

铁还原菌株 P4 的碳源利用特征及其系统发育学分析

关舒元^a,朱 超^a,王保莉^a,曲 东^b,王伟民^b,孙丽蓉^b

(西北农林科技大学 a 生命科学学院, b 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**从水稻土中分离铁还原微生物,研究不同碳源对其铁还原特征的影响,对分离的铁还原微生物进行系统发育学分析。**【方法】**对采自四川的水稻土进行厌氧恢复培养,通过 PTYG 选择性夹层培养基分离纯化及 LB 液体培养基扩繁后,接种到 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 培养基中进行铁还原能力鉴定,筛选出具有铁还原功能的铁还原菌株。通过对 6 种碳源利用的纯培养比较,确定分离菌株利用不同碳源时的铁还原特征。采用通用引物进行 PCR 扩增,对 PCR 产物进行 16S rDNA 序列分析,建立系统发育进化树。**【结果】**分离得到 1 株具有铁还原功能的革兰氏阳性杆状厌氧菌株 P4,其在培养的 10~30 h 达到对数生长期。菌株 P4 利用不同碳源时,铁还原的最大反应速率($V_{\max}$)大小顺序为:葡萄糖>丙酮酸盐>乳酸盐>琥珀酸盐>丙酸盐>乙酸盐。菌株 P4 利用葡萄糖和丙酮酸盐的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率分别为 63.79%和 22.19%,而其他几种碳源的铁还原率均在 10%以下。采用 PCR 技术获得了 1 325 bp 的铁还原菌株 P4 的部分 16S rDNA 序列。菌株 P4 与多种不可培养的厌氧菌株及丁酸梭状芽孢杆菌具有 98%的同源性。**【结论】**从四川水稻土中分离得到了 G^+ 、杆状、圆末端的铁还原菌 P4,其在培养 10~30 h 能够达到对数生长期。葡萄糖和丙酮酸盐可作为菌株 P4 的优势碳源。菌株 P4 可归属为厌氧丁酸梭状芽孢杆菌。

[关键词] 水稻土;铁还原菌; $\text{Fe}(\text{III})$ 还原;碳源利用;系统发育分析

[中图分类号] S154.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)03-0117-07

Characterization of iron reduction using different carbon sources and phylogenetic analysis of $\text{Fe}(\text{III})$ -reducing microorganism P4

GUAN Shu-yuan^a, ZHU Chao^a, WANG Bao-li^a, QU Dong^b, WANG Wei-min^b, SUN Li-rong^b

(a. College of Life Sciences, b. College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** $\text{Fe}(\text{III})$ -reducing microorganism was separated from paddy soil, the effect of strain on $\text{Fe}(\text{OH})_3$ reduction using different carbon sources was analyzed and physiological characterization of strain was also obtained. **【Method】** The soil solution collected from Sichuan paddy soil was incubated under anoxic atmosphere. Through separation and purification from PTYG selective medium and multiplication from LB medium, and then identification of the function of $\text{Fe}(\text{III})$ reduction in $\text{Fe}(\text{OH})_3$ medium, the $\text{Fe}(\text{III})$ -reducing organism was isolated. Through comparison of effects on carbon utilization with six carbon sources in pure culture, the characteristic of strain on $\text{Fe}(\text{III})$ reduction using different carbon sources was investigated. With the PCR and 16S rDNA sequence analysis, the phylogenetic tree was established. **【Result】** An anaerobic, G^+ , rod-shaped organism P4 with function of $\text{Fe}(\text{III})$ reduction was isolated. It attained a logarithms growth period within 10~30 h. With different carbon sources, the maximal re-

* [收稿日期] 2007-04-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(40271067, 40741005);西北农林科技大学创新团队项目

[作者简介] 关舒元(1981—),女,北京市人,在读硕士,主要从事微生物学研究。

[通讯作者] 曲 东(1960—),男,河南陕县人,教授,博士,博士生导师,主要从事土壤环境化学研究。

E-mail: dongqu@nwsuaf.edu.cn

action rate ($V_{\max}$) of iron reduction was in proper order for: glucose>pyruvate>lactate>succinate>propionate>acetate. With glucose and pyruvate as carbon source, iron reduction rate were 63.79% and 22.19%, the others were all below 10%, displaying glucose and pyruvate be the optimal carbon source of strain P4. The adoption of the PCR acquired parts of 16S rDNA sequences of Fe(III)-reducing strain P4 with 1 325 bp. 【Conclusion】 A G^+ , rod-shaped Fe(III)-reducing organism P4 was isolated from Sichuan paddy soil. It attained a logarithms growth period within 10~30 h. Glucose and pyruvate were the optimal carbon sources of strain P4. Homology analysis and phylogenetic comparison of strain P4 and relative strains based on 16S rDNA showed that strain P4 belonged to *Clostridium butyricum*, most to several uncultured bacterium and *Clostridium butyricum* with 98% similarity.

Key words: paddy soil; Fe(III)-reducing microorganism; Fe(III) reduction; utilization of carbon source; phylogenetic analysis

细菌的异化 Fe(III)还原是生物进化过程中最早出现的生物能量代谢途径,多种古细菌和真细菌具有还原 Fe(III)的能力^[1-4]。在异化铁 Fe(III)还原过程中,微生物利用外界的 Fe(III)作为呼吸链末端电子受体,氧化体内的基质(电子供体),实现电子在呼吸链上的传递,形成跨膜的质子浓度电势梯度,进一步转化为其代谢所需的能量,从而使 Fe(III)还原为 Fe(II),此过程所释放出来的能量又被微生物所捕获,满足其生长发育的需要^[5-8]。在自然界中只要有厌氧环境,几乎都会发生异化 Fe(III)还原现象,并有异化铁还原微生物存在。异化 Fe(III)还原被认为是地球上最早的呼吸形式之一,在生命的进化历程中,这一遗传烙印在一定范围和一定程度上都会被继承,且势必有更多的微生物种类都具有还原 Fe(III)的能力或潜能。因此加强异化 Fe(III)还原研究,对于揭示地球早期生命的能量代谢特征和生命进化具有重要理论意义^[9]。

Fe(III)还原微生物的分离和鉴定是研究异化铁还原的基础。从 1987 年发现第一个铁还原菌迄今,已经从各种厌氧环境中分离得到了不同种类的异化 Fe(III)还原微生物。在古生菌域 2 个门下的 5 个纲、7 个目中及细菌域中的 8 个门下、13 个纲、22 个目中均发现有异化 Fe(III)还原微生物的分布^[9]。这些 Fe(III)还原微生物被证明在环境污染防治及生物修复过程中起着重要作用^[10-11]。水稻土作为一种研究氧化还原过程的模式系统一直被人们所重视,其中铁的氧化还原占有重要地位。渍水土壤中氧化铁的还原作用主要受微生物过程控制^[12-15],系统开展 Fe(III)还原微生物的特性研究,对于阐明土壤中氧化铁的微生物还原机理、认识异化铁还原在稻田生态系统中的重要作用、促进水稻土中污染物的转化与修复具有重要的理论和实际意义。本研究

拟从我国典型的水稻土中分离和纯化具有铁还原功能的微生物,研究其利用不同碳源时的铁还原特征,并采用 PCR-16S rDNA 序列分析确定其系统进化关系,以期为水稻土中铁还原微生物分离鉴定体系的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试水稻土样品采自四川省邛崃市回龙镇柏杨村。土壤母质属于下蜀黄土,有机质含量为 48.9 g/kg, pH 值为 7.34,全铁含量为 34.2 g/kg,无定型铁含量为 3.08 g/kg,游离铁含量为 11.7 g/kg。采集 0~20 cm 表土,自然风干后,磨细,过孔径为 1 mm 的土壤筛。

1.2 培养基组成

1.2.1 PTYG 固体培养基 试验中采用质量分数 1%的 PTYG 固体培养基,其基本组成为:蛋白胨 0.05 g/L,胰蛋白胨 0.05 g/L,酵母膏 0.1 g/L,蔗糖 0.1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.07 g/L,琼脂粉 8 g/L,调节培养基 pH 为 7.0。

1.2.2 PTYG 夹层选择性固体培养基 在下层 PTYG 固体培养基中加入少量 $Fe(OH)_3$ 悬液,具有铁还原功能的菌落可将红棕色的 $Fe(OH)_3$ 还原为 Fe(II),作为铁还原微生物的判别。上层为普通 PTYG 固体培养基,用于营造厌氧环境。

1.2.3 LB 液体培养基 采用 LB 液体培养基进行菌体扩繁。由于铁还原微生物大多适应于贫营养环境,故试验中选择质量分数 50%的 LB 液体培养基,其基本组成为:蛋白胨 5 g/L,酵母膏 5 g/L, NaCl 2.5 g/L,调节培养基的 pH 为 7.2。

1.3 铁还原微生物的分离与纯化

1.3.1 水稻土中厌氧微生物的恢复培养 称取供

试水稻土样品 10.00 g 于 30 mL 血清瓶中,加入 1 mL 人工合成 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 悬液(含 Fe 量为 616.1 mg/L)及 20 mL 去离子水,在 30 °C 下静置暗光培养 1 周。将培养后的土壤悬液于 700 r/min 离心 10 min,取上清液作为微生物接种液。

1.3.2 铁还原微生物的分离 按传统的稀释涂布法将接种液接种于 PTYG 夹层选择性固体培养基上,培养皿用封口膜密封,以减少空气中 O_2 的影响。置 30 °C 培养箱中避光培养 4~5 d。选取分散较好的平板,最大量挑取初步具有铁还原功能的单个菌落,转接种于装满 LB 液体培养基的 15 mL 带盖菌种管中,盖紧管盖,30 °C 厌氧培养 1 d。将培养后的菌种管于 3 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,用无菌水洗涤 2 次,再用 1 mL 无菌水悬浮沉淀制得菌液。

1.3.3 铁还原功能的鉴定 在 10 mL 血清瓶中加入 1 mL 人工合成 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 悬液和 1 mL 5 g/L 的氯化铵,加盖后于 121 °C 灭菌 30 min,冷却后开盖,分别加入过 0.22 μm 滤膜的 25 mmol/L 磷酸缓冲液 1 mL,300 mmol/L 葡萄糖溶液 1 mL,接种上述菌液 1 mL,通 N_2 除去瓶中 O_2 ,加橡胶盖后用铝盖密封。30 °C 下暗光培养,观察培养瓶中 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的变化,鉴定不同菌株的铁还原功能。若培养期间瓶内培养液由棕红色变为白色,表明该菌株具有还原 $\text{Fe}(\text{III})$ 的功能。

1.3.4 铁还原菌的纯化 将筛选出的铁还原菌培养液(白色瓶)作为接种液,于 LB 液体培养基中扩繁,离心、洗涤,得到的菌液接种于 PTYG 夹层选择性固体培养基上纯化 2~3 次,再经过 LB 液体培养基扩繁,离心、洗涤后获得的铁还原菌株转入 1.5 mL 离心管中,-18 °C 冷冻保存。

1.4 铁还原菌生长曲线的测定

将纯化扩繁后的菌体用适量 LB 液体培养基悬浮制得接种液。取 12 支装有一半 LB 液体培养基的带盖菌种管,按无菌操作法向每管准确加入 1 mL 接种液,接种后管中剩余空间用 LB 液体培养基补满,加盖后上下摇荡,使菌体混匀,以另一支装满 LB 液体培养基不接种的菌种管为对照(CK),在 30 °C 下培养。分别于培养 0,2,4,6,8,10,12,16,20,26,32,40 h 取出,放入冰箱中贮存,待测。取样结束后,以未接种的菌种管为空白对照,选用 600 nm 波长按取样先后进行光密度测定,以菌悬液的光密度值(OD_{600})为纵坐标、培养时间为横坐标绘制菌体生长曲线。

1.5 铁还原菌碳源利用能力的测定

分别选择葡萄糖(Glu)、丙酮酸钠(Pyr)、乙酸钠(Ace)、丙酸钠(Pro)、乳酸钠(Lac)及琥珀酸钠(Suc)作为唯一电子供体,碳源浓度均为含碳 60 mmol/L。试验同时设置不加菌液和碳源(CK)及加菌液,不加碳源(CK1)2 个对照。取 10 mL 血清瓶若干,分别加入灭菌的人工合成的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 悬液 1 mL、5 g/L 氯化铵 1 mL、25 mmol/L 磷酸缓冲液 1 mL、碳源 1 mL 和接种液 1 mL。通 N_2 除去瓶中 O_2 ,盖上橡胶盖后用铝盖密封,30 °C 下暗光培养。培养体系的总体积为 5 mL,含铁 616.1 μg 。分别于培养的第 1,2,4,6,9,12,17,22,27,32,42 及 52 天采样,测定 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度^[15]。

1.6 铁还原特征分析

利用 Logistic 方程对不同碳源利用下的铁还原过程进行拟合。Logistic 方程的表达式为: $Y = a / [1 + b \cdot \exp(-cx)]$ 。式中: a 表示 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原的最大潜势,即最大 $\text{Fe}(\text{II})$ 累积量; b 为模型参数; c 表示速率常数; x 为培养时间参数;最大反应速率 $V_{\max} = 0.25ac$ 。利用最大 $\text{Fe}(\text{II})$ 累积量与加入的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 量的比值,可以得出 $\text{Fe}(\text{III})$ 的还原率。

1.7 铁还原菌 16S rDNA PCR 和序列测定

取上述于 1.5 mL 离心管中冷冻保存的菌体,用 567 μL TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH 8.0)使其悬浮,加入 30 μL 0.1 g/mL SDS 及 3 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K,于 37 °C 温育 1 h。再加入 100 μL 5 mol/L NaCl 和 80 μL CTAB/NaCl 溶液,于 65 °C 温育 10 min。酚-氯仿抽提后,用异丙醇沉淀 DNA。用体积分数 70%乙醇洗涤沉淀,离心弃去乙醇。将沉淀的 DNA 溶于 50 μL 的无菌去离子水中,-20 °C 保存备用。选用细菌 16S rDNA 通用引物,经 PCR 扩增目的片段。引物序列为:63f: 5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'; 1387r: 5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'。20 μL PCR 反应体系为:DNA 模板 1 μL ,10 $\times$ PCR 缓冲液 2 μL ,上、下游引物各 1 μL ,Taq DNA 聚合酶 1 μL 及 10 $\times$ dNTP 2 μL ,补水至 20 μL 。PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 40 s、42 °C 1 min、72 °C 1 min,30 个循环;最后于 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。扩增产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析,纯化和回收 PCR 产物,送英骏生物有限公司进行序列测定。将获得的序列提交 NCBI 进行 Megablast,并将所选择出的同源性较高的序列,构建基于 N-G 法的进化树。

2 结果与分析

2.1 水稻土中铁还原菌的分离与纯化

将四川水稻土厌氧恢复培养制得接种液,通过在 PTYG 夹层选择性固体培养基上接种及培养,获得 58 个生长较好、形状规则的单菌落。经由 LB 液体培养基繁殖,并接种于含有 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的液体厌氧培养体系中。含 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的培养液为棕红色,当 $\text{Fe}(\text{III})$ 被还原后培养液将变为无色,并产生白色沉淀 FeCO_3 。通过观察 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原情况,得出 21 个菌落具有还原 $\text{Fe}(\text{III})$ 的功能。对 21 个菌株编号命名,并根据培养瓶中颜色变化快慢,选择出铁还原

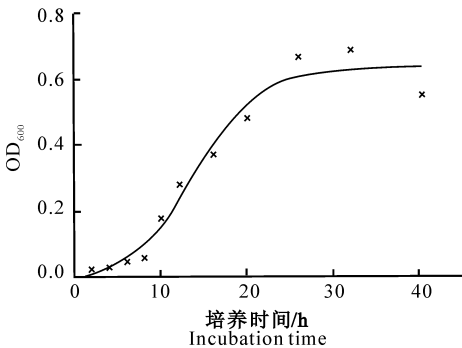


图 1 菌株 P4 的生长曲线
Fig. 1 Growth curve of strain P4

2.3 菌株 P4 利用不同碳源的铁还原特征分析

菌株 P4 利用 6 种不同碳源时的铁还原情况见图 2。由图 2 可知,6 种碳源处理中,菌株 P4 利用葡萄糖的 $\text{Fe}(\text{II})$ 生成量最高且反应速率大;对丙酮酸盐的利用能力次之;对琥珀酸盐、乙酸盐及丙酸盐的

速度较快的 1 个菌株-P4,将其通过 LB 液体培养基扩繁,采用常规方法进行革兰氏染色及菌落形态观察。结果发现,菌株 P4 为 G^+ ,杆状,圆末端,菌落的形态特征为:菌落较小,白色,规则圆,不透明,表面光滑。

2.2 菌株 P4 的生长曲线

由生长曲线(图 1)可看出,P4 菌株在 LB 液体培养基中生长 10 h,后由迟缓期进入对数生长期,并以最大的速率生长和分裂,培养 30 h 后进入稳定生长期。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下,用 LB 液体培养基扩繁 24 h,菌株 P4 可达到最大量生长的要求。

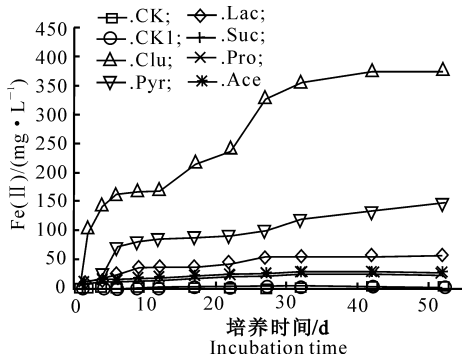


图 2 菌株 P4 利用不同碳源对 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原的影响
Fig. 2 Effect of strain P4 on $\text{Fe}(\text{OH})_3$ reduction using different carbon sources

利用能力均较低,其 $\text{Fe}(\text{II})$ 生成量基本相同。在设置的 2 个对照中, $\text{Fe}(\text{III})$ 还原反应几乎未进行,表明残留于扩繁菌液中的培养基成分对铁还原过程无影响。菌株 P4 利用不同碳源的铁还原过程可用 Logistic 方程描述,拟合方程的主要参数见表 1。

表 1 用 Logistic 方程拟合的菌株 P4 利用不同碳源的铁还原参数

Table 1 Logistic model of dissimilatory $\text{Fe}(\text{III})$ reduction of different carbon sources by strain P4

碳源 Carbon source	Logistic 方程参数 parameter of Logistic model			$\text{Fe}(\text{III})$ 还原率/% Reaction rate	$V_{\max}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})$
	a	c	r^2		
Glu	393.0	0.100	0.929	63.79	9.846
Pyr	136.7	0.112	0.859	22.19	3.819
Lac	57.30	0.136	0.978	9.302	1.950
Suc	30.08	0.215	0.891	4.883	1.619
Pro	27.99	0.157	0.939	4.544	1.101
Ace	27.70	0.138	0.970	4.496	0.956

由表 1 可知,表示拟合方程相关性的决定系数(r^2)在 0.859~0.978,菌株 P4 对 6 种碳源利用过程的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原最大潜势(参数 a)和最大反应速率($V_{\max}$)差异均较大,而铁还原反应速率常数(参数 c)变化不明显; $\text{Fe}(\text{III})$ 还原最大潜势与 $V_{\max}$ 的变化具有一致性。菌株 P4 利用葡萄糖的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原 $V_{\max}$ 最高,而利用乙酸盐的 $V_{\max}$ 最小,利用不同碳源的

$V_{\max}$ 大小顺序为:葡萄糖>丙酮酸盐>乳酸盐>琥珀酸盐>丙酸盐>乙酸盐。菌株 P4 在利用葡萄糖时的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率最高,达到 63.79%,丙酮酸盐次之,为 22.19%,其他几种碳源的铁还原率均很低,在 10% 以下。表明葡萄糖和丙酮酸盐是菌株 P4 的优势碳源。

2.4 菌株 P4 16S rDNA 序列的测定及聚类分析

以铁还原菌株 P4 的基因组 DNA 为模板,选用细菌 16S rDNA 通用引物 63f/1387r,经 PCR 扩增出长度为 1 325 bp 的目的片段(图 3)。将所得铁还原菌株 P4 的 16S rDNA 序列在 NCBI 上进行 Megablast,结果列于表 2。利用 Clustal 和 Phylip 软件构建的铁还原菌株 P4 与相关菌株 16S rDNA 的系统发育进化树见图 4。由表 2 可以看出,从水稻土中分离及培养得到的铁还原菌株 P4 与多种不可培养的厌氧菌株(DQ441334、DQ083720、DQ083732、AM176850、AY953222)的 16S rDNA 的同源性均达 98%,并且和多种丁酸梭状芽孢杆菌(AY604563、AM176850、DQ831126、X77834、AF005092)的 16S rDNA 同源性也达到 98%。从图 4 的聚类结果可知,在进化关系上铁还原菌株 P4 与可培养的厌氧丁酸梭状芽孢杆菌(AY442812)有较高的亲缘性,两者并列于不可培养厌氧菌株(DQ441334)的平行进化分支上,以上三者在进化地位上又平行于丁酸梭状芽孢杆菌 HAW-HC1 菌株(AY604563)。上述 4 个菌株在大的进化方向上与系统发育进化树上由多种其他来源的丁酸梭状芽孢

杆菌菌株构成的进化集团处于平行关系,并且平行于另一丁酸梭状芽孢杆菌菌株(AB075768)。综上所述可以初步推断,本研究分离培养出的铁还原菌株 P4 是一类厌氧的丁酸梭状芽孢杆菌。

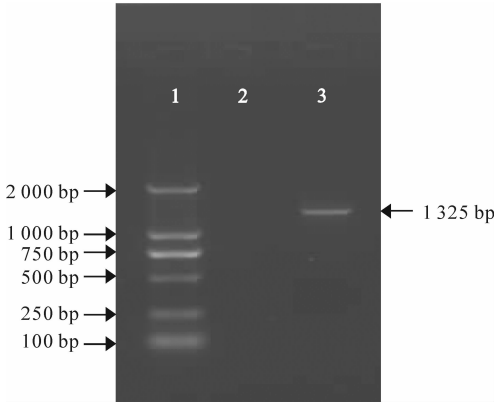


图 3 铁还原菌 P4 16S rDNA 基因扩增产物的电泳结果
1. DNA marker(DL2000);2. 阴性对照(不含模板的扩增混合液);3. 扩增所得的目的片段
Fig. 3 Agarose electrophoresis of the fragments of 16S rDNA from Fe(Ⅲ)-reducing microorganism P4
1. DNA marker(DL2000);2. Negative control (PCR mixture without template);3. Amplification fragment

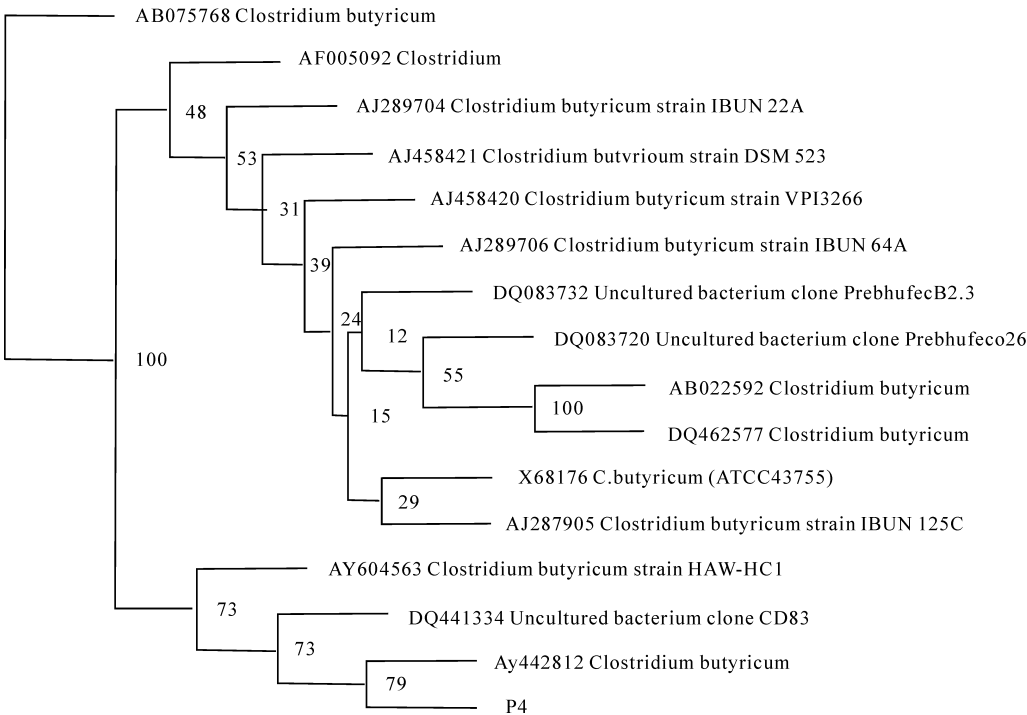


图 4 菌株 P4 与相关菌株 16S rDNA 的系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of strain P4 and relative strains based on 16S rDNA

表 2 铁还原菌株 P4 和相关菌株的 16S rDNA 同源性
Table 2 Homology of Ferric reducing microorganism and relative strains

菌株 Strain	登记号 Accession No.	与铁还原菌株 P4 的 16S rDNA 同源性/% The homology of strain P4	菌株 Strain	登记号 Accession No.	与铁还原菌株 P4 的 16S rDNA 同源性/% The homology of strain P4
Uncultured bacterium CD83	DQ441334	98	Clostridium butyricum W5	DQ831124	98
Uncultured bacterium PrebhufecO26	DQ083720	98	<i>Clostridium butyricum</i> DSM532	X77834	98
Uncultured bacterium PrebhufecB2. 3	DQ083732	98	<i>Clostridium</i> sp. SP3	AF005092	98
Uncultured bacterium SZB10	AM176850	98	<i>Clostridium butyricum</i>	AY442812	98
Uncultured anaerobic bacterium A-2D	AY953222	98	<i>Clostridium butyricum</i>	X68178	98
Uncultured Clostridiace- ae bacterium	U16122	96	<i>Clostridium saccharoper- butylaceticum</i> N1-4	AB218317	97
Uncultured bacterium AR-23	DQ296468	96	<i>Clostridium beijerinckii</i>	X68180	96
<i>Clostridium butyricum</i> HAW-HC1	AY604563	98	<i>Clostridium acetobutyl- icum</i>	X78073	96
<i>Clostridium butyricum</i> W4	DQ831126	98	<i>Clostridium puniceum</i>	X71857	96

3 讨 论

铁还原微生物主要包括极端厌氧和部分兼性厌氧微生物。在分离纯化过程中,对水稻土进行厌氧恢复培养,可促进铁还原微生物的繁殖。在土壤中添加外源无定形氧化铁,可增加土壤中易还原氧化铁的含量,从而增加铁还原微生物的繁殖速率。培养基和培养方法的选择,是分离铁还原微生物的关键环节。对厌氧微生物的分离通常可采用夹层平板培养基、斜面及滚管厌氧培养基等方法。斜面及滚管培养基易于控制厌氧条件,但涂布接种时不易获得分布均匀的菌落,给单菌落挑选造成不便。本研究采用夹层平板培养基,在下层培养基中加入少量人工合成的 Fe(OH)₃ 悬液,不仅有利于铁还原菌的生长,而且可通过 Fe(OH)₃ 颜色减退,对铁还原微生物进行初筛。在实际培养过程中,由于 Fe(OH)₃ 悬液中 Fe(Ⅲ)颗粒不能很好地分散,使得下层加铁培养基在培养过程中颜色渐退并不十分明显。为了确定所挑选的菌落真正具有铁还原功能,必须同时采用 Fe(OH)₃ 液体培养还原试验进行验证。通过严格厌氧的液体培养试验,可以筛选出具有铁还原功能的菌株,并且可判断还原速率的快慢。

异化 Fe(Ⅲ)还原微生物在碳源利用上存在较大的差异。以往的纯培养研究发现,Fe(Ⅲ)还原微生物可利用的电子供体最常见的是有机酸,尤其是短链有机酸^[12]。目前,随着更多的 Fe(Ⅲ)还原微生物被分离,研究人员发现了一些异化 Fe(Ⅲ)还原微生物在 Fe(Ⅲ)还原时可氧化利用糖而获能。多数情

况下,在 Fe(Ⅲ)还原条件下,糖在代谢过程会产生 H₂ 及乙酸^[14],H₂ 和乙酸均能够促进 Fe(Ⅲ)的还原。葡萄糖的发酵主要以丁酸型发酵为主,发酵中主要末端产物为丁酸、乙酸、H₂、CO₂ 和少量丙酸。丁酸型发酵主要是在梭状芽孢杆菌属,如丁酸梭状芽孢杆菌(*C. butyricum*)和酪丁酸梭状芽孢杆菌(*C. tyrobutyricum*)的作用下进行的^[16]。本试验得到的 P4 菌株可以较好地利用葡萄糖,在反应初期其 Fe(Ⅱ)累积量迅速增加,铁还原速率明显大于利用其他有机酸盐,表明菌株 P4 可直接发酵葡萄糖。丙酮酸盐是糖酵解途径的终产物。微生物体内的糖酵解途径是厌氧条件下生物体内主要的获能形式之一。本试验发现,菌株 P4 在 Fe(Ⅲ)还原条件下,也可以在一定程度上利用丙酮酸盐,表明丙酮酸盐对菌株 P4 的代谢同样具有重要作用。

本研究分离培养出的铁还原菌株 P4 和多种丁酸梭状芽孢杆菌菌株的 16S rDNA 有较高的同源性,且在进化关系上亲缘关系接近。因此,通过对 16S rDNA 序列的比较分析,可以初步确定未知种与同属或不同属的种之间的亲缘关系,这将对在亲缘关系较近的簇、种间寻找开发有生理活性的微生物有重要意义。

4 结 论

(1)采用富集培养方法,从四川水稻土中分离得到铁还原菌 P4,其菌落特征为:菌落较小,白色,隆起,规则圆,不透明,表面光滑。染色结果表明,菌株 P4 为 G⁺,杆状,圆末端。生长曲线测定结果表

明,P4 菌株在培养 10~30 h 达到对数生长期。

(2)不同碳源利用试验表明,葡萄糖和丙酮酸钠可作为菌株 P4 的优势碳源。菌株 P4 在利用葡萄糖时的 Fe(Ⅲ)还原量最大, $V_{\max}$ 最高。菌株 P4 利用葡萄糖的 Fe(Ⅲ)还原率可达 63.79%,丙酮酸盐为 22.19%,而其他几种碳源的铁还原率均在 10% 以下。

(3)采用 PCR 技术获得了 1 325 bp 的铁还原菌株 P4 的部分 16S rDNA 序列。经同源性分析和与相关菌株 16S rDNA 的系统进化关系比较发现,菌株 P4 与多种不可培养的厌氧菌株及丁酸梭状芽孢杆菌具有 98% 的同源性,菌株 P4 可归属为厌氧丁酸梭状芽孢杆菌。

[参考文献]

[1] Lovley D R. Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: A review [J]. Geomicrobiol J, 1987, 5: 375-399.

[2] Lovley D R, Phillips E J P. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese [J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54: 1472-1480.

[3] Mc K D S, Gibson E K, Thomas K J, et al. Search for past life on Mars: possible reliobiogenic activity in martian meteorite ALH84001 [J]. Science, 1996, 273: 924-930.

[4] Coates J D, Councell T B, Ellis D J, et al. Carbohydrate oxidation coupled to Fe(Ⅲ) reduction, a novel form of anaerobic metabolism [J]. Anaerobe, 1998, 4: 277-282.

[5] Schröder I, Eric J, Simon de V. Microbial ferric iron reductase [J]. FEMS Microbiol Rev, 2003, 27: 427-447.

[6] Kusel K, Dorsch T, Acker G, et al. Microbial reduction of Fe(Ⅲ) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(Ⅲ) to the oxidation of glucose [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 3633-3640.

[7] Roden E E, Wetzel R G. Organic carbon oxidation and suppression of methane production by microbial Fe(Ⅲ) oxide reduction in vegetated and unvegetated freshwater wetland sedi-

ments [J]. Limnol Oceanogr, 1996, 41: 1733-1748.

[8] Lovley D R. Fe(Ⅲ) and Mn(Ⅳ) reduction [M]// Lovley D R. Environmental microbe-metal interactions. Washington D C: ASM Press, 2000: 3-30.

[9] Lovley D R, Holmes D E, Nevin K P. Dissimilatory Fe(Ⅲ) and Mn(Ⅳ) reduction [J]. Advance in microbiology physiology, 2004, 49: 119-186.

[10] Anderson R T, Vronis H A, Ortiz-Bernard I. Stimulating the in situ activity of *Geobacter species* to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 5884-5891.

[11] Ortiz-Bernard I, Anderson R T, Vronis H A, et al. Vanadium respiration by *Geobacter metallireducens*: novel strategy for In situ removal of vanadium from Groundwater [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(5): 3091-3095.

[12] Lovley D R. Microbial Fe(Ⅲ) reduction in subsurface environments [J]. FEMS Microbiology Rev, 1997, 20: 305-313.

[13] Liesack W, Schnell S, Peter N. Microbiology of flooded rice paddies [J]. FEMS Microbiology Rev, 2000, 24: 625-645.

[14] 曲东, 张一平, Schnell S, 等. 水稻土中铁氧化物的厌氧还原及其对微生物过程的影响 [J]. 土壤学报, 2003, 40(6): 858-863.

Qu D, Zhang Y P, Schnell S, et al. Reduction of iron oxides and its effect on microbial processes in anaerobic paddy soil [J]. Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(6): 858-863. (in Chinese)

[15] 曲东, 贺江舟, 孙丽蓉. 不同水稻土中氧化铁的微生物还原特征 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(4): 97-101.

Qu D, He J Z, Sun L R. Microbial reducing characteristics of iron oxides in different paddy slurries [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2005, 33(4): 97-101. (in Chinese)

[16] 任南琪, 王爱杰. 厌氧生物技术原理与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 224-228.

Ren N Q, Wang A J. Principle and application of anaerobic biological technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 224-228. (in Chinese)