

穿梭体影响微生物群落胞外电子传递过程的研究

陈丹丹^{1, 2, 3}, 罗小波³, 李芳柏³

1. 中国科学院广州地球化学研究所, 广东 广州 510640; 2. 中国科学院大学, 北京 100039;

3. 广东省生态环境技术研究所, 广东 广州 510650

摘要: 微生物是土壤、湖泊、沉积物中重要的活性物种。胞外呼吸是微生物主要的能量代谢方式, 是微生物与胞外受体间进行电子传递的主要路径。胞外电子传递过程是胞外呼吸作用的重要组成部分, 影响着环境中的物质转变和能量交换。研究发现胞外电子传递方式主要包括直接电子传递和间接电子传递两大类。其中, 直接电子传递方式主要分为直接接触、纳米导线和纳米导线网络; 间接电子传递以穿梭体介导的电子传递为主。腐殖质是自然界中重要的氧化还原活性物种, 能作为穿梭体参与间接电子传递过程。已有的研究表明穿梭体能影响单菌体系微生物胞外电子传递过程, 但其影响微生物群落胞外电子传递过程的研究更具实际意义。本实验以浅海沉积物为研究对象, 构建微生物燃料电池 (Microbial Fuel Cell, MFC), 结合电化学方法研究在核黄素、AQDS、2-HNQ 3 种穿梭体介导下, 微生物群落燃料电池的输出电压、极化曲线、功率密度等电化学参数的变化情况, 以此来表征穿梭体对微生物群落胞外电子传递过程的影响。研究结果表明: (1) 浅海沉积物中存在能进行胞外呼吸的微生物且能成功启动微生物燃料电池; (2) 穿梭体的表观电极电位越低, 其介导的微生物燃料电池的输出电压越高, 此研究结果与纯菌体系相同; (3) 纯菌体系中穿梭体的表观电极电位是胞外电子传递速率的决定因素, 但在群落体系中并不成立。

关键词: 胞外呼吸; 电子穿梭体; 微生物燃料电池; 表观电极电位; 浅海沉积物

DOI: 10.16258/j.cnki.1674-5906.2017.08.018

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 1674-5906 (2017) 08-1419-07

引用格式: 陈丹丹, 罗小波, 李芳柏. 2017. 穿梭体影响微生物群落胞外电子传递过程的研究[J]. 生态环境学报, 26(8): 1419-1425.

CHEN Dandan, LUO Xiaobo, LI Fangbai. 2017. Effects of shuttles on extracellular electron transfer of microbial community [J]. Ecology and Environmental Sciences, 26(8): 1419-1425.

微生物的呼吸作用包括有氧呼吸、胞内无氧呼吸、发酵作用等, 除此之外, 近年发现了一种新的能量代谢方式, 即胞外无氧呼吸, 简称胞外呼吸 (Gralnick et al., 2007)。胞外呼吸的末端电子受体位于胞外, 不能穿过生物膜进入细胞内接受电子, 这类电子受体包括土壤中的腐殖质、矿物等 (Myers et al., 1988; 黎慧娟等, 2012)。近年研究发现, 微生物燃料电池的电极也可作为胞外电子受体, 并可采用微生物燃料电池电化学参数表征受体接受电子的情况, 由此建立了一种胞外呼吸的电化学研究方法。胞外呼吸被定义为: 厌氧条件下, 微生物在细胞内彻底氧化有机物释放电子, 产生的电子经胞内呼吸链传递到胞外电子受体使其还原, 同时产生能量维持微生物自身生长的过程 (Paquette et al., 2014)。已有研究表明, 微生物能通过胞外呼吸作用参与重金属迁移转化和有机污染物降解等过程, 具有重要的环境地球化学意义 (Logan et al., 2005;

Lovley, 2006)。然而, 由于微生物本身并不导电, 其胞内产生的电子穿过非导电的细胞膜还原胞外电子受体的电子传递路径成为了胞外呼吸作用的研究重点。研究发现, 微生物在胞内氧化有机物产生的电子是通过细胞内膜、周质空间及外膜的多种细胞色素 c 的氧化还原作用传递至外膜的, 这些细胞色素 c 组成了一条可以穿过非导电细胞膜的跨膜电子传递链 (Firer-Sherwood et al., 2008)。电子从产生到传递至外膜的过程属于胞内的电子传递, 电子到达外膜后继续传递至胞外电子受体的过程称为胞外电子传递 (马晨等, 2011)。研究发现, 电子从外膜细胞色素 c 传递至胞外电子受体的方式有多种, 包括直接接触电子传递、纳米导线电子传递、穿梭体介导电子传递以及穿梭体与外膜细胞色素 c 形成半醌复合物电子传递等 (Lovley, 2008; 吴云当等, 2016)。

穿梭体是一类可通过自身的氧化还原作用运

基金项目: NSFC-广东联合基金项目 (U1401234); 广东省科技计划项目 (2013B090500031; 2015B020207001)

作者简介: 陈丹丹 (1990 年生), 女, 硕士, 研究方向为土壤分子过程。E-mail: chendandan_soil@163.com

收稿日期: 2017-04-10

载电子的可溶性有机物。它接受微生物外膜细胞色素 c 的电子后被还原,再扩散至胞外的电子受体周围被氧化,被氧化的穿梭体又可继续从微生物接受电子,以此循环穿梭于微生物与胞外电子受体之间(陈蕾等,2013)。穿梭体在自然界中广泛存在,腐殖质、植物根系分泌物、细胞自身合成的氧化还原介体等均能作为穿梭体从胞内呼吸链末端得到电子,再将电子转移至电子受体。穿梭介导的胞外电子传递过程是由 Newman et al. (2010) 研究发现的,其研究表明醌类物质在胞外电子传递过程中具有加速电子传递的能力,这些醌类物质接受微生物从胞内产生的电子后被还原,再将电子传递至胞外电子受体后被氧化。这类醌类物质就是典型的电子穿梭体,由其介导的电子传递过程即为穿梭体介导的胞外电子传递。Marsili et al. (2008) 采用电化学方法研究胞外呼吸模式菌 *Shewanella* 在穿梭体介导下的胞外电子传递过程,结果发现 *Shewanella* 自身能分泌核黄素介导胞外电子传递,在其介导作用下胞外电子传递速率大大提高,并实现了较强的胞外呼吸,这是微生物调节代谢的一种重要形式。Wolf et al. (2009) 关于腐殖质和醌类作为穿梭体加速异化铁还原过程的研究结果表明,介导胞外电子传递的穿梭体集中于一个最优的电位区间 $-137\sim-225$ mV 和 NHE (相对标准氢电极电压, $\text{pH}=7$) 内,穿梭体电位等热力学参数决定着穿梭体介导的异化铁还原速率。Wu et al. (2014) 关于外源穿梭体介导 *Shewanella* 胞外电子传递过程的研究进一步理清了穿梭体电位对穿梭过程的影响,并提出了“穿梭过程能量损失”的新概念。

自然界中广泛存在能进行胞外呼吸的微生物,目前,关于胞外呼吸研究较多的是水稻土、湖底泥等基质中存在的各种异化铁还原过程。已报道的能进行胞外呼吸的微生物有地杆菌(*Geobacter*) (Bond et al., 2002; Holmes et al., 2004a; Methe et al., 2003)、希瓦氏菌(*Shewanella*) (Kim et al., 1999; Kim et al., 2002)、铁还原红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*) (Chaudhuri et al., 2003) 等。浅海沉积物长期处于厌氧环境并含有丰富的铁锰矿,铁锰矿可作为胞外电子受体,有利于微生物进行胞外呼吸作用(吴鹏等,2011)。本实验以位于广东省阳江市粤西海域中段海陵湾(地理位置 $21^{\circ}34'\sim 21^{\circ}45'N$, $111^{\circ}41'\sim 111^{\circ}54'E$) 典型的浅海沉积物为微生物接种源,利用电化学方法研究穿梭体介导下微生物群落胞外电子传递热力学和动力学过程,同时采用高通量测序的方法研究浅海沉积物的微生物群落结构。虽然,目前已有更多关于穿梭体介导的微生物胞外电子传递过程的研究,但是已

有研究主要针对纯菌体系,而自然界微生物都是以群落的形式存在的。因此,研究穿梭体介导的微生物群落胞外电子传递的过程更具有实际意义,对其作用机理的研究将有助于人们全面认识自然界中的胞外呼吸过程。

1 材料与方法

1.1 电池的组装

本实验采用有膜、双室型微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC),阳极室体积为 80 mL,阴极室体积为 65 mL,并采用质子交换膜(Nafion117 美国 Du Pont 公司)将其隔开。质子交换膜在使用前用 3% 的 H_2O_2 煮沸 1 h 以除去表面有机物,然后分别用 80 $^{\circ}\text{C}$ 去离子水、 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸和常温去离子水处理 1 h,最后浸泡在去离子水中(Logan et al., 2006)。电池的电极采用碳毡和钛丝制作而成,碳毡的面积为 $3.5\text{ cm}\times 3.5\text{ cm}$ (王跃强等,2013)。

1.2 微生物的培养

微生物接种源:取自广东省阳江市粤西海域中段海陵湾的浅海沉积物,以沉积物质量与阳极缓冲液体积之比为 1:8 的比例接种。

微生物氧化底物: $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖。

阳极室缓冲液: $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液($\text{pH}=7.0$),每升缓冲液中加入 10 mL 维生素和 10 mL 矿物元素。磷酸盐缓冲液的配方为: $1.24\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NH}_4\text{Cl}$, $0.52\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KCl}$, $46.17\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $11.09\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Tang et al., 2010)。维生素溶液: $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 生物素, $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 叶酸, $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 二盐酸吡哆醇, $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 核黄素, $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫胺素, $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 烟酸, $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 泛酸, $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ B-12}$, $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对氨基苯甲酸, $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫辛酸。每升矿物元素溶液含: 1.5 g 次氨基三乙酸钠, $3\text{ g}\text{ MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.5\text{ g}\text{ MnSO}_4$, $1.0\text{ g}\text{ NaCl}$, $0.1\text{ g}\text{ FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.1\text{ g}\text{ CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.1\text{ g}\text{ CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.13\text{ g}\text{ ZnCl}_2$, $0.01\text{ g}\text{ CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.01\text{ g}\text{ AlK}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $0.01\text{ g}\text{ H}_3\text{BO}_3$, $0.025\text{ g}\text{ Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.024\text{ g}\text{ NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.025\text{ g}\text{ Na}_2\text{WO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.02\text{ g}\text{ Na}_2\text{SeO}_4$ (Weber et al., 2009)。

阴极室电解液: $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 。

穿梭体:2-羟基-1,4-萘醌(2-HNQ, 97%, 百灵威)、蒽醌-2,6-二磺酸(AQDS, 98%, TCI, 日本)和核黄素(Riboflavin, 98%, Aladdin, 中国),母液物质的量浓度均为 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.3 测试和分析方法

双室电池组装完成后,称取 8.5 g 浅海沉积物与 68 mL 的阳极缓冲液加入阳极室,穿梭体介导的电池组还需向阳极室加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的穿梭体,再通氮

气 30 min, 安装阳极碳毡电极后用丁基橡胶塞密封阳极室并置于厌氧培养箱中 (DG250, Don Whitley Scientific, 英国。TerAvest et al., 2014)。阴极加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 敞开, 以碳毡为电极, 外接 1000Ω 电阻 (Yong et al., 2013)。微生物燃料电池组装完成后, 整个运行和测试过程均置于 30°C 恒温培养箱中。

MFC 的输出电压采用 32 通道信号采集器 (AD8223, 中国) 自动采集数据。当输出电压下降到一定值后, 向 MFC 阳极室添加葡萄糖, 使输出电压再次上升。电流值 (I) 通过欧姆定律 $I=U/R$ 计算得到, 其中, R 表示外电阻, U 为输出电压。当 MFC 的电压稳定后, 接入可变电阻箱 (ZX21, 中国上海精密科学仪器有限公司) 控制外电阻 ($20\sim 8000 \Omega$), 待输出电压稳定后, 使用万用表 (UT61B, UNI-T, 中国) 记录电压值。根据公式 $P=U^2/R$, $P_{An}=IU/A$ 和 $J=I/A$ (A 表示阳极面积) 分别计算出输出功率 (P)、功率密度 (P_{An}) 以及电流密度值 (J), 绘制极化曲线和功率密度曲线以进一步分析。利用电化学工作站 (CHI660D, 中国上海) 绘制 3 种不同穿梭体的循环伏安曲线, 确定其在反应体系中的氧化还原电位。

采用高通量焦磷酸测序的方法研究胞外呼吸微生物的群落结构 (Kim, 2004)。利用 DNA 提取试剂盒 PowerSoil™ (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) 提取浅海沉积物样品的微生物基因组 DNA。利用 16S rRNA 基因 V4 区的引物 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTAA-3') 和 806R (5'-GGA CTA CVS GGG TAT CTA AT-3') 进行 PCR 扩增。扩增体系 ($30 \mu\text{L}$) 如下: $15 \mu\text{L}$ $2\times\text{Ex Taq PCR Mix}$, $0.5 \mu\text{L}$ $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的正反向引物, $1 \mu\text{L}$ DNA 模板, 加超纯水至终体积 $30 \mu\text{L}$ 。扩增反应条件为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s, 31 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。PCR 扩增产物利用 OMEGA 胶回收纯化试剂盒 (E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit) 进行纯化。纯化后的 PCR 产物浓度采用 Qubit 2.0 (Invitrogen, NY, USA) 测定后进行高通量焦磷酸测序 (Illumina MiSeq, Macrogen)。

2 结果与分析

2.1 沉积物胞外电子传递及微生物群落结构分析

浅海沉积物微生物燃料电池培养 4 个周期后的输出电压如图 1 所示。MFC 在每个周期内的输出电压都经历上升、稳定、下降 3 个阶段。在第 1 周期, 沉积物中能进行胞外呼吸的微生物将胞内氧化葡萄糖产生的电子传递至阳极, 使输出电压先上升至 430 mV 左右。微生物持续氧化葡萄糖产电以维持

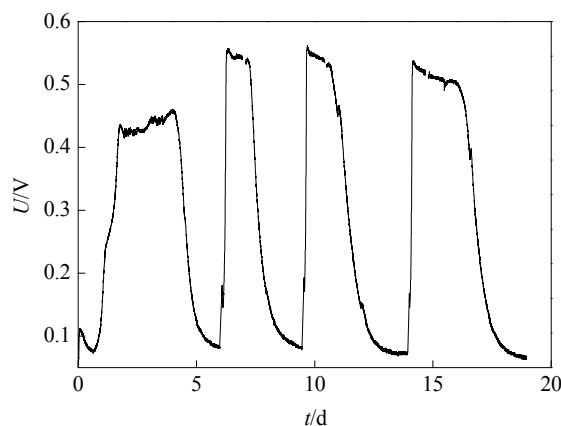


图 1 微生物燃料电池运行的 4 个周期

Fig. 1 The four operational cycles for microbial fuel cell

着稳定的输出电压, 稳定约 72 h 后, 微生物没有足够的底物利用, 电压迅速降低至 50 mV 以下。再次添加葡萄糖, MFC 的输出电压迅速上升, 然后又经历稳定、下降过程。浅海沉积物微生物燃料电池成功的产电, 输出电压周期的上升、稳定和下降都是微生物进行胞外呼吸作用的结果。

采用高通量焦磷酸测序的方法对浅海沉积物的微生物群落结构进行分析, 其在门和科水平上的分布情况如图 2 所示。图 2a 为门水平上丰度大于 0.5% 的群落结构, 结果显示, 隶属于变形菌门 (Proteobacteria) 的微生物含量最多, 占 27.15%, 其次是门水平上未分类的微生物, 占 20.20%, 绿弯菌门 (Chloroflexi) 占 19.55%, 泉古菌门 (Crenarchaeota) 占 7.55%, 广古菌门 (Euryarchaeota) 占 5.44%, 硝化螺旋菌门 (Nitrospirae) 占 4.67%, 浮霉菌门 (Planctomycetes) 占 4.27%, 酸杆菌门 (Acidobacteria) 占 2.37% 等。已有研究显示, 有大量的胞外呼吸微生物隶属于变形菌门, 如胞外呼吸的模式菌: 希瓦氏菌 *Shewanella* 和地杆菌 *Geobacter* (Bond et al., 2003; Srikanth et al., 2008)。因此, 浅海沉积物中可能存在能进行胞外呼吸的微生物。图 2b 是科水平上丰度大于 0.5% 的群落结构, 其中, 只有 Desulfobulbaceae (Holmes et al., 2004b) 和 Rhodospirillaceae (Chaudhuri et al., 2003) 是目前已有研究报道能进行胞外呼吸的微生物。同时, 科水平上未分类的微生物所占比例非常大, 已接近 60%, 说明浅海沉积物中存在大量未知微生物。高通量测序结果再次验证, 浅海沉积物中确实存在已报道的能进行胞外呼吸的微生物, 同时, 科水平上大量未知微生物的存在说明浅海沉积物能作为筛

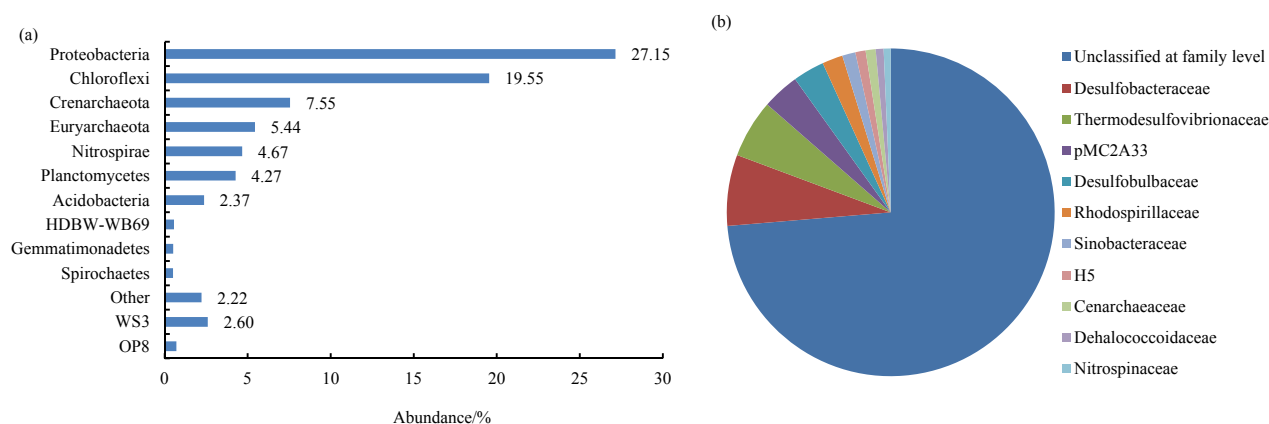


图2 浅海沉积物在微生物门类 (a) 和优势科 (b) 水平上的相对丰度。

Fig.2 Relative abundance (%) of the microbial phyla (a) and dominant family (b) in shallow-sea sediments

选具有胞外呼吸能力新菌种的“发源地”。

2.2 不同穿梭体介导的沉积物胞外电子传递热力学研究

由实验可知, 沉积物微生物燃料电池在未添加穿梭体时可以产生一定的输出电压。添加不同穿梭体构建的浅海沉积物微生物燃料电池的输出电压变化情况如图3所示。由图可知, 添加穿梭体的MFCs (microbial fuel cells, MFCs) 输出电压均大于未添加穿梭体, 核黄素介导的MFC输出电压最高可达到700 mV, 而未添加穿梭体的MFC输出电压最高只能达到550 mV。未添加穿梭体时, MFC阳极室中只有电极周围较小范围内的微生物可以通过直接接触、纳米导线或者自身分泌穿梭体 (Covington et al., 2010) 等胞外电子传递方式将电子从外膜细胞色素c传递至电极, 使输出电压上升。添加穿梭体的MFCs阳极室中, 距离阳极较远的微生物可在穿梭体介导作用下将其外膜细胞色素c上的电子传递至阳极, 近距离的

微生物同样可以选用该方式将电子传递至阳极, 这就极大地提升了阳极获得的电子量, 输出电压明显升高。同时, 结果显示, 3种不同穿梭体对MFCs输出电压的增加效果不同, 在4个周期中, 核黄素对MFCs输出电压的提升最明显, 其次是AQDS和2-HNQ。

采用三电极体系对3种穿梭体进行循环伏安法(CV)测试, 如图4所示, 3种穿梭体在体系中的表观电极电位值分别是: 核黄素(Riboflavin) -225 mV, AQDS -184 mV, 2-HNQ-137 mV, 大小顺序为: Riboflavin < AQDS < 2-HNQ。分析结果表明, 穿梭体的表观电极电位值与其介导的MFCs的输出电压值 (Riboflavin > AQDS > 2-HNQ > No shuttle) 呈显著负相关。当电子流经胞外呼吸微生物—穿梭体—电极时, 其最主要的能量损失发生在“微生物—穿梭体”部分, 两者之间的电势降主要通过热能的形式散失 (Wu et al., 2014), 满足以下方程: $\Delta E = E_{c-Cyt} - E_{ES}$, 其中, E_{c-Cyt} 代表胞外呼吸

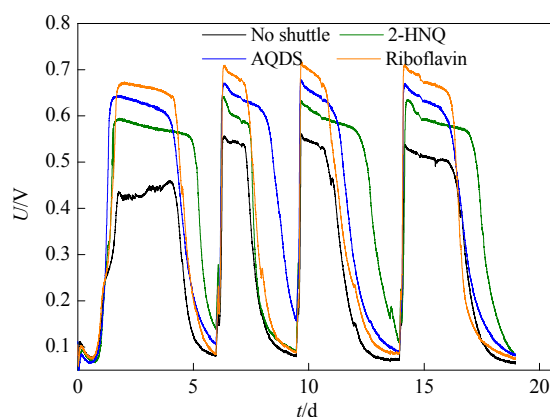


图3 不同穿梭体介导下微生物燃料电池运行过程的输出电压

Fig.3 The output voltage of microbial fuel cells with different electron shuttles (2-HNQ, AQDS and riboflavin)

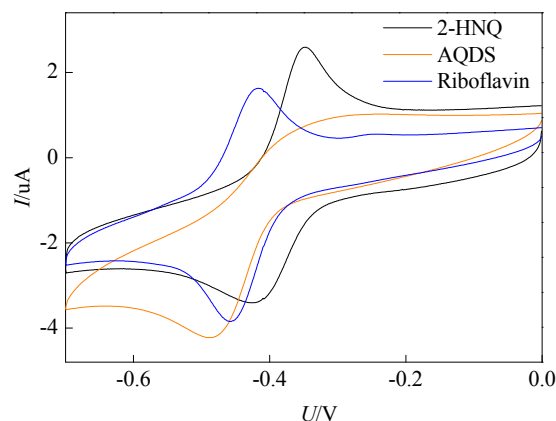


图4 3种穿梭体 Riboflavin、AQDS、2-HNQ 的循环伏安曲线 (CV)

Fig.4 The cyclic voltammetry curve of three different electron shuttles (riboflavin, AQDS and 2-HNQ)

微生物外膜细胞色素 *c* 的表观电极电位, E_{ES} 代表穿梭体的表观电极电位, E_{ES} 负值越大, 越接近 E_{c-Cyt} , ΔE 越小, 能量损失就越少, 输出电压就越高。这一分析结果与本实验结果相一致, 说明穿梭体的表观电极电位与其介导的微生物燃料电池的输出电压有关。

2.3 不同穿梭体介导的沉积物胞外电子传递动力学研究

采用暂态法测试 MFCs 在第 1 和第 4 周期稳定时不同外接电阻条件下的阳极电势和阴极电势的变化, 用以获得其相应的极化曲线, 结果如图 5。图 5(a) 显示, 阴极电势随电流密度的变化不明显, 且不同穿梭体介导的 MFCs 之间无明显差异, 而阳极电势差异则较大。阳极电势的变化与电池极化曲线(图 5(b)) 的趋势一致, 说明阳极电势的变化是 MFC 产生极化的主要因素, 即阳极的极化程度决定着 MFCs 输出电流的大小。

图 6 所示为第 1 和第 4 周期不同 MFCs 的功率密度曲线。由图可知, 添加穿梭体 MFCs 的最大功率密度 (P_{max}) 明显高于未添加穿梭体; 并且, 添加与未添加穿梭体 MFCs 的最大功率密度都随培养周期的增加而增加。因此, 添加穿梭体、增加培养周期均可提高 MFCs 的最大功率密度, 增强输出电流, 加快胞外电子传递。

表 1 统计了微生物群落体系 MFCs 在第 1 和第 4 周期的最大功率密度值和表观内阻 (极化曲线斜

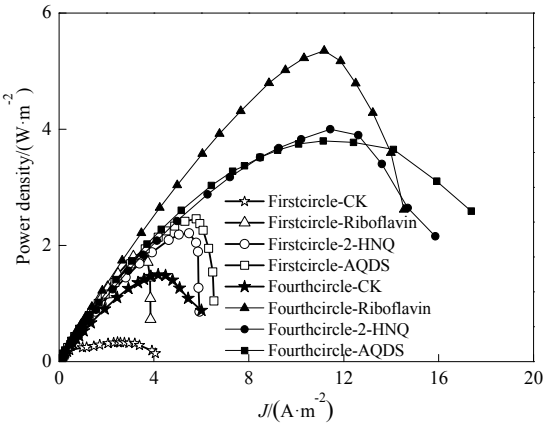


图 6 添加与不添加穿梭体 MFCs 在第 1 和第 4 周期的功率密度曲线
Fig. 6 The power density of MFCs with or without electron shuttles at the first and fourth cycles

表 1 MFCs 第 1 和第 4 周期的最大功率密度和表观内阻
Table 1 The maximal power density and apparent internal resistance of MFCs at the first and fourth cycles

Parameters	First circle		Fourth circle	
	$P_{max}/(W \cdot m^{-2})$	R_{int}/Ω	$P_{max}/(W \cdot m^{-2})$	R_{int}/Ω
No shuttle	0.33	59.93	1.48	49.40
Riboflavin	1.80	46.79	5.25	23.82
2-HNQ	2.15	41.89	3.91	28.87
AQDS	2.42	44.94	3.77	19.82

率, R_{int}), 结果显示, 在第 1 周期内, 不同 MFCs 最大功率密度顺序为: AQDS>2-HNQ>Riboflavin>

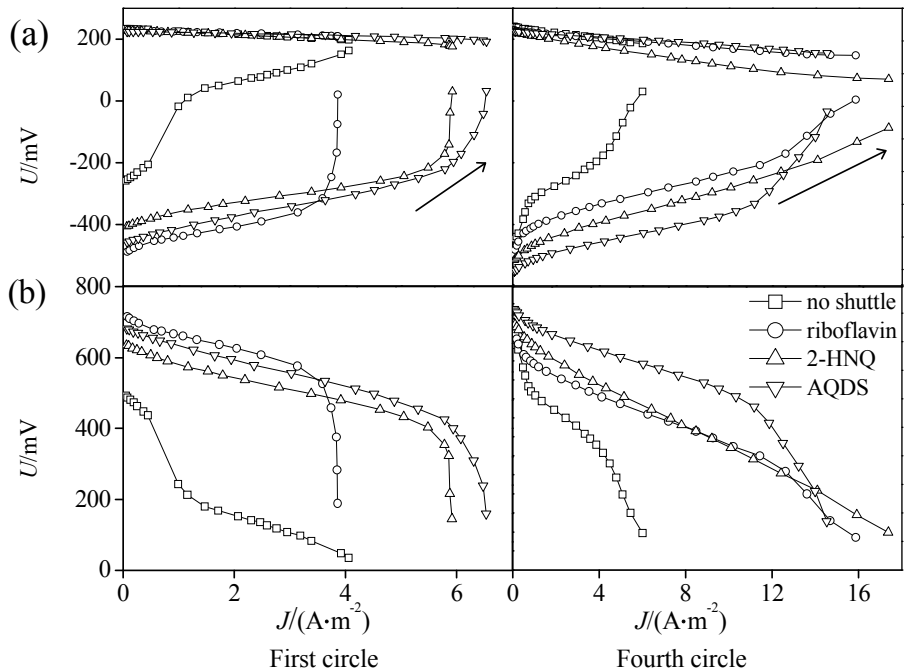


图 5 添加与不添加穿梭体 MFCs 在第 1 和第 4 周期的 (a) 电极电势 (b) 极化曲线

Fig. 5 (a) The electrode potential and (b) the polarization curve of MFCs with or without electron shuttles at the first and fourth cycles

No shuttle, 表观内阻顺序为: No shuttle>Riboflavin>AQDS>2-HNQ; 在第4周期, 最大功率密度顺序为, Riboflavin>2-HNQ>AQDS>No shuttle, 表观内阻顺序为: No shuttle>2-HNQ>Riboflavin>AQDS。第1和第4周期的最大功率密度与表观内阻没有显著相关性。结合3种穿梭体的表观电极电位分析, 发现穿梭体的表观电极电位与其介导的微生物群落MFCs 动力学性质对应的电化学参数没有相关性, 说明穿梭体的表观电极电位对胞外电子传递速率不具有决定性。而在纯菌体系中, 穿梭体表观电极电位与MFCs的电化学参数呈现良好的相关性(Wu et al., 2014)。这就说明: 穿梭体对纯菌和微生物群落体系的胞外电子传递速率作用效果不同。

3 结论与展望

运用电化学方法研究不同穿梭体对微生物群落体系胞外电子传递的影响, 得出以下结果:

(1) 浅海沉积物构建的微生物燃料电池能够成功启动并达到一定的输出电压, 说明浅海沉积物中存在能进行胞外呼吸的微生物, 高通量焦磷酸测序结果与此一致。

(2) 穿梭体的表观电极电位越低, 电子在从微生物传递到穿梭体过程的能量损失越少, MFCs 的输出电压就越高。

(3) 与纯菌体系的研究结果不同, 在微生物群落体系中, 穿梭体的表观电极电位可能不再是胞外电子传递速率的决定因素。

自然环境中广泛存在着穿梭体介导微生物群落胞外电子传递的现象, 对其过程和机理的研究具有重要意义。将来的研究工作可以向以下几个方向拓展: 研究穿梭体对胞外呼吸微生物群落结构的影响; 以沉积物为基质, 发掘能进行胞外呼吸的新模式菌, 并建立完善的分子生物学鉴定方法; 研究胞外电子传递对重要环境过程的影响, 如铁循环、碳循环、氮循环等。

参考文献:

- BOND D R, HOLMES D E, TENDER L M, et al. 2002. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments [J]. *Science*, 295(5554): 483-485.
- BOND D R, LOVLEY D R. 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3): 1548-1555.
- CHAUDHURI S K, LOVLEY D R. 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells [J]. *Nature Biotechnology*, 21(10): 1229-1232.
- COVINGTON E D, GELBMANN C B, KOTLOSKI N J, et al. 2010. An essential role for UshA in processing of extracellular flavin electron shuttles by *Shewanella oneidensis* [J]. *Molecular Microbiology*, 78(2): 519-532.
- FIRER-SHERWOOD M, PULCU G S, ELLIOTT S J. 2008. Electrochemical interrogations of the Mtr cytochromes from *Shewanella*: opening a potential window [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 13(6): 849-854.
- GRALNICK J A, NEWMAN D K. 2007. Extracellular respiration [J]. *Molecular Microbiology*, 65(1): 1-11.
- HOLMES D E, BOND D R, LOVLEY D R. 2004b. Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2): 1234-1237.
- HOLMES D E, NICOLL J S, BOND D R, et al. 2004a. Potential role of a novel psychrotolerant member of the family *Geobacteraceae*, *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10): 6023-6030.
- KIM B H, KIM H J, HYUN M S, et al. 1999. Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(2): 127-131.
- KIM G T. 2004. An investigation into the bacterial community structure of an electricity-generating microbial fuel cell [D]. United Kingdom: The University of Wales College of Cardiff.
- KIM H J, PARK H S, HYUN M S, et al. 2002. A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2): 145-152.
- LOGAN B E, HAMELERS B, ROZENDAL R A, et al. 2006. Microbial fuel cells: methodology and technology [J]. *Environmental Science & Technology*, 40(17): 5181-5192.
- LOGAN B E. 2005. Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation [J]. *Water Science and Technology*, 52(1-2): 31-37.
- LOVLEY D R. 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7): 497-508.
- LOVLEY D R. 2008. Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more [J]. *Geobiology*, 6(3): 225-231.
- MARSILI E, BARON D B, SHIKHARE I D, et al. 2008. *Shewanella* Secretes flavins that mediate extracellular electron transfer [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10): 3968-3973.
- METHE B A, NELSON K E, EISEN J A, et al. 2003. Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments [J]. *Science*, 302(5652): 1967-1969.
- MYERS C R, NEALSON K H. 1988. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor [J]. *Science*, 240(4857): 1319-1321.
- NEWMAN D K, KOLTER R. 2000. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer [J]. *Nature*, 405(6782): 94-97.
- PAQUETE C M, FONSECA B M, CRUZ D R, et al. 2014. Exploring the molecular mechanisms of electron shuttling across the microbe/metal space [J]. *Frontiers in microbiology*, 5: 318-318.
- SRIKANTH S, MARSILI E, FLICKINGER M C, et al. 2008. Electrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* cells immobilized on graphite paper electrodes [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(5): 1065-1073.

- TANG X, DU Z, LI H. 2010. Anodic electron shuttle mechanism based on 1-hydroxy-4-aminoanthraquinone in microbial fuel cells [J]. *Electrochemistry Communications*, 12(8): 1140-1143.
- TERAVEST M A, ROSENBAUM M A, KOTLOSKI N J, et al. 2014. Oxygen allows *Shewanella oneidensis* MR-1 to overcome mediator washout in a continuously fed bioelectrochemical system [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(4): 692-699.
- WEBER K A, HEDRICK D B, PEACOCK A D, et al. 2009. Physiological and taxonomic description of the novel autotrophic, metal oxidizing bacterium, *Pseudogulbenkiania* sp strain 2002 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3): 555-565.
- WOLF M, KAPPLER A, JIANG J, MECKENSTOCK R U. 2009. Effects of humic substances and quinones at low concentrations on ferrihydrite reduction by *Geobacter metallireducens* [J]. *Environmental Science & Technology*, 43(15): 5679-5685.
- WU Y D, LIU T X, LI X M, et al. 2014. Exogenous electron shuttle-mediated extracellular electron transfer of *Shewanella putrefaciens* 200: electrochemical parameters and thermodynamics [J]. *Environmental Science & Technology*, 48(16): 9306-9314.
- YONG Y C, YU Y Y, YANG Y, et al. 2013. Enhancement of extracellular electron transfer and bioelectricity output by synthetic porin [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(2): 408-416.
- 陈蕾, 超峰, 王郑, 等. 2013. 天然有机质对环境污染物的转化过程的介导作用[J]. *生态环境学报*, 22(7): 1244-1249.
- 黎慧娟, 彭静静. 2012. 异化 Fe(III)还原微生物研究进展[J]. *生态学报*, 32(5): 1633-1642.
- 马晨, 周顺桂, 庄莉, 等. 2011. 微生物胞外呼吸电子传递机制研究进展 [J]. *生态学报*, 31(7): 2008-2018.
- 王跃强, 胡勇杰, 李进, 等. 2013. 新型生物电 Fenton 法降解偶氮染料: 铁复合碳毡阴极研究[J]. *生态环境学报*, 22(5): 826-831.
- 吴鹏, 赵怡, 洪义国, 等. 2011. 南海北部海域底泥微生物的腐殖质还原性能研究[J]. *生态环境学报*, 20(1): 132-136.
- 吴云当, 李芳柏, 刘同旭. 2016. 土壤微生物—腐殖质—矿物间的胞外电子传递机制研究进展[J]. *土壤学报*, 53(2): 277-291.

Effects of Shuttles on Extracellular Electron Transfer of Microbial Community

CHEN Dandan^{1,2,3}, LUO Xiaobo³, LI Fangbai³

1. Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510640, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

3. Guangdong Institute of Eco-Environmental Sciences & Technology, Guangzhou 510650, China

Abstract: Microorganisms are the most important active species in soil, lakes and sediments. The main form of microbial energy metabolism was extracellular respiration, which was an important electron transfer pathway between microbe and extracellular electron acceptors. Extracellular electron transfer (EET), the essential part of extracellular respiration, can affect the conversion of matter and exchange of energy. In general, several extracellular electron transfer mechanisms have been proposed: direct electron transfers and indirect electron transfers. Direct electron transfer pathways contain direct contact, nanowires and nanowire networks. While, indirect electron transfer pathways mainly related with electron shuttles (ESs). Humus, an important redox active species in nature, can act as ESs participating in indirect electron transfer pathways. It was reported that ESs had an impact on EET in the single bacteria system. While, ESs-mediated EET of microbial community has more practical significance. In this study, microbial fuel cells (MFCs) were constructed by inoculating shallow-sea sediments for revealing the way of ESs affecting on the EET of microbial community. Electrochemical method was used to study the output voltage, polarization curve, power density of MFCs with different electron shuttles, riboflavin, AQDS and 2-HNQ. The results are as follows, (1) there are many extracellular respiration microorganism existing in shallow-sea sediments with the ability to activate the MFCs. (2) The apparent potentials of ESs have negative correlation with the output voltages of the MFCs inoculating shallow-sea sediments, which was the same with the single bacteria system. (3) Differing from the single bacteria system, the apparent potentials of ESs may not be the key factor for the rate of EET in the MFCs inoculating shallow-sea sediments anymore.

Key words: extracellular respiration; electron shuttles; microbial fuel cells; apparent potential; shallow-sea sediments