



## 培养条件对 *Shewanella oneidensis* MR-1 电极生物膜及细胞形貌的影响

龙明亮<sup>1,2</sup>, 朱潇<sup>2,4,5</sup>, 李芳柏<sup>2,3</sup>, 吴云当<sup>2\*</sup>

- 1 华南农业大学材料与能源学院, 广东 广州 510642
- 2 广东省科学院生态环境与土壤研究所, 广东省农业环境综合治理重点实验室, 广东 广州 510650
- 3 华南土壤污染控制与修复国家地方联合工程研究中心, 广东 广州 510650
- 4 中国科学院广州地球化学研究所, 广东 广州 510640
- 5 中国科学院大学, 北京 100049

龙明亮, 朱潇, 李芳柏, 吴云当. 培养条件对 *Shewanella oneidensis* MR-1 电极生物膜及细胞形貌的影响. 微生物学报, 2022, 62(6): 2265–2276.

Long Mingliang, Zhu Xiao, Li Fangbai, Wu Yundang. Impact of culture conditions on the biofilm and cell morphology of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(6): 2265–2276.

**摘要:**【目的】*Shewanella oneidensis* MR-1 是电活性模式微生物, 但目前仍缺乏对其细胞及生物膜形貌变化的系统研究, 本研究旨在完善对其形貌特征的理解, 为支持其作为模式微生物提供有力的基础数据。【方法】选取培养基类型、缓冲液浓度、维生素、微量元素、无机盐、电子穿梭体、电子供体、电子受体等培养条件作为变量, 采用恒电位培养法获得生物膜, 通过扫描电子显微镜对生物膜形貌进行观察。【结果】低浓度缓冲液中(30 mmol/L 和 100 mmol/L), 其细胞多为短杆状, 高浓度缓冲液中(200 mmol/L 和 300 mmol/L)细胞卷曲伸长; 缺乏维生素、微量元素、无机盐则可使生物膜紧贴电极生长, 变得致密; 而穿梭体和电子受体对于 *S. oneidensis* MR-1 极为关键, 前者的存在可显著促进生物膜的厚度, 后者的缺失可迫使生物膜细胞裂解; 此外, 通过形貌研究发现, *S. oneidensis* MR-1 可首尾相连形成超过 100  $\mu\text{m}$  的长线状结构。【结论】可通过改变缓

**基金项目:** 国家自然科学基金(42077020); 广东省基础与应用基础研究基金(2019A1515011033); 广州市科技计划(201906010060)

Supported by the National Natural Science Foundations of China (42077020), by the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2019A1515011033) and by the Pearl River Science and Technology Nova Program of Guangzhou (201906010060)

\*Corresponding author. Tel: +86-20-87025180; E-mail: ydwu@soil.gd.cn

Received: 1 September 2021; Revised: 1 December 2021; Published online: 21 December 2021

冲液浓度、培养基类型、电子穿梭体和电子供受体等变量,实现 *Shewanella oneidensis* MR-1 电极生物膜及细胞形貌的调控。

**关键词:** 希瓦氏菌; 生物膜; 形貌; 穿梭体; 扫描电子显微镜

## Impact of culture conditions on the biofilm and cell morphology of *Shewanella oneidensis* MR-1

LONG Mingliang<sup>1,2</sup>, ZHU Xiao<sup>2,4,5</sup>, LI Fangbai<sup>2,3</sup>, WU Yundang<sup>2\*</sup>

1 College of Material and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 Guangdong Key Laboratory of Integrated Agro-environmental Pollution Control and Management, Institute of Eco-environmental and Soil Sciences, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510650, Guangdong, China

3 National-Regional Joint Engineering Research Center for Soil Pollution Control and Remediation in South China, Guangzhou 510650, Guangdong, China

4 Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

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

**Abstract:** [Objective] Although *Shewanella oneidensis* MR-1 is a typical electroactive model bacterium, its biofilm morphology remains to be systematically studied. This work aims to improve the understanding of biofilm morphology of *S. oneidensis* MR-1, thus providing basic data to support its role as a model strain. [Methods] Culture conditions such as medium type, buffer concentration, vitamins, trace elements, inorganic salts, electron shuttles, donors, and acceptors were taken as the variables to be studied. The biofilm was cultured under potentiostatic conditions and examined by scanning electron microscopy. [Results] The cells were mostly straight and short in low-concentration (30 mmol/L and 100 mmol/L) buffer solutions while became curled and elongated in high-concentration (200 mmol/L and 300 mmol/L) buffer solutions. The shortage of vitamins, trace elements, and inorganic salts made the biofilm become compact and attach closely to the electrode. The addition of an electron shuttle substantially thickened the biofilm, while a lack of an electron acceptor led to serious cell lysis within one day. In addition, a cable-like structure as long as 100  $\mu\text{m}$  was observed in the biofilm, which indicated a long-distance electron transfer survival strategy of *S. oneidensis* MR-1. [Conclusion] Changing the medium type, buffer concentration, electron shuttles, donors, and acceptors can regulate the biofilm and cell morphology of *S. oneidensis* MR-1.

**Keywords:** *Shewanella oneidensis* MR-1; biofilm; morphology; electron shuttle; scanning electron microscope

电活性微生物是一类能够在固态电子供体或受体表面“吸入”或“呼出”胞外电子,从而获取能量并代谢繁殖的微生物<sup>[1-2]</sup>。电活性生物膜则是它们附着于矿物表面形成的聚集体,它们可将电子传递给固态矿物,致使矿物还原溶解,

驱动矿物表面有毒金属元素的释放、迁移、转化和再固定,是地球表层元素循环和污染物转化的关键参与者<sup>[3-7]</sup>。而富集培养的电活性生物膜,则可应用于生物能源<sup>[8-9]</sup>、生物传感器<sup>[10-11]</sup>、生物催化<sup>[12-13]</sup>以及污染修复<sup>[14-16]</sup>等领域,具备

广阔的应用前景。

最早发现的 2 株典型的电活性微生物分别是 *Shewanella oneidensis* MR-1<sup>[17]</sup>和 *Geobacter metallireducens* GS-15<sup>[18]</sup>。其中, *S. oneidensis* MR-1 由于其兼性厌氧、培养条件简单, 在湖泊、海洋、沉积物中分布广泛等特征, 而被人们所重视<sup>[19-21]</sup>。作为一株模式微生物, *S. oneidensis* MR-1 的电子传递机制、胞外电子传递能力、生理生化性质等已有相对系统的报道, 但对其生物膜及细胞形貌的变化研究较少。阐述其形貌变化的规律不仅是全面理解该菌的前提, 且有利于解释其在自然环境中参与反应时的微观机制; 作为电活性微生物, 生物膜形貌的变化将直接或间接影响生物电化学反应系统的性能, 理解该过程可为调控 *S. oneidensis* MR-1 电子传递性能以及微生物燃料电池反应体系的设计提供指导依据。

*S. oneidensis* MR-1 是典型的杆菌, 呈棒状, 长约 2  $\mu\text{m}$ 。但如果对比不同研究则会发现, 它的形貌并不是一成不变的。例如, 在 Xu 等的研究中, 观察到的 *S. oneidensis* MR-1 细胞呈现出非常规则的直型棒状<sup>[22]</sup>, 但 Liu 的研究中, 细胞却变成了卷曲的形式<sup>[23]</sup>。形貌的变化可能与微生物的生存环境有关, 当环境中存在有毒物质刺激时, 如在含有 Cr(VI)的环境中暴露, *S. oneidensis* MR-1 逐渐由长约 2  $\mu\text{m}$  变长达 10–15  $\mu\text{m}$ <sup>[24]</sup>; 利用特定的化学物质(如氯氨铂)对 *S. oneidensis* MR-1 进行诱导, 也观察到了 10–40  $\mu\text{m}$  首尾相连的长条形细胞<sup>[25]</sup>; 而在 Okamoto 和 Wu 使用的组分不同的培养基中, *S. oneidensis* MR-1 的生物膜则分别呈现出致密与蓬松两种完全不同的状态<sup>[26]</sup>, 上述研究充分说明该菌的形貌并不固定, 而是可调可控的。形貌的变化可进一步改变其电化学活性, 由氯氨铂处理过的细胞, 其电化学活性显著增强,

电流密度由 11  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  提高至 64  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , 证实了形貌之于电化学活性的重要性<sup>[25]</sup>。但直至今日, 并没有研究系统地归纳 *S. oneidensis* MR-1 形貌变化的规律, 尤其是常见培养条件的改变如何影响其生物膜的状态, 目前仍然未知, 亟需相应工作填补此空白。

因此, 本文选取 *S. oneidensis* MR-1 生物膜作为研究对象, 以培养基类型、缓冲液浓度、维生素、微量元素、无机盐、电子穿梭体、电子供体、电子受体等培养条件作为变量, 归纳了本实验室长期以来观测到的 *S. oneidensis* MR-1 生物膜形貌变化方式, 详细讨论了引起其形貌变化的可能原因。本研究可进一步理解 *S. oneidensis* MR-1 生物膜的生理特性, 为支持其作为模式电活性微生物提供有力的基础数据, 并为今后的电活性生物膜培养提供指导依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和化学试剂

*S. oneidensis* MR-1 购自海洋微生物菌种保藏管理中心(MCCC), 用于 LB 培养基配制的胰蛋白胨、酵母提取液购自 Oxoid 公司, 电子穿梭体黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)购自 TCI 公司, 2-蒽醌磺酸(anthraquinone-2-sulfonic acid, AQS)购自 Aldrich 公司, 叔丁醇购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 乳酸钠购自上海麦克林生化科技有限公司, 其余化学试剂均购自广州化学试剂厂。

### 1.2 生物电化学体系的构建

生物电化学体系的构建包括以下几个关键步骤, (1) 获得微生物菌悬液。将 *S. oneidensis* MR-1 接种至 LB 液体培养基, 在 30  $^{\circ}\text{C}$  摇床中以 180 r/min 转速进行有氧培养, 14 h 时取出培养液, 无菌离心、洗涤 3 次, 获得不含 LB 培养基的菌悬液; (2) 将菌悬液加入至 100 mL

西林瓶, 加入厌氧培养液, 配制成  $OD_{600}=1.0$  的菌悬液; (3) 通氮气 40 min, 置入碳布电极 (2 cm×2 cm) 作为工作电极, 钛丝圈电极作为辅助电极, 甘汞电极作为参比电极; (4) 热熔胶密封, 连接恒电位仪, 在外加 0.441 V vs. 标准氢电极 (standard hydrogen electrode, SHE) 条件下进行恒电位培养。

### 1.3 培养基配方设置

本研究探讨了不同培养条件对生物膜形貌的影响, 具体培养条件如下。在不同培养环境的实验中, 使用了 2 种典型的培养基, 其一为 Wu 等使用的培养基<sup>[27]</sup>, 其二为类似 Okamoto 等使用的培养基, 本研究使用的缓冲液为哌嗪-1,4-二乙磺酸 (PIPES) 而非该研究中的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)<sup>[28-29]</sup>, 培养基中添加了 50  $\mu\text{mol/L}$  的 FMN, 具体配方见上述已报道的研究工作。其余实验则均是在 Wu 等使用的培养液基础上做进一步处理, 包括改变磷酸缓冲液 (PBS) 浓度的处理、添加 50  $\mu\text{mol/L}$  AQS 的处理、不含外源穿梭体的处理、完整培养基配方的处理、去除所有维生素、微量元素、无机盐的贫瘠培养基处理、开路断电去除电子受体的处理、以及去除乳酸钠电子供体的处理等。

### 1.4 生物膜分析

本研究涉及的扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 实验均使用飞纳公司的设备完成 (ProX, Phenom), 生物样品的具体前处理方法如下。(1) 固定: 拆开电化学反应器, 用剪刀剪取 0.5 cm×0.5 cm 碳布电极, 转移至 2 mL 2.5% 的戊二醛当中, 浸泡 3 h; (2) 洗涤: 用 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 浸泡 4 次, 每次 20 min; (3) 脱水: 随后进行乙醇梯度脱水, 分别用 30%、50%、70%、90% 的乙醇溶液浸泡电极, 每次 15 min, 再将电极样品转移至无水乙醇中, 浸泡 3 次, 每次 15 min; 最后, 使用叔丁

醇浸泡 3 次, 每次 15 min; (4) 冻干: 将最后一次加入的叔丁醇进行冷冻, 并置于冷冻干燥仪中进行冻干; (5) 喷金: 将干燥的样品喷金; (6) 上机测试。相关方法在本团队前期报道中已得到验证和应用<sup>[30]</sup>。荧光显微镜为蔡司正置荧光显微镜 (Scope A1, Carl Zeiss), 生物膜样品使用死活菌染料进行染色 (L13152 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, Molecular probes), 随后进行荧光观察, 其中红色为死菌, 绿色为活菌。生物膜采用总蛋白提取法进行定量, 将已形成生物膜的碳布电极放置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 浓度为 0.2 mol/L 的 NaOH, 100 °C 水浴振荡 30 min<sup>[31]</sup>。随后, 利用试剂盒针对获得的上清液进行考马斯亮蓝 (C503041-1000 Modified Bradford Protein Assay Kit, Sangon Biotech) 显色, 所得定量结果即生物膜总蛋白含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同培养环境对生物膜形貌的影响

由于 *S. oneidensis* MR-1 易于培养, 在该菌已报道的电化学研究中, 不同研究者使用的培养基略有不同, 但培养条件如何影响其生物膜形貌, 目前尚不清楚。例如, 多名日本学者, 包括 Okamoto 和 Nakamura 等, 其多项研究均使用了 30 mmol/L HEPES 作为缓冲液, 并在添加无机盐的基础上, 引入了 0.5 g/L 的酵母提取液作为营养物进行厌氧培养<sup>[28-29]</sup>; 而本团队由于发现 *S. oneidensis* MR-1 在 *Geobacter* 培养基中也可正常生长, 因而前期发表的系列 *S. oneidensis* MR-1 工作使用了与之类似的培养基, 具体为 200 mmol/L 磷酸缓冲液控制 pH, 添加无机盐、维生素与微量元素进行培养<sup>[23,27,30,32]</sup>。图 1A-B 是上述两种培养条件下的生物膜形貌, 虽然微生物均能正常生长, 但两种培养条件下

的生物膜形貌存在显著差异。在 Okamoto 等的培养条件下(medium A), 电极表面的生物膜呈现出紧贴电极的致密状, 细胞围绕碳纤维电极紧密、均匀排布, 但在本团队使用的培养条件下(medium B), 细胞出现卷曲, 呈现出蓬松状, 细胞脱离电极向外延伸扩张。可见, 培养条件可显著改变生物膜的结构特征。由于两种培养基差异较大、变量较多, Lin 等针对上述两种培养条件的影响因素做了细致分析, 发现缓冲液浓度是影响其形貌的关键因素。在 Lin 等的研究中发现, 缓冲液浓度从 30 mmol/L 提高至 200 mmol/L 时, *S. oneidensis* MR-1 生物膜的最大电流密度从  $165 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  提升至  $327 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , 微生物则由短直型变为长卷曲型<sup>[26]</sup>。将本研究中培养基的 PBS 缓冲液从 30 mmol/L 逐步提升至 300 mmol/L, 也发现细胞形貌产生了显著变化, 低浓度条件下微生物细胞为直型(图 1C 和 D), 而高浓度则转变为卷曲状(图 1E 和 F)。与此同时, 生物膜的生物量也增加了大约一倍(图 1G), 说明缓冲液对生物膜生长影响显著。高缓冲液浓度条件下形成了卷曲型蓬松生物膜, 其生物电流从 30 mmol/L 的  $176 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  提高至 300 mmol/L 的  $443 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (图 S1), 意味着高浓度条件下阴极和阳极之间的电子转移更快。在 Okamoto 等的培养基中, 缓冲液浓度发生改变后表现出了类似的浓度效应<sup>[26]</sup>, 但将本团队培养基的缓冲液替换为 PIPES, 结果发现 PIPES 浓度变化对生物膜形貌的改变影响不如 PBS 明显(图 S2), 说明生物膜的形貌调控与培养条件密不可分。

上述发现意味着, 研究人员可通过培养条件的控制将生物膜从疏松状转变为致密状。生物膜结构的变化极有可能改变膜内传质速率和电子传递阻力, 进而调控生物电流的大小。因

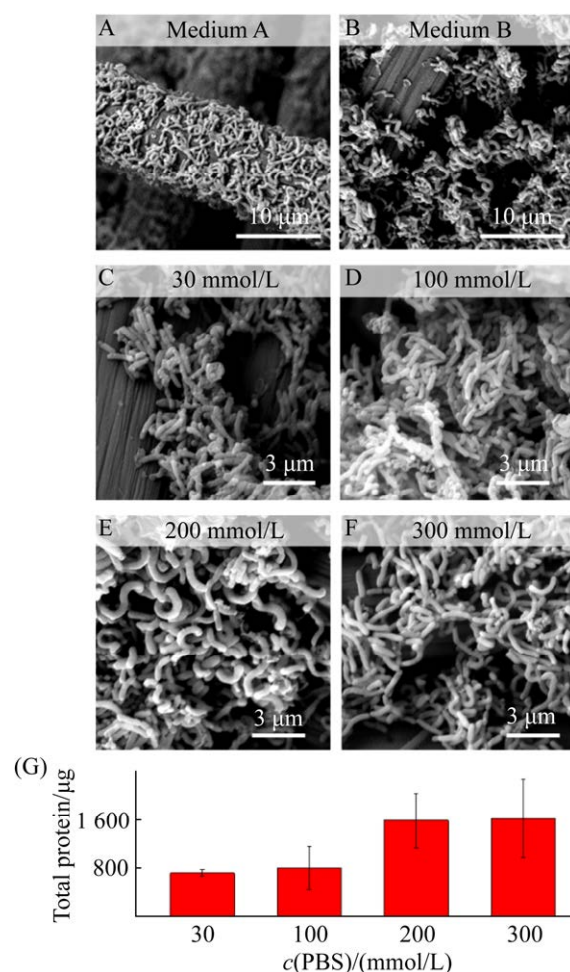


图 1 不同培养基对生物膜形貌的影响

Figure 1 Impact of culture medium on biofilm morphology. A: a medium similar to that in Okamoto's study was used. B: the medium in our group's previous study was used. Biofilms in C–F were cultured in the medium of our group's in a previous study, while the PBS in C was 30 mmol/L, in D was 100 mmol/L, in E was 200 mmol/L and in F was 300 mmol/L. G: quantification of biofilm total protein.

此, 生物膜结构的简易调控在电化学反应器中可能具有独特的应用前景。

## 2.2 同一培养环境中不同位置的形貌

在多数研究中, 研究者附上一至两张 SEM 图片展示生物膜呈现出的形貌状态。但实际上, SEM 所拍摄的形貌仅仅是微生物的局部特征,

但电极表面微生物的生长状态可能是非均一的。本研究发现,即使是在同一培养条件下,电极不同部位的生物膜形貌也可能存在显著差异。图2是使用 Okamoto 报道的培养基进行培养时, *S. oneidensis* MR-1 在同一电极上不同位置的形貌。多数情况下,生物膜的形貌如图 2A 所示,第一层微生物致密地附着在电极上,外层微生物则紧贴在首层表面。但在同一电极的不同位置,却发现 *S. oneidensis* MR-1 的外层细胞能够以长线状存在(图 2B),长度超过 100  $\mu\text{m}$ 。从图 2C 可见,细胞与细胞之间首尾相连,一部分是两个细胞直接贴合,一部分则是以类似纳米线的方式首尾相连。这种状态在形貌上与近期报道的电缆细菌(cable bacteria)有一定相似之处,但电缆细菌主要是通过周质空间的纳米导线进行电子传递<sup>[33-35]</sup>,而此处却是以导线的形式将两者相连接。已有报道表明, *Geobacter* 可通过纳米导线在菌与菌之间传递电子,而近期发现长线状革兰氏阳性菌可形成导电的类似菌毛的附属物,实现远距离的电子传输<sup>[35]</sup>,从本研究的结果可知, *S. oneidensis* MR-1 能够首尾相连,在距离电极较远的位置生存,这是否

意味着它具有百微米级远距离电子传递的能力,值得进一步探讨。这种形貌存在的位置很随机,它的形成或许与生物膜所处的空间位置有关,如电极纤维与周边电极纤维的远近不同等,可能会诱发相应的生长方式,但具体原因尚不清晰。关于希瓦氏菌生物膜已存在较多报道<sup>[36-38]</sup>,氯氨铂处理过的 *S. oneidensis* MR-1 生物膜中曾观察到了类似的长线状细胞,其生物膜电子传递速率提高了 5.8 倍<sup>[25]</sup>,而在具有水分散性的两亲表面改性量子点存在时,也观察到了数十微米的长线状 *S. oneidensis* MR-1 细胞<sup>[39]</sup>,但长度超过 100  $\mu\text{m}$  的长线状希瓦氏菌则较为少见。在沉积物中,长线状的电缆微生物由于其导电迅速、电子传递距离长,可介导氧气与硫化物的反应,显著影响沉积物表层的硫氧化过程<sup>[40-41]</sup>。*S. oneidensis* MR-1 生物膜中连接相邻细胞的纳米线具体组成及是否具有导电特性需要进一步研究。相比于 *S. oneidensis* MR-1 常报道的电子穿梭方式,菌与菌直接接触的方式可使电子传递距离更长、更快,在自然环境中, *S. oneidensis* MR-1 与铁、硫作用时是否也存在类似行为?值得进一步探究。

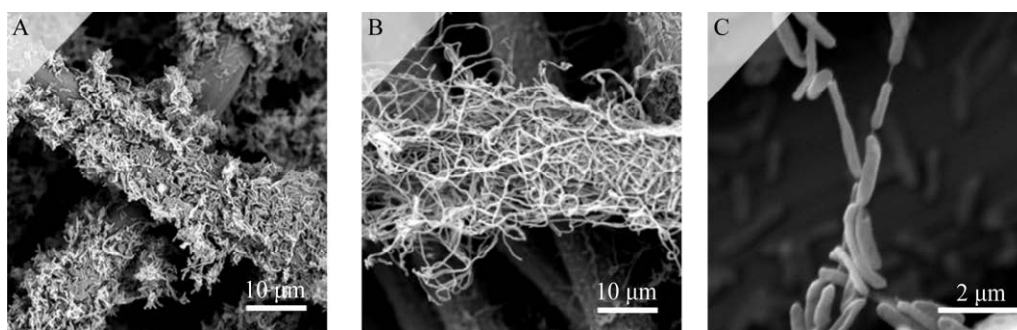


图2 电极不同位置的形貌差异

Figure 2 The biofilm morphology at different positions of the electrode. A: the first position where the inner-layer cells closely attached on the electrode but outer-layer cells loosely distributed. B: the second position where the inner-layer cells closely attached on the electrode but outer layer-cells connected end to end. C: magnification of the cable-like structure.



### 2.3 电子穿梭体、维生素、微量元素的存在与缺失

电子穿梭体是胞外电子传递过程中的重要参与者,因此,本研究继续探索了穿梭体对 *S. oneidensis* MR-1 生物膜形貌的影响(图 3)。结果表明,缺乏外源穿梭体的条件下,电极表面的生物量非常少(图 3A–C),图 3A 视野中仅存 12 个细胞,且细胞呈现出破碎、干瘪等状态;当典型醌类穿梭体 AQS 存在时,生物膜在电极表面可大量生长(图 3D–F)。而进一步研究发现,在贫营养的环境中,穿梭体的重要性更为突出。在图 3G–L 中,使用 200 mmol/L PBS+30 mmol/L 乳酸钠作为培养液,不添加任何维生素、微量元素以及无机盐,如果无外源穿梭存在,其生物膜几乎不再生长(图 3G–I),而外源添加 50  $\mu\text{mol/L}$  的 AQS 则使得生物膜大量繁殖(图 3J–L)。生物膜定量结果显示,含穿梭体处理的蛋白总量远高于不含穿梭体的处理(图 3M 和 N),最大电流密度增加 47–60 倍(图 S3)。这说明穿梭体对生物膜的繁殖起着重要的调控作用,从而佐证了近年来研究者提出的观点:电子穿梭体对于 *S. oneidensis* MR-1 的胞外电子传递极其关键。该观点的提出主要依赖如下几项标志性的研究

结果:早期研究表明,去除 *S. oneidensis* MR-1 分泌的黄素类穿梭体,其生物膜电子传递速率下降 70%<sup>[42]</sup>;而敲除 *S. oneidensis* MR-1 的核黄素分泌基因(*bfe* 基因),其电流密度下降 75%<sup>[43]</sup>;当外源添加 50  $\mu\text{mol/L}$  穿梭体时,其电子传递速率则提升 15–36 倍,若此时去除外源穿梭体,电流密度下降超过 90%<sup>[27]</sup>。结合本研究图 3G–I 的发现,在贫营养条件下 *S. oneidensis* MR-1 生物膜的生长非常依赖穿梭体,足以证实穿梭过程之于 *S. oneidensis* MR-1 的重要程度。本研究的结果进一步确证了穿梭体对于促进 *S. oneidensis* MR-1 生物膜形成的重要性,由于穿梭体可方便地通过置换培养液的方式进行去除,对于需要短期获得成熟生物膜的工程体系,穿梭体可作为快速成膜、缩短反应时间的重要技术手段。

上述结果中也发现,在含有外源穿梭体的处理中(图 3D 和 J),无机盐、微生物素与微量元素的缺失改变了生物膜的状态。缺失上述营养物质使得生物膜开始贴壁生长(图 3J),胞外分泌物增多,其形貌与图 3D 中蓬松的生物膜差异明显。而荧光结果显示,缺失营养物质时死菌含量也略有增加(图 3F 和 L)。已有报道

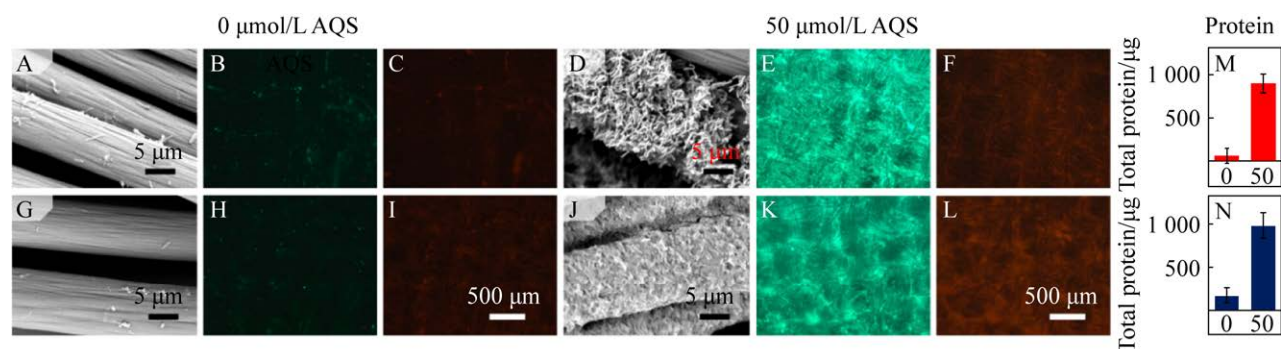


图 3 有无穿梭体以及有无维生素、微量元素、无机盐时的生物膜形貌差异

Figure 3 Biofilms with and without electron shuttles, vitamins, trace elements and inorganic salts. No exogenous electron shuttles were added in A–C and G–I, but AQS (50  $\mu\text{mol/L}$ ) was added in D–F and J–L. Vitamin, trace elements and inorganic salts were used in the medium of A–F, but no such nutrients were used in G–L. M and N are the quantification results of biofilm total protein.

显示, *S. oneidensis* MR-1 在营养缺乏的环境中有可能死亡裂解, 这可能是导致电极表面生物膜的形貌发生变化的原因。同时, 悬液中死亡裂解的微生物可能会释放出蛋白、糖类、无机盐等生源要素, 因此, 生物膜之所以在贫营养条件下仍然能够大量生长, 可能与裂解的微生物为其提供了一定的营养物质有关<sup>[44]</sup>。该结果在揭示维生素、微量元素、无机盐等因子对于生物膜形貌产生关键影响的同时, 发现了营养元素的缺失可以作为调控生物膜形貌的一种手段, 在微生物电化学系统中, 可通过调控该类物质的有无, 选择性地培育贴壁或蓬松的生物膜。

## 2.4 电子供体和受体的充足与缺乏

在生物电化学反应当中, *S. oneidensis* MR-1 的电子供体大多是有机碳源, 如乳酸钠、甲酸钠、葡萄糖等, 而电极则充当电子受体的角色。已有研究表明, 在电子受体受限的条件下, 即电子受体浓度非常低的条件下(溶解氧小于 0.08%), *S. oneidensis* MR-1 的细胞形貌会发生改变, 其细胞外膜向外延伸, 形成纳米线状(nanowire)结构<sup>[17,45]</sup>。随后的研究证实, *S. oneidensis* MR-1 纳米线的结构更接近于此前提道的纳米管(nanotube)<sup>[46]</sup>, 而显著区别于 *Geobacter* 菌属的纤毛型纳米导线<sup>[47]</sup>。于是, 本研究进一步探究了电子供体与受体完全缺失对 *S. oneidensis* MR-1 生物膜形貌的影响, 试图阐明极端条件下微生物形貌的变化特征。

培养成熟的生物膜如图 4A 所示, 进行开路断电操作, 阻断电子的传递。结果显示, 电子受体缺失后细胞开始裂解破碎, 24 h 之后多数微生物已无完整的细胞形态(图 4B), 荧光显微镜结果显示, 生物膜绿色变浅, 活菌减少(图 4D 和 E), 这说明受体缺失引发了 *S. oneidensis* MR-1 的死亡。在前期电子供体受限而形成纳米

导线的研究中, 作者认为该纳米导线的形成是 *S. oneidensis* MR-1 向外寻找电子受体的一种策略<sup>[48]</sup>。但本研究发现, 电子受体的长时间缺失造成了细胞的裂解, 说明这种向外延伸的策略可能对细胞造成了不可逆的破坏性影响, 缺失受体时的细胞膜延伸可能是微生物受胁迫条件下的应对策略, 其极端情况会造成自身的死亡。这与纳米管最新研究进展中的观点较为一致, 虽然此前研究一直认为纳米管是细胞进行物质传递(包括 DNA、蛋白、营养物质传递)的主动行为, 但该研究认为, *Bacillus subtilis* NTs 细胞膜向外延伸而形成纳米管属于被迫的应对机制, 该过程意味着细胞死亡的开始<sup>[49]</sup>。这进一步支撑了本研究的观点, *S. oneidensis* MR-1 在电子受体缺失条件下细胞膜向外产生的延伸, 可能也是其细胞膜发生裂解的开始。

而图 4C 则是生物膜缺失电子供体之后的形貌表现, 将培养基更换为不含电子供体的新培养基, 继续培养 24 h, 结果发现电极上的微生物也出现了部分裂解(图 4C)。虽然与缺失电子受体的条件相比, 裂解程度相对较低, 但也间接说明了 *S. oneidensis* MR-1 对极端环境的抵抗能力有限。荧光结果也显示其绿色较暗, 活菌较少(图 4F)。此外, 从生物膜定量结果可知, 碳布上的生物量下降, 缺失电子供体 24 h 之后生物量减少了大约 1 倍(图 4G), 这可能是由于电子供体缺失而产生了细胞脱落的现象。

上述发现预示着以 *S. oneidensis* MR-1 为菌种构建的生物电化学体系中, 不能长期缺失电子受体, 否则会对生物膜造成不可逆的损伤。根据以往研究可知, 微生物死亡的诱因包括直接导致细胞失活或裂解的物理、化学和生物因素, 包括温度、抗生素和噬菌体侵染等<sup>[50-51]</sup>、以及特定信号诱发的程序性死亡, 包括毒素-抗毒素系统、细胞凋亡等<sup>[52]</sup>, 电子受体缺失导致



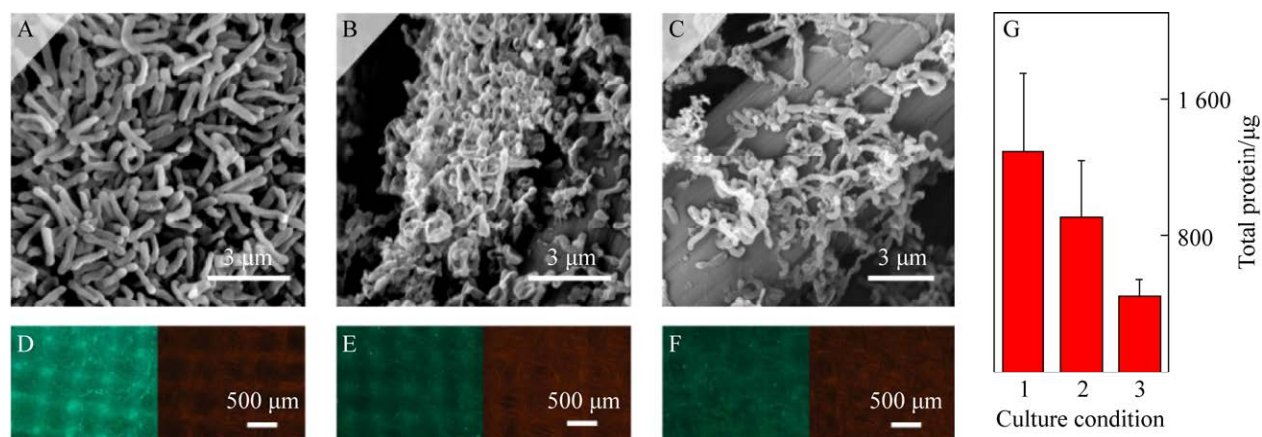


图 4 电子受体或电子供体缺失条件下生物膜形貌的变化

Figure 4 The biofilm morphology under the condition of lacking electron donor or electron acceptor. A and D: both electron donors and acceptors are sufficient. B and E: lacking electron acceptor. C and F: lacking electron donor. G: the quantification of biofilm total protein, in which the culture condition A is the condition both electron donors and acceptors are sufficient, B is lack of electron acceptor and C is lack of electron donor.

细胞膜裂解的机制有待进一步阐明,这也正是 *S. oneidensis* MR-1 作为模式微生物亟待完善的基础认识。

### 3 讨论与结论

本研究发现,培养条件可控制微生物细胞的长短、调节生物膜的致密与疏松。低浓度缓冲液中(30 mmol/L 和 100 mmol/L),其细胞多为短杆状,高浓度缓冲液中(200 mmol/L 和 300 mmol/L)细胞卷曲伸长;缺乏维生素、微量元素、无机盐则可使生物膜变得致密;而穿梭体和电子受体对于 *S. oneidensis* MR-1 极为关键,前者可显著促进生物膜的形成,后者的缺失可迫使生物膜细胞裂解;此外,通过形貌研究,发现了 *S. oneidensis* MR-1 可首尾相连形成超过 100 μm 的长线状结构。本研究从微观世界的形貌特征入手,完善了 *S. oneidensis* MR-1 生物膜形貌特性的理解,可为支持其作为模式电活性微生物提供有力的基础数据,并为今后的研究提出了可能的方向。

### 参考文献

- [1] Logan BE, Rossi R, Ragab A, Saikaly PE. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(5): 307–319.
- [2] Yan YQ, Wang X, Ecological responses to substrates in electroactive biofilm: a review. *Science China Technological Sciences*, 2019, 62: 1657–1669.
- [3] 张玉龙, 陈雪丽, 吴云当. 电子穿梭体及其介导的环境与地球化学过程研究进展. *生态环境学报*, 2021, 30(1): 213–222.  
Zhang YL, Chen XL, Wu YD. Electron shuttle-mediated microbial extracellular electron transfer: mechanisms and geochemical implications. *Ecology and Environmental Sciences*, 2021, 30(1): 213–222. (in Chinese)
- [4] 黄玲艳, 刘星, 周顺桂. 微生物直接种间电子传递: 机制及应用. *土壤学报*, 2018, 55(6): 1313–1324.  
Huang LY, Liu X, Zhou SG. Direct interspecies electron transfer of microbes: mechanism and application. *Acta Pedologica Sinica*, 2018, 55(6): 1313–1324. (in Chinese)
- [5] 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.  
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)
- [6] 孔冠楠, 许玫英, 杨永刚. 基于直接接触的微生物胞外电子传递. *微生物学报*, 2017, 57(5): 643–650.  
Kong GN, Xu MY, Yang YG. Direct contact-dependent microbial extracellular electron transfer. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(5): 643–650. (in Chinese)
- [7] 刘进超, 王欧美, 李佳佳, 刘芳华. 生物地球化学锰循环中的微生物胞外电子传递机制. *微生物学报*, 2018, 58(4): 546–559.  
Liu JC, Wang OM, Li JJ, Liu FH. Mechanisms of extracellular electron transfer in the biogeochemical manganese cycle. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(4): 546–559. (in Chinese)
- [8] Zhao F, Slade RCT, Varcoe JR. Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(7): 1926–1939.
- [9] Yuan Y, Zhou SG, Liu Y, Tang JH. Nanostructured macroporous bioanode based on polyaniline-modified natural loofah sponge for high-performance microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(24): 14525–14532.
- [10] Yang Y, Yu YY, Shi YT, Moradian JM, Yong YC. *In vivo* two-way redox cycling system for independent duplexed electrochemical signal amplification. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(8): 4939–4942.
- [11] Cheng L, Min D, Liu DF, Li WW, Yu HQ. Sensing and approaching toxic arsenate by *Shewanella putrefaciens* CN-32. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(24): 14604–14611.
- [12] McCuskey SR, Su Y, Leifert D, Moreland AS, Bazan GC. Living bioelectrochemical composites. *Advanced Materials*, 2020, 32(24): 1–6
- [13] Liu XW, Li WW, Yu HQ. Cathodic catalysts in bioelectrochemical systems for energy recovery from wastewater. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(22): 7718–7745.
- [14] Feng CH, Li FB, Mai HJ, Li XZ. Bio-electro-fenton process driven by microbial fuel cell for wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(5): 1875–1880.
- [15] Gustave W, Yuan ZF, Li XJ, Ren YX, Feng WJ, Shen HB, Chen Z. Mitigation effects of the microbial fuel cells on heavy metal accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Pollution*, 2020, 260: 113989.
- [16] Wang XF, Aulenta F, Puig S, Esteve-Núñez A, He YJ, Mu Y, Rabaey K. Microbial electrochemistry for bioremediation. *Environmental Science and Ecotechnology*, 2020, 1: 100013.
- [17] Myers CR, Nealson KH. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science*, 1988, 240(4857): 1319–1321.
- [18] Lovley DR, Stolz JF, Nord GL, Phillips EJP. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature*, 1987, 330(6145): 252–254.
- [19] Hau HH, Gralnick JA. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61(1): 237–258.
- [20] Fredrickson JK, Romine MF, Beliaev AS, Auchtung JM, Driscoll ME, Gardner TS, Nealson 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.
- [21] Shi L, Dong HL, Reguera G, Beyenal H, Lu AH, Liu J, Yu HQ, Fredrickson JK. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(10): 651–662.
- [22] Xu S, Jangir Y, El-Naggar MY. Disentangling the roles of free and cytochrome-bound flavins in extracellular electron transport from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Electrochimica Acta*, 2016, 198: 49–55.
- [23] Liu W, Wu YD, Liu TX, Li FB, Dong H, Jing MQ. Influence of incubation temperature on 9, 10-anthraquinone-2-sulfonate (AQ5)-mediated extracellular electron transfer. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 464.
- [24] Chourey K, Thompson MR, Morrell-Falvey J, VerBerkmoes NC, Brown SD, Shah M, Zhou JZ, Doktycz M, Hettich RL, Thompson DK. Global molecular and morphological effects of 24-hour chromium(VI) exposure on *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9): 6331–6344.
- [25] Patil SA, Górecki K, Hägerhäll C, Gorton L. Cisplatin-induced elongation of *Shewanella oneidensis* MR-1 cells improves microbe–electrode interactions for use in microbial fuel cells. *Energy & Environmental Science*, 2013, 6(9): 2626–2630.

- [26] Lin ZX, Long ML, Liu W, Liu TX, Li FB, Wu YD. Distinct biofilm formation regulated by different culture media: implications to electricity generation. *Bioelectrochemistry*, 2021, 140: 107826.
- [27] Wu YD, Luo XB, Qin BL, Li FB, Häggblom MM, Liu TX. Enhanced current production by exogenous electron mediators via synergy of promoting biofilm formation and the electron shuttling process. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(12): 7217–7225.
- [28] Okamoto A, Kalathil S, Deng X, Hashimoto K, Nakamura R, Nealsen KH. Cell-secreted flavins bound to membrane cytochromes dictate electron transfer reactions to surfaces with diverse charge and pH. *Scientific Reports*, 2014, 4(1): 1–8.
- [29] Okamoto A, Hashimoto K, Nealsen KH, Nakamura R. Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. *PNAS*, 2013, 110(19): 7856–7861.
- [30] Qin BL, Wu YD, Wang GY, Chen XL, Luo XB, Li FB, Liu TX. Physicochemical constraints on the *in situ* deposited phenoxazine mediated electron shuttling process. *Electrochimica Acta*, 2020, 339: 135934.
- [31] Zhao LD, Dong HL, Kukkadapu R, Agrawal A, Liu D, Zhang J, Edelman RE. Biological oxidation of Fe(II) in reduced nontronite coupled with nitrate reduction by *Pseudogulbenkiania* sp. strain 2002. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2013, 119: 231–247.
- [32] Wu YD, Li FB, Liu TX, Han R, Luo XB. pH dependence of quinone-mediated extracellular electron transfer in a bioelectrochemical system. *Electrochimica Acta*, 2016, 213: 408–415.
- [33] Pfeffer C, Larsen S, Song J, Dong MD, Besenbacher F, Meyer RL, Kjeldsen KU, Schreiber L, Gorby YA, El-Naggar MY, Leung KM, Schramm A, Risgaard-Petersen N, Nielsen LP. Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. *Nature*, 2012, 491(7423): 218–221.
- [34] 杨永刚, 李道波, 许玫英. 微生物胞外长距离电子传递网络研究进展. *微生物学报*, 2020, 60(9): 2072–2083.  
Yang YG, Li DB, Xu MY. Research progress in microbial extracellular long-distance electron transport networks. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(9): 2072–2083. (in Chinese)
- [35] Yang YG, Wang ZG, Gan CF, Klausen LH, Bonn   R, Kong GN, Luo DZ, Meert M, Zhu CJ, Sun GP, Guo J, Ma YX, Bjerg JT, Manca J, Xu MY, Nielsen LP, Dong MD. Long-distance electron transfer in a filamentous Gram-positive bacterium. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1709.
- [36] Teal TK, Lies DP, Wold BJ, Newman DK. Spatiometabolic stratification of *Shewanella oneidensis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(11): 7324–7330.
- [37] Sivakumar K, Mukherjee M, Cheng HI, Zhang YD, Ji LH, Cao B. Surface display of roGFP for monitoring redox status of extracellular microenvironments in *Shewanella oneidensis* biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(3): 512–520.
- [38] Ding YZ, Zhou YF, Yao J, Szymanski C, Fredrickson J, Shi L, Cao B, Zhu ZH, Yu XY. *In situ* molecular imaging of the biofilm and its matrix. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(22): 11244–11252.
- [39] Aldeek F, Schneider R, Fontaine-Aupart MP, Mustin C, L  cart S, Merlin C, Block JC. Patterned hydrophobic domains in the exopolymer matrix of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(4): 1400–1402.
- [40] Wang B, Zhang H, Yang YG, Xu MY. Diffusion and filamentous bacteria jointly govern the spatiotemporal process of sulfide removal in sediment microbial fuel cells. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 405: 126680.
- [41] Nielsen LP, Risgaard-Petersen N, Fossing H, Christensen PB, Sayama M. Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment. *Nature*, 2010, 463(7284): 1071–1074.
- [42] Marsili E, Baron DB, Shikhar ID, Coursolle D, Gralnick JA, Bond DR. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *PNAS*, 2008, 105(10): 3968–3973.
- [43] Kotloski NJ, Gralnick JA. Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *mBio*, 2013, 4(1): e00553-12.
- [44] Liu TX, Luo XB, Wu YD, Reinfelder JR, Yuan X, Li XM, Chen DD, Li FB. Extracellular electron shuttling mediated by soluble *c*-type cytochromes produced by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(17): 10577–10587.
- [45] Barchinger SE, Pirbadian S, Sambles C, Baker CS, Leung KM, Burroughs NJ, El-Naggar MY, Golbeck JH. Regulation of gene expression in *Shewanella*

- oneidensis* MR-1 during electron acceptor limitation and bacterial nanowire formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(17): 5428–5443.
- [46] Dubey GP, Ben-Yehuda S. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 2011, 144(4): 590–600.
- [47] Subramanian P, Pirbadian S, El-Naggar MY, Jensen GJ. Ultrastructure of *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires revealed by electron cryotomography. *PNAS*, 2018, 115(14): E3246–E3255.
- [48] Pirbadian S, Barchinger SE, Leung KM, Byun HS, Jangir Y, Bouhenni RA, Reed SB, Romine MF, Saffarini DA, Shi L, Gorby YA, Golbeck JH, El-Naggar MY. *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *PNAS*, 2014, 111(35): 12883–12888.
- [49] Pospíšil J, Vítovská D, Kofroňová O, Muchová K, Šanderová H, Hubálek M, Šíková M, Modrák M, Benada O, Barák I, Krásný L. Bacterial nanotubes as a manifestation of cell death. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1–12.
- [50] Paalme T, Elken R, Kahru A, Vanatalu K, Vilu R. The growth rate control in *Escherichia coli* at near to maximum growth rates: the A-stat approach. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1997, 71(3): 217–230.
- [51] Gödeke J, Paul K, Lassak J, Thormann KM. Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *The ISME Journal*, 2011, 5(4): 613–626.
- [52] Kim L. Programmed death in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(3): 503–514.

(本文责编 张晓丽)



**吴云当**，博士，2017年毕业于中国科学院广州地球化学研究所，随后进入广东省科学院生态环境与土壤研究所并工作至今。主要从事土壤微生物电化学、土壤合成微生物学相关研究，重点关注土壤电活性微生物、电子穿梭体、以及微生物驱动的土壤物质循环过程。在 *Environmental Science & Technology*、*Chemical Geology*、《中国科学》、《土壤学报》等国内外权威期刊发表系列研究论文，主持国家自然科学基金青年项目、面上项目等课题多项，先后获广州市“珠江科技新星”称号、广东省土壤学会优秀青年科学家奖。