殷云璐,程 宽,王 莹,等.酸性条件下配体态 Fe(II)与细胞色素 *c* 反应动力学 [J]. 中国环境科学, 2026,46(3):1417-1425.
Yin Y L, Cheng K, Wang Y, et al. Kinetics of reaction between Fe(II)-ligand and *c*-type cytochrome under acidic conditions [J]. China Environmental Science, 2026,46(3):1417-1425.

酸性条件下配体态 Fe(II)与细胞色素 *c* 反应动力学

殷云璐[1],程 宽[2],王 莹[2],刘同旭[2],李晓敏[3*] (1.华南师范大学地理科学学院,广东 广州 510631；2.广东省科学院生态环境与土壤研究所,华南土壤污染控制与修复国家地方联合工程研究中心,广东省农业环境综合治理重点实验室,广东 广州 510650；3.华南师范大学环境研究院,广东省化学品污染与环境安全重点实验室,环境理论化学教育部重点实验室,广东 广州 510006)

摘要：细胞色素 *c*(*c*-Cyts)是微生物驱动亚铁氧化的关键蛋白,然而,酸性条件下配体态亚铁与 *c*-Cyts 的反应过程及影响因素尚不明确.本文选取 Fe(II)-EDTA 和 *c*-Cyts 为配体态亚铁和铁氧化蛋白的模式反应物,设置厌氧/好氧、不同 pH 值和初始亚铁浓度等条件,运用停留光谱仪研究 *c*-Cyts 还原动力学,表征亚铁的电化学特性和物种组成.结果发现,厌氧条件下,*c*-Cyts 还原速率随 pH 值升高和 Fe(II)-EDTA 浓度增加而提高.20μmol/LFe(II)-EDTA 浓度下,pH 3.5 和 5.0 时 *c*-Cyts 还原的表观速率常数(k_{app})分别是 0.841 和 6.802s^{-1}.pH 5.0,Fe(II)-EDTA 浓度增加至 80μmol/L 时,k_{app} 增至 13.028s^{-1}.升高 pH 值或 Fe(II)-EDTA 浓度后,配体态 $FeEDTA^{2-}$ 占比增加,亚铁氧化还原峰信号增强,表明亚铁活性增强,导致 *c*-Cyts 还原速率增加.相较于厌氧条件,好氧条件下 *c*-Cyts 还原受到抑制,且氧气的抑制作用随 pH 值增加而减弱.pH 3.5 和 4.0 时 *c*-Cyts 还原被完全抑制;pH 4.5 时 k_{app} 由厌氧的 5.402s^{-1} 降至 1.658s^{-1};pH 5.0 时, k_{app} 仅由厌氧的 6.802s^{-1} 下降至 6.454s^{-1}.这是因为在酸性条件下,pH 值越低,Fe(II)-EDTA 与 *c*-Cyts 的反应越慢,但其与氧气的反应却越快,不仅更有利于氧气与 Fe(II)-EDTA 反应,其产生的活性氧物种还能进一步加速还原态 *c*-Cyts 的重新氧化.研究阐明了配体态亚铁与 *c*-Cyts 反应的关键机制,并从分子层面加深对微生物亚铁氧化过程的理解.

关键词：酸性环境；亚铁；乙二胺四乙酸；细胞色素 *c*；氧气
中图分类号：X131.3 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2026)03-1417-09

Kinetics of reaction between Fe(II)-ligand and *c*-type cytochrome under acidic conditions. YIN Yun-lu[1], CHENG Kuan[2], WANG Ying[2], LIU Tong-xu[2], LI Xiao-min[3*] (1.School of Geography, South China Normal University, Guangzhou 510631, China；2.Guangdong Provincial Key Laboratory of Integrated Agro-environmental Pollution Control and Management, National-Regional Joint Engineering Research Center for Soil Pollution Control and Remediation in South China, Institute of Eco-environmental and Soil Sciences, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China；3.Ministry of Education Key Laboratory of Theoretical Chemistry of Environment, Guangdong Provincial Key Laboratory of Chemical Pollution and Environmental Safety, Environmental Research Institute, South China Normal University, Guangzhou 510006, China). *China Environmental Science*, 2026,46(3)：1417~1425

Abstract：The *c*-type cytochrome (*c*-Cyts) is a key protein in microbial oxidation of Fe(II). However, the reaction process and influencing factors of ligand-bound Fe(II) with *c*-Cyts under acidic conditions remain unclear. In this study, Fe(II)-EDTA and a model *c*-type cytochrome (*c*-Cyts) were used to investigate the mechanism of microbial Fe(II) oxidation under acidic conditions with various environmental factors, including anoxic/oxic conditions, pH, and initial Fe(II)-EDTA concentration. A stopped-flow spectrophotometer was employed to study the reduction kinetics of *c*-Cyts, while the electrochemical properties of Fe(II) and the distribution of different Fe(II) species were characterized. Under anoxic conditions, the reduction rate of *c*-Cyts increased with increasing pH and Fe(II)-EDTA concentration. At 20μmol/L Fe(II)-EDTA, the apparent rate constants (k_{app}) were 0.841 and 6.802s^{-1} at pH 3.5 and pH 5.0, respectively. At pH 5.0, the k_{app} increased to 13.028s^{-1} when the initial Fe(II)-EDTA concentration increased to 80μmol/L. The increase in pH and Fe(II)-EDTA concentration enhanced the proportion of $FeEDTA^{2-}$ and intensified the redox peaks of Fe(II), indicating greater Fe(II) reactivity and thus a faster *c*-Cyts reduction rate. Compared to anoxic conditions, *c*-Cyts reduction was inhibited under oxic conditions. This inhibitory effect of oxygen decreased as the pH increased. At pH 3.5 and 4.0, *c*-Cyts reduction was completely inhibited. At pH 4.5, the k_{app} decreased from 5.402s^{-1} (anoxic) to 1.658s^{-1} (oxic); and at pH 5.0, the k_{app} slightly decreased from 6.802s^{-1} (anoxic) to 6.454s^{-1} (oxic). This is attributed to the slower reaction between Fe(II)-EDTA and

收稿日期：2025-08-08
基金项目：中国博士后科学基金资助项目(2024M760595);广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目(2024CXTD17);广东省重点实验室开放基金资助项目(2023B1212060044)

* 责任作者, 研究员, xiaomin.li@m.scnu.edu.cn

c-Cyts at lower pH, whereas the competing reaction of Fe(II)-EDTA with oxygen is favored, producing reactive oxygen species that further accelerate the reoxidation of reduced *c*-Cyts. This study elucidates the critical mechanisms of the reaction between Fe(II)-ligand and *c*-Cyts, providing deeper molecular-level insight into the microbial Fe(II) oxidation process.

Key words：acid conditions；Fe(II)；EDTA；cytochrome *c*；oxygen

微生物是铁循环的关键驱动力,能够驱动铁的氧化还原过程,并与其他元素的循环过程耦合,从而对污染物降解和重金属迁移转化产生重要的影响[1-4].目前已发现的亚铁氧化菌包括:嗜酸好氧型亚铁氧化菌、中性微氧型亚铁氧化菌、中性厌氧光合型和硝酸盐还原型亚铁氧化菌四种类型[5].研究发现,位于细胞外膜上的细胞色素 *c*(*c*−Cyts)是微生物介导亚铁氧化过程的关键蛋白[6-7].*c*−Cyts 是一类含血红色素(Heme)的蛋白质,其氧化还原反应核心是铁卟啉[8].在微生物驱动的亚铁氧化过程中,外膜 *c*−Cyts 中的铁卟啉可以接收亚铁氧化产生的电子,并通过一系列电子传递链将电子传递至细胞内部,从而为微生物的生长代谢提供能量[9].除了在细胞外膜发生作用外,*c*−Cyts 还可以被微生物分泌至胞外环境,进而驱动胞外的亚铁氧化过程[10-11].通过以马心 *c*−Cyts 为模式蛋白,研究厌氧条件下亚铁与 *c*−Cyts 的反应过程,发现其在 pH 5.5~8.0 范围内反应非常迅速,且 *c*−Cyts 还原的表观速率常数(k_{app})与 pH 值和初始亚铁浓度密切相关[12].例如:在 pH 5.5 条件下,亚铁浓度由 5μmol/L 增至 1000μmol/L 时,k_{app} 提高了 5 倍;在亚铁初始浓度为 500μmol/条件下,pH 值由 5.5 升至 8.0 时,k_{app} 提高了 70 倍[12].因此,探究亚铁与 *c*−Cyts 的反应动力学与影响因素,可从微观尺度解析微生物驱动的亚铁氧化过程,对深入阐明其环境效应具有重要意义.

自然环境中存在种类繁多的有机质,易与铁离子(Fe^{2+})发生配位络合,提高铁的溶解度和稳定性,进而影响微生物驱动的亚铁氧化过程[13-14].研究发现,乙二胺四乙酸(EDTA),柠檬酸和腐殖酸能够显著提高中性厌氧光合型亚铁氧化菌 *Rhodopseudomonas palustris* TIE−1 的亚铁氧化速率[15].相关研究探究了 pH 6.5 厌氧条件下,不同有机配体对亚铁与 *c*−Cyts 反应动力学的影响,发现亚铁被 EDTA 络合后 *c*−Cyts 还原速率提高幅度最大,且结构相似的有机配体中,*c*−Cyts 还原速率与配体态亚铁(Fe(II)L)的络合常数呈正相关关系[16].此外,*c*−Cyts 还原速率还与配体态亚铁和 *c*−Cyts 间的氧化还原电势差和重组能这两个热力学参数密切相关[16].虽然在 pH 5.5 厌氧条件下,亚铁与 *c*−Cyts 间的反应速率显著低于中性条件,但当亚铁被柠檬酸或乙酸络合时,*c*−Cyts 还原速率可显著提高[17].然而,在 pH≤5.0 的酸性条件下,有机配体态亚铁与 *c*−Cyts 间的反应动力学和影响因素,仍需深入研究.

铁的氧化还原常伴随水文的周期性波动和氧气浓度的变化[18-19].近期研究发现,在 pH 5.5 条件下,氧气的存在抑制了乙酸络合态亚铁或柠檬酸络合态亚铁与 *c*−Cyts 反应体系中 *c*−Cyts 的还原[17].据分析,这是由于一方面氧气能与 *c*−Cyts 竞争亚铁氧化产生的电子,另一方面氧气与亚铁反应产生的 O_2^-•、H_2O_2 和 OH•等活性氧物种可以将已被亚铁还原的 *c*−Cyts 再次氧化[17].相比于柠檬酸,亚铁与乙酸的络合常数更小,反应体系中配体态亚铁的含量更低,导致氧气对该体系的 *c*−Cyts 还原抑制作用更强[13].前期研究主要探究了 pH≥5.5 时不同条件对配体态亚铁与 *c*−Cyts 反应的影响[16-17].然而,当环境 pH 值从 5.5 进一步下降时,亚铁与氧气的反应速率会下降,活性氧物种的产生量也随之下降[20].而根据前人研究,推测相较于游离态亚铁,配体态亚铁(如:EDTA 络合态亚铁,Fe(II)−EDTA)与氧气或 *c*−Cyts 的反应均会加快[16].那么,在这种情况下,不同酸性 pH 值,亚铁浓度,氧气等环境因子如何影响 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 的反应,还有待深入研究.鉴于此,本研究以马心 *c*−Cyts 为模式蛋白,以 EDTA 为有机配体,探究酸性条件下,pH 值,Fe(II)−EDTA 起始浓度和氧气等环境因素对 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 反应动力学的影响.同时,通过电化学表征和物种组成分析等手段,揭示酸性条件下配体态亚铁与 *c*−Cyts 反应的关键机制.

1 材料与方法

1.1 实验材料

马心细胞色素 *c*(*c*−Cyts,纯度 95%,分子量:12,384Da)和四水合氯化亚铁($FeCl_2·4H_2O$,纯度 99%)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司.其它化学试剂均为分析纯(A.R.),包括:乙二胺四乙酸二钠

(EDTA−2Na),2−(N−吗啉代)乙磺酸(MES)和葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase)购自北京百灵威科技有限公司;1,4−二乙基哌嗪(DEPP)购自阿法埃莎(中国)化学有限公司;连二亚硫酸钠($Na_2O_4S_2$)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;盐酸(HCl),葡萄糖($C_6H_{12}O_6$),乙酸(CH_3COOH)和乙酸钠(CH_3COONa)购自广州广试化学试剂有限公司.

1.2　反应溶液配置

在厌氧反应实验中,所有试剂均在厌氧手套箱(Plas−Labs,美国)内使用超纯水进行配置.超纯水使用前通过高纯 N_2 曝气 30min 去除所含氧气.不同 pH 值反应体系使用不同 pH 值缓冲溶液配置,pH 3.0~4.0 使用 HCl 溶液,pH 4.5 使用 30mmol/L 的 DEPP 缓冲液,pH 5.0 使用 30mmol/L 的 MES 缓冲液.对于 *c*−Cyts 反应溶液,首先配置 400μmol/L 的母液,然后使用不同 pH 值缓冲液稀释到 16μmol/L 备用.对于亚铁反应溶液,首先使用不同 pH 值缓冲液配置 16mmol/L 的亚铁母液和 19.2mmol/L 的 EDTA 母液,两者的摩尔比为 Fe(II):EDTA=1:1.2.将亚铁溶液和 EDTA 溶液等比例混合,使用对应 pH 值缓冲液稀释至所需浓度,避光静置 30min 使亚铁和 EDTA 充分络合.在好氧反应实验中,*c*−Cyts 反应溶液需移出厌氧手套箱,并使用氧气曝气 30min,使反应溶液的溶解氧处于饱和状态,其它反应溶液与厌氧实验完全一致.

1.3　动力学实验与速率常数计算

根据 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 之间发生快速反应的特点和还原态 *c*−Cyts(*c*−Cyt_{red})在紫外−可见光谱中的特征吸收峰,本研究使用 SX20 停留光谱仪(Applied Photophysics Co.,Leatherhead,英国)分析 *c*−Cyts 的反应动力学[17,21].停留光谱仪核心反应区域分为外室和内室两部分.反应前,外室使用 2.0g/L 的无氧连二亚硫酸钠填充,以维持厌氧环境.内室包含两个进样注射器及一个反应池,使用含有 5.0μg/mL 葡萄糖和 10mmol/L 的乙酸−乙酸钠缓冲溶液(pH 5.0)填充并静置 2h 进行充分除氧,随后使用无氧超纯水冲洗.校正仪器后,在进样注射器 A 和 B 中分别加入 3.0mL 的 Fe(II)−EDTA 和 3.0mL 的 *c*−Cyts 反应溶液,操作仪器将两种溶液以相同的体积迅速混合,并实时监测 *c*−Cyt_{red} 在 550nm 处吸收峰值的变化.

在本研究中,氧化态 *c*−Cyts(*c*−Cyt_{ox})的初始浓度为 8.0μmol/L,Fe(II)−EDTA 的初始浓度为 20~80μmol/L,反应 pH 值为 3.0~5.0.具体操作为:在厌氧反应实验中,注射器 A 中分别加入以下浓度的 Fe(II)−EDTA 溶液:40μmol/L (pH 3.0,3.5,4.0,4.5 和 5.0),80μmol/L (pH 5.0)和 160μmol/L (pH 5.0).注射器 B 中加入 16μmol/L 对应 pH 值的厌氧 *c*−Cyt_{ox} 反应溶液.在好氧反应实验中,注射器 B 中加入好氧的 *c*−Cyt_{ox} 反应溶液,其它条件与厌氧反应一致.每组实验处理至少重复 3 次,结果以平均值表示以保证实验数据的准确性.反应结束后,根据 *c*−Cyt_{red} 标准曲线计算 *c*−Cyt_{red} 的实际浓度.*c*−Cyts 还原的表观速率常数(k_{app})根据准一级动力学方程 $C_{c-Cyt,t} = C_{c-Cyt,0}\exp(k_{app}\cdot t + b)$ 进行计算.其中,$C_{c\text{-}Cyt,0}$ 和 $C_{c\text{-}Cyt,t}$ 分别为反应 0s 和 *t*s 时 *c*−Cyt_{red} 的浓度.数据统计分析采用 SPSS 24.0 (IBM SPSS, USA)进行,对相关数据进行 ANOVA 分析,然后进行 SNK 检验,显著性水平为 $P<0.05$.

1.4　电化学测试与铁物种组成分析

使用循环伏安法研究不同影响因素对 Fe(II)−EDTA 氧化还原电位的影响.实验在体积为 20mL 的厌氧反应池中进行,以铂电极为对电极,以直径为 0.5cm 的玻碳电极为工作电极,以饱和甘汞电极(Saturated Calomel Electrode, SCE)为参比电极构建三电极体系,使用电化学工作站(CHI660D,上海华晨)进行测试.实验扫描范围为−0.6V~+0.6V,扫描速率为 50mV/s.使用 Visual MINTEQ 3.1 软件计算不同处理组中亚铁物种的形态组成,具体步骤如下:首先根据实际反应体系设定 pH 值,然后在“Add components”添加溶液中亚铁与 EDTA 等组分及其浓度,并通过“Add to List”将各组分添加至列表,最后点击“Run”运行并记录在“View species distribution”输出的亚铁物种形态组成及占比.

2　结果与讨论

2.1　厌氧条件下 pH 值的影响

如图 1(a)所示,*c*−Cyt_{red} 的初始浓度约为 1.30μmol/L,pH 3.0 时 *c*−Cyt_{red} 浓度在整个反应周期内(0.5s)没有明显变化,表明 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 在 pH 3.0 的环境中不能发生反应.pH 3.5~5.0 时 *c*−Cyt_{red} 浓度随反应时间逐渐提高,且 pH 值越高

c−Cyt_{red} 浓度越高.反应结束时,pH 3.5,4.0,4.5 和 5.0 条件下 c−Cyt_{red} 浓度分别提高至 1.69,1.84,2.54 和 3.43μmol/L.

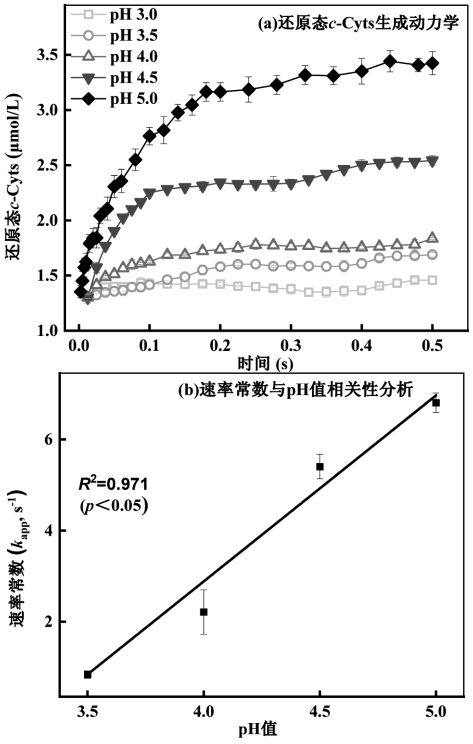


图 1 厌氧条件下还原态 c−Cyts 生成动力学与 pH 值−k_{app} 相关性分析

Fig.1 Kinetics of c−Cyt_{red} formation and the correlation between k_{app} and pH under anoxic conditions

表 1 不同条件下 c−Cyts 还原的表观速率常数(k_{app})和亚铁的中点电位($E_{Fe(II)}$)

Table 1 The apparent rate constants (k_{app}) of c−Cyts reduction and midpoint potential of Fe(II)($E_{Fe(II)}$)

Fe(II)−EDTA 起始浓度(μmol/L)	pH 值	厌氧		好氧		$E_{Fe(II)}$ (V vs. SCE)
		k_{app} (s^{-1})	R^2	k_{app} (s^{-1})	R^2	
20	3.0	/	/	/	/	/
20	3.5	0.841	0.9804	/	/	/
20	4.0	2.210	0.9319	/	/	−0.133
20	4.5	5.402	0.9432	1.658	0.8881	−0.149
20	5.0	6.802	0.9087	6.454	0.9270	−0.159
40	5.0	11.199	0.6816	9.816	0.6360	−0.148
80	5.0	13.028	0.5286	11.380	0.5321	−0.147

注:"/"表示在对应条件下反应难以进行,无法计算k_{app}或$E_{Fe(II)}$.

为了进一步对比酸性条件下 pH 值的影响,本研究计算了 0~0.1s 内 pH 3.5~5.0 条件下 c−Cyts 还原的表观速率常数(k_{app}).如图 1(b)和表 1 所示,k_{app} 值随 pH 值升高逐渐提高,由 pH 3.5 时的 0.841s^{-1} 提高至 pH 5.0 时的 6.802s^{-1},且 k_{app} 值与 pH 值存在明显的正相关关系(R^2=0.971).这与前期研究厌氧条件下 pH 5.5~8.0 时亚铁与 c−Cyts 反应的速率常数变化规律相似[12].前期研究发现,pH 6.5 时 Fe(II)−EDTA 与 c−Cyts 反应的 k_{app} 值为 24.35s^{-1}[16],显著高于本研究中 pH 5.0 时的 k_{app} 值,进一步明确 pH 值是影响 Fe(II)−EDTA 与 c−Cyts 反应动力学的重要因素.

2.2 厌氧条件下亚铁浓度的影响

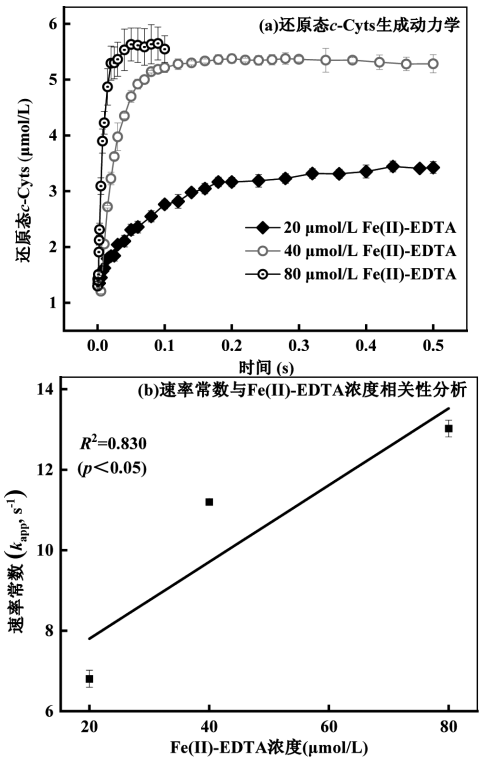


图 2 厌氧条件下还原态 c−Cyts 生成动力学和 Fe(II)−EDTA 浓度−k_{app} 相关性分析

Fig.2 Kinetics of c−Cyt_{red} formation and the correlation between k_{app} and Fe(II)−EDTA concentration under anoxic conditions

pH 5.0 时,如图 2(a)所示,上述 3 种不同浓度 Fe(II)−EDTA 存在时均能快速还原 c−Cyts,但 c−Cyt_{red} 的浓度存在显著差别.反应 0.5s 后,在 20μmol/L 和 40μmol/L Fe(II)−EDTA 反应体系中,c−Cyt_{red} 浓度分别提高至 3.43μmol/L 和 5.28μmol/L.在 80μmol/L Fe(II)−EDTA 反应体系中,反应 0.1s 后,c−Cyt_{red} 浓度已提高至 5.55μmol/L.如图 2(b)所示,不同处理组在 0~0.1s 内 c−Cyts 还原的 k_{app} 值,随着 Fe(II)−EDTA 起始浓度的增加逐渐提高.20μmol/L Fe(II)−EDTA 处理组的 k_{app} 值为 6.802s^{-1},在 40μmol/

L 和 80μmol/L Fe(II)−EDTA 处理组中,k_{app} 值分别提高至 11.199s^{-1} 和 13.028s^{-1},并且 k_{app} 值与 Fe(II)−EDTA 初始浓度存在着显著的正相关关系(R^2=0.830).这与前期研究厌氧条件下 pH 5.5 时 5~1000μmol/L 配体态亚铁与 *c*−Cyts 反应的速率常数变化规律相似[12].

2.3　厌氧条件下的电化学特征

如图 3 和表 1 所示,在相同 Fe(II)−EDTA 浓度(20μmol/L)条件下,pH 3.0 和 pH 3.5 时,并未检测到明显的氧化峰,仅有微弱的还原峰;随着 pH 值的升高,可检测到明显的氧化峰和还原峰,在 pH 4.0,4.5 和 5.0 时亚铁的中点电位分别为−0.133V,−0.149V 和−0.159V vs. SCE.随着 pH 值的升高,中点电位出现负向移动现象,这表明体系中 Fe(II)−EDTA 的氧化能力增强,更易于向其他氧化剂传递电子[12].除了 Fe(II)−EDTA,*c*−Cyts 的中点电位也可能随 pH 值的改变发生变化.研究发现,当 pH≤5 时,*c*−Cyts 的中点电位为正值且不发生明显变化[22].

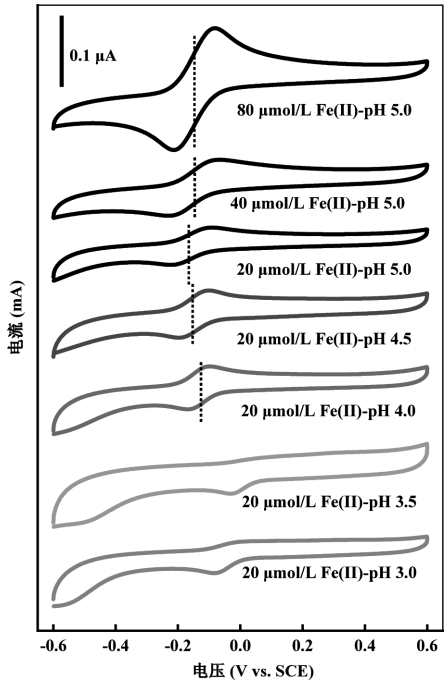


图 3　厌氧条件下不同 pH 值和初始浓度 Fe(II)−EDTA 反应体系中亚铁的循环伏安曲线

Fig.3　Cyclic voltammetry curves of Fe(II) with different pH and Fe(II)−EDTA concentrations under anoxic conditions

因此,当 Fe(II)− EDTA 的中点电位随 pH 值的升高而负向移动时,Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 的电位差增加,表明从热力学角度看两者的反应更易于发生.此外,在相同 pH 值条件下,Fe(II)−EDTA 的浓度也对亚铁的氧化还原活性产生影响.如图 3 所示,pH 5.0 时,Fe(II)−EDTA 浓度的增加并未对体系的中点电位产生显著的改变,但是对 Fe(II)−EDTA 氧化还原峰的峰强产生显著的影响,即 Fe(II)−EDTA 浓度越大,其氧化还原峰的峰强越高,表明 Fe(II)−EDTA 的氧化还原活性越强[23].类似地,pH 5.5 时,柠檬酸络合态亚铁和乙酸络合态亚铁体系的氧化还原峰峰强,也会随着配体态亚铁的浓度提高而增强[17].因此,在相同 pH 值的情况下,Fe(II)−EDTA 浓度的提高可以增强亚铁的反应活性,从而促进 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 的反应.

2.4　厌氧条件下的亚铁物种组成

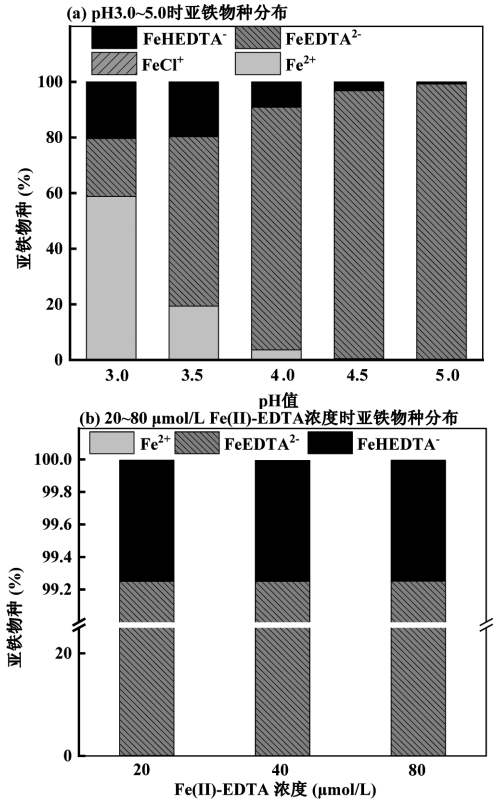


图 4　厌氧条件下不同 pH 值和初始浓度 Fe(II)−EDTA 反应体系中亚铁物种组成

Fig.4　Distribution of different Fe(II) species with different pH and Fe(II)−EDTA concentrations under anoxic conditions

通过计算发现,酸性条件下 Fe(II)−EDTA 体系中主要存在离子态 Fe^{2+},络合态 $FeHEDTA^-$ 和 $FeEDTA^{2-}$ 3 种亚铁物种(图 4(a)).在 pH 3.0 的 20μmol/L Fe(II)−EDTA 体系中,Fe^{2+}为优势物种,占比 58.79%;其次为 $FeEDTA^{2-}$和 $FeHEDTA^-$,分别占

20.79%和 20.39%.随着 pH 值的升高,Fe^{2+}和 $FeHEDTA^{-}$的占比逐渐降低;而 $FeEDTA^{2-}$的占比逐渐提高,pH 3.5~5.0 时 $FeEDTA^{2-}$成为优势物种,占比为 60.89%~99.18%.当 pH 值上升至 6.5 时, 500μmol/L Fe(II)−EDTA 体系中络合态亚铁的占比可高达 99.8%[16].由此可见,在酸性条件下,EDTA 对亚铁的络合能力随 pH 值的升高而增强.反应式(1)和(2)分别展示了 Fe^{2+}和 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 之间的氧化还原反应.在相同 pH 值下,Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 的反应速率常数要比 Fe^{2+}与 *c*−Cyts 的高 1~2 个数量级[16].在不同 pH 值下,亚铁与 *c*−Cyts 的反应速率常数随 pH 值的升高而提高[12].因此,Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 反应的快慢,不仅与体系中 Fe^{2+}和配体态亚铁的占比有关,还与两者单独与 *c*−Cyts 反应的速率有关.pH 值越高,配体态亚铁的占比越高,由于配体态亚铁与 *c*−Cyts 的反应更快,使得反应体系整体上的 *c*−Cyts 还原表观速率更高.

$$Fe^{2+} + c\text{-}Cyt_{ox} \rightarrow Fe(III) + c\text{-}Cyt_{red} \quad (1)$$

$$Fe(II)\text{-}EDTA + c\text{-}Cyt_{ox} \rightarrow Fe(III)\text{-}EDTA + c\text{-}Cyt_{red} \quad (2)$$

如图 4(b)所示,pH 5.0 时,不同浓度 Fe(II)−EDTA 体系的亚铁物种组成差异不显著,优势物种 $FeEDTA^{2-}$的占比为 99.18%~99.23%.然而,随着 Fe(II)−EDTA 浓度的增加,$FeEDTA^{2-}$的含量会逐渐增加.根据上述占比计算可得,20,40 和 80μmol/L Fe(II)−EDTA 体系中,$FeEDTA^{2-}$的浓度分别是 19.84, 59.54 和 79.39μmol/L.综合电化学表征和物种组成分析结果发现,提高 Fe(II)−EDTA 的浓度虽然不能显著改变亚铁的氧化还原电位和物种组成比例,但是能够通过提高配体态亚铁的含量,增强亚铁的氧化还原活性,进而促进 *c*−Cyts 通过反应式(2)发生还原,最终提高 *c*−Cyts 还原的表观速率.

2.5 好氧条件下 pH 值和亚铁浓度的影响

如图 5(a)所示,在 pH 5.0 的 0μmol/L Fe(II)−EDTA 体系中,$c\text{−}Cyt_{red}$ 浓度没有发生明显变化,表明酸性条件下氧气不能直接与 *c*−Cyts 反应.在 pH 3.0~5.0 条件下,$c\text{−}Cyt_{ox}/c\text{−}Cyt_{red}$ 的氧化还原电位范围为 0.31~0.40V[22].而 $O_2/O_2^{\bullet-}$的氧化还原电位在−0.33V~−0.22V 的范围内,低于 $c\text{−}Cyt_{ox}/c\text{−}Cyt_{red}$ 的氧化还原电位[26].因此,从热力学角度看,$c\text{−}Cyt_{red}$ 难以与氧气直接发生反应,与本文的动力学结果一致.

在 20μmol/LFe(II)−EDTA 初始浓度体系中,*c*−Cyts 的还原动力学在 pH 3.0~5.0 范围内存在较大差异.pH 3.0~4.0 条件下,$c\text{−}Cyt_{red}$ 浓度在整个反应周期内没有明显变化,表明没有发生 *c*−Cyts 还原.pH 4.5 条件下,$c\text{−}Cyt_{red}$ 浓度随反应时间缓慢上升,由 0s 时的 1.24μmol/L 增加至 0.5s 时的 1.68μmol/L.pH 5.0 条件下,$c\text{−}Cyt_{red}$ 浓度随反应时间迅速上升,反应 0.5s 后增至 2.95μmol/L.如图 5(b)所示,pH 5.0 条件下,当 Fe(II)−EDTA 初始浓度为 40μmol/L 时,反应 0.5s 后 $c\text{−}Cyt_{red}$ 浓度提高至 5.63μmol/L;当 Fe(II)−EDTA 初始浓度为 80μmol/L 时,反应 0.1s 后 $c\text{−}Cyt_{red}$ 浓度上升至 5.45μmol/L.

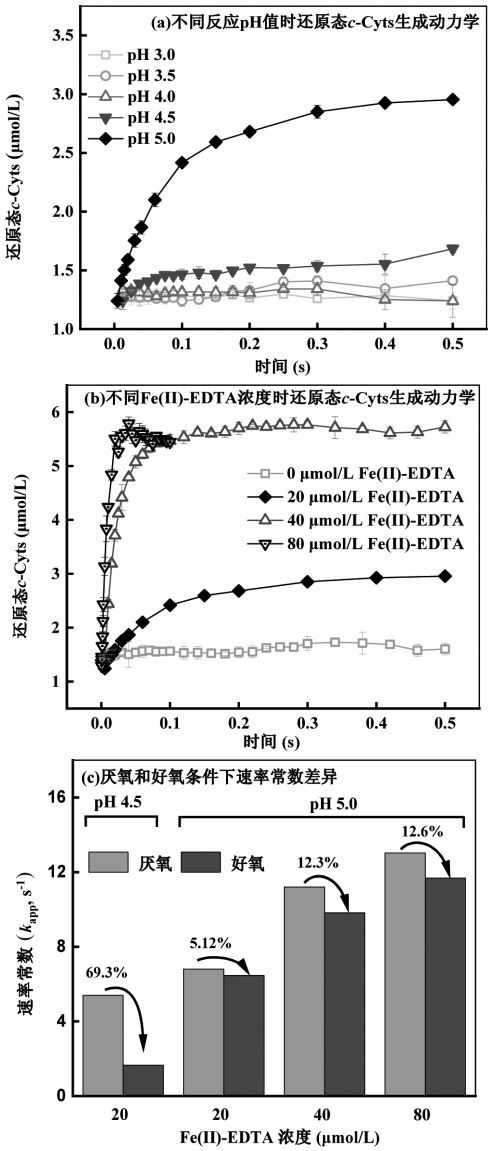


图 5 好氧条件下 pH 值还原态 *c*−Cyts 生成动力学和厌氧与好氧条件下速率常数差异

Fig. 5 Kinetics of $c\text{−}Cyt_{red}$ formation and the difference of the k_{app} between anoxic and oxic conditions

如图 5(c)和表 1 所示,pH 4.5 时 20μmol/L Fe(II)−EDTA 体系的 *c*−Cyts 还原速率常数 k_{app} 为 1.658s^{-1};pH 5.0 时 20,40 和 80μmol/L Fe(II)− EDTA 体系的 k_{app} 值分别为 6.454,9.816 和 11.380s^{-1}.通过对比可以发现,提高反应 pH 值和 Fe(II)−EDTA 初始浓度均能够促进厌氧和好氧条件下 *c*−Cyts 的还原速率,但影响效果有所不同.一方面,在 pH3.0~ 4.0 时,好氧条件下氧气的引入完全抑制了 *c*−Cyts 的还原;另一方面,好氧条件下 pH 值和亚铁浓度升高对 *c*−Cyts 还原的促进作用要弱于厌氧条件,表明氧气的存在抑制了 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 的反应.

2.6　氧气的作用机制

通过对比厌氧和好氧条件下 *c*−Cyts 还原动力学和速率常数,可以将氧气对 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 反应的影响分为 3 种情况:(1)pH 3.5 和 pH 4.0 时,氧气的存在完全抑制了 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 的反应;(2)pH 4.5 时,氧气的加入使 *c*−Cyts 的还原速率降低了 69.31%,因此对 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 的反应产生显著的抑制作用;(3)pH 5.0 时,好氧条件下不同浓度 Fe(II)−EDTA 体系的 *c*−Cyts 还原速率下降幅度在 5.12%~12.65%,表明氧气对 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 的反应抑制作用较弱.

根据前期研究[17,20],本文推测好氧条件下 Fe(II)−EDTA,*c*−Cyts 和氧气之间可发生以下反应:(i)Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 的反应,生成 Fe(III)−EDTA 和 *c*−Cyt_{red},如反应式(2)所示;(ii)Fe(II)−EDTA 与氧气的反应,生成 Fe(III)−EDTA 和超氧负离子($O_2^{\bullet-}$),如反应式(3)所示;(iii)Fe(II)−EDTA 与超氧负离子,过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基(·OH)等活性氧物种的反应,如反应式(4)~(6)所示;(iv)*c*−Cyt_{red} 与活性氧物种的反应,重新生成 *c*−Cyt_{ox},如反应式(7)~(9)所示.

$$\text{Fe(II)-EDTA}+ O_2 \rightarrow \text{Fe(III)-EDTA} + O_2^{\bullet-} \quad (3)$$

$$\text{Fe(II)-EDTA}+O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow \text{Fe(III)-EDTA}+H_2O_2 \quad (4)$$

$$\text{Fe(II)-EDTA} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow \text{Fe(III)-EDTA} + \cdot OH + H_2O \quad (5)$$

$$\text{Fe(II)-EDTA}+\cdot OH+H^+ \rightarrow \text{Fe(III)-EDTA}+H_2O \quad (6)$$

$$c\text{-}Cyt_{red} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow c\text{-}Cyt_{ox} + H_2O_2 \quad (7)$$

$$c\text{-}Cyt_{red} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow c\text{-}Cyt_{ox} + \cdot OH + H_2O \quad (8)$$

$$c\text{-}Cyt_{red} + \cdot OH + H^+ \rightarrow c\text{-}Cyt_{ox} + H_2O \quad (9)$$

根据反应式(2)和(3),氧气会与 *c*−Cyts 竞争来自 Fe(II)−EDTA 氧化产生的电子.前人研究表明,酸性条件下,$FeEDTA^{2-}$ 与氧气的反应速率常数可达 400mol/L s^{-1},且该反应的速率常数随 pH 值的降低而逐步提高[20,27];而 $FeHEDTA^-$ 与氧气的反应速率常数可高达 3000mol/L s^{-1},比 $FeEDTA^{2-}$ 的高一个数量级[20].虽然 $FeEDTA^{2-}$ 和 $FeHEDTA^-$ 在 pH 3.5 和 pH 4.0 时的占比没有其在 pH 4.5 和 pH 5.0 时的高,但是因为 $FeEDTA^{2-}$ 与氧气在较低 pH 值条件下的反应更快,且 $FeHEDTA^-$ 与氧气的反应比 $FeEDTA^{2-}$ 更快,加上 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 在较低 pH 值条件下的反应更慢,导致 *c*−Cyts 的还原被完全抑制.相反,在较高 pH 值条件下,优势物种 $FeEDTA^{2-}$ 与氧气反应更慢,但 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 的反应更快,所以氧气的存在只能部分抑制 *c*−Cyts 的还原.$FeHEDTA^-$ 在 pH 4.5 时的占比为 3.23%,高于 pH 5.0 时的 0.745%;而 $FeEDTA^{2-}$ 在 pH 4.5 时的占比为 96.35%,低于 pH 5.0 时的 99.18%.类似地,pH 4.5 时更多 $FeHEDTA^-$ 与氧气发生快速反应,进而显著抑制 Fe(II)−EDTA 与 *c*−Cyts 的反应.

在酸性条件下,Fe(II)−EDTA 与 $O_2^{\bullet-}$,H_2O_2 和•OH 的反应速率常数分别在 10^9,10^3 和 10^8mol/L s^{-1}[20,28].由此可见,一旦 $O_2^{\bullet-}$ 通过反应式(3)生成之后,就可以迅速与 Fe(II)−EDTA 反应,通过反应式(4)~(6)生成其他活性氧物种.在 pH 值 3.0~5.0 条件下,$O_2^{\bullet-}/H_2O_2$,H_2O_2/•OH 和•OH/H_2O 的氧化还原电位范围分别为 0.40~0.52V,0.84~0.96V 和 2.08~ 2.20V[26],均高于 *c*−Cyt_{ox}/*c*−Cyt_{red} 的氧化还原电位.这表明,从热力学角度看,*c*−Cyt_{red} 能够与上述 3 种活性氧物种发生反应,从而使 *c*−Cyt_{red} 重新氧化成 *c*−Cyt_{ox},降低反应体系中 *c*−Cyt_{red} 的浓度.前期研究发现,好氧条件下配体态亚铁与 *c*−Cyt_{ox} 的反应体系中 $O_2^{\bullet-}$ 和•OH 的生成量,显著高于只有配体态亚铁的反应体系[17].由于本研究的反应体系中 Fe(II)−EDTA 起始浓度相比于 *c*−Cyt_{ox} 是过量的,因此活性氧物种的产生和对 *c*−Cyt_{red} 的再氧化可能是造成氧气抑制 *c*−Cyts 还原的另一个关键机制.虽然 *c*−Cyt_{ox} 与这些活性氧物种的反应速率常数尚不明确,但从本研究在好氧和厌氧条件下获得的 *c*−Cyts 还原表观速率常数来看,*c*−Cyt_{ox} 与活性氧物种的反应对 pH 4.5 时 *c*−Cyts 还原的抑制效果强于 pH 5.0 时的抑制效果.综上所述,酸性条件下,氧气对 Fe(II)−EDTA 还原 *c*−Cyts 过程产

生抑制作用的机制主要包括:氧气与 c−Cyt_{ox} 竞争来自 Fe(II)−EDTA 氧化产生的电子,以及活性氧物种把 c−Cyt_{red} 再氧化成 c−Cyt_{ox}.而氧气对 c−Cyts 还原的抑制效果则取决于 Fe(II)−EDTA 与 c−Cyt_{ox},Fe(II)−EDTA 与氧气,以及 c−Cyt_{red} 与活性氧物种等多个反应的速率.

本研究的动力学结果为深入解析实际环境中生物−化学耦合驱动的亚铁氧化过程提供了参考.首先,明确了以 c−Cyts 为关键蛋白的亚铁氧化菌所驱动的配体态亚铁氧化过程在 pH<3.5 时不能发生.其次,在一些典型的酸性环境中,如酸性矿山废水等,氧气浓度的波动是否会对微生物亚铁氧化产生抑制作用主要取决于 pH 值.而提供厌氧环境将有利于微生物驱动的亚铁氧化过程,并进一步耦合其他元素的转化或促进污染物的固定[4,29].此外,本研究主要关注溶解氧饱和条件下氧气对配体态亚铁与 c−Cyts 反应的影响.实际环境中,水文波动,水层深度等条件的改变可使得氧气浓度呈现梯度性变化[30−31].因此,不同氧气梯度是否会对亚铁与 c−Cyts 间的反应产生不同程度的抑制作用,有待进一步研究.

3 结论

3.1 厌氧酸性条件下,Fe(II)−EDTA 与 c−Cyts 的反应速率受 pH 值和 Fe(II)−EDTA 起始浓度影响,与亚铁氧化还原特性和物种组成相关.pH 值由 3.5 增至 5.0 时,亚铁中点电位负向移动,$FeEDTA^{2-}$的占比由 20.79%增至 99.18%,c−Cyts 还原的表观速率常数(k_{app})由 0.841s^{-1} 提高至 6.802s^{-1}.

3.2 厌氧 pH 5.0 条件下,Fe(II)−EDTA 浓度由 20μmol/L 增至 80μmol/L 时,亚铁氧化还原峰的峰强增大,优势物种 $FeEDTA^{2-}$的浓度由 19.84μmol/L 增至 79.39μmol/L,c−Cyts 还原的 k_{app} 值由 6.802s^{-1} 增至 13.028s^{-1}.

3.3 好氧酸性条件下,氧气可通过与 c−Cyts 竞争来自 Fe(II)−EDTA 氧化产生的电子,及产生活性氧物种再次氧化 c−Cyts 的机制,抑制 Fe(II)−EDTA 与 c−Cyts 的反应,且 pH 值越低抑制作用越明显.相较于厌氧条件,好氧条件下 c−Cyts 还原在 pH 3.5~4.0 时被完全抑制;在 pH 4.5 时 k_{app} 值下降 69.31%;在 pH 5.0 时 k_{app} 值下降 5.12%~12.65%.

参考文献:

[1] 范 聪,方君然,李晓飞,等.纤铁矿与重金属的相互作用——从界面过程到环境行为的研究进展 [J]. 中国环境科学, 2024,44(8):4484−4495.
Fan C, Fang J R, Li X F, et al. Interactions between lepidocrocite and heavy metals: Research progress from interfacial processes to environmental behaviors [J]. China Environmental Science, 2024, 44(8):4484−4495.

[2] 朱维晃,臧 辉,吴丰昌.微生物还原针铁矿胶体的动力学特征及其影响因素 [J]. 中国环境科学, 2011,31(5):820−827.
Zhu W H, Zang H, Wu F C. The kinetic characteristics of the microbial reduction of goethite [J]. China Environmental Science, 2011,31(5):820−827.

[3] 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.

[4] 路永正,阎百兴.微生物对沉积物主要化学组分吸附重金属能力的影响 [J]. 中国环境科学, 2011,31(1):105−110.
Lu Y Z, Yan B X. Effect of microorganisms on adsorption capacities of Pb and Cd on main chemical components in sediments [J]. China Environmental Science, 2011,31(1):105−110.

[5] Emerson D, Fleming E J, Mcbeth J M. Iron−oxidizing bacteria: An environmental and genomic perspective [J]. Annual Review of Microbiology, 2010,64(1):561−583.

[6] Shi L, Rosso K M, Zachara J m, et al. Mtr extracellular electron−transfer pathways in Fe(III)−reducing or Fe(II)−oxidizing bacteria: a genomic perspective [J]. Biochemical Society Transactions, 2012, 40(6):1261−1267.

[7] Yang G, Li S, Niu R, et al. Insights into nitrate−reducing Fe(II) oxidation by *Diaphorobacter caeni* LI3T through kinetic, nitrogen isotope fractionation, and genome analyses [J]. Science of The Total Environment, 2024,912:168720.

[8] Zhang J Q, You Z X, Liu D Y, et al. Conductive proteins−based extracellular electron transfer of electroactive microorganisms [J]. Quantitative Biology, 2023,11(4):405−420.

[9] Coelho A, Silva J M, Cantini F, et al. Resonance assignments of cytochrome MtoD from the extracellular electron uptake pathway of *sideroxydans lithotrophicus* ES−1 [J]. Biomolecular NMR Assignments, 2024,18(2):139−146

[10] Liu T X, Chen D D, Luo X B, et al. Microbially mediated nitrate−reducing Fe(II) oxidation: Quantification of chemodenitrification and biological reactions [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2019, 256:97−115.

[11] 叶 银,周顺桂,刘 星.微生物纳米导线的结构与功能:争议及进展 [J]. 土壤学报, 2024,61(2):297−307.
Ye Y, Zhou S G, Liu X. Structure and function of microbial nanowires: Controversy and progress [J] Acta Pedologica Sinica, 2024,61(2):297−307.

[12] Liu T X, Wang Y, Li X M, et al. Redox dynamics and equilibria of c−type cytochromes in the presence of Fe(II) under anoxic conditions: Insights into enzymatic iron oxidation [J]. Chemical Geology, 2017, 468:97−104.

[13] Daugherty E E, Gilbert B, Nico P S, et al. Complexation and redox

buffering of iron(II) by dissolved organic matter [J]. Environmental Science & Technology, 2017,51(19):11096−11104.

[14] Peng C, Sundman A, Bryce C, et al. Oxidation of Fe(II)−organic matter complexes in the presence of the mixotrophic nitrate−reducing Fe(II)−oxidizing bacterium *Acidovorax* sp. BoFeN1 [J]. Environmental Science & Technology, 2018,52(10):5753−5763.

[15] Peng C, Bryce C, Sundman A, et al. Organic matter complexation promotes Fe(II) oxidation by the photoautotrophic Fe(II)−oxidizer *Rhodopseudomonas palustris* TIE−1 [J]. ACS Earth and Space Chemistry, 2019,3(4):531−536.

[16] Wang Y, Yuan X, Li X M, et al. Ligand mediated reduction of *c*−type cytochromes by Fe(II): Kinetic and mechanistic insights [J]. Chemical Geology, 2019,513:23−31.

[17] Cheng K, Yin Y L, Wang Y, et al. Reduction of *c*−type cytochromes by Fe(II)−ligand under oxic conditions: Roles of Fe(II)−heme complexation and reactive oxygen species [J]. Chemical Geology, 2024,663:122276.

[18] Laufer K, Nordhoff M, Røy H, et al. Coexistence of microaerophilic, nitrate−reducing, and phototrophic Fe(II) oxidizers and Fe(III) reducers in coastal marine sediment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016,82(5):1433−1447.

[19] 张　拓,孙媛媛,张思翰,等.水铁矿稳定性的变化机制及环境条件的影响 [J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2019,37(6):107−113.
Zhang T, Sun Y Y, Zhang S H, et al. The changed mechanism of stability of ferrihydrite and the effect of environment factors. [J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences), 2019,37(6): 107−113.

[20] Jones A M, Griffin P J, Waite T D. Ferrous iron oxidation by molecular oxygen under acidic conditions: The effect of citrate, EDTA and fulvic acid [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2015,160:117−131.

[21] Dong H, Xu Q, Lian L, et al. Degradation of organic contaminants in the Fe(II)/peroxymonosulfate process under acidic conditions: the overlooked rapid oxidation stage [J]. Environmental Science Technology, 2021,55(22):15390−15399.

[22] Battistuzzi G, Borsari M, Sola M. Redox properties of cytochrome *c* [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2001,3(2):279−291.

[23] Long M, Zhu J, Wang X, et al. Hematite enhances microbial autotrophic nitrate removal in carbonate and phosphate−rich environments by increasing Fe(II) activity [J]. Science of The Total Environment, 2024,949:175002.

[24] Van Erk M R, Bourceau O M, Moncada C, et al. Reactive oxygen species affect the potential for mineralization processes in permeable intertidal flats [J]. Nature communications, 2023,14(1):938.

[25] Huang K, Yang Y, Lu H, et al. Transformation kinetics of exogenous nickel in a paddy soil during anoxic−oxic alteration: Roles of organic matter and iron oxides [J]. Journal of Hazardous Materials, 2023,452: 131246.

[26] Nosaka Y, Nosaka A Y. Generation and detection of reactive oxygen species in photocatalysis [J]. Chemical Reviews, 2017,117(17):11302−11336.

[27] Seibig S, Van E R. Kinetics of [Fe^{II}(edta)] oxidation by molecular oxygen revisited. New evidence for a multistep mechanism [J]. Inorganic Chemistry, 1997,36(18):4115−4120.

[28] Kwan W P, Voelker B M. Decomposition of hydrogen peroxide and organic compounds in the presence of dissolved iron and ferrihydrite [J]. Environmental Science & Technology, 2002,36(7):1467−1476.

[29] 宋永伟,王　蕊,杨琳琳,等.三种次生矿物固定 *A.ferrooxidans* 的 Fe^{2+} 氧化及成矿性能比较 [J]. 中国环境科学, 2020,40(5):2073−2080.
Song Y W, Wang R, Yang L L, et al. Fe^{2+} oxidation and mineralization properties of *Acidithiobacillus ferrooxidans* immobilized on three secondary iron minerals. [J] China Environmental Science, 2020,40(5): 2073−2080.

[30] Ayala−Muñoz D, Macalady J L, Sánchez−España J, et al. Microbial carbon, sulfur, iron, and nitrogen cycling linked to the potential remediation of a meromictic acidic pit lake [J]. The ISME Journal, 2022,16(12):2666−2679.

[31] 古小治,张启超,孙淑雲,等.富氧−缺氧过程对氧气分布及交换过程影响 [J]. 中国环境科学, 2015,35(5):1495−1501.
Gu X Z, Zhang Q C, Sun S Y, et al. Influence of anaerobic and aerobic processes on bottom oxygen dynamic and exchange process across sediment−water interface [J]. China Environmental Science, 2015,35 (5):1495−1501.

作者简介：殷云璐(1995−),女,河南商丘人,助理实验师,硕士,主要研究方向为微生物亚铁氧化过程研究.发表论文 3 篇.20219636@m.scnu.edu.cn.