

纯培养条件下不同氧化铁的微生物还原能力

曲 东¹ Sylvia Schnell^{2*}

(¹ 西北农林科技大学资源环境学院 杨凌 712100)

(² Max-Planck-Institute for terrestrial Microbiology, Karl-Frisch-Strasse, 35043 Marburg, Germany)

关键词: 氧化铁, 铁还原菌, 纯培养

中图分类号: Q939.14 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 06-0745-05

在自然湿地及含水沉积物中铁的还原是纯化学过程还是生物学过程, 这一问题直到 80 年代末才有了比较明确的认识。过去认为, 厌氧环境中低氧化还原电位的发生是氧的微生物消耗的结果, 具有还原性的代谢物的产生能引起 Fe(III) 自发地向 Fe(II) 的非生物转化。然而, 对这一假设的直接评价^[1] 已经表明: 低氧化还原电位不是引起 Fe(III) 还原的充分条件, 而需要具有酶学还原 Fe(III) 能力的微生物存在。只有当沉积物环境中保持一定的酶学活性时, 才有显著的 Fe(III) 还原作用发生。因此, 现在的观点是: 具有还原 Fe(III) 能力的细菌及铁还原酶才是厌氧沉积物环境中含铁氧化物还原的真正动力^[2-4]。自从 1987 年分离得到 *Geobacter metallireducens* GS-15^[5] 金属还原菌以来, 采用纯培养的方法已获得了大量的微生物还原 Fe(III) 的证据, 对 Fe(III) 的微生物还原机理也有了较为深入的认识, 即铁还原菌由 Fe(III) 还原为 Fe(II) 的过程中获取能量, 有机物的氧化将提供电子给 Fe(III)。土壤中全铁的含量约为 4%, 除无定形氧化铁以外, 晶体结构存在的氧化铁占到 75% 以上, 其中包括纤铁矿、赤铁矿、针铁矿及其铝取代物。在厌氧条件下, 不同的氧化铁晶体能否被还原或还原程度如何, 目前并不十分清楚。本文采用纯培养的实验方法, 通过接种 Fe(III) 还原菌 GS-15, 以便探讨不同氧化铁的微生物还原能力, 其结果将有助于对淹水土壤中 Fe(III) 还原特征的认识。

1 材料和方法

1.1 Fe(III) 还原菌株

GS-15 属于严格厌氧的革兰氏阳性、非运动型杆菌, 以乙酸盐作为唯一电子供体, 可以 Fe(III) 氧化物作为潜在电子受体。该菌株由淡水沉积物中分离获得, 是目前研究最多的铁还原菌之一。实验中所用的菌种由德国马普地球微生物研究所提供。

1.2 培养基质

培养基质采用 Widdel 和 Bak(1992)报道的方法^[6] 配制。将培养液的基本组成化合物(表 1)溶解, 转入 Widdel 烧瓶, 于 121℃, 1.5 × 10⁵ Pa 下灭菌 40min, 然后在 N₂/CO₂ (80:20) 保护下冷却, 再加入另外灭菌的其它化合物(表 2), 用灭菌过的 1mol/L HCl 或 NaHCO₃ 溶液调节 pH 值到 6.8。在 N₂ 环境及无菌操作下, 将上述无菌的培养液灌入 100mL 带铝盖的血清瓶中。其中, 微量元素溶液配制: FeCl₂ · 4H₂O 1000mg, CoCl₂ · 6H₂O 130mg, ZnCl₂ 70mg, CaCl₂ · 2H₂O 2mg, MnCl₂ · 2H₂O 80mg, NiCl₂ · 6H₂O 24mg, H₃BO₃ 6mg, Na₂MoO₄

* 现在通信地址为: University Giessen, Institute of Applied microbiology, IFZ-Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen Germany

作者简介: 曲 东(1960-), 男, 河南省陕县人, 西北农林科技大学资源环境学院教授, 博士, 1998~1999 年在德国马普地球微生物研究所研修, 主要从事土壤环境化学研究。

收稿日期: 2001-02-06, 修回日期: 2001-05-08

表 1 10 倍 Pfennig 培养液的基本组成

化合物	浓度/(g/L)
NaCl	10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.5
KCl	5
KH ₂ PO ₄	2
NH ₄ Cl	2.5
Fe(Ⅲ) Citrate	8/4 (30 or 15 mmol/L)

表 2 培养液中所需的其它化合物

溶 液	浓度/(mL/L medium)
微量元素溶液	1.0
1mol/L NaHCO ₃ 溶液	30
维生素混合溶液	1.0
维生素 B ₁₂ 溶液 (50mg/L)	1.0
维生素 B ₂ 溶液 (50mg/L)	1.0
0.5mol/L 半胱氨酸溶液	0.6

·2H₂O 36mg, 将上述物质用 50mL 2mol/L HCl 溶解后, 加蒸馏水稀释到 1L, 分装于 50mL 血清瓶中, 灭菌。
维生素混合液配制: D(+) -生物素 1mg, 叶酸 3mg, 烟酸(V_{BS} 10mg, DL-α-硫辛酸 1mg, Ca-D(+) -泛酸 5mg, 维生素 B₁ 10mg, 吡哆胺(V_{B6}) 15mg, 4-氨基苯甲酸 4mg, 先用热蒸馏水将 D(+) -生物素溶解, 冷却后再逐个加入不同维生素使之溶解, 定容至 100mL, 最后用 0.2μm 滤膜过滤。

1.3 恒温培养实验

1.3.1 接种: 将上面制备的培养液(100mL/瓶)在无菌操作下吸出 10mL, 加入 GS-15 接种液 10mL 及 0.5mL 灭菌过的 1mol/L 乙酸钠溶液, 密封, 25℃ 培养。培养液中的柠檬酸铁将作为电子受体, 加入的乙酸盐为电子供体, 使 Fe(Ⅲ) 还原菌生长繁殖。在 2d 内, 培养液可由原来的黄绿色变为无色, 表明 Fe(Ⅲ) 还原菌生长正常, 同时瓶中有絮状微生物聚集生物生成。采用 2 种浓度的柠檬酸铁(15 和 30mmol/L), 目的在于调节培养液中 Fe(Ⅲ) 还原菌的数量。

1.3.2 添加不同氧化铁悬液: 采用含 Fe(Ⅲ) Citr 15mmol/L 的培养液于 100mL 瓶中接种, 置 25℃ 生长 2d, 使 Fe(Ⅲ) Citr 充分还原及 Fe(Ⅲ) 还原菌充分繁殖。吸出 10mL 培养液, 添加经过灭菌处理的氧化铁(15mmol/L) 悬液 10mL 及 0.5mL 乙酸盐溶液, 密封, 于 25℃ 恒温培养。另外, 用含 Fe(Ⅲ) Citr 30mmol/L 的培养液(100mL 瓶) 接种, 并于 25℃ 生长 2d, 添加 Fe(OH)₃ 和纤铁矿悬液 10mL, 以添加灭菌后的蒸馏水为对照。氧化铁添加量分别为 0.15mmol/L 和 1.5mmol/L。添加 Fe(Ⅲ) 氧化物的同时, 补加乙酸盐溶液, 添加量分别为 5mmol/L 及 3mmol/L。每个处理重复 3 份。

实验中使用的不同氧化铁悬液按照文献[7]的方法合成, 并进行晶体鉴定(X-ray 衍射)和铁含量测定(AAS 法)。

1.4 采样及测定

分别在添加氧化铁前、后及培养过程中采集培养液 0.5mL(2 份), 溶于 4.5mL 的 0.5mol/L HCl 中, 用于 Fe(Ⅲ) 和 Fe(Ⅱ) 浓度的测定。另取 1mL(2 份), 用 0.2μm 滤膜过滤, 用于测定乙酸浓度。每次采样后向培养瓶内加入体积约为 2mL 的小玻璃棒(已灭菌), 以填充培养瓶内体积, 保持瓶内被液体充满。Fe(Ⅱ) 和 Fe(Ⅲ) 浓度测定采用离子色谱法^[8]。乙酸浓度测定采用 HPLC 法^[9]。

2 结果和讨论

2.1 不同氧化铁的微生物还原能力

纯培养实验中, 添加 6 种不同氧化铁前后 Fe(Ⅲ) 和 Fe(Ⅱ) 浓度变化见图 1。添加 Fe(OH)₃ 和纤铁矿后, 0.5mol/L HCl 可溶性的 Fe(Ⅲ) 浓度随着培养过程进行呈迅速降低趋势。在培养的 4d 内, Fe(Ⅲ) 的降低率在添加 Fe(OH)₃ 处理时为 95.4%, 添加纤铁矿处理时为 95.8%。表明 Fe(OH)₃ 和纤铁矿都能迅速地被还原; 添加其它氧化铁处理时, Fe(Ⅲ) 浓度与添加前无明显差异。由 Fe(Ⅱ) 生成量比较看出, 添加 Fe(OH)₃ 和纤铁矿处理的 Fe(Ⅱ) 浓度有所增大, 而添加其它氧化铁处理时与添加前比较, Fe(Ⅱ) 浓度未见增加。

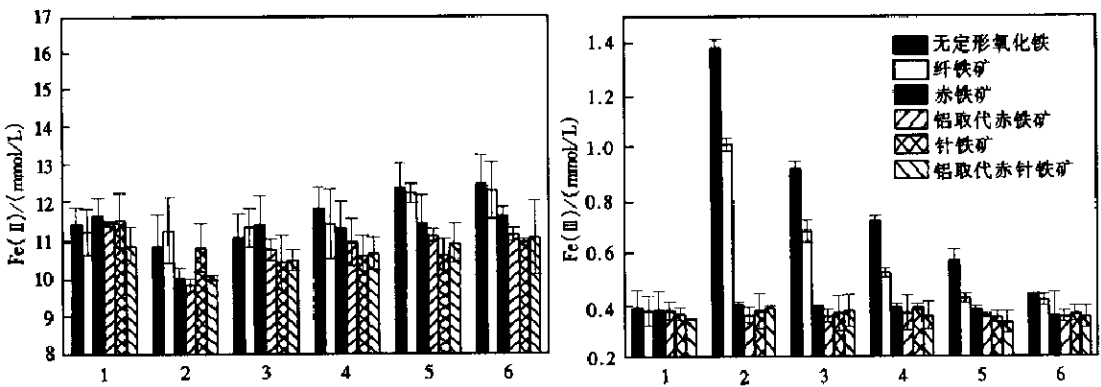


图1 利用GS-15纯培养中添加不同氧化铁前后Fe(Ⅲ)和Fe(Ⅱ)浓度变化
图中1、2、3、4、5、6分别表示不同的采样测定时间。1代表添加不同氧化铁以前采用,2代表添加不同氧化铁以后立即采样,3、4、5、6分别代表添加不同氧化铁后第1d、2d、3d和4d时采样。

2.2 不同添加量时Fe(Ⅲ)还原能力比较

添加0.15mmol/L和1.5mmol/L不同氧化铁时测定的Fe(Ⅱ)、Fe(Ⅲ)及乙酸盐浓度结果分别列于表3和表4中。由于GS-15仅以乙酸盐作为唯一的电子供体,所以,可以通过乙酸盐消耗量来计算GS-15对培养基中Fe(Ⅲ)的还原程度。比较表3和表4的结果可见,由实验测定的铁还原量与由测定乙酸盐消耗量计算所得的铁还原量有一定的差异。其中添加较低浓度的氧化铁时,这一差异较小(差值占Ac⁻折合Fe还原量的百分数在2.6%~13.2%之间),而添加高浓度氧化铁时相差较大(16.6%~49.4%)。添加不同氧化铁之间也有差异,在低添加量时,Fe(OH)₃处理的相差量占Ac⁻折合还原量的比例为2.6%~5.4%,而纤铁矿处理的相差量则占11.5%~13.2%,显著高于Fe(OH)₃;在高添加量时,Fe(OH)₃处理的相差量为28%左右,而纤铁矿处理的相差量为16.6%~43.4%。由Fe(Ⅲ)还原量与Fe(Ⅱ)生成量比较看出,在低添加量时两者基本一致;在高添加量时,对添加Fe(OH)₃处理两者保持一致,但在添加纤铁

表3 添加0.15mmol/L氧化铁时Fe(Ⅲ)、Fe(Ⅱ)和Ac⁻浓度的变化/(mmol/L)

处 理	添加氧 化铁前	添加氧 化铁后	培 养 4d 后	铁变化量或 Ac ⁻ 变化量	Ac ⁻ 折合 Fe 还 原量 ^a 及相差 ^b	
Ac ⁻	Fe(OH) ₃	-	6.186 ± 0.104	5.997 ± 0.289	0.189	1.512 ^a
	γ-FeOOH	-	6.201 ± 0.831	5.972 ± 0.065	0.229	1.832
	H ₂ O	-	6.191 ± 0.417	6.151 ± 0.124	0.040	0.320
Fe(Ⅲ)	Fe(OH) ₃	0.890 ± 0.136	2.347 ± 0.246	0.917 ± 0.219	1.430	- 0.082 ^b
	γ-FeOOH	0.889 ± 0.129	2.431 ± 0.138	0.840 ± 0.145	1.591	- 0.241
	H ₂ O	0.891 ± 0.149	1.137 ± 0.174	0.805 ± 0.105	0.332	0.03
Fe(Ⅱ)	Fe(OH) ₃	23.61 ± 1.58	23.09 ± 0.47	24.56 ± 0.23	1.47	- 0.04 ^b
	γ-FeOOH	23.58 ± 0.80	23.12 ± 0.73	24.74 ± 0.54	1.62	- 0.21
	H ₂ O	23.54 ± 0.91	23.26 ± 0.44	23.61 ± 0.62	0.35	0.03

注:a按1mol/L Ac⁻能还原8mol Fe(Ⅲ)的反应系数计算
b用测定的Fe变化量减去Ac⁻折合的Fe还原量的差值。

表 4 添加 1.5mmol/L 氧化铁时 Fe(Ⅲ)、Fe(Ⅱ)和 Ac⁻ 浓度的变化/(mmol/L)

处 理	添加氧 化铁前	添加氧 化铁后	培养 4d 后	铁变化量或 Ac ⁻ 变化量	Ac ⁻ 折合 Fe 还 原量 ^a 及相差 ^b	
Ac ⁻	Fe(OH) ₃	-	4.166 ± 0.304	2.501 ± 0.047	1.665	13.32 ^a
	γ-FeOOH	-	4.193 ± 0.103	2.908 ± 0.139	1.285	10.28
	H ₂ O	-	4.203 ± 0.186	4.124 ± 0.400	0.079	0.632
Fe(Ⅲ)	Fe(OH) ₃	0.745 ± 0.093	12.49 ± 0.170	3.008 ± 0.021	9.480	-3.840 ^b
	γ-FeOOH	0.752 ± 0.013	7.100 ± 0.144	1.278 ± 0.506	5.822	-4.460
	H ₂ O	0.792 ± 0.315	1.128 ± 0.113	0.762 ± 0.060	0.367	-0.265
Fe(Ⅱ)	Fe(OH) ₃	24.31 ± 0.66	23.84 ± 0.18	33.37 ± 1.21	9.53	-3.79 ^b
	γ-FeOOH	24.37 ± 0.81	23.61 ± 0.29	32.18 ± 0.13	8.572	-1.71
	H ₂ O	24.53 ± 1.91	23.82 ± 1.04	24.39 ± 0.53	0.57	-0.06

注:a, b 与表 3 相同

矿处理中 Fe(Ⅲ)降低量与 Fe(Ⅱ)生成量的差值较大。分析导致铁变化量测定值与由 Ac⁻ 消耗量折算的铁还原量不同的原因,可能受下列因素影响:(1)由于生成 Fe₃O₄(磁铁矿),而使得部分铁转变为难溶性的铁,引起用 0.5mol/L HCl 提取的铁测定量的减少。(2)纤铁矿受在 0.5mol/L HCl 中溶解度的限制,使得 Fe(Ⅲ)测定值减少。(3)由于培养液中 Fe(Ⅲ)还原菌数量的限制,导致氧化物还原速率的不同。另外,直接在 1.5g/L 灭菌后的 Fe(OH)₃、纤铁矿和针铁矿悬液中接种 GS-15 铁还原菌的纯培养实验(25℃)显示,Fe(OH)₃ 还原大约需要 60~70d,同时有大量的黑色 Fe₃O₄ 产生;纤铁矿的还原速率相对较快,一般为 45~50d 左右可完全还原;针铁矿的还原过程极慢,培养 120d 后其颜色(针铁矿为黄色)没有显著变化。与上面以柠檬酸铁培养基的还原状况比较,纯氧化铁的还原过程是比较缓慢的,其原因与铁还原菌的数量及氧化铁的可利用性有关。

总之,通过 GS-15 金属还原菌的纯培养实验证实,Fe(OH)₃ 和纤铁矿能迅速地被微生物还原。添加不同氧化铁后 25℃ 恒温培养 4d,Fe(OH)₃ 和纤铁矿的还原率可达 95.4% 和 95.8%,其它铁氧化物与对照无明显差别。添加低浓度的氧化铁后,实测的 Fe(Ⅲ)还原、Fe(Ⅱ)生成量及由测得的乙酸消耗量折算出的 Fe(Ⅲ)还原量之间有较好的一致性。当添加高浓度氧化铁时,表现出 Fe(Ⅲ)测定值的减少及与由乙酸消耗量折算的 Fe(Ⅲ)还原量的差异较大。

参 考 文 献

[1] Lovley D R. *Microbiol Rev*, 1991, 55: 259 ~ 287.
[2] Lovley D R, Blunt-Harris E L. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(9): 4252 ~ 4254.
[3] Nevin K P, Lovley D R. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(5): 2248 ~ 2251.
[4] Magnuson T S, Hodges-Myerson A L, Lovley D R. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 185(2): 5 ~ 11.
[5] Lovley D R, Stolz J F, Nord G L, et al. *Nature*, 1987, 330: 352 ~ 354.
[6] Widdel F, Bak F. Gram-negative mesophile sulfate-reducing bacteria. In: Hrgs Balows A, Trueper H G, Dworkin M, et al. *The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York: Berlin Press, 1992. 3352 ~ 3378.
[7] Schwertmann U, Cornell R M. *Iron oxides in the Laboratory, Preparation*. VCH, Weinheim, New York Press, 1991. 69 ~ 144.
[8] Schnell S, Ratering S. *Environ Sci Technol*, 1998, 32: 1530 ~ 1537.
[9] Krumboeck M, Conrad R. *FEMS Microbiol Ecol*, 1991, 85: 247 ~ 256.

MICROBIAL REDUCTION ABILITY OF VARIOUS IRON OXIDES IN PURE CULTURE EXPERIMENT

Qu Dong¹ Sylvia Schnell²

(¹ Northwest Science and Technology University of agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

(² Max-Planck-Institute for terrestrial Microbiology, Karl-Frisch-Strasse, 35043 Marburg, Germany)

Abstract: The microbial reduction of ferrihydrite, lepidocrocite, hematite, goethite and aluminum-substituted iron oxides were examined by iron-reducer GS-15 under anaerobic pure culture condition. The results indicated that the ferrihydrite and lepidocrocite can be rapidly reduced by iron-reducer, and the percentage of microbial reduction are respectively 95.4% and 95.8% after 4 days incubation at 25°C. The other iron oxides like hematite, Al-hematite, goethite and Al-goethite are very difficult to reduce during short-term incubation. The amounts of Fe(III)-reducing, Fe(II)-producing and Fe-reducing calculated by acetate consumption are identical under the conditions of lower concentration iron oxides addition.

Key words: Iron oxide, Iron-reducing bacterium, Pure culture