

利用异化金属还原菌构建含糖微生物燃料电池 Construction of Sugar-based Microbial Fuel Cells by Dissimilatory Metal Reduction Bacteria

刘志丹^{1,2}, 连 静³, 杜竹玮¹, 李浩然^{1*}

LIU Zhi-Dan^{1,2}, LIAN Jing³, DU Zhu-Wei¹ and LI Hao-Ran^{1*}

1 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

3 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083

1 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

3 Civil and Environmental Engineering School, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

摘 要 环境中的一些微生物通过还原金属氧化物进行无氧呼吸,而石墨电极与金属氧化物相似,也可以作为这类微生物呼吸作用的最终电子受体,利用这类微生物构建微生物燃料电池,以糖类物质为燃料,对电池产电情况、产电原理进行研究。实验结果表明,以 *Rhodospirillum rubrum* 为产电微生物,在外接电阻 510Ω 条件下,以葡萄糖为燃料,常温下产生的电流密度达 158mA/m² (平台电压为 0.46V, 电极有效接触表面积为 57cm²),且循环性能良好。更换燃料为其它糖,发现微生物可以利用多种糖进行产电;通过 SEM 观察发现大量微生物吸附在石墨电极上,用 Bradford 法对运行 20d 后电池的细胞量进行定量,测得悬浮细胞蛋白浓度为 140mg/L,吸附在电极上的生物量为 1180mg/m²。通过数据采集分析和细菌还原实验,发现吸附在电极上的微生物对电压的产生贡献最大,具有电化学和生物学活性;悬浮细胞对产电贡献很小,不具有电化学和生物学活性。

关键词 异化金属还原菌,微生物燃料电池,生物质,葡萄糖

中图分类号 Q819 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0131-07

Abstract Dissimilatory Metal Reduction Bacteria play an important role in the anaerobic environment. This kind of bacteria gains energy by coupling the oxidation of organic acid or sugars to the reduction of metal oxides. The graphite electrode rode can also be used as the final electron acceptor due to its similarity to solid metal oxides. Based on this biological mechanism, Dissimilatory Metal Reduction Bacteria *Rhodospirillum rubrum* was used to construct a suit of microbial fuel cells with sugars as fuel, and the process and mechanism of electricity generation was studied. *Rhodospirillum rubrum* was inoculated into the anode chamber in which a graphite electrode served as the final electron acceptor and glucose as the sole electron donor. It was showed that current density was up to 158mA/m² with the resistance of 510Ω at the normal temperature (platform voltage was around 0.46V, the effectual electrode surface was 57cm²). Following 20days' growth a large amount of bacteria cells attached to the electrode surface had been observed through the SEM images. The plandtonic cell protein concentration was 140mg/L and the attached biomass of electrode surface was 1180mg/m² determined by the Bradford method, which indicated quite a few bacteria attached to the electrode. By analyzing the voltage value measured by the data acquisition system, it was proved that microbial

Received: June 21, 2005; Accepted: July 29, 2005.

This work was supported by the grant from the National Natural Sciences Foundation of China (No. 20476009).

* Corresponding author. Tel: 86-10-82627064; E-mail: hrli@home.ipe.ac.cn

国家自然科学基金资助项目 (No. 20476009)。

electricity generation attributed mainly to the electrochemically and biologically active cells attached to the electrode, while the planktonic cells had no ability to catalyze electricity generation and almost had not electrochemically and biologically active. Furthermore, this kind of microbial fuel cells exhibited a good electrochemical cycle property and proved to be efficient in biomass utilization and energy restore since other sugars like fructose, sucrose, even xylose, could be oxidized and finally decomposed.

Vast waste biomass in the form of carbohydrates is discarded in the environment. Not only is contamination of the environment caused by the discarded biomass, but also abundant energy stored in the biomass is drained away in vain. The sugar-based microbial fuel cells constructed by *Rhodospirillum rubrum* could effectively transform the energy stored in sugars into electricity. Meanwhile, the microbial fuel cells presented in this paper, which could work cleanly at normal temperature with a good cycle property, showed a promising future application in this field.

Key words dissimilatory metal reduction bacteria, microbial fuel cells, biomass, glucose

异化金属还原菌(Dissimilatory Metal Reduction Bacteria)是生态环境中的一类重要的微生物群体,该菌催化的 Fe(III)和 Mn(IV)还原的生物地球化学过程的重要性直到最近 10 年才被认识^[1]。异化金属还原是指微生物利用金属氧化物作呼吸作用的最终电子受体的还原过程,它有别于细胞将金属离子摄入所造成的金属还原的同化作用^[2]。由于这类菌在生命科学、生物整治和生物产电等方面具有重要的研究意义和应用价值,相关研究越来越多^[3,4,5,6]。

微生物燃料电池是指借助微生物的催化作用直接将燃料(如有机酸、糖类等)的化学能转化为电能的装置^[7]。环境中大量的废水、含糖废弃物等皆有可能作为燃料,微生物在降解利用废水废弃物时存在电子传递,基于微生物催化的氧化还原反应原理,可设计新型的微生物燃料电池,从水中沉积物和有机废水中产生电能^[6,8],且能降解糖类及一些有机污染物,使其转化成二氧化碳以及其它无毒物质。利用异化金属还原菌构建的微生物燃料电池的显著特点是燃料来源广泛(各种有机酸、工农业废弃物等),可常温发电,循环性能好,发电清洁高效等^[9,10]。研究微生物燃料电池的关键问题是其中产电机理和燃料利用情况^[10],目前对产电机理的研究还不够明确。本实验室设计了一套微生物燃料电池装置,与其它电池装置相比,增加了取样和注入口,便于分析考察,且两室中间以聚四氟乙烯材料连接,拆卸方便可湿热灭菌。本实验在乙酸等有机物作燃料的基础上,以糖为燃料,对电池的生物质利用情况及循环性能进行研究,同时比较电极上生物膜形成后悬浮细菌和吸附细菌的产电性能,并进行定量分析,探讨了细菌产电的内在机理,为电池的放大和应用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

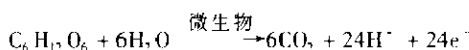
1.1.1 菌种:所用菌种 *Rhodospirillum rubrum* (缩写为 R.f)购自德国菌种保藏中心(DSMZ 15236)。

1.1.2 培养基:①厌氧箱培养基(1L):KCl 0.1g, NH₄Cl 0.2g, NaH₂PO₄ 0.6g, NaHCO₃ 2.5g, Trace Vitamin 溶液 10mL、Trace mineral 溶液 10mL,调 pH 6.8~7.0;通无菌 N₂-CO₂(80:20)混合气 30min 以除去培养基中氧气后,分装入厌氧管中,121℃灭菌 15min,而后转入厌氧箱中,接种和培养均在严格厌氧环境中进行。电子受体 MnO₂ 10mmol/L 称量后紫外灭菌加入,电子供体葡萄糖 5mmol/L 须过滤除菌后加入。其他电子受体富马酸钠 2mmol/L 也须过滤除菌后加入。培养温度:25℃。②电池培养基:阳极液(1L):KCl 0.1g, NaCl 2.9g, NaH₂PO₄ 0.6g, NaHCO₃ 2.5g, Trace Vitamin 溶液 10mL、Trace mineral 溶液 10mL,调 pH 6.8~7.0。通无菌的 N₂-CO₂(80:20)混合气 30min 除氧后,121℃灭菌 15min。阴极液(1L):KCl 0.1g, NaCl 2.9g, NaH₂PO₄ 0.6g, Tris 3.64g, 加盐酸调 pH 7.0, 121℃灭菌 15min。电池运转温度:25℃。

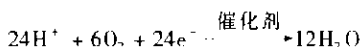
1.1.3 微生物燃料电池装置^[11]:微生物燃料电池装置(图 1)为本实验室设计,主要由阴、阳两极室构成,中间通过质子交换膜(Nafion-117, Dupont)隔开,各极室装入溶液 200mL。电极均为未抛光的高纯石墨电极。电极的物理表面积为 65cm²,使用前用 1mol/L HCl 浸泡去除杂质离子,使用完后再用 1mol/L 的 NaOH 浸泡以除去其表面吸附的细胞。阳极接种细菌,接种前通无菌的 N₂-CO₂(80:20)混合气除尽培养基中氧气,接种后缓慢通混合气,以防止阴极

室的氧气通过质子交换膜渗入阳极,同时可以保持阳极培养基 pH 的平衡(保持在中性条件下)。阴极持续通无菌空气,保持其内溶解氧的浓度,并加入少量 $K_3Fe(CN)_6$ 强化电子传递。两极室均缓慢搅拌。电池装置使用前高压湿热灭菌。一般阳极室内葡萄糖(燃料)初始浓度为 1mmol/L ,当燃料耗完后,可继续加燃料适量注入阳极。为了除去锰离子对电极反应可能的干扰,将细菌从以二氧化锰作电子受体的培养基中转入以富马酸钠作电子受体的培养基,培养 4 代后,取对数生长期后期菌液按 10% 接种入阳极室。由于电池中发生的电极反应比较复杂,葡萄糖最终会主要降解为二氧化碳,为简便明了起见,表述如下:

阳极反应(厌氧):



阴极反应(好氧):



总反应:

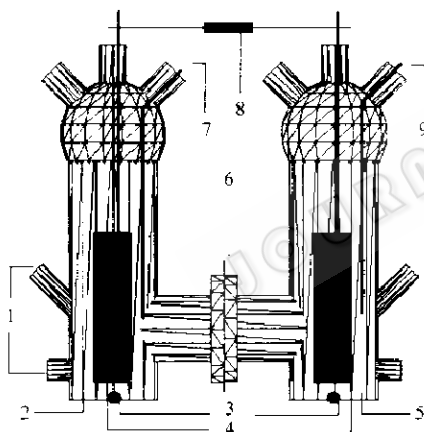
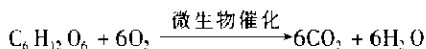


图 1 微生物燃料电池装置图

Fig.1 Schematic diagram of microbial fuel cells

- 1: sampling port; 2: anode cell; 3: stirring bar; 4: graphite rod;
5: cathode cell; 6: proton exchange membrane; 7: sterile N_2/CO_2 input; 8: resistance; 9: sterile air input.

1.2 分析方法

电压采集:数据采集卡为瑞博华 AD8201H, 16 位, 32 通道, 编程双端方式工作, 采集精度 0.1mV , 采集时间间隔 1min 。

阳极室内及电极表面吸附细胞浓度的测量:以牛血清白蛋白为标准, Bradford 法^[11]测定蛋白质浓度定量。样品处理:①悬浮细胞,取菌液 5mL , 8000r/min 4°C 冷冻离心 20min , 去上清液,加 0.5mL 0.1mol/L NaOH 重悬细胞, -20°C 储存。测定时,将样

品解冻, 100°C 沸水浴 20min , 冷却后加 0.5mL 0.1mol/L HCl 。②附着在电极的细胞,将阳极棒从培养液取出,振荡去除悬浮细胞,置于一盛有 3mL 0.2mol/L NaOH 的培养皿中(平放),抽取其中的 NaOH 在 1h 内室温下反复淋洗电极棒 $6\sim 8$ 次,所得碱液取出称重,再取等量去离子水淋洗电极棒,两液混合得 0.1mol/L NaOH 的菌液, -20°C 储存,解冻再处理同①。

葡萄糖浓度测定:YSI2700 生化分析仪。样品处理:取菌液 1mL , 8000r/min , 4°C 冷冻离心 10min 后,取上清 1mL 用生化分析仪检测。生化分析仪缓冲液主要成分(L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.772g , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.390g , KCl 0.130g , NaCl 4.153g , EDTA 钠盐 0.322g , 苯甲酸钠 0.350g , 硫酸庆大霉素(8 万单位) $150\mu\text{L}$ 。

菌浓测定:2700 型紫外-可见分光光度计,检测波长 600nm 。

2 结果

2.1 产电情况

2.1.1 产电最大功率:选取合适的外接电阻以利于电池产生最佳的输出功率。在电池运转正常达到电压平台时,改变外接电阻,变化范围为 $0\sim 5000\Omega$,由电阻-输出功率及电阻-电压图(图 2)可知,随着外电阻的增加,电池电压逐渐增大,但增长速率逐渐放缓;电池功率则先增大后变小,在 500Ω 左右有一最大值,此时电池输出功率最大。本实验过程中以 510Ω 为电池外电阻,选择输出功率最大时对微生物产电情况进行分析。

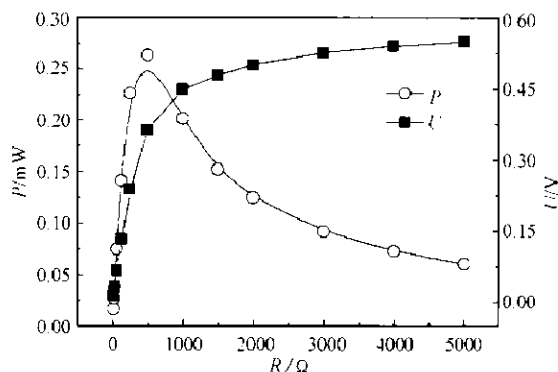


图 2 电池的电阻-输出功率及电阻-电压图

Fig. 2 Resistance-power and resistance-voltage relationships for microbial fuel cells

2.1.2 微生物建膜产电对比及葡萄糖消耗分析:在富马酸钠培养基中培养 4 代后, R.f 以 10% 接种量接入含有 5mmol/L 葡萄糖的阳极液中。细菌在氧化

葡萄糖过程中,以石墨棒为电子受体逐渐吸附在石墨棒上形成生物膜^[12],整个过程大约需要 15d,由图 3 可以看出达到电压平台时的峰值电压为 0.46V,细菌有效接触石墨棒的物理表面积是 57cm²,即产生电流密度达 158mA/m²。通过测量阳极液中悬浮细胞的 OD₆₀₀,发现当达到电压平台后,悬浮细胞的浓度趋于平衡,不再升高。当生物膜成熟后,即电池电压降到初始水平时,再向阳极室中加入 1mmol/L 葡萄糖(图 4),电压很快达到电压平台(几个小时内,相比最初生物膜形成过程要快很多),测定阳极液中葡萄糖浓度变化,最终的残糖浓度低于葡萄糖生化分析仪的检出限。

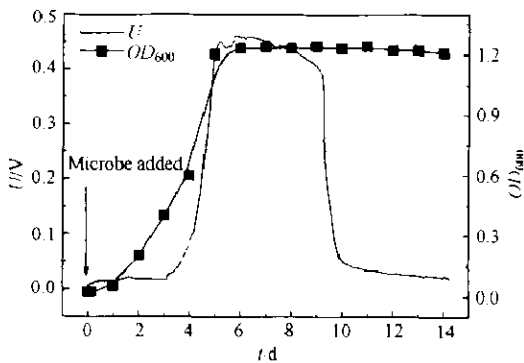


图 3 常温 25℃条件下 R.f 的产电情况及悬浮细胞浓度变化
Fig. 3 Electricity generation by R.f at 25℃ and optical density of the bacterial suspension at 600nm

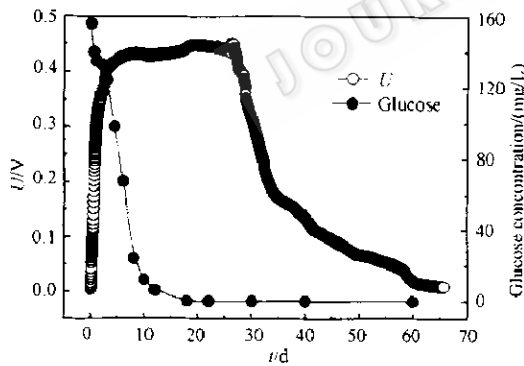


图 4 生物膜形成后的电压产生和葡萄糖消耗情况
Fig. 4 Electricity generation and glucose consumption after the biofilms formed

2.1.3 电池循环性能: 电池运转稳定后,多次向阳极液中加入 1mmol/L 的葡萄糖,电池很快达到电压平台,发现电压平台并没有降低,反而稍有上升。与普通的化学燃料电池及充电电池相比,我们设计的微生物燃料电池装置以葡萄糖为燃料,转化葡萄糖的化学能为电能,葡萄糖消耗的过程如同普通充电电池放电过程;加入葡萄糖的过程,如同充电电池充电过程,放电的快慢取决于加入的葡萄糖量(由图 3

可知),同时由图 4 可以看出,电压从基线到平台所需时间要远小于从平台回到基线的时间,说明放电时间相对长,即一次充电后使用时间长。而且充电过程极快(几个小时内即可完成,如同普通充电电池的快速充电过程),但是这种“快速充电”方式似乎不影响电池的使用寿命及循环性能,同时由图 5 可以看出,多次循环后,“电池容量”(电池电流与时间的乘积)并没有减弱。从电化学角度考虑,这种微生物燃料电池可以看成一种循环性能较好的二次充电电池;从生物质能源利用角度考虑,这种嗜糖的微生物燃料电池可以直接转化含糖生物质的能量为电能。

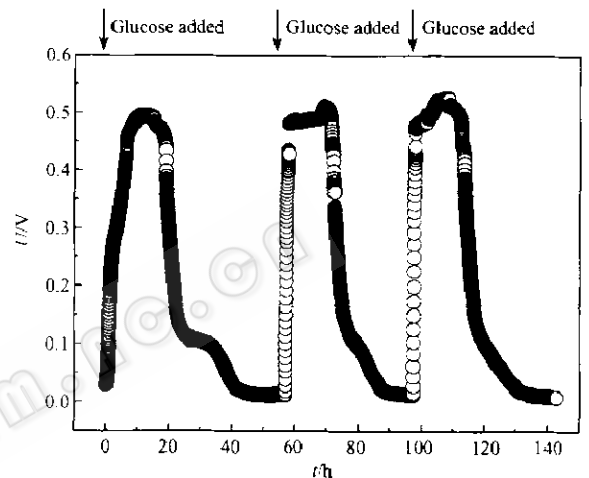


图 5 在图中箭头所指的时刻,即葡萄糖(燃料)消耗完时, 1mmol/L 的葡萄糖重新加入到阳极室中

Fig. 5 At the indicated times represented by the arrows, after glucose (fuel) became depleted, glucose was added to the anodic chamber to restore the concentration of glucose at 1mmol/L

2.1.4 生物质利用情况: 当电池形成生物膜后,加入几种常见的单糖和双糖,与细菌利用葡萄糖情况做对比,考察电池对其它糖的利用情况。由图 6 可知,微生物能很好地利用果糖作燃料,产电情况和葡萄糖类似;在以木糖为燃料时,燃料加入阳极室后,电压没有很快地升到电压平台,而是以一定的线性速率增长到电压峰值,说明该菌在利用木糖的代谢过程所需时间较长;在电池利用蔗糖做燃料时,电压能很快地达到电压平台,只是平台电压比葡萄糖略低,但是平台持续时间约为葡萄糖的 2 倍,这可能与蔗糖的分子大小有关,一分子的蔗糖水解可得两分子的葡萄糖;在以麦芽糖为燃料时,虽然很快达到电压平台,但是平台电压太低,只有 0.18V 左右,且平台持续时间很短,能量利用效率很低。通过以上含糖生物质利用情况分析,细菌对单糖和蔗糖利用很好,但对麦芽糖的利用不好。这也说明,我们在实际

应用中可以利用大量的蔗糖废水直接作燃料,这样不仅可有效降解其中的糖类物质,同时可以把其中废弃的能量转化为电能。同时能够利用木糖作燃料在实际应用中也很重要,因为木糖是植物中半纤维素等分子的重要组成单体,能够降解木糖使这种微生物燃料电池可利用广阔的废弃植物资源(如秸秆)获取能量进行产电。

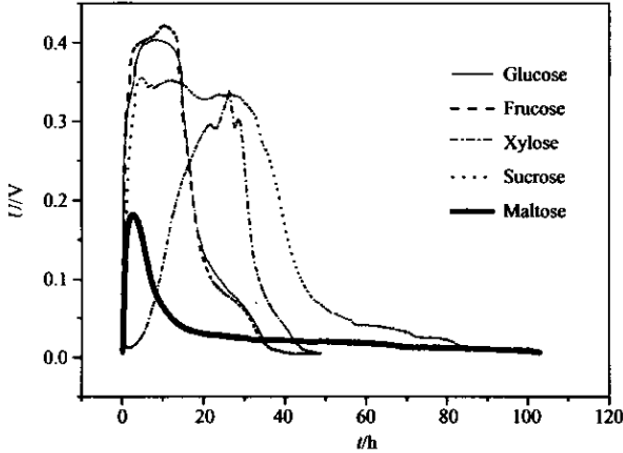


图6 几种单糖双糖利用图(初始浓度均为 1mmol/L)

Fig. 6 Effect of glucose and other sugars used as fuels for microbial fuel cells (initial fuel concentration: 1mmol/L separately)

2.2 产电机理研究

2.2.1 扫描电镜观察:对比细菌吸附前和电池接种20d后的扫描电镜照片(见图7)可看出,接种后的石墨电极表面吸附有大量细菌,而且细胞与细胞之间也有丝状的胞外分泌物相连接。由(b)和(c)可以看出,由于采用的电极是未抛光多层状的高纯石墨电极(a),多表面有许多孔隙,细菌不仅吸附在电极表面,而且材料孔隙间也有细菌吸附,这也说明通过增加材料的孔隙度(即比表面积)等手段可能会使更

多的细菌吸附到电极上,提高电量的输出。

2.2.2 吸附细胞和悬浮细胞产电分析:为进一步认识吸附细胞和悬浮细胞的作用机制,取电池运行20d形成生物膜后的阳极液 20mL 接种到一套新的电池装置的阳极液中,考察悬浮细胞的产电情况。同时把该电池的阳极石墨棒取出,轻微摇动,迅速用无菌水轻轻冲洗,置入另一套新的电池装置中,考察吸附在电极上的细菌的产电情况。悬浮细胞和吸附细胞产电进行对比(见图8),接种悬浮细胞的电池运行一周,电压没有明显变化,基线电压为 5mV 左右,最高电压为 30mV,即表明基本上没有细菌吸附在电极上进行生物产电。而置有吸附细胞石墨棒的电池很快便达到电压平台,且平台电压值(0.4V 左右)基本与生物膜形成时持平。说明电池产电的主要贡献者是吸附在阳极石墨上的细胞,而非悬浮细胞。

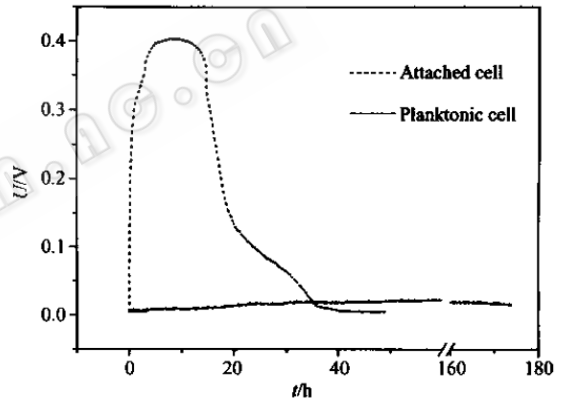


图8 吸附在阳极石墨上的细菌与阳极液中的悬浮细菌产电对比图

Fig. 8 Electricity generation by the cells attached to the graphite electrode compared with the planktonic cells in the anode medium

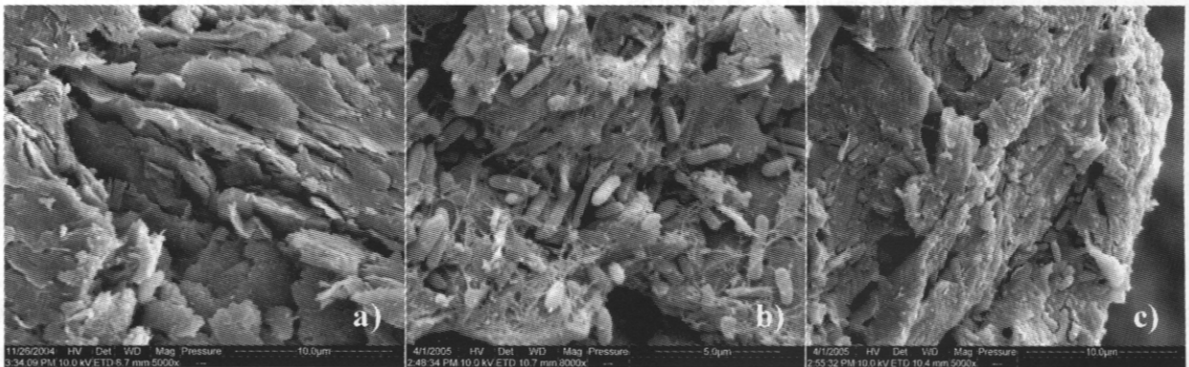


图7 扫描电镜照片

Fig. 7 SEM images

a: unpolished graphite electrode surface (x 5000) before bacteria attached; b: a graphite electrode surface (x8000) following 20 days' growth of R. f with glucose (5mmol/L) as the electron donor; c: the profile image(x5000) of b.

2.2.3 蛋白质浓度分析及细菌还原实验:用 Bradford 法对电池运行 20d 后的悬浮细胞及吸附在电极上细胞浓度进行定量分析,测得悬浮细胞蛋白浓度为 140mg/L,吸附在电极上的生物量为 1180 mg/m²,说明相当一部分细菌吸附在电极上。由 2.2.2 的分析知吸附在电极上的细胞是产电的主要贡献者,而悬浮细胞则基本上不产电。这说明吸附细胞具有电化学活性,而悬浮细胞没有电化学活性。细菌形成生物膜的机理对研究整个微生物燃料电池很重要,同时可以为生物质的利用提供很好的指导,为了更深入地认识液固两相中的两类细胞的差异,分别把吸附细胞和悬浮细胞接种到含有 MnO₂ 粉末的液体培养基中,厌氧箱中 25℃ 培养,其中悬浮细菌按 10% 接种量接种,而吸附在电极上的细菌需用处理后的电极块作为固体接种到培养基中,摇晃多次,尽量使吸附细菌游离。一周后观察接有悬浮细胞的培养基中黑色 MnO₂ 粉末没有颜色变化,而接有吸附细胞的培养基变混浊,有少量黑色粉末变白(被还原为 MnCO₃);一周后观察接有悬浮细胞的 MnO₂ 颜色还是没有明显变化,而接有吸附细胞的培养基粉末颜色大部分已经变白,厌氧培养箱里的细菌还原实验说明吸附在电极上的细菌还具有生物学活性,可以通过氧化葡萄糖还原 MnO₂ 进行生长繁殖,新陈代谢等,而悬浮细菌基本上不具有生物学活性,丧失了还原 MnO₂ 的能力。

3 讨论

微生物燃料电池作为一种新型的生物质利用方式,借助微生物的催化作用把有机酸和糖类物质所含有的能量转化为电能,与生物柴油、生物产氢、燃料乙醇等生物质利用方式^{13,14,15}相比,有其独到的优势和特点,是一种可再生能源的优化利用方式。关于电池燃料的多样性研究很多,从应用角度考虑,要实现糖类生物质的能量转化,需要借助一些发酵性细菌把葡萄糖等分子氧化成乙酸、丁酸等有机酸,再通过金属还原菌把有机酸氧化为二氧化碳来获取能量^{16,17,18}。这样生物质的降解至少需要两类微生物的参与,过程相对复杂。

本实验设计微生物燃料电池装置,通过本实验,选取可以有效氧化葡萄糖的异化金属还原菌 R.f 为产电微生物,对微生物催化糖类生物质的有效降解产电及电池性能进行了研究,用 Bradford 法借助其它手段研究了电池中细菌存在状态对电池产电的影

响。从试验结果可以看出,吸附在阳极石墨棒上的细菌是产电的主要贡献者,20d 后吸附生物量为 1180mg/m²,这些细菌具有电化学活性,可以使电池很快地达到电压平台,这可能是由于细菌在特异性地吸附在石墨电极上时,分泌一些胞外的多糖物质参与电子传递有关,而且吸附细菌可以还原 MnO₂,具有生物学活性。而悬浮细胞 20d 后细胞蛋白浓度为 140mg/L,对产电贡献很小,接种电池后一周电压没有明显变化,基本上不具有电化学活性,也不能再通过还原 MnO₂ 进行生长代谢,进一步通过其它手段分析悬浮细胞和吸附细胞胞外物质的差异可以更直接地认识细菌产电过程;通过循环实验和生物质利用实验证明,由产电微生物 R.f 构建的微生物燃料电池类似于一种理想的二次充电电池,而且可常温发电,循环性也较好,具有清洁环保等优点,直接氧化葡萄糖为二氧化碳,而且可以利用其他几种单糖和蔗糖,大量废弃含糖生物质及含糖废水的能量可望通过这种形式收集起来,且可以净化环境,具有潜在应用价值。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Advances in Microbial Physiology*, 2004, **49**:219 - 286
- [2] Lovley DR. Dissimilatory metal reduction; from early life to bioremediation. *ASM News*, 2002, **68**:231 - 237
- [3] Blunt-Harris EL, Lovley DR, Vargas M *et al.* Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early earth. *Nature*, 1998, **395**:65 - 67
- [4] Anderson RT, Vrionis HA, Ortiz-Bernad I *et al.* Stimulating the in situ activity of Geobacter species to remove Uranium from the groundwater of a Uranium contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(10):5884 - 5891
- [5] Lovley DR. Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *J Industr Microbiol*, 1995, **114**:85 - 93
- [6] Bond DR, Holmes DE, Tender LM *et al.* Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science*, 2002, **295**:483 - 485
- [7] Bond DR, Lovley DR. Electricity production by Geobacter sulfurreducens attached to electrodes. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(3):1548 - 1555
- [8] Leonard MT, Clare ER, Hilmar AS *et al.* Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nature Biotechnol*, 2002, **20**:821 - 825
- [9] Fritz S, Uwe S. Bacterial batteries. *Nature Biotechnol*, 2003, **21**(10):1151 - 1152

- [10] Tayhas G, Palmore R. Bioelectric power generation. *Trends Biotechnol*, 2004, **22**(3):99 - 100
- [11] Holme DJ, Peck H. Analytical Biochemistry, New York: Longman Group Limited, 1983
- [12] Chaudhuri SK, Lovley DR. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnol*, 2003, **21**(10):1229 - 1232
- [13] Gerpen JV. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technol*, 2005, **86** (10):1097 - 1107
- [14] Cortright RD, Davda RR, Dumesic JA. Hydrogen from catalytic reforming of biomass-derived hydrocarbons in liquid water. *Nature*, 2002, **418**:964 - 967
- [15] Sheehan J, Himmel M. Enzymes, energy, and environment: a strategic perspective on the U. S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**:817 - 827
- [16] Holmes DE, Bond DR, Lovley DR. Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(2):1234 - 1237
- [17] Holmes DE, Bond DR, O'Neil RA. Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microbial Ecol*, 2004, **48**:178 - 190
- [18] Hong L, Shao AC, Bruce L. Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environ Sci Technol*, 2005, **39**:658 - 662