

论述与研究

DOI: 10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2022.17.001

蓝铁矿形成要素探究:涉及细菌对乙酸的亲和性

郝晓地, 孙 群, 于文波, 袁土贵

(北京建筑大学城市雨水系统与水环境教育部重点实验室 中-荷污水处理技术研发中心, 北京 100044)

摘 要: 蓝铁矿是继鸟粪石后又一种被关注的高含磷量磷酸盐化合物。不同的是,蓝铁矿只能在污泥厌氧消化过程中形成,且需要污泥中含有足量的三价铁(Fe^{3+})。有关蓝铁矿的研究目前又到了趋之若鹜的程度,但是蓝铁矿形成的关键制约因素仍未完全明晰。为此,通过序批式厌氧消化反应探究了厌氧消化系统中铁还原细菌(DMRB)与产甲烷菌(MPB)对共同基质——乙酸的竞争关系,以确定蓝铁矿的形成是否会因MPB消耗乙酸而被影响(共性问题)。结果发现,两种微生物对挥发性脂肪酸(VFAs)确实存在底物竞争关系,因DMRB对乙酸的亲和系数比MPB低约1个数量级,使其在竞争中立于不败之地。因此,MPB并存并不会明显影响 Fe^{3+} 还原速率及蓝铁矿形成。然而,蓝铁矿大量形成会减少甲烷(CH_4)产量,平衡二者关系应为后续研究重点。

关键词: 蓝铁矿; 三价/二价铁; 异化金属还原细菌; 产甲烷菌; 乙酸; 亲和系数
中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2022)17-0001-06

Unraveling Key Factors of Vivianite Formation: Affinity of Involved Bacteria on Acetic Acid

HAO Xiao-di, SUN Qun, YU Wen-bo, YUAN Tu-gui

(Sino-Dutch R&D Centre for Future Wastewater Treatment Technologies, Key Laboratory of Urban Stormwater System and Water Environment <Ministry of Education>, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing 100044, China)

Abstract: Vivianite is a concerned phosphate compound with a high P-content, following struvite. Differently, vivianite can only be formed during anaerobic digestion of excess sludge, in which enough ferric iron (Fe^{3+}) in sludge is required. Present researches on vivianite are being pursued, but key factors controlling vivianite formation are still not fully understood. Thus, the competition between dissimilated metal reducing bacteria (DMRB) and methane-producing bacteria (MPB) for acetate was mainly investigated to unravel whether vivianite formation was controlled by consuming acetic acid by MPB (a generic question). Experimental results indicated that there was indeed the competition between DMRB and MPB for acetic acid. But the affinity coefficient of DMRB on acetic acid was about one order of magnitude lower than that of MPB, which made DMRB become an unrivaled competitor. As a result, coexistence of MPB did not significantly affect the reduction rate of Fe^{3+} for vivianite formation. However, a large amount of vivianite formation could reduce methane (CH_4) production, and thus the balance

between the two bacteria should be a focus in subsequent researches.

Key words: vivianite; ferric/ferrous iron; dissimilated metal reducing bacteria (DMRB); methane-producing bacteria (MPB); acetic acid; affinity coefficient

磷是一种不可再生、不可或缺的重要资源,它是核蛋白、磷酸腺苷和许多酶的构成成分,在生物体能量传递、储存以及信息遗传中起着关键作用,特别是对DNA和RNA的形成影响极大^[1]。以现有磷资源管理方式,磷矿储量仅可供应约100年^[2],届时将发生无磷可用的“磷危机”现象^[3]。另一方面,人类向自然界排放的生活污水中含有大量的磷酸盐,导致了水体富营养化而出现磷“过剩”问题。

污水中90%的磷在生物处理过程中被转移至剩余污泥之中^[4]。在我国,每年约 144×10^4 t磷资源被排入市政污水中,约占农业磷肥消耗量的1/4^[5]。可见,剩余污泥具有很大的磷回收潜力,或能成为支撑人类社会发展的“第二磷矿”^[6]。从污水中各种磷回收位点和形式来看,从剩余污泥中回收磷明显是一种资源有效利用方式^[7]。

在剩余污泥厌氧消化过程中,人们发现存在一种新的磷酸盐回收形式——蓝铁矿 $[\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$ 。因其 P_2O_5 折标含磷量(28.3%)与趋之若鹜的鸟粪石 $(\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ 旗鼓相当(28.98%),还可用作锂离子电池主要合成原料^[8],所以,近年来成为磷回收的新宠。但是,蓝铁矿中所需 Fe^{2+} 要在厌氧环境下通过异化金属还原细菌(DMRB)将污泥中的 Fe^{3+} 还原,方能与污泥细胞裂解释放的 PO_4^{3-} 发生化学反应生成蓝铁矿^[9]。进言之,DMRB为异养菌,一般需要乙酸作为电子供体去还原 Fe^{3+} 。这就可能形成DMRB与产甲烷细菌(MPB)竞争乙酸的场景。因此,需要从微生物反应动力学角度探究DMRB与MPB这两种细菌对乙酸的竞争关系,以明晰蓝铁矿形成对乙酸竞争的优先程度。

1 材料与方法

1.1 生污泥与接种污泥

本研究采用人工培养剩余污泥作为厌氧消化底物,投加羟基氧化铁(FeOOH)形成铁源。接种污泥来源于北京建筑大学科研楼实验室已稳定运行4年的中试厌氧消化系统,以人工培养的“纯净”生污泥进行培养,从而获得“纯净”的接种污泥。生污泥与接种污泥培养及投加方法与之前研究相同^[10]。

实验中使用2-溴乙基磺酸钠(SBES)作为产甲烷抑制剂,可抑制MPB活性,但不影响系统内其他微生物活性。污泥参数见表1。

表1 生污泥与接种污泥参数

Tab.1 Characteristics of both concentrated and inoculum sludges

项 目	生污泥	接种污泥
pH	7.0±0.1	6.9±0.1
TS/(g·L ⁻¹)	31.09±0.13	25.15±0.03
VS/(g·L ⁻¹)	21.35±0.09	13.24±0.03
VS/TS	0.686±0.006	0.526±0.002
P/(g·L ⁻¹)	1.158±0.033	0.266±0.026
Ca/(g·L ⁻¹)	0.541±0.051	3.677±0.137
Mg/(g·L ⁻¹)	0.151±0.009	0.226±0.004
Fe/(g·L ⁻¹)	0.005±0.007	0.104±0.007
Al/(g·L ⁻¹)	0.015±0.000 8	0.020±0.000 9

1.2 实验方案

采用血清瓶进行序批式厌氧消化实验,血清瓶总容积为600 mL,工作容积为400 mL。设置1个空白组与3个实验组,通过控制 FeOOH 添加量与SBES抑制剂方式达到调控不同实验组中微生物活性目的。未投加 FeOOH 实验组,DMRB因缺少 Fe^{3+} 而无法完成呼吸作用;投加SBES实验组,MPB的关键酶活性被抑制,无法进行产甲烷过程。具体实验方案如表2所示。实验前将生泥与种泥均用1 mmol/L HCl调节pH至7.0,入实验瓶前需将产甲烷抑制剂组中种泥与SBES先混合搅拌30 min;装瓶后通15 min的 N_2 ,以维持充分厌氧环境。实验周期设定为20 d。

表2 实验参数

Tab.2 Experimental parameters mmol·L⁻¹

组别	SBES	FeOOH
R0	50	0
R1	0	45.37
R2	0	0
R3	50	45.37

1.3 实验方法

TP/ PO_4^{3-} : 钼锑抗分光光度法, TFe/ Fe^{2+} : 邻菲啰

紫外分光光度法,金属离子:ICP-OES电感耦合等离子体光谱仪,挥发性脂肪酸(VFAs):气相色谱仪,气体体积:排水法,气体组分:气相色谱仪。

蓝铁矿产量采用磷分级提取,与之前研究一致^[11-12]。其中,污泥中 Fe^{2+} 会与系统中部分阴离子结合形成难溶化合物,无法直接检测。因此,使用1 mol/L的HCl浸取混合污泥2 h后再进行检测。

微生物高通量测序依托某生物云平台进行,将PCR产物用QuantiFluor™-ST蓝色荧光定量系统进行检测定量,获得ASV代表序列和丰度信息,根据文献调研结果分析各组微生物菌群种类。

1.4 动力学公式

应用莫诺方程单底物[式(1)]与双底物[式(2)]形式对微生物铁还原及产甲烷过程进行拟合^[13]。同时,采用抑制常数[式(3)]分析微生物铁还原及产甲烷过程中彼此间的抑制作用。

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_1 S_2}{K_1 S_2 + K_2 S_1 + S_1 S_2} \quad (2)$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S} \quad (3)$$

式中: μ 为微生物比增殖速率,mmol/(gVSS·d); μ_{\max} 为微生物最大比增殖速率,mmol/(gVSS·d); K_s 为亲和常数,也称半饱和系数,mmol/gVSS; I 为竞争微生物浓度,g/L; K_i 为抑制常数,g/L; S 为底物浓度,mmol/g; S_1 和 S_2 分别表示乙酸和 Fe^{3+} 浓度,mmol/g。

2 结果与讨论

2.1 磷分级提取

实验结束后的磷分级提取结果如图1所示。由于各组中铁含量不同,导致各组所形成的蓝铁矿含量也不一样。R0与R2组未投加铁源,出现的蓝铁矿为种泥带入,约占总磷(TP)的18%~20%。R1与R3组中投加了等量铁源,所形成的蓝铁矿含量相当,占TP的57%,含量达(227.5±9.8) mg/g(以干污泥计),较R0与R2组增加了约38%。

此外,在控制铁含量不变的情况下,R0组相对于R2组、R3组相对于R1组,C-P含量占比分别升高7.9%和3.7%,而Ca-P与Fe-P含量之和相应降低。这可能是因为R0与R3组中MPB活性被抑制,不再产生 CH_4 ,而污泥水解过程中产生了一定的

CO_2 ,这就使得气体中 CO_2 分压增大,促进其溶解于溶液中并形成更多的 CO_3^{2-} ^[14],从而形成了更多的难溶碳酸盐,并吸附了部分 PO_4^{3-} 。可见,污泥中铁含量是影响蓝铁矿形成的主要因素。

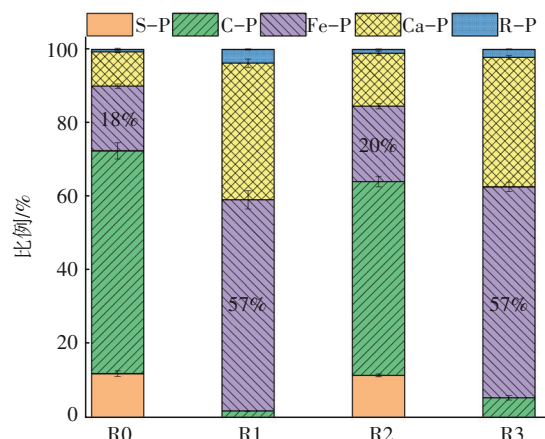


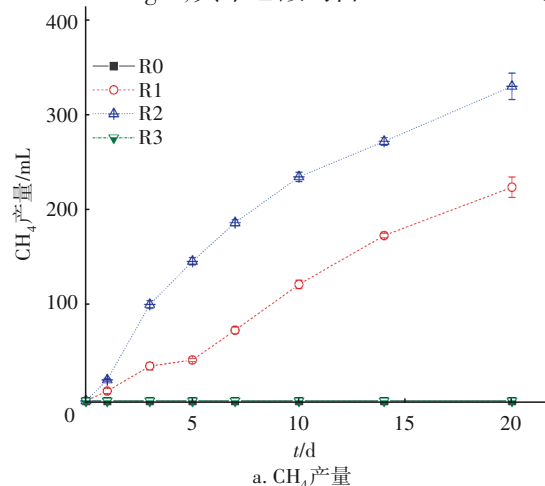
图1 磷酸盐产物磷分级提取结果

Fig.1 Result of phosphate extraction

2.2 常规指标分析

各实验组 CH_4 累积产量变化如图2(a)所示。加入SBES后,R0与R3组中MPB活性被完全抑制,无 CH_4 产生。同时,R1的 CH_4 生成量较低,约为R2的68%,这是因为铁还原过程消耗了一定量的VFAs,使之未被MPB利用转化。这说明DMRB与MPB确实是利用相同的有机底物,蓝铁矿形成在一定程度上会减少厌氧消化的 CH_4 产量。

VFAs浓度(以COD计)变化见图2(b)(每个时间点的4个柱状图从左到右依次为R0、R1、R2、R3)。R1与R2中MPB摄取乙酸将之转化为 CH_4 ,导致VFAs浓度降低。而在R0与R3中,因MPB被抑制,不能利用乙酸,导致VFAs不断积累,浓度达到2 400~3 500 mg/L,其中乙酸约占43.5%~53.2%。



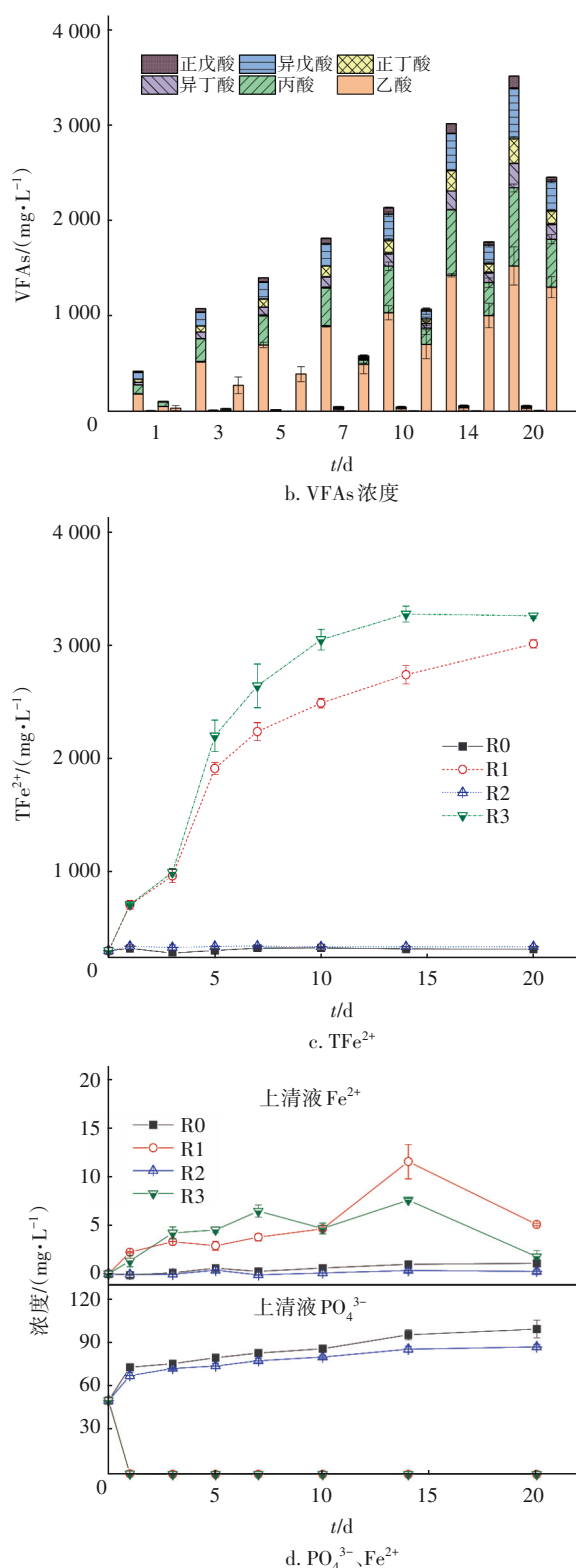


图2 厌氧消化中CH₄累积量、VFAs、TFe²⁺、PO₄³⁻和Fe²⁺浓度变化

Fig.2 Concentration changes of accumulated CH₄, VFAs, TFe²⁺, PO₄³⁻ and Fe²⁺ in anaerobic digestion
总Fe²⁺ (TFe²⁺)浓度变化见图2(c)。R1与R3的

铁还原速率在3~5 d内达到最大,且R3的铁还原速率较R1高19%,这是由于R3中加入的SBES抑制了MPB活性,使得VFAs含量较高,反应底物更充足。这就说明DMRB与MPB间关于摄取利用乙酸存在着竞争,当抑制了MPB的活性后,DMRB对铁还原速率得到明显提升。而在实验后期(10~20 d),即使VFAs含量较高,铁还原速率也逐渐变缓,这是由于铁还原过程同时还受到Fe³⁺浓度的限制。

Fe²⁺与PO₄³⁻变化曲线如图2(d)所示。随厌氧消化反应进行,PO₄³⁻逐渐被释放至上清液中,R0和R2最高可达99 mg/L和87 mg/L。R0中PO₄³⁻浓度较R2高约3.3~12.2 mg/L,这可能是由于R0中VFAs大量积累使得pH较低,进而促进污泥水解酸化与PO₄³⁻释放;而R1与R3随着Fe³⁺逐渐还原、与PO₄³⁻结合,导致浓度变低。因R3的Fe³⁺初期还原速率较快,所以其上清液中溶解性Fe²⁺浓度较高。但由于R3产CH₄反应被抑制,形成了额外的CO₃²⁻,因而结合沉淀了更多的Fe²⁺,使得R3的最大Fe²⁺浓度低于R1。

2.3 微生物种群分析

取R1泥样进行高通量测序并分析微生物组成^[15],结果见图3。在该厌氧消化系统中,DMRB占污泥中全部微生物总数的0.252%,而MPB则高达0.942%,约为前者的3.74倍,在种群数量上占据优势地位。同时,铁还原呼吸可以完全氧化有机物,释放更多能量,但受限于Fe³⁺投加量而有所抑制;对MPB来说,只能利用有机物中的部分化学能,但并不受电子受体的限制。因此,虽然MPB个体竞争碳源能力可能不强,但它可通过大量繁殖分裂,来弥补整体的竞争弱势。

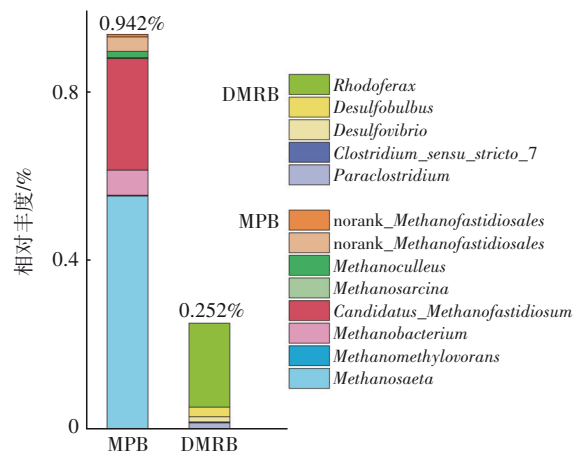


图3 微生物种群分析

Fig.3 Analysis of microbial population

研究通常认为,在自然界中分布更为广泛的地杆菌属(*Geobacter*)与希瓦氏菌属(*Shewanella*)是厌氧消化系统中DMRB菌群主要构成菌属,并针对二者开展了多项研究^[16-17]。但本实验通过高通量测序发现,DMRB主要菌群为红育菌属(*Rhodoferrax*),约占DMRB总数的79.4%,与部分研究结果相同^[18]。红育菌属可生长温度范围在0~37℃^[19],以乙酸、乳酸等有机物作为电子供体^[20]。系统中MPB主要菌群为甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*),约占MPB总数的58.92%,是专性乙酸营养型MPB^[21],广泛存在于淡水沉积物和厌氧消化反应器中^[22],是与DMRB竞争底物的主要菌属。其次为H₂依赖型甲基营养产甲烷菌(*Candidatus_Methanofastidiosum*),占MPB总数的28.2%,并不会与DMRB形成对乙酸的竞争^[23]。

2.4 莫诺方程拟合

采用莫诺方程分别对MPB与DMRB反应进行动力学拟合,结果见表3。

表3 莫诺方程拟合结果

Tab.3 Fitting results for Monod equation

组别	$\mu_{\max}/(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{VSS} \cdot \text{d}^{-1})$		$K_s/(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{VSS})$			R^2	
	MPB	DMRB	MPB-乙酸	DMRB-乙酸	DMRB-Fe ³⁺	MPB	DMRB
R1	4.65	5.55	15.97	4.01	15.33	0.999 9	0.999 9
R2	4.65	—	10.62	—	—	0.999 9	—
R3	—	5.55	—	0.78	15.33	—	0.999 9

由表3可知,在无相互竞争(R2与R3组)中,MPB对乙酸的亲和系数显著高于DMRB,约为后者的13.62倍。而当共同竞争底物(R1)时,MPB与DMRB对乙酸盐相互形成竞争抑制作用,抑制常数 $K_{\text{MPB-DMRB}}$ (MPB对DMRB的抑制)=0.007 2< $K_{\text{DMRB-MPB}}$ =0.213,显示出MPB对DMRB产生的抑制作用更强;但DMRB的亲和系数仍低于MPB,说明DMRB对乙酸的结合能力更强,更能适应低浓度的乙酸环境,从而在竞争中占据优势。因此,产CH₄反应并不会显著减慢铁还原过程,在一般厌氧消化周期中足以完成蓝铁矿形成过程。但反过来,CH₄产量与速率因此而降低,导致正常厌氧消化过程中CH₄终产量受到影响,进而影响污水处理厂能量回收效率。因此,后续研究应关注如何平衡CH₄与蓝铁矿回收之间的关系。

3 结论

在厌氧消化系统中DMRB与MPB间对乙酸存在竞争关系。尽管MPB在种群数量上较DMRB占据优势,但因DMRB对乙酸的亲和系数较低,所以,DMRB摄取乙酸能力比MPB要强很多,在底物竞争中占优势地位。因此,MPB消耗乙酸并不会影响铁还原过程与蓝铁矿的形成。可见,厌氧消化系统中有机底物多寡并非限制蓝铁矿形成的主要因素,污泥中Fe³⁺含量才是关键,增加Fe³⁺量可明显促进蓝铁矿形成。然而,DMRB因消耗VFAs,会减少CH₄产量,影响厌氧消化能源回收效率。因此,后续研究应关注蓝铁矿生成与CH₄产量之间的平衡关系。

参考文献:

- [1] THUNG M. Phosphorus: a limiting nutrient in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production in Latin America and field screening for efficiency and response [J]. Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition, 1990, 193: 501-521.
- [2] RIDDER M. Risks and Opportunities in the Global Phosphate Rock Market: Robust Strategies in Times of Uncertainty [D]. Wageningen: Wageningen University, 2012.
- [3] 郝晓地, 郭小媛, 刘杰, 等. 磷危机下的磷回收策略与立法[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(9): 1196-1200.
- HAO Xiaodi, GUO Xiaoyuan, LIU Jie, et al. Phosphorus recovery strategy and legislation under phosphorus crisis [J]. Environmental Pollution & Control, 2021, 43(9): 1196-1200 (in Chinese).
- [4] KRÜGER O, ADAM C. Recovery potential of German sewage sludge ash [J]. Waste Management, 2015, 45: 400-406.
- [5] 郝晓地, 于文波, 时琛, 等. 污泥焚烧灰分磷回收潜力分析及市场前景[J]. 中国给水排水, 2021, 37(4): 5-10.
- HAO Xiaodi, YU Wenbo, SHI Chen, et al. Potential analysis of phosphorus recovery from sludge incineration ash and its market prospect [J]. China Water & Wastewater, 2021, 37(4): 5-10 (in Chinese).
- [6] CORDELL D, STUART W. Sustainable phosphorus measures: strategies and technologies for achieving phosphorus security [J]. Agronomy, 2013, 3: 86-116.
- [7] TANSEL B, LUNN G, MONJE O. Struvite formation

- and decomposition characteristics for ammonia and phosphorus recovery: a review of magnesium-ammonia-phosphate interactions [J]. *Chemosphere*, 2018, 194 (3):504-514.
- [8] RAO S R, VARADARAJU U V. Hydrothermal synthesis of LiFePO_4 nanorods composed of nanoparticles from vivianite precursor and its electrochemical performance for lithium ion battery applications[J]. *Bulletin of Materials Science*, 2015, 38 (5):1385-1388.
- [9] O'LOUGHLIN E, BOYANOV M I, FLYNN T M, *et al.* Effects of bound phosphate on the bioreduction of lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$) and maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) and formation of secondary minerals[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(16):9157-9166.
- [10] 郝晓地, 周健, 王崇臣. 蓝铁矿形成于污泥厌氧消化系统的验证与分析[J]. *中国给水排水*, 2018, 34 (13):7-13.
- HAO Xiaodi, ZHOU Jian, WANG Chongchen. Verification and analysis of vivianite formation in sludge anaerobic digestion system [J]. *China Water & Wastewater*, 2018, 34(13):7-13(in Chinese).
- [11] UHLMANN D, RÖSKE I, HUPFER M, *et al.* A simple method to distinguish between polyphosphate and other phosphate fractions of activated sludge [J]. *Water Research*, 1990, 24(11):1355-1360.
- [12] CARLIELL-MARQUET C. The Effect of Phosphorus Enrichment on Fractionation of Metals and Phosphorus in Anaerobically Digested Sludge [D]. Loughborough: Loughborough University of Technology, 2000.
- [13] 张自杰. 排水工程[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2015.
- ZHANG Zijie. *Drainage Engineering* [M]. Beijing: China Architecture & Building Press, 2015 (in Chinese).
- [14] GOETZ P W. *Britannica* [M]. 15th ed. Chicago: Britannica Inc., 1998.
- [15] LOVLEY D, HOLMES D E, NEVIN K P. Dissimilatory $\text{Fe}(\text{III})$ and $\text{Mn}(\text{IV})$ reduction [J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2004, 49:219-286.
- [16] WEN Q, LIU B, CHEN Z. Simultaneous recovery of vivianite and produce short-chain fatty acids from waste activated sludge using potassium ferrate as pre-oxidation treatment [J]. *Environmental Research*, 2022, 208: 112661.
- [17] HAO X, TANG J, YI X, *et al.* Extracellular polymeric substance induces biogenesis of vivianite under inorganic phosphate-free conditions [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2022, 120:115-124.
- [18] WANG R, WILFERT P, DUGUULAN I, *et al.* $\text{Fe}(\text{III})$ reduction and vivianite formation in activated sludge[J]. *Separation and Purification Technology*, 2019, 220: 126-135.
- [19] LI T, ZHOU Y, JIN C, *et al.* Genomic insights into a novel species *Rhodoferrax aquaticus* sp. nov. isolated from freshwater[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70:4653-4660.
- [20] FINNERAN K T, JOHNSEN C V, LOVLEY D R. *Rhodoferrax ferrireducens* sp. nov. a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of $\text{Fe}(\text{III})$ [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2003, 53 (3):669-673.
- [21] KAMAGATA Y, KAWASAKI H, OYAZU H, *et al.* Characterization of three thermophilic strains of *Methanotheroxiphilum* ("Methanosaeta") *thermophila* sp. nov. and rejection of *Methanotheroxiphilum* ("Methanosaeta") thermoacetophila[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1992, 42(3):463-468.
- [22] JIANG C, PECES M, ANDERSEN M H, *et al.* Characterizing the growing microorganisms at species level in 46 anaerobic digesters at Danish wastewater treatment plants: a six-year survey on microbial community structure and key drivers [J]. *Water Research*, 2021, 193:116871.
- [23] NOBU M K, NARIHIRO T, KURODA K, *et al.* Chasing the elusive *Euryarchaeota* class WSA2: genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen [J]. *The ISME Journal*, 2016, 10: 2478-2487.

作者简介:郝晓地(1960-),男,山西柳林人,博士,教授,从事市政与环境工程专业教学与科研工作,主要研究方向为污水生物脱氮除磷技术、污水处理数学模拟技术、可持续环境生物技术。现为国际水协期刊《Water Research》区域主编(Editor)。

E-mail:haoxiaodi@bucea.edu.cn

收稿日期:2022-06-10

修回日期:2022-06-15

(编辑:李德强)