



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20210136

## 电子穿梭体核黄素对菌株 *Clostridium* sp. LQ25 异化铁还原性质的影响

袁媛, 刘洪艳

(天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457)

**摘要:** 菌株 *Clostridium* sp. LQ25 分离自海洋沉积物, 是一株发酵型异化铁还原细菌, 通过外加核黄素和测定内源核黄素分泌量, 分析外源型和内源型电子穿梭体对异化铁还原性质的影响. 在外源核黄素质量浓度为 40~120 mg/L 的范围内, 菌株 LQ25 的异化铁还原能力均得到显著提高 ( $P < 0.05$ ), 其中当核黄素质量浓度为 100 mg/L 时, 累积 Fe(II) 浓度达到最高, 为  $(7.73 \pm 0.05)$  mmol/L. 内源核黄素分泌量实验结果表明: 菌株 LQ25 能够分泌核黄素, 核黄素分泌量受到培养时间、Fe(III) 浓度等因素的影响. 在培养时间内, 菌株 LQ25 的核黄素分泌量呈现逐渐增加后再减少的变化趋势, 核黄素分泌量最高出现在培养 20 h 时, 相对荧光强度为  $49.50 \pm 3.92$ ; 在氢氧化铁为电子受体的异化铁培养条件下, 核黄素相对荧光强度为  $56.23 \pm 7.93$ , 比对照组(无氢氧化铁添加)核黄素分泌量提高 14.95%. 本研究数据进一步揭示了电子穿梭体介导的异化铁还原机制.

**关键词:** 发酵型异化铁还原细菌; *Clostridium* sp. LQ25; Fe(III) 还原; 核黄素

中图分类号: Q936 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2022)01-0011-07

## Effect of Electron Shuttle Riboflavin on the Dissimilation Iron Reduction Properties of *Clostridium* sp. LQ25

YUAN Yuan, LIU Hongyan

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

**Abstract:** In our experiment, the strain *Clostridium* sp. LQ25 was isolated from marine sediments. It is a fermentative dissimilar iron-reducing bacteria. By adding riboflavin and measuring the amount of endogenous riboflavin secretion, we analyzed the influence of exogenous and endogenous electron shuttles on the reduction properties of dissimilated iron. The experiment showed that within the range of exogenous riboflavin concentration of 40-120 mg/L, the dissimilation iron reduction ability of strain LQ25 was significantly improved ( $P < 0.05$ ), and when the riboflavin concentration was 100 mg/L, the cumulative Fe(II) concentration reached the highest, which was  $(7.73 \pm 0.05)$  mmol/L. Moreover, the experimental results of endogenous riboflavin secretion showed that strain LQ25 could secrete riboflavin, and the accumulation of riboflavin was affected by such factors as cultivation time and Fe(III). During the set cultivation time, the riboflavin secretion of strain LQ25 showed a trend of gradually increasing and then decreasing. The highest riboflavin secretion appeared when cultured for 20 hours, and the relative fluorescence intensity was  $49.50 \pm 3.92$ ; under the dissimilation iron cultivation condition of the electron acceptor, the relative fluorescence intensity of riboflavin was  $56.23 \pm 7.93$ , which increased the secretion of riboflavin by 14.95% compared with the control group (without iron hydroxide addition). The data of this experiment further reveal the dissimilar iron reduction mechanism mediated by the electron shuttle.

**Key words:** fermentative dissimilar iron-reducing bacteria; *Clostridium* sp. LQ25; Fe(III) reduction; riboflavin

微生物氧化分解释放出电子, 电子经呼吸链从有机物传递到胞外电子受体, 此过程称为胞外电子传递

收稿日期: 2021-06-04; 修回日期: 2021-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41606157)

作者简介: 袁媛(1997—), 女, 河北张家口人, 硕士研究生; 通信作者: 刘洪艳, 副教授, lhy1214@tust.edu.cn

(extracellular electron transfer, EET)<sup>[1]</sup>. 胞外电子传递过程经历两个阶段<sup>[2]</sup>: 第一阶段是有机物被氧化后产生的电子, 经由电子传递链上的组分传递至细胞内膜, 再由细胞色素蛋白或其他功能蛋白传递至细胞外膜; 第二阶段是电子从细胞外膜到末端电子受体的传递, 主要的 4 种方式为直接接触、纳米导线机制、应电运动和电子穿梭机制<sup>[3]</sup>.

异化铁还原是指微生物将有机物中的电子转移到以 Fe(Ⅲ) 为末端的电子受体的过程, 并在这一过程中将 Fe(Ⅲ) 还原为 Fe(Ⅱ). 希瓦氏菌(*Shewanella* sp.) 和地杆菌作为呼吸型异化铁还原菌中的模式菌, 在其胞外电子传递过程中, 细胞色素 c 作为不可缺少的一类蛋白质, 不仅可以将电子从细胞内膜转移到细胞外膜, 而且可以分泌到细胞外, 作为外膜蛋白参与细胞表面的电子传递<sup>[4]</sup>. Breuer 等<sup>[5]</sup>总结奥奈达希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis*) MR-1 存在 16 种细胞色素 c, 包括 MtrC、MtrF、OmcA、MtrA、MtrD、CymA 等. 对于呼吸型异化铁还原细菌, 胞外电子传递机制的研究主要集中于直接接触机制. 而在研究发酵型异化铁还原细菌 *Anoxybacter fermentans* DY22613<sup>T</sup> 的胞外电子传递机制时, Li 等<sup>[6]</sup>未发现该菌株的全基因组序列中有编码细胞色素 c 的基因. 对于缺少细胞色素 c 的发酵型异化铁还原细菌, 利用电子穿梭体可能是胞外电子传递的一种策略<sup>[7]</sup>.

电子穿梭体作为胞外电子传递的重要组成部分, 可介导微生物间、微生物与电子受体间以及电子供体与电子受体间的电子转移<sup>[8]</sup>. 电子穿梭体参与微生物胞外电子传递的基本过程: 氧化态电子穿梭体接受电子变成还原态, 还原态电子穿梭体将电子传递给胞外的电子受体完成一次电子传递, 而自身因失去电子又变回氧化态进行新一轮的电子传递<sup>[9]</sup>. 电子穿梭体按照来源可分为内源电子穿梭体和外源电子穿梭体. 内源电子穿梭体是依靠微生物自身分泌的氧化还原物质, 实现电子从供体到受体的传递, 而外源电子穿梭体是环境中原来就存在的或是人为添加物, 在微生物胞外电子传递过程中起到呈递电子的作用. 电子穿梭体按照化学组成可分为黑色素类、吩嗪类、腐殖质类、醌类和黄素类<sup>[10-14]</sup>.

核黄素作为电子穿梭体是由 Canstein 等<sup>[7]</sup>发现并确定的, 其研究结果表明菌株 *Shewanella oneidensis* MR-1 分泌胞外电子穿梭体黄素单核苷酸(FMN)和核黄素, 用于促进菌株 MR-1 生长和加速还原结晶度较差的 Fe(Ⅲ) 氧化物. 除了希瓦氏菌外, 研究者发

现在多株细菌中, 核黄素具备增强电子传递的能力, 例如硝酸盐还原菌(*Bacillus licheniformis*)<sup>[15]</sup>可以利用希瓦氏菌分泌的核黄素加速不锈钢的腐蚀, 而铁呼吸菌(*Methylophilus* sp.)<sup>[16]</sup>和丝状芽孢杆菌(*Cystobasidium slooffiae*)<sup>[17]</sup>均能自身分泌核黄素, 前者用于异化铁还原的胞外电子传递, 后者用于提高其生物电产量. 核黄素通常以游离的形态作为电子穿梭体发挥作用, 即菌体分泌的核黄素在细胞内接受电子变为还原态, 而后还原态的核黄素通过扩散将电子呈递至电子受体, 自身又变回氧化态, 以此过程不断循环<sup>[18]</sup>. 也有研究发现核黄素在促进菌株电子传递的过程中并非单一地发挥作用, 而是可以作为细胞色素 c 和 MtrC 的辅因子促进电子传递<sup>[11, 19-20]</sup>.

本实验以分离自海洋沉积物中的菌株 *Clostridium* sp. LQ25 为研究对象, 分析电子穿梭体核黄素对菌株异化铁还原性质的影响及菌株分泌核黄素的规律, 旨在为探究发酵型异化铁还原细菌的胞外电子传递机制提供新的思路.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

菌株 *Clostridium* sp. LQ25<sup>[21]</sup>由本课题组从海洋沉积物中分离得到, GenBank 号为 MK156151.

### 1.2 培养方法

培养基成分: 葡萄糖 20.0 g/L, L-半胱氨酸 0.5 g/L, NaCl 4.0 g/L, MgCl<sub>2</sub> 0.1 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g/L, 酵母粉 1.0 g/L, 胰蛋白胍 4.0 g/L, 200 mmol/L 氢氧化铁溶液 25 mL/L.

200 mmol/L 氢氧化铁溶液的制备: 称取 16.23 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 溶于 666 mL 去离子水中, 待完全溶解后使用 5 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 7.0 ± 0.5, 最后用去离子水反复洗涤沉淀并定容至 300 mL, 装瓶备用.

培养条件: pH 7.0 ± 0.5, 温度 35 °C, 置于厌氧罐(英国 Oxoid 公司)培养 36 h.

### 1.3 异化 Fe(Ⅲ) 还原性质

以氢氧化铁为电子受体, 厌氧培养菌株 50 h, 间隔取样, 测定累积 Fe(Ⅱ) 浓度, 并以此表示菌株 LQ25 铁还原能力, 分析菌株 LQ25 异化铁还原性质.

### 1.4 电子穿梭体

外源核黄素: 设置核黄素浓度梯度为 0、20、40、80、100、120、140 mg/L, 菌株 LQ25 分别接种于上述含不同浓度电子穿梭体的培养液中, 3 组平行样. 厌

氧培养 24 h 后,测定累积 Fe(II)浓度,分析外源电子穿梭体对异化铁还原细菌 LQ25 铁还原性质的影响。

内源核黄素:核黄素避光取样,7600g 离心 15 min,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤. 间隔时间取样,分别测定菌体密度(用  $A_{600}$  表示)和核黄素分泌量,分析菌体分泌核黄素的规律。

### 1.5 测定方法

菌株生长测定:分光光度计测定菌液  $A_{600}$ , 以此值表示菌株生长状况。

Fe(II)浓度测定:采用菲洛嗪(Ferrozine)分光光度法测定<sup>[22]</sup>. 取 0.1 mL 培养后菌液的上清液,加到 5.0 mL 菲洛嗪溶液(0.4 g 菲洛嗪、4.766 g 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)溶于 400 mL 蒸馏水)中,振荡 15 s,静置 30 min 使其显色完全,使用分光光度计测定  $A_{562}$ .

核黄素含量的测定:采用核黄素荧光分光光度法测定<sup>[23]</sup>. 使用日立 F-7100 型荧光分光光度计测定样品中核黄素在发射波长处的相对荧光强度. 配制 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的核黄素标准品,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后避光备用,然后扫描标准品的激发光谱,并从中找出吸收波长作为激发波长;设置仪器激发波长,扫描标准品的发射光谱,从中找出吸收最强时对应的波长作为发射波长;设置激发波长后,在 460~600 nm 的范围内测定样品在发射波长处的相对荧光强度. 利用相对荧光强度表示核黄素的含量. 首先直接测定样品在发射波长处的相对荧光强度,记为  $EM_1$ ;接着在样品中添加 0.1 mL 20% 连二亚硫酸钠溶液,再次测定样品在发射波长处的相对荧光强度,记为  $EM_2$ ;最终样品在发射波长处的相对荧光强度为  $EM = EM_1 - EM_2$ .

### 1.6 数据处理

所有实验均设置 3 个平行样,数据表示为“平均值  $\pm$  标准差”;使用  $t$  检验对实验组与对照组之间差异进行显著性分析,\*表示有显著差异( $P < 0.05$ ),\*\*表示有极显著差异( $P < 0.01$ ).

## 2 结果与讨论

### 2.1 外源核黄素对菌株 LQ25 异化铁还原的影响

不同质量浓度的外源核黄素对菌株 LQ25 异化铁还原的影响如图 1 所示. 在设置的质量浓度范围内,添加核黄素均能提高菌株 LQ25 的 Fe(III)还原

能力. 与对照组(无核黄素添加)相比,实验组的核黄素质量浓度为 20 mg/L 时,菌株 LQ25 的 Fe(III)还原能力无明显提高( $P > 0.05$ );核黄素质量浓度为 40 mg/L 时,菌株 LQ25 的 Fe(III)还原能力显著提高( $P < 0.05$ );核黄素质量浓度在 80~120 mg/L 的范围内,菌株 LQ25 的 Fe(III)还原能力被极显著提高( $P < 0.01$ );核黄素质量浓度为 140 mg/L 时,菌株 LQ25 的 Fe(III)还原能力无明显提高( $P > 0.05$ ). 其中当培养基中核黄素质量浓度为 100 mg/L 时,菌株 LQ25 还原 Fe(III)的量达到最高,累积 Fe(II)浓度为  $(7.73 \pm 0.05)$  mmol/L,当培养基中的核黄素质量浓度高于 100 mg/L 时,菌株 LQ25 还原 Fe(III)的量又会降低。

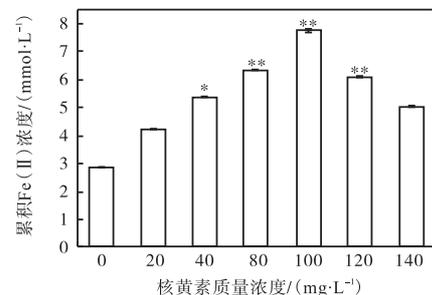


图 1 不同浓度的外源核黄素对菌株 LQ25 异化铁还原的影响

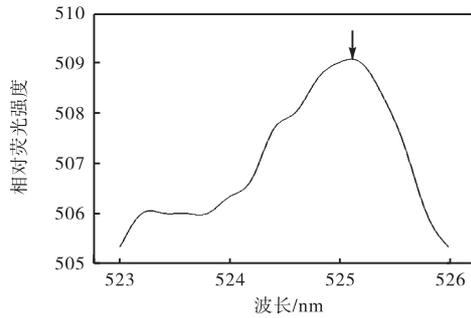
Fig. 1 Effect of different concentrations of exogenous riboflavin on dissimilation iron reduction of strain LQ25

Fuller 等<sup>[24]</sup>研究发现铁还原混合菌群在添加核黄素的培养条件下,其 Fe(II)浓度比空白组的有所增加,从而推测核黄素可能对胞外 Fe(III)还原作用较大. You 等<sup>[25]</sup>在接种巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) LLD-1 的微生物燃料电池中加入 100 nmol/L 核黄素后,输出电压和输出电流分别提高了 2.8 倍和 3.7 倍,从而证明菌株 LLD-1 培养液中的核黄素可以作为电子穿梭物,加强菌株 LLD-1 向电极的电子传递. Yang 等<sup>[16]</sup>为了验证核黄素对噬甲基菌属(*Methylophilus* sp.)培养过程中电子传递作用的影响,比较了添加核黄素组与不加核黄素组的 Fe(III)还原率,结果显示前者的 Fe(III)还原率提高了 33%,这表明 Fe(II)的增加是由于核黄素促进了胞外电子传递. Jin 等<sup>[15]</sup>发现地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)和 *S. oneidensis* 的混合培养对于金属腐蚀具有协同作用,后经研究证实是由于菌株 *S. oneidensis* 分泌的电子穿梭体核黄素提高了 *B. licheniformis* 的胞外电子传递效率. Moradian 等<sup>[17]</sup>在 *Cystobasidium slooffiae* JSUX1 的培养过程中添加核

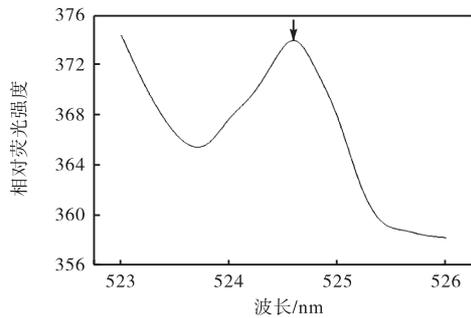
黄素,其最高输出电流约为不添加核黄素时的 3 倍,表明核黄素能促进电子传递.

### 2.2 菌株 LQ25 分泌核黄素的含量

经测定,激发波长为 425 nm. 核黄素在 520 nm 处有荧光发射,但环境中的血红素可将其猝灭. Miyuki 等<sup>[23]</sup>通过监测此处的荧光发射强度的变化,探测核黄素与蛋白复合物 OmcZ 的结合情况,结果表明荧光分光光度法可以鉴定出微摩尔每升级别的核黄素浓度. 在本实验中,外源核黄素标准品和内源核黄素样品的荧光发射峰对比如图 2 所示.



(a) 外源核黄素标准品



(b) 内源核黄素样品

图 2 外源核黄素标准品和内源核黄素样品荧光发射峰对比

Fig. 2 Comparison of fluorescence emission peak between exogenous riboflavin standard and endogenous riboflavin sample

外源核黄素标准品的荧光发射峰大约在 525 nm 处,内源核黄素样品的荧光发射峰在 524.5 nm 处. 此外,实验同时测定了无生物培养基中的核黄素荧光发射峰,结果显示培养基不含有核黄素. 这表明培养液中核黄素荧光发射峰是由于菌株 LQ25 分泌产生的. 因此,用 525 nm 处的荧光发射强度表示菌株培养过程中产生的核黄素含量.

### 2.3 不同培养时间下核黄素分泌量变化

菌株 LQ25 生长与核黄素分泌量随时间的变化如图 3 所示. 培养 0~10 h 为菌株生长迟缓期,最大菌体密度  $A_{600}$  为  $0.26 \pm 0.01$ ,在此期间未测出核黄素

的荧光发射峰;培养 10~15 h 为菌株对数生长期,最大菌体密度  $A_{600}$  为  $1.32 \pm 0.06$ ,核黄素的相对荧光强度最高可达  $11.30 \pm 2.00$ ;培养 15~35 h 为菌株生长稳定期,最大菌体密度  $A_{600}$  为  $1.41 \pm 0.02$ ,核黄素的相对荧光强度在培养 20 h 时达到最高,为  $49.50 \pm 3.92$ ;培养 35 h 后为菌体的衰退期,菌体密度  $A_{600}$  降低,核黄素的相对荧光强度逐渐降低并于 40 h 后荧光发射峰消失.

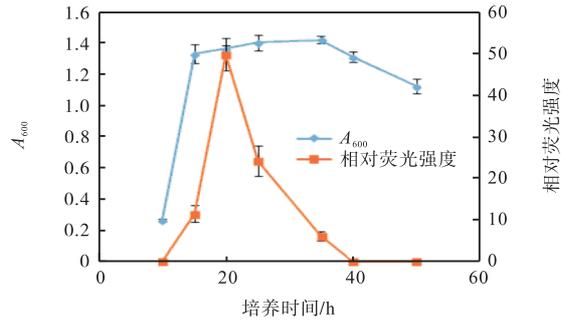


图 3 菌株 LQ25 生长与核黄素分泌随时间的变化

Fig. 3 Growth and secretion curve of riboflavin of strain LQ25

由此可见,菌体生长状态和核黄素分泌关系密切,菌株 LQ25 在旺盛生长时期分泌核黄素,这有利于电子传递合成 ATP 用于自身生长,随着菌体生长减缓,电子传递过程减弱,分泌核黄素也减少. Baron 等<sup>[26]</sup>发现突变体 *Shewanella oneidensis* MR-1 (保留编码核黄素基因)在无外源核黄素的培养条件下仍能检测到存在电子转移,然后使用循环伏安法确定核黄素添加前后的菌液电位均在同一电位处,以上结果表明这种电子转移的产生是由菌株自身分泌核黄素导致的. 周雨行等<sup>[27]</sup>研究菌株 *Shewanella oneidensis* 的氧化还原特征峰强度变化,其峰强度经历了由弱到强再减弱的过程,这表明微生物的生长导致大量核黄素产生,电子传递速率加快;当培养基中的物质逐渐耗尽时,微生物的生长活性减弱并进入生长后期,电子传递过程被削弱,因此氧化还原峰强度开始减小. Song 等<sup>[28]</sup>比较 *Pachysolen tannophilus* 的生长和核黄素分泌随时间变化的关系,认为菌株 *P. tannophilus* 主要在对数生长期分泌核黄素,这与本实验菌株 LQ25 的分泌规律相似. Jain 等<sup>[29]</sup>发现菌株 *Shewanella loihica* PV-4 在一定时间内,随着培养时间的增加,培养液中核黄素的相对峰值强度呈现逐渐增加的趋势. Tian 等<sup>[30]</sup>研究发现微生物燃料电池中的蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) DIF1 和赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*) DIF2 在对数生长期之前,核黄素浓度不断增加,

对数生长期后核黄素浓度又会降低。

大多数细菌可自行分泌核黄素,并且能将核黄素转化为 FMN 和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD),FMN 和核黄素可被分泌到胞外,作为电子穿梭体发挥功能,其浓度高低表征着细胞的生长状态,而 FAD 主要存在于胞内,可作为细胞裂解的指标<sup>[30]</sup>。由菌株 LQ25 的生长曲线可知,在培养的前 20 h,菌株 LQ25 大量分泌的核黄素用于胞外电子传递以供生长,此后由于培养基中营养物质等的消耗及生长环境中有害分泌物的积累,导致菌株逐渐走向衰亡,因此推测菌株 LQ25 分泌的核黄素在培养 20 h 后逐渐分解。此外,实验未采用避光的黑暗培养,长时间的光照也会促使菌株 LQ25 分泌的核黄素降解<sup>[26]</sup>。

#### 2.4 异化铁培养条件下核黄素分泌量变化

以氢氧化铁为电子受体,对菌株 LQ25 核黄素分泌量的影响进行研究,结果如图 4 所示。

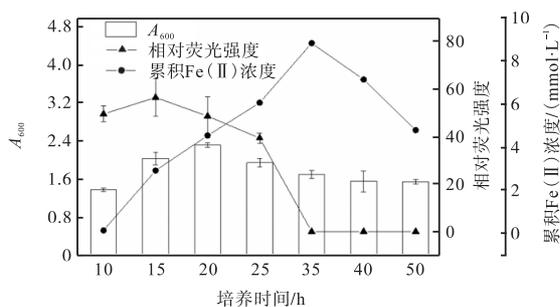


图 4 菌株 LQ25 生长、核黄素分泌及累积 Fe(II) 浓度随时间的变化

Fig. 4 Changes of growth, secretion of riboflavin and Fe(II) concentration of strain LQ25 with time

由图 4 可知:培养的前 10 h,菌株 LQ25 经历快速繁殖的对数生长期,在此阶段核黄素分泌逐渐增加;10 h 之后进入稳定生长期,20 h 时菌体密度  $A_{600}$  达到最大,为  $2.32 \pm 0.05$ ,15 h 时培养液中核黄素的相对荧光强度达到最高,为  $56.23 \pm 7.93$ ;20 h 后菌株开始衰退,菌体密度  $A_{600}$  降低,核黄素的相对荧光强度逐渐降低并于 35 h 后荧光发射峰消失。菌株 LQ25 在培养过程中分泌积累的核黄素呈现逐渐增强再减弱的变化。在对照组(无氢氧化铁添加)条件下培养 20 h 时,菌株 LQ25 中核黄素含量才达到峰值,20~25 h 降低 51.43%,25~30 h 降低 36.43%;实验组条件下,菌株 LQ25 分泌积累的核黄素最高值提前至 15 h,15~20 h 降低 13.98%,20~25 h 降低 16.32%,25~35 h 降低 39.41%。

对比实验组和对照组的核黄素相对荧光强度最

高值,实验组的是对照组的 1.14 倍,实验组中氢氧化铁可能作为电子受体促进了菌体分泌核黄素。Li 等<sup>[22]</sup>对菌株 *Anoxybacter fermentans* DY22613<sup>T</sup> 培养液的高效液相色谱分析发现,核黄素确实在对数生长期产生,添加氢氧化铁组相比不添加组发酵产生的核黄素浓度高 2 倍。Liu 等<sup>[31]</sup>的研究结果显示,在  $3.8 \mu\text{mol/L}$  苯存在下,微生物不仅保持了完整的细胞形态,并且 60 h 还原 Fe(III) 形成 Fe(II) 的量是无苯条件下的 2 倍,微生物对 Fe(III) 还原的促进归因于苯诱导的细胞膜通透性的增加,促进了胞外电子传递和核黄素作为电子穿梭因子或辅因子的分泌和释放。

菌株 LQ25 还原 Fe(III) 并不是与生长同时进行的,培养的前 10 h 生长旺盛,但几乎不进行 Fe(III) 还原;培养 10~35 h 时,菌株 LQ25 大量进行 Fe(III) 还原,35 h 时培养液中累积的 Fe(II) 浓度达到最高值 ( $8.79 \pm 0.01$ ) mmol/L;35 h 后培养液中累积的 Fe(II) 浓度逐渐减少,由此可见 Fe(III) 的还原过程主要是在菌株生长的后期。

相比对照组(无氢氧化铁添加),菌株 LQ25 在 35 h 达到生长高峰,氢氧化铁的加入使得菌株 LQ25 在 20 h 就达到菌体密度最大值,且此刻菌体密度是未添加氢氧化铁的 3.27 倍。宋文杰等<sup>[32]</sup>在腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)的培养基中加入柠檬酸铁,实验结果显示 Fe(II) 浓度与其生物活性存在极显著的正相关关系,表明 Fe(III) 还原与微生物的生长耦合在一起。刘洪艳等<sup>[33]</sup>发现在菌株 *Klebsiella* sp. KB52 的生长过程中,无论添加不可溶性电子受体氢氧化铁还是添加可溶性电子受体柠檬酸铁,菌株 KB52 的细胞生长均高于未添加电子受体的对照组。

菌体分泌核黄素和还原 Fe(III) 密切相关,核黄素的分泌能达到最大积累量主要是在菌体培养前期,还原 Fe(III) 这一过程主要是在培养后期进行。这可能是由于核黄素作为电子穿梭体,将菌体通过分解葡萄糖等营养物质获得的电子从胞内转移至胞外,转移到胞外的电子可用于不溶性氢氧化铁的还原,从而使得培养基中会在菌体培养的后期大量积累 Fe(II)。Dereven'kov 等<sup>[34]</sup>在水钴胺素( $\text{H}_2\text{OCbl}$ )和 NADH 的混合物中添加的核黄素显著加速了 Cbl(II) 的积累,并且还原速率与核黄素浓度呈线性关系,证明了核黄素对 NADH 向水钴胺素电子转移的催化作用。周雨行等<sup>[27]</sup>在探究 *S. oneidensis* 的铁硫还原过程时发现,核黄素的加入将菌株的铁硫转化能力提高了 3 倍,从

而推测核黄素是作为电子穿梭体参与到菌株的电子传递过程中,并将电子从乙酸盐呈递给单质硫和黄钾铁矾. Zhou 等<sup>[35]</sup>在 *S. oneidensis* MR-1 降解磺胺甲恶唑(SMX)的过程中加入了不同浓度的核黄素,其最大降解率能达到 95.3%,从核黄素介导的 SMX 降解和铁还原的总体性能看,SMX 的降解率随着铁还原的加强而逐渐增加.

## 2.5 外源核黄素对菌株 LQ25 异化铁还原性质分析

外源核黄素对菌株 LQ25 异化铁还原性质分析结果如图 5 所示. 培养 20 h, 菌株 LQ25 的菌体密度相比对照组(无氢氧化铁添加)的菌体密度无显著变化( $P>0.05$ ); 培养 25 h, 菌株 LQ25 累积 Fe(II) 浓度为  $(9.05 \pm 0.02)$  mmol/L, 并且随着培养时间的延长, 菌株 LQ25 累积 Fe(II) 浓度还将持续上升.

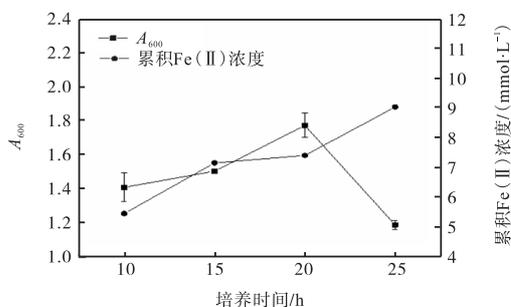


图 5 外源核黄素对菌株 LQ25 异化铁还原性质分析

Fig. 5 Dissimilated iron reduction properties of strain LQ25 by riboflavin

外源核黄素对菌株 LQ25 的生长几乎无影响,但能促进菌株 LQ25 进行异化铁还原. Yarlagadda 等<sup>[36]</sup>也证明外源电子穿梭体对菌株 *Clostridium* sp. BC1 的生长几乎没有影响. List 等<sup>[37]</sup>分析不同来源的电子穿梭体对菌株丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)的异化铁还原性的影响,结果表明外源蒽醌-2-磺酸(AQS)和内源核黄素均能增强菌株的异化铁还原能力,这与本实验的研究结果相似.

## 3 结 语

(1) 外源核黄素可以促进菌株 LQ25 的异化铁还原能力,当核黄素质量浓度为 100 mg/L 时,异化铁还原能力最高,相比对照组提高了 63.26%.

(2) 在设定的培养时间内,通过荧光分光光度法测定核黄素,菌株 LQ25 具有分泌核黄素的能力,最高相对荧光强度可达  $56.23 \pm 7.93$ .

(3) 菌株 LQ25 核黄素分泌量受到培养时间、

Fe(III) 浓度等因素的影响. 目前对呼吸型异化铁还原细菌胞外电子传递机制的研究较为深入,相比之下,发酵型异化铁还原细菌胞外电子传递机制还有待进一步的揭示. 本研究结果为丰富发酵型异化铁还原细菌胞外电子传递机制提供了理论支持.

## 参考文献:

- [1] GRALNICK J A, NEWMAN D K. Extracellular respiration[J]. *Molecular microbiology*, 2007, 65(1): 1-11.
- [2] LOVLEY D R. Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more[J]. *Geobiology*, 2008, 6(3): 225-231.
- [3] LOVLEY D R. Electromicrobiology[J]. *Annual review of microbiology*, 2012, 66(1): 391-409.
- [4] WHITE G F, SHI Z, SHI L, et al. Rapid electron exchange between surface-exposed bacterial cytochromes and Fe(III) minerals[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2013, 110(16): 6346-6351.
- [5] BREUER M, ROSSO K M, BLUMBERGER J, et al. Multi-haem cytochromes in *Shewanella oneidensis* MR-1: structures, functions and opportunities[J]. *Journal of the royal society interface*, 2015, 102: 20141117.
- [6] LI X, QIU D, ZENG X, et al. Complete genome sequence of *Anoxybacter fermentans* DY22613<sup>T</sup>, a piezophilic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium isolated from East Pacific Rise hydrothermal sulfides[J]. *Marine genomics*, 2020, 53: 100755.
- [7] CANSTEIN H V, OGAWA J, SHIMIZU S, et al. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2008, 74(3): 615-623.
- [8] WATANABE K, MANEFIELD M, LEE M, et al. Electron shuttles in biotechnology[J]. *Current opinion in biotechnology*, 2009, 20(6): 633-641.
- [9] 马金莲, 马晨, 汤佳, 等. 电子穿梭体介导的微生物胞外电子传递: 机制及应用[J]. *化学进展*, 2015, 27(12): 1833-1840.
- [10] VELASQUEZ-ORTA S B, HEAD I M, CURTIS T P, et al. The effect of flavin electron shuttles in microbial fuel cells current production[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010, 85(5): 1373-1381.
- [11] OKAMOTO A, HASHIMOTO K, NEALSON K H, et al. Rate enhancement of bacterial extracellular electron

- transport involves bound flavin semiquinones[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2013, 110(19):7856–7861.
- [12] TURICK C E, TISA L S, CACCAVO F. Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe(III) oxide reduction and as a terminal electron acceptor by *Shewanella algae* BrY[J]. Applied and environmental microbiology, 2002, 68(5):2436–2444.
- [13] YU H, LIU G, JIN R, et al. Goethite-humic acid coprecipitate mediated Fenton-like degradation of sulfanilamide: the role of coprecipitated humic acid in accelerating Fe(III)/Fe(II) cycle and degradation efficiency[J]. Journal of hazardous materials, 2020, 403:124026.
- [14] LIANG T T, ZHOU L, IRFAN M, et al. Assessment of five electron shuttling molecules in extracellular electron transfer of electromethanogenesis by *Methanosarcina barkeri*[J]. ChemElectroChem, 2020, 7(18):20200918.
- [15] JIN Y, LI Z, ZHOU E, et al. Sharing riboflavin as an electron shuttle enhances the corrosivity of a mixed consortium of *Shewanella oneidensis* and *Bacillus licheniformis* against 316 L stainless steel[J]. Electrochimica acta, 2019, 316:93–104.
- [16] YANG Y, WANG H, ZHENG Y, et al. Extracellular electron transfer of *Methylophilus methylotrophs*[J]. Progress biochemistry, 2020, 94:313–318.
- [17] MORADIAN J M, XU Z, SHI Y, et al. Efficient biohydrogen and bioelectricity production from xylose by microbial fuel cell with newly isolated yeast of *Cystobasidium slooffiae*[J]. International journal of energy research, 2020, 44(9):325–333.
- [18] BRUTINEL E D, GRALNICK J A. Shuttling happens: soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella*[J]. Applied microbiology & biotechnology, 2012, 93(1):41–48.
- [19] OKAMOTO A, KALATHIL S, DENG X, et al. Cell-secreted flavins bound to membrane cytochromes dictate electron transfer reactions to surfaces with diverse charge and pH[J]. Scientific reports, 2014, 4:5628.
- [20] WANG Z, SHI Z, SHI L, et al. Effects of soluble flavin on heterogeneous electron transfer between surface-exposed bacterial cytochromes and iron oxides[J]. Geochimica et cosmochimica acta, 2015, 163:299–310.
- [21] 刘洪艳,袁媛,张姗,等. 异化铁还原细菌 *Clostridium* sp. LQ25 分离及其产氢与铁还原特性[J/OL]. 微生物学通报:1–15. [2021–06–01]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.China.210308>.
- [22] LI X, QIU D, ZENG X, et al. Extracellular electron transfer in fermentative bacterium *Anoxybacter fermentans* DY22613<sup>T</sup> isolated from deep-sea hydrothermal sulfides[J]. Science of the total environment, 2020, 722:137723.
- [23] MIYUKI A T, ANNE K J. *Geobacter* cytochrome OmcZs binds riboflavin: implications for extracellular electron transfer[J]. Nanotechnology, 2020, 31(12):124001–124008.
- [24] FULLER S J, MCMILLAN D G G, RENZ M B, et al. Extracellular electron transport mediated Fe(III) reduction by a community of alkaliphilic bacteria that use flavins as electron shuttles[J]. Applied and environmental microbiology, 2014, 80(1):128–137.
- [25] YOU L X, LIU L D, XIAO Y, et al. Flavins mediate extracellular electron transfer in Gram-positive *Bacillus megaterium* strain LLD-1[J]. Bioelectrochemistry, 2018, 119:196–202.
- [26] BARON D, LABELLE E, COURSOLE D, et al. Electrochemical measurement of electron transfer kinetics by *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. Journal of biological chemistry, 2009, 284(42):28865–28873.
- [27] 周雨行, 聂珍媛, 夏旭, 等. 微生物铁硫还原耦合水体中 As(V) 吸附行为研究[J]. 水处理技术, 2018, 44(8):40–45.
- [28] SONG W, XIAO Y, SONG P, et al. Riboflavin-mediated extracellular electron transfer process involving *Pachysolen tannophilus*[J]. Electrochimica acta, 2016, 210:117–121.
- [29] JAIN A, ZHANG X, PASTORELLA G, et al. Electron transfer mechanism in *Shewanella loihica* PV-4 biofilms formed at graphite electrode[J]. Bioelectrochemistry, 2012, 87:28–32.
- [30] TIAN T, FAN X Y, FENG M, et al. Flavins-mediated extracellular electron transfer in Gram-positive bacteria *Bacillus cereus* DIF1 and *Rhodococcus ruber* DIF2[J]. RSC Advances, 2019, 9(70):40903–40909.
- [31] LIU S, LIU H, WANG Z, et al. Benzene promotes microbial Fe(III) reduction and flavins secretion[J]. Geochimica et cosmochimica acta, 2019, 264:92–104.
- [32] 宋文杰, 石文静, 吕项蒙. 等. DFeRB 和 SRB 对冰封期铁与硫还原的影响研究[J]. 农业环境科学学报, (下转第 27 页)

- turation kinetics of highly concentrated whey protein isolate[J]. *Journal of food engineering*, 2021, 292: 110294.
- [5] 晋迎申. 丹酚酸 B 热稳定性研究[J]. *上海医药*, 2014, 35(21): 78-80.
- [6] 雷文芳, 谢继红, 陈东, 等. 基于膜蒸馏的热敏料液常压低温浓缩装置性能模拟[J]. *天津科技大学学报*, 2020, 35(6): 25-28.
- [7] SERDAL S, MUTLU C, OMER C, et al. Quality characteristics of pomegranate juice concentrates produced by ohmic heating assisted vacuum evaporation[J]. *Journal of the science of food and agriculture*, 2019, 99(5): 2589-2595.
- [8] 王文成, 陈梅英, 陈锦权. 金线莲根茎提取液冷冻浓缩工艺优化[J]. *食品与机械*, 2016, 32(5): 168-172.
- [9] 秦贯丰, 丁中祥, 原姣姣, 等. 苹果汁冷冻浓缩与真空蒸发浓缩效果的对比[J]. *食品科学*, 2020, 41(7): 102-109.
- [10] BAGCI P O. Potential of membrane distillation for production of high quality fruit juice concentrate[J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2015, 55(8): 1098-1113.
- [11] 金程, 陈东, 彭跃莲, 等. 套管型气隙式膜蒸馏组件性能模拟及优化[J]. *天津科技大学学报*, 2019, 34(5): 51-56.
- [12] ALKHUHIRI A, DARWISH N, HILAL N. Membrane distillation: a comprehensive review[J]. *Desalination*, 2012, 287: 2-18.
- [13] LOUSSIF N, ORFI J. Comparative study of air gap, direct contact and sweeping gas membrane distillation configurations[J]. *Membrane water treatment*, 2016, 7(1): 71-86.
- [14] 陈华艳, 李欢, 吕晓龙. 气扫式膜蒸馏传质传热过程[J]. *化工学报*, 2009, 60(2): 304-309.
- [15] TAN Y Z, HAN L, CHEW N G P, et al. Membrane distillation hybridized with a thermoelectric heat pump for energy-efficient water treatment and space cooling[J]. *Applied energy*, 2018, 231: 1079-1088.
- [16] 杨丹, 高启君, 吕晓龙, 等. 气扫式多效膜蒸馏过程数学模型研究[J]. *膜科学与技术*, 2014, 34(5): 58-64.

责任编辑: 周建军

(上接第 17 页)

- 2020, 39(9): 2015-2025.
- [33] 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.
- [34] DEREVEN'KOV I A, HANNIBAL L, MAKAROV S V, et al. Catalytic effect of riboflavin on electron transfer from NADH to aquacobalamin[J]. *JBIC Journal of biological inorganic chemistry*, 2020, 25(97): 125-133.
- [35] ZHOU C, WANG H, SI Y, et al. Electron shuttles enhance the degradation of sulfamethoxazole coupled with Fe(III) reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2018, 62: 156-163.
- [36] YARLAGADDA V N, GUPTA A, DODGE C J, et al. Effect of exogenous electron shuttles on growth and fermentative metabolism in *Clostridium* sp. BC1[J]. *Bioresource technology*, 2012, 108: 295-299.
- [37] LIST C, HOSSEINI Z, MEIBOM K L, et al. Impact of iron reduction on the metabolism of *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Environmental microbiology*, 2019, 21(10): 3548-3563.

责任编辑: 郎婧

(上接第 22 页)

- [17] MOHAMMED J K, MAHDI A A, AHMED M I, et al. Preparation, deproteinization, characterization, and antioxidant activity of polysaccharide from *Medemia argun* fruit[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2020, 155: 919-926.
- [18] 秦卫东, 马利华, 陈学红, 等. 生姜多糖的提取及脱蛋白研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(4): 218-220.
- [19] 赵师师, 高旭红, 常君, 等. 石榴皮多糖的三氯乙酸法脱蛋白工艺研究[J]. *广州化工*, 2015, 43(17): 64-66.
- [20] 董英, 张艳芳, 孙艳辉. 水飞蓟粗多糖脱蛋白方法的比较[J]. *食品科学*, 2007, 28(12): 82-84.
- [21] YANG H H, WU Y J, GAN C J, et al. Characterization and antioxidant activity of a novel polysaccharide from *Pholidota chinensis* Lindl. [J]. *Carbohydrate polymers*, 2016, 138: 327-334.
- [22] 李月, 何杰, 王昀, 等. 云南野生玛卡多糖脱蛋白工艺研究[J]. *中国食品添加剂*, 2018(9): 149-157.
- [23] 曹红阳, 徐海洋, 陈云美. 多糖去蛋白技术概况[J]. *生物技术世界*, 2013(5): 8.
- [24] 张发宇, 余金卫, 张浏, 等. 巢湖蓝藻藻蓝蛋白纯化过程中紫外-可见吸收光谱特征分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2017, 37(3): 806-810.

责任编辑: 周建军