

强化产电微生物与电极间电子传递速率的研究进展

刘向^{1,2,3}, 张君奇^{1,2,3}, 张保财^{1,2,3}, 杨池^{1,2,4}, 李锋^{1,2,3,4}, 宋浩^{1,2,3,4}

1 天津大学 化工学院, 天津 300072

2 天津大学 合成生物学前沿科学中心和系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

3 天津大学 化工学院 天津化学化工协同创新中心合成生物学研究平台, 天津 300072

4 天津大学 青岛海洋工程研究院, 山东 青岛 266200

刘向, 张君奇, 张保财, 等. 强化产电微生物与电极间电子传递速率的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(2): 361-377.

Liu X, Zhang JQ, Zhang BC, et al. Progress in enhancing electron transfer rate between exoelectrogenic microorganisms and electrode interface. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 361-377.

摘要: 产电微生物是微生物燃料电池、电解池和电合成等微生物电化学技术 (Microbial electrochemical technologies, METs) 的研究基础。产电微生物与电极界面间的胞外电子传递 (Extracellular electron transfer, EET) 效率低以及生物被膜形成能力弱限制了 METs 在有机物降解、电能生产、海水淡化、生物修复和生物传感等方面的应用。因此, 强化产电微生物与电极界面间的相互作用是过去几年的主要研究热点。针对近年的研究, 本文系统概述了通过改造产电微生物来增强微生物-电极间相互作用的各种策略, 重点分析了这些策略的适用性和局限性, 并展望了强化产电微生物-电极界面作用在微生物电化学技术利用方面的研究前景。

关键词: 产电微生物, 微生物电化学技术, 胞外电子传递, 生物被膜, 微生物-电极相互作用

Received: May 18, 2020; **Accepted:** July 13, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0901300), Independent Innovation Fund of Tianjin University (Nos. 0903065083, 0903065084).

Corresponding authors: Feng Li. E-mail: feng.li@tju.edu.cn

Hao Song. E-mail: hsong@tju.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0901300), 天津大学自主创新基金 (Nos. 0903065083, 0903065084) 资助。

网络出版时间: 2020-08-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200810.1706.006.html>

Progress in enhancing electron transfer rate between exoelectrogenic microorganisms and electrode interface

Xiang Liu^{1,2,3}, Junqi Zhang^{1,2,3}, Baocai Zhang^{1,2,3}, Chi Yang^{1,2,4}, Feng Li^{1,2,3,4}, and Hao Song^{1,2,3,4}

1 School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 Frontier Science Center for Synthetic Biology and Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Tianjin University, Tianjin 300072, China

3 Synthetic Biology Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

4 Qingdao Institute of Ocean Engineering, Tianjin University, Qingdao 266200, Shandong, China

Abstract: Exoelectrogenic microorganisms are the research basis of microbial electrochemical technologies such as microbial fuel cells, electrolytic cells and electrosynthesis. However, their applications are restricted in organic degradation, power generation, seawater desalination, bioremediation, and biosensors due to the weak ability of biofilm formation and the low extracellular electron transfer (EET) efficiency between exoelectrogenic microorganisms and electrode. Therefore, engineering optimization of interaction between exoelectrogenic microorganisms and electrode interface recently has been the research focus. In this article, we review the updated progress in strategies for enhancing microbe-electrode interactions based on microbial engineering modifications, with a focus on the applicability and limitations of these strategies. In addition, we also address research prospects of enhancing the interaction between electroactive cells and electrodes.

Keywords: exoelectrogenic microorganisms, microbial electrochemical technologies, extracellular electron transfer, biofilm, microbe-electrode interactions

大量废水废气的排放导致全球气候恶化、空气污染加剧, 对环境和经济产生了极大的破坏^[1-5]。然而, 传统的污水处理、废气减排等方法无法满足工业上绿色可持续发展的要求。与传统方法不同, 微生物燃料电池 (Microbial fuel cells, MFCs)^[6-7]、微生物电解池 (Microbial electrolysis cells, MECs)^[8] 和微生物电合成 (Microbial electrosynthesis, MES)^[9-11] 等微生物电化学技术 (Microbial electrochemical technologies, METs)^[12] 作为新型的废物处理和能源利用方式, 在清洁电能生产、废水处理、生物修复、生物传感以及高能燃料转化合成等方面具有重要的应用潜力和广阔的发展前景, 因此成为世界各国研究的热点^[13-16]。

近年来, 已经开发出一系列基于电活性微生物的生物电化学系统 (Bioelectrochemical systems, BESs), 包括利用有机或无机化合物氧化产电的微生物

燃料电池, 以及用于废水的修复、脱盐和环境有毒化学物质去除的微生物电解池。此外, 基于电驱动的微生物电合成还可以利用电能驱动 CO₂ 合成高附加值化学品。在这些系统中, 能量转化都是依赖微生物在电极上定植和电子在电极表面的传递来实现的。然而, 微生物-电极界面低效的作用是限制整个 BES 中高效电子传递的主要瓶颈^[17-18]。现有研究表明, 修饰改造电极材料增强电极比表面积、提高产电微生物生物被膜的形成、强化产电微生物与电极界面亲和作用仍然是增强 BESs 性能的主要研究方向^[19-22]。因此, 本文将从合成生物学改造细胞、导电纳米材料修饰细胞以及电极表面固定化细胞 3 个方面系统阐述强化产电微生物和电极间电子传递速率的策略, 重点讨论上述策略的适用性和局限性, 并从机理研究和应用方面展望未来的研究方向。

1 产电细胞的合成生物学改造

合成生物学的快速发展使产电微生物的动态调控和电子传递的定向强化成为可能^[23],在构建电子传递元件,提高胞内还原力水平、促进电活性生物膜的形成和强化产电微生物与电极的相互作用等方面具有广泛的应用^[24-26]。基于此,我们从调控细胞电子传递路径、调控胞内还原力水平和胞内信号分子的表达等3个方面总结了比较有代表性的合成生物学改造产电细胞方面的研究(表1)。

1.1 调控细胞电子传递路径

目前,已知的产电细胞胞外电子传递机制主要有两种:1)直接电子传递(Direct electron transfer, DET):产电微生物能够在电极表面形成电活性生物膜,并通过细胞膜上的导电色素蛋白或导电纳米线实现与电极间的直接电子传递,如希瓦氏菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 和硫还原地杆菌 *Geobacter sulfurreducens*^[45-46];2)间接电子传递(Indirect electron transfer, IET):一些产电微生物通过分泌氧化还原性电子传递介质实现与电极间的电子交换^[17],如希瓦氏菌分泌的核黄素(Riboflavin, RF)和黄素单核苷酸(Flavin mononucleotide, FMN)、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 分泌的吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)、吩嗪-1-酰胺(Phenazine-1-carboxylic amide, PCN)和绿脓菌素

(Pyocyanine, PYO)^[47-48]等氧化还原物质均在产电细胞-电极间的电子传输中发挥着重要作用。

由于产电微生物自身电子传递效率较低,可根据产电微生物的电子传递机制,通过合成生物学手段优化或外源引入电子传递元件的生物合成路径,直接调控细胞电子传递路径,提高产电微生物的胞外电子传递效率。

1.1.1 强化基于导电色素蛋白介导的电子传递路径

产电微生物能够通过细胞外膜或周质上的色素蛋白将电子直接传递到胞外固体电极,例如模式产电菌 *S. oneidensis* MR-1 可通过 *c* 型细胞色素蛋白与电极进行电子传递,在 METs 中得到了广泛的应用^[45]。因此,研究人员通过调控产电微生物胞内 *c* 型细胞色素蛋白的表达量来提高其胞外电子传递效率。Min 等^[27]通过对 *S. oneidensis* MR-1 的黄素 (*ribD-ribC-ribBA-ribE*) 和色素蛋白 (*mtrC-mtrA-mtrB*) 生物合成基因簇进行工程化处理,获得的工程菌胞内黄素和 *c* 型色素蛋白的表达水平得到提高,使该菌催化的 MFCs 的最大功率密度 (37 mW/m^2) 提高 3.5 倍。Jensen 等^[7]通过体外重构 *S. oneidensis* MR-1 的导电色素蛋白 MtrC、MtrA 和 MtrB,并导入大肠杆菌 *Escherichia coli* 中,经过改造的工程菌还原金属离子和固体金属氧化物的能力分别提高了 8 倍和 4 倍(图 1A)。随后,针对在 *E. coli* 中引入 MtrCAB 色素系统产生的电流是否影响大肠杆菌胞内代谢环境(包括细胞活性、

表 1 合成生物学改造产电微生物汇总表

Table 1 Summary table of synthetic biology modification of exoelectrogens

No.	Exoelectrogens	Modification strategy	Mechanism	Key comeouts compared with control	References
Regulation of cellular electron transfer pathways					
1	<i>Escherichia coli</i>	Expression a portion of EET chain of <i>S. oneidensis</i> MR-1	Increased the yields of outer membrane cytochrome <i>c</i>	<ul style="list-style-type: none"> Reduction of metal ions (8.0 times) and solid metal oxides (4.0 times) faster 	[7]
2	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Expression biosynthesis gene clusters of flavin (<i>ribD-ribC-ribBA-ribE</i>) and metal-reducing conduit (<i>mtrC-mtrA-mtrB</i>)	Increased the yields of flavins and outer membrane cytochrome <i>c</i>	<ul style="list-style-type: none"> 37.0 mW/m^2 3.5-fold increase in power density 	[27]
					待续

续表 1

3	<i>E. coli</i>	Expression the Mtr Pathway of <i>S. oneidensis</i> MR-1	Increased the yields of outer membrane cytochrome <i>c</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 20.0 μA • 8.0-fold increase in current density 	[28]
4	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Genetic manipulation by deleting gene <i>GSU1240</i> to alter biofilm properties	Increased the yields of pili and exopolysaccharide	<ul style="list-style-type: none"> • 969.0 mW/m^2 • 1.7-fold increase in power density 	[29]
5	<i>G. sulfurreducens</i> PCA	Heterologous expression of gene <i>pilA</i> from <i>G. metallireducens</i>	Increased the yields of e-pili	<ul style="list-style-type: none"> • 11.0 mA 	[30]
6	<i>S. oneidensis</i> MR-1	Overexpression the riboflavin synthesis pathway of <i>B. subtilis</i>	Increased the yields of flavins	<ul style="list-style-type: none"> • 233.0 mW/m^2 • 13.0-fold increase in power density 	[31]
7	<i>S. oneidensis</i> MR-1 ΔCP	Enhanced biosynthesis and transport of flavins	Increased the concentration of flavins	<ul style="list-style-type: none"> • 2.6 W/m^2 • 18.8-fold increase in output power density 	[32]
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Overexpression of the methyltransferase encoding gene <i>phzM</i>	Increased the yields of pyocyanin (PYO)	<ul style="list-style-type: none"> • 1.7 W/m^2 • 4.0-fold increase in power density 	[33]
9	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Overexpression of NAD synthetase gene <i>nadE</i>	Increased the intracellular NAD^+ /NADH cofactor levels	<ul style="list-style-type: none"> • 401.3 mW/cm^2 • 3.7-fold increase in power density 	[34]
10	<i>E. coli</i>	Overexpression of phenazine-1-carboxylic acid (PCA) synthesis pathway	Increased the yields of PCA	<ul style="list-style-type: none"> • 181.1 mW/m^2 • 10.8-fold increase in power density 	[35]
11	<i>P. aeruginosa</i> PA14 ΔretS	Quorum sensing (QS) modulates the current generation	Enhanced phenazines production	<ul style="list-style-type: none"> • 60.8 mA/m^2 • 45.0-fold enhanced current generation 	[36]
12	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Overexpression of gene <i>rhlA</i>	Promoted the biofilm formation, and increased the yields of PYO	<ul style="list-style-type: none"> • (9.4\pm0.6) mW/m^2 • 2.5-fold increase in power density 	[37]
Regulating the level of intracellular reduction					
13	<i>S. oneidensis</i> MR-1	Modular engineering to increase intracellular $\text{NAD}(\text{H}^+)$	Increased in intracellular electron flux	<ul style="list-style-type: none"> • (162.8\pm5.6) mW/m^2 • 4.4-fold increase in power density 	[38]
14	<i>E. coli</i>	Heterologous expression of NADH dehydrogenase II protein (NDH-2) from <i>B. subtilis</i>	Increased in intracellular electron flux	<ul style="list-style-type: none"> • 4.7 μA • 9.0-fold increase in current of oxidation 	[39]
15	<i>E. coli</i>	Multiple-knockout of central metabolism genes in <i>E. coli</i>	Increased in intracellular electron flux	<ul style="list-style-type: none"> • 1.82 mW • 1.5-fold increase in average output power 	[40]
Regulates the expression of intracellular signaling molecules					
16	<i>S. oneidensis</i> MR-1	Heterologously overexpressed a c-di-GMP biosynthesis gene <i>ydeH</i>	Increased the yields of c-di-GMP, and promote the biofilm formation	<ul style="list-style-type: none"> • (167.6\pm3.6) mW/m^2 • 2.8-fold increase in power density 	[41]
17	<i>S. oneidensis</i> MR-1	Heterologous expression of gene <i>ps</i> from <i>Beggiatoa</i> sp.	Increased the intracellular cAMP level	<ul style="list-style-type: none"> • 96.0 mW/m^2 • 1.5-fold increase in power density 	[42]
18	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Genetic manipulation by deleting global regulator gene <i>rpoS</i>	Enhanced the biofilm formation	<ul style="list-style-type: none"> • 42 mA/m^2 • 1.5-fold increase in current density 	[43]
19	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Heterologous expression of global regulator gene <i>IrrE</i>	Increased the yields of phenazines	<ul style="list-style-type: none"> • (56.0\pm2.4) mW/m^2 • 1.7-fold increase in power density 	[44]

底物消耗和产物生成), 该课题组做了进一步研究发现, 表达 MtrCAB-CymA 色素系统的 *E. coli* 产生的电流达到 20 μA , 是对照组的 8 倍^[28] (图 1B)。

1.1.2 强化基于导电纳米线介导的电子传递路径

产电微生物除了能够通过导电色素蛋白与电极进行直接电子传递之外, 也能通过产生导电菌毛 (即导电纳米线) 作为电子转移的通道实现与胞外固体电极间的远程电子传递。在这方面研究较多的产电微生物是地杆菌 *Geobacter sulfurreducens*^[8], 其主要通过自身的导电色素蛋白 (如 OmcS、OmcE 和 OmcB) 和导电菌毛 (e-pili) 实现与电极界面间的直接电子传递^[45,49]。导电色素蛋白的表达量以及导电鞭毛的多少直接影响 *G. sulfurreducens* 的胞外电子传递效率。因此, 有研究通过提高导电菌毛表达量进而促进细胞电子传递能力。如 Leang 等^[29] 通过从 *G. sulfurreducens* 的基因组中敲除 PilZ 结构域蛋白编码基因 *GSU1240* 改变了它的生物膜特性, 与野生型菌株相比, 工程菌可以产生更多的菌毛和胞外多糖,

在石墨阳极上形成的生物膜的导电性提高了 6 倍, 在 MFC 中产生的最大电流密度 (1.67 A/m^2) 提高了 1.5 倍, 最大功率密度 (0.969 W/m^2) 提高了 1.7 倍。此外, 已有研究表明地杆菌的导电菌毛主要是由 PilA 肽单体组装而成, 其中金属还原地杆菌 *Geobacter metallireducens* GS15 的菌毛具有较高的导电率 ($(277.0 \pm 18.9) \text{ S/cm}$), 是 *G. sulfurreducens* PCA 的 5 000 倍, 能够进行高效电子传递^[50]。基于此, Tan 等^[30] 通过在 *G. sulfurreducens* PCA 中异源表达来自 *G. metallireducens* GS15 的 PilA 肽单体编码基因 *pilA*, 获得的工程菌成功产生丰富的导电菌毛, 研究结果表明该工程菌可以提高 Fe (III) 的氧化还原率, 在阳极上产生的最大电流 (11 mA) 与 *G. metallireducens* GS15 相当。以上研究成果表明通过提高导电菌毛的形成能够增强产电微生物与电极界面的电子传递效率。导电菌毛作为一种可持续生产的导电材料, 通过优化其导电率将能够进一步提高其在电子设备和生物传感中的潜在应用价值。

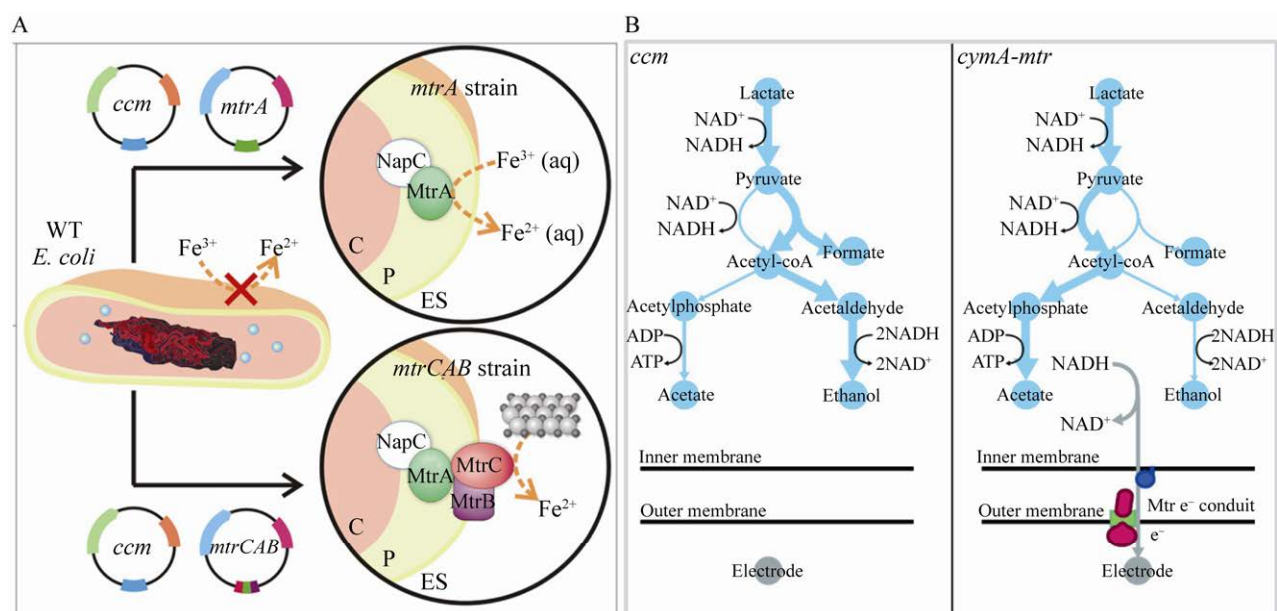


图 1 合成生物学强化基于导电色素蛋白介导的电子传递路径^[7,28]

Fig. 1 Synthetic biology enhances electron transport pathways based on conductive pigment protein-mediated^[7,28]. (A) Schematic of the engineered *mtrA* and *mtrCAB* strains for soluble and extracellular metal reduction^[7]. (B) Electron transfer through the Mtr electron conduit alters substrate utilization in *E. coli*^[28].

1.1.3 强化基于电子穿梭体介导的电子传递路径

近年来大量研究表明,产电微生物也可以利用外源性或自分泌的氧化还原性物质(如黄素类、吩嗪类、醌类物质等)作为电子穿梭体实现与电极间的电子交换^[47-48]。如 Yang 等^[31]通过在 *S. oneidensis* MR-1 中异源表达枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的核黄素合成途径,与对照组相比,工程菌的黄素浓度提高了 25 倍, MFC 的最大输出功率提高了约 13 倍(从 16.4 mW/m² 增加到 233.0 mW/m²),阴极还原电流提高了约 15 倍(从 15.5 μA/cm² 增加到 255.3 μA/cm²)。在此基础上, Lin 等^[32]利用合成生物学方法进一步优化核黄素合成途径,通过筛选最适的启动子和核糖体结合位点,同时引入外膜孔蛋白基因 *oprF* (来自 *P. aeruginosa*),促进希瓦氏菌中黄素的生物合成和转运,以提高其 EET 速率。随后,通过在该工程菌催化的 MFC 中添加氧化石墨烯(Graphene oxide, GO),构建希瓦氏菌-还原型氧化石墨烯(Reduced graphene oxide, rGO) 三维自组装生物混合材料,极大地提高了阳极上电活性生物膜的厚度。最终,使 MFC 的最大输出功率密度达到 2.63 W/m²,比野生型提高约 18.8 倍(图 2A)。*Pseudomonas aeruginosa* 也是一种重要的产电微生物,主要通过自身合成分泌的吩嗪-1-酰胺(PCN)、吩嗪-1-羧酸(PCA)、绿脓菌素(PYO)、铜绿蛋白 A 等氧化还原介质与电极进行间接电子传递^[48]。Yong 等^[33]通过在 *P. aeruginosa* 中过表达甲基转移酶编码基因 *phzM*,强化 PYO 的合成,使工程菌株的 PYO 产量提高了 1.6 倍,同时该菌催化的 MFCs 最大功率密度(166.68 μW/cm²) 提高了 4 倍(图 2B (a))。之后,该团队通过过表达 NAD 合成酶基因 *nadE* 提高了 *P. aeruginosa* 胞内 NAD⁺/NADH 辅因子水平,使 PYO 浓度提高了约 1.5 倍,同时工程菌催化的 MFCs 最大输出功率密度(166.68 μW/cm²) 也提高约 3.7 倍^[34](图 2B (b))。Feng 等^[35]通过在 *E. coli* BL21(DE3) 中引入

P. aeruginosa 的 PCA 合成途径,内生的 PCA 显著增强该菌的胞外电子传递能力,使得 MFC 功率密度从 16.7 mW /m² 增加到 181.1 mW/m²,提高了 10.8 倍。结果表明,在大肠杆菌中引入异源电子穿梭体也可以有效地提高 EET 效率和 MFC 性能。

此外,除了上述通过改造产电微生物电子穿梭体生物合成路径来提高胞内氧化还原物质的合成之外,通过改造产电微生物的群体感应(Quorum sensing, QS) 系统也能调节内源性电子穿梭体的合成和分泌。Venkataraman 等^[36]研究发现通过删除 *P. aeruginosa* PAO1 基因组中 QS 系统负反馈调节基因 *retS* 能够提高该菌吩嗪类物质的合成,突变菌在厌氧条件下产生的电流高于亲本 45 倍(从 0.136 μA/cm² 增加到 6.08 μA/cm²)。Zheng 等^[37]通过在 *P. aeruginosa* PAO1 中过表达鼠李糖脂合成关键基因 *rhlA*,实现了胞内鼠李糖脂的大量合成。鼠李糖脂产量的增加提高了微生物的细胞膜通透性,从而提高了绿脓素合成和分泌,接种该工程菌的 BES 最大功率密度((9.4±0.6) mW/m²) 是野生型菌株的 3.5 倍。上述实验结果再次证明电子穿梭体在介导微生物胞外电子传递过程中起着至关重要的作用,通过强化产电细胞合成分泌电子穿梭体可以很大程度上改善微生物与电极间的电子传递效率。

1.2 调控细胞内还原力水平

产电微生物胞内 NAD (H⁺) 总量和 NADH/NAD⁺ 的比例是决定微生物胞内还原力水平的主要因素,通过合成生物学手段调控微生物胞内 NADH 和 NAD⁺ 的合成与消耗可以提高微生物电子生成效率^[34,38]。为了确定细胞内 NAD (H⁺) 的总水平如何影响希瓦氏菌的 EET 效率, Li 等^[38]通过使用模块化合成生物学策略在 *S. oneidensis* MR-1 中构建从头合成、补救合成和通用生物合成 3 个 NAD⁺ 合成模块对该菌进行改造,强化 NAD⁺ 的生物合成。结果表明,提高胞内电子载体 NAD⁺ 的总量,可以显著提升 *S. oneidensis* MR-1 胞外电子传递速率,解决了限制其胞外电子传递速率的核

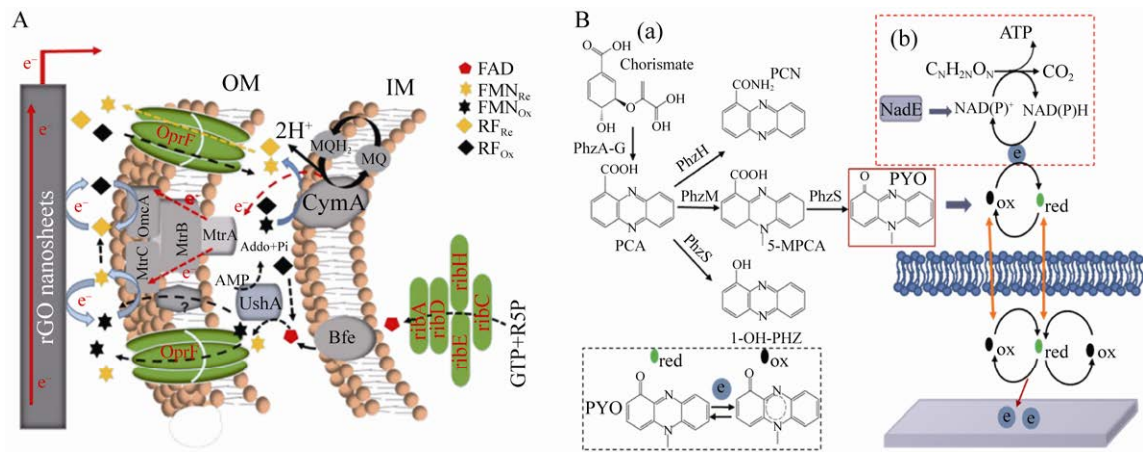


图 2 合成生物学强化基于电子穿梭体介导的电子传递路径^[32-34]

Fig. 2 Synthetic biology enhances electron transport pathways based on electron shuttle-mediated^[32-34]. (A) The schematic of the flavins-mediated EET pathway in the engineered *S. oneidensis*, with the heterogeneous expression of the porin protein OprF^[32]. (B) Schematic illustration of the required genes for the synthesis of phenazines in *P. aeruginosa* and a possible EET pathway in the MFC. (a) The overexpressed methyltransferase encoding gene *phzM* enhanced the synthesis of PYO, which increased the PYO yield of the engineered strain by 1.6 times^[33]. (b) The overexpressed NAD synthase gene *nadE* increased the intracellular NAD⁺/NADH cofactor level, increased the PYO concentration by about 1.5 times, and increased the maximum power output by about 3.7 times^[34].

心问题。其中得到一株重组菌株 SN5, 在 MFCs 中产生的最高输出功率密度 ((162.8±5.6) mW/m²), 比野生型希瓦氏菌 ((30.2±3.4) mW/m²) 提高了 4.4 倍 (图 3A)。

此外, 通过提高胞内可释放电子池的容量也可以改变大肠杆菌 *Escherichia coli* 的胞外电子传递效率。Krishna 等^[39]通过在大肠杆菌 BL21(DE3) 中异源表达来自 *B. subtilis* 的 NADH 脱氢酶 II 蛋白 (NDH-2), 所得工程菌胞内电子通量显著增加, 氧化电流从 0.52 μA 增加到 4.7 μA, 比野生型菌株提高了 9 倍。研究还发现, 与野生型菌株相比, 工程菌 *E. coli* *nndh-2* 能够更高效地还原柠檬酸铁, 说明由于 NDH-2 活性的增加, 提高了电子传递链上的电子通量。最近, Ojima 等^[40]通过敲除 *E. coli* 多个中心代谢基因, 构建了多基因敲除突变体 Δ5 (*AfrdAΔpdhRΔaldhAΔadhEΔpta*), 该工程菌多个耗能代谢过程受到抑制, 使胞内可释放电子池的浓度得到提高。在以葡萄糖为能量来源, 2-羟基-1,4-萘醌 (HNQ) 为电子介质时, 工程菌

催化的 MFCs 表现出更好的性能, 18 h 内平均输出功率达到 1.82 mW, 提高了 1.5 倍, 且库仑效率达到 21.3% (图 3B)。

上述研究证明, 胞内还原力水平也是影响产电微生物胞外电子传递效率的重要因素, 通过合成生物学调控胞内还原力水平是提高微生物胞外电子传递效率的有效途径。

1.3 调控胞内信号分子的表达

微生物在生长和代谢过程中受到多种胞内信号的调控, 其中胞内第二信使或全局调节因子能够调控生物膜的形成以及产电微生物的胞外电子传递通路, 受到许多研究人员的关注。目前, 研究表明通过提高胞内信号分子环二鸟苷酸 (Cyclic diguanylate, c-di-GMP) 或环磷酸腺苷 (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的表达水平可以提高希瓦氏菌的 EET 能力。其中 c-di-GMP 水平的提高可促进细菌生物膜的形成; 而 cAMP 受体蛋白系统 (cAMP-CRP) 可以调节多个双向 EET 通路^[41-42]。Liu 等^[41]通过在 *S. oneidensis* MR-1 中

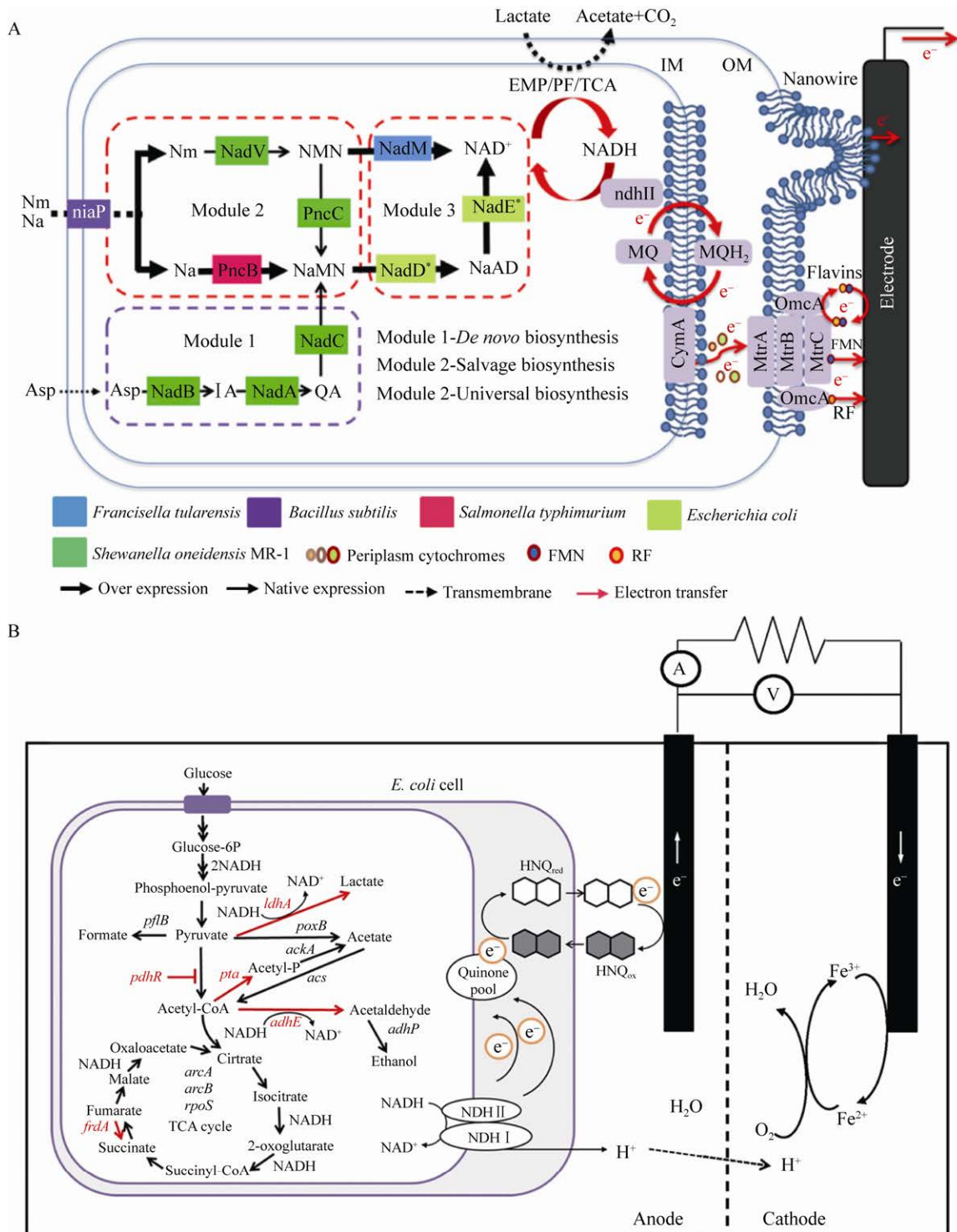


图3 合成功学调控细胞内还原力水平^[38,40]

Fig. 3 Synthetic biology regulates the level of intracellular reduction^[38,40]. (A) Schematic of modular design to enhance NAD^+ biosynthesis and EET rate in *S. oneidensis* MR-1^[38]. Recombinant *S. oneidensis* SN5 harboring five homogeneously and heterogeneously introduced genes (*yce1*, *pncB*, *nadM*, *nadD**, and *nadE**) to enhance NAD^+ biosynthesis. (B) Knock out multiple central metabolic gene in the metabolism path of *E. coli*, built multiple knockout mutant $\Delta 5$ ($\Delta frdA \Delta pdhR \Delta ldhA \Delta adhE \Delta pta$)^[40].

过表达来自大肠杆菌的 *c-di-GMP* 生物合成基因 *ydeH*, 增强了胞内第二信使 *c-di-GMP* 的表达, 进而促进了生物膜的形成和电子传递, 使工程菌催化的 MFCs 最大功率密度达到 $(167.6 \pm 3.6) \text{ mW/m}^2$, 提高了 2.8 倍 (图 4A)。Cheng 等^[42]通过在 *S. oneidensis* MR-1 中表达来自贝氏硫细菌 *Beggiatoa* 菌属的腺苷酸环化酶基因 (*PS*), 提高了胞内第二信使 *cAMP* 的含量, 进而促进了胞内 *c*-型细胞色素和黄素的合成, 使工程菌的胞外电子传递能力得到增强, 最大功率密度从 54 mW/m^2 增加到 96 mW/m^2 , 提高了 1.5 倍。此外, 工程菌对 Cr(VI) 的还原能力也提高了 3 倍 (图 4B)。

此外, 还有研究发现通过调控胞内全局调节因子也可以改善产电微生物的胞外电子传递效率。如全局调控因子 *RpoS* 作为一种典型的 σ 因子, 可以调节 *P. aeruginosa* 许多基因的表达^[51], 在 *P. aeruginosa* 胞内吩嗪类物质和鼠李糖脂的合成以及生物膜的形成过程中起到重要调节作用。Yu 等^[43]通过在 *P. aeruginosa* PAO1 中敲除全局调控因子 *RpoS* 的编码基因 *rpoS*, 获得的工程菌可以在电极上形成更厚的生物膜, 且胞外电子转移能力得到加强, 其催化的生物电化学系统的输出电流达到 $4.2 \mu\text{A/cm}^2$, 提高了 50%。Luo 等^[44]通

过在 *P. aeruginosa* PAO1 中引入来自抗辐射奇异球菌 *Deinococcus radiodurans* 的全局调节因子 *IrrE*, 得到的工程菌株可以合成更多的吩嗪类化合物, 且该工程菌催化的 MFCs 输出的功率密度 $((56.0 \pm 2.4) \text{ mW/m}^2)$ 提高了 70%。这些研究结果表明, 通过引入或改造微生物的胞内调节因子来靶向细胞调控网络是一种简便而有前景的增强产电微生物发电的方法, 在实际的 MFCs 中具有巨大的应用潜力。

上述利用合成生物学改造产电微生物的研究表明, 通过合成生物学技术调控产电微生物的胞外电子传递路径^[7,27-37]、胞内还原力水平^[34,38-40]以及胞内信号分子的表达^[41-44]能够优化微生物胞外电子传输通道、增加胞内电子池浓度、促进生物膜的形成, 进而达到提高微生物电子传递效率、增强微生物与电极相互作用的效果。但由于只有少数表征良好的产电微生物可用, 且对它们的电子传递机制、基因调控和生物膜形成机制的了解不够透彻, 导致大多数遗传工具无法广泛使用, 限制了合成生物学技术的应用。因此, 有必要通过其他手段对产电微生物进行改造以提高细胞与电极间的电子传递效率, 如通过导电材料修饰细胞或在电极表面固定化细胞等, 促进产电细胞在 METs 中的应用。

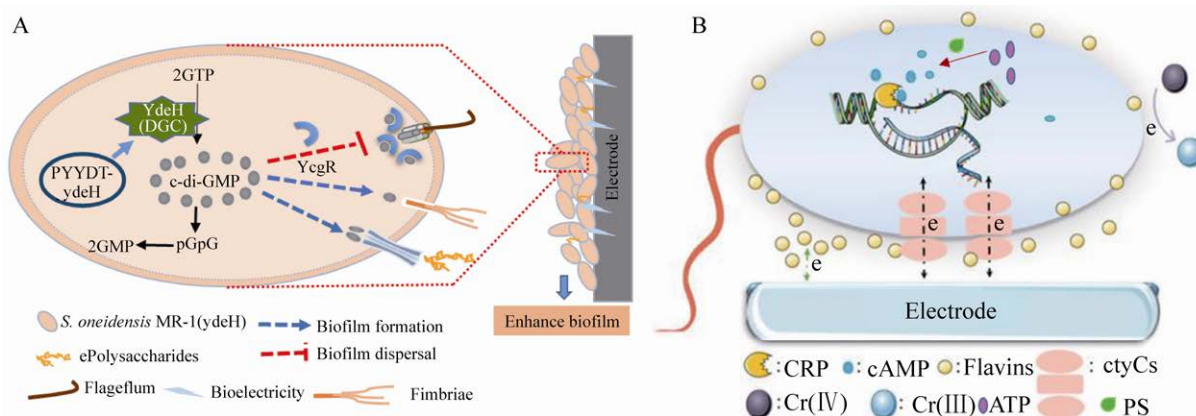


图 4 合成生物学调控胞内信号分子的表达^[41-42]

Fig. 4 Synthetic biology regulates the expression of intracellular signaling molecules^[41-42]. (A) Schematic of enhancing electroactive biofilm formation of *S. oneidensis* promoted bioelectricity generation^[41]. (B) Proposed regulatory mechanisms of bidirectional EET mediated by the cAMP-CRP complex in *S. oneidensis* MR-1^[42].

2 导电材料修饰

在 MFCs 中, 产电微生物与电极界面作用较弱是限制电子传输的主要瓶颈之一^[17-18]。已有研究表明, 用导电材料修饰电极, 可以加快电子在电极上的传递。如用金属氧化物纳米颗粒或导电聚合物制备高性能阳极以增强基于微生物被膜与电极界面接触的 EET^[52-53]。此外一些研究表明, 用导电材料直接修饰微生物或构建导电材料-微生物复合生物膜也是强化微生物与电极之间相互作用的有效策略。本部分我们总结了部分导电材料在修饰产电微生物方面的研究 (表 2)。

2.1 导电材料制备电活性复合生物膜

微生物在自然条件下形成的生物膜薄且导电性差^[23], 用导电材料修饰细胞, 形成电活性复合生物膜可以加强产电微生物胞外电子传递效率。如 Liang 等^[54]通过向 *G. sulfurreducens* 介导的 MFCs 中添加不同剂量的碳纳米管 (Carbon nanotubes, CNTs), 以形成细胞-碳纳米管复合结构, 发现在最优剂量为 4 mg/mL 的 CNTs 条件下, 微生物燃料电池的启动时间最短、阳极电阻相对最低, 可以在 40 d 内持续稳定输出 650 mV 电压。而不加 CNTs 的微生物燃料电池的输出电压在 40 d 内从 630 mV 降低到 540 mV。研究表明, 添加 CNTs 有助于降低和稳定阳极电阻, 从而提高 MFCs 长期运行能

力。石墨烯也是一种高导电性材料, Song 等^[55]发现通过在 MFC 阳极添加氧化石墨烯能 (GO) 能够有效改善 *S. oneidensis* MR-1 的 EET 效率。在添加 GO 的条件下, 微生物被包覆在氧化石墨烯纳米薄片表面, 能够将氧化石墨烯 (GO) 还原为还原型石墨烯 (rGO)。随后, rGO 材料自组装成三维大孔网络, 使大量细菌粘附在电极上, 形成希瓦氏菌-rGO 三维杂化生物膜, 从而在生物膜基质中形成导电网络, 实现了细胞与电极之间的高效 EET, 最终使得氧化电流 (电子从细菌转移到阳极) 增强了 25 倍, 还原电流 (电子从阴极转移到细菌) 提高了 74 倍 (图 5A), 同时最大功率密度 ((843±31) mW/m²) 提高了 23.4 倍。类似的研究中, Zhang 等^[56]发现在 MFC 阳极添加阳离子聚噻吩衍生物聚 (3-(3'-N,N,N-三乙氨基-1'-丙氧基)-4-甲基-2,5-噻吩盐酸盐) (poly(3-(3'-N,N,N-triethylamino-1'-propyloxy)-4-methyl-2,5-thiophene hydrochloride), PMNT) 能同时促进细菌生物膜的形成, 提高细菌的生存能力, 降低电阻值, 加速细菌与电极之间的 EET 过程。研究证明, 在 PMNT 存在的情况下, *S. oneidensis* MR-1 活力明显增强, 可在电极表面形成较厚的生物膜。PMNT 可通过静电作用与 *S. oneidensis* 相互作用, 并通过疏水作用插入到细菌细胞壁中, 与 *c*-型细胞色素密切接触。同时, 远离电极的细菌也可以通过 PMNT

表 2 导电材料修饰产电微生物汇总表

Table 2 Summary table of conductive materials modification of exoelectrogens

No.	Conductive materials	Microorganisms	Energy output without conductive materials	Energy output with conductive materials	References
Preparation electroactive composite biofilm with conductive materials					
1	CNT	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Output voltage decreased from 630 mV to 540 mV during 40 days	Maintained around 650 mV during 40 days	[54]
2	GO	<i>S. oneidensis</i> MR-1	(36±7) mW/m ²	(843±31) mW/m ²	[55]
4	PMNT	<i>S. oneidensis</i> MR-1	33.8 mW/m ²	186 mW/m ²	[56]
3	TiO ₂ @TiN	<i>Shewanella loihica</i> PV-4	33.4 mW/m ²	64 mW/m ²	[57]
Modification of the single electric-producing cell with conductive materials					
5	PPy	<i>S. oneidensis</i> MR-1	9.8 mW/m ²	147.9 mW/m ²	[58]
7	Pd	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	6.25 nA	25 nA	[59]
6	CDs	<i>S. oneidensis</i> MR-1	76 mW/m ²	491 mW/m ²	[60]

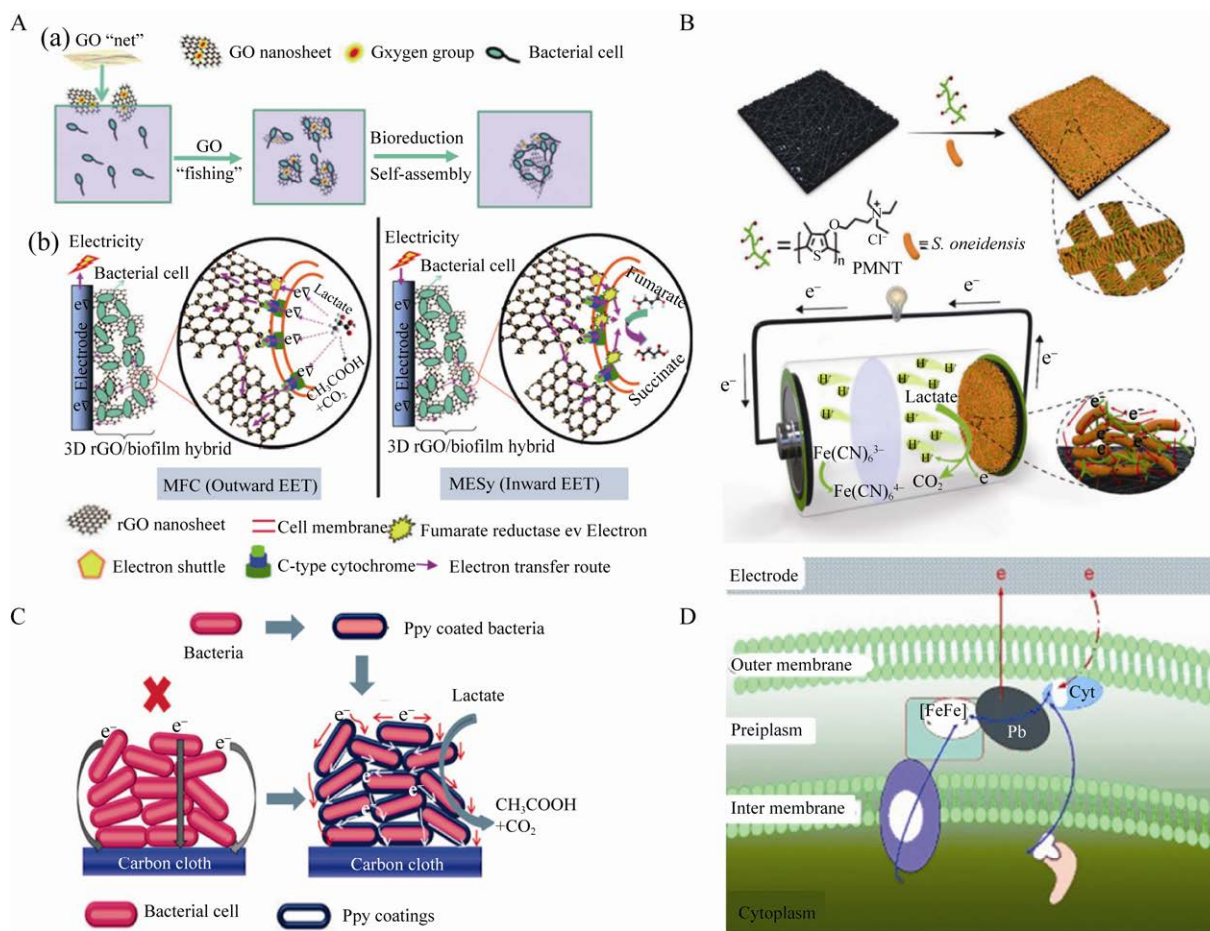


图5 导电纳米材料修饰产电细胞^[55-56,58-59]

Fig. 5 Schematic diagram of the electrogenic cells were modified with conductive material^[55-56,58-59]. (A) Self-assembly of the 3D macroporous rGO/bacteria hybrid biofilm by a fishing process (a), and the proposed mechanism of bidirectional EET (b)^[55]. (B) Schematic representation of the improved bacteria biofilm formation after adding PMNT^[56]. (C) Schematic depicting the direct contact-based EET mechanism of PPy-coated *S. oneidensis* MR-1/CC anode (left) and native *S. oneidensis* MR-1/CC anode (right)^[58]. (D) Hypothesized pathways for the EET chain in the presence of Pd and oligomer in gram-negative bacteria^[59].

将电子传递到电极上。电化学实验结果表明,使用 *S. oneidensis*/PMNT 复合电极作为阳极的 MFCs,其最大电流密度 ($(30.0 \pm 5.2) \mu\text{A}/\text{cm}^2$) 和功率密度 ($18.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) 分别提高了 4.6 倍和 5.5 倍(图 5B)。可以看出,阳离子导电聚合物在促进生物膜形成和改善电子转运方面具有巨大的潜力。

此外,研究发现一些导电复合材料比单一材料具有更好的导电性或生物相容性,用导电复合材料包裹产电微生物制备的复合生物膜具有更高的电催化效率。如 Hu 等^[61]通过利用 DNA 聚合的

二氧化硅纳米颗粒 (Silicon dioxide nanoparticles, SiNPs) 和碳纳米管 (CNTs) 制备的多孔复合材料 (SiNP/CNT-DNA), 构建包含 *S. oneidensis* 的可编程生物杂交系统, 研究发现该生物杂交系统具有较强的电化学稳定性, 能够实现胞外电子的传递, 且胞外电子转移能力与该系统生物膜基质内细胞的数量呈正相关。此外, 通过测量导电材料的导电率发现, 复合材料的最大导电率 ($0.6\text{--}23.0 \text{ S/m}$) 比单一材料 SiNP 提高了 2.9×10^5 倍。Su 等^[57]利用 TiO_2/TiN 纳米复合材料与 *Shewanella loihica*

PV-4 (PV-4) 结合形成杂交生物膜。计时安培法显示, 添加 $\text{TiO}_2@TiN$ 纳米复合材料后, 峰值电流达到 $(30.0 \pm 5.2) \mu\text{A}/\text{cm}^2$, 增加了 4.6 倍。并在双室微生物燃料电池中进一步测试发现, $\text{TiO}_2@TiN$ 纳米复合材料与 PV-4 的复合生物膜的功率密度增加了 92.8%, 达到 $64 \text{ mW}/\text{m}^2$, 且当添加 $\text{TiO}_2@TiN$ 纳米复合材料时, 细胞内黄酮的分泌量和细胞色素 *c* 的表达均增加。这些结果表明, $\text{TiO}_2@TiN$ 纳米复合材料可以通过改变 PV-4 的代谢, 协同增强 PV-4 的 EET 能力。该研究也再次表明利用导电材料制备电活性生物膜, 能有效提高产电微生物的胞外电子传递能力, 在 MFCs 中具有重要的研究价值。

2.2 导电材料修饰单个产电细胞

尽管用导电材料制备电活性复合生物膜可以提高微生物的胞外电子传递速率, 但由于导电材料不能覆盖混合生物膜中的所有微生物, 导致 EET 效率降低。因此, 用导电材料对单个细菌进行修饰是一种解决方案。如, Song 等^[58]通过原位聚合的方法将聚吡咯 (Polypyrrole, PPy) 涂覆在希瓦氏菌 *S. oneidensis* MR-1、人嗜铬杆菌 *Ochrobacterium anthropic*、大肠杆菌 *E. coli* 和嗜热链球菌 *Streptococcus thermophiles* 等微生物细胞表面, 在不影响细胞生存能力的情况下, 明显提高了微生物的电活性, 显著改善了微生物与电极之间的相互作用。其中, 在以乳酸为电子供体时, 涂有 PPy 的 *S. oneidensis* MR-1 的 EET 能力得到了明显提高, 其催化的 MFCs 的最大输出功率密度 ($147.9 \text{ mW}/\text{m}^2$) 提高了 14 倍。研究表明, 细胞外膜上的 *c*-型细胞色素能够通过细胞表面形成的导电 PPy 涂层进行电子传递, 从而增强了导电色素蛋白介导的 EET。更重要的是, PPy 涂层在细胞表面形成了多重导电电路径, 细菌即使远离电极, 也可以通过导电 PPy 将产生的电子有效地传递到电极。相反, 没有 PPy 涂层的细胞仅沿着相邻的非导电细胞进行电子传递, 导致 EET 效率

较低 (图 5C)。Wu 等^[59]以脱硫弧菌 *Desulfovibrio desulfuricans* 为模型生物, 通过研究 Pd 纳米粒子对该菌 EET 过程的影响, 证实了 Pd 纳米颗粒能存在于细胞周质空间并代替细胞色素蛋白传递电子, 沿着天然酶介导的 EET 途径加速电子转移 (图 5D)。而且以玻璃碳棒为电极时, 低 Pd 负载的脱硫弧菌能产生的 25 nA 稳定电流, 该值相对无 Pd 修饰的细胞提高了 4 倍。这一结果也表明, 与细胞膜结合的 Pd 纳米粒子可以促进电子转移。最近, Yang 等^[60]报道了一种简单、高效的提高 *S. oneidensis* MR-1 生物发电能力的方法。通过用碳量子点 (Carbon dots, CDs) 培养 *S. oneidensis* MR-1, 使得该菌的胞外电子转移能力增强。同时, CDs 还提高了细胞的粘附性, 促使细菌在电极表面形成更厚的生物膜。在生物电化学系统中, CDs-fed 细胞与亲本相比, 最大电流密度 ($1.23 \text{ A}/\text{m}^2$) 和功率密度 ($491 \text{ mW}/\text{m}^2$) 分别提高了 7.3 倍和 6.5 倍^[60]。这些研究表明, 用导电材料针对单个微生物细胞进行修饰也能显著加强微生物胞外电子传递能力, 提高细胞与电极间电子传递效率。

通过上述利用导电材料修饰微生物的研究不难发现, 除了利用合成生物学直接改造微生物之外, 用导电材料修饰微生物也是一种强化产电微生物与电极间电子传递效率的高效策略。既能够利用导电材料与微生物结合构建高导电性复合生物膜^[54-57,61], 也能用导电材料针对单个细胞进行修饰^[58-60], 使产电细胞最大程度地通过导电材料与电极进行接触, 强化直接电子传递过程。此外, 一些材料也能增强细胞活性^[56]和粘附性^[60], 促进胞内导电色素蛋白和电子穿梭体的合成^[57], 进一步提高产电细胞的胞外电子传递能力。但由于导电材料的导电性和生物相容性相对较差, 而且操作相对复杂, 故在实现工业化应用中仍有困难。因此, 迫切需要开发具有优良导电性和生物相容性的新型导电材料及简单易操作的修饰策略以同时满足增加生物负载能力, 增强阳极上的生物生

存能力以及提高 EET 效率的需求。

3 电极表面固定化

自然条件下产电微生物不易在电极表面形成生物膜,且在电极表面进行产电微生物的体外培养也比较困难,为此在电极表面利用生物相容性复合物 (Bio-polymers) 固定化产电微生物成为解决此类问题的重要工程策略之一 (图 6A)。Wagner 等^[62]通过在电极表面涂上一层乳胶,提高电极表面的粘附性,把细菌粘附在电极上进行细胞固定化,被固定化的细胞可以形成稳定的电活性生物膜。利用空气刷法和浸渍法对细胞进行固定化,微生物均保留了大部分的胞外电子传递能力。其中,利用空气刷法固定细胞获得的电极与自然形成的生物膜电极在 MFCs 中产生的电压基本一致。而通过浸渍法进行固定化得到的生物电极在 MECs 中的电压降低约 11%,这可能是由于乳胶对微生物的生理活性产生了负面影响。虽然乳胶固定化细胞对微生物的电活性产生一些影响,但可以有效缩短电极表面生物膜的形成时间,在实际应用中具有一定的价值。Li 等^[63]通过在三维水凝胶支架中固定嗜氧细菌,并诱导其渗透繁殖,开发了一种耐氧生物阳极。在水凝胶支架的保护下,嗜氧细菌即使在连续 O₂ 曝气条件下也能表现出良好的生物电催化活性,并取

得了 1.94 mA/cm² 的高电流密度,可与厌氧条件相媲美 (图 6B)。耐氧生物阳极组装的 MFCs 在传统好氧废水处理中具有巨大应用价值。在此之前,为了开发具有特定微生物生理学和电化学活性的生物阳极,Luckarift 等^[64]提出了一种将 *S. oneidensis* MR-1 细胞固定在二氧化硅基质中的方法,被二氧化硅包覆的 *S. oneidensis* 可以吸附在石墨毡纤维电极表面。通过电化学表征发现,二氧化硅固定的细胞催化的 MFCs 具有更好的性能,最大功率密度约为 0.358 μW/cm²,而原始细胞催化的 MFCs 仅为 0.236 μW/cm²。

此外,在固定化材料中混入碳毡纤维或碳纳米管等导电材料,可以解决固定化材料导电性弱的问题,提高固定化细胞的催化效率。如,Plekhanova 等^[65]使用壳聚糖、聚乙烯醇和 N-乙烯基吡咯烷酮改性的聚乙烯醇等聚合物对氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* VKM-1280 (一种非电活性微生物) 的细胞进行固定化,研究发现壳聚糖凝胶固定化细胞催化的 MFCs 具有最低的内阻 (1111 Ohm·cm²) 和最大的功率 (7.6 μW/cm²),相对于原始细胞而言有很大提升。此外,在壳聚糖凝胶中加入碳纳米管,可将 MFC 内阻降至 977 Ohm·cm²,并将功率密度提高至 10.6 μW/cm²,这是因为碳纳米管覆盖在细胞表面可以在细胞与电极之间形成导电网络,更易于微生物胞外电子

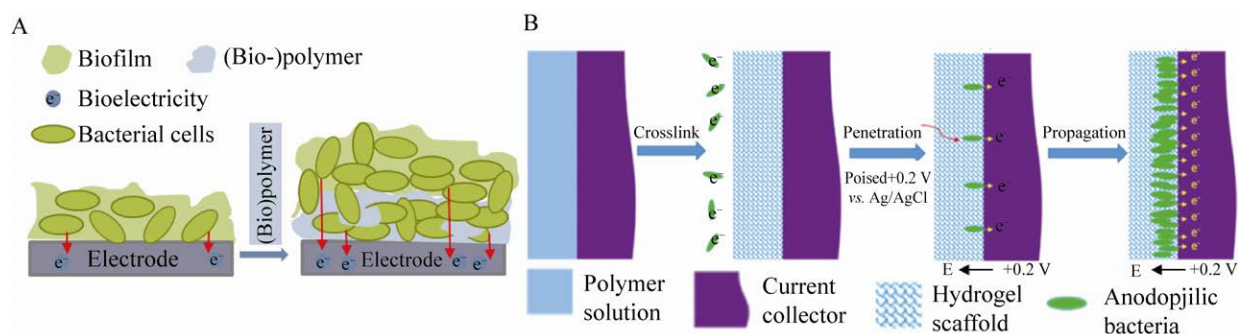


图 6 产电微生物与电极之间的固定化^[63]

Fig. 6 The immobilization of the electroactive cells to the electrode^[63]. (A) Mechanisms of enhancing the interaction between EAMs and electrodes by immobilized microorganisms on the electrodes using (bio-)polymers. (B) Schematic diagram illustrating the fabrication of HBA^[63].

传递。Estevez-Canales 等^[66]在硅胶和碳毡纤维复合材料中固定化 *G. sulfurreducens* 细胞,用于制造人工生物电极。硅碳化合物双框架复合材料阻止了细菌从电极表面的释放,但允许有效物质传递。以醋酸盐或乳酸盐作为电子供体时,人工生物电极在三电极反应器中催化产生的最大电流分别约为 $220 \mu\text{A}/\text{cm}^3$ 和 $150 \mu\text{A}/\text{cm}^3$ 。

由上述研究可知,利用乳胶、水凝胶、二氧化硅、硅胶或壳聚糖等生物相容性复合物在电极表面固定化细胞,可以有效缩短电活性生物膜的形成时间,加强微生物与电极间的接触,甚至可以在细胞膜和电极之间建立一个导电网络,从而在 METs 中实现了高效的生物电催化。但是,使用不同的固定化材料所产生的效果有一定差异,如用乳胶固定化细胞对微生物的生理活性产生了负面影响,导致微生物在 MECs 中输出的电压降低,而在壳聚糖凝胶中加入适量的碳纳米管,却显著提高了 MFC 中固定化细胞的催化效率。由此可见,固定化材料的生物相容性和导电性对固定化细胞的胞外电子传递能力具有很大的影响,所以开发具有生物相容性好、导电性能强、负载量大等优点的新型固定化材料,以及研发新型固定化方法对促进产电微生物在 METs 中的应用和 METs 的工业化进程具有重要意义。

4 展望

随着 METs 在有机物降解、电能生产、海水淡化、生物修复、生物传感等方面具有良好的应用前景,针对如何改良 METs 性能的研究仍是前沿热点。由于产电微生物通过 EET 机制利用电极作为电子受体或供体的能力较弱,限制了各种 METs 在实际中的应用。为了解决这一难题,科研人员针对产电微生物的 EET 机制和电极材料间的相互作用过程开发了多种强化微生物-电极相互作用的策略,如用合成生物学手段改造细胞、导电纳米材料修饰细胞以及在电极表面固定化细

胞等。虽然这些提高微生物-电极相互作用的策略为解决产电微生物在 METs 应用中存在的关键问题提供了有希望的解决方案,但这些策略因其独特的适应性和局限性,不足以满足 METs 在工业化中的应用。

展望未来,为加强微生物-电极之间的相互作用,促进产电微生物在 METs 中的应用,推进微生物电化学技术的工业化,未来可以从以下几个方面深入研究:(1) 基于产电微生物本身,深入解析其胞外电子传递和生物膜形成机制,设计 DNA 机器、蛋白质逻辑门等元件优化产电微生物胞外电子传递路径、提高胞外还原力水平及促进电活性生物膜的形成,来强化微生物胞外电子传递速度和效率。(2) 基于电极材料特性,开发具有生物相容性好、导电性能强、负载量大、稳定性好且成本低等优势活性生物电化学复合材料。(3) 基于微生物-电极之间的相互作用,深入研究导电材料修饰细胞、电极表面固定化细胞等方法在强化微生物与电极之间电子传递效率的过程中所起到的作用,为开发新型导电纳米材料及细胞固定化方法提供理论基础。

REFERENCES

- [1] Yadav RK, Chiranjeevi P, Sukrampal, et al. Integrated drip hydroponics-microbial fuel cell system for wastewater treatment and resource recovery. *Bioresour Technol Rep*, 2020, 9: 100392.
- [2] Panwar NL, Kaushik SC, Kothari S. Role of renewable energy sources in environmental protection: a review. *Renew Sust Energ Rev*, 2011, 15(3): 1513-1524.
- [3] Anwar MN, Fayyaz A, Sohail NF, et al. CO₂ utilization: turning greenhouse gas into fuels and valuable products. *J Environ Manage*, 2020, 260: 110059.
- [4] Bushuyev OS, De Luna P, Dinh CT, et al. What should we make with CO₂ and how can we make it? *Joule*, 2018, 2(5): 825-832.
- [5] Watts N, Amann M, Ayeb-Karlsson S, et al. The

- Lancet* countdown on health and climate change: from 25 years of inaction to a global transformation for public health. *Lancet*, 2018, 391(10120): 581-630.
- [6] Slate AJ, Whitehead KA, Brownson DAC, et al. Microbial fuel cells: an overview of current technology. *Renew Sust Energ Rev*, 2019, 101: 60-81.
- [7] Jensen HM, Albers AE, Malley KR, et al. Engineering of a synthetic electron conduit in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(45): 19213-19218.
- [8] Logan BE, Rossi R, Ragab AA, et al. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(5): 307-319.
- [9] Tefft NM, Teravest MA. Reversing an extracellular electron transfer pathway for electrode-driven acetoin reduction. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(7): 1590-1600.
- [10] Lovley DR, Nevin KP. Electrobiocommodities: powering microbial production of fuels and commodity chemicals from carbon dioxide with electricity. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(3): 385-390.
- [11] Rabaey K, Rozendal RA. Microbial electrosynthesis-revisiting the electrical route for microbial production. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(10): 706-716.
- [12] Kato S. Biotechnological aspects of microbial extracellular electron transfer. *Microbes Environ*, 2015, 30(2): 133-139.
- [13] Zhao F, Heidrich ES, Curtis TP, et al. Understanding the complexity of wastewater: the combined impacts of carbohydrates and sulphate on the performance of bioelectrochemical systems. *Water Res*, 2020, 176: 115737.
- [14] Schröder U, Harnisch F, Angenent LT. Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energ Environ Sci*, 2020, 8(2): 513-519.
- [15] Prévost A, Rabaey K. Electroactive biofilms for sensing: reflections and perspectives. *ACS Sens*, 2017, 2(8): 1072-1085.
- [16] Cecconet D, Sabba F, Devecseri M, et al. *In situ* groundwater remediation with bioelectrochemical systems: a critical review and future perspectives. *Environ Int*, 2020, 137: 105550.
- [17] Patil SA, Hägerhäll C, Gorton L. Electron transfer mechanisms between microorganisms and electrodes in bioelectrochemical systems. *Bioanal Rev*, 2012, 4(2): 159-192.
- [18] Popat SC, Torres CI. Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies. *Bioresour Technol*, 2016, 215: 265-273.
- [19] Karthikeyan R, Singh R, Bose A. Microbial electron uptake in microbial electrosynthesis: a mini-review. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(9): 1419-1426.
- [20] Kumar A, Hsu LHH, Kavanagh P, et al. The ins and outs of microorganism-electrode electron transfer reactions. *Nat Rev Chem*, 2017, 1(3): 0024.
- [21] Guo K, Prévost A, Patil SA, et al. Engineering electrodes for microbial electrocatalysis. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 33: 149-156.
- [22] Hindatu Y, Anuar MSM, Gumel AM. Mini-review: anode modification for improved performance of microbial fuel cell. *Renew Sust Energ Rev*, 2017, 73: 236-248.
- [23] Li F, Wang L, Liu CG, et al. Engineering exoelectrogens by synthetic biology strategies. *Curr Opin Electrochem*, 2018, 10: 37-45.
- [24] Alfonsa L. Genetically engineered microbial fuel cells. *Electroanalysis*, 2010, 22(7/8): 822-831.
- [25] Rosenbaum MA, Henrich AW. Engineering microbial electrocatalysis for chemical and fuel production. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 29: 93-98.
- [26] Teravest MA, Ajo-Franklin CM. Transforming exoelectrogens for biotechnology using synthetic biology. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(4): 687-697.
- [27] Min D, Cheng L, Zhang F, et al. Enhancing extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 through coupling improved flavin synthesis and metal-reducing conduit for pollutant degradation. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(9): 5082-5089.
- [28] Teravest MA, Zajdel TJ, Ajo-Franklin CM. The Mtr pathway of *Shewanella oneidensis* MR-1 couples substrate utilization to current production in *Escherichia coli*. *ChemElectroChem*, 2014, 1(11): 1874-1879.

- [29] Leang C, Malvankar NS, Franks AE, et al. Engineering *Geobacter sulfurreducens* to produce a highly cohesive conductive matrix with enhanced capacity for current production. *Energy Environ Sci*, 2013, 6(6): 1901-1908.
- [30] Tan Y, Adhikari RY, Malvankar NS, et al. Expressing the *Geobacter metallireducens* PilA in *Geobacter sulfurreducens* yields Pili with exceptional conductivity. *mBio*, 2017, 8(1): e02203-16.
- [31] Yang Y, Ding YZ, Hu YD, et al. Enhancing bidirectional electron transfer of *Shewanella oneidensis* by a synthetic flavin pathway. *ACS Synth Biol*, 2015, 4(7): 815-823.
- [32] Lin T, Ding WQ, Sun LM, et al. Engineered *Shewanella oneidensis*-reduced graphene oxide biohybrid with enhanced biosynthesis and transport of flavins enabled a highest bioelectricity output in microbial fuel cells. *Nano Energy*, 2018, 50: 639-648.
- [33] Yong XY, Shi DY, Chen YL, et al. Enhancement of bioelectricity generation by manipulation of the electron shuttles synthesis pathway in microbial fuel cells. *Bioresour Technol*, 2014, 152: 220-224.
- [34] Yong XY, Feng J, Chen YL, et al. Enhancement of bioelectricity generation by cofactor manipulation in microbial fuel cell. *Biosens Bioelectron*, 2014, 56: 19-25.
- [35] Feng J, Qian Y, Wang Z, et al. Enhancing the performance of *Escherichia coli*-inoculated microbial fuel cells by introduction of the phenazine-1-carboxylic acid pathway. *J Biotechnol*, 2018, 275: 1-6.
- [36] Venkataraman A, Rosenbaum M, Arends JBA, et al. Quorum sensing regulates electric current generation of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in bioelectrochemical systems. *Electrochem Commun*, 2010, 12(3): 459-462.
- [37] Zheng T, Xu YS, Yong XY, et al. Endogenously enhanced biosurfactant production promotes electricity generation from microbial fuel cells. *Bioresour Technol*, 2015, 197: 416-421.
- [38] Li F, Li YX, Cao YX, et al. Modular engineering to increase intracellular NAD(H⁺) promotes rate of extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis*. *Nat Commun*, 2018, 9: 3637.
- [39] Krishna KV, Mohan SV. Purification and characterization of NDH-2 protein and elucidating its role in extracellular electron transport and bioelectrogenic activity. *Front Microbiol*, 2019, 10: 880.
- [40] Ojima Y, Kawaguchi T, Fukui S, et al. Promoted performance of microbial fuel cells using *Escherichia coli* cells with multiple-knockout of central metabolism genes. *Bioproc Biosyst Eng*, 2020, 43(2): 323-332.
- [41] Liu T, Yu YY, Deng XP, et al. Enhanced *Shewanella* biofilm promotes bioelectricity generation. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(10): 2051-2059.
- [42] Cheng ZH, Xiong JR, Min D, et al. Promoting bidirectional extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 for hexavalent chromium reduction via elevating intracellular cAMP level. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(5): 1294-1303.
- [43] Yu YY, Fang Z, Gao L, et al. Engineering of bacterial electrochemical activity with global regulator manipulation. *Electrochem Commun*, 2018, 86: 117-120.
- [44] Luo JM, Wang TT, Li X, et al. Enhancement of bioelectricity generation via heterologous expression of *IrrE* in *Pseudomonas aeruginosa*-inoculated MFCs. *Biosens Bioelectron*, 2018, 117: 23-31.
- [45] Lovley DR. Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination. *Energy Environ Sci*, 2011, 4(12): 4896-4906.
- [46] Malvankar NS, Vargas M, Nevin KP, et al. Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6(9): 573-579.
- [47] Kotloski NJ, Gralnick JA. Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *mBio*, 2013, 4(1): e00553-12.
- [48] Shi L, Dong HL, Reguera G, et al. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(10): 651-662.
- [49] Chiranjeevi P, Patil SA. Strategies for improving the electroactivity and specific metabolic functionality

- of microorganisms for various microbial electrochemical technologies. *Biotechnol Adv*, 2020, 39: 107468.
- [50] Rotaru AE, Woodard TL, Nevin KP, et al. Link between capacity for current production and syntrophic growth in *Geobacter* species. *Front Microbiol*, 2015, 6: 744.
- [51] Potvin E, Sanschagrin F, Levesque RC. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32(1): 38-55.
- [52] Geng J, Kim K, Zhang JF, et al. Stochastic transport through carbon nanotubes in lipid bilayers and live cell membranes. *Nature*, 2014, 514(7524): 612-615.
- [53] Wang VB, Du J, Chen XF, et al. Improving charge collection in *Escherichia coli*-carbon electrode devices with conjugated oligoelectrolytes. *Phys Chem Chem Phys*, 2013, 15(16): 5867-5872.
- [54] Liang P, Wang HY, Xia X, et al. Carbon nanotube powders as electrode modifier to enhance the activity of anodic biofilm in microbial fuel cells. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(6): 3000-3004.
- [55] Yong YC, Yu YY, Zhang XH, et al. Highly active bidirectional electron transfer by a self-assembled electroactive reduced-graphene-oxide-hybridized biofilm. *Angew Chem Int Edit*, 2014, 53(17): 4480-4483.
- [56] Zhang PB, Zhou X, Qi RL, et al. Conductive polymer-exoelectrogen hybrid bioelectrode with improved biofilm formation and extracellular electron transport. *Adv Electron Mater*, 2019, 5(8): 1900320.
- [57] Su L, Yin T, Du HX, et al. Synergistic improvement of *Shewanella loihica* PV-4 extracellular electron transfer using a TiO₂@TiN nanocomposite. *Bioelectrochemistry*, 2020, 134: 107519.
- [58] Song RB, Wu YC, Lin ZQ, et al. Living and conducting: coating individual bacterial cells with in situ formed polypyrrole. *Angew Chem Int Edit*, 2017, 56(35): 10516-10520.
- [59] Wu XE, Zhao F, Rahunen N, et al. A role for microbial palladium nanoparticles in extracellular electron transfer. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50(2): 427-430.
- [60] Yang CH, Aslan H, Zhang P, et al. Carbon dots-fed *Shewanella oneidensis* MR-1 for bioelectricity enhancement. *Nat Commun*, 2020, 11: 1379.
- [61] Hu Y, Rehnlund D, Klein E, et al. Cultivation of exoelectrogenic bacteria in conductive DNA nanocomposite hydrogels yields a programmable biohybrid materials system. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(13): 14806-14813.
- [62] Wagner RC, Porter-Gill S, Logan BE. Immobilization of anode-attached microbes in a microbial fuel cell. *AMB Express*, 2012, 2: 2.
- [63] Li M, Lv K, Wu SQ, et al. Immobilization of anodophilic biofilms for use in aerotolerant bioanodes of microbial fuel cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(51): 34985-34990.
- [64] Luckarift HR, Sizemore SR, Roy J, et al. Standardized microbial fuel cell anodes of silica-immobilized *Shewanella oneidensis*. *Chem Commun*, 2010, 46(33): 6048-6050.
- [65] Plekhanova Y, Tarasov S, Kolesov V, et al. Effects of polymer matrices and carbon nanotubes on the generation of electric energy in a microbial fuel cell. *Membranes*, 2018, 8(4): 99.
- [66] Estevez-Canales M, Pinto D, Coradin T, et al. Silica immobilization of *Geobacter sulfurreducens* for constructing ready-to-use artificial bioelectrodes. *Microb Biotechnol*, 2018, 11(1): 39-49.

(本文责编 陈宏宇)