

# 电子穿梭体介导的微生物胞外电子传递： 机制及应用\*

马金莲<sup>1,2,3</sup> 马晨<sup>4</sup> 汤佳<sup>3</sup> 周顺桂<sup>3</sup> 庄莉<sup>3\*\*</sup>

(1. 中国科学院广州地球化学研究所 广州 510640; 2. 中国科学院大学 北京 100049; 3. 广东省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 广州 510650; 4. 中国热带农业科学院分析测试中心 海口 571101)

**摘要** 厌氧条件下微生物将电子传递给胞外电子受体的现象非常普遍,电子穿梭体(electron shuttle, ES)是介导胞外电子传递过程的重要途径之一,但其具体的机制尚未明晰。一部分微生物自身能分泌一些物质作为内生 ES,另一部分微生物能利用天然存在或人工合成的某些物质作为外生 ES,并将其携带的电子传递至微生物胞外电子受体。ES 介导微生物胞外电子传递的基本过程为:氧化态电子穿梭体( $ES_{ox}$ )接受电子变成还原态( $ES_{red}$ ), $ES_{red}$ 传递电子给胞外电子受体,自身再次氧化成  $ES_{ox}$ ,从而循环往复。本文重点介绍不同种类 ES 及其电子穿梭机制,以及 ES 的分子扩散、氧化还原电势及电子转移能力对胞外电子传递过程的影响。ES 介导的胞外电子传递过程直接影响污染物转化和微生物产电,因此在污染修复及生物能源等方面具有重要的应用前景。

**关键词** 胞外电子传递 电子穿梭体 氧化还原 污染物生物降解 生物能源

中图分类号:O646; X13; X172 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2015)12-1833-08

## Mechanisms and Applications of Electron Shuttle-Mediated Extracellular Electron Transfer\*

Ma Jinlian<sup>1,2,3</sup> Ma Chen<sup>4</sup> Tang Jia<sup>3</sup> Zhou Shungui<sup>3</sup> Zhuang Li<sup>3\*\*</sup>

(1. Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Guangdong Key Laboratory of Agricultural Environment Pollution Integrated Control, Guangdong Institute of Eco-Environmental and Soil Sciences, Guangzhou 510650, China; 4. Analysis and Test Center of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

**Abstract** Under anaerobic conditions, many microorganisms are capable of extracellular respiration involving electron transfer to or from extracellular substrates such as iron (hydr)oxides and humic substances. Electron shuttling is one of the significant strategies for extracellular electron transfer, however, the involved mechanism has not been thoroughly understood. Electron shuttles can be divided into endogenous electron shuttles that are self-produced by microbes themselves and exogenous electron shuttles that are natural substances or artificially synthesized materials. Electron shuttle-mediated extracellular electron transfer generally involves the following

收稿: 2015 年 5 月, 收修改稿: 2015 年 7 月, 网络出版: 2015 年 12 月 11 日

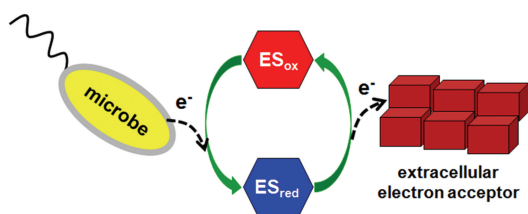
\* 国家自然科学基金项目(No. 41301256, 31470561)和广东省自然科学基金项目(No. S20120011151, S2013040015231)资助

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 41301256, 31470561) and the National Science Foundation of Guangdong Province, China(No. S20120011151, S2013040015231).

\*\* Corresponding author e-mail: lzhuang@soil.gd.cn

reactions: the oxidized form of electron shuttles ( $ES_{ox}$ ) accept electrons from the oxidization of organic matter and become as the reduced form of electron shuttles ( $ES_{red}$ ), then  $ES_{red}$  transfer electrons to extracellular electron acceptors and return to  $ES_{ox}$ . Through these steps, electron shuttles can be reversibly oxidized and reduced. This review mainly focuses on the electron transfer mechanisms of different electron shuttles, and the factors affecting extracellular electron transfer such as the molecule diffusion, redox potential and electron transfer capacity of electron shuttles. Electron shuttle-mediated extracellular electron transfer has significant influence on contaminants degradation and microbial electrogenesis, thus the better understanding of their mechanisms is very important to their implications in bioremediation and bioenergy.

**Key words** extracellular electron transfer; electron shuttles; redox reactions; pollutant biodegradation; bioenergy



## Contents

- 1 Introduction
- 2 Electron transfer mechanisms of different electron shuttles
  - 2.1 Endogenous electron shuttles
  - 2.2 Exogenous electron shuttles
- 3 Factors affecting extracellular electron transfer
  - 3.1 Molecule diffusion
  - 3.2 Redox potential
  - 3.3 Electron transfer capacity
- 4 Environmental implications
  - 4.1 The applications of electron shuttles in pollutant biodegradation
  - 4.2 The applications of electron shuttles in bioelectrochemical systems
- 5 Conclusion and outlook

## 1 引言

微生物胞外呼吸是指厌氧条件下,微生物在胞内氧化电子供体(有机碳)产生的电子,“穿过”非导电性的细胞膜/壁,通过外膜上的氧化还原蛋白、纳米导线或电子介体传递至胞外电子受体,电子受体还原产生能量供微生物自身生长的过程。一些固态物质(如铁锰氧化物、石墨电极)或者由于分子结构太大而不能进入胞内的物质(如腐殖质)可作为微生物的胞外电子受体<sup>[1,2]</sup>。具有胞外呼吸功能的微生物称为胞外呼吸菌,其中 *Shewanella* 菌和 *Geobacter* 菌是研究最为广泛和深入的胞外呼吸菌。

胞外呼吸使微生物与无机环境/微生物之间的直接电子传递成为可能,为理解土壤碳循环、温室气体排放、有机污染物厌氧降解等关键生物地球化学过程提供了全新的科学视角,其生态学和环境学意义在近几年受到广泛关注。

尽管胞外呼吸菌将胞内电子传递至胞外电子受体/其他微生物的能力已得到证实,但其具体的电子传递机制尚未明晰。研究者们提出了多种可能的胞外电子传递方式,主要包括以下四种<sup>[3,4]</sup>:(1)直接接触机制,这种作用方式下,微生物必须直接接触固体表面<sup>[3,5]</sup>或者与电子受体微生物形成团聚体<sup>[6]</sup>,但是能与固体表面直接接触或形成团聚体的微生物数量有限;(2)“纳米导线”机制,通过微生物自身合成的具有导电性的菌毛或鞭毛介导远距离电子传递,但是“纳米导线”的合成需要微生物投入较多的能量<sup>[7]</sup>;(3)导电物质介导机制,微生物利用导电物质作为电子供体微生物和电子受体微生物或固态电子受体之间电子传递的“导管”<sup>[8-10]</sup>。目前已证实具有这种功能的导电物质有导电性生物炭<sup>[9]</sup>、活性炭<sup>[10]</sup>或(半)导电性铁氧化物<sup>[11]</sup>等;(4)电子穿梭机制<sup>[3]</sup>,通过微生物自身分泌的具有氧化还原活性的小分子或者天然存在或人工合成的电子介体物质进行电子传递。电子穿梭机制的优势是使微生物摆脱了需要与胞外电子受体直接接触的限制<sup>[3,12,13]</sup>,也避免了合成“纳米导线”的能量投入。本文将重点阐述电子穿梭体(electron shuttles, ES)在胞外电子传递过程中的作用。

## 2 不同 ES 及其电子传递机制

电子穿梭体也称氧化还原介体(redox mediator, RM),是能充当电子载体可逆的参与氧化还原反应的一类物质<sup>[14,15]</sup>。按照 ES 的来源可分为内生 ES 和外生 ES。内生 ES 是由微生物产生并分泌到细胞外具有电子传递功能的物质,如黄素类<sup>[3]</sup>、黑色

素<sup>[5]</sup>等; 外生 ES 包括环境中天然存在或人工合成的具有接受和给出电子能力的各种氧化还原物质, 如含硫化合物和腐殖质<sup>[16]</sup>等。

## 2.1 内生 ES

许多胞外呼吸菌都具有分泌内生 ES 的功能,

表 1 典型的内生电子穿梭体

Table 1 Representative examples of endogenous electron shuttles

electron shuttle	microorganism	attribute	$E'_0$ (vs. SHE) (mV)	ref
2,6-di- <i>tert</i> -butyl- <i>p</i> -benzoquinone (2,6-DTBBQ)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L17	quinone		18
phenazine-1-carboxamide	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> PCL1391	phenazine derivative	-116	17,19
riboflavin (RF)	<i>Shewanella</i> spp.	flavin	-208	20,21
flavin adenine dinucleotide (FAD)	<i>Shewanella oneidensis</i>	flavin	-219	22,23
flavin mononucleotide (FMN)	<i>Shewanella</i> spp.	flavin	-219	20
melanin	<i>Shewanella algae</i> BrY	pigment		5

$E'_0$ : measured at pH = 7.0, T = 25°C and  $p = 1$  atm relative to standard hydrogen electrode.

内生 ES 在微生物胞外电子传递过程中的应用广泛, 但其具体机制并不明晰。Brutinel 等<sup>[4]</sup>提出了 *Shewanella* 菌分泌黄素类物质作为 ES 介导胞外电子传递的可能机制: 产生的 FAD (flavin adenine dinucleotide, 黄素二核苷酸) 跨过内膜进入周质, 一方面可与周质蛋白 FccA 结合为辅助因子参与其他生理活动, 另一方面能水解为 FMN (flavin mononucleotide, 黄素单核苷酸) 和 AMP (adenosine monophosphate, 腺苷一磷酸)。FMN 透过外膜直接脱磷酸为 RF (riboflavin, 核黄素), 或者 FMN 从 MtrC (一种多血红素细胞色素) 处得到电子被还原为 FMN<sub>red</sub>, 然后 FMN<sub>red</sub> 通过扩散将电子传递至胞外电子受体, 而自身又变成 FMN<sub>ox</sub>, 从而不断循环往复 (图 1)。目前对于产生的黄素类物质究竟是如何跨过细胞内膜和外膜的机制仍不清楚。

Von Canstein 等<sup>[3]</sup>首次证实了 *Shewanella* 菌自身分泌的 FMN 和 RF 能作为 ES, 加速晶型较差的铁氧化物的微生物还原过程。RF 浓度为 1  $\mu\text{M}$  的处理中微生物铁还原速率比不添加 RF 的对照组高 2 倍; 当 RF 浓度达 100  $\mu\text{M}$  时, 铁还原速率与对照组相比提高了 8 倍。这表明当胞外呼吸菌利用这些不溶性电子受体的能力较弱时, 它们能通过自身分泌的 ES 利用在空间上被分离的远距离胞外电子受体。

尽管内生 ES 的分泌需要消耗微生物一部分能量, 但是这些 ES 能被多次反复利用<sup>[3]</sup>。因此对于以胞外电子受体进行呼吸代谢的微生物来说, ES 的产生和分泌其实是一种生长优势<sup>[4]</sup>。研究表明微生物

比如典型的 *Shewanella* 菌, 但已有研究显示 *Geobacter* 菌并不具有此功能。已经确定的内生 ES 主要是一些微生物的次级代谢产物, 如黄素类、黑色素、吩嗪衍生物和某些醌类物质等<sup>[3,5,13,17]</sup>。表 1 总结了目前报道的典型内生 ES 种类。

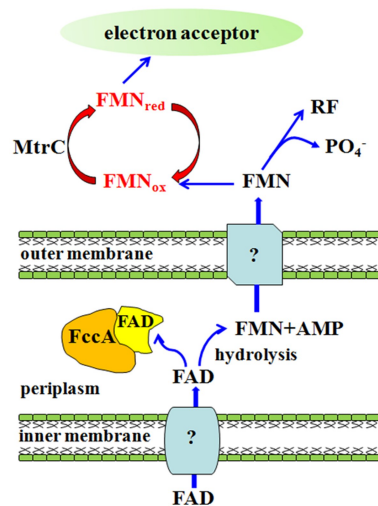


图 1 胞外电子传递过程中的电子穿梭机制 (以内生电子穿梭体 FMN 为例)<sup>[4]</sup>

Fig. 1 Schematics of electron shuttle-mediated extracellular electron transfer (example of FMN)<sup>[4]</sup>

合成一分子 RF 约消耗 25 分子的 ATP, 当以石墨电极为电子受体时, *S. oneidensis* 分泌少量 RF 作为 ES 所消耗的 ATP 还不足细胞合成 ATP 总量的 0.1%<sup>[4]</sup>。

除黄素类物质外, 黑色素、吩嗪类以及某些内源的醌类物质也能作为内生 ES 介导微生物胞外电子传递过程。黑色素可充当一种非晶型的半导体, 既能作为电子供体也能作为电子受体<sup>[5]</sup>, 因而具有作为 ES 的潜能。吩嗪类物质具有与腐殖质类似的芳环结构和氧化还原功能基团, 有一定的氧化还原活性<sup>[17]</sup>。醌类物质能作为 ES 的主要原因是其具有电子传递功能的醌类基团。

表 2 典型的外生电子穿梭体

Table 2 Representative examples of exogenous electron shuttles

electron shuttle	attribute	$E'_0$ (vs. SHE) (mV)	ref
9,10-anthraquinone-2,6-disulfonic acid (AQDS)	anthraquinone	-184	24
9,10-anthraquinone-2-sulfonic acid (AQS)	anthraquinone	-225	24
9,10-anthraquinone-2-carboxylic acid (AQC)	anthraquinone	-254	24
alizarin (Ali)	anthraquinone	-344	24
lawsone (2-HNQ)	naphthoquinone	-137	24
RZ(resazurin)	indicator	-51	20
vitamin B12	vitamin		25
cysteine	amino acid	-348	26

$E'_0$ : Measured at pH = 7.0,  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$  and  $p = 1\text{ atm}$  relative to standard hydrogen electrode.

## 2.2 外生 ES

典型的外生 ES 包括醌类物质(如蒽醌、萘醌等)、腐殖质、半胱氨酸或其他含硫分子等。表 2 列举了一些典型的外生 ES。

醌类物质和腐殖质是微生物胞外电子传递过程中应用最广泛的外生 ES,醌基是它们的氧化还原活性基团。大量研究利用循环伏安法证实这些醌类物质具有反复接受和给出电子的能力<sup>[28]</sup>。醌类物质在胞外呼吸菌的作用下接受电子还原成氢醌,这些氢醌被胞外电子受体(如铁氧化物)氧化成相应的半醌,最后氧化为醌,醌类物质就是以这样的形式循环参与电子传递<sup>[28]</sup>(图 2A)。当胞外电子受体为微生物时,ES 是微生物种间电子传递的电子载体。以 *Geobacter metallireducens* 和 *Geobacter sulfurreducens* 为例,二者互营氧化乙醇时主要利用  $\text{H}_2$  或甲酸作为电子载体。当醌类物质存在时,便可替代  $\text{H}_2$  或甲酸介导微生物种间电子传递,而且其优势在于醌类物质是可以循环利用的电子载体<sup>[29]</sup>(图 2B)。一个单独的 ES 能参与数千次氧化还原循环,因此极小浓度的 ES 都能极大地影响给定环境中的终端电子受体的量<sup>[15]</sup>。

Li 等<sup>[30]</sup>研究表明,与未添加 ES 的对照组相比,添加 AQC 之后分别将 *Shewanella decolorationis* S12 和 *Aeromonas hydrophila* HS01 还原针铁矿的速率提高了 3 倍和 4 倍。Jiang 等<sup>[31]</sup>发现,*G. sulfurreducens* 利用溶解态腐殖质作 ES 还原水铁矿的速率是微生物直接还原 Fe(III) 速率的 7 倍。该过程中,*G. sulfurreducens* 还原溶解态腐殖质的速率比直接还原水铁矿至少快 27 倍,还原态的腐殖质传递电子给铁氧化物的速率比微生物直接传递电子给铁氧化物快 7 倍,很显然,还原态腐殖质还原铁氧化物的化学作用是整个过程的限速步骤<sup>[31]</sup>。

除了一些复杂的具有醌基的有机分子外,一些具有巯基的小分子有机物也能作为电子载体,如 L-

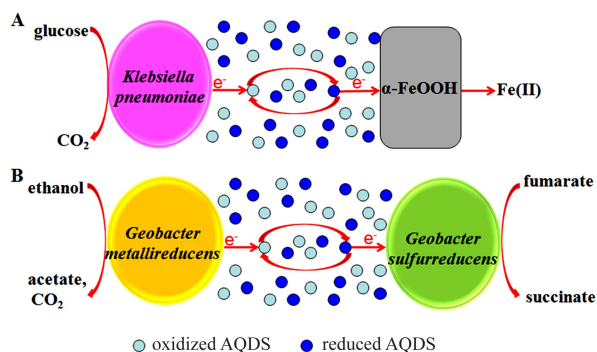


图 2 胞外电子传递过程中的电子穿梭机制(以外生电子穿梭体 AQDS 为例):(A) AQDS 介导 *Klebsiella pneumoniae* 和  $\alpha\text{-FeOOH}$  之间的胞外电子传递过程<sup>[28]</sup>; (B) AQDS 介导 *Geobacter sulfurreducens* 和 *Geobacter metallireducens* 之间的胞外电子传递过程<sup>[29]</sup>

Fig. 2 Schematics of electron shuttle-mediated extracellular electron transfer (example of AQDS). (A) AQDS mediated extracellular electron transfer between *Klebsiella pneumoniae* and  $\alpha\text{-FeOOH}$ <sup>[28]</sup>. (B) AQDS mediated extracellular electron transfer between *Geobacter sulfurreducens* and *Geobacter metallireducens*<sup>[29]</sup>

半胱氨酸<sup>[26]</sup>。Kaden 等<sup>[26]</sup>利用 *G. sulfurreducens*/*Wolinella succinogenes* 的共培养体系研究了 L-半胱氨酸介导乙酸氧化耦合硝酸盐还原的可能性。结果证实 *G. sulfurreducens* 氧化乙酸产生的电子传递给 L-半胱氨酸使其变为 L-半胱氨酸,还原态 L-半胱氨酸传递电子给 *W. succinogenes* 将硝酸盐还原,自身被氧化再次变为 L-半胱氨酸。但是不添加 ES 的对照组中没有发现乙酸氧化或硝酸盐还原。研究人员还发现低浓度的硫化物能代替 L-半胱氨酸起到类似效果,但是 D-半胱氨酸、同型半胱氨酸、二甲基亚砷、AQDS 等却不能作为此过程中 L-半胱氨酸的替代物。

## 3 ES 影响胞外电子传递的主要因素

ES 介导的胞外电子传递过程受多种因素影响,

如 ES 的种类、浓度、溶解度<sup>[26]</sup>, 热力学因素如氧化还原电势, 动力学因素如 ES 的扩散<sup>[27]</sup> 和电子转移能力<sup>[20,28]</sup>, 微生物种类(发酵菌、硫酸盐还原菌、产甲烷菌等)<sup>[4,30]</sup>, 电子受体类型<sup>[3,28]</sup>, 以及外界环境条件如温度、pH 值等<sup>[15]</sup>。这里主要综述 ES 的扩散、氧化还原电势以及电子转移能力对微生物胞外电子传递过程的影响。

### 3.1 ES 的分子扩散

一般认为, ES 介导的胞外电子传递过程主要依靠溶解和可扩散的  $ES_{ox}$  和  $ES_{red}$  进行。比如在腐殖质介导的微生物  $Fe(III)$  还原过程中, Jiang 等<sup>[31]</sup> 认为微生物与铁矿之间的电子传递是通过氧化态和还原态腐殖质的分子扩散进行的。因此, 如果腐殖质浓度较低, 那么每次只能传递很少量的电子, 相应的铁还原过程的促进效果不明显。然而, 若 ES 浓度较高, 可能对微生物有毒害作用<sup>[26]</sup> 抑制细胞代谢和生长<sup>[32]</sup>。

微生物胞内或自然环境中 ES 的浓度都较低, 大约  $100 \mu M$  或更低<sup>[3,24,26,28,30]</sup>, 而体系中其他离子(比如  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Cl^-$ 、 $PO_4^{3-}$ ) 的浓度相对较高, 因此 ES 的迁移扩散相对来说很微弱。Torres 等<sup>[27]</sup> 利用修正的 Fick 定律表征了 ES 扩散与微生物燃料电池电流密度( $j$ ) 的关系:  $j = nF \left( \frac{D_{shuttle} \Delta C_{shuttle}}{\Delta z} \right)$ 。  $D_{shuttle}$  表示 ES 的扩散系数 ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ),  $\Delta z$  表示传递距离 ( $m$ ),  $\Delta C_{shuttle}$  表示  $ES_{ox}$  或  $ES_{red}$  的浓度梯度 ( $mol m^{-3}$ ),  $n$  表示电子数,  $F$  表示法拉第常数。由方程可知, 总的电流密度受限于 ES 的扩散。ES 的扩散系数一般都很小, 因此要通过 ES 的扩散获得最大电流, 就需要较大的  $\Delta C_{shuttle}$ , 而  $\Delta C_{shuttle}$  则取决于体系中 ES 的总浓度。

### 3.2 ES 的氧化还原电势

一般来说, ES 的中点氧化还原电势越高, 微生物通过呼吸作用获得的能量也越多<sup>[14]</sup>。另一方面, ES 的电势与胞外电子受体的电势差越大, 吉布斯自由能越负, 电子受体的还原过程越可能发生<sup>[14]</sup>。理论上, 有效的 ES 的氧化还原电势应该介于两个氧化还原的半反应之间<sup>[15]</sup>。ES 的氧化还原电势不应该低于微生物还原系统或者大部分还原剂的电势, 否则 ES 不能被充分还原; 同样的, 其氧化还原电势也不能比电子受体的高太多(最好是低一点或者更负), 否则该反应也不能顺利进行<sup>[15]</sup>。Liu 等<sup>[10]</sup> 的研究显示, AQDS 能作为 ES 促进 *G. metallireducens* 和 *G. sulfurreducens* 共培养体系中的乙醇氧化和琥珀酸还原, 但是不能介导 *G. metallireducens* 和 *Methanosarcina barkeri* 互营产甲烷过程, 可能是受氧化还原电势的影响。因为, AQDS/AHQDS 氧化还原电势 ( $E'_0 = -184 mV$ ) 能驱动延胡索酸的还原 ( $E'_0$  延胡索酸/琥珀酸 =  $+30 mV$ ), 但是对于将  $CO_2$  还原成  $CH_4$  的反应 ( $E'_0 CO_2/CH_4 = -240 mV$ ) 来说却太高。

许多外生 ES 能介导微生物铁还原过程, 该过程在很大程度上受 ES 的氧化还原电势的影响<sup>[24]</sup>。O'Loughlin<sup>[33]</sup> 在不同 ES 介导 *S. putrefaciens* CN32 还原纤铁矿的实验中, 发现电势位于  $-254 \sim +11 mV$  的大部分 ES 的表观电势与  $Fe(III)$  还原速率有很好的相关性, 其中  $r^2$  高达 0.973。Wolf 等<sup>[24]</sup> 认为, 中性条件下醌类物质介导 *G. metallireducens* 还原水铁矿主要取决于 ES 的氧化还原电势, 氧化还原电势集中在  $-137 \sim -225 mV$  的 2-HNQ、AQDS、AQS 等能很好的促进微生物铁还原过程。Li 等<sup>[28]</sup> 的研究表明发酵菌株 *Klebsiella pneumoniae* L17 还原纤铁矿过程中, 氧化还原电势集中在  $-137 \sim -254 mV$  的 AQC、AQS、2-HNQ 等能促进铁还原, 其中 AQC 效果最好, 将  $Fe(III)$  还原速率提高了 7 倍。Car (carmin, 胭脂红) 之所以不能促进微生物铁还原过程, 主要原因就是其氧化还原电势为  $-500 mV$ , 比细胞外膜上所有 c-Cyts 中最低值 ( $-400 mV$ ) 还低<sup>[28,30]</sup>。

3.3 ES 的电子转移能力

电子转移能力指一定量 ES 能够接受或给出的电子当量, 包括电子接受能力 (electron accepting capacity, EAC) 和电子给出能力 (electron donating capacity, EDC)。一般来说, 醌类物质的 EAC 和 EDC 接近, 表明醌类物质发生电子传递过程几乎是可逆的, 但是也有些物质的 EAC 比 EDC 略高, 比如 2-HNQ、AQC、AQS 等<sup>[30]</sup>。许多研究证实, ES 的电子转移能力 (electron transfer capacity, ETC) 是影响胞外电子传递过程的一个重要因素<sup>[19,28,30]</sup>。

Li 等<sup>[28]</sup> 研究发现, 铁还原速率与 ES 的 EAC 和 EDC 呈很好的线性正相关关系, 其相关系数分别高达 0.933 和 0.944; 电极作电子受体时, 产电速率与 ES 的这两种电子转移能力的相关系数分别为 0.801 和 0.815。同时研究者分析, Car 介导的铁还原速率和产电性能较差, 其可能原因不仅是其氧化还原电势相对较低, 更重要的是其 ETC 也低<sup>[28]</sup>。Wu 等<sup>[20]</sup> 将 ES 用于提高微生物燃料电池性能的研究显示: 电池的电流平均值、开路电

压以及最大功率密度与 EAC 的相关系数分别为 0.930, 0.902 和 0.803。这些研究都表明, ES 介导的微生物胞外电子传递过程与 ES 的 ETC 密不可分。

## 4 环境学意义

### 4.1 ES 在污染物降解中的应用

偶氮染料是一类由偶氮键(—N=N—)连接芳环结构的有机物质,对人类和生物的危害不容忽视。有研究认为厌氧条件下微生物异化偶氮还原实际上是一种新的呼吸类型,即偶氮呼吸<sup>[32]</sup>。厌氧条件下的微生物偶氮还原是在非特异性还原酶作用下发生

的电子传递过程<sup>[34]</sup>。类似胞外呼吸,该过程以一些因极性较强不能进入微生物胞内的偶氮化合物<sup>[22,34]</sup>为终端电子受体。越来越多的研究表明,ES 的添加能加速微生物对染料脱色的速率<sup>[35,36]</sup>,还能减少实际工程应用时的水力停留时间,甚至某些情况下 ES 的存在是脱色反应发生的前提条件<sup>[12]</sup>。染料脱色过程中应用比较广泛的 ES 有 AQDS、AQS、黄素类等<sup>[34,35,37]</sup>。Kudlich 等<sup>[22]</sup>研究了不同 ES 存在时 *Sphingomonassp strain* BN6 还原 amranth 的效果,该研究发现 AQS、AQDS 和 FAD 将还原速率分别提高了 10.5 倍、6.5 倍和 1.5 倍。表 3 总结了 ES 提高的偶氮染料还原的效果。

表 3 电子穿梭体对偶氮染料还原脱色的影响

Table 3 Impact of electron shuttles on the reductive decolorization of azo dyes

azo dye	microorganism(s)	electron shuttle	results	ref
reactive orange 14	anaerobic granular sludge	riboflavin	1.5 ~ 2 times faster	35
amaranth	<i>Shewanella decolorationis</i> S12	AQDS/AQS	electron shuttles both at 1mM, corresponding first-order rate constants increase 75% and 133%	32
acid yellow 23	<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	FAD	3.5 times faster	38
remazol black B	<i>Shewanella strain</i> J18 143	AQDS	3 times faster	35
GemSpers orange EX5	<i>Shewanella strain</i> J18 143	AQDS	4 times faster	36

除偶氮染料外,多聚氯化物的污染也不容小觑,其已被美国环境保护署列入优先级污染物的名单。当前,处理这些污染物的主要办法是微生物脱氯。纯培养体系中 *Acetobacterium woodii* 利用低浓度 (10  $\mu\text{M}$ ) 羟钴胺素作为 ES 能在 2.5 天内将 470  $\mu\text{M}$   $\text{CCl}_4$  完全转化,将转化速率提高了 30 倍<sup>[39]</sup>。同时该研究表明,微生物利用羟钴胺素作为 ES 还能提高  $^{14}\text{CCl}_4$  的矿化程度,使  $^{14}\text{CO}_2$  (增加到 31%) 和其

他  $^{14}\text{C}$  标记的可溶性物质 (主要是 L-乳酸和乙酸) 含量增加,而减少氯仿的百分含量<sup>[39]</sup>。也有研究表明,土壤或沉积物中提取的胡敏素具有大量的氧化还原活性基团,能作为五氯酚微生物还原过程中的 ES,将五氯酚快速转化为 2,3,4,5-四氯苯酚、3,4,5-三氯苯酚、3,5-二氯苯酚、3-氯苯酚,最终完全降解为苯酚,而不含胡敏素的对照中几乎没有五氯酚的降解<sup>[40]</sup>。

表 4 电子穿梭体对氯代有机污染物还原脱氯的影响

Table 4 Impact of electron shuttles on the reductive dechlorination of organic pollutants

pollutant	microorganism(s)	electron shuttle	results	ref
chloroform	methanogenic granular sludge	RF /cyanocobalamin	the first-order rate constant was 5.1- and 91-fold higher in RF and cyanocobalamin amended cultures, respectively, compared to the unamended control culture	41
carbon tetrachloride	anaerobic sludge	humic acids/AQDS	increase the first-order rate of conversion of carbon tetrachloride up to 6-fold	42
carbon tetrachloride	<i>Acetobacterium woodii</i>	hydroxocobalamin	30 times faster compared to the unamended control culture	39
carbon tetrachloride	<i>Shewanella alga strain</i> BrY	vitamin B12	almost fully biodegraded to chloroform (1.43%) and CO (91.9%); no biodegradation in unamended control	25
pentachlorophenol	soil microbes	humic	fully biodegraded to phenol; no biodegradation in unamended control	40

### 4.2 ES 在生物电化学系统中的应用

生物电化学系统是一个富有挑战的新兴领域,主要是利用微生物催化阳极或阴极反应,具有产电与污染物降解转化等功能,因而引起研究者的广泛关注。

生物电化学系统中微生物和电极间的作用过程是制约电池性能的重要因素,许多 ES 可以加速该过程并提高产电能力。大多数革兰氏阴性菌株自身能分泌内生 ES 加速电子传递,其中研究最多的是 RF 和

FMN<sup>[43]</sup>。Marsili 等<sup>[21]</sup>证实了 *S. oneidensis* MR-1 自身能分泌 RF 充当 ES 将电子传递到电极上, 从生物膜中去除 RF 导致电子传递到电极上的速率降低 70%。许多外生 ES 也在生物电化学系统中得到广泛应用, 但是其价格昂贵, 一定程度上限制了其在工程上的应用<sup>[44]</sup>。Wu 等<sup>[20]</sup>研究了多种人工合成的外生 ES 对微生物产电性能的影响, 该结果表明实验所用的 ES 都能提高产电性能, 其中 AQC 和 AQS 的效果

最好, 分别将平均电流提高了 2.9 倍和 2.8 倍。表 5 总结了 ES 提高的微生物产电效果。

ES 不仅能提高生物电化学系统的产电性能, 也有一些研究者提出通过在电极上修饰或在阳/阴极添加 ES 来加速污染物的降解转化, 为其在环境修复方面的应用提供了新思路<sup>[48~51]</sup>。表 6 总结了生物电化学系统中添加 ES 后微生物降解环境污染物的效果。

表 5 电子穿梭体对微生物产电过程的影响

Table 5 Impact of electron shuttles on microbial electrogenesis

microorganism	electron shuttle results		ref
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	riboflavin	removal of RF reduced the rate of electron transfer by >70%	21
<i>Escherichia coli</i> ATCC4157	pyocyanin	13-fold and 23-fold increase for the peak power output and the average power output, respectively	45
<i>Shewanella putrefaciens</i> 200	AQS	the average current was 2.9 times higher	20
<i>Escherichia coli</i>	neutral red	the average current was 10 times higher	46
<i>Shewanella putrefaciens</i>	neutral red	the average current was 10 times higher	47

表 6 生物电化学系统中电子穿梭体对污染物降解的影响

Table 6 Impact of electron shuttles on pollutants degradation in bioelectrochemical systems

pollutant	electrode material	electron shuttle	results	ref
pentachlorophenol	graphite	solid-state humin	dechlorination rate was higher by 15-fold than that of the immobilized system to $116 \mu\text{mol Cl}^- \text{g}^{-1} \text{humin d}^{-1}$	48
trichloroethene	glassy carbon	methyl viologen	degradation rate was $4.5 \mu\text{eq}/(\text{L} \cdot \text{d})$ with methyl viologen, but no trichloroethene was degraded without cells or methyl viologen	49
perchlorate	graphite	AQDS	reduced rate was $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with AQDS, but no perchlorate was reduced without cells or AQDS	50
methyl orange	carbon paper	thionine	decolorization rate increased by over 20%, and the power density was enhanced by over 3 times	51

## 5 总结与展望

许多情况下, 微量 ES 能显著加快微生物铁还原过程, 提高有机污染物降解(脱卤、染料脱色、硝基芳香化合物的降解等)速率和微生物产电性能。但是 ES 的促进作用受到 ES 的浓度、氧化还原电势以及电子转移能力等多方面的影响。因此, 根据实际条件选择 ES 很有必要。理想的 ES 应具备如下条件: (1) 氧化态和还原态的 ES 均可溶; (2) 氧化还原电势应与体系相匹配; (3) EAC 和 EDC 都较高, 可逆性良好; (4) 较稳定, 不能被微生物利用且对其无毒。

目前对于微生物胞外电子传递过程中电子穿梭机制的了解比较有限, 可以作为 ES 的物质种类繁多, 但对其具体电子传递机制的认识仍不足。ES 及其与微生物之间作用的检测手段目前主要包括电化学方法、色谱法<sup>[3]</sup>和光谱法<sup>[5,20]</sup>等。Liu 等<sup>[52]</sup>结合电化学方法和光谱法检测活细胞体内 c-Cyts 的氧化

还原状态, 与 c-Cyts 相似, ES 是通过一系列的氧化还原反应参与电子的传递过程, 因此该方法对于测定 ES 与微生物之间的作用有借鉴意义。Wu 等<sup>[5]</sup>利用原位光谱法进行活细胞体内 c-Cyts 还原 ES 动力学分析, 为同时检测 c-Cyts 及 ES 提供了一种直接方法。微生物将底物氧化产生的电子传递给 ES 需要经过一系列细胞色素的作用, 但是关键的细胞色素和相关蛋白并不确定, 缺乏分子水平上对 ES 介导的微生物胞外电子传递过程的研究, 因此需要在这方面进一步的探索。

人工添加 ES 应用于污染场地的修复中成本较高, 然而已有研究从污染场地分离出能分泌内生 ES 的功能微生物<sup>[14]</sup>, 因此可以考虑通过多种技术手段富集和培养这类微生物, 以达到减少人工添加 ES 进一步减少工程成本的目的。同时, 可以通过构建基因工程菌株提高微生物细胞膜的通透性, 进而增加分泌的内生 ES 的产量和扩散速率, 从而提高胞外电子传递速率。

## 参考文献

- [1] Lovley D R. *Geobiology*, 2008, 6: 225.
- [2] Gralnick J A, Newman D K. *Mol. Microbiol.*, 2007, 65: 1.
- [3] von Canstein H, Ogawa J, Shimizu S, Lloyd J R. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74: 615.
- [4] Brutinel E D, Gralnick J A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93: 41.
- [5] Turick C E, Tisa L S, Caccavo F. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68: 2436.
- [6] Summers Z M, Fogarty H E, Leang C, Franks A E, Malvankar N S, Lovley D R. *Science*, 2010, 330: 1413.
- [7] Kato S, Hashimoto K, Watanab K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, 109: 10042.
- [8] Kappler A, Wuestner M L, Ruecker A, Harter J, Halama M, Behrens S. *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 2014, 1: 339.
- [9] Chen S S, Rotaru A E, Shrestha P M, Malvankar N S, Liu F H, Fan W, Nevin K P, Lovley D R. *Sci. Rep.*, 2014, 4: 1.
- [10] Liu F H, Rotaru A E, Shrestha P M, Malvankar N S, Nevin K P, Lovley D R. *Energ. Environ. Sci.*, 2012, 5: 8982.
- [11] Kato S, Hashimoto K, Watanabe K. *Environ. Microbiol.*, 2011, 14: 1646.
- [12] Lovley D R, Holmes D E, Nevin K P. *Adv. Microb. Physiol.*, 2004, 49: 219.
- [13] Nevin K P, Lovley D R. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68: 2294.
- [14] Watanabe K, Manefield M, Lee M, Kozuma A. *Curr. Opin. Biotech.*, 2009, 20: 633.
- [15] Van der Zee F P, Cervantes F J. *Biotechnol. Adv.*, 2009, 27: 256.
- [16] Lovley D R, Coates J D, Blunt-Harris E L, Phillips E J P, Woodward J C. *Nature*, 1996, 382: 445.
- [17] Hernandez M E, Kappler A, Newman D K. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70: 921.
- [18] 邓丽芳(Deng L F), 李芳柏(Li F B), 周顺桂(Zhou S G), 黄德银(Huang D Y), 倪晋仁(Ni J L). *科学通报(Chinese Science Bulletin)*, 2009, 54(19):2983.
- [19] Wang Y, Newman D K. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42: 2380.
- [20] Wu Y D, Liu T X, Li X M, Li F B. *Environ. Sci. Technol.*, 2014, 48: 9306.
- [21] Marsili E, Baron D B, Shikhare I D, Coursolle D, Gralnick J A, Bond D R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, 105: 3968.
- [22] Kudlich M, Keck A, Klein J, Stolz A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 3691.
- [23] Kotloski N J, Gralnick J A. *MBio.*, 2013, 4: e00553.
- [24] Wolf M, Kappler A, Jiang J, Meckenstock R U. *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43: 5679.
- [25] Workman D, Woods S L, Gorby Y, Fredrickson J K, Truex M J. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31: 2292.
- [26] Kaden J, Galushko A S, Schink B. *Arch Microbiol.*, 2000, 178: 53.
- [27] Torres C I, Marcus A K, Lee H S, Parameswaran P, Krajmalnik-Brown R, Rittmann B E. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2010, 34: 3.
- [28] Li X M, Liu L, Liu T X, Yuan T, Zhang W, Li F B, Zhou S G, Li Y T. *Chemosphere*, 2013, 92: 218.
- [29] Smith J A, Nevin K P, Lovley D R. *Front. Microbiol.*, 2015, 6: 1.
- [30] Li X M, Liu T X, Liu L, Li F B. *RSC Adv.*, 2014, 4: 2284.
- [31] Jiang J, Kappler A. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42: 3563.
- [32] Hong Y G, Guo J, Xu Z C, Xu M Y, Sun G P. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 17: 428.
- [33] O'Loughlin E J. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42: 6876.
- [34] 洪义国(Hong Y G), 许玫英(Xu M Y), 郭俊(Guo J), 岑英华(Cen Y H), 孙国萍(Sun G P). *应用与环境生物学报(Chinese Journal of Applied and Environmental Biology)*, 2005, 11(5):642.
- [35] Pearce C I, Christie R, Boothman C, von Canstein H, Guthrie J T, Lloyd J R. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 95: 692.
- [36] Pearce C I, Guthrie J T, Lloyd J R. *Dyes Pigments*, 2008, 76: 696.
- [37] Cervantes F J, Enriquez J E, Mendoza Hernandez M R, Razo Flores E, Field J A. *Water Sci. Technol.*, 2006, 54: 171.
- [38] Chung K T, Fulk G E, Egan M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1978, 35: 558.
- [39] Hashsham S A, Freedman D. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 4537.
- [40] Zhang C F, Katayama A. *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46: 6575.
- [41] Claudia G B, Field J A. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 89: 539.
- [42] Cervantes F J, Vu-Thi-Thu L, Lettinga G, Field J A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 64: 702.
- [43] Yang Y G, Xu M Y, Guo J, Sun G P. *Process Biochem.*, 2012, 47: 1707.
- [44] 卢娜(Lu N), 周顺桂(Zhou S G), 倪晋仁(Ni J R). *化学进展(Progress in Chemistry)*, 2008, 20(7/8): 1233.
- [45] Choi Y, Kim N, Kim S, Jung S. *B. Kor. Chem. Soc.*, 2003, 24: 437.
- [46] Park D H, Zeikus J G. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 1292.
- [47] Park D H, Zeikus J G. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 59: 58.
- [48] Zhang D D, Zhang C F, Li Z L, Suzuki D, Komatsu D D, Tsunogai U, Katayama A. *Bioresour. Technol.*, 2014, 164: 232.
- [49] Aulenta F, Catervi A, Majone M, Panero S, Reale P, Rossetti S. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42: 6185.
- [50] Thrash J C, Van Trump J I, Weber K A, Miller E, Achenbach L A, Coates J D. *Environ. Sci. Technol.*, 2007, 41: 1740.
- [51] Liu R H, Sheng G P, Sun M, Zang G L, Li W W, Tong Z H, Dong F, Lam M H W, Yu H Q. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 89: 201.
- [52] Liu Y, Kim H, Franklin R R, Bond D R. *ChemPhysChem.*, 2011, 12: 2235.