

# 脱色希瓦氏菌(*Shewanella decolorationis*) S12 还原 不同电子受体的厌氧发酵罐培养方法

王博<sup>1,2,3,4,5</sup> 许玫英<sup>2,3,4</sup> 孙国萍<sup>2,3,4\*</sup>

(1. 中国科学院华南植物园 广东 广州 510650)

(2. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)

(3. 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东 广州 510070)

(4. 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)

(5. 中国科学院研究生院 北京 100039)

**摘要:** 脱色希瓦氏菌 *Shewanella decolorationis* S12 在厌氧环境下能够使用多种电子受体进行厌氧呼吸。为了取得足够的细胞量用于膜蛋白质组学等科学研究的需要, 本研究选取无机小分子(硝酸钠)、金属离子(柠檬酸铁)和有机大分子(偶氮染料苋菜红)作为电子受体, 在使用确定成分的无机盐培养基条件下, 使用不同浓度的电子供体和碳源对 S12 进行厌氧条件下静置和发酵罐的优化培养, 采用连续补充电子受体的培养方式, 确认了电子供体和碳源的合适浓度, 建立了 S12 厌氧发酵罐培养方法。相比传统的静置厌氧培养, 厌氧发酵罐培养方法在保证严格厌氧条件下高效率还原电子受体的同时, 还极大的提高了细胞生长密度。连续补充电子受体的厌氧发酵罐培养的 S12 最大细胞密度最大分别可达到静置厌氧培养细胞密度的 325, 304, 369 倍, 而生长时间也比静置厌氧培养分别缩短了 26.5%, 17.6%, 7.5%。这为需要大量细胞和蛋白的细菌厌氧呼吸生长实验建立了可行方法, 对于进行兼性厌氧呼吸的微生物的大规模厌氧培养具有借鉴意义。

**关键词:** 脱色希瓦氏菌 S12, 厌氧发酵罐培养, 电子受体, 细胞生长密度

## The Method Study of *Shewanella decolorationis* S12 Reduce Different Electron Acceptors with Anaerobic Fermentor Culture

WANG Bo<sup>1,2,3,4,5</sup> XU Mei-Ying<sup>2,3,4</sup> SUN Guo-Ping<sup>2,3,4\*</sup>

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(4. Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(5. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30670020); 国家 863 计划项目(No. 2006AA06Z322); 广东省自然科学基金研究团队项目资助(No. 9351007002000001)

\* 通讯作者: Tel: 86-20-87681673; ✉: guopingsun@163.com

收稿日期: 2009-08-19; 接受日期: 2009-10-26

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

**Abstract:** *Shewanella decolorationis* S12 is a strain which can perform anaerobic respiration by using various electron acceptors under the anaerobic environment. In this study, to obtain the enough biomass and satisfy the need of scientific research such as membrane proteomics, we used the inorganic small molecule (sodium nitrate), metal ion (ferric citrate) and organic macromolecule (azo dye amaranth) as sole terminal electron acceptors, using different concentrations of electron donor and carbon source for anaerobic static culture and anaerobic fermentor culture of *Shewanella decolorationis* S12. The cells were cultured by fed-batch cultivation mode to confirm the optimal concentrations of electron donor and carbon source, finally the method of anaerobic fermentor culture for S12 was established. Comparing to the traditional anaerobic static culture method, anaerobic fermentor culture method not only ensured a high rate mass-transfer efficiency resulting in the effective reduction of electron acceptors, but also greatly increased the cell growth density, the max cell growth densities were increased to 325, 304, 369 times and cell growth times were decreased 26.5%, 17.6%, 7.5% separately. This method provided an effective way to culture a large number of cells and protein under anaerobic respiration condition. The procedure described above would be significance for the studies which need biomass cultivation of *Shewanella* genus bacteria and other anaerobic microorganisms under fully controlled conditions.

**Keywords:** *Shewanella decolorationis* S12, Anaerobic fermentor culture, Electron acceptor, Cell growth density

希瓦氏菌属为革兰氏阴性兼性厌氧菌,能广泛地利用多种有机基质和可溶性或不溶性金属化合物作为末端电子受体进行生长。除了氧气,希瓦氏菌属能够还原的电子受体包括延胡索酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐、三甲胺氮氧化物、二甲基亚砷、亚硫酸盐、硫代硫酸盐和元素硫,以及固体矿产氧化物包括水合氧化铁、针铁矿、赤铁矿、锰氧化物<sup>[1-3]</sup>铬(VI)和U(VI)<sup>[3-7]</sup>等。多株希瓦氏菌均已完成了全基因组测序<sup>[8]</sup>,新的基因组信息也在不断的被预测和注释<sup>[9]</sup>,这些进展使得具有多种呼吸和代谢作用的希瓦氏菌属成为环境生物修复的热点研究对象。

脱色希瓦氏菌(*Shewanella decolorationis* S12)是由许玫英等从印染废水处理系统中分离到的一株具有很强染料降解能力的希瓦氏菌属新种<sup>[10]</sup>。菌株S12厌氧还原偶氮染料的脱色特性的研究已经得到报道<sup>[11]</sup>,其对偶氮染料的异化还原作用也被证明为是一种新的厌氧呼吸形式<sup>[12]</sup>。菌株S12在厌氧环境下能够使用多种电子受体进行广泛的厌氧呼吸,显示了其多样的呼吸机制。作为希瓦氏菌属中一个从污染的环境中分离得到的菌株,其在环境修复方面具有生境来源上的优势。在有关菌株S12的厌氧脱色和偶氮还原机制的研究中,其厌氧还原培养的基本操作均采用首先进行好氧培养,取得大量菌体之后再转入厌氧条件下静置培养的方式。这种培养方式与国际上其他研究希瓦氏菌属乃至兼性厌氧微生

物的厌氧还原培养方式很相似<sup>[13-14]</sup>,但是随着基因组学和蛋白质组学研究的不断发展,许多新的技术被应用于希瓦氏菌属的研究,这使得厌氧条件下静置培养这种难以提供大量细胞的培养方法显示出了局限性。为了提供足够的细胞量进行实验,国内外的研究采用了多种方法,如改变培养基成分、增大培养体积<sup>[15]</sup>等,这些改进确实在一定程度上满足了提供大量细胞和蛋白的需要,但是由于实验设计的不同,许多培养基成分不能做大的改动,而增大培养体积也存在厌氧工作站容纳不下和培养时间过长等问题。近来,一些关于蛋白质组学、基因芯片分析和质谱分析的研究<sup>[16-17]</sup>也开始采用小型发酵罐好氧或者微氧培养希瓦氏菌,满足了实验的需要。在本研究中,我们分别使用无机小分子(硝酸钠)、金属离子(柠檬酸铁)和有机大分子(偶氮染料苋菜红)这3类电子受体作为唯一电子受体在严格受控的小型发酵罐条件下厌氧培养*Shewanella decolorationis* S12。发酵罐在本研究中的应用不同于传统意义上的发酵研究,对于*Shewanella decolorationis* S12厌氧呼吸产能的研究来说是一个全新的尝试。本研究分析与厌氧静置培养方式比较,分析小型发酵罐厌氧培养方式给菌株S12生长带来的变化,以期建立一种有效的培养方法可以为厌氧呼吸研究提供足够的在厌氧条件下生长的细胞。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和培养基

脱色希瓦氏菌(*Shewanella decolorationis*) S12 来自本实验室。好氧培养基和厌氧培养基均为确定成分的无机盐培养基。好氧培养基组成参考洪义国的研究<sup>[12]</sup>, 作以下修改: 10 mmol/L 琥珀酸钠(唯一碳源), 10 mmol/L 甲酸钠(唯一电子供体), 5.7 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3.3 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 18.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.01 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , L-Cysteine (20 mg/L), 1%的维生素溶液和微量元素溶液<sup>[18]</sup>, pH 7.4。厌氧培养基主要组成与好氧培养基的成分一样, 然后外加不同的电子受体组成合成培养基。

### 1.2 试剂及仪器

厌氧静置培养使用厌氧工作站 Bug Box (Ruskin, UK), 厌氧发酵罐培养使用的是  $4 \times 1 \text{ L}$  的 Biostat Q1000 (B. Braun, USA)型小型发酵罐, 配置超纯氮气罐和过滤器。苋菜红购自 Sigma, 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 细菌的培养

**1.3.1 好氧培养:** 接种 S12 菌至 100 mL 好氧培养基中,  $32^\circ\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养 24 h 左右。

**1.3.2 厌氧静置培养:** 取 5 mL 处于对数生长期 ( $OD_{600}=0.4$ ) 的好氧培养的 S12 菌液经  $3000 \times g$  常温离心 5 min, 然后去除上清液收集菌体后转入 50 mL 血清培养瓶, 使用分别加有 3 种不同电子受体(硝酸钠、柠檬酸铁、苋菜红)的 30 mL 厌氧培养基置于厌氧工作站  $32^\circ\text{C}$  静置培养, 此处使用的厌氧培养基中每种电子受体浓度设为 1、2、4 和 6 mmol/L。转入厌氧工作站之前需对瓶中的培养基通入高纯氮气 15 min 排除溶氧。硝酸钠浓度的测量采用 GB-T13451.1 标准程序测定; 柠檬酸铁的还原通过测定  $\text{Fe}^{2+}$  来进行, 采用的方法为邻菲罗啉分光光度法(HJ/T345, 2007); 苋菜红浓度的测定方法为测定苋菜红特定的可见光吸收波长  $OD_{520}$ , 然后对照标准曲线计算浓度。细胞密度测定采用对细胞使用 4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色后在荧光显微镜下直接观察计数, 每次计数均有 3 次重复。

**1.3.3 电子供体浓度改变后的厌氧发酵罐培养:** 在厌氧静置培养基的基础上, 甲酸钠作为唯一电子供体其初始浓度由 10 mmol/L 分别改变为 20、30 和 40 mmol/L, 以观察电子供体浓度的改变对细胞培

养的影响。取 100 mL 处于对数生长期( $OD_{600}=0.4$ ) 好氧培养的 S12 菌液经  $3000 \times g$  常温离心 5 min 后去除上清液, 将收集菌体转至分别含有初始浓度为 1 mmol/L 的 3 种不同电子受体(硝酸钠、柠檬酸铁、苋菜红)的 600 mL 合成培养基, 使用 1 L 容积的小型发酵罐在  $32^\circ\text{C}$ 、200 r/min 条件下搅拌进行严格厌氧培养。使用 pH 电极和溶氧电极检测 pH 和溶氧相对值的变化。转入小型发酵罐之后需通入高纯氮气 30 min 以排除溶氧, 使溶氧相对值  $< 0.5\%$ , 然后密闭培养。氮气经  $0.2 \mu\text{m}$  孔径过滤器除菌后输入发酵罐。溶氧相对值的 100%和 0 的设定参考 Tang 的研究<sup>[19]</sup>。监测 3 种不同电子受体(硝酸钠、柠檬酸铁、苋菜红)在培养过程中残存的浓度, 测定方法同上。在培养过程中当溶氧相对值  $\geq 0.5\%$  时通入氮气排除溶氧后继续培养。

**1.3.4 碳源浓度改变后的厌氧发酵罐培养:** 在厌氧静置培养基的基础上, 琥珀酸钠作为唯一碳源, 其初始浓度由 10 mmol/L 分别改变为 20、30 和 40 mmol/L, 其他厌氧发酵罐培养操作与 1.3.3 描述一致, 以观察碳源浓度的改变对细胞培养的影响。

**1.3.5 连续补充电子受体的厌氧发酵罐培养:** 保持电子供体甲酸钠为 10 mmol/L 和碳源琥珀酸钠为 10 mmol/L 浓度的前提下, 其他厌氧发酵罐培养操作与 1.3.3 描述一致。当发酵罐培养基中电子受体浓度不足 0.2 mmol/L 时, 即从电子受体贮存液瓶中输入相应的电子受体, 使发酵罐培养基中电子受体浓度保持在 1 mmol/L 左右, 每次补充电子受体后均通入高纯氮气排除溶氧相对值  $< 0.5\%$ , 然后继续培养。

## 2 实验结果

### 2.1 厌氧静置培养

使用含有 3 种不同电子受体(硝酸钠、柠檬酸铁、苋菜红)的浓度分别为 1、2、4 和 6 mmol/L 的确定成分的培养基在厌氧条件下静置培养 S12, 其菌体的最大细胞密度和电子受体还原完成时间结果见表 1, 其中 S12 在含 2 个不同浓度(1 和 6 mmol/L)的 3 种电子受体的确定成分培养基中静置培养时厌氧生长曲线见图 1。

由表 1 可知, 在厌氧静置培养的条件下, S12 厌氧可以还原不同浓度(1、2、4 和 6 mmol/L)的同种电

表1 S12菌体在不同电子受体浓度条件下还原3种不同电子受体的厌氧静置培养生长情况  
Table 1 Growth of *S. decolorationis* S12 reduced three different electron acceptors with different electron acceptor concentrations under anaerobic static culture conditions

电子受体浓度 Electron acceptor concentration	硝酸钠 Sodium nitrate		柠檬酸铁 Ferric citrate		苋菜红 Amaranth	
	最大细胞密度 Maximum cell density (10 <sup>6</sup> /mL)	还原完成时间 Time of reduction completed (h)	最大细胞密度 Maximum cell density (10 <sup>6</sup> /mL)	还原完成时间 Time of reduction completed (h)	最大细胞密度 Maximum cell density (10 <sup>6</sup> /mL)	还原完成时间 Time of reduction completed (h)
1 mmol/L	1.32	25	1.23	25	1.21	28
2 mmol/L	1.33	25	1.32	31	1.22	31
4 mmol/L	1.41	34	1.34	34	1.22	40
6 mmol/L	1.50	34	1.45	34	1.26	40

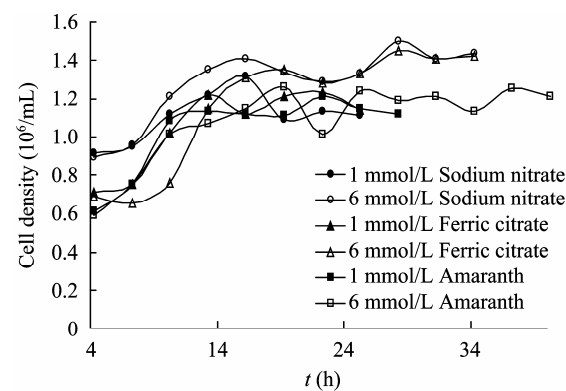


图1 S12在分别含3种不同电子受体的确定培养基中静置培养时厌氧生长曲线  
Fig. 1 Anaerobic growth curves of *S. decolorationis* S12 in defined medium with three different electron acceptors under static culture conditions

子受体,还原所需时间随电子受体浓度的增加而有所延长,而生长过程中细胞最大密度却非常接近。图1显示了S12在含3种不同电子受体(硝酸钠、柠檬酸铁、苋菜红)的2个不同浓度(1和6 mmol/L)的确定培养基中静置培养时厌氧生长情况。从表1中电子受体还原完成时间情况可知,S12还原高浓度

(6 mmol/L)的电子受体比还原低浓度(1 mmol/L)的电子受体需要更长时间。而S12在厌氧生长过程中的细胞密度仅在生长的初期(0–10 h)有过一定的增长,在其他生长阶段变化却不大。这个现象无论在电子受体浓度高(6 mmol/L)还是浓度低(1 mmol/L)均非常相似,虽然由于实验计数误差,细胞密度有所变化,但上下误差不超过 $0.2 \times 10^6/\text{mL}$ 。由此我们可以推断,在静置培养条件下,S12菌体对于较高电子受体浓度能保持一定的还原能力;但电子受体的还原所产生能量主要用于维持细胞生存而不是分裂生长,因而生长较为缓慢。由于细胞增殖数量仍然很少,静置培养的方式远不适应需要提供大量细胞或者蛋白的实验。

2.2 电子供体浓度改变后的厌氧发酵罐培养

在合成培养基的基础上,改变作为唯一电子供体的甲酸钠浓度以观察电子供体浓度对细胞培养的影响。使用厌氧发酵罐在含有1 mmol/L 3种不同电子受体(硝酸钠、柠檬酸铁、苋菜红)的初始浓度条件培养S12,S12的菌体最大细胞密度和电子受体还原完成时间见表2。

表2 S12菌体在不同电子供体浓度条件下还原3种不同电子受体的厌氧发酵罐培养生长情况  
Table 2 Growth of *S. decolorationis* S12 reduced three different electron acceptors with different electron donor concentrations under anaerobic fermentor culture conditions

电子供体甲酸钠浓度 Electron donor formate concentration (mmol/L)	硝酸钠 Sodium nitrate (1 mmol/L)		柠檬酸铁 Ferric citrate (1 mmol/L)		苋菜红 Amaranth (1 mmol/L)	
	最大细胞密度 Maximum cell density (10 <sup>7</sup> /mL)	还原完成时间 Time of reduction completed (h)	最大细胞密度 Maximum cell density (10 <sup>7</sup> /mL)	还原完成时间 Time of reduction completed (h)	最大细胞密度 Maximum cell density (10 <sup>7</sup> /mL)	还原完成时间 Time of reduction completed (h)
10	20.94	13	23.445	13	13.392	19
20	2.52	96	2.430	96	2.120	96
30	2.41	96	2.170	96	2.020	108
40	2.12	96	2.130	96	1.460	120

从表 2 可知当电子供体浓度为 10 mmol/L 而电子受体浓度为 1 mmol/L 的条件下, 发酵罐厌氧培养的 S12 的菌体最大细胞密度与厌氧静置培养条件下相比有显著差异, 其中最大细胞密度分别提高了 158、190 和 110 倍, 而电子受体完全被还原的时间缩短了 1/2 左右。而在电子受体浓度为 1 mmol/L, 增加了电子供体浓度至 20、30 和 40 mmol/L 的条件下, 发酵罐厌氧培养的 S12 的菌体最大细胞密度与厌氧静置培养条件下相比仅提高了近 20 倍, 而还原电子受体所需要的时间却增加了 3 倍左右。本实验

的结果说明厌氧发酵罐培养的方式确实可以大大的增加细胞密度, 但是电子供体浓度的过量增加对细胞的生长和电子受体的还原都有抑制作用, 因此电子供体甲酸钠的浓度保持在 10 mmol/L 比较适合。

2.3 碳源浓度改变后的厌氧发酵罐培养

在合成培养基的基础上, 改变作为唯一碳源的琥珀酸钠浓度来观察碳源浓度对厌氧发酵罐培养 S12 细胞的影响。S12 的菌体最大细胞密度和电子受体还原完成时间结果见表 3。

表3 S12菌体在不同碳源浓度条件下还原3种不同电子受体的厌氧发酵罐培养生长情况						
Table 3 Growth of <i>S. decolorationis</i> S12 reduced three different electron acceptors with different carbon source concentrations under anaerobic fermentor culture conditions						
碳源琥珀酸钠浓度 Carbon source succinate concentration (mmol/L)	硝酸钠 Sodium nitrate (1 mmol/L)		柠檬酸铁 Ferric citrate (1 mmol/L)		苋菜红 Amaranth (1 mmol/L)	
	最大细胞密度 Maximum cell density (10 <sup>7</sup> /mL)	还原完成时间 Time of reduction completed (h)	最大细胞密度 Maximum cell Density (10 <sup>7</sup> /mL)	还原完成时间 Time of reduction completed (h)	最大细胞密度 Maximum cell density (10 <sup>7</sup> /mL)	还原完成时间 Time of reduction completed (h)
10	20.94	13	23.445	13	13.392	19
20	2.12	96	2.330	108	2.150	96
30	1.98	108	2.270	108	1.880	108
40	1.97	108	2.230	108	1.250	108

从表 3 可知在增加了碳源浓度(20、30 和 40 mmol/L)而电子受体浓度为 1 mmol/L 的条件下, 厌氧发酵罐培养的 S12 的菌体最大细胞密度和电子受体还原时间的变化与实验步骤 1.3.4 中改变了电子供体浓度所带来的变化很相似。厌氧发酵罐培养的 S12 的菌体最大细胞密度与厌氧静置培养条件下相比提高了近 20 倍, 而还原电子受体所需要的时间增加了 3 倍左右。这说明碳源浓度的增加对细胞的生长和电子受体的还原也产生了抑制作用, 因此琥珀酸钠的浓度保持在 10 mmol/L 是比较适合 S12 的厌氧生长的。

2.4 连续补充电子受体的厌氧发酵罐培养

在发酵罐厌氧培养的过程中, 由于电子受体不断被还原, 同时细胞密度也在不断增加, 实验过程中不断地向发酵罐中补加电子受体, 每次补充的时间间隔因电子受体的不同而变化。在补加到第 5 次的时候, 细胞密度不再增加, 随后测得细胞密度开始减少, 因此不再补加电子受体, 细胞厌氧培养结束, 3 种电子受体被还原浓度总量达到 6 mmol/L。S12 厌氧还原浓度总量为 6 mmol/L 的 3 种不同电子

受体(硝酸钠、柠檬酸铁、苋菜红)的发酵罐厌氧生长情况见图 2。

从图 1 和图 2 可知, S12 在发酵罐厌氧培养的过

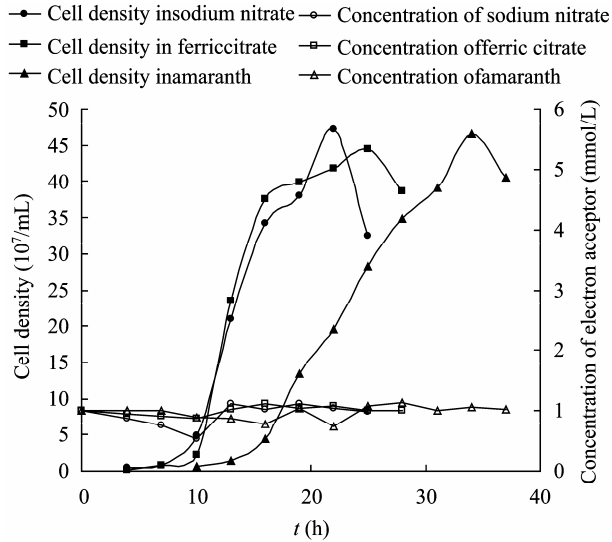


图2 分批添加电子受体的条件下 S12 还原 3 种不同电子受体的发酵罐厌氧生长曲线

Fig. 2 Anaerobic fermentor culture growth curves of *S. decolorationis* S12 reduced three different electron acceptors under fed-batch electron acceptor conditions

程中,电子受体一直保持在 1 mmol/L 浓度,当最终厌氧还原电子受体浓度总量为 6 mmol/L 时细胞密度开始下降。与静置培养结果相比较,使用连续补充 3 种不同的电子受体(硝酸钠、柠檬酸铁、苋菜红)的还原时间都有所缩短,为 25、28 和 37 h,分别缩短了 26.5%、17.6%和 7.5%。而且 S12 在厌氧生长过程中的细胞数保持了持续增长,最高细胞密度分别达到了  $4.71 \times 10^8/\text{mL}$ 、 $4.45 \times 10^8/\text{mL}$  和  $4.65 \times 10^8/\text{mL}$ ,是静置培养最高细胞密度的 325、304 和 369 倍。由此我们可以推断,发酵罐培养条件与静置培养结果相比较,S12 菌体对电子受体的还原产生能量不仅维持细胞生存而且支持了细胞分裂生长,细胞密度实现了大幅的增长。细胞密度的增加提供了足够的细胞和蛋白用于其他实验。连续补充电子受体的发酵罐培养方式显示了提供大量厌氧生长细胞的明显优势。

### 3 讨论

厌氧静置培养实验结果表明,S12 菌可以有效地还原 3 种不同的电子受体。电子受体还原和细胞密度增长之间存在偶联关系。不同的电子受体能够被稳定的还原,而细胞密度保持在一个较低数量上。通过对电子供体和碳源浓度改变的厌氧发酵罐培养试验结果的分析,当电子供体和碳源浓度高于 20 mmol/L 时,细胞的生长和电子受体的还原都受到了很大的抑制,因此,保持电子供体和碳源浓度在一个较低的浓度条件(10 mmol/L)下有利于细胞的生长和电子受体的还原。

确定成分的无机盐培养基对于研究 S12 厌氧还原多种电子受体的生理代谢过程具有非常重要的意义,特别是对于进行蛋白质组学分析来说,可以有利的证明其单一条件的改变和所表达的蛋白质图谱变化之间的联系。因此对其培养体系组成的每一个更改都需要进行不断的尝试和摸索以达到稳定和优化。改变电子供体和碳源浓度后的厌氧发酵罐培养实验结果表明,在本研究中所用的培养体系无论是静置培养还是发酵罐厌氧培养都是最合理有效的。在 S12 厌氧还原各种电子受体的过程中,培养基 pH 值一直保持在 7.4 左右,这说明 S12 的厌氧还原生长没有产生酸性或者碱性物质,整个培养基比较稳

定。同时,对溶氧的监测表明,在整个厌氧培养过程中,仅仅是在补充电子受体之后需要通入高纯氮气排除溶氧,生长过程中由于密闭性良好,不需要再通入氮气即能保持严格厌氧状态。通过对 S12 连续补充电子受体的发酵罐培养结果分析,对于较高浓度总量(6 mmol/L)的电子受体条件下,发酵罐培养比静置培养还原时间缩短了 26.5%、17.6%和 7.5%,而最高细胞密度增大到 325、304 和 369 倍。实验结果表明,使用发酵罐培养的方式大大提高了细胞的质传效率;使用连续补充电子受体的培养方式使得细胞能够在合适的电子受体浓度下进行高效的呼吸产能;同时使用发酵罐培养可以精确的控制培养温度,搅拌速度,溶氧相对值等条件,这一切都使得细胞在厌氧条件下生长密度大大增加。细胞量的大量增加可以满足厌氧呼吸研究等其他实验的要求。发酵罐培养方式显示了能提供大量厌氧生长细胞的优势。本研究虽然基本上满足了获取大量细胞和蛋白的需要,但是对于培养体系中的各个要素,还有进一步细化研究的空间。例如浓度范围在 10–20 mmol/L 之间的甲酸钠和琥珀酸钠的添加量及添加方式的摸索,培养搅拌转速的调整等等,都有可能进一步提高细胞生长密度。

厌氧呼吸机制的研究正在不断发展<sup>[20]</sup>,各种实验技术手段不断地被应用于此领域的研究,而获取大量厌氧呼吸生长的细胞和蛋白的技术方法正是这种研究所追求的。本研究在一个有效的确定成分的无机盐培养基的基础上所进行的发酵罐厌氧培养条件的方法研究,不仅对培养基组成方面进行了摸索,而且通过培养条件和电子受体添加方式的改变,使得厌氧呼吸生长的细胞密度获得极大的提高。这为偶氮染料还原等厌氧还原过程机制的研究提供了一个有效的细胞培养方法,而且也再次确证了菌株 S12 可以对多种类型电子受体进行有效的厌氧呼吸并产生大量的菌体,对于希瓦氏菌属和其他厌氧微生物的厌氧培养都具有借鉴意义。

### 参 考 文 献

- [1] Venkateswaran K, Moser DP, Dollhopf ME, *et al.* Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49(2): 705–724.

- [2] Moser DP, Nealson KH. Growth of the facultative anaerobe *Shewanella putrefaciens* by elemental sulfur reduction. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(6): 2100–2105.
- [3] Myers CR, Nealson KH. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science*, 1988, **240**(4857): 1319–1321.
- [4] Liu C, Kota S, Zachara JM, *et al.* Kinetic analysis of the bacterial reduction of goethite. *Environ Sci Technol*, 2001, **35**(12): 2482–2490.
- [5] Myers CR, Myers JM. Ferric iron reduction-linked growth yields of *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Appl Bacteriol*, 1994, **76**(3): 253–258.
- [6] Myers CR, Nealson KH. Microbial reduction of manganese oxides: interactions with iron and sulfur. *Geochim Cosmochim Acta*, 1988(52): 2727–2732.
- [7] Wade R, DiChristina TJ. Isolation of U(VI) reduction-deficient mutants of *Shewanella putrefaciens*. *FEMS Microb Lett*, 2000, **184**(2): 143–148.
- [8] Heidelberg JF, Paulsen IT, Nelson KE, *et al.* Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(11): 1093–1094.
- [9] Daraselia N, Dernovoy D, Tian Y, *et al.* Reannotation of *Shewanella oneidensis* genome. *OMICS Summer*, 2003, **7**(2): 171–175.
- [10] Xu M, Guo J, Cen Y, *et al.* *Shewanella decolorationis* sp. nov., a dye-decolorizing bacterium isolated from activated sludge of a waste-water treatment plant. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**(1): 363–368.
- [11] 许玫英, 钟小燕, 曹渭, 等. 脱色希瓦氏菌(*Shewanella decolorationis*) S12<sup>T</sup> 的脱色特性. *微生物学通报*, 2005, **32**(1): 5–9.
- [12] Hong Y, Xu M, Guo J, *et al.* Respiration and growth of *Shewanella decolorationis* S12 with an azo compound as the sole electron acceptor. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(1): 64–72.
- [13] Nealson KH, Moser DP, Saffarini DA. Anaerobic electron acceptor chemotaxis in *Shewanella putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(4): 1551–1554.
- [14] Myers CR, Carstens BP, Antholine WE, *et al.* Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Appl Microbiol*, 2000, **88**(1): 98–106.
- [15] Ruebush SS, Brantley SL, Tien M. Reduction of soluble and insoluble iron forms by membrane fractions of *Shewanella oneidensis* grown under aerobic and anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72** (4): 2925–2935.
- [16] Kolker E, Picone AF, Galperin MY, *et al.* Global profiling of *Shewanella oneidensis* MR-1: expression of hypothetical genes and improved functional annotations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(6): 2099–2104.
- [17] Elias DA, Monroe ME, Marshall MJ, *et al.* Global detection and characterization of hypothetical proteins in *Shewanella oneidensis* MR-1 using LC-MS based proteomics. *Proteomics*, 2005, **5**(12): 3120–3130.
- [18] Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS. Formation of methane by bacterial extracts. *J Biol Chem*, 1963(238): 2882–2886.
- [19] Tang YJ, Meadows AL, Keasling JD. A kinetic model describing *Shewanella oneidensis* MR-1 growth, substrate consumption, and product secretion. *Biotechnol Bioeng*, 2007, **96**(1): 125–133.
- [20] 洪义国, 许玫英, 郭俊, 等. 细菌偶氮还原研究进展. *应用与环境生物学报*, 2005, **11**(5): 642–647.

稿件书写规范

## 论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材、两种商品等。