

# 海水中钢铁锈层的微生物成因及其环境效应

段继周, 张晓军

(中国科学院 海洋研究所, 青岛 266071)

**摘要:** 研究了海水环境中钢铁腐蚀产物即锈层中的厌氧微生物群落和锈层矿物特征及其相关性。微生物富集培养和初步的分子生物学分析结果表明, 海水钢铁锈层中至少生存有硫酸盐还原细菌和铁还原细菌两种厌氧细菌。使用扫描电子显微镜和电子能谱、X-射线衍射仪等对锈层样品进行了矿物学观察和分析。在外锈层和中间锈层, 主要是  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -FeOOH 等铁(水合)氧化物。铁水合硫酸盐即绿锈则主要出现在内锈层。初步讨论了厌氧细菌作用下的铁腐蚀矿物生成和转化过程, 并提出钢铁锈层微生物和矿物在海洋环境的微生物修复中可能具有重要作用。

**关键词:** 微生物矿化; 微生物腐蚀; 硫酸盐还原细菌; 铁还原细菌; 铁氧化物; 绿锈

**中图分类号:** Q939.99

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-7493(2007)04-0631-06

## 1 引言

在水体和沉积物中, 许多微生物倾向于在固体表面(包括矿物颗粒、人造金属和非金属材料等)附着形成生物膜, 并进而形成具有复杂结构的微生物群落(Little et al, 1997)。在海洋环境下, 硫酸盐还原细菌(SRB)等腐蚀性微生物能够在金属表面形成生物膜, 导致金属的微生物腐蚀破坏(Lee et al, 1995)。微生物腐蚀不仅导致金属腐蚀动力学的改变, 金属腐蚀产物也会受到微生物活动的影响。微生物腐蚀本质上也是一种微生物-矿物的相互作用过程, 是一种零价金属的生物地球化学过程(Hamilton, 2003)。

在海洋环境中, 每年有大量的海上钢铁设施遭受严重腐蚀, 生成多种铁的氧化物矿物等产物, 成为近海环境重要铁源之一。在富氧的海水环境下, 铁(水合)氧化物作为腐蚀产物能够迅速自然地在钢铁表面生成。在SRB作用下, 伴随着有机碳源的氧化和硫酸盐还原, 生物产生的硫化氢导致铁氧化物能够转化生成铁硫化物(Neal et al, 2001; Vali et al, 2004)。在实验室条件下, 经纯培养的SRB作用通常能够在金属表面检测到铁硫化

物。与之相反, 对采自海洋环境中的腐蚀锈层样品研究表明, 铁(II, III)水合硫酸盐(或碳酸盐等), 俗称绿锈, 是一种重要的腐蚀产物(Génin et al, 2002)。有研究认为, 铁还原细菌(IRB)能够导致绿锈的形成(Ona-Nguema et al, 2004); IRB细菌能够直接使用铁氧化物矿物进行呼吸(Lovley, 1991); Fe(III)氧化物作为电子受体被还原为Fe(II), 并被认为能够抑制铁的腐蚀(Dubiel et al, 2002)。因此, 在实际海洋环境中, 钢铁锈层的生成与微生物密切相关, 很有可能锈层生物膜的微生物群落也参与了其矿物生成过程。

然而, 到目前为止, 人们对海洋钢铁锈层中的腐蚀微生物群落还缺少较系统的认识(Zhang and Fang, 2001), 对腐蚀产物在海洋微生物作用下的变化过程还了解很少(Jeffrey and Melchers, 2003)。本文以海洋全浸环境下形成的钢铁锈层为研究对象, 对锈层中厌氧细菌进行了富集培养和初步分子生物学分析, 分析了锈层的矿物成分, 从微生物-矿物相互作用角度, 初步探讨了锈层中微生物影响的矿物转化过程, 并指出研究锈层微生物和矿物在污染海水环境的微生物修复中作用的重要性。

收稿日期: 2007-08-29; 修回日期: 2007-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40406022, 40676048)

作者简介: 段继周, 男, 1972年生, 博士, 中国科学院海洋研究所, 副研究员, 主要从事海洋微生物腐蚀、微生物矿化等研究;

E-mail: duanjz@ms.qdio.ac.cn

## 2 实验过程与方法

### 2.1 新鲜锈层样品的获取

钢铁锈层样品取自钢铁研究总院青岛海洋腐蚀研究所海水腐蚀实验站全浸区Q235低合金钢试片,海水浸泡腐蚀时间为12个月。选择大约4 cm × 4 cm的锈层,并区分外锈层、中间锈层和内锈层。锈层样品分别用于厌氧微生物富集培养和形貌成分的分析研究。

### 2.2 锈层中厌氧细菌的培养和分子生物学分析

采用改进的海洋Postgate'C培养基进行锈层中硫酸盐还原细菌富集培养。培养基的成分包括:在1 L陈海水中添加0.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.06 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.06 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 6 mL 70% 乳酸钠、1 g 酵母膏和0.3 g 柠檬酸钠,新鲜锈层为接种源。在液体培养基的基础上添加3%的琼脂粉和0.004 g/L的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,制备固体培养基,置于 $\text{CO}_2$ 厌氧培养罐中进行进一步富集培养。

采用通用的CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法从液体富集培养基和固体菌落中提取锈层微生物的总DNA。以提取的DNA作为模板,通过PCR方法扩增16S rRNA基因的超变量区。使用的引物如下: Eub-p8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 Uni-p1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3') 及 Arch-sp 21F (5'-TCCGGTTGATCCTGCC-3' (Muyzer et al, 1993), 用于扩增可能存在的细菌和古细菌。产物经克隆、测序并建立进化树进行可能的细菌群落分析。

### 2.3 锈层形貌、结构和成分分析

对于用于表面观察分析的样品,新鲜的锈层经无水乙醇脱水后,用于扫描电镜(SEM, JEOL JSM-840)观察;部分锈层样品用2.5%戊二醛溶液固定,经 $\text{CO}_2$ 临界点干燥、喷金后,进行SEM观察,以便了解锈层上可能存在的细菌形貌;锈层脱水干燥压制粉末后进行X-射线衍射仪(Bruker D8 Advance X-Ray)分析确定了锈层腐蚀产物的矿物组成。使用能谱(Philips XL30, Phoenix EDAX)确定腐蚀产物的主要元素成分。

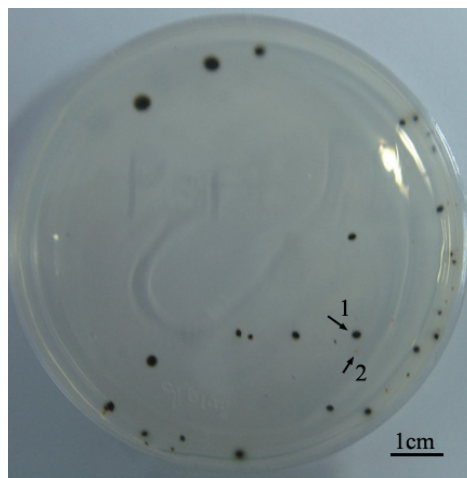
## 3 结果与讨论

### 3.1 天然锈层中的厌氧细菌

硫酸盐还原细菌、铁还原细菌与金属腐蚀、

铁化合物的生成与转化密切相关。本实验条件下的富集培养以筛选厌氧细菌特别是硫酸盐还原细菌为主。

图1是从锈层中富集的细菌在固体培养基上形成的菌落特征照片。锈层中的细菌形成两种不同的菌落,即圆形的黑色菌落和椭圆形的棕黄色菌落。黑色菌落通常是SRB细菌存在的标志,液体培养基中的出现的硫化氢气味也表明了SRB的存在。黄色的菌落可能是一种铁还原细菌(Park et al, 2001)。



1-黑色菌落 (black colony); 2-黄色菌落 (orange colony)

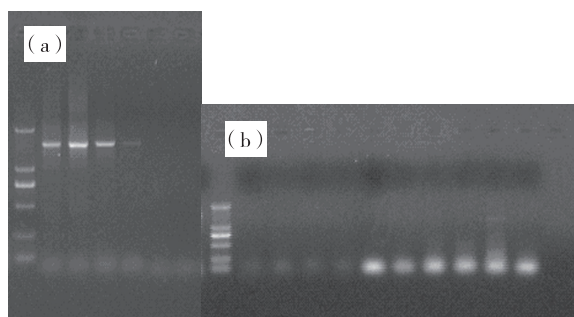
图1 富集培养的细菌在固体培养基上形成的菌落照片

Fig.1 Photo of colonies of enriched bacteria formed in agar solid culture

实际上,由于富集培养条件的限制,许多在原始样品环境中存在的细菌可能不能在人造培养介质条件下生长,因此,直接开展锈层微生物群落的分子生物学分析对了解其组成和生态功能具有重要意义。本研究从富集的锈层微生物培养基中成功进行了细菌和古菌的PCR扩增(图2),并进行了测序和进化树分析工作(未给出),发现钢铁锈层中存在的细菌与硫酸盐还原细菌(*Desulfovibrio dechloracetivorans*)和铁还原细菌(*Clostridium* sp.)两种厌氧细菌最为接近。另外,据电泳分析结果,锈层中还可能存在厌氧古菌如可能的产甲烷古菌等。

### 3.2 锈层的结构与组成

海洋腐蚀产物的锈层整体是疏松的,大致分为三层:外锈层、中间层和内锈层。分别对应不



(a) 细菌 (bacteria); (b) 古菌 (archaea)

图2 PCR扩增16S rRNA基因片段的琼脂糖凝胶电泳照片

Fig. 2 Photo of agarose gel electrophoresis of 16S rRNA gene segment after PCR (polymerase chain reaction) enlargement

同的颜色, 中间层到外锈层呈现棕黄色到红褐

色, 表面局部能观察到淡黄色藻类物质, 内锈层主要为银灰色到黑色物质。

图3是外锈层的形貌, 外锈层是疏松多孔的, 主要由球状和片状结构组成。外锈层的XRD分析(图4)显示外锈层主要由铁氧化物组成, 但成分十分复杂。可能包括有针铁矿( $\alpha$ -FeOOH), 纤铁矿( $\gamma$ -FeOOH), 还可能包括水合铁氧化物(简称HFO,  $\text{Fe}_5\text{O}_7(\text{OH}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ), 以及磁赤铁矿( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)等。

图5为实海全浸12个月产生的棕黄色钢铁锈层中间层(图5a-d)和外锈层内表面(图5e,f)典型SEM形貌照片。图6是棕黄色中间锈层的XRD图。图5a-d显示, 球状和片层状铁氧化物是中间锈层

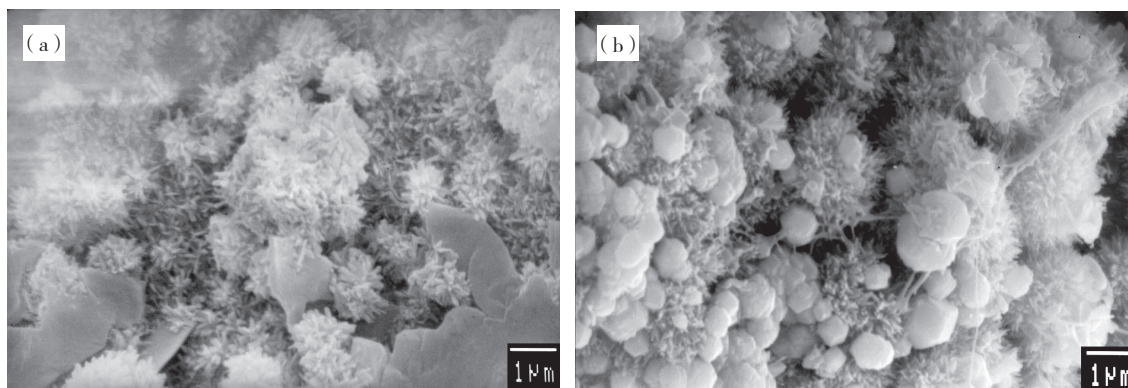
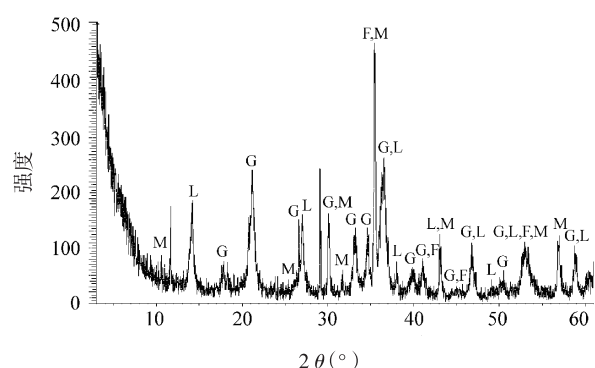


图3 海水全浸1年期钢铁外锈层的典型SEM照片

Fig. 3 SEM micrograph of representative morphologies of outer rust layer of steel immersed in seawater for 1 year



G:  $\alpha$ -FeOOH; L:  $\gamma$ -FeOOH; F:  $\text{Fe}_5\text{O}_7(\text{OH}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ; M:  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
G: goethite; L: lepidocrocite; F: ferrihydrite; M: maghemite

图4 外锈层XRD图谱

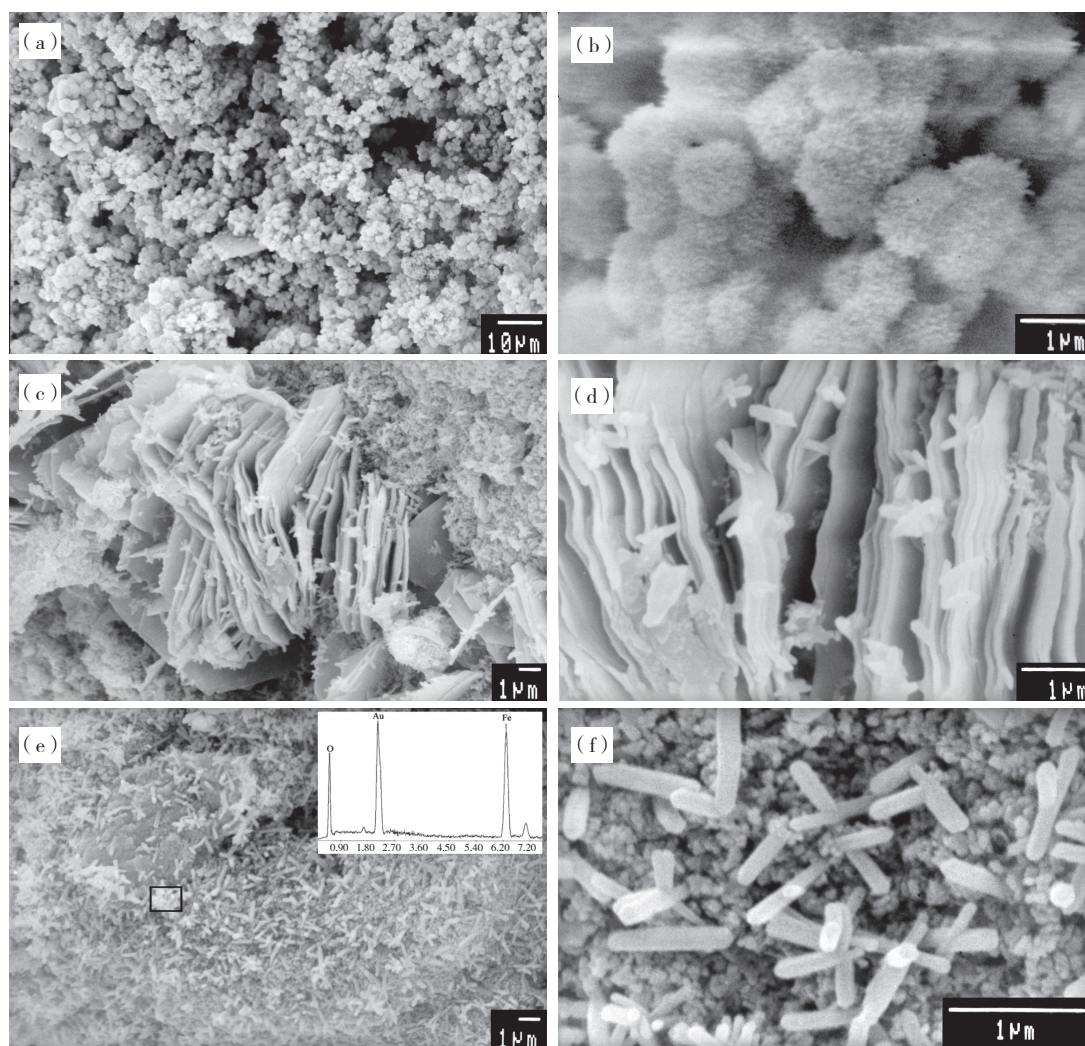
Fig. 4 XRD spectrum of outer layer of steel immersed in natural seawater for 1 year

的主要结构成分。球状氧化物的直径在1  $\mu\text{m}$ 左右甚至更小, 高倍SEM观察表明, 球状体具有纳米级的精细结构, 由更精细的绒毛状微晶组成。片

层氧化物的厚度小于100 nm, 整体形状是不规则的。按照XRD分析(图6), 中间锈层的主要成分是由针铁矿( $\alpha$ -FeOOH)和纤铁矿( $\gamma$ -FeOOH)组成, 是典型的球状铁氧化物和片状氧化物形貌。图4e,f是外锈层内表面的SEM形貌。在该区域, 观察到直径小于100 nm, 长度1  $\mu\text{m}$ 左右的棒状体出现, 高倍SEM观察显示该结构具有棒状或纺锤状结构。EDS分析(图5e)表明, 元素成分主要是铁和氧, 包括Fe 55.46%, O 35.0%, Au 9.24% (原子百分比)。按照它的形貌, 这可能是一种 $\beta$ -FeOOH铁氧化物。

图7是内锈层形貌的典型腐蚀产物特征, 观察到大量的六边形片状体出现在内锈层中。EDS(图7a)分析显示元素成分含有Fe, O, S, 还含有少量的Na, Mg等元素成分(原子百分比C 0.59%, O 39.54%, Na 5.16%, Mg 1.42%, S 9.18%, Fe

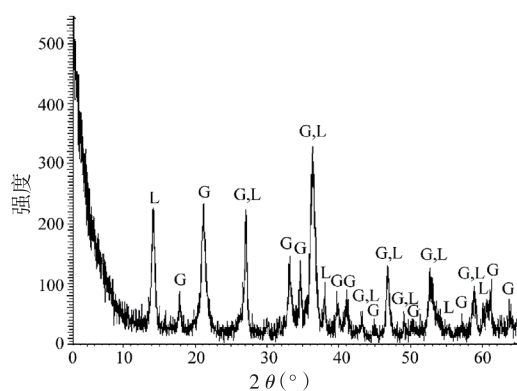




(a) 球状体; (b) 球状体的局部放大; (c) 片状体; (d) 片状体的局部放大; (e) 外锈层内表面发现的棒状体及局部区域的能谱特征; (f) 棒状体的局部放大  
(a) Downy globular cluster; (b) Magnification of globular cluster; (c) Sheety rust; (d) Magnification of part of sheety rust; (e) Clubbed or spindle poles observed on the inner surface of outer rust layer with EDS spectrum of selected area; (f) Closer view of clubbed or spindle poles

图5 海水全浸1年后钢铁锈层中间层的主要SEM照片

Fig. 5 SEM micrographs of middle rust layer of steel immersed in seawater for 1 year



G:  $\alpha$ -FeOOH (goethite); L:  $\gamma$ -FeOOH (lepidocrocite)

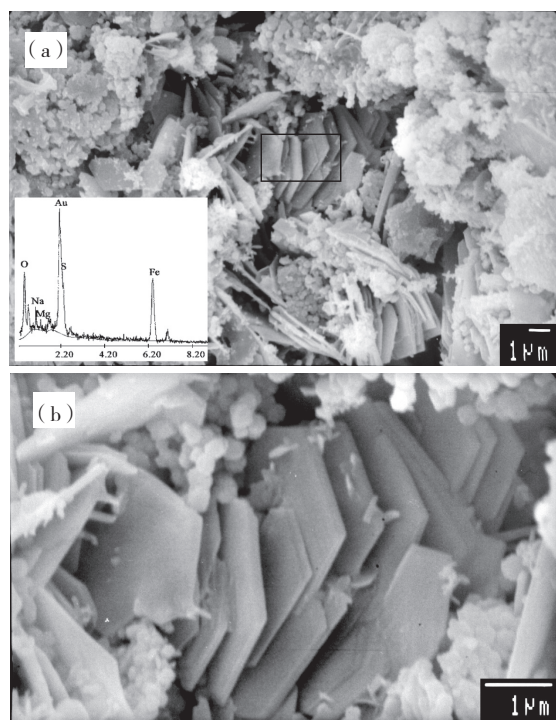
图6 中间层锈层的XRD图谱

Fig. 6 XRD spectrum of middle rust layer for steel immersed in natural seawater for 1 year

33.63%, Au 10.48%)。根据六边形片状典型结构以及能谱分析特征,这是一种典型的铁水合硫酸盐绿锈结构 (Peulon et al, 2003)。

### 3.3 微生物影响的铁锈生成过程及其环境意义

对锈层中微生物的富集培养和初步分子生物学分析表明,锈层中存在有硫酸盐还原细菌和铁还原细菌。锈层同时存在分层现象,外锈层和中间锈层主要由铁的各种氧化物组成,结构十分复杂。在铁的内锈层中则存在着大量的铁水合硫酸盐绿锈结构。在海水钢铁锈层这种特殊环境中,由于硫酸盐细菌和铁还原细菌的作用,铁氧化物和绿锈可能存在相互转化过程。



(a) 内锈层形貌和局部元素能谱分布; (b) 六边形片状形貌  
(a) Morphology of inner rust layer with EDS spectrum of selected area;  
(b) Closer view of hexagonal platelets

图7 海水中钢铁内锈层的典型电镜照片

Fig. 7 SEM micrographs of inner rust layer of steel immersed in seawater

海水钢铁锈层腐蚀产物的形成和转化与海水化学及锈层微环境密切相关。外锈层与中间锈层能够充分或相对充分与海水中的氧接触，毫无疑问，溶解氧作为最终电子受体，零价铁将氧化成为铁(Ⅲ)氧化物。由于微生物的存在，特别是微生物代谢产生的胞外有机聚物质及其形成的局部特定的pH值，将影响铁氧化物的成分和结构。本研究观察到的铁氧化物具有各异的结构(图5b)，这可能是一种微生物影响的胞外生物矿化过程(Banfield et al, 2000)。对于铁氧化物制备和环境学效应虽已有探讨(Cornell and Schwertmann, 2003)，但对于特定的铁氧化物的胞外微生物形成过程，仍需要进一步的观察和研究。

海水钢铁内锈层处于厌氧状态，铁水合硫酸盐绿锈是主要的成分之一。绿锈形成可能与厌氧环境和厌氧微生物活动密切相关。在钢铁腐蚀产物中，绿锈的形成被认为与微生物相关(Génin et al, 2002)，但对何种细菌参与绿锈的形成并未定

论。有研究认为，在SRB异养还原作用下，硫酸盐还原生成硫化氢，铁氧化物能够转化生成硫化铁。如果亚铁离子浓度很低，硫铁矿转变成贫铁硫化物(如 $\text{Fe}_3\text{S}_4$ )，如果浓度很高，将会生成铁水合硫酸盐绿锈，但在非生物体系中不能观察到这种转变(Little et al, 1997)。该解释可能部分适用于本实验观察到的天然绿锈生成过程。

另外，实验室条件下的研究表明，铁还原细菌*Shewanella putrefaciens*可参与铁水合硫酸盐和碳酸盐绿锈的形成(Ona-Nguema et al, 2004; Zegeye et al, 2005)。海水钢铁中间锈层中含有大量的铁氧化物，锈层中生长的铁还原细菌*Clostridium* sp.可能以 $\text{Fe(III)}$ 水合氧化物为电子受体，还原生成 $\text{Fe(II)}$ 离子，与溶液中的硫酸根离子结合生成铁水合硫酸盐绿锈是可能的。详细的动力学机制仍需要做进一步的研究。

本研究观察到的钢铁锈层结构通常具有微米甚至纳米级结构，具有高的比表面积，有很强的吸附性。能够吸附海水中的物质，包括微生物所需的碳源、海水中可能的有机和无机污染物质。作者发现*Desulfovibrio dechloracetivorans*生存在锈层中，这是一种能够还原难降解有机氯污染物的硫酸盐还原细菌(Sun et al, 2000)。铁腐蚀产物本身也可能具有氧化还原性，绿锈作为一种还原剂，能够还原Se等重金属离子(Myneni et al, 1997)。因此，钢铁锈层及相关微生物在环境污染的微生物修复中可能具有潜在作用。具体的过程仍需要进一步深入研究。

## 4 结论

海水钢铁锈层中存在着硫酸盐还原细菌和铁还原细菌两种厌氧细菌及可能的其他细菌。铁氧化物和绿锈是锈层的主要成分，铁氧化物主要分布在外锈层到中间层，绿锈主要分布在内锈层。铁氧化物与绿锈结构存在着矿物转化过程，绿锈的生成可能是一种微生物-铁氧化物的相互作用过程。钢铁锈层氧化物及其中的微生物群落在环境污染的微生物修复中可能具有潜在作用。

致谢：钢铁研究总院青岛海洋腐蚀研究所黄桂桥高工提供了锈层样品，特致谢忱。



## 参考文献 [Refereneces]:

- Banfield J F, Welch S A, Zhang H Z, et al. **2000**. Aggregation-based crystal growth and microstructure development in natural iron oxyhydroxide biomineralization products. *Science*, 289: 751–754.
- Bazylinski D A, Frankel R B. **2003**. Biologically controlled mineralization in prokaryotes. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry*: 54. Biomineralization: 217–247.
- Cowell R R, Grimes D J. **2000**. Nonculturable microorganisms in the environment. ASM, Washington DC, 1–360.
- Cornell R M and Schwertmann U. **2003**. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses. Wiley-VCH; 2 edition: 1–703.
- Dinh H T, Kuever J, Musmann M, et al. **2004**. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms, *Nature*, 427: 829–832.
- Dubiel M, Hsu C H, Chien C C, et al. **2002**. Microbial iron respiration can protect steel from corrosion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 1440–1445.
- Génin J, Refait Ph, Abdelmoula M. **2002**. Green rusts and their relationship to iron corrosion: a key role in microbially influenced corrosion. *Hyperfine Interactions*, 139–140: 119–131.
- Hamilton W A. **2003**. Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling*, 19: 65–76.
- Jeffrey R R, Melchers R E. **2003**. Bacteriological influence in the development of iron sulphide species in marine immersion environments. *Corros. Sci.*, 45: 693–714.
- Lee W, Lewandowski Z, Nielsen P H, et al. **1995**. Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: a review, *Biofouling*, 8: 165–194.
- Little B J, Wagner P A, Lewandowski Z. **1997**. Spatial relationships between bacteria and mineral surfaces. *Reviews in Mineralogy: Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals*. 35:139–167.
- Lovley D R. **1991**. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction, *Microbiol Rev.*, 55: 259–87.
- Myneni S C B, Tokunaga T K, Brown Jr G E. **1997**. Abiotic selenium redox transformations in the presence of Fe(II,III) oxides. *Science*, 278: 1106 – 1109.
- Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. **1993**. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 695–700.
- Neal A L, Techkarnjanaruk S, Dohnalkova A, et al. **2001**. Iron sulfides and sulfur species produced at hematite surfaces in the presence of sulfate-reducing bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 65: 223–235.
- Ona-Nguema G, Carteret Cédric, Benali O, et al. **2004**. competitive formation of hydroxycarbonate green rust 1 versus hydroxysulphate green rust 2 in shewanella putrefaciens cultures. *Geomicrobiology Journal*, 21: 79–90.
- Park H S, Kim B H, Kim H S, et al. **2001**. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to clostridium butyricum isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe*, 7: 297–306.
- Peulon S, Legrand L, Antony H, et al. **2003**. Electrochemical deposition of thin films of green rusts 1 and 2 on inert gold substrate. *Electrochemistry Communications*. 5: 208–213.
- Sun B, Cole J R, Sanford R A, et al. **2000**. Isolation and characterization of desulfovibrio dechloracetivorans sp. nov., a marine dechlorinating bacterium growing by coupling the oxidation of acetate to the reductive dechlorination of 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2408–2413.
- Vali H, Weiss B, Li Y L, et al. **2004**. Formation of tabular single-domain magnetite induced by geobacter metallireducens GS-15. *PNAS*, 101: 16121–16126.
- Zhang T, Fang H P. **2001**. Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 437–440.
- Zegeye A, Ona-Nguema G, Cartere C, et al. **2005**. Formation of hydroxysulphate green rust 2 as a single iron(II–III) mineral in microbial culture. *Geomicrobiology Journal*, 22: 389–399.

## Formation of Rust Layer Influenced by Microorganisms on Steel Immersed in Seawater and Its Environmental Effect

DUAN Ji-zhou, ZHANG Xiao-jun

( Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China )

**Abstract:** The characteristics of rust layer on steel immersed in seawater and related anaerobic microbial community were investigated. Sulfate-reducing bacteria and iron-reducing bacteria were found in the rust layer by microbial enrichment and molecular biological analysis. The characteristics of rust layer minerals were studied and analyzed by SEM, XRD and EDS. In the outer and middle rust layers, the iron oxides ( including  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -FeOOH ) were found, and the green rust was mainly found in the inner rust layer. The formation and transformation of rust layer minerals under the influence of anaerobic bacteria was discussed on the basis of experimental observation. It is also suggested that microorganisms and related rust layer minerals on steel possibly play an important role in marine microbial remediation.

**Key words:** microbiologically influenced mineralization; microbial corrosion; sulfate-reducing bacteria; iron-reducing bacteria; iron oxide; green rust