



一株单环刺螭肠道电活性希瓦氏菌 *Shewanella marisflavi* 的生理学特性

李新^{1,2}, 张月超^{1,2}, 刘芳华^{1*}

¹中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台 264003

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:【目的】探究以单环刺螭为代表的海洋环节动物肠道中电活性微生物的存在情况, 并表征其生理学及电化学生物学特性。【方法】采用平板划线法、16S rRNA 基因测序技术分离纯化菌株并进行菌株鉴定。利用扫描电镜表征菌株形态。高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测其无氧呼吸底物氧化及产物生成情况。通过菲罗嗉和甲醛脲显色法检测菌株的异化 Fe(III)和 Mn(IV)还原能力。借助单室微生物燃料电池(single-chamber microbial fuel cells, SCMFCs)及循环伏安法检测菌株的电化学活性。【结果】从单环刺螭肠道中成功分离得到了一株兼性厌氧菌, 16S rRNA 基因序列比对结果显示该菌株与 *Shewanella marisflavi* 的相似性达 99.93%。扫描电镜结果显示其为杆状, 长约 2 μm , 宽度约为 0.5 μm 。HPLC 检测结果表明, 该菌能以乳酸钠为电子供体, 富马酸为电子受体进行无氧呼吸并伴随代谢产物乙酸钠和琥珀酸产生。菲罗嗉和甲醛脲显色法结果证实, 该菌具有异化铁、锰还原能力。单室 MFCs 检测结果发现该菌的最大电流输出密度为 146 mA/m^2 , 循环伏安法检测结果显示该菌在 0.14 V 和 -0.51 V 位置处分别存在氧化峰和还原峰。【结论】本研究结果证实以单环刺螭为代表的海洋环节动物肠道中存在以 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 为代表的电活性微生物。表明电化学生物学活性微生物在海洋环节动物肠道中广泛存在。

关键词: 肠道微生物, 单环刺螭, *Shewanella marisflavi*, 异化铁、锰还原, 电化学生物学活性

1987 年, Lovley 等分离得到一株具有电活性的金属还原地杆菌, 命名为 *Geobacter metallireducens* GS-15^[1]。1988 年, Myers 和 Nealson 分离到一株能够利用 MnO_2 作为电子受体进行厌氧呼吸的电活

基金项目: 国家自然科学基金(91751112, 41573071); 山东省自然科学基金(JQ201608); “泰山学者”青年专家计划(tsqn20161054)

*通信作者。Tel/Fax: +86-535-2109268; E-mail: fhliu@yic.ac.cn

收稿日期: 2019-09-18; 修回日期: 2019-11-08; 网络出版日期: 2020-01-21

性希瓦氏菌,命名为 *Shewanella oneidensis* MR-1^[2],由此开启了 30 多年的电活性微生物研究,以电活性微生物为基础的微生物胞外电子传递理论的研究也自此拉开序幕。微生物胞外电子传递 (extracellular electron transfer, EET) 是一种新型的微生物能量代谢方式,在厌氧条件下,微生物将胞内有机物氧化产生的电子经电子呼吸链传递给胞外电子受体。微生物胞外电子传递不仅参与多种元素(C、Fe 和 Mn 等)的生物化学循环^[3],且在重金属迁移转化^[4]、有机污染物降解和清洁能源生产^[5]等领域展现出广阔的应用前景。

电活性微生物广泛分布于自然及人工环境中,如海洋沉积物、湿地沉积物、厌氧土壤和厌氧消化池等^[6]。2012 年 Khan 等^[7]发现肠道厌氧菌 *Faecalibacterium prausnitzii* 能够以核黄素-硫醇为氧化还原介质进行电子传递,表明电活性微生物不仅存在于自然环境中,还存在于人类肠道中。已知肠道电活性微生物大多是致病菌和兼性厌氧菌,如普拉梭菌、粪肠球菌等^[7-8]。在自然环境中电活性微生物能够以铁锰矿物为末端电子受体进行 EET 进而支持其生存所需的能量代谢过程,然而 Light 等^[9]研究称由于肠道中缺乏大量的铁锰氧化物,因此存在于肠道中的食源致病性电活性微生物单增李斯特菌 *Listeria monocytogenes* 利用肠道生境中丰富的核黄素进行 EET 从而产生电流。Naradasu 等^[10]也从人类肠道中成功分离出 *Enterococcus avium* 和 *Klebsiella pneumoniae* 两种既能以乙酸盐和乳酸盐为电子供体进行 EET 又能结合葡萄糖发酵进行 EET 的电活性微生物。此外, Wang 等^[11]通过循环伏安法分析小鼠、大鼠及豚鼠肠道微生物群发现无论在体内还是体外都出现明显的催化峰,证实了肠道菌群中 EET 现象在哺乳

动物中普遍存在。迄今为止,肠道电活性微生物的分离主要集中在人类及其他哺乳动物肠道中,关于海洋动物肠道电活性微生物的研究还很少。

海洋中生存着大约 200 万种动物^[12],海洋中所有的生物都与微生物保持相互作用的关系。在海洋长期的演化中,微生物与海洋生物形成了寄生、共生等关系,从而直接或间接参与了海洋生物的物质循环、能量流动^[13]。单环刺螈(*Urechis unicinctus*)又名海肠,属于螭虫动物门螭纲无管螭目刺螭科,主要分布在黄渤海沿岸潮间带及潮下带^[14]。单环刺螈营养成分丰富,其体壁肌中含有 18 种氨基酸(其总量占体壁肌干重的 57.39%),包括人体必需氨基酸及鲜味氨基酸,具有很高的营养价值和食用价值^[15]。

本研究以海洋环节动物单环刺螈为例,通过对其肠道微生物的分离、纯化和鉴定获得了一株具有电化学活性的菌株 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 并对其生理代谢和电化学特性进行了表征。本研究证实了海洋环节动物肠道中电活性微生物的存在,并为研究肠道电活性微生物的生理病理学研究提供了新的思路。

1 材料和方法

1.1 样品来源

本实验所用单环刺螈于 2019 年 3 月购买自烟台莱山区烟大农贸市场,共买 3 尾通体呈淡粉色、体长约为 20 cm、体重约为 35 g 的健康单环刺螈。购买后 1 h 内置于实验室无菌操作台进行快速肠道解剖。

1.2 富集培养

新鲜肠道剪碎后投掷于灭菌的海水 LB 培养

基并利用抽真空装置抽换空气。具体操作为：借助抽滤装置将新鲜海水于 0.22 μm 滤膜过滤。用过滤后的海水配置 LB 培养基 100 mL，并分装到 40 mL 体积的厌氧瓶中，每瓶 20 mL。利用抽换气装置对每个厌氧瓶抽真空 1 min，充氮气 0.5 min，并重复操作 7 次，将厌氧瓶中的空气替换为高纯氮气(N_2 含量 99.99%)，用铝盖密封厌氧瓶口后于 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min。将投加肠道样品后的除氧西林瓶置于 30 $^\circ\text{C}$ 恒温孵育室中培养过夜。将过夜后的富集培养物转接 1 mL 到新的 40 mL 体系无菌厌氧海水 LB 培养基中过夜培养。本实验所用天然海水采自烟台大学东门海域(北纬 37 $^\circ$ 28'25" 东经 121 $^\circ$ 26'24")。

1.3 细菌的分离与鉴定

涂布：在厌氧操作箱中用一次性无菌注射器抽取约 0.05 mL 的肠道富集培养物滴在固体海水 LB 培养基上，用灭菌的涂布棒均匀涂布，待菌液自然晾干后，倒置于厌氧操作箱中，30 $^\circ\text{C}$ 恒温培养。**平板划线：**在厌氧操作箱中用灭菌的接种环挑取涂布平板上长出的单菌落(挑选不同颜色、大小、形态、透明度的单菌落)进行平板划线，后续重复平板划线以纯化单菌落。将纯化后的不同单菌落接入灭菌的海水 LB 培养基培养。**菌液 PCR：**取 2 μL 菌液作为 DNA 模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL)为：10 \times Taq buffer 5 μL ，dNTPs (2.5 mol/L) 4 μL ，Taq 酶(5 U/ μL) 0.25 μL 。扩增引物为细菌 16S rRNA 基因通用引物 Ba27F (5'-GAGTTTGMTCTGGCTCAG-3') 2 μL ，Ba1492R (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 2 μL ，无菌去离子水 34.75 μL 。PCR 反应程序为：95 $^\circ\text{C}$ ，30 s；55 $^\circ\text{C}$ ，30 s；72 $^\circ\text{C}$ ，1.5 min，循环 30 次。16S rRNA 基因序列分析：将扩增产物送往英潍捷基(上海)

贸易有限公司进行 16S rRNA 测序分析，将序列拼接后提交到 NCBI 数据库中，序列号为 MN421995。利用 NCBI 网站的 BLAST 功能对所测序列进行相似性比对分析，确定亲缘关系，再利用 MEGA 7.0 构建邻接法(Neighbor-Joining)进行 1000 次步长计算，并构建系统发育树。

1.4 菌株的形态观察

扫描电子显微镜观察菌株形态，电镜样品处理方法为：取 2 mL 对数期菌液，6000 r/min 离心 4 min，弃上清；加入 0.1 mol/L PBS 缓冲液 2 mL 进行清洗，吹打后 6000 r/min 离心 4 min，重复清洗 5 遍；加 2.5%戊二醛 1 mL 吹打后于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜；取过夜后的菌液，6000 r/min 离心 4 min，弃上清；依次加入 30%、50%、70%、90%的乙醇进行梯度脱水，每次脱水 10 min 后于 8000 r/min 离心 4 min；最后用 100%乙醇脱水 2 次，每次 10 min，最后一次脱水结束后，吸取 0.1 mL 菌液滴加到洁净盖玻片上，放于超净工作台吹干；样品充分干燥后，用扫描电子显微镜观察菌株形态。

1.5 代谢分析

由于 LB 培养基的成分比较复杂，营养过于丰富，所以将测序后的菌液转接到新的改良培养基 LFM 中^[16]：30 mmol/L 乳酸钠，9 mmol/L 硫酸铵，5.7 mmol/L 磷酸氢二钾三水，3.3 mmol/L 磷酸二氢钾，2 mmol/L 碳酸氢钠，30 mmol/L HEPES，0.2 g/L 胰蛋白，30 mmol/L 富马酸，1.5 g/L 氯化钠，同时添加 10 mL/L 的氨基酸溶液和 10 mL/L 的微量矿物质溶液；调节 pH 7.2 \pm 0.2。配置 500 mL 的 LFM 培养基，分装到 40 mL 体积的厌氧瓶中，每瓶 20 mL，利用抽换气装置将厌氧瓶中的空气替换为高纯氮气(N_2 含量 99.99%)，用铝盖密封厌氧瓶口后 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min。将菌株活化传代

3次,取对数期菌液接入 LFM 培养基(5%接种量),间隔 3 h 取 1 mL 样品,共取 7 次,取好的样品经 0.22 μm 的滤膜过滤后,用高效液相色谱仪检测。检测条件为:示差检测器(RID),设置温度为 55 $^{\circ}\text{C}$; 5 mmol/L 硫酸为流动相,设置流速为 0.6 mL/min; HPLC-Hi-Plex H 为检测柱,规格为 7.7 mm \times 300 mm,设置柱温为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.6 生长及异化铁、锰还原能力检测

1.6.1 生长曲线绘制:取冻存于超低温冰箱(-80 $^{\circ}\text{C}$)中的菌株接种于 LFM 培养基中并活化三代后接种(5%接种量)至新鲜培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养,每隔 3 h 取样,将紫外分光光度计波长设置为 600 nm,测定菌液吸光度值。

1.6.2 异化铁还原能力检测:本研究所用 α 型 Fe_2O_3 粒径为 30 nm,纯度为 99.5%,采购自阿拉丁生化科技股份有限公司。将 Fe_2O_3 配成母液,添加到 LFM 培养基中至终浓度分别为 10 mmol/L 和 20 mmol/L。将对数期的菌液以 5%接种量转接至含 Fe_2O_3 的培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养,每隔 8 h 取样,对照组为不接菌的 10 mmol/L Fe_2O_3 培养基。用菲罗嗪显色法^[17]检测溶液中的 $\text{Fe}(\text{II})$ 含量。具体方法为:取 0.1 mL 样品加入 0.9 mL 浓度为 0.5 mol/L 的盐酸溶液,黑暗条件下静置 24 h 后,8000 r/min 离心 5 min,取上清 100 μL 加入到 1.9 mL 含 0.1% 菲罗嗪的 200 mmol/L 的 HEPES 缓冲液中,室温反应 5 min 后,在 562 nm 波长下用紫外分光光度计测定吸光度并根据标准曲线换算 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度。

1.6.3 异化锰还原能力检测:本实验所用 MnO_2 粒径为 50 nm,纯度为 99.9%,采购自北京德科岛金科技有限公司。将 MnO_2 配成母液,添加到 LFM 培养基中至终浓度分别为 10 mmol/L 和 20 mmol/L。将生长至对数期的菌液转接至含 MnO_2 的培养基

中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养,每隔 8 h 取样,对照组为不接菌的 10 mmol/L MnO_2 培养基。用甲醛肟法^[18]检测溶液中的 $\text{Mn}(\text{II})$ 含量。具体方法为:称取 4 g 盐酸羟胺加入 80 mL 蒸馏水中溶解,向溶液中加入 2 mL 甲醛,加蒸馏水定容至 100 mL,最后将上述溶液与 40 mL 氨水混合配置成甲醛肟溶液。取 0.5 mL 样品 5000 r/min 离心 3 min,取 0.1 mL 上清液加入含 1.9 mL 甲醛肟的离心管中,室温反应 5 min 后,在 450 nm 波长下用紫外分光光度计测定吸光度并根据标准曲线换算 $\text{Mn}(\text{II})$ 浓度。

1.7 电化学活性检测

1.7.1 单室微生物燃料电池:构建单室微生物燃料电池(single-chamber microbial fuel cells, SCMFCs),在电池中插入钛丝连接的碳布(20 mm \times 20 mm \times 0.32 mm)作为工作电极和对电极,以饱和甘汞电极作为参比电极。在厌氧操作箱中将钛丝连接的两碳布电极穿过丁基橡胶塞,旋上空心螺纹盖。将组装好的单室燃料电池于 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。在厌氧操作箱中将饱和甘汞电极插入灭菌后的电池。向洁净的灭菌单室电池中接种 10%菌液和新鲜培养基,以不接菌的空白培养基作为对照组。除氧后,将电池连入多通道恒电位仪(上海辰华 CHI 1030C)检测菌株的电化学信号。参数设置为:0.4 V 电压,5 s/次检测电流,灵敏度为 1.0×10^{-3} A/V,每个通道独立运行。

1.7.2 循环伏安扫描:采用循环伏安扫描法(cyclic voltammetry)检测单室燃料电池中产电体系的氧化还原特性。将单室电池从 CHI 1030C 电化学工作站转移到 CHI 660E 电化学工作站。设置参数为:起始电压 1.0 V,最终电压-0.8 V,最高电压 1.0 V,最低电压-1.0 V,扫速为 50 mV/s,扫描循环 3 次,0.001 s/次记录数据,灵敏度为 1.0×10^{-3} A/V。

2 结果和分析

2.1 菌株 16S rRNA 序列分析及系统发育树的构建

测定菌株的 16S rRNA 基因序列并进行序列比对。测定的基因片段长度为 1424 bp; 序列比对结果显示该菌与菌株 *Shewanella marisflavi* SDRB-Na1 (MG456898.1) 具有 99.93% 的相似性。根据比对结果选取与该菌株相似性较高的序列, 在 MEGA 7.0 上用邻位联结法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树 (图 1), 结果表明该菌的 16S rDNA 与 *Shewanella marisflavi* SDRB-Na1 (MG456898.1) 处于系统发育树的同一分支, 同源性最高, 亲缘关系最接近。因此鉴定结果初步确认该菌株为 *Shewanella marisflavi*, 并命名为 *Shewanella marisflavi* UU-3-2。

2.2 形态观察

菌株平板划线后过夜培养 (30 °C), 在 LB 固体平板上观察到单菌落为不规则的圆形, 边缘较为整齐且菌落表面光滑呈现淡黄色不透明状 (图 2-A)。

扫描电镜观察结果显示, 该菌呈短杆状, 长度约为 1.5–2.5 μm , 宽度约为 0.5 μm , 有端生鞭毛 (图 2-B, 箭头所示)。

2.3 代谢分析

液相色谱检测 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 的无氧呼吸产物, 结果显示随着电子供体乳酸钠、电子受体富马酸的消耗, 无氧呼吸产物乙酸钠、琥珀酸的量逐渐积累。乳酸钠和富马酸的初始浓度约为 30 mmol/L, 生长至第 12 h 时, 各物质的浓度基本不再变化, 底物消耗和产物生成达到平衡状态。18 h 时, 乳酸钠消耗量约为 18 mmol/L, 富马酸消耗量约为 27 mmol/L, 富马酸几乎全部消耗完, 乳酸钠消耗量约为初始浓度的 1/2; 同时, 产物乙酸钠生成量约为 11 mmol/L, 琥珀酸生成量约为 25 mmol/L (图 3)。底物乳酸钠的消耗量大于产物乙酸钠的生成量, 表明乳酸钠不能被 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 完全氧化变成乙酸钠, 在此过程中还有其他产物的生成。

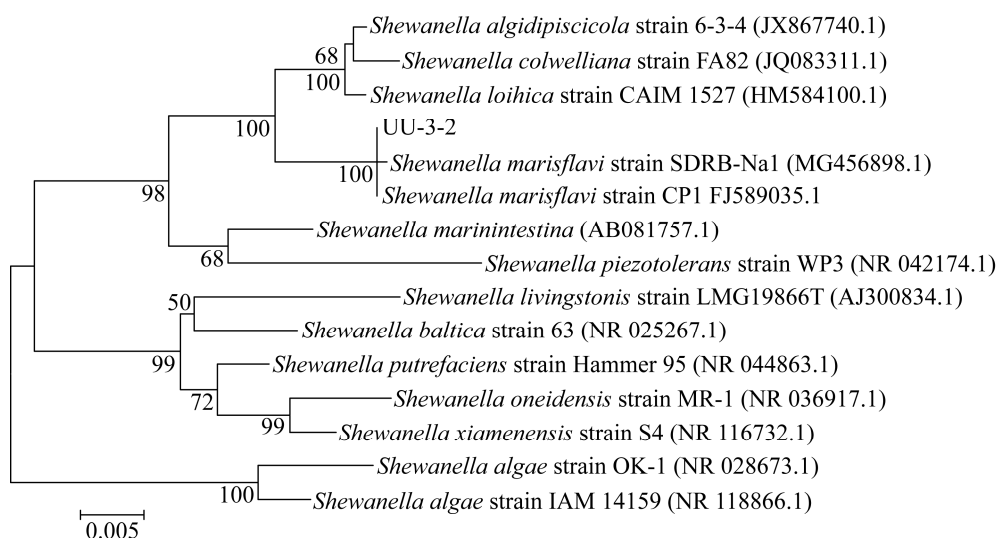


图 1. 基于 16S rRNA 基因构建的菌株 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 系统发育树

Figure 1. Neighbor-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene fragments of strain *Shewanella marisflavi* UU-3-2 and reference species.

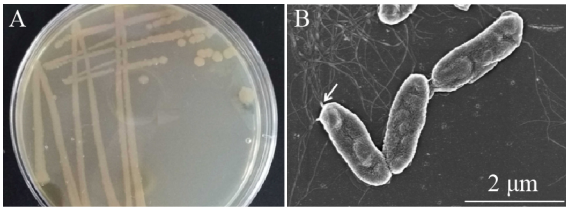


图 2. *Shewanella marisflavi* UU-3-2 的单菌落形态(A)及扫描电镜图像(B)

Figure 2. The images of signal colony (A) and scanning electron microscope (B) of *Shewanella marisflavi* UU-3-2.

2.4 异化铁、锰还原能力表征

生长曲线显示(图 4-A), *Shewanella marisflavi* UU-3-2 在液体培养基中经历小于 2 h 的延滞期后随即进入指数期并持续约 20 h, 随后到达稳定期, OD_{600} 最大值为 0.4。对菌株的异化铁、锰还原能力检测结果(图 4-B、C)显示, 与不含 Fe_2O_3/MnO_2 的对照组相比, 实验组中 $Fe(II)/Mn(II)$ 的含量都随着时间的增加而逐渐积累; 且不同浓度的 Fe_2O_3/MnO_2 中 $Fe(III)/Mn(IV)$ 的还原量不同, 随着 Fe_2O_3/MnO_2 浓度的增加 $Fe(II)/Mn(II)$ 积累量也增加。结合生长曲线可知, 前 24 h 菌株呈指数型增长, $Fe(II)/Mn(II)$ 积累量迅速升高; 24 h 之后,

菌株生长进入稳定期, $Fe(III)/Mn(IV)$ 还原速率减慢; 以上结果说明 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 不仅可以还原 Fe_2O_3/MnO_2 中的 $Fe(III)/Mn(IV)$, 且还原能力随着 Fe_2O_3/MnO_2 浓度的升高而增加, 同时其还原速率与菌株的生长状态有关。相比还原 Fe_2O_3 中的 $Fe(III)$, *Shewanella marisflavi* UU-3-2 更倾向于还原 MnO_2 中的 $Mn(IV)$ 。可能的原因是 Mn^{4+}/Mn^{2+} 的氧化还原电势(0.8 V)比 Fe^{3+}/Fe^{2+} 的氧化还原电势(0.2 V)更高, 因此 MnO_2 更易被 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 还原。综上所述, *Shewanella marisflavi* UU-3-2 能够还原 Fe_2O_3 和 MnO_2 , 且其异化铁、锰还原能力随 $Fe(III)/Mn(IV)$ 添加浓度的增加而增加。表明 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 是一株同时具备异化铁、锰还原能力的金属还原微生物。

2.5 电化学活性测试

构建单室微生物燃料电池并利用循环伏安扫描法对 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 的电化学活性进行检测。单室燃料电池检测结果(图 5-A)显示与不接菌的对照组相比, *Shewanella marisflavi* UU-3-2 实验组能够产生电流, 且电流的上升速度很快,

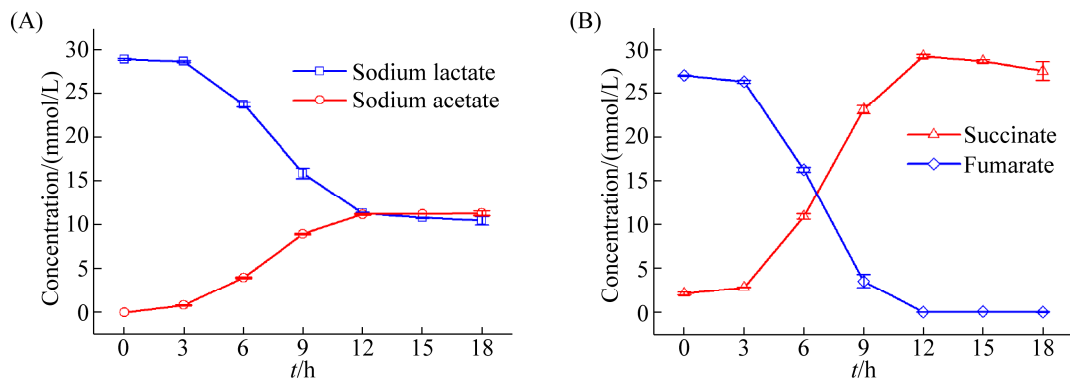


图 3. 电子供体乳酸钠消耗量及乙酸钠生成量(A)、电子受体富马酸的消耗量及琥珀酸的生成量(B)

Figure 3. Electron donor sodium lactate consumption and sodium acetate production (A), electron acceptor fumaric acid consumption and succinic acid production (B).

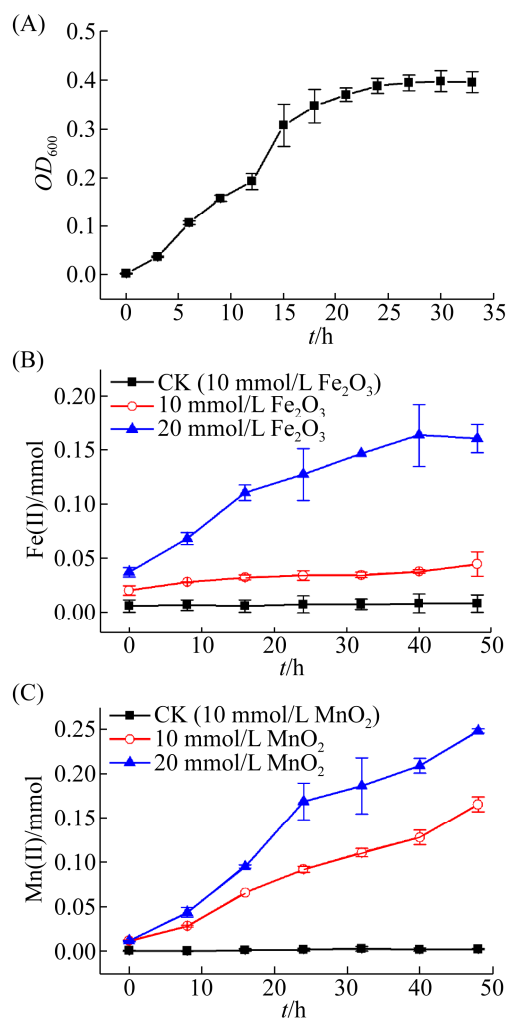


图 4. *Shewanella marisflavi* UU-3-2 生长曲线(A)及 Fe(II) (B)和 Mn(II) (C)物质的量变化曲线

Figure 4. Dynamics of growth curve (A), Fe(II) (B) and Mn(II) (C) concentration.

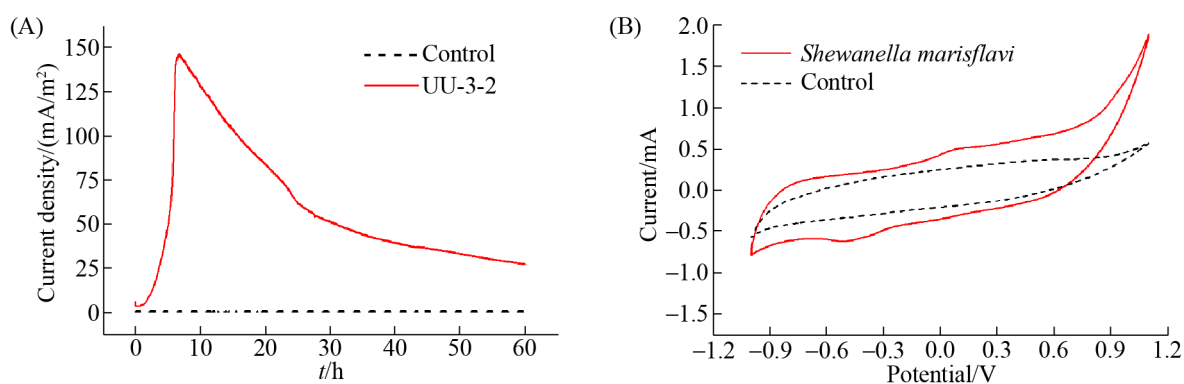


图 5. *Shewanella marisflavi* UU-3-2 的电化学活性(A)和氧化还原特征(B)

Figure 5. The electrochemical activity (A) and redox characters (B) of *Shewanella marisflavi* UU-3-2.

在 10 h 之内即可达到最大电流密度 146 mA/m^2 , 随后电流呈现缓慢降低的趋势, 整个产电过程可持续近 60 h, 表明 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 的产电时间较长。这与 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 的生长情况相符, 在对数生长期时电活性最高, 稳定期后电流随之下降。60 h 后燃料电池检测结束, 循环伏安扫描检测该体系的氧化还原特征。CV 扫描结果显示(图 5-B), 该体系在 -0.51 V 位置有一处明显的还原峰, 在 0.14 V 位置有一处平缓的氧化峰, 表明体系中存在氧化还原物质。该结果进一步说明 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 具有电化学活性。

3 讨论

希瓦氏菌能将有机物质的分解与环境中末端电子受体(如铁锰氧化物、腐殖酸等)的还原相耦合, 是 C、N、Fe 和 Mn 等生物地球化学循环过程中的重要驱动者之一, 且在环境污染修复和微生物燃料电池等领域具有巨大的应用潜势^[19]。自 1988 年第一株能够以 MnO_2 为末端电子受体进行厌氧呼吸的希瓦氏菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 被分离以来, 目前希瓦氏菌属已经成功分离出 69 种(参考 List of Prokaryotic Names with Standing

in Nomenclature (LPSN) <http://www.bacterio.net>)。希瓦氏菌分布广泛,如海水的好氧区或厌氧区^[20]、海洋沉积物^[21]、原油管道^[22]等。虽然近年来陆续从鱼类、对虾等海洋生物的肠道中分离得到不同种的希瓦氏菌^[23-26],但相比起土壤、沉积物和污泥等环境,关于海洋生物肠道中希瓦氏菌电活性特征报道相对较少。本研究从海洋生物单环刺螠肠道中成功分离得到一株电活性希瓦氏菌,经 16S rRNA 基因测序比对后,鉴定为 *Shewanella marisflavi* UU-3-2。

希瓦氏菌 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 代谢物分析结果表明,该菌能以乳酸钠作为电子供体,富马酸为电子受体,产生代谢物乙酸钠和琥珀酸。以乳酸钠为电子供体时,希瓦氏菌不能将乳酸盐完全氧化而是生成中间代谢产物乙酸盐^[27]。根据 Scott 和 Neelson 提出的 *Shewanella oneidensis* MR-1 乳酸盐中心代谢途径可知,乳酸盐首先转化为丙酮酸,随后丙酮酸大部分转化为乙酰辅酶 A,乙酰辅酶 A 可以进入三羧酸循环(TCA),合成生物物质成分(例如氨基酸),或者可逆地转化为乙酸盐同时伴随三磷酸腺苷(ATP)的生成^[28]。此外,随着乙酸逐渐生成,乙酸与乙酰辅酶 A 相互转化时会与乳酸竞争 CoA 基团,导致乳酸的利用率降低,且乙酸浓度升高会导致菌株生长速度变慢^[29-30]。本实验中以富马酸为电子受体时琥珀酸的转化量为 92.6%,与 Tang 等^[31]报道的通过同位素标记检测到的富马酸还原为琥珀酸的转化量为 95%相一致,该过程在富马酸还原酶的催化作用下,富马酸中的 2 个电子转移到琥珀酸,从而将周质中的富马酸还原为琥珀酸^[32]。

Shewanella marisflavi UU-3-2 异化铁、锰还原

检测结果表明,该菌不仅具备将不溶性 Fe_2O_3 和 MnO_2 固体中的 Fe(III)和 Mn(IV)分别还原为 Fe(II)和 Mn(II)的异化铁、锰还原能力,且电活性检测结果发现该菌具有电化学活性。随着 Fe_2O_3 和 MnO_2 浓度增加,Fe(II)和 Mn(II)生成量增加,然而其最大还原率有限(Fe_2O_3 、 MnO_2 还原率分别为 0.65%和 1.5%)。在富马酸浓度为 30 mmol/L 的 LFM 培养基中生长时,菌株优先还原可溶性的电子受体,使不溶性铁、锰还原量降低。Wang 等^[33]利用代谢组学分析表明,电子受体的比例影响 *Shewanella oneidensis* 还原偶氮染料的能力,当菌株在电子受体(富马酸盐)浓度限制条件下生长时,还原染料的能力的显著增加;而随着电子受体(富马酸盐)浓度升高,还原偶氮染料的能力降低。此外,细胞数量也影响其还原量,*Shewanella marisflavi* UU-3-2 在稳定期时最大 OD_{600} 值为 0.4 (图 4),低于 Tang 等^[30]报道的 *Shewanella oneidensis* 生长曲线检测结果 0.8–0.9;Myers 和 Neelson 证明 *Shewanella oneidensis* 对 MnO_2 的还原量与细胞数量成正比,高细胞浓度下 MnO_2 的还原量增大^[2]。

目前已知肠道中分离的电活性微生物的电流密度约为 5300 mA/m^2 ^[34],本实验利用单室微生物燃料电池测得 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 的最大电流密度为 146 mA/m^2 ;已知分离自环境中的电活性微生物的最大电流密度约为 9900 mA/m^2 ^[35],而 *Shewanella oneidensis* DSP10 的最大电流密度约为 6500 mA/m^2 ^[36]。相比自然环境中的电活性微生物,肠道电活性微生物的产电能力相对较弱。研究表明,在燃料电池中,电子供体类型及其浓度、接种菌液中的细胞浓度以及溶液导电率都会影响产电的大小^[35-37]。

Shewanella marisflavi UU-3-2 具有胞外电子传递能力, 不仅可以利用铁、锰氧化物作为电子受体, 还可以在微生物燃料电池中以碳布电极作为电子受体, 从而产生电流。目前已知能进行胞外电子传递的电活性微生物大多分离于自然环境, 对肠道电活性微生物(尤其是海洋中动物肠道电活性微生物)的分离及其胞外电子传递机制的研究还处于起始阶段。以地杆菌属(*Geobacter*)和希瓦氏菌属(*Shewanella*)为模式菌的研究结果表明, 电活性微生物的胞外电子传递机制的主要方式是以导电纤毛和细胞色素为代表的直接接触^[38], 以及以核黄素、醌酮等为介体的间接传递方式^[39]。Pankratova 等^[8]发现革兰氏阳性乳酸菌粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)能够直接或间接地将发酵代谢过程中产生的电子转移到电极上, 并能够在去甲基甲喹酮的参与下进行胞外电子传递, 且细胞色素 *bd* 的参与会使 EET 过程减弱。Khan 等^[7]研究发现在好氧-厌氧界面, 兼性厌氧菌普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)能够分泌电子穿梭体核黄素和硫醇, 且当核黄素加入到燃料电池阳极室后可快速产生电流。除此之外, Light 等^[9]发现病原性革兰氏阳性菌单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)同样利用基于核黄素的胞外电子传递机制将电子传递给 Fe(III)或电极。在希瓦氏菌中, 细胞色素和核黄素是其参与 EET 的主要方式, 根据循环伏安扫描结果可知, 接种 *Shewanella marisflavi* UU-3-2 的电化学体系中存在氧化还原介质, 在 0.14 V 存在氧化峰, 这与已报道的希瓦氏菌 *Shewanella oneidensis* 外膜细胞色素(MtrC 和 OmcA)的标准电位 0.0–0.1 V 基本一致^[40–41]; 此外在–0.51 V 存在还原峰, 与 Roy 等^[42]

报道的检测 *Shewanella oneidensis* 中核黄素的位置–0.45 V 较为接近。以上实验结果暗示, *Shewanella marisflavi* UU-3-2 可以分泌电子穿梭体核黄素。

本研究从海洋环节动物单环刺螠肠道中分离得到了一株同时具备异化铁、锰还原能力的电活性希瓦氏菌 *Shewanella marisflavi* UU-3-2。该菌的分离丰富了海洋环节动物肠道电活性微生物的研究, 为了解肠道电活性微生物的致病性控制及其对宿主健康的影响提供了新的视角, 同时对揭示胞外电子传递在生物肠道生境中发挥作用的机制有重要的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Lovley DR, Stolz JF, Nord GL, Phillips EJP. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature*, 1987, 330(6145): 252–254.
- [2] Myers CR, Nealon KH. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science*, 1988, 240(4857): 1319–1321.
- [3] Lovley DR, Phillips EJP. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(6): 1472–1480.
- [4] Myers CR, Carstens BP, Antholine WE, Myers JM. Chromium (VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(1): 98–106.
- [5] Rabaey K, Keller J. Microbial fuel cell cathodes: from bottleneck to prime opportunity? *Water Science and Technology*, 2008, 57(5): 655–659.
- [6] Wu YD, Li FB, Liu TX. Mechanism of extracellular electron transfer among microbe-humus-mineral in soil: A review. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53(2): 277–291. (in Chinese) 吴云当, 李芳柏, 刘同旭. 土壤微生物—腐殖质—矿物间的胞外电子传递机制研究进展. *土壤学报*, 2016, 53(2):

- 277–291.
- [7] Khan MT, Duncan SH, Stams AJM, van Dijk JM, Flint HJ, Harmsen HJM. The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases. *The ISME Journal*, 2012, 6(8): 1578–1585.
- [8] Pankratova J, Leech D, Gorton L, Hederstedt L. Extracellular electron transfer by the Gram-positive bacterium *Enterococcus faecalis*. *Biochemistry*, 2018, 57(30): 4597–4603.
- [9] Light SH, Su L, Rivera-Lugo R, Cornejo JA, Louie A, Iavarone AT, Ajo-Franklin CM, Portnoy DA. A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature*, 2018, 562(7725): 140–144.
- [10] Naradasu D, Miran W, Sakamoto M, Okamoto A. Isolation and characterization of human gut bacteria capable of extracellular electron transport by electrochemical techniques. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 9: 3267.
- [11] Wang W, Du YH, Yang S, Du XC, Li M, Lin BQ, Zhou J, Lin LY, Song YL, Li J, Zou XL, Yang CY. Bacterial extracellular electron transfer occurs in mammalian gut. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(19): 12138–12141.
- [12] Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B. How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biology*, 2011, 9(8): e1001127.
- [13] Zhang CS, Li WL. Marine Microbiology: new opportunities and new challenges. *Microbiology China*, 2018, 45(9): 1841–1842. (in Chinese)
张长生, 李文利. 海洋微生物学: 新机遇, 新挑战. *微生物学通报*, 2018, 45(9): 1841–1842.
- [14] Liu F, Sun T, Ji Y, Wang LY, Yu HR. Advances in studies on the biology and ecology of *Urechis unicinctus*. *Marine Sciences*, 2017, 41(10): 125–131. (in Chinese)
刘峰, 孙涛, 纪元, 王力勇, 于海瑞. 单环刺螠生物学及生态学研究进展. *海洋科学*, 2017, 41(10): 125–131.
- [15] Li N, Song SL, Tang YZ, Meng RP, Wang BG. Analysis of composition and content of amino acid in the bodywell muscle of *Urechis unicinctus*. *Shandong Fisheries*, 2000, 17(5): 26–27. (in Chinese)
李诺, 宋淑莲, 唐永政, 孟瑞萍, 王宝钢. 单环刺螠体壁氨基酸组分与含量的分析. *齐鲁渔业*, 2000, 17(5): 26–27.
- [16] Kouzuma A, Meng XY, Kimura N, Hashimoto K, Watanabe K. Disruption of the putative cell surface polysaccharide biosynthesis gene SO3177 in *Shewanella oneidensis* MR-1 enhances adhesion to electrodes and current generation in microbial fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(13): 4151–4157.
- [17] Stookey LL. Ferrozine—a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*, 1970, 42(7): 779–781.
- [18] Brewer PG, Spencer DW. Colorimetric determination of manganese in anoxic waters. *Limnology and Oceanography*, 1971, 16(1): 107–110.
- [19] Fredrickson JK, Romine MF, Beliaev AS, Auchtung JM, Driscoll ME, Gardner TS, Neelson KH, Osterman AL, Pinchuk G, Reed JL, Rodionov DA, Rodrigues JLM, Saffarini DA, Serres MH, Spormann AM, Zhulin IB, Tiedje JM. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 592–603.
- [20] DeLong EF, Franks DG, Yayanos AA. Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(5): 2105–2108.
- [21] Murray AE, Lies D, Li G, Neelson K, Zhou J, Tiedje JM. DNA/DNA hybridization to microarrays reveals gene-specific differences between closely related microbial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(17): 9853–9858.
- [22] Obuekwe CO, Westlake DWS. Effects of medium composition on cell pigmentation, cytochrome content, and ferric iron reduction in a *Pseudomonas* sp. isolated from crude oil. *Canadian Journal of Microbiology*, 1982, 28(8): 989–992.
- [23] Hirota K, Nodasaka Y, Orikasa Y, Okuyama H, Yumoto I. *Shewanella pneumatophori* sp. nov., an eicosapentaenoic acid-producing marine bacterium isolated from the intestines of Pacific mackerel (*Pneumatophorus japonicus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(6): 2355–2359.
- [24] Ariole CN, Eddo TT. Effect of an indigenous probiotic (*Shewanella algae*) isolated from healthy shrimp (*Penaeus*

- monodon*) intestine on *Clarias gariepinus*. *International Journal of Aquaculture*, 2016, 5(36): 1–9.
- [25] Kim D, Baik KS, Kim MS, Jung BM, Shin TS, Chung GH, Rhee MS, Seong CN. *Shewanella haliotis* sp. nov., isolated from the gut microflora of abalone, *Haliotis discus hannai*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(12): 2926–2931.
- [26] Satomi M, Oikawa H, Yano Y. *Shewanella marinintestina* sp. nov., *Shewanella schlegeliana* sp. nov. and *Shewanella sairae* sp. nov., novel eicosapentaenoic-acid-producing marine bacteria isolated from sea-animal intestines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(2): 491–499.
- [27] Lovley DR, Phillips EJP, Lonergan DJ. Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese by *Alteromonas putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(3): 700–706.
- [28] Scott JH, Nealson KH. A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(11): 3408–3411.
- [29] Li SL, Yen JH, Kano KJ, Liu SM, Liu CL, Cheng SS, Chen HY. Using metabolic charge production in the tricarboxylic acid cycle (QTCA) to evaluate the extracellular-electron-transfer performances of *Shewanella* spp. *Bioelectrochemistry*, 2018, 124: 119–126.
- [30] Tang YJ, Meadows AL, Keasling JD. A kinetic model describing *Shewanella oneidensis* MR-1 growth, substrate consumption, and product secretion. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 96(1): 125–133.
- [31] Tang YJ, Meadows AL, Kirby J, Keasling JD. Anaerobic central metabolic pathways in *Shewanella oneidensis* MR-1 reinterpreted in the light of isotopic metabolite labeling. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(3): 894–901.
- [32] Flynn CM, Hunt KA, Gralnick JA, Sreenc F. Construction and elementary mode analysis of a metabolic model for *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biosystems*, 2012, 107(2): 120–128.
- [33] Wang H, Correa E, Dunn WB, Winder CL, Goodacre R, Lloyd JR. Metabolomic analyses show that electron donor and acceptor ratios control anaerobic electron transfer pathways in *Shewanella oneidensis*. *Metabolomics*, 2013, 9(3): 642–656.
- [34] Schwab L, Rago L, Koch C, Harnisch F. Identification of *Clostridium cochlearium* as an electroactive microorganism from the mouse gut microbiome. *Bioelectrochemistry*, 2019, 130: 107334.
- [35] Xing DF, Zuo Y, Cheng SA, Regan JM, Logan BE. Electricity generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX-1. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(11): 4146–4151.
- [36] Ringeisen BR, Henderson E, Wu PK, Pietron J, Ray R, Little B, Biffinger JC, Jones-Meehan JM. High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(8): 2629–2634.
- [37] Park DH, Zeikus JG. Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using *Shewanella putrefaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(1): 58–61.
- [38] Summers ZM, Fogarty HE, Leang C, Franks AE, Malvankar NS, Lovley DR. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. *Science*, 2010, 330(6009): 1413–1415.
- [39] Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(5): 375–381.
- [40] Rosenbaum MA, Bar HY, Beg QK, Segrè D, Booth J, Cotta MA, Angenent LT. *Shewanella oneidensis* in a lactate-fed pure-culture and a glucose-fed co-culture with *Lactococcus lactis* with an electrode as electron acceptor. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 2623–2628.
- [41] Meitl LA, Eggleston CM, Colberg PJS, Khare N, Reardon CL, Shi L. Electrochemical interaction of *Shewanella oneidensis* MR-1 and its outer membrane cytochromes OmcA and MtrC with hematite electrodes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2009, 73(18): 5292–5307.
- [42] Roy JN, Luckarift HR, Lau C, Falase A, Garcia KE, Ista LK, Chellamuthu P, Ramasamy RP, Gadhamshetty V, Wanger G, Gorby YA, Nealson KH, Bretschger O, Johnson GR, Atanassov P. A study of the flavin response by *Shewanella* cultures in carbon-limited environments. *RSC Advances*, 2012, 2(26): 10020–10027.

Physiological characteristics of an intestinal electroactive strain *Shewanella marisflavi* UU-3-2 from *Urechis unicinctus*

Xin Li^{1,2}, Yuechao Zhang^{1,2}, Fanghua Liu^{1*}

¹ Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong Province, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] To explore the electroactive microorganism in the intestinal tract of marine annelids represented by *Urechis unicinctus* and characterizing its physiological and electrochemical properties. [Methods] The strain was isolated using plate scribing and identified by 16S rRNA gene sequencing. The morphology of the isolate was depicted by scanning electron microscope. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to analyze the metabolites. The quantifications of Fe(II) and Mn(II) reduction were carried out by ferrozine and formaldoxime assays, respectively. Single-chamber microbial fuel cells (SCMFC) were used to test the electrochemical activity by cyclic voltammetry. [Results] A facultative anaerobic bacterium, *Shewanella marisflavi* UU-3-2 (with the similarity of 99.93%), was successfully isolated which was a rod bacterium with the length about 2 μm and width about 0.5 μm . The metabolic analysis showed that this strain could use sodium lactate as an electron donor, fumarate as an electron acceptor for anaerobic respiration with acetate and succinate production. Ferrozine and formaldoxime assays illustrated that Fe(III)/Mn(IV) in the $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{MnO}_2$ were reduced. The maximum current density was 146 mA/m^2 , and the results of cyclic voltammetry revealed that the oxidation peak and reduction peak happened at 0.14 V and -0.51 V, respectively. [Conclusion] An electrochemical activity microbe, *Shewanella marisflavi* UU-3-2, was successfully isolated from marine animals represented by *Urechis unicinctus*, indicating the widespread existence of electrochemical activity microorganisms in marine annelids' intestine.

Keywords: Intestinal microbes, *Urechis unicinctus*, *Shewanella marisflavi*, dissimilatory Fe(III)/Mn(IV)-reduction, electrochemical activity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (91751112, 41573071), by the Natural Science Foundation of Shandong Province for Distinguished Young Scholars (JQ201608) and by the Young Taishan Scholars Program of Shandong Province (tsqn20161054)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-535-2109268; E-mail: fhliu@yic.ac.cn

Received: 18 September 2019; Revised: 8 November 2019; Published online: 21 January 2020