



奥奈达希瓦氏菌 CctA 介导周质甲基橙还原的电子传递机理

金小雨^{1,2,3}, 李道波^{2,3*}, 郑晓丹^{2,3}, 宋达^{2,3}, 陈乐天¹, 许玫英^{2,3}

1 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070

3 广东省环境保护微生物与区域生态安全重点实验室, 广东 广州 510070

金小雨, 李道波, 郑晓丹, 宋达, 陈乐天, 许玫英. 奥奈达希瓦氏菌 CctA 介导周质甲基橙还原的电子传递机理[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 3843-3857.

JIN Xiaoyu, LI Daobo, ZHENG Xiaodan, SONG Da, CHEN Letian, XU Meiyang. Electron transport mechanism of periplasmic methyl orange reduction mediated by CctA in *Shewanella oneidensis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 3843-3857.

摘要: 电活性微生物奥奈达希瓦氏菌的胞外电子传递(extracellular electron transfer, EET)在污染物降解、环境修复、生物电化学传感、能源利用等方面具有广泛的应用潜力; 四血红素细胞色素 CctA (small tetraheme cytochrome)是希瓦氏菌周质空间中最丰富的蛋白质之一, 能够参与多种氧化还原过程, 但目前对 CctA 在 EET 中的行为和机理认识仍然有限。【目的】研究阐明 CctA 蛋白在希瓦氏菌模式菌株 MR-1 周质空间以偶氮染料作为电子受体的 EET 中的作用, 补充和拓展希瓦氏菌的厌氧呼吸产能机制。【方法】以周质还原型偶氮染料甲基橙(methyl orange, MO)作为电子受体, 在 mteal reduction (Mtr)蛋白缺失菌株 Δmtr 中研究 MO 的周质还原特点, 并通过基因敲除和回补表达研究 CctA 蛋白在周质电子传递中的作用。【结果】在缺失 Mtr 通道的情况下, 细胞色素 CctA 可以介导周质空间的电子传递而还原 MO。重组表达 CctA 在低水平时, MO 在周质空间中的还原速率与其表达水平呈正相关, 更高水平的 CctA 表达无助于进一步提高 MO 的还原速率。蛋白膜伏安结果展示了 CctA 与周质空间内其他高电位氧化还原蛋白的显著区别, 可能参与构成一条低电

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA0910300); 国家自然科学基金(22176043); 广东省科学院建设国内一流研究机构行动专项资金(2020GDASYL-20200103036, 2022GDASZH-2022010201); 广州市基础研究计划(2023A04J0684)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0910300), the National Natural Science Foundation of China (22176043), the Guangdong Academy of Sciences' Special Project of Science and Technology Development (2020GDASYL-20200103036, 2022GDASZH-2022010201), and the Guangzhou Basic Research Program (2023A04J0684).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-87137654, E-mail: lidaobo@ustc.edu.cn

Received: 2023-02-19; Accepted: 2023-06-01; Published online: 2023-06-08

位的 MO 还原通道。【结论】从分子动力学层面揭示了 CctA 在周质 MO 还原中的独特电子传递行为，为进一步推进对细菌周质电子传递机制的理解，以及通过合成生物学设计或改造胞外氧化还原系统、强化生物电化学在污染物降解中的应用提供了重要信息。

关键词：细胞色素 *c*；希瓦氏菌；周质蛋白；甲基橙；胞外电子传递

Electron transport mechanism of periplasmic methyl orange reduction mediated by CctA in *Shewanella oneidensis*

JIN Xiaoyu^{1,2,3}, LI Daobo^{2,3*}, ZHENG Xiaodan^{2,3}, SONG Da^{2,3}, CHEN Letian¹, XU Meiyang^{2,3}

1 College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

3 Guangdong Provincial Key Laboratory of Environmental Protection Microbiology and Regional Ecological Security, Guangzhou 510070, Guangdong, China

Abstract: Extracellular electron transfer (EET) of the electrochemically active microbe, *Shewanella oneidensis*, has promising prospects of application in pollutant degradation, environmental remediation, bioelectrochemical sensing, and energy utilization. The small tetrahaem cytochrome (CctA) is one of the most abundant proteins in the periplasmic space of *S. oneidensis*. Although CctA is involved in multiple redox processes, the knowledge on the behavior and mechanism of CctA in EET is limited. **[Objective]** To investigate the role of CctA in the EET with azo dyes as electron acceptors in the periplasmic space of the model strain *S. oneidensis* MR-1, and further enrich the knowledge about the mechanism of anaerobic respiration of *S. oneidensis*. **[Methods]** We took methyl orange (MO) as the electron acceptor to explore the characteristics of periplasmic MO reduction in Δmtr (*mtr*-deleted strain) and investigate the role of CctA in EET by gene knockout and complementation. **[Results]** In the absence of Mtr complexes, CctA mediates the electron transfer for the periplasmic MO reduction. The reduction rate of MO had a positive correlation with the expression level of recombinant CctA at low concentrations, while higher levels of recombinant CctA did not further improve the reduction rate. The results of protein film voltammetry (PFV) distinguished CctA significantly from high-potential redox proteins in the periplasmic space, suggesting its involvement in a low-potential MO reduction pathway. **[Conclusion]** We uncovered the unique electron transfer behavior of CctA in periplasmic MO reduction from molecular dynamics, bringing valuable information for understanding EET, designing or modifying extracellular redox systems by means of synthetic biology, and facilitating the application of bioelectrochemistry in pollutant degradation.

Keywords: cytochrome *c*; *Shewanella*; periplasmic proteins; methyl orange; extracellular electron transfer (EET)

希瓦氏菌属(*Shewanella*)作为一类具有多样化胞外还原能力的电活性微生物,不仅可以利用氧气作为有氧呼吸的末端电子受体,还可以在厌氧条件下还原高价铁锰氧化物、偶氮染料、富马酸盐、硫代硫酸盐、亚硫酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐和二甲基亚砷等多种化合物^[1],乃至利用这些化合物作为电子受体进行厌氧呼吸。这种广泛的呼吸活性使得希瓦氏菌能够在厌氧条件下通过氧化有机底物为还原捕集有毒重金属和类金属元素(如铬、硒)、放射性核素(如铀)、偶氮染料等提供电子,使它们转变为无毒或低毒的产物,从而在污染物降解、污染环境生物修复、生物电化学传感和能源利用等方面表现出重要的应用潜力^[2]。

对染料的还原活性使希瓦氏菌在有机污染控制方面成为高价值的微生物菌剂^[3]。希瓦氏菌对偶氮类^[4]、蒽醌类^[5]和三苯代甲烷类^[6]染料都具有很好的脱色效果。其中偶氮染料作为合成染料中品种最多、产量最高、应用也最为广泛的一类,因在特定条件下能分解产生多种致癌芳香胺且容易长时间残留于环境中,而成为有机污染控制的重要内容。希瓦氏菌等微生物使其偶氮键断裂而实现的还原脱色被认为是破坏其分子结构、实现污染控制有效且对环境无害的方法^[7]。奥奈达希瓦氏菌 MR-1 作为偶氮染料脱色研究中常用的菌株,在厌氧条件下对 100 mg/L 甲基橙(methyl orange, MO)的脱色率可达 95%以上^[8],对 200 mg/L 以下的阳离子红 X-GRL 也具有较高的脱色能力^[9]。在微氧条件下,对 MO 和酸性黄 199 的脱色率也能分别达到 97.3%和 68.2%^[10]。除了 MR-1 之外,脱色希瓦氏菌 S12 在厌氧条件下也可以利用苋菜红、甲基红和酸性红 13 等多种偶氮染料作为电子受体进行呼吸产能^[4]。

大量研究结果表明,希瓦氏菌多样化呼吸能

力的实现主要归因于其分布于内膜、周质空间和外膜上、种类和含量丰富的多血红素细胞色素 *c* 所构成的胞外电子传递(extracellular electron transfer, EET)^[11]系统。借助蛋白晶体学、分子生物学及生物电化学等多种技术手段,目前对于 EET 系统中外膜电子传递通道的分子组成和工作机制已经较为清楚,但是对于结构较松散、且具有一定流动性的周质空间中电子传递的组织机制仍需继续研究。

周质空间中自由漂浮的细胞色素 FccA 和 CctA 可以从 CymA 接受电子,并进一步传递给周质中的末端还原酶用于周质还原(硝酸盐、亚硝酸盐和延胡索酸盐等)过程,或传递给外膜导电通道中锚定于周质一侧的细胞色素 *c* (如 MtrA、MtrD 和 DmsE)以实现细胞外表面的还原过程,发挥电子中继作用^[12]。其中 FccA 作为富马酸盐还原酶,除了参与富马酸盐的电子传递过程^[13],还可以通过 MtrA 参与水合氧化铁的还原^[14],而 CctA 对 EET 影响的认知还十分有限。Delgado 等^[15]通过敲除周质空间中的其他冗余细胞色素 *c* 同时过表达 CctA,使胞外电子受体柠檬酸铁的还原效率提升 1.7 倍;同样的, Sun 等^[16]通过敲除 3 种干扰电子传递效率的蛋白并过表达 CctA,使得微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)的最高功率密度达到野生型的 3.62 倍。由此推测, CctA 具有显著的电子传递能力并可能以独特的机理参与周质电子传递过程。

基于此,本研究以周质还原型偶氮染料 MO 作为电子受体,以具有 MO 还原功能的菌株 MR-1 野生株及其 Mtr 蛋白(外膜上重要的电子传递体系^[17]、与偶氮还原过程密切相关)缺失菌株 Δmtr 作为试验菌株,结合基因敲除和回补表达的方法调控 CctA 蛋白表达水平,研究 CctA 在周质空间以 MO 作为电子受体的 EET 过程中

的作用。通过本研究工作,为电化学活性微生物周质空间电子传递理论提供新的发现,进而为通过合成生物学设计或改造胞外氧化还原系统、强化生物电化学在污染物降解中的应用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种和质粒

本研究所使用的菌种和质粒详见表 1,其中奥奈达希瓦氏菌 MR-1 的野生菌株及其基因缺失菌株 $\Delta cctA$ 、 Δmtr 和质粒 pBAD202/D-TOPO 来自安徽大学程园园副教授,大肠杆菌 WM3064^[18]和自杀质粒 pHGM01^[19]来自浙江大学高海春教授,均保存于本实验室。

1.2 主要试剂和仪器

PrimeSTAR 聚合酶购于北京宝日医生物技术有限amp;公司; Easy Taq DNA 聚合酶、Easy PureTM Genomic DNA Kit 购于北京全式金生物技术公司;凝胶 DNA、微量 DNA 回收试剂盒购于上海 Magen 公司; Gateway BP Clonase II Enzyme Mix、高速离心机购于 ThermoFisher Scientific 公司;改良型双辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓

度测定试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司; Precast-GLgel 4%–15%变性电泳 HEPES 预制胶 10 Well 购于 BBI 生命科学; PCR 仪、电泳仪、紫外可见-蛋白核酸分析仪购于 Bio-Rad 公司;电热恒温培养箱购于上海智城分析仪器制造有限公司;超微量分光光度计购于 NanoDrop 公司;高压蒸汽灭菌锅购于 TOMY Seiko 公司;厌氧培养箱购于北京艾普瑞斯科技有限公司;分光光度计购于 BioTeK 公司;超声波细胞破碎仪购于 SONICS&MATERIALS 公司;超速冷冻离心机购于贝克曼库尔特有限公司。

1.3 培养基及培养条件

LB (Luria-Broth) 培养基 (g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 5.0;配制固体培养基时添加 15 g/L 琼脂粉。筛选重组菌使用的硫酸庆大霉素(gentamycin, Gm)浓度为 50 mg/L, 二氨基庚二酸(diaminopimelic acid, DAP)浓度 50 mg/L;诱导目的蛋白表达使用的卡那霉素(kanamycin, Km)浓度为 50 mg/L。有氧培养大肠杆菌和希瓦氏菌株分别在 37 和 30 °C 条件下以 180 r/min 的转速运行的摇床中进行。

表 1 本研究中所使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Description	Sources
<i>Escherichia coli</i> strain		
WM3064	Host for pir-dependent plasmids and donor strain for conjugation; Lab stock $\Delta dapA$	
<i>Shewanella oneidensis</i> strains		
MR-1	Wild type	Lab stock
$\Delta cctA$	<i>cctA</i> deletion mutant derived from MR-1	Lab stock
$\Delta cctA_pcctA$	$\Delta cctA$ with pBAD- <i>cctA</i>	Lab stock
Δmtr	<i>mtr</i> deletion mutant derived from MR-1	Lab stock
$\Delta mtr\Delta cctA$	<i>mtr</i> and <i>cctA</i> deletion mutant derived from MR-1	This study
$\Delta mtr\Delta cctA_pBAD$	$\Delta mtr\Delta cctA$ with pBAD	This study
$\Delta mtr\Delta cctA_pcctA$	$\Delta mtr\Delta cctA$ with pBAD- <i>cctA</i>	This study
Plasmids		
pBAD	Original plasmid pBAD202/D-TOPO	Lab stock
pBAD- <i>cctA</i>	Plasmid pBAD contains the gene of <i>CctA</i>	This study
pHGM01	<i>Ap^R</i> , <i>Gm^R</i> , <i>Cm^R</i> , att-suicidal plasmid	Lab stock

MO 脱色还原试验使用 LM (Lactate-Mineral) 基础培养基(g/L): 十二水合磷酸氢二钠 17.1, 磷酸二氢钾 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, 作为电子受体的 MO 0.2。将除氧后的培养基转移到厌氧工作站中后接种用 LM 培养基重悬后的菌液启动反应, 在 30 °C 下静置培养。

1.4 突变株构建

基因敲除方法参考文献[19], 首先根据 NCBI (National Center of Biotechnology Information) 上菌株 MR-1 的基因组序列设计相关引物 5O/5I 和 3O/3I (表 2), 并以基因组为模板分别扩增出目的基因 *cctA* 在基因组中的上游和下游片段约 500 bp。利用引物上的 Linker 标签, 通过融合 PCR 将上、下游片段融合为一条长片段, 将长片段产物进行切胶回收后, 再利用 BP 克隆酶使长片段上的 *attB* 位点与自杀质粒 pHGM01 上的 *attP* 位点进行体外重组, 从而将此长片段结合到自杀质粒上。接着将自杀质粒通过热激法转化到含有 λ 蛋白的菌株 WM3064 (DAP 营养缺陷型) 感受态细胞中, 蛋白是自杀质粒复制所必需的蛋白。

利用自杀质粒上的庆大霉素抗性基因 *Gm* 在抗性平板上进行克隆的筛选, 筛选出成功转化后的大肠杆菌后, 将含有自杀质粒的菌株 WM3064 和 MR-1 进行细菌接合试验。并利用自杀质粒上的庆大霉素抗性基因 *Gm* 和蔗糖致死基因 *SacB* 对菌株进行筛选。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%蔗糖平板上不生长的菌落。采用引物 LF/SR 和 SF/LR 进行 PCR 单交换验证, 再将单交换成功的突变株在无 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 平板上不生长的菌体, 采用引物 LF/LR 进行 PCR 验证, 获得双交换成功的突变株。

1.5 周质蛋白和膜蛋白的提取

周质蛋白提取: 利用渗透休克法^[20] (osmotic shock) 提取周质蛋白。首先离心收集在 LB 培养基中过夜培养的菌体, 用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS) (氯化钠 137 mmol/L, 氯化钾 2.7 mmol/L, 磷酸氢二钠 24.2 mmol/L, 磷酸二氢钾 5.2 mmol/L, pH 值 7.4) 洗涤菌体; 然后用 Spheroplast 缓冲液(三羟甲基氨基甲烷 100 mmol/L, 蔗糖 500 mmol/L, 乙二胺四乙酸二钠 0.5 mmol/L, pH 值 8.0) 重悬离心后的沉淀, 孵育 5 min 后 4 °C、10 000×g 离心 20 min, 去上清。再用低渗液(1 mmol/L 氯化镁溶液)重悬沉淀, 置于冰上 15 s 后加入 20 mmol/L 硫酸镁溶液。离心收集沉淀进行后续膜蛋白提取, 收集上清液然后进行超速离心(120 000×g, 1 h, 4 °C), 收集超速离心后的上清作为周质蛋白。

表 2 本研究中涉及的引物序列

Table 2 Primer sequences involved in this study

Primers	Sequence (5'→3')
5O	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGATTTATCAGTCGCCAGAG
5I	GGTCCGGGTTTCGCTATCTATACTTGCCCCGAAAAGCAC
3I	ATAGATAGCGAACCCGGACCTACTTCTGCGTCTGTTCTG
3O	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGGAGTGATGATGTTTCG
LF	TCCCTAGACTCACGAACC
SR	CCAATGCCACAGTAAAA
SF	GAAGGCGAAGGTTTAGGT
LR	TGGATCGGGATCACTCTG

膜蛋白(包含内膜和外膜蛋白)提取:利用超声破碎法提取膜蛋白,将提取周质蛋白试验中收集的沉淀用 buffer W 蛋白缓冲液(三羟甲基氨基甲烷 100 mmol/L,氯化钠 150 mmol/L, pH 8.0)重悬,进行超声破碎(5 s 脉冲,5 s 暂停,35%功率)。离心(10 000×g, 20 min, 4 °C)去除未破碎的细胞并收集悬浮液,将悬浮液进行超速离心(120 000×g, 1 h, 4 °C)后收集沉淀即为膜组分。使用添加 2% Triton X-100 (体积分数)的 buffer W 在 4 °C 过夜溶解膜组分,离心(10 000×g, 20 min)去除不溶杂质即为可溶膜蛋白。

1.6 组分还原 MO 的滴定试验

使用蛋白浓度归一化的样品进行试验,使周质蛋白和膜蛋白溶液样品的浓度分别等同于提取自 110 μg 菌体总蛋白/mL。在厌氧条件下使用 25 mmol/L 连二亚硫酸钠(sodium dithionite, DT)滴定 2 个样品中的细胞色素 *c*,使其恰好达到完全还原的状态(依据 350–600 nm 范围内的吸收光谱判断)。再用微量进样针向样品中逐步添加 500 mg/L MO 溶液至细胞色素 *c* 的特征吸收区域的吸收光谱曲线不再变化。

1.7 MO 还原脱色试验

MO 还原脱色试验在 100 mL 的血清瓶中进行,每个血清瓶分装 50 mL 的 LM 培养基(乳酸钠为电子供体,MO 为电子受体),充入过滤除菌的氮气 20 min 后用胶垫铝盖封口,转移至厌氧工作站中,加入 LM 培养基重悬至终 OD_{600} 值为 0.2 的菌液来启动反应,然后 30 °C 静置培养,并设置 3 组重复。还原过程使用一次性注射器在厌氧工作站中定时取样过滤除菌分析,利用分光光度计监测 OD_{465} 值的变化并记录。

1.8 CctA 的重组表达

利用质粒电转化法^[21]将包含菌株 MR-1 中

cctA 基因的构造质粒 pBAD-*cctA* (N 端带有 6×His 标签的 CctA_{6×His})以及不含 *cctA* 的空白质粒 pBAD 分别转化到 $\Delta mtr\Delta cctA$ 菌株,构建 *cctA* 表达菌株和对照菌株,通过质粒测序确认 2 种菌株构建成功。通过全蛋白电泳检验 CctA 在构建菌株中是否表达:在含有 Km 抗性的 LB 培养基中活化菌株,培养至对数中期后用 L-阿拉伯糖诱导蛋白表达;结束后各收集 1 mL 菌液中的细胞裂解后上样电泳。

细胞裂解和电泳条件为:先用 buffer W 将细菌细胞重悬至同样的 OD_{600} 值($OD_{600}=3.0$),各取相同体积与 2×loading buffer 混合,98 °C 加热 10 min 进行裂解;然后各取 10 μL 样品在 4%–15%变性电泳 Heps 预制胶上进行上样,低电压慢速电泳(110 V, 60 min)。采用血红素染色法^[22]对电泳胶中的细胞色素 *c* 进行特异性染色:将胶块充分浸泡于乙酸钠-冰乙酸缓冲液(pH 值 5.0)中,加入甲醇溶解的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液(1 mg/mL)并再次充分浸泡,然后加入过氧化氢溶液混合 5–10 min 后充分染色,随即用水替换染液以终止反应。置于凝胶成像仪中进行拍照记录,为了进一步分析条带灰度,使用 ImageJ 软件对图像进行处理^[23]。

1.9 CctA_{6×His} 蛋白的分离纯化

利用组氨酸标签蛋白亲和纯化填料中在琼脂糖螯和介质作用下与微球体发生螯合作用的 Ni^{2+} ,与组氨酸标签上的咪唑环发生特殊的相互作用,从而实现 CctA_{6×His} 的纯化分离。将过滤除气的 binding buffer (羟乙基哌嗪乙硫磺酸 20 mmol/L,氯化钠 150 mmol/L, pH 值 7.8)与填料充分混合以平衡填料,填料沉降后除去上清液;将菌株 $\Delta cctA$ -CctA_{6×His} 用终浓度为 1 mmol/L 的阿拉伯糖诱导表达 20 h 后的菌液进行超声破

碎, 超速离心后将所得的上清液蛋白样品与平衡后的填料充分混匀, 填料沉降后除去上清液; 将填料与 binding buffer 充分混合后以洗涤填料, 填料沉降后除去上清液(未吸附完全的杂质); 在填料中首先加入 10 mmol/L 的咪唑缓冲液, 充分混合后, 待填料沉降后收集上清溶液, 并观察蛋白的洗脱情况(填料中蛋白吸附呈红色), 如未完全洗脱, 进一步使用高浓度(50、100 和 200 mmol/L)咪唑缓冲液洗脱填料, 最后收集所有蛋白洗脱液, 进行 SDS-PAGE 以验证蛋白分子大小及纯度。

1.10 蛋白膜伏安试验^[24]

将新制纳米金电极表面修饰生物相容性自组装单层: 在 8 mmol/L 巯基乙醇、1 mmol/L 巯基乙酸和 1 mmol/L 巯基乙胺的混合溶液中浸泡 48 h。向蛋白溶液中加入聚-(α,β)-DL-天冬氨酸钠盐至 10 mmol/L 后滴加到上述电极表面成膜然后用 5% Nafion 溶液覆盖, 作为工作电极(Ag/AgCl 作为参比电极, 铂丝电极作为对电极)在无氧条件下进行循环伏安扫描。扫描范围为 +0.1 V 至 -0.6 V, 扫速为 50 mV/s, 试验温度为 30 °C。

2 结果与分析

2.1 菌株 MR-1 细胞亚组分还原 MO

为了寻找在周质空间中进行还原脱色的染料类型, 首先使用 MR-1 的野生株和缺陷株 Δmtr (*mtr* 基因缺失菌株是指敲除 *mtrABC*、*mtrDEF* 以及 *omcA* 7 个基因的菌株)对 7 种可被希瓦氏菌还原的染料进行还原(甲基紫^[6]、MO^[8]、刚果红^[25]、苋菜红^[26]、甲基绿^[27]、酸性红 27^[28]和结晶紫^[29])。除 MO 以外, Δmtr 在其他 6 种染料中均没有表现出还原活性(数据未展示), 说明只有 MO 可以在不依赖 Mtr 通道的条件下进行还原脱

色, 所以选择 MO 作为最终电子受体用于后续试验。为了明确菌株 MR-1 的胞外电子传递蛋白在还原 MO 过程中的作用, 分别提取了菌株 MR-1 的周质组分和膜组分, 并通过体外试验对其还原 MO 的活性进行了表征。样品中所包含细胞色素 *c* 氧化-还原状态的变化, 通过样品在可见区吸收光谱的特征进行反映, 并用于监测蛋白和 MO 之间的电子传递。样品的可见吸收光谱(图 1)显示, 在提取到的 2 种样品中细胞色素 *c* 的特征信号都非常突出, 且在空气中均呈现氧化态, 表现为 409 nm 处的 Soret 吸收带和 520–550 nm 区域的 Q 吸收带的显现。使用 DT 滴定 2 种样品后, 其中的细胞色素 *c* 均被还原, 表现为 Soret 吸收带红移至 419 nm 并产生更强的吸收信号, 而 Q 吸收带则在 523 nm 和 552 nm 处产生代表性的吸收信号。

在无氧条件下用 MO 逐步滴定还原态的 2 种样品, 监测到周质组分和膜组分中的细胞色素 *c* 都发生由还原态向氧化态的逐步转变, 表现为位于 419 nm 处的 Soret 吸收带逐渐蓝移回 409 nm, 并伴随着吸收强度的下降; 而在 523 nm 和 552 nm 处的吸收峰也逐步消退。与此同时, 氧化态 MO 在溶液中开始逐渐积累, 表现为 465 nm 处的吸收峰增长。这些结果表明了 MR-1 的周质组分和膜组分都具有对 MO 的还原能力, 而且还原电子传递过程中有细胞色素 *c* 直接参与。此外还可以观察到, 周质样品中的还原态细胞色素 *c* 与 2.5 μg MO 混合后完全恢复到氧化状态(继续加入 MO 后其氧化态特征峰位和强度不再发生变化), 而膜蛋白样品中的细胞色素 *c* 与 5.5 μg MO 混合后才被完全氧化, 说明来自归一化细胞生物量的膜组分比周质组分可以还原更多 MO。

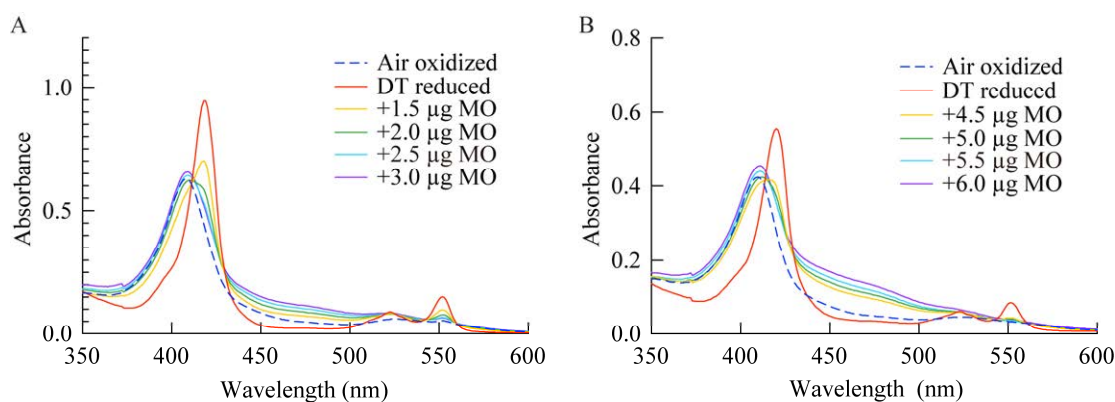


图 1 菌株 MR-1 周质蛋白(A)和膜蛋白(B)体外还原 MO 的紫外可见吸收光谱图

Figure 1 UV-Vis spectra of *in vitro* MO reduction by periplasmic (A) and membrane (B) proteins of *Shewanella oneidensis* MR-1.

2.2 CctA 和 Mtr 通道在 MO 还原中的作用

基于上述结果,可以确认周质电子传递通道在 MO 胞外还原中的作用分别为:(1) 在周质中直接进行电子传递和还原;(2) 将内膜呼吸链中的电子传递到外膜并完成还原。为了对此二者进行原位区分,使用野生型 MR-1 菌株和 *cctA*、*mtr* 基因缺失菌株进行了 MO 还原动力学试验(图 2A)。在假定周质电子传递过程为动力学限

制步骤的前提下,MO 的还原动态可以简化为一级反应动力学过程并根据方程 $-\ln(C_t/C_0)=Kt$ (式中: C_0 为 MO 溶液初始浓度, C_t 为时间 t 时的 MO 的浓度)计算动力学常数 K 用以定量描述 MO 的还原速率。在使用野生型菌株进行的试验中,MO 很快被还原脱色(在本研究的试验条件下,2 h 内对 200 mg/L 浓度的 MO 脱色效率达到 100%)。 $\Delta cctA$ 的还原脱色速率与野生型相比

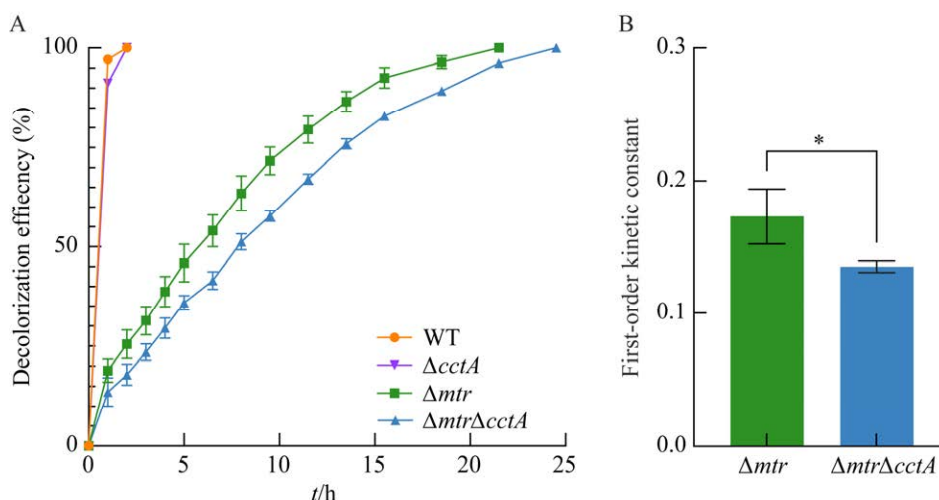


图 2 批次试验中野生型、 $\Delta cctA$ 、 Δmtr 和 $\Delta mtr\Delta cctA$ 菌株还原 MO 的动力学曲线(A)及一级动力学常数对比(B)

Figure 2 Kinetic curves of MO reduction by wild type strain, $\Delta cctA$, Δmtr , $\Delta mtr\Delta cctA$ (A) and first-order kinetic constant by Δmtr and $\Delta mtr\Delta cctA$ (B) in batch tests. There was a significant difference between Δmtr and $\Delta mtr\Delta cctA$ (*: $P < 0.05$). Error bars indicate the standard deviation ($n=3$).

略有降低但仍迅速地完成了脱色。相比之下, Δmtr 和 $\Delta mtr\Delta cctA$ 菌株进行 MO 还原脱色的速率均受到了显著的抑制, 其中 $\Delta mtr\Delta cctA$ 菌株相比于 Δmtr 菌株还原脱色速率降低 22% ($P < 0.05$)。这些结果印证了 Mtr 通道在希瓦氏细菌 MO 还原脱色中重要作用的发现^[8], 也表明了作为周质电子中继的细胞色素 CctA 可能在缺失 Mtr 通道的情况下参与 MO 的还原。

2.3 $\Delta mtr\Delta cctA$ 突变株细胞亚组分还原 MO

为了进一步了解 CctA 在缺失 Mtr 通道的情况下参与 MO 还原的情况, 提取了 $\Delta mtr\Delta cctA$ 菌株的周质组分和膜组分并进行体外还原 MO 的试验。紫外可见吸收光谱结果(图 3A)显示, $\Delta mtr\Delta cctA$ 的周质组分被还原以后也具有向 MO 转移电子并使样品中的细胞色素 *c* 恢复氧化态的能力。但相比于野生型的周质样品, 仅需 1.5 μg MO 就使得 $\Delta mtr\Delta cctA$ 周质样品中的还原态细胞色素 *c* 完全氧化, 说明 CctA 蛋白的缺失使还原态周质组分中储存的活性电子数量显著下降。与野生型菌株相比, $\Delta mtr\Delta cctA$ 的膜蛋白样品中细胞色素 *c* 含量显著下降, 而且该样品不具有还原 MO 的能力(图 3B)。这表明, 在 MR-1 的

膜组分中除了 Mtr 呼吸通道之外, 没有其他蛋白能够参与 MO 的脱色还原; 在 $\Delta mtr\Delta cctA$ 双敲除株中, MO 的还原场所从细菌外表面转移到周质空间中完成。

2.4 CctA 表达水平对还原 MO 的影响

为了进一步研究 CctA 在周质还原 MO 电子传递过程中的作用, 通过在 $\Delta mtr\Delta cctA$ 菌株的周质空间中重组表达 N 端带有 6 \times His 标签的 CctA_{6 \times His} (12.9 kDa), 控制 CctA 的浓度以观察含有不同浓度 CctA 的菌株对 MO 还原的影响。试验中通过控制不同的诱导时间和添加不同浓度的诱导剂 L-阿拉伯糖来调控 CctA_{6 \times His} 的表达量。各种条件下的菌体细胞样品在生物量归一化之后的 SDS-PAGE 的血红素染色(图 4)结果表明, 所设置的试验条件有效地调控了细菌细胞中 CctA_{6 \times His} 的含量水平。在诱导剂诱导后, $\Delta mtr\Delta cctA_pcctA$ 菌株在 SDS-PAGE 中 CctA_{6 \times His} 位置产生比 $\Delta mtr\Delta cctA_pBAD$ 菌株明显清晰的蛋白条带。通过对条带进行灰度分析, 确认 $\Delta mtr\Delta cctA_pcctA$ 菌株中 CctA_{6 \times His} 的含量随着诱导时间(12 h 以内)的延长和诱导剂浓度(5 mmol/L 以内)的提高而逐渐提高。

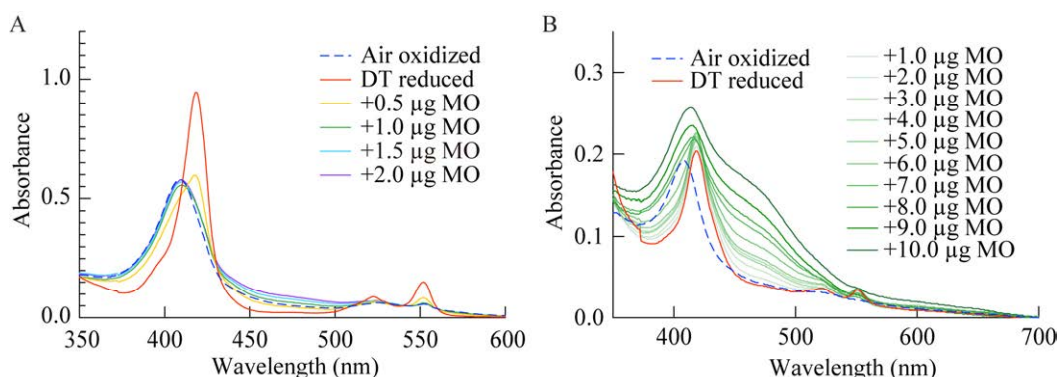


图 3 $\Delta mtr\Delta cctA$ 菌株周质蛋白(A)和膜蛋白(B)体外还原 MO 的紫外可见吸收光谱图

Figure 3 UV-Vis spectra of *in vitro* MO reduction by periplasmic (A) and membrane (B) proteins of $\Delta mtr\Delta cctA$ strain.

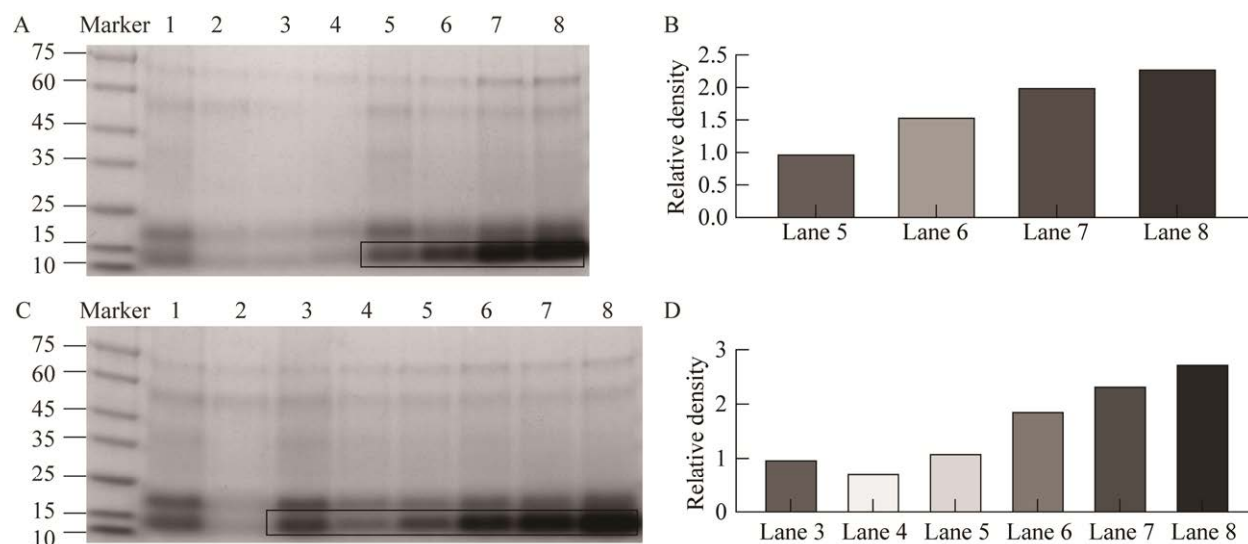


图 4 重组表达 CctA 蛋白的 SDS-PAGE (血红蛋白染色)及条带灰度分析

Figure 4 Heme-stained SDS-PAGE and densitometry analysis to protein expression of CctA. A: Adding 1 mmol/L inducer for 4, 8, and 12 h; Lane 1–4: Before adding inducer and adding inducer for 4, 8, and 12 h of $\Delta mtr\Delta cctA_pBAD$ strains; Lane 5–8: Before adding inducer and adding inducer for 4, 8, and 12 h of $\Delta mtr\Delta cctA_pcctA$ strains. B: Histogram of relative density by densitometry analysis in the box area of lane 5–8 which from Figure A. C: Adding 0.2, 0.5, 1, 2, and 5 mmol/L inducer for 4 h. Lane 1–2: Before adding inducer and adding 1 mmol/L inducer of $\Delta mtr\Delta cctA_pBAD$ strains; Lane 3–8: Before adding inducer and adding 0.2, 0.5, 1, 2, and 5 mmol/L inducer of $\Delta mtr\Delta cctA_pcctA$ strains. D: Histogram of relative density by densitometry analysis in the box area of lane 3–8 which from Figure C.

在 MO 还原的批次动力学试验中, 诱导剂诱导后的 $\Delta mtr\Delta cctA_pcctA$ 菌株表现出符合预期的还原能力。但 $\Delta mtr\Delta cctA_pBAD$ 菌株对 MO 的还原能力相比 $\Delta mtr\Delta cctA$ 菌株(图 2)显著下降, 这可能是作为外源质粒的 pBAD 对宿主代谢或蛋白表达产生的不利影响, 考虑到这一因素, CctA_{6×His} 在 $\Delta mtr\Delta cctA_pcctA$ 菌株中表达对 MO 还原动力学的实际促进作用甚至高于图 5 中观测结果。为了研究周质空间中 CctA 水平和 MO 还原电子传递效率之间的关系, 将不同表达条件的 $\Delta mtr\Delta cctA_pcctA$ 菌株进行 MO 还原动力学试验。图 5A 中的结果显示, 使用 1 mmol/L L-阿拉伯糖诱导表达 4 h 以后细菌细胞可以快速还原 MO。然而, 尽管随着诱导时间的增加, 细胞内具有更高的 CctA_{6×His} 含量,

细菌对 MO 的还原速率却稍微下降, 相应的动力学常数也显著降低(*pcctA*-12 h), 这可能是因为延长的诱导时间使细菌的活性下降, 因而基于不同诱导时间的试验无法给出 CctA_{6×His} 水平和 MO 还原速率之间的关系。另一方面, 使用不同浓度的诱导剂一致诱导 4 h (图 5C), 细菌细胞也都表现出比 $\Delta mtr\Delta cctA_pBAD$ 菌株更显著快速的 MO 还原能力。使用 0.2–2.0 mmol/L 诱导剂诱导, MO 还原速率随着细胞内 CctA_{6×His} 水平的升高而显著上升, 更高浓度诱导剂处理时, MO 还原速率不再增加, 可能是高强度诱导表达对细菌活性的不利影响超过了 CctA_{6×His} 水平升高带来的有利影响。因此, 本研究中 CctA_{6×His} 水平和 MO 还原速率之间的关系符合预期。

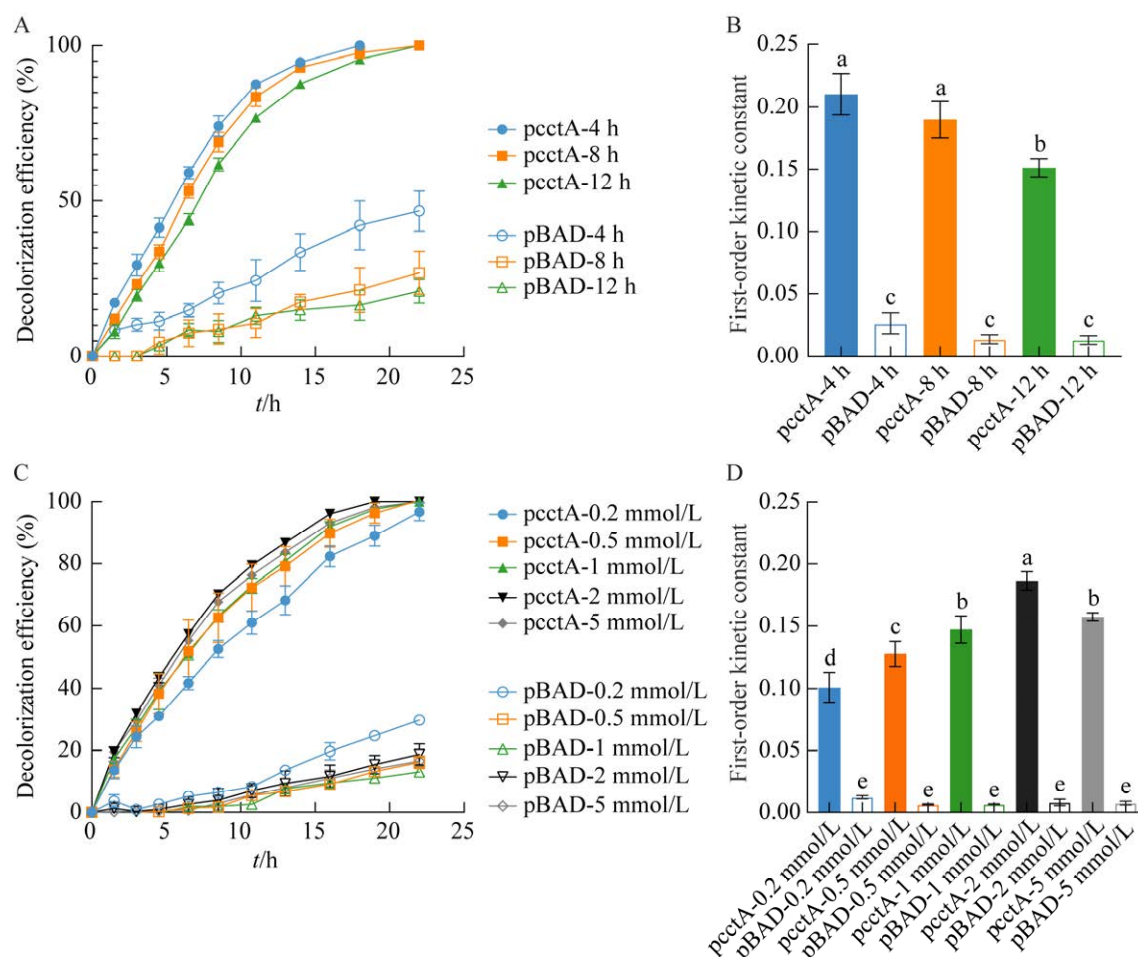


图 5 批次试验中 CctA 表达菌株和对照菌株还原 MO 的动力学曲线及一级动力学常数对比

Figure 5 Kinetic curve of MO reduction and first-order kinetic constant by $\Delta mtr\Delta cctA_pcctA$ and $\Delta mtr\Delta cctA_pBAD$ strains in batch tests. A–B: Kinetic curve of MO reduction (A) and first-order kinetic constant (B) by $\Delta mtr\Delta cctA_pcctA$ and $\Delta mtr\Delta cctA_pBAD$ strains which adding 1 mmol/L inducer for 4, 8, and 12 h. C–D: Kinetic curve of MO reduction (C) and first-order kinetic constant (D) by $\Delta mtr\Delta cctA_pcctA$ and $\Delta mtr\Delta cctA_pBAD$ strains which adding 0.2, 0.5, 1, 2, and 5 mmol/L inducer for 4 h. Different lowercases indicate significant differences between groups ($P < 0.05$), the same lowercases indicate no significant differences between groups. Error bars indicate the standard deviation ($n=3$).

2.5 周质蛋白氧化还原电位分布

蛋白的氧化还原电位是反映电子传递和终端 MO 还原活性的基本热力学参数。为了了解 CctA 蛋白与周质电子传递通道之间的热力学关系, 通过蛋白膜伏安试验对野生型 MR-1 菌株的周质蛋白和纯化后的 CctA_{6×His} 蛋白的电位进行了分析(图 6)。其中 CctA_{6×His} 蛋白在低电位区域出现了 1 对氧化还原峰, 氧化峰电位(E_{pa})和还原峰电位(E_{pc})分别为 -0.218 和 -0.302 V (vs. SHE),

中值电位为 -0.26 V。这一结果与前人报道中 CctA 具有较低的氧化还原电位的发现^[30]相一致, 显示 CctA 蛋白在与低电位的其他氧化还原蛋白或电子受体进行电子传递方面更加具有效率。而混合的周质蛋白除了在同样位置出现 1 对低电位氧化还原峰之外, 于高电位也出现了 2 对氧化-还原峰, 这些不同氧化还原电位的周质蛋白符合周质空间中存在着多条电子传递通道的研究结论。

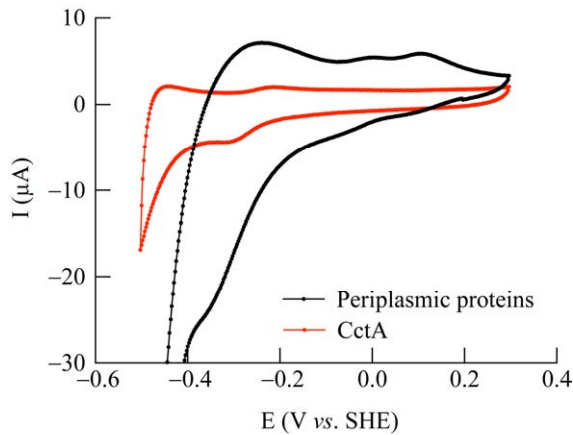


图 6 菌株 MR-1 周质蛋白及 CctA 蛋白在电极表面的伏安曲线图

Figure 6 PFV image of *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type strain and purified protein CctA.

3 讨论

电活性微生物还原或降解偶氮染料的研究是近年来微生物电化学研究的主要内容之一,其中菌株 MR-1 被多次证实通过 EET 来完成对 MO 等偶氮染料的还原,而大量表达的外膜细胞色素 *c* 复合物使得很多试验条件下染料还原主要发生在细菌外膜表面^[31],典型的证据包括内膜电子传递枢纽 CymA 和外膜 MtrCAB-OmcA 系统组成的 Mtr 代谢途径的缺失对希瓦氏菌还原脱色偶氮染料能力造成显著的抑制作用^[8]。然而,周质空间中种类丰富的细胞色素 *c* 和偶氮还原酶同样为催化染料还原转化提供了基础^[32]。一般地,极性较高且亲水的偶氮染料较难跨过外膜进入菌体细胞,而更容易在电活性细菌的细胞外接受电子^[33]。但是细胞膜具有一定的通透性,在适宜的 pH 和温度等条件下会允许偶氮染料分子跨膜通过,而使得染料分子在细胞内部实现脱色^[9],同时 MO 含有苯环和二甲基胺基等非极性基团而具有一定的疏水性,可能使 MO 更容易跨膜进入周质空间。本研究结果发现,敲除外膜细胞色素 *c* 复合物后(Δmtr 菌株),菌株 MR-1 也

仍然保留了对 MO 的还原能力,这一结果也证明了其还原位点从胞外而转移到周质空间中,同时也为开展周质空间中电子传递研究提供了条件。

CctA 和 FccA 同时作为周质空间中的电子中继,均可以在内膜 CymA 和外膜 MtrA 蛋白之间进行电子传递。在 MR-1 中单独敲除 *cctA*^[34] 或 *fccA*^[14] 的试验结果表明,二者互相作为替代对方的电子中继使菌体细胞对铁氧化物的还原能力不会因其中一种的缺失而受到显著抑制。此外,双敲除菌株 $\Delta fccA\Delta cctA$ 在以铁、硝酸盐或富马酸盐为电子受体时表现出生长延迟或不生长^[32],说明 CctA 和 FccA 在 EET 过程中虽功能重叠,但基本不被其他电子中继代替。然而,基于核磁共振波谱对蛋白相互作用的研究表明^[12],虽然 CctA 与 FccA 均能够与 MtrA 进行相互作用,但是 FccA 与 MtrA 的结合亲和力更强,而 CctA 在 FccA 存在时不能与之竞争与 MtrA 的结合位点。此外由于其蛋白质表面均携带的负电荷,FccA 与 CctA 之间并不进行相互作用。在 FccA 存在时,CctA 实际执行的功能尚不清楚。目前仅发现在 DMSO 还原中 CctA 通过与 DmsE 相互作用而表现出不被 FccA 替代的活性^[35]。本研究的结果显示,在 FccA 存在条件下 MR-1 中的 CctA 仍然促进甲基橙的还原,意味着 CctA 在偶氮染料脱色中可能具有不被 FccA 替代的活性。

图 2 中的结果证明,野生型 MR-1 至少存在 3 条 MO 还原的电子传递通道:(1) 通过内膜-周质-Mtr 蛋白复合体在菌体细胞表面完成;(2) 通过 CctA 蛋白在周质空间内完成;(3) 不需要 CctA 蛋白的胞内/周质电子传递通道。其中对比 Δmtr 和 $\Delta mtr\Delta cctA$ 菌株的试验数据,证明基于 CctA 的电子传递通道是存在的。但是单独的 *cctA* 基因缺失并没有使其还原脱色速率显著降

低, 这与前人的研究结果不一致^[36]。这可能是因为在研究的所设置的试验条件下, 以上多条电子传递通道对细菌呼吸代谢提供电子的竞争, 以及 FccA 和 CctA 之间的替代作用, 使 *cctA* 的敲除对 MO 还原速率的影响没有得到充分体现。与此一致, 在 Mtr 通道缺失的条件下, 敲除 *cctA* 使得 MO 还原速率受到更显著的影响, 体现了 CctA 参与的周质电子传递通道在 MO 还原过程中的作用。

由于革兰氏阴性细菌周质空间中缺乏固定蛋白的明确细胞结构, 周质中蛋白间的电子传递被认为是通过蛋白分子自由运动实现分子间血红素的空间匹配来完成的^[37], 其中分子量较小的 CctA 蛋白在理论上具有更高效的运动和分子碰撞。为了探测 CctA 实际的电子传递行为, 本研究在 Mtr 通道缺失的基础上研究了周质空间中 CctA 表达水平和 MO 还原速率之间的关系。按照描述酶促反应底物-速率关系的 Michaelis-Menten 方程, MO 还原速率应当随 CctA 浓度提高而升高, 并逐渐趋于稳定, 这与图 5C、5D 中的结果是一致的。本研究中, CctA 蛋白浓度在较低水平时(0.2 mmol/L 诱导剂诱导)即达到较高的 MO 还原速率, 蛋白浓度继续大幅提高以后, MO 还原速率仅仅有小幅提高, 说明 CctA 蛋白在电子传递过程中具有很小的“半饱和常数”, 即在 CctA 参与的电子传递路径中, 仅需要少量 CctA 即可满足电子传递的需要。考虑到 CctA 自由运动的特性, 这一推论可能表明进行 MO 还原时 CctA 与其电子传递蛋白之间具有较高的结合效率, 或该蛋白表达水平较低。根据氧化还原电位测试结果还可以预测, 该电子传递路径可能具有较低的电位。

4 结论

本研究以偶氮染料 MO 的周质还原过程作

为研究对象, 通过基因敲除和回补表达研究 CctA 蛋白在 MO 周质还原的电子传递中的作用。根据细菌组分还原及基因敲除菌株的 MO 还原动力学试验结果, 证明 CctA 参与了 MO 在周质空间中的还原过程, 而电化学试验结果进一步证明其参与了一条低电位的电子传递通道。在此基础上, 通过对 CctA 表达浓度-MO 还原动力学之间的关系的研究, 探索了 CctA 在周质电子传递过程中的原位动力学行为, 发现低水平表达 CctA 时, MO 在周质空间中的还原速率与其表达水平呈正相关, 更高水平的 CctA 表达无助于进一步提高 MO 的还原速率。这说明周质电子传递依赖 CctA 但并不需要其大量表达, 可能与暂不明确的 CctA 独特电子传递机理有关。以上发现推进了对 CctA 或类似蛋白电子传递机制的理解, 有希望为通过合成生物学设计或改造胞外氧化还原系统、强化生物电化学在污染物降解中的应用提供了重要参考。

参考文献

- [1] YIN Y, LIU C, ZHAO GH, CHEN YG. Versatile mechanisms and enhanced strategies of pollutants removal mediated by *Shewanella oneidensis*: a review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 440: 129703.
- [2] 肖翔, 吴勇民, 徐灿灿, 曹丹鸣, 王明娜, 马晓波, 杜道林. 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.
XIAO X, WU YM, XU CC, CAO DM, WANG MN, MA XB, DU DL. 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).
- [3] 肖翔, 曹丹鸣, 吴勇民, 王明娜, 马晓波, 杜道林. 产电微生物在染料废水生物降解中的应用综述[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(12): 364-367.
XIAO X, CAO DM, WU YM, WANG MN, MA XB, DU DL. Review on the application of electricity-producing

- microorganisms in the biodegradation of dye wastewater[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, 40(12): 364-367 (in Chinese).
- [4] HONG YG, XU MY, GUO J, XU ZC, CHEN XJ, SUN GP. Respiration and growth of *Shewanella decolorationis* S12 with an azo compound as the sole electron acceptor[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(1): 64-72.
- [5] XU MY, GUO J, ZENG GQ, ZHONG XY, SUN GP. Decolorization of anthraquinone dye by *Shewanella decolorationis* S12[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(2): 246-251.
- [6] CHEN CH, CHANG CF, LIU SM. Partial degradation mechanisms of malachite green and methyl violet B by *Shewanella decolorationis* NTOU1 under anaerobic conditions[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 177(1/2/3): 281-289.
- [7] 陈刚, 陈亮, 黄满红. 偶氮染料的微生物脱色研究进展[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(7): 1046-1051.
CHEN G, CHEN L, HUANG MH. Review of studies on azo dyes decolorization[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(7): 1046-1051 (in Chinese).
- [8] CAI PJ, XIAO X, HE YR, LI WW, CHU J, WU C, HE MX, ZHANG Z, SHENG GP, LAM MHW, XU F, YU HQ. Anaerobic biodecolorization mechanism of methyl orange by *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(4): 1769-1776.
- [9] LI Q, FENG XL, LI TT, LU XR, LIU QY, HAN X, FENG YJ, LIU ZY, ZHANG XJ, XIAO X. Anaerobic decolorization and detoxification of cationic red X-GRL by *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Environmental Technology*, 2018, 39(18): 2382-2389.
- [10] YANG YY, DU LN, WANG G, JIA XM, ZHAO YH. The decolorisation capacity and mechanism of *Shewanella oneidensis* MR-1 for methyl orange and acid yellow 199 under microaerophilic conditions[J]. *Water Science and Technology*, 2011, 63(5): 956-963.
- [11] MEYER TE, TSAPIN AI, VANDENBERGHE I, DE SMET L, FRISHMAN D, NEALSON KH, CUSANOVICH MA, van BEEUMEN JJ. Identification of 42 possible cytochrome C genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes[J]. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 2004, 8(1): 57-77.
- [12] FONSECA BM, PAQUETE CM, NETO SE, PACHECO I, SOARES CM, LOURO RO. Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Biochemical Journal*, 2013, 449(1): 101-108.
- [13] PEALING SL, BLACK AC, MANSON FDC, WARD FB, CHAPMAN SK, REID GA. Sequence of the gene encoding flavocytochrome *c* from *Shewanella putrefaciens*: a tetraheme flavoenzyme that is a soluble fumarate reductase related to the membrane-bound enzymes from other bacteria[J]. *Biochemistry*, 1992, 31(48): 12132-12140.
- [14] SCHUETZ B, SCHICKLBERGER M, KUERMANN J, SPORMANN AM, GESCHER J. Periplasmic electron transfer via the *c*-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(24): 7789-7796.
- [15] DELGADO VP, PAQUETE CM, STURM G, GESCHER J. Improvement of the electron transfer rate in *Shewanella oneidensis* MR-1 using a tailored periplasmic protein composition[J]. *Bioelectrochemistry*, 2019, 129: 18-25.
- [16] SUN WN, LIN ZF, YU QZ, CHENG SA, GAO HC. Promoting extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 by optimizing the periplasmic cytochrome *c* network[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 727709.
- [17] HARTSHORNE RS, REARDON CL, ROSS D, NUESTER J, CLARKE TA, GATES AJ, MILLS PC, FREDRICKSON JK, ZACHARA JM, SHI L, BELIAEV AS, MARSHALL MJ, TIEN M, BRANTLEY S, BUTT JN, RICHARDSON DJ. Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(52): 22169-22174.
- [18] DEHIO C, MEYER M. Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(2): 538-540.
- [19] JIN M, JIANG YM, SUN LL, YIN JH, FU HH, WU GF, GAO HC. Unique organizational and functional features of the cytochrome *c* maturation system in *Shewanella oneidensis*[J]. *Public Library of Science ONE*, 2013, 8(9): e75610.
- [20] MALHERBE G, HUMPHREYS DP, DAVÉ E. A robust fractionation method for protein subcellular

- localization studies in *Escherichia coli*[J]. *BioTechniques*, 2019, 66(4): 171-178.
- [21] CORTS AD, THOMASON LC, GILL RT, GRALNICK JA. A new recombineering system for precise genome-editing in *Shewanella oneidensis* strain MR-1 using single-stranded oligonucleotides[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 39.
- [22] THOMAS PE, RYAN D, LEVIN W. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome *P-450* on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 75(1): 168-176.
- [23] GASSMANN M, GREINACHER B, ROHDE B, VOGEL J. Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry[J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(11): 1845-1855.
- [24] ARMSTRONG FA. Recent developments in dynamic electrochemical studies of adsorbed enzymes and their active sites[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9(2): 110-117.
- [25] GOMAA OM, FAPETU S, KYAZZE G, KESHAVARZ T. The role of riboflavin in decolourisation of congo red and bioelectricity production using *Shewanella oneidensis*-MR1 under MFC and non-MFC conditions[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33(3): 56.
- [26] XIAO X, LI TT, LU XR, FENG XL, HAN X, LI WW, LI Q, YU HQ. A simple method for assaying anaerobic biodegradation of dyes[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 251: 204-209.
- [27] 鲍巧雨, 钱怀丽, 郭晶晶, 邓国志, 武超. 希瓦氏菌对甲基绿的脱色及其机制[J]. *安徽农业大学学报*, 2021, 48(6): 975-980.
BAO QY, QIAN HL, GUO JJ, DENG GZ, WU C. Decolorization of methyl green by *Shewanella oneidensis* MR-1 and its mechanism[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2021, 48(6): 975-980 (in Chinese).
- [28] LIU GF, ZHOU JT, WANG J, WANG XJ, JIN RF, LV H. Decolorization of azo dyes by *Shewanella oneidensis* MR-1 in the presence of humic acids[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(2): 417-424.
- [29] CHEN CH, CHANG CF, HO CH, TSAI TL, LIU SM. Biodegradation of crystal violet by a *Shewanella* sp. NTOU1[J]. *Chemosphere*, 2008, 72(11): 1712-1720.
- [30] FIRER-SHERWOOD M, PULCU GS, ELLIOTT SJ. Electrochemical interrogations of the Mtr cytochromes from *Shewanella*: opening a potential window[J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 13(6): 849-854.
- [31] BRIGÉ A, MOTTE B, BORLOO J, BUYSSCHAERT G, DEVREESE B, van BEEUMEN JJ. Bacterial decolorization of textile dyes is an extracellular process requiring a multicomponent electron transfer pathway[J]. *Microbial Biotechnology*, 2008, 1(1): 40-52.
- [32] STURM G, RICHTER K, DOETSCH A, HEIDE H, LOURO RO, GESCHER J. A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime[J]. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2015, 9(8): 1802-1811.
- [33] 刘亮, 刘聪, 蒋继宏, 周郑坤, 刘伟杰. 希瓦氏菌在印染废水脱色中的研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2015, 38(6): 110-116.
LIU L, LIU C, JIANG JH, ZHOU ZK, LIU WJ. Research progress on decolorization of the dyeing wastewater using *Shewanella*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 38(6): 110-116 (in Chinese).
- [34] COURSOLE D, GRALNICK JA. Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(4): 995-1008.
- [35] ALVES MN, NETO SE, ALVES AS, FONSECA BM, CARRÊLO A, PACHECO I, PAQUETE CM, SOARES CM, LOURO RO. Characterization of the periplasmic redox network that sustains the versatile anaerobic metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 665.
- [36] FONSECA BM, SILVA L, TRINDADE IB, MOE E, MATIAS PM, LOURO RO, PAQUETE CM. Optimizing electroactive organisms: the effect of orthologous proteins[J]. *Frontiers in Energy Research*, 2019, 7: 2.
- [37] YUAN Y, LI LC, ZHOU SG. Axial ligation of heme in *c*-type cytochromes of living *Shewanella oneidensis*: a new insight into enhanced extracellular electron transfer[J]. *ChemElectroChem*, 2015, 2(11): 1672-1677.