



磁铁矿对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 厌氧还原甲基橙性能的影响

刘鑫珍^{1,2}, 李惠民², 赵刚², 樊艳春², 梅子奇², 周雨柔^{1,2}, 曾晓丽^{1,2}, 胡春华^{1*}

1 南昌大学资源与环境学院, 江西 南昌 330031

2 江西省生态环境科学研究与规划院, 江西 南昌 330000

刘鑫珍, 李惠民, 赵刚, 樊艳春, 梅子奇, 周雨柔, 曾晓丽, 胡春华. 磁铁矿对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 厌氧还原甲基橙性能的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 2091-2103.

LIU Xinzhen, LI Huimin, ZHAO Gang, FAN Yanchun, MEI Ziqi, ZHOU Yurou, ZENG Xiaoli, HU Chunhua. Effect of magnetite on the performance of anaerobic reduction of methyl orange by *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 2091-2103.

摘要:【目的】在微生物对染料的厌氧还原转化过程中, 前人研究发现磁铁矿可以作为胞外电子传递介质提高或降低染料的微生物还原速率, 这两种截然不同的作用结果背后的作用机制仍亟待阐明。【方法】利用水热法合成磁铁矿, 选择甲基橙作为微生物胞外还原的典型偶氮染料, 研究磁铁矿对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 厌氧还原甲基橙(methyl orange, MO)的影响。【结果】研究发现磁铁矿对 MO 的降解表现出明显的浓度依赖性效应: 同只添加细菌组相比, 低浓度组(20–50 mg/L) MO 的脱色效率提高了 4.07%–10.64%, 而高浓度组(100–200 mg/L)下降了 3.92%–18.35%。进一步研究发现磁铁矿浓度变化对 MO 微生物还原的影响与染料在矿物表面的分配无关, 主要体现在影响细胞表面形态、代谢活性和电子传递效率等方面。低浓度组 ATP 生成量提高了 1.08%–7.65%, 生成了 0.033–0.051 mg/L Fe²⁺, 而高浓度组 ATP 生成量降低了 38.74%–60.14%, Fe²⁺浓度增至 0.091 mg/L。此外, 外源 Fe²⁺的实验结果证明 Fe²⁺对 MO 的厌氧还原同样表现出低浓度(0.01–0.02 mg/L)促进, 高浓度(>0.05 mg/L)抑制的影响趋势。【结论】低浓度磁铁矿未影响细菌细胞形态, 提高了细胞代谢活性, 体系中少量的溶解态 Fe²⁺有利于 MO 微生物还原, 而高浓度磁铁矿则表现出相反的影响趋势。本研究为全面理解磁铁矿对胞外电子传递的影响及其在有机污染物还原转化中的应用提供

资助项目: 江西省自然科学基金(20212BAB203026); 国家自然科学基金(41663002)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20212BAB203026) and the National Natural Science Foundation of China (41663002).

*Corresponding author. E-mail: nchuchunhua@163.com

Received: 2023-09-07; Accepted: 2023-11-16; Published online: 2023-11-23

了参考。

关键词：磁铁矿；胞外电子传递； Fe^{2+} ；甲基橙；厌氧还原

Effect of magnetite on the performance of anaerobic reduction of methyl orange by *Shewanella oneidensis* MR-1

LIU Xinzhen^{1,2}, LI Huimin², ZHAO Gang², FAN Yanchun², MEI Ziqi², ZHOU Yurou^{1,2}, ZENG Xiaoli^{1,2}, HU Chunhua^{1*}

1 School of Resources and Environment, Nanchang University, Nanchang 330031, Jiangxi, China

2 Jiangxi Academy of Eco-environmental Sciences and Planning, Nanchang 330000, Jiangxi, China

Abstract: [Objective] Studies have discovered that magnetite could be used as an extracellular electron transfer mediator to increase or decrease the microbial reduction rate of dyes. However, the mechanisms underlying these two distinct results remain to be elucidated. **[Methods]** In this study, magnetite was synthesized by the hydrothermal method and used for the anaerobic reduction of methyl orange (MO), a typical azo dye, by *Shewanella oneidensis* MR-1. **[Results]** Magnetite exerted concentration-dependent effects on the degradation of MO. Specifically, low concentrations (20–50 mg/L) of magnetite increased the decolorization efficiency of MO by 4.07%–10.64%, while high concentrations (100–200 mg/L) of magnetite decreased the efficiency by 3.92%–18.35%, compared with the group with only bacteria for degradation. Furthermore, the changes in magnetite concentration affected cell surface morphology, metabolic activity, and electron transfer efficiency rather than the distribution of dyes on the microbial surface in the microbial reduction of MO. Low concentrations of magnetite increased ATP production by 1.08%–7.65% and led to the production of 0.033–0.051 mg/L Fe^{2+} , while the high concentrations of magnetite decreased ATP production by 38.74%–60.14% and increased Fe^{2+} concentration to 0.091 mg/L. In addition, exogenous Fe^{2+} showed similar concentration-dependent effects on the anaerobic reduction of MO, i.e., promoting the MO reduction at low concentrations (0.01–0.02 mg/L) and inhibiting the reduction at high concentrations (>0.05 mg/L). **[Conclusion]** Low concentrations of magnetite did not affect the bacterial cell morphology and improved the cell metabolic activity. A small amount of dissolved Fe^{2+} in the system favored the reduction of MO by bacteria, whereas high concentrations of magnetite showed an opposite influencing trend. This work enriches our understanding about the effect of magnetite on extracellular electron transfer and its application in the reductive transformation of organic pollutants.

Keywords: magnetite; extracellular electron transport; Fe^{2+} ; methyl orange; anaerobic reduction

合成偶氮染料具有毒性、致突变性和致癌性，排放到环境之前须对其进行处理，以降低毒

性水平和环境污染风险。目前已有多种物理、化学和生物方法来处理偶氮染料废水，其中生物降

解被认为是经济高效且环境友好的方法^[1]。研究普遍认为厌氧条件下偶氮染料生物降解过程中的关键限速步骤是厌氧脱色非特异性的电子传递过程,染料能够接收被厌氧脱色细菌传递到胞外的电子进而被还原转化^[2]。通过导电材料来促进微生物的胞外电子传递效率,是加快偶氮染料生物降解的潜在解决方案^[3]。

磁铁矿是一种环境中广泛存在的良好导电矿物,它可以作为微生物的末端电子受体和微生物之间的电子传导介质影响微生物的生长代谢,被广泛用于增强厌氧生物降解中的胞外电子传递过程(extracellular electron transport, EET)^[4-6]。尽管由磁铁矿介导的 EET 似乎是增强污染物生物降解的潜在技术,但关于外源性磁铁矿对微生物活性乃至胞外电子传递的影响仍存在争议。如有研究发现在厌氧消化和染料厌氧还原过程中,甲烷的产率和染料的还原效率均随着磁铁矿添加量的增加呈先促进后抑制的趋势,表明高剂量的磁铁矿可能会破坏细胞功能,从而抑制了微生物的活性^[7-9]。之前的研究主要集中在外源性磁铁矿对有机污染物微生物降解的加强效应上,而关于磁铁矿对有机污染物微生物降解的抑制作用机制并未进一步阐明。此外,有研究表明材料的吸附作用可能影响环境中有机污染物的生物利用度^[10],认为在大多数污染物的生物降解过程受污染物生物利用度程度的限制^[11]。因此,关于磁铁矿对污染物的吸附及其对污染物微生物降解的影响尚需明确。

本研究选择甲基橙(methyl orange, MO)和奥奈达希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis*) MR-1 作为典型偶氮染料和模式菌株,在实验室中水热合成磁铁矿,分析不同浓度磁铁矿存在条件下 MO 还原脱色速率与磁铁矿吸附效率、Fe²⁺生成、细菌代谢活性等因素之间的内在联系。研究结果将为探索铁氧化物等导电材料用于有机污染物的

还原转化过程提供参考。

1 材料与方法

1.1 磁铁矿合成及表面形态结构表征

本研究使用的磁铁矿采用水热法在实验室合成^[12],烘干后研磨成粉末状,再过 100 目筛后收集备用。通过 X 射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD)定性分析物质分子结构;使用冷场发射扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM) (Hitachi)和场发射透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)观察磁铁矿的表面形貌和微观结构;采用激光粒度仪(Malvern)、zeta 电位分析仪(Malvern)对磁铁矿粒度和电位进行物理化学性能表征;使用傅里叶红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR) (Thermo Fisher)和 X 射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectrometer, XPS) (Thermo Fisher)对磁铁矿的结构信息进行分析。

1.2 奥奈达希瓦氏菌 MR-1 和培养条件

研究使用的奥奈达希瓦氏菌 MR-1 由华中农业大学资源与环境学院提供。将该菌株在 LB 培养基中活化并扩大培养,在 30 °C 下进行好氧培养到对数生长期后期,5 000 r/min 离心 10 min 收获,用 50 mmol/L N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, HEPES)缓冲溶液洗涤 2 次后,将菌液细胞密度(OD_{600})调节至 1.0 后用于后续实验使用^[13]。HEPES 缓冲溶液用 2 mmol/L NaOH 溶液将 pH 调节至 7.0 左右。

1.3 奥奈达希瓦氏菌 MR-1 对甲基橙的厌氧脱色

分别加入已灭菌的乳酸钠 2 mL 和 MO 5 mL 于 22 mL 含隔垫棕色螺纹瓶中,乳酸钠和 MO 的最终浓度为 10 mmol/L 和 1 mmol/L。然后加

入不同质量的磁铁矿悬浮液(预先超声处理 10 min),使体系中最终质量浓度为 20、50、100、200 mg/L,最后加入 HEPEs 溶液和培养好的 OD_{600} 为 1.0 的菌液 1.0 mL,使体系最终体积为 10 mL,每组设置 3 个平行实验。氮吹 20 min 后置于 28 °C、200 r/min 恒温振荡培养箱(江苏正基仪器有限公司)培养,利用一次性注射器定时吸取 1 mL 体系内液体并装入试管中,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液检测 MO 浓度变化^[13]。MO 含量采用酶标仪(Thermo Scientific)在 465 nm 波长处测定,去除效率按公式(1)计算。

$$R = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

式中: R 为去除率,%; A_0 为 0 h 吸光度测定值; A_i 为 i h 吸光度测定值。

1.4 磁铁矿等温吸附实验

分别加入不同体积 MO 溶液于 50 mL 三角锥形瓶中,使初始浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mmol/L,加入磁铁矿 200 mg,于恒温振荡培养箱中振荡 4 h 后取出,计算去除效率和吸附容量。磁铁矿对 MO 的吸附容量(q_e)和吸附效率(R)通过公式(2-3)计算。实验设置 3 组平行样测试,再取平均值。

$$q_e = \frac{V \times (C_e - C_0)}{m} \quad \text{公式(2)}$$

$$R = \frac{(C_e - C_0)}{C_0} \times 100\% \quad \text{公式(3)}$$

式中: C_e 为吸附平衡时的溶质浓度, mg/L; C_0 为吸附前溶质的初始浓度, mg/L; m 为吸附剂的质量, g; V 为溶液的体积, L。

研究拟采用 Langmuir 和 Freundlich 吸附模型对吸附质在吸附剂上的吸附特征进行分析,以了解吸附材料的表面性质、吸附材料与吸附质之间的作用力等。两个模型的线性表达式见公式(4-5)。

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_{max}} + \frac{1}{q_{max} \times b} \quad \text{公式(4)}$$

式中: q_e 为实际饱和吸附量, mg/g; q_{max} 为理论饱和吸附量, mg/g; b 为 Langmuir 吸附系数。以 C_e 为横坐标, C_e/q_e 为纵坐标作图,所得斜率和截距即可求得 q_{max} 和 b 。

$$\ln q_e = \frac{\ln C_e}{n} + \ln K_F \quad \text{公式(5)}$$

式中: n 为与吸附强度有关的参数; K_F 为 Freundlich 吸附平衡常数, mg/g。以 $\ln C_e$ 为横坐标, $\ln q_e$ 为纵坐标作图,所得斜率和截距即可求得 n 和 K_F 。

1.5 细胞形态观察和细胞代谢

对细胞、氧化铁-细胞进行扫描电子显微镜(SEM)项目分析,以观察细胞形态及氧化铁在细菌表面的吸附状况、对细菌细胞膜结构的影响等。使用 Bac Titer-Glo 试剂盒检测奥奈达希瓦氏菌 MR-1 的 ATP 产量以评价代谢活性。离心收集细菌细胞,用 HEPES 缓冲溶液洗涤 2 次。在不渗透的 96 孔板中,每孔加入 50 μ L 的细菌悬液,然后加入等量的 ATP 试剂盒。摇晃 5 min 后,用多功能酶标仪(Thermo Scientific)检测荧光强度(relative light unit, RLU)^[14]。

1.6 溶解 Fe^{2+} 对甲基橙厌氧脱色的影响

加入磁铁矿和菌液于 22 mL 含隔垫棕色螺旋纹瓶中,氮吹 20 min 后置于 28 °C、200 r/min 恒温振荡培养箱培养 20 h,分别在 0、2、4、8、20 h 取样测定 Fe^{2+} 含量。然后再加入乳酸钠、HEPES 缓冲溶液和 MO 溶液,氮吹 20 min 后置于 28 °C、200 r/min 恒温振荡培养箱培养,定时取样测定 MO 含量。同时采用 $FeCl_2$ 测定 Fe^{2+} 对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 厌氧脱色能力的影响,实验体系中 Fe^{2+} 最终浓度分别为 0、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 mg/L。 Fe^{2+} 含量采用邻菲罗啉分光光度法测定,于酶标仪 510 nm 波长处测吸光度。

2 结果与讨论

2.1 磁铁矿合成及表面形态结构表征

对实验合成所得磁铁矿粉末进行表征。XRD 谱图显示(图 1), 在 2θ 为 30° 、 35° 、 43° 、 53° 、 57° 和 63° 时分别出现明显的特征峰, 和磁铁矿标准样品的标准卡片图谱(JCPDS: 19-0629)较为一致, 且与磁铁矿晶体的(220)、(311)、(400)、(422)、(511)和(440)晶面相符合^[15], 表明通过水热法制得的磁铁矿较为成功。

SEM 及 TEM 结果显示(图 2), 合成磁铁矿大多呈规则的四面体形或八面体形, 粒径分布较均匀, 为典型的磁铁矿颗粒形状, 平均粒径为 245 nm (表 1)。此外, 通过测定磁铁矿的 zeta 电位分析了其表面带电性能(表 1)。磁铁矿通常在

酸性条件下带正电荷, 而在碱性条件下带负电荷, 测试结果也与该结论^[16]一致。

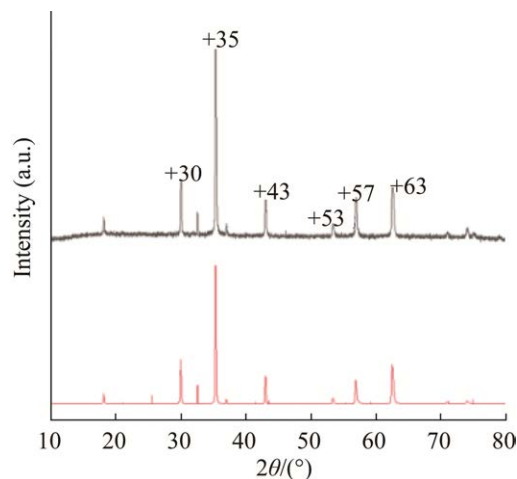


图 1 磁铁矿 XRD 谱图

Figure 1 The XRD spectrum of magnetite.

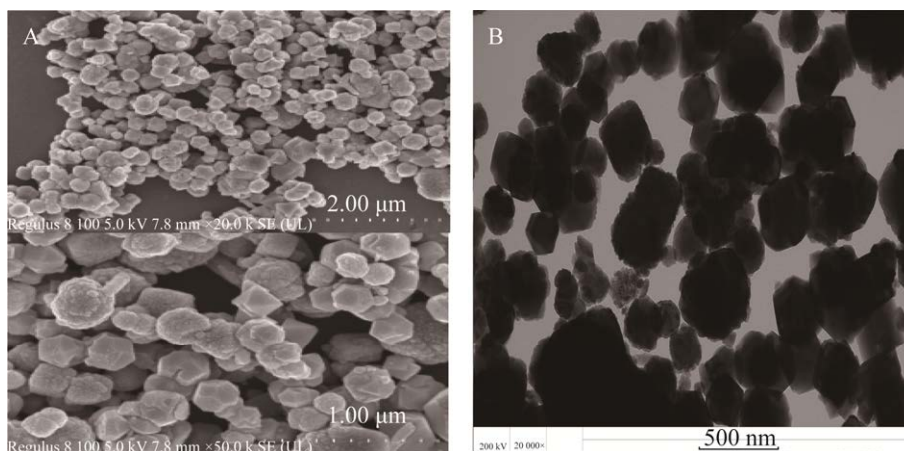


图 2 磁铁矿 SEM (A)和 TEM (B)

Figure 2 The SEM (A) and TEM (B) scans of magnetite.

表 1 磁铁矿理化性能

Table 1 Physical and chemical properties of magnetite

Sequence number	Particle size (nm)	Zeta electric potential (mV)					
		pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
1	246	18.40	11.60	7.57	1.74	-4.34	-10.4
2	240	17.30	11.80	6.77	2.86	-3.43	-9.46
3	249	17.40	12.20	6.41	3.59	-3.04	-10.70
Average value	245	17.70	17.87	6.92	3.06	-3.60	-10.19
Standard deviation	4.58	0.61	0.31	0.59	0.46	0.67	0.65

XPS 光谱图不仅能对测定磁铁矿材料定性、定量地分析所含元素种类及含量,还能对各元素的价态进行分析。分析结果得知磁铁矿中所含元素主要为 Fe 原子(22.65%)、O 原子(53.47%)和 C 原子(23.88%)。Fe2p 区域谱图中(图 3B),位于 711 eV 和 720 eV 的特征峰是 Fe_3O_4 的 Fe2p_{3/2}, 而 725 eV 处的特征峰是属于 Fe_3O_4 的 Fe p_{1/2}, Fe2p_{3/2} 的不同峰代表了 Fe_3O_4 的八面体配位或四面体配位^[17]。图 3C 显示了磁铁矿的 O1s 区域

谱图,位于 530 eV 的峰为磁铁矿的特征峰^[18],此外无其他特征峰,也进一步表明了制备磁铁矿具有较高的纯度。

通过 FTIR 光谱图(图 4)可以对磁铁矿的化学键和分子结构进行分析,FTIR 光谱图显示在 410 cm^{-1} 和 580 cm^{-1} 处存在磁铁矿的特征峰,即 Fe_3O_4 八面体基团($\text{Fe}^{3+}-\text{O}^{2-}$)伸缩振动峰(410 cm^{-1} 带)和 Fe_3O_4 四面体基团($\text{Fe}^{3+}-\text{O}^{2-}$)伸缩振动峰(580 cm^{-1} 带)^[18],此外无其他明显特征峰。

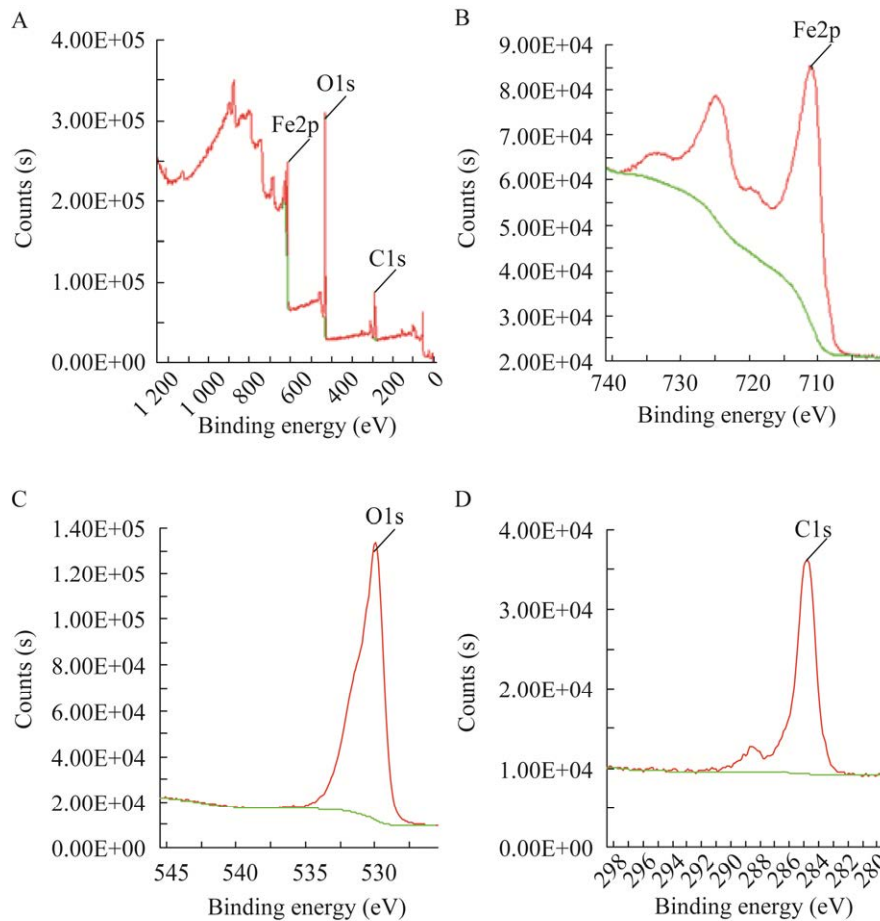


图 3 磁铁矿 XPS 总谱图(A)、Fe2p 区域谱图(B)、O1s 区域谱图(C)和 C1s 区域谱图(D)

Figure 3 The XPS total spectrum of magnetite (A), Fe2p spectrum (B), O1s spectrum (C), and C1s spectrum (D).

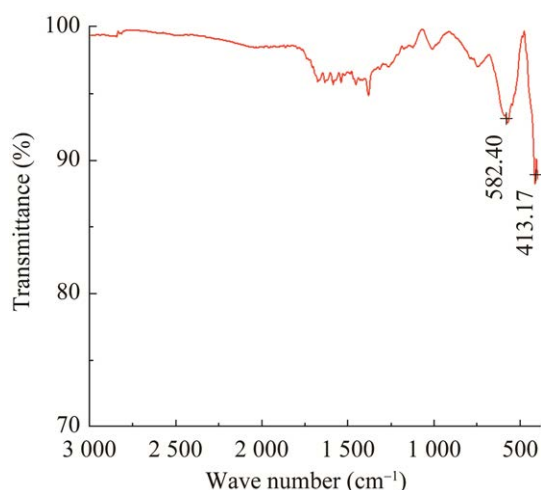


图 4 磁铁矿 FTIR 光谱图

Figure 4 The FTIR spectrum of magnetite.

2.2 磁铁矿等温吸附实验

为了解磁铁矿对 MO 的吸附效果,测定了磁铁矿对不同浓度 MO 的吸附效果。由图 5 可知,当体系中磁铁矿含量为 4 000 mg/L 时,磁铁矿对 MO 的吸附率最高能达到 57% (图 5B),

吸附容量达到 37.67 mg/g (图 5A),说明磁铁矿对 MO 具有比较好的吸附效能。经 Langmuir 和 Freundlich 吸附模型线性拟合分析后,两种吸附模型的相关系数分别为 0.985 和 0.987,两种吸附模型的相关系数非常相近且均已达到最佳拟合效果,说明 Langmuir 和 Freundlich 吸附模型均能很好地描述磁铁矿对 MO 的等温吸附。结果表明 MO 在磁铁矿上的吸附发生在均质表面,吸附位点及吸附能量均匀分布,且吸附质之间不发生相互作用^[19]。

为了解磁铁矿吸附作用对 MO 厌氧脱色的影响,分别测定了 20、50、100、200 mg/L 磁铁矿对 MO 的吸附效果。发现磁铁矿对 MO 的吸附量随磁铁矿含量的增加而有所增加,但最高浓度时对 MO 的吸附效率也不足 3.0% (图 5C),因此认为 20–200 mg/L 浓度范围内磁铁矿的吸附作用对 MO 生物利用度和厌氧脱色效率的影响有限,MO 的去除应归因于生物降解而不是吸附作用。

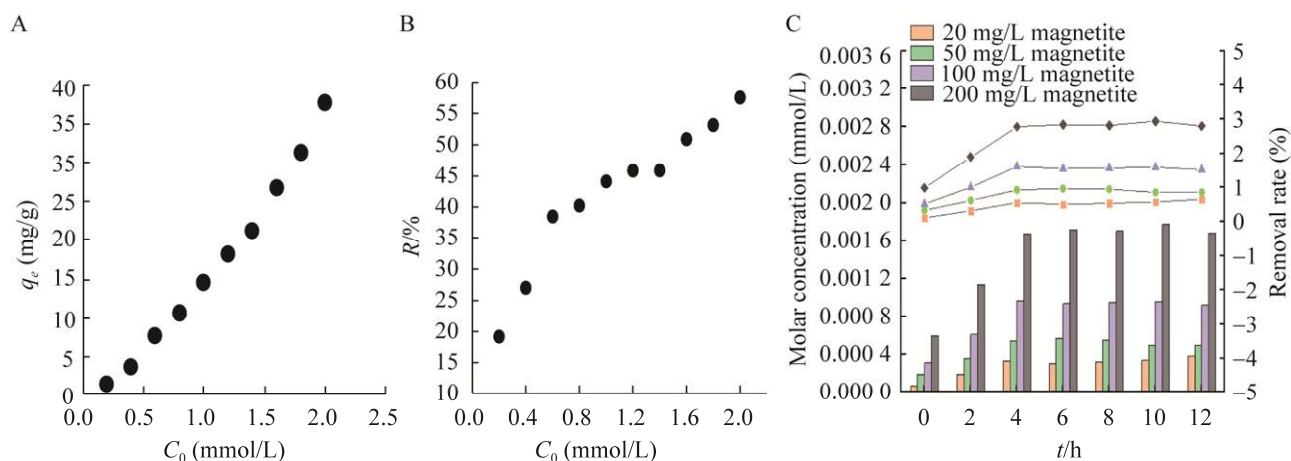


图 5 磁铁矿对 MO 的吸附容量 q_e (A), 吸附效率 R (B) 和不同浓度磁铁矿对 MO 的吸附效率 (C)

Figure 5 Adsorption capacity of magnetite q_e (A), adsorption efficiency R (B), and adsorption efficiency of magnetite at different concentrations (C).

2.3 磁铁矿对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 脱色能力的影响

在厌氧条件下研究了磁铁矿对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 脱色能力的影响。如图 6 所示,磁铁矿对 MO 降解表现出明显的浓度依赖性效应,随着磁铁矿浓度的增加,MO 生物脱色由促进作用逐渐转变为抑制作用。与未添加磁铁矿的对照组相比,低浓度磁铁矿组(20–50 mg/L) MO 脱色效率提高了 4.07%–10.64%。这可能是磁铁矿作为电子传导介质^[4]或其溶解释放的 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 通过 Fe(III)/Fe(II) 的氧化还原循环作为电子穿梭体^[9],促进了奥奈达希瓦氏菌 MR-1 与 MO 之间的 EET,从而促进了 MO 的厌氧脱色效率。此外由于磁铁矿的还原电位较低,在厌氧环境中为厌氧微生物创造了更有利的代谢环境,以往的研究结果表明低还原电位有利于电子传递和改善厌氧微生物的生存环境以进行偶氮还原^[20-21]。但随着磁铁矿浓度的增加(100–200 mg/L),MO 的脱色效率下降了 3.92%–18.35%。由此可以看出,高浓度磁铁矿对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 产生了毒性效应。迄今为止,观察到的磁铁矿对微生物的毒性效应归因于活性氧(reactive oxygen species,

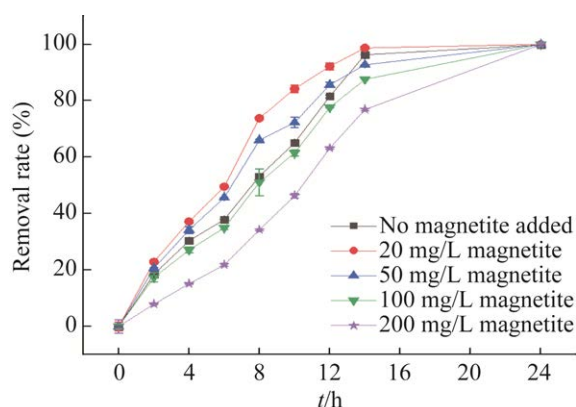


图 6 不同浓度磁铁矿介导奥奈达希瓦氏菌 MR-1 对 MO 厌氧生物脱色的影响

Figure 6 Effect of different concentrations of magnetite on the anaerobic biodecolorization of MO.

ROS)的产生及细胞膜结构被破坏等^[22]。一般认为磁铁矿诱导细胞内 ROS 增加是导致其对微生物毒性效应的主要原因^[23-24],但是由于在厌氧条件下几乎不会产生 ROS,所以认为 ROS 生成不是造成本研究中毒性效应产生的原因,而诱导毒性效应的其他因素有待进一步研究。

2.4 磁铁矿对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 细胞形态及代谢活性的影响

为了探究磁铁矿对细胞形态的影响,研究了磁铁矿对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 细胞形态的影响变化。SEM 观察发现,与未添加磁铁矿培养的细菌相比(图 7A),添加 20 mg/L 和 50 mg/L 的磁铁矿对细菌形态没有显著影响(图 7B、7C),只有极少数细菌表面观察到褶皱或孔隙,该现象与李俊峡等的研究结果相一致^[25]。添加 100 mg/L 磁铁矿处理后的大量细胞形态出现明显皱纹且细胞表面上观察到明显的孔隙(图 7D),而经 200 mg/L 磁铁矿处理过的细胞表面上的孔隙更为明显,甚至表现出明显凹陷的形态(图 7E)。Ahmad 等^[26]认为细菌细胞表面形态显著塌陷(包括无序的皱纹和破裂)证明细胞已死亡,结果表明高浓度磁铁矿会对细胞表面形态造成严重的损害作用导致其死亡。此外细胞结构的严重损伤也会使细胞膜通透性增加,导致细胞内成分(如蛋白质)的泄漏^[27],也可能影响细胞外膜的相关功能^[28]。

通过 ATP 的生成量对细胞代谢活性进行了评估。ATP 的合成依赖于奥奈达希瓦氏菌 MR-1 厌氧呼吸过程中的电子转移,是细胞内与电子传递相关代谢活动的有效指标^[29]。研究发现随着磁铁矿浓度的增加,对细菌 ATP 生成的影响呈先增加后减少的趋势。奥奈达希瓦氏菌 MR-1 在 20 mg/L 和 50 mg/L 磁铁矿存在下 ATP 的生成量比未添加磁铁矿的对照组分别高 7.65% 和 1.08% (图 8)。结果表明 20 mg/L 磁铁矿促进了细胞代

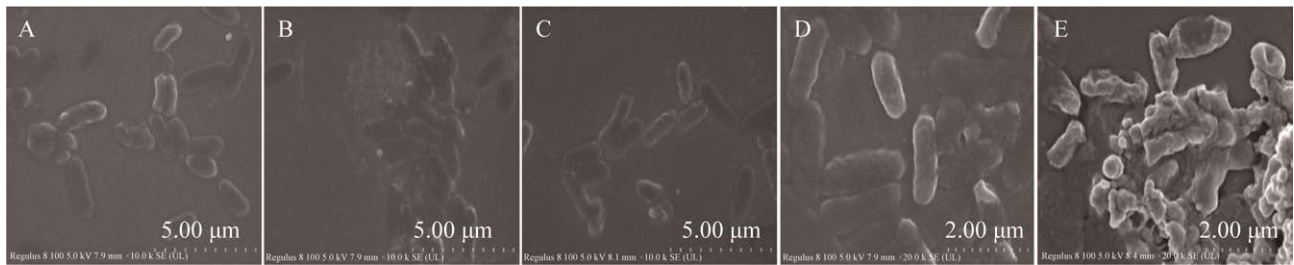


图 7 磁铁矿-奥奈达希瓦氏菌 MR-1 SEM 图

Figure 7 The SEM scans of magnetite-*Shewanella oneidensis* MR-1. A: No magnetite was added. B: 20 mg/L of magnetite was added. C: 50 mg/L of magnetite was added. D: 100 mg/L of magnetite was added. E: 200 mg/L of magnetite was added.

谢活性, 进而增强希瓦氏菌 MR-1 与 MO 之间的 EET, 最终促进了 MO 的厌氧脱色。而磁铁矿浓度为 100 mg/L 和 200 mg/L 时 ATP 的生成量逐渐下降, 分别比对照组低 38.74% 和 60.14% (图 8)。结果表明, 高浓度磁铁矿产生的毒性效应会抑制细胞的厌氧代谢活性及电子传递效率, 从而降低希瓦氏菌 MR-1 的厌氧脱色能力。

2.5 Fe^{2+} 对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 脱色能力的影响

在磁铁矿的培养实验中(图 9A), 20 h 内体系中 Fe^{2+} 释放量与时间成正比, 且释放的 Fe^{2+} 浓度随着磁铁矿浓度的增加而逐渐增加, 培养 20 h 后体系中 Fe^{2+} 浓度达到稳定状态, 20 mg/L

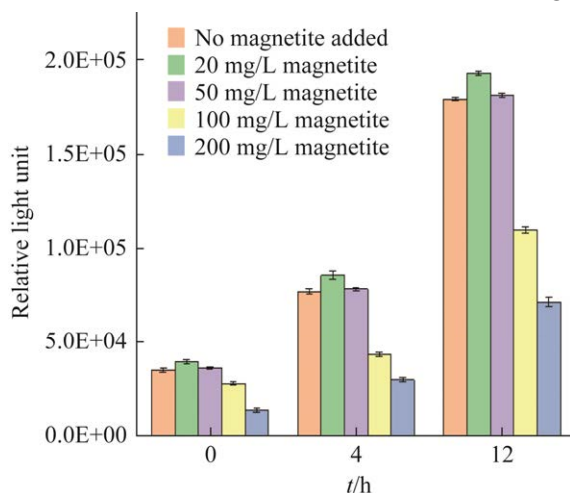


图 8 磁铁矿含量对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 ATP 生成的影响

Figure 8 Effect of magnetite content on the ATP generation of *Shewanella oneidensis* MR-1.

磁铁矿释放出 0.033 mg/L Fe^{2+} , 50 mg/L 磁铁矿释放出 0.051 mg/L Fe^{2+} , 100 mg/L 磁铁矿释放出 0.091 mg/L Fe^{2+} 。以往研究将环境中释放的 Fe^{2+} 分为分布在溶液中的溶解态 Fe^{2+} 和吸附在氧化铁矿物表面的吸附态 Fe^{2+} [30-31]。在 Zhang 等[32] 的研究体系中, 吸附态 Fe^{2+} /释放总 Fe^{2+} 均超过 70%。由于磁铁矿在中性条件下不易溶解, 故认为由微生物还原氧化铁所产生的吸附态 Fe^{2+} 是体系中 Fe^{2+} 的重要组成。

在释放 Fe^{2+} 对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 厌氧脱色影响的实验中(图 9B), 与未先培养 20 h 的对照组相比, 先培养 20 h 的实验组的厌氧脱色效率均低于对照组, 加入 20、50、100 mg/L 磁铁矿培养前后导致希瓦氏菌 MR-1 厌氧脱色效率分别降低了 16.49%、18.90%、25.76%。这些结果表明释放的生源性 Fe^{2+} 对希瓦氏菌 MR-1 厌氧脱色起抑制作用, 该抑制作用对释放 Fe^{2+} 浓度具有依赖性, 释放 Fe^{2+} 浓度越高抑制作用越显著。Tobler 等[33] 的研究结果发现, 吸附态 Fe^{2+} 仅通过直接接触介导电子传递, 并在环境中起到储存电子的作用, 说明吸附态 Fe^{2+} 含量越高则传递至污染物的电子量越少。图 9A 表明随着磁铁矿浓度增加, 体系中越来越多吸附态 Fe^{2+} 生成。因此本研究中高浓度磁铁矿体系释放的吸附态 Fe^{2+} 抑制了 EET, 可能是造成 MO 微生物厌氧还原抑制作用的重要因素。

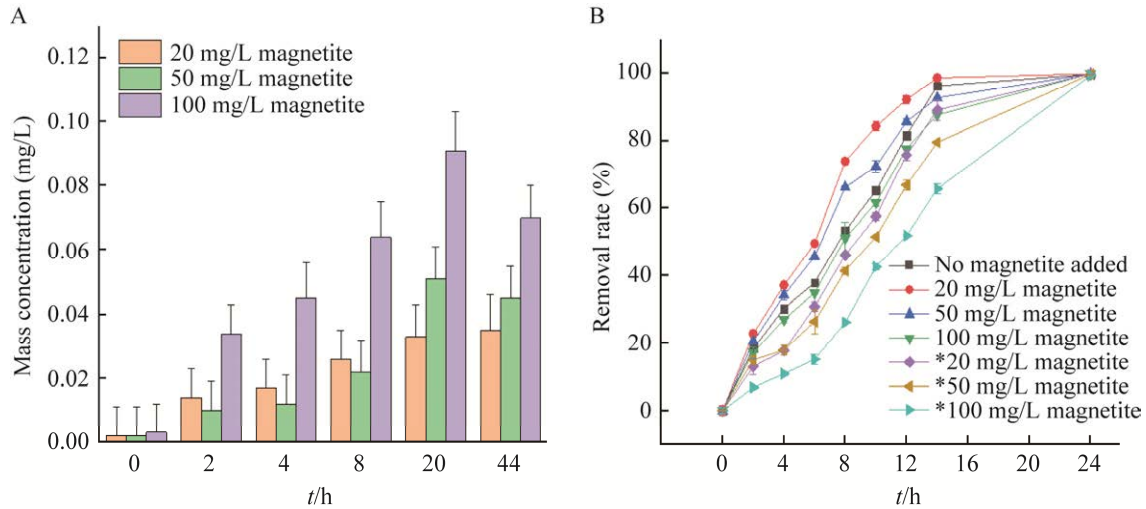


图9 磁铁矿溶解释放 Fe^{2+} (A)和生源性 Fe^{2+} 对MO厌氧脱色的影响(B) *指先培养磁铁矿 20 h的实验组
Figure 9 Release of Fe^{2+} from magnetite dissolution (A) and effect of proogenic Fe^{2+} on anaerobic decolorization of MO (B). * refers to the experimental group with magnetite for 20 h.

为了进一步确定释放的 Fe^{2+} 对MO厌氧生物脱色的影响,使用了外源 FeCl_2 研究 Fe^{2+} 对奥奈达希瓦氏菌MR-1厌氧脱色的影响。前期添加外源 FeCl_2 与MO的对照处理实验证实了 Fe^{2+} 本身对MO的厌氧脱色过程并无影响。外源 FeCl_2 对MO脱色的实验结果证明 Fe^{2+} 对MO的厌氧还原同样表现出低浓度(0.01–0.02 mg/L)促进,高浓度(>0.05 mg/L)抑制的影响趋势(图10)。这说明溶解态 Fe^{2+} 浓度是影响MO生物脱色的重要因素。铁是微生物生长代谢所需的必需营养元素,同时作为一种重要的辅助因子,有助于金属酶的生物学功能以维持微生物的生长和代谢^[34],因此适当的溶解态 Fe^{2+} 浓度可以促进细胞活性并促进污染物的去除。Zhang等^[32]认为少量溶解态 Fe^{2+} 可以显著促进电子传递效率,进而加强有机污染物的去除,该结论进一步验证了低浓度外源 Fe^{2+} 的促进效果。而高浓度外源 Fe^{2+} 的抑制作用表明过量溶解态 Fe^{2+} 会对微生物产生毒性效应,说明高浓度磁铁矿组(100–200 mg/L)中溶解态 Fe^{2+} 含量可能超过0.05 mg/L,并因此破坏细

胞表面形态甚至影响细胞外膜的相关功能。此外,研究发现0.01 mg/L和0.02 mg/L外源 Fe^{2+} 的促进效果均低于20 mg/L磁铁矿组的促进效果,这应归因于磁铁矿的溶解使 Fe^{2+} 的逐渐释放,有助于避免急性 Fe^{2+} 与细菌接触引起的应激毒性。基于上述结果,可以确认溶解释放的 Fe^{2+} 对磁铁矿的厌氧生物效应至关重要。

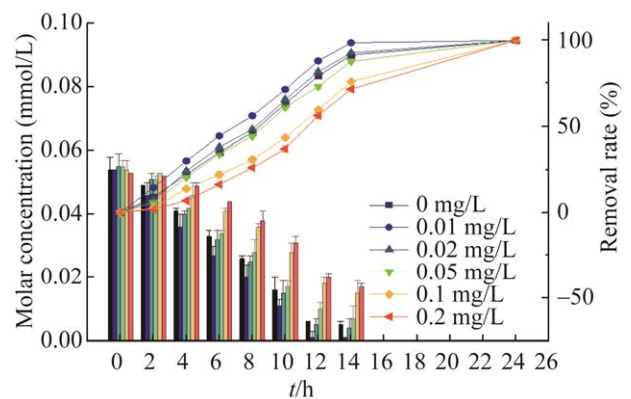


图10 外源 FeCl_2 对MO厌氧脱色的影响
Figure 10 Effect of exogenous FeCl_2 on anaerobic decolorization of MO.

3 结论

通过研究磁铁矿对奥奈达希瓦氏菌 MR-1 厌氧还原甲基橙(MO)的影响, 结果表明, 磁铁矿对 MO 厌氧还原的影响呈低浓度促进高浓度抑制的趋势, 且 MO 的去除应归因于生物降解而不是吸附作用。低浓度磁铁矿(20–50 mg/L)生成了 0.033–0.051 mg/L Fe^{2+} , ATP 生成量提高了 1.08%–7.65%, MO 去除效率提高了 4.07%–10.64%, 表明低浓度磁铁矿及其释放的少量 Fe^{2+} 增强了微生物与 MO 之间的 EET, 进而促进了 MO 的厌氧还原。而高浓度磁铁矿(100–200 mg/L)存在时, 磁铁矿对 MO 的吸附效率不足 3%, 细胞膜表面出现明显皱纹和孔隙, ATP 生成量降低了 38.74%–60.14%, 体系中释放 Fe^{2+} 超过 0.091 mg/L, MO 去除效率下降了 3.92%–18.35%, 表明高浓度磁铁矿及其释放的过量 Fe^{2+} 破坏了微生物的细胞表面形态及抑制了微生物代谢活性和 EET, 从而降低了希瓦氏菌 MR-1 的厌氧还原能力, 而对 MO 生物利用度的影响有限。此外, 外源 FeCl_2 实验证明了释放的少量溶解态 Fe^{2+} (0.01–0.02 mg/L) 有利于 MO 的微生物厌氧还原, 而过量溶解态 Fe^{2+} (>0.05 mg/L) 可能是造成微生物产生毒性效应的重要因素, 但过量溶解态 Fe^{2+} 对微生物产生毒性效应的机制有待进一步确定。本研究将有助于更全面地了解磁铁矿对胞外电子传递的影响及其在有机污染物还原转化中的作用, 为探索铁氧化物等导电材料用于有机污染物的还原转化过程提供参考。

参考文献

- [1] CHOWDHURY A, KUMARI S, AHMAD KHAN A, HUSSAIN S. Selective removal of anionic dyes with exceptionally high adsorption capacity and removal of dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) anion using Ni-Co-S/CTAB nanocomposites and its adsorption mechanism[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 385: 121602.
- [2] WANG RW, LI HD, SUN JZ, ZHANG L, JIAO J, WANG QQ, LIU SQ. Nanomaterials facilitating microbial extracellular electron transfer at interfaces[J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(6): e2004051.
- [3] ZHAO JT, LI F, CAO YX, ZHANG XB, CHEN T, SONG H, WANG ZW. Microbial extracellular electron transfer and strategies for engineering electroactive microorganisms[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 53: 107682.
- [4] LIU PP, LIANG P, JIANG Y, HAO W, MIAO B, WANG DL, HUANG X. Stimulated electron transfer inside electroactive biofilm by magnetite for increased performance microbial fuel cell[J]. *Applied Energy*, 2018, 216: 382-388.
- [5] CHENG J, LI H, DING LK, ZHOU JH, SONG WL, LI YY, LIN RC. Improving hydrogen and methane co-generation in cascading dark fermentation and anaerobic digestion: the effect of magnetite nanoparticles on microbial electron transfer and syntrophism[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 397: 125394.
- [6] WANG ZZ, YIN QD, GU MQ, HE K, WU GX. Enhanced azo dye reactive red 2 degradation in anaerobic reactors by dosing conductive material of ferroferric oxide[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 357: 226-234.
- [7] ZHANG YR, YANG ZH, XU R, XIANG YP, JIA MY, HU JH, ZHENG Y, XIONG WP, CAO J. Enhanced mesophilic anaerobic digestion of waste sludge with the iron nanoparticles addition and kinetic analysis[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 683: 124-133.
- [8] FENG D, XIA A, WU S, HUANG Y, ZHU XQ, ZHU X, DEEPANRAJ B, SHOW PL, LIAO Q. Magnetite as a means to enhance anaerobic digestion of furfural[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2022, 381: 135139.
- [9] QIN J, QIAN LW, ZHANG JT, ZHENG YQ, SHI J, SHEN JY, OU CJ. Accelerated anaerobic biodecolorization of sulfonated azo dyes by magnetite nanoparticles as potential electron transfer mediators[J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128048.
- [10] ZHANG YP, WANG F, BIAN YR, KENGARA FO, GU CG, ZHAO QG, JIANG X. Enhanced desorption of humin-bound phenanthrene by attached

- phenanthrene-degrading bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 92-97.
- [11] XIA XH, LI YR, ZHOU Z, FENG CL. Bioavailability of adsorbed phenanthrene by black carbon and multi-walled carbon nanotubes to *Agrobacterium*[J]. *Chemosphere*, 2010, 78(11): 1329-1336.
- [12] NICULESCU AG, CHIRCOV C, GRUMEZESCU AM. Magnetite nanoparticles: synthesis methods-a comparative review[J]. *Methods*, 2022, 199: 16-27.
- [13] 黄弘杨, 黄津津, 王国祥, 吴向阳, 沈楠, 孙丽. 纳米四氧化三铁强化海藻酸钠包埋希瓦氏菌 MR-1 的甲基橙脱色性能[J]. *生态与农村环境学报*, 2021, 37(2): 217-223.
- HUANG HY, HUANG JJ, WANG GX, WU XY, SHEN N, SUN L. Enhanced decolorization capacity about alginate encapsulation system of *Shewanella oneidensis* MR-1 mingled with nano-Fe₃O₄[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2021, 37(2): 217-223 (in Chinese).
- [14] CAO FT, MA XL, ZHOU XT, HAN JC, XIAO X. Performance and mechanisms exploration of nano zinc oxide (nZnO) on anaerobic decolorization by *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Chemosphere*, 2022, 305: 135510.
- [15] deLa FUENTE D, ALCÁNTARA J, CHICO B, DÍAZ I, JIMÉNEZ JA, MORCILLO M. Characterisation of rust surfaces formed on mild steel exposed to marine atmospheres using XRD and SEM/Micro-Raman techniques[J]. *Corrosion Science*, 2016, 110: 253-264.
- [16] ATTALLAH OA, AL-GHOBASHY MA, NEBSEN M, SALEM MY. Removal of cationic and anionic dyes from aqueous solution with magnetite/pectin and magnetite/silica/pectin hybrid nanocomposites: kinetic, isotherm and mechanism analysis[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(14): 11461-11480.
- [17] LIN RY, LIANG ZJ, YANG C, ZHAO ZW, CUI FY. Selective adsorption of organic pigments on inorganically modified mesoporous biochar and its mechanism based on molecular structure[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2020, 573: 21-30.
- [18] 张政. β -FeOOH/Fe₃O₄/生物炭光致型复合材料的研制及脱除偶氮染料机理研究[D]. 武汉: 武汉科技大学博士学位论文, 2021.
- Zhang Z. Preparation of β -FeOOH/Fe₃O₄/biochar photo-induced composite material and mechanism investigation of removal of azo dye[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Wuhan University of Science and Technology, 2021 (in Chinese).
- [19] TANHAEI B, AYATI A, LAHTINEN M, SILLANPÄÄ M. Preparation and characterization of a novel chitosan/Al₂O₃/magnetite nanoparticles composite adsorbent for kinetic, thermodynamic and isotherm studies of methyl orange adsorption[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 259: 1-10.
- [20] ALBUQUERQUE MGE, LOPES AT, SERRALHEIRO ML, NOVAIS JM, PINHEIRO HM. Biological sulphate reduction and redox mediator effects on azo dye decolourisation in anaerobic-aerobic sequencing batch reactors[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(5/6): 790-799.
- [21] LIANG LF, SUN C, JIN Z, WANG MW, YU QL, ZHAO ZQ, ZHANG YB. Magnetite-mediated electrically connected community for shortening startup of methane-dependent denitrification in a membrane biofilm reactor[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 428: 132004.
- [22] LEARENG SK, UBOMBA-JASWA E, MUSEE N. Toxicity of zinc oxide and iron oxide engineered nanoparticles to *Bacillus subtilis* in river water systems[J]. *Environmental Science: Nano*, 2020, 7(1): 172-185.
- [23] LI GF, HUANG BC, ZHANG ZZ, CHENG YF, FAN NS, JIN RC. Recent advances regarding the impacts of engineered nanomaterials on the anaerobic ammonium oxidation process: performances and mechanisms[J]. *Environmental Science: Nano*, 2019, 6(12): 3501-3512.
- [24] OH E, ANDREWS KJ, JEON B. Enhanced biofilm formation by ferrous and ferric iron through oxidative stress in *Campylobacter jejuni*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1204.
- [25] 李俊峡, 张卓立, 张莉, 祝玉芬. 超顺磁性氧化铁纳米粒子标记成肌细胞及其对细胞活性的影响[J]. *河北医药*, 2007, 29(2): 102-104.
- LI JX, ZHANG ZL, ZHANG L, ZHU YF. Experimental study on cell viability of SPIO-labeled myoblasts[J]. *Hebei Medical Journal*, 2007, 29(2): 102-104 (in Chinese).
- [26] AHMAD NOR Y, ZHOU L, MEKA AK, XU C, NIU YT, ZHANG HW, MITTER N, MAHONY D, YU CZ. Hollow nanospheres: engineering iron oxide hollow nanospheres to enhance antimicrobial property:

- understanding the cytotoxic origin in organic rich environment[J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(30): 5579.
- [27] DEEN GR, AL HANNAN F, HENARI F, AKHTAR S. Effects of different parts of the okra plant (*Abelmoschus esculentus*) on the phytosynthesis of silver nanoparticles: evaluation of synthesis conditions, nonlinear optical and antibacterial properties[J]. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 2022, 12(23): 4174.
- [28] 昂盛骏, 唐萌. 纳米氧化铁的毒性及毒作用机制研究进展[J]. *毒理学杂志*, 2015, 29(2): 152-157.
ANG SJ, TANG M. Research progress on toxicity and toxic mechanism of nano-iron oxide[J]. *Journal of Toxicology*, 2015, 29(2): 152-157 (in Chinese).
- [29] OUYANG K, MORTIMER M, HOLDEN PA, CAI P, WU YC, GAO CH, HUANG QY. Towards a better understanding of *Pseudomonas putida* biofilm formation in the presence of ZnO nanoparticles (NPs): role of NP concentration[J]. *Environment International*, 2020, 137: 105485.
- [30] BOLAND DD, COLLINS RN, MILLER CJ, GLOVER CJ, DAVID WAITE T. Effect of solution and solid-phase conditions on the Fe(II)-accelerated transformation of ferrihydrite to lepidocrocite and goethite[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(10): 5477-5485.
- [31] YAN W, GUO W, WANG LY, JING CY. Extracellular polymeric substances from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms mediate the transformation of ferrihydrite[J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 784: 147245.
- [32] ZHANG JR, HUANG S, YIN YG, YANG LQ, LI XN, JIAO WT, SAKAMAKI T. Fe₂O₃ micron particles are critical for electron transfer and the distribution of electrochemically active bacteria in soil MFCs[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 893: 164909.
- [33] TOBLER NB, HOFSTETTER TB, STRAUB KL, FONTANA D, SCHWARZENBACH RP. Iron-mediated microbial oxidation and abiotic reduction of organic contaminants under anoxic conditions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(22): 7765-7772.
- [34] 邱轩, 石良. 微生物和含铁矿物之间的电子交换[J]. *化学学报*, 2017, 75(6): 583-593.
QIU X SHI L. Electrical interplay between microorganisms and iron-bearing minerals[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2017, 75(6): 583-593 (in Chinese).