نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۵، آذر – دی ۱۳۹۵، ص. ۱۶۶۱-۱۶۴۶

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 5, Nov.-Dec. 2016, p. 1646-1661

تأثیر سه ناقل الکترون بر کاهش زیستی آهن فریک در دو خاک اسیدی و آهکی

ستاره شریفی[۱]- امیر لکزیان[۲*]- علیرضا آستارایی[۳]- نسرین قربان‌زاده[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۰۶

چکیده

چرخه آهن یکی از مهم‌ترین فرآیندهای ژئوشیمیایی است که افزایش زیست‌فراهمی این عنصر در خاک‌ها وابسته به فرآیند کاهش زیستی آهن فریک است. در این پژوهش اثر سه ناقل الکترون AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک در فرآیند کاهش زیستی آهن فریک با دو باکتری در دو خاک اسیدی و آهکی در شرایط بی‌هوازی آزمایشگاهیبررسی شد. آزمایش در قالب فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش چهار سطح ناقل الکترون (بدون ناقل الکترون، AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک) و سه سطح باکتری (بدون باکتری،باکتری.*Shewanella* sp و باکتری *Pseudomonas aeruginosa*) بودند. نتایج نشان داد که تیمار AQS توانست در نبود باکتری، اندازه آهن فرو خاک اسیدی و خاک آهکی را به ترتیب ۸ و ۱۵/۷ برابر نسبت به اندازه نخستین آهن فرو افزایش دهد که تفاوت معنی‌داری نسبت به دیگر ناقل‌های الکترون نشان داد. همچنین بودن باکتری .*Shewanella* sp در دو خاک اسیدی و آهکی منجر به افزایش ۷/۲ و ۱۶/۳ برابری اندازه آهن فرو شد ولی این افزایش در بودن باکتری *P. aeruginosa* به ۵/۶ و ۱۲/۱ برابر رسید. نتایج نشان داد که اندازه آهن فرو خاک‌های اسیدی و آهکی در تیمار باکتری *Shewanella* .sp و ناقل الکترون AQS به ترتیب ۱۱/۷ و ۲۲/۲ برابر نسبت به اندازه نخستین آهن فرو افزایش داشت. در تیمار باکتری *P. aeruginosa* و ناقل الکترون AQS این افزایش به ۷/۵ و ۱۶ برابر رسید. نتایج نشان دادند که در هر دو خاک اسیدی و آهکی، ناقل الکترون AQS و باکتری.*Shewanella* sp، پیامد سودمند بیشتری بر فرآیند کاهش زیستی در برابر دیگر تیمارها داشتند.

واژه‌های کلیدی: آهن فریک، باکتری‌های کاهنده غیرجذبی آهن، کاهش زیستی، ناقل الکترون

مقدمه

آهن چهارمین عنصر فراوان در پوسته زمین می‌باشد و کانی‌های اکسی‌هیدروکسید آهن بیش از ۵۰ درصد توده خاک‌ها را پدید می‌آورند (۵ و ۲۰). در طبیعت، آهن در کانی‌های اکسید و اکسی‌هیدروکسیدی مانند هماتیت (α-Fe_2O_3)، گئوتیت (α-FeO(OH))، مگنتیت (Fe_3O_4)، لیمونیت ((FeO(OH))، سیدریت ($FeCO_3$)، پیریت (FeS_2) و ایلمنیت ($FeTiO_3$) یافت می‌شود (۲۰). فیلوسیلیکات‌های آهن‌دار مانند مونتموریلونیت، نانترونیت و بیوتیت نیز از دیگر منابع آهن در طبیعت می‌باشند (۸). این کانی‌های آهن‌دار، ترکیباتی با حلالیت کم تا خیلی کم هستند که بخش بزرگی از آهن در آن‌ها به گونه آهن فریک بوده که بی‌جنبش می‌باشد (۴). کاهش آهن فریک در زیستگاه بی‌هوازی، مهم‌ترین فرآیند بیوژئوشیمیایی در خاک‌ها و ته‌نشست‌ها می‌باشد که به افزایش غلظت آهن فرو می‌انجامد. برخی از بررسی‌های ژئوشیمیایی و میکروبیولوژیک، کاهش زیستی آهن فریک را به عنوان نخستین شکل تنفس بر روی سطح زمین و نشانه‌ای از زندگی در دیگر سیارات پیشنهاد کرده‌اند (۱۹). کاهش زیستی آهن فریک بر ظرفیت بافری، شرایط اکسایش و کاهش، ترکیب مواد محلول خاک، ویژگی‌های سطحی، فعالیت ژئوشیمیایی کانی‌های آهن‌دار و همچنین شکل شیمیایی، مقاومت و سرنوشت بخش گسترده‌ای از آلاینده‌های آلی و غیرآلی مؤثر است (۳۵). این فرآیند را باکتری‌های کاهنده فلزها[5] انجام می‌دهند. پژوهش‌ها از سال ۱۹۸۰ نشان داده است که گروه گسترده‌ای از ریزجانداران بی‌هوازی، توانایی کاهش آهن فریک در کانی‌های آهن‌دار، را دارا می‌باشند (۱۵). گونه‌های گوناگون دو باکتری *Geobacter* و *Shewanella* از مهم‌ترین باکتری‌های کاهنده

۱، ۲ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: lakzian@ferdowsi.um.ac.ir)
۴- استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

5- Metal Reducing Bacteria

غیرجذبی آهن[1] هستند که به دلیل توانایی آن‌ها در کاهش آهن فریک به گونه گسترده‌ای بررسی شده‌اند (۱۸). همچنین جدایه‌های باکتریایی از جنس *Bacillus*، *Arthrobacter*، *Clostridium* و *Pseudomonas* نیز در گروه باکتری‌های کاهنده آهن فریک قرار گرفتند (۸). آزمایش‌ها نشان داده است که باکتری‌های کاهنده غیرجذبی آهن فریک، توانایی ترابری الکترون از ملکول‌های آلی کوچک مانند استات، گلوکز و لاکتات را به مواد هیومیکی گوناگونی داشته و در پایان با ترابری الکترون به اکسی‌هیدروکسیدهای آهن و فیلوسیلیکات‌های آهن‌دار مایه کاهش زیستی آهن فریک ساختمانی و دگرگونی آن به آهن فرو می‌شوند (۳۰). مواد هیومیکی گروه گسترده‌ای از ملکول‌های آلی مانند اسیدهیومیک، اسیدفولویک و دیگر ترکیبات کوئینون‌دار هستند که در خاک‌ها و ته‌نشست‌ها پدید می‌آیند و همانند واسطه در فرآیندهای اکسایش و کاهش کارایی دارند و ناقل الکترون[2] نامیده می‌شوند (۲۸). ناقل‌های الکترون با دریافت الکترون از دهنده الکترون، توانایی ترابری الکترون میان باکتری‌های کاهنده فلزها و رویه کانی را دارا می‌باشند که نیاز به تماس مستقیم ریزجاندار به رویه کانی را به حداقل می‌رساند (۶). بررسی‌های انجام شده در رابطه با اثر ناقل‌های الکترون بر فرآیند کاهش زیستی آهن فریک نشان دهنده آن است که ناقل‌های الکترون مایه افزایش راندمان این فرآیند می‌شوند (۱۹ و ۲۷). کپلر و همکاران (۱۴ و ۲۵) با بررسی وضعیت اکسایش و کاهش اسیدهیومیک در ژرفای گوناگون ته‌نشست‌های دریاچه‌ای گزارش نمودند که اسیدهیومیک با دریافت الکترون از دهنده الکترون به ریخت کاهش‌یافته می‌باشند که این موضوع نشانگر کارکرد اسیدهیومیک در فرآیند کاهش زیستی در اکوسیستم‌های طبیعی می‌باشد. بررسی‌های انجام شده (۱۹) نشان داد که اندازه بسیار اندکی از ناقل الکترون AQDS[3](۰/۱ mM) موجب افزایش سریع کاهش زیستی اکسیدهای آهن فریک می‌شود. AQDS یک کوئینون سه حلقه‌ای مصنوعی با ساختمانی مشابه به گروه‌های کوئینونی در ترکیبات هیومیکی است که فرآیندهای اکسایش و کاهش در آن به سرعت رخ می‌دهد (۲۲). رویر و همکاران (۲۷) گزارش نمودند که فرآیند کاهش زیستی آهن فریک موجود در ساختمان کانی هماتیت پس از گذشت ۵ روز در بودن باکتری *Shewanella putrefaciens* و ناقل الکترون AQDS نسبت به تیمار شاهد (بدون ناقل الکترون)، ۳ برابر افزایش نشان داد. این پژوهشگران، همچنین، با کاربرد ترکیبات آلی موجود در طبیعت با ساختاری همانند اسیدهیومیک و اسیدفولویک، گزارش نمودند که ترکیبات همانند اسیدهیومیک نسبت به ترکیبات همانند اسیدفولویک کاراتر هستند اما تفاوت آماری معنی‌داری نسبت به یکدیگر نشان ندادند. در پژوهشی که اُلاگلین (۲۴) انجام داد، گزارش شد که در فرآیند کاهش زیستی آهن فریک در ساختمان لپیدوکروسایت در بودن باکتری *Shewanella putrefaciens* و در نبود ناقل‌های الکترون خارجی، پس از گذشت ۲۲ روز منجر به تولید ۵ میلی‌مولار آهن فرو قابل استخراج با اسید شد که این اندازه در بودن ناقل الکترون AQDS به ۵۰ میلی‌مولار آهن فرو قابل استخراج با اسید رسید. این پژوهشگر گزارش کرد که از آنجایی که این باکتری توانایی تولید ناقل‌های الکترونی را دارد، کاهش زیستی اکسیدهای آهن فریک در نبود ناقل الکترون خارجی مانند AQDS نیز با آن افزایش می‌یابد. بررسی‌های فراوانی درباره کاهش زیستی آهن فریک کانی‌های آهن‌دار خاک مانند اکسی‌هیدروکسیدهای آهن (۶، ۱۴، ۲۰، ۲۴، ۳۳و ۳۵) و کانی‌های رسی آهن‌دار (۸، ۱۱، ۳۶ و ۳۷) انجام شده‌است، اما بررسی‌های اندکی در رابطه با کاهش زیستی آهن فریک خاک‌ها در بودن گلوکز و اسیدهای آلی و پیامد آن‌ها بر این فرآیند (۱۲ و ۱۳) در دست است. بنابراین با توجه به اهمیت فرآیند کاهش زیستی در چرخه آهن در خاک‌های گوناگون در شرایط بی‌هوازی، این پژوهش با هدف بررسی فرآیند کاهش زیستی آهن فریک در دو خاک اسیدی و آهکی در بودن ناقل‌های الکترون AQS[4]، اسیدهیومیک و اسیدفولویک و دو باکتری *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

بخش‌اول) نمونه برداری و آماده‌سازی نمونه‌های خاک

دو نمونه خاک اسیدی و آهکی به ترتیب از زمین‌های جنگلی و باغی در استان‌های گیلان و خراسان رضوی از لایه ۳۰-۰ سانتیمتر برداشت شد و پس از رساندن به آزمایشگاه و هواخشک شدن، از الک ۲ میلی‌متری گذرانده شدند. سپس آهن کل (۹)، آهن فریک و فرو (۱۶ و ۱۷)، آهن فراهم (قابل استخراج با DTPA)، آهن قابل استخراج با هیدروکسیل آمین هیدروکلرید (۳۶)، آهن قابل استخراج با پیروفسفات سدیم (۲) و آهن قابل استخراج با اگزالات آمونیوم (۱۰) و همچنین برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی در این دو نمونه خاک اندازه‌گیری شدند.

بخش دوم) آماده کردن و بازکشت باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa*

دو نمونه باکتری *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* که گرم منفی، میله‌ای و بی‌هوازی اختیاری هستند و در رده‌بندی γ-protobacteria قرار می‌گیرند به ترتیب از بانک میکروبی ایران

1- Dissimilatory Iron Reducing Bacteria
2- Electron Shuttle
3- Anthraquinone-2,6-disulfonate
4- Anthraquinone-2-sulfonic acid sodium salt

(مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران- کرج) و گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد آماده و پس از بازکشت در محیط کشت مایع (TSB[1]) برای انجام گام‌های بعدی پژوهش بهره‌گیری شدند. برای بهره‌گیری از باکتری‌ها در آزمایش کاهش زیستی، در آغاز باکتری‌ها در انکوباتور شیکردار (۱۱۰ دور در دقیقه) به مدت ۱۶ ساعت قرار گرفتند و به گونه هوازی در محیط کشت مایع (TSB) کشت داده شدند تا به گام رشد لگاریتمی میانه تا نهایی[2] برسند. سپس یاخته‌های باکتری برای کاهش زیستی دو نمونه خاک مورد نظر با محلول بافر PIPES[3] (۱۰ میلی‌مولار با پ‌هاش ۶/۸) سه بار سانتریفیوژ (۲۷۳۹×g به مدت ۴ دقیقه) و دوباره سوسپانسیون[4] شدند و در آزمایش‌های کاهش زیستی بکار رفتند (۸ و ۱۱).

بخش سوم) آزمایش کاهش زیستی

برای بررسی پیامد کاربرد ناقل‌های الکترون AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک در فرآیند کاهش زیستی آهن فریک در بودن باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* در دو خاک اسیدی و آهکی، آزمایشی در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل چهار سطح ناقل الکترون (بدون ناقل الکترون (C_e)، AQS (A)، اسیدهیومیک (H) و اسیدفولویک (F)) و سه سطح باکتری (بدون باکتری (C_b) ، باکتری *Shewanella* sp. (Sh) و باکتری *P. aeruginosa* (P)) بودند. در آزمایش‌های کاهش زیستی، آهن فریک (آهن بومی خاک) در دو نمونه خاک همانند پذیرنده الکترون، گلوکز (۱۰ میلی‌مولار) همانند دهنده الکترون و یاخته‌های باکتری همانند واسط ترابری الکترون بکار رفتند. برای انجام آزمایش‌های کاهش زیستی، محلول آزمایشی (۲/۵گرم $NaHCO_3$، ۰/۰۸ گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۱ گرم NH_4Cl، ۰/۲ گرم $MgCl_2.6H_2O$، ۱۰ گرم NaCl و ۳/۰۲۴ گرم بافر Hepes[5] در لیتر) با پ‌هاش ۶/۸ آماده شد. به اندازه ده گرم خاک در ظروف شیشه‌ای ریخته شد و ۳۰ میلی‌لیتر از محلول آزمایشی به آن افزوده شد. برای بررسی اثر ناقل‌های الکترون، سه ماده AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و گلوکز با غلظت ۱۰ میلی‌مولار پس از گذر از فیلترهای ۰/۲ میکرومتر به محیط‌های آزمایش کاهش زیستی افزوده شدند. سپس درب این ظروف کاملاً محکم، بسته و درزگیری شدند و پس از آن با گاز نیتروژن پر شدند. در پایان، سوسپانسیون یاخته‌های باکتری (نزدیک 10^8 یاخته در میلی‌لیتر) با بهره‌گیری از سرنگ سترون در زیر محفظه گاز نیتروژن به ظروف شیشه‌ای افزوده شدند. ظروف شیشه‌ای دارای یاخته‌های باکتری *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* به ترتیب در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور و به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند و آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در آن‌ها اندازه‌گیری شدند (۸).

بخش چهارم) اندازه‌گیری آهن فرو در فرآیند کاهش زیستی

کاهش زیستی آهن فریک در نمونه‌های خاک با اندازه‌گیری آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در روز ۳۰ام انجام گرفت. برای اندازه‌گیری آهن فرو قابل استخراج با اسید، ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون با یک سرنگ سترون از درون ظروف شیشه‌ای برداشته و به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری دارای ۰/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک یک نرمال (نسبت ۱:۱) افزوده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و ماندن نمونه‌ها در این حالت، آهن فرو قابل استخراج با اسید به روش فروزین در طول موج ۵۶۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری مدل (S 2000 uv-vis spectroscopy) اندازه‌گیری شد (۲۹). برای اندازه‌گیری آهن فرو محلول، سوسپانسیون سانتریفیوژ شد تا ذرات رس و یاخته‌های باکتری کاملاً ته‌نشین شوند و غلظت آهن فرو محلول رویی نیز به روش فروزین اندازه‌گیری شد. داده‌ها با نرم‌افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌های آزمایشی با یکدیگر با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه نخستین خاک نشان داد که آهن فرو و آهن فریک در خاک اسیدی به ترتیب ۰/۳۸۵ و ۱۷/۲۳۱ میلی‌گرم بر گرم و در خاک آهکی ۰/۱۷۶ و ۱/۱۹۲ میلی‌گرم بر گرم بود (جدول ۱). همچنین اندازه آهن فرو فراهم در دو خاک اسیدی و آهکی نیز به ترتیب ۰/۱۹۶ و ۰/۰۰۳ میلی‌گرم بر گرم محاسبه شد. آهن قابل استخراج با اگزالات آمونیوم اندازه اکسیدهای آهن کریستالی و آهن کمپلکس شده با مواد آلی را نشان می دهد. برای برآورد اندازه آهن کمپلکس شده با مواد آلی نیز از پیروفسفات سدیم بهره‌گیری شد (۷). اختلاف بدست آمده از این دو روش اندازه‌گیری آهن، در دو خاک اسیدی و آهکی به ترتیب ۰/۲۲۲ و ۰/۰۳۵۲ میلی‌گرم بر گرم بود که نشانگر اندازه آهن غیرکریستالی است که در برابر اکسیدهای آهن کریستالی به اندازه بیشتری وابسته به فرآیند کاهش زیستی است (۶). خاک اسیدی با داشتن مواد آلی بیشتر (۳/۵۱ درصد)، آهن قابل استخراج با اگزالات آمونیوم و پیروفسفات سدیم بیشتری داشت که

1- Tryptic Soy Broth
2- Mid to Late Log Phase
3- 1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
4- Resuspended
5- 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethane sulfonic acid

این بیشتر بودن برای آهن اندازه‌گیری شده با اگزالات آمونیوم نمایان‌تر بود که درنتیجه آن اندازه آهن غیرکریستالی در خاک اسیدی نسبت به خاک آهکی بیشتر شد.

جدول ۱- ویژگی‌های عمومی خاک‌ها

Table1- General properties of soils

		خاک اسیدی Acidic soil	خاک آهکی Calcareous soil
Texture		Clay Loam	Sandy Loam
pH		5.31	7.46
EC	($dS.m^{-1}$)	0.746	3.630
$CaCO_3$	(%)	7.130	41.250
Organic matter		3.510	1.170
Fe^{2+}		0.385	0.176
Fe^{3+}		17.231	1.192
Fe_{DTPA}	$mg.g^{-1}$	0.196	0.003
$Fe_{oxalate}$		0.227	0.036
$Fe_{pyrophosphate}$		0.005	0.0008
Fe_{total}		12.183	7.978

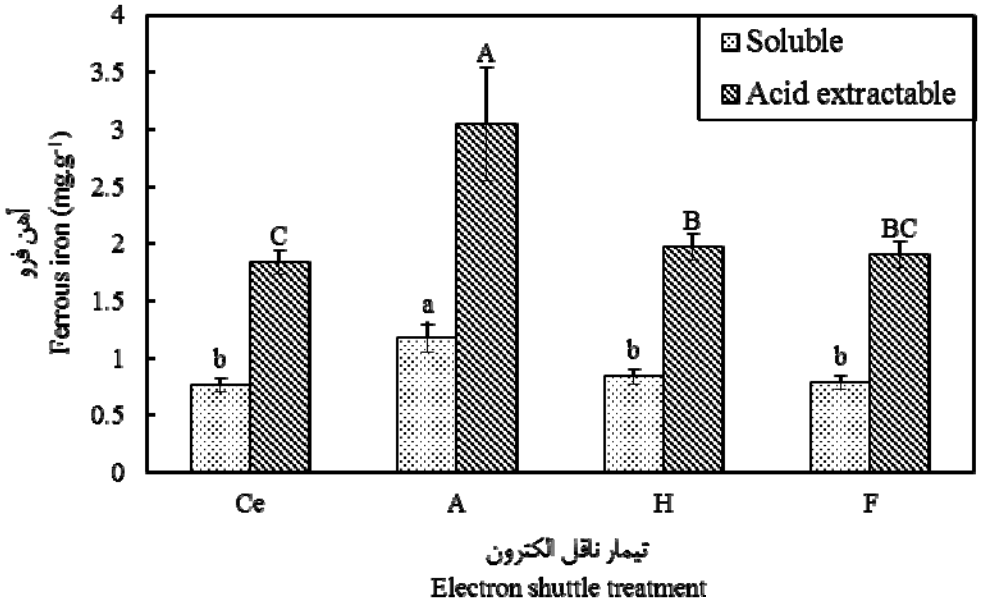
آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در خاک اسیدی و در تیمار ناقل‌های الکترون

نتایج بدست آمده از کاهش زیستی نشان داد که پس از گذشت ۳۰ روز، در خاک اسیدی و در شرایطی که ناقل الکترون بکار نرفته بود (C_e)، غلظت آهن فرو محلول ۰/۷۶ میلی‌گرم بر گرم بود (شکل ۱). اما با افزودن ناقل الکترون AQS به خاک اسیدی بررسی شده، کاهش زیستی آهن فریک تیمار این ناقل الکترون نسبت به تیمار C_e خاک اسیدی، ۵۳/۹ درصد افزایش داشت که این نشانگر پیامد سودمند این ناقل الکترون در فرآیند کاهش زیستی آهن بود. تیمارهای اسیدهیومیک و اسیدفولویک نیز به ترتیب مایه افزایش ۹/۸ و ۲/۸ درصدی غلظت آهن فرو محلول نسبت به تیمار C_e خاک اسیدی شدند اما اسیدهیومیک و اسیدفولویک برخلاف افزایش اندازه آهن فرو محلول نسبت به تیمار C_e، تفاوت معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد نسبت به تیمار C_e از خود نشان ندادند (شکل ۱). در نتیجه ناقل الکترون AQS توانست اثر بیشتری بر فرآیند کاهش زیستی آهن فریک و غلظت آهن فرو محلول در خاک داشته باشد. در پژوهشی که نوین و لاولی (۲۳) انجام دادند، از AQDS همانند ناقل الکترون برای کاهش زیستی اکسیدهای آهن فریک در ته‌نشست‌های آلوده بهره‌گیری شد. این پژوهشگران نیز گزارش کردند که در شرایط طبیعی، کاهش زیستی آهن فریک با افزودن AQDS به ته‌نشست‌ها، به گونه چشمگیری افزایش یافت. پس از گذشت ۳۰ روز از فرآیند کاهش زیستی، اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید در تیماری که ناقل الکترون در آن لحاظ نشده بود (C_e)، ۱/۸۳۶ میلی‌گرم بر گرم بود که در حدود ۴/۸ برابر نسبت به اندازه نخستین آهن فرو قابل استخراج با اسید (۰/۳۸۵ میلی‌گرم بر گرم) در خاک اسیدی افزایش داشت. با افزودن ناقل الکترون AQS، اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید به ۳/۰۴۸ میلی‌گرم بر گرم رسید که نسبت به تیمار C_e خاک اسیدی ۶۶ درصد افزایش داشت و تفاوت معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارها از خود نشان داد. با افزودن اسیدهیومیک و اسیدفولویک، اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید به ترتیب به ۱/۹۶۹ و ۱/۹۰۴ میلی‌گرم بر گرم رسید که در حدود ۷/۲ و ۳/۷ درصد نسبت به تیمار C_e خاک اسیدی افزایش داشتند (شکل ۱). ناقل‌های الکترون AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید را به ترتیب ۸، ۵ و ۵ برابر اندازه نخستین آهن فرو (۰/۳۸۵ میلی‌گرم بر گرم) در خاک اسیدی افزایش دادند. در این تیمارها بودن گلوکز و ایجاد شرایط بی‌هوازی در آزمایش امکان افزایش فعالیت باکتری‌های بومی خاک را با توانایی کاهش آهن فریک و بهره‌گیری از ناقل‌های الکترون فراهم کرد که در نتیجه آن افزایش کاهش زیستی دیده شد (۸). ایاسامی و همکاران (۱) نیز گزارش کردند که بیشترین غلظت آهن فرو را به ترتیب در نمونه‌های تیمار شده با ناقل‌های الکترون AQDS و اسیدهیومیک مشاهده کردند. همچنین رویر و همکاران (۲۷) گزارش نمودند که اسیدهیومیک نسبت به اسیدفولویک در افزایش کاهش زیستی هماتیت کاراتر بود، هرچند که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند.

آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در خاک اسیدی و در بودن باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa*

پس از گذشت ۳۰ روز در تیماری که باکتری بکار نرفته بود (C_b)، غلظت آهن فرو محلول ۰/۶۶ میلی‌گرم بر گرم بود (شکل ۲). براساس نتایج اُلاگلین (۲۴)، بسیاری از ریزجانداران بومی

خاک توان ساخت و تراوش ناقل‌های الکترون از جمله ملانین، فنازین و فلاوین را دارند که کاهش زیستی اکسیدهای آهن را افزایش می‌دهند. بنابراین علت دیدن کاهش زیستی در تیمار C_b می‌تواند، بودن باکتری‌های بومی خاک و بهره‌گیری از گلوکز افزوده شده به خاک به عنوان یک منبع کربنی فعال و ایجاد شرایط بی‌هوازی برای کاهش زیستی آهن فریک باشد (۸).



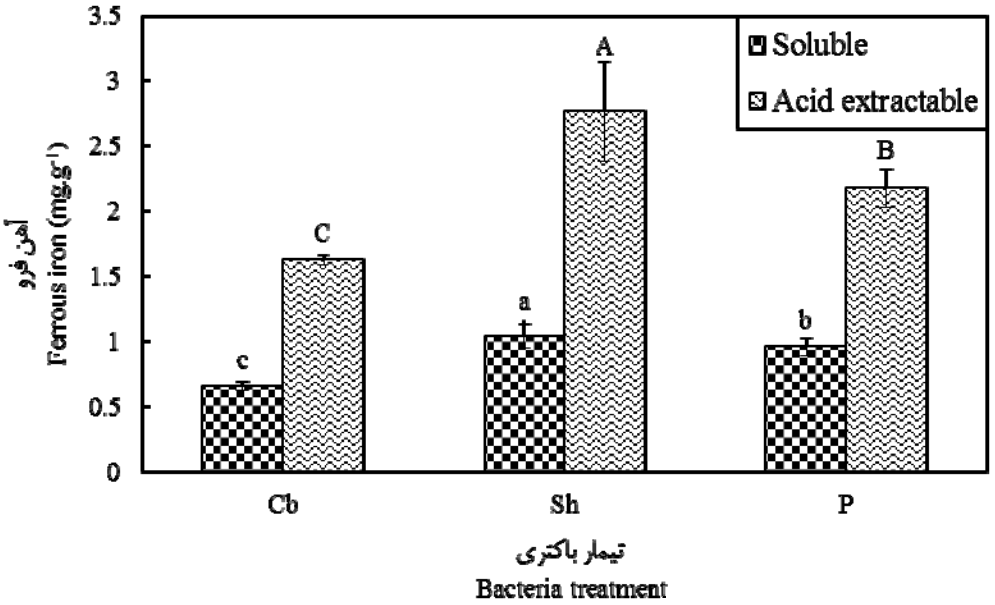
شکل ۱- مقایسه میانگین تغییرات آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در بودن ناقل‌های الکترون (C_e: بدون ناقل الکترون، A: AQS، H: اسیدهیومیک، F: اسیدفولویک) پس از گذشت ۳۰ روز (حروف کوچک و بزرگ به‌صورت جداگانه مقایسه آماری شده‌اند.)

Figure 1- Compare means of soluble and acid extractable ferrous iron in the presence of electron shuttles (C_e: control, A: AQS, H: humic acid, F: fulvic acid) after 30 days of experiment (statistical comparisons are case separately)

با افزودن دو باکتری *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* اندازه آهن فرو محلول به ترتیب به ۱/۰۴۳ و ۰/۹۵۹ میلی‌گرم بر گرم رسید که افزایش ۵۸ و ۴۵/۳ درصدی نسبت به تیمار C_b از خود نشان دادند (شکل ۲). نتایج نشان داد که این دو باکتری در فرآیند کاهش زیستی کارا بوده و تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار C_b ایجاد کردند. غلظت آهن فرو قابل استخراج با اسید در تیمار بدون باکتری به ۱/۶۲۷ میلی‌گرم بر گرم رسید، که ۴/۲ برابر افزایش آهن فرو نسبت به اندازه نخستین آهن فرو (۰/۳۸۵ میلی‌گرم بر گرم) در خاک اسیدی را نشان داد. با افزودن دو باکتری *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* به محیط آزمایش، غلظت آهن فرو قابل استخراج با اسید نسبت به تیمار C_b به ترتیب، ۶۹/۹ و ۳۳/۷ درصد افزایش داشت (شکل ۲). بررسی‌های (۲۲) نشان داد که گونه‌های باکتری *Shewanella* sp. توان ساخت و رهاسازی ترکیب‌های مونو نوکلئوتید فلاوین و ریبوفلاوین را داشته که خود ناقل الکترون می‌باشند. بنابراین در تیمارهای دارای باکتری *Shewanella* sp. بدون افزودن ناقل الکترون نیز کاهش زیستی به اندازه فراوانی انجام شد. نتایج این بخش از آزمایش نشان دادند که هر دو باکتری توانایی کاهش زیستی آهن فریک را دارند اما باکتری *Shewanella* sp. در برابر باکتری *P. aeruginosa* پیامد سودمند بیشتری در افزایش کارایی این فرآیند داشته و تفاوت معنی‌داری نسبت به باکتری *P. aeruginosa* و باکتری‌های بومی خاک در فرآیند کاهش زیستی آهن فریک نشان داد.

آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در خاک اسیدی و در بودن ناقل الکترون و باکتری

نتایج نشان داد که در تیماری که باکتری و ناقل الکترون بکار نرفته بود، غلظت آهن فرو محلول ۰/۵۹ میلی‌گرم بر گرم بود (شکل ۳. الف). با افزودن باکتری *Shewanella* sp. به نمونه‌های خاک در نبود ناقل الکترون، به علت بهره‌گیری از مواد آلی موجود در خاک، ترابری الکترون با آن‌ها و عدم نیاز به تماس مستقیم با آهن فریک موجود در خاک، اندازه ۰/۸۶ میلی‌گرم بر گرم آهن فرو محلول دیده شد که اندازه آن در مقایسه با تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری در خاک اسیدی، ۴۵/۸ درصد افزایش داشت (شکل ۳. الف).



شکل ۲- مقایسه میانگین تغییرات آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در بودن باکتری‌های *Shewanella* sp. (*Sh*) و *P. aeruginosa* (*P*) پس از گذشت ۳۰ روز (حروف کوچک و بزرگ به‌صورت جداگانه مقایسه آماری شده‌اند)

Figure 2- Compare means of soluble and acid extractable ferrous iron in the presence of *Shewanella* sp. (*Sh*) and *P. aeruginosa* (*P*) after 30 days of experiment (statistical comparisons are case separately)

در بودن باکتری *P. aeruginosa* و نبود ناقل الکترون، اندازه آهن فرو محلول نسبت به تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری در خاک اسیدی پس از گذشت ۳۰ روز، ۴۰/۷ درصد افزایش داشت که توانایی این باکتری را همانند باکتری *Shewanella* sp. در بهره‌گیری از مواد آلی موجود در خاک و کاهش زیستی آهن فریک نشان داد (شکل ۳. الف). لازم به ذکر است که در این شرایط باکتری *Shewanella* sp. توانست بیشتر از باکتری *P. aeruginosa*، اندازه آهن فرو محلول را افزایش دهد اما از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند. لاولی و همکاران (۶) بیان نمودند که ریزجانداران از راه تماس مستقیم با منابع نامحلول آهن فریک قادر به کاهش زیستی آن‌ها هستند که اثر محدودکننده‌ای بر کاهش زیستی آهن فریک دارد (۱۴). اما اُلاگلین (۲۴)، ایاسامی و همکاران (۱)، لاگونا و همکاران (۲۰)، شیمیزیو و همکاران (۳۳)، کاسترو و همکاران (۶) و پیپن بروک و همکاران (۲۵) گزارش کردند که کوئینون‌های برون یاخته‌ای همانند ناقل الکترون میان ریزجانداران کاهنده آهن فریک و کانی‌های دارای آهن فریک بکار می‌روند که این امر موجب می‌شود تا نیاز به تماس مستقیم ریزجاندار و رویه کانی به حداقل برسد. در این پژوهش نیز دیده شد که در تیمار AQS و نبود باکتری، اندازه آهن فرو محلول ۰/۷۹ میلی‌گرم بر گرم بود که نسبت به تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری، ۳۳/۹ درصد افزایش داشت اما با افزودن باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* اندازه آهن فرو محلول به ترتیب به ۱/۴۵ و ۱/۲۷ میلی‌گرم بر گرم رسید که افزایش ۸۳/۵ و ۶۰/۸ درصدی نسبت به تیمار AQS بدون باکتری در خاک اسیدی، از خود نشان دادند (شکل ۳. الف). بودن همزمان ناقل الکترون AQS و باکتری *Shewanella* sp. از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارها ایجاد کرد. برپایه نظر ولف و همکاران (۳۴) ترکیب کوئینون‌دار AQDS با گرفتن الکترون از یاخته باکتری کاهش یافته و به هیدروکوئینون (AH_2QDS) دگرگون می‌شود و سپس با ترابری الکترون به آهن فریک در رویه کانی آن را به آهن فرو کاهش داده و دوباره اکسید شده و به ریخت نخستین خود باز می‌گردد که این امر به افزایش کاهش زیستی در کانی‌ها می‌انجامد. در بودن اسیدهیومیک و اسیدفولویک اندازه آهن فرو محلول به ترتیب، ۰/۶۵ و ۰/۶۰ میلی‌گرم بر گرم بود که معادل با افزایش ۱۰/۲ و ۳/۴ درصدی نسبت به تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری خاک اسیدی بود (شکل ۳. الف). در این شرایط تیمار اسیدفولویک بدون باکتری و تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری تفاوت معنی‌داری از خود نشان ندادند. اما با افزودن باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* این افزایش در بودن اسیدهیومیک، به ترتیب به ۵۰/۸ و ۳۵/۴ درصد نسبت به تیمار اسیدهیومیک بدون باکتری رسید و در بودن اسیدفولویک ۴۴/۳ و ۳۹/۳ درصد افزایش نسبت به تیمار اسیدفولویک بدون باکتری دیده شد. باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* در بودن ناقل

الکترون اسیدفولویک با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. همچنین باکتری *P. aeruginosa* در بودن اسیدهیومیک تفاوت معنی‌داری با تیمارهای اسیدفولویک دارای باکتری نشان نداد (شکل ۳. الف). اُلاگلین (۲۴) بیان کرد که افزودن اسیدهیومیک و اسیدفولویک طبیعی، در بهترین شرایط تنها افزایش اندکی در کاهش زیستی آهن فریک موجود در ساختمان لپیدوکروسایت در بودن باکتری *Shewanella putrefaciens* در مقایسه با تیمارهای بدون ناقل نشان داد. رویر و همکاران (۲۴ و ۲۷) گزارش نمودند که کاهش زیستی آهن فریک در بودن ترکیبات هیومیکی که از خاک جداسازی شده‌اند نسبت به زمانی‌که از ته‌نشست‌های بستر رودخانه جداسازی شده‌اند، بیشتر است. زیرا ترکیبات هیومیکی که از خاک جداسازی شده‌اند توانایی پذیرندگی الکترون بیشتری داشته و درنتیجه در کاهش زیستی کاراتر هستند. اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید در روز ۳۰ام و در بودن ناقل‌های الکترون AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک نسبت به تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری به ترتیب ۱/۷۹، ۱/۶۲ و ۱/۵۶ میلی‌گرم بر گرم بود که افزایش ۱۶/۲، ۵/۲ و ۱/۳ درصدی نسبت به تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری از خود نشان دادند (شکل ۳. ب). برخلاف AQS، افزودن اسیدهیومیک و اسیدفولویک تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری ایجاد نکرد. اما با افزودن باکتری *Shewanella* sp. و در بودن ناقل الکترون AQS، اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید حدود ۲ برابر تیمار AQS بدون باکتری افزایش پیدا کرد. در برابر آن، در بودن اسیدهیومیک و اسیدفولویک به ترتیب، افزایش ۹/۶ و ۵/۳ درصدی نسبت به تیمارهای اسیدهیومیک و اسیدفولویک بدون باکتری در خاک اسیدی دیده شد. به این ترتیب که غلظت آهن فرو قابل استخراج با اسید به ترتیب به ۴/۵۰، ۲/۲۸ و ۲/۱۹ میلی‌گرم بر گرم رسید (شکل ۳. ب). اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید در بودن باکتری *P. aeruginosa* و ناقل‌های الکترون AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک، به ترتیب ۲/۸۵، ۲/۰۰ و ۱/۹۵ میلی‌گرم بر گرم بود که افزایش ۵۰/۸، ۶/۱ و ۳/۴ درصدی نسبت به تیمارهای ناقل‌های الکترون AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک بدون باکتری از خود نشان دادند (شکل ۳. ب). در این شرایط باکتری *P. aeruginosa* تفاوت معنی‌داری در تولید آهن فرو قابل استخراج با اسید در بودن اسیدهیومیک و اسیدفولویک ایجاد نکرد. با اندازه‌گیری آهن فرو قابل استخراج با اسید این نتیجه بدست آمد که باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* در بودن ناقل الکترون AQS، اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید را نسبت به مقدار نخستین آن (۰/۳۸۵ میلی‌گرم بر گرم) در خاک اسیدی ۱۱/۷ و ۷/۴ برابر افزایش دادند که به ترتیب تفاوت معنی‌داری در این تیمارها نسبت به دیگر تیمارها دیده شد.

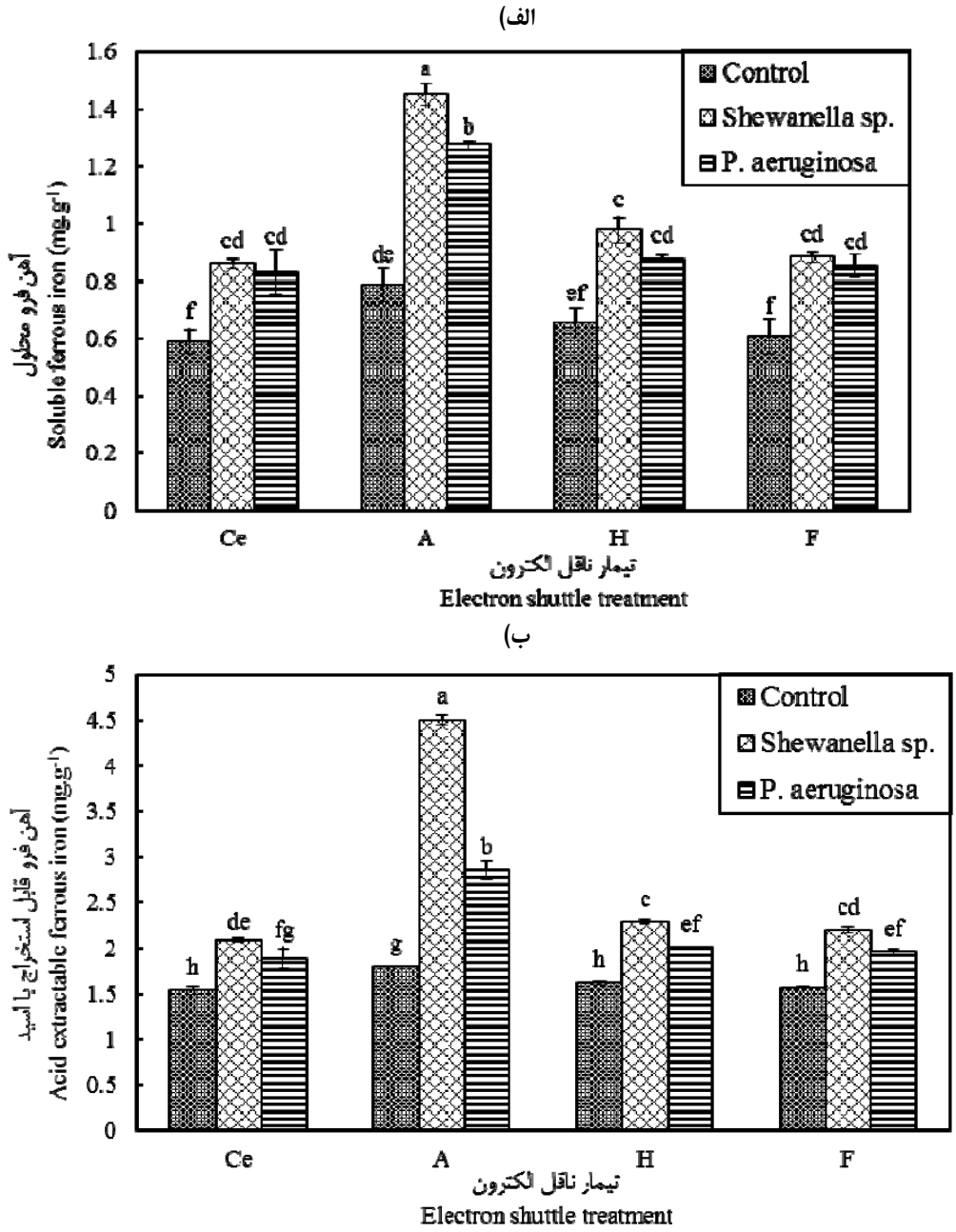
آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در خاک آهکی و در بودن ناقل‌های الکترون

نتایج بدست آمده از آزمایش کاهش زیستی در خاک آهکی نشان داد که پس از ۳۰ روز و در نبود ناقل الکترون (C_e)، اندازه آهن فرو محلول ۰/۰۴ میلی‌گرم بر گرم بود. اما با افزودن ناقل الکترون AQS به این شرایط اندازه آهن فرو محلول ۰/۴۶ میلی‌گرم بر گرم شد که حدود ۱۱/۵ برابر نسبت به تیمار C_e خاک آهکی افزایش پیدا کرد و تفاوت معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارها از خود نشان داد (شکل ۴). این افزایش در بودن اسیدهیومیک و اسیدفولویک به ترتیب ۱۴/۲ و ۲/۴ درصد نسبت به تیمار C_e بود (شکل ۴). برخلاف افزایش ناچیز اندازه آهن فرو محلول در تیمارهای اسیدهیومیک و اسیدفولویک، تفاوت معنی‌داری میان این دو ناقل الکترون با یکدیگر و با تیمار C_e دیده شد. اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید در بودن ناقل الکترون AQS به ۲/۷۷۷ میلی‌گرم بر گرم رسید (شکل۴) که نسبت به اندازه نخستین آهن فرو قابل استخراج با اسید در خاک آهکی (۰/۱۷۶ میلی‌گرم بر گرم)، حدود ۱۵/۸ برابر افزایش داشت. در برابر آن، در بودن اسیدهیومیک و اسیدفولویک تنها ۱۷/۱ و ۱۰ درصد افزایش نسبت به تیمار C_e دیده شد. اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید نسبت به آهن فرو محلول به مقدار چشمگیری افزایش داشت. انتظار می‌رود که افزودن ناقل‌های الکترون منجر به افزایش فرآیند کاهش زیستی از طریق کمپلکس کردن آهن فریک یا آهن فرو شوند (۱۴). کمپلکس کردن آهن فریک با ناقل‌های الکترون منجر به دسترسی بیشتر آهن فریک برای ریزجانداران می‌شود، در برابر آن کمپلکس کردن آهن فرو، از جذب آن به رویه کانی و یاخته‌های میکروبی جلوگیری کرده و مانع توقف فرآیند کاهش زیستی به‌دلیل عدم دسترسی به آهن فریک موجود در ساختمان کانی‌های خاک می‌شود (۱۴).

آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در خاک آهکی و در بودن باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa*

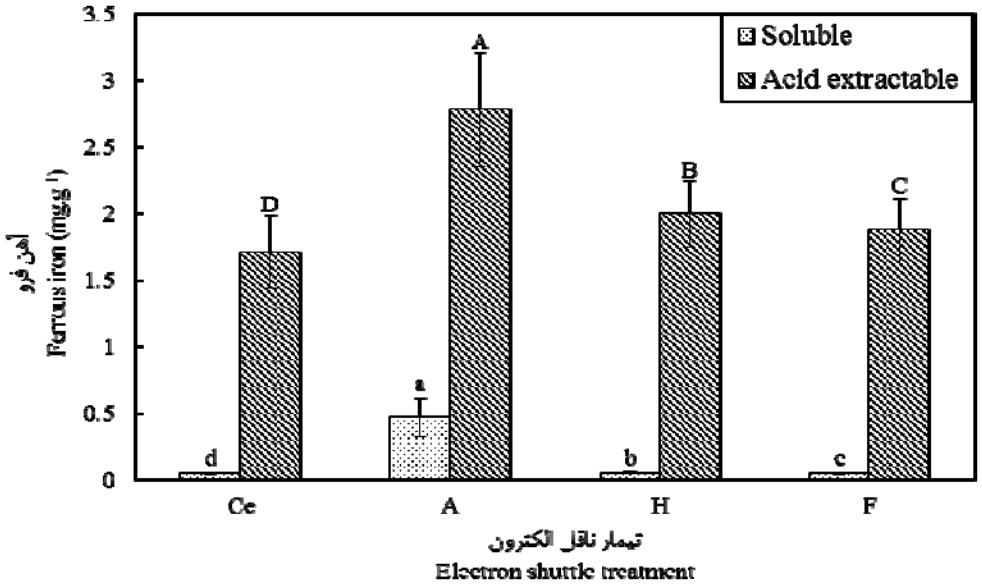
در تیمار C_b، در نبود باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* اندازه آهن فرو محلول، ۰/۰۲۹ میلی‌گرم بر گرم بود اما با افزودن باکتری *Shewanella* sp. به محیط آزمایش، اندازه آهن فرو محلول به ۰/۲۵ میلی‌گرم بر گرم رسید که ۸/۶ برابر نسبت به تیمار C_b افزایش نشان داد. اندازه آهن فرو محلول در بودن باکتری *P. aeruginosa* به ۵/۹ برابر تیمار C_b رسید که برابر با ۰/۱۶۹ میلی‌گرم بر گرم بود (شکل ۵). باکتری *Shewanella* sp. تفاوت معنی‌داری نسبت به باکتری *P. aeruginosa* در اندازه آهن فرو محلول تولیدشده نشان داد. اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید، در روز ۳۰ام و در تیمارهای C_b، *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa*

به ترتیب ۱/۲۵۳، ۲/۸۷۹ و ۲/۱۳۲ میلی‌گرم بر گرم بود (شکل ۵) که بودن باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* منجر به افزایش ۱۶/۴ و ۱۲/۱ برابری آهن فرو قابل استخراج با اسید نسبت به اندازه نخستین آهن فرو (۰/۱۷۶ میلی‌گرم بر گرم) در خاک آهکی شدند.



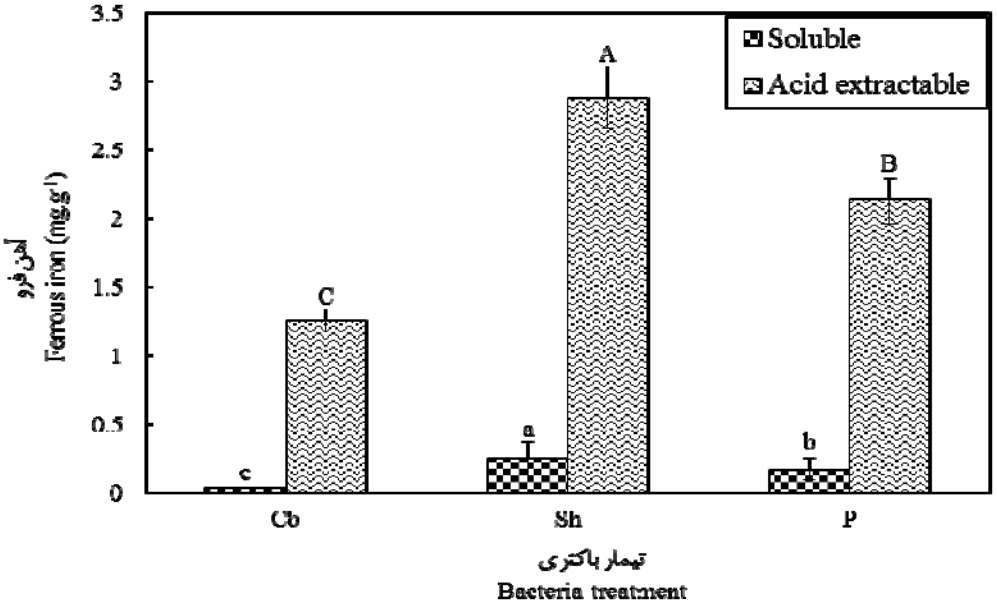
شکل ۳- مقایسه میانگین تغییرات آهن فرو محلول (الف) و قابل استخراج با اسید (ب) در بودن ناقل‌های الکترون (C_e: بدون ناقل الکترون، A: AQS، H: اسیدهیومیک، F: اسیدفولویک) و باکتری پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 3- Compare means of soluble(a) and acid extractable ferrous iron (b) in the presence of electron shuttles (C_e: control, A: AQS, H: humic acid, F: fulvic acid) and bacteria after 30 days of experiment



شکل ٤- مقایسه میانگین تغییرات آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در بودن ناقل‌های الکترون (C_e: بدون ناقل الکترون، A: AQS، H: اسیدهیومیک، F: اسیدفولویک) پس از گذشت ۳۰ روز (حروف کوچک و بزرگ به‌صورت جداگانه مقایسه آماری شده‌اند.)

Figure 4- Compare means of soluble and acid extractable ferrous iron in the presence of electron shuttles (C_e: control, A: AQS, H: humic acid, F: fulvic acid) after 30 days of experiment (statistical comparisons are case separately



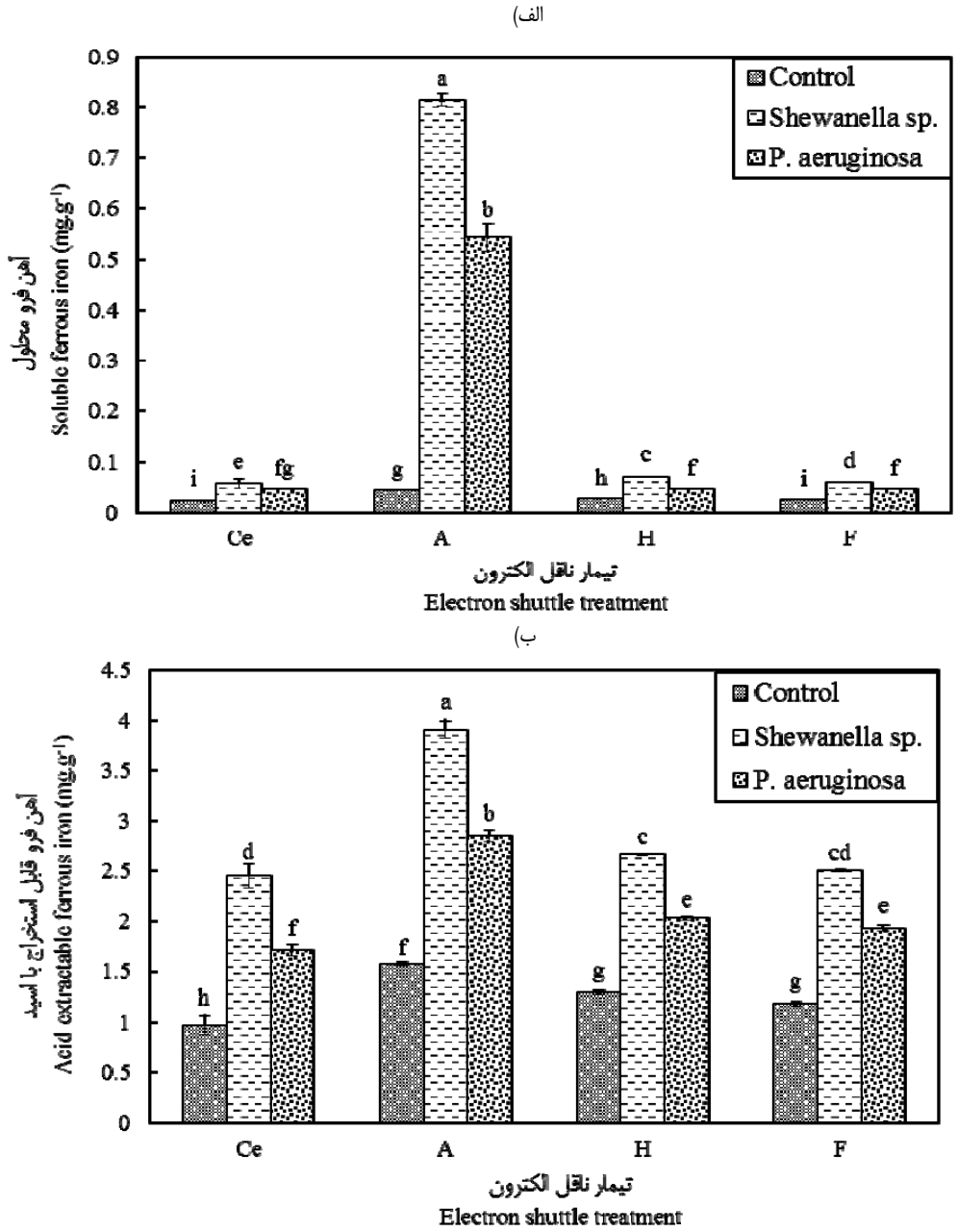
شکل ٥- مقایسه میانگین تغییرات آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در بودن باکتری‌های *Shewanella* sp. (*Sh*) و *P.aeruginosa* (*P*) پس از گذشت ۳۰ روز (حروف کوچک و بزرگ به‌صورت جداگانه مقایسه آماری شده‌اند.)

Figure 5- Compare means of soluble and acid extractable ferrous iron in the presence of *Shewanella* sp. (*Sh*) and *P. aeruginosa* (*P*) after 30 days of experiment (statistical comparisons are case separately)

آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید در خاک آهکی و در بودن ناقل الکترون و باکتری

پس از گذشت ۳۰ روز از فرآیند کاهش زیستی، اندازه آهن فرو محلول در بودن باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* و نبود ناقل الکترون نسبت به تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری در خاک آهکی، ۲/۵ و ۱/۹ برابر افزایش پیدا کرد که بیانگر توانایی هر

دو باکتری در کاهش زیستی آهن فریک می‌باشد.



شکل ٦- مقایسه میانگین تغییرات آهن فرو محلول (الف) و قابل استخراج با اسید (ب) در بودن ناقل‌های الکترون (C_e: بدون ناقل الکترون، A: AQS، H: اسیدهیومیک، F: اسیدفولویک) و باکتری پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 6- Compare means of soluble (a) and acid extractable ferrous iron (b) in the presence of electron shuttles (Ce: control, A: AQS, H: humic acid, F: fulvic acid) and bacteria after 30 days of experiment

اندازه آهن فرو محلول در بودن باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* و ناقل الکترون AQS، نسبت به تیمار AQS بدون باکتری، ۱۸/۹ و ۱۲/۶ برابر افزایش یافت. این دو باکتری توانستند اندازه آهن فرو محلول را به میزان چشمگیری در بودن ناقل الکترون AQS افزایش داده و اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد نسبت به دیگر تیمارها نشان دادند. پژوهشگرانی که روند تولید آهن فرو را در رابطه با ناقل الکترون (AQDS) و دیگر مواد آلی که توانایی ترابری الکترون را دارند بررسی کردند نیز نتایج مشابهی را گزارش

نمودند (۲۶ و ۲۷). اندازه آهن فرو محلول در بودن باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* و ناقل الکترون اسیدهیومیک، در مقایسه با تیمار اسیدهیومیک بدون باکتری، به ترتیب ۲/۶ و ۱/۶ برابر افزایش داشت و تفاوت معنی‌داری میان این دو تیمار دیده شد. با افزودن اسیدفولویک به محیط آزمایش، اندازه آهن فرو محلول به ۰/۰۲۴ میلی‌گرم بر گرم رسید که نسبت به تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری، ۴/۳ درصد افزایش نشان داد اما تفاوت معنی‌داری میان این دو تیمار مشاهده نشد. در بودن دو باکتری *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* و ناقل الکترون اسیدفولویک، اندازه آهن فرو محلول نسبت به تیمار اسیدفولویک بدون باکتری، ۲/۵ و ۱/۸ برابر افزایش پیدا کرد (شکل۶. الف). باکتری *P. aeruginosa* در خاک آهکی و در بودن اسیدهیومیک و اسیدفولویک تفاوت معنی‌داری نشان نداد. پس از گذشت ۳۰ روز، اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید در تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری خاک آهکی، ۰/۹۶۷ میلی‌گرم بر گرم بود که ۵/۵ برابر افزایش نسبت به شروع آزمایش نشان داد که نشانگر فعالیت باکتری‌های کاهنده آهن بومی خاک در شرایط بی‌هوازی می‌باشد. اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید در بودن ناقل‌های الکترون AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک و باکتری‌های بومی خاک نسبت به تیمار بدون ناقل الکترون خاک آهکی، ۱/۵۷، ۱/۲۸ و ۱/۱۸ میلی‌گرم بر گرم بود (شکل ۶. ب). تیمارهای اسیدهیومیک و اسیدفولویک بدون باکتری تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر نشان ندادند. رویر و همکاران (۲۷) بیان کردند که ناقل‌های الکترون امکان دسترسی به مکان‌هایی را که باکتری از آن‌ها محروم مانده را فراهم می‌سازند که درنتیجه منجر به افزایش کاهش زیستی آهن فریک می‌شود. در مطالعه‌ای که سانچزآلکالا و همکاران (۳۲) انجام دادند، مشخص گردید که آهن فرو تولید شده در فرآیند کاهش زیستی در خاک‌های آهکی منجر به تولید کانی سیدریت ($FeCO_3$) در این خاک‌ها می‌شود که این کانی بر اثر اکسایش سریع به اکسیدهای آهن بلورین ضعیف تبدیل می‌شود. اکسیدهای آهن با ویژگی بلوری ضعیف امکان انحلال آهن در این شرایط را فراهم می‌کنند. اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید در بودن باکتری *Shewanella* sp. و در نبود ناقل الکترون در روز ۳۰، به ۲/۴۵ میلی‌گرم بر گرم رسید که نسبت به تیمار بدون ناقل الکترون و باکتری، ۲/۵ برابر افزایش داشت (شکل ۶. ب).اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید در بودن باکتری *Shewanella* sp. و در بودن ناقل‌های الکترون AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک نسبت به تیمارهای ناقل‌های الکترون بدون باکتری، به ترتیب ۵۹/۵، ۸/۷ و ۲/۳ درصد افزایش داشت، در برابر آن، این درصد افزایش در بودن باکتری *P. aeruginosa* و در بودن ناقل‌های الکترون AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک، ۶۶/۵، ۱۸/۹ و ۱۲/۹ درصد بود (شکل ۶. ب). اندازه آهن فرو قابل استخراج با اسید در بودن باکتری *P. aeruginosa* و ناقل‌های اسیدهیومیک و اسیدفولویک تفاوت معنی‌داری نشان نداد، در برابر آن، این تفاوت در بودن باکتری *Shewanella* sp. معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری کلی

کاهش غیرجذبی آهن فریک یک فرآیند بسیار مهم در کنترل آلاینده‌ها می‌باشد. این فرآیند در پالایش فلزها و رادیونوکلئوتیدها بسیار مؤثر است. با تحریک کاهش زیستی آهن فریک، فرآیند پالایش زیستی نیز افزایش می‌یابد. در این پژوهش باکتری‌های *Shewanella* sp. و *P. aeruginosa* توانستند در بودن ناقل‌های الکترون AQS، اسیدهیومیک و اسیدفولویک منجر به افزایش فرآیند کاهش زیستی شوند که این افزایش در بودن باکتری *Shewanella* sp. و ناقل الکترون AQS بسیار چشمگیر بود. اندازه آهن فرو در خاک اسیدی به دلیل بیشتر بودن آهن فریک در این خاک، نسبت به خاک آهکی، قابل ملاحظه بود.

منابع

1- Ayyasamy P.M., Chun S., and Lee S. 2009. Desorption and dissolution of heavy metals from contaminated soil using *Shewanella* sp. (HN-41) amended with various carbon sources and synthetic soil organic matters. Journal of Hazardous Materials, 161: 1095-1102.

2- Bascomb C. L. 1968. Distribution of pyrophosphate extractable iron and organic carbon in soils of various groups. Journal of Soil Science, 19: 251-268.

3- Bonneville S., Cappellen P.V., and Behrends T. 2004. Microbial reduction of iron(III) oxyhydroxides- effects of mineral solubility and availability. Chemical Geology, 212: 255-268.

4- Cornell R.M., and Schwertmann U. 1996. Iron oxides in the laboratory: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses. VCH.

5- Castillo F., Roldan M.D., Blasco R., Huertas M.J., Caballero F.J., Moreno-Vivian C., and Martinez M. 2005. Biotechnologia ambiental. Ed. Tebar, 202-203.

6- Castro L., Garcia-Balboa C., Gonzalez F., Bahhester A., Luisa Blazquez M.,and Muniz J.A. 2013. Effectiveness of anaerobic iron bio-reduction of jarosite and the influence of humic substances. Hydrometallurgy, 131: 29-33.

7- Davranche M., and Bollinger J.C. 2000. Heavy metals desorption from synthesized and natural iron and manganese oxyhydroxides: Effect of reductive conditions. Journal of Colloid and Interface Science, 227: 531-539.

8- Ghorbanzadeh N. 2014. Bioreduction of iron minerals and its effect on Fe availability in calcareous soil. PhD Thesis, (in Persian with English abstract).
9- ISO 11466. 1995. Soil Quality-Extraction of Trace Elements Soluble in Aqua Regia. International Standard. 1-6.
10- Jackson M.L., Lim C.H., and Zelazny L.W.1986. Oxides, hydroxides, and aluminosilicates. In: Klute A. (Editor), Methods of Soil Analysis. Agronomy, 9:101-150.
11- Jaisi D.P., Kukkadapu R.K., Eberl D.D., and Dong H. 2005. Control of Fe(III) site occupancy on the rate and extent of microbial reduction of Fe(III) in nontronite. Geochimica et Cosmochimica Acta, 69: 5429-5440.
12- Jiangzhou H. E., and Dong Q.U. 2008. Dissimilatory Fe(III) reduction characteristics of paddy soil extract cultures treated with glucose or fatty acids. Environmental Science Journal, 20: 1103- 1108.
13- Kamura T., Takai Y., and Ishikawa K. 1963. Microbial reduction mechanism of ferric iron in paddy soils. Soil science and Plant nutrition, 9: 5-9.
14- Kappler A., Benz M., Schink B., and Brune A. 2004. Electron shuttling via humic acids in microbial iron(III) reduction in a freshwater sediment. FEMS Microbiology Ecology, 47: 85-92.
15- Lovely D.R., and Phillips E.J. 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. Applied and Environmental Microbiology, 4: 683-689.
16- Lovely D.R., and Phillips E.J. 1987. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. Applied and Environmental Microbiology, 4: 1536-1540.
17- Lovely D.R., and Phillips E.J. 1988. Novel mode of microbiological energy metabolism: organic carbon oxidation couple to dissimilatory reduction of iron or manganese. Applied Environmental Microbiollogy, 54 (6): 1472-1480.
18- Lovely D.R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. Microbiology Reviews, 55: 259-287.
19- Liyod J.R. 2003. Microbial reduction of metals and radionuclides. FEMS Microbiology Reviews, 27: 411-425.
20- Laguna C., Gonzales F., Garcia-Balboa C., Ballester M.L., and Munoz J.A. 2011. Bioreduction of iron compounds as a possible clean environmental alternative for metal recovery. Minerals Engineering, 24: 10-18.
21- Marshall M.J., Beliaev A.S., Dohnalkova A.C., Kennedy D.W.,Shi L., Wang Z.M., Boyanov M.I., Lai B., Kemner K.M., Mclean J.S., Reed S.B., Culley D.E., Bailey V.L., Simonson C.J., Saffarini D.A., Romine M.F., Zachara J.M., and Fredrickson J.K. 2006. C-type cytochrome−dependent formation of U(IV) nanoparticles by *Shewanella oneidensis*. Plos Biology, 4: 1324–1333.
22- Marsili E., Baron D.B., Shikhare I.D., Coursolle D., Gralnick J.A., and Bond D.R. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. PNAS. Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America, 105(10): 3968-3973.
23- Nevin K.P., and Lovley D.R. 2000. Potential for nonenzymatic reduction of Fe (III) via electron shuttling in subsurface sediments. Environmental Science Technology, 34: 2472–2478.
24- O'loughlin E.J. 2008. Effect of electron transfer mediators on the bioreduction of lepidocrocite by *Shewanella putrefaciens* CN32. Environmental Science Technology, 42: 6876-6882.
25- Piepenbrock A., Behrens S., and Kappler A. 2014. Comparison of humic substance- and Fe(III)-reducing microbial communities in anoxic aquifers. Geomicrobiology Journal, 31: 917-928.
26- Royer R.A., Burgos W.D., Fisher A.S., Jeon B.H., Unz R.F., and Dempsey B.A. 2002a. Enhancement of hematite bioreduction by natural organic matter. Environmental Science Technology, 36: 2897-2904.
27- Royer R.A., Burgos W.D., Fisher A.S., Unz R.F., and Dempsey B.A. 2002b. Enhancement of biological reduction of hematite by electron shuttling and Fe(II) complexation. Environmental Science and Technology, 36: 1939-1946.
28- Royer R.A., Dempsey B.A., Jeon B.H., and Burgos W.D. 2004. Inhibition of biological reductive dissolution of hematite by ferrous iron. Environmental Science Technology, 38: 187–193.
29- Stooky L.L. 1970. Ferrozine- a new spectrophotometric reagent for iron. Analytical Chemistry, 42: 779-781.
30- Scott D., McKnight D., Blunt-Harris E., Kolesar S., and Lovley D. 1998. Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms. Environmental Science and Technology, 32: 2984–2989.
31- Shi L., Richardson D.J., Wang Z., Kerisit S.N., Rosso K.M., Zachara J.M., and Fredrickson J.K. 2009. The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer. Environmental Microbiology Reports, 1(4): 220-227.
32- Sanchez-Alcala I. 2012. Bioavailability of iron in calcareous soils: Microbial reduction and nanofertilizer application. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cordoba. Campus de Rabanales Ctra. Nacinal IV, Km.
33- Shimizu M., Zhou J., Schroder C., Obst M., and Kappler A. 2013. Dissimilatory reduction and transformation of ferrihydrite-humic acid coprecipitates. Environmental Science and Technology, 47: 13375-13384.
34- Wolf M., Kappler A., Jiang J., and Meckenstock R.U. 2009. Effects of humic substances and quinones at low concentrations on ferrihydrite reduction by *Geobacter metallireducens*. Environmental Science and Technology, 43: 5679-5685.

35- Zakhara J.M., Kukkadapu R.K., Peretyazhko T., Bowden M., Wang C., Kennedy D.W., Moore D., and Arey B. 2011. The mineralogic transformation of ferrihydrite induced by heterogeneous reaction with bioreduced anthraquinone disulfonate (AQDS) and the role of phosphate. Geochimica et Cosmochimica Acta, 75: 6330-6349.
36- Zhang G., Dong H., Kim J.W., and Eberl D.D. 2007a. Microbial reduction of structural Fe^{3+} in nontronite by a thermophilic bacterium and its role in promoting the smectite to illite reaction. American Mineralogist, 92: 1411-1419.
37- Zhang G., Kim J.W., Dong H., and Sommer A.J. 2007b. Microbial effects in promoting the smectite to illite reaction: role of organic matter intercalated in the interlayer. American Mineralogist, 92: 1401-1410.

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 5, Nov.-Dec. 2016, p. 1646-1661

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۵، آذر – دی ۱۳۹۵، ص. ۱۶۶۱-۱۶۴۶

Effect of three Electron Shuttles on Bioreduction of Ferric Iron in two Acidic and Calcareous soils

S. Sharifi[1]- A.Lakzian[2*]- A.R. Astaraei[3] – N. Ghorbanzadeh[4]

Received: 30-12-2015
Accepted: 25-04-2016

Introduction: Iron cycle is one of the most important biogeochemical processes which affect the availability of iron in soils. Ferric iron oxides are the most abundant forms of iron in soils and sediments. Ferric iron is highly insoluble at circumneutral pH. Present investigations have shown that the structural ferric iron bound in clay minerals is reduced by some microorganisms. Anaerobic bacteria reduce ferric iron which bound to soil clay minerals under anaerobic conditions. They have the ability to use ferric iron as a terminal electron acceptor. Many studies presented that dissimilatory iron reducing bacteria (DIRB) mediate the transfer of electrons from small organic molecules like acetate and glucose to various humic materials (electron shuttles) which then pass electrons abiotically to ferric iron oxyhydroxide and phyllosilicate minerals. Electron shuttles like AQDS, a tricyclic quinone, increase the rate of iron reduction by iron reducing bacteria on sites of iron oxides and oxyhydroxides. By increasing the rate of bioreduction of ferric iron, the solubility and availability of iron enhanced meaningfully. Royer *et al*. (2002) showed that bioreduction of hematite (common iron mineral in soils) increased more than three times in the presence of AQDS and *Shewanella putrefaciens* comparedto control treatments. Previous works have mostly used synthetic minerals as electron acceptor in bioreduction process. Furthermore, the effect of quinones as electron acceptor for microorganisms were studied with poorly crystalline ferric iron oxides . The main objective of this study was to study the effect of AQS, humic acid and fulvic acid (as electron shuttle) and *Shewanella* sp. and *Pseudomonas aeruginosa,* on bioreduction of native ferric iron in two acidic and calcareous soils.

Materials and Methods: An experiment was conducted in a completely randomized design with factorial arrangement and three replications in vitro condition. The soil samples collected from locations in Mashhad and Guilan cities, Iran, in 2015. The soil samples were air dried in a glasshouse and later subjected to general analysis. Some part of the soil samples were kept at 4 oC as fresh soil samples for bioreduction assay. In that part of experiment, all soil samples were treated with glucose (10 mM) as electron donor. Native ferric iron considered as electron acceptor. Then soil samples were treated with AQS, humic acid and fulvic acid (as electron shuttles) and inoculated with bacterial cells (*Shewanella* sp. and *P. aeruginosa*) and they were incubated for 30 days in an incubator at 30 and 37 ^{o}C according to the optimum temperature for bacteria in an anaerobic condition. At the end of incubation time, ferrous and acid extractable iron were determined with Ferrozine assay by spectrophotometer in 562 nm (8, 25).

Results and Discussion: Results showed that the AQS had a noticeable effect on ferrous iron concentrations in both acidic and calcareous soils. In these cases ferrous iron concentrations were 8 and 15.7 times higher compared to initial concentration in acidic and calcareous soils, respectively. The *Shewanella* sp. intensified ferrous iron concentration 7.2 and 16.3 fold in acidic and calcareous soils, respectively but *P. aeruginosa* increased it 5.6 and 12.1 fold compared to initial concentration of ferrous iron. In acidic soil, in the presence of *Shewanella* sp. and AQS, ferrous and acid extractable iron concentrations were 1.45 and 4.50 mg g^{-1}, respectively. Results showed that 11.7 fold enhancements occur in the presence of *Shewanella* sp. and AQS compared to initial (0.385 mg g^{-1}) concentration of iron in acidic soil. When *P. aeruginosa* was inoculated in acidic soil in the presence of AQS, soluble ferrous iron concentration was 1.27 mg g^{-1}. The acid extractable iron in this treatment was 2.85 mg g^{-1}. The concentration of soluble ferrous iron in calcareous soil was 0.81 mg g^{-1}, when AQS was added to *Shewanella* sp. treatments. That value was 0.54 when *P. aeruginosa* was added. The acid extractable iron was 3.90 mg g^{-1} in the presence of AQS and *Shewanella* sp. By adding *P. aeruginosa*, acid extractable iron was 2.84 mg g^{-1} compared to control treatments.

Conclusion: Dissimilatory ferric iron reduction is a potentially important process in controlling contaminant fate. It has the potential for being particularly useful in the remediation of metals and radionuclides. Means for

1, 2 and 3- MSc Student, Professor and Associate Professor of Soil Science Department, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad
(*-Corresponding Author Email: lakzian@ferdowsi.um.ac.ir)
4-Assistant Professor in Soil Science Department, Gilan University

stimulating ferric iron reduction will be useful in enhancing bioremediation process. Results illustrated that the *Shewanella* sp. and *P. aeruginosa* were enhanced the bioreduction of ferric iron in the presence of AQS, humic acid and fulvic acid in soils. When soil samples were inoculated with *Shewanella* sp., and AQS was added to the soil samples (in acidic and calcareous soil samples) the concentration of ferrous iron increased intensively.

Keywords: Bioreduction, Dissimilatory Iron Reducing Bacteria, Electron shuttle, Ferric iron