

夏金霞,孙金涛,于蕊,等.生物炭及其水溶组分促进水铁矿微生物还原[J].中国环境科学,2023,43(10):5422-5432.

Xia J X, Sun J T, Yu R, et al. Effects of biochar and its dissolved fractions on microbial reduction of ferrihydrite [J]. China Environmental Science, 2023,43(10):5422-5432.

生物炭及其水溶组分促进水铁矿微生物还原

夏金霞,孙金涛,于蕊,王一初,安伟奇,金洁*,曹丹丹(华北电力大学环境科学与工程学院,北京 102206)

摘要: 采用水稻秸秆在 300、400 和 500℃热解温度下制备生物炭(BC),并从中提取生物炭水溶组分(DBC),结合微生物还原实验和傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)、X 射线衍射晶体衍射(XRD)、电子顺磁(EPR)等表征手段考察 BC 和 DBC 对 *Geobacter sulphurreducens* PCA 还原水铁矿的影响和作用机制。结果表明,400℃热解 BC 可使微生物异化铁还原的速率增加 12 倍,还原率最高,这是由于其含有最多的醌基、羧基基团,可以作为电子穿梭体促进电子转移。BC 不能作为电子供体直接向微生物或水铁矿提供电子。DBC 使水铁矿的长期微生物异化铁还原程度和初始还原速率分别增加了 10 倍和 2 倍以上。500℃热解 DBC 可以充当电子供体或者电子穿梭体,促进水铁矿的微生物还原,但是不能直接化学还原水铁矿。

关键词: 生物炭; 生物炭水溶组分; 水铁矿; 异化铁还原菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2023)10-5422-11

Effects of biochar and its dissolved fractions on microbial reduction of ferrihydrite. XIA Jin-xia, SUN Jin-tao, YU Rui, WANG Yi-chu, AN Wei-qi, JIN Jie*, CAO Dan-dan (College of Environmental Science and Engineering, North China Electric Power University, Beijing 102206, China). *China Environmental Science*, 2023,43(10): 5422~5432

Abstract: In this study, biochar (BC) was prepared from rice straw at different pyrolysis temperatures (300, 400, and 500 °C), and was used for dissolved fractions (DBC) extraction. In this study, the effects of BC and DBC on the reduction of ferrihydrite by *Geobacter sulphurreducens* PCA were investigated by combining microbial reduction experiments and various characterization methods including Fourier transition infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction crystal diffraction (XRD), and Electron paramagnetic resonance (EPR). The results showed that the highest reduction rate of ferrihydrite was achieved after the addition of BC prepared at 400°C (BC-400), which increased the rate of microbial dissimilatory iron reduction by 12 times. Containing the most quinone and carboxyl groups, BC-400 could function as an electron shuttle to promote electron transfer. BC could not serve as an electron donor to provide electrons directly to PCA or ferrihydrite. DBC increased the degree of long-term microbial reduction extent and initial reduction rate by more than 10 times and 2 times, respectively. DBC extracted from BC prepared at 500°C served as an both electron shuttle and electron donor to promote the microbial reduction of ferrihydrite, but it cannot directly chemically reduce ferrihydrite.

Key words: biochar; dissolved biochar fractions; ferrihydrite; dissimilatory iron-reducing bacteria

铁(Fe)是地球上重要的氧化还原活性物质,普遍存在于土壤、沉积物和水生环境中,在微生物呼吸过程中起着重要的作用^[1-2]。Fe(III)在还原过程中具有释放、转化和隔离营养物质或污染物的能力^[3]。而微生物异化 Fe(III)还原是诱导 Fe(III)产生次生矿物过程的重要驱动力。

生物炭(BC)是一种富含碳的固体,在≤700℃的限氧条件下由生物质热分解产生。BC 含有芳香族和醌类结构,具有氧化还原活性,可以参与环境相关的氧化还原反应^[4-6]。BC 接受和提供电子的能力可以促进物种间的电子转移^[7-9],从而对土壤中的生物地球化学循环产生重大的影响。例如,近期研究证明,BC 可以作为细菌和 Fe(III)矿物之间的电子穿梭

体,促进 Fe(III)的还原^[10-11]。然而,BC 促进微生物异化铁还原的机理仍存在争议。研究发现,BC 材料具有足够的导电性,可以促进物种之间的直接电子转移,而 BC 的氧化还原活性官能团对电子传递的介导作用有限。另一项研究发现,BC 的导电性并不能促进直接的种间电子转移,而是 BC 表面的官能团(如醌和对苯二酚)可逆地接受和提供电子,在电子转移的过程中发挥了重要作用^[11]。这些不一致的发现表明,人们对 BC 介导微生物异化铁还原的机制仍然知

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(42177204);持久性有毒污染物环境与健康危害湖北省重点实验室开放基金资助项目(PTS-2020-04);中央高校基本科研业务费专项资金(2020MS038)

* 责任作者,副教授, jinjie19@126.com

之甚少.

BC 应用于田间土壤,通过降雨或灌溉的洗脱,可释放可溶性部分,即生物炭水溶组分(DBC). DBC 是了解 BC 地质和环境过程的关键,此外,溶解态和胶体态 BC 被认为在地下具有显著的流动性^[12].与 BC 类似,DBC 富含氧化还原活性官能团,可能会介导 Fe(III)的还原.但是目前,关于 BC 介导的 Fe(III)还原的研究主要集中在新鲜的 BC 颗粒上,而对 DBC 在 Fe(III)还原中的作用仅仅做了初步探讨,得到的研究结果也不一致.例如, Xu 等^[10]发现,麦秸秆 DBC 使赤铁矿的初始还原率提高了 1.0~3.6 倍.然而,在 Kapper 等^[11]的研究中,木屑 DBC 对水铁矿的还原没有显著贡献.这可能是由于木屑 DBC 中有机质浓度过低或者是氧化还原能力有限造成的,但是并没有直接证据能证明这种推论.关于生物炭 DBC 组分对 Fe(III)还原的影响还有待深入研究.

目前,BC 和 DBC 对微生物异化铁还原的影响及其作用机制仍不清楚.因此,本文研究了 BC、DBC 对水铁矿非生物和生物还原的影响,并借助傅里叶转换红外光谱仪(FTIR)、X 射线衍射晶体衍射(XRD)、电子顺磁(EPR)等表征方法,揭示了 BC、DBC 促进微生物胞外电子传递的机制.

1 材料与方法

1.1 微生物培养及材料制备

采用已发表的方法对 *Geobacter sulphurreducens* PCA 菌进行培养^[11]. PCA 菌接种至 NBAF 培养基中,在 30℃ 的培养箱中厌氧培养.孵育 14h 后,在对数中期收集细胞,用 20mmol/L 哌嗪-1,4-二(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲液(pH 值 7)洗涤 3 次.最后,在 10000g 下离心 5min,得到菌球.

水稻秸秆(长度为 1~3cm)购自中国山东省济宁市.缺氧条件下,在马弗炉中热解水稻秸秆制备 BC.热解温度设置为在 2h 内从 30℃ 分别增加至 300,400,500℃,并在各温度下保温 2h.冷却到室温后,将得到的 BC 磨成粉末,过 60 目筛后储存于密封袋中,得到的 BC 根据热解温度命名为 BC-300、BC-400、BC-500.

DBC 在操作上被定义为通过 0.45μm 滤膜的 BC.通过 0.45μm 的滤膜过滤通常用于区分天然含水层中的溶解性和特殊物质.过滤后,DBC 可能仍然含

有小的特殊物质或与部分胶体粒径大小类似的纳米颗粒.本文将不区分胶体 BC 和可溶性 BC,将其统称为 DBC.称取一定量的 BC 于烧杯中,按照 1:10 的固液比加入去离子水,用锡纸避光,放入超声浴中 100W 处理 30min,随后转移到磁子搅拌器处理 30min.浑浊液移至大离心管,4000r/min 离心 30min,向所得沉淀物中加入少量去离子水,离心洗涤 1~2 次,用 0.45μm 滤膜对上清液进行抽滤,使得 BC 溶液固液分离.最后将液体导入烧杯,避光密封 4℃ 冷藏⁰.获得的 DBC 溶液根据其 BC 热解温度命名为 DBC-300、DBC-400、DBC-500.采用总有机碳分析仪(Multi N/C 3100,Germany)测定 DBC 中总有机碳(TOC)的浓度.

水铁矿($\text{Fe}_{10}\text{O}_{15}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$)的制备:将 40g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 溶于 500mL 去离子水中,加入 1mol/L 的 KOH 约 330mL,其中最后 20mL 逐滴加入,调节 pH 值至 7~8,剧烈搅拌.之后,迅速离心得到沉淀物即水铁矿,并将其洗涤 3 次除去电解质.通过 XRD (SmartLab SE,Japan)分析证实了合成的矿物为水铁矿.

1.2 BC 和 DBC 介导的铁的微生物还原实验

厌氧实验在 100mL 的血清瓶中进行,共设置 4 组处理.第一组处理中,分别将 1g/L 的 BC-300、BC-400、BC-500 加入 50mL 新鲜培养基中,接种 10%(v/v)的 PCA 细胞悬浮液于血清瓶中,添加水铁矿作为电子受体,乙酸钠作为电子供体(PCA 菌+BC+乙酸钠+水铁矿),测试不同热解温度的 BC 对 Fe(III)还原的作用,探究 BC 能否作为电子穿梭体影响微生物还原水铁矿;第二组设置不添加乙酸钠实验组(PCA 菌+BC+水铁矿),以此探究 BC 能否作为电子供体影响微生物还原水铁矿;第三组只添加 BC 和水铁矿,设为非生物处理组(BC+水铁矿),考察 BC 对水铁矿非生物还原的影响;第四组接种 10%(v/v)的 PCA 菌,添加乙酸钠和水铁矿,设置为生物对照组(PCA 菌+乙酸钠+水铁矿).厌氧实验中 Fe(III)的初始浓度为 50mmol/L,BC 的添加量为 1g/L,在含有乙酸钠的处理组中,乙酸钠最终浓度为 20mmol/L.

此外将 BC 全部替换为 DBC 进行厌氧实验,以探究 DBC 在微生物异化铁还原过程中的重要性.实验条件设为 Fe(III)初始浓度 50mmol/L,乙酸钠 20mmol/L,DBC 20mgC/L,菌体投加量为 10%(v/v).共设置了 4 组不同处理:PCA 菌+DBC+乙酸钠+

水铁矿;PCA 菌+DBC+水铁矿;DBC+水铁矿;PCA 菌+乙酸钠+水铁矿。

向血清瓶中通入 80% N₂ 和 20% CO₂ 的混合气体以去除氧气,随后用丁基橡胶塞封口,以确保厌氧环境,细胞-矿物悬液在室温下以 100r/min 摇动,每个处理重复 3 次.在不同的时间间隔,用无菌针头抽取一定量液体,血清瓶在取样前涡旋混匀,每次取样约 0.5mL,用 1mol/L HCl 溶液 0.5mL 使悬浮液中氢离子的最终浓度为 0.5mol/L,酸化的悬浮液反应过夜,以去除吸附在固体(水铁矿、细胞和 BC)表面上的 Fe(II).然后,悬浮液经 0.45 μ m 滤膜去除固体,用邻菲罗啉比色法分析 Fe(II) 的浓度,用紫外-可见光谱仪 (UV-2700, Japan) 在 510nm 处检测溶液的吸光度。

1.3 样品表征

本实验对被微生物还原过后的水铁矿进行 XRD 分析,确定反应过程中水铁矿的晶型是否发生变化,并采用 XRD 分析 BC 结构组成特征.采用 FTIR (Thermo Fisher Is50, America) 分析不同 BC 和 DBC 的官能团组成,分析其氧化还原能力来源.通过 Zeta 电位仪 (Zetasizer Nano ZSE, Shanghai) 测定 BC 的 Zeta 电势以及粒径,了解 BC 的表面电荷性质以及粒径大小和粒径分布.采用 EPR (EMX 10/12, Bruker, Germany) 光谱分析法检测与 BC 相关的半醌类自由基.在 EPR 试管中加入固定数量的 (0.0015g) BC 颗粒. EPR 测量的主要参数为:微波频率 9.38GHz,微波功率 20dB (或 2.0mW),扫描宽度 200G,扫描时间 30ms.

用荧光分光光度计 (F-4600, Japan) 测量了 DBC 的荧光激发-发射光谱 (EEM), 其激发 (E_x) 波长为 200~450nm, 发射 (E_m) 波长为 250~500nm, 增量为 5nm^[14]. 在测量前用去离子水将 DBC 样品均匀稀释至 TOC 浓度为 20mgC/L. 每个样品以 2400nm/min 的速率进行了几次平行荧光扫描, 去除测量结果的瑞利和拉曼散射^[15].

在 180~800nm 范围内用紫外-可见光分光 (UV-Vis) 光度计测量 DBC 的吸光度, 以去离子水作为空白对照. 计算了所有 DBC 样品在 250 和 365nm 处的吸光度比 (即 E_2/E_3) 和光谱斜率 $S_{275-295}$ (即 $(A_{275}-A_{295})/20$) 值, 以此反映 DBC 分子芳香度和平均分子量 (Mw) 的变化. 在进行 UV-Vis 测量之前, 使用去离子水将 DBC 样品均匀稀释至 TOC 浓度为

20mgC/L, 以避免内部的过滤效应对其产生影响^[16]. 将每个温度下 DBC 的 254nm 处吸光度 (A_{254} , cm⁻¹) 除以各自的 TOC (mgC/L) 可得比紫外吸收度 ($SUVA_{254}$, L/(mgC·m))^[17].

1.4 数据处理

采用 Excel、Origin 2021 对所有原始数据进行分析. 所有实验重复 3 次, 实验数据均为 3 个平行样品测定的 (平均值 $\pm$ 标准差).

2 结果与讨论

2.1 BC 和 DBC 的表征

2.1.1 BC 和 DBC 的 FTIR 分析 采用 FTIR 分析了 BC 和 DBC 的表面官能团, 如图 1 所示, 可以发现 BC 和 DBC 具有较为相似的 FTIR 光谱, 但是一些特征吸收带存在显著的差异. 在 1098~1164cm⁻¹ 处的吸收带是纤维素和半纤维素中 C—O—C 键伸缩振动, 在 1430cm⁻¹ 的吸收带属于酚羟基, 在 1610cm⁻¹ 处属于芳香羧基/羰基 (C=O) 或醌基, 在 1696cm⁻¹ 处属于芳香 C=C 伸缩振动^[18]. 在 1098cm~1164cm⁻¹ 处, BC-400 的吸收带强度显著增加, 表明 BC-400 纤维素或半纤维素的含量最高. 随着温度的升高, 2858cm⁻¹ 和 2928cm⁻¹ 之间的芳香族 C—H 吸收带强度逐渐减弱, BC-500 几乎没有明显的吸收带, 说明高温热解下生物质分解更加彻底, 原有结构被破坏的程度更高. 在 1610cm⁻¹ 处的 BC-400 吸收带最强烈, BC-500 次之, BC-300 最弱, 这意味着相较于其他温度, BC-400 可能含有最多的醌基, 之前的研究认为, 天然有机质和热解生成的 BC 得失电子能力一部分来自于醌基^[19].

相比于 DBC-300 和 DBC-400, DBC-500 在 1610~1696cm⁻¹ 之间的吸收强度显著增强, 表明高温热解的 DBC 芳香度更高, 且 DBC-500 中含有更多的芳香羧基/羰基 (C=O) 或醌基. 此外, 对比 BC 和 DBC 的 FTIR 光谱, 可以发现 BC 的一些特征吸收带在 DBC 中消失, 如 1310、878、777 和 474cm⁻¹ 均属于芳香族 C—H 伸缩振动, 这表明相比于母体材料 BC, DBC 具有更低的芳香性.

2.1.2 BC 的 Zeta 电位、XRD 光谱和 EPR 表征 由表 1 可以看出, 3 种温度下制备的 BC 的 Zeta 电位在不同处理条件下均为负值, 即 BC 表面带有负电荷, 这是因为 BC 表面的一部分含氧官能团失去质子被

还原. BC-300、BC-400、BC-500 的 Zeta 电位分别为 (-33.38 ± 2.82) 、 (-34.42 ± 2.28) 和 $(-35.26\pm1.16)\text{mV}$, 可见 BC 的 Zeta 电位绝对值随着温度的增加呈现上升的趋势,这与前人的研究相一致^[20].而在培养基溶液中, BC-400 的 Zeta 电位绝对值最低,这可能是由于 BC-400 中的醌基含量最高,具有较强的给电子能力,因此可能失去一部分电子,从而使负电荷数量减少.此外还有研究表明,低温热解的 BC 胶体稳定性高于高温热解的 BC,这可能是因为低温热解得到的 BC 羧基含量更高,因此其表面带有更多的负电荷^[21].

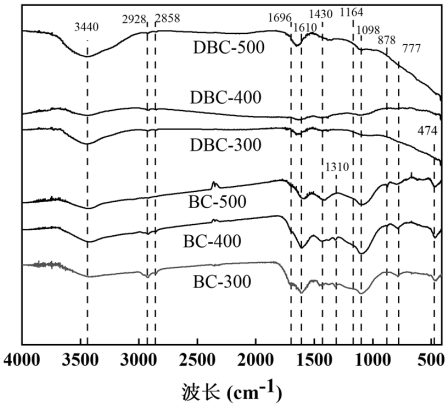


图1 不同热解温度下 BC 和 DBC 的 FTIR 光谱
Fig.1 FTIR spectra of BC and DBC prepared at different pyrolysis temperatures

表 1 BC 在水溶液和培养基中的 Zeta 电位

Table 1 Zeta potential of BC in aqueous solution and culture medium

样品	Zeta 电位(mV)
BC-300(水)	-33.38 ± 2.82
BC-300(培养基)	-14.37 ± 1.83
BC-400(水)	-34.42 ± 2.28
BC-400(培养基)	-12.17 ± 0.57
BC-500(水)	-35.26 ± 1.16
BC-500(培养基)	-16.57 ± 2.27

采用 XRD 对不同温度的 BC 进行分析,确定 BC 的物相组成及热解温度对 BC 结构的影响.如图 2 所示,在 $26^{\circ}\sim28^{\circ}$ 处观察到明显特征峰,代表 BC 非晶态结构的衍射峰,有研究表明这类非晶态结构衍射峰主要是与生物质中的纤维素晶体结构有关^[20].随着炭化温度从 300°C 升高到 500°C ,在 29.3° 、 45.3° 、 47.4° 和 48.6° 处的峰值增强,表明 BC 的 CaCO_3 含量增加.这是由于高温有利于生物质中的

纤维素、半纤维素、木质素等物质的分解,使得灰分含量增高,灰分的主要成分 CaCO_3 含量也随之增高.这也能在一定程度上解释为何 BC 主要呈碱性.虽然随着裂解温度的持续升高,官能团发生了变化,但除了峰的形状和强度有一些小的差异外, XRD 光谱没有明显的变化.

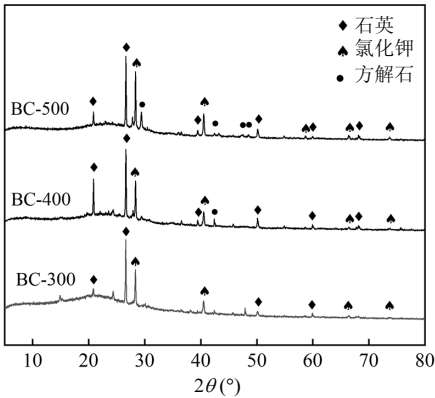


图2 不同热解温度下 BC 的 XRD 光谱
Fig.2 XRD spectra of BC prepared at different pyrolysis temperatures

为了进一步鉴定不同温度下制备的 BC 官能团之间的差异,本文对材料进行了 EPR 分析.之前已有研究证明,在 BC 介导的胞外电子传递过程中半醌自由基起着重要的作用^[22]. g 值是揭示有机自由基类型的典型参数,3 种 BC 均检测到了明显的 EPR 信号,且 g 值均为 2.0032.和不同类型的电子穿梭体的 g 值的研究相比,本实验所用的 BC g 值偏低:腐殖质的 g 值为 2.0037~2.0048^[23];Liao 等^[24]研究的以玉米秸秆、小麦秸秆和稻草为材料制备的 BC g 值为 2.0036~2.0053.通过 g 值可以判断物质所含的自由基情况,一般情况下碳中心自由基的 g 值小于 2.003,如石墨碳和多环芳香族碳自由基的 g 值分别为 2.0028 和 2.0026,氧中心自由基的 g 值大于 2.004,如半醌自由基的 g 值为 2.004^[10].如图 3 所示,本研究中 3 种 BC 主要以碳中心和氧中心的自由基组合,且这些自由基以芳香族碳为中心.这些自由基往往是半醌自由基和烷氧自由基,具有亲电性,很可能是强化微生物胞外电子转移的活性中心.不过考虑到 2.0032 的 g 值大于 2.0028 和 2.0026,水稻秸秆 BC 也可能含有少部分的半醌自由基,因为相比于其他的氧中心自由基,半醌自由基具有共振效应和更低的活化能,能够贡献一部分的碳中心自由基.与前人的

研究^[24]类似, BC 的 EPR 信号强度随着热解温度的升高而增强,表明 BC 中自由基的数量也随热解温度升高而增加,意味着高温热解的 BC 含有更多的芳香族碳和半醌自由基,因而具更高的氧化还原活性.

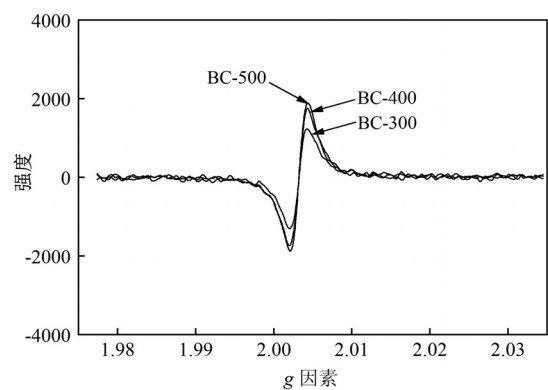


图 3 不同热解温度下 BC 的 EPR 信号
Fig.3 EPR signal of BC prepared at different pyrolysis temperatures

2.1.3 DBC 的紫外和 EEM 分析 随着热解温度的升高, DBC 溶出的比例逐渐降低,测得的 TOC 值从最高的 541.63mgC/降低至 90.6mgC/(图 4(a)),与以往研究报道的趋势一致.过去有研究表明来自水生和陆地环境中的溶解性有机物(DOM)分离物的 $SUVA_{254}$ 值与芳香度之间呈正相关^[25]. Xu 等^[26]假设非焦性 DOM 的 $SUVA_{254}$ 与通过 ^{13}C -NMR 测定的芳香度之间的线性关系也适用于 DBC,从而来估计 DBC 的芳香度.本文在此也采用该方法,根据这一关系, DBC 的芳香度百分比计算公式如下.

芳香度(%)=6.52 $SUVA_{254}$ +3.63 (1)

将所得 $SUVA_{254}$ 与温度的关系绘制成图(图 4(b)),可以发现 DBC 的芳香性随着温度的升高而增加,与 FTIR 结论相一致.此外,根据 DBC 的 UV-Vis 可以研究其有关分子量和芳香性的信息.实验测定了不同温度 DBC 的 UV-Vis (图 5(a)),与以往研究结果类似,其吸收光谱较宽且无特征峰,这可能是由于多个发色团吸收带的重叠^[27].

通过计算得到了所有 DBC 样品在 250 和 365nm 处的吸光度比(即 E_2/E_3),之前的研究表明,随着 DBC 分子量的增加, DBC 吸收向长波长方向转移^[28],即 E_2/E_3 比值会降低.如表 2 所示, DBC-500 的 E_2/E_3 比值最大, DBC-300 次之, DBC-400 最低,说明 DBC-500 的平均分子量最少.计算光谱斜率 $S_{275-295}$

值,可以看到 DBC-500 的 $S_{275-295}$ 值最大,从而也验证了低温 DBC 中含有较多的高分子量化合物,但随着热解温度的升高,它们被分解为低分子量化合物.但本文发现 DBC-400 的结果并不符合这一规律,之所以会出现这种结果,可能是因为 E_2/E_3 比值、 $S_{275-295}$ 值一开始是被用于评价 DOM 的分子量和芳香度,这揭示出 DBC 与 DOM 在分子结构方面存在差异性,因此,后续的工作应开发更加适合 DBC 分子的评价指标.研究结果表明随着热解温度的升高, DBC-500 中有机质分子量降低,芳香性增加,这也与 Xu 等^[26]的研究结果类似.

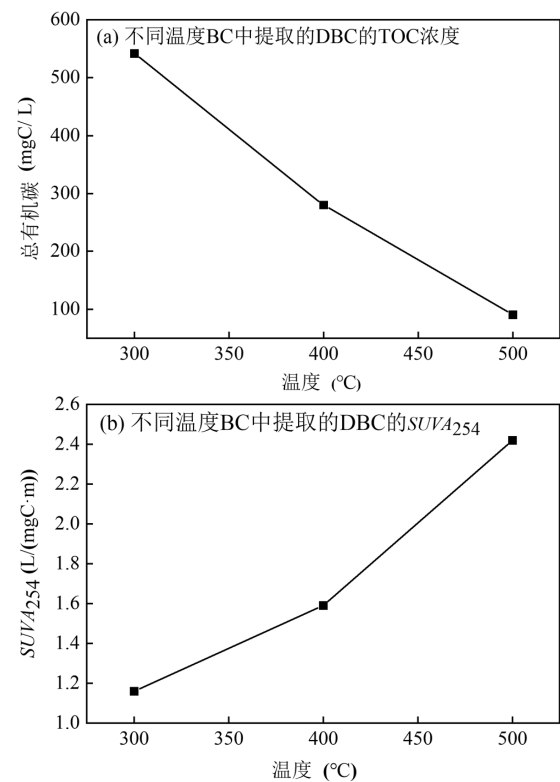


图 4 不同温度 BC 中所提取的 DBC 的 TOC 浓度及 $SUVA_{254}$
Fig.4 TOC concentration and $SUVA_{254}$ of DBC extracted from BC prepared at different pyrolysis temperatures

表 2 DBC 的 $SUVA_{254}$ 、 E_2/E_3 比值、 $S_{275-295}$ 值(表中所得数据均在 DBC 浓度为 20mgC/L 下测得)

Table 2 $SUVA_{254}$, E_2/E_3 ratio, and $S_{275-295}$ values of DBC (all data obtained in the table were measured at a DBC concentration of 20mgC/L)

DBC	$SUVA_{254}$ (L/(mgC·m ³))	$SUVA_{254}$ 芳香度 (%)	E_2/E_3	$S_{275-295}$
DBC-300	1.16	11.17	6.31	0.0023
DBC-400	1.59	14.01	5.88	0.0035
DBC-500	2.42	19.39	7.63	0.0057

为了正确地评估 DBC 的化学成分随热解温度的变化,本文对 DBC 进行了 EEM 的测量分析。如图 5(b~d)所示,突出的荧光信号证明了在制备的 DBC 样品中存在与腐殖质类、黄素类和蛋白类物质相关的官能团^[29]。可以注意到,随着热解温度的升高,DBC 样品的荧光强度开始减弱,DBC-500 样品的 EEM 荧光强度明显低于 DBC-300 和

DBC-400 样品。这些结果表明在较高的热解温度下,DBC 中的大分子物质可能转化为具有水溶性和氧化还原活性醌和苯酚等小分子物质^[30]。这也与通过 UV-Vis 表征(图 5(a))的结果一致即在较低热解温度下,DBC 中含有大量的高分子量化合物,但随着热解温度的增加,高分子量化合物被分解为低分子量化合物。

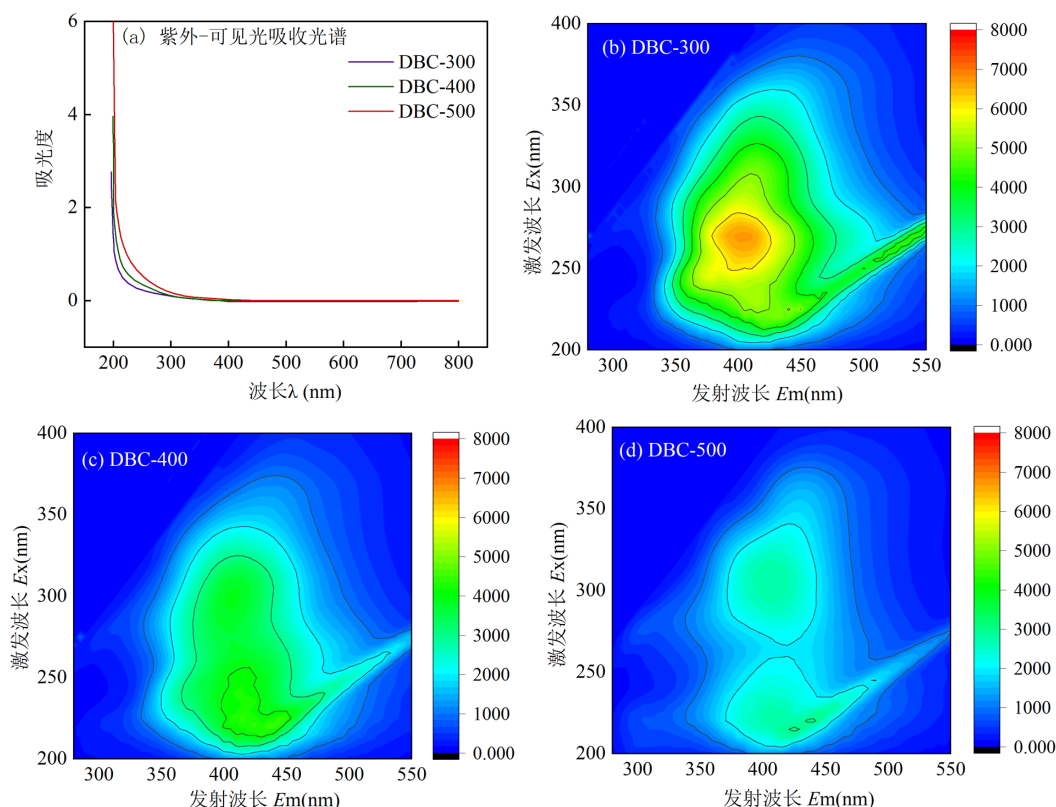


图 5 不同热解温度 DBC 溶液的紫外-可见光吸收光谱以及荧光激发-发射光谱

Fig.5 Ultraviolet-visible absorption spectra and fluorescence excitation-emission spectra of different DBC solutions

2.2 BC 在微生物还原水铁矿过程中的作用

以水铁矿为电子受体,PCA 菌为 Fe(III)还原菌和不同温度热解的 BC 进行了细胞悬液实验,以确定 BC 对微生物还原水铁矿的速率和程度的影响(图 6)。由图 6(a)和图 6(d)可以看出,培育 7d 后,在有 BC 和乙酸钠存在的情况下的 Fe(III)还原率明显高于不添加 BC 的对照组,其还原率在前 3d 保持上升的趋势,并在第 3d 时达到平衡,Fe(III)还原率最高达到了 3.91%,为不加入 BC 时的 12 倍。可见,BC 可以明显促进水铁矿的微生物还原。在 Kapper 等^[11]的研究中,在 5~10g/L BC 的存在下,超过 77%的水铁矿被还原,其还原率高于本实验,这可能由于本实验设置的 BC 浓度为 1g/L,远低于文献中 5~10g/L

的浓度设置,其次本实验设置的初始水铁矿浓度为 50mmol/L,而文献中初始水铁矿浓度为 15mmol/L。Yang 等^[31]的研究表明 BC 对微生物异化铁还原的促进作用需要一定的 BC/水铁矿比,以促进 PCA 菌通过 BC 直接转移到水铁矿,BC 对水铁矿和细胞的聚集会影响 BC 和矿物之间的相位接触,从而刺激或抑制微生物水铁矿的还原。此外,BC 的存在也增加了水铁矿的初始还原率。从图 6(a),(d)可以发现 BC 存在条件下,前 3d 内 Fe(III)初始还原率提高了 11.5 倍以上。

在本文中,经过 7d 的培育,在有 BC 存在和没有乙酸钠的情况下,加入 BC-400 时 Fe(III)还原量相对较高,加入 BC-300 或 BC-500 时 Fe(III)还原率仅为

0.55%~0.87%(图 6(b)),这表明 PCA 菌利用 BC 作为电子供体的效果较弱。

在没有乙酸钠的无细胞对照组中也观察到可忽略的还原量(图 6(c)),如在 7d 时的 Fe(III)还原率仅为 0.50%~0.85%,说明非生物过程在本文水铁矿的还原中所起的作用甚微.本文中 BC 可能主要作为电子穿梭体介导水铁矿的微生物还原:乙酸钠作为电子供体为 PCA 菌提供电子,BC 接受来自细菌的电子并传递给水铁矿,使得 PCA 菌得以完成 Fe 呼吸的过程.根据 BC 的原料和裂解温度,每克 BC 可以可逆地接受和提供多达 2mmol 电子^[32],进一步

支持了 BC 作为 Fe(III)还原细菌和 Fe(III)矿物之间的电子穿梭体的潜在作用. BC 的官能团包括酚羟基、羧基、C—O—C、C=O、芳香 C=C 等,已报道的与 BC 强化电子转移的电活性直接相关的主要有醌基、羧基、羰基,上文 FTIR 表征结果表明 BC-400 中含有较多的 C=O,较高的 C=O 含量可以作为 BC 中的主要的电子接收部分.此外,由于 BC 颗粒具有较大的比表面积,因此具有良好的吸附性能,在其表面可能会吸附细菌、水铁矿,从而缩短了细胞外电子转移所需的距离,进而促进了水铁矿中 Fe(III)的生物还原.

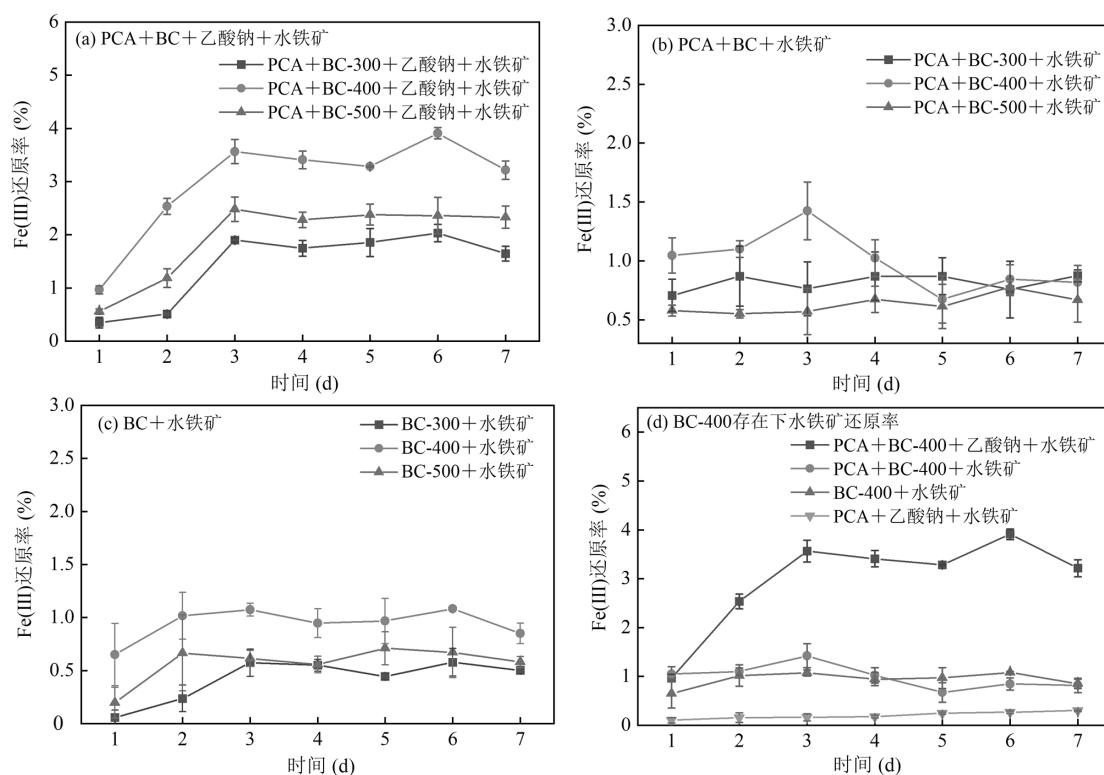


图 6 不同热解温度 BC 对水铁矿还原率的影响

Fig.6 Effects of BC prepared at different pyrolysis temperatures on the reduction of ferrihydrite

由图 6(a)可以看出,所有热解温度的 BC 都促进了水铁矿的还原.在中低温条件下,随着温度的升高 BC 促进微生物异化铁还原的能力先增加后减弱,加入 BC-400 时 Fe(III)的还原率最高为 3.91%, BC-500 次之为 2.48%, BC-300 最低为 2.03%,这与前人对温度影响 BC 氧化还原能力的研究结果类似^[33].这可能与 BC 的得失电子能力随裂解温度先增加后减小的趋势有关. BC 热解过程中产生的环境持久性自由基以及本身所含有的官能团和共轭 π 电子结构、导电性共同

决定着 BC 的得失电子能力,即影响 BC 介导微生物还原水铁矿中 Fe(III)的速率和程度. Song 等^[34]研究表明 C=O 含量与电子交换能力 (EEC) 呈正相关 ($R^2=0.934, P<0.0001$), 氧化还原活性 C=O 是 EEC 的显著贡献因素, 而从 FTIR 结果(图 1)可以得知 BC-400 在 1610cm^{-1} 处 C=O 吸收强度最高, 具有最多的羰基, 因而相较于其他温度的 BC, BC-400 促进 PCA 菌还原水铁矿中的 Fe(III)程度最高. 此外, 除了官能团的影响之外, BC 还可能通过共轭 π 电子结构传递电子, 随着

热解温度的增加, 醌类官能团的结构受到破坏, BC 中稠环芳香结构相关的共轭 π 电子结构具有导电性, 此时 BC 又能以类似导体的方式传递电子, 促进水铁矿还原, 相比于低温生成的无定形碳结构的 BC, 中高温的 BC 电阻更低且没有强烈的能量屏障, 因而会有更强的导电性^[18], 更能促进微生物的异化铁还原。

2.3 DBC 对水铁矿微生物还原的促进作用

如图 7(a)和(d)所示, 与未添加 DBC 的对照组相比, 在添加了 DBC、水铁矿、乙酸钠的条件下, 水铁矿的初始还原速率和 7d 时间内 Fe(III)的还原程度显著增强, 这表明 DBC 对微生物还原水铁矿具有较强的促进作用。对比不同热解温度的 DBC 的促进效果可以发现, DBC-300、DBC-400、DBC-500 在 7d 时间内的 Fe(III)最大还原程度分别为 1.14%、2.27%、2.85%, 其 Fe(III)还原程度随温度增高而增加, 但是 DBC-400 初始还原速率最大(0.0210mmol/(L·h)), DBC-300 的初始还原速率(0.0161mmol/(L·h))

居中, DBC-500 初始还原速率最小, 为 0.0103mmol/(L·h)。BC 的热解温度会对其 DBC 的氧化还原活性官能团的结构和数量产生影响, 进而影响其在促进微生物还原水铁矿时的效果。在未添加乙酸钠的实验中(图 7(b)), 可以看到, 3 种 DBC 展示出几乎相同的初始还原速率(0.0130~0.0159mmol/(L·h)), DBC-500 的 7d 时间还原程度较大(1.57%), 其他 DBC 的 7d 时间还原程度类似(0.39%和 0.43%)。这表明尽管不同热解温度可能会使得 DBC 中氧化还原活性官能团的结构和数量有所不同, 但在没有乙酸钠的情况下, 水铁矿的还原速率要慢得多。此外, 本文还探究非生物条件下 DBC 对 Fe(III)还原的影响, 结果如图 7(c)所示, 可以看出在非生物条件下 DBC 对水铁矿的还原作用在 1d 时间左右基本达到平衡, 3 个温度 DBC 的 Fe(II)平衡还原浓度大都在 0.09mmol/L 左右波动, 其还原率仅为 0.19%, 表明 DBC 难以直接化学还原水铁矿。

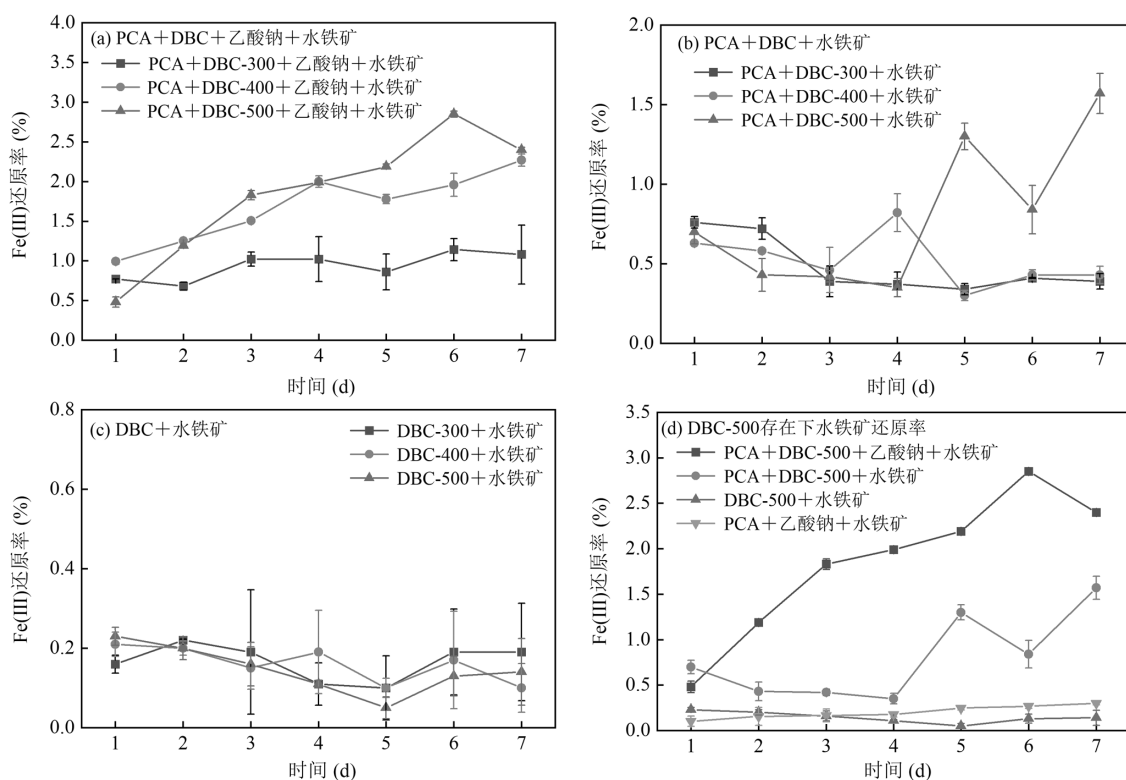


图 7 不同热解温度 DBC 对水铁矿还原的影响

Fig.7 Effects of different DBC on the reduction of ferrihydrite

为了便于比较 3 组数据, 本文选取还原效果最好的 DBC-500 在不同实验条件下的结果进行观察(图 7(d)), 可以看出, 在存在乙酸钠和 DBC-500 的条

件下, 水铁矿的微生物初始还原速率和 7d 还原程度远高于其他组。在存在 DBC-500 和没有乙酸钠的情况下, 水铁矿还原率为 1.57%, 明显低于添加乙酸钠

和 DBC-500 的情况,这部分还原可能是由于两种原因产生的: (1) DBC-500 对水铁矿进行化学(非生物)还原; (2) DBC-500 充当电子供体,从而辅助完成了微生物异化铁还原.考虑到非生物条件下 Fe(III) 还原率仅为 0.19%,占添加 DBC-500 和没有乙酸钠组的 12%左右,这说明 DBC-500 对水铁矿进行化学还原程度有限,因此本文推断在缺少电子供体的环境中, DBC-500 可以作为电子供体来促进水铁矿的微生物还原.在添加 DBC-500 但未接种微生物的情况下,只有极少量的 Fe(II) 产生,这表明在非生物条件下 DBC-500 促进水铁矿还原的效果十分有限,基本可以忽略.同时,本文对未用盐酸解吸的培养基溶液直接测量 Fe(II) 浓度,发现其浓度几乎为零,这说明反应产生的 Fe(II) 都吸附在矿物表面或者储存在矿物晶格中,而溶液中很少有游离态的 Fe(II) 存在.先前的研究表明腐殖质可以吸附 Fe(II) 并且可以吸附到水铁矿矿物上,通过阻止水铁矿表面钝化,导致 Fe(III) 还原程度增加^[34].

DBC 的氧化还原特性与 BC 中的可溶性分子有关,包括醌类和酚类^[35].先前的研究^[34]也表明了氧化还原活性氧官能团在微生物还原过程中促进电子转移时发挥了至关重要的作用,尤其是 Xu 等^[10]的实验发现, DBC 与 *S. MR-1* 菌接触反应后,半醌自由基的 EPR 信号明显增强,进一步支持了半醌自由基在细胞外电子传递过程中的潜在关键作用. BC 热解过程中产生的醌类和芳香族分子被认为具有氧化还原活性,确保了 DBC 的电子交换能力^[36]. Zhang 等^[13]研究也表明醌和芳香基团对 DBC 的氧化还原活性贡献极大,且 DBC 中的醌和芳香基团随着热解温度的升高而增加,达到 500°C 后随着温度的持续升高而降低.上述对 DBC 的 FTIR 和 UV-Vis 表征结果表明 DBC-500 相比 DBC-300 和 DBC-400 具有较高的芳香性,与 Zhang 等^[13]的研究结论一致,这一结论也解释了为何 DBC-500 的 Fe(III) 还原率最高.

这些结果表明, DBC 在 Fe(III) 的微生物还原过程中有着非常重要的作用,不仅提高了水铁矿的长期(7d)还原程度,而且还提高了其初始还原速率,研究结果与 Xu 等^[10]的结论类似.但在 Kapper 等^[11]的实验中 DBC 没有显著的还原能力,表明 DBC 向 Fe(III) 的电子转移可以忽略不计.之所以会出现这样的结果,可能跟其实验条件有关, Kappler 等^[11]的研

究中所用的原材料为木屑,热解温度设为 620°C,而最近的研究^[26]表明原料为木材的 BC 中可溶组分本身就比较少,较高的热解温度会导致其可溶组分进一步分解,当热解温度高于 500°C 时, DBC 的电子转移能力会急剧下降.此外之前的研究中还对提取的 DBC 进行高温灭菌,进一步导致了可溶性组分的分解.而在另一项研究中^[34],也没有发现 DBC 对微生物还原水铁矿过程产生促进作用,这是因为在该实验中利用硝酸溶液来预处理氧化,这个过程本身就是萃取过程, BC 中的可溶组分被转移到硝酸溶液中了,因此,后续再用超纯水就很难再从 BC 中提取出 DBC.

2.4 微生物还原过程中水铁矿晶型的转变

除了对 Fe(III) 还原速率和程度产生影响外, DBC 在微生物还原水铁矿过程中也影响了次生矿物的形成.通过 XRD (图 8)的分析发现,磁铁矿(Fe_3O_4)和蓝铁矿($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$)是水铁矿在前 7d 内形成的主要矿物相,也有一些菱铁矿(FeCO_3)产生.12d 后,所形成的矿物几乎全是蓝铁矿. Bauer 等^[37]发现,电子从还原腐殖酸转移到不同 Fe(III) 矿物的程度取决于矿物的特性,因此可能取决于 Fe(III) 矿物作为电子受体的氧化还原电位.还原过程中存在的 Fe(II) 的量和 Fe(II) 的形成速率控制着水铁矿晶型的转变.

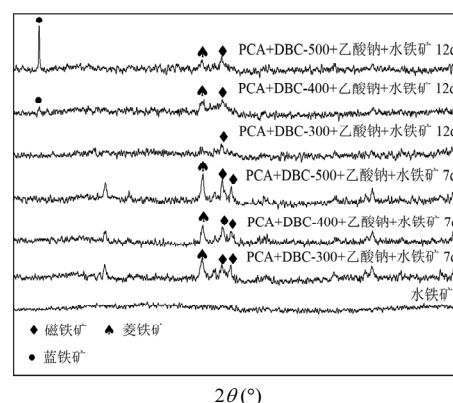


图 8 DBC 存在下微生物还原前后水铁矿 XRD 图谱
Fig.8 The XRD spectra of product minerals before and after microbial reduction in the presence of DBC

此外, Fe(III) 微生物还原过程中诱导产生的次生矿物类型还与培养体系中的阴离子类型(CO_3^{2-} 、 PO_4^{3-})密切相关,并受这些阴离子相对含量的控制,

如碳酸氢盐或磷酸盐可导致营养物质和微量金属的吸附差异,以及土壤矿质反应性的变化.当使用 PIPES 作为缓冲液时,水铁矿还原的最终产物为磁铁矿^[38].在含有碳酸氢盐的缓冲液中,水铁矿很容易还原为磁铁矿和菱铁矿.当培养基中存在磷酸盐时,容易形成蓝铁矿.矿物质的适度还原,会导致表面结合的痕量金属的释放,或形成吸附在 Fe(III)矿物表面的高活性 Fe(II)物种,这可能会参与进一步的氧化还原反应.而且,对比不同 DBC 的结果可以发现,无论是还原 7d 还是 12d,在添加 DBC-500 的情况下均测得了较窄的晶体半峰宽度,这说明 DBC-500 有着更高的氧化还原活性,促进了更多的水铁矿物被还原.

3 结论

3.1 BC 和 DBC 都可以促进水铁矿的微生物还原,BC 作为电子供体促进 PCA 菌还原 Fe(III)的能力较弱,而作为电子穿梭体,能够有效的促进电子由微生物转移到电子受体的过程,从而提高 Fe(III)的还原率.

3.2 在加入 BC-400 时, Fe(III)的还原率最高,为不加入 BC 时的 12 倍.可能是因为 BC-400 含有最多的醌基、酚基基团. BC 颗粒对 Fe(II)的吸附可以提高水铁矿的长期还原效果.

3.3 DBC 能促进微生物还原水铁矿的程度和速率,在 20mgC/L DBC 的存在下,水铁矿的长期微生物异化铁还原程度和初始还原速率分别增加了 10 倍和 2 倍以上.而在缺少电子供体的情况下, DBC-500 在一定程度上可以充当电子供体,但是非生物还原过程对水铁矿的还原促进作用十分有限,几乎可以忽略.

3.4 DBC 的添加还改变了次生矿物形成的类型,在 DBC 存在条件下,磁铁矿 (Fe₃O₄) 和蓝铁矿 (Fe₃(PO₄)₂·8H₂O)是水铁矿在前 7d 内形成的主要矿物相,12d 后,水铁矿所形成的矿物几乎全是蓝铁矿.

参考文献:

- [1] Lu Y, Hu Y, Tang L, et al. Effects and mechanisms of modified biochars on microbial iron reduction of *Geobacter sulfurreducens* [J]. Chemosphere, 2021,283:130983.
- [2] Navrotsky A, Mazeina L, Majzlan J. Size-driven structural and thermodynamic complexity in iron oxides [J]. Science, 2008,319(5870):1635-1638.
- [3] Borch T, Kretzschmar R, Kappler A, et al. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics [J]. Environmental Science and Technology, 2010,44(1):15-23.
- [4] An W H, Wu C, Xue S G, et al. Effects of biochar on the arsenic and mineral transformation in the reduction process of As(III)-adsorbed ferrihydrite [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2021,41(9):3497-3512.
- [5] Cayuela M L, Sánchez-Monedero M A, Roig A, et al. Biochar and denitrification in soils: when, how much and why does biochar reduce N₂O emissions? [J]. Scientific Reports, 2013,3:1732.
- [6] Yu L, Yuan Y, Tang J, et al. Biochar as an electron shuttle for reductive dechlorination of pentachlorophenol by *Geobacter sulfurreducens* [J]. Scientific Reports, 2015,5:16221.
- [7] Chen S, Rotaru A E, Shrestha P M, et al. Promoting interspecies electron transfer with biochar [J]. Scientific Reports, 2014,4(5019):5019.
- [8] Xu X, Huang H, Zhang Y, et al. Biochar as both electron donor and electron shuttle for the reduction transformation of Cr(VI) during its sorption [J]. Environmental Pollution, 2019,244(1):423-430.
- [9] Saquing J M, Yu Y H, Chiu P C, et al. Wood-derived black carbon (biochar) as a microbial electron donor and acceptor [J]. Environmental Science and Technology Letters, 2016,3(2):62-66.
- [10] Xu S, Adhikari D, Huang R, et al. Biochar-facilitated microbial reduction of hematite [J]. Environmental Science and Technology, 2016,50(5):2389-2395.
- [11] Kapper A, Wuestner M L, Ruecker A, et al. Biochar as an electron shuttle between bacteria and Fe(III) minerals [J]. Environmental Science and Technology Letters, 2014,1(8):339-344.
- [12] Mukherjee A, Zimmerman A R. Organic carbon and nutrient release from a range of laboratory-produced biochars and biochar-soil mixtures [J]. Geoderma, 2013,193-194:122-130.
- [13] Zhang B, Zhou S, Zhou L, et al. Pyrolysis temperature-dependent electron transfer capacities of dissolved organic matters derived from wheat straw biochar [J]. Science of the Total Environment, 2019,(696):133895.
- [14] Guéguen C, Cuss C W. Characterization of aquatic dissolved organic matter by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to UV-Visible diode array and excitation emission matrix fluorescence [J]. Journal of Chromatography A, 2011,1218(27):4188-4198.
- [15] Stedmon C A, Bro R. Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial: fluorescence-parafac analysis of DOM [J]. Limnology and oceanography, methods, 2008,6(11):572-579.
- [16] Wu J, Hua Z, Yao Q S, et al. Toward understanding the role of individual fluorescent components in DOM-metal binding [J]. Journal of Hazardous Materials, 2012,215-216(May 15):294-301.
- [17] Matilainen A, Gjessing E T, Lahtinen T, et al. An overview of the methods used in the characterization of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment [J]. Chemosphere, 2011,83(11):1431-1442.
- [18] 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(1):1-12.
- [19] Scott D T, Mcknight D M, Blunt-Harris E L, et al. Quinone moieties

- act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms [J]. Environmental Science and Technology, 1998,32(19):372-372.
- [20] Keiluweit M, Nico P S, Johnson M G, et al. Dynamic molecular structure of plant biomass-derived black carbon (biochar) [J]. Environmental Science and Technology, 2010,44(4):1247-1253.
- [21] Liu G, Hao Z, Jiang Z, et al. Effects of biochar input on the properties of soil nanoparticles and dispersion/sedimentation of natural mineral nanoparticles in aqueous phase [J]. Science of The Total Environment, 2018,634(SEP.1):595-605.
- [22] Lies D P, Hernandez M E, Kappler A, et al. *Shewanella oneidensis* MR-luses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005,71(8):4414-4426.
- [23] Uchimiya M, Stone A T. Reversible redox chemistry of quinones: Impact on biogeochemical cycles [J]. Chemosphere, 2009,77(4):451-458.
- [24] Liao S, Pan B, Li H, et al. Detecting free radicals in biochars and determining their ability to inhibit the germination and growth of corn, wheat and rice seedlings [J]. Environmental Science and Technology, 2014,48(15):8581-8587.
- [25] Weishaar J L, Aiken G R, Bergamaschi B A, et al. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon [J]. Environmental Science and Technology, 2003,37(20):4702-4708.
- [26] Xu W, Walpen N, Keiluweit M, et al. Redox properties of pyrogenic dissolved organic matter (pyDOM) from biomass-derived chars [J]. Environmental Science and Technology, 2021,55(16):11434-11444.
- [27] He Z, Mao J, Honeycutt C W, et al. Characterization of plant-derived water extractable organic matter by multiple spectroscopic techniques [J]. Biology and Fertility of Soils, 2009,45(6):609-616.
- [28] Haan H D, Boer T D. Applicability of light absorbance and fluorescence as measures of concentration and molecular size of dissolved organic carbon in humic Lake Tjeukemeer [J]. Water Research, 1987,21(6):731-734.
- [29] Rajapaksha A U, Yong S, El-Naaggar A, et al. Dissolved organic matter characterization of biochars produced from different feedstock materials [J]. Journal of Environmental Management, 2018,233:393-399.
- [30] Ishii S, Boyer T H. Behavior of reoccurring PARAFAC components in fluorescent dissolved organic matter in natural and engineered systems: a critical review [J]. Environmental Science and Technology, 2012,46(4):2006-2017.
- [31] 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, 2019, 703:135515.
- [32] Kluepfel L, Keiluweit M, Kleber M, et al. Redox properties of plant biomass-derived black carbon (biochar) [J]. Environmental Science and Technology, 2014,48(10):5601-5611.
- [33] Ahmad M, Lee S S, Dou X M, et al. Effects of pyrolysis temperature on soybean stover- and peanut shell-derived biochar properties and TCE adsorption in water [J]. Bioresource Technol, 2012,118(-): 536-544.
- [34] Song W, Fang G, Wang Y, et al. Redox-active oxygen-containing functional groups in activated carbon facilitate microbial reduction of ferrihydrite [J]. Environmental Science and Technology, 2017,51(17): 9709-9717.
- [35] Sharpless C M, Aeschbacher M, Page S E, et al. Photooxidation-induced changes in optical, electrochemical, and photochemical properties of humic substances [J]. Environmental Science and Technology, 2014,48(5):2688-2696.
- [36] Zhang Y, Xu X, Cao L, et al. Characterization and quantification of electron donating capacity and its structure dependence in biochar derived from three waste biomasses [J]. Chemosphere, 2018,211 (11):1073-1081.
- [37] Bauer I, Kappler A. Rates and extent of reduction of Fe(III) compounds and O₂ by humic substances [J]. Environmental Science and Technology, 2009,43(13):4902-4908.
- [38] Li X, Liu T, Li F, et al. Reduction of structural Fe(III) in oxyhydroxides by *Shewanella decolorationis* S₁₂ and characterization of the surface properties of iron minerals [J]. Journal of Soils and Sediments, 2012,12(2):217-227.

作者简介: 夏金霞(1998-),女,吉林蛟河人,华北电力大学硕士研究生,主要从事生物炭和土壤碳的环境地球化学行为研究. 120212232027@ncepu.edu.cn.