



## 研究报告

一株耐盐产电菌 *Shewanella algae* E-1 的分离及其产电特性分析黄亦馨<sup>1</sup> 李晓<sup>1</sup> 赵津莹<sup>1</sup> 李锋<sup>3</sup> 宋浩<sup>\*3</sup> 骆健美<sup>\*1,2</sup>

1 工业发酵微生物教育部重点实验室(天津科技大学) 天津市工业微生物重点实验室 天津市微生物代谢与发酵过程控制技术工程中心 天津科技大学生物工程学院 天津 300457

2 南开大学 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300110

3 系统生物工程教育部重点实验室 天津大学化工学院 天津 300071

**摘要:**【背景】产电微生物的种类和电化活性机制对微生物燃料电池的产电性能有着重要的影响。【目的】从海水中分离获得一株耐盐产电微生物, 研究其产电特性并鉴定种属信息。【方法】以取自南海的海水为接种液启动并运行阳极液中含有不同盐浓度的微生物燃料电池, 从富集的阳极生物膜上分离得到一株纯培养的微生物菌株, 命名为 E-1。通过接种于阳极液中添加不同盐浓度的微生物燃料电池中对其产电特性进行分析, 并利用形态学观察、Biolog 分析和 16S rRNA 基因序列比对相结合的方法进行种属鉴定。【结果】菌株 E-1 在无外源添加和外源添加 6.6% NaCl 条件下产生的功率密度分别为 51.69 mW/m<sup>2</sup> 和 26.56 mW/m<sup>2</sup>, 这与其良好的耐盐能力相关。菌株 E-1 被鉴定为海藻希瓦氏菌(*Shewanella algae*), 表现出多样的底物利用能力, 生长的温度范围为 25–40 °C, pH 范围为 5.0–10.0。【结论】这是首次对 *Shewanella algae* 种内微生物产电性能及其在微生物燃料电池中应用的报道, 丰富了产电微生物的多样性, 菌株 E-1 能够在较高盐浓度条件下表现出良好的产电性能, 为微生物燃料电池在海水资源化处理方面的应用提供新的实验材料。

**关键词:** 海藻希瓦氏菌, 微生物燃料电池, 产电性能, 耐盐能力, 产电微生物

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (21646017); The Open Fund of Ministry of Education Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Nankai University; Independent Innovation Fund of Tianjin University (0903065070)

**\*Corresponding authors:** E-mail: SONG Hao: hsong@tju.edu.cn; LUO Jian-Mei: luojianmei@tust.edu.cn

**Received:** 06-04-2019; **Accepted:** 06-08-2019; **Published online:** 17-10-2019

**基金项目:** 国家自然科学基金(21646017); 南开大学分子微生物学与技术教育部重点实验室开放课题; 天津大学自主创新基金(0903065070)

**\*通信作者:** E-mail: 宋浩: hsong@tju.edu.cn; 骆健美: luojianmei@tust.edu.cn

**收稿日期:** 2019-04-06; **接受日期:** 2019-08-06; **网络首发日期:** 2019-10-17

## Isolation and characterization of a salt-tolerant exoelectrogenic strain *Shewanella algae* E-1

HUANG Yi-Xin<sup>1</sup> LI Xiao<sup>1</sup> ZHAO Jin-Ying<sup>1</sup> LI Feng<sup>3</sup> SONG Hao<sup>\*3</sup>  
LUO Jian-Mei<sup>\*1,2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology (Tianjin University of Science & Technology), Ministry of Education Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin Microbial Metabolism and Fermentation Process Control Technology Engineering Center, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Ministry of Education Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Nankai University, Tianjin 300110, China

3 Key Laboratory of Systems Bioengineering (MOE), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300071, China

**Abstract:** [Background] The types and electrochemical activity mechanism of exoelectrogenic microorganisms have important influence on the electrogenic performance of microbial fuel cells. [Objective] A salt-tolerant exoelectrogenic strain was isolated from seawater, its exoelectrogenic characteristic was studied and the species information was identified. [Methods] A pure exoelectrogenic bacterium (designated as E-1) was isolated from the enriched anodic biofilm of microbial fuel cells (MFCs), where the seawater from the south sea in China was used as the inoculum and MFCs were operated in the anolytes without and with salt addition. The exoelectrogenic characteristic of the pure isolate strain E-1 was investigated by inoculating into MFCs containing different salt concentrations. The species information was identified using the combined methods of morphological observation, Biolog analysis and 16S rRNA gene sequence alignment. [Results] The power densities of strain E-1 were respectively 51.69 mW/m<sup>2</sup> and 26.56 mW/m<sup>2</sup> without salt addition and with addition of 6.6% NaCl, which was related to its good salt tolerance. The strain E-1 was identified as *Shewanella algae*, which showed diversity in substrate utilization, and its growth temperature and pH range were 25–40 °C and 5.0–10.0, respectively. [Conclusion] The strain affiliated to *S. algae* is firstly reported to show electricity activity when applying in MFCs, which enriches the diversity of electricigens. *S. algae* E-1 can generate electricity at high salt concentration, which provides a new experimental material for the application of MFCs in seawater resourceful treatment.

**Keywords:** *Shewanella algae*, Microbial fuel cells, Electricity production, Salt tolerance, Electricigens

微生物燃料电池(microbial fuel cells, MFCs)是利用微生物的催化作用氧化有机物(包括废水中的污染物)直接将化学能转化成电能的新型装置。由于具有废水处理和产生电能的双重作用,它在清洁能源生产、废水资源化处理、生物传感器开发及环境生物修复等领域表现出巨大的应用前景<sup>[1-4]</sup>。

产电微生物是微生物燃料电池系统的核心组成,其电化学活性由于菌种产生电子和传递电子的机制不同而表现出明显的差异<sup>[5]</sup>。目前已发现的产电微生物主要集中在变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)<sup>[6]</sup>。变形菌门主要包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)<sup>[7]</sup>、希瓦氏菌属(*Shewanella*)<sup>[8]</sup>、

克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)<sup>[9]</sup>、地杆菌属(*Geobacter*)<sup>[10]</sup>、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)<sup>[11]</sup>、红育菌属(*Rhodospirillum*)<sup>[12]</sup>、嗜酸菌属(*Acidiphilium*)<sup>[13]</sup>、气单胞菌属(*Aeromonas*)<sup>[14]</sup>、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)<sup>[15]</sup>、弧形杆菌属(*Arcobacter*)<sup>[16]</sup>和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)<sup>[17]</sup>等,厚壁菌门主要包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)<sup>[18]</sup>和梭菌属(*Clostridium*)<sup>[19]</sup>等。

目前大部分产电微生物的来源为污水处理厂的活性污泥、沉积物、土壤和生物垃圾等。其中,天津科技大学的骆健美课题组以天津泰达污水处理厂污泥浓缩间的污泥为接种物接种并运行微生物燃料电池,从富集的阳极生物膜上先后分离得到

一株 *Tolomonas osonensis* P2-A-1 和一株嗜根考克氏菌(*Kocuria rhizophila*) P2-A-5, 该工作是这两个种内微生物产电性能的首次报道<sup>[20-21]</sup>。此外, 彭月等从接种污水处理厂活性污泥的单室空气阳极生物膜上分离到一株克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.) Z6, 该菌株以柠檬酸钠为底物时表现出较强的电化学生活性<sup>[22]</sup>。2016 年, 姜允斌等<sup>[23]</sup>从阔叶林森林土壤中分离得到一株厌氧的生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*) SE6, 该菌可产生孢子, 对环境因素的变化有很强的耐受能力, 接种微生物燃料电池后发现它可通过细胞色素直接将电子传递至阳极, 产生电能<sup>[23]</sup>。2015 年, 刘盛萍等以生物垃圾为底物, 污水处理厂活性污泥为接种物构建双室 MFCs, 运行至稳定期后从阳极碳纤维布上分离得到的一株产电菌 *Nitratireductor* sp. WJ5-4, 该菌株可以利用较高固含量的生物垃圾产电, 在生物垃圾处理方面表现出很好的应用价值<sup>[24]</sup>。近年来, 研究者分别从近海的淤泥样品<sup>[25]</sup>和海域的潮间带表面沉积物<sup>[26]</sup>中分离和筛选来源于海洋的产电微生物, 菌株的鉴定结果均为希瓦氏菌。但研究者很少对菌株在盐条件下的产电特性展开进一步分析。基于此, 本文以取自南海的海水为接种液启动并运行阳极液中含有不同盐浓度的微生物燃料电池, 从富集的阳极生物膜上分离得到了一株纯种微生物菌株 E-1。分析菌株 E-1 在有无盐压力下的产电特性, 并通过形态学观察、Biolog 分析和 16S rRNA 基因序列比对鉴定其种属信息。研究成果有利于丰富耐盐产电微生物的多样性, 为微生物燃料电池在海水资源化处理方面的应用提供新的实验材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 微生物分离和培养所用的培养基

液体培养采用 LB 培养基, 固体培养则采用加入 2%琼脂的 LB 培养基。培养基 pH 调至 7.0–7.2,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。菌株鉴定培养基采用 BUA+B 培养平板, BUA 培养基, Biolog 公司。BUA+B 培

养基: 51.7 g BUA 加 950 mL 蒸馏水, 无氧氮气吹洗, 轻微煮沸, 搅拌以溶解琼脂和其他组分, 冷却后调 pH 为  $7.2 \pm 0.1$ ,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min, 盖紧瓶盖, 防止氧气进入。在无氧的氮气保护下, 冷却至 40–45 °C, 加 50 mL 新鲜的脱纤羊血, 摇匀; 厌氧环境中倒平板。

#### 1.1.2 阳极液(g/L)

$\text{NH}_4\text{Cl}$  0.31,  $\text{KCl}$  0.13,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.576,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2.452, pH 调节为 7.5, 之后加入 1 g/L 的葡萄糖作为碳源,  $0.7 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

Easy Pure<sup>TM</sup> Genomic DNA Kit, 北京全式金生物技术公司。电化学工作站, 上海辰华仪器有限公司; 直流多阻值电阻箱, 天水长城电工仪器有限责任公司; 普通光学显微镜, Olympus 公司; 扫描电子显微镜, Leo 公司; 自动微生物鉴定系统, Biolog 公司。

### 1.2 产电微生物的富集与分离

取自南海的海水经过简单的沉淀处理后接种于 MFCs 的阳极室, 分别在阳极液含有 0%和 6.6% NaCl 的两种条件下连续运行, 待负载电阻两端的电压逐渐稳定后记录电压值用于表征电化学性质。菌株 E-1 和其他的分离株均分离自接种海水且在盐浓度下运行并达到稳定的单室空气阴极 MFCs 的阳极生物膜。具体步骤如下: 在无菌操作台上用接种针刮取阳极生物膜若干, 重悬于 4 mL 0.9%的生理盐水制备成均匀的菌悬液, 将其进行梯度稀释后涂布于分离的 LB 固体培养基上, 37 °C 恒温条件下培养 2 d, 根据菌落形态、颜色、大小、表面和边缘特征, 挑取特征差异明显的菌落, 分别接种于 LB 液体培养基中再次富集培养, 如此反复传代 5–6 次, 得到纯培养的菌株。

#### 1.3 微生物燃料电池的构建、启动和运行

采用空气阴极单室型 MFCs 反应器, 具体构建过程参考文献[20]。

将 LB 固体培养基上的菌体 E-1 接种一环到装有 50 mL 的 LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 取菌液  $6\ 000 \times g$  离心 10 min 后收集菌体并用 0.9%的生理盐水洗涤

3次。将菌体分别重悬于含有不同 NaCl 浓度(0%和 6.6%)的阳极液中(以 1 g/L 葡萄糖作为底物),使其初始  $OD_{600}$  为 1.0,然后接种到 MFCs 反应器中。反应器分别与外电阻(无特殊说明时外电阻均固定在 1 000  $\Omega$ )和数据采集装置连接好,在  $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温条件下运行,运行过程中定期更换接种液。待出现连续两个稳定电压时即认为启动成功。当监测的输出电压低于 50 mV 时,开始更换阳极液。当获得稳定可重复的输出电压后,按照文献[20]的方法进行电流密度( $I$ )和功率密度( $P$ )等相关电化学参数的测定。

#### 1.4 菌株在盐压力下的生长特性分析

将培养过夜的菌液分别转接到含有 0%、2%、4%、6.6% NaCl 的 50 mL LB 液体培养基中,并将其初始  $OD_{600}$  值调为一致。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养,不同时间取样测定  $OD_{600}$  并绘制生长曲线。

#### 1.5 菌株的形态观察

分离纯化后得到的分离株在 LB 固体培养基上  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养 24–48 h,对单菌落的形态、颜色、透明度、大小、光滑、凸起、边缘整齐等特征进行观察和记录,并分别进行革兰氏染色。采用扫描电子显微镜观察菌体形态,电镜样品的预处理方法如下:菌株于 LB 液体培养基中  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 12 h,培养液  $6\ 000\times g$  离心 3 min,倒掉上清,将沉淀物用 PBS 缓冲液悬浮, $6\ 000\times g$  离心 5 min,重复上述步骤 5 次。将最后一步的沉淀悬浮后,过夜浸泡在含有 2.5%戊二醛的 PBS 缓冲液中。第二天继续用 PBS 缓冲液洗 5 次,除掉残余的戊二醛。最后将处理完成的菌液按最适稀释比例取少量于  $5\times 5\text{ mm}$  的盖玻片上风干,拿到电镜室喷金,进行形态观察。

#### 1.6 Biolog 分析

按照革兰氏阴性菌 Biolog 鉴定参数选择合适的培养条件<sup>[27]</sup>。参考文献[28]进行 Biolog 分析,具体方法为:将单菌落接种到 BUA+B 培养平板上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,用无菌牙签挑取少量新鲜菌落制成菌悬液,与标准菌悬液进行对照,误差范围小于  $\pm 2$ ,用八道移液枪进行 Biolog GN II 微孔板接

种,每孔接种菌悬液 150  $\mu\text{L}$ ,加盖  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后,打开微孔板盖,将微孔板放入自动微生物鉴定系统的结果自动读数仪中,显色结果与 Biolog 数据库进行比对分析。

Biolog 鉴定结果有 3 个重要的参数需要考虑:可能性 Probability (PROB),相似性 Similarity (SIM) 和位距 Distance (DIST)。DIST 和 SIM 是最重要的 2 个值, DIST 值表示测试结果与数据库相应数据条的位距, SIM 值表示测试结果与数据库相应数据条的相似程度。当  $\text{DIST}<5.0$ ,  $\text{SIM}>0.75$  为良好的匹配; SIM 值越接近于 1, 检定结果的可靠性越高<sup>[29]</sup>。

#### 1.7 16S rRNA 基因序列分析和系统发育树的构建

采用 Easy Pure<sup>TM</sup> Genomic DNA Kit 进行基因组总 DNA 的提取,具体步骤按照试剂盒的说明书操作。以提取的总 DNA 为模板,采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增。PCR 反应条件和反应体系参考文献[21]。PCR 扩增产物经试剂盒纯化,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后委托金唯智测序公司进行测序。测序结果提交 NCBI (National Center of Biotechnology Information) GenBank 用 BLAST 进行相似性检索和同源性比对。利用 MEGA 7.0 软件,采用基于 Kimura 2-parameter 模型的邻接法 (neighbor-joining method)构建系统发育树,进化树分支稳定性用 Bootstrap 分析,重复 1 000 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 产电微生物的富集和分离

将海水接种于单室空气阴极 MFCs 的阳极室,分别在阳极液(以 1 g/L 葡萄糖为底物)含有 0%和 6.6% NaCl 的两种条件下连续运行待系统进入稳定,此时,阳极膜上出现了肉眼可见的生物膜。由图 1 可知,在无外源添加盐压力的条件下,系统在运行 125 h 后达到稳定,稳定电压约 425 mV。在外源添加 6.6% NaCl 的条件下,系统在运行 60 h

后达到稳定, 稳定电压约 350 mV。这些结果表明, 海水含有一定数量的产电微生物, 尤其是存在着一些耐盐产电微生物。因此, 后续从接种海水且在盐浓度下运行且达到稳定的阳极生物膜上分离和筛选耐盐产电微生物。

根据菌落形态、颜色、大小、表面和边缘特征, 挑取特征差异明显的 9 个菌株(表 1)分别接种电池, 最终筛选到一株产电性能较好的分离株 E-1。如图 2 所示, 在无外源添加盐压力的条件下, E-1

接种 MFCs 后运行 415 h 后达到稳定, 稳定电压约为 554 mV, 功率密度在电流密度为 192.14 mA/m<sup>2</sup> 时最大, 达到 51.69 mW/m<sup>2</sup>。

2.2 菌株 E-1 在盐压力下的产电性能和生长性能

由图 3 可知, 在外源添加盐浓度 6.6% 的条件下, E-1 接种 MFCs 运行 98 h 后达到稳定, 稳定电压约为 384 mV, 其功率密度在电流密度为 79.54 mA/m<sup>2</sup> 时最大, 达到 26.56 mW/m<sup>2</sup>。比较图 2 和图 3 的结果可知, 与无压力条件相比, NaCl

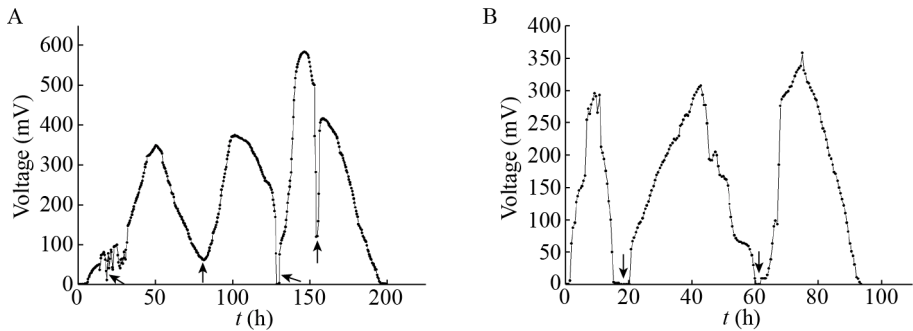


图 1 以海水为接种液的电压变化曲线图

Figure 1 The voltage output of seawater inoculation solution

注: A: 以无外源添加 NaCl 的海水为接种液的电压变化曲线图; B: 以外源添加 6.6% NaCl 的海水为接种液的电压变化曲线图.  
Note: A: The voltage change output of inoculation solution was taken as seawater without NaCl added externally; B: The voltage change output of inoculation solution was obtained by using seawater with 6.6% NaCl.

表 1 分离株的形态特征描述

Table 1 The morphological characterizations of the isolated strains

菌株编号 Strain No.	菌体形态 Bacteria morphology	菌落颜色 The color of the colony	菌落大小 Size of the colony	菌落表面 Surface of the colony	边缘形态 Edge shape
E-1	短杆状 Short rod	浅棕黄色 Light yellow	直径 2 mm 2 mm in diameter	光滑 Smooth	边缘透明光滑, 呈油脂状 The edges are transparent and smooth with an oily appearance
E-2	短杆状 Short rod	橘黄色 Orange	直径 2 mm 2 mm in diameter	光滑 Smooth	边缘整齐规则 Edge regularity
E-3	短杆状 Short rod	乳白色 Milky white	直径 2 mm 2 mm in diameter	光滑 Smooth	边缘整齐光滑 Edge regularity
E-4	短杆状 Short rod	橘黄色 Orange	直径 2 mm 2 mm in diameter	光滑 Smooth	边缘整齐规则 Edge regularity
E-5	圆球状 Globular	乳白色 Milky white	直径 2 mm 2 mm in diameter	光滑 Smooth	边缘整齐规则 Edge regularity
E-6	弧状 Arc	浅黄色 Light yellow	直径 3 mm 3 mm in diameter	光滑 Smooth	边缘整齐规则 Edge regularity
E-7	长杆状 Long rod	黄色 Yellow	直径 2 mm 2 mm in diameter	光滑 Smooth	边缘整齐规则 Edge regularity
E-8	短杆状 Short rod	乳白色 Milky white	直径 3 mm 3 mm in diameter	光滑 Smooth	边缘整齐规则 Edge regularity
E-9	短杆状 Short rod	浅橘色 Shallow orange	直径 2 mm 2 mm in diameter	光滑 Smooth	边缘整齐规则 Edge regularity

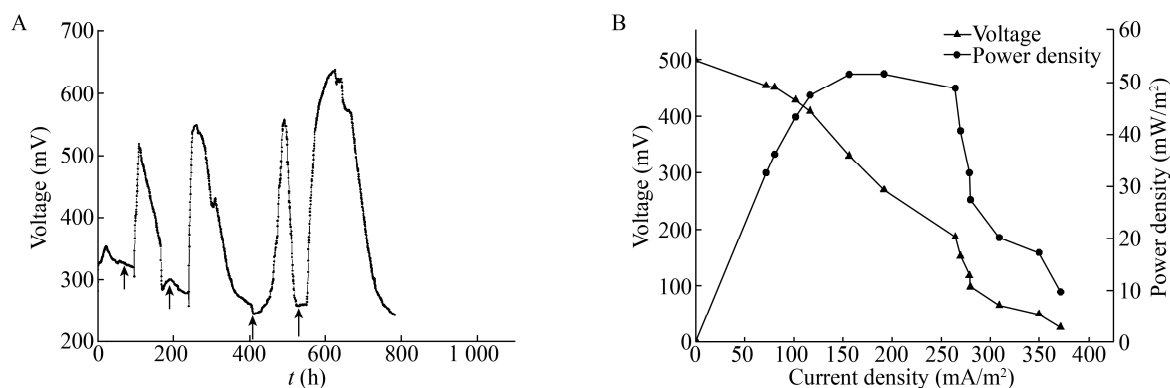


图2 菌株 E-1 在无外源添加盐压力的条件下的产电性能

Figure 2 The electrogenic performance of strain E-1 without salt pressure

Note: A: The voltage output; B: The polarization and power density curves.

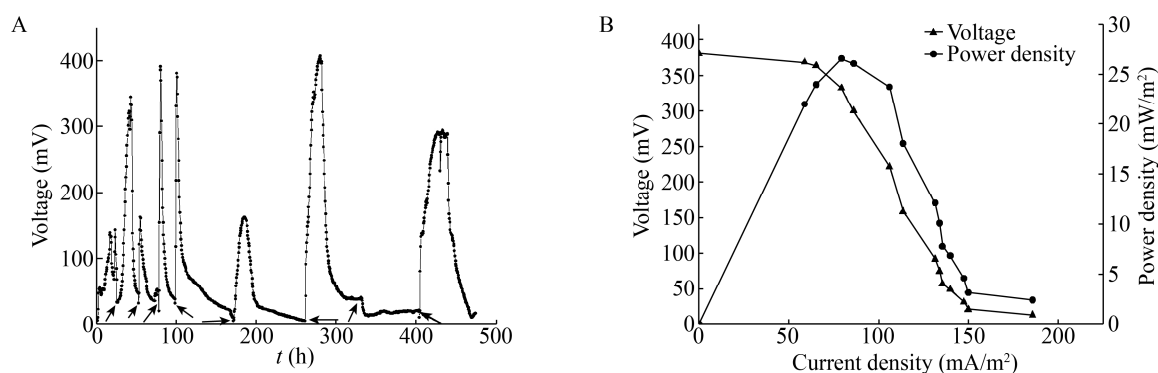


图3 菌株 E-1 在外源添加盐压力 6.6% 的条件下的产电性能

Figure 3 The electrogenic performance of strain E-1 under exogenous salt pressure of 6.6%

Note: A: The voltage output; B: The polarization and power density curves.

添加后的系统达到稳定的时间缩短了 76.4%，系统内阻增大了 48.6%，产生的电压和功率密度分别下降了 30.7% 和 48.6% (表 2)。推测 E-1 在盐浓度下良好的产电性能与其耐盐能力有关，为此测定了菌株在不同盐浓度下的生长曲线。由图 4 可知，在 NaCl 浓度为 0% 的条件下，菌株的延滞期为 0–2.5 h，对数期为 2.5–16 h，培养 21 h 后  $OD_{600}$  值达到最大，为 1.66。随着 NaCl 浓度的增加，菌株的延滞期明显延长，达到稳定后的  $OD_{600}$  值随之下降。当 NaCl 浓度为 6.6% 时，菌株的延滞期为 0–6 h，对数期为 6–23 h，培养 25 h 后  $OD_{600}$  值达到最大，为 1.53。

## 2.3 菌株 E-1 的鉴定

### 2.3.1 形态观察

E-1 在 LB 固体培养基上培养后的单菌落形态

呈圆形，为浅棕黄色，直径 2 mm，边缘整齐，表面透明光滑，呈油脂状，分泌某种褐色物质使培养基呈现浅棕黄色(图 5A 和 5B)；其革兰氏染色的结果为阴性(图 5C)；菌体呈短杆状，长度约 2.5  $\mu\text{m}$ ，宽度约 0.5  $\mu\text{m}$  (图 5D)。

### 2.3.2 Biolog 分析

由表 3 可知，SIM 值=0.94>0.75；DIS 值=0.89<5.0；PROB 为 100%。系统得到的 3 个重要参数比较理想，与数据库匹配良好，SIM 值越接近 1.00，说明鉴定结果的可靠性更高。在物种栏显示出一个最佳匹配名称：*Shewanella algae*，其他 9 种在名称栏里列出作为参考。菌种鉴定出阳性反应 33 种，阴性反应 50 种，边界反应 12 种。阳性反应表示目标菌株与数据库的匹配程度>80%，阴性反应表示样品菌与数据库匹配程



表 2 菌株 E-1 在外源不添加和添加 NaCl 条件下的产电性能比较

Table 2 Comparison of electric properties of strain E-1 without and with NaCl addition

电池运行条件 Battery condition	稳定时间 Stabilization time (h)	电压 Voltage (mV)	系统内阻 The system internal resistance ( $\Omega$ )	功率密度 Power density ( $\text{mW}/\text{m}^2$ )
无外源添加 NaCl No salt addition	415	554	1 468.9	51.69
外源添加 6.6% NaCl With addition of 6.6% NaCl	98	384	2 859.1	26.56

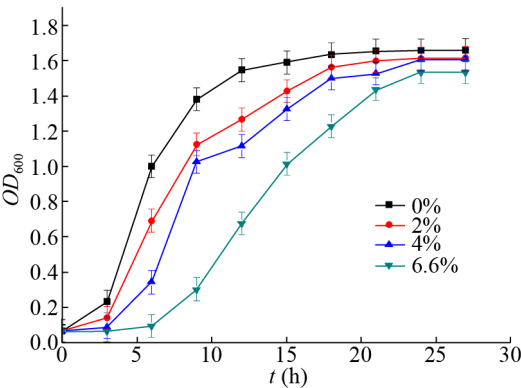


图 4 菌株 E-1 在不同盐浓度下的生长曲线  
Figure 4 Growth curves of strain E-1 at different salt concentrations

度<20%，边界反应多于 15 个为鉴定结果不好，实验中为 12。各种数据指标都表明鉴定结果准确，和数据库有很好的匹配，初步鉴定菌株 E-1 为海藻希瓦氏菌(*Shewanella algae*)。

2.3.3 16S rRNA 基因序列分析和系统发育树的构建

PCR 扩增获得的菌株 E-1 的 16S rRNA 基因片段大小为 1 450 bp (图 6)，将序列提交至 NCBI。BLAST 结果显示，菌株 E-1 的 16S rRNA 基因序列与已知菌株 *Shewanella algae* Hiro-1 具有 100% 的相似性，以邻接(neighbor-joining)法构建系统发

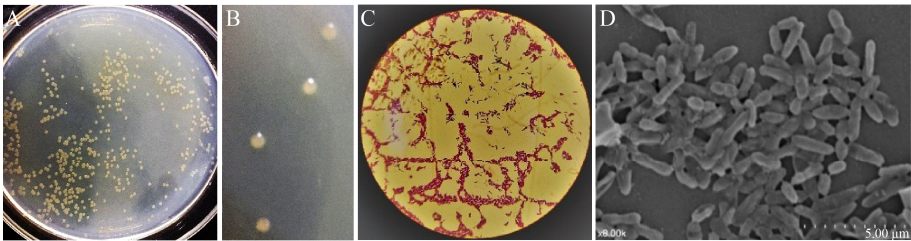


图 5 菌株 E-1 的形态观察  
Figure 5 The morphological observation of strain E-1  
Note: A, B: The single colony morphology; C: The gram staining result; D: The scanning electron microscope image.

表 3 Biolog 微生物鉴定系统鉴定结果

Table 3 Results of Biolog microbial identification system

物种 Species	可能性 PROB (%)	相似性 SIM	位距 DIST	类型 Type
<i>Shewanella algae</i>	100	0.94	0.89	GN-NENT
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0	0.00	5.02	GN-NENT
<i>Myroides odoratimimus</i>	0	0.00	8.49	GN-NENT
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	0	0.00	10.72	GN-NENT
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0	0.00	11.82	GN-NENT
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0	0.00	11.86	GN-NENT
<i>Myroides odoratus</i>	0	0.00	12.04	GN-NENT
<i>Weeksella virosa</i>	0	0.00	12.12	GN-NENT
<i>Aquaspirillum diapar</i>	0	0.00	12.85	GN-NENT
<i>Bordetella hinzii</i>	0	0.00	12.89	GN-NENT

育树,从构建的系统发育树(图 7)可知,菌株 E-1 的 16S rRNA 基因与 *Shewanella algae* Hiro-1 处在系统发育树的同一分支,亲缘关系最为接近。综合上述形态学观察、Biolog 分析和 16S rRNA 基因序列结果,将分离株 E-1 鉴定为 *Shewanella algae* (GenBank 登录号为 MK787267)。

## 2.4 菌株 E-1 的碳源利用情况和生长条件特性

根据代谢微平板对照相应碳源,将该菌株分别涂布到含有不同碳源的基本无机盐固体培养基上,观察菌株是否生长分析其对碳源的利用程度。通过观察可知菌株能够利用乳酸、乙酸、琥珀酰胺酸、L-丙氨酸、尿苷等碳源,但不能利用 L-阿拉伯糖、麦芽糖、蔗糖和甘油等碳源。此外,菌株在不同温度和 pH 条件下的生长情况表明,适宜生长的温度范围为 25–40 °C, pH 范围为 5.0–10.0。

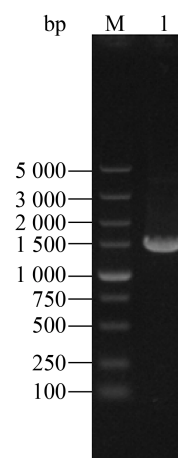


图 6 菌株 E-1 的 16S rRNA 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Figure 6 Agarose gel electrophoresis analysis of 16S rRNA gene PCR product of strain E-1

Note: M: DNA Marker; I: 16S rRNA PCR product of strain E-1.

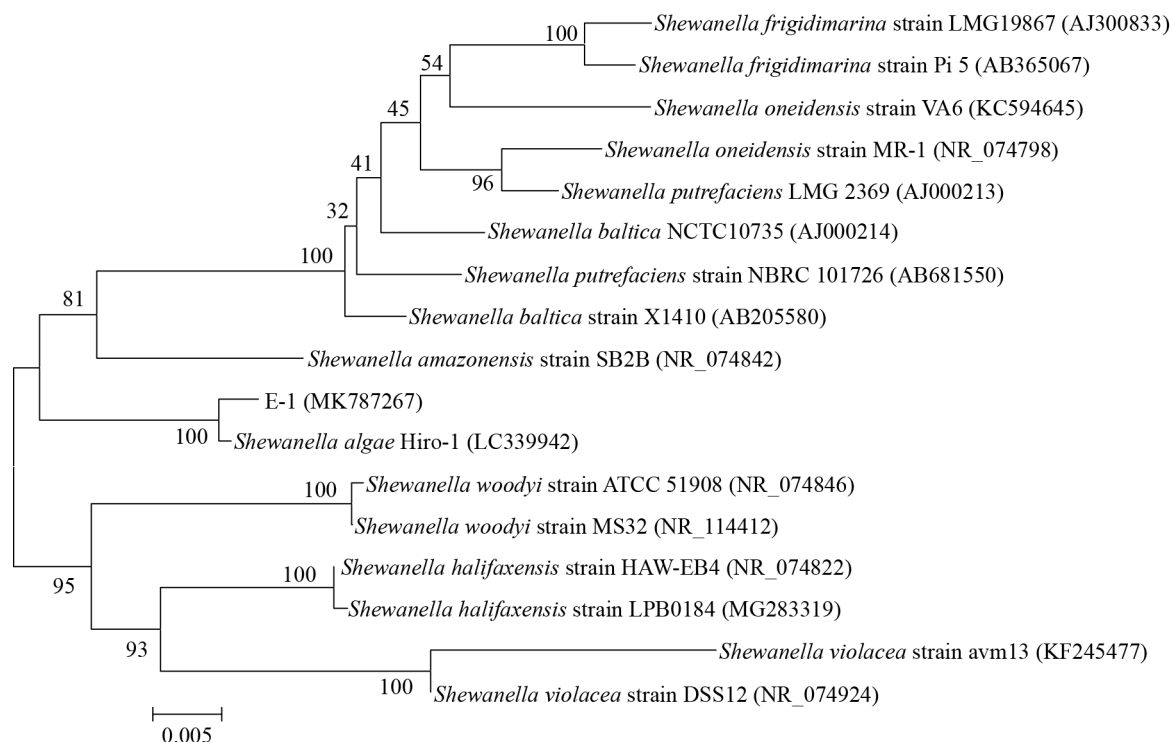


图 7 菌株 E-1 基于 16S rRNA 基因构建的系统发育树

Figure 7 16S rRNA gene phylogenetic tree of strain E-1

注: 括号中的序号表示菌株的 GenBank 登录号; 各分支点显示的数字代表通过 1 000 次重复运算得到的置信值。

Note: The serial number in brackets denotes the GenBank accession number of the strain; Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are shown at branch points.



### 3 讨论与结论

本文以海水为接种液启动并运行阳极液中含有不同盐浓度的微生物燃料电池,从富集的阳极生物膜上分离得到一株纯培养的微生物菌株 E-1。该菌株接种于不添加 NaCl 的微生物燃料电池中产生的最大输出电压和功率密度分别为 554 mV 和 51.69 mW/m<sup>2</sup>。2013 年,彭月等<sup>[22]</sup>将克雷伯氏菌 Z6 接种到单室空气阴极 MFC 中可产生的最大输出电压和最大功率密度分别为 310 mV 和 14.35 mW/m<sup>2</sup>。2016 年,姜允斌等<sup>[23]</sup>将分离的一株土壤产电菌 *Clostridium sporogenes* SE6 接种到 MFCs 中,其产生的稳定电压和最大功率密度分别为 118 mV 和 44 mW/m<sup>2</sup>。相比于这些已报道的产电微生物,菌株 E-1 显示出较强的电化学活性。更值得注意的是,菌株 E-1 在外源添加盐浓度 6.6% 的微生物燃料电池中产生的稳定电压和最大功率密度分别达到 384 mV 和 26.56 mW/m<sup>2</sup>,目前关于耐盐产电微生物的报道较少且菌株的产电水平仍停留在较低水平。2010 年, Huang 等<sup>[30]</sup>从沿海海洋沉积物中分离得到了一株可以在盐浓度 1%–8% 生长并产电的 *Shewanella marisflavi* EP1 菌,该菌株在 6% NaCl 下达到最大输出电压 219 mV 和最大功率密度 9.6 mW/m<sup>2</sup>。同年,王彪等<sup>[31]</sup>利用石墨电极对来源于深海的产电菌 *Shewanella* sp. DS1 在 NaCl 浓度为 1%–7% 条件下的产电性能进行了分析,菌株的最佳盐度为 3%,在该条件下产生的最大输出电压为 202 mV,最大功率密度为 17.21 mW/m<sup>2</sup>。2016 年,李鹏等<sup>[32]</sup>从浙江省舟山海域潮间带中筛选出一株产电菌 *Shewanella* sp. m2,对菌株的培养条件进行系统优化后该菌株在 NaCl 浓度为 1.035% 下产生的最大输出电压为 115 mV。与这些结果相比较,菌株 E-1 这种在盐胁迫下表现出的良好电化学活性,使得其在海水资源化处理方面表现出巨大的应用潜力和优势。

此外,研究者发现内阻是限制产电性能的主要

因素<sup>[33]</sup>,而盐度则会构成内阻的主要限制因素<sup>[30]</sup>,电压会随着 NaCl 浓度的增大先升高后降低。这可能是因为合适的盐度范围内,溶液离子强度的提高可以显著降低总内阻,有利于提高产电性能,但盐浓度太高时,会对产电菌的代谢活性产生胁迫作用,进而降低其电化学活性。李尔场等研究发现假单胞菌在含有 5% NaCl 浓度的条件下,延滞期由原来的 24 h 增长至 35 h 左右,稳定期达到的最大 OD<sub>600</sub> 值由 1.6 下降到 0.35 左右<sup>[34]</sup>。在本论文中,菌株 E-1 的最适盐浓度为 6.6%,延滞期由原来的 2.5 h 增长至 6 h 左右,稳定期达到的最大 OD<sub>600</sub> 值由 1.66 下降到 1.53 左右。与上述工作相比,菌株 E-1 对盐具有较强的耐受性,在盐压力下生长状态良好,这也可能是其在含盐条件下表现出良好产电性能的重要原因。

通过综合形态学观察、Biolog 分析和 16S rRNA 基因序列结果,分离株 E-1 被鉴定为海藻希瓦氏菌(*Shewanella algae*)。海藻希瓦氏菌最早于 1985 年由 Kotaki 等从红藻表面分离出来,当时被命名为 OK-1;海藻希瓦氏菌 OK-1 是革兰氏阴性菌,杆状,有极生鞭毛,氧化酶反应阳性,不产气,根据这些特征 Kotaki 等将其归入假单胞菌属<sup>[35]</sup>。1990 年, Simidu 分析了 OK-1 的(G+C)mol%含量和 16S rRNA 基因碱基序列特点后发现 OK-1 与希瓦氏菌属有较近的亲缘关系,但因 OK-1 与腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)的碱基序列间仍存在显著差异,所以将 OK-1 定义为一种新的希瓦氏菌,即海藻希瓦氏菌(*Shewanella alga*)<sup>[36]</sup>,在 1997 年正式更名为 *Shewanella algae*。目前,关于海藻希瓦氏菌的应用大多集中在发酵生产河豚毒素以及抑制对金属材料的腐蚀性能方面<sup>[37-38]</sup>。本论文是首次对 *Shewanella algae* 种内微生物的产电性能及其在微生物燃料电池中应用的报道,成果丰富了耐盐产电微生物的种类,并为后续利用微生物燃料电池技术进行海水资源化处理提供了新的研究思路 and 新的实验材料。

## REFERENCES

- [1] Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(5): 375-381
- [2] Chang IS, Moon H, Jang JK, et al. Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20(9): 1856-1859
- [3] Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, et al. Microbial fuel cells: methodology and technology[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(17): 5181-5192
- [4] Lovley DR. Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(3): 327-332
- [5] Bond DR, Holmes DE, Tender LM, et al. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments[J]. *Science*, 2002, 295(5554): 483-485
- [6] Li Y, Sun YM, Kong XY, et al. Progress in research of electrigenes in microbial fuel cell[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(9): 1404-1409 (in Chinese)  
李颖, 孙永明, 孔晓英, 等. 微生物燃料电池中产电微生物的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(9): 1404-1409
- [7] Jayapriya J, Ramamurthy V. Use of non-native phenazines to improve the performance of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2474 catalysed fuel cells[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 124: 23-28
- [8] Ringeisen BR, Henderson E, Wu PK, et al. Correction to high power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(8): 2629-2634
- [9] Xia X, Cao XX, Liang P, et al. Electricity generation from glucose by a *Klebsiella* sp. in microbial fuel cells[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(1): 383-390
- [10] Bond DR, Lovley DR. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1548-1555
- [11] Zuo Y, Xing DF, Regan JM, et al. Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(10): 3130-3137
- [12] Chaudhuri SK, Lovley DR. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(10): 1229-1232
- [13] Borole AP, O'Neill H, Tsouris C, et al. A microbial fuel cell operating at low pH using the acidophile *Acidiphilium cryptum*[J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(8): 1367-1372
- [14] Chopra AK, Xu XJ, Ribardo D, et al. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(5): 2808-2818
- [15] Xu S, Liu H. New exoelectrogen *Citrobacter* sp. SX-1 isolated from a microbial fuel cell[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(5): 1108-1115
- [16] Fedorovich V, Knighton MC, Pagaling E, et al. Novel electrochemically active bacterium phylogenetically related to *Arcobacter butzleri*, isolated from a microbial fuel cell[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7326-7334
- [17] Cooney MJ, Roschi E, Marison IW, et al. Physiologic studies with the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*: evaluation for use in a biofuel cell[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18(5): 358-365
- [18] Nimje VR, Chen CY, Chen CC, et al. Corrigendum to "Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell"[J]. *Journal of Power Sources* 190 (2) (2009) 258-263[J]. *Journal of Power Sources*, 2010, 195(16): 5427-5428
- [19] Park HS, Kim BH, Kim HS, et al. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell[J]. *Anaerobe*, 2001, 7(6): 297-306
- [20] Li M, Liang X, Luo JM, et al. Isolation of an exoelectrogen *Kocuria rhizophila* from the anodic biofilm and optimization of its power generation[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(10): 3078-3087 (in Chinese)  
李明, 梁湘, 骆健美, 等. 一株产电菌嗜根考克氏菌 (*Kocuria rhizophila*) 的分离及其产电性能优化[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(10): 3078-3087
- [21] Luo JM, Yang J, He HH, et al. A new electrochemically active bacterium phylogenetically related to *Tolomonas osonensis* and power performance in MFCs[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 139: 141-148
- [22] Peng Y, Zhu NW, Nie HY. Isolation of an electrogen *Klebsiella* sp. Z6 from anodic biofilm and its electricity-generating characteristics[J]. *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[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(4): 1035-1042
- [23] Jiang YB, Deng H, Huang XQ, et al. Characterization of a novel electrogenic *Clostridium sporogenes* isolated from forest soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(5): 846-855 (in Chinese)  
姜允斌, 邓欢, 黄新琦, 等. 一株土壤产电菌 *Clostridium sporogenes* 的分离及其产电性能[J]. *微生物学报*, 2016, 56(5): 846-855
- [24] Liu SP, Wu J, Wu K, et al. Isolation and characterization of an electricity-producing strain *Nitratireductor* sp. WJ5-4[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(4): 665-673 (in Chinese)  
刘盛萍, 吴晶, 吴克, 等. 一株产电菌 *Nitratireductor* sp. WJ5-4 的筛选及产电分析[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(4): 665-673
- [25] Huang JX. Isolation of current producing bacteria and application in microbial fuel cells[D]. Hefei: Doctoral

- Dissertation of University of Science and Technology of China, 2009 (in Chinese)
- 黄杰勋. 产电微生物菌种的筛选及其在微生物燃料电池中的应用研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2009
- [26] Wang B, Huang JX, Zhang XB, et al. Isolation and characterization of an electricity-producing strain *Shewanella* sp. S2 from marine[J]. Microbiology China, 2010, 37(3): 342-348 (in Chinese)
- 王彪, 黄杰勋, 章晓波, 等. 一株海洋产电菌 *Shewanella* sp. S2 的筛选和产电分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(3): 342-348
- [27] Li Y, Sheng H, Zhao RH. Utilization of Biolog microbes identification system in the identification of microbial species[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2005(7): 84-85 (in Chinese)
- 李运, 盛慧, 赵荣华. Biolog 微生物鉴定系统在菌种鉴定中的应用[J]. 酿酒科技, 2005(7): 84-85
- [28] Liu J. Identification of an anaerobic fermentation strain Biolog and effects of different carbon sources on hydrogen production[J]. Environmental Study and Monitoring, 2008, 21(1): 11-13 (in Chinese)
- 刘婧. 一株厌氧发酵菌 Biolog 鉴定及利用不同碳源对产氢的影响[J]. 环境研究与监测, 2008, 21(1): 11-13
- [29] Cheng C, Yang M, Li JX, et al. Biolog microbial identification system—study on the operating regulation of bacteria identification[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(5): 50-54 (in Chinese)
- 程池, 杨梅, 李金霞, 等. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 50-54
- [30] Huang JX, Sun BL, Zhang XB. Electricity generation at high ionic strength in microbial fuel cell by a newly isolated *Shewanella marisflavi* EP1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(4): 1141-1149
- [31] Wang B, Chen XH, Xu FC, et al. Influence of substrate and salinity on electricity production by deep-sea strain *Shewanella* sp. DS1[A]//Power and Energy Engineering Conference 2010[C]. Wuhan: Wuhan University, 2010: 259-262 (in Chinese)
- 王彪, 陈新华, 徐方成, 等. 碳源和盐度对深海产电菌 *Shewanella* sp. DS1 产电能力影响[A]//2010 年电力与能源工程学术会议[C]. 武汉: 武汉大学, 2010: 259-262
- [32] Li P, Liao Z, Miao ZL, et al. Screening and identification of one strain of marine electrogenic bacteria and optimization of electrogenic conditions[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2016, 57(9): 1536-1542 (in Chinese)
- 李鹏, 廖智, 苗增良, 等. 1 株海洋产电细菌的筛选鉴定及产电条件的优化[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(9): 1536-1542
- [33] Manohar AK, Bretschger O, Nealsen KH, et al. The use of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in the evaluation of the electrochemical properties of a microbial fuel cell[J]. Bioelectrochemistry, 2008, 72(2): 149-154
- [34] Li EY, Cheng JH, Shi LW, et al. Research on salt-tolerant bacteria[J]. Journal of Jiangsu Institute of Petrochemical Technology, 2001, 13(4): 4-6 (in Chinese)
- 李尔扬, 程洁红, 史乐文, 等. 耐盐菌的研究[J]. 江苏石油化工学院学报, 2001, 13(4): 4-6
- [35] Kotaki Y, Oshima Y, Yasumoto Y. Bacterial transformation of paralytic shellfish toxins in coral reef crabs and a marine snail[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1985, 51(6): 1009-1013
- [36] Simidu U, Kita-Tsukamoto K, Yasumoto T, et al. Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1990, 40(4): 331-336
- [37] Zhang J, Song XX, Luan X, et al. Effects of *Shewanella algae* on corrosion of Zn-Al-Cd anode[J]. Acta Metallurgica Sinica, 2012, 48(12): 1495-1502 (in Chinese)
- 张杰, 宋秀霞, 栾鑫, 等. 海藻希瓦氏菌对 Zn-Al-Cd 牺牲阳极的腐蚀性能影响[J]. 金属学报, 2012, 48(12): 1495-1502
- [38] Wu SJ. Preliminary research on tetrodotoxin production of *Shewanella alga*[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2005 (in Chinese)
- 吴韶菊. 海藻希瓦氏菌(*Shewanella alga*)产河豚毒素(tetrodotoxin)初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2005