

细菌黑色素在生物电化学领域的研究进展

郭娜, 潘帅, 赵倩玉, 王亚楠, 郭章伟, 尹衍升, 董丽华, 刘涛

(上海海事大学, 上海 201306)

摘 要: 介绍了黑色素在结构上与类腐殖质相似, 且具有非晶半导体的性质和氧化还原特性。根据合成途径的不同, 黑色素可以分为真黑素、棕黑素、DHN 黑色素和脓黑素, 其中脓黑素主要由细菌细胞内苯丙氨酸和酪氨酸代谢途径产生。其次, 细菌黑色素具有独特的生物学功能, 可以通过增强细胞的致病毒性提高生存效率, 也可以通过降低贻贝幼虫的附着和变形来抑制海洋生物污损。最后, 微生物胞外呼吸过程中细菌黑色素独特的分子结构和电化学性质使其作为胞外电子传递载体和终端受体, 参与了微生物胞外呼吸的电子传递机制。细菌黑色素的生物电化学特性也对金属的微生物腐蚀过程造成一定影响, 拓展了微生物腐蚀直接电子传递理论的应用范围。该综述重在阐明细菌黑色素的电子传递能力具有潜在的功能和应用价值, 为产黑色素细菌在微生物腐蚀与微生物燃料电池领域的研究和应用提供理论支持与参考。

关键词: 黑色素; 脓黑素; 生物电化学; 胞外电子传递; 微生物腐蚀; 基因工程

中图分类号: TG172.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2019)07-0229-08

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2019.07.025

Research Progress of Bacterial Melanin in Bioelectrochemistry

GUO Na, PAN Shuai, ZHAO Qian-yu, WANG Ya-nan, GUO Zhang-wei,
YIN Yan-sheng, DONG Li-hua, LIU Tao

(Shanghai Maritime University, Shanghai 201306, China)

ABSTRACT: Bacteria-produced melanins have a unique molecular structure and electrochemical properties, which have attracted more attentions in the field of bioelectrochemistry. Firstly, melanin is similar to humus in structure and has the properties of amorphous semiconductor and redox. There are four main types of melanins, including eumelanin, pheomelanin, DHN melanin and pyomelanin, which are divided based on their different synthesis pathways and biochemistry properties. Among them, pyomelanin is mainly produced by bacterial intracellular phenylalanine and tyrosine metabolism. Secondly, bacteria-produced melanins have unique biological functions, which can enhance the survival efficiency by enhancing the pathogenic toxicity of cells, and inhibit marine biofouling by reducing the attachment and deformation of mussel larvae. Lastly, melanins has the electrochemical properties, which influence the corrosion process and electron transfer theory of microbiologically influenced corrosion. Since melanin has redox cycling properties, it is used as an electron donor and acceptor, as well as an electron mediator. The purpose of this review is to elaborate the principle and mechanism of bacterial melanin as an extracellular electron transport particle, and to provide theoretical support and reference for the application of melanin-producing bacteria in the field of micro-

收稿日期: 2018-11-18; 修订日期: 2019-04-02

Received: 2018-11-18; Revised: 2019-04-02

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFB0300702, 2016YFB0300704); 上海市自然科学基金 (19ZR1422100)

Fund: Supported by the National Basic Research Program of China (2016YFB0300702, 2016YFB0300704); Shanghai Natural Science Fund (19ZR1422100)

作者简介: 郭娜 (1983—), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为微生物腐蚀与燃料电池。

Biography: GUO Na (1983—), Female, Ph. D., Lecturer, Research focus: MIC and MFC.

通讯作者: 刘涛 (1979—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为微生物腐蚀与抑制腐蚀。邮箱: liutao@shmtu.edu.cn

Corresponding author: LIU Tao (1979—), Male, Doctor, Professor, Research focus: MIC and MIC-I. E-mail: liutao@shmtu.edu.cn

bial corrosion and microbial fuel cells.

KEY WORDS: melanin; pyomelanin; bioelectrochemistry; extracellular electron transfer; biocorrosion; genetic engineering

黑色素 (melanin) 是一种高分子量的深色生物色素, 广泛分布于动物、植物和微生物中。它的化学成分十分复杂, 且组成类型可因聚合前体和过程的不同而出现较大的差异, 是类腐殖质型大分子化合物的泛称^[1]。人类对于黑色素的研究已经开展了一个多世纪, 对黑色素的基本性质和功能有了初步的了解。黑色素不是生物体新陈代谢的必需化合物, 但它能为生物的生存提供很多的有利条件^[2]。当前黑色素的获取大多是从动植物提取而来, 或者通过人工化学合成的手段。动植物样品来源不稳定, 化学合成的反应复杂, 且有一定的毒性, 都成为大量高效生产黑色素的制约条件。微生物能够分泌生成黑色素, 而且样品容易获得, 反应条件温和, 操作简单, 成本低, 效率高, 因此近年来关于微生物产黑色素的研究也在日益增多^[3]。研究涉及到黑色素的类型和合成途径^[4-5]、性质和功能^[6]、独特的非晶形半导体性质使其作为电子传递载体和电子终端受体在生物电化学领域的应用等^[7-8]。随着基因技术和蛋白质组学的快速发展, 对产生黑色素的代谢调控在基因水平上有了新的了解, 为细菌黑色素的生成调控和功能应用提供了全新的研究思路^[9]。

1 细菌黑色素简介

1.1 黑色素的结构和性质

黑色素是由吡啶或酚氧化而成的高分子多聚物, 通常带有负电荷, 具有疏水性, 在结构和性质上与腐殖质十分相似, 因此也被称作类腐殖质。它与腐殖质一样, 都是高分子醌类聚合物, 很容易结合亲水和疏水物质, 因此既可以作为异化金属还原菌 (DMRB) 胞外呼吸的电子受体, 又可以作为电子供体, 行使电子传递载体的功能^[7]。黑色素不溶于水、酸溶液和有机溶剂, 但是当结合了糖及蛋白质后, 具有水溶性^[10]。黑色素具有抵御多种辐射的物理性质, 在紫外波长下具有最大吸收值。对于动植物和微生物中提取的黑色素, 可以通过光吸收线性斜率来对其性质进行表征^[11]。目前主要使用红外拉曼光谱分析、电子自旋共振分析、核磁共振谱、质谱分析等技术来研究黑色素的结构和性质。

1.2 黑色素的分类

根据合成途径、代谢产物和生化特征的不同, 黑色素可以分为真黑素、棕黑素、DHN 黑色素和脓黑素。真黑素和棕黑素均是通过经典的 Raper-Mason 酪氨酸酶途径合成的, 因此又称为 L-多巴黑色素; DHN 黑色素和脓黑素在化学组成上与 L-多巴黑色

素有所不同, 主要体现在前两者均不含氮元素和硫元素^[12], 因此它们又被称为异黑色素。

真黑素含有氮原子, 而不含硫原子, 通常呈深棕色或黑色, 难溶于水。合成途径为经典的 Raper-Mason 途径: 酪氨酸酶催化底物酪氨酸形成二羟苯丙氨酸 (DOPA), 在有氧条件下进一步聚合成多巴色素^[13]。外源性 Cu^{2+} 能够增强酪氨酸酶的活性, 从而促进真黑素的生成^[14]。

棕黑素又称为脱黑色素, 含有硫或者氮原子, 呈颜色较浅的黄褐色。合成途径也是 L-多巴黑色素的 Raper-Mason 途径。与真黑色素的合成途径有所不同, 在底物酪氨酸氧化的起始阶段, 半胱氨酸参与反应中, 最终共同形成棕黑素^[15]。

脓黑素不含硫原子或氮原子, 它的合成途径主要涉及底物酪氨酸或苯丙氨酸分解生成尿黑酸 (Homogentisic acid, HGA), 过量的尿黑酸排出到细胞外, 在有氧条件下, 聚合为分子量介于 12 000~120 000 Da 之间的红褐色的脓黑素^[16]。脓黑素主要由微生物代谢生成, 1972 年 Yabuuchi and Ohyama 首次报道了假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 分泌产生脓黑素^[17], 然后相继发现希瓦氏菌 (*Shewanellacollectorwelliana*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) 都具有分泌产生脓黑素的能力^[18-20]。脓黑素是目前研究细菌黑色素性质与功能重点关注的黑色素。

DHN 黑色素全称为 1,8-二羟基萘 (DHN) 黑色素, 是由不含氮原子的多酚类物质催化聚合而成的多聚色素, 呈较深的棕黑色, 主要存在于植物和微生物中^[21]。

1.3 脓黑色素的合成途径及代谢过程

脓黑素又称作 HGA 黑色素, 主要由细菌产生, 之前的研究结果较少, 是文中重点关注和研究的黑色素。脓黑色素的生成主要来自细菌细胞内苯丙氨酸和酪氨酸的代谢, 如图 1 所示。在分解代谢中, 苯丙氨酸先转变为酪氨酸, 酪氨酸的分解代谢经过五步反应, 最终生成延胡索酸和乙酰乙酸, 参与到需氧生物中普遍存在的三羧酸循环中, 为生物体供能。酪氨酸代谢过程中, 4-羟苯基丙酮酸 (4-HPP) 在 4-羟苯基丙酮酸双加氧酶 (4-HPPD) 的催化作用下生成尿黑酸, 是细菌分泌产生脓黑素的重要前体物质。当细胞内的尿黑酸 1,2-双加氧酶 (HGD) 充足时, 会催化尿黑酸继续代谢, 最终生成延胡索酸和乙酰乙酸。当调控 HGD 的基因 *HmgA* 缺失或 1,2-双加氧酶 (HGD) 活性受损时, 会切断尿黑酸进入后续代谢的途径, 从而导致过量生成的 HGA 排出细菌细胞外, 暴露在空气中, 自氧化聚合为大量的脓黑素。与 L-多巴黑色

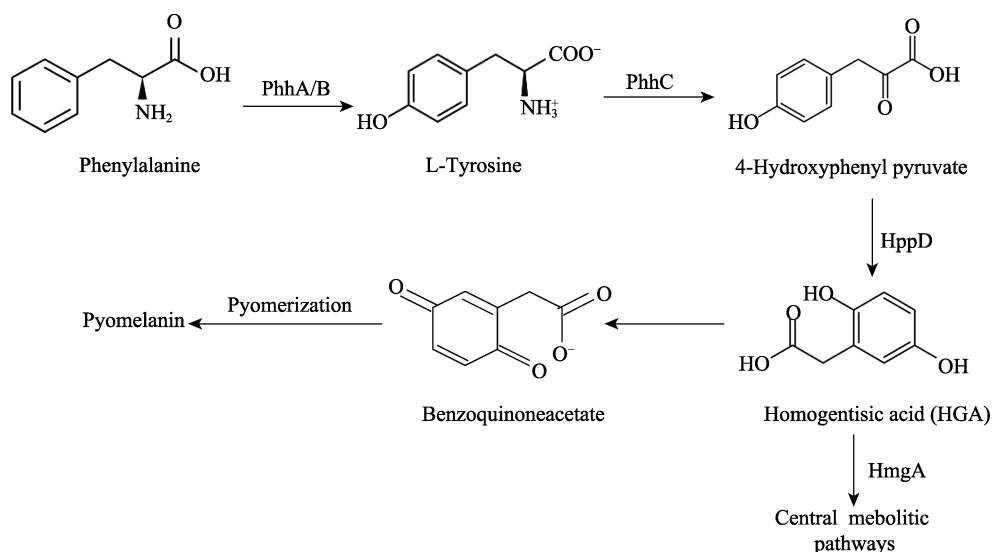


图 1 脓黑色素的 HGA 合成途径^[25]
Fig.1 HGA synthesis path of pyomelanin^[25]

素的 Raper-Mason 途径中出现的酪氨酸酶不同, 4-HPPD 是含有非亚铁血红素的酶^[22], 外源性 Fe^{2+} 能够增强它的酶活性, 从而影响到脓黑素的生成^[23]。

当前对于黑色素的表征可以通过以下方法进行: 从化学组成上鉴定黑色素的前体分子; 通过抑制关键酶的活性来抑制黑色素的生成; 从黑色素的生成途径中研究 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 对于关键酶活性作用和影响^[24]。

2 细菌黑色素的生物学功能

早在 19 世纪末期, 学者 Radais 就发现了一种能够在肉汤培养基中产生黑色素的细菌, 由此人们开始对细菌分泌产生黑色素进行研究^[26]。1972 年 Yabuuchi and Ohyama 首次报道了假单胞菌分泌产生脓黑素^[17], 紧接着 Coon 等^[27]发现海洋菌 *Shewanella colwelliana* 能够分泌脓黑素, 并成功克隆出与黑色素生成相关的功能基因 *melA*, 将此基因在大肠杆菌中表达后得到的蛋白质进行鉴定, 发现是 4-羟苯基丙酮酸双加氧酶。

黑色素在自然界中普遍存在, 也已经在多个领域得到了应用, 人们对其生物学功能有了一定的了解。近年来, 越来越多的研究者开始关注微生物特别是细菌代谢产生黑色素。已有的研究工作主要涉及到细菌黑色素通过增强其致病性提高生存效率, 黑色素的抗辐射性能、电化学性能以及与生物能学的关系等^[7]。

2.1 增强致病菌的毒性

早期人们在临床研究时发现, 一些致病菌能够分泌一种具有毒性的黑色素。例如弧菌属的霍乱弧菌 *Vibrio cholera* 能够在细胞内表达霍乱毒素的同时, 分泌一种具有毒性的黑色素, 这种黑色素与霍乱毒素协同作用, 帮助细菌寄宿在宿主老鼠幼仔体内。后续研

究发现, 与不产生黑色素的野生菌株相比, 能够分泌产生黑色素的霍乱弧菌突变株具有更显著的霍乱毒性, 且对宿主的侵染力也增强了 5 倍^[28]。研究认为, 黑色素在细胞内清除免疫反应中的超氧阴离子自由基, 在侵染宿主的过程中, 以保证致病菌不被宿主吞噬细胞清除。

2.2 提高细菌的生存竞争性

细菌黑色素能够抵御各种辐射、增强细胞毒性、清除自由基等, 提高了细菌的生存竞争能力。黑色素能够在自然环境中显著提高希瓦氏菌 *S. algae* 的生存优势, 研究者认为, 细菌在生长周期的指数后期产生黑色素是对来自环境压力的响应^[19]。伯克氏菌 *Burkholderia cenocepacia* 和假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 分泌产生的黑色素能够清除细胞内外的自由基, 在氧化应激状态下保护细胞不受损伤^[29]。

在基因 *HmgA* 缺失的情况下, 炭疽芽孢杆菌 *Bacillus anthracis* 通过过量分泌脓黑素来抵御 UA 紫外辐射对细菌细胞的损害^[30]。Chatfield 等发现, 嗜肺军团杆菌 *Legionella pneumophila* 可以分泌脓黑素。在细菌摄取铁元素时, 这种脓黑素具有铁还原酶的活性, 能够在铁元素限制条件下显著提高细菌的生存活力^[31]。

2.3 抑制海洋生物的附着和污损

海洋是一个复杂的生态体系, 存在大量的海洋微生物、无脊椎软体生物、大型生物等。这些生物在海洋工程建筑材料或者船舶基底表面附着, 增加了金属材料腐蚀的风险, 严重影响金属结构的寿命和安全, 同时也给人类造成了严重的经济损失。黑色素独特的有机色素物质能够为活组织提供可识别的信号, 成为一种新型抑制海洋生物附着的防污损因子, 这对于抑制海洋生物的附着有很重要的作用^[32]。假交替单胞菌

属中的 *P. rubra*、*P. denitrificans*、*P. tunicata* 都可以分泌产生黑色素,它们均在抑制海洋生物附着和污损方面显示了较强的能力^[33-35]。Zeng 等发现,假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas lipolytica* 在 HmgA 基因位点发生点突变后,会过量分泌产生黑色素,形成的具有脓黑色的微生物膜能够有效降低贻贝幼虫的附着和变形^[36]。

2.4 具有非晶半导体的性质

腐殖质具有非晶半导体的阈值开关性质,它的醌基团具有可逆的氧化还原能力。这种能力决定了腐殖质具有电子传递的特性,因此可溶性的腐殖质能够将电子传递给铁矿,从而起到还原铁矿的作用^[37]。黑色素的化学结构和性质与腐殖质十分相似,早在 20 世纪 70 年代就有学者发现,黑色素也具有类似腐殖质的非晶半导体阈值开关性质,与电荷传递复合物(Charge transfer complexes)协同作用,能够将吸收的电能量子化,还能够将电能转换为热能^[38]。因此人们假设黑色素也能够作为电子的供体和受体,并且在担子菌 *Cryptococcus neoformans* 分泌黑色素将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} 的实验中验证了这个假设^[39]。

3 细菌黑色素作为胞外电子传递载体和终端受体的研究进展

3.1 胞外呼吸及胞外电子受体

微生物的呼吸作用是指有机分子在细胞内氧化分解为二氧化碳和水,并释放能量形成 ATP 的过程,这个过程涉及到电子的得失和偶联呼吸链产能,是一切生命活动和新陈代谢的基础。根据终端电子受体的不同,呼吸作用分为有氧呼吸、无氧呼吸和发酵作用,这三种呼吸方式都是在细胞内进行的。近年来发现了一种新型微生物呼吸代谢方式——胞外呼吸,它是指在厌氧条件下,微生物在细胞内氧化作为电子供体的有机质,将得到的电子通过胞内电子传递链传递到细胞膜上,再通过外膜上的功能蛋白、纳米导线或者电子传递载体传递到胞外受体上,并使其还原。这个过程中,产生的能量供给微生物的生长和新陈代谢^[38,40]。Caccavo 等研究发现,非发酵兼性厌氧菌 *Shewanella algae* BrY 在介于有氧和无氧的海洋底栖环境中,能够利用多种不溶性胞外电子受体进行胞外呼吸,从而获得更强的生存竞争性^[41]。

能够进行胞外呼吸的微生物称为胞外呼吸菌,广泛存在于地球的各种环境中,其中 *Shewanella* 菌的 *Shewanella oneidensis* MR-1 和 *Geobacter* 菌的 *Geobacter sulfurreducens* 是近年来系统而深入研究的胞外呼吸菌^[42]。在胞外呼吸中,电子从微生物直接传递到环境中的受体表面,这种全新的微生物呼吸方式对研究污染物原位降解、污水处理、微生物燃料电池以及

地球生物化学循环具有重要的科学意义^[43]。

有一些胞外受体是可溶的,比如腐殖质,但是其分子量太大,不能穿透细胞膜进入细胞内,因此需要在胞外被还原,这种胞外呼吸也称作腐殖质呼吸^[37];有一些胞外受体是不溶性固体,比如铁、锰氧化物,电子传递到胞外对其进行还原,并偶联产能,这种胞外呼吸称作铁(锰)呼吸^[44]。在微生物燃料电池(MFC)中,产电微生物将氧化分解有机质产生的电子传递到阳极,最终产生循环电流,这种胞外呼吸方式称作产电呼吸,胞外电子受体是阳极^[45]。因此当前根据微生物胞外呼吸过程中胞外电子受体的不同,将胞外呼吸分为腐殖质呼吸、铁(锰)呼吸和产电呼吸三种形式。

3.2 胞外电子传递过程

经典胞内呼吸电子传递链由一系列位于细胞内膜上的氧化还原电势从低到高排列的电子载体组成^[46]。胞外呼吸电子传递链组分不只存在于细胞内膜上,还延伸到周质空间和外膜上。细胞内有机质彻底氧化产生的电子,从内膜上的电子载体经过周质空间传递到外膜上的电子载体,再通过外膜上多种功能的细胞色素 C 或其他功能蛋白,最终将电子由细胞外膜传递到胞外电子受体上^[47]。整个胞外电子传递过程分为两步。首先是电子从细胞内膜经过周质空间传递到外膜,这个步骤是整个胞外电子传递过程的研究重点。研究显示,细胞色素 C (Cyt c) 是存在于内膜、周质空间和外膜上的重要电子传递蛋白,能够介导电子从内膜向外膜的传递^[48]。第二步是电子从细胞外膜传递到胞外电子受体。

3.3 胞外电子传递机制

电子从细胞外膜传递到胞外电子受体,这一过程主要涉及到三种电子传递机制。

1) 直接接触机制。微生物与胞外受体表面直接接触,或者形成团聚物,借助外膜上的细胞色素 c 复合蛋白或者自组装的导电结构物质——“纳米导线”向胞外受体传递电子。研究者们对地杆菌属 *Geobacter* sp. 胞外电子的传递过程和机制进行了比较系统深入的研究,*Geobacter* 的内膜上有细胞色素 c MacA 和膜蛋白 ImcH、CbcL^[49],细胞周质有蛋白 PpcA 和 PpcD^[50],外膜上有膜蛋白 Omas、Omcs 和类蛋白 OmbB、OmbC 形成的外膜蛋白复合体^[40,51]。*Geobacter* 需要与胞外受体直接接触,然后通过内膜、周质和外膜上的多血红素 c-Cyts 和膜蛋白复合体进行电子传递。地杆菌属 *Geobacter* 还能将菌毛蛋白自组装形成一种导电鞭毛结构的“纳米导线”,研究显示,*Desulfobulbaceae* 的菌细胞可以一个一个连接起来,通过纳米导线远距离传递电子^[52]。微生物自组装合成“纳米导线”需要消耗很多能量,这种胞外电子传递机制并不是微生物的优势选择^[53]。

2) 电子穿梭机制。通过电子传递载体将细胞内

电子间接传递到细胞外受体。电子传递载体可以是微生物分泌的具有氧化还原活性的内源性物质, 主要是一些微生物分泌的次级代谢产物, 如黄素、醌类物质、核黄素、吩嗪类色素、黑色素等; 也可以是天然存在或人工合成的外源性电子介体物质, 如腐殖质和蒽醌-2,6 二磺酸盐^[54]。这些电子传递载体在胞外电子传递中可以被重复利用, 不需要微生物与胞外受体直接接触, 也避免合成“纳米导线”的能量消耗。在厌氧条件下, 微生物利用这些胞外电子传递载体完成胞外受体的电催化, 同时偶联菌细胞的新陈代谢过程, 从而维持正常的生长^[55]。Von Canstein 等^[56]研究发现, *Shewanella* 菌利用自身分泌的黄素和核黄素作为电子传递载体, 加速氧化了细胞外的铁氧化物。Ye Huang 和 Dake Xu 等研究发现, 铜绿假单胞菌能够分泌可溶性的小分子物质吩嗪-1-酰胺, 这种内源性的电子传递载体加速了 2205 双相不锈钢的腐蚀速率, 直接证明了胞外电子传递影响了铜绿假单胞菌对金属材料的腐蚀行为^[57]。

3) 胞外导电物质。微生物利用细胞外的导电物质作为电子传递载体, 介导电子从细胞内传递到胞外受体或者电极上。已经发现的胞外导电物质有颗粒活性炭、碳布、磁铁矿等^[58]。

3.4 黑色素的电子传递机制及应用

黑色素是内源性电子传递载体, 是细菌细胞内过量产生的尿酸分泌到细胞外, 自氧化形成的高分子醌类聚合物。黑色素的化学成分和分子结构与腐殖质十分类似, 同时具有非晶半导体的性质, 在微生物的胞外呼吸中既可以作为电子供体, 又可以作为电子受体, 还可以作为可溶性的电子穿梭载体^[7-8]。因此人们对黑色素的研究重点从它的物理性质转向了电化学特性。Turick 等在 2002 年研究发现, 异化金属还原菌 *Shewanella algae* BrY 能够在氧化 H_2 的过程中还原 $Fe(III)$, 这是因为 *S. algae* BrY 分泌的胞外黑色素

既可作为可溶性电子传递载体, 将电子从细胞内传递到细胞外的铁氧化物受体上, 使 $Fe(III)$ 还原, 又可作为细胞外的唯一终端电子受体, 偶联新陈代谢, 维持细菌的正常生长。即使当环境中不存在菌细胞时, 分泌产生的黑色素也可以行使电子传递的功能^[7]。Turick 等进一步研究了异化金属还原菌 *Shewanella algae*-BrY 分泌黑色素的电子传递功能, 发现去除菌细胞后, 黑色素还原高铁氧化物的速率降低了 90%, 将菌细胞重新加入体系中, 还原速率也只提高了 2 倍。结合细胞疏水性实验结果, 证明了与细胞连接的黑色素在细菌还原胞外高铁氧化物时, 充当了“电子导线”的角色, 将电子从细胞内传递到细胞外受体表面^[8]。

Christa H 等研究发现, *L. pneumophila* 分泌的黑色素具有 $Fe(III)$ 还原酶的作用, 再次证明了黑色素的胞外电子传递作用^[59]。笔者所在课题组近期研究结果显示, 一株假交替单胞菌分泌产生的黑色素显著加速了碳钢的腐蚀速率。从微生物腐蚀 (MIC) 的机理来看, 腐蚀过程是电子从金属表面流失的结果, 因此黑色素加速金属腐蚀也从另一角度证明了它具有电子传递和非晶半导体的多样化功能, 为人们进一步了解黑色素的潜在功能和应用价值提供了新的思路。

4 细菌黑色素与微生物腐蚀的关系

腐蚀是材料在环境介质界面上发生的电化学反应, 而微生物腐蚀虽然是腐蚀形式的一种, 但由于有微生物的存在, 整个过程复杂得多。在整个微生物腐蚀过程中, 微生物的新陈代谢会全程参与材料与电解质溶液的界面电化学反应, 细胞内外的氧化还原反应与金属基体的得失电子在多个层面上会发生重叠, 显著影响了材料的电化学腐蚀过程 (见图 2)。因此, 微生物腐蚀机理的研究应当结合微生物生理生化的特点, 从微生物角度甚至基因层面切入, 或许是突破微生物腐蚀机理研究的一个重要手段。

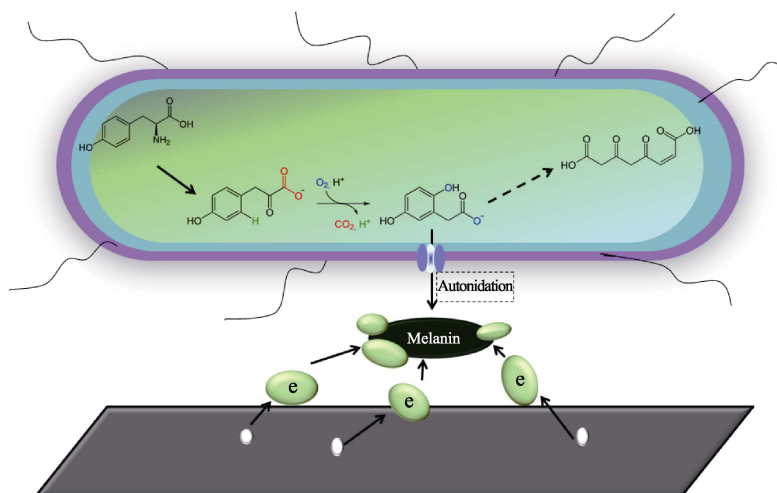


图 2 黑色素参与腐蚀过程的机理

Fig.2 Schematic diagram of melanin involved in the corrosion process

5 结语

近年来,随着胞外电子传递理论在微生物腐蚀领域的应用,越来越多的研究者认为,附着在材料表面的细菌可以直接利用金属在氧化反应中失去的电子作为能量来源,尤其是在厌氧和碳源缺乏的情况下。Xu 和 Gu 等人还提出了“生物阴极催化”理论^[60-61],并通过调控 *phzH* 基因,控制吩嗪的分泌量,从而验证了吩嗪作为电子传递媒介的作用。除此之外,对于间接电子传递的研究较少。作为一种内源性电子传递载体,黑色素具有非晶半导体的性质,因此既可以作为电子供体,又可以作为电子受体,但目前还未有关于黑色素对微生物腐蚀影响的研究报道。因此,寻找合适的模式菌株,从基因层面研究黑色素对于微生物腐蚀的作用,无论是对于微生物腐蚀机理,还是对于电子传递机制来说,都是非常重要的。

参考文献:

- [1] BELL A A, WHEELER M H. Biosynthesis and functions of fungal melanins[J]. Annual review of phytopathology, 1986, 24: 411-451.
- [2] CÉSARINI J P. Melanins and their possible roles through biological evolution[J]. Advances in space research, 1996, 18: 35-40.
- [3] MONTEFIORI D C, ZHOU J. Selection antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus in vitro[J]. Antiviral research, 1991, 15(1): 11-20.
- [4] FUNA N, OHNISHI Y, FUJII I, et al. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms[J]. Nature, 1999, 400(6747): 897-899.
- [5] PAL A K, GAJJAR D U, VASAVADA A R. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in aspergillus species[J]. Medical mycology, 2014, 52: 10-18.
- [6] LIU Y T, SUI M J, JI D D, et al. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquito activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*[J]. Journal of invertebrate pathology, 1993, 62(2): 131-136.
- [7] TURICK C E, TISA L S, CACCAVO F. Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe(III) oxide reduction and as a terminal electron acceptor by *Shewanella algae* BrY[J]. Applied and environmental microbiology, 2002, 68(5): 2436-2444.
- [8] TURICK C E, TISA L S, CACCAVO F. Electron transfer from *Shewanella algae* BrY to hydrous ferric oxide is mediated by cell-associated melanin[J]. FEMS microbiology letters, 2003, 220(1): 99-104.
- [9] VALERU S P, ROMPIKUNTAL P K, ISHIKAWA T, et al. Role of melanin pigment in expression of *Vibrio cholerae* virulence factors[J]. Infection and immunity, 2009, 77(3): 935-942.
- [10] BOSU P K, WALKER X R. Factors affecting virulence and pigment production of *Xanthomonas phaseolicola* Fuscans[J]. Canadian journal of botany, 1967, 45(12): 2367-2374.
- [11] MASON H S, INGRAM D J E, ALLEN B. The free radical property of melanins[J]. Archives of biochemistry and biophysics, 1960, 86(2): 225-230.
- [12] LANGFELDER K, STREIBEL M, JAHN B, et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi[J]. Fungal genetics and biology, 2003, 38(2): 143-158.
- [13] BRIDELLI M G. Self-assembly of melanin studied by laser light scattering[J]. Biophysical chemistry, 1998, 73: 227-239.
- [14] IKEDA K, MASUJIMA T, SUGIYAMA M. Effects of methionine and Cu^{2+} on the expression of tyrosinase activity in *Streptomyces castaneoglobisporus*[J]. The journal of biochemistry, 1996, 120(6): 1141-1145.
- [15] NAPPI A J, OTTAVIANI E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates[J]. Bioessays, 2000, 22(5): 469-480.
- [16] PROTA G. Melanins and melanogenesis[M]. San Diego: Academic Press, 1992.
- [17] YABUUCHI E, OHYAMA A. Characterization of “pyomelanin”-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 1972, 22(2): 53-64.
- [18] WEINER R M, SEGALL A M, COLWELL R R. Characterization of a marine bacterium associated with *Crassostrea virginica*, (the eastern oyster)[J]. Applied and environmental microbiology, 1985, 49(1): 83-90.
- [19] KOTOB S I, COON S L, QUINTERO E J, et al. Homogentisic acid is the primary precursor of melanin synthesis in *Vibrio cholera*, a *Hyphomonas* strain, and *Shewanella colwelliana*[J]. Applied and environmental microbiology, 1995, 61(4): 1620-1622.
- [20] STEINERT M, FLUGEL M, SCHUPPLER M, et al. The Lly protein is essential for p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity in *Legionella pneumophila*[J]. FEMS microbiology letters, 2001, 203(1): 41-47.
- [21] COYNE V E. Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio cholera*[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 2861-2865.
- [22] LINDBLAD B, LINDSTEDT G, LINDSTEDT S, et al. Purification and some properties of human 4-hydroxyphenyl-

- nylpyruvate dioxygenase[J]. The journal of biological chemistry, 1977, 252: 5073-5084.
- [23] LINDSTEDT S, ODELHOG B, RUNDGREN M. Purification and some properties of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas* sp. P. J. 874[J]. Biochemistry, 1977, 16(15): 3369-3377.
- [24] TURICK C E, TISA L S, CACCAVO F. Pyomelanin is produced by *Shewanella* algae BrY and affected by exogenous iron[J]. Canadian journal of microbiology, 2008, 54(4): 334-339.
- [25] HUNTER R C, NEWMAN D K. A putative ABC transporter, hatABCDE, is among molecular determinants of pyomelanin production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of bacteriology, 2010, 192(22): 5962-5971.
- [26] RODEN E E, URRUTIA M M. Ferrous iron removal promotes microbial reduction of crystalline iron(III) oxides[J]. Environ Sci Technol, 1999, 33: 1847-1853.
- [27] COON S L, KOTOB S, JARVIS B B, et al. Homogentisic acid is the product of Mel A, which mediated melanogenesis in the marine bacterium *Shewanella colwelliana* D[J]. Applied and environmental microbiology, 1994, 60(8): 3006-3010.
- [28] HOCQUET D, PETITJEAN M, ROHMER L, et al. Pyomelanin-producing *Pseudomonas aeruginosa* selected during chronic infections have a large chromosomal deletion which confers resistance to pyocins[J]. Environ Microbiol, 2016, 18: 3482-3493.
- [29] KEITH K E, KILLIP L, HE P Q, et al. *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces apigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate[J]. Journal of bacteriology, 2007, 189(24): 9057-9065.
- [30] HAN H S, IAKOVENKO L, WILSON A C. Loss of homogentisate 1,2-dioxygenase activity in *Bacillus anthracis* results in accumulation of protective pigment[J]. Plos one, 2015, 10(6): 1-13.
- [31] CHATFIELD C H, CIANCOTTO N P. The secreted-pyomelanin pigment of *Legionella pneumophila* confers ferric reductase activity[J]. Infection and immunity, 2007, 75(8): 4062-4070.
- [32] LIU G Y, NIZET V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors[J]. Trends in microbiology, 2009, 17(9): 406-413.
- [33] EGAN S, JAMES S, HOLMSTROM C, et al. Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*[J]. Environmental microbiology, 2002, 4(8): 433-442.
- [34] HOLMSTROM C, EGAN S, FRANKS A, et al. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species[J]. FEMS microbiology ecology, 2002, 41(1): 47-58.
- [35] BOWMAN J P. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*[J]. Marine Drugs, 2007, 5(4): 220-241.
- [36] ZENG Z S, GUO X P, CAI X S, et al. Pyomelanin from *Pseudoalteromonas lipolytica* reduces biofouling[J]. Microbial Biotechnology, 2017, 10(6): 1718-1731.
- [37] LOVLEY D R, COATES J D, BIUNT-HARRIS E L, et al. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration[J]. Nature 1996, 382: 445-448.
- [38] LOVLEY D R. Extracellular electron transfer: Wires, capacitors, iron lungs and more[J]. Geobiology, 2008, 6(3): 225-231.
- [39] NYHUS K J, WILBRON A T, JACOBSON E S. Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*[J]. Infection and immunity, 1997, 65(2): 434-438.
- [40] GORBY Y A, LOVLEY D R. Electron transport in the dissimilatory iron reducer, GS-15[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 867-870.
- [41] CACCAVO F, BLAKEMORE Jr R P, LOVLEY D R. A hydrogenoxidizing, Fe(III)-reducing microorganism from the Great Bay estuary, New Hampshire[J]. Applied and environmental microbiology, 1992, 58(10): 3211-3216.
- [42] SHI L, THOMAS C S, JOHN M Z, et al. Respiration of metal (hydr) oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: A key role for multihaem c-type cytochromes[J]. Molecular microbiology, 2007, 65(1): 12-20.
- [43] CLAUDIA M M, LUIS H A, LOURDES B C, et al. Humus-reducing microorganisms and their valuable contribution in environmental processes[J]. Applied microbiology biotechnology, 2013, 97(24): 10293-10308.
- [44] LOVLEY D R. Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-reducing prokaryotes *Prokaryotes*[J]. The prokaryotes, 2006, 2: 635-658.
- [45] LOVLEY D R. Bug juice: Harvesting electricity with microorganisms[J]. Nature reviews microbiology, 2006, 4(7): 497-508.
- [46] WANG J Y, ZHU S G, XU C F. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 121-124.
- [47] KIM B H. Microbial fuel cell[J]. KIS today, 2009, 2(1): 4-8.
- [48] SHI L, THOMAS C S, JOHN M Z, et al. Respiration of metal (hydr) oxides by *Shewanella* and *Geobacter* key role for multihaem c-type cytochromes[J]. Molecular microbiology, 2007, 65(1): 12-20.
- [49] ZACHAROFF L, CHAN C H, BOND D R. Reduction of low potential electron acceptors requires the CbcL inner

- membrane cytochrome of *Geobacter sulfurreducens*[J]. Bioelectrochemistry, 2016, 107: 7-13.
- [50] MORGADO L, BRUIX M, PESSANHA M, et al. Thermodynamic characterization of a triheme cytochrome family from *Geobacter sulfurreducens* reveals mechanistic and functional diversity[J]. Biophysical journal, 2010, 99(1): 293-301.
- [51] RICHTER H, NEVIN K P, JIA H, et al. Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer[J]. Energy environmental science, 2009, 2(5): 506-516.
- [52] MUIER H, BOSCH J, GRIEBLER C, et al. Long-distance electron transfer by cable bacteria in aquifer sediments[J]. International society for microbial ecology, 2016, 10(8): 2010-2019.
- [53] KATO S, HASHIMOTO K, WATANAB K. Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2012, 109(25): 10042-10046.
- [54] BECKWITH C R, EDWARDS M J, LAWES M, et al. Characterization of MtoD from *Sideroxydans lithotrophicus*: A cytochrome c electron shuttle used in lithoautotrophic growth[J]. Frontiers in microbiology, 2015, 6: 332.
- [55] LIU X B, SHI L, GU J D. Microbial electrocatalysis: Redox mediators responsible for extracellular electron transfer[J]. Biotechnology advances, 2018, 36(7): 1815-1827.
- [56] HARALD V C, JUN O, SAKAYU S, et al. Secretion of flavins by shewanella species and their role in extracellular electron transfer[J]. Applied and environmental microbiology, 2008, 74(3): 615-623.
- [57] HUANG Y, ZHOU E, JIANG C Y, et al. Endogenous phenazine-1-carboxamide encoding gene PhzH regulated the microbiologically influenced corrosion of 2205 duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Electrochemistry communications, 2018, 94: 9-13.
- [58] CHEN S S, ROTARU A E, LIU F H, et al. Carbon cloth stimulates direct interspecies electron transfer in syntrophic cocultures[J]. Bioresource technology, 2014, 173: 82-86.
- [59] CHRISTA H. The secreted pyomelanin pigment of *Legionella pneumophila* confers ferric reductase activity[J]. Infection and immunity, 2007, 75(8): 4062-4070.
- [60] ZHANG P Y, XU D K, LI Y C, et al. Electron mediators accelerate the microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm[J]. Bioelectrochemistry 2015, 101: 14-21.
- [61] LI Y C, XU D K, CHEN C F, et al. Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: A review[J]. Journal of materials science & technology, 2018, 34: 1713-1718.

(上接第 228 页)

- [63] GEURTSEN W, LEHMANN F, SPAHL W, et al. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures[J]. Journal of biomedical materials research B: Applied biomaterials, 2015, 41: 474-480.
- [64] RATANASATHIEN S, WATAHA J C, HANKS C T, et al. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts[J]. Journal of dental research, 1995, 74: 1602-1606.
- [65] BOONSTRA J, POST J A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells[J]. Gene, 2004, 337: 1-13.
- [66] ZHI X V, MAJAD K, KARTHIKEYAN N, et al. Antimicrobial/antifouling polycarbonate coatings: Role of block copolymer architecture[J]. Macromolecules, 2015, 48: 1055-1064.
- [67] CAI X, ZHANG J L, YU O Y, et al. Bacteria-adsorbed palygorskite stabilizes the quaternary phosphonium salt with specific-targeting capability, long-term antibacterial activity, and lower cytotoxicity[J]. Langmuir, 2013, 29: 5279-5285.
- [68] KOJI K, KOTARO K, TETSU Y. Hydrophilic quaternary ammonium type ionic liquids. systematic study of the relationship among molecular structures, osmotic pressures, and water-solubility[J]. Langmuir, 2011, 27: 7353-7356.
- [69] DING X, DUAN S, DING X, et al. Versatile antibacterial materials: An emerging arsenal for combatting bacterial pathogens[J]. Advanced functional materials, 2018, 28: 1802140.
- [70] PU Y J, HOU Z, KHIN M M, et al. Synthesis and antibacterial study of sulfobetaine/quaternary ammonium-modified star-shaped poly[2-(dimethylamino) ethyl methacrylate]-based copolymers with an inorganic core[J]. ACS biomacromolecules, 2017, 18: 44-55.
- [71] LI P, POON Y F, LI W F, et al. A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability[J]. Nature materials, 2011, 10: 149-156.