

土壤微生物—腐殖质—矿物间的胞外电子传递机制研究进展*

吴云当^{1,2,3} 李芳柏^{1†} 刘同旭¹

(1 广东省生态环境与土壤研究所, 广州 510650)

(2 中国科学院广州地球化学研究所, 广州 510640)

(3 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 微生物胞外电子传递是地球表层系统元素循环与能量交换的重要驱动力。近年来, 以微生物—腐殖质—矿物之间电子转移为核心的生物地球化学过程得到重视, 拓展了以带电的土壤胶体与离子之间的相互作用为重心的土壤界面过程的内涵, 成为地球表层系统物质间相互作用新的关注点, 启示我们从化学与生物两个角度重新认识地球表层系统过程。本文从微生物、腐殖质和矿物等要素入手, 综述了其地球化学角色与功能, 讨论了它们之间的相互关系以及胞外电子传递的途径与方式; 从热力学的角度探讨了胞外电子传递过程的能量变化, 从动力学的角度探讨了胞外电子传递的传质与速率; 介绍了若干胞外电子传递的研究方法; 并提出了今后需要重点关注的重要科学问题。

关键词 胞外电子传递; 微生物; 矿物; 腐殖质; 热力学; 动力学

中图分类号 S154.3; Q937 文献标识码 A

地球表层系统中, 微生物黏附到矿物表面是一个基本的生物地球化学过程, 包括生物行为与非生物行为。生物行为主要指微生物自身的生长、发育、繁殖与代谢等。非生物行为则主要是微生物表面物质或分泌物与矿物表面的吸附/解吸、络合/溶解、氧化/还原的物理化学过程, 矿物为这些过程提供物理支撑作用。

微生物厌氧呼吸驱动的氧化还原过程是联系不同圈层物质与能量交换的重要纽带^[1], 是大气圈、水圈以及土壤圈中水、土、气、生、岩各要素相互作用的核心过程之一。微生物厌氧代谢是地球微生物最早的代谢方式, 地球厌氧环境中, 微生物通过与矿物的相互作用获得必需营养元素与能量^[2-4]。

有机质是微生物与矿物相互作用过程的重要

参与者。环境中有机质组成与结构复杂, 低分子量有机质能够被微生物吸收利用, 作为电子供体; 而大分子腐殖质无法进入细胞内部, 可充当电子穿梭体。传统观点认为, 腐殖质主要参与吸附、络合和配位等物理化学过程, 而生物地球化学的观点认为, 腐殖质能够担当电子穿梭体的角色, 参与微生物在地表过程中的物质循环与能量代谢^[4-6]。

因此, 我们将重点关注微生物—腐殖质—矿物间胞外电子传递过程。该过程在地球表层系统中呈现出多要素、多元素、多界面、多过程的“四多”特征^[4, 7-9]。其内涵是: 水、土、气、生、岩多要素相互作用; 碳、氮、硫、铁、锰多元素循环^[9-11]; 水/土、水/气、生物/非生物多界面反应; 异化金属还原、有机污染物降解、重金属迁移

* 国家杰出青年科学基金项目 (41025003) 和国家优秀青年科学基金项目 (41522105) 共同资助 Supported by the National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars (No. 41025003) and the National Natural Science Foundation for Excellent Young Scholars (No. 41522105)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cefbli@soil.gd.cn

作者简介: 吴云当 (1989—), 男, 湖南人, 博士研究生, 主要从事生物地球化学相关研究。E-mail: wuyundang@163.com

收稿日期: 2015-11-16; 收到修改稿日期: 2015-12-22

转化等多过程耦合。因此,胞外电子传递影响着自然界元素的生物地球化学循环,以及一系列重要地球表层过程,包括矿物的形成与演化、养分循环与污染物的环境行为等^[11-12]。

1 胞外电子传递三要素:微生物、腐殖质与矿物

1.1 胞外呼吸微生物

微生物胞外电子传递(extracellular electron transfer, EET)是微生物胞外呼吸的本质,是微生物的厌氧代谢方式。胞外呼吸是指厌氧条件下,微生物在胞内彻底氧化有机物释放电子,产生的电子经胞内呼吸链传递到胞外电子受体,并产生能量维持自身生长的过程^[2-3]。1987年,美国科学家Lovley等^[2]首次从沉积物中分离获取了一株能够利用胞外固态物质为电子受体的微生物——*Geobacter metallireducens* GS-15。次年,美国科学家Myers和Nealson^[3]从纽约Oneida湖的沉积物中分离获取了另一株具有相同能力的微生物——*Shewanella oneidensis* MR-1。这两株胞外呼吸菌的发现与深入研究,极大地加深了人们对胞外呼吸过程的认识,开启了微生物胞外呼吸研究的新篇章。

胞外呼吸菌在海洋沉积物、厌氧土壤和湿地沉积物中含量丰富。以地杆菌属与希瓦氏菌属为代表的胞外呼吸菌种相继从自然界分离获得。其他菌株,包括从我国红壤区获得的中国红细菌(*Sinorhodobacter ferrireducens*)胞外呼吸新属^[13]、*Comamonas guangdongensis*胞外呼吸新菌^[14]等,也相继被发现;此外,一些极端环境下生存的微生物的胞外呼吸功能也得到认识,如嗜碱菌*Corynebacterium humireducens* MFC-5等^[15]。

胞外呼吸微生物的重要性在于它与地表各要素间的相互作用。胞外呼吸过程在铁的生物地球化学循环以及氧化铁成矿过程中起着不可忽视的作用:电子的得失影响着铁氧化物的溶解性、价态和形貌等,并导致次生矿物的产生^[16];同时,胞外呼吸微生物驱动的铁循环过程又影响着有机碳源的利用,它对微生物活性的增强影响着有机碳源的代谢,参与全球碳循环。胞外呼吸微生物所能利用的电子受体包括一系列的有毒金属以及毒性有机物,各过程间相互耦合,作用于有机污染物的厌氧降解

与重金属迁移转化过程,具有重要的环境地球化学意义^[17-18]。胞外呼吸微生物的研究,改变了人们对于自然界各物种之间相互作用的传统理解,从原来土壤胶粒、离子和质子间作用的研究拓展至胞外呼吸微生物、腐殖质以及矿物之间的电子转移过程研究^[2-4, 10, 17],为深入理解元素地球化学循环提供了新的理论依据。

1.2 腐殖质

腐殖质是土壤有机质的主要组成部分,它们影响着土壤养分的保持及土壤结构的形成,为植物提供必需的氮、硫、磷和钾等元素。腐殖质分为胡敏酸、富啡酸和胡敏素三大类^[19]。1996年, Lovley等^[4]发现,腐殖质能够作为电子受体参与*Geobacter metallireducens*的胞外呼吸过程。由于腐殖质在地表环境中几乎无处不在,因此这个发现意义重大。研究表明,腐殖质能够被异化铁还原菌^[6]、发酵型铁还原菌^[20]、硫还原菌和产甲烷菌等^[6, 21]等多类菌株作为电子受体使用,是自然界重要的氧化还原活性物种。

与以往对腐殖质关注的不同之处在于,微生物—腐殖质—矿物体系中,研究者主要关注其氧化还原活性,特别是参与反应的基团以及反应位点的重要性等。一直以来,醌基被认为是腐殖质中最重要的直接参与电子传递的官能团^[4]。环境中腐殖质的提取与表征比较困难,组成与结构复杂,因此,多种醌类物质被作为类腐殖质模拟物进行研究,包括AQDS(9, 10-anthraquinone-2, 6-disulfonic acid, 蒽醌-2, 6-二磺酸)、2-HNQ(2-Hydroxy-1, 4-naphoquinone, 2-羟基-1, 4-萘醌)、AQS(9, 10-anthraquinone-2-sulfonic acid, 2-蒽醌磺酸)以及AQC(9, 10-anthraquinone-2-carboxylic acid, 蒽醌-2-羧酸)等^[22-23]。事实上,除了醌基以外,类固态腐殖质生物炭的表面包含大量醌基和吩嗪类基团,都是参与电子传递的重要反应位点^[21, 24]。Ratasuk和Nanny^[25]通过研究14种不同的胡敏酸与富啡酸,发现其参与电子转移的反应位点包括2个醌基的位点与1个非醌基位点,其中非醌基位点在参与氧化还原反应时提供了约21%~56%的电子转移容量,揭示了非醌类基团的电子传递功能与相对贡献。无论是醌基或非醌基团,其氧化还原活性位点是腐殖质参与胞外电子传递的活性中心,是胞外电子传递链中重要一环。

1.3 矿物

矿物既是微生物生存附着的黏附界面，又是胞外呼吸重要的电子受体。铁呼吸是最重要的微生物胞外呼吸，纤铁矿、水铁矿、赤铁矿和磁赤铁矿等氧化铁矿物能够接受胞外电子，直接参与胞外呼吸电子传递过程^[3, 16, 26]。微生物与铁矿的作用受氧化铁的赋存状态影响，包括其晶型、结晶度、表面积和粒径^[16, 27-28]等。如纳米赤铁矿与大颗粒赤铁矿相比，其生物有效性显著增强^[27]，这可能是由于赤铁矿与微生物的接触面积增大引起，也可能是因为纳米级的铁矿起到了增强胞外电子传递的导电作用^[29-30]。生成的亚铁则对胞外呼吸具有自我抑制作用，赤铁矿异化还原研究表明，随着二价铁生成的积累，铁还原过程开始受到亚铁传质的限制，并且受到热力学驱动力变化的影响，还原效率降低^[28]。

此外，参与胞外呼吸的氧化铁能够与铬Cr(VI)和铀U(VI)等高价金属氧化物相互作用或耦合反应，改变其水溶性与毒性，从而显著影响其环境行为；同时高价金属氧化物也能够作为电子受体直接被胞外呼吸微生物还原^[31-32]。在微生物Cr(VI)还原过程中，铁还原过程的耦合起到关键的催化作用，亚铁介导的铬还原远超过微生物直接还原六价铬的作用，这可能是土壤中六价铬脱毒的重要途径^[33]。U(VI)则一方面能够被胞外呼吸菌直接异化还原沉淀，同时微生物还原生成的Fe(II)也能够间接地作用于U(VI)，生成溶解性较低的U(IV)化合物，达到铀固定的目的^[34]。对于类金属砷酸盐，砷显著影响铁的生物成矿，含砷的施威特曼石(Schwertmannite)异化还原过程中，低砷含量(小于0.3 wt%)条件下矿化产物为磁铁矿，高砷含量(大于0.79 wt%)条件下则有针铁矿生成^[35]。

氧化铁还具有半导体性质：一方面，矿物的导带能够传递胞外呼吸电子，可能存在从微生物外膜细胞色素c—矿物导带—底物的电子传递途径，以类似“半导体导带机制”加速微生物与电子受体之间的电子传递^[36]；另一方面，矿物受光激发产生的电子又能够回传至微生物，实现矿物—细胞色素c的电子传递，作为微生物能量的来源反作用于微生物的生长代谢^[37]。可见，理解异化铁还原过程是理解微生物作用下地球表层各金属氧化物迁移转化的枢纽。

2 胞外电子传递途径与方式

胞外呼吸微生物—腐殖质—矿物之间的电子传递过程是驱动元素生物地球化学循环的核心过程。微生物如何将电子从胞内传递至细胞膜外？电子到达细胞膜表面之后又如何被传递至最终的电子受体？这些是微生物—腐殖质—矿物相互作用机制的核心科学问题。

2.1 胞外呼吸微生物的电子传递链

“非导电”的微生物膜之所以能够传递电子，关键在于微生物细胞内膜—周质—外膜结构中具有多个不同特征细胞色素c(c-Cyts)，它们之间构成了一条由内向完整的电子传递链，实现电子的胞外传输。以模式菌*Shewanella oneidensis* MR-1为例，电子由内向外的传递途径如图1所示：

(1) 首先，电子经由内膜上的醌类物质传递至内膜上的CymA蛋白^[38]，CymA拥有4个Heme结构，其电位范围为-350~0 mV^[39]；(2) CymA的电子通过周质空间的STC(Small tetrahaem cytochromec)、FccA(Flavocytochrome)以及ScyA(Monohaem cytochrome c5)蛋白^[40]；(3) 继而传递至细胞周质与外膜内部的MtrA^[41]，MtrA是一个长度达到104Å，宽约50Å的长条状跨膜蛋白^[42]，跨膜部分与MtrB蛋白相结合，MtrB呈折叠状分布于细胞外膜中^[43]，与MtrA结合在一起由细胞外膜外部深入至周质空间，接受CymA传递的电子，并由MtrA的10个Heme负责运输；(4) Heme结构将电子源源不断地传导至细胞膜表面的MtrC或OmcA蛋白^[38, 43-44]。以MtrC为例，它包含10个Heme结构，各Heme的标准电极电位大约在-312~-44 mV之间，在热力学上满足对外传递电子的要求，能够作用于胞外电子受体，是微生物细胞与外界受体传递电子的重要节点^[44]。

微生物由内而外的电子传递，是微生物自身重要的代谢过程，众多c-Cyts构成一个相互协调的整体。研究表明，在蛋白与矿物作用过程中，MtrCAB复合蛋白通过微生物由内而外的电子传递方式运作，较单纯提取的MtrC纯蛋白与矿物反应的速率要高出6个数量级，说明各功能蛋白之间协调的重要性^[45]。各c-Cyts之间相互协作，将电子传递至矿物、腐殖质等电子受体，形成完整的胞外呼吸电子传递链，实现胞外呼吸过程。

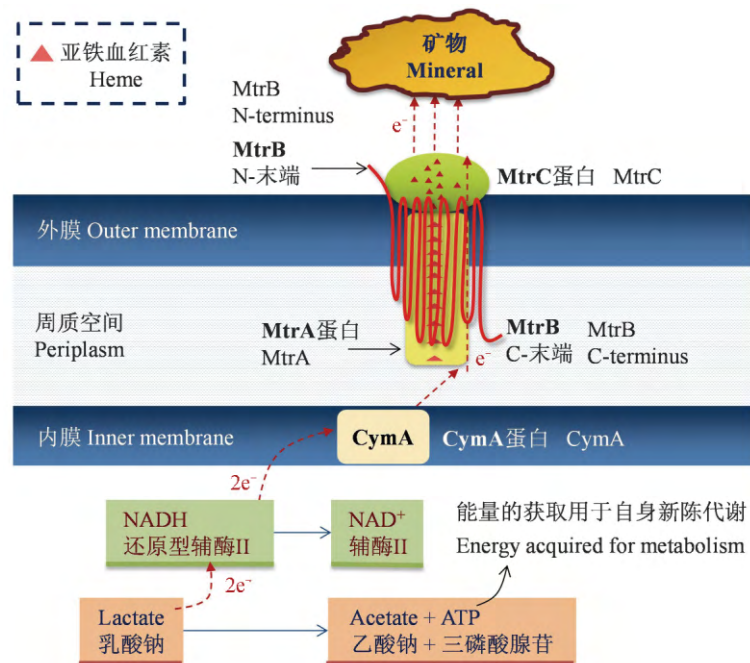


图1 以希瓦氏菌为例，微生物细胞膜上电子传递示意图：各细胞色素c之间相互协作，将电子传递至细胞外
Fig. 1 A schematic diagram of extracellular electron transfer in *Shewanella*: Electron transfer via interaction with *c*-type cytochromes

2.2 微生物与矿物间的“直接电子传递”

电子传递至微生物外膜表面之后，电子向外传递的最直接方式就是外膜细胞色素c与矿物直接接触。以*Shewanella*属为例，处于细胞膜最外端的MtrC和OmcA将直接负责将电子传递至膜外电子受体。若将MtrC和OmcA敲除，电子传递过程将被阻断，胞外呼吸能力大大减弱^[43, 46]。在*Geobacter*属中，与MtrC类似的蛋白是OmcZ，一个包含8个Heme的蛋白，敲除它同样会影响*c*-Cyts与固态电子受体的直接接触，阻断电子传递^[47]（图2a）。

除了外膜*c*-Cyts与矿物的直接接触之外，一种携带OmcS蛋白的导电纤毛状物质于2005年在*Geobacter*属中发现，被命名为纳米导线（Nanowire）^[48]。2006年，在*S. oneidensis* MR-1、蓝细菌等其他菌属中检测到了类似纳米导线的存在^[49]。导电原子力显微镜发现，*Geobacter*所生长出的纳米导线截面具有很强的导电性，是微生物胞外电子传递的重要运输途径，它延长了微生物呼吸电子传递的距离，使得远端的矿物也能被微生物代谢利用^[48]。

作为两类重要的胞外呼吸模式菌，地杆菌*Geobacter*和希瓦氏菌*Shewanella*的纳米导线在结构上存在很大的差异。研究表明，*Geobacter*菌的纤毛传递电子类似于金属导体，电子离域在芳香氨基酸交叠的大 π 键之中完成运输与传递^[50]；然

而，*Shewanella*菌的纳米导线并不是纤毛结构，而是细胞外膜与周质向外延伸的一种形式，它并不具有纤毛的电导性，但其表面附着了密集的*c*-Cyts，*c*-Cyts之间的电子跃迁使得电子沿着导线传递，并且与外膜的囊泡结构相互作用，形成一种多步骤电子跃迁的导电机制^[51-52]（图2b）。

当数量众多的胞外呼吸菌形成生物膜，纳米导线交织在一起时，微生物还能够形成纳米导线网络促进胞外电子的传递；并且，纳米导线与氧化铁交联，共同促进电子的传输，这使得微生物与不溶性矿物之间的作用更为复杂，电子传导的方式也更加丰富^[53-54]。这种以纳米导线进行胞外呼吸的方式很可能是地球化学循环中的一种普遍现象，它改善了微生物的厌氧生存环境，在微生物与矿物之间起着不可忽视的作用（图2c）。

2.3 微生物—腐殖质—矿物间的“间接电子传递”

腐殖质具有较高的地球化学活性，氧化态腐殖质接受胞外呼吸电子被还原，还原态腐殖质供给电子给矿物被氧化，以“穿梭体”的形式介导微生物与矿物之间的电子传递过程。

自然界中，地表大量存在的可溶性有机物（DOM）以及天然可溶性腐殖质^[55]，均能够加速微生物的异化铁还原过程，实现了微生物胞外呼吸电子的远距离和广范围传递。此外，固态腐殖质和

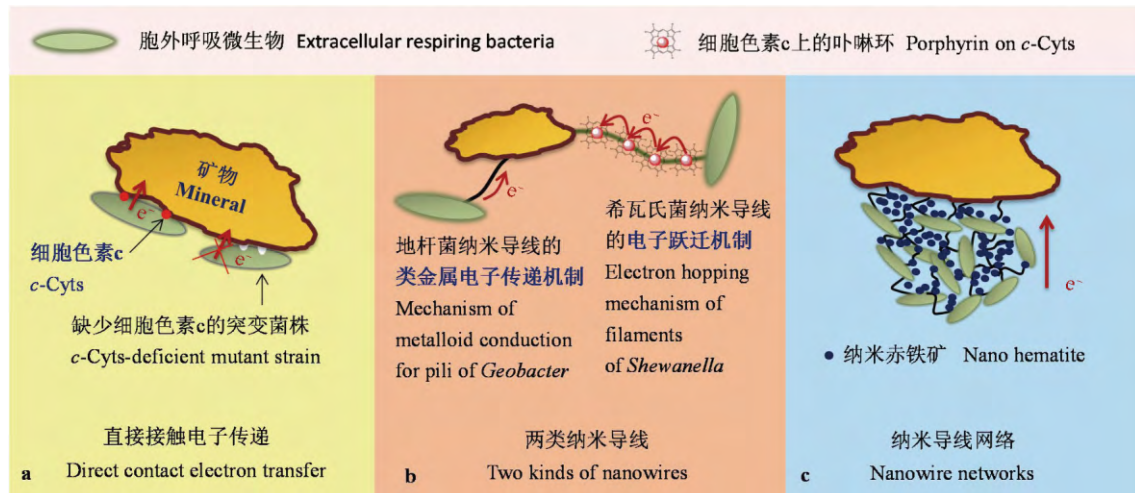


图2 微生物与矿物之间的“直接电子传递”方式（包括a. 直接接触；b. 纳米导线；c. 纳米导线网络）

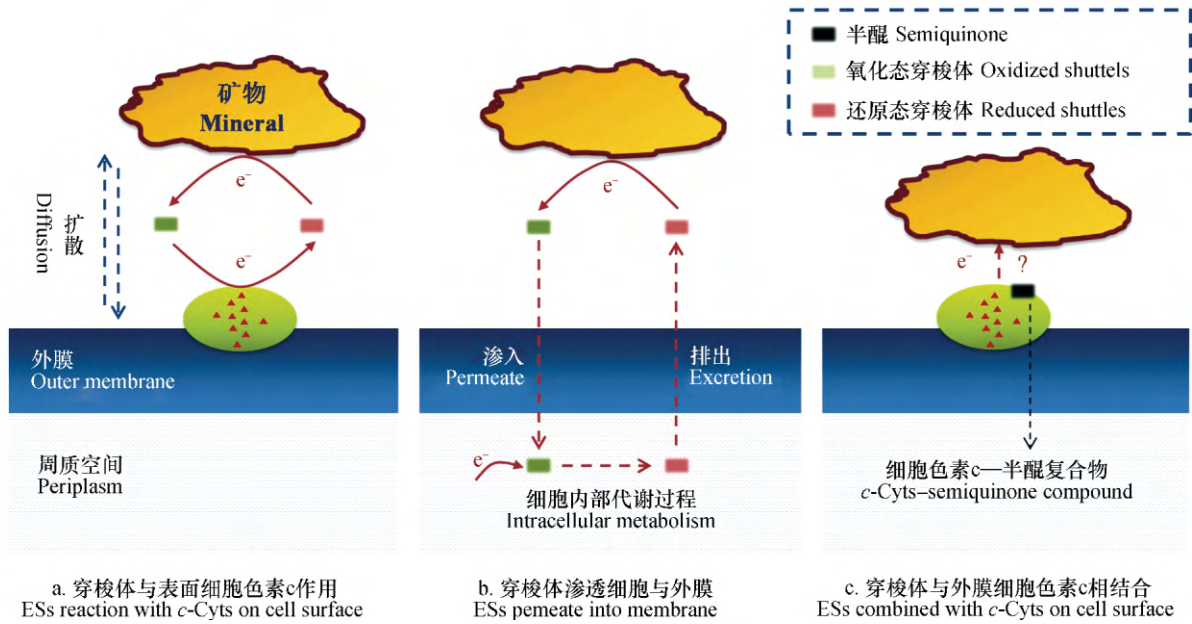
Fig. 2 Direct electron transfer pathways between microbes and minerals (a. Direct contact; b. Nanowires; c. Nanowire networks)

生物炭也被证实能够作为穿梭体介导电子传递，生物炭甚至可以在可溶性类腐殖质AQDS存在的条件下，进一步提高异化铁还原速率^[56]。电子穿梭效应既可以加速电子传递，又影响矿物的还原形态，如生物炭的存在使得水铁矿的还原产物由磁铁矿转变为菱铁矿^[56]。从微生物生态学角度分析，电子穿梭过程还可能影响微生物群落结构。研究表明，生物炭可能促进种间电子传递^[57]，并且还具有促进铁还原菌与脱氮菌生长的功能，说明电子穿梭类物质具有重要的生态学意义^[58]。腐殖质的电子穿梭过程主要与其氧化还原活性位点相关，与天然腐殖质类似的醌类与非醌物质均具有介导微生物胞外电子传递的作用，包括蒽醌、萘醌、黄素类、刃天青等，均能够促进异化铁还原^[23, 59]，同时可能影响铁还原产物的晶相转变过程，形成不同晶体结构的氧化铁矿物^[60]。

除此之外，微生物还能够分泌类腐殖质物质进行电子穿梭，参与能量代谢^[61]。Marsili等^[62]研究表明，*S. oneidensis* MR-1能够分泌黄素类物质。电化学结果显示，将含有微生物生长分泌的黄素类物质的培养液加入新的反应体系，反应体系所产生的电流在短时间内增加大约5倍，表明微生物分泌物黄素类物质大大加速了MR-1的胞外电子传递^[62]。MR-1分泌的黄素类物质主要是RF（Riboflavin，核黄素）和FMN（Flavin mononucleotide，黄素单核苷酸）^[63]，其分泌受到“*bfe*（*SO_0702*）”基因的控制^[64]。据估算，MR-1用于合成黄素类物质消耗ATP的速度只占细

菌总ATP消耗的约0.1%，是一种低耗能的胞外呼吸促进方式^[62]。这就意味着，微生物自身分泌类腐殖质作为电子穿梭体的行为，可能是微生物主动打破与矿物的物理隔离的本能行为，是自然界普遍存在的代谢形式。这种代谢形式在其他微生物中也已被证实，*Shewanella algae* BrY可以分泌黑色素作为电子穿梭体加速异化铁还原过程^[65]。*Pseudomonas aeruginosa* KRP1能产生绿脓菌素—吩嗪类物质进行电子穿梭，并且，所产生的绿脓菌素还能被其他微生物所利用^[66]。这类种间的协作将影响其他微生物的胞外呼吸，可能在促进自身代谢的同时改变环境微生物群落的组成与结构^[67]。

电子穿梭包含三种主要的传递形式：第一种方式，腐殖质通过扩散作用往返穿梭于矿物与微生物表面，与外膜MtrC、OmcA等c-Cyts直接接触发生氧化还原，从而传递电子^[68]（图3a），这是目前认可的最重要的电子穿梭形式。第二种方式，由于小分子的类腐殖质能够渗透到微生物膜内部，因此，穿梭体能与细胞膜内的c-Cyts作用，甚至渗入细胞内部参与代谢，最后将电子携带至外部固态电子受体，完成整个胞外呼吸过程^[43, 69]（图3b）；可能正是这个原因，使得不含外膜c-Cyts的大肠杆菌^[70]以及细胞壁较厚的革兰氏阳性菌^[71]也具有异化金属还原功能。然而，或许是由于这种途径的重要性有限，与之相关的研究仍相对较少。第三种方式，最新研究结果表明，穿梭体还能通过与微生物的结合与分离，调控微生物的胞外呼吸过程。当MR-1分泌的黄素类物质存在时，通过差分脉冲



注：“ESs”代表电子穿梭体 Note：ESs means electron shuttles

图3 微生物与矿物之间的“间接电子传递”方式 (包含a.穿梭体与细胞膜表面c-Cyts作用的穿梭过程；b.穿梭体渗透细胞外膜的穿梭过程；c.穿梭体与c-Cyts结合形成半醌复合物传递电子的过程)

Fig. 3 Indirect electron transfers between microbes and minerals (a. ESs reaction with c-Cyts on cell surface ; b. ESs permeate into membrane ; c. ESs combined with c-Cyts to form semiquinone compounds on cell surface)

伏安扫描所得到的外膜c-Cyts电位值由+50 mV负移至-145 mV，电位负移使得微生物还原驱动力增强，胞外呼吸能力提高；顺磁共振结果显示，这种电位的负移来源于黄素类物质与微生物外膜的MtrC结合，形成了c-Cyts-半醌复合物^[72]（图3c），c-Cyt-半醌复合物随着微生物代谢的强弱而形成与消散，从而改变微生物的表面电位，调控着微生物的呼吸过程。这种结合态半醌机理随后在地杆菌属中也被发现，可能是一种新的普遍的微生物自我调节代谢方式^[73-74]，但是电子如何从这种c-Cyts-半醌复合物传递至矿物表面，是继续穿梭？还是直接接触矿物传递？以及这个过程对微生物的重要性如何？目前仍不是很清楚。

3 胞外电子传递的热力学与动力学

微生物—腐殖质—矿物相互作用的胞外电子传递热力学与动力学，能够回答胞外电子传递过程的能量变化与速率问题，是解释此过程机理的另一关键。

3.1 胞外电子传递热力学

热力学主要研究物质系统的能量变化，从而

对化学反应的方向和进程作出准确的判断。根据方程 $G = -nEF$ （ G 为自由能变化， n 代表电荷转移数， E 为电极电势， F 为法拉第常数），从反应电势 E 的变化入手，可利用电化学手段研究胞外电子传递过程的热力学状况。根据能斯特方程：

$$E_h = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \left[\frac{a_{red}}{a_{ox}} \right]$$

如果已知反应物的标准电极电位 E^0 ，同时测量出反应物的氧化态与还原态的比值，即可计算其实际电势值，从而判断其反应趋势。

然而，在微生物胞外电子传递过程中，c-Cyts的氧化还原状态并不容易测量。常用的分子生物学手段，如RNA表达量分析、转录组分析等，均只能获得c-Cyts的总量变化。幸运的是，c-Cyts中含有大量血红素基团，该基团在410~419 nm、522 nm以及550 nm处具有较强吸收，因此，可以采用这些吸收峰来测试c-Cyts的状态变化，并结合电化学手段测试纯外膜蛋白的光谱电化学性质^[75-76]。然而，活体蛋白与分离纯化的蛋白并不相同，活体细菌是大颗粒，细胞表面强烈的散射光干扰带来很高的背景吸收，普通光谱测试无法顺利进行。近年来，利用紫外—可见漫透射光谱技术中的积分球扣

除散射光背景，从方法学上解决散射光背景吸收问题，活体 *c*-Cyts 测试得到应用。Nakamura 等^[76]首次采用紫外—可见漫透射光谱测试了希瓦氏菌 *c*-Cyts 的氧化还原性质变化。Liu 等^[77]将生物膜负载在透明导电电极表面，在特定电压条件下实时监测生物膜光谱信号的变化，首次将电化学信号与活体细菌中的 *c*-Cyts 变化关联起来。

在此基础上，Wu 等^[78]利用漫透射光谱法，原位研究了 *Shewanella putrefaciens* 200 的胞外电子传递过程，发现 AQDS 等类腐殖质的标准电极电位和平衡状态下氧化/还原物种比例是决定电子穿梭过程反应驱动力以及能量损耗的主要因素。氧化还原物种比例影响表观电极电位 E_h ，从而影响着穿梭体与电子受体之间的电势差，决定电子传递反应的驱动力^[78]。此过程的电势差主要以热能的形式散失，因此成为了穿梭过程能量损失的主要来源，其电势损失表达式如下：

$$\Delta E = E_{c-Cyt}^0 - E_{Hum}^0 - \frac{RT}{2F} \ln \frac{[c-Cyt_{red}][Hum_{ox}]}{[c-Cyt_{ox}][Hum_{red}]} \quad (1)$$

式中， E_{c-Cyt}^0 以及 E_{Hum}^0 分别代表 *c*-Cyts 与腐殖质穿梭体的标准电极电位，而 red 与 ox 则分别代表还原态与氧化态。可见，腐殖质的标准电极电位及其氧化还原状态，将直接决定此过程电势损失的大小。

标准电极电位和氧化还原反应平衡又共同决定了腐殖质的电子穿梭容量 (electron transfer capacity, ETC)，包括电子供给容量 (electron donor capacity, EDC) 和电子接收容量 (electron acceptor capacity, EAC)。研究表明，腐殖质的 ETC 与其穿梭介导铁还原的能力呈显著正相关关系，电子穿梭容量越大，其铁还原穿梭介导能力越强，微生物铁还原速率越快^[59, 79]。电子接收容量 (EAC) 可简化理解为如下方程：

$$EAC = \frac{[Hum_{red}]}{[Hum_{tot}]} = \frac{[Hum_{red}]}{[Hum_{red}] + [Hum_{ox}]} \quad (2)$$

式中， $[Hum_{red}]$ 代表还原态腐殖质的量， $[Hum_{ox}]$ 代表氧化态腐殖质的量。由于 $[Hum_{red}] : [Hum_{ox}]$ 将直接影响 E_h 值，EAC 的实质仍然与表观电极电位直接相关，EAC 对腐殖质穿梭过程影响的本质仍然归结于反应过程实际的表观电极电位的改变。热力学的分析，从驱动力的角度解析了反应体系能量损失规律，从分子层面揭示了电子穿梭体介导的胞外

电子传递的驱动机制。

3.2 胞外电子传递动力学

与反应过程能量变化相对应的，是反应的传质与速率问题。微生物胞外电子传递过程中，传递速率的大小将决定传递方式的效率。若将已发现的胞外电子传递方式分为三类：直接接触的电子传递、穿梭体介导的电子传递以及纳米导线和纳米导线网络传递，从动力学的角度，需要解释一个重要的疑问：三种传递方式哪一种最有效率？

2008 年，Torres 等^[80]根据莫诺方程推导出了微生物燃料电池模拟体系中微生物直接电子传递过程的传递效率。

$$j_{max} = \gamma_s q_{max} X_f L_{fa} \quad (3)$$

式中， L_{fa} 为微生物膜的厚度； X_f 代表有活性的生物量浓度； q_{max} 为最大底物利用速率； γ_s 为转化因子，有活性的生物量按 $2.8 \times 10^5 \text{ g dwt m}^{-3}$ 计算， γ_s 为 $860 \text{ mg BOD cm}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ^[80]；最大底物利用速率大约为 $72 \text{ mmol e}^{-} \text{ g}^{-1} \text{ dwt h}^{-1}$ ^[81-82]。由于生物膜厚度过大时外部电子无法顺利直接传递至受体电极， L_f 最大只能达到大约 $2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ，因此，由于表面生物量的限制，直接电子传递方式所能得到的最大电流效率 j_{max} 大约为 0.24 A m^{-2} 。

对于穿梭体介导的过程，无论穿梭体与微生物或穿梭体与电子受体之间的反应速率多么高效，穿梭体介导始终受到扩散作用的限制，这一过程必定满足菲克扩散定律，其最大电流密度 j 如下所示：

$$j = nF \left(\frac{D_{shuttle} \Delta C_{shuttle}}{\Delta z} \right) \quad (4)$$

式中， Δz 为扩散距离，在由微生物自然产生穿梭体的体系中，由于穿梭体浓度较低，仅 $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ 级别^[62]， $\Delta C_{shuttle}$ 为浓度梯度，按最大浓度梯度计算，为 $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ；若穿梭体要穿过 $1 \text{ } \mu\text{m}$ 的微生物膜， Δz 大约按 $1 \text{ } \mu\text{m}$ 计算； $D_{shuttle}$ 为扩散系数，常见类腐殖质的扩散系数近似于葡萄糖的扩散系数， $D_{shuttle} \approx D_{glucose}$ ^[83]，代入数据计算得到的最大电流密度仅为 0.13 A m^{-2} ，其最大电流密度仍然有限。

此外，纳米导线过程，Marcus 等^[84]进行了动力学建模，若将纳米导线视为一种半导体物质，则其满足欧姆定律，电流密度 j 符合以下公式：

$$j = - \frac{\kappa_{bio} (E_{OM} - E_{interface})}{\Delta z} \quad (5)$$

式中, E_{OM} 为细胞外膜电位, $E_{interface}$ 为电极表面电位, z 为导电距离, κ_{bio} 为纳米导线电导率。电流密度如果要达到 $A\ m^{-2}$ 级别, 纳米导线的电导率 κ_{bio} 必须满足 $> 10^{-3}\ mS\ cm^{-1}$ 。Torres等^[80, 85]利用 Nernst-monod方程拟合阳极微生物膜导电过程, 结果表明, 导电微生物膜的电导率达到了 $0.05\ mS\ cm^{-1}$, 佐证了纳米导线或类纳米导线过程高电导率的可能性, 而实测值也表明, 微生物所产生的电流密度是能够达到 $10\ A\ m^{-2}$ 级别的, 这也从侧面证实了纳米导线机制或其他固态物质构建的类纳米导线机制高传递效率的可能。

微生物胞外电子传递动力学的研究, 从电子传递速率以及传质速率的角度解析了不同途径的传递区别, 增进了胞外呼吸过程的基础理解。

4 胞外电子传递的研究方法

胞外呼吸微生物—腐殖质—矿物间电子传递过程研究的难点在于“四多”: 多要素相互作用、多元素循环、多过程耦合和多界面反应。因此, 需要综合国内外现有技术方法, 解决原位、在线、活体观测等技术难题。

4.1 电化学与光谱电化学技术研究胞外电子传递动力学与热力学机制

电化学分析手段被用于解决微生物—腐殖质—矿物间电子传递的通量、速率、阻力和氧化还原电位等基本信息。借鉴微生物燃料电池的基本原理, 以微生物反应池为阳极、矿物修饰电极为阴极, 能够实时在线监测微生物—矿物间的电子传递库伦量。循环伏安法能够直观地获得微生物外膜 *c*-Cyts 的氧化还原电位^[86], 根据不同扫速下峰电位的偏移, 采用 Butler-volmer 方程, 可以计算微生物胞外电子传递的速率^[87], 定量描述胞外电子传递动力学机制。电化学阻抗谱法是测试微生物—矿物间的电子传递阻力的有力工具^[88], 通过模拟电路的构建可以了解体系各部分传递的阻力来源。

除此之外, 差分脉冲伏安法被成功运用于 *c*-Cyts 与核黄素结合态物质的表征, 半峰宽的变化以及峰位置的改变, 预示着电子传递数量从 2 个电子转变至 1 个, 佐证了核黄素以半醌形式在 *c*-Cyts 上结合的机制^[62, 74]。

电化学还可以与原位漫透射光谱技术联用, 在测试电位的同时观察外膜 *c*-Cyts 氧化还原光谱变

化, 这使得外膜 *c*-Cyts 的氧化还原平衡研究成为可能, 丰富了微生物与电活性物质作用的热力学数据, 为胞外电子传递过程热力学模型的建立提供了条件^[78]。

4.2 分子生物学技术研究外膜功能蛋白

微生物胞外电子传递过程在很大程度上受细胞膜结构、分泌物以及膜外构造的影响, 异化铁还原以及腐殖质还原过程中, 敲除编码某些蛋白的基因片段后, 如 *MtrC*、*MtrA*、*MtrB*、*OmcA*^[38]、*OmcF*^[89]、*OmcB*^[90]、*menC*^[7] 等, 微生物铁还原和腐殖质还原能力均大大下降, 证明了这些蛋白在胞外呼吸过程中的关键作用; 敲除纤毛基因 *pili* 以及 *OmcS* 等基因, 则证实了地杆菌纳米导线与纤毛存在的直接关系, 以及 *c*-Cyts 在纳米导线表面起到的电子传递作用^[48-49, 91]; 此外, 转录组学以及 RNA 反转录定量 PCR 的运用则可进一步阐明微生物基因表达与其胞外电子传递能力的定量关系^[29, 92]。可见, 以基因敲除技术控制变量, 电化学作为电子传递的表征手段, 结合转录组学以及 RNA 表达定量分析, 可针对外膜功能蛋白开展胞外电子传递机理的深入研究。

4.3 显微技术研究胞外电子传递的纳米导线与作用位点

研究胞外电子传递的常用显微技术包括透射电子显微镜 (TEM)^[48]、扫描电子显微镜 (SEM)^[49]、原子力显微镜 (AFM)^[48]、激光共聚焦显微镜 (CSLM)^[91]、免疫荧光成像技术^[51] 以及抗体识别力显微镜 (Ig-RFM)^[93] 等。

显微技术在胞外电子传递中最重要的应用是发现并深入研究微生物纳米导线机制。纳米导线的发现源于透射电镜拍摄到 *Geobacter metallireducens* 生长出连接到氧化铁表面的细丝, 导电原子力显微镜证实了这种细丝的电导性^[48]。并且, El-Naggar 等^[94] 突破性地 将显微技术与电化学联用, 检测到纳米导线切断前后微生物胞外电子传递的情况, 用直接证据证实了纳米导线在胞外呼吸中的作用。近期, 运用免疫荧光成像阐明了希瓦氏菌与地杆菌属纳米导线机制的差异, 剖析了希瓦氏菌纳米导线的“电子跃迁机制”, 使得纳米导线得到了较为透彻的认识^[51]。

4.4 时间分辨光谱法研究功能蛋白与底物间的分子反应动力学

胞外呼吸功能蛋白与 Fe (III) 的反应动力

学是铁还原胞外电子传递的核心科学问题之一。近年来，瞬态动力学技术可提供重要的研究手段^[95]，Qian等^[75]和Ross等^[45]采用停流光谱仪（Stopped-flow）对功能蛋白与Fe（III）之间的快速反应动力学进行了研究，获得了c-Cyts与不同电子受体在0.1秒内的反应动力学数据，为快速反应动力学模型的建立提供了可能。

5 需要重点关注的科学问题与展望

微生物—腐殖质—矿物胞外电子传递过程的研究，是解析元素生物地球化学循环的关键一环，也是理解地球表层微生物、矿物和有机质环境行为的关键。对于此过程，有以下几个值得关注的方面：

5.1 胞外呼吸微生物类群的认知、资源发掘和分布规律

胞外呼吸菌不是一个分类学上的概念，而是具有胞外呼吸能力的微生物的统称。受技术所限，缺乏对胞外呼吸菌共同的遗传学特征与进化特征的认知；目前还欠缺有效的分子生物学技术鉴定环境中的所有胞外呼吸菌类群，因此，也无法认知其在环境中的分布规律。此外，我国报道的模式菌株较少。稻田与富营养化湖泊是我国典型的厌氧生态系统，人为干扰强烈，大量的碳氮营养输入^[96]，我国应加强稻田与湖泊胞外呼吸微生物资源的挖掘与研究^[97-98]。

5.2 外膜功能蛋白结构及其电子传递功能

微生物胞外呼吸相关蛋白的表达水平、结构与电子传递功能的关系是胞外电子传递动力学和热力学关注的核心科学问题，也是难点。采用分离纯化技术获取外膜蛋白，是研究功能蛋白结构域性质的有效手段^[43, 75]。然而纯化蛋白与活体细菌中的蛋白存在较大差异^[45, 76]。直接测试活菌中功能蛋白含量可为胞外电子传递热力学研究提供真实可靠的依据。此外，采用先进的分子生物学手段，构建胞外呼吸菌的基因组学和蛋白组学信息库，有助于从分子、基因与蛋白水平阐明胞外电子传递机制。

5.3 腐殖质结构及其电子传递功能

腐殖质加速胞外电子转移的能力一方面受其氧化还原电位（ E^0 ）控制，另一方面，近期研究表明该能力还受其电子穿梭容量控制^[79]。Aeschbacher等^[99]建立了完善的腐殖质电子穿梭

能力的测试方法，对于腐殖质电子传递能力与其结构和活性的关系研究提供重要方法基础。腐殖质能够大大增加水稻土中具有胞外呼吸功能的地杆菌、脱卤素杆菌与脱亚硫酸菌的丰度，这说明腐殖质具有胞外呼吸功能菌激活剂的作用^[58]。因此，土壤腐殖质的结构与电子传递功能的关系，以及腐殖质结构与具体功能微生物群落之间的关系，均是需要重点关注的科学问题。

5.4 矿物结构及其胞外电子传递功能

前期研究表明，矿物的比表面积、颗粒尺寸和溶解性等性质直接影响微生物与矿物间的电子传递过程；近期研究表明，矿物的半导体性质也在微生物与矿物间的胞外电子传递过程中起着重要作用^[53, 100]。矿物半导体导带可以介导胞外电子传递，从而影响微生物与电子受体之间的反应速率；不同矿物具有不同的导带能级，从而导致同一微生物在不同矿物体系中电子传递能力的差异，这些机制目前尚缺乏系统深入的研究。另一方面，土壤体系中，矿物作为电子受体，反过来影响微生物的活性与丰度，甚至作为微生物激活剂，促进某些功能微生物的生长，这些作用机制是需要关注的重要科学问题^[37]。

5.5 胞外电子传递的热力学与动力学模型

胞外电子传递的本质是外膜蛋白、电子穿梭体和电子受体之间的氧化还原反应，以往的研究多以效应为主，分子反应热力学与动力学研究尚不系统。要建立分子层面的反应热力学与动力学理论模型，需要定性解析胞外电子传递链式反应，获得各步骤的基元反应方程；同时需要从电子、分子（蛋白）和单菌的水平，结合时间分辨，综合运用光谱学、电化学和生物信息学技术相结合的新方法，获得各关键活性物种的反应动力学与热力学信息。在此基础上，将理论与实验分析相结合，建立反应模型，定量描述胞外电子传递机制。

5.6 胞外电子传递与重要环境过程的耦合效应

已有大量的研究结果表明，微生物—腐殖质—矿物间的相互作用与土壤中有有机碳矿化、温室气体排放、养分循环和污染物转化等关键生物地球化学过程密切相关^[5, 17, 16, 26]。如何阐明微生物、腐殖质、矿物等要素在这些过程中的角色与功能，是地球科学关注的重点，也是运用微生物—腐殖质—矿物间的电子传递微观机制，解释其生物地球化学效应的重要前提。需要重点关注的环境过程包括：中

性厌氧亚铁氧化耦合二氧化碳还原、铁循环耦合砷/镉等重金属的环境行为、异化铁还原耦合有机碳的矿化以及铁循环耦合氮循环等。

参考文献

- [1] 宋长青, 吴金水, 陆雅海, 等. 中国土壤微生物学研究 10 年回顾. 地球科学进展, 2013, 28 (10) : 1087—1105
Song C Q, Wu J S, Lu Y H, et al. Advances of soil microbiology in the last decade in China (In Chinese). Advances in Earth Science, 2013, 28 (10) : 1087—1105
- [2] Lovley D R, Stolz J F, Nord G L, et al. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. Nature, 1987, 330 (6145) : 252—254
- [3] Myers C R, Nealson K H. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. Science, 1988, 240 (4857) : 1319—1321
- [4] Lovley D R, Coates J D, Blunt-Harris E L, et al. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. Nature, 1996, 382 (6590) : 445—448
- [5] Klüpfel L, Piepenbrock A, Kappler A, et al. Humic substances as fully regenerable electron acceptors in recurrently anoxic environments. Nature Geoscience, 2014, 7 (3) : 195—200
- [6] Lovley D R, Fraga J L, Blunt-Harris E L, et al. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 1998, 26 (3) : 152—157
- [7] Newman D K, Kolter R. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. Nature, 2000, 405 (6782) : 94—97
- [8] Vargas M, Kashefi K, Blunt-Harris E L, et al. Microbiological evidence for Fe (III) reduction on early Earth. Nature, 1998, 395 (6697) : 65—67
- [9] Flynn T M, O'Loughlin E J, Mishra B, et al. Sulfur-mediated electron shuttling during bacterial iron reduction. Science, 2014, 344 (6187) : 1039—1042
- [10] Melton E D, Swanner E D, Behrens S, et al. The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12 (12) : 797—808
- [11] Friedrich M W, Finster K W. How sulfur beats iron. Science, 2014, 344 (6187) : 974—975
- [12] Borch T, Kretzschmar R, Kappler A, et al. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. Environmental Science & Technology, 2009, 44 (1) : 15—23
- [13] Yang G Q, Chen M, Zhou S G, et al. *Sinorhodobacter ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a non-phototrophic iron-reducing bacterium closely related to phototrophic *Rhodobacter* species. Antonie van Leeuwenhoek, 2013, 104 (5) : 715—724
- [14] Zhang J, Wang Y Q, Zhou S G, et al. *Comamonas guangdongensis* sp. nov., isolated from subterranean forest sediment, and emended description of the genus *Comamonas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63 (Pt 3) : 809—814
- [15] Wu C Y, Zhuang L, Zhou S G, et al. Humic substance-mediated reduction of iron (III) oxides and degradation of 2, 4 D by an alkaliphilic bacterium, *Corynebacterium humireducens* MFC-5. Microbial Biotechnology, 2013, 6 (2) : 141—149
- [16] O'Loughlin E J, Gorski C A, Scherer M M, et al. Effects of oxyanions, natural organic matter, and bacterial cell numbers on the bioreduction of lepidocrocite (gamma-FeOOH) and the formation of secondary mineralization products. Environmental Science & Technology, 2010, 44 (12) : 4570—4576
- [17] Lovley D R. Dissimilatory metal reduction. Annual Review of Microbiology, 1993, 47 (3) : 263—290
- [18] van der Zee F P, Cervantes F J. Impact and application of electron shuttles on the redox (bio) transformation of contaminants: A review. Biotechnology Advances, 2009, 27 (3) : 256—277
- [19] 文启孝. 土壤有机质的组成、形成和分解. 土壤, 1984, 16 (4) : 121—129
Wen Q X. The composition, formation and decomposition of soil organic matter (In Chinese). Soils, 1984, 16 (4) : 121—129
- [20] Benz M, Schink B, Brune A. Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64 (11) : 4507—4512
- [21] Klüpfel L, Keiluweit M, Kleber M, et al. Redox properties of plant biomass-derived black carbon (biochar). Environmental Science & Technology, 2014, 48 (10) : 5601—5611
- [22] O'Loughlin E J. Effects of electron transfer mediators on the bioreduction of lepidocrocite (-FeOOH) by *Shewanella putrefaciens* CN32. Environmental Science & Technology, 2008, 42 (18) : 6876—6882
- [23] Wolf M, Kappler A, Jiang J, et al. Effects of humic substances and quinones at low concentrations on ferrihydrite

- reduction by *Geobacter metallireducens*. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43 (15) : 5679—5685
- [24] Roden E E , Kappler A , Bauer I , et al. Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances. *Nature Geoscience*, 2010, 3 (6) : 417—421
- [25] Ratasuk N , Nanny M A. Characterization and quantification of reversible redox sites in humic substances. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41 (22) : 7844—7850
- [26] O'Loughlin E J , Boyanov M I , Flynn T M , et al. Effects of bound phosphate on the bioreduction of lepidocrocite (γ -FeOOH) and maghemite (γ -Fe₂O₃) and formation of secondary minerals. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47 (16) : 9157—9166
- [27] Dehner C A , Barton L , Maurice P A , et al. Size-dependent bioavailability of hematite (α -Fe₂O₃) nanoparticles to a common aerobic bacterium. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45 (3) : 977—983
- [28] Royer R A , Dempsey B A , Jeon B H , et al. Inhibition of biological reductive dissolution of hematite by ferrous iron. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38 (1) : 187—193
- [29] Liu F , Rotaru A E , Shrestha P M , et al. Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated *c*-type cytochrome in extracellular electron exchange. *Environmental Microbiology*, 2015, 17 (3) : 648—655
- [30] Li H , Chang J , Liu P , et al. Direct interspecies electron transfer accelerates syntrophic oxidation of butyrate in paddy soil enrichments. *Environmental Microbiology*, 2015, 17 (5) : 1533—1547
- [31] Rui X , Kwon M J , O'Loughlin E J , et al. Bioreduction of hydrogen uranyl phosphate : Mechanisms and U (IV) products. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47 (11) : 5668—5678
- [32] Xafenias N , Zhang Y , Banks C J. Enhanced performance of hexavalent chromium reducing cathodes in the presence of *Shewanella oneidensis* MR-1 and lactate. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47 (9) : 4512—4520
- [33] Wielinga B , Mizuba M M , Hansel C M , et al. Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35 (3) : 522—527
- [34] Lee J H , Fredrickson J K , Kukkadapu R K , et al. Microbial reductive transformation of phyllosilicate Fe (III) and U (VI) in fluvial subsurface sediments. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46 (7) : 3721—3730
- [35] Cutting R S , Coker V S , Telling N D , et al. Microbial reduction of arsenic-doped schwertmannite by *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46 (22) : 12591—12599
- [36] Zhang W , Li X M , Liu T X , et al. Enhanced nitrate reduction and current generation by *Bacillus* sp. in the presence of iron oxides. *Journal of Soils and Sediments*, 2012, 12 (3) : 354—365
- [37] Lu A , Li Y , Jin S , et al. Growth of non-phototrophic microorganisms using solar energy through mineral photocatalysis. *Nature Communications*, 2012, 3 : 768
- [38] Shi L , Rosso K M , Clarke T A , et al. Molecular underpinnings of Fe (III) oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3 : 50
- [39] Firer-Sherwood M , Pulcu G S , Elliott S J. Electrochemical interrogations of the Mtr cytochromes from *Shewanella* : Opening a potential window. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 13 (6) : 849—854
- [40] Bruno M F , Catarina M P , Sonia E N , et al. Mind the gap : Cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochemical Journal*, 2013, 449 (1) : 101—108
- [41] Bird L J , Bonnefoy V , Newman D K. Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends in Microbiology*, 2011, 19 (7) : 330—340
- [42] Firer-Sherwood M A , Ando N , Drennan C L , et al. Solution-based structural analysis of the decaheme cytochrome , MtrA , by small-angle X-ray scattering and analytical ultracentrifugation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115 (38) : 11208—11214
- [43] White G F , Shi Z , Shi L , et al. Rapid electron exchange between surface-exposed bacterial cytochromes and Fe (III) minerals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110 (16) : 6346—6351
- [44] Clarke T A , Edwards M J , Gates A J , et al. Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108 (23) : 9384—9389
- [45] Ross D E , Brantley S L , Tien M. Kinetic characterization of OmcA and MtrC , terminal reductases involved in respiratory electron transfer for dissimilatory iron reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (16) : 5218—5226
- [46] Coursolle D , Baron D B , Bond D R , et al. The Mtr respiratory pathway is essential for reducing flavins and electrodes in *Shewanella oneidensis*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (2) : 467—474
- [47] Nevin K P , Kim B C , Glaven R H , et al. Anode biofilm

- transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *PLoS One*, 2009, 4 (5) : e5628
- [48] Reguera G, McCarthy K D, Mehta T, et al. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 2005, 435 (7045) : 1098—1101
- [49] Gorby Y A, Yanina S, McLean J S, et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103 (30) : 11358—11363
- [50] Malvankar N S, Lovley D R. Microbial nanowires for bioenergy applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27 (6) : 88—95
- [51] Pirbadian S, Barchinger S E, Leung K M, et al. *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111 (35) : 12883—12888
- [52] Pirbadian S, El-Naggar M Y. Multistep hopping and extracellular charge transfer in microbial redox chains. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, 14 (40) : 13802—13808
- [53] Nakamura R, Kai F, Okamoto A, et al. Self-constructed electrically conductive bacterial networks. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48 (3) : 508—511
- [54] Li D B, Cheng Y Y, Li L L, et al. Light-driven microbial dissimilatory electron transfer to hematite. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014, 16 (42) : 23003—23011
- [55] Zhang H, Weber E J. Elucidating the role of electron shuttles in reductive transformations in anaerobic sediments. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43 (4) : 1042—1048
- [56] Kappler A, Wuestner M L, Ruecker A, et al. Biochar as an electron shuttle between bacteria and Fe (III) minerals. *Environmental Science & Technology Letters*, 2014, 1 (8) : 339—344
- [57] Chen S, Rotaru A E, Shrestha P M, et al. Promoting interspecies electron transfer with biochar. *Scientific Reports*, 2014, 4 (20) : 163—168
- [58] Tong H, Hu M, Li F B, et al. Biochar enhances the microbial and chemical transformation of pentachlorophenol in paddy soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 70 : 142—150
- [59] Li X M, Liu T X, Liu L, et al. Dependence of the electron transfer capacity on the kinetics of quinone-mediated Fe (III) reduction by two iron/humic reducing bacteria. *RSC Advances*, 2014, 4 (5) : 2284—2290
- [60] Bae S, Lee W. Biotransformation of lepidocrocite in the presence of quinones and flavins. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2013, 114 (4) : 144—155
- [61] Nevin K P, Lovley D R. Mechanisms for accessing insoluble Fe (III) oxide during dissimilatory Fe (III) reduction by *Geothrix fermentans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (5) : 2294—2299
- [62] Marsili E, Baron D B, Shikhare I D, et al. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105 (10) : 3968—3973
- [63] Wu C, Chen Y Y, Li B B, et al. Electron acceptor dependence of electron shuttle secretion and extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioresource Technology*, 2013, 136 (5) : 711—714
- [64] Kotloski N J, Gralnick J A. Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *MBio*, 2013, 4 (1) : e00553-12
- [65] Turick C E, Tisa L S, Caccavo Jr F. Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe (III) oxide reduction and as a terminal electron acceptor by *Shewanella algae* BrY. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (5) : 2436—2444
- [66] Rabaey K, Boon N, Höfte M, et al. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39 (9) : 3401—3408
- [67] Norman R S, Moeller P, McDonald T J, et al. Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (7) : 4004—4011
- [68] Gralnick J A, Newman D K. Extracellular respiration. *Molecular Microbiology*, 2007, 65 (1) : 1—11
- [69] Choi Y, Jung E, Kim S, et al. Membrane fluidity sensing microbial fuel cell. *Bioelectrochemistry*, 2003, 59 (1) : 121—127
- [70] Park D H, Zeikus J G. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (4) : 1292—1297
- [71] Boon N, Aelterman P, Clauwaert P, et al. Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 77 (5) : 1119—1129

- [72] Okamoto A , Hashimoto K , Nealson K H , et al. Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 2013 , 110 (19) : 7856—7861
- [73] Okamoto A , Nakamura R , Nealson K H , et al. Bound flavin model suggests similar electron transfer mechanisms in *Shewanella* and *Geobacter*. *ChemElectroChem* , 2014 , 1 (11) : 1808—1812
- [74] Okamoto A , Saito K , Inoue K , et al. Uptake of self-secreted flavins as bound cofactors for extracellular electron transfer in *Geobacter* species. *Energy & Environmental Science* , 2014 , 7 (4) : 1357—1361
- [75] Qian X , Mester T , Morgado L , et al. Biochemical characterization of purified OmcS , a *c*-type cytochrome required for insoluble Fe (III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* , 2011 , 1807 (4) : 404—412
- [76] Nakamura R , Ishii K , Hashimoto K. Electronic absorption spectra and redox properties of *c*-type cytochromes in living microbes. *Angewandte Chemie International Edition* , 2009 , 48 (9) : 1606—1608
- [77] Liu Y , Kim H , Franklin R R , et al. Linking spectral and electrochemical analysis to monitor *c*-type cytochrome redox status in living *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *ChemPhysChem* , 2011 , 12 (12) : 2235—2241
- [78] Wu Y D , Liu T X , Li X M , et al. Exogenous electron shuttle-mediated extracellular electron transfer of *Shewanella putrefaciens* 200 : Electrochemical parameters and thermodynamics. *Environmental Science & Technology* , 2014 , 48 (16) : 9306—9314
- [79] Li X M , Liu L , Liu T X , et al. Electron transfer capacity dependence of quinone-mediated Fe (III) reduction and current generation by *Klebsiella pneumoniae* L17. *Chemosphere* , 2013 , 92 (2) : 218—224
- [80] Torres C I , Marcus A K , Parameswaran P , et al. Kinetic experiments for evaluating the Nernst-Monod model for anode-respiring bacteria (ARB) in a biofilm anode. *Environmental Science & Technology* , 2008 , 42 (17) : 6593—6597
- [81] Paalme T , Elken R , Kahru A , et al. 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
- [82] Xu B , Jahic M , Enfors S O. Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichiacoli*. *Biotechnology Progress* , 1999 , 15 (1) : 81—90
- [83] Lide D R. *CRC handbook of physics and chemistry*. 82 nd ed. Boca Raton , Florida : CRC Press , 2001
- [84] Kato Marcus A , Torres C I , Rittmann B E. Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell. *Biotechnology and Bioengineering* , 2007 , 98 (6) : 1171—1182
- [85] Torres C I , Marcus A K , Lee H S , et al. A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* , 2009 , 34 (1) : 3—17
- [86] Armstrong F. Protein film voltammetry : Revealing the mechanisms of biological oxidation and reduction. *Russian Journal of Electrochemistry* , 2002 , 38 (1) : 49—62
- [87] Yuan Y , Zhou S S , Xu N , et al. Electrochemical characterization of anodic biofilms enriched with glucose and acetate in single-chamber microbial fuel cells. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* , 2011 , 82 (2) : 641—646
- [88] Xia X , Tokash J C , Zhang F , et al. Oxygen-reducing biocathodes operating with passive oxygen transfer in microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology* , 2013 , 47 (4) : 2085—2091
- [89] Kim B C , Postier B L , Didonato R J , et al. Insights into genes involved in electricity generation in *Geobacter sulfurreducens* via whole genome microarray analysis of the OmcF-deficient mutant. *Bioelectrochemistry* , 2008 , 73 (1) : 70—75
- [90] Myers C R , Myers J M. *Shewanella oneidensis* MR-1 restores menaquinone synthesis to a menaquinone-negative mutant. *Applied and Environmental Microbiology* , 2004 , 70 (9) : 5415—5425
- [91] Reguera G , Nevin K P , Nicoll J S , et al. Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology* , 2006 , 72 (11) : 7345—7348
- [92] Beliaev A S , Klingeman D M , Klappenbach J , et al. Global transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 exposed to different terminal electron acceptors. *Journal of Bacteriology* , 2005 , 187 (20) : 7138—7145
- [93] Lower B H , Yongsunthon R , Shi L , et al. Antibody recognition force microscopy shows that outer membrane cytochromes OmcA and MtrC are expressed on the exterior surface of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology* , 2009 , 75 (9) : 2931—2935
- [94] El-Naggar M Y , Wanger G , Leung K M , et al. Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 2010 , 107 (42) : 18127—18131
- [95] Xiong Y J , Shi L , Chen B W , et al. High-affinity binding

- and direct electron transfer to solid metals by the *Shewanella oneidensis* MR-1 outer membrane *c*-type cytochrome OmcA. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128 (43) : 13978—13979
- [96] 赵其国, 周健民, 沈仁芳, 等. 面向不断变化世界, 创新未来土壤科学——第19届世界土壤学大会综合报道. *土壤*, 2010, 42 (5) : 681—685
Zhao Q G, Zhou J M, Shen R F, et al. Orientating a changing world, innovating soil science in the future—A summary report of the 19th World Congress of Soil Science (In Chinese). *Soils*, 2010, 42 (5) : 681—685
- [97] 涂晨, 骆永明, 马露瑶, 等. 分子生物学与系统生物学技术在土壤污染微生物生态研究中的应用. *土壤学报*, 2013, 50 (3) : 609—617
Tu C, Luo Y M, Ma L Y, et al. Applications of molecular and systematic biological technologies in polluted soil microbial ecology researches (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50 (3) : 609—617
- [98] 贺纪正, 袁超磊, 沈菊培, 等. 土壤宏基因组学研究方法与进展. *土壤学报*, 2012, 49 (1) : 155—164
He J Z, Yuan C L, Shen J P, et al. Methods for and progress in research on soil metagenomics (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49 (1) : 155—164
- [99] Aeschbacher M, Sander M, Schwarzenbach R P. Novel electrochemical approach to assess the redox properties of humic substances. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44 (1) : 87—93
- [100] Liu T X, Li X M, Zhang W, et al. Fe (III) oxides accelerate microbial nitrate reduction and electricity generation by *Klebsiella pneumoniae* L17. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2014, 423 (6) : 25—32

Mechanism of Extracellular Electron Transfer among Microbe–Humus–Mineral in Soil : A Review

WU Yundang^{1, 2, 3} LI Fangbai^{1†} LIU Tongxu¹

(1 Guangdong Institute of Eco-Environment and Soil Sciences, Guangzhou 510650, China)

(2 Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

(3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The process of microbial extracellular electron transfer (EET) is an important driving force of element cycling and energy exchange in epigeosphere. While the previous studies focused on the interaction between soil particles and ions, recently, the biogeochemical processes of the EET among microbe-humus-mineral received widespread attention. The current EET studies enlightened us with new insights into the epigeosphere from the perspectives of chemistry and microbiology.

Since microbes, humus and minerals are very essential factors of the biogeochemical processes on earth surface system via their interactive redox reactions, the main aim of this review is to reveal the detailed mechanism of the EET among microbe-humus-mineral and illustrate their biogeochemical significances on the earth surface system. The paper introduces, first, pathways via which electrons flow from inside to outside of a microbial cell, and then, two pathways via which electrons transfer from the surface of microbes to humus and minerals: (i) direct electron transfer, including direct contact and nanowires; (ii) indirect electron transfer mediated by humus, including “ electron shuttling processes ” and processes of bonding between humus and membrane *c*-type cytochromes.

In this review , based on the key processes and key factors of the thermodynamics , energy transport processes of the whole EET chain of the microbe-humus-mineral system was discussed on a theoretical basis. The importance of redox state of *c*-type cytochromes on EET was highlighted through those discussions , which suggests that the standard redox potential (E^0) and electron transfer capacity (ETC) of humus play dominant roles in the humus-mediated electron shuttling processes. Furthermore , the mass transfer and reaction rates under molecule level are also analyzed using a kinetic approach , which suggests that mediated nanowire-network-mediated electron transfer might be the most efficient way for facilitating EET processes.

In this field , there are several new technical means available to solve the key scientific issues , including : (i) spectroelectrochemistry , combining electrochemistry and spectroscopy , is a useful approach for correlating thermodynamics and kinetics ; (ii) molecular biology techniques are essential for recognizing the functional proteins responsible for EET processes ; (iii) high-resolution imaging techniques are very conducive to the study on micro-structure of the nanowires ; and (iv) time-resolved techniques are essential to determination of the rapid reaction occurring in the EET processes.

To sum up , the future studies in this field should encompass the following four aspects : (i) studies related to extracellular respiring bacteria , which may help build a complete picture of the bacterial community , and will be helpful for the reorganization of other unknown strains ; (ii) The summary on the functions of the proteins responsible for EET will help understanding their roles in this EET process ; (iii) The discussion on humus and minerals , especially their structure , can improve the understanding of their functional mechanism and highlight their microbial ecological significances ; (iv) The modeling of EET processes from thermodynamics and kinetics can provide a quantitative understanding of the intrinsic factors controlling EET processes.

Key words Extracellular electron transfer ; Microbes ; Mineral ; Humus ; Thermodynamics ; Kinetics

(责任编辑 : 陈荣府)