

微氧环境中电化学活性微生物的分离与鉴定

吴松^{1,2}, 肖勇², 郑志勇^{1,2}, 郑越^{1,2}, 杨朝晖^{1*}, 赵峰^{2*}

(1. 湖南大学环境科学与工程学院, 环境生物与控制教育部重点实验室, 长沙 410082; 2. 中国科学院城市环境研究所, 厦门 361021)

摘要: 电化学活性微生物在金属、碳等元素的生物地球化学循环, 以及生物能源合成中具有重要作用. 与微生物燃料电池厌氧阳极相比, 微氧阳极能够捕集更多电能. 但是相比于厌氧阳极中功能微生物的广泛研究, 微氧阳极中的功能微生物还未被分离和研究. 本研究采用传统好氧分离技术从微生物燃料电池微氧阳极分离获得3株纯菌 *Aeromonas* sp. WS-XY2、*Citrobacter* sp. WS-XY3 和 *Bacterium* strain WS-XY4, 其中 WS-XY2 和 WS-XY3 属于变形菌门, WS-XY4 初步鉴定为新种. 循环伏安、计时电流结果表明3株菌均具有电化学活性, 且具有相似的直接胞外电子传递机制. 3株菌在微生物分类学和电化学性质上的异同, 表明微氧阳极能够定向筛选具有相似电化学性质的电化学活性微生物. 微生物燃料电池微氧阳极具有更高效多样的功能微生物, 可能是微氧阳极性能优于厌氧阳极的一个原因. 因此, 进一步针对微生物燃料电池微氧阳极中功能微生物的研究, 将有助于阐明微氧阳极提高微生物燃料电池电能捕集的微生物机制.

关键词: 电化学活性微生物; 微生物燃料电池; 微氧阳极; 循环伏安; 计时电流

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)10-3933-07 DOI: 10.13227/j.hjks.2014.10.041

Isolation and Identification of Electrochemically Active Microorganism from Micro-Aerobic Environment

WU Song^{1,2}, XIAO Yong², ZHENG Zhi-yong^{1,2}, ZHENG Yue^{1,2}, YANG Zhao-hui¹, ZHAO Feng²

(1. Key Laboratory of Environmental Biology and Pollution Control, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China; 2. Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China)

Abstract: Extracellular electron transfer of electrochemically active microorganism plays vital role in biogeochemical cycling of metals and carbon and in biosynthesis of bioenergy. Compared to anaerobic anode, micro-aerobic anode captures more energy from microbial fuel cell. However, most of previous researches focused on functioning bacteria in anaerobic anode, functioning bacteria in micro-aerobic anode was rarely studied. Herein, we used the traditional aerobic screening technology to isolate functioning bacteria from a micro-aerobic anode. Three pure cultures *Aeromonas* sp. WS-XY2, *Citrobacter* sp. WS-XY3 and *Bacterium* strain WS-XY4 were obtained. WS-XY2 and WS-XY3 were belonged to Proteobacteria, whereas WS-XY4 was possibly a new species. Cyclic voltammetry and chronoamperometry analysis demonstrated all of them showed the electrochemical activity by direct extracellular electron transfer, and micro-aerobic anode could select bacteria that have similar electrochemical activity to proliferate on the anode. We further conclude that functioning bacteria in micro-aerobic anode are more efficient than that of anaerobic anode may be the reason that micro-aerobic anode has better performance than anaerobic anode. Therefore, a thorough study of functioning bacteria in micro-aerobic anode will significantly promote the energy recovery from microbial fuel cell.

Key words: electrochemically active microorganism; microbial fuel cell; micro-aerobic anode; cyclic voltammetry; chronoamperometry

电化学活性微生物是能够将代谢产生电子传递到细胞外或从细胞外捕获电子进行代谢的一类具有胞外电子传递功能的微生物^[1]. 其胞外电子传递在金属的生物地球化学循环, 以及生物能源合成过程中具有重要作用^[2]. 以微生物燃料电池为基础的生物电化学系统能够富集电化学活性微生物, 从而加速石油烃、多环芳烃等的氧化降解^[3], 重金属、高氯酸盐等的还原修复^[4], CH_4 、 H_2 等能源物质的合成. 因此, 对生物电化学系统中电化学活性微生物的系统研究, 将会极大促进深入理解金属、碳、氮、硫等元素的生物地球化学循环, 并加速高效环境生

物技术的应用. 微生物群落结构和多样性分析, 可以揭示群落结构与功能的联系; 而基于纯种功能微生物的研究, 能够深入阐明功能实现的机制^[5].

在微生物燃料电池中, 通常认为阳极需要维持厌氧条件, 以促进电能的收集. Rosenbaum 等^[6]用恒电位三电极体系研究氧气对 *Shewanella oneidensis* 产电的影响, 发现少量氧气能够使电流响应增大, 增

收稿日期: 2014-03-14; 修订日期: 2014-04-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(21322703, 21177122, 51208490)

作者简介: 吴松(1989~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物电化学. E-mail: swu@issas.ac.cn

* 通讯联系人. E-mail: yzh@hnu.edu.cn; fzha@iue.ac.cn

加单位时间电能的收集量。Fan 等^[7]和 Ringeisen 等^[8]也发现在混合菌群构建的微生物燃料电池阳极通入微量的氧气,能够提升电池功率密度。此外, TerAvest 等^[9]发现与厌氧条件相比,在微氧条件下 *S. oneidensis* MR-1 可以加速分泌核黄素,从而促进电能的高效收集。Quan 等^[10]比较了微生物燃料电池有氧与厌氧阳极中的微生物群落结构,发现两种条件下,群落结构有 77% 的相似度,还存在很多差异群落。此外,在已报道分离自生物电化学系统的电化学活性微生物中,绝大部分都是采用厌氧分离技术分离获得^[1,11]。基于以上研究结果,本实验中采用传统的好氧分离技术而不是被广泛应用的厌氧分离技术,从微生物燃料电池的微氧阳极分离电化学活性细菌,尝试在纯菌水平上探讨微氧阳极中功能微生物与已报道的厌氧阳极中功能微生物的差异,从而进一步阐明微氧阳极提高微生物燃料电池电能捕集的微生物机制。

1 材料与方法

1.1 培养分离

在本实验中建了一个双室微生物燃料电池,微生物燃料电池阳极和阴极室均为 5 cm × 5 cm × 5 cm 的立方体,阳极和阴极室均有两块 4 cm × 4 cm × 0.4 cm 的碳毡通过钛丝叠加串联,浸于电解液中作为电极。微生物燃料电池阳极以集美污水处理厂二沉池污泥作为接种污泥。驯化过程中,10 mmol·L⁻¹ 乙酸钠作为阳极电子供体,50 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾作为阴极电子受体,阳极维持微氧状态,置于 32℃ 培养箱中培养。微氧环境中溶解氧一般小于 1 mg·L⁻¹^[12]。阳极微氧环境的实现通过在阳极室开一个 Φ 1 cm 的孔,同时在池底加一个长 1.2 cm 的转子,置于磁力搅拌器上以 100 r·min⁻¹ 的低转速进行搅拌来实现。阳极室溶解氧用溶解氧微电极 (REF 321, Unisense, 丹麦) 进行测定,得到阳极室溶解氧为 0.8 ~ 1.1 mg·L⁻¹,即为本研究中微生物燃料电池微氧阳极的维持微氧状态。

待微生物燃料电池运行稳定后,从阳极碳毡刮下生物膜,放入 50 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (phosphate balanced solution, PBS, pH = 7.0) 中,经漩涡振荡混匀,作为纯菌分离源。分离所用培养基为 Luria-Bertani 培养基 (LB): 酵母提取物 5 g·L⁻¹, 蛋白胨 10 g·L⁻¹, 氯化钠 5 g·L⁻¹。培养基 pH = 7.0, 当配制固体培养基时,加入 20 g·L⁻¹ 琼脂条。实验中通过梯度稀释法,进行平板划线初步获得单

菌落,然后接入液体 LB 培养基增殖。为了确保获得纯菌,固体平板划线和液体增殖的过程依次重复 3 次。

1.2 菌株鉴定

菌株全基因组的提取参考 Yang 等^[13]的方法。提取的全基因组样品使用引物对 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 对 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增。PCR 反应程序参考 Xiao 等^[14]的方法。PCR 扩增的 DNA 片段使用试剂盒进行纯化 (DP1401, BioTeke, 中国),纯化产物使用 pGM-T 连接试剂盒 (TianGen, 中国) 和 *Escherichia coli* Top10 (Sangon, 中国) 进行克隆。克隆 DNA 片段使用引物对 T7f 和 SP6r 进行 PCR 扩增检验。阳性克隆样品送上海美吉进行 DNA 测序。测序结果提交 GenBank 并获得登录号。使用 GenBank 的 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对测序结果进行同源性比较,获得与测定序列相似性最高的已知序列数据。使用软件 DNASTar v5.0 (DNASTAR, USA) 的 MegAlign 程序对同源性比对获得的序列数据建立系统发育树。

1.3 菌体形态观察

扫描电镜菌体样品的前处理方法为: LB 培养基中培养至稳定期菌体的收集与 PBS 清洗; 2.5% 戊二醛室温固定 4h 或置于 4℃ 冰箱过夜; 30%、50%、70%、90%、100% 乙醇进行梯度脱水; 乙醇脱水后样品用滤纸包好,置于超临界干燥器 (Samdri-PVT-3D, Gatan, 美国) 中干燥 6 h。处理好的菌体样品固定于导电胶上,经喷金处理后,通过扫描电镜 (S-4800, Hitachi, 日本) 进行菌体形态观察,并采集菌体形态图片。

1.4 循环伏安

循环伏安实验使用三电极体系,通过电化学工作站进行 (CHI 660D, 上海辰华)。三电极体系中玻碳 (Φ 3 mm)、铂丝和 Ag/AgCl (饱和 KCl 溶液) 分别作为工作电极、对电极和参比电极。本文所有的电势值都是相对于饱和 Ag/AgCl 参比电极。Masuda 等^[15]发现 LB 培养基中的酵母提取物中含有核黄素,并且此物质能够作为电子中介体在微生物与电极间进行电子传递。因此本文后续实验中的微生物培养都使用 LB (Y-) 培养基: 蛋白胨 10 g·L⁻¹, 氯化钠 5 g·L⁻¹。

在循环伏安测试过程中,首先对电解液进行通氮气处理 15 min 以上,以去除电解液中的氧气。生长至

稳定期的菌体经离心收集后,用 PBS 清洗 3 次,以清除菌体表面附着的胞外物质。清洗后的菌体立即用 Nafion(Sigma 美国)固定于玻碳电极,进行循环伏安测试,用于初步研究菌体是否存在直接胞外电子传递能力。此外,菌体培养液的上清液也进行循环伏安扫描,以确定菌体是否具有分泌氧化还原电子中介体进行间接胞外电子传递的能力。循环伏安测试中,电势扫描范围为 $-0.5 \sim 0.3$ V,扫描速率为 $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$,电解液持续通氮气,以保持无氧状态。

1.5 计时电流

计时电流实验使用三电极体系,通过电化学工作站进行(CHI 1000B,上海辰华)。三电极体系中碳毡($3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$)、碳毡($1 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$)和饱和 Ag/AgCl 分别作为工作电极、对电极和参比电极。实验中,三电极反应体系在 100 mL 蓝盖瓶中进行,通过橡胶塞进行密封,隔绝氧气,同时防止外来微生物的污染。测试过程中,蓝盖瓶中加入 90 mL LB(Y-)培养基,实验组接种 2~5 mL 稳定期菌液,对照组不接种菌体。

2 结果与讨论

2.1 纯菌的分离与鉴定

采用传统的好氧平板分离技术,结合梯度稀释法,笔者从微生物燃料电池微氧阳极分离获得 3 株纯菌。图 1 为根据 3 株纯菌的 16S rRNA 基因序列构

建的系统进化树。在细菌分类鉴定中,Embley 等^[16]认为当 16S rRNA 基因序列的同源性大于 97% 时,可认为是一个种;Godfellow 等^[17]认为 DNA 的 G+C mol% 差异低于 12% 以及 16S rRNA 基因序列同源性不低于 95% 的种可归属为一个属。图 1 中 WS-XY2 的 16S rRNA 基因与 *Aeromonas* 属中 *Aeromonas hydrophila* BJ、*Aeromonas punctata* W20060720 和 *Aeromonas aquariorum* N2 这 3 个种的 16S rRNA 基因具有 99% 的相似度,命名为 *Aeromonas* sp. WS-XY2。WS-XY3 的 16S rRNA 基因与 *Citrobacter* 属中 *Citrobacter freundii* JZ01、*Citrobacter murlinae* FFL15 和 *Citrobacter braakii* RCPS-4 这 3 个种的 16S rRNA 基因具有 100% 的相似度,命名为 *Citrobacter* sp. WS-XY3。图 1 中 WS-XY4 其 16S rRNA 基因序列在 NCBI 中的比对结果显示,与其序列相似度大于 95% 的序列均是未培养细菌;而与其序列相似度为 95% 的序列,却是来自于不同种属的几株菌(*Enterobacter* sp. strain PP9C、*Endophytic bacterium* strain GYPB16、*Leclercia adecarboxylata* strain C107、*Pantoea agglomerans* strain ABAC23 和 *Averyella dalhousiensis* strain Z173)。因此,基于 WS-XY4 的 16S rRNA 基因序列的比对结果,笔者初步推断 WS-XY4 为新种,需要后续的生理生化实验来进一步在分类学上对其进行鉴定,初步命名为 *Bacterium* strain WS-XY4。

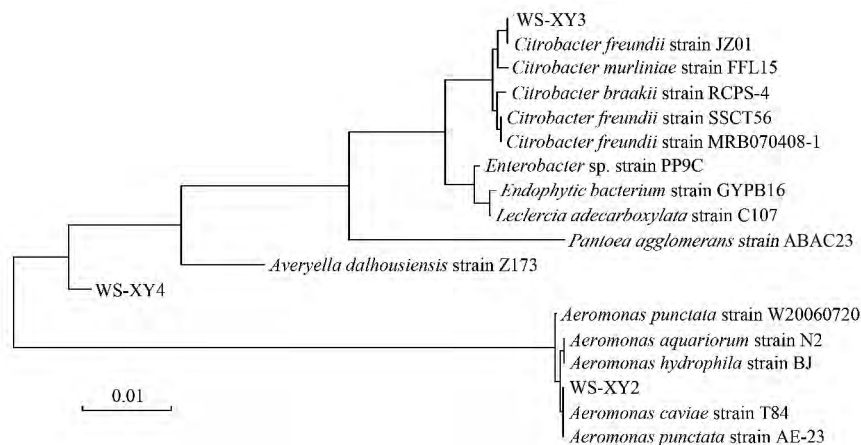


图 1 基于 3 株纯菌的 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of the 3 pure bacteria

图 2 为 3 株选定菌株的扫描电镜图片,结果显示 3 株菌都为杆状,且均约 $2 \mu\text{m}$ 长。WS-XY2 和 WS-XY3 的以上形态特性都与伯杰氏手册中描述的对应种属细菌的形态特征一致,从而进一步证实了 16S rRNA 基因鉴定的结果。变形菌门在 BES

中是优势功能微生物^[18],很多通过厌氧分离技术从微生物燃料电池厌氧阳极分离的电化学活性微生物都属于变形菌门^[11]。并且关于电化学活性微生物胞外电子传递机制的研究,也主要是集中在变形菌门的 *Geobacter* spp. 和 *Shewanella* spp. 中进

行. 本实验利用好氧分离技术从微生物燃料电池微氧阳极分离获得的 *Aeromonas* sp. WS-XY2、*Citrobacter* sp. WS-XY3 和 *Bacterium* strain WS-XY4 中, WS-XY2 和 WS-XY3 均属于变形菌门, 但是

WS-XY4 在系统进化关系上与 WS-XY2 和 WS-XY3 差异较大. 因此进一步的纯菌电化学活性分析, 将有助于揭示微生物燃料电池微氧阳极中的功能微生物.

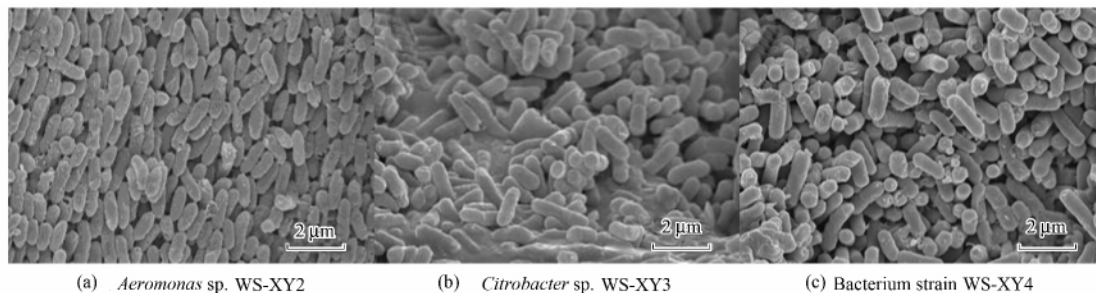


图 2 *Aeromonas* sp. WS-XY2、*Citrobacter* sp. WS-XY3、*Bacterium* strain WS-XY4 的扫描电镜图片

Fig. 2 Scanning electron microscope image of *Aeromonas* sp. WS-XY2, *Citrobacter* sp. WS-XY3, *Bacterium* strain WS-XY4

2.2 纯菌的电化学活性分析

为了能够判断已知菌株的电化学活性, 通常需要循环伏安、计时电流以及构建纯菌燃料电池等方法进行实验. 此外 Yuan 等^[19] 制备了电致变色材料 WO_3 纳米簇, 该材料可以用于快速鉴定产电菌, 但此种方法因不能具体确定电化学活性微生物的氧化还原峰电位, 仅适用于初步筛选电化学活性微生物. 循环伏安曲线能够清晰地呈现出菌体及其培养液上清的氧化还原状况. 通过菌体和培养液上清的循环伏安曲线, 可以推断菌体表面或溶液中是否存在氧化还原活性物质, 但是关于氧化还原活性物质是否参与菌体代谢过程的电子传递, 还需要进一步实验进行验证. 在已有的关于纯菌电化学活性鉴定的文献报道中, 通常通过构建微生物燃料电池来测试其产电性能^[11]. 然而微生物燃料电池的启动, 通常需要数十天才形成稳定的产电生物膜^[20]. 同时基于纯菌的燃料电池在长期运行中, 大大增加了其被外来细菌污染的风险. Wang 等^[21] 发现控制阳极电位能加速微生物燃料电池的启动, 因此本研究中通过构建密闭的恒电位三电极体系进行纯菌电化学活性的进一步验证, 缩短实验周期以避免外来细菌的污染.

2.2.1 循环伏安分析

本研究首先采用循环伏安, 对分离的纯菌进行初步电化学活性分析. 图 3(a) ~ 3(c) 中实验结果表明, 3 株分离纯菌的菌体表面都存在氧化还原活性物质, 能与电极间进行直接胞外电子传递. 它们都在 0.1 V 左右有一个氧化峰, 在 -0.2 V 左右有一个还原峰. 在已知模式菌 *S. oneidensis* 的循环伏

安图中, 也在以上电势范围内出现氧化还原峰电流^[22]. 并且基于 *S. oneidensis* 基因和蛋白水平的研究表明, 其对应峰电位发生的直接胞外电子传递是由菌体表面蛋白细胞色素 c 引起^[23]. 因此, 本研究初步推断图 3(a) ~ 3(c) 中出现在 0.1 V 和 -0.2 V 左右的峰电流响应可能是由位于菌体表面的细胞色素 c 引起.

此外, WS-XY3 和 WS-XY4 两株菌的循环伏安图中, 在 -0.4 V 左右均存在一对氧化还原峰. Marsili 等^[24] 发现 *S. oneidensis* 可以分泌核黄素与电极间进行间接胞外电子传递, 而且核黄素的氧化还原电位在 -0.4 V 左右. 核黄素是生物生长代谢所必需的元素, 它可以被大多数微生物合成^[25], 并且核黄素很容易吸附在细胞或电极表面而不易被清洗, 因此笔者推断 WS-XY3 和 WS-XY4 两株菌的循环伏安图中 -0.4 V 左右的氧化还原峰可能是由吸附于菌体上的核黄素引起.

图 3(a) ~ 3(c) 菌体的电化学活性分析初步表明 3 株菌的菌体表面都存在氧化还原活性物质, 但并不能证明菌株是否具有间接胞外电子传递作用. 图 3(d) 中空白培养基和 3 株菌培养液上清的循环伏安图均未出现氧化还原峰电流响应, 表明 3 株菌都不能分泌具有电化学活性的电子中介体, 或者分泌的电子中介体浓度太低, 以致于不能通过循环伏安检测到.

2.2.2 计时电流分析

通过图 3 的循环伏安曲线, 可以推断菌体表面存在氧化还原活性物质, 为了进一步验证菌体表面氧化还原活性物质是否参与菌体代谢过程的电子传

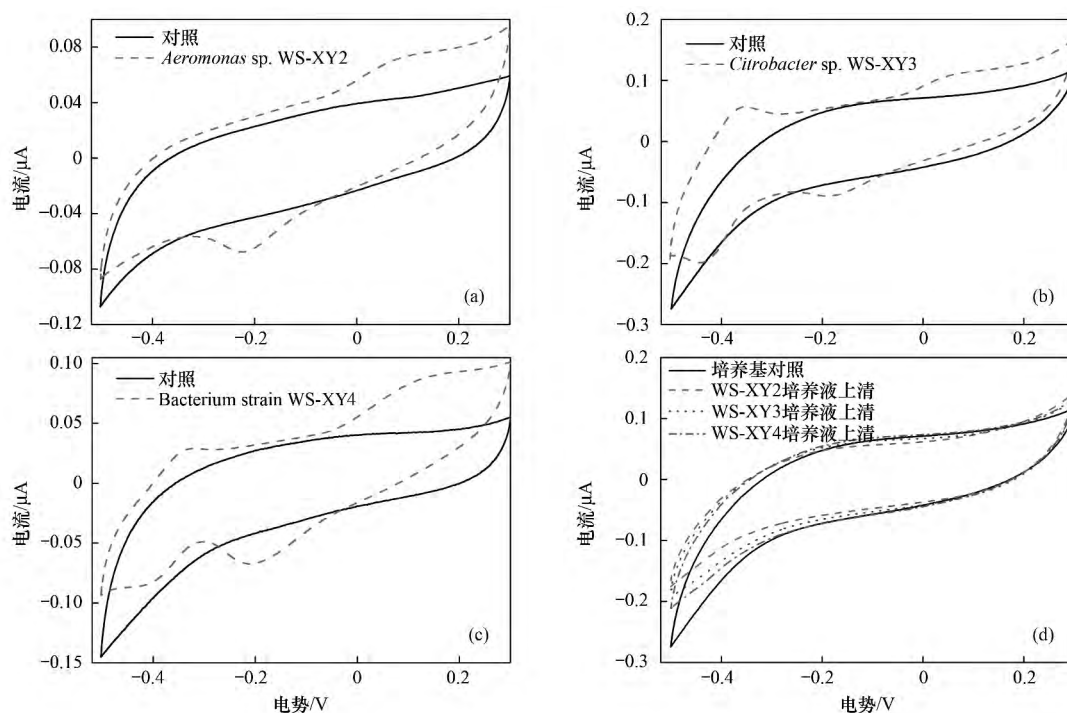


图3 *Aeromonas sp.* WS-XY2、*Citrobacter sp.* WS-XY3、*Bacterium strain* WS-XY4 菌体及培养液上清的循环伏安图

Fig. 3 Cyclic voltammetry of *Aeromonas sp.* WS-XY2, *Citrobacter sp.* WS-XY3, *Bacterium strain* WS-XY4 cell and their culture medium supernatant (cell-free)

递 笔者进行计时电流分析. 图4为3株菌的计时电流结果, 电流响应曲线表明3株菌都能够将代谢过程中产生的电子传递到细胞外, 即3株菌都具有电化学活性. 当在工作电极分别施加0.05 V和0.2 V电位时, 随着菌体的代谢, 3株菌在两个电位下均出现电流增大的响应. 当设定工作电极电位为0.05 V时, 电流的峰值响应是由于-0.4 V处氧化反应的发生引起; 当设定工作电极电位为0.2 V时, 电流的峰值响应是由于-0.4 V和0.1 V左右氧化反应的发生引起. 对于WS-XY3和WS-XY4两株菌, 结果表明菌体循环伏安图中位于0.1 V和-0.4 V左右的氧化峰均参与菌体的代谢电子传递, 这与*S. putrefaciens*在不同阳极电位下的电流响应相一致^[26]. 然而对于WS-XY2, 其循环伏安曲线中只在0.1 V左右有一个氧化峰出现, 但是当工作电极电位设定为低于0.1 V的0.05 V时, 随着菌体的代谢与增殖, 电流也出现峰值响应. *Geobacter sulfurreducens*在低于其氧化峰电位的阳极电位下也呈现出了与WS-XY2相一致的电流响应^[27]. 因此可能是由于菌体能够根据工作电极电位自动调整菌体表面氧化还原活性蛋白氧化态和还原态的比例, 来改变菌体表面最终电子供体的电位, 使其低于电极电位, 从而促进代谢产生电子由菌体传递到电极

表面^[28]. 最近 Okamoto 等^[29] 研究发现 *Geobacter sulfurreducens* 细胞表面的细胞色素 c 能够通过与菌体分泌的核黄素结合, 从而降低其氧化还原电位, 也进一步证实了菌体自身能够调整表面蛋白氧化还原电位. 综上所述, 对于生物电化学体系中的研究结果, 如果要用经典的电化学理论进行解释, 需要同时根据电化学和生物学数据进行综合考量.

3株菌出现相似的计时电流响应, 并且都在0.1 V和-0.2 V左右出现峰电流, 这可能是微氧阳极的定向选择, 使具有相似电化学性质的微生物富集在阳极, 作为功能微生物. WS-XY2和WS-XY3同属于变形菌门, 且对应种属中有电化学活性细菌 *Aeromonas hydrophila*^[30] 和 *Citrobacter sp.* SX-1^[31] 从微生物燃料电池厌氧阳极分离获得, 表明厌氧阳极与微氧阳极有相似的功能微生物. 但是本研究中还分离出初步鉴定为新种的WS-XY4, 表明厌氧阳极与微氧阳极功能微生物也存在差异. 以上结论与Quan等^[10]在群落水平上得出的厌氧阳极与微氧阳极在群落结构存在77%相似相耦合. WS-XY4由于在分类学鉴定上没有与之高度相似的种属, 笔者正在尝试通过系统的生理生化鉴定来确定其种属, 以便进一步围绕WS-XY4进行深入研究, 从而从微生物角度深入理解微氧阳极优于厌氧阳极的机制.

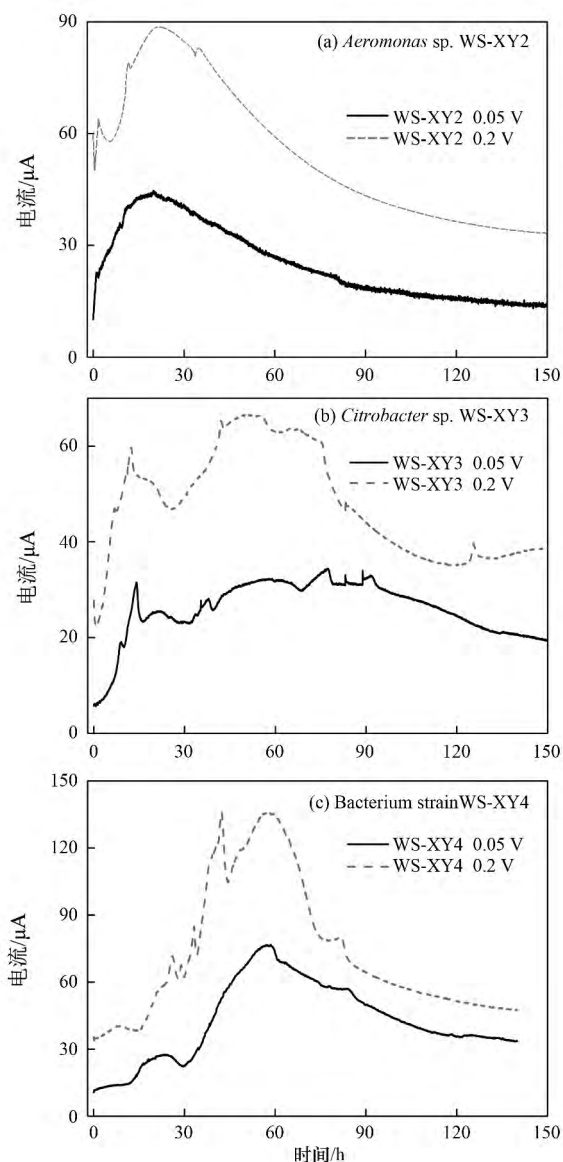


图4 *Aeromonas* sp. WS-XY2、*Citrobacter* sp. WS-XY3、*Bacterium* strain WS-XY4 的计时电流

Fig. 4 Chronoamperometry of *Aeromonas* sp. WS-XY2 ,
Citrobacter sp. WS-XY3 , *Bacterium* strain WS-XY4

3 结论

(1) 本研究采用好氧分离技术从微生物燃料电池微氧阳极分离获得3株纯菌,其中 WS-XY2 和 WS-XY3 均属于变形菌门,WS-XY4 初步鉴定为新种。

(2) 基于循环伏安和计时电流的电化学活性分析表明3株菌都具有电化学活性,且都只有直接胞外电子传递能力。3株菌在微生物分类学上和电化学性质上的异同,也表明微氧阳极能够定向筛选具有相似电化学性质的电化学活性微生物。

(3) 微生物燃料电池微氧阳极具有更高效多样的功能微生物,可能是微氧阳极性能优于厌氧阳极的一个原因。因此,进一步针对微生物燃料电池微氧阳极中功能微生物的研究,可以更全面地理解生物电化学系统,从而能够深入理解金属、碳等元素的生物地球化学循环和加速高效环境生物技术的应用。

参考文献:

- [1] 肖勇,吴松,杨朝晖,等. 电化学活性微生物的分离与鉴定[J]. 化学进展,2013,25(10): 1771-1780.
- [2] Kato S, Hashimoto K, Watanabe 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.
- [3] Wang X, Cai Z, Zhou Q X, et al. Bioelectrochemical stimulation of petroleum hydrocarbon degradation in saline soil using U-tube microbial fuel cells[J]. Biotechnology and Bioengineering,2012,109(2): 426-433.
- [4] Huang L P, Chai X L, Chen G H, et al. Effect of set potential on hexavalent chromium reduction and electricity generation from biocathode microbial fuel cells[J]. Environmental Science & Technology,2011,45(11): 5025-5031.
- [5] Lovley D R. Electromicrobiology[J]. Annual Review of Microbiology,2012,66: 391-409.
- [6] Rosenbaum M, Cotta M A, Angenent L T. Aerated *Shewanella oneidensis* in continuously fed bioelectrochemical systems for power and hydrogen production[J]. Biotechnology and Bioengineering,2010,105(5): 880-888.
- [7] Fan Y Z, Han S K, Liu H. Improved performance of CEA microbial fuel cells with increased reactor size[J]. Energy & Environmental Science,2012,5(8): 8273-8280.
- [8] Ringeisen B R, Ray R, Little B. A miniature microbial fuel cell operating with an aerobic anode chamber[J]. Journal of Power Sources,2007,165(2): 591-597.
- [9] TerAvest M A, Rosenbaum M A, Kotloski N J, et al. Oxygen allows *Shewanella oneidensis* MR-1 to overcome mediator washout in a continuously fed bioelectrochemical system[J]. Biotechnology and Bioengineering,2014,111(4): 692-699.
- [10] Quan X C, Quan Y P, Tao K, et al. Comparative investigation on microbial community and electricity generation in aerobic and anaerobic enriched MFCs[J]. Bioresource Technology,2013,128: 259-265.
- [11] 冯玉杰,李贺,王鑫,等. 电化学生产菌的分离及性能评价[J]. 环境科学,2010,31(11): 2804-2810.
- [12] Ergüder T H, Demirel G N. Investigation of granulation of a mixture of suspended anaerobic and aerobic cultures under alternating anaerobic/microaerobic/aerobic conditions[J]. Process Biochemistry,2005,40(12): 3732-3741.
- [13] Yang Z H, Xiao Y, Zeng G M, et al. Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2007,74(4):

- 918–925.
- [14] Xiao Y, Wu S, Zhang F, *et al.* Promoting electrogenic ability of microbes with negative pressure [J]. *Journal of Power Sources*, 2013, **229**: 79–83.
- [15] Masuda M, Freguia S, Wang Y F, *et al.* Flavins contained in yeast extract are exploited for anodic electron transfer by *Lactococcus lactis* [J]. *Bioelectrochemistry*, 2010, **78**(2): 173–175.
- [16] Embley T M, Stackebrandt E. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes [J]. *Annual Reviews in Microbiology*, 1994, **48**(1): 257–289.
- [17] Goodfellow M, O'donnell A G. Handbook of new bacterial systematics [M]. London: Academic Press, 1993. 191–195.
- [18] Logan B E, Regan J M. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells [J]. *Trends in Microbiology*, 2006, **14**(12): 512–518.
- [19] Yuan S J, He H, Sheng G P, *et al.* A photometric high-throughput method for identification of electrochemically active bacteria using a WO₃ nanocluster probe [J]. *Scientific Reports*, 2013, doi: 10.1038/srep01315.
- [20] 范明志, 梁鹏, 曹效鑫, 等. 阳极初始电势对微生物燃料电池产电的影响 [J]. *环境科学*, 2008, **29**(1): 263–267.
- [21] Wang X, Feng Y J, Ren N Q, *et al.* Accelerated start-up of two-chambered microbial fuel cells: Effect of anodic positive poised potential [J]. *Electrochimica Acta*, 2009, **54**(3): 1109–1114.
- [22] Wu R R, Cui L, Chen L X, *et al.* Effects of bio-Au nanoparticles on electrochemical activity of *Shewanella oneidensis* wild type and ΔomcA/mtrC mutant [J]. *Scientific Reports*, 2013, doi: 10.1038/srep03307.
- [23] Shi L, Richardson D J, Wang Z M, *et al.* The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, **1**(4): 220–227.
- [24] Marsili E, Baron D B, Shikhar I D, *et al.* *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, **105**(10): 3968–3973.
- [25] Abbas C A, Sibirny A A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, **75**(2): 321–360.
- [26] Carmona-Martínez A A, Harnisch F, Kuhlicke U, *et al.* Electron transfer and biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* as function of anode potential [J]. *Bioelectrochemistry*, 2013, **93**: 23–29.
- [27] Zhu X P, Yates M D, Logan B E. Set potential regulation reveals additional oxidation peaks of *Geobacter sulfurreducens* anodic biofilms [J]. *Electrochemistry Communications*, 2012, **22**: 116–119.
- [28] Logan B E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, **7**(5): 375–381.
- [29] Okamoto A, Saito K, Inoue K, *et al.* Uptake of self-secreted flavins as bound cofactors for extracellular electron transfer in *Geobacter* species [J]. *Energy & Environmental Science*, 2014, **7**(4): 1357–1361.
- [30] Pham C A, Jung S J, Phung N T, *et al.* A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, **223**(1): 129–134.
- [31] 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.