

## Mcc 在脱色希瓦氏菌 S12 电极呼吸中的作用

孔冠楠<sup>1,2,5</sup> 许玫英<sup>2,3</sup> 宋达<sup>4</sup> 杨永刚<sup>2,3\*</sup>

(1. 中国科学院南海海洋研究所 广东 广州 510301)

(2. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东 广州 510070)

(3. 省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东 广州 510070)

(4. 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)

(5. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要:**【目的】研究脱色希瓦氏菌 S12 周质空间 *c* 型细胞色素 Mcc 的功能,进一步探索和补充微生物胞外电子传递过程的机制。【方法】借助自杀质粒敲除 *mcc* 基因,通过细胞浓度测定和激光共聚焦显微镜比较分析突变株和野生株之间的浮游细胞和生物膜的生长情况,并比较分析二者在微生物燃料电池电极还原、铁还原和胞外偶氮染料还原过程中的功能。【结果】Mcc 缺失对铁还原和偶氮还原没有影响,但却造成电极呼吸活性下降 34.1%;与野生株相比, *mcc* 突变株的好氧生长和厌氧浮游细胞生长无明显影响,但却显著抑制了电极表面生物膜的形成。【结论】Mcc 是希瓦氏菌 S12 电极呼吸过程中周质空间电子传递的重要组成部分之一,缺失会显著抑制其电极呼吸效率以及生物膜的形成。

**关键词:** 希瓦氏菌, 周质空间, 细胞色素 *c*, 胞外电子传递

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31570111); Guangdong Provincial Programs for Science and Technology Development (No. 2016A030306021, 2015B020235011, 2016B070701017); Pearl River S&T Nova Program of Guangzhou City (No. 201610010090); Guangdong Ocean and Fishery Administration Project (No. A201601D01); Guangdong Academy of Sciences Foundations (No. rcjj201502, 2017GDASCX-0403)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-20-87684471; E-mail: yyg117@163.com

**Received:** January 25, 2017; **Accepted:** May 27, 2017; **Published online** (www.cnki.net): June 06, 2017

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31570111); 广东省科技计划项目(No. 2016A030306021, 2015B020235011, 2016B070701017); 广州市珠江科技新星专项项目(No. 201610010090); 广东省渔港建设和渔业产业发展专项项目(No. A201601D01); 广东省科学院基金项目(No. rcjj201502, 2017GDASCX-0403)

**\*通讯作者:** Tel: 86-20-87684471; E-mail: yyg117@163.com

**收稿日期:** 2017-01-25; **接受日期:** 2017-05-27; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-06-06

## Role of Mcc in *Shewanella decolorationis* S12 electrode respiration

KONG Guan-Nan<sup>1,2,5</sup> XU Mei-Ying<sup>2,3</sup> SONG Da<sup>4</sup> YANG Yong-Gang<sup>2,3\*</sup>

(1. South China Institute of Oceanology, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(3. State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(4. Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(5. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** [Objective] The main objectives of this study were (i) to investigate the role of Mcc, a periplasmic monohemecytochrome *c*, in the extracellular electron transfer process of *Shewanella decolorationis* S12, and (ii) to provide new information for a complete understanding of bacterial extracellular electron transfer. [Methods] An *mcc*-mutant was created by using a suicide plasmid. The planktonic and biofilm growth of the mutant and wild type strains were compared by using cell optical density and confocal laser scanning microscope. Furthermore, the extracellular electron transfer capacities including electrode respiration, iron reduction and azo dye reduction of the two strains were analyzed. [Results] Although no significant difference was detected in iron and azo dye reduction between the wild type and mutant strains, mutant strain showed 34.1% decrease in electrode respiration capacity when using electrode as electron acceptor in microbial fuel cells in comparison with the wild type strain. In microbial fuel cells, the *mcc*-mutant showed similar planktonic growth profile but lower electrode biofilm forming capacity compared to the wild type strain. [Conclusion] The results demonstrated that Mcc played an important and specific role in the periplasmic electron transfer of *S. decolorationis* S12 electrode respiration, Mcc-deficiency caused significantly decrease in the electrode respiration and biofilm growth capacities of *S. decolorationis* S12.

**Keywords:** *Shewanella*, Periplasmic space, Cytochrome *c*, Extracellular electron transfer

微生物的胞外电子传递(Extracellular electron transfer, EET)不仅是多种生物地球化学过程(如异化金属还原、有机物降解等)的重要驱动力,其在生物修复、金属防腐和生物电化学等技术的发展和应用中也发挥了重要作用。近年来,EET研究领域取得了多个重要的发现,如基于纳米导线的EET、微生物细胞间和种间的EET等,并成为微生物学、地球生物化学和生物物理学多个学科共同关注的热点<sup>[1-4]</sup>,但研究者们对EET的分子机制了解还有待完善。

在近30年的EET研究中,希瓦氏菌(*Shewanella*)和地杆菌(*Geobacter*)一直是主要的模式微生物<sup>[5-6]</sup>。目前已知的EET过程可以分为直接和间接两种,前者基于细胞表面细胞色素 *c* 或纳米导线与胞外电子受体的直接接触,后者则借助可溶性电子介体从细胞表面携带电子到电子受体<sup>[1,5]</sup>。相对于EET的胞

外过程,EET的胞内过程(即电子如何从细胞内膜跨越周质空间传递至外膜)可能更为复杂。以 *S. oneidensis* MR-1 为例,较多的研究已表明 CymA 和 MtrA 分别是位于细胞内膜和外膜的EET关键蛋白,但二者的体积远小于周质空间的宽度(235 Å),即二者之间需要其它氧化还原蛋白介导电子传递<sup>[7]</sup>。Fonseca 等发现,周质空间的 STC 和 FccA 可分别与 CymA 和 MtrA 结合介导电子,但仍然存在物理空缺,而且 STC 和 FccA 的突变对 *S. oneidensis* MR-1 的 EET 过程影响较小<sup>[8-10]</sup>。由此可见,希瓦氏菌周质空间的电子传递的组分和途径尚需要进一步补充。

脱色希瓦氏菌(*S. decolorationis*) S12 是本题组从某印染废水厂活性污泥中分离到的菌株,具有较强的污染环境适应性和多种胞外电子受体还原功能,其全基因组已测序<sup>[11]</sup>。通过对该菌基因组

中细胞色素 *c* 的基因序列分析,发现基因 *mcc* 编码一个位于周质空间的单血红素细胞色素 *c* 蛋白(GenBank 登录号: ESE40622.1),该基因的功能尚未见报道。细胞色素 *c* 系统是希瓦氏菌 EET 过程的主要途径,因而推测 *mcc* 可能参与了 *S. decolorationis* S12 周质空间的电子传递。本研究主要通过基因突变和生理功能分析,对编码 *S. decolorationis* S12 周质空间单血红素细胞色素 *c* 的基因 *mcc* 在胞外电子传递中的作用进行了研究,进一步补充了希瓦氏菌 EET 的电子传递机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和质粒: 菌种和质粒详见表 1, 其中 *S. decolorationis* S12 是本实验室从某印染废水处理厂的活性污泥中分离纯化获得的一株希瓦氏菌新种。该菌株已保藏在中国典型培养物保藏中心(保藏号: CCTCC M203093)和日本东京大学应用微生物研究所(保藏号: IAM 15094T)。自杀质粒 pHGM01 由浙江大学高海春教授提供, 保存于本实验室。

1.1.2 主要试剂和仪器: EasyTaq DNA 聚合酶和 TransStart FastPfu DNA 聚合酶及 Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒, 北京 TransGen 公司; 凝胶

DNA 微量 DNA 回收试剂盒, 上海 Magen 公司, LIVE/DEAD BacLight Staining Kit, Invitrogen 公司; 改良型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。小型离心机, 美国 Eppendorf 公司; 电热鼓风干燥箱, 重庆万达公司; Milli-Q 超纯水装置, 美国 Millipore 公司; 梯度 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 紫外可见-蛋白核酸分析仪、凝胶扫描仪、紫外/荧光成像仪, 美国 GE Healthcare 公司; 核酸浓缩仪, 美国 Labcon 公司; 快速低温离心机, Sigma 公司; 高压灭菌锅, 日本 TOMY Seiko 公司。

1.1.3 培养基及培养条件: LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 5.0。固体培养基添加 1.5 g/L 琼脂粉。重组菌筛选硫酸庆大霉素 Gm 使用浓度 50 mg/L, 二氨基庚二酸 DAP 使用浓度 50 mg/L, 有氧培养在 30 °C、200 r/min 条件下进行。12 000×g 离心 2 min 收集在 LB 培养液中好氧生长的过夜培养物, 用磷酸缓冲液(pH 7.4)洗涤 2 次后重悬于磷酸缓冲液中制成菌悬液(*OD*<sub>600</sub>=1.0, 细胞浓度约为 10<sup>8</sup> CFU/mL), 然后以 2% (体积比)的接种量将菌悬液接种于后续厌氧培养体系中。

铁还原及苋菜红还原实验在 100 mL 血清瓶中进行。厌氧还原用乳酸基础培养基(LM, g/L): 十二水合磷酸氢二钠 17.1, 磷酸氢二钾 3.0, 氯化钠 0.5, 氯化铵 1.0, 酵母粉 0.5, 作为电子供体的乳酸钠 2.24, 苋菜红(0.5 mmol/L)或柠檬酸铁(4 mmol/L)作为电子受体。接种后充入过滤除菌的氮气 8 min 后用胶垫铝盖封口, 转移到厌氧工作站(Ruskinn C0105)中 30 °C 静置培养, 设置 3 组重复。还原过程使用一次性注射器在超净台中定时取样分析。

电极呼吸实验在微生物燃料电池(Microbial fuel cells, MFC)中进行。玻璃质双室 MFC 的构建参照参考文献[15]的方法。阳极液为 100 mL LM 灭菌培养液, 阴极液为 100 mL 磷酸盐缓冲液(含铁氰化钾电解液 50 mmol/L)。阳极和阴极均为灭菌

表 1 菌株和质粒 Table 1 Strains and plasmids		
菌株和质粒 Strains and plasmids	描述 Description	来源 Sources
<i>E. coli</i>		
DB3.1λ	pHGM01 宿主	[12]
WM3064	Pir 依赖质粒的宿主, 接合供体菌, 二氨基庚二酸(DAP)缺陷型	[13]
<i>S. decolorationis</i>		
S12	野生型	实验室保藏
Δ <i>mcc</i>	<i>mcc</i> 基因敲除突变株	本研究
pHGM01	Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , att-自杀载体	[14]
pHG102	含有 <i>Shewanella arcA</i> 启动子、 <i>EcoR</i> I、 <i>BamH</i> I 酶切位点载体	[14]

的 2 cm×4 cm 石墨板,使用钛丝连接并串联 1 000  $\Omega$  电阻构成外电路。接种后充入过滤除菌的氮气 8 min 后用胶垫螺盖封口,转移到 30  $^{\circ}\text{C}$  恒温静置培养,设置 3 组重复。使用数据采集器(Keithley 2700,Module 7702)每隔 10 min 记录电阻两端电压。

**1.1.4 突变株及回补株构建:** 基因敲除方法参考文献[13],简要步骤如下: (1) 设计引物(表 2): 上游同源臂引物 5O/5I, 下游同源臂引物 3O/3I (外侧引物 5O 和 3O 添加 att 克隆位点, 内侧引物 5I 和 3I 添加 Linker), 验证引物 LF/LR 和 SF/SR; (2) 构建敲除载体: 采用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 扩增上下游同源臂, 再进行融合 PCR, 将上下游同源臂连接到一起。在 Gateway BP Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen)作用下, 重组到 pHGM01 质粒中; (3) 转化: 通过热激的方法将敲除载体导入 *E. coli* WM3064 感受态细胞中, 采用 LB+DAP+Gm 平板进行筛选, 并通过引物 5O/3O 进行 PCR 验证; (4) 接合: 将转化成功的 *E. coli* WM3064 与 S12 在 LB+DAP 平板上共同培养过夜; (5) 单交换: 将菌体洗下并涂布在 LB+Gm 的平板上, 挑取单菌落转接至 LB+Gm 和无 NaCl 的 LB+10%蔗糖平板上, 选择能够在 LB+Gm 平板上生长, 但在无 NaCl 的

LB+10%蔗糖平板上前期不长的菌体, 采用引物 LF/SR 和 SF/LR 进行 PCR 验证; (6) 双交换: 将单交换成功的 S12 突变株在无 NaCl 的 LB 液体培养基中培养后, 稀释涂布于无 NaCl 的 LB+10%蔗糖平板上培养, 挑取单菌落转接至 LB+Gm 和 LB+10%蔗糖平板上, 选择能够在 LB+10%蔗糖平板上生长, 但在 LB+Gm 平板上不长的菌体, 采用引物 LF/LR 进行 PCR 验证, 获得双交换成功的 S12 突变株。

*mcc* 基因回补株的构建方法如下: PCR 扩增目的基因 *mcc*, 扩增的 PCR 产物进行试剂盒纯化回收, 由限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 处理。用 T4 DNA 连接酶将 *mcc* 同 pHG102 连接(pHG102 带有 *Shewanella arcA* 启动子), 然后将连接产物转化 *E. coli* WM3064, 挑取单克隆进行 PCR 验证, 挑取正确的克隆通过接合转移将质粒转入突变株, 培养后进行菌落 PCR 验证。

## 1.2 分析方法

突变株和野生株的好氧 LB 生长曲线使用全自动生长仪(Bioscreen C)记录, 厌氧浮游细胞使用紫外-可见分光光度计分析 600 nm 波长处的光密度值( $OD_{600}$ )表示菌体浓度。铁还原测定使用邻菲罗啉法定量二价铁离子浓度。偶氮染料苋菜红还原使用

表 2 PCR 引物  
Table 2 Primers for PCR

引物名称 Primers	序列 Sequences (5'→3')
5O	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACTTTATCTGTTCTGCTTCAG
5I	GGTCCGGGTTCGCTATCTATGATATCCCCAATCTCAGTG
3I	ATAGATAGCGAACCCGGACCTCATTGAGATCCCTTAGC
3O	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTATTACGAAATCTGGG
LF	CGTATGCAGGGTTGAGGT
SR	CCAAGGCTTATGGGATTT
SF	TACCAGAACGCCAATAAGA
LR	ACTGAACTCGCTCAAGGA
<i>EcoR</i> I	CCGGAATTCAAGGGATCTCAATGAAAATG
<i>Bam</i> H I	CGCGGATCCTTGTCAGCAAGCAAACGG

紫外-可见分光光度计分析 510 nm 处的吸收值表示<sup>[15]</sup>。MFC 电极表面生物膜在电极呼吸速率达到稳定期后取出,并使用无菌 PBS 缓冲液缓慢淋洗 2 遍以去除电极表面随机吸附的浮游细胞。使用手术刀切取清洗后生物膜电极的上、中、下不同部位各 1 cm<sup>2</sup>,然后分别使用 LIVE/DEAD BacLight Staining Kit 避光染色(方法参照试剂盒说明书)。将染色后的电极生物膜在激光共聚焦显微镜下观察,生物膜三维结构使用 Zeiss 2010 软件的 Z-Stack 模式逐层扫描观察,并根据活性(绿色)和非活性(红色)像素个数计算生物膜细胞相对活性:相对活性=绿色像素数量/总(绿色+红色)像素数量<sup>[15]</sup>。将剩余生物膜电极在 20 mL NaOH (0.2 mol/L)溶液中煮沸 10 min,使生物膜细胞裂解(显微镜检查细胞裂解情况)。取出电极,使用改良型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定生物膜细胞裂解液中的蛋白量以表征生物膜生物量。根据溶液中的蛋白总量(即生物膜蛋白总量)及电极样品表面积,计算单位电极面积上的生物膜蛋白密度<sup>[15]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 Mcc 突变株的构建及其好氧生长特性

根据目标基因 *mcc* 的序列,使用同源臂引物扩增目的基因上下游片段(图 1A),之后将上下游片段融合并转入大肠杆菌。经两次同源重组后对蔗糖耐受且无 Gm 抗性的菌落进行 PCR 验证,目标菌落 PCR 产物比野生株缺失约 330 bp,经测序鉴定确认成功构建 *mcc* 突变株(图 1B)。

突变株构建成功后,首先对其在常规有氧 LB 培养条件下的基本生长特性进行分析。结果发现,突变株与野生株的浮游细胞均在 27 h 左右 *OD*<sub>600</sub> 稳定在 1.3±0.3,进入平台期,生长状况无显著差异(图 1C),表明在有氧丰富培养基条件下, *Mcc* 缺失并不影响 S12 浮游细胞的正常生长。

### 2.2 Mcc 突变对 S12 电极呼吸的影响

以 MFC 技术为代表的微生物电化学系统为研究微生物的生物电化学过程提供了新途径。在本研究的 MFC 体系中,野生株和突变株的浮游细胞浓

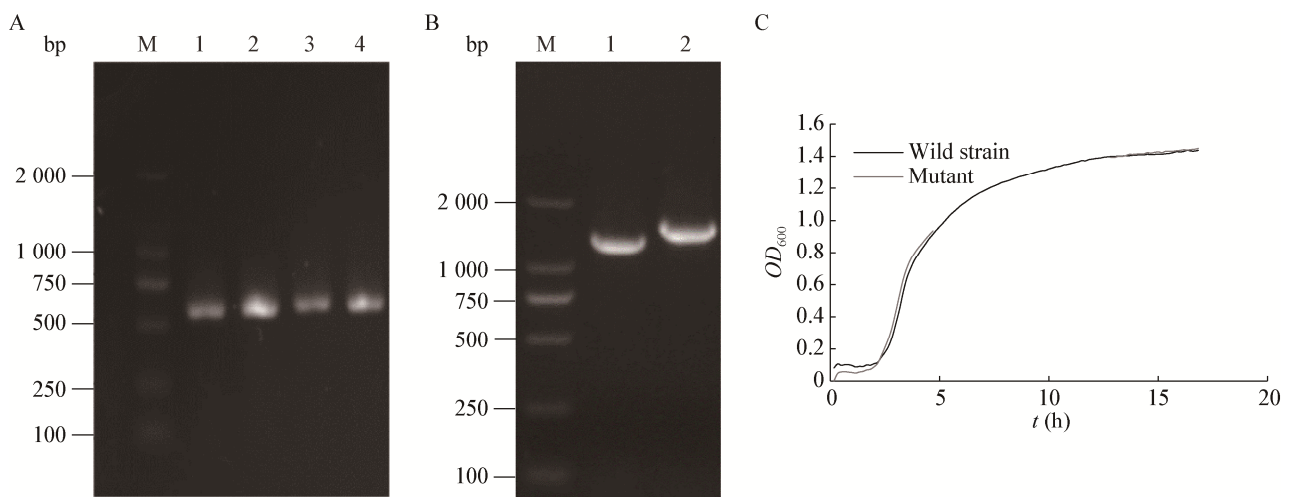


图 1 突变株的构建及其在有氧条件下生长特性

Figure 1 PCR identification of *mcc*-mutant and its growth in aerobic LB

注: A: *mcc* 同源臂引物的扩增的上下游片段; M: DNA marker; 1、2、3、4: 引物 5O/5I 和 3O/3I 的扩增产物. B: 同源重组后突变株的 PCR 验证; M: DNA marker; 1、2: 突变株、野生株的扩增产物. C: 野生株及突变株有氧生长曲线.

Note: A: PCR products of the *mcc* flank segments; M: DNA marker; 1, 2, 3, 4: PCR products by primers 5O/5I and 3O/3I. B: PCR confirmation of *mcc* knock-out; M: DNA marker; 1: Mutant strain; 2: Wild strain. C: Aerobic growth of the planktonic mutant and wild strains.

度接种后的变化趋势无显著差别(图 2A), 在 6 h 内略有下降, 之后持续上升, 在 18 h 后  $OD_{600}$  达到  $0.1 \pm 0.005$ 。*mcc* 基因回补株的结果也显示其浮游细胞与野生株无显著差异。

*S. decolorationis* S12 在电极表面形成的生物膜在 MFC 产电中起到主要作用。对电极表面生物膜蛋白量进行分析显示, 突变株的生物膜生物量较野生株减少了 23.1% ( $0.052$  vs.  $0.064 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), 即突变株的生物膜形成能力显著弱于野生株。*mcc* 基因回补株的生物膜生物量与野生株无显著差异。LSM 观察结果与生物量分析一致, 突变株和野生株在电极表面形成不均匀的细胞簇, 但野生株电极表面的生物膜细胞更为密集, 覆盖率也更高。此外, 基于细胞膜破损度的生物膜活性染色结果显示, 野生株和突变株的生物膜细胞

均保持完整的细胞膜(完整细胞为绿色, 破损细胞为红色), 相对活性均大于 90%(图 2B、C)。

MFC 的电流输出显示(图 2D), 野生株在 18 h 内产电逐渐上升, 达到  $0.097 \text{ mA}$ , 而后开始下降, *mcc* 基因回补株的生物膜生物量与野生株无显著差异。突变株从初始就表现出较低的电流, 18 h 后也基本趋于稳定, 最大电流为  $0.054 \text{ mA}$ , 比野生株低近 44.3%, 表明 Mcc 参与了 *S. decolorationis* S12 的电极呼吸过程。由于突变株和野生株浮游细胞浓度无显著差别, 且 *S. decolorationis* S12 主要通过生物膜产电, 所以对单位生物膜生物量的最大产电活性进行进一步的分析, 结果显示野生株的产电活性为  $93.2 \mu\text{A}/\mu\text{g}$  生物膜蛋白, 突变株的产电活性较野生株下降了 34.1% ( $61.4 \mu\text{A}/\mu\text{g}$  生物膜蛋白)。

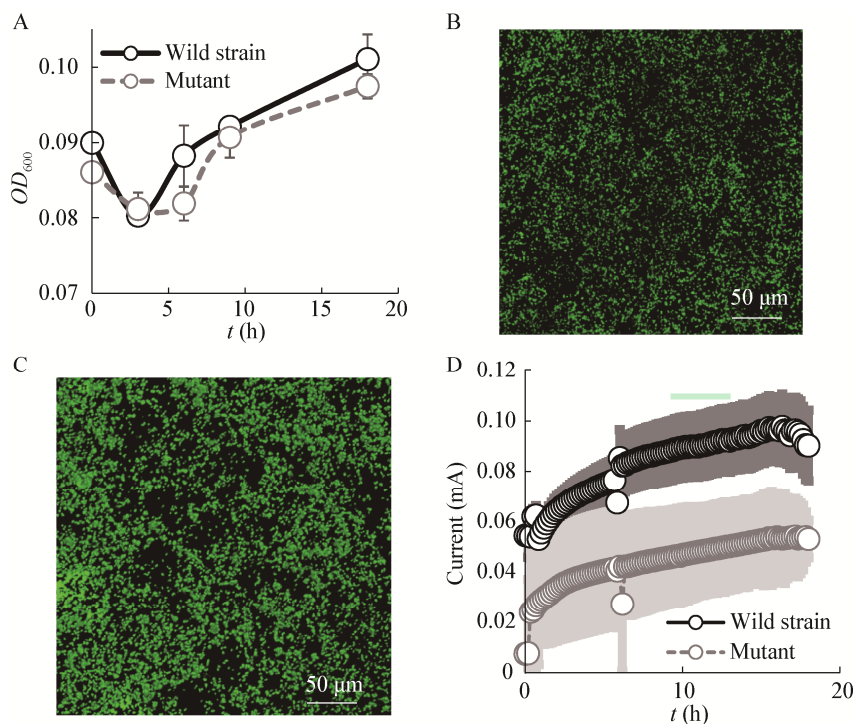


图 2 突变株和野生株的电极呼吸比较

Figure 2 Comparison of the electrode respiration and growth by *mcc*-mutant and wild strain

注: A: 浮游细胞生长情况; B: 突变株的生物膜形态; C: 野生株的生物膜形态; D: 野生株和突变株的产电情况, 灰色背景区域为标准偏差, 6 h 处的电流波动是由取样造成。

Note: A: Planktonic growth; B: *mcc*-mutant biofilm; C: Wild S12 biofilm; D: Electricity generation by the mutant and wild strain, the gray areas along each electricity curve indicate standard deviations and the current fluctuation at 6 h was caused by sampling.



### 2.3 Mcc 突变对 S12 厌氧铁还原和偶氮还原的影响

为进一步研究 Mcc 是否参与 *S. decolorationis* S12 的其它 EET 过程, 比较了野生株和突变株对柠檬酸铁和苋菜红(强极性胞外还原偶氮染料)的还原过程。结果显示, 野生株和突变株对柠檬酸铁和偶氮染料的还原速率没有显著差异(图 3), 即该基因不参与铁还原和胞外偶氮还原的 EET 过程。由此可见, Mcc 特异性地参与电极呼吸过程, 而在铁还原和胞外偶氮还原过程中无显著作用。

### 3 讨论

微生物 EET 过程在金属元素和有机物的生物地球化学循环中发挥着重要作用。希瓦氏菌是微生

物 EET 研究最常用的模式微生物之一, 在各种自然环境和工业过程中都普遍存在。因而, 希瓦氏菌的 EET 机制研究一直是微生物学研究的热点之一。CymA-MtrABC-OmcA 系统是希瓦氏菌 EET 的经典模式<sup>[5-6]</sup>(图 4), 但电子如何从细胞内膜的 CymA 传递到外膜的 MtrA 目前研究较少。

本研究关注的 Mcc 序列预测为一个位于周质空间功能未知的单血红素细胞色素 *c*, 无跨膜区。Mcc 的缺失对该菌的有氧生长没有显著影响, 这与希瓦氏菌其它细胞色素 *c* 的突变株一致<sup>[16]</sup>。Fonseca 等通过 NMR 分析预测周质空间的 FccA 和 STC 分别与 CymA 和 MtrA 结合, 但 FccA 和 STC 之间不能结合, 因而推测二者之间存在一个或多个氧化还

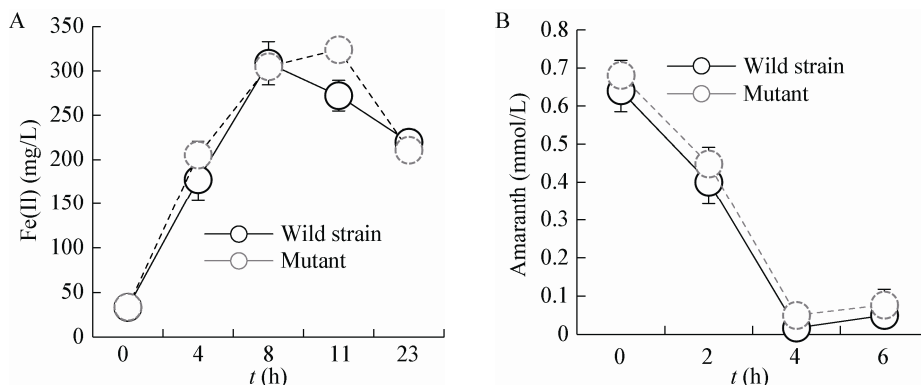


图 3 突变株和野生株的三价铁(A)和胞外偶氮(苋菜红 B)还原能力比较

Figure 3 Comparison of the iron and azo dye amaranth reduction by *mcc*-mutant and wild strains

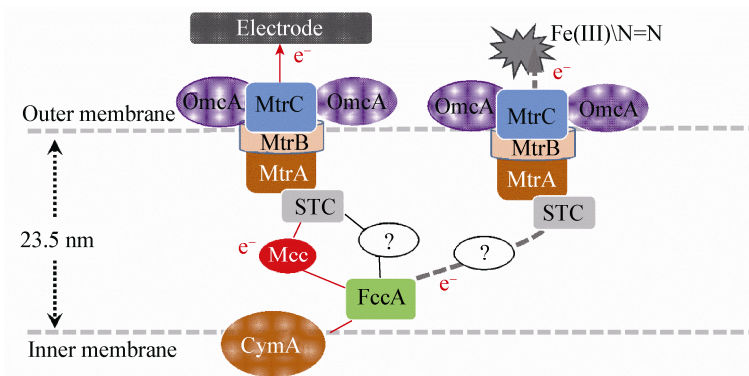


图 4 脱色希瓦氏菌电极呼吸电子传递途径推测模型

Figure 4 A predicted model of *S. decolorationis* EET process

注: 电极呼吸过程中, CymA 将细胞内底物氧化电子依次传递给 FccA、Mcc 和 STC 之后传递给外膜 MtrABC 系统。红色途径为基于 Mcc 的电极呼吸途径, 黑色为不经过 Mcc 的电极呼吸途径, 灰色虚线为脱色希瓦氏菌还原其它胞外电子受体的途径。

Note: For electrode respiration, CymA delivers electrons generated from substrate oxidization to FccA, Mcc, STC and then to the MtrABC system. The red line represents a Mcc-participated pathway; The black line represents a non-Mcc-participated pathway. The dashed gray line represent the electron pathway to extracellular acceptors other than electrode.

原蛋白介导电子<sup>[8]</sup>。本研究的结果证明 Mcc 是电极呼吸过程中周质空间的重要电子传递蛋白之一。Mcc 可能直接与 CymA 或 MtrA 发生电子传递,也可能与 FccA 和 STC 形成复合体介导 CymA 或 MtrA 之间的电子传递。值得注意的是, Mcc 突变株的电极呼吸活性比野生株降低了 34.1%, 表明在该过程中 Mcc 只参与了部分的电子传递, 更多的电子经由周质空间的其他组分完成(图 4)。针对上述推测和尚待解决的问题, 我们将结合基因敲除、蛋白纯化及大分子相互作用分析等技术进一步完善希瓦氏菌周质空间的电子传递机制。

另外, 本研究结果显示 *S. decolorationis* S12 的 Mcc 是一个电极呼吸特异性的细胞色素 *c*, 在铁还原和极性偶氮染料还原过程中并无显著作用。这与之前报道的 *G. sulfurreducens* 的外膜细胞色素 OmcZ 一样, OmcZ 也是只参与 *G. sulfurreducens* 的电极还原过程而不参与其金属还原<sup>[17]</sup>。实际上, 已有较多的报道表明具有 EET 能力的细菌甚至古菌可以根据电子受体的特性(可溶性、氧化还原电位、还原位置等)而选择不同的电子传递途径和组分。例如: *Shewanella* 的 OmcA、*Geobacter* 的 OmcS、OmcE 和 OmpB 只参与固态铁的还原, 对可溶性铁还原没有显著作用<sup>[15]</sup>; 极端嗜热古菌 *Ferroglobus placidus* 在还原可溶性和固态铁氧化物时会表达和利用不同的细胞色素 *c*<sup>[18]</sup>。本课题组最近的研究也显示, 电子受体特性的不同会对 EET 功能细菌的转录组和代谢途径产生全局性的影响<sup>[19]</sup>。但是, 微生物是如何感应胞外电子受体的物理化学特性并调控基因表达和呼吸代谢途径的, 目前尚不清楚。

综上所述, 本研究初步证实了 *S. decolorationis* S12 的 *c* 型周质空间细胞色素 Mcc 在电极呼吸 EET 中的作用, 为全面认识微生物 EET 机制提供了必要信息。Mcc 在周质空间的具体作用机理、是否与其它蛋白形成复合体及其分子结构等尚需要进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Lovley DR. Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination[J]. Energy & Environmental Science, 2011, 4(12): 4896-4906
- [2] Summers ZM, Fogarty HE, Leang C, et al. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria[J]. Science, 2010, 330(6009): 1413-1415
- [3] McGlynn SE, Chadwick GL, Kempes CP, et al. Single cell activity reveals direct electron transfer in methanotrophic consortia[J]. Nature, 2015, 526(7574): 531-535
- [4] Wegener G, Krukenberg V, Riedel D, et al. Intercellular wiring enables electron transfer between methanotrophic archaea and bacteria[J]. Nature, 2015, 526(7574): 587-590
- [5] Yang YG, Xu MY, Guo J, et al. Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 1707-1714
- [6] Xiao X, Wu YM, Xu CC, et al. Anaerobic respiratory capabilities of a metal-reducing microorganism *Shewanella* and its application in environmental remediation[J]. Microbiology China, 2012, 39(11): 1677-1686 (in Chinese)  
肖翔, 吴勇民, 徐灿灿, 等. 金属还原菌希瓦氏菌厌氧呼吸能力及其在环境修复中的研究进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39(11): 1677-1686
- [7] Dohnalkova AC, Marshall MJ, Arey BW, et al. Imaging hydrated microbial extracellular polymers: comparative analysis by electron microscopy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(4): 1254-1262
- [8] Fonseca BM, Paquete CM, Neto SE, et al. Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. Biochemical Journal, 2013, 451(1): 101-108
- [9] Coursolle D, Gralnick JA. Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1[J]. Molecular Microbiology, 2010, 77(4): 995-1008
- [10] Gordon EH, Pike AD, Hill AE, et al. Identification and characterization of a novel cytochrome *c* from *Shewanella frigidimarina* that is involved in Fe(III) respiration[J]. Biochemical Journal, 2000, 34(1): 153-158
- [11] Xu MY, Fang Y, Liu J, et al. Draft genome sequence of *Shewanella decolorationis* S12, a dye-degrading bacterium isolated from a wastewater treatment plant[J]. Genome Announcements, 2013, 1(6): e00993-13
- [12] House BL, Mortimer MW, Kahn ML. New recombination methods for *Sinorhizobium meliloti* genetics[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(5): 2806-2815
- [13] Chen XJ, Sun GP, Xu MY. Role of iron in azoreduction by resting cells of *Shewanella decolorationis* S12[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(2): 580-586
- [14] Wu L, Wang JX, Tang P, et al. Genetic and molecular characterization of flagellar assembly in *Shewanella oneidensis*[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21479
- [15] Yang YY, Xiang YB, Sun GP, et al. Electron acceptor-dependent respiratory and physiological stratifications in biofilms[J]. Environmental Science and Technology, 2015, 49(1): 196-202
- [16] Carpentier W, de Smet L, van Beeumen J, et al. Respiration and growth of *Shewanella oneidensis* MR-1 using vanadate as the sole electron acceptor[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(10): 3293-3301
- [17] Richter K, Schicklberger M, Gescher J. Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(4): 913-921
- [18] Smith JA, Akujkar M, Risso C, et al. Mechanisms involved in Fe(III) respiration by the hyperthermophilic archaeon *Ferroglobus placidus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(8): 2735-2744
- [19] Lian YL, Yang YG, Guo J, et al. Electron acceptor redox potential globally regulates transcriptomic profiling in *Shewanella decolorationis* S12[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31143