

DOI:10.13205/j.hjgc.202603006

田天,崔金乐.不同亚铁盐富集下铁自养反硝化菌群的差异化微生物组装与结构特征[J].环境工程,2026,44(3):73-83.

TIAN T, CUI J L. Distinct microbial assembly and structures of iron-dependent autotrophic denitrifying communities enriched by different ferrous salts[J]. Environmental Engineering, 2026, 44(3): 73-83.

不同亚铁盐富集下铁自养反硝化菌群的差异化 微生物组装与结构特征

田 天* 崔金乐

(大连理工大学 环境学院, 辽宁 大连 116024)

摘 要:铁自养反硝化(iron-dependent autotrophic denitrification, IDAD)是一种在低碳氮比废水处理中具有潜力的生物脱氮技术。目前,不同研究所报道的IDAD菌群在群落结构上存在显著差异,其原因尚不明确。基于亚铁盐中阴离子类型可能是导致菌群结构差异的关键因素的假设,分别以 FeCl_2 和 FeSO_4 为电子供体,在相同接种污泥条件下富集获得2种IDAD菌群(R1和R2),系统比较了其在长期运行过程中的脱氮性能、胞外聚合物组成、铁氧化产物性质、微生物群落结构及功能基因分布特征。结果表明,R1具有更高的反硝化效率和 Fe(II) 氧化活性,其菌群中*Gallionella*等关键铁氧化菌属的相对丰度显著高于R2,且菌群多样性更高。宏基因组分析进一步揭示,R1中与铁氧化和反硝化相关的功能基因丰度更高,而R2中则富集了更多与硫酸盐代谢和复杂有机物降解相关的菌属。此外,不同菌群的胞外聚合物(EPS)组分和铁矿物表面特性也存在明显差异。研究结果证实了亚铁盐类型对IDAD菌群结构组装与代谢功能具有显著调控作用,为优化其在实际废水处理中的应用提供了理论依据。

关键词:铁自养反硝化;低碳氮比废水;亚铁盐;群落结构;宏基因组

Distinct microbial assembly and structures of iron-dependent autotrophic denitrifying communities enriched by different ferrous salts

TIAN Tian*, CUI Jinle

(School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Iron-dependent autotrophic denitrification (IDAD) is a promising biological technology for nitrogen removal from wastewater with a low C/N ratio. While significant differences in community structure among IDAD consortia from different studies have been reported, the underlying reasons remain unclear. Hypothesizing that the anion type of ferrous salts could be a key contributing factor, this study enriched two IDAD consortia (R1 and R2) using FeCl_2 and FeSO_4 as respective electron donors under identical inoculum sludge conditions. Their nitrogen removal performance, extracellular polymeric substance (EPS) composition, iron oxidation product properties, microbial community structure, and functional gene distribution characteristics during long-term operation were systematically compared. The results showed that R1 exhibited higher denitrification efficiency and Fe(II) oxidation activity. Key iron-oxidizing bacterial genera such as *Gallionella* showed a significantly higher relative abundance in R1 than in R2, and R1 also maintained higher community diversity. Metagenomic analysis further revealed a higher abundance of functional genes related to iron oxidation and denitrification in R1. In contrast, R2 was enriched with more genera associated with sulfate metabolism and complex organic matter degradation.

收稿日期:2025-11-28; 修改日期:2025-12-16; 接收日期:2025-12-30

基金项目:国家自然科学基金项目“铁自养反硝化菌群进行铁氮氧化作用的机制及应用研究”(52270026)

*第一作者、通信作者:田天(1988—),男,副教授,主要研究方向为废水生物脱氮与污染物资源化的基础研究。skyetian@dlut.edu.cn

Distinct differences were also observed in EPS composition and iron mineral surface properties between the two consortia. This study confirms that the type of ferrous salt significantly regulates the structural assembly and metabolic functions of IDAD consortia, providing a theoretical basis for optimizing their application in practical wastewater treatment.

Keywords: iron-dependent autotrophic denitrification; low C/N ratio wastewater; ferrous salts; community structure; metagenomics

0 引言

水体氮素污染是制约我国经济发展、影响百姓福祉的重要问题之一。《2024 中国生态环境状况公报》指出,总氮依然是我国部分江河、湖泊(水库),尤其是重要渔业水域水质的主要超标因子;无机氮是全国近岸海域水质的主要超标因子之一。基于硝化/反硝化的生物脱氮技术是当下废水处理中氮素污染防治的最主要手段^[1]。该技术包括好氧自养硝化和缺氧异养反硝化过程:处理 1 kg 氨氮需要消耗 4.57 kg O₂ 和 4.77 kg COD,整体能耗较高。尤其是国家实施“控源减排”有效控制了废水有机污染后,水中碳氮比大幅降低,进一步提升了反硝化阶段外源有机物(如乙酸钠、甲醇等)的消耗^[2]。以无机电子供体驱动的自养反硝化作为一种替代技术,在降低有机质消耗和剩余污泥产量方面表现出一定优势^[3]。

铁自养反硝化(iron-dependent autotrophic denitrification, IDAD),是指微生物利用 Fe(II)(或 Fe⁰)作为电子供体,还原 NO₃⁻/NO₂⁻的代谢作用^[3-4],于 1996 年被首次发现于淡水沉积物中^[5]。代表性的 IDAD 微生物是富集培养菌群 KS^[6],其包括 4 项显著特征:1)无需有机碳源;2)仅提供 Fe(II)、硝酸盐和 CO₂ 即可生长;3)经过多次传代培养能够保留铁氧化能力;4)吸收并同化 CO₂ 合成生物量^[7]。以上 4 个特征使其有别于硝酸盐依赖型铁氧化作用(nitrate-dependent iron(II) oxidation, NDFO)^[8],后者更强调反硝化中间活性产物(如 NO₂⁻)对 Fe(II)的化学氧化作用,代表性菌株包括 *Acidovorax* sp. Strain BoFeN1^[8] 和 *Klebsiella mobilis*^[9]。菌群 KS 中占主导地位的是 Gallinoellaceae 科的菌株,其行使自养铁氧化功能,但不同实验室所培养的菌群 KS 中 Gallinoellaceae 的相对丰度差异很大,占比范围为 42%~96%,其余成分为伴生菌株,部分具有固碳和反硝化功能^[6,10-11]。寡营养条件下,也有研究成功富集获得了群落结构与 KS 类似的、以黄铁矿为电子供体的 IDAD 菌群^[12-13],具备实现铁-硫协同反硝化潜力^[14]。此外,通过活性污泥驯化得到的铁自养菌群,同样展现出较高的反硝化活性^[4,15-17],同时兼具除磷^[18-19]、固砷^[20]的能力。不过,鉴于 Fe(II)

供给电子数量的局限,IDAD 技术更适用于污水处理厂尾水深度脱氮除磷^[2,21]。

与菌群 KS 的情况类似,由活性污泥富集获得的 IDAD 菌群也呈显著的群落结构差异。在 Tian 等^[4]的研究中,富集得到的 IDAD 菌群优势铁氧化细菌主要隶属于 Gallinoellaceae 科,其相对丰度为 15.5%,主要伴生菌属包括 *norank_f_Anaerolineaceae* 和 *norank_f_Nitrosomonadaceae* 等;而在 Zhang 等^[16]报道的 IDAD 菌群中, Gallinoellaceae 科的相对丰度约为 5.8%,主要伴生菌属由 *Nitrosomonadales* 和 *Anaerolineaceae* 等组成。此外,还有研究报道 *Sideroxydans* sp.^[22] 和 *Rhodanobacter*^[23] 在 IDAD 菌群中也扮演着关键的铁氧化角色。接种污泥的性质,尤其是其原始微生物组成,可能是导致不同 IDAD 菌群群落结构的一个重要因素。然而,菌群 KS 相关研究表明,来源相同的菌群在培养过程中,也可能因亚铁盐(电子供体)长期供给方式的差异而发生显著的群落分化^[6,10]。富集 IDAD 菌群常用的亚铁盐为 FeSO₄ 和 FeCl₂,二者是不同实验室培养菌群 KS 实验中的关键差异化指标;在上述活性污泥驯化研究中也均有应用^[4,15-20]。由此可见,除接种污泥的初始组成外,亚铁盐中阴离子形式及其长期影响亦可能在微生物群落结构塑造中起决定性作用。尽管不同活性污泥富集出的 IDAD 菌群在功能上趋于一致,SO₄²⁻ 和 Cl⁻ 的存在差异可能是引发群落差异化的主要原因。

为验证以上猜想,并深入了解不同亚铁盐富集下 IDAD 污泥的差异化微生物组装与结构特征,本研究构建了 2 组反应器,采用相同的接种污泥,分别以 FeSO₄ 和 FeCl₂ 作为电子供体,驯化富集 IDAD 污泥,通过考察 2 组反应器在脱氮性能、微生物活性、铁氧化产物以及群落结构等方面的差异,揭开 IDAD 污泥功能化形成过程的面纱,为其拓展应用提供精细的理论指导。

1 材料与方法

1.1 IDAD 反应器设置与驯化

接种污泥取自凌水污水处理厂(大连)污泥浓缩

池,经30目筛网过滤去除固体颗粒物,随后用去离子水充分冲洗消除溶解性有机物。预处理后的污泥均分并转移至2个相同的升流式反应器(工作容积2.5 L,直径90 mm,高度400 mm)。接种污泥初始SS与VSS分别为14000,9000 mg/L。IDAD污泥驯化富集培养基^[20]以KHCO₃为碳源,添加NaNO₃作为电子受体、亚铁盐(R1:FeCl₂,R2:FeSO₄)作为电子供体。进水pH调节至6.2±0.1,向进水箱吹扫N₂(99.99%)20 min维持缺氧环境。反应器在(30±2)℃下运行200 d,HRT为16 h。本实验设计排除了可能引起微生物细胞电荷胁迫和渗透胁迫的Cl⁻与SO₄²⁻浓度^[24],并排除了盐度对微生物活性、氮循环功能酶活性及Fe(Ⅱ)氧化产物质量的潜在影响。

1.2 铁氧化产物表征

在第200天,采用粉末X射线衍射(XRD)和X射线光电子能谱(XPS)对2个IDAD反应器中形成的Fe(Ⅱ)氧化产物进行对比鉴定。采集的含Fe(Ⅲ)矿物在分析前均经过真空冷冻干燥处理。XRD分析使用D8 Advance型仪器(德国布鲁克),使用Cu Kα辐射(λ=1.54718 Å),扫描范围2θ为10°~70°。XPS测定使用K-alpha plus型仪器(美国赛默飞),使用Mg Kα辐射,以确定其化学组成与表面元素氧化态。

1.3 胞外聚合物(EPS)提取和定量

采用改进的热提取法提取EPS^[25]。取1.0 g湿污泥置于50 mL离心管中,用0.9%(质量/体积)NaCl重悬至20 mL,离心(8000 r/min,10 min,25℃)后用0.9% NaCl洗涤3次。将沉淀用20 mL 0.05%(质量/体积)NaCl重悬,以2000 r/min离心15 min,收集上清液,即为可溶性微生物产物(SMP)。剩余沉淀用20 mL经预热(60℃)的0.05% NaCl重悬,涡旋振荡1 min后离心(4000 r/min,10 min),收集上清液作为松散结合型EPS(LB-EPS)。随后将沉淀用20 mL 0.05% NaCl重悬,涡旋振荡1 min,置于恒温水浴摇床(60℃,120 r/min)中孵育30 min,离心(10000 r/min,15 min)后收集上清液作为紧密结合型EPS(TB-EPS)。收集的上清液均经0.45 μm滤膜过滤。SMP、LB-EPS和TB-EPS中的多糖与蛋白质浓度分别采用Dubois法^[26]和改良Lowry法^[27]进行定量分析。

1.4 IDAD污泥宏基因组分析

使用E. Z. N. A[®] Soil DNA试剂盒(Omega Biotek)并参照说明书,从1.0 g IDAD湿污泥中提取基因组DNA。通过NanoDrop 2000分光光度计评估DNA质

量与浓度,并经琼脂糖凝胶电泳验证完整性;样本于-20℃保存直至送至上海凌恩生物科技有限公司进行扩增与测序。采用TruSeq[®] DNA建库试剂盒(Illumina)对高质量DNA样本(OD_{260/280}=1.8~2.2,OD_{260/230}≥2.0)进行文库构建,使用Qubit荧光计(Thermo)检测文库浓度。宏基因组鸟枪法文库在Illumina NovaSeq 6000平台上进行双末端150 bp测序。将质控后的clean data用Megahit(SDBG)组装为样本contigs,统计并评估N50、N90组装指标。用PlasFlow识别可能的质粒scaffold。对组装contigs用MetaProdigal预测ORF,并用CD-HIT对所有样本的基因序列聚类,取每簇最长序列构建非冗余基因集。用Salmon将原始序列比对到非冗余基因集并计算基因TPM丰度。将基因产物蛋白序列用DIAMOND注释于eggNOG、NR、SARG、NCycle、SCycle等数据库;用HMMER v3.2.1将蛋白与CAZy v12的HMM库比对以注释CAZymes;用KofamScan(含HMMSEARCH)进行KEGG同源注释。原始测序数据已保藏于NCBI BioProject数据库(项目号PRJNA1359363),原始测序读段可在SRA数据库获取(登录号SRR36097515对应R1,SRR36104250对应R2)。

1.5 化学分析测试方法

pH、DO和ORP使用便携式多功能水质分析仪(WTW, multi-3630 IDS)进行测定。通过无菌注射器从各样品瓶中采集液体样本,经0.22 μm滤膜过滤。NO₃⁻-N、NO₂⁻-N及NH₄⁺-N浓度分析采用紫外可见分光光度法^[20](P3,MAPADA)。为减轻NO₂⁻引起的非生物Fe(Ⅱ)氧化的潜在干扰,采用经改进的非洛嗪法定量分析Fe(Ⅱ)和Fe(Ⅲ)^[23,28]。

2 结果与讨论

2.1 IDAD反应器脱氮性能

在IDAD菌群驯化1~9 d期间,R1和R2均实现100%的NO₃⁻-N去除。第10天,NO₃⁻-N去除率分别为83.3%(R1)和87.5%(R2)(见图1a);同时,Fe(Ⅱ)的去除率仅为46.7%和33.2%(见图1c)。反应过程中,还原的NO₃⁻-N与氧化的Fe(Ⅱ)摩尔比(R1为0.35,R2为0.55,见图1d)均明显高于IDAD的理论计量比0.2[式(1)]。这是由于接种污泥中的反硝化细菌利用微生物凋亡释放的有机质作为碳源,进行异养反硝化作用的同时,促进了Fe(Ⅱ)的化学氧化^[4,20]。这一时间段内出水中较高的NH₄⁺-N浓度也进一步支持了该解释^[29]。当有机质耗尽时,反应器

出水中 NO_3^- -N迅速升高,并在25 d达到约20 mg/L,此时,R1和R2的脱氮效率降低至30%左右。而后,尽管偶有波动,R1和R2出水中 NO_3^- -N及 Fe(II) 浓度均

呈逐步降低趋势;同时,还原的 NO_3^- -N与氧化的 Fe(II) 摩尔比也逐渐降低,趋近于0.2。

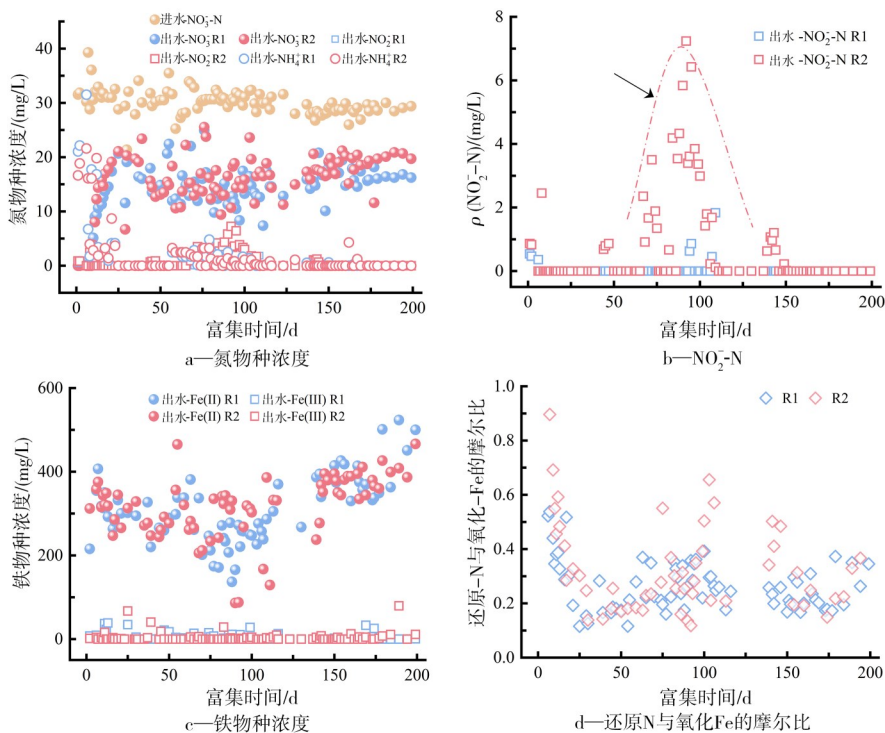


图1 IDAD富集反应器的性能变化

Figure 1 Performance of the IDAD consortia enrichment reactor

在50~150 d,R1和R2的平均 NO_3^- -N去除率分别为52.1%和48.1%,平均 Fe(II) 去除率分别为46.4%和40.6%,结果表明,R1的反硝化效率略优于R2。其中,在75~105 d,R2出水中 NO_2^- -N显著积累,表明此阶段R2中污泥亚硝酸盐还原酶的活性低于R1^[4],可能归因于菌群的代谢活性或群落差异。随后,在150~200 d,R2的 NO_2^- -N积累消失,各反应器脱氮趋于稳定。这期间,R1和R2的平均 NO_3^- -N去除率分别为42.4%和34.6%,较前一阶段下降,推测是反应器内 Fe(II) 氧化产物的积累以及同微生物团聚作用阻碍了 Fe(II) 的生物可得性^[15-16,30],限制了反硝化作用,导致脱氮效率下降。出水中 Fe(II) 浓度的升高和波动支持了这一观点。

2.2 IDAD菌群代谢特征差异

R1和R2在富集IDAD菌群期间的反硝化效率特征,尤其是在稳定阶段(150~200 d),R1反硝化速率显著高于R2,预示所富集的2个菌群可能存在代谢特征差异。为验证这一推测,实验提取了第200天的样品用于分析EPS。EPS是微生物分泌的高分子物

质,主要由多糖和蛋白质组成,与微生物多种胞外活动相关^[31]。在IDAD作用中,EPS可参与微生物-铁矿物互作、胞外电子传递、反硝化碳源等多种机制中^[4,30],被视为间接反映菌群代谢特征的关键因素。

总体而言,R2的IDAD菌群中EPS的多糖含量(11.7 mg/g VSS)略高于R1(8.1 mg/g VSS)(图2a),而两者的蛋白质含量则相当。不过多糖在SMP、LB-EPS和TB-EPS中的分布有显著差异:R2菌群的SMP多糖含量远高于R1,而LB-EPS中R1的多糖含量则高于R2。考虑到SMP作为微生物代谢和细胞衰变的有机产物,可被异养反硝化细菌用作电子供体以支持寡营养条件下的 NO_3^- -N还原^[32]。结合先前研究结果,以 FeSO_4 作为电子供体富集得到的IDAD菌群无法利用SMP进行反硝化脱氮^[4],推测R1中富集的IDAD菌群具备利用SMP作为反硝化电子供体的能力,这可能解释了为何R1菌群中检测到的SMP含量低于R2,同时R1表现出优于R2的反硝化效率的现象。蛋白质在各组分中的分布则较为均匀,未见显著差异。

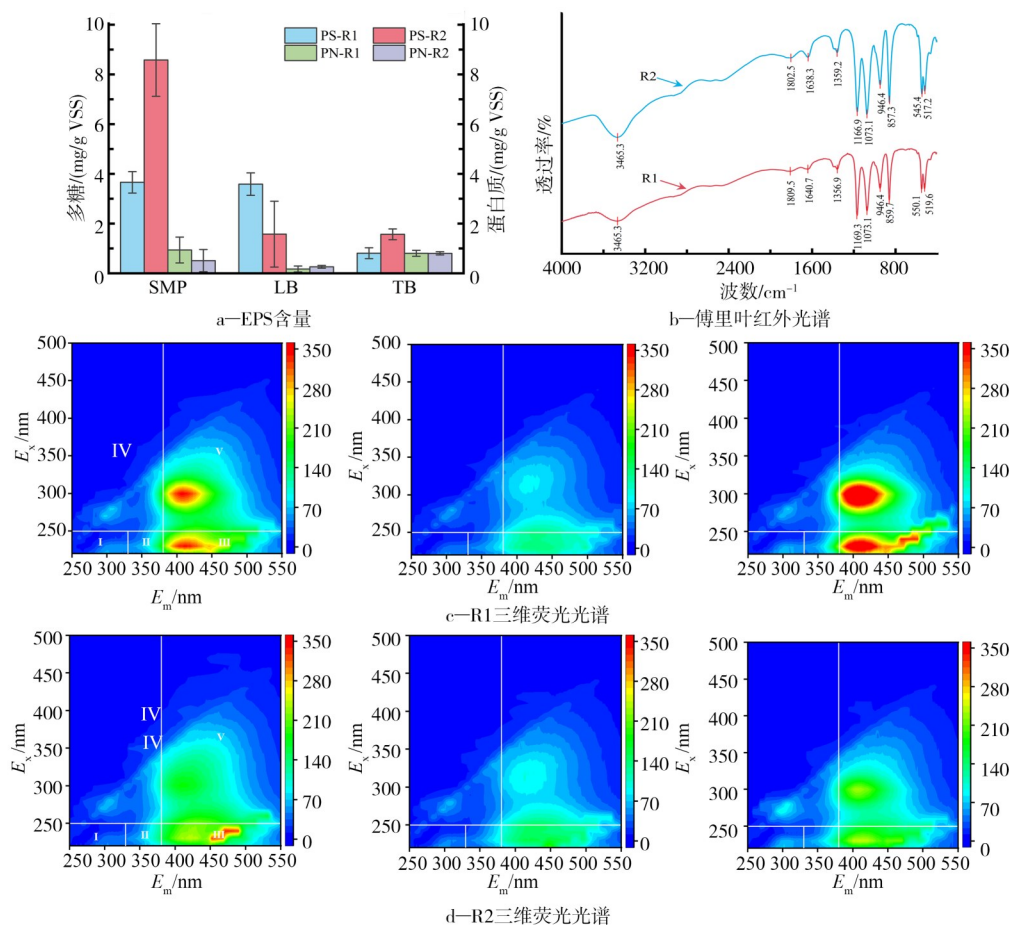


图2 IDAD菌群EPS含量及特征分析

Figure 2 Analysis of EPS content and characteristics of IDAD consortia

EPS的红外光谱(图2b)显示:在3465, 2932 cm^{-1} 处的吸收对应多糖和蛋白质分子的N—H、O—H和C—H的振动伸缩^[33]; 1638 cm^{-1} 处对应C=O伸缩振动, 1166, 1073 cm^{-1} 处对应—C—O—伸缩振动; 946, 856 cm^{-1} 处对应—C—O—C—弯曲振动; 1455, 1359 cm^{-1} 处对应—CH₂弯曲振动。以上结果说明2种IDAD菌群EPS中分子组分接近, 均含有可被异养微生物利用的有机质成分。此外, EEM图谱显示R1菌群EPS中类腐殖质和类富里酸的荧光强度(尤其是SMP和TB-EPS)明显高于R2样本(图2c、d), 预示着R1菌群中可能有更高活性的胞外电子传递作用, 这有利于缓解铁矿物与微生物的团聚对菌群代谢的抑制^[23, 30]。

2.3 IDAD菌群Fe(Ⅱ)氧化产物分析

2组反应器中提取的Fe(Ⅱ)氧化产物均呈红褐色, 具有微弱磁性。XRD图谱显示二者均具有纤铁矿[FeO(OH)]晶型(图3a), 但结晶度相对较弱, 可能是

由于系统内EPS的有机官能团削弱了矿物的成核和结晶作用^[4, 34]。R1和R2中铁矿物的C、Fe、O 3种元素的相对占比存在差异, 但Fe与O元素的比例均在1:2左右(图3b), 与FeO(OH)结构一致。R2中矿物的C含量较R1高出约10%, 说明其表面附着的有机质含量更高, 与微生物的互作可能较R1更为强烈。铁矿物的C 1s XPS图谱在284.8, 286.55, 288.85 eV处显示3个峰, 分别对应脂族的C—C、醚或醇中的C—O以及—C=O(图3c、d); O 1s的XPS图谱显示R1矿物的两个主要共价键分别为Fe—O和C=O, 而R2矿物则为Fe—O、C—O以及C=O, 表明EPS或细胞本身吸附于铁矿物表面(图3e、f)^[35]。以上结果证实了微生物与Fe(Ⅱ)氧化产物的相互作用。Fe 2p的XPS谱图显示出3个典型的特征峰, 分别对应于Fe 2p_{3/2}和Fe 2p_{1/2}。铁矿物的主要铁物种为Fe(Ⅲ), 其中, R1中Fe(Ⅲ)占比达到98%, 高于R2中Fe(Ⅲ)的94.7%, 表明R1中Fe(Ⅱ)氧化产物的成熟度更高^[36-37], 也与R1相对更高的铁氧化、反硝化效率吻合。

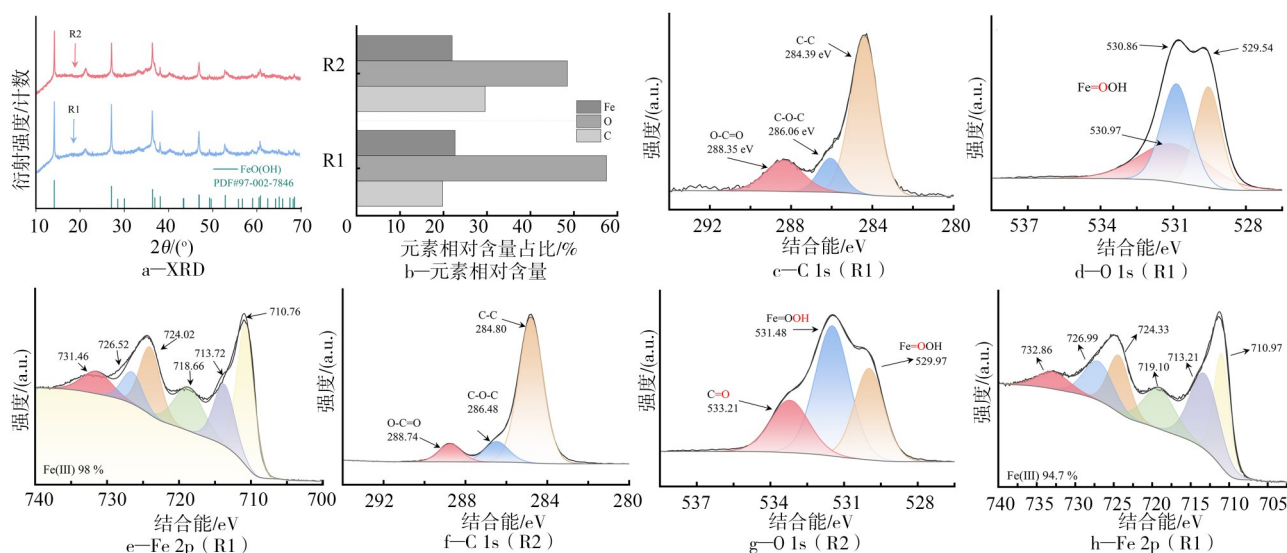


图3 铁氧化产物的XRD和XPS表征分析

Figure 3 XRD and XPS characterization of iron-oxidizing products

2.4 IDAD 菌群结构与宏基因组解析

为了深入探究不同亚铁盐对微生物群落结构及功能的影响,采用宏基因组学技术对 R1 和 R2 中 IDAD 菌群的群落结构和代谢功能等关键方面进行了对比分析。Alpha 多样性分析显示:R1 的 Shannon 指数 (7.276) 高于 R2 (7.129), 同时 Simpson 指数 (0.967) 略低于 R2 (0.973), 表明 R1 中 IDAD 菌群群落的物种均匀度和多样性均高于 R2。将非冗余基因集比对至 NR 数据库,通过对应的分类学数据库获取物种注释信息。基于注释结果,对各物种的基因丰度进行求和,得到该物种的丰度。随后,在各分类学水平上统计所有样品中相应类群的丰度,构建不同水平的丰度谱。为进一步解析菌群结构,选取具有代表性的门水平和属水平丰度谱进行分析。在细菌门水平上(图 4a),R1 中相对丰度占优势的细菌包括 Bacteroidota (34.8%)、Pseudomonadota (26.1%)、Chloroflexota (7.5%)、Acidobacteriota (6.4%) 和 Desulfobacterota_F (6.3%)。与 R1 相比,R2 的 Bacteroidota 相对丰度显著下降至 15.5%,而 Chloroflexota 和 Acidobacteriota 的相对丰度则分别上升至 14.4% 和 11.7%,Pseudomonadota (25.0%) 和 Desulfobacterota_F (6.3%) 的占比相对稳定。

在属水平上(图 4b),R1 群落中相对丰度较高的菌属包括 *unclassified_Melioribacteraceae* (20.4%)、*Gallionella* (10.3%)、*unclassified_Desulfobacterota_F* (5.3%)、*unclassified_Acidobacteriota* (3.3%) 和

unclassified_Bacteroidota (2.3%)。其中,*Gallionella* 是菌群 KS 中代表性铁氧化与碳固定关键菌属^[6,38];同时,另一种典型的铁氧化菌属 *Rhodanobacteraceae*^[38] 也在 R1 中富集,相对丰度为 1.8%。有研究表明,*Melioribacteraceae* 携带编码 NO 和 N₂O 还原酶的基因,推测其在 IDAD 菌群中可能通过及时转化 NO,减轻其对 *Gallionella* 等微生物的毒性影响^[38]。在 R2 中(图 4c),*unclassified_Melioribacteraceae* 和 *unclassified_Acidobacteriota* 的相对丰度分别下降至 9.5% 和 1.7%。铁氧化菌属方面,*Gallionella* 的相对丰度降至 1% 以下,而 *Rhodanobacteraceae* 则上升至 4.5%。由于 *Rhodanobacteraceae* 不具备固碳能力,其生长与代谢所需有机质主要依赖于如 *Chloroflexota* 等伴生细菌提供^[23,38]。因此,铁氧化菌属在物种组成与相对丰度上的变化,可能是导致 R2 中铁氧化与反硝化效率低于 R1 的关键因素。

在 R2 的 IDAD 菌群中,*unclassified_Anaerolineales* (8.2%)、*unclassified_Parvularculaceae* (7.5%) 和 *unclassified_Pyrinomonadaceae* (7.0%) 显著富集。*Anaerolineales* 作为一类典型的反硝化细菌,具有降解有机质的能力^[39]。其在先前报道的以 FeSO₄ 或黄铁矿为电子供体的 IDAD 菌群^[4,16] 和硫自养反硝化菌群^[39] 中也有富集,但是具体功能尚未完全阐明。有研究表明,部分 *Anaerolineales* 菌株能够进行锰氧化还原硝酸盐作用^[40]。基于此,推测 R2 的 IDAD 菌群中富集的 *Anaerolineales* 可能参与铁氧化反硝化过程,并

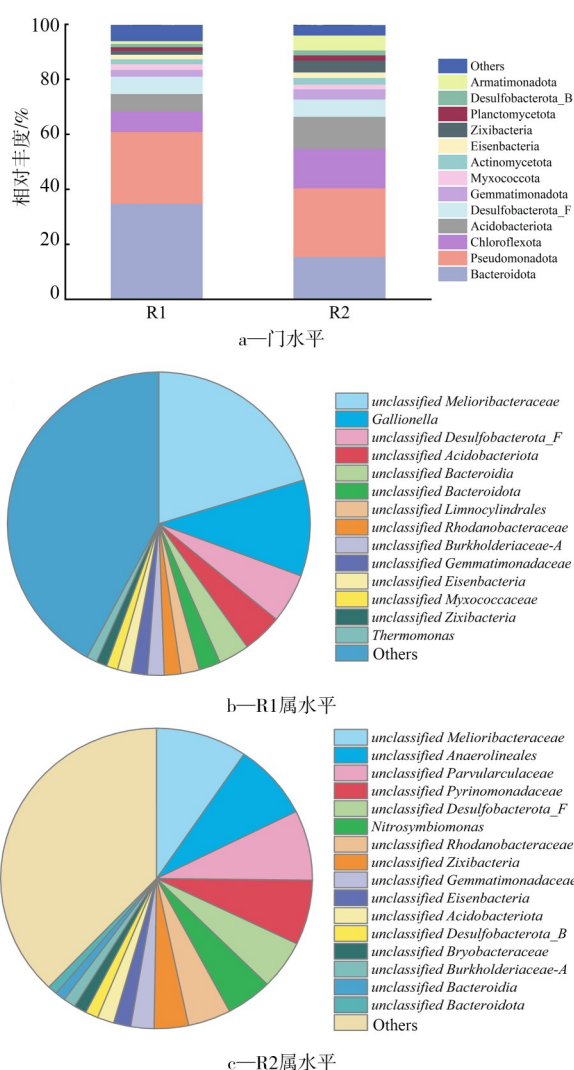


图 4 IDAD 菌群在门水平和属水平的群落结构

Figure 4 Community structures of IDAD consortia at phylum and genus levels

可能与 S 元素的代谢相关,这有待进一步研究证实。此外,R2 中硝化细菌 *Nitrosybiomonas* 的相对丰度达到了 4.8%。先前的研究也观察到 *Nitrosybiomonas* 与 *Anaerolineales* 的共生现象^[40-41]。值得关注的是,Zhang 等^[16]和 Tian 等^[4]的研究也同样发现了 *Anaerolineales* 同亚硝化细菌 *Nitrosomonadaceae* 的共生。综上, SO_4^{2-} 的存在可能会诱导系统中 N、Fe 和 S 元素转化之间的复杂互作,从而导致了反硝化效率的降低。*Parvularculaceae* 是一类典型的寡营养型细菌,对高盐和低 pH 环境表现出较强耐受性^[42]; *Pyrinomonadaceae* 同样能够耐受高盐环境,并具有利用广泛有机碳源生长潜力^[43],被视为 N_2O 排放的生物标志物^[44]。基于其在 IDAD 菌群的显著富集,推测这 2 类细菌可能在菌群中执行着反硝化作用。

为解析 R1 和 R2 富集的 IDAD 菌群中在 N 转化、C 固定和 Fe 氧化过程中的功能差异,基于对原始拼接序列 contigs 进行基因预测构建的非冗余基因集,结合 NR 数据库分析获得的物种组成与丰度谱,并将该基因集的蛋白质序列与 Ccycs、Ncycs 及 HMM 数据库进行比对,进而得到相关功能基因信息。在此基础上进一步分析了主要菌群在 N 转化、C 固定和 Fe 氧化代谢通路中所起的作用。IDAD 的生物脱氮过程主要依赖于反硝化途径,同时氮转化涉及多种关键基因,包括 *nasA*、*napABC*、*narBCGHIJ*、*nirABDKS*、*nrfAC*、*norBC* 和 *nosZ*^[1]。与 R1 相比,R2 在硝酸盐还原 (*narH*、*narIZ*、*napA*) 和亚硝酸盐氧化还原 (*nrxAB*) 相关的酶编码基因相对丰度上有所增加(图 5a)。相反地,NO 和 N_2O 还原 (*norC* 和 *nosZ*) 以及异化硝酸盐还原为铵 (DNRA) 通路涉及的 *nirB* 和 *nrfA* 的相对丰度降低。其余基因的丰度变化不显著,基本维持稳定。R2 中相关基因丰度的变化,与菌群富集过程中观察到的 NO_2^- -N 积累现象相符。*norC* 和 *nosZ* 丰度下降可能导致 NO 积累并抑制 NO_2^- -N 还原^[45](图 5b)。菌群可能通过 *nrxAB* 介导的亚硝酸盐氧化来降低 NO 积累,实现解毒。Fe(II) 氧化方面,基于 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 细胞色素 c Cys2(*cyc2* 基因)驱动 Fe(II)氧化的机制^[46],R1 更高的 *cyc2* 基因丰度(图 5c)表明,其 Fe(II)氧化能力可能优于 R2^[23,47],且与富集阶段的性能及 R1 铁氧化细菌丰度更高的结果一致。固碳功能上,R1 和 R2 固碳基因总体丰度相似,但 R1 在卡尔文循环 (*cbbL*、*cbbM*) 基因上占优,而 R2 则以 3-HP/DC/4-HB 途径基因为主。

R1 中的 *Gallionella*、*Desulfobacterota* 以及 *norank_c_Alphaproteobacteria* 均具备编码完整反硝化通路的基因(图 6)。先前研究并未在 *Gallionella* 中检测到 *norBC* 和 *nosZ* 基因,认为其解毒 NO 依赖于其他如 *Rhodanobacter* 等伴生细菌^[6,38]。本研究证实了 *Rhodanobacteraceae* 携带了 *norBC* 和 *nosZ* 基因,与前人观察结果一致^[6,38]。本研究发现 *Gallionella* 拥有完整的反硝化通路基因组,暗示其在 IDAD 菌群中的功能可能被低估。因此,*Gallionella* 在 IDAD 菌群的 NO 代谢和整体反硝化过程中扮演的角色,应得到更深入的关注和研究。*cyc2* 基因在 *Melioribacteraceae*、*Desulfobacterota*、*Anaerolineales*、*norank_c_Alphaproteobacteria* 以及 *Nitrosybiomonas* 中的检出,表明这些细菌可能通过编码富集可传递电子的外膜

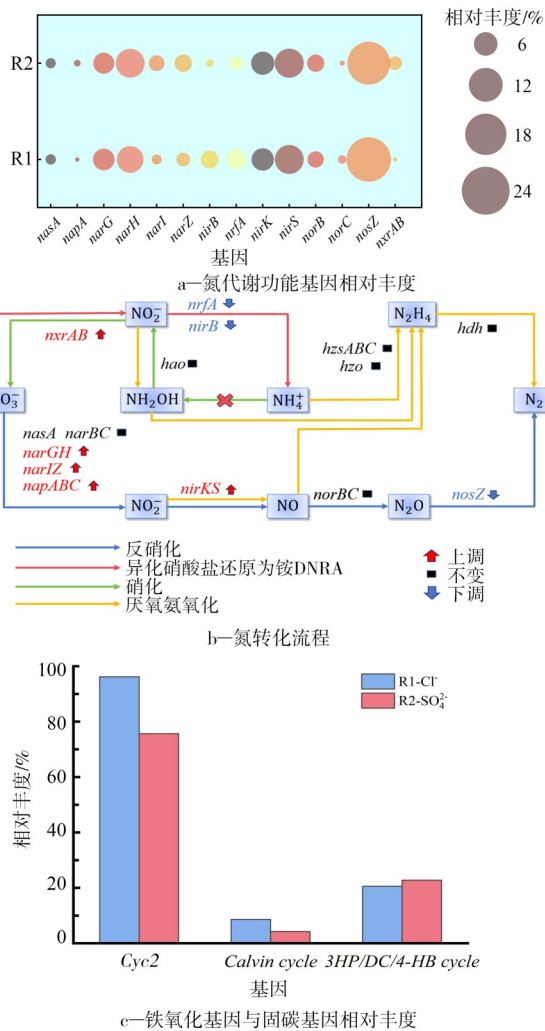


图5 氮代谢功能基因相对丰度、氮转化流程及铁氧化基因与固碳基因相对丰度

Figure 5 Relative abundance of nitrogen metabolism functional genes, nitrogen transformation pathways, and relative abundance of iron oxidation and carbon fixation genes

Cyc2蛋白而拥有潜在的铁氧化能力。尽管在R1和R2的IDAD菌群中,铁氧化和反硝化基因整体分布均匀,但不同的亚铁盐电子供体对群落结构和关键基因的分布产生了显著的差异化。

为进一步了解检出基因的生物学功能,包括代谢途径、遗传信息传递以及细胞学过程等,基于KEGG数据库对R1和R2中的IDAD菌群进行基因功能注释。R1与R2中IDAD菌群在KEGG通路层面的基因表达总体相近,表明二者在整体功能与代谢通路上差异有限(图7)。其中,主要差异表达基因集中在细胞运动(cell motility)和信号转导(signal transduction)(R1相对丰度更高),提示在Cl₂长期作用下IDAD菌群对环境刺激的响应潜能增强^[48],有利于向底物的趋化并提高底物利用效率,这与R1表现出更高的铁氧化与反硝化活性密切相关。相反,R2中与细胞群落(cellular community)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)和异生素生物降解与代谢(xenobiotics biodegradation and metabolism)相关基因的丰度更高,表明R2的群体交互与定植能力以及对复杂有机底物的降解潜能增强^[48-49];这一特征与R2中IDAD菌群均匀度与多样性的下降相吻合。考虑到Fe(II)氧化产物易于细胞团聚^[15,30],运动潜能下降而定植能力提升可能会限制菌群对底物的直接利用,同时衰亡细胞释放的有机物可能被其他微生物利用以维持菌群功能。综合来看,就脱氮效率、群落稳定性与可持续性而言,用FeCl₂(R1条件)富集培养IDAD菌群优于FeSO₄(R2条件)。

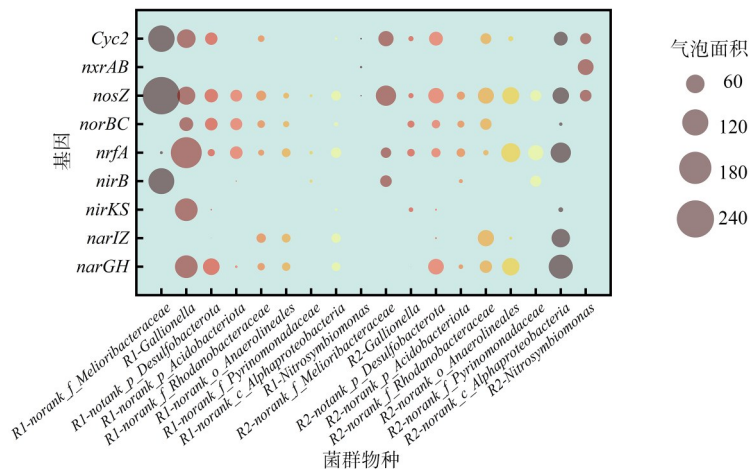


图6 IDAD菌群物种-注释基因贡献

Figure 6 Species contributions to annotated genes in IDAD consortia

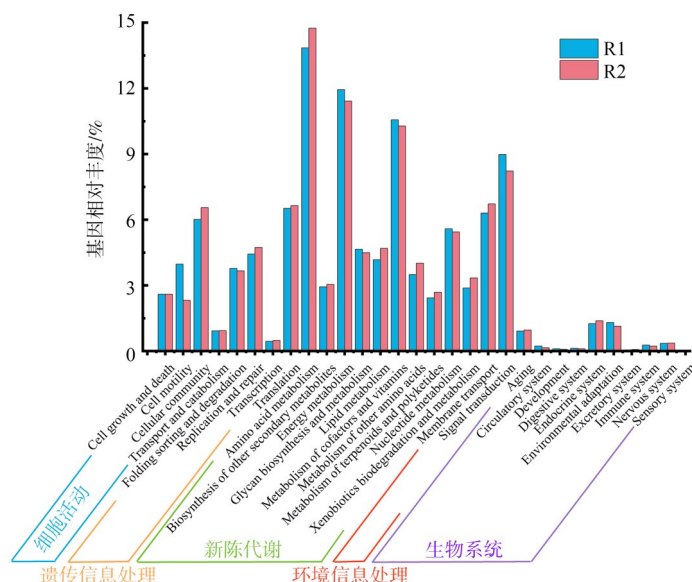


图7 基于KEGG数据库的基因功能注释

Figure 7 Functional annotation of genes based on the KEGG database

3 结 论

本研究对比分别以 FeCl_2 (R1) 和 FeSO_4 (R2) 为电子供体富集 IDAD 菌群, 系统揭示了不同亚铁盐对菌群反应性能、结构组装及代谢功能的差异化影响。R1 在富集过程中表现出更优的铁氧化活性和反硝化效率, 其 IDAD 菌群的多样性更高, $\text{Fe}(\text{II})$ 氧化与反硝化, 尤其是 NO 和 N_2O 还原相关基因丰度更高。综上, 亚铁盐中阴离子类型 (Cl^- 或 SO_4^{2-}) 是驱动 IDAD 菌群差异化组装与功能分化的关键因素。在实际工程应用中, 推荐优先选用 FeCl_2 作为电子供体, 以富集获得更具脱氮优势且代谢更完整的 IDAD 菌群。

参考文献

- [1] KUYPERS M M M, MARCHANT H K, KARTAL B. The microbial nitrogen-cycling network [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263–276.
- [2] 潘元, 孙睿哲, 俞汉青. 外源电子供体驱动生物反硝化技术研究进展[J]. *环境工程*, 2024, 42(9): 1–12.
PAN Y, SUN R Z, YU H Q. Research advances in biological denitrification technology driven by exogenous electron donors [J]. *Environmental Engineering*, 2024, 42(9): 1–12.
- [3] TIAN T, YU H Q. Denitrification with non-organic electron donor for treating low C/N ratio wastewaters [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 299: 122686.
- [4] TIAN T, ZHOU K, XUAN L, et al. Exclusive microbially driven autotrophic iron-dependent denitrification in a reactor inoculated with activated sludge[J]. *Water Research*, 2020, 170: 115300.
- [5] 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.
- [6] HE S, TOMINSKI C, KAPPLER A, et al. Metagenomic analyses of the autotrophic $\text{Fe}(\text{II})$ -oxidizing, nitrate-reducing enrichment culture KS[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(9): 2656–2668.
- [7] BRYCE C, BLACKWELL N, SCHMIDT C, et al. Microbial anaerobic $\text{Fe}(\text{II})$ oxidation-ecology, mechanisms and environmental implications [J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20: 3462–3483.
- [8] KLUEGLEIN N, ZEITVOGEL F, STIERHOF Y, et al. Potential role of nitrite for abiotic $\text{Fe}(\text{II})$ oxidation and cell encrustation during nitrate reduction by denitrifying bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(3): 1051–1061.
- [9] BLOTHE M, RODEN E E. Composition and activity of an autotrophic $\text{Fe}(\text{II})$ -oxidizing, nitrate-reducing enrichment culture[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 6937–6940.
- [10] ETIQUE M, JORAND F P A, ZEGEYE A, et al. Abiotic process for $\text{Fe}(\text{II})$ oxidation and green rust mineralization driven by a heterotrophic nitrate reducing bacteria (*Klebsiella mobilis*) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(7): 3742–3751.
- [11] NORDHOFF M, TOMINSKI C, HALAMA M, et al. Insights into nitrate-reducing $\text{Fe}(\text{II})$ oxidation mechanisms through analysis of cell-mineral associations, cell encrustation, and mineralogy in the chemolithoautotrophic enrichment culture KS [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(13): e00752–17.
- [12] JAKUS N, BLACKWELL N, OSENBRÜCK K, et al. Nitrate removal by a novel lithoautotrophic nitrate-reducing iron(II)-oxidizing culture enriched from a pyrite-rich limestone aquifer[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(16): e0046021.

- [13] JAKUS N, MELLAGE A, HÖSCHEN C, et al. Anaerobic neutrophilic pyrite oxidation by a chemolithoautotrophic nitrate-reducing iron (II)-oxidizing culture enriched from a fractured aquifer [J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55 (14): 9876-9884.
- [14] 丁沛, 任之琪, 马佳莹, 等. 以黄铁矿为电子供体的自养反硝化技术研究现状与展望[J]. *环境工程*, 2024, 42 (12): 97-107.
DING P, REN Z Q, MA J Y, et al. Research status and prospect on autotrophic denitrification technology utilizing pyrite as the electron donor[J]. *Environmental Engineering*, 2024, 42 (12): 97-107.
- [15] WANG R, YANG C, ZHANG M, et al. Chemoautotrophic denitrification based on ferrous iron oxidation: reactor performance and sludge characteristics[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 313: 693-701.
- [16] ZHANG M, ZHANGZHU G, WEN S, et al. Chemolithotrophic denitrification by nitrate-dependent anaerobic iron oxidizing (NAIO) process: Insights into the evaluation of seeding sludge [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 345: 345-352.
- [17] 牟宏霖, 刘绪振, 熊新竹, 等. 铁自养反硝化滤池强化高速公路服务区污水生物处理尾水的应用研究[J/OL]. *环境工程*, 2025, 1-13 [2026-01-20]. <https://link.cnki.net/urlid/11.2097.X.20251107.0935.004>.
MU H L, LIU X Z, XIONG X Z, et al. Research on the application of iron autotrophic denitrification filter to enhance the biological treatment of tail water in expressway service areas [J/OL]. *Environmental Engineering*, 2025, 1-13 [2026-01-20]. <https://link.cnki.net/urlid/11.2097.X.20251107.0935.004>.
- [18] TIAN T, ZHOU K, LI Y S, et al. Phosphate recovery from wastewater prominently through a Fe (II)-P oxidizing pathway in the autotrophic iron-dependent denitrification process [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54 (18): 11576-11583.
- [19] LI R, 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.
- [20] LIU J, ZHANG H, WANG H, et al. Remediation of arsenic- and nitrate-contaminated groundwater through iron-dependent autotrophic denitrifying culture [J]. *Environmental Research*, 2024, 257: 119239.
- [21] 周可, 潘元, 田天, 等. 铁自养反硝化污泥富集培养过程中化学与生物作用的变化规律[J]. *环境工程学报*, 2021, 15 (8): 2789-2800.
ZHOU K, PAN Y, TIAN T, et al. Deciphering the evolution of biological and chemical process in acclimatization of autotrophic iron-dependent denitrifying sludge [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2021, 15 (8): 2789-2800.
- [22] WANG R, ZHENG P, ZHANG M, et al. Bioaugmentation of nitrate-dependent anaerobic ferrous oxidation by heterotrophic denitrifying sludge addition: a promising way for promotion of chemoautotrophic denitrification [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 197: 410-415.
- [23] ZHANG H B, WANG H F, LIU J B, et al. Anaerobic ammonium oxidation coupled to iron (III) reduction catalyzed by a lithoautotrophic nitrate-reducing iron (II) oxidizing enrichment culture[J]. *The ISME Journal*, 2024, 18 (1): wrae149.
- [24] 王茹, 郑平, 杨程, 等. Cl^- 、 SO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} 对异养反硝化污泥的胁迫效应[J]. *中国环境科学*, 2016, 36 (4): 1039-1044.
WANG R, ZHENG P, YANG C, et al. Stress of Cl^- , SO_4^{2-} and PO_4^{3-} on the heterotrophic denitrifying sludge [J]. *China Environmental Science*, 2016, 36 (4): 1039-1044.
- [25] XU J, SHENG G, MA Y, et al. Roles of extracellular polymeric substances (EPS) in the migration and removal of sulfamethazine in activated sludge system [J]. *Water Research*, 2018, 47: 5298-5306.
- [26] DUBOIS M, GILL K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 2: 350-356.
- [27] FRØLUND B, PALMGREN R, KEIDING K, et al. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin[J]. *Water Research*, 1996, 30 (8): 1749-1758.
- [28] SCHÄDLER F, KAPPLER A, SCHMIDT C. A revised iron extraction protocol for environmental samples rich in nitrite and carbonate[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2018, 35: 23-30.
- [29] BI Z, QIAO S, ZHOU J, et al. Fast start-up of Anammox process with appropriate ferrous iron concentration [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 170: 506-512.
- [30] TIAN T, ZHOU K, LI Y, et al. Recovery of iron-dependent autotrophic denitrification activity from cell-iron mineral aggregation-induced reversible inhibition by low-intensity ultrasonication[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56 (1): 595-604.
- [31] 罗啸康, 魏展鹏, 吕芳杰, 等. 生物刺激微生物脱氯性能及其胞外聚合物特性分析[J]. *环境科学与技术*, 2025, 48 (9): 96-107.
LUO X K, WEI Z P, LÜ F J, et al. De-chlorination performance by bio-stimulants and characteristics of extracellular polymeric substances[J]. *Environmental Science & Technology*, 2025, 48 (9): 96-107.
- [32] ZHANG X, SUN Y, MA F, et al. In-situ utilization of soluble microbial product (SMP) cooperated with enhancing SMP-dependent denitrification in aerobic-anoxic sequencing batch reactor [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 693: 133558.
- [33] 吴芷昕, 黄祥武, 宋卫锋, 等. 不同 Cu (II) 胁迫/诱导下 *P. aeruginosa* EPS 组分变化及其吸附特性[J]. *环境科学学报*, 2015, 45 (7): 202-214.
WU Z X, HUANG X W, SONG W F, et al. The EPS components variation and adsorption characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* under different Cu (II) stress/induction [J]. *Acta*

- Scientiae Circumstantiae, 2025, 45(7): 202–214.
- [34] DIPPON U, PANTKE C, PORSCH K, et al. Potential function of added minerals as nucleation sites and effect of humic substances on mineral formation by the nitrate-reducing Fe(II)-oxidizer *Acidovorax* sp. BoFeN1 [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(12): 6556–6565.
- [35] LIU X, EUSTERHUES K, THIEME J, et al. STXM and nanoSIMS investigations on EPS fractions before and after adsorption to Goethite [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(7): 3158–3166.
- [36] 栗畅, 李颖芬, 严兴, 等. 亚铁氧化反硝化生物膜反应器中铁矿物的多样性及其对重金属Cd的吸附 [J]. 环境工程, 2020, 38(5): 76–83.
- SU C, LI Y F, YAN X, et al. Diversity of iron minerals and their adsorption to Cd in ferrous oxidation and denitrification biofilm reactor [J]. Environmental Engineering, 2020, 38(5): 76–83.
- [37] 薛杨峰, 王少锋. Fe(II)介导的亚硝酸盐还原耦合砷氧化研究 [J]. 大连理工大学学报, 2025, 65(2): 118–124.
- XUE Y F, WANG S F, Research on Fe(II)-mediated nitrite reduction coupled with arsenic oxidation [J]. Journal of Dalian University of Technology, 2025, 65(2): 118–124.
- [38] HUANG Y, STRAUB D, BLACKWELL N, et al. Meta-omics reveal *Gallionellaceae* and *Rhodanobacter* species as interdependent key players for Fe(II) oxidation and nitrate reduction in the autotrophic enrichment culture KS [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(15): e00496–21.
- [39] PANG Y, XIA L, LI S, et al. Metagenomic insights into a solid phase heterotrophic-autotrophic denitrification reactor driven by biodegradable polymers and pyrite [J]. Journal of Cleaner Production, 2025, 523: 146411.
- [40] 王暄. 锰氧化还原调控微生物氮转化代谢途径与群落互作机制 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2025.
- WANG X. Manganese redox regulates microbial nitrogen conversion metabolic pathways and community interactions [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2025.
- [41] OKUBO T, TOYODA A, FUKUHARA K, et al. The physiological potential of anammox bacteria as revealed by their core genome structure [J]. DNA Research, 2020, 28(1): 1–12.
- [42] EO J, PARK K. Long-term effects of imbalanced fertilization on the composition and diversity of soil bacterial community [J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2016, 231: 176–182.
- [43] ZHENG Y, ZHOU Z, YE X, et al. Identifying microbial community evolution in membrane bioreactors coupled with anaerobic side-stream reactor, packing carriers and ultrasonication for sludge reduction by linear discriminant analysis [J]. Bioresource Technology, 2019, 291: 121920.
- [44] XU Q, WU Z, XU Z, et al. Soil moisture-dependent tire wear particles aging processes shift soil microbial communities and elevated nitrous oxide emission on drylands [J]. Science of the Total Environment, 2024, 952: 175948.
- [45] 冯鑫, 赵剑强, 代伟, 等. 亚硝酸盐反硝化聚磷过程中NO和N₂O的累积特征 [J]. 环境工程, 2019, 37(12): 1–5, 54.
- FENG X, ZHAO J Q, DAI W, et al. Accumulation characteristics of NO and N₂O in nitrite denitrifying phosphorus accumulation process [J]. Environmental Engineering, 2019, 37(12): 1–5, 54.
- [46] CASTELLE C, GUIRAL M, MALARTE G, et al. A new iron-oxidizing/O₂-reducing supercomplex spanning both inner and outer membranes, isolated from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283: 25803–25811.
- [47] YANG G, LI S, NIU R, et al. Insights into nitrate-reducing Fe(II) oxidation by *Diaphorobacter caeni* LI3^T through kinetic, nitrogen isotope fractionation, and genome analyses [J]. Science of the Total Environment, 2024, 912: 168720.
- [48] DENG Q, SU C, CHEN Z, et al. Effect of hydraulic retention time on the denitrification performance and metabolic mechanism of a multi-chambered bio-electrochemical system [J]. Journal of Environmental Management, 2021, 299: 113575.
- [49] SUN H, ZHAO X, DING J, et al. Unveiling dynamics of microbial communities, species interactions, and ecological assembly during low-temperature-induced sludge bulking in full-scale wastewater treatment systems [J]. Bioresource Technology, 2025, 435: 132950.