

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240823002

http://www.yykxjz.cn/

周瑀, 李莹, 宋协法, 孙佐梁, 董登攀, 魏元戎. S⁰/牡蛎壳比例对海水硫自养反硝化性能及微生物群落的影响. 渔业科学进展, 2025, 46(2): 162–172

ZHOU Y, LI M, SONG X F, SUN Z L, DONG D P, WEI Y R. The effect of different S⁰/oyster shell ratios on the performance of seawater sulfur autotrophic denitrification and microbial community. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(2): 162–172

S⁰/牡蛎壳比例对海水硫自养反硝化性能 及微生物群落的影响*

周 瑀 李 莹 宋协法^① 孙佐梁 董登攀 魏元戎

(中国海洋大学水产学院海洋生物水环境工程实验室 山东 青岛 266100)

摘要 本研究以人工海水循环水养殖尾水为处理对象, 比较了 3 个单质硫颗粒(S⁰)/牡蛎壳配比(5:1、3:1 和 1:1)的硫自养反硝化(SAD)装置在 5 个水力负荷[HLR, 0.19~0.95 m³/(m²·d)]下的脱氮性能。结果显示, S⁰/牡蛎壳为 5:1 和 3:1 装置的脱氮性能较优。HLR 为 0.19~0.48 m³/(m²·d) 时, 不同 HLR 下及同一 HLR 下 3 个装置间硝酸盐氮(NO₃-N)去除率无显著差异; 最高 HLR 为 0.95 m³/(m²·d)时, 3 个装置 NO₃-N 去除率均显著降低, 且 S⁰/牡蛎壳为 5:1 (61.16%±9.31%)和 3:1 (56.62%±7.23%)装置的 NO₃-N 去除率显著高于 S⁰/牡蛎壳为 1:1 (38.98%±10.19%)的装置。S⁰/牡蛎壳为 5:1 和 3:1 装置的 NO₃-N 去除负荷随 HLR 升高而升高。S⁰/牡蛎壳为 3:1 装置的平均出水亚硝酸盐氮(NO₂-N)最低, 为(0.59±0.39) mg/L。装置的出水 pH 随 S⁰/牡蛎壳的比例和 HLR 的升高而降低。SAD 装置中优势菌门为弯曲杆菌门(Campilobacterota, 6.47%~59.73%), 优势菌属为具有反硝化功能的硫单胞菌属(*Sulfurimonas*, 2.70%~49.50%)。随着 S⁰/牡蛎壳的比例下降, 装置内及装置上部牡蛎壳和 S⁰ 交接处的硫单胞菌属丰度上升。pH 与反硝化基因丰度呈正相关。该研究结果可为海水循环水养殖系统中 SAD 装置的设计与运行提供基础理论数据。

关键词 硫自养反硝化(SAD); 脱氮性能; S⁰; 牡蛎壳; 高通量测序

中图分类号 S949 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)02-0162-11

海水循环水养殖作为一种可持续发展的养殖方式, 具有节水节地、高产、环保等优势(He *et al*, 2018、2020)。循环水养殖系统(recirculating aquaculture system, RAS)水处理设备中的生物滤池可通过硝化反应, 将养殖动物代谢产生的毒性较高的总氨氮、亚硝酸盐氮(NO₂-N)转化为硝酸盐氮(NO₃-N)(He *et al*, 2021)。若通过换水控制 NO₃-N 浓度, 不仅消耗大量水资源(Diaz *et al*, 2012), 而且含有高浓度 NO₃-N 的养殖尾水排放会危害周边水域环境, 造成水体富营养化

(Martins *et al*, 2010)。我国生态环境部明确提出, 在 2023 年, 各沿海省份均需根据各自养殖情况出台相应的海水养殖尾水排放标准, 以山东省为例, 其总氮一级排放标准为 4.0 mg/L, 二级排放标准为 6.0 mg/L。尾水中高浓度 NO₃-N 成为限制尾水达标排放、制约海水循环水养殖可持续发展的主要因素之一。

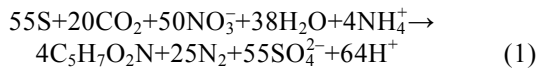
生物反硝化是去除 NO₃-N 的主要途径(Zheng *et al*, 2020)。但由于海水循环水养殖水体中 C/N 低(阮赞杰等, 2009), 需额外添加液体碳源(葡萄糖、甲醇)

* 国家重点研究发展计划(2023YFD2400404; 2023TSGC0925; QDBSH20230101007)资助。周 瑀, Email: 1578473283@qq.com

① 通信作者: 宋协法, 教授, Email: yuchuan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2024-08-23, 收修改稿日期: 2024-09-30

(Tsukuda *et al.*, 2015)、天然植物碳源(稻草、玉米秸秆)(Tan *et al.*, 2010)等有机碳源作为电子供体,驱动反硝化,这不仅会增加成本,而且碳源的添加量难以与波动的 NO₃-N 浓度相匹配,也增加了对水体二次污染的风险(Tsukuda *et al.*, 2015)。硫自养反硝化(sulfur autotrophic denitrification, SAD)是硫自养菌在厌氧或缺氧条件下,以无机碳(CO₂、HCO₃⁻)为碳源,单质硫颗粒(S⁰)等还原态硫为电子供体,将 NO₃-N 还原为 N₂,还原态硫自身被氧化为 SO₄²⁻的过程(Vo *et al.*, 2021)。S⁰是目前应用最广泛的 SAD 电子供体,但属于危险化学品,因此本研究采用复合填料进行探究(王鸿博等, 2024)。SAD 过程具有无需添加有机碳源、污泥产量低等优势(Christianson *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017)。但 SAD 反应生成 H⁺ (式 1),降低水体 pH,影响反硝化装置长期运行稳定性(Moon *et al.*, 2008)。



SAD 装置实际运行过程中,常使用 CaCO₃ (Di Capua *et al.*, 2015)、石灰石(Kilic *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2023)、牡蛎壳(Simard *et al.*, 2015)等作为填充基质调节水体 pH,维持装置脱氮效能,其中,牡蛎壳作为厨房废弃物,便宜、易得,受到了广泛关注(Liang *et al.*, 2018)。牡蛎壳中 CaCO₃ 含量约为 93%,能够较好地调节水体 pH,提供有利于微生物附着的有机基质以及含有大量营养元素促进微生物生长(Liang *et al.*, 2020)。Liang 等(2020)将硫粉和牡蛎壳粉以 3 : 1 (V/V)的比例制成均匀颗粒填充 SAD 装置处理地表水,最大的 NO₃-N 去除速率为 0.33 kg N/(m³·d),且 pH 保持在 6.8~7.2 之间。Simard 等(2015)研究表明, S⁰/牡蛎壳体积比为 3.3 : 1,进水 NO₃-N 为 25~30 mg/L,水力停留时间(hydraulic retention time, HRT)为 16~19 h 时, SAD 装置能去除海洋水族馆水体中几乎所有的 NO₃-N。He 等(2020)研究了海水进水 NO₃-N 为 60 mg/L, S⁰/牡蛎壳体积比为 1.7 : 1, HRT 分别为 24、12 和 8 h 时 SAD 装置的脱氮性能,结果表明 NO₃-N 去除速率在 84~942 g N/(m³·d)之间, pH 保持在 7.5~8.2 之间,

且随着 HRT 的降低,出水 NO₃-N 浓度呈线性增加。

不同 S⁰-牡蛎壳配比会对装置内部微环境产生影响,进而改变功能菌的丰度与分布特征。水力负荷(hydraulic loading rate, HLR)是反应装置的重要运行参数(Çakir *et al.*, 2015)。高 HLR 会提升装置的处理水量,但同时也会降低水体与基质及功能菌的接触时间,导致反硝化效率降低;低 HLR 会在一定程度上提升反硝化效率,但会减少处理水量。因此,适合的 HLR 对 SAD 装置的实际应用至关重要。目前,关于不同 S⁰/牡蛎壳填充比例下 SAD 装置对海水循环水养殖尾水在不同 HLR 下的脱氮性能、微生物群落结构的研究鲜有报道。

本研究比较了 3 个 S⁰/牡蛎壳配比的 SAD 装置在 5 个 HLR 下其处理海水循环水养殖尾水的脱氮性能及进、出水 pH 和溶解氧的变化,结合微生物群落特征及功能基因预测分析,评估不同 S⁰/牡蛎壳配比对 SAD 装置脱氮性能的影响,以为海水循环水养殖尾水 SAD 装置的设计与运行提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验装置

3 个 SAD 装置的本体采用有机玻璃圆形结构,圆柱体直径为 14 cm,高 30 cm,有效体积为 4.7 L。圆柱体下方填充 S⁰/牡蛎壳填料,上方填充火山岩(粒径 3~6 mm)至出水口, S⁰/牡蛎壳填料体积共为 4 L,将 S⁰(粒径 2~6 mm)铺设于中间,牡蛎壳(2~6 mm)均匀铺设于 S⁰ 上方及下方。装置中 S⁰/牡蛎壳体积比分别为 5 : 1 (R1)、3 : 1 (R2)和 1 : 1 (R3),对应的孔隙率分别为 36.97%、40.53%和 48.94% (Kilic *et al.*, 2014)。装置中平均水体温度为(21.71±0.76) °C,外壁包裹锡纸以排除光照影响,采取上行流运行模式,液面略高于填料,以创造缺氧环境。实验装置具体结构见图 1。

1.2 实验方法

装置采用活性污泥接种挂膜的方式启动,活性污

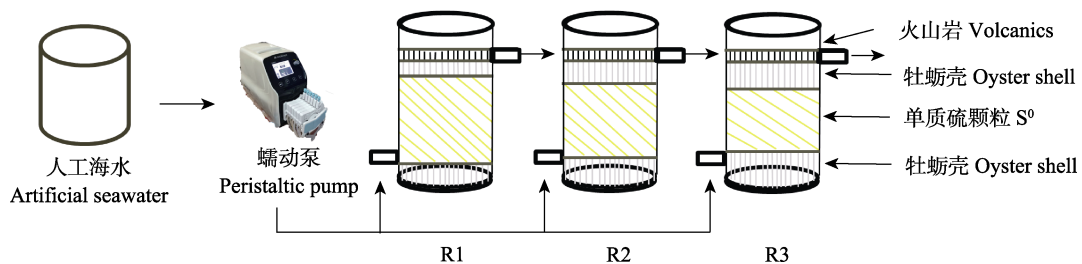


图 1 实验装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of experimental setup

泥取自山东莱州明波水产有限公司循环水养殖厂排水管。使用人工配制的海水养殖尾水开展实验,将硝酸钠(NaNO_3)溶解到过滤海水中, $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度为18 mg/L。启动阶段:通过蠕动泵将活性污泥的上清液循环泵入装置中,HRT为48 h,运行8 d进行接种。然后将人工海水泵入装置中,HRT缩短为24 h(Wang *et al.*, 2023),对菌群进行驯化培养。当出水 $\text{NO}_3\text{-N}$ 连续5 d为0 mg/L时,开展正式实验(阮赞杰等, 2009)。

正式实验周期为75 d,根据HRT分别为15、12、9、6和3 h计算HLR,不同HLR分为5个阶段:I, HLR=0.19 $\text{m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$; II, HLR=0.24 $\text{m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$; III, HLR=0.32 $\text{m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$; IV, HLR=0.48 $\text{m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$; V, HLR=0.95 $\text{m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$,每个HLR下运行15 d。每24 h测进、出水水温、pH,每个阶段测3次溶解氧(DO)。每24 h取进、出水桶水样,水样经0.45 μm 滤膜过滤后测定 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)。3个SAD装置运行稳定后,正式实验前于装置上部(牡蛎壳与 S^0 填料)交接处、中部(S^0 填料)、底部(S^0 与牡蛎壳填料)交接处取填料表面生物膜,使用0.22 μm 孔径的过滤膜过滤,取过滤膜贮存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。

1.3 分析方法

温度、pH采用YSI便携式多参数水质分析仪(Multi 3630 IDS,德国WTW公司)测定;DO采用光纤氧气测量仪(FireStingO₂,德国Pyroscience公司)测定; $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 使用Skalar连续流动分析仪(SA5000,荷兰)测定;总无机氮(TIN)为三氮之和。使用Microsoft Excel软件进行数据处理,实验所得数据以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。采用SPSS 26.0进行单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 表示差异显著。使用Qiime软件计算 α 多样性指数,使用PICRUST2功能预测分析与KEGG基因数据库预测和注释氮代谢相关酶的功能基因,使用TBtools绘制氮代谢基因热图,微生物群落结构分析在上海美吉生物医药科技有限公司云平台完成(www.majorbio.com)。

2 结果

2.1 氮变化情况

2.1.1 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除情况 3个装置进、出水 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度如图2a所示。HLR改变时,装置运行前2 d脱氮性能出现波动,因此,本研究采用每阶段运行稳定期(后13 d)数据分析装置的反硝化性能。实验期间,R1、R2和R3的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 平均去除率分别为(68.88 \pm

11.24)%、(68.61 \pm 13.07)%和(65.71 \pm 15.75)%($P>0.05$), $\text{NO}_3\text{-N}$ 平均去除负荷分别为(19.36 \pm 11.64)、(18.90 \pm 10.63)和(16.83 \pm 7.34) mg N/($\text{m}^3\cdot\text{d}$) ($P>0.05$)。

如图2b和2c所示,I~IV阶段(除第III阶段),同一HLR下不同SAD装置之间及同一装置在不同HLR下的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除率均无显著差异,R1、R2和R3的去除率分别为(72.11 \pm 12.64)%~(75.85 \pm 7.95)%、(76.00 \pm 6.91)%~(78.13 \pm 6.45)%、(70.40 \pm 7.78)%~(75.76 \pm 8.98)%。当HLR继续提升至第V阶段时,R1、R2和R3的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除率均显著降低,分别为(61.16 \pm 9.31)%、(56.62 \pm 7.23)%和(38.98 \pm 10.19)%,且R3的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除率显著低于R1和R2($P<0.05$)。如图2d和2e所示,除第III阶段外,I~IV阶段,R1、R2和R3间 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除负荷无显著差异。I~V阶段,随着HLR升高,R1和R2的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除负荷显著升高,分别达(39.10 \pm 6.18)和(36.19 \pm 4.66) mg N/($\text{m}^3\cdot\text{d}$) ($P<0.05$)。R3的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除负荷在I~IV阶段显著升高,达(24.24 \pm 1.87) mg N/($\text{m}^3\cdot\text{d}$);而第V阶段,R3的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除负荷无显著升高,维持在(24.94 \pm 6.63) mg N/($\text{m}^3\cdot\text{d}$),并且显著低于R1和R2($P<0.05$)。

2.1.2 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 产生情况 3个装置出水 $\text{NO}_2\text{-N}$ 与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度变化如图3a和3b所示。实验期间,R1、R2和R3出水平均 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度分别为(0.79 \pm 0.46)、(0.59 \pm 0.39)和(0.86 \pm 0.43) mg/L,R2出水平均 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度最低($P<0.05$);出水平均 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度分别为(0.17 \pm 0.07)、(0.18 \pm 0.07)和(0.19 \pm 0.11) mg/L,3个装置间无显著差异($P>0.05$)。

$\text{NO}_2\text{-N}$ 是SAD反应的中间产物(He *et al.*, 2020)。如图3c所示,3个装置出水 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度在第II阶段均较高,分别为(1.33 \pm 0.15)、(1.28 \pm 0.22)和(1.33 \pm 0.30) mg/L ($P>0.05$)。随着实验开展至第V阶段,R2出水 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度较低且趋于稳定,而R3在第V阶段出水 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度升高,为(0.85 \pm 0.08) mg/L ($P<0.05$)。

3个装置的出水中均有 $\text{NH}_4^+\text{-N}$,表明SAD装置中存在硝酸盐异化还原为氨(dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)的过程(Wang *et al.*, 2023)。如图3d所示,在第V阶段,即最高HLR下,3个装置的出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度均有所降低,可能是高的HLR对DNRA过程有抑制作用(Wang *et al.*, 2023)。

2.1.3 TIN去除情况 3个装置进、出水TIN浓度如图4a所示,实验期间,3个装置TIN平均去除率分别为(63.81 \pm 11.14)%、(64.49 \pm 12.47)%和(60.19 \pm 15.91)% ($P>0.05$),TIN平均去除负荷分别为(18.07 \pm 11.20)、(17.90 \pm 10.32)和(15.38 \pm 6.94) mg N/($\text{m}^3\cdot\text{d}$) ($P>0.05$)。

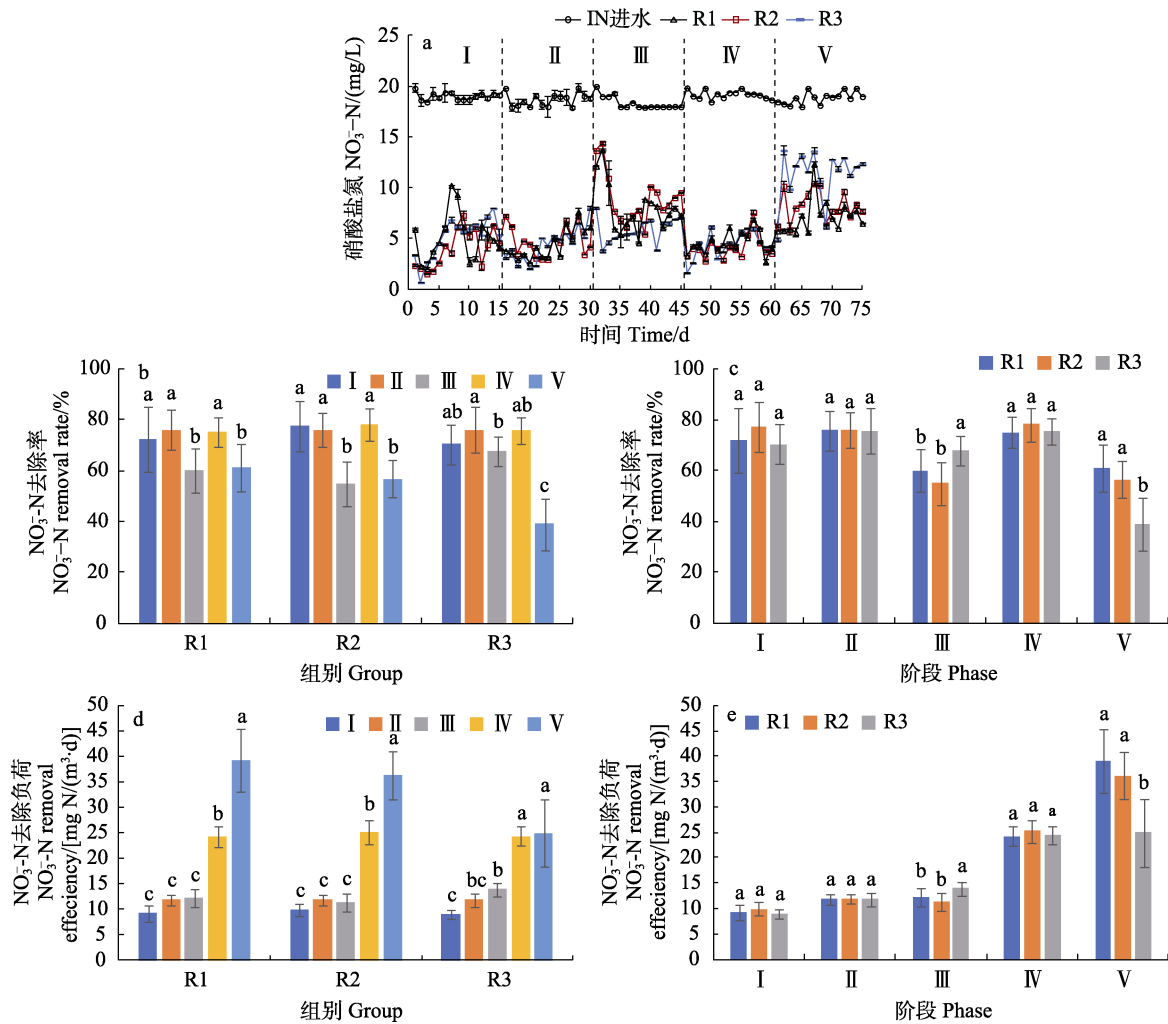


图 2 NO₃-N 去除情况
Fig.2 NO₃-N removal situation

R1、R2 和 R3 的 S⁰/牡蛎壳体积比分别为 5 : 1、3 : 1 和 1 : 1。I、II、III、IV 和 V 阶段的水力负荷(HLR)分别为 0.19、0.24、0.32、0.48 和 0.95 m³/(m²·d)。不同字母表示组间存在显著差异(P<0.05)。下同。

R1, R2 and R3: S⁰/oyster shell is 5 : 1, 3 : 1 and 1 : 1, respectively. The HLR of phase I, II, III, IV and V is 0.19, 0.24, 0.32, 0.48 and 0.95 m³/(m²·d), respectively. Different letters represent significant difference (P<0.05). The same below.

实验期间, SAD 对 TIN 和 NO₃⁻-N 的去除呈类似趋势。如图 4b 和 4c 所示, 除第 III 阶段外, I~IV 阶段, R1、R2 和 R3 间 TIN 去除率差异均不显著, 分别达(68.94±7.25)%、(74.81±6.64)%和(72.08±5.53)% (P>0.05)。当 HLR 继续提升至第 V 阶段时, R1、R2 和 R3 的 TIN 去除率均显著降低, 分别为(58.09±9.55)%、(54.09±7.28)%和(34.07±10.65)%, 且 R3 的 TIN 去除率显著低于 R1 和 R2 (P<0.05)。如图 4d 和 4e 所示, 除第 III 阶段外, I~IV 阶段, R1、R2 和 R3 间 TIN 去除负荷无显著差异。I~V 阶段, 随着 HLR 升高, R1 和 R2 的 TIN 去除负荷显著升高, 分别达(37.15±6.36)和(34.57±4.69) mg N/(m³·d) (P<0.05)。R3 的 TIN 去除负荷在 I~IV 阶段显著升高, 达(23.29±1.94) mg N/(m³·d);

而在第 V 阶段 TIN 去除负荷无显著升高, 为(21.79±6.89) mg N/(m³·d), 并且显著低于 R1 和 R2。

2.2 DO 和 pH 变化情况

装置进、出水 DO 和 pH 变化情况如表 1 所示。实验期间, 3 个装置的出水 DO 显著低于进水, 装置间的出水 DO 无显著差异。3 个装置的出水 pH 显著低于进水, R1 和 R2 的出水 pH 低于 R3 (P<0.05)。如图 5 所示, 随着 HLR 提升, 装置的出水 pH 降低。

2.3 微生物群落特征

2.3.1 α 多样性

各实验组的 α 多样性指数如表 2 所示, 不同装置及同一装置不同取样位置的细菌 α 多样性存在差异。通过 Chao 指数分析发现, 相比于上

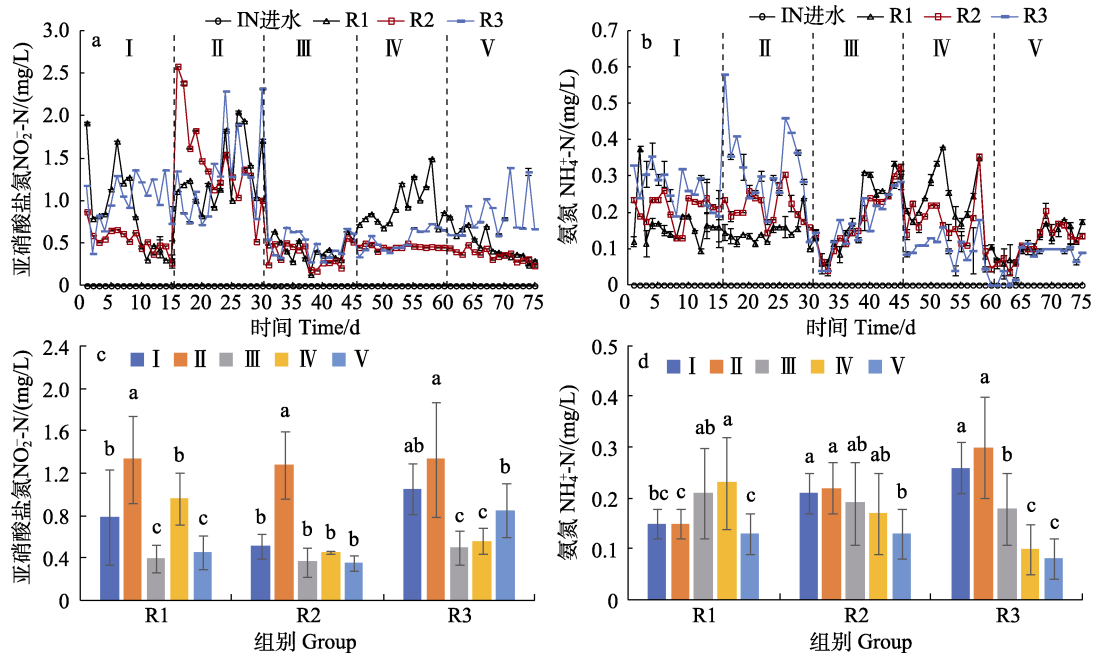


图 3 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 产生情况
Fig.3 Production of $\text{NO}_2\text{-N}$ and $\text{NH}_4^+\text{-N}$

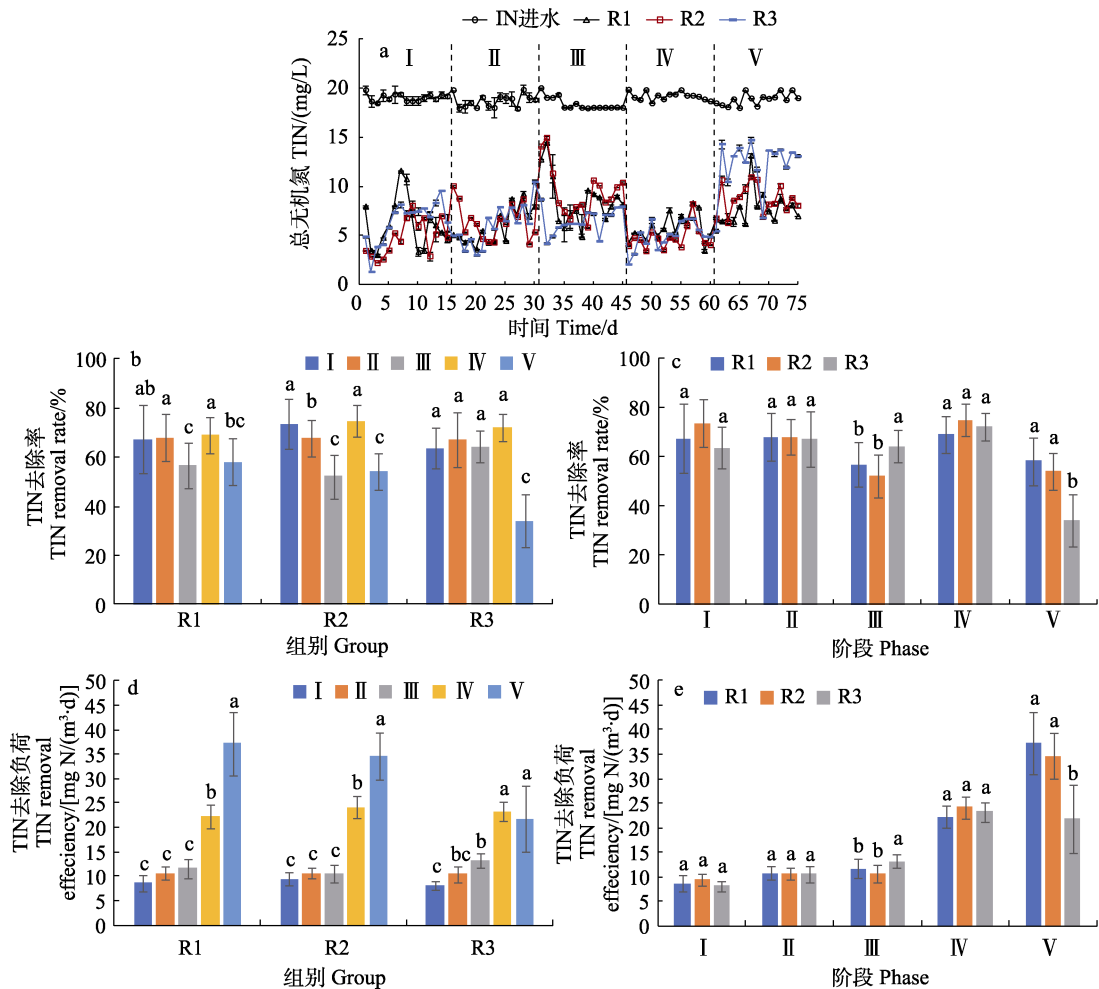


图 4 TIN 去除情况
Fig.4 TIN removal situation

表 1 各实验组进、出水 DO 和 pH 均值变化情况

Tab.1 Changes in mean values of DO and pH of inlet and outlet water in each experimental group

组别 Group	进水 Inlet	出水 Outlet		
		R1	R2	R3
DO/(mg/L)	6.51±0.37 ^a	3.39±0.60 ^b	3.31±0.50 ^b	3.68±0.54 ^b
pH	7.95±0.06 ^a	7.32±0.15 ^c	7.36±0.16 ^c	7.55±0.10 ^b

注: 同行数据上标不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$), 上标相同字母表示组间无显著差异($P>0.05$)。

Note: Peer data superscripted with different letters indicate significant differences between groups and superscripted with the same letter indicate no significant differences between groups ($P>0.05$).

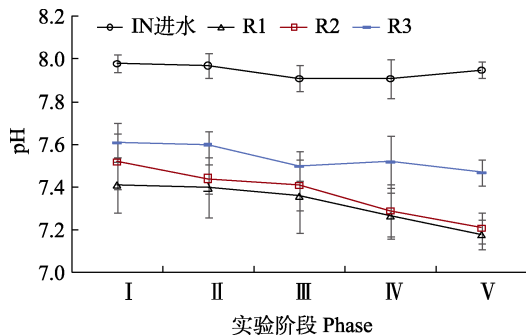


图 5 各实验组在不同 HLR 下出水 pH 变化情况
Fig.5 Change of effluent pH of each experimental group under different HLRs

表 2 各实验组 α 多样性指数Tab.2 α diversity index in each experimental group

组别 Group	OTUs	丰富度 Chao	香农指数 Shannon	覆盖率 Coverage
R1bot	1479	1646.32	4.60	0.99
R1mid	624	734.50	3.26	0.99
R1top	1354	1408.50	4.90	0.99
R2bot	1762	1841.30	5.34	0.99
R2mid	770	864.48	3.51	0.99
R2top	1094	1165.55	4.56	0.99
R3bot	1598	1679.91	4.98	0.99
R3mid	917	1037.67	3.67	0.99
R3top	884	997.19	3.86	0.99

注: top 代表装置上部(牡蛎壳与 S⁰ 填料)交接处、mid 代表装置中部(S⁰ 填料)、bot 代表装置底部(S⁰ 与牡蛎壳填料)交接处。

Note: top represents the junction of the upper part of the device (oyster shell and S⁰ filler), mid represents the middle part of the device (S⁰ filler), and bot represents the junction of the bottom of the device (S⁰ and oyster shell filler).

部基质交接处和中部, 3 个装置底部基质交接处的物种丰富度最高。通过 Shannon 指数分析发现, 3 个装置中部, 即 S⁰ 填料表面的物种多样性最低, SAD 装置上部以及底部基质交接处的物种多样性较高。

2.3.2 优势菌门、属的组成 在各实验组中主要检测到 8 个菌门, 如图 6a 所示, 分别为弯曲杆菌门

(Campilobacterota, 6.47%~59.73%)、变形菌门(Proteobacteria, 16.46%~53.93%)、髌骨细菌门(Patescibacteria, 5.76%~28.75%)、拟杆菌门(Bacteroidota, 3.04%~17.35%)、脱硫杆菌门(Desulfobacterota, 1.71%~8.69%)、厚壁菌门(Firmicutes, 0.34%~4.05%)、绿弯菌门(Chloroflexi, 0.41%~2.97%)和浮霉菌门(Planctomycetota, 0.08%~2.07%)。SAD 装置中弯曲杆菌门丰度最高。大多数弯曲杆菌参与反硝化过程(Jin *et al*, 2023)。R1、R2 和 R3 中部弯曲杆菌门丰度最高, 分别为 54.03%、59.73%和 51.12%。变形菌门和拟杆菌门丰度分别位于第 2 和第 4。这 2 个菌门中包含许多反硝化菌, 且在水产养殖系统菌群中占据主导地位(Chen *et al*, 2023; Zhang *et al*, 2022)。脱硫杆菌门在 SAD 过程中具有重要作用(Wei *et al*, 2023; Liu *et al*, 2023)。R1、R2 和 R3 中平均丰度分别为 5.06%、5.53%和 6.13%。厚壁菌门在 SAD 装置处理水体过程中占据重要地位(Zhou *et al*, 2023)。R1、R2 和 R3 中平均丰度分别为 1.92%、1.33%和 0.54%。

如图 6b 所示, 在属水平上使用主成分(PCA)分析比较各反应装置中细菌群落的差异, 2 个主坐标贡献率分别为 27.29% (PC1)和 18.44% (PC2), 3 个实验组间菌群差异不显著($P=0.728$)。同一装置中不同位置的菌属存在较大差异; 3 个装置中部, 即 S⁰ 填料上的菌属差异较小。

为了进一步揭示装置中的功能细菌, 本研究分析了属水平上的细菌群落组成。如图 6c 所示, 丰度排名前 10 的菌属为硫单胞菌属(*Sulfurimonas*, 2.70%~49.50%)、 α 变形菌(*Alphaproteobacteria*, 2.01%~10.52%)、硫卵菌属(*Sulfurovum*, 1.58%~12.81%)、聚集杆菌属(*Sedimenticola*, 1.79%~10.55%)、脱硫藻属(*Desulfocapsa*, 1.04%~6.81%)、白杆菌属(*Albirhodobacter*, 0.24%~5.54%)等。硫单胞菌属属于弯曲杆菌门, 参与硫自养反硝化反应, 其高丰度可以作为 SAD 装置菌群挂膜成熟的指标(Wang *et al*, 2023)。R1、R2 和 R3 中部的硫单胞菌属丰度最高, 分别为 42.30%、49.50%和 46.61%。硫卵菌属是以 S⁰ 等还原态硫为电子供体

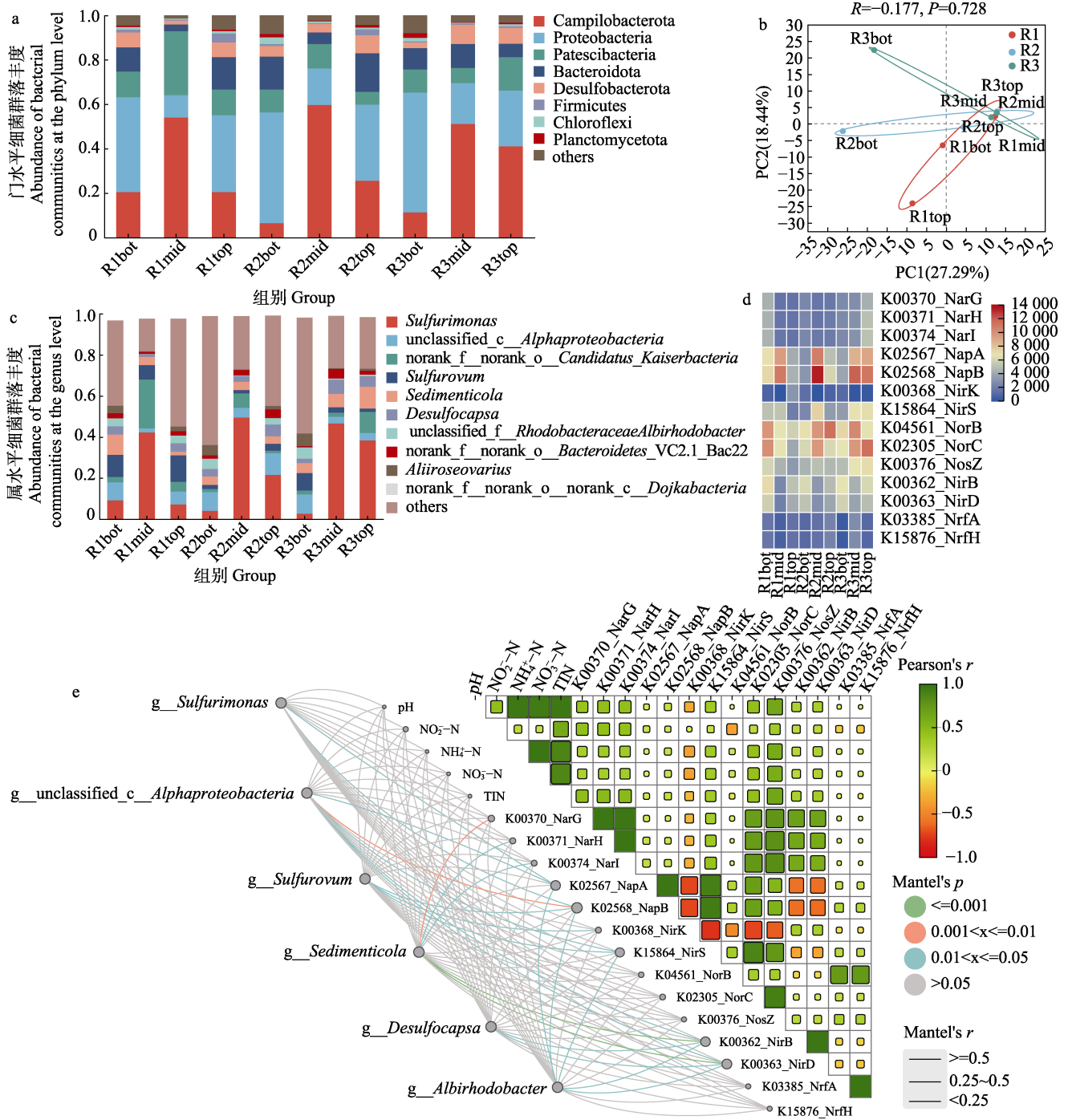


图 6 门水平细菌群落结构(a)、主成分分析(PCA)(b)、属水平细菌群落结构(c)、功能基因热图(d)、Mantel 检验(e)和 Pearson 相关性分析

Fig.6 Phylum level bacterial community structure (a), Principal Component Analysis (PCA) at the genus level (b), Genus level bacterial community structure (c), Functional gene heatmap (d), Mantel test and Pearson correlation analysis (e)

的 ε 变形杆菌(Kilic *et al*, 2014)。聚集杆菌属具有氧化 S⁰ 等还原态硫的化学自养能力(Slobodkina *et al*, 2023)。脱硫藻属与无机硫化物的歧化有关, 可以通过 S⁰ 进行富集(Song *et al*, 2020)。白杆菌属属于红杆菌科(Rubroacteraceae), 是需氧或兼性厌氧的化学自养菌(Foesel *et al*, 2011)。

2.3.3 功能基因预测及分析 根据基因丰度绘制热图, 如图 6d 所示, 在 3 个装置中发现了 2 种潜在的氮代谢途径, 其功能基因的相对丰度从高到低依次为: 将 NO₃⁻-N 还原为 N₂ 的 SAD 过程(包括将 NO₃⁻-N 还原为 NO₂⁻-N, NO₂⁻-N 还原为 NO, NO 还原为 N₂O, N₂O 还原为 N₂ 的过程), 包括 narGHI、napAB、nirKS、

norBC 和 *nosZ* 功能基因; 将 NO_3^- -N 还原为 NH_4^+ -N 的 DNRA 过程, 包括 *nirBD*、*nrfAH* 功能基因。

如图 6e 所示, 对属水平菌群、环境因子和氮代谢功能基因之间进行相关性分析, 通过 Mantel 检验表示其相关性, 线条宽度对应 Mantel's r 统计量; 颜色梯度表示其 Spearman 相关系数。硫单胞菌、 α 变形菌、硫卵菌、白杆菌与 *napAB* 基因存在相关性 ($P < 0.05$); 聚集杆菌与 *narGHI* 基因存在相关性 ($P < 0.05$)。硫卵菌与 *nirKS* 基因有相关性 ($P < 0.05$); α 变形菌、白杆菌与 *nirS* 基因存在相关性 ($P < 0.05$) (Xing *et al.*, 2022)。 α 变形菌、聚集杆菌、脱硫藻、白杆菌与 *nirBD* 基因存在相关性 ($P < 0.05$)。属水平菌群丰度与环境因子无显著相关性 ($P > 0.05$)。pH 与装置出水 NO_3^- -N、TIN 和 NH_4^+ -N 浓度呈正相关, 可归因为 R3 出水的 pH 最高, 但 R3 的脱氮性能最差, 出水 NH_4^+ -N 最高。pH 与 *narGHI*、*nirS*、*norC*、*nosZ* 和 *nirBD* 基因丰度呈正相关, 与 *nirK* 基因丰度呈负相关。

3 讨论

3.1 硫自养反硝化性能

第 III 阶段, 3 个装置的 NO_3^- -N 去除率均显著降低 ($P < 0.05$), 主要是由于该阶段开始时出水 NO_3^- -N 浓度波动较大导致, 考虑其对本研究比较不同 S^0 /牡蛎壳配比装置性能并无影响, 具体原因将在后续研究中深入探讨。

S^0 /牡蛎壳为 5 : 1 和 3 : 1 装置的脱氮性能优于 S^0 /牡蛎壳=1 : 1。3 个装置出水 NO_2^- -N 浓度在第 II 阶段均较高, 可能是前期装置脱氮性能不稳定, NO_2^- -N 还原为 N_2 的速率低于 NO_3^- -N 还原为 NO_2^- -N 的速率, 造成 NO_2^- -N 累积 (史航等, 2022)。本研究在 HLR 为 $0.19 \sim 0.48 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 时, 不同 S^0 /牡蛎壳配比的装置间 NO_3^- -N 与 TIN 的去除率和去除负荷无显著差异, 可能是电子供体 S^0 过量的原因, 水体 pH 均在 SAD 合适的范围内, 即进水 NO_3^- -N 负荷为 $(12.83 \pm 0.25) \sim (32.36 \pm 0.70) \text{ mg N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 时, 装置中 S^0 /牡蛎壳配比在 5 : 1、3 : 1 和 1 : 1 之间变化不会影响脱氮性能。Sahinkaya 等 (2014) 研究表明, 厌氧条件下进水 NO_3^- -N 负荷低于 $0.24 \text{ g N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 不同 S^0 /石灰石配比的 SAD 装置反硝化性能无明显差异; 类似的, Kilic 等 (2014) 研究表明, 进水 NO_3^- -N 负荷低于 $0.4 \text{ g N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 装置中 S^0 /石灰石配比在 1 : 1、2 : 1 和 3 : 1 间变化不影响其反硝化性能。不同 S^0 /牡蛎壳配比的 SAD 装置脱氮时具有相似的现象。当 HLR 提升至 $0.95 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 时, 随进水 NO_3^- -N 负荷继续升高, 3 个 SAD 装置的

NO_3^- -N 去除负荷升高, 但平均 NO_3^- -N 去除率显著下降, 可能是过高的 HLR 导致水体与基质接触时间过短, 导致反应时间不足 (Liang *et al.*, 2020)。 S^0 /牡蛎壳=1 : 1 装置的 S^0 的体积比最小, 考虑到 S^0 的有限溶解速率, 该装置的脱氮性能在 HLR 持续升高时最先受到影响, 反硝化无法反应完全, 可能导致了装置出水 NO_2^- -N 浓度最高, 从而导致其平均 NO_3^- -N 去除率和去除负荷显著下降。因此, S^0 /牡蛎壳为 5 : 1 和 3 : 1 装置的反硝化性能优于 S^0 /牡蛎壳=1 : 1。Kilic 等 (2014) 研究同样发现, 在低 HRT 或高 NO_3^- -N 负荷下, S^0 /石灰石为 3 : 1 装置的反硝化性能优于 S^0 /石灰石=1 : 1 和 2 : 1 的装置。因此, SAD 装置用于海水养殖尾水处理时应优先考虑增大装置中 S^0 的体积比, 以满足高 HLR 下运行高脱氮性能的需求 (Liang *et al.*, 2022)。

3.2 DO 和 pH 的影响

本研究中装置出水 DO 低于进水, 可能是装置中的菌对 O_2 的消耗 (He *et al.*, 2018); 但出水 DO 浓度无显著差异且均大于 3 mg/L 。Wang 等 (2023) 研究建议将 SAD 装置中的 DO 保持在 2.0 mg/L 以下。Zhang 等 (2022) 研究表明, 进水中 DO 的存在会影响 SAD 装置的反硝化性能, 抑制 NO_2^- -N 还原酶的活性。本研究的进、出水溶氧过高, 这解释了 SAD 装置脱氮性能低于类似研究的原因。后续可通过控制海水循环水养殖尾水中的 DO, 探究不同 S^0 /牡蛎壳配比的 SAD 装置最佳的反硝化性能。

SAD 过程产酸, 随着进水 NO_3^- -N 负荷增加, 装置出水 pH 下降, 但本研究中水体 pH 均在硫自养菌适宜的范围内。随 S^0 /牡蛎壳比例升高, 装置出水 pH 降低, 表明牡蛎壳能够调节水体 pH (Zheng *et al.*, 2020)。随着 HLR 升高, 装置出水 pH 均降低, 因为随着平均 NO_3^- -N 去除负荷提升, SAD 反应产生了更多的酸, 但牡蛎壳溶解的速率并未发生改变 (Sahinkaya *et al.*, 2014)。因此, 在高 HLR 运行条件下, 可增大牡蛎壳的体积比以满足 pH 稳定的需求。

3.3 微生物群落特征

α 多样性结果与前人研究一致。基质的交接处更有利于多种菌的生长。Wang 等 (2019) 研究表明, SAD 装置底部交接处微生物数量最多。Tong 等 (2017) 研究表明, 相比于 S^0 , 牡蛎壳上的物种多样性较高。单一富足 S^0 的底物条件更利于硫自养菌占据主导 (Christianson *et al.*, 2015)。 S^0 和牡蛎壳的不同配比对装置中部 S^0 上的菌群结构影响不大 (Kilic *et al.*, 2014), 可能会影响菌群的丰度。SAD 装置中主要功能菌为硫自

养菌,其具有完整的反硝化功能基因。硫单胞菌属在 SAD 装置中属水平上的平均丰度最高。随 S^0 /牡蛎壳比例下降,装置内以及装置上部交接处的硫单胞菌属丰度上升,可能是随 S^0 体积的减少,装置的反硝化效率降低,当进水自下而上流到装置上部交接处时,水体中 NO_3^- -N 浓度变高,硫单胞菌属丰度因底物浓度升高而随之上升。Wang 等(2019)研究表明,硫单胞菌属丰度与较高浓度的 NO_3^- -N 正相关。R2 中的变形菌门和 α 变形菌平均丰度最高,装置中部弯曲杆菌门和硫单胞菌属丰度最高,可能是导致实验第 I 阶段 R2 的 NO_3^- -N 和 TIN 去除率较高的原因。Wang 等(2019)研究表明,装置中硫自养菌越多,反硝化速率越快。

Mantel 检验表明,硫单胞菌属与 *napAB* 基因显著相关,可能是硫单胞菌属只参与了 SAD 中的 NO_3^- -N 还原为 NO_2^- -N 这一步反应(Huang *et al.*, 2021)。R3 中 *napAB* 基因丰度最高与 R3 中的硫单胞菌属丰度最高相一致。脱硫藻属只与 *nirBD* 基因存在相关性,可能只参与了 DNRA 反应,因此,随着 S^0 /牡蛎壳的比例下降,装置中脱硫藻属的平均丰度升高与装置出水 NH_4^+ -N 逐渐上升的趋势相一致。随 S^0 /牡蛎壳的比例下降,装置中 *nirS* 基因丰度上升,*nirK* 基因丰度下降。Xing 等(2022)研究表明,*nirS* 和 *nirK* 这 2 个基因对环境因子会表现出不同的生态响应,且 *nirS* 基因对脱氮性能的贡献更大。因此,除了 *nirK* 基因,本研究中 pH 与所有反硝化基因丰度呈正相关,表明装置出水 pH 越高,越有利于反硝化反应的进行。杨文焕等(2023)研究也表明,pH 是影响氮代谢路径基因丰度的主要影响因子,pH 值与反硝化基因和绝大多数 DNRA 基因呈显著正相关。

4 结论

HLR 为 $0.95\text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$ 时, S^0 /牡蛎壳为 5 : 1 和 3 : 1 装置的 NO_3^- -N 去除性能显著优于 S^0 /牡蛎壳=1 : 1 的装置。装置的出水 pH 随 S^0 /牡蛎壳比例和 HLR 的升高而降低。SAD 装置中优势菌门为弯曲杆菌门(6.47%~ 59.73%),优势菌属为硫单胞菌属(2.70%~49.50%)。随着 S^0 /牡蛎壳的比例下降,装置内及装置上部牡蛎壳和 S^0 交接处硫单胞菌属丰度上升。pH 与反硝化基因丰度呈正相关。

参 考 文 献

ÇAKIR R, GIDIRISLIOGLU A, ÇEBİ U. A study on the effects of different hydraulic loading rates (HLR) on pollutant removal efficiency of subsurface horizontal-flow constructed wetlands used for treatment of domestic wastewaters.

- Journal of Environmental Management, 2015, 164: 121–128
- CHEN S J, SUN X Q, TIAN X L, *et al.* Influence of ammonia nitrogen management strategies on microbial communities in biofloc-based aquaculture systems. *Science of the Total Environment*, 2023, 903: 166159
- CHRISTIANSON L, LEPINE C, TSUKUDA S, *et al.* Nitrate removal effectiveness of fluidized sulfur-based autotrophic denitrification biofilters for recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 2015, 68: 10–18
- DI CAPUA F, PAPIRIO S, LENS P N L, *et al.* Chemolithotrophic denitrification in biofilm reactors. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 280: 643–657
- DIAZ V, IBANEZ R, GOMEZ P, *et al.* Kinetics of nitrogen compounds in a commercial marine recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering*, 2012, 50: 20–27
- FOESEL B U, DRAKE H L, SCHRAMM A. *Defluviimonas denitrificans* gen. nov., sp nov., and *Pararhodobacter aggregans* gen. nov., sp nov., non-phototrophic *Rhodobacteraceae* from the biofilter of a marine aquaculture. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34: 498–502
- HE Q C, CHENG Z, ZHANG D Q, *et al.* A sulfur-based cyclic denitrification filter for marine recirculating aquaculture systems. *Bioresource Technology*, 2020, 310: 123465
- HE Q C, DASI E A, CHENG Z, *et al.* Wood and sulfur-based cyclic denitrification filters for treatment of saline wastewaters. *Bioresource Technology*, 2021, 328: 124848
- HE Q C, ZHANG D Q, MAIN K, *et al.* Biological denitrification in marine aquaculture systems: A multiple electron donor microcosm study. *Bioresource Technology*, 2018, 263: 340–349
- HUANG S, YU D S, CHEN G H, *et al.* Realization of nitrite accumulation in a sulfide-driven autotrophic denitrification process: Simultaneous nitrate and sulfur removal. *Chemosphere*, 2021, 278: 130413
- JIN C H, TANG Q, GAO Y B, *et al.* Nitrogen removal from low-C/N-ratio wastewater using a three-dimensional bioelectrical reactor. *Journal of Water Process Engineering*, 2023, 53: 103835
- KILIC A, SAHINKAYA E, CINAR O. Kinetics of autotrophic denitrification process and the impact of sulphur/limestone ratio on the process performance. *Environmental Technology*, 2014, 35: 2796–2804
- LIANG B R, CHANG M D, ZHANG K, *et al.* Investigation of different solid carbonate additives in elemental-sulfur-based autotrophic denitrification process coupled with anammox process. *Environmental Technology & Innovation*, 2020, 20: 101149
- LIANG B R, KANG F, WANG Y, *et al.* Denitrification performance of sulfur-based autotrophic denitrification and biomass-sulfur-based mixotrophic denitrification in solid-phase denitrifying reactors using novel composite filters. *Science of the Total Environment*, 2022, 823: 153826
- LIANG J, CHEN N, TONG S, *et al.* Sulfur autotrophic denitrification (SAD) driven by homogeneous composite particles containing $CaCO_3$ -type kitchen waste for groundwater

- remediation. *Chemosphere*, 2018, 212: 954–963
- LIU F F, ZHANG Y X, LU T. Performance and mechanism of constructed wetland-microbial fuel cell systems in treating mariculture wastewater contaminated with antibiotics. *Process Safety and Environmental Protection*, 2023, 169: 293–303
- MARTINS C I M, EDING E H, VERDEGEM M C J, *et al.* New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, 2010, 43: 83–93
- MOON H S, SHIN D Y, NAM K, *et al.* A long-term performance test on an autotrophic denitrification column for application as a permeable reactive barrier. *Chemosphere*, 2008, 73: 723–728
- RUAN Y J, TAN H X, LUO G Z, *et al.* Nitrate removal and kinetic model of saline water by sulfur-based autotrophic denitrification. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2009, 25(2): 167–172 [阮赞杰, 谭洪新, 罗国芝, 等. 硫自养反硝化对含盐水体脱氮及其动力学模型. *农业工程学报*, 2009, 25(2): 167–172]
- SAHINKAYA E, KILIC A, DUYGULU B. Pilot and full scale applications of sulfur-based autotrophic denitrification process for nitrate removal from activated sludge process effluent. *Water Research*, 2014, 60: 210–217
- SHI H, LONG T Y, LIU C, *et al.* Deep nitrogen removal from urban wastewater by ceramsite-sulfur mixed biological fillers based on heterotrophy-sulfur autotrophic denitrification coupling technology. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2022, 16(4): 1363–1372 [史航, 隆添翼, 柳聪, 等. 基于异养-硫自养反硝化耦合技术的陶粒-硫磺混合生物填料对城市污水处理厂尾水的深度脱氮. *环境工程学报*, 2022, 16(4): 1363–1372]
- SIMARD M C, MASSON S, MERCIER G, *et al.* Autotrophic denitrification using elemental sulfur to remove nitrate from saline aquarium waters. *Journal of Environmental Engineering*, 2015, 141(12): 1–10
- SLOBODKINA G, MERKEL A, RATNIKOVA N, *et al.* *Sedimenticola hydrogenitrophicus* sp. nov. a chemolithoautotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano, and proposal of *Sedimenticolaceae* fam. nov. in the order *Chromatiales*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2023, 46(5): 126451
- SONG Y Y, LI H B, HAN Y, *et al.* Landfill leachate as an additional substance in the Johannesburg-Sulfur autotrophic denitrification system in the treatment of municipal wastewater with low strength and low COD/TN ratio. *Bioresource Technology*, 2020, 295: 122287
- TAN H, LAI C, LUO G, *et al.* Using biodegradable polymers as carbon source for nitrate removal in marine re-circulated aquaculture systems. *Marine Sciences*, 2010, 34: 22–27
- TONG S, RODRIGUEZ-GONZALEZ L C, FENG C P, *et al.* Comparison of particulate pyrite autotrophic denitrification (PPAD) and sulfur oxidizing denitrification (SOD) for treatment of nitrified wastewater. *Water Science and Technology*, 2017, 75: 239–246
- TSUKUDA S, CHRISTIANSON L, KOLB A, *et al.* Heterotrophic denitrification of aquaculture effluent using fluidized sand biofilters. *Aquacultural Engineering*, 2015, 64: 49–59
- VO T K Q, KANG S, AN S A, *et al.* Exploring critical factors influencing on autotrophic denitrification by elemental sulfur-based carriers in upflow packed-bed bioreactors. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 40: 101866
- WANG H B, ZHENG X Y, WANG W, *et al.* Study on the denitrification performance of the secondary sink water of the urban sewage treatment plant based on the sulfur autotrophic denitrification filler. *Technology of Water Treatment*, 2024, 50(9): 91–97 [王鸿博, 郑晓英, 王慰, 等. 基于硫自养反硝化填料对城市污水厂二沉水的脱氮性能研究. *水处理技术*, 2024, 50(9): 91–97]
- WANG L, LIU J, LI Y, *et al.* Elemental sulfur-driven autotrophic denitrification process for effective removal of nitrate in mariculture wastewater: Performance, kinetics and microbial community. *Chemosphere*, 2023, 337: 139354
- WANG W, WEI D Y, LI F C, *et al.* Sulfur-siderite autotrophic denitrification system for simultaneous nitrate and phosphate removal: From feasibility to pilot experiments. *Water Research*, 2019, 160: 52–59
- WEI Z P, XU Y F, SHI Y Y, *et al.* The response mechanism of microorganisms to the organic carbon-driven formation of black and odorous water. *Environmental Research*, 2023, 231(3): 116255
- XING S Y, WEN C Z, YUAN L B, *et al.* Diversity and community composition of nirS-type denitrifying bacteria and ammonia-oxidizing archaea in biofilm samples attached to bio-substrate and abio-substrates in integrated ecological floating bed systems. *Ecological Engineering*, 2022, 180: 106641
- YANG W H, ZHEN Y, YAO Z, *et al.* Characterization for nitrogen metabolism of sediments in highland saline lake. *China Environmental Science*, 2023, 43(3): 1328–1339 [杨文焕, 甄玉, 姚植, 等. 高原盐化湖泊沉积物氮代谢特征解析. *中国环境科学*, 2023, 43(3): 1328–1339]
- 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. *Environmental Research*, 2022, 210: 113009
- ZHENG S, LIU H, PENG J, *et al.* Biological nitrogen removal performance of heterotrophic-autotrophic coupling deep denitrification system. *Research of Environmental Sciences*, 2020, 33: 385–391
- ZHOU L J, LAI Y Z, SHAO Z Y, *et al.* Keystone bacteria in a thiosulfate-driven autotrophic denitrification microbial community. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 470: 144321
- ZHOU W L, LI Y, LIU X, *et al.* Comparison of microbial communities in different sulfur-based autotrophic denitrification reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101: 447–453

The Effect of Different S⁰/Oyster Shell Ratios on the Performance of Seawater Sulfur Autotrophic Denitrification and Microbial Community

ZHOU Yu, LI Meng, SONG Xiefa^①, SUN Zuoliang, DONG Dengpan, WEI Yuanrong

(Ocean University of China, Hydro-Environmental Engineering Laboratory, Qingdao 266100, China)

Abstract Seawater recirculating aquaculture is a sustainable aquaculture method that provides benefits such as the conservation of water and land resources, high productivity, and environmental protection. The high NO₃⁻-N concentration in wastewater is a primary factor limiting wastewater discharge to meet compliance standards and restricting the sustainable development of seawater recirculation aquaculture. Biological denitrification is the primary method for removing NO₃⁻-N in the water. Sulfur autotrophic denitrification (SAD) does not require an external organic carbon source and produces low sludge production, making it suitable for treating seawater recirculating aquaculture water with lower C/N ratios. However, SAD generates H⁺, which reduces the pH of water, thus affecting the stability of the denitrification device in long-term operation. In the actual operation of the SAD device, oyster shells are frequently used as a filler substrate to regulate the pH of water and ensure the effectiveness of the device in denitrification. Oyster shells, as kitchen waste, are cheap and easy to obtain and have received widespread attention. Studies on the denitrification performance and microbial community structure of the SAD device for marine recirculating aquaculture wastewater with varying hydraulic loading rates (HLRs) and S⁰/Oyster shell filling ratios are limited. In this study, we compared the denitrification performance of SAD devices with three S⁰/Oyster shell ratios (5:1, 3:1, and 1:1) under five HLRs [0.19, 0.24, 0.32, 0.48, and 0.95 m³/(m²·d)] and the changes in influent and effluent pH and DO in the treatment of seawater recirculating aquaculture wastewater, using artificial seawater recirculating aquaculture wastewater as the treatment target. The effects of different S⁰/Oyster shell ratios on the nitrogen removal performance of the SAD device were evaluated in combination with microbial community characterization and functional gene prediction analysis. When the HLR was 0.19~0.48 m³/(m²·d), no significant difference was observed in the NO₃⁻-N removal rates among the four HLRs and three devices, which were (72.11±12.64)%~(75.85±7.95)%, (76.00±6.91)%~(78.13±6.45)%, (70.40±7.78)%~(75.76±8.98)%, respectively. At the highest HLR [0.95 m³/(m²·d)], the NO₃⁻-N removal efficiency of the three devices significantly decreased, and the NO₃⁻-N removal efficiency of the S⁰/Oyster shell=5:1 (61.16%±9.31%) and 3:1 (56.62%±7.23%) devices was significantly higher than that of the S⁰/Oyster shell=1:1 (38.98%±10.19%). For the S⁰/Oyster shell=3:1, the average concentration of effluent NO₂⁻-N of the device was the lowest at (0.59±0.39) mg/L. No significant difference was observed in the average concentration of effluent NH₄⁺-N among the three devices, ranging from (0.17±0.07) to (0.19±0.11) mg/L. The denitrification performance of S⁰/Oyster shell=5:1 and 3:1 devices was better. The effluent pH of the device decreased with increased S⁰/Oyster shell ratio and HLR. The dominant bacterial phyla in the SAD device were Campilobacterota (6.47%~59.73%) and Proteobacteria (16.46%~53.93%), and the dominant bacterial genus was *Sulfurimonas* (2.70%~49.50%). As the ratio of S⁰/Oyster shells decreased, the abundance of *Sulfurimonas* increased within the device and at the intersection of oyster shells and S⁰ in the upper part of the device. pH was positively correlated with denitrification gene abundance. This study provides basic theoretical data for the design and operation of SAD devices in seawater RAS.

Key words Sulfur autotrophic denitrification (SAD); Denitrification performance; S⁰; Oyster shell; High throughput sequencing

① Corresponding author: SONG Xiefa, Email: yuchuan@ouc.edu.cn