

微生物电解池阳极生物膜功能菌群构建及群落特征分析

刘充¹ 刘文宗² 王爱杰^{1,2*}

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150090)

(2. 中国科学院生态环境研究中心 中国科学院环境生物技术重点实验室 北京 100085)

摘要:【目的】微生物电解池(MEC)是近几年快速发展的利用电极呼吸微生物快速降解有机质,通过较小的辅助外加电压直接生成氢气的新工艺。MEC 能够有效地富集高效率电子传递功能菌群,是未来工艺放大和快速启动的关键。【方法】采用不同驯化方法构建 MEC 电极微生物菌群,通过单链构象多肽性技术(Single-strand conformation poly-morphism, SSCP)快速检测分析启动后电子传递功能菌群特征。【结果】阳极生物膜接种 MEC 可以实现 2 d 的快速启动,库仑效率达到 20%以上,7 d 获得稳定产氢,氢气转化率达到 30%,能量回收效率达到 90%以上。通过 SSCP 群落分析发现,采用微生物燃料电池阳极生物膜构建的 MEC 主要电子传递功能相关的菌群包括 *Pseudomonas* sp.、*Flavobacterium* sp.、*Ochrobactrum* sp.,而直接由产氢 MEC 阳极生物膜新启动的 MEC 功能菌群组成丰度更大,包括电子传递效能更高的 *Desulfovibrio*、*Pseudomonas* 和 *Shewanella* 成为主要优势电子传递菌群。通过稳定产氢运行,MEC 阳极生物膜优势菌群中存在的较大比例的厌氧菌与电子传递辅助菌对体系的快速稳定运行十分重要。【结论】与 MFC 阳极生物膜相比,MEC 生物膜作为启动菌源能够获得多样性更丰富的电极功能菌群,其库仑效率和产氢效率更具优势。

关键词: 微生物电解池, 生物产氢, 电子传递, 阳极生物膜, 微生物群落

Anodic biofilm formation and electron transport characteristics of microbial communities in microbial electrolysis cell (MEC)

LIU Chong¹ LIU Wen-Zong² WANG Ai-Jie^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

(2. CAS Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: [Objective] Microbial electrolysis cells (MEC) have been newly developed by employing anodic respiring bacteria to degrade waste organics to electrons. And hydrogen is recovered directly on the cathode surface under a very small external voltage to apply between anode and cathode. Although MECs showed great potential on high efficiency both on organic removal and energy recovery, there is a limited factor to enrich high-efficiency functional communities for scaled up

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 51208496)

*通讯作者: Tel: 86-451-86282195; 信箱: waj0578@hit.edu.cn

收稿日期: 2014-11-20; 接受日期: 2014-12-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-12

reactors. **[Methods]** Microbial community structure and characteristic of electron transport were analyzed through single-strand conformation poly-morphism (SSCP). **[Results]** The results showed that MECs were successfully started up within 2 days with coulombic efficiency of 20%. The hydrogen was produced steadily after 7 days with a conversion yield of 30% and energy recovery rate of 90%. SSCP analysis indicated that *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Ochrobactrum* sp. as the main bacterial community related to electron transfer when inoculating the anode biofilm from microbial fuel cell. While a higher diversity presented when inoculating the anode biofilm of former MECs, and the dominant bacteria were including *Desulfovibrio*, *Pseudomonas*, and *Shewanella*, which were reported high efficiency on electron transport. In addition, it was uncovered the important role of the co-existing bacteria related to anaerobic digestion or assistance to electron transfer, showing an important function to support a stable anodic biofilm structure. **[Conclusion]** The results illustrated that high reactor performances with higher microbial diversity can be obtained using MEC biofilms as inoculum for large MEC reactor setup.

Keywords: Microbial electrolysis cell, Bio-hydrogen, Electron transport, Anodic biofilm, Microbial community

微生物电解池(Microbial electrolysis cell, MEC)产氢新技术于2005年首次提及和报道,实现以发酵末端产物乙酸盐为唯一碳源获得氢气^[1],其原理与传统的厌氧发酵产氢完全不同^[2]。这种在较小的外加电压(<1.0 V)下通过阳极电子传递菌实现的电化学辅助微生物产氢新方法,具有对小分子有机质的高效转化能力(电子转化率和氢气还原率均可达90%以上),同时也能够利用更加复杂的碳源(如纤维素)直接产生氢气^[3]。尽管MEC尚处于实验室规模探索阶段,但是因其原理上所展现出从废水中高效回收生物能源的巨大潜力而成为环境前沿领域新技术之一。MEC反应器的构建与放大是未来应用于废水处理的关键技术核心,尚有众多关键技术难点难以解决,少量放大试验研究获得的产氢效果并不理想^[4],其中一个主要问题表现在电极功能菌群的富集与电子传递效能尚难以有效控制和调控^[5-7]。

MEC技术是在微生物燃料电池(Microbial fuel cell, MFC)的基础上发展出现的,典型的双极室MFC反应器构型也是普遍采用的微生物电解池的构型方式^[1]。从原理上MEC与MFC具有相同的功能微生物,包括能够细胞外电子传递的功能菌和其他协作的功能菌,一般认为在功能菌上二者没有实质的差别。具备直接电子传递功能的功能菌陆续在MFC阳极生物膜中分离,其中一些在反应器运

行中曾被报道具有很高的电子传递能力,包括希瓦菌属(*Shewanella*)^[8]、土杆菌属(*Geobacter*)^[9]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、脱硫弧菌类(*Desulfovibrio*)^[6]等。因此,通常MEC的启动方式基本都是采用先以MFC产电运行的方式驯化获得相应的功能菌群,然后转变阴极室操作条件将MFC反应器转变为MEC反应器运行的方法^[10-11]。通常很少研究直接通过MEC反应器进行分离,一方面是认为二者的功能菌群一致,另一方面MEC技术远没有MFC研究广泛。但是相关研究表明,二者因外加电压等运行条件的“微小”差异导致了阳极群落结构的显著差异,同时这种差异能够影响反应器的运行效能^[12]。

本研究采用不同驯化方法构建MEC电极微生物菌群,分别以产电MFC阳极生物膜和产氢MEC阳极生物膜为不同菌源启动双极室MEC,通过单链构象多肽性技术(Single-strand Ionformation poly-morphism technique, SSCP)快速检测分析启动后电子传递功能菌群特征。基于启动后MEC电子传递效率和产氢效率对不同接种方式形成的阳极功能菌群结构进行分析,深入探讨优化启动条件下的主要电子传递功能菌群特征。

1 材料与方法

1.1 两极室MEC反应器启动及运行

1.1.1 反应器构型: 实验采用长方体型双极室反应

器, 在传统“H”构型反应器基础上进一步改进和优化^[13-14], 新型两极室 MEC 反应器采用厚度为 5 mm 的甲基丙烯酸甲酯有机玻璃, 单室容积为 340 mL, 质子交换膜面积为 25 cm², 两电极之间的距离为 4 cm (图 1)。阳极为不防水的碳布, 面积为 36 cm², 阴极为镀有 0.35 mg/cm² 铂的碳纸, 面积为 9 cm²。实验中采用质子交换膜隔离两个极室, 使用之前需要依次在 30% H₂O₂、去离子水、0.5 mol/L H₂SO₄ 及去离子水中各煮沸 1 h, 然后保存在去离子水中备用^[15]。

1.1.2 人工模拟废水: 用于双极室 MEC 反应器运行的阳极室模拟废水, 每升溶液中含有 KCl 0.1 g, NH₄Cl 0.2 g, NaH₂PO₄ 0.6 g, NaHCO₃ 2.5 g, Wolfe 微量维生素混合液 10 mL/L, Wolfe 微量矿物元素混合液 10 mL/L, 碳源为简单模式底物乙酸钠 10 mmol/L。而阴极室为磷酸盐缓冲液(10 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0), 灭菌后备用, 每升溶液含有 NaH₂PO₄·2H₂O 5.618 g, Na₂HPO₄·12H₂O 6.155 g。

1.1.3 反应器接种菌源: 实验采用运行 1 个月以上的小体积双极室产电 MFC 和双极室产氢 MEC 反应器(单室容积<100 mL)的阳极生物膜, 分别以两种已经驯化的电极生物膜菌群作为 MEC 反应器启动菌源。以 10% 的接种量接入人工模拟废水直接启动新型 MEC 反应器, 辅助外加电压固定为 0.5 V。电路电流通过与反应器串联的 10 欧姆电阻测量获得

(Keithley 数据记录仪, model 2700, Keithley Instruments, Inc.)。反应器运行采用序批式操作, 当反应器运行稳定的电路电流低于 0.5 mA 时更换阳极室模拟废水。

1.2 反应器效能计算

1.2.1 氢气转化效率计算: 氢气转化效率(E_H)以实际产生氢气所需要的电量与阳极室微生物所处理有机底物的理论电量的比值, 用来衡量体系处理有机底物转化为氢气的的能力。以乙酸盐生成氢气为例, 转化率为: $E_H = Q_H / Q_T \times 100\%$

1.2.2 能量回收率计算: 能量回收率(η_E)是 MEC 中实际氢气产生获得的能量与外加电源提供的电能的比值, 用来衡量体系能量投入与产出的效率。

首先计算体系外加电压(E_{ap})单位时间内(dt)所消耗的能量 ΔW , 通过累加后得到 $W_E = \Sigma(\Delta W) = \Sigma(I \cdot E_{ap} \cdot dt)$, 根据电流与时间的积分计算 $Q = \int i \cdot dt$, 那么上述公式推导为 $W_E = Q \cdot E_{ap}$, 再计算产生氢气获得的能量 $W_{H_2} = n \cdot \Delta H$, 其中 n 为氢气的物质的量, ΔH 为氢气单位物质的量的热值, 285.83 kJ/mol。由此计算体系的能量回收率为 $\eta_E = W_{H_2} / W_E \times 100\%$ 。

1.3 微生物群落结构及功能分析

1.3.1 样品采集与保存: (1) 样品的采集。对于悬浮菌液, 反应器运行过程中从驯化启动到稳定运行定期取样, 在一些特殊的操作变化时间点, 如外加

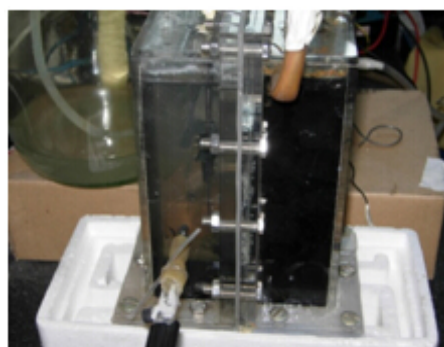


图 1 双极室 MEC 反应器
Figure 1 Cuboid MEC reactor

电压的变化、pH 的调节、氢气产生速率变化以及突发事件等需要进行及时采样。为了防止对整体生物群落的干扰,对生物膜的采样一般在运行过程中并不频繁取样,根据实验设计需要采取对阳极碳布的部分剪取或者最终的生物膜刮取。

(2) 样品的保存和处理。悬浮液一般经过离心(10 000 r/min, 10 min)去除上清液,所有样品存于-80 °C 用于 DNA 的提取和分析。

1.3.2 群落结构分析:单链构象多肽性技术(SSCP)用于考察反应器内部的优势微生物群落结构及其演替过程^[16]。取 0.5 mL 样品,以细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒(上海华舜)按产品说明书提取总 DNA,最后用 100 μ L 2 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0-8.5)溶解纯化的 DNA。将 16S rRNA 基因片段扩增,引物为 BSF8/20 (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3')和 SRV3-2 (5'-TTACCGCGGCTG CTGGCA-3')。PCR 扩增产物^[17],经过纯化和蛋白除去后,酶解产物(约 100 ng) 10 μ L 与 5 μ L 缓冲液混合后,热变性后上样。采用 1 \times TBE 缓冲液,12% 的聚丙烯酰胺(加 10%的甘油),于 20 °C 下 300 V 电泳 15 h。电泳结束后,将聚丙烯酰胺凝胶从玻板上剥下进行银染。选取含量较大或变化较大的条带按文献[16]方法回收单链 DNA,再扩增后克隆进 T-载体(pMD18-T),每条带选取 5 个克隆进行测序分析。将测得的序列通过 RDP 中的 Sequence Match 进行分类,利用软件 Sequencher 5.0 将相似性高于 95%的序列归为同一个 OTU,将不同的 OTU 通过 BLASTn 与数据库中的序列进行对比分析。

2 结果与讨论

2.1 产电 MFC 阳极生物膜接种 MEC 后群落变化

产电 MFC 阳极以产电方式(负载 500 Ω)运行 1 个月后,底物处理效率可以达到 70%-80%,体系的输出功率为 126 mW/m² (阳极表面积),衡量底物转化为电路电能的库仑效率可以达到 15%。将该阳极生物膜菌群作为接种液启动新的 MEC 反应器(外加电压 0.5 V),MEC 反应器运行第 2 天电流呈现上升趋势,第 3 天氢气积累检测量达到 20 mL 以上,乙酸盐到氢气转化率达到 21%,COD 去除率达到 80%以上,能量回收效率 85% (表 1)。持续稳定运行 30 d, COD 去除效率达到 85%,氢气转化效率达到 30%左右,能量回收效率达到 95%。

该过程的群落结构变化如图 2 所示,对图 2 中的显著性条带 1-14 进行克隆分析(表 2),最相似类群结果发现 37 个克隆子主要分布于 4 个门,各门所占比例为: Chloroflexi 8%, Proteobacteria 44%, Actinobacteria 8%, Bacteroidetes 40%。目前微生物燃料电池研究中发现的大部分具有细胞外电子传递功能的微生物都属于 Proteobacteria。反应器以 MFC 模式运行 5 d 左右,阳极室可以形成稳定的生物群落结构,在后续运行的 35 d 中,群落结构仅有微小的变化。以其生物膜启动 MEC 时,群落变化随时间变化比较明显,其中条带 2、3、4、8、9 和 14 有所富集,而条带 13 中的微生物则被淘汰。富集条带 2、3、4 和 8 所指示的最相似 *Pseudomonas* sp., 是目前 MFC 中研究最多的功能菌属之一。报

表 1 产电 MFC 阳极群落启动 MEC 效能分析
Table 1 MEC performances by inoculated anodic biofilm communities of MFC reactors

样品 Samples	MFC-5 d	MFC-20 d	MFC-30 d	MEC-3 d	MEC-10 d	MEC-30 d
COD 去除率 COD removal (%)	81 \pm 3	87 \pm 6	82 \pm 10	86 \pm 5	80 \pm 5	85 \pm 8
氢气产率 H ₂ yield (%)	—	—	—	21 \pm 3	26 \pm 5	29 \pm 3
能量效率 Energy efficiency (%)	—	—	—	85 \pm 3	103 \pm 6	96 \pm 5

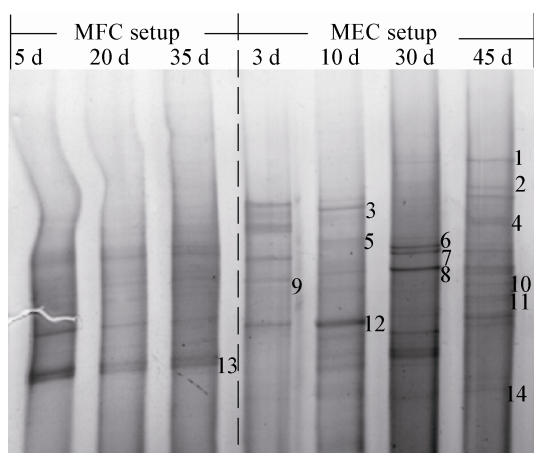


图 2 运行过程微生物群落演替 SSCP 图谱

Figure 2 SSCP for community changes over time

道中对该菌属 *Pseudomonas aeruginosa* KRP1 的电子传递机制研究发现^[18], 该菌株可以通过绿脓菌素和吩嗪-1-羧酸将电子传递至阳极, 而且在阳极能促进这两种物质的生成。这两种物质在电子传递过程是必需的, 绿脓菌素生成菌生成的绿脓菌素不仅可以提高自生的产电能力, 还能提高其他非绿脓菌素生成菌的电子传递能力, 即这种分泌物可以作为介体或者电子穿梭体提高相关功能细菌的电子转移率。另外的富集条带为 9 和 14, 均为 *Ochrobactrum* 菌属^[19], 该菌最近在 MFC 中分离得到, 具有独立的电子传递能力。所淘汰的条带 13 序列相似的菌属为 *Sulfurovum*, 该菌是具有硫酸盐还原功能的嗜

表 2 通过 BLASTn 和 Sequence match 对图 2 比对结果

Table 2 Similarity analysis of OTUs shown in figure 2 based on BLASTn and sequence match

OTU	Band No.	GenBank No.	Most similar strain	Similarity (%)	Most similar genus
1	1-2	DQ207731.2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain CCM 2115	99	<i>Pseudomonas</i>
2	2-1	AJ704794.1	<i>Pseudomonas</i> sp. ws14 partial	96	<i>Pseudomonas</i>
3	2-4	AM411057.1	<i>Pseudomonas</i> sp. Z49zhy	91	<i>Pseudomonas</i>
4	2-5	AB334528.1	<i>Pseudomonas</i> sp. MPU L18	99	<i>Pseudomonas</i>
5	3-3	EF432578.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	96	<i>Acinetobacter</i>
6	4-2	EU072019.1	<i>Agrobacterium</i> sp. X9	99	<i>Agrobacterium</i>
7	4-3	AY643492.1	<i>Dysgonomonas wimpennyi</i>	94	<i>Dysgonomona</i>
8	4-5	DQ989291.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain	97	<i>Pseudomonas</i>
9	5-2, 5-3	AB195773.1	<i>Aquatic bacterium</i> R1-G6	95	<i>Alkanindiges</i>
10	5-5	AF524858.1	Bacterium K-4b6	92	<i>Levilinea</i>
11	6-3, 6-4, 6-5, 11-4	AY643492.1	<i>Dysgonomonas wimpennyi</i>	99	<i>Dysgonomonas</i>
12	7-1, 7-4	AJ319867.2	<i>Dysgonomonas mossii</i> partial	99	<i>Dysgonomonas</i>
13	8-1, 8-2, 8-3	AF276640.1	<i>Corynebacterium</i> sp. IC10	96	<i>Corynebacterium</i>
14	9-3	AY972454.1	<i>Ochrobactrum</i> sp. S79	98	<i>Ochrobactrum</i>
15	10-3, 10-5	DQ677004.1	Iron-reducing enrichment clone CI-A12 clone CI-A12	94	<i>Xylanibacter</i>
16	11-2	AB066236.1	<i>Flavobacterium</i> sp. PJ711	99	<i>Flavobacterium</i>
17	11-5	EU046605.1	<i>Flavobacteriaceae</i> bacterium	97	<i>Flavobacteriaceae</i>
18	12-1, 12-3	DQ977670.1	Synthetic construct clone CC-40 from <i>Pseudomonas</i> sp. II-40	99	<i>Terrimonas</i>
19	13-2, 13-3	AY261811	Uncultured proteobacterium	99	<i>Sulfurovum</i>
20	14-2, 14-5	AY972454.1	<i>Ochrobactrum</i> sp. S79	99	<i>Ochrobactrum</i>

温化能自养型微生物, 该菌属的菌株能够以单质硫或硫化硫酸盐为电子供体, 以氧或硝酸盐为电子受体, 营化能自养生长。除此之外, 与条带 11 序列最相似的菌属 *Flavobacterium*, 在整个过程中一直存在, 该菌属被认为有电化活性, 但是报道很少, 目前用于燃料电池氧化还原酶活性指示菌。其他 7 个条带中的菌基本为发酵和糖代谢相关的厌氧菌, 在新的群落中依然存在。由此可见, 产电生物膜群落中与电子传递相关的微生物在 MEC 中得到较快的富集, 而其他厌氧菌依然构成新的阳极生物膜, 仅有个别菌在新群落形成过程消失和减少。

结果表明采用已经驯化的 MFC 反应器阳极生物膜菌群启动后在新电极生物膜构成类群上比较集中和简单, 新形成的阳极微生物群落在功能上也比较集中和定向化。这个过程中阳极的生物膜菌群在 MFC 启动过程已经完成了菌群的竞争、富集与淘汰, 在条件转变后会因条件的变化出现群落的调整。

2.2 产氢 MEC 阳极生物膜启动新型 MEC 阳极菌群变化

为了进一步揭示阳极生物膜菌群的群落之间存在的相互关系, 以稳定形成的 MEC (R1) 阳极生物膜作为接种源, 在完全一样的另一个 MEC (R2) 反应器中进行启动, 通过 SSCP 跟踪分析微生物的群落演替过程。反应器以乙酸盐为唯一碳源, R1 以活性污泥启动, 在外加电压 0.5 V 下连续运行 3 个月, 库仑效率稳定在 35%±4% 氢气产率稳定在 31%±3% (表 3)。在此状态下将其阳极生物膜刮取和

冲洗用于反应器 R2 的接种, 启动 30 h 后反应器已经能够产生电流, 7 d 左右库仑效率达到 30%±5%, 氢气产率达到 20%±4%, 连续运行 1 个月体系已经稳定, 库仑效率为 32%±4%, 氢气产率为 29%±4%, 3 个月后库仑效率和氢气产率与 1 个月时相比略有增加并稳定在 38%±4% 和 31%±7%。COD 的去除基本变化很小, 从 80%–83% 平均为 82%±1%。这些数据表明用已经驯化的生物膜群落启动新反应器可以在较短的时间内形成新的功能群落。

COD 的去除率只达到 80% 左右, 结合乙酸盐到氢气的库仑效率分析, 80% 的底物利用中仅有 30%–40% 的底物有效转化为电子传递到电极, 这意味着能够进行细胞外电子传递功能的微生物只是一小部分, 除此之外, 其他的优势菌群消耗底物并未承担将电子传递到电极的功能。

对应表 3 中关键效率分析时间点分别采集反应器 R1 悬浮菌液、R1 阳极生物膜、R2 接种 2 d 后的悬浮菌液、R2 运行 7 d 后的生物膜、R2 运行 30 d 的生物膜, 获得群落 SSCP 结果(图 3)和序列分析结果(表 4)。在 SSCP 图谱中一共选择了 10 个条带进行了序列测序分析, 序列相似性分析结果显示这些群落分布在 12 个微生物门类里。整体来说, 我们将这些微生物涉及到 4 个功能群落: (1) 与有机物降解相关的, 包括 *Stenotrophomonas* (γ -Proteobacteria, G⁻) 和 *Lactobacillus* (Bacilli, G⁺); (2) 土壤微生物, 包括 *Curtobacterium* (Actinobacteria, G⁺)、*Agrobacterium* (α -Proteobacteria, G⁻)、*Flavobacterium* (Bacteroidetes, G⁻) 和 *Bradyrhizobium* (α -Proteobacteria, G⁻); (3) 已报道的电子传递功能菌, 包括 *Pseudomonas* (γ -Proteobacteria)、*Desulfovibrio* (δ -Proteobacteria) 和 *Shewanella* (γ -Proteobacteria); (4) 其他的功能菌, 包括 *Desulfonauticus*、*Xenohalictis* 和 *Marinicola*。

在 SSCP 图谱结果中可以看到有一些优势群落始终在 R1 与 R2 中检测到, *Stenotrophomonas* (条带 E1)、*Desulfovibrio* (条带 E2)、*Pseudomonas* (条带 E3)、*Agrobacterium* (条带 E4)、*Bradyrhizobium* (条

表 3 MEC 生物膜启动反应器的生物群落与反应器效能

Table 3 Reactor performance by inoculated anodic biofilm communities of MEC reactors

样品 Samples	MEC-R1	MEC-R2		
		2 d	7 d	30 d
COD 去除率 COD removal (%)	86±5	21±8	72±6	80±4
氢气产率 H ₂ yield (%)	31±3	—	20±4	29±4
能量效率 Energy efficiency (%)	92±4	—	74±7	94±4

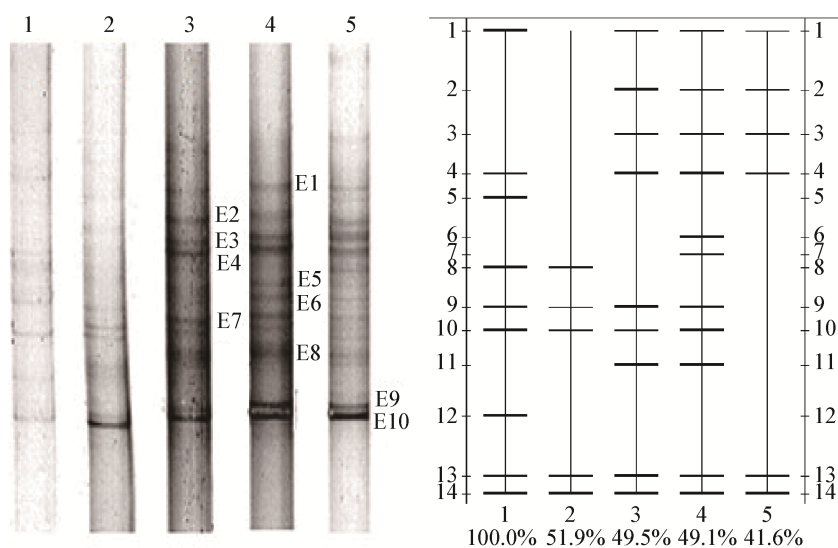


图3 微生物群落分析 SSCP 图谱

Figure 3 Analysis of microbial communities by SSCP

注: 1: 反应器 R1 悬浮菌液; 2: R1 阳极生物膜; 3: R2 接种 2 d 后的悬浮菌液; 4: R2 运行 7 d 后的生物膜; 5: R2 运行 30 d 的生物膜.

Note: 1: Suspension communities in R1; 2: Biofilm communities in R1; 3: Suspension communities in R2 on 2 d; 4: Biofilm communities in R2 on 7 d; 5: Biofilm communities in R2 on 30 d.

表4 通过 BLASTn 和 Sequence match 对图3 比对结果

Table 4 Similarity analysis of OTUs shown in figure 3 based on BLASTn and sequence match

OTU	Band No.	GenBank No.	Most similar strain	Similarity (%)	Most similar genus
1	E1-1, E1-4	EU374944.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. APH3	100	<i>Stenotrophomonas</i>
2	E1-3	EF411134.1	<i>Curtobacterium</i> sp. C01	100	<i>Curtobacterium</i>
3	E2-2	EF520765.1	Uncultured bacterium clone b9-3	100	<i>Desulfovibrio</i>
4	E3-1, E3-2	AM710608.1	<i>Pseudomonas</i> sp. 129 (43zx)	100	<i>Pseudomonas</i>
5	E4-1	EU072019.1	<i>Agrobacterium</i> sp. X9	99	<i>Agrobacterium</i>
6	E5-2	AB066236.1	<i>Agrobacterium</i> sp. X9	98	<i>Flavobacterium</i>
7	E6-3	EF520765.1	Uncultured bacterium clone b9-3	100	<i>Desulfonauticus</i>
8	E7-2	AB362652.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95	<i>Lactobacillus</i>
9	E8-1	AY547290.1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU	95	<i>Bradyrhizobium</i>
10	E9-1, E9-2	DQ898723.1	<i>Sistotrema biggsiae</i> isolate FCUG 782	95	<i>Xenohaliotis</i>
11	E9-3	DQ443995.1	Uncultured bacterium clone ET10-39	99	<i>Marinicola</i>
12	E10-1	AF005250.1	<i>Shewanella alga</i>	92	<i>Shewanella</i>

带 E8) 和 *Shewanella* (条带 E10)。优势菌中 *Shewanella*、*Pseudomonas* 是已被广泛报道的电子传递功能菌, 但是 SSCP 结果也同时表明其他与电子传递无直接相关性的菌群同样会在新生物膜中成为优势菌群。这与我们之前的预期有所不同, 它们并没有在新的生物膜中消失甚至减少存在比例。这意味着电子传递功能菌与其他功能菌之间并未因为功能和生存竞争而导致某些成员的淘汰。因此我

们推断这类生长优势的功能菌群在生物膜体系中必然起到他们特有的作用, 根据相关报道分析推测应当与降解和利用不同底物相关^[20-21]。

条带中 *Agrobacterium* sp. 和 *Bradyrhizobium* sp. 均与硝酸盐还原作用或者固氮作用相关联, 另外一个检测到的优势菌属为 *Desulfonauticus*, 可以利用乙酸盐为底物还原硫酸盐或者硫代硫酸盐^[22], 因此这些微生物具有参与氧化还原过程的能力。作为潜

在的电子传递贡献菌群,它们在体系中均是阳极生物膜微生物群落的主要成员。目前针对微生物燃料电池或者微生物电解池微生物群落在体系中所起的具体作用尚存在争议。本研究的结果表明与电子传递相关的功能菌在电极生物膜群落中是比例较小的一部分,而其他共存微生物则是构成稳定的生物膜结构的重要因素,通过驯化的 MEC 阳极生物膜启动的新电极菌群中共存微生物增加了微生物多样性,这对处理更广泛的底物和不同负荷波动十分有利。因此,启动形成过程的群落变化对探索 MEC 工艺的功能菌群结构与功能的关系十分有意义。

3 结论

本研究针对产电 MFC 阳极生物膜和产氢 MEC 阳极生物膜两种不同的接种菌源,对启动后的 MEC 反应器底物去除与氢气转化效率进行了分析。通过阳极生物膜群落结构变化分析发现,采用微生物燃料电池阳极生物膜构建的 MEC 主要电子传递功能相关的菌群包括 *Pseudomonas* sp.、*Flavobacterium* sp.、*Ochrobactrum* sp., 而直接由产氢 MEC 阳极生物膜新启动的 MEC 功能菌群组成包括电子传递效能更高的 *Desulfovibrio*、*Pseudomonas* 和 *Shewanella* 成为主要优势电子传递菌群。双极室 MEC 产氢反应器在功能菌群形成过程存在电子传递菌与其他功能菌群的底物竞争,导致库仑效率降低。以驯化好的 MEC 生物膜启动新的反应器时,菌群之间协作有助于阳极功能菌的底物快速降解。结果表明采用已经驯化的 MFC 反应器阳极生物膜菌群启动后在新电极生物膜构成类群上比较集中和简单,新形成的阳极微生物群落在功能上也比较集中和定向化。

参考文献

- [1] Liu H, Grot S, Logan BE. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate[J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(11): 4317-4320
- [2] Li JZ, Ren NQ. Study & development in quo of hydrogen production biotechnology[J]. Energy Engineering, 2001, 2: 18-20 (in Chinese)
李建政, 任南琪. 生物制氢技术的研究与发展[J]. 能源工程, 2001, 2: 18-20
- [3] Cheng S, Logan BE. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(47): 18871-18873

- [4] Cusick RD, Bryan B, Parker D, et al. Performance of a pilot-scale continuous flow microbial electrolysis cell fed winery wastewater[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2011, 89(6): 2053-2063
- [5] Logan BE. Extracting hydrogen electricity from renewable resources[J]. Environmental Science and Technology, 2004, 38(9): 160-167
- [6] Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(5): 375-381
- [7] Kim BH, Chang IS, Gadd GM. Challenges in microbial fuel cell development and operation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(3): 485-494
- [8] Kim BH, Kim HJ, Hyun MS, et al. Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1999, 9(2): 127-131
- [9] Bond DR, Lovley DR. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1548-1555
- [10] Rozendal R, Hamelers H, Euverink G, et al. Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31(12): 1632-1640
- [11] Ditzig J, Liu H, Logan BE. Production of hydrogen from domestic wastewater using a bioelectrochemically assisted microbial reactor (BEAMR)[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2007, 32(13): 2296-2304
- [12] Liu WZ, Wang AJ, Cheng SA, et al. Geochip-based functional gene analysis of anodophilic communities in microbial electrolysis cells under different operational modes[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44 (19): 7729-7735
- [13] Wang AJ, Liu WZ, Ren NQ, et al. Reduced internal resistance of microbial electrolysis cell (MEC) as factors of configuration and stuffing with granular activated carbon[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(24): 13488-13492
- [14] Liu WZ, Wang AJ, Ren NQ, et al. Electrochemically assisted biohydrogen production from acetate[J]. Energy Fuels, 2008, 22: 159-163
- [15] Oh SE, Logan BE. Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(2): 162-169
- [16] Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA[J]. Genome Resesrch, 1991, 1: 34-38
- [17] Wang AJ, Kan HJ, Yu ZG, et al. Optimal conditions and validation of single-strand conformation polymorphism technology for the analysis of microbial communities in activated sludge[J]. Microbiology China, 2008, 35(7): 1164-1169 (in Chinese)
王爱杰, 阚洪晶, 于振国, 等. SSCP 技术分析活性污泥微生物群落结构的条件优化及检验[J]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1164-1169
- [18] Rabaey K, Boon N, Hofte M, et al. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells[J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(9): 3401-3408
- [19] 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
- [20] Varrone C, Van Nostrand JD, Liu WZ, et al. Metagenomic-based analysis of biofilm communities for electrohydrogenesis: from wastewater to hydrogen[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2014, 39: 4222-4233
- [21] Pisciotta JM, Zaybak Z, Call DF, et al. Enrichment of microbial electrolysis cell biocathodes from sediment microbial fuel cell bioanodes[J]. Applied Environmental Microbiology, 2012, 78(15): 5212-5219
- [22] Holmes DE, Bond DR, Lovley DR. Electron transfer by *Desulfohalobus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2): 1234-1237