

中国希瓦氏菌 D14^T 的 Fe(III) 还原特性及其影响因素

许玫英 林培真 孔祥义 钟小燕 孙国萍*

(广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

摘 要 报道了中国希瓦氏菌 D14^T 的 Fe(III) 还原特性,研究了溶氧浓度、光照强度、温度、pH 等条件对菌株 Fe(III) 还原的影响。结果发现,随着培养基中 Fe(III) 浓度的提高,菌株 D14^T 的 Fe(III) 还原速率相应降低;氧气和光照对 Fe(III) 还原有一定的抑制作用;菌株还原 Fe(III) 的最适反应温度为 37℃;在反应起始 pH6.0-10.0 的条件下菌株可进行 Fe(III) 还原。对不同形态 Fe(III) 还原特性的研究结果表明,Fe(III) 的溶解度越高越有利于还原反应的进行。采用 SDS 和 OGP 这两种蛋白变性剂对 Fe(III) 还原蛋白进行初步定位的结果表明,参与 Fe(III) 还原的蛋白主要位于细胞可溶性外周蛋白。在同时含有偶氮染料和 Fe(III) 的条件下,菌株 D14^T 的偶氮染料脱色率和 Fe(III) 还原率均有所提高。

关键词 中国希瓦氏菌 D14^T, Fe(III) 还原, 影响因素, 偶氮染料脱色

中图分类号 :Q935 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2005)03-0463-04

早在 19 世纪,人们就发现微生物具有酶促催化 Fe(III) 还原的能力^[1]。近年来,越来越多的地球化学证据表明 Fe(III) 有可能是地球上微生物代谢的第一个外部电子受体,Fe(III) 还原可能是早期地球生命活动的重要呼吸途径^[2-4]。大量的研究表明,Fe(III) 还原细菌能以 Fe 为唯一电子受体对环境中的多种有机物进行氧化,并从中获得生长所需的能量,在有机污染环境的生物治理和生物修复中起着关键的作用,是一类重要的环境微生物。然而相对于甲酸、硝酸、硫酸等物质作为厌氧呼吸电子受体而言,目前国内对于微生物 Fe(III) 还原特性的报道仍然很少。希瓦氏菌能以多种物质作为唯一末端电子受体,完成形式多样的呼吸过程,是一群重要的 Fe(III) 还原细菌。本实验室从印染废水处理系统的活性污泥中分离到一株希瓦氏菌 D14,经鉴定该菌株属于希瓦氏菌的一个新种,命名为中国希瓦氏菌 D14^T。该菌不仅具有广谱的染料脱色、硝酸盐还原、硫代硫酸钠还原等多种功能,同时还具有与大部分希瓦氏菌相同的 Fe(III) 还原能力^[5]。目前有关厌氧 Fe(III) 还原与偶氮染料脱色降解之间的关系尚未见报道。本文将重点报道中国希瓦氏菌 D14^T 的 Fe(III) 还原特性及其与偶氮染料脱色降解之间的关系,为更好地利用这一类微生物进行染料污染的生物治理提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 :从广州某印染厂废水处理系统的活性污泥中分离纯化的中国希瓦氏菌 D14^T,其分离鉴定见文献[5]。

1.1.2 Fe(III) 还原培养基 :在乳酸钠培养基(乳酸钠 2g,酵母抽提物 2g,Na₂HPO₄·7H₂O 12.8g, KH₂PO₄ 3g, NaCl 0.5g, NH₄Cl 1.0g,补水到 1000mL)中添加一定量的 Fe(III)。

1.1.3 主要试剂和仪器 :十二烷基硫酸钠(SDS),超纯级,购于 MBChem;OGP(octyl-β-D-Glucopyranoside),超纯级,购于 AMRESCO;DU 640 紫外分光光度计(美国 BECKMAN 公司);Bugbox 厌氧操作工作站(Ruskinn);WGP-400 隔水式电热恒温培养箱(重庆万达仪器有限公司)。

1.2 不同条件下 Fe(III) 还原率的测定

将在 LB 培养液中培养过夜的菌液于 6000r/min 离心收集菌体,用 1/15mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH8.0)洗菌体 2 次,重悬于上述缓冲液中制成菌悬液,以 10% 的接种量接种于 Fe(III) 还原培养基中,分别于不同起始 Fe(III) 浓度、不同溶氧浓度、不同培养温度、不同起始 pH 和不同光照强度条件下静置培养,采用邻菲罗啉分光光度法定期测定培养基中 Fe(II) 的浓度^[6],以不接种的培养基为阴性对照,所测得 Fe(II) 的浓度与培养基中原 Fe(II) 浓度之差,除以培养基中总铁浓度的百分比,即得 Fe(III) 还原率。

1.3 不同形态 Fe(III) 的还原率

分别以 FeCl₃·Fe₂O₃, Fe(OH)₃ 和柠檬酸铁这四种溶解度不同的 Fe(III) 配制 Fe(III) 还原培养基,使培养基中的起始 Fe(III) 浓度均为 1mmol/L,以不接种的培养基为阴性对照,比较这 4 种 Fe(III) 的还原率。

1.4 蛋白变性剂 SDS 和 OGP(n-octyl-β-D-glucopyranoside) 对菌株 Fe(III) 还原的影响

用 1%、2% 和 3% 的蛋白变性剂 SDS 和 OGP 分别处理菌

基金项目:国家 863 计划(2001AA214111);广东省自然科学基金团队项目(015017);广东省自然科学基金项目(04000242)

* 通讯作者。Tel 86-20-87782471; Fax 86-20-87601587; E-mail: gpsun@gis.sti.gd.cn

作者简介:许玫英(1974-),女,广东省饶平县人,硕士,主要从事环境微生物学研究,现为中国科学院华南植物园博士研究生。E-mail: meiying-xu@yahoo.com.cn

收稿日期 2004-10-14, 修回日期 2005-01-11

体 5min,以 10%的接种量接种至 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原培养基中,30℃ 静置培养,以未处理的菌体为阳性对照,不接种的培养基为阴性对照,比较 $\text{Fe}(\text{III})$ 的还原率。

1.5 细菌 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原与偶氮染料脱色降解之间的关系

将菌液接种于同时含酸性大红 GR 和 FeCl_3 的培养基 (M_{D+F}) 中,以只含酸性大红 GR 的染料培养基 (M_D) 和只含 FeCl_3 的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原培养基 (M_F) 为对照,分别比较不同培养基条件下细菌的偶氮染料还原率和 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率。

2 结果和讨论

2.1 菌株 D14^T 对 $\text{Fe}(\text{III})$ 的利用

在起始 FeCl_3 浓度为 0.04, 0.37, 0.74, 3.72, 7.43, 14.87mmol/L 的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原培养基中,比较菌株 D14^T 的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原速率。结果发现,随着培养基中 FeCl_3 浓度由 0.04mmol/L 升高至 14.87mmol/L,菌株 D14^T 的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原速率总体呈下降的趋势。而当培养基中 FeCl_3 浓度由 0.04mmol/L 升高至 7.43mmol/L 时,反应 136h 后,培养基中 $\text{Fe}(\text{II})$ 的浓度从 0.03mmol/L 升高至 1.69mmol/L,继续提高 FeCl_3 浓度至 14.87mmol/L,培养基中 Fe^{2+} 的浓度也仅为 1.40mmol/L (图版-III-A)。这可能是由于随着 FeCl_3 浓度的升高,培养基中电子受体 $\text{Fe}(\text{III})$ 与电子供体乳酸钠的比例相应提高,使细菌的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原能力相应降低。这一结论与 Fredrickson 等人的研究结论相一致^[7]。

2.2 溶氧浓度对 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原的影响

将菌液接种到起始溶氧浓度为 1.0mg/L 的培养基中,分别在常规恒温培养箱和厌氧操作工作站中静置培养细菌,比较菌株 D14^T 在兼性厌氧和绝对厌氧这两种条件下的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原速率。结果发现,在开始反应的前 4 个小时内,两种条件下的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原速率基本一致,随着反应的继续进行,厌氧条件下的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率始终保持比兼性厌氧条件下高 5~13%。而此时厌氧条件下的溶氧浓度为 0,兼性厌氧条件下的溶氧浓度仍为 0.8mg/L。出现以上结果的原因,可能是由于反应一开始时,培养基中仍含有一定浓度的溶解氧。随着反应的进行,厌氧条件下,培养基中的溶氧逐渐被消耗,最终达到完全厌氧的状态,而兼性厌氧条件下,培养基中则始终保持一定浓度梯度的溶解氧。由此可见,菌株 D14^T 是在厌氧呼吸的条件下以 $\text{Fe}(\text{III})$ 为电子受体,环境中的氧浓度将抑制细菌对 $\text{Fe}(\text{III})$ 的还原。

2.3 光照强度对 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原的影响

在自然光照和黑暗条件下进行 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原反应,比较菌株 D14^T 在不同光照强度下的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原速率。结果发现,在开始反应的前 2h,菌株 D14^T 在黑暗和光照条件下几乎具有相同的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原速率,随着反应的进行,黑暗条件下的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原逐渐显示出优势。反应 12h 时,黑暗条件下的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率达到 65.1%,而光照条件下的仅为 53.41%。反应 18h 时,黑暗条件下的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率仍然保持比光照条件

下的快 11% 左右。由此可见,光照对菌株 D14^T 的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原具有一定的抑制作用,但自然光照条件下菌株仍具有一定的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原能力。

2.4 温度对 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原的影响

在不同培养温度条件下比较菌株 D14^T 的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率。结果发现,当温度由 4℃ 升至 37℃ 时, $\text{Fe}(\text{III})$ 还原速率基本上呈上升趋势。反应 8h 时,4℃ 条件下的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率为 33.53%,30℃ 和 37℃ 条件下的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率均已超过 51.5%。当反应进行到 30h 时,4℃ 条件下的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率达到 39.07%,此时 30℃ 和 37℃ 条件下的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率已分别达到 74.65% 和 80.41%。将反应温度升高到 40℃,菌株无法对 $\text{Fe}(\text{III})$ 进行还原。由此可见,菌株可在 4~37℃ 的条件下对 $\text{Fe}(\text{III})$ 进行还原,在 37℃ 时具有最高的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率。

2.5 pH 对 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原的影响

在起始 pH5.0~10.0 的条件下比较菌株 D14^T 的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率及其反应过程中 pH 的变化。结果发现,pH8.0 时,菌株 D14^T 具有最快的起始 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率,随着反应的进行, $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率出现下降的趋势,继续反应 6h 后,菌株重新恢复高的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率,反应 10h 后达到最高的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率。在 pH7.0 的条件下,反应 2~4h 获得最大的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率,经过 2h 的稳定期后,菌株的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率再次提高,继续反应 2h 后,还原率再次出现下降。反应起始 pH6.0 的条件下,菌株经过 2h 的迟滞期后, $\text{Fe}(\text{III})$ 的还原率不断提高,并始终保持稳定的上升趋势直至达到最大的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率。pH9.0 时反应 2h 后的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率为 9%,反应 6h 后达到 26.06%,反应 23h 后达到 pH6.0~8.0 条件下相当的最大 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率 (61.5%)。在 pH10.0 的条件下,菌株始终保持相对较低的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率,反应 22h 后的还原率仅为 26.23%。在 pH5.0 的条件下,菌株 D14^T 对 $\text{Fe}(\text{III})$ 几乎不具有还原作用。对反应过程中培养基的 pH 变化情况进行监测,结果发现,随着反应的进行,培养基的 pH 在不同程度上得到调节,并逐渐趋向中性。在培养基 pH 小于 6.0 和大于 10.0 的条件下,菌株无法还原 $\text{Fe}(\text{III})$ 。随着反应的进行,培养基的 pH 逐渐被调节到 6.0~10.0 之间,菌株就可以表现出不同程度的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原。由此可见,菌株 D14^T 可在 pH6.0 到 10.0 的范围内对 $\text{Fe}(\text{III})$ 进行还原,且反应过程中,培养基的 pH 会由细菌的生长代谢做出自动调节,逐渐趋向中性。

2.6 菌株 D14^T 对不同形态 $\text{Fe}(\text{III})$ 的还原率

比较菌株 D14^T 对 FeCl_3 , Fe_3O_4 , $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 和柠檬酸铁这 4 种溶解度各不相同的 $\text{Fe}(\text{III})$ 的还原时发现,菌株 D14^T 对柠檬酸铁这种易溶性 $\text{Fe}(\text{III})$ 的还原率最高,而对溶解性较差的 Fe_3O_4 和 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原率相当低。反应 2h 时,菌株 D14^T 对柠檬酸铁的还原率为 62.95%,对 FeCl_3 的还原率为 49.93%,而对 Fe_3O_4 和 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的还原率则分别为 1.42% 和 1.64%。反应 18h 后,菌株 D14^T 对柠檬酸铁的最高还原率达到

80.66% 对 FeCl₃ 的最高还原率为 61.04% ,而对 Fe₃O₂ 和 Fe(OH)₃ 的最高还原率则分别仅为 3.07% 和 2.77%。这与 Gaspard 和曲东等研究环境中不同铁氧化物的还原状况所得的结论相一致^[8,9]。

2.7 蛋白变性剂 SDS 和 OGP 对 Fe(III) 还原的影响

SDS 是一种带电荷的离子型水溶性蛋白变性剂,而 OGP 是一种不带电荷的非离子型膜蛋白变性剂,它们对膜脂和膜蛋白的影响是不一样的。SDS 主要扰动可溶性外周蛋白,对在膜蛋白的影响较小,而 OGP 则主要使内在膜蛋白受到扰动,对可溶性外周蛋白的影响较小^[10]。

由图版-III-B 可见,经 1~3% 的 SDS 作用后,菌株几乎丧失了 Fe(III) 还原的能力。相比较而言,经 1% 的 OGP 作用后,菌株 D14^T 的 Fe(III) 还原率稍慢于对照组,继续提高 OGP 的浓度至 2% 时,菌株的 Fe(III) 还原率进一步减慢,当 OGP 浓度提高至 3% 时,才抑制了几乎全部的 Fe(III) 还原能力。由此可见,SDS 对菌株 D14^T 的 Fe(III) 还原的影响作用远远大于 OGP,推测菌株 D14^T 负责 Fe(III) 还原的蛋白主要集中在可溶性外周蛋白。Beliaev 和 Myers 等也发现 *Shewanella oneidensis* Fe(III) 还原的功能蛋白主要集中在细胞外膜^[11,12]。

2.8 菌株 D14^T Fe(III) 还原与偶氮染料脱色降解作用之间的关系

将菌株 D14^T 接种于同时含 0.076mmol/L 酸性大红 GR 和 0.74mmol/L FeCl₃ 的液体培养基(M_{D+F})中,以单独含酸性大红 GR(M_D)和单独含 FeCl₃(M_F)的培养基为对照,比较菌株 D14^T 在上述不同培养基中的染料脱色率和 Fe(III) 还原率。由图版-III-C 可见,在反应起始的 1.5h,菌株 D14^T 在 M_{D+F} 中的脱色速率比在 M_D 中的低。0.5h 时,菌株在 M_D 中的脱色率已达到 61.39%,而此时在 M_{D+F} 中的脱色率则仅有 41.79%。继续反应到 1.5h,在 M_D 中的脱色率已达到 92.52%,在 M_{D+F} 中的脱色率为 88.91%。但反应 2.5h 后,在 M_{D+F} 中的脱色率与 M_D 基本相同。继续反应到 3h,在 M_D 中的脱色率达到 93.04%,此时,在 M_{D+F} 中的脱色率为 94.02%。由此可见,在反应起始阶段 Fe(III) 对染料的脱色有一定的抑制作用,但菌株很快以高的脱色率完成脱色反应,并不受低的起始脱色率的影响。这一结论与菌株 D14^T 在固体培养基上观察到的脱色圈形成效果(图版-III-D)相一致。当菌株 D14^T 涂布于同时含酸性大红 GR(0.76mmol/L)和 FeCl₃(1.85mmol/L)的固体培养基上,以及单独含 0.76mmol/L 酸性大红 GR 的培养基上,培养 3d 后发现含有 FeCl₃ 的培养基上的脱色圈比不含 FeCl₃ 的明显。由此推测,在反应的起始阶段(2.5h 内),Fe(III) 与偶氮键还原竞争电子,因此对偶氮染料表现出一定的抑制作用,但随着 Fe(III) 的还原,所产生的 Fe(II) 对染料脱色具有一定的促进作用。

在染料完全脱色后,开始测定培养基中的 Fe(III) 还原率。结果发现(图版-III-E),刚完成脱色反应时,M_{D+F} 和 M_F 两种培养基中的 Fe(III) 还原率基本相同,但随着反应的进行,M_{D+F} 中的 Fe(III) 还原率逐渐高于 M_F,并基本上保持这一趋势对 Fe(III) 进行还原。由此可见,染料降解产物的存在对菌株 Fe(III) 还原具有一定的促进作用。这可能是由于染料脱色后的产物可作为 Fe(III) 还原时的电子供体,培养基中可利用的电子供体量的增加促进了 Fe(III) 的还原。

有关菌株 D14^T 的 Fe(III) 还原与偶氮染料脱色过程相互促进的机理需在酶水平、电子传递链层次进行进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Lovley D R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol Rev*, 1991, **55**: 259 - 287.
- [2] Walker J C G. Was the Archaeal biosphere upside down? *Nature*, 1987, **329**: 710 - 712.
- [3] Cairns-Smith A G, Hall A J and Russell M J. Mineral theories of the origin of life and an iron sulfide example. *Orig. Life Evol Biosph*, 1992, **22**: 161 - 180.
- [4] Vargas M, Kashefi K, Blunt-Harris E L, et al. Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth, *Nature*, 1998, **395**: 65 - 67.
- [5] 许玫英,郭俊,钟小燕,等. 一个降解染料的希瓦氏菌新种——中国希瓦氏菌. *微生物学报*, 2004, **44**(5): 561 - 566.
- [6] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法, 第三版. 北京: 中国环境科学出版社出版, 1989, 180 - 182.
- [7] Fredrickson J K, Kota S, Kukkadapu R K, et al. Influence of electron donor/acceptor concentrations on hydrous ferric oxide (HFO) bioreduction. *Biodegradation*, 2003, **14**(2): 91 - 103.
- [8] Gaspard S, Vazquez F and Holliger C. Localization and solubilization of the iron(III) reductase of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 3188 - 3194.
- [9] 曲东, 张一平. 水稻土中铁氧化物的厌氧还原及其对微生物的影响. *土壤学报*, 2003, **40**(6): 858 - 863.
- [10] 黄浩, 李冬海, 张秀芳, 等. 去污剂 SDS 和 OGP 扰动后光系统 II 的蛋白热稳定性研究. *生物物理学报*, 2003, **19**(1): 105 - 109.
- [11] Beliaev A S, Saffarini D A, McLaughlin J L, et al. MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Mol Microbiol*, 2001, **39**: 722 - 730.
- [12] Myers J M, Myers C R. MtrB is required for proper incorporation of the cytochromes OmcA and OmcB into the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 5585 - 5594.

Characterization and influence factors of Fe(III) reduction of *Shewanella cinica* D14^T

XU Mei-ying LIN Pei-zhen KONG Xiang-yi ZHONG Xiao-yan SUN Guo-ping*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Colletion and Application , Guangdong Institute of Microbiology , Guangzhou 510070 , China)

Abstract : This is the first time to described the dissimilatory Fe(III) reducing characteristics of *Shewanella cinica* D14^T. The effects of O₂ , light , temperature and pH on dissimilatory Fe(III) reduction were examined. The results suggested that the rate of Fe(III) reduction decreased with increasing Fe(III) concentration. Fe(III) reduction was partially inhibited by the presence of either O₂ or light. The optimum temperature for Fe(III) reduction is 37°C. At pH 6.0 – 10.0 , strain D14^T can reduce Fe(III). The soluble Fe(III) is more easy to be reduced than the insoluble one. Results of protein denaturants SDS and OGP suggest that the Fe(III) reduction activity of *S. cinica* is mostly localized to the soluble outer membrane fraction. The azo dye decolorization and Fe(III) reduction in strain D14^T were enhanced in the presence of Fe(III) and dye.

Key words : *Shewanella cinica* D14^T , Fe(III) reduction , Influence factors , Azo dye decolorization

Foundation item :National Programs for High Technology Research and Development of China(2001AA214111) ; Guangdong provincial Natural Science Fund (015017) ; Guangdong provincial Natural Science Fund(04000242)

* Corresponding author. Tel : 86-20-87684471 ; Fax 86-20-87684587 ; E-mail : gpsun@gis.sti.gd.cn

Received date :10-14-2004

The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

EDITOR-IN-CHIEF

LI Ji-lun Academician

(College of Biology , Chinese Agricultural University , Beijing 100094 , China)

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

TAN Hua-rong Professor

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

LU De-ru Professor

(Institute of Genetics , Second Military Medical University , Shanghai 200433 , China)

WANG Ao-quan Professor

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

QU Yin-bo Professor

(School of Life Science , Shandong University , Jinan 250100 , China)

XU Jian-guo Professor

(National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control , Chinese Center for Disease Control and Prevention , Beijing 102206 , China)

MEMBERS OF THE BOARD

CAI Yong-feng

CHEN Yong-qing

CHENG Chi

DONG Xiu-zhu

FAN Yun-liu

GUO Jun

HU Fu-quan

HU Yuan-yang

HUANG Li

LU Cheng-ping

MIN Hang

QIAN Shi-jun

SHAO Yi-ming

SHENG Jun

TANG Hong

TIEN Po

WANG Ping

WANG Hua-ming(USA)

XIE Hong

YANG Su-sheng

ZHAI Zhong-he

ZHANG Yao-ping(USA)

ZHENG Tian-ling

ZHU Bao-quan

ZHUGE Jian

MANAGING EDITORS

WANG Jin-fang

WANG Min