

两株异化铁还原菌与蒙脱石交互作用实验研究

曹维政¹, 朱云², 鲁安怀², 李艳²,
王清华¹, 张虢雷¹, 王浩然², 杨晓雪², 王长秋², 董海良³

1. 大庆油田有限责任公司 勘探开发研究院, 黑龙江 大庆 163712;

2. 北京大学 地球与空间科学学院, 造山带与地壳演化教育部重点实验室, 北京 100871;

3. 中国地质大学(北京), 地质过程与矿产资源国家重点实验室, 北京 100083

摘要: 本文选用采自辽宁某矿的天然钠基蒙脱石与两株异化铁还原菌模式菌株 *Shewanella putrefaciens* CN32 和 *Shewanella oneidensis* MR-1, 研究了蒙脱石与微生物之间的交互作用。结果表明这两株菌均能还原蒙脱石晶格中的三价铁, 使微生物作用于蒙脱石之后的反应体系中二价铁离子浓度明显升高, 反应悬浊液颜色由无色变为浅绿色。透射电子显微镜晶格条纹像显示微生物作用后的粘土矿物微结构发生明显变化, 其层间距 d_{001} 值从 1.29 nm 分别减小为 1.06 nm (CN32) 和 1.02 nm (MR-1)。上述结果综合指示这两株异化铁还原菌能够通过还原天然蒙脱石结构中的三价铁促进矿物发生生物相转变。

关键词: 钠基蒙脱石; 异化铁还原菌; *Shewanella putrefaciens* CN32; *Shewanella oneidensis* MR-1

中图分类号: P593 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-2802(2011)03-0311-06

An Experimental Study on Interactions of two Dissimilatory Iron Reducing Bacteria with Smectite

CAO Wei-zheng¹, ZHU Yun², LU An-huai², LI Yan², WANG Qing-hua¹,
ZHANG Xiao-lei¹, WANG Hao-rang², YANG Xiao-xue², WANG Chang-qi², DONG Hai-liang³

1. PetroChina Daqing Oilfield Company Ltd. Exploration and Development Research Institute, Heilongjiang Daqing 163712, China; 2. The Key Laboratory of Orogenic Belts and Crustal Evolution, School of Earth and Space Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; 3. Geomicrobiology Laboratory, State Key Laboratory of Geological Processes and Mineral Resources, Beijing 100083, China

Abstract: This paper studied the influence of dissimilatory iron reducing bacteria (DIRB), *Shewanella putrefaciens* CN32 and *Shewanella oneidensis* MR-1 on the natural smectite from a mine in Liaoning province. The results showed that both strains reduced ferric irons in the crystal lattice of smectite, thus lead the concentrations of ferrous ions in the reaction systems increased significantly. Accordingly, the colour of the suspensions turned from colorless to light green. The crystal lattice images of transmission electron microscope (TEM) indicated that the interlayer distance (d_{001}) of the mineral sample was decreased from 1.29 nm to 1.06 nm (CN32) and to 1.02 nm (MR-1). Therefore we concluded that the both DIRB strains can reduce ferric irons in natural smectite and can promote transformations between mineral phases.

Key words: Na-smectite; dissimilatory iron reducing bacteria; *shewanella putrefaciens* CN32; *shewanella oneidensis* MR-1

收稿日期: 2010-12-30 收到, 2011-03-30 改回

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2007CB815602); 大庆油田对外协作计划项目(2009-JS-1006)

第一作者简介: 朱云(1982-), 女, 博士研究生, 材料与环境矿物学专业. E-mail: zhuyun@pku.edu.cn.

通讯作者: 鲁安怀. E-mail: ahlu@pku.edu.cn.

铁呼吸即异化铁还原,是指微生物利用细胞外 Fe^{3+} 为末端电子受体,通过氧化作为电子供体的有机物质将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ,从这一过程中储存生命活动所需的能量。微生物学和地质学中愈来愈多的证据表明, Fe^{3+} 呼吸是最早的微生物呼吸形式^[1,2]。这个代谢形式是地球化学最重要的过程之一,普遍存在于沉积物、土壤和地层中。能通过上述代谢形式进行生命活动的微生物即为异化铁还原菌(Dissimilatory Iron Reducing Bacteria, DIRB),它们的代谢活动往往对生物地球化学中的碳和多种金属循环有着重要的影响^[3]。

异化铁还原菌 *Shewanella putrefaciens* CN32 最早是从新墨西哥西北区的 Morrison 岩层 250 m 深处岩芯样品中分离获得的厌氧菌; *Shewanella oneidensis* MR-1 是从奥奈达湖底沉积物中分离得到^[4],是目前异化铁还原菌研究的模式菌株。这两株厌氧菌常被用来研究其还原粘土矿物(如绿脱石、伊利石、绿泥石^[5~7]和各种含铁矿物如针铁矿、赤铁矿、磁铁矿等^[8~10])中的三价铁能力,探讨当矿物结构中的三价铁被还原后矿物物理化学性质的变化。粘土矿物和各种含铁矿物均为地表常见矿物,研究微生物呼吸作用对这些矿物晶格中铁价态的影响情况,是近年来矿物与微生物交互作用领域的研究热点之一,被认为是可以从另一个角度反映自然环境中的铁元素的地球化学循环^[6]。由于粘土矿物具有的特殊层状结构和物理化学性质,使得上述异化铁还原菌结合粘土矿物还原并固定治理放射性金属元素七价钨^[11]、六价铀^[12]、有毒重金属污染物六价铬^[13]以及有机污染物^[14]等应用研究受到越来越多的关注^[15]。

本文在前人研究富铁粘土矿物与异化铁还原菌的基础上^[5~7,11~14],选取天然蒙脱石样品和两株异化铁还原菌模式菌株,重点研究了粘土矿物样品与细菌交互作用后结构中的铁被还原的情况和粘土矿物的结构变化特征。以自然界中储量丰富的普通蒙脱石为研究对象,研究它与异化铁还原菌之间的作用,为自然界中广泛存在的微生物和粘土矿物之间的交互作用及其在促进矿物相变过程中所发挥的作用提供重要的指示意义。

1 材料及实验方法

1.1 材料

本文使用的两株铁还原菌分别为 *Shewanella putrefaciens* CN32 (ATCC BAA-453) 和 *Shewanella oneidensis* MR-1 (ATCC 70050); 矿物样

品采自辽宁某矿的天然膨润土,矿物样品经 80℃ 干燥 2 h 后,研磨过 200 目筛,取粒径小于 200 目的样品进行实验。

1.2 培养基

铁还原菌活化采用 LB 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,NaCl 10 g/L,用 1M NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0 左右。该培养基在 121℃ 下,高温灭菌 20 min。

细菌-矿物反应体系中营养物质浓度如下:乳酸钙 10 mM,NaHCO₃ 2 g/L,KCl 0.1 g/L,用 1 M 盐酸调节 pH 值至 7.0 左右,分装至 250 mL 容量蓝盖瓶,每瓶含 150 mL 溶液和 3 g 天然钠基膨润土,通 20 min 氮气除氧,并在 80℃ 下灭菌 1 h。

1.3 实验步骤

(1)在 LB 培养基分别活化两株铁还原菌,在 30℃ 下培养两天。

(2)将装有培养基和矿物的蓝盖瓶分为三组,其中 B 为对照组,每瓶接入 5 mL 无菌水;C 为每瓶接入 5 mL *S. putrefaciens* CN 32 菌液的样品,菌液浓度为 1.39×10^8 个/mL;M 为接入 5 mL *S. oneidensis* MR-1 菌液的样品,菌液浓度为 1.03×10^8 个/mL,同样在 30℃ 下进行培养。

(3)每间隔两天取体系悬浊液用邻菲罗啉分光光度法测体系中的 Fe^{2+} 浓度;用扫描电子显微镜观测反应 20 天后样品的微形貌,用透射电子显微镜进行反应后矿物的显微结构分析。

1.4 测试方法

样品的 X 射线衍射在微构分析测试中心(北京)的日本理学 Rigaku-RA 高功率旋转阳极 X 射线衍射仪(12 kW)上进行,辐射源为 $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.15418$ nm),步宽为 0.02° ,扫描范围 $2.6^\circ \sim 70^\circ$,扫描速度 $4^\circ/\text{min}$,电压 40 kV,电流 100 mA,常温下扫描。

用邻菲罗啉分光光度法在 UV-2102 PC 型分光光度计上测定体系中亚铁离子浓度。从反应的第 2 天开始,取 200 μL 体系悬浊液加入 0.6 mL 10% H_2SO_4 ,100 μL 10% 邻菲罗啉,60 μL 40% HF,水浴 30 min,室温冷却 15 min 后加入 0.5 mL 5% 硼酸,上述过程均在 1.5 mL 黑色离心管中避光进行。上述步骤完成后,6000 r/min 离心 5 min;取 1 mL 上清液至 10 mL 比色管,并加入 1 mL 10% 的柠檬酸三钠,稀释至刻度,摇匀后在 510 nm 处测吸光度^[16~18]。

使用英国 Quorum/mittech K850 临界点干燥仪干燥扫描电镜样品;采用北京大学电镜实验室

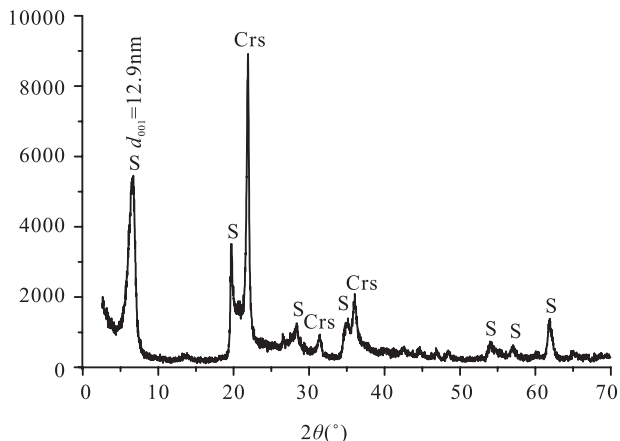
Quanta 200FEG 环境扫描电子显微镜观察样品的显微形貌。扫描电镜样品处理过程如下:1)分别从对照组 B、有菌体系 C、M 中取 2 mL 样品悬浊液,经 6000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 1 mL 加入 0.1 M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 颠倒混匀重悬细胞 5 min,离心同上,弃上清液。此即洗细胞一次,重复此步骤两次。2)上步菌液弃上清液后,加入 2.5% 戊二醛固定液 4℃ 过夜。3)2.5% 戊二醛固定后,用磷酸缓冲液清洗 3 次,再用乙醇梯度脱水,30%、50%、70%、85% 和 95% 乙醇各一次,100% 乙醇两次,15~20 min/次,随后用乙酸异戊酯置换乙醇 4 次,每次乙醇:乙酸异戊酯为 3:1,2:1,1:1,0:1,30 min/次。4)将普通定性滤纸裁成 35 mm×20 mm 的纸条,将长边均分成 3 份,对折成小纸包,用订书钉将一端订牢,成小口袋状。将离心浓缩后的菌液滴入小纸包,立即用订书器将另一端订牢,放入临界点干燥仪 (Quorum/mittech K850) 样品室,进行 CO₂ 临界点干燥 [19]。

样品的透射电镜分析前处理过程如下:将 10 mL 样品悬浊液离心,弃上清液,在厌氧条件下干燥并研磨,用伦敦白胶定向包埋,加入促进剂加速凝固,然后沿平行粘土矿物 c 轴方向打磨切片。将制好的薄片捞在铜网上进行离子减薄,最后用迈阿密大学地质系 JEOL JEM-2100 透射电子显微镜观察 [20]。

2 结果与讨论

2.1 蒙脱石样品矿物学分析

实验所用蒙脱石样品的 XRD 分析结果如图 1 所示。物相鉴定结果显示:样品主要由蒙脱石含量



S 蒙脱石; Crs 方石英

S is smectite; Crs is cristobalite

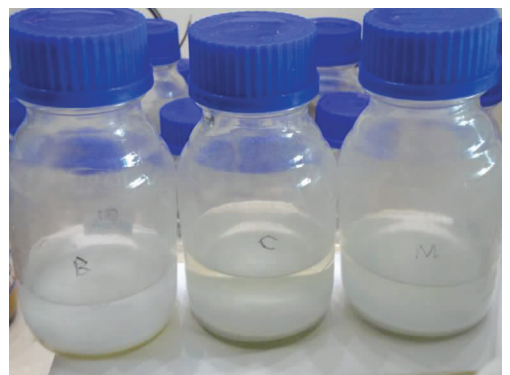
图 1 天然矿物样品的 XRD 图谱

Fig. 1 The XRD pattern of the natural bentonite

达 90% 的天然钠基膨润土 (PCPDF 号: 12-0204) 组成,其 d_{001} 值为 1.29 nm,另含少量方石英和极少量方解石等矿物。

2.2 微生物作用后溶液体系的变化特征

2.2.1 颜色及 pH 变化 图 2 显示未添加微生物的空白对照实验体系颜色无任何变化,而经 CN32 和 MR-01 作用后的反应体系颜色随反应时间发生了明显变化,在反应进行的第 6 天,即可观察到有菌体系由原来的无色变为浅绿色。由于 Fe³⁺ 在溶液中显示黄褐色,Fe²⁺ 在溶液中显示绿色。因此,体系颜色的变化暗示蒙脱石晶格中的铁被释放,并以 Fe²⁺ 的形式存在于溶液中 [21]。由于蒙脱石晶格中同时含有 Fe²⁺ 和 Fe³⁺,推测反应体系中的 Fe²⁺ 既可能由蒙脱石单纯的溶解作用而来,也可能由细菌直接还原作用于蒙脱石结构中的 Fe³⁺,使其结构发生转变而释放出 Fe²⁺。通过对反应前后溶液 pH 值的监测结果显示,对照实验和有菌实验体系的 pH 值始终保持在 7.2 左右 (表 1),均未发生明显变化,说明体系没有发生明显的酸蚀或碱溶反应。可以认为溶液颜色的变化并非蒙脱石单纯的非氧化还原溶解作用所致,而是在微生物与其发生还原作用之后发生结构转变所释放出来的 Fe²⁺ 所致。



对照组样品 B 颜色较白,加入微生物的样品颜色稍有变绿;左起依次 B、C、M; B. 空白对照组; C. 加入 CN32; M. 加入 MR-1
The blank sample (B) is white, the samples with bacteria treatment (C and M) are slight green; from left to right: B, M, C; B. Blank; M. with MR-01; C. with CN32

图 2 B、C、M 组样品颜色变化

Fig. 2 Color change in the samples B, C, M

2.2.2 Fe²⁺ 浓度变化 反应进行 2、4、6、8、10、12、20、30 d 的实验体系,Fe²⁺ 浓度变化如图 3 所示。随反应时间的增加,没有添加微生物的矿物溶液体系 (B) 中 Fe²⁺ 浓度没有明显变化,浓度始终在 0.2 mM 以下;而加入 CN32 的矿物溶液 (C) 中 Fe²⁺ 浓

表 1 不同反应时间溶液的 pH 值

Table 1 Solution pH values at different reaction times; B is blank; C is the sample with CN32; M is the sample with MR-1

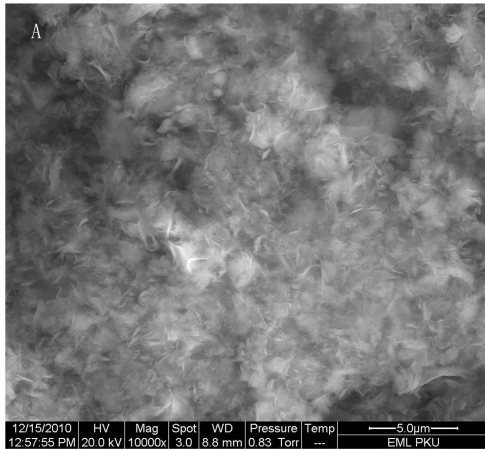
时间/d	2	4	8	10	12	20	30
B	7.21	7.22	7.31	7.35	7.37	7.35	7.22
C	7.0	7.40	7.21	7.25	7.29	7.25	7.28
M	7.06	7.22	7.21	7.25	7.27	7.24	7.30

注: B: 对照组样品(不加菌); C: 加入 CN32; M: 加入 MR-1

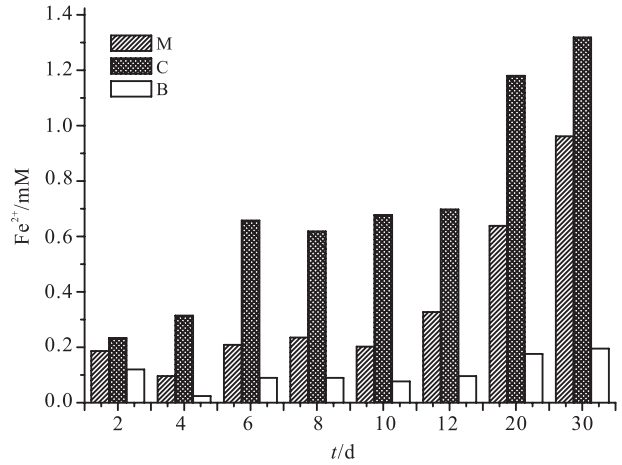
度则从第 2 天的 0.2 mM 明显升高至第 30 天的 1.3 mM, 且 Fe^{2+} 量保持持续增加的趋势; 加入 MR-1 的一组矿物溶液(M)中 Fe^{2+} 浓度变化与 C 一致, 但浓度略低于 C 组中, 这可能与初期接入菌的浓度略低以及反应中细菌的生长状况有关^[22]。从图 3 可见, 实验体系中 MR-1 还原蒙脱石结构中三价铁的效率略低于 CN32。

2.3 显微形貌学观察

扫描电子显微镜下可见到对照组样品中的粘土矿物呈不规则和厚薄不均的絮状或边缘突刺的薄片状, 边缘大多模糊不清, 为典型的钠基蒙脱石形貌

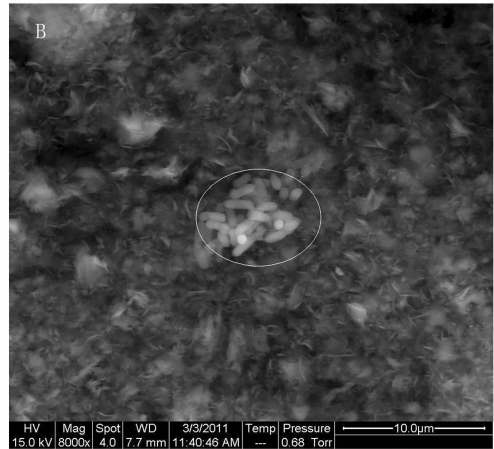


(图 4-A); 而经微生物处理过后的矿物形貌并未发生明显改变, 长约 2 μm 菌体(图 4 中圆圈所指)夹杂在细碎的矿物之中, 不易观察(图 4-B)。

图 3 反应体系中 Fe^{2+} 浓度变化情况:

M 加入 MR-1; C 加入 CN32; B 对照组样品

Fig. 3 The concentrations of Fe^{2+} in mineral-bacteria interaction (C and M) and blank (B) systems



A. 对照组样品的扫描电镜图像; B. 含 CN32 样品的扫描电镜图像

A. the SEM picture of Blank; B. the SEM image of CN32 and minerals

图 4 微生物与矿物交互作用扫描电镜图像

Fig. 4 The SEM microphotograph showing the interaction of bacteria and minerals

2.4 微生物作用后矿物微结构变化

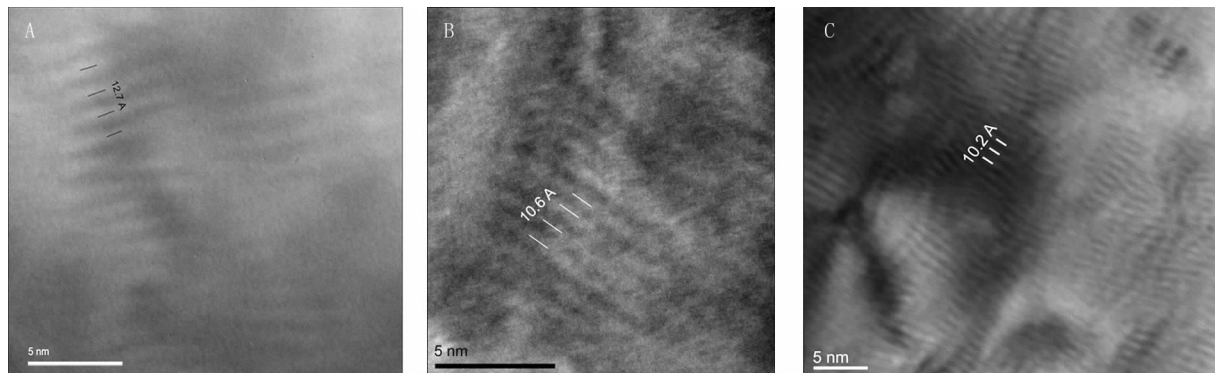
粘土矿物的透射电镜下的微晶格条纹像可指示其层间距的变化。通过对照组实验体系的蒙脱石样品和两株常温厌氧菌作用后的蒙脱石样品进行观察, 发现对照体系中蒙脱石(001)面的层间距为 1.27 nm 左右(图 5-A), 与天然钠基蒙脱石的 d_{001} 值 1.29 nm 相近; 而 CN32 作用后的矿物样品 d_{001} 值减小为 1.06 nm(图 5-B); MR-1 作用后的样品同样观

察到 1.02 nm 的 d_{001} 值(图 5-C)。这一结果证明微生物与蒙脱石作用后, 蒙脱石发生了结构转变, 层间距缩小。

透射电镜观察到的细菌作用后矿物样品中的 d_{001} 值与伊利石 1.0 nm 左右层间距相近。蒙脱石的负电荷主要来自 Mg^{2+} 替代铝氧八面体中的 Al^{3+} 和 Al^{3+} 替代硅氧四面体中的 Si^{4+} , 而层间阳离子则能中和负电荷。蒙脱石中的 Fe^{3+} 主要存在于八面

体中心, 替代 Al^{3+} 的位置; 当铁还原菌作用于天然蒙脱石时, 晶格中 Fe^{3+} 被还原, 矿物原有的电荷平衡被破坏。为了平衡电荷, 培养基中钾离子进入蒙

脱石层间, 层间水逸出, 层间距缩小, 矿物结构发生变化, 其反应过程可用图 6 表示。此时, 蒙脱石发生向伊利石化的物相转变^[23]。



A) 对照组样品透射电镜图像; B) CN32 处理后样品的透射电镜图像; C) MR-1 处理后样品的透射电镜图像
A) mineral without bacteria treatment; B) mineral in C; C) mineral in M

图 5 微生物作用前后蒙脱石样品透射电镜分析

Fig. 5 TEM detections of minerals without and with bacteria treatment

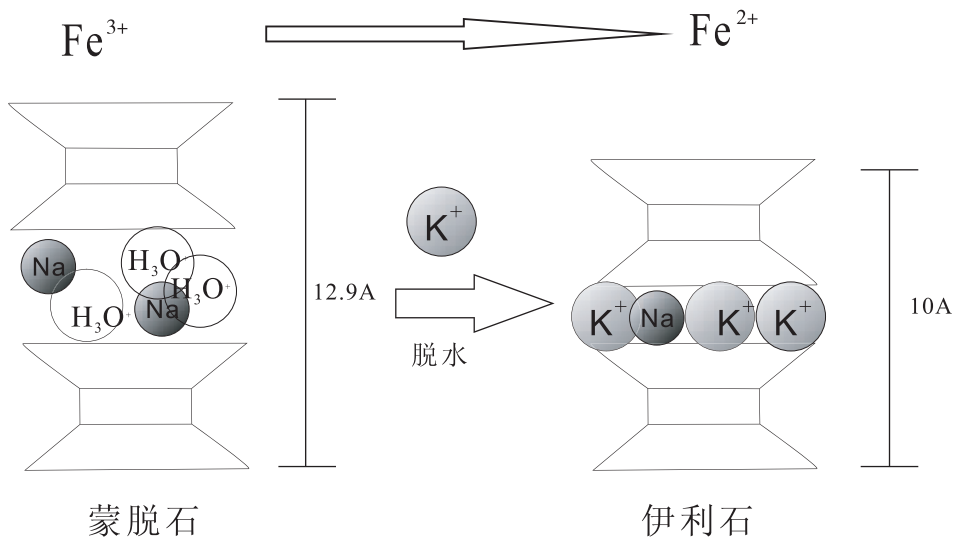


图 6 蒙脱石相变示意图

Fig. 6 Schematic diagram of smectite phase transformation

3 结 论

(1) 铁还原菌 *S. putrefaciens* CN32 和 *S. oneidensis* MR-1 通过与矿物的交互作用, 能将天然钠基蒙脱石中的 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 铁还原量与细菌的接入量及生长情况密切相关, 且还原反应可持续进行较长时间。*S. oneidensis* MR-1 还原天然蒙脱石中 Fe^{3+} 的效率略低于 *S. putrefaciens* CN32。

(2) 两株异化铁还原菌在与矿物发生反应的过程中, 溶液 pH 值没有发生明显变化, 即在反应过程中没有明显的酸蚀或碱溶反应。但细菌作用后的蒙

脱石层间距明显缩小, 从原来的 1.29 nm 分别缩小至 1.06 nm 和 1.02 nm, 说明随着矿物中的 Fe^{3+} 被还原, 蒙脱石可能发生了向伊利石化的相变。

参考文献 (References):

[1] Lovley R. Dissimilatory metal reduction[J]. Ann. Rev. Microbiol., 1993, 7: 263-290.
 [2] Lovley D R. Dissimilatory metal reduction: from early life to bioremediation[J]. ASM News, 2002, 68(5): 231-237.
 [3] Lovley D R. Dissimilatory $Fe(III)$ and $Mn(IV)$ reduction[J]. Microbial Mol. Biol. Rev., 1991, 55(2): 259-287.
 [4] Myers C, Nealson K. Bacterial manganese reduction and growth

- with manganese oxide as the sole electron acceptor[J]. *Science*, 1988, 240: 1319—1321.
- [5] Kostka J E, Stucki J W, Nealson K H, Wu J. Reduction of structural Fe(III) in smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* strain MR-1[J]. *Clays and Clay Minerals*, 1996, 44: 522.
- [6] Kostka J E, Wu J, Nealson K H, Stucki J W. The impact of structural Fe(III) reduction by bacteria on the surface chemistry of smectite clay minerals[J]. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1999, 63: 3705.
- [7] Jaisi D P, Kukkadapu R K, Eberl D D, Dong H L. Control of Fe(III) site occupancy on the rate and extent of microbial reduction of Fe(III) in nontronite[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 69, No. 23, 2005: 5429—5440.
- [8] Zachara J M, Frederickson J K, Li S M, Kennedy D W, Smith S C, Gassman P L. Bacterial reduction of crystalline Fe(III) oxides in single phase suspensions and subsurface materials[J]. *American Mineralogist*, 1998, 83: 1426.
- [9] Urrutia M M, Roden E E, Zachara J M. Influence of aqueous and solid-phase Fe(II) complexants on microbial reduction of crystalline iron(III) oxides[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33: 4022.
- [10] Roden E E, Urrutia M M, Mann C J. Bacterial reductive dissolution of crystalline Fe(III) oxide in continuous-flow column reactors[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 1062.
- [11] Jaisi D P, Dong H, Plymale A E, Fredrickson J K, Zachara J M, Steve H, Liu C X. Reduction and long-term immobilization of technetium by Fe(II) associated with clay mineral nontronite[J]. *Chemical Geology*, 2009, 264: 127—138.
- [12] Fredrickson J K, Zachara J M, Kennedy D W, Liu C X, Duff M C., Hunter D B, Dohnalkova A. Influence of Mn oxides on the reduction of uranium(VI) by the metal-reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*[J]. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2002, 66(18): 3247—3262.
- [13] Viamajala S, Peyton B, Apel W, Petersen J. Chromate/nitrite interactions in *shewanella oneidensis* MR-1; Evidence for multiple hexavalent chromium [Cr(VI)] reduction mechanisms dependent on physiological growth conditions[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 78 (7): 770—778.
- [14] Hofstetter T B, Neumann A, Schwarzenbach R P. Reduction of nitroaromatic compounds by Fe(II) species associated with iron-rich smectites[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40 (1): 235—242.
- [15] Dong H L. Mineral-microbe interactions: A review[J]. *Front. Earth Sci.*, China 2010, 4(2): 127—147.
- [16] Stucki J W, and Anderson W L. The quantitative assay of minerals for Fe²⁺ and Fe³⁺ using 1,10-phenanthroline. I. Sources of variability[J]. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1981, 45: 633—637.
- [17] Stucki J W. The quantitative assay of minerals for Fe²⁺ and Fe³⁺ using 1,10-phenanthroline. II. A photochemical method[J]. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1981, 45: 638—641.
- [18] 中华人民共和国环境保护行业标准. HJ/T 345—2007. 水质铁的测定邻菲罗啉分光光度法[S]. People's Republic of China Environmental Standards. HJ/T 345—2007. Water Quality-Determination of Iron-phenanthroline Spectrophotometry[S]. (in Chinese)
- [19] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. *电子显微学报*, 2005, 24(4): 440. Xie Jiayi, Dong Guangjun, Liu Zhenying. Microbial sample preparation for scanning electron microscope [J]. *J. Chin. Electr. Microsc. Soc.*, 2005, 24 (4): 440. (in Chinese)
- [20] Kim J W, Peacor D R., Tessier D, Elsass F. A technique for maintaining texture and permanent expansion of smectite interlayers for TEM observations[J]. *Clays and Clay Minerals*, 1995, 43: 51.
- [21] Kim J W, Yoko F, Dong H L, Newell S W. The effect of microbial Fe(III) reduction on smectite flocculation[J]. *Clays and Clay Minerals*, 2005, 53 (6): 572—579.
- [22] Dong H L, Jaisi D P, Kim J, Zhang G X. Microbe-clay mineral interactions[J]. *American Mineralogist*, 2009, 94: 1505—1519.
- [23] Kim J W, Dong H L, Swabaugh J, Newell S W, Eberl D D. Role of microbes in the smectite-to-illite reaction[J]. *Science*, 2004, 303: 830—832.