

一株海洋产电菌 *Shewanella* sp. S2 的 筛选和产电分析

王彪¹ 黄杰勋² 章晓波³ 王蔚² 熊小京¹ 徐方成^{3,4*}

- (1. 厦门大学 海洋与环境学院 福建 厦门 361005)
- (2. 国家海洋局第三研究所 海洋生物遗传资源重点实验室 福建 厦门 361005)
- (3. 浙江大学 生命科学学院 浙江 杭州 310058)
- (4. 厦门大学 化学化工学院 福建 厦门 361005)

摘要: 以厦门白城海域的潮间带表面沉积物为菌种来源筛选得到一株具有电催化活性的菌株 S2, 该菌株的 16S rRNA 和 *gyrB* 基因发育树与 *Shewanella oneidensis* MR-1 同支, 相似性分别为 98.5% 和 87%, 葡萄糖、木糖、半乳糖等碳源利用及最佳生长的 NaCl 浓度与 *S. oneidensis* MR-1 有显著差别, 因此初步鉴定为 *Shewanella* 属菌株, 命名为 *Shewanella* sp. S2。初步研究了菌株 S2 产电活性, 在以乳酸作为碳源产电时, 电压最高为 150 mV, 相应的电流密度为 66.1 mA/m²。

关键词: 产电菌, *Shewanella*, *gyrB*, 微生物燃料电池

Isolation and Characterization of an Electricity-producing Strain *Shewanella* sp. S2 from Marine

WANG Biao¹ HUANG Jie-Xun² ZHANG Xiao-Bo³ WANG Wei²
XIONG Xiao-Jing¹ XU Fang-Cheng^{3,4*}

- (1. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)
- (2. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, Fujian 361005, China)
- (3. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)
- (4. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: A new electrochemically active bacterium (exoelectrogen), strain S2, was isolated from coastal marine sediments of Xiamen. The phylogenetic trees based on 16S rRNA and *gyrB* gene sequences showed that strain S2 formed a lineage within the genus *Shewanella* and had high similarity (98.5% and 87.0%, respectively) with strain *S. oneidensis* MR-1. The phenotypic characteristics indicated strain S2 could be distinguished easily from *S. oneidensis* MR-1 by its culture conditions such as pH, NaCl tolerance and carbon source utilization. Based on these results, it is identified as *Shewanella* sp. S2. The preliminary current generation experiments showed that S2 could use lactate and xylose for electricity production. When lactate was used as a fuel, the MFC had highest voltage (150 mV) and current density (66.1 mA/m²).

基金项目: 中国大洋协会项目(No. DYXM-115-02-2-15)

* 通讯作者: ✉: fcxu@xmu.edu.cn

收稿日期: 2009-09-03; 接受日期: 2010-01-08

Keywords: Exoelectrogen, *Shewanella*, *GyrB*, Microbial fuel cell

微生物燃料电池(MFC)是一种特殊的燃料电池,它以微生物为催化剂,废弃生物质、有机废水等有机物作为燃料,通过生物氧化产生电能。将MFC应用于有机废水处理领域,既处理了废水,又能回收保存在有机物中的部分能量,降低废水处理成本,实现污染治理与资源化的双重效果。MFC技术主要包括反应器和产电微生物两方面,我国学者在MFC的反应器构建^[1]、MFC的微生物驯化启动^[2]以及MFC在染料脱色^[3]等方面开展了一些研究工作,但在产电菌的选育方面研究报道还不多。产电菌主要属于变性菌纲(Proteobacteria)的 β 、 γ 、 δ 几个亚纲的化能异养细菌^[4],其中以 δ 亚纲的地杆菌属(*Geobacter*)和 β 亚纲的希瓦氏菌属(*Shewanella*)的产电菌比较多。地杆菌是严格厌氧菌,到目前为止有系统命名的菌种约有14种,绝大多数是2000年以后筛选得到的新种,其中产电菌 *Geobacter sulfur-reducens* 和 *Geobacter metallireducens* 完成了全基因组测序^[14-15]。希瓦氏菌属是1985年Macdonell等^[16]根据5S rRNA序列从交替单胞菌属中另立的新属,2004年Ivanova^[17]根据海洋无色菌类细菌的16S rRNA系统进化分析,进一步提出了希瓦氏科(Shewanellaceae),*Shewanella*是该科唯一的属。希瓦氏菌是典型的海洋细菌属,其中有一些是来自深海的嗜冷细菌和深海热液区的产电菌^[5]。该属现有系统命名的菌种约51种,其中50%左右是2004年后筛选得到的新种,产电菌模式种 *S. oneidensis* MR-1 已完成全基因组测序^[18]。产电菌的生理生化性质比较特殊,目前还没有统一的筛选方法。我们以厦门白城海域的潮间带表面沉积物为菌种来源,FeO(OH)作为胞外电子受体,先富集培养然后通过厌氧平板筛选得到一株产电菌 S2, 本文报道该菌的筛选、鉴定和产电分析等方面的研究工作。

1 材料和方法

1.1 培养基

富集培养基采用经改进的2216E培养基(1 L): 陈海水, 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 无定形氢氧化铁 FeO(OH) 10 g, pH 7.0, 其中 FeO(OH) 作为胞外电子受体。产电基础培养基(1 L): NaCl 20.0 g, KCl 0.745 g, NaH₂PO₄ 0.35 g, Na₂HPO₄ 0.44 g, MgSO₄ 0.188 g,

Wolfe 微量元素溶液 10 mL^[6], 初始 pH 6.8-7.0。生理生化测试在产电基础培养基基础上, 根据具体实验项目补加碳源和氮源。

1.2 产电菌筛选

选取白城海域的潮间带表面沉积物作为菌种来源, 加去离子水振荡后过滤, 滤液为接种物。在厌氧管内用富集培养基富集 4-6 个月后, 吸取富集物涂布于琼脂平板或厌氧管, 置于厌氧手套箱培养, 温度 30°C。用接种针挑取典型菌落接种于富集培养基中再次富集培养, 培养后再次涂布分离。如此反复几次, 得到形态、大小、颜色都一致的菌落即认为是纯种, 经 MFC 产电测试能明显产生电流的即认为是产电菌。

1.3 产电装置

产电测试采用试剂瓶型的微生物燃料电池(MFC), 两个体积为 500 mL 的试剂瓶作为阴极室和阳极室, 两室之间通过短侧管连接一片质子交换膜(Nafion117, DuPont), 形成 H 型。每个电极室装液 400 mL, 电极为不抛光的高纯石墨, 尺寸 50 mm × 30 mm × 10 mm, 两电极用带绝缘套的导线接出, 外接 510 Ω 电阻。电极使用前用 1 mol/L HCl 浸泡去除表面吸附物, 使用后再用 1 mol/L NaOH 浸泡以除去其表面吸附的细菌。阳极室接种前通 N₂ 除氧, 接种后仍持续通气, 阴极持续通空气, N₂ 和空气先经过孔径为 0.20 μ m 滤膜除菌, 并有磁力搅拌促进溶液混合。所接菌种先用富集培养基(无氢氧化铁)培养至对数末期, 冷冻离心(7000 r/min, 5 min)后用产电基础培养基重新悬浮, 再用注射器注入阳极室。

1.4 分析方法

菌体浓度用紫外可见分光光度计(UV-2000, Unico, United States)测量, 测量波长 600 nm。超景深三维显微系统(VH-Z500R, Keyence Digital Microscope, Japan) 观察细菌形态, 多通道万用数字电表(2000, Keithley, United States)测量 510 Ω 电阻两侧电压, 数据通过采集卡汇总到电脑, 采集速度 30 min/次。

1.5 16S rRNA、*gyrB* 序列分析

根据 Holmes^[7]报道的方法提取基因组总 DNA, PCR 扩增 16S rRNA 基因采用通用引物, 27F:

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'。扩增程序为: 94°C 4 min; 94°C 15 s, 53°C 31 s, 65°C 8 min, 35 个循环; 72°C 10 min^[8]。gyrB 基因的引物 GYR130F/GYR1130: 5'-ATCTCCTGGGAGGAGAGCATC-3'/5'-CTGGAGCTGGAGATTCCCG-3'。扩增程序为: 94°C 4 min; 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min^[9]。所测序列提交 GenBank 数据库, 使用 BLAST 程序进行相似性比较 (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>)。调取 GenBank 数据库中与之同源性较高的一些细菌序列, 采用邻位联结法(Neighbor-joining method) 用 MEGA 4.0 软件构建产电菌的系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 产电菌筛选

产电菌不需要人工电子介体, 就能把代谢产生的部分电子传递到细胞外^[10]。在自然界, 产电菌往往不是优势种群, 因此需要先富集。我们以 FeO(OH) 作为胞外电子受体模拟物, 在厌氧管内先富集, 富集物稀释后在含有 FeO(OH) 的平板上或厌氧管内涂布培养。经多次富集、分离和产电测试, 得到 6 株产电能力明显的菌株。本文选择其中一株产电菌(S2)进行菌种鉴定。该菌细胞在超景深三维显微镜下(放大 5000 倍)呈浅黄色, 能运动, 形状为棒型, 长 4 μm-6 μm, 宽 0.3 μm-0.5 μm (图 1), 革兰氏反应为阴性。

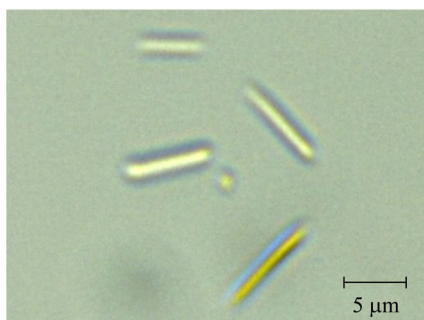


图 1 菌株 S2 电子显微照片

Fig. 1 Transmission digital micrograph of strain S2

2.2 16S rRNA 和 gyrB 基因进化关系分析

16S rRNA 及 gyrB 基因同源性分析是细菌分类鉴别的一种有效方法^[11-12], 研究表明两种微生物的 16S rRNA 序列虽然同源性达 97% 以上仍有可能属于不同种, 增加除 16S rRNA 以外基因的比对有助

于提高菌株鉴定的准确性。在变形菌纲的细菌鉴定中, gyrB 常作为协助鉴定的基因, 一般认为 gyrB 序列同源性大于 90%, 视为同种的最低要求。

测序由上海生工有限公司完成, BLAST 调用 GenBank 数据库中待鉴定菌株相似性较高的菌株的基因序列, 使用 MEGA 软件进行多序列匹配排列, 删除序列匹配排列中出现的插入和缺失, 构建了 S2 与相关菌种的系统发育树如图 2、3 所示。结果表明菌株 S2 的 16S rRNA 与 *S. oneidensis* MR-1 (AF005964) 属于同一个分支, 同源性为 98.5%; 该菌株 gyrB 基因与 *S. oneidensis* MR-1 相似性为 87%。S2 菌株的 16S rRNA 和 gyrB 序列在 GenBank 登录号分别为 FJ589033 和 FJ589044。

2.3 生理生化分析

从 16S rRNA、gyrB 系统发育树得知菌株 S2 与 *S. oneidensis* MR-1 有最近的亲缘关系, 因此选择 *S. oneidensis* MR-1^[13] 作为生理生化的对比菌株。pH、温度、NaCl 含量对生长的影响采用经改进的 2216E 培养基, 得出 S2 能生长的 pH 范围为 4.0-9.0, 温度 4°C-45°C, NaCl 0-7% (表 1)。在产电基础培养基基础上, 添加 20 mmol/L 乳酸和 20 mmol/L 富马酸作为电子供体和电子受体, 测试氮源对生长的影响, 结果发现 S2 能很好地利用酵母膏、硝酸盐和铵盐, 但不能利用亚硝酸。以氯化氨作为氮源、富马酸为电子受体研究了 S2 碳源利用情况, 得出 S2 与模式菌株 *S. oneidensis* MR-1 在葡萄糖、木糖、乳酸、甘露糖、甘油、甘露醇、乳糖、半乳糖、柠檬酸等碳源利用方面有明显区别。希瓦氏菌能利用的电子受体非常广泛, 除了 O₂、硝酸盐, 还能利用单质 S、SO₃⁻、S₂O₃²⁻、二甲亚砷、三甲胺氧化物、铁氧化物、锰氧化物以及金属离子 U (VI)、Cr (VI)、Tc (VII) 等作为电子受体, 但一般认为希瓦氏菌能利用的碳源很有限, 主要以发酵中间产物(乳酸、丙酸等)以及一些氨基酸作为碳源, 不能利用葡萄糖和木糖, S2 碳源利用特性可能与该菌来自近海沉积物有关。

2.4 产电特性

根据 S2 碳源利用的测试结果, 选择乙酸、木糖、乳酸和葡萄糖(浓度均为 20 mmol/L) 作为代表性的碳源, 初步研究 S2 的产电能力。因为 S2 能利用蛋白胨或酵母产电, 因此, 产电测试使用无机盐作为氮源(1 g/L NH₄Cl)。菌体用经改进的 2216E 培养基

好氧培养(不加氢氧化铁)至对数末期, 离心后用产电培养基重新悬浮后加入阳极室, 菌液初始 $OD_{600} = 0.3$, 阴极只加入产电基础培养基, 实验结果如图 4 所示。S2 能利用乳酸和木糖产电, 但不能利用葡萄糖、乙酸产电。在木糖为燃料时, 产生的最高电压只有

20 mV, 而且持续时间很短。在以乳酸为燃料时, 产电效果最佳, 最高稳定电压可达 150 mV, 相应地电流密度为 66.1 mA/m^2 。从产电曲线看, 开始电压上升比较快, 然后进入一个相对缓慢的增长期, 运行到 155 h, 电压不再增加。

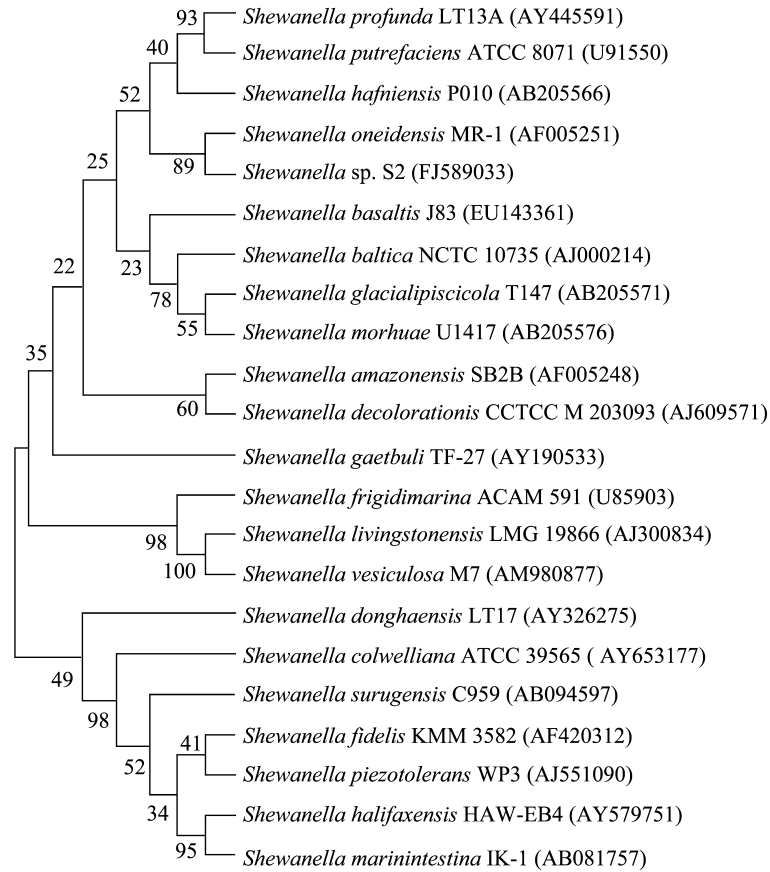


图 2 菌株 S2 的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain S2 based on 16S rRNA gene sequences

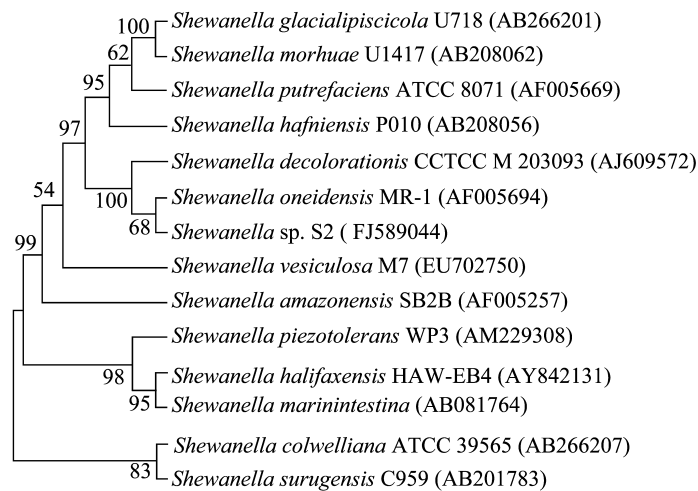


图 3 菌株 S2 的 *gyrB* 基因系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree strain S2 based on *gyrB* gene sequences

表 1 S2 菌株与 *S. oneidensis* MR-1 的生理生化比对
Table 1 Comparison of physiological and biochemical characteristics of S2 with *S. oneidensis* MR-1

测试项目	菌株		测试项目	菌株	
Test items	S2	<i>S. oneidensis</i> MR-1	Test items	S2	<i>S. oneidensis</i> MR-1
最佳生长温度	25-30	25-35	柠檬酸	+	-
Optimal temperature for growth (°C)			Citrate		
最佳生长 pH	6-8	7-8	苹果酸	-	-
Optimal pH for growth			Malate		
最佳盐度	1%-3%	1%	甘露糖	+	+
Optimal NaCl			Mannose		
7%	+	w	甘露醇	+	-
45°C	+	w	D-Mannitol		
乙酸	w	-	葡萄糖酸钠	+	+
Acetate			Gluconate		
还原硝酸盐	+	+	麦芽糖	+	-
Nitrate reduction			Maltose		
还原亚硝酸盐	-	-	琥珀酸	w	+
Nitrite reduction			Succinate		
半乳糖	+	-	乳酸	+	+
D-Galactose			DL-Lactate		
葡萄糖	+	-	木糖	+	ND
D-Glucose			Xylose		
乳糖	+	-	晶体几丁质	-	ND
Lactose			Crystal chitin		
甲酸	-	-	甘油	+	-
Formic			Glycerol		
淀粉	-	-	产电	+	+
Starch			Current generation		

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction; ND: No data; w: Weak.

产电菌的产电活性主要有电化学法、异化还原铁氧化物法和燃料电池法 3 种测试方法,其中以燃料电池法较常用,因为燃料电池结构简单操作方便,既可作为测量装置,也可作为产电微生物的筛选装置。用于测试的 MFC 可分为双室 MFC 和单室 MFC,根据 MFC 大小又可分为试剂瓶型 MFC 和微型 MFC。同一产电菌在不同的 MFC 装置中测得的产电能力可能差异很大,影响产电的因素非常多,阳极、隔膜和阴极之间的距离和相对大小是关键的影响因素。一般地,两室的体积越大,生化反应产生的质子从阳极室迁移到阴极室的距离越长,MFC 的内阻就越大,单位面积上的电流就越低。除了反应器大小是造成产电表征差异的主要因素外,阳极面积的不同表示法也有很大影响,如表 2 所示的产电菌 *Rhodospirillum rubrum* 在同样的反应器和同样的碳源条件下,以石墨板、碳毡和泡沫石墨做阳极的

电流密度分别为 31、88.4、74 mA/m²,因为碳毡和泡沫石墨的真实表面积比石墨板的要大得多,当他们都以名义表面积计算时就显得产电活性比较高。本文的产电装置为试剂瓶型的 MFC,与 Lovley 等^[22]的 MFC 测试装置很相似,如试剂瓶大小、质子交换膜型号、以及阳极和阴极材料均为石墨板。经测试该 MFC 的内阻达到 494 欧姆,在此条件下 S2 利用乳酸的电流密度仍能达到 66.1 mA/m²,如果采用微型的 MFC 或采用碳毡等多孔材料,S2 的电流密度会更高。

在现有的产电菌中,很少有能利用葡萄糖或木糖生长的菌株,S2 能利用葡萄糖和木糖厌氧生长,但不能利用葡萄糖产电,这可能是由于我们的产电实验装置还比较粗糙所致,因为我们发现 Lovley 等^[22]在研究 *R. ferrireducens* 利用葡萄糖产电时,阴极电位做了严格控制(阴极电压控制在 200 mV),并且

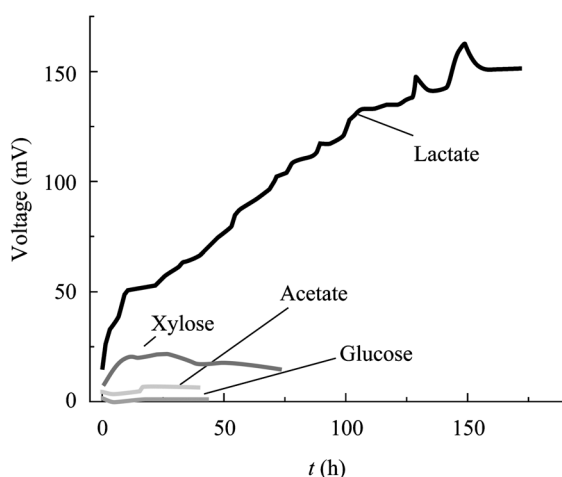


图4 菌株 S2 利用不同碳源产电

Fig. 4 Electricity generation by strain S2 using different carbon sources (20 mmol/L in all tests) in H-MFCs

在阴极室添加了铁氰化钾促进阴极反应。本文主要报道产电菌 S2 筛选和鉴定, S2 利用葡萄糖、木糖等碳源的产电能力将在下一步详细研究。

3 结论

本文以 FeO(OH) 作为胞外电子受体模拟物, 从厦门白城海域的潮间带表面沉积物中分离得到产电菌 S2。16S rRNA 和 *gyrB* 进化树显示 S2 与 *S. oneidensis* MR-1 的 16S rRNA 的相似性大于 97%, 但 *gyrB* 的相似性只有 87%, 低于同种的最低相似度要求。在生理生化方面, S2 能在高盐培养基(约 7% NaCl)中能生长, 当以延胡索酸作为电子受体时, 能利用乳糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖、甘油、

表2 产电菌产电能力比较
Table 2 Current-producing ability of some exoelectrogens

产电菌 Exoelectrogens	MFC 类型 MFC properties	电子供体 Electron donor	阳极特性 Anode properties	电流密度 mA/m ² anode surface area
<i>S. putrefaciens</i> IR-1 ^[19]	两室微型, 阳极室体积 20 mL	乳酸	碳毡	27.2
<i>S. oneidensis</i> MR-1 ^[20]	两室微型, 阳极室体积 25 mL	乳酸	碳毡	13.8
<i>S. oneidensis</i> DSP10 ^[21]	两室微型, 阳极室体积 1.2 mL	乳酸	石墨板	17.2
<i>S. oneidensis</i> DSP10 ^[21]	两室微型, 阳极室体积 1.2 mL	乳酸	碳毡	54.0
<i>R. ferrireducens</i> ^[22]	两室试剂瓶型, 阳极室体积 370 mL	葡萄糖	石墨板	31.0
<i>R. ferrireducens</i> ^[22]	两室试剂瓶型, 阳极室体积 370 mL	葡萄糖	碳毡	88.4
<i>R. ferrireducens</i> ^[22]	两室试剂瓶型, 阳极室体积 370 mL	葡萄糖	泡沫石墨	74.0
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> ^[23]	两室试剂瓶型, 阳极室体积 370 mL	乙酸	石墨板	31.0
<i>G. sulfurreducens</i> ^[24]	两室试剂瓶型, 阳极室体积 370 mL	乙酸	石墨板	65.0
<i>Shewanella</i> sp. S2	两室试剂瓶型, 阳极室体积 500 mL	乳酸	石墨板	66.1

甘露醇、柠檬酸、乳酸等多种碳源。在碳源利用方面, S2 不仅与现有的希瓦氏属细菌有显著区别, 而且与模式株 *S. oneidensis* MR-1 也有明显不同。根据这些分析结果, 暂时将 S2 定为 *Shewanella* sp. S2。

初步产电测试表明 S2 能利用乳酸和木糖产电, 以乳酸作为电子供体时单位阳极表面积电流达到 66.1 mA/m², 属于高活性的产电菌。S2 能利用葡萄糖但在现有 MFC 装置中没有产电活性, 可能与装置控制条件有关, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 黄霞, 梁鹏, 曹效鑫, 等. 无介体微生物燃料电池的研究进展. 中国给水排水, 2007, 23(4): 1-6.
- [2] 李浩然, 连静, 冯雅丽, 等. 无介体微生物燃料电池性

能研究. 高校化学工程学报, 2008, 22(4): 4.

- [3] 许玫英, 郭俊, 钟小燕, 等. 一个降解染料的希瓦氏菌新种——中国希瓦氏菌. 微生物学报, 2004, 44(5): 561-566.
- [4] Logan BE, Regan JM. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol*, 2006, 14(12): 512-518.
- [5] Wei D, Zhang X. Current Production by a Deep-Sea Strain *Shewanella* sp. DS1. *Current Microbiology*, 2007, 55(6): 497-500.
- [6] Bond DR, Lovley DR. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1548-1555.
- [7] Holmes DE, Nevin KP, Lovley DR. Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family *Geobacteraceae* fam. nov.. *Soc General Microbiol*, 2004, 54(5): 1591-1599.

- [8] Zuo Y, Xing D, Regan JM, *et al.* Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**(10): 3130–3137.
- [9] Watanabe K, Yamamoto S, Hino S, *et al.* Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by *gyrB*-targeted quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(4): 1203–1209.
- [10] Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, **7**(5): 375–381.
- [11] Adachi T, Mizuuchi M, Robinson EA, *et al.* DNA sequence of the *E. coli gyrB* gene: application of a new sequencing strategy. *Nucleic acids research*, 1987, **15**(2): 771–785.
- [12] 姬广海, 魏兰芳, 吴亚鹏. 一种新型生防细菌菌株 13-1 鉴定及其生物学特性. *微生物学通报*, 2009, **36**(7): 974–980.
- [13] Venkateswaran K, Moser DP, Dollhopf ME, *et al.* Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1999, **49**(2): 705–724.
- [14] Methe BA, Nelson KE, Eisen JA, *et al.* Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science*, 2003, **302**(5652): 1967–1969.
- [15] Aklujkar M, Krushkal J, DiBartolo G, *et al.* The genome sequence of *Geobacter metallireducens*: features of metabolism, physiology and regulation common and dissimilar to *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiology*, 2009(9): 109–131.
- [16] MacDonell MT, Colwell RR. Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1985(6): 171–182.
- [17] Ivanova EP, Flavier S, Christen R. Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Montellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004(54): 1773–1788.
- [18] Heidelberg JF, Paulsen IT, Nelson KE, *et al.* Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnology*, 2002, **20**(11): 1118–1123.
- [19] Kim HJ, Park HS, Hyun MS, *et al.* A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **30**(2): 145–152.
- [20] Bretschger O, Obraztsova A, Sturm CA, *et al.* Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(21): 7003–7012.
- [21] Ringeisen BR, Henderson E, Wu PK, *et al.* High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environmental Science & Technology*, 2006, **40**(8): 2629–2634.
- [22] Chaudhuri SK, Lovley DR. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*, 2003, **21**(10): 1229–1232.
- [23] Bond DR, Holmes DE, Tender LM, *et al.* Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science*, 2002, **295**(5554): 483–485.
- [24] Bond DR, Lovley DR. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(3): 1548–1555.