



铁锰氧化物提高巴斯德梭菌电子输出率

刘进超^{Δ1,2} 刘芳华^{Δ*1} 张月超^{1,2} 孟德龙³ 王学明³ 肖雷雷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

3 中国农业大学烟台研究院 山东 烟台 264670

摘要:【背景】发酵型异化金属还原菌通过发酵获取能量,同时也具有一定的异化还原变价金属氧化物的能力,关于变价金属氧化物对发酵型异化金属还原菌电子输出率的影响还知之甚少。【目的】探究铁锰氧化物($\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{MnO}_2$)对发酵型异化金属还原菌 *Clostridium pasteurianum* 电子输出率的影响。【方法】将不同浓度 $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{MnO}_2$ 添加到以葡萄糖为底物并接种 5% *C. pasteurianum* 的发酵体系中,利用电化学工作站检测 *C. pasteurianum* 电化学特性;以菲罗嗪(Ferrozine)显色法和甲醛肟法分别测定发酵体系中 Fe(II)、Mn(II)含量;气相色谱、高效液相色谱检测发酵底物葡萄糖及代谢产物(乙酸、丁酸、 CO_2 和 H_2)随发酵时间的变化情况;最后计算发酵过程的电子输出率。【结果】研究表明,接种 *C. pasteurianum* 的微生物燃料电池可以检测到电流的产生,最大电流密度为 0.93 mA/m^2 ;随着发酵时间的推移,反应体系中 Fe(II)和 Mn(II)的浓度逐渐增高; $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{MnO}_2$ 的添加使发酵体系中葡萄糖消耗量提高了 9.4%/7.7%,同时,乙酸产量提高了 37.5%/25.0%,丁酸产量提高了 22.7%/6.8%,氢气产量提高了 21.6%/9.8%,而总的电子输出率则提高了 24.27%/10.82%;添加铁锰氧化物的实验组 pH 值与对照组相比无显著差异。【结论】铁锰氧化物的添加可以提高 *C. pasteurianum* 的电子输出率,其原因可能是增加了葡萄糖消耗和缓冲 pH 值。研究结果为揭示变价金属氧化物影响发酵型异化金属还原菌电子输出的规律提供了证据,并进一步拓展了对变价金属氧化物与发酵型异化金属还原菌之间相互作用机制的认识。

关键词: 巴斯德梭菌, 电子输出率, 电化学活性, 铁锰氧化物, 异化金属还原, 发酵

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (91751112, 41573071); Senior User Project of RV KEXUE of Chinese Academy of Sciences (KEXUE2018G01); Natural Science Foundation of Shandong Province for Distinguished Young Scholars (JQ201608); Young Taishan Scholars Program of Shandong Province (TSQN20161054)

Δ These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: fhliu@yic.ac.cn

Received: 12-03-2019; Accepted: 29-04-2019; Published online: 15-05-2019

基金项目: 国家自然科学基金(91751112, 41573071); 中国科学院科学号高端用户项目(KEXUE2018G01); 山东省自然科学基金杰出青年基金(JQ201608); “泰山学者”青年专家计划(TSQN20161054)

Δ 对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: fhliu@yic.ac.cn

收稿日期: 2019-03-12; 接受日期: 2019-04-29; 网络首发日期: 2019-05-15

Iron and manganese oxides enhance electron output efficiency of *Clostridium pasteurianum*

LIU Jin-Chao^{Δ1,2} LIU Fang-Hua^{Δ*1} ZHANG Yue-Chao^{1,2} MENG De-Long³
WANG Xue-Ming³ XIAO Lei-Lei¹

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 100049, China

3 Yantai Research Institute, China Agricultural University, Yantai, Shandong 264670, China

Abstract: [Background] Fermentative dissimilatory metal-reducing bacteria, which are capable of reducing metallic oxides, get energy from fermentation. Little is known about how metallic oxides affect electron output efficiency of fermentative dissimilatory metal-reducing microorganisms. [Objective] This study was conducted to explore the influence of iron and manganese oxides ($\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{MnO}_2$) on electron output efficiency. [Methods] Different concentrations of $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{MnO}_2$ were added into fermented system containing glucose and inoculated 5% *C. pasteurianum*. Electrochemical activity of *C. pasteurianum* was detected. The concentrations of Fe(II) and Mn(II) were measured by ferrozine spectrophotometry and formaldoxime method. Fermentation substrate and metabolites of *C. pasteurianum* were detected by gas chromatography and high performance liquid chromatography. Lastly, we calculated the electron output efficiency. [Results] The current density peaked with the value of about 0.93 mA/m^2 . The concentrations of Fe(II) and Mn(II) gradually accumulated. The consumption of glucose was increased by 9.4%/7.7%, Meanwhile, acetate production was increased by 37.5%/25.0%, and butyrate production was increased by 22.7%/6.8%. Additionally, hydrogen production was increased by 21.6%/9.8%, and the total electron output efficiency was increased by 24.27%/10.82%, respectively. The pH values between experimental group and control are no significant difference. [Conclusion] This study shows that iron and manganese oxides can improve the electron output efficiency of *C. pasteurianum* by increasing glucose consumption and buffering pH value. The results provide evidence for revealing the effects of multivalent metal oxides on the electron output of fermentative dissimilatory metal-reducing bacteria, and further expand our understanding of the interaction mechanism between multivalent metal oxides and fermentative dissimilatory metal-reducing bacteria.

Keywords: *Clostridium pasteurianum*, Electron output efficiency, Electrochemical activity, Iron and manganese oxides, Dissimilatory metal reduction, Fermentation

能量驱动着生物体进行各种生命活动, 生命活动所需的能量主要来源于以糖类、蛋白质和脂肪等有机物进行的产能代谢^[1]。微生物通过氧化有机物产生电子, 在电子传递到电子受体的过程中伴随着能量的产生, 从而实现产能代谢^[2]。与 O_2 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 等可溶性电子受体不同, 不溶性的变价金属氧化物也可作为微生物的电子受体, 其结果是固体金属氧化物中的变价金属被还原为更低价态的离子, 而微生物对这些金属元素无同化作用, 则此过程称为异化金属还原(dissimilatory metal reduction)^[3]。由于铁锰氧化物的氧化还原电势相对较高^[4], 因此当体系中存在这些氧化物时, 还原性

底物的利用率可能会提高。

对于异化金属还原, 现在研究较多的是革兰氏阴性菌, 如希瓦氏菌属(*Shewanella*)和地杆菌属(*Geobacter*), 大量报道证实革兰氏阴性菌可以利用固态电极或者铁锰氧化物作为电子受体, 同时固态电极或者铁锰氧化物也影响革兰氏阴性菌的电子输出效率。Kato 等^[5]构建了地杆菌微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC), 通过向其中添加铁氧化物, 发现铁氧化物提高了 3 株地杆菌(*G. bremerensis*, *G. pelophilus*, *G. metallireducens*)的电流输出, 然而降低了其中一株地杆菌(*G. sulfurreducens*)的电流密度。Kato 等^[6]研究了 MFC 中的阳极电势对地杆菌

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

的电流密度的影响,发现在广泛的阳极电势范围内,*G. metallireducens* 和 *G. sulfurreducens* 均可产生高电流密度,而 *G. daltonii* 和 *G. bemidjensis* 仅仅在较窄的阳极电势范围内产生相对较大的电流密度。在我们以前的研究中,通过构建 *G. metallireducens* 和 *G. sulfurreducens* 共生体系,发现向其中添加纳米磁铁矿会促进二者之间的电子传递^[7]。近期我们也发现,向黄河三角洲原位土壤中添加纳米磁铁矿提高了甲烷的产生,这是因为纳米磁铁矿加速了 *Geobacter* 与甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)之间的电子传递^[8]。但是,固态电极或者铁锰氧化物是如何影响革兰氏阳性菌电子输出效率的研究还比较少。

梭菌属(*Clostridium*)属于革兰氏阳性微生物,是重要的发酵研究对象,在其代谢过程中,有机物被部分氧化,且释放的电子转移至内源性中间代谢产物中,以底物水平磷酸化产能^[9]。同时,越来越多的梭菌被发现具有异化还原金属的能力^[10-12],所以许多梭菌是发酵型异化金属还原菌(fermentative dissimilatory metal-reducing microorganisms),当外部环境存在含 Mn(IV)/Fe(III)氧化物时,仅有少于5%的电子传递至这些含变价金属的氧化物,但胞外电子受体的缺失并不影响发酵型异化金属还原菌的存活^[13]。近期我们从黄河三角洲也分离了一株同时具备产电、异化金属还原和产氢能力的梭菌 *Clostridium bifermentans* EZ-1^[14],向 EZ-1 中添加弱晶型的水铁矿,该梭菌总的电子输出率提高了53.5%,并且水铁矿的添加改变了 EZ-1 的产氢代谢途径^[15]。然而,对于结晶程度更高的铁锰氧化物如何影响发酵型异化金属还原菌电子输出率还知之甚少。

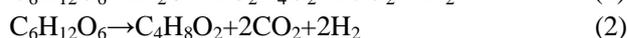
本研究以发酵型异化金属还原菌 *Clostridium pasteurianum* 为研究对象,分别向培养体系添加不同浓度的纳米 Fe₂O₃ 和 MnO₂,通过检测发酵体系 pH 值、*Clostridium* 代谢底物和产物的变化情况,并计算发酵过程的电子输出率,以此评估对于铁锰氧化物的添加,发酵型异化金属还原菌电子输出率

是如何响应的。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株、主要试剂和仪器

所用的微生物菌株是 *C. pasteurianum* DSM 525,购自 DSMZ 菌种库。DSM 525 是革兰氏阳性菌,严格厌氧,可产芽孢^[16],其主要发酵代谢途径为^[17]:



将冻存于-80 °C 超低温冰箱中的 DSM 525 菌株接种至 MSG 培养基中并传至 3 代。MSG 培养基改良自文献[18]。MSG 基本培养基(g/L):大豆蛋白胨 0.50,胰蛋白胨 0.50,葡萄糖 10.00,NaCl 5.00,KH₂PO₄ 0.54,K₂HPO₄·3H₂O 2.10。混合液 A: Mineral:Trace element:Vitamin 按 48:1:1 (体积比)组成。Mineral 溶液(g/L):NH₄Cl 6.00,NaCl 6.00,CaCl₂·2H₂O 0.20,MgCl₂·6H₂O 2.00; Trace element 溶液(g/L):FeCl₂·2H₂O 2.00,ZnCl₂ 0.05,MnCl₂·4H₂O 0.05,CuCl₂·2H₂O 0.03,(NH₄)₆MnO₂₄·4H₂O 0.05,AlCl₃ 0.05,CoCl₃·2H₂O 0.20,H₃BO₃ 饱和溶液 1 mL,浓盐酸 1 mL; Vitamin 溶液(g/L):生物素 0.002,叶酸 0.002,维生素 B6 0.010,核黄素 0.005,维生素 B1 0.005,烟酸 0.005,维生素 B12 0.005,对氨基苯甲酸 0.005,泛酸 0.005。混合液 B: L-半胱氨酸盐酸盐溶液:Na₂S 溶液按 49:1 (体积比)组成。L-半胱氨酸盐酸盐溶液(g/L):NaHCO₃ 80.00,L-半胱氨酸盐酸盐 1.00;Na₂S 溶液为 242.00 g/L。基本培养基与混合液 A 和 B 的比例为 100:1:1 (体积比)。

实验所用的 α-Fe₂O₃ 购自阿拉丁公司,颗粒直径 30 nm,纯度为 99.5%;MnO₂ 购自北京德科岛金公司,颗粒直径 50 nm,纯度为 99.9%。称取适量 α-Fe₂O₃ 和 MnO₂ 并将其配置成母液。

紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;电化学分析仪和多通道恒电位仪,上海辰华仪器有限公司;气相色谱和高效液相色谱,安捷伦科技有限公司。

1.2 DSM 525 铁锰氧化物还原及生理检测实验

配制 MSG 基本培养基,分装 20 mL 至 50 mL

西林瓶内,曝氮气 30 min 使体系无氧,丁基橡胶塞密封,铝盖加固, 1.7×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 30 min。待灭菌完成冷却后,分别添加 0.2 mL 混合液 A 和 B 至体系中,然后分别添加终浓度 2.5、10 mmol/L 的 Fe_2O_3 、 MnO_2 至体系中,设置不接菌对照组,实验组转接 5% 的指数生长期 ($OD_{600}=0.72$) 的 DSM 525,定时取样测定其中的 $\text{Fe}(\text{II})$ 和 $\text{Mn}(\text{II})$ 浓度,以及 H_2 、 CO_2 、葡萄糖和有机物含量。发酵结束后,测定发酵体系的 pH 值。

1.3 电化学活性表征与生长曲线测定

构建单室微生物燃料电池 (single-chamber microbial fuel cell, SCMFC) 表征 DSM 525 的产电能力。将配好的培养基倒入阳极室,工作电极和对电极选用钛丝连接的石墨电极 ($20 \times 20 \times 0.2$ mm),使用抽换气装置将阳极室空气置换为氮气,最后将电池灭菌。以甘汞电极作为参比电极,向电池内接入 5% DSM 525,而另一个不接菌的电池作为对照。使用多通道恒电位仪对两个电池的产电情况进行测定。测定电流所加电压为 0.4 V,敏感度为 1.0×10^{-4} ,每隔 2 s 记录电流。循环伏安扫描操作过程:将上述 MFC 的三电极连接到电化学分析仪,设置最低且起始电压为 -1 V,最高且最终电压为 1.2 V,扫描速度是 50 mV/s,共 4 个扫描片段,每 0.001 s 记录数据,敏感度设置为 0.001 A/V。

向新鲜的培养基中接种 5% 的菌液,在 30 °C 中的暗室中培养,定期取样,紫外分光光度计 600 nm 波长下测定吸光值。

1.4 $\text{Fe}(\text{II})$ 和 $\text{Mn}(\text{II})$ 浓度测量

菲罗嗪 (ferrozine) 显色法测定 $\text{Fe}(\text{II})$ 含量^[19]。取样品 0.1 mL 注入离心管中,随即取 0.5 mmol/L 的盐酸 0.9 mL 加入其中,静置 24 h 后,5 000 r/min 离心 3 min,取 0.1 mL 上清液到新的离心管中,加入 1.9 mL 0.1% 的菲罗嗪显色液,在室温下反应 5 min 后,紫外分光光度计 562 nm 波长下测定吸光值,并根据制定的标准曲线计算样品的 $\text{Fe}(\text{II})$ 含量。

甲醛肟法测定 $\text{Mn}(\text{II})$ 含量^[20-21]。甲醛肟溶液:4% (质量体积比) 盐酸羟胺,0.74% (质量体积比) 甲

醛溶液,将以上溶液与氨水 (25%–28%) 按 1:0.4 的体积比混合为分析试剂。取 0.5 mL 样品溶液过滤,取 0.1 mL 样品与 1.9 mL 分析试剂混合,在室温下反应 5 min 后,紫外分光光度计 450 nm 波长下测定吸光值,并根据制定的标准曲线计算样品的 $\text{Mn}(\text{II})$ 含量。

1.5 气体及有机物摩尔浓度测定

取顶空气体样品 0.2 mL,使用配置热导检测器 (thermal conductivity detector, TCD) 的气相色谱仪对 H_2 和 CO_2 摩尔浓度进行分析^[22]。TCD 温度设置为 250 °C,进样口温度为 80 °C,柱箱温度为 80 °C。以 N_2 为载气,流速为 5 mL/min。 H_2 的出峰时间是 0.88 min, CO_2 的出峰时间是 2.3 min。

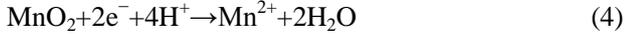
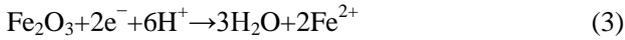
高效液相色谱仪对发酵底物葡萄糖和产物乙酸和丁酸进行分析^[8]。检测器为示差折光检测器 (refractive index detector, RID),温度 55 °C;色谱柱为 Hi-Plex H (300×7.7 mm),柱温 60 °C;5 mmol/L 稀硫酸溶液作流动相,流速 0.6 mL/min。葡萄糖的出峰时间为 10.4 min,乙酸出峰时间为 16.3 min,丁酸出峰时间为 24.5 min。

1.6 电子输出量与电子输出率计算方法

本文中的电子输出是指电子转移到 a 物质生成 b 物质 (电子输出的产物),根据 b 物质与电子的化学计量关系计算电子输出量,将所有电子输出量相加即为该组总电子输出量。电子输出率的计算方法为^[15]:将对照组总的电子输出量 c 定义电子输出率为 100%,实验组中电子输出量是对照组的 n 倍,则实验组的电子输出率为 100n%,这是一种直观表示实验组与对照组电子输出关系的方式。

根据公式(1)可知,1 mol $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 发酵生成 2 mol 乙酸,释放 8 mol 电子^[23],8 mol 电子转移给质子,在梭菌氢酶的作用下生成 4 mol 氢气,因而该反应中氢气是电子输出产物,每生成 1 mol 氢气的电子输出量是 2 mol。公式(2)中,1 mol $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 发酵生成 CO_2 释放 8 mol 电子,只有 4 mol 质子接收 4 mol 电子生成 2 mol 氢气,意味着每生成 1 mol 丁酸接收了 4 mol 电子,则该公式中根据氢气和 $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$

物质的量计算电子输出即可。实验组中,加入铁锰氧化物,发生反应为:



从中可以看出, Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 也是电子输出产物,根据公式(3)、(4)中的化学计量关系,计算电子输出量。

1.7 数据分析

应用 IBM SPSS statistics 25 对数据显著性进行 t 检验分析和曼-惠特尼 U 检验分析。

2 结果与分析

2.1 DSM 525 电活性表征

将 5% DSM 525 接种到 SCMFC 阳极室,并实时检测 SCMFC 电流密度。结果如图 1A 所示,相对于不接菌的对照组,接种 DSM 525 的实验组随培养时间的增加,电流密度逐渐增大,且在 32 h 达到最大值 0.93 mA/m^2 , 32 h 后逐渐降低。从生长曲线来看(图 1B), DSM 525 在 30 h 后基本进入指数期末期,此时必要营养成分没有特别限制生长,菌体密度接近最大,代谢葡萄糖速度快,产生大量电子传递到电极,表现为电流密度的增大。随着葡萄糖的大量消耗和代谢产物的累积,DSM 525 从稳定期进入衰亡期,电流密度趋于 0 mA/m^2 。循环伏安扫描结果(图 1C)显示,对照组的曲线平滑且无氧化还原峰,与之相比,实验组的电流明显较大,在 0.8 V 处有还原峰,说明 DSM 525 可能产生还原性的代谢产物,但没有氧化峰,表明 DSM 525 可能不是通过电子穿梭机制进行胞外电子传递。以上结果表明,DSM 525 是一株具有胞外电子传递能力的电活性微生物,在 MFC 中可以将胞内有机物氧化产生的电子传递到固体电极表面,从而产生电流。

2.2 DSM 525 厌氧还原铁锰氧化物

将 Fe_2O_3 和 MnO_2 分别添加到接种 DSM 525 培养体系中,检测体系中 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度随培养时间的变化情况。结果如图 2 所示,接菌的实验组中,随时间的增加,体系中累积的 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 物质的量越高,而不接菌的对照组 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 物质的量基本

为零,表明 DSM 525 可以厌氧还原铁锰氧化物。当添加浓度均为 2.5 mmol/L 时,体系中最大 Mn^{2+} 物质的量(0.040 mmol)要高于 Fe^{2+} (0.026 mmol), MnO_2 的还原率为 82.9% , Fe_2O_3 的还原率为 27.2% ;当添加浓度均为 10 mmol/L 时,体系中 Fe^{2+} 物质的量(0.071 mmol)要高于 Mn^{2+} (0.061 mmol), MnO_2

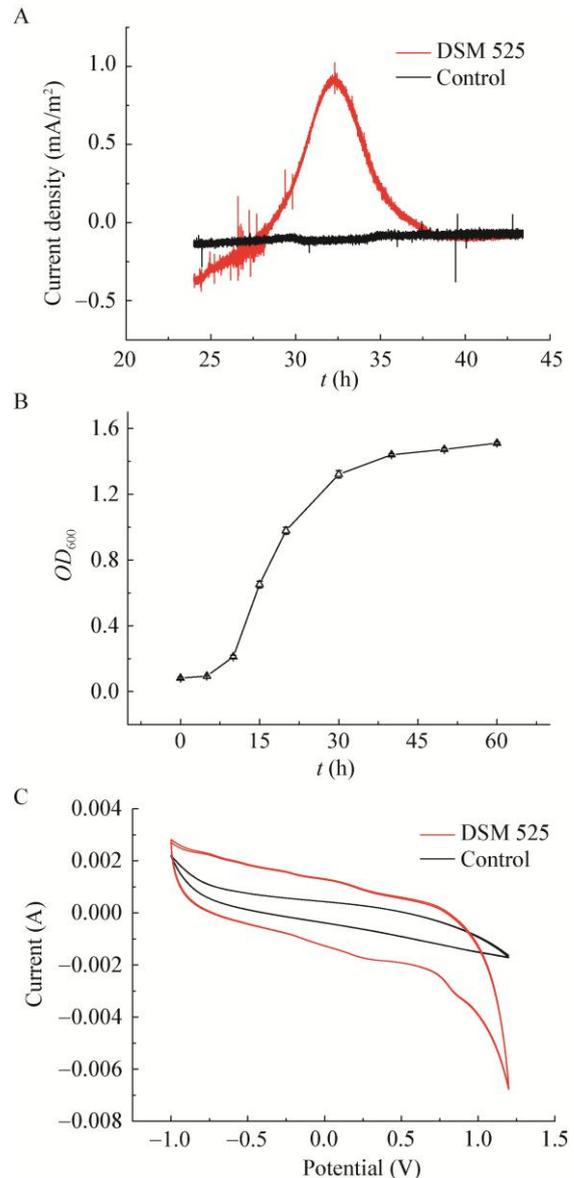


图 1 DSM 525 的产电能力表征(A)、生长曲线测定(B)与循环伏安曲线(C)

Figure 1 The characterization of DSM 525's capacity for electricity generation (A), growth curve (B) and cyclic voltammogram (C)

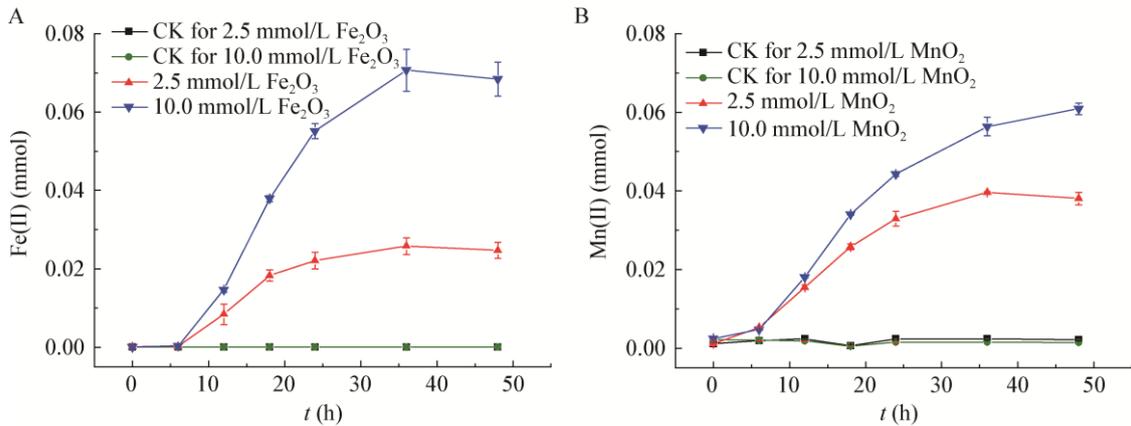


图 2 DSM 525 在发酵过程中的 Fe(II) (A)和 Mn(II) (B)物质的量变化曲线

Figure 2 Dynamics of Fe(II) (A) and Mn(II) (B) concentrations

的还原率为 33.3%， Fe_2O_3 的还原率为 18.6%。以上结果表明，相较于 Fe_2O_3 ，DSM 525 更易于还原 MnO_2 ，这可能是由于 $\text{MnO}_2/\text{Mn}^{2+}$ 氧化还原电势高于 $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}^{2+}$ ，因而接受电子的趋势更强^[24]。

2.3 Fe_2O_3 和 MnO_2 促进 DSM 525 底物消耗

如图 3 所示，在含有 Fe_2O_3 的接菌实验组中，与不含铁锰氧化物的接菌对照组相比，前 18 h 葡萄糖消耗量和消耗速率无明显差异；18–36 h，添加 2.5、10.0 mmol/L Fe_2O_3 的实验组中，葡萄糖消耗量 (0.38 mmol, 0.39 mmol) 均高于对照组 (0.32 mmol)，且实验组中的葡萄糖消耗完全，而对照组仍有 0.06 mmol 葡萄糖未消耗。相比 Fe_2O_3 ，仅 6 h 后，添加 MnO_2 实验组中葡萄糖消耗量与对照组存在显

著差异，6–24 h 的消耗量最大为 0.61 mmol，大于对照组 (0.47 mmol) 和 Fe_2O_3 实验组 (0.53 mmol)；而在 24–36 h， Fe_2O_3 添加组葡萄糖消耗量 (0.24 mmol) 高于 MnO_2 添加组 (0.15 mmol)。以上结果表明， Fe_2O_3 和 MnO_2 的添加显著增加了 DSM 525 葡萄糖消耗量和消耗速率。另外，金属氧化物浓度梯度不同 (2.5、10.0 mmol/L) 对于葡萄糖消耗速率和消耗量的影响无显著差异。

2.4 Fe_2O_3 和 MnO_2 促进 DSM 525 代谢产物累积

由公式 (1) 和 (2) 可知，DSM 525 代谢葡萄糖的产物主要是 H_2 、乙酸、丁酸和 CO_2 。DSM 525 代谢葡萄糖产物的变化情况如图 4 所示。在不含铁锰氧化物的接菌对照组中，葡萄糖消耗量为 0.75 mmol，

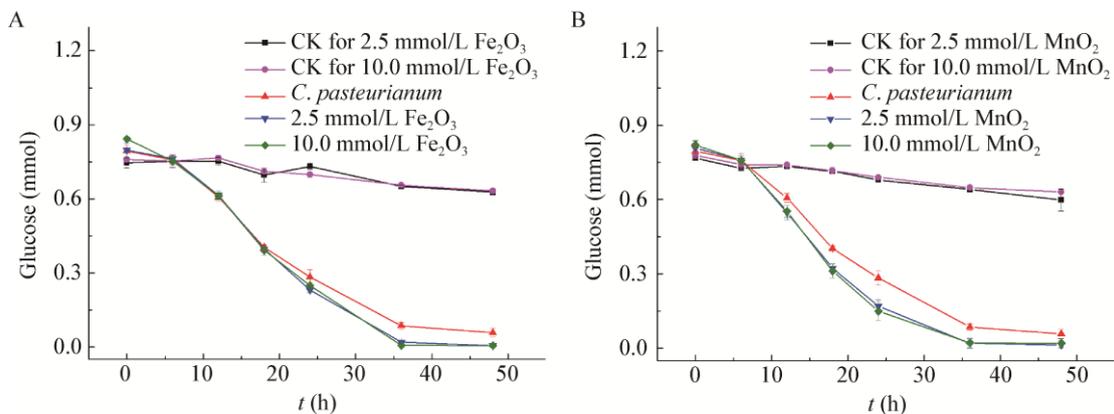


图 3 Fe_2O_3 (A) 和 MnO_2 (B) 的添加对 DSM 525 代谢葡萄糖的影响

Figure 3 Effects of Fe_2O_3 (A) and MnO_2 (B) on the glucose consumption of DSM 525

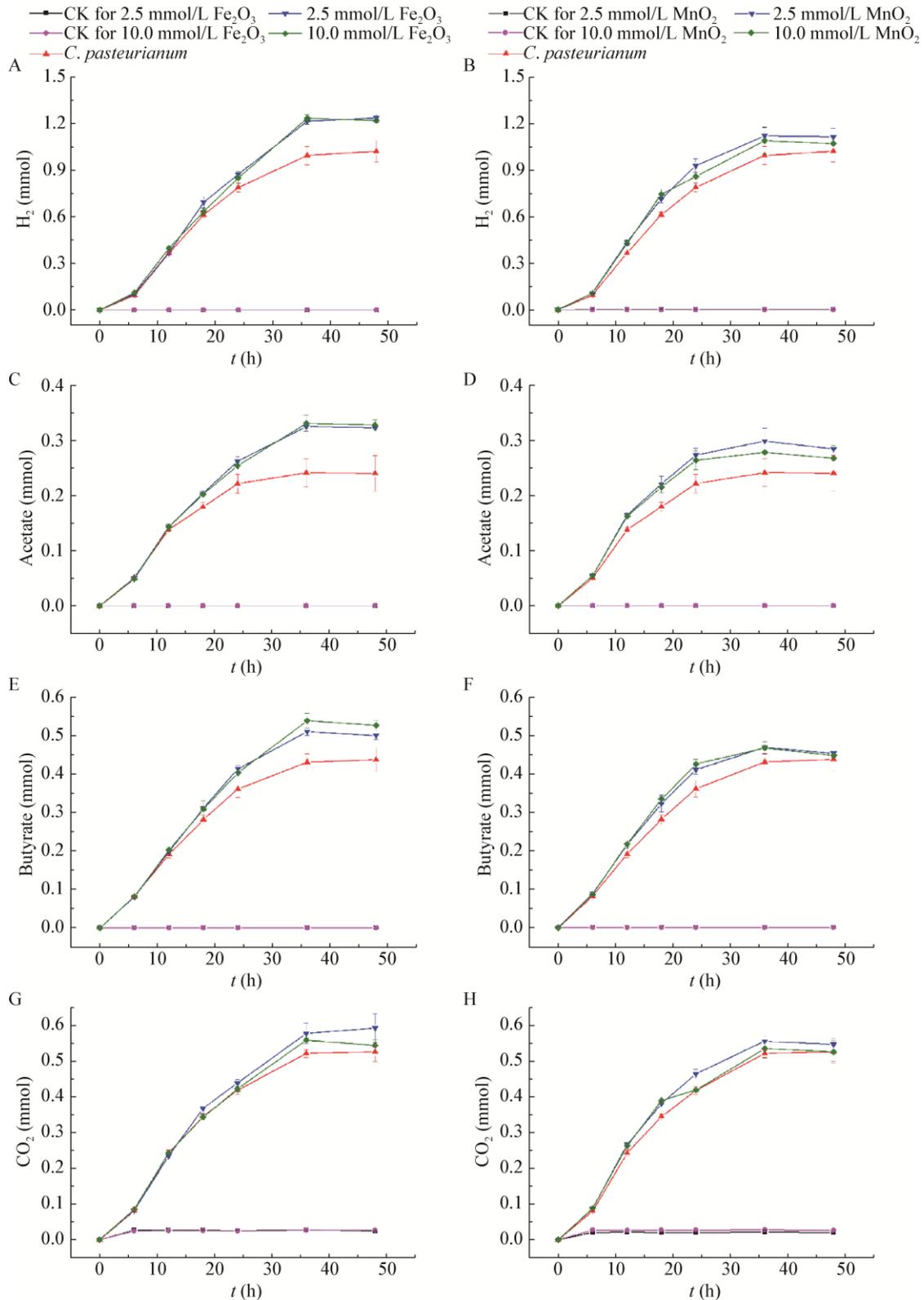


图 4 Fe_2O_3 和 MnO_2 的添加对 DSM 525 氢气(A 和 B)、乙酸(C 和 D)、丁酸(E 和 F)、 CO_2 (G 和 H) 累积的影响

Figure 4 Effects of Fe_2O_3 and MnO_2 on the H_2 (A and B), acetate (C and D), butyrate (E and F), CO_2 (G and H) accumulation of DSM 525

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

理论上最大氢产量为 3.0 mmol, 而实际为 1.02 mmol, 产氢效率为 34%; Fe_2O_3 添加的实验组中, 葡萄糖消耗量为 0.81 mmol, 理论产氢量为 3.24 mmol, 实际产氢量为 1.24 mmol (图 4A), 产氢效率为 38.2%; 添加 MnO_2 的实验组中, 葡萄糖消耗量为 0.80 mmol, 理论产氢量为 3.20 mmol, 实际产氢量为 1.12 mmol (图 4B), 产氢效率为 35%。经过 t 检验可知, 除了 10 mmol/L MnO_2 添加无显著影响($P>0.05$), 其它实验组的氢气产量和产氢效率相比对照有显著增加。

对照组中, 乙酸和丁酸最大产量分别为 0.24 mmol 和 0.44 mmol; Fe_2O_3 实验组的乙酸和丁酸最大产量分别为 0.33 mmol (图 4C) 和 0.54 mmol (图 4E); MnO_2 实验组的乙酸和丁酸最大产量分别为 0.30 mmol (图 4D) 和 0.47 mmol (图 4F)。 t 检验分析可知, 除了 10 mmol/L MnO_2 添加无显著影响($P>0.05$), 其它实验组的乙酸、丁酸产量相比对照有显著增加。这表明适量铁锰氧化物的添加会同时促进两种产氢代谢途径。

Fe_2O_3 和 MnO_2 添加对体系 CO_2 累积的影响如图 4G、H 所示, 对照组中 CO_2 最大量为 0.53 mmol, 添加 MnO_2 实验组中 CO_2 最大量为 0.56 mmol, 添加 Fe_2O_3 实验组中 CO_2 最大量为 0.59 mmol。同样地, 通过 t 检验分析发现除了 10 mmol/L MnO_2 添加无显著影响($P>0.05$), 其它实验组的 CO_2 产量相比对照有显著增加。细胞内有机物经一系列氧化分解生成 CO_2 , 因此 CO_2 在一定程度上可以反映细菌数

量、酶活性等微生物生长状态。以上结果表明, 低浓度铁锰氧化物(2.5 mmol/L)可以促进 DSM 525 发酵代谢, 更有利于其生长; 而高浓度铁锰氧化物(10.0 mmol/L)虽能促进 DSM 525 葡萄糖发酵代谢, 但由于大量铁锰离子释放, 可能对 DSM 525 有一定毒性; 因为铁是微生物所需的大量元素, 而锰是微量元素^[25], 因此大量的锰离子对 DSM 525 毒害性更强。

通过发酵产物物质的量计算发酵过程电子输出和电子输出率的情况如表 1 所示。整体上, Fe_2O_3 和 MnO_2 的添加分别提高 DSM 525 总的电子输出率 24.27% 和 10.82%, Fe_2O_3 促进效果相比 MnO_2 更优。尽管还原 Mn(IV) 的电子输出量(0.079 mmol, 0.12 mmol) 要高于还原 Fe(III) (0.026 mmol, 0.071 mmol), 但 Fe_2O_3 实验组总电子输出物质的量(4.55 mmol, 4.71 mmol) 要高于 MnO_2 添加实验组(4.20 mmol, 4.17 mmol), 且均高于对照组的电子输出物质的量(3.79 mmol)。高浓度 Fe_2O_3 添加实验组还原 Fe(III) 的电子输出率是其低浓度添加实验组的 2.6 倍; 高浓度 MnO_2 添加实验组还原 Mn(IV) 的电子输出比率是其低浓度添加实验组的 1.5 倍。另外, 通过计算金属还原所占电子输出比率可知, 最高为 2.88%, 低于 5%, 这与以前的研究^[13]吻合。

2.5 Fe_2O_3 和 MnO_2 添加缓冲发酵体系 pH 值

为了探索 Fe_2O_3 和 MnO_2 对发酵体系 pH 值的影响, 发酵结束后, 测试 pH 值结果如图 5 所示, 仅添加铁锰氧化物而不接种 DSM 525 的对照组中发

表 1 Fe_2O_3 和 MnO_2 的添加对 DSM 525 电子输出率的影响

Table 1 Effect of Fe_2O_3 and MnO_2 on DSM 525's electron output efficiency

项目 Item	对照 Control	Fe_2O_3 (mmol/L)		MnO_2 (mmol/L)	
		2.5	10	2.5	10
H_2 (mmol)	2.04±0.14	2.48±0.03	2.48±0.04	2.24±0.11	2.18±0.18
丁酸 Butyrate (mmol)	1.75±0.12	2.04±0.04	2.16±0.08	1.88±0.07	1.87±0.03
Fe(II)/Mn(II) (mmol)	0	0.026±0.002 1	0.071±0.005 3	0.079±0.03	0.12±0.03
电子输出 Electron output (mmol)	3.79	4.55	4.71	4.20	4.17
总电子输出率	100.00	120.05	124.27	110.82	110.03
The total electron output efficiency (%)					
金属还原所占电子输出比率	0	0.57	1.51	1.88	2.88
Electron output ratio of metal reduction (%)					

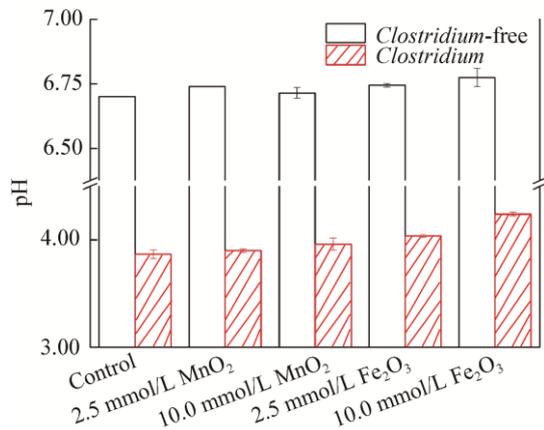


图 5 Fe₂O₃ 和 MnO₂ 的添加对培养基酸碱度的影响
Figure 5 Effects of Fe₂O₃ and MnO₂ on the pH values of culture media

醇前后 pH 值无显著差异, pH 值均为 6.70 左右, 经曼-惠特尼 *U* 检验发现它们之间并无显著差异, 表明不同浓度铁锰氧化物的添加不会改变培养基的 pH 值, 排除了初始 pH 值差异对 DSM 525 发酵过程的影响。仅接种 5% DSM 525 的对照组和添加铁锰氧化物且接种 5% DSM 525 的实验组中, 由于大量发酵代谢产物乙酸和丁酸的累积及 CO₂ 的溶解, pH 值均大幅降低; 统计学分析结果显示, 二者终 pH 值无显著差异, 但相比未添加铁锰氧化物的对照, 铁锰氧化物的添加显著促进了 DSM 525 代谢产物——乙酸、丁酸和 CO₂ 的产生(图 4)。由此表明, 铁锰氧化物的添加可以有效缓冲发酵过程中由于发酵产物酸累积导致 pH 值的快速下降。pH 值是影响发酵的重要限制因素, 过低的 pH 值会抑制发酵过程的继续进行, 而铁锰氧化物的添加可以有效缓冲发酵体系中 pH 值的快速下降, 促使发酵过程继续进行, 提高底物利用率。

3 讨论与结论

发酵型微生物具有多种发酵途径, 如乙醇发酵、丁酸发酵和混合酸发酵等。发酵型微生物通过发酵获取能量用于生命活动, 同时发酵型微生物也被广泛用于工业发酵, 从而获得高附加值的产物。提高发酵效率一直以来都是人们所关注的热点问题。

题。近些年, 纳米技术领域的快速发展加速了其在生物过程方面的潜在应用价值。由于纳米颗粒易于制备和特殊的理化特性, 将纳米颗粒添加到体系中提高发酵效率具有较好的研究前景。

本研究测试了 Fe₂O₃ 和 MnO₂ 对 *C. pasteurianum* DSM 525 发酵代谢的影响, 结果表明 DSM 525 具有产电能力, 且能厌氧还原铁锰氧化物中的 Fe(III)/Mn(IV)。近些年, 研究发现多种梭菌属如 *C. butyricum*^[11]、*C. sporogenes*^[12]、*C. bifermans*^[14] 等具有电化学活性。相比于革兰氏阴性菌, 革兰氏阳性菌因细胞壁厚、具有电子传递能力的细胞色素蛋白相对较少等原因, 胞外电子传递机制研究滞后。大量研究发现, 梭菌属发酵体系的循环伏安扫描结果存在氧化还原峰^[11-12,14], 表明通过产生具有氧化还原性物质作为电子穿梭体可能是梭菌胞外电子传递重要机制之一, 而本研究的 DSM 525 仅有还原峰, 说明梭菌中可能也存在其它胞外电子传递机制。

铁锰氧化物的添加提高了 DSM 525 的电子输出率, 其潜在的机制可归纳为 3 点: (1) 铁锰氧化物的加入增加了额外的电子输出途径, 使得 DSM 525 消耗更多的葡萄糖, 从而产生更多电子; (2) 铁锰氧化物的还原可以缓冲发酵体系 pH 值, 降低产物(乙酸和丁酸)抑制效应, 从而更有利于 DSM 525 高效发酵; (3) 静置培养条件下, 铁锰氧化物从上到下分布密度逐渐增加, 上下分布不均使得 DSM 525 电子输出存在差异, 使得同菌株间产生电势差, 有利于种内电子传递。

本研究发现, 添加铁锰氧化物的实验组中葡萄糖消耗量明显高于对照组, MnO₂ 接受电子的趋势更强, 而实验前期 MnO₂ 实验组葡萄糖消耗量也高于 Fe₂O₃ 实验组, 以上结果表明, 铁锰氧化物的加入激活了 DSM 525 胞外电子传递通路, 增加了体系中电子输出的需求, 促进底物葡萄糖的消耗, 以产生更多电子满足需求。在我们最新的研究中, 以 10.0 g/L 葡萄糖为底物并接种 DSM 525 的体系里, 对照组 DSM 525 只消耗了 68% 的葡萄糖, 当添加无定形水铁矿后, 葡萄糖消耗完全^[26]。Zhao 等^[27]

向混合体系(*C. butyricum* 丰度较高)中添加磁铁矿, 提升了葡萄糖的转换效率。Popovic 等^[28]发现, 正常情况下 *C. beijerinckii* 代谢木糖的能力较弱, 当向体系中添加弱晶型的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 和两种典型的电子穿梭体(蒽醌-2,6-二磺酸钠和核黄素)后, 电子穿梭体加速了 *C. beijerinckii* 与 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的电子传递, 木糖利用增加的同时丁醇产量提升。

pH 对微生物的生长影响不可忽视, 因而在发酵过程中的 pH 控制十分必要。铁锰氧化物的添加可以有效缓冲发酵体系 pH 值, 有利于发酵过程持久高效的进行。我们此前的研究结果也表明水铁矿具有缓冲体系 pH 值的作用^[26]。Beckers 等^[29]利用 *C. butyricum* 在可控 pH 值的厌氧序批式反应器中发酵产氢, 共运行 15 个周期, 在第一个周期内, 发酵体系 pH 值从 7.6 降至 5.2, 之后控制在 5.2 左右, 然而第一个周期的产氢量仅为 1.7 L, 而后面周期的产氢量为 3.0–3.3 L, 此外的许多研究也都表明了 pH 对发酵过程的持续进行具有重要的调节作用^[30-31]。近年来, 有研究发现异化还原金属氧化物与缓冲 pH 值直接关联的新机制, *Orenia metallireducens* Z6 是一株发酵产氢气、有机酸的发酵型微生物, 同时可进行异化铁还原, 其铁还原过程耦合氢气和质子的消耗, 缓冲了 pH 值的下降, 从而促进了发酵过程的持续进行^[32]。

近些年, 微生物种间直接电子传递(direct interspecies electron transfer, DIET)一直是研究的热点, 不同种的微生物通过 DIET 获得能量, 实现互营生长。然而均一的纯培养体系下同种微生物性质基本相同, 难以设置条件区别同种微生物互营与否, 目前种内电子传递的概念和相关研究较为匮乏, 在静置培养条件下, 纳米颗粒因重力作用在体系中分布不均, 使得微生物与其接触程度存在差异, 从而使同种微生物间产生电势差, 创造了利于 DSM 525 种内电子传递的条件。

本文结果表明, 适量铁锰氧化物的添加促进了 DSM 525 发酵代谢葡萄糖, 从而产生更多电子满足电子输出的需求, 更多的电子转移到内源性代谢产

物, 使得最终产物累积增多; 另外, 铁锰氧化物的添加对于体系 pH 值有一定缓冲作用, 这也可能是铁锰氧化物促进 DSM 525 发酵的重要原因之一。化学计量分析结果表明, 铁锰氧化物的添加显著促进了 *C. pasteurianum* 电子的胞外输出率。本文研究结果进一步拓展了对铁锰氧化物与发酵型异化金属还原菌之间相互作用机制的认识。

REFERENCES

- [1] Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 114 (in Chinese)
王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 114
- [2] Min H. Microbiology[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2011: 98 (in Chinese)
闵航. 微生物学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2011: 98
- [3] Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction[J]. Advances in Microbial Physiology, 2004, 49: 219-286
- [4] Slonczewski JL, Foster JW. Microbiology: An Evolving Science[M]. 4th ed. London: W. W. Norton & Company, 2017: 526
- [5] Kato S, Hashimoto K, Watanabe K. Iron-oxide minerals affect extracellular electron-transfer paths of *Geobacter* spp.[J]. Microbes and Environments, 2013, 28(1): 141-148
- [6] Kato S. Influence of anode potentials on current generation and extracellular electron transfer paths of *Geobacter* species[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(1): 108
- [7] Liu FH, Rotaru AE, Shrestha PM, et al. Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated c-type cytochrome in extracellular electron exchange[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(3): 648-655
- [8] Xiao LL, Liu FH, Liu JC, et al. Nano- Fe_3O_4 particles accelerating electromethanogenesis on an hour-long timescale in wetland soil[J]. Environmental Science: Nano, 2018, 5(2): 436-445
- [9] Li XJ, Chen C. Discussion on the partition of metabolic type and definition standard of some concepts about producing energy in cells[J]. Bulletin of Biology, 2009, 44(6): 20-23 (in Chinese)
李兴杰, 陈超. 关于生物细胞产能代谢类型划分和有关概念界定标准的商榷[J]. 生物学通报, 2009, 44(6): 20-23
- [10] Dobbin PS, Carter JP, San Juan CGS, et al. Dissimilatory Fe(III) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe(III) maltol enrichment[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 176(1): 131-138
- [11] 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

- [12] Jiang YB, Deng H, Huang XQ, et al. Characterization of a novel electrogenic *Clostridium sporogenes* isolated from forest soil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 56(5): 846-855 (in Chinese)
姜允斌, 邓欢, 黄新琦, 等. 一株土壤产电菌 *Clostridium sporogenes* 的分离及其产电性能[J]. 微生物学报, 2015, 56(5): 846-855
- [13] Lovley DR. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1991, 55(2): 259-287
- [14] Zhang YC, Xiao LL, Wang OM, et al. Hydrogen-producing and electrochemical properties of a dissimilatory Fe(III) reducer *Clostridium bifermentans* EZ-1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(4): 525-537 (in Chinese)
张月超, 肖雷雷, 王欧美, 等. 异化铁还原梭菌 *Clostridium bifermentans* EZ-1 产氢与电化学特性[J]. 微生物学报, 2018, 58(4): 525-537
- [15] Zhang YC, Liu FH, Xu HD, et al. Extraction of electrons by magnetite and ferrihydrite from hydrogen-producing *Clostridium bifermentans* by strengthening the acetate production pathway[J]. Science China Technological Sciences, 2019. DOI: 10.1007/s11431-018-9460-9
- [16] Poehlein A, Grosse-Honebrink A, Zhang Y, et al. Complete genome sequence of the nitrogen-fixing and solvent-producing *Clostridium pasteurianum* DSM 525[J]. Genome Announcements, 2015, 3(1): e01591-14
- [17] Reddy K, Nasr M, Kumari S, et al. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate: effects of pH, S/X, Fe²⁺, and magnetite nanoparticles[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(9): 8790-8804
- [18] Atlas RM. Handbook of Microbiological Media[M]. Washington: CRC Press, 2010
- [19] Stookey LL. Ferrozine — a new spectrophotometric reagent for iron[J]. Analytical Chemistry, 1970, 42(7): 779-781
- [20] Brewer PG, Spencer DW. Colorimetric determination of manganese in anoxic waters[J]. Limnology and Oceanography, 1971, 16(1): 107-110
- [21] Zhou NQ, Liu DF, Min D, et al. Continuous degradation of ciprofloxacin in a manganese redox cycling system driven by *Pseudomonas putida* MnB-1[J]. Chemosphere, 2018, 211: 345-351
- [22] Li JJ, Xiao LL, Zheng SL, et al. A new insight into the strategy for methane production affected by conductive carbon cloth in wetland soil: beneficial to acetoclastic methanogenesis instead of CO₂ reduction[J]. Science of the Total Environment, 2018, 643: 1024-1030
- [23] Lee HS, Rittmann BE. Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen[J]. Biotechnology Bioengineering, 2009, 102(3): 749-758
- [24] Thamdrup B. Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments[A]//Schink B. Advances in Microbial Ecology[M]. Boston, MA: Springer, 2000, 16: 41-84
- [25] Zhou DQ. Essential Microbiology[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 2002: 90-91 (in Chinese)
周德庆. 微生物学教程[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 90-91
- [26] Zhang YC, Xiao LL, Wang SN, et al. Stimulation of ferrihydrite nanorods on fermentative hydrogen production by *Clostridium pasteurianum*[J]. Bioresource Technology, 2019, 283: 308-315
- [27] Zhao W, Zhao J, Chen GD, et al. Anaerobic biohydrogen production by the mixed culture with mesoporous Fe₃O₄ nanoparticles activation[J]. Advanced Materials Research, 2011, 306-307: 1528-1531
- [28] Popovic J, Ye XF, Haluska A, et al. Ferric iron and extracellular electron shuttling increase xylose utilization and butanol production during fermentation with multiple solventogenic bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(21): 8053-8061
- [29] Beckers L, Hiligsmann S, Lambert SD, et al. Improving effect of metal and oxide nanoparticles encapsulated in porous silica on fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum*[J]. Bioresource Technology, 2013, 133: 109-117
- [30] Karadag D, Puhakka JA. Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production through on-line pH control[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(19): 10245-10251
- [31] Masset J, Hiligsmann S, Hamilton C, et al. Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(8): 3371-3378
- [32] Dong YR, Sanford RA, Chang YJ, et al. Hematite reduction buffers acid generation and enhances nutrient uptake by a fermentative iron reducing bacterium, *Orenia metallireducens* strain Z6[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(1): 232-242