



Shewanella putrefaciens CN32 对粘土附着态铵氮释放的影响

马晓田, 常保璇, 黄柳琴*, 蒋宏忱

中国地质大学(武汉), 生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北 武汉 430074

摘要:【目的】研究产胞外分泌物微生物 *Shewanella putrefaciens* CN32 对土壤中常见粘土矿物附着态 NH_4^+ 的释放效果及影响机制。【方法】以吸附 NH_4^+ 的蒙脱石、蛭石、伊蒙混层矿物和黑云母为对象, 通过监测 *S. putrefaciens* CN32 作用下不同粘土释放的 NH_4^+ 含量及过程, 以及监测微生物量及释放的胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)的含量变化, 研究 *S. putrefaciens* CN32 作用下不同粘土矿物类型附着态 NH_4^+ 释放的差异性。【结果】粘土矿物附着态 NH_4^+ 含量从高到低依次为蒙脱石>蛭石>伊蒙混层矿物>黑云母(黑云母 NH_4^+ 吸附量极低, 会在非生物作用下几乎完全释放), CN32 作用下粘土附着态 NH_4^+ 相对释放量依次为蒙脱石>伊蒙混层矿物>蛭石; 然而, 尽管 CN32 有效促进了粘土附着态 NH_4^+ 释放, 但释放的 NH_4^+ 并未在溶液中大量累积, 而是多被微生物同化吸收转化为生物有机氮(EPS 为主)并吸附在粘土表面, 且粘土对 EPS 的吸附能力表现为蒙脱石>伊蒙混层矿物>蛭石>黑云母; 由于粘土吸附 NH_4^+ 及 EPS 都与矿物中的羟基(结构水或层间水)关系密切, 推测 EPS 对矿物羟基的竞争吸附可能是 CN32 促进 NH_4^+ 释放的重要原因之一。【结论】以上结果表明, 产 EPS 微生物 *S. putrefaciens* CN32 能够促进各类粘土矿物的附着态 NH_4^+ 释放, 但释放的 NH_4^+ 可以通过微生物作用转化为有机氮, 从而在减少 NH_4^+ 流失的同时增加土壤氮肥的生物可利用性, 因此微生物在降低土壤氮肥流失、转化土壤氮肥污染过程中可能起到了重要作用, 也揭示了深入系统地分析不同类型土壤(粘土类型不同)中粘土附着态 NH_4^+ 在不同功能微生物作用下的迁移转化过程, 是精准评估土壤氮肥施用效率及流失风险的前提之一。

关键词: 粘土矿物, 氮肥释放, *Shewanella putrefaciens* CN32, 胞外聚合物

近半个世纪以来, 世界人口急剧增长, 随之而来的是对粮食巨大的需求, 促生了农业生产对化学肥料的强烈依赖性, 这种状况在我国表现尤为突出。由于土壤中氮素是制约农作物生长的最

主要因素之一, 施用氮肥成为了提升粮食产量最有效的措施之一^[1]。因此, 世界氮肥使用量长期呈猛烈上升趋势, 尤其是我国, 氮肥的施用量远高于世界平均水平^[2]。据世界粮农组织统计数据显示

基金项目: 国家自然科学基金(41602347)

*通信作者。Tel/Fax: +86-27-67883452; E-mail: huanglq@cug.edu.cn

收稿日期: 2020-03-28; 修回日期: 2020-05-15; 网络出版日期: 2020-05-18

(FAOSTAT, www.fao.org), 全世界化肥氮(主要为 NH_4^+ 基氮肥)使用总量自 1961 年 11.6×10^6 t 急速增长到 2014 年的 137.9×10^6 t 后才趋于平稳, 而此间中国使用量由 0.5×10^6 t 增长到了 30.9×10^6 t, 且中国年平均每公顷耕地氮肥使用量是世界平均水平的 3 倍以上, 农作物对这些过量施加的氮肥利用率往往低于 40%^[3]。因此, 尽管氮肥对粮食增产功不可没, 但过剩的氮肥导致了大量氮素的流失、淋滤进入地表水体或者地下水, 是中国大量湖泊、河流、近海等水体富营养化以及大面积地下水氮污染的最主要污染源之一^[4]。

事实上, 长期过量的施加氮肥不仅污染环境, 也大大增加了土壤的氮负荷。氮肥的主要形态为铵基(NH_4^+)氮肥, 因为土壤中的颗粒细小($< 2 \mu\text{m}$)的粘土矿物常带有永久负电荷(晶体结构中低价阳离子类质同象替换高价阳离子)且具有极大的比表面积, 可以通过吸附等方式有效减缓 NH_4^+ 基氮肥的流失。因此, 在农耕土壤大量施入 NH_4^+ 基氮肥的背景下, 相当可观的 NH_4^+ 以粘土附着态的形式被截留在土壤中。前人对全球范围土壤的统计研究发现, 每千克土壤可吸附 10–90 mg(粗砂土)至 60–460 mg(粘质土)的 NH_4^+ , 可占施入 NH_4^+ 氮肥的 30%; 每公顷表层土壤(0–30 cm)中的粘土能够固定 350–3800 kg 的 NH_4^+ -N(多占土壤总氮含量 2%–25%), 而这一比例在粘土含量高、缺乏根系的下层土壤则更高(多占总氮含量 14%–85%)^[5]。因此, 粘土附着态 NH_4^+ 是人为活动造就的一个巨大土壤氮库, 其释放过程及机理不仅决定了土壤供氮的效率, 也与氮素持续流失造成水体污染密切相关, 因此了解粘土矿物附着态 NH_4^+ 的释放过程及机理至关重要。

粘土附着态 NH_4^+ 的含量并非一成不变, 其稳

定性受粘土矿物学性质差异以及多种环境因素影响巨大。粘土附着态 NH_4^+ 包括吸附于粘土矿物外表面、侧面断键或 2:1 型矿物层间的 NH_4^+ , 其中前两种被视为可交换性附着态 NH_4^+ , 相对较易通过生物或非生物作用从粘土矿物上脱离下来; 而插层在 2:1 型矿物层间的 NH_4^+ 往往被称为固定态 NH_4^+ , 因为 NH_4^+ (1.43 Å)的离子半径与 K^+ (1.33 Å)相近, 正好吻合四面体基面氧原子形成的六边孔洞的大小, 使 2:1 型矿物层间坍塌, 层间距减小至 1 nm, 导致 NH_4^+ 圈闭而难以通过阳离子交换作用置换出来^[6]。在不同的粘土中, NH_4^+ 主要的吸附方式和存在形态可能不同, 例如缺乏层间结构的高岭石主要将 NH_4^+ 吸附在矿物表面、层间膨胀和阳离子可交换性更高的蒙脱石固定 NH_4^+ 的能力高于蛭石等, 也正是粘土对 NH_4^+ 吸附方式的不同导致在外界因素干扰下其吸附的 NH_4^+ 释放难易程度的不同^[7–8]。目前, 对影响粘土矿物附着态 NH_4^+ 释放研究较多的因素主要包括 K^+ 离子^[9]、腐殖质^[10]、植物根系^[11]、氧化还原条件^[12]等。这些因素中有些直接影响粘土附着态 NH_4^+ 的阳离子交换和扩散过程, 如离子特征与 NH_4^+ 极相似的 K^+ 可以与 NH_4^+ 发生竞争吸附^[13], 腐殖质与高岭石形成复合体增强了阳离子交换能力从而增加了对 NH_4^+ 吸附量等; 另一些因素则是通过影响粘土的矿物学特征改变粘土矿物对 NH_4^+ 的吸附能力, 如水稻田淹水带来的铁还原环境导致粘土负电性增加从而增加对 NH_4^+ 的吸附能力^[14]。

然而事实上, 除以上因素之外, 土壤微生物是影响粘土附着态 NH_4^+ 稳定性的一个非常重要但极少被重视的角色。微生物在土壤中数量极其庞大, 可通过同化吸收 NH_4^+ 、改变粘土矿物微环境及转化 NH_4^+ 形态(如硝化作用)等方式影响粘土附

着态 NH_4^+ 的稳定性, 从而影响其释放过程^[15]。其中, 微生物通过分泌有机酸或胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 不仅可以帮助细胞截留环境中的有机和无机分子, 为细胞提供营养物质, 还能协同其他代谢物共同破坏矿物的晶格结构, 帮助细菌与矿物相互接触形成细菌-矿物复合体, 从而形成相对封闭的微环境, 加速矿物的风化过程^[16]。因此, 本研究选取土壤中多种代表性粘土矿物, 包括蛭石、蒙脱石、伊蒙混层矿物及黑云母, 以及一种土壤中常见的能分泌 EPS 的功能微生物 (腐败希瓦氏菌 *Shewanella putrefaciens* CN32) 为研究对象, 分析这些粘土吸附 NH_4^+ 的能力以及在 CN32 作用下它们释放附着态 NH_4^+ 的过程, 探究该微生物与粘土矿物相互作用的过程。以期可以通过模拟实验得到该微生物影响粘土矿物附着态 NH_4^+ 的释放过程和机制。

1 材料和方法

1.1 吸附 NH_4^+ 的粘土制备

本实验选取蒙脱石、伊蒙混层矿物、蛭石及黑云母这四种粘土矿物为代表, 因为它们是土壤中常见的主要粘土矿物类型^[14]。其中蒙脱石 (NAu2) 和伊蒙混层矿物 (ISCz) 购买于美国粘土矿物学会 (<http://www.clays.org/>), 蛭石 (简称 Ver) 及黑云母 (简称 Bt) 来自我国新疆地区某矿床。以上粘土矿物首先研磨过筛, 浸泡分散于 0.5 mol/L NaCl 溶液中, 利用斯托克斯沉降公式分选出粒径小于 2 μm 的组分; 然后对该粒径组分用清水多次洗涤, 洗去多余 NaCl 后用于制备吸附 NH_4^+ 的粘土。不同的粘土吸附 NH_4^+ 的方式可能存在很大差异 (可交换性或固定态 NH_4^+), 但也是影响附着态 NH_4^+ 稳定性的天然因素, 因此制备 NH_4^+ 吸附的粘土时

并未区分 NH_4^+ 附着状态。吸附 NH_4^+ 的粘土制备方法如下: 用 1 mol/L 的 NH_4Cl 配置成 50 g/L 的粘土悬浊液, 搅拌 2 h 弃去上清, 重新加入新鲜的 1 mol/L NH_4Cl , 如此反复 3 次, 最后离心收集粘土, 水洗 6 次去除多余的 NH_4Cl , 烘干研磨待用。

1.2 菌株培养及计数

本次实验选用的菌株为腐败希瓦氏菌 *Shewanella putrefaciens* CN32 (以下简称 CN32), 分离自新墨西哥州 Morrison 地层开采的地下岩芯样品, 是一株广泛被研究的模式菌株。取 CN32 储存菌液 (-80 °C 条件下储存于 40% 甘油中) 培养于 LB 培养基 (10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L NaCl) 中复苏 24 h (30 °C, 150 r/min)。之后, 取 1 mL 转接至新鲜的 100 mL 灭菌后的 LB 培养基中, 在摇床上培养 16 h, 使其生长处于对数期后, 离心收集菌体, 利用碳酸氢钠缓冲液 (2.5 g/L NaHCO_3 , 0.1 g/L KCl) 清洗 3 遍, 利用吡啶橙直接计数法在荧光显微镜 (Leica DM5000B, Germany) 下观察并计数。所有接种、清洗与稀释操作均在超净工作台完成。

1.3 微生物作用于吸附 NH_4^+ 的粘土

本次实验共设置 5 个系列, 分别以四种吸附 NH_4^+ 的粘土 (标记为 NH_4^+ -NAu2、 NH_4^+ -ISCz、 NH_4^+ -Ver 和 NH_4^+ -Bt, 粘土浓度均为 5 g/L) 和溶解态 NH_4Cl (浓度为 0.5 mmol/L) 为唯一氮源, 培养基其他成分包括 0.1 g/L NaCl、0.05 g/L KH_2PO_4 、0.05 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.02 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2 mL/L 微量元素溶液、1 mL/L 维他命溶液以及 1 g/L lactate-Na; 其中微量元素溶液的每升母液成分包括: NTA 1.5 g, MgSO_4 3 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, ZnCl_2 0.13 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0.01 g, H_3BO_3 0.01 g, Na_2MoO_4 0.025 g, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g; 维生素溶液的母液组分包括(L^{-1}): biotin 2 mg, folic acid 2 mg, pyridoxine HCl 10 mg, riboflavin 5 mg, thiamine 5 mg, nicotinic acid 5 mg, B-12 0.1 mg, *p*-aminobenzoic acid 5 mg, thiocetic acid 5 mg; 将培养基和相应的粘土混合后高温灭菌, 之后分别接种等浓度上述收集的新鲜菌液(CN32 终浓度为 1×10^9 cell/mL), 同时设立不接种菌液的空白对照。以上每组培养设置两个平行对照组。

1.4 粘土矿物附着态 N 含量的测试

粘土矿物附着态 N 在微生物作用前等同于吸附的 NH_4^+ , 在微生物作用后还包含可能吸附的有机 N(如生物量及 EPS)。粘土矿物附着态 N 含量变化通过元素分析仪测定: 在选取的时间点吸取 5 mL 粘土溶液, 离心去除上清液并用去离子水清洗(3次), 得到粘土沉淀冷冻烘干, 用碳氮元素分析仪(Elementar Unicube, Germany)测试其总 C、N 的含量。

1.5 释放到上清中 NH_4^+ 离子浓度的测试

粘土释放到上清中的 NH_4^+ 分光光度法测定^[15]: 显色试剂为 1:2 的体积比混合溶液 1(85 g/L sodium salicylate 和 0.6 g/L sodium nitroprusside)和溶液 2(0.3 mol/L NaOH 溶液), 取 0.6 mL 样品加入 0.3 mL 的显色试剂, 混合均匀后向样品中加入 0.12 mL 的 0.1% sodium dichloroisocyanurate, 混合均匀后避光 30 min, 于 660 nm 波长下测定样品的吸光度并确定上清 NH_4^+ 离子的浓度(岛津 UV1750)。

1.6 总蛋白含量(total protein)的测试

由于粘土矿物的干扰难以对微生物菌体含量

进行计数, 因此通过测定蛋白总含量的方式来反映微生物含量的变化。测试方法采用改进的 Bradford 法^[19]: 取 0.9 mL 粘土悬浊液, 加入 0.1 mL 的 0.2 mol/L NaOH 溶液, 摇匀后煮沸 10 min, 冷却后离心($10000 \times g$, 10 min), 取上清液 0.8 mL 加入到 0.2 mL 的 Bradford reagent 中反应 5 min, 于 595 nm 波长下测定样品的吸光度并确定溶液中总蛋白含量。

1.7 EPS 的提取与测定

为了研究 EPS 对附着态 NH_4^+ 释放的影响, 采用 Tallon 提取法^[20]: 将 3 mL 粘土悬浊液在 4 °C 下离心($15000 \times g$, 15 min), 弃上清液, 沉淀用 3 mL 1 mol/L NaCl 洗涤后再次离心(4 °C 下 $15000 \times g$, 15 min), 弃上清液; 向得到的沉淀中加入 3 mL 50 mmol/L EDTA 后在 4 °C 下孵育 4 h, 并间隔一定时间轻微振荡, 后在 4 °C 下离心($6000 \times g$, 30 min); 保留上清液, 并向上清液中加入两倍体积(即 6 mL)的冷乙醇, 4 °C 下孵育过夜后即沉淀出 EPS; 将沉淀的 EPS 离心弃上清, 风干后用 3 mL 蒸馏水溶解。对 EPS 的两个主要组分碳水化合物和蛋白质组分根据标准苯酚/硫酸法^[21]和 Bradford 法^[19]进行定量分析。定量过程中的标准物质采用葡萄糖和蛋白质(BSA, Sigma-Aldrich)。

1.8 傅里叶变换红外光谱分析(FTIR)

原始粘土、微生物作用与空白对照中的粘土利用傅里叶变换红外光谱分析(FTIR)分析粘土矿物结构及组成的潜在变化。取 0.5 mL 粘土溶液样品后, 离心后去除上清液, 并用无菌水洗涤 3 遍, 待样品自然晾干后, 取 2 mg 粉末样品与 200 mg KBr 迅速充分研磨, 压片后上机测试。扫描范围为中红外 $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$, 扫描次数 50 次。

2 结果和讨论

2.1 粘土附着态 NH_4^+ 的含量

通过元素分析测定吸附 NH_4^+ 前后的粘土矿物 N 含量表明, 实验选取的四种粘土矿物均能够吸附一定量的 NH_4^+ 。其中, 蒙脱石 N_{Au2} 对 NH_4^+ 的吸附量最高, 其次是蛭石 Ver 和伊蒙混层矿物 ISCz, 而黑云母 Bt 对 NH_4^+ 的吸附量最低。经计算, 当使用 5 g/L 吸附 NH_4^+ 的粘土矿物用于微生物与矿物相互作用实验时, 体系中附着态 NH_4^+ 的总含量为 0.49–3.32 mmol/L(表 1)。

所选的粘土矿物 NH_4^+ 的吸附量与其矿物学性质差异息息相关。蛭石和蒙脱石所带的负电荷一般较多, 因此吸附的 NH_4^+ 也较多, 但二者 NH_4^+ 吸附的主要方式可能差异较大: 蛭石的负电荷多在四面体片上, 而蒙脱石多在次表面的八面体面片层上, 且蛭石的层间膨胀性和阳离子交换能力都比蒙脱石差, 因此, 蛭石外表面吸附 NH_4^+ 的能力强于蒙脱石, 而蒙脱石层间吸附 NH_4^+ 的能力强于蛭石。而伊蒙混层矿物中的伊利石层负电量低, 层间 K 离子含量高, 阳离子交换能力弱, 导致其整体的 NH_4^+ 吸附能力弱于蒙脱石。黑云母中 K 含量较高, 负电量和阳离子交换能力都很低, 因此黑云母吸附的 NH_4^+ 含量较少。

表 1. 四种实验所选取的粘土矿物附着态 NH_4^+ 的含量
Table 1. Contents of adsorbed NH_4^+ in the selected clay minerals

Mineral	N content/ (mg/kg)	Adsorbed NH_4^+ in 5 g/L clay suspension/(mmol/L)
N _{Au2}	10	3.32
NH_4^+ -N _{Au2}	9310	
Ver	390	2.36
NH_4^+ -Ver	7000	
ISCz	390	1.51
NH_4^+ -ISCz	4610	
Bt	220	0.49
NH_4^+ -Bt	1600	

2.2 CN32 影响粘土矿物附着态 NH_4^+ 的稳定性

2.2.1 粘土附着态 N 含量的变化: 以粘土附着态 NH_4^+ 为唯一氮源培养 *S. putrefaciens* CN32 后, 通过对比微生物作用前后粘土矿物吸附的 N 含量发现, CN32 确实能够促进粘土矿物附着态 NH_4^+ 的释放, 但促进程度受粘土矿物类型影响较大(图 1)。从无菌对照组来看, 四种粘土矿物在培养液中初期都能够自发地释放一部分 NH_4^+ , 释放的相对含量从高到低依次为黑云母>伊蒙混层矿物>蒙脱石>蛭石, 表明它们吸附 NH_4^+ 的稳定性依次增强(即黑云母<伊蒙混层矿物<蒙脱石<蛭石)。而在 CN32 作用体系中, 粘土附着态 N 相较于无菌对照组进一步降低, 半个月内, N_{Au2}、ISCz 和 Ver 附着态 N 的释放程度较大, 释放的增加量分别为 32%、22% 和 20%(释放量分别为 1.06 mmol/L、0.3 mmol/L 和 0.47 mmol/L, 图 1-A-C), 而 Bt NH_4^+ 吸附量极少, 在没有微生物作用下会自动地完全释放(后面讨论不再涉及)(图 1-D)。因此, CN32 促进粘土附着态 NH_4^+ 释放的效果由强到弱依次为蒙脱石>伊蒙混层矿物>蛭石。

值得注意的是, 在 CN32 作用于粘土的过程中, 部分释放的 NH_4^+ 可被微生物体吸收同化转变为有机 N。这些有机 N 可能重新吸附在矿物表面, 因此微生物作用后的粘土附着态 N 含量事实上包括了剩余的附着态 NH_4^+ 及可能吸附在粘土矿物上的有机 N, 因此, 根据测定的粘土附着态 N 含量的变化(图 1)可能低估了实际的 CN32 促进 NH_4^+ 释放效果。不过, 不同类型粘土对微生物有机 N 的吸附效率可能不同, 例如在 ISCz 体系中, CN32 作用前期(0–5 d, 图 1-C)无菌对照组反而比微生物作用组固体 N 含量更低, 表明可能有相当数量的有机 N 吸附在 ISCz 上; 而其他粘土体系中, 微生

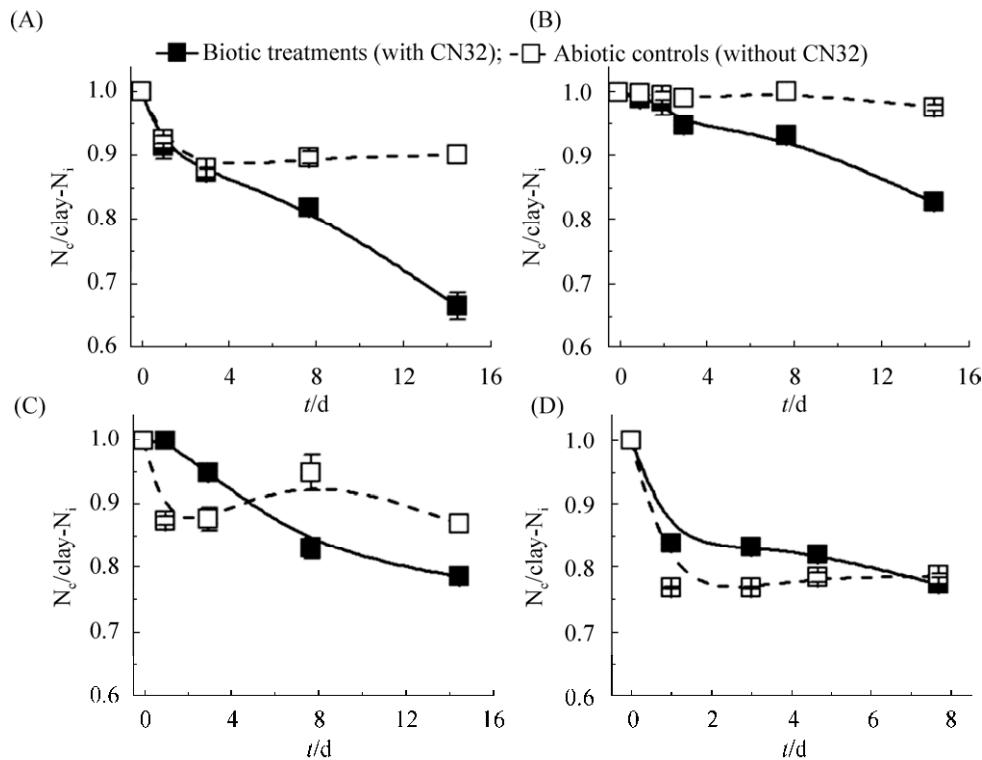


图 1. 吸附 NH_4^+ 的蒙脱石(A)、蛭石(B)、伊蒙混层矿物(C)及黑云母(D)在 *S. putrefaciens* CN32 作用下粘土颗粒上 N 含量随时间的变化

Figure 1. Variation of clay-sorbed N on smectite (A), vermiculite (B), smectite-illite mixlayer mineral (C) and biotite (D) in the incubation with and without inocula of *S. putrefaciens* CN32 cells. The error bar represented standard error of duplicates.

物作用体系一直低于无菌对照组 NH_4^+ 含量，表明这些粘土吸附有机 N 较少，或吸附的有机 N 低于 CN32 促进 NH_4^+ 的释放量。

2.2.2 上清液中 NH_4^+ 离子的浓度变化：在实际土壤中，粘土附着态 NH_4^+ 在微生物作用下释放成为溶解态 NH_4^+ 后，可能被转化为易淋滤的 NO_3^- 造成 N 流失抑或直接被生物吸收利用，因此实验监测了 CN32 促进粘土附着态 NH_4^+ 释放后溶液中的溶解态 NH_4^+ 含量变化(图 2-B-E)，同时也测定了 CN32 以溶解态 NH_4^+ 培养时 NH_4^+ 消耗的行为(图 2-A)。结果表明，以溶解态 NH_4^+ 为氮源培养 CN32 时，初期(0-4 d)溶液的 NH_4^+ 相对于无菌对照组仅有极少量的减少，且 pH 几乎无波动(6.74-6.92)，

而并未发生接种入细胞体后吸附 NH_4^+ 导致其浓度明显下降的现象；然而在整个培养过程中 NH_4^+ 浓度持续下降，表明微生物在持续吸收同化 NH_4^+ ，因此可以推测 CN32 菌体或其分泌物对 NH_4^+ 的吸附作用可能明显弱于微生物的吸收同化作用。

在粘土体系中，NAu2 在 CN32 作用下释放到溶液中的 NH_4^+ 浓度略高于无菌组(图 2-B)，而其他粘土矿物组中微生物作用下溶液中 NH_4^+ 的累积浓度始终低于无菌组(图 2-C-E)。决定 CN32 作用下溶解态 NH_4^+ 含量是否高于无菌组含量的因素有二：一是 CN32 促进矿物附着态 NH_4^+ 释放的效率，二是 CN32 同化吸收 NH_4^+ 的效率(CN32 可有效同化吸收较多量的溶解态 NH_4^+ ，图 2-A)，当前者大于后者时，

则表现为溶液中 NH_4^+ 高于无菌组；反之，当 CN32 同化 NH_4^+ 高于促进释放效率时，反而使溶液中 NH_4^+ 浓度低于无菌组。因此，CN32 作用下 N Au2 附着态 NH_4^+ 的释放速率最快、释放量最多，从而使上清 NH_4^+ 的累积量高出 CN32 同化吸收所需 NH_4^+ 量，表现出比无菌对照组中更高的 NH_4^+ 累积量，而在其他三个粘土体系中 (Ver、ISCz 及 Bt) 附着态 NH_4^+ 的释放效率低于 CN32 的同化吸收的效率，从而使体系中累积的 NH_4^+ 量低于无菌组。这一发现与上文中粘

土附着态 N 的结果相互印证，即在 CN32 作用下 N Au2 释放附着态 NH_4^+ 的效率和释放量高于其他三类粘土。同时，CN32 快速同化吸收释放到溶液中的 NH_4^+ ，造就矿物附着态 NH_4^+ 与溶解态 NH_4^+ 存在较高的势差，可能在促进粘土附着态 NH_4^+ 不断被“泵出”释放发挥了重要作用。该结果也表明，微生物促进土壤中粘土附着态 NH_4^+ 的释放并不一定会造成更多的 N 流失，反而可以促进粘土附着态 NH_4^+ 的生物利用性，从而使土壤固定氮肥的利用率提高。

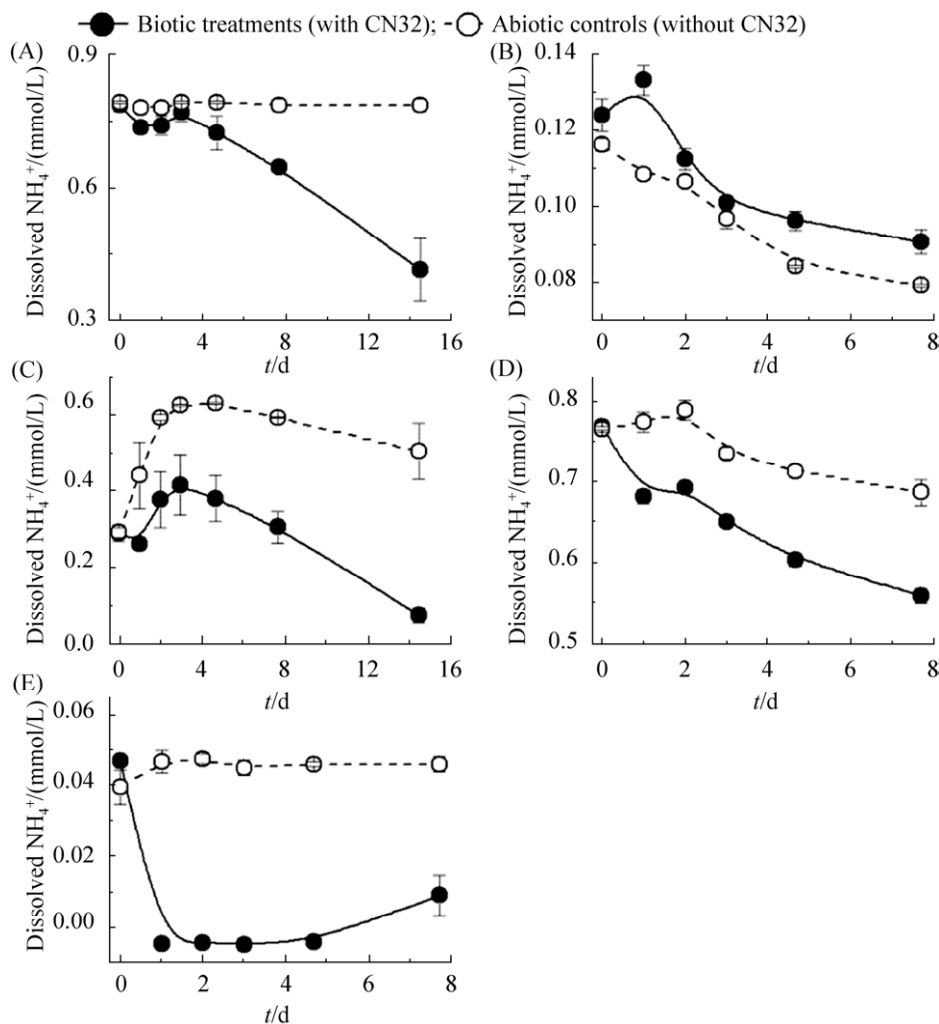


图 2. *S. putrefaciens* CN32 作用于溶解态 NH_4^+ (A) 及吸附 NH_4^+ 的蒙脱石 (B)、蛭石 (C)、伊蒙混层矿物 (D)、黑云母 (E) 时溶液中 NH_4^+ 浓度的变化

Figure 2. Dissolved NH_4^+ variation in the mesocosm where *S. putrefaciens* CN32 cells were grown with dissolved NH_4^+ (A), NH_4^+ -sorbed smectite (B), vermiculite (C), smectite-illite mixlayer mineral (D), and biotite (E) as the sole N source, respectively. The error bar represented standard error of duplicates.

2.3 总蛋白含量变化

由于实验体系中粘土矿物颗粒对微生物细胞计数的干扰, 本实验通过测定微生物蛋白含量的变化来反映 CN32 的生长状况。结果表明, 以溶解态 NH_4^+ 为唯一氮源培养 CN32 时, 其总蛋白含量始终处于一个稳定值 (~90 mg/L, 图 3-A), 表明实验培养过程中菌体并未发生大量繁殖, 因此推测 CN32 同化吸收 NH_4^+ 可能主要用于合成一些代谢产物, 主要是胞外多糖 EPS。

在粘土培养体系中, 以 NH_4^+ -Bt 为底物培养时微生物蛋白含量与溶解态 NH_4^+ 培养体系极其相近(图 3-E), 表明黑云母颗粒表面对 CN32 及其产生的 EPS 几乎没有吸附作用, 且由于黑云母体系释放的 NH_4^+ 极少, 在该体系中 CN32 代谢活性低下。与 Bt 不同, N Au2、Ver 及 ISCz 体系中可提取总蛋白初始数量低于溶液体系中数量(图 3-B-D), 表明这三种矿物对 CN32 菌体有一定吸附能力。在 Ver 和 ISCz 体系中, 二者初始时刻提取的菌体蛋白仅为 ~20 mg/L, 表明大量的菌蛋白吸附在粘土表面难以被提取出来, 但随着培养时间的增加, Ver 体系中可提取总蛋白含量出现明显增长, 最终保持稳定(90 mg/L), ISCz 也出现类似但较低的可提取总蛋白增加(稳定在 40 mg/L, 应是受限于 ISCz 附着态 NH_4^+ 释放量较少), 表明 CN32 作用于 Ver 或 ISCz 促进了菌蛋白的释放, 可能是由于其分泌的代谢产物(如 EPS)改变了菌蛋白在这两种粘土表面的吸附强度; 而在 N Au2 体系中, 可提取的菌蛋白初始含量约为 45 mg/L (尽管微生物作用组测量值约为 75 mg/L, 但无菌对照组的背景值约为 30 mg/L, 这可能是受极少量颗粒极细小的难以沉降的 N Au2 胶体的干扰, 因此 CN32 作用下菌蛋白浓度应约为 45 mg/L); 与

Ver 和 ISCz 体系不同的是, 尽管 N Au2 释放的 NH_4^+ 最多, CN32 合成的代谢产物可能更多, 但 N Au2 体系可提取的菌蛋白含量始终几乎不变, 表明 N Au2 对菌蛋白具有更强的吸附能力, 这在近期本课题组通过可以获得粘土表面元素和分子组成的分析技术(time of flight SIMS, ToF-SIMS)的研究也发现了微生物来源有机质能有效地吸附在矿物表面^[22]。因此, 粘土矿物对微生物有机质具有一定的吸附能力, 吸附强度受矿物类型影响较大, 依次为蒙脱石>蛭石>伊蒙混层矿物>黑云母。

2.4 EPS 含量变化

胞外聚合物 EPS 是 CN32 已知的能够大量分泌到细胞外部的代谢产物, 其主要成分为多糖和蛋白质。同时, 前人研究也表明 EPS 通过促进细胞与矿物之间的紧密接触, 能够有效促进矿物吸附物质甚至矿物结构中的营养元素的释放^[23]。因此, 本实验监测了与粘土作用过程中 CN32 产生的 EPS 中多糖与蛋白质的含量变化。结果显示, 相对于无菌对照组, 以溶解态 NH_4^+ 培养时 EPS(多糖及蛋白)含量都在前期(0-4 d)少量上升后达到平稳, 表明有少量的 EPS 生成(图 4-A)。而以粘土附着态 NH_4^+ 为底物培养, EPS 的变化受不同的粘土类型影响大: N Au2 体系中 EPS 蛋白含量未发生增加甚至略有减少(图 4-B), 与菌体总蛋白变化趋势类似, 但 EPS 多糖类保持增长模式明显增加(图 4-B), 表明 N Au2 对 CN32 菌体及其产生的 EPS 吸附性都很强, 尤其是蛋白类结构物质; 与 N Au2 不同, Ver 培养体系中 EPS 蛋白类含量显著增加(图 4-C), 与图 3 中总蛋白增加趋势一致, 表明 Ver 对 EPS 的吸附性较弱; ISCz 和 Bt 的 EPS 含量变化(图 4-D 和 E)较弱, 与二者释放的 NH_4^+ 较少、转化生成的 EPS 较少有关。

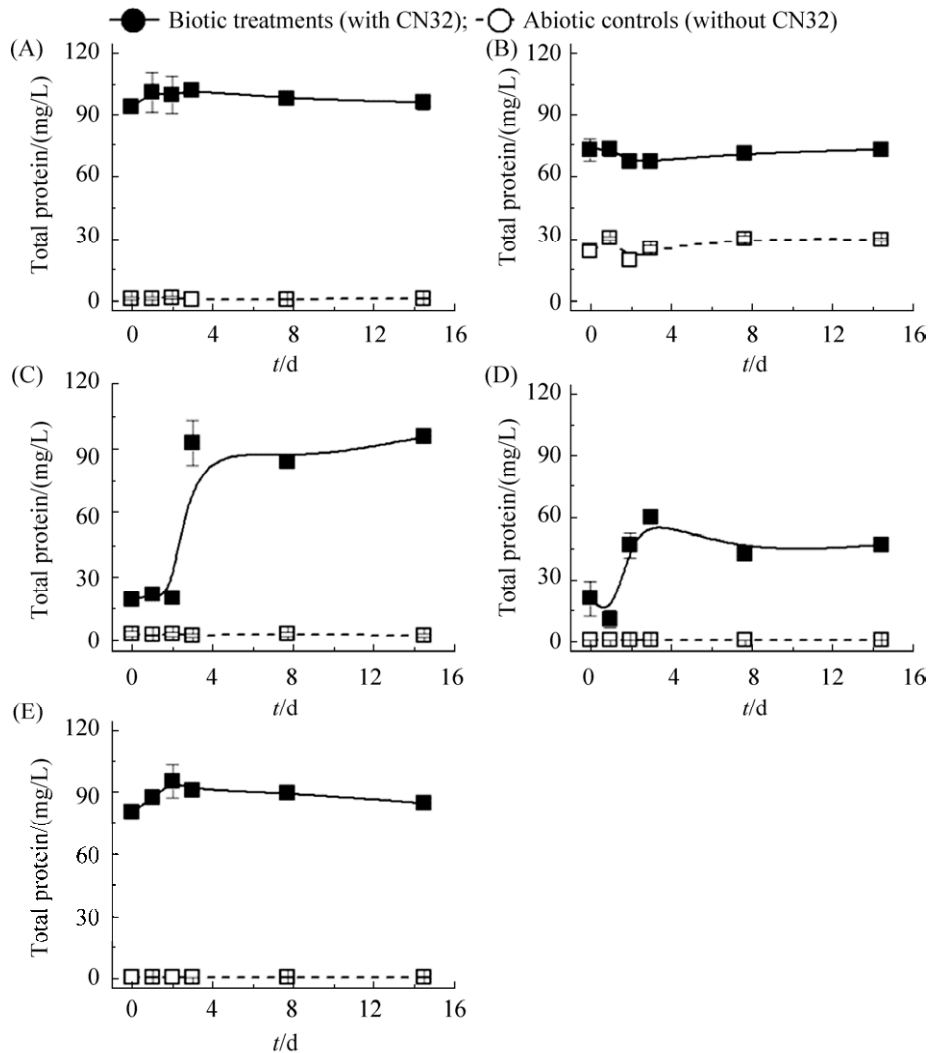


图 3. *S. putrefaciens* CN32 在溶解态 NH_4^+ (A)及吸附 NH_4^+ 的蒙脱石(B)、蛭石(C)、伊蒙混层矿物(D)、黑云母(E)培养体系中菌蛋白含量的变化

Figure 3. Variation of protein contents in the *S. putrefaciens* CN32 cells grown with dissolved NH_4^+ (A), NH_4^+ -sorbed smectite (B), vermiculite (C), smectite-illite mixlayer mineral (D), and biotite (E) as the sole N source, respectively. The error bar represented standard error of duplicates.

2.5 FTIR 结果

实验进一步对各粘土矿物吸附 NH_4^+ 前后以及被 CN32 作用后的矿物进行了 FTIR 分析。根据前人研究, 峰值在 $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ 的强吸收峰往往是粘土矿物硅氧四面体层的 Si-O 振动峰(如图 5), 是层状硅酸盐矿物的指纹峰; 位于 1640 cm^{-1} 左右的吸收峰和 $3400\text{--}3750\text{ cm}^{-1}$ 宽缓峰分别为 -OH(包

括八面体羟基以及自由水分子)的弯曲振动峰和伸缩振动峰, 其强度往往与层间水分子含量、结构-OH 周围环境变化等密切相关; 而 NH_4^+ 的 N-H 弯曲振动峰一般出现在 1400 cm^{-1} 附近, 其对称伸缩振动峰一般出现在 3140 cm^{-1} 附近, 且二者的峰值强度一般与粘土附着态 NH_4^+ 量显著相关^[24]。对比四种粘土矿物的 FTIR 图谱(图 5), 可以明显发

现 NH_4^+ 吸附和解吸附过程中其特征峰的变化, 例如, N Au2 和 Ver 吸附 NH_4^+ 量最大, 二者在 1401 cm^{-1} 和 3140 cm^{-1} 处的 NH_4^+ 的 N-H 弯曲振动峰和伸缩振动峰都明显增强, 而在 NH_4^+ 吸附量较低的 ISCz 与 Bt 中这两个特征峰的变化则相对较少; 而当 CN32 作用后, N Au2 中 NH_4^+ 被大量释放使得 1401 cm^{-1} 处的吸收峰则几乎消失(图 5-A), 而在释放程度较低的 Ver 和 ISCz 中该特征峰变化

则相对较弱(图 5-B 和 C)。

NH_4^+ 往往通过静电引力吸附在粘土矿物表面或阳离子交换进入矿物层间, 前人研究表明 NH_4^+ 可与粘土矿物-OH 形成氢键, 且粘土矿物含水量发生变化均有助于 NH_4^+ 的吸附^[25]。本研究中通过 FTIR 图谱的变化也可以反映 NH_4^+ 在不同粘土中吸附方式的差异。例如, N Au2 和 ISCz 八面体中 OH 伸缩振动带的红外吸收峰在吸附 NH_4^+ 后发

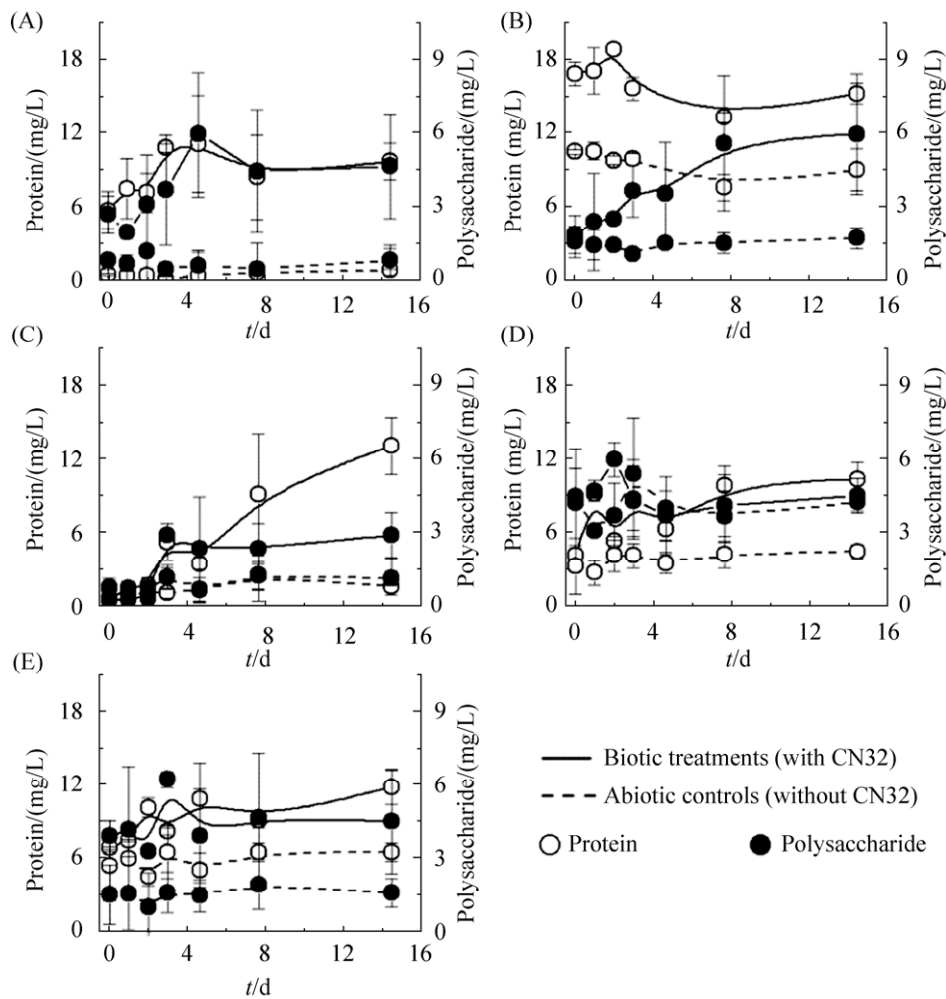


图 4. *S. putrefaciens* CN32 在以溶解态 NH_4^+ (A)及吸附 NH_4^+ 的蒙脱石(B)、蛭石(C)、伊蒙混层矿物(D)、黑云母(E)培养体系中 EPS 的蛋白(空心)及多糖组分(实心)含量的变化

Figure 4. Variation of protein (open circle) and polysaccharide (solid circle) contents in EPS derived from *S. putrefaciens* CN32 cells that were grown with dissolved NH_4^+ (A), NH_4^+ -sorbed smectite (B), vermiculite (C), smectite-illite mixlayer mineral (D), and biotite (E) as the sole N source, respectively. The error bar represented standard error of duplicates.

生了明显变化, 分别由 3558 cm^{-1} 和 3438 cm^{-1} 移至 3563 cm^{-1} 和 3441 cm^{-1} , 这种转变意味着粘土矿物在吸附 NH_4^+ 后, 其表面羟基周围环境发生了变化, 表明 NH_4^+ 吸附主要发生在粘土表面且与粘土矿物表面羟基基团的相互作用密切相关; 而 Ver 在吸附 NH_4^+ 后, 其位于 1641 cm^{-1} 处水分子的 OH 弯曲振动带移至 1637 cm^{-1} , 并且几乎失去了夹层

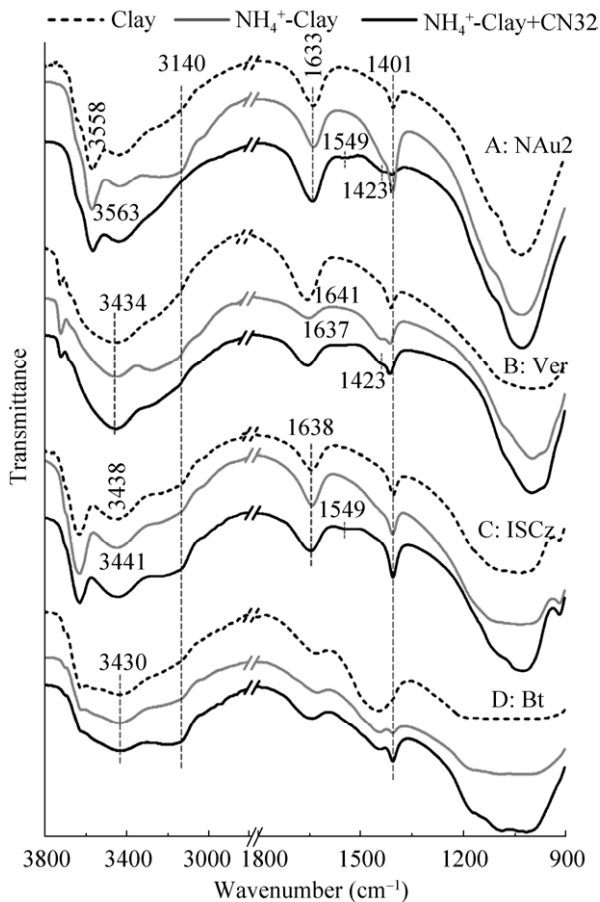


图 5. 蒙脱石(A)、蛭石(B)、伊蒙混层矿物(C)及黑云母(D)在吸附 NH_4^+ 及与 *S. putrefaciens* CN32 作用前后的 FTIR 图谱

Figure 5. FTIR spectra showing the spectral difference on the montmorillonite (A), vermiculite (B), montmorillonite mineral (C), and biotite (D) in the controls and treatments (with adsorbed NH_4^+ , and with adsorbed NH_4^+ and inocula of *S. putrefaciens* CN32 cells), respectively.

中的大多数水分子^[26], 表明 NH_4^+ 可能进入到层间结构排挤了吸附态的水分子, 这种较为紧密的吸附方式使蛭石附着态 NH_4^+ 较难释放^[27]; 相反, Bt 中 3430 cm^{-1} 处八面体 OH 伸缩振动带及 1622 cm^{-1} 处水分子的 OH 弯曲振动带在吸附 NH_4^+ 前后均未发生偏移。因此, NAu2 和 ISCz 对 NH_4^+ 的吸附应主要与 OH 基团之间的静电相互作用有关, Ver 对 NH_4^+ 的吸附则可能通过层间阳离子交换为主, 而这两种吸附方式在 Bt 中较弱, 使黑云母吸附 NH_4^+ 的能力较弱。

此外, EPS 吸附在矿物表面在 FTIR 图谱上也有所体现, 例如, CN32 作用后, 1549 cm^{-1} 处代表 EPS 蛋白组分的 N-H 或 C-H 振动峰, 1423 cm^{-1} 吸收峰代表 COO⁻官能团的 C-O 振动峰, 在吸附 EPS 较强的 NAu2 上均明显出现, 在吸附 EPS 蛋白组分较弱的 Ver 中仅出现较强的 C-O 振动峰, 而在与 NAu2 较相似的伊蒙混层矿物中则出现较弱的 N-H/C-H 振动峰。前人研究表明, EPS 可以与矿物表面结合水或羟基形成氢键紧密结合^[23,28], 因此, EPS 可能与 NH_4^+ 的吸附位点出现了竞争性的关系, 并改变了粘土矿物表面的微环境, 从而促进了矿物吸附物质甚至矿物结构中的营养元素的释放^[29]。

3 结论

本文研究了土壤中四种典型的粘土矿物与产 EPS 细菌相互作用下粘土附着态氨氮的稳定性。结果表明, 粘土附着态 NH_4^+ 的吸附量及稳定性受粘土矿物学性质影响极大。其中, 附着态 NH_4^+ 含量依次为蒙脱石>蛭石>伊蒙混层矿物>黑云母(吸附量极低, 后面不予讨论), 而 CN32 作用可以有效增加粘土附着态 NH_4^+ 释放量, 相对释放量依次为蒙脱石>伊蒙混层矿物>蛭石; FTIR 光谱分析表

明 NH_4^+ 与 EPS 在粘土矿物上的吸附能力都与矿物的羟基(结构水或层间水)含量紧密相关。由此可推测 EPS 与 NH_4^+ 对羟基竞争吸附可能是促进 CN32 释放的重要原因之一。值得注意的是, CN32 作用下粘土释放的 NH_4^+ 并没有主要以溶解态形式累积于溶液中, 而是被 CN32 吸收同化转化为生物有机氮, 从微生物总蛋白和 EPS 的测试结果来看, 不同的粘土体系中均有一定量的微生物来源有机质吸附在粘土表面(尤其是蒙脱石)难以被提取出来, 表明 CN32 吸收 NH_4^+ 后转化的有机氮能够有效地吸附在粘土表面。换言之, CN32 的作用促进了滞留在土壤中(吸附在粘土矿物上)的氨基氮肥释放, 将其转化为有机氮继而吸附在矿物表面, 可能有助于减少无机氮肥流失。因此, 分泌胞外聚合物的微生物可能在降低土壤氮肥流失、转化土壤氮肥污染过程中发挥着重要作用。这也说明了研究其他类型功能微生物对粘土附着态 NH_4^+ 影响十分必要, 为降低土壤氮肥施用量及其流失造成的污染问题提供思路。

参 考 文 献

- [1] Zhang X. Biogeochemistry: A plan for efficient use of nitrogen fertilizers. *Nature*, 2017, 543(7645): 322.
- [2] Galloway JN, Cowling EB. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 2002, 31(2): 64–72.
- [3] Han YG, Fan YT, Yang PL, Wang XX, Wang YJ, Tian JX, Xu L, Wang CZ. Net anthropogenic nitrogen inputs (NANI) index application in Mainland China. *Geoderma*, 2014, 213: 87–94.
- [4] Yu C. Managing nitrogen to restore water quality in China. *Nature*, 2019, 567(7749): 516–520.
- [5] Lu CY, Zhang XD, Chen X. Fixation of labeled ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$ and its subsequent release in black soil of Northeast China over consecutive crop cultivation. *Soil and Tillage Research*, 2010, 106(2): 329–334.
- [6] Nommik H, Vahtras K. Retention and fixation of ammonium and ammonia in soils. *Nitrogen in Agricultural Soils*, 1982, (nitrogeninagrics): 123–171.
- [7] Qiu SJ, Peng PQ, Li L. Effects of applied urea and straw on various nitrogen fractions in two Chinese paddy soils with differing clay mineralogy. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(2): 161–172.
- [8] Juang TC, Wang MK, Chen HJ, Tan CC. Ammonium fixation by surface soils and clays. *Soil Science*, 2001, 166(5): 345–352.
- [9] Beuters P, Scherer HW, Spott O, Vetterlein D. Impact of potassium on plant uptake of non-exchangeable NH_4^+ -N. *Plant and Soil*, 2015, 387(1-2): 37–47.
- [10] Zhang WZ, Chen XQ, Zhou JM, Liu DH, Wang HY, Du CW. Influence of humic acid on interaction of ammonium and potassium ions on clay minerals. *Pedosphere*, 2013, 23(4): 493–502.
- [11] Martin HC, Denis AA, Philippe R, Candido P, David EP. Evidencing overwinter loss of residual organic and clay-fixed nitrogen from spring-applied, ^{15}N -labelled pig slurry. *Canadian Journal of Soil Science*, 2014, 94(1): 1–8.
- [12] Zhang YS, Scherer HW. Ammonium fixation by clay minerals in different layers of two paddy soils after flooding. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29(2): 152–156.
- [13] Scherer HW. Dynamics and availability of the non-exchangeable NH_4^+ -N—a review. *European Journal of Agronomy*, 1993, 2(3): 149–160.
- [14] Zhang Y, Scherer H. Mechanisms of fixation and release of ammonium in paddy soils after flooding. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 35(3): 184–188.
- [15] Dai QW, Zhao YL, Dong FQ, Bin W, Huang YB. Interaction between bentonite and *Bacillus litoralis* strain SWU9. *Applied Clay Science*, 2014, 100: 88–94.
- [16] Hans CF, Jost W. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623–633.
- [17] Xiong Y, Xu JQ. Frequency distribution of clay minerals in the soils of China. *Acta Pedologica Sinica*, 1964, 12(3): 266–274. (in Chinese)
熊毅, 许冀泉. 中国土壤中粘粒矿物的分布规律. 土壤学报, 1964, 12(3): 266–274.
- [18] Kandeler E, Gerber H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium.

- Biology and Fertility of Soils*, 1988, 6(1): 68–72.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248–254.
- [20] Tallon R, Bressollier P, Urdaci MC. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 2003, 154(10): 705–712.
- [21] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350–356.
- [22] Zeng Q, Huang LQ, Ma JY, Zhu ZH, He C, Shi L, Liu W, Wang X, Xia Q, Dong HL. Bio-reduction of ferrihydrite-montmorillonite-organic matter complexes: Effect of montmorillonite and fate of organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2020, 276: 327–344.
- [23] Hong ZN, Chen WL, Rong XM, Cai P, Dai K, Huang QY. The effect of extracellular polymeric substances on the adhesion of bacteria to clay minerals and goethite. *Chemical Geology*, 2013, 360: 118–125.
- [24] Petit S, Righi D, Madejová J. Infrared spectroscopy of NH_4^+ -bearing and saturated clay minerals: A review of the study of layer charge. *Applied Clay Science*, 2006, 34(1-4): 22–30.
- [25] Alshameri A, He HP, Zhu JX, Xi YF, Zhu RL, Ma LY, Tao Q. Adsorption of ammonium by different natural clay minerals: characterization, kinetics and adsorption isotherms. *Applied Clay Science*, 2018, 159: 83–93.
- [26] Cheng Y, Huang TL, Shi XX, Wen G, Sun YK. Removal of ammonium ion from water by Na-rich birnessite: Performance and mechanisms. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 57: 402–410.
- [27] Pérez ML, Balek V, Poyato J, Perez RJ, Šubrt J, Bountsewa I, Beckman I, Málek Z. Study of natural and ion exchanged vermiculite by emanation thermal analysis, TG, DTA and XRD. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2003, 71(3): 715–726.
- [28] Cao YY, Wei X, Cai P, Huang QY, Rong XM, Liang W. Preferential adsorption of extracellular polymeric substances from bacteria on clay minerals and iron oxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 83(1): 122–127.
- [29] Mao Y, Daniel LN, Whittaker N, Saffiotti U. DNA binding to crystalline silica characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Environmental Health Perspectives*, 1994, 102 (suppl 10): 165–171.

Effects of *Shewanella putrefaciens* CN32 on the release of clay-sorbed NH_4^+

Xiaotian Ma, Baoxuan Chang, Liuqin Huang*, Hongchen Jiang

State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430074, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] This study was conducted to explore the effect and mechanism of *Shewanella putrefaciens* CN32, a typical bacterium secretes extracellular polymeric substances (EPS), on the release of clay-sorbed NH_4^+ in soils. [Methods] The common clay minerals in soil, including smectite, vermiculite, smectite-illite mixlayer mineral and biotite were used for NH_4^+ sorption and then was inoculated by *S. putrefaciens* CN32. The contents of clay-sorbed N, dissolved NH_4^+ , the microbial biomass and EPS were monitored to understand the variation of NH_4^+ release from different types of the clay minerals. [Results] The content of clay-sorbed NH_4^+ was dependent on clay

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41602347)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-67883452; E-mail: huanglq@cug.edu.cn

Received: 28 March 2020; Revised: 15 May 2020; Published online: 18 May 2020

types, with high to low in smectite > vermiculite > smectite-illite mixlayer mineral (in biotite was too low). With the activity of *S. putrefaciens* CN32, the percentage of released NH_4^+ was highest in smectite, followed by in smectite-illite mixlayer mineral and lowest in vermiculite. Although CN32 effectively promoted the release of clay-sorbed NH_4^+ , the released NH_4^+ did not accumulate in the solution but assimilated by the bacterial cells, which was transformed into bio-organic nitrogen (mainly EPS) and attached on the clay surface. The adsorption of EPS was highest on smectite, followed by smectite-illite mixlayer mineral and vermiculite. FTIR analysis revealed that the adsorption of both NH_4^+ and EPS on clays were closely associated with the hydroxyl groups in minerals (structural or interlayer water), thus, it is speculated that the competitive adsorption on mineral hydroxyl may be one of the important reasons for stimulated release of NH_4^+ by CN32. **[Conclusion]** The results of the present study demonstrated that the EPS-producing *S. putrefaciens* CN32 can promote the release of clay-sorbed NH_4^+ from all kinds of clay minerals. The released NH_4^+ does not necessary to be leached from the soil profile but instead to be transformed into organic nitrogen and increases the bioavailability of nitrogen fertilizer. Therefore, microorganisms may play an important role in reducing nitrogen loss and easing ammonia pollution from soils. It is important to systematically understand the microbial effects on the migration and transformation of clay-sorbed NH_4^+ in different types of soils (with different assemble of clay minerals), which serves for the precise prediction of the efficiency and loss risk of nitrogen fertilizers in soils.

Keywords: clay minerals, release of nitrogen fertilizer, *Shewanella putrefaciens* CN32, extracellular polymeric substances

(本文责编: 张晓丽)

黄柳琴, 女, 博士, 本科及硕、博研究生均就读于中国地质大学(北京)地质学相关专业, 现任中国地质大学(武汉)生物地质与环境地质国家重点实验室副研究员, 主要从事地质微生物学研究, 专注于研究微生物-矿物相互作用在土壤、热泉等多种环境中驱动 C、N、Fe 等元素循环的环境及地质学意义; 迄今主持完成了一项国家自然科学基金委青年基金项目, 作为骨干人员参与了多项国家自然科学基金委面上及重大研发等项目, 发表 SCI 及中文核心论文 20 余篇, 担任 *Frontiers in Microbiology*、*Applied Clay Science* 等杂志审稿专家。

