

水稻土中铁还原菌的分离纯化及铁还原能力分析

王伟民, 曲 东, 徐 佳

(西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】对水稻土中铁还原菌进行分离纯化, 比较不同培养基的分离效果, 研究不同菌株的铁还原特征。【方法】以四川和江西水稻土为材料, 采用 PTYG 固体平板培养基及柠檬酸铁固体培养基(斜面)分离出兼性厌氧和严格厌氧的菌株, 并通过柠檬酸铁液体培养基及 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 培养基进行铁还原能力测定, 比较不同菌株的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率大小、铁还原特征曲线, 以及分别在 LB 液体培养基和柠檬酸铁液体培养基中的生长曲线。【结果】在以葡萄糖为碳源时, 来源于江西水稻土的 8 个菌株对柠檬酸铁的利用率较高, 铁还原率为 84.34%~93.81%, 而对 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的还原率为 71.07%~90.90%; 来源于四川水稻土的 8 个菌株对柠檬酸铁还原率为 83.78%~93.52%, 而对 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的还原率为 88.19%~99.84%。严格厌氧菌株的铁还原速率较快, 在培养 3 d 后 20 个菌株的铁还原率都在 90% 以上, 利用柠檬酸铁的铁还原率为 90.49%~97.93%, 利用 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的为 94.03%~99.57%。在 LB 液体培养基及柠檬酸铁液体培养基中, 不同菌株的对数生长期为 10~25 h, 前者的延滞期较短, 而后的细胞产量较大。【结论】由四川和江西水稻土中获得了柠檬酸铁和 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 具有高效利用率的铁还原菌株, 其中严格厌氧菌株对 2 种铁源的利用率均明显大于兼性厌氧菌株。兼性厌氧铁还原菌株为革兰氏阴性芽孢杆菌, 严格厌氧铁还原菌株为革兰氏阳性, 有芽孢, 属梭状杆菌。铁还原菌的生长与 $\text{Fe}(\text{III})$ 的还原具有耦合关系。

【关键词】 水稻土; 铁还原菌; 分离纯化; 铁还原率

【中图分类号】 S154.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)10-0103-07

Isolation of iron-reducing bacteria in paddy soil and its $\text{Fe}(\text{III})$ reduction potential analysis

WANG Wei-min, QU Dong, XU Jia

(College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The study isolated $\text{Fe}(\text{III})$ -reducing bacterium from paddy soil, compared the different isolating results of different dilution factor, and studied the Fe reducing-characters of different strains. 【Method】 $\text{Fe}(\text{III})$ -reducing bacterium was isolated with PTYG plate and $\text{Fe}(\text{III})$ -citrate medium from paddy soil of Jiangxi and Sichuan Province and the ability of $\text{Fe}(\text{III})$ -reducing potential of bacterium was identified by $\text{Fe}(\text{OH})_3$ culture and $\text{Fe}(\text{III})$ -citrate medium method. The rate of $\text{Fe}(\text{III})$ -reducing and the character curve of $\text{Fe}(\text{III})$ -reduction and growth of different bacteria were compared. 【Result】When using glucose as carbon source, 8 strains facultative anaerobic bacteria from paddy of Jiangxi could reduce $\text{Fe}(\text{III})$ -citrate quickly and the rate of $\text{Fe}(\text{III})$ -citrate reduction was between 84.34%—93.81%, but the rate of $\text{Fe}(\text{OH})_3$ reduction was low, just between 71.07%—90.90%. 8 strains facultative anaerobic bacteria from paddy soil of Sichuan had efficient abilities to reduce $\text{Fe}(\text{III})$ and the rate of $\text{Fe}(\text{III})$ -citrate reduction was between 83.78%—93.52%, and the rate of $\text{Fe}(\text{OH})_3$ reduction between 88.19%—99.84%. The

* [收稿日期] 2007-10-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(40271067, 40741005)

[作者简介] 王伟民(1980—), 男, 陕西咸阳人, 硕士, 主要从事土壤环境化学研究。

[通讯作者] 曲 东(1960—), 男, 河南陕县人, 教授, 博士生导师, 主要从事土壤环境化学研究。E-mail: dongqu@nwsuaf.edu.cn

strictly anaerobic bacteria from paddy soil of Jiangxi and Sichuan Province all had efficient ability to reduce Fe(Ⅲ). 20 strains strictly anaerobic bacteria could reduce Fe(Ⅲ) quickly,the rate of Fe(Ⅲ)-citrate reduction was between 90.49%—97.93% and the rate of Fe(OH)₃ reduction between 94.03%—99.57%. The lag phase of different bacteria was almost between 10—25 h in LB culture and Fe(Ⅲ)-citrate medium. Bacteria had short lag phase in LB culture,and the outputs of cells were larger in Fe(Ⅲ)-citrate medium.

【Conclusion】 Bacteria strains which can reduce Fe were isolated from paddy soil of Jiangxi and Sichuan,and the isolated bacteria showed high utilization rate of Fe(Ⅲ)-citrate and Fe(OH)₃. Strictly anaerobic iron reducing bacteria’s utilization rate of the two Fe resources were both higher then that of facultative anaerobic bacteria’s. Facultative anaerobic bacteria were rod-shaped gram-negative bacteria with spores;strictly anaerobic bacteria were gram-positive bacteria with spores,belonging to fusiform bacillus. The Fe(Ⅲ)-reduction was coupled with the growth of bacteria.

Key words: paddy soil;Fe(Ⅲ)-reduction bacterium;isolation;Fe(Ⅲ)-reduction rate

铁还原微生物通常指具有异化还原 Fe(Ⅲ)功能的微生物。异化 Fe(Ⅲ)还原是厌氧沉积物及水稻土中重要的生物化学过程之一,是一些特殊的微生物利用有机物为电子供体,在氧化有机物的同时,以 Fe(Ⅲ)作为惟一的电子受体,使 Fe(Ⅲ)还原为 Fe(Ⅱ),并由代谢过程中获得能量支持生长^[1]。Yana 等^[2]和 Lonergan 等^[3]综述了厌氧环境中具有异化还原 Fe(Ⅲ)能力的微生物多样性,并将已知的铁还原微生物划分到确定的系统发生种属中。目前,已经报道的铁还原菌主要包括:严格厌氧菌 *Geobacteraceae* 中的一些成员,如由淡水沉积物中分离的 *Geobacter* 和海洋环境中的 *Desulfuromonas* 的一些种^[4-5];兼性厌氧菌 *Shewanella* 内的一些种^[6-7],以及一些嗜温菌和嗜热菌^[8-9]。铁还原菌在细菌域和古菌域几乎都有分布^[10],这些微生物代谢能力十分强大,不但可利用纤维素等有机物,还可利用各种有机酸和烃类化合物及芳香族化合物作为碳源和能源^[11-13]。铁还原菌不仅可以还原铁,而且还可以利用 O₂、NO₃⁻、NO₂⁻、S⁰、及多种形态的 Fe(Ⅲ)、MnO₂ 和一些腐殖酸作为电子受体^[14-16]。此外,铁还原菌还可以还原许多痕量金属盐,如 Cr₂O₇²⁻、AsO₃⁻、SeO₄²⁻ 以及一些高价放射性金属,如 Co、U(Ⅵ)、Tc(Ⅶ)^[17-18]。Kashefi 等^[19]报道,一些异化铁还原的嗜热菌和嗜温菌甚至可以将

Au(Ⅲ)还原为单质金而沉降。铁还原菌的多样性及其在各种淹水环境中的广泛分布,使人们认识到其在环境中的重要意义。因此,对铁还原菌的分离、提纯、鉴定以及生理代谢和铁还原机理的研究,已成为异化铁还原研究中的热点。针对水稻土中铁还原菌分离纯化的研究在国内尚处于起步阶段,分离方法及分类也鲜见报道。

我国水稻土资源丰富,加强水稻土中铁还原机理的研究,无疑具有重要的理论和实际意义。然而,针对水稻土中异化 Fe(Ⅲ)还原过程的研究却十分有限。因此,为了进一步深入研究铁还原菌的作用机理,本试验在借鉴前人研究成果的基础上,进行了铁还原微生物的分离和筛选,并对其 Fe(Ⅲ)还原微生物特性进行了研究,这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。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试水稻土分别采自四川省邛崃市迴龙镇柏杨村(用“SC”表示)和江西省安福县竹江乡店上村(用“JX”表示)。土壤样品自然风干,磨细,过孔径 1 mm 筛。供试土壤基本理化性状见表 1。

表 1 供试土壤的基本理化性质
Table 1 The basic chemical-physic properties of soils

土壤 Soil	有机质/(mg·kg ⁻¹) O. M.	全铁/(g·kg ⁻¹) Total iron	无定形铁/(g·kg ⁻¹) Amorphous iron	游离铁/(g·kg ⁻¹) Free iron	pH	细菌总数/(×10 ⁸ g ⁻¹) Bacteria number
SC	48.9	34.2	3.08	11.69	7.34	9.14
JX	23.9	19.5	1.94	6.48	4.84	8.96

1.2 培养基组成

1.2.1 PTYG 培养基 蛋白胨 0.25 g/L,胰蛋白

胨 0.25 g/L,酵母膏 0.5 g/L,葡萄糖 0.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.6 g/L,CaCl₂·2H₂O 0.07 g/L,

琼脂粉 10 g/L,调节培养基 pH 为 7.0。

1.2.2 柠檬酸铁培养基 柠檬酸铁 3.3 g/L, NH_4Cl 1 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.722 g/L, KH_2PO_4 0.25 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 琼脂粉 10 g/L, 调节培养基 pH 为 7.0。当去除琼脂粉后即为柠檬酸铁液体培养基。

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 100 mL 血清瓶中,加入 1 mL 人工合成的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 悬液(含 Fe 量为 15.4 mg/mL)及 50 mL 去离子水,在 30 ℃ 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 兼性厌氧铁还原菌株的分离纯化 将 1.3.1 中的接种液稀释 100 倍,取 100 μL 在 PTYG 固体培养基平板上涂布,培养皿用封口膜密封,以减少空气中 O_2 的影响。置 30 ℃ 培养箱中避光培养 2 d。选择菌落分布均匀的平板,全部挑取单菌落,分别接入柠檬酸铁液体培养基中培养。培养瓶采用 10 mL 的血清瓶,每瓶加柠檬酸铁液体培养基 5 mL,冲氮气 5 min,密封。如果在培养过程中柠檬酸铁液体培养基由黄绿色逐渐变为白色,表明柠檬酸铁已被还原,此菌株具有还原 $\text{Fe}(\text{III})$ 的功能。据此分离筛选目的菌株。吸取含目的菌株的培养液 100 μL ,在 PTYG 固体培养基平板上涂布,培养皿用封口膜密封,于 30 ℃ 避光培养 2 d。最大量挑取单菌落,转接于装满 LB 液体培养基的 15 mL 带盖菌种管中,盖紧管盖,30 ℃ 厌氧培养 1 d。将培养后的菌种管于 3 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,用无菌水洗涤 2 次,再用 1 mL 无菌水悬浮沉淀制得菌液,转入 1.5 mL 离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,于 4 ℃ 保存。

1.3.3 严格厌氧铁还原菌株的分离纯化 吸取稀释 $10^3 \sim 10^4$ 倍的 1.3.1 中接种液 1 mL,在柠檬酸铁固体培养基斜面上均匀涂布(柠檬酸铁固体培养基斜面在 25 mL 的血清瓶中制备),将血清瓶加橡胶盖,充无菌氮气 15 min,除去瓶中氧气,用铝盖密封。于 30 ℃ 避光培养 3~4 d。当铁还原微生物开始生长时,培养基中的柠檬酸铁会逐渐被还原,培养基的颜色由黄绿色逐渐变为白色。将斜面上生长的、能够还原柠檬酸铁的单菌落分别挑入柠檬酸铁液体培养基中继续培养,进一步筛选具有铁还原功能的目的菌株。挑选具有还原柠檬酸铁能力的培养瓶作为接种液,在柠檬酸铁固体培养基上再次涂布,

分离纯化目标菌株。最大量挑取单菌落,转接于装满 LB 液体培养基中扩繁,制得菌液,转入 1.5 mL 离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,于 4 ℃ 保存。

1.4 铁还原特征曲线与铁还原率的测定

选择 $\text{Fe}(\text{III})$ 为惟一的电子受体,铁源分别采用柠檬酸铁溶液(含 Fe 量为 658.2 mg/L)和人工合成的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 悬液(含 Fe 量为 616.2 mg/L)。在若干个 10 mL 血清瓶中,分别加入 1 mL 铁源,1 mL 5 g/L 的氯化铵,加盖后于 121 ℃ 灭菌 30 min,冷却后开盖,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,分别接种 1.3 中分离纯化的菌液 1 mL,通氮气除去瓶中 O_2 ,盖上橡胶盖后用铝盖密封。试验处理中,以不加菌液(补 1 mL 无菌水)为对照(CK),以接种不同菌株但不加碳源的处理(补 1 mL 无菌水)为对比,用 CK_1 、 CK_2 、 CK_3 、 CK_4 ……表示。30 ℃ 下暗光培养,分别在不同培养时间下测定培养瓶中 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度的变化。不同菌株的铁还原率依据测定的 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度与体系中加入的总 $\text{Fe}(\text{III})$ 浓度(Fe_T)比值计算,用百分数(%)表示。

1.5 铁还原菌生长曲线的测定

1.5.1 不同菌株在 LB 液体培养基中的生长曲线

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,盖紧管盖后上下摇荡,使菌体混匀。以不接种的装满 LB 液体培养基管为对照(CK)。在 30 ℃ 下避光培养。分别在培养的 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(CK)为测定空白,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^[20]、培养时间为横坐标制得菌体生长曲线。

1.5.2 不同菌株在柠檬酸铁液体培养基中的生长曲线

将纯化扩繁后的菌体用适量无菌水悬浮制得接种液,分别转接到柠檬酸铁液体培养基中,接种量为 1%(体积分数)。然后将接种瓶密封,充无菌氮气,30 ℃ 下避光培养。分别在不同时间段采样,以未接种的菌种管为测定空白,测定 600 nm 波长的光密度值(OD_{600}),绘制菌体生长曲线。同时,测定培养体系中柠檬酸铁的还原率,考察铁还原菌株的生长与铁还原的耦联情况。

1.6 采样及测定方法

吸取 1 mL 培养液,置于 4 mL 0.5 mol/L 盐酸溶液中浸提,在 30 ℃下静置浸提 24 h^[21],平行 3 份。将提取液过 0.22 μm 滤膜,滤液中 Fe(Ⅱ)浓度采用邻菲啰啉分光光度法测定^[22]。

2 结果与分析

2.1 铁还原微生物的分离与纯化

分离兼性厌氧铁还原菌时,使用 PTYG 固体培养基和柠檬酸铁液体培养基。PTYG 固体培养基平板接种时的稀释倍数由多级稀释法确定。由表 2 可知,选择 100 倍的稀释倍数比较适宜。通过柠檬酸铁液体培养基可初步对具有铁还原功能的菌株进行筛选。由江西和四川水稻土中分离的 93 和 85 株菌中,有 39 和 42 株菌在培养过程中有明显的铁还原现象。通过 Fe(Ⅱ)浓度测定,江西和四川水稻土中分别有 14 和 26 株菌的铁还原率在 70%以上。

分离严格厌氧铁还原菌时,使用柠檬酸铁固体

培养基(斜面)。接种液稀释倍数为 10³~10⁴ 倍。在控制严格厌氧条件下,在斜面上生长的铁还原菌能够将黄绿色的柠檬酸铁还原为白色。直接从柠檬酸铁固体培养基表面挑取具有铁还原能力的单菌落,接入柠檬酸铁液体培养基进一步进行铁还原能力鉴定。

表 2 不同稀释倍数下 PTYG 平板培养基的菌落数

Table 2 The number of CFU on the PTYG plate in different dilution factors			
水稻土浸提液 Extracted solution of paddy soil	稀释倍数 Dilution factor		
	10 ¹	10 ²	10 ³
JX	524.7±101.6	53.3±18.3	4.7±1.5
SC	956.0±92.0	149.7±7.1	17.3±1.5

2.2 不同菌株铁还率的比较

由江西和四川水稻土中分离获得的部分兼性厌氧菌株,在以葡萄糖为碳源时对柠檬酸铁和 Fe(OH)₃ 的还原率见表 3。

表 3 兼性厌氧条件下分离的不同菌株的铁还原率(培养 6 d)

Table 3 Fe(Ⅲ)-reduction rate of different facultative anaerobic bacteria (incubated for 6 days)							
土壤 Soil	菌株编号 Number of strain	柠檬酸铁 还原率/% Ferric citrate reduction rate	Fe(OH) ₃ 还原率/% Fe(OH) ₃ reduction rate	土壤 Soil	菌株编号 Number of strain	柠檬酸铁 还原率/% Ferric citrate reduction rate	Fe(OH) ₃ 还原率/% Fe(OH) ₃ reduction rate
JX	JX-o2	90.79	79.57	SC	SC-o7	83.78	92.97
	JX-o3	84.34	75.72		SC-o9	88.84	94.43
	JX-o4	91.54	71.07		SC-o12	91.38	94.01
	JX-o5	86.23	83.21		SC-o17	91.77	93.18
	JX-o6	89.64	78.15		SC-o18	93.13	88.19
	JX-o18	93.24	90.90		SC-o24	93.02	94.64
	JX-o105	93.81	73.70		SC-o42	93.52	89.44
	JX-o106	92.30	72.89		SC-o46	93.13	99.84

表 4 严格厌氧条件下分离的不同菌株的铁还原率(培养 3 d)

Table 4 The Fe(Ⅲ)-reduction rate of different strictly anaerobic bacteria (incubated for 3 days)							
土壤 Soil	菌株编号 Number of strain	柠檬酸铁 还原率/% Ferric citrate reduction rate	Fe(OH) ₃ 还原率/% Fe(OH) ₃ reduction rate	土壤 Soil	菌株编号 Number of strain	柠檬酸铁 还原率/% Ferric citrate reduction rate	Fe(OH) ₃ 还原率/% Fe(OH) ₃ reduction rate
JX	JX-a3	97.93	96.33	SC	SC-a11	94.70	95.33
	JX-a5	97.66	97.75		SC-a12	96.10	97.69
	JX-a6	96.24	95.51		SC-a13	93.89	94.52
	JX-a8	92.92	96.50		SC-a14	93.06	95.40
	JX-a9	95.17	97.69		SC-a15	90.78	99.57
	JX-a10	94.36	96.53		SC-a16	94.19	95.06
	JX-a12	93.98	97.23		SC-a17	94.04	94.18
	JX-a17	97.20	94.03		SC-a18	91.78	94.05
	JX-a20	93.55	99.45		SC-a19	90.49	96.68
	JX-a22	92.07	96.82		SC-a24	95.41	95.73

由表 3 可知,来源于江西水稻土的 8 个菌株,对柠檬酸铁的利用率均较高,铁还原率在 84.34%~93.81%,而对 Fe(OH)₃ 的还原率为 71.07%~

90.90%,表明在 6 d 培养时间内,这些菌株较易于还原离子态的铁。来源于四川水稻土的 8 个菌株,对柠檬酸铁的还原率为 83.78%~93.52%,而对

$\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的还原率为 88.19% ~ 99.84%, 对 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的利用率明显高于柠檬酸铁, 表明四川水稻土中分离的菌株铁还原特征与江西水稻土中分离的菌株不同。

以葡萄糖为碳源时, 严格厌氧条件下分离的不同菌株对柠檬酸铁和 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的还原率列于表 4。由表 4 可知, 总体而言, 严格厌氧条件下分离的菌株铁还原速率较快, 在培养 3 d 后, 20 个菌株的铁还原率均在 90% 以上, 其中利用柠檬酸铁的铁还原率为 90.49% ~ 97.93%, 利用 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的为 94.03% ~ 99.57%。各菌株对 2 种铁源的利用率均明显大于

兼性厌氧菌株。

2.3 不同菌株的铁还原特征曲线

从兼性厌氧及严格厌氧的铁还原菌株中各选出 4 个菌株, 在厌氧条件下以人工合成的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 为惟一电子受体进行培养, 测定不同培养时间下 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度的变化, 得到的铁还原特征曲线见图 1 和图 2。由图 1 可知, 4 个兼性厌氧菌株在培养 1 d 后, $\text{Fe}(\text{III})$ 还原进入快速增长期, 4 d 后 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原率基本达到稳定, 除 JX-o6 菌株的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原率稳定在 80% 左右外, 其他 3 个菌株均稳定在 90% 以上。

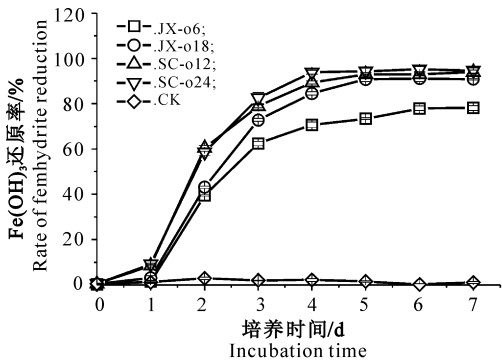


图 1 4 株兼性厌氧菌的铁还原特征曲线

Fig. 1 The character curve of $\text{Fe}(\text{III})$ -reduction of 4 strains of facultative anaerobic bacteria

在 4 个严格厌氧菌株的铁还原过程中, 在培养 1.5 d 后, JX-a10 和 JX-a8 菌株的铁还原率迅速增大, 较 SC-a15 和 SC-a17 菌株提前 0.5 d, 培养 3 d 后 4 个严格厌氧菌株的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原率均达到 90% 以上(图 2)。在培养体系中, 不接菌的 CK 及接种 4 株菌但不加碳源的对照(CK_1 、 CK_2 、 CK_3 、 CK_4)

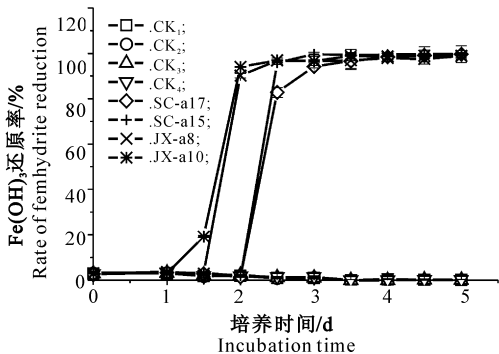


图 2 4 株严格厌氧菌的铁还原特征曲线

Fig. 2 The character curve of $\text{Fe}(\text{III})$ -reduction of 4 strains of strictly anaerobic bacteria

的铁还原率几乎为一条直线, 说明没有微生物参与及微生物生长受到限制时, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的还原反应几乎不会发生。

2.4 不同铁还原菌株的生长曲线

不同铁还原菌株在 LB 液体培养基及柠檬酸铁液体培养基中的生长曲线分别如图 3 和图 4 所示。

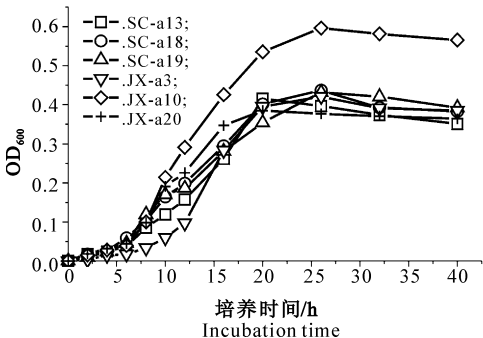


图 3 不同铁还原菌株在 LB 液体培养基中的生长曲线

Fig. 3 The character curve of $\text{Fe}(\text{III})$ -reduction of 4 strains of facultative anaerobic iron reducing bacteria

由图 3 和图 4 可知, 总体上看, 不同铁还原菌株在 LB 液体培养基中停滞期比较短, 培养 8 h 左右生

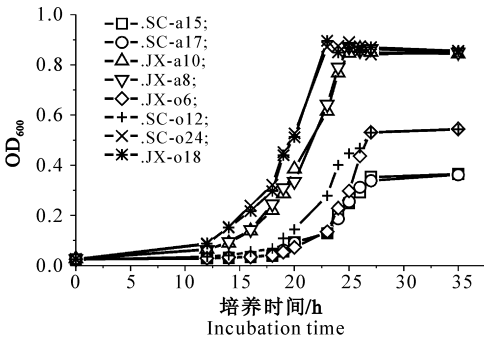


图 4 不同铁还原菌株在柠檬酸铁液体培养基中的生长曲线

Fig. 4 The character curve of $\text{Fe}(\text{III})$ -reduction of 4 strains of strictly anaerobic iron reducing bacteria

长曲线就进入对数期; 在柠檬酸铁液体培养基中, 由于其微生物繁殖较快, 故在测定生长曲线时将菌悬

液稀释了 5 倍。在培养 15~25 h,不同菌株的生长曲线可进入对数期。从测定的柠檬酸铁液体培养基中菌悬液的光密度比较,其微生物生物量远大于用 LB 液体培养基。

选择严格厌氧菌株(JX-a10)和兼性厌氧菌株(SC-o24),同时测定其生长曲线和铁还原特征曲线,

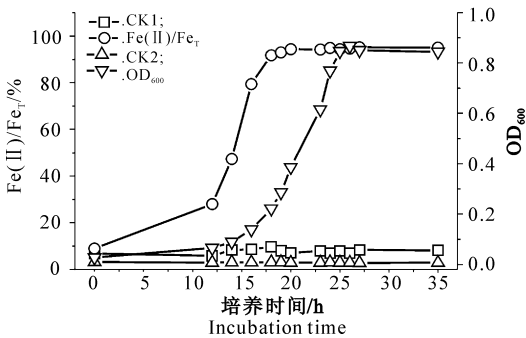


图 5 JX-a10 的生长曲线和铁还原特征曲线

Fig. 5 Growth curve and Fe(III)-reduction of strictly anaerobic bacteria JX-a10

3 讨 论

本研究在分离兼性厌氧菌时发现,四川水稻土样品中的微生物数量显著多于江西水稻土样品。在 PTYG 固体平板培养基上,四川水稻土样品中可培养的微生物数量是江西水稻土样中的 2~4 倍(表 2)。其中 SC 土样中铁还原率大于 70% 的菌株检出率约为 31%,而 JX 土样中的检出率仅为 15% 左右,这一结果可能与不同地区的耕作环境有关。采自江西的水稻土属于水稻连作,而采自四川的水稻土为水-旱轮作,导致兼性厌氧菌的数量有一定差异。另外,四川及江西两地水稻土理化性质的差异,可能也是影响微生物种群特征及数量差异的因素。

本试验通过比较四川和江西水稻土样品中铁还原菌的形态特征及铁还原特征发现,四川和江西水稻土样品中的兼性厌氧铁还原菌形态上并无明显差异,一般都为浅棕色,菌落边缘不规则,隆起,表面粘滑,透光性差,直径 3 mm 左右,染色镜检为革兰氏阴性芽孢杆菌。但是四川水稻土样品中分离出的兼性厌氧铁还原菌对氧化铁的还原能力明显高于江西水稻土样品。这可能是由两种水稻土样品理化性质的差异造成的。四川水稻土样品中全铁含量、游离铁含量以及有机质含量均明显高于江西水稻土样品。对江西和四川水稻土样品中分离出的严格厌氧铁还原菌,从菌落形态及显微形态观察可以看出,菌株具有一些共同特征:菌落白色,粘滑,隆起,透光性

结果见图 5 和图 6。从图 5 和图 6 可以看出,2 株菌的生长曲线和铁还原特性曲线有着密切的相关性。伴随铁还原细菌生长进入对数期,体系中的 Fe(III) 还原率也进入快速增长期,表明 Fe(III) 的还原和铁还原菌的生长耦合在一起。

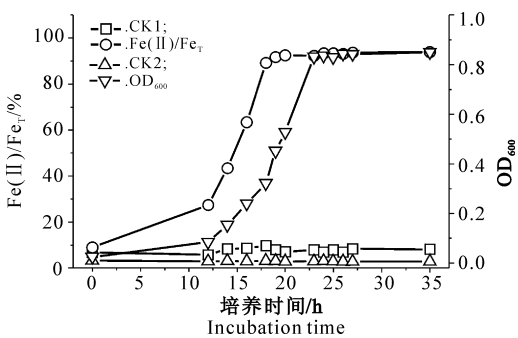


图 6 SC-o24 的生长曲线和铁还原特征曲线

Fig. 6 Growth curve and Fe(III)-reduction of strictly anaerobic bacteria SC-o24

差,边缘光滑,直径 2 mm 左右,革兰氏阳性,有芽孢,属梭状杆菌;其对氧化铁的还原率一般都在 94.03%~99.57%。通过对江西水稻土和四川水稻土中铁还原菌的研究可以看出,铁还原菌在 2 种水稻土中都有较多的分布。比较严格厌氧铁还原菌和兼性厌氧铁还原菌在 Fe(OH)₃ 培养基中的铁还原特征曲线,可以看出,严格厌氧铁还原菌对铁的还原速率明显大于兼性厌氧铁还原菌。

在本研究中,只是通过单菌落筛选,由土壤中分离出不同的具有铁还原功能的菌株,对这些菌株还有待进行系统的分类鉴定。另一方面,由于试验中仅以葡萄糖作为惟一碳源,可能会限制一些利用特殊碳源的铁还原菌的生长,也难以获得不同碳源利用能力的信息。鉴于微生物呼吸代谢的多样性,选择其他碳源,如乙酸盐、乳酸盐或丙酮酸盐等代替葡萄糖,还有待进行深入探讨。

4 结 论

由四川和江西水稻土中分离获得了具有铁还原能力的兼性厌氧及严格厌氧菌株。通过对柠檬酸铁和人工合成 Fe(OH)₃ 2 种培养基中铁还原率的比较,都表现出较高的 Fe(III) 还原率。不同水稻土中分离的兼性厌氧及严格厌氧菌株的铁还原特征具有一定差异,严格厌氧菌株对 2 种铁源的利用率均明显大于兼性厌氧菌株。兼性厌氧铁还原菌株为革兰氏阴性芽孢杆菌,严格厌氧铁还原菌株为革兰氏阳

性,有芽孢,属梭状杆菌。不同菌株的对数生长期为 10~25 h,且铁还原菌的生长与 Fe(Ⅲ)的还原具有耦合关系。

[参考文献]

[1] Anderson R T,Lovley D R. Hexadecane decay by methanogenesis [J]. Nature,2000,404:722-723.

[2] Yana B, Barbara A,Lovley D R. Computational prediction of conserved operons and phylogenetic footprinting of transcription regulatory elements in the metal-reducing bacterial family *Geobacteraceae* [J]. Journal of Theoretical Biology,2004,230:133-144.

[3] Lonergan D J,Phillips E J P,Lovley D R. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(Ⅲ)-reducing bacteria [J]. J Bacteriology,1996,178(8):2402-2408.

[4] Myers C R,Nealson K H,Lovley D R. A long-chain fatty acid oxidizing Fe(Ⅲ) reducer from marine sediments [J]. Arch Microbiol,1995,164:406-413.

[5] Coates J D,Phillips E J P,Lovley D R. Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments [J]. Appl Environ Microbiol,1996,62(5):1531-1536.

[6] Lovley D R,Holmes D E,Nevin K P. Dissimilatory Fe(Ⅲ) and Mn(Ⅳ) reduction [J]. Advances in Microbial Physiology,2004,49(3):220-286.

[7] Semple K M,Westlake D W S. Characterization of iron reducing *Alteromonas putrefaciens* strains from oilfield fluids [J]. Can J Microbiol,1987,33(9):366-371.

[8] Slobodkin A,Reysenbach A L,Wiegel J. *Thermoterrabacterium ferrireducens* gen. nov. ,a thermophilic anaerobic dissimilatory Fe(Ⅲ)-reducing bacterium from a continental hot spring [J]. Int J Syst Bacteriol,1997,47(6):541-547.

[9] Kashefi K, Holmes D E, Lovley D R. Thermophily in the *Geobacteraceae:Geothermobacter ehrlichii* gen. nov. , sp. nov. , a novel thermophilic member of the *Geobacteraceae* from the “Bag City” hydrothermal vent [J]. Appl Environ Microbiol,2003,69(5):2985-2993.

[10] Nielsen J L,Juretschko S,Wagner M. Aboundance and phylogenetic affiliation of iron reduction in activated sludge as assessed by fluorescence in situ hybridization and microautoradiography [J]. Appl Environ Micobiol,2002,68(5):4629-4636.

[11] Francis C A,Obeaztsova A Y,Tebo B M. Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1 [J]. Appl Environ Microbiol,2000,66(2):543-548.

[12] Tor J M,Kashefi K,Lovley D R. Acetate oxidation coupled to

Fe(Ⅲ) reduction in hyperthermophilic microorganisms [J]. Appl Environ Microbiol,2001,67(3):1363-1365.

[13] He Q,Stanford R A. Characterization of Fe(Ⅲ) reduction by chlororespiring *Anaeromxyobacter dehalogenans* [J]. Appl Environ Microbiol,2003,69(5):2721-2728.

[14] Kieft T L,Fredrickson J K,Onstott T C. Dissimilatory reduction of Fe(Ⅲ) and other electronic acceptors by a *thermus* isolate [J]. Appl Environ Microbiol,1999,65(3):1214-1221.

[15] Lovley D R, Schink B. Growth of *Geobacter sulfurreducens* with acetate in syntrophic cooperation with hydrogen-oxidizing anaerobic partners [J]. Appl Environ Microbiol,1998,64(6):2232-2236.

[16] Kusel K, Dorsch T, Stackebrandt E. Microbial reduction of Fe(Ⅲ) in acidic sediments:isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction Fe(Ⅲ) to the oxidation of glucose [J]. Appl Environ Microbiol,1999,65(8):3633-3640.

[17] Holmes D E,Finneran KT,Lovley D R. Enrichment of members of the family *Geobacteraceae* associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments [J]. Appl Environ Microbiol,2002,68(5):2300-2306.

[18] Lloyd J R,Sole V A,Lovley D R. Direct and Fe(Ⅱ)-mediated reduction of technetium by Fe(Ⅲ)-reducing bacteria [J]. Appl Environ Microbiol,2000,66(9):3743-3749.

[19] Kashefi K,Tor J M,Nevin K P,et al. Reductive precipitation of gold by dissimilatory Fe(Ⅲ)-reducing *bacteria* and *archaea* [J]. Appl Environ Microbiol,2001,67(7):3275-3279.

[20] 孔祥义,许玫英,陈棉才. 脱色希瓦氏菌 S12 的铁还原性能研究 [J]. 微生物学通报,2006,33(3):98-103.

Kong X Y,Xu M Y,Chen M C. Investigation of the Fe³⁺ reduction properties of *Shewanella decolorationis* S12 [J]. Microbiology,2006,33(3):98-103. (in Chinese)

[21] Schnell S,Ratering S. Simultaneous determination of iron(Ⅲ), iron(Ⅱ) and Manganese(Ⅱ) in environmental samples by ion chromatography [J]. Environ Sci Technol,1998,32:1530-1537.

[22] 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)