



异化铁还原梭菌 *Clostridium bifermentans* EZ-1 产氢与电化学特性

张月超^{1,2}, 肖雷雷¹, 王欧美^{3*}, 刘芳华^{1*}

¹ 中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带生物学与生物资源利用所重点实验室, 山东 烟台 264003

² 中国科学院大学, 北京 100049

³ 滨州医学院, 山东 烟台 264003

摘要:【目的】从黄河三角洲滨海湿地土壤中获得同时具备产氢、产电以及异化铁还原能力的多功能菌株。【方法】通过厌氧分离技术从黄河三角洲土壤中分离得到纯菌株, 16S rRNA 基因测序后与数据库已有序列进行比对。利用革兰氏染色及扫描电镜观察菌株形态, 并用气相色谱(gas chromatography, GC)和液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测其生理代谢底物和产物。通过添加不同形态铁氧化物检测该菌株 Fe(III)的还原能力。构建微生物燃料电池(Microbial fuel cells, MFCs)检测该菌株的电化学活性。【结果】16S rRNA 基因序列比对发现其与双酶梭菌 *Clostridium bifermentans* 的相似性达 97.99%。革兰氏染色结果显示为阳性菌。能够利用葡萄糖为底物发酵产生氢气、二氧化碳、乙酸和丁酸。Fe(III)还原能力检测发现, 其不仅可以还原柠檬酸铁($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$)中可溶性的 Fe(III), 还可以还原无定形铁水铁矿(FeOOH)和晶型纳米磁铁矿(Fe_3O_4)中的 Fe(III)。此外, 经 MFCs 检测发现, 该菌具有电化学活性, 最大电流输出密度可达 6.5 mA/m^2 , 且在 0.15 V 位置存在氧化峰。【结论】本研究从土壤中成功分离得到了一株同时具有产氢、产电以及异化铁还原能力的多功能梭菌菌株, 保藏并命名为 *Clostridium bifermentans* EZ-1。

关键词: 滨海湿地, 双酶梭菌, 产电, 产氢, 异化铁还原

化石原料的燃烧不仅导致全球气候变暖, 同时还对大气造成污染。氢气作为一种清洁能源, 具有较高的热值($\Delta H = -285.8 \text{ kJ/mol}$), 是一种潜在的化石能源替代品。目前, 氢气的制备主要通过电解和烃类裂解转化等高耗能的生产工艺, 生物制氢因其能耗低及污染小等特点受到广泛关注^[1]。

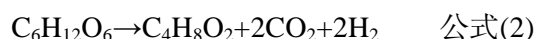
基金项目: 国家自然科学基金(41573071, 41371257, 91751112, 41703075); 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDJ-SSWDQC015); 山东省自然科学基金(ZR2016DQ12); “泰山学者”青年专家计划(tsqn 20161054)

*通信作者。刘芳华, Tel/Fax: +86-535-2109268, E-mail: fhliu@yic.ac.cn; 王欧美, Tel: +86-535-6913374, E-mail: omwang@aliyun.com

收稿日期: 2017-10-17; 修回日期: 2017-11-22; 网络出版日期: 2018-02-08

生物制氢途径可分为光解和发酵两大途径, 发酵途径根据是否需要光可划分为光发酵和暗发酵两类^[2]。暗发酵相比光发酵不需要光源, 节约空间降低成本, 具有较高的应用前景。已报道的暗发酵产氢微生物主要有梭菌属 *Clostridium*^[3]、肠杆菌属 *Enterobacter*^[4]和芽孢杆菌属 *Bacillus*^[5]等, 其中 *Clostridium* 因其分布广泛、底物多样、产氢量高等特点受到广泛关注和研究。

Clostridium 可以利用多种糖作为底物发酵产氢, 同时产生乙酸、丁酸和乙醇等发酵副产物, 根据副产物的类型, 可以将利用葡萄糖产氢途径分为乙酸发酵型和丁酸发酵型^[6], 见公式(1)和公式(2)。



理论上, 1 mol 葡萄糖通过产乙酸发酵途径最多可产 4 mol 氢气, 通过产丁酸发酵途径最多产生 2 mol 氢气, 实际上在利用葡萄糖产氢过程中两种产氢途径往往同时存在, 最大产氢量小于 4 mol。

随着对 *Clostridium* 的深入研究发现其不仅具有发酵产氢能力, 同时还具有异化铁还原能力。早在 20 世纪 50 年代, Bromfield 等^[7]就发现在土壤中共存的 *Clostridium* spp. 具有异化铁还原能力。目前已分离得到了多株具有异化铁还原能力的梭菌, 如 *Clostridium beijerinckii*^[8]、*Clostridium butyricum*^[9]和 *Clostridium sporogenes*^[10]等。研究已证实 *Clostridium butyricum* 是典型的产氢模式菌株, 2001 年 Park 等^[9]从微生物燃料电池中分离得到的 *Clostridium butyricum* EG3 同时具有电化学生活性和还原无定形水铁矿中 Fe(III)的能力。然而, 自然环境中是否存在多功能(产氢、产电和异化铁还原)梭菌仍不清楚。

异化铁还原菌(dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms)是指在代谢过程中以胞外 Fe(III)为电子受体, 将 Fe(III)还原为 Fe(II)的一类微生物, 在此过程中, 胞外含 Fe(III)矿物作为电子受体接收来自胞内代谢产生的电子从而完成呼吸过程。根据胞外电子传递过程中是否产生用于微生物生命活动需要的能量, 异化铁还原菌可分为呼吸型异化铁还原菌(respirative dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms)和发酵型异化铁还原菌(fermentative dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms), 前者是直接利用 Fe(III)作为电子受体产生能量; 而后者是微生物发酵有机质, 期间产生的部分电子传递给 Fe(III), 因此由此发生铁还原, 并不是能量的来源^[11]。

铁是地球表面含量最丰富的元素之一, 多以氧化物的形式广泛存在于土壤、河流与海洋沉积物中。根据结晶程度的不同, 铁氧化物矿物可以分为无定形铁矿(水铁矿)和晶型铁矿(赤铁矿、针铁矿和磁铁矿)^[12], 且在自然界中, 晶型铁矿的丰度往往高于无定形铁矿, 约是无定形铁矿的 2–10 倍^[13]。异化铁还原菌不仅在铁的生物地球化学循环过程中扮演着重要的角色, 还在生物原位修复和基于微生物燃料电池技术进行电能回收等领域发挥着重要功能。目前的研究主要集中在呼吸型的异化铁还原菌, 尤其是 *Geobacter sulfurreducens*^[14]和 *Shewanella oneidensis*^[15]。相比呼吸型的异化铁还原菌, 发酵型异化铁还原菌的研究才刚刚起步。

早在本世纪初, Park 等^[9]从微生物燃料电池中分离得到一株革兰氏阳性梭菌 *Clostridium butyricum* EG3, 其具有电化学生活性且能够还原无定形水铁矿中的 Fe(III)。无论如何, 迄今为止鲜

有新的同时兼具电化学活性和还原 Fe(III)的梭菌被分离到,这也导致革兰氏阳性菌胞外电子传递机制的研究相比革兰氏阴性菌要滞后很多。湿地的厌氧环境和干湿交替条件有利于铁氧化物的累积富集,黄河三角洲滨海湿地作为典型的湿地生态系统,铁含量约是世界土壤平均值的 2 倍^[16]。本研究中,我们分离得到了一株革兰氏阳性菌 *Clostridium bifermentans* EZ-1。与以往的菌株相比,该菌株同时具有产氢、产电和异化铁能力,这为研究生物产氢和革兰氏阳性菌胞外电子传递机制提供了新的选择。

1 材料和方法

1.1 采样

土壤样品取自黄河三角洲滨海湿地 (37°45'46"N, 118°58'40"E)^[17]表层土(0–10 cm),放入无菌密封袋中运回实验室,分别存储在 4 °C 与 -80 °C 备用。

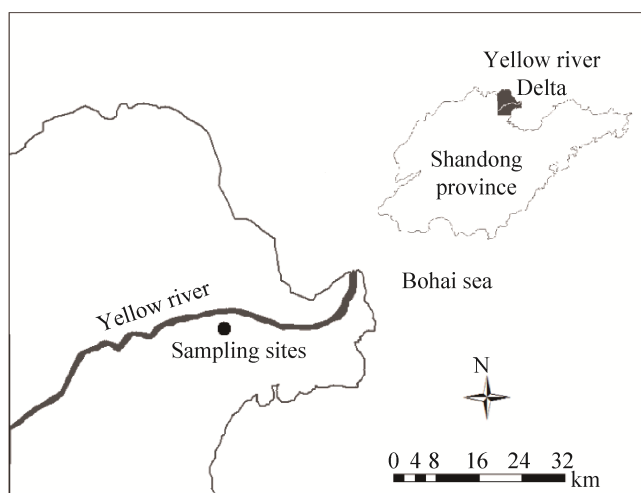


图 1. 黄河三角洲采样位点示意图^[17]

Figure 1. The sampling location in Yellow River Delta^[17].

1.2 富集培养

孵育:取 10 g 表层土添加到盛有 100 mL 灭菌除氧无菌水的厌氧瓶中,将厌氧瓶放在 30 °C 培养箱中黑暗条件下孵育 1 周。转接:用无菌脱氧注射器取 5 mL 悬浊液转接到装有 80 mL 灭菌除氧的 PYG 培养基中,继续放在 30 °C 培养箱中孵育 1 周。培养基 PYG: Peptone 5.0 g/L, Tryptone 5.0 g/L, Yeast extract 10.0 g/L, Glucose 4.0 g/L, CaCl₂ 0.008 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.016 g/L, K₂HPO₄ 0.04 g/L, KH₂SO₄ 0.04 g/L, NaHCO₃ 0.04 g/L, NaCl 5 g/L, L-cysteine 0.25 g/L; pH 6.3±0.2。

1.3 分离鉴定

用无菌脱氧注射器取 1 mL 二次孵育的悬浊液注射到装有 9 mL 灭菌除氧无菌水厌氧管中,依次按照 10¹–10⁶ 倍进行梯度稀释。在厌氧操作箱中(涉及无菌操作均在厌氧操作箱内进行)用灭菌过的接种环蘸取稀释 10⁶ 倍的悬浊液在事先倒好的 PYG 固体培养基上划线。培养:将划好的平板放入厌氧带中密封后于 30 °C 培养箱中暗培养 48 h。挑选不同形态单一菌落接入 20 μL 无菌水中,2 μL 用于 PCR,剩余的转接到装有 5 mL 灭菌除氧 PYG 液体培养基的厌氧管中 30 °C 黑暗培养。PCR 反应体系:2 μL buffer 缓冲液;2 μL dNTP (2.5 mol/L);0.5 μL Taq 酶(5 U/μL);0.5 μL Ba907R (20 μmol/L, 5'-AGA GTTTGATCCTGG CTCAG-3')反向引物;0.5 μL Ba27F (20 μmol/L, 5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3')正向引物;2 μL 单菌落悬浊液模板;2.5 μL 无菌水。PCR 程序:95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min, 循环 30 次。将得到的 PCR 产物进行 16S rRNA 基因测序。将序列结果在 Greengens 上进行序列比对。16S rRNA 基因测序结果提交到 NCBI 数据

库中, 序列号为 MF510818。系统进化分析通过 MEGA 6.0 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。菌株保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号: CGMCC 13913。

1.4 形态观察

1.4.1 革兰氏染色: 取 0.05 mL 菌悬液滴加到载玻片上, 涂匀, 烤干; 滴加 1 滴草酸铵结晶紫液, 染 1 min 后水洗; 滴加 1 滴碘液, 染 1 min 后水洗; 95%乙醇脱色 20 s; 滴加 1 滴蕃红复染 3 min 后水洗; 光学显微镜镜下观察。

1.4.2 扫描电镜: 取 5 mL 菌悬液于离心管中, 3000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 添加 5 mL PBS 吹打悬浮, 3000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复 1 次; 添加 5 mL 2.5%戊二醛, 吹打悬浮, 固定, 4 °C 过夜; 30%、50%、70%、90%和 100%×2 乙醇依次梯度脱水; 第二次 100%乙醇脱水离心后保留 1 mL, 吹打悬浮菌团; 取 0.05 mL 菌悬液滴加到盖玻片上于干燥皿中晾干; 喷镀金属膜; 高分辨冷场发射扫描电镜(HITACHI S-4800)观察。

1.5 生长及代谢物检测

1.5.1 生长曲线: 以葡萄糖为底物, 接种量 1%, 30 °C 暗培养, 每 2 h 取 1 次样, 用紫外分光光度计(600 nm)测吸光值。

1.5.2 代谢底物及产物检测: 配置 PY 培养基(无底物葡萄糖), 血清瓶(25 mL)分装, 每瓶 10 mL; 分别添加葡萄糖、蔗糖、木糖、纤维二糖和纤维素作为底物, 终浓度均为 4 g/L; 30 °C, 黑暗条件下培养, 每 2 h 取 1 次样, 共 9 次(代谢底物检测只 18 h 取 1 次), 进行气相色谱和液相色谱

检测。

气相色谱检测: 用气相色谱进样针取 0.2 mL 血清瓶顶部气体进行气相色谱(安捷伦 7820)检测。检测条件: 检测器 TCD, 温度 250 °C; 进样口温度 80 °C; 柱箱温度 80 °C; 载气为氮气, 流速 10 mL/min。液相色谱检测: 取 0.1 mL 菌悬液于 0.9 mL 去离子水中稀释 10 倍, 0.22 μm 滤膜过滤, 液相色谱(安捷伦 1260)检测。检测条件: 检测柱 HPLC-Hi-Plex H, 300×7.7 mm, 柱温 60 °C; 检测器为示差检测器(RID), 温度 55 °C; 流动相为 5 mmol/L 硫酸, 流速为 0.6 mL/min。

1.6 异化铁还原能力检测

1.6.1 无定形水铁矿: 实验室合成, 参照 Lovley 实验室方法^[18]。合成方法如下: 称取 162.2 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 400 mL 去离子水, 加转子搅拌至溶解; 用 10 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.0; 将溶液分装至 250 mL 的离心瓶中; 离心洗涤, 用低速离心机 3500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用去离子水将沉淀重新悬浮, 再离心 10 min, 重复此操作进行清洗, 直至离心后上清液变黄色, 此清洗次数约为 4–5 次; 洗至上清液变黄后, 弃掉上清, 收集无定形铁, 加入 400 mL 去离子水溶解后得到浓度约为 1 mol/L 的无定形铁; 置于黑暗条件下保存, 测定浓度后使用。

1.6.2 晶型磁铁矿: 实验室合成, 参照 Young 等^[19]的合成方法: 将 0.85 mL 12.1 mol/L 的 HCl 添加到除氧的去离子水中; 称取 5.2 g FeCl_3 和 2.0 g FeCl_2 依次溶于配好的 HCl 溶液中; 然后逐滴加入到 250 mL 1.5 mol/L 的 NaOH 溶液中, 边加边充分搅拌; 在产生的黑色沉淀物附近添加一块磁铁将沉淀物吸附与溶液分开, 将上清倒掉; 加入除氧去

离子水清洗后 4000 r/min 离心去上清, 重复 3 次; 加入 500 mL 0.01 mol/L HCl 溶液中和纳米颗粒上的阴离子; 4000 r/min 离心去上清, 加入除氧去离子水将阳离子纳米颗粒悬浮, 最终形成明显的阳离子胶体。

将柠檬酸铁、水铁矿和磁铁矿分别添加到无菌除氧 10 mL PYG 培养基, 使其终浓度分别达到 40 mmol/L 柠檬酸铁, 2.5、5.0 和 10.0 mmol/L 水铁矿和 5.0、10.0 mmol/L 和 20 mmol/L 磁铁矿, 于 30 °C 培养箱中黑暗培养 24 h。菲啰嗪显色法检测培养液中 Fe(II) 含量, 具体方法如下: 将 0.1 mL 样品加入到 0.9 mL 的 0.5 mol/L 的盐酸中, 室温下静置 24 h, 8000 r/min 离心 5 min; 取上清 0.1 mL, 加入到 1.9 mL 200 mmol/L HEPES 缓冲液配制的 0.1% 菲啰嗪溶液中, 反应 5 min 后, 紫外分光光度计 562 nm 波长下测定吸光度。最后根据标准曲线计算 Fe(II) 浓度。

1.7 电化学活性检测

构建“H”型双室 MFCs。将灭菌后的 MFCs 在无菌操作台内进行组装, 阴阳两室之间用质子交换膜隔开, 以钛丝连接的石墨片(30 mm×25 mm×3 mm) 作为电极, 外电路连接一个 1000 Ω 的外电阻。阳极室注入 100 mL 无菌 PYG 培养基, 阴极室添加 100 mL 铁氰化钾溶液。阳极室除氧, 抽真空 10 min, 冲氮气 30 s; 抽真空 5 min, 冲氮气 30 s; 抽真空 1 min, 冲氮气 30 s。接种 1% EZ-1 菌液。将 MFCs 连接到数据采集系统采集电压信号, ExcellINX 软件每 60 s 记录 1 次电压信号, 连续采集 24 h。采用循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)测试 MFCs 体系的氧化还原特性, 在运行结束后的 MFCs 开路状态下加入参比电极(Ag/AgCl), 以阳

极为工作电极, 铂电极为对电极, 构建三电极体系。用 660 E 电化学工作站以 10 mV/s 的扫描速度在 -0.3~0.4 V 的范围内进行 CV 扫描。

2 结果和分析

2.1 菌株分离鉴定

为了确认所分离菌株的分类地位, 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 1227 bp。将测得序列通过 Blast 比对, 选取相似性较高的序列, 以及典型的产氢、产电和异化铁还原菌的 16S rRNA 基因序列, 构建系统发育树(图 2)。结果显示该菌株与 *C. bif fermentans* HT2 (DQ928211) 的同源性最高, 为 97.99%, 初步确认该菌株为 *C. bif fermentans*。

2.2 形态鉴定

经过 24 h 黑暗培养(30 °C), EZ-1 在 PYG 固体培养基(添加 2% 琼脂糖)上形成白色光滑圆形菌落(图 3-A)。革兰氏染色显示, 菌体呈紫色(图 3-B)。扫描电子显微镜检测, 菌株呈棒状, 长 2.5~3.5 μm (图 3-C、D)。

2.3 生长及代谢物分析

30 °C 进行黑暗培养, 接种量 1% 的 EZ-1 在 PYG 液体培养基中快速进入指数生长期, 延滞期小于 2 h, 随后到达平稳期, 最大 OD 值可达 4.5 (OD_{600}), 平稳期较短, 且迅速进入衰亡期(图 4-A)。葡萄糖(glucose)、蔗糖(sucrose)、木糖(xylose)、纤维二糖(cellobiose)和纤维素(cellulose)被作为底物进行发酵产氢测试, 结果只有葡萄糖可被利用产氢, 其他糖类均不能被 EZ-1 用来产氢, 产氢量同无任何底物添加的 PY 培养基对照类似(图 4-B)。

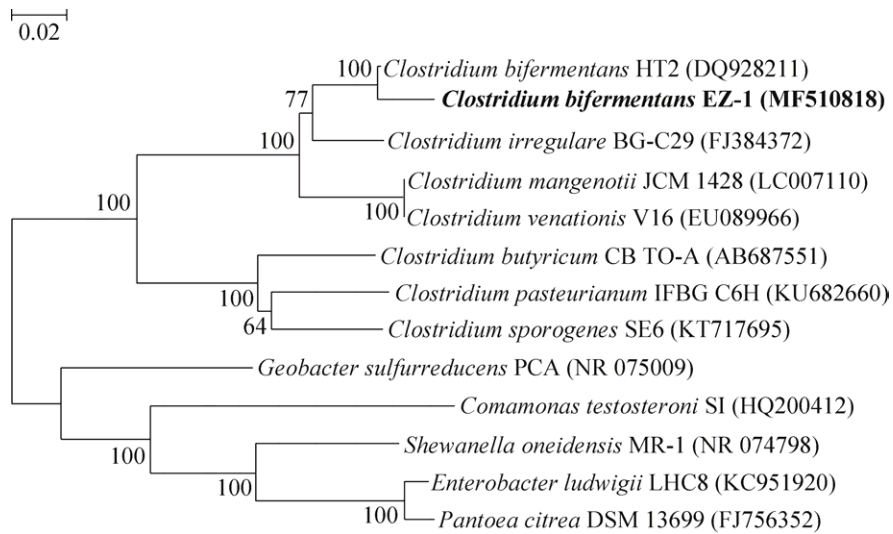


图 2. 基于 16S rRNA 基因构建的菌株 EZ-1 系统发育树

Figure 2. Neighbor-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene fragments (1227 bp) of strain EZ-1 and reference species. The isolated strain, *Clostridium bifermentans* EZ-1, was in boldface. Bootstrap values at nodes were calculated using 1000 replicates by Maximum Composite Likelihood model. Scale bar meant 0.02 substitutions per nucleotide sequence position.

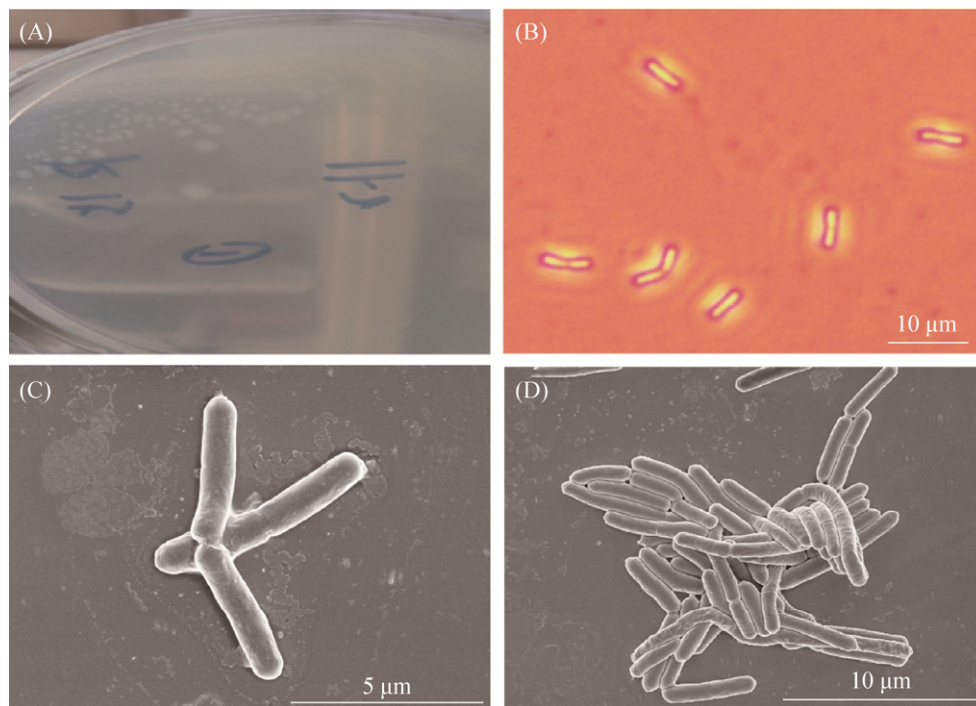


图 3. EZ-1 单菌落形态及扫描电镜图像

Figure 3. The images of signal colony (A), Gram staining (B) and scanning electronic microscopy (C, D) of *Clostridium bifermentans* EZ-1.

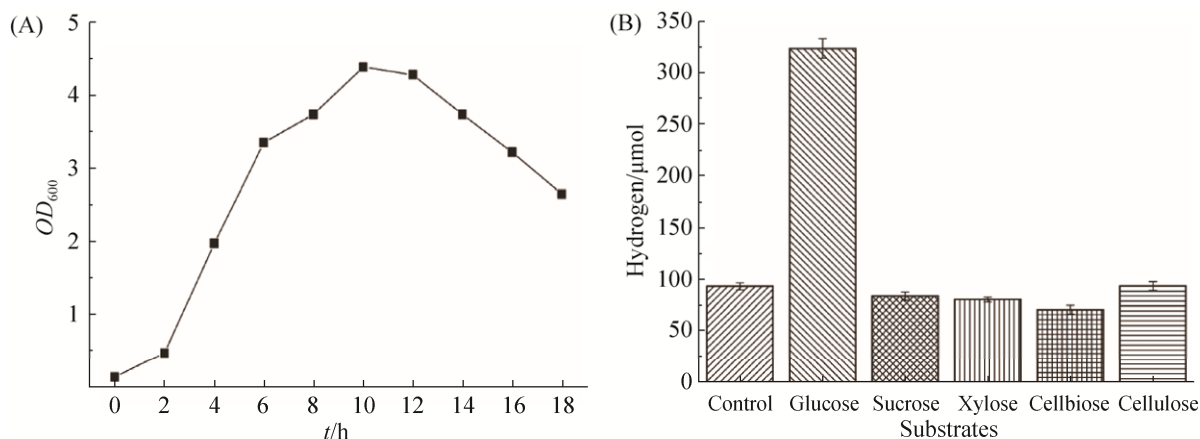


图 4. *Clostridium bifermentans* EZ-1 生长曲线(A)及底物利用情况(B)

Figure 4. The growth curve of *Clostridium bifermentans* EZ-1 (A) and the utilized substrates of the strain (B). Bars represented standard deviations of the means.

以葡萄糖作为发酵底物, 气相、液相色谱检测 EZ-1 的代谢产物。随着代谢底物葡萄糖的消耗, 代谢产物氢气、乙酸和丁酸的量逐渐积累, 18 h 时葡萄糖消耗约 75% (图 5)。1 mol 葡萄糖可生成 1.114 mol 氢气。乙酸的生成量约是丁酸生成量的 5 倍(图 5-C, D), 乙酸途径相比丁酸途径占优势, 说明 EZ-1 为乙酸型的发酵产氢菌。

2.4 异化铁还原能力

含有可溶性柠檬酸铁(40 mmol/L)的培养基呈现 Fe(III) 的颜色(棕黄色)(图 6-A 左), 接种 1% EZ-1, 暗培养 24 h 后, 培养基呈现 Fe(II) 颜色(浅绿色)(图 6-A 右), 此现象暗示柠檬酸铁中 Fe(III) 被还原。培养 24 h 后培养基中 Fe(II) 含量增加了约 20 mmol, 表明 EZ-1 可以还原可溶性柠檬酸铁中 Fe(III), 具备还原可溶性 Fe(III) 的能力。

除了可溶性的柠檬酸铁, 我们还对 EZ-1 还原不溶性无定形水铁矿和晶型磁铁矿中 Fe(III) 的还原能力进行了测试。将不同浓度无定形水铁矿和晶型磁铁矿添加到 PYG 培养基中, 用菲罗嗪显色法测定培养前后(24 h)培养基中 Fe(II) 含量, 随着水铁矿(2.5–10 mmol/L)和磁铁矿(5.0–10.0 mmol/L)

浓度的增加, 培养基中 Fe(II) 的累积量逐渐增加(图 6-B), 由此说明, EZ-1 可以还原无定形水铁矿和晶型磁铁矿中的 Fe(III)。当磁铁矿浓度增加到(23.4±0.2) mmol/L 时, Fe(II) 的累积量相比添加 10 mmol/L 磁铁矿并没有增加, 反而减少, 说明高浓度的磁铁矿抑制了 EZ-1 的 Fe(III) 还原能力。综上所述结果表明, EZ-1 不仅具有还原可溶性 Fe(III) 的能力, 同时还具有异化铁还原能力, 能够还原无定形水铁矿和晶型磁铁矿, 属于发酵型的异化铁还原菌。

2.5 电化学活性

我们对 EZ-1 的电化学活性进行了测试, 结果如图 7-A 所示, EZ-1 能够产生电流, 15 h 时电流密度达到最大值 6.3 mA/m²。此外, 电流产生趋势与 EZ-1 生长曲线相符(图 3-A)。24 h 后 MFC 产电结束, 添加 Ag/AgCl 作为参比电极, 铂电极作为对电极, 构建三电极体系对 MFC 体系进行循环伏安扫描分析, 检测体系中氧化还原特征。设置 10 mV/s 的扫速在 -0.3–0.4 V 的电势窗口下扫描, CV 结果显示, 在 0.15V 处存在明显的氧化峰(图 7-B)。由此进一步说明, EZ-1 具有电化学活性。

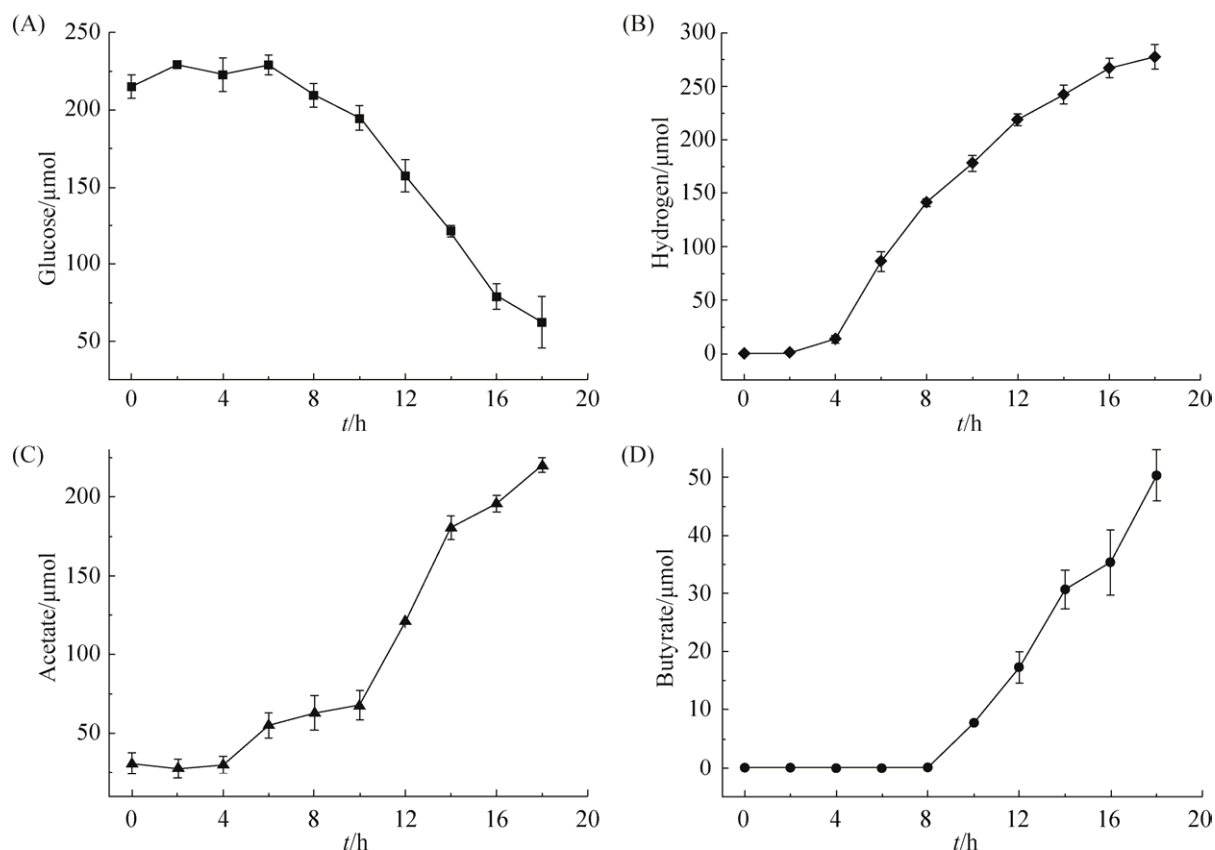


图 5. EZ-1 代谢底物葡萄糖(A)消耗及产物氢气(B)、乙酸(C)和丁酸(D)生成情况

Figure 5. The accumulation of hydrogen (B), acetate (C) and butyrate (D) with the consumption of glucose (A). Bars represented standard deviations of the means.

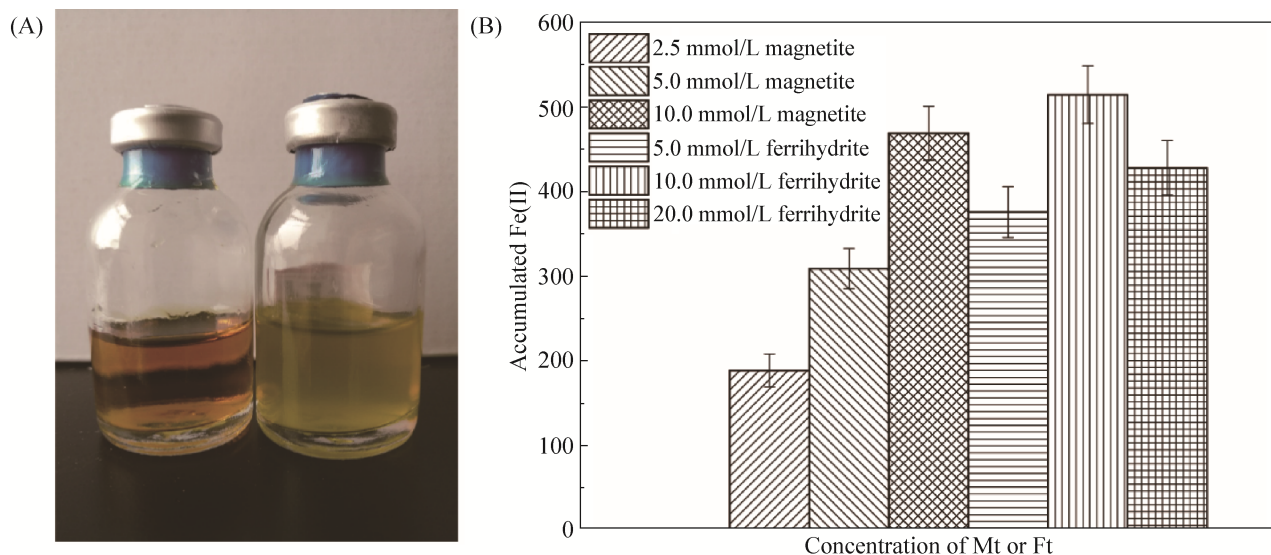


图 6. 柠檬酸铁被还原(A)及含水铁矿和磁铁矿培养基中 Fe(II)含量培养前后变化情况(B)

Figure 6. The Fe(III) of ferric citrate was reduced by *Clostridium bifermentans* EZ-1 (A); The accumulated Fe(II) of the medium supplied with ferrihydrite and magnetite (B). Bars represented standard deviations of the means. Mr: magnetite; Ft: ferrihydrite.

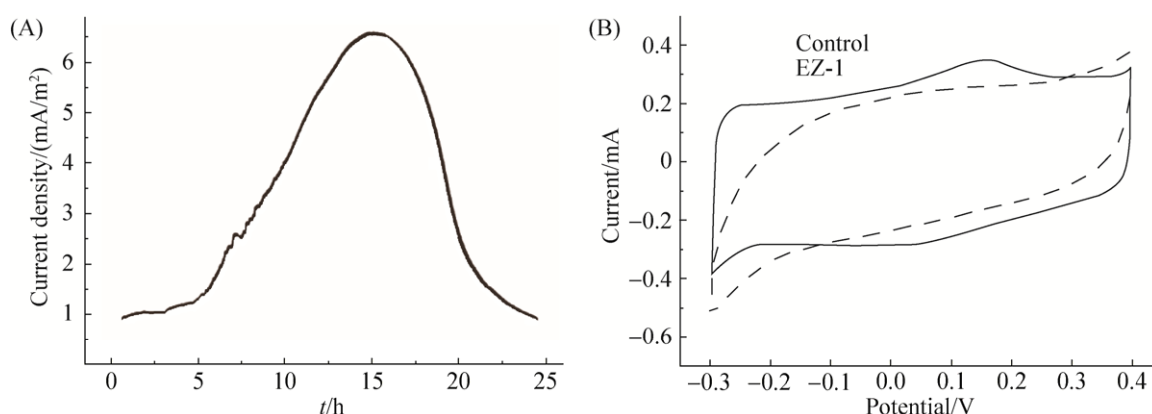


图 7. *Clostridium bifermentans* EZ-1 的电化学活性(A)及其氧化还原特征(B)

Figure 7. The electrochemical activity (A) and redox characters (B) of *Clostridium bifermentans* EZ-1.

3 讨论

Clostridium 广泛分布在森林、湿地、河口等自然环境中。黄河三角洲作为典型的滨海湿地, 是世界上陆-河-海交互作用最活跃的区域之一, 蕴含丰富的微生物资源^[20]。Xiao 等^[17]通过高通量数据分析发现, *Clostridium* 在黄河三角洲滨海湿地分布广泛, 同时 Zhang 等^[20]在对黄河三角洲滨海湿地铁还原菌多样性分析过程中发现, *Clostridium* 为黄河三角洲高盐度植物带(碱蓬、柽柳)原位土壤中的优势铁还原菌。在此基础上, 我们通过厌氧分离技术得到了一株多功能梭菌 EZ-1, 经生理及 16S rRNA 基因鉴定为 *C. bifermentans*。

我们通过代谢物检测分析发现, 在检测的几种代谢底物(葡萄糖、蔗糖、木糖、纤维二糖和纤维素)中 EZ-1 仅可以利用葡萄糖作为底物进行发酵代谢。EZ-1 能够以葡萄糖为底物产生氢气及短链挥发性脂肪酸乙酸、丁酸和二氧化碳, 1 mol 葡萄糖可以产生 1.114 mol 氢气, 同时产生 1.09 mol 的乙酸和 0.22 mol 的丁酸。近年来, *Clostridium* 已广泛用于生物制氢领域的研究, 例如 *C. butyricum*^[21]、*C. beijerinckii*^[22]、*C. tyrobutyricum*^[23] 和

C. pasteurianum^[24]等, 且越来越多的 *Clostridium* 被证实具有产氢能力。目前, 已知产氢梭菌利用每摩尔葡萄糖可生成氢气范围约为 0.81–3.35 mol^[6]。相比很多其他产氢菌株, EZ-1 利用葡萄糖产氢能力相对较弱, 但其具有速率优势, 氢气产生延滞期(<4 h)较短。

本研究中分离得到 EZ-1 经异化铁还原能力检测及电活性检测发现, 其不仅具有异化铁还原能力, 而且还具有电化学活性, 由此说明 EZ-1 可以进行胞外电子传递, 可以将胞内氧化有机物产生的电子传递到胞外铁氧化物(水铁矿和磁铁矿)和石墨电极表面。目前, 以 *Geobacter sulfurreducens* 和 *Shewanella oneidensis* 为代表的革兰氏阴性菌的胞外电子传递机制的研究已经取得了重大进展, 然而, 革兰氏阳性菌相关研究才刚刚起步。纤毛和细胞色素^[25]被认为是革兰氏阴性菌进行胞外电子传递的两大关键细胞组分, 且研究发现在部分具有胞外电子传递能力的革兰氏阳性菌中同样存在纤毛和细胞色素^[26]。本研究分离得到的 EZ-1 为革兰氏阳性菌且具有胞外电子传递能力, 但扫描电镜图像并未发现纤毛结构。李莹等^[27]的研究发现, 分离自界河沉积物经富集培养后得到的产

甲烷团聚体中, 革兰氏阳性菌 *Clostridium* spp. 和 *Methanosacina barkeri* 为优势菌株, 在以乙醇为底物共培养体系下能够互营产甲烷, 暗示 *Clostridium* spp. 和 *M. barkeri* 之间可能存在种间直接电子传递。EZ-1 同时具备产氢及胞外电子传递能力, EZ-1 的分离纯化为进一步阐明革兰氏阳性菌 *Clostridium* 与 *M. barkeri* 互营产甲烷机制提供了可能, 同时也可以作为研究革兰氏阳性菌胞外电子传递的候选模式菌株。

将具有胞外电子传递能力的 EZ-1 接种到 MFCs 中, 有电流产生, 最大电流密度可达 6.3 mA/m^2 。产电微生物主要通过两种方式将胞内产生的电子传递到胞外电极表面, 一种是直接接触, 通过具有导电性的纤毛和细胞色素蛋白与电极表面直接接触并形成生物膜, 然后将电子直接传递到电极表面; 另一种是间接接触, 产电微生物可以通过分泌电子穿梭体核黄素(flavin)等^[15]将产生的电子转运到电极表面形成电流。相比模式革兰氏阴性产电菌 *G. sulfurreducens* 的电流输出密度 60 mA/m^2 ^[28], EZ-1 相对较弱。相比革兰氏阴性菌, 革兰氏阳性菌具有较厚的细胞壁, 且其主要成分脂质和肽聚糖都不具有导电性; 此外, 革兰氏阳性菌细胞壁表面往往会形成荚膜, 荚膜的主要成分多糖也不具有导电性, 因此, 革兰氏阳性菌进行胞外电子传递要比革兰氏阴性菌困难的多, 这也是研究革兰氏阳性菌胞外电子传递相对困难的主要原因之一。选用的电极材料, 电极的比表面积, 电极室的大小, 以及有机底物的浓度和不同材料隔膜的使用等因素都会对 MFC 的内阻产生影响, 进而体现在产电性能上^[29-30]。优化 EZ-1 产电条件, 提高产电活性还有待进一步的研究。

目前越来越多的具有电活性的革兰氏阳性

Clostridium 被报道, Park 等^[9]在处理淀粉废水的 MFC 电池中分离得到一株革兰氏阳性 *Clostridium*, *C. butyricum* EG3, 循环伏安扫描发现该菌具有电活性。姜等^[10]自森林土壤中分离得到了一株革兰氏阳性 *Clostridium*, *C. sporogenes* SE6, 接种到 MFCs 中检测到该菌株可以产生电, 最大电压约 180 mV , 且循环伏安扫描显示存在氧化还原物质, 且氧化峰的位置(-0.34 V)与含有细胞色素的革兰氏阴性菌 *Shewanella oneidensis* 氧化峰位置(-0.36 V)相近, 暗示其氧化还原物质为细胞色素^[31]。Rodgers 等^[32]研究发现 *C. perfringens* 具有 IV 型菌毛, 而 IV 型菌毛被证实具有导电性能, 在与 *Geobacter* 之间的电子传递过程中发挥了重要功能。然而还没有相关文章报道 *C. perfringens* 具有电活性, 且 EZ-1、EG3 和 SE6 的扫描电镜图像中均未发现纤毛等细胞表面附着物。除了纤毛外, 细胞色素在胞外电子传递同样发挥着重要功能, *Clostridium* 含有铁氧还蛋白, 能在低氧化还原电位下作为电子载体还原细胞色素, 这也可能是梭菌能够进行胞外电子传递的原因之一。本研究对接种 EZ-1 且周期结束的 MFCs 反应器体系进行循环伏安扫描, 结果显示体系中明显存在电活性物质。CV 扫描结果显示, 在 0.15 V 处存在明显的氧化峰, 这与已报道的 *C. sporogenes* (-0.34 V)^[32]和 *C. butyricum* (-0.31 V)^[9]的氧化峰的位置相差较远, 暗示电活性 *Clostridium* 具有不同的氧化还原活性物质。

本研究通过厌氧分离技术, 分离得到了一株革兰氏阳性菌 *Clostridium bifermentans* EZ-1。与以往的菌株相比, 该菌株同时具有产氢、产电和异化铁能力, 这为研究生物产氢和革兰氏阳性菌胞外电子传递机制提供了新的选择。

参考文献

- [1] Nikolaidis P, Poullikkas A. A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017, 67: 597–611.
- [2] Maintinguer S, Fernandes B, Duarte I, Saavedra N, Adorno M, Varesche M. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33(16): 4309–4317.
- [3] Zhang JN, Li YH, Zheng HQ, Fan YT, Hou HW. Direct degradation of cellulosic biomass to bio-hydrogen from a newly isolated strain *Clostridium sartagoforme* FZ11. *Bioresource Technology*, 2015, 192: 60–67.
- [4] Sun LL, Huang AY, Gu WH, Ma YC, Zhu DL, Wang GC. Hydrogen production by *Enterobacter cloacae* isolated from sugar refinery sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2015, 40(3): 1402–1407.
- [5] Kumar P, Patel SKS, Lee JK, Kalia VC. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(8): 1543–1561.
- [6] Abdeshahian P, Al-Shorgani NKN, Salih NKM, Shukor H, Kadier A, Hamid AA, Kalil MS. The production of biohydrogen by a novel strain *Clostridium* sp. YM1 in dark fermentation process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014, 39(24): 12524–12531.
- [7] Bromfield SM. Reduction of ferric compounds by soil bacteria. *Journal of General Microbiology*, 1954, 11(1): 1–6.
- [8] Dobbin PS, Carter JP, San Juan CGS, von Hobe M, Powell AK, Richardson DJ. Dissimilatory Fe(III) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe(III) maltol enrichment. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 176(1): 131–138.
- [9] 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.
- [10] Jiang YB, Deng H, Huang XQ, Zhang YP, Zhong WH. Characterization of a novel electrogenic *Clostridium sporogenes* isolated from forest soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(5): 846–855. (in Chinese)
姜允斌, 邓欢, 黄新琦, 张银萍, 钟文辉. 一株土壤产电菌 *Clostridium sporogenes* 的分离及其产电性能. *微生物学报*, 2016, 56(5): 846–855.
- [11] Lovley DR. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(2): 259–287.
- [12] Kato S, Nakamura R, Kai F, Watanabe K, Hashimoto K. Respiratory interactions of soil bacteria with (semi)conductive iron-oxide minerals. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(12): 3114–3123.
- [13] Roden EE, Urrutia MM. Influence of biogenic Fe(II) on bacterial crystalline Fe(III) oxide reduction. *Geomicrobiology Journal*, 2002, 19(2): 209–251.
- [14] Caccavo F Jr, Lonergan DJ, Lovley DR, Davis M, Stolz JF, Mcinerney MJ. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied & Environmental Microbiology*, 1994, 60(10): 3752–3759.
- [15] Myers CR, Nealson KH. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science*, 1988, 240(4857): 1319–1321.
- [16] Yu JB, Chen XB, Mao PL, Wu CF, Dong HF, Shan K. The spatial differentiation of soil trace nutrient elements in new-born coastal wetland *Wetland Science*, 2010, 8(3): 213–219. (in Chinese)
于君宝, 陈小兵, 毛培利, 吴春发, 董洪芳, 单凯. 新生滨海湿地土壤微量营养元素空间分异特征. *湿地科学*, 2010, 8(3): 213–219.
- [17] Xiao LL, Xie BH, Liu JC, Zhang HX, Han GX, Wang OM, Liu FH. Stimulation of long-term ammonium nitrogen deposition on methanogenesis by Methanocellaceae in a coastal wetland. *Science of the Total Environment*, 2017, 595: 337–343.
- [18] Lovley DR, Phillips EJP. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Applied & Environmental Microbiology*, 1986, 51(4): 683–689.
- [19] Kang YS, Risbud S, Rabolt JF, Stroeve P. Synthesis and characterization of nanometer-size Fe₃O₄ and γ -Fe₂O₃ particles. *Chemistry of Materials*, 1996, 8(9): 2209–2211.
- [20] Zhang HX, Zheng SL, Ding JW, Wang OM, Liu FH. Spatial variation in bacterial community in natural wetland-river-sea ecosystems. *Journal of Basic Microbiology*, 2017, 57(6): 536–546.
- [21] Beckers L, Hiligsmann S, Lambert SD, Heinrichs B, Thonart

- P. Improving effect of metal and oxide nanoparticles encapsulated in porous silica on fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 109–117.
- [22] Masset J, Calusinska M, Hamilton C, Hilgsmann S, Joris B, Wilmotte A, Thonart P. Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 35.
- [23] Jiang L, Wu Q, Xu Q, Zhu LY, Huang H. Fermentative hydrogen production from Jerusalem artichoke by *Clostridium tyrobutyricum* expressing exo-inulinase gene. *Scientific Reports*, 2017, 7: 7940.
- [24] Hsieh PH, Lai YC, Chen KY, Hung CH. Explore the possible effect of TiO₂ and magnetic hematite nanoparticle addition on biohydrogen production by *Clostridium pasteurianum* based on gene expression measurements. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2016, 41(46): 21685–21691.
- [25] Summers ZM, Fogarty HE, Leang C, Franks AE, Malvankar NS, Lovley DR. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. *Science*, 2010, 330(6009): 1413–1415.
- [26] Wrighton KC, Thrash JC, Melnyk RA, Bigi JP, Byrne-Bailey KG, Remis JP, Schichnes D, Auer M, Chang CJ, Coates JD. Evidence for direct electron transfer by a gram-positive bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Applied & Environmental Microbiology*, 2011, 77(21): 7633–7639.
- [27] Li Y, Zheng SL, Zhang HX, Wang BC, Wang OM, Liu FH. Potential direct interspecies electron transfer (DIET) from *Clostridium* spp. to *Methanosarcina barkeri* in methanogenic isolates. *Microbiology China*, 2017, 44(3): 591–600. (in Chinese) 李莹, 郑世玲, 张洪霞, 王炳臣, 王欧美, 刘芳华. 产甲烷分离物中 *Clostridium* spp. 与 *Methanosarcina barkeri* 潜在的种间直接电子传递. *微生物学通报*, 2017, 44(3): 591–600.
- [28] Bond DR, Lovley DR. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1548–1555.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] Rodgers K, Arvidson CG, Melville S, Camilli A. Expression of a *Clostridium perfringens* type IV pilin by *Neisseria gonorrhoeae* mediates adherence to muscle cells. *Infection and Immunity*, 2011, 79(8): 3096–3105.

Hydrogen-producing and electrochemical properties of a dissimilatory Fe(III) reducer *Clostridium bifermentans* EZ-1

Yuechao Zhang^{1,2}, Leilei Xiao, Oumei Wang^{3*}, Fanghua Liu^{1*}

¹ Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong Province, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ Binzhou Medical University, Yantai 264003, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] To obtain and characterize a versatile strain isolated from the soil of Yellow River Delta. [Methods] The strain was isolated by anaerobic technologies and identified by sequencing the 16S rRNA gene. The morphology was depicted with Gram staining and scanning electron microscope. High performance liquid chromatography and gas chromatography were used to analyze the metabolic substrates and productions. Ferric citrate ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$), ferrihydrite (FeOOH) and magnetite (Fe_3O_4) were supplied to detect the capability of Fe(III) reduction of this strain. Microbial fuel cells were constructed with graphite as electrodes to test the electrochemical activity of this strain. [Results] Compared to *Clostridium bifermentans*, the similarity of 16S rRNA gene is 97.99%. It is a rod, Gram-positive bacterium, which can use glucose to produce hydrogen, carbon dioxide, acetate and butyrate. The Fe(III) reduction results showed that it could reduce soluble ferric citrate, amorphous ferrihydrite and crystal magnetite. Furthermore, the electrochemical activity was detected and the maximum current density peaked at 6.5 mA/m^2 . [Conclusion] In this work, a versatile strain which is capable of producing hydrogen, electricity and reducing iron oxide, was successfully isolated from the soil of Yellow River Delta named as *Clostridium bifermentans* EZ-1.

Keywords: coastal wetland, *Clostridium bifermentans*, producing electricity, hydrogen evolution, dissimilatory Fe(III)-reduction

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41573071, 41371257, 91751112, 41703075), by the Key Research Project of Frontier Science of Chinese Academy of Sciences (QYZDJ-SSW-DQC015); by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016DQ12) and by the Young Taishan Scholars Programme (tsqn 20161054)

*Corresponding author. Fanghua Liu, Tel/Fax: +86-535-2109268, E-mail: fhliu@yic.ac.cn; Oumei Wang, Tel: +86-535-6913374, E-mail: omwang@aliyun.com

Received: 17 October 2017; Revised: 22 November 2017; Published online: 8 February 2018

刘芳华, 博士, 中国科学院烟台海岸带研究所研究员。2009年获得中国科学院上海生命科学研究所微生物学博士学位。现任山东微生物学会理事, 中国微生物学会地质微生物专业委员会委员。2014年获中科院“百人计划”、2016年获“山东省杰青”及“泰山学者青年专家”计划资助, 从事“电微生物学”研究, 解析微生物及其与动、植物之间的共生机制。发现并证实了“电子驱动甲烷产生”新机制, 2017年7月正式被写入新版美国教科书 *Microbiology*。先后主持了水圈微生物重大研究计划培育项目和两项面上项目; 近年的科研成果以第一/通讯作者身份在 *Energy & Environmental Science* (IF=29.5), *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *ISME Journal*, *Environmental Science: Nano* 和 *Environmental Microbiology* 等国际高端学术刊物上发表 SCI 论文 33 篇, 单篇最高 SCI 引用 124 次。

