

太湖沉积物中厌氧铁氨氧化过程*

陈小锋**, 王润竹, 陈 静, 朱诗雅

(扬州大学环境科学与工程学院, 扬州 225127)

摘 要: 铁氨氧化(Feammox)是近年来发现的一种新型的厌氧氨氧化耦合三价铁[Fe(Ⅲ)]还原的脱氮途径,该途径对于水生态系统中的氮素自净可能有着重要的作用。但是相对于废水处理和农田土壤,目前自然水体中 Feammox 相关的研究相对甚少。为此,本研究采集太湖不同区域沉积物进行厌氧培养,并借助同位素技术和分子生物学等手段,对沉积物中铁、氮循环相关细菌、Feammox 影响因素以及潜在速率等进行了探究。厌氧培养过程中,亚铁[Fe(Ⅱ)]和各形态氮的浓度以及沉积物形态和颜色的变化,表明沉积物中发生了 Feammox 反应,并且硝酸盐(NO_3^-)是铵(NH_4^+)氧化的重要产物之一。不同氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)添加量的厌氧培养实验表明, NH_4^+ 可以促进 Fe(Ⅲ)的还原,但过量的 NH_4^+ 可能会产生抑制效应。不同 Fe(Ⅲ)添加量的各处理中, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度的变化无显著差异 ($P>0.05$, ANOVA),但是高 Fe(Ⅲ)添加量的处理中,硝酸盐氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)浓度显著高于其它处理 ($P<0.01$, ANOVA),表明 Fe(Ⅲ)的添加可以促进 NH_4^+ 氧化为 NO_3^- 的过程。厌氧培养过程中, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度急剧上升后又快速下降,伴随着反硝化功能相关的菌属相对丰度的大大增加,说明体系中可能发生了 Feammox 和反硝化的耦合。同位素富集培养结果表明,太湖不同区域沉积物均有较高的 Feammox 潜在速率 ($0.17\sim0.51\text{ mg N}/(\text{kg}\cdot\text{d})$),表明 Feammox 在太湖氮素自净过程中可能发挥了重要的作用。

关键词: 铁氨氧化;沉积物;太湖;蓝藻水华

Ferric iron reduction coupled to anaerobic ammonium oxidation in the sediments of Lake Taihu*

Chen Xiaofeng**, Wang Runzhu, Chen Jing & Zhu Shiya

(School of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, P.R.China)

Abstract: Ferric iron [Fe(Ⅲ)] reduction coupled with anaerobic ammonium oxidation (Feammox), a novel nitrogen removal pathway discovered in recent years, may play an important role in nitrogen self-purification in aquatic ecosystems. However, current research on this process is mainly focused on wastewater treatment or agricultural soils, with limited studies in natural lakes. In this study, sediments collected from different areas of Lake Taihu were anaerobically cultured and the bacteria involved in the iron and nitrogen cycles, the factors influencing Feammox and the potential rates in the sediments were investigated using high-throughput sequencing and isotope technology. During anaerobic culture, changes in the concentrations of iron [Fe(Ⅱ)] and various forms of nitrogen, as well as the morphology and colour of the sediments, indicated the presence of Feammox in the sediments, with nitrate (NO_3^-) being an important product of ammonia (NH_4^+) oxidation. The addition of NH_4^+ can promote the reduction of Fe(Ⅲ), but excessive NH_4^+ can have an inhibitory effect. In the treatments with different Fe(Ⅲ) additions, there were no significant changes in $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($P>0.05$, ANOVA). However, the $\text{NO}_3^-\text{-N}$ concentration in the treatment with the highest Fe(Ⅲ) addition was significantly higher than in the other treatments ($P<0.01$, ANOVA), indicating that Fe(Ⅲ) addition could promote the production of $\text{NO}_3^-\text{-N}$. The concentration of $\text{NO}_3^-\text{-N}$ increased sharply and then decreased rapidly during anaerobic culture, accompanied by a significant increase in the relative abundance of genera associated with denitrification, indicating that the coupling of Feammox and denitrification occurred in the system. The results of the isotope enrichment experiment showed that the potential rates of Feammox were relatively high in different regions of Lake Taihu ($0.17\sim0.51\text{ mg N}/(\text{kg}\cdot\text{d})$), indicating that Feammox may play an impor-

* 2023-01-04 收稿;2023-03-13 收修改稿。

国家自然科学基金项目(42177185)资助。

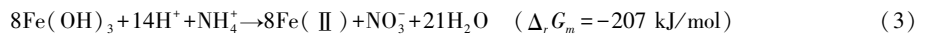
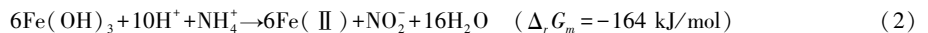
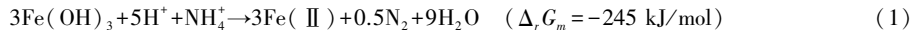
** 通信作者;E-mail:xfchen@yzu.edu.cn。

tant role in the nitrogen self-purification of Lake Taihu.

Keywords: Feammox; sediments; Lake Taihu; cyanobacterial bloom

近几十年来,水体富营养化已成为全球性的环境问题^[1]。氮是组成生命的最基本的元素之一,同时也是造成水体富营养化的最主要的营养物质之一。反硝化或厌氧氨氧化(Anammox)可以将水体中的氮素转化为 N_2 逸出,因此被认为是水生态系统中氮素自净的最重要的两个途径^[2]。然而,Anammox是自养型生物脱氮反应,较易发生于有机碳含量相对较低的区域,因此对于富营养化水体来说,反硝化可能才是最主要的脱氮途径^[3]。

近年来,一种新型的由微生物介导的Anammox与三价铁[Fe(Ⅲ)]还原相结合的方式(铁氨氧化,Feammox)在活性污泥的厌氧培养过程中被发现,该过程中,在铵(NH_4^+)被氧化为亚硝酸盐(NO_2^-)的同时还伴随着Fe(Ⅲ)的还原^[4]。此后,Feammox逐渐在许多生境,如水稻土^[5],潮间带湿地^[6],河岸带^[7]和湖泊沉积物^[8]中被发现。除 NO_2^- 外,Feammox过程中 NH_4^+ 还可以被氧化为 N_2 或硝酸盐(NO_3^-)^[9]。从典型土壤中Feammox反应(方程(1)、(2)、(3))的吉布斯自由能变^[10]来看,生成 N_2 是该反应更为主要的氮素转化途径。由Feammox反应产生的 N_2 可以直接从水体逸出,而其它产物(NO_2^- 或 NO_3^-)又可以为反硝化提供底物,因此Feammox同样可能对水生态系统中的氮素自净有着极大的作用。



太湖,面积2239 km²,是我国的第三大淡水湖泊,具有饮用水源、蓄洪、工农业用水、航运等多重功能^[11]。近几十年来,太湖富营养化日趋严重,并常年暴发蓝藻水华。研究表明,夏季太湖浮游植物处于氮限制状态,其原因可能是夏季太湖具有强大的氮素自净能力^[12]。在此氮素自净过程中,除了常规反硝化和厌氧氨氧化以外,是否存在一些新的脱氮途径以及这些途径的脱氮潜力如何等尚不明确。

调查数据显示,太湖沉积物中含有较多的铁元素^[13],而沉积物中衰亡蓝藻的降解又会产生大量的 NH_4^+ ^[14],这说明太湖沉积物中存在充足的Feammox反应底物。此外,蓝藻水华的暴发会营造出白天好氧、夜间厌氧的环境^[15],而这种好氧/厌氧交替的环境被认为是Feammox反应的热点场所^[7]。因此我们推测,Feammox可能在夏季太湖氮素自净的过程中发挥了较为重要的作用。为此,本研究采集太湖不同区域沉积物进行厌氧培养,结合分子生物学手段,对Feammox是否可以在太湖沉积物中发生、不同底物浓度对Feammox的影响以及太湖不同区域Feammox潜在速率等进行探究,以丰富湖泊氮素循环理论,并为太湖富营养化治理提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 研究区域和样品采集

于蓝藻暴发期(2022年8月)布点采集沉积物样品(图1)。采样时间为下午14:00—16:00,天气晴,风力等级3级,采样时大量的蓝藻上浮并堆积在湖体表面。各采样点中,河口区(位点C)堆积了大量的蓝藻,梅梁湾区(位点B)湖面也有较多的蓝藻分布,而湖心区蓝藻密度则相对较低。使用彼得逊采泥斗采集湖泊表层沉积物样品,装入自封袋后置于保温箱中,低温下运回实验室后立即开展理化性质的检验和厌氧培养实验,剩余的沉积物样品置于4℃冰箱冷藏,用于测定细菌群落结构的样品则置于-70℃超低温冰箱中保存。

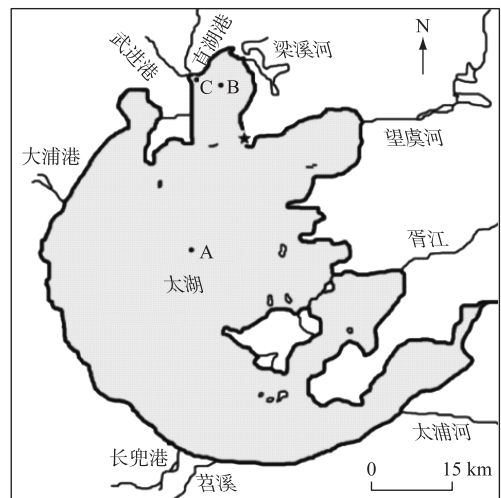


图1 太湖采样位点

Fig.1 Location of sampling points in Lake Taihu

1.2 底物浓度对 Feammox 的影响

为考察氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)和 Fe(III) 浓度对太湖沉积物中 Feammox 的影响,采用梅梁湾中心处(位点 B)沉积物样品进行厌氧培养实验,具体操作如下:将沉积物样品与去离子水以质量比 1:3 混合形成均质泥浆,取 3 份该泥浆于 -70°C 超低温冰箱中保存以进行细菌群落结构分析。称取 12 g 上述泥浆 30 份,分别与 80 mL 去离子水混合后加入血清瓶(约 140 mL)中,氮气曝气 20 min 后加厌氧去离子水近满。厌氧手套箱中避光培养 2 d,以去除样品本底的 NO_3^- 、 NO_2^- 以及残余的氧气。实验分为两组,第一组中加入 0.5 mL 0.1 mol/L NH_4Cl ,再加入不同体积 0.5 mol/L FeCl_3 使得 Fe(III) 添加量分别为 0、2.8、5.6、8.4、14.0 mg;第二组加入 0.5 mL 0.5 mol/L FeCl_3 ,再分别加入不同体积 0.1 mol/L NH_4Cl ,使得 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 添加量分别为 0、0.14、0.28、0.42、0.7 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$,每个处理设 3 个平行。室温下厌氧避光培养,定时采集上方清液,测定硝酸盐氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)、亚硝酸盐氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和亚铁离子[Fe(II)]浓度,每次取样后用封口膜密封,以防止厌氧手套箱中可能残留的氧气进入。实验结束时,选取沉积物颜色变化最明显的处理组,进行 DNA 提取和高通量测序。

1.3 不同蓝藻暴发区域沉积物 Feammox 潜在速率测定

太湖不同区域 3 个位点的沉积物处理方法同上。在厌氧避光培养 2 d 后,将浆液混合均匀,取 0.5 mL 于含 4.5 mL 2 mol/L KCl 的离心管中,用以测定 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量。根据上述实验结果,分别添加一定量的 Fe(III) 和 $^{15}\text{NH}_4^+\text{-N}$ (99%,源叶生物),每个位点设 5 个平行。 25°C 下厌氧避光培养 24 h 后,使用注射器加入 0.1 mL 7 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 以停止血清瓶中的微生物活动,通过膜接口质谱仪(MIMS)测定 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 的浓度。沉积物中含有较多的 $^{14}\text{NH}_4^+\text{-N}$ 会对 Feammox 潜在速率的测定产生干扰,因此参考 Ding 等^[16]方法,采用公式 $R=R_{30}/(P_{15})^2$ 进行校正,式中 R 为 Feammox 潜在速率, R_{30} 为 $^{30}\text{N}_2$ 产生速率, P_{15} 为 $^{15}\text{NH}_4^+\text{-N}$ 占总 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的比例。

1.4 DNA 提取和高通量测序

采用 EZNA 土壤 DNA 提取试剂盒(Omega, USA)提取沉积物基因组 DNA,选择引物对 338F (5'-ACTCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域进行扩增。采用 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序,利用 Mothur 等软件进行细菌群落结构及多样性分析,并将测序原始数据上传至 NCBI 数据库,SRA 编号 PRJNA905072。测序和数据分析工作由上海凌恩生物科技公司完成。

1.5 理化性质分析

沉积物有机质含量和含水率的测定分别参照标准方法《GB9834—1988》和《HJ613—2011》进行;采用盐酸提取邻菲罗琳分光光度法测定沉积物活性铁,采用湿法消解-原子吸收分光光度法测定总铁含量,采用 KCl 提取水杨酸分光光度法测定沉积物中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量,结果均以干重计;采用 YSI 便携式水质分析仪测定表层水体的 pH 和溶解氧(DO);分别采用丙酮提取分光光度法、水杨酸分光光度法、紫外分光光度法和 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法测定水中叶绿素 a 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度^[17]。

1.6 数据分析

参照 Li 等^[6]方法,估算太湖由 Feammox 导致的氮去除量,其公式为:

$$N_t = 3.65 \times \rho \times h \times (1 - W) \times R \quad (4)$$

式中, N_t 为氮去除量($\text{t}/(\text{km}^2 \cdot \text{a})$); ρ 为太湖沉积物密度(g/cm^3); h 为发生 Feammox 反应的沉积物深度(cm); W 为含水率(%); R 为 Feammox 潜在速率($\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$)。采用 SPSS18.0 软件进行相关性(Pearson)和单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 代表显著水平, $P < 0.01$ 代表极显著水平。

2 结果与分析

2.1 太湖不同区域水体和沉积物理化性质

夏季是太湖蓝藻暴发季节,因此水体中叶绿素 a 浓度很高,其中河口区达到 $83.9 \text{ mg}/\text{m}^3$,而湖心区也有 $47.7 \text{ mg}/\text{m}^3$ 。受蓝藻光合作用的影响,3 个位点的水体均有较高的溶解氧浓度,并且呈现弱碱性。3 个位点的沉积物中有机质和铁元素的含量均比较高,其中梅梁湾中心位点的有机质浓度达到 $15.14 \text{ mg}/\text{L}$,河口区的总铁达 $23.7 \text{ g}/\text{kg}$,而盐酸可提取 Fe(II) 和 Fe(III) 浓度达 2.5 、 $5.4 \text{ g}/\text{kg}(\text{DW})$ (表 1)。

表 1 太湖不同区域水体和沉积物理化性质

Tab.1 Physiochemical properties of the water and sediments in different areas of Lake Taihu

采样点	表层水			沉积物					
	溶解氧/(mg/L)	pH	叶绿素 <i>a</i> /(mg/m ³)	含水率/%	有机质/(g/kg(DW))	NH ₄ ⁺ -N/(g/kg(DW))	活性 Fe(Ⅱ)/(g/kg(DW))	活性 Fe(Ⅲ)/(g/kg(DW))	总铁/(g/kg(DW))
A	9.34	9.00	47.7	38.27	9.02	0.16	1.9	4.2	21.3
B	8.61	9.19	69.2	36.45	15.14	0.20	2.3	5.1	22.4
C	9.31	9.21	83.9	35.44	11.90	0.18	2.5	5.4	23.7

2.2 底物浓度对太湖沉积物中 Feammox 过程的影响

采用梅梁湾中心(位点 B)的沉积物进行室内厌氧培养实验,考察不同 Fe(Ⅲ)含量对 Feammox 过程的影响(图 2)。从图中可以看出,各处理组中的 NH₄⁺-N 在培养的前 24 h 内均有较大幅度下降的过程,此后开始上升,在 48 h 后又持续下降。各实验组中的 NO₃⁻-N 浓度在培养后均急剧上升,且随着 Fe(Ⅲ)添加量的增加而增大,此后 NO₃⁻-N 浓度又快速下降。与 NO₃⁻-N 浓度变化趋势类似,Fe(Ⅱ)浓度也在培养 8 h 后急剧上升,在经历短暂的下降过程后,Fe(Ⅱ)浓度又持续上升,其中 Fe(Ⅲ)添加量最大的处理组中 Fe(Ⅱ)浓度最高,在培养结束后达到 13.9 mg/L。NO₂⁻-N 浓度的变化趋势与 NO₃⁻-N 类似,但是始终处于较低的水平,其最大值仅有 0.05 mg/L 左右。

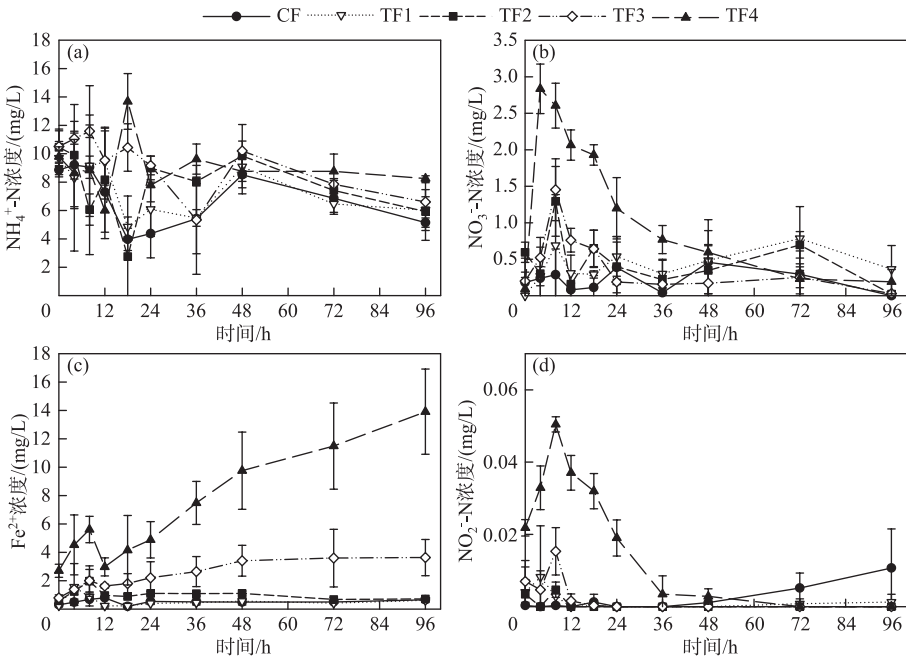


图 2 不同 Fe(Ⅲ)添加量的处理中 NH₄⁺-N (a)、NO₃⁻-N (b)、Fe²⁺(c)、NO₂⁻-N (d) 的浓度变化 (CF 为对照组;TF1、TF2、TF3、TF4 分别为添加 2.8、5.6、8.4、14.0 mg Fe(Ⅲ) 的处理)

Fig.2 Variations of the concentrations of NH₄⁺-N (a), NO₃⁻-N (b), Fe²⁺(c) and NO₂⁻-N (d) in the treatments with different Fe(Ⅲ) addition (CF represented control group; TF1, TF2, TF3 and TF4 were the treatments with the additions of 2.8, 5.6, 8.4 and 14.0 mg Fe(Ⅲ), respectively)

添加不同量 NH₄⁺-N 各处理中,NH₄⁺-N 浓度在厌氧培养 4~8 h 后均有较大的下降,而与之相对应,NO₃⁻-N 浓度快速上升。培养 12 h 后,NH₄⁺-N 浓度急剧上升,此后又继续下降,呈现出上下波动的变化过程,而 NO₃⁻-N 浓度则持续下降,但是在 48 h 后又开始缓慢上升。与 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 不同,各处理组中 Fe(Ⅱ)浓

度均持续上升,其中处理组 TA1($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 添加量为 0.14 mg) 的上升速度最快,在培养结束时该处理组中的 Fe(II) 浓度达 20.7 mg/L。与添加不同量 Fe(III) 的处理相似, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度也维持在较低的水平,峰值仅 0.05 mg/L 左右(厌氧培养后 8 h,图 3)。

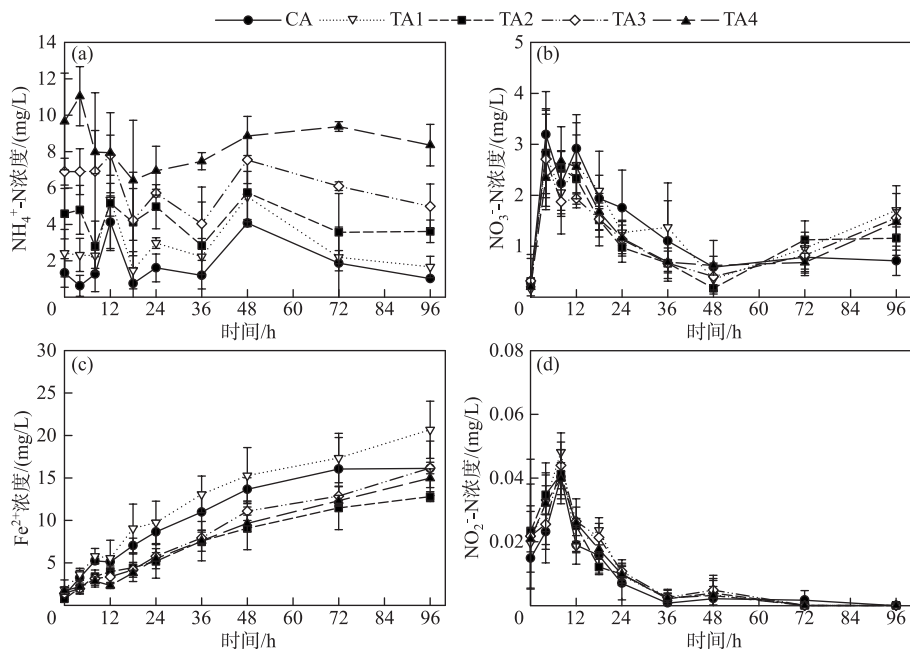


图 3 不同 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 添加量的处理中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (a)、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (b)、 Fe^{2+} (c)、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (d) 浓度的变化 (CA 为对照组;TA1、TA2、TA3、TA4 分别为添加 0.14、0.28、0.42、0.7 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的处理)

Fig.3 Variations of the concentration of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (a), $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (b), Fe^{2+} (c), $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (d) in the treatments with different $\text{NH}_4^+\text{-N}$ addition (CA represented control group; TA1, TA2, TA3 and TA4 were the treatments with the additions of 0.14, 0.28, 0.42 and 0.7 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$, respectively)

2.3 厌氧培养前后沉积物中的细菌群落结构变化

厌氧培养过程中,添加 0.70 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 8.4 mg Fe(III) 的处理(TF3)中沉积物颜色和形态变化最为明显,因此选择该处理的沉积物进行细菌群落结构分析。通过 Illumina MiSeq 测序共获得了 221553 个高质量序列(平均长度 425 bp),各样品的 Shannon 稀释曲线均接近平台期,表明样本数据已达到饱和。基于 97% 的阈值进行 OTU 聚类,获得 1904~2883 个细菌 OTU 数,最终共鉴定出 58 门、154 纲、335 目、477 科、741 属。厌氧培养前后,细菌的群落结构有较大的变化。培养前以 γ -变形菌纲为代表的变形菌(Proteobacteria)门最具优势(30.6%~37.0%),其次是硝化菌门(11.6%~13.9%)、脱硫菌门(7.0%~9.3%)、拟杆菌门(7.4%~10.1%)等。培养结束后,厚壁菌门的丰度大大提高,从培养前的 1.9%~2.5% 提高到 26.2%~40.3%,其它门类的细菌的丰度都有不同程度的下降(附图 I),而 Chao1、Simpson 等物种丰富度指数也表明细菌的多样性在厌氧培养后有一定程度的降低(附表 I)。

在属水平上, *Thermodesulfovibrio* 是培养前沉积物中的优势属,其丰度达到 8.7%~10.0%,其次是 uncultured *Sutterellaceae* (3.3%~4.1%) 和 uncultured *Steroidobacteraceae* (2.2%~3.7%),而在厌氧培养之后 *Symbiobacteraceae* 成为优势属,其丰度达到 15.0%~27.7%,其次是 *Thermodesulfovibrio* (5.7%~7.4%) 和 *Alicyclobacillus* (3.3%~7.4%) (附图 II)。

2.4 太湖不同区域沉积物 Feammox 潜在速率

底物浓度对 Feammox 的影响结果表明,添加 5.6 mg Fe(III) (处理组 TF2) 和 0.28 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (处理组

TA2)的两个处理中氨氧化和铁还原速率较高,因此选择这两个添加量对太湖不同区域沉积物 Feammox 潜在速率进行测定。如图 4 所示,不同区域沉积物的同位素富集培养过程中均有较多的 $^{30}\text{N}_2$ 产生,其中河口区速率最高,约 $0.11 \text{ mg N}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,湖心区最低,但也达到 $0.05 \text{ mg N}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。不同区域沉积物中 $^{29}\text{N}_2$ 产生速率达到 $0.55\sim 0.59 \text{ mg N}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,显著高于 $^{30}\text{N}_2$ 产生速率($P<0.01$),说明体系中存在较多的 $^{14}\text{NH}_4^+$ 。采用预培养 2 d 后泥浆中的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量,计算出湖心区、梅梁湾中心和直湖港河口区的 Feammox 潜在速率分别为 0.17 、 0.28 和 $0.51 \text{ mg N}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。假定太湖沉积物的湿体密度为 $1.36 \text{ g}/\text{cm}^3$,含水率为 44.15% ^[18],并且发生 Feammox 反应的沉积物深度为 $0\sim 5 \text{ cm}$ ^[6],根据 3 个位点的 Feammox 潜在速率,可估算出太湖因 Feammox 导致的氮损失量约为 $2.4\sim 7.2 \text{ t}/(\text{km}^2\cdot\text{a})$ 。

3 讨论

3.1 厌氧培养条件下太湖沉积物中发生了 Feammox 反应

在添加 Fe(III) 和 NH_4^+ 前,所有沉积物浆液中的 NO_3^- 和 NO_2^- 都已通过厌氧培养去除,并且在整个实验过程中一直保持着严格的厌氧程序,因此培养过程中产生的 NO_3^- 只能通过 NH_4^+ 的氧化而来,而同位素富集实验中产生的 $^{30}\text{N}_2$ 也只能直接来源于 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的厌氧氧化,或者来源于 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的厌氧氧化产物 $^{15}\text{NO}_3^-$ 、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 的反硝化或厌氧氨氧化过程^[10]。添加 Fe(III) 后,沉积物表层出现了棕色絮状物,这些絮状物在培养过程中逐渐消失(附图 III),并伴随着上覆水中 Fe(II) 浓度的升高,说明沉积物表层的 Fe(III) 迅速被还原。相关性分析结果(附表 II)表明,在 96 h 的厌氧培养过程中, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度与 Fe(II) 或 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度显著负相关($P<0.01$),而 Fe(II) 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度显著正相关($P<0.01$),这表明 Fe(III) 还原过程在 NH_4^+ 厌氧氧化为 NO_3^- 的过程中发挥了重要作用,即发生了 Feammox 反应。研究发现, NH_4^+ 的厌氧氧化也可以在微生物的介导下由硫酸盐完成^[19]。本研究未对硫酸盐还原产物进行检测,因而并不能确定硫酸盐还原对氨氧化的相对贡献。但是吴松峻等^[20]发现,太湖沉积物中三价铁的还原速率是硫酸盐的 7.4 倍,因此实验过程中 NO_3^- 或 N_2 的产生可能主要与 Fe(III) 还原有关。

铁还原菌,如 *Exiguobacterium*, *Geobacter*, *Shewanella* 和 *Acidimicrobiaceae* 等^[4,21],可以利用 Fe(III) 为电子受体,氧化氨、乙酸盐、乳酸盐等电子供体并从中获取生命活动所需能量。尽管目前尚不能直接鉴别参与铁氨氧化进程的细菌,但铁还原菌可以影响铁氨氧化过程已得到证明,因此有学者认为这类细菌是介导 Feammox 过程的主要细菌^[8]。厌氧培养结束后,沉积物中铁还原菌丰度从培养前的 $2.83\%\pm 0.36\%$ 上升至 $4.3\%\pm 1.77\%$ (附图 IV),这也从微生物学角度证明了培养过程中的确发生了 Feammox 反应。

3.2 底物浓度对 Feammox 的影响

Fe(III) 是 Feammox 反应中的电子受体,因此充足的 Fe(III) 一般有利于 NH_4^+ 的氧化^[22]。Ding 等^[23]采用同位素添加法测定不同土壤中的 Feammox 速率时发现, $^{30}\text{N}_2$ 的产生速率与 Fe(III) 含量显著正相关。本研究中,随着 Fe(III) 添加量的增加, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的产生量也显著增加(图 2b),说明 Fe(III) 浓度的提高可能会促进 NH_4^+ 进一步氧化为 NO_3^- 。类似的现象也有报道,如 Chen 等^[24]在厌氧氨氧化的研究中发现,随着 Fe(III) 浓度的增加, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 增加量与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 减少量的比例显著增加;Guan 等^[25]采用乙炔抑制法来区别 Feammox 过程产生的 N_2 和 NO_x ,发现添加氯化铁后 $^{45}\text{N}_2\text{O}$ 或 $^{46}\text{N}_2\text{O}$ 产生量显著提高。遗憾的是,这些文献均未对此现象进行分析。从 Feammox 反应方程(1)和方程(3)来看,1 mol NH_4^+ 厌氧氧化为 NO_3^- 需要消耗 8 mol Fe(III) ,因此相比于氧化为 N_2 ,增加 Fe(III) 浓度对 NH_4^+ 氧化为 NO_3^- 的吉布斯自由能变的影响更大,这可能是本研究中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的产生量随 Fe(III) 添加量的增加而显著增加的原因。

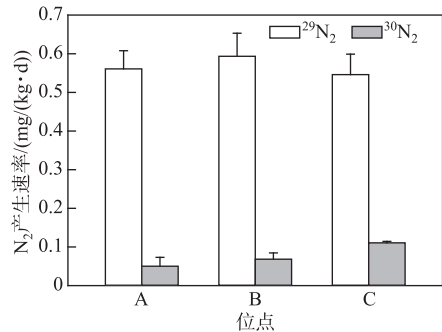


图 4 同位素厌氧培养过程中 $^{30}\text{N}_2$ 和 $^{29}\text{N}_2$ 的产生速率(位点 A、B 和 C 分别为湖心区、梅梁湾中心和直湖港河口区)

Fig.4 Production rates of $^{30}\text{N}_2$ and $^{29}\text{N}_2$ in the isotopic anaerobic culture (Sites A, B and C are the center of Lake Taihu, the center of Meiliang Bay and the estuary of Zhihugang, respectively)

作为 Feammox 过程中的电子供体, NH_4^+ 含量同样会影响该反应进程。但是针对 Feammox 的研究大多集中在废水处理中的应用, 而废水中 NH_4^+ 浓度一般都比较低, 因此 NH_4^+ -N 浓度对 Feammox 的影响的研究相对较少。一般而言, NH_4^+ 的添加有利于 $\text{Fe}(\text{III})$ 的还原^[8]。但是罗文齐等^[26]在测定太湖梅梁湾沉积物 Feammox 潜在速率时发现, 沉积物 NH_4^+ -N 含量与 Feammox 速率之间并没有显著的相关性。而 Desiredy 等^[27]在利用 Feammox 处理废水中 NH_4^+ 时也发现, 当达到一定浓度后, NH_4^+ -N 去除率随着 NH_4^+ 浓度的增加而下降。本研究中, 最低 NH_4^+ -N 添加量 (0.14 mg, TA1) 的处理中的 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而对照组又显著高于其它 NH_4^+ -N 添加量的处理 ($P < 0.01$, 图 3c), 其原因可能是 NH_4^+ -N 浓度升高释放出的游离 NH_3 抑制了微生物的活性导致^[27]。

3.3 Feammox 对湖泊氮素自净的贡献

在浅水富营养化湖泊中, 由于水生植物的光合作用和氧气在水-大气界面的充分交换, 水体中的溶解氧在白天可能处于过饱和状态^[28], 此时沉积物中的氧气穿透深度可达到 15 mm 左右^[29], 进而有效促进了沉积物中有机氮的降解和 $\text{Fe}(\text{II})$ 的氧化。藻华暴发过程中, 夜间藻和其它微生物的呼吸作用会大大降低水体中的溶解氧水平, 上覆水-沉积物界面 2~6 mm 深度以下已处于厌氧状态^[30], 这又为 Feammox 的进行营造了合适的环境条件^[31]。铁被认为是除氮、磷外, 影响蓝藻水华程度的最重要微量元素之一^[32], 因此一般而言, 太湖、滇池、巢湖等蓝藻水华频发湖泊的沉积物中均含有较多的铁元素^[33-34]。与之相对应, 这些湖泊沉积物中也存在着较多的铁还原细菌, 如巢湖中 *Thiobacillus*、*Desulfuromonas* 和 *Geobacter* 等铁还原菌相关属的相对丰度达到 2.4%~6.7%^[35], 而本研究中, 太湖沉积物中铁还原菌相对丰度也有 $2.83\% \pm 0.36\%$ (附图 IV), 说明这些湖泊均具备发生 Feammox 反应的微生物基础^[16]。充足的底物、适宜的环境条件和相关功能微生物的存在, 表明 Feammox 反应同样可以在这些富营养化湖泊的实际环境中发生。

同位素富集培养过程中, $^{29}\text{N}_2$ 产生速率远高于 $^{30}\text{N}_2$, 说明体系中原有的 $^{14}\text{NH}_4^+$ 对 Feammox 潜在速率的测定有较大的影响^[10], 同时也说明有必要采用 NH_4^+ -N 背景值对 Feammox 潜在速率进行校正。校正后湖心区和梅梁湾中心区的 Feammox 潜在速率分别为 0.17、0.28 mg N/(kg·d), 与 Li 等^[6]对长江口潮间带的测定结果 (0.24~0.36 mg N/(kg·d)) 接近, 低于福建红树林土壤的 0.48 mg N/(kg·d)^[25]。以该潜在速率计算, 太湖因 Feammox 导致的氮损失量约占总输入量 (约 23.1 t/km^2 ^[36]) 的 10.2%~31.2%。由于同位素示踪实验添加了 Feammox 底物, 并且是在绝对厌氧的环境和适宜的温度下进行, 所得结果必然过高地估计了实际水体中 Feammox 的脱氮能力。为此, 采用添加相同量的 $\text{Fe}(\text{II})$ 和 $^{15}\text{NO}_3^-$ -N 方法测定了梅梁湾、湖心区两个位点的潜在反硝化速率 [分别为 5.28、6.10 mg N/(kg·d)^[37]], 并将 Feammox 潜在速率与之进行对比, 可发现太湖 Feammox 途径的脱氮速率约占反硝化途径的 3.2%~5.3%, 该结果略低于文献中太湖亲水河河岸带的 4.0%~7.3%^[7]。

Feammox 反应可生成 N_2 、 NO_3^- 或 NO_2^- , 其中 N_2 被认为是 Feammox 的最主要产物^[10], 如 Guan 等^[25]在红树林沉积物厌氧培养过程中发现, 直接由 Feammox 产生的 N_2 约占总 N_2 产生量的 75%~82%, 而长江口潮间带沉积物直接由 Feammox 产生的 N_2 的比例甚至达到 78.5%~93.2%^[6]。但是在添加 Feammox 底物的处理中, Yang 等^[10]发现 Feammox 产生的 N_2 的比例仅为 47%~72%, 远低于上述研究, 表明该处理中 Feammox 产物的反硝化或厌氧氨氧化对 N_2 的生成有较大的贡献。Huang 等^[38]根据河岸湿地土壤厌氧培养过程中微生物群落结构的变化, 也推测产生的 N_2 可能有很大一部分来源于 Feammox 产物 NO_2^- 的反硝化或厌氧氨氧化。本研究中, NO_3^- -N 浓度在厌氧培养过程中有着显著的上升和下降趋势, 48 h 后其浓度已低于 0.5 mg/L (图 3b), 而培养结束后, uncultured *Symbiobacteraceae* 这一具反硝化功能的菌属^[39]的相对丰度也从培养前的 0.25%~0.31% 增加到 15.0%~27.7%, 说明厌氧条件下沉积物中发生了 Feammox 和反硝化的耦合, 这种耦合可能对湖泊的氮素自净起到重要作用。

4 结论

- 1) Feammox 反应可以在太湖不同区域沉积物中发生, 其潜在速率可达到 0.17~0.51 mg N/(kg·d);
- 2) $\text{Fe}(\text{III})$ 浓度的提高有利于 Feammox 反应, 并可以促进 NH_4^+ 进一步氧化为 NO_3^- ;

- 3)一定浓度的 NH_4^+ 可以促进 Feammox 反应,但浓度过高可能产生抑制作用;
4)Feammox 可以促进反硝化功能菌属相对丰度的提高,形成 Feammox 和反硝化的耦合脱氮。

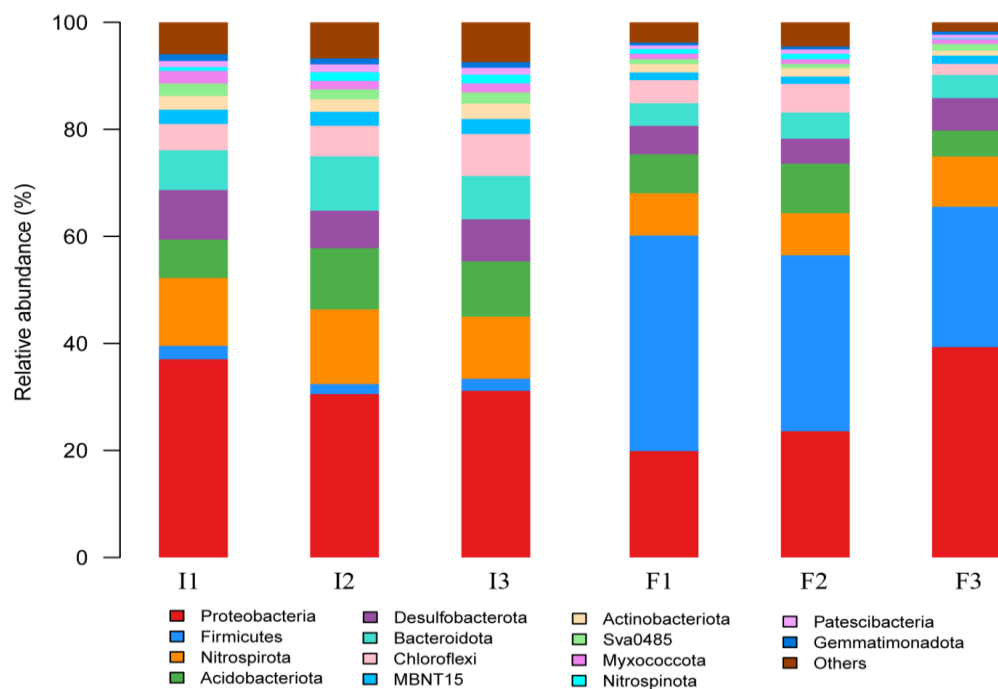
5 附录

附图 I ~ IV 和附表 I ~ II 见电子版(DOI: 10.18307/2023.0521)。

6 参考文献

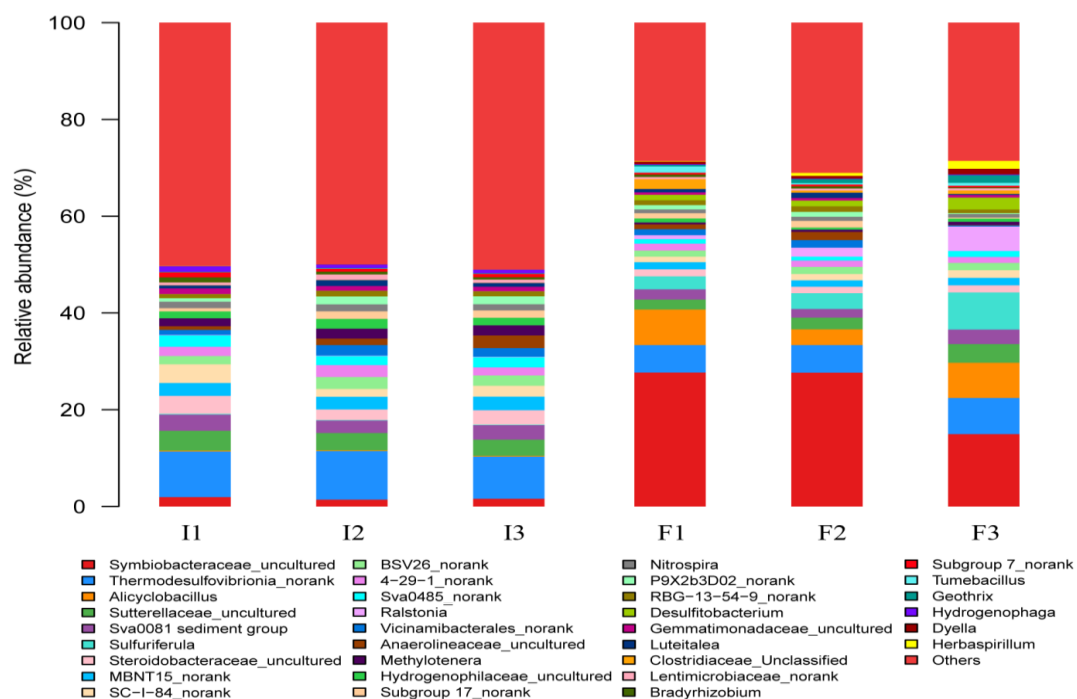
- [1] Wurtsbaugh WA, Paerl HW, Dodds WK. Nutrients, eutrophication and harmful algal blooms along the freshwater to marine continuum. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 2019, **6**(5): e1373.
- [2] Wang J, Kan J, Qian G *et al.* Denitrification and anammox: Understanding nitrogen loss from Yangtze Estuary to the east China sea (ECS). *Environmental Pollution*, 2019, **252**: 1659-1670.
- [3] Burgin AJ, Hamilton SK. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2007, **5**(2): 89-96.
- [4] Sawayama S. Possibility of anoxic ferric ammonium oxidation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, **101**(1): 70-72.
- [5] Ding LJ, An XL, Li S *et al.* Nitrogen loss through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction from paddy soils in a chronosequence. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**(18): 10641-10647.
- [6] Li X, Hou L, Liu M *et al.* Evidence of nitrogen loss from anaerobic ammonium oxidation coupled with ferric iron reduction in an intertidal wetland. *Environmental Science & Technology*, 2015, **49**(19): 11560-11568.
- [7] Ding B, Li Z, Qin Y. Nitrogen loss from anaerobic ammonium oxidation coupled to Iron (III) reduction in a riparian zone. *Environmental Pollution*, 2017, **231**: 379-386.
- [8] Yao Z, Wang F, Wang C *et al.* Anaerobic ammonium oxidation coupled to ferric iron reduction in the sediment of a eutrophic lake. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, **26**(15): 15084-15094.
- [9] Zhu TT, Lai WX, Zhang YB *et al.* Feammox process driven anaerobic ammonium removal of wastewater treatment under supplementing Fe (III) compounds. *Science of the Total Environment*, 2022, **804**: 149965.
- [10] Yang WH, Weber KA, Silver WL. Nitrogen loss from soil through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction. *Nature Geoscience*, 2012, **5**(8): 538-541.
- [11] Qin B, Lake Taihu, China: Dynamics and environmental change. Springer Science & Business Media, 2008.
- [12] Chen X, Jiang H, Sun X *et al.* Nitrification and denitrification by algae-attached and free-living microorganisms during a cyanobacterial bloom in Lake Taihu, a shallow Eutrophic Lake in China. *Biogeochemistry*, 2016, **131**(1): 135-146.
- [13] Qu W, Mike D, Wang S. Multivariate analysis of heavy metal and nutrient concentrations in sediments of Taihu Lake, China. *Hydrobiologia*, 2001, **450**(1): 83-89.
- [14] Sima W, Hu M, He Q *et al.* Regulation of nitrogen dynamics at the sediment-water interface during HAB degradation and subsequent reoccurrence. *RSC Advances*, 2020, **10**(23): 13480-13488.
- [15] Chen X, Wang K, Li X *et al.* *Microcystis* blooms aggravate the diurnal alternation of nitrification and nitrate reduction in the water column in Lake Taihu. *Science of the Total Environment*, 2021, **767**: 144884.
- [16] Ding B, Luo W, Qin Y *et al.* Effects of the addition of nitrogen and phosphorus on anaerobic ammonium oxidation coupled with iron reduction (Feammox) in the farmland soils. *Science of the Total Environment*, 2020, **737**: 139849.
- [17] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法:第4版. 北京:中国环境科学出版社, 2002.
- [18] Wang C, Xu D, Bai L *et al.* Effects of accumulated cyanobacterial bloom biomass contents on the characteristics of surface fluid sediments in a eutrophic shallow lake. *Journal of Environmental Management*, 2022, **308**: 114644.
- [19] Rios-Del Toro EE, Valenzuela EI, Lopez-Lozano NE *et al.* Anaerobic ammonium oxidation linked to sulfate and ferric iron reduction fuels nitrogen loss in marine sediments. *Biodegradation*, 2018, **29**: 429-442.
- [20] Wu SJ, Wang X, Ji QY *et al.* Iron-sulfur distribution and its environmental significance in three typical areas of western Lake Taihu. *J Lake Sci*, 2019, **31**(4): 950-960. DOI:10.18307/2019.0408. [吴松峻, 汪旋, 季秋忆等. 太湖西岸典型区域沉积物的硫铁分布特征及环境意义. 湖泊科学, 2019, **31**(4): 950-960.]
- [21] Xia Q, Ai Z, Huang W *et al.* Recent progress in applications of Feammox technology for nitrogen removal from wastewaters: A review. *Bioresource Technology*, 2022: 127868.
- [22] Zhao S, Feng SJ, Wu CC *et al.* A review on new ammonium oxidation alternatives for effective nitrogen removal from wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2022, **97**(8): 1917-1928.
- [23] Ding B, Chen Z, Li Z *et al.* Nitrogen loss through anaerobic ammonium oxidation coupled to Iron reduction from ecosystem habitats in the

- Taihu estuary region. *Science of the Total Environment*, 2019, **662**: 600-606.
- [24] Chen Y, Jia F, Liu Y *et al.* The effects of Fe (III) and Fe (II) on anammox process and the Fe-N metabolism. *Chemosphere*, 2021, **285**: 131322.
- [25] Guan Q, Cao W, Wang M *et al.* Nitrogen loss through anaerobic ammonium oxidation coupled with iron reduction in a mangrove wetland. *European Journal of Soil Science*, 2018, **69**(4): 732-741.
- [26] Luo WQ, Xu MS, Li DD *et al.* Effect of cyanobacteria outbreak on Feammox rates in the sediments of Meiliang Bay, Taihu Lake. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2020, **40**(8): 2828-2833. [罗文齐, 徐梦珊, 李丹丹等. 蓝藻暴发对太湖梅梁湾底泥中铁氨氧化速率的影响. 环境科学学报, 2020, **40**(8): 2828-2833.]
- [27] Desiredreddy S, Sabumon P, Maliyekkal SM. Anoxic ammonia removal using granulated nanostructured Fe oxyhydroxides and the effect of pH, temperature and potential inhibitors on the process. *Journal of Water Process Engineering*, 2020, **33**: 101066.
- [28] Chen X, Yang L, Xiao L *et al.* Nitrogen removal by denitrification during cyanobacterial bloom in Lake Taihu. *Journal of Freshwater Ecology*, 2012, **27**(2): 243-258.
- [29] Cui J, Jin Z, Wang Y *et al.* Mechanism of eutrophication process during algal decomposition at the water/sediment interface. *Journal of Cleaner Production*, 2021, **309**: 127175.
- [30] Zhu L, Shi W, Van Dam B *et al.* Algal accumulation decreases sediment nitrogen removal by uncoupling nitrification-denitrification in shallow eutrophic lakes. *Environmental Science & Technology*, 2020, **54**(10): 6194-6201.
- [31] Weber KA, Achenbach LA, Coates JD. Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, **4**(10): 752-764.
- [32] Zhang S, Zheng X, Zhang W *et al.* The effect of bioavailable sedimentary iron on the growth of cyanobacteria in eutrophic lakes. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2018, **229**: 1-13.
- [33] Gao L, Zhou JM, Yang H *et al.* Phosphorus fractions in sediment profiles and their potential contributions to eutrophication in Dianchi Lake. *Environmental Geology*, 2005, **48**: 835-844.
- [34] Yang C, Yang P, Geng J *et al.* Sediment internal nutrient loading in the most polluted area of a shallow eutrophic lake (Lake Chaohu, China) and its contribution to lake eutrophication. *Environmental Pollution*, 2020, **262**: 114292.
- [35] Fan YY, Li BB, Yang ZC *et al.* Abundance and diversity of iron reducing bacteria communities in the sediments of a heavily polluted freshwater lake. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, **102**: 10791-10801.
- [36] Xu H, McCarthy MJ, Paerl HW *et al.* Contributions of external nutrient loading and internal cycling to cyanobacterial bloom dynamics in Lake Taihu, China: Implications for nutrient management. *Limnology and Oceanography*, 2021, **66**(4): 1492-1509.
- [37] Chen XF, Wang RZ, Zhu SY *et al.* Nitrate dependent ferrous oxidation in the sediments of Lake Taihu. *China Environmental Science*, 2023. [J/OL]. [陈小锋, 王润竹, 朱诗雅等. 太湖沉积物硝酸盐依赖亚铁氧化性能研究. 中国环境科学, 2023. [J/OL].]
- [38] Huang S, Jaffe PR. Characterization of incubation experiments and development of an enrichment culture capable of ammonium oxidation under iron-reducing conditions. *Biogeosciences*, 2015, **12**(3): 769-779.
- [39] Wu M, Li J, Leu AO *et al.* Anaerobic oxidation of propane coupled to nitrate reduction by a lineage within the class Symbiobacteria. *Nature Communications*, 2022, **13**(1): 1-12.



附图 I 厌氧培养前 (I)、后 (F) 沉积物中细菌在门水平上的群落结构

Attached Fig. I Bacterial community structure at phyla level in sediments before (I) and after (F) anaerobic culture

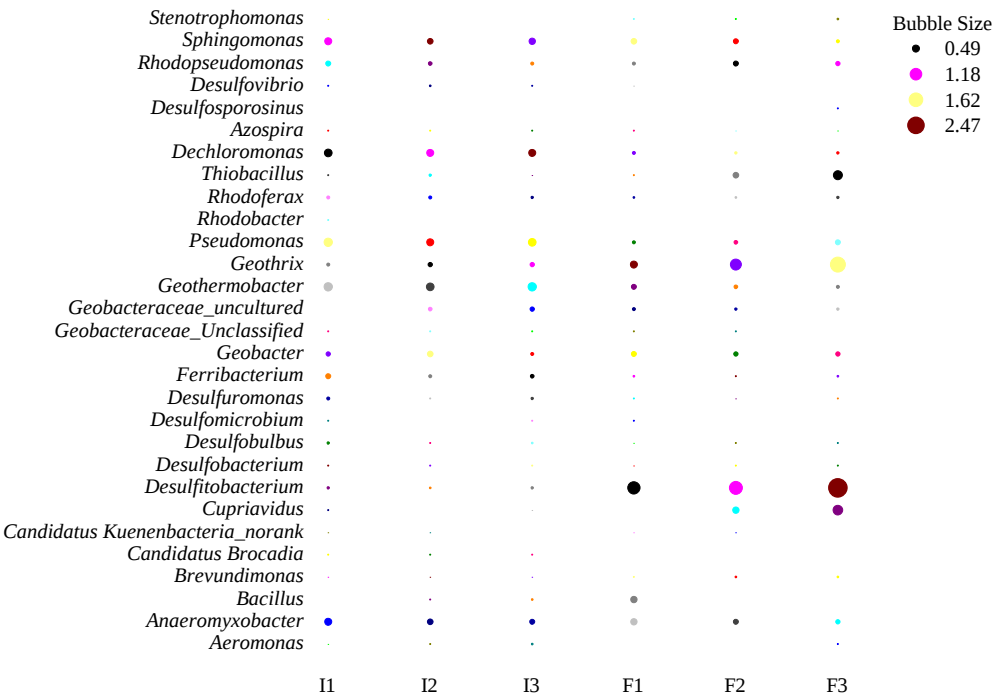


附图 II 厌氧培养前 (I)、后 (F) 沉积物中细菌在属水平上的群落结构

Attached Fig.II Bacterial community structure at genus level in sediments before (I) and after (F) anaerobic culture



附图 III 厌氧培养前（左）后（右）沉积物形态和颜色
Attached Fig. III The sediment morphology and color before (L) and after (R) anaerobic culture



附图 IV 厌氧培养前（I）后（F）沉积物中 Fe(III)还原相关属相对丰度的变化
Attached Fig. IV Changes in the abundance of the genera related to Fe (III) reduction before (I) and after (F) anaerobic culture

附表 I 培养前后细菌多样性指数

Attached Tab.I Bacterial diversity index before (I) and after (F) anaerobic culture

位点	Reads	Chao	Richness	Shannon	Simpson
I	33170±637	3052±47	2807±72	9.69±0.08	0.0034±0.0002
F	32827±3081	2672±279	2265±320	7.64±0.12	0.0437±0.0144

附表II 厌氧培养过程中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 Fe(II) 浓度相关性分析结果 ($n=300$)Attached Tab.II Correlation between $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ and Fe (II) concentrations during anaerobic culture ($n=300$)

	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	Fe(II)
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	1		
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	-.337**	1	
Fe(II)	-.233**	.159**	1

**表示在 0.01 水平上显著相关（双尾）。