

# 亚热带土壤亚铁与厌氧反硝化<sup>①</sup>

续勇波<sup>1</sup>, 蔡祖聪<sup>2</sup>

(1 云南农业大学烟草学院, 昆明 650201; 2 南京师范大学地理科学学院, 南京 210097)

**摘要:** 本文就亚热带土壤亚铁参与反硝化的可能性进行了探讨。研究结果表明: 厌氧还原条件下加入  $\text{KNO}_3$  的处理中,  $\text{Fe}^{2+}$  浓度随培养时间延长而下降, 且  $\text{Fe}^{2+}$  浓度的降低和  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度的降低呈显著正相关。预培养结束后的亚铁浓度( $\ln\text{-Fe}^{2+}$ )和厌氧培养期间  $\text{Fe}^{2+}$  浓度降低速率与反硝化势表征指标  $k$ 、 $b$ 、 $v_7$ , 以及与无定形铁氧化物(活性铁)含量的显著正相关性初步证明, 活性铁通过不同价态铁离子( $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$ )之间的转化, 参与了反硝化的电子传递过程。当有机碳等电子供体受限时,  $\text{Fe}^{2+}$  可作为电子供体参与反硝化还原  $\text{NO}_3^-$ -N。这一结果表明,  $\text{NO}_3^-$ -N 作为电子受体参与厌氧条件下  $\text{Fe}^{2+}$  氧化成  $\text{Fe}^{3+}$  的反应可能在铁氧化物含量丰富的亚热带土壤中普遍存在。

**关键词:** 铁; 厌氧培养; 反硝化; 氧化还原反应

**中图分类号:** S153

还原条件下通常按  $\text{O}_2$ 、 $\text{MnO}_2$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{CO}_2$  的次序依次还原<sup>[1]</sup>。根据这一原则, 反硝化培养条件下  $\text{NO}_3^-$ -N 被还原完之后,  $\text{Fe}^{3+}$  被还原为  $\text{Fe}^{2+}$ , 即  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度的降低伴随着  $\text{Fe}^{2+}$  浓度的升高, 两个过程似乎应该为相对独立的依次进行的还原过程。然而不同价态铁之间的电子传递过程参与反硝化过程国外已有一些文献报道, 这一过程既可以是微生物介导的<sup>[2-3]</sup>, 也可以是纯化学过程<sup>[4-6]</sup>, 亦或是两者兼有。但似乎主要以微生物参与的反应过程为主<sup>[7]</sup>。早在 1966 年 Chao 和 Kroontje 等<sup>[8]</sup>研究表明, 铁的氧化和还原作用造成无机氮转化的复杂情况。在酸性溶液中,  $\text{NO}_3^-$ -N 可被  $\text{Fe}^{2+}$  还原为  $\text{N}_2$ , 中间产物为  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}$  和  $\text{N}_2\text{O}$ , 这些顺序产物与生物反硝化过程出现的相似。之后 Sahrawat<sup>[9]</sup>在含有硫酸盐的酸性稻田土壤中发现  $\text{Fe}^{2+}$  可能参与了  $\text{NO}_3^-$ -N 的化学反硝化。Yamane 和 Okazaki<sup>[10]</sup>在培养实验中发现, 淹水土壤中加入  $\text{NO}_3^-$ -N 后可溶性  $\text{Fe}^{2+}$  的降低。Komatsu 等<sup>[11]</sup>也发现不同价态的铁离子之间的转化可能参与了淹水条件下的氮素反硝化过程。Savant 等<sup>[12]</sup>总结前人的研究工作, 提出了铁氧化物参与淹水土壤中反硝化作用的可能性。

以上结论均是基于温带恒电荷土壤的研究结果。热带亚热带土壤为可变电荷土壤, 其化学性质与温带地区恒电荷土壤有诸多不同<sup>[13]</sup>。热带亚热带土壤铁铝氧化物含量显著高于温带地区土壤<sup>[13-14]</sup>, 其活性

较高的部分既是土壤可变电荷的载体, 同时也为铁参与反硝化创造了物质基础。然而关于亚热带土壤, 尤其是我国亚热带土壤中是否能参与氮素反硝化过程的报道尚不多见。仅有的试验结果表明, 我国亚热带土壤无定形铁氧化物(活性铁)含量与反硝化势呈显著正相关<sup>[15]</sup>, 因此, 可以推测亚热带土壤中厌氧条件下  $\text{Fe}^{2+}$  有可能作为电子供体参与了反硝化过程。为此, 本研究选择易于测定的  $\text{Fe}^{2+}$  含量作为表征铁参与反硝化的表观指标, 研究整个培养期间  $\text{Fe}^{2+}$  的动态变化及其与  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度降低的关系, 以加深对热带亚热带土壤铁循环与氮循环耦合的理解和认识。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试土壤

供试土样采自具有典型亚热带季风湿润性气候特征的江西省(24°29' ~ 30°04' N, 113°34' ~ 118°28' E)。采样地点详细情况见文献<sup>[15]</sup>, 根据中国土壤系统分类土壤类型为铁铝土(Ferralsols)<sup>[16]</sup>。土样涵盖 3 种典型成土母质(第四纪红土(Q)、第三纪红砂岩(S)和花岗岩(G))与 5 种主要利用方式(林地(F)、灌丛(B)、茶园(T)、旱地(U)和稻田(R))共 15 个土壤类型组合, 即 GF、GB、GT、GU、GR、SF、SB、ST、SU、SR、QF、QB、QT、QU 和 QR。依据不同土壤类型组合要求确定相应的采样地点, 每一组合的土壤类型分别选取不

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101605, 31260503)和云南省自然科学基金项目(2010ZC083)资助。

作者简介: 续勇波(1974—), 女, 山西太原人, 博士, 副教授, 主要从事养分资源利用与环境效应研究。E-mail: xuyongboxx@163.com

同的 3 个地点采样作为 3 次重复, 共计 45 个采样地点。每一地点随机选取不同的 3 个点采集 0 ~ 20 cm 土层土样, 然后充分混合均匀作为一个地点的土样。土样采集后于室温下风干, 粉碎过 1 mm 筛, 放于 4°C 冷库中保存备用。供试土壤理化性质见文献[15]。

## 1.2 试验方法

反硝化势的测定采用加入  $\text{KNO}_3$  在恒温条件下淹水厌氧密闭培养法, 试验方法借鉴 Drury 等<sup>[17]</sup>的方法, 并稍作改进, 具体操作步骤为: 称取相当于 30 g 烘干土重的过 1 mm 筛风干土, 装入 250 ml 三角瓶中, 加蒸馏水 30 ml, 用硅橡胶塞密封瓶口, 于  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  下淹水预培养 7 天, 以便激活土壤微生物。预培养结束后, 随机选取 3 瓶测定土壤中的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  含量并作为初始值, 分别表示为  $\text{In-NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{In-NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{In-Fe}^{2+}$ 。

其余培养瓶中注入 10 ml (含 6 mg  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )  $\text{KNO}_3$  溶液 (相当于每 kg 土含 N 量 200 mg, 折合施入大田 N 556 kg/hm<sup>2</sup> (按每公顷面积 20 cm 深土壤重量为  $2.8 \times 10^6$  kg 计算)), 充分混合。将三角瓶用带丁基橡胶塞采气口的特殊硅橡胶塞盖紧并在瓶塞周围涂抹 704 胶以密封瓶口。将 6 个培养瓶连接到真空泵和充  $\text{N}_2$  气装置上, 从采气口将三角瓶抽成真空, 通入  $1.01 \times 10^5 \text{ Pa}$  的高纯  $\text{N}_2$ , 重复 3 次, 每次 10 min, 最后将采气口用 704 胶密封以保证厌氧培养环境, 置于  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  下恒温黑暗条件下培养, 并以此作为厌氧培养起始时间, 记做第 0 天。分别在加入  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  后的 1、2、4、7、11、18 和 28 天取样测定  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  含量。同时设一不加  $\text{KNO}_3$  只注入相同体积 (10 ml) 蒸馏水的处理作为空白对照。所有处理均重复 3 次。

## 1.3 土壤理化性质的测定

$\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  含量的测定: 向培养瓶中按液土比为 4 : 1 加入 3 mol/L KCl 溶液 80 ml (已加水量考虑在内, 使最终浓度为 2 mol/L), 于  $25^\circ\text{C}$ 、250 r/min 下震荡提取 1 h, 离心分离, 过滤, 收集滤液于塑料瓶中, 立即测定提取液中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  含量, 若不能立即测定, 则将提取液保存于 4°C 的冰箱中, 并于一周内完成测定。滤液中的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  含量用荷兰生产的 Skalar<sup>plus</sup>San 流动分析仪比色测定, 相对误差为 3.9%, 检测下限为 0.2 mg/L。根据标准溶液和待测溶液的峰高计算待测液的浓度。

无定形铁铝氧化物: 采用 pH 3.0 草酸铵缓冲液提取, ICP 质谱仪 (IRIS-Advan, 美国产) 测定<sup>[18]</sup>。

土壤  $\text{Fe}^{2+}$  含量: 邻菲罗啉比色法测定<sup>[18]</sup>。

土壤有机碳和全氮测定: 采用德国生产的 Elementar

碳氮元素分析仪测定。

## 1.4 数据处理和分析方法

培养期间  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度随培养时间降低的趋势用一级反应方程和对数方程拟合, 反硝化势用一级反应方程速率常数 ( $k$ )、对数方程回归系数 ( $b$ ) 和 0 ~ 7 天的  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度平均降低速率 ( $v_7$ ) 来表征, 试验结果见文献[15]。用对数方程拟合  $\text{Fe}^{2+}$  浓度随培养时间的降低趋势, 土壤  $\text{Fe}^{2+}$  浓度降低速率表征指标和  $k$ 、 $b$  和  $v_7$  以及土壤性质指标之间的关系采用相关分析方法分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养期间土壤中 $\text{Fe}^{2+}$ 浓度变化

如图 1 所示, 空白对照土壤中  $\text{Fe}^{2+}$  浓度随培养时间延长而增加, 而加入  $\text{KNO}_3$  的处理土壤中  $\text{Fe}^{2+}$  浓度则随培养时间延长而减少。对照中观测到  $\text{Fe}^{2+}$  的升高, 表明培养瓶密闭较好, 能够较长时间维持厌氧条件的存在。对全部 45 个土样的配对  $t$  检验结果表明, 第 7 天对照和  $\text{KNO}_3$  处理土壤中  $\text{Fe}^{2+}$  浓度已分别极显著 ( $P < 0.001$ ) 高于或低于第 0 天初始值 (图 1)。在 28 天的培养期间内, 空白对照的  $\text{Fe}^{2+}$  测定值均极显著 ( $P < 0.001$ ) 高于  $\text{KNO}_3$  处理。图 1 还显示, 培养后期 (约 7 ~ 11 天后)  $\text{KNO}_3$  处理土壤中  $\text{Fe}^{2+}$  浓度已降至最低, 用全培养期的  $\text{Fe}^{2+}$  浓度降低速率作为分析依据将低估培养 7 天内的  $\text{Fe}^{2+}$  浓度降低速率, 故本研究以 0 ~ 7 天的  $\text{Fe}^{2+}$  浓度变化做为数据分析的基础。

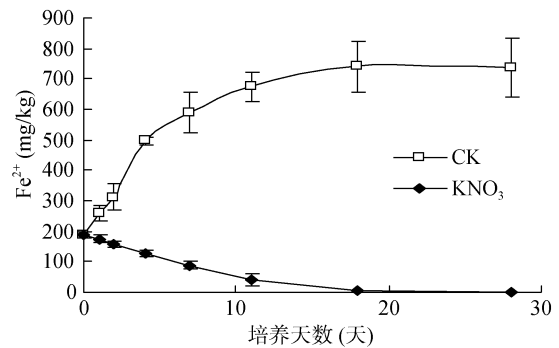


图 1 厌氧培养期间  $\text{Fe}^{2+}$  含量变化 (以 QT3 为例)

Fig. 1 Changes of  $\text{Fe}^{2+}$  contents during anaerobic incubation period (e.g. QT3)

### 2.2 $\text{KNO}_3$ 处理土壤中 $\text{Fe}^{2+}$ 浓度降低速率

$\text{KNO}_3$  处理的 45 个土样中  $\text{Fe}^{2+}$  浓度随培养时间 ( $t$ ) 的降低趋势均可用对数方程拟合:  $[\text{Fe}^{2+}] = a - b \times \ln(t)$ , 平均  $R^2 = 0.66$ , 式中:  $a$  为常数,  $b$  为对数方程回归系数, 以该对数方程中回归系数  $b$  表示  $\text{Fe}^{2+}$  浓度随培养时间的降低速率,  $b$  值越大表示  $\text{Fe}^{2+}$  浓度降低速率越快, 记作  $b_{\text{Fe}}$ 。

KNO<sub>3</sub>处理中, Fe<sup>2+</sup>浓度的降低和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度的降低呈指数正相关关系, 如图 2 所示, 可用指数方程拟合: [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N]=a×e<sup>k[Fe<sup>2+</sup>]</sup>, 且达显著水平(P<0.05), 平均 R<sup>2</sup>=0.60, 式中: a 为常数, k 为指数方程速率常数, [Fe<sup>2+</sup>] 为 Fe<sup>2+</sup> 浓度。其中, k 表征的是培养开始后单位 Fe<sup>2+</sup> 浓度减少量所引起的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度减少量。

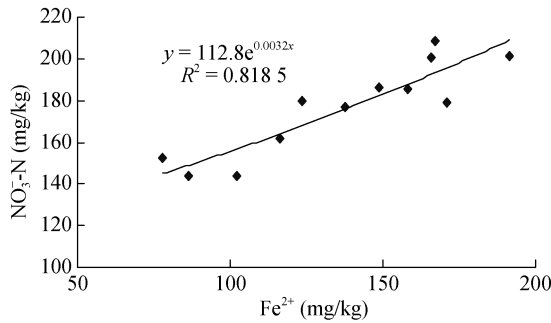


图 2 KNO<sub>3</sub> 处理中 Fe<sup>2+</sup> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度的关系  
Fig. 2 Correlation between Fe<sup>2+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N contents in soil amended with NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N (e.g. QT3)

### 2.3 KNO<sub>3</sub> 处理土壤中 Fe<sup>2+</sup>和反硝化的关系

由表 1 中可见, 无论以对数方程中的回归系数 b<sub>Fe</sub>, 还是以 0~7 天 Fe<sup>2+</sup> 平均降低速率 v<sub>Fe</sub> (即培养期间 Fe<sup>2+</sup> 浓度差除以培养天数) 表征 Fe<sup>2+</sup> 随培养时间降低的快慢程度, 均与反硝化势表征指标 k、b 和 v<sub>7</sub> 呈显著正相关, 相关系数 r 分别为 0.721、0.646、0.656、0.758、0.636 和 0.578 (P<0.01)。值得注意的是, b<sub>Fe</sub> 和 v<sub>Fe</sub> 也分别与 ΔNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (培养 7 天内矿化量) 和 ln-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (预培养结束时的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 浓度, 表征预培养期矿化量) 呈显著相关, 相关系数 r 分别为 0.515、0.893, 0.450 和 0.752 (P<0.01)。除与 Xu 和 Cai<sup>[15]</sup> 试验得到的无定形铁氧化物含量与 k 和 v<sub>7</sub> 呈显著正相关结论一致外, 无定形铁氧化物还与 ln-Fe<sup>2+</sup> (预培养结束时的 Fe<sup>2+</sup> 浓度) (r = 0.472, P<0.01) 和 Fe<sup>2+</sup> 的降低速率 (b<sub>Fe</sub>, v<sub>Fe</sub>) 呈正相关 (r = 0.46~0.51, P<0.01); 此外, 第 0 天的 Fe<sup>2+</sup> 初始值 (ln-Fe<sup>2+</sup>) 也和反硝化势表征指标 k、b 和 v<sub>7</sub> 呈显著正相关 (r = 0.57~0.77, P<0.01),

表 1 Fe<sup>2+</sup> 变化表征指标和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 变化表征指标间的相关性

Table 1 Correlations between indicators of changes of Fe<sup>2+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N

	无定形铁氧化物	ln-Fe <sup>2+</sup>	b <sub>Fe</sub>	v <sub>Fe</sub>	k	b	v <sub>7</sub>	ΔNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	ln-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N
ln-Fe <sup>2+</sup>	0.472**								
b <sub>Fe</sub>	0.511**	0.751**							
v <sub>Fe</sub>	0.455**	0.931**	0.861**						
k	0.314*	0.774**	0.721**	0.758**					
b	NS	0.617**	0.646**	0.636**	0.884**				
v <sub>7</sub>	0.309*	0.568**	0.656**	0.578**	0.893**	0.815**			
ΔNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	0.327*	0.476**	0.515**	0.450**	0.795**	0.767**	0.847**		
ln-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	0.380**	0.656**	0.893**	0.752**	0.815**	0.715**	0.844**	0.662**	

注: \*, \*\* 表示显著水平分别为 P<0.05 和 P<0.01 (n = 45), NS 表示不显著; 下同。

这与 van Cleemput<sup>[19]</sup> 的研究结果一致, 表明无定形铁通过其不同价态的氧化物之间的转化, 参与了反硝化的电子传递过程。

### 2.4 KNO<sub>3</sub> 处理土壤中影响 Fe<sup>2+</sup> 浓度变化的土壤因素

将表征 Fe<sup>2+</sup> 降低速率的指标 b<sub>Fe</sub>、v<sub>Fe</sub> 和土壤理化性质做相关分析发现, 两者均与土壤全碳 (TC)、全氮 (TN) 呈显著正相关, 而与碳氮比 (C/N) 和无定形铝氧化物含量呈显著负相关 (表 2)。无定形铁氧化物是土壤可变电荷的活跃载体, 可通过其不同价态氧化物间的转化参与土壤中的氧化还原反应。Fe<sup>2+</sup> 降低速率与 C/N 和无定形铝氧化物呈负相关, 表明在碳和其他电子供体供应相对不足时 Fe<sup>2+</sup> 有可能作为电子供体参与反硝化的电子传递过程。

表 2 Fe<sup>2+</sup> 降低速率表征指标与土壤性质的相关系数

Table 2 Correlation coefficients between indicators of Fe<sup>2+</sup> content reduction rate and soil properties

	TC	TN	C/N	无定形铝氧化物
b <sub>Fe</sub>	0.410**	0.604**	-0.401**	-0.333*
v <sub>Fe</sub>	0.326*	0.498**	-0.380*	-0.351*

跃的元素之一<sup>[3]</sup>。土壤铁氢氧化物及其铁矿物是土壤表面元素地球化学循环最为活跃的部分, 通过不同价态铁之间的转化与氮素转化过程密切联系。

本研究中预培养结束后土壤中已经富集了由 Fe<sup>3+</sup> 还原而来的 Fe<sup>2+</sup>, 为随后厌氧条件下 Fe<sup>2+</sup> 参与反硝化提供了丰富的 Fe<sup>2+</sup> 底物, 造成 Fe<sup>2+</sup> 的再氧化和硝酸盐的还原。Fe<sup>2+</sup> 呈可溶态, 较不溶解的 Fe<sup>3+</sup> 更容易被微生物利用作为电子供体还原硝酸盐。当有机碳等电子供体有限时, Fe<sup>2+</sup> 可作为电子供体参与反硝化还原 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N。

## 3 讨论

铁是地壳中第四大元素, 也是氧化还原反应最活

本研究结果证明, 厌氧环境条件下微生物利用  $\text{NO}_3^-$ -N 或  $\text{NO}_2^-$ -N 作为电子受体氧化  $\text{Fe}^{2+}$  成  $\text{Fe}^{3+}$ , 这一现象是普遍存在的。 $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$ -N 的氧化还原反应可用下列反应方程表示:  $\text{NO}_3^- + 5\text{Fe}^{2+} + 6\text{H}^+ \rightarrow 1/2\text{N}_2 + 5\text{Fe}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$ <sup>[20]</sup>。这一过程既可以是化学反硝化过程<sup>[4-6]</sup>, 也可以是生物反硝化过程。Komatsu 等<sup>[11]</sup> 认为  $\text{NO}_3^-$  首先由微生物还原为  $\text{NO}_2^-$ -N, 再将  $\text{NO}_2^-$ -N 还原为  $\text{NO}$ , 同时氧化  $\text{Fe}^{2+}$ , 这一步反应主要是化学过程。 $\text{Fe}^{2+}$  的来源主要有两种途径, 一条途径是由生物还原  $\text{Fe}^{3+}$  得到, 因为在加入  $\text{NO}_3^-$ -N 的土壤中,  $\text{Fe}^{3+}$  的化学还原受到抑制。 $\text{Fe}^{3+}$  的生物还原是通过微生物以一种类似于硝酸盐呼吸的机理利用  $\text{Fe}^{3+}$  作为呼吸底物将其还原为  $\text{Fe}^{2+}$ 。另外一条途径是, 厌氧条件下微生物能够利用  $\text{H}_2$  作为电子供体来还原  $\text{Fe}^{3+}$  产生  $\text{Fe}^{2+}$ <sup>[21-25]</sup>。

厌氧条件下  $\text{Fe}^{2+}$  与  $\text{NO}_3^-$ -N 反硝化的反应过程主要是由微生物参与的, 即在中性 pH 厌氧环境下微生物利用  $\text{NO}_3^-$ -N 或  $\text{NO}_2^-$ -N 作为电子受体氧化  $\text{Fe}^{2+}$  成  $\text{Fe}^{3+}$ 。据报道能够进行厌氧  $\text{Fe}^{2+}$  氧化的反硝化菌广泛分布于各种反硝化菌种中<sup>[7,26]</sup>, 是反硝化微生物中的重要组成成员, 约占总反硝化菌的 58%<sup>[3]</sup>。自然界中已经从淡水江河湖沉积物中检测、富集和鉴定出这些微生物<sup>[2,27-31]</sup>。能够进行厌氧  $\text{Fe}^{2+}$  氧化的反硝化菌主要分为两类: 即光能营养型细菌<sup>[3,32-35]</sup>和化能营养型反硝化微生物<sup>[26, 36]</sup>。在参与上述反应的化能营养型反硝化微生物中, 主要以兼性异养的微生物为主, 自养型微生物数量比兼性异养的微生物低一个数量级, 仅占其中的 2%~10%<sup>[3]</sup>。微生物介导的  $\text{Fe}^{2+}$  与  $\text{NO}_3^-$ -N 的反硝化反应使得在厌氧的自然生态环境条件下也能完成铁的循环, 同时造成氮素损失, 因此自然环境下其生态功能和意义还值得深入研究。

本研究未能区分和探讨其生物学机理或化学机理, 然而从试验现象来看, 厌氧条件下  $\text{Fe}^{2+}$  参与的  $\text{NO}_3^-$ -N 还原,  $\text{Fe}^{2+}$  氧化成  $\text{Fe}^{3+}$  的过程, 即  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$ -N 的耦合反应, 广泛存在于供试亚热带土壤中。在富含铁氧化物的亚热带土壤中铁的氧化还原过程很可能是亚热带土壤中氮氧化物氧化还原反应的重要调节因子。这一反应或许可为研究厌氧条件下的  $\text{Fe}^{2+}$  氧化以及污水脱氮提供依据。

#### 参考文献:

- [1] Neue HU. Methane emission from rice fields[J]. *Bioscience*, 1993, 43: 466-474
- [2] Kumaraswamy R, Sjollem K, Kuenen G, van Loosdrecht M, Muyzer G. Nitrate-dependent [Fe (II) EDTA]<sup>2-</sup> oxidation by *Paracoccus ferrooxidans* sp. nov., isolated from a denitrifying bioreactor[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, 29: 276-286
- [3] Hauck S, Benz M, Brune A, Schink B. Ferrous iron oxidation by denitrifying bacteria in profundal sediments of a deep lake (Lake Constance) [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 37: 127-134
- [4] Philips S, Rabaey K, Verstraete W. Impact of iron salts on activated sludge and interaction with nitrite or nitrate[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 88: 229-239
- [5] van Hecke K, van Cleemput O, Baert L. Chemo-denitrification of nitrate-polluted water[J]. *Environmental Pollution*, 1990, 63: 261-274
- [6] Li T, Wang HJ, Dong WY, Liu TZ, Ouyang F, Zhang Q, Dong XQ. Performance of an anoxic reactor proposed before BAF: Effect of ferrous sulfate on enhancing denitrification during simultaneous phosphorous removal[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2014, 248: 41-48
- [7] Nielsen JL, Nielsen PH. Microbial nitrate-dependent oxidation of ferrous iron in activated sludge[J]. *Environmental Science and Technology*, 1998, 32: 3 556-3 561
- [8] Chao TT, Krootje W. Inorganic nitrogen transformations through the oxidation and reduction of iron[J]. *Soil Science Society of America Proceedings*, 1966, 30: 193-196
- [9] Sahrawat KL. Is nitrate reduced to ammonium in waterlogged acid sulfate soil? [J]. *Plant and Soil*, 1980, 57: 147-149
- [10] Yamane I, Okazaki M. Chemical properties of submerged rice soils[G]. *Transactions of the 12<sup>th</sup> international congress of soil science*. New Delhi, India, 1982: 143-157
- [11] Komatsu Y, Takagi M, Yamaguchi M. Participation of iron in denitrification in waterlogged soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1978, 10: 21-26
- [12] Savant NK, McClellan GH. Do iron oxide systems influence soils under wetland rice based cropping systems? [J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1987, 18: 83-113
- [13] 徐仁扣, 李九玉, 姜军. 可变电荷土壤中特殊化学现象及其微观机制的研究进展[J]. *土壤学报*, 2014, 51(2): 1-9
- [14] Qafoku NP, Van Ranst E, Noble A, Baert G. Variable charge soils: their mineralogy, chemistry and management[J]. *Advances in Agronomy*, 2004, 84: 159-215
- [15] Xu YB, Cai ZC. Denitrification characteristics of subtropical soils in China affected by soil parent material and land use[J]. *European Journal of Soil Science*, 2007, 58: 1 293-1 303
- [16] 中国科学院南京土壤研究所土壤系统分类课题组. 中国土壤系统分类检索[M]. 3 版. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2001
- [17] Drury CF, Oloya TO, McKenney DJ, Gregorich EG, Tan CS, VanLuyk CL. Long-term effects of fertilization and rotation on denitrification and soil carbon[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1998, 62: 1 572-1 579
- [18] 鲁如坤. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000
- [19] van Cleemput O. Subsoils: chemo- and biological denitrification,  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  emission[J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1998, 52: 187-194
- [20] Pauwels H, Kloppmann W, Foucher JC, Martelat A, Fritsche V. Field tracer test for denitrification in a pyrite-bearing schist aquifer[J]. *Applied Geochemistry*, 1998, 13: 767-778

- [21] Dassonville F, Godon JJ, Renault P, Richaume A, Cambier P. Microbial dynamics in an anaerobic soil slurry amended with glucose, and their dependence on geochemical processes[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36: 1 417–1 430
- [22] Achtnich C, Bak F, Conrad R. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 19: 65–72
- [23] Achtnich C, Schuhmann A, Wind T, Conrad R. Role of interspecies  $H_2$  transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil[J]. *FEMS Microbiology and Ecology*, 1995, 16: 61–70
- [24] Lovley DR. Bioremediation of organic metal contaminants with dissimilatory metal reduction[J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1995, 14: 85–93
- [25] Nealson KH, Myers CR. Microbial reduction of manganese and iron: new approaches to carbon cycling[J]. *Applied and Environmental Technology*, 1992, 58: 439–443
- [26] Straub KL, Benz M, Schink B, Widdel F. Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 1 458–1 460
- [27] Caccavo F, Lonergan DJ, Lovley DR, Davis M, Stolz JF, McInerney MJ. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov. a hydrogen and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60: 3 752–3 759
- [28] Caccavo F, Blakemore RP, Lovley DR. A hydrogen oxidizing Fe(III)-reducing microorganism from the Great Bay Estuary. New Hampshire[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 3 211–3 216
- [29] Lovley DR, Phillips EJP, Lonergan DJ. Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese by *Alteromonas putrefaciens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55: 700–706
- [30] Balashova VV, Zavarzin GA. Anaerobic reduction of ferric iron by hydrogen bacteria[J]. *Microbiology*, 1980, 48: 635–639
- [31] Straub KL, Buchholz-Cleven BEE. Enumeration and detection of anaerobic ferrous iron-oxidizing, nitrate-reducing bacteria from diverse European sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 4 846–4 856
- [32] Widdel F, Schnell S, Heising S, Ehrenreich A, Assmus B, Schink B. Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria[J]. *Nature*, 1993, 362: 834–836
- [33] Ehrenreich A, Widdel F. Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60: 4 517–4 526
- [34] Heising S, Schink B. Phototrophic oxidation of ferrous iron by a *Rhodomicrobium vannielii* strain[J]. *Microbiology*, 1998, 144: 2 263–2 269
- [35] Heising S, Richter L, Ludwig W, Schink B. *Chlorobium ferrooxidans* sp. nov., a phototrophic green sulfur bacterium that oxidizes ferrous iron in coculture with a *Geospirillum* sp. strain[J]. *Archives of Microbiology*, 1999, 172: 116
- [36] Benz M, Brune A, Schink B. Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemotrophic nitrate-reducing bacteria[J]. *Archives of Microbiology*, 1998, 169: 159–165

## Ferrous Iron Involved in Denitrification in Subtropical Soils Under Anaerobic Condition

XU Yong-bo<sup>1</sup>, CAI Zu-cong<sup>2</sup>

(1 College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2 School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** The possibility of ferrous iron involved in denitrification in subtropical soils was investigated. The results showed that in the treatment  $KNO_3$  added under anaerobic condition, the  $Fe^{2+}$  concentration decreased with incubation time, and the decrease in  $Fe^{2+}$  concentration was significantly positively correlated with the reduction of  $NO_3^-$ -N content. There were significant positive correlations between the  $Fe^{2+}$  concentration at the end of pre-incubation (In- $Fe^{2+}$ ), or the decreasing rate of  $Fe^{2+}$  concentration during the anaerobic incubation period and the indicators of denitrification capacity ( $k$ ,  $b$  and  $v_7$ ). The contents of amorphous Fe oxides (active iron) were also significantly positively correlated with In- $Fe^{2+}$  and the decreasing rate of  $Fe^{2+}$  concentration. The correlation testified preliminarily that the active iron was involved in denitrification by the electron transfer between  $Fe^{2+}$  and  $Fe^{3+}$ .  $Fe^{2+}$  could participate in  $NO_3^-$ -N reduction during denitrification acted as electron donor when other electron donors such as organic carbon were restricted. The results also suggested that nitrate could also serve as an electron acceptor in the oxidation of  $Fe^{2+}$  to  $Fe^{3+}$  under anoxic conditions, indicating the reaction would probably universally exist in the subtropical soils which are abundant in iron oxides.

**Key words:** Ferrum; Anaerobic incubation; Denitrification; Oxidation-reduction reaction