

电化学联用技术研究微生物的胞外电子传递机制*

田晓春^{1,2} 吴雪娥¹ 赵峰^{2**} 姜艳霞^{1**} 孙世刚¹

(1. 厦门大学化学化工学院 厦门 361005; 2. 中国科学院城市环境研究所 中国科学院城市污染物转化重点实验室 厦门 361021)

摘要 胞外电子传递(EET)是指氧化还原反应所产生的电子在微生物细胞内和细胞外的电子受体/电子供体之间互相转移的过程,这一过程伴随着能量和物质的转化。阐明 EET 机制是提高微生物能量和物质转化效率的基础,为元素的生物地球化学循环、金属防腐以及生物电化学系统的应用等提供理论支撑。电化学技术作为研究电极/溶液界面电子转移的简便、有效方法,在研究微生物的直接电子传递和间接电子传递机制中发挥了重要的作用,也促进了 EET 机制的研究从宏观层面到微观层面不断深入。本文综述了研究微生物 EET 机制所涉及的电化学联用技术(包括微电极、扫描电化学显微镜、电化学联用光学显微镜和光谱电化学等);详细介绍了这些电化学联用技术的功能和优势;重点阐述了这些电化学联用技术如何推动着 EET 机制的研究,从宏观的生物膜层面到微观的单个微生物细胞、蛋白和分子层面不断深入;展望了新的电化学联用技术在 EET 研究领域的应用前景。

关键词 胞外电子传递 电化学活性微生物 扫描电化学显微镜 电化学联用技术

中图分类号: O657.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2018)08-1222-06

Research on Mechanisms of Microbial Extracellular Electron Transfer by Electrochemical Integrated Technologies*

Xiaochun Tian^{1,2}, Xue'e Wu¹, Feng Zhao^{2**}, Yanxia Jiang^{1**}, Shigang Sun¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. CAS Key Laboratory of Urban Pollutant Conversion, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China)

Abstract Microbial extracellular electron transfer (EET) is the process that electrons generated from redox reactions transfer between inside of cells and extracellular electron donors/acceptors. This process accompanies with the energy transformation and substance conversion. Studies of microbial EET have attracted increasing interests in recent years because it is found to be significant to understand element biogeochemical cycle, anti-corrosion of metals, bioelectrochemical systems, etc. Electrochemical techniques have played important roles in EET mechanisms analysis, because these techniques are simple and available in studying electron transfer reactions at the interfacial region between electrode and solution. In this review, electrochemical integrated techniques used to study EET pathways including microelectrode, scanning electrochemical microscopy, three-electrode cell combined with optical microscopy and electrochemical spectroscopy are summarized. The functions and advantages of these integrated techniques are illustrated in detail. The EET pathways from macroscopic to microcosmic aspects are reviewed, which include four hierarchies: whole biofilm, redox reaction in

收稿: 2018 年 2 月 6 日, 收修改稿: 2018 年 2 月 26 日, 网络出版: 2018 年 8 月 20 日

* 国家重点研发计划项目(No. 2017YFA0206500) 和国家自然科学基金项目(No. 21777155, 21773198, U1705253, 21621091) 资助

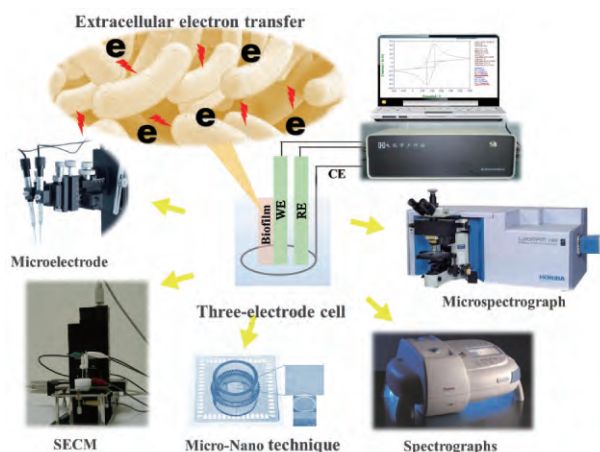
The work was supported by the National Key Research and Development Program of China(No. 2017YFA0206500) and the National Natural Science Foundation of China(No. 21777155, 21773198, U1705253, 21621091) .

** Corresponding author e-mail: fzhao@ iue. ac. cn(Feng Zhao) ; yxjiang@ xmu. edu. cn(Yanxia Jiang)

http://www. progchem. ac. cn Progress in Chemistry, 2018, 30(8): 1222 ~ 1227

microenvironment of biofilm, single cell, redox proteins or molecular. This review proposes that several advanced electrochemistry combined techniques can be useful for the investigation of microbial EET mechanisms in the future.

Key words extracellular electron transfer; electrochemically active microorganisms; scanning electrochemical microscopy; electrochemical integrated techniques



Contents

- 1 Introduction
- 2 Study of the electron transfer of microenvironment in biofilm by microelectrode and scanning electrochemical microscopy
- 3 Study of the electron transfer of single cell by three-electrode cell combined optical microscope
- 4 Study of the redox of protein or molecule by electrochemical spectroscopy
 - 4.1 Electrochemical UV-visible spectroscopy
 - 4.2 Electrochemical infrared spectroscopy
 - 4.3 Electrochemical Raman spectroscopy
- 5 Conclusion and outlook

1 引言

微生物的胞外电子传递 (extracellular electron transfer, EET) 是指电子跨过细胞膜从细胞内传递到细胞外终端电子受体的过程, 或者电子从细胞外的电子供体传递至细胞内被利用的过程^[1,2]。具有 EET 能力的微生物被称为电化学活性微生物 (electrochemically active microorganisms, EAMs)^[3,4], 它们能通过代谢作用将化合物的氧化还原电势差转换为微生物可利用的能量。EET 的研究涉及环境科学、化学、材料、微生物等多学科交叉领域, 在污染修复、废水处理、元素的生物地球化学循环、生物能-电能转换等方面引起越来越多的关注^[5]。

经典电化学技术, 如伏安法、计时电流, 在 EET

研究的初期起到了关键作用。由于生物膜组成复杂, 微生物分泌物、胞外聚合物等部分成分也具有电子传递能力^[6]。经典的电极/溶液界面反应动力学信息的数学模型已不适用, 无法获得分子和蛋白结构发生变化的信息, 电子转移的具体途径难以区分和定量。因此, 随着 EET 研究内容的丰富和深入, 电化学联用技术逐渐用于研究微生物的电子传递反应, 并有效地推进了 EET 机制从宏观到微观层面的发展。

研究微生物与电极之间的电子转移机制从宏观到微观分为 4 个层面^[7], 如图 1 所示: (a) 生物膜整体作为研究对象的层面; (b) 生物膜内外微区环境层面; (c) 微生物个体与电极之间相互作用的层面;

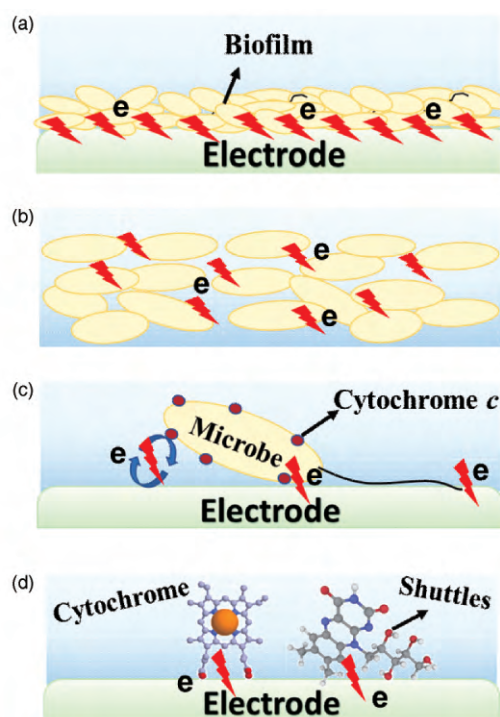


图 1 电极表面电化学活性微生物研究的不同层面。(a) 生物膜; (b) 生物膜微区环境; (c) 微生物个体; (d) 蛋白和分子

Fig. 1 Different hierarchies for the study of electrochemically active microorganisms. (a) Biofilm; (b) Microenvironment of biofilm; (c) Single cell; (d) Redox proteins or molecular

(d) 与 EET 相关的蛋白和分子层面。本文重点阐述电化学联用技术如何推动着 EET 的研究从生物膜层面到微生物个体、蛋白和分子层面,并展望新的电化学联用技术将如何进一步促进 EET 机制的发展。

2 微电极及扫描电化学显微镜研究生物膜微区环境的电子转移

微电极尺寸小,具有较高的灵敏度,目前已经成为无损表征生物膜微区环境的重要工具。Beyenal 等^[8,9]用微电极研究了 *Shewanella* 和 *Geobacter* 生物膜内部的氧化还原电势梯度,发现越靠近电极处,生物膜的电活性越强;通过选择性测定 H^+ 的浓度,他们认为在缓冲体系中 *Shewanella* 生物膜内的质子迁移不是影响生物膜活性的限制条件;对 *Geobacter* 而言,生物膜电活性增强时 pH 值降低,说明乙酸钠的消耗利于质子产生。随后,他们也利用 *Shewanella* 分泌的电子中介体 flavins 测得生物膜的厚度,测量结果与激光共聚焦显微镜测得的结果一致^[10]。Zhao 等将微电极用于原位监测生物电化学系统 (Bioelectrochemical systems, BESs) 阴极的溶解氧浓度、pH 值和氧化还原电势,结果表明在相对较低的极化电势下微生物的电化学活性更高,并提出可通过控制溶解氧浓度和 pH 值来优化 BESs 的性能^[11]。由此可见,微电极将 EET 机制的研究层面拓展至生物膜内的微区环境,并可用于监测生物膜微区环境中铜离子浓度^[12]、 H_2O_2 浓度的分布^[13,14] 等。

以微电极为探针电极的扫描电化学显微镜 (scanning electrochemical microscopy, SECM) 是一种电化学成像技术,其结构如图 2 所示。通过准确控制微电极与基底之间的距离以及微电极的移动速度, Matsue 等^[15]利用微生物芯片中的微生物与铁氰化钾之间的氧化还原反应,监测微生物培养不同时间的生长状况。Bard 等^[16]利用 SECM 定量铜绿假单胞菌生物膜微区环境内分泌的绿脓菌素的浓度及其分布,并通过电化学电流呈现了生物膜的三维空间图像。Hsing 等^[17]监测 *Shewanella* 生物膜形成过程中电流的变化,提出其可用于原位检测微生物的活性。最近, Jiang 等利用 SECM 的穿透模式,通过微电极介导外源性电子中介体二茂铁甲醇分子与 *S. oneidensis* MR-1 的氧化还原反应,测定了 *Shewanella* 生物膜在电极/溶液界面的氧化还原性质和界面结构^[18]。

目前, SECM 用于研究 EET 机制仍处于生物膜内外的局部微区环境层面,微电极纳米化和微生物

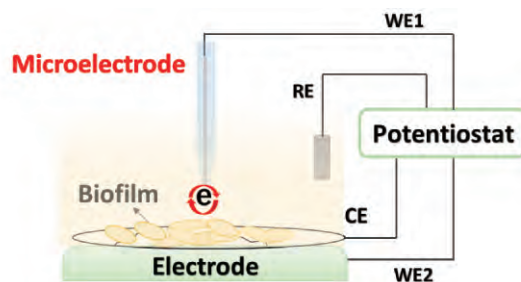


图 2 扫描电化学显微镜用于研究微生物胞外电子传递机制示意图。WE1: 微电极; WE2: 工作电极; RE: 参比电极; CE: 对电极

Fig. 2 Schematic diagram of SECM for studying EET mechanism. WE1: microelectrode; WE2: working electrode; RE: reference electrode; CE: counter electrode

在基底表面的有序排列是未来实现 SECM 从单细胞层面研究 EET 机制的关键。

3 电化学联用光学显微镜研究单个微生物的直接电子传递

在单个细胞层面,通过微纳加工技术得到的电极与显微镜的联用推动 EET 机制向原位、直观的方向发展^[19]。Hashimoto 等^[20]利用光镊技术控制单个 *S. loihica* PV-4 细胞与直径约为 $2 \mu\text{m}$ 的氧化铟锡 (indium tin oxide, ITO) 微电极接触和分离,通过接触前后电流的变化定量了单个微生物细胞产生的电流约为 200 fA ^[20]。该体系中通过微加工得到的 ITO 电极以及三电极体系的构型都为电化学联用光学显微镜奠定了基础。El-Naggar 等^[21]利用显微镜观察光捕获微生物,得到单个 *S. oneidensis* MR-1 通过直接电子传递产生的电流在 $15 \sim 100 \text{ fA}$,同样条件测定敲除外膜细胞色素 *c* 蛋白的缺陷菌株时,电流并无变化,这从单细胞层面直观地体现了外膜细胞色素 *c* 蛋白在直接电子传递过程中的重要作用。

为了分离和定量直接电子传递和间接电子传递途径产生的电流, Lieber 等^[22]设计了两种纳米结构的电极:一种是通过纳米孔阵列隔离微生物与电极的接触,这样电极测到的电流来自于间接电子传递和纳米附属物;另一种是面积一定的微电极,可以通过显微镜观察到与电极接触的微生物的数量并测得它们产生的电流。将该体系用于测定 *S. oneidensis* MR-1 的产电能力时,在去除上清液和恢复上清液得到的电流变化几乎相同,并且接触到电极的细胞数量与产生的电流大小没有关联,以此说明 *S. oneidensis* MR-1 胞外电子传递的主要贡献来自间接电子传递途;在该体系用于研究 *G. sulfurreducens*

DL-1 单细胞的产电能力时^[23], 两个微米电极分别记录了一个和两个微生物与电极接触产生的电流分别为 (92 ± 33) pA 和 (196 ± 20) fA, 根据此结果推算生物膜的产电能力理论上应比目前 BESs 的产电能力高 2~3 个数量级, 说明 BESs 的输出能力还有提升空间。电化学联用光学显微镜测量单个微生物的产电能力, 将 EET 机制的研究微观至微生物个体层面。

4 光谱电化学研究与胞外电子传递相关的蛋白/分子

光谱电化学从蛋白和分子层面研究微生物的 EET 机制, 能原位得到分子水平的反应信息和动力学过程。目前, 联用电化学研究 EET 机制的谱学技术主要有紫外可见光谱、红外光谱、拉曼光谱等, 其关键在于电极要有利于光的透射或反射, 基本原理如图 3 所示。

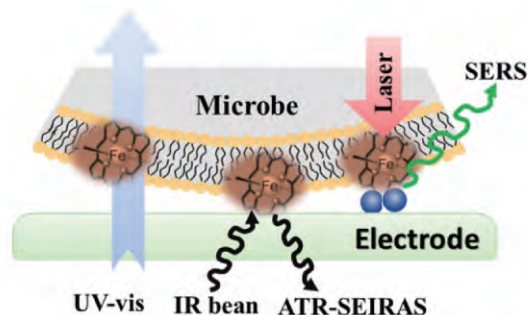


图 3 电化学联用紫外可见光谱、红外光谱或拉曼光谱研究微生物电极表面的胞外电子传递机制示意图

Fig. 3 Schematic diagram of electrochemistry combined ultraviolet-visible spectrometry, infrared spectroscopy or Raman spectroscopy on EET mechanism studies

4.1 电化学紫外可见光谱

紫外可见吸收光谱能测定外膜细胞色素 *c*^[24], 因为细胞色素 *c* 中的血红素铁具有较高的摩尔吸光系数。Hashimoto 等^[25] 在扩散透射模式下控制电极电势从 0.82 V 变化至 -0.18 V (*vs* SHE), 外膜细胞色素 *c* 蛋白的特征吸收峰从 419 nm 处移至 409 nm; 同时得到 *S. loihica* PV-4 菌体的氧化还原态的电势范围在 20~270 mV, 这相比纯化的外膜细胞色素 *c* 蛋白的电势明显正移。另外, Bond 等^[26] 和 Marsili 等^[27] 实时无损地监测 *G. sulfurreducens* 在透明电极表面形成生物膜的过程, 收集的谱学信号有效证明了细胞色素 *c* 参与 EET 过程, 并且发现亚铁血红素的中心 Fe 的价态与胞外固体受体的电势有关。这些研究从与 EET 相关的蛋白层面指出, 在体的外膜

细胞色素 *c* 蛋白和纯化后得到的外膜细胞色素 *c* 蛋白的氧化还原性质存在差异。

4.2 电化学红外光谱

Feliu 等^[28] 利用衰减全反射表面增强红外光谱 (Attenuated total reflection surface enhanced infrared reflection absorption spectroscopy, ATR-SEIRAS) 研究 *Pseudomonas fluorescens* 与金电极的相互作用; 证明 *G. sulfurreducens* 的最外层细胞色素 *c* 蛋白与电极表面能够接触^[29], 并从蛋白层面确认直接电子传递机制的存在^[30]。此外, 他们利用电化学石英晶体微天平测得电极表面吸附微生物的量和产电量之间的关系, 结合 ATR-SEIRAS 的结果认为, 生物膜培养至成熟期并不是增强产电量的最佳时期, 水的吸附结构随着吸附在电极表面的生物量以及培养时间而变化^[31]。尽管红外谱峰是来自于蛋白的羰基、羧基、酰胺 I 等官能团的振动, 但是生物膜组成复杂且含有的蛋白种类多, Jiang 等通过对比 *S. oneidensis* MR-1 及其缺陷型 ($\Delta omcA/\Delta mtrC$) 菌株在周转和非周转条件下的红外光谱, 从蛋白层面确认参与直接电子传递的蛋白种类, 认为 1742 cm^{-1} 的羰基峰来自于参与直接电子传递的外膜 OmcA-MtrC 蛋白^[32]。

4.3 电化学拉曼光谱

Wandlowski 等结合了电化学红外和拉曼光谱研究了亚单层 *G. sulfurreducens* 在金电极、银电极, 以及羧基终端的自组装单分子层表面通过细胞色素 *c* 蛋白 OmcZ 进行短程的直接电子传递, 结果表明微生物在氧化和还原过程中细胞色素 *c* 蛋白的构象没有发生变化^[33,34]。Schröder 等^[35] 的研究结果表明 *G. sulfurreducens* 与电极之间通过两个双组氨酸结合的亚铁血红素氧化还原电对进行直接电子传递, 并且这两种细胞色素 *c* 的活性中心与电极之间的距离相当。Batstone 等^[36] 利用时间分辨的共振拉曼光谱实时测定生物膜内能增强胞外电子传递能力的电化学活性物质, 认为细胞色素 *c* 中心的铁是六配位、低自旋, 有两个组氨酸作为轴向配体, 并得到电子在生物膜的扩散系数 D_E 约为 $2.3 \times 10^{-6}\text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。由此可见, 电化学拉曼光谱不仅能从蛋白分子层面揭示 EET 的电子传递机理, 而且能得到反应动力学参数。

最近, Reisner 等^[37] 结合紫外可见和电化学拉曼光谱研究纯化的 *S. oneidensis* MR-1 的外膜 MtrC 蛋白与 ITO 的相互作用, 由于在氧化还原过程中形成了高价铁的催化活性中间体, MtrC 对 H_2O_2 的催化活性远超辣根过氧化酶, 高达 $1\text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。虽然, 这不是在体的微生物蛋白与 ITO 相互作用的结果,

但是很可能在未来用于解释目前文献中使用 ITO 电极研究 *S. oneidensis* MR-1 的胞外电子传递机制的优越性。

5 总结与展望

电化学联用技术已经有效地推动了 EET 机制的研究从宏观向微观发展。虽然经典电化学技术难以直接测定微生物体内与 EET 代谢途径相关的蛋白、酶和分子等信息,但能从电子转移层面为微生物学的研究提供线索和研究内容。合理地将三电极体系耦合表征仪器是拓展电化学联用技术应用于研究 EET 机制的关键。例如, Jiang 等将三电极体系与化学发光检测仪联用,将 EET 机制的研究拓展至发光细菌领域,并发现了 *S. woodiyi* 的 EET 和生物发光之间的联系^[38]。目前可用于研究 EET 机制的先进电化学联用技术和表征方法还包括电化学联用色谱仪、液相电化学核磁共振、电化学原位透射电镜、电化学-原子力显微镜等。这些技术在定性和定量微生物分泌的电子中介体以及原位观察微生物合成过程等方面将发挥重要作用。因此,推进电化学与先进原位技术联用研究微生物 EET 机制,一方面能够促进微生物电化学技术作为清洁高效能源技术的发展;另一方面,研究微生物以电子形式转移的热力学和动力学,能丰富微生物学、环境理论化学等的研究内容。

参考文献

- [1] Choi O, Sang B I. *Biotechnol. Biofuel.*, 2016, 9: 11.
- [2] Rosenbaum M, Aulenta F, Villano M, Angenent L T. *Bioresource Technol.*, 2011, 102(1): 324.
- [3] Lee J Y, Phung N T, Chang I S, Kim B H, Sung H C. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, 223(2): 185.
- [4] 肖勇(Xiao Y), 吴松(Wu S), 杨朝晖(Yang Z H), 郑越(Zheng Y), 赵峰(Zhao F). *化学进展(Progress in Chemistry)*, 2013, 25(10): 1771.
- [5] Liang F Y, Xiao Y, Zhao F. *Chem. Eng. J.*, 2013, 218 (Supplement C): 147.
- [6] Xiao Y, Zhang E H, Zhang J D, Dai Y F, Yang Z H, Christensen H E M, Ulstrup J, Zhao F. *Sci. Adv.*, 2017, 3(7): e1700623.
- [7] Harnisch F, Freguia S. *Chemistry – An Asian Journal*, 2012, 7(3): 466.
- [8] Babauta J T, Nguyen H D, Beyenal H. *Environ. Sci. Technol.*, 2011, 45(15): 6654.
- [9] Babauta J T, Nguyen H D, Harrington T D, Renslow R, Beyenal H. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109(10): 2651.
- [10] Nguyen H D, Renslow R, Babauta J, Ahmed B, Beyenal H. *Sensor Actuat. B – Chem.*, 2012, 161(1): 929.
- [11] Wang Z J, Deng H, Chen L H, Xiao Y, Zhao F. *Bioresource Technol.*, 2013, 132: 387.
- [12] Hu Z Q, Jin J, Abruña H D, Houston P L, Hay A G, Ghiorse W C, Shuler M L, Hidalgo G, Lion L W. *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 41(3): 936.
- [13] Liu X H, Ramsey M M, Chen X L, Koley D, Whiteley M, Bard A J. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011, 108(7): 2668.
- [14] Abucayon E, Ke N, Cornut R, Patelunas A, Miller D, Nishiguchi M K, Zoski C G. *Anal. Chem.*, 2014, 86(1): 498.
- [15] Kaya T, Nagamine K, Oyamatsu D, Shiku H, Nishizawa M, Matsue T. *Lab Chip*, 2003, 3(4): 313.
- [16] Koley D, Ramsey M M, Bard A J, Whiteley M. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011, 108(50): 19996.
- [17] Zhang W J, Wu H K, Hsing I M. *Electroanalysis*, 2015, 27(3): 648.
- [18] 田晓春(Tian X C), 吴雪娥(Wu X E), 詹东平(Zhan D P), 赵峰(Zhao F), 姜艳霞(Jiang Y X), 孙世刚(Sun S G). *物理化学学报(Acta Physico-Chimica Sinica)*, 2019, 35(1): 22.
- [19] Hol F J H, Dekker C. *Science*, 2014, 346(6208): 1251821.
- [20] Liu H, Newton G J, Nakamura R, Hashimoto K, Nakanishi S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49(37): 6596.
- [21] Gross B J, El-Naggar M Y. *Rev. Sci. Instrum.*, 2015, 86(6): 064301.
- [22] Jiang X C, Hu J S, Fitzgerald L A, Biffinger J C, Xie P, Ringeisen B R, Lieber C M. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2010, 107(39): 16806.
- [23] Jiang X C, Hu J S, Petersen E R, Fitzgerald L A, Jackan C S, Lieber A M, Ringeisen B R, Lieber C M, Biffinger J C. *Nature Commun.*, 2013, 4: 2751.
- [24] Shi L, Chen B W, Wang Z M, Elias D A, Mayer M U, Gorby Y A, Ni S S, Lower B H, Kennedy D W, Wunschel D S, Mottaz H M, Marshall M J, Hill E A, Beliaev A S, Zachara J M, Fredrickson J K, Squier T C. *J. Bacteriol.*, 2006, 188(13): 4705.
- [25] Nakamura R, Ishii K, Hashimoto K. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 2009, 48(9): 1606.
- [26] Liu Y, Kim H, Franklin R R, Bond D R. *ChemPhysChem*, 2011, 12(12): 2235.
- [27] Jain A, Gazzola G, Panzera A, Zanon M, Marsili E. *Electrochim. Acta*, 2011, 56(28): 10776.
- [28] Busalmen J P, Berná A, Feliu J M. *Langmuir*, 2007, 23(11): 6459.
- [29] Busalmen J P, Esteve-Núñez A, Berná A, Feliu J M. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 2008, 47(26): 4874.
- [30] Busalmen J P, Esteve-Núñez A, Berná A, Feliu J M. *Bioelectrochemistry*, 2010, 78(1): 25.
- [31] Liu Y, Berná A, Climent V, Feliu J M. *Sensor Actuat. B Chem.*, 2015, 209: 781.

- [32] You L X , Rao L , Tian X C , Wu R R , Wu X E , Zhao F , Jiang Y X , Sun S G. *Electrochim. Acta* , 2015 , 170: 131.
- [33] Kuzume A , Zhumaev U , Li J F , Fu Y C , Fueg M , Estevez M , Borjas Z , Wandlowski T , Esteve - Nunez A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* , 2014 , 16(40) : 22229.
- [34] Kuzume A , Zhumaev U , Li J F , Fu Y C , Fueg M , Esteve - Nuñez A , Wandlowski T. *Electrochim. Acta* , 2013 , 112: 933.
- [35] Millo D , Harnisch F , Patil S A , Ly H K , Schröder U , Hildebrandt P. *Angew. Chem. Int. Ed.* , 2011 , 50 (11) : 2625.
- [36] Virdis B , Millo D , Donose B C , Batstone D J. *PLoS ONE* , 2014 , 9(2) : e89918.
- [37] Reuillard B , Ly K H , Hildebrandt P , Jeuken L J C , Butt J N , Reisner E. *J. Am. Chem. Soc.* , 2017 , 139(9) : 3324.
- [38] Tian X C , Zhao F , You L X , Wu X E , Zheng Z Y , Wu R R , Jiang Y X , Sun S G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* , 2017 , 19 (3) : 1746.