

水稻土中铁氧化物的厌氧还原及其对微生物过程的影响*

曲 东¹ 张一平¹ Schnell S² Conrad R³

(1 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100)

(2 Justus-Li-dig University Giessen, Institute of Applied Microbiology, 35392 Giessen, Germany)

(3 Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology, 35043 Marburg, Germany)

摘 要 采用厌氧泥浆恒温培养实验, 测定了添加 6 种外源氧化铁后土壤中 Fe(II) 和 Fe(III) 浓度的变化, 探讨了不同氧化铁的还原能力及其对土壤产 H₂、产 CO₂、产乙酸和产 CH₄ 过程的影响。结果表明: 无定形氧化铁和纤铁矿易于被还原, 两者的最终还原程度大体相同, 但无定形氧化铁存在还原滞后现象; 针铁矿、赤铁矿、Al 取代针铁矿和 Al 取代赤铁矿难以被还原, 表现出与对照相同的还原特征; 铁还原能导致土壤中 H₂ 和乙酸稳态浓度的降低, 有效抑制了甲烷产生; 添加 Fe(OH)₃ 和纤铁矿后, Fe(III) 还原占总电子传递的贡献率由对照的 18.30% 增至 63.32% 和 46.90%, 而形成甲烷的电子传递贡献率由对照的 80.92% 降至 35.85% 和 52.32%, Fe(III) 还原对电子的竞争消耗, 使土壤产甲烷过程被强烈抑制。

关键词 水稻土, 铁还原, 产甲烷过程

中图分类号 S154.2

在厌氧水稻土中, 受热力学原理控制发生着一系列的化学及生物学反应。随着土壤 Eh 逐渐下降, 取代氧作为电子受体的反应是硝酸盐、Mn(IV)、Fe(III) 和 SO₄²⁻ 的还原以及 CH₄ 的形成。NO₃⁻ 可在 +400 mV 左右还原为 NO₂⁻, SO₄²⁻ 和 Fe³⁺ 还原大约在 +200~ -100 mV 进行, 而受产甲烷菌作用开始大量释放甲烷的 Eh 值低于 -150 mV, 即当土壤中存在 NO₃⁻、SO₄²⁻、Mn(IV) 和 Fe(III) 时, 其 Eh 将维持一个较高的数值, 而阻止有机碳进一步还原为甲烷的微生物过程发生。因此, 矿质成分 NO₃⁻、SO₄²⁻ 和 Fe³⁺ 对厌氧电子传递过程具有重要影响。尽管针对水稻土中碳、氮、硫和铁的土壤化学循环已有许多研究报告, 但侧重铁还原与土壤生物化学过程关系的研究并不多见。鉴于铁在土壤中具有很高的丰度(平均含量估计为 3.8%), 所以水稻土中铁循环研究与碳、氮、硫循环一样, 在土壤生态中具有非常重要的意义。不同土壤类型中氧化铁矿物存在的形式不同, 并决定着土壤许多物理和化学性质的差异。由于研究方法的限制, 人们不能区分土壤中存在不同铁矿物及其各自的还原特征, 更难以估计铁还原对土壤生物化学过程的影响程度。针对这一现实问题, Acht nich^[1] 首先采用添加 Fe(OH)₃ 研究了厌氧培养的水稻土中电子的传递作用, 随后 Jaekel^[2]、曲东和 Schnell 等^[3, 4] 分别报道了 Fe(OH)₃ 对厌氧水稻土中 CH₄ 形成的抑制效应。Conrad^[5, 6] 对这种抑制作用的机理解释为: Fe(III) 在还原过程中竞争消耗了土壤中的 H₂ 及乙酸盐等产甲烷基质。对意大利水稻土而言, 除无定形氧化铁以外, 晶体结构存在的氧化铁占到 75% 以上, 其中包括纤铁矿、赤铁矿、针铁矿及其铝取代物。为了解答这些不同氧化铁晶体能否被还原或还原程度如何的问题, 本文设计了添加不同铁氧化物的厌氧泥浆培养试验, 以期探讨不同氧化铁的厌氧还原特征及其对土壤微生物过程的影响。

1 材料与方 法

1.1 供试土壤及培养方法

土样采自意大利北部 Vercelli 收获后的水稻田(0~20 cm 表层)。土壤自然风干, 捡去土中水稻根及异

* 国家自然科学基金(40141005)、陕西省自然科学基金(2000SM11)资助

收稿日期: 2002-06-28; 收到修改稿日期: 2002-10-10

物, 磨细, 过 1mm 尼龙筛, 保存在聚乙烯塑料盆中备用。水稻土质地为粘壤土。土壤有机碳含量 16.1 mg g^{-1} , 水溶性硫酸盐 $0.317 \text{ nmol g}^{-1}$, 用 $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ 溶液提取的 Fe(II+III) 总量为 $95.10 \text{ mmol kg}^{-1}$ 。实验采用泥浆培养的方法。称取风干土样 200g, 于 1 L 培养瓶中, 加入 200 ml 抽气除 O_2 后的去离子水(对照)、或无定形氧化铁[Fe(OH)_3] 悬液、纤铁矿($\gamma\text{-FeOOH}$)、针铁矿($\alpha\text{-FeOOH}$)、Al 取代针铁矿(Al-Geothite)、赤铁矿(Fe_2O_3)及 Al 取代赤铁矿(Al-Hematite) 悬液, 通 N_2 除去培养瓶中的 O_2 , 密封, 氧化铁加入量为 100 mmol L^{-1} 泥浆。所有实验均分为两套并重复 3 份。一套用于气体(CH_4 、 CO_2 和 H_2) 测定, 另一套用于采集土壤悬液, 测定 Fe(II) 、 Fe(III) 和有机酸浓度。25℃ 恒温室中避光培养。

1.2 不同氧化铁的制备

为了研究土壤对外源铁氧化物的作用, 人工合成了无定形氧化铁、纤铁矿、针铁矿、赤铁矿、Al 取代针铁矿及 Al 取代赤铁矿, 并进行必要的纯化、铁和铝含量测定及 X-ray 晶体结构鉴定。铁氧化物制备方法主要参照 Schwertman 和 Cornell 介绍的合成方法^[7], 部分原料的选用上有所改动。铁、铝含量测定采用原子吸收分光光度法。X-射线晶体分析采用晶粉法。样品送到德国 Phillips 大学地质矿物实验室测定, 以确认所合成产物的可靠性。

1.3 测定项目和方 法

采样时由培养瓶的下面侧管放出均匀的土壤悬液, 迅速地吸取土壤悬液 0.35 ml 于预先称重过的盛有 4.6 ml $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ 溶液的具塞塑料管($\Phi 10 \times 70 \text{ mm}$) 中, 加盖、摇匀, 称重, 以确定所采集土壤悬液的重量。于室温下静置浸提 24 h^[8]。吸取 100 μl 提取液, 加到装有 0.9 ml $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ 溶液的 1.5 ml 离心管中, 摇匀, 于 15000 r min^{-1} 离心 5 min, 小心吸取上清液 400 μl , 用 HPLC 法测定 Fe(II) 和 Fe(III) ^[8]。另外收集土壤悬液于 2 ml 离心管中, 15000 r min^{-1} 离心 5 min, 过 0.2 μm 滤膜, 采用折射率检测器, 离子色谱法测定土壤滤液中不同脂肪酸、硝酸盐及硫酸盐浓度^[9]。 H_2 、 CO_2 和 CH_4 分压测定时, 将培养瓶中泥浆摇匀, 直接采集培养瓶中气体, 气相色谱法测定。 H_2 采用 TCD 检测器, CO_2 和 CH_4 采用 FID 检测器^[10]。土壤泥浆氧化还原电位(Eh) 测定采用 N_2 保护下铂电极法。

2 结果与讨论

2.1 水稻土中铁氧化物的厌氧还原特征

厌氧水稻土中 Fe(II) 的产生是由微生物还原土壤中的高价铁所导致。细菌对铁的还原能力越强, 产生的 Fe(II) 也越多。然而, 细菌对氧化铁的还原是有一定选择性的, 无定形氧化铁通常较容易被还原, 而晶体态的难以被还原^[11]。所以, 不同氧化铁在土壤中将表现出不同的还原特征。由图 1 可见, 添加无定形氧化铁和纤铁矿后, Fe(II) 的最终产生量显著大于对照(土壤自身氧化铁的还原)和添加其它氧化铁处理, 说明这 2 种铁氧化物是容易被还原的。与 Fe(II) 产生相对应, 由培养过程中 Fe(III) 浓度变化曲线也证明了 Fe(OH)_3 和纤铁矿可以被微生物还原利用, 并且 Fe(II) 的产生与 Fe(III) 的还原具有很好的相关关系, R^2 分别为 0.975 2 和 0.960 4。添加针铁矿、赤铁矿及其 Al 取代物则与对照没有明显差异, 显示这些氧化铁是难以被还原的。以上结果表明, 微生物在还原氧化铁时, 易于利用比表面大的非晶体及易溶性的铁, 而对有稳定晶体结构的针铁矿及赤铁矿是难以利用的, 这与纯培养试验的结果完全一致^[11]。

尽管 Fe(OH)_3 最终能被很好还原, 但在 30 d 以前 Fe(II) 产生量始终低于对照, 铁还原表现出明显的滞后现象。究其原因可能在于: (1) 添加 Fe(OH)_3 后会引起土壤的氧化还原电位升高, 导致还原条件减弱, 铁还原速率减慢; (2) 添加 Fe(OH)_3 后, 由于其具有较大的比表面, 对 SO_4^{2-} 和其它阴离子的吸附性增大。在厌氧还原过程中, 表面吸附的 SO_4^{2-} 产生竞争还原, 而使 Fe(III) 的还原滞后; (3) 同样由于 SO_4^{2-} 及其它阴离子的吸附, 使氧化铁与铁还原菌的有效接触减少, 结果也可能导致 Fe(III) 溶解性减弱。图 2 显示, 添加 Fe(OH)_3 使土壤悬液的 Eh 值上升, 并随着添加量的增加而增加。由图 3 看出, 添加无定形氧化铁将导致土壤溶液中硫酸盐浓度的降低, 特别是在培养的初始阶段(0~4 d) SO_4^{2-} 浓度几乎接近于零, 其后随着土壤中 Fe(III) 的还原, 被吸附的 SO_4^{2-} 逐步释放出来, 至 15 d 时达峰值, 30 d 以后与对照相同, 这与 Fe(II) 产生量在 30 d 后超出对照的结果是一致的。目前, 微生物还原铁的机制尚不清楚, 但人们普遍认为细菌对铁的溶解能力是影响铁还原的重要因素。有人假设, 铁还原的关键是铁还原

酶对矿物态铁的溶解^[12]，以及土壤中有机络合物对 Fe(III) 的络合溶解，以此推论，当吸附了大量的阴离子时，可能会对铁还原酶的活性产生不利影响，并使 Fe(III) 的溶解能力下降，进而导致 Fe(II) 产生量降低。

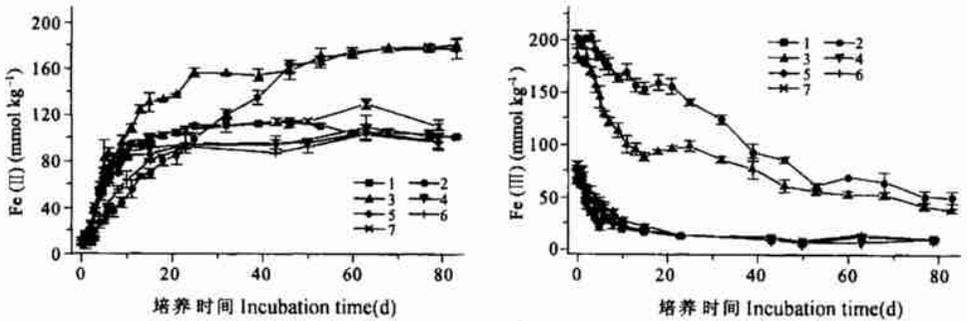


图1 厌氧泥浆恒温培养过程中Fe(II)和Fe(III)浓度的变化

Fig.1 The variation of iron(II) and iron(III) concentrations in anaerobic incubated paddy soil

1. 对照; 2. 添加无定型氧化铁; 3. 添加纤铁矿; 4. 添加针铁矿; 5. 添加铝取代针铁矿; 6. 添加赤铁矿; 7. 添加针铁矿赤铁矿。(下同)

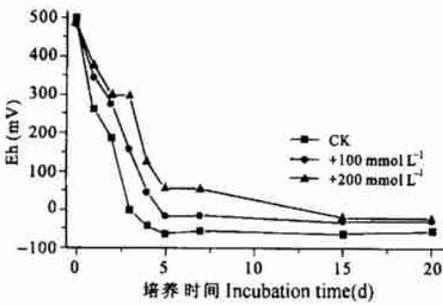


图2 添加 Fe(OH)₃ 对土壤泥浆 Eh 值的影响

Fig.2 Effect of ferric hydroxide addition on redox potential

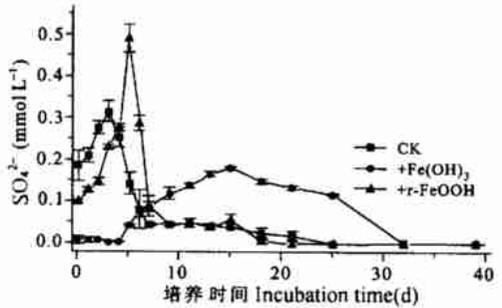


图3 添加氧化铁对土壤溶液中硫酸盐浓度的影响

Fig.3 Effect of iron oxide addition on sulfate concentration in soil solution

2.2 水稻土中铁氧化物对微生物过程的影响

厌氧条件下土壤的生物化学变化可由其产 H₂、产酸、产 CO₂ 及产甲烷过程来表示。就土壤自身而言，在有机质分解过程中将产生大量的 H₂、CO₂ 及乙酸等小分子量的脂肪酸。在极端厌氧的产甲烷菌作用下，通过利用 H₂ 还原 CO₂ 及乙酸的脱甲基化生成甲烷。土壤淹水培养的初期，首先是 H₂ 和乙酸的大量积累，并作为电子供体。当土壤中 NO₃⁻、SO₄²⁻、Fe(III) 等其它电子受体被消耗后，产甲烷菌开始迅速繁殖，甲烷浓度不断增加，H₂ 及乙酸浓度迅速降低，然后维持基本恒定的浓度水平。此时，体系中 H₂ 及乙酸的消耗与 CO₂ 和 CH₄ 的产生将达到一种动态平衡。Conrad^[5]报道，稳态的 H₂ 及乙酸浓度将作为一个特征值影响着水稻土的产甲烷过程，即对体系微生物过程的影响将从 H₂、CO₂、乙酸及 CH₄ 浓度变化来体现。

添加不同氧化铁处理中 H₂ 浓度随培养时间的变化见图 4。添加无定形氧化铁和纤铁矿能显著降低体系中 H₂ 的浓度。对照的稳态 H₂ 分压大约在 1.7~ 3.0 Pa 左右，而添加 Fe(OH)₃ 或纤铁矿处理在 8 d 后降低到 0.3~ 0.4 Pa，并维持到培养结束。添加其它氧化铁处理在 20 d 以前 H₂ 浓度也有一定程度的降低，其后与对照基本相同，稳定在 1.7~ 2.0 Pa 上下。添加无定形氧化铁和纤铁矿引起的 H₂ 稳态浓度降低的原因是利用 H₂ 的铁还原增加所导致。

由图 5 可见, 添加无定形氧化铁和纤铁矿亦能使乙酸浓度急剧降低。培养开始的 3 d 内, 乙酸浓度均急剧增大, 此时期反映了土壤中由于厌氧发酵过程而导致的乙酸形成为主要过程。其后, 微生物对乙酸的利用开始增加。由于添加了易还原的氧化铁, 如 $\text{Fe}(\text{OH})_3$, 利用乙酸的铁还原菌加剧了乙酸的消耗, 导致体系中乙酸浓度迅速降低, 并使乙酸在 7 d 后维持 $10\sim 20 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的低稳态浓度。对纤铁矿来说, 它有部分易还原的 $\text{Fe}(\text{III})$, 在 5 d 时与无定形氧化铁相同, 能使乙酸浓度急剧降低, 但随后乙酸浓度又逐渐回升, 至 15 d 时与对照相近, 但其后又迅速降低到与无定形氧化铁相近的水平。45 d 后, 对照与添加氧化铁处理的乙酸浓度都保持在 $10\sim 20 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的较低稳态浓度水平。对比铁还原过程, 此时的铁还原也已基本稳定。

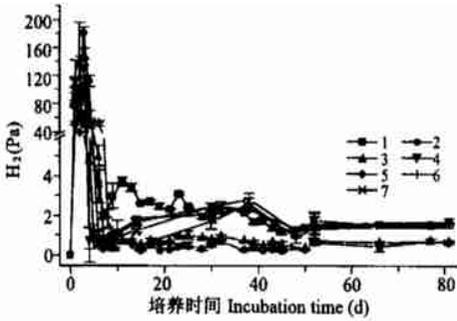


图 4 添加不同氧化铁对土壤泥浆中 H_2 分压的影响
Fig. 4 Effect of iron oxide addition on H_2 partial pressure in anaerobic incubated slurry

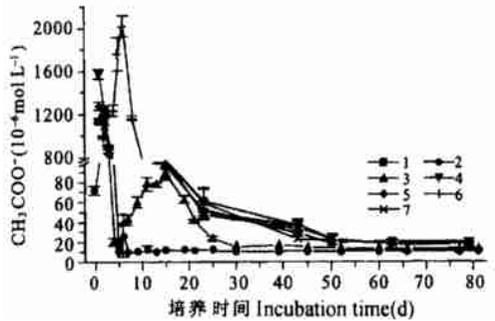


图 5 添加不同氧化铁对土壤泥浆中乙酸盐浓度的影响
Fig. 5 Effect of iron oxide addition on acetate concentration in anaerobic incubated slurry

添加不同氧化铁后, 对土壤泥浆中 CO_2 产生量的影响由图 6 表示。添加无定形氧化铁对 CO_2 生成量的影响大于纤铁矿处理, 其峰值浓度分别为对照的 44% 和 65%。培养 80 d 以后, 添加氧化铁处理的 CO_2 产生量仅为对照的 17% 左右。添加易还原氧化铁导致 CO_2 分压降低的原因主要是 $\text{Fe}(\text{II})$ 对碳酸盐的固定 (形成 FeCO_3), 这可以通过测定土壤中无机碳的方法来证明 (关于铁还原对土壤碳平衡的影响将另文论述)。添加其它氧化铁对 CO_2 分压的影响是极其微弱的。

甲烷产生的主要途径包括由 H_2 还原 CO_2 及乙酸的脱甲基作用。既然易还原氧化铁能有效地降低 H_2 、 CO_2 和乙酸浓度, 因而也必将影响其产甲烷过程。由图 7 看出, 在培养初期 (0~8 d) 无定形氧化铁和纤铁矿处理的产甲烷量与对照没有显著差别, 且两者作用基本相同。在培养的 8~50 d, 对照的甲烷产生量迅速增大, 而添加 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 处理的产甲烷量却维持在约 0.6~1 kPa 的低水平, 尽管添加纤铁矿处理

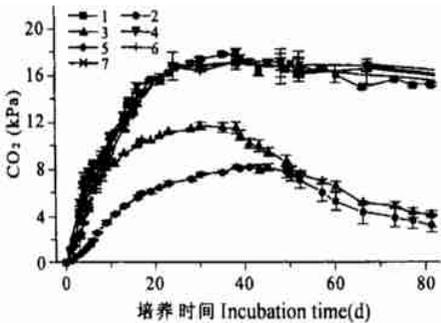


图 6 添加不同氧化铁对土壤泥浆中 CO_2 分压的影响
Fig. 6 Effect of iron oxide addition on CO_2 partial pressure in anaerobic incubated slurry

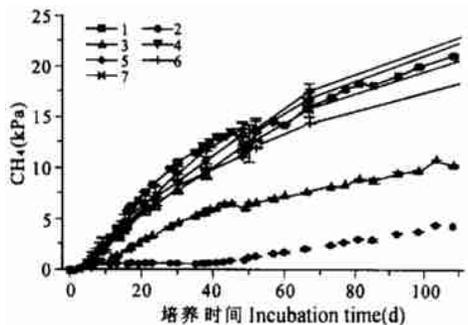


图 7 添加不同氧化铁对土壤泥浆中 CH_4 分压的影响
Fig. 7 Effect of iron oxide addition on CH_4 partial pressure in anaerobic incubated slurry

的甲烷产生量比添加 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 处理的大,且保持增长趋势,但同样表现出显著的抑制作用。培养 50 d 以后, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 处理产甲烷量开始增加,并与纤铁矿保持大体相似的增长速率,显示易还原 $\text{Fe}(\text{III})$ 的大量消耗,对产甲烷过程的竞争作用减弱。添加其它氧化铁后,对土壤中 CH_4 自身的产生特征没有明显的影响。

添加氧化铁对厌氧水稻土中微生物过程的影响还可以从体系的电子传递过程变化体现。厌氧水稻土中发生的主要电子传递过程包括:(1) $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$ (5e 转移), (2) $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$ (8e 转移), (3) $\text{Fe}(\text{III}) \rightarrow \text{Fe}(\text{II})$ (1e 转移), (4) $\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$ (8e 转移)。根据土壤中测得的各种电子受体的数量,可以计算出体系内总电子转移数及各个过程电子转移数量占总电子转移数的百分数(贡献率)。由表 1 可见,不同处理之间 NO_3^- 及 SO_4^{2-} 对总电子传递的贡献率相近,并且所占的比例很小;添加不同氧化铁后,对 NO_3^- 及 SO_4^{2-} 还原影响不大,主要导致铁还原和产甲烷量的变化。添加 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 后, $\text{Fe}(\text{III})$ 还原对总电子传递的贡献率由对照的 18.30% 增至 63.32%,使甲烷形成对总电子传递的贡献率由对照的 80.92% 降至 35.85%;添加纤铁矿后,铁还原过程增至 46.90%,甲烷形成过程降至 52.32%,由此可见,由于 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原对电子的竞争消耗,使甲烷产生被强烈抑制。赤铁矿和铝取代赤铁矿的作用是极其微弱的,而针铁矿和铝取代针铁矿不能抑制甲烷产生。

表 1 不同电子受体在电子传递过程中的贡献率

Table 1 Contribution of various electron receptor to electron transfer processes(%)

处 理 Treatment	还原过程 Reduction processes			甲烷形成 Production of methane
	NO_3^-	SO_4^{2-}	$\text{Fe}(\text{III})$	H_2/CO_2
对照	0.035	0.741	18.30	80.92
$\text{Fe}(\text{OH})_3$	0.037	0.791	63.32	35.85
$\gamma\text{-FeOOH}$	0.035	0.745	46.90	52.32
$\alpha\text{-FeOOH}$	0.033	0.697	16.18	83.09
铝取代针铁矿	0.034	0.722	15.28	83.96
Fe_2O_3	0.039	0.833	20.20	78.93
铝取代赤铁矿	0.035	0.738	20.71	78.52

综合以上结果可见,不同氧化铁在土壤中的还原状况有一定的区别,无定形氧化铁和纤铁矿能够较容易地还原,并且对体系中 H_2 、 CO_2 、 CH_4 及乙酸盐浓度具有十分显著的降低作用。表明铁还原亦显著地影响着土壤的生物化学过程。进一步深入研究铁还原对土壤生物化学变化的影响及其微生物学机理,对于正确认识铁在土壤微生物生态中的作用,无疑具有重要的理论和实际意义。

参考文献

1. Achnich C, Bak F, Conrad R. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils*, 1995, 19: 65~ 72
2. Jaekel U, Schnell S. Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 1 811~ 1 814
3. Qu D, Schnell S. Effect of iron oxides addition on methanogenesis in paddy soil. *Bio-Spektrum. VAAM' 99 Jahrestagung, Germany*. 1999. 111~ 112
4. 曲东, Schnell S. 外源氧化铁对水稻土甲烷形成的抑制. *环境科学学报*, 2002, 22(1): 65~ 69
5. Conrad R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentration in methanogenic soil and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1999, 28: 193~ 202
6. Yao H, Conrad R. Thermodynamics of methane production in different rice paddy soils from China, the Philippines and Italy. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 463~ 473

7. Schwertmann U, Cornell R M. Iron oxides in the Laboratory. Preparation and characterization. VCH, Weinheim. 1991. 69~144
8. Schnell S, Ratering S. Simultaneous determination of iron(III), iron(II), and manganese(II) in environmental samples by Ion chromatography. *Envim. Sci. Technol.*, 1998, 32: 1 530~ 1 537
9. Krumboech M, Conrad R. Metabolism of position- labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1991, 85: 247~ 256
10. Conrad R, Schuetz H, Babbe M. Temperature limitation of hydrogen turnover and methanogenesis in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 1987, 45: 281~ 289
11. 曲东, Schnell S. 纯培养条件下不同氧化铁的微生物还原能力. *微生物学报*, 2001, 41(6): 745~ 749
12. Lovley D R. Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiol. Reviews*, 1997, 20: 305~ 313

REDUCTION OF IRON OXIDES AND ITS EFFECT ON MICROBIAL PROCESSES IN ANAEROBIC PADDY SOIL

Qu Dong¹ Zhang Yiping¹ Schnell S² Conrad R³

(1 Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2 Justus-Liebig University Giessen, Institute of Applied Microbiology, 35392 Giessen, Germany)

(3 Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology, 35043 Marburg, Germany)

Summary

The microbial reduction of ferrihydrite, lepidocrocite, hematite, goethite and Aluminum-substituted iron oxides were examined under anaerobic incubation by slurry experiment. The variation of the partial pressure of H₂, CO₂, CH₄ and the acetate concentration were determined. The results indicated that different iron oxides had been shown different reduced ability in slurry. The ferrihydrite and lepidocrocite were easily to be reduced, which had almost same reduced level, meanwhile in the addition of ferrihydrite, there was a reduced hysteresis. The goethite, hematite, Al-substituted goethite and Al-substituted hematite were difficult to be reduced, which showed a same characteristic of iron reduction with control. Iron reduction can cause the decrease of H₂ and acetate concentration, and then methane production was inhibited. By ferrihydrite and lepidocrocite addition, the contribution (%) of electron-transfer belong to iron reduction were respectively increased to 63.32% and 46.90% from 18.30% (control), however, the contribution (%) by methane production were respectively decreased to 35.85% and 52.32% from 80.92% (control). Because of electron competing consumption of iron reduction, the methanogenesis was greatly inhibited.

Key words Paddy soil, Iron reduction, Methanogenesis