

海洋沉积物中一株铁还原细菌分离及 Fe(III)还原性质

刘洪艳¹, 王红玉¹, 谢丽霞¹, 王广策²

(1. 天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津科技大学 海洋与环境学院, 天津 300457; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 以渤海(塘沽海域)沉积物为材料, 富集异化铁还原混合菌群。采用三层平板方法, 从混合菌群中纯化出一株异化铁还原细菌 KB52。通过形态观察和 16S rRNA 基因序列分析, 菌株命名为 *Klebsiella* sp. KB52(GeneBank 号 KM233642)。在葡萄糖为电子供体, Fe(OH)₃ 为电子受体条件下厌氧培养菌株 KB52, 其细胞生长和 Fe(III)还原具有明显耦合关系。碳源分别设置为葡萄糖、乳酸钠、丙酮酸钠、乙酸钠、甲酸钠和丙酸钠, 在海水培养条件下菌株 KB52 以丙酮酸钠为碳源时, 菌株培养液累积 Fe(II)浓度最高, 为 4.41 mmol/L±0.59 mmol/L。菌株 KB52 在设定 NaCl 浓度范围内, 都能够生长并具有铁还原性质, 菌株表现出较强的耐盐性。NaCl 质量浓度为 4 g/L 时, 菌株 KB52 还原 Fe(III)效率最高, Fe(II)达到 4.95 mmol/L±0.72 mmol/L。铁还原细菌 KB52 在淡水和海水条件下能够生长并具有铁还原性质, 可用于近海沉积物中微生物介导异化 Fe(III)还原过程, 进一步应用于治理海洋环境污染。

关键词: 海洋沉积物; 铁还原细菌; *Klebsiella* sp. KB52; Fe(III)还原; 培养条件

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)03-0065-06

doi: 10.11759/hyxx20150417001

铁是一种变价金属, 铁的生物氧化还原涉及多种元素的生物地球化学循环, 在生态环境中具有重要意义。微生物介导的异化 Fe(III)还原被认为是自然界中 Fe(III)还原的主要途径^[1-2]。异化铁还原细菌是指能利用有机物为电子供体, 以 Fe(III)作为唯一电子受体, 能够将 Fe(III)还原为 Fe(II)的一类微生物^[3-4]。其中一些异化铁还原细菌能够将有机物的厌氧发酵与异化 Fe(III)还原过程相耦联, 分解有机物和转化污染物, 达到环境污染治理目的。*Geobacter metallireducens* GS-15 是首次分离的异化铁还原细菌, 在 Fe(III)还原的过程中同时分解苯和甲苯等芳香族化合物^[5]。Scala 等^[6]在重金属和放射性元素污染的萨凡纳河底沉积物中, 分离鉴定一株异化铁还原细菌 PAR2B, 该菌株的铁还原效率非常高, 可达到每天产生 Fe(II) 2.2 mmol/L。许玫英等^[7]从印染废水中分离到一株 Fe(III)还原细菌 *Shewanella decolorationis* S12, 该菌株能够脱色降解染料。此外, 微生物异化铁还原过程能够改变土壤中重金属和有毒元素的形态。邢辉等^[8]从重金属含量高的酸矿水中分离 Fe(III)还原细菌 *Acidithiobacillus* sp. nju-T1, 利用菌株的铁还原过程加强治理矿山环境的酸矿水污染。可见, 微生物介导铁还原过程可以有效降低金属污染, 在生态环境及生物修复中具有重要的作用^[9]。

海洋沉积物因其特殊的厌氧环境而成为铁还原微生物的重要生境。海洋沉积物中微生物介导铁还原过程可以有助于海洋污染物的净化。Canfield 等^[10]研究报道, 在海洋和入海口的沉积物中, Fe(III)和 Mn(IV)的还原可使得 30%~90%的有机碳氧化。Iwahori 等^[11]发现有毒金属能够被铁还原微生物转化而从污染水域中去除。在无定形铁氧化物含量更丰富的深海区域, 异化铁还原对有机物分解的贡献可达 75%^[12]。目前一些研究从淡水环境中进行筛选异化铁还原细菌, 例如水稻土、溪水和热泉等^[13-14]。而目前关于海洋环境铁还原细菌的相关研究比较有限。渤海是我国内陆最大的海湾。在渤海, 陆源污染物排放与海洋自净能力已经超出平衡临界值, 污染物最终积累在海底沉积物中。利用海洋沉积物中微生物介导铁还原过程对于治理海洋污染具有重要意义。

收稿日期: 2015-04-17; 修回日期: 2015-10-30

基金项目: 天津市自然科学基金 (12JCQNJC04200); 大学生创新创业训练计划 (201510057134)

[Foundation: Natural Science Foundation of Tianjin of China, No.12JCQNJC04200; Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program, No. 201510057134]

作者简介: 刘洪艳(1977-), 女, 吉林通化人, 副教授, 博士, 主要从事海洋微生物研究, 电话: 022-60601305, E-mail: hongyanliu1214@163.com; 王广策, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898574, E-mail: guangce-wang@sohu.com

义。因此,本实验以渤海海底沉积物为材料,筛选 Fe()还原细菌,并分析培养条件对菌株铁还原能力的影响。旨在扩大海洋沉积物异化铁还原微生物种质资源,为利用微生物异化 Fe()还原过程治理海洋环境污染提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 混合菌群的富集

海底沉积物取自渤海塘沽海域(116°E, 38°N)。富集培养基成分如下(g/L): 葡萄糖 10, 胰蛋白胨 1, NaCl 30, K₂HPO₄ 1.5, L-半胱氨酸 0.5。称取 10 g 污泥样品于 150 mL 血清瓶中,加入 100 mL 富集培养基和 1.0 mL Fe(OH)₃ 溶液(Fe³⁺质量浓度为 12.60 g/L)。泥浆混合物于 120 r/min, 30°C 恒温培养 72 h。1 mL 富集菌液接种于 150 mL 血清瓶中,加入 100 mL 培养基。30°C 培养 48 h 后测定培养液 Fe()的浓度,分析菌群 Fe()还原能力。此步骤重复 3 次,目的在于富集异化铁还原混合菌群。

1.2 Fe(III)还原菌株的分离

Fe()还原培养基(g/L): 葡萄糖 20, 胰蛋白胨 4, 酵母提取物 1, NaCl 30, K₂HPO₄ 1.5, MgCl₂ 0.1, L-半胱氨酸 0.5。10 mL 人工合成的 Fe(OH)₃ 溶液, 琼脂, 15, pH 7.2~7.4。菌株分离采用三层平板法, 步骤如下: 混合菌群稀释 10³ 倍均匀涂布 Fe()还原固体培养基; 待完全吸收, 倒入一层 Fe()还原固体培养基, 冷却凝固后, 倾入一层灭菌固体石蜡达到密闭厌氧目的。30°C 倒置培养 24 h。挑取单菌落于液体 Fe()还原培养基, 30°C 培养 48 h 测定培养液 Fe()的浓度。挑取 Fe()还原效率高的菌株涂布于平板, 此过程重复 5 次, 选取培养液 Fe()浓度高, 即菌株 Fe()还原效率高的菌株进行鉴定。

1.3 Fe(III)还原菌株的鉴定

结合形态观察和 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定。16S rRNA 基因序列分析步骤: DNA 的提取, 16S rRNA 基因的扩增和序列测定。菌株基因组 DNA 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根)的操作步骤进行提取。以基因组 DNA 为模板, PCR 仪(MYCYCLER, 伯乐公司)扩增 16S rRNA 基因, 扩增引物采用细菌通用引物, 序列如下: 27F: 5'-AGAG TTTGATCCATGGCTCAG-3'和 1541R: 5'-AAGGAG GTGATCCAGCC-3'。反应体系采用 50 μL 体系: 10× Buffer 5 μL; 10 mmol/L dNTP 1 μL; 引物 27F 和

1541R 各 1 μL(10 μmol/L); 模板 DNA 1 μL(0.08 μg/μL); TaKaRa Ex Taq(5 U/μL)1 μL; 灭菌蒸馏水 45 μL。反应程序为: 94°C, 4 min; 94°C, 30 s, 56°C, 30 s, 72°C, 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。测序由北京奥科生物工程技术有限公司完成。菌株 16S rRNA 序列在 GenBank 中进行 Blast 同源比对。

1.4 菌株 Fe(III)还原性质分析

Fe()还原菌株按 1:100 比例接种到 150 mL 血清瓶中(含 100 mL Fe()还原培养基), 以不接种菌株(补加 1 mL 蒸馏水)为对照组。血清瓶充氮气 1 min 后, 迅速密封橡皮瓶塞, 30°C, 120 r/min 厌氧培养。间隔 12 h 取样, 测定菌体生长量 OD₆₀₀, 培养液 pH 和 Fe()浓度, 绘制菌株细胞生长和 Fe()还原性质随时间变化曲线。设置不同培养条件, 即碳源: 葡萄糖、乳酸钠、丙酮酸钠、乙酸钠、甲酸钠和丙酸钠, 每种碳源浓度均固定为 20 mmol/L。NaCl 浓度设置为 0、4、30、40、50 和 60 g/L。菌株按 1% 接种于 Fe()还原培养基。120 r/min, 30°C 恒温摇床振荡厌氧培养 72 h 后, 测定菌体生长量 OD₆₀₀, 培养液 pH 值和 Fe()浓度, 分析培养条件对菌株生长和 Fe()还原性质影响。

1.5 分析方法

细胞生长密度是通过分光光度计(UV-1800, 岛津仪器有限公司), 测定培养液在 600 nm 吸收值来表示。pH 值采用酸度计测量(LE501, 梅特勒托利多有限公司)。Fe()还原效率采用邻菲罗啉分光光度法测定培养液 OD₅₁₀ 并计算 Fe()浓度来表示, 具体步骤参考文献^[15]: 吸取 1 mL 培养液, 置于 4 mL 0.5 mol/L 盐酸溶液中, 在 30°C 下静置浸提 24 h, 3 000 g 离心 5 min, 取 100 μL 上清液与 10% 盐酸羟胺, 1 mol/L 乙酸-乙酸钠溶液(pH 5.0)和 0.1% 邻菲罗啉混合, 然后加蒸馏水定容至 5 mL。

2 结果与讨论

2.1 菌株分离和鉴定

海洋沉积物经过 Fe()还原培养基 3 次富集培养, 培养液颜色由最初的深红棕色明显变淡, 测定富集培养液 Fe()浓度是 1.25 mmol/L。这是由于铁还原细菌的 Fe()还原过程所形成^[15], 表明混合菌群具有明显的 Fe()还原性质。经过 5 次平板反复分离, 从 Fe()还原混合菌群中纯化一株 Fe()还原细菌 KB52。光学显微镜形态观察菌株 KB52 为短杆状的革兰氏阴性菌。通过 PCR 扩增和序列测定获得

菌株 KB52 的 16S rRNA 序列(长度 1 453 bp), GeneBank 号 KM233642。16S rRNA 序列在 GenBank 中进行 Blast 搜索同源序列, 发现菌株 KB52 与 *Klebsiella pneumoniae* BR102A 相似性达到 100%。结合形态观察和 16S rRNA 序列分析, Fe()还原菌株 KB52 鉴定为 *Klebsiella* sp. KB52。

2.2 菌株 Fe(III)还原性质分析

在葡萄糖为电子供体, Fe(OH)₃ 为电子受体的厌氧培养条件下, 分析菌株 KB52 的 Fe()还原性质。菌株 KB52 细胞生长和 Fe()还原效率随时间的变化特征, 见图 1。菌株 KB52 在培养 24 h 时进入对数生长期, 培养 48 h 时细胞密度 OD₆₀₀ 达到最高, 为 1.3411±0.02。而对于培养液中不加 Fe(OH)₃ 溶液的对照组, 在不同培养时间内, 菌株 KB52 细胞生长量都有所下降, 细胞生长的 OD₆₀₀ 最高值为 0.8712±0.03。这表明培养液中添加 Fe(OH)₃ 能够提高菌株细胞生长。这可能是由于 Fe()还原细菌的异化 Fe()还原过程对细胞生长具有促进作用^[16]。在培养结束时, 培养液的 pH 值从起始值 7.20 降到 4.93。培养液 pH 下

降可能是由于菌株利用葡萄糖厌氧发酵产生有机酸, 从而导致培养液 pH 降低^[17]。这同时也表明菌株 KB52 是一株厌氧发酵细菌。已报道发酵型异化 Fe()还原细菌包括 *Clostridium beijerinckii*, *Enterococcus gallinarum*, *Bacillus* sp., 它们都是严格厌氧或者兼性厌氧^[18-20]。

Fe()还原实验结果表明, 菌株 KB52 细胞在指数生长后期(36 h), 培养液中累积的 Fe()浓度明显增加。在培养 72 h 时, 培养液中累积的 Fe()浓度可达到 2.74 mmol/L±0.38 mmol/L。菌株细胞 Fe()还原过程主要发生在细胞指数生长后期和稳定静止期。菌株 KB52 细胞生长和 Fe()还原能力呈现比较明显的正相关。这与菌株 *Klebsiella* sp. FD-3 表现出 Fe()还原效率随着细胞生长而增加的研究结果相一致^[21]。而不接种菌株的对照组, 在不同间隔时间内, 培养液中都没有测定出 Fe()的浓度。这表明培养液中 Fe()的累积是由于 Fe()还原菌株 KB52 在利用 Fe(OH)₃ 为电子受体的生长过程中形成, 而在没有菌株的参与下, Fe()还原过程是无法完成的。

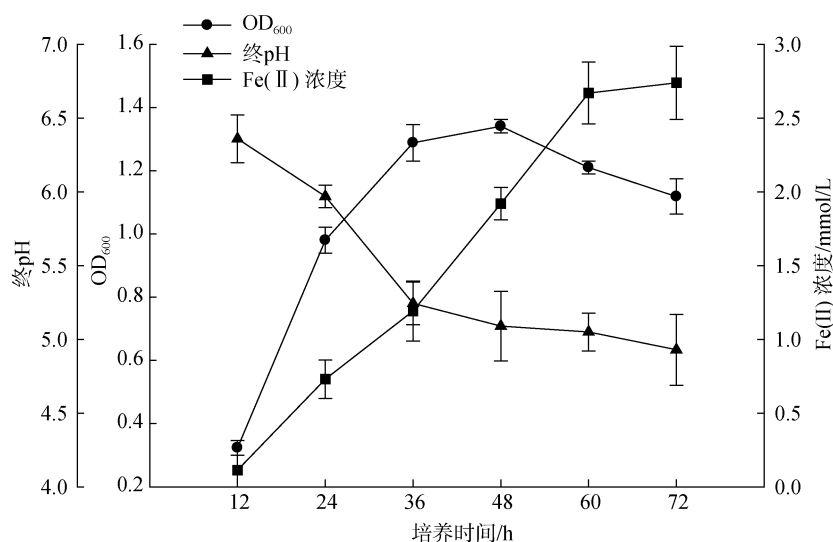


图 1 菌株 KB52 培养过程中 OD₆₀₀, pH 和 Fe()浓度

Fig. 1 Changes in OD₆₀₀, pH value, and Fe() concentration during fermentation of the strain KB52

2.3 碳源对菌株 Fe(III)还原性质的影响

碳源, 如葡萄糖、乳酸钠、丙酮酸钠、乙酸钠、甲酸钠和丙酸钠(浓度为 20 mmol/L)对菌株 KB52 细胞生长和 Fe()还原效率的影响见图 2。以丙酮酸钠和葡萄糖为碳源时, 菌株 KB52 细胞生长比较明显。菌株 KB52 在乙酸钠为碳源的培养条件下, 细胞生长缓慢。在甲酸钠、乳酸钠和丙酸钠的碳源培养条件

下, 菌株 KB52 细胞几乎无法生长。培养结束时, 培养液终 pH 较起始值基本没有变化, 菌株 KB52 不能有效利用甲酸钠等碳源为能量来源进行生长发酵。同时表明菌株 KB52 是一株葡萄糖依赖型发酵细菌。

菌株 KB52 在上述不同碳源培养条件下, Fe()还原效率具有较显著差异。菌株 KB52 以丙酮酸钠为碳源时, 培养液累积 Fe()浓度最高, 达到 4.41 mmol/L±

0.59 mmol/L。菌株 KB52 利用葡萄糖为电子供体时, 其 Fe(II) 还原效率是 Fe(III) 达 2.74 mmol/L±0.38 mmol/L。这与菌株 *Bacillus* sp. 还原 Fe(III) 的效率基本一致^[20]。研究结果进一步证实铁还原细菌能够有效利用丙酮酸钠和葡萄糖作为电子供体进行 Fe(III) 还原^[22]。在乙酸钠为碳源的培养条件下, 菌株 KB52 Fe(III) 还原过程比较微弱, 培养液累积的 Fe(II) 浓度仅为 0.93 mmol/L±0.34 mmol/L。目前关于 Fe(III) 还原细菌能否有效利用乙酸钠进行生长和 Fe(III) 还原的报道存在不同结论。Scala 等^[6]分离 Fe(III) 还原细菌 *Aeromonas* sp. PAR2B 能够有效利用乙酸钠进行细胞生长和 Fe(III) 还原。而 Fe(III) 还原细菌 P4 几乎不能利用乙酸钠作为电子供体还原 Fe(III)^[23]。在以甲酸钠、乳酸钠和丙酸钠为碳源时, 菌株 KB52 几乎无法生长, 同时也无法进行 Fe(III) 还原。

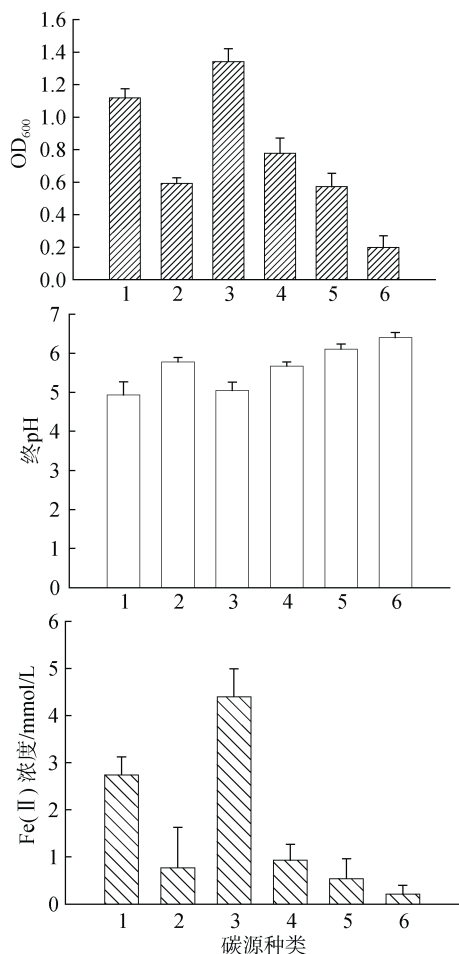


图2 碳源对菌株 KB52 细胞生长和累积 Fe(II) 浓度的影响
Fig. 2 Effects of carbon sources on cell growth and Fe(II) concentration in the strain KB52

1. 葡萄糖; 2. 乳酸钠; 3. 丙酮酸钠; 4. 乙酸钠; 5. 甲酸钠; 6. 丙酸钠
1. glucose; 2. lactate; 3. pyruvate; 4. acetate; 5. formate; 6. propionate

2.4 盐度对菌株 Fe(III) 还原性质的影响

菌株 KB52 分离自海洋沉积物, 沉积物中盐度组成主要是 NaCl。在以丙酮酸钠为碳源的培养基中, 分别设置 NaCl 质量浓度 0、4、30、40、50 和 60 g/L。不同 NaCl 质量浓度对菌株 KB52 生长和 Fe(III) 还原性质的影响见图 3。当 NaCl 质量浓度分别是 4 和 30 g/L 时, 菌株 KB52 细胞的 OD₆₀₀ 值达到 1.4729±0.09 和 1.3417±0.08。菌株 KB52 虽然分离自海洋环境, 但在淡水条件下菌株细胞生长旺盛。当 NaCl 质量浓度为 50 和 60 g/L 时, 菌株 KB52 仍能够继续生长。这表明菌株 KB52 能够适应盐度的剧烈变化而具有较强的耐盐能力。在不同 NaCl 浓度培养条件下, 菌株 KB52 培养液终 pH 较起始 pH 都有不同程度下降。

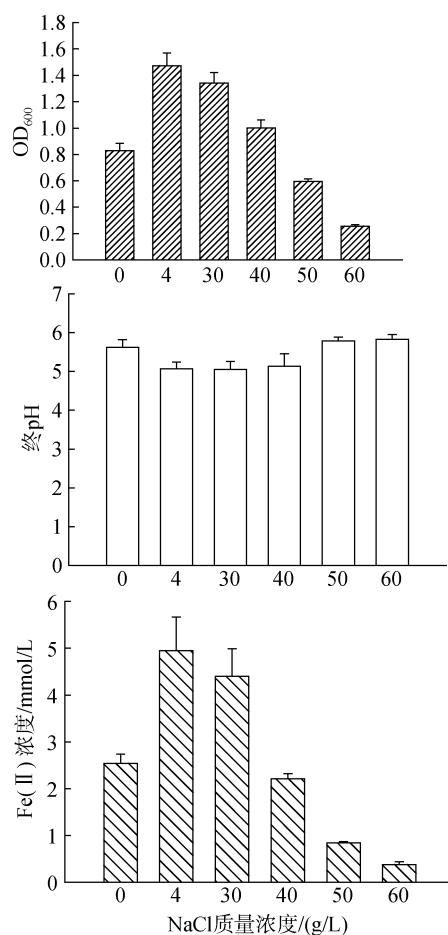


图3 NaCl 质量浓度对菌株 KB52 细胞生长和累积 Fe(II) 浓度的影响

Fig. 3 Effect of NaCl concentration on cell growth and Fe(II) concentration in the strain KB52

菌株 KB52 在设定的 NaCl 浓度范围内都具有 Fe(III) 还原性质。Fe(III) 还原效率和细胞生长变化趋

势基本一致。这也表明菌株 KB52 细胞生长与铁还原过程是同步进行。当 NaCl 质量浓度分别是 4 和 30 g/L 时, 菌株 KB52 培养液累积 Fe() 浓度达到 4.95 mmol/L±0.72 mmol/L 和 4.41 mmol/L±0.59 mmol/L。菌株 KB52 隶属克雷伯氏菌属(*Klebsiella*), 肠杆菌科(Enterobacteriaceae), 许多克雷伯氏菌属细菌已被报道用于铁还原, 产氢和产电研究^[21, 24-25]。这些克雷伯氏菌属细菌主要从淡水环境中获得。本实验菌株 *Klebsiella* sp. 52 分离自海洋环境的沉积物中, 菌株 KB52 在淡水和海水条件下都能够利用以 Fe(OH)₃ 为电子受体进行细胞生长和还原 Fe()。目前, 尚未见从海洋环境中获得该类菌株进行异化 Fe() 还原研究的报道。

3 结论

Fe() 还原细菌 KB52 分离自海洋沉积物, 通过形态观察和 16S rRNA 基因序列分析, 该菌株鉴定为 *Klebsiella* sp. KB52。在葡萄糖为电子供体, Fe(OH)₃ 为电子受体的厌氧培养条件下, 菌株 KB52 细胞生长过程中具有明显的 Fe() 还原性质。分析碳源和 NaCl 浓度对菌株 KB52 细胞生长和 Fe() 还原效率的影响。丙酮酸钠是菌株 KB52 生长和 Fe() 还原的最适碳源。培养结束时, 累积 Fe() 浓度是 4.41 mmol/L±0.59 mmol/L。菌株 KB52 具有较强的耐盐性, 在淡水和海水培养条件下, 菌株 KB52 能够继续生长和还原 Fe()。这表明 Fe() 还原细菌 KB52 可用于近海沉积物中微生物介导异化 Fe() 还原过程。应用于治理海洋环境污染, 还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 黎慧娟, 彭静静. 异化 Fe() 还原微生物研究进展[J]. 生态学报, 2012, 32(5): 1633-1642.
Li Huijuan, Peng Jingjing. Recent advances in studies on dissimilatory Fe()-reducing microorganisms[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(5): 1633-1642.
- [2] 王亚娥, 冯娟娟, 李杰. 不同 Fe() 对活性污泥异化铁还原及除磷影响研究[J]. 中国环境科学, 2013, 33(6): 993-998.
Wang Ya'e, Feng Juanjuan, Li Jie. Phosphorous removal using dissimilatory reduction of different Fe() in activated sludge[J]. China Environmental Science, 2013, 33(6): 993-998.
- [3] Anderson R T, Lovley D R. Hexadecane decay by methanogenesis[J]. Nature, 2000, 404: 722-723.
- [4] Wang A J, Liu L H, Sun D, et al. Isolation of Fe()-reducing fermentative bacterium *Bacteroides* sp. W7 in the anode suspension of a microbial electrolysis cell (MEC) [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35: 3178-3182.
- [5] Lovley D R, Stolz J F, Nord G L, et al. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism[J]. Nature, 1987, 330(6145): 252-254.
- [6] Scala D J, Hacherl E L, Cowan R, et al. Characterization of Fe()-reducing enrichment cultures and isolation of Fe()-reducing bacteria from the Savannah River site, South Carolina[J]. Research in Microbiology, 2006, 157: 772-783.
- [7] 许玫英, 郭俊, 岑英华, 等. 异化 Fe()-还原及其在污染治理中的作用[J]. 微生物学通报, 2007, 34(1): 132-136.
Xu Meiyang, Guo Jun, Cen Yinghua, et al. Dissimilatory Fe()-reduction and its application in contaminants treatment [J]. Microbiology China, 2007, 34(1): 132-136.
- [8] 邢辉, 赵婷婷, 许泽安, 等. 分离自铜矿山尾矿区的铁还原菌 nju-T1 菌株: 菌种鉴定及其还原 Fe³⁺的最适条件[J]. 高校地质学报, 2011, 17(1): 59-65.
Xing Hui, Zhao Tingting, Xu Ze'an, et al. A Study on the ferric reduction microorganism nju-T1 isolated from Shizishan Tailings, Tongling, Anhui Province[J]. Geological Journal of China Universities, 2011, 17(1): 59-65.
- [9] 司友斌, 王娟. 异化铁还原对土壤中重金属形态转化及其有效性影响[J]. 环境科学, 2015, 36(9): 3533-3542.
Si Youbin, Wang Juan. Influence of dissimilatory iron reduction on the speciation and bioavailability of heavy metals in soil[J]. Environmental Science, 2015, 36(9): 3533-3542.
- [10] Canfield D E, Joregensen B B, Fossing H. Pathways of organic carbon oxidation in there continental margin sediment[J]. Marine Geology, 1993, 113: 27-41.
- [11] Iwahori K, Watanabe J, Tani Y, et al. Removal of heavy metal cations by biogenic magnetite nanoparticles produced in Fe()-reducing microbial enrichment cultures[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 117: 333-335.
- [12] Jensen M M, Thamdrup B, Regard S, et al. Rates and regulation of microbial iron reduction in sediments of the Baltic- North Sea transition[J]. Biogeochemistry, 2003, 65(3): 295-317.
- [13] Bongoua-Devisme A J, Mustin C, Berthelin J. Responses of iron-reducing bacteria to salinity and organic matter amendment in paddy soils of Thailand[J]. Pedosphere, 2012, 22, 375-393.
- [14] Bruun A M, Finster K, Gunnlaugsson H P, et al. A comprehensive investigation on iron cycling in a fresh-water seep including microscopy, cultivation and molecular community analysis[J]. Geomicrobiology Journal, 2010, 27(1): 15-34.
- [15] 王伟民, 曲东, 徐佳. 水稻土中铁还原菌的分离纯化及铁还原能力分析[J]. 西北农林科技大学学报, 2008, 36(10): 103-109.
Wang Weimin, Qu Dong, Xu Jia. Isolation of iron-reducing bacteria in paddy soil and its Fe() reduction potential analysis[J]. Journal of Northwest A&F Univer-

- sity, 2008, 36(10): 103-109.
- [16] Lovley D R, Holmes D E, Nevin K P. Dissimilatory Fe () and Mn() reduction[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2004, 49: 219-86.
- [17] 杨生玉, 王刚, 沈永红. 微生物生理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 78-80.
Yang Shengyu, Wang Gang, Shen Yonghong. *Microbial physiology*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 78-80.
- [18] Kim G T, Hyun M S, Chang I S, et al. Dissimilatory Fe () reduction by an electrochemically active lactic acid bacterium phylogenetically related to *Enterococcus gallinarum* isolated from submerged soil[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99: 978-987.
- [19] Garcia-Balboa C, Chion Bedoya I, González F, et al. Bio-reduction of Fe () ores using three pure strains of *Aeromonas hydrophila*, *Serratia fonticola* and *Clostridium celerecrescens* and a natural consortium[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 7864-7871.
- [20] Hobbiea S N, Li X Z, Basena M, et al. Humic substance-mediated Fe() reduction by a fermenting *Bacillus* strain from the alkaline gut of a humus-feeding scarab beetle larva[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35: 226-232.
- [21] Zhou X M, Jing G H, Zheng X J. Reduction of Fe () EDTA by *Klebsiella* sp. strain FD-3 in NO_x scrubber solutions[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 132: 210-216.
- [22] He Z J, Qu D. Dissimilatory Fe () reduction characteristics of paddy soil extract cultures treated with glucose or fatty acids [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(9): 1103-1108.
- [23] 关舒元, 朱超, 王保莉, 等. 铁还原菌株 P4 的碳源利用特征及其系统发育学分析[J]. *西北农林科技大学学报*, 2008, 36(3): 117-123.
Guan Shuyuan, Zhu Chao, Wang Baoli. Characterization of iron reduction using different carbon sources and phylogenetic analysis of Fe()-reducing microorganism P4[J]. *Journal of Northwest A&F University*, 2008, 36(3): 117-123.
- [24] 邬小兵, 徐惠娟, 丛一博, 等. 产酸克雷伯氏菌耐氧产氢及其可溶性氢酶耐氧特性研究[J]. *生物技术*, 2008, 18(4): 50-51.
Wu Xiaobing, Xu Huijuan, Cong Yibo. Study on hydrogen production activity of *Klebsiella oxytoca* HP1 and stability of its soluble hydrogenase under atmosphere with O₂[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 18(4): 50-51.
- [25] 彭月, 朱能武, 聂红燕. 一株克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.) Z6 的分离及其产电特性研究[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(4): 1035-1042.
Peng Yue, Zhu Nengwu, Nie Hongyan. Isolation of an electrogen *Klebsiella* sp. Z6 from anodic biofilm and its electricity-generating characteristics[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(4): 1035-1042.

Isolation and characterization of Fe ()-reducing bacterium *Klebsiella* sp. KB52 from marine sediment

LIU Hong-yan¹, WANG Hong-yu¹, XIE Li-xia¹, WANG Guang-ce²

(1. Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Apr. 17, 2015

Key words: marine sediment; Fe ()-reducing bacterium; *Klebsiella* sp. KB52; Fe () reduction; culture condition

Abstract: In this study, we collected marine sediment from the Bohai Sea in Tanggu, and enriched them for isolation with Fe ()-reducing microbial strains. The bacterium strain KB52 was isolated for high Fe ()-reduction and, using light microscopic examination and 16S rRNA gene sequence analysis, we identified this strain as *Klebsiella* sp. KB52 (GeneBank KM233642). Under anaerobic conditions using glucose as an electron donor and Fe(OH)₃ as an electron acceptor for Fe () reduction, Fe () reduction and cell growth of strain KB52 was synchronous. We investigated the effects of carbon sources, including glucose, lactate, pyruvate, acetate, formate, and propionate, on Fe ()-reducing activity and cell growth in the strain KB52. The results indicated that strain KB52 was able to transfer electrons to Fe () using various carbon sources and showed a higher Fe ()-reducing activity of 4.41 mmol/L±0.59 mmol/L-Fe () by adopting pyruvate. In addition, strain KB52 could grow and reduce Fe () at tested ranges of NaCl concentration from 0 to 60 g/L. It also showed a strong tolerance to salt concentrations. The highest Fe ()-reducing activity of the strain KB52 was 4.95 mmol/L±0.72 mmol/L-Fe () at an NaCl concentration of 4 g/L. Strain KB52 can grow and tolerate Fe ()-reducing activity under fresh water and marine conditions, which indicates that it can be used as a model organism in the study of Fe ()-reducing activity in isolation from the marine environment. Microbial Fe () reduction by this strain will contribute to the purification of pollutants and has application to marine environmental protection.

(本文编辑: 刘珊珊)