

纳米零价铁强化克雷伯氏菌的反硝化影响研究

李 圆, 赵博玮*, 吴 忱, 李海波

(太原理工大学环境与生态学院, 山西 太原 030024)

摘要:研究了纳米级零价铁(nZVI)存在下克雷伯氏菌(*Klebsiella sp.-LJB2*)的厌氧反硝化作用及其机理,采用血清瓶装置,接种克雷伯氏菌快速启动短程反硝化进程,在此基础上添加纳米级零价铁(nZVI),构建了加铁的短程反硝化反应封闭装置。阐明了nZVI和*Klebsiella sp.-LJB2*之间的相互作用和脱氮贡献率,探究了不同C/N比、不同pH脱氮效能的影响机制及微生物种群响应特性。nZVI加速了硝态氮和氨氮的去除,减少了亚硝酸盐氮的积累。nZVI投加量是影响厌氧反硝化效果的关键因素。结果表明,nZVI可以有效提高废水中的氮去除率。*Klebsiella sp.-LJB2*的电子转移效率得到增强。nZVI还刺激了厌氧反硝化过程中反硝化酶及相关基因的表达。

关键词:废水生物脱氮;脱氮机理;硝酸盐还原;纳米零价铁

中图分类号:X703

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2025)S2-0120-08

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2025.S2.023

Study on impact of nano zero-valent iron enhanced *Klebsiella oxytoca* on denitrification

LI Yuan, ZHAO Bo-wei*, WU You, LI Hai-bo

(College of Environment and Ecology, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract: Anaerobic denitrification by *Klebsiella sp.-LJB2* in the presence of nanoscale zero-valent iron (nZVI) and its mechanism are investigated. In this experiment, a serum bottle device is employed to inoculate *Klebsiella sp.-LJB2* for rapid initiation of the short-range denitrification process, to which a closed device for the short-range denitrification reaction with the addition of iron is constructed by adding nanoscale zero-valent iron (nZVI). The interaction between nZVI and *Klebsiella sp.-LJB2* as well as their nitrogen removal contribution are elucidated. The influencing mechanism of nitrogen removal efficacy, and microbial population response characteristics at different C/N ratios and pH values are investigated. It is verified that nZVI accelerates the removal of nitrogen in nitrate and ammoniacal nitrogen, and reduces the accumulation of nitrogen in nitrite. The dosage of nZVI is a key factor influencing the effect of anaerobic denitrification. The results show that nZVI can effectively increase the nitrogen removal rate in wastewater. The electron transfer efficiency of *Klebsiella sp.-LJB2* is enhanced by ZVI. In addition, nZVI promotes the activity of denitrifying enzymes, and stimulates the expression of denitrifying enzyme and related genes in anaerobic denitrification.

Key words: biological denitrification of wastewater; denitrification mechanism; nitrate reduction; nano zero-valent iron

微生物脱氮是治理水体氮污染的一种经济有效的手段,传统的废水脱氮工艺主要依赖于硝化和反硝化过程。铁是环境中普遍存在的金属元素,也是微生物所需的重要微量元素之一。在微生物氮循环网络中,铁在DNA合成、酶合成、能量代谢和细胞呼吸的许多酶反应中起着至关重要的作用^[1]。此外,铁可以作为无机电子供体,增强微生物代谢活性,从而提高微生物群落的稳定性^[2]。Fe、Fe²⁺和Fe³⁺通常被添加到生物处理系统中,以富集反硝化细菌并

增加生物脱氮^[3-4]。硝酸盐是污水处理厂污水中氮的主要形式^[5]。Wang等^[6]构建建筑信息模型-数字原生建筑格式(BIM-DNBF)系统,发现生物量是促进Fe³⁺还原为Fe²⁺的关键因素,从而推动铁自养反硝化反应的发生。铁介导的自养反硝化系统已成功克服有机碳限制并用于反硝化^[7],与颗粒零价铁(Fe⁰)相比,nZVI(纳米零价铁)具有更大的比表面积和更高的表面活性,提高了集成铁微生物系统的反硝化效率^[8]。Fe⁰去除硝酸盐氮(NO₃⁻-N)的过程

收稿日期:2025-04-07;修回日期:2025-08-08

基金项目:国家自然科学基金(202302090301012)

作者简介:李圆(1998-),女,硕士生,研究方向为污水生物脱氮,2948990956@qq.com;赵博玮(1984-),男,博士,副教授,研究方向为污水生物脱氮方向研究,通讯联系人,zhaobowei@tyut.edu.cn。

中,同时存在化学反应和生物协同作用:非生物还原作用将 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 转化为氨氮 ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$);而生物还原则以 Fe^0 厌氧腐蚀产生的氢气 (H_2) 作为电子供体,以 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 作为电子受体,通过自养反硝化作用生成氮气 (N_2)^[9]。

尽管反硝化菌在废水脱氮中展现出重要的工程应用价值,但目前对其生理生化特性、代谢机理以及在实际工程中的应用仍存在许多未解之谜。例如,部分厌氧反硝化菌的纯培养困难,限制了对其代谢途径的深入研究;同时,厌氧反硝化菌在不同废水类型和环境条件下的适应性和稳定性尚需进一步验证。基于此,本研究通过构建单一反硝化菌系统,研究纳米铁对反硝化的影响。厌氧反硝化菌的应用不仅可以降低运行成本,还能减少温室气体排放,具有显著的环境和经济效益。

1 材料与方 法

1.1 材料与化学药品

兼性厌氧反硝化菌来源于太原理工大学环境与生态学院实验室筛选纯化的菌株。在基础反硝化 (DM) 培养基 (1 L 超纯水,含 0.468 8 g $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 、0.607 2 g NaNO_3 、0.4 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、0.20 g KH_2PO_4 、0.1 g NaCl 、1 g MgCl_2 和 0.1 mL 微量元素溶液) 中,以 30℃ 和 120 r/min 的条件培养细菌。 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 为细菌提供氮资源。纳米级零价铁 (nZVI, 100 nm, 纯度为 99.9%) 购自上海茂果纳米科技有限公司。其他化学试剂 (分析纯) 购自中国国药化学试剂有限公司。

1.2 纳米颗粒增强实验

在营养肉汤 (LB) 培养基 (蛋白胨 10 g, 牛肉膏 5 g, 氯化钠 5 g, 1 L 培养基) 中培养厌氧反硝化菌,当细胞质量浓度为 3 g/L 时, OD_{600} 为 1.20, 然后将 10 mL 细胞液加入到 200 mL DM 培养基中。同时,在菌液中加入不同量的 nZVI, 在 30℃、120 r/min 的条件下培养 24 h。培养基中化学需氧量 (COD)、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的初始浓度分别为 500、100 mg/L。通过改变 nZVI 的浓度 (10、50、100、200、250 mg/L)、C/N (3、5、7、9、11, 培养基中 C、N 元素质量比) 及 pH (5、7、9、10), 研究其对厌氧反硝化效果的影响。在本研究中,碳氮比通过改变培养基中碳源 (无水葡萄糖) 含量来调节。

1.3 酶测定

测定了克雷伯氏菌反硝化过程中反硝化酶和辅酶 I 的活性。将菌液以 5 000 r/min 离心 10 min, 用

0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 7.4) 洗涤细胞沉淀。重悬后,用超声 (4℃, 20 kHz) 处理 5 min, 然后离心 (12 000 r/min, 10 min)。之后立即用试剂盒测定所得上清液中 NAP (硝酸盐还原酶)、NIR (亚硝酸盐还原酶) 和辅酶 I (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)/NAD⁺) 的水平。检测步骤严格按照制造商的说明进行。NAP、NIR 检测试剂盒由中国南京建成生物工程研究所提供, NADH 检测试剂盒由白鲨 BIOSHARP LIFE SCIENCES 提供。本研究所有实验均为 3 次重复。

1.4 电子传递系统活性测定

电子传递系统活性 (ETSA) 与呼吸的测定: 采用下述方法检测 *Klebsiella sp. -LJB2* 的 ESTA^[10]。取 10 mL 菌液, 以 6 000 r/min 离心 10 min 后, 用 10 mL 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次。在 0.1 mol/L PBS 缓冲液中重悬后, 与 1 mL 氯化碘硝基四唑混合。在黑暗中孵育 30 min, 振荡培养 (200 r/min) 氧化成吡啶甲酯, 然后加入 1 mL 甲醛终止反应。加入 5 mL 甲醇振荡提取 10 min, 然后离心 (8 000 r/min, 10 min)。用紫外-可见分光光度计测定上清液在 490 nm 处的吸光度。

1.5 转录组分析

为了研究 nZVI 对反硝化的反应, 对 nZVI (K1 为添加 nZVI 的处理组) 影响下的 *Klebsiella sp. -LJB2* 菌进行了转录组学分析。使用 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 作为唯一的氮资源。对照组 (CK) 为未添加铁元素的培养体系。使用 RNA-seq 技术进行转录组学分析。napA、nirC、norV 和 nirB 是厌氧反硝化基因, nifJ 基因与铁氧还蛋白氧化还原酶有关。它们还参与铁代谢的调节。上述基因的表达水平通过上海美吉生物技术有限公司的原核转录组测序分析测定。

2 结果与讨论

2.1 纳米零价铁对脱氮的增强作用

2.1.1 不同纳米铁用量的影响

nZVI 具有更大的比表面积和更高的吸附性能和还原活性^[11]。在厌氧反硝化过程中, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 还原为 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 和 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ ^[12]。在没有 nZVI 的情况下, 克雷伯氏菌在 12 h 内完全消除了 $\text{NO}_3^- - \text{N}$, 而 100 nm nZVI 的存在加速了厌氧反硝化菌对 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的消除。不同纳米铁投加量对兼性厌氧反硝化的促进效果如图 1 所示。当用量为 200 mg/L 时, 100 nm nZVI 对克雷伯氏菌降解 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的影响明显。

如图 1(a)所示,4 h 内硝氮快速下降,转化为亚硝态氮及氨氮。可以看出加入 200 mg/L 的纳米铁可有效促进硝态氮降解,与单一克雷伯氏菌相比,nZVI 与细菌共存导致 NO_2^- -N 的积累量和 COD 的去除量增加。结果表明,高浓度的 nZVI 对厌氧反硝化有显著促进作用。反应 12 h 后,添加 200 mg/L 纳米铁, NO_3^- -N 去除率达 93.25%。此外,高剂量 nZVI 的增强效果无显著差异。nZVI 的用量太低,

不能提供足够的电子来还原 NO_3^- -N,也不能刺激细菌呼吸和促进酶的活性。图 1(b)、(c)为添加不同浓度纳米铁后亚硝酸盐与铵盐的变化。如图 1(d)、(e),厌氧反硝化过程中 COD、细胞生长和 OD_{600} 的变化与去除 NH_4^+ -N 过程相同。细菌在生长过程中,利用碳资源和 NH_4^+ -N 生物合成细胞内的有机物在副球菌细胞中添加 nZVI,当 nZVI 浓度为 50 mg/L 时,对 NO_3^- -N 的去除率达到 85.2%^[13]。

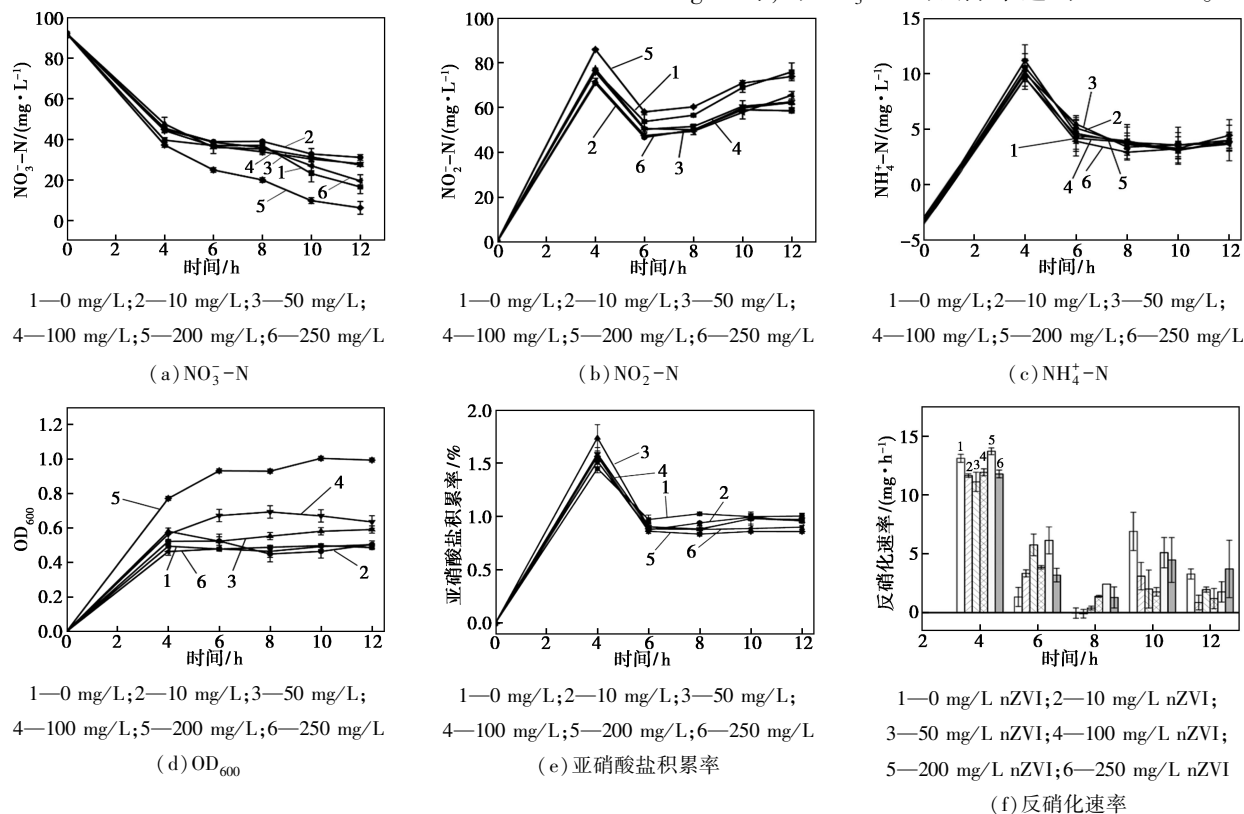
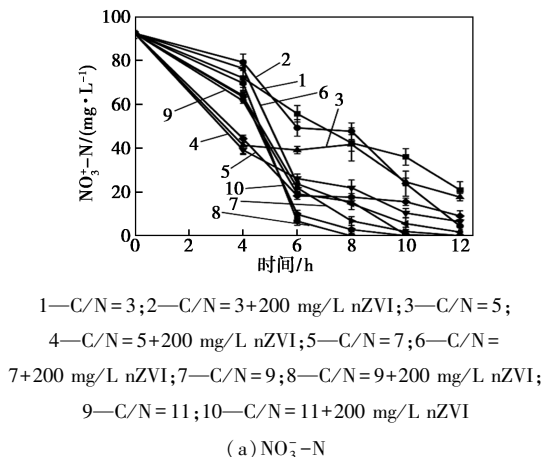


图 1 不同浓度纳米零价铁对 *Klebsiella sp.-LJB2* 的氮去除影响

2.1.2 C/N 的影响

高 C/N 比有利于厌氧反硝化,且 NO_3^- -N 去除率较高^[14](图 2)。A.Junii 是一种好氧反硝化细菌,当 C/N 比高时,它可以更有效地传输电子^[15]。当 C/N 过低时,nZVI 只能在有限范围内促进厌氧反硝化过程和反硝化速率。当碳源不足时, NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 都不能被充分利用。高 C/N 意味着细菌可以利用更多的碳资源,通过代谢产生更多的能量^[16]。当 C/N 为 3 时,培养 12 h,该菌株 *Klebsiella sp.-LJB2* 对 NO_3^- -N 的去除率仅为 60.82%,对 NO_3^- -N 的降解受到明显抑制。添加 nZVI 后,在 12 h 时 NO_3^- -N 去除率达到 95.80%,说明在低 C/N 条件下,nZVI 可以提高 *Klebsiella sp.-LJB2* 对 NO_3^- -N 的去除率。此外,最大 NO_3^- -N 积累量减少,说明在低 C/N 条件下,nZVI 加速了 NO_3^- -N 向 NO_2^- -N 的转

化,但对 NH_4^+ -N 的同化和硝化作用没有促进作用。碳是厌氧反硝化的电子供体。当碳源足够提供电子时,nZVI 可以取代碳作为电子供体的作用。当 C/N 增加到 5 时,nZVI 的增强效果与 C/N = 3 时相似。



(a) NO_3^- -N

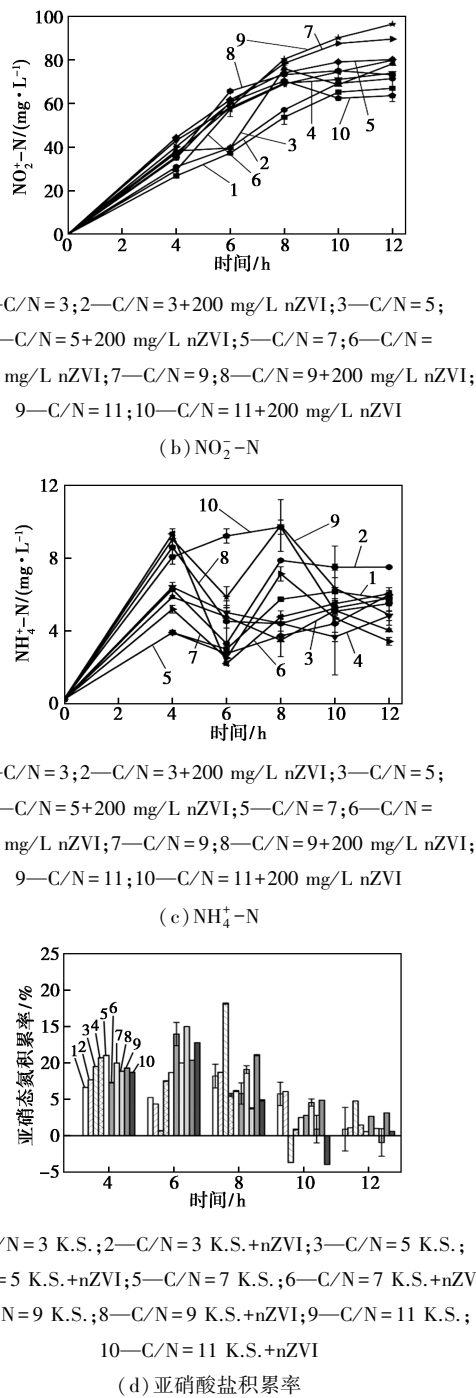


图 2 不同碳氮比下添加纳米零价铁对 *Klebsiella sp.-LJB2* 的氮去除影响

当 C/N 为 7, 9 和 11 时, 单个 *Klebsiella sp.-LJB2* 可以在 8~12 h 内完全转化 $\text{NO}_3^- \text{-N}$, 而在 nZVI 存在下, 完全去除 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的时间缩短至 8 h。

2.1.3 pH 的影响

pH 可以影响反硝化酶的活性, 改变细菌细胞的电荷, 从而影响反硝化细菌对营养物质的利用^[17]。pH 过高或过低都会抑制细菌生长^[18]。在低 pH 的条件下, 反硝化过程中有毒副产物的积累导致早期细

胞生长停滞^[18]。从图 3 可以看出, nZVI 对 *Klebsiella sp.-LJB2* 去除 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的效果显著。 *Klebsiella sp.-LJB2* 在 pH=7 和 9 的条件下, 对 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的去除效果也较好。在酸性或碱性条件下, 细菌的厌氧反硝化能力较低; 此外, nZVI 的增强作用非常有限。pH 为 10 时, nZVI 对 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的去除无促进作用, 且有轻微抑制作用。nZVI 不能修复这种抑制, 可能是由于细菌生长受到碱性环境的抑制。不同的反硝化细菌也得到了类似的结果。土壤反硝化细菌副球菌在

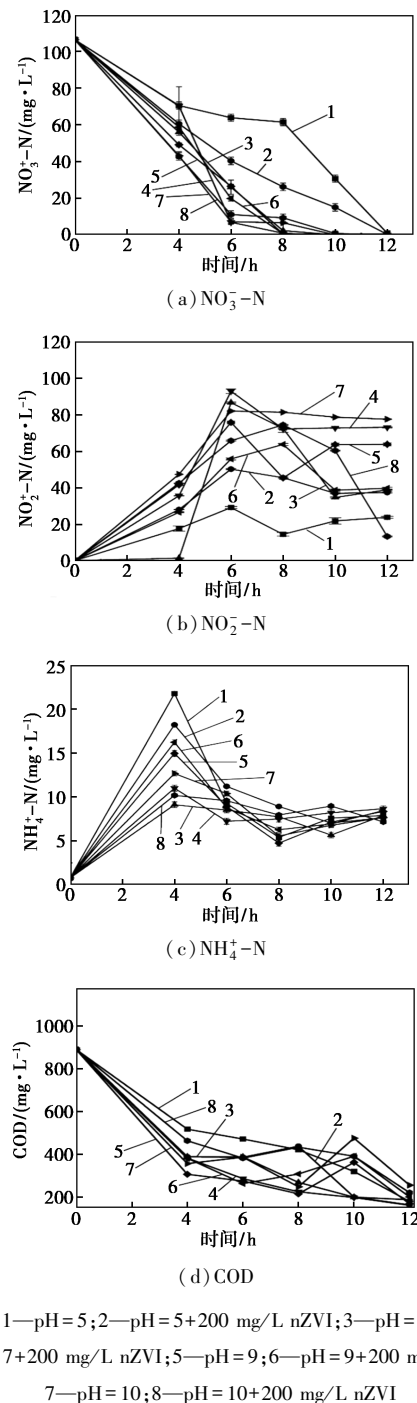


图 3 不同 pH 对厌氧反硝化菌的脱氮影响

pH=9.0 时可以还原 NO_3^- -N, 但在 pH=10 时则不能^[19]。在副球菌反硝化菌中, 酸性条件下参与 NO_3^- -N 降解和反硝化的辅助因子和酶活性的生物合成途径降低^[20]。在碱性条件下, nZVI 转化为 $\text{Fe}(\text{OH})_2$ 、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 和 FeCO_3 , 这些 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 和 FeCO_3 包裹在 nZVI 表面, 降低了其表面的活性位点, 从而降低了 NO_3^- -N 的去除效率^[21]。

2.2 细菌细胞的形态

采用扫描电镜 (SEM) 观察克雷伯氏菌及 100 mg/L、100 nm 的 nZVI 处理后的细菌, 可以看到两种不同的放大倍数下的细菌形态, 如图 4 所示, 根据放大 20 k 倍和 30 k 倍观察。显示了克雷伯氏菌的典型形态, 细菌呈杆状, 表面有明显的突起和附着物。细菌的两端略微圆润, 这是克雷伯氏菌的典型特征。图 4 中可以看出添加 nZVI 导致细胞破裂, 细胞壁的破损、内容物的外泄等现象。

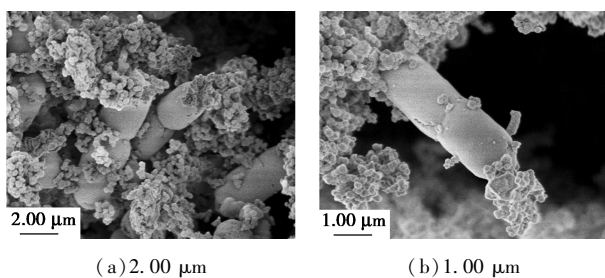


图 4 SEM 图

2.3 纳米铁颗粒溶解 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对兼性厌氧反硝化的影响

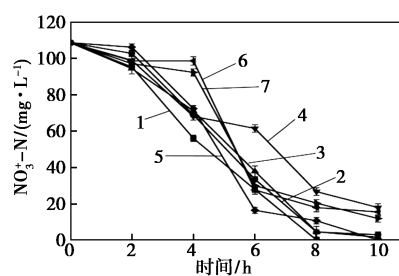
2.3.1 纳米铁颗粒溶解 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对兼性厌氧反硝化的影响

Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 可以促进厌氧反硝化^[22]。为评估 nZVI 溶解释放铁离子对厌氧反硝化过程的贡献机制, 本研究通过对 *Klebsiella sp.*-LJB2 外源补充不同浓度 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 替代 nZVI 的实验体系, 开展对比研究。如图 5(a)~(c) 所示, Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的剂量对 NO_3^- -N 的去除效能并不显著; 在最优浓度下, nZVI 的促进作用高于 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} , 这与二者还原电势的梯度差异相吻合。与对照组相比, 在特定时间段 Fe^{2+} 或 Fe^{3+} 的存在可增强 NO_3^- -N 的去除效率, 但 nZVI 对氮去除的强化效果更突出, 这是由于 nZVI 能比铁离子更快地去除 NO_3^- -N。当 Fe^{3+} 浓度超过 5 mg/L 时, 对 NO_3^- -N 的去除率产生抑制作用; 而在低铁离子浓度 (<5 mg/L) 下, 氮的去除率虽有提高, 但仍低于添加 nZVI 时的 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 的去除率水平。因此, nZVI 介导的厌氧反硝化强化主要通过直接的细胞内化机制发生, 而可溶性铁离子的产生是次要

的辅助途径。

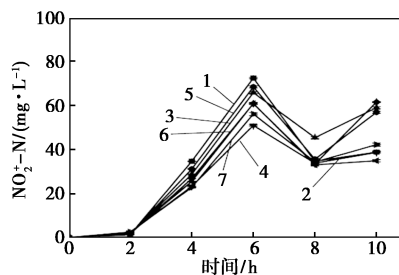
2.3.2 纳米颗粒对 ETSA 和呼吸的影响

ETSA 用于评估电子传递能力和微生物代谢活性^[23]。其变化趋势如图 5(d) 所示, 可以看出, ETSA 在 10 h 内呈连续波动状。无 nZVI 时, ETSA 波动幅度较小, 在 8 h 时降至 2.50 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 。



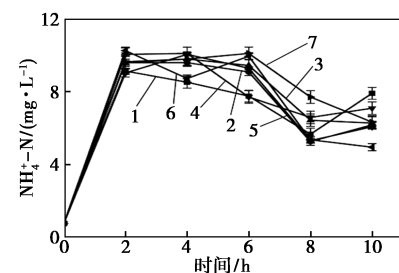
1—0 mg/L; 2—5 mg/L Fe^{2+} ; 3—10 mg/L Fe^{2+} ; 4—20 mg/L Fe^{2+} ; 5—5 mg/L Fe^{3+} ; 6—10 mg/L Fe^{3+} ; 7—20 mg/L Fe^{3+}

(a) NO_3^- -N



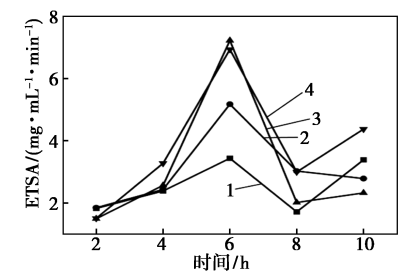
1—0 mg/L; 2—5 mg/L Fe^{2+} ; 3—10 mg/L Fe^{2+} ; 4—20 mg/L Fe^{2+} ; 5—5 mg/L Fe^{3+} ; 6—10 mg/L Fe^{3+} ; 7—20 mg/L Fe^{3+}

(b) NO_2^- -N



1—0 mg/L; 2—5 mg/L Fe^{2+} ; 3—10 mg/L Fe^{2+} ; 4—20 mg/L Fe^{2+} ; 5—5 mg/L Fe^{3+} ; 6—10 mg/L Fe^{3+} ; 7—20 mg/L Fe^{3+}

(c) NH_4^+ -N



1—0 mg/L; 2—5 mg/L Fe^{2+} ; 3—10 mg/L Fe^{2+} ; 4—20 mg/L Fe^{2+}

(d) ETSA

图 5 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对厌氧反硝化的影响

值得注意的是,在 6~8 h ETSA 整体处于相对高位;随后于 8 h 出现下降,之后逐渐回升。该 ETSA 变化模式恰好对应厌氧反硝化效率在此阶段的快速提升及其后的速率减缓。相比之下,nZVI 的存在显著促进了 NO_3^- -N 在 6~8 h 内的快速降解,并大幅提高了胞内电子传递效率。

ETSA 的最大值对应系统的最高脱氮效率,这与电子转移的增加密切相关^[24]。由于 NO_3^- -N 在没有 nZVI 的情况下被 *Klebsiella sp.*-LJB2 去除,6 h 后 ETSA 快速下降可能是由于介质中 NO_3^- -N 含量低,缺乏足够的电子传递底物,导致电子传递效率下降。总体而言,nZVI 显著提高了 ETSA,增强了电子传递能力,提高了厌氧反硝化效率。此外,铁离子对电子传递系统也有类似的影响。厌氧反硝化的电子传递链包含含铁反硝化酶(如硝酸还原酶)及复合物 I、III 等,其中血红素和 Fe-S 簇蛋白是关键活性位点^[22]。推测这是 nZVI 促进电子传递的原因之一。

2.4 纳米颗粒呼吸的影响与基因表达

2.4.1 纳米颗粒呼吸的影响

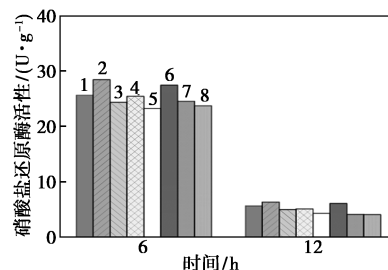
NADH 作为主要的电子供体,通过电子传递链将电子传递给好氧反硝化过程中的硝酸盐,实现 NO_3^- -N 的生物还原^[25]。图 6(c) 显示,NADH/NAD⁺ 比值随着培养时间的延长而增加,培养 12 h 时,与对照组相比,铁的存在使 NADH/NAD⁺ 显著增加。特别是添加 nZVI 后,该比值较单独培养的 *Klebsiella sp.*-LJB2 高 8.42 倍。有报道称 NADH 通常被用作生物还原的直接电子供体,然后通过电子传递链转化为 NAD⁺。在反硝化过程中,NADH 被氧化为 NAD⁺,同时 NAD⁺可在细胞利用碳源的代谢过程中被还原为 NADH。NADH 与 NAD⁺的相互转化对于维持氧化还原平衡至关重要^[26-27]。在本研究中,铁促进了 NAD⁺向 NADH 的转化,加速了反硝化过程,NADH/NAD⁺比值与 NO_3^- -N 去除率呈正相关^[27],这一结果也被前文所述的电子传递系统活性的增加所证实。

2.4.2 反硝化相关基因表达

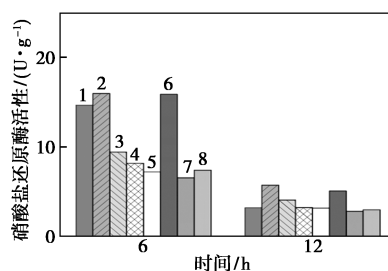
在生物脱氮过程中,每个还原过程都涉及特定的脱氮酶,对应于 NR ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$)、NIR ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$)、NOR ($\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$) 和 NOS ($\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)。如图 6 所示,低浓度的 Fe^{3+} 提高了 NAP 和 NIR 的活性,且随时间增加,底物浓度降低,酶活性整体水平也随之降低。图 6(d) 中,CK 为空白对照组,K1 为添加 nZVI 的处理组,可以看出添加纳米铁可以提高反硝化相关酶的活性。有报道称,铁离子可以刺激反硝

化细菌中 NAP 和 NIR 酶的活性^[22]。在这项研究中,nZVI 和铁离子促进了反硝化相关酶活性,表明铁加速了 NO_3^- -N 的转化。

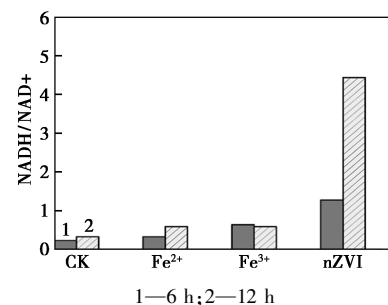
对应 2.3 节中加铁离子强化脱氮的结果一致:添加 nZVI 的组,氮去除率更高,且对应反硝化酶活



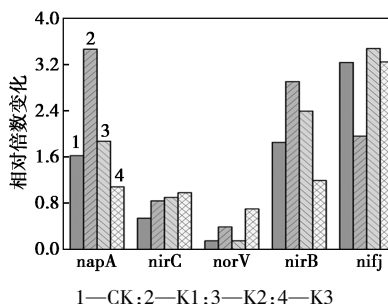
1—空白;2—200 mg/L nZVI;3—5 mg/L Fe^{2+} ;4—10 mg/L Fe^{2+} ;
5—20 mg/L Fe^{2+} ;6—5 mg/L Fe^{3+} ;7—10 mg/L Fe^{3+} ;
8—20 mg/L Fe^{3+}
(a) 硝酸盐还原酶活性



1—空白;2—200 mg/L nZVI;3—5 mg/L Fe^{2+} ;4—10 mg/L Fe^{2+} ;
5—20 mg/L Fe^{2+} ;6—5 mg/L Fe^{3+} ;7—10 mg/L Fe^{3+} ;
8—20 mg/L Fe^{3+}
(b) 亚硝酸盐还原酶活性



1—6 h;2—12 h
(c) NADH/NAD⁺还原氢辅酶/辅酶 I



1—CK;2—K1;3—K2;4—K3
(d) 基因相对数量

图 6 反硝化相关酶活与基因表达

性也相对更高;5 mg/L 的 Fe^{3+} 在 6 h 时硝氮降解速率达到最大值,对应图 6(a) 硝酸盐还原酶的活性相对较高。而在 12 h 时, NR 与 NIR 的活性整体下降,推测在反应周期末期,由于实验反应的底物浓度大大减少,导致相关酶活性整体下降。

2.4.3 基于转录组的差异基因表达

通过转录组测序结果分析 *Klebsiella sp.*-LJB2 菌株脱氮过程中的差异表达基因。在 K1 与 CK 的比较中,有 34 个基因显著上调,394 个基因显著下调,而 5119 个基因表达差异不明显。显著上调和下调的基因在火山图中分别位于右上角和左上角,表明这些基因在 K1 与 CK 之间的表达差异不仅显著,而且变化倍数较大。通过火山图可以快速识别出在 K1 与 CK 之间表达差异显著的基因,结果[使用 $(\log_2 FC) \leq -2.5$ 或 ≥ 2.5 作为筛选阈值]表明,59 个编码转录因子的基因转录发生了显著变化(9 个上调,50 个下调)如图 7。

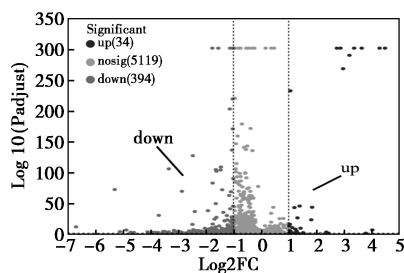


图 7 基于转录组的 K1、CK 差异基因表达

注:横坐标为基因在两组样本间表达差异的倍数变化值,即 FC 值。纵坐标为基因表达量变化差异的统计学检验值,即 p 值。 p 值越高则表达差异越显著,横纵坐标的数值都做了对数化处理。

3 结论

本研究揭示了 nZVI 强化克雷伯氏菌厌氧反硝化的多尺度作用机制。实验表明,nZVI 投加量显著影响脱氮效能,200 mg/L 条件下 NO_3^- -N 去除率最高,达 93.25%,且缩短完全脱氮时间至 8 h。nZVI 通过双重路径增强脱氮效率:一方面,其高比表面积与表面活性直接加速 NO_3^- -N 的化学还原;另一方面,通过提升 ETSA 及 NADH/NAD⁺ 比值(最高增加 8.42 倍),优化微生物代谢能量分配,促进反硝化酶(NAP、NIR)活性及关键基因(*napA*、*nirC*)表达。此外,转录组分析显示 nZVI 诱导 *niJ* 基因显著上调(铁吸收调控),同时抑制 *ntxB/ntxC*(氮代谢负调控因子),表明铁-氮代谢网络存在协同互作。

环境参数研究表明,中性 pH(7~9)与高 C/N

(≥ 7)条件下,nZVI 的强化效果最佳,而碱性环境(pH>9)因 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 钝化作用导致效能受限。对比可溶性 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$,nZVI 的强化作用更优,证实其细胞内化机制为主导路径。SEM 观察发现 nZVI 促进菌体表面附着物形成,但高浓度(100 mg/L)引发细胞破裂,需优化投加策略以平衡增效与生物毒性。

本研究为 nZVI-微生物耦合脱氮技术提供了理论支撑,其通过跨尺度调控(电子传递效率-反硝化酶活性-氮代谢基因表达)实现高效脱氮,在低碳工业废水处理中具显著应用潜力。未来需结合多组学与机器学习,进一步解析铁代谢网络动态,推动工艺精准调控与工程化应用。

参考文献

- [1] You G X, Wang C, Hou J, *et al.* Effects of zero valent iron on nitrate removal in anaerobic bioreactor with various carbon-to-nitrate ratios: Bio-electrochemical properties, energy regulation strategies and biological response mechanisms[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 419: 129646.
- [2] Zhou G X, Chen L, Zhang C, *et al.* Bacteria-virus interactions are more crucial in soil organic carbon storage than iron protection in biochar-amended paddy soils[J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(48): 19713-19722.
- [3] Zhang Q, Feng Z, Zhou J, *et al.* Roles of $\text{Fe}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{III})$ and Fe^0 in denitrification and anammox process: Mechanisms, advances and perspectives[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2023, 53: 1-13.
- [4] Chen H, Zhao X, Cheng Y, *et al.* Iron robustly stimulates simultaneous nitrification and denitrification under aerobic conditions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(3): 1404-1412.
- [5] Chen F, Li Z, Ye Y, *et al.* Coupled sulfur and electrode-driven autotrophic denitrification for significantly enhanced nitrate removal[J]. *Water Research*, 2022, 220: 118675.
- [6] Wang P, He Y, Zhou G. Iron-based mixotrophic denitrification for enhancing nitrate removal from municipal secondary effluent: Performance, microbial community dynamics, and economic feasibility[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 406: 130989.
- [7] Chen S, Zhou B, Chen H, *et al.* Iron mediated autotrophic denitrification for low C/N ratio wastewater: A review[J]. *Environmental Research*, 2023, 216: 114687.
- [8] Chi C. Nano-sized zerovalent iron particles production process for e. g. environmental remediation includes continuous mixing of the formed two aqueous solutions to precipitate nano-sized zerovalent iron particles: US 2007022839-A1[P]. 2007-02-01.
- [9] Kim I, Cha D K. Effect of low temperature on abiotic and biotic nitrate reduction by zero-valent Iron[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 754: 142410.
- [10] Zhao S, Su X, Wang Y, *et al.* Copper oxide nanoparticles inhibited denitrifying enzymes and electron transport system activities to influence soil denitrification and N_2O emission[J]. *Chemosphere*,

- 2020, 245: 125394.
- [11] Lin D, Hu L, Lo I M C, *et al.* Size distribution and phosphate removal capacity of nano zero-valent iron (nZVI): Influence of pH and ionic strength [J]. *Water*, 2020, 12(10): 2939.
- [12] Qian Y, Qiao W, Zhang Y. Toxic effect of sodium perfluoronyloxybenzenesulfonate on *Pseudomonas stutzeri* in aerobic denitrification, cell structure and gene expression [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2021, 15(5): 100.
- [13] Liu Y, Li S, Chen Z, *et al.* Influence of zero-valent iron nanoparticles on nitrate removal by *Paracoccus* sp [J]. *Chemosphere*, 2014, 108: 426–432.
- [14] Hu B, Quan J, Huang K, *et al.* Effects of C/N ratio and dissolved oxygen on aerobic denitrification process: A mathematical modeling study [J]. *Chemosphere*, 2021, 272: 129521.
- [15] Gu X, Leng J, Zhu J, *et al.* Influence mechanism of C/N ratio on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 343: 126116.
- [16] Yang J R, Wang Y, Chen H, *et al.* Ammonium removal characteristics of an acid-resistant bacterium *Acinetobacter* sp. JR1 from pharmaceutical wastewater capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 274: 56–64.
- [17] Liu X, Wei J, Wu Y, *et al.* Performances and mechanisms of microbial nitrate removal coupling sediment-based biochar and nanoscale zero-valent iron [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 345: 126523.
- [18] Ren Y X, Yang L, Liang X. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 171: 1–9.
- [19] Albina P, Durban N, Bertron A, *et al.* Adaptation of neutrophilic *paracoccus denitrificans* to denitrification at highly alkaline pH [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(17): 22112–22119.
- [20] Olaya-Abril A, Hidalgo-Carrillo J, Luque-Almagro V M, *et al.* Effect of pH on the denitrification proteome of the soil bacterium *Paracoccus denitrificans* PD1222 [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 17276.
- [21] Liu S, Han X, Li S, *et al.* Stimulating nitrate removal with significant conversion to nitrogen gas using biochar-based nanoscale zerovalent iron composites [J]. *Water*, 2022, 14(18): 2877.
- [22] Feng L, Yang J, Ma F, *et al.* Biological stimulation with Fe(III) promotes the growth and aerobic denitrification of *Pseudomonas stutzeri* T13 [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 776: 145939.
- [23] Deng Y, Xia J, Zhao R, *et al.* Modified biochar promotes the direct interspecies electron transfer between iron-reducing bacteria and methanogens in high organic loading co-digestion [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 126030.
- [24] Xu L, Su J, Ali A, *et al.* Magnetite-loaded rice husk biochar promoted the denitrification performance of *Aquabacterium* sp. XL4 under low carbon to nitrogen ratio: Optimization and mechanism [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 348: 126802.
- [25] Zhao J, Xie S, Luo Y, *et al.* NADH accumulation during DPAO denitrification in a simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal system [J]. *Environmental Science-Water Research & Technology*, 2021, 7(10): 1819–1827.
- [26] Su Y, Zheng X, Chen A, *et al.* Hydroxyl functionalization of single-walled carbon nanotubes causes inhibition to the bacterial denitrification process [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 279: 47–55.
- [27] Wan R, Chen Y, Zheng X, *et al.* Effect of CO₂ on NADH production of denitrifying microbes via inhibiting carbon source transport and its metabolism [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 627: 896–904. ■
-
- (上接第 119 页)
- [17] Sarma C, Chaurasia P K, Bharati S L. Versatile catalytic applications of manganese(II, III) Schiff base complexes (review) [J]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2019, 89(3): 517–531.
- [18] Mondal K, Mistri S. Schiff base based metal complexes: A review of their catalytic activity on aldol and Henry reaction [J]. *Comments on Inorganic Chemistry*, 2023, 43(2): 77–105.
- [19] 贾士芳, 郝秀丽, 温艳珍, 等. 含有席夫碱配体的钕配合物的合成、表征及抗肿瘤活性 [J]. *无机化学学报*, 2022, 38(10): 1919–1926.
- [20] Naya L, Vázquez-García D, Fernández A, *et al.* Novel palladacycle *N*-heterocyclic carbene complexes with bidentate [C, N] and terdentate [C, N, N] and [C, N, O] Schiff bases. Synthesis, characterization and crystal structure analysis [J]. *Journal of Organometallic Chemistry*, 2014, 772/773: 192–201.
- [21] Sau S C, Santra S, Sen T K, *et al.* Abnormal *N*-heterocyclic carbene palladium complex: Living catalyst for activation of aryl chlorides in Suzuki-Miyaura cross coupling [J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(4): 555–557.
- [22] Yang H, Wang Y, Qin Y, *et al.* One-pot preparation of magnetic *N*-heterocyclic carbene-functionalized silica nanoparticles for the Suzuki-Miyaura coupling of aryl chlorides: Improved activity and facile catalyst recovery [J]. *Green Chemistry*, 2011, 13(5): 1352.
- [23] 李瑞, 白雪峰. 钯(II)/双齿席夫碱配合物催化 Suzuki 偶联反应的研究 [J]. *化学与黏合*, 2017, 39(6): 405–407, 414.
- [24] 张雷, 杨晨, 郭雪峰, 等. Suzuki-Miyaura 偶联反应机理研究进展 [J]. *有机化学*, 2021, 41(9): 3492–3510.
- [25] Littke A F, Dai C, Fu G C. Versatile catalysts for the Suzuki cross-coupling of arylboronic acids with aryl and vinyl halides and triflates under mild conditions [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(17): 4020–4028.
- [26] 韩悦, 刘思乐, 陆姗姗, 等. 有机膦配体银金属配合物的合成及催化 Suzuki-Miyaura 交叉偶联反应探究 [J]. *化工科技*, 2025: 1–12.
- [27] Poulain A, Iglesias M, Albrecht M. Abnormal NHC palladium complexes: Synthesis, structure, and reactivity [J]. *Current Organic Chemistry*, 2011, 15(18): 3325–3336.
- [28] Wen X, Xie W, Li Y, *et al.* Room temperature anhydrous Suzuki-Miyaura polymerization enabled by C–S bond activation [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(40): e202309922. ■