



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202008254

中图分类号 X703

文献标识码 A

苑心, 李鹏松, 顾予一, 等. 微生物燃料电池中地杆菌对 Ag^+ 的耐受机理及其对产电性能的影响[J]. 环境工程学报, 2021, 15(6): 2126-2132.

YUAN Xin, LI Pengsong, GU Yuyi, et al. Tolerance mechanism of *Geobacter sulfurreducens* to silver ion and its effects on electricity generation in microbial fuel cell[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(6): 2126-2132.

微生物燃料电池中地杆菌对 Ag^+ 的耐受机理及其对产电性能的影响

苑心, 李鹏松, 顾予一, 陈浩强, 孙德智, 党岩*

北京林业大学环境科学与工程学院, 水体污染源控制技术北京市重点实验室, 污染水体源控制与生态修复技术北京市高等学校工程研究中心, 北京 100083

第一作者: 苑心(1998—), 女, 大学本科。研究方向: 水污染的生物修复和检测技术。E-mail: yuanxingr98@163.com

*通信作者: 党岩(1983—), 男, 博士, 教授。研究方向: 环境微生物学。E-mail: yandang@bjfu.edu.cn

摘要 微生物燃料电池(MFC)是污水处理领域的一个研究热点,地杆菌(*Geobacter*)因其出色的产电能力被广泛关注。自然水环境中,重金属等具有生物毒性的组分会影响*Geobacter*的生长生存和产电能力,进而影响MFC的产电性能。*Geobacter*对 Ag^+ 等多种重金属具有较强的耐受能力,然而其耐受较高浓度重金属的机理尚不明晰。选用*Geobacter*的模式菌株硫还原地杆菌(*Geobacter sulfurreducens*)作为研究对象,研究了*copZ*基因对*G. sulfurreducens*耐受 Ag^+ 的调控作用。结果表明:在 $0.05\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ag}^+$ 的培养条件下,野生型*G. sulfurreducens*的*copZ*基因转录量提升了24.8倍;当把*copZ*基因从*G. sulfurreducens*基因组中敲除后,*G. sulfurreducens*对 Ag^+ 的耐受能力显著下降,在 Ag^+ 浓度为 $0.01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养条件下,*copZ*基因缺失型*G. sulfurreducens*菌株的生长速率仅为 Ag^+ 浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养条件下野生型*G. sulfurreducens*的33.3%;在接种*copZ*基因缺失型*G. sulfurreducens*菌株的MFC体系内加入 $0.05\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ag}^+$ 后,MFC的电流减小6.99%。本研究结果证明了*copZ*基因对*G. sulfurreducens*耐受 Ag^+ 具有明显的调控作用,揭示了较高浓度 Ag^+ 对MFC体系中*G. sulfurreducens*产电性能的影响机制。

关键词 微生物燃料电池; 硫还原地杆菌; *copZ*基因; 重金属抵抗; 银离子

微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)是污水处理领域的一个研究热点。MFC阳极表面生长的产电微生物的生长、活性和产电能力对MFC的性能、污水处理的效果均有重要影响。地杆菌(*Geobacter*)因其出色的产电能力成为这类微生物中广泛被学术界关注的电活性细菌^[1]。然而,污水中重金属等具有生物毒性的组分会影响*Geobacter*的生长生存和产电能力,进而制约MFC的产电性能和运行效果^[2]。因此,研究*Geobacter*对重金属的耐受机制对MFC在污水处理领域的应用和发展具有重要意义和现实价值。

银及其相关产品广泛应用于电子、电镀、感光材料、化工工业和科研领域。其中,照相业和电镀业是可溶性含银废液的2大主要来源,主要涉及到定影废液和电镀废液^[3]。以定影废液为例,

收稿日期: 2020-08-28; 录用日期: 2021-01-26

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(2019ZY19); 国家自然科学基金资助项目(51708031)

世界每年生产感光材料所消耗的白银在3 000 t以上, 我国每年的消耗量也超过了100 t。在洗印过程中, 这些感光材料中70%以上的Ag会溶解进入定影废液^[4]。除了工业含银废水, Ag在环境中的迁移还来自于金属银纳米颗粒(nAg)。银纳米颗粒是一种广泛应用的抗菌剂。自2010年以来, 我国纳米银抗菌剂的市场需求量已超过 5×10^6 t^[5]。然而, 人类活动释放的银纳米颗粒进入自然生态环境中会形成银胶体。银胶体主要以银单质颗粒和银离子(Ag⁺)形式存在^[6]。同时, 银胶体的毒性主要来源于Ag⁺^[7], 应妥善监测和处理。

细菌对重金属的耐受能力即其细胞结构具有的将有毒金属离子外排或泵出细胞的能力。目前, 已发现3种将有毒重金属转运排出细胞的机制, 分别依赖于抗瘤细胞分裂蛋白(resistance-nodulation-cell division super family, RND)家族、助阳离子扩散体(cation diffusion failitator, CDF)家族和P型ATP酶(P-type ATPase)家族。其中, 由P型ATP酶驱动的金属外排被认为是细菌抵抗重金属毒性的主要模式^[8]。在基于P型ATP酶的重金属抵抗模式中, 有毒重金属离子(如Ag⁺、Cu²⁺)进入细胞后会诱导细胞合成CopZ和CopA蛋白。其中, CopZ蛋白负责结合细胞质中的金属离子, 并将其转移至位于细胞膜的转运蛋白CopA上, 并由CopA将其转运出细胞^[8]。因此, 由copZ基因编码的CopZ蛋白对细菌抵抗重金属毒性具有重要作用。然而, 不同细菌利用P型ATP酶家族系统所能抵抗的重金属种类存在较大差别, 需要分别探究。

截至目前, 对于*Geobacter*的P型ATP酶系统耐受重金属的研究尚未见报道。本研究以*Geobacter*的模式菌种硫还原地杆菌(*Geobacter sulfurreducens*)为代表, 研究其对Ag⁺的耐受能力, 并对其P型ATP酶系统中copZ基因对Ag⁺耐受能力的内在影响机制进行深入探究, 以期在MFC系统内揭示较高浓度Ag⁺对*G. sulfurreducens*产能性能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验菌株培养条件及生长速率的测定方法

本研究中所用菌株为实验室收集保存的野生型*Geobacter sulfurreducens* DL1(ATCC 51573), 在含有10 mmol·L⁻¹的乙酸作为唯一电子供体和50 mmol·L⁻¹的富马酸作为唯一电子受体的厌氧培养基中恒温(30 °C)培养。

培养基的制备: 每升去离子水中加入0.42 g KH₂PO₄、0.22 g K₂HPO₄、0.2 g NH₄Cl、0.38 g KCl、0.36 g NaCl、0.04 g CaCl₂·2H₂O、0.10 g MgSO₄·7H₂O、1.80 g NaHCO₃、0.50 g Na₂CO₃、2.04 g NaC₂H₃O₂·3H₂O、6.40 g Na₂C₄H₄O₄, 再加入0.50 mL质量分数为0.1%刃天青, 1 mL浓度为100 mmol·L⁻¹的Na₂SeO₄溶液, 10 mL维生素溶液以及10 mL微量矿物质溶液。维生素溶液成分参考文献^[9]。微量矿物质溶液的制备: 每升去离子水中添加0.10 g MnCl₂·4H₂O、0.3 g FeSO₄·7H₂O、0.17 g CoCl₂·6H₂O、0.20 g ZnSO₄·7H₂O、0.30 g CuCl₂·2H₂O、0.005 g AlK(SO₄)₂·12H₂O、0.005 g H₃BO₃、0.09 g Na₂MoO₄、0.11 g NiSO₄·6H₂O及0.2 g Na₂WO₄·2H₂O。

Ag⁺以硝酸银(AgNO₃)形式添加, 浓度为0.000 1~1 mmol·L⁻¹。在厌氧条件下, 用一次性无菌注射器从接种培养后的培养基中取出1 mL菌液至一次性比色皿中, 在可见分光光度计600 nm波长下检测菌液的OD值, 再根据培养时间换算出生长速率^[10]。

1.2 定量反转录PCR分析相关基因转录量的方法

用上述培养基培养野生型*G. sulfurreducens*。培养条件分别为菌液中不加Ag⁺和添加0.05 mmol·L⁻¹的Ag⁺。培养至指数增长后期后, 使用RNEasy Plus minikit(Qiagen)提取RNA, 并用不含DNA的DNase(Ambion)处理。RNA样品纯度通过琼脂糖凝胶电泳进行检查, A₂₆₀/A₂₈₀的比率为1.8~2.0, 并用相关基因引物以提取的RNA样品为模版进行PCR扩增, 确保RNA样品不含DNA污染。最后, 用Superscript III first-strand synthesis SuperMix(Invitrogen)试剂盒将纯化后的RNA样品反转录为cDNA。

从美国能源部联合基因组研究所网站 (www.jgi.doe.gov) 获得基因组序列数据用于设计定量反转录 PCR (qRT-PCR) 引物, 主要关注的基因包括助阳离子扩散体 (CDF) 家族的 *cdf1* (GSU0487)、*cdf2* (GSU2613), 抗瘤细胞分裂蛋白 (RND) 家族的 *czcA1* (GSU3400)、*czcA2* (GSU0830) 和 P 型 ATP 酶 (P-type ATPase) 家族的 *copZ* (GSU1338)、*copA* (GSU2452) (见表 1)。然后, 以上述反转录的 cDNA 为模版, 用 7500 qPCR 系统 (Applied Biosystems) 进行 qRT-PCR 扩增和检测, 并用已知浓度的纯化 cDNA 做系列稀释, 构建覆盖 6 个数量级的标准曲线。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

引物名称	前引物序列	后引物序列
copZ_45f/168r	AGTGATCGTGGTGGTCTCT	GAGCGTCTCTCGATCTTGC
copA_2263f/2368r	GCCGGGGTCTCTACTATCC	GGAGCAGGATCGAGTTGGTC
czcA1_451f/561r	CCCATGGAGTTGAAGGAGAC	CACTTGGTACTGCCGCTTTT
czcA2_2276f/2374r	AAGAGAACCGCAGCTTCGAC	TGCCGGTTTTCTAGTAGTATG
cdf1_681f/796r	GGTCAATGCCGTTTCATCAGA	GTCGTAGAACCTCGGCTTGC
cdf2_781f/876r	ATCGCCACGTGTGTCAAAAA	ATCCTCATGCTCCTCGTCGT

1.3 *copZ* 基因缺失型 *Geobacter sulfurreducens* 菌株的构建

构建 *copZ* 基因缺失型 *G. sulfurreducens* 菌株采用基因重组方法^[11], 对 *G. sulfurreducens* DL1 的 *copZ* 基因的上游和下游各约 500 bp 的区域设计 PCR 引物 (见表 2), 并在上游后引物的 3' 端和下游前引物的 5' 端添加 AvrII (CCTAGG, NEB) 限制性酶切位点。对 *copZ* 基因的上游和下游区间进行高保真的 JumpStart AccuTaq LA DNA 聚合酶 (Sigma-Aldrich) 的 PCR 扩增, 产物用 AvrII 限制性核酸内切酶 (NEB, Beverly, MA) 消化, 乙醇沉淀, 并与 T4 DNA 连接酶 (NEB) 连接。然后将连接反应混合物的约 1 kb 长度的产物条带进行琼脂糖凝胶回收 (Qiaquick 凝胶提取试剂盒 Qiagen), 并连接到 pCR2.1 TOPO 克隆载体中, 形成 PCR2.1 上游 5'+3' 下游质粒, 通过 Sanger 测序以验证克隆产物的序列。然后提取测序结果完全准确的克隆子的质粒载体, 再用 AvrII 限制性核酸内切酶消化, 用 T4 DNA 连接酶将消化产物与同样用 AvrII 酶切处理过的庆大霉素抗性基因片段连接形成 PCR2.1 上游 5'+庆大霉素抗性基因+3' 下游质粒, 测序验证质粒序列的准确性。接着用限制性内切酶 KpnI (GGTACC, NEB) 对上述构建的质粒进行酶切使质粒线性化。线性化的质粒通过电转进入 *G. sulfurreducens* 菌株的感受态细胞, 方法见文献^[9]。最后, 利用厌氧手套箱中制备的已添加了 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 庆大霉素的 NBAF 固体培养基筛选 *copZ* 基因缺失型 *G. sulfurreducens* 菌株, 并通过 PCR 检验 *copZ* 基因是否被替换成功。

表 2 *copZ* 基因上游和下游引物序列
Table 2 Primer sequences for upstream and downstream of *copZ*

引物名称	引物序列
copZ_up_f	GATGCGGCCGTC AACGTCAA
copZ_up_r	TATCATGACAGGCTCCTTTGAAG
copZ_dwn_f	TATACCGGCAGTACCACCGCCTT
copZ_dwn_r	TCGGTGCGGAAGTCTTGTGTC

1.4 MFC 体系装置及运行条件

反应体系由 2 组双极室 MFC 组成, 阴阳两极室的容积均为 250 mL, 并由质子膜 (CMI; CMI7000, Membranes International Inc., 美国) 隔开。每升阴阳极溶液含 0.42 g KH_2PO_4 、0.22 g K_2HPO_4 、0.20 g NH_4Cl_2 、0.38 g KCl 、0.36 g NaCl 、0.04 g $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.10 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.80 g NaHCO_3 、0.50 g Na_2CO_3 , 以及 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Na_2SeO_4 溶液 10 mL、10 mL 微量矿物质溶液和 15 mL 维生素溶液^[9]。阳极室培养液中还加入 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸作为唯一电子供体。配制时将以上组分溶解于 800 mL 去离子

水中, 溶解后定容至 1 L, 各取 200 mL 溶液并用 N₂:CO₂=80:20 的混合气曝气 30 min。阳极室用丁腈橡胶塞密封以保证厌氧环境, 并利用磁力搅拌器进行搅拌。阴阳极均为石墨棒电极 (Φ 6 mm×80 mm), 参比电极为饱和甘汞电极 (相对标准氢电势为 +199 mV)。分别在 2 组 MFC 的阳极室接种野生型 *G. sulfurreducens* 和 *copZ* 基因缺失型 *G. sulfurreducens*。通过电化学工作站 (CHI1030C, 上海辰华仪器有限公司) 控制阳极电势为 +300 mV, 同时监测 2 组 MFC 的输出电流。

2 结果与讨论

2.1 *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺ 耐受的相关基因表达分析

根据助阳离子扩散体 (CDF) 家族、抗癌细胞分裂蛋白 (RND) 家族、P 型 ATP 酶家族这 3 种已知金属转运机制, 选取了 *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺ 耐受性可能相关的助阳离子扩散体 (CDF) 家族的 *cdf1/cdf2* 基因、抗癌细胞分裂蛋白 (RND) 家族的 *czcA1/czcA2* 基因和 P 型 ATP 酶家族的 *copA/copZ* 基因进行研究。分别在不加 Ag⁺ 和已添加 0.05 mmol·L⁻¹ Ag⁺ 条件下, 对野生型 *G. sulfurreducens* 的上述基因的转录量进行比较分析, 结果如图 1 所示。

由图 1 可见, Ag⁺ 的存在对 *cdf1* 和 *czcA1* 的表达量影响较小, 可推测这 2 种基因与 *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺ 解毒特性的相关性并不大。在 Ag⁺ 浓度为 0.05 mmol·L⁻¹ 的条件下, Ag⁺ 的存在对 *cdf2* 与 *czcA2* 的表达量有一定影响, *cdf2* 与 *czcA2* 的表达量分别增加了 3.5 倍与 4.2 倍。而对于与 P-ATPase 家族相关的 *copZ* 和 *copA* 基因, 在 Ag⁺ 的浓度为 0.05 mmol·L⁻¹ 的培养条件下, 其表达量分别提升了 24.8 倍与 8.1 倍。*copZ* 基因的表达量变化受 Ag⁺ 的影响更为明显。

由 *copZ* 基因所编码的 CopZ 蛋白是一种金属伴侣蛋白, 其在多种细菌如海氏肠球菌^[12] (*Enterococcus hirae*)、枯草芽孢杆菌^[13] (*Bacillus subtilis*) 等耐受某种特定重金属 (如 Cu²⁺) 的过程中发挥了重要作用。由此可推测, *copZ* 对 Ag⁺ 的响应相比于其他重金属转运相关基因更为显著, 可能调控了 *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺ 的耐受能力。

2.2 *copZ* 基因对 *G. sulfurreducens* 菌株耐受 Ag⁺ 的浓度阈值的影响

为进一步证实 *copZ* 基因在 *G. sulfurreducens* 耐受 Ag⁺ 过程中的关键作用, 本研究通过同源重组的方式构建了 *copZ* 基因缺失型 *G. sulfurreducens* 菌株, 且在不同 Ag⁺ 浓度的培养条件下, 分别研究了野生型与 *copZ* 基因缺失型的 *G. sulfurreducens* 菌株对 Ag⁺ 耐受浓度阈值, 结果如图 2 所示。

由图 2(a) 可知, 野生型 *G. sulfurreducens* 菌株对 Ag⁺ 浓度耐受能力较强, 当 Ag⁺ 浓度为 0~0.075 mmol·L⁻¹ 时, *G. sulfurreducens* 菌株生长速率可保持在 0.10 h⁻¹ 左右。随着 Ag⁺ 浓度的增大, *G. sulfurreducens* 菌株生长速率虽有下降, 但在 Ag⁺ 浓度增大至 1.00 mmol·L⁻¹ 时, 菌株生长速率仍能达到 0.046 h⁻¹。其他细菌, 如埃希大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 对 Ag⁺ 的耐受浓度仅为 7×10⁻⁴~9×10⁻⁴ mmol·L⁻¹^[14], 由此说明, 野生型 *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺ 有很强的耐受能力。

然而, 从图 2(b) 可知, 当 *copZ* 从 *G. sulfurreducens* 的基因组中敲除后, *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺ 的耐受能力显著下降。在 Ag⁺ 浓度高于 0.01 mmol·L⁻¹ 时, *copZ* 基因缺失型菌株的生长受到明显

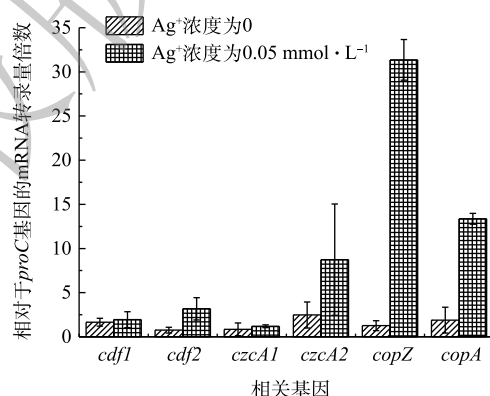
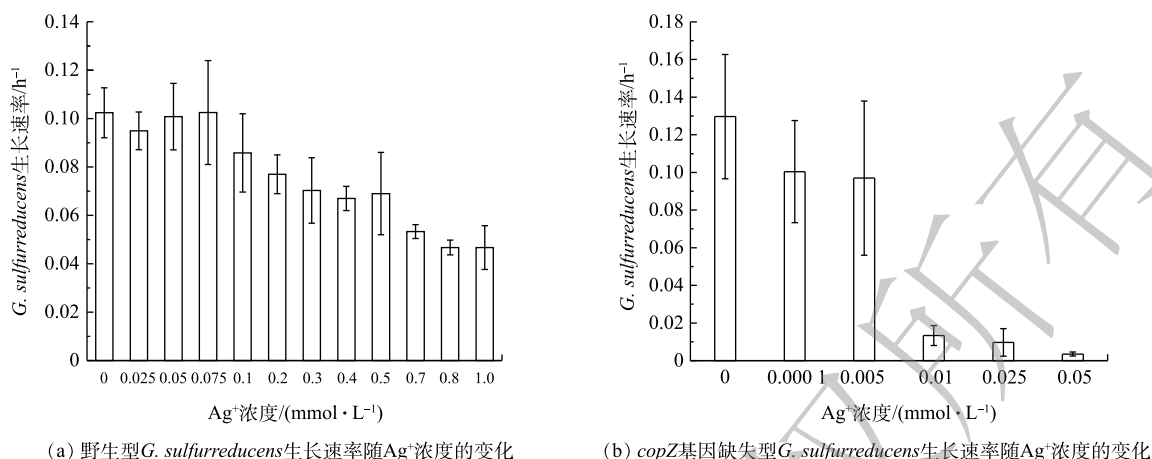


图 1 不添加和添加 Ag⁺ 条件下 *G. sulfurreducens* 重金属转运相关基因表达变化对比

Fig. 1 Comparison of the expression changes of heavy metal transport related genes in *G. sulfurreducens* in the absence or presence of Ag⁺

(a) 野生型*G. sulfurreducens*生长速率随 Ag^+ 浓度的变化(b) *copZ*基因缺失型*G. sulfurreducens*生长速率随 Ag^+ 浓度的变化图2 野生型与 *copZ* 基因缺失型 *G. sulfurreducens* 菌株对 Ag^+ 的耐受浓度阈值Fig. 2 Tolerance threshold of wild-type and *copZ*-deficient *G. sulfurreducens* strains to Ag^+ concentration

抑制, 生长速率低于 0.013 h^{-1} , 仅为野生型 *G. sulfurreducens* 菌株在 Ag^+ 浓度为 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养条件下的 33.3%。由此可见, *copZ* 的缺失使 *G. sulfurreducens* 对 Ag^+ 的耐受浓度阈值降低了约 100 倍, 也证实了 *copZ* 参与了 *G. sulfurreducens* 对 Ag^+ 耐受能力的调控。由于 *copZ* 的高表达协助了 *G. sulfurreducens* 菌株对 Ag^+ 的解毒, 从而保证了其生长速率, 而缺失了 *copZ* 的 *G. sulfurreducens* 菌株的生长则受到了 Ag^+ 毒性的抑制。

2.3 Ag^+ 对 *G. sulfurreducens* 产电性能的影响

G. sulfurreducens 具有出色的产电能力。分别构建接种野生型与 *copZ* 基因缺失型 *G. sulfurreducens* 菌株的 MFC 体系, 通过对比 2 组 MFC 的电化学性能, 探究 *copZ* 的缺失对于 *G. sulfurreducens* 产电能力的影响, 同时在稳定运行 24 h 后, 向 2 组 MFC 阳极室加入 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ag^+ , 研究 Ag^+ 的存在对 2 种 *G. sulfurreducens* 菌株产电能力的影响, 结果如图 3 所示。

由图 3 可见, 当体系中不存在 Ag^+ 时, 2 种菌株产电性能差别不大, 体系输出电流均为 0.29 mA 左右。当体系运行 24 h 时加入 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ag}^+$ 后, 接种野生型 *G. sulfurreducens* 菌株的 MFC 体系电流出现了短暂下降, 后又回升至原来的电流水平。这可能是由于 Ag^+ 的出现对于 MFC 阳极中的 *G. sulfurreducens* 细胞产生了一定毒害作用, 但由于 *copZ* 基因的存在, 野生型 *G. sulfurreducens* 可以实现 Ag^+ 的解毒, 适应该 Ag^+ 浓度下的生存环境, 使 MFC 体系电流又得以恢复。然而, 加入 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ag}^+$ 后, 接种了 *copZ* 基因缺失型 *G. sulfurreducens* 菌株的 MFC 系统的电流持续下降, 表明基因缺失型 *G. sulfurreducens* 菌株的产电能力受到了外加 Ag^+ 的影响, 且无法自我恢复。当体系运行到 90 h 后, 体系电压由加入 Ag^+ 前的 0.29 mA 下降到加入 Ag^+ 后的 0.27 mA , 下降了 6.99%。

copZ 基因编码的金属伴侣 CopZ 蛋白与 P-ATPase 金属转运机制密切相关, 当 CopZ 蛋白与金属结合后能够促进其外排^[15]。根据前文叙述的实验结果, 当环境中 Ag^+ 浓度超过 *G. sulfurreducens* 细胞的适应范围时, 野生型菌株

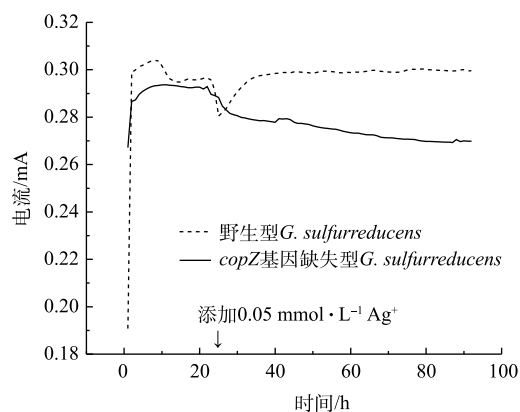


图3 Ag^+ 对分别接种了野生型与 *copZ* 基因缺失型 *G. sulfurreducens* 菌株的 MFC 系统的产电性能的影响
Fig. 3 Effect of Ag^+ on the electricity production performance of MFC systems inoculated with wild-type and *copZ*-deficient *G. sulfurreducens* strains

可通过细胞质中的 CopZ 蛋白将 Ag⁺运送到跨膜金属结合位点上, 激活基于 P-ATPase 的 Ag⁺转运机制, 从而保持细胞内 Ag⁺浓度的稳定, 继而维持自身的生长与生命活动。在此过程中, *copZ* 基因通过调控 CopZ 蛋白的表达影响了 *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺的耐受。

低浓度 Ag⁺对 *copZ* 基因缺失型 *G. sulfurreducens* 菌株的产电能力会产生影响, 进而改变 MFC 的输出电压。因此, *copZ* 基因对 *G. sulfurreducens* 的 Ag⁺毒性的解毒起到了关键作用, 也展现了 *Geobacter* 型 MFC 在实际含 Ag⁺废水中潜在的应用可行性。另一方面, 通过多基因敲除构建出对痕量 Ag⁺极其敏感的 *G. sulfurreducens* 工程菌株, 可以利用接种该菌株的 MFC 系统构建生物电化学传感器, 对自然环境中的 Ag⁺污染通过电信号进行实时监测。该设想的可行性还有待后续研究证实。

3 结论

1) 野生型 *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺有较强的耐受能力, 在 Ag⁺浓度高达 1 mmol·L⁻¹ 时仍能保持一定的生长速率, 在含 Ag⁺废水的处理领域具有潜在的应用潜力。

2) *cdf2* 和 *czcA2* 基因与 *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺耐受作用的相关性较弱, 而与 P-ATPase 家族相关的 *copZ* 和 *copA* 基因对 Ag⁺的响应较强, 表现出与 *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺耐受作用更强的相关性。*copZ* 基因在 *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺的耐受过程中起到关键作用, 该基因通过调控 CopZ 蛋白的表达影响了 *G. sulfurreducens* 对 Ag⁺的耐受。

3) *copZ* 基因的缺失不影响野生型 *G. sulfurreducens* MFC 的产电能力, 但 Ag⁺会对接种了 *copZ* 基因缺失型 *G. sulfurreducens* 菌株的 MFC 的产电能力造成较大影响, 且短时间内无法自我恢复。

参考文献

- [1] LOVLEY D R, UEKI T, TIAN Z, et al. *Geobacter*: The microbe electric's physiology, ecology, and practical applications[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2011, 59: 1-100.
- [2] BURKHARDT E M, BISCHOFF S, AKOB D M, et al. Heavy metal tolerance of Fe(III)-reducing microbial communities in contaminated creek bank soils[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2011, 77(9): 3132.
- [3] 黄美荣, 李振宇, 李新贵. 含银废液来源及其回收方法[J]. *工业用水与废水*, 2005, 36(1): 9-12.
- [4] 李岳泰. 从定影废液中回收银的新方法[J]. *湖南有色金属*, 1985(5): 55-56.
- [5] 胡烈海, 朱新根, 余双, 等. 纳米银抗菌应用的研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2020, 45(8): 745-750.
- [6] WANG Z, CHEN J G, LI X H, et al. Aquatic toxicity of nanosilver colloids to different trophic organisms: Contributions of particles and free silver ion[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2012, 31(10): 2408-2413.
- [7] MIAO A J, SCHWEHR K A, XU C, et al. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances[J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(11): 3034-3041.
- [8] BONDARCZUK K, PIOTROWSKA-SEGET Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in gram-negative bacteria[J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2013, 29(6): 397-405.
- [9] COPPI M V, LEANG C, SANDLER S J, et al. Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3180.
- [10] MOUSER P J, HOLMES D E, PERPETUA L A, et al. Quantifying expression of *Geobacter* spp. oxidative stress genes in pure culture and during in situ uranium bioremediation[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(4): 454-465.
- [11] AKLUJKAR M, LOVLEY D R. Interference with histidyl-tRNA synthetase by a CRISPR spacer sequence as a factor in the evolution of *Pelobacter carbinolicus*[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10(1): 230.
- [12] ODERMATT A, SUTER H, KRAPF R, et al. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in

Enterococcus hirae[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(17): 12775-12779.

- [13] BANCIL, BERTINI I, CIOFI-BAFFONI S, et al. Understanding copper trafficking in bacteria: interaction between the copper transport protein CopZ and the N-terminal domain of the copper ATPase CopA from *Bacillus subtilis*[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(7): 1939.
- [14] HWANG M G, KATAYAMA H, OHAGKI S, et al. Inactivation of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluation of the bactericidal ability of silver cations[J]. *Water Research*, 2007, 41(18): 4097-4104.
- [15] RAIMUNDA D, GONZÁLEZ-GUERRERO M, LEEBER B W, et al. The transport mechanism of bacterial Cu⁺-ATPases: Distinct efflux rates adapted to different function[J]. *BioMetals*, 2011, 24(3): 467-475.

(责任编辑: 靳炜)

Tolerance mechanism of *Geobacter sulfurreducens* to silver ion and its effects on electricity generation in microbial fuel cell

YUAN Xin, LI Pengsong, GU Yuyi, CHEN Haoqiang, SUN Dezhi, DANG Yan*

Engineering Research Center for Water Pollution Source Control and Eco-Remediation, Beijing Key Laboratory for Source Control Technology of Water Pollution, College of Environmental Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

*Corresponding author, E-mail: yandang@bjfu.edu.cn

Abstract Microbial fuel cell (MFC) is a hot spot research area in sewage treatment. *Geobacter* is widely recognized in the field of MFC due to its excellent electricity generation ability. The biologically toxic components such as heavy metals in the natural water environment will affect the growth and survival of *Geobacter* and the ability to generate electricity, which in turn affects the electricity generation performance of MFC. *Geobacter* is generally tolerant to various kinds of heavy metals such as Ag⁺. However, the mechanism of its tolerance to higher concentrations of heavy metals is still unclear. In this study, *Geobacter sulfurreducens*, a model species of *Geobacter*, was selected to study the regulation of the *copZ* gene on *G. sulfurreducens*'s tolerance to Ag⁺. Results showed that the transcription of the *copZ* gene of wild-type *G. sulfurreducens* increased by 24.8 times under 0.05 mmol·L⁻¹Ag⁺. When *copZ* was knocked out from the *G. sulfurreducens* genome, the tolerance of *G. sulfurreducens* to Ag⁺ decreased significantly. The growth rate of the *copZ*-deficient *G. sulfurreducens* strain in the presence of 0.01 mmol·L⁻¹ Ag⁺ was only 33.3% of that of the wild-type *G. sulfurreducens* in the presence of 1 mmol·L⁻¹Ag⁺. When 0.05 mmol·L⁻¹ Ag⁺ was added to the microbial fuel cell (MFC) system which inoculated with the *copZ*-deficient *G. sulfurreducens* strain, the output current of the MFC decreased by 6.99%. This study proved that the *copZ* has a significant regulatory effect on *G. sulfurreducens* tolerance to Ag⁺, and revealed the internal mechanism of high Ag⁺ concentration influence on the electricity productivity performance in the *G. sulfurreducens* MFC system.

Keywords microbial fuel cell; *Geobacter sulfurreducens*; *copZ* gene; heavy metal resistance; silver ion