

发酵脱氢产氢过程对微生物铁还原的影响

贾蓉, 曲东*, 乔莎莎

(西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 发酵型微生物是铁还原菌中的主要类群,但其发酵产氢过程对铁还原的作用尚不清楚,为此采用接种水稻土浸提液混合培养的方法对微生物分别利用葡萄糖、丙酮酸盐和乳酸盐为碳源时,Fe(Ⅲ)还原过程中脱氢酶活性变化、培养体系 pH、氢气分压及铁还原特征进行分析,探讨了发酵微生物脱氢产氢过程与微生物 Fe(Ⅲ)还原的内在关系。结果表明:2 种水稻土浸提液中的微生物均能够以葡萄糖为优势碳源进行脱氢、产氢及还原氧化铁,Fe(OH)₃ 可以诱导脱氢酶的产生,利用葡萄糖时脱氢酶活性在厌氧培养的 4~6 d 出现最大峰值,利用丙酮酸盐和乳酸盐时脱氢酶活性出现峰值的时间分别为培养的 15 d 和 21~22 d,脱氢酶活性出现峰值的时间与最大铁还原速率 V_{max} 显著负相关、与最大反应速率对应的时间 T_{Vmax} 存在显著正相关关系。脱氢产氢过程中产生的 H⁺ 导致培养体系 pH 的变化是影响铁还原过程的主要原因,培养体系 pH 与体系氢气分压及 Fe(Ⅱ)累积量呈极显著负相关。微生物利用不同碳源产氢时,利用葡萄糖的产氢能力最高,丙酮酸盐次之,乳酸盐最低。Fe(OH)₃ 的加入增加了氢气的消耗量,培养体系氢气分压与 Fe(Ⅱ)累积量存在极显著正相关关系。

关键词: 土壤微生物;铁还原;脱氢酶活性;pH;氢气

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2013)12-2395-08 doi:10.11654/jaes.2013.12.012

Microbial Iron Reduction as Influenced by Fermentative Dehydrogenation and Hydrogen Production

JIA Rong, QU Dong*, QIAO Sha-sha

(College of Natural Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Fermentative microorganism is the major group of iron reducing bacteria in paddy soil. However, it is unclear how dehydrogenation and hydrogen production impact microbial iron reduction. In an anaerobic incubation, dehydrogenase activity, pH, partial pressure of hydrogen and iron(Ⅲ) reduction were investigated using paddy soil extract solution as microorganism source, Fe(OH)₃ as electron acceptor, and glucose, pyruvate and lactate as C source. Results showed that glucose was a dominant electron donor for microorganisms in dehydrogenation, hydrogenation and iron reduction in paddy soils collected from Jilin and Guizhou provinces. With Fe(OH)₃ as sole electron acceptor, the dehydrogenase activity peaked at about 4~6 d of anaerobic incubation with glucose, 15 d with pyruvate and 21~22 d with lactate. The time when the peak of dehydrogenase activity occurred was negatively correlated with the maximum iron reduction rate(V_{max}), but positively with the time to reach the max reduction rate(T_{Vmax}). There was a negative correlation between pH and the partial pressure of hydrogen as well as iron(Ⅱ) concentrations. The change of pH caused by microbial fermentation was the major factor affecting iron reduction process. Carbon sources had a great impact on hydrogen production, with the maximum hydrogen production occurred under glucose, followed by pyruvate and the least under lactate. Addition of Fe(OH)₃ increased the consumption of hydrogen in the incubation. In addition, an extremely significant positive correlation was found between the partial pressure of hydrogen and iron(Ⅱ) accumulation.

Keywords: soil microorganism; iron reduction; dehydrogenase activity; pH; hydrogen

近年来大量研究证实,具有还原 Fe(Ⅲ)能力的细菌及铁还原酶是厌氧环境中铁氧化物还原的真正

动力,自然厌氧环境中铁还原过程由微生物介导^[1-4]。许多研究者已从淹水稻田、湿地、湖泊、热泉和海洋沉积物等厌氧环境中分离纯化得到大量的铁还原菌株。从还原机制上可将这些菌株分为两大类,其中一类是以 *Geobacter* 和 *Shewanella* 为典型代表的依靠铁呼吸获得能量的专性 Fe(Ⅲ)还原微生物^[5-6],另一类被称为兼性铁还原微生物,这类微生物能够从代谢利用有机

收稿日期:2013-05-06

基金项目:国家自然科学基金面上项目(41171204)

作者简介:贾蓉(1987—),女,陕西延安人,博士研究生,主要从事土壤环境化学研究。E-mail:jiarong@nwfau.edu.cn

*通信作者:曲东 E-mail:dongqu@nwfau.edu.cn

质过程中获得能量来维持生长,并利用其代谢产物如乙酸、 H_2 等还原 $Fe(III)$ ^[7]。水稻土淹水过程中的微生物 $Fe(III)$ 还原过程因其具有丰富的碳化合物作为电子供体以及庞大的微生物物种库而独具特色^[8]。脱氢酶参与微生物代谢有机质的过程,是其中重要的限速酶。葡萄糖是生物体脱氢的第一个有效底物,其代谢中间产物丙酮酸和乳酸也能被相应的丙酮酸脱氢酶系和乳酸脱氢酶作用发生脱氢反应,脱氢反应将脱下的氢通过电子传递体系及辅酶传递给铁氧化还原蛋白,传递的电子越多,通过脱氢酶的重氧化释放的 H_2 越多^[9]。在淹水稻田中,水中的 O_2 迅速被消耗殆尽,土壤中的 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 和 $Fe(III)$ 则成为最主要的氢受体^[10],厌氧环境下利用 H_2 的自养微生物可以完成硝酸盐的反硝化^[11]和硫酸盐的还原^[12], H_2 也可以为 $Fe(III)$ 还原过程提供电子并供微生物生长和还原 $Fe(III)$ ^[13]。曲东等^[14-15]也证实了铁还原过程能够显著竞争消耗土壤中的 H_2 ,从而抑制甲烷的产生。 H_2 是厌氧过程中产生甲烷的必要元素,因此研究发酵微生物脱氢产氢过程对铁还原的作用对抑制甲烷产生有重要的意义。本文模拟稻田复水过程,利用淹水 5 d 获得的水稻土微生物群落进行模拟培养试验,通过对微生物 $Fe(III)$ 还原过程中脱氢酶活性变化特征的分析及体系 pH 值及 H_2 分压的分析测定,以期阐明发酵微生物脱氢产氢过程与微生物 $Fe(III)$ 还原的内在关系,为揭示水稻土中微生物 $Fe(III)$ 还原机理提供必要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试水稻土

供试水稻土分别采自吉林省吉林市丰满区前二道乡河东村(用 JL 表示)和贵州省贵阳市小河区王武村(用 GZ 表示)。采集 0~20 cm 的耕层土样,自然风干,磨细,过 1 mm 土壤筛。这两种供试水稻土的基本性质分别为:有机质含量 41.2、34.4 $g \cdot kg^{-1}$,全氮含量 2.78、1.85 $g \cdot kg^{-1}$,无定形氧化铁含量 4.94、2.48 $g \cdot kg^{-1}$,游离铁含量 10.01、8.11 $g \cdot kg^{-1}$,pH(1:5)值为 4.85、7.46。

1.1.2 土壤微生物接种液制备

称取若干份风干过筛(<1 mm)的水稻土,每份 8.000 g,分别置于灭菌后的 25 mL 血清瓶中,以 1:1 的土水比($m:V$)添加去离子水 8.0 mL,充 N_2 除去瓶中 O_2 ,密封,于 30 °C 恒温箱中暗光培养 5 d。制备接种液时,将淹水培养后的泥浆样品按 1:9 的土水比($m:V$)

用无菌水定量转移到灭菌后的离心管中,30 °C 下 180 $r \cdot min^{-1}$ 振荡浸提 1 h,于 1000 $r \cdot min^{-1}$ 下离心 25 min,收集上清液作为土壤微生物接种液。

1.2 试验处理设置及培养体系

试验按照土壤接种液来源、电子供体、电子受体的不同,共设置 12 个处理,每个处理设置 3 个重复。(1)微生物接种液来源:收集采自吉林(JL)和贵州(GZ)的水稻土微生物接种液。(2)电子供体:根据等摩尔碳量的原则选择含碳量 300 $mmol \cdot L^{-1}$ 的易于被微生物利用的 3 种小分子碳源作为电子供体,碳源种类和浓度分别为:0.25 $mol \cdot L^{-1}$ 葡萄糖(Glu)、0.50 $mol \cdot L^{-1}$ 丙酮酸钠(Pyr)和 0.50 $mol \cdot L^{-1}$ 乳酸钠(Lac)。(3)电子受体:以人工合成的 $Fe(OH)_3$ (ferrhydrite)为电子受体(+Fe), $Fe(III)$ 浓度为 3.83 $g \cdot L^{-1}$,同时以无菌水代替 Fe 源作为对照。

取若干个灭菌后的 10 mL 血清瓶,按照不同处理分别加入 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ NH_4Cl 溶液 1 mL 作为微生物生长所需的 N 源、0.25 $mol \cdot L^{-1}$ KH_2PO_4 - K_2HPO_4 缓冲液 1 mL 作为 P 源、不同种类的碳源 1 mL、微生物接种液 1 mL 及人工合成的 $Fe(OH)_3$ 悬液 1 mL,不加 $Fe(OH)_3$ 的处理用 1 mL 无菌水代替。充 N_2 除去瓶中 O_2 ,用橡胶盖及铝盖密封,置于 30 °C 培养箱中避光培养,定期取出一瓶测定脱氢酶活性、培养体系 pH 及 $Fe(II)$ 浓度。此外,将上述培养液添加至灭菌后的 25 mL 血清瓶中,充 N_2 除 O_2 后密封,30 °C 避光培养,定期测定培养体系 H_2 分压。

1.3 采样及检测方法

脱氢酶活性(DHA)测定采用 TTC 分光光度法^[16]。将取出的样品充分涡旋混匀后取 1 mL 样品溶液置于含有 2 mL Tris-HCl 缓冲液(pH 值为 8.4)、0.5 mL 3.6 $mg \cdot mL^{-1}$ Na_2SO_3 溶液及 0.5 mL 20 $mg \cdot mL^{-1}$ TTC 溶液的离心管中,重复 3 组,充分摇匀,于 37 °C 恒温水浴反应 15 min 后加入 0.4 mL 甲醛终止反应。再加 4 mL 无水乙醇作为萃取剂,37 °C 恒温避光 200 $r \cdot min^{-1}$ 振荡 10 min,离心取上清液(3500 $r \cdot min^{-1}$, 5 min),于 480 nm 下测定吸光度。根据测定的吸光度计算出 TF 的浓度,定义 1 min 产生 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ TF 为一个酶活单位(U)。pH 值测定采用玻璃电极电位法。 H_2 分压采用气相色谱法测定,检测器为 TCD,色谱柱填充物为 TDX-01,60~800 目,柱长 200 cm,内径 2 mm,柱温 40 °C,进样口温度 120 °C,检测器温度 120 °C,载气(N_2)流量为 2 $kg \cdot cm^{-2}$ 。 $Fe(II)$ 含量测定采用邻菲罗啉分光光度法^[17]。采样前将样品用涡旋仪充分混匀,吸取 1 mL

样品溶液置于含 4 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液的带盖聚乙烯管中, 30°C 浸提 24 h。测定时, 于 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取 1 mL 上清液至 50 mL 容量瓶, 用 5 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc 调控 pH 值, 加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 邻菲罗啉溶液 1 mL 显色, 定容后于 510 nm 测定吸光度, 计算 $\text{Fe}(\text{II})$ 含量。

1.4 数据统计

微生物 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原是微生物介导的生物学过程, 可用描述微生物生长动力学的 Logistic 方程^[18]进行拟合。Logistic 方程的表达式为 $C_t = a / (1 + b e^{-ct})$, 其中: t 为培养时间; C_t 表示培养时间 t 时体系中的 $\text{Fe}(\text{II})$ 含量; a 为体系中 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原的最大潜势, 即 $\text{Fe}(\text{II})$ 的最大累积量; b 为模型参数; c 为反应的速率常数。最大反应速率 ($V_{\max}$) 数值上等于 $0.25ac$; 最大反应速率对应的时间 ($T_{V_{\max}}$) 用 $\ln(b/c)$ 计算。

试验数据经 Excel 整理后用 Origin 8.0 作图, 并用 CurveExpert 1.3 对试验所得结果进行拟合; 用 SPSS16.0 进行方差分析, 采用最小显著差数法 (LSD) 检验试验数据的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 微生物利用不同碳源时的脱氢酶活性变化

脱氢反应是微生物发酵有机物的第一步, 脱氢酶活性不仅可以反映碳源被利用的程度, 也可以间接反映微生物铁还原过程。添加不同碳源和 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 条件下接种不同水稻土浸提液的培养体系中脱氢酶活性的变化如图 1 所示。

由图 1 可见, 没有铁参与时仅检测到很低的脱氢酶活性 ($0.04 \sim 0.68 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), 而添加 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 后脱氢酶活性随培养时间的延长则出现明显的峰值

变化, 表明铁可以诱导底物脱氢酶的产生, 并且显著影响脱氢酶活性。微生物利用不同发酵碳源时的脱氢酶活性出现峰值的时间具有明显差异, 其中以葡萄糖为碳源时峰值出现在厌氧培养的 4~6 d, 吉林 (JL) 和贵州 (GZ) 水稻土浸提液处理的脱氢酶活性峰值分别为 7.58 、 $10.04 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 至培养 10 d 后迅速降低至检测线以下; 以丙酮酸盐为电子供体时, 脱氢酶活性峰值出现在厌氧培养的 15 d 左右, 比葡萄糖处理延迟 6~10 d, 脱氢酶活性最大值分别为 7.99 、 $6.33 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; 微生物利用乳酸盐时的脱氢酶活性峰值显著推后至厌氧培养的 20~21 d, 脱氢酶活性分别为 5.97 、 $7.66 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。脱氢反应表现出的时间差异反映出微生物利用不同碳源的脱氢机制不同。另外, 在以丙酮酸盐为碳源时, 脱氢酶活性尽管也有峰值出现, 但在培养过程中仍然能够维持较高的脱氢酶活性, 显示出与葡萄糖及乳酸盐处理之间的明显区别。

2.2 微生物利用不同碳源时体系 pH 值变化

利用不同碳源的微生物铁还原过程中, 培养体系 pH 值变化如图 2 所示。以葡萄糖作为碳源对体系 pH 的影响显著, 在厌氧培养的前 5 d 中体系 pH 值可迅速降低到 4 左右, 而以丙酮酸盐和乳酸盐作为底物时, 与葡萄糖处理相比对体系的 pH 值影响较小。在接种 JL 水稻土浸提液的培养体系中, 丙酮酸盐的 pH 值在培养前 15 d 均略有所降低, 其后稳定在 pH 值 7 左右, 乳酸盐处理的 pH 值基本保持稳定。对于接种 GZ 水稻土浸提液的培养体系, 丙酮酸盐处理的 pH 值在培养 3~8 d 时有明显的降低, 而乳酸盐则在 8~15 d 有所降低, 其后维持稳定。体系 pH 值变化与微生物发酵产酸过程有关, pH 值的变化表明葡萄糖发酵时的

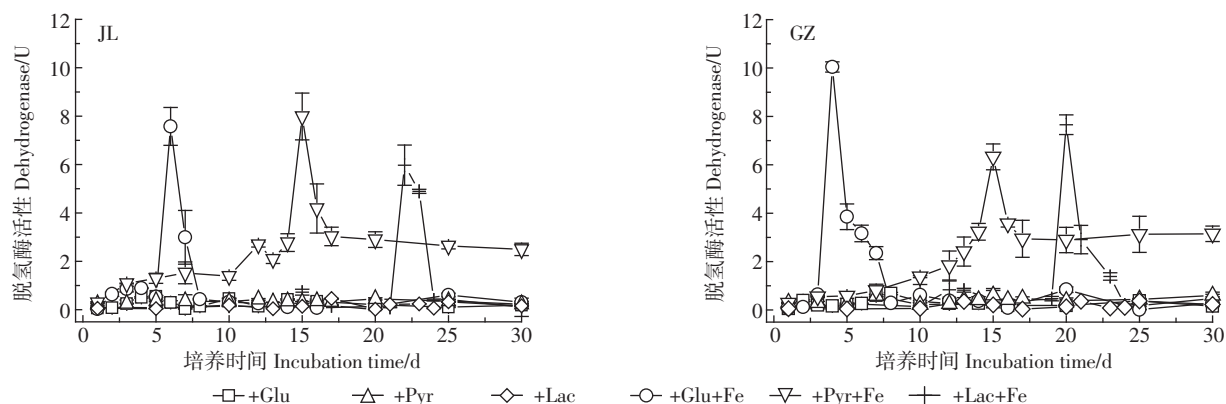


图 1 添加不同碳源的水稻土浸提液培养体系中脱氢酶活性的变化

Figure 1 Changes of dehydrogenase activity in the solution extracted from two paddy soils under different C sources

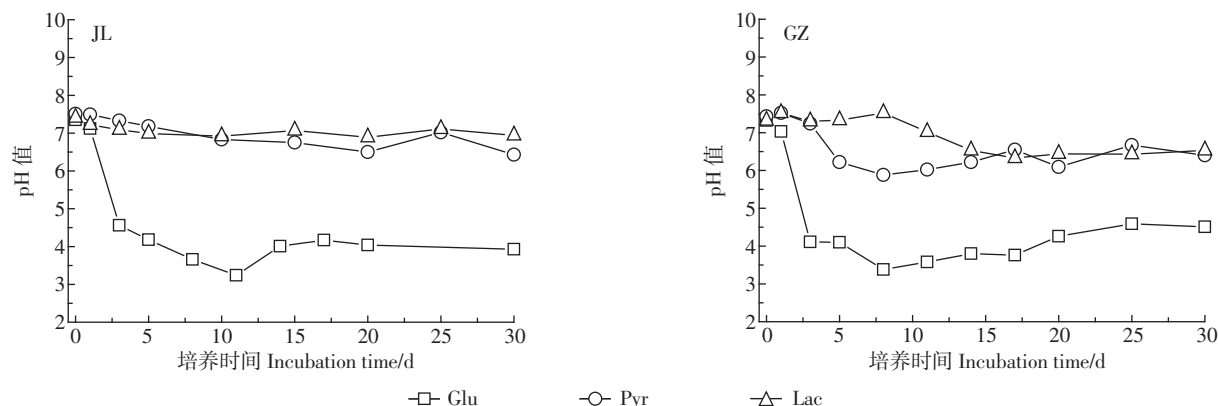


图 2 水稻土微生物群落利用不同碳源的 Fe(Ⅲ)还原过程中 pH 值的变化

Figure 2 Influence of microbial iron(Ⅲ) reduction on pH in the solution extracted from two paddy soils under different C sources

产酸能力明显大于丙酮酸盐和乳酸盐处理。

2.3 微生物利用不同碳源时体系 H_2 分压变化

水稻土中的微生物利用不同碳源的产氢能力有所差异(图 3), 总体而言葡萄糖的产氢量较丙酮酸盐和乳酸盐高。在接种 JL 和 GZ 水稻土浸提液的添加葡萄糖处理中, 氢气压在培养的 5~7 d 可达到最高值, 分别为 20.89、22.36 kPa; 以丙酮酸盐为碳源时, 2 种水稻土浸提液培养体系中氢气压在 18 d 和 12 d 达到最高值, 分别为 7.30、10.63 kPa; 利用乳酸盐时的产氢能力最低, 氢气压分别小于 1、2 kPa。

在以葡萄糖和丙酮酸盐作为碳源时, 未添加无定形氧化铁的处理检测出较高的氢气压, 而有氧化铁参与时由于电子受体的增加, 表现出对氢气的消耗量增加。在 2 种水稻土浸提液处理中, 铁还原过程对丙酮酸盐的产氢过程影响明显, 导致氢气压显著降低; 在葡萄糖处理中也有降低的趋势, 但变化不如丙酮酸盐处理显著, 并且两种土壤浸提液处理也有一定的差异。在微生物发酵葡萄糖和丙酮酸盐的产氢过程中, 葡萄糖处理的氢气压在厌氧培养的 5~7 d 后基本维持在稳定状态, 而丙酮酸盐处理则出现先迅速增加而后快速降低的趋势。

从添加氧化铁处理的氢气消耗量来看, 如在贵州水稻土浸提液处理中氢分压最大相差约为 6 kPa (葡萄糖和丙酮酸盐处理), 折合约 97.96 μmol 的电子, 而从添加的氧化铁量计算, 体系中共有 68.62 μmol Fe(Ⅲ), 其全部还原时仅需要 68.62 μmol 的电子, 说明 H_2 的消耗中除了还原铁以外还有部分用于产甲烷。如果以贵州水稻土浸提液利用葡萄糖处理培养 5 d 时的氢气差值来计算, 其电子相差为 70.69 μmol , 与完全还原氧化铁时的电子需求量基

本相当。

2.4 微生物利用不同碳源时的 Fe(Ⅲ)还原特征

不同碳源模式下水稻土微生物群落的 Fe(Ⅲ)还原能力如图 4。来源于不同水稻土的微生物群落对利用不同碳源时 Fe(Ⅲ)的还原能力差异显著, 葡萄糖为电子供体时, 微生物对 Fe(Ⅲ)还原有较快的响应, 反应初期 Fe(Ⅱ)累积量迅速上升, 到反应 20 d 以后铁还原率达到 90% 以上。以丙酮酸盐为碳源时, Fe(Ⅲ)还原的启动时间有所滞后, 培养至 30 d 时, 铁还原率达到 71.55% 和 77.63%。利用乳酸盐为碳源时, 铁还原微生物群落对其响应较慢, 到 10 d 以后才开始有响应, 到 30 d 时仍未达到平衡, Fe(Ⅱ)累积量分别仅为 319.3、390.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

采用 Logistic 方程对添加不同碳源的水稻土微生物群落的 Fe(Ⅲ)还原特征进行动力学拟合, 拟合参数如表 1 所示。各处理的 Logistic 方程拟合结果相关程度良好, 相关系数介于 0.988~0.997 之间。比较来源于不同水稻土的微生物的铁还原特征值发现, 来源于 JL 水稻土的微生物利用不同碳源时的铁还原潜势 (a)、最大还原速率 (V_{max}) 较 GZ 水稻土高, 且达到最大还原速率的时间晚 4~5 d, 可能与微生物群落中铁还原微生物的丰度和多样性有关。收集于 JL 和 GZ 的水稻土微生物均可以以葡萄糖作为优势碳源, 分别在培养第 9 d 和第 5 d 达到最大反应速率 55.43、88.36 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。微生物对丙酮酸盐的高效利用主要集中在厌氧培养中期, 达到最大反应速率的时间较葡萄糖有所推迟, 而利用乳酸盐时分别在厌氧培养的 23 d 和 18 d 才达到最大的铁还原速率, 与微生物利用这三类碳源时脱氢酶活性出现峰值的时间基本一致。对脱氢酶活性出现峰值的时间与铁还原特征参数的相

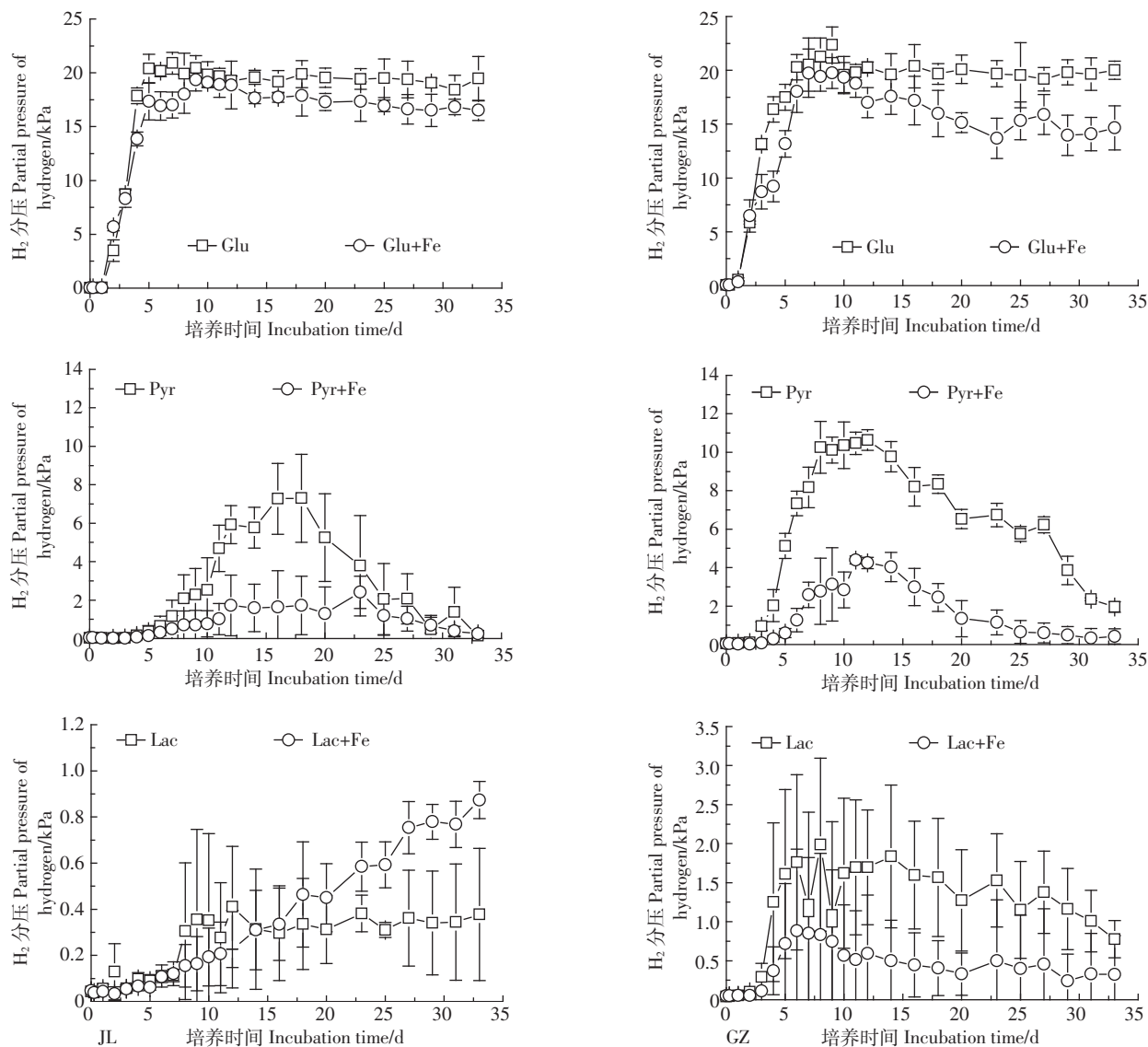


图3 添加不同碳源和无定形氧化铁对培养体系氢气压的影响

Figure 3 Effects of C sources and amorphous $\text{Fe}(\text{OH})_3$ on the partial pressure of H_2 in the solution extracted from two paddy soils

关性分析发现,脱氢酶活性峰值对应时间与铁还原率、铁还原潜势 α 、最大反应速率 $V_{\max}$ 均呈极显著负相关(Pearson 相关系数分别为 -0.931^{**} 、 -0.918^{**} 、 -0.935^{**}),与铁还原最大速率对应的时间 $T_{V_{\max}}$ 呈极显著正相关(Pearson 相关系数为 0.932^{**})。

3 讨论

微生物铁还原过程受微生物群落多样性、电子供体、电子受体、环境因素(温度、pH、光照)等过程的影响^[19]。梭菌和芽孢杆菌是研究较多的发酵产氢微生物,均可以在淹水条件下通过发酵代谢进行异化铁还原^[4,20],地杆菌也是依赖氢气还原铁的微生物^[13]。Wang 等^[21]采用富集培养的方法研究水稻土中的微生物群

落多样性,发现无论是添加柠檬酸铁还是无定形氧化铁作为电子受体,水稻土中梭菌和地杆菌都是优势种群。李秀颖^[22]测定结果显示,吉林和贵州水稻土在厌氧培养 5 d 时的浸提液中可培养芽孢杆菌的 16S rDNA 的拷贝数分别达到 1.05×10^{10} 和 2.22×10^{10} , 占总细菌拷贝数的 19.85% 和 26.30%;梭菌属的 16S rDNA 拷贝数分别为 0.66×10^7 和 1.01×10^7 , 占总细菌拷贝数的 0.125‰ 和 0.120‰。虽然梭菌的拷贝数较芽孢杆菌低,但其 α 多样性指数较高,说明在水稻土铁还原微生物中发酵微生物为优势种群,其代谢产氢过程可能偶联 $\text{Fe}(\text{III})$ 的还原。微生物的数量和多样性是影响铁还原过程的重要因素,对比李秀颖的结果中 2 种水稻土浸提液的微生物群落特征参数发现,

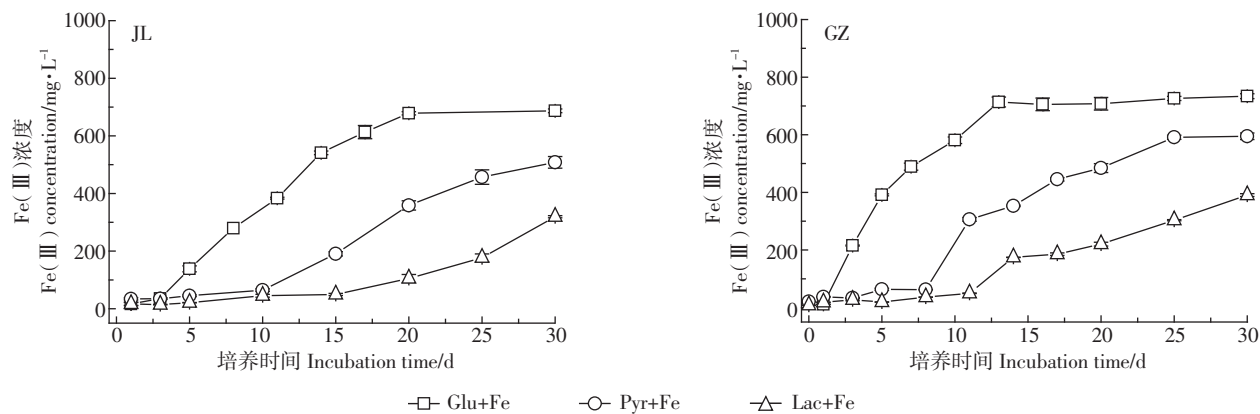


图 4 水稻土微生物群落利用不同碳源的 Fe(II) 浓度变化

Figure 4 Changes of Fe(II) concentrations in the solution extracted from two paddy soils under different C sources

表 1 水稻土微生物利用不同碳源的铁还原特征动力学拟合参数

Table 1 Kinetic parameters of microbial Fe(III) reduction under different C sources

样品 Sample	碳源 Carbon	Logistic 方程参数 Logistic model parameters				$V_{max}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	T_{Vmax}/d	Fe(III)还原率 Reduction rate/%
		$a/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	b	c/d^{-1}	r			
JL	Glu	688.8 ± 2.2	24.09 ± 0.71	0.32 ± 0.07	0.997	55.43 ± 1.25	9.88 ± 0.12	96.72 ± 0.89
	Pyr	580.4 ± 5.6	58.92 ± 9.17	0.23 ± 0.02	0.997	29.48 ± 1.98	18.40 ± 0.11	71.55 ± 2.85
	Lac	350.9 ± 2.6	182.95 ± 49.6	0.22 ± 0.01	0.990	19.32 ± 0.79	23.55 ± 0.23	44.94 ± 0.53
GZ	Glu	709.5 ± 15.0	13.00 ± 0.31	0.50 ± 0.00	0.989	88.36 ± 2.35	5.14 ± 0.02	95.80 ± 1.11
	Pyr	634.69 ± 5.1	25.92 ± 1.02	0.24 ± 0.01	0.992	38.47 ± 0.82	13.42 ± 0.33	77.63 ± 1.49
	Lac	414.1 ± 13.6	37.19 ± 1.27	0.20 ± 0.01	0.988	20.26 ± 0.22	18.47 ± 0.55	50.99 ± 0.65

JL 水稻土微生物中细菌、芽孢杆菌、梭菌的 16S rDNA 拷贝数和α 多样性指数均较 GZ 水稻土微生物低,可以解释本试验中 JL 水稻土 V_{max} 低于 GZ 水稻土且 T_{Vmax} 较 GZ 水稻土滞后的原因。

脱氢酶是催化氧化还原反应的胞内酶,仅在活体细胞中才能表现出活性,因此可以作为微生物活性的指标来描述微生物群落的变化^[23]。由脱氢酶主导的脱氢反应是微生物发酵脱氢产氢的限速反应,脱氢酶活性是影响水稻土中微生物 Fe(III)还原过程的重要因素^[24]。易维洁等^[24]通过微生物混合培养试验发现,在 91~345 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Fe(II)浓度范围内,脱氢酶表现出较高活性。本试验条件下,添加 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 对培养体系中脱氢酶活性影响显著,经微生物还原的 Fe(II)可以诱导脱氢酶的产生,但随着 Fe(II)的累积,脱氢酶活性出现峰值后开始降低,峰值所对应的 Fe(II)的浓度为 143.44~391.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,脱氢酶活性出现峰值的时间与铁还原反应最大速率对应的时间一致,说明少量的 Fe(II)可以诱导脱氢酶的产生。这可能是由于大多数脱氢酶的受体是 NAD^+ ,发酵底物经这类脱氢酶的催化使 NAD^+ 还原生成 NADH ,而 Fe(II)是一

种还原剂,也是构成脱氢酶的活性中心,从而可以协助脱氢酶加速 NAD^+ 的还原速度,进而提高了脱氢酶的活性和产氢量。

在水稻土微生物发酵有机物的脱氢产氢过程中,会伴随产生大量的 H^+ ,pH 值的变化会引起铁氧化物的形态以及微生物的群落结构发生改变,同时体系中的产氢过程也受 pH 值的影响,从而直接影响微生物铁还原过程。从表 2 可以看出,培养体系中 Fe(II)累积量与培养体系 pH 值存在极显著负相关关系($P<0.01$),是由于随着有机碳源的发酵,微生物脱氢释放出大量的 H^+ ,使加入的 Fe(III)溶解为离子态,从而加速了微生物的利用能力。另一方面,在厌氧发酵过程中氢酶的活性对 pH 值非常敏感,通常认为,存在于较低 pH 值环境的含铁氢酶对于整个发酵过程起着十分重要的作用。对培养体系 pH 值和氢气分压的相关分析也发现,在培养过程中体系的 pH 值在 3.24~7.90 范围内,体系 pH 值越低,氢气分压越高,二者呈极显著负相关关系。樊耀亭等^[25]研究发现,蔗糖的生物产氢稳定阶段的 pH 值在 4.5~5.5 的范围内,恰好说明了本试验中虽然添加等碳量的碳源,但微生物以葡萄

表 2 发酵微生物脱氢产氢过程与 Fe(Ⅱ)累积量的 Person 相关性分析

Table 2 The person's correlation between dehydrogenation-hydrogenation and Fe(Ⅱ) accumulation

项目 Item	Fe(Ⅱ)累积量 Fe(Ⅱ)accumulation	脱氢酶活性 Dehydrogenase activity	培养体系 pH 值 pH of culture system	H ₂ 分压 H ₂ pressure
Fe(Ⅱ)累积量	1	0.141	-0.68**	0.676**
脱氢酶活性		1	0.063	-0.119
培养体系 pH			1	-0.948**
H ₂ 分压				1

注:**表示 $P<0.01$ 。Note:** Significant at $P<0.01$ levels.

糖为底物时的氢气分压远高于丙酮酸盐和乳酸盐,其原因可能与培养体系 pH 值对氢酶活性的影响有关。

微生物在厌氧情况下通常通过两种方式发酵葡萄糖产氢^[26]。一是葡萄糖经 EMP 途径发酵生成丙酮酸的过程中经脱氢酶的催化使 NAD⁺还原生成NADH 和 H⁺,当微生物体内的 NADH 和 H⁺累积过多时,NADH 会通过脱氢酶的作用将电子转移给 H⁺释放分子氢。另一途径是通过丙酮酸脱羧产氢,其中:丁酸型发酵是丙酮酸脱羧后形成羟乙基与硫胺素焦磷酸酶的复合物,该复合物将电子转移给铁氧还蛋白,还原态的铁氧还蛋白被铁氧还蛋白氢酶重新氧化产生分子氢;甲酸裂解型发酵是丙酮酸在甲酸裂解酶的作用下分解为甲酸和乙酰基,然后甲酸通过铁氧还蛋白和氢酶裂解生成 CO₂ 和 H₂。乳酸在乳酸脱氢酶的作用下可以与丙酮酸相互转化并偶联 NAD⁺与 NADH 和 H⁺的相互转化。本试验中 pH 与 H₂ 分压间存在极显著负相关关系($P<0.01$),这与微生物发酵葡萄糖、丙酮酸盐和乳酸盐产氢的途径有关。Fe(Ⅱ)累积量与体系中 H₂ 分压呈极显著正相关($P<0.01$),进一步说明 H₂ 对铁还原过程的贡献作用。Lovely 等^[27]分析添加 H₂ 能够刺激铁还原的主要原因是由于铁氧化物对氢的高亲和力,使含铁沉积物中的微生物可以将氢气的氧化与铁还原作用相偶联。Conrad^[28]报道,氢及乙酸盐对产甲烷过程的贡献率分别为 33%和 67%,针对本培养体系,氢的消耗主要来自产甲烷和铁还原,体系中测得的氢气浓度反映着氢气产生与消耗作用的动态平衡。所以在葡萄糖处理中氢分压维持较高水平的原因或许是其发酵过程产生的乙酸盐大量地用于产甲烷,而对氢的消耗较少。而在丙酮酸盐处理中,氢可能作为主要的产甲烷基质被利用,所以其消耗量增加,导致培养后期迅速降低的趋势。对于添加氧化铁的处理,铁还原微生物同样可以通过消耗氢及乙酸盐来还原氧化铁,土壤中存在地杆菌、厌氧粘细菌等专性铁还原菌,可以利用葡萄糖发酵产生的乙酸盐还原氧化铁,也存在部分兼性铁还原菌直接利

用氢还原铁。

4 结论

发酵微生物在氧化铁还原过程中起着重要作用。在水稻土浸提液混合培养过程中,适当的 Fe(Ⅱ)浓度能够刺激脱氢反应的发生,发酵微生物利用葡萄糖为底物的发酵脱氢主要出现在培养初期,利用丙酮酸盐和乳酸盐的脱氢酶活性出现峰值的时间出现在厌氧培养的中后期,且脱氢酶活性出现峰值的时间与微生物铁还原反应达到最大反应速率的时间(T_{Vmax})具有一致性。培养体系中 H⁺的产生是微生物利用有机碳源的主要产物,培养体系 pH 与 H₂ 分压呈极显著负相关,与 Fe(Ⅱ)累积量也存在极显著负相关关系,说明 pH 通过影响参与脱氢产氢和铁还原过程的微生物和酶系以及铁氧化物的微生物可利用性影响着微生物铁还原过程。由于铁氧化物对氢的高亲和力,体系中 Fe(Ⅲ)的加入增加了 H₂ 的消耗,说明铁还原微生物可以以发酵产物 H₂ 为电子供体使更多的 Fe(Ⅲ)向 Fe(Ⅱ)转化。

参考文献:

[1] Lovley D R. Dissimilatory metal reduction[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1993, 47(6):263-290.

[2] Nevin K P, Lovley D R. Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(Ⅲ) during reduction of insoluble Fe(Ⅲ) oxide by *Geobacter metallireducens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5):2248-2251.

[3] Magnuson T S, Hodges-Myerson A L, Lovley D R. Characterization of a membrane-bound NADH-dependent Fe³⁺ reductase from the dissimilatory Fe³⁺-reducing bacterium *geobacter sulfurreducens*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 185(2):205-211.

[4] Lehours A C, Rabiet M, Morel-Desrosiers N, et al. Ferric iron reduction by fermentative strain BS2 isolated from an iron-rich anoxic environment(Lake Pavin, France)[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2010, 27(8):714-722

[5] Lovley D R, Giovannoni S J, White D C, et al. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov. a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic-compounds to the reduction of iron and other metals

- [J]. *Arch Microbiol*, 1993, 159:336–344.
- [6] Myers C R, Myers J A. Shewanella oneidensis MR-1 restores menaquinone synthesis to a menaquinone-negative mutant[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70:5415–5425.
- [7] Lovley D R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction[J]. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(2):259–287.
- [8] Rui J P, Peng J J, Lu Y H. Succession of bacterial populations during plant residue decomposition in rice field soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(4):4879–4886.
- [9] Zajic J E, Kosaric N, Brosseau J D. Microbial production of hydrogen//Barker S A, Pitcher W H Jr. *Advances in Biochemical Engineering*. Berlin:Springer, 1978:57–109.
- [10] Lovley D R, Phillips E J P. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 51(4):683–689.
- [11] 张彦浩, 钟佛华, 夏四清. 利用氢自养反硝化菌处理硝酸盐污染地下水的研究[J]. *水处理技术*, 2009, 35(5):75–78.
ZHANG Yan-hao, ZHONG Fo-hua, XIA Si-qing. Study on contaminated ground water treatment with hydrogenotrophic denitrifying bacteria[J]. *Technology of Water Treatment*, 2009, 35(5):75–78.
- [12] Nedwell D B, Banat I M. Hydrogen as an electron donor for sulfate-reducing bacteria in slurries of salt marsh sediment[J]. *Microbial Ecology*, 1981, 7(4):305–313.
- [13] Coppi M V, O'Neil R A, Lovley D R. Identification of an uptake hydrogenase required for hydrogen-dependent reduction of Fe(III) and other electron acceptors by *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(10):3022–3028.
- [14] 曲东, 张一平, Schnell S, 等. 添加氧化铁对水稻土中 H_2 、 CO_2 和 CH_4 形成的影响[J]. *应用生态学报*, 2003, 14(8):1313–1316
QU Dong, ZHANG Yi-ping, Schnell S, et al. Effect of iron oxide addition on hydrogen, carbon dioxide and methane geneses in paddy soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(8):1313–1316.
- [15] Qu D, Ratering S, Schnell S. Microbial reduction of weakly crystalline iron(III) oxides and suppression of methanogenesis in paddy soil[J]. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, 2004, 72:1172–1181.
- [16] Tian Q, Chen J H, Zhang H, et al. Study on the modified triphenyl tetrazolium chloride dehydrogenase activity (TTC-DHA) method in determination of bioactivity in the up-flow aerated bio-activated carbon filter[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(2):181–188.
- [17] Phillips E J P, Lovley D R. Determination of Fe(III) and Fe(II) in oxalate extracts of sediment[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1987, 51(4):938–941.
- [18] 易维洁, 曲东, 黄婉玉, 等. 淹水培养时间对水稻土中 Fe(III) 异化还原能力的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(9):1723–1729.
YI Wei-jie, QU Dong, HUANG Wan-yu, et al. Effect of flooding time on dissimilatory iron(III) reduction in paddy soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(9):1723–1729.
- [19] 陈秦, 赵佳佳, 曲东, 等. 渤海沉积物中微生物铁还原能力及其影响因素探讨[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(6):1172–1179.
CHEN Qin, ZHAO Jia-jia, QU Dong, et al. The capability and influencing factors of microbial iron reduction in marine sediments from Bohai Bay, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(6):1172–1179.
- [20] Pollock J, Weber K A, Lack J, et al. Alkaline iron(III) reduction by a novel alkaliphilic, halotolerant, *Bacillus* sp. isolated from salt flat sediments of Soap Lake[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(4):927–934.
- [21] Wang Xin-jun, Yang Jing, Chen Xue-ping, et al. Phylogenetic diversity of dissimilatory ferric iron reducers in paddy soil of Hunan, South China[J]. *J Soils Sediments*, 2009, 9(6):568–577.
- [22] 李秀颖. 淹水时间对水稻土中可培养梭菌和芽孢杆菌群落结构及丰度的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2012.
LI Xiu-ying. Effect of flooding time on community structure and abundance of culture clostridium and bacillus in paddy soil[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2012.
- [23] Włodarczyk T, Stępniewski W, Brzezińska M. Dehydrogenase activity, redox potential, and emissions of carbon dioxide and nitrous oxide from Cambisols under flooding conditions[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 36(3):200–206.
- [24] 易维洁, 曲东, 贾蓉. 不同淹水时间水稻土微生物群落的 Fe(III) 还原能力及其与脱氢酶活性的关系[J]. *应用基础与工程科学学报*, 2012, 5:768–776.
YI Wei-jie, QU Dong, JIA Rong. Relationships between Fe(III) reduction and dehydrogenase activity of microbial communities in paddy soil during different flooding periods[J]. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2012, 5:768–776.
- [25] 樊耀亭, 李晨林, 侯红卫, 等. 天然厌氧微生物氢发酵产生生物氢气的研究[J]. *中国环境科学*, 2002, 22(4):370–374.
FAN Yao-ting, LI Chen-lin, HOU Hong-wei, et al. Studies on biohydrogen production by biohydrogen fermentation of natural anaerobic microorganism[J]. *China Environment Science*, 2002, 22(4):370–374.
- [26] 任南琪, 李建政, 林明, 等. 产酸发酵细菌产氢机理探讨[J]. *太阳能学报*, 2002, 23(1):1–5.
REN Nan-qi, LI Jian-zheng, LIN Ming, et al. Study on the mechanism of bacterial hydrogen evolution by fermentation[J]. *Acta Energiæ Solaris Sinica*, 2002, 23(1):1–5.
- [27] Lovley D R. Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-Reducing Prokaryotes//Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. *The Prokaryotes*[M]. New York:Springer, 2000:635–658.
- [28] Conrad R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 28:193–202.