تأثیر اسید هیومیک، اسید فولویک و AQS برکاهش زیستی آهن فریک در خاک آهکی

ستاره شریفی [۱]، امیر لکزیان [۲]، علیرضا آستارائی [۳]، نسرین قربان‌زاده [۴]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ۲ استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، [۳] دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، [۴] استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

چکیده
فرآیند کاهش زیستی آهن فریک نقشی کلیدی در چرخه آهن در اکوسیستم‌های مختلف ایفا می‌کند. در این پژوهش اثر اسید هیومیک، اسید فولویک و AQS به‌عنوان ناقل الکترون در فرآیند کاهش زیستی آهن فریک توسط باکتری شونلا در خاک آهکی مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت ۲۵ روز از فرآیند کاهش زیستی، مقدار آهن فرو محلول در تیمار دارای ناقل الکترون AQS نسبت به تیمار شاهد ۱۰ درصد افزایش نشان داد. اما مقدار آهن فرو محلول در تیمارهای حاوی اسید هیومیک و اسید فولویک افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان نداد. مقدار آهن فرو قابل استخراج با اسید در حضور هر سه ناقل افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. بیشترین مقدار آهن قابل استخراج با اسید در حضور ناقل AQS مشاهده شد که پس از گذشت ۳۰ روز از فرآیند کاهش زیستی به ۲/۳ میلی‌گرم بر گرم رسید.

واژه‌های کلیدی: آهن فریک، باکتری کاهنده آهن، کاهش زیستی، ناقل الکترون.

مقدمه
آهن، فراوان‌ترین عنصر فلزی با ظرفیّت متغیر بر روی زمین است و کانی‌های دارای آهن از ترکیبات فعّال در خاک‌ها و رسوبات می‌باشند (Broch et al., ۲۰۱۰). همچنین آهن نقش مهمی را در شماری از واکنش‌های بیوشیمیایی ضروری گیاه ازجمله انتقال الکترون در زمان تنفس و فتوسنتز ایفا می‌کند. کمبود آهن مهم‌ترین علت کاهش محصولات کشاورزی بوده که به‌دلیل حلالیت کم آهن فریک، فراوان‌ترین گونه آهن موجود درخاک، رخ می‌دهد. این کمبود خصوصاً در خاک‌های آهکی نواحی استوایی نیمه خشک مشاهده می‌شود و تا زمانی‌که آهن فریک گونه غالب آهن در خاک باشد، فرآیندهایی با هدف افزایش آهن جهت استفاده گیاهان در این خاک‌ها مورد توجه قرار می‌گیرد (Lopez-Bucio et al., ۲۰۰۰; Ramirez-Rodriguez et al., ۲۰۰۵).
کاهش آهن فریک در شرایط بی‌هوازی توسط ریزجانداران کاهنده آهن انجام می‌گیرد. باکتری‌های غیرجذبی کاهنده آهن (DIRB)[۱۳۴] گروهی از ریزجانداران هستند که می‌توانند مواد آلی را اکسید کرده و در شرایط بی‌هوازی آهن فریک را به آهن فرو کاهش دهند که شامل هردو گروه باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری و اجباری می‌باشند (Fredrickson et al., ۱۹۹۶). Geobacter و Shewanella دو گونه از باکتری‌های غیرجذبی کاهنده آهن هستند که به‌دلیل توانایی آن‌ها در کاهش آهن فریک مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Loneragan et al., ۱۹۹۶; Lovley., ۱۹۹۱).
در این فرآیند باکتری کاهنده آهن با دریافت الکترون از یک مولکول آلی کوچک مانند گلوکز، فرومات و استات، که به‌عنوان منبعی از انرژی و کربن هم مطرح هستند، و انتقال آن به آهن فریک موجب کاهش زیستی آن می‌شوند (Scott et al., ۱۹۹۸). در پژوهشی که توسط محققان درباره باکتری Geobacter انجام شد به این نتیجه رسیدند که به‌منظور انجام این فرآیند نیاز به تماس مستقیم سلول باکتری با سطح کانی دارای آهن فریک می‌باشد که با تشکیل زوائدی مانند پیلی و تاژک این تماس برقرار می‌شود. مشاهدات نشان داده است که گونه Shewanella برخلاف Geobacter قادر به تشکیل این زوائد نمی‌باشد، در نتیجه این باکتری کاهنده آهن می‌تواند بدون برقراری تماس مستقیم با سطح کانی نیز موجب افزایش فراهمی آهن فرو شود (Childers et al., ۲۰۰۲). به این ترتیب که پس از دریافت الکترون از ماده آلی، آن را به ناقل الکترون[۱۳۵] انتقال داده و موجب کاهش آن‌ها شده و در نهایت انتقال الکترون از این ناقل به آهن فریک نیز موجب تولید آهن فرو می‌شود. ناقلین الکترون موادی مانند اسید هیومیک، اسید فولویک و ترکیبات کوئینون‌دار می‌باشند که در محیط‌های آبی و خاکی به فراوانی یافت شده و دارای گروه‌های عامل فعّال کوئینون هستند. ترکیبات هیومیکی از جنبه واکنش‌های اکسایش و کاهش بسیار فعّال بوده و می‌توانند کاهش زیستی کانی‌های آهن فریک با حلالیت کم را با ایفای نقش ناقل الکترون بین سلول باکتری و کانی تسهیل بخشند (Royer et al., ۲۰۰۴). از آنجایی‌که در انجام فرآیند کاهش زیستی تماس مستقیم بین

[۱۳۴] Dissimilatory Iron Reduction Bacteria
[۱۳۵] electron shuttle

ریزجاندار و اکسید آهن به‌منظور انتقال الکترون مورد نیاز می‌باشد این مواد قابلیت دسترسی را بیشتر کرده و موجب افزایش راندمان کاهش زیستی می‌شوند.

مطالعات گسترده‌ای در رابطه با فرآیند کاهش زیستی آهن فریک در ساختمان اجزای تشکیل دهنده خاک‌ها (اکسی‌هیدروکسیدها و فیلوسیلیکاتها) به‌صورت جداگانه در حضور ناقلین الکترون در دسترس است. اما بررسی‌های اندکی در رابطه با کاهش زیستی آهن فریک موجود در خاک‌ها به شکل کلی موجود است. لذا با توجه به اهمیت فرآیند کاهش زیستی در خاک‌های مختلف، این مطالعه با هدف بررسی فرآیند کاهش زیستی آهن فریک در یک خاک آهکی در حضور ناقلین الکترون و باکتری شونلا انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور مطالعه تأثیر اسید هیومیک، اسید فولویک و AQS در کاهش زیستی آهن فریک در خاک آهکی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل چهار سطح ناقل الکترون (بدون ناقل الکترون (Control)، اسید هیومیک (Humic acid)، اسید فولویک (Fulvic acid) و AQS[۱۳۶]) و دو سطح باکتری (بدون باکتری (Control) و باکتری شونلا(Shewanella)) با سه تکرار بود. نمونه‌برداری از واحدهای آزمایشی به مدت ۳۰ روز با فاصله زمانی ۵ روز انجام گرفت. در آزمایش کاهش زیستی، آهن فریک موجود در نمونه خاک به عنوان پذیرنده الکترون، گلوکز (۱۰ میلی‌مولار) به عنوان دهنده الکترون و سلول‌های باکتری به عنوان واسط انتقال الکترون مورد استفاده قرار گرفتند. همه محلول‌های آزمایشی در کاهش زیستی در محیطی با پهاش ۸/۶ تهیه شدند. مقدار ۱۰ گرم از نمونه خاک و گلوکز به ظروف شیشه‌ای اضافه شده و سپس این ظروف با گاز نیتروژن پر و درب پلاستیکی آن‌ها کاملاً محکم و درزگیری شدند. در نهایت مقدار دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلول‌های باکتری (تقریبا ۱۰۸ سلول در میلی‌لیتر از طریق شمارش بر روی پلیت) با استفاده از سرنگ سترون به ظروف شیشه‌ای اضافه شدند. این ظروف سپس بر روی شیکر (۶۰ دور در دقیقه) و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. به منظور بررسی اثر ناقلین الکترون، سه ماده اسید هیومیک، اسید فولویک و AQS با غلظت ۵/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محیط‌های آزمایش کاهش زیستی افزوده شدند. تیمارهای شاهد ش امل شرایط بدون باکتری و ناقل الکترون بود. نمونه‌برداری با فاصله ۵ روز از تیمارهای آزمایشی به منظور اندازه‌گیری آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید با روش فروزین در طول موج ۵۶۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری مدل (S uv-vis spectroscopy ۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

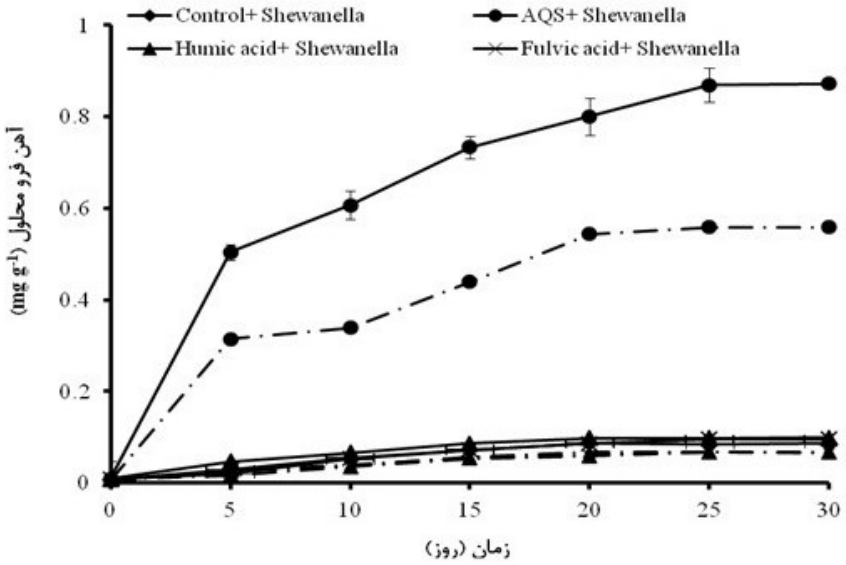
ویژگی‌های خاک آهکی مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- برخی از ویژگی‌های شیمیایی خاک آهکی مورد آزمایش

	pH	EC (mS cm^{-1})	$CaCO_3$(%)	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Fe_{DTPA}	Fe_{Total}
				(mg g^{-1})			
خاک اهکی	۴۶/۷	۶۳/۳	۲۵/۴۱	۲۳۱/۰	۲۰۹/۳	۰۰۳/۰	۹۷۸/۷

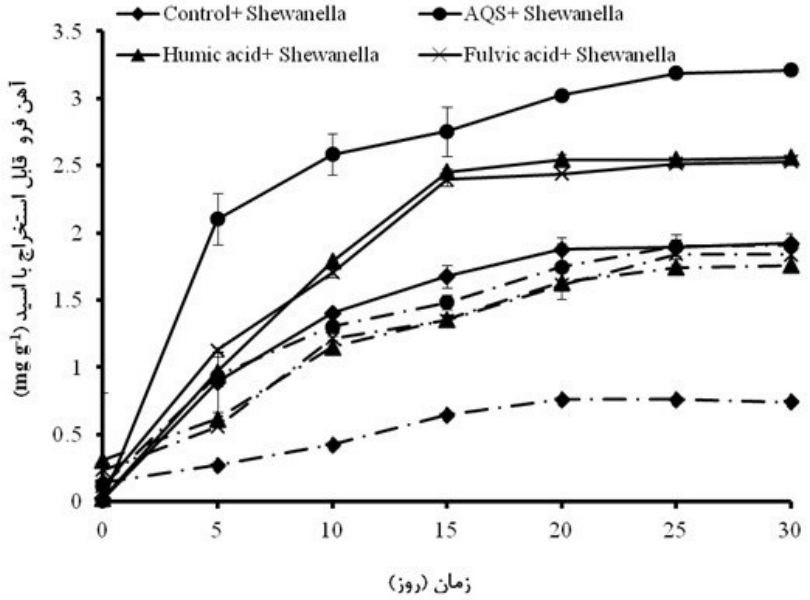
نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که در شرایط بی‌هوازی، بدون حضور باکتری شونلا و ناقل الکترون، باکتری‌های بومی خاک توانایی کاهش زیستی آهن فریک را به مقدار بسیار اندک دارا می‌باشند (شکل ۱). افزودن اسید هیومیک و اسید فولویک به تیمار شاهد بدون باکتری نیز اندکی موجب افزایش غلظت آهن فرو محلول شد که البته تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بدون باکتری و ناقل الکترون از خود نشان ندادند (شکل ۱). پس از افزودن باکتری شونلا به تیمارها در حالتی که هیچ‌گونه ناقل الکترونی حضور نداشت، غلظت آهن فرو محلول تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت (شکل ۱) که با نتایج چیلدرز و همکاران (۲۰۰۲) مبنی بر توانایی اندک باکتری شونلا در انتقال الکترون از طریق تماس مستقیم و بدون حضور ناقل الکترون مطابقت دارد. به‌دلیل عدم برقراری تماس مستقیم، انتقال الکترون از باکتری شونلا به آهن فریک صورت نگرفته و درنتیجه آهن فرو محلول تولید نمی‌شود. با افزودن اسید هیومیک و اسید فولویک به این شرایط، غلظت آهن فرو محلول به مقدار کمی افزایش می‌یابد که البته نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری از خود نشان ندادند (شکل ۱). در تیمار دارای ناقل الکترون AQS و عدم حضور باکتری شونلا، افزایش چشمگیر غلظت آهن فرو محلول مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمارهای شاهد و حاوی اسید هیومیک و اسید فولویک داشت (شکل ۱). غلظت آهن فرو محلول در این شرایط نسبت به تیمار شاهد از ۰۶/۰ به ۵۸/۰ میلی‌گرم بر گرم رسید که معادل با افزایش ۶۶/۸ درصدی غلظت آهن فرو محلول می‌باشد. پس از افزودن باکتری شونلا به تیمار حاوی ناقل AQS غلظت آهن فرو محلول افزایش بیشتری داشت. غلظت آهن فرو محلول در این تیمار نسبت به تیمار شاهد افزایش ۱۲/۱۰ درصدی داشت که از ۰۸/۰ در تیمار شاهد به ۸۹/۰ میلی‌گرم بر گرم در تیمار حاوی ناقل AQS و باکتری شونلا رسید. این مشاهده بیانگر این بود که در این شرایط افزودن هم‌زمان AQS به‌عنوان ناقل الکترون و باکتری شونلا به‌عنوان واسط انتقال الکترون موجب افزایش قابل ملاحظه غلظت آهن فرو محلول می‌شود که با نتایج گزارش شده توسط شی و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد.

[۱۳۶] Anthraquinone-۲,۶-disulfonate



شکل ۱- تغییرات آهن فرو محلول در تیمارهای مختلف خاک آهکی در مدت زمان ۳۰ روز (نشانه‌ها در تیمارهای دارای ناقل و باکتری شونلا و شاهد بدون باکتری و ناقل‌ها یکسان هستند. تیمارهای شاهد با خطوط نقطه چین و سایر تیمارها با خطوط پیوسته و مشخص شده‌اند.)

نتایج نشان داد که مقدار آهن فرو قابل استخراج با اسید در تیمار بدون حضور باکتری و ناقل الکترون ۷۶/۰ میلی‌گرم بر گرم بود اما در حضور باکتری شونلا مقدار آن به ۱۷/۲ میلی‌گرم بر گرم رسید (شکل ۲). پس از افزودن اسید هیومیک و اسید فولویک به نمونه‌های بدون باکتری مشاهده شد که این دو ناقل الکترون موجب افزایش غلظت آهن فرو قابل استخراج با اسید از ۷۶/۰ میلی‌گرم بر گرم در تیمار شاهد، به حدود ۷۵/۱ میلی‌گرم بر گرم در تیمار حاوی اسید هیومیک و ۸۳/۱ میلی‌گرم بر گرم در تیمار حاوی اسید فولویک شدند. تیمارهای حاوی اسید هیومیک و اسید فولویک تفاوت معنی‌داری از نظر غلظت آهن فرو قابل استخراج با اسید با یکدیگر نشان ندادند (شکل ۲). با افزودن ناقل AQS به خاک، مقدار آهن فرو قابل استخراج با اسید از ۷۶/۰ در تیمار شاهد به ۹۰/۱ میلی‌گرم بر گرم رسید که افزایش ۵/۱ درصدی نسبت به تیمار شاهد از خود نشان داد. این روند افزایشی با افزودن باکتری شونلا به ۲۱/۳ درصد رسید و غلظت آهن فرو قابل استخراج با اسید در این تیمار به ۲۰/۳ میلی‌گرم بر گرم رسید (شکل ۲).



شکل ۲- تغییرات آهن قابل استخراج با اسید در تیمارهای مختلف خاک آهکی در مدت زمان ۳۰ روز (نشانه‌ها در تیمارهای دارای ناقل و باکتری شونلا و شاهد بدون باکتری و ناقل‌ها یکسان هستند. تیمارهای شاهد با خطوط نقطه چین و سایر تیمارها با خطوط پیوسته و مشخص شده‌اند.)

نتایج حاکی از آن است که راندمان فرآیند کاهش زیستی آهن فریک در حضور سه ناقل الکترون اسید هیومیک، اسید فولویک و AQS افزایش می‌یابد. ناقل الکترون AQS در مقایسه با اسید هیومیک و اسید فولویک تأثیر مثبت بیشتری را در فرآیند کاهش زیستی در خاک آهکی داشت.

منابع

Borch T., Kretzschmar R., Kappler A., Cappellen P.V., Ginder-Vogel M. and Voegelin A. ۲۰۱۰. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. Environmental Science Technology, ۴۴: ۱۵-۲۳.

Childers S.E., Ciufo S. and Lovley D.R. ۲۰۰۲. Geobacter metallireducens accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. Nature, ۴۱۶: ۷۶۷-۷۶۹.

Fredrickson J.K. and Gorby Y.A. ۱۹۹۶. Environmental processes mediated by iron reducing bacteria.Current opinion in Biotechnology, ۷: ۲۸۷-۲۹۴.

Lovley D.R. ۱۹۹۱. Dissimilatory Fe(II) and Mn(IV) reduction. Microbiological Reviews, ۵۵: ۲۵۹-۲۸۷

Loneragan D.J., Jenter H.L., Coates J., Phillips E.J., Schmidt T.M. and Lovley D.R. ۱۹۹۶. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. Journal of Bacteriology, ۱۷۸: ۲۴۰۲-۲۴۰۸.

Royer R.A., Dempsey B.A., Jeon B.H. and Burgos W.D. ۲۰۰۴. Inhibition of biological reductive dissolution of hematite by ferrous iron. Environmental Science Technology, ۳۸: ۱۸۷-۱۹۳.

Scott D., McKnight D., Blunt-Harris E., Kolesar S. and Lovley D. ۱۹۹۸. Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms. Environmental Science and Technology, ۳۲: ۲۹۸۴-۲۹۸۹.

Shi L., Richardson D.J., Wang Z., Kerisit S.N., Rosso K.M., Zachara J.M. and Fredrickson J.K. ۲۰۰۹. The roles of outer membrane cytochromes of Shewanella and Geobacter in extracellular electron transfer. Environmental Microbiology Reports, ۴: ۲۲۰- ۲۲۷.

Zhang J., Dong H., Liu D., Fischer T.B., Wang S. and Huang L. ۲۰۱۲. Microbial reduction of Fe(III) in illite-smectite minerals by methanogen Methanosarcina mazei. Chemical Geology, ۳۵-۴۴.

Abstract

Bioreduction of ferric iron has a key role in iron cycle in different ecosystems. In this research, the effect of humic acid, fulvic acid and AQS as an electron shuttle was studied on bioreduction of ferric iron by Shewanella sp. in calcareous soil. After ۲۵ days, the amount of aqueous ferrous iron increased ۱۰ percent in AQS treatment compare to control treatment. But the amount of aqueous ferrous iron in humic acid and fulvic acid treatments did not show any significant difference compare to control treatment. In presence of all three electron shuttles, the amount of acid extractable iron showed significant difference compare to control treatment. After ۳۰ days, the most amount of acid extractable iron found in presence of AQS that it was ۳.۲ mg g-۱.

Key words: Ferric iron, iron reduction bacteria, bio-reduction, electron shuttle.