

外源与内源电子穿梭体协同驱动好氧甲基营养菌的缺氧铁还原过程

赵成^{1#}, 林娜娜^{1,2#}, 周文杰^{1,2}, 唐彦强², 韩雪欣^{1,3}, 许妍², 邢鹏^{1*}

1 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 湖泊与流域水安全全国重点实验室, 江苏 南京

2 东南大学 土木工程学院, 江苏 南京

3 中国科学院大学 资源与环境学院, 北京

赵成, 林娜娜, 周文杰, 唐彦强, 韩雪欣, 许妍, 邢鹏. 外源与内源电子穿梭体协同驱动好氧甲基营养菌的缺氧铁还原过程[J]. 微生物学报, 2026, 66(6): 2944-2957.

ZHAO Cheng, LIN Nana, ZHOU Wenjie, TANG Yanqiang, HAN Xuexin, XU Yan, XING Peng. Exogenous and endogenous electron shuttles synergistically drive oxygen-deficient iron reduction in an aerobic methylotroph[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(6): 2944-2957.

摘要: 【目的】好氧甲基营养菌在缺氧环境中的生存机制是当前微生物生态学的研究热点。本研究旨在探究好氧甲基营养菌——嗜甲基菌属(*Methylophilus*)菌株在缺氧条件下利用不溶性铁矿物(水铁矿)进行胞外电子转移(extracellular electron transfer, EET)的机制, 阐明外源与内源电子穿梭体在该过程中的协同作用。【方法】以分离自抚仙湖沉积物的好氧甲基营养菌 *Methylophilus* sp. 14 为研究对象, 在缺氧条件(初始 O₂ 为 2%)下开展以甲醇为碳源、水铁矿为唯一终端电子受体的培养实验。通过铁还原动力学测定、电化学分析(差分脉冲伏安法、循环伏安法)及显微表征(扫描/透射电子显微镜)系统评估其铁呼吸能力, 并探究外源穿梭体[腐殖质(humic substances, HS)、蒽醌-2,6-二磺酸(anthraquinone-2,6-disulfonate, AQDS)]与内源黄素(类)物质在电子传递中的功能。【结果】*Methylophilus* sp. 14 能够耦合甲醇氧化与水铁矿还原, 在 20 d 内将 Fe(II)浓度从 0.49 μmol/L 提升至 8.29 μmol/L, 并促使部分水铁矿转化为磁铁矿。外源添加腐殖质或 AQDS 可使 Fe(II)产量进一步提高至 10.73 μmol/L 和 11.22 μmol/L, 电子转移效率提升约 1.5 倍。电化学分析表明菌体还原电位低于水铁矿, 支持电子自发传递; 可溶性 AQDS 可形成“导电微环境”加速电子传递。研究发现, 该菌可合成并分泌黄素(类)物质, 其浓度与 EET 速率显著正相关($r=0.94$, $P<0.001$), 且外源穿梭体能刺激总黄素分泌量增加 30%–50%。黄素化合物作为关键“电子桥梁”, 介导电子从胞内向外源穿梭体传递, 形成协同电子链。【结论】本研究揭示了一种好氧甲基营养菌适应缺氧环境

资助项目: 国家自然科学基金(U2571205, U2102216, 92251304, 31722008); 中国科学院青年创新促进会项目(2014273)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U2571205, U2102216, 92251304, 31722008) and the Youth Innovation Promotion Association Project of CAS (2014273).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: pxing@niglas.ac.cn

Received: 2026-01-04; Accepted: 2026-02-07; Published online: 2026-02-24

的新颖 EET 策略: 外源电子穿梭体通过构建胞外导电微环境并刺激黄素(类)物质的分泌, 形成内外源协同的电子传递机制, 从而高效驱动固态铁矿物的还原。该发现深化了对好氧微生物代谢灵活性及其在氧化-缺氧界面生态功能的理解。

关键词: 好氧甲基营养菌; 厌氧生存策略; 铁还原; 胞外电子转移; 电子穿梭体

Exogenous and endogenous electron shuttles synergistically drive oxygen-deficient iron reduction in an aerobic methylotroph

ZHAO Cheng^{1#}, LIN Nana^{1,2#}, ZHOU Wenjie^{1,2}, TANG Yanqiang², HAN Xuexin^{1,3}, XU Yan², XING Peng^{1*}

1 State Key Laboratory of Lake and Watershed Science for Water Security, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu, China

2 School of Civil Engineering, Southeast University, Nanjing, Jiangsu, China

3 College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Abstract: [Objective] The survival mechanisms of aerobic methylotrophs in oxygen-deficient environments represent a focal topic in current microbial ecology. This study aims to investigate the extracellular electron transfer (EET) mechanism by which the aerobic methylotroph *Methylophilus* sp. 14 utilizes insoluble iron minerals (ferrihydrite) under oxygen-deficient conditions and to elucidate the synergistic role of exogenous and endogenous electron shuttles in this process. **[Methods]** Anaerobic culture (initial O₂ level: 2%) of *Methylophilus* sp. 14 isolated from sediments of Fuxian Lake was conducted with methanol as the carbon source and ferrihydrite as the sole terminal electron acceptor. Iron reduction kinetics were measured along with electrochemical analyses (differential pulse voltammetry and cyclic voltammetry) and microscopic characterization (scanning/transmission electron microscopy) to systematically evaluate the iron-reducing capacity of the strain and explore the roles of exogenous shuttles (humic substances, HS; anthraquinone-2,6-disulfonate, AQDS) and endogenous flavins in electron transfer. **[Results]** *Methylophilus* sp. 14 coupled methanol oxidation with ferrihydrite reduction, increasing the Fe(II) concentration from 0.49 μmol/L to 8.29 μmol/L within 20 days and promoting the partial transformation of ferrihydrite into magnetite. Exogenous addition of HS and AQDS further enhanced Fe(II) production to 10.73 μmol/L and 11.22 μmol/L, respectively, improving the cumulative electron transfer efficiency by approximately 1.5 folds. Electrochemical analyses indicated that the redox potential of the bacterial cells was lower than that of ferrihydrite, thermodynamically favoring spontaneous electron transfer. Soluble AQDS formed a conductive microenvironment that accelerated electron flux. Notably, this study first revealed that *Methylophilus* sp. 14 synthesized and secreted flavins, whose extracellular concentration showed a strong positive correlation with the EET rate ($r=0.94$, $P<0.001$). Furthermore, exogenous shuttles stimulated increases of 30%–50% in total flavin secretion. Flavins functioned as a critical electron

bridge, mediating electron transfer from intracellular metabolism to exogenous shuttles and thereby establishing a cooperative electron transport chain. **[Conclusion]** This work reveals a novel EET strategy employed by aerobic methylotrophs to adapt to oxygen-deficient conditions. That is, exogenous electron shuttles not only construct an extracellular conductive microenvironment but also stimulate the secretion of endogenous flavins, resulting in a synergistic electron transfer mechanism that efficiently drives the reduction of solid-phase iron minerals. These findings deepen our understanding of the metabolic flexibility of aerobic microorganisms and their ecological role at aerobic-anaerobic interfaces.

Keywords: aerobic methylotroph; anaerobic survival strategy; iron reduction; extracellular electron transfer; electron shuttle

甲基营养细菌是一类能够利用不含碳-碳键的还原碳化合物(如甲烷、甲醇、甲酸、甲胺等一碳底物)作为唯一碳源和能源的微生物^[1]。作为环境中重要的功能类群,甲基营养细菌在全球碳、氮和硫循环中扮演关键角色^[2]。该类菌群能够作为天然高效的甲烷生物过滤器,减少约95%释放至大气中的甲烷,对缓解甲烷引起的温室效应具有重要意义^[3]。甲基营养细菌广泛分布于好氧、缺氧及厌氧环境^[4-6]。传统上,对好氧甲基营养细菌(尤其是假单胞菌门中的好氧甲烷氧化类群)的认知主要集中于其依赖氧气的代谢模式,相关研究也多聚焦于有氧条件下的生理生态功能^[7-9]。然而,越来越多的研究表明,这类细菌在氧限制条件下仍能维持生存并具有代谢活性^[10-11],表明好氧甲基营养细菌的生态功能与分布范围可能长期被低估,其生态角色与适应策略实际比以往认识更为复杂和广泛。

胞外电子转移(extracellular electron transfer, EET)是好氧甲基营养细菌在氧气限制条件下维持生存与获取能量的关键机制^[12-13]。在厌氧或缺氧环境中,这类细菌能够利用多种胞外替代电子受体(如硝酸盐、硫酸盐、铁锰氧化物等)进行电子传递与能量代谢^[14-16]。铁矿物作为环境中含量最丰富的氧化还原活性矿物,在该过程中发挥着核心作用。好氧甲基营养细菌利用铁矿物进行的胞外电子传递过程,通常被称为胞外矿物呼吸^[15]。Yang等^[17]研究发现,在氧气受

限条件下嗜甲基菌属菌株可利用铁氧化物作为替代电子受体进行胞外矿物呼吸;Zheng等^[18]的研究进一步证实,缺氧条件下 γ -变形菌纲的甲基单胞菌属与 α -变形菌纲的甲基弯曲菌属同样具备利用铁矿物进行此类呼吸的能力。然而,与末端电子受体为可自由扩散的气体或易溶性物质不同,微生物以不溶性铁矿物作为替代电子受体面临特殊挑战:电子如何被高效传递至无法自由扩散进入细胞质膜或细胞质的固态矿物表面,仍是当前研究的重要问题。

为应对电子难以高效传递至不溶性固体铁矿物表面的挑战,微生物形成了专门的胞外电子交换策略,其中电子穿梭体的使用尤为关键^[19]。电子穿梭体是微生物还原无法直接接触细胞质膜的胞外底物的一种有效机制。借助电子穿梭体,微生物既能够克服与胞外电子受体必须直接物理接触的限制,又可避免合成如“纳米线”等导电结构所伴随的能量消耗^[17,20]。根据来源不同,电子穿梭体可分为内源性(由微生物自身合成,如核黄素)与外源性(包括环境中天然存在或人工添加的物质,如天然腐殖质)两类^[21]。传统上,针对胞外电子转移的研究常将内源与外源电子穿梭体分别探讨^[19,22-23]。然而,二者在实际环境中很可能存在密切的相互作用,其对电子转移过程的联合贡献可能远超单一方式所起的作用。尽管这种协同效应意义重大,但目前关于内源电子穿梭体分泌与外源电子穿梭体

之间的相互作用机制及其潜在协同效应, 仍知之甚少, 亟待进一步深入研究。

本研究首先验证了好氧甲基营养菌嗜甲基菌属(*Methylophilus* sp.) 14 是否能够通过水铁矿进行胞外铁呼吸并在缺氧条件下存活。基于这一发现, 进一步在其接种体系中添加固态铁矿物水铁矿, 并引入溶解性不同的 2 种外源电子穿梭体——可溶的蒽醌-2,6-二磺酸(anthraquinone-2,6-disulfonate, AQDS) 与不溶的腐殖质(humic substances, HS), 结合基因组学、电化学及显微分析系统探讨以下问题: (1) 外源电子穿梭体对胞外电子转移的促进作用; (2) 外源电子穿梭体对微生物黄素(类)物质分泌的诱导作用; (3) 外源与内源电子穿梭体共同介导的胞外电子转移机制。本研究旨在揭示好氧甲基营养菌在缺氧条件下的铁呼吸能力及其电子传递策略, 深化对其能量代谢途径的理解, 并为阐释好氧微生物在缺氧环境中的生存适应机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 *Methylophilus* sp. 14 的富集和分离

Methylophilus sp. 14 菌株分离自云南省抚仙湖表层沉积物。甲烷氧化菌群富集培养采用液体 NMS 培养基: 将约 5 g 沉积物接种于装有 20 mL NMS 培养基和 10 mL CH₄ (CH₄ 体积分数为 10%) 的 100 mL 血清瓶中, 于 18 °C 培养 1 周。随后取 2 mL 富集液转接至含 20 mL 新鲜 NMS 培养基的新血清瓶中, 并置换 10 mL 空气为等体积 CH₄, 以维持甲烷供应。该富集体系每周传代一次, 持续在 18 °C 下培养, 最终获得以甲烷氧化菌为主、含少量异养菌的混合菌群。经约 10 代富集后, 采用 AMS 琼脂固体培养基进行分离。取适量富集菌液稀释至 10⁻³-10⁻⁶ 梯度, 涂布于 AMS 平板上, 于 27.5 °C 恒温生化培养箱中培养。通过 3-4 次连续划线纯化, 最终获得 1 株纯菌, 命名为 *Methylophilus* sp. 14。

NMS 培养基(g/L): KNO₃ 1.0, KH₂PO₄ 0.35, Na₂HPO₄·12H₂O 0.65, NaHCO₃ 8.4, Na₂CO₃ 3.0, NaCl 7.5, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCl₂ 0.02, Na₂EDTA 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.2, H₃BO₃ 0.03, ZnSO₄·7H₂O 0.01, MnCl₂·4H₂O 0.003, CuSO₄·5H₂O 0.03, NiCl₂·6H₂O 0.002, Na₂MO₄·2H₂O 0.003。AMS 培养基(g/L): KH₂PO₄ 2.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.025, NaCl 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.02, 琼脂 15-20。此外, 将 0.5% (体积分数) 甲醇均匀涂布于琼脂培养基表面, 作为唯一碳源。

1.2 沉积物腐殖质提取与傅里叶变换红外光谱表征

本研究所用腐殖质提取自中国太湖竺山湾的 0-10 cm 表层沉积物^[24]。提取前, 新鲜沉积物经除杂、风干、研磨及酸洗预处理。取 20 g 预处理后沉积物与 20 mL 2% 氢氟酸(hydrofluoric acid, HF)置于离心管中, 混合呈泥浆状, 于振荡器中反应 24 h, 20 °C、6 000 r/min 离心 10 min 后弃上清。该酸洗步骤重复 4 次, 每次均使用 20 mL 2% HF。随后, 以 0.1 mol/L NaOH 替代 2% HF, 按上述相同步骤进行碱洗。待沉积物出现颜色分层后, 收集上层黑色泥状物至干净离心管中。对该黑色提取物再进行 3 次酸洗, 并继续碱洗直至碱洗上清液变为无色透明。最后, 以超纯水反复洗涤样品至上清液呈中性, 经冷冻干燥后于低温条件下保存备用。采用傅里叶红外光谱仪(ThermoFisher Scientific 公司)在 400-4 000 cm⁻¹ 波长范围内对所得腐殖质进行红外光谱分析。每个样品重复测定 3 次。

1.3 水铁矿的制备

水铁矿通过化学共沉淀法制备^[25]: 将 0.4 mol/L FeCl₃ 溶液用 1 mol/L NaOH 溶液调节至 pH 7.0, 随后在 20 °C、8 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清。沉淀用去离子水反复洗涤, 直至上清液中 Cl⁻ 浓度低于 1 mmol/L, 随后于 45 °C 干燥, 得到水铁矿粉末。

1.4 缺氧条件下 *Methylophilus* sp. 14 的铁还原实验

将 *Methylophilus* sp. 14 接种于含 0.5% 甲醇的 40 mL AMS 液体培养基中培养至适宜生长阶段, 离心收集菌体。菌体沉淀用 1×PBS (pH 7.2) 洗涤后, 重悬于含 0.5% 甲醇的 40 mL 缺氧 AMS 培养基中。实验共设 3 个生物处理组(水铁矿+微生物、水铁矿+微生物+AQDS、水铁矿+微生物+腐殖质)和 3 个非生物对照组(水铁矿、水铁矿+AQDS、水铁矿+腐殖质), 以研究该菌在缺氧条件下的代谢机制。培养在微氧系统(初始 O₂ 浓度为 2%)中进行, 该浓度模拟了沉积物等自然生境中常见的微氧界面状态, 能够维持菌体基础代谢、避免剧烈的缺氧胁迫^[26], 并添加 0.5 mL 刃天青溶液(质量浓度为 0.1%)作为氧指示剂。所有血清瓶在厌氧手套箱中平衡超过 12 h 后, 用丁基橡胶塞密封并用铝盖压紧。各组中添加的终浓度分别为: 水铁矿 10 mmol/L, AQDS 50 μmol/L, 腐殖质 1.2 g/L。在 27.5 °C、180 r/min 培养 20 d。

在反应的第 0、1、3、7、10、13、16、20 天, 采用菲洛嗪法测定反应体系中 Fe(II) 的浓度^[27]。在微生物与水铁矿共培养 20 d 后, 检测体系中总黄素的含量以及水铁矿的形态和结构。总黄素浓度采用紫外-可见分光光度法进行测定^[28], 所获浓度为总黄素浓度, 即包含核黄素及其衍生物在内的黄素(类)物质总量。取孵育 20 d 的甲基营养菌-氧化铁共培养液, 经 4 500 r/min 离心 5 min, 收集上清液。使用分光光度计在 375 nm 波长下测定吸光度值, 计算上清液中总黄素的浓度。取培养 20 d 后的培养液 1 mL, 4 °C、经 4 500 r/min 离心 5 min 收集菌体与矿物复合物, 沉淀经超纯水洗涤 2 次后冷冻干燥。样品分别采用扫描电子显微镜(SEM, Zeiss 公司, 加速电压 5 kV)和高分辨率透射电子显微镜(TEM, 加速电压 200 kV)进行形貌与结构观察。

1.5 微生物与铁矿物的电化学分析

电化学测试在 CHI 1030C 工作站上采用标准三电极体系进行(容积为 30 mL), 其中玻碳电极为工作电极, 铂片电极为对电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 电解液为磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.2)。测试前通入高纯氮气至少 15 min 以去除溶解氧, 并在整个过程中维持氮气氛围。首先, 采用差分脉冲伏安法研究菌体、水铁矿及培养上清液的氧化还原性质: 将离心收集的菌体或 10 mmol/L 水铁矿负载于工作电极, 以 PBS 或培养上清液为电解液, 在 -0.4~0.4 V 电位范围内扫描, 参数设置为电位增量 4 mV、脉冲幅度 50 mV、脉冲宽度 0.2 s、脉冲周期 0.5 s、静置时间 30 s。其次, 通过循环伏安法表征外源电子穿梭体 AQDS (50 μmol/L) 和腐殖质(1.2 g/L) 的电化学行为, 扫描速率分别设为 20、40、60、80、100 mV/s。最后, 利用计时电流法监测缺氧条件下菌体对外源电子穿梭体的实时响应: 将 5 μL 菌液滴加于工作电极, 在 -0.2 V 恒定电位下待电流稳定后, 依次向体系中注入 AQDS 和腐殖质, 记录电流随时间的变化。

1.6 腐殖质与黄素化合物氧化还原可逆性测试

为评估腐殖质与黄素化合物的可逆氧化还原活性, 本研究对二者进行了 5 轮氧化还原循环处理。其中, 腐殖质的还原采用 Pd-H₂ 催化系统实现, 氧化则通过连续曝气完成^[29-30]。首先将腐殖质溶于碱性溶液, 调节 pH 至 7.0, 配制成 0.5 g/L 的工作液并转移至密封血清瓶; 加入 Pd/Al₂O₃ 催化剂后, 通入 H₂ 吹扫 30 min, 随后在摇床中孵育 24 h 以充分还原。还原后的溶液经 0.22 μm 醋酸纤维素膜过滤去除催化剂, 再曝气 24 h 使其重新氧化, 至此完成一次完整的氧化还原循环。该过程重复进行 5 次, 每次循环后均采用电化学方法测定腐殖质的电子转移能力。核黄素样品也按相同流程进行氧化还原循环处理与测定。

1.7 统计方法

不同外源穿梭体处理组(无添加、HS 添加、AQDS 添加)之间的铁还原效率及总黄素产量比较, 采用单因素方差分析, 若组间差异显著, 则进一步使用 Tukey 多重比较检验。总黄素浓度与电子转移速率之间的相关性通过 Pearson 相关系数进行检验。非生物对照组与生物处理组间的总黄素浓度差异采用 t 检验进行显著性分析。所有电化学测试, 如差分脉冲伏安法与循环伏安法均重复至少 3 次以确保结果重现性。所有培养实验, 包括铁还原动力学测定与总黄素浓度分析均设置 3 个生物学重复。显著性水平设定: $P < 0.05$ 表示显著, $P < 0.01$ 表示非常显著, $P < 0.001$ 表示极其显著。

2 结果与讨论

2.1 *Methylophilus* sp. 14 通过胞外矿物呼吸方式实现缺氧生存

为从热力学角度评估 *Methylophilus* sp. 14 能否以固态水铁矿作为胞外电子受体, 本研究采

用差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)分析了二者的氧化还原性质。DPV 分析能够灵敏地检测氧化还原活性物质的特征电位, 从而为判断电子传递方向与可行性提供直接依据。*Methylophilus* sp. 14 的 DPV 曲线在 -8 mV 和 -260 mV 处分别出现明显的氧化峰与还原峰(图 1A), 表明其胞外组分具备多步氧化还原活性。水铁矿的 DPV 曲线(图 1B)则在 -152 mV 和 -120 mV 处分别呈现氧化峰与还原峰。关键的是, 菌株的还原峰电位(-260 mV)显著负于水铁矿的还原峰电位(-120 mV)。这一电位关系在热力学上表明, 菌株内部代谢产生的电子能够自发地向电位更正的水铁矿传递, 从而证实水铁矿具备作为该菌在缺氧条件下终端电子受体的潜力(图 1D)。

为进一步明确 *Methylophilus* sp. 14 能否利用固态水铁矿作为替代电子受体并在缺氧条件下存活, 开展了以甲醇为碳源、水铁矿为唯一电子受体的培养实验。结果显示, 代表 Fe(III)还原程度的 Fe(II)/Fe(T)比值随时间持续上升并最终趋于稳定(图 2A), 表明水铁矿中的 Fe(III)被微生物主动还原为 Fe(II)。具体而言, Fe(II)浓度从

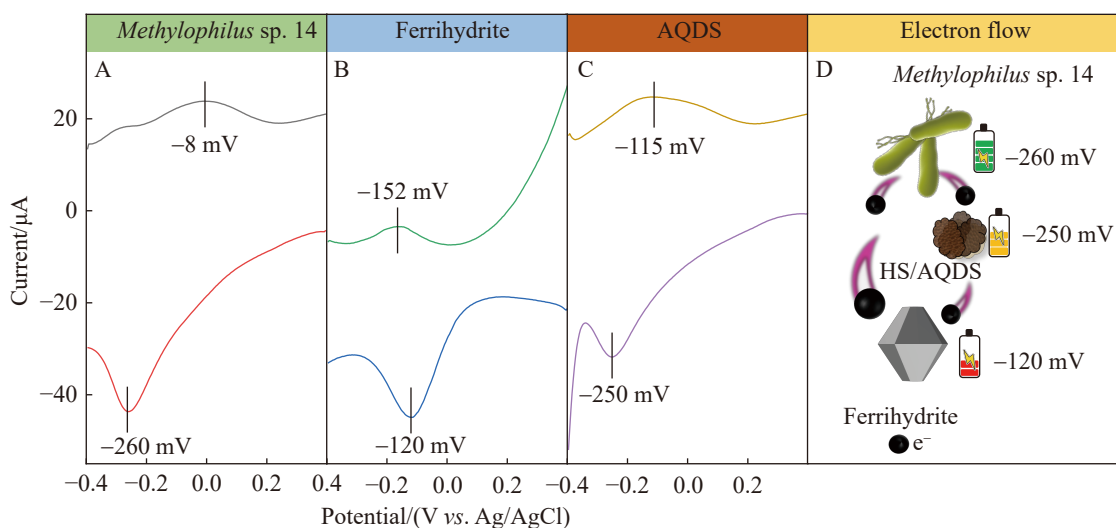


图1 *Methylophilus* sp. 14、水铁矿与AQDS的氧化还原性质电化学分析

Figure 1 Electrochemical analysis of redox properties of *Methylophilus* sp. 14, ferrihydrite, and AQDS. A: Differential pulse voltammetry of *Methylophilus* sp. 14; B: Differential pulse voltammetry of ferrihydrite; C: Differential pulse voltammetry of AQDS; D: Schematic of the electron flow between *Methylophilus* sp. 14 and ferrihydrite.

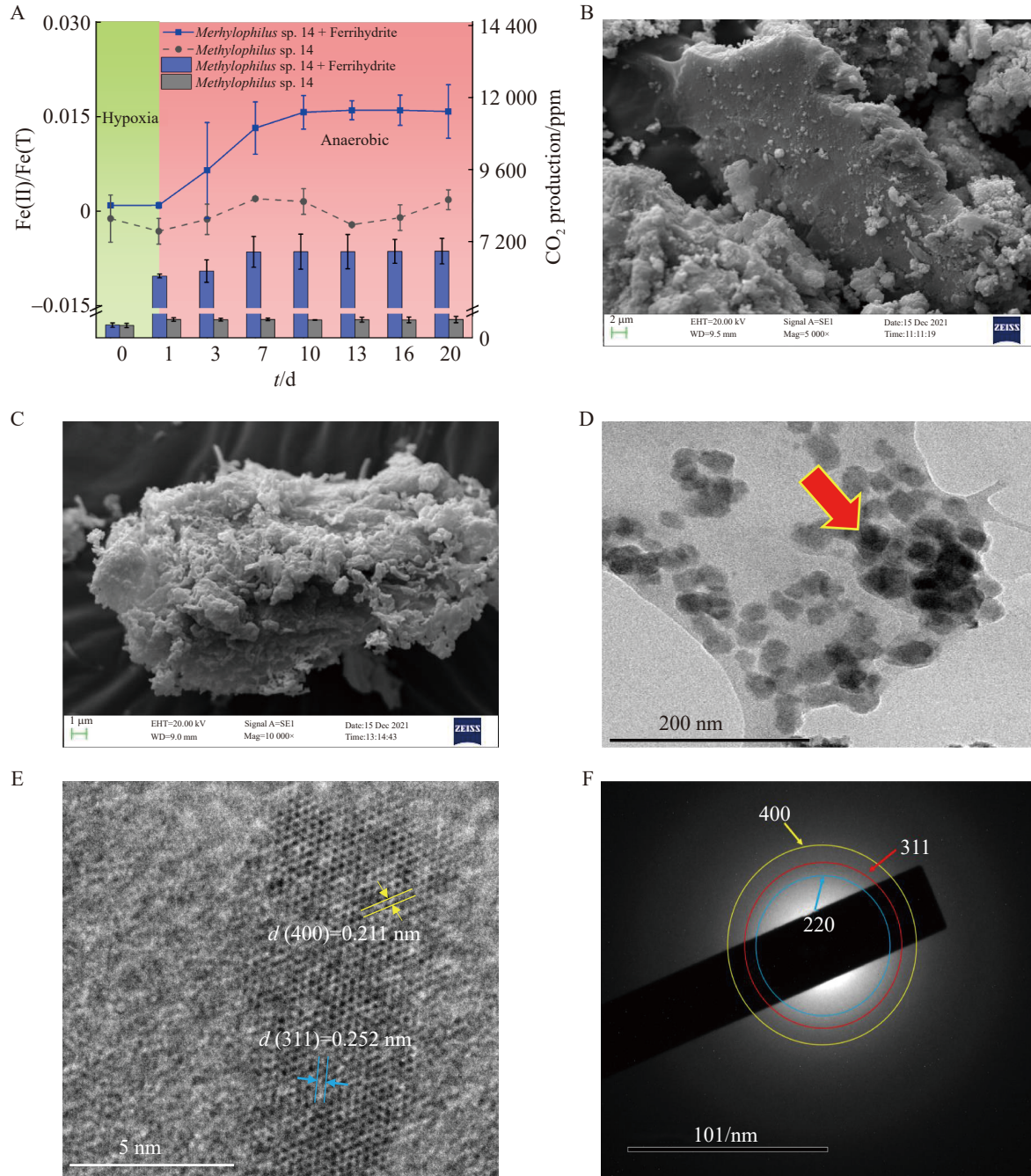


图2 *Methylophilus sp. 14*依赖甲醇还原水铁矿的过程

Figure 2 Methanol-dependent reduction of ferrihydrite by *Methylophilus sp. 14*. A: Dynamics of accumulation of Fe(II) (linear graph) and variation of CO₂ concentration (histogram); B: SEM of ferrihydrite before iron reduction process; C: SEM of ferrihydrite after iron reduction process; D: Transmission electron microscope images of ferrihydrite at 200 nm after reaction (red arrows indicate aggregated iron oxide particles); E: HRTEM characterization of iron minerals during the iron reduction; F: SAED characterization of iron minerals during the iron reduction.

初始的 $0.49 \mu\text{mol/L}$ 升高至 $8.29 \mu\text{mol/L}$ 。相比之下, 不含微生物的非生物对照组中未观察到明显的铁还原, 证实该还原过程由生物活动介导。上述结果与前期电化学分析相一致, 共同证明好氧甲基营养菌 *Methylophilus sp.* 14 能够通过水铁矿的胞外呼吸在缺氧条件下维持生存。

通过扫描电子显微镜观察发现, 反应前的水铁矿表面光滑, 无附着物(图 2B); 而与 *Methylophilus sp.* 14 共培养后, 可见大量细胞及絮状物质聚集于水铁矿颗粒周围(图 2C), 表明微生物细胞可能通过直接接触或分泌胞外物质促进电子向矿物的传递。透射电子显微镜进一步证实了这种聚集态结构的存在(图 2D)。为明确水铁矿在微生物还原过程中的矿物相转化, 采用高分辨透射电子显微镜(high-resolution transmission electron microscopy, HRTEM)结合选区电子衍射(selected area electron diffraction, SAED)对反应后的固体产物进行分析。HRTEM 图像(图 2E)显示存在结晶良好的纳米颗粒, 其晶格条纹清晰可辨。SAED 图谱(图 2F)呈现多组明显的衍射环, 经与标准粉末衍射卡片(PDF #89-4319)比对, 这些衍射环可分别指标为磁铁矿的(220)、(311)和(400)晶面。

HRTEM 观测到的晶面间距与 SAED 的指标结果一致, 共同证实反应后样品中存在磁铁矿结晶相。该结果表明, 在 *Methylophilus sp.* 14 的还原作用下, 部分无定形水铁矿转化为次生矿物磁铁矿。

2.2 添加外源电子穿梭体可以提高铁呼吸的电子传递效率

在培养体系中添加电子穿梭体 AQDS 或 HS 后, 胞外电子转移效率显著提升(图 3A)。Fe(II) 浓度分别增加至 $11.22 \mu\text{mol}$ (AQDS 组) 和 $10.73 \mu\text{mol}$ (HS 组), 而仅含相同添加剂的非生物对照组中 Fe(II)/Fe(T) 比值未发生明显变化。这表明水铁矿的还原过程主要由生物活动驱动, HS 和 AQDS 自身对 Fe(III) 的化学还原贡献可忽略。

根据反应 $\text{CH}_3\text{OH} + \text{Fe(III)} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe(II)} + 6\text{H}^+ + \text{CO}_2 + 5\text{e}^-$, 通过 Fe(II) 生成量计算了铁还原过程中对应的电子转移量。添加 HS 和 AQDS 后, 电子转移量分别达到 $60.35 \mu\text{mol/L}$ 和 $56.66 \mu\text{mol/L}$, 约为未添加电子穿梭体时的 1.5 倍(图 3B)。上述结果说明, 外源电子穿梭体是增强胞外电子转移效率的重要策略之一, 但其具体作用机制仍有待进一步阐明。

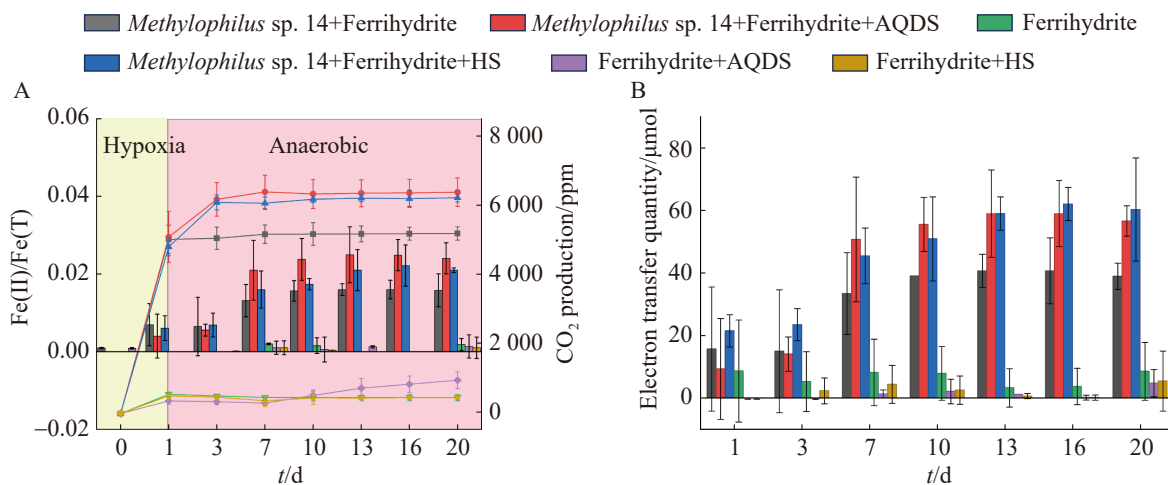


图3 AQDS与腐殖质在铁还原中的作用

Figure 3 Role of AQDS and humic substances (HS) in iron reduction. A: Dynamics of accumulation of Fe(II) involving AQDS and humus (histogram) and variation of CO₂ concentration (linear graph); B: Number of electrons transferred in iron reduction.

为明确外源电子穿梭体(HS 与 AQDS)在胞外电子转移中的作用机制,本研究采用三电极电化学系统,以工作电极模拟胞外电子受体,通过计时电流法与循环伏安法分析电子转移动力学。结果显示,添加 HS 或 AQDS 均显著提升了系统电流响应(图 4A、4B),表明二者可有效促进微生物与电极间的电子传递。循环伏安分析进一步证实, AQDS 与 HS 介导的电子转移受扩散控制^[31](图 4C、4D)。值得注意的是,尽管 AQDS 的电子转移能力仅约为 HS 的 10 倍[原始数据已上传 ScienceDB 数据库(<https://www.scidb.cn/c/j00231>), CSTR 编号为 31253.11.science db.j00231.00058],但 AQDS 对胞外电子传递效率的提升幅度约为 HS 的 50 倍(编号为 31253.11.science db.j00231.00058)。我们认为这一差异主要源于 AQDS 较高的溶解性:与不溶的 HS 不

同,可溶的 AQDS 能够自由扩散并在细胞外围积累,从而在微生物附近形成局部高浓度的“导电微环境”,为长距离电子传递提供高效通路。微生物细胞质膜是电子传递的关键位点,但其外部的肽聚糖层、外膜及 S 层等非导电且不通透的结构阻碍了与胞外矿物受体的电子传递过程^[12]。外源性电子穿梭体如 AQDS 能够在细胞表面区域形成高浓度导电活性区域。这种局部微环境极大增强了电子的可及性与流动性,从而克服了空间限制,显著提升胞外电子传递效率。

2.3 外源电子穿梭体对内源电子穿梭体黄素化合物分泌的诱导作用

内源电子穿梭体(如黄素类化合物)在胞外电子传递过程中发挥着重要作用,这类物质能够作为有效的氧化还原介质协助电子跨越细胞的

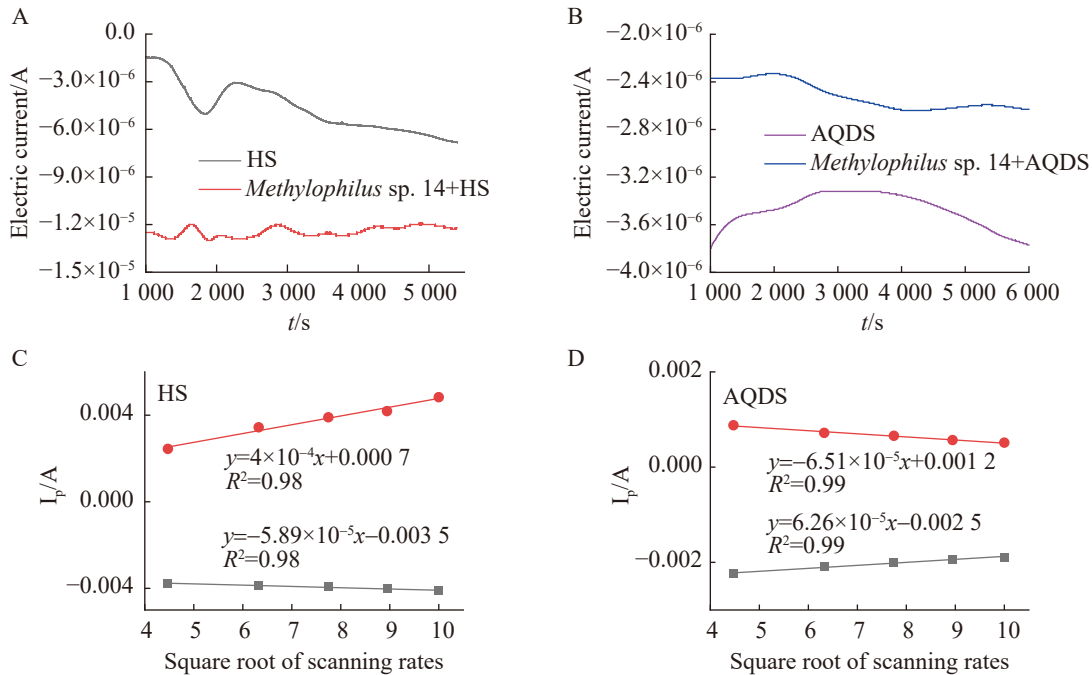


图4 循环伏安与计时电流曲线分析

Figure 4 Cyclic voltammetry (CV) and time-current curve (i-t curve) analysis. A: The electrochemical response of *Methylophilus sp. 14* in the presence of HS; B: The electrochemical response of *Methylophilus sp. 14* in the presence of AQDS; C: Fitting of the peak current to scanning rate, electron transfer mediated by HS at different scanning rates (20, 40, 60, 80, 100 mV/s); D: Fitting of the peak current to scanning rate, electron transfer mediated by AQDS at different scanning rates (20, 40, 60, 80, 100 mV/s).

非导电屏障, 促进其与胞外受体的相互作用。例如, 已有研究显示黄素能够与外膜细胞色素结合, 促进 *Shewanella* 的胞外电子传递过程^[32]。基因组分析显示, *Methylophilus* sp. 14 具有完整的核黄素合成基因簇(如 *ribA*、*ribBA*、*ribD*、*ribH*、*ribE*、*ribF*), 表明该菌具备合成核黄素的能力^[33]。实验证实, 菌株培养上清液中总黄素浓度显著高于非生物对照($P<0.05$, 图 5A)。相关性

分析显示, 总黄素浓度与电子转移速率呈显著正相关($r=0.94$, $P<0.001$, 图 5B), 说明黄素(类)物质是调控胞外电子传递效率的关键因子。

外源电子穿梭体 AQDS 和 HS 能够刺激菌株增加黄素类物质的分泌, 使其产量分别提高 50% 和 30% (图 5A)。这一正反馈调节进一步提升了细胞外围黄素类物质的局部浓度, 使其在细胞内部代谢体系与胞外“导电微环境”之间建

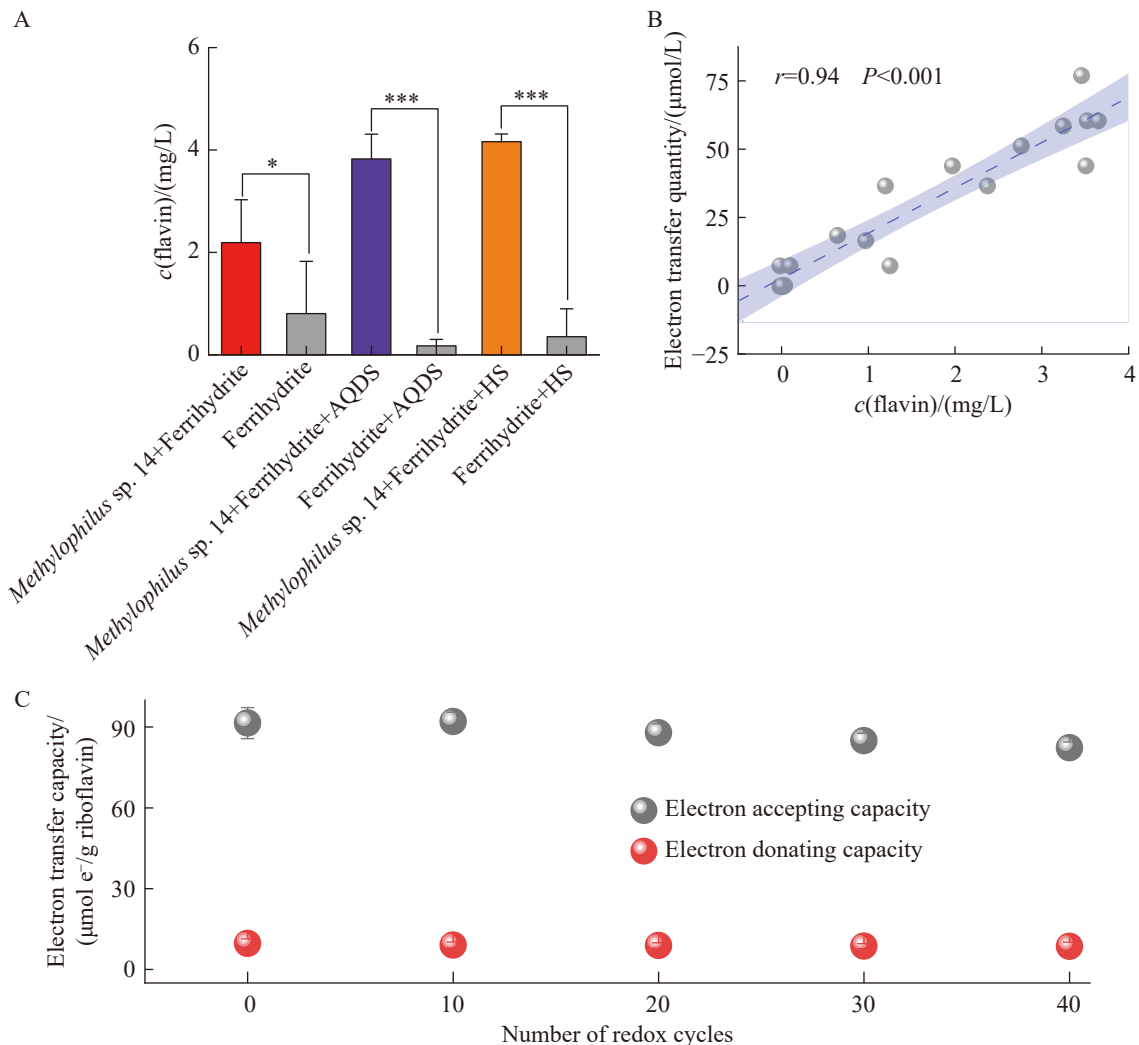


图5 黄素介导的胞外电子转移

Figure 5 Flavin-mediated extracellular electron transfer. A: The flavin content in the culture supernatant after 20 days of incubation (*: $P<0.05$; ***: $P<0.001$); B: Pearson correlation analysis of flavin content and electron transfer; C: Changes in the EAC and EDC of riboflavin during reduction by H_2 and subsequent re-oxidation under oxic conditions.

立起一座高效的“电子桥梁”。高浓度的电子穿梭体环境主要通过 2 种机制支持高效胞外电子传递：(1) 提供足够的氧化还原介质，使电子能够通过一连串穿梭体分子实现从细胞到 Fe(III)矿物的多步“跳跃”；(2) 通过介质的持续扩散维持电子传递链的连续性，避免因介质不足形成传递瓶颈^[34]。在这一协同体系中可溶性外源电子穿梭体(如 AQDS)不仅自身通过扩散构建胞外导电微环境，还能进一步刺激黄素类物质分泌，从而强化“桥梁”连接效应。尽管黄素合成需要消耗能量(约每分子 25 个 ATP)，但其作为氧化还原介质可进行数百次高效循环利用^[19]。本研究表明，在经历 40 次氧化还原循环后黄素化合物(核黄素)仍保持 90% 以上的电子转移活性(图 5C)。这种强大的循环能力显著放大了能量回报，足以抵消其初始合成成本。

从氧化还原电位来看，核黄素的标准电位约为 -0.21 V (vs. SHE) ^[35]，较 AQDS (约 -0.18 V) 和多数腐殖质组分(普遍介于 $-0.3\text{--} -0.1\text{ V}$) 更低。该电位关系使得还原态核黄素在热力学上能够自发地将电子传递至 AQDS 或 HS，进而通过后者的扩散与循环将电子最终转移至电位更高的水铁矿(其还原峰电位约 -0.12 V)。因此，黄素类物质不仅在空间上连接了细胞代谢体系与外源导电微环境，在能量梯度上也具备作为初级电子传递介体的合理性与效率，进一步支持了其在内外源穿梭体协同电子传递链中的关键“桥梁”作用。

综上所述，黄素的分泌是微生物在能量投入与产出之间实现平衡的一种适应性策略。通过响应外源电子穿梭体的刺激，微生物可优化黄素化合物的合成与分泌，从而在细胞外围构建一个连接胞内代谢与胞外微环境的高效电子传递通道。这不仅显著提升了胞外电子传递的效率，也增强了微生物在依赖胞外电子受体的缺氧环境中的生存与竞争能力。

需要说明的是，外源电子穿梭体(HS 与 AQDS)刺激下黄素浓度的升高可能源于 2 种不同的生理机制：一是细菌生长繁殖加速，细胞

总数增加导致总黄素分泌总量上升；二是细胞数量保持稳定，但外源刺激上调了黄素合成相关基因(如 *rib* 系列基因)的表达，从而提高了单位细胞的黄素产量。在本研究的缺氧铁还原体系中能量供应相对有限，细菌生长通常受到抑制。结合 AQDS 可快速形成胞外“导电微环境”并显著提升胞外电子传递效率的现象，我们倾向于认为外源电子穿梭体主要通过第 2 种机制发挥作用，即通过促进单位细胞黄素的合成与分泌效率以增强微生物在能量限制条件下的电子输出能力。当然，这一推断尚需未来通过同步监测细胞生长、结合转录组学等方法进一步验证。然而，无论如何，黄素化合物分泌量的功能性增加及其与电子传递效率的正相关性，已明确支持了其在协同电子传递网络中起到的关键桥梁作用。

2.4 好氧甲基营养菌适应缺氧环境的电子传递策略

甲基营养菌的代谢具有模块化特征^[36]，其核心功能可归纳为以下必需模块：(1) 从 C1 底物获取能量的初级氧化模块；(2) 对初级氧化产物进行进一步氧化的模块；(3) 将 C1 单元同化为细胞物质的同化模块^[37]。这些模块总体上可分为异化模块(释放能量)和同化模块(储存能量)^[37]。前期的研究表明^[33]，*Methylophilus* sp. 14 能够通过 H_4MPT 依赖的途径将甲醛转化为甲酸盐，该途径涉及 *fae*、*mtdB*、*mch*、*ftt* 及 *fwdA/B/C* 等一系列基因编码的酶。随后，甲酸脱氢酶负责将甲酸盐氧化，并将电子转移至 NAD^+ 形成 NADH ^[33](图 6)。作为小分子电子载体， NADH 可进一步将电子传递给 NADH 脱氢酶，驱动后续的 ATP 合成^[38]。在有氧条件下，甲基营养菌可通过甲醇的异化氧化高效产能；而在缺氧条件下，这类微生物则能利用替代性末端电子受体。例如，在氧受限时 *Methylophilus* sp. 14 能够以甲醇依赖的方式将电子转移至胞外电子受体水铁矿，水铁矿无法进入细胞，因此，

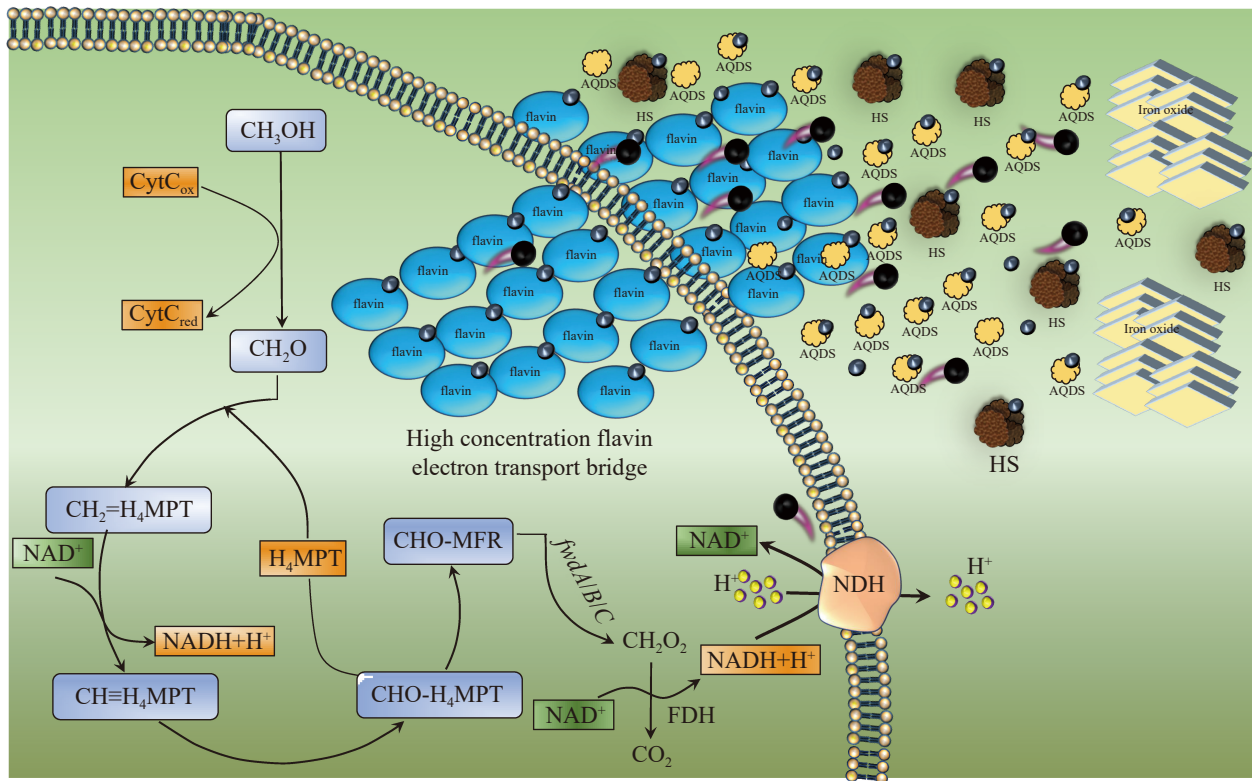


图6 好氧甲基营养菌在缺氧条件下胞外电子转移机制示意图

Figure 6 Proposed extracellular electron transfer (EET) mechanism in aerobic methylotrophs under hypoxia. Schematic diagram of extracellular electron transfer strategy of aerobic methylotrophs under hypoxia stress. Exogenous electron shuttles form a “conductive zone” around microorganisms and stimulate the production of endogenous electron shuttle flavin. Flavin acts as an “electron bridge”, transferring intracellular electrons to the extracellular environment and enhancing extracellular electron transfer processes.

微生物需采用特殊的电子传递策略来还原胞外电子受体^[39]。电子穿梭体正是微生物还原胞外铁矿的一种高效策略。本研究进一步揭示，外源电子穿梭体通过在细胞周围建立局部高浓度“导电微环境”来增强电子转移，而内源电子穿梭体黄素化合物则扮演关键的“电子桥梁”角色：它促进电子从细胞内部向外源穿梭体传递，再由穿梭体将电子最终递交给不溶性的水铁矿，从而显著加速整个电子传输链(图6)。此外，外源穿梭体能够刺激微生物增加黄素的合成与分泌，帮助细胞处理过量还原力、维持氧化还原平衡。黄素作为微生物自身合成的内源电子介质，其扩散至胞外可形成连接细胞代谢系统与

外源导电微环境的桥梁，大幅提升电子转移的整体效率^[32]。这一机制使得外源穿梭体能够有效介导细胞与固体矿物之间的电子扩散。黄素化合物的可逆氧化还原特性在促进胞外电子转移的同时，也最大限度地降低了能量损耗；它通过协调电子传递、能量守恒与外源穿梭体的功能帮助微生物适应缺氧等胁迫条件。这种双重作用凸显了黄素类物质在微生物氧化还原调节与能量代谢效率中的关键贡献。

3 结论

本研究证实，好氧甲基营养菌能够利用水铁矿等固态矿物作为替代电子受体，从而适应

氧气受限的环境。外源电子穿梭体(如 HS 与 AQDS)通过在细胞外围形成局部导电区域,并促进其还原态与氧化态在微生物与 Fe(III)矿物之间的循环扩散,显著提升了电子转移效率。同时,外源电子穿梭体可以刺激微生物合成并分泌黄素化合物;黄素作为关键的“电子桥”,将电子从细胞内部传递至外源穿梭体,进而转移至水铁矿。该机制不仅降低了直接电子传递的能量消耗,也支持了高效的胞外电子转移过程。尽管黄素类物质的合成需要代谢投入,但其可逆的电子传递特性有助于微生物维持氧化还原稳态、优化能量分配,并提升其在缺氧条件下的适应能力。综上所述,外源电子穿梭体与内源黄素在甲基营养菌的胞外电子转移策略中均扮演关键角色。这些发现为深入理解该类微生物在低氧环境中的生存适应性与代谢灵活性提供了新的视角。

致谢

感谢中国科学院南京地理与湖泊研究所的李彪博士、毛振铎博士和顾秋锦老师在 *Methylophilus* sp. 14 的富集与分离实验和铁还原实验过程中提供的帮助。

作者贡献声明

赵成:研究构思和设计、数据收集和处理、论文撰写和修改;林娜娜:研究构思和设计、数据收集和处理、论文审阅与修订;周文杰:提供技术支持、协助实验操作;唐彦强:提供技术支持、协助实验操作;韩雪欣:数据收集、论文审阅;许妍:论文审阅、监督指导;邢鹏:研究构思和设计、论文审阅与修订、获取基金、提供资源、项目管理。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Chistoserdova L, Kalyuzhnaya MG, Lidstrom ME. The expanding world of methylophilic metabolism[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 477-499.
- [2] Chistoserdova L, Lapidus A, Han C, Goodwin L, Saunders L, Brettin T, Tapia R, Gilna P, Lucas S, Richardson PM, Lidstrom ME. Genome of *Methylobacillus flagellatus*, molecular basis for obligate methylophilicity, and polyphyletic origin of methylophilicity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(11): 4020-4027.
- [3] Dean JF, Middelburg JJ, Röckmann T, Aerts R, Blauw LG, Egger M, Jetten MSM, de Jong AEE, Meisel OH, Rasigraf O, Slomp CP, in't Zandt MH, Dolman AJ. Methane feedbacks to the global climate system in a warmer world[J]. *Reviews of Geophysics*, 2018, 56(1): 207-250.
- [4] Nercessian O, Noyes E, Kalyuzhnaya MG, Lidstrom ME, Chistoserdova L. Bacterial populations active in metabolism of C₁ compounds in the sediment of Lake Washington, a freshwater lake[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6885-6899.
- [5] Oshkin IY, Beck DAC, Lamb AE, Tchesnokova V, Benuska G, McTaggart TL, Kalyuzhnaya MG, Dedysh SN, Lidstrom ME, Chistoserdova L. Methane-fed microbial microcosms show differential community dynamics and pinpoint taxa involved in communal response[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(5): 1119-1129.
- [6] Chistoserdova L, Kalyuzhnaya MG. Current trends in methylophilicity[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(8): 703-714.
- [7] Jenkins O, Byrom D, Jones D. *Methylophilus*: a new genus of methanol-utilizing bacteria[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1987, 37(4): 446-448.
- [8] Meruvu H, Wu H, Jiao ZY, Wang LY, Fei Q. From nature to nurture: essence and methods to isolate robust methanotrophic bacteria[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2020, 5(3): 173-178.
- [9] Singleton CM, McCalley CK, Woodcroft BJ, Boyd JA, Evans PN, Hodgkins SB, Chanton JP, Frolking S, Crill PM, Saleska SR, Rich VI, Tyson GW. Methanotrophy across a natural permafrost thaw environment[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(10): 2544-2558.
- [10] Deutzmann JS, Wörner S, Schink B. Activity and diversity of methanotrophic bacteria at methane seeps in eastern Lake Constance sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(8): 2573-2581.
- [11] Biderre-Petit C, Jézéquel D, Dugat-Bony E, Lopes F, Kuever J, Borrel G, Viollier E, Fonty G, Peyret P. Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake: methane cycle in a stratified freshwater ecosystem[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 77(3): 533-545.
- [12] Shi L, Dong HL, Reguera G, Beyenal H, Lu AH, Liu J, Yu HQ, Fredrickson JK. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(10): 651-662.
- [13] Jiang ZW, Liu MH, Chen YK, Qian XF, Dai QZ, Yao JC, Chen J. Extracellular electron transfer in bioelectrochemical system and its role in denitrification: mechanisms, enhancement strategies, and application prospects[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 437: 133188.
- [14] Ettwig KF, Zhu BL, Speth D, Keltjens JT, Jetten MSM,

- Kartal B. Archaea catalyze iron-dependent anaerobic oxidation of methane[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(45): 12792-12796.
- [15] Beal EJ, House CH, Orphan VJ. Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation[J]. Science, 2009, 325(5937): 184-187.
- [16] Haroon MF, Hu SH, Shi Y, Imelfort M, Keller J, Hugenholtz P, Yuan ZG, Tyson GW. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage[J]. Nature, 2013, 500(7464): 567-570.
- [17] Yang YY, Wang H, Zheng Y, Zhu BL, Wu XE, Zhao F. Extracellular electron transfer of *Methylophilus methylotrophs*[J]. Process Biochemistry, 2020, 94: 313-318.
- [18] Zheng Y, Wang H, Liu Y, Zhu BL, Li JH, Yang YY, Qin W, Chen LF, Wu XE, Chistoserdova L, Zhao F. Methane-dependent mineral reduction by aerobic methanotrophs under hypoxia[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2020, 7(8): 606-612.
- [19] 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.
- [20] Keller JK, Weisenborn PB, Megeonigal JP. Humic acids as electron acceptors in wetland decomposition[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(7): 1518-1522.
- [21] Von Canstein H, Ogawa J, Shimizu S, Lloyd JR. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(3): 615-623.
- [22] 张多瑞, 裴珍媛, 刘李柱, 杨洪英, 夏金兰. 微生物胞外电子传递过程及其应用研究进展[J]. 生命科学, 2018, 30(6): 680-689.
- Zhang DR, Nie ZY, Liu LZ, Yang HY, Xia JL. Mechanisms of microbial extracellular electron transfer and its application[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2018, 30(6): 680-689 (in Chinese).
- [23] Huo N, Li X, Xu YZ, Ren CY, Yan WF, Tian XC, Wu XE, Zhao F. Electron shuttles in microbial photoelectrochemical systems: cytotoxicity and photostability[J]. ChemElectroChem, 2024, 11(8): e202300785.
- [24] Hall GEM, MacLaurin AI, Vaive JE. Readsorption of gold during the selective extraction of the "soluble organic" phase of humus, soil and sediment samples[J]. Journal of Geochemical Exploration, 1995, 54(1): 27-38.
- [25] 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.
- [26] Li B, Tao Y, Mao ZD, Gu QJ, Han YX, Hu BL, Wang HW, Lai AX, Xing P, Wu QL. Iron oxides act as an alternative electron acceptor for aerobic methanotrophs in anoxic lake sediments[J]. Water Research, 2023, 234: 119833.
- [27] Yu HL, Liu GF, Dong B, Jin RF, Zhou JT. Humic acids promote hydroxyl radical production during transformation of biogenic and abiogenic goethite under redox fluctuation[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 424: 130359.
- [28] Zhao C, Xun F, Li B, Han XT, Liu H, Du YX, Wu QL, Xing P. The dual roles of dissimilatory iron reduction in the carbon cycle: the "iron mesh" effect can increase inorganic carbon sequestration[J]. Global Change Biology, 2024, 30(3): e17239.
- [29] Zhao C, Liu HB, Zhang XD, Li YJ, Shi MZ, Huang F, Dong L, Wen JX, Liu H. Humic acids promotion or inhibition of sludge anaerobic digestion depends on their redox potentials[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 464: 142653.
- [30] Zhao C, Liu HB, Liu H, Zhan XM, Zhang XD, Fu B, Shi MZ, Lu SL, Huang F, Cui MH, Li YJ. Influence of thermal hydrolysis on sludge anaerobic digestion: release of humic acid promotes electron transport of methanogen[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 451: 138455.
- [31] Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry[J]. Journal of Chemical Education, 2018, 95(2): 197-206.
- [32] Okamoto A, Saito K, Inoue K, Neelson KH, Hashimoto K, Nakamura R. Uptake of self-secreted flavins as bound cofactors for extracellular electron transfer in *Geobacter* species[J]. Energy & Environmental Science, 2014, 7(4): 1357-1361.
- [33] Lin NN, Tao Y, Gao PX, Xu Y, Xing P. Comparative genomics revealing insights into niche separation of the genus *Methylophilus*[J]. Microorganisms, 2021, 9(8): 1577.
- [34] Jiang J, Kappler A. Kinetics of microbial and chemical reduction of humic substances: implications for electron shuttling[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(10): 3563-3569.
- [35] 张青卯, 胡志彬, 汪正浩. 核黄素电化学还原研究[J]. 化学学报, 1991, 49(8): 729-734.
- Zhang QM, Hu ZB, Wang ZH. Studies on electroreduction mechanism of riboflavin[J]. Acta Chimica Sinica, 1991, 49(8): 729-734 (in Chinese).
- [36] Chistoserdova L. Methylophilus in a lake: from metagenomics to single-organism physiology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(14): 4705-4711.
- [37] Chistoserdova L. Methylophilus in natural habitats: current insights through metagenomics[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(14): 5763-5779.
- [38] Cai YF, Zheng Y, Bodelier PLE, Conrad R, Jia ZJ. Conventional methanotrophs are responsible for atmospheric methane oxidation in paddy soils[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11728.
- [39] Li FB, Li XM, Zhou SG, Zhuang L, Cao F, Huang DY, Xu W, Liu TX, Feng CH. Enhanced reductive dechlorination of DDT in an anaerobic system of dissimilatory iron-reducing bacteria and iron oxide[J]. Environmental Pollution, 2010, 158(5): 1733-1740.