

## 水稻秸秆生物质炭对*Shewanella oneidensis* MR-1异化铁还原过程的抑制作用及其潜在机制分析

钱永明, 任东, 唐凤琳, 杨焱, 吴云当, 路璐, 彭超

### 引用本文:

钱永明, 任东, 唐凤琳, 杨焱, 吴云当, 路璐, 彭超. 水稻秸秆生物质炭对*Shewanella oneidensis* MR-1异化铁还原过程的抑制作用及其潜在机制分析[J]. *农业环境科学学报*, 2022, 41(4): 841-848.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0855>

### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### [Shewanella oneidensis MR-1异化铁还原诱导次生矿物固定镉](#)

童昆, 徐成, 吴峥, 司友斌

*农业环境科学学报*. 2021, 40(10): 2114-2123 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0496>

#### [铁还原条件下铁负载生物质炭固定三价砷的能力及其稳定性](#)

朱晓东, 杨敏, 吴松, 施维林, 周东美

*农业环境科学学报*. 2020, 39(12): 2735-2742 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0548>

#### [两种典型炭材料对微生物还原含砷水铁矿的影响及其机制研究](#)

吴松, 袁贝嘉, 闫慧珺, 方国东, 张俊, 王玉军, 周东美

*农业环境科学学报*. 2018, 37(7): 1370-1376 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0433>

#### [土壤-水稻系统砷的生物地球化学过程研究进展](#)

吴川, 安文慧, 薛生国, 江星星, 崔梦倩, 钱子妍

*农业环境科学学报*. 2019, 38(7): 1429-1439 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-1302>

#### [生物质材料与营养物配施对石油污染土壤的修复](#)

王艳杰, 李法云, 荣湘民, 陈佳勃, 石丽芳

*农业环境科学学报*. 2018, 37(2): 232-238 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1058>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

钱永明, 任东, 唐凤琳, 等. 水稻秸秆生物质炭对 *Shewanella oneidensis* MR-1 异化铁还原过程的抑制作用及其潜在机制分析[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(4): 841-848.

QIAN Y M, REN D, TANG F L, et al. Inhibitory effects and mechanisms of biochar on microbial Fe(III) reduction using *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(4): 841-848.



开放科学 OSID

# 水稻秸秆生物质炭对 *Shewanella oneidensis* MR-1 异化铁还原过程的抑制作用及其潜在机制分析

钱永明<sup>1,2</sup>, 任东<sup>2,3</sup>, 唐凤琳<sup>3</sup>, 杨焯<sup>4</sup>, 吴云当<sup>5</sup>, 路璐<sup>2</sup>, 彭超<sup>1,3\*</sup>

(1. 西华师范大学生命科学学院, 四川 南充 637009; 2. 西华师范大学环境科学与工程学院, 四川 南充 637009; 3. 西华师范大学化学合成与污染控制四川省重点实验室, 四川 南充 637009; 4. 北京大学城市与环境学院, 北京 100871; 5. 广东省科学院生态环境与土壤研究所/广东省农业环境综合治理重点实验室, 广州 510650)

**摘要:**为进一步明晰生物质炭影响微生物异化铁还原过程的机制,本研究综合采用微生物细胞悬浮液培养、激光扫描共聚焦显微镜成像、介导电化学分析等技术手段,探究了铁还原菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 在不同生物质炭和水铁矿浓度下的铁还原动力学规律及其潜在反应机制。结果表明:水稻秸秆生物质炭能够强烈抑制微生物的铁还原速率,且其抑制效应极大地受 Fe(III) 浓度的影响,而具有较强给电子能力的生物质炭能化学还原水铁矿,降低微生物铁还原过程中的初始 Fe(III) 浓度。同时,显微成像发现生物质炭表面附着有微生物细胞并形成聚集体,但在聚集体中未观察到水铁矿。研究表明,水稻秸秆生物质炭能够抑制微生物铁还原过程,其抑制作用可能与生物质炭对水铁矿的化学还原降低初始 Fe(III) 浓度以及对细胞进行吸附有关。

**关键词:**微生物铁还原;生物质炭;水铁矿;*Shewanella oneidensis* MR-1

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2022)04-0841-08 doi:10.11654/jaes.2021-0855

## Inhibitory effects and mechanisms of biochar on microbial Fe(III) reduction using *Shewanella oneidensis* MR-1

QIAN Yongming<sup>1,2</sup>, REN Dong<sup>2,3</sup>, TANG Fenglin<sup>3</sup>, YANG Zhen<sup>4</sup>, WU Yundang<sup>5</sup>, LU Lu<sup>2</sup>, PENG Chao<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong 637009, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong 637009, China; 3. Chemical Synthesis and Pollution Control Key Laboratory of Sichuan Province, China West Normal University, Nanchong 637009, China; 4. College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; 5. Guangdong Key Laboratory of Integrated Agro-environmental Pollution Control and Management/Institute of Eco-environmental and Soil Sciences, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** It is under debate whether microbial Fe(III) reduction is promoted or inhibited by biochar. To explore the mechanisms of how biochar influences microbial Fe(III) reduction, this study determined the kinetics of microbial Fe(III) reduction using *Shewanella oneidensis* MR-1 suspension experiments with the addition of biochar and ferrihydrite (Fh) at different concentrations. The aggregates of cells-biochar were visualized using laser scanning confocal microscopy (LSCM). The redox properties of biochar were analyzed using mediated electrochemical analysis. The results showed that addition of rice straw-derived biochar inhibited the rate of microbial Fh reduction. The inhibiting effect of biochar on microbial Fh reduction was influenced by the concentration of Fh. In addition, the biochar

收稿日期:2021-07-30 录用日期:2021-11-01

作者简介:钱永明(1994—),男,四川巴中人,硕士研究生,从事环境微生物研究。E-mail:875510826@qq.com

\*通信作者:彭超 E-mail:chpeng89@cwnu.edu.cn

基金项目:四川省科技计划项目(2021YJ0295);国家自然科学基金项目(42107278)

Project supported: The Sichuan Science and Technology Program(2021YJ0295); The National Natural Science Foundation of China(42107278)

used in this study had relatively high electron donating capacity and was able to chemically reduce Fh, lowering the initial Fh concentration for microbial Fe(III) reduction. The image obtained from LSCM showed that cells, but not Fh, were adsorbed on the surface of biochar. These results suggest that rice straw-derived biochar inhibit microbial Fe(III) reduction and may be related to the chemical Fh reduction by biochar and formation of cells-biochar aggregates.

**Keywords:** microbial Fe(III) reduction; biochar; ferrihydrite; *Shewanella oneidensis* MR-1

铁(Fe)是环境中具有高活性和高丰度的元素,同时也是构成生命体的必需重要元素之一。由Fe(II)与Fe(III)的氧化和还原过程组成的铁循环,关联着环境中多个元素和污染物的生物地球化学过程<sup>[1]</sup>。在pH中性的环境中,Fe(III)多以固体铁矿物的形式存在<sup>[2]</sup>。大量研究表明,这些铁矿物的表面具有较强的化学活性,在环境中能作为吸附剂影响污染物的迁移,或作为催化剂促进环境中多种物质的转化过程<sup>[3]</sup>。

在环境中铁还原过程由生物和非生物的化学反应共同驱动。异化铁还原微生物(铁还原微生物)是一种能够在无氧的条件下,利用有机质、氢气等多种物质为电子供体,将Fe(III)还原为Fe(II)的微生物<sup>[4]</sup>。铁还原微生物在环境中广泛分布,其对Fe(III)矿物的还原影响着环境中众多的生物和化学过程,具有重要的环境意义。然而,由于处于固态的铁矿物难以穿过细胞膜,如何将电子从细胞转移给铁矿物是微生物铁还原过程的主要限制因素之一<sup>[4]</sup>。除了微生物自身建立的一套胞外电子传递系统以外,在环境中还存在一些氧化还原活性物质,能够作为电子穿梭体在微生物与铁矿物之间传递电子,让铁还原微生物在不与铁矿物发生直接接触的情况下还原Fe(III)<sup>[5-8]</sup>。最近的研究发现,作为环境功能材料之一的生物质炭能够影响微生物铁还原过程。但目前关于生物质炭对微生物铁还原过程的影响仍存在争议。由于菌种、生物质炭类型、实验浓度设置等的差异,甚至出现了相悖的结论。一部分研究发现,生物质炭能够促进微生物铁还原<sup>[5,9-13]</sup>,然而又有一些研究发现同样的生物质炭在一定生物质炭和铁的浓度比例下会抑制微生物铁还原<sup>[15,12,14]</sup>。目前已知的生物质炭影响微生物铁还原过程的机制有多种,包括通过生物质炭表面的化学官能团在细胞和矿物之间传递电子<sup>[15]</sup>、在生物质炭的双电层(Electrical double-layer)存储或释放电子<sup>[16]</sup>、利用生物质炭的导电性直接在细胞和矿物之间传递电子<sup>[17]</sup>,以及对细胞进行吸附形成团聚体改变细胞与矿物的接触关系<sup>[14]</sup>等。

在过去对生物质炭介导微生物铁还原的多数研究中,使用的水铁矿浓度都相对较高,有一些甚至达

到每升数十毫摩尔( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。然而在实际环境中,生物质炭<sup>[18-19]</sup>和铁<sup>[20]</sup>的添加量和天然含量都在较大的范围内波动,在不同环境中的差异甚至可达到2~3个数量级,同时环境中水铁矿含量大多也仅占总铁浓度的一小部分,且在不同环境中含量不同<sup>[2]</sup>。此外,研究表明,微生物铁还原的速率与水铁矿浓度呈正比<sup>[21]</sup>,而由于一些在中高温条件下制备的生物质炭具有较高的得失电子能力<sup>[15]</sup>,能够快速对铁矿物进行化学还原,降低初始铁浓度。因此,铁矿物的浓度很可能是影响生物质炭介导微生物铁还原的关键因素之一。为了验证该推测,进一步明晰生物质炭影响微生物铁还原的机制,本实验制备水稻秸秆生物质炭,借助介导电化学技术明确其得失电子能力;在多个不同水铁矿浓度条件下,开展铁还原菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 细胞悬浮培养实验,在多个生物质炭和水铁矿浓度条件下测定了微生物铁还原的反应速率;借助化学成分分析和共聚焦显微镜成像等技术手段,分析 *Shewanella oneidensis* MR-1 在不同生物质炭和水铁矿浓度下还原水铁矿的动力学,观察微生物细胞与生物质炭形成的聚合体的形态。该研究对揭示具有不同铁浓度的环境中生物质炭介导微生物铁还原的机制有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物质炭的和铁矿物的制备

采集水稻收获后的新鲜秸秆,用自来水初步清洗后,避光风干。磨碎过10目筛,置于有盖坩埚内放在马弗炉中,在500℃下无氧热解2h(持续通 $\text{N}_2$ ,流量 $200\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )。自然冷却到室温后,再次过10目筛,用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HF-HCl浸洗24h,重复两遍,再用去离子水清洗生物质炭到无 $\text{F}^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 检出,以排除生物质炭中残余的矿物成分对微生物铁还原过程中电子传递过程的干扰<sup>[22]</sup>。最后避光风干,磨碎过230目筛后避光保存。

水铁矿(Fh)和针铁矿(Gt)使用九水合硝酸铁和氢氧化钾在实验室合成,矿物的具体合成方案参考AMSTAETTER等<sup>[23]</sup>的方法。在无氧手套箱中(100%

N<sub>2</sub>, 布劳恩 Unilab Pro) 利用无氧水将铁矿物配制成悬浮液, 存储于血清瓶中, 用丁基胶塞密封试管口, 加盖铝盖, 避光保存。

## 1.2 菌株及微生物铁还原实验

*Shewanella oneidensis* MR-1, 最初分离自美国 Oneida 湖的无氧沉积物中, 是目前研究较为广泛的铁还原微生物之一<sup>[24]</sup>。

将 MR-1 菌株于 -80 °C 冷冻保存, 在实验前通过划线接种至含有 LB 固体培养基的平板上(培养基成分: 胰蛋白酶 10 g·L<sup>-1</sup>、酵母提取物 5 g·L<sup>-1</sup>、NaCl 10 g·L<sup>-1</sup>、琼脂 15 g·L<sup>-1</sup>), 于 28 °C 恒温静置培养约 24 h 后, 保存于 4 °C 冰箱中。在 LB 固体培养基上挑取 MR-1 的单一菌落, 接种到 LB 液体培养基中进行避光培养, 摇床速度为 150 r·min<sup>-1</sup>, 培养温度为 28 °C。通过 OD 值检测培养过程中微生物的生长曲线, 培养约 12 h 后, 离心(5 000 g, 5 min) 收集处于对数期后期的细胞(OD<sub>600</sub> 约 0.41), 离心之后倒掉上清液, 用无氧的 PIPES 缓冲溶液(10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 为 7) 重新悬浮细胞, 并再次进行离心(5 000 g, 5 min)。重复操作两次, 以去除残余的 LB 培养基。最后用无氧的 PIPES 缓冲溶液重新悬浮细胞, 制备成约 20 倍浓缩的细胞悬浮液。

在 pH=7 的 PIPES 无氧培养液(10 mmol·L<sup>-1</sup> PIPES) 中按照顺序分别添加不同浓度的水铁矿(2、4、10 mmol·L<sup>-1</sup>) 或针铁矿(4 mmol·L<sup>-1</sup>)、10 mmol·L<sup>-1</sup> 乳酸钠、不同浓度生物质炭(2、4、10 g·L<sup>-1</sup>), 取一定量的浓缩的细胞悬浮液添加到 PIPES 无氧培养液中, 使其最终细胞数为 6.20×10<sup>7</sup> 个·μL<sup>-1</sup>, 最后分装到亨盖特厌氧培养管(顶空含 100% N<sub>2</sub>) 中, 用丁基胶塞密封试管口, 加盖铝盖, 在 28 °C 无氧黑暗的条件下静置培养。每个实验设置 3 个重复, 同时设置不加生物质炭的对照组和未添加细胞的非生物对照组。

## 1.3 Fe(II) 浓度测定和微生物铁还原速率计算

培养过程中每隔数小时采集样品, 通过斐林试剂法测得样品中 Fe(II) 浓度<sup>[25]</sup>。具体步骤为: 首先, 用 N<sub>2</sub> 清洗过的注射器采集样品, 然后迅速用 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸(水铁矿处理) 或 6 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸(针铁矿处理) 对样品进行稀释, 于室温(水铁矿处理) 或 60 °C 培养箱(针铁矿处理) 中避光静置 2 h 后离心(5 000 g, 1 min) 取上清液。在 96 孔板中, 用 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液对样品再次进行再次稀释, 然后混合斐林试剂溶液(0.1% m:V ferrozine, 50% m:V 醋酸铵) 培养 5 min 后, 利用微孔板酶标仪(Multiskan GO, Thermo Fisher Sci-

entific 公司) 测量波长为 562 nm 处的吸光值, 与使用 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 和 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸制得的 Fe(II) 标准曲线进行比较, 测得 Fe(II) 浓度。最后利用 Excel 软件选取铁还原最快的时期中至少 3 个时间点的 Fe(II) 浓度变化, 进行一元线性回归分析 [Y=aX+b, 式中: X 为时间, Y 为 Fe(II) 浓度], 从线性拟合直线的斜率得出微生物铁还原的速率。

## 1.4 介导电化学分析

采用介导电化学氧化(MEO) 和还原(MER) 方法对生物质炭的供电子能力(EDC) 和得电子能力(EAC) 进行定量化测定<sup>[15,26-27]</sup>。测试系统由电化学工作站(CHI 760E) 和介导测试反应装置两部分组成, 其中三电极测试体系由石墨板(工作电极)、铂网(对电极) 和 Ag/AgCl 电极(参比电极) 组成, 介导剂分别为 ABTS 和 Ziv, 测试电压分别为 0.61 V 和 -0.49 V, 电介质溶液为 0.1 mol·L<sup>-1</sup> KCl(pH=7.0, PBS)。为排除氧气对测试体系的干扰, 测试前所有溶液均采用高纯氮气脱氧处理 20 min。于 i-t 测试模式下达到稳定电流, 加入 500 μL 10 mmol·L<sup>-1</sup> 的 ABTS 或 Ziv 溶液, 待反应电流回到基线并再次稳定后, 向测试体系加入 100 μL 生物质炭悬浮液(1.0 g·L<sup>-1</sup>), 得到生物质炭得失电子过程中的 i-t 曲线。最后, 采用公式(1) 和公式(2) 对生物质炭的 EAC 和 EDC 进行计算。

$$EAC = \frac{\int \frac{I_{red}}{F} dt}{m_{BC}} \quad (1)$$

$$EDC = \frac{\int \frac{I_{ox}}{F} dt}{m_{BC}} \quad (2)$$

式中:  $I_{red}$  和  $I_{ox}$  分别为介导还原和氧化电流, A; F 为法拉第常数, 96 485 C·mol<sup>-1</sup>;  $m_{BC}$  为加入测试体系中生物质炭的质量, g;  $t$  为积分时间, s。

## 1.5 激光扫描共聚焦显微镜观察

细胞悬浮液的制备同 1.2。首先用 4% 甲醛溶液对细胞进行固定, 然后利用含有 SYTO 9 和 Propidium iodide 的死活菌染色试剂盒(Live/Dead BacLight, Invitrogen) 对菌体进行避光染色。染色完成后, 将细胞添加到含有 10 g·L<sup>-1</sup> 生物质炭和 4 mmol·L<sup>-1</sup> 水铁矿的 PIPES 缓冲溶液中, 并使最终细胞浓度达到与实验中相同的 6.20×10<sup>7</sup> cells·μL<sup>-1</sup>。利用 Leica TCS SP8 激光扫描共聚焦显微镜系统获取样品中生物质炭、铁矿物和细胞沿 Z 轴方向的系列图层, 使用的激发光波长为 488 nm。然后使用 NIH ImageJ 1.53 软件对采集到的系列图层进行最大密度投影(Maximum intensity pro-

jection)处理,分析生物质炭、铁矿物和细胞的结合和空间分布情况。

## 1.6 统计分析

采用SPSS 25.0对不同实验设置条件下测得的微生物铁还原速率、生物质炭的得电子能力(EAC)和失电子能力(EDC)的结果进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 时认为具有显著性差异的统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同生物质炭浓度对微生物异化铁还原的影响

在加入生物质炭的处理中,在0时刻有大量Fe(II)产生,其浓度随着生物质炭浓度的增加而增加(图1)。平均每克生物质炭与水铁矿[ $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe(III)}$ ]反应生成了约 $174.8 \mu\text{mol Fe(II)}$ 。在之后的培养时间里,在添加了生物质炭的处理中,微生物铁还原的

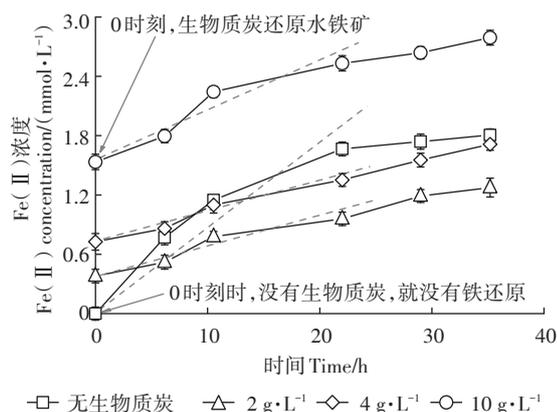


图1 不同生物质炭浓度条件下微生物对水铁矿的还原  
Figure 1 Reduction of ferrihydrite by MR-1 at different biochar concentrations

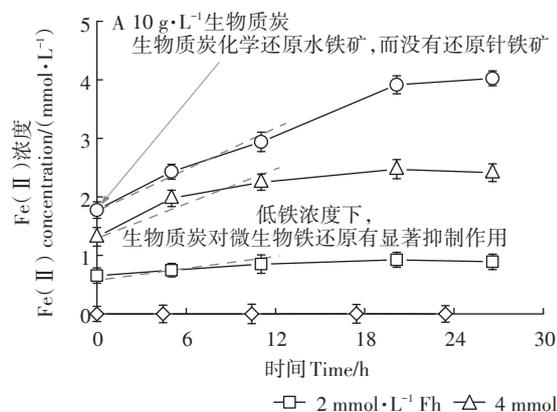


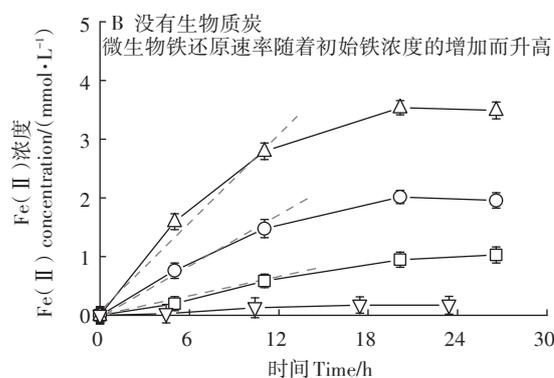
图2 不同Fe(III)浓度和矿物种类条件下的微生物铁还原

Figure 2 Microbial iron reduction at different concentrations of ferrihydrite and goethite

速率和程度均明显低于不添加生物质炭的对照组。在对照组中,微生物铁还原的速率为 $110.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,而在添加了 $2, 4, 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 生物质炭的实验组中,微生物铁还原的速率分别为 $36.9, 34.5, 65.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,其中添加了 $2, 4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 生物质炭的样品与不添加生物质炭或添加 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 生物质炭的样品的微生物铁还原的速率具有显著差异。

### 2.2 不同铁矿物浓度对生物质炭介导微生物铁还原的影响

为了研究铁矿物的浓度对生物质炭介导微生物异化铁还原动力学的影响,在添加及不添加 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的生物质炭条件下,实验设置了 $2, 4, 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  3个Fe(III)浓度。此外,还设置了一个加入针铁矿的对照,以验证在0时刻生成的Fe(II)是否为水铁矿与生物质炭的反应生成,排除盐酸对亚铁进行提取的过程对结果的干扰<sup>[28]</sup>。结果发现,铁矿物的浓度会显著影响微生物还原水铁矿的动力学,在添加了生物质炭的处理中,铁矿物浓度的变化对微生物铁还原过程的影响更为显著。如图2所示,微生物铁还原速率和程度随着Fe(III)浓度增加而增加。在添加了生物质炭的处理中(图2A),Fe(III)浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时微生物铁还原几乎被完全抑制,其铁还原速率仅有 $17.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。而随着Fe(III)浓度升高,在含有生物质炭的处理中,当Fe(III)浓度为 $4, 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的铁还原速率分别为 $83.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $105.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,分别是Fe(III)浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的4.69倍和5.90倍。在不含生物质炭的处理中(图2B),当Fe(III)浓度从 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,微生物的铁还原速率从 $53.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 分别增加到 $133.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $251.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,分别是



Fe(III)浓度为  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时的 2.50 倍和 4.70 倍。在使用针铁矿为铁源的处理中,添加生物质炭后,在 0 时刻和实验的培养时间内(约 23.4 h)均未检测到 Fe(II)的产生(图 2A),证明添加针铁矿和生物质炭的处理中,0 时刻所产生的 Fe(II)不是在用 HCl 对铁进行提取的过程中生物质炭对 Fe(III)的还原所产生的。

### 2.3 生物质炭的氧化还原特性和对微生物细胞的吸附

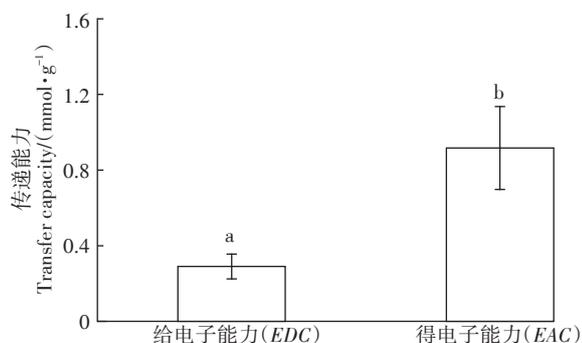
电化学分析的结果发现,该生物质炭的给电子能力为  $(0.29 \pm 0.06) \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ,得电子能力为  $(0.91 \pm 0.21) \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ (图 3),其得电子能力是给电子能力的 3.14 倍,二者具有显著差异( $P < 0.05$ )。其给电子能力高于实验中测得的对  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  水铁矿的还原能力(约  $0.17 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )(图 3)。

共聚焦激光显微镜成像发现,在混合了  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  水铁矿、 $6.20 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  MR-1 细胞和  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  生物质炭的处理中,有大量的细胞吸附在生物质炭表面,形成聚合物,但聚合物中并没有明显观察到水铁矿,许多细胞仍自由悬浮于液体中(图 4)。

## 3 讨论

本研究发现在不同的生物质炭和铁浓度条件下,生物质炭均抑制了微生物的铁还原过程,这与以往的许多研究中发现的生物质炭促进微生物铁还原的现象相反<sup>[5,9-10]</sup>。同时,本研究还发现了生物质炭可以化学还原水铁矿,从而降低初始 Fe(III)浓度的现象,以及生物质炭吸附细胞于其表面、形成微生物细胞和生物质炭的聚合体的现象。

生物质炭对微生物铁还原过程的抑制作用可能与



柱状图上不同小写字母表示  $P < 0.05$  水平差异显著

The different lowercase letters indicate significant differences between EDC and EAC ( $P < 0.05$ )

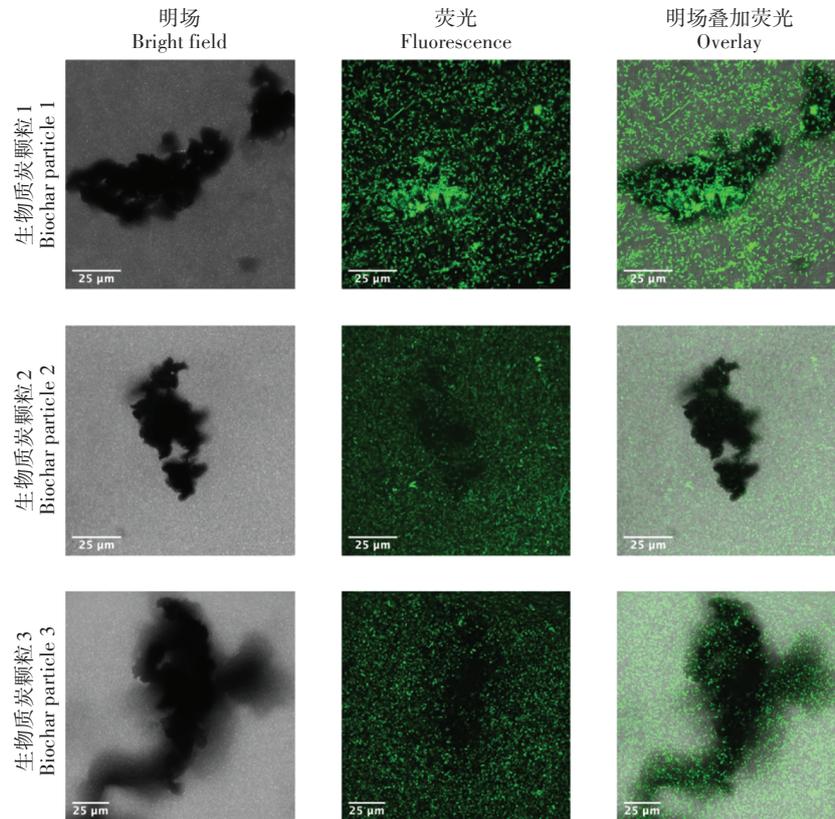
图 3 生物质炭的得电子能力(EAC)和失电子能力(EDC)

Figure 3 Electron accepting capacities(EAC), and electron donating capacities(EDC) of biochar

其自身对水铁矿的还原所导致的初始 Fe(III)浓度下降有关。在本研究中,无论是否添加生物质炭,微生物铁还原的速率与水铁矿浓度呈正比(图 2),即当水铁矿的浓度升高时,铁还原速率也随之升高,这与前人的研究结果类似<sup>[21]</sup>。因此,生物质炭自身对水铁矿的还原所导致 Fe(III)浓度的降低(图 1),可能是其在低铁浓度条件下抑制微生物铁还原的原因之一。此外,本研究还发现,相比不添加生物质炭的对照组,在添加生物质炭( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的处理中,铁矿物浓度的变化对微生物铁还原速率的影响更为显著。当铁浓度从  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  增加到  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,在添加生物质炭( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的处理中微生物铁还原速率增加了 3.69 倍(图 2A),而在不添加生物质炭的处理中仅增加了 1.50 倍(图 2B)。这可能是由于随着初始 Fe(III)浓度的升高,相同浓度生物质炭化学还原水铁矿,降低一部分初始 Fe(III),因此对微生物铁还原速率的负面影响相对降低。该结果证明水铁矿的浓度在生物质炭介导微生物铁还原过程中扮演了重要的作用。

生物质炭抑制微生物铁还原的另一个原因可能与细胞-生物质炭聚合体的形成有关。共聚焦激光显微镜结果发现一部分细胞吸附于生物质炭的表面形成聚合物,且在聚合物中并没有发现水铁矿(图 4)。这一现象与前人发现当铁矿物与微生物细胞-生物质炭聚合物结合时生物质炭才会促进微生物铁还原的现象一致<sup>[14]</sup>。这种由微生物和生物质炭形成的聚合物,可能会限制微生物和生物质炭在溶液中的活性<sup>[29]</sup>,减少微生物和生物质炭与水铁矿的接触概率,进而抑制电子传递给水铁矿。然而,由于在过去类似的研究中,使用的水铁矿的浓度都相对较高,如  $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  等<sup>[10]</sup>,远高于本研究中所使用的  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在含有较高浓度水铁矿的情况下,即使也有微生物-生物质炭聚合体的形成和一部分 Fe(III)被还原的现象<sup>[5,10]</sup>,但由于其体系中依然有足够高浓度的水铁矿供微生物接触和还原,因此对后期培养过程中微生物铁还原的抑制作用并不显著。本研究中的结果也支撑了这一推论,当水铁矿的初始浓度相对较低时,生物质炭对微生物铁还原的抑制作用更为显著(图 2)。

同时,由于本研究使用的生物质炭具有较高的给电子和得电子能力(图 3),在形成不含水铁矿的微生物-生物质炭聚合物后,生物质炭可能取代水铁矿作为微生物呼吸作用的电子受体<sup>[16]</sup>,与水铁矿产生竞争关系,这可能是本研究中生物质炭进一步抑制微生物



此图为处于立体空间中的细胞和生物质炭在平面上的投影,仅能作为同一空间中处于不同位置的细胞的相对密度的估计  
Due to overlay of cells, minerals and biochar particles, pictures can only be used for quantitation of relative cell abundances at the same position

图4 激光扫描共聚焦显微镜拍摄到的生物质炭颗粒和微生物细胞沿垂直方向的堆叠图

Figure 4 Biochar particles and bacterial cells photographed using laser scanning confocal microscopy

物对水铁矿的还原另一个原因。

此外,该研究结果与以往研究结果不同,也可能与使用了不同的物理化学特性的生物质炭有关<sup>[11,15]</sup>。本研究中使用的是去除了煅烧过程中产生的矿物质成分的生物质炭,而前人对该过程的研究中多使用包含矿物成分的生物质炭。已有的研究发现,生物质炭中的矿物成分可能会影响生物质炭对有机质的吸附<sup>[22]</sup>,而这些矿物成分对生物质炭介导微生物铁还原过程的影响目前仍然未知,值得在未来开展进一步深入的研究。同时,在本实验中,不同生物质炭(2~10 g·L<sup>-1</sup>)和水铁矿浓度(2~10 mmol·L<sup>-1</sup>)下,生物质炭均对微生物铁还原有抑制作用。YANG等<sup>[14]</sup>在研究木材煅烧的生物质炭介导微生物铁还原的研究中发现,生物质炭与Fe(Ⅲ)的质量浓度比(g·mmol<sup>-1</sup>)高于或低于一个固定比值时,生物质炭对微生物铁还原分别表现出促进和抑制作用的现象。有研究发现浓度为10 mg·L<sup>-1</sup>的石墨烯就会对微生物铁还原过程表现出抑制作用<sup>[30]</sup>。因此,氧化还原活性和吸附能力不同的生物质炭或碳基材料在不同的环境条件下对微生物铁还原过

程的影响可能不尽相同,并非所有的生物质炭都能够促进微生物铁还原。

目前,生物质炭作为新型碳材料在农业环境领域中得到了广泛的应用,本研究的结果为生物质炭的环境效应提供了基础数据。本研究发现在生物质炭介导微生物铁还原过程中,生物质炭不仅作为电子穿梭体促进微生物铁还原<sup>[5,9-10]</sup>,也可以通过其自身的氧化还原特性改变环境中水铁矿的浓度,以及通过吸附细胞形成聚合体等方式参与微生物铁还原的过程。生物质炭对微生物铁还原过程的抑制,可能会进而影响到环境中与铁还原微生物厌氧呼吸相关的多种电子供体的降解过程,例如微生物对有机质的降解、甲烷的氧化,以及最新发现的铵根离子的降解等<sup>[4]</sup>。同时,由于环境中的铁是由多种不同的类型的各类铁矿物混合而成的,在一些环境中,具有较高生物利用度的水铁矿浓度可能相对较低<sup>[2]</sup>。许多生物质炭均有一定的给电子能力,进而能够还原Fe(Ⅲ)<sup>[14,31]</sup>,在以往的研究中发现生物质炭的给电子能力可以达到2 mmol·g<sup>-1</sup><sup>[15]</sup>。在一些具有较低浓度水铁矿的环境中,

施加具有较强化学铁还原和与铁还原微生物形成聚集体能力的生物质炭,可能会强烈抑制环境微生物铁还原过程。在未来需进一步从微生物-生物质炭聚集体和生物质炭-铁矿物的反应效应等方向对生物质炭介导微生物铁还原过程的机制展开深入研究。

## 4 结论

(1) 该研究中的水稻秸秆生物质炭显著抑制了微生物铁还原过程。

(2) 生物质炭对微生物铁还原过程的抑制作用可能有两个原因:一是生物质炭对水铁矿的化学还原降低了初始 Fe(III) 浓度;二是形成了微生物-生物质炭聚集体。

(3) 水铁矿初始浓度相对较低时,生物质炭对微生物铁还原的抑制更显著。

(4) 铁矿物浓度是影响生物质炭介导微生物铁还原过程的重要因素。

### 致谢:

感谢西华师范大学侯怡铃教授和白鑫同学提供实验平台,以完成本项目中激光扫描共聚焦显微镜实验。

### 参考文献:

- [1] MELTON E D, SWANNER E D, BEHRENS S, et al. The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(12): 797-808.
- [2] COLOMBO C, PALUMBO G, HE J Z, et al. Review on iron availability in soil: Interaction of Fe minerals, plants, and microbes[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2014, 14(3): 538-548.
- [3] BORCH T, KRETZSCHMAR R, KAPPLER A, et al. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(1): 15-23.
- [4] KAPPLER A, BRYCE C, MANSOR M, et al. An evolving view on biogeochemical cycling of iron[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(6): 360-374.
- [5] KAPPLER A, WUESTNER M L, RUECKER A, et al. Biochar as an electron shuttle between bacteria and Fe(III) minerals[J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2014, 1(8): 339-344.
- [6] LOVLEY D R, FRAGA J L, BLUNT-HARRIS E L, et al. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction[J]. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 1998, 26(3): 152-157.
- [7] 柳广飞, 朱佳琪, 于华莉, 等. 电子穿梭体介导微生物还原铁氧化物的研究进展[J]. *地球科学*, 2018, 43(增刊1): 157-170. LIU G F, ZHU J Q, YU H L, et al. Review on electron-shuttle-mediated microbial reduction of iron oxides minerals[J]. *Earth Science*, 2018, 43(Suppl 1): 157-170.
- [8] 吴云当, 李芳柏, 刘同旭, 等. 土壤微生物-腐殖质-矿物间的胞外电子传递机制研究进展[J]. *土壤学报*, 2016, 53(2): 277-291. WU Y

- D, LI F B, LIU T X, et al. Mechanism of extracellular electron transfer among microbe-humus-mineral in soil: A review[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53(2): 277-291.
- [9] XU S, ADHIKARI D, HUANG R, et al. Biochar-facilitated microbial reduction of hematite[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(5): 2389-2395.
- [10] WU S, FANG G, WANG Y, et al. Redox-active oxygen-containing functional groups in activated carbon facilitate microbial reduction of ferrihydrite[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(17): 9709-9717.
- [11] WU S, WANG D, LIU C, et al. Pyridinic- and pyrrolic nitrogen in pyrogenic carbon improves electron shuttling during microbial Fe(III) reduction[J]. *ACS Earth and Space Chemistry*, 2021, 5(4): 900-909.
- [12] 吴松, 袁贝嘉, 闫慧珺, 等. 两种典型炭材料对微生物还原含砷水铁矿的影响及其机制研究[J]. *农业环境科学学报*, 2018, 37(7): 1370-1376. WU S, YUAN B J, YAN H J, et al. Mechanism of two representative carbonaceous materials impact on microbial reduction of arsenic-bearing ferrihydrite[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(7): 1370-1376.
- [13] 朱晓东, 杨敏, 吴松, 等. 铁还原条件下铁负载生物质炭固定三价砷的能力及其稳定性[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(12): 2735-2742. ZHU X D, YANG M, WU S, et al. Arsenite immobilization capacity and stability of iron-loaded biochar under an iron-reducing environment[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(12): 2735-2742.
- [14] YANG Z, SUN T, SUBDIAGA E, et al. Aggregation-dependent electron transfer via redox-active biochar particles stimulate microbial ferrihydrite reduction[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 703: 135515.
- [15] KLÜPFEL L, KEILUWEIT M, KLEBER M, et al. Redox properties of plant biomass-derived black carbon (biochar) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(10): 5601-5611.
- [16] JI H, ZHAO X, QIAO Z, et al. Capacitance of carbon-based electrical double-layer capacitors[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3317.
- [17] SUN T, LEVIN B D A, GUZMAN J J L, et al. Rapid electron transfer by the carbon matrix in natural pyrogenic carbon[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14873.
- [18] BISTA P, GHIMIRE R, MACHADO S, et al. Biochar effects on soil properties and wheat biomass vary with fertility management[J]. *Agronomy*, 2019, 9(10): 623.
- [19] GLASER B, LEHMANN J, ZECH W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal: A review[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 35(4): 219-230.
- [20] BODEK I, LYMAN W J, REEHL W F, et al. Environmental inorganic chemistry: Properties, processes, and estimation methods[M]. New York: Pergamon Press, 1988.
- [21] RODEN E E, ZACHARA J M. Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth[J]. *Environmental Science & Technology*, 1996, 30(5): 1618-1628.

- [22] CHEN J, ZHANG D, ZHANG H, et al. Fast and slow adsorption of carbamazepine on biochar as affected by carbon structure and mineral composition[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 579:598–605.
- [23] AMSTAETTER K, BORCH T, KAPPLER A. Influence of humic acid imposed changes of ferrihydrite aggregation on microbial Fe(III) reduction[J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 2012, 85:326–341.
- [24] MYERS C R, NEALSON K H. Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(11):6232–6238.
- [25] GIBBS C R. Characterization and application of ferrozine iron reagent as a ferrous iron indicator[J]. *Analytical Chemistry*, 1976, 48(8):1197–1201.
- [26] AESCHBACHER M, SANDER M, SCHWARZENBACH R P. Novel electrochemical approach to assess the redox properties of humic substance[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(1):87–93.
- [27] BI R, LU Q, YU W, et al. Electron transfer capacity of soil dissolved organic matter and its potential impact on soil respiration[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2013, 13(9):1553–1560.
- [28] 张月. 生物炭的氧化还原机制及其环境应用[D]. 上海:上海交通大学, 2019. ZHANG Y. Redox mechanism of biochar and its environmental application[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2019.
- [29] LIU L, LIU G, ZHOU J, et al. Cotransport of biochar and *Shewanella oneidensis* MR-1 in saturated porous media: Impacts of electrostatic interaction, extracellular electron transfer and microbial taxis[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 658:95–104.
- [30] LIU G, YU H, WANG N, et al. Microbial reduction of ferrihydrite in the presence of reduced graphene oxide materials: Alteration of Fe(III) reduction rate, biomineralization product and settling behavior[J]. *Chemical Geology*, 2018, 476:272–279.
- [31] WANG L, WANG Y, MA F, et al. Mechanisms and reutilization of modified biochar used for removal of heavy metals from wastewater: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 668:1298–1309.

(责任编辑:宋潇)