

微生物还原铁氧化物矿物的电化学研究

丁竑瑞, 李 艳, 鲁安怀, 王 鑫, 曾翠平, 颜云花, 王长秋

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

摘要: 微生物可以还原铁氧化物矿物。本文通过使用电化学方法对铁氧化物矿物在微生物还原作用下的氧化还原特性进行模拟与表征, 补充了从新角度对微生物还原铁氧化物矿物的研究。研究结果显示, 微生物可直接以铁氧化物矿物作为电子受体将其还原得到二价铁生成物。电化学实验显示, 0.2 mA 阴极恒电流条件下铁氧化物矿物可以接受电子, 同时铁氧化物矿物中的 Fe^{3+} 在 $0.89 \pm 0.01 \text{ V}$ (相对于饱和甘汞电极) 时发生还原反应, 表明铁氧化物矿物满足被微生物还原的电化学条件。双室微生物-铁氧化物矿物体系研究证实, 铁氧化物矿物可以作为阴极接受微生物提供的电子。

关键词: 铁氧化物矿物; 微生物; 电化学; 循环伏安法; 计时电位法

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1007-2802(2011)03-0299-05

Electrochemical Research on Iron Oxide Minerals Reduction by Microorganisms

DING Hong-rui, LI Yan, LU An-huai, WANG Xin, ZENG Cui-ping,

YAN Yun-hua, WANG Chang-qi

The Key Laboratory of Orogenic Belts and Crustal Evolution, School of Earth and Space

Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract: Iron oxide minerals are electron acceptors and can be reduced by microorganisms. We characterized the redox properties of iron oxide minerals using electrochemical methods in a dual-chamber system of microorganism-iron oxide mineral, accomplishing the research of microorganism reduction in a new perspective. The results showed that microorganisms use iron oxide minerals as electron acceptors and hereby reduce them, and that iron oxide minerals can receive electron under the condition of 0.2 mA cathodic constant current. The cyclic voltammetry results indicated that ferric ion iron oxide minerals can be reduced at $0.89 \pm 0.01 \text{ V}$ (*vs.* SCE). In the dual-chamber system, iron oxide minerals acted as cathodes and were capable of accepting microbial electron.

Key words: iron oxide mineral; microorganism; electrochemistry; cyclic voltammetry; chronopotentiometry

以细菌为代表的微生物是地球上分布最为广泛的生命形式, 而矿物则是无机界的主要组成部分。微生物与矿物之间在多个层面上存在密切联系, 如微生物诱导下的矿物形成、微生物作用下的矿物分解, 以及微生物与含变价元素矿物间的氧化还原作用等。其中, 微生物与矿物之间的氧化还原作用被认为是影响着地球表面元素地球化学循环的关键途径。这一氧化还原过程主要体现在两方面: 一是化能自养微生物氧化还原态矿物, 如硫化物矿物、二价

铁矿物等获得电子能量; 二是微生物以氧化态矿物作为自身呼吸过程的终端电子受体将其还原^[1]。

目前, 对于微生物还原金属氧化物矿物的研究, 主要围绕可还原铁、锰氧化物的异化金属还原菌展开。异化金属还原菌通过氧化有机物底物获得电子, 逐步将电子传递至作为终端电子受体的金属氧化物, 并最终将金属氧化物还原。近年的多项研究表明, 分离自湖底沉积物的 *Shewanella oneidensis* MR-1 具有还原金属氧化物矿物的能力^[2]; 合成针

收稿日期: 2010-12-30 收到, 2011-3-30 改回

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(2007CB815602)

第一作者简介: 丁竑瑞(1985-), 博士研究生, 研究方向: 环境矿物学。

通讯作者: 鲁安怀. E-mail: ahlu@pku.edu.cn.

铁矿晶体在 *Shewanella putrefaciens* CN32 还原作用下会发生 Fe^{2+} 的溶出^[3]; *Geobacter metallireducens* 以 Fe^{3+} 与 Mn^{4+} 氧化物为电子受体的还原过程^[4]; 利用 *Shewanella putrefaciens* 的还原作用可将电子直接传递至固体电极^[5]。还有人通过分子生物学手段,研究了 *Geobacter sulfurreducens* 中与金属还原作用相关基因表达^[6]。

然而,迄今有关微生物还原金属氧化物矿物的研究技术主要集中于常规的分析化学手段与成像学表征。Coleman^[7]对硫酸盐还原菌作用下 Fe^{3+} 的还原产物进行了定量分析。近年有人用 SEM 等手段观察细菌菌毛的形貌^[8],用 AFM 表征细菌还原固体 Fe^{3+} 氧化物过程中菌毛的导电特性进行表征^[9]。相对于上述研究方法,电化学分析技术广泛应用于表征电极反应的氧化还原特性以及分析反应机理。常用电化学技术中,循环伏安扫描可以判定复杂体系中电极表面氧化还原反应的发生情况^[10]; 计时电位技术则可以根据研究需求,在实验体系中实现对特定反应状况的模拟^[11]。

对于微生物还原金属氧化物矿物的研究,电化学技术可以表征氧化物矿物的氧化还原特性并模拟微生物还原金属氧化物矿物的过程。同时,通过构建基于化学原电池原理的双室体系,能够表征研究对象间的电子转移过程。此类体系近年来已在多个领域得到广泛应用,如能源、环保领域热门的微生物燃料电池(MFC)与生物电反应器(BER)均采用了类似的构造^[12]。同时,使用此类装置对微生物与半导体材料光催化作用的协同特性^[13]以及酸性条件下磁黄铁矿矿物的 Fenton 效应^[14]的电化学特性进行了考察。研究微生物与铁氧化物矿物间的氧化还原作用,也可以构建以微生物氧化有机物底物为阳极反应、氧化物矿物还原为阴极反应的双室研究体系,通过电化学技术可以模拟微生物与矿物两端员的氧化还原半反应。

本文以金属氧化物矿物中具有代表性的铁氧化物矿物与一株异化铁还原菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 作为研究对象,对微生物还原铁氧化物矿物这一过程进行研究。通过电化学实验技术的运用与双室微生物-铁氧化物矿物研究体系的构建,模拟与表征了铁氧化物矿物在微生物还原作用下的氧化还原特性。该研究对微生物直接作用条件下还原铁氧化物矿物的研究进行了补充与完善,拓宽了微生物-矿物相互作用领域的研究手段与方法,并为此类研究提供了一种简化模拟生物过程的实验方法。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料与微生物培养

培养 *Shewanella oneidensis* MR-1 (ATCC 70050)用于还原铁氧化物矿物,使用 LB 液体培养基(每 1000 mL 含 10 g 蛋白胨、5 g 酵母粉及 10 g NaCl, pH 调节至约 7.0)在厌氧条件下于 30℃ 恒温进行活化培养。铁氧化物矿物选择使用针铁矿、磁铁矿与赤铁矿,矿粉磨样后过 300 目筛。实验所用的所有试剂均为分析纯,溶液均使用去离子水配制,除特殊说明外,所有实验操作均在恒温(25±1℃)下进行。

1.2 微生物直接还原铁氧化物矿物

实验使用的乳酸钠培养基含 1.8 g/L 乳酸钠、2 g/L NaHCO_3 、0.1 g/L KCl, pH 人工调节至 7.0, 经 0.25 μm 微孔滤膜过滤后于 80℃ 恒温灭菌 4 h。实验体系 50 mL, 加入 0.20 g 铁氧化物矿粉。实验组接种 5 mL LB 活化培养的 MR-1, 对照组加入 5 mL 未接种 MR-1 的灭菌 LB 液体培养基。在 855-AC 厌氧手套箱(Plas-labs, USA)中进行相关厌氧操作并于 30℃ 进行培养。

培养 14 天后取液体样品于 10000 rpm 离心 5 min, 以去除样品中悬浮菌体与矿粉。取上清液 1 mL 并稀释 25 倍, 邻菲罗琳分光光度法于 510 nm 处测定吸光度, 测定溶液中铁离子浓度。

1.3 铁氧化物矿物电极制备与电化学表征技术

铁氧化物矿物电极的制备以光滑石墨板(上海弘枫石墨有限公司)作为导电基底。光滑石墨板尺寸 50 mm×60 mm, 使用前预先在 1 mol/L HCl 与 1 mol/L NaOH 溶液中分别浸泡 1 h, 去除杂质, 用去离子水洗净后干燥待用。将 0.07 g 铁氧化物矿物矿粉、0.03 g 乙炔黑、50 μL Nafion 乳液(Du-pont, USA)与适量无水乙醇混合并搅拌均匀。其中乙炔黑用于增强矿粉与石墨基底间的导电性, Nafion 乳液为经过导电性改良的有机粘结剂, 无水乙醇用于稀释与分散混合物。将混合均匀后的矿粉用玻棒均匀涂布于光滑石墨板表面, 放置过夜自然干燥后用蒸馏水冲洗备用。

电化学相关测试使用 CHI 660C 型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)。铁氧化物矿物的相关电化学测试采用单室三电极体系, 以 232 型饱和甘汞电极(SCE, 电极电势 0.2445 V 相对标准氢电极, 25℃)作为参比电极, 213 型铂电极为对电极, 涂布铁氧化物矿物的光滑石墨板电极作为工作电极。工作电极与对电极, 电极中心距离 12 cm。反应体系

1000 mL,以 1 mol/L KCl 作为电解液,使用稀盐酸调节 pH 至 4.0。同时为降低溶解氧对测定的干扰,体系通 N₂ 除氧 20 min 后密封。使用磁力搅拌以保证溶液混合均匀。

计时电位测试,工作电极设定为阴极,阴极电流 0.2 mA,阴极工作时间 3 h。此条件下,电化学工作站持续向工作电极提供恒定的电子输入。记录工作电极电势的变化情况。循环伏安测试,扫描范围为 -1.5~1.5 V,扫描速度 0.02 V/s。初始扫描方向为负向,累计扫描 31 段,15 个循环。同时,电化学测试使用相同规格,但未涂布铁氧化物矿粉的石墨板作为工作电极进行对照实验。

1.4 微生物-铁氧化物矿物体系的搭建

实验使用的双室实验装置(图 1)为有机玻璃矩形构型。阴阳两室体积均为 625 mL,中间以 5×7 cm² 的阳离子交换膜(CEM, CMI-7000, Ultrex)分隔。阳极室使用 1.5×2.5×7.5 cm³ 的粗糙石墨棒(北京三业碳素有限公司)为电极,接种微生物并使用含 Na₂HPO₄·12H₂O 10.31 g/L, NaH₂PO₄·2H₂O 3.31 g/L, CH₃COONa 1.64 g/L, NH₄Cl 0.31 g/L, KCl 0.13 g/L 的乙酸自配水培养。培养基中添加 0.5 g/L 的酵母粉用于提供各种微量元素与营养物质,初始 pH 约 7.2。阳极室通 N₂ 去除溶解氧,密封以保持厌氧状态。培养阳极微生物,使其

附着于阳极电极表面,待阳极电极电势稳定于 -450 mV(vs. SCE)左右时,认为阳极微生物已具有稳定的电子输出能力,此时进行双室体系的微生物还原铁氧化物矿物研究。

体系阴极使用铁氧化物矿物电极,1 mol/L KCl 作为电解液,使用稀盐酸调节 pH 至 4.0 通 N₂ 密闭,磁力搅拌。两电极中心距离 12 cm。石墨电极在顶部打孔并与直径 1.0 mm 的钛丝连接,使用环氧树脂胶固定并密闭连接点。外电路接入 1000 Ω 定值电阻作为外负载,外负载两端使用 Pico ADC-16 Data logger(Pico Technologies Limited, UK)记录电压并计算体系电流。实验以阴极使用未涂布矿粉的石墨电极作为对照。

2 结果与讨论

2.1 微生物直接还原铁氧化物矿物

Shewanella oneidensis MR-1 可以直接还原矿物。实验进行 14 d 后检测各组的亚铁与总铁离子浓度(表 1)。未接种微生物条件下,对照实验组的铁离子浓度过低无法检出,认为在实验培养条件下,单纯铁氧化物矿物自身十分稳定,未发生溶解反应。而经 MR-1 作用后,铁氧化物矿物明显溶出铁离子,针铁矿、磁铁矿、赤铁矿中被还原生成的 Fe²⁺ 在总铁离子中所占比例依次为 79.2%、81.1% 与 80.1%。对这三种铁氧化物矿物,其自身所含的铁均以 Fe³⁺ 为主,Fe²⁺ 所占比例远少于 80%。可认为 Fe²⁺ 主要源于微生物对铁氧化物矿物的还原作用,而非微生物对矿物的单纯的溶出。

表 1 微生物直接作用还原铁氧化物矿物溶液铁离子含量

Table 1 Iron concentration in the solution of using microorganism to directly reduce iron oxide minerals

矿粉种类	针铁矿	磁铁矿	赤铁矿	针铁矿	磁铁矿	赤铁矿
菌种接种	MR-1	MR-1	MR-1	N/A	N/A	N/A
Fe ²⁺ (×10 ⁻⁶)	51.249	14.274	16.862	2.442	—	—
总 Fe(×10 ⁻⁶)	64.683	17.601	21.052	0.839	—	—

2.2 铁氧化物矿物电化学特性分析

以铁氧化物矿物作为阴极,体系电流 0.2 mA 的条件下使用计时电位法测试 3 h,得到的电极电势-时间曲线如图 2 所示,期间电极电势逐步稳定于 -188~-162 mV;同时,该测试条件下对照的石墨电极的电极电势稳定于 -350 mV,远低于铁氧化物矿物电极的电极电势。阴极恒电流条件下,模拟微生物给出电子还原铁氧化物矿物的过程,实验中通过外部仪器调整体系两极的电势,使单位时间内体

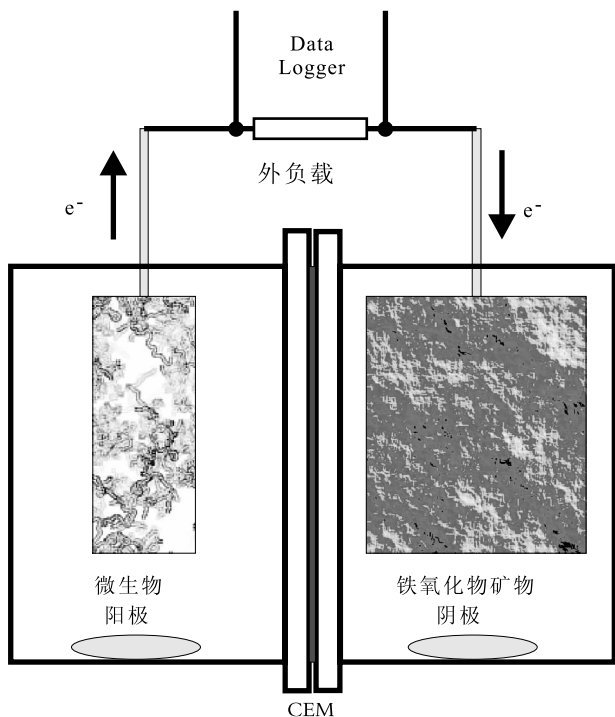


图 1 微生物-铁氧化物矿物体系模式图

Fig. 1 Schematic graph of the dual-chamber system of microorganism-iron oxide mineral

系两极发生对等的氧化还原半反应,从电化学热力学角度保证了电极反应的发生。对于铁氧化物矿物电极具有较高的电极电势,分析原因是其自身含有的氧化态铁具有更强的得电子能力,此时铁氧化物矿物电极得电子发生还原反应并在电化学动力学上表现为具有更高的氧化还原电势。

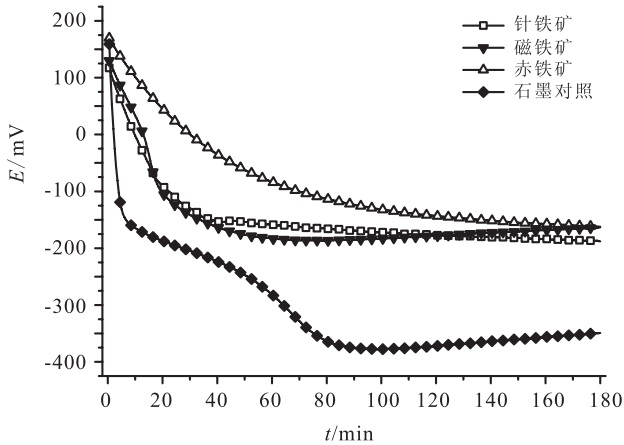


图2 铁氧化物矿物计时电位实验电极电势-时间曲线
Fig. 2 Potential-time curves of iron oxide minerals measured by chronopotentiometry

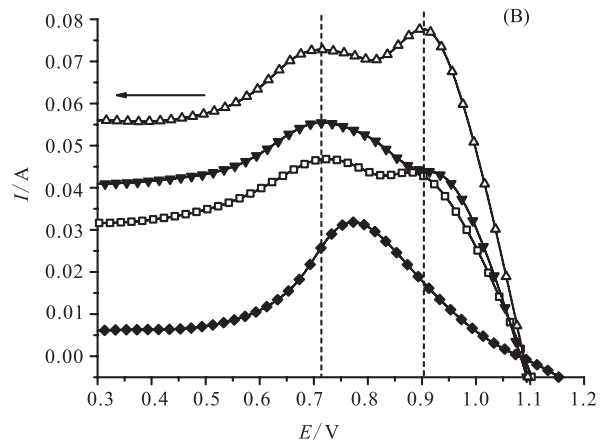
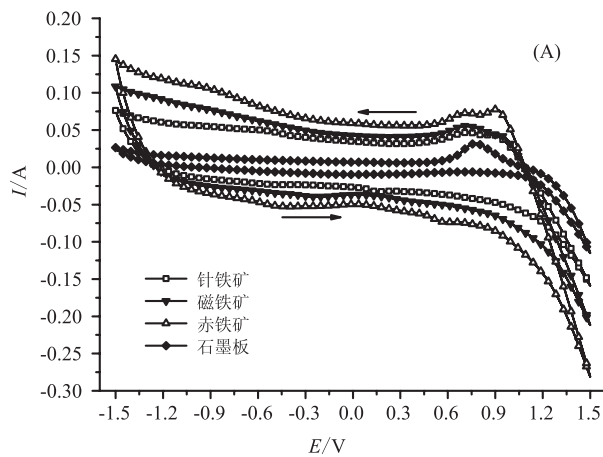


图3 铁氧化物矿物的(A)循环伏安曲线与(B)还原峰局部放大

Fig. 3 Cyclic voltammetry curves of iron oxide minerals (A) and the enlarged reduction peaks (B)

要集中于 $-400\text{ mV}^{[17]}$,由于这一电势远低于铁氧化物矿物的氧化还原电势,因此在电化学热力学方面铁氧化物矿物可以作为微生物电子受体,为微生物还原。

2.3 微生物-铁氧化物矿物体系

铁氧化物矿物作为微生物-铁氧化物矿物体系的阴极,阳极微生物提供的电子经外电路传递后在铁氧化物矿物阴极发生氧化还原反应,将铁氧化物矿物还原。电路电流的大小由阴阳两极电化学半反应的电极电势与体系整体内阻决定,将 Data logger 记录的数据换算为电流后,得到图 4 所示的电流-时

图 3 为循环伏安扫描结果,在负向扫描阶段,石墨对照在 $0.77\text{ V}(vs. \text{SCE})$ 处存在还原峰,分析将该还原峰归属为氧气还原为水的过程^[15],即在实验条件下,溶液中少量的溶解氧与质子发生了还原反应。相对于石墨对照的扫描结果,铁氧化物矿物电极具有 2 处明显的还原峰,分别集中于 $0.72 \pm 0.01\text{ V}$ 、 $0.89 \pm 0.01\text{ V}(vs. \text{SCE})$ 处。其中 $0.89 \pm 0.01\text{ V}(vs. \text{SCE})$ 位置的还原峰归属于铁氧化物矿物中氧化态的 Fe(III) 还原生成 Fe(II) 的反应^[16]; $0.72 \pm 0.01\text{ V}(vs. \text{SCE})$ 处发生的反应与石墨电极对照中发生的氧气还原反应一致,但由于受铁氧化物矿物电极反应的影响,峰位发生一定程度的偏移。同时,铁氧化物矿物电极的循环伏安结果在相同电势条件下具有较大的电流,说明铁氧化物矿物的这一还原反应具有更低的过电势,在动力学上更易于发生。

综合电化学分析结果,可见铁氧化物矿物中氧化态铁可以得电子发生还原反应,体现氧化还原活性。同时,微生物通过膜表面电子传递链给出电子这一过程的氧化还原电势,相对于饱和甘汞电极主

间曲线。阴极使用铁氧化物矿物电极的情况,初始电流为 $0.37 \pm 0.01\text{ mA}$ 。随着体系运行,由于电极反应的消耗导致阴极电极电势的降低,反映为体系电流的缓慢下降。体系运行 60 min 后,电流维持于 $0.20 \pm 0.05\text{ mA}$ 。同等实验条件下,使用石墨电极对照时,初始电流为 0.13 mA ,运行 60 min 后,电流稳定于 0.075 mA 。

体系阴极为铁氧化物矿物电极时,电流密度较石墨提高了 166%。证明以铁氧化物矿物作为阴极材料,具有良好的电子接受能力,可以有效地接受阳极微生物传出的电子。

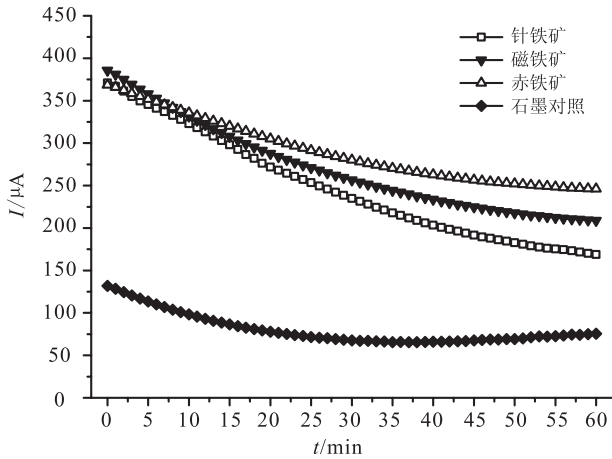


图4 微生物-铁氧化物矿物体系电流-时间曲线

Fig. 4 Current-time curves of the microorganism-iron oxide mineral system

2.4 三种铁氧化物矿物还原结果的比较分析

对铁氧化物矿物的电化学特性分析表明,铁氧化物矿物具有良好的氧化还原活性,可以作为电子受体被微生物还原。双室微生物-铁氧化物矿物体系也证明,阳极微生物提供的电子可以还原阴极铁氧化物矿物并形成电流。这一结果印证了微生物直接作用下对铁氧化物矿物的还原作用。研究使用的三种铁氧化物矿物由于矿物性状的不同,实验结果反映出一定的差异性。

微生物直接作用下,针铁矿的还原量约为磁铁矿与赤铁矿的3倍。由于针铁矿属于水合铁氧化物矿物,结晶程度较低且质地疏松,相对于具有良好结晶度的磁铁矿与赤铁矿,更容易在溶液体系中与微生物发生作用,从而为微生物还原。

在电化学实验与双室体系研究中,赤铁矿反映出最优异的电化学活性,表现为具有更高的电极电势与电流。分析认为,三种铁氧化物矿物中,赤铁矿主要成分为 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$,相对于磁铁矿与针铁矿 Fe^{3+} 比例更高,氧化性更强,易于被还原;同时,赤铁矿中水与杂质含量较低,结晶程度较好,具有更好的导电性能。所以,赤铁矿电极体现出更为优异的电化学活性。

对于铁氧化物矿物的还原研究,微生物直接作用条件下,矿物自身结晶度等结构特征对还原结果具有较大影响;电化学方法测试中,矿物成分组成等因素会影响其氧化还原性质。两种研究方法在取得共性一致的基础上,又在不同方面体现一定的差异。因此,对于微生物还原铁氧化物矿物的研究,适宜将两种方法结合,相互补充,分别从不同的侧重点进行研究。

3 结 论

在微生物直接作用下,铁氧化物矿物中可以作为电子受体,被微生物还原,得到 Fe^{2+} 生成物。电化学实验证明,铁氧化物矿物具有良好的氧化还原活性,结构中的氧化态铁可以得电子被还原,这也是铁氧化物矿物可以为微生物还原的电化学基础。同时,在双室微生物-铁氧化物体系中,铁氧化物矿物可以作为阴极接受微生物传递的电子形成电流。将电化学方法应用于微生物还原铁氧化物矿物的研究,补充并拓宽了该领域的研究手段与方法,并为此类微生物-矿物相互作用的研究提供了一种新的思路。

参考文献 (References):

- [1] Dong H. Mineral-microbe interactions: a review [J]. *Front. Earth Sci. China*, 2010, 4(2): 127-147.
- [2] Myers C R, Nealson K H. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor [J]. *Science*, 1988, 240 (4857): 1319-1321.
- [3] Roden E E, Urrutia M M, Mann C J. Bacterial Reductive Dissolution of Crystalline Fe(III) Oxide in Continuous-Flow Column Reactors [J]. *App. Environ. Microbiol.*, 2000, 66 (3): 1062-1065.
- [4] Childers S E, Ciuffo S, Lovley D R. *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis [J]. *Nature*, 2002, 416(6882): 767-769.
- [5] Kim H J, Park H S, Hyun M S, Chang I S, Kim M, Kim B H. A mediator less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, 30 (2): 145-152.
- [6] Methé B A, Webster J, Nevin K, Butler J, Lovley D R. DNA microarray analysis of nitrogen fixation and Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71 (5): 2530-2538.
- [7] Coleman M L, Hedrick D B, Lovley D R, White D C, Pye K. Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria [J]. *Nature*, 1993, 361: 436-438.
- [8] Richter H, McCarthy K, Nevin K P, Johnson J P, Rotello V M, Lovley D R. Electricity generation by *geobacter sulfurreducens* attached to gold electrodes [J]. *Langmuir*, 2008, 24 (8): 4376-4379.
- [9] Reguera G, McCarthy K D, Mehta T, Nicoll J S, Tuominen M T, Lovley D R. Extracellular electron transfer via microbial Nanowires [J]. *Nature*, 2005, 435 (7045): 1098-1101.
- [10] Marshall C W, May H D. Electrochemical evidence of direct electrode reduction by a thermophilic gram-positive bacterium, *thermincola ferriacetica* [J]. *Energy Environ. Sci.*, 2009, 2: 699-705.