零价铁纳米颗粒对硫酸盐还原菌的杀灭作用研究

舒中亚¹,汪杰²,黄艺^{1*}

(1. 北京大学环境科学与工程学院,北京 100871;2. 北京大学深圳研究生院环境与能源学院,深圳 518055)

摘要:在实验条件下通过混合振荡的方式,探究了零价铁纳米颗粒(NZVI)对硫酸盐还原菌(SRB)的杀灭能力和杀灭效果;并 通过电镜扫描等手段观察零价纳米铁颗粒与硫酸还原菌形态变化,推测杀灭机制.结果表明,当向油田回注水中分别加入0、 1、2、5和10mg/mL的零价铁时,该纳米粒子对硫酸还原菌的杀灭效率分别为0、75.6%、90.0%、99.9%和99.9%.染色与 电镜结果说明,在杀灭过程中 NZVI与 SRB 之间发生了紧密的吸附,并在细菌细胞表面发生了氧化作用.5mg/mL 的 NZVI 对 SRB 有很强的杀灭作用,其作用机制主要是通过包被细胞、抑制细胞增殖,而非破坏细胞结构而达到.

关键词:硫酸盐还原菌;零价铁纳米颗粒;油田回注水;杀灭效率;杀灭机制

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)10-3040-05

Study of Inactivating Sulfate Reducing Bacteria with Zero-valent Iron Nanoparticles

SHU Zhong-ya¹, WANG Jie², HUANG Yi¹

(1. College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China; 2. School of Environment and Energy, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen 518055, China)

Abstract: This research investigates the ability and effect of nanoscale zero-valent iron (NZVI) particles in inactivating sulfatereducing bacteria; and conjectures the mechanism through observing transformation of SRB and NZVI. According to the research results, when adding 0, 1, 2, 5, and 10 mg/mL NZVI to the injection water, the inactivating rate of SRB would be 0, 75.6%, 90.0%, 99.9% and 99.9%. The dyeing and ESEM results show that NZVI adsorbs closely to the SRB cell when inactivating SRB, and it is oxidated on the surface of the bacteria cells. 5 mg/mL NZVI kills SRB greatly and the inhibition may mainly through coating the cells, inhibiting cell proliferation, rather than destroying the cellular structure.

Key words: sulfate-reducing bacteria; zero-valent iron nanoparticles; oilfield injection water; inactivating efficiency; inactivating mechanism

硫酸盐还原菌(sulfate reducing bacteria, SRB) 是一类在厌氧条件下,能把硫酸盐、亚硫酸盐、硫 代硫酸盐、连二亚硫酸盐等硫氧化物及元素硫还原 成硫化物^[1],本身以有机物(如乳酸、乙酸)为营养 的细菌的统称,适宜在脱氧后的油田回注水,密闭污 水系统中的污水,管线垢下、死水区中生长^[2]. SRB 的大量繁殖对油井存在腐蚀、结垢和阻塞三大危 害,它们之间相互关联、相互作用.因此,抑制 SRB 的繁殖是防治油田注水井微生物腐蚀的一个重要 环节.

零价铁纳米颗粒(nano zero-valent iron, NZVI) 作为一种热门的纳米材料,与一般商用铁粉相比,具 有粒子的直径小,颗粒的比表面积和表面能大等特 性,从而具有优越的吸附性能和很高的还原活 性^[3],近年来被用于催化还原废水中多种有机与无 机污染物(PCBs^[4]、TCE^[5]、有机农药^[6]等),使其 转化为无毒或者低毒的化合物,以及去除废水中多 种重金属离子等^[7,8].此外,NZVI 对病毒也具有较 好的杀灭作用^[9].目前杀灭油田回注水中 SRB 的主要手段为添加化学杀菌剂,而利用 NZVI 对环境微生物抑制作用方面的相关研究仍未见报道.本研究 拟在厌氧条件下,通过测定混合液中 SRB 残存率, 探索 NZVI 对 SRB 的杀灭效果;并通过观察 SRB 细胞形态变化,分析 NZVI 产生效用的原因,以期为深 入研究 NZVI 对生物细胞的杀灭作用提供基础.

- 1 材料与方法
- 1.1 实验设计

采用化学方法制备并纯化 NZVI,并将富含 SRB 的油田回注水样与浓度分别为 0、1、2、5、10 mg/mL的 NZVI 悬浊液混合进行反应(每个浓度重 复4次);对反应后混合液进行 SRB 计数,检测不同 浓度 NZVI 对 SRB 的杀灭效率,绘制杀灭曲线;根据

收稿日期:2010-11-27;修订日期:2011-01-20

作者简介:舒中亚(1990~),女,硕士研究生,主要研究方向为环境 微生物技术,E-mail:shuzyfairfaith@gmail.com

^{*} 通讯联系人, E-mail:yhuang@pku.edu.cn

杀灭曲线选取最适宜杀灭浓度,将该浓度下的反应 后体系分作"上清"与"沉淀"两部分,分别进行 SRB 计数、革兰氏染色-镜检、台盼蓝染色-镜检(重复 4 次).

采用环境扫描电镜(ESEM)对反应前的 SRB 菌 液与 NZVI、反应后的混合体系进行电镜扫描(重复 4 次);根据 SRB 计数结果、革兰氏染色结果、台盼 蓝染色结果、电镜扫描结果,推测杀灭机制.

1.2 实验材料

本研究的水样采集自胜利油田的油田回注水, 硫酸还原菌(SRB)浓度为 4.50 × 10⁴ 个/mL, pH 6.9.

1.3 零价铁纳米颗粒(NZVI)的制备与纯化

采用液相化学还原法制备 NZVI:将 0.045 mol/L FeCl₃·6H₂O 和 0.25 mol/L KBH₄ 以 1:1的体积比混合.经磁性转子搅拌 0.5 h 后,过滤.并将得到的纳米零价铁依次用去离子水和无水乙醇分别洗涤 3 次^[10]:

 $4 \text{Fe}^{3+} + 3 \text{BH}_{4-} + 9 \text{H}_2 \text{O} \longrightarrow$

 $4 \text{Fe}^0 \downarrow + 3 \text{H}_2 \text{BO}_3^- + 12 \text{H}^+ + 6 \text{H}_2 \uparrow$

真空干燥后,置于无水乙醇中保存备用.

1.4 实验方法

按照表1的比例,将富含 SRB 的水样与不同浓度的 NZVI 溶液混合,所有反应体系均在10 mL 离心管中进行.将体系各组分在振荡器上振荡、充分混合,反应15 min.

表1 混合反应各体系组分

		Table 1	Components of each	h mixed system		
项目	组号					
	0	1	2	3	4	5
水样/mL	0	5.0	0.5	0.5	0.5	0.5
$ddH_2 O/mL$	0.5	0	0	0	0	0
$Fe/mg \cdot mL^{-1} \cdot mL$	10 × 4.5	0	10 × 4. 5	5 × 4.5	2 × 4. 5	1 × 4.5

1.5 硫酸盐还原菌(SRB)计数方法

SRB 的检测与计数采用油田系统中通用的绝迹稀释-MPN 法^[11].选用北京华兴公司改进的新型 SRB 测试瓶(BHX67-SRB-7 硫酸盐还原菌细菌测试瓶),培养时间为 7d.

1.6 反应体系形态表征方法

采用革兰氏染色、FEI Quanta 200F 场发射环境 扫描电镜(ESEM)、台盼蓝染色,对最适宜杀灭浓度 下反应后混合液的上清与沉淀进行如下检测.

(1) 革兰氏染色 分别取原始水样、反应后混 合液的上清与沉淀制成临时装片,进行革兰氏染色, 在光学显微镜下进行观察,观察细菌的数目与细胞 形态的改变.

(2)台盼蓝染色 分别取原始水样、反应后混合

液的上清与沉淀制成临时装片,进行台盼蓝染色,在 光学显微镜下进行观察,观察细菌细胞的着色情况.

(3)场发射环境扫描电镜扫描(ESEM) 分别 取 Fe、FeO、原始水样、反应后混合液的上清与沉 淀,涂抹于 5 mm×5 mm 的单面硅片上,晾干后粘于 电镜样品台上,进行扫描.

其中,Fe 指的是新制备的 NZVI 悬浊液,FeO 指的是制备出的 NZVI 悬浊液被充分氧化后形成的含有红棕色颗粒的浊液.

2 结果与讨论

2.1 SRB 杀灭效果

经过 7 d 的培养计数,得不同浓度的 NZVI 悬浊 液对 SRB 的杀菌效果如表 2.

表 2	不同浓度铁悬浊液杀菌率
-----	-------------

	Table 2	Killing rates of NZV	I under different concent	rations	
项目	原水样(稀释10倍)	10mg/mL Fe	5mg∕mL Fe	2mg/mL Fe	1mg∕mL Fe
菌液浓度	4. 50 × 10^3	4.0	4.0	4. 50 × 10^2	1.1×10^{3}
杀灭率/%	0	99. 9	99.9	90.0	75.6

以原水样中的菌液浓度为参照,计算 SRB 的杀 灭率,NZVI 悬浊液浓度与水样中 SRB 的杀灭率关 系如图 1 所示. 由图 1 可知,NZVI 悬浊液浓度在 0~5 mg/mL 范围内,对 SRB 的杀灭效率随着 NZVI 悬浊液的浓 度的升高而增大,在 5 mg/mL处达到最大,杀灭率接





近 100%.因此,取 5 mg/mL作为该 SRB 样品的最佳 杀灭浓度.此时分别对 5 mg/mL的上清液和沉淀进 行 SRB 计数.其测试瓶计数结果如表 3,结果证明, 在最佳杀灭浓度下,杀灭后体系的上清液与沉淀中 的 SRB 含量均为 0.说明杀灭后,上清液与沉淀中均 不存在可增殖的 SRB.

表 3 反应后混合液上清与沉淀的 SRB 计数结果1)

${\rm Table} \ 3$	Number of sediment and supernate of the mixed system

孫奴位粉	SRB 阴阳性				
柿样信奴	上清液	沉淀			
10 - 1	—	_			
10 - 2	—	—			
10 - 3	_	—			
10 - 4	—	—			
SRB 含量(单位)	0	0			

1)"一"表示 SRB 计数瓶呈阴性,即不出现 SRB 黑色沉淀

2.2 SRB 杀灭前后的形态变化

将富含 SRB 的水样加入 NZVI 悬浊液中,可观察到原本呈现悬浊状态的体系立刻出现沉降(图 2).



图 2 SRB 水样中加入 NZVI 悬浊液中后出现沉降现象 Fig. 2 Settlement after putting NZVI into SRB aqueous solution

观察革兰氏染色结果,原本在水样中分散分 布呈现粉色的细菌细胞[图3(a)],在添加NZVI 悬浊液后发生聚集,并且被红棕色颗粒物紧密覆 盖[图3(b)和3(c)].根据Diao等^[12]的研究,深 红棕色的物质主要由NZVI与NZVI的氧化产物 FeO(OH)组成.由于SRB是一类以有机物(如乳 酸、乙酸)为营养的异养型细菌,其生长所需营养 与代谢产物的运输均通过细菌的细胞膜、细胞壁 与环境的直接接触完成.当细菌细胞表面被纳米 级的NZVI以及其氧化产物所覆盖时,细胞与周围 环境间的物质交换势必将受到阻碍,进而阻碍细 菌细胞生长增殖.



(a) 原始菌液

(b) 上清液

(c) 沉淀

图 3 革兰氏染色结果照片 Fig. 3 Results of Gram straining

观察 ESEM 扫描电镜结果发现,原本在扫描电镜的磁场作用下呈整齐、规律分布的 SRB 细胞[图

4(b)],在混合反应结束后,细胞表面被大量的絮状物包裹[图4(c)],进一步放大电镜倍数可以观察

到 SRB 细胞周围的絮状物为针状物质[图 4(d)]. 同时对照 NZVI 氧化产物的电镜图片[图 4(a)],可 以观察到 SRB 细胞周围的针状物与 NZVI 氧化针状 产物,在形态的上有很大的相似性,由此可以推断 出,SRB 细胞周围的絮状物是由 NZVI 氧化产物构 成的,其应该是导致细胞发生聚集沉降,并且是失活 的主要因素.

由以上结果可以发现,由于 SRB 细胞的直径 小,比表面积大以及表面能大等特性,使其具有很强 的吸附能力,将油田回注水加入到 NZVI 悬浊液以 后,SRB 细胞能与 NZVI 颗粒或其氧化颗粒发生吸附作用,形成以细菌细胞为中心的颗粒物,并由于自身重力作用,使整个反应体系发生沉降作用.在Jones 等^[13]的研究中,他们发现在 Fe²⁺到 Fe³⁺的快速氧化过程中,杆状细菌的存在(*A. ferrooxidans*等)可以减缓这一过程,并会导致针状铁氧化物的出现. 在本研究中,反应结束后,SRB 细胞周围被大量的针状物质包裹,可能是由于 NZVI 悬浊液与油田回注水混合后,NZVI 颗粒迅速被 SRB 细胞吸附,并在其表面被氧化,生成 FeO(OH)红棕色针状物质.



图 4 ESEM 扫描结果照片 Fig. 4 Results of EMES

NZVI 氧化产物包裹在 SRB 细胞周围,并造成 细胞失活,其可能的原因有:①由于 NZVI 与 SRB 细 胞吸附紧密,其氧化形成的针状产物与细菌细胞发 生物理接触,造成穿刺伤害,导致细胞死亡.Kang 等^[14]已证明超纯度的单层碳纳米管能够表现出很 强的抗菌性,并证明碳纳米管与细菌的直接接触会 造成细胞膜损坏,从而导致细胞死亡;Arisa 等^[15]也 发现单层碳纳米管在不同的缓冲体系中均表现出很 强的杀菌效果,并推测导致细菌死亡可能是由于细 胞膜受损造成的.②与降解卤代烃等有机物一样, NZVI 的强还原作用导致细菌细胞膜上的氧化还原 状态发生变化,导致发生结构与构象的改变,影响细 胞的信号转导、基因转录等过程中的调控作用,影 响细胞生命活动,造成细胞死亡^[16].③SRB 细胞被 NZVI氧化产物包被,使细胞膜的通透性变差,抑制 了细菌细胞的生命活动,使细胞处于沉睡状态,从而 抑制细菌的增殖.

在以上提出的机制可能性中,前2种将会导致 细菌细胞的死亡.在本研究中,根据死亡细菌的细胞 膜通透性与活细菌不同的原理,分别对原始水样以 及混合反应结束后的上清液和沉淀进行台盼蓝染色,结果显示 3 个体系中的 SRB 细胞均未被台盼蓝染成蓝色,说明细菌细胞结构并未完全破坏.这个结果说明,虽然反应后的计数结果显示混合反应体系中已经不存在能够增殖的 SRB 细胞,但不能肯定细胞已经死亡.

根据电镜扫描的结果[图4(c)和(d)],在混合 反应结束后,SRB 的细胞周围被 NZVI 的氧化产物 紧紧包被,形成了一种由针状物质组成的外壳.这层 外壳也可能会阻止台盼蓝染料与细胞膜接触,而使 染色反应无法进行.这就导致了台盼蓝试验结果的 不确定性,NZVI 对 SRB 细胞的抑制和破坏作用机 制还需要进一步研究.

3 结论

(1)通过对 NZVI 对 SRB 的杀灭效率的计算, 以及对革兰氏染色、台盼蓝染色和场发射环境扫描 电镜扫描结果的分析,可以看出,在本研究结果条件 下,NZVI 对 SRB 的杀灭效率在 5 mg/mL剂量时达 到最大,杀灭率接近 100%.而在最佳杀灭浓度下, SRB 与 NZVI 的混合体系无论是在上清液中还是在 沉淀中,均不存在可增殖的 SRB 细胞,但 NZVI 对 SRB 细胞的作用原理尚有待研究.

(2)总结本研究结果以及前期同类研究,NZVI 可以作为一种有效且廉价的灭菌剂,为处理废水以 及减小 SRB 对管道腐蚀提供了一种新的可能性.同 时由于其反应产物的环境友好性,不会造成二次污 染,且由于产物颗粒小,能够很容易地被微生物以及 其他颗粒吸附,使得其去除工艺也比较简单.但是由 于 NZVI 在环境中很容易被氧化,且大规模生产工 艺的不成熟,对 NZVI 有效的利用仍需要进一步研 究.

参考文献:

- [1] 马保国,胡振琪,张明亮,等.高效硫酸还原菌的分离鉴定及 其特性研究[J].农业环境科学学报,2008,27(2):608-611.
- [2] 易绍金,佘跃惠.石油与环境微生物技术[M].北京:中国地 质大学出版社,2003.
- [3] 耿兵,李铁龙,金朝晖,等. 壳聚糖稳定纳米铁的制备及其对

地表水中 Cr(\I) 的去除性能[J]. 高等学校化学学报,2009, 30(4):796-799.

- [4] Lowry G V, Johnson K M. Congener-specific dechlorination of dissolved PCBs by microscale and nanoscale zerovalent iron in a water/methanol solution [J]. Environmental Science and Technology, 2004, 38(19): 5208-5216.
- [5] Wang C B, Zhang W X. Synthesizing nanoscale iron particles for rapid and complete dechlorination TCE and PCBs [J]. Environmental Science and Technology, 1997, 31 (7): 2154-2156.
- [6] Liao C J, Chung T L, Chen W L, et al. Treatment of pentachlorophenol-contaminated soil using nanoscale zerovalent iron with hydrogen peroxide [J]. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2007, 265(1-2): 189-194.
- [7] Ponder S M, Darab J G, Malloukt E. Remediation of Cr (VI) and Pb (II) aqueous solutions using supported nanoscale zerovalent iron [J]. Environmental Science and Technology, 2000, 34(12): 2564-2569.
- [8] Ponder S M, Darab J G, Bucher J, et al. Surface chemistry and electrochemistry of supported zerovalent iron nanoparticales in the remediation of aqueous metal contaminants [J]. Chemistry of Materials, 2001, 13(2): 479-486.
- [9] Youwen Y, Chiu Y. Removal and inactivation of waterborne viruses using zerovalent iron [J]. Environmental Science and Technology, 2005, 39(23): 9263-9269.
- [10] Sun Y P, Li X Q, Zhang W X, et al. Characterization of zerovalent iron nanoparticales [J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2006, 120(1-3): 47-56.
- [11] GB/T 14643.5-1993. 工业循环冷却水中硫酸盐还原细菌的 测定, MPN 法[S].
- [12] Diao M H, Yao M S. Use of zero-valent iron nanoparticales in inactivating microbes [J]. Water Research, 2009, 43 (20): 5243-5251.
- [13] Jones B, Renaut R W. Selective mineralization of microbes in Fe-rich precipitates (jarosite, hydrous ferric oxides) from acid hot springs in the Waiotapu geothermal area, North Island. New Zealand [J]. Sedimentary Geology, 2007, 194(1-2): 77-98.
- [14] Kang S, Pinault M, Pfefferle L D, et al. Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity [J]. Langmuir, 2007, 23(17): 8670-8673.
- [15] Arias L R, Yang L J. Inactivation of bacterial pathogens by carbon nanotubes in suspensions [J]. Langmuir, 2009, 25(5); 3003-3012.
- [16] 刘漪沦,孙静,刘月明. 氧化还原状态与细胞信号传导[J]. 成都医学院学报,2009,4(2):127-131.