

研究报告

产甲烷分离物中 *Clostridium* spp. 与 *Methanosarcina barkeri*
潜在的种间直接电子传递李莹^{1,2} 郑世玲¹ 张洪霞^{1,2} 王炳臣^{1,2} 王欧美^{3*} 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 100040)

(3. 滨州医学院 山东 烟台 264003)

摘要: 【目的】革兰氏阴性菌 *Geobacter metallireducens* 可以与乙酸型产甲烷菌 *Methanosaeta harundinacea* 或 *Methanosarcina barkeri* 通过种间直接电子传递(DIET)还原 CO₂ 产甲烷。本实验室前期的研究发现 *Methanosarcina mazei* 和 *Geobacteraceae* 在铁还原富集培养中形成团聚体, 可能存在直接电子传递。然而, 革兰氏阳性菌(如 *Clostridium* spp.)与产甲烷菌是否存在种间直接电子传递尚不明确。【方法】采用 Hungate 厌氧滚管法, 以乙醇为唯一电子供体从铁还原富集培养体系中获得产甲烷分离物(S6)。通过 T-RFLP 及克隆文库分析群落多样性, 结合循环伏安法等电化学方法研究产甲烷分离物的电活性。【结果】*Clostridium* spp. (与 *C. tunisiense* 相似性最高)和 *M. barkeri* 分别在 S6 细菌和古菌群落中占优势。S6 与 *G. metallireducens* 共培养后铁还原和产甲烷能力未明显增加, *Clostridium* spp. 可能与 *G. metallireducens* 类似, 将电子直接传递给产甲烷菌 *M. barkeri* 产甲烷。此外, 电化学检测发现, 在用透析袋包裹电极阻碍微生物与电极表面通过直接接触形成生物膜条件下, 电流密度显著降低, 并且循环伏安扫描无明显氧化还原峰。【结论】产甲烷分离物 S6 中存在直接电子传递途径。本工作提出在产甲烷分离物中占优势的革兰氏阳性菌 *Clostridium* spp. 和 *M. barkeri* 之间可能存在种间直接电子传递。

关键词: 种间直接电子传递, 革兰氏阳性菌, *Clostridium* spp., *Geobacter*, *Methanosarcina barkeri*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 41371257, 41573071, 41401285); Key Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KZZD-EW-14); Hundred Talents Program (A) of the Chinese Academy of Sciences

***Corresponding authors:** E-mail: WANG Ou-Mei: zhou79@hotmail.com; LIU Fang-Hua: fhliu@yic.ac.cn

Received: March 18, 2016; **Accepted:** April 29, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 24, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41371257, 41573071, 41401285); 中国科学院重点资助项目(No. KZZD-EW-14); 中国科学院百人计划经费资助项目(A类)

***通讯作者:** E-mail: 王欧美: zhou79@hotmail.com; 刘芳华: fhliu@yic.ac.cn

收稿日期: 2016-03-18; **接受日期:** 2016-04-29; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-05-24

Potential direct interspecies electron transfer (DIET) from *Clostridium* spp. to *Methanosarcina barkeri* in methanogenic isolates

LI Ying^{1,2} ZHENG Shi-Ling¹ ZHANG Hong-Xia^{1,2} WANG Bing-Chen^{1,2}
WANG Ou-Mei^{3*} LIU Fang-Hua^{1*}

(1. Key Laboratory of Coastal Biology and Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100040, China)

(3. Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China)

Abstract: [Objective] *Geobacter metallireducens*, a Gram-negative bacterium, can directly transfer electron to acetoclastic methanogens such as *Methanosaeta harundinacea* and *Methanosarcina barkeri* for reducing carbon dioxide to methane. Our previous results showed that *Methanosarcina mazei* and *Geobacteraceae* formed aggregates in an iron(III)-reducing enrichment culture indicating direct interspecies electron transfer. However, the capability of direct electron transfer with methanogens for Gram-positive iron(III)-reducing bacteria such as *Clostridium* spp. is still unknown. [Methods] In this further study, methanogenic isolates (S6) were achieved from the iron (III)-reducing enrichment by roll-tube (Hungate) method with ethanol as the sole electron donor. We used terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and clone library analysis to investigate the community of S6 and used electrochemical method such as cyclic voltammetry (CV) to confirm the electroactivity of isolates. [Results] Clone library analysis of 16S rRNA gene showed that *Clostridium* spp. (close to *C. tunisiense*) and *Methanosarcina barkeri* were predominant in the bacterial and archaeal community, respectively. Interestingly, addition of *G. metallireducens* into S6 did not increase the ability of both iron(III) reduction and methanogenesis, indicating that *Clostridium* spp. may play a similar role in direct interspecies electron transfer from *G. metallireducens* to *M. barkeri*. Furthermore, current generation of the S6 suspension dramatically decreased when contact between the organisms and the electrodes was prevented by dialysis bag, and CV showed no obvious redox peaks. [Conclusion] These results suggested that there was direct electron transfer in the methanogenic isolates. This work demonstrated that the dominant Gram-positive *Clostridium* spp. can potentially directly transfer electron to *M. barkeri* in methanogenic isolates.

Keywords: Direct interspecies electron transfer (DIET), Gram-positive bacterium, *Clostridium* spp., *Geobacter*, *Methanosarcina barkeri*

微生物种间电子传递 (Inter species electron transfer, IET) 是地球表层生态系统中元素循环的核心驱动力之一。在长达近半个世纪之久的传统知识体系里, 厌氧产甲烷体系中细菌与产甲烷古菌之间的种间电子传递, 自发现以来就一直被认为是通过氢气作为媒介来进行的, 随后甲酸也被发现具有类似的功能^[1]。直到 2010 年, 美国麻省大学 Amherst 分校 Derek Lovley 教授实验室报道了一种新的种间电子传递模式——微生物种间直接电子传递, 该领

域的研究进入一个新的阶段。

2012 年, Liu 等在 Lovley 教授的指导下提出并证实了细菌与产甲烷古菌之间通过种间直接电子传递产甲烷的新机制, 研究表明导电的活性炭颗粒不仅能够促进互营养细菌之间进行直接电子传递, 而且也能促进细菌 *Geobacter metallireducens* 与产甲烷古菌 *Methanosarcina barkeri* 之间的直接电子传递^[2]; 2014 年, Rotaru 等进一步证实了细菌 *G. metallireducens* 与产甲烷古菌 *Methanosaeta*

harundinacea 之间,在不依赖活性炭颗粒等导电材料的条件下,通过直接电子传递还原 CO_2 产甲烷的机制^[3]。除此之外,产甲烷古菌 *M. barkeri* 也具备直接从细菌 *G. metallireducens* 获得电子的能力^[4]。本实验室目前已报道第 3 株产甲烷古菌。*Methanosarcina mazei* 能够与 *Geobacteraceae* 共同形成进行 DIET 所必需的团聚体结构,暗示其中 DIET 存在的可能性^[5]。

异化铁还原菌 *Geobacter* 和 *Shewanella* 属于革兰氏阴性菌,是研究 DIET 的模式菌株,在厌氧环境中广泛存在。革兰氏阴性菌胞外电子传递的研究广泛,主要集中于变形菌门(Proteobacteria),如 α -变形菌纲的沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)^[6]、 β -变形菌纲的铁还原红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)^[7]、 γ -变形菌纲的希瓦氏菌(*Shewanella* spp.)^[8]、 δ -变形菌纲的地杆菌(*Geobacter* spp.)^[9]。然而,目前已知能够直接传递电子给产甲烷古菌的细菌仅限于革兰氏阴性菌 *G. metallireducens*,革兰氏阳性菌(如 *Clostridium* spp.)与产甲烷菌之间是否能够进行直接电子传递尚不明确。

微生物的胞外电活性表现在能够将代谢底物产生的电子从胞内转移到细胞表面,再通过直接电子传递或电子穿梭体等方式传输给胞外电子受体,该过程中存在胞外电子传递。目前已报道的厚壁菌门丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)和芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)都是具有胞外电活性的革兰氏阳性菌,其中 *C. butyricum* 在微生物燃料电池中能够以葡萄糖为底物产生电流,最大电流可达 0.22 mA ^[10]; *B. subtilis* 也能够通过分泌电子穿梭体与电极进行胞外电子传递,发挥产电作用^[11]。这说明此类具有胞外电子传递能力的革兰氏阳性菌可能存在微生物种间电子传递。

基于前期研究发现界河沉积物中铁还原菌除了 *Geobacter* 以外,还包括 *Clostridium* spp.和 *Bacillus* spp.等革兰氏阳性菌^[5],因此本研究拟采用 Hungate 厌氧滚管法从沉积物铁还原富集培养中获得产甲烷分离物,进而分析其中革兰氏阳性菌与产甲烷菌

之间存在直接电子传递的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 沉积物样品采集于招远市界河(N37°05′-N37°33′, E120°08′-E120°38′)河口流域。界河沿西北方向汇入我国渤海莱州湾,属于典型的滨海河口地区。收集表层沉积物(0-5 cm),保存于 4°C ,用于后续富集培养的研究。

1.1.2 培养基: 铁还原富集培养采用淡水富集培养基 FWE^[12](g/L): NaHCO_3 2.500, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.100, KCl 0.100, NH_4Cl 1.500, NaH_2PO_4 0.600, NaCl 0.100, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.100, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.100, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.001, CH_3COONa 2.700, 酵母提取物 0.050, 调节 pH 为 7.0 后添加 100 mmol/L 的无定形铁(配制方法参考文献[12])。产甲烷培养基采用 DSMZ120, 配方参考文献[13], 添加 25 mmol/L 的乙酸或乙醇为底物。

1.1.3 主要试剂和仪器: 透析袋(MWCO: 8 000-14 000 D, 宽度: 4.4 cm)和氨苄青霉素购自索莱宝生物科技有限公司; DNA 提取试剂盒 FastDNATM SPIN Kit for Soil 购自 MP Biomedicals 公司; TIANGEN 纯化试剂盒购自天根生化科技有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Msp* I、*Taq* I、pMD18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司; 感受态细胞 Trans1-T1 购自北京全式金生物技术有限公司; 菲罗嗪、HEPES 试剂购自 BB International Life Sciences 公司; 引物合成及测序由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。气相色谱 Agilent 7890A、高效液相色谱 Agilent 1260 Infinity 购自安捷伦科技有限公司; 数据采集系统 Model 2700 购自美国吉时利仪器公司; 660E 电化学工作站购自上海辰华仪器有限公司; 微生物燃料电池所用的阳离子交换膜 Ultrex CMI-7000 购自 Membranes International 公司。

1.2 富集培养

产甲烷分离物(S6)的获得: 首先将沉积物接种到培养基 FWE^[12]中进行铁还原富集培养; 富集培养后, 采用 Hungate 厌氧滚管法, 挑取产甲烷菌菌

落,在产甲烷培养基 DSMZ120^[13]中以乙酸为底物进行培养,发现存在多种群落结构;然后将此群落转入 25 mmol/L 乙醇为底物的产甲烷培养基 DSMZ120,构建产甲烷共培养体系。

培养菌群所用的培养基分装至 100 mL 规格的西林瓶中,每瓶 40 mL,采用实验室自制的厌气站曝气 30 min (80% N₂+20% CO₂),用硅胶塞密封瓶口,加盖铝盖。将 0.15 MPa 灭菌后的培养基置于厌氧操作台中,每瓶接种 0.5 g 沉积物样品,再次密封瓶口,在 30 °C 黑暗条件下静置培养。培养 30 d 左右接种 10%–20%进行传代培养。Hungate 厌氧滚管法:用无菌注射器取对数生长中后期的铁还原富集培养物 0.5 mL,接种到半固体培养基 DSMZ120 中,加入氨苄青霉素至 1 g/L 抑制杂菌生长;将培养基置于冰上滚管,使其凝固后均匀贴附于管壁,置于 37 °C 黑暗条件下培养 2–4 周。待试管壁上长出肉眼可见的菌落后,在厌氧操作台中挑取白色或黄色半透明圆形的产甲烷菌菌落,接种到含有新鲜培养基的试管中,培养 2–4 周。筛选有甲烷产生的试管,以乙酸为底物进行传代培养,更换乙醇为电子供体获得产甲烷分离物。

共培养体系的建立:产甲烷分离物 S6 与 *G. metallireducens* 共培养称为 G-S6。在 DSMZ120 培养基中以 25 mmol/L 乙醇为唯一电子供体培养 S6 和 G-S6,设置添加或不添加 100 mmol/L 无定形铁的两种试验组,比较两者的铁还原能力和产甲烷能力。

1.3 DNA 提取及 T-RFLP 分析

采用试剂盒 FastDNA™ SPIN Kit for Soil,根据说明书标准流程提取富集物的 DNA。参考 Zheng 等^[6]的方法进行 T-RFLP 分析,以 DNA 为模板,细菌引物对为 Ba27f/Ba907r 和古菌引物对为 Ar109f/Ar915r 进行 PCR^[6],其中引物 Ba27f 的 5'端和 Ar915r 的 3'端标记 6-羧基荧光素(FAM)。PCR 反应条件为:94 °C 2 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,25 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物经纯化后,古菌用 *Taq* I 酶、细菌用 *Msp* I 酶进行酶切,酶切产物送英潍捷基(上海)贸易有限公司完成测序。特异

T-RF 相对丰度采用每个 T-RF 峰高值与总 T-RFs 峰高值的百分数计算,每个样品重复 3 次。

1.4 克隆文库的构建

以 DNA 为模版,采用无荧光标记的细菌引物对 Ba27f/Ba907r 和古菌引物对 Ar109f/Ar915r 进行 PCR^[6],基因片段切胶纯化后连接在 T 载体上,转化感受态细胞 Trans1-T1 培养。随机选取一定数量的克隆子进行菌落 PCR。阳性克隆由英潍捷基生物技术公司测序。将测定的目的基因片段序列采用 DNASTar 7.0 和 DNAMAN 8.0 进行序列分析,用 BLAST 的方法与基因库中的序列进行比对,所得序列同时用 DNAMAN 8.0 软件进行模拟酶切分析。将克隆序列及其相似性最高的序列采用 MEGA 6.0 软件 Neighbor-Joining 方法进行系统进化树的构建,并进行 Bootstrap 分析,重复 1 000 次。序列数据提交 GenBank 获取登录号,细菌序列登录号为 KU933361–KU933364、KU933366、KU933371、KU933372、KU933374;古菌序列登录号为 KT008244、KT008245、KT008259、KT008262。

1.5 MFC 的构建及运行

设置 H 型的双室微生物燃料电池(Microbial fuel cell, MFC),中间由阳离子交换膜隔开。阴阳极均采用长方体石墨电极(3.5 cm×2.5 cm×0.5 cm,投影面积为 17.5 cm²),通过钛导线与外电路相连,添加 1 000 Ω 的外电阻。组装好的 MFC 经过 0.15 MPa 灭菌后,阳极室加入 100 mL 无菌的 DSMZ120 (pH 7.0)培养基,以乙醇为底物,充气 1 h (80% N₂+20% CO₂) 阴极室加入 100 mL 无菌的 Tris-HCl (0.1 mol/L, pH 7.0)溶液,氧气为电子受体。培养 10 d 左右阳极更换 20%除氧的新鲜培养基并补充底物,保证微生物燃料电池持续运行。实验组(a)接种 5%的产甲烷分离物 S6;实验组(b)用透析袋包裹阳极,将 S6 接种在透析袋外部,透析袋将在物理上阻断微生物和电极的直接接触,防止电极表面形成生物膜;同时设置对照组(c)不接种微生物。所有 MFCs 都在室温黑暗条件下培养。

1.6 电化学数据分析

MFC 运行时用数据采集系统采集电压信号, ExcellINX 软件记录每分钟的输出电压, 根据欧姆定律计算电流密度 [$C_{\text{den}} = U/(RA)$, C_{den} (mA/m²) 为电流密度, 其中 U 是电池输出电压 (mV), R 是外阻 (Ω), A 是阳极投影面积 (m²)]. 采用循环伏安法 CV (Cyclic voltammetry) 测试微生物在 MFC 中的氧化还原特性, 在稳定运行的 MFC 开路状态下加入参比电极 (Ag/AgCl), 以阳极为工作电极, 阴极为对电极, 构建三电极体系。用 660E 电化学工作站以 10 mV/s 的扫描速度在 -0.45~0.35 V 的范围内进行扫描。

1.7 检测方法

1.7.1 Fe(II)测定方法: 培养液中 Fe(II)含量测定采用 Ferrozin 试剂显色法^[14]。培养过程中每 5 d 用无菌注射器取出 0.5 mL 样品, 置于 4.5 mL 的 0.5 mol/L 的盐酸中, 室温下静置 24 h。在转速 8 000 r/min 下离心 5 min 取上清 100 μ L 加入到 1.9 mL 的含 0.1% 菲啰嗪 (Ferrozin) 的 200 mmol/L 的 HEPES 缓冲液中, 反应 5 min 后, 在 562 nm 波长下紫外分光光度计测定吸光度。最后根据标准曲线计算 Fe(II)浓度。

1.7.2 气相、液相色谱检测: 每 5 d 用无菌注射器抽取厌氧培养瓶上空的气体, 采用配备 FID 检测器的气相色谱测定甲烷产量。体系中的乙醇、乙酸浓度用高效液相色谱定期检测: 取 1 mL 菌液 10 000 r/min 离心 2 min, 用移液枪吸取 20 μ L 上清, 加入 980 μ L 无菌水中, 稀释 50 倍。稀释后的液体经 0.22 μ m 孔径滤膜过滤, 然后上机检测。

2 结果与分析

2.1 产甲烷分离物 S6 的获得

沉积物经铁还原富集培养后, 采用 Hungate 厌氧滚管法挑取单菌落, 接种于乙醇为电子供体的液体培养基 (DSM120) 中静置培养, 发现生长到一定阶段会出现肉眼可见的团聚体。实验室已发表的文章^[5]中描述, 将培养物的电子供体由乙酸更换为乙醇时出现团聚体, 且团聚体的结构相对紧密。而本

研究结果与之有所不同, 在乙醇作为电子供体的培养条件下出现的微生物团聚体结构相对松散, 而且随着培养时间的延长会发生解聚 (图 1)。经气相色谱仪检测发现此分离物能够产生大量的甲烷气体, 我们将获得的这种产甲烷分离物命名为 S6。

2.2 S6 及共培养 G-S6 的铁还原及产甲烷能力

在研究产甲烷分离物 S6 是否存在直接电子传递时, 将 S6 和已知能与产甲烷菌进行直接电子传递的 *G. metallireducens* 共同培养, 该体系命名为 G-S6 (G 代表 *G. metallireducens*, S6 代表产甲烷分离物)。S6 和 G-S6 富集培养 30 d 的铁还原和产甲烷情况如图 2 所示。S6 和 G-S6 都表现出铁还原能力, 并且在第 10 天 Fe(II)生成量同时达到最大值, 分别为 1.190 ± 0.015 mmol 和 1.470 ± 0.044 mmol。其中 S6 的铁还原速率为 0.115 mmol/d, G-S6 的最大铁还原速率为 0.181 mmol/d。无菌对照组在非生物作用下培养 30 d 共产生 0.140 mmol 左右的 Fe(II), 说明培养过程中 Fe(III)还原是由于微生物的作用。由图 2A 可知, *G. metallireducens* 的加入并没有使 Fe(III)还原速率有明显的加快。

在第 25 天时 S6 的甲烷量最高达到 0.550 ± 0.018 mmol, 添加无定形铁的 S6 甲烷量最大值为 0.580 ± 0.004 mmol, 产甲烷速率分别为 0.074 mmol/d 和 0.066 mmol/d。添加无定形铁使 G-S6 的产甲烷启动时间延长, 第 10~15 天产甲烷速率达到最大 0.054 mmol/d, 最高甲烷量为 0.560 ± 0.017 mmol; 而



图 1 产甲烷分离物 S6 的团聚和解聚状态

Figure 1 The aggregate and disaggregate of methanogenic isolates S6

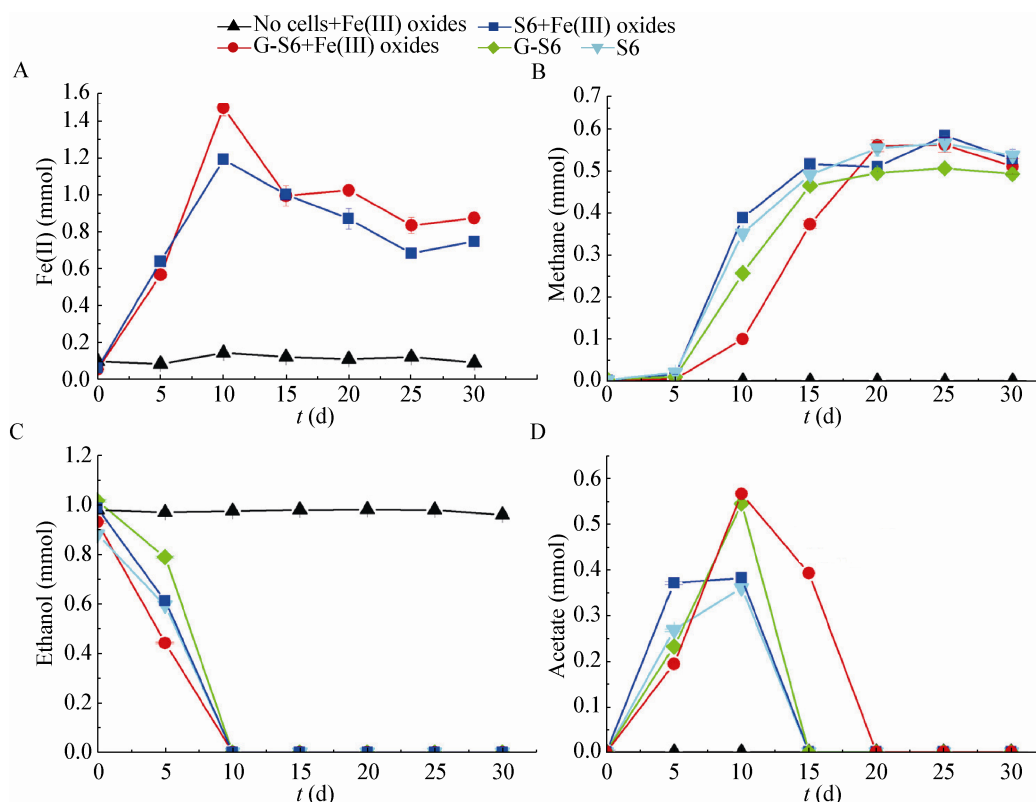


图2 S6和G-S6的铁还原(A)、产甲烷(B)、乙醇消耗(C)及乙酸积累与消耗(D)

Figure 2 Fe(III) reduction (A), methane production (B), ethanol consumption (C) and acetate production and consumption (D) in S6 and G-S6

注：S6：产甲烷分离物；G-S6：产甲烷分离物和 *G. metallireducens* 的共培养。

Note: S6: Methanogenic isolates; G-S6: Co-culture of *G. metallireducens* and methanogenic isolates.

不添加无定形铁时，产甲烷速率在第5–10天内最大为0.049 mmol/d，产甲烷量最大值为0.510±0.002 mmol。由图2B可知，添加 *G. metallireducens* 并没有提高产甲烷速率。

乙醇作为底物在10 d内消耗殆尽，添加无定形铁促进G-S6利用乙醇，而不添加无定形铁降低G-S6对乙醇的消耗。乙醇用尽后，Fe(II)不再增加。随着乙醇的消耗产生中间产物乙酸，伴随着乙酸的积累产甲烷速率显著提高，乙酸耗尽后甲烷产量也不再增加。S6培养时最高有0.38 mmol的乙酸积累；G-S6培养时乙酸积累量为0.57 mmol(图2C、D)。

S6与 *G. metallireducens* 共培养后，铁还原能力和产甲烷性能并没有明显增加，说明S6中含有的铁还原微生物与 *G. metallireducens* 具有类似的作用，能够以乙醇为唯一电子供体与产甲烷菌进行直接电子传递产甲烷。

2.3 微生物群落多样性

富集分离到S6与共培养G-S6在乙醇底物条件下培养，采用T-RFLP及克隆文库分析其中的微生物群落多样性。S6样品中细菌T-RF片段主要包括210、90、525 bp，分别占47%、29%、24%；共培养G-S6中，525 bp和160 bp分别以49.85%和50.15%的比例在细菌群落中占优势(图3A)。通过克隆文库分析，210 bp和525 bp T-RFs代表Clostridiaceae，90 bp T-RF代表Bacteroidaceae。

将克隆序列及其同源序列进行系统发育分析(图3B)，525 bp T-RF序列与 *Clostridium tunisiense* 相似性最高，达到98.65%；210 bp T-RF序列与 *Clostridium hathewayi* 相似性达到91.83%；90 bp T-RF序列与 *Bacteroides* sp. Z4 相似性最高达到98.67%；160 bp T-RF为共培养中添加的 *G. metallireducens*。

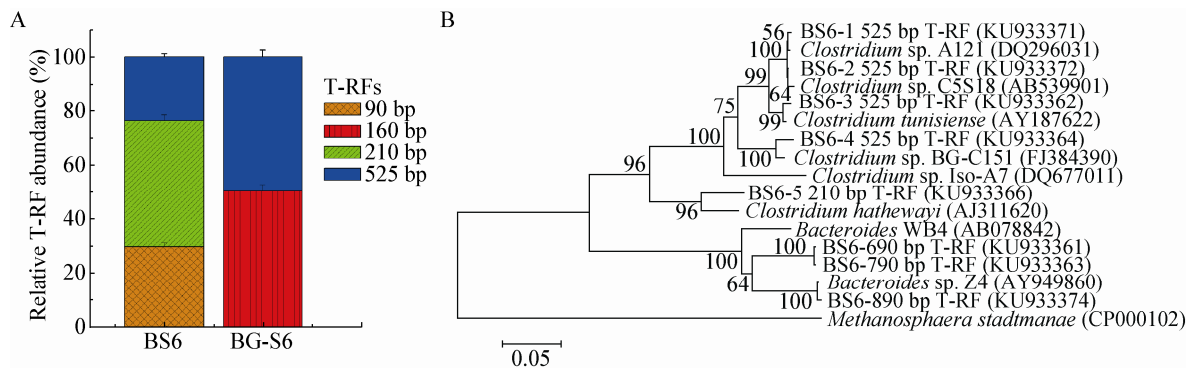


图3 S6和G-S6细菌群落T-RFLP(A)及16S rRNA基因系统发育树(B)

Figure 3 Community characteristics of bacteria revealed by T-RFLP (A) and phylogenetic tree of representative bacterial 16S rRNA gene clones generated from DNA in S6 (B)

注: B: Bacterial; S6: 产甲烷分离物; G-S6: *G. metallireducens* 与 S6 共培养; 图 B 中已标注 T-RF 片段的碱基长度; 括号中的序号为 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示 Bootstrap 1 000 个循环的置信度; 标尺代表 5% 的序列差异; 以 *Methanosphaera stadtmanae* 为细菌系统发育树外群。

Note: B: Bacterial; S6: Methanogenic isolates; G-S6: Co-culture of *G. metallireducens* and S6; Numbers of T-RF lengths are shown in base pairs; GenBank accession number of reference sequence as indicated and the number of branch represent the percentage of 1 000 bootstrap replications; The scale bars represents 5% sequence divergence and *Methanosphaera stadtmanae* was selected as outgroups of bacterial phylogenetic tree (B).

同样, 采用 T-RFLP 及克隆文库分析古菌的群落多样性。古菌 T-RF 片段以 188 bp 和 172 bp 为主, 在 S6 中分别占 41% 和 59%, 在 G-S6 中分别占 63% 和 37% (图 4A)。188 bp T-RF 代表 *Methanosarcinaceae*, 172 bp T-R 未知。系统进化树分析, 188 bp T-RF 序列与 *M. barkeri* 同源性最高达到 98.49%。

综上所述, S6 中细菌以 *Clostridium* spp. 为主, 共培养 G-S6 中 *Clostridium* spp. 和 *G. metallireducens* 占优势, 古菌都为 *M. barkeri*。

2.4 产甲烷分离物的电活性

通过微生物燃料电池研究 S6 的电活性, 电化学工作站记录输出电压, 计算电流密度。MFC 实验组和对照组的产电性能如图 5 所示, 其中实验组 a:



图4 S6和G-S6古菌群落T-RFLP(A)及16S rRNA基因系统发育树分析(B)

Figure 4 Community characteristics of archaea revealed by T-RFLP (A) and phylogenetic tree of representative archaeal 16S rRNA gene clones generated from DNA in S6 (B)

注: A: Archaeal; S6: 产甲烷分离物; G-S6: *G. metallireducens* 与 S6 共培养; 图 B 中已标注 T-RF 片段的碱基长度; 括号中的序号为 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示 Bootstrap 1 000 个循环的置信度; 标尺代表 5% 的序列差异; 以 *Dehalococcoides* sp. BHI80-15 为古菌系统发育树外群。

Note: A: Archaeal; S6: Methanogenic isolates; G-S6: Co-culture of *G. metallireducens* and S6; Numbers of T-RF lengths are shown in base pairs; GenBank accession number of reference sequence as indicated and the number of branch represent the percentage of 1 000 bootstrap replications; The scale bars represents 5% sequence divergence and *Dehalococcoides* sp. BHI80-15 was selected as outgroups of archaeal phylogenetic tree (B).

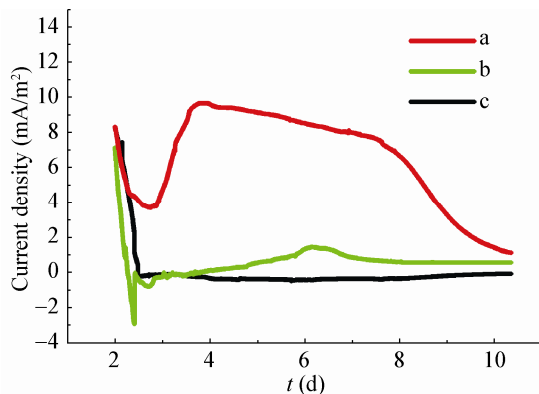


图5 实验组与对照组的电流密度随时间的变化

Figure 5 Current density over time of experimental and control systems in MFC

注：a：阳极培养 S6；b：阳极包裹透析袋培养 S6；c：非生物阳极。

Note: a: Anode chamber cultured methanogenic isolates S6; b: Culture of S6 suspension with anode enveloped by a dialysis bag; c: Abiotic anode.

阳极培养 S6；b：阳极包裹透析袋后培养 S6；对照组 c：非生物阳极。实验组 a 经过前 3 d 的稳定期开始启动，此时随着微生物生长在阳极形成生物膜，电流密度逐渐增加，第 4 天时电流密度升高到 9.68 mA/m^2 ，第 4–8 天内产电性能基本稳定，运行 8 d 之后电流密度下降；实验组 b 阳极包裹透析袋后微生物无法形成生物膜，S6 的产电启动期延长，第 6 天电流密度达到 1.46 mA/m^2 ，远低于实验组 a，并且稳定时间很短；非生物阳极对照组 c 几乎没有电流产生。阳极生物膜的形成促进微生物和电极之间的直接电子传递，透析袋阻碍生物膜形成，但也有微弱电流产生，说明非生物膜的原因如微生物自身分泌的电子穿梭体也能介导电子传递。

MFC 周期结束后，添加 Ag/AgCl 参比电极，对实验组和非生物阳极分别进行循环伏安扫描分析，比较氧化还原反应的强弱。设置 10 mV/s 的扫描速在 $-0.45\text{--}0.35 \text{ V}$ 的电势窗口下扫描，结果如图 6 所示。由循环伏安曲线可知，非生物阳极不存在氧化还原峰，说明氧化还原反应是由微生物作用产生的。实验组 a 在 0 V 出现氧化峰， -0.225 V 出现还原峰。实验组 b 在 -0.206 V 电势下出现还原峰，峰电流小于实验组 a，没有明显的氧化峰。说明 S6 在

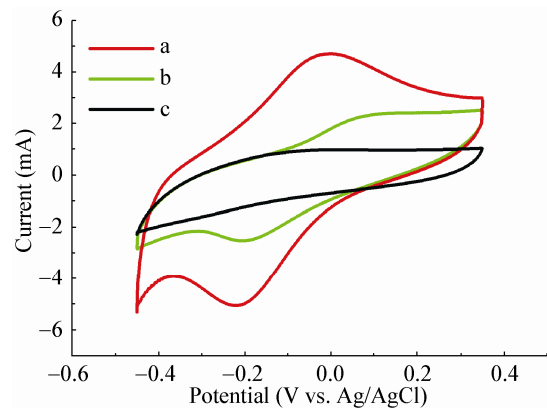


图6 实验组与对照组的循环伏安曲线

Figure 6 Cyclic voltammogram of experimental and control systems in MFC

注：a：阳极培养 S6；b：阳极包裹透析袋培养 S6；c：非生物阳极。

Note: a: Anode chamber cultured methanogenic isolates S6; b: Culture of S6 suspension with anode enveloped by a dialysis bag; c: Abiotic anode.

MFC 中可能存在直接电子传递途径，并且能氧化还原性的电子穿梭体。

根据产电性能及循环伏安结果分析，产甲烷分离物 S6 可能存在直接电子传递途径还原电极产生电流，也暗示其中占优势的 *Clostridium* 和 *M. barkeri* 之间也可能存在潜在的直接电子传递。

3 讨论

近年来有关种间直接电子传递的研究多集中于革兰氏阴性菌，尤其是以 *Shewanella* 和 *Geobacter* 为代表的异化铁还原菌，革兰氏阳性菌在种间直接电子传递中的研究尚未见报道。本工作揭示了 *Clostridium* 为代表的革兰氏阳性菌在产甲烷分离物中，可能与 *M. barkeri* 存在种间直接电子传递。

Rotaru 等已报道革兰氏阴性菌 *G. metallireducens* 可以与 *M. harundinacea* 和 *M. barkeri* 通过种间直接电子传递机制还原 CO_2 产甲烷。本实验室 Zheng 等从滨海沉积物中富集到 *Geobacteraceae* 与 *M. mazei* 共存群落，根据富集物形成团聚体推测可能存在直接电子传递^[5]。*Shewanella* 可以通过分泌黄素类^[15-16]电子穿梭体介导直接电子传递。另一种革兰氏阴性菌 *Klebsiella*

pneumoniae 不仅可以利用外膜细胞色素 c 进行胞外电子传递^[17], 当电极与微生物用微孔滤膜隔开时, 还可以分泌醌类电子穿梭体介导电子传递^[18]。而有关革兰氏阳性菌胞外电子传递的研究较少, 由于其细胞壁结构紧密, 含有大量不导电的肽聚糖, 由糖蛋白 S 层包裹, 脂蛋白较少, 这些特征都是革兰氏阳性菌进行胞外电子传递的屏障。近年来具有电极还原活性的革兰氏阳性菌逐渐被发现, Nimje 等首次将 *Bacillus subtilis* 在 MFC 中培养 3 月后获得了稳定高效的产电能力, 最高输出电压 370 mV^[11]。Wrighton 等在 MFC 阳极分离到一株 *Thermincola potens*, 能将电子穿过细胞壁传递到细胞表面, 再通过直接接触传递给电极, 并且发现 c 型细胞色素在革兰氏阳性菌的电子传递中起重要作用^[19]。另一种革兰氏阳性菌 *Carboxydotherrmus ferrireducens* 在还原胞外金属时与电子传递相关的 c 型细胞色素高表达^[20]。

Clostridium 属于革兰氏阳性菌, 研究发现 *Clostridium perfringens* 具有 IV 型菌毛介导粘附和运动, 其菌毛亚基 PilA2 与革兰氏阴性菌 *Pseudomonas aeruginosa* 结构相似^[21]。菌毛这一结构特性为 *Clostridium* 形成生物膜、与其他微生物团聚、分泌蛋白、作为“纳米导线”介导电子传递提供了可能^[22-23]。梭菌含有铁氧还蛋白, 能在低氧化还原电位下作为电子载体还原细胞色素 c, 这也可能是梭菌能够进行胞外电子传递的原因之一^[24]。Park 等在废水处理微生物燃料电池中分离得到一株 *Clostridium butyricum*, 循环伏安法扫描发现该菌具有电活性^[10]。在许多厌氧产甲烷体系中, 都发现 *Clostridium* 存在, 甚至占主要地位, 但人们普遍认为梭菌起到发酵作用^[25-27], 重点关注 *Geobacter* 等革兰氏阴性菌与产甲烷菌之间的 DIET^[25], 或者梭菌与氢营养产甲烷菌通过种间氢气传递互营产甲烷^[28], 很少有研究者将 *Clostridium* 与直接电子传递产甲烷联系起来。我们发现在 *Clostridium* 和 *M. barkeri* 占优势的产甲烷富集物中, 乙醇为唯一电子供体时能够产甲烷, 共培养添加 *G. metallireducens*

后铁还原和产甲烷能力并没有明显增加, 说明 *Clostridium* 与 *G. metallireducens* 类似, 在互营产甲烷过程中与 *M. barkeri* 可能通过种间直接电子传递产甲烷。微生物紧密接触是发生种间直接电子传递的条件之一, 培养过程中团聚体的出现也间接说明可能存在直接电子传递方式^[29]。团聚体短暂形成后又解聚, 可能因为乙醇为底物时产甲烷菌不能生长, 需要与其他微生物形成团聚体进行直接电子传递产甲烷; 随着微生物的富集培养, 可能存在分泌型电子穿梭体或通过其他途径与产甲烷菌进行种间电子传递, 产甲烷菌生长不再依赖紧密结合的团聚状态, 因此团聚体解聚。

循环伏安法等电化学手段为研究 S6 是否存在种间直接电子传递提供了依据。S6 在 MFC 中将电子传递给电极, 同时发生氧化还原反应, 说明其具有电活性。电极外包裹透析袋后无法在电极表面形成生物膜, 产电性能和氧化还原反应均减弱。有研究表明在单室 MFC 阳极用透析袋包裹电活性升高, 是由于浮游生物 *Chattonella marina* 分泌内生可溶性电子介体促进电子传递^[30]。Deng 等采用与本研究透析袋类似的微孔滤膜包裹阳极, 革兰氏阴性菌 *Klebsiella pneumoniae* 不能在电极上形成生物膜, 产电能力下降, 但随着电子穿梭体 2,6-二叔丁基苯醌(2,6-DTBBQ)的分泌电活性升高, *K. pneumoniae* 能通过膜结合细胞色素 c 和电子穿梭体两种形式传递电子^[18]。因此结合其他胞外电子传递研究进行分析, 表明 S6 与电极间存在直接电子传递途径, 可能与膜结合物质(如细胞色素或菌毛)及自身分泌的可溶性电子穿梭体有关, 进一步佐证了在产甲烷分离物中 *Clostridium* 和产甲烷菌之间存在种间直接电子传递的可能性。

Clostridium 不仅能够进行胞外电子传递, 还可能与 *M. barkeri* 通过种间直接电子传递互营产甲烷。这一发现将以前限定在革兰氏阴性菌介导直接电子传递的认识推广到革兰氏阳性菌, 并采用透析袋等电化学方法研究了产甲烷分离物中 *Clostridium* 和 *M. barkeri* 存在种间直接电子传递的潜力。虽然

这类种间直接电子传递的机制还有待研究,但传统集中于革兰氏阴性菌通过直接电子传递介导互营产甲烷的研究局面将打开。后续研究将致力于从产甲烷分离物中分离 *Clostridium* 和产甲烷菌,构建纯菌共培养体系,进一步解析 *Clostridium* 和产甲烷菌之间的种间直接电子传递机制。

参 考 文 献

- [1] Boone DR, Johnson RL, Liu YT. Diffusion of the interspecies electron carriers H_2 and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K_m for H_2 or formate uptake[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(7): 1735-1741
- [2] Liu FH, Rotaru AE, Shrestha PM, et al. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon[J]. Energy & Environmental Science, 2012, 5(10): 8982-8989
- [3] Rotaru AE, Shrestha PM, Liu FH, et al. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane[J]. Energy & Environmental Science, 2014, 7(1): 408-415
- [4] Rotaru AE, Shrestha PM, Liu FH, et al. Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(15): 4599-4605
- [5] Zheng SL, Zhang HX, Li Y, et al. Co-occurrence of *Methanosarcina mazei* and *Geobacteraceae* in an iron (III)-reducing enrichment culture[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 941
- [6] Xing DF, Zuo Y, Cheng SA, et al. Electricity generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX-1[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(11): 4146-4151
- [7] Liu ZD, Li HR. Effects of bio- and abio-factors on electricity production in a mediator-less microbial fuel cell[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 36(3): 209-214
- [8] Ringeisen BR, Henderson E, Wu PK, et al. High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(8): 2629-2634
- [9] Bond DR, Lovley DR. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1548-1555
- [10] Park HS, Kim BH, Kim HS, et al. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell[J]. Anaerobe, 2001, 7(6): 297-306
- [11] Nimje VR, Chen CY, Chen CC, et al. Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell[J]. Journal of Power Sources, 2009, 190(2): 258-263
- [12] Lovley DR, Phillips EJP. Organic-matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51(4): 683-689
- [13] Lueders T, Friedrich MW. Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2484-2494
- [14] Jaisi DP, Dong H, Kim J, et al. Nontronite particle aggregation induced by microbial Fe(III) reduction and exopolysaccharide production[J]. Clays and Clay Minerals, 2007, 55(1): 96-107
- [15] von Canstein H, 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
- [16] Brutinel ED, Gralnick JA. Shuttling happens: soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(1): 41-48
- [17] Zhang LX, Zhou SG, Zhuang L, et al. Microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae* biofilm[J]. Electrochemistry Communications, 2008, 10(10): 1641-1643
- [18] Deng LF, Li FB, Zhou SG, et al. Study of electron shuttle electrogenesis mechanism in *Klebsiella pneumoniae* based-microbial fuel cells[J]. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(19): 2983-2987
- [19] Wrighton KC, Thrash JC, Melnyk RA, et al. Evidence for direct electron transfer by a gram-positive bacterium isolated from a microbial fuel cell[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(21): 7633-7639
- [20] Gavrilov SN, Slobodkin AI, Robb FT, et al. Characterization of membrane-bound Fe(III)-EDTA reductase activities of the thermophilic Gram-positive dissimilatory iron-reducing bacterium *Thermoterrabacterium ferrireducens*[J]. Microbiology, 2007, 151(2): 139-146
- [21] Rodgers K, Arvidson CG, Melville S. Expression of a *Clostridium perfringens* type IV pilin by *Neisseria gonorrhoeae* mediates adherence to muscle cells[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(8): 3096-3105
- [22] Varga JJ, Nguyen V, O'Brien DK, et al. Type IV pili-dependent gliding motility in the gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other clostridia[J]. Molecular Microbiology, 2006, 62(3): 680-694
- [23] Ramsugit S, Pillay M. Pili of *Mycobacterium tuberculosis*: current knowledge and future prospects[J]. Archives of Microbiology, 2015, 197(6): 737-744
- [24] Lode ET, Murray CL, Sweeney WV, et al. Synthesis and properties of *Clostridium acidi-urici*[Leu⁻]-ferredoxin: a function of the peptide chain and evidence against the direct role of the aromatic residues in electron transfer[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1974, 71(4): 1361-1365
- [25] Karluvali A, Köroğlu EO, Manav N, et al. Electricity generation from organic fraction of municipal solid wastes in tubular microbial fuel cell[J]. Separation and Purification Technology, 2015, 156: 502-511
- [26] Sieber JR, McInerney MJ, Gunsalus RP. Genomic insight into syntrophy: the paradigm for anaerobic metabolic cooperation[J]. Annual Review of Microbiology, 2012, 66(1): 429-452
- [27] Zheng X, Su YL, Li X, et al. Pyrosequencing reveals the key microorganisms involved in sludge alkaline fermentation for efficient short-chain fatty acids[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(9): 4262-4268
- [28] Yang ZM, Shi XS, Wang CS, et al. Magnetite nanoparticles facilitate methane production from ethanol via acting as electron acceptors[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 16118
- [29] Kouzuma A, Kato S, Watanabe K. Microbial interspecies interactions: recent findings in syntrophic consortia[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 477
- [30] Li XM, Liu TX, Wang K, et al. Light-induced extracellular electron transport by the marine raphidophyte *chattonella marina*[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(3): 1392-1399