

王娟娟,刘玲玲,金 婷,等. 设施输液管道淤堵物的微生物铁还原特征[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):509-513.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.151

设施输液管道淤堵物的微生物铁还原特征

王娟娟,刘玲玲,金 婷,杨 静,盛海君

(扬州大学环境科学与工程学院,江苏扬州 225009)

摘要:结合理化分析、矿物分析与微生物方法,研究水肥一体化设施管道淤积物样品铁还原潜势及对铁氧化物存在的影响。结果表明,样点 FS1 与样点 FS2 的水样均为弱酸性,接近 6,而样点 FS1 的含铁量与铁还原潜势均高于样点 FS2;添加外源有机碳源对样品的三价铁还原速率有促进作用,其中以乳酸促进作用最为明显,甲酸对体系的铁还原速率的促进作用则较小。不同样品对有机碳源的反应有差异,可能与微生物组成及铁氧化物成分不同有关。外加碳源培养后,与铁还原有关的微生物明显富集,以地杆菌属(*Geobacter* sp.)、脱硫芽孢弯曲菌属(*Dsulfosporosinus* sp.)及脱亚硫酸菌属(*Desulfitobacterium*)为代表。由结果可知,可以通过调节管道的氧化还原状态及选择有机碳源种类,加速氧化铁的还原溶解,从而缓解管道淤堵。

关键词:微生物;铁还原;设施管道;淤堵物

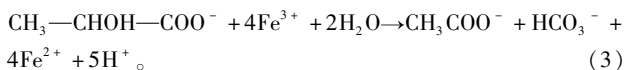
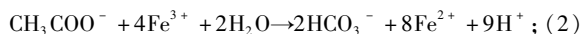
中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0509-05

铁(Fe)是地球上较丰富的金属元素,铁的循环影响各种地球化学及生物化学过程。微生物通过参与调控铁元素的氧化或还原,为其生长提供能源,微生物参与的铁循环过程受到越来越多的关注^[1]。铁在自然界中主要存在形态为二价[Fe(Ⅱ)]与三价[Fe(Ⅲ)],前者可以通过化学过程与微生物作用使铁氧化生成 Fe(Ⅲ)氧化物。这类氧化铁常见于富铁的土壤、矿山、湿地以及工业系统如管道等^[2-4]。微生物铁氧化物的形成与去向具有重要的生态意义^[5]。一方面,铁的氧化与还原过程存在电子的转移,影响着其他地球化学循环;另一方面,铁氧化物因其比表面积大并带有电荷,对环境中各种重金属及有机污染物有较强的吸附固定能力。铁氧化作用消耗氧气,从而形成微厌氧环境,为异化还原微生物生长提供环境条件。氧化铁的存在为铁还原微生物提供电子受体,用于厌氧呼吸。铁氧化物的形态与种类影响异化还原过程^[6],而异化铁还原过程则会促使铁形态发生改变^[7]。

自然界中三价铁的还原主要通过异化还原过程进行,常见于淹水土壤、底泥及其他地下环境等^[8]。异化铁还原是指微生物利用细胞外三价铁为末端电子的受体,通过氧化作为电子供体的有机物将 Fe(Ⅲ)还原为 Fe(Ⅱ),获得能量以维持生长。微生物异化还原铁利用多种有机酸作为电子供体与碳源,因而对主要元素的地质环境循环,尤其是碳循环有着深刻的影响。甚至有研究认为,微生物铁还原是地球上最早将有机碳转化为二氧化碳的过程^[9-10]。铁还原过程还可耦联有机物的氧化降解,包括氯代有机物、偶氮染料等,并影响到一些重金属和有毒元素的形态^[11-14],因而在环境污染与修复

领域受到越来越多的关注。

参与铁氧化过程的微生物在形态与分类学上各异。已知分离菌种包括嗜热、嗜酸与嗜碱的细菌与古菌^[10]。其中,研究较为广泛的代表性菌属有地杆菌属(*Geobacter*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、金属还原地杆菌(*Geobacter metal lireducens*) GS-15 是首次分离的异化铁还原细菌,在 Fe(Ⅲ)还原的过程中同时分解苯和甲苯等芳香族化合物^[15]。此类细菌常使用小分子脂肪酸如甲酸、乙酸、乳酸及 H₂ 等。其主要反应式如下:



在水肥一体化设施栽培中,管道淤堵是较为常见的问题,而在铁含量较高的情况下,氧化铁的形成往往是形成管道淤堵的直接因素^[4]。因其产生速度较快^[16],清理和修复工作较为困难。异化还原细菌可利用氧化态铁作为电子受体,同时导致铁氧化物的还原与溶解。因此,研究不同条件下铁氧化还原,对于调控铁氧化物的去向、清除管道淤堵具有重要意义。本研究比较 2 个样点的排水管道中的不同铁氧化的微生物还原潜势以及参与铁还原的主要微生物群落,以探明不同样品中铁还原的影响因子,为了解水肥一体化设施管道环境中铁氧化物的存在与转移规律提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本试验共设定 2 个区域(FS1、FS2),各 2 个样点(FS1A、FS1B、FS2C、FS2D),采集管道内水样与淤堵物(主要为铁氧化物)。样品采集用严格的灭菌设备与方法。铁氧化物用不锈钢药匙收集,存入无菌离心管内。分 2 份保存:用于室内培养以及铁氧化物矿物分析的样品存放于冷却箱内,而用于常规 DNA 分离的样品则立刻用干冰冷冻保存。同时,采集水

收稿日期:2016-09-13

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK20160468)。

作者简介:王娟娟(1979—),女,江苏泗洪人,博士,讲师,主要从事农业微生物资源利用研究。E-mail:wangjuanjuan@yzu.edu.cn。

通信作者:盛海君,硕士,高级农艺师,主要从事环境科学研究。

E-mail:hjsheng@yzu.edu.cn。

样,1 份冷藏保存,用于室内培养;1 份用 0.2 μm 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜过滤,分别用 50% 硝酸或 50% 盐酸酸化,用于测定水样铁及其他元素含量。

1.2 培养试验

对于铁还原潜势测定,样品处理过程均为严格无菌厌氧操作,在厌氧箱内进行。每个样品称取 5 g 铁氧化物,加同地点采样的水样(经吹氮气去氧处理)至体积 75 mL,于密封血清瓶内混匀。分别添加甲酸、乙酸及乳酸,使得最终浓度为 10 mmol/L。另设不加任何碳源的对照(预试验结果表明,加入杀菌剂与否与常规对照相比没有明显区别,因而为操作安全方便,对照只使用不加碳源不加杀菌剂处理)。对照与处理各重复 3 次,在室温(25 ℃)下避光培养。隔 0~3 d 从各处理中取 1 mL 混合培养液,过滤后测定样品 pH 值及二价铁含量变化,持续采样至 4 周以后。

1.3 理化分析与测定

常规理化性质包括 pH 值、温度、含氧量、电导率等,在现场用便携式电极测定。

铁氧化物矿物采用拉曼光谱分析,波长为 532 nm,物镜为 100 倍,获取时间为 300~1 800 s,光谱分辨率为 6 cm⁻¹。

金属离子含量用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES)及电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测定。

铁元素测定用邻菲罗啉显色、紫外-可见分光光度计测定。硫酸根离子用氯化钡显色、紫外-可见分光光度计测定。

1.4 分子生物学测定

称取 0.3 g 样品用于 DNA 提取,采用十六烷基三甲基溴

化铵-十二烷基硫酸钠(CTAB-SDS)处理、酚-三氯甲烷-异戊醇提取、异丙醇沉淀方法,具体操作步骤与条件见文献[17]。提取后的 DNA 用通用细菌 16S 基因片段引物 27F/1492R 扩增,巢式扩增采用通用引物 341F(GC)与 907R。扩增后的产物用于变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(DGGE)。电泳条件为 100 V,60 ℃,16 h。回收主要条带,继续扩增,并送至 Macrogen Inc 测定基因片段序列。

1.5 数据分析

数据图表生成用 Excel 或 SigmaPlot。方差分析用 SPSS,其中 $P<0.1$ 为差异显著。用统计分析软件 R(Jaccard 相似度)来分析样品变性梯度凝胶电泳(DGGE)凝胶图谱的微生物群落结构差异。

2 结果与分析

2.1 几个水样的理化性质

表 1 结果显示,几个样品总铁含量均较高,最高达 325.05 mg/L,但 2 个样点之间差异明显;还原态铁与总铁之间不存在相关性,以样品 FS1B 还原态铁比例最低,约占总铁含量 38%,其他几个样品还原态铁比例则高达 90%~95%;所有样品的 pH 值介于 5.15~6.06 之间,均为弱酸;溶解氧含量较高,FS1、FS2 样品平均分别为 12.00、3.15 mg/L。虽然样品的含氧量不低,其还原态铁含量仍较高,这可能与地下水不断供给有关。溶解氧含量测定结果与总铁量成正比,样点 FS1 平均值明显高于样品 FS2。

表 1 不同采样点管道水的基本理化性质

样品	pH 值	O ₂ 含量 (mg/L)	全铁含量 (mg/L)	二价铁含量 (mg/L)	溶解氧含量 (mg/L)	温度 (℃)
FS1A	5.17	2.74	325.05	295.12	11.50	19.30
FS1B	5.15	3.76	307.18	116.48	12.50	18.60
FS2C	5.85	4.11	74.84	70.56	2.40	19.20
FS2D	6.06	1.97	77.07	71.12	3.90	22.40

2.2 外源电子供体对铁还原的影响

图 1 表明,所有样品在培养前 2 d 均未有铁还原过程发生。其中,添加乳酸的样品 FS1A 自 4 d 开始有铁还原发生,其还原性铁浓度为 116.6 mg/kg,到培养结束时,二价铁浓度则达到 507.5 mg/kg。样品 FS1B 中的二价铁浓度自培养 6 d 开始以平均每天 1.4 mg/kg 的速率积累,并在培养结束时浓度达到与样品 FS1A 接近;另 1 个采样点的 2 个样 FS2C 与 FS2D 的总铁还原速率则与样点 1 相近,不同的是在培养 9~13 d 其二价铁浓度增加较为缓慢,有 1 个短暂的滞后期。

图 1-b 为添加外源乙酸后样品铁还原动态,可以看出,对于样品 FS1A、FS1B、FS2C,在培养前 2 周内添加乙酸并不影响铁还原;样品 FS2D 的 Fe(Ⅱ)浓度在 6~11 d 所增加,之后变化较小;在 13 d 时,样品 FS1A 与 FS2C 中二价铁开始有所增加,其中样品 FS1A 还原速率较高,在这段时间内,其增加速率为 17.6 mg/(kg·d),最终达到 397.2 mg/kg。从增加趋势看,样品 FS2C 最高,FS1A 与 FS1B 接近,而样品 FS2D 最低。

甲酸的增加(图 1-c)对样品体系铁还原过程影响较小,其中样品 FS1A、FS1B 与对照(图 1-d)几乎没有差异。样品

FS2C、FS2D 只是在培养约 10 d 后有一些变化,铁的还原速率稍有增加,但最终二价铁浓度分别只达到 179.1、224.9 mg/kg,平均还原速度分别为 1.68、4.99 mg/(kg·d)。

2.3 培养后体系 pH 值变化

与原始样品 pH 值(表 1)相比,添加外源有机酸后体系初始 pH 值略有提高,平均增加了 0.20(图 2)。在培养 1 个月,各处理体系的 pH 值有不同程度的提高。以乙酸与乳酸处理较为明显。其中,添加乳酸后培养 1 个月的样品 FS1B pH 值提高了 1。而乳酸与乙酸的添加均使得样品 FS1A 体系 pH 值有所提高。这与铁还原过程释放 H⁺ 似乎有些矛盾,然而整体 pH 值变化并不明显。

2.4 参与铁还原过程的微生物丰度与多样性

对自然样品的微生物群落结果进行了 DGGE 测定,并对图像进行聚类分析。由图 3 可以看出,样品的微生物多群落结果有明显的地域性,2 个样点的样品各自聚为不同类群;相对于样点 FS2 的 2 个样品(C 与 D),样点 FS1 的 2 个样品(A 与 B)之间相似度稍低,Jaccard 相似系数仅为 0.3,也就是两者的微生物群落结构有 30% 的相似度,而样品 FS2C、FS2D 则达到 45%。

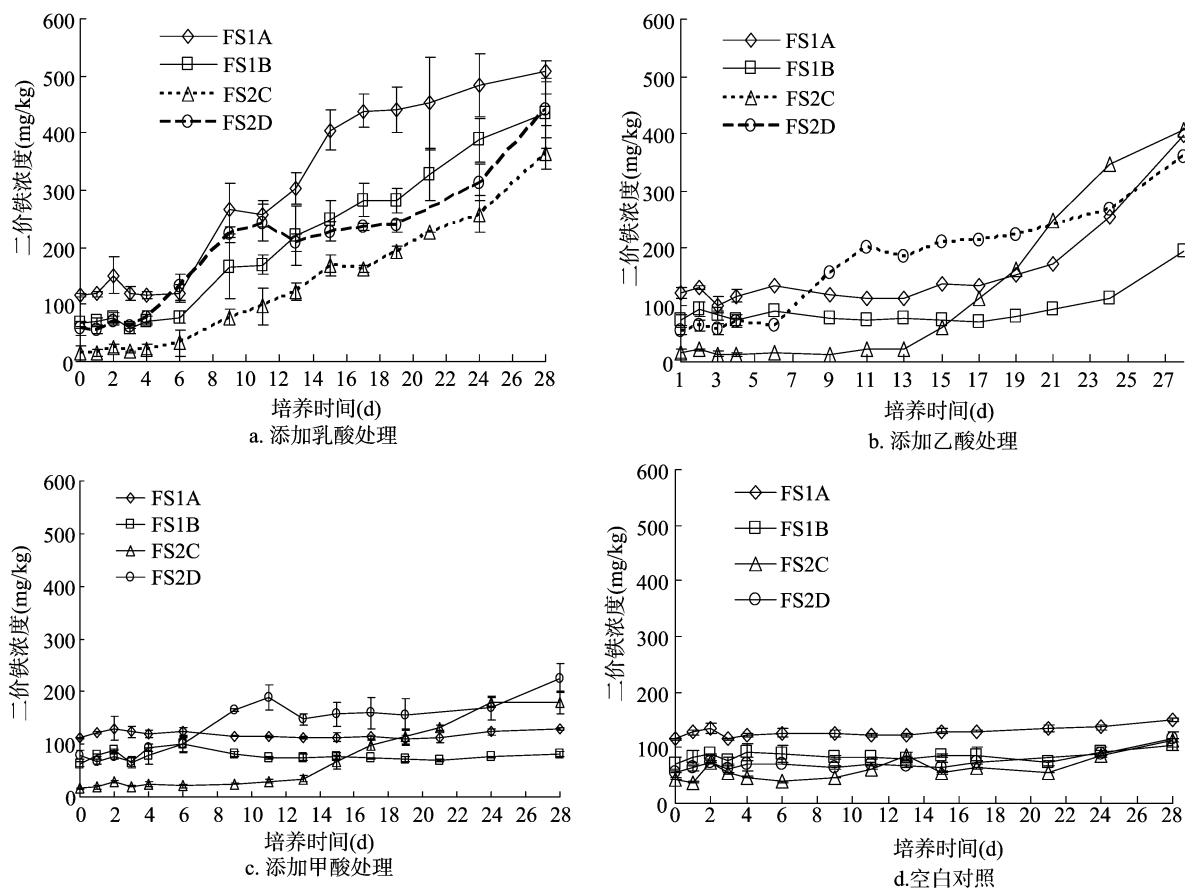


图1 外源有机酸供给对不同样品铁氧化物还原速率的影响

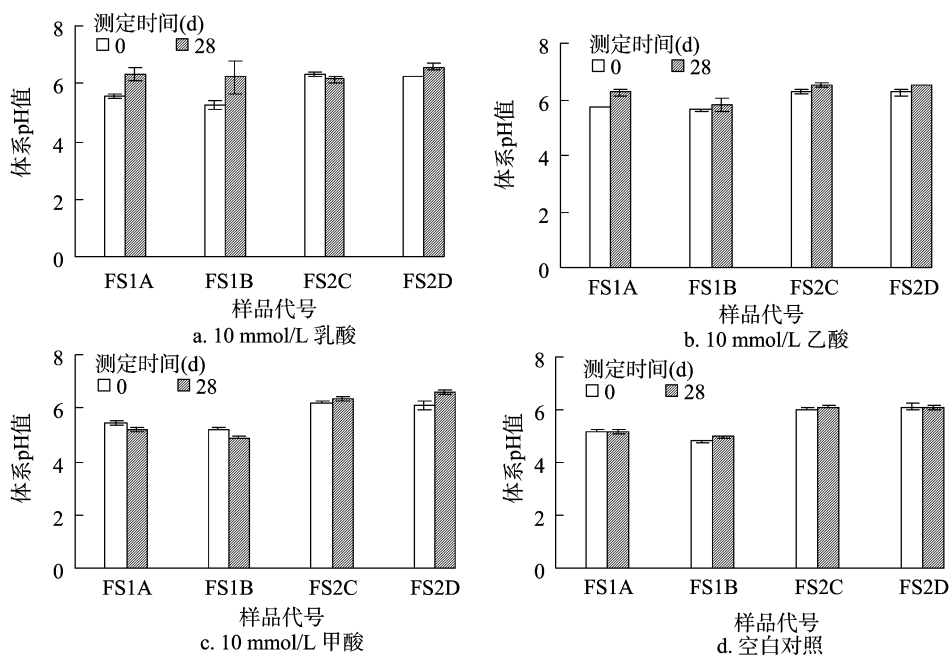


图2 厌氧培养条件下体系pH值的变化

为进一步了解可能参与铁还原过程的微生物,对于添加外源有机酸培养后体系的主要细菌进行测序分析。结果表明,几种丰度较大的细菌均为铁还原细菌种属。代表性的细菌有地杆菌属(*Geobacter* sp.)、脱硫芽孢弯曲菌属(*Desulfos-*

porosinus sp.)以及脱亚硫酸菌属(*Desulfotobacterium*),这几类占培养体系中细菌的大多数(图4)。而与原始自然样品相比,微生物群落有一定变化,铁还原类细菌丰度(图4所示比例)明显增加。

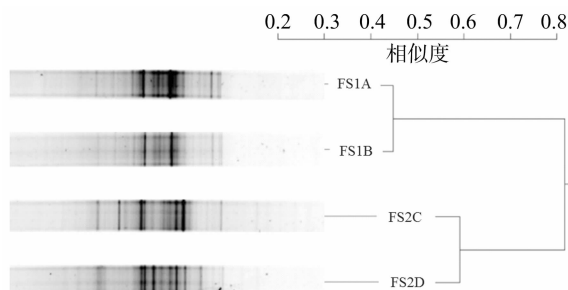
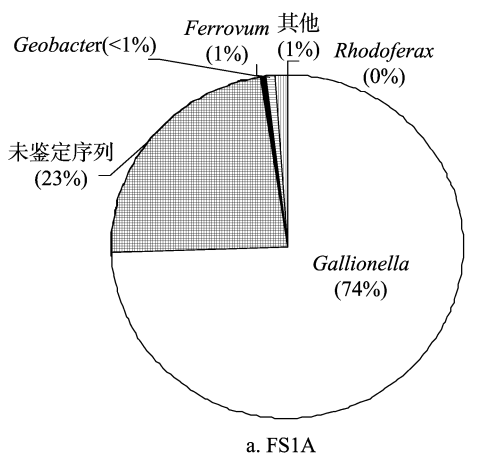
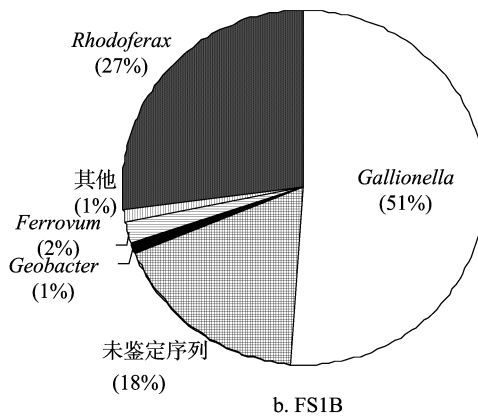


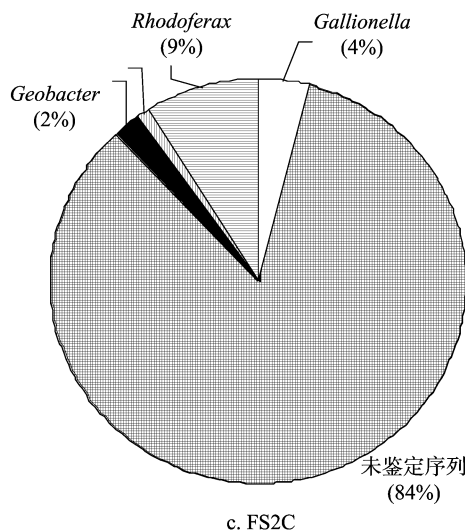
图3 聚丙烯酰胺凝胶聚类分析结果



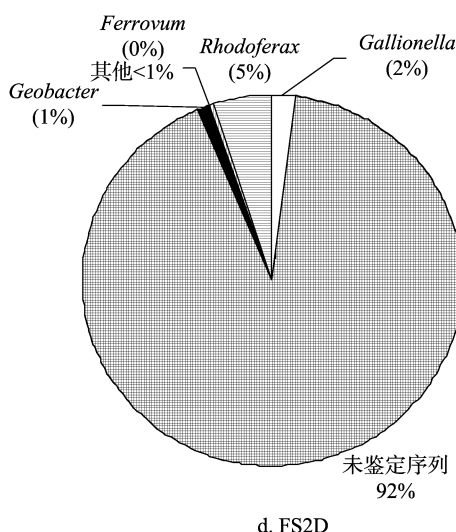
a. FS1A



b. FS1B



c. FS2C



d. FS2D

括内表示所占比例;与铁氧化有关的微生物属为:披毛菌属(*Gallionella*、*Ferroplasma*);与铁还原相关的是*Geobacter*、红育菌属(*Rhodospirillum*)

图4 各环境样品铁氧化物中含有的与铁循环相关的微生物群落组成

减缓了化学氧化过程;另一方面可以归结于二价铁含量高的水源补给作用。样品中相对较高的溶解氧含量也为微生物活动尤其是氧化铁还原过程提供了充足的碳源。

添加外源有机碳对铁还原影响有所不同。总体而言,乙酸与乳酸的加入提高了铁还原速率,而甲酸对体系铁还原速率的影响可以忽略。其原因可能与原样品的微生物群落结构有关,偏好甲酸的铁还原菌在样品中含量较低^[8],因而对整个过程并无太大的促进作用。所有的处理均存在1个滞后期,此期间微生物需要适应生长环境的变化,恢复到应有的活

3 讨论与结论

铁氧化物不仅影响到其他元素循环,还可以吸附钝化环境中重金属、有机污染物等,因而受到越来越多的关注。铁氧化物的还原作用在一定程度上决定着环境中铁氧化物的存在。在中性及偏碱性条件下,自然环境中二价铁很容易被化学氧化^[18]。而本试验样品 pH 值为 5~6,这为微生物铁氧化提供了有利条件,而其产物及代谢物质可能更利于异化还原过程。虽然样点 2 溶解氧含量平均达 3.15 mg/L,但样品中二价铁的含量并不低。这一方面原因可能在于弱酸性 pH 值

动力。滞后期长短可能与样品内铁还原微生物的组成与活性有关。另外,原样品的铁氧化物矿物结构与组成也可能影响它作为三价铁源的释放速率^[19]。相比之下,乙酸添加产生的滞后期较长,可能与其单分子产生的 H^+ 含量较高,短期内对微生物生长产生一定的抑制作用有关。

厌氧培养明显富集铁还原微生物,加速三价铁的溶解。聚丙烯酰胺凝胶图谱表明,微生物群落结构在添加乙酸与乳酸培养后明显不同于甲酸处理与原始样品,铁还原菌 *Geobacter* sp.、*Desulfosporosinus* sp. 以及 *Desulfitobacterium* 占主

导地位。同样,从铁还原潜势看,后面 2 个处理没有表现出较高的铁还原速率。而乙酸与乳酸处理之间也各不同,表现出很强的培养基选择性。此外,样品之间也差异明显,同样是乳酸处理,样品 FS1A 与 FS1B 的还原速率增长程度明显高于样品 FS2C 和 FS2D。

对于室内培养的铁氧化物样品中微生物群落进行分析的结果可视为培养体系的初始微生物组成。结果发现,各样品中具有铁还原能力的菌属含量较低,只有样品 FS1B 中达到总测定序列的 28%,样品 FS1A 中只检测到小于 1% 的 *Geobacter*。然而,无论是添加乳酸或乙酸的处理,样品 FS1B 的铁还原潜势却低于样品 FS1A,而 2 个样品的基本理化性质与铁氧化物组成均比较接近。因此,可能还有影响铁还原潜势的其他重要原因存在。

研究表明,铁还原细菌更喜好非结晶态铁氧化物,如水铁矿^[10,20],但也有些细菌可以还原结晶态氧化铁^[9]。在本试验中,样品 FS1A 与 FS1B 的还原速率明显高于 FS2B 和 FS2D,而前二者氧化物主要成分为结晶度较差的施氏矿物 Schwertmannite,后者则含有多种无定形与结晶态铁氧化物。据报道,Schwertmannite 较容易被微生物利用进行铁还原^[21],不难解释样品铁还原潜势的差异。因此,调控环境中铁氧化的存在要综合考虑有机碳源与铁氧化物底物因素。

pH 值是影响异化铁还原的重要因素,不但影响体系中 Fe(Ⅲ)溶解度及各氧化还原体系间的化学反应,而且还会影响微生物生长和形态及其代谢过程中的酶活性。吴超等研究发现,初始体系 pH 值与铁还原过程呈显著正相关,与水稻土微生物群落的铁还原能力均有显著负相关关系,但在 pH 值为 6.0 时效果最佳^[22]。这与本试验条件弱酸性有很好的统一性。

综上所述,抽测样点排水管道中铁氧化物主要由施氏矿物组成,其微生物群落结构以样点间相似度更大。添加小分子有机酸对铁还原潜势有一定促进作用,不同有机酸表现的作用有差异,其中以乳酸的促进作用最大,甲酸最小;厌氧培养改变了样品微生物群落结构,铁还原细菌得到了富集;培养前后体系的硫酸根则无明显变化。

参考文献:

- [1] Hedrich S, Schloemann M, Johnson D B. The iron - oxidizing proteobacteria[J]. Microbiology, 2011, 157: 1551 - 1564.
- [2] 张莎莎, 沈晨, 刘兰兰, 等. 附着微生物黄铁矿回流对不同温度酸性硫酸盐体系亚铁氧化及总铁沉淀的强化效果[J]. 环境科学学报, 2016, 36(2): 513 - 520.
- [3] 陈娅婷, 李芳柏, 李晓敏. 水稻土嗜中性微好氧亚铁氧化菌多样性及微生物成矿研究[J]. 生态环境学报, 2016, 25(4): 547 - 554.
- [4] Houben G J. Iron oxide incrustations in wells. Part 1: Genesis, mineralogy and geochemistry[J]. Applied Geochemistry, 2003, 18

- (6): 927 - 939.
- [5] 胡敏, 李芳柏. 土壤微生物铁循环及其环境意义[J]. 土壤学报, 2014(4): 683 - 698.
- [6] 李俊, 谢丽, 盛杰, 等. Fe(Ⅱ)/铁氧化物表面结合铁系统还原有机污染物的研究进展[J]. 地球科学进展, 2009, 24(1): 25 - 32.
- [7] 李弘, 种云霄, 余光伟, 等. 典型富氧化铁土壤基质中铁异化还原的特性[J/OL]. 环境科学学报. [2016 - 08 - 30]. <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1843.X.20160513.0815.001.html>.
- [8] Lovley D R. Dissimilatory Fe(Ⅲ) and Mn(Ⅳ) reduction[J]. Microbiol Rev, 1991, 55(2): 259 - 287.
- [9] Lovley D R. Dissimilatory Fe(Ⅲ) and Mn(Ⅳ) reducing prokaryotes[J]. Prokaryotes, 2000(3): 635 - 658.
- [10] Weber K A, Achenbach L A, Coates J D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(10): 752 - 764.
- [11] 王亚娥, 冯娟娟, 李杰, 等. 不同 Fe(Ⅲ) 对活性污泥异化铁还原耦合脱氮的影响及机理初探[J]. 环境科学学报, 2014, 34(2): 377 - 384.
- [12] 王亚洁, 朱永官, 孙国新, 等. 铁还原菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 对根表铁膜中砷运移的影响[J]. 环境科学学报, 2015, 35(7): 2240 - 2246.
- [13] 罗光俊, 何天容, 尹德良, 等. 贵阳市湖泊沉积物中铁还原菌的季节分布[J]. 生态学杂志, 2014, 33(8): 2153 - 2160.
- [14] 司友斌, 王娟. 异化铁还原对土壤中重金属形态转化及其有效性影响[J]. 环境科学, 2015, 36(9): 3533 - 3542.
- [15] 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(6145): 252 - 254.
- [16] Ralph D E, Stevenson J M. The role of bacteria in well clogging[J]. Water Research, 1995, 29(1): 365 - 369.
- [17] Steenbergh A K, Meima M M, Kamst M, et al. Biphasic kinetics of a methanotrophic community is a combination of growth and increased activity per cell[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2010, 71(1): 12 - 22.
- [18] Sung W, Morgan J J. Kinetics and product of ferrous iron oxygenation in aqueous systems[J]. Environ Sci Technol, 1980, 9(12): 561 - 568.
- [19] Fortin D, Langley S. Formation and occurrence of biogenic iron-rich minerals[J]. Earth - Science Reviews, 2005, 72(1): 1 - 19.
- [20] Straub K L, Benz M, Schink B. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 34(3): 181 - 186.
- [21] Coupland K, Johnson D B. Evidence that the potential for dissimilatory ferric iron reduction is widespread among acidophilic heterotrophic bacteria[J]. FEMS Microbiology Letter, 2008, 279(1): 30 - 35.
- [22] 吴超, 曲东, 刘浩. 初始 pH 值对碱性和酸性水稻土微生物铁还原过程的影响[J]. 生态学报, 2014, 34(4): 933 - 942.