



研究报告

驯化对生物阴极微生物燃料电池中阴极微生物群落多样性的影响

刘瑶 侯彬* 陈佳俊 张蓉 刘晓宇 叶蓉

中北大学环境与安全工程学院 山西 太原 030051

摘要:【背景】生物阴极微生物燃料电池因其构造成本低和阴极可持续性发展的优点而成为一种很有前途的废水处理系统,但阴极微生物的氧化还原性能限制了其在实际应用中的推广。【目的】为了提高生物阴极的性能,需要深入了解影响阴极氧化还原性能的微生物群落。【方法】利用 16S rRNA 基因高通量测序技术分析对比原始接种污泥样品和驯化后阴极电极上生物膜样品多样性及结构变化。【结果】测序结果表明,原始接种污泥样品与驯化后阴极电极生物膜样品中微生物群落种类和结构存在显著差异,驯化后阴极电极生物膜样品中变形菌门(*Proteobacteria*)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)和特吕珀菌属(*Trueperaceae*)相对丰度比例高于原始污泥样品,成为优势菌群。

【结论】驯化对系统阴极电极生物膜群落影响显著,随着产电量的输出,优势菌群不断富集,最终形成一个适应该实验环境下的新的微生物群落。对优势菌群结构和变化进行探讨,为生物阴极的研究补充更多生物学方面的理论基础。

关键词: 生物阴极, 微生物燃料电池, 16S rRNA 基因高通量测序技术, 驯化, 微生物多样性

The influence of domestication on the diversity of cathodic microbial community in biocathode microbial fuel cell

LIU Yao HOU Bin* CHEN Jiajun ZHANG Rong LIU Xiaoyu YE Rong

School of Environmental and Safety Engineering, North University of China, Taiyuan, Shanxi 030051, China

Abstract: [Background] Biocathode microbial fuel cell is a promising wastewater treatment system due to its low construction cost and sustainable development of the cathode. However, the oxidation-reduction properties of cathode microorganisms limit its further development in practical applications. [Objective] In order to improve the performance of the biocathode, it is necessary to understand the microbial community that affects the redox performance of the cathode. [Methods] The 16S rRNA gene high-throughput sequencing technology was used to analyze and compare the microbial diversity and structural changes of the original inoculated sludge samples and the domesticated cathode electrode biofilm samples. [Results] The sequencing results showed that there were significant differences in the types and structures of microbial communities in the original inoculated sludge and the domesticated

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21806147, 41977141); Natural Science Foundation of Shanxi Province (201801D121268)

*Corresponding author: E-mail: houbin566@163.com

Received: 04-10-2020; Accepted: 11-11-2020; Published online: 09-12-2020

基金项目: 国家自然科学基金(21806147, 41977141); 山西省自然科学基金(201801D121268)

*通信作者: E-mail: houbin566@163.com

收稿日期: 2020-10-04; 接受日期: 2020-11-11; 网络首发日期: 2020-12-09

cathode electrode biofilm samples. The relative abundance ratios of *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Trueperaceae* in the cathodic electrode biofilm samples after domestication were higher than those of the original sludge samples, which became the dominant flora. **[Conclusion]** Domestication has a significant impact on the biofilm community of the cathode electrode of the system. With the output of electricity production, the dominant bacterial community is continuously enriched, and finally a new microbial community adapted to the experimental environment is formed. Discussing the structure and changes of the dominant flora, which provide more biological theoretical foundations for the research of biocathode.

Keywords: biocathode, microbial fuel cell, 16S rRNA gene high-throughput sequencing technology, domestication, microbial diversity

微生物燃料电池(Microbial Fuel Cell, MFC)是一种利用微生物作为催化剂将化学能转化为电能的生物电化学装置^[1],可以应用于废水处理。但在实际应用中,由于MFC的功率输出相对于其他类型的燃料电池来说较低,提高其产电性能一直是这个领域研究的热点。其中,阴极性能目前成为主要的限制之一^[2]。

有研究表明,在阴极室中添加替代氧化剂可以提高微生物燃料电池的输出效率,其中包括铁氰化物、中性红色、硫代宁和甲基紫精^[3-7]。虽然这些修饰的应用大大提高了阴极性能,但是这些添加剂的应用不仅成本高昂,而且稳定性差、容易造成环境污染,可持续性不高,这些缺点都使得MFC在实际废水处理中无法大规模应用。1977年Hasvold等^[8]对一项长期的海底沉积物燃料电池的研究中发现,电池在不断地运行过程中阴极表面会不可避免地长出生物膜,阴极表面的生物膜不但会催化氧气的还原,而且阴极的催化活性使得电池的电压从1.2 V增加到1.6 V。随后,Bergel等^[9]利用不锈钢为阴极电极材料,在以氧气为电子受体的MFC中,比较了不锈钢阴极表面有生物膜和无生物膜MFC的产电情况,发现电池的最大功率密度由无膜的2.8 mW/m²上升到含生物膜的270 mW/m²,功率密度提升幅度高达99%,他们认为阴极表面的生物膜可以利用阳极传导过来的电子还原空气中的氧气。这一类型燃料电池被称之为生物阴极型MFC。生物阴极型MFC的出现是一种用来改善阴极性能很有前途的方法,而且不会存在上述问题。生物阴

极型MFC是一种由微生物代替化学催化剂促进阴极反应的MFC^[10]。与非生物阴极MFC相比,生物阴极MFC在操作条件上不仅降低了MFC的建设和运营成本,而且提高了阴极运行的可持续性^[11],为MFC的大规模推广带来了可能。

生物催化剂在系统运行的过程中也会有有一定的限制,从而影响氧气的还原速率。Rismani-Yazdi等^[12]提出,生物催化剂的性能不仅受到阴极活化过电位的限制,而且微生物的代谢产物和穿过质子交换膜质子的积累也会降低微生物的活性,代谢产物还可以通过充当微生物的电子供体来与阴极竞争,从而抵消生物催化剂的作用,进而降低阴极生物膜催化氧气还原的性能。然而目前利用微生物作为阴极催化剂的研究处于起步阶段,在MFC的这些限制条件下,阴极微生物的群落结构和变化演替尚不清楚。

为了提高生物阴极MFC的性能,需要更加全面地了解MFC系统中的微生物群落结构。阴极电极上微生物群落的结构组成会根据阴极室提供的条件进行筛选和富集^[13],不同阴极微生物接种源包含不同的微生物群落,为生物膜的组成提供了多种可能性。在MFC系统中,阴极电极上微生物菌群在系统产电的过程中发挥关键作用^[14-15]。在Rabaey等^[16]的研究中使用H₂/O₂混合气体作为唯一电子受体培养形成阴极生物膜,采样中成功分离到8株菌(KROX1-8),8个菌株纯培养液接种电池阴极产电试验显示,与未接种阴极相比,除菌株KROX4和KROX8之外,其他菌株都获得了

高于对照的 16–49 W/m² 不等的最大功率密度,但都低于用混合菌种接种阴极电池功率密度(303±17 W/m²)。由此可见,鉴于不同种类微生物的功能,它们对阴极氧气还原的催化效率具有显著的差别。因此,研究生物阴极微生物群落结构对增强 MFC 的性能至关重要。

本实验利用 16S rRNA 基因高通量测序技术监测生物阴极型双室 MFC 在产电中阴极电极上微生物群落的变化演替,通过数据结果对比分析系统接种底物和驯化后阴极电极生物膜中微生物群落的种类变化,分析群落结构并探讨其与产电效能的对应关系,以期为 MFC 装置的优化和操作提供微生物学依据。

1 材料与方法

1.1 MFC 装置构造和材料

实验采用双极室 MFC,腔体由有机树脂玻璃加工而成,阳极室和阴极室的有效体积均为 1 728 cm³ (12 cm×12 cm×12 cm)。阴阳两室在顶部设计数个小圆形开孔,方便实验中曝气、取样、换液与电极插入,阳极室为厌氧环境并用橡胶塞塞孔,并用环氧树脂进行密封。采用相同正方形横截面积为 16 cm² (8 cm×8 cm)的质子交换膜(Nafion 117, Dupont, Wilmington, US)分离阳极和阴极。两极室的电极材料相同,均为剪裁大小 16 cm² (8 cm×8 cm)的碳毡,使用前先在 1 mol/L HCl 中浸泡一夜,用去离子水冲洗,再在 1 mol/L NaOH 中浸泡一夜,在去离子水中多次冲洗,以便去除金属离子和其他杂质^[17]。两极外部通过钛丝连接,中间接入阻值为 1 000 Ω 的电阻。MFC 的输出电压是由 6 位半精度数据采集器(Model 2700, Keithly Instruments, USA)采集电压信号,每 30 s 采集一次各路电压值并由电脑自动记录保存。

1.2 主要试剂与仪器

葡萄糖、磷酸盐缓冲溶液、矿物质溶液和维生素溶液,阿拉丁试剂(上海)有限公司;DNA 提取试剂盒(NucleoSpin 96 Soil),Macherey-Nagel 公司;

PCR 聚合酶,东洋纺(上海)生物科技有限公司。真空泵,杭州米欧仪器有限公司;酶标仪,基因有限公司;PCR 仪,Applied Biosystems 公司。

1.3 装置的接种和启动

实验的接种活性污泥取自山西省太原市世纪阳光水净化厂二沉池,原始活性污泥储存在收集箱中,待沉降过滤后按照厌氧污泥和好氧污泥体积比 1:1 接种到 2 个极室^[18]。采用模拟废水为阴阳极室进水,驯化期间 MFC 以 1 g/L 葡萄糖为阳极室提供唯一碳源,阴极不添加。培养液基质同为 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(Na₂HPO₄·12H₂O 4.57 g/L, NaH₂PO₄·2H₂O 2.45 g/L, KCl 0.13 g/L, NH₄Cl 0.31 g/L),调节 pH 为 7.0。此外,投加微生物生长所需的 12.5 mL/L 的矿物质溶液和 5 mL/L 的维生素溶液^[19]。在此基础上,阴极室通过圆形小孔插入曝气管进行曝气,随后 2 个极室放在磁力搅拌器上同时进行搅拌。启动方法反应器采用间歇式的方式,通过观察电压变化的情况及时更换阴阳极电解液,平均 48 h 更换一次,实验在室温下进行。

1.4 阴极微生物群落的提取和分析

1.4.1 样品微生物的采集

样品一共 2 组,一组是污水厂采集的原始污泥,用于阴极室的接种样品,命名为 Group1,包含 3 个平行样品(A1、A2、A3)。另一组是系统经过 28 d 的驯化电压输出达到稳定后收集阴极电极上成熟的生物膜样品,命名为 Group2,包含 3 个平行样品(B1、B2、B3)。将样品收集在 50 mL 的离心管中,10 000 r/min 离心 1 min,弃上清液。

1.4.2 基因组 DNA 的提取

采用 NucleoSpin 96 Soil 试剂盒进行样品 DNA 的提取,具体操作步骤参考文献[20]。

1.4.3 PCR 扩增及建库测序

以纯化后的基因组 DNA 为模板,采用细菌 16S rRNA 基因 V3–V4 区引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行 PCR 扩增,PCR 反应体系和反应条件参考文献[21]。随后将扩增产物进行

纯化、定量和均一化,通过文库质检形成最终合格文库,由北京百迈克有限公司使用 Illumina HiSeq 2500 平台进行高通量测序。

1.5 生物信息分析流程

按照最小 Overlap 对每个样品的 Reads 进行拼接得到 Raw Tags (FLASH^[22], V1.2.11),随后对 Raw Tags 进行质量过滤(Trimmomatic^[23], V0.33)得到 Clean Tags, 鉴定并去除嵌合体序列(UCHIME^[24], V4.2)得到最终 Effective Tags。建好的文库质检合格后用 Illumina HiSeq 2500 平台进行测序。

在相似性 97%的水平上对序列进行聚类 (USEARCH^[25], V10.0), 以测序所有序列数的 0.005%作为阈值过滤^[26]。采用 RDP Classifier^[27], 置信度阈值为 0.8 (V2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdpclassifier>)贝叶斯算法对 OTU 代表序列进行分类学比对,统计各分类水平上样本的群落组成, 比对数据库采用 Silva6^[28] (Release128, <http://www.arb-silva.de>)。利用 Mothur (V1.3.0, <http://www.mothur.org>)软件分析 α 多样性指数。使用 R 语言工具绘制 PCA 分析图对群落的差异性进行主成分分析。

2 结果与讨论

2.1 驯化过程中电压分析

以 1 g/L 葡萄糖为唯一碳源启动运行系统,由图 1 可知系统在驯化初期电压输出值很低而且不稳定,此时阴极电极上没有任何微生物负载,电极上电子接收能力有限,氧气还原效率不高,导致电压出现不规则的波动。随后电压出现明显的规律起伏,此时具有电子传递能力与氧气结合发生反应的微生物在阴极电极上不断富集。最后经过 28 d 的运行系统电压值输出最大且保持在一定值,期间 MFC 输出的最大电压为 648 mV,表明 MFC 驯化成功。输出电压的稳定表明此时阴极电极生物膜趋于成熟,形成一个稳定的生物群落。系统运行过程中整体的输出电压一直在不断地升高,由此说明由外电路传导到阴极的电子在不断地参与反应,阴极

电极表面的氧气在不断被还原,产电情况进一步说明了阴极电极上微生物多样性的变化提高了氧气的还原速率。为了明确阴极表面微生物多样性的结构和变化,我们对原始接种污泥和驯化后阴极生物膜中样品菌群的组成结构进行了深入的对比分析。

2.2 原始接种污泥和驯化后阴极生物膜中样品的稀释曲线和 OTU 聚类分析

2 组样品驯化前后一共获得有效细菌序列数是 288 439, 其中 Group1 包括 A1 51 009、A2 32 350、A3 50 633; Group2 包括 B1 44 016、B2 54 139、B3 356 292。获得细菌序列后以 0.005%作为阈值过滤,在相似性 97%的水平上对序列进行 OTU 聚类, 分别绘制驯化前后菌群的稀释曲线(图 2A)和菌群 OTU 分布维恩图(图 2B)。

图 2A 显示在一定量的测序后,原始接种污泥样品和驯化污泥样品的稀释曲线均在一定值后保持相对平稳,表明测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种,足以达到测试目的。根据图 2B 中数据显示,驯化前后样品共有 OTU 的数目是 939 个,原始接种污泥样品共有 928,驯化后阴极生物膜样品共有 893,其中有 882 个样品重合,说明原始接种污泥样品和驯化后阴极生物膜样品的组成中微生物种类相似;但原始接种污泥样品特有 OTU 数目为 46,驯化后阴极生物膜样品特有 OTU 数目

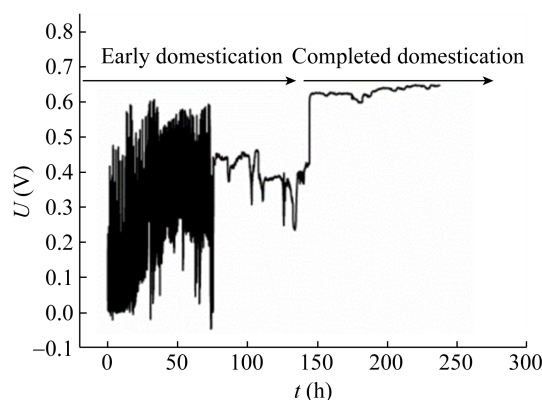


图 1 MFC 驯化运行中电压-时间图

Figure 1 Voltage-time diagram during MFC domestication operation

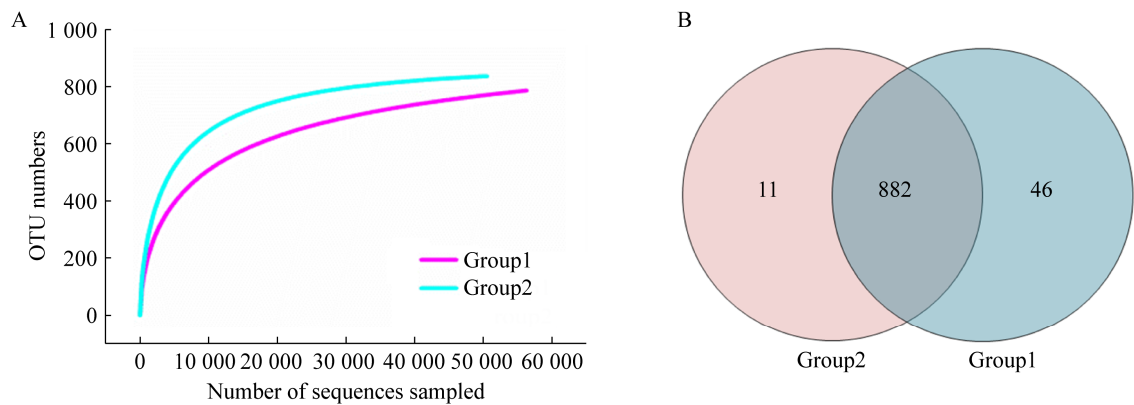


图 2 原始接种污泥样品和驯化后阴极生物膜样品稀释曲线图(A)和 OTU 分布的维恩图(B)
Figure 2 Original inoculated sludge sample and the domesticated cathode biofilm sample rarefaction curve (A) and Venn diagram of OTU distribution (B)
 注: Group1: 原始接种污泥样品组; Group2: 阴极生物膜样品组
 Note: Group1: Original inoculated sludge sample group; Group2: Cathode biofilm sample group

为 11。原始接种污泥样品中微生物种类要高于驯化后阴极生物膜样品中的微生物类别,驯化后阴极生物膜中微生物种类变少,表明驯化对阴极微生物的菌群具有一定的选择作用,而关于菌落多样性和丰富度的具体变化还需要进一步的数据说明。

2.3 原始接种污泥和驯化后阴极生物膜的 α 多样性(Alpha Diversity)分析

如表 1 所示, Group1 的覆盖率是 99.8%, Group2 的覆盖率是 99.7%, 2 组样品的稀释曲线也相对趋于平稳,表明测序数据足以捕捉驯化前后微生物群落的实际多样性。对于样品的 α 多样性分析中包含指标有 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数。其中 Chao1 和 ACE 指数指示的是物种丰度即物种数量的多少,而 Shannon 和 Simpson 指数是用来指示物种多样性。对比驯化

前后污泥样品的 Chao1 指数和 ACE 指数, Group2 均有小幅下降,说明驯化前微生物菌落的丰度总体略高于驯化后。Shannon 和 Simpson 指数表明原始污泥样品的细菌多样性较驯化后污泥样品细菌丰富。

2.4 原始接种污泥和驯化后阴极生物膜中细菌群落组成和相对丰度分析

2.4.1 门水平上驯化前后样品的物种对比

如图 3 所示, 门水平上 Group1 中物种相对丰度比例由高到低依次是绿弯菌门(*Chloroflexi*) 33.8%、变形菌门(*Proteobacteria*) 26.4%、拟杆菌门(*Bacteroidetes*) 12.4%、*Patescibacteria* 6.6%和放线菌门(*Actinobacteria*) 5.5%。与 Group1 相比, Group2 中 *Proteobacteria* 丰度比例大幅上升, 所占比例达到了 38.6%, 成为优势门类; 而 *Chloroflexi* 所占比例下降了 22.3%, 在 Group2 中比例为 11.5%; 拟杆菌门(*Bacteroidetes*)在 Group2 中所占丰度比例为 11.2%, 变化不大。相较于 Group1, Group2 中放线菌门(*Actinobacteria*)相对丰度比例上升明显为 8.6%; 厚壁菌门(*Firmicutes*)所占丰度比例小幅上升为 5.5%; 异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)和浮霉菌门(*Planctomycetes*)所占比例均有明显上升, 分别上升了 6.7%和 5.9%。

表 1 样品 α 多样性指数统计
Table 1 Sample alpha diversity index statistics

Samples	Group1	Group2
ACE index	890.984 2	879.756 6
Chao1 index	899.346 0	893.101 3
Simpson index	0.022 2	0.024 5
Shannon index	5.152 1	4.617 5
Coverage index	0.998	0.997

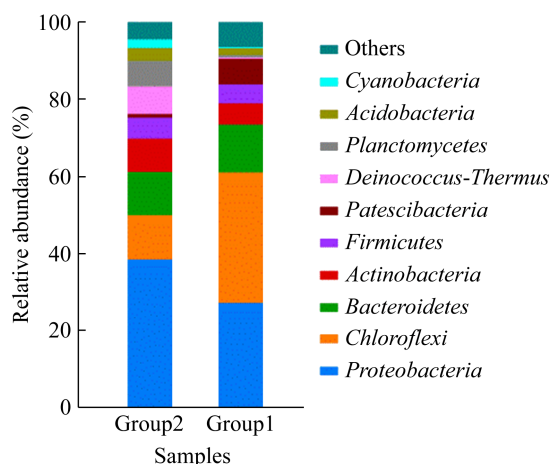


图3 门水平物种对比图

Figure 3 Comparison of species at phylum level

注: Group1: 原始接种污泥样品组; Group2: 阴极生物膜样品组
Note: Group1: Original inoculated sludge sample group; Group2: Cathode biofilm sample group

以上分析表明, *Proteobacteria*、*Chloroflexi* 和 *Bacteroidetes* 是驯化后阴极生物膜样品中的主要优势菌群。在众多生物阴极型 MFCs 微生物群落的研究中, *Proteobacteria* 均被发现是优势菌种, 而且对系统的产电性能具有一定促进作用^[16], 这与本研究结果具有一致性。*Bacteroidetes* 同样是一类常存在于 MFC 中的菌群, 而且这类群体通过提高某些代谢产物和底物的利用率, 进而提高 MFC 中产电细菌的活性^[29]。*Chloroflexi* 主要通过降解糖类物质来提高 MFC 系统的产电效能, 虽然在驯化后生物膜中占有一定丰度值, 但因其兼性厌氧特性, 所以该实验环境下不利于其群落的生长繁殖, 因此驯化后生物膜样品中所占丰度比例较接种污泥样品中明显下降。虽然阴极室在大量曝气环境下进行驯化过程, 但是阴极电极生物膜在富集作用下具有一定厚度, 使得内部因接触氧气较少而出现部分厌氧区, 因此在驯化完成后阴极电极生物膜中依旧会有部分类似 *Chloroflexi* 这样兼性厌氧菌群的存在^[30]。

Actinobacteria 被报道称其可以产生独特的次生代谢产物如抗生素、酶和酶抑制剂等, 是革兰氏阳性丝状菌^[31], 但关于其产电性质没有具体的实

践研究。*Firmicutes* 能够在胞外进行电子传递, 而且是兼性需氧微生物, 因此是曝气环境下阴极电极微生物群落的优势组成部分^[32]。驯化后电极生物膜中该类菌群的相对丰度上升, 由此说明驯化后生物膜加快了电子传递的效率, 促进阴极表面氧气的还原, 从而提高了系统的产电效能。*Deinococcus-Thermus* 和 *Planctomycetes* 在驯化后阴极生物膜组成微生物群落中占据一定丰度值, 但对其产电活性这一方面的报道较少, 据本研究结果初步推测其具有一定的电化活性。

2.4.2 纲分类水平上的对比

如图4所示, 纲水平上 Group1 群落中相对丰度比例前5的依次是厌氧绳菌纲(*Anaerolineae*) 31.0%、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*) 12.2%、 δ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*) 11.7%、拟杆菌纲(*Bacteroidia*) 9.5%和 *Saccharimonadia* 4.2%。与 Group1 相比, Group2 中 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)成为纲水平上丰度最大的纲类, 丰度比例为 29.2%; 其次是属于绿弯菌门(*Chloroflexi*)的厌氧绳菌纲(*Anaerolineae*), 所占比例为 10.2%, 相比 Group1 中比例下降了 20.8%, 变化明显, 这与门类水平上驯化前后的比例下降

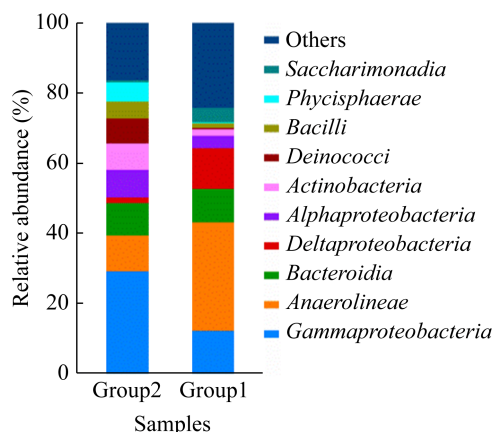


图4 纲水平物种对比图

Figure 4 Comparison of species in class level

注: Group1: 原始接种污泥样品组; Group2: 阴极生物膜样品组

Note: Group1: Original inoculated sludge sample group; Group2: Cathode biofilm sample group

趋势相同; 拟杆菌纲(*Bacteroidia*)相对丰度比例相近; α -变形杆菌纲(*Alphaproteobacteria*)、放线菌纲(*Actinobacteria*)和异常球菌纲(*Deinococci*) 在 Group2 中均有较高的丰度比例, 所占比例分别是 7.9%、7.5%和 7.1%; 而 δ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)相对丰度比例下降变化明显, 在 Group2 中比例只有 1.6%; 在 Group1 中占比例 4.4%的 *Saccharimonadia* 在 Group2 中仅有 0.7%, 而且在 Group2 中相对丰度比例最低。

Gammaproteobacteria、*Alphaproteobacteria* 和 *Deltaproteobacteria* 同属于 *Proteobacteria*。*Gammaproteobacteria* 被发现在以碳毡为填料的滴滤式 MFC 的生物阴极微生物群落中占很大优势比例^[33], 这与本实验结果相一致, 结合本文的产电效果推测, 该菌群对生物阴极氧气的还原有催化作用, 能进一步提高阴极效能。然而 *Alphaproteobacteria* 可以产生电子介质将电子传递到电极^[34], 因此和阴极氧还原速率反应有密切的联系, 而且该菌群在驯化后电极生物膜中相对丰度比例较高, 能加快阴极电极表面氧气的还原速率, 一定程度上可以提高阴极效能。*Deltaproteobacteria* 虽然是常见的产电微生物菌群, 但却是兼性厌氧菌^[35], 因此在该曝气阴极的

环境下并不适宜生长。*Bacteroidia* 属于 *Bacteroidetes*, 驯化前后相对丰度比例变化不明显, 推测其适应环境能力强于其他菌类。*Anaerolineae* 属于 *Chloroflexi*, 属于兼性厌氧菌, 虽在驯化后样品中的丰度值很高, 但同原始样品对比则明显下降, 因为阴极的曝气环境对其生长具有一定抑制作用^[36]。

2.4.3 属分类水平上的对比

如图 5 所示, 属水平上 Group1 中 *Uncultured_bacterium_f_Anaerolineaceae* 具有最高丰度, 占总序列 20.4%; 紧随其后的 *Uncultured_bacterium_f_Bacteroidetes_vadinHA17*、*Uncultured_bacterium_o_Saccharimonadales* 和 *Denitratisoma* 相对丰度比例较高, 分别是 7.2%、4.2%和 2.7%; 其他菌属如特吕珀菌属(*Truepera*)、赖氏细菌属(*Leifsonia*)、*Uncultured_bacterium_f_A4b*、SM1A02、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、*Ferruginibacter* 等所占比例均不高, 相对丰度比例不到 1%。与 Group1 相比较, Group2 中特吕珀菌属(*Truepera*)比例上升了 6.7%, 在 Group2 中所占比例为 7.1%, 成为优势菌属; 紧随其后的是赖氏细菌属(*Leifsonia*)和 *Uncultured_bacterium_f_A4b*, 它们所占比例分别是 6.7%和 6.3%。然而在 Group1 属水平上丰度比例前三的

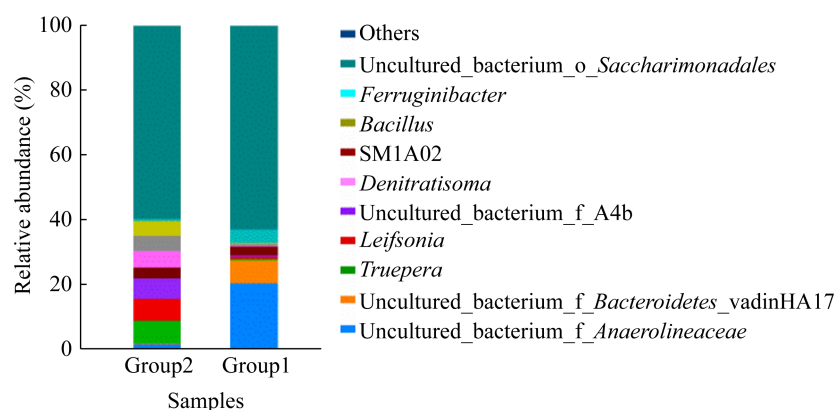


图 5 属水平物种对比图

Figure 5 Comparison of genus horizontal species

注: Group1: 原始接种污泥样品组; Group2: 阴极生物膜样品组

Note: Group1: Original inoculated sludge sample group; Group2: Cathode biofilm sample group

Uncultured_bacterium_f_Anaerolineacea、Uncultured_bacterium_f_Bacteroidetes_vadinHA17 和 Uncultured_bacterium_o_Saccharimonadales 在 Group2 中占总序列的 1.5、0.3%和 0.7%，相对丰度比例均不高。

Deinococcus-Thermus 的特吕珀菌属 (*Trueperaceae*)和 *Actinobacteria* 的赖氏细菌属 (*Leifsonia*)在驯化后污泥样品中的相对丰度比例最高,属于优势菌属,但关于 2 种菌属的实际研究报道并不多。*Trueperaceae* 被报道可以抵御高温和利用多种有机质进行繁殖生长^[37]。根据本实验的产电效能推测,该菌属出现在阴极电极微生物群落中,可能具有协助其他产电菌提高产电效能的作用。*Leifsonia* 被报道是一类亚硝酸盐氧化菌属,与其产电相关的性质研究没有具体报道,需要进一步详细研究^[38]。

2.5 原始接种污泥和驯化后阴极生物膜中细菌群落的相似性分析

图 6 基于基因水平对两组样品的主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA)显示, Group1 和 Group2 两组样品在 PC1 水平上的分离距离均较

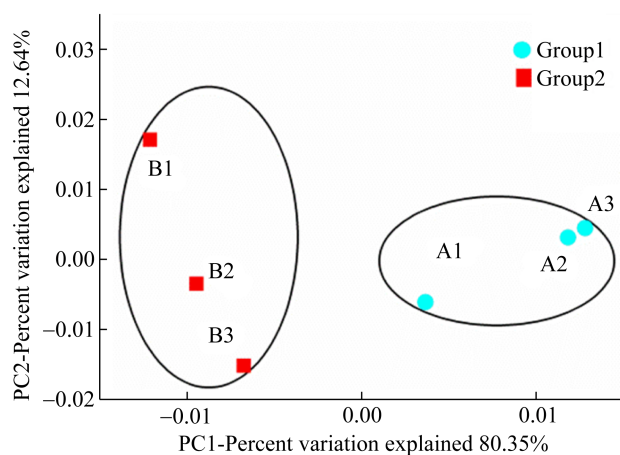


图 6 样品高通量测序数据的主成分(PCA)分析图

Figure 6 Principal component analysis (PCA) diagram of sample high-throughput sequencing data

注: Group1: 原始接种污泥样品组; Group2: 阴极生物膜样品组

Note: Group1: Original inoculated sludge sample group; Group2: Cathode biofilm sample group

大,在 PC2 水平上距离较远,2 组样点之间有明显分离,驯化前后微生物多样性组间差异远大于组内差异。通过 PCA 分析可以进一步说明在 MFC 驯化发电过程中微生物菌群有显著差异,尤其在 Group2 组中沿着 PC2 的方向具有很大分离,表明确实包含许多比较独特的菌属。结合 MFC 产电效能,驯化后输出电压明显升高,表明在驯化后的优势菌群提高了产电效率,达到了驯化优势菌种的目的。

3 结论

生物阴极双室 MFC 驯化期间电压输出不断增大,输出电压最高可以达到 648 mV,系统能够稳定运行,表明驯化阶段已经完成。通过高通量技术测序结果对比分析接种污泥样品和驯化后阴极电极生物膜中微生物多样性及其结构变化,可以得知 2 组样品中的优势菌群存在明显差异。驯化后的阴极电极微生物菌群多样性下降,丰度比例有更加明显的集中,说明驯化对微生物菌群具有一定的选择作用。通过这种选择作用,适应阴极环境的菌群不断富集成为优势菌种,大部分优势菌种能够高效利用氧气,提高电子传递速率,从而提高阴极性能。因此,驯化作用能够显著改变阴极微生物多样性,并推动阴极微生物向着提高阴极性能的方向演变。

REFERENCES

- [1] Park DH, Zeikus JG. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1292-1297
- [2] He Z, Angenent LT. Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells[J]. *Electroanalysis*, 2006, 18(19/20): 2009-2015
- [3] Bullen RA, Arnot TC, Lakeman JB, Walsh FC. Biofuel cells and their development[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21(11): 2015-2045
- [4] Du ZW, Li HR, Gu TY. A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(5): 464-482
- [5] Kargi F, Eker S. Electricity generation with simultaneous wastewater treatment by a microbial fuel cell (MFC) with Cu and Cu-Au electrodes[J]. *Journal of Chemical*

- Technology and Biotechnology, 2007, 82(7): 658-662
- [6] Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, Aelterman P, Verstraete W, Rabaey K. Microbial fuel cells: methodology and technology[J]. Environmental Science and Technology, 2006, 40(17): 5181-5192
- [7] Rabaey K, Verstraete W. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(6): 291-298
- [8] Hasvold Ø, Henriksen H, Melv'r E, Citi G, Johansen BØ, Kjønnigsen T, Galetti R. Sea-water battery for subsea control systems[J]. Journal of Power Sources, 1997, 65(1/2): 253-261
- [9] Bergel A, Féron D, Mollica A. Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm[J]. Electrochemistry Communications, 2005, 7(9): 900-904
- [10] Freguia S, Rabaey K, Yuan ZG, Keller J. Non-catalyzed cathodic oxygen reduction at graphite granules in microbial fuel cells[J]. Electrochimica Acta, 2007, 53(2): 598-603
- [11] Rabaey K, Keller J. Microbial fuel cell cathodes: from bottleneck to prime opportunity[J]. Water Science and Technology, 2008, 57(5): 655-659
- [12] Rismani-Yazdi H, Carver SM, Christy AD, Tuovinen OH. Cathodic limitations in microbial fuel cells: an overview[J]. Journal of Power Sources, 2008, 180(2): 683-694
- [13] Hou B, Lu J, Wang HF, Li Y, Liu PX, Liu Y, Chen JJ. Performance of microbial fuel cells based on the operational parameters of biocathode during simultaneous Congo red decolorization and electricity generation[J]. Bioelectrochemistry, 2019, 128: 291-297
- [14] Kim GT, Webster G, Wimpenny JWT, Kim BH, Kim HJ, Weightman AJ. Bacterial community structure, compartmentalization and activity in a microbial fuel cell[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 698-710
- [15] Pham TH, Boon N, Aelterman P, Clauwaert P, De Schamphelaire L, Vanhaecke L, De Maeyer K, Höfte M, Verstraete W, Rabaey K. Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 77(5): 1119-1129
- [16] Rabaey K, Read ST, Clauwaert P, Freguia S, Bond P, Blackall LL, Keller J. Cathodic oxygen reduction catalyzed by bacteria in microbial fuel cells[J]. The ISME Journal, 2008, 2(5): 519-527
- [17] Xie S, Liang P, Chen Y, Xia X, Huang X. Simultaneous carbon and nitrogen removal using an oxic/anoxic-biocathode microbial fuel cells coupled system[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(1): 348-354
- [18] Hou B. Performance and mechanism of microbial fuel cell based on simultaneous Congo red decolorization and bioelectricity generation[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2012 (in Chinese)
- 侯彬. 同步脱色刚果红与产电的微生物燃料电池的性能和机理研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2012
- [19] Lee J, Phung NT, Chang IS, Kim BH, Sung HC. Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 223(2): 185-191
- [20] Le Maréchal C, Fourour S, Ballan V, Rouxel S, Souillard R, Chemaly M. Detection of *Clostridium botulinum* group III in environmental samples from farms by real-time PCR using four commercial DNA extraction kits[J]. BMC Research Notes, 2018, 11(1): 441
- [21] Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, et al. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species[J]. Royal Society Open Science, 2015, 2(7): 150088
- [22] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963
- [23] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120
- [24] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200
- [25] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998
- [26] Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59
- [27] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267
- [28] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590-D596
- [29] Padmanabhan P, Padmanabhan S, DeRito C, Gray A, Gannon D, Snape JR, Tsai CS, Park W, Jeon CO, Madsen EL. Respiration of ^{13}C -labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of ^{13}C -labeled soil DNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1614-1622
- [30] Meng K. Study on nitrogen and phosphorus removal efficiency with electricity generation of domestic sewage in dual-cathode microbial fuel cells[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2017 (in Chinese)
- 孟琨. 双阴极 MFC 系统对生活污水脱氮除磷效能及产电性能研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文,

2017

- [31] Takii S, Hanada S, Tamaki H, Ueno Y, Sekiguchi Y, Ibe A, Matsuura K. *Dethiosulfatibacter aminovorans* gen. nov., sp. nov., a novel thiosulfate-reducing bacterium isolated from coastal marine sediment via sulfate-reducing enrichment with Casamino acids[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(10): 2320-2326
- [32] Rabaey K, Rodriguez J, Blackall LL, Keller J, Gross P, Batstone D, Verstraete W, Neelson KH. Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities[J]. The ISME Journal, 2007, 1(1): 9-18
- [33] Cao X. Performance on a novel biocathode microbial fuel cell with trickling aeration[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan University of Science and Technology, 2012 (in Chinese)
曹新. 新型滴滤式生物阴极微生物燃料电池的同步污水处理及产能研究[D]. 武汉: 武汉科技大学硕士学位论文, 2012
- [34] Yu J, Cho S, Kim S, Cho H, Lee T. Comparison of exoelectrogenic bacteria detected using two different methods: U-tube microbial fuel cell and plating method[J]. Microbes and Environments, 2012, 27(1): 49-53
- [35] Logan BE, Regan JM. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells[J]. Trends in Microbiology, 2006, 14(12): 512-518
- [36] Wang CB. The research of C/N removal of double-chamber MFC combined with A/O process and its electricity generation performance[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)
王存豹. 与 A/O 工艺相结合的双室 MFC 脱氮除碳及其产电性能的研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2016
- [37] Albuquerque L, Simões C, Nobre MF, Pino NM, Battista JR, Silva MT, Rainey FA, De Costa MS. *Truepera radiovictrix* gen. nov., sp. nov., a new radiation resistant species and the proposal of *Trueperaceae* fam. nov.[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 247(2): 161-169
- [38] Meng J. Process control of shortcut nitrification and functional microbial community in a SBR for anaerobic digested piggery wastewater treatment[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2013 (in Chinese)
孟佳. 养猪废水厌氧消化液的亚硝化调控与功能微生物分析[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2013