

<https://doi.org/10.3799/dqkx.2022.115>



# 铁还原菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 在 $H_2O_2$ 扰动下的 响应及机制

赵雨溪, 孙群群, 童曼\*, 袁松虎

中国地质大学生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北武汉 430078

**摘要:** 铁还原菌参与的铁循环是地表系统中物质循环的重要驱动力, 自然生成和人工注入地下环境的  $H_2O_2$  可能通过氧化胁迫影响铁还原菌的活性和功能, 但铁还原菌在  $H_2O_2$  扰动下的响应及机制仍不清楚. 以铁还原模式菌株 *Shewanella oneidensis* MR-1 作为研究对象, 结合批实验和转录组测序研究了不同浓度水平  $H_2O_2$  扰动下 MR-1 活性和功能的变化及其调控机制. 结果表明, MR-1 能够有效抵御  $H_2O_2$  的胁迫, 且  $H_2O_2$  扰动使 MR-1 的铁还原能力增强. 转录组测序表明,  $H_2O_2$  使 MR-1 处于抗应激状态, 通过积极氧化有机物供能, 促进过氧化氢酶的合成抵御  $H_2O_2$  的负面影响.

**关键词:** 铁循环; 铁还原菌; 氧化胁迫; 地质微生物; 环境地质学.

中图分类号: P69

文章编号: 1000-2383(2023)04-1649-08

收稿日期: 2021-12-30

## Response and Mechanism of Iron-Reducing Bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1 to Perturbance of $H_2O_2$

Zhao Yuxi, Sun Qunqun, Tong Man\*, Yuan Songhu

State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430078, China

**Abstract:** Iron cycling mediated by iron-reducing bacteria is an important factor driving material cycle in the surface system of earth.  $H_2O_2$  naturally generated and artificially injected into the subsurface environment may affect the activity and function of iron-reducing bacteria through oxidative stress, but the response and mechanism of iron-reducing bacteria to  $H_2O_2$  disturbance is still unclear. In this study, *Shewanella oneidensis* MR-1 was chosen as a representative iron-reducing bacterium. In combination with batch experiments and RNA-seq analysis, the changes of MR-1 activity and function under different concentrations of  $H_2O_2$  and its regulatory mechanism were investigated. Results show that MR-1 could resist  $H_2O_2$  stress effectively, and  $H_2O_2$  enhanced the Fe(III)-reducing ability of MR-1. RNA-seq results show that MR-1 maintained in an anti-stress state infacing to  $H_2O_2$  disturbance, which could resist the negative effects of  $H_2O_2$  by actively oxidizing organic matter to provide energy and promoting the synthesis of catalase.

**Key words:** iron cycling; iron-reducing bacteria; oxidative stress; geological microorganism; environmental geology.

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(Nos. 41703113, 42025703).

**作者简介:** 赵雨溪(1997—), 女, 硕士研究生, 主要从事锰生物氧化研究. ORCID:0000-0002-7801-1602. E-mail:824813080@qq.com

\* **通讯作者:** 童曼, ORCID:0000-0002-0286-0608. E-mail:tongman@cug.edu.cn

**引用格式:** 赵雨溪, 孙群群, 童曼, 袁松虎, 2023. 铁还原菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 在  $H_2O_2$  扰动下的响应及机制. 地球科学, 48(4): 1649-1656.

**Citation:** Zhao Yuxi, Sun Qunqun, Tong Man, Yuan Songhu, 2023. Response and Mechanism of Iron-Reducing Bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1 to Perturbance of  $H_2O_2$ . *Earth Science*, 48(4): 1649-1656.

## 0 引言

铁(Fe)是地壳中含量第四的元素,主要以Fe(II)和Fe(III)大量存在于地表环境中(Melton *et al.*, 2014).铁还原菌介导的Fe(III)还原调控着沉积环境中污染物的迁移转化和生源元素的运移等过程,是地表系统中物质循环的重要驱动力(Borchet *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; 胡敏和李芳柏, 2014).铁还原菌(FeRB)通常为兼性厌氧菌,目前分离到的FeRB有200多株,其活性和功能与环境条件(如氧化还原条件、pH、阴阳离子浓度等)密切相关(Kumar and Riyazuddin, 2012; Zhou *et al.*, 2013).虽然铁还原菌通常在厌氧环境中发挥功能,但在自然和人为活动(如地表水—地下水交互、环境工程修复等)的扰动下,铁还原菌可与氧化性物种遭遇,研究该过程中铁还原菌生理生化过程及铁还原能力的变化对于阐明厌氧—好氧界面上的铁循环及其耦合的生物地球化学过程具有重要意义.

过氧化氢( $H_2O_2$ )是自然环境中普遍存在和环境工程修复中常用的活性氧化物质.地表水体中硝酸根/亚硝酸根和溶解性有机质的光化学反应、氧化还原波动带中的还原态物种(Fe(II)等)活化氧气、水生和陆生环境中的很多异养微生物是环境中 $H_2O_2$ 的天然来源(Vermilyea *et al.*, 2010; 张娜, 2021),国内外研究者在地表水、土壤孔隙水和潜水含水层中均检测到了稳定浓度水平的 $H_2O_2$  (nmol/L~ $\mu$ mol/L)(Yuan *et al.*, 2017).另外, $H_2O_2$ 是环境修复中常用的Fenton高级氧化试剂,土壤和地下水原位修复中注入地下环境的 $H_2O_2$ 浓度高达mmol~mol(潘玉兰, 2014; Bendouz *et al.*, 2017),例如,杜勇超等(2011)证明0.5 mol/L  $H_2O_2$ 是类Fenton试剂氧化降解土壤中PAHs的最佳浓度.铁还原菌广泛存在于地下水、湖泊、土壤等厌氧物体中,例如铁还原模式菌株*Shewanella oneidensis* MR-1分离自淡水湖(Esther *et al.*, 2015),而研究者在湖泊中监测到了 $H_2O_2$ (Wong and Wong, 2001),湖泊中的 $H_2O_2$ 主要源于光化学作用与异养微生物(异养菌、真菌、浮游植物)(Zhang *et al.*, 2016),化学与生物途径产生的 $H_2O_2$ 都会对铁还原菌造成氧化胁迫,从而影响铁还原菌参与的铁循环及其耦合元素的生物地球化学循环过程,例如将溶解的Cr(VI)还原为毒性和溶解性更小的Cr(III)(毛晖等, 2005).

虽然 $H_2O_2$ 对细菌的氧化胁迫及细菌的氧化应

激反应已被大量研究(Chen *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020; 屈婧祎等, 2021; 赵淑凤等, 2021),但 $H_2O_2$ 对地质微生物功能的影响鲜有报道. $H_2O_2$ 可进入细胞内部与胞内游离态 $Fe^{2+}$ 发生Fenton反应,产生羟自由基( $\cdot OH$ ),从而对细菌DNA、磷脂以及蛋白质造成破坏,导致细菌死亡(Brandi *et al.*, 1989).但铁还原菌作为一种兼性菌,可以通过分泌过氧化氢酶等酶类在一定程度上抵御 $H_2O_2$ 的氧化胁迫,目前对于不同浓度水平 $H_2O_2$ 扰动对铁还原菌活性的影响仍不清楚.另外,铁还原菌通过胞外分泌核黄素、Mtr呼吸通道传递电子、c-型细胞色素电子传递链等途径还原Fe(III),以上功能的实现通过一系列功能基因(如CymA、MtrA、PpcA等)的调控来完成(Pitts *et al.*, 2003; Schuetz *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2011),而目前 $H_2O_2$ 扰动下,铁还原菌代谢过程及还原能力的变化还不清楚.

针对以上问题,作者以*Shewanella oneidensis* MR-1作为铁还原菌的代表,结合室内批实验和转录组测序的研究手段,研究了不同浓度 $H_2O_2$ 影响下MR-1活菌生长和Fe(III)还原能力的变化,探究了MR-1对 $H_2O_2$ 的抵御能力,并分析了 $H_2O_2$ 扰动下MR-1关键功能基因的差异表达,旨在从分子层面阐明铁还原菌应对 $H_2O_2$ 扰动的响应及机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 微生物菌株及其培养

*Shewanella oneidensis* MR-1获取自美国标准菌种保存中心(ATCC).LB液体培养基(2 g 胰蛋白胍, 1 g 酵母提取物, 2 g NaCl, pH=7.0, 总体积500 mL)用于*Shewanella oneidensis* MR-1的活化、培养与保存.LB固体培养基(向500 mL LB液体培养基中加入20 g/L琼脂)用于*Shewanella oneidensis* MR-1的菌种保存和平板计数.

### 1.2 试剂

$H_2O_2$ 和NaCl购于上海国药集团化学试剂有限公司,二乙基对苯二胺(DPD, 97%)购于成都艾科达化学试剂有限公司,胰蛋白胍、酵母提取物购于英国Oxoid公司.过氧化氢酶检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司.本实验中所有溶液均使用18.2 M $\Omega$ ·cm去离子水配制(Heal Force NW ultra-pure water system).

### 1.3 实验方法

批实验在100 mL厌氧瓶中进行.首先将

50 mL LB 液体培养基加入厌氧瓶,随后加入 MR-1,使其最终浓度约为  $1 \times 10^7$  CFU/mL,然后加入不同浓度的  $H_2O_2$  (0  $\mu$ mol、50  $\mu$ mol、200  $\mu$ mol、1 000  $\mu$ mol),并于 26  $^\circ$ C、220 r/min 下恒温振荡培养 24 h. 不同反应时间点取样分析体系中 MR-1 的活菌数量、剩余  $H_2O_2$  浓度和过氧化氢酶的活性.

为探究  $H_2O_2$  对 MR-1 还原 Fe(III) 能力的影响,在不同浓度  $H_2O_2$  (0  $\mu$ mol、50  $\mu$ mol、200  $\mu$ mol、1 000  $\mu$ mol) 与 MR-1 反应 24 h 后,向厌氧瓶中吹氮 1 h 除氧,然后向体系中添加 5 mmol 水铁矿和 10 mmol L-乳酸钠,并于 30  $^\circ$ C、220 r/min 的摇床中反应,不同反应时间点取样分析溶解态 Fe(II) 及总 Fe 浓度. 以上所有实验均重复两次,平行样品的相对偏差小于 20%.

#### 1.4 化学分析

采用 DPD 分光光度法分析  $H_2O_2$  浓度. 在不同反应时间取 2 mL 样品,用孔径 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后,取 1 mL 滤液并加入 0.4 mL 磷酸缓冲盐 (pH = 6) 和 20  $\mu$ L 0.1% DPD 溶液,定容至 4 mL 后,于 551 nm 处测量吸光度.

利用平板计数法分析 MR-1 的活菌数量. 在不同反应时间,取 0.1 mL 样品,逐级连续稀释至适当浓度后,取 0.1 mL 稀释后的样品涂布在固体 LB 培养基上,每个样品按 2~3 个浓度梯度进行涂布. 涂布后,将培养皿放置于 30  $^\circ$ C 恒温培养箱中培养 24 h 后,对菌落数目进行计数.

利用邻菲罗啉分光光度法测定溶解态 Fe(II) 浓度. 在不同反应时间点取 2 mL 样品,使用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,取 1 mL 过滤后的样品,分别加入 1 mL 乙酸铵缓冲盐和 1 mL 0.5% 邻菲罗啉溶液,使用紫外分光光度计在 510 nm 波长处测定吸光度.

采用过氧化氢酶检测试剂盒进行过氧化氢酶 (CAT) 活性检测. 在不同反应时间点取 20  $\mu$ L 样品,加入 20  $\mu$ L 过氧化氢酶检测缓冲液和 10  $\mu$ L、250 mmol 过氧化氢溶液. 混匀后加入 450  $\mu$ L 过氧化氢酶反应终止液以终止反应. 取 20  $\mu$ L 已终止并混匀的上述反应体系,加入 80  $\mu$ L 过氧化氢酶检测缓冲液,再加入 2 mL 显色工作液,于 25  $^\circ$ C 孵育 15 min 后使用紫外分光光度计在 520 nm 波长处测定吸光度.

#### 1.5 转录组测序

采用转录组测序的方式检测  $H_2O_2$  扰动后,MR-1 基因表达的变化. 转录组测序工作由广东美

格基因科技有限公司完成. MR-1 在含有 0  $\mu$ mol  $H_2O_2$  (对照组) 和 5  $\mu$ mol  $H_2O_2$  的 LB 培养基 (处理组) 中培养 16 h. 采用 Trizol 法进行样品抽提,并用 ThermoNanoDrop One 和 Agilent 4200 Tape Station 进行样品质检;检测合格后,使用 Epicentre-Ribo-Zero rRNA Removal Kit 去除核糖体 RNA;使用 Illumina HiSeq2000 进行文库构建. 获得原始测序序列 (Raw Reads) 之后,使用 fastp 软件对数据进行过滤和质量评估,使用 Hisat2 将过滤后的 reads 比对到参考基因组,使用 Benjamini & Hochberg 法调整  $p$  值得到的  $p.adjust$ ,  $p.adjust < 0.05$  的  $|\log_2(FC)| > 1$  的基因为差异表达基因. 使用 RSEM 计算每个样本 read count 数目,基于 reads count 对转录本定量后,采用 edgeR 进行差异表达分析,从而鉴定样本间表达量发生差异的基因. 为了揭示差异基因与哪些生物学功能显著相关,使用 clusterProfiler 对差异基因的功能和通路进行 GO 富集分析 (GO, <http://www.geneontology.org>).  $p.adjust < 0.05$  的 GO 通路被认为显著富集.

## 2 结果与讨论

### 2.1 $H_2O_2$ 扰动下 MR-1 活性的变化

不同浓度  $H_2O_2$  对 MR-1 活性的影响如图 1 所示. MR-1 在 3 h 进入对数生长期,在 9 h 达到最大生物量. 50  $\mu$ mol  $H_2O_2$  对 MR-1 的生长速率及生物量无显著影响. 当  $H_2O_2$  浓度增加到 200  $\mu$ mol 时,MR-1 活菌数量在 3 h 内使下降了 0.29 个数量级,当  $H_2O_2$  浓度增加到 1 000  $\mu$ mol 时 MR-1 活菌数量下降了 3.08 个数量级,但 3 h 后 MR-1 均能恢复生长. 以上结果表明 MR-1 能有效应对  $H_2O_2$  的氧化胁迫,低于 50  $\mu$ mol 的  $H_2O_2$  不影响 MR-1 活性,高于 200  $\mu$ mol 的  $H_2O_2$  虽然会造成细菌的死亡,但剩余细菌在营养充足的条件下可恢复生长至初始水平.

为探究 MR-1 对  $H_2O_2$  的分解能力,分别测定了无菌体系及培养体系中水相  $H_2O_2$  的浓度变化. 如图 2 所示,无菌组各浓度水平的  $H_2O_2$  在 24 h 内均无显著降低,说明  $H_2O_2$  不会与 LB 培养基中的有机质发生显著反应,而在 MR-1 培养体系中  $H_2O_2$  浓度快速下降. 其中 50  $\mu$ mol 和 200  $\mu$ mol  $H_2O_2$  在 3 h 内完全分解,1 mmol  $H_2O_2$  在前 3 h 快速分解 76%,在 9 h 内完全分解. 以上  $H_2O_2$  的分解趋势与 MR-1 活菌数量在前 3 h 下降,随后恢复生长的趋势一致 (图 1).  $H_2O_2$  分解产生的  $O_2$  能作为电子受体维持 MR-1 生

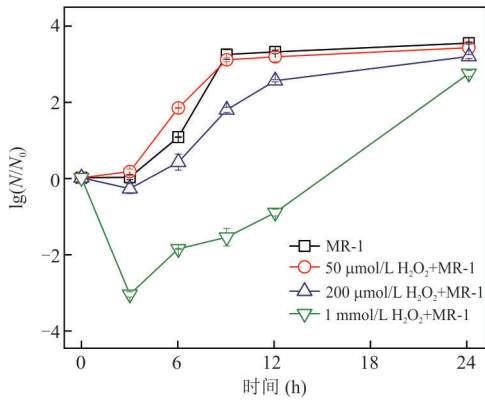


图1 不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>扰动下MR-1的生长曲线

Fig.1 Effects of different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the viability of MR-1

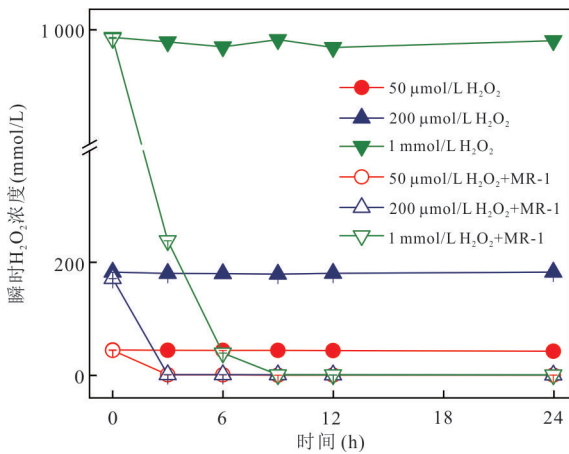


图2 有菌和无菌体系中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度变化

Fig.2 Variations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in the presence and absence of MR-1

存,但由于实验在敞口体系中进行,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分解产生的O<sub>2</sub>与空气中的O<sub>2</sub>相比浓度较低,不会成为额外的电子受体影响MR-1生长.以上结果表明,MR-1能快速分解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以抵御其负面影响.因此,作者进一步检测了不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>影响下MR-1体系中过氧化氢酶(CAT)活性的变化.如图3所示,无H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系中MR-1的CAT活性在24 h内均维持在较低水平(~1.5 U/mL),H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的添加显著提升了CAT的活性,当H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为50 μmol,200 μmol和1 000 μmol时,CAT活性分别增加至5.23 U/mL,7.08 U/mL和8.24 U/mL.以上结果证明MR-1能通过分泌CAT快速分解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>抵御其负面影响,因此低浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对MR-1活性无显著影响,高浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>虽然在初期会造成部分MR-1死亡,但在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>被CAT完全分解后MR-1仍可恢复生长.

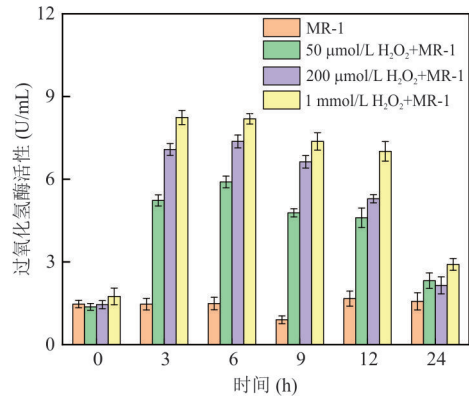


图3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对CAT活性的影响

Fig.3 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the activity of CAT

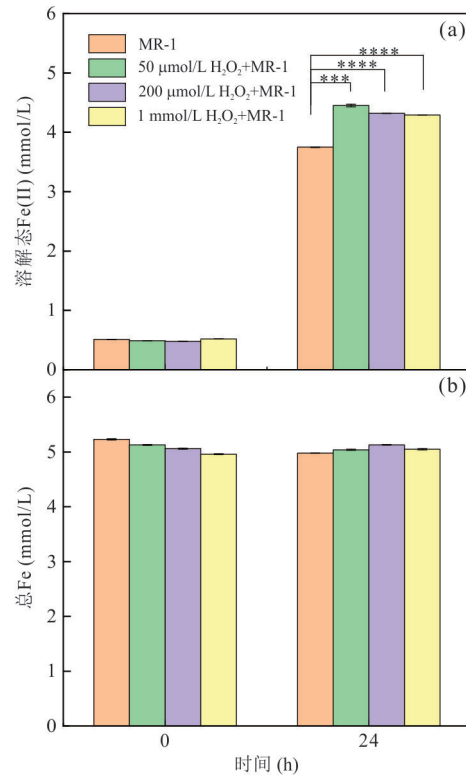


图4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对MR-1铁还原能力的影响

Fig.4 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on Fe(III) reduction capacity of MR-1  
与空白组相比,\*\*\*P<0.001,\*\*\*\*P<0.0001

## 2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>扰动下MR-1铁还原功能的变化

为探究H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对MR-1铁还原能力的影响,对比了经不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理24 h后MR-1对Fe(III)的还原能力.如图4所示,未经H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>影响的MR-1在24 h内还原了75%的Fe(III),而受H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>影响后的MR-1的Fe(III)还原能力反而得到了增强,50 μmol、200 μmol和1 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后的MR-1分别能在24 h内还原89%、86.4%、85.8%的



表 1 差异基因表达情况

Table 1 Differential gene expression results

基因 ID	log <sub>2</sub> (变化倍数)	P 值	描述
SO_RS10090	-5.67	$4.44 \times 10^{-93}$	海洋变形菌分选酶靶蛋白
SO_RS10085	-6.46	$7.06 \times 10^{-81}$	分选酶相关 ompa 样蛋白 PdsO
SO_RS10095	-3.96	$1.36 \times 10^{-58}$	GN 分选酶
SO_RS03930	-3.77	$8.98 \times 10^{-54}$	OXA-48 家族水解酶
SO_RS06920	3.39	$1.25 \times 10^{-45}$	苏氨酸脱氢酶基因
SO_RS07720	3.10	$7.72 \times 10^{-37}$	外膜蛋白 OmpW
SO_RS15335	3.00	$1.64 \times 10^{-35}$	细胞色素 d 泛醇氧化酶亚基 II
SO_RS17985	3.92	$6.21 \times 10^{-33}$	钼酸盐 ABC 转运蛋白底物结合蛋白
SO_RS15340	2.82	$6.21 \times 10^{-33}$	细胞色素泛醇氧化酶亚基 I
SO_RS10080	-3.28	$4.57 \times 10^{-28}$	变形菌分选酶系统反应调节器
SO_RS18135	2.50	$8.75 \times 10^{-28}$	孔蛋白
SO_RS13090	2.25	$1.56 \times 10^{-18}$	碳饥饿蛋白 A
SO_RS06640	2.20	$1.34 \times 10^{-17}$	钼喋呤支撑的氧化还原酶
SO_RS09405	1.97	$2.17 \times 10^{-17}$	蛋白-蛋氨酸-亚砷还原酶催化亚基 MsrP
SO_RS01505	3.27	$6.67 \times 10^{-17}$	鸟氨酸脱羧酶
SO_RS14360	2.08	$2.56 \times 10^{-15}$	Sigma70 家族 RNA 聚合酶因子
SO_RS21580	2.04	$2.98 \times 10^{-15}$	H 家族蛋白
SO_RS19750	-2.79	$4.06 \times 10^{-15}$	ISSod4 家族转座酶
SO_RS03335	1.89	$4.38 \times 10^{-15}$	分子伴侣 GroEL
SO_RS10010	2.51	$5.15 \times 10^{-15}$	细胞色素 C 氧化酶
SO_RS10075	-2.83	$1.57 \times 10^{-14}$	变形杆菌专用分选酶系统组氨酸激酶
SO_RS20140	-2.92	$2.08 \times 10^{-14}$	细胞包膜完整性蛋白 CreD
SO_RS04535	-1.76	$2.08 \times 10^{-14}$	ISSod2 家族转座酶
SO_RS09350	-1.76	$2.08 \times 10^{-14}$	ISSod2 家族转座酶
SO_RS09940	-1.76	$2.08 \times 10^{-14}$	ISSod2 家族转座酶
SO_RS19795	-1.76	$2.08 \times 10^{-14}$	ISSod2 家族转座酶
SO_RS21600	1.75	$1.49 \times 10^{-12}$	含有 DUF3300 结构域的蛋白
SO_RS08155	1.63	$3.25 \times 10^{-12}$	OmcA/MtrC 家族血红素 c 型细胞色素
SO_RS14365	1.80	$6.92 \times 10^{-12}$	含有 DUF3379 结构域的蛋白
SO_RS07745	1.70	$1.60 \times 10^{-11}$	辅酶 a 酰化甲基丙二酸半醛脱氢酶

Fe(III). 以上结果表明,虽然  $H_2O_2$  对 MR-1 前期的生长起阻滞作用,但当 MR-1 恢复生长至相近生物量后,其还原 Fe(III) 的能力反而得到了增强. 应对  $H_2O_2$  扰动时,MR-1 代谢过程可能发生改变,导致 MR-1 的代谢产物发生变化,丙酮酸等代谢产物可作为 Fe(III) 还原过程电子供体,代谢产物的组分和含量的差异可能导致 MR-1 铁还原能力的变化.

### 2.3 MR-1 对 $H_2O_2$ 扰动响应的分子机制

由于 MR-1 的抗氧化应激能力,低浓度  $H_2O_2$  不会引起 MR-1 生长的显著变化,但可能引起 MR-1 的代谢和铁还原功能的改变. 为了阐明 MR-1 对  $H_2O_2$  扰动响应的分子机制,作者选择了贴近自然环境、不会引起细菌显著死亡的  $5 \mu\text{mol}$  作为  $H_2O_2$  代表

浓度进行转录组测序,分析  $H_2O_2$  扰动后 MR-1 功能基因的差异性表达. 统计结果显示,具有显著表达差异的基因共有 211 个,其中 144 个基因显著上调,67 个基因显著下调,其中差异表达最显著的 30 个基因如表 1 所示.

值得注意的是, $H_2O_2$  扰动后,MR-1 的碳饥饿蛋白 A (carbon starvation protein A) 调控基因显著上调,碳饥饿蛋白会使细菌处于抗应激状态,对营养物质高度敏感,蛋白质合成速度提升,这意味着在面临  $H_2O_2$  扰动时 MR-1 处于氧化应激状态,且能通过积极合成碳饥饿蛋白提升 MR-1 摄取营养的能力,有利于包括过氧化氢酶在内的多种抗氧化应激酶的合成. 以上结果说明, $H_2O_2$  的胁迫使 MR-1 处

表 2 GO 富集分析结果

Table 2 GO enrichment analysis results

GO ID	描述	P 值	分类	差异基因数量
GO:1901606	$\alpha$ -氨基酸分解代谢过程	$6.13 \times 10^{-5}$	BP	8
GO:0009063	细胞氨基酸分解代谢过程	$1.18 \times 10^{-4}$	BP	8
GO:0016054	有机酸分解代谢过程	$1.11 \times 10^{-3}$	BP	8
GO:0046395	羧酸分解代谢过程	$1.11 \times 10^{-3}$	BP	8
GO:0055114	氧化还原过程	$3.00 \times 10^{-3}$	BP	25
GO:0006091	前体代谢产物和能量的产生	$3.36 \times 10^{-3}$	BP	14
GO:0044282	小分子分解代谢过程	$3.51 \times 10^{-3}$	BP	8
GO:1901565	有机氮化合物分解代谢过程	$3.56 \times 10^{-3}$	BP	8
GO:0016491	氧化还原酶	$8.02 \times 10^{-3}$	MF	24
GO:0006536	谷氨酸代谢过程	$1.15 \times 10^{-2}$	BP	4
GO:0009056	分解代谢过程	$1.27 \times 10^{-2}$	BP	11
GO:0044248	细胞分解代谢过程	$1.94 \times 10^{-2}$	BP	9
GO:0022900	电子传递链	$1.94 \times 10^{-2}$	BP	10
GO:0006574	缬氨酸分解代谢过程	$2.60 \times 10^{-2}$	BP	2
GO:1901575	有机物分解代谢过程	$2.60 \times 10^{-2}$	BP	10
GO:0015980	由有机化合物氧化产生的能量	$2.74 \times 10^{-2}$	BP	6
GO:0045333	细胞呼吸	$3.34 \times 10^{-2}$	BP	5
GO:0009259	核糖核苷酸代谢过程	$3.34 \times 10^{-2}$	BP	7
GO:0009156	磷酸核糖核苷生物合成过程	$3.34 \times 10^{-2}$	BP	5
GO:1901564	有机氮化合物代谢过程	$3.34 \times 10^{-2}$	BP	33

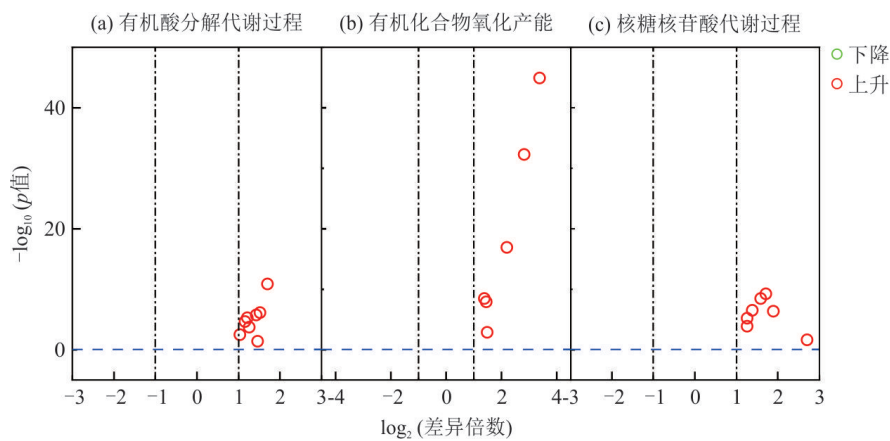


图 5 关键差异基因表达火山图

Fig.5 Volcano plot of key differential gene expression

于氧化应激状态,为抵抗  $H_2O_2$  的负面影响,碳饥饿蛋白 A 的合成得到促进,使 MR-1 积极摄取能量,并分泌过氧化氢酶对细胞内出现的多余  $H_2O_2$  进行淬灭,从而应对氧化应激以维持细菌生长。

MR-1 对  $H_2O_2$  扰动的响应包括多种代谢通路的变化.为了探究  $H_2O_2$  对 MR-1 代谢通路的影响,利用 GO 数据库将差异基因分为分子生物功能(Molecular function)、生物过程(Biological process)和细胞组分(Cellular Components)三类.其中生物

过程中有 44 个 GO 通路显著富集,分子生物功能中有 3 个 GO 通路显著富集,富集最显著的 20 个 GO 通路如表 2 所示.GO 通路富集结果表明, $H_2O_2$  扰动后,MR-1 有机酸代谢过程(谷氨酸、缬氨酸、甘氨酸、组氨酸、丝氨酸等)调控基因明显上调(图 5a),表明 MR-1 更积极地利用 LB 培养基中有机质底物,通过氧化有机物释放大量的能量(图 5b),这与碳饥饿蛋白调控基因明显上调的现象一致,此外,MR-1 核苷酸代谢过程也表现得更积极(图 5c),表

明 MR-1 体内的产能代谢更加活跃,这意味着 MR-1 产生大量能量用于应对  $H_2O_2$  扰动导致的氧化应激并维持细菌的生长.综上所述,在  $H_2O_2$  的影响下,MR-1 代谢有机物的能力提升以应对的  $H_2O_2$  扰动带来的负面影响并维持 MR-1 生长.

### 3 结论

(1)MR-1 在  $H_2O_2$  胁迫下处于抗应激状态,通过促进过氧化氢酶的合成分解  $H_2O_2$  抵御氧化胁迫,低浓度  $H_2O_2$  ( $<50 \mu\text{mol}$ ) 不影响 MR-1 活性,高浓度  $H_2O_2$  ( $>200 \mu\text{mol}$ ) 虽然会造成细菌的部分死亡,但  $H_2O_2$  被 CAT 分解完全后剩余细菌在营养充足的条件下可恢复生长至初始水平.

(2) $H_2O_2$  扰动促进了 MR-1 代谢有机物的能力,提供能量用于 MR-1 应对氧化应激与维持生长.

### References

- Bendouz, M., Tran, L. H., Coudert, L., et al., 2017. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Different Synthetic Solutions by Fenton's Oxidation. *Environmental Technology*, 38(1): 116–127. <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1188161>
- Borch, T., Kretzschmar, R., Kappler, A., et al., 2010. Biogeochemical Redox Processes and Their Impact on Contaminant Dynamics. *Environmental Science & Technology*, 44(1): 15–23. <https://doi.org/10.1021/es9026248>
- Brandi, G., Cattabeni, F., Albano, A., et al., 1989. Role of Hydroxyl Radicals in *escherichia-coli* Killing Induced by Hydrogen-Peroxide. *Free Radical Research Communications*, 6(1): 47–55. <https://doi.org/10.3109/10715768909073427>
- Chen, R., Liu, H., Tong, M., et al., 2018. Impact of Fe(II) Oxidation in the Presence of Iron-Reducing Bacteria on Subsequent Fe(III) Bioreduction. *Science of the Total Environment*, 639: 1007–1014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.241>
- Du, Y.C., Dou, J.F., Ding, A.Z., et al., 2011. Study on Characteristics and Influencing Factors of PAHs Degradation in Soil by Fenton-Like Reagent. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 5(8): 1882–1886 (in Chinese with English abstract).
- Esther, J., Sukla, L. B., Pradhan, N., et al., 2015. Fe (III) Reduction Strategies of Dissimilatory Iron Reducing Bacteria. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32(1): 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11814-014-0286-x>
- Hu, M., Li, F.B., 2014. Soil Microbe Mediated Iron Cycling and Its Environmental Implication. *Acta Pedologica Sinica*, 51(4): 683–698 (in Chinese with English abstract).
- Kumar, A. R., Riyazuddin, P., 2012. Seasonal Variation of Redox Species and Redox Potentials in Shallow Groundwater: A Comparison of Measured and Calculated Redox Potentials. *Journal of Hydrology*, 444: 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2012.04.018>
- Li, Y. C., Yu, S., Strong, J., et al., 2012. Are the Biogeochemical Cycles of Carbon, Nitrogen, Sulfur, and Phosphorus Driven by the “Fe-III-Fe-II Redox Wheel” in Dynamic Redox Environments? *Journal of Soils and Sediments*, 12(5): 683–693. <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0507-z>
- Ma, C., Zhou, S., Zhuang, L., Wu, C., 2011. Electron Transfer Mechanism of Extracellular Respiration: A Review. *Acta Ecologica Sinica*, 31: 2008–2018.
- Mao, H., Qu, D., Zhou, L. N., 2005. Effect of Variant Chromate and Ferrihydrite on Dissimilatory Fe (III) Reduction in Paddy Soil. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 21(6): 235–237 (in Chinese with English abstract).
- Melton, E. D., Swanner, E. D., Behrens, S., et al., 2014. The Interplay of Microbially Mediated and Abiotic Reactions in the Biogeochemical Fe Cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 12(12): 797–808. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3347>
- Pan, Y.L., 2014. The Oxidative Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water and Soil by Fenton's Reagent (Dissertation). Nanjing Agricultural University, Nanjing (in Chinese with English abstract).
- Pitts, K. E., Dobbin, P. S., Reyes-Ramirez, F., et al., 2003. Characterization of the *Shewanella Oneidensis* MR-1 Decaheme Cytochrome MtrA. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30): 27758–27765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302582200>
- Qu, J.Y., Tong, M., Yuan, S.H., 2021. Effect and Mechanism of Fe(II) Oxygenation on Activities of Iron and Manganese Cycling Functional Microbes. *Earth Science*, 46(2): 632–641 (in Chinese with English abstract).
- Schuetz, B., Schicklberger, M., Kuermann, J., et al., 2009. Periplasmic Electron Transfer via the c-Type Cytochromes MtrA and FccA of *Shewanellaoneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24): 7789–7796. <https://doi.org/10.1128/aem.01834-09>
- Vermilyea, A. W., Hansard, S. P., Voelker, B. M., 2010. Dark Production of Hydrogen Peroxide in the Gulf of Alaska. *Limnology and Oceanography*, 55(2): 580–

588. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.55.2.0580>
- Wong, A. Y. L., Wong, G. T. F., 2001. The Effect of Spectral Composition on the Photochemical Production of Hydrogen Peroxide in Lake Water. *Terrestrial Atmospheric and Oceanic Sciences*, 12(4): 695–704. [https://doi.org/10.3319/tao.2001.12.4.695\(o\)](https://doi.org/10.3319/tao.2001.12.4.695(o))
- Yuan, X., Nico, P. S., Huang, X., et al., 2017. Production of Hydrogen Peroxide in Groundwater at Rifle, Colorado. *Environmental Science & Technology*, 51(14): 7881–7891. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04803>
- Zhang, N., 2021. Distribution and Production Mechanisms of Hydrogen Peroxide in Riparian Unconfined Aquifers (Dissertation). China University of Geosciences, Wuhan (in Chinese with English abstract).
- Zhang, T., Hansel, C. M., Voelker, B. M., et al., 2016. Extensive Dark Biological Production of Reactive Oxygen Species in Brackish and Freshwater Ponds. *Environmental Science & Technology*, 50(6): 2983–2993. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03906>
- Zhang, Y., Tong, M., Yuan, S., et al., 2020. Interplay between Iron Species Transformation and Hydroxyl Radicals Production in Soils and Sediments during Anoxic–Oxic Cycles. *Geoderma*, 370. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114351>
- Zhao, S. F., Liu, H., Zhao, L., et al., 2021. Responses of Different Iron and Nitrogen Transformation Functional Microorganisms to Fe(II) Chemical Oxidation. *Earth Science*, (4): 1481–1489 (in Chinese with English abstract).
- Zhou, G., Yin, J., Chen, H., et al., 2013. Combined Effect of Loss of the *caa3* Oxidase and Crp Regulation Drives *Shewanella* to Thrive in Redox-Stratified Environments. *ISME Journal*, 7(9): 1752–1763. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.62>

#### 附中文参考文献

- 杜勇超, 豆俊峰, 丁爱中, 等, 2011. 类 Fenton 试剂氧化降解土壤中 PAHs 及其影响因素研究. 环境工程学报, 5(8): 1882–1886.
- 胡敏, 李芳柏, 2014. 土壤微生物铁循环及其环境意义. 土壤学报, 51(4): 683–698.
- 毛晖, 曲东, 周莉娜, 2005. 稻田土壤中添加不同浓度铬对异化铁还原和铬还原的影响. 中国农学通报, 21(6): 235–237.
- 潘玉兰, 2014. Fenton 试剂氧化降解水和土壤中多环芳烃 (硕士学位论文). 南京: 南京农业大学.
- 屈婧祎, 童曼, 袁松虎, 2021. 二价铁氧化对铁锰循环功能微生物活性的影响及机制. 地球科学, 46(2): 632–641.
- 张娜, 2021. 河岸带潜水含水层过氧化氢的分布规律和产生机制(博士学位论文). 武汉: 中国地质大学.
- 赵淑凤, 刘慧, 赵磊, 等, 2021. 不同铁、氮转化功能微生物对 Fe(II) 化学氧化的响应. 地球科学, 46(4): 1481–1489.