持  $0.22 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ , 包埋颗粒经 23 d 驯化成功,  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  ( $100 \text{ mg}/\text{L}$ ) 几乎完全去除。连续实验结果表明, 脱氮效果受温度、进水  $\text{NO}_3^-$  浓度和 HRT 因素影响, 受温度制约最大, 春秋季节室温下进水负荷可达  $0.96 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ , 最低水力停留时间 (HRT) 达到 1 h,  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  和 TN 的去除率均达到 90% ~ 100%, 最高去除速率均达到  $39.8 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ , 冬季最低 HRT 达 2 h。系统出水无  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  和  $\text{S}^{2-}$  累积。分子生物学实验显示包埋颗粒经驯化得到反硝化功能菌并逐渐增殖。

**关键词:** 硝酸氮; 自养反硝化; 硫代硫酸盐; 固定化; 包埋

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)06-1644-09

## Study on Sulfur-Based Autotrophic Denitrification by Immobilized Pellets

OUYANG Li-hua, ZHOU Wei-li, ZHANG Zhen-jia, WANG Hui

(School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** Autotrophic denitrification by immobilized microorganisms was investigated in this study. Using thiosulfate as the electron donor, the lab scale up-flow sludge blanket reactor ran continuously for 220 days under the room temperature to investigate the effects of cultivate conditions, influence factors and optimal operating parameters. It took 23 days to finish the initial domestication stage. A nearly complete removal of nitrate ( $100 \text{ mg}/\text{L}$ ) was attained at nitrate loading rates (NLR) of  $0.22 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ . The results revealed that the denitrification efficiency was dependent on temperature, influent nitrate concentration and hydraulic retention time (HRT), and temperature was the most important factor. In spring and autumn, nitrate and total nitrogen removal efficiency remained 90% - 100% at the NLR of  $0.96 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ . The shortest HRT and the highest denitrification rate could achieved 1h and  $39.8 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$  separately. While in winter the shortest HRT was 2 h and no nitrite or sulfide accumulation was detected. Molecular biological analysis indicated that denitrifying bacteria were re-enriched successfully in the immobilized pellets.

**Key words:** nitrate; autotrophic denitrification; thiosulfate; immobilization; embedding

在处理湖泊、景观水、饮用水源地源水等低C/N污水的实际工程中, 自养反硝化技术在传统脱氮工艺中更具优势, 如产泥量极少、出水无二次污染、无外加有机基质降低运行操作费用等<sup>[1]</sup>。利用还原态硫作为电子供体的硫自养反硝化研究一直以来是自养反硝化脱氮研究的热点<sup>[2]</sup>。万东锦等<sup>[3]</sup>利用硫磺单质在室温厌氧条件下对地下水进行脱氮处理, 发现反应受温度影响较大,  $20^\circ\text{C}$  以上利于反硝化的进行,  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  去除率可达 99%, 最低 HRT 达 1.8 h, 单质 S 被氧化产生的  $\text{SO}_4^{2-}$  离子与去除掉的  $\text{NO}_3^-$  离子呈正相关。Sierra-Alvarez 等<sup>[4]</sup>采用硫/石灰石自养反硝化工艺处理地下水, 进水为  $100 \text{ mg}/\text{L}$  的  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  污水经处理可达到完全去除, 最高进水负荷可达  $0.3 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ , 出水无  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  和  $\text{S}^{2-}$  的积累。Vaiopoulou 等<sup>[5]</sup>考察不同 S/N 比对于同步脱氮除硫的影响, 表明自养反硝化产泥较少, 出水无氮氧化物积累。Zhang 等<sup>[6]</sup>通过实验对比 PVA 包埋脱氮硫杆菌进行自养反硝化与未包埋的细菌进行反硝化脱

氮, 结果表明二者均不受硫化物的抑制作用, 最佳反应温度与 pH 条件保持不变, 而包埋菌的反硝化效率更高。Gadekar 等<sup>[7]</sup>通过间歇实验和连续实验研究脱氮硫杆菌的反硝化特性, 表明针对不同浓度的  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  污水, 采用各条件下的最佳 S/N 比和 HRT 均能达到良好的脱氮效果, 出水中单质 S 与  $\text{SO}_4^{2-}$  的浓度变化受进水中  $\text{S}^{2-}$  与  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  浓度的影响。

多数研究认为硫自养反硝化是耗碱产酸反应<sup>[8,9]</sup>, 以单质 S 为电子供体往往需要添加  $\text{CaCO}_3$  以提供碱度控制反应 pH 环境, 文献<sup>[10~13]</sup>都对该工艺的实验效果和动力学有深入的研究, 对硫自养反硝化功能菌也有相关研究<sup>[14]</sup>, 随着同步脱氮除硫用于异养和自养反硝化<sup>[15~17]</sup>的工艺不断改进, 与

收稿日期: 2010-07-15; 修订日期: 2010-09-25

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07106-2-2)

作者简介: 欧阳丽华(1985~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为生物脱氮, E-mail: scarlett0923@yahoo.cn

\* 通讯联系人, E-mail: weilizhou@sjtu.edu.cn

固定化技术相结合<sup>[18]</sup>也成为研究热点,生物固定化技术可能使系统在更苛刻的条件下获得更好的处理效果<sup>[19,20]</sup>.而在各类还原态硫的电子供体中, $S_2O_3^{2-}$ 溶解度高,使得系统传质优于单质 S,同时考虑到  $Na_2S_2O_3$  较  $Na_2S$  更稳定,对系统内 pH 环境影响不大,本研究选用硫代硫酸盐作为电子供体,并采用包埋颗粒培养驯化出反硝化功能菌进行脱氮实验,旨在改进自养反硝化工艺,同时考察包埋颗粒驯化条件、脱氮效果、影响因素及运行稳定性,并进一步在分子生物学方面对包埋颗粒中功能菌的驯化过程作初步探究.

## 1 材料与方

### 1.1 实验装置

连续实验装置采用升流式颗粒污泥床反应器,反应器为密封的有机玻璃柱,内径 88 mm,高度 500 mm,有效容积 3.2 L,采用高分子凝胶材料水性聚氨酯包埋普通活性污泥制成包埋颗粒,反应器内加入包埋颗粒 1.6 L.反应装置由进水装置、蠕动泵、升流式反应器、出水装置、排气装置 5 部分组成(如图 1).模拟配水中外加  $Na_2S_2O_3$  作为反硝化反应电

子供体, $n(S_2O_3^{2-}):n(NO_3^-) = 1:1$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  和  $NaH_2PO_4$  作为微生物生长所需微量营养元素投加,  $NaHCO_3$  为系统提供碱度.模拟配水如表 1 所示.

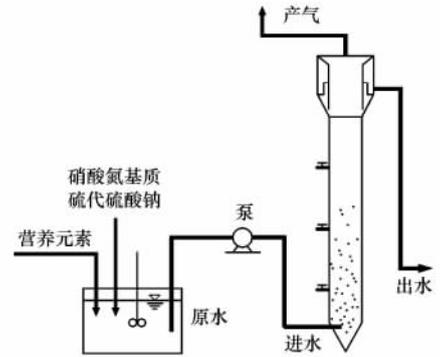


图 1 连续实验装置示意

Fig. 1 Setup of the continuous experiment system

### 1.2 分析项目与测定方法

进、出水  $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$ 、 $NH_4^+$ 、TN、 $S^{2-}$ 、 $SO_4^{2-}$  均采用标准方法<sup>[21]</sup>用于反映连续实验脱氮效果的变化,产气端的气相组分( $N_2/O_2$ )分析采用气相色谱法(气相色谱仪 GC-14B,岛津),室温和进出水 pH 值为每日实测.

表 1 模拟配水组成(以 N 100  $mg \cdot L^{-1}$  计)

Table 1 Composition of synthetic water

项目	$NaNO_3$	$Na_2S_2NO_3 \cdot 5H_2O$	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	$KH_2PO_4$	$NaHCO_3$
浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	607.14	1 771.43	6	3	134

### 1.3 分子生物学分析材料和方法

根据连续实验运行条件的变化确定采样时间,取部分反应器中的包埋颗粒收集于无菌离心管中进行样品采集,置于  $-80^\circ C$  冰箱中保存或直接用于基因组 DNA 抽提<sup>[22,23]</sup>.实验中对各阶段包埋颗粒样品分别取 12 颗颗粒研磨至泥浆,加入裂解液(包括抽提缓冲液、SDS、RNase A)振荡打碎 1 min,加入氯化苄  $50^\circ C$  培养 1 h,再加入 NaAC 冷却 15 min,离心后加入等体积异丙醇沉淀 DNA,离心

后再以乙醇洗涤干燥,加入 TE 缓冲液溶解即为 DNA 模板.聚合酶链式反应(PCR)扩增采用针对亚硝酸盐还原酶结构基因 *nirS* 和 *nirK* 的特异引物对<sup>[24]</sup>(见表 2),进行 PCR 扩增,所用 PCR 反应体系为 25  $\mu L$ .其中包含 2  $\mu L$  DNA 模板,各引物 400 nmol/L, *Taq* 酶(SC0010,上海生工) 2.5 单位, dNTP 混合液(上海生工) 200  $\mu mol/L$ ,  $1 \times$  PCR 缓冲液(上海生工)以及 1 500  $\mu mol/L$   $MgCl_2$ (上海生工).

表 2 亚硝酸盐还原酶结构基因 *nirS*、*nirK* 的特异引物对

Table 2 Primers for the detection of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*)

引物	序列(5'-3')	位置	产物长度/bp
<i>nirK</i> 1F	GG(A/C)-ATG-GT(G/T)-CC(C/G)-TGG-CA	526 ~ 542	514
<i>nirK</i> 5R	GCC-TCG-ATC-AG(A/G)-TT(A/G)-TGG	1 023 ~ 1 040	
<i>nirS</i> 1F	CCT-A(C/T)T-GCC-CGC-C(A/G)C-A(A/G)T	763 ~ 780	890
<i>nirS</i> 6R	CCT-TGA-ACT-T(A/G)C-CGG-T	1 638 ~ 1 653	

### 1.4 实验运行条件

反应器以连续方式运行,驯化阶段和二次启动阶

段采用低负荷运行,后续连续实验分阶段改变运行参数,控制调节进水  $NO_3^-$ -N 浓度和水力停留时间

(HRT). 由于连续实验是在室温条件下进行,在连续运行的 220 d 中经历秋冬春三季,因此依据进水浓度、负荷以及环境温度的变化分为 9 个阶段(如表 3),依据硝酸氮污染现状<sup>[25,26]</sup>,设置 3 个进水浓度:70 mg/L用以代表工业废水等高浓度硝酸氮废水,40

mg/L代表硝酸氮污染的地下水和城市污水厂二级处理出水等中浓度氮污染水,10 mg/L代表如景观水、富营养化地表水等低浓度硝酸氮进水. B、C、D 阶段分别为 70、40 和 10 mg/L进水浓度下,通过改变 HRT 调节进水负荷,对包埋颗粒的脱氮效果进行实验研究.

表 3 运行参数

Table 3 Operating parameter

运行阶段	运行时间 /d	$t$ /°C	进水 $\text{NO}_3^-$ -N /mg·L <sup>-1</sup>	HRT /h	NLR /kg·(m <sup>3</sup> ·d) <sup>-1</sup>
A	0~23	22~28	100	10±0.5	0.23±0.01
B	24~51	15~23	70	6~2	0.28~0.84±0.01
C	52~65	9~14	40	6~2	0.16~0.48±0.01
D	66~119	5.6~12	10	6~0.5	0.04~0.5±0.01
E	120~143	10~12	10	6~4	0.04~0.06±0.01
F	144~162	11~15	10	3~1	0.08~0.24±0.01
G	163~184	12~21	40	6~1	0.16~0.96±0.01
H	185~194	20~23	10	1~0.62	0.24~0.37±0.02
I	195~220	23~26	40	1.5~1	0.64~0.96±0.01

## 2 结果与分析

### 2.1 $\text{NO}_3^-$ -N 去除效果

连续实验运行 220 d,阶段 A 和阶段 E 分别为初始驯化阶段和二次启动阶段,如图 2 所示,进水  $\text{NO}_3^-$ -N浓度为 100 mg/L,维持 HRT 为 10 h,驯化 23 d,出水  $\text{NO}_3^-$ -N浓度低于 10 mg/L,脱氮速率达到 9.2 mg/(L·h)并稳定,驯化完成. 二次启动在低温下进行(10~12°C),低负荷进水,进水  $\text{NO}_3^-$ -N浓度 10 mg/L,HRT 为 6 h 时,出水  $\text{NO}_3^-$ -N浓度低于 1.5 mg/L, $\text{NO}_3^-$ -N去除率高于 85%,连续实验经暂停 40 d 之后迅速启动,随后降低 HRT 至 4 h, $\text{NO}_3^-$ -N去除率有短暂下降,此后又迅速恢复至 85% 以上,表明系统在低温环境中仍能保持较强的抗冲击负荷能力. 二次启动阶段后期,综合考虑低温环境对脱氮效果的影响,进水中外加  $\text{NaHCO}_3$  以增加进水碱度,结果显示,出水  $\text{NO}_3^-$ -N浓度低于 1.5 mg/L, $\text{NO}_3^-$ -N去除率维持 85% 左右,二次启动完成.

进水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度为 70 mg/L如图 2 中 B 阶段所示,HRT 为 6 h 和 4 h 时,出水  $\text{NO}_3^-$ -N浓度均低于 3 mg/L, $\text{NO}_3^-$ -N去除率达到 95%,当 HRT 为 3 h 和 2 h 时,受负荷提高影响,出水  $\text{NO}_3^-$ -N有明显增加再逐渐减少的过程,其中 HRT 为 3 h 时, $\text{NO}_3^-$ -N去除率达 90% 以上,HRT 为 2 h 时,出水  $\text{NO}_3^-$ -N浓度为 10 mg/L左右,去除率为 85%~90%. 这一阶段实验结果表明,室温 20°C 左右,进水  $\text{NO}_3^-$ -N为 70 mg/L条件

下,最低 HRT 可达 2 h,此时负荷达 0.83~0.85 kg/(m<sup>3</sup>·d).

进水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度 40 mg/L如图 2 中阶段 C、G、I 所示,其中阶段 C 为 12°C 左右低温运行,阶段 G 环境温度由 12°C 逐渐上升至 21°C,该阶段逐渐降低 HRT,以考察该浓度条件下的最高进水负荷,阶段 I 在较高环境温度下运行(22°C),着重考察高负荷条件下脱氮效果. 实验结果显示,C 阶段出水  $\text{NO}_3^-$ -N平均浓度低于 2 mg/L,去除率均达 95% 以上,最低 HRT 为 2 h,负荷为 0.48 kg/(m<sup>3</sup>·d);G 阶段随环境温度上升不断提高进水负荷,出水  $\text{NO}_3^-$ -N均接近于 0 mg/L,当 HRT 降至 1.5 h 和 1 h 时, $\text{NO}_3^-$ -N去除率短暂下降随后迅速恢复;I 阶段运行结果与 G 阶段相同. 实验结果表明,进水  $\text{NO}_3^-$ -N为 40 mg/L,低温下最低 HRT 为 2 h,高温下最低 HRT 为 1 h,最高进水负荷达 0.96 kg/(m<sup>3</sup>·d),出水  $\text{NO}_3^-$ -N低于 1 mg/L, $\text{NO}_3^-$ -N去除率均接近 100% 并保持稳定.

进水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度 10 mg/L如图 2 中阶段 D、F、H 所示,D 阶段为 5~12°C 低温运行阶段,本阶段初期,HRT 由 6 h 逐渐降低至 1 h,出水  $\text{NO}_3^-$ -N均为 1 mg/L左右,去除率维持 98%. 运行第 83 d,当 HRT 降低至 0.5 h,同时环境温度降低至 8°C,系统脱氮效果急剧恶化, $\text{NO}_3^-$ -N去除率迅速下降至 40% 以下,随后降低负荷以维持反硝化反应在低温下进行,当环境温度为 5~7°C 时,控制 HRT 为 2 h,负荷为 0.12 kg/(m<sup>3</sup>·d),出水  $\text{NO}_3^-$ -N浓度为 3 mg/L,去除率维持 70% 并保持稳定. 阶段 F 为 11~15°C 低温运

行阶段,运行 22 d 中,出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度均低于 3 mg/L,去除率达 85% 以上,运行第 153 d,由于降低 HRT 为 1 h,  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率下降至 60% 以下,此后降低负荷,控制 HRT 为 1.5 h,脱氮效果恢复. H 阶段为较高温度下运行阶段(20 ~ 23℃),HRT 为 1 h 时  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率接近 100%,降低 HRT 为 40 min(实测值 0.62 ~ 0.68 h),运行 10 d 结果显示,出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度低于 3 mg/L,平均去除率达 80%,但运行效果不稳定. 综合三阶段实验结果可得,进水  $\text{NO}_3^-$ -N 在 10 mg/L,高温下最低 HRT 为 1 h,负荷达 0.24 kg/(m<sup>3</sup>·d),因此 15℃ 以下的低温条件最低

HRT 为 1.5 h,  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率均接近 100% 并保持稳定,室温低于 8℃ 时,最佳 HRT 应维持 2 h 以上.

图 2 显示在连续实验运行 220 d 中,当系统提升负荷时,脱氮效果会暂时下降,此后又迅速恢复,说明系统无论在较高或较低环境温度中,甚至极端温度下都能保持较强的抗冲击负荷能力. 在 3 类进水浓度条件下,系统均能在较低 HRT、较高进水负荷条件下正常运行,出水均达到国家标准<sup>[27, 28]</sup>,达到高效低耗脱氮目的,说明包埋固定化技术应用于自养反硝化工艺,较传统自养反硝化技术,具备更高的脱氮效率以及更良好的抗冲击负荷能力.

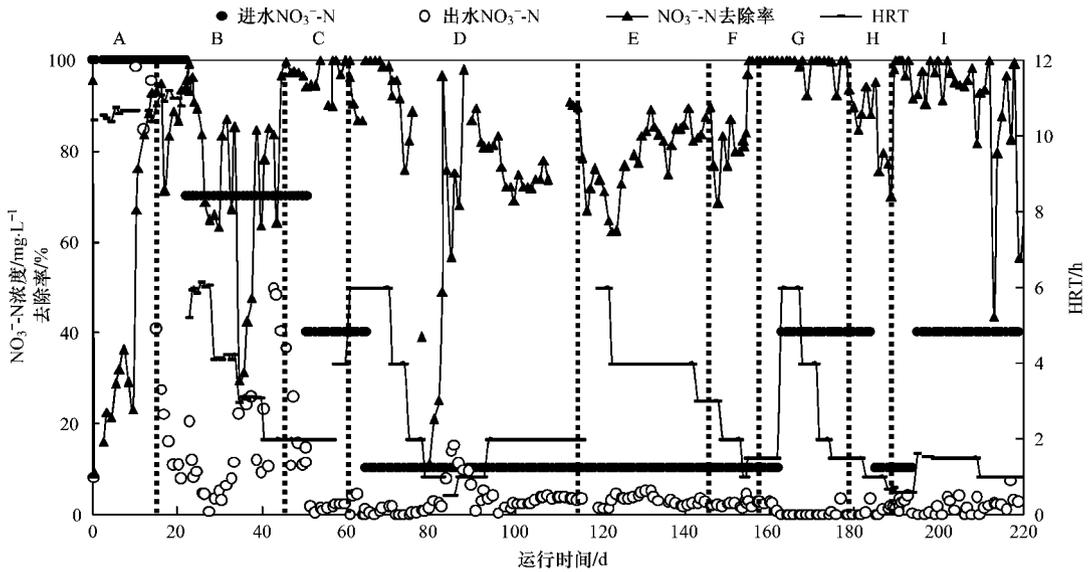


图 2 连续实验硝酸氮去除情况

Fig. 2 Variation of  $c(\text{NO}_3^-)$  in continuous experiments

## 2.2 $\text{NO}_2^-$ -N 和 $\text{NH}_4^+$ -N 的积累

在驯化阶段初期,  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效率低下,存在  $\text{NO}_2^-$ -N 积累,出水  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度不高于 15 mg/L,且积累程度不断降低,表明脱氮效果好转,驯化第 10 d,  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效率明显提高,出水  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度低于 2 mg/L. 驯化阶段完成后,系统内不再有  $\text{NO}_2^-$ -N 积累情况,连续实验正常运行期间,出水  $\text{NO}_2^-$ -N 均低于 0.2 mg/L. 同时检测出水  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度,由图 3 所示,出水中检测有  $\text{NH}_4^+$ -N, 均低于 1 mg/L,且其浓度变化不随  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效果改变而变化,可以认为连续实验正常运行期间,不存在  $\text{NH}_4^+$ -N 积累.

图 3 所示连续运行第 188 d,由于降低 HRT 至 40 min,虽然出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度低于 3 mg/L,但是该阶段出水  $\text{NO}_2^-$ -N 积累率明显增加,出水  $\text{NO}_2^-$ -N 由于

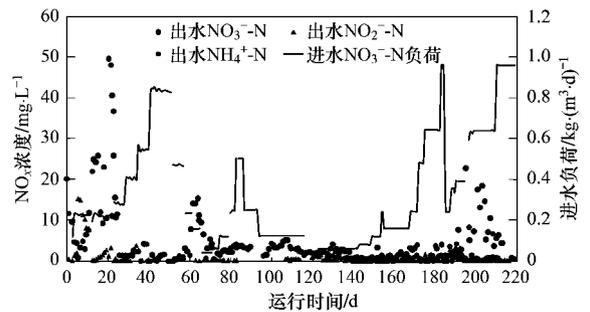


图 3 连续实验系统中出水各形态氮积累情况

Fig. 3 Variation of  $c(\text{NO}_3^-)$ ,  $c(\text{NO}_2^-)$ ,  $c(\text{NH}_4^+)$  in continuous experiments

HRT 降低而迅速增加至 2 ~ 3 mg/L, 积累率达到 20% 以上,且出水  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度变化不稳定. 实验结

果表明,  $\text{NO}_2^-$ -N 积累与脱氮效果直接相关, 驯化阶段初期  $\text{NO}_2^-$ -N 积累现象说明随  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效果好转,  $\text{NO}_2^-$ -N 积累程度显著降低. 阶段 H 中 HRT 降低至 40 min 引起脱氮效果下降, 直接导致  $\text{NO}_2^-$ -N 积累程度增大, 此时进水负荷为  $0.36 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ , 而 I 阶段 HRT 为 1 h, 进水负荷为  $0.96 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ , 并无  $\text{NO}_2^-$ -N 积累现象, 可以推测  $\text{NO}_2^-$ -N 积累与 HRT 的相关性较大, HRT 低于 1 h 易导致  $\text{NO}_2^-$ -N 累积.

### 2.3 TN 的去除

由于  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除效率不能完整反映系统内反硝化情况, 故以 TN 的去除效果作为衡量反硝化效果好坏的指标. 由于连续实验正常运行中无  $\text{NO}_2^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 的积累, TN 去除率 (图 4) 与图 2 所示  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率基本一致, 说明连续实验运行效果良好而且系统有较好的稳定性.

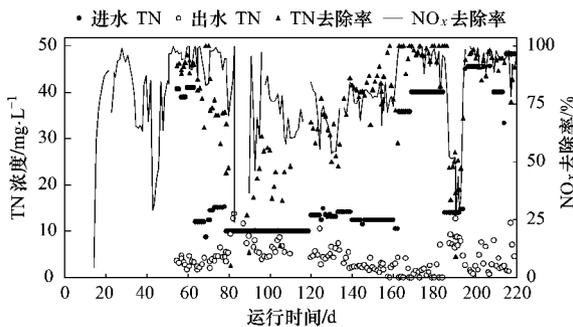


图 4 连续实验运行中系统内 TN 情况

Fig. 4 Variation of  $c(\text{TN})$  in continuous experiments

### 2.4 气体组分分析

连续实验运行期间反应器内  $\text{N}_2/\text{O}_2$  测定结果如图 5 所示, 系统内  $\text{N}_2/\text{O}_2$  比值均大于空气  $\text{N}_2/\text{O}_2$  比值, 驯化阶段之后, 在 70 mg/L 和 40 mg/L 较高浓度进水条件正常运行期间, 系统内  $\text{N}_2$  含量均大于 90%, 图 5 中显示运行第 85 ~ 161 d 为低温低浓度运行, 环境温度为  $8 \sim 12^\circ\text{C}$ , 进水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度为 10 mg/L, 以及运行第 185 ~ 194 d 低浓度运行期间, 气相测定中  $\text{N}_2/\text{O}_2$  比值较小, 系统内  $\text{N}_2$  体积分数约为 85%, 可以说明, 低浓度进水条件下, 产生的  $\text{N}_2$  量较少, 系统内  $\text{N}_2$  生成量与进水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度呈正相关.

### 2.5 $\text{S}^{2-}$ 及 $\text{SO}_4^{2-}$

模拟配水中  $n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}):n(\text{NO}_3^-)$  维持 1:1, 各阶段进水  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  浓度随进水  $\text{NO}_3^-$  浓度变化而改变. 图 6 显示驯化阶段初期, 脱氮效率较低, 出水  $\text{SO}_4^{2-}$  浓

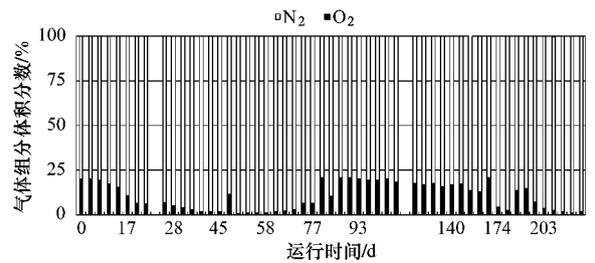


图 5 连续实验气相中的  $\text{N}_2/\text{O}_2$  组分测定

Fig. 5 Percentage of  $\text{N}_2/\text{O}_2$  in the biogas

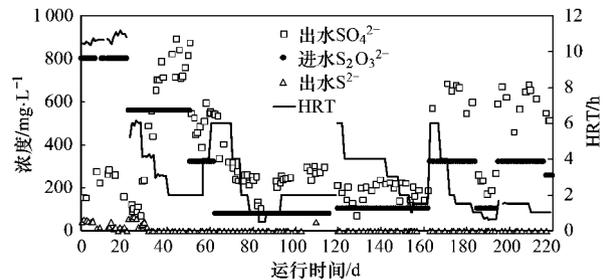


图 6 连续实验出水  $\text{S}^{2-}$  及  $\text{SO}_4^{2-}$

Fig. 6 Variation of  $c(\text{S}^{2-})$  and  $c(\text{SO}_4^{2-})$  in continuous experiments

度较低, 平均浓度为 200 mg/L, 有  $\text{S}^{2-}$  残留, 说明驯化阶段尚未完成, 对底物利用不充分, 供电子方仍有残留, 转化为  $\text{SO}_4^{2-}$  含量也较低. 驯化阶段完成之后, 出水  $\text{SO}_4^{2-}$  含量较稳定且无  $\text{S}^{2-}$  残留,  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度随进水负荷的变化而维持在不同浓度范围, 进水  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  浓度为 560 mg/L 时, 出水  $\text{SO}_4^{2-}$  平均浓度为 700 mg/L, 进水  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  浓度为 320 mg/L 时, 出水  $\text{SO}_4^{2-}$  平均浓度为 400 mg/L, 进水  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  浓度为 80 mg/L 时, 出水  $\text{SO}_4^{2-}$  平均浓度为 250 mg/L. 实验结果显示出水  $\text{SO}_4^{2-}$  含量可以在一定程度上作为反硝化反应运行效果的依据, 当系统运行效果良好并稳定时, 出水中无  $\text{S}^{2-}$  残留, 出水  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度与进水  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  浓度正相关并保持稳定.

出水  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度与系统消耗的  $\text{NO}_3^-$  浓度具有线性相关性, 如图 7 所示, 每消耗 1 mol 的  $\text{NO}_3^-$  生成约 1.9 mol 的  $\text{SO}_4^{2-}$ .

### 2.6 最佳工况选择

连续实验运行 220 d, 历经秋冬春三季, 由于实验结果显示环境温度低于  $8^\circ\text{C}$  对运行效果极为不利, 因此依据温度范围, 综合考虑出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度与脱氮效率, 总结各进水浓度条件下不同温度、不同 HRT 的出水  $\text{NO}_3^-$ -N 平均浓度以及  $\text{NO}_3^-$ -N 平均去除效率得到不同进水浓度下的最佳工况.

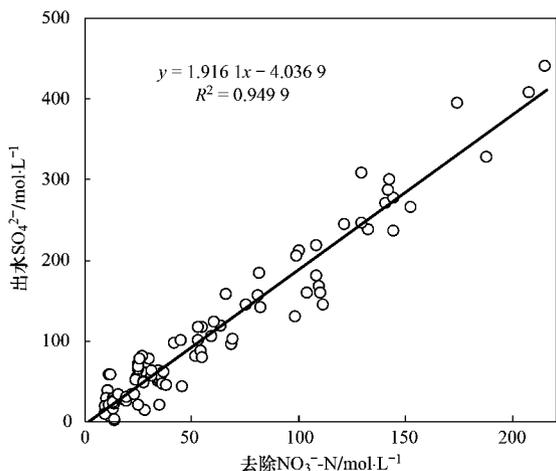


图7 出水  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度与消耗的  $\text{NO}_3^-$  浓度关系

Fig. 7 Correlation between the  $c(\text{SO}_4^{2-})$  and removed  $c(\text{NO}_3^-)$

中高温条件 ( $15 \sim 28^\circ\text{C}$ ) 下, 进水  $\text{NO}_3^-$ -N 为  $70 \text{ mg/L}$ , 最低 HRT 为  $2 \text{ h}$ , 出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度为  $11 \text{ mg/L}$  左右, 去除率为  $85\%$ ; 进水  $\text{NO}_3^-$ -N 为  $40 \text{ mg/L}$ , 最低 HRT 为  $1 \text{ h}$ , 出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度为  $1.5 \text{ mg/L}$ , 去除率达  $97\%$ ; 进水  $\text{NO}_3^-$ -N 为  $10 \text{ mg/L}$ , 当 HRT 为  $40 \text{ min}$  时, 虽然出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度低于  $2 \text{ mg/L}$ , 但是系统内  $\text{NO}_2^-$ -N 积累严重, TN 去除率显著降低, 因此选择最佳 HRT 为  $1 \text{ h}$ ,  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率达  $100\%$ ; 中低温条件 ( $9 \sim 14^\circ\text{C}$ ) 下, 进水  $\text{NO}_3^-$ -N 为  $40 \text{ mg/L}$ , 最低 HRT 为  $1.5 \text{ h}$ , 出水  $\text{NO}_3^-$ -N 为  $1.5 \text{ mg/L}$ , 去除率达  $97\%$ ; 低温条件 ( $5 \sim 8^\circ\text{C}$ ) 下, 进水  $\text{NO}_3^-$ -N 为  $10 \text{ mg/L}$ , 最佳 HRT 为  $2 \text{ h}$ , 出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度为  $2.86 \text{ mg/L}$ , 去除率约为  $77\%$ 。

### 3 影响因素分析

#### 3.1 温度

连续实验在室温下运行, 对比相同负荷条件、不同环境温度下的  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效果, 结果显示环境温度对反硝化运行效果影响较大。图 8 显示在整个连续实验运行过程中, 系统去除速率与环境温度变化紧密相关, 对比  $10 \text{ mg/L}$  进水浓度、HRT 为  $1 \text{ h}$ 、不同温度下的脱氮效果, 进水负荷不变, 环境温度越高脱氮效果越好、去除速率越大。图 8 说明自养反硝化的最适温度为  $15 \sim 28^\circ\text{C}$ , 当温度为  $9 \sim 14^\circ\text{C}$  时, 系统仍能在中等负荷条件下保持较好的运行效果, 最高进水负荷达  $0.48 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ , 去除速率达  $20 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。温度低于  $8^\circ\text{C}$  是不利于自养反硝化反应

进行的, 因此低温阶段, 系统只能在低浓度低负荷条件下运行, 此时最佳进水负荷为  $0.12 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ , 去除速率可维持  $4.27 \sim 5.54 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。实验结果表明, 固定化包埋为自养反硝化菌提供良好的微环境, 使得包埋颗粒在低温下仍保持较高活性, 并且低温下仍可在较低负荷下正常运行, 此外驯化后的包埋颗粒经暂时休眠后也可在低温环境中迅速完成再次启动。由于自养反硝化菌生长缓慢, 且在低温条件下脱氮效果较差, 本实验结果体现了固定化包埋技术应用与自养反硝化工艺相结合的优势, 即提高微生物在较低温度下的活性, 增强脱氮效率, 使得自养反硝化工艺的实际应用具有更高的可行性。

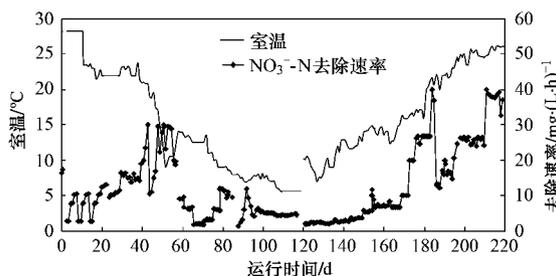


图8 连续实验运行温度与系统去除速率相关性

Fig. 8 Relationship between the temperature and nitrate removal

#### 3.2 进水负荷

实验中进水负荷的控制是由改变进水浓度和 HRT 完成的, 对比相同温度、相同进水负荷条件下, 不同浓度和 HRT 的实验结果, 考察二者对脱氮效率的影响。如图 2 所示, 运行第  $153 \sim 194 \text{ d}$  实验结果显示当进水负荷为  $0.16 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ , 进水浓度  $40 \text{ mg/L}$ , HRT 为  $6 \text{ h}$  比进水浓度  $10 \text{ mg/L}$ 、HRT 为  $1.5 \text{ h}$  运行效果更好, 且当进水负荷为  $0.35 \sim 0.48 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$  时,  $40 \text{ mg/L}$  进水浓度、HRT 为  $2 \text{ h}$ , 脱氮效率可维持  $100\%$ ,  $10 \text{ mg/L}$  进水浓度、HRT 为  $40 \text{ min}$ , 出水  $\text{NO}_2^-$ -N 积累率增大, 系统脱氮效果急剧恶化, 实验结果说明一定进水负荷条件下, HRT 对脱氮效果影响更大, 推测 HRT 过短会造成微生物无法充分利用底物, 引起反硝化效果的恶化。

#### 3.3 碱度

连续实验进出水的 pH 值变化为每日实测, 实测结果显示进出水 pH 值相差较小, 系统负荷提高初期, 出水 pH 值会略有下降, 此后逐渐恢复, 连续运行  $220 \text{ d}$  期间, 系统内 pH 环境始终保持相对稳定, 进水 pH 值为  $6.5 \sim 6.8$ , 出水 pH 值为  $6.0 \sim 6.5$ 。

进水由自来水中本身碱度提供系统所需无机碳源, 而在二次启动阶段, 由于环境温度较低, 系统启

动缓慢,进水中外加  $\text{NaHCO}_3$  用以提高系统碱度,提高了脱氮效率.由图 2 所示,I 阶段后期通过改变外加  $\text{NaHCO}_3$  浓度考察碱度对脱氮效果的影响,结果显示在低温环境下,可以通过外加碱度的方式提高系统脱氮效果,而在较高环境温度条件下,可以适量减少外加碱度,对脱氮效果影响较小.

实验结果显示系统在高负荷进水条件下,出水 pH 值有显著下降,此后随着  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  去除率的提高而上升,稳定运行时,进出水的 pH 值几乎保持一致,可以推断硫自养反硝化反应是一个耗碱产酸的过程, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  作为电子供体对碱度变化影响不大,外加少量的碱度更有助于反硝化反应保持较高效率,且有助于提高抗冲击负荷能力,保持系统运行的稳定性.

#### 4 与其他自养反硝化处理工艺的对比

表 4 为本研究与其他自养反硝化处理工艺的脱

氮效率对比.对比不同电子供体的硫自养反硝化结果,可以看出以 S 单质为电子供体,反应最低 HRT 可以降低至 1.8 h,但是系统进水负荷较低,且多数研究均在环境温度高于  $20^\circ\text{C}$  的条件下进行.

用培养基培养得到脱氮硫杆菌用以进行连续实验,HRT 多大于 4 h,在适宜温度下处理高浓度硝酸氮污染水,往往需要很长的反应时间,而在较低环境温度下运行,只能维持较低的进水负荷.

而本研究结果显示,包埋颗粒用于硫代硫酸盐自养反硝化,可以在适宜环境温度下,各进水浓度下最低 HRT 达到 1 h,进水负荷达到  $0.96 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ .即使在低温环境下,最高进水负荷也可达到  $0.12 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ ,高于其他硫自养反硝化处理效率.因此,采用包埋固定化污泥驯化后的硫自养反硝化工艺处理效率高,脱氮效果好,系统抗冲击负荷能力强,运行管理简单,可达到高效低耗脱氮目的.

表 4 本研究与各文献资料的自养反硝化工艺的效率比较

Table 4 Comparison of the efficiency of different autotrophic denitrification processes

采用工艺	电子供体	运行方式	环境温度 / $^\circ\text{C}$	进水硝酸氮 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$n(\text{S})$ / $n(\text{N})$	HRT / $\text{h}$	Max NLR / $\text{kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$	去除效率 / $\%$	备注	文献
S/Ca, 填料床	S	培养基培养后再进行连续/间歇实验	$30 \pm 2$	400 80	$0.53 \pm 0.02$	$30.5 \pm 3.7$ $1.8 \pm 0.2$	0.3 0.25	96	无亚硝酸积累	[4]
硫自养反硝化脱硫	$\text{Na}_2\text{S}$	连续恒温循环	30	130				完全去除	无亚硝酸积累	[5]
培养 <i>Thiomicrospira</i> sp. CVO 脱硫	$\text{Na}_2\text{S}$	间歇连续	22 室温	110	$0.28 \sim 1.6$	4.3			有亚硝酸积累	[7]
<i>T. denitrificans</i> 3870 PVA 包埋菌	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	间歇	$30 \pm 2$	700	3.04	运行 12 d		75	包埋菌优于未包埋菌	[6]
电化学 + 单质 S 自养	$\text{S} + \text{H}_2$	连续	室温	30		$1.9 \sim 5$	0.381	完全去除		[17]
S/Ca	S	间歇中试	28 $20 \sim 25$	100		$5.47 \sim 8.86$		完全去除	$\text{CaCO}_3$ 提供碱度	[11]
单质 S + 膜处理		连续		25		2.6		完全去除		[29]
包埋固定化 + UASB	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	连续	$5 \sim 28$ , 室温	$10 \sim 70$	1.0	1.0	0.96	$95 \sim 100$	无亚硝酸积累	本研究

#### 5 分子生物学分析

为了考察包埋颗粒内自养反硝化微生物的生长情况,从反应器内提取包埋颗粒中微生物的基因组 DNA,采用 PCR 技术,对 16S rRNA 基因的 V3 区进行扩增,通过对比扩增条带的亮度半定量地反映包埋颗粒内反硝化菌数量的变化.

包埋颗粒样品采集信息如表 5 所示,1~8 号样品为连续实验不同时期采集的包埋颗粒样品,其中 3 号样品为反应器内颗粒上浮时采集的上浮颗粒,

连续实验长期运行之后,部分包埋颗粒颜色变浅成为白色,因此分别取黑色颗粒和白色颗粒为 7 号和 8 号样进行对比,9 号样品为异养反硝化污泥样,10 号样品为单质硫自养反硝化污泥,与本实验的 1~8 号样品进行对比.

采用引物 *nirS* 和 *nirK* 对抽提出的 DNA 样品进行扩增,扩增条件如表 6 所示,退火温度经最佳退火温度实验选定为  $58.5^\circ\text{C}$ .扩增结果见图 9、图 10.

PCR 扩增结果显示,由 *nirK* 和 *nirS* 引物对获得的扩增结果不同(图 10 所示),以 10 号样作为阳性

对照,硫自养反硝化实验中,以  $S_2O_3^{2-}$  为电子供体与以单质 S 为电子供体驯化培养出的功能菌不同. 由图 9 可得,连续实验运行期间,包埋颗粒内微生物含量逐渐增加,通过光密度分析可得,1、2、3 号样品中微生物量变化不大,显示该阶段微生物增殖量较少,4~8 号样品扩增条带明显变亮,说明随着连续

运行时间颗粒内反硝化微生物含量增多,环境温度上升有利于微生物增殖. 由图 9 所示,对比 7 号和 8 号样品,包埋颗粒长期运行后,部分颗粒颜色变浅,二者通过半定量分析结果显示,白色颗粒中含有的微生物量高于黑色颗粒. 颗粒颜色的变化不影响反应器的脱氮效率.

表 5 包埋颗粒样品采集说明

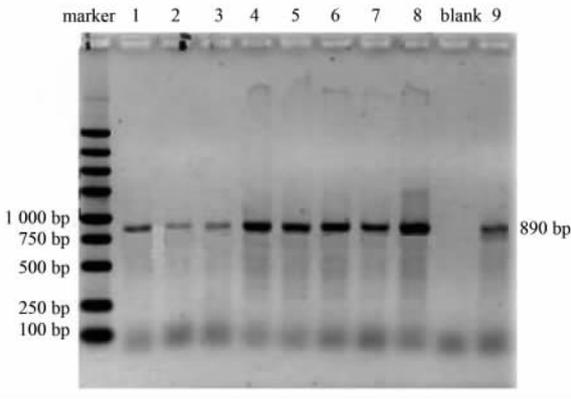
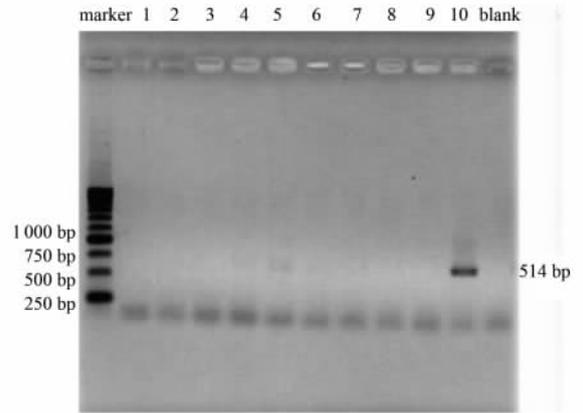
Table 5 Illustration of immobilized pallets samples

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
采样时间 (月-日)	11-09	11-17	12-01	01-08	03-30	04-14	05-05 (黑色)	05-05 (白色)	异养反硝 化泥样	单质硫自养 反硝化泥样
温度/ $^{\circ}C$	20.8	11.0	12.9	6.5	12.2	14.0	21.0	21.0	—	—
代表季节		秋季		冬季		春季		春季		秋季

表 6 PCR 扩增循环条件

Table 6 Protocol for PCR amplification

引物	预变性			循环条件						循环后延伸	
	温度/ $^{\circ}C$	时间/min	循环次数	变性		退火		延伸		温度/ $^{\circ}C$	时间/min
				温度/ $^{\circ}C$	时间/s	温度/ $^{\circ}C$	时间/s	温度/ $^{\circ}C$	时间/s		
<i>nirK</i>	95.0	10	40	94	30	60	40	72	30	72	5
<i>nirS</i>	95.0	10	40	94	30	58.5	40	72	30	72	5

图 9 *nirS* 引物扩增产物的凝胶电泳图Fig. 9 Gel picture of *nirS* amplicons图 10 *nirK* 引物扩增产物的凝胶电泳图Fig. 10 Gel picture of *nirK* amplicons

## 6 结论

(1) 固定化包埋技术结合硫自养反硝化工艺, 利用外加  $S_2O_3^{2-}$  作为反硝化反应电子供体, 可以达到高效低耗脱氮的目的. 实验结果表明脱氮效率与环境温度、进水  $NO_3^-$ -N 浓度和 HRT 相关, 连续实验正常运行期间, 出水无  $S^{2-}$  残留, 无  $NO_2^-$ -N、 $NH_4^+$ -N 积累, 出水  $NO_3^-$ -N 及 TN 含量达到国家标准. 固定化包埋技术应用于硫自养反硝化工艺的优势为: ① 无剩余污泥; ② 生物量高、处理能力高; ③ 固液分离效果好, 出水水质良好; ④ 水力停留时间短; ⑤ 系统抗

冲击负荷能力强.

(2) 常温条件下, 春秋季进水负荷可达  $0.96 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ , 最低 HRT 可达 1 h, 脱氮率达 95% 以上. 采用固定化包埋技术, 自养反硝化正常运行的适宜温度范围扩展到  $10^{\circ}C$  以上, 其中最适温度为  $15^{\circ}C$  以上. 自养反硝化菌在低温条件下 ( $5 \sim 8^{\circ}C$ ), 仍旧保持较高生物活性, 可以处理低浓度  $NO_3^-$ -N 废水, 最佳进水负荷为  $0.12 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ , HRT 为 2 h, 出水  $NO_3^-$ -N 低于  $3 \text{ mg}/L$ , 脱氮率可达 77%.

(3) 硫自养反硝化反应的影响因素有温度、进水浓度和 HRT 等, 其中环境温度的影响最大, 系统

$\text{NO}_3^-$ -N去除速率随温度上升而提高;相同进水负荷条件下,HRT对脱氮效率的影响更大,最低HRT与温度相关,春秋季节常温条件下,最低HRT为1 h.

(4)分子生物学实验结果显示,包埋颗粒内自养反硝化菌经历了先被驯化、筛选后增殖、富集的过程,与异养反硝化分子生物学实验结果对比,固定化包埋技术使得生长缓慢且易受环境因素影响的自养反硝化菌能维持较高生物活性,有助于包埋颗粒内自养反硝化菌的增殖,且不随出水流失,促进反硝化反应高效稳定运行.

#### 参考文献:

- [ 1 ] Campos J L, Carvalho S, Portela R, *et al.* Kinetics of denitrification using sulphur compounds; Effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds [ J ]. *Bioresource Technology*, 2008, **99** ( 5 ): 1293-1299.
- [ 2 ] 邓旭亮,王爱杰,荣丽丽,等. 硫自养反硝化技术研究现状与发展趋势[ J ]. *工业水处理*, 2008, **28** ( 3 ): 13-16.
- [ 3 ] 万东锦,刘会娟,雷鹏举,等. 硫自养反硝化去除地下水中硝酸盐氮的研究[ J ]. *环境工程学报*, 2009, **3** ( 1 ): 1-5.
- [ 4 ] Sierra-Alvarez R, Beristain-Cardoso R, Salazar M, *et al.* Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment [ J ]. *Water Research*, 2007, **41** ( 6 ): 1253-1262.
- [ 5 ] Vaiopoulou E, Melidis P, Aivasidis A. Sulfide removal in wastewater from petrochemical industries by autotrophic denitrification [ J ]. *Water Research*, 2005, **39** ( 17 ): 4101-4109.
- [ 6 ] Zhang Z Y, Lei Z F, He X Y, *et al.* Nitrate removal by *Thiobacillus denitrificans* immobilized on poly ( vinyl alcohol ) carriers [ J ]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, **163** ( 2-3 ): 1090-1095.
- [ 7 ] Gadekar S, Nemati M, Hill G A. Batch and continuous biooxidation of sulphide by *Thiomicrospira* sp. CVO: Reaction kinetics and stoichiometry [ J ]. *Water Research*, 2006, **40** ( 12 ): 2436-2446.
- [ 8 ] Sher Y, Schneider K, Schwermer C, *et al.* Sulfide-induced nitrate reduction in the sludge of an anaerobic digester of a zero-discharge recirculating mariculture system [ J ]. *Water Research*, 2008, **42** ( 16 ): 4385-4392.
- [ 9 ] Aoi Y, Shiramasa Y, Kakimoto E, *et al.* Single-stage autotrophic nitrogen-removal process using a composite matrix immobilizing nitrifying and sulfur-denitrifying bacteria [ J ]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, **68** ( 1 ): 124-130.
- [ 10 ] Liu L H, Koenig A. Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification batch experiments [ J ]. *Process Biochemistry*, 2002, **37** ( 8 ): 885-893.
- [ 11 ] Koenig A, Liu L H. Use fo limestone for pH control in autotrophic denitrification; continuous flow experiments in pilot-scale packed bed reactors [ J ]. *Journal of Biotechnology*, 2002, **99** ( 2 ): 161-171.
- [ 12 ] Koenig A, Liu L H. Kinetic model of autotrophic denitrification in sulphur packed-bed reactions [ J ]. *Water Research*, 2001, **35** ( 8 ): 1969-1978.
- [ 13 ] Zeng H, Zhang T C. Evaluation of kinetic parameters of a sulfur-limestone autotrophic denitrification biofilm process [ J ]. *Water Research*, 2005, **39** ( 20 ): 4941-4952.
- [ 14 ] Sorokin D Y, Tourova T P, Bezoudnova E Y, *et al.* Denitrification in a binary culture and thiocyanate metabolism in *Thiohalophilus thiocyanoxidans* gen. nov. sp. nov. —a moderately halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing *Gammaproteo bacterium* from hypersaline lakes [ J ]. *Archives Microbiology*, 2007, **187** ( 6 ): 441-450.
- [ 15 ] Reyes J S, Razo E, Gomez J. Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification [ J ]. *Water Research*, 2004, **38** ( 14-15 ): 3313-3321.
- [ 16 ] Li W, Zhao Q L, Liu H. Sulfide removal by simultaneous autotrophic and heterotrophic desulfurization denitrification process [ J ]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, **162** ( 2-3 ): 848-853.
- [ 17 ] Wang H Y, Qu J H. Combined bioelectrochemical and sulfur autotrophic denitrification for drinking water treatment [ J ]. *Water Research*, 2003, **37** ( 15 ): 3767-3775.
- [ 18 ] Kimura K, Nakamura M, Watanabe Y. Nitrate removal by a combination of elemental sulfur-based denitrification and membrane filtration [ J ]. *Water Reasearch*, 2002, **36** ( 15 ): 1758-1766.
- [ 19 ] 傅利剑. 反硝化微生物生物学特性及其固定化细胞对硝酸盐去除的研究[ D ]. 南京:南京农业大学, 2004.
- [ 20 ] 王丽丽. 高效反硝化菌的实验研究及其脱氮动力学分析[ D ]. 天津:天津大学, 2003.
- [ 21 ] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[ M ]. ( 第四版 ). 北京:中国环境科学出版社, 2002. 132-284.
- [ 22 ] Kageyama K, Komatsu T, Suga H. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil[ J ]. *Journal of General Plant Pathology*, 2003, **69** ( 3 ): 153-160.
- [ 23 ] Zhou W, Kageyama K, Li F, *et al.* Monitoring of microbiological water quality by real-time PCR [ J ]. *Environmental Technology*, 2007, **28** ( 5 ): 545-553.
- [ 24 ] Braker G, Fesefeldt A, Witzel K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes ( *nirK* and *nirS* ) to detect denitrifying bacteria in environmental samples [ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64** ( 10 ): 3769-3775.
- [ 25 ] 聂晓雪,蒋进元,王勇,等. 生物循环流化床工艺自养反硝化研究[ J ]. *环境科学研究*, 2008, **21** ( 4 ): 10-13.
- [ 26 ] 姜巍,曲久辉,雷鹏举,等. 固定床自养反硝化去除地下水中的硝酸盐氮[ J ]. *中国环境科学*, 2001, **21** ( 2 ): 133-136.
- [ 27 ] GB 5749-2006, 生活饮用水卫生标准[ S ].
- [ 28 ] GB 8978-1996, 污水综合排放标准[ S ].
- [ 29 ] Katsuki K, Masahiko N, Yoshimasa W. Nitrate removal by a combination of elemental sulfur-based denitrification and membrane filtration [ J ]. *Water Research*, 2002, **36** ( 7 ): 1758-1766.