

• 研究报告 •

双陈冬 博士，南京大学环境学院副教授，长期围绕废水深度处理需求，进行环境功能材料研发和应用研究。以第一/通讯作者发表SCI论文25篇，获授权国家发明专利49项，授权美国专利10项。研发的新型磁性树脂达国际领先水平，目前已实现工业化生产和规模化应用。获中国专利优秀奖、2016年度国家科技进步奖二等奖和2018年度环境保护科学技术奖一等奖；被评为江苏省“六大人才高峰”高层次人才和江苏省知识产权骨干人才。



Fe₃O₄对施氏假单胞菌反硝化过程的影响

徐珊珊，周金登，双陈冬，周庆，李爱民

南京大学 环境学院 污染控制与资源化研究国家重点实验室，江苏 南京 210023

徐珊珊，周金登，双陈冬，等. Fe₃O₄对施氏假单胞菌反硝化过程的影响. 生物工程学报, 2021, 37(10): 3685-3695.

Xu SS, Zhou JD, Shuang CD, et al. Effects of Fe₃O₄ on the denitrification performance of *Pseudomonas stutzeri*. Chin J Biotech, 2021, 37(10): 3685-3695.

摘要: 生物反硝化是目前废水深度处理中应用最为广泛的硝酸盐氮处理技术，但该方法一般停留时间较长，在冬季因低温处理效果欠佳，因此有必要开发反硝化强化技术。以施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* 为研究对象，考察了不同投加量下 Fe₃O₄对 *P. stutzeri* 反硝化过程的影响。结果显示当 Fe₃O₄投加量由 0 mg/L 增至 4 000 mg/L 时，硝酸盐氮最大比降解速率由 18.0 h⁻¹ 增加至 23.7 h⁻¹，体系中的总蛋白含量以及细菌体内的铁含量显著增加。RT-qPCR 和非标记 (Label-free) 定量蛋白组学分析表明，投加 4 000 mg/L Fe₃O₄体系中的 *P. stutzeri*，其反硝化功能基因 *napA*、*narJ*、*nirB*、*norR*、*nosZ* 表达量分别提高了 55.7%、24.9%、24.5%、36.5%、120%，对应反硝化还原酶 Nap、Nar、Nir、Nor、Nos 表达量提高了 85.0%、147%、16.5%、47.1%、95.9%。对比体系中“游离细菌”和“Fe₃O₄粘附细菌”，发现二者的反硝化功能基因以及反硝化相关酶没有显著差别；而 Fe₃O₄粘附细菌电子传递相关蛋白表达量有所提高，说明了 Fe₃O₄通过与细菌直接接触促进其生长代谢，导致体系中细菌总量的增加，从而提高反硝化速率。该结果可为反硝化强化技术的开发提供理论支撑。

关键词: 施氏假单胞菌，Fe₃O₄，反硝化脱氮，铁运载，非标记蛋白组学

Received: June 4, 2021; **Accepted:** September 2, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 51678289), Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20181253), Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (No. 0211 14380169).

Corresponding author: Chendong Shuang. Tel/Fax: +86-25-89681669; E-mail: shuangchendong@nju.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 51678289), 江苏省自然科学基金 (No. BK20181253), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. 0211 14380169) 资助。

网络出版时间: 2021-09-09

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210908.1832.002.html>

Effects of Fe₃O₄ on the denitrification performance of *Pseudomonas stutzeri*

Shanshan Xu, Jindeng Zhou, Chendong Shuang, Qing Zhou, and Aimin Li

State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, Jiangsu, China

Abstract: Biological denitrification is the most widely used technology for nitrate removal in wastewater treatment. Conventional denitrification requires long hydraulic retention time, and the nitrate removal efficiency in winter is low due to the low temperature. Therefore, it is expected to develop new approaches to enhance the denitrification process. In this paper, the effect of adding different concentrations of Fe₃O₄ nanoparticles on the denitrification catalyzed by *Pseudomonas stutzeri* was investigated. The maximum specific degradation rate of nitrate nitrogen improved from 18.0 h⁻¹ to 23.7 h⁻¹ when the concentration of Fe₃O₄ increased from 0 mg/L to 4 000 mg/L. Total proteins and intracellular iron content also increased along with increasing the concentration of Fe₃O₄. RT-qPCR and label-free proteomics analyses showed that the relative expression level of denitrifying genes *napA*, *narJ*, *nirB*, *norR*, *nosZ* of *P. stutzeri* increased by 55.7%, 24.9%, 24.5%, 36.5%, 120% upon addition of Fe₃O₄, and that of denitrifying reductase Nap, Nar, Nir, Nor, Nos increased by 85.0%, 147%, 16.5%, 47.1%, 95.9%, respectively. No significant difference was observed on the relative expression level of denitrifying genes and denitrifying reductases between the bacteria suspended and the bacteria adhered to Fe₃O₄. Interestingly, the relative expression level of electron transfer proteins of bacteria adhered to Fe₃O₄ was higher than that of the bacteria suspended. The results indicated that Fe₃O₄ promoted cell growth and metabolism through direct contact with bacteria, thereby improving the denitrification. These findings may provide theoretical support for the development of enhanced denitrification.

Keywords: *Pseudomonas stutzeri*, Fe₃O₄, denitrification, iron transport, label-free proteomics

随着工业化进程加快,水污染问题日趋严重。水环境中过量的硝酸盐会对人体健康和生态环境造成危害^[1]。许多国家和机构组织都规定了水中硝酸盐氮的限值,如世界卫生组织(World Health Organization, WHO)规定饮用水中硝酸盐浓度限值为 50 mg-NO₃⁻/L^[2],我国为 10 mg-N/L^[3],此外《城镇污水处理厂污染物排放标准(GB18918-2002)》^[4]中一级 A 标准要求总氮(Total nitrogen, TN)浓度不超过 15 mg/L。

在废水处理中,生物反硝化是目前广泛应用的硝酸盐去除工艺^[5],它是指在缺氧的环境下,反硝化菌以 NO₃⁻-N 为末端电子受体,将其还原为 N₂ 的过程。然而,反硝化需要的停留时间长,易受温度、碳源、pH 等外界因素影响^[6]。报道显示,我国北方污水处理厂在冬季反硝化效果不佳,导致出水总氮很难达标^[7-8]。因此有必要开发反硝化强化技术,以提高反硝化速率,保障出水稳定

达标。

铁是微生物生长必需的微量元素^[9],铁元素不同价态间的氧化还原过程,对环境其他污染物的降解^[10-11]、微生物的生长代谢过程^[12-13]都有重要的作用。研究表明,铁氧化物能够作为胞外呼吸的终端电子受体/供体、电子储存介质或是种间电子传递介体促进微生物代谢过程^[14-16]。在反硝化研究中,Zhang 等^[17]发现针铁矿 α-FeOOH、纤铁矿 γ-FeOOH、赤铁矿 α-Fe₂O₃ 和磁铁矿 γ-Fe₂O₃ 能够作为电子介体促进芽孢杆菌 *Bacillus* sp. 的反硝化过程。Ni 等^[18]发现,当活性污泥长期暴露于 50 mg/L 的 Fe₃O₄ 纳米颗粒后,总氮去除率由 80.3% 提高到 94.4%,反硝化酶 Nor、Nar、Nir 活性分别提高了 12%、23%、27%。乔楠等^[19]将好氧反硝化菌负载于 Fe₃O₄ 纳米颗粒上,发现细菌对总氮、总磷(Total phosphorus, TP)、化学需氧量(Chemical oxygen demand, COD) 的去除

率随着 Fe_3O_4 用量的增加而提高。

目前, Fe_3O_4 对反硝化微生物的影响及其作用机制的研究较少。本研究采用向反硝化体系中投加 Fe_3O_4 纳米颗粒的方式考察其对施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* 反硝化过程的影响, 旨在从反硝化动力学过程、微生物生长代谢水平、反硝化酶与功能基因的表达等角度, 探讨 Fe_3O_4 对 *P. stutzeri* 反硝化过程的影响机制, 为反硝化强化技术的开发提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的施氏假单胞菌 ATCC17588 冻干粉购自中国普通微生物菌种保藏管理中心; 纳米 Fe_3O_4 (20 nm)、石墨粉 (8 000 目) 均购自上海麦克林生化科技有限公司; 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.2 培养基

LB 肉汤培养基: 购自青岛海博生物技术有限公司, 作为活化培养基, 121 °C 高压灭菌 15 min。

反硝化培养基 (g/L): CH_3COONa 3.086、 KNO_3 0.619、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 4.78、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2、 KH_2PO_4 1.24 和 1 mL 微量元素溶液。

微量元素溶液 (g/L): $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.03、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.00、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.50、 ZnCl_2 0.05、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.61 和 H_3BO_3 2.86。

所用试剂均为分析纯, 除 KNO_3 、 ZnCl_2 、 H_3BO_3 购自国药集团化学试剂有限公司; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 购自西陇科学股份有限公司; 其余均购自南京化学试剂有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种的活化

于 250 mL 锥形瓶中加入 100 mL LB 肉汤, 接种菌株, 置于 37 °C、200 r/min 的数显振荡培养箱中恒温振荡培养, 取培养 10 h 后 ($OD_{600}=0.8$) 的菌液进行反硝化实验。

1.3.2 反硝化实验

取 1 mL 上述培养好的菌液接种至 100 mL 无菌反硝化培养基中, 进行 *P. stutzeri* 生物反硝化实验。

为考察无机颗粒物对 *P. stutzeri* 反硝化的影响, 在以下体系中开展实验: 4 000 mg/L Fe_3O_4 +*P. stutzeri*; 4 000 mg/L 石墨粉+*P. stutzeri*; *P. stutzeri* (Control)。为进一步研究 Fe_3O_4 对 *P. stutzeri* 的影响, 向反硝化体系中分别加入 500 mg/L、1 000 mg/L、2 000 mg/L、4 000 mg/L、6 000 mg/L Fe_3O_4 。

1.3.3 游离细菌与粘附细菌的电镜表征

用磁铁将 Fe_3O_4 吸附于锥形瓶底部, 将上清液离心, 得到游离细菌 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-S}$), 将底部的 Fe_3O_4 与细菌混合物用 PBS 反复清洗, 得到粘附细菌 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-A}$)。用 2.5% 戊二醛对菌体进行固定化, 4 h 后离心, 用 PBS 清洗 3 遍, 去上清。用 30%、50%、70%、80%、90% 的梯度乙醇溶液对菌体脱水, 每次 15 min, 之后在 100% 乙醇中脱水 2 次, 离心, 去上清后置于 1:1 乙醇和叔丁醇混合液中 15 min, 去上清, 用纯叔丁醇置换 2 次, 每次 15 min。最后将细菌悬浮液滴在盖玻片上, 置于 -80 °C 冰箱冷冻后放入冷冻干燥机中, 样品充分干燥后在电镜下观察。

1.3.4 总蛋白质含量测定

蛋白质含量采用二喹啉甲酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 法微量蛋白质浓度试剂盒测定。取一定体积的菌液, 利用超声破碎仪在冰水浴中进行细胞破碎 (功率 400 W, 破碎 1.0 s 停 1.0 s, 15 min)。破碎后 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 经 0.22 μm 的滤膜过滤后用于溶液体系总蛋白量的测定。

1.3.5 反硝化功能基因和反硝化还原酶表达

将上述不同体系反硝化 12 h 后的细菌混合液置于高速离心机中, 0 °C、8 000 r/min 离心 15 min, 倒去上清液, 用 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 清洗 3 次, 重复离心后将沉淀物置于 -80 °C 冰箱中保

存,利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 测定功能基因的相对表达量,利用非标记 (Label-free) 定量蛋白组学分析酶的相对表达量。

RT-qPCR 反应在 ABI7300 型荧光定量 PCR 仪上进行,设 3 次重复实验,目的基因及引物如表 1 所示,反应体系 20 μL ,包括 2 \times Taq Plus Master Mix 10 μL 、Primer F (5 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL 、Primer R (5 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL 、cDNA 1 μL 、ddH₂O 7.4 μL 。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 退火 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量, $-\Delta\Delta C_t$ 可根据以下公式计算:

$$\Delta C_t = C_t (\text{目标基因}) - C_t (\text{内参基因, 16S rRNA})。$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{实验组}) - \Delta C_t (\text{对照组})。$$

Label-free 测定流程如下: 从样品中提取蛋白,用 BCA 法定量蛋白质浓度; 蛋白质经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析并评价样品质量是否符合后续实验要求; 对质量达标的蛋白样品进行还原烷基化处理,每个样品取等量蛋白用胰蛋白酶 (Trypsin) 酶解,对已酶解的肽段进行定量; 取等量样本进行 LC-MS 分析。

1.4 分析方法

乙酸根、亚硝酸根、硝酸根的测定选用标准 HJ/T 84-2001 离子色谱法^[20] (ICS-1100 离子色谱仪,

赛默飞,美国)。OD₆₀₀ 通过酶标仪 (Multiskan FC, 赛默飞,美国) 测定。溶液中的 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 根据 HJ/T 345-2007 邻菲罗啉比色法测定^[21]。将干细胞硝化后用电感离子耦合等离子体原子发射光谱仪 (ICP-OES) 测定细胞内铁含量。

使用 Uniprot 数据库,通过软件 Proteome Discover 2.2 进行搜库和蛋白质鉴定,计算一级质谱相关的肽段峰面积,再对样品中每个肽段的谱图积分,进行定量。通过软件 InterProScan 进行 GO 功能注释,通过 KEGG 对蛋白质进行通路分析。使用 SAS 8.0 软件进行单因素方差分析及 Pearson 相关性分析。

2 结果与分析

2.1 Fe₃O₄ 对反硝化过程的影响

从图 1 可以看出,向 *P. stutzeri* 反硝化体系中分别投加 Fe₃O₄ 和石墨后,体系中硝酸盐氮、乙酸盐以及 OD₆₀₀ 都呈现出前期变化缓慢后期快速的趋势。在实验前期,乙酸盐和硝酸盐浓度均无明显降低,微生物生长迟缓。从 8 h 开始,微生物进入快速生长阶段,乙酸盐被快速降解,硝酸盐氮明显降低,12 h 时 Fe₃O₄ 体系中硝酸盐氮被彻底还原,16 h 时对照组硝酸盐氮被完全去除,而石墨体系中仍残余 20 mg/L 硝酸盐氮。

表 1 目的基因及扩增引物

Table 1 Target genes and primers

Target genes	Primers	Sequences (5'-3')
<i>napA</i>	napA-F	GCGTCGCCTTCTATGTCTCCG
	napA-R	GCCTCGCCTTGGCTTCTTC
<i>narJ</i>	narJ-F	ATCCCGCTTTACCTCGAATACC
	narJ-R	AAGTTGACCTGTTCTCCTCCTCC
<i>nirB</i>	nirB-F	GTTCTACCGTCACTCCGCTCAC
	nirB-R	CCGTGGCTGCTGTAGTAGTCG
<i>norR</i>	norR-F	TCGTTTCGACGCTGCCAATG
	norR-R	TGCCCGTCACGCACGCTTT
<i>nosZ</i>	nosZ-F	CAACGCCGAGTTCATCATCC
	nosZ-R	TCTCCGAGTTGTAGCAGGTGG
16S rRNA	16S RNA1F	GCGCGTAGGTGGTTCGTTAA
Loading control	16S RNA1R	AAATTCCACCACCTCTGCC

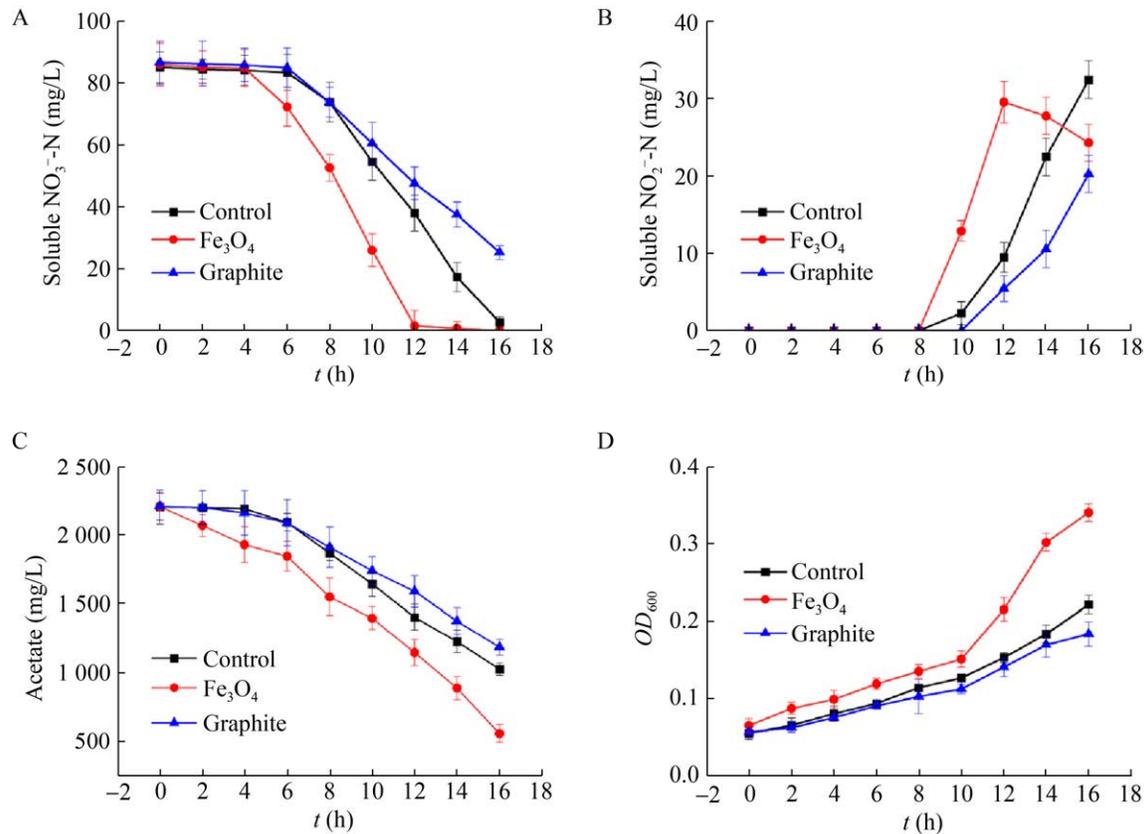


图 1 不同无机物对反硝化过程的影响

Fig. 1 Effects of different inorganic substances on denitrification. (A) NO₃⁻-N reduction. (B) NO₂⁻-N reduction. (C) Acetate degradation. (D) Cell growth of *P. stutzeri*.

对比 3 个体系可以发现, Fe₃O₄ 对反硝化起促进作用, 石墨起抑制作用。选用单一底物限制的 Monod 模型^[22]来描述 6 h 后 *P. stutzeri* 反硝化动力学, 3 个体系拟合结果 R^2 均大于 0.9, 硝酸盐氮最大比降解速率 $V_{\max-\text{Fe}_3\text{O}_4}$ ($=23.7 \text{ h}^{-1}$) $> V_{\max-\text{control}}$ ($=18.0 \text{ h}^{-1}$) $> V_{\max-\text{graphite}}$ ($=17.1 \text{ h}^{-1}$)。由于石墨与 Fe₃O₄ 均可作为导体促进微生物胞外电子传递^[23], 说明胞外电子传递并不是 Fe₃O₄ 促进反硝化的主要机制。

进一步考察了 Fe₃O₄ 投加量对反硝化过程的影响。从图 2 可以看出随着 Fe₃O₄ 投加量的增加, OD₆₀₀ 增加, *P. stutzeri* 的生长速率提高, 同时硝酸盐氮的还原速率也显著提高, 通过 Monod 方程拟合计算出最大比降解速率, 发

现当 Fe₃O₄ 投加量分别为 500 mg/L、1 000 mg/L、2 000 mg/L、4 000 mg/L、6 000 mg/L 时, 硝酸盐氮最大比降解速率分别为 19.4 h^{-1} 、 19.6 h^{-1} 、 21.5 h^{-1} 、 23.7 h^{-1} 、 24.0 h^{-1} , 表明 Fe₃O₄ 对 *P. stutzeri* 反硝化过程的促进作用随着投加量的增加而加强。

2.2 Fe₃O₄ 强化反硝化机制的研究

近年来的研究发现, 微生物与含铁矿物之间存在着多种相互作用机制。铁氧化物在中性水环境中多为不可溶矿物, 难以穿透微生物的细胞质膜进入到胞内。因此, 微生物会通过直接或间接方式利用胞外的矿物进行呼吸作用^[24]。为了探究 *P. stutzeri* 对 Fe₃O₄ 的利用机制, 测定了不同体系中的 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 浓度。

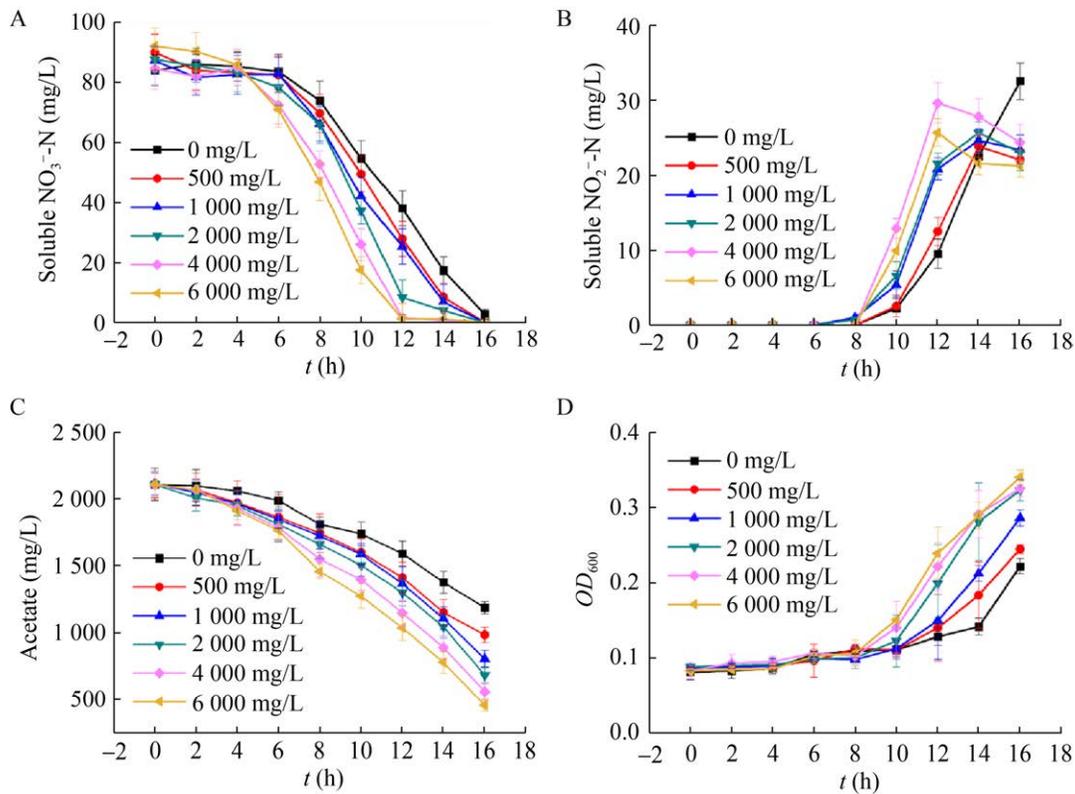


图2 不同 Fe_3O_4 投加量对反硝化过程的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of Fe_3O_4 on denitrification. (A) NO_3^- -N reduction. (B) NO_2^- -N reduction. (C) Acetate degradation. (D) Cell growth of *P. stutzeri*.

所有体系中均未检测出 Fe^{3+} , 图3反映了体系中 Fe^{2+} 浓度变化, 可以看出, 反硝化培养基中投加 Fe_3O_4 后, 在未接种细菌的体系中, Fe^{2+} 浓度没有变化, 说明体系中的 Fe_3O_4 没有溶出。而在接种 *P. stutzeri* 后, 无论有无 Fe_3O_4 的存在, Fe^{2+} 浓度均明显降低, 说明 *P. stutzeri* 可以利用 Fe^{2+} 。通过对溶液中 Fe^{2+} 浓度的变化计算, 发现在无 Fe_3O_4 生物体系中 *P. stutzeri* 摄取的 Fe^{2+} 总量 (4.355 μg) 与有 Fe_3O_4 体系中的摄取量 (4.358 μg) 几乎相同。

另一方面, 对细胞内铁含量进行分析, 从图4可以看出, 随着 Fe_3O_4 投加量增加至 4000 mg/L, 细胞内铁含量由 0.427 mg/g 增加至 0.864 mg/g。而 *P. stutzeri* 从溶液中 Fe^{2+} 的摄取量几乎相等, 说明 *P. stutzeri* 可以直接将 Fe_3O_4 中的铁元素运载到细胞内进行生长代谢, 而不需要将 Fe_3O_4 转化为

溶解态的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 再利用。有研究表明, 一些微生物可以分泌铁载体 (Siderophore) 将矿物晶格中的铁离子转化为可溶性的含铁络合物, 然后进入胞内参与代谢过程^[25]。

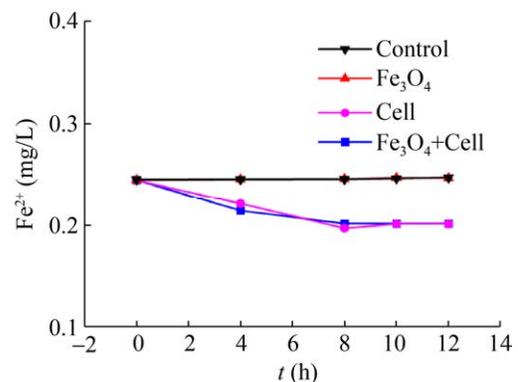


图3 不同反硝化体系中的亚铁浓度

Fig. 3 Concentration of Fe^{2+} in different denitrification systems.

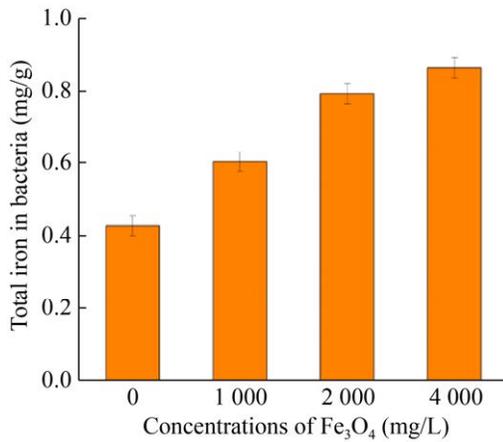


图4 不同 Fe₃O₄ 投加量下生物细胞内铁含量
Fig. 4 Intracellular iron content under different concentrations of Fe₃O₄.

2.3 Fe₃O₄对反硝化功能基因、蛋白表达的影响

2.3.1 有/无 Fe₃O₄ 体系

P. stutzeri 具备完整的氮代谢通路,反硝化过程涉及多种酶和多种中间产物,4种反硝化还原酶包括硝酸盐还原酶(Nap或Nar)、亚硝酸盐还原酶(Nir)、一氧化氮还原酶(Nor)、一氧化二氮还原酶(Nos),对应的编码基因分别是 *napA*、*narJ*、*nirB*、*norR* 和 *nosZ*^[26]。

从图5可以发现,投加 Fe₃O₄后, *P. stutzeri*

反硝化功能基因 *napA*、*narJ*、*nirB*、*norR*、*nosZ* 表达量分别提高了 55.7%、24.9%、24.5%、36.5%、120%,对应的反硝化还原酶 Nap、Nar、Nir、Nor、Nos 表达量提高了 85.0%、147%、16.5%、47.1%、95.9% ($P < 0.05$)。这说明 Fe₃O₄ 的存在可以提高 *P. stutzeri* 反硝化还原酶的表达,有效促进硝酸盐还原以及一氧化二氮还原为氮气的末端反应。

2.3.2 Fe₃O₄体系中的游离细菌与粘附细菌

有研究发现纳米颗粒可以很容易地附着到细胞表面,对微生物的代谢活动造成影响^[27]。对 Fe₃O₄反硝化体系上清液中的游离细菌(Fe₃O₄_S)与 Fe₃O₄粘附细菌(Fe₃O₄_A)进行扫描电镜表征,图6A中游离细菌表面无明显颗粒态物质存在,图6B中细菌周围布满 Fe₃O₄,这表明在反硝化过程有一部分细菌可与 Fe₃O₄进行直接粘附。

将实验鉴定到的蛋白按粘附细菌和游离细菌分组,探究 Fe₃O₄对细菌蛋白的差异影响。共鉴定出 2 530种差异蛋白,差异倍数(Fold change)大于 2.0倍的差异蛋白为 99种,以游离细菌为参照,粘附细菌表达上调的差异蛋白有 67种,表达下调的有 32种,这说明 Fe₃O₄调控了 *P. stutzeri*的蛋白表达。表2列出了差异倍数前5位的差异上调蛋白和下调蛋白,GO注释表明上调蛋白主

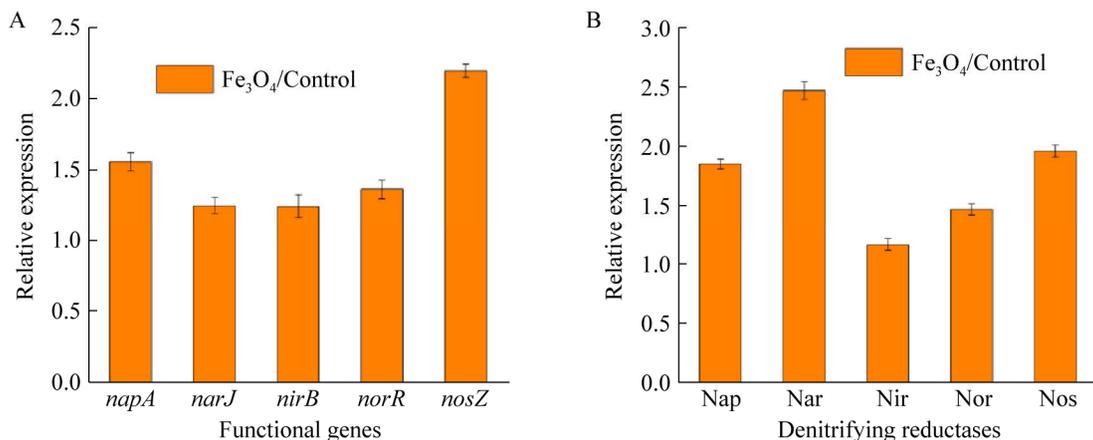


图5 有/无 Fe₃O₄体系中反硝化功能基因和酶的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of denitrifying genes and reductases (Fe₃O₄/Control). (A) Denitrifying genes. (B) Denitrifying reductases.

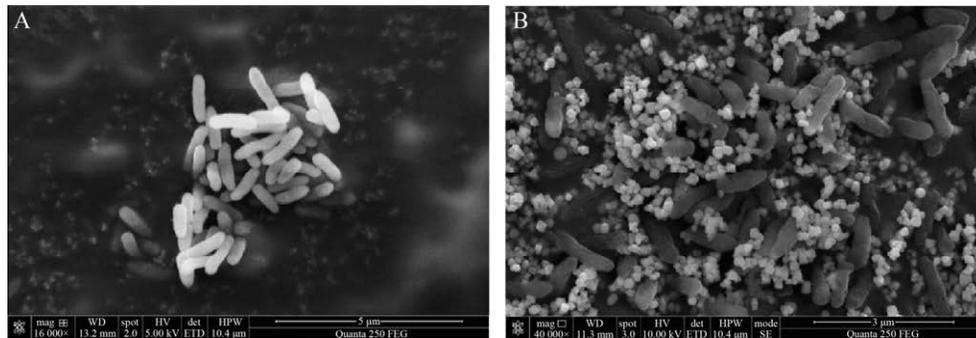


图 6 Fe_3O_4 体系中游离细菌和粘附细菌扫描电镜

Fig. 6 SEM of bacteria surface. (A) Bacteria suspended. (B) Bacteria adhered to Fe_3O_4 .

表 2 差异倍数前 5 位的上调蛋白和下调蛋白

Table 2 Top 5 up-regulated proteins and down-regulated proteins

Proteins	GO description (biological process)	KEGG description	Fold change
Up-regulated protein			
Maltokinase	Carbohydrate metabolic process	Starch and sucrose metabolism, metabolic pathways	70.9
30S ribosomal protein S17	Translation	Small subunit ribosomal protein	7.6
ABC transporter substrate-binding protein	–	Simple sugar transport system substrate-binding protein	7.5
BMP family ABC transporter substrate-binding protein	–	Simple sugar transport system substrate-binding protein	6.2
Membrane protein	–	Periplasmic iron binding protein	5.9
Down-regulated protein			
Nicotinate phosphoribosyltransferase	–	Nicotinate and nicotinamide metabolism	0.2
3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase CysQ	Phosphatidylinositol phosphorylation	Sulfur metabolism	0.2
3-isopropylmalate dehydratase small subunit	Metabolic process	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	0.3
Acyl-CoA dehydrogenase	Oxidation-reduction process	–	0.3
50S ribosomal protein L35	Translation	Large subunit ribosomal protein	0.3

要涉及的生物学过程包括碳水化合物代谢和翻译, KEGG 注释表明差异上调蛋白主要调控淀粉和蔗糖代谢、单糖转运系统底物结合蛋白和周质铁结合蛋白。由此可以发现, 与 Fe_3O_4 的直接接触促进了 *P. stutzeri* 对碳源的代谢过程、蛋白质的生物合成以及对铁的吸收转运过程。差异下调蛋白则主要涉及磷脂酰肌醇磷酸化、代谢过程、氧化-还原过程和翻译, 调控的 KEGG 通路包括烟酸和烟酰胺代谢、硫代谢以及缬氨酸、亮氨酸和异

亮氨酸的生物合成。

图 7 反映了 Fe_3O_4 体系中粘附细菌与游离细菌反硝化功能基因、反硝化还原酶的变化, 可以看出反硝化基因和酶的相对表达量均在 1.0 左右, 在游离细菌与粘附细菌中的表达量没有明显差别。

P. stutzeri 反硝化电子传递链包括 NADH、FAD、Fe-S 中心、泛醌、Cu 中心以及细胞色素 *a*、*b*、*c*^[28], 其中大量的蛋白 (如细胞色素 *c*) 都含有

铁活性中心^[29]。从图 8 可以发现,相较于游离细菌,粘附细菌的电子传递蛋白均有不同程度的提高,NADH 脱氢酶、FAD、细胞色素 *c* 的相对表达量分别是游离细菌的 2.02 倍、1.76 倍、3.30 倍。

测定了有/无 Fe_3O_4 体系中总蛋白浓度的变化,发现在添加 Fe_3O_4 后,蛋白浓度由 195 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加至 252 $\mu\text{g}/\text{mL}$,进一步测定了 Fe_3O_4 体系中游

离细菌和粘附细菌的蛋白浓度,发现游离细菌的蛋白浓度 (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 高于粘附细菌 (219 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。结合基因、酶以及蛋白的变化可以发现,与 Fe_3O_4 的直接接触提高了电子传递蛋白的表达,促进了粘附细菌的生长代谢,使得整个体系中的细菌数目增加(结合前文图 2D),反硝化速率因此得到提高。

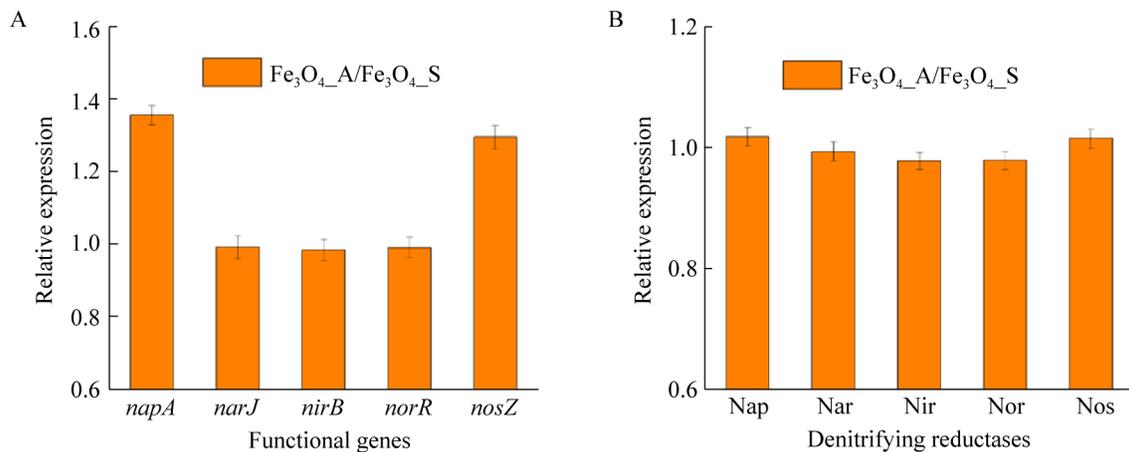


图 7 粘附细菌与游离细菌的反硝化功能基因和酶的相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of denitrifying genes and reductases (Fe_3O_4 _A/ Fe_3O_4 _S). (A) Denitrifying genes. (B) Denitrifying reductases.

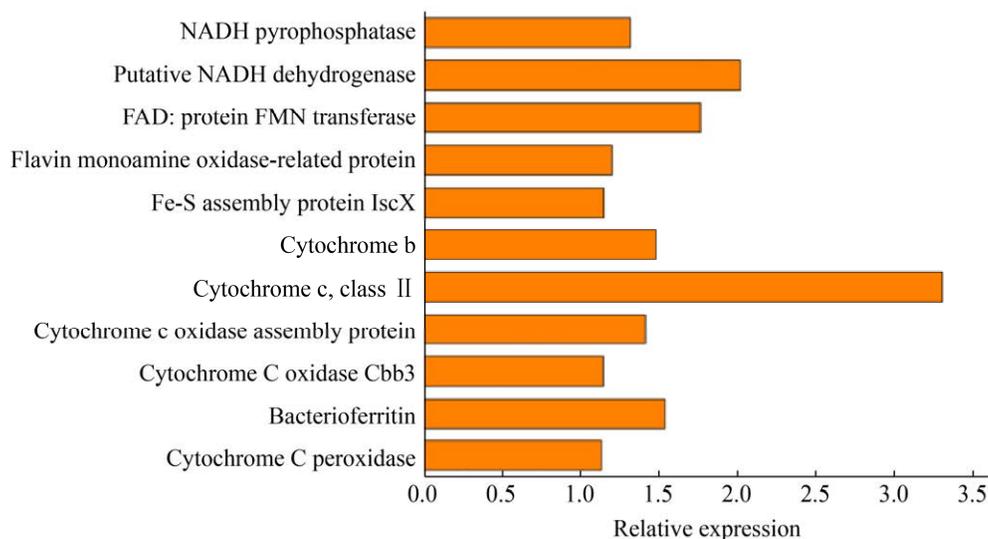


图 8 粘附细菌反硝化电子传递蛋白的相对表达量

Fig. 8 Relative expression levels of electron transfer proteins involved in denitrification.

3 总结

本研究探讨了 Fe_3O_4 对 *P. stutzeri* 反硝化过程的影响。研究发现随着 Fe_3O_4 投加量由 0 mg/L 增加至 4 000 mg/L, 硝酸盐氮最大比降解速率由 18.0 h^{-1} 提高至 23.7 h^{-1} , 体系中总蛋白浓度和细胞内的铁含量均显著增加。RT-qPCR 和 label-free 分析结果显示, Fe_3O_4 体系中的反硝化功能基因和对应的反硝化还原酶表达量均显著提升, 当 Fe_3O_4 投加量为 4 000 mg/L 时, *P. stutzeri* 反硝化功能基因 *napA*、*narJ*、*nirB*、*norR*、*nosZ* 表达量分别提高了 55.7%、24.9%、24.5%、36.5%、120%, 对应反硝化还原酶 Nap、Nar、Nir、Nor、Nos 的表达量提高了 85.0%、147%、16.5%、47.1%、95.9%。游离细菌和 Fe_3O_4 粘附细菌的反硝化功能基因以及反硝化相关酶没有显著差别, 但 Fe_3O_4 粘附细菌的 NADH 脱氢酶、FAD、细胞色素 *c* 等电子传递相关蛋白表达量均有所提高。这说明 Fe_3O_4 通过与细菌直接接触可促进生长代谢, 导致体系中细菌总数的增加, 从而提高反硝化速率。

REFERENCES

- [1] Ward MH, Jones RR, Brender JD, et al. Drinking water nitrate and human health: an updated review. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(7): E1557.
- [2] Guidelines for Drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. Geneva: World Health Organization, 2017.
- [3] 生活饮用水卫生标准. GB 5749-2006. 2006-12-29. Standards for drinking water quality. GB 5749-2006. 2006-12-29 (in Chinese).
- [4] 城镇污水处理厂污染物排放标准. GB 18918-2002. 2002-12-24. Discharge standard of pollutants for municipal wastewater treatment plant. GB 18918-2002. 2002-12-24 (in Chinese).
- [5] Du R, Cao S, Li B, et al. Performance and microbial community analysis of a novel DEAMOX based on partial-denitrification and anammox treating ammonia and nitrate wastewaters. *Water Res*, 2017, 108: 46-56.
- [6] Lee YY, Choi H, Cho KS. Effects of carbon source, C/N ratio, nitrate, temperature, and pH on N_2O emission and functional denitrifying genes during heterotrophic denitrification. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2019, 54(1): 16-29.
- [7] 杨红, 白文龙, 梅小乐, 等. 寒冷地区冬季脱氮除磷工艺调控及效果分析. *中国给水排水*, 2021, 37(6): 107-111. Yang H, Bai WL, Mei XL, et al. Adjustment and analysis of nitrogen and phosphorus removal process to resist winter in cold regions. *China Water Wastewater*, 2021, 37(6): 107-111 (in Chinese).
- [8] Li L, Qian GS, Ye LL, et al. Research on the enhancement of biological nitrogen removal at low temperatures from ammonium-rich wastewater by the bio-electrocoagulation technology in lab-scale systems, pilot-scale systems and a full-scale industrial wastewater treatment plant. *Water Res*, 2018, 140: 77-89.
- [9] Das NK, Schwartz AJ, Barthel G, et al. Microbial metabolite signaling is required for systemic iron homeostasis. *Cell Metab*, 2020, 31(1): 115-130.e6.
- [10] Shi M, Min X, Ke Y, et al. Recent progress in understanding the mechanism of heavy metals retention by iron (oxyhydr)oxides. *Sci Total Environ*, 2021, 752: 141930.
- [11] 钱子妍, 吴川, 何璇, 等. 铁循环微生物对环境重金属的影响研究进展. *环境化学*, 2021, 40(3): 834-850. Qian ZY, Wu C, He X, et al. Study on the influence of iron redox cycling microorganisms on heavy metals in the environment. *Environ Chem*, 2021, 40(3): 834-850 (in Chinese).
- [12] Newsome L, Morris K, Cleary A, et al. The impact of iron nanoparticles on technetium-contaminated groundwater and sediment microbial communities. *J Hazard Mater*, 2019, 364: 134-142.
- [13] Dong H, Li L, Lu Y, et al. Integration of nanoscale zero-valent iron and functional anaerobic bacteria for groundwater remediation: a review. *Environ Int*, 2019, 124: 265-277.
- [14] 邱轩, 石良. 微生物和含铁矿物之间的电子交换. *化学学报*, 2017, 75(6): 583-593.

- Qiu X, Shi L. Electrical interplay between microorganisms and iron-bearing minerals. *Acta Chimica Sin*, 2017, 75(6): 583-593 (in Chinese).
- [15] Orsetti S, Laskov C, Haderlein SB. Electron transfer between iron minerals and quinones: estimating the reduction potential of the Fe(II)-goethite surface from AQDS speciation. *Environ Sci Technol*, 2013, 47(24): 14161-14168.
- [16] 刘娟, 李晓旭, 刘枫, 等. 铁氧化物-微生物界面电子传递的分子机制研究进展. *矿物岩石地球化学通报*, 2018, 37(1): 39-47, 159.
- Liu J, Li XX, Liu F, et al. Research advantages on molecular mechanisms of interfacial electron transfer between iron oxide and microbe. *Bull Mineral Petrol Geochem*, 2018, 37(1): 39-47, 159 (in Chinese).
- [17] Zhang W, Li XM, Liu TX, et al. Enhanced nitrate reduction and current generation by *Bacillus* sp. in the presence of iron oxides. *J Soils Sediments*, 2012, 12(3): 354-365.
- [18] Ni SQ, Ni J, Yang N, et al. Effect of magnetic nanoparticles on the performance of activated sludge treatment system. *Bioresour Technol*, 2013, 143: 555-561.
- [19] 乔楠, 张静, 张金榜, 等. 纳米 Fe_3O_4 负载好氧反硝化菌脱氮除磷性能. *化工进展*, 2009, 28(11): 2058-2062.
- Qiao N, Zhang J, Zhang JB, et al. Nitrogen, phosphorus and COD removal characteristics of an aerobic denitrifying bacterial strain loaded on nano Fe_3O_4 . *Chem Ind Eng Prog*, 2009, 28(11): 2058-2062 (in Chinese).
- [20] 水质 无机阴离子的测定 离子色谱法. HJ/T 84-2001. 2001-12-19
- Water quality. Determination of inorganic anions. Ion chromatography method. HJ/T 84-2001. 2001-12-19 (in Chinese)
- [21] 水质 铁的测定 邻菲罗啉分光光度法. HJ/T 345-2007. 2007-03-10.
- Water quality. Determination of iron. phenanthroline spectrophotometry. HJ/T 345-2007. 2007-03-10 (in Chinese).
- [22] 黄河浪. 城市污水处理厂污泥中磺胺类抗生素降解技术研究. *环境科学与管理*, 2017, 42(12): 74-77.
- Huang HL. Study on degradation technology of sulfonamides in sludge of municipal wastewater treatment plant. *Environ Sci Manag*, 2017, 42(12): 74-77 (in Chinese).
- [23] Jain A. Extracellular electron transfer mechanism in *Shewanella loihica* PV-4 biofilms formed at indium tin oxide and graphite electrodes. *Int J Electrochem Sci*, 2013, 8: 1778.
- [24] Dong GW, Chen YB, Yan ZY, et al. Recent advances in the roles of minerals for enhanced microbial extracellular electron transfer. *Renew Sustain Energy Rev*, 2020, 134: 110404.
- [25] 董子阳, 胡佳杰, 胡宝兰. 微生物铁载体转运调控机制及其在环境污染修复中的应用. *生物工程学报*, 2019, 35(11): 2189-2200.
- Dong ZY, Hu JJ, Hu BL. Regulation of microbial siderophore transport and its application in environmental remediation. *Chin J Biotechnol*, 2019, 35(11): 2189-2200 (in Chinese).
- [26] Berks BC, Ferguson SJ, Moir JW, et al. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1232(3): 97-173.
- [27] Wu L, Zhu G, Zhang X, et al. Silver nanoparticles inhibit denitrification by altering the viability and metabolic activity of *Pseudomonas stutzeri*. *Sci Total Environ*, 2020, 706: 135711.
- [28] Chen J, Strous M. Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1827(2): 136-144.
- [29] Chen H, Zhao X, Cheng Y, et al. Iron robustly stimulates simultaneous nitrification and denitrification under aerobic conditions. *Environ Sci Technol*, 2018, 52(3): 1404-1412.

(本文责编 郝丽芳)