

Shewanella putrefaciens DK-1의 Fe(III) 환원 특성

조아영 · 이일규* · 전은형 · 안태영*

단국대학교 미생물학과

Shewanella putrefaciens DK-1은 그람음성, 통성 혐기성 세균으로 NO₃⁻, Fe(III), Mn(IV), humic acid와 같은 다양한 전자수용체를 이용한다. *S. putrefaciens* DK-1의 전자공여체의 이용능력은 제한적이며, lactate나 formate는 좋은 전자공여체로 이용되지만 acetate나 toluene은 이용하지 못하였다. 다양한 전자수용체간의 경쟁을 살펴보기 위해 전자수용체로 Fe(III)와 같이 NO₃⁻, NO₂⁻를 넣어 주었을 때 Fe(III)의 환원은 저해되었다. 또한 *S. putrefaciens* DK-1은 전자수용체로 토양에 광범위하게 존재하는 humic acid를 이용하였으며, 환원된 humic acid는 질산염에 의해서 다시 산화되었다. Fe(III) 환원능이 있는 환경 시료를 이용하여 탄소, 질소, 인과 같은 제한 요인이 Fe(III) 환원세균의 활성에 미치는 효과를 조사하였다. 천호지의 저질토와 대호의 농토에 각각 탄소원, 질소원, 인을 첨가해 주었을 경우 *S. putrefaciens* DK-1과 탄소원을 동시에 첨가해 주었을 때 가장 높은 철 환원능을 보여주었다.

Key words □ dissimilatory Fe(III) reduction, electron acceptor, *Shewanella putrefaciens* DK-1

Fe(III)를 전자수용체로 이용하는 미생물이 분리되기 전에는 산화된 금속이온이 혐기성 상태에서 미생물의 작용으로 생산된 과산화수소나 황화수소에 의해 화학적으로 환원된다고 생각되었기 때문에 황 환원과 메탄 생성에 관한 연구가 주로 진행되어져 왔다. 그러나 1980년대 이후 철과 같은 금속이온을 혐기적 호흡에서 전자 수용체로 이용하여 Fe(III)를 Fe(II)로 환원시키는 *Shewanella putrefaciens*의 존재가 밝혀지면서 미생물에 의한 dissimilatory iron reduction이 연구되기 시작했다(8).

Dissimilatory microbial Fe(III) reduction은 강, 호수, 바다와 같은 수계나 토양과 저질토 같은 혐기적 환경에서 유기물을 분해하는 작용을 할 뿐만 아니라 탄소와 금속이온의 지화학적 물질순환에 중요한 역할을 하는데(4), 이전 연구에 의하면 미생물에 의한 Fe(III) 환원은 혐기성 생태계에서 지하수에 오염된 유기물의 65% 이상을 분해하며(2), 탄소, 황, 인과 같은 유기 또는 무기화합물의 순환에 있어서 큰 영향을 미친다(4). 특히 이러한 혐기성 생태계의 정화 연구에 있어서 Fe(III) 환원은 유해한 방향족 화합물의 제거나 독성 중금속 환원 연구에 있어서 중요한 모델이 될 수 있기도 하다.

*Shewanella putrefaciens*는 통성 혐기성 철 환원세균으로서 다양한 환경에 분포하며, oxygen, ferric ion, manganese, nitrite, fumarate, thiosulfate, dimethyl sulfoxide, trimethylamine N-oxide, sulfite와 같은 여러 가지 전자수용체를 이용할 수 있다(18). 이들의 대사적 다변성은 지화학적 물질순환 현상을 조절하는 매카니즘을 밝히는데 도움을 줄 수 있을 뿐만 아니라, 산소가 결핍되어

있는 환경에서의 유기물 전환과 독성물질 제거에 있어 중요한 역할을 할 수 있다.

부식질은 화학적으로 복잡한 물질로서 토양이나 저질토에 유기물의 형태로 존재하여 미생물의 혐기적 호흡에서 전자수용체로 이용될 수 있다(13). 최근 Lovley와 Blunt-Harris는 humic substance나 그 유사체인 anthraquinone-2, 6-dis-sulphonate (AQDS)가 유류 오염물질의 분해를 촉진하며, Fe(III)와 electron shuttle을 이루어 물질순환에 큰 영향을 미친다고 보고했다(14). 지금까지 Fe(III) 환원으로 많이 연구되어진 *Geobacter*와 *Shewanella*는 최종 전자수용체로써 Fe(III)를 대신해서 부식질을 이용할 수 있다(15). 이러한 미생물이 부식질에 전자를 이동시킬 수 있는 능력은 metal cycling에 중요하며 iron과 manganese의 환원을 촉진할 수 있기도 한다(14).

이에 본 연구는 국내 토양에서 분리된 *Shewanella putrefaciens* DK-1의 전자수용체에 따른 다양한 전자공여체의 이용 여부를 알아보고, 또한 이를 저질토에 적용함으로써 혐기성 환경에서의 철 환원 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 준비 및 혐기적 배양

소양호 저질토에서 분리한 *Shewanella putrefaciens* DK-1(1)은 TSB (tryptic soy broth)에서 25°C, 100 rpm으로 24시간 배양 후, 원심 분리하여 균체를 수확 후, 최소배지에 흡광도 0.15(OD₄₄₀)가 되도록 serum bottle에 접종하였다. 혐기적 배양은 serum bottle에 고무마개와 알루미늄 마개를 씌운 후, head space를 혼합가스(질소 80%, 이산화탄소 15%, 수소 5%)로 치환하여 혐기적 조건으로 만들어 준 후, 27°C에서 배양하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-550-3451, Fax: 041-561-2210
E-mail: ahnty@dankook.ac.kr

전자수용체에 따른 기질의 이용

전자수용체에 따른 다양한 기질의 이용 여부를 조사하기 위하여 최소 액체 배지 20 ml를 serum bottle에 준비하였다. 배지 조성은 1L 당 NaCl 2.0 g, NaHCO₃ 2.5 g, K₂HPO₄ 0.25 g, (NH₄)₂SO₄ 0.03 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, CaCl₂·H₂O 0.02 g, trace metal solution 1 ml을 첨가하였고 trace metal solution은 100 ml 당 Fe-EDTA 0.2 g, ZnSO₄·7H₂O 0.2 g, FeSO₄·7H₂O 0.15 g, CuSO₄·5H₂O 0.03 g, CoCl₂·6H₂O 0.02 g, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.01 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.01 g, MnCl₂·4H₂O 0.01 g을 첨가하여 준비하였다. 전자수용체로 각각 10 mM의 Fe(III) citrate, nitrate, manganese, AQDS, 산소를 사용하였으며, 그에 따른 전자공여체로 sodium lactate, succinate, acetate, formate, methanol, ethanol, butanol, lysine, fructose, toluene을 각각 10 mM 씩 첨가하였다. 모든 분석은 삼반복으로 이루어졌다.

화학적 분석

환원된 Fe(II)의 정량은 시료 100 µl에 발색 시약(HEPES buffer with ferrozin) 5 ml을 반응시키고, 15분 후 562 nm 에서 흡광도를 측정하였다(4).

Nitrate 시료를 copper coated cadmium column에 통과시켜 환원시킨 다음, sulfanilamide와 N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride 40 µl를 반응시킨 다음 10분에서 2시간 사이에 543 nm에서 azo dye의 흡광도를 측정해 nitrate 양을 결정했다.

Mn(IV) 시료에 2mM benzidine hydrochloride solution(10% acetic acid)을 반응시켜 440 nm에서 benzidine blue의 흡광도를 측정하여 소모된 Mn(IV)양을 결정하였다. Nitrate와 manganese의 정량을 위한 표준시약은 각각 sodium nitrite, manganese oxide를 사용하였다.

Fe(III) 환원능에 대한 nitrite와 nitrate의 영향

전자 공여체로 10 mM sodium lactate가 첨가되었으며 전자수용체로는 Fe(III) citrate, KNO₂, KNO₃가 사용되었다. 10mM Fe(III) citrate와 sodium lactate가 들어있는 serum bottle에 KNO₂

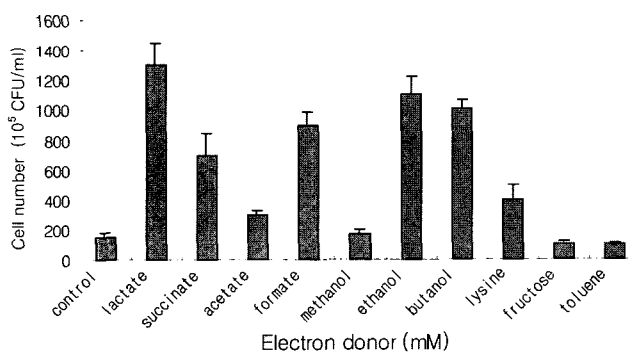


Fig. 1. Aerobic growth of *Shewanella putrefaciens* DK-1 with various compounds as electron donors and oxygen as an electron acceptor. All values are averages of triplicate, which were determined of six days after inoculation.

와 KNO₃를 농도별(0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM)로 첨가해 준 후 균을 접종하고 혐기적 상태로 만들어 주었다. 27°C에서 120시간 배양하였으며 24시간마다 Fe(II)를 정량해 Fe(III) 환원능을 결정하였다.

저질토에서의 Fe(III) 환원

천호지와 대호에서 채취된 저질토를 사용하였다. 천호지 시료의 경우 수위 간만이 심한 저수지 주변의 토양층으로부터 채취하였고, 대호 시료의 경우 시범지구 농토의 토양으로부터 채취하였다. 시료는 멸균된 플라스틱 용지에 알맞은 양을 분주한 후 혼합가스(질소 80%, 이산화 탄소 15%, 수소 5%)로 상층의 공기를 치환시키고, 밀봉하여 산소의 유입을 완전 차단시킨 후 4°C 에서 운반 및 보관하였다.

저질토에서 탄소원, 질소원, 인의 첨가가 Fe(III) 환원능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 50 ml serum bottle에 저질토를 20 ml씩 넣고, 탄소원으로 10 mM sodium lactate, 질소원으로 1 mM NH₄Cl, 인은 1 mM KH₂PO₄를 첨가한 후, head space를 혼합가스로 치환하여 혐기적 상태로 만들어 주고, 초기 Fe(II)의 양을 측정 후 27°C에서 12일간 배양하였으며 4일, 8일, 12일에 Lovley and Phillips(1998)의 HCl 추출 방법으로 Fe(III) 환원능을 측정하였다.

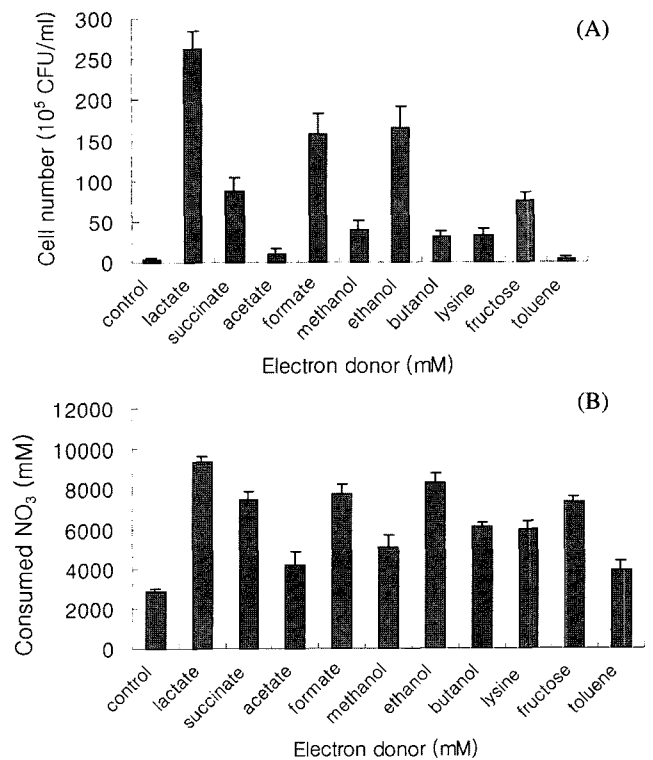


Fig. 2. (A) Anaerobic growth of *Shewanella putrefaciens* DK-1 with various organic compounds as electron donors and nitrate as an electron acceptor. (B) Nitrate reduction according to the different organic compounds as electron donors.

결과 및 고찰

전자수용체에 따른 전자 공여체의 이용

*Shewanella putrefaciens*는 조건혐기성세균으로 Fe(III)를 포함한 다양한 물질을 최종 전자수용체로써 이용할 수 있다고 알려져 있다(18). 본 실험에서는 토양에서 분리된 *Shewanella putrefaciens* DK-1에 각기 다른 5개의 전자수용체와 그에 따른 10개의 전자공여체를 첨가해 각각의 이용능을 알아보았다.

Shewanella putrefaciens DK-1이 산소를 전자수용체로 이용하는 상태에서 다양한 전자공여체에 따른 성장은 Figure 1과 같다. 전자공여체로 lactate를 넣어주었을 때 1.3×10^8 CFU/ml로 가장 높은 성장을 보였으며, formate, ethanol에서도 각각 1.1×10^8 CFU/ml, 1.2×10^8 CFU/ml로 높은 성장을 나타냈다. 반면, acetate, methanol, fructose, toluene을 첨가 하였을 때 균수의 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 1).

전자수용체로써 nitrate를 첨가한 경우, 호기적 조건과 마찬가지로 lactate를 첨가한 실험군에서 최대(2.6×10^7 CFU/ml) 성장을 나타내었고, ethanol에서 1.7×10^7 CFU/ml, formate에서 1.6×10^7 CFU/ml로 비교적 높은 성장을 보여주었다(Fig. 2-A). 이에 따른 nitrate 소모량은 lactate 첨가 시 9.4 mM, ethanol과 formate 첨가 시 각각 8.3 mM, 7.7 mM로 균의 성장이 nitrate 소모량에 비례하여 나타나는 것을 알 수 있었다. 반면, acetate와 방향족 화합

물인 toluene에서는 균의 성장이 느릴 뿐 아니라 nitrate의 소모량도 적은 것으로 나타났다(Fig. 2-B).

Fe(III)를 전자수용체로 이용하는 경우도 마찬가지로 균수는 lactate에서 1.2×10^7 CFU/ml, formate에서 9.8×10^6 CFU/ml, ethanol에서 7.7×10^6 CFU/ml이며(Fig. 3-A), 각각 환원된 Fe(II)의 생산량은 598 μ M, 415 μ M, 398 μ M으로 환원된 Fe(II)의 양에 비례하여 균수가 증가하였다(Fig. 3-B). Acetate나 toluene, butanol, lysine, fructose의 경우는 낮은 균 성장과 100 μ M 이하의 Fe(II) 생산량을 보이므로 이들 기질은 전자공여체로 이용되지 못하였다.

Manganese의 경우 다른 전자수용체에 비해서 균의 성장이 낮은 것을 볼 수 있는데 이것은 혐기성 환경에서 manganese의 느린 환원을 때문인 것으로 사료된다(4). Manganese에서도 역시 lactate에서 1.3×10^4 로 다른 기질에 비해 균의 성장이 높으며(Fig. 4-A), 이 때 50% 이상의 Mn(IV) 환원율을 보였다(Fig. 4-B).

Humic acid의 이용 여부를 알아보기 위하여 유사체인 2,6-anthraquinone disulfonate (AQDS)를 전자수용체로 사용할 경우에는 다른 전자수용체를 사용할 때와 유사한 양상을 보였다. 즉, lactate, formate, ethanol에서 각각 1.2×10^7 CFU/ml, 9.7×10^6 CFU/ml, 9.8×10^6 CFU/ml로 높은 성장률을 나타내며(Fig. 5-A), acetate, lysine, methanol, toluene에서 AQDS의 환원이 전혀 일어나지 않았다(Fig. 5-B).

Shewanella putrefaciens DK-1의 전자수용체에 따른 다양한 전

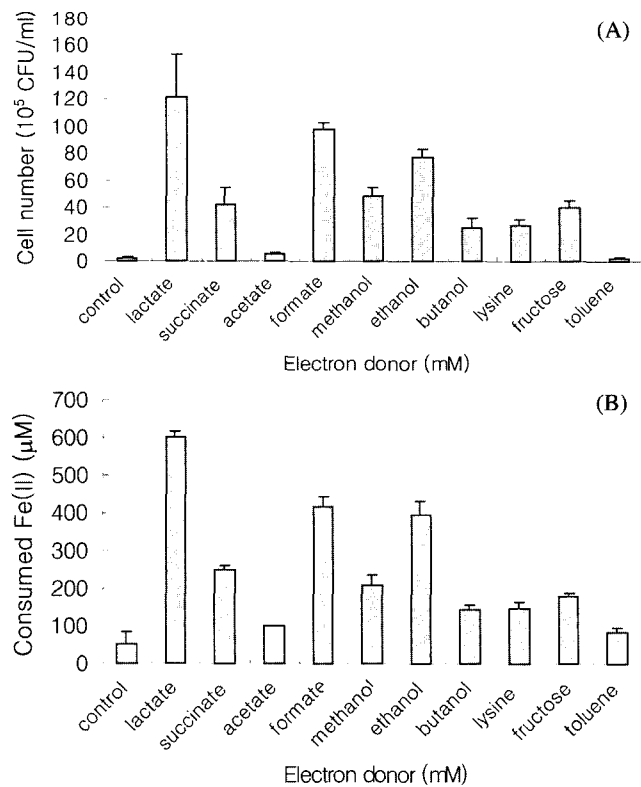


Fig. 3. (A) Anaerobic growth of *Shewanella putrefaciens* DK-1 with various organic compounds as electron donors and Fe(III)citrate as an electron acceptor. (B) Fe(III) reduction according to the different organic compounds as electron donors.

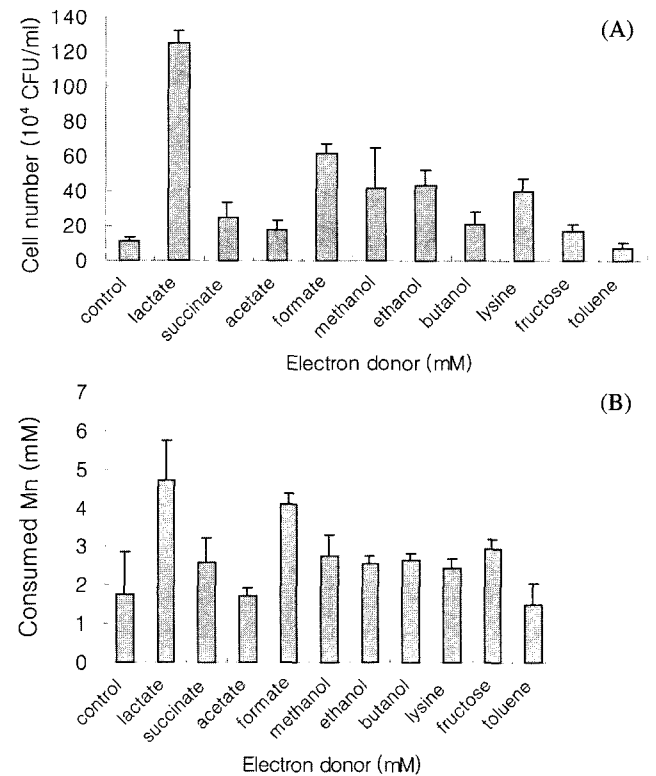


Fig. 4. (A) Anaerobic growth of *Shewanella putrefaciens* DK-1 with various organic compounds as electron donors and manganese dioxide as an electron acceptor. (B) Manganese reduction according to the different organic compounds as electron donors.

자공여체의 이용여부를 실험한 결과, 혐기적일 때 nitrate에서 가장 높은 성장을 보였으며, 모든 전자수용체에서 lactate와 ethanol, 그리고 formate를 이용하는 것으로 나타났다. 열역학적 이론에 따르면 높은 산화·환원 전위를 가지는 전자수용체가 먼저 환원되는 것으로 알려져 있다. 그 결과 nitrate가 제일 높은 산화·환원 전위를 가지므로 가장 먼저 환원될 것이며, 그 다음이 ferric iron, sulfate, CO₂ 순서이다. 하지만 실제 환경에서는 더욱 복잡하며, 세균의 생리적 활성도에 따라 환원되어지는 순서가 조절될 수 있다. 균의 성장을 측면에서 보면 nitrate가 가장 좋은 전자수용체이지만 유해물질 정화를 위한 현장 적용시 과도한 nitrate의 첨가는 2차 오염을 유발시킬 수 있기 때문에 humic acid는 매우 유용한 전자수용체 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

Fe(III)의 환원에 미치는 nitrite와 nitrate의 영향

Fe(III)와 nitrite를 전자수용체로 사용하는 경우 nitrite의 농도에 관계 없이 50시간까지는 Fe(III)의 환원이 발생하지 않았으며 (Fig. 6), Nitrate의 경우에는 KNO₃ 10 mM, 5 mM, 1 mM에서 20시간까지 각각 124.52 mM, 148.12 mM, 162.12 mM로 Fe(II)양이 약간 증가하는 양상을 보이다가, 그 이후에는 급격히 저해되어 120시간에는 환원된 Fe(II)의 양이 50 mM 이하가 되는 것을

볼 수 있었다. 반면, KNO₃ 0.1 mM에서는 Fe(II)양이 대조군과 거의 유사하게 나타나는데, 이 결과로 보아 낮은 농도의 nitrate는 Fe(III) 환원에 큰 영향을 미치지 않는다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 7). DiChristina는 nitrogen oxide의 환원이 Fe(III)에 의해서는 영향을 받지 않지만, Fe(III) 환원은 NO₂⁻나 NO₃⁻에 의해서 부분적으로 저해된다고 보고했다(3). NO₃⁻가 Fe(III)의 환원을 부분적으로 저해할지라도 Nitrate가 Fe(II) 생산의 chemical oxidant이거나 Fe(III)에 전자전달을 방해하는 경쟁적 저해제는 아니라는 것이다. 즉, nitrate가 Fe(III)의 환원에 영향을 미치는 것은 respiratory electron의 선택적인 shuttling에 의한 것이다(3).

탄소원, 질소원, 인의 첨가에 따른 저질토에서의 Fe(III) 환원

천호지 저질토에 탄소원으로 lactate를 첨가한 후 8일까지 멸균

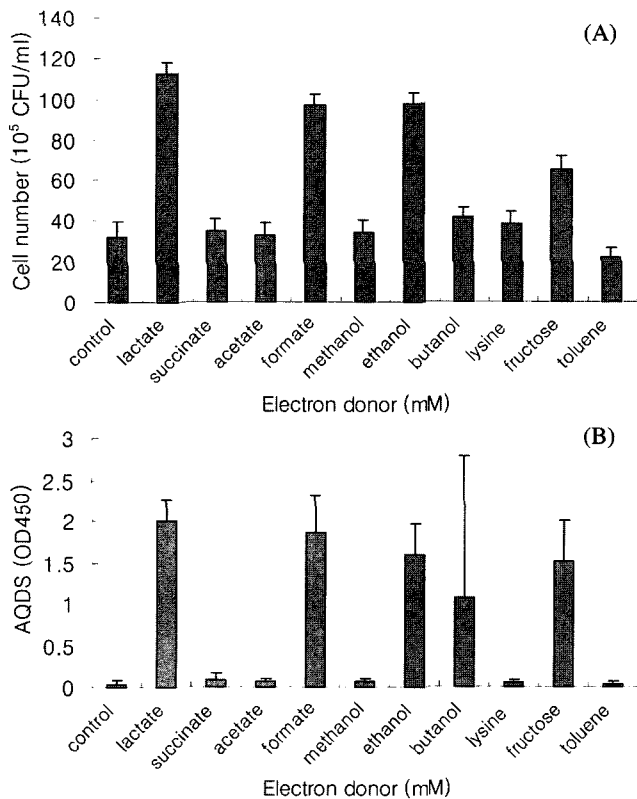


Fig. 5. (A) Anaerobic growth of *Shewanella putrefaciens* DK-1 with various organic compounds as electron donors and AQDS as an electron acceptor. (B) AQDS reduction according to the different organic compounds as electron donors.

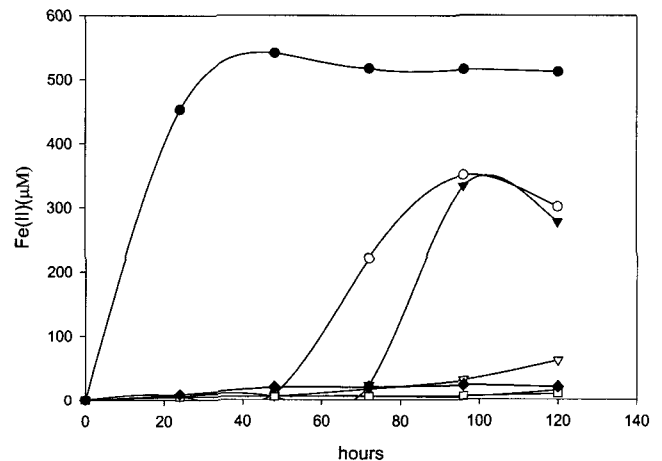


Fig. 6. Effects of nitrite on iron reduction by *Shewanella putrefaciens* DK-1. (●: control, ○: KNO₂ 0.1 mM, ▼: KNO₂ 0.5 mM, ▽: KNO₂ 1 mM, ■: KNO₂ 5 mM, □: KNO₂ 10 mM, ◆: Fe(III) only).

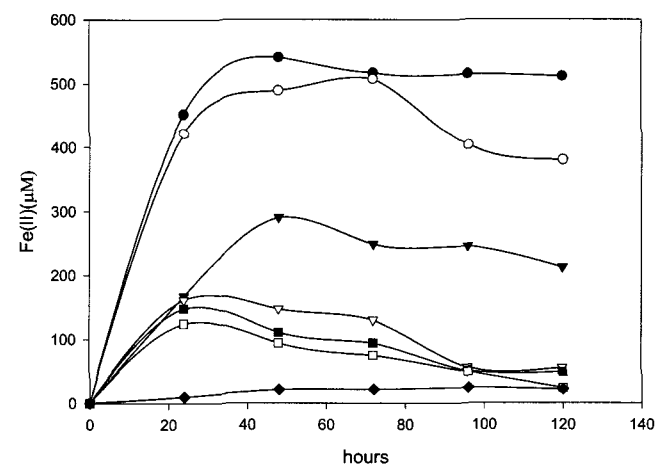


Fig. 7. Effects of nitrate on iron reduction by *shewanella putrefaciens* DK-1. (●: control, ○: KNO₃ 0.1 mM, ▼: KNO₃ 0.5 mM, ▽: KNO₃ 1 mM, ■: KNO₃ 5 mM, □: KNO₃ 10 mM, ◆: Fe(III) only).

하지 않고 균을 접종해 준 시료에서 Fe(II) 생산량이 463 μM 로 월등히 높게 나타났다. 멸균하지 않은 시료와 멸균하고 균을 접종해 준 시료에서는 각각 129 μM , 201 μM 로 거의 비슷하게 Fe(II)양이 증가하는 결과를 볼 수 있었고 그 이후에는 정체되는 현상을 보였다(Table 1). 질소원을 첨가해 준 경우, 탄소원을 첨가했을 때 보다 낮은 Fe(III) 환원율을 보였으며, 멸균하지 않고 균을 첨가한 시료에서 346 μM 로 Fe(II) 생산량이 가장 높게 나타났다(Table 1). 또한 인을 첨가한 경우에는 탄소원이나 질소원을 첨가했을 때 비해 낮은 환원율을 보였으며(Table 1). 대호저수지의 초기 Fe(II) 함유량은 천호지보다 높았고, 천호지와 마찬가지로

지로 탄소 원을 첨가해 주었을 때 멸균하지 않고 균을 접종한 시료에서 Fe(II) 생산량이 498 μM 로 가장 높았다(Table 2). 질소원과 인을 첨가해 주었을 때도 멸균하지 않고 균을 접종해 준 시료에서 각각 453 μM , 378 μM 로 멸균만 하거나 균만 접종해 준 시료에서 보다 높은 Fe(II) 생산량을 나타내었다(Table 2). 대호 저수지는 자연농법을 실시하는 농지이며 관개시설이 우수하여 일정한 수위를 유지하고 고농도 유기물의 유입이 없기 때문에 천호지의 시료보다 Fe(II) 함유량이 높았다. 이 지역의 저질토를 이용해 천호지의 시료와 동일한 방법으로 실험해 보았더니 역시 탄소원으로 lactate를 첨가해 주었을 때 가장 높은 Fe(III) 환원을 나타냈다. 탄소원, 질소원, 인을 넣어준 모든 경우, 멸균하지 않은 시료에서 가장 높은 Fe(III) 환원을 나타내는 것으로 보아 시료 자체 내에 Fe(III) 환원 세균이 있거나, 시료내의 bacteria와 *Shewanella putrefaciens* DK-1이 서로 상호 작용을 하고 있다고 추측할 수 있었다.

지금까지는 환경시료에 분포하는 미생물들의 계통분석학적 연구나 금속을 환원시키는 균을 분리하여 특성을 알아보는 연구는 많이 진행되어왔지만 분리된 균을 환경 시료에 적용함에 있어서 여러 가지 문제가 있었다. 이 실험 결과는 비록 소규모로 진행되었지만 토양에서 분리된 Fe(III) 환원 세균인 *Shewanella putrefaciens* DK-1을 직접 다양한 토양에 적응시켜 탄소, 질소, 인에 따른 Fe(II) 생산량을 측정해 봄으로써, *Shewanella putrefaciens* DK-1이 저질토와 같은 자연환경 시료에서도 Fe(III) 환원능을 나타낸다는 것을 확인하였다.

감사의 글

이 연구는 2002년도 단국대학교 대학 연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 박재홍, 이일규, 전은형, 안태영. 2002. 천호지 저질토에서 분리한 철 환원 세균의 특성. 한국 미생물학회지 38, 133-138.
2. Canfield, D. E. 1989. Reactive iron in marine sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta* 53, 619-632.
3. DiChristina, T. J. 1992. Effect of nitrate and nitrite on dissimilatory iron reduction by *Shewanella putrefaciens* 200. *J. Bacteriol.* 174, 1891-1896.
4. Lovley, D.R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.* 55, 259-287.
5. Lovley, D.R. 1993. Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 263-291.
6. Lovley, D.R. and D.J. Lonergan. 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1858-1864.
7. Lovley, D.R. and E.J.P. Phillips. 1986. Organic matter mineralization with Reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 683-689.
8. Lovley, D.R. and E.J.P. Phillips. 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: Organic carbon oxidation coupled to dissimi-

Table 1. Effects of nutrients on Fe(III) reduction in the sediment of Chunho reservoir

day	Fe(II)(μM) Sterilized		Fe(II)(μM) Nonsterilized	
	no inoculated	inoculated	no inoculated	inoculated
C	0	0.0	0.0	0.0
	4	1.6	86.7	161.0
	8	15.9	155.0	161.2
	12	0.0	201.2	129.8
N	0	0.0	0.0	0.0
	4	11.8	0.0	27.1
	8	13.3	65.9	58.6
	12	0.0	116.8	157.9
P	0	0.0	0.0	0.0
	4	13.4	1.1	9.8
	8	0.0	106.2	119.5
	2	0.0	116.3	101.5

Table 2. Effects of nutrients on Fe(III) reduction in the sediment of Daeho reservoir

day	Fe(II)(μM) Sterilized		Fe(II)(μM) Nonsterilized	
	no inoculated	inoculated	no inoculated	inoculated
C	0	0.0	0.0	0.0
	4	30.6	142.0	280.9
	8	90.1	229.7	283.2
	12	60.7	270.3	291.0
N	0	0.0	0.0	0.0
	4	53.7	129.2	218.0
	8	95.6	150.4	248.8
	12	95.6	146.9	213.8
P	0	0.0	0.0	0.0
	4	58.3	119.7	182.6
	8	84.9	170.2	183.1
	12	85.8	168.7	175.3

- latory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472-1480.
9. Lovley, D.R., E.J.P. Phillips, and D.J. Lonergan. 1989. Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese by *Alteromonas putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 700-706.
 10. Lovley, D.R., E.J.P. Phillips, and D.J. Lonergan. 1991. Enzymatic versus nonenzymatic mechanisms for Fe(III) reduction in aquatic sediments. *Environ. Sci. Technol.* 25, 1062-1067.
 11. Lovley, D.R., E.J.P. Phillips, F. Caccavo Jr., H.K. Neelson, and C. Myers. 1992. Letter to the editor: Acetate oxidation by dissimilatory Fe(III) reducers. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3205-3208.
 12. Lovley, D.R., E.J.P. Phillips, D.J. Lonergan, and P.K. Widman. 1995. Fe(III) and S⁰ oxidation by *Pelobacter carbinolicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2132-2138.
 13. Lovley, D.R., J.D. Coates, E.L. Blunt-Harris, E.J.P. Phillips, and J. Woodward. 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382, 445-448.
 14. Lovley, D.R., J.L. Fraga, J.D. Coates, and E.L. Blunt-Harris. 1999. Humic as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* 1, 89-98.
 15. Lovley, D.R., J.C. Woodward, and F.H. Chapelle. 1996. Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 288-291.
 16. Myers, C.R. and K.H. Neelson. 1990. Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Bacteriol.* 172, 6232-6238.
 17. Neelson, K.H. and C.R. Myers. 1992. Microbial reduction of manganese and iron: New approaches to carbon cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 439-443.
 18. Saffarini, D.A., T.J. Dichrestina, D. Bermudes, and K.H. Neelson. 1994. Anaerobic respiration of *Shewanella putrefaciens* requires both chromosomal and plasmid-borne genes. *Microbiol. lett.* 119, 271-278.

(Received August 14, 2003/Accepted September 5, 2003)

ABSTRACT: Utilization of Various Electron Acceptors in *Shewanella putrefaciens* DK-1
Ah-Young Cho, Il-Gyu Lee, Eun-Hyoung Jeon and Tae-Young Ahn*
 (Dept. of Microbiology, Dankook University, Chunan 330-714, Korea)

Microbial Fe(III) reduction is an important factor for biogeochemical cycle in anaerobic environments, especially sediment of freshwater such as lakes, ponds and rivers. In addition, the Fe(III) reduction serves as a model for potential mechanisms for the oxidation of organic compounds and the reduction of toxic heavy metals, such as chrome or uranium. *Shewanella putrefaciens* DK-1 was a gram-negative, facultative anaerobic Fe(III) reducer and used ferric ion as a terminal electron acceptor for the oxidation of organic compounds to CO₂ or other oxidized metabolites. The ability of reducing activity and utilization of various electron acceptors and donors for *S. putrefaciens* DK-1 were investigated. *S. putrefaciens* DK-1 was capable of using a wide variety of electron acceptor, including NO₃⁻, Fe(III), AQDS, and Mn(IV). However, its ability to utilize electron donors was limited. Lactate and formate were used as electron donors but acetate and toluene were not used. Fe(III) reduction of *S. putrefaciens* DK-1 was inhibited by the presence of either NO₃⁻ or NO₂⁻. Further *S. putrefaciens* DK-1 used humic acid as an electron acceptor and humic acid was re-oxidized by nitrate. Environmental samples showing the Fe(III)-reducing activity were used to investigate effects of the limiting factors such as carbon, nitrogen and phosphorus on the Fe(III) reducing bacteria. The highest Fe(III) reducing activity was measured, when lactate as a carbon source and *S. putrefaciens* DK-1 as an Fe(III) reducer added in untreated sediment samples of Cheon-ho and Dae-ho reservoirs.