

混合培养中晶体磷酸铁的异化还原能力

孙宏飞, 曲东, 张磊

(西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 采用厌氧混合培养方法, 分别以来源四川、吉林和江西的水稻土浸提液作为接种液, 选择 Fe(II) 浓度及游离磷酸盐浓度变化为指标, 研究不同来源微生物对晶体磷酸铁的微生物还原特征, 探讨晶体磷酸铁微生物还原反应中对不同碳源利用能力的差异。结果表明, 来源于不同水稻土的微生物对晶体磷酸铁的最大还原速率 (V_{max})、潜在最大铁还原量及 Fe(III) 还原率均有显著差异, 其中四川水稻土微生物的 V_{max} 较大, 而吉林和江西水稻土微生物的潜在最大 Fe(III) 还原量及铁还原率较高。3 种水稻土微生物对晶体磷酸铁的还原反应速率及铁还原量明显低于无定型氧化铁。不同水稻土的微生物能够利用丙酮酸盐、乙酸盐及葡萄糖作为惟一电子供体, 使晶体磷酸铁发生异化还原, 产生 Fe(II) 并释放磷酸盐, 且 Fe(II) 累积量与磷素累积量呈极显著相关。体系中可溶性磷酸盐数量对以用葡萄糖为碳源的 Fe(III) 还原反应有显著影响, 在缺乏可溶性磷酸盐的环境下, 可能通过抑制发酵微生物生长, 阻断了葡萄糖发酵生成有机酸和 H_2 的过程, 使晶体磷酸铁的异化还原过程被显著抑制。

[关键词] 晶体磷酸铁; 异化 Fe(III) 还原; 碳源; 水稻土

[中图分类号] S154.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0173-06

微生物介导的铁还原对厌氧环境中磷素的地球生物化学循环过程有显著的影响。研究^[1-3]表明, 南方酸性和中性水稻土中磷的释放与铁的氧化还原密切相关。稻田土壤中磷的有效性在很大程度上受到铁形态转化的制约, 淹水过程能使氧化铁还原, 导致土壤中磷素有效性的明显提高及无机磷形态的变化^[4], 而 Zhang 等^[5]的研究显示, 淹水过程可导致结晶度差的铁氧化物增多, 使土壤对磷的吸附量显著增加。在土壤的无机磷形态中, 晶体磷酸铁是 Fe-P 的重要组成部分, 虽然普遍认为 Fe-P 具有一定的生物有效性, 但目前仍缺少确切的试验数据证明晶体磷酸铁可向可溶性磷酸盐转化。对于土壤中铁的氧化还原过程研究主要集中在氧化铁矿物的转化方面, 而针对晶体磷酸铁的研究资料较少。通过不同氧化铁的纯培养试验^[6]发现, 比表面积大的无定型氧化铁和弱晶体氧化铁, 如纤铁矿能被铁还原微生物全部或部分还原, 而针铁矿和赤铁矿等晶体氧化铁的微生物还原速率却极低。不同水稻土中的铁还原研究^[7]表明, 微生物能够还原的铁占土壤总铁量的 20% 左右, 占土壤游离氧化铁含量的 60% ~ 75%, 而土壤中无定型氧化铁含量仅占微生物可还原铁的

50% ~ 65%, 说明其中晶体态铁还原同样具有重要地位。所以, 探明这些晶体铁的还原, 对于深入认识土壤中微生物铁还原机理具有重要的理论意义。目前, 针对微生物铁还原的研究多都是以水稻土或沉积物为研究模式来进行的^[8-9]。虽然这种模式比较真实地反映了这一过程的自然特征, 但由于水稻土中影响因素复杂, 背景干扰大, 数据分析比较困难。因此, 本研究采用混合培养方法, 以晶体磷酸铁为铁源, 通过接种不同来源的土壤微生物, 探讨厌氧培养条件下晶体磷酸铁的生物还原能力, 及在不同碳源条件下还原能力的差异, 以期发现晶体磷酸铁在地球化学循环中的活动能力大小, 及其导致的磷素的释放情况。

1 材料与方 法

1.1 供试土壤及接种液制备

供试水稻土样品分别采自吉林省吉林市丰满区前二道乡、四川省邛崃市迴龙镇、江西省安福县竹江乡店上村。先后于 2000 年 2~ 9 月采集 0~ 20 cm 耕层土壤, 风干, 磨细。土样的基本性质参见文献^[9]。将风干过孔径 1 mm 筛的供试水稻土以 m (土)

收稿日期: 2006-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(40271067); 教育部博士学科点专项科研基金项目(20020712009)

作者简介: 孙宏飞(1980-), 女, 河南周口人, 在读硕士, 主要从事环境化学研究。

通讯作者: 曲东(1960-), 男, 河南陕县人, 教授, 博士生导师, 主要从事土壤环境化学研究。E-mail: dongqu@nw.suaaf.edu.cn

V(去离子水)=1:9的比例在30℃下淹水1周。将培养后的土样于700 r/min离心10 min,取上清液用作微生物接种液。来源于3种水稻土的接种液分别用“SC”(由四川水稻土样品中提取的微生物)、“JL”(由吉林水稻土样品中提取的微生物)和“JX”(由江西水稻土样品中提取的微生物)表示。

1.2 微生物营养来源

在混合培养中,提供微生物生长所需的碳源分别采用葡萄糖、乙酸盐或丙酮酸,将不同碳源配制成浓度为50 mmol/L的溶液;氮源选用NH₄Cl,配制成浓度为5.0 g/L的溶液。为了强化微生物活性,设置了添加磷酸缓冲液^[10](KH₂PO₄与K₂HPO₄的摩尔比为0.581)的处理,磷酸缓冲液中P的浓度为25 mmol/L。微生物所需的其他元素和生长因子由接种液提供。

1.3 试验方案及测定方法

1.3.1 晶体磷酸铁微生物还原能力试验 选用葡萄糖作为碳源,NH₄Cl为氮源,磷酸缓冲液为磷源。铁源采用分析纯晶体磷酸铁(市售),并将晶体磷酸铁固体用玛瑙研钵磨细。称取7.7855 g磨细的晶体磷酸铁粉末于1 L去离子水中,用超声波分散20 min,制得晶体磷酸铁悬液。取10 mL的血清瓶若干,分别加入碳源、氮源、磷源、晶体磷酸铁悬液及微生物接种液(SC、JL和JX)各1 mL。培养液总体积为5 mL,含Fe量为576.6 mg。为了与无定形氧化铁(ferrihydrite,用Fe(OH)₃表示)比较,设置相同碳源、氮源和磷源条件下以Fe(OH)₃为铁源的处理作为对照,Fe(OH)₃加入量为含Fe量为2.883 g/L悬液1 mL。无定形氧化铁按照Schwertmann等^[11]的方法合成。制备的Fe(OH)₃悬液用6 mol/L HCl溶解,原子吸收分光光度法测定铁含量。培养试验所用的晶体磷酸铁悬液、Fe(OH)₃悬液、磷酸缓冲液及NH₄Cl直接采用高压灭菌,葡萄糖溶液采用细菌过滤器(<0.22 μm)过滤除菌。充氮气除去血清瓶中氧

气后,用橡胶盖及铝盖密封。于30℃下避光恒温培养,定期采样,测定不同处理中Fe(II)的浓度。采样时取各处理1瓶,摇匀,迅速吸取1 mL并置于含4.0 mL HCl溶液的离心管中,HCl溶液的浓度为0.5 mol/L。于室温下静置浸提24 h^[12],浸提液用0.22 μm滤膜过滤,滤液采用邻二氮菲分光光度法测定Fe(II)浓度^[13]及磷钼蓝比色法测定P浓度^[14]。

1.3.2 不同碳源对晶体磷酸铁微生物还原能力的影响 分别选用葡萄糖、乙酸盐和丙酮酸盐作为碳源,NH₄Cl为氮源,不添加磷源。取10 mL的血清瓶若干,分别加入不同碳源、氮源、去离子水、晶体磷酸铁悬液及微生物接种液各1 mL。培养、采样及Fe(II)和P浓度测定方法同1.3.1。

1.4 数据处理

异化Fe(III)还原是微生物介导的生物学过程,与微生物的生长密切相关,所以可用表征微生物生长动力学的Logistic方程描述。Logistic方程的表达式为: $Y = a / [1 + b \cdot \exp(-cx)]$ 。利用参数a可得出Fe(III)还原的最大潜势,即最大Fe(II)累积量;参数c表示速率常数;用参数a和c可求出最大反应速率V_{max},其数值等于0.25ac;最大Fe(II)累积量和加入氧化铁量的比值可以得出Fe(III)的还原率;r和s分别表示相关系数和偏差。

2 结果与分析

2.1 晶体磷酸铁的微生物还原

晶体磷酸铁悬液中接种3种水稻土微生物后,Fe(II)累积量的变化如图1所示。由图1可知,不同处理中Fe(II)累积量均随培养时间的延长而不断增大,说明来源于3种水稻土的厌氧微生物均能以葡萄糖作为电子供体还原磷酸铁,证明晶体磷酸铁具有一定的生物还原能力。用Logistic方程拟合的晶体磷酸铁还原过程的参数见表1。

表1 用Logistic方程拟合的晶体磷酸铁还原参数

Table 1 Logistic model fits of dissimilatory Ferric phosphate reduction in different treatments

处理 Treatment	Logistic 方程参数 Logistic model parameters					Fe(III) 还原率/% Reaction rate	V _{max} / (mg·L ⁻¹ · d ⁻¹)
	a	b	c	r	s		
SC	325.3	15.37	0.181	0.994	16.04	56.42	14.68
JL	395.7	19.87	0.073	0.989	13.37	68.63	7.172
JX	403.2	20.73	0.090	0.996	11.03	69.93	9.112

由表1看出,不同来源微生物对晶体磷酸铁的还原反应速率有差异,其中SC处理的Fe(III)还原最

大反应速率(V_{max})最高,为14.68 mg/(L·d),而JL和JX处理的V_{max}分别为7.172和9.112

mg/(L · d)。用 Logistic 方程拟合的最大 Fe(II) 累积量 (a) 除以晶体磷酸铁的初始加入量 (按 Fe 计) 可得出晶体磷酸铁的潜在铁还原率。比较不同来源微生物处理 (表 1) 可知, JL 和 JX 的潜在铁还原率较高, 分别达到 68.63% 和 69.93%, 而 SC 处理仅为 56.42%, 表明吉林和江西水稻土微生物还原晶体磷酸铁的潜力较大。图 1 还表明, 当培养 51 d 后, 尽管 SC 和 JX 处理的 Fe(II) 累积量大体相同, 并明显大于 JL 处理, 但 JL 和 JX 处理的 Fe(II) 累积过程仍有较大反应速率, 对晶体磷酸铁还原具有潜力。

不同来源微生物对无定型氧化铁的还原情况见图 2。由图 2 可知, SC 处理在厌氧培养前 4 d 的

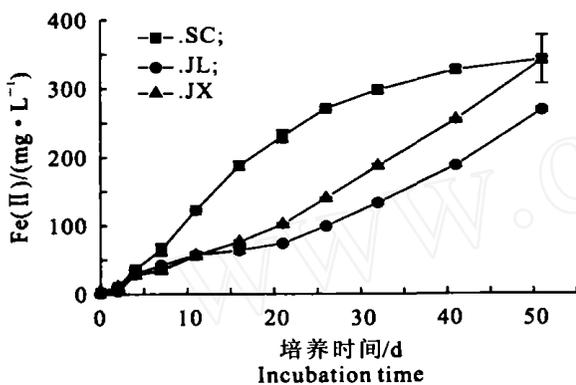


图 1 不同来源微生物对晶体磷酸铁异化还原的影响

Fig. 1 Effect of different resources of m icrobe on dissim ilatory reduction of Ferric phosphate

2.2 不同来源微生物对晶体磷酸铁微生物还原过程中磷素累积的影响

不同来源微生物对晶体磷酸铁还原过程中磷素累积量的影响如图 3 所示。

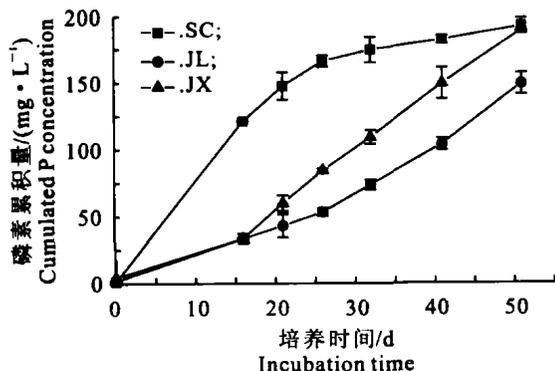


图 3 不同来源微生物对晶体磷酸铁生物还原过程中磷素累积量的影响

Fig. 3 Effects of different resources m icrobe on cum ulated phosphate during dissim ilatory reduction of Ferric phosphate

Fe(III) 还原反应迅速, 16 d 后 Fe(II) 累积量达到最大值, Fe(III) 还原率为 95.3%。JL 和 JX 处理的无定型氧化铁还原反应速率在 21 d 后才快速增加, Fe(II) 的累积量分别在 41 d 和 32 d 后逐渐稳定并达到最大值, 其 Fe(III) 还原率分别为 92.1% 和 96.3%。以上结果表明, 3 种水稻土中的微生物均能使 Fe(III) 还原为 Fe(II), 并且微生物对无定型氧化铁的还原反应速率和 Fe(III) 还原率均显著大于晶型磷酸铁处理, 与纯培养试验中得出的无定型氧化铁较晶态氧化铁更易被微生物还原的结论^[6]一致。

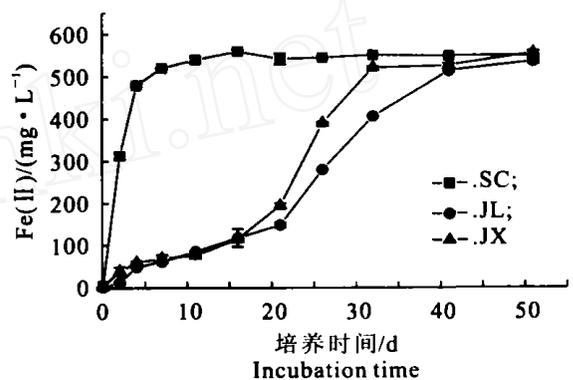


图 2 不同来源微生物对无定型氧化铁异化还原的影响

Fig. 2 Effect of different resources of m icrobe on dissim ilatory reduction of phosphorus

由于反应体系中加入了一定数量的磷酸盐缓冲液, 所以图 3 中的数值为测定的有效磷量减去加入磷量所得的结果。从图 3 可以看出, 磷素累积的趋势与 Fe(II) 的累积趋势一致。SC 处理在前 26 d 的磷素累积速率很快, 随后趋于稳定; JX 和 JL 处理的磷素累积速率均表现为先慢后快的趋势, 分别在培养的 16 和 28 d 后迅速增大。3 个处理中磷素累积量表现为 SC > JX > JL 的趋势。

2.3 不同碳源对晶体磷酸铁微生物还原及磷素累积的影响

不同来源微生物在利用不同碳源时的 Fe(II) 和磷素累积量变化如图 4~ 6 所示。由图 4~ 6 可知, 3 种来源微生物在利用不同碳源的 Fe(II) 和磷素累积量均有明显的差异, 并且磷素累积的趋势与 Fe(II) 的累积趋势一致。3 种碳源处理中, 利用丙酮酸盐的 Fe(III) 还原反应速率最大, 开始迅速还原所需的培养时间也较短; 利用乙酸盐的 Fe(III) 还原反应速率小于丙酮酸盐处理, 但显著大于以葡萄糖为碳源的处理。以葡萄糖为碳源的晶体磷酸铁还原过

程总体上反应均较慢,特别是四川水稻土微生物几乎不发生Fe(III)还原反应,相应的磷素累积量也无显著变化。与图1比较可以看出,在缺少可溶性磷源

的环境中,以葡萄糖为碳源的Fe(III)还原过程将受到明显抑制。

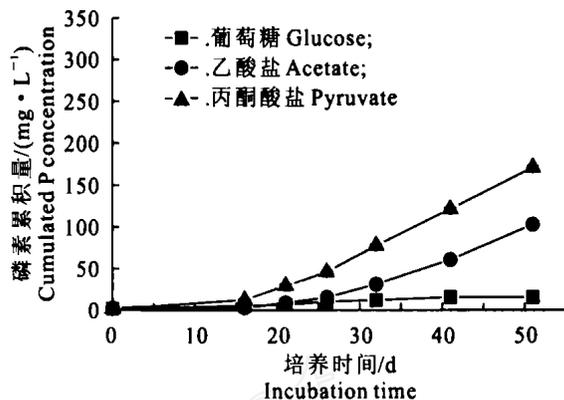
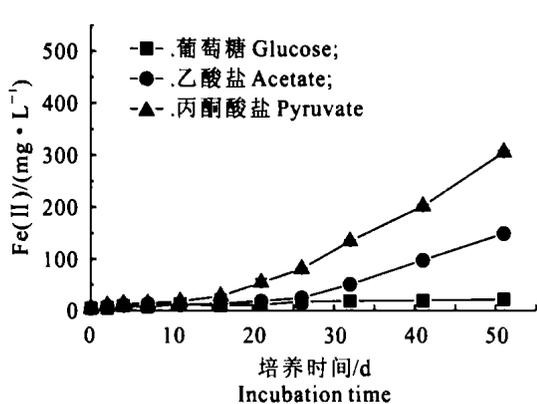


图4 四川水稻土微生物还原晶体磷酸铁时Fe(II)和磷素累积量的变化

Fig 4 Changes of Concentration of Fe(II) and P when Ferric phosphate was reduced by anaerobe of Sichuan paddy

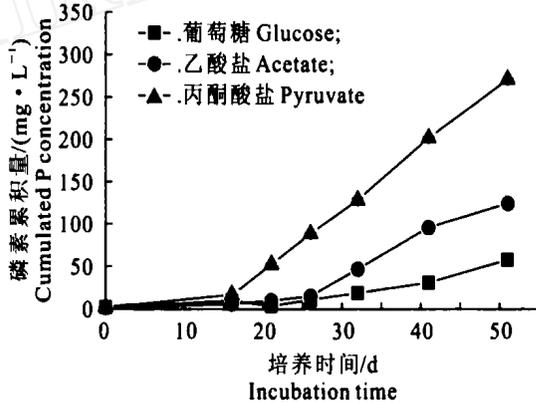
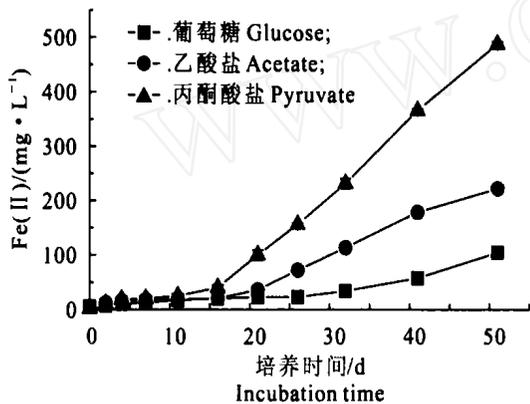


图5 吉林水稻土微生物还原晶体磷酸铁时Fe(II)和磷素累积量的变化

Fig 5 Changes of Concentration of Fe(II) and P when Ferric phosphate was reduced by anaerobe of Jilin paddy

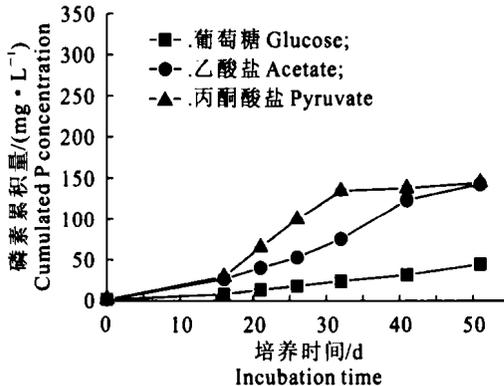
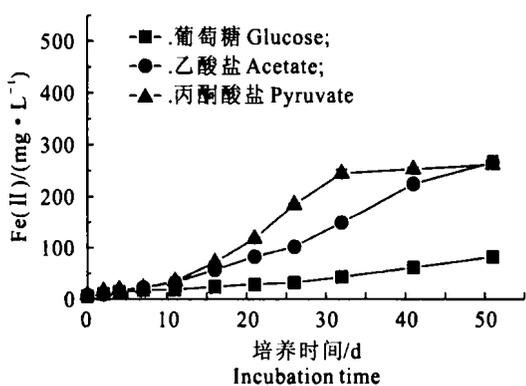


图6 江西水稻土微生物还原晶体磷酸铁时Fe(II)和磷素累积量的变化

Fig 6 Changes of Concentration of Fe(II) and P when Ferric phosphate was reduced by anaerobe of Jiangxi paddy

比较3种来源微生物的Fe(III)还原反应可以看出,Fe(III)还原反应速率开始迅速增大所需的培养时间不同,表现为SC>JL>JX;利用丙酮酸盐的Fe(II)累积量在3种来源微生物处理中有明显的差

异,其中以吉林水稻土微生物最大;而利用乙酸盐处理的Fe(III)表现为JX>JL>SC;利用葡萄糖处理的Fe(II)累积量在JX和JL处理中大致相同,而SC处理中最小。以上结果表明,不同土壤性质对晶体磷酸

铁的微生物还原能力有一定的影响。

3 讨论

由本研究结果可知,难溶性的晶体磷酸铁具有一定的微生物还原能力。以晶体磷酸铁为铁源的各处理中,Fe(II)累积量和磷素累积量之间呈线性相关,相关系数为0.983~0.999,差异达到极显著水平($P < 0.01$),表明Fe(II)累积和磷素产生同步进行。这不仅提供了晶体Fe(III)化合物能够被微生物还原利用的证据,而且也为淹水条件下水稻土有效磷含量增加的试验结果^[4]提供了新的理论依据。由本研究结果还可知,不同来源微生物、不同的碳源及磷酸盐的存在与否均会对Fe(III)还原反应产生显著影响,表明不同来源微生物在Fe(III)还原反应中的碳源利用特征不同。在缺少可溶性磷源的环境中,丙酮酸盐是Fe(III)还原微生物易于利用的电子供体,使晶体磷酸铁具有较高的还原效率,尽管利用乙酸盐的Fe(III)还原反应速率较低,但仍然具有较高的Fe(II)累积量;而在以葡萄糖为碳源的晶体磷酸铁还原反应中,可溶性磷缺乏已成为限制Fe(III)还原的重要因素。这一结果预示,水稻土中的Fe(III)还原微生物或许不能直接利用葡萄糖,而是以葡萄糖的发酵产物如乙酸、甲酸、丙酸和氢气等作为异化铁还原微生物代谢利用的碳源和能源。无机磷作为发酵微生物必需的营养基质,磷素缺乏将抑制发酵微生物的生长繁殖,强烈抑制葡萄糖发酵产氢和产生有机酸的过程,从而使利用葡萄糖代谢产物为碳源的Fe(III)还原过程难以发生。这与Dassonville等^[15]报道的在厌氧水稻土培养期间,外源葡萄糖发酵后才可能被硫酸盐还原菌和产甲烷菌利用的结果具有相似性。因此,选择葡萄糖作为碳源时,必须补充适

量的磷源才能促进Fe(III)还原过程的进行。

Fe(III)被微生物还原后产生的Fe(II)主要以菱铁矿(FeCO_3)、磁铁矿(Fe_3O_4)或蓝铁矿 $[\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$ 等形式存在^[16]。在微生物利用无定型氧化铁的还原试验中,产生的菱铁矿是主要产物,其可以被0.5 mol/L HCl溶解,产生的 Fe^{2+} 可以被测定。在微生物还原Fe(III)时,如果反应温度较高,产物中会有很少量的黑色磁铁矿出现。磁铁矿不能被稀HCl浸提,同时结合的Fe(III)也难以被微生物还原^[6]。本试验在30℃下培养,可能会导致少量磁铁矿形成,影响Fe(III)的还原率。在晶体磷酸铁的还原过程中,由于还原反应会产生大量的磷酸盐,使形成蓝铁矿的量显著增加,而蓝铁矿中的Fe(II)不易被稀HCl浸提,所以导致晶体磷酸铁处理的最大Fe(II)累积量及Fe(III)还原率较无定型氧化铁处理低。在含有充足磷酸盐的体系中,铁还原过程会产生蓝铁矿,使部分磷酸盐被固定,从而影响铁的氧化还原循环及磷酸盐的有效性,在土壤环境化学研究中应加以重视。

Fe(III)还原微生物对不同碳源的利用能力一直是广泛关注的问题之一,Lovley等^[17]发现,GS-15菌株是一种以乙酸盐为唯一电子供体的铁还原菌,表明不同铁还原微生物可能具有不同的碳源利用特征。考虑到混合培养中Fe(III)还原微生物可能存在共营养和共代谢的特征,本试验分别选用了葡萄糖、乙酸盐和丙酮酸盐作为碳源进行比较,从碳源利用情况可知,尽管相同浓度的葡萄糖中包含的碳原子数最多,但被铁还原微生物利用的能力明显低于丙酮酸盐和乙酸盐,说明在混合培养中Fe(III)还原微生物对碳源的利用是具有选择性的,并非表现为体系中C原子数量越多其铁还原率越大。

[参考文献]

- [1] Lyons J B, Gorres J H, Amador J A. Spatial and temporal variability of phosphorus retention in a riparian forest soil[J]. J Environ Qual, 1998, 27: 895-903
- [2] Fox R L, Kamprath E J. Phosphate sorption isotherm for evaluating the phosphate requirement of soils[J]. Soil Sci Soc Am Proc, 1970, 34: 902-907.
- [3] Phillips IR, Greenway M. Changes in water-soluble and exchangeable ions, cation exchange capacity, and phosphorus max in soils under alternating waterlogged and drying conditions[J]. Commun Soil Sci Plant Anal, 1998, 29(1-2): 51-65
- [4] 曲东,曹宁,王保莉.添加EDTA及黄腐酸对水稻土中有效磷浓度的影响[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(3):127-130
- [5] Zhang Yong-song, Li in Xian-yong. Relation between Fe-oxides transformation and phosphorus adsorption in the oxic and anoxic layers of two paddy soils as affected by flooding[J]. Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci), 2002, 28(5): 485-491.
- [6] 曲东, Schnell S. 纯培养条件下不同氧化铁的微生物还原能力[J].微生物学报,2001,41(6):744-749
- [7] 曲东,贺江舟,孙丽蓉.不同水稻土中氧化铁的微生物还原特征[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(4):98-101.

- [8] 曲东,张一平, Schenell S, 等. 添加氧化铁对水稻土中 H_2 , CO_2 和甲烷形成的影响[J]. 应用生态学报, 2003, 14(8): 1312-1316
- [9] 曲东, 谭中欣, 王保莉. 外源物质对水稻土铁还原的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, 31(4): 6-10
- [10] Rebert S B, Ronald A, David S, et al. Isolation, cultivation and characterization of iron- and manganese-reducing bacteria[C]. Techniques in Microbial Ecology. New York: Oxford University Press, 1998, 3: 58-78
- [11] Schwertmann U, Cornell R M. Iron oxides in the laboratory preparation and characterization[M]. Weinheim: VCH, 1991: 69-144
- [12] Schnell S, Ratering S. Simultaneous determination of iron (III), iron (II), and manganese (II) in environmental samples by ion chromatography[J]. Environ Sci Technol, 1998, 32: 1530-1537.
- [13] 曲东, 王保莉. 邻氮二菲分光光度法同时测定水稻土中的 $Fe(II)$ 和 $Fe(III)$ [J]. 西北农业大学学报, 1991(19): 85-88
- [14] 南京农业大学. 土壤农化分析[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 65-82
- [15] Dassonville F, Godon J J, Renault P, et al. Microbial dynamics in anaerobic soil slurry amended with glucose, and their dependence on geochemical processes[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2004, 36: 1417-1430
- [16] Zachara J M, Redrickson J K. Solubilization of $Fe(III)$ oxide-bound trace metals by a dissimilatory $Fe(III)$ reducing bacterium [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2001, 65(1): 75-93
- [17] Lovley D R, Stolz J F, Nord G L, et al. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism [J]. Nature, 1987, 330: 352-354

Dissimilatory reduction capability of crystal ferric phosphate in enrichment cultivation

SUN Hong-fei, QU Dong, ZHANG Lei

(College of Resources and Environmental Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The process of dissimilatory reduction of crystal ferric phosphate by microbes and the difference of carbon source utilizing ability was investigated by adopting anaerobic co-cultivation in which three kinds of water-extracted paddy soil solutions were inoculated and crystal ferric phosphate as electron acceptor of dissimilatory iron respiration was added. These results showed that the microbes from different paddy soils had remarkable effects on the maximal reaction rate (V_{max}) of crystal ferric phosphate reduction, the potential reduction capacity of iron and iron reduction rate. In detail, the microbes from Sichuan paddy soil possessed much more V_{max} , however, the microbes from Jilin and Jiangxi paddy soils had a higher level of the potential reduction capacity of iron; the reduction rate and iron reduction capacity of crystal ferric phosphate were less than that of ferrihydrite by microbes from three kinds of paddy soils. The microbes from different paddy soils could utilize glucose, acetate and pyruvate as solely electron donor and dissimilatory reduction of ferric phosphate could take place, producing $Fe(II)$ and releasing phosphate. Furthermore, the accumulation of $Fe(II)$ and phosphate showed remarkable correlation. The content of soluble phosphate had a great influence on iron reduction with glucose as carbon source. When soluble phosphate was deficient, the process of producing organic acid and H_2 would be blocked by suppressing the growth of the microbes, then the process of dissimilatory reduction of crystal ferric phosphate would be greatly inhibited.

Key words: crystal ferric phosphate; dissimilatory $Fe(III)$ reduction; carbon source; paddy