

不同形态铁对脱色希瓦氏菌 S12 偶氮还原的影响

陈杏娟^{1,2,3,4}, 许玫英^{2,3}*, 孙国萍^{2,3}

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301; 2. 广东省微生物研究所, 广州 510070; 3. 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070; 4. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 以脱色希瓦氏菌(*Shewanella decolorationis*) S12 为材料, 研究了不同形态铁对其厌氧偶氮还原的影响. 结果表明, Fe(III) 对偶氮还原的影响与其形态及浓度直接相关. 不可溶性 Fe(III) 对偶氮还原表现延缓作用, 0.05 ~ 2 mmol/L 的 Fe_2O_3 均延缓 0.2 mmol/L 的苋菜红还原, 但作用效果不随 Fe_2O_3 浓度的增加而成比例强化. 而对于可溶性 Fe(III) , 0.4 mmol/L 浓度以下对 0.2 mmol/L 的苋菜红还原具有一定的促进作用, 作用效果与其浓度变化不呈线性关系. 1 mmol/L 浓度以上则表现为抑制作用, 浓度越高其抑制作用越强, 这种现象在电子供体不足的情况下尤为明显. 进一步研究发现, 可溶性 Fe(II) 和 Fe(III) 均具有缓解双香豆素对醌循环的抑制作用而促进偶氮还原. 由此推测, 可溶性铁对偶氮还原的促进作用是由于这些化合物的细胞透过性, 在低浓度条件下形成 $\text{Fe(II)} \leftrightarrow \text{Fe(III)}$ 氧化还原循环, 充当电子传递的中间媒介, 通过发挥电子穿梭功能从而促进细菌的偶氮还原. 而高浓度条件下可溶性 Fe(III) 优先大量接受来自电子供体的电子而与偶氮化合物竞争, 其电子穿梭功能被掩盖, 从而抑制偶氮还原. 对于不可透过细胞的不可溶性 Fe(III) , 只是作为胞外电子受体与强极性的偶氮化合物竞争电子从而仅仅呈现延缓作用. 通过对铁的形态及浓度的适当选择与控制可以获得更高效的偶氮还原效率.

关键词 Fe(III) 还原; 偶氮还原; 电子传递媒介; 竞争抑制; *Shewanella decolorationis* S12

中图分类号 X172 **文献标识码** A **文章编号** 0250-3301(2010)01-0230-07

Effects of Iron on Azoreduction by *Shewanella decolorationis* S12

CHEN Xing-juan^{1,2,3,4}, XU Mei-ying^{2,3}*, SUN Guo-ping^{2,3}

(1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China; 4. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The effects of soluble and insoluble Fe(III) on anaerobic azoreduction by *Shewanella decolorationis* S12 were examined in a series of experiments. Results showed that the effects of iron on anaerobic azoreduction depended on the solubility and concentration of the compounds. Azoreduction was inhibited by insoluble Fe(III) and 0.05-2 mmol/L Fe_2O_3 all decelerated the azoreduction activity of 0.2 mmol/L amaranth, but the increase in the concentrations of Fe_2O_3 did not cause an increasing inhibition. Soluble Fe(III) of which concentration less than 0.4 mmol/L enhanced azoreduction activity of 0.2 mmol/L amaranth but there was no linear relationship between the concentration of soluble Fe(III) and azoreduction activity. Soluble Fe(III) of which concentration more than 1 mmol/L inhibited azoreduction activity of 0.2 mmol/L amaranth and an increasing concentration resulted in an increased inhibition. The inhibition was strengthened under the conditions of limited electron donor. On the other hand, soluble Fe(III) and Fe(II) could relieve the inhibition of azoreduction by dicumarol which blocked quinone cycle. It suggests that in addition to quinone cycle, there is a $\text{Fe(III)} \leftrightarrow \text{Fe(II)}$ cycle shuttling electrons in cytoplasmic and periplasmic environment. That is the reason why low concentration of soluble Fe(III) or Fe(II) can enhance azoreduction of *S. decolorationis* S12. It also indicates that insoluble Fe(III) and high concentration of soluble Fe(III) do compete with azo dye for electrons once it acts as electron acceptor. Thus, when iron and azo dye coexisted, iron could serve as an electron transfer agent or electron competitive inhibitor for anaerobic azoreduction under different conditions. High efficiency of azoreduction can be achieved through controlling the solubility and concentration of irons.

Key words Fe(III) reduction; azoreduction; electron transfer agent; competitive inhibition; *Shewanella decolorationis* S12

在厌氧条件下, 微生物可以利用多种物质作为末端电子受体进行呼吸和生长. 能被微生物利用的末端电子受体多种多样, 典型的如 Fe(III) 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 Mn(IV) 、延胡索酸^[1], 以及新发现的腐殖质^[2]和氯化物^[3]等. 其中, 以 Fe(III) 为末端电子受体的厌氧 Fe(III) 呼吸是一种古老的呼吸方式, 电子供体通过脱氢酶氧化释放电子在呼吸链上传递, 并最终到

达 Fe(III) 使其还原为 Fe(II) , 同时伴随能量的产生以支持细菌生长^[4]. 同样, 含有偶氮键的偶氮化合物

收稿日期 2009-02-24 **修订日期** 2009-04-13

基金项目 国家自然科学基金项目(30500009, 30670020); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA06Z322); 广东省自然科学基金项目(06020226); 广东省自然科学基金研究团队项目(9351007002000001)

作者简介 陈杏娟(1981~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: xingjuan_chen@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: meiying_xu@yahoo.com.cn

在厌氧条件下也可以作为末端电子受体,在接受电子后还原成芳香胺化合物^[5~8],并且产生能量耦联细菌生长.偶氮还原作为一种新的细菌厌氧呼吸方式已被证实^[9],多种能促进电子传递的氧化还原中间体均可明显地加强偶氮还原^[10].

对于能利用多种物质作为电子受体进行厌氧呼吸的微生物来说,电子从脱氢酶产生后进入网络化的呼吸链并最终到达不同的末端电子受体,它们之间存在一定的相互关系.目前国际上关于不同末端电子受体相互作用的研究多集中在硝酸呼吸和 Fe(Ⅲ)呼吸. Dichristina^[11] 和 Coby 等^[12] 研究发现硝酸盐和亚硝酸盐对 *Shewanella putrefaciens* 200 和 *Paracoccus denitrificans* 的 Fe(Ⅲ)呼吸存在竞争抑制作用.而 Rafii 等^[13] 在酶学水平对 *Clostridium perfringens* 进行的研究表明,硝基芳香烃竞争抑制偶氮还原酶的活性.这些研究都表明某些厌氧呼吸的末端电子受体之间存在电子竞争作用.而对于新近证实的厌氧偶氮呼吸和古老的厌氧 Fe(Ⅲ)呼吸之间的相互关系,目前国际上尚鲜见报道.

希瓦氏菌属的细菌由于具有利用多种多样高价态金属及其氧化物和有机污染物作为电子受体进行厌氧呼吸的能力,目前已被广泛用于环境生物修复的理论研究和实际应用^[14].脱色希瓦氏菌(*Shewanella decolorationis*) S12 是本实验室分离鉴定的希瓦氏菌新种^[15],同样能利用多种电子受体进行厌氧呼吸^[9,15,16].其中,厌氧 Fe(Ⅲ)呼吸和偶氮呼吸的能力尤为明显,2 种过程可以同时进行,在呼吸链电子传递水平上存在相互关系.在电子传递水平开展研究,将为合理有效利用 Fe(Ⅲ)治理偶氮化合物引起的环境污染问题、提高生物修复效率提供科学理论指导.本实验着重从电子传递过程研究不同形态铁对脱色希瓦氏菌 S12 厌氧偶氮还原的影响,发现铁的存在形态及浓度对偶氮还原的影响是有规律的,通过对铁的形态和浓度的适当选择与控制可以获得更高效的偶氮还原效率.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

脱色希瓦氏菌(*Shewanella decolorationis*) S12 是本实验室从广州某印染厂废水处理系统的活性污泥中分离纯化得到的希瓦氏菌新种^[17],该菌株已保藏于中国典型培养物保藏中心(保藏号为 CCTCC M203093^T)和日本东京大学应用微生物研究所(保藏

号为 IAM 15094^T).

1.1.2 培养基

好氧生长 LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L;酵母抽提物 5 g/L;NaCl 5 g/L.

厌氧还原培养基:Na₂HPO₄·12H₂O 5.7 mmol/L;KH₂PO₄ 3.3 mmol/L;NH₄Cl 18.0 mmol/L.矿物质元素和维生素各 10 mL/L^[18];半胱氨酸 0.02 g/L;添加一定量甲酸钠为电子供体;一定量苋菜红或 Fe(Ⅲ)为电子受体.

1.1.3 主要试剂和仪器

偶氮染料苋菜红(Amaranth) :C. I. 16185,最大吸收峰为 520nm;电子传递抑制剂 rotenone(鱼藤酮)、dicumarol(双香豆素)和 stigmatellin(标桩菌素)均购自 Sigma 公司,为分析纯,电子传递抑制剂的特性见表 1. DU640 紫外分光光度计(Beckman 公司). Bugbox 厌氧工作站(Ruskinn 公司).

表 1 电子传递抑制剂的使用浓度范围、溶剂和抑制位点

Table 1 Concentration range, solvent and inhibition site or action of electron transport inhibitors			
抑制剂	使用浓度范围 /mol·L ⁻¹	溶剂	抑制位点
鱼藤酮	1×10 ⁻⁵ ~3×10 ⁻⁴	乙醇	NADH 脱氢酶
CuCl ₂	1×10 ⁻⁶ ~1×10 ⁻⁴	水溶液	脱氢酶(氢酶)
双香豆素	5×10 ⁻⁵ ~2×10 ⁻⁴	NaOH 水溶液	甲基萘醌
标桩菌素	1×10 ⁻⁵ ~1×10 ⁻⁴	乙醇	细胞色素 bc 复合物
NaN ₃	1×10 ⁻⁵ ~5×10 ⁻⁴	水溶液	细胞色素氧化酶

1.2 静息细胞培养

离心收集 LB 过夜培养细胞,用 0.07 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.4)洗涤 2 次后重悬于磷酸缓冲液中制成菌悬液(A₆₀₀≈0.4),然后以 1% 接种量把菌悬液接种于厌氧培养基中,充入氮气 5 min 后,置于厌氧工作站中 33℃静置培养.在培养基中除甲酸钠作为电子供体以外,不含有提供细胞增殖的碳源物质,使 S12 菌仅保持进行呼吸代谢而不能繁殖的状态,从而消除由于细胞量增多所引起的苋菜红还原加速的现象.

1.3 偶氮染料还原率的测定

每间隔一定时间取出一定量的培养液于 12 000 r/min 离心 1 min 去除菌体,然后测定苋菜红染料最大吸收峰 520 nm 下的吸光值,并以不加菌的培养基为对照,计算染料的还原率.

染料还原率 = (A - B) / A

式中,A 为不加菌的培养基上清液的吸光值;B 为培养一定时间的培养基上清液的吸光值.

1.4 Fe(Ⅱ)浓度及Fe(Ⅲ)还原率的测定

每间隔一定时间取出一定量的培养液于12 000 r/min离心1 min去除菌体,然后采用邻菲罗啉分光光度法^[19]测定510 nm下的吸光值,以此值反映培养基中Fe(Ⅱ)的浓度.以不加菌的培养基为对照,所测得Fe(Ⅱ)的浓度与无菌培养基中原Fe(Ⅱ)浓度之差,除以培养基中总铁浓度的百分比,即为Fe(Ⅲ)的还原率.

1.5 电子传递抑制剂对偶氮还原和Fe(Ⅲ)还原的作用效果

按不同浓度添加电子传递抑制剂于各培养基中,并以加入电子传递抑制剂的助溶剂而不含电子传递抑制剂的培养基为对照,按上述1.3和1.4的方法测定偶氮还原率和Fe(Ⅲ)还原率,以扣除了对照组的还原率为最终还原率来反映电子传递抑制剂的作用效果.

1.6 Fe(Ⅱ)和Fe(Ⅲ)对偶氮还原的影响

分别将不同浓度的氯化亚铁、柠檬酸铁和三氧化二铁加入到含一定浓度偶氮化合物的培养基中,加入不同量的甲酸钠为电子供体进行厌氧培养.分别在相同的时间间隔点取样,测定偶氮还原在520nm的吸光值,进而分析不同浓度Fe(Ⅱ)和Fe(Ⅲ)以及不同状态Fe(Ⅲ)对希瓦氏菌厌氧偶氮还原的影响.

2 结果与分析

2.1 可溶性Fe(Ⅲ)对偶氮还原的作用

2.1.1 电子供体不足条件下可溶性Fe(Ⅲ)对偶氮还原的影响

在培养基中同时加入0.2 mmol/L苋菜红和0.2 mmol/L柠檬酸铁作为电子受体进行厌氧培养,分别添加不同浓度甲酸钠作为电子供体,观察苋菜红的还原速率.结果发现,当甲酸钠浓度>0.6 mmol/L时,偶氮还原能够顺利进行,苋菜红在12 h脱色完全;当甲酸钠浓度为0.6 mmol/L时,偶氮还原率在12 h达到了85%,而当甲酸钠浓度降低至0.4 mmol/L时,偶氮还原率在12 h只达到50%.对于甲酸钠浓度<0.4 mmol/L的情况,在12 h内基本没有检测出苋菜红的脱色,偶氮还原受到抑制(图1).理论上,还原0.2 mmol/L苋菜红和0.2 mmol/L柠檬酸铁分别需要0.4 mmol/L和0.2 mmol/L电子供体.当电子供体少于0.4 mol/L时苋菜红没有得到足够的电子,同时Fe(Ⅲ)的还原也在消耗电子,电子供体不足导致偶氮还原不能顺利进行.由此可见,当Fe(Ⅲ)和苋菜红

作为电子受体同时存在时,两者对电子供体所提供的电子存在一定的竞争性,只有当电子供体提供充足电子流可以满足同时还原2种电子受体时,偶氮还原才能顺利进行.

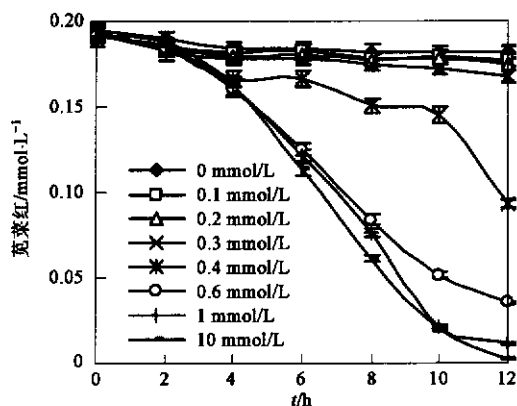


图1 不同浓度电子供体甲酸钠条件下等物质的量的可溶性Fe(Ⅲ)对脱色希瓦氏菌S12偶氮还原的作用效果

Fig.1 Effects of equal mole of soluble Fe(Ⅲ) on azoreduction by *S. decolorationis* S12 under conditions of different concentrations of formate

2.1.2 电子供体充足条件下可溶性Fe(Ⅲ)对偶氮还原的影响

在添加足够量的甲酸钠(10 mmol/L)作为电子供体的条件下,研究不同浓度的可溶性Fe(Ⅲ)对0.2 mmol/L苋菜红还原的影响.结果发现,可溶性Fe(Ⅲ)在低浓度条件下可促进偶氮还原,而在高浓度条件下则由于具有较高氧化还原电势优先利用电子而抑制偶氮还原.当柠檬酸铁浓度<0.4 mmol/L时可明显加快偶氮还原速率,但是偶氮还原速率的加快与可溶性Fe(Ⅲ)浓度变化并不呈线性关系.实验过程中0.2 mmol/L和0.4 mmol/L柠檬酸铁对偶氮还原的促进作用最强,而0.05 mmol/L和0.1 mmol/L柠檬酸铁作用相当,对偶氮还原的促进作用较前2种浓度弱.当Fe(Ⅲ)浓度提高至1 mmol/L时,Fe(Ⅲ)的存在开始减缓偶氮还原作用,浓度越高其延缓作用越强.当浓度达到2 mmol/L时则完全抑制偶氮还原,在10h内基本没有检测出偶氮还原活性,与没有接种菌体的对照组的结果相似(图2).10h以后继续测定偶氮还原活性,其还原率基本维持在10%,在测试时间内没有明显变化.由此可见,在电子供体充足的条件下,高浓度可溶性Fe(Ⅲ)主要表现为与苋菜红竞争电子从而抑制偶氮还原.

2.2 可溶性铁的氧化还原循环作为电子传递媒介对偶氮还原的影响

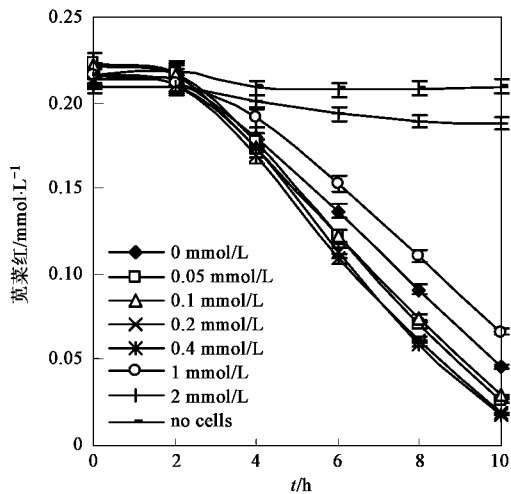


图 2 充足电子供体条件下不同浓度可溶性Fe(Ⅲ)对脱色希瓦氏菌 S12 偶氮还原的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of soluble Fe(Ⅲ) on azoreduction by *S. decolorationis* S12 under conditions of sufficient electron donor

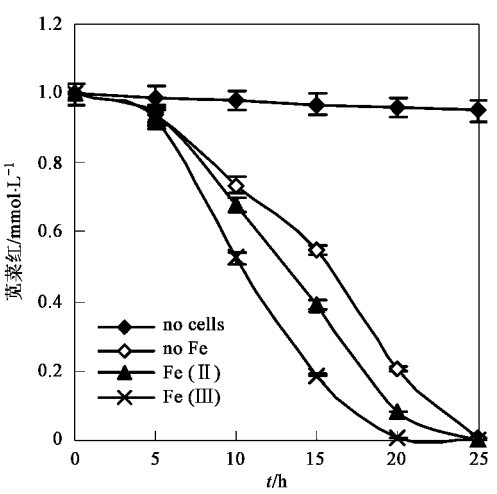


图 3 可溶性 Fe(Ⅱ)和 Fe(Ⅲ)对脱色希瓦氏菌 S12 偶氮还原的促进作用

Fig.3 Effects of soluble Fe(Ⅱ) and Fe(Ⅲ) on azoreduction by *S. decolorationis* S12

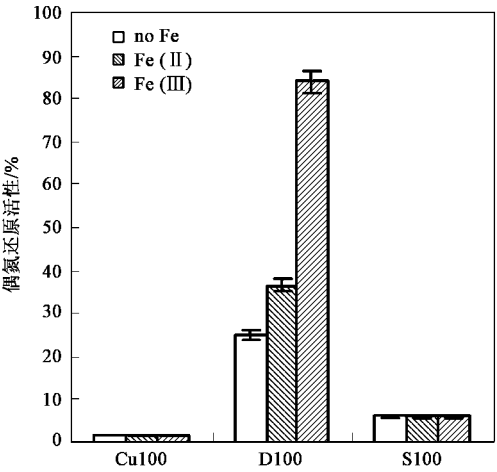
2.2.1 可溶性Fe(Ⅱ)氧化和Fe(Ⅲ)还原对偶氮还原的作用

在 10 mmol/L 甲酸钠作为电子供体的条件下,向 1 mmol/L 苋菜红的偶氮还原系统中添加 0.4 mmol/L 氯化亚铁时,同样观察到与可溶性Fe(Ⅲ)促进偶氮还原类似的现象.但相同浓度的Fe(Ⅲ)的促进作用比Fe(Ⅱ)明显.而此时,在没有接种菌体、同时没有添加Fe(Ⅱ)和Fe(Ⅲ)的对照组实验中则没有观察到苋菜红脱色的现象(图 3).这说明柠檬酸铁及氯化亚铁对偶氮还原的促进作用依赖细菌细胞,不是由化学反应引起的.此外,由于反应系统中 S12 菌处于静息细胞培养条件,尽管偶氮呼吸产生 ATP 但由于没有提供碳源物质,细菌菌体无法繁殖而只处于一种基础呼吸代谢水平.由此可见,氯化亚铁和柠檬酸铁对偶氮还原的促进作用并不是由于细菌数量的增多引起的,而是因为Fe(Ⅲ)还原和Fe(Ⅱ)氧化这一循环过程有利于促进呼吸代谢的电子产生或传递而导致偶氮还原的加速.

2.2.2 可溶性Fe(Ⅱ)和Fe(Ⅲ)缓解双香豆素对偶氮还原的抑制作用

为了进一步明确可溶性Fe(Ⅱ)和Fe(Ⅲ)在偶氮还原过程中的作用,在可溶性铁存在条件下分别添加 CuCl₂、双香豆素(dicumarol)和标桩菌素(stigmatellin)等电子传递抑制剂,监测偶氮还原效率.结果发现,氯化亚铁和柠檬酸铁可在一定程度上缓解双香豆素对偶氮还原的抑制作用.当向添加了

双香豆素的脱色反应系统中补充 0.4 mmol/L 的氯化亚铁或 0.4 mmol/L 柠檬酸铁后,1 mmol/L 苋菜红的偶氮还原率由原来的 25.1% 分别上升为 36.4% 和 83.9%(图 4).双香豆素作为甲基萘醌的专一性抑制剂,能阻断甲基萘醌由氧化态向还原态转化,从而中断电子的传递^[20].当醌循环受到抑制时,可溶性Fe(Ⅱ)和Fe(Ⅲ)可有效缓解这种抑制作用,说明Fe(Ⅱ)和Fe(Ⅲ)之间的氧化还原循环具有穿梭电子的效应,可以替代受抑制的醌循环,从而使呼吸链上



Cu100 : CuCl₂ 100 μmol/L ; D100 : 双香豆素 100 μmol/L ; S100 : 标桩菌素 100 μmol/L

图 4 可溶性 Fe(Ⅱ)和 Fe(Ⅲ)缓解双香豆素对脱色希瓦氏菌 S12 偶氮还原的抑制作用

Fig.4 Soluble Fe(Ⅱ) and Fe(Ⅲ) relieve the inhibition of dicumarol on azoreduction by *S. decolorationis* S12

电子传递得以顺利进行.

2.3 不可溶性Fe(Ⅲ)作为电子竞争者对偶氮还原的影响

在 10 mmol/L 甲酸钠为电子供体、0.2 mmol/L 苋菜红为电子受体的偶氮还原培养基中,添加不同浓度的不可溶性 Fe_2O_3 ,研究不可溶性 Fe(Ⅲ) 对偶氮还原的影响.结果发现,不可溶性 Fe_2O_3 对偶氮还原的作用与可溶性 Fe(Ⅲ) 存在一定的差异.不同浓度的 Fe_2O_3 对 0.2 mmol/L 苋菜红的还原脱色均表现出延缓作用(图 5),这种延缓作用并没有随着 Fe_2O_3 浓度的增加而成比例的强化.测定培养基中的 pH,发现 Fe_2O_3 的加入并没有引起 pH 的变化.推测 Fe_2O_3 对偶氮还原的抑制作用是由于不可溶性 Fe(Ⅲ) 和苋菜红这种强极性化合物均作为胞外电子受体而各自竞争电子.

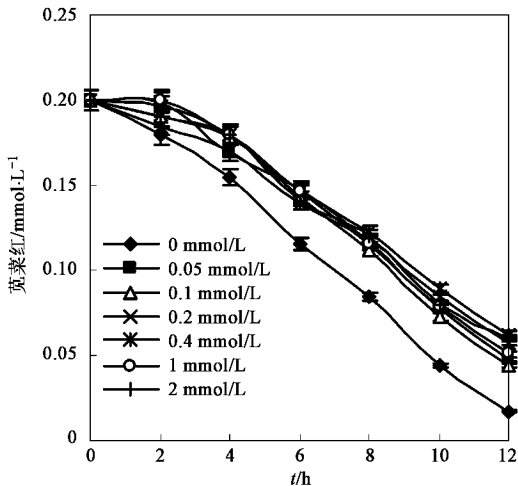


图 5 不同浓度 Fe_2O_3 对脱色希瓦氏菌 S12 偶氮还原的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of Fe_2O_3 on azoreduction by *S. decolorationis* S12

3 讨论

在厌氧条件下脱色希瓦氏菌 S12 可以利用偶氮化合物作为末端电子受体进行偶氮呼吸^[9],接受电子后还原为相应的芳香胺化合物^[21, 22],本实验重点研究了可同样作为末端电子受体的 Fe(Ⅲ) 对其偶氮还原的影响.结果表明,在电子供体不足的情况下, Fe(Ⅲ) 的存在明显抑制偶氮还原;而当电子供体充足时,可溶性 Fe(Ⅲ) 对偶氮还原的影响则与其浓度直接相关.在低浓度条件下,可溶性 Fe(Ⅲ) 对偶氮还原表现出一定的促进作用,但作用效果与其浓度不呈线性关系.而高浓度的可溶性 Fe(Ⅲ) 则主要表现为偶氮还原的电子竞争对手而抑制偶氮还原,浓度

越高其抑制作用越强. Fe(Ⅲ) 和偶氮染料都是脱色希瓦氏菌 S12 可利用的末端电子受体,可同时接受来自电子传递体的电子.由于 Fe(Ⅲ) 与偶氮染料的标准氧化还原电势不同,从而造成其对电子的亲合力存在高低差异. Fe(Ⅲ) 还原为 Fe(Ⅱ) 时的标准氧化还原电势为 771 mV^[23],而苋菜红曾报道的标准氧化还原电势是 -400 mV^[24] 和 -250 mV^[25],这是因为还原产物不同其标准氧化还原电势也有所不同.但是相对于 Fe(Ⅲ) 来说,苋菜红的标准氧化还原电势低很多,因此,当 Fe(Ⅲ) 和苋菜红同时存在时,前者比后者优先接受来自甲酸钠(标准氧化还原电势为 -430 mV^[25])的电子,2 种电子受体同时存在时表现出电子竞争现象,这与国际上关于不同末端电子受体相互作用的研究结果相符^[11~13].硝酸盐和亚硝酸盐对 *Shewanella putrefaciens* 200 和 *Paracoccus denitrificans* 的 Fe(Ⅲ) 呼吸存在竞争抑制作用,硝酸还原酶可以同时作为 NO_3^- 和 Fe(Ⅲ) 的还原酶^[11,12].硝基芳香烃竞争抑制 *Clostridium perfringens* 的偶氮还原活性,其硝酸还原酶和偶氮还原酶是同一个蛋白^[13].基于脱色希瓦氏菌 S12 的 Fe(Ⅲ) 还原与偶氮还原之间的电子竞争现象,推测这 2 种电子受体可能使用同一种外膜末端还原酶.

与国际上研究不同末端电子受体相互作用得到的单纯竞争性抑制作用不同,笔者发现可溶性 Fe(Ⅲ) 除了作为电子受体与偶氮染料竞争电子以外,在一定浓度下还具有明显的促进偶氮还原的作用.在电子供体充足的条件下,氯化亚铁和低浓度柠檬酸铁均能明显促进偶氮还原,该作用不是因为化学反应或者细菌数量增多引起的,而是由于 Fe(Ⅲ) 还原和 Fe(Ⅱ) 氧化这一循环过程有利于促进呼吸代谢的电子产生或传递而导致偶氮还原的加速.通过电子传递抑制剂实验表明,氯化亚铁和低浓度柠檬酸铁可有效缓解双香豆素(一种专一性的甲基萘醌抑制剂^[20])对脱色希瓦氏菌 S12 偶氮还原的抑制作用.这反映了可溶性 Fe(Ⅱ) 和 Fe(Ⅲ) 之间的氧化还原循环,在细胞内可以替代醌循环而发挥电子传递作用.当醌循环没有受到抑制时,这种 $\text{Fe(Ⅱ)} \leftrightarrow \text{Fe(Ⅲ)}$ 氧化还原循环可以补充醌循环加快电子传递从而促进偶氮还原.而当醌循环受到抑制时,这种 $\text{Fe(Ⅱ)} \leftrightarrow \text{Fe(Ⅲ)}$ 氧化还原循环效应突出代替受阻的醌循环使电子顺利传递到偶氮化合物.也就是说,在一定条件下铁可以作为脱色希瓦氏菌 S12 偶氮还原的电子传递媒介.

这种电子传递媒介的作用只是对于可溶性的铁

而言,不可溶性 $\text{Fe}(\text{III})$ 如 Fe_2O_3 对偶氮还原只表现抑制作用,抑制效果不随其浓度增加而强化.这可能是由于可溶性铁可以通过细胞膜上的通道进入细胞内,而不可溶性铁作为一种胞外电子受体与强极性的偶氮化合物同处细胞外而竞争外膜末端还原酶传递的电子.这说明铁作为偶氮还原的电子传递媒介是在细胞内起作用的,与醌循环起作用的位置一样.另外这种电子传递媒介的作用只局限在低浓度的铁,当铁离子浓度超过一定范围时, $\text{Fe}(\text{III})$ 优先大量接受来自电子供体的电子而与偶氮化合物竞争电子,其电子穿梭功能被掩盖,从而表现明显的抑制偶氮还原效应.

本研究所揭示的 $\text{Fe}(\text{III})$ 作为末端电子受体与偶氮还原的竞争抑制现象,以及作为电子传递媒介对偶氮还原的促进作用,将为有效利用 $\text{Fe}(\text{III})$ 治理偶氮化合物引起的环境污染问题、提高生物修复效率提供科学的理论指导.

4 结论

(1)对于具有很强厌氧 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原和偶氮还原能力的脱色希瓦氏菌 S12 来说, $\text{Fe}(\text{III})$ 对偶氮还原的影响是与其形态及浓度直接相关的.

(2)不可溶性 $\text{Fe}(\text{III})$ 延缓偶氮还原过程,作用效果不随其浓度增加而强化.不可溶性 $\text{Fe}(\text{III})$ 在细菌细胞膜上仅具有低渗透性,作为胞外电子受体与强极性的偶氮化合物竞争电子从而仅仅呈现延缓偶氮还原作用.

(3)低浓度可溶性 $\text{Fe}(\text{III})$ 对厌氧偶氮还原具有一定的促进作用,但作用效果与其浓度变化不呈线性关系.可溶性 $\text{Fe}(\text{III})$ 在细胞内存在氧化还原循环,充当电子传递的中间媒介,通过发挥电子穿梭功能而促进厌氧偶氮还原.

(4)高浓度可溶性 $\text{Fe}(\text{III})$ 对厌氧偶氮还原呈现抑制作用,浓度越高其抑制作用越强.在高浓度条件下可溶性 $\text{Fe}(\text{III})$ 优先大量接受来自电子供体的电子而与偶氮化合物竞争,其电子穿梭功能被掩盖,从而明显抑制偶氮还原.

参考文献:

- [1] Kroger A, Biel S, Simon J, *et al.* Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1553** (1-2): 23-38.
- [2] Lovley D R, Coates J D, Blunt-Harris E L, *et al.* Humic substances as electron acceptor for microbial respiration [J]. *Nature*, 1996, **382** (6590): 445-448.
- [3] DeWeerd K A, Mandelco L, Tanner R S, *et al.* *Desulfomonile*

tiedjei gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium [J]. *Arch Microbiol*, 1991, **154** (1): 23-30.

- [4] Coates J D, Councell T, Ellis D J, *et al.* Carbohydrate oxidation coupled to $\text{Fe}(\text{III})$ reduction, a novel form of anaerobic metabolism [J]. *Environ Microbiol*, 1998, **4** (6): 277-282.
- [5] Kudlich M, Keck A, Klein J, *et al.* Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63** (9): 3691-3694.
- [6] Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56** (1-2): 69-80.
- [7] Ramalho P A, Cardoso M H, Cavaco-Paulo A, *et al.* Characterization of azo reduction activity in a novel *Ascomycete* yeast strain [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70** (4): 2279-2288.
- [8] Brigé A, Motte B, Borloo J, *et al.* Bacterial decolorization of textile dyes is an extracellular process requiring a multicomponent electron transfer pathway [J]. *Microb Biotechnol*, 2008, **1** (1): 40-52.
- [9] Hong Y G, Xu M Y, Guo J, *et al.* Respiration and Growth of *Shewanella decolorationis* S12 with Azo Compound as Sole Electron Acceptor [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73** (1): 64-72.
- [10] van der Zee F P, Bouwman R H, Strik D P, *et al.* Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors [J]. *Biotechnol Bioengineer*, 2001, **75** (6): 691-701.
- [11] Dichristina T J. Effects of nitrate and nitrite on dissimilatory iron reduction by *Shewanella putrefaciens* 200 [J]. *J Bacteriol*, 1992, **174** (6): 1891-1896.
- [12] Coby A J, Picardal F W. Inhibition of NO_3^- and NO_2^- reduction by microbial $\text{Fe}(\text{III})$ reduction: evidence of a reaction between NO_2^- and cell surface-bound Fe^{2+} [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71** (9): 5267-5274.
- [13] Rafii F, Cerniglia C E. Comparison of the azoreductase and nitroreductase from *Clostridium perfringens* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59** (6): 1731-1734.
- [14] Fredrickson J K, Romine M F, Beliaev A S, *et al.* Towards environmental systems biology of *Shewanella* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, **6** (8): 592-603.
- [15] 许玫英, 钟小燕, 曹渭, 等. 脱色希瓦氏菌 (*Shewanella decolorationis*) S12^T 的脱色特性 [J]. *微生物学报*, 2005, **32** (1): 5-9.
- [16] Hong Y G, Guo J, Xu Z C, *et al.* Humic substances act as electron acceptor and redox mediator for microbial dissimilatory azoreduction by *Shewanella decolorationis* S12 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, **17** (3): 428-437.
- [17] Xu M Y, Guo J, Cen Y H, *et al.* *Shewanella decolorationis* sp. nov., decolorizing bacterium isolated from activated sludge of a waste-water treatment plant [J]. *In J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55** (1): 363-368.
- [18] Wolin E A, Wolin M J, Wolfe R S. Formation of methane by bacterial extracts [J]. *J Biol Chem*, 1963, **238** (8): 2882-2886.

- [19] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. (第四版). 北京: 中国科学环境出版社, 2002. 368-370.
- [20] Basu T K. Drug-induced losses of vitamins and inorganic elements from the body [R]. Canada :SNELL Medical Communication Inc, 2004.
- [21] Xu M Y, Guo J, Sun G P. Biodegradation of textile azo dye by *Shewanella decolorationis* S12 under microaerophilic conditions [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, **76** (3) : 719-726.
- [22] Hong Y G, Guo J, Xu Z C, *et al*. Reduction and partial degradation mechanisms of naphthylaminesulfonic azo dye amaranth by *Shewanella decolorationis* S12 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, **75** (3) : 647-654.
- [23] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(下册) [M]. (第三版). 北京: 高等教育出版社, 2002. 114-117.
- [24] Li F, Zhou Y W, Yang W S, *et al*. Electrochemical degradation of Amaranth aqueous solution on ACF [J]. J Hazard Mater, 2006, **137** (2) : 1182-1188.
- [25] Rau J, Knackmuss H J, Stolz A. Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dye by bacteria [J]. Environ Sci Technol, 2002, **36** (7) : 1497-1504.