农业环境科学学报
JOURNAL OF AGRO-ENVIRONMENT SCIENCE
中文核心期刊/CSCD
请通过网上投稿系统投稿
网址：http://www.aes.org.cn

不同黏土矿物对恶臭假单胞菌KT2440生物膜形成的影响机制

蒋宇, 刘单鹏, 汤宇晴, 赵升, 熊轩, 严贵丽, 欧阳凯

引用本文:
蒋宇, 刘单鹏, 汤宇晴, 等. 不同黏土矿物对恶臭假单胞菌KT2440生物膜形成的影响机制[J]. 农业环境科学学报, 2025, 44(12): 3162-3171.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2025-0220

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

果壳种类对生物膜特性及废水处理效果的影响
胡小兵, 汪坤, 沈翼军, 张琳, 姚友长, 林睿, 顾娴静
农业环境科学学报. 2020, 39(12): 2887-2894 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0601

Shewanella oneidensis MR-1异化铁还原诱导次生矿物固定镉
童昆, 徐成, 吴峥, 司友斌
农业环境科学学报. 2021, 40(10): 2114-2123 https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0496

钒胁迫对紫花苜蓿生长及钒积累与转移的影响
武振中, 杨金燕, 张有贤
农业环境科学学报. 2021, 40(6): 1198-1207 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1165

微塑料与铅复合污染对水稻幼苗根系生长和氧化应激的影响
刘玲, 洪婷婷, 胡倩男, 谢瑞丽, 周颖, 王玲, 汪承润
农业环境科学学报. 2021, 40(12): 2623-2633 https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0523

外源NO对铝胁迫下西瓜幼苗生长及生理特性的影响
肖家昶, 郑开敏, 马俊英, 郑阳霞
农业环境科学学报. 2021, 40(8): 1650-1658 https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0145

关注微信公众号，获得更多资讯信息

蒋宇, 刘单鹏, 汤宇晴, 等. 不同黏土矿物对恶臭假单胞菌KT2440生物膜形成的影响机制[J]. 农业环境科学学报, 2025, 44(12): 3162-3171.
JIANG Y, LIU S P, TANG Y Q, et al. Mechanism of different clay minerals influencing the biofilm formation of *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2025, 44(12): 3162-3171.

开放科学OSID

不同黏土矿物对恶臭假单胞菌KT2440生物膜形成的影响机制

蒋宇, 刘单鹏, 汤宇晴, 赵升, 熊轩, 严贵丽, 欧阳凯*

(湖南农业大学资源学院, 长沙 410128)

摘　要: 为揭示土壤中黏土矿物对细菌生物膜生长发育的影响机制,本研究借助多功能酶标仪、荧光显微镜等科学仪器,结合结晶紫染色法、荧光检测等技术手段,探讨了3种典型黏土矿物(蒙脱石、高岭石、针铁矿)对恶臭假单胞菌KT2440细胞生长及生物膜形成的影响。结果表明:相较于纯培养体系,蒙脱石处理体系中细菌生物膜生物量增加了78.95%,低浓度阈值内的针铁矿(0~5 mg·L^{-1})和高岭石(0~100 mg·L^{-1})对细菌生物膜的形成均有不同程度的促进作用,而高浓度针铁矿(>5 mg·L^{-1})和高岭石(>100 mg·L^{-1})处理体系则显著抑制细菌生物膜形成,最高抑制率分别达83.78%和34.72%。通过共沉降试验和荧光显微镜观察发现,针铁矿能有效吸附并杀死细菌。针铁矿、高岭石诱导产生的活性氧(ROS)含量分别是纯培养体系的3.66倍和1.97倍;针铁矿在与恶臭假单胞菌共培养192 h后,细胞内三磷酸腺苷(ATP)含量相比纯培养体系降低了58.21%。蒙脱石通过静电互斥作用减少对细菌细胞膜的损伤,并利用高比表面积促进细胞定殖,显著增强其生长与生物膜形成。针铁矿和高岭石在低浓度时可以杀死部分细胞,释放营养物质促进生物膜形成,而高浓度则通过诱发氧化应激破坏细胞代谢功能,抑制生物膜发育。

关键词: 黏土矿物;恶臭假单胞菌;生物膜;氧化应激反应;代谢活性

中图分类号: S15　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1672-2043(2025)12-3162-10　　doi:10.11654/jaes.2025-0220

Mechanism of different clay minerals influencing the biofilm formation of *Pseudomonas putida* KT2440

JIANG Yu, LIU Shanpeng, TANG Yuqing, ZHAO Sheng, XIONG Xuan, YAN Guili, OUYANG Kai*

(College of Resources, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: To elucidate the influence mechanisms of clay minerals in soil on the growth and development of bacterial biofilms. This study employed scientific instruments including a multifunctional microplate reader and fluorescence microscope, combined with technical approaches such as crystal violet staining and fluorescence detection, to investigate the effects of three typical soil clay minerals (montmorillonite, kaolinite, and goethite) on the growth of *Pseudomonas putida* KT2440 and biofilm formation. The results demonstrated that, compared to the pure culture system, the biofilm biomass in the montmorillonite-treated system increased by 78.95%. Within low concentration thresholds, goethite (0-5 mg·L^{-1}) and kaolinite (0-100 mg·L^{-1}) both promoted bacterial biofilm formation to varying degrees, while high concentrations of goethite (>5 mg·L^{-1}) and kaolinite (>100 mg·L^{-1}) significantly inhibited biofilm formation, with maximum inhibition rates of 83.78% and 34.72%, respectively. Through co-sedimentation experiments and fluorescence microscopy observations, it was demonstrated that goethite can effectively adsorb and kill bacteria. The production of reactive oxygen species (ROS) induced by goethite and kaolinite was 3.66 times and 1.97 times higher, respectively, than that in the pure culture system. Additionally,

收稿日期: 2025-03-05　　**录用日期:** 2025-05-19

作者简介: 蒋宇(2001—),男,湖南益阳人,硕士研究生,研究方向为土壤矿物与生物膜互作。E-mail:1748739263@qq.com

***通信作者:** 欧阳凯　E-mail:Kai_ouyang@hunau.edu.cn

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(2024JJ5202);湖南省教育厅重点项目(24A0163);国家自然科学基金青年基金项目(42007021);中国博士后科学基金项目(2020M672498)

Project supported: Natural Science Foundation of Hunan Province, China (2024JJ5202); Key Project of Hunan Provincial Department of Education (24A0163); National Natural Science Foundation of China (42007021); China Postdoctoral Science Foundation (2020M672498)

after 192 h of co-cultivation with *P. putida*, the intracellular adenosine triphosphate (ATP) content in the goethite-treated system decreased by 58.21% compared to the pure culture system. Montmorillonite mitigates bacterial cell membrane damage through electrostatic repulsion and enhances bacterial colonization via its high specific surface area, thereby significantly promoting bacterial growth and biofilm formation. In contrast, goethite and kaolinite at low concentrations kill a subset of cells, releasing nutrients that stimulate biofilm formation, whereas at high concentrations, they induce oxidative stress, disrupt cellular metabolic functions, and suppress biofilm development.

Keywords: clay minerals; *Pseudomonas putida*; biofilm; oxidative stress response; metabolic activity

土壤活性组分是指土壤中化学和生物活性较高、易参与地球化学过程，对植物和微生物有较强有效性的部分物质，主要包括腐植酸、黏土矿物和铁/锰/铝氧化物等[1]。黏土矿物作为土壤中重要的活性组分，因具有颗粒小、表面活性官能团多、带有大量可变电荷等特点，而成为驱动土壤生物地球化学过程的关键介质[2]。土壤黏土矿物与微生物相互依存，相互影响，共同决定着土壤中的物质循环和能量流动[3]。微生物与矿物的相互作用深刻影响着土壤团聚体稳定性[4]、土壤肥力[5]、污染物的迁移和固定[6]、矿物的溶解和生物成矿[7-8]等诸多地球化学过程。在土壤环境中，微生物主要通过分泌有机酸、产生铁载体以及氧化还原作用改造土壤矿物[3]。研究表明，微生物可通过生物诱导和生物矿化作用参与高岭石的形成过程[9-10]，也可以通过氧化还原反应溶解蒙脱石[11]。同时，不同类型的黏土矿物也会对微生物细胞活性表现出显著的选择性影响[12]。Wu等[13]研究指出蒙脱石显著增强了恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）的葡萄糖代谢能力，而高岭石和针铁矿则对该代谢过程产生明显的抑制作用；Cai等[14]发现在共培养6 h后，大肠杆菌O157：H7在蒙脱石和高岭石表面依然保持活性，而在针铁矿表面其生长被显著抑制。此外，土壤矿物的存在对细菌的底物利用、呼吸作用以及消化与反硝化作用等都会产生显著影响[15-17]。

微生物在土壤环境中并不是以游离态形式存在，而是会依附在生物或非生物表面聚集形成生物膜[18]。在地球生态系统中，99%以上的微生物都是以生物膜的形式存在[19]。生物膜的形成是一个复杂的动态过程，分为4个主要阶段：首先游离细菌通过物理化学作用（如范德华力、静电力）向土壤介质表面迁移[20]，并在胞外多糖和蛋白质等胞外聚合物（Extracellular polymeric substances，EPS）的作用下黏附于介质表面；在生物膜发育阶段，细菌细胞生长分裂并吸引更多的游离细菌，逐步形成微生物群落；随后发展成具有三维结构的稳定生物膜；最后在环境胁迫（如干旱、养分缺失）下生物膜裂解将细菌细胞重新释放到环境中[21]。生物膜就像是细菌细胞的一道坚硬铠甲，保护着细菌细胞，使其能够应对外界恶劣环境并很好地生存下来[22]。黏土矿物作为微生物定殖、黏附的载体，可能会通过表面理化特性调控生物膜的形成、结构、代谢活性及功能表达[23-24]。生物膜能够促进土壤团聚体的形成与稳定[25]，参与碳、氮、磷等多种土壤元素循环[26]，影响有机物的降解和储存[27]以及矿物的风化[28]，在陆地生态系统的物质循环和能量流动中发挥着不可或缺的作用[29]。

黏土矿物与微生物的互作存在于各种时间和空间尺度下，在一定程度上决定着各自的性状和功能[30]，因此探明黏土矿物与生物膜的互作机制十分必要。然而，近年来的研究多聚焦于单一组分矿物与游离态细菌细胞间的界面互作[31]，土壤矿物，特别是不同类型黏土矿物如何影响细菌生物膜的形成、结构及功能表达？其背后的驱动因子是什么？相关信息仍十分缺乏。基于此，本研究构建“模式菌株-黏土矿物界面”模拟体系，以土壤中广泛存在的模式菌株恶臭假单胞菌KT2440和3种黏土矿物（蒙脱石、高岭石、针铁矿）作为供试材料，采用传统化学和生物化学等分析方法，结合荧光显微镜、多功能酶标仪、纳米粒度Zeta电位分析仪等技术手段，探究不同类型黏土矿物对恶臭假单胞菌KT2440细胞生长、生物膜形成、代谢活性及功能表达的影响，揭示细菌生物膜形成对黏土矿物的响应机制，研究结果可为评估黏土矿物的微生物效应提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 恶臭假单胞菌KT2440的培养与菌悬液制备

本研究选用的土壤中常见细菌恶臭假单胞菌KT2440，来自于湖南农业大学土壤生物实验室。从低温保存的Luria-Bertani（LB）固体培养基中挑取生长状态良好的单菌落，接种于5 mL LB液体培养基内。将接种后的培养基置于28 ℃恒温摇床中，以150 r·min^{-1}的转速进行过夜培养（12~16 h）。随后，按照1∶100的接种比例，将过夜培养的菌液转移至250 mL新鲜LB液体培养基中，在相同培养条件下继续振

荡培养12 h，以使细菌细胞生长达到指数中期。然后使用高速离心机在4 ℃和5 000 *g*条件下离心10 min，收集细胞并用磷酸盐缓冲溶液（PBS，20 mmol·L^{-1} PO_4^{3-}、pH 7.2）冲洗以除去培养基残余物，最后将菌体重新悬浮于等体积的PBS缓冲液中，并将细胞密度调节至10^8 CFU·mL^{-1}（OD_{600}=1.0）。

1.1.2 实验矿物

实验矿物有蒙脱石（Mnt）、高岭石（Kln）和针铁矿（Gt）3种。其中蒙脱石和高岭石购买自美国Sigma公司。针铁矿根据Atkinson等[32]的方法合成，合成针铁矿经X-ray分析并与标准峰比对一致后保存使用（图1）。

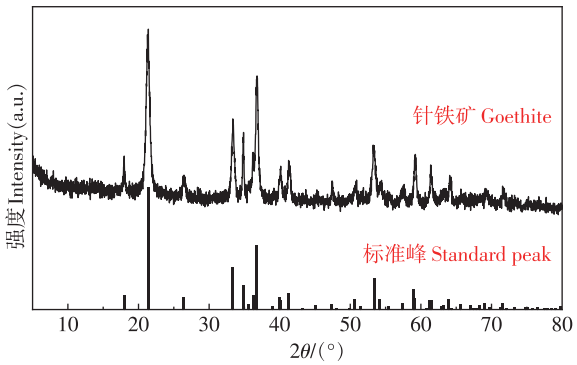


图1 针铁矿与标准峰比对图

Figure 1 Comparison diagram of goethite with standard peak

1.2 实验方法

1.2.1 不同矿物颗粒悬液的细胞暴露实验

将恶臭假单胞菌与矿物颗粒共培养，调节混合液中矿物浓度为1 g·L^{-1}，同时控制恶臭假单胞菌的OD_{600}值为0.75。在培养期间的不同时间节点（第0、1、4、7、10、14、18天）无菌取样。对待测样品进行系列稀释处理，选取适宜浓度的菌悬液，使用无菌涂布棒均匀涂布至LB固体平板表面，涂布后的平板在室温条件下静置20~30 min，待培养基被菌液充分渗透，将平板倒置转移至28 ℃恒温培养箱中进行培养（16~18 h）。待观察到长出菌落后计数。

1.2.2 生物膜生物量测定

为了评估暴露于矿物颗粒下细菌的生长状况，在未经处理的无菌96孔平底微量滴定板（BD Falcon）中开展细胞生长和生物膜培养实验。在每次实验之前，对矿物颗粒进行30 min超声处理以使其均匀分散。经超声分散处理后，将已灭菌的矿物颗粒悬浮液和矿物盐戴维斯培养基（MMD，pH 7.0）混合，配制形成浓度梯度系列。实验共设置11个的浓度，包括：0（作为空白对照，不含任何矿物颗粒）、0.5、1、5、10、50、100、500、1000、2 000 mg·L^{-1}和5 000 mg·L^{-1}。取200 μL各浓度矿物悬浮液分别加入96孔微量滴定板中，每个浓度设置12个重复孔。然后向每个孔中加入2 μL恶臭假单胞菌菌悬液，并在恒温培养箱（28 ℃）中孵育24 h。同时设置对照组，该组仅加入等量矿物悬浮液而不接种细菌。孵育结束后，使用PBS洗涤细胞至少3次，随后使用1%结晶紫染液进行染色处理，并再次用PBS洗涤。最后加入200 μL体积比为20∶80的丙酮/乙醇混合液，使用多功能酶标仪在波长为540 nm下测定微量滴定板壁上的细胞数量。读取对照组的OD_{540}平均值，并将其从含细菌孔读数中减去即为最终的生物膜生物量值。

1.2.3 细菌和矿物表面电荷性质及粒径的测定

借助Zeta电位仪，通过测定电泳速率并根据相关公式计算得到细菌和矿物的表面Zeta电位。取一定浓度的菌悬液（OD_{600}=0.20），以10 mmol·L^{-1}的KCl作为背景电解质（pH 6.8）。借助Zetasizer Nano型纳米激光粒度仪测定细菌和矿物的粒径，测定条件与Zeta电位一致。测得的细菌和矿物的Zeta电位及水力学直径见表1。

表1 细菌和矿物的Zeta电位及水力学直径

Table 1 Electrodynamic potentials and hydraulics diameters of bacteria and minerals

项目 Item	Zeta/mV	水力学直径 Hydraulics diameter/nm
恶臭假单胞菌	−6.5±0.7	1 988.0±125.5
针铁矿	27.8±0.3	358.0±36.5
高岭石	−20.5±1.3	945.0±39.6
蒙脱石	−27.0±1.1	726.0±85.7

1.2.4 矿物与细菌沉降的测定

为了研究矿物颗粒与细菌混合体系的沉降行为，本研究采用紫外-可见分光光度法在600 nm波长下监测体系吸光度的动态变化。实验过程中，将经过超声分散处理的矿物悬浮液（OD_{600}=1.0）与恶臭假单胞菌悬浮液（OD_{600}=1.0，以10 mmol·L^{-1} KCl为分散介质）按1∶1体积比混合，各取1.5 mL加入比色皿中。为排除单一组分的影响，实验同时设置了等浓度的菌液和矿物悬液作为对照组。所有实验组均设置3个重复样本以保证数据的可靠性。混合体系在室温条件下静置2.5~3 h，期间每隔5~10 min使用紫外分光光度计测定一次吸光度值。

1.2.5 细菌氧化应激水平及代谢活性的测定

胞内活性氧（ROS）测定：参考Saison等[33]的方法，

选用2′，7′-二氯二氢荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）作为特异性荧光探针。实验以10 mmol·L^{-1} KCl溶液作为电解质，配制OD_{600}值为1.5的恶臭假单胞菌悬浮液20 mL，加入20 μL DCFH-DA储备液，使探针终浓度达到10 μmol·L^{-1}。随后将混合体系置于28 ℃恒温摇床中，以150 r·min^{-1}的转速孵育30 min，使探针充分进入细胞。孵育结束后，采用低温离心法（4 ℃、1 200 *g*、5 min）对菌液进行3次清洗，以去除未进入细胞的游离探针，最后将菌体重新悬浮于10 mmol·L^{-1} KCl溶液中。荧光测定在96孔黑色聚苯乙烯酶标板中进行，每孔依次加入100 μL经超声分散的矿物颗粒悬液（0.1 g·L^{-1}）和100 μL已装载探针的菌液。将酶标板转移至恒温振荡培养箱中反应3 h后，使用多功能酶标仪测定荧光强度，检测参数设置为：激发波长480 nm、发射波长520 nm。将未装载探针和未经矿物处理的菌液设置为对照。

暴露于针铁矿下的胞内ROS和丙二醛（MDA）测定：在含有0.5 mg·L^{-1}和500 mg·L^{-1}针铁矿矿物颗粒的MMD培养基中，将恶臭假单胞菌温育24 h，然后对细胞内ROS进行定量分析。采用硫代巴比妥酸分光光度法[34-35]测定细胞膜脂质过氧化终产物的MDA含量。并按照欧阳凯[36]的方法计算相对ROS含量和相对MDA含量。

三磷酸腺苷（ATP）测定：利用荧光生物检测技术测定ATP含量。准确称取20 mg矿物颗粒于50 mL锥形瓶中，加入10 mL浓度为10 mmol·L^{-1}的NaCl溶液，超声波振荡直至充分分散，再加入等体积（10 mL）菌悬液；同时设置仅含菌悬液而不添加矿物的对照组，保持相同总体积（20 mL）。将上述反应体系置于恒温摇床（25 ℃、40 r·min^{-1}）中振荡培养，分别在第0、4、8、24、48、72、96、120、144、168、192小时取样分析，准确吸取25 μL混合体系滴加到不透明的96孔板中测定荧光值，每个时间点设置5个重复。用测得的荧光值间接表征ATP含量。

1.2.6 荧光显微镜观察

将OD_{600}值为1.0的恶臭假单胞菌菌液按照体积比1∶1与2 g·L^{-1}的矿物母液混合，于28 ℃、150 r·min^{-1}摇床振荡培养。取混合培养2 h后的菌液用由红色荧光核酸染料Propidium iodide（碘化丙啶）和绿色荧光核酸染料SYTO®9组成的混合染液进行染色，参照谢俊[37]的步骤检测细菌细胞膜的完整性。由于细菌只有在细胞膜完整时才能进行正常的生理代谢活动，因此在染色分析时可以根据细菌细胞膜结构是否完整来表征细菌的活性。

1.2.7 统计分析

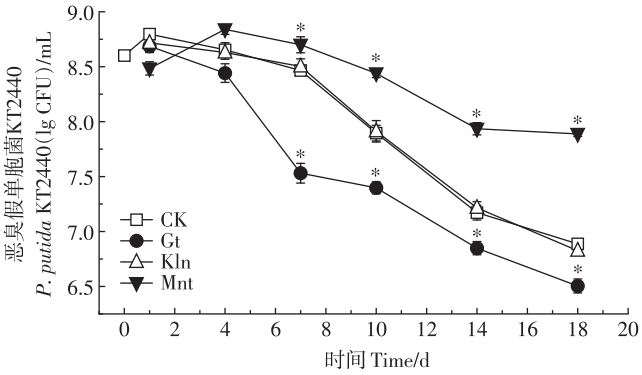
采用SPSS 27.0统计软件对实验数据进行单因素方差分析（ANOVA），$P<0.05$表示差异显著。采用Origin 2024软件进行数据可视化处理。

2 结果与分析

2.1 不同矿物对恶臭假单胞菌生长和生物膜形成的影响

不同黏土矿物悬液中恶臭假单胞菌数量随时间的变化如图2所示。暴露于高岭石时，恶臭假单胞菌数量曲线与对照组大致重合，恶臭假单胞菌数量先增长，在24 h之后再缓慢减少；而暴露于蒙脱石时，细菌数量在24 h时降低，随后缓慢增长，4 d后再次下降，并且4 d后每个时期的细菌数量都显著高于对照组；暴露于针铁矿时，24 h后细菌数量急剧减少，在4~7 d时下降最快，且在4 d后细菌数量都显著低于对照组。与开始培养时相比，对照组与暴露于针铁矿、高岭石、蒙脱石处理的细菌数量在第18天时分别下降了19.92%、24.38%、20.65%、8.28%。

不同矿物浓度下，培育24 h后恶臭假单胞菌形成生物膜量的情况如图3所示。在针铁矿处理下，浓度为0.5~5 mg·L^{-1}时，生物膜量都高于对照，且在5 mg·L^{-1}时达到最大值，在浓度高于5 mg·L^{-1}后，生物膜量开始低于对照，并且随着浓度增大，生物膜量逐渐减少，可见浓度为0.5~5 mg·L^{-1}的针铁矿悬液可以促进恶臭假单胞菌KT2440生物膜的形成，而高浓度的针铁矿则抑制生物膜形成；高岭石处理下，浓度在0.5~100 mg·L^{-1}时，生物膜量均高于对照，同样在5 mg·L^{-1}时生物膜量达到最大值，在浓度大于100 mg·L^{-1}后，



*$P<0.05$。下同。
*$P<0.05$. The same below.

图2 矿物对恶臭假单胞菌细胞数量的影响

Figure 2 Effects of minerals on the number of *Pseudomonas putida*

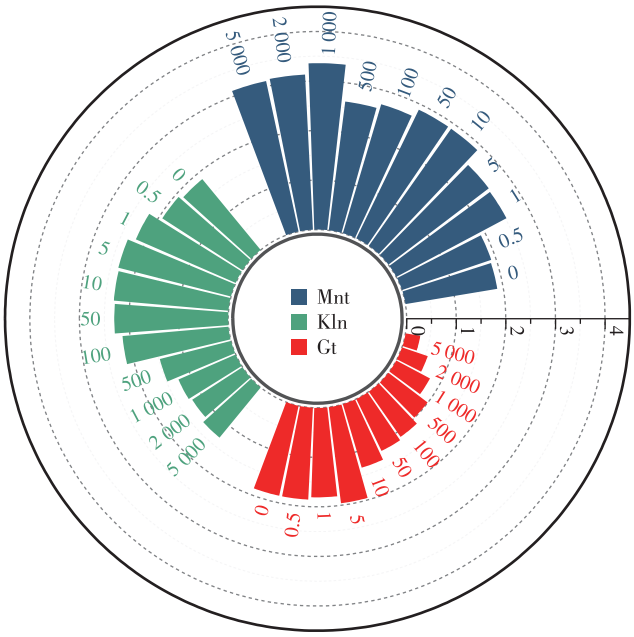


图3 不同浓度矿物颗粒悬液对生物膜量的影响

Figure 3 Effects of different concentrations of mineral particle suspensions on biofilm volume

会抑制生物膜的形成;蒙脱石则促进了细菌生物膜的形成,浓度达到5 000 mg·L^{-1}时,生物膜量依然高于对照,且在1 000 mg·L^{-1}时,生物膜量达到最大值并高于其他两个体系中的生物膜量最大值。3种矿物中蒙脱石对生物膜量的影响不同于其他两种矿物,这一实验现象与矿物对细菌数量影响的结果相似。

2.2 恶臭假单胞菌与矿物颗粒的共沉降过程

细菌和矿物通过颗粒界面间的相互作用力聚合,由于二者尺寸较小,颗粒间存在显著的范德华引力,同时具有较大的比表面积和丰富的表面电荷,当颗粒间的静电斥力小于范德华引力时,就会产生团聚体并发生沉降。图4A、图4B、图4C分别为高岭石、蒙脱石、针铁矿与恶臭假单胞菌的沉降曲线。

从图4中可以看出,在10 mmol·L^{-1} KCl溶液中,OD_{600}值为0.5的恶臭假单胞菌悬液在3 h内保持稳定分散状态,未观察到明显的细胞聚集和沉降现象。值得注意的是,矿物-细菌混合体系的共沉淀速率高于单一组分沉降速率的加和值,这表明矿物颗粒与细菌细胞之间存在显著的异相凝聚效应。具体而言,针铁矿-细菌混合体系表现出最快的沉降动力学特征。在反应初始的60 min内,混合体系的吸光度迅速下降至接近纯菌悬液的水平;60 min后,其吸光度值甚至低于纯菌悬液,这一现象证实了针铁矿颗粒与细菌细胞发生了强烈的吸附作用,导致负载矿物颗粒的细菌快速沉降。相比之下,高岭石-细菌混合体系在90 min后才出现类似的沉降特征。蒙脱石及其与细菌的混合悬液在测量时间范围内没有出现沉降,说明蒙脱石与细菌没有发生团聚。

2.3 不同矿物处理体系中细菌的氧化应激响应

胞内ROS的动态平衡变化能够整合性反映矿物细胞界面相互作用引发的氧化还原稳态扰动,因此可以通过对恶臭假单胞菌产生的胞内ROS定量间接反映矿物颗粒与细菌细胞膜的接触程度及其引发的氧化应激效应。图5展示了不同矿物与恶臭假单胞菌相互作用3 h后对细菌胞内ROS的影响。在生理条件下,细胞代谢产生的ROS能够被内源性抗氧化酶系统有效清除,维持氧化还原平衡。然而,在外界胁迫因子作用下,这种平衡会被打破,导致ROS过量积累,进而引发氧化应激损伤。通过观察图5可知,供试黏土矿物能不同程度地诱导细菌细胞内ROS的生成,但不同矿物表现出的诱导效应存在显著差异。与纯培养体系相比,蒙脱石对恶臭假单胞菌胞内ROS水平几乎没有影响,高岭石体系和针铁矿体系中所产生的胞内ROS含量均显著高于纯培养体系,且针铁矿体系也显著高于高岭石体系。这种差异可能与矿物的表面特性、化学组成及其与细胞的作用方式有关。

为进一步探究恶臭假单胞菌对针铁矿的响应,测定了两种浓度的针铁矿处理下恶臭假单胞菌产生的ROS和MDA以及ATP的含量。MDA是多不饱和脂肪酸的氧化特征产物,被广泛用作细胞膜脂质过氧化作用的指标,通过对ATP的定量来表征恶臭假单胞菌的代谢活性。在图6A中,0.5 mg·L^{-1}的针铁矿矿物颗粒对胞内ROS和MDA的产生几乎没有影响,而500 mg·L^{-1}的针铁矿矿物颗粒显著促进胞内ROS和MDA的产生。图6B为针铁矿体系中恶臭假单胞菌KT2440代谢ATP随时间的变化。实验结果表明,恶臭假单胞菌KT2440在针铁矿体系中的能量代谢呈现明显的阶段性变化,在反应初始4 h内,细胞内ATP含量呈现小幅上升趋势,但4 h后ATP水平急剧下降,且始终显著低于对照组(纯菌体系)的ATP含量。经过192 h的培养后,针铁矿体系中细菌的ATP含量从对照组的6.7×10^{-17} mol·cell^{-1}降至2.8×10^{-17} mol·cell^{-1},抑制效果达58.21%,充分证明了针铁矿对恶臭假单胞菌代谢活性具有显著的抑制作用。

2.4 不同矿物对恶臭假单胞菌细胞活性的影响

图7展示了采用LIVE/DEAD BacLight染色法评

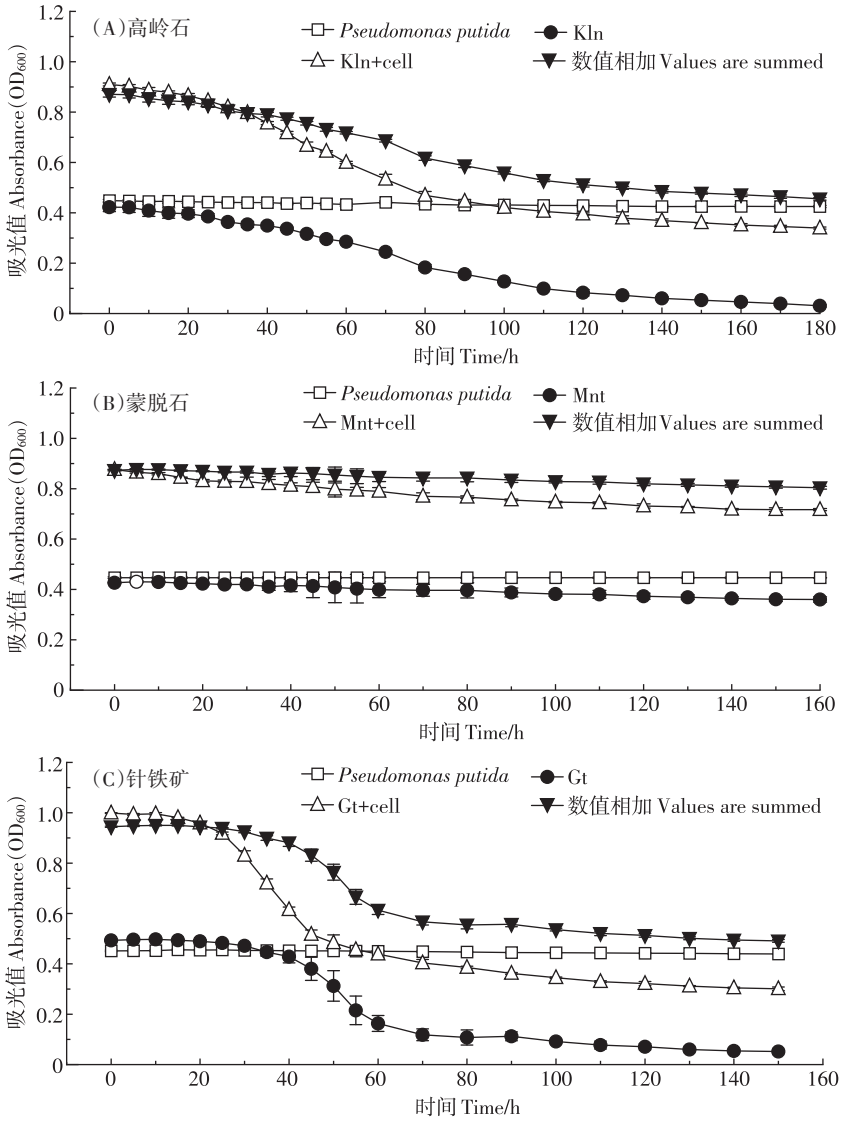
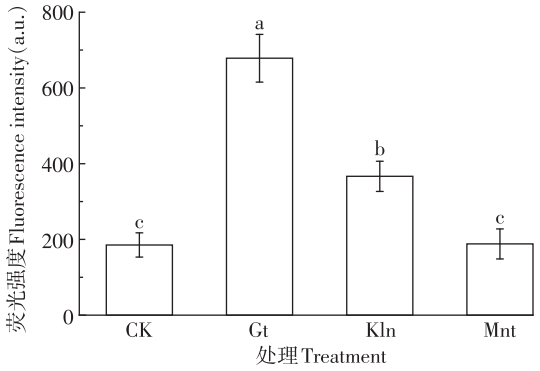


图4 高岭石、蒙脱石和针铁矿与恶臭假单胞菌的沉降曲线

Figure 4 Settlement curve of kaolinite, montmorillonite and goethite and *Pseudomonas putida*



不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences among treatments($P<0.05$).

图5 矿物对恶臭假单胞菌胞内ROS的影响

Figure 5 Effects of minerals on intracellular ROS of *Pseudomonas putida* KT2440

估矿物作用2 h后恶臭假单胞菌细胞膜完整性的结果。在对照组(纯培养体系)中，细菌细胞呈现均匀的空间分布特征，绝大多数细胞都被染成绿色，表明细胞膜结构完整且具有活性；在整个视野范围内不存在细胞膜破损被染成红色的细菌，这说明对照组中不存在细胞膜受损的细菌。在针铁矿体系中，出现了细菌与针铁矿的聚集，有大量细菌细胞膜破损被染成红色，且被染成红色的区域和细菌与矿物聚集的区域大致重合。这是因为大量恶臭假单胞菌因为静电引力的作用与针铁矿接触而受到针铁矿的破坏。而在高岭石和蒙脱石体系中，恶臭假单胞菌均匀分布在整个图像中，但也有部分恶臭假单胞菌出现了与高岭石和蒙脱石聚集的现象，并产生细菌细胞膜破损而被染成红色的现象。通过针铁矿、高岭石、蒙脱石3种黏土

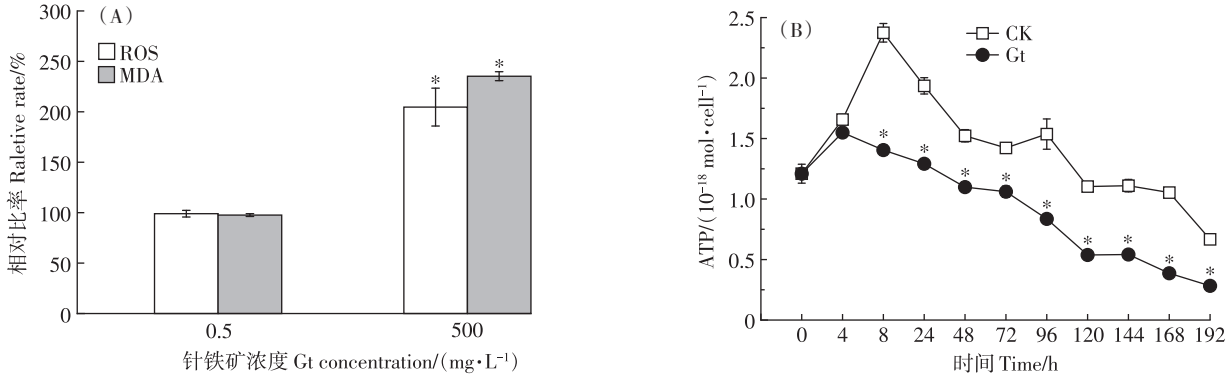
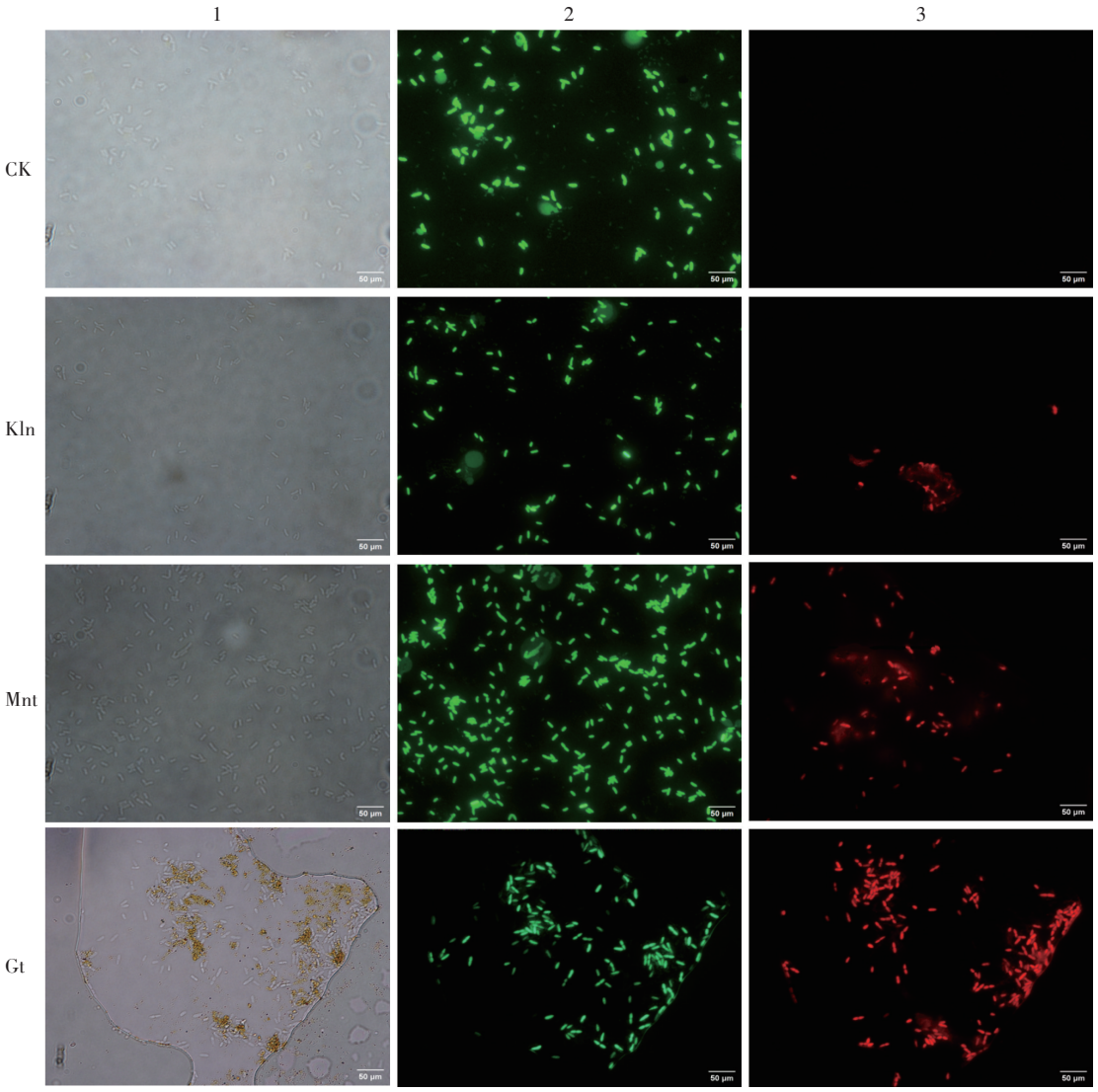


图6 0.5 mg·L^{-1}和500 mg·L^{-1}的针铁矿处理体系中产生ROS和MDA的相对比率及针铁矿对恶臭假单胞菌KT2440代谢ATP的影响

Figure 6 Relative rate of ROS and MDA produced in goethite treatment system of 0.5 mg·L^{-1} and 500 mg·L^{-1}, and effects of goethite on ATP metabolism of *pseudomonas putida* KT2440



1、2、3为同一视野，1为白光光源，2、3为荧光光源。

1, 2, 3 for the same view. 1 for white light source, 2, 3 for the fluorescent light source.

图7 不同矿物对恶臭假单胞菌细胞活性的影响

Figure 7 Effects of different minerals on the cellular activity of *Pseudomonas putida*

中文核心期刊

矿物对恶臭假单胞菌细胞膜完整性的比较可以得知针铁矿对细菌细胞的破坏力最大，这也进一步解释了之前观测到的现象。

3 讨论

蒙脱石显著促进了恶臭假单胞菌细胞的生长以及生物膜的形成（图2、图3）。蒙脱石为2∶1型层状硅酸盐黏土矿物，在本实验条件下带负电荷（表1），与带负电的细菌细胞间存在较强的静电互斥作用，菌矿混合体系中并未发生团聚现象（图4B和图7），减少了对细菌细胞膜的破坏。此外，蒙脱石还能通过促进有机、无机物质的交换以及维持pH水平来提高细菌活性[38]；且其较大的比表面积为细菌附着提供了充足位点，刺激细菌细胞生长并发生初始黏附[39]，从而进一步推动了生物膜的形成。相比之下，低浓度的高岭石和针铁矿能够促进生物膜的形成，而高浓度则表现出抑制作用。带负电的高岭石与细菌之间的作用力为静电斥力（表1），对细胞膜的伤害较小，在低浓度条件下，高岭石作为硅铝酸盐矿物会释放出Al^{3+}对细胞产生毒性[40]，为应对胁迫，细菌可能通过调节相关基因的表达或激活特定的调控因子诱导分泌多糖蛋白来促进生物膜的形成[41-42]。Glasauer等[43]通过透射电子显微镜观察发现，针铁矿在与细菌共培养过程中会穿透细胞外膜和肽聚糖层。在本研究中，带正电的针铁矿与细菌细胞间存在较强的静电引力，低浓度阈值范围内呈针状结构的针铁矿可能会在与细胞接触时刺破细胞膜，抑制细菌正常生理活动和代谢活性（图6B），致使部分细胞死亡。受损或失活的细胞释放出的DNA、RNA、脂质、蛋白质等胞内物质可供活细胞摄取养分[36]，从而促进细胞生长和生物膜的形成。但在高浓度条件下，针铁矿会迅速杀死几乎所有细菌细胞，显著抑制细菌存活[44]；而高浓度的高岭石则可能通过减少细胞信号分子的合成干扰群体感应功能[45]，进而抑制了细菌生物膜的形成。

细菌与矿物颗粒的沉降特征可以间接表征二者的接触程度[46]。3种黏土矿物与细菌的共沉降能力由大到小依次为针铁矿>高岭石>蒙脱石（图4）。Jiang等[47]研究了恶臭假单胞菌在黏土矿物上的吸附，发现恶臭假单胞菌在针铁矿上的吸附量大于高岭石与蒙脱石，这与本实验的结果相同。根据测得的Zeta电位可知，针铁矿表面带有正电荷，而恶臭假单胞菌表面带负电荷，二者之间存在静电引力，这可以很好地解释针铁矿在3种黏土矿物中最快与恶臭假单胞菌发生共沉降这一现象。细菌细胞与针铁矿发生共团聚后，环境中游离态恶臭假单胞菌的数量大幅减少，不利于细菌团聚形成菌落，进而抑制生物膜的形成。这也可能是针铁矿对恶臭假单胞菌生长和生物膜形成的影响不同于高岭石和蒙脱石的另一原因。

ROS的积累是矿物颗粒-细胞互作的关键响应[48-49]。针铁矿与高岭石均显著提升了恶臭假单胞菌胞内的ROS水平，且针铁矿还会进一步导致细菌细胞膜发生脂质过氧化（图6A）。Jiang等[50]研究了*Arthrobacter sp.* DNS10与针铁矿、蒙脱石及高岭石的相互作用，发现在暴露于针铁矿体系的细胞中检测出的ROS含量显著高于高岭石和蒙脱石体系，这与本研究的结果相似（图5）。这可能是由于针铁矿会释放出Fe^{2+}并渗透进细胞内部，Fe^{2+}大量积累破坏了细胞内铁离子平衡，导致铁依赖性Fenton反应过度激活，Fe^{2+}被氧化成Fe^{3+}沉淀，产生致命的活性氧物质[51]。恶臭假单胞菌胞内过量积累的ROS无法被胞内抗氧化酶完全中和，从而氧化胞内糖类、脂质和蛋白，最终对细胞产生毒害，所以针铁矿对于恶臭假单胞菌的代谢活性有明显的抑制作用（图6B），使其细胞数量随时间的推移急剧下降（图2）。本研究揭示了不同类型黏土矿物（针铁矿、高岭石和蒙脱石）通过差异化的表面特性和氧化应激调控恶臭假单胞菌KT2440生物膜形成的机制。作为土壤中常见的革兰氏阴性菌，恶臭假单胞菌KT2440与*Arthrobacter sp.* DNS10（革兰氏阳性菌）[50]的生物膜形成对矿物的响应具有相似性，表明土壤矿物对细菌生物膜形成的调控机制可能具有跨菌种的普适性。这些发现从矿物-生物膜视角拓展了土壤界面互作理论框架，为土壤生态系统功能调控机制解析提供了新的科学依据。

4 结论

（1）不同类型的黏土矿物因其电荷属性、尺寸大小等自身性质不同而对恶臭假单胞菌KT2440生物膜的形成产生了不同影响。蒙脱石通过静电互斥作用减轻了对细菌细胞膜的破坏，同时其巨大的比表面积促进了细菌的附着与定殖，显著增强了恶臭假单胞菌的细胞生长及生物膜的形成。

（2）低浓度阈值下针铁矿颗粒可以通过杀死部分细胞释放营养物质来促进生物膜的形成，而高浓度阈值下的针铁矿颗粒则通过破坏细胞内抗氧化系统的平衡以及抑制细胞代谢活性阻碍生物膜的形成。

（3）高岭石通过诱导细胞产生氧化应激对细菌

生物膜的形成产生影响，但对细胞的毒性作用小于针铁矿。

参考文献：

[1] 殷辉，殷明，严欣然，等. 土壤活性组分界面重金属同位素分馏行为研究进展[J]. 核农学报，2024，38(3)：603-611. YIN H, YIN M, YAN X R, et al. Recent advances in heavy metal isotope fractionation behaviors at the interfaces of soil active components[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2024, 38(3)：603-611.

[2] 李颜. 土壤活性组分与酶蛋白协同运移过程及影响机制[D]. 武汉：华中农业大学，2021：4-5. LI Y. The regulating mechanisms of enzymes co-transportinfluenced by the soil active components[D]. Wuhan：Huazhong Agricultural University, 2021：4-5.

[3] 刘洵，赖潘民旺，张敏，等. 微生物-矿物相互作用：机制与重金属固定效应[J]. 环境化学，2024，43(2)：377-392. LIU X, LAIPAN M W, ZHANG M, et al. Microbe-mineral interactions：mechanisms and immobilization effect toward heavy metals[J]. *Environmental Chemistry*, 2024, 43(2)：377-392.

[4] 刘亚龙，王萍，汪景宽. 土壤团聚体的形成和稳定机制：研究进展与展望[J]. 土壤学报，2023，60(3)：627-643. LIU Y L, WANG P, WANG J K. Formation and stability mechanism of soil aggregates：progress and prospect[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2023, 60(3)：627-643.

[5] BURGHELEA C I, DONTSOVA K, ZAHARESCU D G, et al. Trace element mobilization during incipient bioweathering of four rock types [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2018, 234：98-114.

[6] RATHOD J, JEAN J S, JIANG W T, et al. Micro-colonization of arsenic-resistant *Staphylococcus* sp. As-3 on arsenopyrite (FeAsS) drives arsenic mobilization under anoxic sub-surface mimicking conditions[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 669：527-539.

[7] POURJASEM L, LANDI A, ENAYATIZAMIR N, et al. The release of some elements from vermiculite during the short periods of incubation by heterotrophic bacteria[J]. *Eurasian Soil Science*, 2020, 53(2)：223-229.

[8] DE OLIVEIRA MENDES G, BAHRI-ESFAHANI J, CSETENYI L, et al. Chemical and physical mechanisms of fungal bioweathering of rock phosphate[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2021, 38(5)：384-394.

[9] FIORE S, DUMONTET S, HUERTAS F J, et al. Bacteria-induced crystallization of kaolinite[J]. *Applied Clay Science*, 2011, 53(4)：566-571.

[10] TAZAKI K. Clays, micro-organisms and biomineralization[M]// BERGAYA F, LAGALY G. Handbook of clay science. Elsevier：Developments of Clay Science, 2013：613-653.

[11] WU L L, JACOBSON A D, CHEN H C, et al. Characterization of elemental release during microbe-basalt interactions at T=28 ℃[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2007, 71(9)：2224-2239.

[12] 董海良，曾强，刘邓，等. 黏土矿物-微生物相互作用机理以及在环境领域中的应用[J]. 地学前缘，2024，31(1)：467-485. DONG H L, ZENG Q, LIU D, et al. Interactions between clay minerals and microbes：mechanisms and applications in environmental remediation [J]. *Earth Science Frontiers*, 2024, 31(1)：467-485.

[13] WU H Y, CHEN W L, RONG X M, et al. Soil colloids and minerals modulate metabolic activity of *Pseudomonas putida* measured using microcalorimetry[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2014, 31(7)：590-596.

[14] CAI P, HUANG Q Y, WALKER S L. Deposition and survival of *Escherichia coli* O157：H7 on clay minerals in a parallel plate flow system[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(4)：1896-1903.

[15] JONES D L, EDWARDS A C. Influence of sorption on the biological utilization of two simple carbon substrates[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30(14)：1895-1902.

[16] DIAB S, SHILO M. Effect of adhesion to particles on the survival and activity of *Nitrosomonas* sp. and *Nitrobacter* sp. [J]. *Archives of Microbiology*, 1988, 150(4)：387-393.

[17] KEEN G A, PROSSER J I. The surface growth and activity of nitrobacter[J]. *Microbial Ecology*, 1988, 15(1)：21-39.

[18] HALL-STOODLEY L, COSTERTON J W, STOODLEY P. Bacterial biofilms：from the natural environment to infectious diseases[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(2)：95-108.

[19] VU B, CHEN M, CRAWFORD R J, et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation[J]. *Molecules*, 2009, 14 (7)：2535-2554.

[20] 谢朝阳，黄巧云，黄敏. 耐重金属细菌对土壤胶体及矿物体系吸附镉的影响[J]. 湖北农业科学，2010，49(4)：855-858. XIE Z Y, HUANG Q Y, HUANG M. Influence of heavy metal-resistant bacterium on the adsorption of Cu^{2+} in soil colloid and minerals[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2010, 49(4)：855-858.

[21] 曹媛媛. 细菌胞外聚合物与土壤固相界面作用机理及其环境效应[D]. 武汉：华中农业大学，2013：2-6. CAO Y Y. Interaction mechanisms of extraceller polymeric substances from bacteria with soil solids interface and its environmental effect[D]. Wuhan：Huazhong Agricultural University, 2013：2-6.

[22] 李宇佳，文翊，骆乐丹，等. 土壤生物膜的生态功能及其研究方法综述[J]. 江苏农业科学，2023，51(10)：1-11. LI Y J, WEN Y, LUO L D, et al. Ecological functions of soil biofilms and their research methods：a review[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2023, 51 (10)：1-11.

[23] 熊轩，李宇佳，赵升，等. 土壤矿物介导下2种母质发育水稻土中多物种生物膜的形成[J]. 微生物学报，2025，65(1)：106-121. XIONG X, LI Y J, ZHAO S, et al. Formation of multi-species biofilms in paddy soils developed from two parent materials mediated by soil minerals[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(1)：106-121.

[24] 严贵丽，文翊，赵升，等. 酸紫泥田水稻土生物膜提取及其种间互作的矿物响应特性[J/OL]. 土壤学报，2025：1-12. (2025-02-14). https://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1119.P.20250213.1819.008.html. YAN G L, WEN Y, ZHAO S, et al. Extraction of biofilms and mineral response characteristics of interspecific interaction in acidic purple paddy[J/OL]. *Acta Pedologica Sinica*, 2025：1-12. (2025-02-14). https://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1119.P.20250213.1819.008.html.

[25] LEHMANN A, ZHENG W S, RILLIG M C. Soil biota contributions to soil aggregation[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(12)：1828-1835.

[26] 孔亚丽，秦华，朱春权，等. 土壤微生物影响土壤健康的作用机制研究进展[J]. 土壤学报，2024，61(2)：331-347. KONG Y L, QIN

H, ZHU C Q, et al. Research progress on the mechanism by which soil microorganisms affect soil health[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2024, 61(2):331-347.

[27] YESANKAR P J, PAL M, PATIL A, et al. Microbial exopolymeric substances and biosurfactants as 'bioavailability enhancers' for polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2023, 20(5): 5823-5844.

[28] KIM J, DONG H L, SEABAUGH J, et al. Role of microbes in the smectite-to-illite reaction[J]. *Science*, 2004, 303(5659):830-832.

[29] 陈俊芳, 吴宪, 杨佳绒, 等. 全球气候变化下干旱及复水对植物和土壤微生物的影响:进展与展望[J]. 生态学杂志, 2023, 42(12): 3038-3049. CHEN J F, WU X, YANG J R, et al. Effects of drought and rewatering on plants and soil microorganisms under climate change: review and perspectives[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2023, 42(12):3038-3049.

[30] 朱栎佳, 丁玲, 仇欣然, 等. 微生物与矿物相互作用对污染物环境行为的影响[J]. 科学通报, 2025, 70(3):443-456. ZHU L J, DING L, QIU X R, et al. Effects of microbe-mineral interaction on the environmental behaviors of coexisting pollutants: a review[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2025, 70(3):443-456.

[31] 万学雅, 赖潘民旺, 魏梦珍, 等. 典型黏土矿物-土壤细菌相互作用对镉固定的影响[J]. 陕西科技大学学报, 2025, 43(3): 38-47. WAN X Y, LAIPAN M W, WEI M Z, et al. The impact of typical clay mineral-soil bacteria interactions on cadmium immobilization[J]. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology*, 2025, 43(3): 38-47.

[32] ATKINSON R J, POSNER A M, QUIRK J P. Adsorption of potential-determining ions at the ferric oxide-aqueous electrolyte interface[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1967, 71(3):550-558.

[33] SAISON C, PERREAULT F, DAIGLE J C, et al. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis(photosystem Ⅱ energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 96(2): 109-114.

[34] GURR J R, WANG A S S, CHEN C H, et al. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells[J]. *Toxicology*, 2005, 213(1/2):66-73.

[35] KUMARI S S, VARGHESE A, MURALEEDHARAN D, et al. Effect of vitamin E on the severity of myocardial infarction induced by isoproterenol[J]. *The Indian Journal of Medical Research*, 1989, 90: 468-471.

[36] 欧阳凯. 细菌生物膜对天然及工程纳米颗粒的响应机制[D]. 武汉:华中农业大学, 2018: 22-23. OUYANG K. Response of bacterial biofilms to natural and engineered nanoparticles[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018:22-23.

[37] 谢俊. 大肠杆菌O157:H7对不同土壤矿物响应的分子生物学机制[D]. 武汉:华中农业大学, 2015: 10-11. XIE J. The molecular biological mechanism of *Escherichia coli* O157: H7 response to different soil minerals[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015:10-11.

[38] RANSOM B, BENNETT R H, BAERWALD R, et al. *In situ* conditions and interactions between microbes and minerals in fine-grained marine sediments: a TEM microfabric perspective[J]. *American Mineralogist*, 1999, 84(1/2):183-192.

[39] 王阳, 刘菲, 谢宇轩, 等. 左氧氟沙星在蒙脱石存在条件下对大肠杆菌的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(2): 593-601. WANG Y, LIU F, XIE Y X, et al. The toxic effect of levofloxacin on *Escherichia coli* with montmorillonite[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(2):593-601.

[40] WONG D, SUFLITA J M, MCKINLEY J P, et al. Impact of clay minerals on sulfate-reducing activity in aquifers[J]. *Microbial Ecology*, 2004, 47(1):80-86.

[41] 杨芊, 金中初. 细菌的氧化应激反应及其基因调控[J]. 国外医学(微生物学分册), 1998, 21(2): 21-24. YANG Q, JIN Z C. Oxidative stress response in bacteria and its genetic regulation[J]. *Foreign Medical Sciences*, 1998, 21(2):21-24.

[42] GUIDA L, SAIDI Z, HUGHES M N, et al. Aluminium toxicity and binding to *Escherichia coli*[J]. *Archives of Microbiology*, 1991, 156(6): 507-512.

[43] GLASAUER S, LANGLEY S, BEVERIDGE T J. Sorption of Fe(hydr) oxides to the surface of *Shewanella putrefaciens*: cell-bound fine-grained minerals are not always formed *de novo*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12):5544-5550.

[44] BRAYNER R, FERRARI-ILIOU R, BRIVOIS N, et al. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium[J]. *Nano Letters*, 2006, 6(4): 866-870.

[45] YANG S S, QU C C, MUKHERJEE M, et al. Soil phyllosilicate and iron oxide inhibit the quorum sensing of *Chromobacterium violaceum* [J]. *Soil Ecology Letters*, 2021, 3(1):22-31.

[46] 马文婷. 土壤矿物介导下细菌生物膜形成过程及机制[D]. 武汉:华中农业大学, 2017: 74-75. MA W T. The processes and mechanisms of bacteria biofilm formation in the precence of soil minerals[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017:74-75.

[47] JIANG D, HUANG Q, CAI P, et al. Adsorption of *Pseudomonas putida* on clay minerals and iron oxide[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007, 54(2):217-221.

[48] NAVARRO E, BAUN A, BEHRA R, et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi [J]. *Ecotoxicology*, 2008, 17(5):372-386.

[49] FRANKLIN N M, ROGERS N J, APTE S C, et al. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and $ZnCl_2$ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41 (24):8484-8490.

[50] JIANG Z, AN N, CHU Y X, et al. Growth, biofilm formation and atrazine degrading gene(*trzN*) expression of *Arthrobacter* sp. DNS10 cultured with montmorillonite, kaolinite and goethite[J]. *Chemosphere*, 2022, 307:135904.

[51] WILLIAMS L B, METGE D W, EBERL D D, et al. What makes a natural clay antibacterial?[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(8):3768-3773.

(责任编辑:李丹)