

溶液培养条件下腐殖酸对铁异化还原的影响^①

徐丽娜^{1,2}, 李忠佩^{1,2*}, 车玉萍¹

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 腐殖酸对土壤和水体环境中铁(Fe)的还原过程有重要影响。本文采用从山西大同风化煤、河南巩县褐煤、云南昆明滇池底泥中提取制备的腐殖酸, 通过布置培育试验并接种土壤悬液, 研究了不同来源的腐殖酸对无定形氧化铁异化还原的影响。结果表明: 单独添加腐殖酸对氧化铁的还原几乎没有影响; 而当同时添加腐殖酸与葡萄糖时, 培养基中氧化铁的还原过程显著加强; 腐殖酸浓度越高对氧化铁还原的促进作用越明显。不同来源的腐殖酸因其复杂程度和结构不同, 对氧化铁还原的促进作用有明显差异, 其中山西大同风化煤提取的腐殖酸促进作用最大, 云南昆明滇池底泥和河南巩县褐煤提取的腐殖酸之间则无显著差异。

关键词: 腐殖酸; 铁; 异化还原

中图分类号: S154.2

铁(Fe)的微生物还原(异化还原)过程直接影响 Fe 元素在水底沉积物、淹水土壤和地下水中的移动和分布。Fe 的异化还原过程的强弱程度还影响到水生环境中有毒稀有金属、可溶性 Fe 元素、P 元素的释放, 因为这些物质都通过氧化铁矿物的吸附作用而存留于土壤或底泥中^[1-4]。因此, Fe 的异化还原过程的强弱与环境质量密切相关^[5]。腐殖酸普遍存在于生物圈的土壤^[6]、水和底泥中, 由于结构复杂很难被微生物降解利用, 但是腐殖酸能够在厌氧环境中作为电子桥参与 Fe 的异化还原过程, 在 Fe 还原细菌和 Fe(III) 氧化物之间发挥传递电子的作用^[7]。腐殖酸所具有的这种电子桥的作用克服了 Fe 还原细菌和铁氧化物之间所必须的物理接触的限制性条件, 加速了电子的传递, 促进了 Fe 的微生物异化还原过程^[8-10]。但是, 目前关于腐殖酸的组成结构与其作为电子桥作用的能力之间的关系如何, 尚未能得到深入认识。本文采用从山西大同风化煤、河南巩县褐煤、云南昆明滇池底泥中提取制备的腐殖酸, 通过布置室内培育试验并接种新鲜水稻土悬液, 以葡萄糖作为微生物的有效碳源, 观测溶液培养条件下不同来源的腐殖酸对 Fe 的异化还原过程的影响。结果可为深入认识腐殖酸在 Fe 异化还原过程中的作用机理, 探索利用腐殖酸调控环境物质生物化学过程提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 供试腐殖酸的提取和配制

收集山西大同风化煤、河南巩县褐煤、云南昆明滇池底泥, 采用 NaOH 提取和酸沉淀并经电渗析分离纯化的方法获得腐殖酸样品^[11]。使用时, 将腐殖酸样品溶解于 30 mmol/L 的 NaHCO₃ 溶液中, 高压灭菌。供试腐殖酸样品的基本化学性状见表 1。

表 1 供试腐殖酸的基本化学性状

Table 1 Basic chemical properties of humic acids tested

腐殖酸来源	C(g/kg)	N(g/kg)	E4	E4/E6
山西大同风化煤(HAs)	506.7	52.4	2.62	2.91
河南巩县褐煤(HAh)	508.2	39.4	2.44	4.44
云南昆明滇池底泥(HAk)	451.2	40.3	1.38	2.97

1.2 无定形氧化铁的制备^[12-13]

用 1 mol/L 的 NaOH 将 0.4 mol/L 的 FeCl₃ 滴定至中性, 高压灭菌, 备用。

1.3 微生物接种液的制备

采用新鲜的 0~15 cm 高肥力红壤水稻土制备土壤悬液。土壤采自中国科学院红壤生态实验站, 有机质含量为 39.68 g/kg, pH 5.2, 碱解 N 149.94 mg/kg, 速效 P 12.75 mg/kg, 0.5 mol/L HCl 可提取态 Fe(II+III) 1.57 g/kg。新鲜土样密封保存于冰箱中, 每次制备土壤悬液之前, 取出新鲜土在 28℃ 恒温培养 9

①基金项目: 国家自然科学基金项目(40471066)资助。

* 通讯作者(zhpli@issas.ac.cn)

作者简介: 徐丽娜(1983—), 女, 浙江金华人, 硕士研究生, 主要从事土壤生物化学研究。E-mail: lnxu@issas.ac.cn

天以恢复微生物活性, 然后以水土比 2:1 的比例将土壤置于振荡瓶中振荡 30 min, 迅速用布氏漏斗抽滤, 收集滤液作为微生物接种液备用。

1.4 基础无机盐培养液配置^[12-13]

按 NaHCO_3 2.5 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L、 KCl 0.1 g/L、 NH_4Cl 1.5 g/L、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L 的组成溶解无机盐于去离子水中, 用 HCl 或 NaOH 将 pH 调至 6.8, 高压灭菌, 备用。

1.5 培育试验

无菌操作条件下, 吸取人工制备的混合均匀无定形氧化铁溶液置于厌氧管中作为唯一 Fe 源, 添加无机盐培养液提供微生物所需的矿质元素。设置①去离子水 (对照, CK) 及添加山西大同风化煤腐殖酸和/或葡萄糖处理 (HAs、G、HAs+G、1/2 (HAs+G)), ②葡萄糖加不同浓度腐殖酸处理 (G、G+HAs 2.00 g/L、G+HAs 0.20 g/L、G+HAs 0.02 g/L), ③分别都添加葡萄糖和山西大同风化煤、巩县褐煤、昆明滇池底泥腐殖酸处理 (G、G+HAs、G+HAh、G+HAk)。每处理视取样次数设若干重复。其中, 无定形氧化铁的培养浓度为 50 mmol/L, 葡萄糖的培养浓度为 2.8916 g/L (其含碳量与 HAs 2.00 g/L 的含碳量相等), 试验①中 HAs 的浓度为 HA 2.00 g/L, 试验③中 HAs、HAh 和 HAk 的培养浓度为 HA 2.00 g/L。葡萄糖溶液采用细菌滤器 ($<0.22 \mu\text{m}$) 过滤除菌。以严格的厌氧操作技术接入 1 ml 微生物接种液, 然后充氮气 5 min 除去瓶内氧气, 迅速盖上胶塞, 28℃ 恒温培养。定期采样测定 Fe(II) 和总 Fe 浓度。

1.6 测定方法

在确定的取样期每处理取出 3 个重复, 充分摇

匀, 用移液枪吸取 1 ml 悬液, 置于含 4.9 ml 浸提液 (0.5 mol/L HCl) 的带盖聚乙烯管中, 摇匀, 恒温 28℃ 条件下提取 1 h 后, 用注射器吸取浸提液过孔径为 0.22 μm 的滤膜, 收集滤液, 采用邻菲罗啉比色法测定 0.5 mol/L HCl 可提取态 Fe(II) 和总 Fe 含量, Fe(III) 浓度为总 Fe 浓度和 Fe(II) 浓度之间的差值^[10, 14]。

腐殖酸 C 测定采用费尔恩法^[15], 腐殖酸 N 测定采用半微量开氏法^[16], 腐殖酸光密度的测定按照 Kononova 的方法^[17]。

本文实验数据运用 Spss 12.0 for windows 软件进行 One-Way ANOVA 分析。

2 结果与分析

2.1 腐殖酸和葡萄糖在 Fe 异化还原过程的作用

腐殖酸和葡萄糖的结构和性质有明显差异, 其在 Fe 异化还原中的作用显著不同。结果表明 (图 1), 对照 (CK) 和仅添加腐殖酸 (HAs) 的处理, 整个培养期间 0.5 mol/L HCl 可提取态 Fe(III) 和 Fe(II) 的浓度没有发生变化。但是, 仅添加葡萄糖 (G) 的处理则从培养的第 6 天开始, 0.5 mol/L HCl 可提取态 Fe(II) 浓度开始升高, 0.5 mol/L HCl 可提取态 Fe(III) 的浓度则降低; 培养到 12 天的时候, Fe(II) 的浓度达到最高, 从初始浓度 0.101 g/L 增加至 0.621 g/L, 而 0.5 mol/L HCl 可提取态 Fe(III) 的浓度则从初始浓度的 3.197 g/L 降低到 2.306 g/L。这显示, 仅有腐殖酸存在的条件下, 微生物不能从分解腐殖酸中获得电子而将 Fe(III) 还原成 Fe(II); 而当葡萄糖作为碳源时, Fe 的异化还原能够顺利进行。

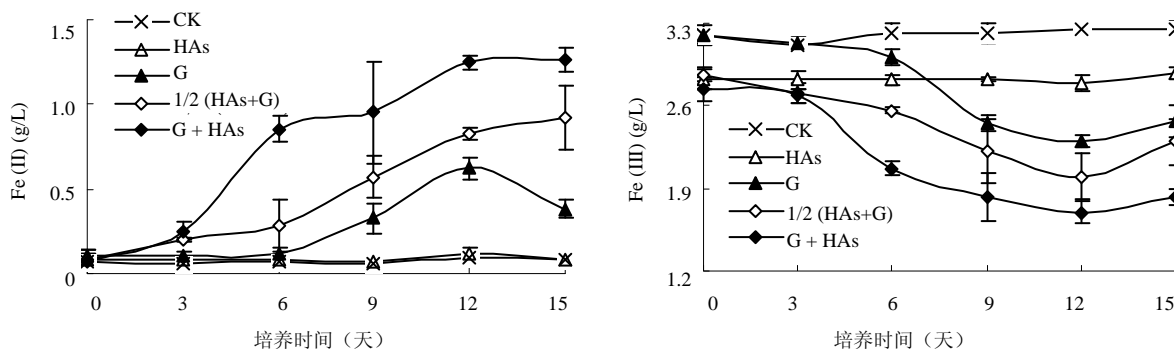


图 1 添加葡萄糖 (G) 和腐殖酸 (HAs) 对悬液中氧化铁还原的影响

Fig. 1 Effect of glucose and humic acid additions on amorphous Fe(III) reduction in suspensions

同时添加葡萄糖和腐殖酸 (HAs+G) 的处理 (包括添加了半量腐殖酸和半量葡萄糖处理 1/2 (HAs+G)), 培养初始 0.5 mol/L HCl 可提取态 Fe(II)

浓度即逐渐升高, Fe(III) 的浓度逐渐降低; 当培养进入第 12 天时, Fe(II) 浓度的增加幅度开始趋于平缓, 此时 HAs+G 处理的 Fe(II) 浓度为 1.248 g/L, 1/2

(HAs+G) 处理的 Fe(II) 浓度为 0.826 g/L, 分别比仅添加葡萄糖(G)的处理高出 1 倍和 0.3 倍, 而 Fe(III) 最终浓度则都比 G 处理低。这表明, 腐殖酸、葡萄糖共存体系中, 腐殖酸对 Fe 的异化还原过程有促进作用。

以上结果表明, 葡萄糖和腐殖酸对 Fe 异化还原过程影响的作用机理是不同的。葡萄糖作为微生物生长的有效碳源, 其分解释放的电子, 促进了 Fe 的异化还原过程。而腐殖酸结构复杂, 短期内很难被微生物分解利用, 只有在有效碳源(如葡萄糖)存在的情况下, 其丰富的官能团可以加速葡萄糖-Fe(III) 之间电子的微生物传递, 促进 Fe 的异化还原过程^[7]。腐殖酸对 Fe 异化还原过程的促进作用非常显著, 1/2 (HA+G) 处理与 G 处理相比, 其添加碳量相近, 但前者的有效碳源明显较低, 而其氧化铁被还原的量却高出后者 0.3 倍; 所有添加葡萄糖和腐殖酸处理的 Fe(II) 最终浓度均比 G 处理高, 且 Fe 还原过程发生时间提早了 6 天左右。

2.2 添加不同浓度的腐殖酸对 Fe 异化还原过程的影响

腐殖酸和葡萄糖共存体系中腐殖酸对 Fe 异化还原的促进作用还随腐殖酸的添加浓度而变化。结果表明(图 2), 随着添加浓度升高, 腐殖酸对 Fe 异

化还原的促进作用明显加强。当 HAs 的添加浓度为 0.02 g/L 时, 与 G 处理相比, 两者之间 0.5 mol/L HCl 可提取态 Fe(III) 和 Fe(II) 浓度无明显差异 ($p>0.05$)。腐殖酸浓度为 0.20 g/L 的处理在培养的第 3 天开始有 Fe(III) 被还原, 其 Fe 异化还原时间比 G 处理提前了 3 天左右的时间; 在培养的第 6 和 12 天 Fe(II) 浓度分别达到 0.37 g/L 和 0.73 g/L, 与 G 处理相比, 均达到显著差异水平 ($p<0.05$), 培养到第 12 天时的 Fe(II) 浓度比 G 处理 (0.53 g/L) 增加了 0.11 g/L。而腐殖酸添加浓度为 2.00 g/L 的处理, 在培养起始就有 Fe(II) 开始慢慢生成, 培养进入第 12 天后, Fe(II) 的浓度开始保持稳定, 此时溶液中 Fe(II) 的浓度为 1.25 g/L, 比 G 处理 Fe(II) 的浓度 (0.62 g/L) 高出 0.63 g/L, 比添加 0.20 g/L 腐殖酸的处理相对于 G 处理的增加值 (0.11 g/L) 更是显著高出 3.7 倍。这表明, 当腐殖酸浓度低于某一定值时, 可能因为其作为电子桥作用的官能团数量过少从而在短期培育时间内不能显示对 Fe 异化还原过程的促进作用; 只有当腐殖酸超过一定浓度水平, 其对 Fe 异化还原的作用才能明显表现。

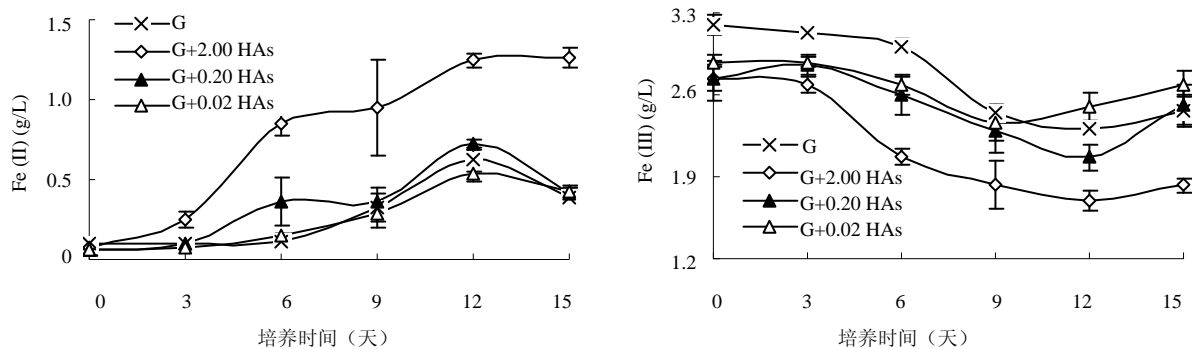


图 2 不同浓度腐殖酸对悬液中氧化铁还原的影响

Fig. 2 Effect of humic acid concentrations on amorphous Fe(III) reduction in suspensions

2.3 不同来源的腐殖酸对 Fe 异化还原过程的影响

不同来源的腐殖酸由于结构和组成的差异, 对 Fe 异化还原过程的影响可能有明显不同。结果表明(图 3), 在有葡萄糖存在条件下, 添加山西大同风化煤、河南巩县褐煤、云南昆明滇池底泥中提取腐殖酸(HAs、HAh、HAk)处理 Fe(II) 的最终浓度分别为 1.26、0.83 和 0.97 g/L, 比 G 处理 Fe(II) 的浓度 (0.25 g/L) 高出 4 倍、2.3 倍和 2.9 倍。可见, 3 种不同来源腐殖酸均能显著促进 Fe 的异化还原过程, 但影响的程度存在明显差异。统计分析表明, 在培养的前 7 天内添加 HAh 和 HAs 的两个处理之间 Fe

异化还原程度很接近 ($p>0.05$), 而添加 HAK 的处理 Fe(II) 含量显著较高 ($p<0.05$)。培养进入第 10 天时这种差异开始发生变化, 此时, 添加 HAh、HAs 和 HAK 的 3 个处理 Fe(II) 浓度分别为 0.656、0.824、0.842 g/L, 添加 HAs 处理中的 Fe(II) 浓度已经接近并在随后的培育期间内开始逐步超过添加 HAK 的处理, 恒温培养进入第 13 天后, 3 种添加腐殖酸的处理的 Fe(II) 浓度开始趋于稳定, 而同时 HAs 处理的 Fe(II) 浓度达到了 1.244 g/L, 显著高于其它两个处理 (0.842 g/L、0.941 g/L) ($p<0.05$), HAh 和 HAK 两个处理之间的 Fe(II) 浓度无显著差异 ($p>0.05$)。

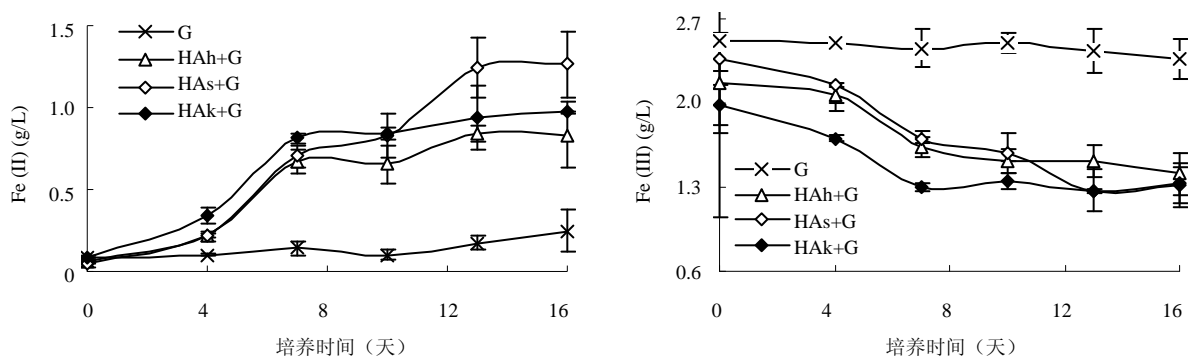


图3 不同来源腐殖酸对悬液中氧化铁还原的影响

Fig. 3 Effect of humic acids originated from different materials on amorphous Fe(III) reduction in suspensions

造成3种腐殖酸影响程度不同的原因可能是腐殖酸内所含的各种官能团组成和数量差异所致。腐殖酸本身是一类非常复杂的大分子物质,其溶液的E4/E6比值可用来指示腐殖酸的腐殖化、团聚化程度和分子量大小^[18],根据E4/E6比值推测山西褐煤和云南滇池底泥腐殖酸的腐殖化程度较高,分子结构比河南褐煤腐殖酸相对复杂,其官能团种类和含量可能相对较多^[19],从而在促进Fe异化还原上的作用更明显。有些研究者选择E4值表征腐殖物质的结构特征^[20-21],根据E4值与醌基-O百分含量呈显著正相关的结果判断3种腐殖酸的醌基含量依次为:山西大同风化煤腐殖酸>河南巩县褐煤腐殖酸>云南昆明滇池底泥腐殖酸,醌基是腐殖酸中作为Fe异化还原过程电子桥的主要官能团,醌基含量越高越有利于促进Fe异化还原过程。比较而言,山西大同风化煤腐殖酸的E4值较高,结构较复杂,对Fe异化还原的促进作用也较大。但是,腐殖酸中能够作为电子桥的官能团非常复杂,不同来源腐殖酸对Fe异化还原的促进程度可能还受其他因素包括伴生物质的影响,其作用机理如何,还需要更深入的研究才能得到揭示。

3 小结

腐殖酸作为一类复杂的高分子有机物,来源和形成条件的差异使不同腐殖酸之间在结构的复杂性、官能团的种类和数量、以及化学性质等方面都有明显不同^[17,22]。

许多文献都表明腐殖酸具有促进Fe异化还原过程的作用^[7,23]。本试验结果表明,腐殖酸和葡萄糖在Fe异化还原过程中对微生物的作用方式是不同的。在短期培育过程中,腐殖酸不能作为微生物生长繁殖所需的碳源参与代谢,却能在有另外有效碳源存在的厌氧条件下作为电子桥促进微生物和氧化铁之间的相互作用。腐殖酸浓度越高对Fe异化还原促进作用越明显。

不同来源的腐殖酸对Fe异化还原作用的影响存在差异,其中山西大同风化煤腐殖酸促进作用最大,河南巩县褐煤腐殖酸和云南昆明滇池底泥腐殖酸之间无显著差异,将3种腐殖酸的E4/E6比值和E4值进行比较,可以推测腐殖酸腐殖化程度越高、结构越复杂、官能团种类越多及官能团中醌基含量越高,则越有利于促进Fe异化还原过程。

参考文献:

- [1] Lovley DR. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol Rev.*, 1991, 55: 259-287
- [2] Lovley DR. Dissimilatory reduction of iron and uranium. *Physiological Ecology*, 1993: 1-74
- [3] Lan YQ, Yang JX, Deng BC. Analysis of dissolved and adsorbed iron in soil suspension for chromium(VI) reduction by sulfide. *Pedosphere*, 2006, 16(5): 572-578
- [4] Tessier A, Rapin F, Cariga R. Trace metals in oxic lake sediments: Possible adsorption onto iron oxyhydroxides. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1985, 49: 183-194
- [5] 姜明, 吕宪国, 杨青, 佟守正. 湿地铁的生物地球化学循环及其环境效应. *土壤学报*, 2006, 43: 493-498
- [6] 余贵芬, 吴泓涛, 蒋新, 青长乐. 腐殖酸结合汞对多年生植物 (*Citrus Sinensis L. Osbeck*) 的生物有效性初探. *土壤*, 2006, 38(4): 435-440
- [7] Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP, Woodward JC. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 1996, 382: 445-448
- [8] Lovley DR. Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, 20: 305-313
- [9] Lovley DR, Fraga JL. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 1998, 26: 152-157

- [10] Michael JM. Dissimilatory iron(III) reduction: Studies on the mechanism and on processes of environmental relevance. *Ersteltt*, 2005, 19(9): 1-87
- [11] 文启孝主编. 土壤有机质研究方法. 北京: 农业出版社, 1984, 112-124
- [12] Lovley DR, Phillips EJP. Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, 51: 683-689
- [13] Lovley DR, Phillips EJP. Novel mode of microbial energy metabolism: Organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54: 1472-1480
- [14] 彭杰, 张扬珠, 周清, 刘香伶, 周卫军. 去除有机质对土壤光谱学特性的影响. *土壤*, 2006, 38(4): 453-458
- [15] 杜丽娟, 文启孝, 张晓华. 应用费尔法测定氯化钠盐土或底土中的有机碳. *土壤*, 1982, 14(4): 149-151
- [16] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999: 147-149
- [17] 李忠佩, 焦坤, 林心雄, 程励励. 施肥条件下瘠薄红壤的生物化学性状变化. *土壤*, 2003, 35(4): 304-310
- [18] 张甲坤, 曹军, 陶澍. 土壤水溶性有机物的紫外光谱特征及地域分异. *土壤学报*, 2003, 40: 118-112
- [19] 科诺诺娃 MM. (周礼恺译). 土壤有机质. 北京: 科学出版社. 1966
- [20] 彭福泉, 高坤林, 车玉萍. 我国几种土壤中腐殖质性质的研究. *土壤学报*, 1985, 22: 64-73
- [21] Chen Y, Senesi N, Schnitzer M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratio. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1977, 41: 352-358
- [22] 魏沙平, 李红陵, 陈飞霞, 魏世强. 不同土壤腐殖酸对辛硫磷水解的影响. *水土保持学报*, 2007, 21: 75-78
- [23] Lovley DR. Reduction of iron and humics in subsurface environments. *Surface Microbiology and Biogeochemistry*, 2001: 193-217

Effect of Humic Acids on Dissimilatory Iron Reduction in Aquatic Incubation

XU Li-na^{1,2}, LI Zhong-pei^{1,2}, CHE Yu-ping¹

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China;

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Humic acids have significant influences on iron reduction in soil and aquatic environment. In this paper, humic acids, extracted from weathering coal of Datong in Shanxi Province, lignite of Gongxian in Henan Province and Dianchi Lake sediment in Kunming of Yunnan Province, were used to investigate their influences on dissimilatory amorphous Fe(III) reduction in aquatic incubation experiment by inoculating soil suspension. Results indicated that single addition of humic acid showed small influence on iron reduction, while addition of humic acid accompanied with glucose intensified significantly iron reduction process in the culture medium. The effect on dissimilatory iron reduction increased with the increase of humic acid concentration added in the culture. Humic acids extracted from the different material had different effects on dissimilatory iron reduction because of the differences in the structures and complexities of these material, and the humic acid extracted from the weathering coal showed the strongest effect on dissimilatory iron reduction, but no significant difference between humic acids from lignite and lake sediment.

Key words: Humic acids, Iron, Dissimilatory iron reduction