

脱色希瓦氏菌 S12 的铁还原性能研究*

孔祥义^{1,2,3,4} 许玫英^{2,3} 陈绵才⁴ 钟小燕^{2,3} 岑英华^{2,3} 孙国萍^{2,3**}(华南热带农业大学植保学院 儋州 571737)¹ (广东省微生物研究所 广州 510070)²(广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)³ (海南省农业科学院植物保护研究所 海口 571100)⁴

摘要:从印染废水中分离得到了一株具有染料脱色功能的希瓦氏菌脱色新种。该菌能在厌氧条件下利用 Fe^{3+} 作为末端电子受体获得能量,支持细胞生长。在 pH8.0, 温度 30℃, 柠檬酸铁 800mg/L, 乳酸钠 2g/L, 酵母抽提物 0.5g/L 的条件下,培养 8h 的过程中,菌体细胞量的增长完全与 Fe^{3+} 的还原发展趋向一致。同时考察了碳氮源、乳酸钠、酵母抽提物、pH 值和温度等方面对该菌株的生长和铁还原特性的影响。结果表明,菌体生长以 LB 为最好,以葡萄糖和乳酸钠为碳源时对铁还原有利。在酵母抽提物浓度 4g/L 范围内,菌体生长量和铁还原率随着酵母抽提物浓度的提高而提高。当乳酸钠为 6g/L 时, S12 菌体生长量和铁还原率达到最佳。柠檬酸铁浓度为 800mg/L 时菌体生长量和铁还原率最高。在起始 pH6~8 的范围内,菌株 S12 的生长随着 pH 升高而升高,这也是菌株 S12 进行铁还原的最佳 pH 范围。菌株 S12 在温度范围 20℃~40℃ 内均可生长和进行铁还原,而以 30℃ 时最佳。

关键词:脱色希瓦氏菌 S12, 铁还原, 铁还原条件

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0098-06

Investigation of the Fe^{3+} Reduction Properties of *Shewanella decolorationis* S12*KONG Xiang-Yi^{1,2,3,4} XU Mei-Ying^{2,3} CHEN Mian-Cai⁴ ZHONG Xiao-Yan
CEN Ying-Hua^{2,3} SUN Guo-Ping^{2,3**}(South China University of Tropical Agriculture Plant Protection College, Danzhou 571737)¹(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)²(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)³(Hainan Academy of Agriculture Sciences Institute of Plant Protection, Haikou 571100)⁴

Abstract: A new species of genus *Shewanella* *Shewanellade decolorationis* S12, was isolated from activated sludge of a textile-printing waste-water treatment plant. In the anaerobic condition, S12 could conserve energy for growth by using Fe^{3+} as the terminal electron acceptor. At the optimal condition of pH8, temperature 30℃, ferric citrate 800mg/L, sodium lactate 2g/L, yeast extract 0.5g/L, the cell growth increased with the raise of the amount of the Fe^{3+} reduction in 8h. The effect of different carbon sources, nitrogen sources, pH values and growth temperatures on the anaerobic Fe^{3+} reduction of *Shewanella decolorationis* S12 was investigated. LB was favorable for Fe^{3+} reduction. Glucose and sodium lactate also were favorable for Fe^{3+} reduction. The cell growth and Fe^{3+} reduction increased with the raise of the amount of the yeast extract from 0 to 4g/L. The amounts of the sodium lactate of 6g/L and ferric citrate of 800mg/L were suitable for strain S12 growth and Fe^{3+} reduction. In the optimum initial pH value range of 6~8 for Fe^{3+} reduction, strain S12 growth increased with the raise of the pH val-

* 国家自然科学基金 (No. 30500009)

广东省自然科学基金团队项目 (No. 015017)

广东省自然科学基金项目 (No. 04000242)

广东省自然科学基金 (No. 05100365)

** 通讯作者 Tel: 020-87684471, Fax: 86-20-87684471, E-mail: guopingsun@163.com

收稿日期: 2005-09-07, 修回日期: 2006-02-08

ue. Strain S12 could growth and reduce Fe^{3+} at the temperature range of 20 ~ 40°C. The best temperature for strain S12 growth and Fe^{3+} reduction was 30°C.

Key words: *Shewanella decolorationis* S12, Fe^{3+} reduction, The condition of Fe^{3+} reduction

铁还原是古老的厌氧呼吸途径之一, 在 35 亿年前的地球超热还原环境下, 细菌最初是利用 $\text{Fe}(\text{III})$ 或 $\text{S}(0)$ 作为电子受体进行呼吸的^[1]。越来越多报道证明 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原在自然生物地球化学循环和有机物降解过程中有着重要的作用。希瓦氏菌是一类重要的铁还原菌, 该类菌在降解有机化合物的环境修复中起着重要的作用^[2-5]。由于染料是一类重要的有机化合污染物, 因此铁还原菌对染料及其脱色产物的降解方面的研究越来越引起人们的关注^[6-8]。但是对于希瓦氏菌这一类重要的铁还原菌的染料及其脱色产物的降解方面的研究目前还少见报道^[1]。本实验室从印染废水处理系统的活性污泥中分离到一株具有脱色功能的希瓦氏菌新种^[6]。目前国内有关该菌株铁还原特性的研究尚未见报道, 本文将重点对菌株 S12 的铁还原条件进行探讨。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

实验用菌种是本实验室分离鉴定的脱色希瓦氏菌 (*Shewanella decolorationis*) S12。乳酸钠培养基的成分: 乳酸钠 2 g, 酵母抽提物 2 g, $1 \times \text{M9}$, 蒸馏水定容至 1L, pH8。铁还原培养基: 在乳酸钠培养基中添加文中实验指明的铁量。

LB 培养基的成分参照《分子克隆实验指南》^[9]。

1.2 铁还原率和菌体生长量的测定

每升乳酸钠培养基中分别添加一定浓度的柠檬酸铁作为培养基, 在 LB 培养基培养过夜的菌体经离心, 洗涤, 用磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲溶液配成一定浓度的菌液以 1% (v/v) 的接种量, 接种于乳酸钠柠檬酸铁培养基中, 操作过程均在严格厌氧环境的厌氧培养箱中进行。同时置于厌氧培养箱中静置培养, 每隔一段时间取样, 菌体生长量采用 600nm 处的吸光值表示。培养液用 6,000r/min 离心去菌体后, 取上清以邻啡罗林分光光度法测定亚铁离子浓度^[10]。

2 结果与讨论

2.1 铁浓度对菌体生长和铁还原的影响

希瓦氏菌是一类重要的铁还原菌, 因此推论株菌 S12 能够在厌氧条件下进行铁还原。该实验考察不同柠檬酸铁的量对菌体生长和铁还原的影响。在乳酸钠为 2g/L, 酵母抽提物为 0.5g/L, 温度为 30°C, pH 为 8, 柠檬酸铁浓度分别为 50, 200, 800, 1400, 2,000mg/L 的条件下, 考察不同 Fe^{3+} 浓度对菌体生长和铁还原影响。在 8h 取样测定, 结果如图 1 所示, 随着 Fe^{3+} 浓度的增加, 菌体的生长量和铁还原率随着提高, 当柠檬酸铁的浓度达到 800mg/L 时

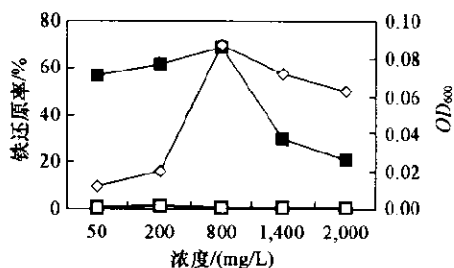


图 1 Fe^{3+} 浓度对菌体生长和铁还原的影响

—■— 接菌时的铁还原率,
—◇— 不接菌时的铁还原率, —◇— 菌体 OD 值

菌体的生长量和铁还原率达到最大值, 培养液在 600nm 处的吸光值为 0.0870, 铁还原率为 69.04%。而当柠檬酸铁的浓度达到 1,400mg/L 时, 培养液在 600nm 处的吸光值为 0.0722, 铁还原率降为 29.62%。当柠檬酸铁浓度达到 2,000mg/L 时, 培养液在 600nm 处的吸光值仅为 0.0626, 铁还原率也降为 21.03%。由此可见, 当培养基中的柠檬酸铁浓度为 800mg/L 时最有利于菌株 S12 的生长和铁还原的进行。

2.2 菌体生长与铁还原相耦连的关系

在乳酸钠为 2g/L, 酵母抽提物为 0.5g/L, pH 为 8, 温度为 30℃, 柠檬酸铁浓度为 800mg/L 的条件下。考察菌株 S12 的生长与铁还原的关系, 结果如图 2 所示。从图中可以看出, 铁还原率与菌体生长成正比。而且该菌进行铁还原速度相当快, 当到达 8h 后, 铁还原率即达到 69.04%。同时培养液在 600 nm 处的吸光值从 0h 的 0.0286 上升到 0.0870。

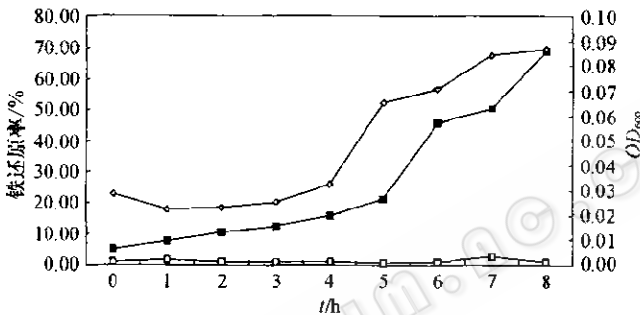


图2 菌体生长与铁还原相偶连情况

■-接菌时的铁还原率, □-不接菌时的铁还原率, *-菌体 OD 值

从图 1 和图 2 中可以了解到, 该菌在厌氧条件下, 确实可以利用 Fe^{3+} 还原进行厌氧呼吸, 并从中获得能量支持细胞增殖。而且实验中不接菌的含 Fe^{3+} 培养基中没有测出 Fe^{2+} , 说明本实验条件下不存在 Fe^{3+} 还原的化学反应。

2.3 不同碳源对 Fe^{3+} 还原的影响

因为在 Fe^{3+} 还原的厌氧呼吸反应过程中, Fe^{3+} 为最终电子受体, 其电子供体由外加碳源提供。不同种类碳源将直接影响菌株 S12 的生长及相应的 Fe^{3+} 还原效果。实验考察了糊精、甲酸钠、蔗糖、葡萄糖、乳酸钠、麦芽糖、琥珀酸钠、LB、1/2LB 在温度为 30℃, pH 为 8, 碳源添加量均为 2g/L, 酵母抽提物为 2g/L, 柠檬酸铁浓度为 200mg/L 的情况下, 对希瓦氏菌株 S12 的生长和铁还原的影响。在厌氧培养 44h 后取样, 结果如图 3 所示。

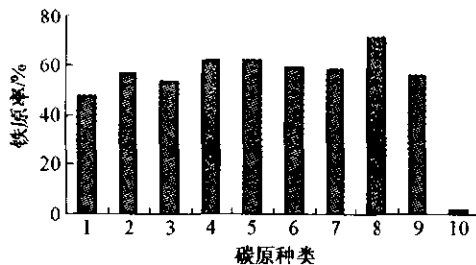


图3 碳源种类对菌体铁还原的影响

1 糊精, 2 甲酸钠, 3 蔗糖, 4 葡萄糖, 5 乳酸钠, 6 麦芽糖, 7 琥珀酸钠, 8 LB, 9 1/2LB, 10 不接菌时的 LB 培养基下的铁还原率

以 LB 为碳源的铁还原率均比其他碳源的要高, 在 44h 后达到 71.24%, 其次是葡萄糖和乳酸钠, 分别达到 62.16% 和 61.83%。以其他碳源为培养基的铁还原率都比较接近, 糊精为 47.26%, 甲酸钠为 56.50%, 麦芽糖为 59.22%, 1/2LB 为 56.17%。但由于 LB 培养基中的蛋白胨等成分复杂, 并且培养后产生黑色沉淀物, 不利于观察, 因此 LB 不利于作为研究铁还原相关特性的碳源。与其他碳源相比, 当菌株 S12 以葡萄糖或乳酸钠为唯一碳源时, 菌株 S12 具有较高的铁还原率。同时我们可以看出, 实验中不接菌的培养基中没有铁还原进行, 可以排除铁还原为化学反应过程。许玫英等的研究表明乳酸钠是菌株 S12 的最佳电子供体^[6]。荆国华等研究克雷伯氏菌 FR-1 的性能时发现葡萄糖为碳源时有利于菌株的生长和铁还原的进行^[8]。这一结果与上述文献研究结果相一致。

2.4 酵母抽提物和乳酸钠的量对菌体生长和 Fe³⁺ 还原的影响

酵母抽提物和乳酸钠是培养和研究菌体 S12 生长的基本物质, 因此研究在何种浓度下, 菌株 S12 生长和铁还原达到最佳是十分有必要的。首先采用乳酸钠培养基, 分别改变其中酵母抽提物和乳酸钠的量以考察菌体生长和铁还原情况。在温度为 30℃, pH 为 8, 乳酸钠添加量均为 2g/L, 柠檬酸铁浓度为 200mg/L, 酵母抽提物分别为 0, 0.5, 1, 2, 4 g/L 时, 考察希瓦氏菌株 S12 的生长和铁还原情况。在厌氧培养 6h 后取样发现, 不加酵母抽提物时, 菌体的生长量相当低, 基本不生长, 同时也不能对 Fe³⁺ 进行还原。随着酵母抽提物浓度的提高, 其菌体生长量和铁还原都随着提高。这是因为酵母抽提物充当氮源的作用, 没有氮源, 菌体不能合成相关的氨基酸类自身必需物质而使之不能生长。当增加酵母抽提物浓度后, 菌体生长量也随之增加, 因此铁还原率相应提高 (图 4)。

在固定氮源酵母抽提物的量为 0.5 g/L, 温度为 30℃, pH 为 8, 柠檬酸铁浓度为 200mg/L 时, 仅改变乳酸钠的浓度考察菌株 S12 的铁还原情况。碳源乳酸钠添加量分别为 1, 2, 4, 6, 8g/L, 在厌氧培养 6h 后取样, 结果如图 5 所示, 当乳酸钠的浓度由 1g/L 逐渐提高至 6g/L 时, 菌体生长量和铁还原率随着提高。在乳酸钠浓度达到 6g/L 的条件下, 菌体生长量和铁还原率达到最大, 而当继续提高乳酸钠浓度至 8g/L 时, 菌体生长量和铁还原率反而下降。由此可见, 乳酸钠和 Fe³⁺ 这一对电子供体和电子受体

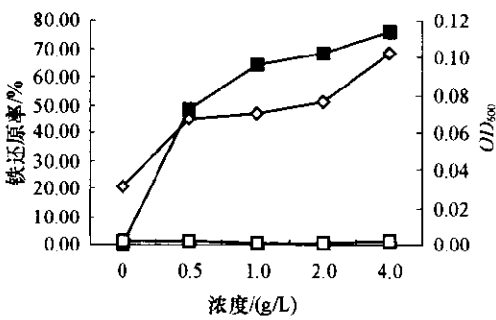


图 4 酵母抽提物浓度对菌体生长和铁还原的影响

■— 接菌时的铁还原率, □— 不接菌时的铁还原率, ○— 菌体 OD 值

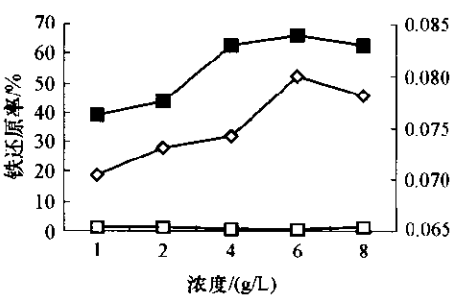


图 5 乳酸钠浓度对菌体生长和铁还原的影响

■— 铁还原率, □— 不接菌时的铁还原率, ○— 菌体 OD 值

之间是存在一定的平衡关系的。这一结论与 Fredrickson 等的研究结论相一致^[11]。

2.5 pH 对菌体生长和铁还原的影响

环境的 pH 对菌体生长和铁还原都有很大的影响, pH 值如果过高或过低都会影响菌体的活性, 从而影响其生长和铁还原。考察菌体的生长 pH 范围对该菌在染料废水的环境修复方面应用有很好的指导作用, 同时对于研究其铁还原性能也有很大的帮助。实验在乳酸钠为 2g/L, 酵母抽提物为 2g/L, 温度为 30℃, 柠檬酸铁浓度为 200mg/L, pH 分别为 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 的条件下进行。培养 12h 后的结果如图 6 所示, 菌体在 pH4~10 条件下都可以存活。在 pH4 和 5 时, 菌体生长极其微弱, 基本上没有生长。到了 pH6 时, 菌体生长量有了很大的提高。在 pH8 的时候菌体生长最快, 而当 pH 值

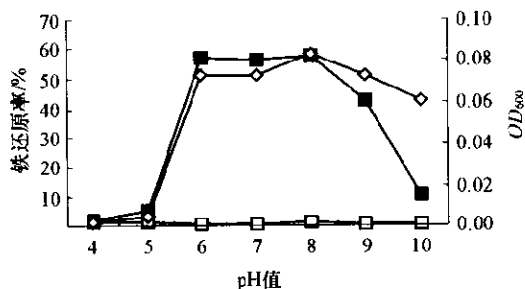


图 6 不同 pH 对菌体和铁还原的影响

■ 接菌时的铁还原率, □ 不接菌时的铁还原率,
◇ 菌体 OD 值

继续提高到 9 和 10 时菌体生长逐渐减弱, S12 在不同 pH 条件下的铁还原率与其生长情况基本相似。在 pH8 的条件下, 菌株 S12 也表现出最快的铁还原率, 12h 后达到 57.48%。而此时 pH6 和 pH7 时的铁还原率分别为 56.98% 和 56.23%, pH9 和 10 时的铁还原率仅有 42.70% 和 10.22%。在 pH 为 4 和 5 的时候, 铁还原率很低, 菌体几乎不进行铁还原。由此可见菌体进行生长和铁还原的 pH 在 6~9 之间, 而以 pH8 为最好。

2.6 温度对菌体生长和铁还原的影响

温度也影响菌体生长和铁还原的进行, 如果菌体适宜温度范围过窄, 会严重制约该菌在以后的染料废水处理中的应用。实验在乳酸钠为 2g/L, 酵母抽提物为 0.5g/L, pH 为 8, 柠檬酸铁浓度为 800mg/L, 温度为 20, 30, 37, 40℃ 条件下培养菌株 S12,

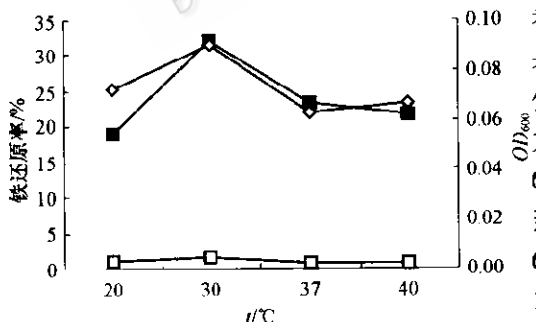


图 7 温度对菌体和铁还原影响

■ 接菌时的铁还原率, □ 不接菌时的铁还原率,
◇ 菌体 OD 值

考察温度对菌体生长和铁还原的影响, 结果如图 7 所示, 在温度为 20℃~40℃ 的条件下菌体都可以进行正常生长和铁还原, 尤其以 30℃ 为最佳。培养 6h, 培养液在 600nm 处的吸光值为 0.0902, 铁还原率达到 32.12%, 而 20℃ 培养条件下培养液在 600nm 处的吸光值为 0.0718, 铁还原率为 19.11%, 37℃ 的为 0.0626, 铁还原率为 23.29%, 40℃ 条件下培养液的在 600nm 处的吸光值为 0.0665, 铁还原率仅有 21.57%。由此可见, 菌株 S12 进行生长和铁还原的最适温度为 30℃。

3 结论

(1) 从印染废水处理系统的活性污泥中分离到的希瓦氏菌新种——脱色希瓦氏菌 S12 具有高效的铁还原能力。

(2) 葡萄糖和乳酸钠这两种碳源有利于菌株 S12 的生长和铁还原, 当乳酸钠浓度为 6g/L 时, 菌株生长和铁还原达到最佳。再提高乳酸钠浓度到 8g/L 时, 菌株生长量和铁还原率反而有所下降。当酵母抽提物的浓度由 0g/L 提升到 4g/L 时, 菌株生长量和铁还原率也随着提高。

(3) 当 Fe^{3+} 浓度达到 800mg/L 时有利于菌株生长和铁还原的进行, 继续提高 Fe^{3+} 的浓度, 菌株生长量和铁还原率反而下降。

(4) 菌株 S12 铁还原的最适温度为 30℃。在起始 pH6~9 的范围内, 菌株 S12 的生长随着 pH 升高而升高, 是菌株 S12 进行铁还原的最佳 pH 范围。

(5) 脱色希瓦氏菌 S12 作为一株新的具有脱色功能的铁还原菌, 深入研究其铁还原性能为以后相关铁还原菌的研究提供了参考, 同时也为以后探讨铁还原与染料脱色相关机理方面研究提供了相关培养基础。

(6) 从以上结果可以看出, S12 菌株能够利用多种碳源进行生长和铁还原, 同时其生长和进行铁还原的温度和 pH 范围也是比较广的, 因此可以预见该菌在染料废水处理中具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Lovley D R, Holmes D E, Nevin K P. *Advances in Microbial Physiology*, 2004, **49**: 219~286.
- [2] 谭盈盈, 郑 平, 姜 辛. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2002, **28** (3): 350~354.
- [3] 朱维琴, 林咸永, 章永松. 应用生态学报, 2002, **13** (3): 369~372.
- [4] Jasonm T, Lovley D R. *Environmental Microbiology*, 2001, **3** (4): 281~287.
- [5] Kazumi J, H? ggbloom M M, Young L Y. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**: 4069~407.
- [6] Xu M Y, Guo J, Cen Y H, *et al.* *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005, **55**: 363~368.
- [7] 乐毅全, 王士芬, 朱核光. 环境科学与技术, 2004, **27** (3): 14~15, 37.
- [8] 荆国华, 李 伟, 施 耀, 等. 中国环境科学, 2004, **24** (4): 447~451.
- [9] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 《分子克隆实验指南》(第二版). 北京: 科学出版社, 1998.
- [10] 国家环保总局. 《水和废水监测分析方法》(第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 368~370.
- [11] Fredrickson J K, Kota S, Kukkadapu R k, *et al.* *Biodegradation*. 2003, **14** (2): 91~103.