

<https://doi.org/10.3799/dqkx.2020.131>



# 不同铁、氮转化功能微生物对 Fe(II) 化学氧化的响应

赵淑凤, 刘慧\*, 赵磊, 陈荣, 马杰, 刘珊

中国地质大学环境学院, 生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北武汉 430078

**摘要:** 在地下水位波动带、地表水—地下水交互带等氧化还原变化区域,  $O_2$  会与 Fe(II) 发生反应产生活性氧, 如  $\cdot OH$ 、 $\cdot O_2^-$ 、 $H_2O_2$  等。这些活性氧具有生物毒性, 可能对微生物的存活产生影响, 而不同的功能微生物对 Fe(II) 化学氧化产生活性氧的响应可能不同。为了验证这一科学假设, 选取了一种 Fe(II) 氧化菌 *Pseudogulbenkiania* sp. strain 2002 (strain 2002) 和两种氨氧化细菌 *Rhodococcus* sp. (A1) 和 *Arthrobacter oxydans* (A2) 作为模式菌株, 并与铁还原菌 *Shewanella oneidensis* strain MR-1 (MR-1) 对比, 研究了 Fe(II) 化学氧化过程中微生物数量、细胞结构的变化, 通过淬灭实验探究了活性氧的贡献。结果表明, 不同功能微生物对 Fe(II) 化学氧化的响应截然不同。0.2 mmol/L Fe(II) 氧化 60 min 后, MR-1 数量下降了 1.61 个数量级, A1 和 A2 分别下降了 0.74 和 1.37 个数量级, 而 strain 2002 的存活几乎不受 Fe(II) 氧化的影响。透射电镜观察结果显示, MR-1、A1 和 A2 菌细胞的外膜受到了不同程度的破坏, 而 strain 2002 完好无损。淬灭实验结果表明, 溶液中和胞内生成的活性氧是造成功能微生物死亡的原因, 但是不同微生物由于对 Fe(II) 的吸附性能和对活性氧的抵御能力不同, 因而对活性氧的响应机制不同。该研究结果对于诠释现代环境氧化还原变化区域微生物群落演化及地球史上氧气大爆发事件的生物地球化学过程具有重要的借鉴意义。

**关键词:** Fe(II) 氧化; 杀菌作用; 功能微生物; 活性氧; 环境地质学。

中图分类号: P66

文章编号: 1000-2383(2021)04-1481-09

收稿日期: 2020-01-06

## Responses of Different Iron and Nitrogen Transformation Functional Microorganisms to Fe(II) Chemical Oxidation

Zhao Shufeng, Liu Hui\*, Zhao Lei, Chen Rong, Ma Jie, Liu Shan

State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan 430078, China

**Abstract:** In redox fluctuation areas such as groundwater level fluctuation zone, surface water-groundwater interaction zone,  $O_2$  reacts with Fe(II) to produce reactive oxygen species (ROSs), such as  $\cdot OH$ ,  $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , etc. These ROSs are of biological toxicity and may have impact on the survival of microorganisms, and different functional microorganisms may respond differently to ROSs produced by Fe(II) chemical oxidation. To validate this scientific hypothesis, a Fe(II) oxidizing bacteria *Pseudogulbenkiania* sp. strain 2002 (strain 2002), two ammonia oxidation bacteria *Rhodococcus* sp. (A1) and *Arthrobacter oxydans* (A2) were selected as model strains, and contrasted with the iron reducing bacteria *Shewanella oneidensis* strain MR-1 (MR-1). The numbers of microorganisms, changes of cell structures, and the contribution of ROS were studied. The results show that different functional microorganisms respond differently to Fe(II) chemical oxidation. After oxidation of 0.2 mmol/L Fe(II) for 60 min, the MR-1 numbers decreased by 1.61 orders of magnitude, A1 and A2 decreased by 0.74 and 1.37 orders of magnitude, respectively, while the survival of strain 2002 was virtually unaffected by Fe(II) oxidation. It was observed through transmission

**基金项目:** 国家自然科学基金重点项目 (No.41830862); 国家自然科学基金面上项目 (No.41672353); 国家创新群体 (No.41521001)。

**作者简介:** 赵淑凤 (1994-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境化学生物学。ORCID:0000-0003-3951-9240. E-mail:zsfeng2020@163.com

\* **通讯作者:** 刘慧, E-mail:hliu2009@cug.edu.cn

**引用格式:** 赵淑凤, 刘慧, 赵磊, 等, 2021. 不同铁、氮转化功能微生物对 Fe(II) 化学氧化的响应. 地球科学, 46(4):1481-1489.

electron microscope that the outer membranes of MR-1, A1 and A2 bacteria cells were damaged to varying degrees, while strain 2002 was intact. The results of quenching test show that ROS produced in solution and in the cell caused death of functional microorganisms, but different microorganisms had different response mechanisms to ROS due to their adsorption ability to Fe(II) and their resistance to ROS. The results of this study are of great significance for interpreting the microbial community evolution in the redox fluctuation region and the biogeochemical processes in the Great Oxygen Explosion in the history of the earth.

**Key words:** Fe(II) oxidation; bactericidal effect; functional microorganism; reactive oxygen; environmental geology.

## 0 引言

铁是地球上丰度最高及地壳中含量第4的元素,以Fe(II)和Fe(III)为主要价态分布于地表沉积环境中.铁的氧化还原循环不仅是地表能量流的重要途径之一,更直接耦合调控沉积环境矿物的形成与转化、C、N、S、P等生源要素的循环与污染物的迁移转化等过程,是地表系统中物质循环的重要驱动力(Melton *et al.*, 2014;胡敏和李芳柏, 2014;张勋等, 2018).

在一些氧化还原条件经常变化的区域,如地下水位波动带、地表水—地下水交互带、干湿交替的水稻田和湿地中,铁的氧化还原过程交替进行.铁主要以2种氧化还原状态存在于自然环境中,即氧化态Fe(III)和还原态Fe(II).在还原环境中,铁主要以Fe(II)形式存在,Fe(II)较易溶解且具有更高的生物活性,但在中性条件下与氧气接触极易被氧化(柳广飞等, 2018),发生一系列化学反应,生成活性氧中间体(包括 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$ 等)(Emerson and De Vet, 2015).近年研究发现,Fe(II)化学氧化产生的活性氧具有生物毒性(Imlay, 2003),能杀死大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)(Lee *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010)、大肠杆菌噬菌体(MS2)、肠杆菌噬菌体(P22)(Heffron *et al.*, 2019)等微生物.然而,Fe(II)化学氧化对一些元素和物质转化的功能微生物是否也会产生杀灭作用尚未可知.为了回答这个问题,笔者课题组近期研究了水溶态Fe(II)化学氧化对铁还原菌*Shewanella oneidensis* MR-1(MR-1)存活的影响,结果表明:在中性条件下,0.2 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ 与氧气接触60 min就杀死了1.61个数量级的MR-1菌(Chen *et al.*, 2018).由此,本论文将继续探究不同功能微生物对Fe(II)化学氧化的响应,以期为氧化还原变化区域的生物地球化学过程提供新的认知.

铁、氮的生物氧化还原循环是由微生物功能群调控的(贺纪正和张丽梅, 2009;谢树成等, 2012).Fe(III)的生物还原主要由兼性厌氧的铁还原微生

物功能群完成,而Fe(II)的生物氧化主要由铁氧化微生物功能群完成.在富含Fe(II)和硝酸盐的黑暗、缺氧的地下环境中,硝酸盐型厌氧铁氧化菌可利用硝酸盐或亚硝酸盐作为电子受体氧化Fe(II),硝酸盐则被还原成亚硝酸根、氧化亚氮和氧气,此过程是耦合铁与氮素循环的重要途径(Weber *et al.*, 2006;王茹等, 2015).氨氧化菌在有氧的条件下将氨氮( $\text{NH}_4^+$ )氧化为亚硝酸盐( $\text{NO}_2^-$ ),从而为反硝化细菌的呼吸作用提供电子受体(赵琳, 2013).在还原条件向氧化条件转化过程中,氨氧化是氮素的主要转化过程,且与Fe(II)化学氧化过程共存.因此,本研究选取了硝酸盐型厌氧铁氧化菌和两种氨氧化菌做模式菌种,并与铁还原菌MR-1对比,探究不同铁、氮转化功能微生物对Fe(II)化学氧化的响应.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

主要试剂:PIPES(哌嗪-1,4-二乙磺酸,缓冲范围6.1~7.5), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,25%戊二醛,磷酸缓冲液(PBS,pH为7.4), $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,苯甲酸钠,对羟基苯甲酸,甲醇.

菌种来源:实验使用的铁氧化菌为*Pseudogulbenkiania* sp. strain 2002(strain 2002),铁还原菌为*Shewanella oneidensis* strain MR-1(MR-1),均来自美国标准菌种保存中心.氨氧化菌A1为红球菌属(*Rhodococcus* sp.),A2为氧化节杆菌(*Arthrobacter oxydans*),均分离自江汉平原区地下水位波动带土壤中.

LB富集培养基(pH=7):每升纯水中添加10 g胰蛋白胨,5 g酵母提取物,10 g NaCl.固体培养基是在液体培养基的基础上,按1.5%~2.0%的比例加入琼脂.培养基均于121 °C高温湿热灭菌20 min后备用.

TSA富集培养基(pH=7):每升纯水中添加15 g胰蛋白胨,5 g大豆胨,5 g NaCl.固体培养基是在

液体培养基的基础上,按1.5%~2.0%的比例加入琼脂,培养基均于121℃高温湿热灭菌20 min后备用。

## 1.2 实验方法

用TSA液体培养基培养strain 2002菌,用LB液体培养基培养MR-1、A1和A2菌。取生长至对数中后期的菌液,于4℃下以8 000 r/min离心5 min,倾去上清液,然后用已灭菌的5 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>使菌体悬浮,在同样的条件下离心,然后倾去上清液,重复3次,最后用已灭菌的5 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>重悬已冲洗3次的菌体,控制每毫升菌悬液的菌落数约为2×10<sup>9</sup>个(即菌体浓度约为2×10<sup>9</sup> CFU/mL),之后于4℃冰箱内保存备用。

在100 mL厌氧瓶中加入99 mL 5 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液,121℃高温湿热灭菌20 min,接着将厌氧瓶置于超净工作台中,冷却后用铝箔纸将其包裹避光,添加1 mL菌悬液,使体系中的初始菌浓度为2×10<sup>7</sup> CFU/mL左右;然后添加400 μL pH为7.0并经0.22 μm聚醚砜(PES)滤膜过滤除菌过的0.5 mol/L PIPES(PIPES不会与Fe(II)及Fe(III)形成复合物(Keenan and Sedlak, 2008))缓冲液,以维持整个反应过程中的pH在6.6~7.0范围内;最后加入400 μL经0.22 μm PES滤膜过滤除菌过的50 mmol/L FeSO<sub>4</sub>溶液,控制体系中水溶态Fe(II)的初始浓度为0.2 mmol/L。将盛有上述反应液的厌氧瓶敞口置于超净工作台的磁力搅拌器上,用涂有聚四氟乙烯的磁力搅拌子持续搅拌,以保证反应溶液混合均匀且与氧气充分接触,转速设置为300 r/min。按照设定时间间隔,用带灭菌枪头的移液枪吸取200 μL反应液直接进行逐级稀释平板计数;用无菌注射器取1 mL反应液,立即用0.45 μm PES滤膜过滤至加有20 μL(1+3)盐酸的1.5 mL离心管中进行固定。实验设置不加FeSO<sub>4</sub>(加入400 μL无菌水)的对照实验,且每组实验至少重复3次。为了探究活性氧对Fe(II)化学氧化的杀菌贡献,在上述反应体系中,加入菌悬液前加入10 mmol/L甲醇,以淬灭在Fe(II)氧化过程中产生的·OH(Grannas *et al.*, 2006; Keenan and Sedlak, 2008)。其他操作同上。为了确定Fe(II)氧化过程中·OH的产生量,在不添加菌的条件下,于反应开始前加入10 mmol/L的苯甲酸钠捕获体系内产生的·OH,按照预定时间间隔,取1 mL反应溶液用0.22 μm PES滤膜过滤,接着迅速取0.7 mL过滤所得的滤液加入到装有0.7 mL甲醇(HPLC级别)的液相小瓶中以测定生成

的·OH(Zhang and Yuan, 2017)。

## 1.3 分析方法

活菌浓度的测试采用常规的逐级稀释平板法。细菌的全细胞透射电镜(TEM)观察方法请参见文献(Chen *et al.*, 2018)。反应液中水溶态Fe(II)浓度的测定采用邻菲罗啉分光光度法:取0.5 mL酸化后的反应溶液用超纯水稀释至1 mL,接着加入100 μL乙酸-乙酸铵缓冲液,然后加入40 μL 0.5%邻菲罗啉显色剂,避光显色15~20 min,用多功能酶标仪(Tecan M200 PRO,瑞士)在波长510 nm处测吸光度。菌细胞的超薄切片TEM观察:离心收集反应后的溶液,用PBS(pH为7.4)清洗数次,再用4℃预冷2.5%的戊二醛溶液(0.2 mol/L PBS配制)于4℃固定过夜,将戊二醛固定好的样品用0.1 mol/L PBS缓冲液清洗3次,接着用1%锇酸室温(20℃)固定2~3 h,0.1 mol/L PBS漂洗3次,然后样品依次经30%、50%、70%、80%、85%、90%、95%、100%(2次)酒精梯度脱水,每次15~20 min。之后于37℃温箱内进行渗透,渗透剂依次为丙酮:环氧树脂(2:1)、丙酮:环氧树脂(1:1)、环氧树脂,每次渗透8~12 h。将渗透过的样品放入胶囊或包埋板中,加入包埋剂环氧树脂,在60℃温箱中聚合48 h,接着制备超薄切片,切片厚度为80~100 nm,最后利用铅和铀双染色(2%醋酸铀饱和水溶液,枸橼酸铅,室温染色15 min),室温干燥过夜,电镜观察菌细胞的受损情况(TEM, H-7000FA, Hitachi, Tokyo, Japan)。对照实验组在未加Fe(II)的溶液中处理60 min。·OH的累积产生量通过检测·OH与苯甲酸钠反应生成的对羟基苯甲酸(*p*-HBA)的浓度来确定。*p*-HBA浓度的测定是利用配有紫外检测器和C18液相色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)的高效液相色谱仪(HPLC, LC-20AD, Shimadzu, Japan)检测。流动相为0.1%的三氟乙酸水溶液和乙腈的混合液(65:35,体积:体积),超声脱气,流速为1 mL/min,测定波长为255 nm,柱温箱温度为40℃。在中性条件下,·OH的浓度为*p*-HBA浓度的5.87倍(Joo *et al.*, 2005)。该方法的检出限为0.1 μmol/L *p*-HBA,相当于0.59 μmol/L的·OH。

## 2 结果

### 2.1 不同功能微生物存在下Fe(II)的化学氧化动力学过程

在中性好氧条件下水溶态Fe(II)被快速氧化,

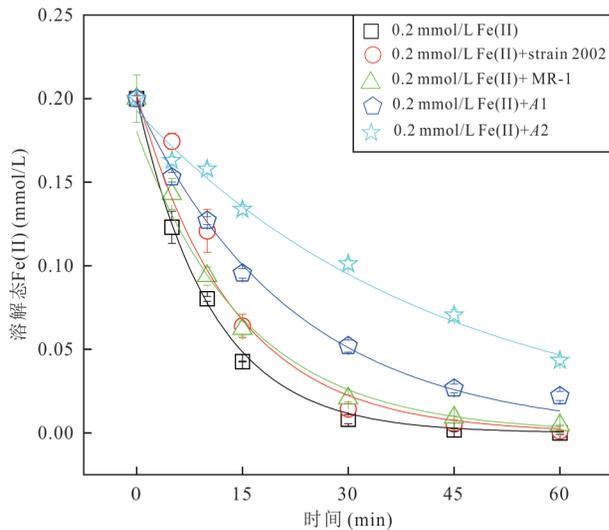


图1 0.2 mmol/L Fe(II)化学氧化过程中水溶态Fe(II)浓度的变化

Fig. 1 Variations of dissolved Fe(II) concentration during 0.2 mmol/L Fe(II) oxidation

60 min内,对照未加菌的0.2 mmol/L FeSO<sub>4</sub>已被完全氧化(图1).加入微生物菌悬液后,Fe(II)的氧化

速率明显减慢,说明菌的存在对Fe(II)的化学氧化产生了抑制作用.而且,不同微生物对Fe(II)化学氧化的抑制作用不同.其中,A2菌的抑制作用最强,其次是A1菌, strain 2002和MR-1对铁氧化的抑制作用很小.

## 2.2 Fe(II)化学氧化过程中不同功能微生物存活数量的变化

在中性好氧条件下0.2 mmol/L FeSO<sub>4</sub>氧化过程中4种不同功能微生物存活数量的变化如图2所示.在不加FeSO<sub>4</sub>的对照实验中,4种菌悬液的活菌数量变化不大.而当加入0.2 mmol/L FeSO<sub>4</sub>后,随着氧化过程的进行,MR-1和A2菌的活菌数量显著减少,氧化60 min后分别减少了1.61、1.37个数量级(lg),说明Fe(II)的化学氧化对这两种功能微生物均有很强的杀菌作用.相比之下,A1菌的数量在Fe(II)氧化过程中也有明显减少,但只减少了0.74个数量级,表明Fe(II)的化学氧化对该菌具有较弱的杀菌作用.而strain 2002在Fe(II)氧化过程中活菌数量没有发生明显的变化,说明该菌能抵抗Fe(II)化学氧化对菌细胞的伤害.

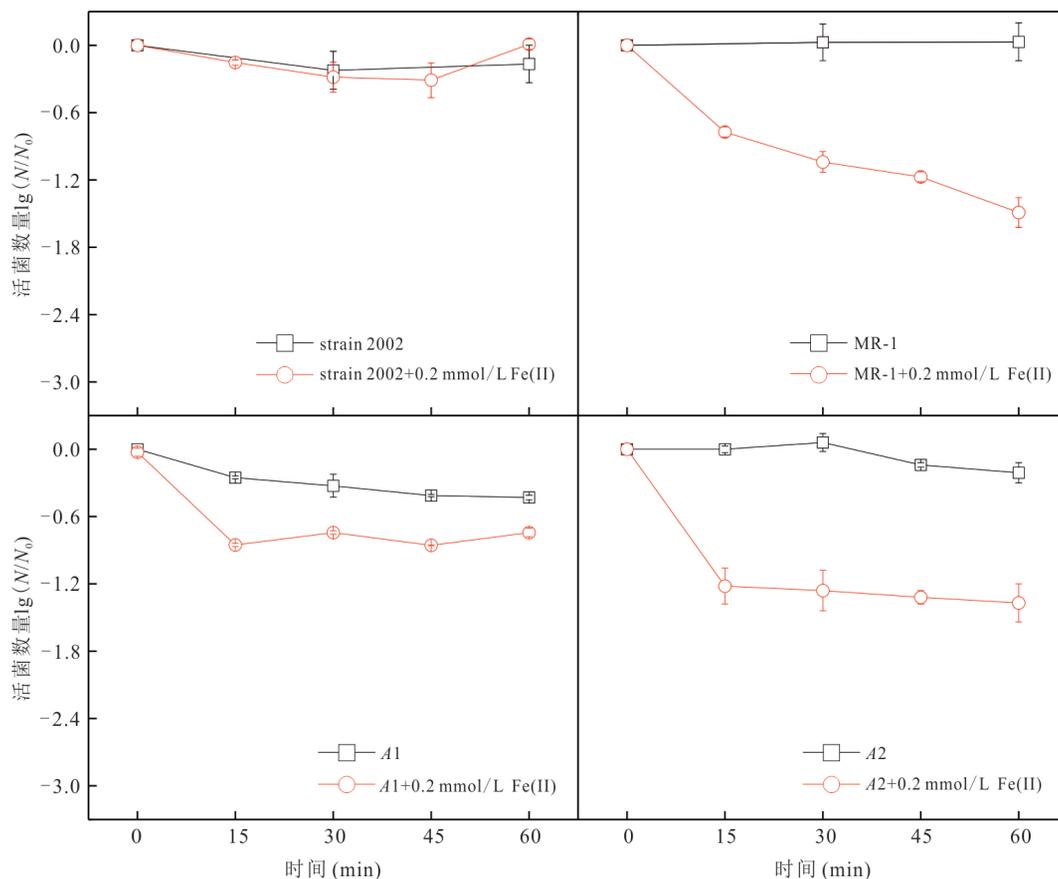


图2 0.2 mmol/L Fe(II)氧化过程中不同功能微生物的存活数量

Fig. 2 Surviving of different functional microorganisms during 0.2 mmol/L Fe(II) oxidation

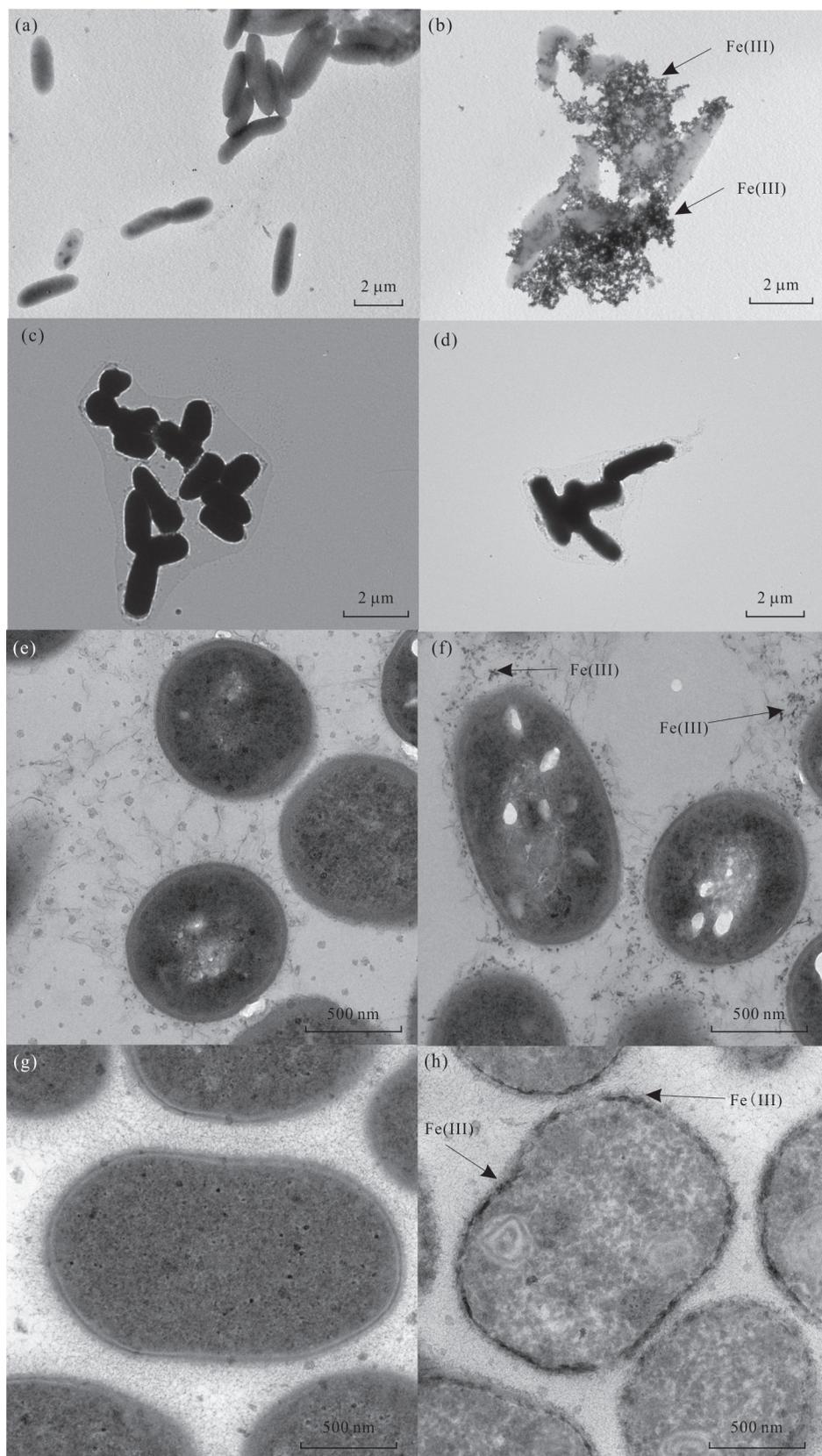


图 3 好氧条件下 Fe(II)化学氧处理 60 min 后的微生物 TEM 图片

Fig.3 TEM images of microorganisms under aerobic condition and Fe(II) oxidation for 60 min  
a,b.MR-1;c,d. strain 2002;e,f.A1 菌;g,h.A2 菌.图 a~d 为全细胞 TEM 图片;图 e~h 为超薄切片的 TEM 图片

### 2.3 Fe(II)化学氧化对不同功能微生物细胞结构的影响

通过 TEM(透射电镜)技术对 Fe(II)氧化处理后的细胞结构进行观察,并与未加 Fe(II)氧化处理的菌细胞进行对比(图 3).图 3a 和 3b 显示,经过 Fe(II)化学氧化 60 min 后的 MR-1 菌细胞结构完全被破坏,大量 Fe(III)与菌残体结合在一起,与笔者课题组前期的实验结果(Chen *et al.*, 2018)一致.从图 3c 和 3d 可以看出, strain 2002 菌为棒状菌,在 Fe(II)氧化处理 60 min 后, strain 2002 菌的细胞结构完整,未遭受明显的破坏.氨氧化菌 A1 在好氧状态下为球形(图 3e),胞内充实,细胞质均匀,细胞外膜结构完整、边界清晰;经 Fe(II)氧化处理后,该菌细胞质中出现了大小不一的泡状结构,细胞表面出现毛边,细胞边界模糊,外膜结构受到损害(图 3f).A2 菌在好氧状态下呈椭圆形,细胞外膜结构完整、清晰(图 3g);经 Fe(II)氧化处理后,该菌细胞外膜呈锯齿状,细胞颜色变浅,表明已有细胞内容物流出(图 3h).

### 2.4 活性氧对氨氧化菌存活的影响

$\cdot\text{OH}$  是一种重要的活性氧,它的氧化电位为 2.8 V,是自然界仅次于氟的氧化剂. Fe(II)好氧氧化 60 min 累积产生了 1.4  $\mu\text{mol/L}$  的  $\cdot\text{OH}$ (图 4).为了验证活性氧在 Fe(II)氧化杀菌作用中的贡献,本文利用甲醇淬灭 Fe(II)氧化过程中产生的  $\cdot\text{OH}$ ,研究  $\cdot\text{OH}$  淬灭后功能微生物对 Fe(II)氧化的响应.由图 5 可以看出, Fe(II)氧化过程中加入甲醇后, A1 菌的致死数量

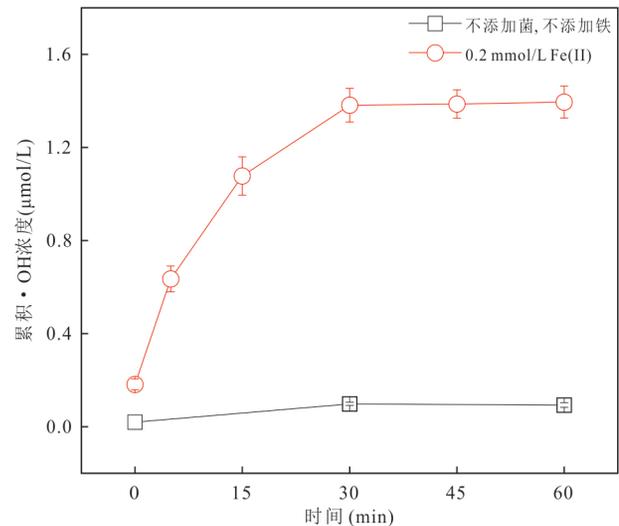


图 4 好氧条件下 Fe(II)氧化 60 min 过程中生成的累积  $\cdot\text{OH}$  量

Fig.4 Variations in cumulative  $\cdot\text{OH}$  concentrations during 60-min Fe(II) oxidation

(0.52 lg)比没有加淬灭剂的实验组(0.74 lg)明显减少,活菌数提升了 0.22 个数量级;而 A2 菌在加入甲醇后活菌数量几乎恢复到未被 Fe(II)氧化处理的水平.甲醇单独存在时对氨氧化菌 A1 和 A2 的存活数量影响较小.因此,  $\cdot\text{OH}$  对氨氧化菌 A1 和 A2 均起到了一定的杀灭作用,而且  $\cdot\text{OH}$  是造成 A2 菌死亡的主要原因.

## 3 讨论

本研究的实验结果表明,4种功能微生物对 Fe(II)

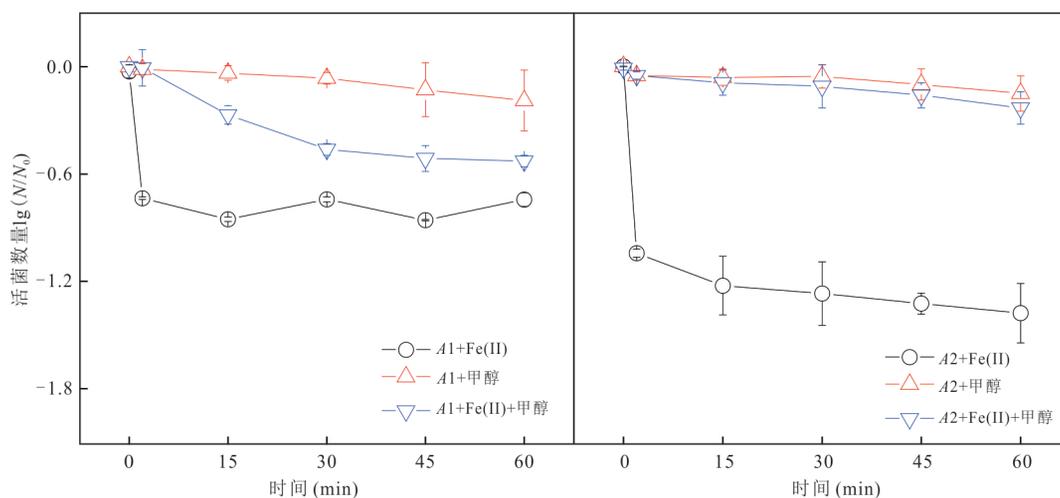


图 5 添加淬灭剂甲醇对 Fe(II)氧化 60 min 过程中氨氧化菌 A1 和 A2 数量的影响

Fig.5 Effect of quencher methanol on viable cell numbers of ammonia oxidizing bacteria A1 and A2 during 60-min Fe(II) oxidation

化学氧化的响应截然不同.从活菌数量和细胞结构观察结果来看,MR-1受Fe(II)化学氧化的杀灭作用最大.前期研究发现:加入淬灭剂后,MR-1的存活数量仅仅提升了0.2~0.4个数量级,说明Fe(II)氧化时存在于溶液中的活性氧对MR-1的杀灭作用贡献较小;而利用3'-(p-羟基苯基)荧光素(HPF)和二氢乙锭(HE)作为荧光探针测定MR-1胞内和胞外活性氧时发现,MR-1细胞可以吸附Fe(II)并在细胞内(或膜上)产生 $\cdot\text{O}_2^-$ 和 $\cdot\text{OH}$ 等活性氧,从而造成细胞膜的破坏及细胞的死亡(Chen *et al.*, 2019);Fe(II)氧化形成的纤铁矿中的-OH与细胞表面的 $\text{PO}_2/\text{COO}^-$ 相互作用,形成Fe(III)与MR-1残体的共聚体,而单独存在Fe(III)时,Fe(III)会附着在MR-1表面,但是MR-1细胞形态保持完整,且活菌数量保持不变,说明Fe(III)本身并不会对微生物的存活产生影响(Chen *et al.*, 2018).氨氧化菌A2也严重受到了Fe(II)化学氧化的杀灭作用.从细胞结构上看,A2菌的大部分细胞外膜结构遭到破坏,内容物流出,但大部分细胞形态尚存,未与Fe(III)形成明显的共聚体.而且与MR-1不同,A2菌主要是由溶液中Fe(II)氧化生成的活性氧造成细胞膜破坏致死的,生成的Fe(III)比较均匀地分布在细胞表面.氨氧化菌A1受Fe(II)化学氧化杀灭作用较轻,其大部分细胞在Fe(II)氧化处理后仍保持较完好的形貌,但是其细胞外膜也受到了一定程度的破坏,部分细胞会因此而死亡.而淬灭实验也发现,甲醇淬灭活性氧后仍有0.52个数量级的A1菌死亡,说明溶液中Fe(II)化学氧化产生的活性氧只是A1菌死亡的部分原因.铁氧化菌 strain 2002几乎不受Fe(II)化学氧化的影响.

由此可见,不同的功能微生物细胞对Fe(II)化学氧化产生活性氧的响应机制不同,主要源于细胞对Fe(II)的吸附性能和细胞表面对活性氧的抵御能力.MR-1对Fe(II)有较强的吸附能力,吸附的Fe(II)产生活性氧直接作用于细胞膜,由于淬灭剂难以淬灭细胞内的活性氧,因此淬灭剂对Fe(II)化学氧化导致的MR-1死亡没有很大的缓解作用(Chen *et al.*, 2019).同样,淬灭剂也没能完全消除Fe(II)化学氧化导致的A1菌死亡现象,说明死亡的A1菌仍然可能是由细胞内产生的活性氧造成的.但是,A1对Fe(II)的吸附能力可能弱于MR-1,从而产生的活性氧少而使A1菌受Fe(II)化学氧化的损伤较小,TEM图片中看不到明显的Fe(III)聚集,也

进一步说明了这一点.淬灭实验结果表明,A2菌的死亡主要是由溶液中产生的活性氧导致的,说明A2菌对活性氧非常敏感,其表面形成的锯齿状结构可能是被破坏的细胞外膜吸附的Fe(III).铁氧化菌 strain 2002在厌氧条件下能利用硝酸盐使Fe(II)氧化生成含Fe(III)的固体外壳包裹在细胞外面(Zhao *et al.*, 2013).可能这层外壳使得溶液中Fe(II)氧化产生的活性氧不能作用于细胞外膜,从而使该菌对Fe(II)化学氧化产生很强的抗性.因此,功能微生物对Fe(II)氧化的响应取决于细胞表面的结构,易于吸附Fe(II)且细胞表面裸露易受活性氧攻击的 $\text{PO}_2/\text{COO}^-$ 基团的微生物易受到Fe(II)化学氧化的破坏.

另外,多数细菌尤其是需氧菌和病原体可以通过产生酶来消除活性氧,以此抵御氧化还原压力,这些酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶、过氧化物酶等(Cornelis *et al.*, 2011).正常情况下,生物体内活性氧的清除与生成处于平衡状态,当环境因素导致活性氧浓度超过生理限度时就会损伤生物大分子.研究证实,缺少Ahp过氧化物酶的大肠杆菌胞内会积聚0.2  $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,当其过氧化氢酶基因酶缺失时,胞内积聚1  $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{H}_2\text{O}_2$ (Im-lay, 2003).因而推测不同类型功能微生物对Fe(II)氧化的响应不同,也可能与其对胞内活性氧的消除能力有关.透射电镜中观察到的A1菌细胞中生成的泡状物也可能是其抵御活性氧的一种机制,而这些机制均需要进一步的研究去证实.

铁是地球上丰度最高及地壳中含量第4的元素,铁的氧化还原循环不仅是地表能量流的重要途径之一,也是地表系统中物质循环的重要驱动力(胡敏和李芳柏, 2014;Emerson and De Vet, 2015).本文揭示了铁的化学氧化与铁、氮的生物转化之间的一种潜在关系,为氧化还原变化区域铁、氮循环提供了一种新的认识,尤其是铁的化学氧化可能会影响氮的生物氧化.该认识为铁、氮的耦合循环提供了新的线索.

本文研究发现,Fe(II)化学氧化对不同功能微生物的杀菌效果截然不同,存在不同的影响机制.该结果提示Fe(II)化学氧化可能对微生物群落的物种结构产生影响.笔者近期的研究结果证实了河岸交互带还原性沉积物在曝氧后,其中的微生物数量减少,群落物种结构发生了明显变化(Ma *et al.*, 2019).这些结果不但有利于诠释现代环境的氧化还

原变化区域微生物群落及其功能的分布与演化,而且可以推测,在地球经历的氧气爆发事件(Lyons *et al.*, 2014)中,地球从一种强还原环境演化为有氧环境过程中,铁的化学氧化对微生物的数量和群落结构也可能产生了重要影响,从而在生物地球化学过程中起到了重要的作用。

## 4 结论

在还原环境向氧化条件转变过程中,不同铁、氮转化功能微生物对Fe(II)化学氧化的响应不同。其中,铁还原菌MR-1的外膜破坏,内容物流出,从而菌体大量死亡,其残体与生成的Fe(III)形成共聚体;铁氧化菌由于其表面有厌氧铁氧化生成的含铁固体外壳,对Fe(II)化学氧化具有抗性;两种氨氧化菌均受Fe(II)化学氧化影响,部分菌因Fe(II)化学氧化生成的活性氧对其细胞外膜破坏而死亡,但其程度有很大的不同,且受影响的机制也不尽相同。以Fe(II)化学氧化对不同功能微生物产生的不同杀菌效果诠释氧化还原变化区域微生物数量及群落结构和功能具有重要意义,且可能对地球经历的氧气爆发事件中微生物群落演化及其主导的生物地球化学过程提供借鉴。

## References

- Chen, R., Liu, H., Tong, M., et al., 2018. Impact of Fe(II) Oxidation in the Presence of Iron-Reducing Bacteria on Subsequent Fe(III) Bio-Reduction. *The Science of the Total Environment*, 639: 1007–1014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.241>
- Chen, R., Liu, H., Zhang, P., et al., 2019. Attenuation of Fe(III)-Reducing Bacteria during Table Fluctuation of Groundwater Containing Fe<sup>2+</sup>. *Science of the Total Environment*, 694: 133660. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133660>
- Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S. C., et al., 2011. Iron Homeostasis and Management of Oxidative Stress Response in Bacteria. *Metallomics*, 3(6): 540–549. <https://doi.org/10.1039/c1mt00022e>
- Emerson, D., De Vet, W., 2015. The Role of FeOB in Engineered Water Ecosystems: A Review. *Journal American Water Works Association*, 107(1): E47–E57. <https://doi.org/10.5942/jawwa.2015.107.0004>
- Grannas, A. M., Martin, C. B., Chin, Y. P., et al., 2006. Hydroxyl Radical Production from Irradiated Arctic Dissolved Organic Matter. *Biogeochemistry*, 78(1): 51–66. <https://doi.org/10.1007/s10533-005-2342-4>
- He, J. Z., Zhang, L. M., 2009. Advances in Ammonia-Oxidizing Microorganisms and Global Nitrogen Cycle. *Acta Ecologica Sinica*, 29(1): 406–415(in Chinese with English abstract).
- Heffron, J., McDermid, B., Mayer, B. K., 2019. Bacteriophage Inactivation as a Function of Ferrous Iron Oxidation. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 5(7): 1309–1317. <https://doi.org/10.1039/C9EW00190E>
- Hu, M., Li, F. B., 2014. Soil Microbe Mediated Iron Cycling and Its Environmental Implication. *Acta Pedologica Sinica*, 51(4): 683–698(in Chinese with English abstract).
- Imlay, J. A., 2003. Pathways of Oxidative Damage. *Annual Review of Microbiology*, 57(1): 395–418. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938>
- Joo, S. H., Feitz, A. J., Sedlak, D. L., et al., 2005. Quantification of the Oxidizing Capacity of Nanoparticulate Zero-Valent Iron. *Environmental Science & Technology*, 39(5): 1263–1268. <https://doi.org/10.1021/es048983d>
- Keenan, C. R., Sedlak, D. L., 2008. Factors Affecting the Yield of Oxidants from the Reaction of Nanoparticulate Zero-Valent Iron and Oxygen. *Environmental Science & Technology*, 42(4): 1262–1267. <https://doi.org/10.1021/es7025664>
- Kim, J. Y., Park, H. J., Lee, C., et al., 2010. Inactivation of *Escherichia coli* by Nanoparticulate Zerovalent Iron and Ferrous Ion. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22): 7668–7670. <https://doi.org/10.1128/aem.01009-10>
- Lee, C., Kim, J. Y., Lee, W. I., et al., 2008. Bactericidal Effect of Zero-Valent Iron Nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environmental Science & Technology*, 42(13): 4927–4933. <https://doi.org/10.1021/es800408u>
- Liu, G. F., Zhu, J. Q., Yu, H. L., et al., 2018. Review on Electron-Shuttle-Mediated Microbial Reduction of Iron Oxides Minerals. *Earth Science*, 43(Suppl.1): 157–170 (in Chinese with English abstract).
- Lyons, T. W., Reinhard, C. T., Planavsky, N. J., 2014. The Rise of Oxygen in Earth's Early Ocean and Atmosphere. *Nature*, 506(7488): 307–315. <https://doi.org/10.1038/nature13068>
- Ma, S. C., Tong, M., Yuan, S. H., et al., 2019. Responses of the Microbial Community Structure in Fe(II)-Bearing Sediments to Oxygenation: The Role of Reactive Oxygen Species. *ACS Earth and Space Chemistry*, 3(5): 738–747. <https://doi.org/10.1021/acsearth->

- spacechem.8b00189
- Melton, E.D., Swanner, E.D., Behrens, S., et al., 2014. The Interplay of Microbially Mediated and Abiotic Reactions in the Biogeochemical Fe Cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 12(12): 797–808. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3347>
- Wang, R., Zheng, P., Zhang, M., et al., 2015. Nitrate-Dependent Anaerobic Ferrous/Iron Oxidation Microorganism: Review on Its Species, Distribution and Characteristics. *Microbiology*, 42(12): 2448–2456(in Chinese with English abstract).
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D., 2006. Microorganisms Pumping Iron: Anaerobic Microbial Iron Oxidation and Reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10): 752–764. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1490>
- Xie, S.C., Yang, H., Luo, G.M., et al., 2012. Geomicrobial Functional Groups: A Window on the Interaction between Life and Environments. *Chinese Science Bulletin*, 57(1): 3–22(in Chinese).
- Zhang, P., Yuan, S.H., 2017. Production of Hydroxyl Radicals from Abiotic Oxidation of Pyrite by Oxygen under Circumneutral Conditions in the Presence of Low-Molecular-Weight Organic Acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 218: 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2017.08.032>
- Zhang, X., Chen, T.H., Wang, J., et al., 2018. Influence of Iron Oxides on Methanogenic Process of Organic Matter and Related Mechanism. *Earth Science*, 43(Suppl.1): 136–144(in Chinese with English abstract).
- Zhao, L., 2013. Influence of Elodea Nuttallii-Nitrogen Cycling Bacteria on Nitrogen Cycling of Shallow Eutrophic Taihu Lake, China(Dissertation). Nanjing University, Nanjing(in Chinese with English abstract).
- Zhao, L.D., Dong, H.L., Kukkadapu, R., et al., 2013. Biological Oxidation of Fe(II) in Reduced Nontronite Coupled with Nitrate Reduction by *Pseudogulbenkiania* sp. Strain 2002. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 119: 231–247. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2013.05.033>

#### 附中文参考文献

- 贺纪正, 张丽梅, 2009. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. *生态学报*, 29(1): 406–415.
- 胡敏, 李芳柏, 2014. 土壤微生物铁循环及其环境意义. *土壤学报*, 51(4): 683–698.
- 柳广飞, 朱佳琪, 于华莉, 等, 2018. 电子穿梭体介导微生物还原铁氧化物的研究进展. *地球科学*, 43(增刊1): 157–170.
- 王茹, 郑平, 张萌, 等, 2015. 硝酸盐型厌氧铁氧化菌的种类、分布和特性. *微生物学通报*, 42(12): 2448–2456.
- 谢树成, 杨欢, 罗根明, 等, 2012. 地质微生物功能群: 生命与环境相互作用的重要突破口. *科学通报*, 57(1): 3–22.
- 张勋, 陈天虎, 王进, 等, 2018. 铁氧化物对有机质厌氧产甲烷过程的影响及其机制. *地球科学*, 43(增刊1): 136–144.
- 赵琳, 2013. 伊乐藻-氮循环菌共同作用对太湖氮循环的影响(硕士学位论文). 南京: 南京大学.