

菌株 *Enterococcus* sp. ZQ21 异化还原 Fe(III) 及产氢性质分析

刘洪艳, 李凯强, 康博伦, 覃海华

(天津科技大学 海洋与环境学院, 天津 300457)

摘要: 一些发酵型异化铁还原细菌同时具有异化铁还原与产氢的能力, 该类细菌在环境污染修复的同时能够解决能源问题, 具有广阔应用前景。本文以海洋沉积物中异化铁还原细菌 *Enterococcus* sp. ZQ21 为研究对象, 设置不同形态 Fe(III), 分析菌株 ZQ21 异化铁还原与产氢性质。结果表明, 当氢氧化铁和柠檬酸铁为电子受体时, 菌株 ZQ21 以柠檬酸铁为电子受体时 Fe(III) 还原效率较高, 其酶活性分别为 3.66 U 和 4.40 U。同时, 菌株 ZQ21 在异化铁还原培养体系中具有产氢能力, 以柠檬酸铁和氢氧化铁为电子受体进行厌氧发酵培养时, 体系累积产氢量分别为 (1395.30 ± 4.79) mL/L 和 (174.30 ± 3.23) mL/L, 均显著高于对照组 $[(23.20 \pm 2.09)$ mL/L]。通过液相发酵产物分析, 在柠檬酸铁和氢氧化铁不同形态 Fe(III) 培养条件下, 菌株 ZQ21 分别表现出乙醇型发酵和丁酸型发酵产氢代谢类型。菌株 *Enterococcus* sp. ZQ21 具有异化铁还原和产氢能力, 进一步拓宽发酵型异化铁还原细菌种质资源。

关键词: 菌株 *Enterococcus* sp. ZQ21; 异化还原 Fe(III); Fe(II) 浓度; 产氢量

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2021)03-0379-05

Fe(III) reduction and hydrogen production by Fe(III)-reducing bacterium *Enterococcus* sp. ZQ21

LIU Hong-yan, LI Kai-qiang, KANG Bo-lun, QIN Hai-hua

(College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Some anaerobic fermentation bacteria with simultaneous dissimilatory iron reduction and hydrogen production have been paid more and more attention for dual characteristics of energy-saving and environment-friendliness. A Fe(III)-reducing bacterium, *Enterococcus* sp. ZQ21 isolated from marine sediment was used to analyze the characteristics of microbial Fe(III) reduction coupled to hydrogen production. Strain ZQ21 could reduce Fe(III) with iron reductase activity of 3.66U when iron hydroxide was as electron acceptor. While, using ferric citrate, strain ZQ21 had the higher iron reductase activity of 4.40U. In addition, strain ZQ21 was capable of hydrogen production under the culture condition of Fe(III) reduction. Hydrogen production of strain ZQ21 was (1395.30 ± 4.79) mL/L, which significantly increased hydrogen production compared the control $[(23.20 \pm 2.09)$ mL/L]. According to the gas chromatography analysis, for strain ZQ21, ethanol and butyric acid became the major soluble production when electron acceptors were ferric citrate and iron hydroxide respectively. This result indicates that strain ZQ21 has the ability of high microbial Fe(III) reduction and hydrogen production, which will provide evidence for the application of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria for the characteristics of energy-saving.

Key words: *Enterococcus* sp. ZQ21; Fe(III) reduction; Fe(II) concentration; hydrogen production

收稿日期: 2020-05-09, 修订日期: 2020-07-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(41606157); 天津市自然科学基金项目(16JCYBJC20900); 天津科技大学大学生实验室创新基金项目(1905A201)

作者简介: 刘洪艳(1977-), 女, 吉林通化人, 副教授, 博士, 主要研究方向为海洋环境微生物, E-mail: hongyanliu1214@163.com

铁是一种十分活跃的元素,最常见的价态是+2、+3,在地壳中含量丰富,占地壳总重的5.1%。铁的氧化还原循环是最重要的生物地球化学过程之一^[1]。异化铁还原细菌以有机物作为电子供体,铁氧化物(Fe(Ⅲ))为电子受体,通过氧化电子供体偶联还原Fe(Ⅲ),能够实现Fe(Ⅲ)还原为Fe(Ⅱ)^[2-3]。细菌的异化铁还原过程中还原产物Fe(Ⅱ)累积于细胞外,不进入细胞内参与代谢活动。异化铁还原菌不是一个分类学上的名词,在细菌域中的8个门、13个纲和22个目中都有异化铁还原菌的分布^[4]。目前,关于异化铁还原细菌研究中,希瓦氏菌属*Shewanella* spp.和地杆菌属*Geobacter* spp.最为深入。这两类菌属为代表的异化铁还原细菌,能够直接利用细胞外Fe(Ⅲ)作为电子受体进行还原,并产生能量,即呼吸型异化铁还原细菌^[5]。而一些异化铁还原细菌,如巴氏芽孢梭菌*Clostridium pasteurianum*和多粘芽孢杆菌*Bacillus polymyxa*等,在发酵底物形成小分子有机酸、乙醇及氢气等产物的过程中,同时还原细胞外Fe(Ⅲ),此过程并不产生能量,即发酵型异化铁还原菌^[6]。

自然环境中,异化铁还原细菌能够利用多种形式电子受体,比如U(Ⅳ)、V(Ⅴ)、As(Ⅲ)以及MeHg等多种重金属,进行异化Fe(Ⅲ)还原过程,导致重金属元素的化合价降低或沉淀,实现异化铁还原对重金属污染的生物修复^[7-10]。此外,异化铁还原细菌能够利用很多有机物作为电子供体,如苯、酚、苯甲酸和苯胺等,进行异化铁还原,实现异化铁还原对有机物氧化降解^[11-12]。除了在无机重金属和有机污染环境治理方面的应用,近年来研究者发现异化铁还原菌在生物燃料电池方面同样具有广泛的应用^[13]。异化铁还原细菌*Rhodospirillum rubrum*在生物电池中能够将电子传递到阳极而产生电流^[14]。

研究发现,一些厌氧发酵细菌,如*Clostridium butyricum* EG3和*Clostridium bifermentans* EZ-1,同时具有发酵产氢和异化铁还原能力。在环境污染修复和生物新能源制造方面,具有广阔应用前景。相比呼吸型的异化铁还原菌,发酵型异化铁还原菌在生物新能源的应用研究刚刚起步^[15]。海洋沉积物的特殊厌氧环境有利于富集异化铁

还原细菌,本研究以海洋沉积物一株异化铁还原细菌ZQ21为研究对象,分析菌株异化铁还原和产氢性质,拓宽发酵型异化铁还原微生物在环境污染修复及生物新能源开发中的应用。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

菌株*Enterococcus* sp. ZQ21 (GenBank号MF192756)分离自渤海沉积物,具有较高Fe(Ⅲ)还原效率^[3]。

1.2 菌株的厌氧培养

基础培养基成分(g/L):葡萄糖 10,胰蛋白胨 1.0,酵母提取物 2.0,NaCl 30.0,NaHCO₃ 2.0,K₂HPO₄ 1.5[pH (7.2 ± 0.2)]。为保证无氧培养环境,向血清瓶内充氮气5 min。按1%比例接种菌株ZQ21,厌氧培养72 h,培养温度30℃。每12 h测定细胞生长指标OD₆₀₀及发酵液pH。

1.3 异化铁还原

两种Fe(Ⅲ)形态:可溶性柠檬酸铁和不可溶性氢氧化铁,分别添加到基础培养基中。培养结束时,测定菌体蛋白质含量、发酵液Fe(Ⅱ)浓度以及铁还原酶活性,分析不同电子受体下菌株ZQ21细胞生长和Fe(Ⅲ)还原性质。

1.4 发酵产氢

两种培养条件,即基础成分培养[无Fe(Ⅲ)]和异化铁还原体系培养,测定菌株ZQ21的产氢指标和液相发酵产物,分析异化铁还原细菌产氢的性质。

1.5 分析方法

OD₆₀₀值采用上海光谱752PC型分光光度计测定培养液于600 nm处吸收度。pH采用雷磁PHS-3C型pH计测定。菌体蛋白质含量根据考马斯亮蓝G250染色法测定^[16]。异化还原Fe(Ⅲ)性质通过测定发酵液中产生Fe(Ⅱ)浓度表示,采用邻菲罗啉分光光度法测定Fe(Ⅱ),标准曲线法计算Fe(Ⅱ)浓度^[16]。

铁还原酶活性根据体系中产生的Fe(Ⅱ)浓度来计算^[17]。测定体系以NADH为电子供体,柠檬酸铁为电子受体,在10 mL体系中,1 h 1 mg蛋白产生1 μmol Fe(Ⅱ)为1个酶活单位,用U来表示。氢气含量采用气相色谱(AGILENT

6820)测定,反应条件参考文献[18],填料5 A分子筛(60/80目),柱长2 m,以氮气作为载气,流速30 mL/min;柱温和进样器温度分别为40℃和250℃;检测器为TCD,温度为200℃。产氢量=根据排水法收集的气体总量×氢气含量。液相发酵液组成采用高效液相色谱(Agilent 200)测定,反应条件如文献[18],示差折光检测器;Bio-Rad HPX-87H色谱柱;60℃柱温;流动相是5 mol/L硫酸,流速0.6 mL/min;进样量10 μL。

2 结果与讨论

2.1 菌株的生长

厌氧培养条件下,菌株ZQ21在72 h培养时间内生长曲线见图1。菌株12 h进入对数生长期,培养60 h时细胞密度 OD_{600} 达到最高,为 0.5547 ± 0.013 ,表明菌株ZQ21在厌氧培养条件下生长状况良好。菌株发酵液pH在72 h培养过程中出现明显变化,在培养24 h时pH明显下降,由起始值6.95下降到5.66。随着培养时间延长,培养液pH继续下降,培养36 h时,pH已经下降至4.74。培养过程中发酵液pH的下降是由于菌株厌氧发酵产生有机酸的原因^[19-20]。可见,菌株ZQ21是一株典型的厌氧发酵型细菌。

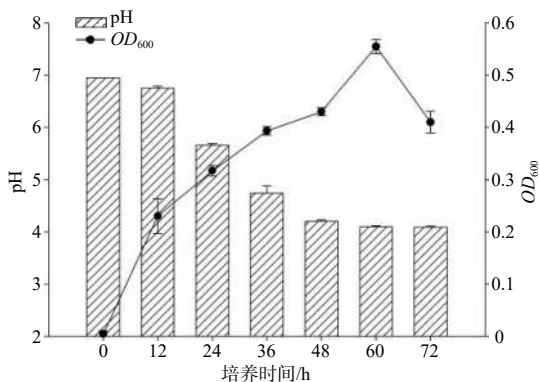


图1 菌株ZQ21生长过程中 OD_{600} 和pH变化

Fig. 1 Variation of OD_{600} and pH of strain ZQ21 during the growth process

2.2 异化铁还原性质

设置电子受体为柠檬酸铁,培养结束后收集菌体,菌体蛋白质含量是 (32.78 ± 0.77) mg/L;而在氢氧化铁为电子受体培养条件下,菌体蛋白质含量是 (20.62 ± 1.15) mg/L。相比较对照组[未添加Fe(III)],异化铁还原培养条件下菌体蛋白

含量都有提高,见图2。表明异化铁培养体系促进菌株ZQ21细胞生长。这是由于Fe(III)还原过程能够促进细胞生长^[21-22]。

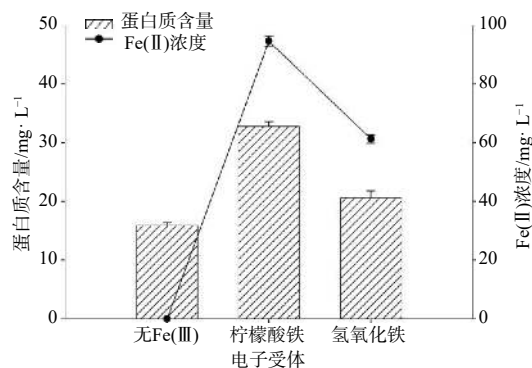


图2 电子受体对菌株ZQ21蛋白质含量和异化铁还原效率的影响

Fig. 2 Effect of electron acceptor on protein content and efficiency of Fe(II) reduction by strain ZQ21

培养液累积产生Fe(II)浓度能够间接表示细菌异化铁还原能力^[23]。当设置柠檬酸铁为电子受体时,产生的Fe(II)浓度较高,达到 (94.54 ± 1.76) mg/L,说明菌株异化铁还原效率较高。这可能是由于可溶性Fe(III)是异化铁还原细菌容易利用的电子受体形式^[24]。

细菌的异化铁还原过程是一种酶促反应,分析铁还原酶活性有利于更充分了解异化铁还原过程。

电子受体对菌株ZQ21铁还原酶活力影响,见表1。当柠檬酸铁作为电子受体及葡萄糖作为电子供体时,菌株ZQ21的铁还原酶活力是4.40 U;而电子受体为氢氧化铁及葡萄糖为电子供体时,菌株的铁还原酶活力为3.66 U。当菌株ZQ21分别以柠檬酸铁和氢氧化铁作为电子受体进行异化铁还原时,细胞生长、异化铁还原和铁还原酶活性均存在差异。这可能是由于Fe(III)形态能够影响异化铁还原细菌呼吸的获能过程^[25]。

表1 电子受体对菌株ZQ21铁还原酶活力影响

Tab.1 Effect of electron acceptor on activity of Fe(III) reductase by strain ZQ21

电子受体	Fe(II)浓度/ mg·L ⁻¹	蛋白含量/ mg·mL ⁻¹	体积/ mL	t/h	酶活力U
柠檬酸铁	64	26	10	1	4.40
氢氧化铁	43	21	10	1	3.66

2.3 产氢性质

2.3.1 产氢量

异化铁还原培养体系中, 菌株 ZQ21 具有产氢的性质(图3)。在不同电子受体培养条件下, 菌株 ZQ21 产氢量存在着较明显差异。当电子受体为柠檬酸铁时, 菌株 ZQ21 累积产氢量达到 (1395.30 ± 4.79) mL/L, 较对照组有显著提高。当电子受体为氢氧化铁时, 菌株产氢量 (174.30 ± 3.23) mL/L, 高于对照组 [产氢量为 (23.20 ± 2.09) mL/L]。由此可见, 在异化铁还原培养体系中菌株 ZQ21 产氢量都显著提高。对比氢氧化铁, 柠檬酸铁为电子受体培养条件下, 菌株 ZQ21 的产氢量与异化 Fe(III) 还原能力分别提高 7 倍和 35%。同样, 游萍等^[26] 研究发现菌株 JX1-25 能够利用氢氧化铁和葡萄糖发酵产氢和 Fe(III) 还原, 而且产氢过程与 Fe(III) 还原过程具有一定相关性。细菌利用葡萄糖为电子供体进行厌氧发酵, 产生还原型 NADH 与 H^+ 。当胞外存在电子受体 Fe(III) 时, 即异化铁还原细菌胞外 Fe(III) 还原与 NADH 的氧化相偶联, NADH 被氧化成 NAD^+ , 同时产生氢气。Park 等^[27] 研究发现, 产氢模式菌株 *Clostridium butyricum* 还具有还原无定形水铁矿中 Fe(III) 的能力。张月超等^[15] 研究发现, 梭菌 *Clostridium bifermentans* EZ-1 具有同时异化铁还原与产氢性质, 利用柠檬酸铁为电子受体, 累积 Fe(II) 浓度和产氢量为 20 mmol/L, 1.11 mol H_2 /mol 葡萄糖。同

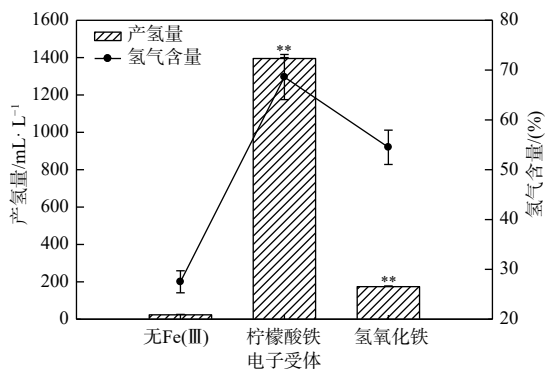


图3 电子受体对异化铁还原细菌 ZQ21 产氢性质影响 (**, $p < 0.01$ 极显著)

Fig. 3 Effect of electron acceptor on characteristics of hydrogen production by Fe(III)-reducing strain ZQ21 (**, $p < 0.01$ extremely significant)

样, 梭菌 *Clostridium saccharobutylicum* BS2 以氢氧化铁为电子受体的异化铁还原过程累积产生 Fe(II) 浓度为 12 mmol/L, 可产生氢气量 0.38 mol/mol 葡萄糖^[23]。而菌株 *Clostridium butyricum* 以氧化铁为电子受体的异化铁还原过程累积产氢量可达 2.20 mol/mol 葡萄糖^[28]。

可见, 梭菌属发酵型异化铁还原细菌具备同时厌氧发酵产氢与异化 Fe(III) 还原能力。菌株 ZQ21 属于肠球菌属, 目前未见关于该菌属同时产氢与异化铁还原能力的相关报道。这可能由于发酵型异化铁还原细菌研究相对比较少。

2.3.2 液相发酵产物

厌氧培养结束, 分析菌株 ZQ21 液相发酵代谢产物, 见图4。菌株 ZQ21 在基础培养条件下 [未添加 Fe(III)] 发酵液成分主要是甲酸, 含量为 420 mL/L。菌株 ZQ21 在异化铁培养体系中 (柠檬酸铁和氢氧化铁) 发酵液成分主要是乙醇和丁酸, 含量分别为 284 mL/L 和 140 mL/L。

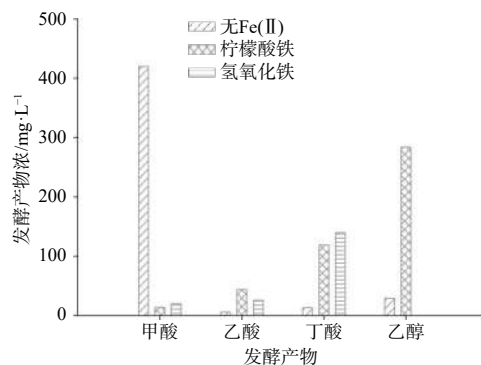


图4 电子受体对菌株 ZQ21 液相发酵产物的影响

Fig. 4 Effect of electron acceptor on liquid fermentation products by strain ZQ21

微生物厌氧发酵制氢的代谢类型主要有丁酸型发酵和乙醇型发酵, 两者都具有较高的产氢效率^[29]。以柠檬酸铁为电子受体时, 菌株 ZQ21 高产氢量与其乙醇型产氢代谢类型存在密切的关系。菌株 ZQ21 在氢氧化铁培养体系中具有较高的产量, 这是由于其属于丁酸型发酵。而在基础培养条件下 [未添加 Fe(III)] 菌株 ZQ21 是甲酸型发酵, 表现出微弱产氢现象。

3 结论

异化铁还原细菌 *Enterococcus* sp. ZQ21 分离

自海洋沉积物。在异化铁还原培养体系中, 菌株 ZQ21 能够以柠檬酸铁和氢氧化铁为电子受体进行异化铁还原及产氢。在异化铁培养条件下, 菌株 ZQ21 的生长和产氢量明显增加。柠檬酸铁为电子受体时, 菌株的产氢量相比对照组提高 60 倍; 在氢氧化铁为电子受体时, 相比对照组, 菌株的产氢量提高 6.5 倍。液相发酵产物分析结果表明, 菌株 ZQ21 在柠檬酸铁及氢氧化铁为电子受体培养条件下发酵类型分别是乙醇型和丁酸型。菌株 ZQ21 是目前为止被发现的第一种能够利用 Fe(III) 同时进行异化铁还原和产氢的肠球菌属细菌, 关于该菌株的研究将拓宽发酵型异化铁还原细菌的种质资源, 推动相关生物能源开发的研究进程。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] TAYLOR K G, KONHAUSER K O. Iron in Earth surface systems: A major player in chemical and biological processes[J]. *Elements*, 2011, 7(2): 83-88.
- [3] 刘洪艳, 覃海华, 王珊. 海洋沉积物中一株铁还原细菌 ZQ21 异化还原 Fe(III) 性质分析[J]. *海洋环境科学*, 2019, 38(4): 508-512, 520.
- [4] 黄灿, 郭红东, 何清明, 等. 异化 Fe(III) 还原酶促反应及调控机制的研究进展[J]. 生态学杂志, 2009, 28(7): 1381-1387.
- [5] 黎慧娟, 彭静静. 水稻土中铁还原菌多样性[J]. 应用生态学报, 2011, 22(10): 2705-2710.
- [6] LOVLEY D R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction[J]. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(2): 259-287.
- [7] SHEN Y H, ZHENG X Y, WANG X Y, et al. The biomineralization process of uranium (VI) by *Saccharomyces cerevisiae*-transformation from amorphous U(VI) to crystalline chernikovite[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(9): 4217-4229.
- [8] 段骏, 贾蓉, 曲东. 厌氧培养体系中 V(V) 与 Fe(III) 还原之间的电子竞争[J]. 水土保持学报, 2014, 28(3): 264-270.
- [9] AMSTAETTER K, BORCH T, LARESE-CASANOVA P, et al. Redox transformation of arsenic by Fe(II)-activated goethite (α -FeOOH)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(1): 102-108.
- [10] SI Y B, ZOU Y, LIU X H, et al. Mercury methylation coupled to iron reduction by dissimilatory iron-reducing bacteria[J]. *Chemosphere*, 2015, 122: 206-212.
- [11] 李光玉, 曾湘, 邵宗泽. 南大西洋中脊热液区异化铁还原微生物及其矿化产物分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(7): 1295-1306.
- [12] 刘娟, 朱茂旭, 姬泓巍. 胶州湾沉积物中微生物可还原 Fe(III) 的定量评价及早期成岩作用意义[J]. 中国海洋大学学报, 2013, 43(11): 64-70.
- [13] BOND D R, HOLMES D E, TENDER L M, et al. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments[J]. *Science*, 2002, 295(5554): 483-485.
- [14] CHAUDHURI S K, LOVLEY D R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(10): 1229-1232.
- [15] 张月超, 肖雷, 王欧美, 等. 异化铁还原梭菌 *Clostridium bifermentans* EZ-1 产氢与电化学特性[J]. 微生物学报, 2018, 58(4): 525-537.
- [16] 刘洪艳, 王珊. 海洋沉积物中异化铁还原细菌还原重金属 Cr(VI) 研究[J]. *海洋科学*, 2019, 43(5): 19-26.
- [17] WANG J C, LIN Y, SUN B L. Localization and characterization of Fe(III) reductase of *Desulfovibrio dechloracetivorans* strain SF3[J]. *Journal of University of Science and Technology of China*, 2009, 39(4): 337-343.
- [18] 覃海华. 异化铁还原对重金属形态转化及其产氢过程研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2018.
- [19] 孙青民, 刘威, 姚红. 屎肠球菌产生有机酸降低琼脂胶凝作用[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(11): 1252-1257.
- [20] 唐婧, 李光昊, 付璞玉, 等. 电刺激对 *Ethanoligenens harbinense* B49 产氢菌生长代谢的促进作用[J]. 安全与环境学报, 2019, 19(4): 1406-1410.
- [21] SALAS E C, BERELSON W M, HAMMOND D E, et al. The impact of bacterial strain on the products of dissimilatory iron reduction[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2010, 74(2): 574-583.
- [22] 刘洪艳, 王珊. 异化铁还原细菌 *Klebsiella* sp. KB52 还原重金属 Cr(VI)[J]. *环境工程学报*, 2019, 13(5): 1113-1118.
- [23] LEHOURS A C, RABET M, MOREL-DESROSIERES N, et al. Ferric iron reduction by fermentative strain BS2 isolated from an iron-rich anoxic environment (Lake Pavin, France)[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2010, 27(8): 714-722.
- [24] 李曦, 曾湘, 张昭, 等. 深海嗜热异化铁还原菌 *Caloranaerobacter ferrireducens* DY22619^T 对不同铁氧化物的铁还原特性[J]. 海洋学报, 2016, 38(8): 83-92.
- [25] 覃海华, 忻宏蔚, 刘洪艳. 不同电子受体下铁还原细菌异化还原 Fe(III) 性质及菌群特征[J]. 生态学杂志, 2018, 37(6): 1759-1764.
- [26] 游萍, 贾蓉, 乔莎莎, 等. 碳源浓度对微生物发酵产氢及铁还原特征的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(4): 722-727.
- [27] PARK H S, KIM B H, KIM H S, et al. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell[J]. *Anaerobe*, 2001, 7(6): 297-306.
- [28] BECKERS L, HILIGSMANN S, LAMBERT S D, et al. Improving effect of metal and oxide nanoparticles encapsulated in porous silica on fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum*[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 109-117.
- [29] 昌盛, 刘枫, 李建政. 对比分析 HRT 对 ACR 乙醇型和丁酸型发酵制氢系统的影响[J]. 环境科学学报, 2016, 36(4): 1266-1272.