

研究报告

土壤产铁载体细菌的筛选及其对铁氧化物的活化与利用

葛淼淼¹, 薄永琳¹, 刘宸², 刘方春³, 解秀祥⁴, 董玉良¹, 任丽英^{*1}

1 临沂大学资源环境学院 山东省水土保持与环境保育重点实验室, 山东 临沂 276000

2 浙江大学山东(临沂)现代农业研究院, 山东 临沂 276000

3 山东省林业科学研究院 山东省森林植被生态修复工程技术研究中心, 山东 济南 250014

4 临沂市生态环境局沂水县分局, 山东 临沂 276400

葛淼淼, 薄永琳, 刘宸, 刘方春, 解秀祥, 董玉良, 任丽英. 土壤产铁载体细菌的筛选及其对铁氧化物的活化与利用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1062-1072.

GE Miaomiao, BO Yonglin, LIU Chen, LIU Fangchun, XIE Xiuxiang, DONG Yuliang, REN Liying. Screening of soil siderophore-producing bacteria and their activation and utilization of iron oxide[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1062-1072.

摘要:【背景】土壤中铁主要以难溶态铁氧化物的形式存在, 有效性较低, 产铁载体细菌对铁氧化物的活化是提高铁利用效率的有效途径。【目的】从林木土壤筛选产铁载体细菌, 并观察菌株对难溶性铁氧化物的利用效应, 可为土壤微生物资源开发及其在养分调控中的作用提供理论依据。

【方法】通过 CAS 检测法从林木根系附近表层土壤中分离产铁载体细菌, 借助生物培养实验分析温度和 pH 对微生物生长和铁载体产生的影响, 通过振荡平衡实验, 探究细菌产铁载体对铁氧化物的活化效应。【结果】通过 CAS 检测法从林木根系附近表层土壤中分离得到 12 株产铁载体细菌, 16S rRNA 基因扩增子测序初步鉴定结果显示筛选细菌均为假单胞菌属。选取铁载体产生能力和生长活性较高的两株细菌 ARSB02 和 CNRSB01 作为重点研究对象, 结果显示, 不同条件下 CNRSB01 的生物量和铁载体产量均高于菌株 ARSB02, 22 h 时菌株 ARSB02 和 CNRSB01 的铁载体活性单位分别达到 67.07% 和 84.60%。pH 5.0–8.0 的范围内两株细菌可以保持较好的铁载体产生能力, 菌株 ARSB02 和 CNRSB01 在 pH 7.0 时铁载体产生能力最强, 铁载体活性单位分别达到 38.98% 和 48.77%。铁载体产生最适温度为 25–30 °C, 菌株 ARSB02 和 CNRSB01 在 30 °C 时铁载体产生能力最强, 铁载体活性单位分别达到 42.35% 和 56.06%。在针铁矿悬液中 ARSB02 和 CNRSB01 均能较

资助项目: 山东省农业科技资金(林业科技创新)项目(2019LY009); 山东省高等学校青创科技支持计划(2019KJH001); 浙江大学山东(临沂)现代农业研究院服务地方经济发展项目(ZDNY-2021-FWLY02003)

This work was supported by the Agricultural Science and Technology (the Forestry Science and Technology Innovation) Project of Shandong Province (2019LY009), the Youth Innovation Science and Technology Support Program of Shandong Province (2019KJH001), and the Serves Local Economic Development Project of Shandong (Linyi) Institute of Modern Agriculture of Zhejiang University (ZDNY-2021-FWLY02003).

*Corresponding author. E-mail: liyingren25@163.com

Received: 2022-07-11; Accepted: 2022-09-16; Published online: 2022-11-03

好地生长, 菌株 ARSB02 在铁氧化物比例为 0.03 g/L 时生物量最高, OD_{420} 值为 0.75, 菌株 CNRSB01 在铁氧化物比例为 0.015 g/L 时生物量最高, OD_{420} 值为 1.11。而且细菌铁载体对铁氧化物有一定的活化效应, 144 h 时菌株 ARSB02 和 CNRSB01 对针铁矿的活化量分别达到 12.99 $\mu\text{mol/L}$ 和 16.50 $\mu\text{mol/L}$ 。【结论】从林木根系附近表层土壤中分离得到的产铁载体细菌均属于假单胞菌, 产铁载体细菌对铁氧化物有一定的活化能力, 研究结果在林木土壤微生物资源开发和应用中具有重要的意义。

关键词: 土壤; 产铁载体细菌; 分离鉴定; 铁氧化物

Screening of soil siderophore-producing bacteria and their activation and utilization of iron oxide

GE Miaomiao¹, BO Yonglin¹, LIU Chen², LIU Fangchun³, XIE Xiuxiang⁴, DONG Yuliang¹, REN Liying^{*1}

1 Shandong Provincial Key Laboratory of Soil Conservation and Environmental Protection, School of Resources and Environment, Linyi University, Linyi 276000, Shandong, China

2 Shandong (Linyi) Institute of Modern Agriculture, Zhejiang University, Linyi 276000, Shandong, China

3 Shandong Engineering Research Center for Ecological Restoration of Forest Vegetation, Shandong Academy of Forest, Jinan 250014, Shandong, China

4 Linyi City Ecological Environment Bureau Yishui County Branch, Linyi 276400, Shandong, China

Abstract: [Background] Iron in soil mainly exists in the form of insoluble iron oxide with low availability. The activation of iron oxide by siderophore-producing bacteria is an effective way to improve the iron utilization efficiency. **[Objective]** To observe the utilization of insoluble iron oxide by the siderophore-producing bacterial strains isolated from woodland soil and provide a theoretical basis for the development of microbial resources and the research on its role in nutrient regulation. **[Methods]** Siderophore-producing bacteria were isolated from surface soil near the tree roots by CAS detection method. The effects of temperature and pH on the growth and siderophore production of the isolates were analyzed by plate culture method. The activation effect of siderophore-producing bacteria on iron oxide was explored via oscillation balance experiments. **[Results]** Twelve siderophore-producing bacterial strains were isolated from surface soil near the tree roots. The results from 16S rRNA gene amplicon sequencing showed that the isolates were *Pseudomonas*. We selected two strains ARSB02 and CNRSB01 and analyzed their siderophore production and growth. The biomass and siderophore production of CNRSB01 were higher than those of ARSB02 under different conditions. At the time point of 22 h, the siderophore activity of ARSB02 and CNRSB01 reached 67.07% and 84.60%, respectively. The two strains could maintain good siderophore production within the range of pH 5.0–8.0 and the strongest siderophore production capacity (38.98% and 48.77%, respectively) at pH 7.0. The strains showed good siderophore production performance at

25–30 °C and the strongest siderophore production capacity (42.35% and 56.06%, respectively) at 30 °C. Both ARSB02 and CNRSB01 grew well in goethite suspension. Strain ARSB02 had the highest biomass (OD_{420} value of 0.75) in the suspension with the iron oxide ratio of 0.03 g/L and strain CNRSB01 had the highest biomass (OD_{420} value of 1.11) in the suspension with the iron oxide ratio of 0.015 g/L. The siderophore produced by the two strains could activate goethite. At the time point of 144 h, the activation of goethite by ARSB02 and CNRSB01 reached 12.99 $\mu\text{mol/L}$ and 16.50 $\mu\text{mol/L}$, respectively. **[Conclusion]** The siderophore-producing bacteria isolated from surface soil near the tree roots all belong to *Pseudomonas* and have the ability to activate iron oxide. The results are of significance for the development and application of microbial resources in woodland soil.

Keywords: soil; siderophore-producing bacteria; isolation and identification; iron oxide

铁元素是大部分有机组分的必需微量元素,然而在中性和碱性条件下,铁氧化物的移动性较低,环境中普遍存在铁缺乏的现象^[1]。微生物可以通过分泌铁载体促进土壤中难溶性铁氧化物的溶解,增强对铁元素的获取^[2],改善植株铁缺乏症状,促进植物的生长^[3]。

产铁载体细菌是一类能够合成铁载体并对铁等元素具有较强螯合能力的微生物,可促进相关元素从难溶性铁复合氧化物中的溶解^[4-6]。当环境处于低铁条件时,产铁载体细菌对不溶性铁氧化物的溶解是增强铁活性的重要途径,产铁载体细菌可促进含铁矿物的溶解,加速矿物中离子的溶出,以满足植物对铁的需求^[7-8]。研究表明,铁载体的加入可触发针铁矿表面铁的快速溶解^[2],铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 在缺铁条件下可获取不溶性未定型铁氧化物中的铁元素^[1], 门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)可以利用赤铁矿中的铁^[9],海洋产铁载体细菌交替单胞菌(*Alteromonas haloplanktis*)可促进针铁矿和无定形铁氧化物的溶解^[10],土壤产铁载体细菌 *Pseudomonas* sp.可溶解赤铁矿^[11]。产铁载体细菌对铁氧化物的活化作用机制可能是细菌产生的铁载体对矿物结构的改变以及对矿物表面溶解平衡的影响,从而驱动了铁氧化物

中铁元素的溶出。产铁载体细菌对土壤中难溶性铁氧化物的活化为铁元素的利用提供了有利途径,但不同菌株的作用能力差异较大,筛选获得优良菌株则可更好地发挥菌株的优异特性。

本研究从山地丘陵区种植樱桃、苹果、板栗和桃树的表层土壤中分离高产铁载体菌株,通过对细菌铁载体产生能力的分析和细菌对难溶性铁氧化物利用能力的研究,以为土壤微生物资源开发和缺铁条件下的利用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 土壤样品的采集

分别在山东省临沂市和淄博市山地丘陵区进行土壤样品的采集,所采集土壤样品均为种植果树的山地土壤,在果树根系附近采集 0–10 cm 的表层土壤,采集土壤分两部分储存:一部分新鲜土样放入 4 °C 恒温冰箱进行细菌的分离;另一部分土样风干,磨碎进行土壤性质分析,采样点信息及土壤基本性质如表 1 所示,其中,土壤有机质采用灼烧法测定^[12],土壤 pH 采用 1:2.5 水土比提取, pH 计测定;土壤碱解氮采用碱解扩散法测定;土壤速效磷采用钼锑抗比色法测定;土壤有效铁采用 DTPA 提取,原子吸收分光光度法测定。

表 1 土壤基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of the soil

| 采样点 | 经纬度 | 海拔 | 林木类型 | pH | 有机质 | 碱解氮 | 速效磷 | 有效铁 |
|---|----------------------------|--------------|----------------------|------|--------------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Sampling point | Longitude and latitude | Altitude (m) | Tree type | | Organic matter (%) | Alkali-hydrolyzable nitrogen (mg/kg) | Effective phosphorus (mg/kg) | Effective iron (mg/kg) |
| 山东省淄博市沂源县 Yiyuan County, Zibo City, Shandong Province | 37°7'15"N, 118°15'12"E | 286 | 樱桃树 Cherry tree | 7.83 | 2.63 | 43.75 | 34.40 | 2.96 |
| | 37°7'14"N, 118°15'13"E | 293 | 苹果树 Apple tree | 7.97 | 3.15 | 70.70 | 58.20 | 3.99 |
| 山东省临沂市蒙阴县 Mengyin County, Linyi City, Shandong Province | 35°47'17"N, 117°97'21"E | 163 | 桃树 Peach tree | 6.37 | 3.45 | 21.35 | 32.69 | 4.31 |
| | 35°57'36"N, 117°94'23"E | 331 | 板栗树 Chestnut tree | 5.67 | 2.90 | 50.05 | 33.63 | 5.68 |

1.2 土壤产铁载体细菌的筛选

细菌的分离与筛选: 利用牛肉膏蛋白胨固体培养基进行稀释平板涂布^[3], 首先取供试土壤 10 g 放入 90 mL 无菌水中, 25 °C、180 r/min 振荡 30 min, 用无菌水稀释到 10^{-6} , 取 200 μ L 稀释后的土壤悬液涂布到牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 室温培养 28 h; 挑取生长状态良好不同菌落形态的细菌, 分别接种到 CAS 检测培养基上, 28 °C 的恒温箱培养 24 h; 当细菌产生铁载体时固体培养基上出现橙色晕圈, 挑选产生较大橙色晕圈的菌落进行多次划线纯化分离, 并对获得的纯菌株进行鉴定。

CAS 检测平板的配制^[13]: (1) CAS 染液含 1 mmol/L 的铬天青(CAS)、4 mmol/L 的十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)和 0.1 mmol/L FeCl_3 , 充分混匀后得到 CAS 染液。(2) 称取 2.427 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.590 5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.075 g KH_2PO_4 、0.25 g NH_4Cl 和 0.125 g NaCl 充分混合, 制成 100 mL pH 6.8 的磷酸盐缓冲液。(3) 每 100 mL CAS 检测培养基含 1 mL 浓度 20% 的蔗糖溶液、3 mL 浓度 10% 的酸水解酪蛋白、100 μ L 浓度 1 mmol/L 的 CaCl_2 、2 mL 浓度 1 mmol/L 的 MgSO_4

和 1.8 g 的琼脂。将溶液(1)、(2)、(3)分别灭菌, 冷却至 50 °C, 分别将 5 mL 溶液(1)和(2)缓慢加入到(3)中, 得到蓝色 CAS 检测培养基。

1.3 细菌铁载体定量分析

细菌铁载体定量分析参照文献[14]: 取等体积的细菌培养上清液与 CAS 检测液混匀, 避光反应 1 h, 在 680 nm 波长下检测吸光度 A_s , 同时测定空白培养基与等体积 CAS 检测液反应的吸光度 A_r , 通过 A_s/A_r 分析菌株铁载体产生能力, A_s/A_r 在 0-1 之间, 每减少 0.2 增加一个“+”, 产铁载体能力较高的细菌 A_s/A_r 低于 0.5。用铁载体活性单位(siderophore unit, SU)表示菌株铁载体的产量, $SU = [(A_r - A_s)/A_r] \times 100$ 。

1.4 产铁载体细菌初步鉴定

采用 16S rRNA 基因序列分析方法对筛选菌株进行分子生物学鉴定, 首先按照细菌基因组提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)说明书提取菌株总 DNA, 然后采用表 2 中细菌通用 16S rRNA 基因扩增引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对待测菌株进行扩增。PCR 反应体系(20 μ L): 预混合物 10 μ L, 正、反向引物

(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL , 模板 DNA 1.0 μL , ddH₂O 补足 20 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min^[5]。16S rRNA 基因 PCR 产物测序后, 通过 NCBI 中的 BLAST 检索确定相似性较高的序列。

1.5 细菌生长条件分析

配制 SM 培养基参照文献[1], 1 L SM 培养基中含有 6.0 g K₂HPO₄、1.0 g (NH₄)₂SO₄、3.0 g KH₂PO₄、0.2 g MgSO₄ 和 4.0 g 丁二酸钠。向 150 mL SM 培养基中接种对数期(*OD*₄₂₀ 为 1.2)的细菌种子液 1 mL, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下振荡培养, 测定细菌的生长曲线和铁载体产量, 并分析培养时间、温度和溶液 pH 对细菌生长和铁载体产量的影响。

1.6 铁氧化物对产铁载体细菌生长的影响

选用土壤中常见的针铁矿作为铁氧化物的代表, 通过人工合成的方式制备针铁矿^[15], 磨碎过 100 目筛。

向 SM 液体培养基中加入 1 g/L 的 8-羟基喹啉, 充分混匀, 然后用氯仿萃取分离 8-羟基喹啉, 得到无铁培养基。将无铁培养基分装到一系列三角瓶中, 每瓶装入 150 mL, 然后加入针铁矿, 使其浓度分别为 0–0.3 g/L。向上述针铁矿悬液中加入对数期(*OD*₄₂₀ 为 1.2)的细菌种子液 1 mL, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养 12 h, 培养结束后将悬液转入离心管中, 向离心管底部加入 3 mL 的蔗糖溶液(质量浓度 60%), 利用梯度离心法, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 \times g 离心 5 min 分离细菌和针铁矿, 将上部细菌吸取出, 涡旋均匀后重新分散到 150 mL 培养基中, 测定细菌的生物量(*OD*₄₂₀), 同时 12 000 \times g 离心上层悬液 5 min 测定铁载体产生单位 *SU*。

上述同样培养条件下, 细菌培养结束后于 5 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 \times g 离心 5 min, 用去离子水清洗 2 次, 然后通过捷克 TESCAN MIRA LMS 扫描

电镜喷金后观察细菌在针铁矿表面的生长状况, 测试加速电压为 200–30 eV, 探针束流为 2 pA–400 nA。

1.7 细菌铁载体对铁氧化物的活化作用

将菌株在上述无铁培养基中培养 36 h, 用 0.45 μm 滤膜抽滤将细菌细胞和上清液分离, 上清液为细菌发酵液, 将发酵液分装到一系列三角瓶中, 每瓶加入细菌发酵液 40 mL, 针铁矿浓度为 0.03 g/L, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养, 于不同的反应时间(48、96 和 144 h)取上清液, 消化后, 用等离子体发射光谱测定铁元素的含量, 同样条件下测定不加细菌条件下针铁矿在无铁培养基中的活化速率。

2 结果与分析

2.1 林地土壤产铁载体细菌筛选与鉴定

本研究从苹果树、樱桃树、桃树和板栗树根系附近土壤中分离获得 127 株细菌, 通过 CAS 培养基对土壤中产铁载体细菌进行初筛, 在 CAS 固体检测培养基上出现橙色晕圈的为产铁载体细菌(图 1)。经过筛选分离得到 12 株具有产铁载体能力的菌株(表 2), 根据晕圈直径大小, 7 株细菌具有较强的铁载体产生能力, 分别为 ARSB02、CRSB01、CRSB02、CRSB03、CRSB05、CRSB06 和 CNRSB01。

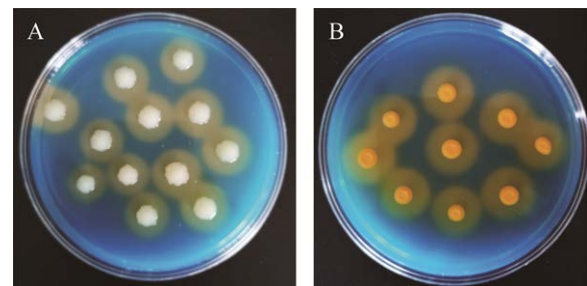


图 1 部分细菌在 CAS 检测培养基上的生长情况
Figure 1 Bacterial growth on CAS detection media.
A: ARSB02. B: CNRSB01.

利用分子生物学方法对 12 株细菌进行 16S rRNA 基因的扩增与测序, 将序列通过 BLAST 对比, 结果显示 12 株菌均归属于假单胞菌属(表 2), 包括绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chloroaphis*)、*Pseudomonas frederiksbergensis*、杰氏假单胞菌 (*Pseudomonas jessenii*)、*Pseudomonas laurylsulfatiphila* 和未知名假单胞菌(*pseudomonas* sp.), 以往的研究也表明, 假单胞菌属细菌具有特异的铁载体产生能力^[16-17]。

2.2 高产铁载体菌株生长曲线和铁载体产量

根据细菌铁载体产生能力选择 ARSB02 和

CNRSB01 两株高产铁载体的细菌进行重点分析。两株细菌的生长曲线和铁载体产生活性单位如图 2 所示。CNRSB01 菌株在 0–3 h 为细菌生长的迟缓期, 3–16 h 为对数生长期, 16 h 之后细菌的生长速度逐步趋于缓慢; ARSB02 菌株生长相对稍慢, 在 0–4 h 为细菌生长的迟缓期。CNRSB01 菌株的铁载体产生能力高于 ARSB02, 随着时间的延长, 两株细菌的铁载体活性单位 *SU* 逐渐增加。22 h 时 CNRSB01 菌株的 *SU* 达到 84.60%, 基本达到最大值, 而 ARSB02 菌株的 *SU* 为 67.07%, 仍有缓慢的上升趋势。

表 2 不同菌株产铁载体能力及菌属鉴定结果

Table 2 Siderophore production capacity of different strains and species identification results

| 菌株编号 Strain No. | 菌株来源 Source of strains | 菌株产铁载体能力 Siderophore production capacity | 相似性菌株 Strains of similarity | GenBank 登录号 GenBank accession No. | 相似度 Similarity (%) |
|--------------------|-----------------------------|---|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| ARSB01 | 苹果树土壤 Apple tree soil | ++ | <i>Pseudomonas</i> sp. S34 | KY462015.1 | 99.93 |
| ARSB02 | 苹果树土壤 Apple tree soil | ++++ | <i>Pseudomonas</i> sp. | MG266378.1 | 99.79 |
| ARSB03 | 苹果树土壤 Apple tree soil | ++ | <i>Pseudomonas laurylsulfatiphila</i> | MW741536.1 | 99.65 |
| CRSB01 | 樱桃树土壤 Cherry tree soil | +++ | <i>Pseudomonas</i> sp. | MN400232.1 | 99.72 |
| CRSB02 | 樱桃树土壤 Cherry tree soil | +++ | <i>Pseudomonas</i> sp. S34 | CP019398.1 | 99.93 |
| CRSB03 | 樱桃树土壤 Cherry tree soil | +++ | <i>Pseudomonas</i> sp. | MT026958.1 | 99.86 |
| CRSB04 | 樱桃树土壤 Cherry tree soil | ++ | <i>Pseudomonas baetica</i> | JQ236625.1 | 99.36 |
| CRSB05 | 樱桃树土壤 Cherry tree soil | +++ | <i>Pseudomonas jessenii</i> | LK391528.1 | 98.79 |
| CRSB06 | 樱桃树土壤 Cherry tree soil | ++++ | <i>Pseudomonas chlororaphis</i> | CP019399.1 | 100.00 |
| CRSB07 | 樱桃树土壤 Cherry tree soil | ++ | <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> | MW391603.1 | 99.93 |
| PRSB01 | 桃树土壤 Peach tree soil | ++ | <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> | MW085012.1 | 100.00 |
| CNRSB01 | 板栗树土壤 Chestnut tree soil | ++++ | <i>Pseudomonas chlororaphis</i> | CP050510.1 | 100.00 |

A_s/A_r ranging from 0 to 1, adding one “+” per 0.2 reduction.

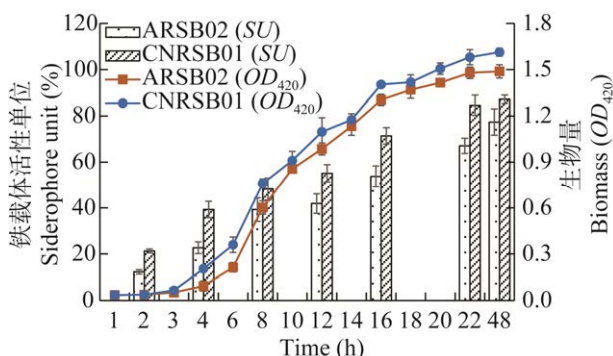


图2 ARSB02和CNRSB01菌株生长曲线 垂线为标准差, $n=3$. 下同

Figure 2 The growth curve of ARSB02 and CNRSB01. Vertical bars represent standard deviations, $n=3$. The same below.

2.3 温度对细菌生长的影响

温度对细菌生长和铁载体产量具有一定的影响, 通过培养实验考察了菌株 ARSB02 和 CNRSB01 在 25–45 °C 条件下的生长状况(图 3)。两株高产铁载体菌株 ARSB02 和 CNRSB01 在 25–30 °C 范围内最有利于生长, 菌株 ARSB02 和 CNRSB01 在 30 °C 时铁载体产生能力最强, 铁载体活性单位分别达到 42.35% 和 56.06%, 当温度达到 45 °C 时细菌的生长受到显著的抑制, 其铁载体活性单位与生长趋势基本一致。

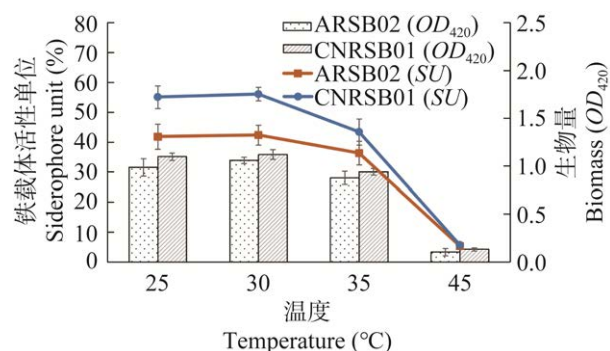


图3 温度对细菌 ARSB02 和 CNRSB01 生长的影响

Figure 3 Effect of temperature on the growth of bacterial ARSB02 and CNRSB01.

2.4 pH 对细菌生长的影响

环境 pH 对菌株的生长有着显著的影响。通过培养实验考察了菌株 ARSB02 和 CNRSB01 在 pH 4.0–9.0 条件下的生长状况(图 4), 结果显示菌株 CNRSB01 在 pH 6.0–8.0 的范围内有较高的生存活力和较强的铁载体产生能力; 菌株 ARSB02 在 pH 6.0–7.0 的范围内有较高的生物量, pH 5.0–8.0 的范围内铁载体产生能力接近。综合来看, pH 5.0–8.0 条件下, 两株细菌可保持一定的活性和铁载体产量, 菌株 ARSB02 和 CNRSB01 在 pH 7.0 时铁载体产生能力最强, 铁载体活性单位分别达到 38.98% 和 48.77%, 当 pH 值低于 5.0 和高于 8.0 时两株细菌的生长能力和铁载体产量均明显减弱。

2.5 产铁载体细菌对铁氧化物的利用

通过人工合成铁氧化物并观察培养基中铁氧化物不同比例下细菌的生长状况(图 5), 结果发现 0–0.300 g/L 铁氧化物浓度下, 随着铁氧化物浓度的增加, 细菌的生物量先升高后降低。菌株 ARSB02 在铁氧化物浓度为 0.03 g/L 时生物量最高, OD_{420} 值为 0.75, 随着铁氧化物浓度升高, 菌株仍能较好地生长, 但有下降的趋势; 菌株 CNRSB01 菌株在铁氧化物浓度为 0.015 g/L 时生物量最高, OD_{420} 值为 1.11, 之后生物量降低。

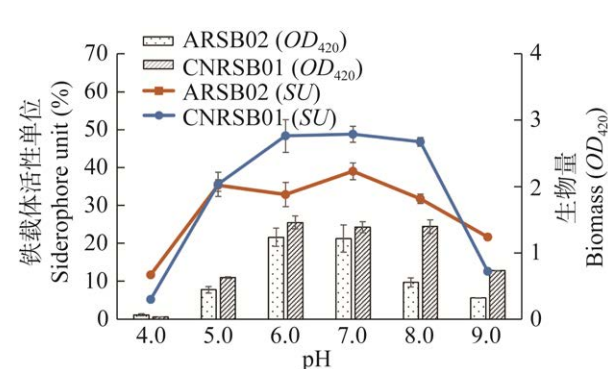


图4 培养基 pH 对细菌 ARSB02 和 CNRSB01 生长的影响

Figure 4 Effects of pH on the growth of bacterial ARSB02 and CNRSB01.

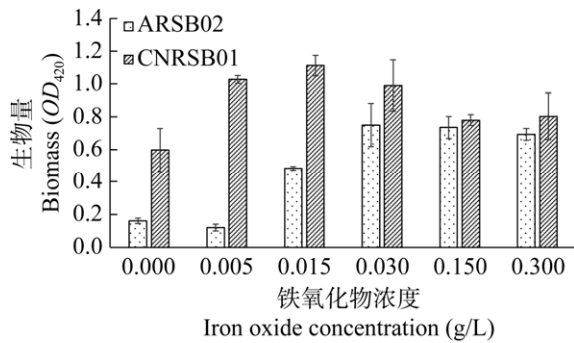


图5 铁氧化物对细菌 ARSB02 和 CNRSB01 生长的影响

Figure 5 Effect of iron oxides on the growth of bacterial ARSB02 and CNRSB01.

扫描电镜结果显示细菌在针铁矿悬液中生长状况良好(图 6), 这为后续细菌与氧化物的相互作用提供了有利的条件。

2.6 细菌铁载体对铁氧化物的活化

通过振荡平衡实验考察菌株 ARSB02 和 CNRSB01 发酵液对针铁矿的活化效应(图 7), 结果显示, 与不加细菌对照相比(CK), 两株细菌发酵液均可促进难溶性针铁矿的溶解, 随着时间的延长, 溶解量逐渐增多, 菌株 CNRSB01 的发酵液对铁氧化物的溶解能力高于菌株 ARSB02, 144 h 时菌株 ARSB02 和 CNRSB01 发酵液对针铁矿中铁的活化量分别达到 12.99 $\mu\text{mol/L}$ 和 16.50 $\mu\text{mol/L}$,

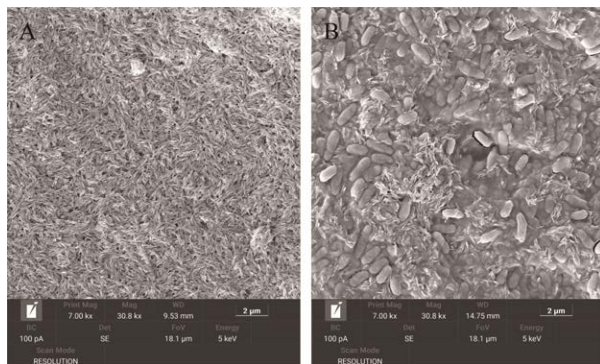


图6 针铁矿(A)及细菌在针铁矿表面的生长(B)
Figure 6 SEM images of goethite (A) and bacteria growing on goethite surface (B).

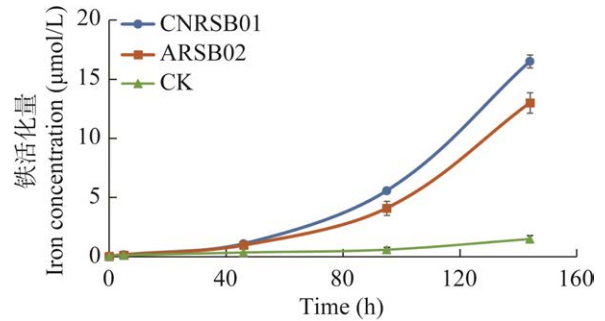


图7 菌株 ARSB02 和 CNRSB01 铁载体对针铁矿的活化效应

Figure 7 Dissolution of iron oxide in siderophore solution produced by ARSB02 and CNRSB01.

两株细菌发酵液对铁氧化物的活化能力与二者铁载体产生能力一致, 这说明两种细菌的生长能力及其铁载体产生能力与铁氧化物的活化有关。

3 讨论

土壤微生物在植物生长中具有重要的促生和调控作用^[18-19], 其通过产生铁载体等促使土壤中不溶性铁转化为可以被植物利用的有效态铁, 增强植物对环境条件的耐受能力, 促进植物的生长^[20-21]。

不同细菌铁载体产生能力有较大的差异, 这一方面取决于菌株自身的特性, 杨妍等^[22]筛选得到的 14 株具备产铁载体能力的植物根际促生菌, 其铁载体产生能力有较大差异; 李艳梅等^[3]分离筛选得到的 5 株花生根际芽孢杆菌中 HSGJ1 菌株铁载体产生能力最强。本研究采用林地土壤分离筛选出 12 株具有铁载体产生能力的菌株, 其中 7 株细菌具有较高的产铁载体能力, CNRSB01 的铁载体产生能力最好。另一方面, 菌株铁载体产生能力差异的原因取决于外界环境的影响。pH 是影响菌株铁载体产生能力的重要因素之一, pH 值为 6.0 时绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)荧光嗜铁素的产生量最高^[23]。黑曲霉

(*Aspergillus niger*) RL1 的最佳产铁载体培养条件为 pH 5.0^[24]。在 pH 6.5–9.0 的范围内假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) SPF-1 铁载体分泌较多^[25]。本研究显示, pH 5.0–8.0 的范围较适宜菌株 ARSB02 和 CNRSB01 铁载体的产生。温度对产铁载体细菌的生长和铁载体产生能力也有较大影响, 26–43 °C 范围内最适合假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) SPF-1 铁载体的产生, 温度低于 26 °C 时该菌株几乎不分泌铁载体^[25]。本文中菌株 ARSB02 和 CNRSB01 在 25–30 °C 范围内生物量和铁载体产量较高。除此之外, 氮源、碳源和金属离子等均对菌株铁载体产生能力有一定的影响, 由此可见, 筛选获得的不同菌株铁载体产生能力有较大的差异, 要充分考虑菌株特性和环境条件, 获得铁载体产生能力较强的菌株进行深入研究。

铁载体是由细菌产生的可以螯合铁的小分子有机化合物^[16]。产铁载体微生物可促进赤铁矿、针铁矿和黄铁矿等含铁矿物的分解^[2,26], 将铁元素从矿物中螯合出来^[27–28], 同时也可以和环境中的其他元素形成配合物, 加速矿物中离子的溶出^[29]。铁活化实验中, 加入细菌发酵液后, 溶液中铁的含量逐渐增加, 说明菌株 ARSB02 和 CNRSB01 对铁氧化物均具有一定的活化作用, 这与上述文献中报道的一致。后续将对产铁载体菌株与铁氧化物的作用机制及其在土壤中的应用进行深入实践与分析, 为土壤培肥及促生提供优质的微生物资源。

4 结论

铁氧化物是土壤中铁存在的主要形式之一, 其在土壤中的转化过程直接影响植物对铁的吸收和利用。本文通过 CAS 检测法从林木根系附近土壤筛选产铁载体细菌, 考察产铁载体细菌对土壤铁氧化物的活化特性, 结果显示, 分离得到

的 12 株产铁载体细菌均为假单胞菌属, 对铁载体产生能力较强的菌株 ARSB02 和 CNRSB01 重点分析发现, 不同条件下菌株 CNRSB01 铁载体产生能力更强, 22 h 铁载体产生单位 *SU* 达到 84.60%; 两株细菌在针铁矿悬液中均能较好地生长, 且对铁氧化物有一定的活化效应。该研究结果为相关土壤微生物资源开发和土壤应用奠定了科学基础。

REFERENCES

- [1] 朱慧明. 高产铁载体菌株的筛选及其对不溶性铁化合物的利用[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2014.
ZHU HM. Isolation of high siderophore-producing bacteria and the utilization of insoluble iron compounds[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science and Technology, 2014 (in Chinese).
- [2] REICHARD PU, KRETZSCHMAR R, KRAEMER SM. Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2007, 71(23): 5635-5650.
- [3] 李艳梅, 王琼瑶, 涂卫国, 崔永亮, 钟玘狄, 李俐珩, 陈强, 余秀梅. 镍胁迫下产铁载体细菌对花生的促生性[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(8): 1882-1890.
LI YM, WANG QY, TU WG, CUI YL, ZHONG QD, LI LH, CHEN Q, YU XM. Growth promoting activity of siderophore secreting bacteria for peanut plant under nickel stress[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(8): 1882-1890 (in Chinese).
- [4] DUBBIN WE, LOUISE ANDER E. Influence of microbial hydroxamate siderophores on Pb(II) desorption from α -FeOOH[J]. *Applied Geochemistry*, 2003, 18(11): 1751-1756.
- [5] 王东升, 王立立, 李取生, 周婷, 周雪芳, 高琼. 产铁载体菌对龙葵修复土壤 Cd 污染的促进效应[J]. *环境工程学报*, 2018, 12(8): 2311-2319.
WANG DS, WANG LL, LI QS, ZHOU T, ZHOU XF, GAO Q. Enhancing effect of siderophore-producing bacteria on remediation of cadmium-contaminated soil by *Solanum nigrum* L.[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2018, 12(8): 2311-2319 (in Chinese).
- [6] 王亚军, 冯炬威, 李雅倩, 虞方伯. 高产铁载体菌 *Burkholderia vietnamiensis* YQ9 促生特性研究及其对

- 重金属胁迫条件下种子萌发的影响[J]. 环境科学学报, 2022, 42(2): 430-437.
- WANG YJ, FENG JW, LI YQ, YU FB. Studies on growth-promoting properties of an efficient siderophore producing bacterium, *Burkholderia vietnamiensis* YQ9, and its effects on seed germination under heavy metal stress[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2022, 42(2): 430-437 (in Chinese).
- [7] GHOSH SK, BERA T, CHAKRABARTY AM. Microbial siderophore - a boon to agricultural sciences[J]. Biological Control, 2020, 144: 104214.
- [8] ZHANG LM, ZENG Q, LIU X, CHEN P, GUO XX, MA LZ, DONG HL, HUANG Y. Iron reduction by diverse actinobacteria under oxic and pH-neutral conditions and the formation of secondary minerals[J]. Chemical Geology, 2019, 525: 390-399.
- [9] DEHNER CA, AWAYA JD, MAURICE PA, DUBOIS JL. Roles of siderophores, oxalate, and ascorbate in mobilization of iron from hematite by the aerobic bacterium *Pseudomonas mendocina*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(7): 2041-2048.
- [10] YOSHIDA T, HAYASHI KI, OHMOTO H. Dissolution of iron hydroxides by marine bacterial siderophore[J]. Chemical Geology, 2002, 184(1/2): 1-9.
- [11] HERSMAN L, LLOYD T, SPOSITO G. Siderophore-promoted dissolution of hematite[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1995, 59(16): 3327-3330.
- [12] 吴才武, 夏建新, 段峥嵘. 土壤有机质测定方法述评与展望[J]. 土壤, 2015, 47(3): 453-460.
- WU CW, XIA JX, DUAN ZR. Review on detection methods of soil organic matter(SOM)[J]. Soils, 2015, 47(3): 453-460 (in Chinese).
- [13] 陈伟, 舒健虹, 陈莹, 曾庆飞, 王小利, 陆瑞霞, 付薇. 黑麦草根际铁载体产生菌 WN-H3 的分离鉴定及其产铁载体培养条件的优化[J]. 生物技术通报, 2016, 32(10): 219-226.
- CHEN W, SHU JH, CHEN Y, ZENG QF, WANG XL, LU RX, FU W. Screening, identification and fermentation condition optimum of a siderophore-producing bacteria WN-H3 from rhizosphere of ryegrass[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(10): 219-226 (in Chinese).
- [14] 赵翔, 陈绍兴, 谢志雄, 沈萍. 高产铁载体荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* sp-f 的筛选鉴定及其铁载体特性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 691-695.
- ZHAO X, CHEN SX, XIE ZX, SHEN P. Isolation, identification and over-siderophores production of *Pseudomonas fluorescens* sp-f[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(5): 691-695 (in Chinese).
- [15] 王娟, 廖水姣, 朱端卫, 任丽英, 周文兵, 丁家旺. 不同氧化物硼负载体吸附锰离子的特性研究[J]. 土壤学报, 2006, 43(5): 749-755.
- WANG J, LIAO SJ, ZHU DW, REN LY, ZHOU WB, DING JW. Mn²⁺ adsorption characteristics of different B-loaded oxides[J]. Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(5): 749-755 (in Chinese).
- [16] SCHALK IJ, RIGOUIN C, GODET J. An overview of siderophore biosynthesis among *fluorescent Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization[J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(4): 1447-1466.
- [17] BERTI AD, THOMAS MG. Analysis of achromobactin biosynthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(14): 4594-4604.
- [18] 靳海洋, 王慧, 张燕辉, 胡天龙, 林志斌, 刘本娟, 蔺兴武, 谢祖彬. 稻田土壤固氮菌株的分离筛选及促生潜力[J]. 生物技术通报, 2020, 36(6): 73-82.
- JIN HY, WANG H, ZHANG YH, HU TL, LIN ZB, LIU BJ, LIN XW, XIE ZB. Isolation, screening and plant growth-promoting potential of nitrogen-fixing strains from paddy soils[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(6): 73-82 (in Chinese).
- [19] 杨华, 胡展, 郭照辉, 肖蓉, 罗容珺, 付祖姣, 魏小武, 蔡长平, 王玉双. 水稻促生菌的筛选、鉴定及其促生效果[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2088-2099.
- YANG H, HU Z, GUO ZH, XIAO R, LUO RJ, FU ZJ, WEI XW, CAI CP, WANG YS. Screening and identification of rice growth-promoting strains and their effects on rice growth[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2088-2099 (in Chinese).
- [20] TRIPATHI K, KUMAR N, SINGH M, SINGH RK. Fungal Siderophore: Biosynthesis, Transport, Regulation, and Potential Applications[M]. Rhizosphere Microbes. Singapore: Springer Singapore, 2020: 387-408.
- [21] CAVITE HJM, MACTAL AG, EVANGELISTA EV, CRUZ JA. Growth and yield response of upland rice to application of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2021, 40(2): 494-508.
- [22] 杨妍, 龙云川, 蒋娟, 景兆鹏, 周少奇. 西双版纳保护区植物根际细菌的筛选及其促生能力研究[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 2877-2885.
- YANG Y, LONG YC, JIANG J, JING ZP, ZHOU SQ. Screening of plant-growth promoting rhizosphere actinomycetes in Xishuangbanna Reserve[J].

- Microbiology China, 2019, 46(11): 2877-2885 (in Chinese).
- [23] MANWAR AV, KHANDELWAL SR, CHAUDHARI BL, MEYER JM, CHINCHOLKAR SB. Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004, 118(1): 243-251.
- [24] 许佳露, 张平, 李美芳, 廖柏寒, 彭佩钦, 李靖, 梅金星. 产铁载体菌株的分离、培养条件优化及初步应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1004-1016.
- XU JL, ZHANG P, LI MF, LIAO BH, PENG PQ, LI J, MEI JX. Isolation, culture condition optimization, and preliminary application of siderophore-producing strains[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1004-1016 (in Chinese).
- [25] 陈绍兴. 假单胞菌 SPF-1 产铁载体条件及其铁载体性质研究[D]. 武汉: 武汉大学硕士学位论文, 2005.
- CHEN SX. Analysis of the biosynthesis conditions and characteristics of siderophores from *Pseudomonas* sp. SPF-1[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan University, 2005 (in Chinese).
- [26] REVESZ E, FORTIN D, PAKTUNC D. Reductive dissolution of arsenical ferrihydrite by bacteria[J]. Applied Geochemistry, 2016, 66: 129-139.
- [27] FERRET C, STERCKEMAN T, CORNU JY, GANGLOFF S, SCHALK IJ, GEOFFROY VA. Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*[J]. Environmental Microbiology Reports, 2014, 6(5): 459-467.
- [28] DAVID SR, IHIAWAKRIM D, REGIS R, GEOFFROY VA. Iron removal from raw asbestos by siderophores-producing *Pseudomonas*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 385: 121563.
- [29] KIMURA T, FUKUTANI S, IKEGAMI M, SAKAMOTO F, KOZAI N, GRAMBOW B, YONEDA M. Effect of bacterial siderophore on cesium dissolution from biotite[J]. Chemosphere, 2021, 276: 130121.