



一株土壤产电菌 *Clostridium sporogenes* 的分离及其产电性能

姜允斌¹, 邓欢¹, 黄新琦¹, 张银萍², 钟文辉^{1*}

¹ 南京师范大学地理科学学院, 江苏省物质循环与污染控制重点实验室, 江苏 南京 210023

² 南京师范大学分析测试中心, 江苏 南京 210023

摘要: 【目的】从土壤中分离获得产电菌纯菌株SE6, 鉴定其种类并分析其产电性能。【方法】通过厌氧培养分离得到纯菌株, 根据其形态、生理生化性质及16S rRNA基因测序分析确定其种属。以该菌株作为产电菌接种源, 液体LB培养基和铁氰化钾溶液分别作为阳极液和阴极液, 构建双室微生物燃料电池(Microbial fuel cells, MFCs), 研究其产电能力; 根据交流阻抗图谱, 分析MFCs的内阻。应用循环伏安测试确定该菌株的胞外电子传递方式。并利用扫描电镜对阳极表面产电菌形态进行观察。【结果】菌株SE6的16S rRNA基因序列与*Clostridium sporogenes*有100%同源性, 结合其形态特征和生理生化特性, 确定其属于梭菌属(*Clostridium*)。SE6接种到MFCs中可以获得44.42 mW/m²的最大功率密度。MFCs的阳极内阻、阴极内阻和欧姆内阻分别为(1488±193) Ω/cm²、(0.92±0.01) Ω/cm²和(20.69±1.76) Ω/cm²。其循环伏安图谱显示体系中存在电活性物质且峰值电流随扫速升高线性增大。扫描电镜观察到阳极表面聚集附着着长度约1 μm的杆菌。【结论】本研究成功从土壤中分离出具有一定产电能力的菌株*C. sporogenes* SE6, 可直接将电子传递至阳极, 其产电过程阻抗较大。

关键词: 生孢梭菌, 微生物燃料电池, 循环伏安, 交流阻抗, 扫描电镜

微生物燃料电池(Microbial fuel cells, MFCs)是一类利用微生物的催化作用将化学能转化为电能的装置^[1]。近年来研究者对其在土壤环境中的应用进行了广泛尝试并且取得了良好效果, 主要集中在以下几个方面: (1) 温室气体减排。运行MFCs在添加纤维素^[2]或种植水稻^[3]的条件下, 均

可减少稻田土壤的甲烷排放。(2) 污染物修复。MFCs产电过程对土壤中有有机污染物的降解具有显著的加速效果, 包括酚^[4]、烷烃和多环芳烃^[5]等。(3) 生物传感器。MFCs运行产生的电信号对土壤污染物浓度^[6]和土壤微生物活性^[7]都有迅速的响应。MFCs中的产电菌能够催化氧化有机质供自身

基金项目: 国家自然科学基金(41301260); 江苏省高校自然科学研究面上项目(13KJB610009); 江苏省高校优秀创新团队项目; 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(KYZZ150217)

*通信作者。Tel/Fax: +86-25-85891352; E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn

收稿日期: 2015-07-27; 修回日期: 2015-10-13; 网络出版日期: 2016-01-05

生长, 并将获得的电子传递给电极, 发挥着关键作用^[8]。因此, 土壤中产电菌的产电能力直接影响到上述MFCs技术的应用效果。对土壤产电菌的分离鉴定及其产电性能的评价可为MFCs技术在土壤环境的应用提供最直接的理论依据和更丰富的机理解释。

目前, 国际上已报道分离获得的产电微生物约30株, 其中细菌约20余株, 主要分布于变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes), 包括希瓦氏菌属(*Shewanella*)^[9]、地杆菌属(*Geobacter*)^[10]、红育菌属(*Rhodospirillum rubrum*)^[11]和芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[12]等。国内研究者也报道了分离出的产电菌, 包括费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)^[13]、嗜根考克氏菌(*Kocuria rhizophila*)^[14]、克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)^[15]、*Nitratireductor* sp.^[16]等。基于对产电菌纯菌株的已有研究, 具有产电能力的细菌既有革兰氏阳性菌也有革兰氏阴性菌; 大多数为厌氧或兼性厌氧的化能异养菌; 其胞外电子传递方式包括直接电子传递(菌毛、细胞色素等)和间接电子传递(核黄素、醌酮等中介体)^[8]; 运行MFCs产生的功率密度最高约为3000 mW/m²^[9], 大多数在200 mW/m²以下。但是, 已有产电菌的来源主要为工业废水和污泥及沉积物, 而对于土壤产电菌产电特性的研究仍鲜有报道。从土壤中分离筛选产电菌并进行产电性能和产电机理研究, 有利于丰富对自然界产电菌多样性、产电性能和产电机理的认识。

本研究在厌氧培养条件下, 从森林土壤中成功分离得到1株细菌纯培养菌株SE6。通过形态学观察、生理生化实验和16S rRNA基因测序确定了其种属信息, 并将其接种至MFCs研究了菌株的产电性能。通过对MFCs的交流阻抗和循环伏安测试, 分别研究了菌株的内阻和电化活性。通过扫描电镜对MFCs阳极表面的观察, 为该菌株的电化学特性评价提供更多依据。土壤产电菌的分离

鉴定拓宽了产电菌资源的来源, 也为土壤产电技术的应用提供了最直接的证据。

1 材料和方法

1.1 菌种的分离和筛选

1.1.1 样品来源: 土壤采自南京师范大学仙林校区后山的阔叶林森林土壤, 剔除凋落物后过2 mm筛, 于4 °C保存备用。

1.1.2 培养基: (1) 液体培养基(g/L)^[17]: 蛋白胨8.0, 酵母粉1.0, 乙酸钠16.0, NaCl 5.0, CaCl₂ 0.1, MgCl₂ 0.1, K₂HPO₄ 1.2, 半胱氨酸1.0, 柠檬酸铁25.0 mmol/L, 刃天青 4.0 mL/L, pH 7.0; (2) 固体培养基: 组分同液体培养基, 另加琼脂20 g/L。

1.1.3 分离方法: 量取50 mL液体培养基于100 mL具塞厌氧瓶中, 抽气后灭菌。待冷却后于厌氧手套箱(miniMACS, Don Whitley Scientific)内加入2 g土壤样品, 30 °C静置培养5 d。培养基颜色由棕红色变为黑色后, 吸取1 mL富集液用装于具塞试管已灭菌的无氧水进行梯度稀释, 涂布于固体培养基上, 培养3–4 d, 在10⁻⁴–10⁻⁶浓度长出黑色单菌落。挑选单菌落接种至液体培养基后获得纯菌株。上述实验、培养操作均在厌氧手套箱中完成。

1.2 菌株的形态观察和生理生化特征测定

对菌株进行革兰氏染色实验, 并对其形态特征通过扫描电镜进行观察(见1.7)。菌株的生理生化特征使用Biolog板(GNPlateTM, BIOLOGInc), 按照生产商说明书进行测定, 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[18]对菌株进行生理生化鉴定。

1.3 菌株16S rRNA基因测序分析

菌株的16S rRNA基因直接将纯菌液作为模板进行PCR扩增。引物为27F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACCTTGTTACGAC TT-3')^[19]。PCR产物使用PeasyTM-T3克隆试剂盒(Transgene), 按生产商说明书进行克隆。挑选6个克隆子进行测序, 并对序列进行比对。系统发育

分析通过MEGA 4.0软件按邻接法(Neighbor-Joining)计算完成, 距离系数模型为Maximum Composite Likelihood, Bootstrap次数为1000。

1.4 菌株产电性能测定

产电测试采用双瓶型(H型)的MFCs反应器(100-II, 常熟文特)进行, 阳极室和阴极室体积均为120 mL, 两室间通过侧管由直径为4 cm的阳离子交换膜(32S, 浙江千秋)隔开。阳极和阴极均使用碳毡(4 cm×2 cm), 由钛丝与1 kΩ外阻连接形成闭合回路。阳极液为灭菌的LB培养基, 阴极液为50 mmol/L的铁氰化钾磷酸盐溶液。向阳极室接种200 μL纯菌液并启动运行, 使用数据采集卡(7660B, 北京中泰研创)每隔20 min记录1次电压数据, 结束后更换约2/3的阳极和阴极液进行下一周期的运行。实验设置3个相同的MFCs进行平行测定。

MFCs的极化曲线和功率密度曲线获得方法如下: 运行MFCs至电压稳定, 断开回路2 h后, 依次连接阻值为50 kΩ、10 kΩ、5 kΩ、1 kΩ、800 Ω、500 Ω、300 Ω、200 Ω、100 Ω的外阻, 运行20 min, 记录电压值。根据欧姆定律计算电流密度(mA/m^2 , $I=V/R \times A$), 功率密度(mW/m^2)由公式 $P=V^2/R \times A$ 计算得到^[18]。其中, V 是电池测量电压(mV), R 是外阻(Ω), A 是阳极投影面积(m^2)。

1.5 MFCs内阻测定

MFCs反应器内阻通过交流阻抗法测得。方法简述为: 断开MFCs回路2 h至开路电压稳定, 采用了电极体系, 以阳极为工作电极, 阴极为对电极与参比电极, 由电化学工作站(VersaSTAT4, Princeton Applied Research)施加1个电压为10 mV, 频率从10 mHz至100 kHz的交流电, 获得奈奎斯特图谱。所得图谱由ZSimpWin 3.1软件进行拟合, 得到反应器各部分的内阻值^[20]。

1.6 菌株电化学活性测定

菌株的电化学活性通过循环伏安扫描测定。方法如下: 保持MFCs开路并加入Ag/AgCl参比电

极, 以阳极作为工作电极, 阴极作为对电极, 由电化学工作站(CHI1040C, 上海辰华)在-700 mV-300 mV之间循环测试体系的氧化还原特性, 变换扫速从10 mV/s至200 mV/s, 绘制循环伏安图谱^[21]。

1.7 MFCs阳极细菌扫描电镜观察

在第四周期(电压约为100 mV)停止运行MFCs并采集阳极样品, 另准备原始碳毡样品。样品经清洗、固定和脱水^[15], 通过扫描电镜(JSM-5610LV, JEOL)进行观察。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离与鉴定

本研究从森林土壤中分离出1株具有铁还原能力的细菌菌株SE6, 其菌落在固体培养基上表面光滑、有光泽、边缘整齐。菌株SE6革兰氏染色为阳性, 菌体为杆状, 厌氧条件下能够生长, 其生理生化性质见表1, 与生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)相似^[18]。

为了确认菌株SE6的分类地位, 对其16S rRNA基因序列进行了测定和比对。测定的基因片段长度为1465 bp, 检测的6个克隆子中含有的序列100%一致。将测得序列通过BlastX比对, 选取一致性大于99%的序列, 以及系统发育关系较近和较远种属的序列, 构建系统发育树(图1), 结果显示SE6与*C. sporogenes*的系统发育关系最近, 确认菌株SE6为*C. sporogenes*。

2.2 MFCs产电性能

将SE6接种至MFCs阳极室, 启动运行并记录电压(图2)。结果显示3个平行MFCs的电压曲线变化趋势一致, 经过约2 d的启动, 电压迅速上升达到第1个运行周期的峰值130 mV左右, 之后电压逐渐回落。于箭头所示时刻更换新鲜培养基后, 电压迅速上升, 后2个运行周期电压的平均峰值达到了160 mV左右。

表1. 菌株SE6与生孢梭菌的生理生化特征比较

Table 1. Physiological and morphological characteristics of strain SE6 and *Clostridium sporogenes*

Test items	SE6	<i>C. sporogenes</i>	Test items	SE6	<i>C. sporogenes</i>
Gram stain	+	+	Maltose	w	w/-
Anaerobic growth	+	+	Mannitol	-	-
Arabinose	-	-	Mannose	-	-
Cellobiose	-	-	Melibiose	-	-
Fructose	-	w/-	Rhamnose	-	-
Galactose	-	-	Sucrose	-	-
Inosose	w	-	Trehalose	-	-
Lactose	-	-			

+: positive reaction; -: negative reaction; w: weak reaction.

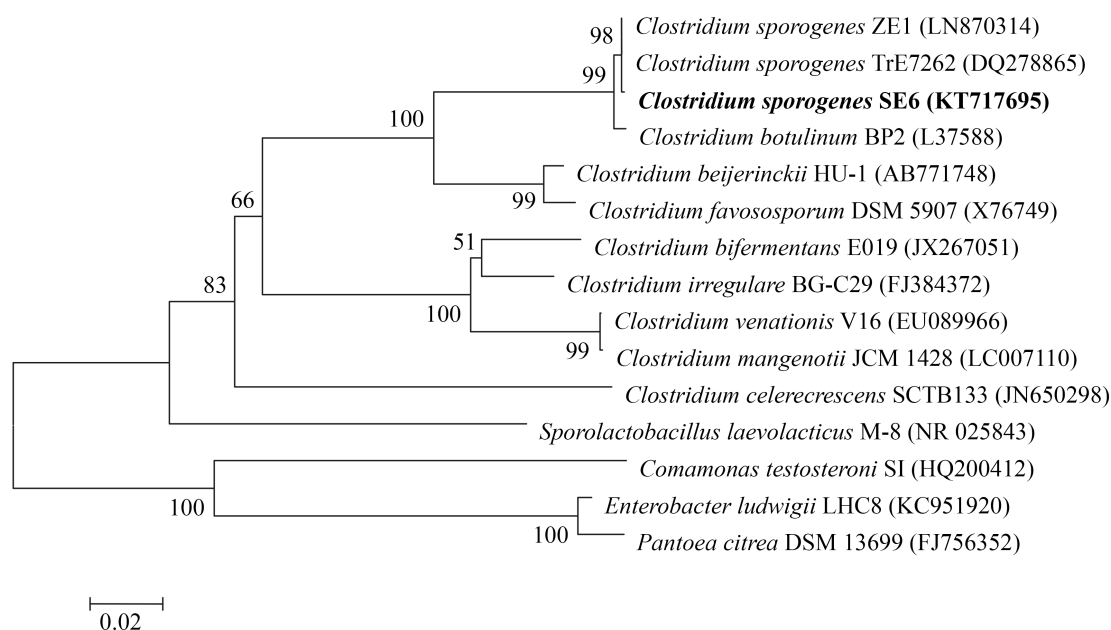


图1. 基于16S rRNA基因构建的菌株SE6系统发育树

Figure 1. Neighbor-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene fragments (1465 bp) of strain SE6 and reference species. The isolated strain, *Clostridium sporogenes* SE6, was in boldface. Bootstrap values at nodes were calculated using 1000 replicates by Maximum Composite Likelihood model. Scale bar means 0.02 substitutions per nucleotide sequence position.

MFCs的极化曲线和功率密度曲线如图3所示。在所测的阻值中,当电压为118 mV时,反应器的功率密度达到最大值44 mW/cm²,所对应的电流密度和外阻值分别为236 mA/cm²和1000 Ω。极化曲线显示,电流密度小于55 mA/cm²,反应器

的电势存在活化损失,电流密度增大后主要为欧姆损失。

MFCs反应器的内阻测量结果如图4所示,图中数据点为3个平行MFCs的平均值,右下小图为进行软件拟合分析的MFCs等效电路图。经计算,

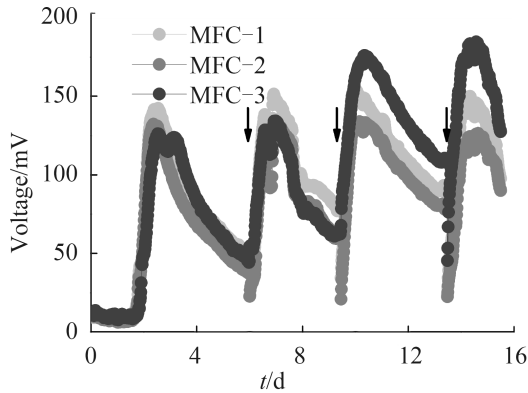


图 2. 菌株SE6催化的3个平行MFCs的电压曲线

Figure 2. Voltage curves of triplicate MFCs operated with strain SE6 in batch-fed mode. Black arrows indicated the time of medium replacement.

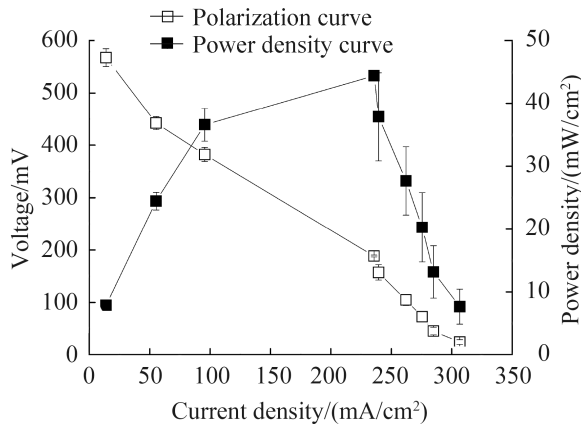


图 3. 菌株SE6催化的MFCs的极化曲线和功率密度曲线

Figure 3. Polarization curve and power density curve of MFCs operated with strain SE6. Bars represented standard deviations of the means.

MFCs反应器的阳极内阻、阴极内阻和欧姆内阻分别为 $(1488 \pm 193) \Omega/\text{cm}^2$ 、 $(0.92 \pm 0.01) \Omega/\text{cm}^2$ 和 $(20.69 \pm 1.76) \Omega/\text{cm}^2$ 。

2.3 MFCs体系电化学活性

通过循环伏安扫描来测定MFCs体系中物质的氧化还原特性。循环伏安图谱如图5-A所示,不同扫速的循环伏安曲线均在 -0.34 V 左右出现了氧化峰,在 -0.16 V 左右产生了还原峰,且峰值随扫速的增加而增大。将氧化峰和还原峰的峰值分别与

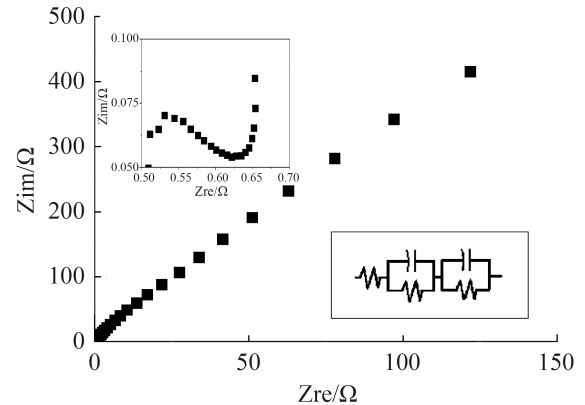


图 4. 菌株SE6催化的MFCs反应器的交流阻抗图谱

Figure 4. Nyquist plots of the impedance spectra of MFC reactors operated with strain SE6. The inserted figures were the detailed plots at high frequency and the equivalent circuit of MFCs used for ZSimpWin fitting program.

扫速进行回归分析(图5-B),结果显示锋面与扫速间均存在线性相关关系。

2.4 MFCs阳极扫描电镜观察

通过扫描电镜对原始碳毡和运行后的MFCs阳极进行观察(图6)。结果显示,原始碳毡的碳纤维表面光滑,没有微生物附着。MFCs阳极样品表面,微生物大量聚集并附着于碳纤维上。放大倍数可观察到附着的微生物长度约 $1 \mu\text{m}$,形状为杆状,细胞表面光滑平整,没有其他向外延伸的细胞结构。

3 讨论

本研究运用厌氧条件下微生物分离培养方法,首次从森林土壤中分离得到1株生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)。该菌可产生孢子,对环境因素的变化有很强的耐受能力,也使得其能够从土壤当中获得分离。研究显示,基于MFCs的土壤产电技术可用于指示污染物对微生物活性的影响^[6]或减少温室气体排放^[3]等。土壤中产电菌的分离鉴定为土壤产电提供了最直接的证据。目前,从环境中分离的具有产电能力的细菌共有20余

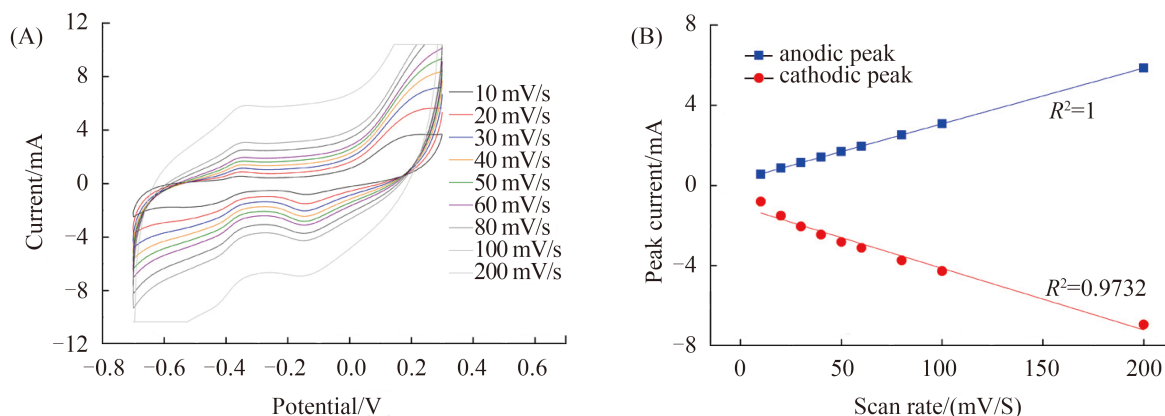


图 5. 菌株SE6催化的MFCs的循环伏安图谱(A)和氧化峰和还原峰值与扫速的回归分析(B)

Figure 5. Cyclic voltammograms of MFCs operated with strain SE6 under different scan rates (A) and regression analysis of anodic and cathodic peak currents in the cyclic voltammograms with their corresponding scan rates (B).

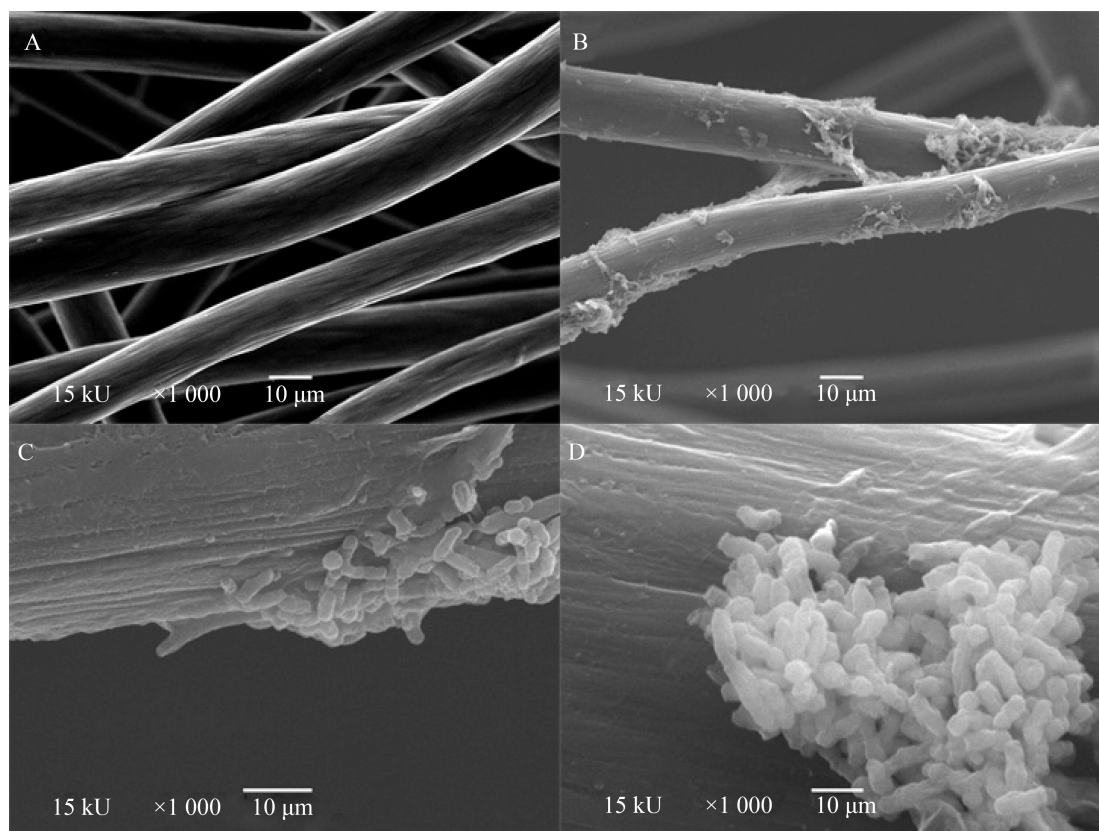


图 6. 原始碳毡(A)和(B-D) MFC阳极碳毡样品的扫描电镜照片

Figure 6. Scanning electron micrographs of unused carbon fiber (A) and (B-D) MFC anode operated with strain SE6.

株, 其中绝大多数来源于废水、活性污泥和底泥沉积物。菌株SE6也拓宽了产电微生物的来源, 为土壤中产电菌的分离研究提供了依据。

在已报道的使用其他菌种的MFCs中, 最大功率密度普遍在 200 mW/m^2 以下^[11,22-23], 最高可达约 3000 mW/m^2 ^[9,24]。菌株SE6具有胞外电子传递能

力, 接种其运行的MFCs能够产生一定的电能。本研究获得的最大功率密度为 44 mW/m^2 , 纯菌反应器在产电性能上的差距可能是由以下两方面的原因造成的: 一方面是产电菌自身分解有机物和电子传递能力的差异。不同菌种对有机底物的喜好和分解能力存在差异^[25], 有机底物不能被完全降解会使得MFCs的库伦效率偏低^[26]。而反应器产电能力表现的关键因素还是阳极的电子传递步骤。Reguera等^[27]发现阳极表面生物膜厚度与MFCs产电能力有着正相关关系。若以胞外电子传递方式来将产电菌类别进行划分, 采用间接电子传递^[28]和直接电子传递中膜结合物质传递^[29]的产电菌只能在阳极表面形成单层生物膜, 而采用直接电子传递中纳米导线传递^[30]的产电菌可在阳极表面形成多层的生物膜^[8], 因此接种不同胞外电子传递方式的产电菌运行的MFCs会在产电能力上出现差距。另一方面, 反应器的构型对其产电能力的提升也发挥着重要作用。电极的面积、材料、催化剂修饰, 电极室的大小, 有机底物的浓度和不同材料隔膜的使用等因素^[31-33]都会对反应器的内阻产生影响, 进而体现在产电性能上。本研究也对接种SE6运行的MFCs反应器的内阻进行了测定, 结果显示其欧姆内阻和阴极内阻很小, 阳极内阻较大。对阳极进行改性或表面催化剂修饰可能能够有效提升反应器的产电性能。

本研究对MFCs反应器体系进行了循环伏安扫描, 结果显示体系中明显存在电化学活性物质。通过扫速和其对应的峰值电流关系可确定电化学活性物质的特性, 氧化电流峰值与扫描速度有着很好的线性相关关系, 表明体系中电化学活性物质的特性是基于与电极直接接触的氧化还原作用^[21]。CV结果显示氧化峰产生的电势位点为 -0.34 V , Park等^[34]对梭菌属的另一纯菌株丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)的CV扫描结果显示位于约 -0.31 V 出现

明显的氧化峰, 此外, *Shewanella oneidensis*在CV扫描中氧化峰出现电位约为 -0.36 V ^[21], 菌株SE6与上述菌种的氧化峰电位相近, 而这2种菌均在研究中被证明其电化学活性物质为膜结合细胞色素, 综上可推测菌株SE6的胞外电子传递机制可能为依靠细胞色素的直接电子传递。扫描电镜观察到阳极表面有细菌状微生物附着, 为菌株SE6的产电能力提供了直观证据, 其细胞膜外没有观察到类似纳米导线的衍生结构, 可基本排除另一种依靠纳米导线的直接电子传递机制, 进一步佐证了SE6依靠细胞色素进行电子传递的猜测。

参考文献

- [1] Lovley DR. Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(3): 327-332.
- [2] Ishii S, Shimoyama T, Hotta Y, Watanabe K. Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 6.
- [3] da Rosa AC. Diversity and function of the microbial community on anodes of sediment microbial fuel cells fueled by root exudates. Doctor Dissertation of Philipps-Universität, 2010.
- [4] Huang DY, Zhou SG, Chen Q, Zhao B, Yuan Y, Zhuang L. Enhanced anaerobic degradation of organic pollutants in a soil microbial fuel cell. *Chemical Engineering Journal*, 2011, 172(2/3): 647-653.
- [5] Wang X, Cai Z, Zhou QX, Zhang ZN, Chen CH. Bioelectrochemical stimulation of petroleum hydrocarbon degradation in saline soil using U-tube microbial fuel cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(2): 426-433.
- [6] Jiang YB, Deng H, Sun DM, Zhong WH. Electrical signals generated by soil microorganisms in microbial fuel cells respond linearly to soil Cd^{2+} pollution. *Geoderma*, 2015, (255/256): 35-41.
- [7] Deng H, Wu YC, Zhang F, Huang ZC, Chen Z, Xu HJ, Zhao F. Factors affecting the performance of single-chamber soil microbial fuel cells for power generation. *Pedosphere*, 2014,

- 24(3): 330–338.
- [8] Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(5): 375–381.
- [9] Ringeisen BR, Henderson E, Wu PK, Pietron J, Ray R, Little B, Biffinger JC, Jones-Meehan JM. High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(8): 2629–2634.
- [10] Bond DR, Lovley DR. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1548–1555.
- [11] Chaudhuri SK, Lovley DR. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(10): 1229–1232.
- [12] Nimje VR, Chen CY, Chen CC, Jean JS, Reddy AS, Fan CW, Pan KY, Liu HT, Chen JL. Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. *Journal of Power Sources*, 2009, 190(2): 258–263.
- [13] Li Y, Sun YM, Kong XY, Li LH, Li D, Yuan ZH. Isolation and characterization of exoelectrogenic bacterium *Citrobacter freundii* LY-3 from microbial fuel cell. *Acta Energetica Sinica*, 2012, 33(11): 1968–1972. (in Chinese)
李颖, 孙永明, 孔晓英, 李连华, 李东, 袁振宏. 微生物燃料电池中一株产电菌 *Citrobacter freundii* 的分离及特性研究. 太阳能学报, 2012, 33(11): 1968–1972.
- [14] Li M, Liang X, Luo JM, Zhou MH. Isolation of an exoelectrogen *Kocuria rhizophila* from the anodic biofilm and optimization of its power generation. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(10): 3078–3087. DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2014.1038. (in Chinese)
李明, 梁湘, 骆健美, 周明华. 一株产电菌嗜根考克氏菌 (*Kocuria rhizophila*) 的分离及其产电性能优化. 环境科学学报, 2015, 35(10): 3078–3087. DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2014.1038.
- [15] Peng Y, Zhu NW, Nie HY. Isolation of an electrogen *Klebsiella* sp. Z6 from anodic biofilm and its electricity-generating characteristics. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(4): 1035–1042. (in Chinese)
彭月, 朱能武, 聂红燕. 一株克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.) Z6 的分离及其产电特性研究. 环境科学学报, 2013, 33(4): 1035–1042.
- [16] Liu SP, Wu J, Wu K, Yu ZM, Wu Y. Isolation and characterization of an electricity-producing strain *Nitratireductor* sp. WJ5–4. *Microbiology China*, 2015, 42(4): 665–673. (in Chinese)
刘盛萍, 吴晶, 吴克, 俞志敏, 巫杨. 一株产电菌 *Nitratireductor* sp. WJ5–4 的筛选及产电分析. 微生物学通报, 2015, 42(4): 665–673.
- [17] Lovley DR, Phillips EJP. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(6): 1472–1480.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 66–127.
- [19] Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 625–630.
- [20] Feng YJ, Li H, Wang X, He WH, Liu YL. Isolation and evaluation of exoelectrogenic bacteria in a baffled air-cathode microbial fuel cell. *Environmental Science*, 2010, 31(11): 2804–2810. (in Chinese)
冯玉杰, 李贺, 王鑫, 何伟华, 刘尧兰. 电化学产电菌的分离及性能评价. 环境科学, 2010, 31(11): 2804–2810.
- [21] Liu T, Yu YY, Deng XP, Ng CK, Cao B, Wang JY, Rice SA, Kjelleberg S, Song H. Enhanced *Shewanella* biofilm promotes bioelectricity generation. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(10): 2051–2059. DOI: 10.1002/bit.25624.
- [22] Holmes DE, Bond DR, Lovley DR. Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 1234–1237.
- [23] Bond DR, Lovley DR. Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 2186–2189.
- [24] Xing DF, Zuo Y, Cheng SA, Regan JM, Logan BE. Electricity generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX-1. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(11): 4146–4151.
- [25] Chae KJ, Choi MJ, Lee JW, Kim KY, Kim IS. Effect of

- different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 2009, 100(14): 3518–3525.
- [26] Lee HS, Parameswaran P, Kato-Marcus A, Torres CI, Rittmann BE. Evaluation of energy-conversion efficiencies in microbial fuel cells(MFCs) utilizing fermentable and non-fermentable substrates. *Water Research*, 2008, 42(6/7): 1501–1510.
- [27] Reguera G, Nevin KP, Nicoll JS, Covalla SF, Woodard TL, Lovley DR. Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(11): 7345–7348.
- [28] Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, Coursolle D, Gralnick JA, Bond DR. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(10): 3968–3973.
- [29] Bond DR, Holmes DE, Tender LM, Lovley DR. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science*, 2002, 295(5554): 483–485.
- [30] Gorby YA, Yanina S, McLean JS, Rosso KM, Moyles D, Dohnalkova A, Beveridge TJ, Chang IS, Kim BH, Kim KS, Culley DE, Reed SB, Romine MF, Saffarini DA, Hill EA, Shi L, Elias DA, Kennedy DW, Pinchuk G, Watanabe K, Ishii S, Logan B, Neals KH, Fredrickson JK. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(30): 11358–11363.
- [31] Chen MQ, Cheng FL, Guo WX, Zhang M, Liu P. Latest research progress of anode materials in microbial fuel cells. *Chinese Journal of Power Sources*, 2015, 39(4): 857–860. (in Chinese)
陈妹琼, 程发良, 郭文显, 张敏, 柳鹏. 微生物燃料电池阳极材料的最新研究进展. *电源技术*, 2015, 39(4): 857–860.
- [32] Zhou J, Wang XJ. Research progress in anode modification of microbial fuel cells. *Journal of Chemical Industry & Engineering*, 2014, 35(1): 56–60. (in Chinese)
周俊, 王秀军. 微生物燃料电池阳极改性修饰最新研究进展. *化学工业与工程技术*, 2014, 35(1): 56–60.
- [33] Xie S, Ouyang K, Li LH. Researches of membranes as the separators for microbial fuel cells. *Technology of Water Treatment*, 2011, 37(8): 15–18. (in Chinese)
谢珊, 欧阳科, 黎丽华. 膜在微生物燃料电池分隔材料中应用的研究进展. *水处理技术*, 2011, 37(8): 15–18.
- [34] Park HS, Kim BH, Kim HS, Kim HJ, Kim GT, Kim M, Chang IS, Park YK, Chang HI. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe*, 2001, 7(6): 297–306.

Characterization of a novel electrogenic *Clostridium sporogenes* isolated from forest soil

Yunbin Jiang¹, Huan Deng¹, Xinqi Huang¹, Yiping Zhang², Wenhui Zhong^{1*}

¹ Jiangsu Key Laboratory of Materials Cycling and Pollution Control, School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, Jiangsu Province, China

² Center for Analysis and Testing, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To identify and characterize an electrogenic bacterium SE6 isolated from forest soil. [Methods] Pure culture of the strain was obtained by anaerobic incubation. It was identified based on morphology, physiology and biochemistry, and 16S rRNA gene sequencing analysis. The strain was inoculated in a dual chamber microbial fuel cell with LB medium as anolyte and potassium ferricyanide as catholyte, to characterize its electrogenic ability. Electrochemical impedance spectroscopy was conducted to analyze internal resistances of the MFCs. Extracellular electron transfer mechanism of the strain was explored by cyclic voltammetry. Biofilm on the anode surface was observed using scanning electron microscope. [Results] The 16S rRNA gene sequence of strain SE6 was 100% phylogenetically related to *Clostridium sporogenes*. Their morphological, physiological and biochemical characteristics were identical. The maximum power density of the MFCs inoculated with SE6 was 44.42 mW/m². The anodic resistance, cathodic resistance and ohmic resistance were (1488±193) Ω/cm², (0.92±0.01) Ω/cm² and (20.69±1.76) Ω/cm², respectively. Cyclic voltammograms indicated the existence of an electrochemically active substance, of which the peak currents were linearly correlated with the scanning rates. The 1 μm-rodshaped bacteria densely attaching to the anode surface were observed in scanning electron micrographs. [Conclusion] A novel electrogenic strain of *C. sporogenes* was isolated from forest soil, which transfers electrons extracellularly to electrode with high resistance.

Keywords: *Clostridium sporogenes*, microbial fuel cells, cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, scanning electron microscope

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (41301260), the Natural Science Foundation of the Higher Education Institutions of Jiangsu Province (13KJB610009), the Outstanding Innovation Team in Colleges and Universities in Jiangsu Province, and by the Research Innovation Program for College Graduates of Jiangsu Province (KYZZ150217)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-85891352; E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn

Received: 27 July 2015; Revised: 13 October 2015; Published online: 5 January 2016