

# 厌氧条件在不同 Fe(II) 浓度测定方法中必要性的比较研究\*

张洪霞<sup>1,2</sup> 李莹<sup>1,2</sup> 郑世玲<sup>1</sup> 魏文超<sup>1,2</sup> 王炳臣<sup>1,2</sup> 刘芳华<sup>1†</sup>

(1 中国科学院海岸带生物学与生物资源利用所重点实验室(烟台海岸带研究所),中国科学院烟台海岸带研究所,山东烟台 264003)

(2 中国科学院大学,北京 100049)

**摘要** 厌氧是目前 Fe(II)测定方法中常选择的处理方式,但是不可避免会给实验操作带来不便。为了方便、准确地测定铁还原体系中的 Fe(II)浓度,对比研究了厌氧条件对草酸—草酸铵和盐酸两种典型浸提方法测定 Fe(II)浓度的影响。结果表明:对于草酸—草酸铵浸提法,厌氧条件是必须的,以防止提取液中的 Fe(II)被氧化,而且样品浸提 1 h 便可用于 Fe(II)的测定;然而对于盐酸浸提法,厌氧条件却并不是必须的,对 Fe(II)浓度测定基本不产生影响。因此,为简化实验操作或在没有厌氧条件的情况,可利用盐酸浸提法测定铁还原体系中 Fe(II)浓度。

**关键词** Fe(II)测定;厌氧条件;盐酸提取;草酸—草酸铵提取

20 世纪 80 年代以来,通过还原 Fe(III)以获得能量用于生长的微生物不断被分离,人们才认识到微生物介导的铁还原是自然界中铁还原的主要途径<sup>[1,2]</sup>,是生物进化过程中最早出现的能量代谢途径之一。铁还原菌(Fe(III)-reducing bacteria)是一类在代谢过程中以 Fe(III)为外在电子受体,把 Fe(III)还原成 Fe(II)的微生物。Fe(III)还原菌还原能力的研究对污染环境的生物修复、清洁能源开发及铁元素的地球化学循环等方面都有重要意义<sup>[3]</sup>。而 Fe(III)是滨海潮滩沉积物中丰度最高的电子受体之一,滨海湿地频繁受海陆交互作用的影响,使沉积物中电子受体数量和种类变化剧烈,海岸带环境中铁还原菌群落结构及其生物地球化学作用需要更多的深入研究。因而,在海陆交互作用过渡带 Fe(III)还原菌研究中涉及的 Fe(II)浓度的测定显得尤为重要。

对铁还原菌的相关研究,其富集培养体系中常加入无定形铁氧化物作为电子受体,另外也有晶型的赤铁矿和磁铁矿。已有研究大多选用草酸—草酸铵或

0.5 mol L<sup>-1</sup> HCl 浸提测定无定形铁氧化物,并以灵敏度较高、简便、抗干扰的非洛嗪作为显色剂<sup>[4,5]</sup>。1987 年,Phillips 等<sup>[6]</sup>报道了用草酸(15 g L<sup>-1</sup>)—草酸铵(28 g L<sup>-1</sup>)提取测定沉积物中的 Fe(II)/Fe(III)的方法,在提取过程中利用通 N<sub>2</sub> 去除氧气。Lovley 等<sup>[7]</sup>采用 0.5 mol L<sup>-1</sup> HCl 提取、测定了添加无定形铁氧化物的富集培养基中或沉积物中的 Fe(II),提取过程中通 N<sub>2</sub>。王思源<sup>[8]</sup>对红壤无定形铁的测定采用草酸—草酸铵溶液,盖严瓶盖震荡提取 4 h。Schnell 等<sup>[9]</sup>的方法研究中,取 0.5 g 土壤,加入 4.5 mL 0.5 mol L<sup>-1</sup> HCl 室温放置 24 h 后,用于测定 Fe(II)/Fe(III)。Ding 等<sup>[10]</sup>对于长期施氮肥对稻田土壤铁还原菌群落结构影响的研究中,采用 0.5 mol L<sup>-1</sup> HCl 对培养的泥浆浸提 24 h 后测定 Fe(II),用 0.25 mol L<sup>-1</sup> 的溶于等浓度盐酸中的羟胺盐酸处理测定 Fe(III)。黎慧娟等<sup>[1]</sup>研究水稻土中铁还原菌多样性时,将抽取的培养悬液立即加入 0.5 mol L<sup>-1</sup> HCl 中,浸提 15 min 后离心用于 Fe(II)的测定。

此外,上述测定方法中厌氧条件的采用与否也

收稿日期:2016-04-21

\* 国家自然科学基金面上项目(41371257,41573071);国家自然科学基金青年项目(41401285);中国科学院知识创新工程国外杰出人才引进计划“百人计划”项目资助

† 通讯作者:E-mail: fhliu@yic.ac.cn

作者简介:张洪霞(1985—),女,博士研究生,主要从事滨海湿地微生物生态研究。E-mail:hxzhang@yic.ac.cn

不尽相同,且厌氧条件对 Fe(II) 的测定可能产生重要影响。为了优化实验过程、更简便准确地测定富集培养体系中 Fe(II) 的生成量,探究厌氧条件对 Fe(II) 测定结果的影响,本研究以菲洛嗪为显色剂、用紫外分光光度法,分析了厌氧条件对铁还原培养体系中 Fe(II) 浓度测定的影响,研究比较了厌氧与有氧条件下盐酸处理和草酸—草酸铵处理 Fe(II) 测定的差异。为铁还原培养体系中 Fe(II) 的测定提供方法选择依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 供试材料

选取接种铁还原菌第 0 天的富集培养样品为研究对象。培养基采用富集培养铁还原菌的 (pH 7.0) 淡水培养基,配方参照文献[11],培养基加入终浓度相当于  $75 \text{ mmol L}^{-1}$  无定形铁氧化物 (FeOOH) 或  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  磁铁矿 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )。调 pH 7.0,将配好的培养基分装入血清瓶中,充入混合气 ( $\text{N}_2 : \text{CO}_2 = 80 : 20$ ) 至少 30 min,灭菌。

#### 1.1.2 主要化学试剂

选取硫酸亚铁氨标准品、2-[4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸 (HEPS)、菲洛嗪、盐酸羟胺、磁铁矿:生工,分析纯;盐酸、草酸、草酸铵、氢氧化钠:北京国药,分析纯;无定形铁氧化物:实验室合成,参照 Lovley 实验室方法<sup>[7]</sup>。

#### 1.1.3 仪器设备

选用 DU800 紫外分光光度计:美国贝克曼;AR-124CN 分析天平;Eppendorf 5430R 台式高速离心机;DK-8D 型电热恒温水浴锅:上海一恒科技有限公司;厌氧工作站。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 试验设置

盐酸和草酸—草酸铵浸提均设 8 个处理:①添加  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ +草酸—草酸铵 (Mag+Oa);②添加  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ +草酸—草酸铵,通  $\text{N}_2$  (N-Mag+Oa);③添加 FeOOH+草酸—草酸铵 (Amo+Oa);④添加 FeOOH+草酸—草酸铵,通  $\text{N}_2$  (N-Amo+Oa);⑤添加  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ +盐酸 (Mag+Ha);⑥添加  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ +盐酸,通  $\text{N}_2$  (N-Mag+Ha);⑦添加 FeOOH+盐酸 (Amo+Ha);⑧添加 FeOOH+盐酸,通  $\text{N}_2$  (N-Amo+Ha)。每个处理 3 次重复。

#### 1.2.2 试剂配制

(1)  $\text{Fe}^{2+}$  标准溶液:准确称取 0.3921 g 硫酸亚铁氨 ( $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ),先用 50 mL  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  稀 HCl 酸化,再用去离子水稀释,定容至 1.0 L,配制成  $1.000 \text{ mmol L}^{-1}$  的  $\text{Fe}^{2+}$  标准溶液 (贮存液)。再依次稀释成 0,10,20,50,100,200,500 和  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$  的浓度梯度用于标准曲线的制作。

(2) pH = 7.0 的  $200 \text{ mmol L}^{-1}$  HEPES(2-[4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸)缓冲液配制:称取 23.8 g HEPES (分析纯),先用去离子水溶解至 150 ~ 200 mL,用  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl 和  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH 溶液调节 pH 至 7.0,再用去离子水定容至 500 mL,得总浓度为  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  的 HEPES 缓冲溶液。

(3) 菲洛嗪 (ferrozine) 显色液配制:称取 0.1 g ferrozine,溶解在 100.0 mL HEPES 缓冲溶液中,得  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  显色液。

#### 1.2.3 样品处理

厌氧处理:在厌氧管中加入 4.5 mL 盐酸或草酸—草酸铵溶液后,在厌氧工作站充  $\text{N}_2$  至少 15 min,以排出  $\text{O}_2$ ,盖严盖子。非厌氧处理为室内放置,不作充气处理。

盐酸浸提处理:用注射器抽取 0.5 mL 培养基,置于 4.5 mL  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  的盐酸中,室温下黑暗静置处理 24 h,取样快速测定。

草酸—草酸铵浸提处理:用注射器抽取 0.5 mL 培养基,置于 4.5 mL 草酸—草酸铵溶液中 ( $15 \text{ g L}^{-1}$  草酸,  $28 \text{ g L}^{-1}$  草酸铵),在处理的第 30,60,90,120 min 取样,快速测定。处理方法参考文献[9,10,12]。

#### 1.2.4 测定方法

Fe(II) 的测定:取样后,8000 g 离心 5 min,取 100  $\mu\text{L}$ ,加入到 1.9 mL 的含 0.1% ferrozine 的  $200 \text{ mmol L}^{-1}$  的 HEPES 缓冲液 (pH = 7) 中,反应 5 min 后,在 562 nm 波长测定吸光值,根据标准曲线计算浓度。

Fe(III) 的测定:取 100  $\mu\text{L}$  上述浸提样品,与 2 mL 的  $0.25 \text{ mol L}^{-1}$  的溶于等浓度盐酸中的羟胺盐酸混合,在  $60^\circ\text{C}$  保温 2 h,取 100  $\mu\text{L}$  与 1.9 mL 的非洛嗪试剂混合,然后按上述测 Fe(II) 的步骤操作,计算得可提取态总 Fe 浓度,其与 Fe(II) 测定浓度之差,即为 Fe(III) 测定浓度。Fe(II)/Fe(III) 的测定方法参照文献[9,13]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 厌氧条件对 Fe(II) 测定的影响

### 2.1.1 厌氧条件对草酸—草酸铵提取测定 Fe(II)的影响

如图1(a)所示, Mag+Oa 和 N-Mag+Oa 处理, 在第30 min 取样时 Fe(II) 浓度几乎一致。N-Mag+Oa 处理在第60 min 取样时, Fe(II) 浓度即达最大测定值 20.24 mmol L<sup>-1</sup>, 在之后 90 ~ 120 min 的测定值趋于平稳; 而 Mag+Oa 处理在第60 min 后呈逐渐下降趋势, 到第120 min 测定时, Fe(II) 浓度降低为 3.45 mmol L<sup>-1</sup>。

由图1(b)可看出, 草酸—草酸铵对无定形铁氧化物的浸提测定中, N-Amo+Oa 处理 Fe(II) 浓度同

样在第60 min 取样时达最高值 1.0 mmol L<sup>-1</sup>, 在第90 ~ 120 min, 稍有降低后保持稳定。整个测定期间, Amo+Oa 处理 Fe(II) 浓度均低于 N-Amo+Oa 处理, 降低了 44.8% ~ 52.2%, 达极显著水平 ( $p < 0.01$ )。说明用草酸—草酸铵浸提30 min 后不能完全提取出 Fe(II), 需浸提1h 后用于测定。以上结果说明, 氧气的存在会使草酸—草酸铵浸提出的 Fe(II) 氧化, 使测定不准确, 使用草酸—草酸铵作为浸提液测定 Fe(II) 时, 需严格控制为厌氧。

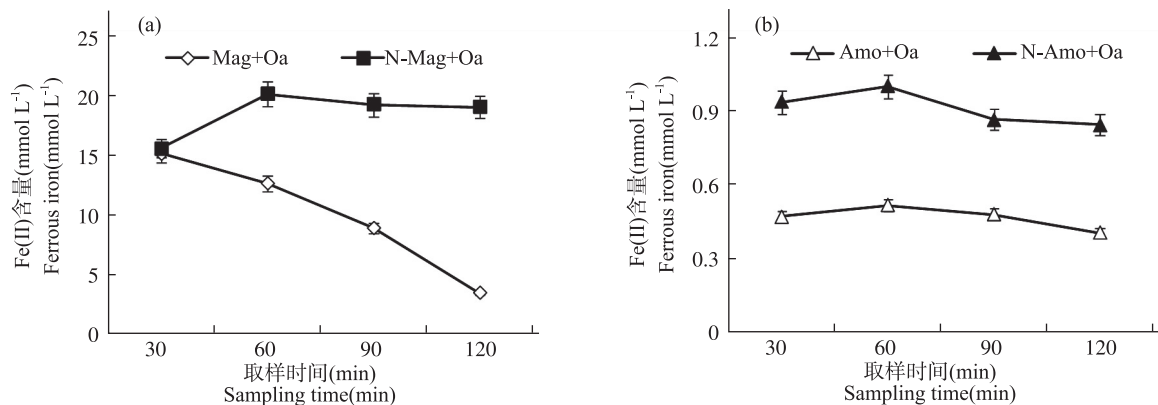


图1 草酸—草酸铵提取添加磁铁矿(a)和无定形铁(b)培养基的 Fe(II) 浓度

**Fig. 1** Concentrations of oxalate-extractable Fe(II) in the medium with addition of magnetite (a) or amorphous Fe(III) oxides (b)

注: Mag+Oa; 添加 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>+草酸—草酸铵; N-Mag+Oa; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>+草酸—草酸铵, 通 N<sub>2</sub>; Amo+Oa; 添加 FeOOH+草酸—草酸铵; N-Amo+Oa; 添加 FeOOH+草酸—草酸铵, 通 N<sub>2</sub>。

Note: Mag+Oa; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>+oxalate-ammonium oxalate; N-Mag+Oa; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>+oxalate-ammonium oxalate, filled with N<sub>2</sub>; Amo+Oa; FeOOH+oxalate-ammonium oxalate; N-Amo+Oa; FeOOH+oxalate-ammonium oxalate, filled with N<sub>2</sub>.

### 2.1.2 厌氧条件对盐酸提取测定 Fe(II)的影响

由图2可知, 在用盐酸提取24 h后, Mag+Ha 处理的 Fe(II) 测定值为 8.07 mmol L<sup>-1</sup>, 而 N-Mag+Ha 处理为 8.40 mmol L<sup>-1</sup>, 两者差异不显著。说明盐酸也能一定程度上溶解磁铁矿, 而溶解程度低于草酸—草酸铵, 但基本不受氧气存在的影响。Amo+Ha 处理 Fe(II) 的测定值为 1.17 mmol L<sup>-1</sup>, N-Amo+Ha 处理为 1.23 mmol L<sup>-1</sup>, 两者无明显差异, 说明厌氧条件不是盐酸提取测定添加铁氧化物的培养体系中 Fe(II) 测定的必要条件。

### 2.2 厌氧条件对 Fe(III) 测定的影响

如图3(a)所示, 在整个取样测定过程中, Mag+Oa 处理的 Fe(III) 浓度均明显低于 N-Mag+Oa 处理, 降低了 23.43% ~ 38.13%, 差异达显著水平 ( $p < 0.05$ )。N-Mag+Oa 处理的 Fe(III) 浓度值保持稳定 (299.23 ~ 308.83 mmol L<sup>-1</sup>), 说明氧气存在对草酸—草酸铵提取测定磁铁矿中 Fe(III) 浓度同样有影响, 使测定值比实际值低。而且草酸—草酸铵浸提后, 再用盐酸羟胺处理, 能够测定出磁铁矿中

Fe(III) 的全部含量。Amo+Oa 与 N-Amo+Oa 处理的 Fe(III) 浓度均保持稳定, 且两者趋于一致。说明厌氧条件对草酸—草酸铵提取的无定形铁氧化物中 Fe(III) 含量测定基本不存在影响。

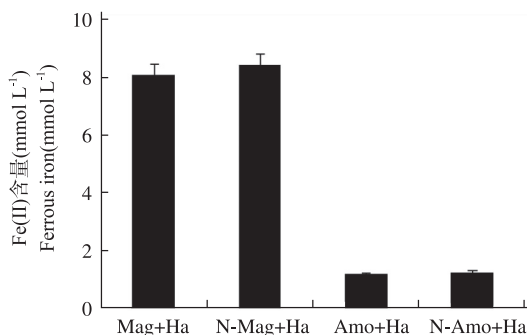


图2 盐酸提取添加磁铁矿和无定形铁培养基的 Fe(II) 浓度

**Fig. 2** Concentrations of hydrochloride-extractable Fe(II) in the medium with addition of magnetite or amorphous Fe(III) oxides

注: Mag+Ha; 添加 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>+盐酸; N-Mag+Ha; 添加 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>+盐酸, 通 N<sub>2</sub>; Amo+Ha; 添加 FeOOH+盐酸; N-Amo+Ha; 添加 FeOOH+盐酸, 通 N<sub>2</sub>。

Note: Mag+Ha; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>+hydrochloride acid; N-Mag+Ha; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>+hydrochloride acid, filled with N<sub>2</sub>; Amo+Ha; FeOOH+hydrochloride acid; N-Amo+Ha; FeOOH+hydrochloride acid, filled with N<sub>2</sub>.

图3(b)表明, Mag+Ha 处理 Fe(III) 的测定值为  $128.19 \text{ mmol L}^{-1}$ , 而 N-Mag+Ha 处理为  $126.87 \text{ mmol L}^{-1}$ , 两者差异不显著。同样, Amo+Ha 处理 Fe(III) 的测定值为  $74.49 \text{ mmol L}^{-1}$ , N-Amo+Ha 处理为  $74.22 \text{ mmol L}^{-1}$ ,

两者 Fe(III) 测定值相似, 说明氧气存在对盐酸提取磁铁矿或无定形铁氧化物中 Fe(III) 浓度测定不存在影响。

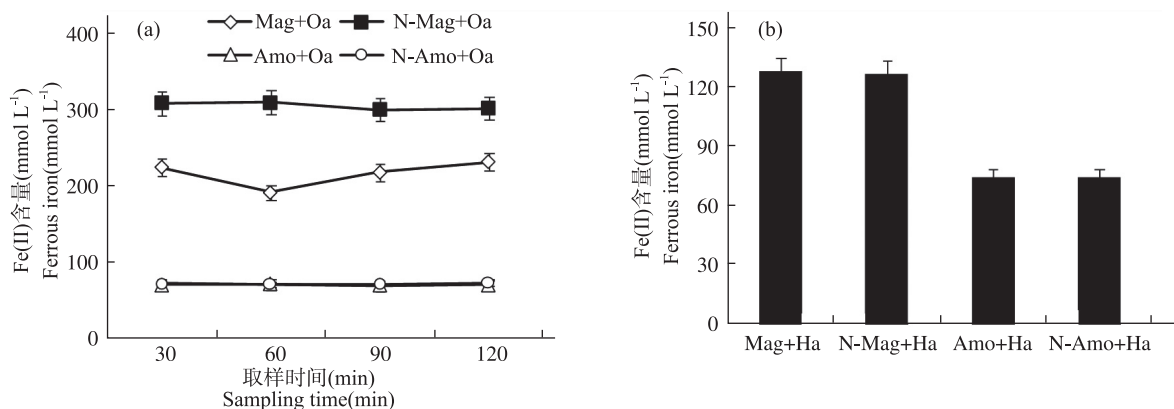


图3 草酸—草酸铵(a)和盐酸(b)处理添加磁铁矿与无定形铁培养基的 Fe(III) 浓度

Fig. 3 Concentrations of oxalate and hydrochloride-extractable Fe(III) in the medium with addition of magnetite (a) or amorphous Fe(III) oxides (b)

注: Mag+Oa, N-Mag+Oa, Amo+Oa, N-Amo+Oa, Mag+Ha, N-Mag+Ha, Amo+Ha, N-Amo+Ha, 见图1, 2。

Note: Mag+Oa, N-Mag+Oa, Amo+Oa, N-Amo+Oa, Mag+Ha, N-Mag+Ha, Amo+Ha, N-Amo+Ha, the same as fig. 1, fig. 2.

已有的相关研究认为对无定形铁的提取方法是不能溶解磁铁矿的<sup>[9]</sup>, 有研究在测定添加  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的铁氧化还原培养体系中 Fe(II) 生成量时, 采用  $6.0 \text{ mol L}^{-1}$  HCl 提取<sup>[14]</sup>, 提取过程通  $\text{N}_2$ 。Emmerich 等<sup>[15]</sup>研究中也采用  $6.0 \text{ mol L}^{-1}$  HCl 提取沉积物中晶型铁。本文中分别对添加无定形铁氧化物和磁铁矿的培养体系中 Fe(II) 的测定结果表明, 草酸—草酸铵能够一定程度上提取出磁铁矿中的 Fe(II), 这与潘赟等<sup>[16]</sup>的研究结果一致, 其研究发现草酸—草酸铵溶液浸提土壤无定形铁时, 少量以磁性矿物为代表的结晶态铁也会被溶解。而盐酸浸提测得的 Fe(II)/Fe(III) 值明显低于草酸—草酸铵浸提测得的, 说明草酸—草酸铵对磁铁矿的溶解能力大于  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  HCl。

研究中一般用还原剂(如盐酸羟胺)将 Fe(III) 还原后, 测得总铁与 Fe(II) 的差值即为 Fe(III) 测定值<sup>[17]</sup>。因为盐酸羟胺能够把 Fe(III) 全部还原为 Fe(II)<sup>[18]</sup>, 而这个还原过程可能不受厌氧条件的影响, 因而总铁的测定并不困难, 而 2 种价态铁浓度的精确测定却不容易做到<sup>[4]</sup>。有研究表明, 当  $\text{pH}=7$ , 氧气分压为  $0.21 \text{ atm}$  时, Fe(II) 的半氧化时间只有  $4 \text{ min}$ <sup>[19]</sup>。研究中采用的草酸—草酸铵溶液  $\text{pH}$  为  $3.2$ , 但不作厌氧处理, 提取液中的 Fe(II) 也会很大程度上被氧化, 随着时间的增加氧化程度越大, 从而对

草酸—草酸铵提取测定添加磁铁矿或无定形铁氧化物的培养基中 Fe(II) 含量有显著影响。然而, 厌氧条件对盐酸提取测定添加铁氧化物的培养体系中 Fe(II)/Fe(III) 浓度无明显影响。

### 3 结论

厌氧条件是草酸—草酸铵提取测定添加磁铁矿或无定形铁氧化物的培养体系中 Fe(II) 浓度的必要条件, 氧气存在使测定值比实际值显著偏低, 但在厌氧条件下浸提 1 h 后便可测定。而厌氧条件对盐酸提取测定添加铁氧化物的培养基中 Fe(II)/Fe(III) 浓度无明显影响。

厌氧条件对草酸—草酸铵提取的磁铁矿中 Fe(III) 浓度测定同样存在影响, 非厌氧条件下测定值比实际降低, 对无定形铁氧化物中 Fe(III) 含量测定基本不存在影响。

草酸—草酸铵溶液和  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  盐酸均能够一定程度上溶解磁铁矿, 所以若有磁铁矿共存时, 采用此方法对无定形铁氧化物中 Fe(III)/Fe(II) 测定时, 需考虑。根据研究结果, 为简化实验操作, 可选择用  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  盐酸非厌氧条件下提取测定无定形铁氧化物; 若需较快测定, 可选择厌氧条件下的草酸—草酸铵溶液提取测定。



## 参考文献

- [1] 黎慧娟,彭静静. 异化Fe(III)还原微生物研究进展. 生态学报, 2012, 32(5): 1633-1642. Li H J, Peng J J. Recent advances in studies on dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms. *Acta Ecol. Sin.*, 2012, 32(5): 1633-1642
- [2] Lovley D R, Holmes D E, Nevin K P. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv. Microb. Physiol.*, 2004, 49: 219-286
- [3] 李秀颖,周莉娜,王保莉,等. 富集培养下不同渤海沉积物中铁还原菌的群落结构差异. 西北农业学报, 2012, 21(6): 35-40. Li X Y, Zhou L N, Wang B L, et al. Difference of iron-reducing bacteria community structure in Bohai sediments under enrichment culture. *Acta Agricul. Boreali-occident. Sin.*, 2012, 21(6): 35-40
- [4] 邹元春,姜明. 湿地土壤铁的分析测定方法比较. 湿地科学, 2008, 6(2): 136-141. Zou Y C, Jiang M. Comparison of analysis and determination methods of iron in wetland soil. *Wetl. Sci.*, 2008, 6(2): 136-141
- [5] Stookey L L. Ferrozine—a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.*, 1970, 42(7): 779-781
- [6] Phillips E J, Lovley D R. Determination of Fe(III) and Fe(II) in oxalate extracts of sediment. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1987, 51(4): 938-941
- [7] Lovley D R, Phillips E J. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, 51(4): 683-689
- [8] 王思源. 中国南方红土磁学特征、起源及其与成土过程关系研究. 杭州: 浙江大学, 2004. Wang S Y. The red earth in southern China; its magnetic characters, origins and pedogenic implication. Hangzhou: Zhejiang University, 2004
- [9] Schnell S, Ratering S, Jansen K H. Simultaneous determination of iron (III), iron (II), and manganese (II) in environmental samples by ion chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32(10): 1530-1537
- [10] Ding L J, Su J Q, Xu H J, et al. Long-term nitrogen fertilization of paddy soil shifts iron-reducing microbial community revealed by RNA <sup>13</sup>C-acetate probing coupled with pyrosequencing. *The ISME J.*, 2015, 9(3): 721-734
- [11] Coates J D, Phillips E J, Lonergan D J, et al. Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62(5): 1531-1536
- [12] Lovley D R, Phillips E J. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53(7): 1536-1540
- [13] Achnich C, Bak F, Conrad R. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fert. Soils*, 1995, 19(1): 65-72
- [14] Byrne J M, Klueglein N, Pearce C, et al. Redox cycling of Fe(II) and Fe(III) in magnetite by Fe-metabolizing bacteria. *Science*, 2015, 347(6229): 1473-1476
- [15] Emmerich M, Bhansali A, Lösekann-Behrens T, et al. Abundance, distribution, and activity of Fe(II)-oxidizing and Fe(III)-reducing microorganisms in hypersaline sediments of Lake Kasin, southern Russia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78(12): 4386-4399
- [16] 潘赞,胡雪峰,叶荣,等. 温度对酸性草酸—草酸铵溶液浸提土壤无定形铁的影响. 土壤通报, 2006, 37(6): 1188-1190. Pan Y, Hu X F, Ye R, et al. Influence of temperature on the extraction of amorphous iron by the acidic ammonium oxalate method. *Chin. J. Soil. Sci.*, 2006, 37(6): 1188-1190
- [17] Zheng S L, Zhang H X, Li Y, et al. Co-occurrence of *Methanosarcina mazei* and *Geobacteraceae* in an iron(III)-reducing enrichment culture. *Front. Microbiol.*, 2015, 6: 941
- [18] 迟光宇,张兆伟,陈欣,等. 羟胺浸提—可见分光光度法测定土壤无定形铁. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(12): 2931-2934. Chi G Y, Zhang Z W, Chen X, et al. Determination of amorphous iron oxides in soil by hydroxylamine extraction-spectrophotometry. *Spectrosc. Spect. Anal.*, 2008, 28(12): 2931-2934
- [19] Theis T L, Singer P C. The stabilization of ferrous iron by organic compounds in natural waters//Singer P C. *Trace Metals and Metal-Organic Interactions in Natural Waters*. Ann Arbor: Ann Arbor Sci., 1973, 303-320

## COMPARATIVE STUDY ON THE NECESSITY OF ANAEROBIC CONDITIONS IN DETERMINATIONS OF Fe(II)

Zhang Hongxia<sup>1,2</sup> Li Ying<sup>1,2</sup> Zheng Shiling<sup>1</sup> Wei Wenchao<sup>1,2</sup> Wang Bingchen<sup>1,2</sup> Liu Fanghua<sup>1†</sup>

(1 Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** Determination of Fe(II) in microbial enrichment culture is often carried in anaerobic conditions, which often requires tedious procedures. In order to achieve convenient and accurate determination of Fe(II) in microbial enrichment culture, the effect of

anaerobic condition on concentrations of oxalate and hydrochloride-extractable Fe(II) was studied. The results revealed that the condition of anaerobic leaching is essential to detecting oxalate-extractable Fe(II). Samples can be determined after 1 hour even so. On the opposite, the presence of oxygen has no effect on the determination of hydrochloride-extractable Fe(II). Thus, Fe(II) in microbial enrichment culture can be extracted and determined by using hydrochloride, which eliminates the anaerobic leaching and tedious procedures.

**Key words** Determination of Fe(II); Anaerobic condition; Hydrochloride-extraction; Oxalate-extraction